

## HMC05의 배양 Chinese Hamster Lung 세포를 이용한 염색체이상 시험

신흥묵\*

동국대학교 한의과대학 생리학교실

### A Chromosome Aberration Test of HMC05 on Cultured Chinese Hamster Lung Cells

Heung Mook Shin\*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objectives** : We investigated genetic toxicity of HMC05 in relation to chromosome aberration test on Cultured Chinese Hamster Lung (CHL) in the presence and absence of S-9 mix.

**Methods** : Experimental groups were divided into two groups: with S-9mix (+S) or without S-9 mix (-S). -S group was also divided 2 series by treatment hours (6 hr: 6-S; or 24 hr: 24-S). Each group treated with vehicle only (complete culture medium), HMC05 (1,250, 2,500, 5,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and cyclophosphamide monohydrate (CPA) and ethylmethanesulfonate (EMS), respectively.

**Results** : HMC05 did not show any aberrant metaphase. However, there were significant ( $p < 0.01$ ) aberrant metaphases with CPA in S+ and with EMS in S-.

**Conclusions** : These results indicate that HMC05 formula does not show any toxicity in chromosome aberration test.

**Key words** : Genetic toxicity, HMC05, Chinese Hamster Lung cells, chromosome aberration test

#### 서론

HMC05는 한방치료기술연구개발사업(B030007, B050042)의 연구결과로 개발된 고혈압과 동맥경화의 예방 및 치료를 목표로 개발된 복합제제이다<sup>1,2)</sup>. HMC05의 조성은 半夏·白朮·天麻·陳皮·茯苓·山楂·獐齋·黃連으로 구성되었으며, 실험적 연구를 통하여 혈관이완<sup>1)</sup>, 동맥경화반 감소<sup>2)</sup> 및 내피세포에서의 항염증 효능<sup>3)</sup>을 보고하였으며, 제제의 표준화를 위한 지표성분의 연구에서 hesperidin, coptisine, palmatine 및 berberine의 성분을 설정하였다<sup>4)</sup>. 또한 전임상시험으로 단회경구투여 독성시험에서 개략치사량(ALD)은 한계량인 2,000 mg/kg를 상회하며<sup>5)</sup>, 식품의약품안전청고시 제2005-60호(2005년 10월 21일) '의약품 등의 독성시험기준'<sup>6)</sup> 및 식품의약품안전청고시 제2005-79호(2005년 12월 21일) '비임상시험 관리기준'<sup>7)</sup>에 준하여 4

주간 반복 경구투여 독성시험에서 시험물질 HMC05에 의한 특이적 변화는 관찰되지 않았다<sup>8)</sup>.

이에 후속 연구로서 HMC05의 유전독성에 대한 자료를 확보하기 위하여 식품의약품안전청고시 제2009-19호(2009년 05월 1일) '비임상시험 관리기준'<sup>9)</sup> 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice(1997)<sup>10)</sup>에 따라 HMC05의 염색체이상 시험을 실시하였다. HMC05의 염색체이상 시험은 배양한 포유동물세포인 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용하여 평가하였으며, 대사활성계 적용 및 비적용하에서 염색체이상 유발성 여부를 검색하여 유의한 결과를 보고하고자 한다.

천연물 한의약제제의 개발에 있어서 유전독성의 연구는 제제의 안전성 평가를 위한 중요한 부분이다. 유전독성은 유전자(DNA) 및 염색체가 물리화학적 또는 생리적인 요인에 의하여 직접 손상을 받아 형태학적 및 기능적 이상

\* 교신저자 : 신흥묵, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학  
· Tel : 054-770-2372 · E-mail : heungmuk@dongguk.ac.kr  
· 접수 : 2010년 1월 19일 · 수정 : 2010년 3월 19일 · 채택 : 2010년 3월 22일

을 일으키는 현상으로 염색체 이상시험, 세균 복귀 돌연변이 분석, 소핵시험이 있으며, 본 연구에서는 HMC05의 시험물질이 염색체에 미치는 상해작용을 검사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시험물질

본 연구의 시험물질인 HMC05 (半夏 1.5 : 白朮 2 : 天麻 1 : 陳皮 1 : 茯苓 1.5 : 山楂 1.5 : 薺 1.5 : 黃連 1.5 ; Table 1)는 (주) Bioland (Korea)에 의뢰하여 제조하였다. 100°C에서 1시간 30분 전탕한 후 추출액을 여과지(1 µm)로 여과하고 진공 농축기(진공도 60~70 cmHg)로 감압 농축하여 멸균탱크(100°C)에서 1시간 가열하고 1일간 방치한 후 다시 1시간 가열하여 연조액을 실험에 사용하였다. 건조함량은 51.5%로 나타났다.

