

澤瀉散 抽出物이 Cisplatin으로 誘發된 흰쥐의 急性腎不全에 미치는 影響

유동조, 윤경민, 장수영, 이연경, 강석봉
대구한의대학교 한의과대학 신계내과학교실

Nephroprotective Effects of *Taeksa-san* Aqueous Extracts on Cisplatin-induced Rat Acute Renal Failure

Dong-jo Yu, Kyeong-min Yoon, Su-yeong Jang, Yeon-keong Lee, Seok-bong Kang
Dept. of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Gu Haany University

ABSTRACT

Objectives : This study was to observe the nephroprotective effects of the traditional prescription, *Taeksa-san*(TSS). TSS has generally been used for treating various renal diseases, including renal failure.

Methods : Three different dosages of TSS extract were orally administered once a day for 28 days. At the 23rd day after TSS extract treatment, cisplatin was also treated. Then, 5 days after cisplatin treatment, all the rats (6 groups of 8 rats each) were sacrificed. Changes in the body weight, kidney weight, serum BUN and creatinine levels were observed with changes on the kidney MDA and GSH contents. The results were compared with captopril 100mg/kg, of which the effects on cisplatin-induced acute renal failures are already confirmed.

Results : Dramatic decrease of body weight, increase of kidney weight, increase of serum BUN and creatinine levels were detected in the cisplatin control as compared with the intact control. In addition, marked increase of kidney MDA contents and decrease of kidney GSH contents were also detected in the cisplatin control as compared with the intact control. This means that cisplatin-induced ARF is induced by oxidative stress and related lipid peroxidation in the present study. However, these ARFs and inhibition of antioxidant effects induced by cisplatin were dose-dependently reduced by treatment with all three different dosages of *TSS* extracts.

Conclusion : This study suggests that TSS extracts show favorable effects on cisplatin-induced rat ARF.

Key words : *Taeksa-san*(zexiesan), ARF, Cisplatin, Antioxidant effect

1. 서론

급성 신부전은 급격한 GFR(Glomerular filtration rate)의 감소와 질소 대사산물의 저류 그리고 세포 외액의 양과 전해질, 산염기 항상성의 교란을 특징

으로 하는 질환이다. 이 증후군은 입원 환자의 약 5%에서 발생하며 중환자실 환자의 30% 이상에서 발생한다. 췌노는 흔하나 늘 동반하는 임상양상은 아니다. 급성 신부전은 대개 무증상이며 입원한 환자의 최근 혈중 BUN과 Creatinine 상승으로 진단된다. 최근 의학의 발달에도 불구하고 국내외의 여러 보고에 의하면 급성신부전의 사망률은 40~60%에 달한다¹.

· 교신저자: 강석봉 대구시 수성구 상동 165번지
대구한의대학교 부속 대구 한방병원 6내과
TEL: 053-770-2102
E-mail: kangsb@dhu.ac.kr

澤瀉散은 許俊의 《東醫寶鑑》²에 나오는 처방이다. 澤瀉, 赤茯苓, 枳殼, 猪苓, 木通, 檳榔 및 黑牽牛子 등 7종의 약재로 구성된 방제로 전통적으로 子淋, 水證 등의 신장질환에 응용되어², 본 연구에 적합할 것으로 생각 되어진다. 澤瀉散의 신장에 대한 보호 또는 신병증에 대한 치료효과에 관련된 연구는 없었다.

Cisplatin은 다양한 종양의 치료에 유효한 효과를 나타내는 항암제이나 반응성 산소기의 발생으로 인한 신장 독성을 나타내어 신부전을 일으키는 신장 손상의 원인 물질로 보고되고 있다³.

본 연구에서는 澤瀉散의 신장 보호효과를 확인하기 위하여, cisplatin 투여 전 23일부터 28일간 澤瀉散 물 추출물을 매일 100, 300 및 500 mg/kg의 농도로 각각 경구투여하였다. 천연물이 급격한 변화를 일으키기는 어려우므로, Cisplatin 투여전 비교적 장기간인 23일간 전 투여하여, 실험동물 자체의 항산화 효과를 올린 다음 cisplatin 을 처리하여, 그 보호 효과를 보기 위한 것이다. cisplatin 투여 5일 후 모든 실험동물을 Ethyl Ether마취를 통해 희생하여, 체중 및 신장 중량의 변화, 혈중 BUN 및 creatinine 함량의 변화를 관찰하였으며, 지질과산화(lipid peroxidation)에 미치는 영향을 관찰하기 위해, 신장내 malondialdehyde(MDA) 함량을 측정하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재 료

1) 실험동물

48마리의 암컷Sprague-Dawely 랫트 (6-week old upon receipt, SLC, Japan)를 7일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간동안 온도 (20-25°C)와 습도 (30-35%)가 조절된 사육실에서 랫트용 polycarbonate 사육상자에 5마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료 (삼양, 한국)와 음수는 자유롭게 공급하였다. 본 실험에 사용된 실험동물은 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Department of Health, Education, and Welfare Publication (National Institute of Health) 85-23, 1996]에 준하여 취급하였다.

