

## Host-Mediated Assay를 이용한 감궁탕의 돌연변이원성 평가

손윤희 · 김철호<sup>1</sup> · 남경수\*

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터  
<sup>1</sup>동국대학교 한의과대학 생화학분자생물학교실

### Evaluation of Mutagenicity with Gamgung-tang Using Host-Mediated Assay

Yun-Hee Shon, Cheorl-Ho Kim<sup>1</sup>, and Kyung-Soo Nam\*

Department of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Disease Research Center,  
Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Oriental Medicine,  
Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

**Abstract** – Mutagenicity of Gamgung-tang (GGT) was tested using *in vitro* S-9 mixture and *in vivo* host-mediated assay with *Salmonella typhimurium*. In the previous reports, GGT was tested for the safety using Ames(-S-9), *Bacillus subtilis* Rec, and *umu* gene expression mutagenicity tests. Mutagenic activity in any assays we tested was not found. In this report, we further investigated safety of GGT after metabolic activation *in vivo*. Ames test with S-9 mixture and host-mediated assay with *Salmonella typhimurium* TA98 were used to identify mutagenic property of GGT. GGT was administered 3 times with *i.m.* to Balb/c mice did not induced mutagenic effect in *Salmonella typhimurium* TA98 recovered from the liver after 3.5 h with *i.p.* treatment. Over the entire dose range (3~150 mg/mouse) tested no toxicity was detected to the bacterial cells. These results suggest that there was no DNA damage and mutagenicity by GGT.

**Key words** – Gamgung-tang, mutagenicity, host-mediated assay, Ames test

남성보다 여성에게 다발하는 갑상선기능저하증(hypothyroidism)은 기초체온 저하, 성장 및 발육저하 등을 동반하는 대사성 질환으로써, 주요병인으로는 비정상적인 자가면역 항진작용으로 보고되고 있다. 지금까지는 갑상선호르몬의 기능을 대신할 수 있는 약물들이 치료제로 복용되어지고 있으나 심계항진, 빈맥 그리고 심근경색등의 부작용을 동반함으로써 문제를 야기하고 있다.<sup>1)</sup> 따라서 저자등은 예비실험에서 활성이 확인된 감초, 천궁, 당귀 및 흑두로 구성된 감궁탕을 조제하고 그 효능을 검토한 결과 갑상선세포의 기능저하를 개선하는 효능<sup>2)</sup>이 확인되었기에 치료용 약물로 처방될 수 있어 그 독성평가가 반드시 필요한 실정이다. 생약은 사용의 폭이 비교적 넓고 장기간 환자에게 적용되기 쉬워 과거 경험적 혹은 문헌적으로 안전하다고 인정되어온 약제 혹은 처방일지라도 인체에 적용될 경우 보다 구체적인 실험적 방법에 근거한 치료효과 검증 및 안전성 평가는 매

우 중요하다.

이전의 연구결과에서 감궁탕은 *Bacillus subtilis* Rec 및 *Salmonella typhimurium* Ames, *umu* gene expression을 이용한 DNA 손상성 실험과 돌연변이원성 유발 실험에서 DNA 손상성 및 돌연변이원성이 없는 것으로 판단되었다.<sup>3,4)</sup> 그러나 감궁탕 역시 임신중인 여성에게도 사용될 수 있는 처방이며 경우에 따라서는 태아에게까지도 그 영향을 줄 수 있다고 판단됨으로 안전성 평가에 대한 의의는 아무리 강조해도 지나치지 않는다. 또한 처방에 의해 구성된 복용은 개개의 생약이 이미 안전성이 확보되었다고 하더라도 복용시 체내에서 복합적으로 대사되어 나타나는 영향에 대해서는 아직 연구가 미흡한 실정이다. 감궁탕은 Rec assay에서 DNA 손상성이 없으며 마우스의 간에도 별다른 독작용을 나타내지 않는 것으로 나타났으나,<sup>3)</sup> 감궁탕을 이용한 갑상선기능저하증에 대한 효율적인 치료를 위해서라면 환자는 장기간 구성생약들에 노출되어야 하기 때문에 투약기간과 간대사를 고려한 감궁탕의 돌연변이원성 및 발암성 유무에 관한

\*교신저자(E-mail) : namks@dongguk.ac.kr  
(FAX) : 054-770-2477

실험은 반드시 필요하다.

