

## 한라돌쩌귀로부터 분리된 Dopaoal $\beta$ -D-glucoside의 신장독성 보호효과

노종현 · 정자균 · 정호경 · 장지훈 · 정다은 · 이기호 · 김아현 · 성태경 · 박 호 · 조현우<sup>†</sup>  
한약진흥재단

### Protective Effect of Dopaoal $\beta$ -D-glucoside Isolated from East Asian Monk'shood on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity

Jong Hyun Nho, Ja Kyun Jung, Ho Kyung Jung, Ji Hun Jang, Da Eun Jung, Ki Ho Lee,  
A Hyeon Kim, Tae Kyoung Sung, Ho Park and Hyun Woo Cho<sup>†</sup>

National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

#### ABSTRACT

**Background:** Cisplatin is one of the most extensively used chemotherapeutic agents for the treatment of cancer, including bladder, and ovarian cancers. However, it has been shown to induce nephrotoxicity, despite being an outstanding anti-cancer drug. In this study, we investigated the protective effect of dopaoal  $\beta$ -D-glucoside (dopaoal) on cisplatin-induced nephrotoxicity.

**Methods and Results:** To confirm the protective effect of dopaoal on cisplatin-induced nephrotoxicity, HK-2 cells were treated with 20  $\mu$ M cisplatin and 80  $\mu$ M dopaoal. Cisplatin increased apoptosis, caspase-3 activity and mitochondrial dysfunction; however pre-treatment with 80  $\mu$ M dopaoal successfully attenuated apoptosis, caspase-3 activity and mitochondrial dysfunction. To evaluate the protective effect dopaoal on cisplatin-induced nephrotoxicity *in vivo*, we used an animal model (balb/c mice, 20 mg/kg, i.p. once/day for 3 day). The results were similar to those obtained using HK-2 cells; renal tubular damage and neutrophilia induced by cisplatin reduced following dopaoal injection (10 mg/kg, i.p. once/day for 3 day).

**Conclusions:** These results indicate that dopaoal treatment reduced cisplatin-induced nephrotoxicity *in vitro* and *in vivo*, and can be used to treat cisplatin-induced nephrotoxicity. However, further studies are required to determine the toxicity high dose dopaoal and the signal pathways involved in its mechanism of action in animal models.

**Key Words:** *Aconitum japonicum* subsp. *nipiforme* (H. Lév. & Vaniot) Kadota, Cisplatin, Dopaoal  $\beta$ -D-Glucoside, HK-2, Nephrotoxicity

#### 서 언

우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 암환자의 수는 매년 증가되고 있는 추세이며, 항암 치료를 위해 항암제와 면역치료제 같은 다양한 약물이 사용되고 있다 (Dranitsaris *et al.*, 2011). 항암효과를 가진 대부분의 항암제들은 이로운 효과와 함께 심장독성, 신장독성, 간독성과 같은 심각한 부작용이 나타난다고 알려져 있다 (Leibundgut *et al.*, 2007).

Cisplatin [CDDP, cis-diamminedichloroplatinum (II)]은 여러 세포에서 세포 주기 중 G<sub>2</sub> phase (DNA 합성기)를 억제하

여 세포자멸사 (apoptosis)를 유도하는 물질이며, 암 치료를 위한 항암제로 사용되고 있다 (Hanigan and Devarajan, 2003; Ju *et al.*, 2008; Schrier, 2002). 하지만 cisplatin은 이로운 효과와 함께 이독성 (Kim *et al.*, 2010), 신장독성 그리고 신경독성과 같은 강한 부작용이 함께 수반된다 (Kim *et al.*, 2011; So *et al.*, 2008). 따라서 cisplatin의 부작용을 최소화시키면서 항암효능을 증가시킬 수 있는 천연소재의 탐색과 연구가 필요한 실정이다.

MST (mammalian sterile 20-like kinase)는 Ser/Thr kinase 로써 기능하는 단백질로 kinase domain과 regulatory domain

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-61-860-2873 (E-mail) thej01234@gmail.com

Received 2017 June 26 / 1st Revised 2017 July 20 / 2nd Revised 2017 August 16 / 3rd Revised 2017 August 24 / Accepted 2017 August 24

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

을 포함하고 있다 (Ling *et al.*, 2008). MST family는 대부분 조직에서 발현되는데, MST-1은 주로 신장, 골격근에서 많이 발현되고 있다 (Creasy and Chernoff, 1995). MST-1의 여러 가지 기능 중, apoptosis를 유도하기 위한 단계로 아미노산 서열인 Thr<sup>183</sup>과 Thr<sup>187</sup>의 자가인산화 (autophosphorylation) 그리고 caspase-3에 의한 조절이 필요하며, caspase-3에 의해 잘려진 MST-1은 활성화되어 핵으로 들어가게 되고 핵 내에 존재하는 히스톤단백질을 인산화 시킴에 따라 염색상 응축 (chromatin condensation)과 DNA단편화 (DNA fragmentation)를 유도하여 세포사멸이 일어나도록 한다고 알려져 있다 (Minoo *et al.*, 2007).

