

신장에서 cisplatin이 활성산소 대사에 미치는 영향

계명대학교 신장연구소

백철민 · 객춘식 · 하은영 · 김여희 · 최혜정 · 황은아 · 박성배 · 김현철 · 문교철

Effect of Cisplatin on the Metabolism of the Reactive Oxygen Species in Kidney

Chul Min Baek, M.D., Chun Sik Kwak, Ph.D., Eunyoung Ha, M.D.,
You Hee Kim, M.D., Hye Jung Choi, Ph.D., Eun A Hwang, M.D.,
Sung Bae Park, M.D., Hyun Chul Kim, M.D., Kyo Cheol Mun, M.D.

*Dongsan Kidney Institute, Keimyung University,
Daegu, Korea*

Abstract : Cisplatin, an antitumor agent widely used in the treatment of a variety of human solid tumors, has nephrotoxicity. To understand the mechanism for the nephrotoxicity, oxidative stress markers levels and activities of antioxidative enzymes were measured. Sprague-Dawley rats received a single intraperitoneal injection of 8 mg/kg of cisplatin and sacrificed 6 days after cisplatin injection. When mitochondria was exposed to cisplatin, the oxygen free radical production was increased depending on the exposure time. Cisplatin treated rats showed the increase of hydrogen peroxide levels and xanthine oxidase activity in serum. However, catalase activity was decreased. The mRNA expression for renal superoxide dismutase was decreased in the cisplatin treated rats. These results suggest that cisplatin induces nephrotoxicity is associated with the production of reactive oxygen species via the changes of the antioxidant enzymes.

Key Words : Cisplatin, Kidney, Reactive oxygen species

서 론

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II)은 각종 고형암 특히 고환, 방광 및 전립선암에 널리 사용되는 항암제이나, 신장 기능 손상, 위장관 장애, 골수 장애, 신경 장애 등의 부작용이 있어 그 사용이 제한되고 있다[1-4]. 이러한 cisplatin에 의한 부작용 중 신장 기능 손상에 대해서는 그 기전이 약간 밝혀져 있기는 하나 명확하지는 않다. 현재 추정하고 있는 cisplatin에 의한 신장 기능 손상 기전은 cisplatin에 의한 지질 과산화의 촉진, 효소 불활성화, 세포 내 비효소적 및 효소적 항산화 방어 체계의 변화와 glutathione 상태의 변화 등으로 인한 산화적 손상의 초래이며[5-10], 또 다른 기전으로는 cisplatin에 의한 DNA 합성의 억제인 것으로 알려져 있으며 이러한 결과로 신장 세포에서는 특이적으로 발현하는 mRNA 발현의 변화를 초래하게 된다[11].

한편, 활성산소는 생체 내에서 호흡, 면역반응 및 각종 산화·환원반응에 의해 생성되며[12-13], 정상인은 세포 내의 항산화계에 의해 평형을 유지하고 있다. Superoxide 음이온, 과산화수소, 수산화 radical 등의 활성산소는 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase에 의해 소거된다. 이러한 활성산소에 의한 산화적 손상은 여러 가지 질병을 유발하고, 이는 약물에 의한 독성 기전에 중요한 작용을 한다[14]. Cisplatin에 의한 신장 기능 손상은 cisplatin이 활성산소를 생성하여 유발하는 것으로 알려져 있다[2-4].

이 연구에서는 cisplatin에 의한 신장 손상을 이해하기 위해 활성산소 생성과 항산화계 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였으며, 항산화 효소들에 대한 역전사 중합 연쇄 반응도 실시하였다.

재료 및 방법

1. 동물 및 처치

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중

320—360 g이 되는 Sprague-Dawley종의 수 흰 쥐를 사용하였으며 2 군으로 나누어 실험하였다. 대조군은 총 5 마리로 쥐를 12시간 금식시킨 후, 5% ethanolic saline 용액 4 mL와 생리식염수 1 mL을 복강내로 주입하고, 72 시간 후 5% ethanolic saline 용액을 다시 4 mL 주사한 다음, 최초 주사 후 6일에 쥐를 희생시켜 신장을 적출한 후 각종 측정 시료로 사용하였다. Cisplatin 투여군은 동물 실험 종료까지 생존한 총 5 마리로 Rybak 등의 방법[3]에 따라 쥐를 12시간 금식시킨 후, 5% ethanolic saline 용액 4 mL과, 체중 kg당 8 mg의 cisplatin (Sigma, St. Louis, MO, 미국)을 생리 식염수 1 mL에 녹여 복강내로 주입하였다. 최초 주사 72시간에 다시 5% ethanolic saline 4 mL을 주사하였으며, 최초 주사 6일에 쥐를 희생시켜 신장을 적출한 후 각종 측정 시료로 사용하였다. 각 실험군은 개별 분리 수용하였으며, 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 삼양유지사료주식회사 제품인 실험동물 사료를 물과 함께 자유로이 먹도록 하였다.