따라서 본 연구에서는 생약 및 기능성식품에 대한 항암 및 항돌연변이원성용 보고한 이전 경험을 바탕으로<sup>5-7)</sup> 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*)을 이용한 Ames test(+S-9) 및 host-mediated assay 방법으로 감공당의 대사 후 돌연변이 원성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

**시약** - 본 실험에 사용한 시약 중 agar와 tryptone은 Difco (Detroit, MI, U.S.A.)의 제품을 그리고 L-histidine, biotin, glucose, ampicillin, glucose-6-phosphate, NADP, NaN<sub>3</sub>, NPD(4-nitro-*o*-phenylenediamine), B[a]P (benzo[a]pyrene) 및 2-AF (2-aminofluorene)는 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 사용하였다. 그외 실험에 사용된 모든 시약들은 Sigma사 및 Wako사의 특급제품들을 사용하였다.

**균주 및 실험동물** - 본 실험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100은 경상북도 보건환경연구원 (대구, 한국)에서 분양받아 사용하였다. 또한 본 실험에 사용한 실험동물은 7 주령의 자성 마우스(Balb/c, 체중 20 g 내외)를 대한실험동물센터(충북, 음성)에서 구입하여 본 대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도 20±2°C, 습도 40~60%) 하에서 일주일간 안정시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험시작 전까지 사료와 물은 자유로이 먹게 하였다.

**감공당의 조제**<sup>8)</sup> - 감공당(감초 15 g, 흑두 15 g, 당귀 15 g 및 천궁 15 g) 60 g에 증류수 400 ml를 가한 후, 3시간 전탕하여 추출하고 여과하였다. 여액을 rotary evaporator로 전량을 200 ml가 되도록 감압농축하였다. 여기에 ethanol을 가하여 75%, 85%, 95% ethanol 용액으로 되게 한 다음, 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여과하고 여액을 pH 7.4로 조절하여 전량이 200 ml가 되게 하였다. 이후 이들은 저온에서 24시간 방치한 후 membrane filter (0.22 µm, 직경 25 mm, Whatman®, Germany)로 여과 멸균하여 시료로 사용하였다. 최종적으로 여액 1 ml당 30 mg의 추출물을 얻었다.

**Salmonella typhimurium TA series에 의한 돌연변이원성 검토** - *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100을 본 실험에 사용하였다.<sup>9)</sup> 이 균주들은 매 실험 직전 histidine 요구성, deep rough (*rfa*) 돌연변이, *uvrB* 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인한 후 실험에 사용하였다. 먼저 Vogel-Bonner citrate medium E (agar 1.5 g을 증류수에 녹인 후, 50배의 VB salts 2.0 ml 및 40% glucose 5.0 ml를 첨가) 배지를 멸균하여 잘 섞은 뒤 plate를 만들었다. 고압 100 ml top agar (agar 0.6 g, NaCl 0.5 g) 당 여과멸균한 0.5 mM L-histidine-HCl·H<sub>2</sub>O와 0.5 mM biotin 용액을 각각 10 ml씩 혼합하여 사용하였다. 45°C의 top agar 2 ml에 최종 24시간 배양한 균 현탁액을 0.1 ml (1~2 × 10<sup>9</sup> cells/ml) 가했으며, microsomal

activation system을 사용할 경우에는 S-9 mixture를 100 µl 및 각 농도 (3 mg/ml, 30 mg/ml 및 150 mg/ml)의 시료 100 µl를 잘 혼합하여 Vogel-Bonner citrate medium E plate 위에 부어 배지상에 고루 퍼지게 하였다. 음성대조군으로서는 5% DMSO를 사용하였으며, 양성대조군으로서는 sodium azide 및 NPD를 사용하였다.

**S-9 mixture의 조제** - S-9 mixture 조제<sup>10)</sup>를 위해서 체중 150 g 내외의 웅성 흰쥐를 도살하기 4일 전에 phenobarbital 생리식염수 용액을 kg당 30 mg을 복강내로 주사하였고, 또한 도살 3일 전, 2일 전, 1일 전에는 kg당 60 mg을 복강내로 주사한 다음, 16시간 절식시켜 S-9 fraction을 얻었다. 복부를 개복한 다음, 냉각한 생리식염수를 간장에 관류시킨 후, 간장을 적출해서 가위로 저민 다음 3배량의 0.15 M KCl을 가해 균질화 한 다음 9,000×g에서 10분간 원심분리하고, 그 상층액을 취해 S-9 fraction으로 하였다. S-9 fraction은 균에 처리하기 직전에 NADPH regenerating system을 포함한 S-9 mixture로 만들어 실험에 사용하였다(Table I).