2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-ethyl-O-β-D-glucopyranoside (dopaol β-D-glucoside)는 정제천연물질인 배당체로써, 어성초 (*Houttuynia cordata*), 호황련 (*Picrorhiza scrophulariiflora*), 벚나무 껍질 (*Prunus grayana*)에 포함되어 있는 물질로 보고 되어있다 (Ahn and Kim, 2016; Wang *et al.*, 2004). 현재 이 물질은 바나나 잎에서, 사상균병의 일종이며 *Mycosphaerella fijiensis*에 의해 일어나는 검정시가토카 병(black sigatoka)에 대한 항진균 효과가 있다고 알려져 있지만 (Hidalgo *et al.*, 2016), 생리활성 수준에서 어떤 효과가 나타나는지는 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구는 cisplatin에 의해 유발된 신장독성 모델에 dopaol β-D-glucoside를 처리 또는 투여하여 신장독성 억제 효과가 있는지 조사해보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

실험에 사용된 dopaol β-D-glucoside는 한라돌쩌귀 [*Aconitum japonicum* subsp. *napiforme* (H. Lév. & Vaniot) Kadota] 진초에서 분리된 천연분리물질이며 한약진흥재단 (National Development Institute of Korean Medicine, NIKOM) 천연물 물질은행 (NPBANK, Gyung-san, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

### 2. 세포배양

실험에 사용된 HK-2 세포 (human kidney proximal tubule cell)는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. PRMI 1640 배지 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% penicilin/streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 3. 실험동물 사육

실험동물은 BALB/C mice 6 주령 수컷을 샘타코 (Samtako

Inc., Osan, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 온도 20±2°C, 습도 55±5%, 12 시간 명암조건에서 사육하였다. 실험동물은 구입 후 1 주일 동안 순화한 다음, 각 군당 7 마리를 배치하여 실험군을 분류하였다. 정상대조군, cisplatin 단독 투여군, cisplatin + dopaol β-D-glucoside 투여군으로 군을 분리하였다. 정상대조군을 제외한 모든 군에 20 mg/kg 용량의 cisplatin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 3 일 동안 24 시간 주기로 복강투여 하여 신장독성을 유발하였고, cisplatin 복강투여 30 분 후에 dopaol β-D-glucoside를 10 mg/kg 용량으로 복강투여 하였다.

### 4. MTS assay

세포생존율은 CellTiter 96® aqueous one solution Cell proliferation assay kit (Promega Co., Madison, WI, USA)를 사용하였으며, 제조사의 프로토콜에 따라서 측정하였다. HK-2 세포를 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml 농도가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% 배양기에서 24 시간 배양한 후 dopaol β-D-glucoside를 각각 10, 20, 40 그리고 80 μM 농도로 24 시간 동안 처리하여 천연분리물질에 대한 자체 독성을 조사하였고 이와 같은 농도로 1 시간 동안 전 처리한 뒤 20 μM cisplatin을 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 뒤 MTS 시약 20 μl를 넣고 2 시간 동안 배양한 후 microplate reader infinite® 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포생존율은 정상대조군에 대한 생존율로 표시하였다.

### 5. TUNEL assay

TUNEL 염색은 DeadEnd™ fluorometric TUNEL system (Promega Co., Madison, WI, USA)을 사용하였으며, 제조사의 프로토콜에 따라서 수행하였다. HK-2 세포를 12 well plate에서 cover slip 위에 2×10<sup>5</sup> cells/ml 농도가 되도록 분주한 뒤, 37°C, 5% 배양기에서 24 시간 배양했다. 배양된 세포는 80 μl dopaol β-D-glucoside를 1 시간 동안 전 처리한 뒤 20 μM cisplatin을 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 10% neutralized buffered formalin (NBF)로 4°C에서 20 분 동안 고정하였고, phosphate buffered saline (PBS)로 2 번 씻어주었다. 다음 0.2% triton X-100 in PBS 용액으로 5 분간 투과화한 뒤 PBS로 2 번 씻어주었다. 남은 액체가 없도록 모두 제거하고 equilibration buffer를 5 분간 처리하였으며 100 μl rTdT incubation buffer를 처리하고 37°C에서 60 분 동안 배양하였다. 그 후 2X SSC buffer를 처리하고, PBS로 2 번 씻은 뒤 Prolong™ gold antifade mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)로 마운트하여 Epi-fluorescence microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany)하에 관찰하였다.

