

[報 文]

오미자성분 Schizandrin의 Cisplatin 유도 신장 독성에 대한 억제효과

박 선 영 · 정 세 영

경희대학교 약학대학

Inhibitory Effect of Schizandrin on Nephrotoxicity of Cisplatin

Seon Young Park and Se Young Chung

Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University,
Hoegi-Dong, Dongdaemun-Ku, Seoul, Korea

ABSTRACT

Cisplatin is one of the most effective antitumor agents currently available for cancer chemotherapy. However its clinical use has been limited by its severe side effects, especially nephrotoxicity. To evaluate the effect of schizandrin, one of radical scavengers and constituents of *Schizandra chinensis*, cisplatin and schizandrin were given intraperitoneally. Protective effect of schizandrin against nephrotoxicity of cisplatin was observed when schizandrin was administered to rats 1,24 hr after cisplatin injection. Hepatotoxicity induced by combination treatment of cisplatin and schizandrin was evaluated by measuring sGPT and sGOT. Combination treatment did not affect the levels of sGPT and sGOT. The present result indicate that schizandrin when it is given after cisplatin, may provide protection against cisplatin nephrotoxicity without hepatotoxicity.

서 론

Cisplatin은 그 사용범위가 광범위하여 고환암, 식도암, 난소암, 방광암, 뇌종양, 위암, 폐암, 자궁경부암, 전립선암, 골육종 등의 암에 널리 쓰이며^{1)~9)} 특히, 생식기계통의 암에 가장 많이 쓰이는 항암제이나 그 독성 즉, 신독성, 이독성, 골수독성, 위장관장해, allergy 등의 독성 그 중에서도 신장독성으로 인하여 임상적인 사용에 큰 제한을 받고

있다.^{10)~13)} 따라서 cisplatin의 가장 큰 독성인 신독성을 감소시키는 방법을 찾아내는 것은 효과적이면서 안전한 항암요법의 개발이라는 점에서 아주 중요하다고 볼 수 있다. 현재 이 신독성을 감소시키기 위해 행해지고 있는 많은 시도가 크게 세가지 방향에서 이루어지고 있다.¹⁴⁾

첫째, 신장독성이 적은 유도체를 합성하는 것이다. 그 예로는 carboplatin (CBDCA)가 있는데 carboplatin은 cisplatin보다 안정하여 신장독성이 적지만 골수 독성이 매우 강하다는 단점을 가지고

있다.

두 번째로 배설을 촉진시켜 독성을 감소시키는 방법이 있다. 그 예로는 mannitol 병용투여 또는 hypertonic saline 병용투여 등이 있는데 이는 cisplatin 반감기를 짧게 함으로써 효과를 감소시키는 결과를 초래한다.

세 번째로는 cisplatin의 독성을 감소시키는 물질의 개발을 들 수 있는데, 여기에 관해 그동안 이루어져 온 연구에 관해 세가지로 나누어 고찰하면 먼저 Se를 투여하여 생체내 항산화인자인 GSH의 합성을 촉진시켜 체내 방어 기전을 상승시키는 것이 있고, 다음으로 bismuth subnitrate 등의 중금속을 투여하여 체내에서 metallothionein의 합성을 유도하여 cisplatin과의 결합에 의해 독성 감소를 일어나게 하는 것이 있으나 이 방법은 중금속 자체 독성을 고려해야 하고 역시 cisplatin 효과를 감소시키는 결과를 가져올 수도 있다. 마지막으로 two-route chemotherapy (TRC)로써 cisplatin과 그 해독물질을 병용투여하는 방법들이 있다. 여기에는 sod, thiosulfate, diethyldithiocarbamate (DDTC), α -tocopherol, N-N'-diphenyl-p-phenylenediamine, o-(β -hydroxyethyl)route side, aminooxyacetic acid, γ -glutamyltranspeptidase 등의 물질이 연구되고 있다.

