

荊芥連翹湯 추출물의 遺傳毒性 평가

황순이^{1,2}, 이종록¹, 김상찬^{1,3}, 지선영^{1,2*}

대구한의대학교 1한의학대학, 2안이비인후피부과, 3한방신약개발연구팀(BK21)

A study on Genotoxicity Test of Hyeong-gae-yeon-gyo-tang extract

Sun-yi Hwang^{1,2}, Jong-Rok Lee¹, Sang-Chan Kim^{1,3}, Seon-young Jee^{1,2*}

1:College of Oriental Medicine, 2:Dept. of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, 3:Development Team for The New Drug of Oriental Medicine(BK21 program) Daegu Haany University, Daegu 706-080, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The genotoxicity of extract of “Hyeonggaeyeongyotang”, a polyherbal formula has been used as a tonic agents in oriental medicine was tested.

Methods : Extract of “Hyeonggaeyeongyotang” was tested by In Vitro Chromosome Aberration Test, Bacterial Reverse Mutation Assay and Micronucleus test according to OECD Guidelines and KFDA Guidelines [2005-60].

Results : The obtained results were as follows :

1. Chromosome Aberration Test: No significant changes in the number of aberrant metaphases having structural and number of aberrations were detected in all concentrations of “Hyeonggaeyeongyotang” extracts treated in this study.
2. Bacterial Reverse Mutation Assay: No significant increases in the number of revertant colonies compared to its negative control were detected in all concentrations of “Hyeonggaeyeongyotang” extracts treated in this study against all 5 strains except for 50µg/ml treated group where significantly decreases in colony numbers were detected against all five strains used in this study as pharmacological effects not genotoxicity.
3. Micronucleus test: No significant changes in the number of micronucleated polychromatic erythrocytes among 2000 polychromatic erythrocytes compared to negative control were detected in all “Hyeonggaeyeongyotang” extracts-dosing groups tested.

Conclusions : From above-mentioned results, it is concluded that “Hyeonggaeyeongyotang” extracts have not any genotoxicity against In Vitro Chromosome Aberration Test, Bacterial Reverse Mutation Assay and Micronucleus test.

Key Words : Hyeonggaeyeongyotang, Genotoxicity, Chromosome Aberration Test, Bacterial Reverse Mutation Assay, Micronucleus test

서론

의료기술의 발달과 달리 인간 삶의 환경은 갈수록 나빠져 성인은 물론 청소년들까지도 각종 질환과 스트레스에 시달리면서 건강 기능성 식품 및 천연물 의약품에 관심이 높아지고 있다¹⁻⁴⁾. 또한 안전성이 확보되지 않은 식품 및 의약품의 오·남용으로 인한 독성 및 부작용이 늘어나게 됨으로써 사회문제화 되고 있어 이에 대한 철저한 규제 및 관리가 요구되고 있다^{1,2)}.

그러나 이에 대한 안전성은 오래 전부터 한의학에서 사용되어 왔다는 사실만으로 충분히 검토되지 않았다. 하지만 오랫동안의 시행착오와 경험을 바탕으로 확립된 한약 처방은 의약품으로서, 서양 의학의 처방과 같은 맥락으로 취급되게 되었으며, 이에 따라 의약품의 독성평가에 준하여 한약 처방을 적용하여 안전성 평가가 이루어져야 할 필요성이 있다.

荊芥連翹湯은明代 龔廷賢의 《萬病回春⁵⁾》에 처음 수록되어 風熱이 上發하여 頭上諸證을 야기시킨 것을 다스리는 대표적인 방제로 각종 이비인후질환에 많이 활용되어왔다⁶⁾. 그러나 荊芥連翹湯의 유전독성 실험은 거의 이루어지지 않고 있다.

본 연구에서는 현재 의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전청고시 제 2005-60호)⁷⁾에 명시되어 있는 Chinese hamster lung(CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험, 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 통해, 한의학에서 각종 이비인후과 질환에 널리 사용되고 있는 荊芥連翹湯 추출물의 유전독성을 규명하고자 하였다.

재료·방법 및 결과

본 실험은 식품의약품안전청(KFDA) 고시 제 2005-60호(2005년 10월 21일) “의약품의 독성시험기준” 및 OECD Guidelines [TG No. 471, 473, 474]에 준하여 실험을 실시하였으며, 모든 실험동물은 “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals⁸⁾”에 준하여 취급하였다.

1. 荊芥連翹湯의 조성 및 추출

1) 조성

본 실험에 사용된 약재는 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 구입하여 엄선한 것을 사

용하였으며, 본 실험에 사용된 荊芥連翹湯 1첩 분량의 조성은 <Table 1>과 같다.

Table 1. Composition of “Hyeonggaeyeongyotang” used in this study

藥物名	生藥名	用量(g)	藥物名	生藥名	用量(g)
荊芥	Schizonepetae	2.63	枳殼	Aurantii Fructus	2.63
	Herba				
連翹	Forsythiae	2.63	黃芩	Scutellariae	2.63
	Fructus			Radix	
防風	Ledebouriellae	2.63	山梔子	Gardeniae	2.63
	Radix			Fructus	
當歸	Angelicae	2.63	白芷	Angelicae	2.63
	Gigantis Radix			Dahuricae Radix	
川芎	Cnidii	2.63	桔梗	Platycodi Radix	2.63
	Rhizoma				
白芍藥	Paeoniae	2.63	甘草	Glycyrrhizae	1.88
	Radix Alba			Radix	
柴胡	Bupleuri Radix	2.63			
總量					33.44

2) 추출

선정된 약제 15첩 분량(501.60g)을 취하여 정제수 5000ml로 180분 가열 추출한 후 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator(N-N type; LAB Camp, Dajeon, Korea)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer(PV TFD10A; IShin Lab., Seoul, Korea)를 사용하여 동결 건조시켜 1첩 당 3.70g, 총 55.53g(수율 약 11.07%)의 추출물을 얻어 실험에 사용하였다.

2. 荊芥連翹湯 추출물의 CHL세포를 이용한 염색체 이상시험(In Vitro Chromosomal Aberration Test Using Cultured Chinese Hamster Lung Cells of Hyeonggaeyeong yotang extract)

1) 실험기준

시험은 식품의약품안전청 고시 제 2005-60호(2005년 10월 21일) “의약품등의 독성시험기준” 및 OECD Guideline for the Testing of Chemicals(July 21, 1997) TG No. 473 “In Vitro Mammalian chromosomal aberration test”에 제시된 방법에 따랐으며, 시험의 방법은 Ishidate 등⁹⁾ 및 Dean과 Danford¹⁰⁾의 방법을 응용하여 실시하였다.

2) 시험계

식품의약품안전청 국립독성연구소로부터 분양 받

은 Chinese hamster lung(CHL) 세포¹¹⁾를 사용하였다. 본 세포의 염색체 수(modal chromosome number)는 25, 분열주기는 11 - 16시간으로 확인되었다. 세포는 액체질소에 보관한 세포 주를 해동하여 7일 이상 배양한 후 도립현미경으로 미생물의 오염 여부와 형태를 확인하고 실험에 사용하였다.

3) 배양 방법

(1) 배양액

Minimum Essential Medium(GIBCO BRL, USA)을 적량의 주사용 멸균증류수로 용해하여 sodium bicarbonate(2.2g), L-glutamine(292mg), streptomycin sulfate(100µg/ml) 및 penicillin G·Na(105 units)를 첨가, 증류수로 총액량을 1000ml로 조정하였다. 이를 구경 0.22µm의 membrane filter로 여과한 후 우태아 혈청(Fetal Bovine Serum: FBS, GIBCO BRL, USA) 100ml를 첨가해 사용하였다.

(2) 배양조건

세포는 포화수증기와 이산화탄소 농도를 5%로 유지하는 37℃ 항온배양기(Forma 3110, USA)에서 세포배양용 플라스크(75cm², Falcon, USA)를 사용하여 단층 배양하였으며, 매 2-3일 마다 0.1% 트립신액으로 세포를 분리하여 계대 배양하였다. 계대 중인 세포를 트립신으로 처리하여 수거한 다음, 25cm² 플라스크 당 4×10⁴ 세포를 5ml의 배양액으로 파종하여 약 3일간 배양하고 실험물질을 처리하였다.

