



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

工學碩士 學位論文

Cisplatin에 의한 신독성 유발
랫드의 신장 내 산화적 스트레스에
대한 산수유의 저해효과



2010年 8月

釜慶大學校 産業大學院

食品産業工學科

金 泰 希

工學碩士 學位論文

Cisplatin에 의한 신독성 유발
랫드의 신장 내 산화적 스트레스에
대한 산수유의 저해효과

指導教授 安東賢

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함

2010年 8月

釜慶大學校 産業大學院

食品産業工學科

金 泰 希

이 논문을 工學碩士 學位論文으로 認准함

2010年 8月



主 審 農學博士 金善奉 ①

委 員 藥學博士 金榮穆 ①

委 員 農學博士 安東賢 ①

목 차

목 차	i
Abstract	iv
서 론	1
재료 및 방법	6
1. 실험 재료	6
1-1. 시약 및 기구	6
2. 실험 동물 및 처치	6
3. 시료의 채취	9
4. 효소원의 조제	9
5. 산수유의 일반적인 특성	12
6. 혈청 중 효소 활성의 측정	12
6-1. 단백질, albumin 및 요소질소(BUN)의 함량 측정	12
6-2. Creatine의 측정	13
6-3. Lactate dehydrogenase(LDH)의 측정	13
7. 신장 조직 중 lipid peroxide 함량의 분석	13
8. 신장 조직 glutathione 함량 측정	13
9. 신장 효소 활성의 측정	14
9-1. Xanthine oxidase/dehydrogenase 활성의 측정	14
9-2. Aldehyde oxidase 활성의 측정	14
9-3. Aminopyrine demethylase의 활성 측정	15

9-4. Aniline hydroxylase의 활성측정	15
9-5. Superoxide dismutase(SOD) 활성의 측정	15
9-6. Catalase 활성의 측정	16
9-7. Glutathione peroxidase 활성의 측정	16
9-8. Glutathione S-transferase 활성의 측정	16
9-9. Glutathione reductase 활성의 측정	17
9-10. γ -Glutamylcysteine synthetase 활성의 측정	17
10. 단백질 정량 및 통계처리	18

결과 및 고찰	19
1. 산수유의 일반성분	19
2. 산수유의 pH 및 색도	21
3. 산수유 투여에 의한 체중과 조직의 무게 변화	23
3-1. 체중증가량	23
3-2. 조직무게 변화	23
3-3. 신장무게 변화	23
4. 신장의 기능	28
4-1. 단백질, 알부민 및 혈청 요소질소 함량	28
4-2. 혈중 creatine 및 lactate dehydrogenase(LDH) 활성에 미치는 영향	28
5. 신조직중 지질 과산화함량에 미치는 영향	33
6. 신장의 활성산소 생성계에 미치는 영향	35
6-1. Cytosol 효소계에 미치는 영향	35
6-2. Microsomal 효소계에 미치는 영향	38
7. Glutathione S-transferase 활성에 미치는 영향	41

8. 활성 산소의 해독계에 미치는 영향	43
9. Glutathione농도 및 glutathione 생성계에 미치는 영향	45
요 약	47
감사의 글	49
참 고 문 헌	50



Protective Effects of *Cornus officinalis* on Oxidative Stress Associated with Cisplatin -Induced Nephrotoxicity Rats

Tae-Hee Kim

Department of Food Industrial Engineering Graduate
School of Industry, Pukyong National University

Abstract

Cisplatin is a platinum-containing complex, one of the most effective anticancer drugs administered to treat a variety of cancers such as ovarian, testicular, bladder, head and neck, and uterine cervix carcinomas. High dose of cisplatin are more effective than low doses in ovarian and colorectal cancer. However, high dosage treatment induces nephro- and neurotoxicity. *Cornus officinalis* (CO) has been used as a traditional Chinese medicine in urinary incontinence, reinforcement of renal function and nocturnal enuresis. This study was designed to evaluate the nephroprotective potential of a natural antioxidant, against cisplatin-induced changes in renal function and renal cortex antioxidant status in rats.

Cornus officinalis is a natural resource plant which is traditionally used as a polyuric, backache, poor nutrition, robustness, diuretic, anticancer, antibacterial agent.

In this study, we observed protein concentration of serum, serum urea nitrogen content and kidney enzyme on cisplatin (2 mg/kg) induced oxidative

stress in nephrotoxicity animals for figure out mechanism controlling oxidative stress in cisplatin induced animals. Before inducing, we take oral administration *Cornus officinalis* for 4 weeks.

Protein concentration of serum and serum urea nitrogen content is increased in cisplatin treated animals but recovered in co-administration with *Cornus officinalis*. Blood Creatinine and lactate dehydrogenase activity are increased in cisplatin treated animals but recovered in co-administration with *Cornus officinalis*.

ROS detoxication system, Superoxide dismutase, catalase and glutathion peroxidase activity, are remarkably decreased in cisplatin treated animals but increased in co-administration cisplatin with *Cornus officinalis*.

And kidney glutathion content, glutathion reductase activity also increased in co-administration cisplatin with *Cornus officinalis* which is noticeably repressed in cisplatin treated animals.

Put together all above results, mechanism for repressing cisplatin induced kidney toxicity by co-administration with *Cornus officinalis* is the effect of reduced lipid peroxidation in kidney by controlling cisplatin induced ROS creating system and detoxication system.

서 론

현대사회가 서구화된 식생활과 빠른 문명의 발달로 인해 질병의 형태 또한 많은 변화를 가져 왔다. 특히, 우리나라에 있어서는 신장 질환을 지닌 환자들의 수도 적지 않다. 통계청에 따르면 고혈압성 신장 질환으로 입원한 환자는 2004년에 2,653명이고 2006년에는 2,980명으로 소폭 증가하였고, 신장 및 요로 결석으로 입원한 환자는 2004년에 21,080명, 2006년에는 21,891명으로 집계 되었으며, 신장의 악성신생물질(암)로 입원한 환자는 2004년에 2,502명, 2006년에 3,067명이었다. 또한 달리 분류 되지 않은 신장 및 노란 장애로 입원한 환자는 2004년과 2006년에 각각 1,594명, 1,813명으로 집계되었다(통계청, 2004; 통계청, 2006). 따라서 신장의 기능을 강화하고 질병의 예방 치료에 관한 관심이 증가 하고 있으며 각종 신장질환 약물과 건강 기능성 식품에 대한 관심 또한 증가하고 있다.

한편 산수유나무(*Cornus officinalis* Siebold et Zuccarini)는 층층 나무과(Cornaceae)에 속하는 3 m가량의 낙엽고목으로서 잎은 마주나며 난상 타원형 또는 난형이고 길이 4-12 cm로서 밑은 둥글고 끝은 날카롭고 뒷면 맥액(脈腋)에 갈색 밀모가 나며 측맥(側脈)은 4-7쌍이다. 꽃은 황색으로 3-4월에 피며 산형화서(傘形花序)로서 20-30개의 꽃이 달리고 꽃잎은 피침상 삼각형이다. 과실은 핵과(核果)로서 장질(漿質)이며 10월에 짙은 홍색으로 익는다. 종자를 제거한 과육을 산수유(Corni Fructus)라 하며 편압된 긴 원형이고 길이 1.5-2 cm, 너비 약 1 cm이다(厚生省, 1981). 바깥면은 암적자색 내지 암자색을 띠며, 윤이 나고 거친 주름이 있으며 기부에 과병의 자국이 있다. 질은 부드러우며 약간 특이한 냄새와 신맛이 있고 약간 달다(厚生省, 1972; 厚生省, 1981; 山原條二, 1986). 산수유의 내부 형태가 꽃에

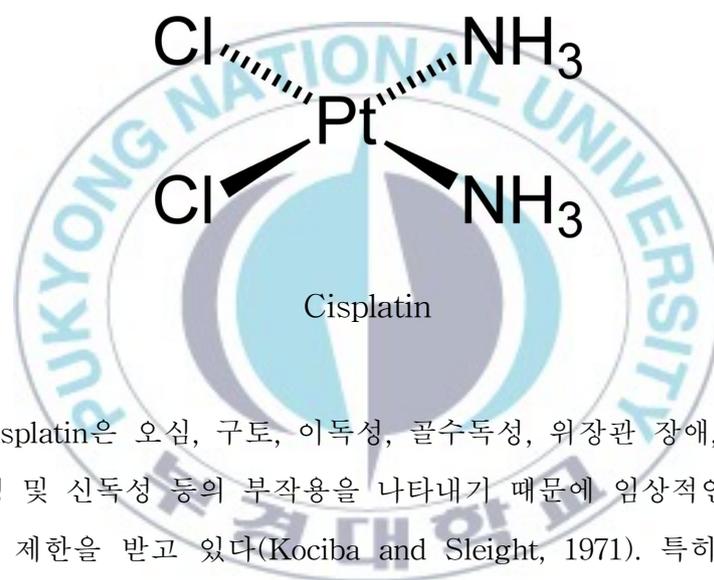
서 성숙 과실로 싹트기 까지 몇가지 발달 단계로 비교 관찰되었는데 생약의 사용부위는 화탁동(花托筒)의 성숙한 팽대부인 hypanthium이고, 제거된 부분은 진정 과실의 과피가 석세포로 변화된 것이다(下村裕, 1986). 산지는 중국이 원산이며, 한국에서는 중남부의 산야에 자생하고 있다. 예로부터 다뇨증, 요통, 이명, 폐결핵 등의 치료제로 사용되어 왔으며 과실은 자양, 강장, 음위, 이조에 약효가 있고 간경화, 신경에 좋고 이뇨작용, 혈압강화작용, 항암 및 항균 작용이 있다고 한방자료에 기록되어 있다(山原條二, 1986; 韓藥研究所委員會, 1980).

산수유의 성분으로는 loganin, morroniside와 같은 iridoid 배당체와 sweroside와 같은 secoiridoid 배당체, ursolic acid, oleanolic acid 등의 triterpenoid류, gallic acid, malic acid, tartaric acid 등이 보고 되었고, tellimagrandin 1, tellimagrandin 2, isoterchebin (cornustannin 1), 1, 2, 3-tri-O-galloyl- β -D-glucose, 1, 2, 6-tri-O-galloyl- β -D-glucose, 1, 2, 3, 6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose와 gemin D, cornusiin A, B, C 및 2, 3-di-O-gallyol-D-glucose, comusiin D, E와 F, 1, 7-di-O-galloyl-D-sedoheptullose 등의 tannin류가 보고 되었다(Kim, 1999; Guilian et al., 2000).

