마우스에서 Procaine 투여에 의한 Cisplatin 신독성의 완화 기전

고신대학교 의과대학 *생리학교실, 마취통증의학교실

안도환* · 김상래* · 하동호 · 김세환

Mechanism of Amelioration of Cisplatin Nephrotoxicity by Procaine Treatment in Mice

Do Whan Ahn, M.D.*, Sang Rae Kim, M.S.*, Dong Ho Ha, M.D., and Se Hwan Kim, M.D.

Departments of *Physiology, Anesthesiology and Pain Medicine, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Background: Procaine binds to DNA and reduces cisplatin nephrotoxicity, but the mechanism is poorly understood. We explored whether procaine amelioration of cisplatin nephrotoxicity was related to down-and/or up-regulation of inflammatory response gene tumor necrosis factor- α (TNF- α), oxidative stress indicator gene heme oxygenase-1 (HO-1) or cell cycle inhibitor gene p21.

Methods: Cisplatin and procaine were intraperitoneally injected to mice at a single dosage of 16 and 80 mg/kg, respectively. Renal evaluation was performed 72 hours after cisplatin administration. The expression of transcripts and proteins was analyzed using real time RT-PCR and Western blot, respectively.

Results: Procaine treatment moderately attenuated necrotic changes of renal proximal tubules and increases in BUN and creatinine concentration by cisplatin administration. Kidney platinum level between the cisplatin (cis) group and the cisplatin + procaine (CisPro) group was not different. Although the level of TNF- α mRNA increased 4-fold higher in the Cis group than in the control, this increase was not attenuated by procaine treatment. Gene expression of p21 and HO-1 was elevated 175 and 4-times higher in the Cis group than in the control, respectively. But their expression was no further elevated, rather significantly reduced in the CisPro group compared to the Cis group. Protein abundance of p21 and HO-1 was paralleled by their respective mRNA expression.

Conclusions: Procaine amelioration of cisplatin nephrotoxicity is likely to be achieved through processes other than the regulation of TNF- α , HO-1 or p21 gene expression. (Korean J Anesthesiol 2007; 52: 318~27)

Key Words: cisplatin nephrotoxicity, heme oxygenase-1, procaine, tumor necrosis factor- α , p21.

서 론

Cisplatin은 상피세포에서 기원하는 고형암의 치료에 효과적인 항암제이다. 고환암, 난소암, 두경부암, 방광암, 비소세포성 폐암 등에 강한 항암작용을 나타낸다.¹⁾ Cisplatin의 작용기전은 알킬화 항암제와 유사한 특성을 갖는데 세포 내 DNA의 핵친화적(nucleophilic) 부위와 작용하여 cisplatin-DNA adduct를 형성하므로^{2,3)} 세포분열이 왕성한 암세포의 DNA 복제를 억제하여 항암작용을 나타낸다. Cisplatin의 부작용은

골수억제, 위장관계 독성, 신경독성, 신독성 등이지만 이중 신독성이 제일의 걸림돌로 인식되어 왔는데 이는 cisplatin이 신장에 집중적으로 축적됨으로써 신독성이 cisplatin의 용량에 비례하여 심각해지기 때문이다.^{4,5)} Cisplatin이 신장세포로 이동되는 기전은 명확히 밝혀진 바 없지만 최근에는 세포막의 유기양이온 이동계를 이용한다는 보고가 많다.^{6,9)} 급성 근위세뇨관 기능장애는 cisplatin 신독성이 시작됨을 알리는 신호탄으로서 약물 투여 초기에는 신혈류량과 사구체여과율은 변하지 않는다. 약물 투여 72시간이 지나면 신혈류량과 사구체여과율도 급격히 감소하고 근위세뇨관의 괴사도 동반될 뿐만 아니라 다뇨와 natriuresis도 지속된다. 실험동물에서 cisplatin 신독성은 근위세뇨관 S3분절의 손상이 집중적으로 일어나는 반면 사람에선 근위세뇨관과 원위 세뇨관에 서도 손상이 나타나는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾

임상에서 cisplatin을 투여한 환자의 25~35%에서 신독성이 유발되기 때문에¹¹⁾ 이러한 독성을 감소시키려는 다양한

논문접수일 : 2006년 9월 18일

책임저자 : 김세환, 부산시 서구 압남동 34번지

고신대학교복음병원 마취통증의학과, 우편번호: 602-702

Tel: 051-990-6263, Fax: 051-254-2504

E-mail: kshwan@ns.kosinmed.or.kr

박사학위 논문임.

약리학적 방안들이 시도되었다. 이노제 투여와 함께 수화요법(hydration)은 이미 임상치료의 표준요법으로 자리 잡았으며 이 요법은 cisplatin에 의한 신독성, 신경독성, 골수억제 등을 현저히 감소시킨다.^{12,13)} 황(sulfur)을 함유한 화합물이 백금과 결합력이 높다는 사실이 밝혀진 이후 sodium thiosulfate가 cisplatin 신독성을 감소시키는 데 사용되었다. 그러나 이 물질은 한편으로 신독성을 감소시키지만 cisplatin의 항암효과도 동시에 감소시키는 단점이 발견되었다.¹⁴⁾ Thiol기를 함유한 물질인 WR-2721 (amifostineTM)과 glutathione이 cisplatin 신독성을 일부 감소시키며,^{15,16)} 세포 내 glutathione의 감소는 cisplatin 신독성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.^{17,18)}

