

Effects of Zizyphi Spinosae Extract on Cisplatin and t-Butylhydroperoxide Induced Acute Renal Failure in Rabbits

Jae Young Kim¹ and Chung Hui Kim^{2*}

¹Swine Science & Technology Center, Gyeongnam National University of Science & Technology, 33 Dong Jin-Ro, Jinju, Gyeongnam 660-758, Korea

²College of Life Science, Gyeongnam National University of Science & Technology, 33 Dong Jin-Ro, Jinju, Gyeongnam 660-758, Korea

Received May 22, 2014 / Revised July 23, 2014 / Accepted July 24, 2014

Cathepsin D (CtsD), an aspartyl peptidase, is involved in apoptosis, resulting in the release of cytochrome C from mitochondria in cells. Here, we investigated microRNA regulation of CtsD expression in 3T3-L1 cells. First, we observed the expression of CtsD in cells in response to doxorubicin (Dox). As expected, the level of CtsD mRNA increased in 3T3-L1 cells exposed to Dox in a dose-dependent manner. The cellular viability of ectopically expressed CtsD cells was decreased. Next, we used the miRanda program to search for particular microRNA targeting CtsD. MiR-145 was selected as a putative controller of CtsD because it had a high miR-SVR score. In a reporter assay, the luciferase activity of cells containing the CtsD 3'-UTR region decreased in cells transfected with a miR-145 mimic compared to that of a control. The level of CtsD expression was down-regulated in preadipocytes ectopically expressing miR-145 and up-regulated by an miR-145 inhibitor. Cells also suppressed miR-145 expression when exposed to Dox. The miR-145 inhibitor reduced the cellular viability of 3T3-L1 cells. Taken together, these data suggest that miR-145 regulates CtsD-mediated cell death in adipocytes. These findings may have valuable implications concerning the molecular mechanism of CtsD-mediated cell death in obesity, suggesting that CtsD could be a useful therapeutic tool for the prevention and treatment of obesity by regulating fat cell numbers.

Key words : Antioxidant, cisplatin, renal Failure, spinosin, zizyphi extract

서 론

세포는 대사과정에서 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)을 생성한다. ROS는 세포의 주요 구성물질인 단백질, 지질 및 DNA 등에 산화적 손상을 초래하여 세포의 손상, 자살 또는 괴사를 유발한다[19]. 일상적인 상태에서의 정상세포는 ROS의 제거기전으로 glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase 및 NADPH 등이 세포 내에 작용하여 산화와 항산화의 균형을 유지하는데 관여 한다[6]. 그러나 이러한 균형을 유지하기 어려울 정도의 과도한 ROS가 발생하거나 세포가 스트레스를 받게 되면 세포의 자살, 괴사 등이 발생하면서 신체질병의 발생원인이 된다[25].

연구에 따르면 산화적 스트레스 유도성 질환에 대하여 항산화의 역할을 하는 유전자의 조절물질을 개발하여 임상에 적용하는 항산화제 치료(antioxidant therapy)라는 개념의 약리학적 치료가능성을 제시하고 있다[3]. 항산화제 치료제의 개념으

로 개발되고 있는 약제들의 주요 성분으로 Vitamin A, C, E 그리고 B 등이 널리 알려져 있다[15]. 최근에는 식물성 플라보노이드(flavonoid) 성분이 항산화제로써 탁월한 효과를 나타낸다고 한다[23].

플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 성분으로 플라보노이드의 C6-C3-C6를 기본골격으로 하여 노란색 또는 담황색을 나타내는 페놀계 화합물의 총칭으로 자연계에 널리 분포하고 있다. 그리고 채소류와 식물의 잎, 꽃, 과실, 줄기 및 뿌리 등 거의 모든 부위와 곡물, 과실류 등에도 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[14].

식물성 플라보노이드의 성분으로 한약제로 널리 사용되고 있는 산조인(*Semen Zizyphi Spinosae*)은 낙엽관목인 뽕대추나무(*Zizyphi Spinosae* HU)의 종으로 대한약전에 규정되어 있으며 양간, 영심, 안심, 수렴의 효과가 있으며 불면증, 진정, 심장질환, 신경강장, 최면약으로 사용되고 있는 주요 생약 중의 하나로 사용되고 있다[18]. 또한 산조인은 체중의 증가, 근육강화 및 지구력의 향상 그리고 면역체계 강화에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[11]. 그러나 산조인의 많은 사용과 연구에도 불구하고 신장에 대한 항산화 효과에 대한 연구는 아직까지 부족한 실정이다.

