

시스플라틴 유도 체중감소에 대한 반하사심탕 추출물의 방어효과

김하림 · 김미성 · 이영래¹ · 류도곤² · 임찬한² · 김병숙³ · 이금산⁴ · 권강범^{2*}

원광대학교 의과대학 대사가능제어연구센터, 1: 원광대학교 치과대학 구강생화학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 생리학교실, 3: 전북과학대학교 호텔조리영양과, 4: 원광대학교 한의과대학 본초학교실

Inhibitory Effects of Banhasasim-tang Extracts on Cisplatin-induced Body Weight Decrease in Mouse Model

Ha Rim Kim, Mi Seong Kim, Young Rae Lee¹, Do Gon Ryu², Chan Han Lim², Byung Sook Kim³, Geum-San Lee⁴, Kang Beom Kwon^{2*}

Center for Metabolic Function Regulation, School of Medicine, 1: Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, 2: Department of Physiology, School of Korean Medicine, Wonkwang University, 3: Department of Hotel Culinary Arts & Nutrition, Jeonbuk Science College, 4: Department of Herbology, School of Korean Medicine, Wonkwang University

In this study, Banhasasim-tang extracts (BSTE) have an inhibitory effects on cisplatin-induced decrease of body weights in two mouse model. Cisplatin is the most widely used anticancer drug for treatment of various cancer. However, cisplatin treatment to cancer patients leads to many side effects such as nausea, vomiting and body weight decrease. BSTE has been used to decrease digestive disorders in South Korea. We hypothesize that BSTE improve the cisplatin-induced side effects in mouse models. We found that pre- and co-administration of BSTE inhibited decreases of body weights and food intake by cisplatin in mouse models. But BSTE had no synergistic effects for tumor shrinkage by cisplatin in xenograft model. Collectively, our data suggest that BSTE have great potential as a agent for having decrease effects on side effects by cisplatin in cancer patients.

keywords : Banhasasim-tang, Cisplatin, Side effect, Body weight, Food intake

서 론

시스플라틴(cisplatin)은 백금 복합체로서 고환암, 두경부암, 비소세포폐암 등 다양한 고형암의 치료제로 사용되고 있다¹⁾. 그러나 시스플라틴에 의한 내성, 오심, 구토, 식욕부진, 체중 감소 등과 같은 부작용을 나타내, 이를 극복하기 위한 다양한 시도들이 행해지고 있다^{2,3)}.

반하사심탕(半夏寫心湯)은 장중경(張仲景)의 「상한론(傷寒論)」⁴⁾에 최초로 수록된 후 허준의 「동의보감(東醫寶鑑)」⁵⁾에도 수록되어 있다. 반하사심탕은 반하(생강초), 인삼, 감초, 황금, 건강, 생강, 대조 및 황련 등 8가지 한약재로 구성되어 있으며 임상에서 오심, 구토, 위하수, 위궤양, 설사 등의 증상에 사용되고 있다. 또한 반하사심탕 추출물은 실험적으로 위궤양 치료제인 씨메티딘(cimetidine)과 병용투여 할 경우 씨메티딘의 효과를 증가시킨다고 보고되었고⁶⁾, 항암제인 독소루비신(doxorubicin) 투여에 의한 심장 독성⁷⁾, 간장 및 비장 독성⁸⁾을 완화 효과가 있다고 보고되었다. 임상실험에서

반하사심탕은 기능성 소화불량⁹⁻¹¹⁾, 항암제 또는 방사선 치료에 의한 구강점막염증(oral mucositis)에 효과적인 것^{12,13)}으로 보고되었다.

본 연구에서 정상 마우스와 TC-1 세포 xenograft model을 이용하여 시스플라틴 유도 부작용에 대한 반하사심탕 추출물의 방어효과를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

50마리 6주령(20-24g) C57BL/6 수컷 마우스(오리엔트바이오, 경기도)를 사료(삼양사, 서울)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 1주일간 적응시킨 후, 총 5군으로 구분하여 각 군당 10마리씩 실험에 사용하였다.