2. 시료채취

혈액 및 신장의 채취는 가벼운 ether 마취하에서 시행하였으며, 복부대동맥으로부터 혈액을 채취하여 쥐를 실험사시키고, 신장을 적출하였다. 채혈한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후, 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈청을 얻어 측정용 시료로 사용하였다. 적출한 신장은 RNA를 분리하기 전까지 액체질소에 보관하였다.

Cisplatin에 의한 활성 산소 생성 능력을 평가하기 위해 20—45%(w/v) sucrose linear density gradient 용액을 사용하여 간 조직으로부터 미토콘드리아 분획을 분리하였다.

3. RNA 분리

신장 조직 50 mg을 1 mL의 RNAzol™B 용액 (Biotech Laboratory, Houston, TX, 미국)으로 균질화시킨 후, 0.2 mL의 chloroform을 가하여 실험

온에 5분간 방치한 다음 15초간 혼합하여 실온에서 10분간 방치하였다. 균질액은 4℃에서 $12,000 \times g$ (average relative centrifugal force)로 15분간 원심분리하여 유기용매층의 DNA와 변성된 단백질을 제거하고, 수용액층의 RNA를 얻었다. 1/10배의 7.5 mol/L sodium acetate를 가하고, 동량의 isopropanol을 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후, $12,000 \times g$ 로 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA에 75% ethanol 1 mL을 가한 뒤 교반기로 혼합한 후, $7,500 \times g$ 로 5분간 원심분리하여 RNA를 세척한 다음 5분간 자연건조시켰다. 건조된 RNA를 RNase-free water로 녹인 후, 정량하여 시료로 사용하였다.

4. 활성산소 측정

활성산소 생성은 미토콘드리아를 이용하여 비형광성의 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)가 형광성의 2',7'-dichlorofluorescein로 산화되는 정도를 측정하여 나타내었다[15]. 즉, 미토콘드리아를 96-well plate에 분주한 후, 20 $\mu\text{mol/L}$ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (Sigma)를 처리하여 45분간 37℃에서 반응시켰다. 반응 후, 100 μL 의 cisplatin (0-100 $\mu\text{mol/L}$)을 처리하여 37℃에서 60분 동안 5분 간격으로 형광도를 측정하였다. 이때 형광도는 VICTOR³ multilabel counter (PerkinElmer, CT, 미국)로 측정하였다.

5. Malondialdehyde 함량 측정

Malondialdehyde 농도 측정은 malondialdehyde가 thiobarbituric acid와 반응할 때 나타나는 붉은색을 535 nm에서 측정하는 thiobarbituric acid assay 방법[16]에 의하였다. 즉, 시료를 0.25 N 염산에 0.375%의 thiobarbituric acid와 15% trichloroacetic acid를 함유한 시약과 혼합하고, 반응액을 100℃에서 15분간 반응시킨 다음, $3,000 \times g$ 에서 5분간 원심하여 얻은 상층액의 흡광도를 DU 650 분광광도

계(Beckman Instruments, Fullerton, CA, 미국)를 이용하여 535 nm에서 측정하였다. 시료 중 malondialdehyde 농도는 분자 흡광계수 $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 사용하여 계산하였다.

6. 과산화수소 농도 측정

과산화수소의 측정은 ferrous 이온이 산성 조건 하에서 과산화수소에 의해 ferric 이온이 된 후, xylenol orange와 결합하여 생성하는 화합물을 560 nm에서 측정하는 xylenol orange 과산화수소 측정법[17]으로 측정하였다.

