

흰쥐에서 Cyclosporine 유도가 산겨릅나무에서 분리한 salidroside의 신독성 경감기전에 관한 효과

김성훈¹ · 박희준² · 최종원*

경성대학교 약학대학, 1: 경희대학교 한의과대학, 2: 상지대학교 제약공학과

Protective Mechanism of Salidroside Isolated from *Acer termentosum* Max on Cyclosporine-Induced Nephrotoxicity in Rats

Sung Hoon Kim¹, Hee Juhn Park², Jongwon Choi*

College of Pharmacy, Kyungseong University, 1: Oriental Medical College, Kyunghee University,
2: Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University

Cyclosporine(CsA) is an immunosuppressant drug widely used in post-allogeneic organ transplant to reduce the activity of the patient's immune system and so the risk of organ rejection. It has been studied in transplants of skin, heart, kidney, liver, lung, pancreas, bone marrow and small intestine. Initially isolated from a Norwegian soil sample, Both kidney and liver dysfunction are prominent side effects of CsA. The present study was designed to determine the possible protective effect of salidroside(Sal) isolated from the BuOH extract of *Acer termentosum* Max against oxidative damage in CsA-treated(50 mg/kg, ip) nephrotoxicity rats. Results showed oral administration of methanol and butanol extract of *Acer termentosum* Max(200 mg/kg, po) significantly reduced activities of marker enzymes(BUN, Creatinine) and LDH activity in serum to CsA induced experimental kidney injured rats. And significantly decrease of protein amount level in urine and activities of free radical formation enzyme were significantly improved by the treatment of Sal. And significantly decrease of MDA level in kidney and activities of catalase, glutathione peroxidation and SOD were significantly improved by the treatment of Sal(20 mg/kg, po). But glutathione concentration and glutathione S-transferase activity was not affected. Results of this study revealed that Sal could afford a significant protection in the alleviation of CsA-induced nephrotoxicity injury.

Key words : *Acer termentosum* Max, salidroside, cyclosporin, neproprotective

서 론

사이클로스포린은 1980 년대에 처음 소개되면서 장기이식중 신장이식에 스테로이드와 함께 가장 많이 사용되고 있는 면역억제제로 11개의 아미노산으로 구성된 분자량 1,202의 환상 펩타이드이다¹⁾. 사이클로스포린은 T 림프구의 세포질내에 존재하는 Cyclophilin과 결합한후 calcineurin의 기능을 억제하여 IL-2 유전자를 활성화를 억제함으로써 면역억제의 기전을 가진 약물이다. 사이클로스포린이 임상에 처음 적용된 것은 1978년²⁾에 의한 신장 및 골수 이식으로서 좋은 결과가 발표되면서 이후 점차 그

적용 범위가 확대되어 현재는 장기 이식 이외에도 자가 면역 질환³⁾ 및 기존의 치료에 반응하지 않는 신증후군 치료에도 사용되고 있다⁴⁾.

사이클로스포린 사용으로 가장 문제가 되고 있는 점은 신독성으로 급성 신독성을 일으키는 중요 기전은 신장내 미세혈관의 수축으로 신혈관 저항이 증가되어 이에 따른 혈류량 감소하며 특히 사구체 구심성 세동맥의 수축으로 사구체 여과율이 감소되며, 신세뇨관으로의 혈류 감소로 인해 신세뇨관의 손상을 초래한다. 최근 사이클로스포린 신독성에 신장 조직의 지질 과산화가 관여하며⁵⁾, 특히 반응성 산소종의 생성 증가와 지질의 과산화 증가 및 산화적 스트레스가 신독성의 중요한 원인으로 추정되고 있다. 사이클로스포린이 주로 미토콘드리아 cytochrome P-450에서 대사되고 이 cytochrome P-450이 활성화되는 동안 과도하게 반응

* 교신저자 : 최종원, 부산시 남구 대연동 314-79, 경성대학교 약학대학

· E-mail : jwchoi@ks.ac.kr, · Tel : 051-620-4883

· 접수 : 2008/12/09 · 수정 : 2009/01/02 · 채택 : 2009/01/30

성 산소종이 생성되어 지질 과산화에 의해 사이클로스포린 신독성을 일으킨다고 주장하였다.

산겨릅나무(*Acer termentosum* Max)는 단풍과(Aceraceae)에 속하는 식물로서 산청목 및 벌나무라고도 불리우며, 중국에서는 줄기를 청해척이라 하여 소종과 외상출혈에 치료목적으로, 한국에서는 잎과 목부를 간염, 간경화, 간암등의 간질환 치료제 및 백혈병, 당뇨병, 신장염이나 부종의 치료에 사용하며 음주시 산겨릅나무의 목부 추출물을 복용하면 주독을 예방을 하며 잎은 넓고 어린 줄기는 연한 녹색이며 줄기가 매우 연하여 잘 부러지며 껍질이 두껍고 재질은 희고 가벼우며, 독성이 없으며 어떠한 체질에도 부작용이 거의 없는 약제이며, 맛이 담백하여 정혈제와 이수제로 사용하고 있다^{6,7)}. 이 나무의 주성분을 이루고 있는 salidroside에 대한 약리작용은 신경세포보호작용⁸⁾, 지질과산화억제⁹⁾, carbohydrate 대사에 미치는 영향¹⁰⁾, bone marrow cell cycle에 미치는 영향¹¹⁾ 및 최근에 와서는 항염효과에 대한 다양한 결과¹²⁾가 보고는 되고 있으나 신독성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

이에 본 실험에서는 임상에서 면역억제제로 많이 사용되고 있는 사이클로스포린 급성신장 독성을 유발 시킨 실험동물에 산겨릅나무에서 분리한 살리드로사이드를 투여함으로써 이의 신장 보호 작용기전을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 동물 및 처치

