

가시오가피 추출물의 독성경감 및 면역증강효과

이경호 · 윤원호^{1*}

코오롱생명과학(주), ¹서일대학 식품가공과

Effects of Protein-Bound Polysaccharide Isolated from *Acanthopanax senticosus* in Reducing the Toxic Effects of Cisplatin

Keyong Ho Lee and Won Ho Yoon^{1*}

Kolon Life Science, Inc. Yongin-city, 446-797, Korea

¹Department of Science and Technology, Seoil College, Myunmok-dong, Jungnang-gu, Seoul 131-702, Korea

Abstract – Protein-bound polysaccharide is derived from *Acanthopanax senticosus* by the cold water extraction. The aim of the study was to evaluate the effects of PS against weight loss and hematological change as a indication of toxicity produced by the treatment of cisplatin. PS protected the weight loss caused by cisplatin (6 mg/kg) and significantly recovered hematological change. Treatment of PS showed the recovery on the weight loss and hematological change as indicators of toxicity of cisplatin treatment. By increasing lymphocyte proliferation and cytokine production, PS may be highly effective in protecting against cisplatin-induced toxicity. The results suggest PS might have a role in reducing toxicity or permitting larger dose of cisplatin to be given.

Key words – protein-bound polysaccharide, *Acanthopanax senticosus*, cisplatin, cytoprotection

암치료에 있어서 화학치료요법은 종종 많은 부작용을 동반한다. 그 이유로는 이러한 화학치료 요법제는 암 특이적인 특이성에 기초를 두기보다는 동물모델에서 설립된 세포주들의 독성을 근거하여 선택되기 때문이다. 일반적인 화학요법제는 암세포에 대한 특이적인 세포독성을 갖지만, 동시에 정상세포나 조직에 대해서도 동일한 영향력을 나타낸다. 그 중에서도 장내의 점막세포는 상당히 민감한 세포들이며 이러한 화학요법제는 장내에 국소 혹은 전반에 걸친 손상을 야기하여 화학요법제의 고유 활성을 방해하며, 오히려 장내 괴양 및 출혈을 야기 시켜 생명을 위협할 수 있는 출혈이나 천공을 야기 시킨다.¹⁾ 따라서 항암 치료 시, 이러한 간섭으로부터 보호 할 수 있으며 정상세포나 조직을 보호할 수 있는 복합치료법은 환자의 암치료에 있어서 삶의 향상(Quality of Life)에 도움이 된다고 할 수 있다. 현재 상용화되어 사용되고 있는 독성경감제(cytoprotector)로는 항암제와 같은 화학물질로부터 세포나 조직을 보호할 수 있는 chemo-protector와 방사선 치료로부터 세포나 조직을 보호할 수 있는 radio-protector가 있으며, 기능적으로는 화학물질인 chemoprotectants

와 면역물질인 immunomodulators로 나눌 수 있겠다.²⁾ 화학적으로는 일반적인 chemoprotectants는 화학구조로 thiosulfate를 함유한 것들이 많다. 그 이유는 thiosulfate는 신속한 노배출 시에 신장세관에 축적되며, 이와 같은 thiosulfate는 노나 혈액 중에서 alkylating agent를 비활성화시키기 때문에 alkylating agent에 의한 국소적인 chemoprotectant로 이용될 수 있다.³⁾ 특히 thiol-based chemoprotectant인 WR2721이나 diethyldithiocarbamate(DDTC)는 cisplatin과 같은 alkylating agent의 신장독성이나 골수억제와 같은 부작용을 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 왔다.²⁾ 이 밖에는 Mensa, Disulfiram 및 ICRF-187 등이 있다.^{4,8)} 그러나 이러한 화학물질은 항암제와 마찬가지로 부작용을 갖는 것이 일반적이다. Amifostine(WR2721)의 경우는 cisplatin과 같은 독성이 강한 항암제나 방사선치료 시 종종 사용되는 독성 경감제이나 저혈압, 구토, 오한 등의 부작용을 가지고 있다.^{9,10)} 이러한 부작용을 극복할 수 있는 대안 물질로는 식물유래의 면역증강제를 들 수 있다. Chemoprotectant 및 radioprotectant로 알려진 약용식물로는 *Withania somnifera*, *Tinospora cordifolia* 및 *Asparagus racemosus* 등이 있다.¹¹⁻¹⁴⁾ 이들의 약용식물의 경우 각각 성분이 정확히는 알려져 있지는 않음에도 불구하고

*교신저자(E-mail): whyoon@seoil.ac.kr
(FAX): 02-490-7456

고 항암 치료시의 부작용을 줄일 수 있는 물질의 발굴의 좋은 재료도 판단된다.