7. Superoxide Dismutase의 활성도 측정

Superoxide dismutase 활성도 측정은 xanthine oxidase를 superoxide anion 발생 system으로 사용하여 nitroblue tetrazolium을 환원시키는 양을 측정하는 Sun 등의 방법[18]을 사용하였으며, 이 효소 1 unit는 효소액을 넣지 않은 반응액 중의 nitroblue tetrazolium의 환원을 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

8. Catalase의 활성도 측정

Catalase 활성도의 측정은 과산화 수소를 기질로 사용하여 25℃에서 30초 반응시키는 동안에 240 nm 파장에서 과산화 수소가 환원되어 감소하는 흡광도로써 효소 활성도를 측정하는 Nelson과 Kiesow의 방법[19]에 의하였으며, 효소 활성도의 단위는 1분간 1 mL의 혈청이 반응하여 환원시킨 과산화 수소 양으로 나타내었다.

9. Glutathione Peroxidase의 활성도 측정

Glutathione peroxidase의 활성도 측정은 환원형 glutathione, 과산화 수소 및 NADPH를 기질로 사용하고, glutathione reductase를 촉매로 하여 시료액과 함께 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 환원형 glutathione이 과산화 수소에 의해 산화형

glutathione으로 된다. 이것이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원형 glutathione으로 환원될 때 NADPH는 산화되며 이 NADPH가 NADP⁺로 산화되는 정도를 340 nm 파장에서 time scan하여 NADPH의 분자흡광계수 ($E_{340\text{ nm}} = 6.22\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 효소의 활성도를 산출하는 Paglia와 Valentine의 방법[20]에 의하였다. 이 효소 활성도의 단위는 1분간 1 mL의 혈청이 반응하여 생성된 NADP⁺량으로 나타내었다.

10. Xanthine Oxidase 활성도 측정

Xanthine oxidase의 활성도 측정은 xanthine을 기질로 사용하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 생성되는 요산을 292 nm에서 비색정량하는 Rowe와 Wyngaarden의 방법[21]에 의하였으며, 단위는 1분간 1 mL의 혈청이 반응하여 생성한 요산의 양으로 나타내었다.

11. cDNA의 합성

Total RNA에 oligo d(T)₁₆, 10 × buffer II, MgCl₂, 10 mmol/L dNTPs, 20 U/μL RNase inhibitor, 50 U/μL 역전사 중합효소(Roche Molecular system, Basel, 스위스)를 첨가하여 최종 20 μL가 되게 넣고, 42°C에서 1시간 동안 반응시키고, 역전사 중합효소의 활성을 제거하기 위해 99°C에서 5분간 열변성하여 cDNA 합성반응을 종료하였다.

12. 중합효소 연쇄반응

쥐의 Cu/Zn superoxide dismutase를 지시하는 mRNA에 대한 염기 서열을 확인한 후, superoxide dismutase의 sense 시발체로 5'-GAGCAGAAGGCAAGTGGTGA-3'과 antisense 시발체로 5'-TAGCAGGCC-AGCAGATGAGT-3'의 서열이 되도록 시발체를 (주)바이오니아(충북 청원군, 한국)에 주문 제작하였으며, 이를 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응을

실시하여 superoxide dismutase mRNA의 발현 여부를 조사하였다. 중합효소 연쇄반응은 합성된 cDNA 1.3 μL에 10 × buffer II, MgCl₂, 10 mmol/L dNTPs, 시발체, 5 U/μL Taq polymerase, 역전사 반응물을 첨가하여 최종 20 μL가 되게 하였다. DNA 증폭은 thermal cycler(GeneAmp PCR system 2400, PerkinElmer Co.)에서 94°C에서 5분간 열처리한 후 94°C에서 1분간 변성(denaturation), 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 연장(extension)하여 이를 총 28회 시행한 후, 72°C에서 5분간 연장 반응을 추가하였다. 이러한 반응을 통하여 쥐 신장 조직의 superoxide dismutase에 대한 449 base pair짜리 띠를 확인하여 superoxide dismutase의 발현 여부를 확인하였다.

13. Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase의 발현

Cu/Zn superoxide dismutase에 대한 실험 결과를 검정하기 위하여 대조군으로 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였다. GAPDH의 sense 시발체의 염기 서열은 5'-ATCACTGCCACTCAGAAGAC-3'과 antisense 시발체로 5'-CTTGCTCTC-AGTATCCTTGC-3'이 되도록 (주)바이오니아에 주문 제작하였으며, 이를 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시하여 GAPDH mRNA의 발현 여부를 조사하였다. 중합효소 연쇄반응은 합성된 cDNA 1.3 μL에 10 × buffer II, MgCl₂, 10 mmol/L dNTPs, 시발체, 5 U/μL Taq polymerase, 역전사 반응물을 첨가하여 최종 20 μL가 되게 하였다. DNA 증폭은 thermal cycler에서 94°C에서 5분간 열처리한 후, 94°C에서 1분간 변성, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 연장하여 총 28회 시행한 후, 72°C에서 5분간 연장 반응을 추가하였다. 이러한 반응을 통하여 쥐의 GAPDH에 대한 512 base pair짜리 띠를 확인하여 GAPDH의 발현 정도를 확인하였다.