본 연구에서는 cisplatin의 신장독성기전이 cisplatin이 DNA와 결합하여 나타나는 항암기전과 다르다는 점, cisplatin이 투여후 근위세뇨관에 빠르게 축적되며 항암작용을 나타내는 농도 이하에서 강한 신장독성이 발현된다는 점과 cisplatin 등에 의해 지질과산화의 증가, GSH level감소가 현저하게 보이며, cisplatin의 중심금속인 백금이 인체내 주된 면역세포인 neutrophil 등에 의해서 이물질로 인식될 수 있는 점을 종합하여 cisplatin의 신장독성기전으로 cisplatin이 neutrophil을 특이적으로 자극해 respiratory burst를 일으키게 하여 세포독성물질인 oxygen radical을 생산케 함으로써 지질과산화 등의 신장세포에 대해 독성을 유발할 것이라는 점에 착안하여 radical scavenger 능력이 큰 오미자의 약효성분 schizandrin을 사용하여 cisplatin의 항암효과를 감소시키지 않고 독성을 감소시켜 주는지 여부를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

실험에 사용한 schizandrin은 새한제약에서 공급 받았으며 GOT, GPT, BUN, Creatinine 측정용 kit는 영동제약 것을, cisplatin을 포함한 그 외의 시약은 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험동물

본 실험에 사용된 female SD rat은 식품 의약품 안전성 독성 연구원에서 분양 받아 4주 이상 실험사육장에서 적응시킨 후 체중이 200g 전후일 때 실험에 사용하였다. 사료는 고품사료(삼양사)를 사용하였고 사료의 조성은 조단백 21%, 조지방 3.5%, 조셀룰로오스 5.0%, 무기질 8.0% 등이었다. 급수는 일반 상수도수를 사용하였으며, 사료와 급수는 제한하지 않았다.

3. 동물처치

Schizandrin을 용량별(cisplatin과 molar ratio 1:1, 1:5, 1:10)로 투여하였다. 또 schizandrin을 cisplatin과 molar ration 1:10으로 고정하여 전, 후, 동시투여 및 반복 투여를 실시하였다. 반복투여는 이틀동안 schizandrin을 cisplatin투여 한 시간 전에 투여했는데, 첫 번째 군은 cisplatin 투여 2일전 부터 2일 동안, 두 번째군은 cisplatin 투여 1일전 부터 투여하기 시작해서 그다음 날까지, 세 번째군은 cisplatin 투여한 날부터 그다음 날까지 투여하였다.

4. 혈청분리

4일째 되는 날에 diethyl ether로 가볍게 마취시킨 뒤 심장채혈하여 혈액을 채취한 후 실온에서 30분간 방치하였다. 실온에서 30분간 방치시킨 혈액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액인 혈청을 분리하였다.

5. 간독성 지표측정 (sGOT, sGPT)

GOT 및 GPT 기질용액 1ml을 취해 37°C에서 3분간 배양한 후 serum 0.2ml을 취해 혼합하고 37°C에서 GOT는 1시간, GPT는 30분간 배양하였다. 여기에 2,4-dinitrophenylhydrazine 1ml을 가하

고 상온에서 20분간 방치후 0.4N-NaOH 10ml을 가하고 진탕후 505 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

6. BUN 측정

Urease 0.1 ml을 완충액 20 ml에 섞어 만든 효소 완충액 2개에 각각 혈청과 기준액 (60 mg/100 ml Urea-N) 0.02 ml을 넣고 37°C에서 15분간 배양한 후 발색액을 각각 2 ml씩 넣고 37°C에서 5분간 배양하였다. 570 nm에서 흡광도를 측정한 후 BUN의 양을 구하였다.

7. Creatinine 측정

0.5 ml의 혈청에 4 ml의 tungstic acid 용액을 가한 다음 격렬히 흔들고 10분간 방치후 1,500 g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리한 상등액, creatinine 표준액 그리고 증류수 (blank) 3 ml을 시험관에 가하고 picrate 용액 1 ml 및 0.5 ml 1.4 N-NaOH를 가한 다음 잘 흔들고 정확히 15분후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

1. Schizandrin 투여 용량 변화에 따른 독성 억제효과

Schizandrin을 투여 용량을 달리하여 cisplatin (5.8 mg/kg) 투여 한시간 전투여했을 때의 BUN level 변화를 보았다 (Fig. 1).

Cisplatin과 schizandrin의 molar ratio가 1:5, 1:10일 때 cisplatin의 신장 독성을 약간 감소시켰으며 1:1에서는 오히려 신장 독성이 cisplatin의 자체 독성보다도 더 증가하였다. 또 다른 신장 독성 지표인 creatinine치는 cisplatin과 molar ratio가 1:5, 1:10일 때 50% 정도로 감소되었으며 이는 BUN level 변화 결과와 일치하였다 (Fig. 2).