2. 반하사심탕 추출물 분리

반하사심탕은 Table 1와 같이 8가지 한약재로 구성되어 있

* Corresponding author

Kang Beom Kwon, Department of Physiology, School of Korean Medicine, Wonkwang University, 460, Iksandae-ro, Iksan, Republic of Korea

E-mail : dession@wku.ac.kr Tel : +82-63-850-6917

Received : 2017/11/22 Revised : 2017/12/08 Accepted : 2017/12/08

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2017.12.31.6.362

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

며, 추출물의 분리를 위하여 8가지 한약재를 비율대로 조제하여 총 75g의 반하사심탕에 1500ml 증류수를 가한 후 2시간 동안 100°C에서 전탕한 후 농축, 동결건조 과정을 거쳐 11.78g의 추출물을 획득(수율:15.7%)하여 실험에 사용하였다. 반하사심탕 구성 한약재는 원광대학교 한의과대학 본초학교실 이금산 교수에게 검증받은 후 사용하였다.

Table 1. Banhasasitang composition

한약재	생약명	비율(%)
반하(半夏)	<i>Pinelliae Tuber</i>	20
인삼(人蔘)	<i>Ginseng Radix</i>	15
감초(甘草)	<i>Glycyrrhizae Radix Preparata</i>	15
황금(黃芩)	<i>Scutellariae Radix</i>	15
건강(乾薑)	<i>Zingiberis Processum Rhizoma</i>	10
생강(生薑)	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	10
대조(大棗)	<i>Ziziphi Jujubae Fructus</i>	10
황련(黃連)	<i>Coptidis Rhizoma</i>	5

3. 시스플라틴 유도 부작용 모델 및 반하사심탕 추출물의 투여

1) 동물

6주령 C57BL/6 마우스에 10 mg/kg 시스플라틴(Sigma-Aldrich Korea, 경기도)을 3일 간격으로 두번 복강내(i.p.)로 투여하였다. 시스플라틴을 처음 투여한 날을 day 0로 하였으며 6일째(day 6) 혈액과 조직을 획득하여 분석하였다. 반하사심탕 추출물은 시스플라틴을 투여하기 7일 전(day -7)에 500, 1000, 2000 mg/kg의 농도로 투여하기 시작하여 총 13일간 투여하였다.

2) TC-1 세포를 이용한 xenograft model

TC-1 세포주(원광대학교 의과대학 양세훈 교수로부터 제공)는 항생제와 5% fetal bovine serum이 포함된 RPMI-1640 배지에 배양액에서 배양한 후 사용하였다. 6주령 C57BL/6 마우스에 Trypsin-EDTA(Gibco BRL)를 처리하여 수거한 TC-1 세포주를 3×10⁶ cells/100 µl PBS로 준비한 후, 마우스의 등부위에 피하주사(s.c.)하여 종양을 유발하였다. 시스플라틴의 항종양 효과를 조사하기 위하여 TC-1 세포주를 주입한 후 7일째부터 6 mg/kg 시스플라틴을 3일 간격으로 세 번 복강내(i.p.)로 투여하였다. 시스플라틴을 처음 투여한 날을 day 0로 하였으며 9일째(day 9) 종양의 크기를 측정하였다. 반하사심탕 추출물은 시스플라틴을 투여하기 시작한 날(day 0)에 500, 1000, 2000 mg/kg의 농도로 투여하기 시작하여 총 9일간 투여하였다.

4. Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색

실험이 끝난 소장의 형태학적, 조직학적 변화를 관찰하기 위해 H&E 염색에 사용되었다. 적출한 소장을 고정한 후 40 µm로 절편하여 hematoxylin에 10초 동안 담가 둔 후 흐르는 물에서 세척하고, eosin에 20초 동안 담군 후 다시 세척하였다. 탈색(destaining) 과정을 수행하기 위해 50, 70, 90 % 알코올에서 각각 30 초 동안 담가 두었고, xylene에 1분 동안 세척하여 coverslip을 씌워 광학 현미경으로 관찰하였다.

