Cisplatin 유도 신장독성에 대한 보정방암탕 에탄올층의 보호효과

이효정 · 김관현 · 이재호 · 장유성 · 이은옥 · 심범상 · 안규석 · 이경태[1] · 김성훈*

경희대학교 한의과대학, 1 : 경희대학교 약학대학

Cytoprotective effect of Bojungbangam-tang on cisplatin-induced nephrotoxocity

Hyo Jung Lee, Kwan Hyun Kim, Jae Ho Lee, Yu Sung Jang, Eun Ok Lee, Beom Sang Shim, Kyoo Seok Ahn, Kyung Tae Lee[1], Sung Hoon Kim*

College of Oriental Medicine, 1:College of Pharmacy, Kyunghee University

Cisplatin, an antitumor agent widely used in the treatment of cancers, has nephrotoxicity. This side effect is closely related to oxidative stress. In the present study, we studied to protective effect of ethanol extract of Bojungbangam-tang (EBJT) on cisplatin-induced nephrotoxicity. Bojungbangam-tang is a new herbal prescription composed of nine crude drugs. Pretreatment of EBJT prevented cisplatin-induced cytotoxicity and generation of ROS. Also, cellular GSH content and gluathione peroxidase activity were recovered by EBJT. EBJT also decreased cisplatin-induced expression of HO-1 via inhibition of ERK activation. Taken together, these results suggest that EBJT has a cytoprotective effect against cisplatin-induced nephrotoxicity through anti-oxidant activity.

Key words : Bojungbangam-tang, anti-oxidant activity, LLC-PK1, cisplatin, nephrotoxicity

서 론

암이 인류의 난치병으로 대두된 이래 각종 항암제가 개발되어 화학요법으로 활용되어 왔다. 그러나 이 항암제가 정상세포까지 손상을 주어 탈모, 소화장애, 골수조혈장애, 면역장애 등을 초래하여 각종 부작용을 초래하는 것으로 알려져 있다. 이에 최근에는 한약으로부터 항암제의 부작용을 줄이고 상승적 항암효과를 나타내는 연구가 비교적 활발히 진행되고 있다[1,2].

대표적 항암제중 cisplatin은 고환암, 난소암, 방광암, 자궁암, 전립선암 등의 고형암 치료제로서 지금까지 널리 사용되어지고 있으나[3-5] 세뇨관을 괴사시키는 강한 신장독성을 나타내므로 임상적인 사용에 제한을 받고 있다[6-10]. 이러한 부작용은 cisplatin이 활성산소를 생성하여 초래하는 것으로 알려져 있다[11-13]. 활성산소는 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시키므로 항산화제와 항산화효소의 작용을 통해 제거해야한다[14,15]. 따라서 cisplatin의 신장독성을 감소시키면서 항암효과를 증대시킬 수 있는 방법을 고안하는 것이 매우 중요하다. 본 실험에서 9가지 약재로 구성된 보정방암탕이 cisplatin으로 유도된 신장독성으로부터 세포를 보호하는 효과를 활성산소와 항산화효소 활성, 신호전달기전 등을 통하여 유효한 효과를 나타내어 이에 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 김성훈, 서울시 동대문구 회기동 1번지, 경희대학교 한의과대학
· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-9233

· 접수 : 2007/01/04 · 수정 : 2007/01/24 · 채택 : 2007/02/01

재료 및 방법

1. 보정방암탕구성 및 에탄올 추출

보정방암탕의 구성성분은 Table 1과 같이 9종으로 구성하였다. 이 구성분 3첩 분량 (360 g)을 에탄올 3 L에 3일간 3회 추출하여 감압농축 후 분말 44 g을 얻어 수율 12.2%를 나타냈으며, 이를 DMSO에 녹여 사용하였다.

2. 세포배양

돼지 신장세포인 LLC-PK1세포를 5% FBS가 첨가된 M199로 5% CO_2, 37 ℃조건으로 배양하였다.

3. 세포독성

In vitro 세포독성은 MTT법을 사용하였으며 방법은 다음과 같다. 1×10^4 cells를 96웰에 분주하여 24시간 배양 후 농도별로 보정방암탕을 처리하고 50 uM농도의 cisplatin을 동시에 처리하였

다. 48시간 배양 후 MTT (1 mg/ml) 용액 50 ul를 각 웰에 분주하였다. 이를 다시 4시간 배양 후 배양액을 모두 버리고 DMSO 100 ul를 넣고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 활성산소 측정

약재 처리한 세포를 수거한 후 DCFH-DA (1 uM) 용액으로 부유하였다. 이를 37 ℃에서 30분간 반응시킨 후 유세포분석기로 분석하였다.

