

## Flavin mononucleotide (1,4-butanediamine) Pt(II) Complex 와 Cisplatin 의 세포주기에 대한 유세포 분석 및 ICR 계 생쥐에서의 신장독성에 대한 생화학적 분석

권영이<sup>#</sup> · 황규자 · 김안근 · 김국환\* · 김원규\*\* · 안동춘\*\*\*

숙명여자대학교 약학대학, \*동덕여자대학교 약학대학,  
\*\*한양대학교 의과대학, \*\*\*강원대학교 동물자원과학대학

(Received November 25, 1999)

### Flow cytometry of cell-cycle on Flavin mononucleotide (1,4-butanediamine) Pt(II) Complex and Cisplatin and Their Biochemical Analysis of Nephrotoxicity in ICR Mice

Y. E. Kwon<sup>#</sup>, K. J. Whang, A. K. Kim, K. H. Kim\*, W. K. Kim\*\* and D. C. Ahn\*\*\*

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

\*College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

\*\*School of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

\*\*\*Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University,  
Chunchon, Kangwon, 200-701, Korea

**Abstract** — Flavin mononucleotide (1,4-butanediamine) Pt(II) complex (7FMN) was synthesized and screened anticancer activity [*J. Pharm. Soc. Korea* 43(6), 762-770 (1999)]. 7FMN have good water solubility and moderate anticancer activity. In this paper, cell-cycle specificity and nephrotoxicity were studied. Interaction of DNA with cisplatin and synthesized 7FMN was analyzed by flow cytometry, and showed G2 arrest in L1210 cell line. It means that cell-cycle on L1210 was inhibit in S phase by cisplatin and 7FMN. In order to biochemically analyze nephrotoxicity of cisplatin and 7FMN, after injecting each agent intraperitoneally, blood was exsanguinated after 6 hours, 1 day, 3 days and 7 days, respectively. Then, serum was separated from the blood. The serum level of BUN, creatinine and uric acid in cisplatin and 7FMN administrated mice (25~35 g, ICR strain, a dose each 8, 12 and 16 times of the IC<sub>50</sub> value, cisplatin; 7 times) were determined by autochemistry analyzer. In cisplatin-administered mice group, BUN level was elevated than normal control group at 3rd day and repaired at 7th day. In 7FMN administrated group was not elevated. Creatinine and uric acid level were no difference with the normal control group. Therefore synthesized 7FMN is less toxic than cisplatin in nephrotoxicity.

**Keywords** □ Flavin mononucleotide (1,4-butanediamine) Pt(II) complex, anticancer activity, flow cytometry, nephrotoxicity.

세포주기에 대한 이해가 점차로 발전함에 따라 항암제와 세포주기와와의 관계를 새로이 조명해 보고 세포주기 조절인자에 대한 연구가 최근 매우 활발히 진행되고 있다.<sup>1-4)</sup> 모든 세포는 기본적인 세포주기를 갖고 있

지만 각각의 단계에서 소비되는 시간은 다양한데 일단 세포분열이 시작되면 새로이 시작되거나 멈춤이 없이 계속 자라고 계속 분열된다. 암세포는 여러가지 면에서 정상세포와 다른데 그 중에서 가장 근본적인 차이는 암세포의 세포분열이 조절되지 않는다는데 있다. 항암제에는 세포주기중 특정 phase에 있는 세포에만 작용하는 cell cycle(phase)-specific drug(CCPS)이 있

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-760-1838 (팩스) 02-762-5178

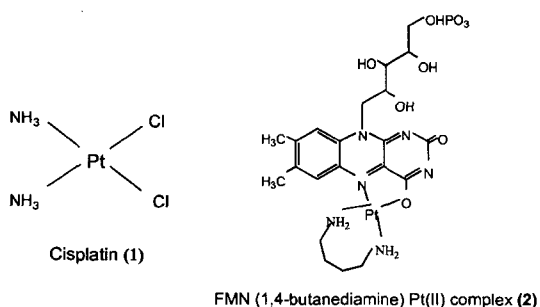


Fig. 1 - Structures of Cisplatin (1) and 7FMN (2).

