Kor. J. Food Hygiene 8(4), 189-193(1993)

Cisplatin의 신장독성에 관한 연구

1. Cisplatin의 신장근위세뇨관 para-aminolhippurate (PAH) 이동에 미치는 영향

성하정 · 이창업 · 이문한 · 이영재 · 류판동 · 김곤섭*

*서울대학교 수의과대학 *경상대학교 수의과대학*

Studies on the Cisplatin Nephrotoxicity

1. Effects of cisplatin on the renal proximal tubular para-aminohippurate (PAH) transport

Ha-Jung Sung, Chang-Eop Lee, Mun-Han Lee, Young-Jae Lee, Pan-dong Ryu, Gon-Sup Kim*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744

**College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University*

ABSTRACT – **Cisplatin is useful for various cancers including advanced testicular and ovarian cancers. However, clinical use of cisplatin has been limited due to its dose-related nephrotoxicity. Transport studies across the membrane vesicles were performed to study the cisplatin nephrotoxicity. In these experiments, after cisplatin was administered to adult male New Zealand White rabbits, basolateral membrane (BLM) vesicles were prepared from the renal cortex. Para-aminohippurate (PAH) uptakes through BLM vesicles were measured to examine the interactioln of cisplatin on the transports of the substrates. As results of the uptake experiments using the vesicle systems, cisplatin had little effects on PAH transport through BLM vesicle. In conclusion, cisplatin did not cause the damage of basolateral membranes.**

Keywords □ **basolateral membrane vesicles, para-aminohippurate, cisplatin nephrotoxicity**

전이된 고환암과 난소암의 병용요법에 매우 유용하고, 방광, 두부 및 경부암에도 뛰어난 효과가 있는 것으로 보고된 cisplatin은 내이 손상, 심한 구토와 오심, 경미하거나 중등도의 골수억제에 의한 일과성의 백혈구 감소증과 혈소판 감소증 그리고 저마그네슘혈증, 저칼슘혈증, 저칼륨혈증과 저인산혈증 등의 전해질 이상을 일으킬 수 있다.[1,2]

실험동물을 대상으로한 독성학적 연구결과로 cisplatin의 주된 독성표적장기는 신장인 것으로 확인되었다.[3] 사람에서의 신장독성은 치료 2주째에 빈번히 나타나고, 고농도 또는 반복투여시 비가역적으로 진행되는 것으로 알려져 있다.[4] Cisplatin에 의한 신장독성 중 가장 뚜렷한 것은 신장세뇨관의 손상이다. Cisplatin 6 mg/kg을 복강내로 1회 투여하였을 때 투여 후 3일만에 신장세뇨관 중 근위곡세뇨관의 S_3 segment에 쇄모연의 국소적 박리 및 손실, 세포 종창, 핵 chromatin의 농축 및 국소적인 괴사가 나타남이 보고되어 있다.[5]

최근에 개발된 신장 근위세뇨관의 쇄모연막(brush border membrane, BBM)과 기저측막(basolateral membrane, BLM)의 소포제조 방법에 의하면 PAH는 기저측막에 존재하는 음이온 운반계에 의하여 능동적으로 상피세포내로 이동하고 세포질내에 이 물질의 농도가 증가하면 확산에 의하여 오줌 중으로 배설된다는 사실이 밝혀졌다.[6]

Williams과 Hottendort[7]는 랫트 신장피질로부터

Received for publication December 15, 1993
Reprint request: M.-H. Lee at the above address

제조한 막소포를 이용하여 cisplatin이 PAH와 TEA의 막이동에 미치는 영향을 조사하였던 바 cisplatin에 의하여 TEA의 이동은 감소한 반면, PAH의 이동에는 영향이 없다고 보고하였다. 그러나 Goldstein 등[8]은 무처치 랫트 신장피질 절편을 이용하여 medium에 cisplatin을 500 또는 600 μg/ml을 첨가하였을시는 PAH 축적을 유의성 있게 억압시켰다고 하였다.