동물은 효창 science(대구)로 부터 분양 받아 본 대학 동물사에서 일정한 조건(온도 : 22±0.5℃, 습도 : 46-60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 고형 사료로 적응시킨 체중 180±10 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였다. 산겨릅나무 목부의 시료는 상지대학교 제약공학과 박희준 교수 연구실에서 분리한 분획(methanol, water, chloroform, buthanol, ethyl acetate: 200 mg/kg, po) 및 saliroside(Sal. 20 mg/kg, po)를 사용하였다. 각 시료는 2% Tween 80에 현탁하여 4주간 경구로 투여하였으며, cyclosporin(CsA, Novartis Rearch East Hanover, NJ, USA)은 50 mg/kg을 olive oil에 용해하여 복강내에 세차례 4일간격으로 투여하였으며 대조약물로는 metallothionein을 증가시키는 급속으로 알려진 bismuth nitrate(Bis-N. Wako사, 50 μmole/kg, po)을 사용하였다. 마지막 투여 24시간 후에 처치하였으며 실험동물은 처치전 12시간 동안 사료를 제거하고 물만 섭취케 하였다. 대조군은 동일량의 상기의 용매를 사용하였다.

2. 시료의 채취

실험 마지막날에 소변을 채취하여 소변에서 단백질과 creatinin을 측정하였으며, CO₂로 가볍게 마취시키고 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하였고 신장은 0.9% 생리식염수로 관류시켜 조직 내 혈액을 제거하고 적출하여 생리식염수에 씻은 후 여지로 가볍게 압박하여 남아 있는 혈액 및 생리식염수를 제거하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분 이상 방치해 두었다가 3000

rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 얻어 분석시까지 냉동보관 하였다. 신장 조직은 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 방냉하에서 glass teflon homogenizer를 사용하여 10% 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄액을 homogenate 분획으로 하였으며 이분획을 계통분리하여 cytosol, microsome 및 mitochondria 분획으로 분리하였다. 마쇄액은 lipid peroxide 및 glutathione 함량 측정에, cytosol 분획은 xanthine oxidase, aldehyde oxidase, glutathione reductase 및 glutathione S-transferase 활성의 측정에 사용하였으며, microsomal 분획에서는 aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase의 활성 측정, mitochondria 분획은 catalase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다.

3. 뇨 및 혈청의 함량측정

뇨중 단백질의 정량은 Lowry 방법¹³⁾을 이용하여 3 ml의 뇨에 10% TCA 용액을 3 ml 넣고 2000rpm에서 30분간 원심 분리한 후 침전물을 3% NaOH 용액에 녹인 후, carbonate-CuSO₄ reagent와 Folin phenol reagent로 발색시켜 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈중 BUN의 측정은 Urease-indophenol법에 의해 조제된 kit(AM 165-K, Asan)를 사용하여 측정하였다. 뇨중 creatinine은 Jaffe 반응의 변법을 이용한 kit(영동제약)을 사용하였으며 혈중 LDH활성도는 젯산 기질법에 의해 조제된 kit를 사용하여 측정하였다.

4. 신조직 지질과산화 및 glutathione 함량

지질과산화의 함량 측정은 Ohkawa 등의 방법¹⁴⁾을 변경하여 신장 조직 1 g당 10배량의 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 가해 마쇄하고 이 10% 마쇄액에 동일한 buffer를 동량 가하여 3시간 preincubation 시킨 후 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid를 가한 후 95℃에서 1시간 동안 반응시켜 실온에서 냉각 후에 n-BuOH : pyridine(15:1)을 첨가하여 15분간 원심 분리하여 생성된 홍색의 n-BuOH : pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 그 흡광도를 측정하여 표준 곡선에서 그 함량을 신장 조직 1 g 당 malondialdehyde nmole로 표시하였다. Glutathione의 정량은 Ellman의 방법¹⁵⁾에 준하여 신장 조직 중 GSH의 함량 측정은 마쇄액 100 μl에 25% HPO₃를 섞어 4℃, 12000 rpm에서 10분간 원심분리 한 상등액 시료로 한다. 시료 1 μl와 phosphate buffer(1 mM EDTA 함유, pH 7.4)와 OPT(o-phthalaldehyde)를 넣어 15분간 혼합 후 360 nm에서 측정하였다.

5. 효소활성의 측정

Xanthine oxidase 활성의 측정은 Stripe과 Della의 방법¹⁶⁾, Aldehyde oxidase 활성의 측정은 Rajagopalan 등의 방법¹⁷⁾, Aminopyrine N-demethylase의 활성 측정은 Nash 등의 방법¹⁸⁾을 약간 변경하였으며, Aniline hydroxylase의 활성 측정은 Bidlack 등의 방법¹⁹⁾, Superoxide dismutase(SOD) 활성의 측정은 Marklund와 Marklund의 방법²⁰⁾에 준하여 0.2 M potassium

