

## 토끼에서 cisplatin에 의해 유도된 급성 신부전시 황금 (黃芩; *Scutellaria Baicalensis* Georgi.) 추출물의 효과

김수창 · 송영민 · 이성대\* · 송승희\*\* · 고필옥\*\*\* · 김종수\*\*\* · 김충희<sup>1</sup>  
 진주산업대학교 동물생명과학과, 동물소재공학과, \*가고시마대학교 축산학부,  
 \*\*창원전문대학 애완동물관리과, \*\*\*경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소

(게재승인: 2007년 9월 15일)

### Effect of *Scutellaria Baicalensis* Georgi. Extract on Cisplatin-Induced Acute Renal Failure in Rabbits

Soo-Chang Kim, Sung-Dae Lee\*, Seung-Hee Song\*\*, Phil-Ok Koh\*\*\*, Chung-Boo Kang\*\*\*, Jong-Su Kim\*\*\* and Chung-Hui Kim<sup>1</sup>

Department of Animal Science and Resources Technology, Jinju National University, Korea

\*The United Graduate School of Agricultural Science, Kagoshima University, Japan

\*\*Department of Pet Management, Changwon College, Korea

\*\*\*College of Veterinary Medicine and Institute of Animal Medicine, GyeongSang National University, Korea

**Abstract :** *Scutellaria baicalensis* Georgi. (SBGE) is known to be antioxidant effect. In addition of the effects, we further investigated the SBGE on the antioxidant effect on a renal cortical slices cell and kidney protecting effects. The results were as follows. 1. When renal cortical slices separated from a rabbit's kidney were treated with 1mM tert-Butylhydroperoxide (t-BHP) in the presence of SBGE. SBGE significant prevented t-BHP induced increase in lactate dehydrogenase (LDH) release and lipid peroxidation. 2. When renal cortical slices separated from a rabbit's kidney were treated with oxidant 300µM cisplatin in the presence of SBGE. SBGE significant prevented cisplatin-induced increase in LDH release and lipid peroxidation. 3. Pretreatment with 0.1 g/kg SBGE for seven day and treatment with 5 mg/kg cisplatin by the intraperitoneal injection. The results were that the pretreatment group with SBGE showed a significant decrease in lipid peroxidation, increase in clearance rate of blood urea nitrogen (BUN) and creatinine in the kidney than the administering single agent group of cisplatin. and pretreatment group with SBGE showed intact microvillus of proximal tubule and no contraction of rumen, it was a similar result with normal group. With the results, SBGE showed to be highly effective on antioxidant effect and cellular protection activity against cisplatin that was a toxic agent on a kidney. Therefore, SBGE is considered to have protective effective on a disordered kidney or kidney diseases such as nephritis or renal failure that cause tissue damages in a kidney.

**Key words :** *Scutellaria Baicalensis* Georgi., acute renal failure, cisplatin, rabbit

## 서 론

생명유지를 위하여 세포내에서 필수적으로 이루어지는 대사과정의 결과로 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)이 생성된다. fenton 및 haber-weiss reaction에 의해 생성된 hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )은 반응성이 매우 커서 세포 지질막, 세포내 단백질 및 DNA 등의 생체물질을 손상시킨다. 정상적인 세포는 활성산소를 제거하기 위하여 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, NADPH 및 urate

등을 이용하여 세포 내 산화-항산화 균형(oxidant-antioxidant homeostasis)을 유지한다.

그러나 이러한 균형이 파괴되거나 과도한 활성산소가 발생될 경우 세포는 산화적 스트레스를 받게 되며, 그 현상이 지속될 경우 세포 내 신호 전달계 및 유전자 발현계 등에 손상을 가져와 돌연변이 또는 세포사멸이 일어나며, 나아가 노화를 포함한 각종 질환의 직·간접적 원인이 된다.

따라서 생리학적 산화-환원 항상성 조절, 산화적 스트레스 유도성 질환과 관련된 유전자의 조절 또는 항산화제로 이용할 수 있는 물질을 개발하여 임상에 적용될 수 있다면 ‘항산화제 치료(antioxidant therapy)’라는 새로운 약물학적 및

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : Kimch@jinju.ac.kr

의학적 치료가능성을 제시할 수 있게 된다(4). 최근에는 이와 관련된 연구가 다양하게 이루어지고 있으며, 앞으로는 대체의학의 한 분야로서 더욱 많은 관심을 갖게 될 것으로 전망된다.

현재 널리 사용되고 있는 항산화제로는  $\alpha$ -tocopherol, ascorbic acid 및  $\beta$ -carotene 등이 있으나, vitamin과 생체 유래의 몇몇 항산화제를 제외하고는 생체에 적용할 경우 심한 부작용을 동반하므로 식품 및 의약품에 사용하는 것을 엄격히 규제하고 있다(14). 그러므로 최근에는 자연계에 널리 존재하는 페놀계 화합물에 많은 관심이 집중되고 있으며, 특히 flavonoid는 자연적으로 생성되는 페놀계 화합물로서 약 4,000여종이 발견되어 있다. 이는 인간이 섭취하는 대부분의 식물체에 존재하는 것으로 알려져 있으며, 항산화뿐만 아니라 일부 성분은 항암효과가 뛰어나 생물학적, 약물학적 및 의학적 측면에서 중요성을 나타내고 있다.

최근 식물성 flavonoid의 성분이 분석되고, 그 효능이 밝혀지고 있는 한약제 중에 황금[*Scutellaria baicalensis* Georgi, 黃芩(SBGE)]이 주목받고 있다(1,13,25).

황금의 성분이 밝혀지면서 성분의 약리학적 기능에 대한 연구가 수행되었는데, baicalin은 호르몬의 항상성에 영향을 준다는 보고(33)와 항염 및 항경련(31) 그리고 항종양과 종양전이 억제능이 있다고 보고하였다(32).

tert-Butylhydroperoxide(t-BHP)는 oxidative stress에 의한 세포 손상 연구에 널리 사용되는 모델물질이며, mitochondria의 cytochrome c 혹은 cytochrome c에 의해 대사되어 t-butoxyl, t-butylperoxyl, 및 methyl radical 등의 free radical 등을 생성한다(6). 이 radical들은 지질과산화, 단백질산화 및 핵산의 손상을 초래한다고 보고되어 있다.