암발생 시 치료제로 사용되고 있는 cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II)은 ROS를 생성시킴으로써 p53을 자극하여 암세포를 사멸시킨다[2]. 이러한 과정 중에 생성된

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3237, Fax : +82-55-751-3267

E-mail : kimch@gntech.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ROS는 신장독성을 일으키는 심각한 부작용을 초래하여 사용이 제한되고 있다. 이를 이용하여 cisplatin은 손상된 신장의 모델을 제시하기 위한 약제로 사용되고 있다[21]. 따라서 이번 연구에서는 cisplatin가 생성시키는 ROS에 의하여 유발된 급성신부전 시 산조인의 항산화 작용에 의한 치료 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 체중 1.5~1.8 kg의 New Zealand male rabbit을 SNT 바이오에서 구입하여 고품사료(삼양사료, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 2주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 모든 실험동물관리는 경남과학기술대학교 실험동물관리기준에 의거하여 동물실험을 수행하였다(승인번호 2013-4). 대조군과 실험군은 각 5마리의 토끼를 사용하였으며, *in vitro* 실험으로 신장을 적출하여 신피질 절편을 만든 후 지질과산화 및 lactate dehydrogenase (LDH) 유출 실험과 *in vivo* 실험으로 약물 투여 후 혈액을 채취하여 급성신부전의 지표인 creatinine의 혈 중 농도와 항산화 효과를 조사하기 위한 지질과산화를 측정하였다. 또한, 신장세포의 병리조직을 검사하였다.

산조인 추출액 제조

산조인 300 g을 증류수 3,000 ml와 함께 전기 약탕기로 100 °C에서 2시간 전탕한 후 부직포를 이용하여 찌꺼기를 제거하고 동결 건조기를 이용하여 33.7 g의 건조 추출물을 얻었다. 이를 냉동실에 신선하게 보관하였다가 실험 직전에 필요한 농도로 1차 증류수에 용해시켜서 실험에 사용하였다.

신피질 절편의 제작

실험동물을 경추 타격법으로 희생시킨 후 즉시 신장을 분리하여 ice-cold isotonic solution (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂)을 신동맥에 주입하여 관류시켜 혈액을 제거한 뒤 ice-cold modified Cross-Taggart medium (130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 5 mM glucose, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)에 보관하였다. 그리고 준비된 장기를 Stadie-Riggs microtome을 이용하여 0.4~0.5 mm 두께로 절단한 후 실험 전까지 ice-cold modified Cross-Taggart medium에 다시 보관하였다.

t-Butylhydroperoxide (t-BHP) 약물처리 방법

t-BHP 1 mM이 함유된 37°C, 4 ml의 modified Cross-Taggart medium에 100% 산소를 지속적으로 공급하면서 산조인 추출물 0~0.5% 첨가한 후 신장의 피질에서 준비된 50 mg 정도의 신장 절편을 medium에 넣어 1시간 배양하였다.

급성 신부전 유도

Cisplatin 투여 전 7일 동안 산조인 추출액(*Zizyphus Extract*)을 투여(50 mg · kg⁻¹ · day⁻¹, p.o)하였다. 대조군은 동량의 생리식염수를 투여하였다. Cisplatin 5 mg · kg⁻¹을 dimethylsulfoxide (DMSO)에 희석하여 1회 복강 내 주사하고, 24 시간 및 48시간 뒤에 채혈 후 희생하여 조직을 채취하고 변화를 관찰하였다.

지질과산화의 분석

In vitro 실험으로 지질과산화는 malondialdehyde (MDA)의 함량을 측정하여 분석하였다[18]. t-BHP 1 mM 및 산조인 추출물이 함유된 배양액에 신장 절편을 1시간 배양 한 후 D.W. 1.8 ml가 함유된 10 ml 시험관에 넣고, 1 ml의 20% sodium dodecyl sulfate, 1 ml의 0.8% thiobarbituric acid를 첨가하였다. 상온에서 10분간 방치한 후 95°C에서 60분간 가열하고 4°C에서 10분간 방치하였다. 4 ml의 n-butanol:pyridine (15, v/v)를 혼합 및 진탕하여 2,000g에서 20분간 원심한 후 상층액을 취하여 spectrophotometer (Hitach, U-2,000 Japan)를 이용하여 510 nm와 534 nm에서 측정하였다.

In vivo 지질과산화 분석은 cisplatin에 의한 급성 신부전을 유발시킨 후 신장을 적출하여 신장절편을 만든 다음 *in vitro*와 같은 방법으로 지질과산화를 측정하였다.

유산 탈수소효소(Lactate dehydrogenase, LDH) 유출 측정

약물로 처리된 신장 조직 절편을 증류수에 넣고 갈아서 만든 조직액과 배양 용액을 각각 50 ml를 취하여 LDH 활성을 LDH 측정 kit (아산제약, 한국)로 측정하였다.

혈청성분 측정

토끼의 귀동맥에서 혈액을 채취한 뒤 원심 분리하여 혈청을 획득하였으며, Express Plus (Bayer, USA, 2002)를 이용하여 혈청에 함유된 creatinine을 측정하였다.

병리조직학적 검사

조직학적 소견을 위하여 적절한 신장의 동맥에 4% formaldehyde를 관류하여 고정하고 파라핀에 포맷한 후에 5 µm 두께로 조직 절편으로 만들어 염색하여 광학현미경으로 세포의 손상 정도를 검사하였다.

통계분석

통계처리는 SAS (The SAS System for Windows, ver. 9.0, SAS Institute, USA)를 이용하였다. 실험성적은 mean ± SD로 나타내었으며, 실험군 평균치 차에 대한 검증은 t-test로 실시하여 유의수준을 $p < 0.05$ 이하로 하였다.