## 6. Protein analysis

약물처리 후 배양이 끝난 HK-2 세포는 PBS로 세척한 뒤 Pierce™ protease and phosphatase inhibitor mini tablets (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)가 포함된 RIPA cell lysis buffer 2 (Enzo Life Science Inc., Farmingdale, NY, USA)로 1 시간 동안 용해하였다. 세포용해액은 원심분리기로 4°C, 13,000 × g 조건에서 10 분간 원심분리하였고, 단백질 농도를 Bradford assay를 이용하여 측정하였다. 총 1  $\mu$ g의 단백질 샘플을 Wes (Protein simple, San Jose, CA, USA)를 이용해 단백질을 탐지하였으며 제조사에서 제공한 protocol을 사용하였고, 1 차 항체는 cell signaling technology (CST, Danvers, MA, USA) 제품인 MST-1 (#14946S), phospho-MST thr183 (#3681S), caspase-3 (#9662), GAPDH (8884S)를 사용하였다.

## 7. Caspase-3 activity assay

Caspase-3 colorimetric detection kit (Enzo Life Science Inc., Farmingdale, NY, USA)를 이용해 실험을 진행하였다. Western blot 분석 방법에서 사용된 동일한 방법으로 세포를 용해하였고 총 20  $\mu$ g의 단백질 샘플을 사용하여 제조사가 제시한 protocol에 따라 수행하였다.

## 8. FACS analysis

Annxon V-FITC apoptosis detection kit (Enzo Life Science Inc., Farmingdale, NY, USA)을 사용하였다. HK-2 세포에 약물 처리 후 유도되는 apoptosis의 비율을 구분하기 위해 제조사의 protocol에 따라 annexin V-FITC와 propidium iodide (PI) 형광염료로 염색시켰으며, mitochondrial membrane potential (MMP)의 비율을 측정하기 위해 JC-1 Dye (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 실험을 진행하였다. 각각 형광염료로 염색된 세포는 CytoFLEX (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

## 9. 혈구 분석

Cisplatin 투여에 의해 변화되는 호중구의 비율을 분석하기 위해 IDEXX ProCyt DX hematology analyzer (IDEXX, Westbrook, ME, USA)를 사용하였다. 실험은 제조사의 protocol에 따라 진행하였으며 마우스에서 채취한 전혈을 BD Vacutainer™ glass blood collection tube with K<sub>3</sub> EDTA (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에 담아 사용하였다.

## 10. 혈청 분석

Cisplatin 투여에 의해 변화되는 blood urine nitrogen

(BUN)과 creatinine (Cre)의 양을 분석하기 위해 FUJI DRI-CHEM 4000i (Fujifilm Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다. 실험은 제조사의 protocol에 따라 진행하였으며 마우스에서 채취한 혈청을 이용해 분석하였다.

## 12. H&E 염색

신장을 적출한 뒤 10% NBF에 고정하여, 조직처리 과정을 통해 파라핀으로 포매하였다. 포매가 끝난 조직은 5  $\mu$ m 두께로 절편을 제작하였으며, Dako Mayer's hematoxylin (Agilent Technologies Inc., Santa clara, CA, USA)과 Eosin Y (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용해 염색한 뒤 광학현미경하에 관찰하였다.

## 13. 통계처리

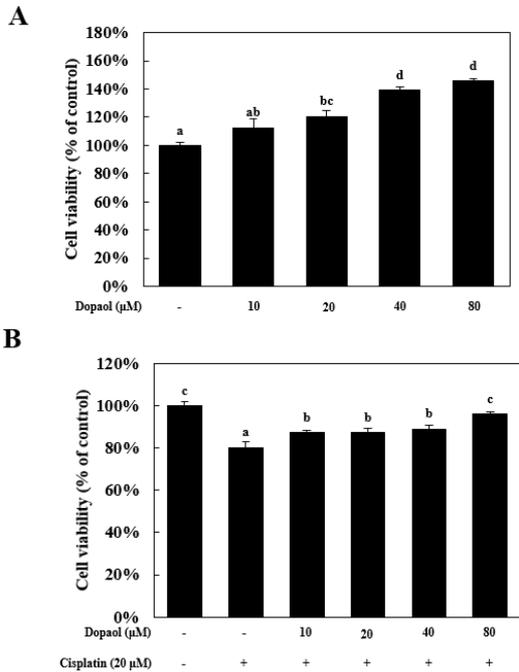
통계처리는 평균  $\pm$  표준편차 (means  $\pm$  SD)로 나타내었고, 군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 사용하였다. 일원변량분석 (One-way ANOVA)을 실시하였으며, 유의성이 있는 경우  $p < 0.05$  수준에서, Duncan's Multiple Range Test (DMRT)와 Tukey post-hoc test를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Dopaol의 세포독성 보호효과