Table 1. Composition Ratio of HMC05

Pharmaceutical name	Herb name	Ratio
半夏	Pinelliae Rhizoma	1.5
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	2
天麻	Gastrodiae Rhizoma	1
陳皮	Citri Pericarpium	1
茯苓	Poria	1.5
山楂	Crataegi Fructus	1.5
薺	Siegesbeckiae HerbaMakino	1.5
黃連	Coptidis Rhizoma	1.5

#### 2) 시험계

시험계는 염색체이상 시험에 Chinese Hamster Lung Cell (American Type Culture Collection (ATCC #CRL-1935 CHL/IU))<sup>11)</sup>을 사용하였다. CHL 세포는 액체 질소에 보관한 세포주를 해동하여 7일 이상 배양하고, 마이크로플라스마의 오염 여부를 확인하고, 증식속도 및 핵형 등을 확인한 후 시험에 사용하였다.

### 2. 방법

시험 방법은 Ishidate 등<sup>12)</sup> 및 Dean and Danford<sup>13)</sup>의 방법을 변형하여 실시하였다.

#### 1) 세포배양

CHL 세포는 5% 이산화탄소와 포화 수증기를 함유한 37°C 항온배양기(Forma 311 및 3111)에서 매 2~3일 마다 0.1% 트립신액으로 세포를 분리하여 계대 배양하였다. 충분한 수의 세포를 트립신으로 분리한 다음 배양면적 25 cm<sup>2</sup> 플라스크 당 6×10<sup>4</sup>개의 세포를 Minimum Essential Medium (Gibco-BRL #41500-034)에 sodium bicarbonate

(NaHCO<sub>3</sub> 2,200 mg), L-glutamine (292 mg), penicillin streptomycin (Gibco-BRL #15140-122, 100 µg/ml)을 첨가한 후 FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco-BRL #16000-044)를 첨가한 5 ml의 배양액에 파종, 약 3일간 배양한 후 시험물질을 처리하였다.

#### 2) 대사활성계의 조성 및 사용

대사활성계 S-9 mix 1 ml 중의 조성(S-9 30% v/v)은 8 µmol MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 33 µmol KCl, 5 µmol G-6-P, 4 µmol NADPH, 4 µmol NADH, 100 µmol sodium phosphate buffer (pH 7.4) 및 Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간에서 추출한 0.3 ml S-9 (Molecular Toxicology Inc, USA)으로 하였으며, 조제한 S-9 mix는 얼음에 채워 사용하였다. S-9 mix 0.5 ml를 T-25 flask (5 ml)에 처리하고, 이의 활성은 cyclophosphamide · H<sub>2</sub>O (CPA)에 의한 염색체이상 유발로 확인하였다.

#### 3) 시험물질 및 양성대조물질의 조제

시험물질의 최고 농도군은 시험물질의 순도가 51.5%이므로 순도 보정으로 100% (51.5%×1.942=100.0130%)를 만들어 주기 위해 약 1.942를 시험물질에 곱해준 양을 칭량한 후 부형제(멸균증류수)에 용해하여 조제하였고, 이를 동일한 부형제로 단계별 희석 조제하여 각 처리농도의 10배 농축액을 조제하였다. 양성대조물질은 OECD 가이드라인 TG473<sup>14)</sup>에 따라 Series 1에는 CPA (Sigma, USA), Series 2 및 3에는 EMS (Sigma, USA)를 선택하여 사용 직전 배양액에 용해하였다.