5. Glutathione 함량측정[16]

Glutathion level 측정은 GSH-400 (OXIS International Inc.) kit를 사용하여 측정하였다.

6. 항산화효소 활성측정

항산화효소인 Glutathione peroxidase (GPx)[17]와 Glutathione reductase (GR)[18]의 활성은 각각 GPx-340 (OXIS International Inc.)와 GR-340 (OXIS International Inc.) kit를 사용하여 측정하였다.

7. 단백질발현정도 측정

약재를 처리한 cell을 수거하여 PBS로 세척한 후 lysis buffer를 넣고 얼음상에서 30분간 방치한 후 12,000 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하였다. 상층액의 단백질을 정량한 후 20 ug의 단백질과 sample buffer를 혼합하여 5분간 끓이고 SDS-polyacrylamide gels에서 전기영동한 후 300 mA 에서 90분간동안 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Transfer된 membranes을 blocking시킨 후 primary antibodies를 4℃에서 overnight으로 반응시켰다. 세척 후 secondary antibody 반응시켰다. 세척후 ECL western blotting detection kit (Amercham Pharmacia biotech, UK)로 발색시킨 후 Agfa X ray films에 노출시켜 현상하였다.

8. 통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, student's t-test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 평가하였다.

Table 1. The botanical origins and ratio of crude drugs of Bojungbangam-tang.

Crude drug	Botanical origin	Place	weight g)	Specimen no.
Agaricus mushroom	*Agaricus blazei* Murill	Korea	40	GSM011
Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	*Atractylodes macrocephala* Koidz	China	12	GSM012
Ginseng Radix	*Panax ginseng* C.A. Meyer	Korea	20	GSM013
Polyporus	*Polypours umbellatus* (PERS.) Fries	China	12	GSM014
Citri Pericarpium	*Citrus unshiu* Markovich	Korea	8	GSM015
Astragali Radix	*Astragalus membranaceus* Bunge	Korea	8	GSM016
Dioscoreae Rhizoma	*Dioscorea japonica* Thunb	Korea	8	GSM017
Angelicae giantis Radix	*Angelica gigas* Nakai	Korea	8	GSM018
Glycyrrhizae Radix	*Glycyrrhiza uralensis* Fisch	China	4	GSM019

결과 및 고찰

1. 보정방암탕의 세포독성 보호효과

돼지 신장 세포인 LLC-PK1을 이용한 cell viability를 MTT assay 를 통해 실험하였다. Cisplatin에 의해 대조군에 비해 약 60 % 정도로 감소한 cell viability는 보정방암탕 에탄올층에 의해 농도 의존적으로 회복되었으며, 20 uM에서는 세포 생존률을 85%까지 회복하여 cisplatin유도 신장독성 보호 효과를 확인 하였다(Fig. 1).

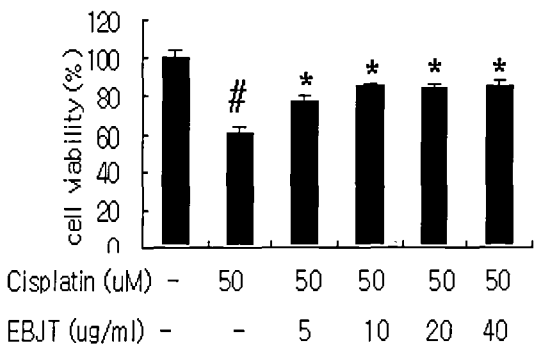

Fig. 1. Effects of EBJT on cisplatin-induced cytotoxicity in LLC-PK1 cells.

2. 보정방암탕의 활성산소 저해효과

돼지의 신장 세포인 LLC-PK1을 이용하여 cisplatin에 의해 생성된 활성산소를 보정방암탕 에탄올층으로 감소시키는 것을 DCFH시약을 사용하여 활성산소 (ROS)에 의해 형성되는 DCF의 형광의 정도를 측정한 결과 20 ug/ml에서 현저한 ROS생성 감소를 확인함으로서 cisplatin에 의한 세포독성 감소는 ROS 제거에 의한 것임을 확인하였다(Fig. 2).

