

시스플라틴의 세포고사에 대한 보정방암탕 에탄올 추출물의 효과

박성주^{#1}, 전병훈², 김성훈³, 안규석³, 송호준^{*1}

1; 원광대학교 한의과대학 본초학교실, 2; 원광대학교 한의과대학 병리학교실
3; 경희대학교 한의과대학 한방병리학교실

Ethanol extract of Bojungbangam-tang (EBJT) prevents Cisplatin-induced Apoptosis in mice.

Sung-Joo Park^{#1}, Byung-Hun Jeon²,
Sung-Hoon Kim³, Kyoo-Seok Ahn³ and Ho-Joon Song^{*1}

1; Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
2; Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
3; Dept. of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study is to investigate cisplatin-induced apoptosis by ethanol extract of bojungbangam-tang (EBJT).

Methods : To evaluate of anti-apoptic effects of EBJT, we examined several kinds of cell populations such as CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and macrophages in spleen.

Results : 1. EBJT inhibited cisplatin-induced cell death in spleen.

2. EBJT inhibited the death of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in spleen by cisplatin. However, EBJT did not effect the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

3. EBJT slightly recovered the number of macrophages by cisplatin. Furthermore, cisplatin-induced upregulation of class II were inhibited by EBJT.

Conclusion : EBJT prevented cisplatin-induced cell death, which could provide a clinical basis for side effects of anti-tumor therapeutics.

Key words : *Acanthopanax sessiliflorus*, immuno-stimulating, anti-Cancer

#제1저자 : 박성주, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel: 063-850-6450 · E-mail: parksj08@wonkwang.ac.kr

*교신저자 : 송호준, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel: 063-850-6844 · E-mail: songhj@wonkwang.ac.kr

· 접수 : 2007년 01월 09일 · 수정 : 2007년 02월 06일 · 채택 : 2007년 03월 20일

서론

보정방암탕은 보익제로 활용되는 증치준승의 삼출탕에 동충하초와 백하수오를 주재료로 하고 당귀와 산약을 가미한 처방으로 모두 식품공전에 등재된 9종의 한약으로 구성되어 있다. 이미 보정방암탕 수층에서는 NK세포와 대식세포를 활성화시켜 면역기능을 증진시킴으로써 항전이 활성을 나타낸다는 보고를 하였다¹⁾.

시스플라틴은 다양한 악성 종양 (두면부, 목, 난소, 정자등)에 널리 사용되는 효과적인 항암제이다. 하지만, 시스플라틴의 가장 많은 부작용은 신장독성이다²⁾. 대략 25%에서 30%의 환자가 시스플라틴을 투여 받은 후에 신장독성이 나타나고 있다³⁾. 시스플라틴에 대한 신장 독성은 활성산소⁴⁾, 캐스페이스의 활성화⁵⁾, DNA의 손상^{6,7)} 및 미토콘드리아의 손상⁸⁾에 의해 나타난다는 보고가 있다. 따라서 시스플라틴에 의한 신장독성은 세포고사, 세포괴사 및 염증이 중요한 기전으로 인식되고 있다^{9,10)}.

최근의 연구에 의하면 시스플라틴이 신장에서 Tumor necrosis factor-a (TNF-a)의 발현을 증가시키고, 증가된 TNF-a가 신장의 손상과 상호 연관성이 있는 것으로 알려지고 있다^{11,12)}. TNF-a의 분비와 활성을 억제하는 길항제 및 TNF-a 수용체2가 결핍된 마우스는 시스플라틴에 의한 신장독성을 현저히 저하시켰다^{13,14)}. 더욱이, T 세포가 신장, 간, 폐 및 장에서 ischemia reperfusion injury (IRI)에 중요한 인자라고 보고되고 있다^{15, 18)}.

본 연구에서 보정방암탕 에탄올 추출물을 투여한 후에 T 세포수의 변화와 활성화도 및 대식세포의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 보정방암탕의 구성 및 에탄올 추출

보정방암탕의 구성은 Table 1과 같이 9종으로 구성하였다. 이 구성분 3첩 분량 (135 g)을 에탄올 3 L에 3일간 추출하여 감압농축 후 분말 7.04 g을 얻어 수득율 5.22%을 나타냈으며, 이를 DMSO에 녹여 사용하였다.