고, 세포주기에 관계없이 작용하는 cell cycle (phase)-nonspecific drug (CCPNS)이 있다. 모든 진핵세포들은 각각의 세포주기(cell cycle)가 다른 비복제 상태(nonreplicating state)인 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase와 DNA합성기인 S phase, 그리고 분열기인 G<sub>2</sub>/M phase로 구성되어 있으며 각 단계마다 일정한 세포내 DNA content를 함유하고 있다. 따라서 암세포에 항암제를 투여한후 세포주기의 변화가 어떻게 일어나는 지를 밝혀내고 이 정보를 토대로 하여, 새로운 세포주기 조절인자를 발견하여 여기에 적용할 수 있다면 이를 이용한 암의 정복이 가능할 것으로 보인다. 현재 임상에서 우수한 항암제로 사용되고 있는 cisplatin (1) (Fig. 1)의 경우 암세포마다 다른 경향을 나타내고 있다고 보고된 논문이 있고,<sup>5-6</sup> G<sub>2</sub> arrest를 나타낸다고 주장하는 논문도 있다.<sup>7-8</sup> 항암제가 세포주기의 어느 단계의 DNA와 결합하여 세포중식의 억제를 나타내는지에 대한 기전을 밝히는 것은 매우 중요한 의미를 가지는데 그것은 세포사멸(apoptosis)과 직접적인 연관을 가지기 때문이다.<sup>9</sup> 이에 저자들이 합성한 leaving ligand로 flavin mononucleotide(FMN)를, carrier ligand로 1,4-butanediamine을 도입하여 합성한 백금착체인 FMN(1,4-butanediamine) Pt(II) complex(이하 7FMN) (2) (Fig. 1)의 경우 cisplatin보다 항암활성은 떨어지지만 수용성이 매우 좋고, 현재 임상에서 우수한 항암제로 쓰이고 있는 carboplatin의 IC<sub>50</sub>는 일반적으로 시스플라틴의 10배정도이나 7FMN의 IC<sub>50</sub>는 시스플라틴의 약 6배로 상당히 유의성있는 항암활성을 보여주었으므로<sup>10</sup> 인체에 적용시 유리하고 독성이 적을 것으로 추정된다. 따라서 cisplatin과 비교하여 같은 암세포주에서 세포주기와 어떤 상관관계가 있는지 그 작용기전을 밝히기 위하여 유세포분석법(flow cytometry)을 이용하여 연구하였다.

또한 합성된 항암성 화합물이 신약후보물질이 되기

위하여는 정상 세포에 대한 독성이 적어야 한다. Cisplatin은 이미 잘 알려진 바와 같이 다른 항암제로 치료가 불가능한 고형암이나 전립선암등에도 치료효과를 나타낸 우수한 항암제이나<sup>11-13</sup> 심각한 독성, 특히 신장독성이 가장 큰 문제가 되고있어<sup>14-15</sup> 투여시 많은 제한을 받고있는 실정이다. 따라서 저자들이 신장독성이 적을 것으로 예상되는 분자를 설계하여 합성한 7FMN에 대한 신장독성을 혈청생화학적인 방법으로 시스플라틴과 비교, 연구하였다.

## 실험방법

### Flow cytometry에 의한 세포주기 특이성 분석

시약, 기구 및 기기 - 사용한 암세포주는 부유세포로서 생쥐의 백혈병 세포인 L1210 세포주이며 한국세포주은행에서 냉동세포를 분양받아 배양하여 사용하였다. RPMI 1640배지, penicillin-streptomycin 1000 unit/ml, fetal bovin serum(FBS), phosphate buffer saline (PBS)는 Gibco에서, cisplatin, RNase와 propidium iodide는 Sigma에서 구입하였다. CO<sub>2</sub> 가스는 동아가스사에서 구입하여 사용하였고, 그외에 사용된 시약은 세포배양용 또는 특급시약을 사용하였다. 세포수 계수는 hemacytometer를 이용하여 광학현미경(Olympus CK2)으로 관찰하여 실시하였다. 5 ml flow cytometry용 tube는 Falcon #2052를 사용하였고, 세포주기 특이성에 대한 DNA content의 분석은 서울대학교 의과대학 임상의학연구소에서 FACSCalibur(Bectone & Dickinson, USA)를 이용하여 유세포 분석법으로 실시하였다.