phosphate buffer(200 μ M cytochrome C, 100 μ M EDTA 함유 pH 8.6) 1.0 ml에 효소액 0.2 ml를 가하여 ice bath 상에서 20분간 방치하고 test에는 alkaline dimethyl sulfoxide(DMSO)용액 0.5 ml, blank에는 non-alkaline DMSO 용액 0.5 ml를 각각 가하고 37°C에서 30분간 반응시키고 파장 550 nm에서 감소되는 cytochrome C의 흡광도를 측정하고 alkaline DMSO-mediated cytochrome C reduction을 50% 억제하는 enzyme 량을 1 unit로 산정하여 활성도를 표시하였다. Catalase 활성의 측정은 Aebi의 방법²¹⁾에 준하여 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)중에 기질인 10 mM H₂O₂의 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 분자흡광계수 0.041 mM⁻¹ cm⁻¹을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 분해하는 hydrogen peroxide의 양을 μ mole로 표시하였다. Glutathione peroxidase 활성의 측정은 Paglia와 Balentine의 방법²²⁾에 준해 hydrogen peroxide 및 glutathione이 함유된 0.1 mM tris buffer(pH 7.2) 중에서 효소액을 가하여 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량선에 준하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 생성하는 NADP의 양을 nmole로 표시하였다. Glutathione S-transferase 활성의 측정은 Habig 등의 방법²³⁾에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5)에 40 mM reduced glutathione 75 μ l를 가한 후 효소액 10 μ l를 넣고 25°C에서 5분간 preincubation 한 뒤 기질로서 2,4-dinitrochlorobenzene 25 μ l를 가하여 2분간 반응시킨 후 20% trichloroacetic acid를 가하여 반응을 완료시키고 시료를 원심 분리하여 얻은 상정액을 파장 340 nm에서 흡광도를 측정할 후 2,4-dinitrochlorobenzene의 mole 흡광계수 9.6 mM⁻¹ cm⁻¹를 이용하여 활성도를 산정하였다.

6. 단백질 정량 및 통계처리

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법¹³⁾에 준하여 bovine serum albumin(Sigma, Fr. V)을 표준품으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결 과

1. BUN, creatinine 및 lactate dehydrogenase(LDH)활성에 대한 효과

CsA 투여로 유발된 신장해 흰쥐의 혈중 뇨소질소, 신장 기능의 지표로 널리 알려져 있는 뇨중 creatinine과 세뇨관 손상 지표로 사용되는 LDH 활성에 미치는 산겨릅나무의 각분획에 미치는 영향을 관찰한 성적이 Fig. 1이다. 흰쥐에 CsA를 처치하면 혈중의 뇨소질소의 함량이 20.2±7.87 mg/dl로 정상군 10.1±3.23 mg/dl에 비하여 약 2배정도 현저히 증가되었다. 산겨릅나무 각 분획(메탄올, 물, 부탄올, 클로로포름, 에틸아세테이트) 200 mg/kg을 4주간 투여군에서 분탄올 분획을 투여한 군에서 14.8±4.32 mg/dl로 대조군에 비하여 효소활성의 상승억제효과를 보였다. 또한 물층에서도 억제하는 경향을 보였으며 산겨릅나무

부탄올, 클로로포름 및 에틸아세테이트 분획의 투여에서는 대조군과 활성의 차이는 있었으나 통계적(p<0.05)인 유의성은 없었다. 이러한 결과는 뇨중 creatinine의 함량 및 혈중 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성에서도 CsA를 처치한 군에서 정상군에 비하여 현저히 증가되던 각각의 효소 활성이 산겨릅나무 부탄올 분획 200 mg/kg 투여에서 현저히 억제되었다. 한편 양성대조약물인 Bis-N의 50 μ mole/kg 투여군에서도 BUN, 뇨중 creatinine 및 혈중 LDH의 활성도는 대조군에 비하여 유의한 상승억제효과가 인정되었다.

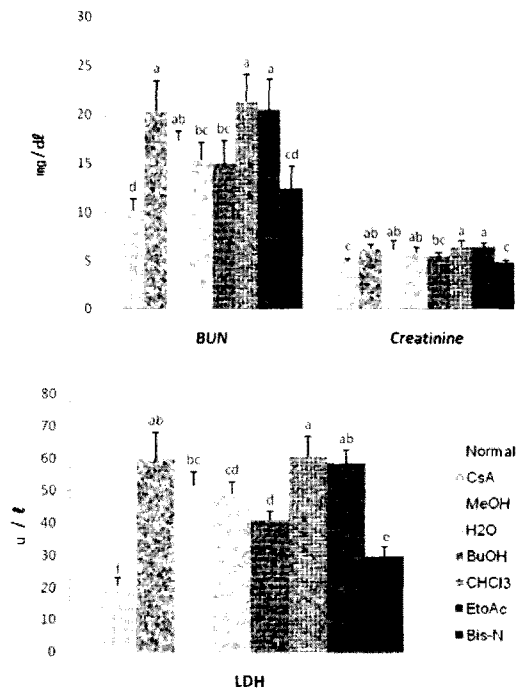


Fig. 1. The effect of *Acer termentosum* Max on BUN, serum creatinine and lactate dehydrogenase in CsA-treated rats. Rats were orally administered with plant extract(200 mg/kg) and sodium thiosulfate(Bis-N, 50 μ mole/kg) for four weeks and intraperitoneally injection of cyclosporine-A(CsA, 50 mg/kg) for 3 times of 4 days after supplementation of extract. Values are mean and standard deviation for 6 experiments. Data followed by different superscript are significant by Duncan new multiple range test from normal(p<0.05). BUN: Blood urea nitrogen LDH: Lactate dehydrogenase

2. 단백질뇨에 대한 효과

단백뇨 양은 정상군에서는 9.1±5.5 g/kg/day이었으며, CsA 단독 투여군에서는 31.2±11.1 g/kg/day로 정상군에 비하여 통계학적으로 증가되었다(p<0.05)(Fig. 2). 산겨릅나무 각분획(메탄올, 물, 부탄올, 클로로포름, 에틸아세테이트) 200 mg/kg을 4주간 투여군에서 분탄올 분획을 투여한 군에서 24.2±3.98 g/kg/day로 대조군에 비하여 단백질뇨 함량의 상승을 억제하는 경향을 보였으며, 물층에서도 억제하는 경향을 보였으며 산겨릅나무 부탄올, 클로로포름 및 에틸아세테이트 분획의 투여에서는 대조군과 활성의 차이는 있었으나 통계적(p<0.05)인 유의성은 없었다. 한편 양성대조약물인 Bis-N의 50 μ mole/kg 투여군에서도 CsA를 투여한 대조군에 비하여 유의한 상승억제효과가 인정되었다. 이에 본 예비실험에서 산겨릅나무 부탄올 분획에서 CsA에 의해 유도되

는 신독성의 보호효과를 관찰하고자 부탄을 분획에서 활성 성분인 Sal을 동정하고서 아래의 실험을 행하였다.