Table 1. The botanical origins and ratio of crude drugs of bojung-bangam-tang

Crude drug	Botanical origin	weight (g)
Cordyceps	<i>Cordyceps sinensis</i> SACC	30
Rhizoma Atractylodes	<i>Atractylodes macrocephala</i>	18
Macrocephalae	KORIZ	
Radix Astragali	<i>Astragalus membranaceus</i> (FISHL) BUNGE	18
Radix Ginseng	<i>Panax ginseng</i> C.A. MEYER	12
Rhizoma Dioscoreae	<i>Dioscorea opposita</i> THUNB	12
Radix Angelicae	<i>Angelica sinensis</i> (OLIV.) DIELS	12
Sinens		
Polyporus	<i>Polyporus umbellatus</i> (PERS.) FR	12
Radix Cynanchi	<i>Cynanchum wilfordii</i> (MAXIM)	12
Wilfordii		
Radix Glycyrrhizae	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISHL	9

2) 시약

anti-mouse CD4, CD8, CD25, CD44, CD69, CD62L, Mac-1, MHC II은 BD Pharmingen (San Diego, CA)에서 구입하였다. 그 외의 시약들은 SIGMA (St. Louis, USA)에서 구입하였다.

3) 실험 동물

C57BL/6 6주령 암컷을 오리엔트에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) EBJT의 투여 및 in vivo 실험모델

EBJT를 구강으로 500 mg/kg을 3일간 투여한 후에 시스플라틴을 복강으로 10 mg/kg을 투여한 후 3일 후에 비장을 추출하여 실험하였다.

2) 유식세포 분석

비장세포를 단일화세포로 만든 후에 항체를 이용하여 염색하였다. 간단히 실험방법을 보면, 먼저 비장세포를 4°C에서 20분간 염색한 후 세척하였다. 세포의 분석은 FACsflow을 이용하였으며 CellQuestpro 프로그램을 이용하여 분석하였다.

3) 통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 나타냈으며, Student's t test를 이용하여 유의성을 평가하였고, p-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 보정방암탕이 시스플라틴 유도성 비장세포의 고사에 미치는 영향

보정방암탕을 구강으로 3일간 총 3회 투여한 후에 시스플라틴 (10 mg/kg)을 복강으로 투여하고 3일 후에 비장을 채취하여 전체 비장세포의 수를 조사하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이 시스플라틴이 비장 세포를 현저하게 감소시키는 것을 알 수 있었다. 보정방암탕은 시스플라틴에 의한 비장세포수의 감소를 억제하였다.

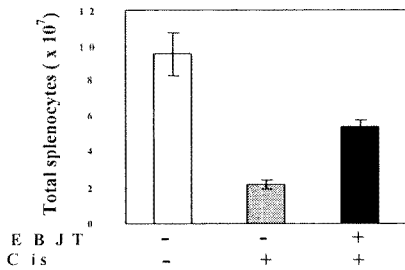


Figure 1. EBJT inhibited Cisplatin-induced spleen cell death. EBJT were orally given to mice (n=6 per group) at 500 mg/kg for 3 d. The spleen were taken from the mice at 3 d after challenge with cisplatin (10 mg/kg). The number of total spleen cells was measured. Data represent the mean ± SEM of two separate experiments performed in duplicate

2. 보정방암탕이 시스플라틴 유도성 CD4+, CD8+ T 세포의 고사 및 활성화에 미치는 영향

Figure 1에 보는 바와 같이 보정방암탕이 시스플라틴에 의한 비장 세포 수를 감소해서, 다음은 T 세포의 비율과 활성을 조사하였다. 최근의 논문(1)에 의하면 T 세포가 신장 독성에 중요한 의미를 갖기 때문이다. Figure 2A에서 보는 바와 같이 시스플라틴이 CD4+와 CD8+ T 세포의 비율을 증가시켰다. 하지만 보정방암탕이 시스플라틴에 의한 CD4+, CD8+ T 세포의 비율에는 영향을 미치지 못했다. 다음은 CD4+, CD8+ T 세포의 수를 조사한 결과 보정방암탕이

CD4+, CD8+ T 세포의 수를 정상적으로 회복시켰다 (Figure 2B, 2C). 하지만 시스플라틴은 CD4+, CD8+ T 세포의 수를 현저하게 감소시켰다 (Figure 2B, 2C).

