

Melatonin이 Cisplatin에 의한 신장 손상에 미치는 영향

계명대학교 의학대학 만성질환 예방 및 치료화학제 연구센터*, 신장연구소†, 의학과†

최혜정*, † · 신영호*, † · 문교철*, † · 송대규*, † · 김인철†
서상혁*, † · 곽춘식*, † · 장은주*, † · 김현철*, †

〈요약〉

목적: Cisplatin은 항암제로 널리 사용되나 활성산소를 생성하여 신장 기능 손상 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있고 강력한 항산화제인 melatonin은 cisplatin에 의한 산장독성을 줄일 수 있을 것이다. Cisplatin에 의한 신장 독성에 대하여 melatonin의 방어 효과를 알아보기로 하였다.

방법: 실험군을 대조군인 제 1군, cisplatin 투여군인 제 2군 및 cisplatin과 melatonin을 투여한 제 3군으로 나눈 후 신장 조직의 형태학적 변화와 더불어 산화적 손상에 대한 연구를 수행하였으며 과산화수소, malondialdehyde 및 항산화효소의 활성도를 측정하였다.

결과: 혈청 BUN ($p<0.001$), creatinine 농도 ($p<0.001$) 및 신장의 과산화수소 생성량은 제 1군에 비해 제 2군에서 증가하였고, 제 2군에 비해 제 3군에서는 감소되었으며, 활성산소로 인한 손상 표지자인 malondialdehyde 농도도 같은 경향을 나타내었다. Creatinine 청소는 제 1군에 비해 제 2군에서 감소를 보였고, 제 2군에 비해 제 3군에서는 증가되었다. 신장의 superoxide dismutase 활성도는 제 1군에서 제 2군에 비해 감소하였고 catalase 활성도는 제 1군에 비해 제 2군에서 증가되었으며, 제 2군에 비해 제 3군에서는 더욱 증가되었다. Glutathione peroxidase는 통계학적으로 의미 있는 변화가 없었다. 또한 광학 현미경 소견을 보면 제 2군의 사구체에서는 특이한 변화가 없었으나, 근위 곱슬 세관은 심한 괴사를 나타내었고, 제 3군의 근위 곱슬 세관에서 중등도의 괴사를 나타내었으며 제 2군보다 경한 변화를 보였다.

결론: Cisplatin은 신장에서 superoxide dismutase 활성도 증가와 catalase의 활성도를 저하시켜 과산화수소의 생성을 유도하여 신장 손상을 유발하는 것으로 생각되며, melatonin은 superoxide dismutase 활성도 증가와 catalase 활성도 증가를 유도하여 cisplatin에 의해 유발된 신장 손상을 줄이는 것으로 생각된다.

서 론

Cisplatin은 각종 암 특히 고환, 방광, 전립선 암에 널리 사용되는 항암제이나 신장 기능 손상, 위장관 장애, 골수 장애, 신경 장애 등의 부작용이 있는 것¹⁻³⁾으

본 연구는 한국과학재단 기초의학 연구센터 사업지원으로 수행되었음 (R13-2002-028-01003-0) (2002).

접수: 2003년 9월 30일, 승인: 2003년 11월 27일

책임 저자: 문교철 대구광역시 중구 동산동 194

계명대학교 의과대학 생화학교실

Tel : 053)250-7786, Fax : 053)252-1605

E-mail : mun@dsmc.or.kr

로 알려져 있다. 이러한 cisplatin에 의한 부작용 중 신장 기능 손상 기전은 cisplatin이 활성산소를 생성하여 초래하는 것¹⁻³⁾으로 알려져 있다.

사람의 눈 뒤쪽, 뇌의 중심부에 위치하는 옥수수 알갱이 크기의 송파선은 melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine)을 분비하며 melatonin은 세로토닌에서 5-메톡실화와 N-아세틸화에 의해 합성된다^{4, 5)}. Melatonin의 기능은 잘 알려져 있지 않았으나, 최근 들어 우리 몸에서 다양한 역할을 한다는 것이 밝혀지고 있다. 특히 세포 내에서 항산화제로 작용하여 활성산소로 인한 신체의 손상을 예방하거나 감소

시킬 수 있으며 신체의 모든 세포에 침투할 수 있고 천연적인 항산화제 가운데 가장 강력하다^{4,5)}고 알려져 있다. Melatonin은 safrole과 같은 발암성 화학물질에 의한 DNA 손상, 방사선에 의한 손상 및 paraquat나 세균의 lipopolysaccharide에 의한 지질 파산화 등을 방지하며 활성산소에 의한 백내장 형성 억제 작용도 있는 것⁴⁾으로 알려져 있다. 이와 같이 강력한 항산화제로 알려진 melatonin은 또한 항산화 효소들의 활성을 증가⁶⁾시킬 뿐만 아니라 수산화 radical을 제거⁴⁾하는 것으로 보고되고 있으므로 cisplatin에 의한 손상을 방지할 수 있을 것으로 생각된다.

