

시스플라틴 유도 신장 독성에 대한 반하사심탕 추출물의 방어효과

오기수 · 이수빈 · 소홍섭 · 김하림 · 이영래¹ · 이금신² · 양세훈³ · 임찬한⁴ · 권강범^{4*}

원광대학교 의과대학 대사기능제어연구센터, 1: 원광대학교 치과대학 구강생화학교실

2: 원광대학교 한의과대학 본초학교실, 3: 원광대학교 의과대학 내과학교실

4: 원광대학교 한의과대학 생리학교실

Inhibitory Effects of *Banhasasim-tang* Extracts on Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Mouse Model

Gi Su Oh, Su Bin Lee, Hong Seob So, Ha Rim Kim, Young Rae Lee¹, Geum San Lee², Sei Hoon Yang³, Chan Han Lim⁴, Kang Beom Kwon^{4*}

Center for Metabolic Function Regulation, School of Medicine, 1: Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry,

2: Department of Herbology, School of Korean Medicine, 3: Department of Internal Medicine, School of Medicine,

4: Department of Physiology, School of Korean Medicine, Wonkwang University

In this study, *Banhasasim-tang* extracts (BSTE) have an inhibitory effects on cisplatin-induced nephrotoxicity in mouse model. Cisplatin is the most widely used anticancer drug for treatment of various cancer. However, cisplatin treatment to cancer patients leads to many side effects such as nephrotoxicity and body weight decrease. We hypothesize that BSTE improve the cisplatin-induced side effects in mouse model. We found that BSTE administration protected tubular injury by cisplatin in mouse model. BSTE also inhibited increase of creatinine and BUN induced by cisplatin injection in serum. Collectively, our data suggest that BSTE could be a therapeutic agent for reducing kidney injury induced by cisplatin treatment in cancer patients.

keywords : *Banhasasim-tang*, Cisplatin, Nephrotoxicity, Cancer

서 론

시스플라틴(cisplatin)은 백금 복합체로서 임상에서 항암 효과 가 뛰어나 고환암, 방광암, 전립선암, 난소암, 두경부암, 폐암 등 다양한 고형암의 치료제로 사용되고 있다^{1,2)}. 그러나 시스플라틴은 내성을 야기하거나, 오심, 구토, 식욕부진, 체중 감소 등과 같은 부작용을 나타내며^{3,4)}, 청각 및 신장 손상이 가장 두드러진 부작용으로 알려져 있다⁵⁾. 최근 시스플라틴에 의한 신장 독성에 대한 한약재 추출물들의 방어효과가 보고되고 있다⁶⁻⁸⁾.

반하사심탕(半夏瀉心湯)은 장중경(張仲景)의 「상한론(傷寒論)」⁹⁾에 최초로 수록된 후 허준의 「동의보감(東醫寶鑑)」¹⁰⁾에도 수록되어 있는 처방으로 반하(생강초), 인삼, 감초, 황금, 건강, 생강, 대조 및 황련 등 8가지 한약재로 구성되어 있으며 임상에서 오심, 구토, 위하수, 위궤양, 설사 등의 소화기계 질환에 사용되고 있다. 암환자의 시스플라틴 요법에 의한 부작용은 소화기계가 질환이 주 증상으로 나타나나 이와 더불어 신장 독성 또한 심각하게 여겨지고 있는 실정이다. 한의학에서 소화기계 질환에 유용하게 사용하고 있는 반

하사심탕의 시스플라틴에 유도 신장독성에 대한 효능은 보고되지 않았다.

본 연구에서 시스플라틴에 의해 발생하는 신장 독성에 대한 반하사심탕 추출물의 방어효과를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

C57BL/6 수컷 마우스 6주령 (20-24 g) 30마리 (오리엔트바이오, 경기도)를 사료 (삼양사, 서울)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 1주일간 적응시킨 후, 총 3군으로 구분하여 각 군당 10마리씩 실험에 사용하였다.