배양 및 유세포분석 -37°C, 5% CO<sub>2</sub> 존재하에 L1210 2×10<sup>5</sup> 개/ml인 세포주 6 ml를 T25-flask에 취하고 cisplatin과 합성된 백금착체인 7FMN에 대한 세포주기 특이성을 분석하기 위하여 각각 세포의 증식이 약 40%와 약 80% 억제되는 농도로 처리하였다. (Table I) 대조군 세포에는 배지만 6 ml 가하여 주었다. 48시간 배양후 1200 rpm, 10분 원심분리하여 배지를 제거하고 PBS용액 3 ml를 가하여 세포를 세척하였다. 5 ml flow cytometry 용 tube에 세포를 1×10<sup>6</sup> 개 취하여 PBS로 2회 세척하였다. 세포를 고정하기 위하여 70% 에탄올 1 ml를 서서히 가하고 4°C에서 24시간 방치하였다. 원심분리하여 에탄올을 제거하고 냉각시킨 PBS-2 mM EDTA용액으로 세포를 2

**Table I** - Serum levels of BUN in mice after a single i.p. administration of cisplatin and 7FMN

Compound	Dose (mg/kg)	6 hours	1 day	3 day	7 day
Control	-	19.7 ± 1.3	22.1 ± 1.6	23.8 ± 1.4	18.9 ± 1.0
Cisplatin	6	31.1 ± 1.5**	31.8 ± 2.2*	33.1 ± 1.3	19.7 ± 1.2
7FMN	88	25.7 ± 1.2	19.5 ± 1.5*	21.4 ± 1.6	22.2 ± 1.2
7FMN	132	28.5 ± 1.2*	24.9 ± 1.4	19.4 ± 1.3	22.2 ± 1.9
7FMN	176	25.6 ± 1.5	23.9 ± 1.2	22.7 ± 1.8	22.4 ± 1.5

Control group were administered 6.6 ml/kg of PBS by i.p., Each value represents the means ± S.E. of 5-6 ICR mice male Each unit is mg/dL, Significantly different from control: \*P<0.05, \*\*P<0.001

회 세척후 PBS-2 mM EDTA용액 800  $\mu$ l를 가하였다. RNase(1 mg/ml) 용액을 100  $\mu$ l가하고 상온에서 30분 방치후 형광물질을 DNA에 도입하기 위하여 PI (400  $\mu$ g/ml)용액 100  $\mu$ l가하여 유세포분석(flow cytometry)를 실시하였다.

#### 신장독성에 대한 생화학적 분석

**실험동물** - 실험동물은 체중 약 25 g내외의 수컷 ICR계 생쥐를 대한실험동물센터에서 구입하여 사용하였다. 실험 기간중 동물은 한양대학교 의과대학 해부학교실내 청정동물실에서 사육하였으며 사료(삼양사)와 물은 무제한 공급하였다. 실험동물은 대조군과 cisplatin 투여군, 7FMN 투여 3군으로 분류하고, 각군에 대하여 20~22마리씩 배정하였으며, 이것을 다시 6시간, 24시간, 3일, 7일 처리군으로 나누어 한 군에 각각 5~6마리씩 약물처리하였다.

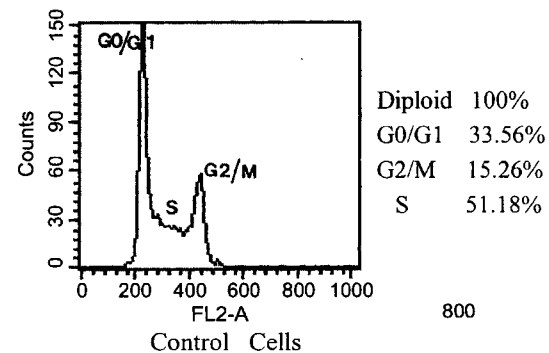
**실험동물의 처치** - 체중 1 kg당 투여한 약물용량은 cisplatin 6 mg(IC<sub>50</sub>×7), 7FMN 88 mg(IC<sub>50</sub>×8), 132 mg(IC<sub>50</sub>×12), 176 mg(IC<sub>50</sub>×16)으로 하였다. 각각 해당량만큼 취하여 7FMN은 PBS를 가하여 6.6 ml로, cisplatin은 DMSO 200  $\mu$ l에 녹인후 PBS를 가하여 6.6 ml로 하였다. DMSO의 함량은 마우스 1 마리당(30 g) 적용될수 있는 20  $\mu$ l 보다 훨씬 적은 양으로<sup>16)</sup> 실험에 끼치는 영향이 없도록 하였다. PBS에 녹인 약물들을 0.2  $\mu$ m 주사기용 필터로 여과하여 멸균하여 복강내 주사하고 주사일을 0일로하여 6시간, 1일, 3일 및 7일 경과후 5~6마리씩 심장채혈 후 경추탈구법으로 희생시켰다.