이 연구는 송파체 hormone인 melatonin이 cisplatin에 의한 신장 손상을 어느 정도 막을 수 있는지를 알아보고 그 기전을 이해하기 위하여 흰쥐에게 cisplatin과 melatonin을 투여한 후 활성산소 대사의 변동과 광학 현미경 관찰에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 동물 및 처치

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 320~360 g이 되는 Sprague-Dawley 종의 숫 흰쥐를 사용하였으며 다음과 같이 총 3군으로 나누었다. 대조군(제 1군, n=6)은 12시간 금식시킨 후 5% ethanolic saline 용액 4 mL와 생리식염수 1 mL를 복강 내로 주입하였다. Cisplatin 투여군(제 2군, n=11)은 Rybak 등¹⁾의 방법에 따라 쥐를 12시간 금식시킨 후 5% ethanolic saline 용액 4 mL과, 체중 kg 당 16 mg의 cisplatin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 생리식염수 1 mL에 녹여 복강 내로 주사하였다. Cisplatin과 melatonin을 투여한 melatonin 투여군(제 3군, n=10)은 12시간 금식시킨 후 Floreani 등⁷⁾의 방법에 따라 5% ethanolic saline 용액 4 mL에 melatonin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 체중 kg 당 5 mg이 주입되도록 녹인 액을 복강 내 주사하고, 체중 kg 당 16 mg의 cisplatin을 생리식염수 1 mL에 녹여 복강 내로 주사하였다.

최초 주사 72시간 후, 제 1군과 제 2군은 5% ethanolic saline 용액 4 mL을 주사하고 제 3군은 5% ethanolic saline 용액 4 mL에 melatonin을 체중 kg 당 5 mg이 주입되도록 녹인 액을 다시 복강 주사하였다. 최초의 주사 6일 후 쥐를 회생시켜 신장을 적

출한 후 적출한 신장을 각종 측정 시료로 사용하였다. 각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건에서 물과 사료 (삼양사, Korea)를 자유로이 공급하였다.

2. 시료채취

최초 주사 6일 후 ether 마취하에서 복부대동맥으로부터 혈액을 채취하여 쥐를 실혈사시키고 신장을 적출하였다. 채혈한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 혈청을 얻어 BUN 및 creatinine 측정용 시료로 사용하였다. 그리고 적출한 신장의 일부는 면포로 균등히 압박하여 신장에 남아 있던 혈액을 가능한 한 모두 제거한 후 즉시 2-4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 9배량의 0.25 M sucrose액을 넣은 다음 teflon pestle glass homogenizer (Wheaton Scientific, Milville, NJ, USA)로 10% (w/v)의 신장 균질액을 만들었다. 이 균질액의 일부를 쥐하여 파산화수소 농도, malondialdehyde 농도, catalase 활성도 측정용 시료로 사용하였다. 신장 균질액 나머지 일부는 10,000×g에서 1시간 원심분리하여 얻은 상청액을 superoxide dismutase 활성도 및 glutathione peroxidase 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

3. BUN 및 creatinine의 농도 측정

BUN 및 creatinine의 측정은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)의 kit를 사용하였다.

4. Creatinine 청소 (clearance) 측정

쥐를 개별 분리 수용한 후 24시간 소변을 받아 creatinine의 농도를 측정하였다. Creatinine 청소의 계산은 '요 중 creatinine 농도×요량/혈청 중 creatinine 농도'의 방법으로 계산하였다.

5. 파산화수소의 농도 측정

파산화수소의 측정은 ferrous 이온이 산성 조건에서 파산화수소에 의해 ferric 이온이 된 후 xylenol orange와 결합하여 생성하는 화합물을 560 nm에서 측정하는 xylenol orange hydrogen peroxide 측정법⁸⁾을 사용하여 측정하였다.