2) 실험약제

본 실험에 사용된 약제는 약업사 (효성약업사, 대구, Korea)에서 매입한 것을 대구한의대학교 생물학교실에서 현미경하에 관능검사를 통하여 선정하여 사용 하였으며, 본 실험에 사용된 澤瀉散1첩 분량의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of *Taeksa-sar*(TSS)

Herbs	Scientific name	Korean name	Amounts (g)
Alismatis Rhizoma	<i>Alisma canaliculatum</i> A.BR. et BOUCHE.	Taeksa	4
Hoelen Rubrum	<i>Pachyma hoelen</i> Rumph	JeokBokryeong	4
Aurantii Fructus	<i>Citrus aurantium</i> L.	Jigak	4
Polyporus	<i>Polyporus umbellatus</i> (PERS.) FRIES	Jeoryeong	4
Akebiae Caulis	<i>Akebia quinata</i> (THUNB.) DECNE	Moktong	4
Arecae Semen	<i>Areca catechu</i> L.	Binrang	4
Pharbitidis Semen Black	<i>Pharbitis nil</i> Choisy	Heukgeonuja	4
Total	7 types		28

All individual herbs were purchases from local voucher (Hyo-sung Pharmacy. Co. Daegu, Korea) after confirm the morphology under microscopy.

2. 방법

1) 澤瀉散 추출물 제조

선정된 약제 5첩 분량 (140 g)을 취하여 정제수 2000 ml로 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (N-N type; LAB Camp, Daejeon, Korea)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer (PVTFD10A; ilShin LAB, Seoul, Korea)를 사용하여 동결 건조시켜 1첩 당 4.10g, 총 20.50 g (수율 약 14.64%)의 진갈색의 물 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 澤瀉散 물 추출물은 -20°C의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 용매인 증류수에 100 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었다.

2) 실험군 분리 및 약물의 투여

실험동물은 군당 5마리씩 Table 2에 기록한 6그룹으로 구분하였다. 먼저 정상 대조군과 cisplatin 투여할 군으로 나누고 cisplatin 투여할 군을 다시 captopril, 증류수, 澤瀉散 물 추출물 100 mg/kg, 300 mg/kg, 500 mg/kg로 나누었다. 즉, cisplatin 대신 생리식염수를 투여한 정상 대조군 (정상 대조군), 멸균 증류수 및 cisplatin 투여 대조군 (cisplatin 대조군), captopril (Sigma, USA) 100 mg/kg 및 cisplatin 투여군 (captopril 투여군; Captopril 100), 澤瀉散 물 추출물 100 mg/kg 및 cisplatin 투여군 (澤瀉散 물 추출물 100 mg/kg 투여군; TSS 100), 澤瀉散 물 추출물 300 mg/kg 및 cisplatin 투여군 (澤瀉散 물 추출물 300 mg/kg 투여군; TSS 300), 澤瀉散 물 추출물 500 mg/kg 및 cisplatin 투여군 (澤瀉散 물 추출물 500 mg/kg 투여군; TSS 500)의 6 군으로 구분하여 실험하였다 (Table 2). 澤瀉散 물 추출물 및 captopril 은 각각 멸균 증류수에 용해시켜 동물 체중 kg 당 5 ml의 용량으로 매일 1회씩 28일간 급속제 Zonde가 부착된 3 ml syringe를 이용하여 강제 경구투여하였다.

Table 2. Experimental Design Used in Single Dose Toxicity Test

Groups		Cisplatin/Test article/Dose (mg/kg/day)
Control	Intact	Distilled water and saline treated (5ml/kg)
	Cisplatin	Distilled water and Cisplatin 5mg/kg treated
Reference	Captopril	Captopril 100mg/kg and Cisplatin 5mg/kg treated
TSS	TSS 100	TSS 100mg/kg and Cisplatin 5mg/kg treated
	TSS 300	TSS 300mg/kg and Cisplatin 5mg/kg treated
	TSS 500	TSS 500mg/kg and Cisplatin 5mg/kg treated

TSS, *Taeksa-san* aqueous extracts; TSS, captopril or vehicle (distilled water) were dosed at 5ml/kg volume, once a day for 28 days; 8 rats per group, total 6 groups were used this study; Acute renal failures were induced by single intraperitoneal injection of cisplatin at 5 days before sacrifice; All animals were sacrificed after 28 days of test article treatment, at 5 days after cisplatin treatment.

3) 급성신부전의 유발

급성신부전증을 유발하기 위하여 최종 희생 5일 전 cisplatin (*cis*-diaminedichloroplatinum; CCDP; Sigma, MO, USA) 5 mg/kg을 1회 복강투여하였다. cisplatin은 생리식염수에 녹여 실험동물 체중 kg 당 5 ml의 농도로 23G (gauge)의 needle이 부착된 3 ml syringe로 투여하였으며, 정상 대조군에서는 cisplatin 대신 멸균 생리식염수만 동일한 방법으로 투여하였다.

4) 체중 측정

모든 실험동물의 체중을 투여 시작 1일전, 약물 투여 시작일, 투여 7, 21, 23일 (cisplatin 투여일) 및 최종 희생일에 각각 측정하였으며, 사료섭취에 따른 체중 변화를 최소화하기 위해 투여시작일, cisplatin 투여일 및 최종 희생일에 모든 실험동물은 18시간 정도 절식시켰으며, 실험 시작시의 개체

차이에 의한 체중 변화를 최소화하기 위해 하기의 공식 [1]을 이용하여 투여시작일에서 투여 21일후까지의 체중변화, cisplatin 투여일에서 최종희생일까지의 체중변화 및 투여시작일에서 최종 부검일까지의 실험 전기간 동안의 체중변화량인 증체량 (body weight gains)을 각각 측정하였다. 6주령 흰쥐의 평균체중은 120~140g이었다.