많은 연구에 의하면 신장독성은 자유전자, 특히 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 관계하고 있음이 밝혀지고 있다(17). 이들은 주위의 화합물과 쉽게 반응하여 여러 신체조직에 침투함으로써 여러 장기와 조직에 독성효과를 나타내어 관절염, 심근경색, 신부전, 암유발 등 많은 질병을 일으키는 요인으로 작용한다.

Cisplatin(cis-diamminedichloroplatinum II)은 암 치료시 종양의 제거를 위하여 치료제로 사용되는 항암제로 신장독성을 일으키는 부작용이 있어 임상적인 사용이 제한되고 있다. 이용하여 최근에는 손상된 신장의 모델을 제시하기 위하여 사용하고 있다(11).

급성신부전은 외부의 독성물질 투여나 신장실질세포의 기계적인요인에 의한 장애로 인하여 체내 질소노폐물의 축적이 발생하는 질환으로 치사율이 높고 만성형으로 이환될 경우 투석이나 신장이식을 통해서만 치료받을 수 있는 질병이다. 그러나 급성신부전의 치료를 위하여 많은 연구가 수행되었지만 아직 그 치료법이 개발되지 않고 있는 실정이다.

지금까지 황금의 성분으로 많은 연구 결과들의 보고가 있으나 급성신부전에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았으며, 신피질의 기능에 대하여 실험이 이루어졌을 뿐 전자현미경 수준에서 조직학적 소견이나 *in vivo* 상태에서 항산화효과에

대한 실험은 보고된 바 없었다.

이에 t-BHP를 이용하여 *in vitro* 상태에서 황금 추출물의 신피질 기능 실험과 cisplatin에 의해 유발된 급성신부전 실험동물 모델에서 신장의 기능 향상과 항산화 효과 및 광학현미경적 소견을 조사하여 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

실험동물은 체중 1.5~1.8 kg의 New Zealand male rabbit을 효창 사이언스에서 구입하여 고형사료(삼양사료, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 2주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 대조군과 실험군은 5마리의 토끼를 사용하여 *in vitro*와 *in vivo*로 신장을 적출하여 각 성상을 검사하였다.

### 황금추출액 제작

황금 600 g을 분쇄하여 70% methyl alcohol에 4시간씩 3차례 역류시켜 추출한 용액을 감압 상태에서 65 g으로 농축하여 실험 까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하고, 실험 전에 생리식염수에 1시간동안 용해시켜 사용하였다.

### *-in vitro-*

#### 신피질 절편의 제작

토끼를 경추 타격법으로 희생시킨 후 즉시 신장을 분리하여 ice-cold isotonic solution(140 mM NaCl, 10mM KCl, 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$ )을 신동맥에 주입하여 관류시켜 혈액을 제거한 뒤 ice-cold modified Cross-Taggart medium(130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM glucose, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)에 보관하였다. 그리고 준비된 장기를 Stadie-Riggs microtome를 이용하여 0.4~0.5 mm두께로 절단한 후 실험 전까지 ice-cold modified Cross-Taggart medium에 다시 보관하였다.

#### t-BHP 약물처리 방법

t-BHP 1 mM이 함유된  $37^{\circ}\text{C}$ , 4 ml의 modified Cross-Taggart medium에 100% 산소를 지속적으로 공급하면서 SBGE를 0~0.1% 첨가한 후 신장의 피질에서 준비된 50 mg 정도의 신장 절편을 medium에 넣어 1시간 배양하였다.

#### 지질과산화의 분석

지질과산화의 분석은 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정하였다(28). t-BHP 1 mM 및 SBGE가 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 acid을 첨가하였다. 상온에서 10분간 방치한 후  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 가열하고  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 방치하였다. 4 ml의 n-butanol:pyridine(15, V/V)를 혼합 및 진탕하여 2,000 g에서 20분간 원심한 후 상층액을 취하여

spectrophotometer(Hitach, U-2,000, Japan)를 이용하여 510 nm 와 534 nm에서 측정하였다.

외부 표준시료로서 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane을 사용하였다. MDA 값은 단백질 1g당 n moles로 표시하였고, 단백질 농도는 Bradford method로 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.

#### -in vivo-

#### 급성 신부전 유도

Cisplatin 주입전 7일 동안 황금 추출액을 투여 (0.1 g/kg/day, p.o)하였다. 대조군은 동량의 생리식염수를 투여하였다. Cisplatin 5 mg/kg을 dimethylsulfoxide(DMSO)에 희석하여 복강내주사하고, 24시간 및 48시간 뒤에 채혈 후 희생하여 조직을 채취하고 변화를 관찰하였다.

#### 지질과산화의 분석

In vitro에서와 동일한 방법으로 Cisplatin에 의한 급성 신부전을 유발시킨 뒤 신장에서 지질과산화를 측정하였다. 황금 추출액을 7일간 급여한 후 cisplatin을 처리하여 24시간 경과 한 후 희생시켜 신장을 적출하여 신피질 절편을 만들어 지질 과산화를 측정하였고, 어떤 처리도 하지 않은 대조군에서 신피질 절편의 지질과산화를 측정하였다.

#### 혈청 성분 측정

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

#### 병리조직학적 검사

조직학적 소견을 위하여 적출한 신장의 동맥에 4% formaldehyde를 관류하여 고정하고 파라핀에 포매한 후에 5 µm두께로 조직 절편으로 만들어 염색하여 광학현미경하에서 신사구체와 세뇨관의 손상정도를 비교하였다.