6. Malondialdehyde의 농도 측정

Malondialdehyde 농도의 측정은 malondialdehyde 가 thiobarbituric acid와 반응할 때 나타나는 붉은 색을 535 nm에서 측정하는 thiobarbituric acid assay 방법⁹⁾에 의하였다. 즉, 시료를 0.25 N 염산에 0.375% 의 thiobarbituric acid와 15% trichloroacetic acid를 함유한 시약과 혼합하고, 반응액을 100°C 수용액 중에서 15분간 방치한 후 3,000×g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 535 nm에서 측정하였다. 시료 중 malondialdehyde 농도는 분자 흡광계수 1.56×105 M⁻¹ cm⁻¹을 사용하여 계산하였다.

7. Superoxide dismutase의 활성도 측정

Superoxide dismutase 활성도 측정은 xanthine oxidase를 superoxide anion 발생 system으로 사용하여 nitroblue tetrazolium을 환원시키는 양을 측정하는 Sun 등¹⁰⁾의 방법을 사용하였으며 이 효소 1 unit는 효소액을 넣지 않는 반응액 중의 nitroblue tetrazolium의 환원을 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

8. Catalase의 활성도 측정

Catalase 활성도의 측정은 과산화수소를 기질로 사용하여 25°C에서 30초 반응시키는 동안에 240 nm 파장에서 과산화수소가 환원되어 감소하는 흡광도로써 효소 활성도를 측정하는 Nelson과 Kiesow¹¹⁾의 방법에 의했으며 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질 혹은 1 mL의 혈청이 반응하여 환원시킨 과산화수소 양으로 나타내었다.

9. Glutathione peroxidase의 활성도 측정

Glutathione peroxidase의 활성도 측정은 환원형 glutathione, 과산화수소 및 NADPH를 기질로 사용하고 glutathione reductase를 촉매로 하여 시료액과 함께 25°C에서 5분간 반응시키는 동안에 환원형 glutathione이 과산화수소에 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 scan을 하여 NADPH의 분자 흡광계수 ($E_{340\text{ nm}}=6.22\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)를 이용하여

효소의 활성도를 산출하는 Paglia와 Valentine¹²⁾의 법에 의하였다. 이 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질 혹은 1 mL의 혈청이 반응하여 생성된 NADP⁺ 량으로 나타내었다.

10. 광학현미경 검사

광학현미경적 검색을 위한 시료는 적출된 흰쥐의 신장을 10% 중성 포르말린에 고정하고 탈수 및 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 5 μm의 박절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

11. 단백질 정량

효소 시료 중의 단백질 정량은 0.5 mol/L perchloric acid와 methanol-ether 혼합액 (3:1)으로 단백질을 정제한 후 biuret법으로 정량하였다.

12. 성적 검정

자료는 평균±표준편차로 표시하고, 실험군 사이의 비교는 Student's t-test로 하였으며 통계학적 유의수준은 p값이 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1. 혈청 BUN의 농도

제 1군에서 BUN의 농도는 $21.51\pm7.47\text{ mg/dL}$ 이었으며, 제 2군은 $474.93\pm70.33\text{ mg/dL}$ 로 제 1군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다 ($p<0.001$). 제 3군에서는 $340.68\pm16.96\text{ mg/dL}$ 로 제 1군에 비해서는 유의한 증가를 나타내었으나 ($p<0.001$) 제 2군에 비해서는 유의한 감소를 나타내었다 ($p<0.05$) (Table 1).

2. 혈청 creatinine의 농도

제 1군에서 creatinine의 농도는 $0.66\pm0.20\text{ mg/dL}$ 이었으며, 제 2군은 $21.30\pm7.78\text{ mg/dL}$ 로 제 1군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다 ($p<0.001$). 제 3군에서는 $13.07\pm9.21\text{ mg/dL}$ 로 제 1군에 비해서는 유의한 증가를 나타내었으나 ($p<0.01$) 제 2군에 비해서는 유의한 감소를 나타내었다 ($p<0.05$) (Table 1).