EQUATION [1]. Body Weight Gains (g)

Pre CCDP-treated periods = Body weight gains during pretreated of test article periods (At initiation of test article treatment ~ 23 days after test article treatment)

After CCDP-treated periods = Body weight gains after CCDP-treatment (23 days after test article treatment ~ at sacrifice, the end of 28 days of test article treatments)

Throughout the whole experimental periods = Body weight gains after CCDP-treatment (At initiation of test article treatment ~ at sacrifice, the end of 28 days of test article treatments)

5) 신장중량의 측정

최종 희생일에 모든 실험동물의 좌측 신장을 적출하여 분리한 다음 각각의 중량을 측정하여, 절대중량으로 하였으며, 체중의 변화에 수반된 이차적 변화를 최소화 하기 위해 체중에 대한 각각의 장기 절대중량의 비율인 상대 중량을 하기의 공식 [2]을 이용하여 산출하였다.

EQUATION [2]. Relative Kidney Weights (%)
 = (Absolute kidney weight / Body weight at sacrifice) × 100

6) 혈중 BUN의 측정

Cisplatin 투여 직전 및 최종 희생일에 모든 실험동물을 18시간 이상 절식 후 안와정맥총 (orbital plexus)에서 약 0.5 ml의 혈액을 채취하였으며, 상온에서 1시간 정도 방치한 다음 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈청 (serum)을 분리하였다. 이후 자동혈액분석장치 (Toshiba 200 FR, Japan)를 이용하

여 혈중 BUN 함량을 각각 측정하였다. Cisplatin 투여 전의 개체 차이에 의한 혈중 BUN 함량의 차이를 최소화 하기 위해 하기의 공식 [3]을 이용하여 cisplatin 투여 전에서 최종 희생일의 혈중 BUN의 변화량을 각각 측정하였다.

EQUATION [3]. Changes of Serum BUN Levels (mg/dl)

Changes (After CCDP-dosing) = Serum BUN levels at sacrifice - Serum BUN levels at 23 days after test article treatment, at Cisplatin treatment

7) 혈중 creatinine의 측정

Cisplatin 투여 직전 및 최종 희생일에 모든 실험동물을 18시간 이상 절식 후 안와정맥총 (orbital plexus)에서 약 0.5 ml의 혈액을 채취하였으며, 상온에서 1시간 정도 방치한 다음 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈청 (serum)을 분리하였다. 이후 자동혈액분석장치 (Toshiba 200 FR, Japan)를 이용하여 혈중 creatinine 함량을 각각 측정하였다. cisplatin 투여 전의 개체 차이에 의한 혈중 creatinine 함량의 차이를 최소화 하기 위해 하기의 공식 [4]을 이용하여 cisplatin 투여 전에서 최종 희생일의 혈중 creatinine의 변화량을 각각 측정하였다.

EQUATION [4]. Changes of Serum Creatinine Levels (mg/dl)

Changes (After CCDP-dosing) = Serum Creatinine levels at sacrifice - Serum Creatinine levels at 23 days after test article treatment, at Cisplatin treatment

8) 신장 내 MDA 및 GSH 함량의 측정

최종 희생일에 모든 실험동물을 18시간 이상 절식 후 개복하여 신장을 적출한 다음, 멸균 생리 식염수로 세척하고 주변 지방조직을 제거하였다. 이후 Kavutcu et al⁴의 방법으로 얼음으로 냉각시켜 0.15 M/L KCl 및 1.9 mM/L ethylenediaminetetraacetic acid가 함유된 용액에서 homogenize하고, 상층액을 분리하여 MDA 및 GSH 측정하였다. 신장내 단백질 함량은 Lowry et al⁵의 방법으로 bovine serum

albumin을 standard로 이용하여 측정하였으며, 지질 과산화 정도 (lipid peroxidation)는 Dahle et al⁶의 방법으로 2-thiobarbituric acid를 이용하여 MDA (nmole)/g protein 단위로 측정하였다. 또한 항산화 정도를 판단하기 위해, Eyer 와 Podhradsky⁷의 방법으로 microplate reader에 적응시킨 enzymatic recycling procedure를 이용하여 GSH (μmole)/g protein 단위로 측정하였다.

3. 통계처리

모든 수치는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증 하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences (LSD) test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비 등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, $p < 0.05$ 통계적 유의성을 인정하였다. 또한 cisplatin에 의한 급성신부전의 유발 정도를 파악하기 위하여 정상 대조군과 cisplatin 유발 대조군과의 percent change를 하기의 공식 [5]을 이용하여 측정하였으며, 투여 물질의 약효를 좀더 명확히 하기 위하여 투여군과 cisplatin 유발 대조군과의 percent change를 하기의 공식 [6]을 이용하여 각각 측정하였다.

EQUATION [5]. Percentage Changes as Compared with Intact Control (%) = ((Data of Cisplatin control - Data of intact control)/Data

of intact control) × 100

EQUATION [6]. Percentage Changes as Compared Cisplatin Control (%) = ((Data of administered groups - Data of Cisplatin control) /Data of Cisplatin control) × 100

III. 결 과

1. 체중의 변화

정상 대조군에 비해 cisplatin 대조군에서는 유의성 있는 ($p < 0.01$) 현저한 체중의 감소가 cisplatin 투여 후 인정되었으며, 따라서 cisplatin 투여후 증체량 및 실험 소기간동안의 증체량 역시 각각 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 나타내었다. 한편 captopril, 澤瀉散 물 추출물 100(TSS 100), 300(TSS 300) 및 500 mg/kg 투여군 (TSS 500)에서는 각각 cisplatin 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) cisplatin 투여 후 체중의 증가가 인정되었으며, cisplatin 투여후 증체량 및 실험 소 기간동안의 증체량 역시 각각 cisplatin 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 증가를 나타내었다. 한편 cisplatin 투여 前 기간인 투여 21일부터 정상 및 cisplatin 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 체중 증가가 TSS 300 및 TSS 500 투여군에서 인정되었으며, cisplatin 투여 前 기간 (3주) 동안의 증체량 역시, TSS 300 및 TSS 500 투여군에서 정상 및 cisplatin 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 증가를 각각 나타내었다. 한편 TSS 100 및 captopril 투여군에서는 cisplatin 투여 前 기간동안 정상 및 cisplatin 대조군에 비해 의미 있는 체중 및 증체량의 변화는 인정되지 않았다(Table 3, Fig. 1).