2. 반하사심탕 추출물 분리

반하사심탕은 아래의 Table 1와 같이 8가지 한약재로 구성되어 있으며, 추출물의 분리를 위하여 8가지 한약재를 비율대로 조제

* Corresponding author

Kang Beom Kwon, Department of Physiology, School of Korean Medicine, Wonkwang University, 460, Iksandae-ro, Iksan, Republic of Korea

·E-mail : dession@wku.ac.kr ·Tel : +82-63-850-6917

·Received : 2018/04/17 ·Revised : 2018/10/17 ·Accepted : 2018/10/24

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2018.10.32.5.328>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

하여 총 75 g의 반하사심탕에 1,500 ml 증류수를 가한 후 2시간 동안 100°C에서 전당한 후 농축, 동결건조 과정을 거쳐 11.78 g의 추출물을 획득 (수율:15.7%)하여 실험에 사용하였다. 반하사심탕 구성 한약재는 원광대학교 한의과대학 본초학교실 이금산 교수에게 검증받은 후 사용하였다.

Table 1. Banhasasintang composition

한약재	생약명	비율(%)
반하(半夏)	<i>Pinelliae Tuber</i>	20
인삼(人蔘)	<i>Ginseng Radix</i>	15
감초(甘草)	<i>Glycyrrhizae Radix Preparata</i>	15
황금(黃芩)	<i>Scutellariae Radix</i>	15
건강(乾薑)	<i>Zingiberis Processum Rhizoma</i>	10
생강(生薑)	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	10
대조(大棗)	<i>Ziziphi Jujubae Fructus</i>	10
황련(黃連)	<i>Coptidis Rhizoma</i>	5

3. 신장 독성 모델 및 반하사심탕 투여

실험군은 총 3개의 군으로 정상군, 시스플라틴 투여군, 시스플라틴과 반하사심탕 추출물 투여군이다. 1,000 mg/kg의 반하사심탕 추출물을 20 mg/kg 시스플라틴을 복강내 (I.P.)로 투여하기 7일 전부터 총 10일간 경구 투여하였으며, 시스플라틴 투여 3일 후에 전혈 및 조직을 확보하였다. 전혈에서 혈청을 분리하여 creatinine 및 BUN (blood urea nitrogen) 분석 등에 사용하였으며 신장조직은 포르말린에 고정 후 조직학적 분석을 수행하였다.

4. 체중 측정

실험동물의 체중은 전자체중계로 동일 시간 동일 조건에서 측정하였고 실험 개시일 체중 대비 실험 종료일 체중을 측정하여 감소율(%)로 표시하였다.

5. 혈청 creatinine 및 BUN 측정

마우스 안와에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻었다. 신장 기능을 측정하는 creatinine 및 BUN의 혈청 내 양은 제자사(Asan Pharm. Co., 화성, 경기도)에서 제공하는 프로토콜에 따라 측정하였다.

6. Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색

실험 종료 후 신장조직의 형태학적 및 조직학적 변화를 관찰하기 위해 H&E 염색을 수행하였다. 적출한 신장을 고정한 후 탈수 및 파라핀 블록을 만들고 5 µm의 두께로 절편하여 hematoxylin 용액에 10초 동안 담가 둔 후 흐르는 물에서 세척하고, eosin 용액에 20초 동안 담가 둔 후 다시 세척하였다. 탈색 (destaining) 과정을 수행하기 위해 50, 70, 90 % 알코올에서 각각 30 초 동안 담가 두었고, xylene에 1분 동안 세척하여 coverslip을 씌워 광학 현미경으로 관찰하였다.

7. PAS(periodic-acid-Schiff) 염색

실험 종료 후 확보된 신장조직에서 관류조직의 정량적 손상 정도를 비교하기 위하여 PAS 염색을 수행하였다. 신장 조직을 5 µm

로 절편 하여 periodic acid에 10분간 담가 둔 후 물에서 세척하고, Schiff 용액에 37°C에서 30분간 염색한 후 다시 세척한다. Sulphurous acid 용액에 담가 둔 후 물에서 분홍색이 될 때까지 세척한 후, mayer hematoxylin으로 30분간 대조 염색 후 세척하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

8. 면역조직화학 염색

신장조직에서 염증성사이토카인의 하나인 TNF-α 발현 정도를 조사하기 위하여 면역조직화학염색법을 시행하였다. 실험 종료 후 확보된 신장조직 블록을 5 µm의 두께로 절편하고 Bouin 용액에서 고정한 다음 에탄올용액에서 탈수시킨 후, 0.3% 과산화수소 용액에 5분간 노출시켜 endogenous peroxidase를 제거하였다. 1.5% goat serum으로 비특이적 항체 반응을 제거한 후, TNF-α 1차 항체 (Santa Cruz, CA, USA)에 24시간 동안 반응시킨 다음 PBS를 이용하여 세척하였다. 2차 항체는 제자사가 제시한 방법 (LSAB+System-HRP; Dako, CA, USA)에 따라 반응시킨 후, 발현하는 부분은 DAB+chromogen 기질을 이용하여 발색하였으며, 정량 분석은 IHC-processed kidney specimens에 근거하였으며 software Image v. 1.46을 사용하였다.