Table 1. Parameters for Kidney Function

	BUN	Creatinine	Creatinine clearance
Group 1	21.51±7.47	0.66±0.20	0.25±0.04
Group 2	474.93±70.33 [†]	21.30±7.78 [†]	0.08±0.06 [†]
Group 3	340.68±16.96 ^{*,†}	13.07±9.21 ^{*,†}	0.14±0.13

Group 1 (n=6) : normal control group; Group 2 (n=11) : cisplatin (16 mg/kg, i.p.) treated group; Group 3 (n=10) : cisplatin (16 mg/kg, i.p.) and melatonin (10 mg/kg, i.p.) treated group. i.p. : intraperitoneal injection

*p<0.01 vs. group 1; [†]p<0.001 vs. group 1; *p<0.05 vs. group 2

3. Creatinine 청소

제 1군에서 creatinine 청소는 0.25±0.04 mL/min 이었으며, 제 2군은 0.08±0.06 mL/min으로 제 1군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다 (p<0.001). 제 3군에서는 0.14±0.13 mL/min으로 제 1군 및 제 2군에 비해 유의한 변화가 없었다 (Table 1).

4. 신장 균질액에서 과산화수소의 농도

제 1군에서 과산화수소의 농도는 6.26±0.90 nmol H₂O₂/mg protein이었으며, 제 2군은 7.53±2.61 nmol H₂O₂/mg protein으로 제 1군에 비해 증가하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 제 3군은 5.67±2.21 nmol H₂O₂/mg protein으로 제 2군에 비해 약간 감소하였으나 통계학적인 유의성은 없었다 (Fig. 1).

5. 신장 균질액에서 Malondialdehyde 농도

제 1군에서 malondialdehyde의 농도는 1.39±0.10 nmol/mg protein이었으며, 제 2군은 2.51±0.54 nmol/mg protein으로 제 1군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다 (p<0.001). 제 3군은 1.99±0.41 nmol/mg protein으로 제 1군에 비해서는 유의한 증가를 보였으나 (p<0.01), 제 2군에 비해서는 유의한 감소를 보였다 (p<0.05) (Fig. 2).

6. 신장 세포질에서 superoxide dismutase의 활성도

제 1군에서 superoxide dismutase 활성도는 0.89±0.07 unit/min/mg protein이었으며, 제 2군은 1.24±0.13 unit/min/mg protein으로 제 1군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다 (p<0.001). 제 3군은 1.35±0.09

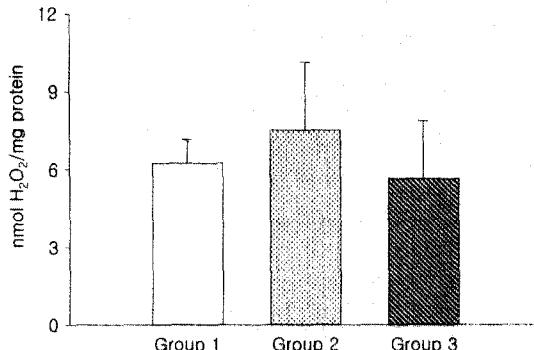


Fig. 1. Hydrogen peroxide levels. Group 1 (n=6) : normal control group; group 2 (n=11) : cisplatin (16 mg/kg, i.p.) treated group; group 3 (n=10) : cisplatin (16 mg/kg, i.p.) and melatonin (10 mg/kg, i.p.) treated group. i.p. : intraperitoneal injection.

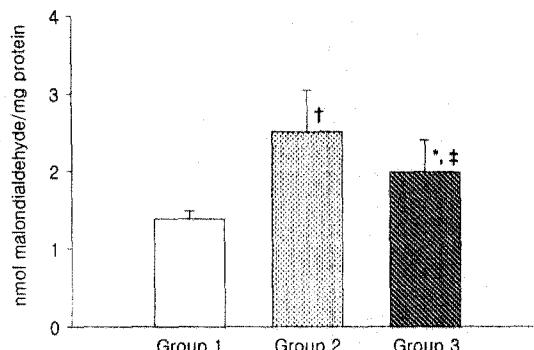


Fig. 2. Malondialdehyde levels. Group 1 (n=6) : normal control group; Group 2 (n=11) : cisplatin (16 mg/kg, i.p.) treated group; group 3 (n=10) : cisplatin (16 mg/kg, i.p.) and melatonin (10 mg/kg, i.p.) treated group. i.p. : intraperitoneal injection. *p<0.01 vs. group 1; [†]p<0.001 vs. group 1; ^{*}p<0.05 vs. group 2.

unit/min/mg protein으로 제 1군 (p<0.001) 및 제 2군 (p<0.05)에 비해 각각 유의한 증가를 나타내었다 (Fig. 3).