#### 4) 시험군 및 처리농도 결정

시험군은 대사활성계 적용군(+S: Series 1)과 비적용군(-S: Series 2 및 3)으로 구분하였으며, -S는 다시 HMC05를 6시간 처리 후 18시간 회복기를 둔 Series 2 (6-S)와 24시간 처리한 Series 3 (24-S)로 구분하였다. 양성 대조물질의 처리는 식품의약품안전청고시에 따라 Series 1에는 CPA (Sigma, USA) 12 µg/ml를 사용하였으며, Series 2 및 3에는 EMS (Sigma, USA)를 각각 800 및 600 µg/ml를 처리 하였다.

본 실험의 처리농도는 예비시험을 실시하여 결정하였다(Table 2). 예비실험은 식품의약품안전청고시 및 OECD 가이드라인에 따라 5000 µg/ml를 최고 농도로 본 실험과 동일한 방법으로 시험물질을 처리한 후, 처리개시 24시간 후 각 플라스크의 세포를 분리, 계수하여 상대세포수를 산출하였다(Table 3).

#### 5) 시험물질 처리 및 검체제작

##### (1) 시험물질 처리

시험군을 1, 2, 3 으로 나누어 준비하고, 각 군은 시험물질 처리 전에 미리 각 플라스크의 배양액을 모두 제거한 후 대사활성계 적용군(series 1)은 2.5 ml, 비적용군

Table 2. Result of Preliminary dose Range-finding Tests<sup>a</sup>

Dose of HMC05 (mg/m <sup>2</sup> )	S-9 min	Treatment schedule (hours) <sup>b</sup>	Cell counts		mean	Relative cell counts(%) <sup>c</sup>
0	+	6-18	6,272	6,130	6,201	100
20	+		6,363	6,334	6,349	102
39	+		6,390	6,418	6,404	103
78	+		5,984	5,900	5,942	96
156	+		6,602	6,451	6,527	105
313	+		6,076	6,072	6,074	98
625	+		5,862	5,752	5,807	94
1,250	+		5,857	5,788	5,823	94
2,500	+		6,018	6,047	6,033	97
5,000	+		6,113	6,297	6,205	100
0	-	6-18	6,480	6,420	6,450	100
20	-		6,412	6,222	6,317	98
39	-		6,091	6,014	6,053	94
78	-		6,457	6,155	6,306	98
156	-		5,993	5,959	5,976	93
313	-		6,079	6,128	6,104	95
625	-		6,007	5,920	5,964	92
1,250	-		6,115	6,003	6,059	94
2,500	-		6,446	6,494	6,470	100
5,000	-		6,614	6,678	6,646	103
0	-	24-0	6,336	6,327	6,332	100
20	-		6,186	6,120	6,153	97
39	-		6,018	6,062	6,040	95
78	-		6,256	6,384	6,320	100
156	-		6,316	6,102	6,209	98
313	-		6,229	6,288	6,259	99
625	-		6,205	6,134	6,170	97
1,250	-		5,882	6,075	5,979	94
2,500	-		6,125	6,146	6,136	97
5,000	-		6,079	6,047	6,063	96

a : flask/dose was used. After harvesting mitotic cells, each culture was trypsinized and suspended with 0.5ml of 0.1% trypsin and 5ml 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 twice/culture using Coulter Counter model Z2. Actual number of cells per flask = Mean Count × 550.

b : treatment time - recovery time.

c : relative Cell Counts =  $\frac{\text{Cell counts of treated flask}}{\text{Cell counts of control flask}} \times 100 (\%)$

Table 3. Classification of Experimental Groups and dose Decision

Treatment series	S-9 mix	Dose (μg/ml)	Treatment (μl)	Treatment schedule (hrs) <sup>a</sup>
Vehicle only	+	0	300	06 - 18 (designated as "6+S")
HMC05 I	+	1,250	300	
HMC05 II	+	2,500	300	
HMC05 III	+	5,000	300	
CPA	+	12	300	
Vehicle only	-	00.00	500	06 - 18 (designated as "6-S")
HMC05 I	-	1,250	500	
HMC05 II	-	2,500	500	
HMC05 III	-	5,000	500	
EMS	-	800	400	
Vehicle only	-	00.00	500	24 - 0 (designated as "24-S")
HMC05 I	-	1,250	500	
HMC05 II	-	2,500	500	
HMC05 III	-	5,000	500	
EMS	-	600	300	

Vehicle : complete culture medium (EMEM). CPA : cyclophosphamide · H<sub>2</sub>O. EMS : ethylmethane sulfonate. a : treatment time - recovery time.