급성 신부전의 대표적 모델로 신장의 허혈-재관류 손상이 흔히 이용되는데 이 모델에 의한 신장 손상은 세포 내 산화스트레스에 의한 과잉의 활성산소(reactive oxygen species) 때문에 유발된다.^{19,20)} 허혈 모델과 유사하게 독성물질에 의한 신장 손상의 하나인 cisplatin 신독성도 허혈-재관류 손상과 기능적, 조직학적 측면에서 유사하기 때문에 cisplatin 신독성의 완화를 위해 superoxide dismutase, 비타민 C, 비타민 E, selenium, melatonin 등 다양한 종류의 항산화제가 주로 사용되었다.²¹⁻²⁴⁾ 활성 산소 외에도 산화 스트레스를 받을 경우 조직 내 heme oxygenase-1 (HO-1) 생산이 증가되는데 이 단백질의 생성 유무에 따라 cisplatin 신독성이 조절되는 것으로 알려져 있다.^{25,26)} 최근에는 cisplatin 신독성의 병태생리학적 기전을 염증반응의 변화로 해석할 수 있는 실험적 증거가 대두됨으로써 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 중요성이 부각되고 있다.^{27,28)} 한편으로 cisplatin이 일차적으로 DNA 손상을 일으켜 세포주기를 활성화시킴으로써 세포괴사나 세포자살(apoptosis)을 일으키므로 이를 방지하는 p21 단백질이 cisplatin 신독성 조절에 관여할 것으로 믿고 있다.^{29,30)} 그러나 어떤 물질이 HO-1, TNF- α , p21 등의 유전자나 단백질 발현을 조절함으로써 cisplatin 신독성을 감소시키는 지 관해서는 연구된 바가 없다.

Procaine은 국소마취제로 다른 국소마취제와 달리 독성은 매우 낮다. 그러나 역가가 낮고 작용시간이 짧으며 작용효과도 서서히 나타나기 때문에 오늘날 국소 마취 영역에서 제한적으로 사용되는 편이다.³¹⁾ Qiao 가³²⁾ 미만성 림프종(lymphosarcoma) 환자에게 cisplatin과 procaine을 병용 투여하여 환자의 생존기간을 늘렸다는 사례를 보고한 이후 Esposito 등은³³⁾ P388 백혈병 암세포를 이식시킨 마우스를 사용하여 cisplatin과 procaine을 병용 투여한 마우스가 cisplatin을 단독 투여한 마우스보다 생존기간이 연장되었을 뿐만 아니라 급성 신독성도 감소되었다는 보고를 한 바 있다. 한편 procaine은 GC 염기가 풍부한 DNA 가닥에 강하게 결합하여 DNA를 탈메틸화(demethylation)시키는 작용도 갖고 있다.^{34,35)}

따라서 저자들은 마우스에서 procaine 투여 시 cisplatin 신

독성의 완화 기전이 염증반응과 관련된 TNF- α 유전자, 세포주기 억제와 관련된 p21 유전자, 산화 스트레스와 관련된 HO-1 유전자 등의 발현 변화와 관련이 있는지 조사했다.

대상 및 방법

실험 동물과 약물 투여

체중 25 g 내외의 9-10주 C57BL/6 수컷 마우스(오리엔탈바이오, 서울, 한국)를 무작위로 생리식염수 투여군, procaine 투여군, cisplatin 투여군, cisplatin과 procaine의 병용투여군으로 나누었다. Cisplatin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 생리식염수에 2 mg/ml의 농도로 녹인 후 16 mg/kg의 용량으로, procaine-HCl (Sigma)은 증류수에 녹여 80 mg/kg의 용량으로 투여하되 주사직전 두 약물을 섞어 복강 내로 1회 투여했다. 모든 군에서의 투여된 약물의 총용량은 0.3 ml로 통일시켰으며 투여 72시간 후 마우스를 희생시켰다.

신기능 검사와 조직학적 검사

Ketamine (50 mg/kg)과 xylazine (10 mg/kg)이 혼합된 마취제를 복강 내 투여하여 동물을 마취시킨 다음 heparin 10 ul (50 U)가 포함된 1 ml 주사기로 심장을 천자하여 혈액을 채취했다. 즉시 혈장을 분리하여 BUN과 creatinine 농도를 측정했다. 한편으로 신장을 적출하여 한쪽은 10% 포르말린 완충액(pH 7.4) 내에 고정시키고 다른쪽은 액체질소에 얼린 후 -70°C에 보관했다. 고정시킨 신장은 paraffin에 포매한 후 5 um의 두께로 자르고 탈파라핀 과정과 탈수과정을 거쳐 periodic acid-Schiff (PAS)염색을 시행했다.

신장의 platinum 함량

신장 한 개를 적출하여 주위 혈관과 지방을 깨끗이 제거한 다음 무게를 측정했다. 이것을 테프론 용기에 담고 35% 과산화수소수 1 ml를 넣은 다음 100°C에서 3시간 가열했다. 이후 질산과 염산을 8 : 2의 비율로 혼합한 혼합액 1 ml를 다시 첨가하여 150°C에서 가열시키고 겔상태가 될 때까지 시료를 증발시켰다. 마지막으로 2% 질산을 첨가하여 최종 부피가 10 ml가 되도록 mass-up시켰다. 시료 내의 백금 농도는 inductively coupled plasma/mass spectrometer (ICP/MS) (Elan 6100, Perkin Elmer, Boston, MA, USA)로 측정했으며 신장 단위 g당 백금 함량을 산출했다.

신장 내 총 thiol 함량

조직의 총 thiol (sulfhydryl, SH)은 단백질과 결합된 부분과 glutathione처럼 비단백성 부분으로 구성되어 있다. 본 실험에서는 Ellman 시약을 사용하여 신장내 총 thiol의 함량을 Klip 등의³⁶⁾ 방법을 변형하여 다음과 같이 측정했다. Tris

완충용액(25 mM Tris, pH 7.4) 1 ml가 포함된 시험관에 신장의 반쪽을 넣고 조직파쇄기로 10초 동안 2회 반복하여 조직을 완전히 파쇄시킨 후 균등액(homogenate)을 만들었다. 새로운 시험관에 2 mM DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) 0.1 ml, 1 M Tris, pH 8.0) 0.2 ml, 15% SDS 0.2 ml, 균등액 0.2 ml, 증류수 1.3 ml을 넣고 실온에서 5분간 방치시킨 후 412 nm에서 흡광도를 측정했다. Thiol 농도는 DTNB의 흡광계수(13,600 cm⁻¹. M⁻¹)를 이용하여 계산했다. 균등액의 단백질 농도를 측정하기 위해 BioRad protein assay kit (BioRad, Hercules, CA, USA)를 사용했으며 표준단백질로 rat serum albumin을 사용했다. 신장 내 thiol 함량은 mmole thiol/mg protein으로 표준화시켰다.