**BUN, creatinine, uric acid의 측정** - Cisplatin과 7FMN이 투여된 생쥐들로부터 얻은 혈액을 4,500 rpm, 15분 원심분리하여 혈청만 취하여 BUN, creatinine, uric acid를 측정시까지 -20°C 이하에서 보관하였다. BUN, creatinine, uric acid는 생화학자

동분석기(Olympus reply, Japan)로 측정하였으며 각 동물의 평균치와 표준편차로 나타내었다.

#### 실험결과 및 고찰

**Flow cytometry에 의한 세포주기 특이성 분석** - L1210 세포주에 cisplatin과 합성된 7FMN을 세포의 증식이 약 40%억제되는 농도인 IC<sub>40</sub>는 cisplatin이 1.5  $\mu$ M/ml, 7FMN은 10  $\mu$ M/ml이며, 80%억제되는 농도인 IC<sub>80</sub>는 cisplatin 5  $\mu$ M/ml, 7FMN이 30  $\mu$ M/ml이다. 이들 농도로 각각 처리하여 배양한 후 이들 각 세포주기 단계에 있는 세포들을 측정하기 위하여 DNA 형광염색 시약인 propidium iodide(PI)로 염색하였다. PI는 세포내 DNA content에 따라 결합하므로 유세포분석기(flow cytometry)로 측정하여 발산되는 형광강도에 따라 DNA 영역을 구분하였다. 약물처리하지 않은 L1210 세포주 대조군의 DNA content는 Diploid를 100%로 보았을 때 G0/G1 phase의 세포가 33.56%, G2/M phase의 세포가 15.26%, S phase의 세포가 51.18%였다(Fig. 2). Cisplatin (1)을 처리한 세포주에서 세포증식이 40%정도 억제될 때부터 G2



