

# GST 추출물의 유전독성평가

이철화<sup>1</sup> · 한종민<sup>1</sup> · 이미영<sup>2</sup> · 정인철<sup>3</sup> · 진미림<sup>4,5</sup> · 김승형<sup>5</sup> · 박양춘<sup>1,5\*</sup>

1: 대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 2: ㈜ 바이오톡스텍, 3: 대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실,  
4: 대전대학교 한의과대학 약리학교실, 5: 대전대학교 동서생명과학연구원

## Genotoxicity Study of GST Extract

Chul Wha Lee<sup>1</sup>, Jong Min Han<sup>1</sup>, Mi Young Lee<sup>2</sup>, In Chul Jung<sup>3</sup>, Mirim Jin<sup>4,5</sup>,  
Seung Hyung Kim<sup>5</sup>, Yang Chun Park<sup>1,5\*</sup>

1: Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University,

2: Biototech, 3: Department of Neuropsychology, College of Oriental Medicine, Daejeon University,

4: Department of Pharmacology, College of Oriental Medicine, Daejeon University,

5: Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University

This study aimed to evaluate the genotoxicity of GST (Gamisasangja-tang). For examining genotoxicity, we carried out bacterial reverse mutation assay, chromosome aberration assay, micronucleus induction test according to OECD guidelines. Bacterial reverse mutation assay: In GST treating group, regardless of existence S9 mix, revertant colonies counts appeared to be less than twice of negative control group and dose dependent increase. In positive control group, revertant colonies counts were shown to be more than twice of negative control group. Chromosome aberration assay: All cell line showed repetition rate of abnormal chromosome aberration less than 5%, regardless of treating time, existence of S9 mix, and no significant change ( $p \geq 0.05$ ) compared with negative control group. Micronucleus induction test: Micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) repetition rate of Polychromatic erythrocytes (PCE) showed no significant changes compared with negative control group ( $p \geq 0.05$ ). PCE portion of total erythrocytes also showed no significant changes ( $p \geq 0.05$ ). Our results showed that GST didn't induce any genotoxicity.

keywords : Sasangja-tang (Shechuangzi-tang), genotoxicity, mutagenicity, chromosome aberration assay, micronucleus induction

## 서론

아토피 피부염은 가려움증, 홍반성 구진, 진물, 부종, 인설, 태선화 등의 피부 증상이 재발과 호전을 반복하는 양상을 보이는 만성 염증성 피부질환으로<sup>1)</sup>, 증상으로 인한 고통뿐만 아니라 수면 부족, 자신감 결여 및 우울 등 신체적, 사회적, 정신적 측면에서 다양한 삶의 질 저하를 가져온다<sup>2)</sup>. 또한 국내에서 이루어진 The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) 역학조사에 따르면 아토피 피부염의 유병률은 지속적으로 증가하는 있으며<sup>3)</sup>, 특히 천식과 알레르기 비염으로 발전되는 양상은 아토피 피부염의 증상을 완화시키고 병변이 악화되는 것을 예방하는 노력의 중요성을 보여주고 있다<sup>4)</sup>. 그렇지만 현재의 주된 치료인 항히스타민제와 국소 스테로이드 외용제 위주의 치료는 증상의 완화를 얻을 수 있으나 증상이 쉽게 재발하고 일부 환자에서 치료에

반응하지 않는 경우도 많으며 특히 스테로이드의 장기 사용은 피부 위축과 같은 부작용을 초래할 수 있어 치료효과가 우수하면서 장기적인 사용이 가능한 전신치료제의 개발이 절실하게 요구되고 있다<sup>5)</sup>.

대전대학교부속한방병원 폐계내과에서 아토피 피부염을 포함한 소양증에 다용되고 있는 GST는 『外科正宗』에서 “治腎囊風濕熱爲患, 疥癩作痒, 搔之作痒”이라 기술되어 있는 사상자탕 (Sasangja-tang, Shechuangzi-tang)<sup>6)</sup>에 殺蟲하는 백부근 (百部根, Stemonae Radix)<sup>7)</sup>과 宣散風熱 透疹하는 부평초 (浮萍草, Spirodela Herba)<sup>7)</sup>를 가하여 사상자 (蛇床子, Cnidii Fructus), 위령선 (威靈仙, Clematidis Radix), 당귀 (當歸, Angelica Gigas Root), 고삼 (苦參, Sophora Root), 백부근 (百部根), 부평초 (浮萍草)의 여섯 가지 약물로 구성되었다. GST는 NC/Nga 아토피 피부염 생쥐에 경구 투여하여 굵은 시간, 피부 조직의 epidermis와 dermis 두께 증가, 호산구와 비만세포의 유입, IgE를 포함한 관련

\* Corresponding author

Yang Chun Park, Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Korean Hospital of Daejeon university, 170, Daeheung-ro, Jung-gu, Daejeon, Korea

E-mail : omdpyc@dju.kr · Tel : +82-42-229-6919

Received : 2014/09/15 · Revised : 2014/10/25 · Accepted : 2014/10/29

© The Korean Society of Korean Pathology, The Korean Society of Korean Physiology

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.17208/kjopp.2014.12.28.6.621

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV\_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojc=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

cytokines의 발현을 감소시킴으로써 피부질환을 개선시키는 효과를 나타냈고<sup>8)</sup>, 아토피 피부염에 대한 효능을 평가하기 위한 임상연구의 사전연구로서 시행한 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험 및 4주 반복 경구투여 용량결정시험<sup>9)</sup>을 통하여 안전성을 확인한 바 있으며, 본 연구에서는 GST 안전성의 추가적 확인을 위해 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵유발시험을 통하여 유전독성을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

본 시험은 식품의약품 안전청 고시 제 2013-40호 (2013년 4월 5일) '비임상시험관리기준', 고시 제 2013-121호 (2013년 4월 5일) '의약품 등의 독성시험기준' 10, OECD guideline 11-13에 준하여 시행하였다.