5. 채혈 및 WBC count

마우스 안와 정맥에서 채혈하였고 혈액시료는 K2 EDTA가 포

함된 모세관채혈튜브 (Becton Dickinson ref: 365974)에 담아 당일 분석하였으며 분석을 진행하는 동안 실온 보관하였다. 전혈 검사는 자동혈구분석기 KT-6200 VET(Shenzhen Genius Electronics Co.,LTD, Shenzhen, China)를 이용하여 분석하였다

6. 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차(mean ± SD)로 표기하였으며, SPSS 22.0 program을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 다음 least-significant differences test로 사후 검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였다. 유의수준 p-value <0.05에서 검정하였다.

결 과

1. 시스플라틴 유도 체중 및 먹이 섭취 감소에 대한 반하사심탕 추출물의 억제 효과

시스플라틴 투여 후 나타나는 체중 및 먹이 섭취 감소에 대한 반하사심탕의 효과를 조사하기 위하여 시스플라틴을 투여하기 7일 전부터 500, 1000, 2000 mg/kg 반하사심탕 추출물(BSTE)을 경구 투여한 후 체중과 먹이 섭취량을 조사하였다. 그 결과 시스플라틴 투여군은 대조군에 비하여 유의하게 감소(p<0.05)하였으나 반하사심탕 추출물을 투여한 군은 시스플라틴에 의한 체중과 먹이 섭취 감소를 유의하게 억제(p<0.05)하였다(Fig. 1A, 1B).

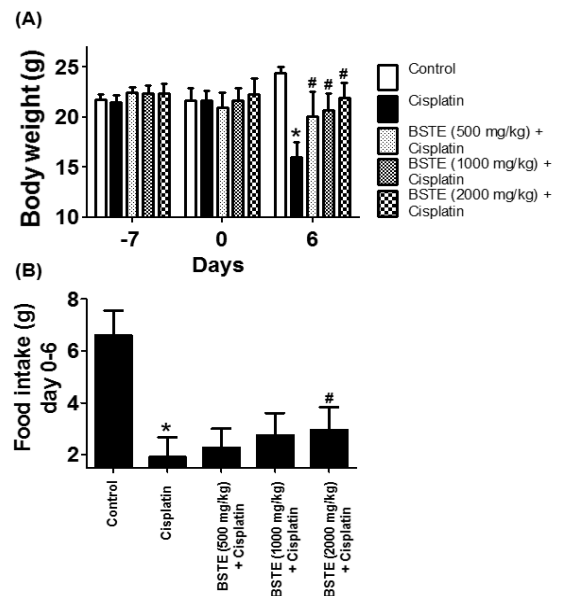


Fig. 1. Effects of Banhasasim-tang extract (BSTE) on cisplatin-induced decreases of body weight and food intake in C57BL/6 mouse. Data are mean ± SD values (N=10). *, p<0.05 vs. control group; #, p<0.05 vs. Cisplatin group.

2. 시스플라틴 유도 소장 독성 및 백혈구 감소에 대한 반하사심탕 추출물의 억제 효과

시스플라틴 투여 후 나타나는 소장 독성 및 백혈구 감소에 대한 반하사심탕의 효과를 조사하기 위하여 시스플라틴을 투여하기 7

일 전부터 500, 1000, 2000 mg/kg 반하사심탕 추출물(BSTE)을 경구 투여한 후 소장과 백혈구 수를 조사하였다. 그 결과 시스플라틴 투여군의 소장은 장점막세포의 소실이 뚜렷하게 나타나 독성을 나타냈으나 반하사심탕 추출물을 투여한 군은 시스플라틴에 소장 점막세포 손실을 억제하였다(Fig. 2A). 또한 시스플라틴을 투여한 군의 백혈구 수는 대조군에 비해 유의하게 감소($p < 0.05$)하였으나, 반하사심탕 추출물 투여군은 유의한 억제 효과($p < 0.05$)를 나타냈다(Fig. 2B).