본 연구에서는 면역증강작용이 예전부터 알려져 있어 사용되어온 약용식물 중의 하나인 가시오가피(*Acanthopanax senticosus*)로부터 항암치료시의 항암제 부작용을 경감효과에 대한 유의한 결과를 얻었다. 본 연구자의 가시오가피에 대한 최근의 연구보고로는 가시오가피의 껍질로부터 추출 및 분리정제를 통하여 분리한 단백다당류의 알코올에 의한 간 손상의 회복에 관한 연구와 bovine serum albumin (BSA) 와 ovalbumin(OVA)에 대한 세포면역증강효과가 있다.^{15,16} 또한 이와 동일한 물질인 단백다당체로부터 항암제에 의한 세포독성을 경감을 기대할 수 있는 항암제에 의한 독성경감효과를 동물실험을 통하여 확인할 수 있었다.

재료 및 방법

단백다당체 - 독성경감 효과를 위한 가시오가피로부터의 단백다당체로 하였다. 즉, 가시오가피의 껍질로부터 4°C에서 24시간 물로 추출한 후, 추출물을 여과하고 여액을 70% 농도의 ammonium sulfate로부터 단백다당체를 침전시켰다. 침전시켜 얻은 조단백다당체는 sepharose S gel filtration(2.5×90 cm, FPLC system Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용하여 분리하였다. 분리하여 얻은 단백다당체의 총당, 단백질 정량, 구성당 및 아미노산서열은 각각 페놀-황산법, Bradford법, Bio-LC 및 N-terminal amino acid sequencing을 통하여 물질을 분석하였다. 분리한 단백다당체는 분자량 30.5 kDa, 단백질과 당의 비율은 6:4 이며 구성당은 galactose 와 glucose, 단백질의 아미노산 서열은 NH₂-Val-Ala-Tyr-Pro-Trp -Ala-Gly-Phe-Ala-Leu-Ser-Leu-Glx-Pro-Pro-Ala-Tyr-Gly-Tyr-X-Glu-Ile-Asn-Asp-Lys의 서열을 갖는 단백다당체로 확인하였다(Table I).¹⁵ 단백다당체의 투여경로는 정맥으로 하였으며, 투여농도는 0.2 mg/kg과 2 mg/kg으로 하였다.

시험동물 - 5주령의 Balb/C 마우스를 중앙실험로부터 공급받아 동물사육실(온도 23±3°C, 습도 50±10%, 12시간 조명주기)에서 일반 고형사료와 물을 자유롭게 공급하면서 2주간 적응시킨 후 실험에 이용하였다.

독성경감효과 측정 - 독성경감의 척도로 체중의 변화를 보았다. 모든 시험구에 대한 체중의 변화는 15일 동안 관찰하였으며, 체중의 측정은 2일 간격으로 측정하였다. 단백다당체의 투여는 시험개시 일(0 일), 2일 및 4일째에 총 3회 실시하였고, cisplatin의 투여는 시험 3일째와 5일째 총 2회 실시하였다. Cisplatin의 농도는 Balb/C 마우스에 대한 LD₅₀ 값을 구하여 그 값의 1/2값으로 하였다. 모든 시험개체는 시험 15일째에 CO₂ 마취를 하여 모든 장기에 변화 이상 유무를 육안으로 관찰하였다. 각 시험에 사용한 동물 수는 군당 10마리로 하였다.