본 실험에서는 cisplatin을 투여한 토끼의 신장으로부터 근위세뇨관 기저측막 소포를 만들어 PAH의 소포막을 통한 이동을 조사하여 cisplatin이 쇄모연의 유기음이온 이동에 영향을 미치는가를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 체중 2~3 kg의 성숙한 New Zealand White 수토끼 20마리를 사용하였다. 사료(토끼용 펠렛사료, 신촌사료)와 물은 자유로이 공급하면서 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

약물투여

실험군은 무투약 대조군과 cisplatin(Sigma, 2 mg/kg) 투여군으로 나누었다. Cisplatin은 복강내로 1회 투여하였다. 약물투여 후 3일에 적출한 신장으로 소포를 제조하여 PAH 측정에 사용하였다.

신장 근위곡세뇨관 막소포를 이용한 물질이동 측정

막소포의 제조－신장근위곡세뇨관의 기저측막(basolateral membrane, BLM)의 소포는 분별원심분리법[9]과 Percoll 밀도경사 원심분리법[10]을 병용하여 제조하였다.

표지효소 활성도 측정－위에서 제조한 막소포의 분리도를 조사하기 위하여 정제한 기저측막 소포의 기저측막의 표지효소인 Na^+, K^+-ATPase의 활성도를 Jørgenson과 Skou의 방법[11]에 따라 측정하고 이 결과를 microsomal homogenate에서의 효소활성도와 비교하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준시약으로 하여 Bradford의 방법[12]으로 측정하였다.

물질이동 측정－약물투여 후 3일에 적출한 신장으로 기저측막 소포를 제조하여 유기음이온(para-aminohippurate, PAH)의 uptake을 실시하였다. 모든 uptake 실험은 rapid filtration method[13]로 실시하였다.

통계 처리

얻어진 자료들은 student-t test로 검정하여 $p<0.05$ 이하의 것만을 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결 과

분리된 막소포의 순수도

막소포가 순수하게 분리되었는지 확인하기 위하여 microsomal homognate와 기저측막 소포에서 기저측막의 표지효소인 Na^+, K^+-ATPase의 활성도를 측정하여 비교하였는데 기저측막 소포에서 100.98± 23.65 μmole Pi/mg protein/hr로 homogenate의 9.92± 2.28 μmole Pi/protein/hr에 비하여 10.2배이었다.

신장근위세뇨관 막소포의 PAH 이동에 미치는 영향

대조군 및 cisplatin 투여군에서 기저측막소포의 PAH uptake치를 Na^+ 및 α-ketoglutarate 농도 경사하에서 20초, 60초 및 60분의 incubation time에 따라 측정한 결과는 Fig. 1, 2 및 3과 같다.

대조군의 총PAH uptake치는 20초, 60초 및 60분에 각각 34.56± 4.89, 43.70± 5.74 및 55.36± 7.46 pmole PAH/mg protein/hr이었으나, cisplatin 투여군의 총 PAH uptake치는 각각 48.81± 5.47, 62.56± 8.58 및 88.34± 18.14 pmole PAH/mg protein/hr로 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 1).

Probenecid가 첨가된 배지에서 대조군의 PAH uptake치는 20초, 60초 및 60분에서 각각 8.38± 2.63, 18.75± 5.58 및 49.21± 6.12 pmole PAH/mg protein/hr이었으나, cisplatin 투여군에서의 PAH uptake치는 각각 25.19± 10.65, 33.03± 8.16 및 61.34± 13.70 pmole PAH/mg protein/hr로 대조군에 비하여 큰 차이가 없었다(Fig. 2).

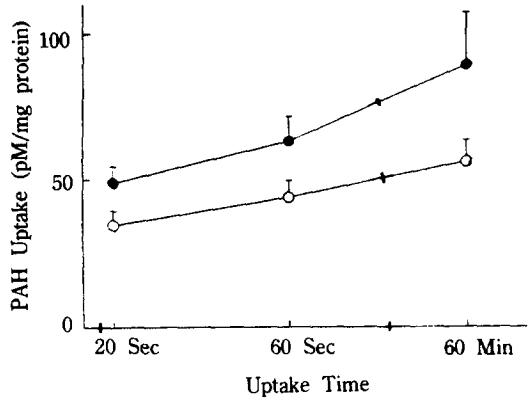

Fig. 1. Effect of cisplatin of PAH uptakes of renal cortical BLMV. The BLMV was prepared by differential and gradient centrifugation of renal cortical homogenate of rabbits which were treated with or without cisplatin (2 mg/kg). Membrane vesicles were preincubated for 30 min at 37°C in vesicle buffer containing 100 mM mannitol, 20 mM HEPES (pH 7.4) and 1 mM α-ketoglutarate, then vesicular uptake of PAH was carried out at 25°C in the medium containing 100 mM mannitol, 20 mM HEPES, 40 μM PAH (pH 7.4) and 3.6 μci ^{3}H-PAH/ml.
○−○: control, ●−●: cisplatin (2 mg/kg).