산수유의 생리활성에 관한 연구로는 산수유 추출물의 항균 및 항산화성 효과(Kim, 2005; Park et al., 1995), 동물에서의 항당뇨 및 항염증효과(Dai and Hang, 1992; Yamahara et al., 1981), 소염작용과 부종의 억제 효과(Won et al., 1996), 산수유의 물추출물이 정자의 운동성 증가에 미치는 효과(Jeng et al., 1997), B16/F10 melanoma 세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향(Burks and Littleton, 1992), 산수유에 함유된 항암물질의 정제 및 특성(Aprikan et al., 1995)등이 보고되어있다.

한편, cisplatin은 현재 임상에서 고환암, 식도암, 난소암, 방광암, 뇌종양, 위암, 폐암, 자궁경부암, 전립선암, 골육종 등의 고형암 치료제로 광범위하

게 사용되고 있는 항암제이다(Rosenberg et al., 1969; Connors et al., 1972; Broch, 1987; Prestayko et al., 1980; Von Hoff et al., 1979). Cisplatin은 중심에 platinum분자를 가지는 제 1세대 백금 착제 항암제로 tumor cell 내 핵에 존재하는 DNA 이중나선의 rich guanosine, cytosine region에 교차 결합하여 DNA의 복제 및 RNA와 protein 합성을 저해하여 암세포의 성장 및 증식을 억제한다.



그러나 cisplatin은 오심, 구토, 이독성, 골수독성, 위장관 장애, allergy, 내이신경독성 및 신독성 등의 부작용을 나타내기 때문에 임상적인 사용에 있어 상당한 제한을 받고 있다(Kociba and Sleight, 1971). 특히 cisplatin에 의한 신장 독성은 매우 강하여 신장의 세뇨관 괴사, 신장피질, 집합관 등에 독성을 나타내어 신장의 기능을 손상시키고 심한 경우에는 사용 환자의 사망원인이 되기도 한다(Ward and Fauvie, 1976; Ward et al., 1976; Leonard et al., 1971). Cisplatin의 이러한 신장 독성 mechanism은 정확하게 밝혀지진 않았지만 현재까지의 연구로는 cisplatin 투여 시 일어날 수 있는 전해질 불균형에 의해 신장의 세뇨관에서의 재흡수 기능 손상이 급성 세뇨관 괴사와 관련되어 있다는 것(Madias and Harrington, 1978)과 cisplatin complex의 reactive metabolite이 생성되어 이것이 신장 조직 내

의 protein이나 lipid, nucleic acid와 같은 필수적인 거대 분자에 공유적 결합을 하여 세포 독성을 야기한다는 추측이 있다(Rosenberg, 1975). 또한 neutrophil과 같은 면역 세포의 자극에 의해 oxygen free radical이 생성되며 이러한 oxidative stress에 의해 cytotoxicity가 나타나 신장 조직의 lipid peroxidation level을 증가시킨다고 보고되어 있다(Choi and Chong, 1992; Sodzuks et al., 1991; Sugihara et al., 1987).

현재 이러한 cisplatin의 신장 독성을 감소시키기 위해 carboplatin이나 heptaplatin과 같은 독성이 적은 platinum 유도체를 합성하는 연구가 진행되고 있으며 mannitol이나 강력한 수화제를 병용하여 cisplatin의 신장내 농도를 감소시켜 신장 독성을 떨어뜨리는 방법을 사용하고 있는데 이러한 경우 cisplatin 자체의 항암효과를 저하시키는 결과를 가져온다. 따라서 cisplatin의 가장 큰 독성인 신장 독성을 감소시키면서 항암제로서의 효과에도 영향을 주지 않은 안전한 항암요법의 개발과 독성을 감소시키는 물질의 개발이 필요하다.

근래에 와서 인체는 각종 stress 및 화학물질에 의한 질병이 야기되고 있어 관심의 대상이 되고 있다. 이러한 화학물질에 의한 손상 기전은 일반적으로 생체 조직 세포의 손상인데 생체막 구성성분인 다가불포화지방산의 과산화가 그 한가지 원인으로 지적되고 있다(Stock et al., 1990). 또한 지질의 과산화는 생화학적인 요인 즉, free radical의 생성계로 알려져 있는 cytosolic xanthine oxidase, aldehyde oxidase, microsomal mixed function oxidase, mitochondrial respiratory chain 및 catecholamin류와 thiol류, hemoprotein 등의 자동산화에 의해 생성된 free radical인 활성산소 및 친전자성 물질들의 공격으로 야기되어진다고 알려져 있다(Ward et al., 1988). 이와같은 물질들은 여러 가지 독작용 뿐만 아니라 식균작용에도 관여하고 있어 양면성을 지니고 있다. 그러나 생체는 free radical들의 독성을

제거시켜 주는 해독기구의 존재로 여러 가지 독작용에 의한 조직손상으로 부터 보호받고 있으며, free radical 생성계와 해독계 사이의 불균형 때문에 독작용이 유발된다고 한다.

이에 본 실험에서는 cisplatin으로 손상된 신장에서의 항산화효소계와 지질과산화에 미치는 영향을 연구하여 산수유의 생리활성 효과의 기전을 연구하여 밝힘으로써 기능성 식품의 소재나 의약신소재로서 개발하는데 기초 자료를 얻는 것에 목적을 두었다.



재료 및 방법

1. 실험 재료

1-1. 시약 및 기구

시약중 cisplatin, sodium thiosulfate, thiobarbituric acid, sodium dodecyl sulfate, bovine serum albumin, reduced glutathione, oxidized glutathione, xanthine sodium, xanthine oxidase, NADPH, Cytochrome C, blood urea nitrogen kit 및 creatinine kit는 Sigma사로부터, uric acid 및 malondialdehyde 는 Aldrich사로부터 구입하였으며, nicotinamide, trichloroacetic acid, sodium dihydrogenphosphate, disodium hydrogenphosphate는 Junsei사로부터 구입하였다. 그 외 시약은 특급 또는 일급시약을 사용하였다.

실험에 사용한 기구는 glass teflon homogenizer(Changshin scientific Co., Korea), UV-spectrophotometer(UV-240, Shimadzu, Japan), refrigerated centrifuge(J2-21, Beckman, USA), ultracentrifuge (65-P7, Hitachi, Japan), Water bath(Jeio tech Co., Japan) 및 cold laboratory chamber(KMC-8512, Korean manhattan, Korea)등이었다.

2. 실험 동물 및 처치

실험 동물은 효창사이언스(대구)로부터 분양 받아 동물사에서 일정한 조건(온도 : $22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 습도 : 46-60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 고형 사료(Table 1)로 적응시킨 체중 180 ± 10 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였다. 산수유(전남 구례산 산수유를 씨를 제거한 후 건조하여 분말로 만듦)는 천호식품(주)에서 공급받아 사용

Table 1. Composition of basal diet

Ingredient	Basal Diet (%)
Casein	20.0
DL-Methionine	0.3
Corn Starch	15.0
Sucrose	50.0
Fiber ¹⁾	5.0
Corn oil	5.0
AIN-mineral Mixture ²⁾	3.5
AIN-vitamin Mixture ³⁾	1.0
Choline Bitartate	0.2

¹⁾ Cellulose : Sigma Co. LTD., USA

²⁾ Mineral mixture based on the pattern of Rogers and Haper(1965) contain the following (g/kg diet): calcium phosphate dibasic 500.0, sodium chloride 74.0, potassium citrate monohydrate 220.0, potassium sulfate 52.0, magnesium oxide 24.0, magnesium carbonate 3.5, ferric citrate 6.0, zinc carbonate 1.6, cupuric carbonate 0.3, potassium iodate 0.01, chromium potassium sulfate 0.55, sucrose, finely powered make 1,000

³⁾ Vitamin mixture(g/kg diet): thiamine HCl 0.6, biotin 0.02, riboflavin 0.6, cyanocobalamine 0.001, pyridoxine HCl 0.7, retinyl acetate 0.8, nicotinic acid 3.0, DL-tocopherol 3.8, Ca-pantothenate 1.6, 7-dehydrocholesterol 0.0025, folic acid 0.2, methionine 0.005, sucrose, finely powered make 1,000.

하였다. 산수유는 2% Tween 80에 현탁(100, 200 mg/kg)하여 4주간 경구로 투여하였다. Cisplatin은 2 mg/kg을 복강내로 4주간 투여하였으며 마지막 투여 24시간 후에 처치하였는데, 실험동물은 처치전 12시간 동안 사료를 제거하고 물만 섭취하도록 하였다. 대조약물로서 Mesna (sodium methanethiolate, 200 mg/kg)를 사용 하였다.



3. 시료의 채취

시료의 투입이 끝난 실험동물을 CO₂로 가볍게 마취시키고 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하였고 신장은 0.9% 생리식염수로 관류시켜 조직 내 혈액을 제거하고 적출하여 생리식염수에 씻은 후 여지로 가볍게 압박하여 남아 있는 혈액 및 생리식염수를 제거하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분 이상 방치해 두었다가 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 얻어 분석시까지 냉동보관 하였다. 흰쥐에서 혈액을 채취한 후 즉시 신장, 간, 지라, 부고환 지방은 떼어서 무게를 측정하였다. 분리한 혈청은 단백질, Albumin, blood urea nitrogen, creatinine 및 lactate dehydrogenase 활성의 측정에 사용하였다.

4. 효소원의 조제

신장 조직은 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer를 사용하여 10% 마쇄액을 만들었다.

이 마쇄액을 homogenate 분획으로 하였으며, 이것을 600×g에서 10분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄 세포 부분을 제거하였다. 다시 10,000×g에서 20분간 원심 분리하여 그 침전물에 일정량의 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하고 현탁시켜 mitochondria 분획으로 하고 상청액을 다시 105,000×g에서 1시간 동안 초원심 분리하여 얻은 상청액을 cytosol 분획으로, 그 침전물에 동일한 양의 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 현탁시킨 액을 microsome 분획으로 하였다.

Mitochondria와 microsome 분획은 현탁한 후 재원심 분리하여 효소원으로 사용하였다. 이렇게 얻어진 homogenate는 lipid peroxide 및 glutathione 함량 측정에, cytosol 분획은 xanthine oxidase, aldehyde oxidase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase,

glutathione S-transferase 및 γ -glutamylcysteine synthetase활성의 측정에 사용하였다. 또한, Microsomal 분획은 aminopyrine N-demethylase 및 aniline hydroxylase의 활성의 측정에 사용하였으며, mitochondria 분획은 catalase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다(Fig. 1).



