

## 이공산(異功散)의 세포보호 및 항산화 작용

이경태<sup>3</sup>, 최정혜, 노영수, 안규석<sup>1,3</sup>, 장성구<sup>2,3</sup>, 오수명<sup>2,3</sup>, 정지창<sup>2,3,\*</sup>

경희대학교 약학대학, <sup>1</sup>한의학대학, <sup>2</sup>의과대학,

<sup>3</sup>경희대학교 동서의학 연구소

## Cytoprotective and Antioxidative Effects of Crude Drug Preparation (E-kong-san)

Kyung-Tae Lee<sup>3</sup>, Jung-Hye Choi, Young-Soo Rho, Kyoo-Seok Ahn<sup>1,3</sup>,

Sung-Goo Chang<sup>2,3</sup>, Soo-Myung Oh<sup>2,3</sup> and Jee-Chang Jung<sup>2,3,\*</sup>

College of Pharmacy, <sup>1</sup>Oriental Medicine, <sup>2</sup>Medicine and <sup>3</sup>East-West Medical  
Research Institute, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

**Abstract** – In the previous report, E-kong-san, which is usually used for recovering health in traditional medicine, has been shown to decrease cisplatin induced nephrotoxicity *in vivo* and *in vitro*.<sup>1)</sup> The significant reduction of E-kong-san on the cisplatin induced nephrotoxicity led us to investigate whether the effect of this water extract was a result of triggering antioxidation. In monkey kidney Vero cells, E-kong-san at 5~10 mg/ml was able to attenuate 2 mM cisplatin-stimulated cell death by 46.8% and 31.8%, respectively. E-kong-san showed strong free radical scavenging activities on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) radical and xanthine/ xanthine oxidase (XOD) generated superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ). We further studied the effects of E-kong-san on lipid peroxidation in rat liver microsomes induced by enzymatic and nonenzymatic methods. Moreover, E-kong-san exhibited significant inhibition on both ascorbic acid/ $Fe^{2+}$  and ADP/NADPH/ $Fe^{3+}$  induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. Based on these results, we suggest that E-kong-san protects the cisplatin induced cytotoxicity by its antioxidative mechanism.

**Key words** – Cytotoxicity; DPPH; superoxide anion; lipid peroxidation; antioxidant.

이공산 (異功散)은 人蔘, 甘草, 茯苓, 白朮로 구성된 四君子湯에 陳皮를 가한 처방으로 대표적인 理氣劑로 사용되어져 왔다.<sup>2)</sup> 이공산의 기본이 되는 사군자탕은 전통적으로 脾胃虛弱에 사용되어져 왔으며, 최근 중국과 대만을 중심으로 사군자탕의 효과에 대한 과학적 입증이 시도되고 있는데 주로 조절기능, 면역기능과 관련<sup>3,4)</sup>하여 사군자탕 또는 각각의 구성약물에 대한 연구가 진행되고 있다. 사군자탕에 진피를 가한 이공산에 대한 연구는 상당히 미비한 수준인데 어린이에게 투여시 체중증가 및 신장의 기능을 향상시키며 多汗이나 기타 감기, 기관지염에 유

\*교신저자 : Fax 02-966-3885

효하다는 보고<sup>5)</sup>가 있다.

Superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl free radical (HO) 등을 통칭하여 reactive oxygen species (ROS)라 하며 이들은 짧은 시간동안 매우 활성이 높게 작용하는 특징을 가지고 있다. 빛의 노출 및 철의 복용에 의하여 ROS가 증가하며, 이는 인체내 구성 성분인 지질, 단백질과 DNA등 여러 세포 성분에 영향을 미쳐 결국 질병을 야기하게 된다. 여러 질환 중 특히 암, 심혈관, 관절염 및 염증과 노화를 포함하는 퇴행성 질환<sup>6,7)</sup>과도 밀접한 연관성이 확인되고 있다. 이러한 비정상적 변화에 대해 인체는 ROS를 불활성화 시키는 기전으로

서 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 같은 효소적 기전과 metal chelator 등의 비효소적 기전이 알려져 있다.