Real time RT-PCR

신피질 20–30 mg을 RNAqueous-4PCR kit (Ambion, Austin, TX, USA)을 이용하여 RNA를 분리했으며 kit 내에 포함된 DNase로 오염된 DNA를 제거하여 RNA순도를 높였다. 260/280 nm에서 각각 RNA의 흡광도를 측정하여 순도를 확인하고 RNA 농도를 계산했다. 총 RNA 0.5–1 ug을 역전사(reverse transcription)시켜 cDNA를 합성했는데 이를 위해 SuperScript II first-strand synthesis system (Invitrogen, Calsbad, CA, USA)을 사용하여 제조사의 지시대로 시행했다. Real time RT-PCR은 Applied Biosystem 7000 Sequence Detection System (Foster City, CA, USA)을 이용하여 Taq polymerase와 기타 필요한 시약이 모두 함유된 2 × SYBR Green 시약(Applied Biosystem)을 사용했다. 반응액 25 ul 속에는 5배 희석한 cDNA 5 ul와 primer 10 pmole을 포함시켰다. Annealing과 extension은 60°C, 1분으로 설정하고 PCR 주기는 45회로 설정했다. 각 primer의 염기서열은 Whitehead Institute에서 개발한 Primer3 프로그램을³⁷⁾ 사용하여 작성했으며 Table 1에 표시했다.

PCR이 끝난 후 각 유전자의 mRNA의 상대적 발현비(R)는 PCR 효율을 보정하지 않은 delta-delta 방법으로 계산했다. 예를 들면 대조군에 대한 cisplatin 투여군의 TNF- α 발현비를 계산하기 위해서는 다음과 같은 식을 이용했다.³⁸⁾ $R = \frac{(cisplatin/control)_{TNF}}{\beta-actin} = 2^{\frac{\Delta CT_{TNF}(control - cisplatin)}{\Delta CT_{\beta-actin}(control - cisplatin)}}$. 여기서 ΔCT 는 threshold cycle의 차이를 의미한다.

Western blot

-70°C에서 보관 중이던 반쪽 신장을 꺼내어 protease inhibitor cocktail (Sigma)이 1/100로 희석된 mannitol 완충용액(300 mM mannitol, 16 mM HEPES/Tris, 1% Triton X-100, pH 7.4) 500 ul에 넣고 조직파쇄기로 갈아 균등액을 만들었다. 균등액 단백질 일정량을 5% β -mercaptoethanol이 포함된

2 × Laemmli buffer (Sigma)에 넣고 90°C에서 5분간 가열했다. 이 시료를 16% Tris-glycine precast gel (Invitrogen)에 100 ug을 분주한 다음 Excel 전기영동 장치(Invitrogen)를 이용하여 전류의 강도를 125 V로 고정시킨 상태에서 실험조건에 따라 50분에서 90분까지 전기영동시켰다. Gel로부터 PVDF membrane (Amersham Pharmacia, Piscaway, NJ, USA)으로 단백질을 이동시키기 위해 동일한 장치를 사용하여 25 V로 고정된 전류를 흘려 transfer 용액(25 mM Tris, 192 mM glycine; 20% v/v methanol) 내에서 1시간 내지 2시간 동안 전기영동시켰다. 1% Ponceau 용액에 담가 PVDF로의 단백질 전이를 확인한 다음 교반기에서 blocking 용액(5% skim milk, 0.1% tween-20 in PBS, pH 7.4)에 담가 1시간 방치했다. 1차 항체는 1 : 1,000으로 희석하여 사용했으며 실온에서 밤새 반응시켰다. 이때 사용한 1차 항체는 모두 토끼의 polyclonal 항체로서 TNF- α , p21, HO-1는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 β -actin은 Abcam (Cambridge, UK)으로부터 구입했다. 10분씩 두번 세척한 다음 HRP가 결합된 2차항체(HRP conjugated goat anti-rabbit IgG, Sigma)를 1 : 2,000의 비율로 blocking 용액에 넣고 1시간 반응시키고 10분간씩 세번 세척한 후 ECL kit (Amersham)를 사용하여 signal을 확인했다. β -actin signal을 얻기 위해 처음 사용했던 PVDF를 stripping 용액(100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7)에 넣고 50°C에서 1시간 반응시킨 후 blocking 과정부터 반복했다. 최종으로 얻은 band 강도는 densitometer를 사용하여 정량했다.

DNA 분절화(fragmentation)

세포자살(apoptosis)에 의한 DNA 분절화를 확인하기 위해

Table 1. Primer Sequences of Mouse Genes for Real Time RT-PCR

Gene	Sequence	Size (bp)	GenBank #
TNF- α			
Forward	5'-acg tgg aac tgg cag aag ag-3'	208	NM 013693
Reverse	5'-agg gtc tgg gcc ata gaa ct-3'		
HO-1			
Forward	5'-aca ggt tga cag aag agg cta a-3'	247	BC 010757
Reverse	5'-aac agg aag ctg aga gtc agg a-3'		
p21			
Forward	5'-aac atc tca ggg ccg aaa a-3'	251	BC 002043
Reverse	5'-taa gtt tgg aga ctg gga gag g-3'		
β -actin			
Forward	5'-gac ggc cag gtc atc act at-3'	216	NM 007393
Reverse	5'-ctt ctg cat cct gtc agc aa-3'		

TNF- α : tumor necrosis factor-alpha, HO-1: heme oxygenase-1.

신피질만을 오려내어 DNeasy tissue kit (Quiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 DNA를 분리하고 RNase A (Quiagen)를 처리하여 DNA만 순수하게 분리했다. 흡광도를 읽어 DNA가 순수하게 분리되었음을 확인한 후 ethidium bromide가 함유된 2% agarose gel에 전기영동했다.