### 1. 시험물질 조성

본 실험에 사용한 GST는 (주)한국신약에서 표준화하여 연조엑스 형태로 공급받았으며, 1일 복용량으로서의 조성은 다음과 같다. (Table 1)

Table 1. The Composition of GST

Herbal name(Korean)	Herbal name	Amount (g)
사상자	Cnidi Fructus	1.275
백부근	Stemonae Radix	1.275
부평초	Spirodelae Herba	1.275
고삼	Sophora Root	1.275
당귀	Angelica Gigas Root	0.645
위령선	Clematidis Radix	0.645
Total		6.390

### 2. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

#### 1) 시험균주 및 배지

##### (1) 균주

변이원성물질에 대한 감수성이 높고, 변이원성시험에 가장 일반적으로 사용되고 있으며, OECD guideline<sup>11)</sup>에서 추천되고 있는 균주를 사용하였다 (Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537, Eschrichia coli WP2uvrA(pKM101)). 균주는 2011년 10월 28일 Molecular Toxicology, Inc. (U.S.A)에서 구입한 후, 입수된 각 균주를 nutrient broth 배지에 접종하여 8시간 동안 진탕배양 (37°C, 130rpm)하고, 각 균주의 유전자형 (genotype), 자발복귀돌연변이콜로니수 및 양성대조물질에 대한 감수성을 확인하였다. 균주의 특성을 확인한 후, 균주 현탁액과 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Germany)를 1:0.09의 비율로 혼합하여 동결보존용 튜브에 분주하고 초저온냉동고 (-80~-60°C)에 보관하였다.

이후 동결보존된 각 균주를 해동하여 nutrient broth 배지에 접종하고 진탕배양 (37°C, 130rpm)하여 전배양 하였다. 전배양을 종료한 후, 각 균주의 흡광도를 Ultraviolet visible spectrophotometer (측정파장 660nm, V-550, Jasco, Japan)를 이용하여 측정하고, 균수가 1×10<sup>9</sup> cells/mL 이상 되는 것을 확인한

후 시험에 사용하였다.

#### (2) 배지

nutrient broth 배지는 Nutrient broth No.2 (Oxoid, UK)를 칭량한 후, 소량의 초순수를 첨가하여 stirrer로 교반하여 용해시켰다. 최종농도가 2.5%가 되도록 초순수를 첨가하였다. 조제 후 고압증기멸균하였다.

최소 glucose 한천평판배지는 bacto agar (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 초순수를 첨가하여 조제하여 고압증기멸균하였다. 멸균후 Vogel-Bonner (VB) salts 10배 농축액과 20% glucose (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)를 각각 첨가하고 플레이트에 분주하여 실온방치하였다.

Top agar는 염화나트륨 및 bacto agar를 칭량한 후, 초순수를 첨가하여 각각 0.5 및 0.6%가 되게 조제한 후, 고압증기 멸균하였다. 멸균후, 살모넬라균주용 top agar는 0.5mM L-Histidine/D-Biotin 혼합액 (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하고, 대장균용 top agar는 0.5mM L-Tryptophan (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하여 조제하였다.

#### 2) 대사활성계

S9과 Cofactor A를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)으로부터 구입하여 초저온 냉동고 (-80~-60°C)에 보관하고, 유효기간 내에 사용하였다. S9 mix 1ml의 조성은 8 μmol MgCl<sub>2</sub>, 33 μmol KCl, 5 μmol Glucose-6-phosphate, 4 μmol NADPH, 4 μmol NADH, 100 μmol Sodium phosphate buffer(pH 7.4) 및 0.1 ml S9으로 구성되었다. 동결보존된 S9 및 Cofactor A를 해동하여 1:9의 비율로 혼합하여 조제하였다.

#### 3) 시험물질의 처리

##### (1) 처리농도의 결정

본시험의 용량을 결정하기 위하여 용량설정시험을 실시하였다. 예비시험은 식약청고시<sup>10)</sup> 및 OECD guideline<sup>11)</sup>에 따라 5,000 μg/plate를 최고용량으로 하여, 이하 공비 4로 1,250, 313, 78.1, 19.5 μg/plate의 4용량을 설정하고, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하여 농도군 당 3 plate를 실험하였다.

용량설정시험의 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화 비존재하의 TA98균주의 5,000 μg/plate, TA100 균주의 1,250 μg/plate 이상에서 관찰되었다. 대사활성화비존재하의 TA1535, TA1537, WP2uvrA(pKM101) 균주, 대사활성화존재하의 TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA(pKM101) 균주에서는 시험물질에 의한 생육저해가 관찰되지 않았다.

이에 본시험의 최고용량은 생육저해가 관찰된 최저용량으로 하여 대사활성화비존재하의 TA98 균주는 5,000 μg/plate, TA100 균주는 1,250 μg/plate으로 하고, 이하 공비 2로 5용량의 시험물질군을 설정하였다. 각 용량당 3매의 plate를 사용하였다.

##### (2) 실험군의 구분

실험은 Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 Eschrichia coli WP2uvrA(pKM101) 각 5개의 균주에 대하여 각각 S9 mix 적용군 (대사활성화존재하)과 미적용군 (대사활성화비존재하)으로 대별하였으며, 양성대조물질은 Sodium azide (SA), 2-Nitrofluorene (2-NF), 2-Aminoanthracene (2-AA),

9-Aminoacridine (9-AA), 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2)를 사용하였다. S-9 미적용군의 경우 TA98에 대해서는 2-NF를, TA100, TA1535에 대해서는 SA를, TA1537에 대해서는 9-AA를, WP2uvrA(pKM101)에 대해서는 AF2를 사용하였다. S-9 적용군의 경우 2-AA를 사용하였다. 음성대조물질로는 부형제인 주사용수 (중외제약, Korea)를 사용하였다.

### (3) 시험물질의 조제

시험물질 GST는 고형분 함량 (78.0%)를 고려하여, 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (CP323S, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제 (주사용수, 중외제약, Korea)를 가하여 vortex mixer로 교반하여 현탁시킨 후, 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계희석하여 조제하였다.

각 균주에 대한 양성대조물질의 용량은 Good Laboratory Practice 기관인 Biototech내 시험기준14에 기초하여 설정하였다. SA는 주사용수 (중외제약, Korea)에 2-NF, 9-AA, AF2, 2-AA는 각각 DMSO에 용해하여 조제하고, 조제된 양성대조물질은 초저온냉동고 (-80~-60°C)에 동결보관하고, 처리일에 해당하여 사용하였다.