Cisplatin은 여러 고형암의 치료에 광범위하게 사용되는 강력한 항암제이나 여러 동물에서 신장독성<sup>8)</sup>을 유발시킴으로써 사용에 많은 제한이 되어왔다. 비록 cisplatin의 신장독성을 일으키는 정확한 기전에 대해서는 설명되지 않았으나 산화 스트레스와의 관련성에 관한 여러 논문들이 보고되어왔다. Cisplatin 처리 후 *in vivo* 및 *in vitro*의 신장조직 및 신장 cortical slice에서 지질과산화의 증가가 보고되었다.<sup>9,10)</sup> 세포내 유리기의 제거제로서 작용하는 glutathione 결핍은 결국 cisplatin 유도 세포 독성을 증가<sup>11)</sup>시키며 항산화제와 유리기 제거제는 cisplatin 유도 신장독성과 지질과산화를 억제한다고 보고<sup>11)</sup>되었다.

본 연구는 이공산의 cisplatin 유도 신장독성 감소의 유의성있는 작용기전을 연구하고자 DPPH와 xanthine/XOD에 의해 형성된 superoxide anion radical의 제거, 흰쥐 마이크로솜에서 ascorbic acid/Fe<sup>2+</sup>와 ADP/NADPH/Fe<sup>3+</sup>에 의해 유도된 지질의 과산화 등 항산화 작용과 cisplatin 유도 세포독성 보호 작용과의 상관성을 연구하였다.

## 재료 및 방법

**실험 재료 및 시료의 제조** - 본 실험에 사용된 생약 및 시료제조는 전보<sup>1)</sup>에 따랐다.

**시약** - MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), XOD (xanthine oxidase), xanthine, ADP, NADPH, TBA (2-thiobarbituric acid) 등은 Sigma사에서 구입하였으며 RPMI 1640과 FBS는 Gibco에서 구입하였다.

**흰쥐 간 마이크로솜 분획** - 흰쥐 마이크로솜 분획은 Kiso 등의 방법<sup>12)</sup>을 따랐다. 흰쥐를 24시간 절식시킨 후 복대동맥을 통해 0.9% ice-cold NaCl 용액으로 관류하여 혈액을 완전히 제거하였다. 간을 가위로 잘게 잘라 1.15% KCl 용액을 사용하여 호모게나이저로 균질화시킨 후 1.15% KCl으로 4배 희석하였다. 8000 g, 4°C에서 20분간 원심분리한 후 다시 상등액을 취해 105,000 g에서 60분간 원심분리 하였다. 침전물을 취하여 동량의 1.15% KCl액으로 현탁하였으며 단백질 정량은 Bradford법<sup>12)</sup>으로

측정하였다.

**MTT assay<sup>1)</sup>** - 96well plate에 24시간 배양한 세포에 2 mM과 4 mM cisplatin 100  $\mu$ l 및 여러 농도의 이공산 100  $\mu$ l를 첨가하여 45분간 배양한 후 상등액을 제거하고 배지 200  $\mu$ l를 주입하여 다시 48시간 배양하였다. 배양액 속에 5 mg/ml MTT시약 50  $\mu$ l를 가하여 4시간 배양 후 상등액을 제거하고 DMSO 50  $\mu$ l를 첨가한 후 540 nm에서 ELISA Reader로 흡광도를 측정하였다. 세포독성 (Cytotoxicity index: CI)은 다음과 같은 식으로 계산하여 %로 나타내었다.

$$C.I.(%) = \left(1 - \frac{\text{sample O.D.}}{\text{control O.D.}}\right) \times 100$$

**DPPH assay<sup>6)</sup>** - 60  $\mu$ M DPPH 500  $\mu$ l와 이공산 용액 500  $\mu$ l를 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험군으로 DPPH대신 에탄올을 사용하였으며 대조군으로는 시료대신 물을 사용 하였을때를 100%로 하여 DPPH radical 제거 정도를 %로 구했다.

**Superoxide anion radical 형성에 미치는 영향<sup>6)</sup>** - 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 10.2) 900  $\mu$ l에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 1.5  $\mu$ g/ml BSA, 0.75 mM NBT 50  $\mu$ l를 각각첨가 하였다. 여러 농도의 이공산 50  $\mu$ l와 XOD (0.1  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l를 가해 반응 정지 후 560 nm에서 흡광도로 측정하였다.

**XOD 활성억제효과<sup>6)</sup>** - 0.1 M 인산완충액(pH 7.5) 600  $\mu$ l, 이공산 50  $\mu$ l를 가하여 25°C에서 10분간 방치시킨 후 0.1 mM xanthine 용액 300  $\mu$ l를 첨가하여 다시 25°C에서 30분간 반응을 정지시키고 295 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료대신 완충액을 첨가한 대조군의 흡광도를 100%로 하여 XOD 저해도를 %로 계산하였다.