#### 통계분석

통계처리는 SAS(The SAS System for Windows, ver. 9.0, SAS Institute, U.S.A.)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 황금의 지질 과산화 억제효과

t-BHP에 의한 신피질 절편의 지질과산화를 황금 추출액

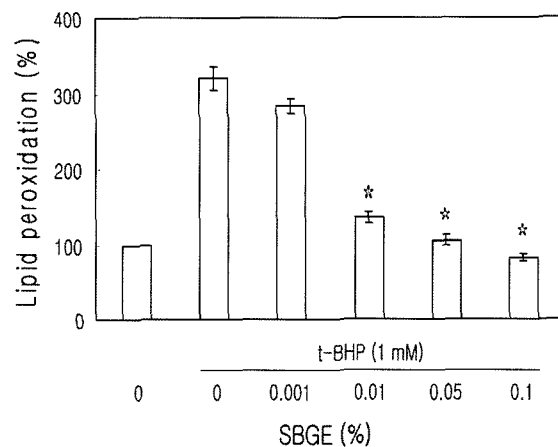
이 효과적으로 억제하는지를 시험관 내 실험을 통해 확인하기 위해 각각 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1% 농도의 황금 추출액이 들어 있는 용액 내에서 1 mM t-BHP를 신피질 절편에 처리하고 지질과산화 정도를 조사하였다(Fig 1).

실험 결과에 따르면 아무런 처치를 하지 않은 군의 지질과산화를 100%로 환산하였을 때, 1 mM의 t-BHP를 처리한 대조 배양군에서는 322.5±16.8%를 나타내어 3배 이상이 증가하였으나, 황금 추출액을 0.05%와 0.1%를 처리하였을 때 각각 108.2±9.4% 및 92.8±8.4%로 나타나 황금 추출액 농도에 의존하여 t-BHP에 의한 지질과산화가 감소하였으며, 모두 대조 배양군과 유의한 차이를 보였다(P<0.05).

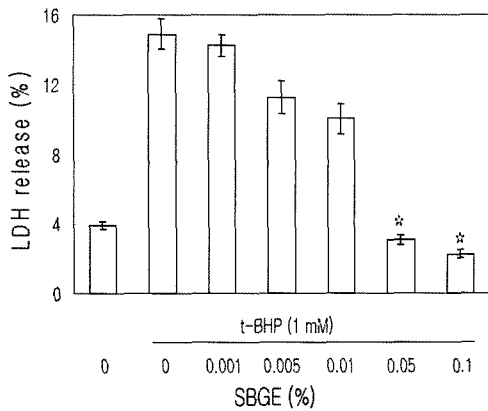
### t-BHP 처리한 신피질 절편에서 황금의 LDH 유출 억제효과

t-BHP에 의한 신피질 절편의 손상을 황금 추출액이 효과적으로 억제하는지를 시험관 내 실험을 통해 확인하기 위해 각각 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1% 농도의 황금 추출액이 들어 있는 용액 내에서 1 mM t-BHP를 신피질 절편에 처리하고 LDH 유출 정도를 조사하였다.

실험 결과에 따르면 아무런 처치를 하지 않은 군의 LDH 유출은 3.06±0.28%였으며, 1 mM의 t-BHP를 처리한 대조 배양군에서는 14.9±0.87%를 나타내어 4배 이상이 증가하였으나, 황금 추출액을 0.05%와 0.1%를 처리하였을 때 각각 3.06±0.28% 및 2.27±0.26%로 나타나 황금 추출액 농도에 의존하여 t-BHP에 의한 LDH 유출이 감소하였으며, 모두 대조 배양군과 유의한 차이를 보였다(P<0.05). 이는 t-BHP에 의해 발생한 신피질 절편의 반응성 산소기로 인한 세포손상을 황금 추출액이 효과적으로 감소시키는 효과를 나타냄을 알 수 있다(Fig 2).



**Fig 1.** Protective effect of SBGE on t-BHP-induced lipid peroxidation in rabbit kidney slices cells. Slices were treated with various concentrations of 0 to 0.1% SBGE in the presence of 1mM t-BHP at 37°C for 60min, and lipid peroxidation was measured. Data are mean ± SE of five experiments. \*: Significantly different compared with 1 mM t-BHP (p<0.05).



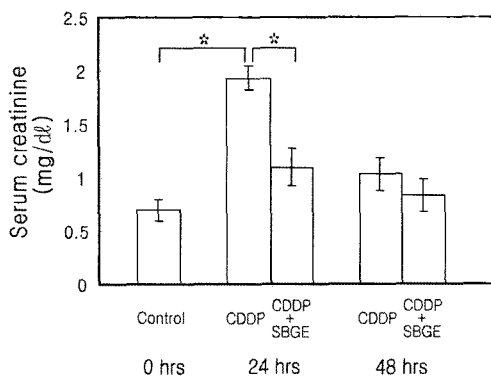
**Fig 2.** Protective effect of SBGE on t-BHP-induced LDH release in rabbit kidney slices cells. Slices were treated with various concentrations of 0 to 0.1% SBGE in the presence of 1mM t-BHP at 37°C for 60 min, and LDH release was measured. Data are mean ± SE of five experiments. \*: Significantly different compared with 1mM t-BHP (p < 0.05).

**Cisplatin에 의해 유도된 급성 신부전시 황금의 혈청 creatinine 농도에 미치는 영향**

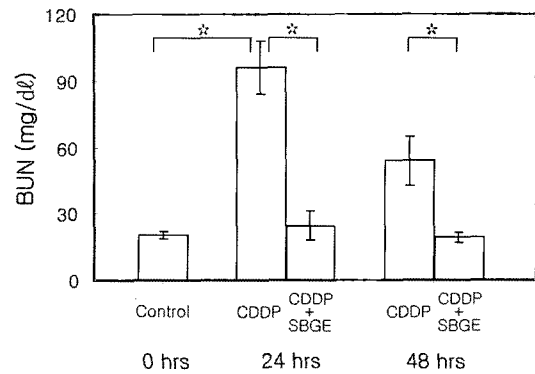
황금 추출액을 7일간 급여한 후 cisplatin을 처리하여 24시간 후에 혈청 creatinine 제거율을 측정한 결과, 약물을 처리하지 않은 대조군은 0.7 ± 0.1 mg/dl로 나타났으나, cisplatin 단독 처리군은 1.93 ± 0.1 mg/dl로 약 2.8배로 유의(P < 0.05)하게 상승하였다. 그러나 황금 추출액을 7일간 급여한 후 cisplatin 처리한 군은 1.03 ± 0.15 mg/dl로 cisplatin 단독 처리군에 비하여 약 50%가 유의적으로 감소하였다. 48시간 경과시 혈청 creatinine 제거율은 모두 감소하였으며, 특히 황금을 투여한 군은 0.83 ± 0.15 mg/dl로써 대조군과 비슷한 결과를 나타내었다(Fig 3).