### 4) 본시험

본시험은 프리인큐베이션법으로 대사활성화비존재하 및 존재하의 2계열로 실시하였으며, 각 용량당 3매의 plate를 사용하였다. 각각의 plate에는 균주명, 용량, 음성대조군, 양성대조군 및 S9 mix 존재유무를 식별한 번호를 기입하였다. 대사활성화비존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질을 각각 100 µL씩 건열멸균한 유리시험관에 넣고, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 및 각 균주현탁액 100 µL를 첨가한 후, 37°C에서 20분간 진탕하였다. 진탕 종료 후, TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에는 살모넬라용 top agar를, WP2uvrA(pKM101) 균주에는 대장균용 top agar를 각각 2 mL씩 첨가하여 vortexing하였다. 그 후, 현탁액을 최소 glucose 한천평판배지에 중층하여 실온에서 방치하였다. 대사활성화 존재하에서는 0.1mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 대신에 S9 mix 500 µL를 첨가하였다. Top agar가 굳은 후엔 플레이트를 뒤집어 37°C에서 48시간 배양하였다.

### 5) 결과의 판정기준

복귀변이콜로니수의 측정치는 실측치를 표기하고, 평균 ± 표준편차 (n=3)를 표시하였으며, 집락계수시 생육저해 유무를 확인하기 위해 background lawn의 형성유무를 확인하였다. 생육저해의 판정기준은 background lawn이 음성대조군과 비교시 없어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였다.

또한 잡균에 의한 오염유무를 확인하기 위해 무균검사를 시행하였다. 최고용량 (5,000 µg/plate)의 시험물질액 100 µL, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL, S9 mix 500 µL를 건열멸균한 유리시험관에 각각 넣고, 37°C 배양기에서 20분간 진탕하였다. 진탕 종료 후, top agar를 가해서 vortexing한 후, nutrient broth 한천평판배지에 중층하여 실온에 방치하였다. Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기에서 48시간 배양한 후, 미생물의 오염으로 인한 콜로니 평성 유무를 확인하였다.

본시험의 배양 종료 후엔 복귀변이콜로니수를 콜로니카운터 (ProtoCOL, SYNBIOSIS, UK)로 자동계측하였다. 자동계측이 정확

하지 않을 경우에는 육안계수를 실시하였다. 양성대조군의 복귀변이 콜로니수가 음성대조군의 2배 이상일 것, 4용량 이상에서 생육저해가 관찰되지 않을 것, 오염이 없을 것을 시험의 성립조건으로 하였고, 적어도 1개 균주에서 복귀변이콜로니수가 1용량 이상에서 음성대조군에 비해 2배 이상 증가하고, 증가에 따른 용량의존성이 있거나, 재현성이 있는 경우 양성으로 판정하였다<sup>10)</sup>.

## 3. 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험

### 1) 세포주

2011년 11월 24일 American Type Culture Collection (USA)에서 구입한 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포를 사용하였다. 구입한 CHL/IU 세포주를 10% Fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, USA)를 포함한 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Lonza Walkersville Inc., USA)이 들어있는 75cm<sup>2</sup> 플라스크 (Nunc, Denmark)에 넣고, 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기 (MCO-20AIC, SANYO, Japan)에서 배양하였다. Hoechst Stain Kit (MPBIOMEDICALS, Japan)를 사용하여 세포의 마이크로 플라즈마 오염유무에 대해 확인하고, 배양된 세포에 0.25% Trypsin - Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 용액을 배양플라스크에 가하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리하였다. 세포현탁액을 튜브에 옮겨 담고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하였다. 1×10<sup>6</sup> cells/mL이 되도록 FBS를 첨가한 후, DMSO의 최종농도가 10%가 되도록 첨가한 후, 동결보존용 튜브에 분주하고, 초저온냉동고 (-80~-60°C)에서 하루동안 방치한 후, 액체질소탱크에 사용시까지 보관하였다.

### 2) 배양과정 및 배지

#### (1) 계대배양

동결된 세포를 37°C로 설정된 항온수조에서 녹인 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지가 들어있는 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm<sup>2</sup> 플라스크에 옮겨, 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포가 배양플라스크 바닥면적에 70~80% 이상 생육할 때 세포형태를 관찰하고, 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리하였다. 세포현탁액을 50 mL 튜브에 넣고, 1,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시켰다. 세포현탁액을 75cm<sup>2</sup> 플라스크에 옮겨, 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

#### (2) 전배양

염색체 이상시험에는 세포 계대수가 25이내인 세포를 사용하였다. 대수증식기의 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리한 후, 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM배지에 현탁시킨 후, 혈구계수판을 이용하여 세포수를 계수하여 5×10<sup>4</sup>cells/mL 세포현탁액을 만든 후, 세포증식 억제시험용은 96well plate (200 µL/well; Nunc, Denmark), 본시험용은 60 mm plate (5mL/plate, BD, U.S.A.)에 분주하여 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 1일간 배양하였다. 각 plate에 식

별번호를 기입하였다.

### (3) 배지

시험에 사용할 배지를 조제하기 위하여, EMEM에 비활성화된 FBS를 최종농도 10%가 되도록 첨가한 후, 10,000units/mL의 Penicillin G sodium과 10,000 $\mu$ g/mL의 streptomycin sulfate를 포함한 혼합액 (Invitrogen, U.S.A.)을 100:1의 비율로 첨가하였다. 조제 후 사용시까지 냉장 (2~8°C) 보관하였다.

### 3) 대사활성계

S9과 Cofactor C를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)으로부터 구입하여 초저온 냉동고 (-80~-60°C)에 보관하고, 유효기간 내에 사용하였다. S9 mix 1 ml의 조성은 5 $\mu$ mol MgCl<sub>2</sub>, 33  $\mu$ mol KCl, 5  $\mu$ mol Glucose-6-phosphate, 4  $\mu$ mol Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), 4  $\mu$ mol HEPES buffer (pH7.2, zwitterionic organic chemical), 0.1 mL 정제수 및 0.3 ml S9으로 구성되었다. 동결보관된 S9 및 Cofactor C를 해동하여 2:4.7의 비율로 혼합하여 조제하였다.

### 4) 시험물질의 처리

#### (1) 처리농도의 결정

본시험의 용량을 결정하기 위해 세포증식억제시험을 실시하였다. OECD guideline에서 추천한 5,000  $\mu$ g/mL을 최고용량으로 하고<sup>12)</sup>, 이하 2,500, 1,000, 500, 250, 100, 50, 10 및 5  $\mu$ g/mL의 8 용량을 설정하였으며, 음성대조군을 설정하였다. 전배양 종료 후, 각 plate는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 합 3계열로 분리하였다. 한 용량당 4well을 사용하였다.