Table I. Characterization of protein-bound polysaccharide (PS)

MW ^a	Ratio of protein/ carbohydrate ^b	Amino acid sequence ^c
30.5 kDa	6/4	Val-Ala-Tyr-Pro-Trp-Ala-Gly-Phe-Ala-Leu-Ser-Leu-Glx-Pro-Pro-Ala-Tyr-Gly-Tyr-X-Glu-Ile-Asn-Asp-Lys

a: Gel permeation chromatography

b: Bradford assay for protein and phenol-sulfuric assay for carbohydrate

c: N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation

혈액학적 변화측정 - 시험종료일에 마우스의 심장으로 부터 채혈하여 EDTA가 들어있는 시험관(Sherwood medical)에 취하고 roll mixer로 온화한 후, hematology system (Bayer)을 사용하여 cisplatin 투여로 변화가 예상될 수 있는 호중구(neutrophil), 백혈구(leucocyte), 혈소판(thrombocyte), 적혈구(erythrocyte) 및 적혈구용적(hematocyte)의 변화를 측정하였다.¹⁷

림프구의 증진효과 - 비장으로부터의 림프구증식효과는 MTT assay를 이용하여 측정하였다.^{18,19} Cisplatin의 투여는 체중측정에 의한 독성경감효과 측정 시와 같이 동일 농도인 6 mg/kg으로 2회 투여하였다. 항암제를 투여 받은 마우스를 1주, 2회 및 4주째에 마우스로부터 비장세포를 분리하여 in vitro에서 비장으로부터 분리한 lymphocyte의 증식 정도와 IL-2 분비능을 측정하였다. Cisplatin 6 mg/kg의 농도로 1일과 3일째에 각각 1회 투여한 Balb/C 마우스로부터 비장을 멸균적으로 분리한 후, 비장을 PBS buffer로 세척하고 멸균가위로 비장조직을 잘게 자른 후, RPMI 1640 배지가 담겨있는 petri dish에서 nylon mesh와 22 G 주사기를 이용하여 비장조직 안에 있는 림프구 세포를 분리하였다. 분리한 림프구 세포들을 원심분리 tube에 옮겨 800×g에 가깝게 원심분리하여 얻은 세포 pellet를 ACK lysis buffer로 상온에서 10분간 방치하여 적혈구를 제거하였다. 적혈구를 제거한 후, RPMI 1640 배지로 2~3회 정도 세척하여 림프구 세포를 얻었다. 림프구 세포는 1×10⁶ cell/ml씩 96-well plate에 접종하였고, 양성대조군을 위한 림프구 세포 자극인자로는 phytohemagglutinin(PHA, Sigma)과 Lipopolysaccharide (LPS, Sigma)을 각각 2 µg/ml과 10 µg/ml을 사용하였고, 단백다당체는 50 µg/ml을 각각 48시간 동안 노출시켜 림프구 증식 정도를 MTT assay를 이용하여 측정하였다.

Cytokine IL-2 측정은 ELISA kit(BioSource International, Camarillo, CA)으로 측정하였다.

결 과

체중변화 - Cisplatin의 세포 독성에 의한 체중감량에 대하여 단백다당체 투여가 마우스의 체중 변화에 미치는 영향

Table II. Effect of protein-bound polysaccharide (PS) on loss of body weight induced by cisplatin

Treatment	Day 0	Day 3 (%) [*]	Day 5 (%)	Day 7 (%)
PS 0.2 mg/kg	22.2±1.5	24.8±0.3 (12)	25.9±0.9 (17)	27.2±0.6 (23)
PS 2 mg/kg	22.3±0.7	24.5±0.4 (10)	25.4±0.7 (14)	27.0±0.3 (21)
Cisplatin 6 mg/kg	22.5±0.5	24.7±0.7 (10)	24.1±1.2 (7)	24.3±1.1 (8)
PS 0.2 mg/kg+Cisplatin 6 mg/kg	22.5±0.8	25.0±0.6 (11)	23.4±0.8 (4)	22.4±0.9 (0)
PS 2 mg/kg+Cisplatin 6 mg/kg	23.1±0.4	25.8±0.9 (12)	25.8±0.8 (12)	26.3±0.6 (14)
Treatment	Day 9 (%)	Day 11 (%)	Day 13 (%)	Day 15 (%)
PS 0.2 mg/kg	29.5±0.3 (33)	32.5±1.2 (46)	33.7±1.2 (52)	34.2±1.3 (54)
PS 2 mg/kg	30.3±0.4 (36)	33.2±0.8 (49)	33.9±1.1 (52)	34.5±1.2 (55)
Cisplatin 6 mg/kg	23.7±1.2 (5)	22.6±1.2 (0)	21.9±0.7 (-3)	14.3±1.2 (-36)
PS 0.2 mg/kg+Cisplatin 6 mg/kg	26.7±1.1 (19)	27.6±1.2 (23)	28.1±1.0 (25)	29.7±0.9 (32)
PS 2 mg/kg+Cisplatin 6 mg/kg	28.1±0.9 (22)	30.6±1.3 (32)	32.1±1.4 (39)	32.9±1.3 (42)