신장 독성억제를 위해 cisplatin과 combination treatment한 schizandrin투여 용량 증가에 따른 간 독성 유발 여부를 보기위해 간 독성의 임상 지표인 sGOT, sGPT치를 측정하였다 (Figs. 3, 4).

결과는 비슷하거나 오히려 sGOT, sGPT level이 cisplatin 단독 투여한 경우보다 증가하여 간 독성을 나타낸 것으로 보인다. 특히 molar ratio가 1:5에서 현저하게 간 독성이 증가하였다.

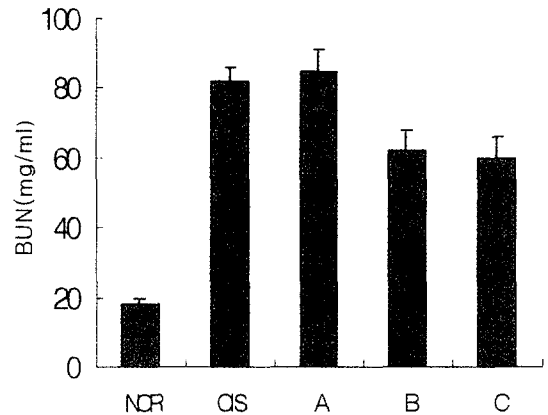


Fig. 1. Inhibitory effect of schizandrin on nephrotoxicity of cisplatin Control animals were given injection of saline Data are given as means±SE (n=5) NOR:Normal CIS:Cisplatin alone A: Cisplatin:Schizandrin=1:1(molar ratio) B: Cisplatin:Schizandrin=1:5(molar ratio) C: Cisplatin:Schizandrin=1:10(molar ratio)

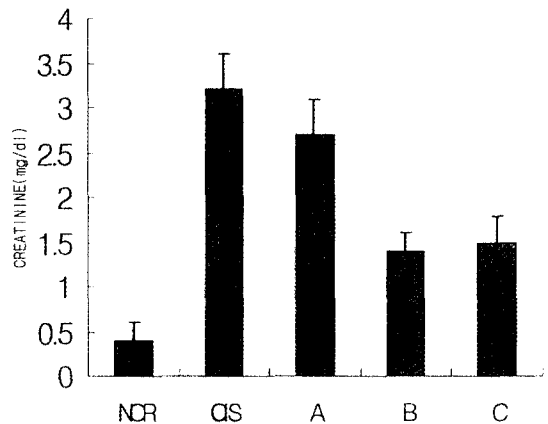


Fig. 2. Inhibitory effect of schizandrin on nephrotoxicity of cisplatin Control animals were given injection of saline Data are given as means±SE (n=5) NOR:Normal CIS:Cisplatin alone A: Cisplatin:Schizandrin=1:1(molar ratio) B: Cisplatin:Schizandrin=1:5(molar ratio) C: Cisplatin:Schizandrin=1:10(molar ratio)

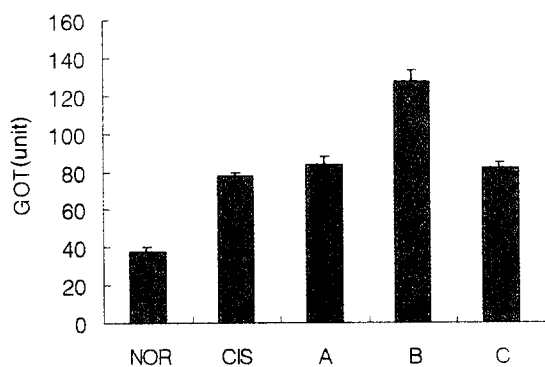


Fig. 3. Inhibitory effect of schizandrin on hepatotoxicity of cisplatin Control animals were given injection of saline
Data are given as means \pm SE (n=5)
NOR: Normal CIS: Cisplatin alone
A: Cisplatin:Schizandrin=1:1(molar ratio)
B: Cisplatin:Schizandrin=1:5(molar ratio)
C: Cisplatin:Schizandrin=1:10(molar ratio)