**흰쥐 간 마이크로솜에서 지질 과산화 억제 효과**  
흰쥐간을 사용한 지질과산화 측정의 효소적 및 비효소적 방법은 Kiso 등의 방법<sup>13)</sup>을 일부 수정하여 사용하였다.

1) Ascorbic Acid/Fe<sup>2+</sup> 유도 지질 과산화법(비효소적 방법) - 100 mM KCl 390  $\mu$ l, Tris-HCl (45 mM, pH 8.0) 390  $\mu$ l, 시료 용액 50  $\mu$ l, 마이크로솜 분획(20  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l에 ascorbic acid(10 mM)와 FeSO<sub>4</sub>(0.5 mM)를 각각 10  $\mu$ l를 가한 후 37°C에서 20분간 방치하였다. 4°C에서 반응을 정지시킨 후 반응물에 2% SDS 400  $\mu$ l, 20% acetic acid 완충액(pH 3.5) 750  $\mu$ l, 0.8% TBA(2-thiobarbitu-

ric acid) 750  $\mu$ l를 가하여 95°C에서 1시간 가열한 후 butanol/pyridine (15:1) 2  $\mu$ l를 가하여 잘 흔들 어준 뒤 3500 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 시료로는 시료대신 증류수를 첨가하여 이때의 흡광도를 100%로 하여 억제 정도를 %로 나타내었다.

2) ADP/NADPH/Fe<sup>3+</sup> 유도 과산화지질법(효소적 방법) - 100 mM KCl 390  $\mu$ l, 45 mM Tris-HCl (pH 8) 390  $\mu$ l, 이공산 50  $\mu$ l, 마이크로솜 분획(20  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l에 20 mM ADP 50  $\mu$ l, 1 mM NADPH 50  $\mu$ l, 2 mM FeCl<sub>3</sub> 10  $\mu$ l를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨후 1)번과 같은 방법을 사용하여 흡광도를 측정하였다.

## 결 과

**이공산의 Cisplatin 유도 세포독성 보호작용** - 원숭이 정상 신장 세포인 Vero 세포에 5 mg/ml과 10 mg/ml 농도의 이공산은 2 mM cisplatin 유도 신장 세포 독성 보호 효과를 MTT법으로 확인하였다. 2 mM cisplatin 단독 투여군에서 78.3%의 세포독성을 보였으나 5 mg/ml과 20 mg/ml 이공산의 동시 투여에서 각각 42.5와 4.5%의 세포독성을 보여 줌으로서 이공산의 유의성 있는 세포독성 감소를 확인하였다. 20 mg/ml이상의 이공산 농도에서는 이공산 자체의 독성으로 오히려 세포독성 증가를 확인하였다 (Table I). 대조 약물로 사용한 유허 함유물질인 mesna를 같은 조건에서 투여한 결과 0.5 mM에서 59.4%의 세포독성을 보였다.

**이공산의 DPPH radical 소거 작용** - 이공산과 대조물질인 glutathione의 농도에 따른 DPPH radical 감소 정도를 %로 나타내었다. 1 mg/ml 이하 이공산 농도에서는 농도 의존적인 DPPH radical의 감소를 확인(Fig. 1) 하였으며 50% 감소시키는 이공산의 농도는 0.26 mg/ml, 대조 약물인 glutathione

의 IC<sub>50</sub>는 9.8  $\mu$ g/ml을 나타내었다.

**Superoxide anion radical 생성에 대한 영향** - Xathine oxidase에 의해 형성되는 superoxide 생성에 이공산은 유의성있는 감소 효과를 보였으며 (Fig. 2) IC<sub>50</sub>은 0.72 mg/ml, 대조약물인 caffeic acid의 IC<sub>50</sub>은 0.3  $\mu$ g/ml을 보였다.

**XOD 활성 억제 작용** - 이공산 2.6, 3.2, 4.5와 5 mg/ml 이공산 농도에서 각각 31.5, 35.9, 54.3과 99% 저해율의 농도 의존적 XOD 활성 저해 효과를 보여 주고 있다. XOD 효소 활성 저해를 통하여 ROS의 생성을 억제하는 효과를 보였으며 이공산의 IC<sub>50</sub>은 3.8 mg/ml이며 대조 약물인 allopurinol의 IC<sub>50</sub>은 0.06  $\mu$ g/ml이었다.