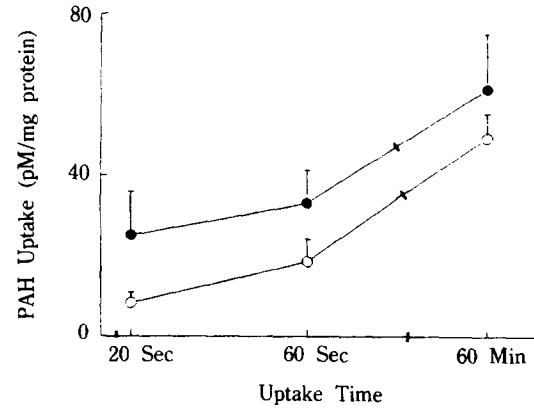

Fig. 2. Effect of cisplatin on probenecid-inhibited PAH uptakes of renal cortical BLMV. The BLMV was prepared by differential and gradient centrifugation of renal cortical homogenate of rabbits which were treated with or without cisplatin (2 mg/kg). Membrane vesicles were preincubated for 30 min at 37°C in vesicle buffer containing 100 mM mannitol, 20 mM HEPES (pH 7.4) and 1 mM α-ketoglutarate, then vesicular uptake of PAH was carried out at 25°C in the medium containing 100 mM NaCl, 100 mM mannitol, 20 mM HEPES, 40 μM PAH (pH 7.4), 3.6 μci ^{3}H-PAH/ml and 2 mM probenecid.
○−○: control, ●−●: cisplatin (2 mg/kg).

위에서 얻은 총 PAH uptake치와 probenecid 존재하에서 측정한 PAH uptake치로부터 probenecid 감수성 PAH uptake치를 계산한 결과 probenecid 감수성 PAH uptake치는 대조군의 경우 20, 60초 및 60분에서 각각 26.07± 2.24, 24.95± 0.63 및 6.15 ± 2.59 pmole PAH/mg protein/hr이었고, cisplatin 투여군은 각각 23.48± 9.41, 29.53± 8.73 및 27.00± 14.95 pmole PAH/mg protein/hr로 각각 대조군에 비하여 유의성 있는 차이가 없었다(Fig. 3).

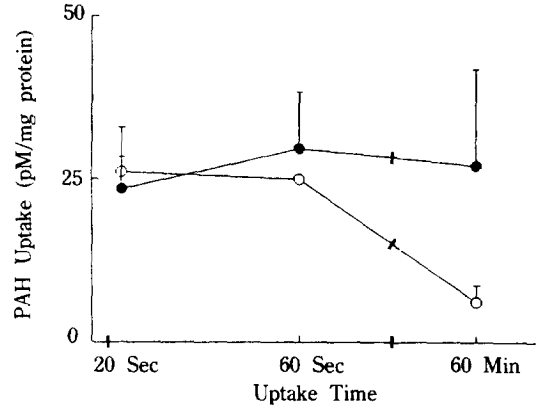

Fig. 3. Effect of cisplation on the probenecid-sensitive PAH uptake. Values are calculated based on the data shown in Fig. 1 and 2.
○−○: control, ●−●: cisplatin (2 mg/kg).

고 찰

막소포를 이용한 물질이동의 연구에서는 막의 적절한 분리가 이루어졌는지를 확인하는 것이 중요하다.[14] 여러 효소 중에서 막소포가 순수하게 분리되었는지를 확인하는데 주로 사용되는 marker enzyme은 기저측막에서는 Na^+, K^+-ATPase이다.