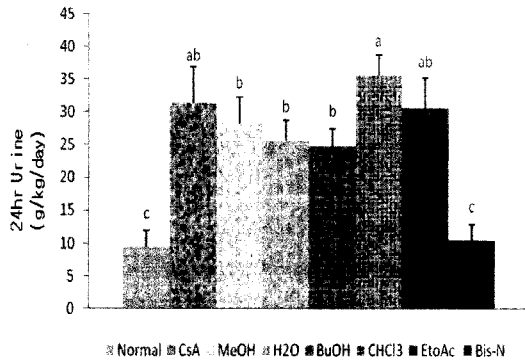


Fig. 2. The effect of *Acer termentosum* Max on urine protein amount in CsA-treated rats. Values are mean \pm SD(n=6). Data followed by different superscript are significant by Duncan new multiple range test from normal(p<0.05).

3. 신조직중 지질 과산화 함량에 미치는 효과

정상군과 CsA를 투여하고서 신독성을 유발한 군에 산겨릅나무 분획을 CsA와 동시에 투여한 군에서 신조직중의 지질과산화물을 관찰한 성적이 Fig. 3이다. CsA의 투여로 유발된 신장해 흰 쥐의 간 과산화지질량(MDA) 함량은 2.53 \pm 0.54 nmole/mg protein으로 정상군 0.98 \pm 0.09 nmole/mg protein에 비하여 약 1.5배 유의성(p<0.05) 있게 증가됨이 관찰되었다. 산겨릅나무 부탄을 분획 200 mg/kg 투여군에서는 2.12 \pm 0.12 nmole/mg protein으로 대조군에 비하여 유의한 지질과산화물질 형성저해효과를 보였고, 이의 성분으로 추정되는 Sal 20 mg/kg의 투여에서도 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되는 경향을 보였다. 양성 비교약물 Bis-N의 50 μ mole/kg의 유의한 지질과산화형성 저해 활성이 인정되었다.

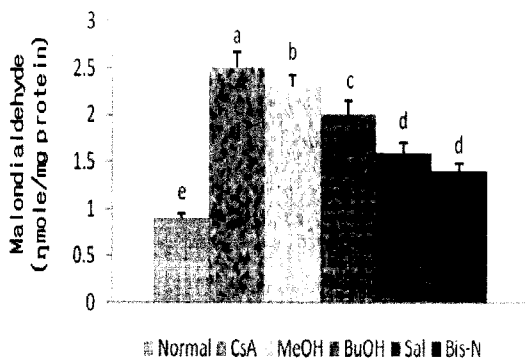


Fig. 3. The effect of *Acer termentosum* Max on renal lipid peroxidation contents in CsA-treated rats. Values are mean \pm SD(n=6). Data followed by different superscript are significant by Duncan new multiple range test from normal(p<0.05).

3. 활성산소의 생성계에 미치는 효과

Fig. 3 에서 신조직 중의 지질 과산화함량의 변동을 관찰하고자 이러한 신조직 중의 CsA의 투여로 지질과산화 함량의 증가되던 것이 산겨릅나무의 전처리로 억제되는 기전을 검색할 목적으로 대사 과정 중 phase I 단계의 microsomal 및 cytosolic 효소

계에 미치는 영향을 관찰한 성적이 Fig. 4 이다. 정상동물에 CsA를 투여한 군에서는 신장 조직의 microsomal enzyme으로서 신장의 지질과산화 생성 대사 효소계에 영향을 미치는 aminopyrine N-demethylase(AD)와 aniline hydroxylase(AH) 효소 활성에 대해 측정된 결과, 정상쥐에 비하여 CsA를 투여하므로서 현저히 증가 되던 것이 산겨릅나무 분획의 전처리로 CsA 단독 투여군 보다 억제되는 경향을 보였다. 한편, cytosolic 효소인 신장 xanthine oxidase(XO)와 aldehyde oxidase(AO)의 활성도 CsA의 투여로 현저히 증가 되던 것이 정상군에 CsA를 투여하므로서 정상군에 비해 현저히 증가되던 cytosolic 효소가 microsomal 효소계와 유사하게 산겨릅나무 분획부탄 및 Sal의 전처리로 감소되었다.