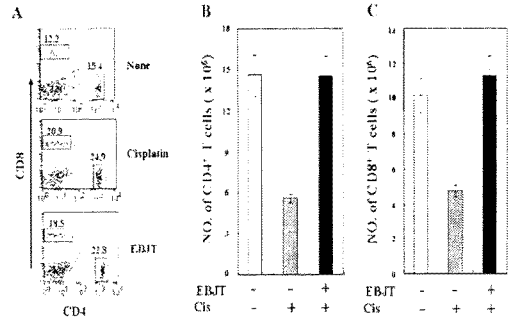


Figure 2. EBJT inhibited Cisplatin-induced T cells death. EBJT were orally given to mice (n=6 per group) at 500 mg/kg for 3 d. The spleen were taken from the mice at 3 d after challenge with cisplatin (10 mg/kg). The cells from spleen were analysed by Flow cytometer. (A) T cells from spleen were stained with anti-CD4 and -CD8 Ab and then analyzed using CellQuestPro. The numbers of total CD4+ (B) and CD8+ (C) T cells were measured. Data represent the mean ± SEM of two separate experiments performed in duplicate

다음은 CD4+ T 세포의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 시스플라틴은 CD44+CD62L+ 세포 즉 활성화된 T 세포의 비율에 영향을 미치지 못하였다. 또한 CD25+, CD69+ T 세포 즉 활성화된 T 세포의 비율에도 영향을 미치지 못했다 (Figure 3).

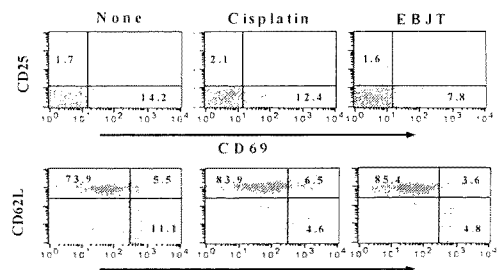


Figure 3. EBJT did not effect activation of CD4+ T cells by cisplatin. EBJT were orally given to mice (n=6 per group) at 500 mg/kg for 3 d. The spleen were taken from the mice at 3 d after challenge with cisplatin (10 mg/kg). The cells from spleen were analysed by Flow cytometer. Data represent the mean ± SEM of two separate experiments performed in duplicate.

다음은 CD8+ T 세포의 활성도를 조사하였다. 보정방암탕은 CD8+ T 세포의 활성화 정도에도 특별한 영향을 미치지 못했다 (Figure 4).

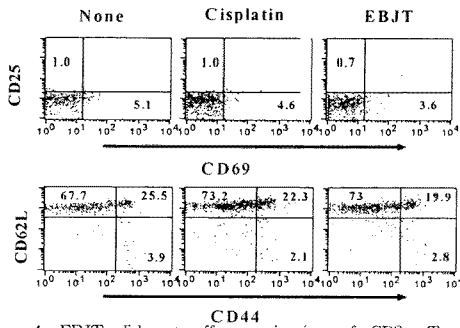


Figure 4. EBJT did not effect activation of CD8+ T cells by cisplatin. EBJT were orally given to mice (n=6 per group) at 500 mg/kg for 3 d. The spleen were taken from the mice at 3 d after challenge with cisplatin (10 mg/kg). The cells from spleen were analysed by Flow cytometer. Data represent the mean ± SEM of two separate experiments performed in duplicate.

3. 보정방암탕이 시스플라틴 유도성 Mac-1+ 세포의 고사 및 MHC class II 발현에 미치는 영향

다음은 염증성 질환에 중요한 세포인 대식세포의 수를 조사하였다. Figure 5에서 나타난 바와 같이 시스플라틴이 비장에서 대식세포의 수를 현저하게 감소시켰다. 하지만 보정방암탕이 시스플라틴에 의한 대식세포 수의 감소를 억제하였다 (Figure 5A). 다음은 대식세포에 발현하는 MHC class II의 발현을 조사하였다 (Figure 5B). MHC는 이물질을 인식하는데 중요한 역할을 한다. 즉 특정 이물질을 대식세포가 인식하면 항원제시기능을 통하여 MHC-peptide 복합체를 형성하여 T 세포를 활성화시킨다. 시스플라틴은 MHC class II의 발현을 증가시켰다. 하지만, 보정방암탕이 시스플라틴에 의한 Class II의 발현을 감소시켰다 (Figure 5B).