HK-2 세포에 대한 천연분리물질의 자체적인 세포독성과 cisplatin에 대한 세포보호효과를 확인하기 위해 MTS assay를 진행하였다. Dopaol을 농도별로 24 시간 동안 처리하였을 때, 세포독성은 나타나지 않았지만 40  $\mu$ M 농도부터 비처리군에 비해 세포의 증식이 증가한 것으로 확인되었다 (Fig. 1A). 이어서 dopaol을 농도별로 처리하고 20  $\mu$ M cisplatin을 함께 처리하였을 때, cisplatin 단독처리군은 비처리군에 비해 세포생존율이 80.2  $\pm$  3.0%로 감소하였으며 80  $\mu$ M dopaol 처리군은 비처리군에 가깝게 회복되는 결과를 나타냈다 (Fig. 1B). 실험 결과를 종합하였을 때 dopaol은 HK-2 세포에 대해서 독성을 나타내지 않았다. 흥미롭게도 HK-2 세포의 증식을 증가시키는 것으로 나타났으며 cisplatin 처리에 의한 세포독성도 80  $\mu$ M 농도에서 차단되었다. Dopaol은 cisplatin으로 유도된 신장독성으로부터 농도 의존적으로 세포생존율을 회복시켜 신장독성 보호 효과가 있음을 확인하였다.

하지만 dopaol 처리에 따른 HK-2 세포의 증식에 관련된 중요 인자들을 확인하기 위해 추가적인 실험이 필요하다고 생각되며, cisplatin과 dopaol의 처리가 apoptosis와 necrosis 중 어느 기전에 영향을 미치는지 알지 못하기 때문에 다음 실험을 진행하였다.



**Fig. 1. Dopaol β-D-glucoside prevents cisplatin-induced cell death in HK-2 cells.** A; HK-2 cells were treated with dopaol β-D-glucoside for various concentration, B; after pretreatment with dopaol β-D-glucoside for various concentration, HK-2 cells were treated with 20 μM cisplatin for 24 h. Cell viability was measured by MTS assay. Means values ± SD from triplicate separated experiments are shown. \*Means with difference letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

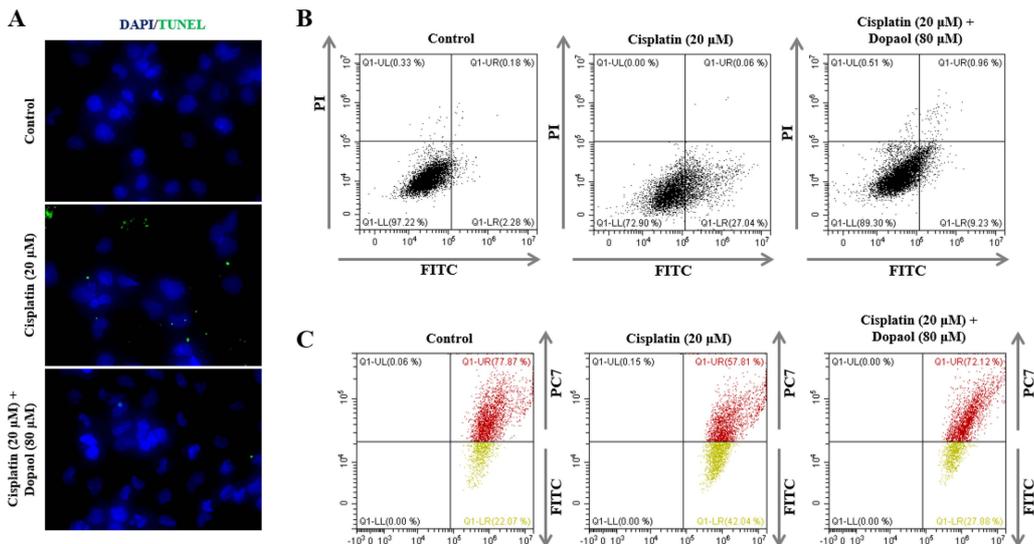
## 2. Dopaol의 apoptosis 저해효과

Dopaol이 cisplatin에 의해 유도된 세포사 중 apoptosis와 necrosis 둘 중 어느 기전을 억제하는지 알아보기 위해 몇 가지 실험을 진행하였다. TUNEL 염색은 DNA 단편화 (DNA fragmentation)를 형광 표지를 통해 시각화하는 방법으로 염증성 세포자멸사 (pyroptosis), 세포자멸사 (apoptosis) 및 세포괴사 (necrosis)를 측정하는데 많이 이용된다. Cisplatin를 HK-2 세포에 20 μM 농도로 24 시간 동안 처리하였을 때 증가하는 TUNEL signal이 dopaol을 80 μM 농도로 함께 처리하였을 때 대부분 감소되는 결과가 나타났다 (Fig. 2A).