4) 대사활성계(S9 mix)

S9 mix 1ml의 조성은 다음과 같다. 8µmol MgCl₂·6H₂O, 33µmol KCl, 5µmol G-6-P, 4µmol NADPH, 4µmol NADH, 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4) 및 0.3ml S-9(Molecular Toxicology Inc., Boone, NC, USA).

조제한 S9 mix는 얼음에 채워 사용하였고, 0.5ml/5ml/T-25 플라스크로 처리하였으며, 그 활성은 Cyclophosphamide에 의한 염색체 이상 유발로 확인하였다.

5) 실험물질의 처리

(1) 처리농도의 결정

본 실험의 처리 농도는 예비실험을 실시하여 결정하였다 <Table 2>. 예비실험은 식품의약품안전청 고시 및 OECD guideline에 따라 5000µg/ml을 최고 농도로 본 실험과 동일한 방법으로 실험물질을 처리한 후, 처리 개시일로부터 약 24시간 후 각 플라

스크의 세포를 분리 계수하여 실험물질 처리군에서 얻은 세포수에 대하여 음성대조군에 대한 상대 세포수(Relative Cell Count: RCC)를 산출하였다. 예비실험의 결과 5000µg/ml의 荊芥連翹湯 추출물을 처리한 군에서도 RCC가 90%이상으로 관찰되어 처리군은 <Table 3>에서와 같이 5000µg/ml을 최고 농도로 결정하였으며, 공비 2 또는 10으로, 1000, 500, 50, 5 및 0.5µg/ml의 6 단계의 농도군을 설정하였다. 한 농도군 당 2개의 플라스크를 사용하였다.

Table 2. Results of preliminary range-finding test in Chromosomal Aberration Test of "Hyeonggaeyeongyotang" extract in this studya).

Conc. (µg/ml)	S9 mix	Timeb)	ViableCellsc)	Relative cell countd)
0	+	6-18	11531.50 ± 1450.36	100.00
0.05	+	6-18	10335.50 ± 691.03	89.63
0.5	+	6-18	11176.25 ± 949.07	96.92
5	+	6-18	11036.75 ± 1674.37	95.71
50	+	6-18	10747.25 ± 464.99	93.20
500	+	6-18	10220.75 ± 427.82	88.63
1000	+	6-18	11263.00 ± 754.37	97.67
5000	+	6-18	10647.25 ± 1038.37	92.33
CPA1) 6	+	6-18	8214.25 ± 961.39	71.23
0	-	6-18	11238.50 ± 957.23	100.00
0.05	-	6-18	11086.00 ± 865.32	98.64
0.5	-	6-18	10857.50 ± 1733.60	96.61
5	-	6-18	10332.50 ± 702.71	91.94
50	-	6-18	10210.00 ± 185.42	90.85
500	-	6-18	10877.25 ± 1443.86	96.79
1000	-	6-18	10434.25 ± 212.59	92.84
5000	-	6-18	11020.00 ± 929.02	98.06
EMS2) 800	-	6-18	7770.50 ± 393.54	69.14
0	-	24-0	10650.75 ± 1034.32	100.00
0.05	-	24-0	9709.00 ± 531.42	91.16
0.5	-	24-0	9949.75 ± 1078.91	93.42
5	-	24-0	10179.75 ± 247.78	95.58
50	-	24-0	11122.75 ± 1875.86	104.43
500	-	24-0	10306.00 ± 150.68	96.76
1000	-	24-0	10250.75 ± 1372.80	96.62
5000	-	24-0	10520.75 ± 1201.25	98.78
EMS2) 600	-	24-0	6264.25 ± 852.01	58.82

a) Each culture was trypsinized and suspended with 0.5ml of 0.1% trypsin and 5 ml of culture medium. The cell suspensions of 0.4ml/culture was diluted 50 times with 19.6ml of Isoton sol.. The cells in 0.5ml Isoton sol. were counted five/culture using Coulter Counter. Actual number of cells per flask = Mean Count × 550; b) Treatment time - Recovery time, hrs; c) Mean ± S.D. cells, n=4; d) Relative Cell Counts = {(Cell counts of treated flask/Cell counts of control flask) × 100}(%) ; 1) Cyclophosphamide H₂O; 2) Ethylmethanesulfonate.

(2) 실험군의 구분

실험은 S-9 적용군(Test I)과 미적용군(Test II 및 III)으로 대별하였으며, S9 mix 미적용군은 다시

6시간 처리 후 18시간 회복기를 둔 Test II와 실험 물질은 24시간 처리한 Test III로 세분하여 실시하였다. 대조물질은 식품의약품안전청 고시에 따라 실험 Test I에서는 Cyclophosphamide · H₂O(CPA, Sigma, USA) 6µg/ml을 사용하였으며, Test II 및 III에서는 각각 800 및 600µg/ml의 Ethylmethanesulfonate(EMS, Sigma, USA)를 사용하였다.

Table 3. Experimental designs used in Chromosomal Aberration Test of "Hyeonggaeyeongyotang" extract in this study.

Groups	Concentration(µg/ml)		Treatment - Recovery time(hrs)
	S9 mix	+	
Test I(6·S)	Negative control	0	6-18
	test item 01	0.5	6-18
	test item 02	5	6-18
	test item 03	50	6-18
	test item 04	500	6-18
	test item 05	1000	6-18
	test item 06	5000	6-18
Positive control	CPA 6	6-18	
Test II(6·S)	Negative control	0	6-18
	test item 01	0.5	6-18
	test item 02	5	6-18
	test item 03	50	6-18
	test item 04	500	6-18
	test item 05	1000	6-18
	test item 06	5000	6-18
Positive control	EMS 800	6-18	
Test III(24·S)	Negative control	0	24-0
	test item 01	0.5	24-0
	test item 02	5	24-0
	test item 03	50	24-0
	test item 04	500	24-0
	test item 05	1000	24-0
	test item 06	5000	24-0
Positive control	EMS 600	24-0	

Test item: Hyeonggaeyeongyotang extract
 Negative Control: Minimum Essential Medium(MEM) containing distilled water, CPA: Cyclophosphamide H₂O
 EMS: Ethylmethanesulfonate

(3) 실험물질의 처리

실험물질은 멸균증류수(중외제약, Korea)에 용해하여 처리하였으며, 대조물질은 배양액에 용해하여 조제하였다. 실험물질 및 대조물질은 조제 즉시 처리하였으며, 실험물질 처리를 위한 세포는 Test I, II 및 III으로 나누어 준비하고, 실험물질 처리 전 미리 각 플라스크의 배양액을 모두 제거한 후 S-9 적용

군(Test I)은 4.00ml, 미적용군(Test II 및 III)은 4.5ml의 배양액을 분주, 1시간 후 시험물질을 처리하였으며, 음성대조군에서는 부형제인 멸균증류수만을 처리하였다. 처리액의 조성을 <Table 4>와 같다.

Table 4. Composition of treatment medium

Groups	Culture medium	Test extract	S9 mix	Total
Test I	4.0ml	0.5ml	0.5ml	5.0ml
Test II	4.5ml	0.5ml	-	5.0ml
Test III	4.5ml	0.5ml	-	5.0ml

S9 mix 적용(Test I) 및 미적용 6시간 처리군(Test II)은 처리시작으로부터 약 6시간 경과 후 플라스크로부터 시험물질을 함유한 처리액을 제거하고 5ml의 CMF D-PBS(Ca²⁺ 및 Mg²⁺ free Dulbecco's phosphate buffered saline)로 세포층을 1회 세척한 후 신선한 배양액 5ml을 가해 증기세포 수거시까지 계속 배양하였으며, S9 mix 미적용 24시간 처리군(Test III)의 경우 세척 없이 증기세포 수거시까지 계속 처리하였다. 모든 플라스크에 대하여 시험물질 처리 시작으로부터 약 22시간 후에 각각 배양액의 1%에 해당하는 100µM 콜히친 용액(colchicine solution)을 각 플라스크에 처리해(최종 농도 1µM) 2시간 경과한 후 증기세포를 수거하였다.