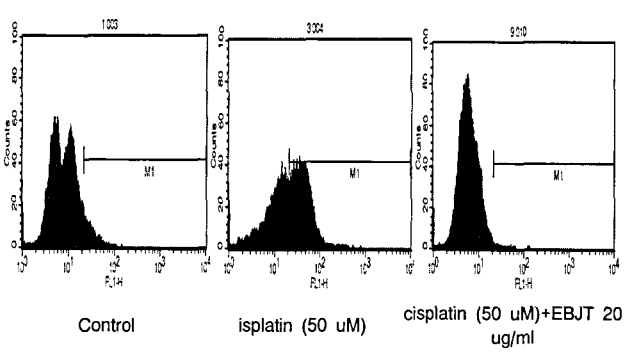

Fig. 2. The Effect of EBJT on cisplatin-induced ROS response in LLC-PK1 cells.

3. 보정방암탕의 글루타치온 회복효과

돼지의 신장 세포인 LLC-PK1을 이용하여 cisplatin에 의해 감소된 글루타치온에 대해 보정방암탕 에탄올층의 영향을 실험한 결과 cisplatin처리에 의해 감소된 글루타치온이 보정방암탕 에탄올층 10 ug/ml과 20 ug/ml에서 유의성있는 회복을 확인하였다(Fig. 3).

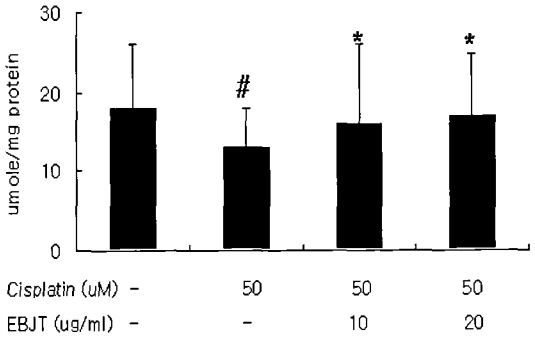

Fig. 3 The Effect of EBJT on cisplatin-induced gluatathione depletion in LLC-PK1 cells.

4. 보정방암탕의 gluathione peroxidase의 활성 증가효과

돼지의 신장 세포인 LLC-PK1 을 이용하여 cisplatin 에 의해 감소된 gluathione peroxidase에 대해 보정방암탕 에탄올층이 이들 효소 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 농도 의존적인 gluathione peroxidase의 활성 증가를 확인하였고, 20 ug/ml 농도에서 유의성 있는 결과를 나타내었다.

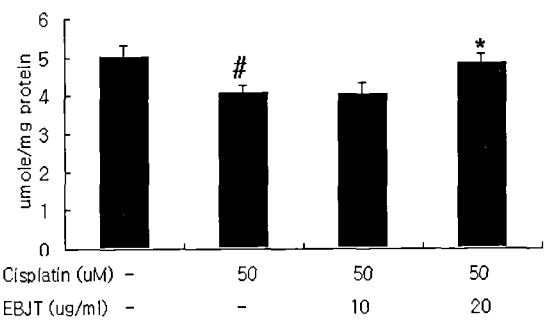

Fig. 4. The Effect of EBJT on cisplatin-induced gluatathione peroxidase activity in LLC-PK1 cells.

5. 보정방암탕의 gluathione reductase의 활성 증가효과

돼지의 신장 세포인 LLC-PK1을 이용하여 cisplatin에 의해 감소된 gluathione reductase 에 대해 보정방암탕 에탄올층의 영향을 실험한 결과 약간의 활성은 보였으나 유의성 있는 활성 증가는 관찰되지 않았다(Fig. 5).

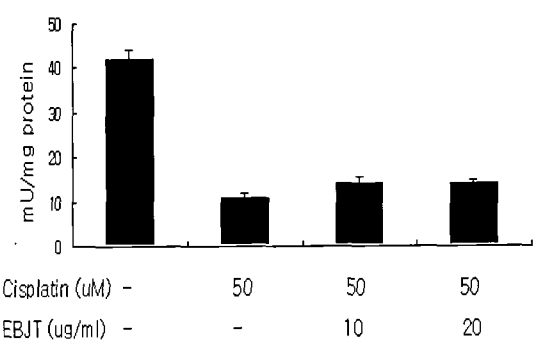

Fig. 5. The Effect of EBJT on cisplatin-induced gluatathione reductase activity in LLC-PK1 cells.

6. Cisplatin이 Nrf2와 HO-1의 발현에 미치는 영향

Cisplatin 은 LLC-PK1 cell 에서 Nrf2 의 translocation 을 통하여 HO-1 의 발현을 증가시키는 것으로 보여진다. 세포는 cisplatin 의 최종 농도 50 uM 로 하여 시간의 따른 변화추이를 관찰하였다. HO-1의 발현은 2시간 째에 최고였고 그 후 줄어들었으나 24 시간 이후에도 대조군에 비해 증가된 상태를 유지하였다 Nrf2는 ARE와 결합하여 HO-1 의 발현을 조절하기 때문에 cytosol과 nuclear 에서의 Nrf2 발현양을 관찰하였다. Nrf2는 cytosol 내에서는 감소하고 nuclear 에서는 증가되는 것으로 보아 Nrf2 는 nuclear 내로 translocation 되는 것을 알 수 있다 (Fig. 6).