9. 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차(mean ± S.D.)로 표기하였으며, SPSS 22.0 program을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 다음 least-significant differences test로 사후 검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였다. 유의수준 p-value <0.05에서 검정하였다.

결 과

1. 시스플라틴 유도 체중 감소 및 혈청 creatinine과 BUN에 대한 반하사심탕 추출물의 효과

시스플라틴 투여 후 나타나는 체중 감소에 대한 반하사심탕의 효과를 조사하기 위하여 시스플라틴을 투여하기 7일 전부터 1000 mg/kg 반하사심탕 추출물(BSTE)을 경구 투여한 후 체중의 변화량을 측정하였다. 그 결과 20 mg/kg 시스플라틴 투여군은 대조군 (3.0±0.1)에 비해 19.9±0.7% 감소율이 증가(p<0.05) 하였으나, 반하사심탕 추출물 투여군의 체중 감소율은 12.4±1.1%로 시스플라틴 투여군과 비교하여 유의하게 변화 (p<0.05)하였다(Fig. 1A).

실험 종료 후 얻어진 마우스 혈액에서 신장 손상의 지표인 creatinine과 BUN을 조사한 결과 시스플라틴 투여군은 각각 1.12±0.01, 144.6±12.3 mg/dL로 대조군에 비해 유의하게 증가 (p<0.05)하여 시스플라틴 투여에 따른 신장 독성을 확인할 수 있었으며 반하사심탕 추출물 투여군의 creatinine과 BUN은 각각 0.79±0.16, 94.42±32.7 mg/dL로 시스플라틴 투여군에 비해 유의하게 감소 (p<0.05)되는 것을 확인하였다(Fig. 1B).

2. 시스플라틴 유도 신장 조직 손상에 대한 반하사심탕 추출물의 억제 효과

시스플라틴 투여 후 나타나는 신장 조직 손상에 대한 반하사심탕의 방어효과를 조사하기 위하여 시스플라틴을 투여하기 7일 전부터 1,000 mg/kg 반하사심탕 추출물 (BSTE)을 경구 투여한 후 신장의 조직학적 손상 정도를 조사하였다. 그 결과 20 mg/kg 시스플라틴 투여군의 사구체 손상 정도는 대조군 ($7.84 \pm 3.0\%$)에 비해 $39.97 \pm 5.0\%$ 로 증가 ($p < 0.05$) 하였으나, 반하사심탕 추출물 투여군은 $18.99 \pm 5.0\%$ 로 시스플라틴 투여군과 비교하여 유의하게 감소 ($p < 0.05$)하였다(Fig. 2A).

또한 관류조직의 손상 정도를 분석한 결과 시스플라틴 투여군에서 대조군과 비교하여 유의하게 증가 ($p < 0.05$) 하였으나 반하사심탕 추출물 투여군은 통계적으로 유의하지 않았으나 시스플라틴 투여군에 비해 감소하였다(Fig. 2B).

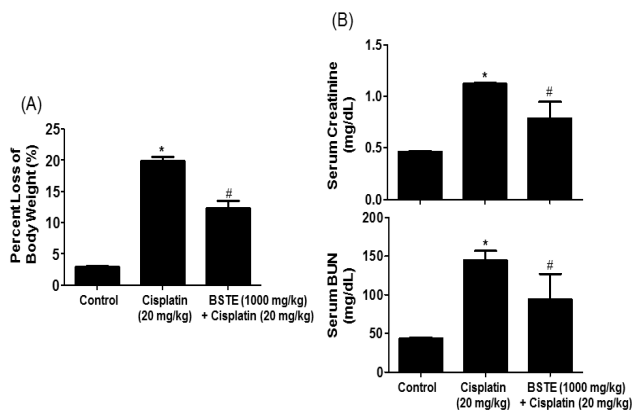


Fig. 1. Effects of Banhasasim-tang extract (BSTE) on cisplatin-induced body weight loss, serum creatinine, and BUN concentrations in C57BL/6 mice. Data are mean \pm S.D. values (N=10). *, $p < 0.05$ vs. control group; #, $p < 0.05$ vs. Cisplatin group.