*: Increased rate of body weight

을 조사한 결과는 Table II과 같다. Cisplatin 6 mg/kg을 3일째와 5일째에 각각 처리한 결과, 3일째까지의 체중 증가율은 10%로 단백다당체 단독 투여군이나 cisplatin과 단백다당체 병용투여군과 비교하여 변화를 나타내지 못하였다. Cisplatin 투여에 의한 체중 감소는 투여 5일째부터 관찰되기 시작하였으며, 단백다당체만 처리한 시험군에 대비하여 약 1g 이상의 체중 감소를 나타내었다. Cisplatin 단독 처리군은 시험 마지막 일인 15일째에 시험시작일의 체중 100% 대비 64%의 체중을 나타내어 36% 정도의 체중 감소율을 나타내었다.

Cisplatin 처리에 대한 단백다당체 0.2 mg/kg 처리군의 경우는 cisplatin 투여 시점부터 체중감소를 보였으나, 시험 9일째부터 체중 감소에 대한 회복능력을 나타내었다. 즉, 시험 9일째의 체중은 26.7±1.1 g으로 투여 완료 시점인 7일째에 비하여 19%의 체중 증가율을 나타내었고, 시험 종료일인 15일째에는 29.7±0.9 g으로 시험 개시일 대비 32%의 체중증가율을 나타내었다. Cisplatin 처리에 대한 단백다당체 2 mg/kg 처리군의 경우는 cisplatin이 투여되는 시점인 3일째와 5일째에도 시험 개시일의 체중에 비하여 감소되는 경향은 나타내지 않았으며, 7일째부터는 서서히 체중 증가가 회복되어 시험 종료일인 15일째에는 32.9±1.3 g으로 시험 개시일 대비 42%의 체중증가 회복율을 나타내었다. 이

에 반하여 단백다당체 0.2 mg/kg과 2 mg/kg 단독 투여군은 마우스 개체 모두 이상적인 체중 증가를 나타내었으며, 투여 농도에 따른 차이도 발생하지 않았다. 따라서 단백다당체의 투여에 의한 시험군의 개체의 사망은 없어 독성 및 부작용은 없는 것으로 판단되며, 오히려 cisplatin 투여에 의한 체중감소에 대한 회복능력을 가지고 있는 것으로 나타났다. Cisplatin 단독 투여에 의한 개체 사망 수는 투여 완료 시점인 7일째에 2마리, 11일째에 1마리가 사망하여 30%의 사망률을 나타내었다. Cisplatin과 단백다당체 0.2 mg/kg 투여 시험군의 경우는 7일째에 1마리가 사망하여 10%의 사망률을 나타내었다. 그 밖의 나머지 시험군에서는 사망 개체수가 발생하지 않았다.

혈액학적 변화 - Cisplatin 단독투여에 의한 마우스의 혈액세포에 미치는 영향과 단백다당체의 병용투여에 의한 혈액세포의 변화를 관찰한 결과는 Table III와 같다. 시험 종료일에 채혈하여 변화가 의심되는 혈액학적 변화를 측정하였다. 약물을 처리하지 않은 대조군의 모든 혈액학적 수치는 정상 마우스의 수준으로 나타났다. 단백다당체 0.2 mg/kg 및 2 mg/kg 처리군의 혈액학적 수치 역시 대조군과 차이를 보이지 못하였다. Cisplatin 6 mg/kg 처리군의 호중구의 수치는 0.06±0.01로 대조군 및 단백다당체 단독 투여군의 수

Table III. Response of blood counts to cisplatin and treatment with protein-bound polysaccharide (PS) in the 15days