통계처리

모든 자료는 평균 $\pm$ 표준편차로 표기했다. SPSS (version 12.0)를 이용하여 세 군 이상의 비교에는 one-way ANOVA를 시행했으며 사후검정으로 분산이 동질성을 갖는 경우는 Tukey 검정을, 동질성을 갖지 않은 경우 Dunnett 검정을 실시했다. 두 군 간의 비교는 양측검정을 통한 unpaired t-test를 실시했다. P값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의한 차

이가 있는 것으로 판정했다.

결 과

체중과 신장무게의 변화

Table 2는 약물 처치 전과 처치 72시간 후 체중 변화를 나타낸 것으로서 약물 처치 전에는 각 군 사이의 체중 차이는 전혀 없었다. 처치 72시간 후 대조군과 procaine 투여군의 경우 약 3%의 체중 증가를 보인 반면 cisplatin 투여군과 cisplatin + procaine 병용투여군은 각각 17.5%, 16.4%의 체중감소가 일어났다($P < 0.05$ vs. saline). 그러나 cisplatin 투여군과 cisplatin + procaine 병용투여군 사이의 체중 변화는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과는 cisplatin 처치에 의해 심한 체중 감소가 일어나지만 이같은 감소가 procaine 투여에 의해 전혀 개선되지 않음을 나타낸다. Table

Table 2. Effect of Various Treatments on Body Weight

	Body weight (g)			% change
	Before	After	Net change	
Saline	23.3 $\pm$ 0.9	23.9 $\pm$ 1.2	0.66 $\pm$ 0.45	2.8 $\pm$ 1.9
Procaine	24.1 $\pm$ 1.4	24.8 $\pm$ 1.6	0.70 $\pm$ 0.26	2.9 $\pm$ 1.0
Cisplatin	23.2 $\pm$ 0.6	19.2 $\pm$ 0.6*	-4.07 $\pm$ 0.62*	-17.5 $\pm$ 2.5*
Cisplatin + procaine	22.8 $\pm$ 1.0	19.1 $\pm$ 1.4*	-3.76 $\pm$ 0.97*	-16.4 $\pm$ 4.1*

Cisplatin and procaine were injected at a dose of 16 and 80 mg/kg body weight, respectively. When procaine was administered with cisplatin, two drugs were mixed immediately before injection. Body weight was not different 72 hours after treatment between cisplatin and cisplatin + procaine groups. Data are mean $\pm$ SD of 5–7 mice. * $P < 0.05$ vs. saline.

Table 3. Effect Various Treatments on Kidney Weight and the Ratio of Kidney to Body Weight

	Kidney weight (g)	Kidney to body weight ratio (mg/g)
Saline	0.140 $\pm$ 0.016	6.0 $\pm$ 0.9
Procaine	0.145 $\pm$ 0.022	5.9 $\pm$ 1.1
Cisplatin	0.111 $\pm$ 0.006*	5.8 $\pm$ 0.5
Cisplatin + procaine	0.116 $\pm$ 0.010*	6.1 $\pm$ 0.8

Cisplatin and procaine were injected at a dose of 16 and 80 mg/kg body weight, respectively. When procaine was administered with cisplatin, two drugs were mixed immediately before injection. Kidney weight was not different between cisplatin and cisplatin + procaine treatments. Data are mean $\pm$ SD of 5–7 mice. * $P < 0.05$ vs. saline.

Fig. 1. Effect of various treatments on BUN (A) and plasma creatinine concentration (B). Cisplatin and procaine were injected at a dose of 16 and 80 mg/kg, respectively. Renal function was measured 72 hours after treatment. Data are mean $\pm$ SD of 5–7 mice. Sal: saline, Cis: cisplatin, Pro: procaine, Cis + pro: cisplatin + procaine. * $P < 0.05$ vs. Sal, † $P < 0.05$ vs. Cis.

3은 약물 처치 72시간 후 신장무게와 체중과의 상대적 비를 나타낸 것이다. Cisplatin 투여군과 cisplatin + procaine 병용투여군은 각각 대조군에 비해 신장무게가 약 20% 감소하여 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 cisplatin 투여에 의한 신장 무게의 감소는 procaine 투여에 의해 방지되지 않았다(0.111 ± 0.006 vs. 0.116 ± 0.006 g, $P = 0.27$). 그러나 단위 체중당 신장무게를 환산했을 때 네 군 모두 유사한 값을 보였다.

신장의 기능 변화와 조직학적 변화

혈장 creatinine 농도와 요소질소 농도(BUN)는 신장 기능의 간접적 지표로 흔히 이용된다. Fig. 1은 대조군과 세 실험군에서 약물 처치 72시간 후 심장 천자를 통해 채취한 혈액에서 creatinine 농도와 BUN의 측정값을 표시한 것이다. BUN의 경우 대조군에 비해 cisplatin 투여군은 5.8배 증가했

으며 cisplatin + procaine 병용투여군은 2.4배 증가했지만 procaine 투여군은 대조군과 차이가 없었다. cisplatin 처치에 의해 증가된 BUN은 procaine 투여로 그 증가폭이 약 58% 억제되었다(107.0 ± 31.6 vs. 44.6 ± 16.4 mg/dl, $P < 0.01$). 한편 혈장 creatinine 농도의 변화도 BUN과 유사한 경향을 보였다. 이러한 결과는 cisplatin 처치에 의해 신장기능이 저하되지만 procaine 투여로 그 기능이 현저히 회복됨을 의미한다. 다음은 procaine 투여에 의해 신장의 조직학적 회복이 이루어지는지 알아보기 위해 PAS 염색을 실시했다. Fig. 2는 PAS 염색한 사진을 100배 확대하여 도시한 것이다. 대조군과 procaine 투여군에서 조직학적 이상소견은 전혀 관찰되지 않았다. 반면 cisplatin 투여에 의해 신피질의 근위세뇨관 세포의 손상이 현저히 관찰되었는데 이러한 손상은 세포괴사, cast 형성, brush border의 소실, 세뇨관의 확장 등 다양한 병변으로 표출되었다. 그러나 이 병변은 procaine 투

Fig. 2. Effect of various treatments on renal histology. Mice were treated with saline, procaine, cisplatin, and cisplatin in combination with procaine. The kidney was stained with PAS. The cisplatin group showed extensive cell necrosis, cast formation, and tubular dilatation. But these changes were less prominent in the cisplatin + procaine group. None of the saline group and the procaine group showed histological abnormality (Magnification, $\times 100$).