결 과

t-BHP 처리한 신피질 절편에서 산조인 추출물의 지질과산화 억제 효과

산조인 추출액이 신피질 절편에서 지질과산화를 효과적으로 감소시키는지 확인하기 위하여 산조인 추출액을 각각 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5% 농도가 되게 한 다음 1 mM t-BHP를 첨가하여 신피질 절편에서 유리되는 지질과산화 정도를 조사하였다(Fig. 1). 실험의 결과는 대조군을 100%로 환산하였을 때, 1 mM의 t-BHP 처리군은 342.5±18.6%를 나타내었으나 산조인 추출액 0.1%와 0.5%를 처리하였을 때 각각 155.1±12.7% 및 124.8±10.5%로 나타나 산조인 추출액이 1 mM의 t-BHP에 의한 지질과산화를 효과적으로 감소시켰으며, 모두 대조군과 유의한 차이를 보였다($p<0.05$).

t-BHP 처리한 신피질 절편에서 산조인 추출물의 LDH 유출 억제 효과

산조인 추출액이 신피질 절편에서 t-BHP에 의한 세포의 손상을 억제하는지를 확인하기 위하여 산조인 추출액을 각각 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5% 농도가 되게 한 다음 1 mM t-BHP를 첨가하여 신피질 절편에서 유리되는 LDH의 정도를 조사하였다. 실험의 결과로 아무런 처리를 하지 않은 대조군의 LDH 유출은 3.53±0.31%였으며, t-BHP 1 mM을 처리한 대조군은 17.42±0.95%를 나타내었다. 이는 t-BHP 1 mM 처리군이 아무런 처리를 하지 않은 대조군에 비하여 LDH 유출이 5배 가까이 증가한 것이다. 산조인 추출액을 0.1%와 0.5%를 처리하였을 때 각각 3.78±0.26% 및 3.24±0.18%로 나타나 산조인 추출액

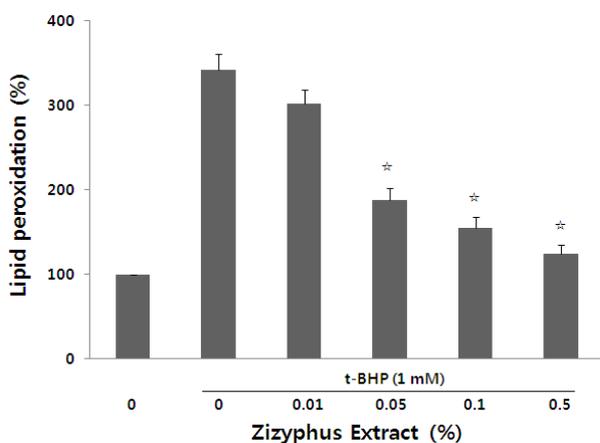


Fig. 1. Protect effect of *Zizyphus* Extract on t-BHP-induced lipid peroxidation in rabbit kidney slices cells. Slices were treated with various concentrations of 0 to 0.5% *Zizyphus* Extract in the presence of 1 mM t-BHP at 37°C for 60 min, and lipid peroxidation was measured. Data are mean ± SE of four experiments. *: Significantly different compared with 1mM t-BHP ($p<0.05$).

농도에 의존하여 t-BHP에 의한 LDH 유출이 감소하였으며, 모두 대조 배양군과 유의한 차이를 보였다($p<0.05$). 이러한 결과는 t-BHP에 의해 유발된 신피질 절편의 세포손상에 대해 산조인 추출액이 효과적인 감소를 나타내는 것으로 보였다(Fig. 2).

Cisplatin에 의해 유도된 급성 신부전시 산조인 추출액의 혈청 creatinine 농도에 미치는 영향

산조인 추출액이 cisplatin에 의한 급성 신부전 치료에 효과가 있는지를 조사하기 위하여 급성 급성 신부전 증세의 지표인 혈 중 creatinine의 농도를 측정하였다. 약물을 처리하지 않은 대조군의 혈청 creatinine은 0.76±0.1 mg · dl⁻¹로 나타난 반면, cisplatin 5 mg · kg⁻¹을 복강으로 단독 처리하여 24시간 경과한 군은 2.13±0.1 mg · dl⁻¹로 대조군에 비하여 약 2.8배 높게 신장의 손상을 유발하는 것으로 나타났다($p<0.05$). 그러나 산조인 추출액 50 mg · kg⁻¹ · day⁻¹을 7일간 전처리 한 군에서 cisplatin을 복강 투여한 군은 1.26±0.1 mg · dl⁻¹로 cisplatin 단독 처리군에 비하여 약 40% 정도 신장의 손상을 감소시키는 것으로 나타났으며, 특히 48시간 경과 시 0.84±0.1 mg · dl⁻¹로써 대조군과 비슷한 결과를 나타내었다(Fig. 3).