Bile salts, cyclic AMP, fatty acids, hippurate, hydroxybenzoates, oxalate, prostaglandins, urate 등의 생리활성물질과 acetazolamide, cephalothin, ethacrynic acid, furosemide, penicilin G, probenecid, saccharin, salicylate 등의 약물들과 같은 유기

음이온은 신장근위세뇨관 기저막에 분포하는 유기음이온 운반단백계에 의하여 능동적으로 분비됨으로써 오줌 중으로 배설된다.[15]

PAH는 유기음이온의 prototype으로서 신세뇨관을 통하여 분비되고 효소에 의하여 파괴되지 않으며 또한 거의 재흡수되지 않기 때문에 신세뇨관의 유기음이온 이동연구에 널리 이용되고 있다.[16] PAH는 기저측막을 통하여 상피세포 내로 능동적으로 이동하고, 세포내에 축적되면 확산에 의하여 쇄모연을 통해 요중으로 배설된다.[6] 최근에 소포를 이용한 연구결과에 의하면 기저측막에서의 PAH 이동기전은 Na^+과 공동운반되며 OH^-, Cl^+ 및 sulfate 등의 무기음이온이나 oxoglutarate와 같은 유기음이온이 PAH와 상호교환되는 acid/acid exchange system인 것으로 이해되고 있다.[17] 본 연구의 예비실험에서도 1 mM의 α-ketoglutarate를 배지에 첨가하면 PAH uptake이 증가하고, Na^+를 첨가하면 "overshoot" 현상이 일어나며 그리고 2 mM의 probenecid를 첨가하면 "overshoot" 현상이 소실되는 것으로 보아 기저측막에서의 PAH 이동은 acid/acid exchange와 carrier-mediated system에 의하여 이루어짐을 확인할 수 있었다.

Williams와 Hottendorf는 무처치 랫트 신장피질에서 제조한 막소포를 이용하여 kinetic analysis를 실시한 결과 PAH의 이동은 1 mM의 cisplatin에 의하여 영향을 받지 않았다고 보고하였고, Goldstein 등[8]은 무처치 랫트 신장피질 절편을 이용하여 medium에 cisplatin을 500 또는 600 μg/ml을 첨가하였을시는 PAH 측적을 유의성 있게 억압시켰다고 하였다. Cisplatin의 실험은 아니지만 양이온은 중금속을 사용한 실험에서 Hirch[18]는 uranyl acetate 6 mg/kg를 랫트에 1회 복강내 투여 후 신장피질절편을 만들어서 실험한 결과 PAH의 이동에는 영향을 주지 않았다고 하였다. Foulkes와 Blanck[19]는 ^{3}H-PAH를 infusion한 후 신장피질에서 PAH의 측정정도를 살펴본 바 cadmium에 의하여 유의한 변화가 없음을 보고하였다.

본 연구에서 cisplatin을 토끼에 투여한 다음 기저측막소포에서 PAH의 이동을 측정한 결과 대조군과 유의성 있는 차이가 인정되지 않아서 cisplatin을 비롯한 중금속류를 사용한 실험 즉, Williams와 Hottendorf,[7] Hirch[18] 및 Foulkes와 Blanck[19]의 결과와 일치하였다. 그러나 Goldstein 등[8]의 cisplatin이 PAH uptake를 억제한다는 결과는 Litterst 등[20]이 랫트에 cisplatin 5 mg/kg을 투여한 4일 후 신장조직 g wet tissue당 10 μg platinum의 백금농도를 얻은 것과 비교해 보면 Goldstein 등[8]이 신장피질절편에 적용한 양(cisplatin 500 또는 600 μg/ml)이 지나치게 많은데서 오는 비특이적인 반응일 것으로 사료된다.

따라서 cisplatin은 유기음이온인 PAH 이동에 영향을 주지 않는 것으로 나타나, 신장근위세뇨관의 기저측막에는 독성을 일으키지 않는 것으로 밝혀졌다.

국문요약

항암효과가 뛰어난 cisplatin은 각종 암치료에 많이 사용하고 있는데 신장독성으로 인하여 그 사용이 제한되고 있다. Cisplatin을 단독으로 성숙한 New Zealand White 수토끼에 투여한 후, 신장피질을 절제하여 기저측막소포(basolateral membrane vesicle, BLMV)을 제조하였다. 제조한 기저측막소포에서 유기음이온인 *p*-aminohippurate(PAH)를 측정하여 cisplatin이 유기음이온의 이동에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보아 다음과 같은 결과를 얻었다. (1) 기저측막의 표지효소인 Na, K^+-ATPase의 활성도는 기저측막소포에서 homogenate의 10.2배이었다. (2) 기저측막소포에서의 PAH uptake은 cisplatin에 의하여 영향을 받지 않았다. 이상의 결과를 요약하면 cisplatin은 신장근위세뇨관의 기저측막의 유기음이온 운반에는 영향을 주지 않았다.