(series 2 및 3)은 5 ml의 배양액을 분주, 1시간 이상 경과한 후 시험물질을 처리했으며, 처리액의 양만큼 배양액을 제거한 후 해당농도가 되도록 조절한 시험물질 용액을 각 농도에 맞게 처리하였다(Table 4).

대사활성계 적용(+S) 및 대사활성계 비적용(-S) 6시간 처리군의 경우 처리개시로부터 약 6시간 경과 후 플라스

크로부터 시험물질을 함유한 처리액을 제거하고 5 ml의 CMF D-PBS (Ca<sup>2+</sup> & Mg<sup>2+</sup> free Dulbecco's phosphate buffered saline)로 세포층을 1회 세척한 후 신선한 배양액 5 ml를 가하여 증기세포 회수시까지 다시 18시간 계속 배양하였으며, 대사활성계 비적용 24시간 처리군의 경우 세척없이 증기세포 회수 시까지 계속 처리하였다.

Table 4. Composition of treatment medium

SERIES	Culture medium + HMC05 solution	S-9 mix	Total
1 (06+S)	2.2 ml + 0.3 ml	0.5 ml	3.0 ml
2 (06-S)	4.5 ml + 0.5 ml	-	5.0 ml
3 (24-S)	4.5 ml + 0.5 ml	-	5.0 ml

## (2) 검체제작

시험물질 처리 개시로부터 약 22시간 후에 각각 배양액 양의 1%에 해당하는 100  $\mu$ M 콜히친(colchicine) 용액(50  $\mu$ l)을 각 플라스크에 처리하여(최종 농도 1  $\mu$ M) 2시간 경과한 후 증기세포를 수집하였다. 증기세포를 분리, 수집하여 150  $\times$  g으로 5분간 원심분리하여 75 mM KCl 용액 5 ml를 가하여 10분간 실온에서 저장액 처리하였다. 저장액 처리 후 고정액(메틸알콜:빙초산 = 3:1 v/v) 5 ml를 기존 75 mM KCl 용액에 혼합하여 20분간 전고정을 실시한 다음 300  $\times$  g으로 원심분리하여 고정액을 2회 교환하여 준 후 공기건조법으로 검체를 제작하고 5% Giemsa액으로 염색하였다. 검체는 각 플라스크 당 2매씩 제작하였으며 염색, 수세 및 건조를 마친 검체는 계수 시까지 상온에 보관하였다.

증기세포 수거 후 플라스크에 남은 세포들은 0.1% Trypsin액 0.5 ml와 5 ml의 배양액으로 분리, 현탁하여 세포현탁액을 만들고, 계수하여 세포증식 억제의 지표로 활용하였다.

## 6) 염색체이상의 계수

본 시험의 각 플라스크 당 제작된 검체 중 염색상태가 양호한 1매씩을 선정하여, 관찰자가 그 내용을 알 수 없도록 코드화 한 후 1,000배의 배율로 관찰, 계수하였다. 염색체이상의 형태 판별 및 계수는 일본환경돌연변이학회(JEMS) 포유동물시험분과회(MMS)판 '염색체이상 아틀라스'<sup>15)</sup>에 따랐다. 염색체이상은 염색체형(chromosome type) 절단 및 교환과 염색분체형(chromatid type) 절단 및 교환으로 대별해 계수하였으며, 분열중기상(이하 중기상) 중 이상을 가진 중기상(이하 이상중기상)의 빈도 및 염색체 이상의 수는 gap을 포함한 경우와 제외한 경우를 병기하였다.

