

葛根과 熟地黄 추출물의 cisplatin에 의한 rat mesangial cell의 apoptosis에 대한 보호효과

주성민 · 박진모 · 전병제 · 양현모 · 홍재의¹ · 김인규 · 김원신² · 전병훈*

원광대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 폐계내과학교실, 2: 자연과학대학 생명과학부

Preventive Effect of *Puerariae Radix* and *Rehmanniae Radix Preparata* on Cisplatin-induced Rat Mesangial Cell Apoptosis

Sung Min Ju, Jin Mo Park, Byung Jae Jeon, Hyun Mo Yang, Jae Eui Hong¹, In Gyu Kim, Won Sin Kim², Byung Hun Jeon*

Department of Pathology, 1: Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, 2: Division of Natural Science, College of Natural Sciences, Wonkwang University

One of the major side effects of cisplatin is nephrotoxicity, leading to acute renal failure. Recent study has suggested a role of hydroxyl radicals and p53 in renal cell injury by cisplatin. This study determined the possible involvement of oxidative stress in p53 activation. In rat mesangial cells, cisplatin treatment induced apoptosis and p53 activation. Pifithrin- α , a pharmacological inhibitor of p53, suppressed cisplatin-induced apoptosis. Cisplatin also induced reactive oxidative species (ROS) generation. Of interest, cisplatin-induced apoptosis was prevented by N-acetyl-cysteine (NAC), a general antioxidant. NAC diminished p53 activation during cisplatin treatment. *Puerariae Radix* and *Rehmanniae Radix Preparata* with antioxidative activity were reduced the cisplatin-induced ROS generation, caspase-3 activity and p53 activation. In conclusion, ROS may contribute to p53 activation to initiate cisplatin-induced apoptosis in rat mesangial cells. In result, antioxidative effect of *Puerariae Radix* and *Rehmanniae Radix Preparata* prevented cisplatin-induced apoptosis through inhibition of p53 activation.

Key words : *Puerariae Radix*, *Rehmanniae Radix Preparata*, cisplatin, nephrotoxicity, rat mesangial cell, apoptosis, ROS, p53

서 론

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum[II])는 대부분의 세포에서 성장정지와 apoptosis를 강력하게 유도하는 물질로서 암 치료를 위한 화학요법 치료제로 광범위하게 효과적으로 사용되고 있다¹⁾. 그러나 cisplatin은 신부전증을 유발하는 신장독성 때문에 사용이 제한되어 있다^{2,3)}. Cisplatin은 다양한 신호전달 경로를 활성화시켜 신세뇨관 세포의 necrosis와 apoptosis를 유도한다⁴⁻¹⁰⁾.

최근 연구에서 cisplatin에 의한 신세뇨관 세포의 apoptosis에서 p53의 역할에 대해 제시되었는데, p53은 cisplatin을 처리하

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

· E-mail : omdjbh@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6843

· 접수 : 2008/09/01 · 수정 : 2008/10/04 · 채택 : 2008/10/13

는 동안 활성화된다고 보고되었다^{11,12)}. 특히 cisplatin에 의해 유도된 신세뇨관 세포의 apoptosis는 p53의 약리학적 억제제인 pifithrin- α 에 의해 감소하였다^{11,12)}.

활성산소종 (ROS)에 의한 산화적 스트레스는 다양한 병리학적 상태에서 신장손상과 관련되어 있다^{13,14)}. ROS는 p53 조절에 관여할 수 있다. ROS는 DNA손상을 유도하여 p53활성을 강하게 촉발시킨다¹⁵⁾. 특히 ROS는 p53 인산화와 활성화에 관련된 다양한 protein kinase들의 신호전달체계를 활성화 시킨다¹⁵⁾. Cisplatin의 신장독성과 관련하여 신세뇨관 세포는 산화적 스트레스를 유발하는 ROS를 생성시킨다^{13,16)}. 다양한 ROS scavenger에 의한 산화적 스트레스 감소는 cisplatin 상해에 대하여 보호효과를 가진다^{5,17-20)}.

최근 논문에서 cisplatin으로 손상된 HEI-OC1 청각세포에서 갈근과 숙지황의 free radical 소거에 의한 보호효과가 보고되었

다^{21,22}). 갈근과 숙지황은 in vitro cell free system에서 hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide radical에 대한 소거능이 검증되었고, cisplatin에 의해 감소된 HEI-OC1청각세포의 생존율을 증가시켰다^{21,22}).