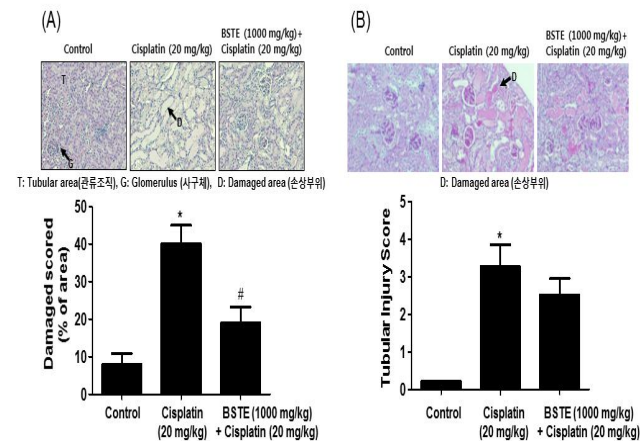


Fig. 2. Effects of Banhasasim-tang extract (BSTE) on cisplatin-induced kidney (A) and tubular (B) injury in C57BL/6 mice. Data are mean \pm S.D. values (N=10). *, $p < 0.05$ vs. control group; #, $p < 0.05$ vs. Cisplatin group.

3. 시스플라틴 유도 TNF- α 발현에 대한 반하사심탕 추출물의 억제 효과

시스플라틴에 의해 증가하는 대표적 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 신장 조직 내 발현에 대한 반하사심탕의 조절효과를 면

역조직화학적 방법을 이용하여 조사하였다. 시스플라틴을 투여하기 7일 전부터 1,000 mg/kg 반하사심탕 추출물 (BSTE)을 경구 투여한 후 TNF- α 발현 정도를 조사한 결과 20 mg/kg 시스플라틴 투여군의 TNF- α 발현은 대조군 ($0.34 \pm 0.03\%$)에 비해 $29.2 \pm 6.0\%$ 로 증가 ($p < 0.05$)하였으나, 반하사심탕 추출물 투여군은 $20.0 \pm 5.1\%$ 로 시스플라틴 투여군과 비교하여 유의하게 감소 ($p < 0.05$)되는 것을 확인하였다(Fig. 3).

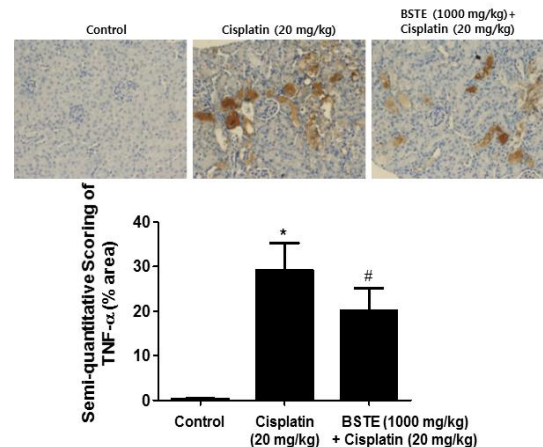


Fig. 3. Effects of Banhasasim-tang extract (BSTE) on cisplatin-induced TNF- α expression in C57BL/6 mice. Data are mean \pm S.D. values (N=10). *, $p < 0.05$ vs. control group; #, $p < 0.05$ vs. Cisplatin group.

고 찰

본 연구에서 반하사심탕 추출물은 시스플라틴에 의한 신장 손상을 유의하게 억제하였다.