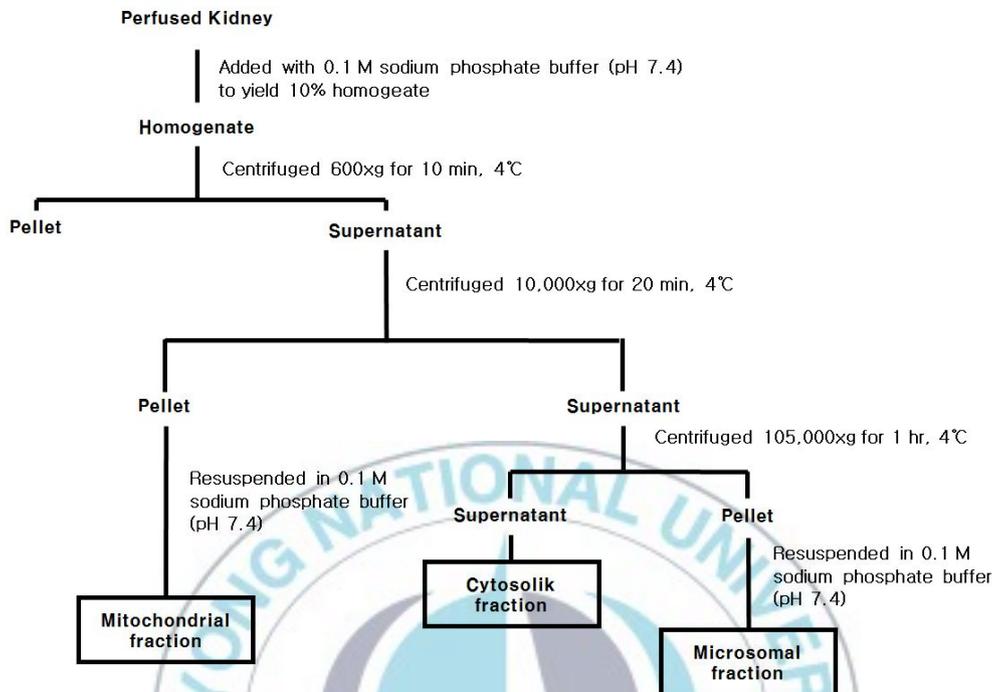


Fig. 1. Preparation of mitochondrial, cytosol and microsomal fraction.

5. 산수유의 일반적인 특성

5-1. 일반성분분석

산수유의 수분, 회분, 조지방 및 조단백 함량 분석은 AOAC법에 따라 실시하였다. 수분함량은 105℃ 조건하에서 수분함량측정기(MB45 Moisture Analyzer, OHAUS Co., Korea)를 이용하여 측정하였고, 회분함량은 550℃ 직접 회화법(PDMF-5T, Rab Partner, Korea)으로 측정하였다. 조단백질함량은 Kjeldahl법(BUCHI Distillation Unit K-350/355, Hwashin Instrument Co., Korea), 조지방함량은 Soxhlet 추출법(EAM4202, Dongwon science Co., Korea)으로 분석하여 백분율로 나타내었다.

5-2. pH

산수유 5 g을 취하여 10배량의 증류수 50 mL을 가해 혼합하고 pH meter(HM-30V, Toa, Japan)로 측정하였다.

5-3. 색도

색도는 산수유 3.5 g을 색도 측정용 cell에 채워 넣은 후 색차계(JC 801, color techno system Co., Japan)를 사용하여 각각의 색도를 L^* , a^* , b^* 값으로 각각 명도, 적색도 및 황색도로 나타내었다. 이때 사용된 표준백판의 값은 $L^*=93.73$, $a^*=-0.12$, $b^*=0.11$ 이었다.

6. 혈청 중 효소 활성의 측정

6-1 단백질, albumin 및 요소질소(BUN)의 함량측정

총단백 농도는 biuret법, 알부민 농도는 bromcresol green법 그리고 blood urea nitrogen(BUN)농도는 urease-indophenol법에 따라 조제된 kit (아산제약, 화성)로 측정하였다.

6-2 Creatinine의 측정

Jaffe method에 준하여 조제된 kit(Sigma)를 사용하여 실험하였다. 즉, 혈청에 alkaline picrate solution 3.0 mL을 가하여 실온에서 10분간 반응하고 acid reagent 0.1 mL을 가하여 5분간 방치한 뒤 시약 blank를 대조로 500 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 검량선에 준하여 함량을 mg/dl로 표시하였다.

6-3 Lactate dehydrogenase(LDH)의 측정

6.3 mM NAD와 50 mmol L-lactate를 함유하는 완충액(pH 8.9)의 반응액에 효소원인 혈청 50 μ L를 가하여 340 nm에서 흡광도의 증가율을 관찰하여 효소 활성을 측정(Cabaud and Wroblewski, 1958)하였다.

7. 신장 조직 중 lipid peroxide 함량의 측정

Ohkawa et al. (1979)의 방법을 변경하여 신장 조직 1 g당 10배량의 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 가해 마쇄하였다. 이 10% 마쇄액에 동일한 buffer를 동량 가하여 3시간 preincubation 시킨 후 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid를 가하였다. 이를 95°C에서 1시간 동안 반응시켜 실온에서 냉각 후에 *n*-BuOH : pyridine(15:1)을 첨가하여 15분간 원심 분리하여 생성된 홍색의 *n*-BuOH : pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선에서 그 함량을 신장 조직 1 g 당 malondialdehyde nmole로 표시하였다.

8. 신장 조직 glutathione 함량측정

Ellman (1959)의 방법에 준하여 신장 조직 중 GSH의 함량 측정은 마쇄액 100 μ L에 25% HPO_3 를 섞어 4°C, 12000 rpm에서 10분간 원심분리한 상정액 시료로 한다. 시료 1 μ L와 phosphate buffer(1 mM EDTA 함유, pH 7.4)와 OPT(o-phthalaldehyde)를 넣어 15분간 혼합 후 360 nm에서 측정하였다.

9. 신장 효소 활성의 측정

9-1. Xanthine oxidase/dehydrogenase 활성의 측정

Stripe과 Della(1969)의 방법에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 3.0 mL에 효소액 0.4 mL를 가하고 기질인 60 μ M의 sodium xanthine 0.1 mL를 가하였다. 이를 37°C에서 반응시킨 다음 20% trichloroacetic acid를 가하여 제단백시키고 상정액을 취해 생성된 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선에 준하여 활성도를 산정하여 xanthine oxidase의 활성으로 하였으며, 반응액 중에 NAD를 첨가하여 uric acid의 농도를 측정한 것을 xanthine dehydrogenase의 활성도로 하였다. 효소 활성의 단위는 1분 당 1 mg protein이 생성되는 uric acid nmole로써 나타내었다. Xanthine dehydrogenase에서 xanthine oxidase로 전환하는 비의 산정은 $\text{XO}/\text{XD}+\text{XO}$ 로 산정하였다.

9-2. Aldehyde oxidase 활성의 측정

Rajagopalan et al.(1962)의 방법에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 기질인 NMN(n-1-methyl nicotinamide chloride)와 효소액을 가해 반응시킨 후 생성물인 2-pyridone을 파장 300 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 검량선에 준해 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 분당 mg protein이 생성하는 2-pyridone을 nmole로 표시하였다.

9-3. Aminopyrine demethylase의 활성 측정

Nash et al.(1953)의 방법을 약간 변경하여 반응액 2 mL 중 0.1M Na^+/K^+ phosphate buffer(pH 7.5)에 2 mM aminopyrine, HCl, 0.5 mM NADPH, 10 mM MgCl_2 , 150 mM KCl, 1 mM semicarbazide 및 효소액 (30-400 μg 의 단백질)을 가해 이 반응액을 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그후 15% ZnSO_4 와 포화 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 를 가하여 반응을 종료시키고 5분간 방치 후 10분간 원심분리하여 여기서 얻은 상징액 5 mL에 발색의 목적으로 Nash reagent를 첨가하고 60°C에서 30분간 반응시킨 후 다시 원심분리하여 상징액을 취하여 파장 415 nm에서 그 흡광도를 측정하고 표준곡선에 준하여 활성도를 산정하였다.

9-4. Aniline hydroxylase의 활성 측정

Bidlack et al.(1982)의 방법에 준하여 반응액 2 mL 중 10 mM MgCl_2 와 150 mM KCl이 함유된 50 mM Tris. HCl 완충액(pH 7.4)에 기질인 1 mM aniline HCl, 0.5 mM NADPH 및 효소액(300-400 μg 의 단백질)을 가하였다. 이 액을 37°C에서 20분간 반응시킨 다음 반응을 종료시킬 목적으로 20% trichloroacetic acid를 가하였다. 10분간 원심분리하여 상징액에 발색의 목적으로 10% Na_2CO_3 와 0.2 N-NaOH (2% phenol 함유)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 파장 640 nm에서 그 흡광도를 읽고 표준곡선에서 활성도를 산정하였다.

9-5. Superoxide dismutase(SOD) 활성의 측정

Marklund와 Marklund(1974)의 방법에 준하여 0.2 M potassium phosphate buffer(200 μM cytochrome C, 100 μM EDTA 함유 pH 8.6) 1.0

mL에 효소액 0.2 mL를 가하여 ice bath 상에서 20분간 방치하고 test에는 alkaline dimethyl sulfoxide(DMSO)용액 0.5 mL, blank에는 non-alkaline DMSO 용액 0.5 mL를 각각 가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 파장 550 nm에서 감소되는 cytochrome C의 흡광도를 측정하여 alkaline DMSO-mediated cytochrome C reduction을 50% 억제하는 enzyme 량을 1 unit로 산정하여 활성도를 표시하였다.

9-6. Catalase 활성의 측정

Aebi(1974)의 방법에 준하여 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)중에 기질인 10 mM H₂O₂의 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 분자흡광계수 0.041 mM⁻¹cm⁻¹을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 분해하는 hydrogen peroxide의 양을 μ mole로 표시하였다.

9-7. Glutathione peroxidase 활성의 측정

Paglia와 Balentine(1967)의 방법에 준해 hydrogen peroxide 및 glutathione이 함유된 0.1 mM tris buffer(pH 7.2) 중에서 효소액을 가하여 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량선에 준하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 생성하는 NADP의 양을 nmole로 표시하였다.