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 시험물질을 6시간 처리한 후, well내를 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS)로 세정하고, 신선한 배양액 200  $\mu$ L를 가해 18시간 더 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질은 24시간 연속처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 시험물질의 침전은 시험물질액 처리시, 처리종료시 및 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다.

모든 well에는

3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL D-PBS)를 50  $\mu$ L씩 첨가하여 4시간 더 배양한 후에 배양액을 버리고 건조시켰다. 여기에 DMSO를 150  $\mu$ L씩 첨가하여 침전물을 용해시켰다. ELISA reader (ELx8081IU, BioTek, U.S.A.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포증식 억제시험의 결과 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포독성이 관찰되어, 50% 세포증식억제용량 (Inhibition concentration 50%, IC50)을 산출한 결과, 1,878.2  $\mu$ g/mL이었다. 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하에서는 세포증식을 명확하게 50%이상 억제하는 용량은 관찰되지 않았다. 시험물질의 침전은 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

이에 본시험의 최고용량은 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하는 5,000  $\mu$ g/mL으로 하고, 이하 공비 2로 2,500, 1,250  $\mu$ g/mL 2용량의 시험물질군을 설정하였다. 연속처리법의 대

사활성화비존재하 에서는 1,900  $\mu$ g/mL을 본시험의 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 950, 475, 238  $\mu$ g/mL 3용량의 시험물질군을 설정하였다.

### (2) 실험군의 구분 및 처리

전배양 종료 후, 각 plate는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 합 3계열로 분리하였다. 한 용량당 2개의 plate를 사용하였다. 단시간처리법의 대사활성화비존재 및 존재하는 시험물질을 6시간 처리한 후, plate 내를 D-PBS로 세정하고, 신선한 배양액 5 mL를 가해 18시간 더 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질을 24시간 연속처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 단시간처리법의 및 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 양성대조물질로 Mytomicin C (MMC, 0.1 $\mu$ g/mL)가 이용되었으며 단시간처리법의 대사활성화 존재하에서는 Benzo[a]pyrene (B[a]P, 20  $\mu$ g/mL)가 이용되었고, 음성대조물질로는 주사용수 (중외제약, Korea)가 이용되었다. 시험물질의 침전은 시험물질액의 처리시, 처리종료시 및 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다.

### (3) 시험물질의 조제

시험물질은 고형분 함량 (50.5%)를 고려하여, 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (LA230S, CP323S, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 vortex mixer로 교반하여 현탁시킨 후, 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계회색하여 조제하였다.

MMC는 DMSO를 가하여 vortex mixer로 용해시켜 10  $\mu$ g/mL의 stock solution을 조제하였다. B[a]P는 필요량을 칭량한 후 DMSO를 가하여 vortex mixer로 용해시켜 2,000  $\mu$ g/mL의 stock solution을 조제하였다. 조제된 각각의 양성대조물질은 튜브에 분주하여 초저온냉동고 (-80~-60°C)에 동결보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다.

### 5) 검체의 제작

배양종료 2시간 전에 Colcemid용액 (Invitrogen, U.S.A.)을 최종농도가 0.2  $\mu$ g/mL되게 첨가하여 세포분열을 중지시켜 정지시켰다. 배양종료 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 plate 바닥으로부터 세포를 떼어낸 후, 1,000rpm에서 5분간 원심분리 (FLETA 5, 한일과학)하였다. 상등액을 버리고, 37°C에서 보온한 0.075 mol/L KCl 수용액을 5mL 첨가하여 37°C에서 20분간 처리하였다. 냉각한 고정액 (metahnol:acetic acid = 3:1) 1 mL를 첨가한 후, 1,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거한 후, 5 mL의 냉각한 고정액을 첨가한 후 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 고정하였다. 이러한 고정작업을 1회 반복하여 세포를 고정하였다. 얻어진 세포부유액을 슬라이드글라스 2군데에 1방울씩 떨어뜨려 1장의 슬라이드 표본을 제작하였다. 건조 후, 슬라이드글라스에 코드화된 번호를 기입하였다. 3% Giemsa 염색액으로 20분간 염색한 후, 초순수로 세척한 후 건조하였다.

### 6) 염색체 이상의 계수

슬라이드 표본관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시하였다. 염색체 관찰의 대상용량은 각 처리법 모두 용량당 200

개의 분열중기상이 관찰 가능한 3용량을 설정하였다. 각 슬라이드당 100개, 1개 용량 당 최소 200개의 분열중기상을 현미경 (BX51, Olympus, Japan, 400배 및 600배 배율)으로 관찰하였다.

#### (1) 구조적 이상의 계수

구조 이상에 대해서는 염색분체절단 (chromatid break; ctb), 염색분체교환 (chromatid exchange; cte), 염색체절단 (chromosome break; csb), 염색체교환 (chromosome exchange; cse) 갭 (gap), 단편화 (fragment; frg) 및 기타 (other; o)를 관찰하였다. 1개의 분열중기상에 다수의 gap 및 절단 등이 포함된 것은 단편화 (fragmentation; frg)로 기록하였다. 갭 (gap)은 염색분체의 폭 보다도 좁은 비염색성 부위로, 결과기록시 구조이상에 포함하지 않고, 종합판정에서도 gap을 포함하지 않는 결과로 평가하였다.

#### (2) 수적 이상의 계수

수적 이상에 대해서는 배수체 (polyploidy; pol) 및 핵내배화 (endoreduplication; end)를 관찰하였다. 이러한 이상을 1개 이상 가지는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 종류를 각각 기록하였다.

#### 7) 통계처리 및 판정

염색체 이상의 출현빈도가 음성대조군에서 5% 미만, 양성대조군에서 10%이상일 것, 시험물질군에서 분열중기상을 200개 관찰한 용량이 3용량 이상일 것, 세포의 오염이 없을 것을 시험의 성립조건으로 삼았다. 또한 gap을 제외한 염색체 이상을 가진 세포의 출현빈도에 대해 Toshio Sofuni 등의 판정기준에 따라 5% 미만은 음성, 5%이상 10%미만을 의양성, 10%이상을 양성으로 판정하였다<sup>15)</sup>.

염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)을 사용하여 통계해석을 실시하였다. 음성으로 판정되어 염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도에 대해서 Fisher's exact test<sup>16)</sup>에 의해 음성대조군과 시험물질처리군 간 및 음성대조군과 양성대조군간의 유의차 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01) 검증을 실시하였다.