구조적 이상의 계수는 검체당 염색체가 잘 퍼진 100개의 중기상(23~27동원체)에 대하여 염색체 수 및 염색체 이상의 유무를 관찰하고, 염색체 이상이 관찰되면 이상의 종류와 수 및 슬라이드 상의 위치를 기록하였다. 또한 수적 이상의 계수는 염색체 이상의 유무에 관계없이 염색체 수에 따라 diploid (DP, 23~36동원체), polyploid (PP, 37 $\leq$ 동원체) 및 핵내배화(endoreduplication: ER)로 분류, 100개의 중기상당 관찰되는 빈도를 기록하였다.

## 7) 통계처리 및 판정

이상 중기상의 빈도에 대한 통계처리는 OECD guideline 등을 참조하여 gap을 제외한 숫자만을 대상으로 실시하였다. 각 시험 기초자료에 대한 통계처리는 Richardson 등<sup>16,17)</sup>의 방법을 응용하였다. 먼저 각 중기상을 염색체 이상이 없는 것(normal metaphase, 정상 중기상)과 1개 이상의 이상을 포함한 것(aberrant metaphase, 이상 중기상)으로 나누고, 이상 중기상의 빈도에 대해 통계처리를 실시하였다. 수적 이상에 대해서는 중기상을 DP, PP 및 ER로 분류하여 배수체(PP) 및 핵내배화(ER)의 빈도에 대해 같은 방법으로 실시하였다.

음성대조군과 시험물질 처리군 및 양성 대조군의 비교에 있어서 통계처리는 SPSS program<sup>18)</sup>의 Chi-square test 및 Fisher's exact test를 사용하였고, 결과의 판정은 시험물질 처리군에 있어서 염색체이상을 가진 중기상의 빈도가 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다. 또 *p* value가 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

## 1. 대사활성계 적용군의 염색체이상

이상 중기상(gap 제외)의 빈도는 대사활성계 적용 6시간 처리의 음성 대조군 및 HMC05 시험물질을 처리한 모든 군에서 0.0으로, 시험물질 1,250, 2,500, 5,000  $\mu$ g/ml을 처리한 농도군에서 모두 음성대조군에 비해 통계학적으로

Table 5. Chromosome Aberration Test of HMC05 Treatment for 6 Hrs in the Presence of S-9 Mix

Dose of HMC05 (mg/ml) <sup>a</sup>	Treatment schedule (hours) <sup>b</sup>	Mean aberrant metaphases <sup>c</sup>	Mean total aberrations <sup>d</sup>	Mean of PP + ER	RCC (%)
0		0.0 / 0.0	0.0 / 0.0	0.0 + 0.0	100
1,250		0.0 / 0.0	0.0 / 0.0	0.0 + 0.0	100
2,500	6-18	0.0 / 0.0	0.0 / 0.0	0.0 + 0.0	101
5,000		0.5 / 0.0	0.5 / 0.0	0.0 + 0.0	99
CPA 12		40.0 / 39.0 <sup>***</sup>	49.5 / 45.5	0.0 + 0.0	74

\*\* Significantly different from the control at *p* < 0.01. a : nominal concentration of the Test Article. b : treatment time - recovery time. c : gaps included/excluded, means of duplicate cultures. 100 metaphases were examined per culture. d : fisher's exact test. PP : polyploid. ER : endoreduplication. CPA : cyclophosphamide monohydrate. rCC : relative Cell Counts.

Table 6. Individual Chromosome Aberration Test of HMC05 Treatment for 6 Hrs in the Presence of S-9 Mix

Dose of HMC05 (mg/ml)	Treatment schedule (hours) <sup>a</sup>	Number of aberrant metaphases <sup>b</sup>	Number of total aberrations <sup>b</sup>	Number of findings/100 metaphases						
				Gap	Chromosome type		Chromatid type		Other	PP + ER
					DEL	EXC	DEL	EXC		
0 (A)		0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0
0 (B)		0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0
1,250 (A)		0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0
1,250 (B)		0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0
2,500 (A)	6-18	0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0
2,500 (B)		0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0
5,000 (A)		1 / 0	1 / 0	1	0	0	0	0	0	0 + 0
5,000 (B)		0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0
CPA 12 (A)		43 / 42	51 / 47	4	0	0	3	37	7	0 + 0
CPA 12 (B)		37 / 36	48 / 44	4	0	0	3	34	7	0 + 0

a : treatment time-recovery time. b : gaps included/excluded, 100 metaphases per culture. DEL : deletion. EXC : exchange. PP : polyploid. ER : endoreduplication. CPA : cyclophosphamide monohydrate.