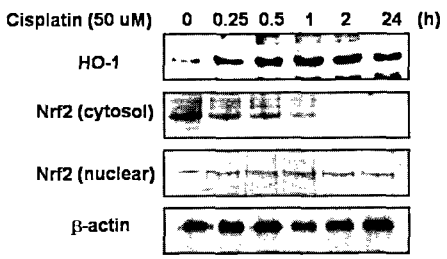

Fig. 6. Cisplatin induces HO-1 protein in LLC-PK1 cells via Nrf2 translocation.

7. Cisplatin이 MAPK 인산화에 미치는 영향

Cisplatin은 시간 의존적으로 MAPK 의 인산화를 증가시켰다. 50 uM의 cisplatin 을 처리한 LLC-PK1 세포에서 p38의 인산화는 시간의존적으로 증가했고, 45 분 후 최대치를 보인 후 감소하는 경향을 보였고, ERK 의 경우도 1 시간 후 최대치를 보인 후 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. JNK 도 마찬가지로 인산화가 점차 증가하였지만 그 증가가 ERK 와 p38 보다는 크지 않은 것을 확인하였다. 이러한 MAPK 인산화 증가는 MAPK 자체가 발현이 증가되어서가 아님을 인산화 되지 않은 MAPK form 를 확인함으로써 증명하였다(Fig. 7A). Cisplatin 이 유도한 Nrf2 translocation 에 의한 HO-1 의 발현은 ERK 와 p38 이 관여하는 것으로 보인다. ERK inhibitor 인 PD098059 과 p38 inhibitor 인 SB202190을 30 분 전처리하고 cisplatin 이 유도하는 HO-1 과 Nrf2 를 확인한 결과 각각의 inhibitor 에 의해 HO-1 의 발현과 Nrf2 의 translocation 이 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 7B).

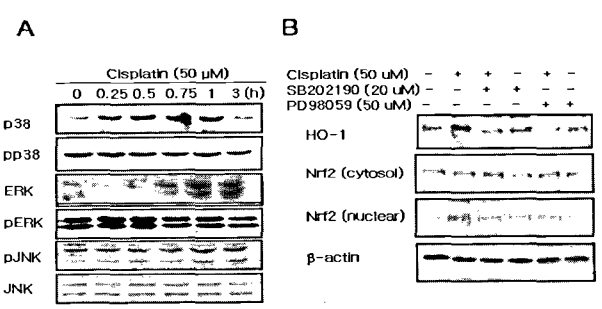

Fig. 7. Cisplatin induces the MAPKs phophorylation in time-dependent manner and suppression of ERK and p38 pathway inhibits HO-1 expression via block the Nrf2 translocation in LLC-PK1 cells.

8. 보정방암탕이 신호전달에 미치는 영향

보정방암탕 에탄올층은 cisplatin에 의해 유도된 HO-1의 발현을 cisplatin단독 투여군에 비해 억제됨을 보였다. 또한 cisplatin이 유도한 ERK 의 인산화를 효과적으로 억제하는 것으로 보아 보정방암탕 에탄올층에 의한 HO-1 억제는 ERK 의 인산화를 억제하는 것에 의한 것으로 사료된다 (Fig. 8).

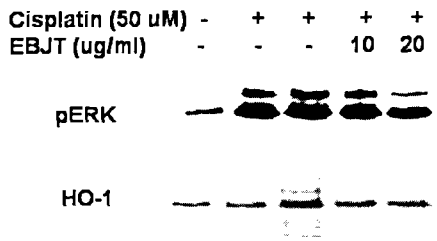

Fig. 8. Samples inhibit cisplatin-induced induction of HO-1 expression and Nrf2 translocation via suppression of ERK pathway in LLC-PK1 cells.

