

유전독성시험에 의한 녹용약침의 안전성 연구

변부형^{**}, 서부일

대구한의대학교 한의과대학

Safety study on Genetic Toxicity of Cervi Pantotrichum Cornu Herbal acupuncture Solution(CPCHA)

Boohyeong Byun^{**}, Bu-il Seo

Dept of Oriental Medicine, Daegu Hanny University, Daegu 708-060, Korea

ABSTRACT

Objectives: The purpose of this study is to investigate genetic toxicity of Cervi pantotrichum Cornu herbal acupuncture solution(CPCHA).

Methods: In this study, a series of investigation have been carried out to analyze the effects of Cervi pantotrichum Cornu herball acupuncture solution(CPCHA) on colony forming ability of NIH3T3cells, Hela cells and adrenorectal coloncell for genetic toxicity test.

Results and Conclusions: From the above results, it is suggested that Cervi pantotrichum Cornu herball acupuncture solution(CPCHA) was limited 0.5-10ug/ml by test. Cervi pantotrichum Cornu herball acupuncture solution(CPCHA) did not exert the protective role to the genetic toxicity in kinds of cell lines used in this study. From these results, Cervi pantotrichum Cornu herbal aqua-acupuncture solution needs further study to prove it's function in cell culture system.

Key words: Cervi pantotrichum Cornu Herbal aqua-acupuncture solution(CPCHA), genetics, toxicity, cell culture system, NIH3T3, HeLa, SW480

^{**} 제1저자, 교신저자: 변 부형. 대구한의대학교. Tel: 053-770-2245

· 접수 : 2005년 4월 23일 · 수정 : 2005년 6월 13일 · 채택 : 2005년 6월 20일

서론

약침이란 한약의 유효성분을 피부를 통해 주입할 수 있도록 추출하여 경혈에 직접 주사하는 새로운 침 요법이다¹⁾. 약침은 한약을 주사액에 적합하도록 정제하여 그 약물이 작용해야 하는 특정 경락에 자입 함으로써 침 효과와 한약의 효과가 동시에 나타나도록 하는 방법이다²⁾. 환자의 질병을 치료하기 위하여 정확한 경락, 경혈과 정확한 약물을 선택하여 직접 투여하므로 그 효과를 극대화 할 수 있으며 각 종 난치병 질환에 광범위하게 응용할 수 있다³⁻⁵⁾. 한편 약침의 효과가 여러 질병에서 입증된 바 있으나, 약침제제로서 개발하기 위한 안전성 평가 자료의 확보가 요구된다⁶⁻⁷⁾. 또한 약침의 임상 활용도를 높이기 위해서는 안전성 평가에 대한 실험적 연구가 폭넓게 이루어 져야 하겠다.

이에 저자는 현재 임상에서 肝, 腎經에 歸經하고, 性味는 따뜻하고 독은 없으며, 溫腎壯陽, 補氣血, 益精髓, 強筋骨하는 효능을 지니고 있어서 腎虛陽痿, 早泄, 遺精, 腰膝寒冷, 下肢軟弱無力, 遺尿 등의 증상을 치료하는 효과를 나타내는 鹿茸⁸⁾ 藥針液을 약침학회부설 약침연구실에서 제조한 것을 제공 받아서 유전 독성 시험을 수행한 결과, 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 녹용 약침액 제조

약침학회 부설 약침연구실에서 제조한 녹용약침액(Cervi pantotrichum Cornu Herbal aqua-acupuncture solution; 0.02g/20cc saline)을 시험 물질로 사용하였다.

2. 세포배양

NIH3T3세포와 HeLa세포를 10% new born calf serum이 존재하는 DMEM과 EMEM 배양액으로 각각 37°C CO₂ incubator에서 계대 배양하였다. 인간 직장암 세포주인 SW480세포는 RPMI1640 배양액에 배양하였다.

3. 녹용 약침이 세포군 형성능(colony forming ability)에 미치는 영향 분석

녹용 약침이 세포군 형성능(colony forming ability)에 미치는 영향을 분석하기 위하여 배양 포유동물세포를 100mm petri dish에 1500개 정도의 세포를 seeding한 후 1 µg/ml에서 10 µg/ml의 녹용 약침을 함유한 배지에서 3주 동안 배양하여 대조군과 세포군 수를 비교함으로써 검토하였다.