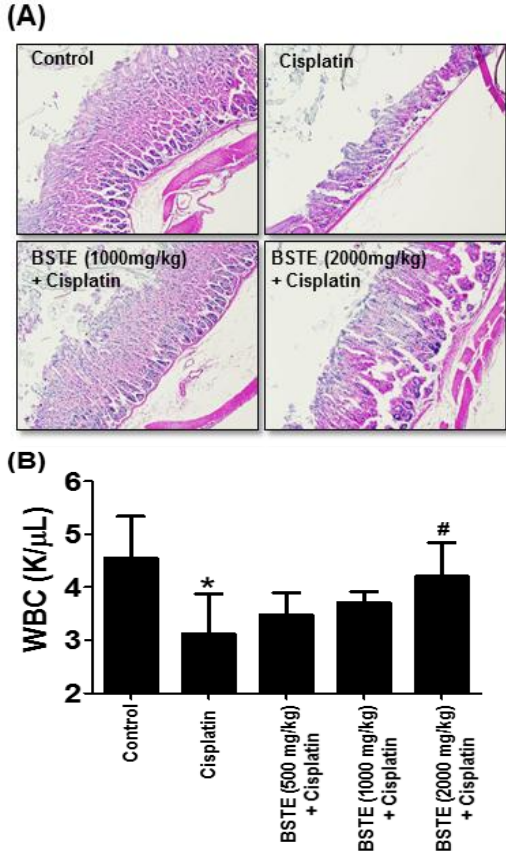


Fig. 2. Effects of Banhasasim-tang extract (BSTE) on cisplatin-induced small intestine toxicity (A) and WBC decrease in C57BL/6 mouse. Data are mean \pm SD values (N=10). *, $p < 0.05$ vs. control group; #, $p < 0.05$ vs. Cisplatin group.

3. Xenograft 모델에서 시스플라틴의 항암 효과에 대한 반하사심탕의 영향

시스플라틴의 항암 효과에 대한 반하사심탕의 효과를 조사하기 위하여 마우스에 TC-1 세포주를 주입하여 종양을 유발한 후 반하사심탕 추출물을 투여하였다. 그 결과 시스플라틴을 투여한 군은 대조군에 비하여 유의한 종양 무게와 크기 감소 효과를 나타냈다. 그러나 반하사심탕을 투여한 군에서는 시스플라틴의 항종양 효과에 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 3A, 3B).

4. Xenograft 모델에서 시스플라틴 유도 체중 및 먹이 섭취 감소에 대한 반하사심탕 추출물의 억제 효과

Xenograft 모델에서 시스플라틴에 의한 체중 및 먹이 섭취 감

소에 대한 반하사심탕의 효과를 조사하기 위하여 마우스에 TC-1 세포주를 주입하여 종양을 유발한 후 반하사심탕 추출물을 투여하였다. 그 결과 시스플라틴을 9일 동안 18 mg/kg의 농도로 투여한 군은 대조군에 비하여 유의한 체중의 감소(Fig. 4A)와 먹이 섭취의 감소(Fig. 4B)가 나타나 부작용을 나타냈다. 그러나 반하사심탕 추출물을 투여한 군의 체중 감소는 시스플라틴을 투여한 군에 비해 유의하게 적었으며, 먹이 섭취의 감소 또한 유의하지는 않았으나 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 4A, 4B).