Fig. 3. Effect of cisplatin and procaine on DNA fragmentation in kidney cortex. DNA from the renal cortex was isolated and electrophoresed on 2% agarose gel. Cisplatin increased DNA fragmentation. But this effect was not inhibited by procaine.

여에 의해 현저히 감소되었다. 이상의 결과는 cisplatin에 의한 신장의 기능적, 조직학적 손상이 procaine 투여에 의해 완화됨을 보여준다.

한편 신장 세포의 세포자살(apoptosis)의 변화를 관찰하기 위해 DNA 절편화를 조사한 것을 Fig. 3에 표시했다. Cisplatin 투여에 의해 DNA 절편화가 증가되었지만 이 현상은 procaine 투여에 의해 방지되지 않았다.

신장 내 platinum의 함량과 총 thiol 함량

Cisplatin 신독성이 procaine에 의해 완화되는 기전을 밝히기 위해 먼저 신장 내 cisplatin 함량을 조사했다. Table 4는 신장내 cisplatin의 함량을 단위 단백질당 백금함량으로 나타낸 것이다. 대조군과 procaine 투여군에서 백금은 전혀 검출되지 않았으며 cisplatin 투여군과 cisplatin + procaine 병용투여군의 백금함량에도 차이가 없었다(5.21 ± 0.37 vs. 4.91 ± 0.57 ug/g kidney weight, $P = 0.49$). 이러한 결과는 procaine이 신장 세포로 들어오는 cisplatin 이동에 전혀 영향을 미치지 않았음을 시사한다. 한편 glutathione을 포함하는 신장내 총 thiol 함량을 측정했을 때 대조군과 cisplatin 투여군, cisplatin + procaine 병용 투여군 사이에 차이가 없었다(Table 5).

TNF- α , p21, HO-1 유전자와 단백질 발현의 비교

먼저 procaine 투여군의 신장 기능과 조직학적 소견 등이 대조군과 다르지 않았기 때문에(Fig. 1, 2) 유전자와 단백질 발현을 조사하는 실험에서 procaine 투여군을 제외시켰다. Fig. 4에서 보듯 TNF- α 유전자의 경우 대조군에 비해 cisplatin 투여군은 4.2배, cisplatin + procaine 병용투여군은 3.7배 증가했지만 cisplatin 투여군과 cisplatin + procaine 병용투여군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 없었다($P = 0.59$). HO-1와 p21 mRNA의 경우도 대조군에 비해 실험군에서 증가하였으며 동시에 cisplatin 투여군과 cisplatin + procaine 병용투여군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Fig.

Table 4. Platinum Contents in the Kidney

Platinum content (ug/g kidney weight)	
Saline	ND
Procaine	ND
Cisplatin	5.21 ± 0.37
Cisplatin + Procaine	4.91 ± 0.57

Cisplatin and procaine were injected at a dose of 16 and 80 mg/kg body weight, respectively. Kidney was excised 72 hours after treatment and renal platinum content was measured by ICP-mass spectrometry. Data are mean $\pm$ SD of 5 mice. ND: not detected.

Table 5. Total Thiol Contents in Kidney Homogenates

SH content (mmole/mg protein)	
Saline	1.38 ± 0.13
Cisplatin	1.32 ± 0.08
Cisplatin + procaine	1.33 ± 0.03

Cisplatin and procaine were injected at a dose of 16 and 80 mg/kg body weight, respectively. Kidney was excised 72 hours after treatment and the total thiol content in kidney homogenates was normalized with protein. Data are mean $\pm$ SD of 4 mice.

4B, C).

유전자 발현의 변화가 단백질의 발현에 그대로 반영되는지 알아보기 위해 cisplatin 투여군과 cisplatin + procaine 병용투여군 사이에 유의한 차이를 보인 두 유전자 HO-1와 p21의 단백질 발현에 대해 Western blot을 시행했다. 한편 처치에 의한 단백질의 비특이적 증감을 배제하기 위해 β -actin을 내부 표준단백질로 삼았다. Fig. 5에서 보듯 HO-1과 p21 단백질 발현은 cisplatin 투여 시 증가하지만 procaine의 처치에 의해 이러한 증가가 상당히 둔화되었다. Fig. 5의 결과를 densitometer로 읽어 signal의 크기를 정량화했을 때 HO-1의 경우 대조군에 비해 cisplatin 투여군은 2.5배, cisplatin + procaine 병용투여군은 0.7배 증가했으며 p21의 경우도 대조군에 비해 cisplatin 투여군은 14.3배, cisplatin + procaine 병용투여군은 7.3배 증가했다. 따라서 정성적으로 보아 HO-1과 p21 유전자 발현은 단백질 발현으로 반영됨을 확인할 수 있었다.

고 찰

저자들은 Esposito 등의³³⁾ 연구를 모델로(cisplatin 8 mg/kg과 procaine 40 mg/kg 투여) 삼아 예비실험을 시행한 결과 그들의 연구와 몇 가지 다른 결과를 얻었다. 첫째, cisplatin

Fig. 4. Effect of cisplatin and cisplatin + procaine on the expression of TNF- α gene (A), HO-1 gene (B), and p21 gene (C). The kidney RNA was prepared 72 hours after treatment. Real time RT-PCR was performed using the same amount of RNA in all groups. The relative expression level was first normalized for β -actin. Data are mean $\pm$ SD of 3 separate experiments. Sal: saline, Cis: cisplatin, Cis + pro: cisplatin + procaine. * $P < 0.05$ vs Cis.