Cisplatin에 의해 유도된 급성 신부전시 산조인 추출액의 지질과산화 억제효과

산조인 추출액 50 mg · kg⁻¹ · day⁻¹를 7일간 처리한 후, cisplatin 5 mg · kg⁻¹을 1회 복강 투여하여 24시간 후 희생시켜 신장에서 신피질 절편을 만들어 지질과산화를 측정된 결과 대조군을 100%로 환산하였을 때 cisplatin 단독 처리군에서는 165.12±12.83%로 나타났으나, 산조인 추출액을 7일간 처리한

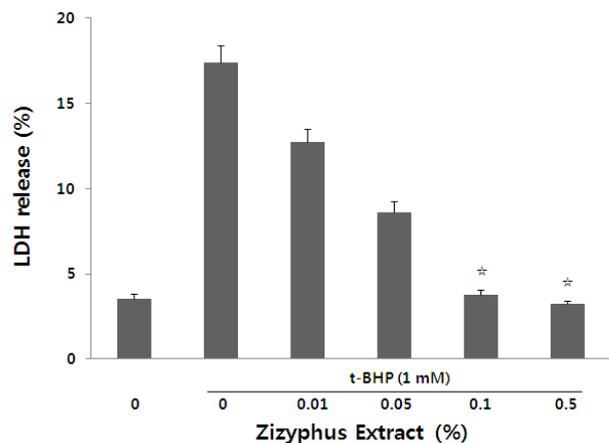


Fig. 2. Protect effect of *Zizyphus* Extract on t-BHP-induced LDH release in rabbit kidney slices cells. Slices were treated with various concentrations of 0 to 0.5% *Zizyphus* Extract in the presence of 1mM t-BHP at 37°C for 60 min, and LDH release was measured. Data are mean ± SE of four experiments. *: Significantly different compared with 1 mM t-BHP ($p<0.05$).

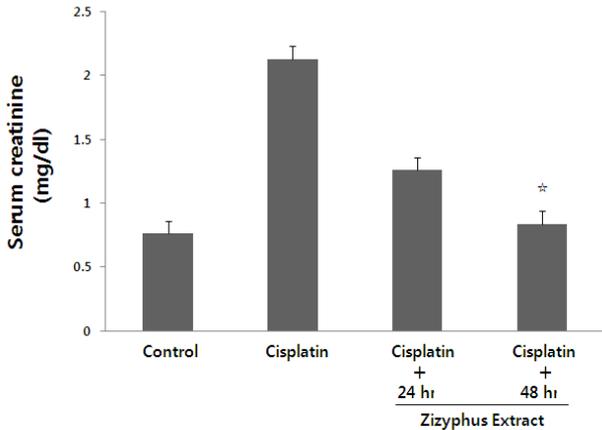


Fig. 3. Effect of *Zizyphus* Extract pretreatment on changes in serum creatinine levels in cisplatin-induced acute renal failure. Data are mean \pm SE of four experiments. * : $p < 0.05$.

후 cisplatin을 처리하여 48시간 경과한 군은 $110.84 \pm 9.08\%$ 로 대조군과 비슷한 결과를 보였다(Fig. 4).

병리조직학적 소견

신장에 약물 처리를 하지 않은 대조군의 조직은 육안적으로 근위곱슬세관에 eosin으로 세포질이 붉게 염색되었다. 내강에는 용모세포들이 관찰되었으며, 원위곱슬세관은 세포질이 밝고 내강이 정상적인 소견을 나타내었다. 반면, cisplatin ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 투여 24시간 경과 군에서는 근위곱슬세관이 대조군보다 더 붉게 염색되었으며, 세포의 경계가 불분명하였다. 원위곱슬세관의 내강은 용모세포의 탈락으로 공포를 형성하였다.

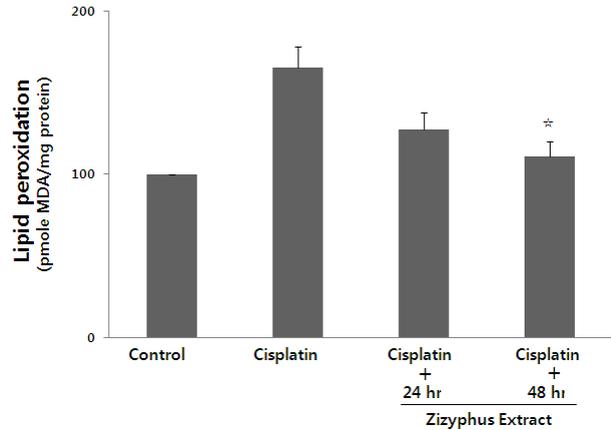


Fig. 4. Effect of *Zizyphus* Extract pretreatment on change in lipid peroxidation of cortex of kidney in cisplatin-induced acute renal failure. The rabbit killed 24 hr after cisplatin treatment. Data are mean \pm SE of four experiments. * : $p < 0.05$.

48시간 경과 군에서는 근위곱슬세관과 원위곱슬세관이 eosin에 더욱 진하게 염색되었다. 근위곱슬세관의 내강은 완전히 소실되어 큰 공포를 형성하였다. 산조인 추출액을 전처리하고 cisplatin을 투여한 군에서는 근위곱슬세관이 대조군과 비슷하게 세포질이 eosin에 붉게 염색되며, 원위곱슬세관의 세포질은 밝게 나타났다. Cisplatin 단독 처리군에서는 근위곱슬세관의 용모세포가 탈락하였으나 산조인 추출액을 전 처리한 군에서는 용모세포의 탈락이 거의 없이 대조군과 비슷한 결과를 나타내었다(Fig. 5).