	Neutrophil (10 ³ cells/ml)	Leucocyte (10 ³ cells/ml)	Thrombocyte (10 ³ cells/ml)	Erythrocyte (10 ⁶ cells/ml)	Hematocyte (%)
Control	0.12±0.05	1.23±0.55	1140±234	12.3±0.39	57.7±3.9
PS 0.2 mg/kg	0.12±0.01	1.16±0.42	1120±127	12.2±0.40	58.2±2.5
PS 2 mg/kg	0.11±0.01	1.19±0.39	1158±291	11.9±0.89	56.3±5.2
Cisplatin 6 mg/kg	0.06±0.01	0.57±0.09	821±154	10.5±0.52	50.3±2.3
PS 0.2 mg/kg+Cisplatin 6 mg/kg	0.08±0.06	0.69±0.15	897±198	10.3±0.34	55.2±5.1
PS 2 mg/kg+Cisplatin 6 mg/kg	0.09±0.03	0.97±0.10	955±260	10.8±0.29	55.1±5.7

Table IV. Effects of protein-bound polysaccharide (PS) on lymphocyte proliferation and IL-2 production in mice treated with cisplatin 6 mg/kg

Weeks	Dose (mg/ml)	Absorbance of proliferation (proliferation rate %)	Absorbance of IL-2 production (production rate %)
0	Control ^a	1.12±0.23	0.85±0.06
1	- ^b	0.28±0.06	0.14±0.02
	50 ^c	0.35±0.08 (25%)	0.18±0.06 (28%)
2	-	0.34±0.12	0.21±0.03
	50	0.43±0.07 (26%)	0.29±0.04 (38%)
4	-	0.83±0.11	0.48±0.09
	50	1.04±0.15 (25%)	0.71±0.05 (48%)

a: Normal mice, b: Cisplatin (6 mg/kg) only, c: PS (50 mg/ml) treatment after cisplatin (6 mg/kg)

치에 비하여 50% 정도 감소가 되었고, 백혈구 수치는 0.57 ± 0.09 로 대조군 및 단백다당체 단독 투여군 대비 47% 수준을 나타내었다. 적혈구의 경우는 10.5 ± 0.52 로 대조군 대비 82% 수준을 나타내었으며, 적혈구 용적률에 있어서도 대조군 57.7% 대비 50.3%로 87% 수준을 나타내었다. 따라서 cisplatin 치료로 인하여 호중구 및 백혈구를 비롯하여 전반적으로 혈액학적 수치가 정상 마우스군에 비하여 회복되지 않는 것으로 판단되었다.

림프구의 증식 및 IL-2 생산효과 - 항암제를 투여 받은 마우스로부터 단백다당체의 독성경감효과를 비장의 면역세포의 기능의 회복여부로 확인하였다(Table IV). Cisplatin 6 mg/kg을 투여한 마우스를 1주째에 정상 마우스에 비하여 1.12 ± 0.23 에서 0.28 ± 0.06 으로 흡광값이 4배 정도 감소하여 cisplatin에 의하여 비장조직의 림프구 세포에 영향을 나타내었다. 이는 IL-2생산에도 영향을 주어 정상 마우스에 비하여 6배 정도 IL-2생산량이 감소되었다. Cisplatin 단독투여에 대한 림프구의 감소 및 IL-2생산량의 감소는 4주 동안 서서히 증가하기는 하였으나 정상마우스 정도로 회복되지는 않았다. 단백다당체 처리군의 경우, 1주째에서는 단백다당체를 처리하지 않은 구에 비하여 림프구세포의 증식은 25%, IL-2생산량은 28%정도 증가하였고, 2주째에는 림프구세포 증식 26%, IL-2생산량 38%, 4주째에는 각각 25%와 48%로 단백다당체의 처리에 의한 림프구 세포의 증식율은 일정하였고, IL-2의 생산은 시간이 증가함에 따라서 약간씩 증가추세를 보여 4주째에는 1주째 대비 약 20% 정도가 증가되었다. 이러한 결과는 항암제 투여에 의한 독성의 회복에 있어서 단백다당체의 면역증강에 의하여 많은 영향을 준다고 할 수 있겠다.