Fig. 5. Western blot analysis of p21, HO-1, and β -actin in the saline, cisplatin, and cisplatin + procaine groups. Kidney homogenates were prepared 72 hours after treatment. The same amount of proteins in each group was loaded and separated on 16% SDS-PAGE. β -Actin was used as internal control.

을 8 mg/kg 용량으로 투여한 경우 체중감소를 제외하고 투여 6일까지도 신장의 기능과 조직학적 이상소견은 전혀 관찰되지 않았다. 둘째, cisplatin 농도를 LD₅₀인 16 mg/kg로 올리고³⁹⁾ procaine 40 mg/kg을 병용 투여한 72시간 후 신기능 장애와 조직학적 손상은 발견되었지만 이들의 개선은 거의 관찰되지 않았다. 따라서 cisplatin 16 mg/kg과 procaine 80 mg/kg을 투여한 결과 Esposito 등의 연구와 유사한 신장의 반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 1, 2). 약물 용량에 대한 반응이 이처럼 다른 이유는 Esposito 등은 BDF1 잡종 마우스를 사용했고 본 실험에서는 C57BL/6 마우스를 사용한 점과 전자가 약물을 개별적으로 연속해서 투여한 것과 저자들은 두 약물을 투여 직전 섞은 다음 한번에 투여한 점 때문일 것이다. 한편 본 연구에서 procaine 80 mg/kg을 투여했을 때 실험 진행기간 동안 경련과 같은 신경 독성은 관찰되지 않았는데 Phansalkar 등은⁴⁰⁾ 마우스에서 procaine의 LD₅₀을 150 mg/kg으로 보고한 바 있다.

Procaine을 제외한 국소마취제들 즉, lidocaine, bupivacaine, tetracaine에 의한 급성 신부전의 조절을 조사한 최근의 연구에 의하면 급성 허혈-재관류 손상을 유도한 쥐에게 이 마취제들을 정맥 내로 지속적으로 투여했을 때 신기능과 조직학적 손상이 오히려 악화되었다.⁴¹⁾ 이와는 달리 본 연구와 Esposito 등의^{33,42)} 연구에서 일회 투여한 procaine에 의해 cisplatin 신독성이 완화되었다. 국소마취제들 사이의 이러한 신장 보호효과 차이가 생기는 이유에 대해서는 아직 연구된 바 없다.

본 연구에서 procaine 투여 시 cisplatin 신독성이 감소한 까닭은 먼저 procaine이 cisplatin의 신장 내 유입을 억제했기 때문일 것이다. Cisplatin은 신장세포의 기저측면막(basolateral membrane)에 존재하는 유기양이온 이동체를 통해 세포 내

로 이동하는 것으로 알려져 있으므로⁶⁻⁹⁾ 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 procaine에 의해 cisplatin의 신장 내 이동도 경쟁적으로 억제될 수 있으나, 이러한 추정은 Table 4에서 보듯 cisplatin 투여군과 cisplatin + procaine 병용투여군의 신장 백금 함유량의 차이가 없었기 때문에 procaine에 의한 cisplatin 신독성의 억제효과는 cisplatin의 신장 이동량의 차이에 의한 현상은 아닌 것 같다. Esposito 등은 procaine 투여에 의해 신장의 백금함량이 감소했다고 보고했으며, Viale 등은³⁵⁾ procaine과 구조적으로 매우 유사한 procainamide를 쥐에게 투여했을 때 cisplatin 신독성이 감소되지만 신장의 백금함량은 procainamide 투여군에서 오히려 증가했다고 보고했다. 현재로서 연구들 사이에 이러한 차이는 확실하지 않지만 마우스와 쥐, 마우스 종(species)의 차이, 측정방법의 차이 등이 그 요인으로 작용했을 것이다.

Procaine이 세포 내에서 어떤 과정을 통해 cisplatin 신독성을 감소시키는지에 대해선 확실히 밝혀진 바 없다. Zhong 등은⁴³⁾ 정상쥐의 신피질 절편에 cisplatin을 노출시키고 procaine을 첨가하면 free radical 발생에 의한 지질 과산화(lipid peroxidation)가 감소된다고 한다. Fenoglio 등은⁴⁴⁾ 효소 조직화화학(enzyme histochemistry)을 이용한 조직화적인 연구를 시행하여 신장 내 대사과정에 관여하는 일부효소 즉, K-nitrophenyl phosphatase와 nitric oxide synthase의 활성도가 procaine에 영향을 받기 때문에 cisplatin에 의한 신독성이 완화될 것이라고 추정했다.

본 연구에선 procaine에 의한 cisplatin 신독성의 완화기전을 세 종류의 유전자 발현의 변화에 초점을 맞추었다. 첫째, cisplatin에 의한 급성 신부전이 염증반응의 결과로 나타나며 염증반응에 관여하는 cytokine 중의 하나인 TNF- α 가 신독성의 중심적인 역할을 담당한다. 즉, cisplatin 처치 시 TNF- α mRNA와 단백질 생성이 증가하는데 TNF- α 생성을 억제시키는 약물의 투여나 TNF- α 를 중화시키는 항체 투여로 신독성은 현저히 예방되며,²⁷⁾ 유사한 예방 효과가 TNF- α 유전자 결실 마우스²⁷⁾ 또는 TNF receptor-2 knockout 마우스에서도⁴⁵⁾ 확인되었다. 본 연구에서도 cisplatin 신독성이 나타날 때 TNF- α mRNA 발현은 대조군에 비해 4.2배 증가하여 타 연구들과 유사한 값을 보였지만 cisplatin 투여군과 cisplatin + procaine 병용투여군 사이에는 차이가 없었다. 이러한 결과는 procaine 처치 시에도 TNF- α 유전자 발현은 영향을 받지 않음을 시사한다.