4. 녹용 약침의 세포 독성측정

세포독성을 측정하기 위한 MTT방법(살아있는 세포의 미토콘드리아 효소는 MTT를 환원시켜 formazan을 형성시킬 수 있음을 근거로 formazan의 농도를 측정함으로써 생존한 세포 수를 간접적으로 측정)을 이용하여 시료를 일정한 비율로 희석시켜 넣고 3일 후에 얻은 반로그 약물 농도-생존율 곡선으로부터 IC₅₀ 농도를 구하였다⁹⁾. 간단히 기술하면 96-well microplate에 세포를 3×10⁵/ml이 되도록 한 용액 90 µl aliquots를 해당 well에 넣는다. 이때 시료와 세포가 없는 well에는 시료대신 시료용매로 사용한 DMSO만 넣어 세포의 대조로 삼고, 세포대신 배양액만을 넣어 blank로 삼는다. 잘 혼합한 후 2-3일간 CO₂ 배양기에서 배양한 후 MTT용액 (5 mg/ml) 10 µl를 모든 well에 넣은 후 다시 4-5시간 배양하였다. 살아있는 세포의 미토콘드리아 효소에 의해 생성된 formazan은 0.04 N HCl-isopropanol 용액 100 µl로 녹여서 microplate reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 시료를 처리한 well의 흡광도 값을 시료를 처리하지 않은 대조군 세포가 들어있는 흡광도 값으로 나눈 다음 백분율로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. 녹용약침이 생쥐 형질 전환 세포주와 인간의 암 세포주의 세포군 형성에 미치는 영향 분석

1) 녹용 약침이 생쥐 섬유아세포의 세포군 형성능(colony forming ability)에 미치는 영향

녹용 약침이 생쥐 섬유아세포인 NIH3T3세포의 세포군 형성능(colony forming ability)에 미치는 영향을 분석하기 위하여 녹용약침을 1·5·10 μ g/ml의 농도로 16일 동안 세포배양액에 넣어 배양한 후 세포군 수를 조사한 결과, 세포군 형성이 대조군에 비해 처리한 전 농도 범위에서 최대 약 15% 감소하였으나 유의성은 관찰되지 않았다(Table 1).

녹용 약침이 DNA 상해요인으로 작용하는 mitomycin-C(MMC)에 의해 유도된 유전독성에 방어효과를 갖는지를 분석하기 위하여 NIH3T3세포에 0.5 μ g/ml과 1 μ g/ml의 MMC와 녹용약침을 함께 처리한 후 세포군 형성률을 분석하였다(Table 1). Table 1에서 보여주는 바와 같이, 0.5 μ g/ml과 1 μ g/ml의 MMC를 처리한 경우 거의 모든 세포가 사멸하였으나, 1 μ g/ml의 녹용 약침과 0.5 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 11.1%, 1 μ g/ml의 녹용약침과 1 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 2.2%, 5 μ g/ml의 녹용약침과 0.5 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 23.6%, 5 μ g/ml의 녹용약침과 1 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 9%, 10 μ g/ml의 녹용약침과 0.5 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 22%, 10 μ g/ml의 녹용약침과 1 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 10.9%의 세포군 생존률이 증가하였다. 이와 같은 결과는 녹용약침이 DNA 상해요인에 의한 세포사를 지연시키고 세포생존률을 증가시킬 수 있음을 의미하나 그 자세한 기작은 더 연구해볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

Table 1. Effect of CPCHA on colony forming ability of NIH3T3 cells treated or non-treated with mytomycin-C.

Treatment*		Relative CFU \pm S.D.**
CPCHA (μ g/ml)	Mitomycin-C (μ g/ml)	
-	-	100 \pm 0
1	-	82.9 \pm 5
5	-	85.0 \pm 10
10	-	85.0 \pm 2
-	0.5	0.0
-	1.0	0.0
1	0.5	11.1 \pm 3
1	1.0	2.2 \pm 4
5	0.5	23.6 \pm 7
5	1.0	9.0 \pm 6
10	0.5	22.0 \pm 14
10	1.0	10.9 \pm 4

*. Various concentrations of the CPCHA and the mitomycin-C or both were treated for 16 days.

**.. CFU(colony forming unit) are expressed as an average number relative to control value. S.D. means the standard deviation calculated from three independent experiments.