9-8. Glutathione S-transferase 활성의 측정

Habig et al.(1974)의 방법에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5)에 40 mM reduced glutathione 75 μ L를 가한 후 효소액 10 μ L를 넣고 25°C에서 5분간 preincubation 한 뒤 기질로서

2,4-dinitrochlorobenzene 25 μL 를 가하여 2분간 반응시켰다. 그후 20% trichloroacetic acid를 가하여 반응을 완료시키고 시료를 원심 분리하여 얻은 상정액을 파장 340 nm에서 흡광도를 측정한다. 후 2,4-dinitrochlorobenzene의 mole 흡광계수 $9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 활성도를 산정하였다.

9-9. Glutathione reductase 활성의 측정

Charles와 Robert(1962)의 방법에 준해 10 μmole EDTA, 1.63 μmole GSSG, 0.1 μmole NADPH가 함유된 300 μmole Tris buffer(pH 7.5)중에 효소액을 첨가하여 22°C, 파장 340 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 분자흡광계수 $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 이용하여 활성도를 환산하였다. 효소 활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 분해하는 NADPH의 양을 nmole로 표시하였다.

9-10. γ -Glutamylcysteine synthetase 활성의 측정

Meister와 Richman(1975)의 방법에 준하여 반응액 1 mL 중에 0.1 M tris HCl buffer(pH 8.0)에 8.9 mM L-glutamic acid, 0.94 mM EDTA, 3.2 mM MgCl_2 , 1.35 mM ATP 및 1 mM L- α -aminobutylic acid에 효소액 (100-200 μL protein)을 가한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid로 반응을 완료시켰다. 이후, 원심분리한 뒤 상정액에 molybdic acid와 aminonaphthol sulfonic acid를 가하여 생성되는 황색의 생성물을 파장 600 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량선에서 산정하였다. 효소의 활성 단위는 1분당 1 mg protein이 생성한 P_i 의 양을 nmole로 표시하였다.

10. 단백질 정량 및 통계처리

단백질의 함량은 Lowry et al.(1951)의 방법에 준하여 bovine serum albumin(Sigma, USA)을 표준품으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.



결과 및 고찰

1. 산수유의 일반성분

산수유 분말의 일반성분을 Table 2에 나타내었다. 산수유 분말의 수분과 회분은 각각 4.35와 4.77%로 나타났으며, 조지방과 조단백의 함량은 각각 4.31과 3.21%의 값을 나타냈다. 이러한 결과는 Lee et al.(2006)의 산수유의 일반성분 분석결과와 유사한 것으로 나타났다.



Table 2. General components of *Cornus officianalis*

(Unit : %, dry basis)

	<i>Cornus officianalis</i>
Moisture	4.35±0.13
Ash	4.77±0.25
Crude lipid	4.31±0.98
Crude protein	3.21±0.04



2. 산수유의 pH와 색도

산수유 분말의 pH와 색도를 측정하여 Table 3과 Table 4에 나타내었다. 산수유 분말의 pH는 3.21로 산성을 띠는 것으로 나타났으며, 이는 Lee et al.(1992)의 산수유 착즙액의 pH와 유사하였다.

색도의 경우 lightness값이 56.15의 수치를 보였으며, redness와 yellowness는 9.82와 19.25의 값을 나타내어 밝은 적황색을 띠는 것으로 나타났다. 산수유의 색소성분으로 알려져 있는 anthocyanin은 anthocyanin을 구성하는 수산기의 수에 따라 색깔이 변하는 것으로 보고(Francis and Markakis, 1989)되고 있다. 산성영역에서 anthocyanin의 색은 orange-red 색을 나타내므로 본 연구결과에서 산수유 분말을 측정한 색도와 일치하는 것으로 사료된다.



Table 3. pH value of *Cornus officianalis*

<i>Cornus officianalis</i>	
pH	3.21±0.01

Table 4. Color of *Cornus officianalis*

<i>Cornus officianalis</i>	
Lightness (L*)	56.15±0.01
Redness (a*)	9.82±0.11
Yellowness (b*)	19.25±0.17

3. 산수유 투여에 의한 체중과 조직 무게의 변화

3-1. 체중증가량

Cisplatin 단독투여 및 산수유와 cisplatin 동시 투여군에서 체중 변화를 관찰한 성적을 Table 4에 수록하였다.

정상군의 흰쥐에서의 체중은 4주 동안에 약 99.9 g정도 증가되던 것이 cisplatin 단독 투여군에서는 약 16.9 g 증가로 증가비가 현저히 감소되었으며, 산수유 100, 200 mg/kg을 동시에 투여한 군에서는 각각 2.2 g 및 35.8 g 증가되었다.

한편 임상에서 cisplatin의 신독성을 경감시킬 목적으로 사용하고 있는 Mesna (sodium methanethiolate)를 200 mg/kg 투여한 경우 57 g 증가로 정상군에는 미치지 못하였으나 산수유와 cisplatin을 동시에 투여한 군보다 현저히 체중이 증가되었다.

3-2. 조직무게 변화

실험 종료시에 측정된 장기 무게는 Table 5와 같다. 즉 cisplatin 단독투여군 및 산수유와 cisplatin 동시 투여군에서는 간, 비장, 그리고 부고환지방(epididymal fat pad, EFP)의 무게에서 간과 비장, EFP의 무게는 cisplatin 단독투여군이 정상군보다 감소하였으며 산수유의 동시투여로 다소 증가하는 경향을 보였다. 한편, 신장 무게(Table 3)는 cisplatin의 단독투여로 현저히 정상군에 비하여 증가되던것이 산수유의 동시 투여로 유의성 있게 억제 되었다.

3-3. 신장무게 변화

cisplatin을 투여한 후 산수유 100 mg/kg과 산수유 200 mg/kg을 전처리한 실험군과 cisplatin을 투여한 대조군과 mesna를 투여한 대조군에서 신

Table 5. Effect of *Cornus officinalis* on weight gain in cisplatin-induced renal toxicity in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Body weight				
		0	1	2	3	4 (week)
Normal		185.8±10.2 ^a	210.8±17.6 ^a	224.8±21.7 ^a	251.6±13.5 ^a	285.7±17.9 ^a
Cisplatin	5	191.2±11.2 ^a	190.7±20.5 ^a	200.1±19.3 ^{ab}	189.6±15.7 ^c	174.3±14.6 ^d
+ CRO	100	188.7±10.8 ^a	193.2±15.4 ^a	190.8±20.0 ^b	190.7±14.0 ^c	91.2±15.8 ^d
	200	182.7±10.5 ^a	200.5±14.8 ^a	200.9±17.2 ^{ab}	210.5±18.6 ^b	218.5±13.5 ^c
+ Mesna	200	180.7±11.3 ^a	198.5±21.3 ^a	215.8±19.6 ^{ab}	221.6±14.5 ^b	237.7±15.2 ^b

Rats were orally administered *Cornus officinalis*(CRO) and intraperitoneally injected cisplatin once a day for four weeks and killed 24hr after the last treatment of CRO and cisplatin. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different($p<0.05$).

Table 6. Effect of *Cornus officinalis* on organ weight gain in cisplatin-induced renal toxicity in rats

Treatment	Dose (mg/g)	Liver	Spleen	EFP
		mg / body weight		
Normal		26.1±1.43 ^c	3.04±0.20 ^a	17.1±1.51 ^a
Cisplatin	5	29.8±0.91 ^a	2.61±0.15 ^b	13.4±1.44 ^c
+ CRO	100	28.9±1.08 ^{ab}	2.67±0.32 ^b	13.6±2.31 ^{bc}
	200	27.6±1.98 ^{bc}	2.71±0.19 ^b	15.8±1.55 ^{ab}
+ Mesna	200	27.1±1.72 ^{bc}	2.80±0.17 ^{ab}	16.3±2.41 ^a

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

EFP: epidymal fat pad.

Table 7. Effect of *Cornus officinalis* on kidney weight gain in cisplatin-induced renal toxicity in rats

Treatment	Dose (mg/g)	Right	Left	Total
		mg/ body weight		
Normal		1.40±0.09 ^e	1.37±0.10 ^c	2.83±0.12 ^d
Cisplatin	5	2.68±0.12 ^a	2.43±0.20 ^a	5.13±0.21 ^a
+ CRO	100	2.55±0.11 ^b	2.40±0.13 ^a	4.95±0.19 ^a
	200	2.34±0.08 ^c	2.38±0.06 ^a	4.72±0.21 ^b
+ Mesna	200	2.17±0.07 ^d	2.14±0.14 ^b	4.35±0.18 ^c

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

EFP: epididymal fat pad.

장의 무게 변화를 비교 관찰한 성적이 Table 7에서 볼 수 있다.

각 실험군에서의 신장의 무게는 cisplatin으로 유도하였을 때 무게 증가를 보였으나 산수유의 투여로 유의성 있게 감소하였다. 이는 고도비만쥐의 비만에 대해 실험한 Jayaprakasam et al.(2006)에서 보고한 바와 같이 산수유에 함유되어 있는 Anthocyanins과 ursolic acid에 의해 신장에 triglyceride 농도가 감소되어 지방축적의 억제로 신장의 무게가 감소되는 것을 유추할 수 있다.



4. 신장의 기능

4-1. 단백질, 알부민 및 혈청 요소질소 함량

Cisplatin 및 산수유와 cisplatin을 동시에 투여하고서 단백질, albumin 및 혈중 요소질소의 함량을 관찰한 성적이 Table 8과 같다. Cisplatin 단독 투여군에서 단백질, 알부민 및 혈청 요소질소의 함량이 현저히 증가되던 것이 산수유의 동시 투여로 현저히 감소되었다.

신장염이 있는 쥐에서 알부민의 항상성을 연구한 Kaysen and Don(1997)은 정상쥐에서는 식이 단백질 수준이 높을수록 혈중 알부민 농도가 높았고, 신장염을 앓고 있는 쥐에서는 단백질 수준이 증가할수록 감소하였다고 보고했다. 그러므로 신장의 손실이 초래하였을 때 혈청 알부민 농도의 저하하는 것은 신장기능의 저하, 특히 뇨단백질 배설량의 증가로 인한 결과임을 알 수 있었다.

요소질소(BUN)은 나이가 들수록, 고단백식을 먹일수록 증가하며, 신장을 절제한 경우에 증가한다고 보고되었다(Kim et al., 1999). 그리고, 뇨로 단백질이 배설되는 것에 대한 적응현상으로써 아미노산의 산화가 감소하고, 신장기능의 저하로 뇨로 배설되는 요소 질소의 양이 감소한다는 것이 사람과 동물에서 보고되어 본 연구 결과와 일치하였다(Rodricks et al., 2001). 따라서 cisplatin의 투여로 신장 기능이 저하되어 뇨를 통한 요소 질소의 배설이 원활히 이루어지지 않아 혈중 요소 질소의 농도가 높아지는 것으로 볼 수 있다. 이러한 현상을 산수유의 투여로 개선하여 주는 것으로 생각된다.