**Fig. 2** - DNA content of cellcycle analysis of L1210 control cells.

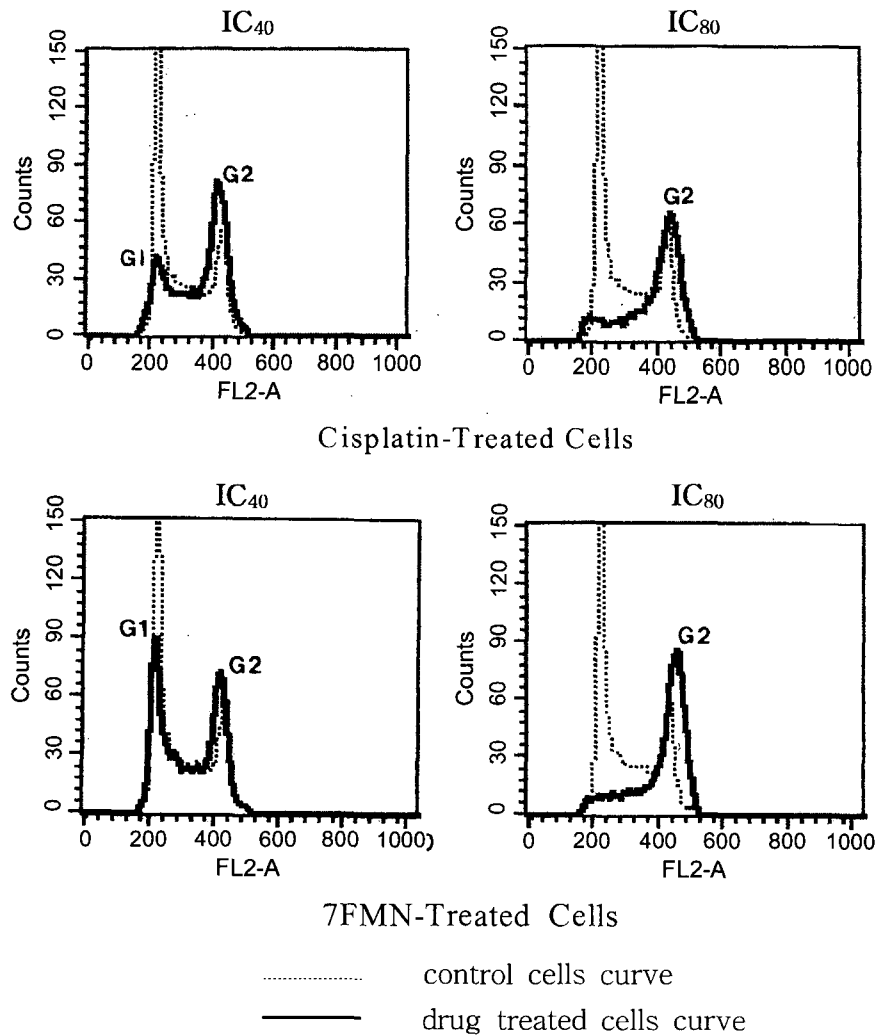


Fig. 3 - DNA content of cell cycle analysis of cisplatin-treated cells and 7FMN-treated cells.

arrest가 일어나기 시작하여 80%정도 억제되었을 때는 거의 모든 세포가 G2 phase에 있었다. 7FMN (2)을 처리한 세포주에서도 cisplatin과 거의 동일한 결과가 확인되었다(Fig. 3). 따라서 cisplatin과 7FMN은 세포주기의 S phase, 즉 세포분열기에 DNA와 결합하여 G2/M phase에 세포가 축적된 것으로 나타났으며, 이 결과가 의미하는 바는 세포분열기에 cisplatin과 7FMN이 암세포의 DNA와 결합하여 암세포의 증식을 억제한다는 것이다. 인체에 이 항암제들을 투여시 정상세포에도 마찬가지로 나타날 가능성을 예측할 수 있다. 이 연구 결과를 토대로하여 앞으로 세포주기 조절 인자를 발견하여 이에 적용할 수 있다면 매우 흥미롭고 의미있는 연구가 될 것으로 판단된다.

**신장독성에 대한 생화학적 분석** - Cisplatin과 7FMN의 신장독성을 생화학적으로 분석하기 위하여 약물별로 복강내 주사후 6시간, 1일, 3일, 7일 경과후 혈청 중의 BUN, creatinine, uric acid를 분석하였다.<sup>17)</sup> 생화학분석기로 측정할 수 있는 요소질소(BUN : Blood Urea Nitrogen)는 혈액중에 존재하는 Urea 중의 질소를 의미하는 것으로 신장질환과 관계있는 대사 산물로 혈중 Urea는 신장의 사구체 여과량에 크게 영향을 미치는 데, 조직의 붕괴정도, 단백섭취량, 소화관내 혈액, 생체내 수분량, 뇨량 등에 따라 영향을 받는다. 항암제 등을 투여하여 신장 독성을 유발하게되면 BUN의 수치가 올라가게 된다. Cisplatin의 경우 독성을 나타내거나 독성이 나타나더라도 반감기가 지남에 따라 정상으로

**Table II** – Serum levels of creatinine in mice after a single i.p. administration of cisplatin and 7FMN

Compound	Dose (mg/kg)	6 hours	1 day	3 day	7 day
Control	-	0.57 ± 0.02	0.58 ± 0.07	0.48 ± 0.04	0.5 ± 0.03
Cisplatin	6	0.51 ± 0.04	0.55 ± 0.02	0.57 ± 0.04	0.57 ± 0.07
7FMN	88	0.48 ± 0.03	0.49 ± 0.04	0.50 ± 0.03	0.5 ± 0.03
7FMN	132	0.43 ± 0.03	0.58 ± 0.03	0.53 ± 0.05	0.45 ± 0.02
7FMN	176	0.48 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.56 ± 0.06	0.52 ± 0.03

Control group were administered 6.6 ml/kg of PBS by i.p., Each value represents the means ± S.E. of 5-6 ICR mice male. Each unit is mg/dL

**Table III** – Serum levels of uric acid in mice after a single i.p. administration of cisplatin and 7FMN

Compound	Does (mg/kg)	6 hours	1 day	3 day	7 day
Control	-	2.3 ± 0.1	1.8 ± 0.2	2.1 ± 0.3	2.3 ± 0.1
Cisplatin	6	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.1
7FMN	88	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.2
7FMN	132	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.2
7FMN	176	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.2