Table 3. Effect of TSS Extract on Body Weight in Cisplatin-treated Rats

Groups	Body weight		
	Pre cisplatin treatment (3 weeks)	After cisplatin treatment (5 days)	Total experimental periods (4 weeks)
Controls			
Intact	42.75 ± 5.18	8.88 ± 2.85	51.63 ± 5.66
Cisplatin	44.50 ± 8.49	-15.00 ± 3.55*	29.50 ± 9.18*
Captopril 100 mg/kg	45.88 ± 6.60	-3.63 ± 3.50* [#]	42.25 ± 7.29** [#]
TSS extracts			
100 mg/kg	42.13 ± 8.51	-2.88 ± 3.91* [#]	39.25 ± 9.36* [#]
300 mg/kg	53.00 ± 5.55* [#]	2.50 ± 3.41* [#]	55.50 ± 7.95 [#]
500 mg/kg	56.50 ± 7.39* [#]	1.63 ± 3.46* [#]	58.13 ± 6.51 [#]

Values are expressed Mean ± SD of eight rats (g); * p<0.01 and ** p<0.05 compared with intact control; # p<0.01 and # p<0.05 compared with Cisplatin control.

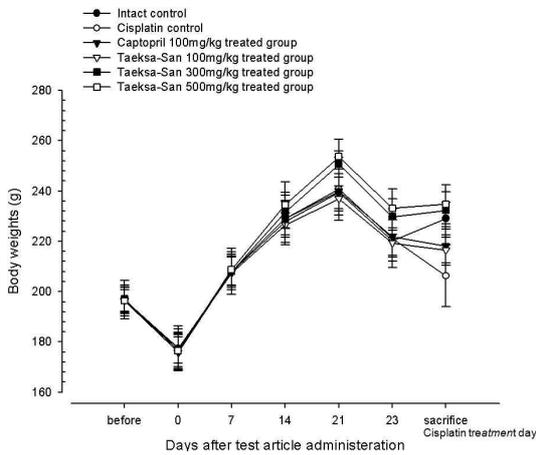


Fig. 1. Effect of TSS Extract on Body Weight in Cisplatin-treated Rats.

Note that the body weights at sacrifice, 5 days after cisplatin treatments and 28 days after test article administration in cisplatin control were significantly (p<0.01; arrow) decreased. However, these body weight decreases were significantly (p<0.01 or p<0.05; arrow) inhibited by treatment of captopril, *Taeksa-san* 100, 300 and 500 mg/kg, respectively. In addition, significant (p<0.01 or p<0.05; a) increases of body weights were detected in *Taeksa-san* extracts 300 and 500 mg/kg treated group from 21 days after start of test article treatment as compared with intact and cisplatin controls, respectively (a). No meaningful changes were detected in captopril

treated group during pre-cisplatin treatment periods as compared with intact and cisplatin controls. Before means 1 day before start of test article administration; Day 0 means at start of test article administration; All animals at Day 23 (Cisplatin treatment day), sacrifice and Day 0 were overnight fasted.

2. 신장중량의 변화

정상 대조군에 비해 cisplatin 대조군에서는 유의성 있는 (p<0.01) 현저한 신장의 상대 및 절대 중량치의 증가가 각각 인정되었으나, captopril, TSS 100, TSS 300 및 TSS 500 투여군에서는 각각 cisplatin 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 신장의 상대 및 절대 중량치의 감소가 인정되었다(Table 4).

3. 혈중 BUN 함량의 변화

정상 대조군에 비해 cisplatin 대조군에서는 유의성 있는 (p<0.01) 혈중 BUN함량의 상승이 cisplatin 투여 후 인정되어, cisplatin 투여 전후 혈중 BUN 함량의 변화량 역시 정상 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 현저한 증가를 나타내었으나, captopril, TSS 100, TSS 300 및 TSS 500 투여군에서는 각각 cisplatin 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) cisplatin 투여 후 혈중 BUN 함량 및 cisplatin 투여 전후 혈

중 BUN 함량 변화량의 감소가 인정되었다. 한편 cisplatin 투여 전의 혈중 BUN 함량은 모든 실험군에서 의미 있는 변화를 나타내지 않았다(Table 5).

Table 4. Effect of TSS Extract on the Kidney Weight in Cisplatin-treated Rats

Groups	Kidney weights	
	Absolute (g)	Relative (%) of body weights
Controls		
Intact	0.783 ± 0.042	0.342 ± 0.021
Cisplatin	0.971 ± 0.067*	0.472 ± 0.032*
Captopril 100 mg/kg	0.877 ± 0.048*#	0.402 ± 0.022*#
TSS extracts		
100 mg/kg	0.881 ± 0.049*#	0.407 ± 0.020*#
300 mg/kg	0.808 ± 0.050#	0.349 ± 0.029#
500 mg/kg	0.824 ± 0.065#	0.351 ± 0.030#

Values are expressed Mean ± SD of eight rats; * p<0.01 compared with intact control; # p<0.01 compared with cisplatin control.