본 연구에서는 cisplatin에 의한 rat mesangial cell의 apoptosis에서 ROS 생성과 p53 활성화에 대한 관련여부를 조사하고, 항산화효과를 가진 갈근과 숙지황 에탄올추출물을 사용하여 cisplatin에 의한 rat mesangial cell의 손상에 대하여 보호효과를 검증하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 항체

Cisplatin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT), 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), pifithrin- α , N-Acetyl-cysteine (NAC), protease inhibitor cocktail은 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-pNA (Ac-DEVD-pNA)과 Z-VAD-FMK는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)으로부터 구입하였다. Anti-PARP, anti-p53, anti-phospho-p53 항체들은 Cell Signaling Technology INC. (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다. 갈근과 숙지황 에탄올 추출물은 한국생명공학연구원 내 한국식물추출물은행에서 분양받았다.

2. 세포배양

Immortalization된 rat mesangial cells는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 분양받았고, 15% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada)를 사용하여 37°C와 5% CO₂ 상태에서 배양하였다. 세포는 안정된 성장과 형태적 특성을 검증하기 위해 G418이 포함된 배지에 최소 5 회 이상 계대배양 하였고, 그 후의 세포는 15% FBS와 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin 포함된 DMEM배지에서 배양하였다. 세포는 0.25% trypsin-0.03% EDTA용액을 사용하여 계대 배양하였으며, 세포는 cisplatin을 처리하기 24시간 전에 배양접시에 seeding하였다.

3. 세포생존률측정

세포생존률은 MTT 방법을 사용하여 측정하였다. MTT 검사는 미토콘드리아의 숙신산 탈수소효소에 의해 MTT가 formazan으로 환원되는 원리를 기초로 하고 있다. 세포는 5×10⁴ cells/well로 12 웰 플레이트에 24시간 배양하였다. 세포는 시료와 함께 24시간 배양 후, 배지를 제거하고 500 μ l의 MTT (0.5 mg/ml in PBS) 용액을 각 well에 첨가하여 37°C에서 3 시간 배양하였다. 그 후 상층액을 제거하고 500 μ l의 DMSO를 각 well에 첨가하여 비수용성의 보라색 formazan을 용해시켰다. Formazan의 양은 SpectraMAX 250 microplate spectrophotometer (Molecular

Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 세포생존률의 확률은 다음 방정식으로 계산하였다.

$$\text{viability}(\%) = \frac{\text{mean OD of treated cells}}{\text{mean OD of control cells}} \times 100$$

4. Caspase-3 활성검사

세포는 lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA)를 사용하여 freezing/thawing 방법으로 용해하였고, 세포용해액은 4°C에서 10,000rpm으로 1분 원심분리하여 얻었다. Caspase 활성검사는 제조사가 제시한 protocol에 따라서 수행하였다. 간략하게 설명하면, 10 μ l cell lysates (30 μ g total protein)+88 μ l reaction buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol)와 2 μ l fluorogenic Ac-DEVD-pNA substrate (200 μ M final concentration)를 혼합하였다. 샘플은 37°C에서 3시간 배양 후 enzyme-catalyzed되어 방출된 p-nitroanilide를 SpectraMAX 250 microplate spectrophotometer로 405 nm에서 측정하였다.

5. 활성산소종 측정

ROS는 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence assay에 의해 측정하였다. 세포는 PBS에 두 번 세척하였고, 20 μ M DCFH-DA/PBS 용액에서 37°C에서 30분 배양하였으며, 형광광도는 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 524 nm에서 측정하였다.

6. Western blot 분석

시료처리 후 배양이 끝난 세포는 ice-cold PBS로 세척하였고 1% protease inhibitor cocktail이 포함된 ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium vanadate)로 얼음 위에서 30분 동안 용해하였다. 세포용해액은 저온원심분리기로 14,000 × g 상태에서 15분 원심분리 하였고, 단백질 농도는 Bradford assay를 이용하여 측정하였다. 총 30 μ g의 단백질 샘플을 10% 또는 12% SDS-PAGE 젤로 분리하였고, 분리된 SDS-PAGE 젤 상의 단백질을 trans blot kit를 사용하여 40 V에서 3시간 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane은 5% milk가 포함된 Tris-buffered saline+Tween-20 (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 차단한 후 1차 항체를 결합시켰다. 반응활성도는 퍼옥시타제가 붙어있는 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체를 사용하여 SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Pierce, Rockford, IL, USA)에 의해 탐지하였다.

7. 통계처리

모든 데이터의 결과는 mean ± standard deviation (SD)로 기록하였다.