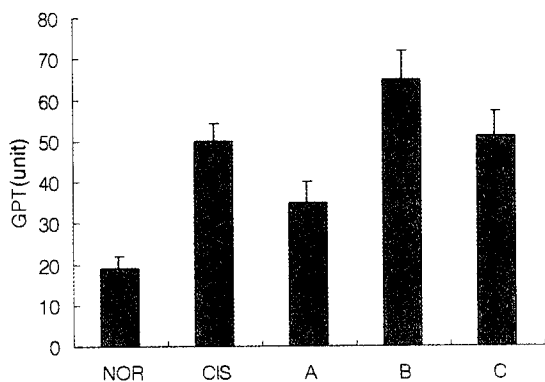


Fig. 4. Inhibitory effect of schizandrin on hepatotoxicity of cisplatin Control animals were given injection of saline
Data are given as means \pm SE (n=5)
NOR: Normal CIS: Cisplatin alone
A: Cisplatin:Schizandrin=1:1(molar ratio)
B: Cisplatin:Schizandrin=1:5(molar ratio)
C: Cisplatin:Schizandrin=1:10(molar ratio)

2. Schizandrin 투여 시기 변화에 따른 cisplatin 독성 억제 효과

한시간 전 투여에서 효과가 좋았던 schizandrin의 molar ratio가 1:10을 cisplatin 투여 한시간

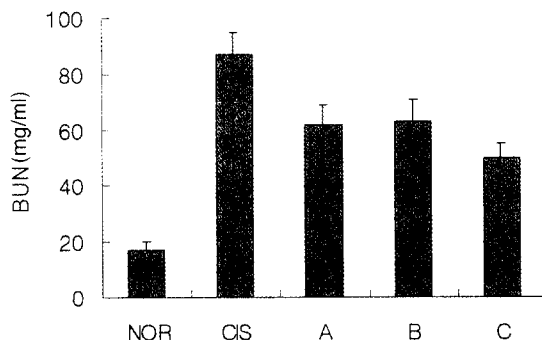


Fig. 5. Inhibitory effect of schizandrin on nephrotoxicity of cisplatin Control animals were given injection of saline
Data are given as means \pm SE (n=5)
NOR: Normal CIS: Cisplatin alone
A: Cisplatin:Schizandrin=1:1(molar ratio)
B: Cisplatin:Schizandrin=1:5(molar ratio)
C: Cisplatin:Schizandrin=1:10(molar ratio)

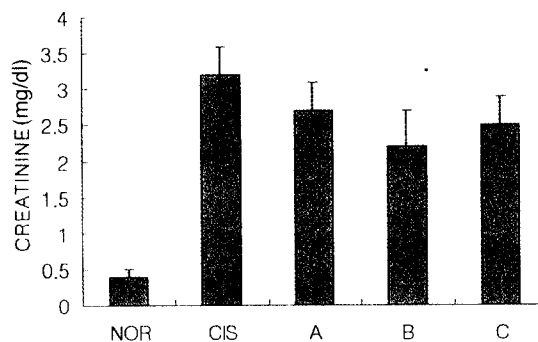


Fig. 6. Inhibitory effect of schizandrin on nephrotoxicity of cisplatin Control animals were given injection of saline
Data are given as means \pm SE (n=5)
NOR: Normal CIS: Cisplatin alone
Cisplatin:Schizandrin=1:10(molar ratio)
A: 1hr pretreatment
B: Simultaneous treatment
C: 1hr posttreatment

전, 후, 동시 투여하여 BUN level 변화를 보았다. (Fig. 5)

Cisplatin 투여 한시간 후에 투여한 군에서 cisplatin 신장 독성을 약 42% 감소시켰다. 동시 투여한 군과 한시간 전 투여한 군은 또 다른 신장

독성 지표인 creatinine치 측정 결과에서도 동일하게 동시 투여와 후 투여에서 전투여보다 더 많은 감소를 보았다(Fig. 6).

간장 독성 지표인 sGOT, sGPT치 측정 결과에서는 sGOT의 경우에는 후투여에서 현저하게 감소하였으며 전, 동시 투여에서는 cisplatin 단독 투여한 경우보다 증가한 양상을 보였다. sGPT의 경우에는 cisplatin 단독 투여한 경우보다 약간씩 낮아진 것으로 나타났다(Figs. 7, 8).

3. Schizandrin 반복 투여에 의한 신장 독성 억제 효과

한시간 전투여에서 효과가 좋았던 cisplatin과 schizandrin의 molar ratio 1:10을 선택하여 schizandrin을 이틀 동안 반복 투여하였다. 첫 번째 group은 cisplatin투여 2일전부터 2일 동안, 두 번째 group은 cisplatin투여 1일전부터 투여하기 시작해서 그 다음날까지, 세 번째 group은 cisplatin 투여한 날부터 그 다음날까지 투여하였다. 이렇게 해서 BUN level을 측정한 결과 cisplatin의 신장 독성을 감소시키지 못했고 마지막 group에서는 오히려 신장 독성이 증가한 것으로 나타났다(Fig. 9).