Table 5. Effect of TSS Extract on the Serum Levels of BUN in Cisplatin-treated Rats

Groups	BUN level		
	Pre cisplatin treatment (A)	After cisplatin treatment (B)	Changes after cisplatin treatment (B-A)
Controls			
Intact	18.78 ± 1.52	18.99 ± 1.43	0.21 ± 0.77
Cisplatin	18.58 ± 1.19	47.21 ± 3.70*	28.64 ± 3.26*
Captopril 100 mg/kg	18.61 ± 1.42	32.20 ± 3.40*#	13.59 ± 4.07*#
TSS extracts			
100 mg/kg	18.46 ± 1.74	29.28 ± 1.84*#	10.81 ± 1.58*#
300 mg/kg	18.68 ± 1.07	24.16 ± 3.72*#	5.49 ± 3.83*#
500 mg/kg	18.54 ± 1.40	25.40 ± 2.82*#	6.86 ± 3.82*#

Values are expressed Mean ± SD of eight rats (mg/dl); * p<0.01 compared with intact control; # p<0.01 compared with cisplatin control.

4. 혈중 creatinine 함량의 변화

혈중 BUN 함량과 유사하게, 정상 대조군에 비해 cisplatin 대조군에서는 유의성 있는 (p<0.01) 혈중 creatinine 함량의 상승이 cisplatin 투여 후 인정되었고, cisplatin 투여 전후 혈중 creatinine 함량의 변화량 역시 정상 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 현저한 증가를 나타내었으나, captopril, TSS 100,

TSS 300 및 TSS 500 투여군에서는 각각 cisplatin 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) cisplatin 투여 후 혈중 creatinine 함량 및 cisplatin 투여 전후 혈중 creatinine 함량 변화량의 감소가 인정되었다. 한편 cisplatin 투여 전의 혈중 creatinine 함량은 모든 실험군에서 의미 있는 변화를 나타내지 않았다 (Table 6).

Table 6. Effect of TSS on the Serum Levels of Creatinine in Cisplatin-treated Rats

Groups	Creatinine levels		
	Pre cisplatin treatment (A)	After cisplatin treatment (B)	Changes after cisplatin treatment (B-A)
Controls			
Intact	0.64 ± 0.04	0.65 ± 0.05	0.01 ± 0.01
Cisplatin	0.65 ± 0.04	1.36 ± 0.19*	0.71 ± 0.20*
Captopril 100 mg/kg	0.65 ± 0.04	0.94 ± 0.09* [#]	0.28 ± 0.09* [#]
TSS extracts			
100 mg/kg	0.65 ± 0.03	0.95 ± 0.07* [#]	0.30 ± 0.08* [#]
300 mg/kg	0.65 ± 0.04	0.77 ± 0.07* [#]	0.13 ± 0.07* [#]
500 mg/kg	0.65 ± 0.04	0.80 ± 0.07* [#]	0.15 ± 0.08* [#]

Values are expressed Mean ± SD of eight rats (mg/dl); * p<0.01 compared with intact control; # p<0.01 compared with cisplatin control.

5. 신장내 MDA 함량의 변화

정상 대조군에 비해 cisplatin 대조군에서는 유의성 있는 (p<0.01) 신장내 MDA 함량의 증가가 인정되었으나, captopril, TSS 100, TSS 300 및 TSS 500 투여군에서는 각각 cisplatin 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 신장내 MDA 함량의 감소가 인정되었다(Fig. 2).

6. 신장내 GSH 함량의 변화

정상 대조군에 비해 cisplatin 대조군에서는 유의성 있는 (p<0.01) 신장내 GSH 함량의 감소가 인정되었으나, captopril, TSS 100, TSS 300 및 TSS 500 투여군에서는 각각 cisplatin 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01 or p<0.05) 신장내 GSH 함량의 증가가 인정되었다(Fig. 3).

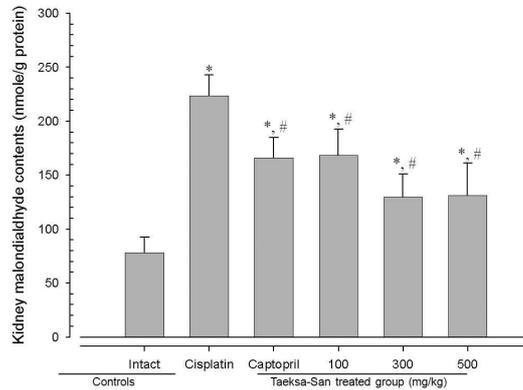


Fig. 2. Effect of TSS Extract on the Kidney Malondialdehyde Contents in Cisplatin-treated Rats.

Note that the kidney malondialdehyde (MDA) contents was significantly (p<0.01) increased in Cisplatin control as compared with intact control. It means, lipid peroxidation was increased by treatment of Cisplatin. However, these kidney MDA contents increases were significantly (p<0.01) inhibited by treatment of captopril, *Taeksa-san* 100, 300 and 500mg/kg, respectively; Captopril was dosed as 100mg/kg of body weights; * p<0.01 compared with intact control; # p<0.01 compared with Cisplatin control.