로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 또한 시험물질 처리군의 배수체(PP) 및 핵내배화(ER)의 빈도에서도 음성 대조군 및 모든 시험물질 처리군에서 모두 0.0으로, 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다.

그러나 양성 대조군에서는 이상 증기상(gap 제외)의 빈도는 39.0으로 통계학적으로 유의한 증가( $P < 0.01$ )가 관찰되었다(Table 5, 6).

## 2. 대사활성계 비적용군의 염색체이상

HMC05 시험물질의 6시간 처리군에서 이상 증기상(gap 제외)의 빈도는 시험물질 모든 용량 처리군에서 0.5 이하로 나타나 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 또한 시험물질 처리군의 배수체

(PP) 및 핵내배화(ER)의 빈도 역시 음성 대조군 및 시험물질 처리군에서 0.0으로, 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 그러나 양성 대조군에서는 이상증기상(gap 제외)의 빈도는 26.0으로 유의한 증가( $p < 0.01$ )가 관찰되었다.

한편 HMC05 시험물질의 24시간 처리에 의해서도 이상증기상(gap 제외)의 빈도는 음성 대조군 및 시험물질의 모든 처리군에서 모두 0.0으로 이상증기상의 빈도는 통계학적 증가를 나타내지 않았다. 나아가 시험물질 처리군의 배수체(PP) 및 핵내배화(ER)의 빈도에서도 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 0.0으로 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 그러나 양성 대조군에서 이상증기상(gap 제외)의 빈도는 21.0으로 유의한 증가( $p < 0.01$ )가 관찰되었다(Table 7, 8).

Table 7. Chromosome Aberration Test of HMC05 Treatment for 6 or 24 Hrs in the Absence of S-9 Mix

Dose of HMC05 (mg/ml) <sup>a</sup>	Treatment schedule (hours) <sup>b</sup>	Mean aberrant metaphases <sup>c</sup>	Mean total aberrations <sup>c</sup>	Mean of PP + ER	RCC(%)
0		0.0 / 0.0	0.0 / 0.0	0.0 + 0.0	100
1,250	6-18	0.5 / 0.0	0.5 / 0.0	0.0 + 0.0	104
2,500		1.0 / 0.0	1.0 / 0.0	0.0 + 0.0	98
5,000		0.5 / 0.5	0.5 / 0.5	0.0 + 0.0	103
EMS 800		29.0 / 26.0 <sup>**d</sup>	31.5 / 27.0	0.0 + 0.0	73
0		0.0 / 0.0	0.0 / 0.0	0.0 + 0.0	100
1,250	24-0	0.0 / 0.0	0.0 / 0.0	0.0 + 0.0	97
2,500		0.0 / 0.0	0.0 / 0.0	0.0 + 0.0	90
5,000		0.5 / 0.0	0.0 / 0.0	0.0 + 0.0	92
EMS 600		24.0 / 21.0 <sup>**d</sup>	26.5 / 22.5	0.0 + 0.0	70

\*\* : significantly different from the control at  $p < 0.01$ . a : nominal concentration of the Test Article. b : treatment time - recovery time. c : gaps included/excluded, means of duplicate cultures. 100 metaphases were examined per culture. d : fisher's exact test. PP : polyploid. ER : endoreduplication. EMS : ethylmethanesulfonate. RCC : relative cell counts.