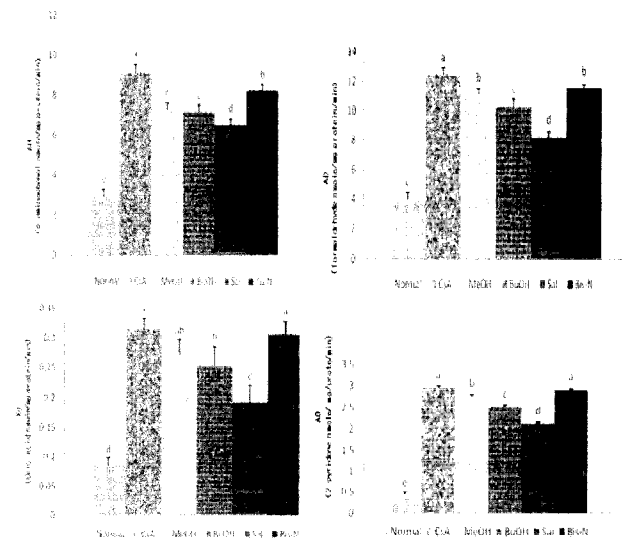


Fig. 4. The effect of *Acer termentosum* Max on kidney phase I enzyme activities in cyclosporin-A(CsA) terated rats. Values are mean \pm SD(n=6). Data followed by different superscript are significant by Duncan new multiple range test from normal(p<0.05). AH(aniline hydroxylase): p-aminophenol nmole/mg protein/min; AD(aminopyrine N-demethylase): formaldehyde nmole/mg protein/min; XO(xanthine oxidase): uric acid nmole/mg protein/min; AO(aldehyde oxidase): 2-pyridone nmole/mg protein/min

4. 활성 산소의 해독계에 미치는 영향

정상쥐와 산겨릅 나무 분획 및 Sal을 동시에 투여하고서 활성산소의 해독계인 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione peroxidase(GSH-Px)의 활성, 신조직중의 glutathione 농도 및 glutathione S-transferase 활성에 미치는 영향을 관찰한 성적이 Table 1, 2이다. 정상쥐에 CsA를 투여하였을 때에 정상군에 비하여 활성산소를 H₂O₂로 변환시키는 효소인 SOD의 활성도가 유의성있게 감소하였으며 산겨릅나무 부탄을 및 Sal을 투여하므로서 CsA의 단독 투여로 감소되던 SOD의 활성이 증가되었다. H₂O₂를 H₂O로 변환시켜 활성산소를 체외로 배설시키는 catalase, glutathione을 기질로 하여 catalase와 같은 기능을 수행하는 GSH-Px 역시 정상군에 CsA를 투여하므로서 정상군에 비해 현저히 감소되던 catalase 및 GSH-Px의 활성이 SOD의 활성과 유사하게 산겨릅나무의 투여로서 증가되는 경향을 보였다. 한편 정상쥐에 CsA를 투여한 군에서는 신조직중의 glutathione의 농도 및

glutathione S-transferase의 활성이 현저히 억제되었으나, 산겨릅나무 부탄올 및 Sal의 전처리에서도 CsA의 투여에 대한 억제 효과를 개선하지는 못하였다.

Table 1. Influence of *Acer termentosum* Max on kidney free radical scavenging enzyme system in cyclosporin-A(CsA) terated rats

Treatment	Dose	SOD	CAT	GSH-Px
Normal		39.4±4.71 ^a	64.7±3.26 ^a	160.4±8.56 ^a
CsA	50 mg/kg	20.7±2.16 ^d	42.5±2.01 ^e	115.1±7.53 ^f
MeOH	200 mg/kg	24.4±1.98 ^{cd}	50.6±2.82 ^d	120.8±5.42 ^{cd}
BuOH	200 mg/kg	28.5±2.41 ^{bc}	55.7±3.11 ^{cd}	137.6±6.51 ^b
Sal	20 mg/kg	30.6±3.43 ^b	58.9±1.83 ^c	141.2±3.27 ^b
Bis-N	50 μmole/kg	21.8±2.98 ^c	43.9±2.91 ^e	120.3±9.17 ^{cd}

Values are mean ± SD(n=6). Data followed by different superscript are significant by Duncan new multiple range test from normal(p<0.05). SOD(superoxide dismutase): U/mg protein/min. 1 unit: reduction of cytochrome C by 50% in a coupled system. CAT(catalase): hydrogen peroxide nmole/mg protein/min. GSH-Px(glutathione peroxidase): oxidized NADPH nmole/mg protein/min

Table 2. The effect of *Acer termentosum* Max on renal glutathione content and glutathione S-transferase activity in cyclosporin-A(CsA) terated rats

Treatment	Dose	GSH	GST
Normal		240.1±8.06 ^c	120.9±7.45 ^c
CsA	50 mg/kg	60.5±5.216 ^c	99.6±8.80 ^b
MeOH	200 mg/kg	80.9±6.25 ^c	93.2±7.25 ^c
BuOH	200 mg/kg	81.2±7.29 ^c	89.6±8.12 ^c
Sal	20 mg/kg	73.8±8.25 ^{cd}	93.7±9.36 ^c
Bis-N	50 μmole/kg	201.3±12.9 ^c	118.5±6.50 ^c

Values are mean ± SD(n=6). Data followed by different superscript are significant by Duncan new multiple range test from normal(p<0.05). GSH(glutathione concentration): μ mole/g of tissue. GST(glutathione S-transferase): DCNB nmole/mg protein/min