Control group were administered 6.6 ml/kg of PBS by i.p., Each value represents the means ± S.E. of 5-6 ICR mice male. Each unit is mg/dL

회복될 수 있는 단회 투여용량이 6 mg/kg으로,<sup>18)</sup> 항암 활성시험에서 얻었던 IC<sub>50</sub>의 7배의 양이 되었다. 합성한 7FMN이 항암제로 개발되기 위해서는 최소한 cisplatin (1)보다 독성이 적게 나타나야만 하므로 이 실험에서의 7FMN의 투여 용량은 생쥐 1kg당 7FMN (2)을 IC<sub>50</sub>의 8배, 12배, 16배에 해당하는 양 만큼 각각 투여하였다. 분리된 혈청을 생화학 자동분석기로 분석한 수치를 일원변량분석(ANOVA)으로 통계처리한 결과 BUN의 경우 정상 대조군은 PBS투여 6시간후에 19.7±1.3, 1일째 22.1±1.6, 3일째 23.8±1.4, 7일째 18.9±1.0 mg/dL로 나타났다. Cisplatin은 투여 6시간후 31.1±1.5(P<0.001), 1일째 31.8±2.2 (P<0.05), 3일째 33.1±1.3, 7일째 19.7±1.2 mg/dL로 나타나 약물 투여 후 3일까지 정상 대조군에 비하여 약간 상승된 BUN수치가 나타나 신장 독성을 유발한다는 것을 알 수 있었고, 7일째에는 정상 대조군과 비슷한 수치가 나타나 신장기능이 회복됨을 알 수 있었다. 생체에 대한 독성이 낮을 것으로 예상하여 분자설계하여 합성한 7FMN을 88 mg/kg투여 6시간후 25.7±1.2, 1일후 19.5±1.5, 3일후 21.4±1.6, 7일후 22.2±1.2 mg/dL, 132 mg/kg 투여 6시간후 28.5±1.2(P<0.05), 1일후 24.9±1.4, 3일후 19.4±1.3, 7일후 22.1±1.9 mg/dL, 176 mg/kg 투여 6시간후 25.6±1.5, 1일후 23.9±1.2, 3일후 22.7±1.8, 7일후 22.4±1.5 mg/dL로 나타나 7FMN을 투여받은 군은 모두

정상 대조군과 비교하여 차이가 없었다(Table I). 정상 세포와 암세포의 차이점은 정상세포는 어느 정도 손상을 받아도 회복이 되지만 암세포는 빠르게 성장하다가도 일단 손상을 받으면 회복되지 않고 사멸로 간다는 점에 있다. 이 실험에서는 건강한 생쥐를 대상으로 하여 정상세포에 대한 신장독성의 정도를 관찰한 결과 시스플라틴을 투여한 군은 3일까지 정상대조군에 비하여 신장기능의 손상이 유발되었고 7일째 회복됨을 관찰하였다. 7FMN은 IC<sub>50</sub>의 약 8~16배에서도 신장독성이 나타나지 않았다. Table II와 Table III에 나타난 creatinine과 uric acid의 혈청내 농도는 cisplatin과 7FMN 모두 정상 대조군과 모두 큰 차이가 없었다. 결과적으로 cisplatin보다 7FMN의 신장독성이 더 적게 나타나 앞으로 더 깊이있는 연구를 거듭한다면 7FMN은 신약 후보물질이 될 수 있다. 본 실험의 데이터들은 약물들을 단회 투여하여 나타난 결과이므로 앞으로 중복투여, 혼합투여, 장기간 투여등에 대한 신장독성의 연구및 기타 다른 장기에 대한 독성연구가 더 뒷받침되어야 할 것으로 생각된다.