Table 8. Individual Chromosome Aberration Test of HMC05 Treatment for 6 or 24 Hrs in the Absence of S-9 Mix

Dose of HMC05 (mg/ml)	Treatment schedule (hours) <sup>a</sup>	Number of aberrant metaphases <sup>b</sup>	Number of total aberrations <sup>b</sup>	Number of findings/100 metaphases							
				Gap	Chromosome type		Chromatid type		Other	PP + ER	
					DEL	EXC	DEL	EXC			
0 (A)	6-18	0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0	
0 (B)		0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0	
1,250 (A)		0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0	
1,250 (B)		1 / 0	1 / 0	1	0	0	0	0	0	0 + 0	
2,500 (A)		1 / 0	1 / 0	1	0	0	0	0	0	0 + 0	
2,500 (B)		1 / 0	1 / 0	1	0	0	0	0	0	0 + 0	
5,000 (A)		1 / 1	1 / 1	0	0	0	0	1	0	0 + 0	
5,000 (B)		0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0	
EMS 800 (A)		32 / 30	34 / 30	4	0	0	2	28	0	0 + 0	
EMS 800 (B)		26 / 22	29 / 24	5	0	0	3	21	0	0 + 0	
0 (A)		24-0	0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0
0 (B)			0 / 0	0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0
1,250 (A)	0 / 0		0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0	
1,250 (B)	0 / 0		0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0	
2,500 (A)	0 / 0		0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0	
2,500 (B)	0 / 0		0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0	
5,000 (A)	0 / 0		0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0	
5,000 (B)	0 / 0		0 / 0	0	0	0	0	0	0	0 + 0	
EMS 800 (A)	25 / 23		29 / 25	4	0	0	1	23	1	0 + 0	
EMS 800 (B)	23 / 19		24 / 20	4	0	0	1	16	3	0 + 0	

a : treatment time - recovery time. b : gaps included/excluded, 100 metaphases per culture. DEL : deletion. EXC : exchange. PP : polyploid. ER : endoreduplication. EMS : ethylmethanesulfonate.

## 고찰 및 결론

안전성이 확보되지 않은 의약품의 오·남용으로 인한 독성 및 부작용이 사회적으로 문제가 되고 있고, 한의약의 역시 유전독성으로부터 안전성이 충분히 검토되지 않아 한의약제제 개발에 있어서 식품의약품안전청의 '의약품 등의 독성시험 기준'(제2005-60호)에 준한 유전독성의 평가는 매우 중요하다.

유전독성(genotoxicity)은 세포 유전자 물질인 DNA 및 염색체가 물리화학적 요인 또는 생리적인 요인에 의하여 직접 손상을 받아 형태학적 및 기능적 이상을 일으키는 현상으로 유전독성 시험은 발암성은 물론 유전병의 원인을 예측하는 중요한 평가로서 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상 시험, 세균을 이용한 복귀 돌연변이 시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험이 있다.

HMC05는 半夏 1.5 : 白朮 2 : 天麻 1 : 陳皮 1 : 茯苓 1.5 : 山楂 1.5 : 豨薟 1.5 : 黃連 1.5 의 비율로 조성된 고혈압과 동맥경화의 예방 및 치료 등 심혈관질환의 치료를 목표로 개발된 복합제제(특허 제10-0577674호/ 10-0787174호)이다. 본 제제는 健脾祛痰하고 清熱燥濕의 효능에 근거하여 실험적으로 혈관확장을 통한 항고혈압 효능<sup>1)</sup>, apoE<sup>-/-</sup> 생쥐에서의 항동맥경화 효능<sup>2)</sup>, 혈관 내피세포에서의 항염증 효능<sup>3)</sup> 물론 제제의 표준화 연구로서 hesperidin, coptisine,

palmitine 및 berberine의 지표성분<sup>3)</sup>이 밝혀졌다.

본 연구는 식품의약품안전청고시 '의약품 등의 독성시험 기준'(제2005-60호)에 근거하여 HMC05의 환취에서의 단회 및 4주 경구투여 독성시험<sup>58)</sup>에 기초한 후속 연구로서 유전독성에 대한 자료를 확보하기 위하여(CHL 세포를 이용하여 대사활성계(S-9 mix) 적용(+S)의 6시간 및 대사활성계 비적용(-S9)의 6시간 또는 24시간 HMC05 시험물질을 처리하고 처리개시 24시간 후에 염색체 검체를 제작하여 HMC05의 염색체이상 시험을 수행하였다.