**Cisplatin에 의해 유도된 급성 신부전시 황금의 혈청 BUN 농도에 미치는 영향**

황금 추출액을 7일간 급여한 후 cisplatin을 처리하여 24시



**Fig 3.** Effect of SBGE pretreatment on changes in serum creatinine levels in cisplatin(CDDP)-induced acute renal failure. Data are mean SE of five experiments. \*: p < 0.05.

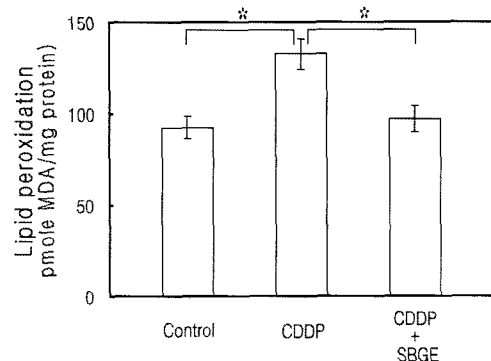


**Fig 4.** Effect of SBGE pretreatment on changes in serum BUN levels in cisplatin(CDDP)-induced acute renal failure. Data are mean SE of five experiments. \*: p < 0.05.

간 후에 혈청 BUN 제거율을 측정한 결과, 약물을 처리하지 않은 대조군은 20.7 ± 1.66 mg/dl로 나타났으나 cisplatin 단독 처리군은 96.27 ± 11.96 mg/dl로 증가하여 약 4.6배 이상으로 유의(P < 0.05)하게 상승하였다. 그러나 황금 추출액을 7일간 급여후 cisplatin을 처리군의 혈청 BUN 농도는 24.67 ± 6.59 mg/dl로 cisplatin 단독 처리군에 비하여 4배나 감소하여 대조군과 거의 같은 결과를 나타내었다. 48시간 경과시 혈청 BUN 제거율은 모두 감소하였으며 cisplatin을 단독 처리군은 53.93 ± 11.1 mg/dl로 여전히 정상군에 비하여 2배 이상 높은 수치를 나타낸 반면, 황금 추출액을 전 처리한 군에서는 19.2 ± 2.26 mg/dl로써 오히려 정상군보다 다소 낮게 나타났다(Fig 4).

**Cisplatin에 의해 유도된 급성 신부전시 황금의 지질과산화 억제효과**

황금 추출액을 7일간 급여한 후 cisplatin을 처리하여 24시간 경과 한 후 희생시켜 신장을 적출하여 신피질 절편을 만들어 지질 과산화를 측정한 결과, 아무런 처리를 하지 않은



**Fig 5.** Effect of SBGE pretreatment on changes in lipid peroxidation of cortex of kidney in cisplatin(CDDP)-induced acute renal failure. The rabbit killed 24hour after cisplatin treatment. Data are mean SE of five experiments. \*: p < 0.05.

대조군에서 신피질 절편의 지질과산화는  $92.43 \pm 6.24$  mg/dl로 나타났으며, cisplatin 단독 처리군에서  $132.55 \pm 8.52$  mg/dl로 1.4배 이상 유의적으로 증가하였다. 황금 추출액을 7일간 급여한 후 cisplatin을 처리한 군은  $97.38 \pm 7.11$  mg/dl로 대조군과 비슷한 수치를 보였다(Fig 5).

### 병리조직학적소견

#### 대조군

신장에 약물 처리를 하지 않은 정상 피질부위의 육안적 소견으로 사구체와 근위곱슬세관, 원위곱슬세관이 관찰되었다. 근위곱슬세관의 세포질은 eosin에 붉게 염색되고, 세포꼭대기 부분은 솔가장자리에 의해 내강은 경계가 불명확하게 보이며, 세포질내의 지방방울을 함유한 정상적인 소견을 나타내었다. 원위곱슬세관은 핵의 수가 더 많고, 세포질은 밝게 보이고, 내강이 크고 깨끗한 정상적인 소견을 보인다. 그리고 근위곱슬세관 내강에는 용모세포들을 관찰할 수 있다 [Fig 6. (A), arrow].

#### Cisplatin 5 mg/kg 투여 후 24시간 경과한 신장의 소견

근위곱슬세관의 세포질의 염색이 대조군보다 eosin에 더 붉게 염색되었으며, 세포융합에 의하여 세포의 경계가 명확하지 않고 내강 안의 구조가 대조군보다 깨끗한 소견을 나타내었다[Fig 6. (B) open arrow].

원위곱슬세관의 세포질도 근위곱슬세관의 구조와 동일하게 대조군보다 eosin에 더 붉게 염색되었으며, 세포융합에 의하여 세포의 경계가 명확하게 나타나지 않았으며 근위곱슬세

관 내강에는 용모세포의 일부가 사라져 공포를 형성하고 있다. 이것은 대조군에 비하여 많은 용모세포 탈락을 나타내고 있는 것이다.