다음으로 apoptosis와 necrosis의 비율을 측정하기 위해 annexinV-PI 염색을 통해 flow cytometry에서 측정하였다. HK-2 세포에 20 μM cisplatin을 24 시간 동안 처리했을 때 apoptosis의 비율이 27.04%까지 증가하였고 80 μM dopaol을 함께 전 처리했을 때 9.23%까지 감소되는 결과가 나타났다 (Fig. 2B).

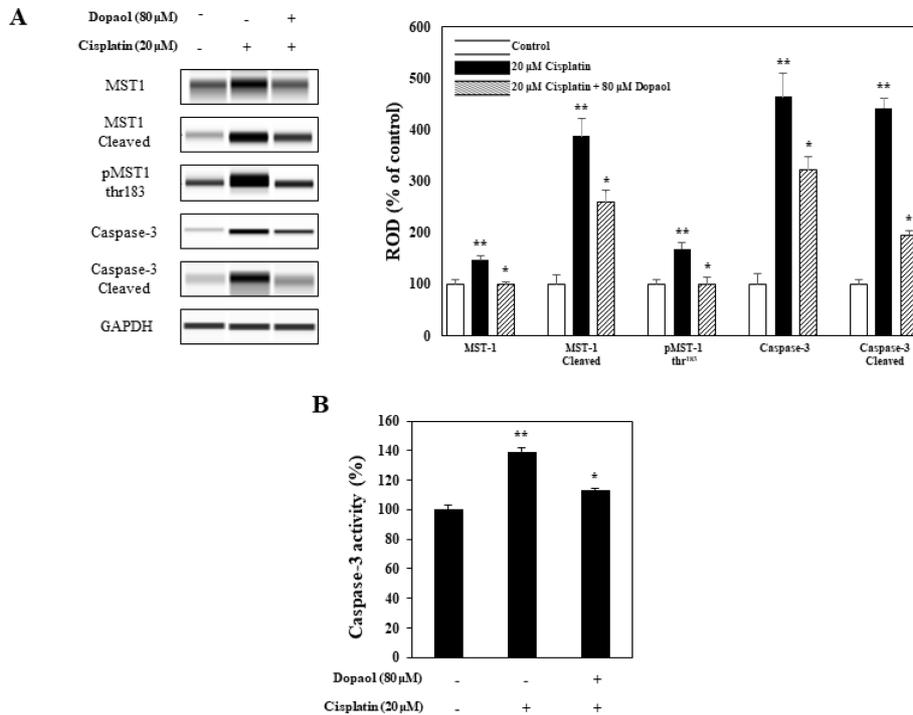
마지막으로 미토콘드리아의 활성을 측정하기 위해 JC-1 염색을 실시하였다. 미토콘드리아막전위 (MMP, mitochondrial membrane potential)는 flow cytometry를 이용해 측정하였으며, 비처리군은 red signal이 77.87%인 반면 20 μM cisplatin 처리군은 57.81%까지 감소하였고 80 μM dopaol을 함께 처리하였을 때 72.12%까지 회복되었다 (Fig. 2C).

결과를 종합하였을 때 dopaol의 처리는 cisplatin에 의해 유도된 HK-2 세포 apoptosis를 억제하는 것으로 확인될 뿐만 아니라 cisplatin에 의해 감소된 미토콘드리아의 활성 까지 회복시키는 것으로 나타났다. 미토콘드리아의 활성은 세포가



**Fig. 2. Dopaol β-D-glucoside ameliorates cisplatin-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction in HK-2 cells.** After pretreatment with 80 μM dopaol β-D-glucoside for 1 h, HK-2 cells were treated with 20 μM cisplatin for 24 h. A; HK-2 cell visualized by TUNEL assay, B; annexin V and propidium iodide staining, C; JC-1 staining were analyzed by flow cytometry. Representative images were taken from at least three independent experiments.