6) 검체의 제작

증기세포를 분리, 수거하여 150 × g으로 5분간 원심분리해 세포를 모은 다음 75mM KCl 용액 5ml를 가하여 10분간 실온에서 저장액 처리하였다. 저장액 처리 후 고정액(메틸 알콜 : 빙초산 = 3 : 1) 5ml을 기존 75mM KCl 용액에 혼합하여 20분간 전고정을 실시한 다음 300 × g으로 원심분리하여 고정액을 2회 교환해준 다음 공기건조법으로 검체를 제작하고 3% Giemsa액으로 염색하였다. 검체는 각 플라스크 당 2 매씩 제작하였으며, 염색, 수세, 건조 및 봉입을 마친 검체는 계수시까지 상온에 보관하였다.

7) 염색체 이상의 계수

염색체 이상의 형태 판별 및 계수는 일본환경돌연변이학회(Japanese Environmental Mutagen Society: JEMS) 포유동물시험분과회(Mammalian Mutagenicity Study Group: MMS)의 "염색체 이상 아틀라스¹²⁾"에 따랐다. 이상은 염색체형(Chromosom

e type) 절단 및 교환과 염색분체형(Chromatid type) 절단 및 교환으로 대별하여 계수하였으며, 이상을 가진 중기상(이상 중기상)의 빈도 및 염색체 이상의 수는 gap을 포함한 경우와 제외한 경우를 동시에 표시하였다.

(1). 구조적 이상의 계수

각 검체당 100개의 분열중기상(23-27 동원체)에 대하여 염색체 수 및 염색체 이상의 유무를 관찰하고, 염색체 이상이 관찰되면 이상의 종류와 수를 기록하였다.

A-7-2. 숫적 이상의 계수

염색체 이상의 유무에 관계없이 염색체 수에 따라 diploidy(DP, 23-36 동원체), polyploidy(PP, 37≤ 동원체) 및 핵내배화(Endoreduplication: ER)로 분류, 100 중기상당 관찰되는 빈도를 기록하였다.

8) 통계처리 및 판정

모든 수치는 평균 ± 표준편차(n=4)로 표시하였으며, OECD Guideline에 따라 gap을 제외한 숫자만을 대상으로 양성 판정을 실시하였다. 양성 판정은 Richardson 등13)의 방법을 응용하였다. 즉, 먼저 중기상을 염색체 이상이 없는 것(normal metaphase, 정기 중기상)과 1개 이상의 이상을 포함한 것(aberrant metaphase, 이상 중기상)으로 나누고, 이상 중기상의 빈도를 매체 대조군과 비교하였다. 숫적 이상에 대해서는 중기상을 DP, PP 및 ER로 분류하고 PP 및 ER의 빈도에 대해 매체대조군과 비교하였다. 시험물질 처리군에 있어서 염색체 이상을 가진 분열중기상의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성 반응을 나타낼 경우를 양성으로 판정하였다.

모든 수치는 SPSS for Windows(Release 6.1.2, SPSS Inc., USA)를 이용하여, 매체 대조군과 비교하여 Mann-Whitney, Wilcoxon's Rank Sum(M-W) test로 유의성을 검증하였다.

9) 결과

(1) 염색체 이상 빈도

① S9 mix 적용 6시간 처리군(Test I), S9 mix 미 적용 6시간 처리군(Test II), S9 mix 미적용 24시간 처리군(Test III)

Table 5. Chromosomal Aberration Test of "Hyeonggaeyeongyotang" extract in 6 hrs treatment group under present of S9 mix(Test I), absence of S9 mix(Test II), in 24 hrs treatment group under absence of S9 mix(Test III)

Conc.(µg/ml)		Mean Aberra	Mean Total	Mean of	Mean of ER			
		nt/Metaphases	Aberration	PP				
T	Contrn	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58	0.25 ± 0.50			
	0.5	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50			
	5	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00			
	c	Gap	0.25 ± 0.50	0.50 ± 1.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50		
		Include						
	I	500	0.50 ± 1.00	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00		
1000		0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.50 ± 1.00	0.00 ± 0.00			
5000		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50			
CPA			13.00 ± 1.41*	22.75 ± 3.77*	0.75 ± 0.86	0.75 ± 0.50		
T		Contrn	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.58	0.25 ± 0.50		
	0.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50			
	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00			
	e	Gap	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50		
		Exclud						
	I	500	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00		
1000		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 1.00	0.00 ± 0.00			
5000		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50			
CPA			10.25 ± 0.96*	21.25 ± 3.30*	0.75 ± 0.86	0.75 ± 0.50		
T		e	Control	0.50 ± 0.58	0.75 ± 0.96	0.50 ± 1.00	0.25 ± 0.50	
	0.5		0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50		
	5		0.00 ± 0.00	0.50 ± 1.00	0.50 ± 1.00	0.00 ± 0.00		
	Gap		50	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	
			Include					
	500		0.50 ± 1.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00		
	I	1000	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00		
		5000	0.25 ± 0.50	0.50 ± 0.58	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50		
		EMS		20.25 ± 2.22*	28.50 ± 1.29*	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58	
		T	e	Control	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 1.00	0.25 ± 0.50
				0.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50
5	0.00 ± 0.00			0.00 ± 0.00	0.50 ± 1.00	0.00 ± 0.00		
II	Gap			0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	
	Exclud							
500	0.00 ± 0.00			0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00		
I	1000		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00		
	5000		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50		
	EMS			13.00 ±	25.25 ± 1.89*	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58	
				3.92*				
	T		e	Control	0.50 ± 0.58	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.50 ± 1.00
				0.5	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50
5		0.25 ± 0.50		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00		
Gap		50		0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.58	0.00 ± 0.00	
		Included						
500		0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.58		
I		1000	0.50 ± 0.58	0.00 ± 0.00	0.50 ± 1.00	0.50 ± 1.00		
		5000	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.50 ± 1.00	0.25 ± 0.50		
		EMS		28.00 ±	44.00 ±	0.50 ± 1.00	0.25 ± 0.50	
				2.58*	13.29*			
		T	e	Control	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.50 ± 1.00
				0.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50
5	0.00 ± 0.00			0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00		
II	Gap			0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.58	0.00 ± 0.00	
	Exclude							
500	0.00 ± 0.00			0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.58		
I	1000		0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.50 ± 1.00	0.50 ± 1.00		
	5000		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 1.00	0.25 ± 0.50		
	EMS			23.00 ± 2.16*	38.00 ± 12.73*	0.50 ± 1.00	0.25 ± 0.50	
	600							

Treatment time - Recovery time: 6-18 hrs(Test I, Test II) or

24-0hrs(Test III); Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; CPA: Cyclophosphamide H2O; EMS: Ethylmethanesulfonate; * p<0.05 vs Control

(2) Gap 및 염색체형 이상 빈도

① S9 mix 적용 6시간 처리군(Test I), S9 mix 미 적용 6시간 처리군(Test II), S9 mix 미적용 24시간 처리군(Test III)

Table 6. Changes of Chromosome types and Gap in Chromosomal Aberration Test of "Hyeonggaeyeongyotang" extract in 6 hrs treatment group under present of S9 mix, and in 6 hrs or 24 hrs treatment group under absence of S9 mix .

Conc. (µg/ml)	Gap	Chromosome type	
		Deletion	Exchanges
Control	0.50 ± 0.58	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
5	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Test I	50	0.50 ± 1.00	0.00 ± 0.00
	500	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
	1000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	5000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	CPA 6	1.50 ± 0.58	1.50 ± 1.29*
Control	0.75 ± 0.96	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
5	0.50 ± 1.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Test II	50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
	500	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
	1000	0.50 ± 1.00	0.00 ± 0.00
	5000	0.50 ± 0.58	0.00 ± 0.00
	EMS 800	3.25 ± 0.96*	1.75 ± 0.96
Control	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Test III	50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	500	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	1000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	5000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	EMS 600	6.00 ± 1.41*	4.00 ± 1.41*

Treatment time - Recovery time: 6-18 hrs(Test I, Test II) or 24-0hrs(Test III); Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; CPA: Cyclophosphamide H2O; EMS: Ethylmethanesulfonate; * p<0.05 vs Control

(3) 염색분체형 이상 및 기타 이상 빈도

① S9 mix 적용 6시간 처리군(Test I), S9 mix 미 적용 6시간 처리군(Test II), S9 mix 미적용 24시간 처리군(Test III).