#### Cisplatin 5 mg/kg 투여 후 48시간 경과한 신장의 소견

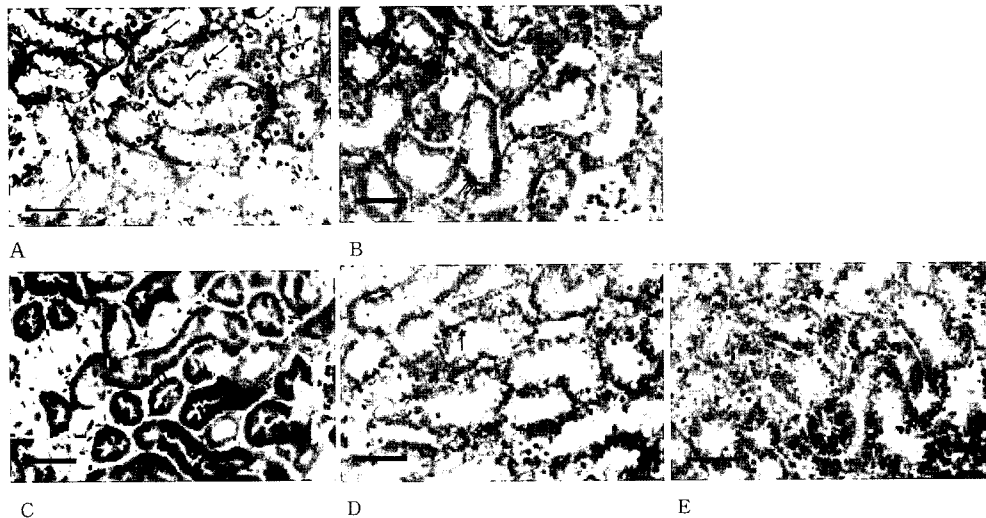
대조군과는 달리 근위곱슬세관이 뚜렷하게 관찰되었다. 근위곱슬세관의 세포질이 eosin에 아주 진하게 염색되었으며, 세포융합에 의하여 세포의 경계가 명확하지 않으며, 내강은 관찰 할 수 없을 정도로 좁아진 소견을 나타내었다[Fig 6. (C)]. 원위곱슬세관의 세포질로 대조군보다 eosin에 진하게 염색된 소견을 나타내었다.

근위곱슬세관 내강에는 용모세포의 대부분이 사라졌으며, 탈락된 용모세포의 근위곱슬세관 내강부위가 서로 유착되어 내강이 완전히 소실되었다. 이것은 cisplatin 투여 후 24시간 군에 비하여 더욱 많은 용모세포의 탈락을 의미한다.

cisplatin 5 mg/kg을 투여후 48시간 경과시, 근위곱슬세뇨관의 용모세포 대부분이 탈락하고 내강이 협착됨으로 실질적인 신장의 기능은 대부분 소실되는 것으로 생각된다[Fig 6. (C), open arrow].

#### 황금 추출액을 전처리하고 cisplatin 5 mg/kg 처리 후 24시간 뒤 신장의 소견

대조군과 비슷하게 근위곱슬세관의 세포질은 eosin에 붉게 염색되나, 세포질의 경계가 명확하지 않고, 세포 꼭대기 부분은 솔가장자리에 의해 내강의 경계가 불명확하며, 세포질내의 지방방울을 함유하고 있었다. 원위곱슬세관의 세포질은 밝게 보이는 소견을 나타내었다.



**Fig 6.** Histological finding of the renal cortex in untreated (A), cisplatin (5 mg/kg, 24hr)-treated (B), cisplatin (5 mg/kg, 24hr)-treated (C), SBGE+cisplatin (5 mg/kg, 24hr)-treated (D), and SBGE+cisplatin (5 mg/kg, 48hr)-treated rabbit (E). A: The epithelial cell of proximal tubule formed numerous long microvilli in untreated rabbit. B and C: The microvilli of proximal tubule is destructed and the lumen of proximal tubule is disappeared in cisplatin-treated animals. D and E: The epithelial cell with microvilli appeared in cisplatin-treated rabbit after SBGE pretreatment. Arrows indicate the epithelial cell with microvilli of the proximal tubule in untreated rabbit and cisplatin-treated rabbit after SBGE pretreatment. Open arrows indicates the disappearance of microvilli in cisplatin-treated animals. Hematoxylin and eosin staining. Scar bars = 30  $\mu$ m.

cisplatin 단독 처리군에서는 근위곱슬세뇨관의 용모세포가 탈락하였으나, 황금 추출액을 전 처리하고 24시간 경과한 후 용모세포의 탈락은 거의 관찰되지 않았으며 대조군과 비슷한 결과를 보였다[Fig 6. (D), arrow].

**황금 추출액을 전처리하고 cisplatin 5 mg/kg 처리 후 48시간 뒤 신장의 소견**

근위곱슬세뇨관의 세포질은 eosin에 붉게 염색되었고, 세포 꼭대기 부분은 슬가장자리에 의해 내강이 경계가 불명확하며 원위곱슬세뇨관은 밝게 보였다. cisplatin 단독처리하여 48시간 경과한 군은 근위곱슬세뇨관의 내강이 협착되어 소실되었으나 황금 추출액을 전처리하여 48시간 경과한 군은 일부 근위곱슬세뇨관에서 탈락된 용모세포로 인하여 내강의 일부가 협착된 것을 볼 수 있으나 대부분이 용모세포를 잘 간직하고 있고 대조군과 유사하게 내강이 잘 보존되어 있었다[Fig 6. (E), arrow].

**고 찰**

한방의학에서 주로 항염증, 황달, 폐렴, 해열 및 항암작용에 효과가 있다고 알려진 황금 추출물은 자연성 제재로써 안정성이 뛰어나 현재 그 성분 및 약리학적 기능에 대한 연구가 활발하게 수행되어 지고 있다. 급성 신부전의 치료법이 개발되지 않고 있는 실정에서 현재 황금 추출물의 신장 손상에 있어 항산화 효과 및 세포보호 작용이 주목을 받고 있다.