4-2. 혈중 creatinine 및 lactate dehydrogenase(LDH)활성에 미치는 영향

정상군과 cisplatin 단독 투여군 및 cisplatin과 산수유의 동시 투여군에서

혈중 creatinine, Lactate dehydrogenase(LDH)활성에 미치는 영향을 관찰

Table 8. Influence of *Cornu officinalis* on blood urea nitrogen(BUN) concentration of cisplatin-induced renal toxicity in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Protein	Albumin	Serum Urea Nitrogen
		(g/dl)		
Normal		6.51±0.16 ^c	4.54±0.16 ^a	10.5±0.50 ^e
Cisplatin		7.43±0.21 ^a	3.87±0.11 ^b	29.6±1.25 ^a
+ CRO	100	6.99±0.14 ^b	4.02±0.07 ^b	25.7±1.01 ^b
	200	6.83±0.13 ^b	4.16±0.21 ^b	21.4±1.28 ^c
+ Mesna	200	6.60±0.16 ^c	4.30±0.09 ^{ab}	18.7±1.33 ^d

Rats were orally administered *Cornu officinalis*(CRO) and intraperitoneally injected cisplatin once a day for four weeks and killed 24 hr after the last treatment of CRO and cisplatin. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different($p < 0.05$).

한 성적을 Fig. 2과 3에 나타내었다.

신장 기능의 지표로 널리 알려져 있는 creatinine과 세뇨관 손상 지표로 사용되는 LDH활성에 미치는 영향을 관찰하였다. Creatinine은 신장 실질 장애가 진행되면 내인성 삼투압 이뇨가 생겨 요소의 세뇨관 재흡수를 저해하여 creatinine, creatine, 요산 등에 비하여 상대적으로 뇨중 배설이 증가된다(Checchio and Como, 1986). Cisplatin을 투여하지 않은 정상군에 비하여 정상 쥐에 cisplatin을 투여한 군에서 creatinine의 함량이 현저히 증가되었다.

Lactate dehydrogenase (LDH)는 생체내에서 해당계의 최종 단계에 작용하는 효소로 L-lactate를 pyruvate로 전환하는 가역반응을 촉매하고 뇨중 근위 및 원위 세뇨관의 손상을 반영하는 것으로 알려져 있다(Melissnos et al., 1972). Cisplatin과 산수유의 동시 투여에서 cisplatin에 의하여 증가되던 혈중 creatinine의 함량이 억제 되었다. 이러한 경향은 혈중 LDH 활성에도 유사한 결과를 관찰할 수 있었다.

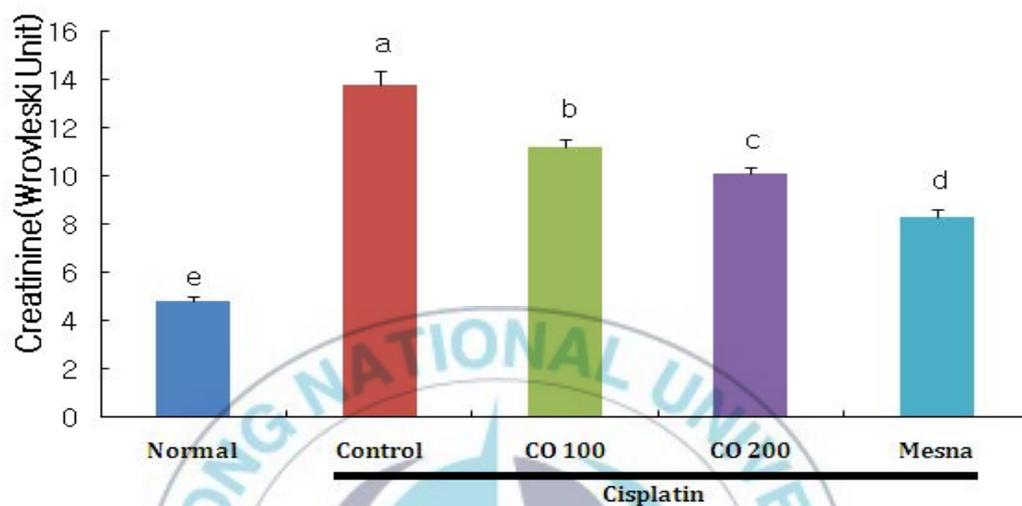


Fig. 2. Dose-dependent protective effect of *Corna officinalis* on cisplatin-induced renal toxicity in rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

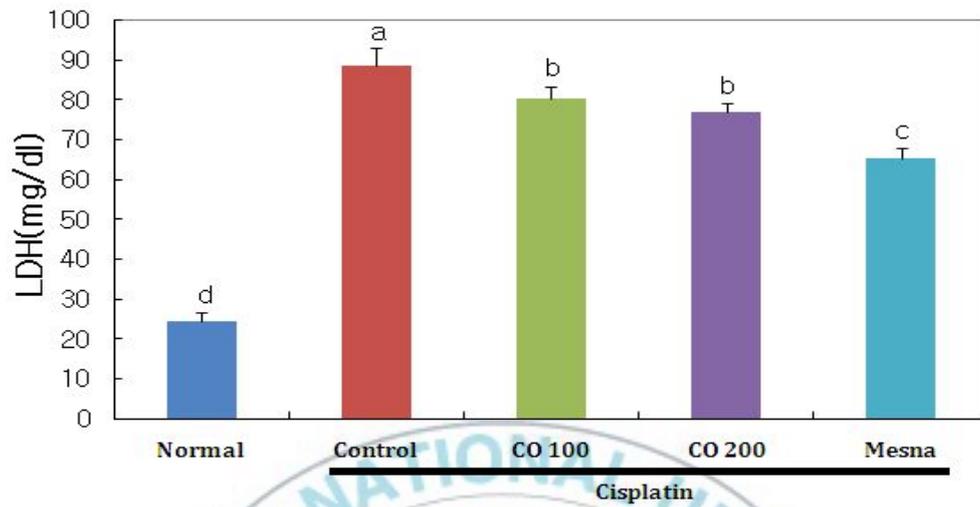


Fig. 3. Influence of dosing on the protective effect of *Corna officinalis* on cisplatin-induced renal toxicity in rats

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

5. 신조직중 지질 과산화합량에 미치는 영향

생체내에서 독작용, 노화, 발암 및 면역 억제작용을 유발하는 원인 물질로 알려진 활성산소는 생체 내외인성 요인에 의한 친전자성 물질이다 (Ward et al., 1988). 이런 활성산소는 세포막의 구성성분인 불포화 지방산을 과산화시켜 세포의 성분이나 기질 특히 세포막의 연쇄적인 과산화를 일으켜 세포 괴사 등을 일으킨다. 즉 독성물질등 여러 가지 인자에 의하여 생성된 oxygen radical과 반응한 불포화 지방산은 불포화지방산의 radical이 되고, 산소와 결합하여 hydroxyepoxide를 생성하며, 이 불포화지방산은 지질과산화물이 생성되어 malondialdehyde로 분해된다. 일반적으로 과산화 지질을 유도하는 물질은 그 물질이 세포내에서 직접 radical로 변화하거나 또는 대사부산물로서 oxygen radical을 생성시켜서 이들이 세포내 recycling 반응에 관여하여 계속적으로 radical을 생성하여 지질과산화의 생성을 증가시켜 결국은 조직의 괴사를 초래한다(Stock et al., 1990).

정상군과 cisplatin을 투여하고서 신독성을 유발한 군에 산수유를 cisplatin과 동시에 투여한 군에서 신조직중의 지질과산화물 함량을 관찰한 성적을 Fig. 4에 나타내었다. 정상군에 cisplatin을 투여한 군에서는 지질과산화물의 함량이 현저히 증가되던 것이 cisplatin과 산수유를 동시에 투여함으로써 cisplatin 단독 투여군 보다 억제되는 경향을 보였다.

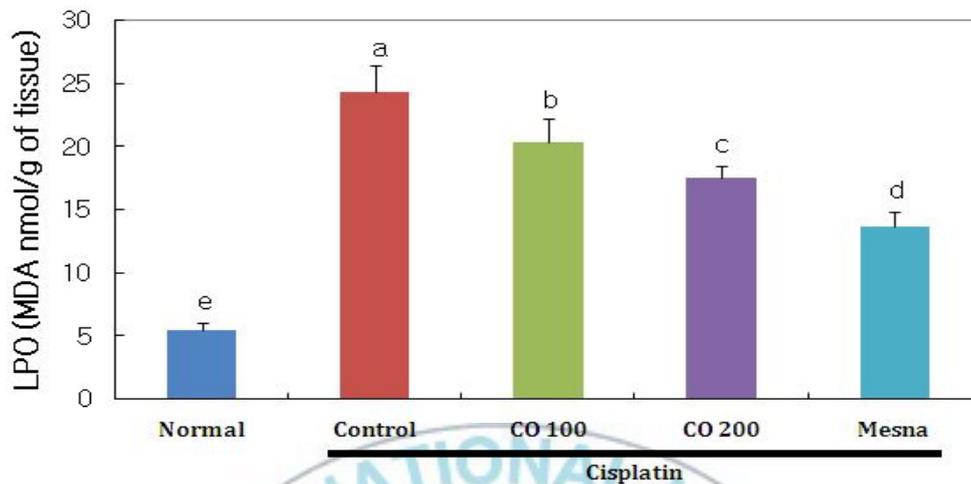


Fig. 4. Influence of *Cornus officinalis* in renal lipid peroxide content on cisplatin-induced renal toxicity in rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

6. 신장의 활성산소 생성계에 미치는 영향

6-1. Cytosol 효소계에 미치는 영향

활성산소에 의한 세포독성은 체내 해독 기구의 작용에 의하여 무독화 되는 것으로 알려져 있는데(Sinha and Mimnaugh, 1990), 일반적으로 간장의 해독기전은 간세포의 smooth endoplasmic reticulum에 존재하는 대사 효소계에 의하여 해독 또는 불활성화되어 체외로 배출되는 oxidative(산화) 및 nonsynthetic(비합성) 시키는 phase I 단계와, conjugation(포합) 및 synthetic(합성)시키는 phase II 단계로 나눌 수 있다.