또 다른 신장 독성 지표인 creatinine치 측정 결

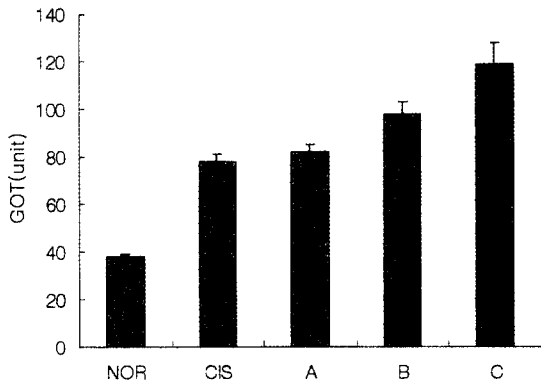


Fig. 7. Inhibitory effect of schizandrin on hepatotoxicity of cisplatin Control animals were given injection of saline
Data are given as means±SE(n=5)
NOR:Normal CIS:Cisplatin alone
Cisplatin:Schizandrin=1:10(molar ratio)
A: 1hr pretreatment
B: Simultaneous treatment
C: 1hr posttreatment

과 cisplatin의 신장 독성을 약간 억제하는 것으로 보이나 앞 실험 결과에서 보다는 미미한 것으로 나타났다(Fig. 10).

간장 독성 지표인 sGOT, sGPT level 측정 결과 sGOT의 경우에는 두 번째, 세 번째 group에서 약간 감소하였으나 첫 번째 group에서 약간 감소하였으나 첫 번째 group에서는 훨씬 증가하였고 sGPT

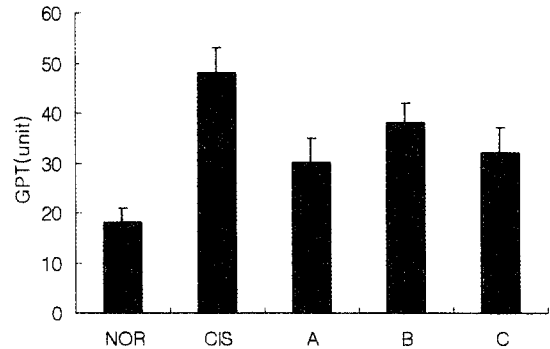


Fig. 8. Inhibitory effect of schizandrin on hepatotoxicity of cisplatin Control animals were given injection of saline
Data are given as means±SE(n=5)
NOR:Normal CIS:Cisplatin alone
Cisplatin:Schizandrin=1:10(molar ratio)
A: 1hr pretreatment
B: Simultaneous treatment
C: 1hr posttreatment

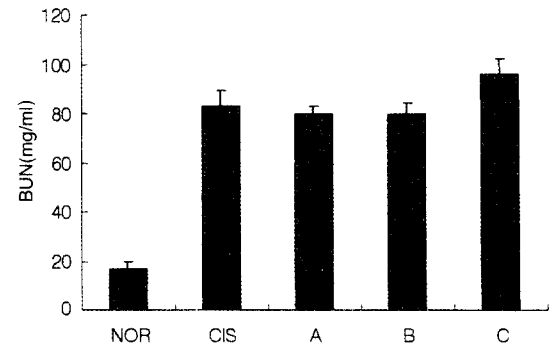


Fig. 9. Inhibitory effect of schizandrin on nephrotoxicity of cisplatin Control animals were given injection of saline Data are given as means±SE(n=5)
NOR:Normal CIS:Cisplatin alone
Cisplatin:Schizandrin=1:10(molar ratio)

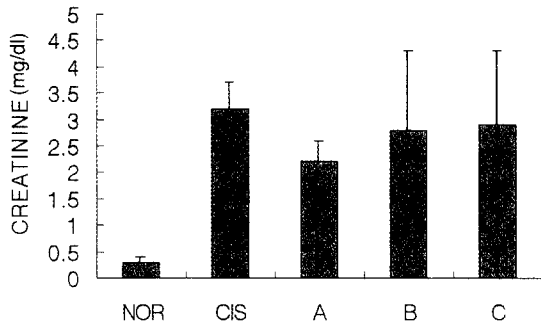


Fig. 10. Inhibitory effect of schizadrin on nephrotoxicity of cisplatin Control animals were given injection of saline
Data are given as means \pm SE(n=5)
NOR:Normal CIS:Cisplatin alone
Cisplatin:Schizadrin=1:10(molar ratio)