## 4. 마우스를 이용한 소핵시험

### 1) 실험동물

성숙한 수컷 Imprinting control region (ICR) mouse (7주령, ORIENTBIO, Korea)를 실험동물용 고품사료 (Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.) 및 음수를 자유공급하며 7일간의 순화과정 중 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 검역·순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 동물의 건강상태에 이상이 없는 것을 확인하였다.

군분리는 일반증상 및 체중증가에 이상이 없는 동물을 이용하여 순화종료일 (군분리일)에 실시하였다. 군분리일에 평균체중에서 벗어난 개체를 순서대로 제외하고, 필요 동물 수 (용량설정시험: 15마리, 검체제작시간 설정시험: 9마리, 본시험: 25마리)를 선별하였다. 선별한 동물을 각 군의 평균체중이 균등하도록 군분리 하였다.

실험동물은 온도 (21.2-23.4°C), 상대습도 (44.4-55.4%)가 조절된 동물실에서 사육하였으며 환기횟수는 시간당 10-15회, 명암주기는 1일당 12시간, 조도는 150-300Lux로 유지되었다. 사료는 고품

사료를 자유롭게 공급하였으며, 음수는 충청북도 보건환경연구원 '먹는 물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙'에 준하여 수도수를 사용하고 자유공급하였다.

### 2) 투여 경로 및 방법

시험물질의 임상예정 경로인 경구투여를 투여경로로 선택하였다. 시험물질의 개체당 투여액은 10 mL/kg으로 하고, 군분리시 체중을 기초로 하여 산출하였으며, 테프론제 존대를 장착한 주사기 (1 mL)을 사용하여 1회 강제경구 투여하였다. 양성대조물질인 MMC는 복강내 투여를 투여경로로 설정하였으며, 투여액은 10 mL/kg, 군분리시 체중을 기초로 산출하였다. 1 mL (26G) 주사기를 사용하여 1회 투여하였다.

### 3) 투여용량의 설정 및 시험군의 구성

#### (1) 투여용량의 결정

본시험의 용량을 설정하기 위해 용량설정시험을 실시하였다. Guideline에서 정하고 있는 최고용량은 2,000 mg/kg이지만<sup>13)</sup>, 시험물질이 생약복합물질의약품이고, 의약품 등의 독성시험기준에서 투여량의 상한선은 단회투여 독성시험의 최고용량에 준하므로, 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 2,500, 1,250, 625, 313 mg/kg의 4용량을 설정하였다.

1용량당 3마리를 실험하였으며, 투여액은 10 mL/kg, 존대를 장착한 주사기를 사용하여 1회 강제경구 투여하였다. 이후 투여직 후, 투여 후 2시간, 투여 후 1.2,3일에 각 용량별 일반증상 및 사망동물을 관찰하였으며, 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상 및 사망동물을 관찰되지 않았다. 이에 본시험의 최고용량은 5,000 mg/kg으로 하고 이하 공비 2로 2,500, 1,250 mg/kg의 2용량을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

#### (2) 검체제작시간의 결정

본시험의 검체제작시간을 설정하기 위해 검체제작시간 설정시험을 실시하였다. 용량설정시험에서 설정한 최고용량 5,000 mg/kg을 1회 경구투여하고, 투여후 24, 48, 72시간째에 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰하였다. 각 시간당 동물은 3마리로 하였고, 투여액은 10 mL/kg으로 하여 존대를 장착한 주사기로 1회 강제경구투여 하였다. 이후 시험물질 투여직후, 투여후 2시간, 투여후 1.2,3일에 일반증상 및 사망동물을 관찰하였으며, 모든 관찰시간대에서 소핵유발은 증가되지 않았기 때문에 일반적으로 사용되는 투여후 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 하였다.

#### (3) 실험군의 구분

본 실험은 10 mL/kg의 vehicle(멸균증류수, Korea)를 1회 경구 투여한 매체 대조군 (음성대조군), 각각 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg의 시험물질을 1회 경구 투여한 실험군, MMC를 2 mg/kg의 용량으로 1회 복강내투여한 양성대조군으로 실험군을 구분하였다.

#### (4) 시험물질 및 양성 대조물질의 조제

시험물질의 조제는 투여일에 실시하였다. 시험물질의 고품분 함량 (50.5%)을 고려하여, 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (CP323S, CP423S, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 vortex mixer로 교반하여 현탁시킨 후, 부형제 (주사용수, 중의제약)로 규정용량이 되도록 조제하였다. 양성대조물질은 MMC 2 mg에 주사용수 4 mL를 첨가하여 용해한 후 생리식염주사액 (중

외제약, Korea)을 더하여 0.2 mg/mL로 조제하였다.

#### 4) 골수검체의 제작

시험물질 투여후 각 군의 검체제작시간에 동물을 경수탈골 하였다. 대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 그 양 끝단을 가위로 절단하여 200  $\mu$ L의 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, Invitrogen, U.S.A.)을 관류시켜 골수세포를 채취하였다. 골수세포 부유액은 1,000rpm에서 5분간 원심분리 (MICRO17TR, Hanil Science Industrial, Korea)하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 소량을 슬라이드글라스에 떨어뜨려 도말하였다. 개체당 2매의 골수도말검체를 제작하였다. 슬라이드글라스에 개별번호를 기입하고 충분히 건조시킨 후, 메탄올로 고정하였다. 3% Giemsa 염색액 (0.01 mol/L Sörenson 인산완충액 (pH6.8)으로 조제)으로 30분간 염색하였다. 0.01 mol/L Sörenson 인산완충액 (pH6.8)을 사용하여 세척하고 0.004% citric acid 수용액에 세정하여 건조시켰다.

#### 5) 소핵의 계수

코드화된 골수도말표본을 600배 및 1,000배 배율의 현미경 (BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 검체 1장당 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte)를 1,000개씩 관찰하고, 1개체당 2,000개의 다염성적혈구를 관찰하여 개체마다 다염성적혈구에 대한 소핵 다염성적혈구 (MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현율을 구하였다. 골수세포의 증식억제의 지표로서, 검체 1장당 총적혈구 250개를 관찰하여, 1개체당 500개의 총적혈구에 대한 PCE의 비를 구하였다.

#### 6) 일반증상 및 체중의 관찰

일반증상 관찰은 투여직수 (투여 0일), 투여후 2시간 및 검체제작일까지 24시간 간격으로 실시하였으며, 각 용량의 사망동물을 관찰하였다. 체중은 투여일 (투여 0일) 및 골수채취직전에 측정하였다 (BP410S, Sartorius, Germany).