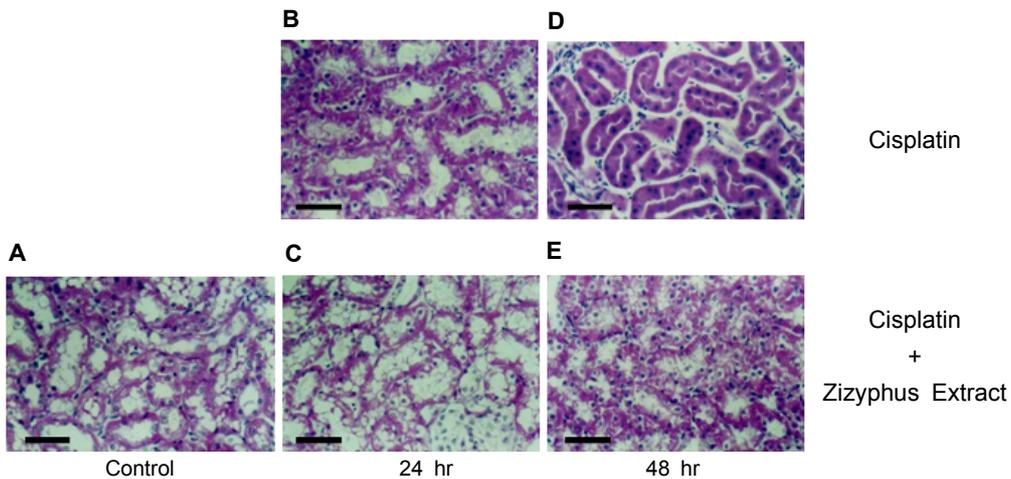


Fig. 5. Histological finding of the renal cortex in untreated (A), cisplatin ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 24 hr) treated (B), *Zizyphus* Extract + cisplatin ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 24 hr) treated (C), cisplatin ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 48 hr) treated (D), *Zizyphus* Extract + cisplatin ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 48 hr) treated (E). A: The epithelial cell of proximal tubule formed numerous long microvilli in untreated rabbit. B: The microvilli of proximal tubule is destructed and the lumen of proximal tubule is disappeared in cisplatin treated rabbits. D: The microvilli of proximal tubule is destructed in the lumen of proximal tubule is disappeared in cisplatin-treated rabbits. C and E: The epithelial cell with microvilli appeared in cisplatin treated rabbit after *Zizyphus* Extract pretreatment. Hematoxylin and eosin staining. Scar bars = $30 \mu\text{m}$.

고 찰

세포의 대사과정 결과로 활성산소가 체내에 축적되면 세포와 조직은 손상을 받아 세포기능의 저하로 여러 가지 질병의 원인을 제공하게 된다[13]. 산화적 스트레스는 신장질환, 당뇨병, 치매, 동맥경화, 관절염, 심장병, 비만, 혈압상승 등 성인병의 원인이 되며, 현대 의학에서는 이러한 스트레스를 억제하기 위한 연구가 수행되고 있다[16].

신장질환의 치료를 위해 항산화제 처리, 약물요법, 신장이식 등의 다양한 치료방법이 수행되고 있지만 부작용 및 치료의 한계성으로 인하여 적절한 치료제가 개발되어 있지 못한 상태이다[4]. 최근 대체의학의 치료법에 대한 관심이 증가하면서 항산화 효과가 우수한 식품의 처방으로 인체에서 생성되는 지질과산화와 스트레스를 억제하는 방법으로 질병을 예방하거나 치료하는 방법이 제시되고 있다[3].

산조인은 동양의 전통의학에서 심신의 안정, 심장질환, 간질환, 허약체질, 스트레스 억제 등에 효과가 있는 치료제로 알려져 있다[24]. 산조인 추출물이 아질산과 활성산소의 생성을 억제하여 세포의 손상 방지와 기억력을 증진시키고 치매 예방에도 효과가 있을 것이라고 Jung 등(2005)은 보고하였고, 산조인은 닭에서 환절기에 송과체의 자극으로 melatonin의 분비를 증가시키며 동시에 임파조직에 직접 작용하여 면역기능을 상승시키는 효과가 있다고 하였다[25]. 최근 연구에 따르면 산조인은 간에서 plasma nesfatin-1의 결합을 증가시켜 당의 합성을 증가시킨다고 하였다[8]. 그러나 산조인이 신장에 미치는 항산화 효과에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 현대인들은 직장에서의 과도한 스트레스와 음주문화, 성인질환 유발 음식의 과다섭취 등으로 신장질환으로 사망하는 비율이 높아져 가고 있는 반면 치료제의 개발은 미비한 상태이다. 이러한 관점에서 본 연구는 산조인 추출물을 제작하여 신장에 대한 항산화 효과에 대해 알아보고자 하였다.

Cisplatin은 항암제로 널리 사용되는 약제이지만 신장독성 효과로 인해 사용이 일부 제한되고 있는데, 오히려 이러한 독성효과가 신장질환의 실험과 관련된 질환의 척도 약제로 널리 사용되고 있다[1]. 이러한 독성효과는 cisplatin의 ROS 생성에 의하여 일어나며[26], t-BHP는 항산화 효과를 측정할 수 있는 실험에서 신장의 손상척도 지표로 사용되는 약제이다[5].