7. 신장 균질액에서 catalase의 활성도

제 1군에서 catalase 활성도는 34.32±12.23 μmol H₂O₂/min/mg protein이었으며, 제 2군은 15.88±5.81 μmol H₂O₂/min/mg protein으로 제 1군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다 (p<0.01). 제 3군은 22.32±8.15 μmol H₂O₂/min/mg protein으로 제 1군에 비해 유의한 감소를 나타내었으나 (p<0.05), 제 2군에 비해

— 최해정 외 8인 : Melatonin이 Cisplatin에 의한 신장 독성에 미치는 영향 —

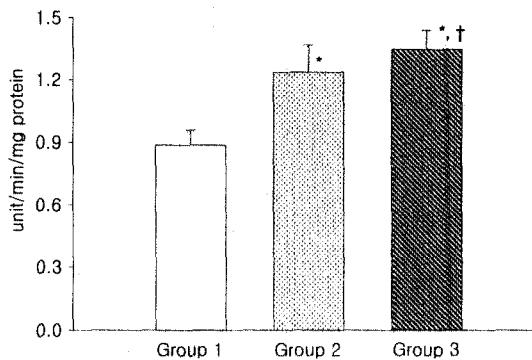


Fig. 3. Superoxide dismutase activity. Group 1 ($n=6$): normal control group; group 2 ($n=11$): cisplatin (16 mg/kg, i.p.) treated group; group 3 ($n=10$): cisplatin (16 mg/kg, i.p.) and melatonin (10 mg/kg, i.p.) treated group. i.p.: intraperitoneal injection. * $p<0.001$ vs group 1; † $p<0.05$ vs. group 2.

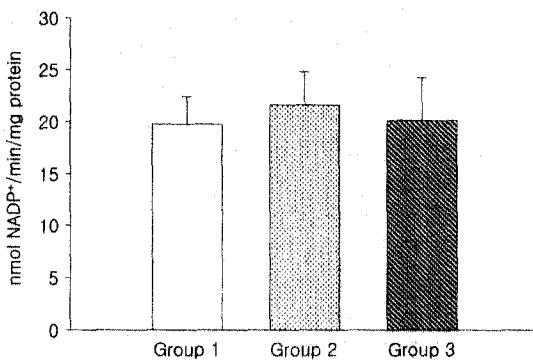


Fig. 5. Glutathione peroxidase activity. Group 1 ($n=6$): normal control group; group 2 ($n=11$): cisplatin (16 mg/kg, i.p.) treated group; group 3 ($n=10$): cisplatin (16 mg/kg, i.p.) and melatonin (10 mg/kg, i.p.) treated group. i.p.: intraperitoneal injection.

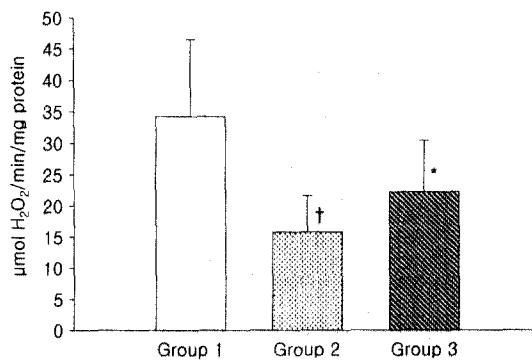


Fig. 4. Catalase activity. Group 1 ($n=6$): normal control group; group 2 ($n=11$): cisplatin (16 mg/kg, i.p.) treated group; group 3 ($n=10$): cisplatin (16 mg/kg, i.p.) and melatonin (10 mg/kg, i.p.) treated group. i.p.: intraperitoneal injection. * $p<0.05$ vs. group 1; † $p<0.01$ vs. group 1.

서는 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 4).

8. 신장 세포질에서 glutathione peroxidase의 활성도

제 1군에서 glutathione peroxidase 활성도는 19.81 ± 2.65 nmol NADP+/min/mg protein이었으며, 제 2군은 21.68 ± 3.13 nmol NADP+/min/mg protein, 제 3군은 20.19 ± 4.09 nmol NADP+/min/mg protein으로 제 1군 및 제 2군에 비해 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 5).