참고문헌

1. Rozencweing, M., Von Hoff D.D., Slavik, M., Muggia, F.M.: Cis-diammindichloroplatinum(II)-a new cancer drug. *Ann. Inter. Med.*, **86**, 803-812 (1977).
2. Goldstein, R.S., Mayor, G.H.: The nephrotoxicity

of cisplatin. *Life. Sci.*, **32**, 685-690 (1983).
3. Schaeppi, U., Heyman, I.A., Fleischman, R.W., Rosenkrantz, H., Ilievski, V., Phelan, R., Cooney, D. A., Davis, R.D.: Cis-dicholorodiammineplatinum (II) (NSC-119875): preclinical toxicologic evaluation of intravenous injection in dogs, Monkeys and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **25**, 230-241 (1973).
4. Hardaker, W.T, Stone, R.A., McCoy, R.: Platinum nephrotoxicity. *Cancer*, **34**, 1030-1032 (1974).
5. Dobyan, D.C., Levi, J., Jacobs, C., Kosek, J., Weiner, M.W. Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity. II. Morphologic observations. *J. Pharmacol. Exp.*, **213**, 551-556 (1980).
6. Kinsella, J.L., Holohan, P.D., Pessah, N.I., Ross, C.R.: Transport of organic ions in renal cortical luminal and antiluminal membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **209**, 443-450 (1979).
7. Williams, P.d., Hottendorf, G.H.: Effect of cisplatin on organic ion transport in membrane vesicles from rat kidney cortex. *Cancer Treat. Rep.*, **69**, 875-880 (1985).
8. Goldstein, R.S., Noordewier, B., Bond., J.J.: Cis-dichlorodiamineplatinum nephrotoxicity: Time course and dose response of renal function impairment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **60**, 163-175 (1981).
9. Kinsella, J.L., Holohan, P.D., Pessah, N.I., Ross, C.R.: Isolation of luminal and antiluminal membranes from dog kidney cortex. *Biochim. Biophys. Acta*, **552**, 468-477 (1979).
10. Scalera, V., Storelli, C., Storelli-Joss, J., Haase, W., Murer, H.: A simple and fast method for the isolation of basolateral plasma membranes from rat small intestinal epithelial cells. *Biochem. J.*, **186**, 177-181 (1980).
11. Jφrgenson, P.L., Skou, J.: Purification and characterization of (Na^+-K^+)-ATPase. I. The influence of detergents on the activity of (Na^+-K^+)-ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney. *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 366-380 (1971).
12. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
13. Berner, W., Kinne, R.: Transport of *p*-aminohippurate by plasma membrane vesicles isolated from rat kidney cortex. *Pfiu'gers Arch*, **361**, 269-277 (1976).
14. Sheikh, M.I., Kragh-Hansen, U., Jφrgensen, K.E., Rφigaard-Petersen, H.: An efficient method for the isolation and separation of basolateral-membrane and luminal-membrane vesicles from rabbit kidney cortex. *Biochem J.*, **208**, 377-382 (1982).
15. Grantham, J.J., Chonko, A.M.: Renal handling of organic anions and cations: metabolism and excretion of uric acid. *In The Kidney.* (Brenner, B.M. and Rector, F.C. eds.) W. B. Saunders Co., p. 663-700 (1986).
16. Mφller, J.V., Sheikh, M.I.: Renal organic anion system: Pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.*, **34**(1), 315-356 (1983).
17. Low, I., Friedrich, T., Burckhardt, G.: Properties of an anion exchanger in rat renal basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.*, **246**, F334-F 342 (1984).
18. Hirch, G.H.: Effect of chronic lead treatment on renal function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **25**, 84-93 (1972).
19. Foulkes, E.C., Blanck, S.: Cadmium inhibition of basolateral solute fluxes in rabbit renal tubules and the nature of cycloleucine uptake. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **108**, 150-156 (1991).
20. Litterst, C.L., torres, I.H., Guarino, A.M.: Plasma levels and organ distribution of platinum in the rat, dos and dogfish shark following single intravenous administration of *cis*-dichlorodi-ammineplatinum (II). *J. Clin. Hematol. Oncol.*, **7**, 169-179 (1977).