이번 연구의 결과 신피질 절편 실험에서 세포의 손상정도를 나타내는 지질과산화 생성은 t-BHP 단독 처리군에 비하여 산조인 추출액 0.5%를 동시 처리했을 때 63.56%의 세포손상억제 효과를 나타내었으며, 세포사멸의 정도를 나타내는 LDH 유출은 t-BHP 단독처리군 17.42%에 비하여 산조인 추출액 0.5% 동시 처리했을 때 3.24%로 81.4%의 감소를 나타내어 대조군과 유사한 결과를 보였다. 이는 산조인이 ROS를 제거하는 항산화 효과로 산화적 스트레스를 감소시킨다는 사실을 나타낸 것이다. 급성신부전 시 혈청 creatinine 농도에 미치는 영향은

대조군($0.76 \pm 0.1 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$)에 비하여 cisplatin $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 을 단독으로 복강 처리하였을 때 $2.13 \pm 0.1 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ 로 약 2.8배의 높은 신장손상을 보였지만, 산조인 추출액 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ 을 7일간 전처리하고 cisplatin을 복강투여 후 48시간 경과한 군은 $0.84 \pm 0.1 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ 로서 대조군과 유사한 결과를 나타내었다. 그리고 신장 절편조직의 지질과산화 검사에서도 cisplatin투여군은 대조군 보다 1.6배 높았으나, 7일 동안 산조인 추출액 전처리군은 1.1배로 대조군과 유사한 수준으로 나타났다.

병리조직학적 검사조건에서 cisplatin 투여군은 근위곱슬세관의 내강이 탈락하여 공포를 형성하였으나 산조인 추출액 전 처리군에서는 용모세포의 탈락이 거의 없는 대조군과 유사한 결과를 보였다. 이러한 결과로 cisplatin과 t-BHP에 의해 손상된 신장의 세포들이 산조인 추출액에 의하여 세포가 회복되거나 손상이 억제되는 것을 알 수 있었다.

Gao 등(2013)은 cisplatin이 특이적으로 신장세포에 ROS를 증가시켜 독성효과를 유발하고, 산조인은 신장세포에서 지질과산화와 LDH의 생성을 억제하는 기전에 의하여 cisplatin에 의해 생성된 ROS를 감소시켜 세포의 기능을 정상화 함으로 혈 중 노폐물인 creatinine을 정상적으로 체외로 배출하여 혈 중 creatinine을 감소시킨다고 하였는데, 이러한 내용은 creatinine을 대조군 수준으로 감소시킨 본 실험의 결과와 유사하였다.

이는 산조인 추출액의 효능에 관한 실험적 연구로 Mosaad 등(2007)은 aflatoxin을 쥐에 투여하여 산조인의 신장에 대한 항산화 효과실험으로 총 단백질 함량을 조사한 결과 대조군에 비하여 aflatoxin 단독 처리군은 37% 감소한 반면 산조인 추출액을 동시 투여한 군은 대조군에 비하여 14% 감소하여 산조인 추출액이 총 단백질 함량을 23% 증가시키는 탁월한 치료효과를 나타내었다고 하였고 보고한 내용과 Yen 등(2014)이 사람의 신장유래 세포주인 HK-2와 ATCC CRL-184에 coxsackievirus B4를 처리하였을 때 산조인 추출액을 전처리한 군에서 바이러스 부착력이 50% 감소되는 효능을 나타내었다고 보고한 내용과 유사하다. 또한 Mosaad 등(2007)이 보고한 내용에서 aflatoxin에 의해 유발된 신장의 용모세포 탈락 시 산조인 추출액이 용모세포의 탈락을 억제하였다는 내용은 이번 실험의 조직관찰 결과와 일치하였다.

이번 실험에서 t-BHP와 cisplatin에 의한 신장의 급성신부전 시 산조인 추출액이 세포의 손상을 초래하는 지질과산화의 생성 및 세포의 사멸의 척도를 나타내는 LDH 유출을 효과적으로 억제 하였으며, 신장기능의 척도인 creatinine 검사에서도 신장기능 보호 효과를 나타내었다. 그리고 신장의 조직조건에서 용모세포의 탈락을 억제하여 신장을 보호하는 효능을 입증하였다. 이러한 결과로 볼 때 산조인은 신장의 질환에 대하여 치료의 효능을 가질 수 있는 대체의약품으로 사용 가능할 것으로 생각된다.

산조인의 성분을 살펴보면, 산조인은 식물성 기름을 다량 함유하고 있으며 flavonoid 주성분으로 알려진 spinosin을 다량 함유하고 있다[8]. He 등(2012)은 동양에서 불면증 치료제로 사용되는 spinosin을 산조인에서 분리하여 $1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 의 양을 쥐에게 구강 투여했을 때 85%의 쥐 혈청에서 검출하여 치료약제로서의 효능이 가능성을 보고하였다. 또한 산조인은 혈압강화작용, 자궁수축작용, 지방유, 단백질, vitamin C와 2 종류의 sterol와 betulin, betulinic acid 등의 jujuboside 및 spinosin으로 구성하고 있으며, 산조인 추출액을 신경세포주에 처리하여 실험한 결과 $\text{A}\beta$ 혹은 H_2O_2 에 의한 세포독성에 대하여 정상세포에 근접하게 회복시켰을 뿐만 아니라 apoptosis를 효과적으로 억제시켰다고 보고하였다[17].