고찰

생체의 노화기전은 아직 명확하지 않으나 모든 장기는 노화함에 따라 그 구조가 변하고 기능이 퇴화된다. 이러한 결과로 나이가 증가함에 따라 해부학적, 생화학적, 생리적, 행동적인 면을 포함한 모든 측면에서의 신체 변화가 나타나고 만성 퇴행성 질병이 증가하게 된다. 신장은 수분, 전해질, 산·염기 및 체내 대사 노폐물 등 여러 가지 물질을 적절히 배설시킴으로써 체내물질 항상성을 유지하는데 있어 가장 중요한 기관이다. 신장의 노화에 따른 사구체의 여과, 재흡수와 분비등 신장 기능의 저하는 나이가 증가하면서 나타나는 체내 항상성 조절의 문제를 제기하게 된다. 이와 같이 신장기능 저하로 인한 체내 항상성의 불균형은 고혈압, 동맥경화증, 심장병, 당뇨병 등 노화와 관련된 만성 질병의 직접, 간접적인 원인이 되고 있으며, 따라서 노화 과정을 촉진시키게 된다^{24,25)}. 그러므로 신장의 노화 원인을 규명하고 이를 지연시키기 위한 방안을 연구하는 것은 수명연장과 정상적인 체기능 유지를 위해 매우 중요한 과제라고 생각된다. 신장기능 감소의 원인으로서는 당뇨, 고혈압, 동맥경화, 감염 등의 질병과 약물, 식이 등이 거론되고 있다. 이에 본 실험에서는 약물에 대한 신기능에 독성을 초래하는 물질로 알려진 임상에서 강력한 면역 억제제로 신독성 때문에 환자 치료에 제한을 받고 있는 cyclosporine (CsA) 대상으로 산겨릅나무의 성분인 salidroside(Sal)의 신독성 경감 기전을 추구하고자 하였다. CsA에 의한 세포 독성 기전 중

의 하나로 반응성 산소종의 역할이 제시되고 있으며^{26,27)} 인체의 대사과정에서 발생하는 이 반응성 산소종은 여러 가지로 다양한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 즉 고농도에서는 세포의 직접적인 독성을 나타내지만²⁸⁾, 낮은 농도에서는 세포 신호전달 분자로 작용하거나 유전자의 전산 인자에 영향을 미치며²⁹⁾, 효소의 활성에도 영향을 미치고³⁰⁾, 세포의 증식을 촉진³¹⁾, 또는 apoptosis를 유도하는 등³²⁾ 다양한 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

산겨릅나무에서 활성 성분의 검색을 목적으로 CsA 투여로 유발된 신장해 환쥐에서 혈청중의 뇨소질소 및 LDH의 활성과 뇨중 creatinine 및 단백질의 함량을 산겨릅나무 각분획(메탄올, 물, 부탄올, 클로로포름, 에틸아세테이트)을 투여하고서 검색하여 본 결과 BUN 및 LDH의 활성과 뇨중의 creatinine 및 단백질의 함량이 정상군에 비하여 유의한 상승을 보여 신독성이 유발됨을 알 수 있었다. 따라서, CsA 처리 전에 산겨릅나무 각분획을 4주간 경구투여하고서 CsA 간신성 예방효과를 검토한 바 검역 부탄올 분획 200 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 BUN의 활성이 약 40%정도 유의적으로 억제되었으며 LDH는 약 30%, creatinine의 농도는 약 20%정도 억제되었다. 한편 24시간 뇨중에서의 단백질 농도도 약 40%정도 억제되는 경향을 보였다. 양성비교약물로 사용한 bismuth nitrate(50 μmole/kg)의 투여군에서도 신장세포의 변성, 괴사를 반영하는 효소에서 CsA 투여 대조군에 비하여 유의한 신보호 효과가 인정되었다.

근래에 지질 과산화화가 중요한 인자로 보고되고 있는데, 세포막에서 고농도의 포화지방산이 함유되어 있으며 세포의 정상 방어기체인 glutathion, SOD와 glutathion peroxidase system이 적절한 기능을 못할 때 oxygen free radical이 생성되어 지질 과산화화 초래됨으로써 신손상을 유발하게 된다는 것이다^{33,34)}. 본 실험에서도 실험동물에 CsA의 투여로서 신장의 MDA가 증가하고 신독성이 증가하는 것을 관찰하였으며, 산겨릅나무 부탄올 및 Sal의 전처리로 증가되던 MDA의 농도가 유의성 있게 억제되었다. 이러한 산겨릅나무의 투여로서 신장중의 지질과산화 함량의 억제 기전을 추구할 목적으로 활성산소의 생성 및 해독기구에 대하여 추구하고자 하였다. Free radical³⁵⁾은 생체 내외인성 요인에 의한 친전자성 물질로 생체내에서 독작용, 노화, 발암 및 면역 억제작용을 유발하는 원인 물질로 병태 생리학적 현상이나 조직의 손상 정도를 나타내는 지표로서 세포막의 투과성을 향진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 세포 기능을 저하시키며 세포 괴사나 노화현상에 관여하여 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 유발하는 물질이다. 활성산소에 의한 세포독성은 체내 해독 기구의 작용에 의하여 무독화 되는 것³⁶⁾으로 알려져 있는데, 일반적으로 간장의 해독기전은 간세포의 smooth endoplasmic reticulum에 존재하는 대사 효소계에 의하여 해독 또는 불활성화되어 체외로 배출되는 산화, 환원 및 가수분해 시키는 1상 반응과 활성산소를 포함하여 체외로 배설 시키는 2상 반응으로 나눌 수 있다³⁸⁾. 그 중 1상 반응에 관여하는 cytochrome P-450은 mixed function oxidase로써 약물이 결합하는 형태 및 존재조직에 따라 서로 다른 spectrum을 나타내는데, aminopyrine을 기질로 하여 formaldehyde를 생성하는 Type I 과 aniline을 기질로 하여

p-aminophenol을 생성하는 Type II로 분류하고 있으며 이는 microsomal계의 활성산소 생성에 관여하고 있다³⁷⁾. 체내에 투여되어진 약물 및 독성물질의 대사과정은 1상 반응과 2상 반응으로 나눌 수 있으며, 지질과산화 함량의 증가가 어떠한 기전에 의하여 나타나는가를 검토할 목적으로 1상 반응인 microsomal 효소인 aminopyrine N-demethylase 및 aniline hydroxylase의 효소계를 측정하여 본 결과 정상군에 비하여 CsA의 처리로 현저히 증가되던 것이 산겨릅나무 분획의 전처리로 억제되었다. 또한 cytosol에서 일어나는 반응인 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase의 활성도 정상쥐에 CsA를 투여하였을 때 현저히 증가되던 활성이 산겨릅나무 분획의 투여로 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과로 보아 정상쥐에 CsA의 투여에 의하여 신독성의 증가를 산겨릅나무 분획중 부탄올 및 이의 성분인 Sal이 cytosol계 및 microsomal 효소계의 활성을 조절함으로써 활성산소의 생성을 억제하는 것으로 생각되어진다.