**Host-mediated assay** - 본 실험법<sup>11,12)</sup>을 요약하면 *Salmonella typhimurium* TA98 균주를 agar slant로부터 소량 취해 tryptone broth에 접종한 다음 37°C 18 시간 접종 진탕배양하였다. 이 배양균액을 주사위로 2 ml 취해 자성 마우스의 복강내로 주사하였다. 시료를 농도별로 조제한 다음 각각 0.1 ml씩 마우스의 다리근육에 1시간 간격으로 3회 주사한 뒤, 마지막 주사 30분 후에 생리식염수 1 ml를 마우스 복강 내에 다시 주사하였다. 그리고 얼마 후에 복강으로부터 균을 무균적으로 회수하였다. 회수한 균액은 빙수중에 넣어 놓고 회수액 중의 생균수를 측정할 때에는 회수균 0.1 ml를 2 ml top agar (0.1 µmole histidine 함유)에 가해 최소배지위에 퍼지게 하였다. 이들 배지를 37°C에서 2일간 배양시킨 후 각 plate에 상에 복귀 돌연변이(revertant colony) 수, 생균수를 측정해서 생균수당 10<sup>8</sup>개의 복귀 돌연변이수를 아래 계산식에 의거 계산하였다.

$$\text{복귀 돌연변이수}/10^8 \cdot \text{생균수} = \frac{\text{복귀돌연변이수}/\text{ml}}{\text{생균수}/\text{ml}} \times 10^8$$

**Table I.** Composition of S-9 mixture

Components	Quantity per ml	Volume per ml	Final concentration
S-9 fraction	300 µl	300 µl	30%
MgCl <sub>2</sub>	8 µmol	20 µl	0.4 M
KCl	33 µmol	20 µl	1.65 M
Glucose-6-phosphate	5 µmol	10 µl	0.5 M
NADP	4 µmol	40 µl	0.1 M
Sodium phosphate buffer	100 µmol	400 µl	0.25 M
Distilled water	210 µl	210 µl	

## 결과 및 고찰

이전의 연구결과에서 저자들은 감궁탕이 흰쥐의 thyrocyte 인 FRTL세포에서 cytokine-induced cytotoxicity를 억제하고 MHC class antigen과 관련된 세포사멸 방지등의 효능을 가지며,<sup>2)</sup> 또한 감궁탕가미방이 갑상샘 기능장애에 효능이 있음을 보고하였다.<sup>13)</sup> 최근에는 자가면역성 갑상선기능저하증의 실험적 유도(experimental autoimmune thyroiditis)에는 thyroglobulin에서 당을 제거한 non-glycosylated thyroglobulin이 갑상선기능저하증 유발의 주요 원인물질임이 밝혀졌다.<sup>14)</sup>

인체에 유전자독성 및 암을 일으키는 물질 중 85% 이상이 환경중에 존재하는 화학물질이 원인인 된다는 보고<sup>15-17)</sup>가 있어 사람들이 일상생활에서 손쉽게 접하게되는 의약품(생약포함), 식품, 농약 등을 비롯한 많은 화학물질의 발암성 유무를 단시일 내에 검색하는 일은 매우 중요한 일이라 생각된다. 현재 우리나라를 비롯하여 미국, 일본 및 유럽 등에서도 안전성 평가방법 가운데 시료물질의 발암성 유무와 유전자에 미치는 영향을 검색하는 것이 필수적으로 규정되어 있다. 기존의 발암성물질의 약 90% 이상이 세균에 대해서도 돌연변이원성을 가진다는 Ames 등의 보고에 따라,<sup>18,19)</sup> 세균을 사용한 돌연변이원성 실험은 발암성 물질검출의 단기 스크리닝법으로서 세계적으로 가장 널리 이용되고 있다. 또한 host-mediated assay법은 동물에 직접 미생물 검출계와 시료를 주입하는 방법으로 시료 구성성분들이 동물체내에서 여러 종류의 복잡한 대사를 받는 중에, 함께 투여한 미생물(*Salmonella typhimurium*)의 유전자에 손상을 주는 대사물로 전환되는지의 여부를 결정하기 위한 방법이다.