Table 7. Changes of Chromatid types and others(Shortening) in Chromosomal Aberration Test of "Hyeonggaeyeongyotang" extract in 6 hrs treatment group under present of S9 mix, and in 6 hrs or 24 hrs treatment group under absence of S9 mix.

Conc.(µg/ml)	Others	Chromatid type	
		Deletion	Exchanges
Control	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Test I	50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	500	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	1000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	5000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	CPA 6	0.00 ± 0.00	7.75 ± 1.89*
Control	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Test II	50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	500	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	1000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	5000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	EMS	0.00 ± 0.00	2.75 ± 0.96*
800	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Test III	50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	500	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	1000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	5000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	EMS	1.00 ± 0.82*	10.75 ± 7.37*
600	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Treatment time - Recovery time: 6-18 hrs(Test I, Test II) or 24-0hrs(Test III); Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; CPA: Cyclophosphamide H2O; EMS: Ethylmethanesulfonate; * p<0.05 vs Control

3. 荊芥連翹湯 추출물의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험(Bacterial Mutation Assay Using the Plate Incorporation Methods of Hyeonggaeyeon gyotang extract)

1) 실험기준

시험은 식품의약품안전청 고시 제 2005-60호 (2005년 10월 21일) "의약품등의독성시험기준" 및 OECD Guideline for the Testing of Chemicals(July 21, 1997) TG No. 471 "Bacterial Reverse Mutation Test"에 제시된 방법에 따랐으며, 시험의 방법은 Maron과 Ames¹⁴⁾의 방법에 준하여 실시하였다.

2) 시험균주 및 배지

(1) 균주

실험균주는 식품의약품안전청 고시 제 2005-60호 (2005년 10월 21일) "의약품등의독성시험기준" 및 OECD Guideline for the Testing of Chemicals(July 21, 1997) TG No. 471 "Bacterial Reverse Mutation

Test"에 제시된 것으로, 복귀돌연변이에 널리 사용되며 변이원성 물질에 감수성이 높은 것으로 알려져 있는 균주를 사용하였다. 염기쌍치환형(base-pair substitution type) 돌연변이 검사를 위해서는 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535 및 *Escherichia coli* WP2 uvrA를 사용하였으며, frame-shift 형 돌연변이 검사를 위해서는 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA1537을 사용하여 모두 5개의 균주를 사용하였다. 모든 시험균주는 형질 확인 후 계대배양한 것을 사용하였다.

(2) 배지

시험균주들은 각각 master plate로부터 25ml의 액체배지(2.5% Oxoid Nutrient broth No. 2)에 접종하여 Shaking incubator(37°C, 200rpm)에서 약 10시간 전배양하고, 최소배지(minimal glucose agar plate)는 1.5% Bacto agar(Difco, USA)와 Vogel-Bonner medium E 및 2% glucose를 함유한 패트리디쉬(Falcon #1029, USA)에 25ml씩 분주하여 사용하였으며, *E. coli*를 이용한 시험에는 위와 동일한 최소배지에 0.1% tryptophan 액 0.25ml/L를 첨가한 것을 사용하였다. Top agar는 0.6% agar와 0.5% NaCl로 조제하였으며, 살모넬라 균주용 Top agar에만 0.05mM histidine-biotine을 첨가하였다.

(3) 균주의 형질확인

균주의 유전자형 확인을 위해 *S. typhimurium* 균주들의 경우에는 histidine 요구성의 여부, uvrB mutation 유지 여부, R-factor 유지 여부, rfa 돌연변이의 유지여부, spontaneous revertant의 수 등을 검사하였고, *E. coli* WP2 uvrA 균주에 있어서는 tryptophan 요구성 여부, uvrA mutation 유지여부, spontaneous revertant의 수 등을 Maron과 Ames(14)에 준하여 확인하였다.

3) 대사활성제(S9 mix)

S9 mix 1ml의 조성은 다음과 같다. 8µmol MgCl₂·6H₂O, 33µmol KCl, 5µmol G-6-P, 4µmol NADPH, 4µmol NADH, 100µmol sodium phosphate buffer(pH 7.4) 및 50µl S-9(Molecular Toxicology Inc., Boone, NC, USA).

조제한 S9 mix는 얼음에 채워 사용하였고, 0.5ml/plate로 처리하였으며, 활성은 2-Aminoanthracene(Sigma, USA)의 돌연변이 유발로 확인하였다.

4) 실험물질의 처리

(1) 처리농도의 결정

본 실험의 처리 농도는 예비실험을 실시하여 결정하였다 <Table 8>. 예비실험은 식품의약품안전청 고시 및 OECD guideline에서 복귀돌연변이 실험시 최고농도로 제시한 5000µg/plate을 최고농도로 1000, 500, 50, 5, 0.5, 0.05µg/plate의 7 단계 농도군과 음성대조군 및 양성대조군으로 농도군 당 1 plate를 사용하여 실험을 수행하였다. 예비실험의 결과 500µg/ml 이상의 荊芥連翹湯 추출물 처리군에서 모든 균주에 대한 강한 항균 활성이 관찰되어 처리군은 <Table 9>에서와 같이 50µg/ml을 최고 농도로 결정하였으며, 공비 10으로, 5, 0.5, 0.05, 0.005 및 0.0005µg/ml의 6 단계의 농도군을 설정하였다. 한 농도군 당 4 매의 plate를 사용하였다.

Table 8. Results of preliminary range-finding test in Bacterial Reverse Mutation Assay of "Hyeonggaeyeongyotang" extract in this study.

Tester Strain	Colonies/plate [Factor]a				Tester Strain	Colonies/plate [Factor]a				
	without		with S9			without		with S9		
	S9 mix		mix			t S9 mix		mix		
	Colon	Factor	Colon	Factor		Colon	Factor	Colon	Factor	
Concentration (µg/ml)	y	r	y	r	y	r	y	r	y	r
Salmonella typhimurium TA100					Salmonella typhimurium TA1535					
0	132	1.00	121	1.00	0	13	1.00	9	1.00	
0.05	123	0.93	113	0.93	0.05	11	0.85	7	0.78	
0.5	121	0.92	101	0.83	0.5	10	0.77	9	1.00	
5	102	0.77	113	0.93	5	12	0.92	8	0.89	
50	98	0.74	79	0.65	50	10	0.77	6	0.67	
500b)	21	0.16	19	0.16	500b)	3	0.23	2	0.22	
1000b)	19	0.14	5	0.04	1000b)	4	0.31	1	0.11	
5000b)	2	0.02	1	0.01	5000b)	2	0.15	1	0.11	
SA1) 0.5	402	3.05	NT*	NT	SA1) 0.5	413	31.77	NT	NT	
2-AA2) 0.4	NT	NT	275	2.43	2-AA2) 2	NT	NT	297	42.43	
Salmonella typhimurium TA98					Salmonella typhimurium TA1537					
0	30	1.00	33	1.00	0	12	1.00	14	1.00	
0.05	31	1.03	30	0.91	0.05	9	0.75	11	0.79	
0.5	22	0.73	21	0.64	0.5	8	0.67	12	0.86	
5	25	0.83	26	0.79	5	8	0.67	12	0.86	
50	29	0.97	21	0.64	50	12	1.00	10	0.71	
500b)	5	0.17	10	0.30	500b)	3	0.25	4	0.29	
1000b)	3	0.10	4	0.12	1000b)	2	0.17	1	0.07	
5000b)	1	0.03	2	0.06	5000b)	1	0.08	0	0.00	
4NQO3) 0.5	297	9.90	NT	NT	9-AA4) 50	301	25.08	NT	NT	
2-AA2) 0.4	NT	NT	344	11.47	2-AA2) 2	NT	NT	323	29.36	

Escherichia coli WP2 uvrA					
0	21	1.00	16	1.00	
0.05	20	0.95	15	0.94	
0.5	18	0.86	14	0.88	
5	17	0.81	14	0.88	
50	21	1.00	12	0.75	
500b)	3	0.14	3	0.19	
1000b)	0	0.00	0	0.00	
5000b)	0	0.00	1	0.06	
4NQO3)	132	6.29	NT	NT	
0.5					
2-AA2) 4	NT	NT	244	16.27	

a) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) Growth inhibition(decrease in number of colonies and/or formation of micro-colonies); * NT: Not tested; 1) Sodium azide; 2) 2-Aminoanthracene; 3) 4-Nitroquinolone-1-oxide; 4) 9-Aminoacridine.