결 론

Cisplatin으로 신장독성을 유도한 후 보정방암탕의 보호효과를 살펴보았다. 보정방암탕은 돼지 신장 세포 (LLC-PK1)에 대해 독성을 유도하는 cisplatin으로부터 농도 의존적으로 생존률을 회복시켜 신장독성 보호 효과가 있음을 확인하였다. 보정방암탕은 현저히 ROS생성을 저해시킴으로써 cisplatin에 의한 세포독성을 감소시키는 것으로 확인되었다. Cisplatin에 의해 감소된 글루타치온에 대해 보정방암탕 에탄올층의 영향을 실험한 결과 cisplatin처리에 의해 감소된 글루타치온이 보정방암탕 에탄올층에의해 유의적으로 회복되었고, 농도 의존적으로 gluathione peroxidase의 활성을 증가시켰으나, gluathione reductase에 대해 보정방암탕 에탄올층의 영향은 유의적인 효과를 나타내지 않았다. 보정방암탕 에탄올층은 cisplatin에 의해 유도된 HO-1의 발현을 억제하였고 또한 cisplatin이 유도한 ERK 의 인산화를 효과적으로 억제하는 것으로 보아 보정방암탕 에탄올층에 의한 HO-1 억제는 ERK 의 인산화를 억제하는 것에 의한 것으로 사료된다 (Fig. 8). 이와 같이 보정방암탕은 활성산소의 생성을 저해하고 항산화효소의 활성에 영향을 주어 cisplatin으로 유도된 독성으로부터 세포의 보호활성을 나타냄을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 보건복지부 한방치료기술연구개발사업 바이오퓨전 (B050007)의 지원에 의해 수행되었기에 감사 드립니다.

참고문헌

1. 김성훈, 김동희. 항암제 부작용에 대한 한방요법. 대전대학교 한의학연구소 한의학 논문집, 2(1):32-51, 1993.
2. 김성훈. 항암제 (抗癌劑) 및 방사선 부작용에 대한 한방 요법, 동의병리학회지, 9:239-263, 1994.
3. Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko, J.E., Mansour, V.H. Platinum compounds : a new class of potent antitumor agents. Nature 223:385-386, 1969.
4. Connors, T.A., Johns, M., Ross, W.C.J. New platinum complex with anti-tumor activity. Chem. Biol. Interact. 5:415-424, 1972.
5. Rosenberg, B. Fudamental studies with cisplatin. Cancer, 55:2303-2306, 1985.
6. Kim, Y.H., Kim, Y.W., Oh, Y.J., Back, N.I., Chung, S.A., Chung, H.G., Jeong, T.S., Choi, M.S., Lee, K.T. Protective effect of the ethanol extract of the roots of Brassica rapa on cisplatin-induced nephrotoxicity in LLC-PK1 cells and rats. Biol Pharm Bull. 29(12):2436-2441, 2006.
7. Dobyan, D.C., Levi, J., Jacobs, C., Weiner, M.W. Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity, II Morphologic observation. J. Pharmacol. Exp., 213:551-556, 1980.
8. Atessahin, A., Ceribasi, A.O., Yuce, A., Bulmus, O., Cikim, G. Role of Ellagic Acid against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Oxidative Stress in Rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 100(2):121-126, 2007.
9. Santos, N.A., Catao, C.S., Martins, N.M., Curti, C., Bianchi, M.L., Santos, A.C. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. Arch Toxicol. 11, 2007.
10. Fujieda, M., Naruse, K., Hamauzu, T., Miyazaki, E., Hayashi, Y., Enomoto, R., Lee, E., Ohta, K., Wakiguchi, H., Enzan, H. Effect of selenium on Cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Nephron Exp Nephrol. 104(3):e112-122, 2006.
11. Salahudeen, A., Badr, K., Morrow, J., Roberts, J. Hydrogen peroxide induces 21-aminosteroid-inhibitable F2-isoprostane production and cytolysis in renal tubular epithelial cells. J. Am. Soc. Nephrol. 6:1300-1030, 1995.
12. Lieberthal, W., Triaca, V., Levine, J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. Am. J. Physiol. 270:700-708 1996.
13. Masuda, H., Tanaka, T., Takahama, U. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. Biochem. Biophys. Res. Commun., 203:1175-1180, 1994.
14. Cetin, R., Devrim, E., Kilicoglu, B., Avci, A., Candir, O., Durak, I. Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues: possible protective roles of natural antioxidant foods. J. Appl. Toxicol. 26:42-46, 2006.
15. Kuhlmann, M.K., Burkhardt, G., Kohler, H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. Nephrol. Dial. Transplant. 12:2478-2480, 1997.

16. Eyer, P., Podhradsky, D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent.Anal Biochem. 153(1):57-66, 1986.
17. Paglia, D.E., Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 70(1):158-169, 1967.
18. Glatzle, D., Vuilleumier, J.P., Weber, F., Decker, K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. Experientia. 30(6):665-667, 1974.