9. 광학현미경 소견

제 1군에서의 사구체 (glomerulus) 및 근위 곱슬 세관 (proximal convoluted tubule)은 특이한 변화를 나타내지 않았다. 제 2군에서는 사구체는 특이한 변화가 없었으나, 근위 곱슬 세관은 심한 파사를 나타내었다. 제 3군은 사구체는 특이한 변화가 없었으며, 근위 곱슬 세관은 중등도의 파사를 나타내었으며 제 2군보다 경한 변화를 보였다 (Fig. 6).

고 찰

활성산소에 의한 손상에 대하여 인위적으로 활성산소의 발생을 차단하기 위한 각종 노력이 시도되고 있다. 예를 들면 항산화 효과가 있다고 알려진 vitamin을 사용한 실험이 행하여지고 있으며^{13, 14}, calcium 이온 차단제인 verapamil은 calcium 이온의 세포내로의 이동을 차단하여 xanthine dehydrogenase에서 xanthine oxidase로의 전환을 차단하여 활성산소 발생을 줄임으로 이를 이용하려는 시도도 있다^{15, 16}. 또한 allopurinol은 xanthine oxidase의 활성을 억제하는 것으로 알려져 이를 이용하여 활성산소 발생을 줄이려는 노력¹⁷도 행하여지고 있다. 최근에는 melatonin이 활성산소를 직접 처리하면서 항산화 효소들의 활성을 자극한다는 보고가 있어 이를 이용한 연구^{18, 19}도 시행되고 있다.

각종 암에 널리 사용되는 항암제인 cisplatin은 신

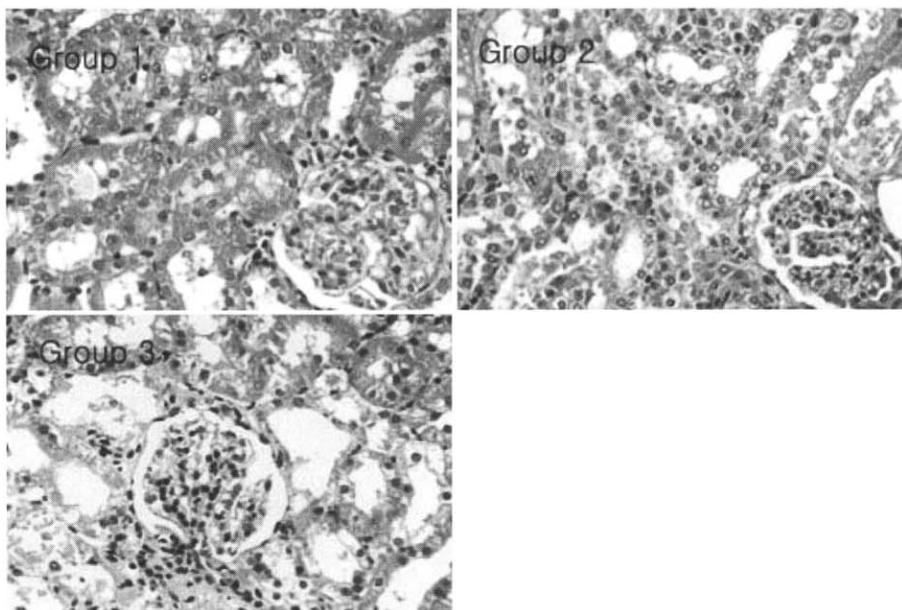


Fig. 6. Light microscopic findings in the each group. Group 1 ($n=6$): normal control group; group 2 ($n=11$): cisplatin (16 mg/kg, i.p.) treated group; group 3 ($n=10$): cisplatin (16 mg/kg, i.p.) and melatonin (10 mg/kg, i.p.) treated group. i.p.: intraperitoneal injection. Group 1: Well preserved renal tubules and glomeruli are noted; group 2: The glomerulus was well preserved. Proximal convoluted tubules exhibit severe tubular necrosis; group 3: Mild tubular necrosis was seen within the proximal tubules (hematoxylin-eosin, $\times 400$).

장 기능 손상, 위장관 장애, 골수 장애 및 신경 장애 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다¹⁻³⁾. 이러한 cisplatin에 의한 부작용, 특히 신장 기능 손상은 cisplatin에 의한 활성산소 생성에 기인하는 것으로 알려져 있다¹⁻³⁾. 따라서 본 연구는 항산화제인 melatonin이 cisplatin에 의한 신부작용을 감소시킬 수 있는지를 알아보기 위하여 수행하였다.