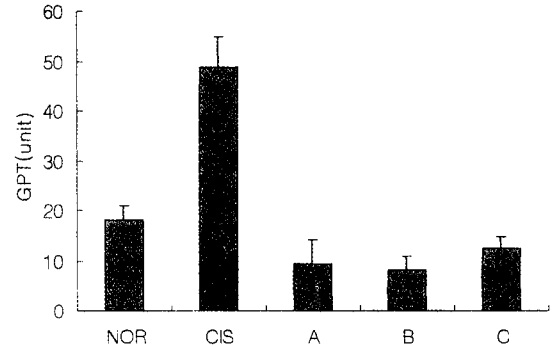


Fig. 12. Inhibitory effect of schizadrin on hepatotoxicity of cisplatin Control animals were given injection of saline
Data are given as means \pm SE(n=5)
NOR:Normal CIS:Cisplatin alone
Cisplatin:Schizadrin=1:10(molar ratio)

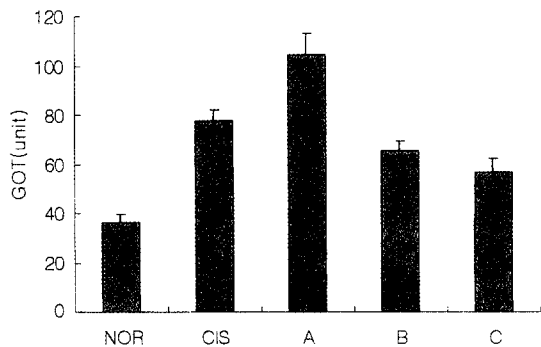


Fig. 11. Inhibitory effect of schizadrin on hepatotoxicity of cisplatin Control animals were given injection of saline
Data are given as means \pm SE(n=5)
NOR:Normal CIS:Cisplatin alone
Cisplatin:Schizadrin=1:10(molar ratio)

의 경우에는 모든 group에서 상당히 감소한 것으로 나타났다 (Figs. 11, 12).

고찰 및 결론

Cisplatin은 각종 암에 우수한 효과를 나타냄에도 불구하고 여러 가지 독성 특히, 신장 독성으로 인하여 임상적 사용에 크게 제한을 받고있는 항암제이다.

본 연구에서는 cisplatin의 신장 독성을 억제하는

물질로 radical scavenger인 schizadrin을 사용하여 우선 가장 많이 감소시키는 용량을 찾기위해 schizadrin의 투여 용량을 달리하여 투여해 보았다. 투여해 본 결과 cisplatin과 schizadrin의 molar ratio가 1:5와 1:10에서 비슷한 정도로 신장 독성 억제 효과를 보았다. 하지만 간장 독성의 임상 지표인 sGOT, sGPT치 측정 결과에서는 cisplatin 단독 투여한 경우와 비슷하거나 약간 증가한 것으로 나타나 간 독성 유발이 의심스러웠다. 이러한 현상은 schizadrin이 간의 여러 대사효소를 증가시켜 독성을 유발시키는 cisplatin 대사체가 간에서 증가되었기 때문이라고 추측되어진다.

용량별 투여 실험결과 가장 억제효과가 좋은 용량을 cisplatin과 schizadrin의 molar ratio가 1:10일 때로 정하고 1시간 전 투여, 동시 후투여하여 비교해 보았다. 그 결과 모든 group에서 cisplatin의 신장 독성을 억제하는 것으로 보였으나 후 투여나 동시 투여에서 효과가 좋은 것으로 나타났다. sGOT level에서는 후 투여에서 많이 감소했으나 전 투여나 동시 투여에서는 cisplatin 단독투여 보다도 증가하였고 sGPT level은 모든 group에서 감소하는 경향을 나타냈다.

전체적으로 살펴보면 후 투여한 경우에 전 투여에서보다 효과가 좋은 것으로 보이는데 이런 현상은 다음과 같은 가능성이 있다고 생각된다.