이상의 결과로 산조인 추출액은 t-BHP와 cisplatin의 ROS에 의한 독성작용에 의해 유도된 급성 신부전 시 항산화 작용 및 세포보호 작용을 가지는 효과가 있음을 확인하였으며, cisplatin에 의한 급성 신부전 시 신장의 세포조직을 탈락시키는 손상 유발 시에도 세포를 보호하여 탈락을 억제하는 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 산조인의 효과를 입증할 수 있는 더 많은 연구가 이루어져 산조인이 인체의 신장질환 치료에 유용한 대체요법으로 활용될 수 있기를 기대한다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 경남과학기술대학교 기성회연구비 지원으로 수행된 연구입니다.

References

- Ashrafi, F., Nematbakhsh, M., Nasri, H., Talebi, A., Hosseini, S. M. and Ashrafi, M. 2013. Vacuolization, dilatation, hyaline cast, debris or degeneration: which one is the most correlated item to score the kidney damage pathologically in Cisplatin induced nephrotoxicity model? *Nephrourol Mon* **5**, 918-920.
- Bragado, P., Armesills, A., Silva, A. and Porras, A. 2007. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38 α MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis* **12**, 1733-1742.
- Burton, G. W. and Traber, M. G. 1990. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* **10**, 357-382.
- Buyuklu, M., Mehmet, K. F., Ozkaraca, M., Set, T., Murat, B. E. and Topal, E. 2014. Protective effect of curcumin against contrast induced nephropathy in rat kidney: what is happening to oxidative stress, inflammation, autophagy and apoptosis? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **18**, 461-470.
- Choi, S. S., Huh, K. D., Woo, J. S. and Kim, Y. K. 1994. Effect of t-butylhydroperoxide on p-aminohippurat uptake in rabbit renal cortical slices. *Korean J Intern Med* **9**, 105-112.
- Coyle, J. T. and Puttfarcken, P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **29**, 689-695.
- Gao, S., Chen, T., Choi, M. Y., Liang, Y., Xue, J. and Wong, Y. S. 2013. Cyanidin reverses cisplatin-induced apoptosis in HK-2 proximal tubular cells through inhibition of ROS-mediated DNA damage and modulation of the ERK and AKT pathways. *Cancer Lett* **333**, 36-46.
- Ghanbari, N. A., Mohammadi J. F., Zare, K. N., Najafi, S., Chaichi, M. J., Rodbari, F. and Bayat, H. 2013. Liver and plasma nesfatin-1 responses to 6 weeks of treadmill running with or without zizyphus jujuba liquid extract in female rat. *Int J Endocrinol Metab* **11**, 95-101.
- Han, B. H., Park, M. H. and Park, J. H. 1989. Chemical and pharmacological studies on sedative cyclopeptide alkaloids in some Rhamnaceae plants. *Pure Appl Chem* **61**, 443-448.
- He, B., Li, Q., Jia, Y., Zhao, L., Xiao, F., Lv, C., Xu, H., Chen, X. and Bi, K. 2012. A UFLC-MS/MS method for simultaneous quantitation of spinosin, mangiferin and ferulic acid in rat plasma: application to a comparative pharmacokinetic study in normal and insomnic rats. *J Mass Spectrom* **47**, 1333-1340.
- Hong, Y. Y., Moon, J. S., Kim, D. I. and Lee, T. K. 1999. A Study on melatonin, serotonin secretion change and behavior in the rats treated with Yiseontang, Gammakdaejotang, Sanjointang, and Sanjogammaktang. *Korean J Orient Gynecol* **12**, 209-230.
- Jung, J. U., Park, C. G., Park, C. S., Lee, S. Y., Yoon, H. D. and Shin, W. C. 2005. Neuroprotective and memory enhancing effects of Semen Zizyphi Spinosae extract. *Korean J Herbol* **20**, 19-33.
- Kang, I. H., Cha, J. H., Lee, S. W., Kim, H. J., Kwon, S. H., Ham, I. H., Hwang, B. S. and Whang, W. K. 2005. Isolation of anti-oxidant from domestic Crataegus pinnatifida bunge leaves. *Korean J Pharmacogn* **36**, 121-128.
- Kim, E. J., Choi, J. Y., Yu, M. R., Kim, M. Y., Lee, S. H. and Lee, B. H. 2012. Total Polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* **44**, 337-342.
- Kodentsova, V. M., Vrzhesinskaia, O. A. and Mazo, V. K. 2013. Vitamins and oxidative stress. *Vopr Pitan* **82**, 11-18.
- Lee, D. H. 2007. A study on SOD activity and serum antioxidant mineral concentrations in obese adolescents. *Korean J Nutr* **40**, 41-48.
- Lee, S. W., Kim, D. H., Yun, J. H., Kim, J. W., Jung, E. Y., Lee, S. G., Lee, K. S., Kim, T. H., Lyu, Y. S. and Kang, H. W. 2008. The Effects of Antioxidant and Anti-Alzheimer on Hydrogen peroxide and β -amyloid peptide-induced PC 12cells by Semen Zizyphi Spinosae water extract. *J Oriental Neuropsychiatry* **19**, 179-193.
- Lee, S. Y., Lee, J. Y., Kim, J. S., Lee, J. H. and Kang, S. S. 2012. Flavonoids from the Seeds of Zizyphus jujuba var. spinosa. *Korean J Pharmacogn* **43**, 127-136.
- Markesbery, W. R. 1977. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* **23**, 134-147.
- Mihara, M. and Uchiyama, M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* **86**, 271-278.
- Miyawaki, Y., Ueki, M., Ueno, M., Asaga, T., Tokuda, M.