**흰쥐 간 마이크로솜에서 지질과산화 억제작용** - 이공산은 효소적 및 비효소적 과정 모두에서 지질과산화에 유의성 있는 억제 효과를 보였다 (Table II). 농도의존적으로 저해 효과가 뚜렷하였으며 50% 억제효과를 보이는 농도에서 비효소적 방법과 효소적 방법 각각 1.25 mg/ml와 12.5 mg/ml를 보임으로서 비 효소적 방법에서 효소적 방법에 비해 약 10배 정도의 강한 억제 효과를 확인하였다.

## 고 찰

저자 등은 이공산의 cisplatin 유도 신장 독성의 감소효과를 *in vivo* 및 *in vitro* 연구에서 확인<sup>1)</sup> 하였으나 그 작용 기전에 대해서는 아직까지 설명되지 않았다.

Cisplatin은 임상에서 항암제로서 많이 사용되나 심각한 부작용등으로 그 사용에 제한을 받고 있으며<sup>8)</sup> 그중 가장 심각한 부작용중의 하나인 신장 독성은 세포내 glutathione 등의 유허 함유화합물의 결핍과 지질과산화에 의한 세포 손상등의 많은 보고<sup>10,14)</sup>가 있다. 이러한 신장독성은 유허함유 화합물, 항산화제와 철분억제제인 deferoxamone으로 cisplatin유

**Table I.** Effect of Ekongsan on the cytotoxicity of cisplatin in normal monkey kidney cells

Treatment	Dose (mM)	Ekongsan (mg/ml)			
		0	5	10	20
cisplatin	1	47.6±2.37a	27.6±2.15**	31.5±1.65***	58.3±1.99
	2	78.3±3.80	31.3±1.72**	46.5±1.06***	86.9±2.29

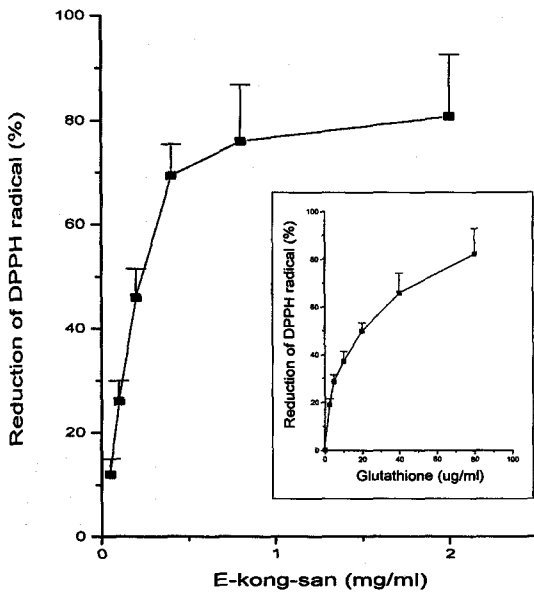
<sup>a</sup>Cytotoxicity Index (%), M ± S.E. n=3)

Statistically significant compared with cisplatin control (p<0.05\*\*, p<0.01\*\*\*)

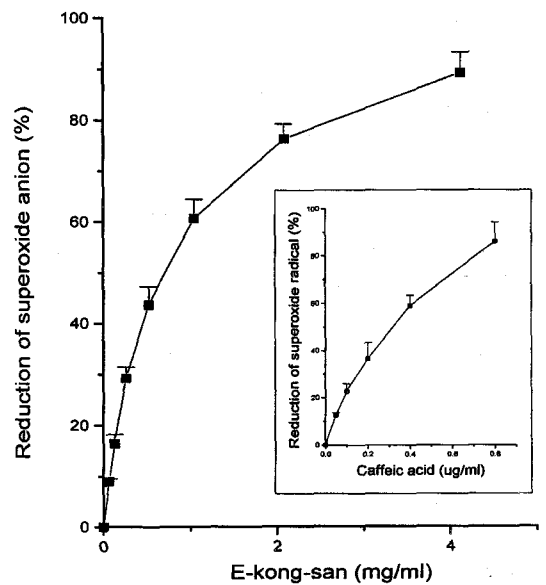
**Table II.** Inhibitory effects on ascorbic acid/Fe<sup>2+</sup> and ADP/NADPH/Fe<sup>3+</sup> induced lipid peroxidation in rat liver microsome