신장 기능을 반영하는 혈청 BUN, creatinine 농도 및 creatinine 청소 실험결과, 제 1군에 비해 제 2군에서는 신장 기능이 감소되어 있었으나 제 3군에서는 제 2군에 비해 신장 기능의 감소 정도가 적었다. 활성산소의 하나인 과산화수소 생성량과 활성산소로 인한 손상 표지자인 malondialdehyde 농도도 제 2군에서 제 1군에 비해 증가되었고 제 3군에서는 그 양들이 감소되었다.

Superoxide dismutase 활성도는 제 1군에 비해 제 2군에서 증가되고, catalase 활성도는 제 1군에 비해 제 2군에서 감소되었다. Ichikawa 등²⁰⁾에 따르면 superoxide dismutase의 활성도 증가는 과산화수소

의 증가를 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 제 2군에서 superoxide dismutase 활성도 증가와 catalase의 활성 저하는 과산화수소의 증가를 초래하며 이로 인해 조직 손상이 초래되는 것으로 생각된다. 제 3군에서 superoxide dismutase의 활성도는 제 2군에 비해 증가되나 catalase의 활성도 증가도 동반되었다. 이는 제 3군에서 활성산소로 인한 손상을 줄이는 하나의 요인이 되리라 생각된다. 그리고 melatonin이 superoxide dismutase와 catalase의 활성을 자극하는 것⁶⁾으로 알려져 있는 만큼 제 3군에서 이들 효소의 활성도 증가의 일부 원인은 melatonin에 기인된 것으로 생각된다. 한편 과산화수소 처리 효소의 하나인 glutathione peroxidase 활성도는 변화가 없었는데, 이에 대한 연구 및 superoxide dismutase와 catalase 활성변동의 원인에 대한 연구는 추후 필요한 것으로 생각된다.

또한 광학현미경 소견을 보면 제 2군에서는 사구체는 특이한 변화가 없었으나, 근위 곱슬 세관은 심한 괴사를 나타내었고, 제 3군은 근위 곱슬 세관은 중등

도의 괴사를 나타내었으며 제 2군보다 경한 변화를 보였다. 이는 cisplatin으로 인해 신체 전반에 걸쳐서 뿐만 아니라 신장에서도 과산화수소와 같은 활성산소의 생성이 증가되어 이로 인한 지질과산화의 표지자(marker)인 malondialdehyde가 증가되고, 이는 신장 손상으로 이어져 BUN과 혈중 creatinine 농도의 증가와 creatinine 농도의 감소를 유발하여 형태학적 변화로 이어진 것으로 생각된다. Cisplatin과 melatonin 을 투여했을 때는 이러한 변화들이 정상화되거나 감소하는 것으로 봐서 melatonin은 cisplatin에 의한 손상을 줄일 수 있는 것으로 생각된다.

이상 문헌적 고찰과 실험 결과로 유추해 볼 때 cisplatin은 신장에서 superoxide dismutase 활성 증가와 catalase의 활성을 저하시켜 과산화수소의 생성을 유도하여 신장 손상을 유발하는 것으로 생각되며, melatonin은 superoxide dismutase와 catalase의 활성 증가를 유도하여 cisplatin에 의해 유발된 활성산소에 의한 신장 손상을 줄이는 것으로 생각된다.

= Abstract =

Protective Effect of Melatonin on the Nephrotoxicity by Cisplatin

Hye-Jung Choi, M.S.*[†], Young-Ho Shin, M.D.*[†]
Kyo-Cheol Mun, M.D.*[†], Dae-Kyu Song, M.D.*[†]
In-Cheol Kim[†], Sang-Hyuck Seo, M.D.*[†]
Chun-Sik Kwak, Ph.D.*[†]
Eun-Ju Chang, Ph.D.*[†]
and Hyun-Chul Kim, M.D.*[†]

Chronic Disease Research Center*, Dong San
Kidney Institute[†], Medical School Student[†],
Keimyung University School of Medicine,
Taegu, Korea

Background : Cisplatin (CP), an antitumor agent widely used in the treatment of cancers, has nephrotoxicity. This side effect is closely related to oxidative stress. In the present study, we attempted to reduce CP-induced nephrotoxicity in rats by administering melatonin, an antioxidant.