둘째, cisplatin처럼 DNA 손상을 일차적으로 유발하는 항암제는 세포주기를 자극하여 세포괴사 또는 세포자살을 유도하는데 cyclin-dependent kinase (cdk)은 세포주기의 활성화를 담당하는 주요한 단백질의 하나이다. 이 단백질을 억제하는 것으로 알려진 p21은 세포주기의 G1 arrest를 유도하여 손상된 DNA 복제를 방지함으로써 세포사망을 줄이고 따라

서 cisplatin 신독성을 감소시킬 것으로 추정해 왔다. 실제로 p21 knockout 마우스가 야생형 마우스보다 cisplatin 신독성이 훨씬 증가하며 반대로 세포 내 p21 발현을 유도하면 cisplatin 신독성이 감소한다.³⁰⁾ 허혈-재관류에 의한 급성신부전 모델에서도 p21 유전자가 없을 경우 급성신부전이 악화된다.⁴⁶⁾ 본 연구에서 cisplatin 처치 시 p21 mRNA 발현이 무려 175배 증가했으며 단백질은 14배 증가했다. 만일 procaine에 의한 cisplatin 신독성의 완화 효과가 p21의 증가에 의해 이루어진다면 cisplatin + procaine 병용 투여군의 p21 mRNA와 단백질 발현이 cisplatin 투여군보다 더 증가되어야 할 것이다. 예상과는 반대로 cisplatin + procaine 병용 투여군에서 유전자와 단백질은 cisplatin 투여군보다 오히려 낮았다(Fig. 5). 뿐만 아니라 cisplatin에 의한 세포자살도 procaine에 의해 방지되지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과는 procaine이 p21 유전자의 발현을 상향조절하여 cisplatin 신독성을 완화시키지 않음을 시사한다.

셋째, cisplatin에 의한 산화 스트레스는 활성산소의 생성을 유발시키는데 이것이 대사변화, 지질과산화 등을 초래하여 세포의 불가역적 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다. 활성 산소는 HO-1 생성을 유도하는데 HO-1 단백질이 과발현된 신장 근위세뇨관 세포에서 cisplatin 세포독성이 완화되며, 반면 HO-1 knockout 마우스에서는 cisplatin 신독성이 현저히 증가된다.²⁶⁾

한편 조직 내 항산화 물질-예를 들면 glutathione의 감소도 HO-1의 발현을 유도하는데 Table 5에서 신장의 총 thiol 함량이 여러 가지 처치에 의해 전혀 변하지 않았기 때문에 cisplatin 투여에 의한 항산화 물질의 감소가 HO-1 유전자 발현의 증가를 유도한 직접적인 요인은 아닌 것 같다. 본 연구에서 산화 스트레스의 지표로 사용한 HO-1 유전자와 단백질의 발현도 cisplatin 투여군보다 cisplatin + procaine 병용 투여군이 오히려 낮았다. 따라서 procaine 처치에 의한 cisplatin 신독성의 완화는 HO-1 유전자 발현의 상향조절에 의한 현상은 아닐 것으로 여겨진다. 한편 Cafaggi 등은⁴⁷⁾ cisplatin과 procaine이 결합된 새로운 화합물(DPR)을 합성했는데 이 화합물도 in vitro에서 cisplatin보다 낮은 하지만 뚜렷한 항암 효과를 보였다고 보고한 바 있다. 이로 미루어 본 연구에서도 cisplatin과 procaine이 결합된 DPR이 신장세포를 손상시켰을 것이다. 그러나 그 손상은 cisplatin보다 약하게 진행됨으로써 cisplatin + procaine 병용투여군의 TNF- α , HO-1, p21 유전자 발현이 cisplatin 투여군에 비해 상대적으로 낮았을 것으로 추정된다.

결론적으로 procaine 처치 시 cisplatin 신독성이 기능적, 조직학적으로 현저히 완화되는데 이는 TNF- α 유전자 발현이 하향조절되거나 p21 또는 HO-1 유전자의 발현이 상향조절되는 과정이 아닌 다른 과정을 통해 이루어질 것으로 추