고 찰

암세포를 파괴하기 위한 항암치료 시에는 종양의 종류와 분포, 진행정도, 부작용 등을 고려하여 개인에 따라 다르게 처방되며 약물은 보통 한 가지 이상의 항암화학요법을 복합적으로 사용하고 있다. 대부분 암세포에 작용하지만, 일부 정상 신체부위 중에서 입안이나 위장관의 약한 점막조직에 많

은 영향을 주게 된다. 또한 치료 시 오심, 구토, 피로감 등의 부작용이 동반되는 것이 일반적이다. 항암제를 맞으면 입맛이 떨어지고, 오심, 구토로 인하여 음식섭취가 줄어들어 체중이 감소하고 항암제 투여 후 1-2주 사이에 골수에서 만들어지는 백혈구가 일시적으로 줄고 면역이 약해져 세균 감염의 원인을 제공하게 된다. 따라서 이러한 부작용을 줄일 수 있는 물질의 투여 및 개발은 암환자의 치료에 상당한 도움을 줄 수 있다. 이러한 물질로는 WR2721, diethyldithiocarbamate(DDTC), Mensa, Disulfiram 및 ICRF-187 등이 있다.²⁾ 최근에는 Melatonin이 adriamycin과 함께 투여될 경우, adriamycin의 부작용을 감소시킬 수 있다는 동물시험연구와 임상연구가 있으며, 이러한 물질의 개발에도 연구가 시행되고 있다.^{20,21)} 본 연구에서는 가시오가피로부터 분리한 면역증강효과있는 단백다당체를 이용하여 항암제 투여에 의한 부작용을 감소시킬 수 있는 독성경감효과를 측정하였다. Cisplatin의 세포 독성에 의한 체중감소에 대하여 단백다당체 투여가 마우스의 체중 변화에 미치는 영향을 조사한 결과, cisplatin 6 mg/kg을 3일째와 5일째에 각각 처리한 군은 시험 최종관찰 시점까지 계속적으로 체중이 감소되었으나, 단백다당체 0.2 mg/kg과 2 mg/kg 단독 투여군은 마우스 개체 모두 이상적인 체중 증가를 나타내었고, 개체의 사망 역시 없어 항암제의 세포독성 및 면역계에 심각한 부작용은 없는 것으로 판단되었다. Cisplatin의 투여는 심각한 골수 부작용을 초래하여 혈액세포의 구성성분이나 비율에 영향을 준다. 그러나 단백다당체의 투여는 cisplatin에 의하여 영향을 받은 혈액세포의 변화에 많은 회복을 보여 주었다.

본 연구에서 단백다당체가 cisplatin 투여에 의한 체중감소는 2주 정도(15일)만에 정상 마우스와 동일한 수준으로 회복능력을 보여 주었으며, 혈액세포의 변화에 있어서도 비슷한 양상을 보여 주어 단백다당체의 투여에 의한 cisplatin의 독성경감효과는 2주정도면 회복할 수 있는 효능을 나타내었다.

항암 면역계의 중요한 기관 중의 하나는 비장이라 할 수 있다. 본 연구에서 cisplatin의 투여는 비장의 면역세포의 생존율과 IL-2의 생산에 영향을 주는 것으로 나타났다. 정상 마우스에 비하여 cisplatin 투여군은 1주째에 면역세포 및 IL-2

생산량이 많이 감소하였으나 시간이 지남에 따라서 회복되는 것으로 나타나 생존율과 IL-2의 생산량이 급격하지는 않으나 서서히 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 증가에 단백질다당체의 투여는 급격한 상승효과를 나타내어 4주째에는 정상 마우스에 가까운 면역세포 생존율과 IL-2 생산량을 나타내었다. 이러한 결과는 단백질다당체의 면역증강 작용에 의하여 화학요법제의 독성을 감소시킬 수 있는 능력이 있는 것으로 판단할 수 있다.

향후, 추가적으로는 골수에 미치는 영향에 대한 조사와 함께 병용투여 할 때 cisplatin과 같은 독성을 갖는 항암제의 기능에 방해를 하는가에 대한 조사도 이루어져야 할 것이다.