2) 녹용 약침이 인간 자궁암 세포의 세포군 형성능(colony forming ability)에 미치는 영향

녹용 약침이 자궁암세포 HeLa 세포의 세포군 형성능(colony forming ability)에 미치는 영향을 분석하기 위하여 녹용약침을 5 μ g/ml과 10 μ g/ml의 농도로 16일 동안 세포배양액에 넣어 배양한 후 세포군 수를 조사한 결과, 세포군 형성이 대조군에 비해 처리한 두 농도 범위에서 최대 약 3% 감소함으로써 자궁암 세포의 세포군 형성에 아무런 영향을 미치지 않았다(Table 1). 녹용 약침이 DNA 상해요인으로 작용하는 mitomycin-C(MMC)에 의해 유도된 유전독성에 방어효과를 갖는지를 분석하기 위하여 HeLa세포에 0.5 μ g/ml과 1 μ g/ml의 MMC와 녹용약침을 함께 처리한 후 세포군 형성률을 분석하였다(Table 2).

Table 2. Effect of CPCHA on colony forming ability of Hela cells treated or non-treated with mytomycin-C.

Treatment*		Relative CFU \pm S.D.**
CPCHA (μ g/ml)	Mitomycin-C (μ g/ml)	
-	-	100 \pm 0
5	-	97.0 \pm 1.5
10	-	98.0 \pm 0.05
-	0.5	20.1 \pm 5.3
-	1.0	8.3 \pm 0.049
5	0.5	25.0 \pm 1.57
5	1.0	27.0 \pm 3.54
10	0.5	20.0 \pm 5.2
10	1.0	15.0 \pm 3.24

*. Various concentrations of the CPCHA and the mitomycin-C or both were treated for 16 days.

**.. CFU(colony forming unit) are expressed as an average number relative to control value. S.D. means the standard deviation calculated from three independent experiments.

Table 2에서 보여주는 바와 같이, 0.5 μ g/ml과 1 μ g/ml의 MMC를 처리한 경우 HeLa세포는 0.5 μ g/ml의 MMC를 처리한 경우 대조군에 비해 20.1% 세포군을 형성하였고, 1 μ g/ml의 MMC를 처리한 경우 대조군에 비해 8.3% 세포군만을 형성하였다. 이와 같은 결과는 암세포가 정상의 세포에 비해 DNA 상해에 덜 민감하다는 것을 의미한다. 그러나 HeLa세포에 5 μ g/ml의 녹용약침과 0.5 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 25.0%, 5 μ g/ml의 녹용약침과 1 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 27.0%, 10 μ g/ml의 녹용약침과 0.5 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 20.0%, 10 μ g/ml의 녹용약침과 1 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 15.0%의 세포군 생존률이 증가하였다.

3) 녹용 약침이 인간 직장암 세포의 세포군 형성능(colony forming ability)에 미치는 영향

녹용약침이 직장암 세포 SW480 세포의 세포군 형성능(colony forming ability)에 미치는 영향을 분석하기 위하여 녹용약침을 5 μ g/ml과 10 μ g/ml의 농도로 16일 동안 세포배양액에 넣어 배양한 후 세포군 수를 조사한 결과, 세포군 형성이 대조군에 비해 처리한 두 농도 범위에서 최대 약 3% 감소함으로써 자궁암 세포의 세포군 형성에 아무런 영향을 미치지 않았다(Table 3).

Table 3. Effect of CPCA on colony forming ability of adrenorectal colon CA (SW480)cells treated or non-treated with mytomycin-C

Treatment*		Relative CFU \pm S.D.**
CPCA (μ g/ml)	Mitomycin-C (μ g/ml)	
-	-	100 \pm 0
5	-	97.0 \pm 1.5
10	-	98.0 \pm 0.05
-	0.5	25.0 \pm 3.7
-	1.0	12.0 \pm 4.26
5	0.5	30.0 \pm 2.54
5	1.0	27.0 \pm 5.6
10	0.5	35.0 \pm 6.3
10	1.0	29.0 \pm 5.78

*. Various concentrations of the CPCA and the mitomycin-C or both were treated for 16 days.

**.. CFU(colony forming unit) are expressed as an average number relative to control value. S.D. means the standard deviation calculated from three independent experiments.