**Salmonella typhimurium TA series에 의한 돌연변이원성 검토** - *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100을 사용하여 감궁탕의 돌연변이원성을 실험한 결과를 Table II에 나타내었다. 돌연변이원성의 정량은 3개의 plate를 사용하여 얻어지는 결과를 3회 평균하여 나타내었으며, 음성대조군에 비해서

revertant colony 수가 2배 이상일 때 돌연변이원성이 있는 것으로 판정하였다. 미생물에 의한 약물대사는 포유동물에서와 다르기 때문에 미생물에 직접 돌연변이를 유발하는 물질이라도 포유동물의 조직중, 특히 간 microsomal enzyme system에 의해 대사되어 그 작용이 약화되거나, 소실되는 수도 있으며, 반면에 돌연변이를 유발하지 못하는 물질이라도 대사를 받은 후에 다시 활성화되어 작용을 나타내는 경우도 많이 있다. 이를 위해서 미생물에 약물대사 효소계의 일종인 S-9 mixture (Table I)를 가하여 시료가 대사를 받은 후에 유도될 수 있는 돌연변이원성의 유무를 아울러 알아보려고 하였다. S-9 mixture를 첨가하지 않은 실험군은 음성대조군으로 DMSO (5%)을, 양성대조군으로 TA98에는 NPD를 사용하였다. 결과에서 처럼, 감궁탕의 각 농도(3.0 mg/ml, 30 mg/ml 및 150 mg/ml)에서 TA98은 revertant colony수가 각각의 음성대조군 수준으로 나타났으므로 감궁탕은 돌연변이원성이 없는 것으로 판정되었다. 한편 S-9 mixture를 첨가한 경우에는 음성대조군으로 DMSO (5%)를, 양성대조군으로 TA98에 2-AF를 사용하였다. Table II에 나타낸 바와 같이 S-9 mixture의 존재 하에서는 revertant colony수가 S-9 mixture를 첨가하지 않은 경우보다는 다소 증가했으나 각 농도에서 음성대조군 정도 밖에 나타나지 않았으므로 감궁탕은 대사가 된 후에도 돌연변이원성이 없는 것으로 사료되었다.

**감궁탕의 host-mediated assay** - Legator에 의한 방법<sup>10)</sup>으로 host-mediated assay를 수행한 결과를 Table III에 나타내었다. 감궁탕의 농도가 증가됨에 따라 복강으로부터 회수한 생균수 10<sup>8</sup>개에 대한 *Salmonella*균의 revertant colony의 수가 증가 되었으며, 음성대조군과 비교해 볼 때 감궁탕은 마우스에 투여한 3, 30 및 150 mg에서 대사 후에도 돌연변이원성을 유발하지 않는 것으로 확인되었다. 이는 *in vitro* 실험인 Ames test에서 S-9 mixture를 첨가한 경우와 유사한 양상을 나타낸 것으로 감궁탕은 대사되어도 돌연변이원성이 나타나지 않는 처방임을 알 수 있었다.

**Table II.** Mutagenicity of Gamgung-tang on *Salmonella typhimurium* TA series

Groups	Concentration (mg/ml)	Histidine revertants per plate			
		-S9 mix.		+S9 mix.	
		TA98	TA100	TA98	TA100
5% DMSO		34 ± 4 <sup>a</sup>	149 ± 11	35 ± 3	139 ± 9
NPD	0.1	409 ± 49	-	-	-
NaN <sub>3</sub>	0.01	-	601 ± 54	-	-
2-AF	0.05	-	-	927 ± 37	-
B[a]P	0.05	-	-	-	401 ± 31
Gamgung-tang	3	33 ± 4	122 ± 13	31 ± 4	114 ± 12
	30	39 ± 5	138 ± 11	45 ± 6	108 ± 11
	150	48 ± 7	152 ± 17	49 ± 8	168 ± 17

<sup>a</sup>Values are mean ± SD(standard deviation) of three experiments, each plated in triplicate.

**Table III.** Host-mediated assay of Gamgung-tang

Groups	Concentration (mg/mouse)	<sup>a</sup> Revertant colonies per plate	<i>Salmonella</i> per 0.1 ml	The number of revertants per <i>Salmonella</i> 10 <sup>8</sup>
Control		174 ± 16	2.46 × 10 <sup>8</sup>	70.7
Benzo[a] pyrene	0.05	830 ± 35	2.98 × 10 <sup>8</sup>	278.5
Gamgung-tang	3	235 ± 22	3.34 × 10 <sup>8</sup>	70.4
	30	276 ± 19	3.40 × 10 <sup>8</sup>	79.4
	150	340 ± 28	3.61 × 10 <sup>8</sup>	94.1

<sup>a</sup>Values are mean ± SD(standard deviation) of three experiments.