생체내의 정상적인 상태에서는 xanthine dehydrogenase(XD) 활성만을 가지고 있는데, radical 또는 외부 독성 물질 유입은 이들을 xanthine oxidase(XO)로 변환시켜 NAD^+ 를 필요로 하지 않는 효소 형태로 바꾸어 버린다. 이들 XO는 각종 aldehyde, purine 등을 분해할 수 있는데, 이들 분해 과정에서 많은 radical이 형성되어 생체내 산화적 손상을 더욱 악화시키게 된다(Iyer and Sinz, 1999).

신장조직 중의 지질 과산화의 함량의 변동을 관찰하고, 지질과산화의 함량이 증가가 나타나는 기전을 알아볼 보고자 하였다. 간장의 대사 과정 중 phase I 단계 중 cytosol enzyme인 신장 xanthine oxidase(XO)와 xanthine dehydrogenase(XD)의 활성을 관찰한 결과를 Table 10에 나타내었다.

정상쥐에 cisplatin을 투여하였을 때에 정상군에 비하여 XD의 활성도가 유의성있게 감소하였으며 cisplatin과 산수유를 동시에 투여하므로써 cisplatin의 단독 투여로 감소되던 XD의 활성이 증가되었다. 그리고 정상군에 cisplatin을 투여하므로써 정상군에 비해 현저히 증가되던 XO의 활성은 산수유의 투여로 감소되었다. 이러한 결과로 XO/XD+XO의 전환률 또한 XO와 유사한 결과를 관찰할 수 있었다. 또 다른 cytosol enzyme인 aldehyde oxidase(AO) 활성(Fig. 5) 역시 정상쥐에 cisplatin을 투여하였을

Table 10. Influence of *Cornus officinalis* in renal cytosolic enzyme system activity on cisplatin-induced renal toxicity in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	XD*	XO**	Type conversion (XO/XD+ XO)
		uric acid nmole/mg protein/min		
Normal		0.21±0.04 ^a	0.093±0.02 ^c	0.29±0.04 ^d
Cisplatin		0.018±0.01 ^c	0.208±0.02 ^a	0.92±0.15 ^a
CRO	100	0.048±0.03 ^c	0.193±0.02 ^a	0.80±0.09 ^b
	200	0.054±0.04 ^c	0.165±0.01 ^b	0.75±0.06 ^b
Mesna	200	0.090±0.03 ^b	0.147±0.02 ^b	0.61±0.08 ^c

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

*XD : xanthine dehydrogenase.

**XO: xanthine oxidase.

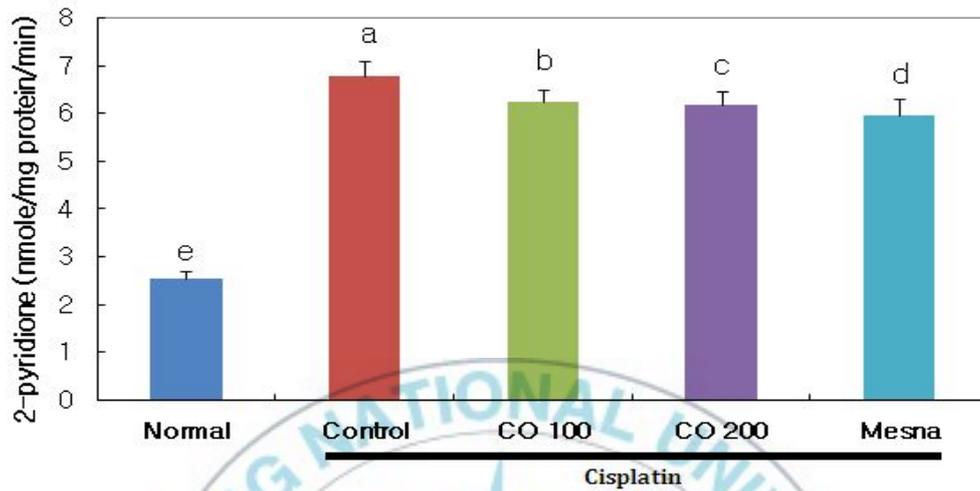


Fig. 5. Influence of *Cornus officinalis* in renal cytosolic enzyme system activity on cisplatin-induced renal toxicity in rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

때 현저히 증가되던 활성이 산수유의 동시 투여로 감소하는 경향을 보였다.

이러한 결과로 보아 정상쥐에 cisplatin의 투여에 의하여 생긴 신독성의 증가를 산수유의 동시 투여로 억제되는 것은 산수유가 cytosol계 효소의 활성을 조절함으로써 활성산소의 생성을 억제하는 것으로 사료된다.

6-2. Microsomal 효소계에 미치는 영향

일반적으로 간장의 해독기전은 간세포의 smooth endoplasmic reticulum에 존재하는 대사 효소계에 의하여 해독 또는 불활성화되어 체외로 배출되는 oxidative(산화) 및 nonsynthetic(비합성) 시키는 phase I 단계와, conjugation(포합) 및 synthetic(합성)시키는 phase II 단계로 나눌 수 있다. 그 중 phase I 단계에 관여하는 cytochrome P-450은 mixed function oxidase로써 약물이 결합하는 형태 및 존재조직에 따라 서로 다른 spectrum을 나타내는데, aminopyrine을 기질로 하여 formaldehyde를 생성하는 Type I 이 있다. 그리고, aniline을 기질로 하여 p-aminophenol을 생성하는 Type II로 분류하고 있다(Iyer and Sinz, 1999).

이는 microsomal계의 활성산소 생성에 관여하고 있으므로, phase I 단계인 microsomal enzyme system에 미치는 영향을 관찰하여 나타난 결과를 Fig. 6와 7에 나타내었다.

정상군에 cisplatin을 투여한 군에서는 신장 조직의 microsomal enzyme으로서 신장의 지질과산화 생성 대사 효소계에 영향을 미치는 aminopyrine N-demethylase(AD)와 aniline hydroxylase (AH) 효소 활성에 대해 측정된 결과, 정상쥐에 비하여 cisplatin을 투여하므로써 현저히 증가되던 것이 cisplatin과 산수유를 동시에 투여하므로써 cisplatin 단독 투여군과 비교 할 때 별다른 감소 효과는 나타나지 않았다.

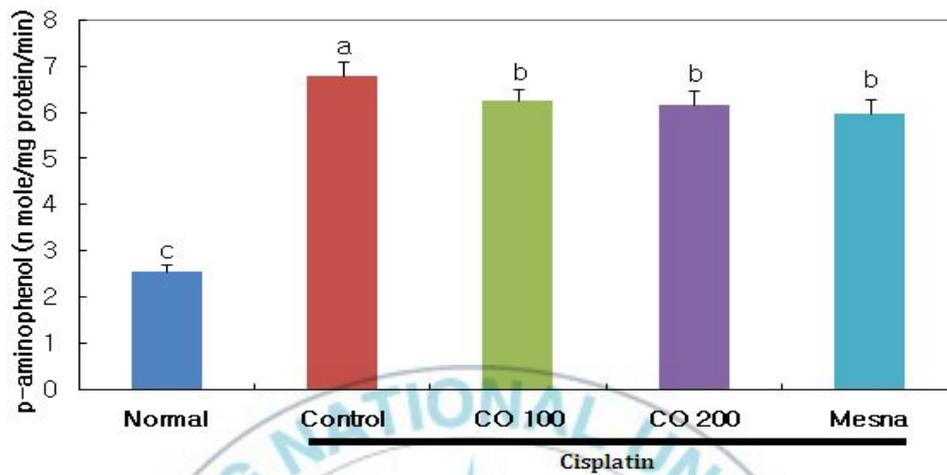


Fig. 6. Influence of *Cornus officinalis* in renal cytosolic enzyme system activity on cisplatin-induced renal toxicity in rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

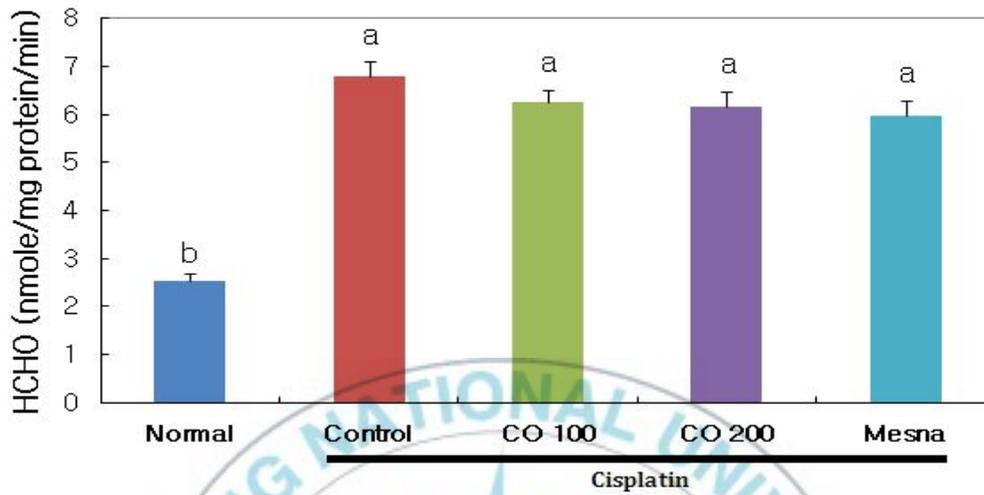


Fig. 7. Influence of *Cornus officinalis* in renal cytosolic enzyme system activity on cisplatin-induced renal toxicity in rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

7. 활성 산소의 해독계에 미치는 영향

Phase II 반응은 phase I 반응을 거친 약물이나 내인성 및 외인성 물질을 포함시키고 무독화 시키는 단계이다. 그 중 superoxide dismutase(SOD)는 xenobiotics로 인하여 생성된 superoxide anion을 H_2O_2 로 전환시키는 효소로 생체 내 해독 과정에 관여하는 효소 중 하나이다 (Cand and Verdeti, 1989). Catalase는 체내에서 지방의 자동 산화 및 유기물의 산화로 생기는 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 분해하여 무독화 시키는 radical scavenging enzyme로 물로 변환시켜 생성된 활성 산소를 체외로 배설시킨다(Hussain et al., 1995). Glutathione peroxidase 역시 catalase와 같은 기능을 수행하는 효소로 glutathione을 기질로 하여 유리기를 물로 변환시켜 생성된 활성 산소를 체외로 배설시킨다.

이러한 radical scavenging enzyme의 활성은 정상군에 cisplatin을 투여함으로써 현저히 억제되었고, 효소의 활성들이 산수유와 cisplatin을 동시에 투여함으로써 통계적으로 유의성있게 증가되었다.