녹용약침이 DNA 상해요인으로 작용하는 mitomycin-C(MMC)에 의해 유도된 유전독성에 방어효과를 갖는지를 분석하기 위하여 SW480 세포에 0.5 μ g/ml과 1 μ g/ml의 MMC와 녹용약침을 함께 처리한 후 세포군 형성률을 분석하였다(Table 3). Table 3에서 보여주는 바와 같이, 0.5 μ g/ml과 1 μ g/ml의 MMC를 처리한 경우 SW480세포는 0.5 μ g/ml의 MMC를 처리한 경우 대조군에 비해 25.0% 세포군을 형성하였고, 1 μ g/ml의 MMC를 처리한 경우 대조군에 비해 12.0% 세포군을 형성하였다. 이와 같은 결과는 직장암 세포인 SW480세포도 DNA 상해에 대한 민감도가 자궁암 세포인 HeLa 세포와 비슷함을 의미한다. SW480 세포에 5 μ g/ml의 녹용약침과 0.5 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 30.0%, 5 μ g/ml의 녹용약침과 1 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 27.0%, 10 μ g/ml의 녹용약침과 0.5 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 35.0%, 10 μ g/ml의 녹용약침과 1 μ g/ml의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 29.0%의 세포군 생존률이 증가하였다.

2. 녹용약침의 세포 독성측정

1) 녹용약침이 생쥐 섬유아세포의 세포독성 유발여부 분석

녹용약침이 생쥐 섬유아세포인 NIH3T3세포의 세포독성을 유발하는지의 여부는 MTT 방법으로 분석하였다. Table 4에서 보여주는 바와 같이 5 μ g/ml과 10 μ g/ml의 녹용약침은 세포독성을 전혀 유발하지 않았다. 그러나 0.3 μ g/ml과 0.5 μ g/ml의 MMC는 각각 8%와 15%의 세포독성을 대조군에 비해 야기시켰다. 처리한 농도범위의 녹용약침은 MMC에 의해 야기된 세포독성을 감소시키지 않았다.

Table 4. Effect of CPCHA on cell proliferation of NIH3T3 cell treated or non-treated with mytomycin-C

Treatment*		A ₅₉₅ ±S.D.**
CPCHA (µg/ml)	Mitomycin-C (µg/ml)	
-	-	0.72±0.05
5	-	0.90±0.06
10	-	0.70±0.06
-	0.3	0.54±0.04
-	0.5	0.47±0.02
5	0.3	0.57±0.05
5	0.5	0.50±0.04
10	0.3	0.54±0.07
10	0.5	0.47±0.05

*. Various concentrations of the CPCHA and the mitomycin-C or both were treated for 48 hr.

**. Absorbance was measured at a wavelength of 595 nm. S.D. means standard deviation calculated from 6 independent experiments.

2) 녹용 약침이 인간 자궁암 세포의 세포군 형성능(colony forming ability)에 미치는 영향

녹용 약침이 인간 자궁암 세포인 HeLa세포의 세포독성을 유발하는지의 여부는 MTT 방법으로 분석하였다. Table 5에서 보여주는 바와 같이 5 µg/ml 과 10 µg/ml의 녹용약침은 세포독성을 전혀 유발하지 않았다. 그러나 0.3 µg/ml과 0.5 µg/ml의 MMC는 각각 16.6%와 33.3%의 세포독성을 대조군에 비해 야기 시켰다. 처리한 농도범위의 녹용약침은 MMC에 의해 야기된 세포독성을 감소시키지 않았다.

Table 5. Effect of CPCHA on cell proliferation of Hela cell treated or non-treated with mytomycin-C

Treatment*		A ₅₉₅ ±S.D.**
CPCHA (µg/ml)	Mitomycin-C (µg/ml)	
-	-	0.30±0.05
5	-	0.29±0.06
10	-	0.30±0.05
-	0.3	0.25±0.04
-	0.5	0.20±0.02
5	0.3	0.30±0.05
5	0.5	0.27±0.02
10	0.3	0.27±0.04
10	0.5	0.23±0.05

*. Various concentrations of the CPCHA and the mitomycin-C or both were treated for 48 hr.

**. Absorbance was measured at a wavelength of 595 nm. S.D. means standard deviation calculated from 6 independent experiments.