14. 전기영동

1.5% agarose gel에 $1 \times$ TAE(Tris base, glacial acetic acid, 0.5 mol/L EDTA) 완충액과 최종 농도 $0.3 \mu\text{g/mL}$ ethidium bromide를 사용하였으며, 중합효소 연쇄 반응 반응물 $20 \mu\text{L}$ 와 100 bp size marker(Gibco BRL, Grand Island, NY, 미국) $5 \mu\text{L}$ 를 100 V (12×14 cm, 4.5 V/cm) 직류 하에서 30분 동안 전기영동한 후, 자외선 상에서 사진 촬영을 하였다.

15. Superoxide Dismutase의 유전자 발현 정도

Superoxide dismutase에 대한 mRNA의 발현 정도는 Gel Doc 1000 Video Gel Documentation system (Bio-Rad사, Hercules, CA, 미국)에서 읽은 superoxide dismutase에 대한 강도를 각각의 GAPDH 강도로 나누어 relative index를 구하여 계산하였다.

16. 통계적 분석

자료는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하고, 실험군 사이의 평균 비교는 Student's t-test로 하였으며 통계학적 유의수준은 P값이 0.05 미만으로 하였다.

성 적

1. 미토콘드리아 내 활성산소 생성 정도

Cisplatin에 의한 미토콘드리아 내의 활성산소 생성은 Figure 1에 나타내었다. 시간에 따라 활성산소 생성이 증가하였으며, 60분 동안 cisplatin을 처리한 경우 활성산소 생성이 약 1.7배 증가하였다. 농도에 따른 활성산소 생성에는 유의한 차이가 없었다.

2. 혈청에서 malondialdehyde 농도

혈청의 malondialdehyde 농도는 Figure 2와 같다. 대조군에서 malondialdehyde의 농도는 38.85 ± 1.85 nmol malondialdehyde/mL이었으며, cisplatin 처리군은 36.39 ± 4.40 nmol malondialdehyde/mL로 유의한 차이가 없었다.

3. 혈청에서 과산화수소의 농도

혈청의 과산화수소 농도는 Figure 3과 같다. 대

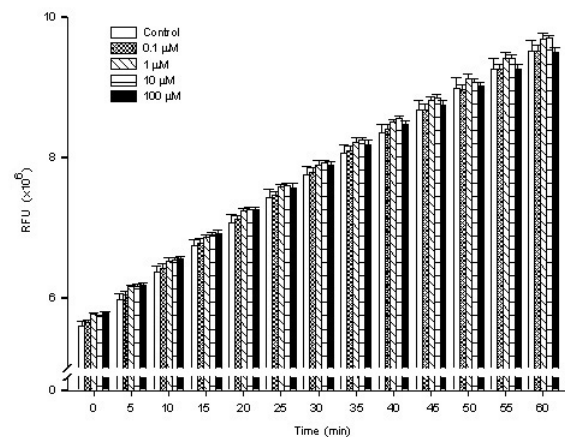


Fig. 1. Effect of cisplatin on the production of oxygen free radicals in mitochondria. Mitochondria was treated with $20 \mu\text{mol/L}$ 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate. RFU: relative fluorescence units.

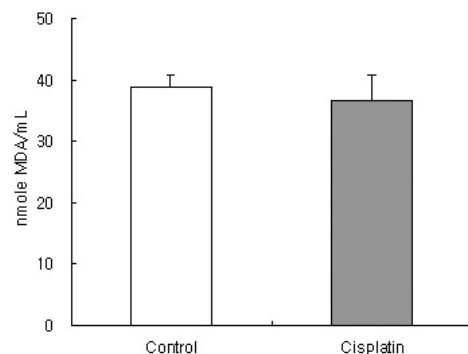


Fig. 2. Malondialdehyde levels in serum. Control (n=5): control group; Cisplatin (n=5): cisplatin treated group. MDA: malondialdehyde.