결 과

1. Cisplatin의 세포독성 효과

Rat mesangial cells의 cisplatin에 대한 세포독성의 효과를 조사하기 위해 cisplatin을 일정한 간격으로 농도를 증가시켜 20~100 μ M로 24 시간 처리하였다. 세포생존율은 MTT검사에 의하여 측정되었다. Cisplatin은 농도 의존적으로 rat mesangial cell의 생존율을 감소시켰다(Fig. 1). 24시간 처리 후, Cisplatin의 IC50값은 약 30 μ M이었다.

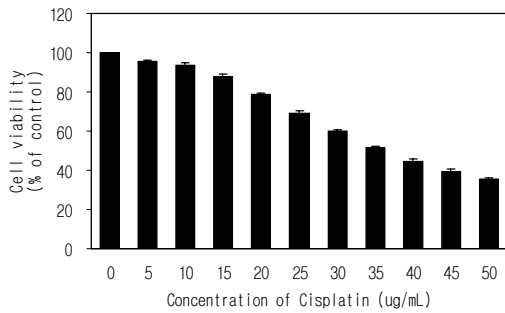


Fig. 1. Effect cisplatin on cytotoxicity in rat mesangial cells. The cells were treated with various concentrations of cisplatin for 24 hr and the cells were tested for viability by MTT assay. Value are means \pm SD, N = 3.

2. Cisplatin의 apoptosis 유도효과

Caspase 계열 단백질은 apoptosis에 있어서 중요한 역할을 수행하고 있는데, 그 중에서 caspase-3는 apoptosis의 최종 실행 단백질로서 가장 중요하다. Caspase-3의 활성화는 30 μ M cisplatin을 1.5, 3, 6, 12, 24 시간 처리하여 조사하였다. Caspase-3의 활성화는 cisplatin에 의해 시간 의존적으로 크게 증가하였다(Fig. 2A). Caspase-3의 활성화는 cisplatin은 12 시간에서 316.20% 증가하였으며, 24 시간에서 1080.09%로 크게 증가하였다. Caspase-3의 활성을 재검증하기 위하여 PARP 절단현상을 western blot 통하여 확인하였다. Caspase-3의 기질과 같은 PARP 절단현상은 cisplatin에 의한 caspase-3의 활성화에 의해 시간 의존적으로 증가하였다(Fig. 2B).

3. Cisplatin의 p53 활성을 통한 apoptosis 유도효과

Cisplatin에 의한 rat mesangial cell의 apoptosis에서 p53의 역할을 조사하기 위해 p53의 발현과 활성을 western blot으로 분석하였다. p53 발현은 cisplatin처리 12시간까지 변화가 없었고 24시간에 약간 감소하였다. 그러나 p53 인산화는 cisplatin처리 1.5시간 후 관찰되었고 12시간까지 시간 의존적으로 증가하여 24시간에 크게 감소하였다(Fig. 3).

Cisplatin에 의한 p53 활성증가가 apoptosis에 미치는 영향을 조사하기 위해 p53 억제제인 pifithrin- α 를 사용하여 p53 활성 억제에 따른 caspase-3 활성화와 PARP 절단현상을 관찰하였다. Cisplatin에 의해 증가된 caspase-3 활성화 (987.50%)은 pifithrin- α (PFT)에 의해 597.02%감소하였고(Fig. 4A), 그에 따른 PARP 절단현상도 감소하였다(Fig. 4B). Caspase 억제제인 Z-VAD-FMK

(VAD)는 caspase-3 활성화 (95.83%)과 PARP 절단현상을 완벽하게 억제하였다.

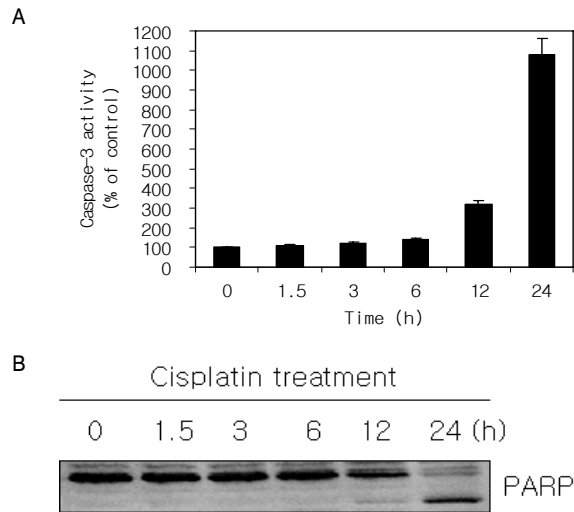


Fig. 2. Effect of cisplatin on caspase-3 activity and PARP cleavage in rat mesangial cells. The cells were treated with 30 μ M cisplatin for various times. (A) Caspase-3 activity was measured with AC-DEVD-pNA. The activation was measured as the increase in activity (%) with respect to control cells (100%). Value are means \pm SD, N = 3. (B) Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis with, anti-PARP antibody.