3) 녹용약침이 인간 직장암 세포의 세포군 형성능(colony forming ability)에 미치는 영향

녹용약침이 인간 직장암 세포인 SW480세포의 세포독성을 유발하는지의 여부는 MTT 방법으로 분석하였다. Table 6에서 보여주는 바와 같이 5 µg/ml 과 10 µg/ml의 녹용약침은 세포독성을 전혀 유발하지 않았다. 그러나 0.3 µg/ml과 0.5 µg/ml의 MMC는 각각 15.6%와 28.3%의 세포독성을 대조군에 비해 야기 시켰다. 처리한 농도범위의 녹용약침은 MMC에 의해 야기된 세포독성을 감소시키지 않았다.

Table 6. Effect of CPCHA on cell proliferation of adrenorectal colon CA(SW480) cells treated or non-treated with mytomycin-C

Treatment*		A ₅₉₅ ±S.D.**
CPCHA ($\mu\text{g/ml}$)	Mitomycin-C ($\mu\text{g/ml}$)	
-	-	0.76±0.05
5	-	0.90±0.06
10	-	0.75±0.08
-	0.3	0.70±0.04
-	0.5	0.65±0.06
5	0.3	0.65±0.05
5	0.5	0.55±0.07
10	0.3	0.60±0.04
10	0.5	0.58±0.05

*. Various concentrations of the CPCHA and the mitomycin-C or both were treated for 48 hr.

**. Absorbance was measured at a wavelength of 595 nm. S.D. means standard deviation calculated from 6 independent experiments.

결 론

녹용 약침이 유전독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생쥐 섬유아세포인 NIH3T3세포의 세포군 형성 능(colony forming ability)을 분석하였다. 그 결과 녹용약침을 $1 \cdot 5 \cdot 10 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 16일 동안 세포배양액에 넣어 배양한 후 세포군 수를 조사한 결과, 세포군 형성이 대조군에 비해 처리한 전 농도 범위에서 최대 약 15% 감소하였으나 유의성은 관찰되지 않았다. 그러나 HeLa세포에 $5 \mu\text{g/ml}$ 의 녹용약침과 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 25.0%, $5 \mu\text{g/ml}$ 의 녹용약침과 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 27.0%, $10 \mu\text{g/ml}$ 의 녹용약침과 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 20.0%, $10 \mu\text{g/ml}$ 의 녹용약침과 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 MMC를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 15.0%의 세포군 생존률이 증가하였다. 녹용약침이 DNA 상해요인으로 작용하는 mitomycin-C(MMC)에 의해 유도된 유전독성에 방어효과를 갖는지를 분석하기 위하여 SW480 세포에 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 과 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 MMC와 녹용약침을 함께 처리한 후 세포군 형성율을 분석하였다, $0.5 \mu\text{g/ml}$ 과 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 MMC를 처리한 경우 SW480세포는 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 의 MMC를 처리한 경우 대조군에 비해 25.0%

세포군을 형성하였고, $1 \mu\text{g/ml}$ 의 MMC를 처리한 경우 대조군에 비해 12.0% 세포군을 형성하였다. 이와 같은 결과는 직장암 세포인 SW480세포도 DNA 상해에 대한 민감도가 자궁암 세포인 HeLa 세포와 비슷함을 의미 하나 보다 더 자세한 메커니즘은 연구해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국한의학연구원 1998년도 한방치료 기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

參考文獻

1. Lee SJ. Bonchogangmog. Beijing:Human Hygiene. 1977:780-783.
2. 崔容泰 외. 鍼灸學(下). 서울:集文堂. 1994:1457.
3. Hong SH, Choi DY. The experimental study on the anti-inflammatory and analgesic effects of gold injection aqua-acupuncture. Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion society. 2001;18(2):200-12.
4. Korean Institute of Herbal Acupuncture. Guide of Herbal Acupuncture. Seoul:Hanseong Publishing company. 1999;13, 14, 128-133, 163-165.
5. 신민교. 原色臨床本草學. 서울:永林社. 1991:308-9.
6. Kang DI, Kwon KR. A report on the manufacturing process of Korea herbal acupuncture prepared with KGMP, The 1st Journal of International Congress of KIIHA. 2001;4(1):87-101.
7. Shin MK. Oriental medicine and herbal acupuncture therapy in 21st century. The 1st Journal of International Congress of KIIHA. 2001;4(1):1-3.
8. 서부일, 정국영. 알기쉬운 본초학. 대구:대구한의대 출판부. 2004:409-10.
9. Cole S.P. Rapid Chemosensitivity testing of human cancer cells usuing the MTT assay. Cancer Chemother Pharmacology. 1986;17(3):259-263.