(2) 실험군의 구분

실험은 S. typhimurium TA100, TA1535, E. coli WP2 uvrA, S. typhimurium TA98 및 TA1537의 5개 균주에 대하여 각각 S9 mix 적용군과 미적용군으로 대별하였으며, 대조물질은 식품의약품안전청 고시에 따라 Sodium azide(SA), 4-Nitroquinolone-1-oxide(4NQO), 9-Aminoacridine(9-AA) 및 2-AA를 사용하였다. S9 mix 미처리군의 경우, S. typhimurium TA100, TA1535에 대해서는 SA를, TA98에 대해서는 4NQO를, TA1537에 대해서는 9-AA를 각각 사용하였으며, E. coli WP2 uvrA에 대해서는 4NQO를 사용하였다. S9 mix 적용군에서는 각각의 균주에 대하여 2-AA를 사용하였다.

Table 9. Experimental designs used in Bacterial Reverse Mutation Assay of "Hyeonggaeyongyotang" extract in this study.

Tester Strain Groups	S9 mix	Concentration (ug/ml)	Tester Strain Groups	S9 mix	Concentration (ug/ml)
Test I : Salmonella typhimurium TA100			Test II : Salmonella typhimurium TA1535		
Negative control	+/-	0	Negative control	+/-	0
test item 01	+/-	0.0005	test item 01	+/-	0.0005
test item 02	+/-	0.005	test item 02	+/-	0.005
test item 03	+/-	0.05	test item 03	+/-	0.05
test item 04	+/-	0.5	test item 04	+/-	0.5
test item 05	+/-	5	test item 05	+/-	5

test item 06	+/-	50	test item 06	+/-	50
Positive control I	-	SA 0.5	Positive control I	-	SA 0.5
control I			control I		
Positive control II	+	2-AA 0.4	Positive control II	+	2-AA 2
Test III : Salmonella typhimurium TA98			Test IV : Salmonella typhimurium TA1537		
Negative control	+/-	0	Negative control	+/-	0
test item 01	+/-	0.0005	test item 01	+/-	0.0005
test item 02	+/-	0.005	test item 02	+/-	0.005
test item 03	+/-	0.05	test item 03	+/-	0.05
test item 04	+/-	0.5	test item 04	+/-	0.5
test item 05	+/-	5	test item 05	+/-	5
test item 06	+/-	50	test item 06	+/-	50
Positive control I	-	4NQO 0.5	Positive control I	-	9-AA 50
Positive control II	+	2-AA 0.4	Positive control II	+	2-AA 2
Test V : Escherichia coli WP2 uvrA					
Negative control	+/-	0			
test item 01	+/-	0.0005			
test item 02	+/-	0.005			
test item 03	+/-	0.05			
test item 04	+/-	0.5			
test item 05	+/-	5			
test item 06	+/-	50			
Positive control I	-	4NQO 0.5			

Test item: Hyeonggaeyongyotang extract A: Sodium azide 2-AA: 2-Aminoanthracene 4NQO: 4-Nitroquinolone-1-oxide 9-AA: 9-Aminoacridine.

(3) 실험물질의 처리

실험물질은 멸균증류수(중외제약, Korea)에 용해하여 direct plate incorporation 방법으로 처리하였으며, 대조물질인 SA는 멸균증류수(중외제약, Korea)에 용해하여 사용하였으며, 2-AA, 9-AA 및 4NQO

는 각각 DMSO에 용해하여 조제하였다. 고압증기멸균한 top agar를 dry bath에서 45℃로 예열한 멸균 tube(Falcon #2058, USA)에 2ml씩 분주한 다음 시험물질 용액 0.1ml, S9 mix(또는 pH 7.4의 Sodium-phosphate buffer) 0.5ml, 균배양액 0.1ml을 top agar에 혼합하고 즉시 vortex mix로 2-3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고르게 퍼지게 하여 굳게 하였다. 음성대조군은 시험물질 대신 부형제인 멸균증류수 0.1ml를, 양성대조군은 각각의 양성대조물질 용액을 동일한 방법으로 첨가하였다. 시험물질 및 S9 mix의 무균성을 확인하기 위하여 균주가 없는 상태에서 시험물질 최고농도액 0.1ml와 S9 mix 0.5ml를 각각 2ml의 top agar에 혼합하여 plate를 제작하였다. 처리가 종료된 후 top agar가 굳으면 plate를 뒤집어 37℃에서 약 48 시간 배양 후 집락을 계수하였다.

5) 통계처리 및 판정

모든 수치는 평균 ± 표준편차(n=4)로 표시하였으며, 집락 계수시 각 plate의 background lawn의 형성 여부를 검사하였으며, 오염 또는 기타 이상의 발생 여부를 점검하였다. 무균성 확인을 위한 plate에서는 미생물의 성장으로 인한 집락 형성 유무를 확인하였다. 시험물질을 처리한 plate에서 S9 mix 적용 여부에 상관없이 최소 1개 균주에서 평판당 복귀돌연변이 집락 수가 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다. 항균성 또는 세포독성은 background lawn이 없어지거나 미세집락의 출현 혹은 집락 수가 음성대조군에 비해 현저히 감소하는 것으로 판단하였다. 또한 하기의 공식을 이용하여 음성대조군에 대한 처리군의 집락 수를 Factor로 환산하여 0.5이하로 감소한 경우를 항균성으로 판단하였다. 각 결과표에 Factor를 동시에 표시하였다. 모든 수치는 SPSS for Windows(Release 6.1.2, SPSS Inc., USA)를 이용하여, 음성대조군과 비교하여 Mann-Whitney Wilcoxon's Rank Sum(M-W) test로 유의성을 검증하였다.

Factor =Number of colonies of treated plate / Number of colonies of negative control plate

6) 결과

(1) 복귀돌연변이 집락수

① Salmonella typhimurium TA100(Test I) · TA1535(Test II) · TA98(Test III) · TA1537(Test IV), Escherichia coli WP2 uvrA(Test V).

Table 10. Results of Bacterial Reverse Mutation Assay of "Hyeonggaeyeongyotang" extract in Salmonella typhimurium TA100(Test I) · TA1535(Test II) · TA98(Test III) · TA1537(Test IV), Escherichia coli WP2 uvrA(Test V).

Conc. (µg/ml)	Without S9 mix		With S9 mix		
	Colonies	[Factor] a)	Colonies	[Factor] r)	
Control	138.50 ± 9.54	[1.00]	130.50 ± 1.29	[1.00]	
0.0005	132.75 ± 12.12	[0.96]	127.25 ± 4.19	[0.98]	
0.005	131.75 ± 11.73	[0.95]	131.00 ± 9.56	[1.00]	
Test I	0.05	129.25 ± 6.02	120.50 ± 11.33	[0.92]	
	0.5	128.00 ± 10.49	127.50 ± 8.96	[0.98]	
	5	125.50 ± 5.07	123.75 ± 4.86	[0.95]	
	50	104.75 ± 14.10*	108.25 ± 10.37*	[0.83]	
SA1)	0.5	522.75 ± 91.00*	NTb)	NT	
	2-AA2)	NT	313.75 ± 17.78*	[2.40]	
	0.4	NT	NT	NT	
	Control	13.75 ± 1.71	[1.00]	8.75 ± 2.50	[1.00]
0.0005	12.25 ± 1.71	[0.89]	7.75 ± 2.50	[0.89]	
0.005	13.00 ± 2.71	[0.95]	8.25 ± 3.40	[0.94]	
Test II	0.05	12.25 ± 0.96	8.00 ± 2.00	[0.91]	
	0.5	13.00 ± 1.41	6.75 ± 1.71	[0.77]	
	5	12.50 ± 3.11	7.75 ± 1.71	[0.89]	
	50	9.25 ± 1.50*	4.75 ± 1.26*	[0.54]	
SA1)	0.5	492.75 ± 74.82*	NTb)	NT	
	2-AA2)	NT	262.00 ± 34.62*	[20.94]	
	2	NT	NT	NT	
	Control	23.50 ± 4.65	[1.00]	34.75 ± 2.75	[1.00]
0.0005	23.00 ± 4.32	[0.98]	31.75 ± 2.63	[0.91]	
0.005	22.75 ± 5.19	[0.97]	33.00 ± 2.31	[0.95]	
Test III	0.05	20.25 ± 2.22	32.50 ± 4.65	[0.94]	
	0.5	22.00 ± 3.83	32.75 ± 2.50	[0.94]	
	5	19.75 ± 4.11	32.25 ± 3.95	[0.93]	
	50	14.25 ± 3.77*	22.00 ± 5.48*	[0.63]	
4NQO3)	0.5	287.00 ± 52.04*	NTb)	NT	
	2-AA2)	NT	337.00 ± 22.80*	[9.70]	
	0.4	NT	NT	NT	
	Control	11.00 ± 0.82	[1.00]	18.00 ± 2.16	[1.00]
0.0005	10.50 ± 1.29	[0.95]	17.75 ± 2.22	[0.99]	
0.005	10.75 ± 0.50	[0.98]	16.50 ± 5.07	[0.92]	
Test IV	0.05	10.25 ± 1.71	15.75 ± 3.77	[0.88]	
	0.5	10.00 ± 1.63	16.25 ± 1.89	[0.90]	
	5	9.25 ± 1.71	16.50 ± 1.91	[0.92]	
	50	6.75 ± 2.06*	12.00 ± 2.45*	[0.67]	
9-AA4)	50	267.75 ± 26.12*	[24.34]	NTb)	NT
	2-AA2)	NT	319.25 ± 17.86*	[17.74]	
2	NT	NT	NT	NT	