2상 반응은 1상 반응을 거친 약물이거나 내인성 및 외인성 물질을 포함시키고 무독화 시키는 단계이다. 그중 superoxide dismutase(SOD)는 xenobiotics로 인하여 생성된 superoxide anion을 H₂O₂로 전환시키는 효소로 생체 내 해독 과정에 관여하는 효소 중 하나이다. 또 catalase는 체내에서 지방의 자동 산화 및 유기물의 산화로 생기는 H₂O₂를 H₂O와 O₂로 분해하여 무독화 시키는 radical scavenging enzyme^{38,39)}로 물로 변환시켜 생성된 활성 산소를 체외로 배설시킨다. glutathione peroxidase 역시 catalase와 같은 기능을 수행하는 효소로 glutathione을 기질로 하여 유리기를 물로 변환시켜 생성된 활성 산소를 체외로 배설시킨다. 이러한 radical scavenging enzyme의 활성은 정상군에 CsA를 투여함으로써 현저히 억제되던 효소의 활성들이 산겨릅나무 부탄올 및 Sal의 전처리로 통계적으로 유의성있게 증가되었다.

한편 1상 반응을 거처서 생성된 친전자성 물질을 친핵성 물질인 GSH와 포함시켜 무독화시키는 또 다른 2상 과정에 관여하는 효소^{40,41)}인 glutathione s-transferase의 활성에 미치는 영향을 관찰하였던 바, 정상군에 CsA를 투여함으로써 현저히 억제되었던 것이 산겨릅나무 부탄올 및 Sal의 투여로 CsA의 단독 투여군과 비교 할 때 별다른 영향이 없었다.

이상의 결과를 추론 하여 볼때 CsA의 단독투여로 신 조직에서의 지질과산화 함량의 증가를 산겨릅나무분획중 부탄올 분획에 존재하는 Sal이 CsA에 의하여 유도되는 신독성을 경감시키는 것은 활성 산소의 생성계를 조절하며 나아가 SOD, GSH-Px 및 catalase를 조절하여 나타나는 결과로 산겨릅나무 성분중에는 CsA가 유도하는 신독성을 경감시키는 성분이 함유되어 있는 것으로 생각되며 앞으로 더욱 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

임상에서 장기이식중 면역억제제로 사용되는 cyclosporine (CsA)은 심각한 부작용으로 신장장애를 들 수 있으며 이러한 신장장애를 경감시킬 목적으로 산겨릅 나무에서 분리한 salidroside

(Sal)가 CsA의 신독성 경감기전에 어떠한 영향을 주는가를 관찰한 결과 CsA 처리로 유발된 신장해 흰쥐에서 혈중 뇨소질소와 LDH의 활성 및 뇨중 creatinine과 단백질의 함량이 현저히 증가되던 것이 Sal의 전처리로 유의성 있게 억제되었다. 신조직중 지질과산화 함량의 지표인 MDA의 함량도 현저히 신장해 유발로 증가되던 것이 억제되었으며, 활성산소의 생성계인 aniline hydroxylase, aminopyrine N-demethylase, xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase의 활성이 CsA의 투여로 유의성 있게 증가되던 것이 억제 되었으며, 항산화 효소로 알려진 superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 catalase의 효소 활성도 유의성 있게 개선되었다.

한편 신조직중의 glutathione 농도와 glutathione S-transferase의 활성은 CsA의 투여로 현저히 억제되었으나 Sal의 전처리로는 별다른 영향이 없었다. 이상의 결과로 보아 산겨릅나무에서 분리한 Sal는 체외에서 섭취되어진 xenobiotics로부터 손상을 입는 신장장애에 보호작용이 있는 것으로 향후 기능성 물질의 소재로 활용할수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2008학년도 경성대학교 학술연구비지원에 의하여 연구되었음

참고문헌

- Hess, A.D. Cyclosporine. Immunobiologic aspects in transplantation, in kidney transplant rejection Diagnosis and treatment. 2nd ed. Edited by Burdick JF, Racusen KC, Solez K, Williams GM, New York, Marcel Dekker Inc, pp 567-599, 1992.
- Powles, R.L., Barrett, A.J., Clink, H., Kay, H.E., Sloane, J., McElwain, T.J. Cyclosporine A for the treatment of graft-versus-host disease in man. Lancet, 2: 1327-1331, 1978.
- Rijthoven, A.W., Dijkmans, B.A., Goei, H.S., Hermans, J., Montnor-Beckers, Z.L., Jacobs, P.C., Cats, A. Cyclosporine treatment for rheumatoid arthritis: a placebo controlled, double blind, multicentre study. Ann. Rheum. Dis. 45: 726-731, 1986.
- Neuhaus, T.J., Burger, H.R., Klingler, M., Fanconi, A., Leumann, E.P. Long-term low-dose cyclosporine A in steroid dependent nephrotic syndrome of childhood. Eur. J. Pediatr. 151: 775-778, 1992.
- Wang, C., Salahudeen, A.K. lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity: effects of vitamin E. Kidney Int. 47: 927-934, 1995.
- 이창복. 대한식물도감. 향문사, 서울, p 552, 1993.
- 소배근. 중국본초도감(3권), 여강출판사, 서울, p 193, 1994.
- Jang, S.I., Pae, H.O., Choi, B.M., Oh, G.H., Jeong, S., Lee,