## 결 론

감궁탕(GGT)이 체내에서 대사된 후에 돌연변이원성을 유도하지는 알아보기 위하여 *Salmonella typhimurium* TA 98 (+S-9)을 이용한 Ames법과 마우스를 이용해서 직접 생체에 감궁탕을 투여하고 대사 후의 안전성을 살펴보는 host-mediated assay법을 사용하여 실험을 수행하였다. 그 결과 Ames test 의 S-9 mixture 처리한 경우와 유사하게 감궁탕은 실험에 사용한 전농도(3~150 mg/마우스)에서 대사 후 돌연변이원성을 일으키지 않는 것으로 판정되었다. 따라서 감궁탕은 그 자체 및 대사 후에도 돌연변이원성을 나타내지 않는 비교적 안전한 생약처방으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발 사업의 지원(01-PJ9-PG1-01CO04-0002)에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Katzung, B. G. (2004) Basic & Clinical Pharmacology p.625-640, The McGraw-Hill Com., San Francisco, U.S.A.
- Shon, Y. H., Lee, H. S., Lim, J. K., Kim, C. H., Jeon, B. H. and Nam, K. S. (2004) Effect of herbal medicines on cytokine-induced cytotoxicity and MHC class antigen expression in rat thyroid cells. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 371-374.
- 손윤희, 백태선, 문지선, 김미경, 김철호, 전병훈, 남경수 (2005) Rec assay 및 효소학적 방법을 이용한 감궁탕의 안전성평가. *동의생리병리학회지* **19**: 98-101.
- 손윤희, 김철호, 남경수 (2005) Ames 및 umu assay를 이용한 감궁탕의 안전성평가. *한국생명과학회지* **15**: 215-219.
- Nam, K. S., Choi, Y. R. and Shon, Y. H. (2001) Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide: Rec, Ames and Umu assays. *Biotechnol. Lett.* **23**: 971-975.
- Shon, Y. H. and Nam, K. S. (2001) Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *J. Ethnopharmacol.* **77**: 103-109.
- Shon, Y. H., Lee, J. S., Lee, H. W. and Nam, K. S. (1999) Antimutagenic potential of *Phellinus Igniarius*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 525-528.
- 錢百炎 (1981) 中草藥注射劑, p.71-130, 上海科學技術出版社, 上海, 中國.
- 田島疆太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶 (1980) 環境變異原實驗法, p.56-68, 講談社, 東京, 日本.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**: 173-215.
- Legator, M. S. and Malling, H. V. (1971) The host-mediated assay, a practical procedure for evaluating potential mutagenic agents in mammals. *Chemical Mutagens* **2**: 569-589.
- Apostolidis, S., Chandra, T., Demirhan, I., Cinatl, J., Doerr, H. W. and Chandra, A. (2002) Evaluation of carcinogenic potential of two nitro-musk derivatives, musk xylene and musk tibetene in a host-mediated *in vivo/in vitro* assay system. *Anticancer Res.* **22**: 2657-62.
- 최호승, 김영목, 임종국, 손윤희, 남경수, 김철호, 전병훈 (2003) 감궁탕 가미방이 갑상샘 기능장애에 미치는 효과. *동의생리병리학회지* **17**: 648-655.
- Moon, S. K., Kang, B. S., Kim, Y. G., Chung, T. W., Kim, J. R., Cha, B. Y., Moon, J. Y., Lim, J. K., Shon, Y. H., Nam, K. S., Ko, J. H., Jeon, B. H. and Kim, C. H. (2004) Induction of an autoimmune thyroiditis by deglycosylated thyroglobulin induction of a Tc1-mediated experimental autoimmune thyroiditis by deglycosylated porcine thyroglobulin. *Immunopharm. and Immunotoxicol.* **26**: 355-372.
- Doll, S. R. (1977) Strategy for detection of cancer hazards to man. *Nature* **265**: 589-596.
- Wynder, E. L. and Gori, G. B. (1977) Contribution of the environment to cancer incidence: An epidemiologic exercise. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**: 825-832.
- Sugimura, T. (1985) Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food. *Cancer* **49**: 1970-1984.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* microsome test. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 5135-5139.
- McCann, J. and Ames, B. N. (1976) Detection of carcinogens as mutagen in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 950-954.

(2005년 3월 4일 접수)