사 사

본 연구는 2006년도 서일대학 학술연구비 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Hoekman, K., van der Vijgh, W.J. and Vermorken, J.B. (1999) Clinical and preclinical modulation of chemotherapy-induced toxicity in patients with cancer. *Drugs*. **57**: 133-155.
2. Diwanay, S., Gautam, M. and Patwardhan, B. (2004) Cytoprotection and immunomodulation in cancer therapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **4**: 479-490.
3. Shea, M., Koziol, J.A. and Howell, S.B. (1984) Kinetics of sodium thiosulfate, a cisplatin neutralizer. *Clin. Pharmacol. Ther.* **35**: 419-425.
4. Zaki, E.L., Springate, J.E. and Taub, M. (2003) Comparative toxicity of ifosfamide metabolites and protective effect of mesna and amifostine in cultured renal tubule cells. *Toxicol. In Vitro* **17**: 397-402.
5. Springate, J.E. (1997) Ifosfamide metabolite chloroacetaldehyde causes renal dysfunction in vivo. *J. Appl. Toxicol.* **17**: 75-79.
6. Springate, J., Chan, K., Lu, H., Davies, S. and Taub, M. (1999) Toxicity of ifosfamide and its metabolite chloroacetaldehyde in cultured renal tubule cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **35**: 314-317.
7. Ishikawa, M., Aoki, T., Yomogida, S., Takayanagi, Y. and Sasaki, K. Drug interaction effects on antitumor drugs (XV): Disulfiram as protective agent against cyclophosphamide-induced urotoxicity without compromising antitumor activity in mice. *Pharmacol. Toxicol.* **74**: 255-261.
8. Weiss, G., Loyevsky, M. and Gordeuk, V.R. (1999) Dexrazoxane (ICRF-187). *Gen. Pharmacol.* **32**: 155-158.
9. Kemp, G., Rose, P., Lurain, J., Berman, M., Manetta, A., Roullet, B., Homesley, H., Belpomme, D. and Glick, J. (1996) Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide-induced and cisplatin-induced toxicities: results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* **14**: 2101-2112.
10. Grdina, D.J., Kataoka, Y., Basic, I. and Perrin, J. (1992) The radioprotector WR-2721 reduces neutron-induced mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in mouse splenocytes when administered prior to or following irradiation. *Carcinogenesis* **13**: 811-814.
11. Davis, L. and Kuttan, G. (1998) Suppressive effect of cyclophosphamide-induced toxicity by *Withania somnifera* extract in mice. *J. Ethnopharmacol.* **62**: 209-214.
12. Dhuley, J.N. (1998) Effect of ashwagandha on lipid peroxidation in stress-induced animals. *J. Ethnopharmacol.* **60**: 173-178.
13. Mathew, S. and Kuttan, G. (1997) Antioxidant activity of *Tinospora cordifolia* and its usefulness in the amelioration of cyclophosphamide induced toxicity. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **16**: 407-411.
14. Thatte, U.M. and Dahanukar, S.A. (1988) Comparative study of immunomodulating activity of Indian medicinal plants, lithium carbonate and glucan. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* **10**: 639-644.
15. Choi, J.S., Yoon, T.J., Kang, K.R., Lee, K.H., Kim, W.H., Suh, Y.H., Song, J. and Jung, M.H. (2003) Glycoprotein isolated from *Acanthopanax senticosus* protects against hepatotoxicity induced by acute and chronic alcohol treatment. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 306-314.
16. 하은숙, 황수현, 신광순, 유광원, 이경호, 최주선, 박우문, 윤택준 (2003) 가시오가피로부터 분리한 단백질 다당물질의 경쟁적 ELISA법에 의한 분석. *한국식품과학회지*. **35**: 1209-1215.
17. Floersheim, G.L., Chiodetti, N. and Bieri, A. (1988) Differential radioprotection of bone marrow and tumour cells by zinc aspartate. *Br J Radiol.* **61**: 501-508.
18. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
19. Heeg, K., Reimann, J., Kabelitz, D., Hardt, C. and Wagner, H. (1985) A rapid colorimetric assay for the determination of IL-2-producing helper T cell frequencies. *J. Immunol. Methods*. **77**: 237-246.
20. Catala, A., Zvara, A., Puskas, L.G. and Kitajka, K. (2007) Melatonin-induced gene expression changes and its preventive effects on adriamycin-induced lipid peroxidation in rat liver. *J. Pineal. Res.* **42**: 43-49.
21. Lissoni, P., Barni, S., Mandala, M., Ardizzoia, A., Paolorossi, F., Vaghi, M., Longarini, R., Malugani, F. and Tancini, G. (1999) Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur. J. Cancer* **35**: 1688-1692.