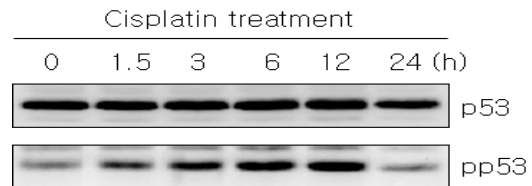


Fig. 3. Effect of cisplatin on p53 expression and activation in rat mesangial cells. Expression and activation of p53 protein determined by Western blot analysis with an anti-p53 and anti-phospho-p53 antibodies.

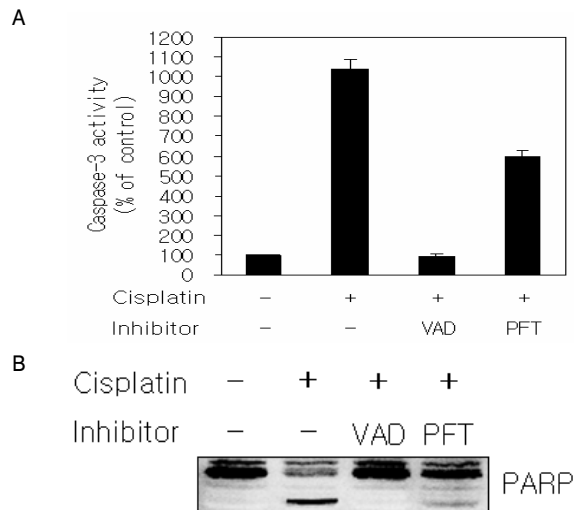


Fig. 4. Effect of p53 inhibitor on cisplatin-induced apoptosis in rat mesangial cells. The cells were preincubated with 100 μ M z-VAD-FMK (VAD) and 20 μ M pifithrin- α (PFT) for 3 hr, and then treated with cisplatin for 24 h. (A) The caspase-3 activity was measured as the increase in activity (%) with respect to control cells (100%). Value are means \pm SD, N = 3. (B) PARP cleavage were determined by Western blot analysis using anti-PARP antibody.

4. Cisplatin의 ROS 생성을 통한 apoptosis 유도효과

Cisplatin에 의해 유도된 apoptosis는 다양한 세포유형에서 ROS 생성과 관련되어 있다. Cisplatin에 의한 rat mesangial cell의 세포내 ROS 생성을 DCF를 사용하여 측정하였다. ROS 생성은 cisplatin 1.5시간 처리 후 1.32배 증가하였고, 12시간 까지 일정하게 유지되었다(Fig. 5).

Cisplatin에 의한 세포내 ROS 생성이 apoptosis에 미치는 영향을 조사하기 위해 항산화제의 효과를 관찰하였다. 항산화제인 N-Acetyl-cysteine (NAC)는 cisplatin에 의해 증가된 caspase-3 활성 (1016.67%)을 436.90%로 감소시켰고(Fig. 6A), PARP 절단 현상도 감소하였다(Fig. 6B).

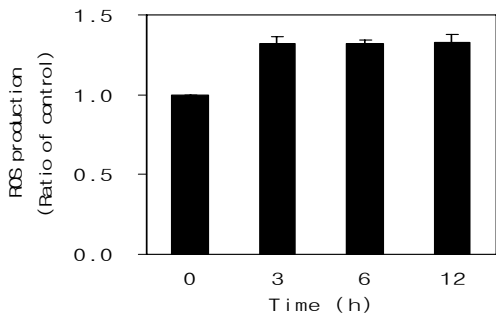


Fig. 5. Effect of cisplatin on ROS production in rat mesangial cells. ROS were determined by DCFH-DA fluorescence assay. Value are means \pm SD, N = 3.