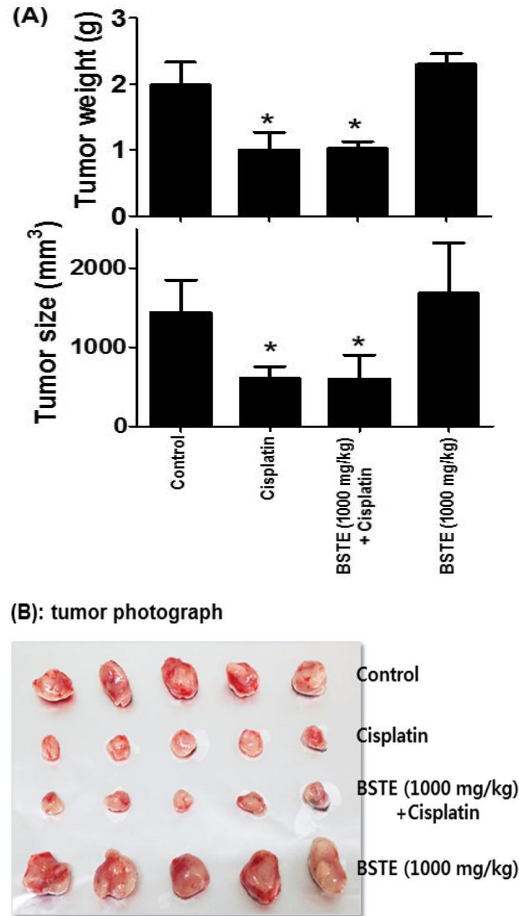
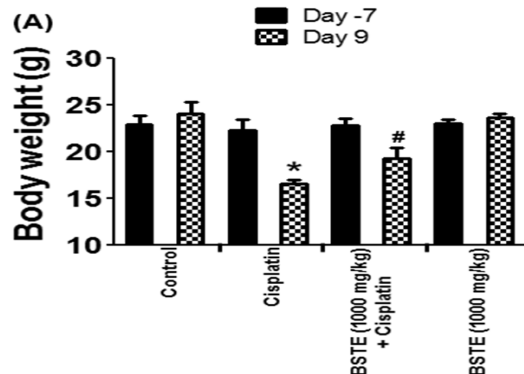


Fig. 3. Effects of Banhasasim-tang extract (BSTE) on cisplatin-induced tumor shrinkage on TC-1 cell-inoculated xenograft model. Data are mean \pm SD values (N=5). *, $p < 0.05$ vs. control group.



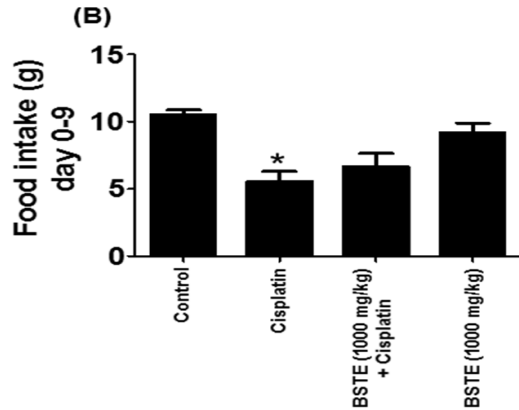


Fig. 4. Effects of Banhasasim-tang extract (BSTE) on cisplatin-induced decreases of body weight and food intake TC-1 cell-inoculated xenograft model. Data are mean \pm SD values (N=5). *, $p < 0.05$ vs. control group; #, $p < 0.05$ vs. Cisplatin group.

고찰

본 연구에서 반하사심탕 추출물은 정상 마우스에서 시스플라틴에 의한 체중 및 식이 섭취의 감소를 유의하게 억제하였다. 또한 TC-1 세포를 주입한 xenograft model에서 반하사심탕 추출물의 투여는 시스플라틴의 항종양 효과에는 영향을 나타내지 않았으나, 시스플라틴에 의한 체중 감소를 유의하게 억제하였다.