- and Shirakami, G. 2012. D-allose ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Tohoku J Exp Med* **228**, 215-221.
22. Abdel-Wahhab, M. A., Omara, E. A., Abdel-Galil, M. M., Hassan, N. S., Nada, S. A., Saeed, A. and el-Sayed, M. M. 2007. Zizyphus spina-christi extract protects against aflatoxin B1-initiated hepatic carcinogenicity. *Afr J Tradit Complement Altern Med* **4**, 248-256.
23. Papageorgiou, N., Tousoulis, D., Katsargyris, A., Charakida, M., Androulakis, E., Siasos, G., Tentolouris, C. and Stefanadis, C. 2013. Antioxidant Treatment and Endothelial Dysfunction: Is it Time for Flavonoids? *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* **8**, 81-92.
24. Peng, Z., Zhang, H., Cheng, S. and Guo, W. 1995. Protective effect of semen Zizyphi spinosae on superoxide dismutase reduction in mice with endotoxin fever. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **20**, 369-370.
25. Poon, A. M., Liu, Z. M., Pang, C. S., Brown, G. M. and Pang, S. F. 1994. Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. *Biol Signals* **3**, 107-117.
26. Sawicka, E., Dlugosz, A., Rembacz, K. P. and Guzik, A. 2013. The effects of coenzyme Q10 and baicalin in cisplatin-induced lipid peroxidation and nitrosative stress. *Acta Pol Pharm* **70**, 977-985.
27. Silva, A. C., De Almeida, B. F., Soeiro, C. S., Ferreira, W. L., De Lima, V. M. and Ciarlini, P. C. 2013. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. *Can J Vet Res* **77**, 136-141.
28. Yen, M. H., Lee, J. J., Yeh, C. F., Wang, K. C., Chiang, Y. W., Chiang, L. C. and Chang, J. S. 2014. Yakammaoto inhibited human coxsackievirus B4 (CVB4)-induced airway and renal tubular injuries by preventing viral attachment, internalization, and replication. *J Ethnopharmacol* **151**, 1056-1063.

초록 : 토끼에서 cisplatin에 의해 유도된 급성 신부전시 산조인 추출물의 효과

김재영¹ · 김총희^{2*}

(¹경남과학기술대학교 대학중점연구소 양돈과학기술센터, ²경남과학기술대학교 동물생물학과)

항암제로 알려진 cisplatin과 t-BHP를 토끼에 투여하여 유도된 급성 신부전 시 산조인 추출액을 처리하였을 때 신장 세포의 보호에 미치는 항산화 효과를 조사하였다. 신장을 분리한 후 신피질 절편 실험에서 세포의 손상을 유발하는 지질과산화 및 LDH 실험에서 t-BHP 단독 처리 시 대조군에 비하여 각각 3배, 5배 이상 증가하였으나 산조인 추출액 0.5%를 동시 처리하였을 때는 대조군 수준으로 감소하였다. Creatinine 측정과 지질과산화 실험에서 cisplatin 5 mg · kg⁻¹을 복강 투여한 군의 creatinine 농도가 2.13±0.1 mg · dl⁻¹로 나타났으나 산조인 추출액 50 mg · kg⁻¹ · day⁻¹을 7일간 전처리 후 cisplatin 투여 48시간 경과한 군은 0.84±0.1 mg · dl⁻¹로 creatinine의 농도가 약 60% 감소되는 신장보호 효과를 나타내었고, 지질과산화 검사는 cisplatin 단독 투여 시 대조군에 비하여 1.6배 높게 나타났으나 산조인 추출액 전처리 시 1.1배로 대조군과 유사하였다. 병리조직 검사는 cisplatin 단독 처리군에서 근위곱슬세관이 대조군에 대하여 더 붉게 염색되었으며 근위곱슬세관은 내강의 용모세포가 탈락하여 공포를 형성하였다. 그러나 산조인 추출액을 7일간 전처리한 군에서는 근위곱슬세관이 대조군과 유사한 염색소견을 보였고 근위곱슬세관도 내강의 용모세포 탈락이 거의 나타나지 않았다. 따라서 cisplatin과 t-BHP에 의해 유발된 신장세포 손상에 대하여 산조인 추출액이 항산화 효과를 보였다.