#### 7) 통계처리 및 판정

MNPCE의 출현빈도는 Kastenbaum and Bowman의 추정학적 통계방법18을 사용하여 검증하고, 통계학적으로 유의하게 증가 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01)할 경우 양성으로 판정하였다. PCE의 출현빈도 및 체중의 변화는 통계처리 프로그램 (SAS version 9.3, Institute Inc., U.S.A.)을 사용하여 통계해석을 실시하였다. Barlett test19를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산으로 확인되어, One-way of variance (ANOVA)20를 실시하였다 (유의수준: 0.05).

## 결 과

### 1. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

#### 1) 복귀변이콜로니수의 계측

시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 군주의 모든 용량에 대해서 복귀변이콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다. 각 군주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실히 증가하였다 (Table 2).

Table 2-1. The number of Revertant Colonies in Absence of Metabolic Activation

Strain	Test substance	Dose level ( $\mu$ g/plate)	Mean $\pm$ S.D.	
TA98	Water for injection	0	17 $\pm$ 4	
		156	16 $\pm$ 2	
	GST Extract	313	20 $\pm$ 3	
		625	20 $\pm$ 3	
		1,250	19 $\pm$ 4	
		2,500	15 $\pm$ 2	
TA100	2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	515 $\pm$ 12	
		Water for injection	0	77 $\pm$ 6
	GST Extract	39.1	79 $\pm$ 8	
		78.1	82 $\pm$ 12	
		156	74 $\pm$ 5	
		313	65 $\pm$ 10	
TA1535	Sodium azide (SA)	625	67 $\pm$ 5	
		1,250*	60 $\pm$ 13	
	Water for injection	1.5	586 $\pm$ 12	
		0	14 $\pm$ 2	
		313	10 $\pm$ 4	
		625	10 $\pm$ 2	
TA1537	GST Extract	1,250	9 $\pm$ 3	
		2,500	8 $\pm$ 1	
	Sodium azide (SA)	5,000*	9 $\pm$ 3	
		1.5	514 $\pm$ 48	
		Water for injection	0	10 $\pm$ 3
		313	11 $\pm$ 2	
WP2uvrA (pKM101)	GST Extract	625	11 $\pm$ 1	
		1,250	8 $\pm$ 1	
	9-Aminoacridine (9-AA)	2,500	10 $\pm$ 3	
		5,000	10 $\pm$ 2	
		80.0	462 $\pm$ 66	
		Water for injection	0	121 $\pm$ 9
WP2uvrA (pKM101)	GST Extract	313	127 $\pm$ 20	
		625	129 $\pm$ 8	
	2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2)	1,250	145 $\pm$ 17	
		2,500	133 $\pm$ 16	
		5,000	139 $\pm$ 5	
		0.005	1056 $\pm$ 168	

\*: Indicated growth inhibition.

### 2. 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험

#### 1) 시험물질의 침전

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 모든 용량에서 시험물질의 침전은 관찰되지 않았다.

#### 2) 염색체이상 출현빈도

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체 이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이도 관찰되지 않았다 ( $p \geq 0.05$ ). 각 처리계열에 대한 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 10%이상이며, 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.01$ ) (Table 3).

Table 2-2. The number of Revertant Colonies in Presence of Metabolic Activation

Strain	Test Substance	Dose level (µg/plate)	Mean ±S.D
TA98	Water for injection	0	30±3
		313	33±6
		625	32±3
	GST Extract	1,250	33±1
		2,500	31±4
		5,000	32±1
2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	183±12	
	<hr/>		
TA100	Water for injection	0	102±7
		313	103±16
		625	105±11
	GST Extract	1,250	99±4
		2,500	103±9
		5,000	83±8
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	274±31	
	<hr/>		
TA1535	Water for injection	0	9±2
		313	10±2
		625	10±1
	GST Extract	1,250	12±3
		2,500	9±3
		5,000	10±1
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	117±1	
	<hr/>		
TA1537	Water for injection	0	14±2
		313	14±4
		625	16±4
	GST Extract	1,250	16±3
		2,500	13±1
		5,000	18±6
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	118±27	
	<hr/>		
WP2uvrA (pKM101)	Water for injection	0	154±9
		313	158±18
		625	166±7
	GST Extract	1,250	168±9
		2,500	175±26
		5,000	189±9
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	331±23	

Table 4. Body weight changes of Imprinting control region mice

Group	Dose (mg/kg)	Route	Weight (g)		
			0 day	1 day	
Negative control	Water for injection	0	34.5±1.26*	33.9±1.13	
		1,250	34.5±1.22	33.5±1.05	
		2,500	34.4±1.05	33.5±1.41	
Test Substance	GST Extract	5,000	34.4±0.99	34.0±1.08	
		<hr/>			
Positive control	MMC	2	IP.	34.4±0.99	33.3±0.91

P.O.: Per Os I.P.: Intraperitoneal MMC: Mytomycin C \*: It was expressed by mean ± standard deviation.

3. 마우스를 이용한 소핵시험

1) 일반증상 및 사망동물의 관찰

시험물질군의 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.

2) 체중변화

시험기간 동안 모든 용량에서 음성대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화가 관찰되지 않았다(p≥0.05)(Table 4).

3) 소핵유발 출현빈도

시험물질군에서는 PCE 중 MNPCE의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (p≥0.05). 또한, 총 적혈구 중 PCE의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다(p≥0.05). 양성대조군에서는 PCE 중 MNPCE의 출현빈도가 음성대조군에 비해 유의하게 증가하였다 (p<0.01). 총 적혈구 중 PCE의 비율은 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 관찰되지 않았다(p≥0.05)(Table 5).