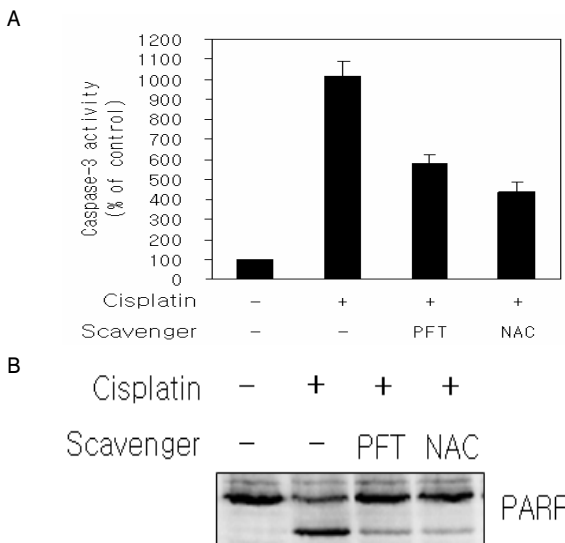


Fig. 6. Effect of antioxidant on cisplatin-induced apoptosis in rat mesangial cells. The cells were preincubated with 20 μ M pifithrin- α (PFT) and 5 mM N-Acetyl-cysteine (NAC) for 3 hr, and then treated with cisplatin for 24 h. (A) The caspase-3 activity was measured as the increase in activity (%) with respect to control cells (100%). Value are means \pm SD, N = 3. (B) PARP cleavage were determined by Western blot analysis using anti-PARP antibody.

5. Cisplatin의 p53 활성화에 대한 항산화제의 억제효과

Cisplatin에 의한 p53 활성화에 대한 ROS의 역할을 조사하기 위해 항산화제가 p53 발현과 활성화에 미치는 효과를 관찰하였다. NAC와 cisplatin을 12시간 배양 후 p53 발현에는 변화가 없었으나, p53 활성은 NAC에 의해 뚜렷하게 감소하였다(Fig. 7).

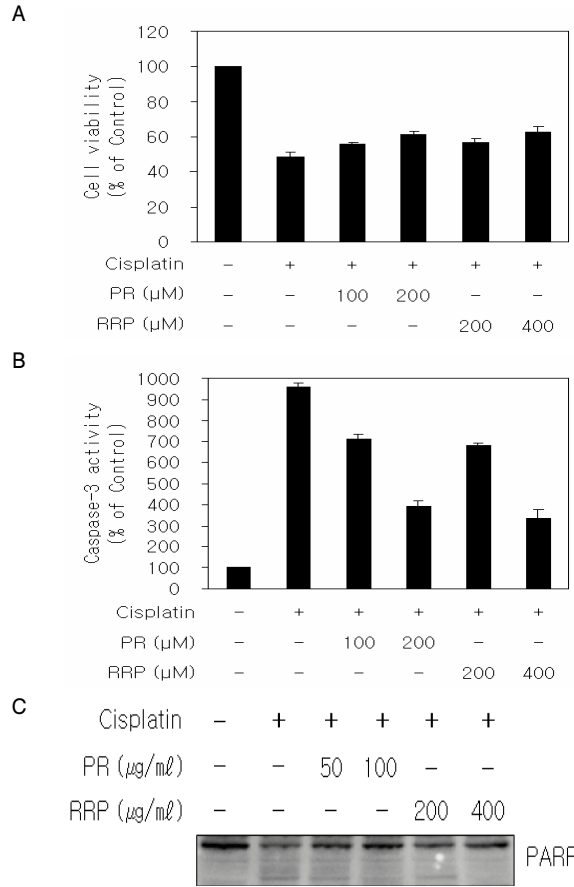


Fig. 7. Effect of PR and RRP on cisplatin-induced apoptosis in rat mesangial cells. The cells were preincubated with PR or RRP for 3 h, and then treated with or without 30 μ M cisplatin for 24 h. (A) cell viability was determined by MTT assay. Value are means \pm SD, N = 3. (B) Caspase-3 activity was measured with AC-DEVD-pNA. The activation was measured as the increase in activity (%) with respect to control cells (100%). Value are means \pm SD, N = 3. (C) Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis with, anti-PARP antibody.

6. Cisplatin의 apoptosis에 대한 갈근과 숙지황 에탄올추출물의 보호효과

Cisplatin에 의해 유도된 rat mesangial cell의 세포독성에 대한 갈근과 숙지황 에탄올추출물의 보호효과를 조사하기 위해 세포생존율측정, caspase-3 활성, PARP 절단현상을 관찰하였다. 세포는 갈근과 숙지황 추출물을 일정한 농도로 갈근과 숙지황 에탄올추출물을 증가시켜 12시간 전 처리한 후, cisplatin과 함께 24시간 배양하였다. 갈근과 숙지황 에탄올 추출물은 cisplatin에 의해 감소된 세포생존율 (48.79%)을 갈근 에탄올 추출물 (PR)은 100과 200 μ g/ml농도에서 각각 55.56%와 61.11%로 증가시켰고, 숙지황 에탄올 추출물은 (RRP) 200과 400 μ g/ml농도에서 각각 56.85%와 62.86%로 증가시켰다(Fig. 8A). Cisplatin에 의한 Caspase-3활성 (957.20%)을 PR은 100과 200 μ g/ml농도에서 각각 712.53%와 391.32%로 감소시켰고, RRP는 200과 400 μ g/ml농도에서 각각 682.23%와 335.90%로 감소시켰다(Fig. 8B). PARP 절단현상도 갈근과 숙지황 에탄올추출물에 의해 감소되었다(Fig. 8C). 다음으로 갈근과 숙지황 에탄올추출물이 cisplatin에 의한 ROS 생성과 p53 활성화에 미치는 효과를 조사하였다. PR은