## Dopaol $\beta$ -D-glucoside의 신장독성 보호효과



**Fig. 3. Dopaol  $\beta$ -D-glucoside reduces cisplatin-induced caspase-3/MST-1 signaling pathway in HK-2 cells.** After pretreatment with 80  $\mu$ M dopaol  $\beta$ -D-glucoside for 1 h, HK-2 cells were treated with 20  $\mu$ M cisplatin for 24 h. Cell extracts were subjected to protein analysis using Wes and caspase-3 activity assay. Data represent the means  $\pm$  SEM of three independent experiments. Means with difference letters are significantly different at \*\* $p < 0.05$  vs. control, \* $p < 0.05$  vs. cisplatin (20  $\mu$ M).

necrosis로 진행되었을 때 과활성화 (hyperactivation) 된다고 알려져 있지만 (Shin *et al.*, 2015), 반대로 apoptosis로 진행되었을 때 감소된다 (Gottlieb *et al.*, 2003). 이는 dopaol이 necrosis가 아닌 apoptosis 기전을 억제하는 것으로 사료되며, 미토콘드리아 활성을 회복시키는 것으로 보아 아마도 apoptosis 초기단계부터 관여한다고 생각된다. 다음으로 dopaol은 어떤 apoptosis 관련 신호전달경로에 관여하는지 알아보기 위해 실험을 진행하였다.

### 3. Dopaol이 caspase-3/MST-1 신호전달에 미치는 영향

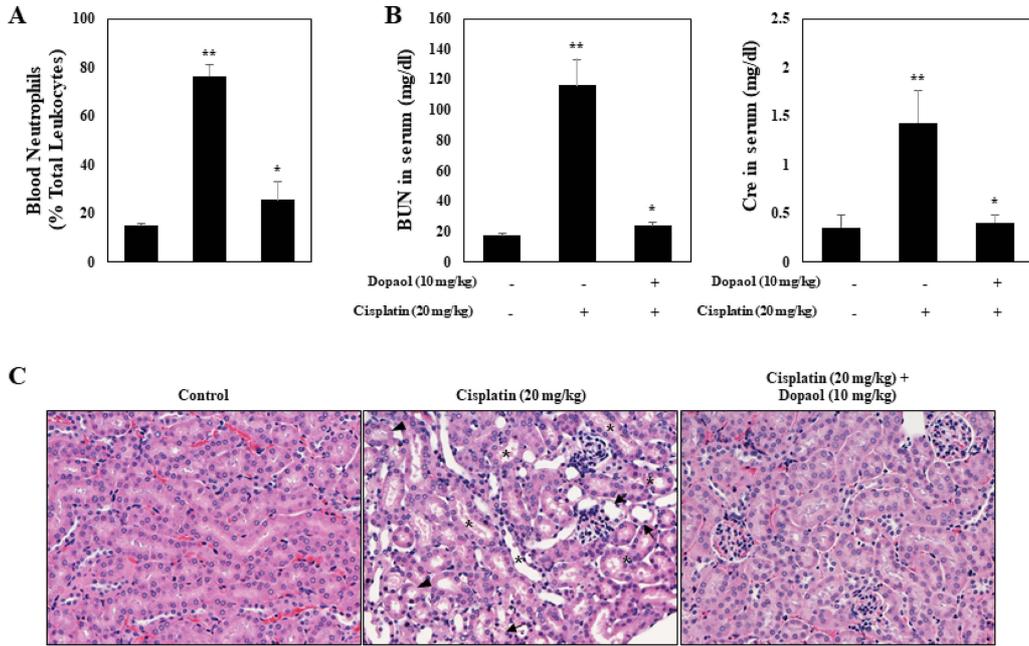
Caspase-3/MST-1 신호전달경로는 포유류세포 (mammalian cell)에서 cell apoptosis에 관여하는 중요한 신호전달경로로 알려져 있으며 apoptosis를 개시하기 위해 Thr<sup>183</sup> 부위의 자가인산화 (autophosphorylation)와 caspase-3에 의한 단백질 절단이 필요하다 (Ardestani *et al.*, 2014). 이에 따라 20  $\mu$ M cisplatin을 HK-2세포에 처리하였을 때 caspase-3/MST-1 신호전달경로가 활성화되는지 또는 dopaol 처리에 의해 차단되는지 알아보기 위해 단백질 발현량을 조사하였다. Cisplatin을 20  $\mu$ M 농도로 HK-2 세포에 처리하였을 때, 비처리군에 비하여 MST-1, MST-1 cleaved form, caspase-3, caspase-3 cleaved form

의 단백질 발현량 뿐만 아니라 MST-1 Thr<sup>183</sup>부분에 자가인산화 비율이 증가하였다. 하지만 80  $\mu$ M dopaol을 처리하였을 때 cisplatin 처리에 의해 증가된 단백질 발현량이 감소되는 결과가 나타났다 (Fig. 3A). 추가적으로 caspase-3 활성도를 확인하였을 때 마찬가지로 20  $\mu$ M cisplatin에 의해 증가된 caspase-3 활성도가 80  $\mu$ M dopaol을 처리했을 때 감소되는 결과가 확인되었다 (Fig. 3B).