Compound	Ascorbic acid/Fe <sup>2+</sup>		ADP/NADPH/Fe <sup>3+</sup>	
	concentration(mg/ml)	inhibition(%)	concentration(mg/ml)	inhibition(%)
E-Kong-San	1.4	99.9a ± 7.6	2.5	91.6 ± 11.9
	0.8	63.0 ± 9.6	1.5	85.9 ± 11.0
	0.7	56.7 ± 8.9	1.3	75.9 ± 12.4
	0.5	45.2 ± 8.1	0.9	63.5 ± 9.8
	0.4	36.7 ± 6.6	0.6	58.4 ± 7.8
	0.3	32.6 ± 8.2	0.5	43.4 ± 6.6

<sup>a)</sup>Data of inhibition(%) were expressed as the mean ± S.D of independent triplicate tests



**Fig. 1.** DPPH radical scavenging activity of various concentration of E-kong-san water extract and glutathione.



**Fig. 2.** Scavenging activity various concentration of E-kong-san water extract and caffeic acid on xanthine XOD generated superoxide anion radical.

도에 의한 glutathione 결핍을 유의성있게 감소시킴으로 세포독성 보호작용을 보고하였다.<sup>15)</sup> Cisplatin 유도에 의한 신장세포, 조직 및 Jurket T 세포에 대한 세포독성은 천연물중에 많이 함유되어있는 phenolic 항산화제<sup>16)</sup>와 diethyldithiocarbamate,<sup>17)</sup> DTT와 glutathione<sup>18)</sup> 등의 유허함유 항산화제등에 감소됨이 보고되었다. Cisplatin은 흰쥐 신장의 항산화효소들인 SOD, catalase와 gutathione peroxidase 등을 억제하며, *in vivo*에서 SOD를 흰쥐에 투여함으로써 cisplatin 신독성을 감소시킴으로서 cisplatin

세포독성은 활성기 산소의 생성에 의한 것으로 제시하고있다.<sup>19)</sup>

본 실험은 이공산의 cisplatin 유도 원숭이 정상신장세포에 대한 세포독성 보호작용을 *in vitro*에서 MTT 분석으로 확인하였으며 이의 작용기전이 항산화작용으로 추정되어 DPPH, xanthine oxidase에 의한 superoxide anion 유리기 억제 및 효소적 비효소적 방법에 의한 지질과산화 억제를 관찰하였다. 이공산의 cisplatin 유도 독성 감소 효과에서는 정상신

장 세포에서 농도 의존적으로 cisplatin 유도 신장 독성에 대한 보호작용이 관찰되었으며 특히 cisplatin에 의한 세포손상이 50%이하에서는 이공산에 의한 독성 감소 효과는 매우 높은 유의성을 보였다. DPPH 분석에서 이공산에 대한 농도 의존적인 유리기 소거 작용을 보였다. Superoxide anion 유리기 억제효과를 관찰하는 방법에는 xanthine oxidase 효소를 직접적으로 억제하는 방법과 이 효소에 의해 생성되는 superoxide anion 유리기 소거 활성을 관찰하는 방법 등이 있다. 이공산은 두 실험 모두에서 이공산에 의한 억제 효과가 관찰되었으며 이 중에서 XOD에 의한 superoxide radical에 대한 소거 활성에서 이공산은 매우 낮은 농도에서 항 산화 효과를 보여줌으로서 높은 선택성을 확인하였다. 따라서 이공산의 XOD 효소 억제 활성보다는  $O_2^-$  또는 'OH기 생성 억제에 의한 유리기 소거 때문으로 추측된다. 지질과산화 억제 실험에서 이공산은 효소 유도 및 비 효소 유도 모두에서 농도 의존적 억제 효과를 나타내었다.

본 실험에서 밝혀진 이공산의 DPPH, superoxide 유리기 제거 효과의 결과에서 cisplatin유도 지질 과산화에 의한 생성 유리기를 제거함으로써 신장 세포에서 세포독성 보호효과를 나타낸 것으로 추정되며 *in vivo*에서의 기전 및 그 성분에 관한 계속적인 연구가 필요하다.