cisplatin의 ROS 생성 (1.35배)을 PR은 100과 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 1.27배와 1.14배로 감소시켰고, RRP는 200과 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 1.26배와 1.13배로 감소시켰다(Fig. 8A). PR과 RRP는 Cisplatin에 의한 p53활성을 억제하였다(Fig. 8B).

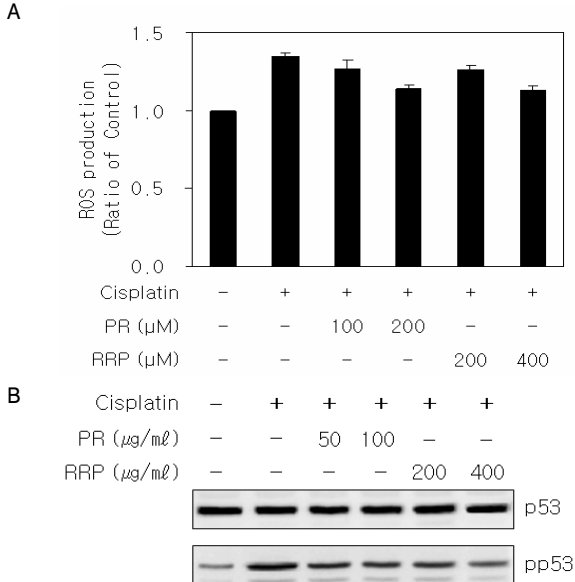


Fig. 8. Effect of PR and RRP on cisplatin-induced ROS production and p53 activation in rat mesangial cells. The cells were preincubated with PR or RRP for 3 h, and then treated with or without 30 μM cisplatin for 12 h. (A) ROS were determined by DCFH-DA fluorescence assay. Value are means \pm SD, N = 3. (B) Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis with, anti-p53 and anti-phospho p53 antibodies.

고찰

본 연구에서 rat mesangial cell에서 cisplatin의 ROS 생성에 의한 p53 활성을 통한 apoptosis를 확인할 수 있었다. ROS는 급성신부전증을 유도하는 독성시약의 중요한 매개체와 같이 언급되고 있지만, cisplatin에 의해 유도된 세포사멸에서 ROS의 역할은 논쟁의 여지가 남아있다. 그러나 본 연구에서 cisplatin에 의해 유도된 apoptosis가 NAC에 의해 억제되는 것이 관찰되었고, 또한 다양한 세포유형에서 cisplatin에 의한 apoptosis가 ROS 생성에 의해 매개되었다고 보고되었다.

암억제유전자인 p53은 DNA 손상이나 스트레스 조건에서 전사 후 변형에 의한 안정화로 인해 단백질 수준이 빠르게 증가한다²³. 이 전사 후 변형은 p53 단백질이 분해되지 않게 보호하고 이러한 p53 활성은 세포를 세포주기정지 또는 apoptosis로 유도한다²⁴⁻²⁶. Rat mesangial cell은 cisplatin에 의해 p53 활성이 증가하였고, p53 inhibitor에 의한 p53 활성 억제는 cisplatin의 apoptosis를 억제하였다.

Cisplatin에 의해 생성된 ROS는 p53활성과 관련되어 있다²⁷. Cisplatin을 처리한 rat mesangial cell에서 NAC에 의한 ROS 생성 억제는 p53 활성을 억제하였다. 이 결과는 cisplatin에 의한 p53 활성이 ROS 생성을 통해 유도되고, 결국 ROS 생성을 통한 p53 활성이 cisplatin의 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다.