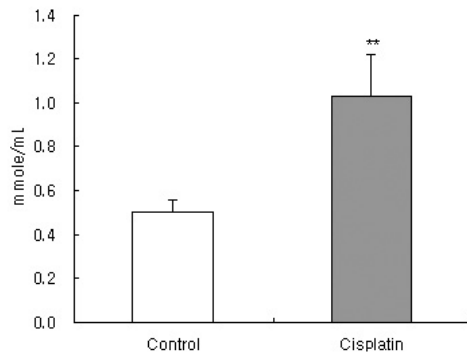


Fig. 3. Hydrogen peroxide levels in serum. Control (n=5): control group; Cisplatin (n=5): cisplatin treated group. **: $P < 0.01$ vs. Control group.

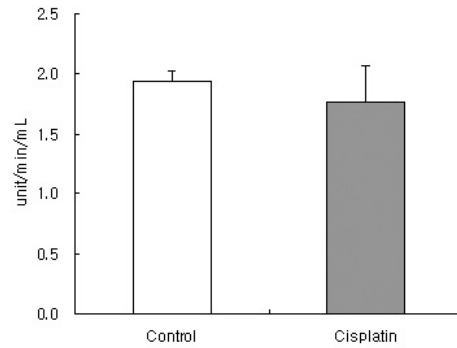


Fig. 4. Superoxide dismutase activity in serum. Control (n=5): control group; Cisplatin (n=5): cisplatin treated group.

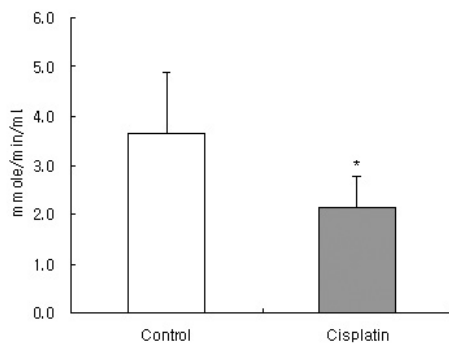


Fig. 5. Catalase activity in serum. Control (n=5): control group; Cisplatin (n=5): cisplatin treated group (8 mg/kg. i.p.). *: $P < 0.05$ vs. Control group.

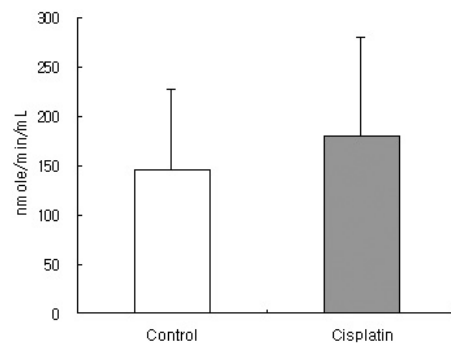


Fig. 6. Glutathione peroxidase activity in serum. Control (n=5): control group; Cisplatin (n=5): cisplatin treated group.

조군의 과산화수소 농도는 0.50 ± 0.05 mmol/mL이었으며, cisplatin 처리군의 과산화수소 농도는 1.03 ± 0.19 mmol/mL로 대조군에 비해 약 2배 증가하였다($P < 0.01$).

4. 혈청에서 Superoxide dismutase의 활성도

혈청에서의 superoxide dismutase 활성도는 Figure 4와 같다. 대조군의 superoxide dismutase 활성도는 $96.94 \pm 2.77\%$ 였으며, cisplatin 처리군에서는 $88.31 \pm 14.81\%$ 로 유의한 차이가 없었다.

5. 혈청에서 Catalase의 활성도

혈청에서 catalase 활성도는 Figure 5와 같다. 대조군에서는 3.66 ± 1.22 mmol/min/mL이었으며, cisplatin 처리군에서는 2.13 ± 0.67 mmol/min/mL로 대조군에 비해 catalase 활성도가 유의하게 증가하였다($P < 0.05$).