첫째, 간의 대사기능의 변화라는 측면으로 생각해 볼 수 있는데 schizadrin을 전 투여한 경우 간의

여러 가지 대사효소를 유도해서 cisplatin의 대사체 생성을 증가시켜 독성이 증가했다고 생각되고 반면 후 투여한 경우에는 cisplatin이 이미 간 대사를 거쳐 target site에 bind한 후 schizandrin을 투여해서 cisplatin의 대사체 생성이 증가되지 않으면서 free radical 제거라는 schizandrin 독성 억제 기능이 크게 나타난 것으로 생각할 수 있다.

둘째, 체내 분포, 배설에 따른 영향 면에서 살펴 보면 schizandrin 전 투여한 경우 cisplatin이 target site에 분포된 뒤 free radical을 생성시킬 때 쯤에 이미 schizandrin의 free radical scavenger 기능이 저하된 것이라 생각되고 반면 후 투여의 경우에 cisplatin을 투여한 지 한시간이 되면 cisplatin이 target site에 분포해서 신장 독성의 원인이 되는 free radical이 생성되는 시간과 일치하여 schizandrin의 free radical scavenger 기능에 의해 free radical을 제거하므로 cisplatin의 신장 독성을 감소시킬 수 있는 것이라 생각된다.

마지막으로 반복 투여 실험에서는 cisplatin의 신장 독성을 거의 억제하지 못하는 것으로 나타났고 반면 sGOT, sGPT치가 약간 감소한 양상을 나타냈다. 이는 schizandrin을 고용량으로 반복 투여해서 간에서 enzyme induction이 많이 되어 cisplatin의 대사가 신속하게 이루어지고 이 대사체가 신장으로 빨리 이송되어 cisplatin의 신장 독성 억제 효과는 감소한 반면에 cisplatin 대사체의 간 체류 속도가 짧아져 cisplatin의 간장 독성은 많이 회복시킨 것으로 생각되어진다.

참 고 문 헌

1. Stephen J. Lippard, New chemistry of an molecule : cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂], *Science*, **218**, 1075-1082(1982)
2. Marcel Rosenberg, Daniel D. Von Hoff, Milan Slavik and Franco M. Muggia, Cis-diamminedichloroplatinum : A new anticancer drug, *Ann. Int. Med.*, **86**, 803-812(1983)
3. Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko, J.E., et al., Platinum compounds : A new class of potent antitumor agents, *Nature (London)*, **222**, 385-386 (1969)
4. Brenbaum, M.C., Immunosuppression by platinum diammines. *Br.J. Cancer*, **25**, 208-211 (1972)
5. Beck, D.J., and Brubarker, R.R., Mutagenic properties of cis-platinum(II) diamminodichloride in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, **27**, 181-189(1975)
6. Samuels M.L., Holoyer P.Y., Johnson D.E., Bleomycin combination chemotherapy in the management of testicular neoplasia, *Cancer*, **36**, 318-356(1975)
7. Yagoda A, Watson R.C., Whitmore W.F., Adriamycin in advanced urinary tract cancer. Experience in 42 patients and review of the literature, *Cancer*, **39**, 279-285(1977)
8. Ellerby R.A., Davis H.L.Jr., Ansfield F.J., Phase I clinical trial of combined therapy with 5-FU (NSC-19893) and cis-platinum(II)diamminedichloride (NSC-119875), *Cancer*, **34**, 1005-1010(1974)
9. Kamalaker P., Wang J.J., Higby D., Clinical experience with cis-diamminedichloroplatinum (DDP) in children, *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res./Proc. Am. Soc. Clin. Onco l.*, **17**, 283 (1976)
10. Jon D.B., Julian B.H., Renal and electrolyte disturbance associated with cisplatin, *Ann. Int. Med.*, **95**, 628-632(1981)
11. Nicolas E.M., John T.H., Platinum nephrotoxicity, *Am. J. Med.*, **65**, 307-314(1978)
12. R.Mack H., Richards., Nicolas J.U., Renal vascular lesions after chemotherapy with vinblastine, bleomycin and cisplatin, *Am. J. Med.*, **73**, 429-433(1982)
13. Lippman A.J., Helson C., Helson L., Clinical trials of cis-diamminedichloroplatinum(II) (NSC-119875). *Cancer Chemother. Rep.*, **57**, 191-200(1973)
14. Gaynon P.S., Ettinger L.J., Moel D., Baum E.S., Krivit.W., Hammond G.D., Pediatric phase I trial of carboplatin : A children's cancer study group report, *Cancer Treat. Rep.*, **71**, 1039-1042(1987)