결과를 종합하자면 dopaol 처리는 cisplatin에 의해 증가되는 caspase-3/MST-1 신호전달경로를 억제할 뿐만 아니라 caspase-3 활성도를 감소시켜 HK-2 세포에 일어난 apoptosis 기전을 억제하는 것으로 보이지만, MST-1 Cleaved form이 세포핵내로 도입되거나 MST-1 단백질을 HK-2 세포 내부에 인위적으로 과발현 시켰을 때 apoptosis가 유도되는지에 대한 추가실험이 필요할 것으로 생각된다.

### 4. Dopaol이 신장독성 animal model에 미치는 영향

각 실험군간 신장의 손상 정도와 혈액 내 호중구의 양을 측정하기 위해 실험을 진행하였다. 동물에서 채취한 전혈의 일부분을 IDEXX ProCyte DX hematology analyzer를 이용해 모든 적혈구와 백혈구의 비율을 분석하였다.



**Fig. 4. Dopaoil β-D-glucoside prevents cisplatin-induced nephrotoxicity on animal model.** Mice were separated 3 groups [(control (n = 7), cisplatin 20 mg/kg (n = 7), cisplatin 20 mg/kg + dopaoil 10 mg/kg (n = 7)]. Mice were administered with vehicle or cisplatin 20 mg/kg. A; blood neutrophils were analysed by IDEXX procyte, B; BUN and Cre in sirum are analysed by FUJI DRI-CHEM 4000i, C; representative images were stained by hematoxylin and eosin (H&E) staining. Means with difference letters are significantly different at \*\* $p < 0.05$  vs. control, \* $p < 0.05$  vs. cisplatin (20 mg/kg).

Cisplatin 단독처리군은 정상대조군과 비교하여 총 백혈구 중 호중구의 비율이  $76.4 \pm 4.6\%$ 로 증가하였지만 dopaoil 처리군은  $25.5 \pm 7.3\%$ 로 감소하였다. 다음으로 혈청에 존재하는 blood urea nitrogen (BUN)과 creatinine (Cre)의 양을 측정하기 위해 FUJI DRI-CHEM 4000i를 이용하였다. 그 결과 cisplatin 단독처리군은 정상대조군과 비교하여 BUN 농도가  $116.0 \pm 16.54$  mg/dl, Cre 농도  $1.4 \pm 0.34$  mg/dl로 증가된 반면 dopaoil 처리군은 BUN 농도  $23.5 \pm 2.36$  mg/dl, Cre 농도  $0.4 \pm 0.08$  mg/dl로 감소하였다. 마지막으로 H&E 염색을 통해서 신장 내에 존재하는 세포와 조직의 형태를 확인하였을 때, cisplatin 단독 투여군 (CIS)은 정상대조군 (NOR)과 비교하여 세뇨관 세포의 솔가장자리 (brush border) 부분의 소실과 세뇨관 손상 (tubular damage)이 관찰되었으며 dopaoil 처리군에서 정상에 가까운 형태로 회복되었다. Cisplatin을 투여했을 때 혈중 호중구와 BUN과 Cre 농도가 증가되고, 세뇨관 손상이 일어난다고 알려져 있다 (Faubel *et al.*, 2007; İşeri *et al.*, 2007). 본 실험에서도 cisplatin 투여에 의해 증가된 혈중 호중구와 BUN, Cre 농도가 확인되었을 뿐만 아니라 손상된 신장 조직을 확인할 수 있었지만 dopaoil 투여에 의해 회복되는 결과를 실험을 통해 확인하였다. 하지만 dopaoil이 *in vivo*에서

정확히 어떤 기전에 의해 cisplatin에 의해 유도된 신장독성을 억제하는지 신장조직 내부에서 발견되는 MST-1과 caspase-3 단백질 발현량 확인실험이 필요할 것으로 생각되며, dopaoil의 혈중 반감기 또는 투여농도에 따른 독성평가가 추가적으로 필요할 것이라 생각된다.