Table 5. Results of micronucleus induction test

Group	Dose (mg/kg)	Route	PCE/ (PCE+NCE)	MNPCE/PCE	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	29.6±5.96*	0.090±0.065
		1,250	P.O.	34.0±3.58	0.050±0.050
		2,500	P.O.	28.9±5.28	0.080±0.057
Test Substance	GST Extract	5,000	P.O.	30.5±5.26	0.080±0.027
		<hr/>			
Positive control	MMC	2	I.P.	24.0±5.04	5.850±1.719†

PCE: Polychromatic erythrocyte. NCE: Normochromatic erythrocyte. MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte. P.O.: Per Os. I.P.: Intraperitoneal. MMC: Mytomycin C. \*: It was expressed by mean ± standard deviation (%). †: Significant difference from negative control by Kastenbaum & Bowman (p<0.01)

고 찰

유전독성이란 본래, 세포 또는 개체 수준에서 돌연변이를 유발 하는 성질을 가리키나 현재는 세포유전물질 (DNA)에 상해성을 나타 내는 성질을 포함하는 광범위한 의미로 이용되고 있다<sup>21)</sup>. 현재의 유 전독성시험은 식품의약품안전청 고시<sup>10)</sup> 및 OECD guideline<sup>11-13)</sup>에 따 라 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험, CHL 세포를 이용한 염색체이 상시험, 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험의 세 가지로 진행되며 본 시험도 이에 따라 진행되었다.

기존의 한방제제는 수천년 동안의 경험적 처방에 의하여 처방 되고 있으나 현대에 와서 약물자체로서 유발되는 독성에 대한 검증 에 대하여 그 필요성이 제기되고 있다. 본 시험물질 GST에 대해서 기존의 단회 경구투여 독성시험<sup>9)</sup>에서는 최고용량이 5,000 mg/kg 을 상회하는 것을 확인하였고, 4주 반복 경구투여 용량결정시험<sup>9)</sup>에 서는 최고용량을 5,000 mg/kg으로 결정하였다. 그러나 시험물질에 의한 유전독성에 대한 연구는 없었고 이에 본 연구에서는 대전대학 교부속한방병원 폐계내과에서 아토피피부염에 다용하고 있는 GST 의 효능을 평가하는 임상연구의 선행 연구로서 유전독성시험을 실 시하였다.

GST의 구성 약물의 효능을 보면 蛇床子는 性味が 辛溫하여 散 寒하고 助陽하며, 苦燥하여 除濕시키므로 止痒시키는 효능이 있고, 外用하면 燥濕殺蟲시키는 효능이 있어 陰痒帶下를 치료한다. 百部根 은 性味が 甘潤苦降하고 性平不燥하며 殺蟲시키는 작용이 있어 인 체의 頭風, 體風, 陰風 및 蟻蟲 등에 비교적 강한 살충작용이 있다. 浮萍草는 辛寒한 性味로 泄熱하고, 入肺하여 宣肺透疹, 祛風止痒하 는 효능으로 癩疹透發不暢과 皮膚風熱 혹은 血燥受風하여 발생되는 隱疹, 風疹, 皮膚癢痒 등을 치료한다. 苦參은 味苦性寒하여 燥濕清 熱하고 祛風, 殺蟲하여 止痒하는 효능이 있어 많은 종류의 피부질 환, 즉 皮膚疥癬, 濕疹, 膿疱瘡, 麻風病과 婦女的 陰道滴蟲 등을 치 료하는 효능이 있다. 當歸는 性溫하고 味甘辛하며 補血和血하여 癰

Table 3. Results of chromosome aberration test

Test substance	Dose( $\mu$ g/mL)	S9 mix	Trt-Rec Time(hr)	Structural aberrations*						gap (%)	Numerical aberrations*		
				ctb	csb	cte	cse	frg	total (%)		end	pol	total (%)
Water	0	-	6-18	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
	1,250	-	6-18	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
	2,500	-	6-18	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
GST Extract	5,000	-	6-18	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
	0.1	-	6-18	9	0	30	0	0	35†(17.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
Water	0	+	6-18	0	0	1	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
	1,250	+	6-18	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
	2,500	+	6-18	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	2	2 (1.0)
GST Extract	5,000	+	6-18	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	3	3 (1.5)
	20	+	6-18	14	0	51	0	0	55†(27.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
Water	0	-	24-0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
	238	-	24-0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
	475	-	24-0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	3	3 (1.5)
	950	-	24-0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)
	1,900	-	24-0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)
MMC	0.1	-	24-0	16	0	56	0	0	63†(31.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)

Trt-Rec time: Treatment-Recovery times, ctb: chromatid break, csb: chromosome break, cte: chromosome exchange, frg: fragmentation, gap: chromatid and chromosome gap, end: endoreduplication, pol: polyploidy, MMC: Mitomycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene. \*: Number of cell analyzed is 200 in each. †: Significant difference from negative control (Water) by Fisher's exact test ( $p < 0.01$ )

疽瘡瘍을 치료하는 효능이 있다. 威靈仙은 辛散溫通하고 性急善走하므로 肌表에 작용하고, 그 莖葉은 清熱解毒시키는 작용이 있다<sup>7)</sup>.

세균을 이용한 복귀돌연변이시험은 식품의약품안전청 독성시험기준<sup>10)</sup>을 준용하여 실시하였다. 시험에 이용된 균주는 히스티딘 요구성인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537과 트립토판 요구성인 *Escherichia coli* WP2uvrA (pKM101)로 대사활성화존재 및 비존재의 경우에 대해 각각 검토하였다. 본시험에 앞서 최고용량을 설정하기 위해, 5,000  $\mu$ g/plate을 최고용량으로 용량설정시험을 실시한 결과, GST에 의한 생육저해가 대사활성화비존재의 TA98 균주의 5000  $\mu$ g/plate, TA100균주의 1,250  $\mu$ g/plate 이상에서 관찰되었고, 이외의 균주에서는 관찰되지 않았다. 따라서 본시험에서는 대사활성화비존재하 TA98균주에서는 최고용량을 5,000  $\mu$ g/plate, TA100 균주에서는 1,250  $\mu$ g/plate로 설정하고 이하 공비 2로 총 6용량을 설정하였고, 이외의 균주에서는 최고용량 5,000  $\mu$ g/plate 이하 공비 2로 총 5용량을 설정하여 시험을 시행하였다. 시험결과 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 복귀돌연변이수가 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았으며, 양성대조군의 복귀돌연변이수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 증가하였다. 이상의 결과로 GST의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단하였다.