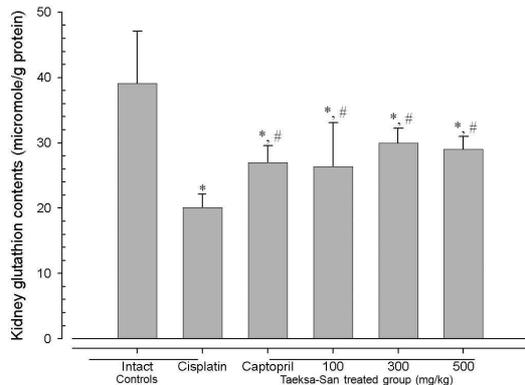


Fig. 3. Effect of TSS on the Kidney Glutathione Contents in Cisplatin-treated Rats.

Note that the kidney glutathione content was significantly ($p < 0.01$) decreased in Cisplatin control as compared with intact control. It means, oxidative stress was induced by treatment of Cisplatin. However, these kidney glutathione contents decreases were significantly ($p < 0.01$) inhibited by treatment of captopril, *Taeksa-san* 100, 300 and 500mg/kg, respectively; Captopril was dosed as 100mg/kg of body weights; * $p < 0.01$ compared with intact control; # $p < 0.01$ compared with Cisplatin control.

IV. 고찰

일반적으로 급성신부전은 신장의 급성 기능장애에 의해 혈액요소질소 (blood urea nitrogen; BUN) 또는 크레아티닌 (creatinine)과 같은 노폐물의 체내 축적이 일어나는 것을 의미한다. 급성신부전은 임상적으로 흔히 관찰되는 질환 중 하나로, 내원한 환자의 4~5% 정도에서 급성신부전으로 진행되는 것으로 알려져 있으며, 유아에서는 성인에 비해 비교적 드문 질환으로 알려져 있다. 신부전은 몇몇 질환에서 말기적으로 진행되는 질환으로 사망률과 이환률이 비교적 높으며, 다양한 원인으로 유발되므로 적절한 치료를 요한다⁸.

澤瀉散은 李梴의 《醫學入門》²을 보면 “治水腫二便澀澤瀉赤茯苓枳殼豬苓木通檳榔黑牽牛頭末各等分右爲末生薑蔥白湯調下二錢”이라 하여, 이노 작용

을 통한 浮腫의 治療에 使用되는 處方이다. 澤瀉散은 澤瀉, 赤茯苓, 枳殼, 豬苓, 木通, 檳榔 및 黑牽牛子 등 7종의 藥材로 構成되어 있으며, 澤瀉는 利水滲濕 및 清熱瀉火 하는 效능이 있고, 赤茯苓은 利水滲濕, 健脾 및 寧心安神의 效능이 있으며, 枳殼은 波氣消積, 化痰散痞의 效능이 있다. 또한 豬苓은 利水滲濕하는 效능이 있고, 木通은 瀉火行水 및 通利血脈의 效능이 있으며, 檳榔은 殺蟲, 消積行氣, 行水 등의 效능이 있고, 黑牽牛子는 瀉水通便, 消痰水飲하는 效능이 있는 등 澤瀉散을 構成하는 대부분의 藥材가 이노작용이 강해 부중에 效능이 있는 것으로 알려져 있다⁹.

본 실험의 결과, cisplatin 투여에 의해 현저한 체중의 감소, 신장 중량의 증가, 혈중 BUN 및 creatinine 함량의 증가와 함께 신장내 MDA 함량의 증가와 GSH 함량의 감소가 인정되어, 이전의 보고들^{10-17, 20-27} 과 유사하게, 지질과산화에 의한 항산화 억제로 인한 급성신부전이 cisplatin 투여에 의해 유발되었다. 본 실험에 사용한 3가지 용량의 모든 澤瀉散 물 추출물 투여에 의해 이러한 cisplatin 유발 급성 신부전증이 경감되어, 澤瀉散이 급성 신부전증 등의 신장질환에 매우 유효할 것으로 생각된다. 澤瀉散 500 mg/kg 과 300 mg/kg 투여군 사이에서 용량 의존성이 인정되지 않은 점은 500 mg/kg 투여군에서 흡수 포화가 일어난 것으로 판단되어, cisplatin 유발 급성신부전에 대한 澤瀉散의 최대 유효 용량은 300 mg/kg 전후로 판단되며, 100 mg/kg 투여군에서도 captopril과 유사한 정도의 효과가 인정되어, 澤瀉散의 유효농도는 100 mg/kg 이상으로 생각된다.

Cisplatin 투여 후 인정된 체중 및 증체량의 감소는 cisplatin 자체의 직접적인 독성 또는 cisplatin에 의해 유발된 급성신부전증에 수반된 이차적인 변화로 판단되며, 현재까지 이러한 체중의 변화는 신장보호 효과가 있는 활성 물질의 탐색에 있어 가장 기본적인 지표로 사용되어 왔다²⁸. 따라서 본 실험에서 澤瀉散 물 추출물 투여에 의해 투여 용

량 의존적인 cisplatin에 의한 체중 감소 억제효과가 인정된 점은 澤瀉散의 급성신부전에 대한 효과를 간접적으로 나타내는 증거로 판단되며, 일반적으로 면역활성 효과가 있는 물질 투여시 체중의 증가 등 성장 촉진 효과가 인정되는 것으로 알려져 있어²⁹, cisplatin 및 정상 대조군에 비해 澤瀉散 물 추출물 300 및 500 mg/kg 투여군에서 인정된 cisplatin 투여 前 기간동안의 체중 및 증체량의 증가는 면역활성 등의 다른 약리작용에 수반된 이차적 변화로 생각된다. 한편 澤瀉散 자체의 면역활성 효과는 알려져 있지 않으나, 구성 약재 중 茯苓³⁰ 및 猪苓⁸의 면역활성 작용이 알려져 있다.