	Contro l	13.75 ± 2.06	[1.00]	15.75 ± 1.71	[1.00]
	0.0005	13.00 ± 2.71	[0.95]	15.25 ± 2.87	[0.97]
	0.005	13.25 ± 2.63	[0.96]	15.25 ± 3.50	[0.97]
Test V	0.05	12.00 ± 0.82	[0.87]	14.00 ± 3.37	[0.89]
	0.5	11.75 ± 0.86	[0.85]	15.00 ± 1.63	[0.95]
	5	12.50 ± 2.08	[0.91]	14.00 ± 1.83	[0.89]
	50	7.75 ± 3.20*	[0.56]	9.00 ± 1.41*	[0.57]
	4NQO	114.75 ±	[8.35]	NTb)	NT
	5) 0.5	14.34*			
	2-AA2) 4	NT	NT	277.25 ± 28.96*	[17.60]

a) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) NT: Not tested; 1) Sodium azide; 2) 2-Aminoanthracene; 3) 4-Nitroquinolone-1-oxide; 4) 9-Aminoacridine; 5) 4-Nitroquinolone-1-oxide; * p<0.05 vs Control

4. 荊芥連翹湯 추출물의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험(Micronucleus Test in Bone Marrow Cells of Male ICR Mouse of Hyeonggaeye ongyotang extract)

1) 실험기준

시험은 식품의약품안전청 고시 제 2005-60호(2005년 10월 21일) “의약품등의 독성시험기준” 및 OECD Guideline for the Testing of Chemicals(July 21, 1997) TG No. 474 “Mammalian Erythrocyte Micronucleus test”에 제시된 방법에 따랐으며, 실험동물은 “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals9)”에 준하여 취급하였다.

2) 실험동물

성숙한 수컷 ICR mouse(6wks old upon receipt, Charles River, Japan)를 사료(삼양사, 서울)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 1주일간 적응시킨 후, 총 6개 군으로 구분하고, 각 그룹 당 5 마리씩 사용하여 총 30마리를 사용하였다. 실험동물은 온도(20-25℃)와 습도(30-35%)가 조절된 사육실에서 사육하였으며, 환기횟수는 11-12회/hr, 조명은 12hr/day를 유지하였다. 사료는 고품사료를 자유롭게 공급하였으며, 물은 수도수를 자유롭게 공급하였다.

3) 투여 경로 및 방법

시험물질의 임상예정 경로인 경구투여를 투여경로로 선택하였다(단, 양성대조물질인 CPA는 복강내 투여를 투여경로로 선택하였다). 시험물질의 개체당 투여액은 투여 직전에 측정된 체중에 따라 Kg 당 10ml로 산출하여 투여하였다. 경구투여는 살균한 금속제 зонде(Sonde)를 이용하여 강제투여 하였다.

4) 투여용량의 설정 및 시험군의 구성

(1) 투여용량의 결정

본 실험의 처리 농도는 <Table 11>에서와 같이 식품의약품 안전청 고시 제 2005-60호(2005년 10월 21일) “의약품 등의 독성시험기준”에 준하여 설치류 최대 투여 한계 용량인 2000mg/kg을 최고 용량으로 결정하였으며, 공비 2로 1000, 500 및 250mg/kg의 4 단계의 용량군을 설정하였다. 한 용량군 당 5 마리의 수컷 마우스를 사용하였다.

Table 11. Experimental grouping used in Micronucleus Test in Bone Marrow Cells of “Hyeonggaeyeongyotang” extract in this study.

Group ID	Treatment	Dosage	Total Dosing	Dosing Route
G0	Distilled water	0	2	Oral
G1	Test Item 01	2000mg/kg	2	Oral
G2	Test Item 02	1000mg/kg	2	Oral
G3	Test Item 03	500mg/kg	2	Oral
G4	Test Item 04	250mg/kg	2	Oral
G5	CPA	70mg/kg	1	IP

Test item: Hyeonggaeyeongyotang extract G0: Vehicle, negative control group

G5: Positive control group CPA: Cyclophosphamide H2O Test item and CPA were dosed at 10ml/kg.

(2) 실험군의 구분

본 실험은 10ml/kg의 vehicle(멸균증류수, Korea)를 매일 1회씩 2일간 투여한 매체 대조군(G0), 각각 2000, 1000, 500 및 250mg/kg의 荊芥連翹湯 추출물을 매일 1회씩 2일간 투여한 G1, G2, G3 및 G4 군으로 구별하였다. 또한 CPA 70mg/kg을 1회 복강투여한 양성대조군(G5)을 별도로 구분하였다.

(3) 시험물질 및 양성 대조물질의 조제

荊芥連翹湯 추출물(시험물질)을 멸균증류수에 희석하여 최고 농도군(200mg/1ml)을 조제하고 이를 단계별로 희석하여 저 농도군(100, 50 및 25mg/ml)을 조제하였다. 양성대조물질은 생리식염수(중의제약, Korea)에 용해하여 7mg/ml로 조제하였다.

5) 골수 검체의 제작

최종투여 약 24시간 후 모든 실험동물을 Ethyl ether 마취하에 방혈한 다음 양쪽 대퇴골을 적출하였다. 골수검체의 제작은 Schmid15)의 방법에 따랐다. 즉, 개체당 2매의 도말검체를 제작하였다. 각 동물로부터 적출한 대퇴골로부터 23 Gauge(G) 주사침을 이용하여, 3ml 우태아혈청(FBS, GIBCO BRL #26140-079, USA)으로 골수를 세척하여 현탁하고 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 침전된 골수세포를 슬라이드 글라스에 도말, 실온에서 충분히 건조한 후 메틸알코올에 5분간 침적하여 세포를 고정하였다. 고정 및 건조가 끝난 검체는 다음 순서로 염색하여 1000배의 배율로 검경하였다.

- May-Grunwald 염색액 원액3min
- May-Grunwald 염색액 1:1 희석액2min
- Giemsa 염색액 1:6 희석액10min

6) 소핵의 계수

각 동물로부터 제작한 검체 중 염색 상태가 양호한 1매를 선택하여 무작위 검경하였다. 시험 결과는 개체당 2000개의 다염성적혈구(Polychromatic Erythrocyte: PCE) 중에 나타나는 소핵다염적혈구(Micronucleated Polychromatic Erythrocyte: MNPCE)를 계수하여 평균 ± 표준편차(n=5)로 표시하였으며, 이를 소핵유발 빈도로 하였다. 계수시 세포 직경의 1/5-1/20의 크기로 주변 유헤세포의 핵과 동일한 염색상을 나타내는 원형과 타원형의 소체를 소핵으로 계수하였으며, 소핵과 이물질을 구별하였다. 소핵계수 후 소핵 유무에 상관없이 합계 500개의 PCE와 정상적혈구(Normo-chromatic Erythrocyte: NCE)를 계수하고, PCE의 수를 500으로 나누어 PCE/(PCE + NCE)의 비율을 산출하여 세포독성의 지표로 결정하였다.