시스플라틴은 항암효과가 뛰어나 다양한 고형암 치료제로 사용되고 있으나 청각 및 신장 손상 등과 같은 부작용을 일으켜 항암 치료효율의 감소 및 암환자의 삶의 질을 저해 시키는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 한편, 시스플라틴에 의한 신장 손상을 억제하기 위하여 이노제 투여에 의한 수화(hydration)요법^{11,12)}, glutathione 요법¹³⁾ 등이 사용되고 있으며, 실험적으로 한약재 추출물이 신장 독성을 방어한다고 보고되고 있다⁶⁻⁸⁾. 이러한 노력들은 암환자의 삶의 질과 밀접하게 관련되어 있어 향후 의료 시장에서 수요는 증가할 것으로 예상되고 있다.

반하사심탕은 임상에서 소화기 관련 증상, 즉 오심, 구토, 위하수, 위궤양, 설사 등의 증상에 빈번하게 사용되는 처방으로 암과 관련된 반하사심탕 추출물의 연구 보고로는 위암 환자에게서 항암제 사용으로 인해 발생하는 구강점막염에 대한 보호 효과¹⁴⁾, 방사선과 항암제 치료를 받고 있는 두경부암 환자의 구강점막염 개선 효과¹⁵⁾가 있다. 반면에 반하사심탕의 소화기 증상에 대한 효과 이외에 신장 손상에 대한 조사는 보고되지 않았다.

본 연구에서 C57BL/6 마우스에 20 mg/kg의 시스플라틴을 복강 내로 주입한 후 3일에 19.9%의 체중감소(Fig. 1A), 혈청 내 creatinine 및 BUN 농도의 증가(Fig. 1B), 신장 조직의 손상(Fig. 2)이 유발되었다. 그러나 반하사심탕 추출물을 시스플라틴 투여하기 7일 전부터 시스플라틴 투여기간 동안, 총 10일 투여한 군의 체

중은 12.4% 감소하여 시스플라틴에 의한 체중 감소를 유의하게 억제하였다. 또한 반하사심탕 추출물은 신장의 독성 지표물질인 creatinine과 BUN 농도를 유의하게 감소시켜 시스플라틴에 의한 체중 감소 억제와 더불어 시스플라틴에 의한 신장 독성을 유의하게 방어한 것으로 확인된다. 시스플라틴에 의한 신장 독성은 관류조직의 손상이 우선적으로 나타나며 관류조직의 팽창, 액포형성 및 세포괴사 등으로 확인할 수 있으며 Fig. 2에서 나타났듯이 반하사심탕 추출물의 투여는 시스플라틴에 의한 관류조직의 손상을 (52.5%) 유의성 있게 감소시켰다(23.2%). 이러한 결과는 실험적으로 반하사심탕 추출물은 시스플라틴에 의한 신장 손상을 방어한다는 것을 시사한다.

최근 시스플라틴에 의한 신장 독성 유발 기전에 다양한 요인들이 관여하는 것으로 알려지고 있으나 그 중 대표적인 전사 인자가 NF- κ B이다¹⁶⁾. NF- κ B는 p50, p65, I κ B α 3가지 단백질의 형태로 자극이 없는 조건에서 세포질 내 존재하다가 활성산소 등과 같은 자극인자에 의해 활성화되어 핵 내로 이동하고 염증성 사이토카인의 발현을 증가시켜 신장 조직 손상을 유발한다¹⁶⁾. 신장 독성을 야기하는 다양한 사이토카인 중 TNF- α 의 역할이 주목받고 있다¹⁷⁾. 본 연구에서 시스플라틴에 의한 신장독성을 반하사심탕 추출물이 방어하는 기전에 TNF- α 발현 감소가 관여되어 있는지 면역조직화학염색법을 이용하여 조사하였다. 시스플라틴을 투여한 군은 대조군에 비해 유의하게 TNF- α 의 발현이 증가하였으나 반하사심탕 투여군은 시스플라틴 투여군과 비교하여 31.5% 감소시켰다(Fig. 3). 이러한 결과는 반하사심탕 추출물의 시스플라틴 유도 신장 독성에 대한 방어효과 기전에 TNF- α 발현의 감소가 관여되어 있음을 간접적으로 시사한다. 그러나 그 기전에 TNF- α 이외의 다른 사이토카인, 활성산소 등의 역할을 배제할 수는 없다.