본 실험의 결과, 澤瀉散 물 추출물 및 captopril 투여군에서 인정된 cisplatin 대조군에 비해 유의성 있는 신장 중량의 감소는 澤瀉散 물 추출물 및 captopril이 cisplatin 유발 급성신부전에 유효한 효과를 나타내는 직접적인 증거로 생각된다. cisplatin 투여에 의해 급성신부전증이 진행됨에 따라 신장 중량이 유발되며, 결과적으로 신장 중량의 증가가 초래되고, 이러한 신장 중량의 변화 억제 역시 신장보호 효과가 있는 활성 물질의 탐색에 사용되어 왔다³¹.

澤瀉散 물 추출물 투여 후 인정된 혈중 BUN 및 creatinine 함량의 감소는 澤瀉散 물 추출물의 cisplatin 유발 급성신부전에 대한 유효한 효과를 나타내는 직접적인 증거로 생각된다. BUN은 단백질 분해의 대사산물인 요소질소 (urea nitrogen)의 혈중 함량을 나타내는 혈액생화학적 지표로, 혈중 BUN의 상승은 일반적으로 신장질환의 존재를 의미한다³². cisplatin 유발 급성신부전 시에도 현저한 혈중 BUN 함량의 증가가 초래된다³³. 또한 creatinine은 비단백질 유래의 근육 대사에 의해 형성되는 질소산물 (nitrogenous product)로, BUN과 함께 혈중 creatinine 함량의 증가는 사구체 여과율의 감소를 의미한다³². Cisplatin 유발 급성신부전 시에도 혈중 BUN 함량의 증가와 함께 creatinine 함량의 증가가 초래되므로³⁴, 이들 혈중 BUN 및 creatinine

함량의 변화 역시 cisplatin 유발 급성신부전을 판단하는 기본적인 지표로 이용되어 왔다.

본 실험의 결과, 지질과산화에 의해 cisplatin 투여 후 신장내 MDA 함량의 증가가 인정되었다. 최근 연구에 따르면, GSH 함량의 감소에 의한 oxidative stress에 의해 급성신부전증이 cisplatin에 의해 유발되며, free radical scavenger agent 즉, 항산화제 투여에 의해 cisplatin 유발 급성신부전증이 억제되는 것으로 알려져 있다³⁵. 본 실험에서도 신장내 GSH 함량의 감소와 함께 MDA 함량의 증가가 cisplatin 투여에 의해 초래되었다. 따라서 지질 과산화에 의한 항산화 효과 억제가 초래되었다. 한편 이러한 신장내 MDA 함량의 증가와 GSH 함량의 감소가 澤瀉散 물 추출물 투여에 의해 투여 용량 의존적으로 억제된 점이 인정되었으므로, 澤瀉散 물 추출물의 cisplatin 유발 급성신부전증에 대한 효과가 항산화 효과에 의해 초래되는 것으로 판단된다. 한편 澤瀉散 자체의 항산화효과는 아직까지 알려져 있지 않으나, 적복령³⁶에 대한 항산화 효과가 이미 알려져 있다. 또한 항산화와 항염증 작용은 서로 긴밀한 관련이 있으며³⁷, cisplatin 유발 급성신부전에 염증반응 역시 깊은 관여를 하는 것으로 알려져 있고³⁸, 澤瀉散 구성 약재 중, 적복령³⁹ 및 목동⁴⁰에 대한 항염 효과가 알려져 있어, 항염 효과 역시 cisplatin 유발 급성신부전증에 대한 澤瀉散의 기전으로 작용할 가능성 역시 배제할 수 없어, 다양한 방면으로의 기전적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

澤瀉散 추출물의 급성 신부전에 대한 효과를 관찰하기 위하여, cisplatin 유발 급성신부전 랫트 모델을 이용하여 평가하였다.

1. 澤瀉散 투여는 cisplatin에 의한 체중 감소와 신장중량의 증가를 억제하는 효과가 있음이 투여

용량 의존적으로 유의성 있게 인정되었다.

2. 澤瀉散 투여 후 혈중 BUN과 혈중 creatinine 함량의 감소가 유의성 있게 인정되었다.
3. 澤瀉散 투여는 cisplatin에 의해 유발된 신장 내 MDA 함량의 증가와 GSH 함량의 감소를 투여 용량 의존적으로 억제하는 것으로 유의성 있게 인정되었다.