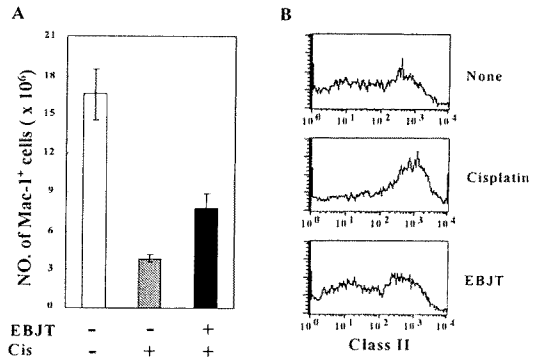


Figure 5. EBJT did not effect activation of Mac-1+ cells by cisplatin. EBJT were orally given to mice (n=6 per group) at 500 mg/kg for 3 d. The spleen were taken from the mice at 3 d after challenge with cisplatin (10 mg/kg). The Mac-1+ cells from spleen were analysed by Flow cytometer. Data represent the mean ± SEM of two separate experiments performed in duplicate.

고찰

본 논문은 보정방암탕이 시스플라틴 유도성 세포의 고사에 미친 영향을 조사하였다. 보정방암탕이 시스플라틴에 의한 비장 세포의 수의 감소를 억제시켰으며 (Figure 1), 또한 CD4+, CD8+ T 세포의 감소를 회복시켰다 (Figure 2). 이와 같이 보정방암탕은 특히 T 세포의 고사를 억제하는데 탁월한 효과를 보였다. 하지만 T 세포의 고사에는 다양한 인자가 작용한다. 즉, 시스플라틴에 의해 직접적으로 DNA에 손상을 주거나 또는 세포고사에 영향을 주는 caspase의 활성을 유도해서 세포를 고사시키거나, 또는 세포고사에 영향을 주는 인자를 유도하거나 하는 다양한 경로에 영향을 미친다(4-8). 보정방암탕이 위의 경로중 하나를 억제해서 비장 세포의 고사 및 CD4+, CD8+ T 세포의 수의 감소를 억제했을 가능성이 있다. 또한 T 세포의 활성을 나타내는 표면 표지자를 조사한 결과 즉 CD25, CD69, CD62L, CD44 등을 조사한 결과 보정방암탕이 T 세포의 활성화에는 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다.

최근의 보고에 의하면 시스플라틴에 의한 신장 독성은 세포고사 또는 세포괴사 및 활성산소에 의한다고 알려졌다(4, 9). 또한 시스플라틴에 의한 신장 독성을 염증성 측면에서 접근 하는데 즉 adhesion molecule, TNF-a 및 다른 염증성 물질들이 관여 할 것으로 보고하고 있다(11, 12, 19). 또한 최근에는 CD4+ T 세포이 시스플라틴에 의한 신장독성을 매개

하는데 중요한 역할을 한다고 보고하고 있다²⁰). 즉 누드마우스는 시스플라틴에 의한 신장 독성이 감소하게 나타난다. 하지만 이 마우스에 CD4⁺ T 세포를 주입하게 되면 신장 독성이 나타나는 것이 보고되었다. 따라서 보정방암탕이 시스플라틴에 의한 신장 독성의 완화에 미치는 것은 중요한 의미가 있다. 보정방암탕을 이용하여 T 세포 유래성 세포 활성물질을 조사하는 것은 중요한 의미가 있다.

보정방암탕은 NK세포와 대식세포를 활성화시킨다는 보고를 하였다¹). 본 논문에서는 대식세포의 수와 MHC class II의 발현을 조사한 결과 보정방암탕이 시스플라틴에 의한 대식세포 수의 감소를 억제하였다. 시스플라틴은 대식세포에서 MHC Class II의 발현을 증가시켰다. MHC 조절은 다양한 원인에 의해 다생하는데 첫째는 시스플라틴이 다양한 세포활성 물질을 생산해서 대식세포를 활성화시켰을 가능성이 있다. 특히 TNF- α 는 MHC의 조절에 중요한 역할을 한다. 또한 세포괴사 찌꺼기들이 직접적으로 MHC Class II의 발현을 증가시켰을 가능성이 있다. 최근의 보고에 의하면 TNF- α 는 시스플라틴 유도성 신장 독성에 중요한 역할을 한다고 알려져서 보정방암탕이 TNF- α 의 생성을 억제해서 대식세포에서 MHC class II의 발현을 억제했을 가능성이 있다.