반하사심탕은 임상에서 소화기 관련 증상들, 즉 오심, 구토, 위하수, 위궤양, 설사 등의 증상에 빈번하게 사용되는 처방으로 실험적으로 소화기 증상에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다⁹⁻¹³. 종양과 관련된 반하사심탕 추출물의 연구 보고로는 위암 환자에게서 항암제 사용으로 인해 발생하는 구강점막염에 대한 보호 효과¹², 방사선과 항암제 치료를 받고 있는 두경부암 환자의 구강점막염 개선 효과¹³가 있다. 시스플라틴은 고환암, 두경부암 등 다양한 고형암의 치료제로 사용되고 있는 항암제¹, 오심, 구토, 식욕부진, 체중 감소, 구강점막염 등과 같은 소화관내 부작용을 나타내 항암제 치료를 받는 환자의 삶의 질을 떨어뜨린다. 최근 암환자의 삶의 질을 개선하려는 노력이 다양하게 이뤄지고 있으며^{2,3}, 이런 연구들의 일환으로 임상에서 소화기 질환에 사용되고 있는 반하사심탕을 이용하여 시스플라틴에 의한 부작용을 완화시키는 한방제제를 개발하고자 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서 두가지 마우스 모델을 이용하였다. 첫 번째 정상 C57BL/6 마우스에 10 mg/kg의 시스플라틴을 3일 간격으로 두 번 주입하여 적절한 체중감소, 식이섭취 감소 등의 병증을 유발하였다. 시스플라틴을 투여한 군에서 체중은 대조군에 비하여 26% 감소하였으며, 식이 섭취 또한 69% 감소하였다(Fig. 1). 그러나 반하사심탕 추출물을 시스플라틴 투여하기 7일 전부터 시스플라틴 투여기간 동안, 총 13일 투여한 군의 체중과 식이 섭취량은 시스플라틴을 투여한 군과 비교하여 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 1). 또한 반하사심탕 추출물 투여군은 시스플라틴에 의한 소장점막의 이상과 백혈구의 감소를 유의하게 억제하였다(Fig. 2). 최근 임상실험에서 기능성 소화불량 환자들에게 반하사심탕을 투여한 경우 증상을 개선시켰으며, 기능성 소화불량과 관련된 삶의 질을 높여준 것으로

보고되었다⁹⁻¹¹. 시스플라틴 투여에 의한 암환자들의 체중 감소, 식이섭취 감소, 오심, 구토는 암환자의 삶의 질과 밀접한 관련이 있다. 실험적으로 반하사심탕 추출물이 시스플라틴에 의한 체중 및 식이섭취의 감소를 유의하게 억제한다는 것은 임상적으로 시스플라틴의 부작용 중 소화기 관련 부작용을 감소시켜, 암환자의 삶의 질을 개선시킬 수 있는 보조제 개발의 후보가 될 수 있을 것으로 사료된다.

TC-1 세포주를 이용한 xenograft model은 다양한 물질의 항종양 효과를 조사하는 모델로 이용되고 있다¹⁴. 본 연구에서 TC-1 세포를 C57BL/6 마우스의 등등 피하에 주입한 후 종양이 발생한 후 6 mg/kg 시스플라틴을 3일 간격으로 세 번 주입하여 모델을 확립하였으며 시스플라틴 투여와 동시에 1000 mg/kg 반하사심탕 추출물을 경구 투여한 후 시스플라틴의 항종양 효과에 대한 반하사심탕의 효과 및 시스플라틴에 의한 체중 및 식이섭취 감소에 대한 반하사심탕의 효과를 조사하였다. 그 결과 시스플라틴 투여군에서는 대조군에 비하여 유의한 종양 크기 및 무게 감소 효과를 나타냈으나 반하사심탕 병용 투여군은 시스플라틴 투여군에 비교하여 유의한 변화가 없었다(Fig. 3). 이러한 결과는 반하사심탕은 시스플라틴의 항종양 효과에는 영향을 미치지 못한 것으로 생각된다. 그러나 시스플라틴 투여에 의한 체중 감소 효과는 반하사심탕 추출물 투여에 의해 유의하게 억제하였다(Fig. 4A). 또한 시스플라틴에 의한 식이섭취 감소 효과는 통계적으로 유의하지 않았으나 억제하는 경향을 나타냈다(Fig. 4B).

종합해 보면 반하사심탕 추출물은 정상 마우스와 TC-1 세포주를 이용한 동물 모델에서 시스플라틴에 의한 부작용, 즉 체중감소와 식이섭취 감소 효과를 유의하게 억제하였다.