## 결 론

이공산의 물 추출물은 cisplatin 유도 정상신장세포에 대한 독성을 감소시켰으며 *in vitro*에서 뚜렷한 항산화작용을 확인하였다. 이공산의 물 추출물의 cisplatin 유도 신장독성감소작용은 부분적으로 항산화작용 기전으로 설명할 수 있다.

## 감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 주관 98' 보건의료기술연구개발사업 연구비의 도움으로 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

## 인용문헌

- Lee, K. T., Rho, Y. S., Ahn, K. S., Chang, S. G. and Jung, J. C. (1998) Preventive effect of crude drug preparation (E-kong san) on cisplatin induced nephrotoxicity. *Kor. J. Pharmacogn.* 29: 258-264.
- 동의학 연구소, 방제학, 211-215. 여강출판사, 서울 (1993).
- Hsu, H. Y., Yaung, J. J., Lian, S. L., Ho, Y. H. and Lin, L. L. (1996) Recovery of the hematopoietic system by Si-Jun-Zi-Tang in whole body irradiated mice. *J. Ethnopharmacol* 54: 69-75.
- Tseng, J. and Li, T. L. (1996) Si-jun-zi-tang regulate granulocyte macrophage colony stimulating factor secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Am. J. Chin. Med.* 24: 45-52.
- Li, X. M., Wang, B. Y. and Zhou, Z. W. (1990) Treatment of childhood anorexia with spleen deficiency by principle of invigorating spleen and benefiting GI. *Chung Hsi Chieh Ho Tsa Chih* 10: 482-454.
- Quanbo, X., Shigetoshi, K., Tadato, T. and Tsuneo, N. (1996) Antioxidative effect of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 1580-1585.
- Rockstein, M., Sussman, M. L. and Chesky, J. (1974) Theoretical aspects of aging. Acad. Press, New York.
- Donald, G., Bruce, V. and Donald, C. (1993) Clinically silent progressive renal tubulointerstitial disease during cisplatin chemotherapy. *Cancer* 71: 4050-4054.
- Sugihara, K., Nakano, S., Koda, M., Tanaka, K., Fukuishi, N. and Gemba, M. (1987) Stimulatory effect of cisplatin on production of lipid peroxidation in renal tissues. *Jpn. J. Pharmacol.* 43: 247-252.
- Hannemann, J., Duwe, J. and Baumann, K. (1991) Iron and ascorbic acid induced lipid peroxidation in renal microsomes isolated from rats treated with platinum compounds. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 28: 427-433.
- Reed, D. J. (1990) Glutathione. Toxicological implications. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 603-631.
- Brafford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

- protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
13. Kiso, Y., Tohkin, M., Hikio, H., Hattori, M., Sakamoto, T. and Namba, Y. (1984) Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin. *Planta Med.* 50: 298-302.
  14. Zhang, J. G. and Lindup, W. E. (1994) Cisplatin nephrotoxicity decreases in mitochondrial protein sulfhydryl concentration and calcium uptake by mitochondria from rat renal cortical slices. *Biochem. Pharmacol.* 47: 1127-1135.
  15. Sadzuka, Y., Shimizu, Y., Takino, Y. and Hirota, S. (1994) Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat by inducers and an inhibitor of glutathione S-transferase. *Biochem. Pharmacol.* 48: 453-459.
  16. Rao, M., Kumar, M. M. and rao, M. A. (1999) In vitro and in vivo effects of phenolic antioxidants against cisplatin-induced nephrotoxicity. *J. Biochem.* 125: 383-390.
  17. Thomas, J. M. and Richard, F. B. (1988) Quiescent LLC-PK1 cells as a model for cis-diaminedichloroplatinum(II) nephrotoxicity and modulation by thiol rescue agents. *Cancer Research* 48: 6017-6024.
  18. Kim, Y. K., Jung, J. S., Lee, H. E. and Kim, Y. W. (1997) Effects of antioxidants and  $Ca^{2+}$  in cisplatin-induced cell injury in rabbit renal cortical slices. *Tox. Appl. Pharmacol.* 146: 261-269.
  19. McGinness, J. E., Proctor, P. H., Dempoulos, H. B., Hokanson, J. A. and Kirkpatrick, D. S. (1978) Amelioration of cis-platinum nephrotoxicity by orgotein (superoxide dismutase). *Physiol. Chem. Phys.* 10: 267-277.

(1999년 6월 10일 접수)