황금이 함유하고 있는 플라보노이드 중 가장 많은 부분을 차지하는 baicalin(C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>)과 Wogonin(C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>)은 가수분해되면 baicalein과 glucuronic acid로 되는 특성이 있다(1). 그리고 황금의 주 약효성분인 baicalin의 함량은 재배지 토양의 질소, 인산 및 가리 함량의 영향을 크게 받는다고 하며, 또한 황금의 품질은 뿌리에 함유되어 있는 baicalin, 유리당류 및 회분의 함량에 따라서 결정된다고 한다(25).

황금의 약리작용으로 항염증 작용(7,12,19), 항히스타민 효과(20), 항간독성(29), 항균작용(21), 항암작용(22) 등이 보고되면서 황금에 대한 관심이 집중되었으며 이후, 황금의 효능을 검증하기 위한 실험이 많이 수행되었다.

황금의 항염증작용에 대한 연구에서 생쥐에 실험적으로 dextran sulfate sodium(DSS)를 투여하여 체중감소, 헤모글로빈 함량감소, 직장출혈 등과 같은 대장염 증세를 나타내었으며, 여기에 황금의 플라보노이드 성분인 baicalein, baicalin과 wogonin을 각각 20 mg/kg을 10일간 경구투여 하였을 때 baicalein은 증세를 완화시킨 반면 baicalin과 wogonin은 증세를 완화시키지 못하였다는 보고가 있으며(12), 2-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), 99% arachidonic acid (AA), oxazolone, hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 단독 또는 황금 추출액과 함께 생쥐의 귀에 문질러 피부염을 유발시키는 실험에서 귀의 염증 및 부종의 유발은 황금 추출물에 의하여 16~18%정도 감소되었다고 보고와(7), 생쥐의 피부에 포르말린과 정제된 황금의 플라보노이드 성분인 baicalin을 투

여한 실험에서 baicalin이 높은 항염증작용을 나타내었다고 보고한 바 있다(19).

세포의 염증반응동안 대식세포, 간세포 및 신장세포 등에서 lipopolysaccharide(LPS), tumor necrosis factor(TNF), interleukin(IL)-1, 또는 interferon(IFN)과 같은 방어인자들의 활동에 의해 nitric oxide synthase(iNOS)의 형성이 촉진되어 결국 nitric oxide(NO)를 생성되며(27), 생쥐복강에서 추출된 대식세포를 실험실에서 배양하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sulfanilamide 또는 naphthylenediamide dihydrochloride를 황금 추출액과 동시에 투여 하고, NO indicator를 사용하여 NO의 형성을 측정할 결과 황금을 투여한 군에서 NO의 형성이 현저히 감소하였다고 보고하였다. 이와 비슷한 실험으로 Kim 등(15)은 황금이 신경세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생쥐 유래세포인 L929, PC12 그리고 BV-2 cell를 배양하여 LPS를 처리한 다음 황금 투여군과 비교한 결과 NO의 형성을 20%이상 감소시켰다고 보고하였다.

황금이 암세포에 미치는 실험에 대한 보고로서는 사람유래 전립선 암세포주인 DU145 cell를 사용하여 tunnel labeling, DNA 분절, activation of caspase-3 그리고 cleavage of poly-ADP-ribose polymerase(PARP)방법을 이용하여 실험한 결과, baicalin이 전립선암세포의 성장을 50% 정도 억제하였다고 보고하였으며(5), 폐암에서 T-임파구의 증식을 억제하는데 황금 추출액이 T-임파구의 증식을 증가시켜 항암효과를 나타내었다고 보고한 바 있다(26).

본 연구에서 산화제인 t-BHP에 의해 발생한 신피질 절편의 반응성 산소기로 인한 세포손상을 황금 추출액이 효과적으로 감소시키는 것을 알 수 있었으며, 이는 신경세포에 glucose를 고갈시켜 유발된 LDH에 대하여 황금 추출액이 보호 작용을 나타낸 것과 유사한 결과를 보인다(18). 따라서 황금 추출액 0.05~0.1%를 처리 할 경우 신피질 세포의 손상을 감소시킬 뿐만 아니라 다른 조직의 세포 손상시 적용하여도 유사한 결과를 나타내리라 추정된다.

어떠한 처치도 하지 않은 대조군의 지질과산화물을 100%로 환산하였을 때, t-BHP 1mM를 처리군은 322.5±16.8%를 나타내어 3배 이상 증가하였으나, 황금 추출액을 0.05%와 0.1%를 처리하였을 때 각각 108.2±9.4% 및 92.8±8.4%로 나타나 황금 추출액 농도에 의존하여 t-BHP에 의한 지질과산화가 감소하였으며, 모두 대조군과 유의적인 차이를 보였다. 이는 생쥐에서 황금 추출액 150 mg을 28일간 투여한 뒤 사염화탄소를 처리하여 간세포에서의 지질과산화를 측정할 결과 황금 추출액이 지질과산화의 형성을 억제하였다는 보고(23)와 HS-SY5Y cells에 과산화수소를 처리하여 지질과산화가 유발될 때 10 μM의 baicalein을 처리시 flavonoid의 항산화 효과에 의해 지질과산화의 형성이 감소된 결과와 일치한다(10). 따라서 황금이 함유하고 있는 여러 가지 flavonoid가 t-BHP로 유발된 급성 신부전의 진행에 있어 유효한 역할을 하는 것으로 사료되며, 이런 가능성은 황금 추출액이 t-BHP로 유발된 지질과산화를 감소시킨 결과에 의해 입증되었다.

신장기능에 관한 연구들 중에서 cisplatin 5mg을 토끼의 복강에 투여하여 신장의 손상과 TNF- $\alpha$  mRNA의 형성을 억제하였으나 항산화제인 pentoxifylline 30 mg/kg을 처리함으로써 신장의 손상억제와 TNF- $\alpha$  mRNA를 증가시켜 조직학적으로 급성 신세뇨관의 괴사를 억제하였으며(15) 쥐에 신장독성을 유발하는 genamycin과 2가지의 식물성 flavonoid를 함유하고 있는 *Pongamia pinnata*를 동시에 투여한 결과, 항산화 작용에 의해 독성을 억제하였다(24)는 보고들과 같이 황금 추출액 또한 pentoxifylline과 *Pongamia pinnata*처럼 항산화 효과에 의하여 creatinine 제거율과 BUN 제거율을 지속시켜 신장의 기능을 보호한다는 것을 관찰할 수 있었다.