7) 일반증상의 관찰

1차 투여 후에는 1회, 2차 투여 후에는 1, 3, 5 시간 경과 시 및 골수 채취 시에 외관 관찰을 실시해 사망동물 및 이상 징후의 발생여부를 관찰하였다.

8) 체중의 측정

동물의 체중은 시험물질 투여 시와 골수 채취 시에 실시하였다.

9) 통계처리 및 판정

모든 수치는 평균 ± 표준편차(n=5)로 표시하였으며, SPSS for Windows(Release 6.1.2, SPSS Inc., USA)를 이용하여, 음성대조군과 비교하여 Mann-Whitney Wilcoxon's Rank Sum(M-W) test로 유의성을 검증하였다. 모든 동물에 있어서 PCE/(PCE + NCE) 비율이 0.1 이상인 경우 시험이 타당한 것으로 하고¹⁶⁾, MNPCE의 빈도가 통계학적으로 유의하며, 용량 의존성으로 증가하거나 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성을 나타낼 때 양성으로 판정하였다.

10) 결과

(1). 체중의 변화, 증체량의 변화

Table 12. Body weigh changes and gains in Micronucleus test of "Hyeonggaeyeongyotang" extract in ICR mouse.

Group IDa)	Day -1	Day 0	Day 1	Day 2	Gainsb)
G0	32.58 ± 0.78	32.74 ± 0.90	33.12 ± 0.64	33.86 ± 0.94	1.12 ± 0.49
	33.18 ± 1.58	33.60 ± 1.32	34.20 ± 1.08	34.58 ± 0.99	0.98 ± 0.50
G2	32.40 ± 0.72	33.18 ± 0.88	33.58 ± 0.68	34.32 ± 1.00	1.14 ± 0.62
	32.38 ± 1.43	32.80 ± 1.39	33.62 ± 1.30	34.10 ± 1.17	1.30 ± 0.53
G4	32.32 ± 1.15	32.82 ± 1.30	33.20 ± 1.06	33.78 ± 0.86	0.96 ± 0.46
	32.44 ± 1.25	33.02 ± 1.23	32.86 ± 0.53	33.68 ± 0.49	0.66 ± 0.92

a) Group ID was listed in Table 7; mean ± S.D., g(n=5); b) Gains = body weight at Sacrifice - body weight at initial dosing

(2) 소핵다염적혈구(MNPCE)의 수적 변화, PCE 및 NCE 비율의 변화

Table 13. Results of Micronucleus Test of "Hyeonggaeyeongyotang" extract in ICR mouse.

Group IDa)	MNPCE/20 00 PCEs	Number of Erythrocytes		
		PCE	NCE	Ratiob)
G0	1.60 ± 0.89	238.00 ± 9.95	262.00 ± 9.95	0.48 ± 0.02
		235.80 ± 15.47	264.20 ± 15.47	0.47 ± 0.03
G1	1.20 ± 0.45	234.40 ± 23.40	265.60 ± 23.40	0.47 ± 0.03
		6.99	6.99	0.01

G3	1.40 ± 0.55	231.40 ±	268.60 ±	0.46 ±
		8.62	8.62	0.02
G4	1.40 ± 0.55	235.60 ±	264.40 ±	0.47 ±
		6.27	6.27	0.01
G5	75.80 ±	221.00 ±	279.00 ±	0.44 ±
		6.10*	16.79	16.79

a) Group ID was listed in Table 7; mean ± S.D., g(n=5); b) PCE/(PCE+NCE); MNPCE, PCE with one or more micronuclei; PCE, Polychromatic erythrocyte; NCE, Normochromatic erythrocyte; * p<0.01 vs Control

고찰

유전독성(genotoxicity)이란 원래, 세포 또는 개체 수준에서 돌연변이(mutation)를 유발하는 성질을 가리키나 현재는 세포유전물질(DNA)에 상해성을 나타내는 성질(genotoxicity)을 포함하는 광범위한 의미로 이용되고 있다. 유전독성시험은 시험물질의 발암성을 예측하기 위한 단기 검색법의 하나로 중요한 역할을 해왔으나, 의약품의 안전성 평가는 발암성에 국한된 것은 아니다. DNA에 대한 상해성이 태아에 미친다면 최기형성(teratogenicity)으로 연결되고, 또한 생식세포(정자 또는 난자)에 영향을 미친다면 다음 세대에 유전적 상해(genetic hazard)를 초래하게 된다. 현재 식품의약품안전청 고시 의약품 등의 독성기준 2005-60호에 명시된 시험법은 크게 3가지로 대별된다. 즉, 1)유전자 돌연변이(gene mutation)을 지표로 하는 것, 2)염색체 이상(chromosomal aberration)을 지표로 하는 것 및 3) DNA에 대한 상해성 또는 수복성(DNA damage 또는 repair)을 지표로 하는 것이다⁷⁾. 따라서 일반적으로 식품의약품안전청 고시 의약품 등의 독성시험 기준 [제 2005-60호] 및 OECD Guidelines [TG No. 471, 473, 474]에 따르면 Chinese hamster lung(CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험(In Vitro Chromosome Aberration test using cultured Chinese Hamster Lung Cells), 세균을 이용한 복귀돌연변이시험(Bacterial Reverse Mutation Assay using the Plate Incorporation Method) 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험(Micronucleus Test in Bone Marrow Cells of Mice)의 세 가지로 진행된다.

현재까지 생약 추출물의 독성은 오래 전부터 한의학에서 사용되어 왔다는 이유만으로 그 안전성이 충분히 검토되지 않았다. 그러나 최근 들어 반하⁴⁾ 등의 추출물에서 독성이 검출되기도 하였다. 한편 현재까지 천연물 추출물의 유전독성학적 평가는 주

로 다른 화합물이나 방사선과 같은 독성물질에 대한 예방 차원에서 이루어져 왔다. 그러나 최근 들어 이러한 천연물 유래 추출물 역시 유전독성으로부터 자유롭지 못하다는 연구들이 다수 보고됨에 따라 현재 천연물 추출물 자체에 대한 유전독성의 평가 역시 활발히 진행되고 있다¹⁷⁾.

荊芥連翹湯은 《萬病回春》에 처음 수록된 方으로 荊芥, 連翹, 防風, 當歸, 川芎, 白芍, 柴胡, 枳殼, 黃芩, 山梔, 白芷, 桔梗, 甘草로 구성되어, 腎經風熱로 인한 兩耳腫痛을 치료하는 方劑이다. 또한 萬病回春에는 鼻淵을 치료하는 荊芥連翹湯이 있으며, 방제의 구성에 있어서는 枳殼 대신 薄荷가 들어간 차이가 있다⁵⁾. 荊芥連翹湯은 風熱이 上發하여 頭上諸證을 야기시킨 것이나 上焦風熱 諸症을 다스리며, 素質 改善劑로 널리 응용되는 處方이다. 清熱, 和血, 解毒작용이 있어 耳病뿐만 아니라 中耳炎, 扁桃腺炎 또는 青年期 腺病質者의 諸證에도 응용된다¹⁸⁾.

荊芥連翹湯의 구성 약물의 효능을 보면 荊芥는 性溫味辛하며 發表散風하고, 방향성이 있어 血分の 風熱이 上部에 鬱遏한 頭痛目赤하고 咽喉腫痛에 다용되고, 防風은 性溫味辛甘하며 解表祛風, 祛濕하는 효능이 있다. 白芷는 性溫味辛하여 消腫排膿하는 작용이 있고, 桔梗은 性平味苦辛하며 祛痰排膿하는 작용이 있어 인체 내의 膿性 물질을 배출시킨다. 枳殼은 性涼味苦辛하고 破氣, 行痰시키는 작용이 있으며, 柴胡는 性涼味辛하여 清熱, 發表透疹, 升舉陽氣하며, 黃芩은 性寒味苦하고 瀉實火, 除濕熱하며, 連翹는 性涼味苦하여 清熱解毒 작용이 강하고, 특히 질이 輕清하여 上浮하므로 上焦의 瘡瘍을 치료하는 요약으로 이용되고, 梔子是 性寒味苦하고 清熱瀉火, 涼血하는 작용이 있다. 當歸는 性溫味甘辛하며 養血潤燥, 和血行氣하며, 川芎은 性溫味辛하며 活血行氣, 祛風止痛하며, 白芍藥은 性微寒味苦酸하여 養血柔肝하며, 甘草는 性平味甘하며 和中緩急하고 百藥의 毒을 解하는 작용이 있다¹⁹⁾.