- H.J., Kim, H.Y., Kang, K.H., Yun, Y.G., Kim Y.C., Chung, H.T. Salidroside from *Rhodiola sachalinensis* protects neuronal PC 12 cells against cytotoxicity induced by amyloid- β . *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 25: 295-304, 2003.
9. Zhang, Y., Liu, Y. Study on effect of salidroside on lipid peroxidation in oxidative stress in rat hepatic stellate cells. *Zhong Yao Cai.* 28: 794-796, 2005.
 10. Wang, S.H., Wang, W.J., Wang, X.F., Chen, W.H. Effect of salidroside on carbohydrate metabolism and differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Zhong Xi He Xue Bao* 2: 193-195, 2004.
 11. Zhang, X.S., Zhu, B.D., Hung, X.Q., Chen, Y.F. Effect of salidroside on bone marrow cell cycle and expression of apoptosis-related proteins in bone marrow cells of bone marrow depressed anemia mice. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 36: 820-823, 2005.
 12. Moch, S.B., Asih, T., Park, H.J., Choi, J. Protective effect of Salidroside isolated from *Acer termentosum maxim* against Freund's complete adjuvant-induced oxidative stress in rheumatoid arthritis. *대한약학회발표 초록*, 2008.
 13. Lowry, O.H., Rodebrough, N.J. Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
 14. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358, 1979.
 15. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77, 1959.
 16. Stirpe, F., Della, C.E. The regulation of rat liver xanthine oxidase conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (Type D) to oxidase (Type O). *J. Biol. Chem.* 244: 3855-3863, 1969.
 17. Rajagopalan, K.V., Fridovich, I., Handler, P. Hepatic aldehyde oxidase. In *Purification and properties*, *J. Biol. Chem.* 237: 922-928, 1962.
 18. Nash, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *J. Biol. Chem.* 55: 412-416, 1953.
 19. Bidlack, W.R., Lowry, G.L. Multiple drug metabolism: p-Nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* 31: 311-317, 1982.
 20. Marklund, S., Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47: 469-474, 1974.
 21. Aebi, H. Catalase. In "Methods of enzymic analysis" Bergmeyer, M.U., Academic Press, New York. 2: 673-689, 1974.
 22. Paglia, E.D., Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169, 1967.
 23. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. Glutathione S-transferase The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139, 1974.
 24. Lamb, E.J., O'Riordan, S.E., Delaney, M.P. Kidney function in older people: Pathology, assessment and management. *Clinica. Chimica. Acta.* 334: 25-40, 2003.
 25. Lamb, E.J., Webb, M.C., O'Riordan, S.E. Using the modification of diet in renal disease (MDRD) and Cockcroft and Gault equations to estimate glomerular filtration rate (GFR) in older people. *Age and Ageing*, 36: 689-692, 2007.
 26. Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* 258: 1898-1902, 1992.
 27. No, W., Breckin, C., Garber, S.L., Song, R.H., Pegoraro, A.A., Au, J., Arruda, J.A.K., Dunea, G., Singh, A.K. Changes in collagenases and TGF- β precedes structural alterations in a model of chronic fibrosis. *Kidney Int.* 56: 145-153, 1999.
 28. Shah, S.V. The role of reactive oxygen metabolites in glomerular disease. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 245-262, 1995.
 29. Sen, C.K., Packer, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10: 709-720, 1996.
 30. Nath, K.A., Grande, J., Croatt, A., Haugen, J., Kim, Y., Rosenberg, M.E. Redox regulation of renal DNA Synthesis, transforming growth factor- β and collagen gene expression. *Kidney Int.* 53: 367-381, 1998.
 31. Sies, H. Oxidative stress. Oxidant and Antioxidant, p 650, Academic Press, London, 1991.
 32. Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., Goldschmidt-Clermont, P.J. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*, 275: 1649-1652, 1997.
 33. Trifillis, A.I., Kahng, M.W. Effect of cyclosporine A on cultured human kidney cells: lipid peroxidation and cytosolic calcium. *Transplant Proc.* 20: 717-721, 1998.
 34. Ling, H., Edelstein, C., Gengaro, P., Meng, X., Lucia, S., Knotek, M., Wangsiripaisan, A. Attenuation of renal ischemiareperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am. J. Physiol.* 277: 383-390, 1999.
 35. Freeman, B.A., Crapo, J.D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47: 412-426, 1982.
 36. Routledge, P.A., Shand, D.G. Presystemic drug elimination, *Res. Pharmacol. Toxicol.* 19: 447-468, 1979.
 37. Leonard, V., Schenkman, J.B. Decrease in the levels of a constitutive cytochrome P-450 in hepatic microsomes of

- diabetic rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142: 623-630, 1987.
38. Leibovitz, B.E., Siegel, B.V. Aspects of free radical reactions in biological systems. *Aging. J. Gerontol.* 35: 45-56, 1980.
39. McCord, J.M. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312: 159-163, 1985.
40. Ip, C., Lisk, D.J. Modulation of phase I and phase II xenobiotic- metabolizing enzymes by selenium-enriched garlic in rats. *Nutri. Can.* 28: 184-188, 1997.
41. Leng, G., Lewalter, J. Polymorphism of glutathione S-transferases and susceptibility to acrylonitrile and dimethylsulfate in cases, *Toxicol. Letters*, 134: 209-217, 2002.