결과를 종합하자면 HK-2 세포에서  $80 \mu\text{M}$  dopaoil 전처리는  $20 \mu\text{M}$  cisplatin 처리에 의해  $80.2 \pm 3.0\%$  감소된 세포생존율을  $97.9 \pm 1.0\%$ 까지 회복시켰다. TUNEL assay와 FACS analysis에서도  $20 \mu\text{M}$  cisplatin 처리에 의해 증가된 DNA 단편화와 apoptosis의 비율은 모두  $80 \mu\text{M}$  dopaoil 전처리에 의해 감소되었을 뿐만 아니라 caspase-3/MST-1 신호전달경로에 관여하는 단백질의 발현량을 감소시켰다. 세포실험과 마찬가지로 6 주령 수컷 BALB/C를 이용한 동물실험에서도  $20$  mg/kg cisplatin 처리에 의해 증가된 혈중 호중구, BUN과 Cre 농도, 신장조직손상을  $10$  mg/kg dopaoil 투여로 억제하는 효과를 확인하였다. 따라서 dopaoil은 cisplatin의 부작용을 예방할 수 있는 천연분리 물질로써 유용하게 이용 될 수 있을 거라고 생각된다. 하지만 dopaoil 투여에 따른 신장조직 내부의 기전변화와 혈중 반감기 측정 또는 독성평가와 같은 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한국토종자원의 한약재기반구축사업의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Ahn J and Kim J.** (2016). Chemical constituents from *Houttuynia cordata*. *Planta Medica*. 82:S1-S381.
- Ardestani A, Paroni F, Azizi Z, Kaur S, Khobragade V, Yuan T, Frogne T, Tao W, Oberholzer J, Pattou F, Conte JK and Maeler K.** (2014). MST1 is a key regulator of beta cell apoptosis and dysfunction in diabetes. *Nature Medicine*. 20:385-397.
- Creasy CL and Chernoff J.** (1995). Cloning and characterization of a human protein kinase with homology to Ste20. *Journal of Biological Chemistry*. 270:21695-21700.
- Dranitsaris G, Truter I, Lubbe MS, Amir E and Evans W.** (2011). Advances in cancer therapeutics and patient access to new drugs. *PharmacoEconomics*. 29:213-224.
- Faubel S, Lewis EC, Reznikov L, Ljubanovic D, Hoke TS, Somerset H, Oh DJ, Lu L, Klein CL, Dinarello CA and Edelstein CL.** (2007). Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 322:8-15.
- Gottlieb E, Armour SM, Harris MH and Thompson CB.** (2003). Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome *c* release during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 10:709-717.
- Hanigan MH and Devarajan P.** (2003). Cisplatin nephrotoxicity: Molecular mechanisms. *Cancer Therapy*. 1:47-61.
- Hidalgo W, Chandran JN, Menezes RC, Otálvaro F and Schneider B.** (2016). Phenylphenalenones protect banana plants from infection by *Mycosphaerella fijiensis* and are deactivated by metabolic conversion. *Plant, Cell and Environment*. 39:492-513.
- İşeri S, Ercan F, Gedik N, Yüksel M and Alican İ.** (2007). Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology*. 230:256-264.
- Ju SM, Park JM, Jeon BJ, Yang HM, Hong JE, Kim IG, Kim WS and Jeon BH.** (2008). Preventive effect of puerariae radix and rehmanniae radix preparata on cisplatin-induced rat mesangial cell apoptosis. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*. 22:1140-1146.
- Kim HJ, Lee JH, Kim SJ, Oh GS, Moon HD, Kwon KB, Park C, Park BH, Lee HK, Chung SY, Park R and So HS.** (2010). Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. *Journal of Neuroscience*. 30:3933-3946.
- Kim HJ, Oh GS, Lee JH, Lyu AR, Ji HM, Lee SH, Song J, Park SJ, You YO, Sul JD, Park C, Chung SY, Moon SK, Lim DJ, So HS and Park R.** (2011). Cisplatin ototoxicity involves cytokines and STAT6 signaling network. *Cell Research*. 21:944-956.
- Leibundgut G, Pfisterer M and Brunner-La Rocca HP.** (2007). Drug treatment of chronic heart failure in the elderly. *Drugs and Aging*. 24:991-1006.
- Ling P, Lu TJ, Yuan CJ and Lai MD.** (2008). Biosignaling of mammalian Ste20-related kinases. *Cellular Signaling*. 20:1237-1247.
- Minoo P, Zlobec I, Baker K, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR and Lugli A.** (2007). Prognostic significance of mammalian sterile20-like kinase 1 in colorectal cancer. *Modern Pathology*. 20:331-338.
- Schrier RW.** (2002). Cancer therapy and renal injury. *Journal of Clinical Investigation*. 110:743-745.
- Shin HJ, Kwon HK, Lee JH, Gui X, Achek A, Kim JH and Choi S.** (2015). Doxorubicin-induced necrosis is mediated by poly-(ADP-ribose)polymerase 1(PARP1) but is independent of p53. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1172/JCI1656>(cited by 2017 May 24).
- So HS, Kim HJ, Kim Y, Kim E, Pae HO, Chung HT, Kim HJ, Kwon KB, Lee KM, Lee HY, Moon SK and Park R.** (2008). Evidence that cisplatin-induced auditory damage is attenuated by downregulation of pro-inflammatory cytokines via Nrf2/HO-1. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 9:290-306.
- Wang H, Ye WC, Xiong F and Zhao SX.** (2004). Phenylethanoid glycosides from root of *Picrorhiza scrophulariiflora*. *China Journal of Chines Materia Medica*. 29:531-534.