6. 혈청에서 Glutathione peroxidase의 활성도

혈청에서 glutathione peroxidase 활성도는 Figure 6과 같다. 대조군의 glutathione

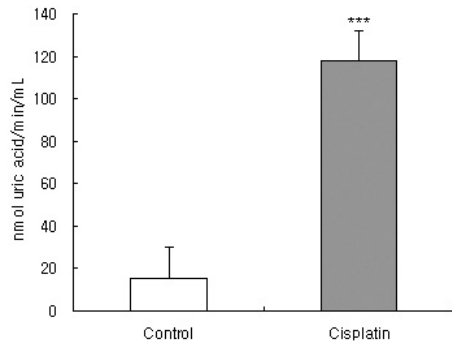


Fig. 7. Xanthine oxidase activity in serum. Control (n=5): control group; Cisplatin (n=5): cisplatin treated group (8 mg/kg. i.p.). ***: $P < 0.001$ vs. Control group.

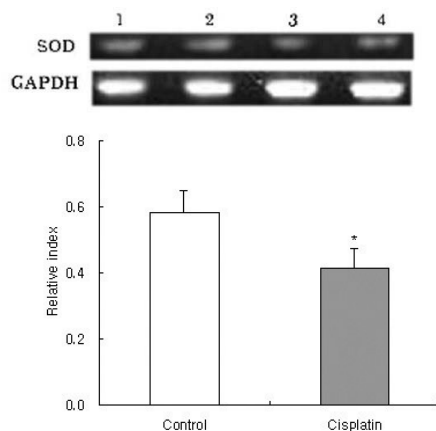


Fig. 8. mRNA expression for renal superoxide dismutase. Control (n=5): control group; Cisplatin (n=5): cisplatin treated group (8 mg/kg. i.p.). Relative index was defined as the ration between SOD and GAPDH. 1 and 2: Control gorup; 3 and 4: cisplatin treated group; SOD, superoxide dismutase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *: $P < 0.05$ vs. Control group.

peroxidase 활성도는 145.23 ± 82.25 nmol/min/mL이었으며, cisplatin 처리군에서는 179.10 ± 101.86 nmol/min/mL로 유의한 차이는 없었다.

7. 혈청에서 Xanthine oxidase의 활성도

혈청의 xanthine oxidase의 활성도는 Figure 7과 같다. 대조군에서 xanthine oxidase 활성도는 15.62 ± 10.02 nmol uric acid/min/mL이었으며, cisplatin 처리군에서는 117.71 ± 14.16 nmol uric acid/min/mL로 대조군에 비해 약 10배 증가하였다($P < 0.001$).

8. Superoxide dismutase/GAPDH의 mRNA 발현 정도

신장 조직에서의 superoxide dismutase에 대한 mRNA의 발현 정도는 Figure 8과 같다. Superoxide dismutase에 대한 relative index를 비교했을 때, 대조군에서는 0.58이었으며, cisplatin 처리군에서는 0.41로, cisplatin 처리군에서 mRNA 발현 정도가 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

고 찰

Cisplatin은 여러 동물종 [22-23] 뿐만 아니라 환자 [24-25]에 대해서 신독성을 나타내어 그 사용이 제한되고 있다. Cisplatin에 의해 유발된 신독성은 cisplatin에 의해 생성된 활성산소에 의한 것으로 밝혀져 있다 [2-4]. 이 연구는 cisplatin에 의한 신장손상시 활성산소 대사 변화를 확인하기 위하여 수행하였다.

이 연구에서는 cisplatin에 의한 활성산소 생성을 형광 염색 시약인 DCFH-DA를 이용하여 측정하였다. 이 측정법은 DCFH-DA가 미토콘드리아 막에 결합하여 cisplatin에 의해 생성된 활성산소와 반응하여 나타나는 형광을 측정하여 활성산소 생성 정도를 알아내는 방법 [26]이다. 이 연구에서 cisplatin 농도 차이에 의한 활성산소 생성에는 유의적 변화가 없었으나 cisplatin 처리 시간이 증가할수록 활성산소 생성은 증가하였다. 이 결과로 보아 cisplatin은 미토콘드리아 내에서 활성산소의 생성

을 촉진시키는 것으로 생각된다.

산화적 손상은 활성산소의 과다 생성 또는 항산화 방어 기능 저하로 인해 일어난다. 활성산소는 세포막의 지질 과산화를 일으키며 특히 malondialdehyde는 불포화지방산의 연쇄적인 산화반응의 최종산물로 산화적 손상의 표지자이다 [27-28]. 이 연구에서 cisplatin에 의한 혈청 내 malondialdehyde 농도는 변화가 없었다. 이 현상은 이 실험만으로 무엇이냐 분명하게 추론하기는 힘들며 앞으로 계속 추구하여야 하겠다. 이 연구에서 활성산소의 하나인 과산화수소는 cisplatin 투여군의 혈청에서 약 2배 증가하였다. 이는 조직 내 생성된 과산화수소가 혈액에 용해되기 때문에 cisplatin 투여군의 혈청에서 과산화수소 생성량이 증가한 것으로 사료된다.

Superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소는 활성산소 생성의 간접적인 지표[29]로, superoxide 음이온은 superoxide dismutase에 의해 과산화수소로 바뀌며, 과산화수소는 catalase와 glutathione peroxidase에 의해 무해한 물로 전환된다[30-32]. 이 연구에서 혈청 내 superoxide dismutase 활성도는 대조군과 cisplatin 투여군 사이에는 차이가 없었으며, catalase 활성도는 cisplatin 투여군에서 유의적으로 감소하였으나, glutathione peroxidase 활성도에는 유의한 변화가 없었다. Ichikawa 등 [33]에 따르면 superoxide dismutase의 활성도 증가는 과산화수소의 증가를 유발하는 것으로 알려져 있으나, 이 연구에서 cisplatin에 의한 과산화수소의 증가는 catalase 활성도의 감소에 기인한 것으로 생각된다. 한편, 혈청 내 xanthine oxidase는 대조군에 비해 cisplatin 투여군에서 10배 높은 활성도를 나타내었다. Xanthine oxidase는 활성산소 즉, superoxide radical을 생성시키는 효소[34]로서 xanthine oxidase 활성의 증가로 인한 증가된 혈중 활성산소가 신장 기능 손상을 초래하는 것으로 생각된다. 그리고, 역전사 중합효소 연쇄반응에서 cisplatin 투여군에서 superoxide dismutase 유전자의 발현이 감소하였다. 이 현상은 신장의

superoxide dismutase 생성 감소를 superoxide radical의 과산화 수소로의 전환을 저하시킴으로써 superoxide radical에 의한 신장 손상이 조장된 것이 아닌가 생각되나 분명하지는 않다.

이상의 문헌적 고찰과 실험 결과로 보아, cisplatin은 catalase 활성을 저하시키고, 활성산소 생성을 유발하는 xanthine oxidase 활성을 증가시켜 과도한 과산화수소의 생성을 유도하여 신장 조직의 산화적 손상을 초래하여 신장 기능을 저하시키는 것으로 생각된다.

요 약

Cisplatin은 항암제로 널리 사용되고 있으나 신장 등에 부작용을 초래하는 것으로 알려져 있다. 그러나 그 독성의 기전은 명확히 규명되어 있지 않다. Cisplatin에 의한 신장 독성의 기전을 규명하기 위하여 흰쥐를 대조군과 cisplatin 투여군으로 나눈 후, 산화적 손상에 미치는 cisplatin의 영향을 조사하기 위하여 cisplatin을 투여한 흰쥐의 혈청으로, 과산화수소, malondialdehyde 및 항산화효소의 활성도를 측정하였다. Cisplatin에 의한 미토콘드리아 내 활성산소 생성은 시간이 경과할수록 증가하였으나, cisplatin 농도에 의해서는 활성산소 생성에는 차이가 없었다. 혈청에서 malondialdehyde 농도는 차이가 없었으며, 과산화수소 농도는 대조군에 비해 cisplatin 투여군에서 증가하였다. 혈청의 superoxide dismutase 활성도는 별다른 차이가 없었고, catalase 활성도는 대조군에 비해 cisplatin 투여군에서 유의한 감소를 보였다. Glutathione peroxidase 활성도는 두 군간에 유의한 차이가 없었고, xanthine oxidase 활성도는 cisplatin 투여군에서 크게 증가하였다. 신장 조직에서의 superoxide dismutase에 대한 mRNA 발현은 대조군에 비해 cisplatin 투여군에서 감소하였다. 이 실험 결과로 볼 때, cisplatin은 catalase 활성 저하 및 활성산소 생성을 유발하는 xanthine oxidase의 활성을 증가시켜 과도한 과산화수소의 생성을 유도함으로써 신장 조직의 산화적 손상을