정상쥐와 cisplatin 및 cisplatin과 산수유를 동시에 투여하고서 활성산소의 해독체인 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione peroxidase(GSH-Px)의 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과를 Table 11에 나타내었다. 정상쥐에 cisplatin을 투여하였을 때에 정상군에 비하여 free radical을 H_2O_2 로 변환시키는 효소인 SOD의 활성도가 유의성있게 감소하였으나, 산수유와 cisplatin을 동시에 투여함으로써 cisplatin의 단독 투여로 감소되던 SOD의 활성이 증가되었다. Catalase과 glutathione을 기질로 하여 catalase와 같은 기능을 수행하는 GSH-Px 역시 정상군에 cisplatin을 투여함으로써 정상군에 비해 현저히 감소되었다. 그러나, 산수유와 cisplatin을 동시 투여군의 catalase 및 GSH-Px의 활성이 cisplatin 단독투여군 보다 유의성 있게 증가되었다.

Table 11. Influence of *Cornus officinalis* in renal antioxidant enzyme system activities on cisplatin-induced renal toxicity in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	SOD	Catalase	GSH-Px
		unit/mg protein/mm	H ₂ O ₂ nmole/mg protein/mm	oxidized NADPH nmole/mg protein/min
Normal		28.3±2.76 ^a	159.6±15.8 ^a	211.5±20.6 ^a
Cisplatin		19.6±1.25 ^d	86.5±19.3 ^c	131.4±17.3 ^c
+ CRO	100	20.7±2.19 ^{cd}	90.1±9.48 ^c	150.2±18.8 ^c
	200	22.9±1.14 ^{bc}	113.5±13.4 ^b	182.9±14.5 ^b
+ Mesna	200	24.8±1.43 ^b	126.6±10.5 ^b	197.5±15.6 ^{ab}

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

8. Glutathione S-transferase 활성화에 미치는 영향

Phase I 대사 과정을 통해 생성된 친전자성 물질을 친핵성 물질인 GSH와 포함시켜 무독화시키는 phase II 과정에 관여해 glutathione s-transferase가 관여한다(Vos and Van Bladeren, 1990).

정상쥐에 cisplatin 및 cisplatin과 산수유를 동시에 투여하고 활성산소의 해독과정인 phase II 단계 중 glutathione S-transferase의 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과를 Fig. 8에 나타내었다.

정상쥐에 cisplatin을 투여하였을 때에 정상군에 비하여 GST의 활성이 현저히 감소되던 것이 산수유와 cisplatin을 동시에 투여하므로써 cisplatin의 단독 투여군과 비교 할 때 별다른 증가 현상은 나타나지 않았다.



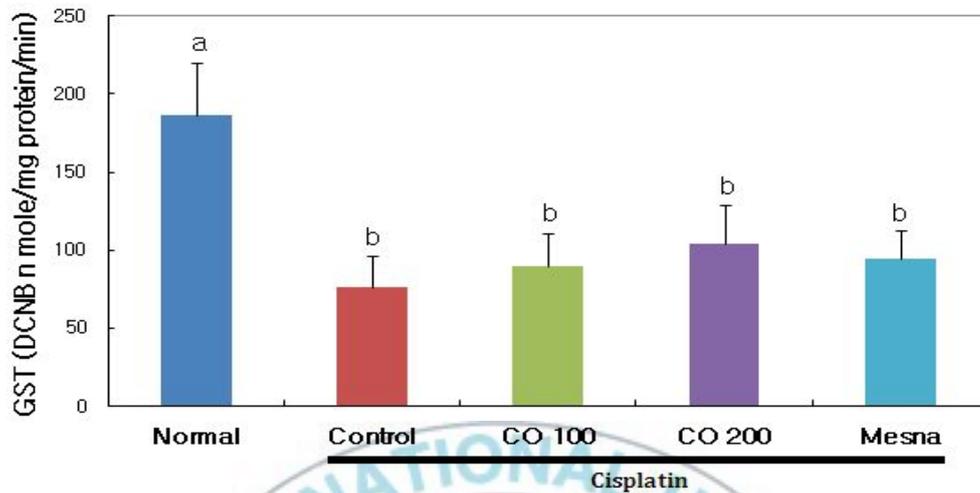


Fig. 8. Influence of *Cornus officinalis* in renal glutathione S-transferase activity on cisplatin-induced renal toxicity in rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

9. Glutathione 농도 및 glutathione 생성계에 미치는 영향

이렇듯 친전자성 물질들과 활성 산소 및 과산화물의 최종적 무독화 과정에서 필연적으로 glutathione이 요구되는데 이 물질의 함량에 따라 독성 발현의 유무를 판단할 수 있다. glutathione은 간과 신장에서 glutamic acid, cysteine 및 glycine을 기질로 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase에 의해 합성된다(Beutler and Gelbart, 1986). 본 연구에서는 cisplatin의 독성에 산수유의 투여가 GST의 활성을 저해하는가를 알아보기 위해 GST의 활성에 필연적인 endogenous reactant인 glutathione(GSH) 농도를 측정된 결과를 Table 12에 나타내었다.

정상쥐에 cisplatin을 투여하였을 때에 정상군에 비하여 glutathione의 함량이 유의성있게 감소하였으며 산수유와 cisplatin을 동시에 투여하므로써 cisplatin의 단독 투여로 감소되던 glutathione의 함량이 증가되었다.

세포내 GSH의 감소는 화학 물질, 방사선, 활성 산소에 의해서 야기된 독성에 대한 감수성의 증가이며, 신장에서 GSH 자체의 고갈은 신장 기능을 손상시킨다고 알려져 있다(Beutler and Gelbart, 1986). 산수유의 동시투여로 glutathione의 농도가 증가되므로써 glutathione peroxidase의 활성이 증가 되는 것으로 생각된다.

Cisplatin의 단독 투여에 의한 glutathione의 함량 감소와 cisplatin과 산수유의 동시투여에 따른 glutathione의 농도 증가의 기전을 알아볼 목적으로 glutathione 합성에 관여하는 γ -glutamylcystein synthetase(γ -GCS)의 활성과 산화형 glutathione을 환원형 glutathione으로 환원시키는 glutathione reductase의 활성을 관찰하였다. 그 결과 정상군에 cisplatin을 투여하므로써 현저히 감소되던 γ -GCS의 활성에는 별다른 영향이 없었으나, glutathione reductase의 활성이 cisplatin과 산수유의 동시 투여에 의하여 증가됨을 관찰할 수 있었다.

Table 12. Influence of *Cornus officinalis* in renal glutathione biosynthesis on cisplatin-induced renal toxicity in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	GSH	GR	γ-GCS
		nmole/mg protein	μmole/g of tissue	Pi nmole /mg protein/min
Normal		26.2±3.89 ^a	31.3±2.18 ^a	15.6±0.89 ^a
Cisplatin		14.8±2.11 ^c	9.17±1.42 ^c	6.13±0.55 ^c
+ CRO	100	16.9±1.46 ^c	10.9±1.33 ^c	6.45±0.37 ^c
	200	20.2±1.17 ^b	15.3±3.15 ^b	6.50±0.45 ^c
+ Mesna	200	22.5±2.01 ^b	17.6±2.29 ^b	7.17±0.39 ^b

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

요 약

임상에서 각종 암에 사용하는 cisplatin은 심각한 부작용으로 신장장애를 들수 있으며 이러한 신장장애를 경감시킬 목적으로 산수유가 cisplatin의 신독성 경감기전에 어떠한 영향을 주는가를 관찰할 목적으로 일반적인 신기능검사, 신장조직에서의 활성산소의 생성 및 해독계에 미치는 영향을 실험하여 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체중증가량 및 장기의 무게에서 cisplatin 단독투여에 의하여 현저히 감소되던 체중이 산수유와 cisplatin 동시 투여에서 증가되었으며, 각 장기 중 신장의 무게는 cisplatin의 투여로 증가되던 것이 산수유의 투여로 억제되었다.

2. 신장의 기능시험인 혈청 단백질 및 혈청의 요소질소 함량은 cisplatin의 단독 투여로 증가되던 것이 산수유의 동시투여로 억제되었으며 혈중 creatinine 및 lactate dehydrogenase의 활성은 cisplatin 단독투여로 증가되었으며 산수유의 동시투여로 억제되었다.

3. 신조직중 지질 과산화함량은 cisplatin의 투여로 증가되던 것이 산수유의 동시 투여로 억제되었으며, 활성산소의 생성체인 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase의 활성은 cisplatin의 단독투여로 증가되던 것이 산수유의 동시투여로 억제되었다. 한편 aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase의 활성에는 별다른 영향이 없었다.

4. 활성산소의 해독계인 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase의 활성은 cisplatin의 단독 투여로 현저히 억제되던 것이 산수유와 cisplatin의 동시 투여로 증가되었으며 glutathione S-transferase의 활성에는 별다른 영향이 없었다.

5. 신조직중의 glutathione 함량, glutathione reductase의 활성은 cisplatin의 단독 투여로 현저히 억제되던 것이 산수유와 cisplatin의 동시 투여로 증가되었으며, γ -glutamylcysteine synthetase의 활성에는 별다른 영향이 없었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 cisplatin의 투여로 야기되는 신독성이 산수유의 동시 투여로 경감되는 기전은 cisplatin에 의한 활성산소의 생성계 및 해독계를 조절하므로써 이로 인한 신조직의 지질과산화의 함량을 감소시키는 것으로 사료되어진다.

감사의 글

식품에 대한 지식을 넓히고자하는 높은 포부를 가지고 늦각이 대학원생이 된지가 엇그제 같은데 벌써 졸업이라니 많은 생각들이 스쳐 지나갑니다.

바쁜 업무라 여유없는 일상속에서도 배움의 기회를 제공해 주신 김영식 회장님, 배근호부사장님, 김지안 팀장님, 저희 연구실 직원 외 천호식품 모두를 사랑합니다.

그리고 늦게 시작한 공부지만 게을리 할 수 없게 옆에서 항상 채찍질 해주시고 격려해주신 안동현 교수님과 이근태, 조영제, 김선봉, 전병수, 양지영, 이양봉, 김영목 교수님 그리고 자원 개발 실험실 대학원, 학부 모든 분들, 실험에 대한 조언과 지원을 아낌없이 해주신 경성대학교 최종원 교수님과 김태호 선생님께도 감사드립니다.