p53/ROS cross-talk는 세포의 redox 균형을 조절하는데 중요하다²⁸. 강한 스트레스 자극이 없는 경우 p53은 낮은 수준으로 존재하여 항산화 유전자를 발현시키지만 세포에 큰 손상이 올 경우 p53의 산화기능이 활성화 되어 apoptosis에 관련된 유전자를 발현시키고 또한 p53의 전사적 활성은 ROS 생성이 요구된다²⁹. 최근 연구에서 갈근과 숙지황 에탄올 추출물은 cisplatin의 손상을 HEI-OC1 청각세포에서 유리라디칼 소거에 의한 보호효과가 보고되었다^{21,22}. 갈근의 주요 성분으로 soflavone인 pueraine, puerarinxyloside, daidzein, daidzine과 β -sitosterol, stigmasterol이 포함되어 있는 것으로 보고되었는데³⁰, puerarine과 daidzine이 항산화제 역할이 보고되었다³¹⁻³³. 숙지황의 주요 성분은 β -sitosterol, stigmasterol, campesterol과 iridoid glycosides인 catapol, rehmannioside, ajugol, aucubin, melittoside가 포함되어 있는 것으로 보고되었고^{34,35}, 그 중 sterols와 iridoid glycoside는 유리라디칼을 제거하는 항산화제 역할이 밝혀져 있다³⁶⁻³⁹. 갈근과 숙지황의 항산화효과는 이들 유효성분에 의한 효과로 사료된다. 본 연구에서도 갈근과 숙지황 에탄올 추출물이 cisplatin에 의해 손상된 rat mesangial cell에서 항산화효과에 의한 p53 활성 억제를 통한 보호효과를 보여주었다. 갈근과 숙지황 에탄올 추출물은 cisplatin에 의해 감소된 rat mesangial cell의 세포생존율을 증가시켰고, caspase-3 활성, PARP 절단현상을 억제하였다. 또한 ROS 생성 억제를 통하여 cisplatin의 p53 활성을 억제하였다.

결론

Rat mesangial cell에서 cisplatin의 세포독성은 ROS 생성에 의한 p53 활성을 통하여 apoptosis를 유도하였다. 이러한 cisplatin의 세포독성은 갈근과 숙지황 에탄올 추출물의 항산화 효과에 의하여 억제되고, 항산화 효과에 의해 감소된 ROS 생성은 p53 활성을 감소시켜 cisplatin에 의해 유도된 apoptosis를 억제하였다. 이상의 결과는 갈근과 숙지황 에탄올 추출물이 cisplatin에 의한 rat mesangial cell의 세포독성에 대하여 보호효과를 가지고 있음을 시사하고 있다.

감사의 글

본 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-313-E00592).

참고문헌

1. Timmer-Bosscha, H., Mulder, N.H. and de Vries, E.G. Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance: a review. *Br J Cancer* 66: 227-238, 1992.
2. Goldstein, R.S. and Mayor, G.H. Minireview. The nephrotoxicity of cisplatin. *Life Sci.* 32: 685-690, 1983.
3. Safirstein, R., Winston, J., Goldstein, M., Moel, D., Dikman,