조직학적 연구 결과를 보면 cisplatin을 처리후 48시간 에는 근위급슬세관 내강에는 용모세포의 대부분이 사라졌으며, 탈락된 용모세포의 근위급슬세관 내강부위가 서로 유착되어 내강이 완전히 소실된 것을 관찰할 수 있었으며 이것은 cisplatin 투여 후 24시간 군에 비하여 더욱 많은 용모세포의 탈락된 것으로 신장의 기능은 대부분 소실되었을 것이며 이는 cisplatin에 의한 산화적 스트레스 작용에 의한 것으로 확인되었다. 이에 황금추출물을 전처리후에 cisplatin 5 mg/kg 처리하고 24시간 경과시 용모세포의 탈락을 거의 볼 수 없으며 아무런 처방을 하지 않은 대조군과 비슷한 결과를 보였다. 이것은 cisplatin에 의해 유도된 신장손상에 있어 melatonin의 항산화 효과를 나타내는 조직학적 연구 결과와 유사하게 나타났다(16). 따라서 황금 추출액이 cisplatin에 의해 유발된 신장조직 손상을 억제 및 보호효과를 지니고 있을 뿐 아니라 다른 장기에도 이러한 효과를 나타내리라 사료된다.

황금 추출액의 효능에 관한 실험적 연구로 황금 추출액의 흰쥐에서 간세포내에서 항산화 효과에 대한 연구가 보고된 바 있으며(32), 쥐에 cisplatin을 투여시 지질과산화의 상승과 심한 구도의 부작용을 황금이 억제한다는 보고도 있다(2). 따라서 본 실험과 다른 연구자들과의 결과를 비교할 때 황금 추출액은 *in vivo* 상태에서도 cisplatin에 의한 지질과산화의 형성을 억제한다는 것을 입증하였다.

본 실험에서 t-BHP와 cisplatin에 의한 신피질 자극시 황금추출액이 효과적으로 지질과산화와 LDH를 억제시키는 것을 관찰하였다. 이는 쥐에 사염화탄소가 간세포에 스트레스를 주어 LDH를 유발하지만 황금 추출액이  $\beta$ -glucuronidase를 억제하여 LDH 유출을 감소시킴으로 간세포를 보호한다는 것과(3), 신경계 세포주에 glucose를 고갈시켜 유출된 LDH를 황금 추출액이 감소시켰다는 내용과 유사하다(18). 또한 butylated hydroxytoluene가 lecithin liposome membranes에 미치는 지질과산화에 황금 추출액이 항산화효과를 나타내어 지질과산화의 형성을 억제하였으며(8), 쥐의 간세포에 ascorbic acid가 유발한 지질과산화를 baicalein이 억제하였고 보고한 내용과 일치한다(9). 따라서 신체 여러 부위에서 다양한 산화적 손상에 의해 유발된 지질과산화와 LDH의 유출은 황금 추출액이 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 황금 추출물은 t-BHP 및 cisplatin에 의해 유도된 신장의 독성작용에 대하여 항산화 효과 및 세포보호 작용을 가지고 있음이 확인되었으며, 신부전, 신우염 등 신장의 조직손상을 유발하는 신장질환에 있어 보조 대체 치료제로써 적용하면 보다 빠른 치유 효과 및 보호 작용을 나타낼 것으로 추정되며, 더 나아가 다른 원인에 의한 신독성의 경우와 다른 장기에서의 항산화 효과에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

토끼에서 t-BHP 처리 및 항암제로 알려진 cisplatin에 의해 유도된 급성 신부전에 있어 황금 추출물의 항산화 효과 및 신장보호 작용에 대해서 조사하였다.

1. 토끼의 신장에서 분리한 신피질 절편을 산화제인 t-BHP 1 mM을 처리시 황금 추출액 0.05%, 0.1%를 함께 첨가한 군이 LDH 유출 및 지질과산화가 유의적으로 감소되었다.
2. 황금 추출액 0.1 g/kg을 7일간 급여후 다음 cisplatin 5 mg/kg을 복강투여한 후 24시간 뒤에 신장을 적출하여 신피질 절편에서 형성된 지질과산화를 측정한 결과 cisplatin 단독 처리군보다 황금 추출액을 전처리한 군이 지질과산화가 유의적으로 감소되었다.
3. 황금 추출액 0.1 g/kg을 7일간 전처리한 다음 cisplatin 5/kg을 복강투여한 후 24시간 및 48시간 뒤에 혈액을 채취하여 혈청 BUN과 creatinine 농도를 측정한 결과, 황금 추출액을 전처리한 군에서 cisplatin 단독처리한 군보다 신장의 BUN 및 creatinine 제거율이 유의적으로 높게 나타났다.
4. 토끼에 황금 추출액 0.1 g/kg을 7일간 전처리한 다음 cisplatin 5 mg/kg을 투여 후 24시간 및 48시간 뒤에 신장을 적출하여 조직학적 소견을 관찰한 결과 cisplatin 단독 투여 군에 비하여 황금 추출액을 전처리한 군이 근위급슬세뇨관의 미세용모세포가 탈락되지 않고 형태를 유지하고 있으며 내강도 협착되지 않아 대조군과 비슷한 양상을 관찰하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2006년도 기성회 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

## 참 고 문 헌

1. Anke H, Kolthoum I, Zahner H, Laatsch H. The anthraquinones of the *Aspergillus glaucus* group. I. Occurrence, isolation, identification and antimicrobial activity. Arch Microbiol 1980; 126.: 223-230.
2. Aung HH, Dey L, Mehendale S, Xie J, Wu JA, Yuan CS. *Scutellaria baicalensis* extract decreases cisplatin-induced pica in rats. Cancer Chemother Pharmacol 2003; 52.: 453-458.
3. Bae HS, Kim YS, Cho KH, Lee KS, Kim JJ, Lee HU, Kim DH. Hepatoprotective activity of *Yuldan-xiao-tang* (yuldahanso-tang) is related to the inhibition of beta-glucuronidase. Am J