측되거나 이 점에 대해서는 연구가 더 수행되어야 할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Chabner BA, Ryan DP, Paz-Ares L, Garcia-Carbonero R, Calabresi P: Antineoplastic agents. In: The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. Edited by Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG; Seoul, McGraw-Hill. 2001, pp 1432-5.
- Boulikas T, Vougiouka M: Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncology Rep* 2003; 10: 1663-82.
- Chu G: Cellular response to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem* 1994; 269: 787-90.
- Safirstein R, Miller P, Guttenplan JB: Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney Int* 1984; 25: 753-8.
- Safirstein R, Winston J, Goldstein M, Moel D, Dikman S, Guttenplan J: Cisplatin nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis* 1986; 8: 356-67.
- Ludwig T, Riethmuller C, Gekle M, Schwerdt G, Oberleithner H: Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int* 2004; 66: 196-202.
- Okuda M, Tsuda K, Masaki K, Hashimoto Y, Inui K: Cisplatin-induced toxicity in LLC-PK1 kidney epithelial cells: role of basolateral membrane transport. *Toxicol Lett* 1999; 106: 229-35.
- Pan BF, Sweet DH, Pritchard JB, Chen R, Nelson JA: A transfected cell model for the renal toxin transporter, rOCT2. *Toxicol Sci* 1999; 47: 181-6.
- Williams PD, Hottendorf GH: Effect of cisplatin on organic ion transport in membrane vesicles from rat kidney cortex. *Cancer Treat Rep* 1985; 69: 875-80.
- Borch RF: The nephrotoxicity of antineoplastic drugs. In: Toxicology of the kidney. 2nd ed. Edited by Hook JB, Goldstein RS: New York, Raven Press. 1993, pp 288-301.
- Merouani A, Davidson SA, Schrier RW: Increased nephrotoxicity of combination taxol and cisplatin chemotherapy in gynecologic cancers as compared to cisplatin alone. *Am J Nephrol* 1997; 17: 53-8.
- Gandara DR, Perez EA, Phillips WA, Lawrence HJ, DeGregorio M: Evaluation of cisplatin dose intensity: current status and future prospects. *Anticancer Res* 1989; 9: 1121-8.
- Ozols RF, Corden BJ, Jacob J, Wesley MN, Ostchega Y, Young RC: High-dose cisplatin in hypertonic saline. *Ann Intern Med* 1984; 100: 19-24.
- Howell SB, Taetle R: Effect of sodium thiosulfate on cis-dichlorodiammineplatinum (II) toxicity and antitumor activity in L1210 leukemia. *Cancer Treat Rep* 1980; 64: 611-6.
- Glover D, Grabelsky S, Fox K, Weiler C, Cannon L, Glick J: Clinical trials of WR-2721 and cis-platinum. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16: 1201-4.
- Yuhhas JM, Culo F: Selective inhibition of nephrotoxicity of cis-dichlorodiammine platinum (II) by WR-2721 without altering its antitumor properties. *Cancer Treat Rep* 1980; 64: 57-64.
- Anderson ME, Naganuma A, Meister A: Protection against cisplatin toxicity by administration of glutathione ester. *FASEB J* 1990; 4: 3251-5.
- Oriana S, Bohm S, Spatti G, Zunino F, Di Re F: A preliminary clinical experience with reduced glutathione as protector against cisplatin-toxicity. *Tumori* 1987; 73: 337-40.
- Sheridan AM, Bonventre JV: Pathophysiology of ischemic acute renal failure. *Contrib Nephrol* 2001; 132: 7-21.
- Sutton TA, Molitoris BA: Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin Nephrol* 1998; 18: 490-7.
- Appenroth D, Frob S, Kersten L, Splinter FK, Winnefeld K: Protective effects of vitamin E and C on cisplatin nephrotoxicity in developing rats. *Arch Toxicol* 1997; 71: 677-83.
- Davis CA, Nick HS, Agarwal A: Manganese superoxide dismutase attenuates cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2683-90.
- Naziroglu M, Karaoglu A, Aksoy AO: Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver, and lens tissues in rats. *Toxicology* 2004; 195: 221-30.
- Parlakpınar H, Sahna E, Ozer MK, Ozugurlu F, Vardi N, Acet A: Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced acute renal injury. *J Pineal Res* 2002; 33: 161-6.
- Agarwal A, Balla J, Alam J, Croatt AJ, Nath KA: Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney Int* 1995; 48: 1298-307.
- Shiraishi F, Curtis LM, Truong L, Poss K, Visner GA, Madsen K, et al: Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F726-36.
- Ramesh G, Reeves WB: TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 2002; 110: 835-42.
- Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, et al: Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int* 2003; 63: 72-82.
- Megyesi J, Price PM, Tamayo E, Safirstein RL: The lack of a functional p21^{WAF1/CIP1} gene ameliorates progression chronic renal failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10830-5.
- Megyesi J, Safirstein RL, Price PM: Induction of p21^{WAF1/CIP1/SDI1} in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure. *J Clin Invest* 1998; 101: 777-82.
- Catterall W, Mackie K: Local anesthetics. In: The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. Edited by Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG; Seoul, McGraw-Hill. 2001, pp 375-6.
- Qiao SM: Intralymph nodal administration of cisplatin-procaine superimposed to systemic chemotherapy to effect "cures" of all three cases of disseminated lymphsarcomas. *Proc 13th Int Cancer Congress, Seattle, 1982, P62*.
- Esposito M, Fulco RA, Collecchi P, Zicca A, Cadoni A, Merlo F, Rosso R, Sobrero A: Improved therapeutic index of cisplatin

- by procaine hydrochloride. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 677-84.
34. Esteller M: DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol* 2005; 17: 55-60.
35. Viale M, Vannozzi MO, Pastrone I, Mariggio MA, Zicca A, Cadoni A, et al: Reduction of cisplatin nephrotoxicity by procainamide: does the formation of a cisplatin-procainamide complex play a role? *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 829-36.
36. Klip A, Grinstein S, Semenza G: Distribution of sulfhydryl groups in intestinal brush border membranes. Localization of side-chains essential for glucose transport and phlorizin binding. *Biochim Biophys Acta* 1979; 558: 233-45.
37. Ronzen S, Helen JS: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Edited by Krawetz S, Misener S: Ottawa, Human Press. 2000, pp 365-86.
38. Ahn DW: Quantification of endothelin-1 mRNA and endothelin receptor B mRNA from cortex and inner medulla of mouse kidney using real-time RT-PCR. *Kor J Nephrol* 2004; 23: 188-94.
39. Townsend DM, Hanigan MH: Inhibition of γ -glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate β -lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 142-8.
40. Phansalkar AG, Joglekar GV, Balwani JH: Role of adrenergic mechanisms in procaine toxicity in mice. *Ind J Pharmac* 1971; 3: 157-160.
41. Lee HT, Krichevsky IE, Xu H, Ayuko OS, D'Agati VD, Emala CW: Local anesthetics worsen renal function after ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol* 2004; 286: F111-9.
42. Esposito M, Vannozzi MO, Viale M, Pellecchia C, Merlo F, Cadoni A, et al: Cis-diamminedichloroplatinum (II)-procaine pharmacokinetic interaction in mice bearing P388 leukemia. *Anticancer Res* 1993; 13: 1511-6.
43. Zhong LF, Zhang JG, Zhang M, Ma SL, Xia YX: Protection against cisplatin-induced lipid peroxidation and kidney damage by procaine in rats. *Arch Toxicol* 1990; 64: 599-600.
44. Fenoglio C, Boicelli CA, Ottone M, Addario C, Chiari P, Viale M: Protective effect of procaine hydrochloride on cisplatin-induced alterations in rat kidney. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 1043-54.
45. Ramesh G, Reeves WB: TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F610-8.
46. Price PM, Safirstein RL, Megyesi J: Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F378-84.
47. Cafaggi S, Esposito M, Parodi B, Vannozzi MO, Viale M, Pellecchia C, et al: Synthesis and antitumor activity of a new cis-diammineplatinum (II) complex containing procaine hydrochloride. *Anticancer Res* 1992; 12: 2285-92.