포유류배양세포를 이용한 염색체 이상시험은 식품의약품안전청 독성시험 기준<sup>10)</sup>을 준용하여 실시하였다. 이용된 세포주는 CHL/IU cell line이었다. 본시험의 최고용량을 설정하기 위한 세포증식억제 시험 결과, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포독성이 관찰되어, 50% 세포증식억제용량을 산출한 결과, 1,878.2  $\mu$ g/mL이었다. 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하에서는 세포증식을 명확하게 50%이상 억제하는 용량이 관찰되지 않았다. 이에 본시험에서는 단시간 처리법의 대사활성화 존재하 및 비존재하에서 최고용량 5,000  $\mu$ g/mL 이하 공비 2로 총 3용량을 설정하였고, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 최고용량 1,900  $\mu$ g/mL 이하 공비<sup>2)</sup>로 총 4용량을 설정하여 시험을 시행하였다. 본시험의 결과 모든 처리계열에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으

로 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이도 관찰되지 않았다. 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가되었다. 이상의 결과로 GST는 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단하였다.

마우스를 이용한 소핵시험은 식품의약품안전청 독성시험 기준<sup>10)</sup>을 준용하여 실시하였다. 수컷 ICR 마우스를 이용하여 임상 적용 예상 경로인 단회 경구투여를 결정하였고, 음성대조군으로 주사용수 경구투여를 양성대조군으로 MMC 복강내투여를 결정하였다. 5,000 mg/kg을 최고용량으로 한 용량설정시험 결과 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았기에, 본시험에서도 최고용량 5,000 mg/kg 이하 공비 2로 총 3용량의 시험물질 균을 설정하였다. 검체제작시간 설정시험 결과 모든 관찰 시간대에서 소핵유발이 증가되지 않았기 때문에 가장 일반적인 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 결정하였다. 본시험의 결과 PCE중 MNPCE 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았으며, 총 적혈구 중 PCE의 비율도 음성대조군과 비교시 유의한 차이가 관찰되지 않았고, 양성대조군에서는 PCE중 MNPCE 출현빈도가 유의하게 증가하였다. 이러한 결과로 GST는 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다.

이상의 결과는 GST의 유전독성에 대한 안전성을 입증하는 자료를 마련하게 된 것으로 추후 이루어질 임상 연구에 있어 약물의 안전성을 확보하게 되는 기초자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론

GST는 TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주의 최고농도 5,000  $\mu$ g/plate에서, TA100 균주의 최고농도 1,250  $\mu$ g/plate에서 돌연변이를 유발하지 않았다.

GST는 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험의 단시간 처리법 최고용량 5,000  $\mu$ g/mL 및 연속처리법 최고용량 1,900  $\mu$ g/mL에서 염색체 이상을 유발하지 않았다.



GST는 마우스 경구투여 최고용량 5,000 mg/kg에서 골수세포의 소핵유발에 영향을 미치지 않았다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업의 지원(과제번호: HI12C1954)과 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(NRF-2012R1A1A2041904)을 받아 수행되었음.

## References

- Bieber, T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 358(14):1483-1494, 2008.
- Cho, J.B., Lee, J.H., Suh, J.M., Yu, J.S., Lee, H.S., Park, E.A., Kim, H.M., Chang, E.Y., Kim, J.H., Han, Y.S., Ahn, K.M. Change in Quality of Life according to the Change in Atopic Dermatitis Severity. *Pediatric Allergy Respir Dis* 22(1):86-99, 2012.
- Park, Y.M. Epidemiologic Study and Risk Factor of Atopic Dermatitis. *Pediatric Allergy Respir Dis* 21(2):74-77, 2011.
- Kim, T.Y. Lectures of Medical Science: Treatment of Atopic Dermatitis: an Update and Review of the Literature. *Pediatric Allergy Respir Dis* 19(3):209-219, 2009.
- Park, Y. Status of clinical practice on diagnosis and management of atopic dermatitis in Korea: a questionnaire survey of physicians. *Allergy Asthma Respir Dis* 1(3):257-265, 2013.
- Chen, S. *Wai-ke-zheng-zong*. Beijing, People's medical publishing house. p 244, 1964.
- Gam, B.S., Kim, I.R., Kim, H.C., Guk, Y.B., Park, Y.G., Seo, B.I., Seo, Y.B., Song, H.J., Shin, M.G., Lee, Y.J., Lim, G.H., Jo, S.I., Jung, J.G., Ju, Y.S., Choi, H.Y. *Bon-cho-hak*. Seoul, Younglimsa. pp 197, 227, 308, 517, 631-633, 1991.
- Park, Y.C., Kim, S.H., Jin, M.R. Composition comprising the extract of complex herb an active ingredient for preventing and alleviating allergic or non-allergic skin disease and the use thereof. Korea Patent No. 10139796100000. 2014.
- Han, J.M., Hong, J.H., Lee, H.Y., Jung, I.C., Jin, M.R., Kim, S.H., Park, Y.C. Single Oral Dose Toxicity Test and Four Weeks Repeated Oral Dose Determinating Test of GST in Sprague-Dawley Rats. *J. Int. Korean Med* 34(4):349-361, 2013.
- Ministry of Food and Drug Safety. Guidelines for toxicity tests of drugs and related materials notification. Chungbuk, MFDS. 2014.
- OECD. OECD guideline testing of chemicals No. 471 Bacterial Reverse Mutation Test. 2001.
- OECD. OECD guideline testing of chemicals No. 473 in vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. 2001.
- OECD. OECD guideline testing of chemicals No. 474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. 2001.
- Biotoxtech, Standard Operating Procedures (SOP), SOP/GNT/004: Manufacture of positive control material.
- Sofuni, T. Data book of chromosomal aberration test invitro, Revised edition. Tokyo: Life-Science Information Center: 1998.
- Fisher, R.A. On the interpretation of  $\chi^2$  from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* 85(1):87-94, 1922.
- Chungcheongbukdo Institute of Health Environment. Quality standard for drinking water, water quality criteria. [serial online] 2013 Nov-2014 Feb:[cited 2014 Feb 1] Availed from: URL:[http://here.cb21.net/home/sub.do?menu\\_key=44](http://here.cb21.net/home/sub.do?menu_key=44).
- Berchtold, W. Comparison of the Kastenbaum-Bowman test and Fisher's exact test. *Arch Genet* 48(2-3):151-157, 1975.
- Bartlett, M.S. Properties of sufficiency and statistical test. *Journal of the Royal Statistical Society* A160: 268-282, 1937.
- Anscombe, F.J. The validity of Comparative Experiments. *Journal of the Royal Statistical Society* A111(3):181-211, 1948.
- Hwang, S.Y., Lee, J.R., Kim, S.C., Jee, S.Y. A study on Genotoxicity Test of Hyeong-gae-yeon-gyo-tang extract. *Kor. J. Herbology* 22(4):287-300, 2007.