이러한 결과는 반하사심탕이 임상적으로 소화기 질환에 써온 경험을 토대로 항암제로 인한 부작용을 완화시키는 제제를 개발하는데 기초 자료로 이용될 것으로 사료된다.

결론

반하사심탕의 시스플라틴에 의한 부작용 완화 효과를 조사하기 위하여 정상 마우스와 TC-1 세포를 주입한 마우스 모델에서 반하사심탕 추출물을 경구 투여한 후 시스플라틴에 의한 체중감소, 식이섭취 감소 등에 대한 억제 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

반하사심탕 추출물의 정상 마우스에서 시스플라틴에 의한 체중 및 식이섭취 감소를 유의하게 억제하였다. 반하사심탕 추출물은 정상 마우스에서 시스플라틴에 의한 백혈구의 감소, 소장 점막의 손상을 유의하게 억제하였다. 반하사심탕 추출물은 TC-1 세포주를 이용한 xenograft model에서 시스플라틴에 의한 체중 및 식이섭취 감소를 유의하게 억제하였다.

이상의 결과를 토대로 시스플라틴에 의한 부작용을 완화시키는 임상연구를 진행할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건

의료기술연구개발사업 지원에 의하여 이루어진 것임 (과제고유번호:HI14C0750).”

References

1. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and strategies. *Kidney Int.* 2008;73:994-1007.
2. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007;7:573-84.
3. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
4. Zhang ZJ. *Shanghanzabinglun*, Han dynasty, 200-210: hanhanlun. Seoul:Daesungmunhwasa; 1993. 112 p.
5. Heo, J. *Donguibogam*, p 397. Namsandang, Seoul, 2007.
6. Lee KG, Cui X, Lim JP. Effect of the Concurrent Administration of Banhasasim-tang with Cimetidine on Gastric Ulcer in Rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2002;16(3):572-6
7. Shin Mk, Hwang HJ, Kim SC, Byun JS. Effect of Banhasasim-tang on the Cardiac Toxicity and clinical symptom induced by Doxorubicin. *Korean J. Oriental Medical Prescription.* 2002;10(1):131-42.
8. Hwang HJ, Shin Mk, Kwak MA, Lee YH, Byun JS, Kim SC. Effect of Banhasasim-tang on the Hepatic and Splenic Toxicity induced by Doxorubicin. *J. of Kor. Oriental Oncology.* 2002;8(1):9-21.
9. Yoon SH, Ryu BH, Ryu KW, Kin JS. Evaluation for Therapeutic Effectiveness of Banwhasashim-tang in Functional Dyspepsia. *Korean J. Orenta. Int. Med.* 2003;24(2):329-36.
10. Park JW, Ko SJ, Han G, Yeo I, Ryu B, Kim J. The Effects of Banha-sasim-tang on dyspeptic symptoms and gastric motility in cases of functional dyspepsia: A randomized, double-blind, placebo-controlled, and two-center trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;265035.
11. Park JW, Ryu B, Yeo I, Jerng UM, Han G, OH S, Lee J, Kim J. Banha-sasim-tang as an herbal formula for the treatment of functional dyspepsia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, two-center trial. *Trials* 2010;11:83.
12. Aoyama T, Nishikawa K, Takiguchi N, Tanabe K, Imano M, Fukushima R, et al. Double-blind, placebo-controlled, randomized phase II study of TJ-14 (hangeshashinto) for gastric cancer chemotherapy-induced oral mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;73:1047-54.
13. Yamashita T, Araki K, Tomifuji M, Kamide D, Tanaka Y, Shiotani A. A traditional Japanese medicine--Hangeshashinto (TJ-14)--alleviates chemoradiation-induced mucositis and improves rates of treatment completion. *Support. Care Cancer.* 2015;23:29-35.
14. Namgung J, Bae SM, Wen LY, Oh EK, Shin JE, Kim YW, et al. Vascular shutdown effects by tetraarsenic oxide in TC-1 cells implanted C57BL/6 mice. *Obstet. Gynecol. Sci.* 2009;52(2):220-7.