## 문 헌

- 1) Iida, T., Yoshida, N., Kuramoto, H., Shimoda, T., Hamano, M., Hata, H., Yonamine, K., Hayashi, K. : Establishment of a new human ovarian serous

- cystadenocarcinoma cell line (IM), and influence on cell proliferations by cisplatin with or without hyperthermia. *Human. Cell* **9**(4), 345 (1996).
- 2) Epp, R. A., Justice, W. M., Garcia, F. U., McGregor, D. H., Giri, S. P., Kimler, B. F. : Retrospective DNA ploidy analysis by image and flow cytometry in head and neck cancer. *Laryngoscope* **106**(10), 1306 (1996).
  - 3) Otto, A. M., Paddenber, R., Schubert, S., Mannherz, H. G. : Cell-cycle arrest, micronucleus formation, and cell death in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells by tamoxifen and cisplatin. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **122**(10), 603 (1996).
  - 4) Azumi, Y., Konishi, E., Urata, Y., Itoi, H., Yamaguchi, N., Kubo, H., Horii, A., Yamagishi, H., Ashihara, T., Oka, T. : Analysis of cell proliferation kinetics and the effects of cisplatin on the cell cycle of human gastric cancer cells by autostage flow cytometry. *Gan To Kagaku Ryoho* **19**(7), 987 (1992).
  - 5) Otto, A. M., Paddenber, R., Schubert, S., Mannherz, H. G. : Cell-cycle arrest, micronucleus formation, and cell death in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells by tamoxifen and cisplatin. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **122**(10), 603 (1996).
  - 6) Shinomiya, N., Katsura, Y., Tsugita, M., Noritake, M., Tsuru, S. : Analysis of tumor cell growth and effects of antitumor drugs on cell cycle regulation by flow cytometry. *Gan To Kagaku Ryoho* **18**(12), 2109 (1991).
  - 7) Perras, J. P., Ramos, R., Sevin, B. U. : Demonstration of an Sphase 1 population of cells without DNA synthesis generated by cisplatin and pentoxifylline. *Cytometry* **14**(4), 441 (1993).
  - 8) Tamura, J., Tanaka, J., Fujita, K., Yoshida, M., Kasamatsu, T., Arii, S., Tobe, T. : Effect of anticancer agents on cellcycle of regenerating hepatocytes in rats. *J. Surg. Res.* **53**(3), 218 (1992).
  - 9) Alaoui, S., Lawry, J., Griffin, M. : The cell cycle and induction of apoptosis in a hamster fibrosarcoma cell line treated with anti-cancer drugs: its importance to solid tumour chemotherapy. *Neurooncol.* **31**(1-2), 195 (1997).
  - 10) Kwon, Y. E., Whang, K. J. : Synthesis of Pt(II) Complexes containing Flavin mononucleotide as Leaving Ligand and their Anticancer Activity. *J. Pharm. Soc. Korea* **43**(6), 762 (1999).
  - 11) Einhorn, L. H., Donohue, J. : Vinblastine and Bleomycin Combination Chemotherapy in Disseminated Testicular Cancer. *Ann. Intern. Med.* **87**, 293 (1977).
  - 12) Ozols, R. F., Young, R. C. : Chemotherapy of Ovarian Cancer. *Semin. Oncol.* **11**, 251 (1984).
  - 13) Wiltshaw, E. : Phase II Study of cis-Diaminedichloroplatinum(NSC-119875, CACP) in Advanced Adenocarcinoma of the Ovary. *Cancer Treat. Rep.* **60**, 55 (1976).
  - 14) Ward, J. M., Young, D. M., Fauvie, K. A., Wolpert, M. K., Davis, R., Guarno, A. M. : Comparative nephrotoxicity of platinum cancer chemotherapeutic agent. *Cancer Chemother. Rep.* **60**, 1675 (1976).
  - 15) Krakoff, I. H. : Nephrotoxicity of cis-Diaminedichloroplatinum(II). *Cancer Treat. Rep.* **63**, 1523 (1979).
  - 16) Sheu, M. Y., Jeng, F. W., Tzong, L. L., Sheng C. K. : Inhibition of nitric oxide synthase expression by PPM-18, a novel antiinflammatory agent, *in vitro* and *in vivo*. *J. Biochem.* **328**, 363 (1997).
  - 17) Rose, W. C., Schurig, J. E., Huftalen, J. B., Bradner, W. T. : Antitumor Activity and Toxicity of Cisplatin Analogs. *Cancer Treat. Rep.* **66**, 135 (1982).
  - 18) Kim, D. K., Kim, G., Gam, J., Cho, Y. B., Kim, H. T., Tai, J. H., Kim, K. H., Hong, W. S., Park, J. G. : Synthesis and Antitumor Activity of a Series of [2-substituted-4,5-bis(aminomethyl)-1,3-dioxolane] Pt(II) Complexes. *J. Med. Chem.* **37**(10), 1471 (1994).