- Chin Med 2003; 31: 111-117.
4. Burton GW, Taber MG. Vitamin-E : antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. Annu. Rev 1990; 10: 357-382.
  5. Chan FL, Choi HL, Chen ZY, Chan PS, Huang Y. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. Cancer Lett 2000; 160: 219-228.
  6. Christopher HK, Daniel FC, Gray W, Willaim AP. t-Butyl Hydroperoxide-induced Radical Production in Rat Liver Mitochondria. Free Radical Biology and Medicine 1992; 12: 381-387.
  7. Cuellar MJ, Giner RM, Recio MC, Manez S, Rios JL. Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders. Fitoterapia 2001; 72: 221-229.
  8. Gabrielska J, Oszmianski J, Zylka R, Komorowska M. Antioxidant activity of flavones from *Scutellaria baicalensis* in lecithin liposomes. Z Naturforsch [C] 1997; 52: 817-823.
  9. Gao D, Sakurai K, Chen J, Ogiso T. Protection by baicalein against ascorbic acid-induced lipid peroxidation of rat liver microsomes. 1995; 90; 103-104.
  10. Gao Z, Huan K, Xu H. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. Pharmacol Res 2001; 43: 173-178.
  11. Hae-Yon K. Beneficial Effect of *Scutellaria Baicalensis* Georgi. Extract (SBGE) on Cisplatin - Induced Acute Renal Failure in Rabbit. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society 2002; 3: 119.
  12. Hong T, Jin GB, Cho S, Cyong JC. Evaluation of the anti-inflammatory effect of baicalein on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Planta Med 2002; 68: 268-271.
  13. Ishimaru K, Nishikawa K, Omoto T, Asai I, Yoshihira K, Shimomura K. Two flavone 2'-glucosides from *Scutellaria baicalensis*. Phytochemistry 1995; 40: 279-281.
  14. Kahl R. Protective and adverse biological actions of phenolic antioxidants, Oxidative stress(oxidants and antioxidants). New York: Academic Press. 1991: 245-273.
  15. 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: 909-922.
  16. Kim YO, Leem K, Park J, Lee P, Ahn DK, Lee, BC, Park HK, Suk K, Kim SY, Kim H. Cytoprotective effect of *Scutellaria baicalensis* in CA1 hippocampal neurons of rats after global cerebral ischemia. J Ethnopharmacol 2001; 77: 183-188.
  17. Kruidering M, Van B, Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. J Pharmacol Exp Ther 1997; 280: 638-649.
  18. Lee HH, Yang LL, Wang CC, Hu SY, Chang SF, Lee YH. Differential effects of natural polyphenols on neuronal survival in primary cultured central neurons against glutamate- and glucose deprivation-induced neuronal death. Brain Res 2003; 986: 103-113.
  19. Li BQ, Fu T, Gong WH, Dunlop N, Kung H, Yan Y, Kang J, Wang JM. The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. Immunopharmacology 2000; 49: 295-306.
  20. Middleton JE, Drzewiecki G. Flavonoid inhibition of human stimulated by various agents. Biochem. Pharmacol 1984; 33: 3333-3338.
  21. Middleton E Jr, Ferriola P, Drzewiecki G. Effect of flavonoids on tumor promoter-induced basophil histamine release and protein kinase C. Trans Am Clin Climatol Assoc 1998; 100: 47-56. 1984; 33: 3333-3338.
  22. Motoo Y, Sawabu N. Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines. Cancer Lett. 1994; 86: 91-95.
  23. Nan JX, Park EJ, Kim YC, Ko G, Sohn DH. *Scutellaria baicalensis* inhibits liver fibrosis induced by bile duct ligation or carbon tetrachloride in rats. J Pharm Pharmacol 2002; 54: 555-563.
  24. Shirwaikar A, Malini S, Kumari SC. Protective effect of Pongamia pinnata flowers against cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in rats. Indian J Exp Biol 2003; 41: 58-62.
  25. Shimaru K, Nishikawa K, Omoto T, Asai I, Yoshihira K, Shimomura K. Two flavone 2'-glucosides from *Scutellaria baicalensis*. Phytochemistry 1995; 40: 279-281.
  26. Smol'ianinov ES, Gol'dberg VE, Matiash MG, Ryzhakov VM, Boldyshev DA, Litvinenko VI, Dygai AM. Effect of *Scutellaria baicalensis* extract on the immunologic status of patients with lung cancer receiving antineoplastic chemotherapy. Eksp Klin Farmakol 1997; 60: 49-51.
  27. Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K, Kadota S. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of Zanthoxylum bungeanum. J Ethnopharmacol 2001; 77: 209-217.
  28. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem 1978; 86: 271-278.
  29. Wagner H, Geyer B, Fiebig M, Kiso Y, Hikino H. Isobutrin and butrin, the antihepatotoxic principles of Butea monosperma flowers. Planta Med 1986; : 77-9.
  30. Ye F, Xui L, Yi J, Zhang W, Zhang DY. Anticancer activity of *Scutellaria baicalensis* and its potential mechanism. J Altern Complement Med 2002; 8: 567-572.
  31. Zhu M, Rajamani S, Kaylor J, Han S, Zhou F, Fink AL. The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. J Biol Chem. 2004 Jun 25; 279(26):26846-57. Epub 2004 Apr 19.
  32. 김성만, 도원역, 김갑성. 황금추출액의 흰쥐 간세포내의 항산화 효능에 관한 연구. 대한침구학회지 1999; 16: 497-509.
  33. 최민순, 이정호, 소준노, 김종면. Lentiana이 면역활성에 미치는 영향. 대한면역학회지 1990; 12: 235.