항상 옆에서 가장 든든한 버팀목이 되어주는 우리 부모님과 시어머님, 남편과 우리 두 딸 유영이, 유진이도 저를 가장 자랑스러워 할 것이라 믿습니다.

입학해 2년간을 함께 한 2008학번 식품 산업 공학과 교우 여러 분들께도 감사드립니다.

아직은 배워고 익혀야 할 것이 많겠지만 산업 현장에서 조금이라도 도움이 되는 논문이 되기를 바라고 다시 한 번 고개 숙여 이 논문이 완성되도록 도움을 주신 모든 분들께 감사를 드리고 항상 노력하는 모습으로 열심히 살아가겠습니다.

참 고 문 헌

- Aebi H. 1974. Catalase. In " Methods of enzymetic analysis" Vergmeyer, M.U., *Academic Press*, New York., 2, 673.
- Aprikian AG, Bazinet M, Plante M, Meshref A, Trudel C, Aronson S, Nachabe M, Peloquin F, Dessureault J, Narod S, Begin L and Elhilali M. M. 1995. Family history and the risk of prostatic carcinoma in a high risk group of urological patients. *J Urol* 154: 404-406.
- Beutler E. and Gelbart T. 1986. Improved assay of the enzymes of glutathione synthesis: γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase. *Clinica Chimica Acta* 158(1): 115-123.
- Bidlack W. R. and Lowry G. L. 1982. Multiple drug metabolism: *p*-Nitroanisole reversal off acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem Pharmacol* 31: 311.
- Borch R. F. 1987. The platinum anti-tumour drugs. In: Powis G, Prough RA (eds) *Metabolism and action of anti-cancer drugs. Taylor and Francis*, London, 163-193
- Burks D. and Littleton R. 1992. The epidemiology of prostate cancer in

black men. *Henry Ford Hosp Med J* 40: 89-92.

Cabaud P. G. and Wroblewski F. 1958. The determination of serum lactate dehydrogenase. *Am J Clin Path* 30: 234.

Cand F. and Verdetti J. 1989. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Rad. Bio Med* 7(1): 59-63.

Charles E. M. and Robert G. L. 1962. Hepatic glutathione reductase. *J Biol Chem* 237: 1589.

Checchio L. M., and Como A. J. 1986. Electrolytes, BUN, creatinine: Who's at risk. *Annal Emergency Med* 15(3): 363-366.

Choi H. J., and Choung S. Y. 1992. Neutrophil mediated cytotoxicity of cisplatin. Abstract of the 41st Annual Convention of Pharmaceutical Society of Korea. 123.

Connors T. A., Johns M. and Ross W. C. J. 1972. New platinum complexes with antitumor activity. *Chembiol interact* 5 :415-424.

Dai Y. and Hang H. Z. 1992. Inhibition of *Corni Fructus* on experimental inflammation. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 17: 307-309.

- Ellman G. L. 1959. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 30: 2409.
- Francis F. J. and Markakis P. C. 1989. Food colorants: Anthocyanins. *Food Sci Nutr* 28(4): 273-314.
- Goldstein R. S. and Mayor G. H. 1983. The nephrotoxicity of cisplatin. *Life Sci* 32: 685-690.
- Guilian T., Zhang T., Yang F. and Ito Y. 2000. Separation of gallic acid from *Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 886: 309-312.
- Habig W. H., Pabist M. J. and Jakoby W. B. 1974. Glutathione S-transferase : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130.
- Hussain S., Slikker Jr. W. and Ali S. F. 1995. Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *International J Develop Neuro.* 13(8), 811-817.
- Iyer K. R. and Sinz M. W. 1999. Characterization of Phase I and Phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver

preparations. *Chemico-Biol Inter.* 118(2): 151-169.

Jayaprakasam B., Olson L. K., Schutzki R. E., Tai M. H. and Nair M. G. 2006. Amelioration of Obesity and Glucose Intolerance in High-Fat-Fed C57BL/6 Mice by Anthocyanins and Ursolic Acid in Cornelian Cherry (*Cornus mas*). *J Agric Food Chem* 54: 243-248

Jeng H, Wu C. M., Su S. J. and Chang W. C. 1997. A substance isolated from *Cornus officinalis* enhances the motility of human sperm. *AM J Chinese Med* 25: 301-306.

Kaysen G. A. and Don B. R. 1997. Factors that affect albumin concentration in dialysis patients and their relationship to vascular disease. *Am J Kidney Dis* 29: 658 - 668

Kim O. K. 2005. Antidiabetic and antioxidative effects of *Corni Fructus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Oil Chem* 22: 157-167.

Kim W. Y., Lee H. S. and Moon H. M. 1999. Effects of Chronic High Protein Feeding on the Calcium and Skeletal Metabolism in Male Rats. *Kor J Gerontol* 9(3): 17-27.

Kim Y. H. 1999. Isolation of constituents from the fruits *Cornus officinalis*. *Siebold* 14: 287-292.

- Kociba R. J. and Sleight S. D. 1971. Acute toxicologic and pathologic effects of cis-diaminedichloroplatinum (NSC-119875) in the male rat. *Cancer Chemother Rep* 55: 1-8.
- Lee S. O., Han S. M., Kim H. M., Jeung S. K., Choi J. Y. and Kang I. J. 2006. Chemical components and antimicrobial effects of Corni frutus. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35(7): 891-896.
- Lee Y. C., Kim Y. E., Lee B. Y and Kim C. J. 1992. Chemical compositions of Corni frutus and separating properties of its flesh by drying. *Korean J Food Sci Technol* 24(5): 447-450.
- Leonard B. J., Eccleston E. and Jones D. 1971. Antileukemic and nephrotoxic properties of platinum compounds. *Nature* 234: 43-45.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Rendall R. J. 1951. Protein Measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265.
- Madias N.E. and Harrington J. T. 1978. Platinum nephrotoxicity. *Am J Med* 65: 307-314.
- Marklund S. and Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for

- superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469.
- Meister A. and Richman P. G. 1975. Regulation of γ -glutamylcysteine synthesis by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 250: 1422.
- Melissinos K., Drivas G. and Vlassopoulos K. 1972. LDH activity of red cells in chronic renal failure. *Clinica Chimica Acta* 40(1): 165-169.
- Nash T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hentsch reaction. *J Biol Chem* 55: 416.
- Ohkawa H., Ohishi N. and Yaki K. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351.
- Paglia E. D. 1967. Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158.
- Park Y. K., Whang W. K. and Kim I. H. 1995. The antidiabetic effects of extract from *Cornus officinalis* seed. *Chung-Ang J Pharm Sci* 9: 5-11.
- Prestayko A. W., Crooke S. T. and Carter S. K. Cisplatin: Current

status and new developments. *Academic Press*, New York, 1980

Rajagopalan K. V., Fridovich I. and Handler P. 1962. Hepatic aldehyde oxidase. In Purification and properties, *J Biol Chem* 237: 92.

Rodricks J. V., Gaylor D. W. and Turnbull D. 2001. Quantitative extrapolations in toxicology. In : Hayes. AW, ed. *Principles and Methods of Toxicology, Fourth Edition*. Philadelphia, PA : Taylor and Francis.

Rosenberg B. 1975. Possible mechanism for the antitumor activity of platinum coordination complexes. *Cancer Chemother Rep* 59: 589-598.

Rosenberg B, Van Camp L, Trosko J. E. and Mansour V. H. 1969. Platinum compounds : a new class of potent antitumor agents. *Nature* 233: 385-386.

Sinha B. K. and Mimnaugh E. G. 1990. Free radicals and anticancer drug resistance: Oxygen free radicals in the mechanisms of drug cytotoxicity and resistance by certain tumors. *Free Rad Biol Med* 8(6): 567-581.

Sodzuks Y., Shoji T. and Takino Y. 1991. Change of lipid Peroxide levels in rat tissues after cisplatin administration. *Toxicology*

Letters 57: 159-166.

Stirpe F. and Della C. E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase(Type D) to oxidase(Type O). *J Biol Chem* 244: 3855.

Stock M. K., Silvernail K. K. and Metcalf J. 1990. Prenatal oxidative stress: I. Malondialdehyde in hypoxic and hyperoxic chick embryos. *Free Rad Biol Med* 8(4): 313-318.

Sugihara K., Nakano S., Koda M., Tanaka K., Fkuisky N. and Gemba M. 1987. Stimulatory effects of cisplatin on production of lipid peroxidation in renal tissues. *Jpn J Pharmaco* 43: 247-252.

Von Hoff P. P., Schilsky R., Reichert C. M., Reddick R. L., Rozencwig M., Young R. C. and Muggia F. M. 1979. Toxic effects of cis-dichlorodiammine-platinum (II) in man. *Cancer Treat Rep* 63: 1527-1531.

Vos R. M. E. and Van Bladeren P. J. 1990. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chemico-Biol Inter* 75(3): 241-265.

Ward J. M., and Fauvie K. A. 1976. The nephrotic effects of cis-

diaminedichloroplatinum (NSC-119875) in male F-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 38: 525-541.

Ward J. M., Young D. M., Fauvie K. A., Wolpert M. K., Davis R. and Gaurino A. M. 1976. Comparative nephrotoxicity of platinum cancer chemotherapeutic agent. *Cancer Chemother Rep.* 60: 1975-1682.

Ward P. A., Warren J. S. and Johnson K. J. 1988. Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. *Free Rad. Biol Med* 5(5-6): 403-408.

Won D. H., Cho J. H., Kim H. S., Ko J. H., Lee J., Park S. A., Lee H. J., Yook C. S., Kim I. H. and Won B. P. 1996. Studies on the analysis of *Corni Fructus* and its preparation. *The Annual Report KFDA* 1: 197-201.

Yamahara J., Mibu H., Sawada T., Fujimura H. and Takino S. 1981. Antidiabetic principles of *Corni Fructus* experimental diabetes induced by streptozotocin. *Yakugaku Zasshi* 101: 86-90.

통계청. 질병 소분류별 입원 다빈도 상병 급여 현황, 2004

통계청. 질병 소분류별 입원 다빈도 상병 급여 현황, 2006

厚生省, “第十改正 日本薬局方”, 4月 p.1014, 1981

陸昌洙, 安德均 共著, “現代 本草學”, 高文社, p.155, 1972

陸昌洙, “寒國藥品植物學圖鑑”, 進明出版社, p.268, 1981

山原條二, “現代東洋醫學”, 7(3): 51, 1986

下村裕, 子, 藥學雜誌, 106(10): 878-887, 1986

韓藥研究所委員會 編, “韓藥學”, p.259, 1980