이상의 실험 결과를 종합해 보면, 보정방암탕이 시스플라틴 유도성 비장세포 및 CD4⁺, CD8⁺T 세포의 고사를 억제했다. 따라서 T 세포의 고사 억제 기전 및 신장 독성에 미치는 영향을 조사 할 필요가 있다.

결 론

마우스에 보정방암탕을 투여하고 시스플라틴에 의한 효과를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 보정방암탕이 시스플라틴에 의한 비장 세포의 수의 감소를 억제 하였다.
2. 보정방암탕이 시스플라틴에 의한 CD4⁺, CD8⁺ T 세포의 감소를 회복시켰으나, T 세포의 활성화 정도에는 영향을 미치지 않았다.
3. 보정방암탕이 시스플라틴에 의한 대식세포의 수의 감소를 회복하였다. 또한 시스플라틴에 의한 MHC class II의 발현의 증가를 감소시켰다.

이상의 결과는 보정방암탕이 시스플라틴에 의한

세포의 고사를 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

감사의 글

이 논문은 보건복지부 한방치료기술연구개발사업 바이오퓨전 (B050007)의 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Lee, S. J., Saiki, I., Hayakawa, Y., Nunome, S., Yamada, H., Kim, S. H. Antimetastatic and immunomodulating properties of new herbal prescription, Bojung-bangam-tang. *Int. Immunopharmacol.* 2003;3:14-157
2. Schrier RW: Cancer therapy and renal injury. *J Clin Invest* 2002;110:743 - 745
3. Ries F, Klustersky J. Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *Am J Kidney Dis* 1986;8:368 - 379
4. 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 - 526
5. Kaushal GP, Kaushal V, Hong X, Shah SV: Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 2001;60:1726 - 1736
6. Leibbrandt ME, Wolfgang GH, Metz AL, Ozobia AA, Haskins JR. Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat renal proximal tubule cells. *Kidney Int* 1995;48:761 - 770
7. Megyesi J, Safirstein RL, Price PM. Induction of p21WAF1/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure. *J Clin Invest* 1998;101:777 - 782
8. Sugiyama S, Hayakawa M, Kato T, Hanaki Y, Shimizu K, Ozawa T. Adverse effects of anti-tumor drug, cisplatin, on rat kidney mitochondria: Disturbances in glutathione peroxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:1121 - 1127
9. 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:F700 - F708

10. Okuda M, Masaki K, Fukatsu S, Hashimoto Y, Inui K. Role of apoptosis in cisplatin-induced toxicity in the renal epithelial cell line LLC-PK1. Implication of the functions of apical membranes. *Biochem Pharmacol* 2000;59:195 - 201
11. Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 2002;110:835 - 842
12. Ramesh G, Reeves WB. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F610 - F618
13. Ramesh G, Reeves WB. Salicylate reduces cisplatin nephrotoxicity by inhibition of tumor necrosis factor-alpha. *Kidney Int* 2004;65:490 - 499
14. 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
15. Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, Maujiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, Rabb H. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 2001;108:1283 - 1290
16. de Perrot M, Young K, Imai Y, Liu M, Waddell TK, Fischer S, Zhang L, Keshavjee S. Recipient T cells mediate reperfusion injury after lung transplantation in the rat. *J Immunol* 2003;171:4995 - 5002
17. Shigematsu T, Wolf RE, Granger DN. T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation* 2002;9:99 - 109
18. Laight DW, Lad N, Woodward B, Waterfall JF. Assessment of myeloperoxidase activity in renal tissue after ischaemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol* 1994;292:81 - 88
19. Kelly KJ, Meehan SM, Colvin RB, Williams WW, Bonventre JV. Protection from toxicant-mediated renal injury in the rat with anti-CD54 antibody. *Kidney Int* 1999;56:922 - 931
20. Manchang Liu, Chu-Chun Chien, Melissa Burne-Taney, Roshni R. Molls, Lorraine C. Racusen, Robert B. Colvin and Hamid Rabb. A Pathophysiologic Role for T Lymphocytes in Murine Acute Cisplatin Nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:765-774.