이상의 결과에서 澤瀉散은 cisplatin 유발 급성신부전에 매우 양호한 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. E. Braunwald, A. Fauci, D.Kasper, S.Hauser, D. Longo and J. Jameson. Harrison's principles of internal medicine. 서울: 도서출판 MIP; 2006, p. 1794-803.
2. 이천. 國譯 篇註 醫學入門 IV 雜病門. 서울: 남산당; 1991, p. 700.
3. Lippman AJ, Helson C, Helson L, Krakoff IH. Clinical trials of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875). Cancer Chemother Rep. 1973;57:191-200.
4. Kavutcu M, Canbolat O, Oztürk S, Olcay E, Ulutepe S, Ekinci C, Gökhan IH, Durak I. Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissues from gentamicin-treated guinea pigs: effects of vitamins E and C. Nephron. 1996;72:269-74.
5. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265-75.
6. Dahle LK, Hill EG, Holman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. Arch Biochem Biophys. 1951;193:265-75.
7. Eyer P, Podhradský D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. Anal Biochem. 1986;153:57-66.
8. Anderson RJ. Prevention and management of acute renal failure. Hosp Prac. 1993;28:61-75.
9. 김동현, 김형민, 류종훈, 엄재영, 김상찬, 양재하, 조민경, 임종필, 홍승현. 한방약리학, 서울: 신일상사; 2006, p. 49-53, 490-1, 496-8, 503-8, 532-4, 569-73, 610-3.
10. Safirstein R, Winston J, Goldstein M, Moel D, Dikman S, Guttenplan J. Cisplatin nephrotoxicity. Am J Kidney Dis. 1986;8:356-67.
11. Salahudeen A, Badr K, Morrow J, Roberts J 2nd. Hydrogen peroxide induces 21-aminosteroid-inhibitable F2-isoprostane production and cytolysis in renal tubular epithelial cells. J Am Soc Nephrol. 1995;6:1300-3.
12. Masuda H, Tanaka T, Takahama U. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. Biochem Biophys Res Commun. 1994;203:1175-80.
13. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. Nephrol Dial Transplant. 1997;12:2478-80.
14. Cetin R, Devrim E, Kiliçoğlu B, Avcı A, Candir O, Durak I. Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues: possible protective roles of natural antioxidant foods. J Appl Toxicol. 2006;26:42-6.
15. Ahn H, Lee E, Kim K, Lee C. Effect of glutathione and its related enzymes on chemosensitivity of renal cell carcinoma and bladder carcinoma cell lines. J Urol. 1994;151:263-7.
16. Baldew GS, McVie JG, van der Valk MA, Los G, de Goeij JJ, Vermeulen NP. Selective reduction

- of cisdiamminedichloroplatin(II) nephrotoxicity by ebselen Cancer Res. 1990;50:7031-6.
17. Kang DG, Lee AS, Mun YJ, Woo WH, Kim YC, Sohn EJ, Moon MK, Lee HS. Butein ameliorates renal concentrating ability in cisplatin-induced acute renal failure in rats. Biol Pharm Bull. 2004;27:366-70.
 18. Gordon JA, Peterson LN, Anderson RJ. Water metabolism after cisplatin in the rat. Am J Physiol. 1982;243:36-43.
 19. Seguro AC, Shimizu MH, Kudo LH, dos Santos Rocha A. Renal concentration defect induced by cisplatin. The role of thick ascending limb and papillary collecting duct. Am J Nephrol. 1989;9:59-65.
 20. Suzuki CA, Cherian MG. The interactions of cis-diamminedichloroplatinum with metallothionein and glutathione in rat liver and kidney. Toxicology. 1990;64:113-27.
 21. Wong NL, Walker VR, Wong EF, Sutton RA. Mechanism of polyuria after cisplatin therapy. Nephron. 1993;65:623-7.
 22. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. Am J Physiol. 1996;270:700-8.
 23. Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. J Am Soc Nephrol. 2001;12:2683-90.
 24. Karimi G, Ramezani M, Tahoonian Z. Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2005;2:383-6.
 25. Shimeda Y, Hirotani Y, Akimoto Y, Shindou K, Ijiri Y, Nishihori T, Tanaka K. Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Biol Pharm Bull. 2005 ;28:1635-8.
 26. Latha PG, Panikkar KR. Chemoprotective effect of *Ixora coccinea* L. flowers on cisplatin induced toxicity in mice. Phytother Res. 2001;15:364-6.
 27. Duarte, C.G., dos Santos, G.L., Azzolini, A.E. and de Assis Pandochi, A.I. The effect of the antithyroid drug propylthiouracil on the alternative pathway of complement in rats. Int. J. Immunopharmacol; 2000, p. 22, 25-33.
 28. Yu SJ, Tseng J. Fu-Ling, a Chinese herbal drug, modulates cytokine secretion by human peripheral blood monocytes. Int J Immunopharmacol. 1996;18:37-44.
 29. Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khattab MM, Al-Shabanah OA. Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2002;132:123-8.
 30. Sodikoff CH. Laboratory profiles of small animal diseases. A guide to laboratory diagnosis. 2nd ed., Mosby: St. Louise; 1995, p. 1-36.
 31. Kim YK, Choi TR, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS. Beneficial effect of pentoxifylline on cisplatin-induced acute renal failure in rabbits. Ren Fail. 2003;25:909-22.
 32. Gonzalez R, Borrego A, Zamora Z, Romay C, Hernandez F, Menendez S, Montero T, Rojas E. Reversion by ozone treatment of acute nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. Mediators Inflamm. 2004;13:307-12.
 33. Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. J Lab Clin Med. 1998;131:518-26.
 34. Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich de Buschiazzo P, Ríos JL. Antioxidant activity

- of anti-inflammatory plant extracts. Life Sci. 2002;70:1023-33.
35. Joannidis M. Medical therapy of acute kidney injury. Acta Clin Belg Suppl; 2007, p. 353-6.
36. Kuhad A, Pilkhwal S, Sharma S, Tirkey N, Chopra K. Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. J Agric Food Chem. 2007;55:10150-5.
37. Yasukawa K, Kaminaga T, Kitanaka S, Tai T, Nunoura Y, Natori S, Takido M. 3 beta-p-hydroxybenzoyldehydrotumulosic acid from *Poria cocos*, and its anti-inflammatory effect. Phytochemistry. 1998;48:1357-60.
38. Yamahara J, Takagi Y, Sawada T, Fujimura H, Shirakawa K, Yoshikawa M, Kitagawa I. Effects of crude drugs on congestive edema. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1979;27:1464-8.