그러나 현재까지 荊芥連翹湯 자체의 유전독성 실험은 거의 이루어지지 않고 있어, 본 연구에서는 현재 의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전청고시 제 2005-60호)에 명시되어 있는 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험, 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 통해 荊芥連翹湯의 유전독성을 규명하고자 하였다.

荊芥連翹湯 추출물의 유전독성을 평가하기 위해 CHL 세포를 이용하여 대사활성계(S9 mix) 적용 및 미적용하에 염색체 이상 시험을 수행한 결과, 예비

실험에서 5000µg/ml의 농도에서도 별 다른 세포독성이 유발되지 않아 본 실험에서는 5000µg/ml 농도를 최고농도로 실험을 수행하였다. 본 실험의 결과 모든 荊芥連翹湯 추출물 투여군에서 매체 대조군에 비해 유의성 있는 염색체 이상 빈도의 증가가 인정되지 않아, 荊芥連翹湯 추출물은 CHL 세포에 대해 염색체 이상을 일으키지 않는 것으로 판단된다. 한편 Cyclophosphamide·H₂O(CPA)와 ethylmethanesulfonate(EMS)를 사용한 양성대조군의 경우 매체 대조군에 비해 유의성 있는 현저한 염색체 이상 빈도의 증가가 인정되어, 실험 자체가 무난히 수행되었음을 알 수 있다.

또한 본 실험에서는 荊芥連翹湯 추출물의 유전독성 검색을 위해 Salmonella typhimurium의 히스티딘을 필요로 하는 균주인 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개 균주와 Escherichia coli의 트립토판 요구성 균주인 WP2 uvrA 균주를 이용해 대사활성효소계 미적용 및 적용하에 복귀돌연변이 실험을 실시하였다. 예비실험의 결과 500, 1000 및 5000µg/ml의 농도에서 사용한 모든 균주에 대해 강한 항균력이 유발되어, 본 실험에서는 50µg/ml 농도를 최고농도로 실험을 수행하였다. 본 실험의 결과 모든 균주에서 대사활성효소계 미적용/적용시 시험물질을 처리한 어떤 농도군에서도 유의성 있는 복귀돌연변이 집락 수의 증가현상이 관찰되지 않았으므로 본 실험의 조건하에서 荊芥連翹湯 추출물이 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 생각된다. 한편 본 실험에 양성대조물질로 사용한 Sodium azide, 9-Aminocridine, 4NQO, 2-Aminoanthracene는 각각의 균주에 대해 매체 대조군에 비해 유의성 있는 복귀돌연변이 집락 수의 증가를 일으켜 본 실험의 실험방법에는 별 다른 문제가 없을 것으로 생각된다. 또한 본 실험에서 사용된 균주들의 접종 수 역시 흡광도 측정결과 1.3×10⁹cell/ml로 적정수준인 것으로 관찰되었다. 한편 사용한 모든 균주에 대해 50µg/ml 농도의 荊芥連翹湯 추출물 처리군에서 인정된 유의성 있는 집락 수의 감소는 독성 증상이라기보다는 荊芥連翹湯 추출물이 가지고 있는 항균활성에 의한 약리작용의 결과로 판단된다.

荊芥連翹湯 추출물의 유전독성을 평가하기 위하여 수컷 마우스 골수세포를 이용한 소핵실험을 실시한 결과, 본 실험의 투여용량은 식품의약품 안전청 고시 제 2005-60 “의약품등의 독성시험기준”에 명시되어 있는 마우스 최대 투여용량인 2000mg/kg을 최고 용량으로 설정하였다. 본 실험의 결과 2000개

의 PCE로부터 소핵을 계수한 결과, 荊芥連翹湯 추출물을 투여한 모든 군에서 소핵의 빈도가 매체 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 또한 체중 및 PCE/(PCE + NCE)의 비율 역시 매체 대조군과 별 다른 차이를 나타내지 않아 본 실험의 결과 荊芥連翹湯은 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단된다. 한편 양성대조군인 CPA 투여군에서는 매체 대조군에 비해 유의성 있는 소핵 세포의 수적 증가가 인정되었다.

이상에서 荊芥連翹湯 추출물의 유전독성 실험 중 현재 의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전청 고시 제 2005-60호)에 의거하여 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험, 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시한 결과 荊芥連翹湯 추출물은 유전독성을 일으키지 않는 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원 한방바이오퓨전연구지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.(B050035)

참고문헌

1. 김대병, 박혜경, 박건상, 최윤주, 장재희, 구용의, 김보영, 이재진, 권우정. 기능성식품의 합리적 관리체계 구축을 위한 연구. 식품의약품안전청연구보고서. 2002;6:1174.
2. 21세기 신약개발 중심국가로 가는 한약·생약 제제 및 천연물 신약 신제품개발 지원 설명. 식품의약품안전청. 2002.
3. 정세영, 황인경, 김형민, 성현제, 남재현. 건강기능식품의 기능성평가체계 구축에 대한 연구. 식품의약품안전청연구보고서. 2002;6:892-893.
4. Lee JE, Kim HJ, Choi EK, Chai HY, Yun YW, Kim DJ, Nam SY, Lee BJ, Ahn BW, Kang HG and Kim YB. Four-week repeated-dose toxicity study on Pinellia extract. Korean J. Lab. Anim. Sci.. 2003;19:127-141.
5. 龔廷賢. 增補 萬病回春(下卷). 일중사. 1994;12-14.
6. 오은영, 지선영, 서부일. 荊芥連翹湯 및 구성약물의 Klebsiella pneumoniae에 대한 항균 효과에 관한 연구. 대한본초학회지. 2003;18(2):109-119.

7. 의약품등의 독성시험 기준. 식품의약품안전청 고시 제2005-60호, 식품의약품안전청. 서울. 2005.
8. Department of Health, Education, and Welfare Publication(National Institute of Health). 1985;23-85.
9. Ishidate MJr, Sofuni T and Yoshikawa K. Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens, GANN Monograph on Cancer Res. 1981;27:95-107.
10. Dean BJ, and Danford N. Assays for the detection of chemically-induced chromosomal damage in cultured mammalian cells. In: Mutagenicity testing - a practical approach(Venitt S and Parry JM, eds), IRL press, England. Oxford. 1984;187-232.
11. Koyama H, Utakoji T and Ono T. A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue. GANN. 1970;61(2):161-167.
12. JEMS-MMS. Atlas of chromosome aberration by chemicals. Japanese Environmental Mutagen Society-Mammalian Mutagenicity Study Group. Tokyo. Japan. 1988.
13. Richardson C, Williams DA, Allen JA, Amphlett G, Chanter DO and Phillips B. Analysis of data from in vitro cytogenetics assays. In: Statistical evaluation of mutagenicity test data(Kirkland, D. J., ed.). Cambridge University Press. Cambridge. U.K. 1989;141-154.
14. Maron DM and Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 1983;113:173-215.
15. Schmid, W. The micronucleus test. Mutat. Res. 1975;31:9-15.
16. Heddle JA, Stuart E and Salamone MF. The bone marrow micronucleus test. In: Handbook of mutagenicity test procedures, 2nd rev. ed. Elsevier. New-York. USA. 1984;441-457.
17. de Carvalho MC, Barca FN, Agnez-Lima LF and de Medeiros SR. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark(*Schinus terebinthifolius* Raddi). Environ. Mol. Mutagen. 2003;42:185-191.
18. 申載鏞 編著. 方藥合編解說. 서울:成輔社. 1989;169.
19. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 1999;127, 129, 131, 149, 167, 178, 199, 351, 409, 460, 540, 578, 581.