Methods : Male Sprague-Dawley rats were divided into different groups and were treated as follows: (1) saline control; (2) CP (16 mg/kg, i.p.); (3) CP plus melatonin (10 mg/kg, i.p.). The rats were sacrificed at the 6th day after CP treatment. To evaluate renal damage, BUN, serum creatinine, creatinine clearance and microscopic examination were done.

Hydrogen peroxide which is one of the oxygen free radicals, and malondialdehyde which is known as a marker of the oxygen free radical mediated injury, and the activities of the antioxidant enzymes such as superoxidedismutase, catalase, and glutathione peroxidase were also measured.

Results : CP-treated rats showed the increase of BUN, serum creatinine, malondialdehyde, hydrogen peroxide and superoxide dismutase (SOD) in kidney. And CP-treated rats also showed the decrease of creatinine clearance and catalase levels. CP-treated rats showed severe tubular necrosis in proximal convoluted tubules under the light microscopic examination. The light microscopic finding and all of the parameters except SOD were restored in the rats injected with CP plus melatonin than those with CP alone. SOD level was higher in the rats injected with CP plus melatonin than that with CP alone.

Conclusion : These results suggest that melatonin suppresses CP-induced nephrotoxicity by suppressing the production of reactive oxygen species via the activation of SOD and catalase. (Korean J Nephrol 2004;23(2):205-212)

Key Words : Melatonin, Nephrotoxicity, Cisplatin, Oxidative stress

참 고 문 헌

- 1) 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* 47:195-202, 1999a
- 2) Rybak LP, Whitworth C, Somani S : Application of antioxidants and other agents to prevent cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope* 109:1740-1744, 1999
- 3) Teranishi M, Nakashima T, Wakabayashi T : Effects of alpha-tocopherol on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Hear Res* 151:61-70, 2001
- 4) Reiter RJ : Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 9:526-533, 1995
- 5) Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W : Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 34:237-256, 2001
- 6) Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS : Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 29:363-372, 1997
- 7) Floreani M, Skaper SD, Facci L, Lipartiti M,

- Giusti P : Melatonin maintains glutathione homeostasis in kainic acid-exposed rat brain tissues. *FASEB J* 11:1309-1315, 1997.
- 8) Bleau G, Giasson C, Brunette I : Measurement of hydrogen peroxide in biological samples containing high levels of ascorbic acid. *Anal Biochem* 263:13-17, 1998.
- 9) Buege JA, Aust SD : Microsomal lipid peroxidation. In Colowick SP, Kaplan NO (Eds) : Methods in Enzymology. Vol 52. New York, Academic Press, 1978, p302-310.
- 10) Sun Y, Oberley LW, Li Y : A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34:497-500, 1988.
- 11) Nelson DP, Kiesow LA : Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in UV). *Anal Biochem* 49:474-478, 1972.
- 12) Paglia DE, Valentine WN : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169, 1967.
- 13) Bilgin-Karabulut A, Ademoglu E, Aydin I, Erer M, Gokkusu C : Protective effects of vitamins A and E pretreatment in venous ischemia/reperfusion injury. *J Reconstr Microsurg* 17:425-429, 2001.
- 14) Rhoden EL, Pereira-Lima L, Teloken C, Lucas ML, Bello-Klein A, Rhoden CR : Beneficial effect of alpha-tocopherol in renal ischemia-reperfusion in rats. *Jpn J Pharmacol* 87:164-166, 2001.
- 15) Ishii K, Suita S, Sumimoto H : Effect of verapamil on conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat liver. *Res Exp Med (Berl)* 190:389-399, 1990.
- 16) Nauta RJ, Tsimoyannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A : The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 213:137-142, 1991.
- 17) Bor MV, Durmus O, Cayci B, Turkozkan N : An alternative parameter for monitoring the therapeutic benefits of allopurinol simultaneously in renal ischaemia-reperfusion injury : MDA/ATP Ratio. *Cell Biochem Funct* 18:229-234, 2000.
- 18) Mun KC, Suh SI : Effect of melatonin on renal function in cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 32:1919-1920, 2000.
- 19) Kim YH, Lee SH, Mun KC : Effect of melatonin on antioxidant status in the plasma of cyclosporine-treated rats. *Transplant Proc* 34:2652-2653, 2002.
- 20) Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T : Renal antioxidant enzymes : their regulation and function. *Kidney Int* 45:1-9, 1994.