초래하여 신장 기능을 저하시키는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Walker EM Jr, Gale GR. Methods of reduction of cisplatin nephrotoxicity. *Ann Clin Lab Sci* 1981;**11**:397-410.
2. Rybak LP, Husain K, Whitworth C, Somani SM. Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *Toxicol Sci* 1999a;**47**:195-202.
3. Rybak LP, Whitworth C, Somani S. Application of antioxidants and other agents to prevent cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope* 1999b;**109**:1740-4.
4. Teranishi M, Nakashima T, Wakabayashi T. Effects of alpha-tocopherol on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Hear Res* 2001;**151**:61-70.
5. Xia Y, Zweier JL. Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. *J Biol Chem* 1995;**270**:18797-803.
6. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insight into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 1997;**12**:2478-80.
7. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev* 1999;**31**:971-97.
8. Greggi Antunes LM, Darin JD, Bianchi MD. Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacol Res* 2000;**41**:405-11.
9. Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol* 2001;**12**:2683-90.
10. Özyurt H, Yildirim Z, Kotuk M, Yilmaz HR, Yağmurca M, Iraz M, Söğüt S, Gergerlioglu S. Cisplatin-induced acute renal failure is ameliorated by erdosteine in a dose-dependent manner. *J Appl Toxicol* 2004;**24**:269-75.
11. Howle JA, Gale GR. Cis-dichlorodiammineplatinum (II): Persistent and selective inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 1970;**19**:2757-62.
12. Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In Armstrong D (Ed). *Free Radicals in Diagnostic Medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York, Plenum Press, 1994, pp.17-27.
13. Punchard NA, Kelly FJ. Introduction. In Punchard NA, Kelly FJ (Eds). *Free Radicals-A practical approach*. Oxford, Oxford University Press, 1996, pp.1-8.
14. Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res* 1999;**29**:49-55.
15. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;**27**:612-6.
16. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. In Colowick SP, Kaplan NO (Eds). *Methods Enzymol* 1978;**52**:302-10.
17. Bleau G, Giasson C, Brunette I. Measurement of hydrogen peroxide in biological samples containing high levels of ascorbic acid. *Anal Biochem* 1998;**263**:13-7.
18. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxid dismutase. *Clin Chem* 1988;**34**:497-500.
19. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972;**49**:474-8.
20. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*

- 1967;**70**:158-69.
21. Rowe PB, Wyngaarden JB. The mechanism of dietary alterations in rat hepatic xanthine oxidase levels. *J Biol Chem* 1966;**241**:5571-6.
22. Badary OA, Nagi MN, al-Sawaf HA, al-Harbi M, al-Bekairi AM. Effect of L-histidinol on cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Nephron* 1997;**77**:435-9.
23. Badary OA, Nagi MN, al-Shabanah OA, al-Sawaf HA, al-Sohaibani MO, al-Bekairi AM. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;**75**:1356-61.
24. DeConti RC, Toftness BR, Lange RC, Creasey WA. Clinical and pharmacological studies with cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* 1973;**33**:1310-5.
25. Daugaard G, Abildgaard U, Holstein-Rathlou NH, Bruunshuus I, Bucher D, Leyssac PP. Renal tubular function in patients treated with high-dose cisplatin. *Clin Pharmacol Ther* 1988;**44**:164-72.
26. LeBel CP, Ishiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992;**5**:227-31.
27. Diaz J, Serrano E, Acosta F, Carbonell LF. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. *Clin Chem* 1998;**44**:2215-7.
28. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareno EJ, Romero B, Marin N, Roma J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect* 1998;**106**:1229-34.
29. Ozyurt H, Irmak MK, Akyol O, Sogut S. Caffeic acid phenethyl ester changes the indices of oxidative stress in serum of rats with renal ischaemia-reperfusion injury. *Cell Biochem Funct* 2001;**19**:259-63.
30. Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems. the superoxide theory of oxygen toxicity. In Halliwell B, Gutteridge JMC (Eds). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press, 1989, pp.86-187.
31. Babior BM, Benna JE, Chanock SJ, Smith RM. The NADPH oxidase of leukocytes: the respiratory burst oxidase. In Scandalios JG (Ed). *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defense*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, pp.737-83.
32. Murray RK. Red and white blood cells. In Murray RK, Granner DK, Mayer PA, Rodwell VW (Eds). *Harper's Biochemistry*. 26th ed. New York, McGraw-Hill, 2003, pp.609-25.
33. Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 1994;**45**:1-9.
34. Joannidis M, Gstraunthaler G, Pfaller W. Xanthine oxidase: evidence against a causative role in renal reperfusion injury. *Am J Physiol* 1990;**258**:232-6.