종합해 보면, 반하사심탕 추출물은 시스플라틴에 의한 부작용 중 신장 독성을 유의하게 억제하였으며 그 기전에 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 발현이 관여하였다. 이러한 결과는 반하사심탕이 실험적, 임상적으로 효과를 나타낸 소화기 질환 이외에 시스플라틴에 의한 신장 독성을 방어하는 제제를 개발하는데 기초 자료로 이용될 것으로 사료된다.

결 론

반하사심탕의 시스플라틴에 의한 신장 독성 완화 효과를 조사하기 위하여 정상 마우스에 시스플라틴을 주입하기 전에 반하사심탕 추출물을 경구 투여한 후 시스플라틴에 의한 신장 손상에 대한 억제 효과 및 기전을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

반하사심탕 추출물은 시스플라틴에 의한 체중 감소, creatinine과 BUN 증가를 유의하게 억제하였다.

반하사심탕 추출물은 시스플라틴에 의한 신장 조직의 손상을 유의하게 억제하였다.

시스플라틴에 의한 반하사심탕 추출물의 방어효과 기전에 TNF- α 발현의 감소가 관여하였다.

이상의 결과를 토대로 시스플라틴에 의한 부작용을 완하시키는 임상연구를 진행할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건 의료기술연구개발사업 지원에 의하여 이루어진 것임 (과제고유번호:HI14C0750).

References

1. Krarup-Hansen A, Helweg-Larsen S, Schmalbruch H, Rørth M, Krarup C. Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: prospective clinical and neurophysiological studies. *Brain* 2007;130:1076-88.
2. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and strategies. *Kidney Int.* 2008;73:994-1007.
3. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2007;7:573-84.
4. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 2014;740:364-78.
5. Nicolao P, Giometto B. Neurological toxicity of ifosfamide. *Oncology* 2003;65:11-6.
6. Ju SM, Kim SH, Kim YM, Jeon BH, Kim WS. Mechanism of Cisplatin-induced Apoptosis and Bojungbangam-tang-mediated Antiapoptotic Effect on Cell Proliferation in Rat Mesangial Cells. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 2013;27:43-8.
7. Kim DG, Kim KJ, Ju SM, Kim YI, Choi HS, Keum KS, Kim WS, Gao YA, Jeon BH. Protective effect of Ganopoly and Ganopoly/C+ on nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 2003;17:316-25.
8. Kim JY, Kim CH. Effect of Zizyphi Spinosae Extract on Cisplatin and t-Butylhydroperoxide Induced Acute Renal Failure in Rabbits. *Journal of Life Science* 2014;24:777-83.
9. Zhang ZJ. *Shanghanzabinglun*, Han dynasty, 200-210: hanhanlun. Seoul:Daesungmunhwasa: 1993. 112 p.
10. Heo, J. *Donguibogam*, Namsandang, Seoul, 2007. p 397.
11. Ozols RF, Corden BJ, Jacob J, Wesley MN, Ostchega Y, Young RC. High-dose cisplatin in hypertonic saline. *Ann. Intern. Med.* 1984;100:19-24.
12. Gandara DR, Perez EA, Phillips WA, Lawrence HJ, DeGregorio M. Evaluation of cisplatin dose intensity: current status and future prospects. *Anticancer Res.* 1989;9:1121-8.
13. Oriana S, Bohm S, Spatti G, Zunino F, Di Re F. A preliminary clinical experience with reduced glutathione as protector against cisplatin toxicity. *Tumori.*

- 1987;73:337-40.
14. Aoyama T, Nishikawa K, Takiguchi N, Tanabe K, Imano M, Fukushima R, Sakamoto J, Oba MS, Morita S, Kono T, Tsuburaya A. Double-blind, placebo-controlled, randomized phase II study of TJ-14 (hangeshashinto) for gastric cancer chemotherapy-induced oral mucositis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2014;73:1047-54.
 15. Yamashita T1, Araki K, Tomifuji M, Kamide D, Tanaka Y, Shiotani A. A traditional Japanese medicine--Hangeshashinto (TJ-14)--alleviates chemoradiation-induced mucositis and improves rates of treatment completion. *Support. Care Cancer.* 2015 Jan;23(1):29-35.
 16. Storck M, Schilling M, Prestel R, Abendroth D, Burkhardt K, Hammer C. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in exvivo xenogeneic kidney perfusion. *Transplant International* 1994;7:647-9.
 17. Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *Journal of Clinical Investigation* 2002;110:835-42.