- S. and Guttenplan, J. Cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Kidney Dis.* 8: 356-367, 1986.
4. Lieberthal, W., Triaca, V. and Levine, J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am. J. Physiol.* 270: F700-F708, 1996.
 5. Baliga, R., Zhang, Z., Baliga, M., Ueda, N. and Shah, S.V. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* 53: 394-401, 1998.
 6. Kaushal, G.P., Kaushal, V., Hong, X. and Shah, S.V. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 60: 1726-1736, 2001.
 7. Liu, H. and Baliga, R. Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. *Kidney Int.* 63: 1687-1696, 2003.
 8. Park, M.S., De Leon, M. and Devarajan, P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 858-865, 2002.
 9. Tsuruya, K., Ninomiya, T., Tokumoto, M., Hirakawa, M., Masutani, K. and Taniguchi, M. et al. Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int.* 63: 72-82, 2003.
 10. Sheikh-Hamad, D., Cacini, W., Buckley, A.R., Isaac, J., Truong, L.D. and Tsao, C.C. et al. Cellular and molecular studies on cisplatin-induced apoptotic cell death in rat kidney. *Arch. Toxicol.* 78: 147-155, 2004.
 11. Cummings, B.S. and Schnellmann, R.G. Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302: 8-17, 2002.
 12. Jiang, M., Yi, X., Hsu, S., Wang, C.Y. and Dong, Z. Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis: dependence on p53 transcriptional activity. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 287: F1140-F1147, 2004.
 13. Baliga, R., Ueda, N., Walker, P.D. and Shah, S.V. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab. Rev.* 31: 971-997, 1999.
 14. Nath, K.A. and Norby, S.M. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am. J. Med.* 109: 665-678, 2000.
 15. Martindale, J.L. and Holbrook, N.J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell Physiol.* 192: 1-15, 2002.
 16. Taguchi, T., Nazneen, A., Abid, M.R. and Razzaque, M.S. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib. Nephrol.* 148: 107-121, 2005.
 17. Baek, S.M., Kwon, C.H., Kim, J.H., Woo, J.S., Jung, J.S. and Kim, Y.K. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J. Lab. Clin. Med.* 142: 178-186, 2003.
 18. Matsushima, H., Yonemura, K., Ohishi, K. and Hishida, A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J. Lab. Clin. Med.* 131: 518-526, 1998.
 19. Sueishi, K., Mishima, K., Makino, K., Itoh, Y., Tsuruya, K. and Hirakata, H. et al. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 451: 203-208, 2002.
 20. Tsuruya, K., Tokumoto, M., Ninomiya, T., Hirakawa, M., Masutani, K. and Taniguchi, M. et al. Antioxidant ameliorates cisplatin-induced renal tubular cell death through inhibition of death receptor-mediated pathways. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 285: F208-F218, 2003.
 21. Yu, H.H., Seo, S.J., Kim, Y.H., Park, R.K., So, H.S., Jeon, B.H., Shin, M.K., Jung, S.Y., Kim, K.Y. and You, Y.O. Protective effect of rehmannia radix preparata extract on the cisplatin-induced cytotoxicity of HEI-OC1 cells via scavenging of free radicals. 19(5):1349-1355, 2005.
 22. Yu, H.H., Seo, S.J., Moon, H.D., Park, R.K., So, H.S., Jeon, B.H., Jung, S.Y. and You, Y.O. Protective effect of pueraria radix extract on the cisplatin-induced cytotoxicity of HEI-OC1 cells via scavenging of free radicals. *Kor. J. Orien. Physiol. Pathol.* 21: 462-467, 2007.
 23. Laptenko, O. and Prives, C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ.* 13: 951-961, 2006.
 24. Xu, Y. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ.* 10: 400-403, 2003.
 25. Fei, P. and El-Deiry, W.S. P53 and radiation responses. *Oncogene* 22: 5774-5783, 2003.
 26. Alarcon-Vargas, D. and Ronai, Z. p53-Mdm2 - the affair that never ends. *Carcinogenesis* 23: 541-547, 2002.
 27. Jiang, M., Wei, Q., Pabla, N., Dong, G., Wang, C.Y., Yang, T., Smith, S.B. and Dong, Z. Effects of hydroxyl radical scavenging on cisplatin-induced p53 activation, tubular cell apoptosis and nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 73: 1499-1510, 2007.
 28. Bragado, P., Armesilla, A., Silva, A. and Porras, A. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis* 12: 1733-1742, 2007.
 29. Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E. and Chumakov, P.M. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* 11: 1306-1313, 2005.
 30. 김창민, 신민교, 안택균, 이경순. 중약대사전. 서울, 정담, pp

- 33-40, 1998.
31. 박종옥, 김경순, 지영애, 류병호. 갈근에서 분리한 Daidzin 및 Puerarin의 사람 Low Density Lipoprotein 대한 항산화 효과. 한국식품영양과학회지 26: 25-31, 1997.
 32. Lai, H.H. and Yen, G.C. Inhibitory effect of isoflavones on peroxynitrite-mediated low-density lipoprotein oxidation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 22-28, 2002.
 33. Toda, S. and Shirataki, Y. Comparison of antioxidative and chelating effects of daidzein and daidzin on protein oxidative modification by copper in vitro. Biol. Trace Elem. Res. 79: 83-89, 2001.
 34. Yao, S.C., Wang, L.L. and Yeung, C.S. Pharmacology and applications of chinese materia medica. World Scientific, Hongkong, pp 461-467, 1981.
 35. Tang, W. and Eisenbrand, G. Chinese drugs of plant origin: Chemistry, pharmacology, and use in traditional modern medicine. Springer-Verlag, Berlin, pp 849-854, 1992.
 36. Van Rensburg, S.J., Daniels, W.M., van Zyl, J.M. and Taljaard, J.J. A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, dehydroepiandrosterone sulphate and melatonin on in vitro lipid peroxidation. Metabolic Brain Disease 5: 257-265, 2000.
 37. Yoshida, Y. and Niki, E. Antioxidant effects of phytosterol and its components. J. Nutr. Sci. Vitaminol.(Tokyo) 49: 277-280, 2003.
 38. Raju, B.L, Lin, S.J., Hou, W.C., Lai, Z.Y., Liu, P.C. and Hsu, F.L. Antioxidant iridoid glucosides from *Wendlandia formosana*. Nat. Prod. Res. 8: 357-364, 2004.
 39. Sridhar, C., Subbaraju, G.V., Venkateswarlu. Y. and Venugopal, R.T. New acylated iridoid glucosides from *Vitex altissima*. J. Nat. Prod. 67: 2012-2016, 2004.