HMC05의 CHL 세포를 이용한 대사활성계 적용(+S) 및 비적용(-S)하의 예비 실험에서 5,000  $\mu$ g/ml의 농도에서 세포독성이 유발되지 않아 본 실험에서 5,000  $\mu$ g/ml의 농도를 최고 농도로 하여 시험을 실시하였다. 본 연구에서 CHL 배양세포를 HMC05의 시험물질에 노출시킨 다음 세포분열의 중기상태로 만들어 염색체 이상을 관찰한 결과, 대사활성계 적용군(+S) 및 대사활성계 비적용군(-S)에서 HMC05 처리(1,250, 2,500, 5,000  $\mu$ g/ml)에 의한 육안으로 관찰 가능한 혼탁이나 침전은 관찰되지 않았다. 또 염색체형과 염색체분형의 절단(deletion) 및 교환(exchange)으로 구분하여 염색체이상을 계수한 결과, 대사활성계 적용군에서 HMC05 시험물질을 6시간 처리한 경우와 대사활성계 비적용군(-S)의 6시간, 24시간 처리에 의하여 유사분열의 중기에서 염색체의 수나 구조의 변화에 의한 이상을 가진 중기상의 출현빈도는 유의한 변화

가 없었다. 나아가 HMC05 시험물질의 처리에 의한 배수체(PP) 및 핵내배화(ER)의 빈도에서도 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 그러나 CPA나 EMS를 처리한 양성대조군의 경우에는 음성대조군에 비해 이상중기상(aberrant metaphase)의 유의한 양성 반응( $p < 0.01$ )을 관찰할 수 있다.

이상의 결과로 보아 HMC05는 본 시험조건 하에서 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약연구개발사업(B080031) 및 동국대학교 학술지원사업비의 지원으로 수행되었음

## 참고문헌

1. Moon KJ, Jang HO, Kim GW, Shin HM. Signaling mechanism on the vascular relaxation of HMC05. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2008 ; 22(2) : 315-20.
2. Kim KM, Choi JY, Yoo SE, Park MY, Lee BS, Ko YH et al. HMC05, Herbal Extract, Inhibits NF- $\kappa$ B Expression in Lipopolysaccharide Treated Macrophages and Reduces Atherosclerotic Lesions in Cholesterol Fed Mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007 ; 114 : 316-24.
3. Lee JS, Park SY, Thapa D, Kim AR, Shin HM, Kim JA. HMC05, Herbal Formula, Inhibits TNF- $\alpha$ -induced Inflammatory Response in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2009 ; Sep 7(in publish).
4. Kim SH, Choi EJ, Lee KY, Sung SH, Shin HM. Simultaneous determination of alkaloids and flavonoids in HMC05 preparation by HPLC-DAD. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, Ethnopharmacology*. 2008 ; 31 : 2917-26.
5. 신흥목. HMC05의 흰쥐를 이용한 단회경구투여 독성시험. *동의생리병리학회지*. 2008 ; 22(6) : 1562-5.
6. Korea Food and Drug Administration : the Standards of Toxicity Study for Medicinal Products, Notification No. 2005 ; 2005-60.
7. Korea Food and Drug Administration : Good Laboratory Practice Regulation For Nonclinical Laboratory Studies, Notification No. 2005 ; 2005-79.
8. 신흥목. HMC05의 Sprague-Dawley 흰쥐를 이용한 4주 반복 경구투여 DRF 독성시험. *대한한의학회지*. 2009 ; 30(5) : 102-14.
9. Korea Food and Drug Administration : Good Laboratory Practice, Notification No. 2009 ; 2009-19.
10. OECD. OECD Principles on Good Laboratory Practice. 1997.
11. Koyama H, Utakoji T, Ono T. A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue. *GANN*. 1970 ; 61 : 161-7.
12. Ishidate M Jr, Sofuni T, 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.
13. Dean and Danford. Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells, in: *Mutagenicity testing a practical approach*. IRL press Limited. 1984 ; 187-232.
14. OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, TG No. 473. "In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test". 1997.
15. Japanese environmental mutagen society-mammalian mutagenicity study group. *Atlas of chromosome aberration by chemicals*. Tokyo. Japan. 1988.
16. Richardson C, Williams DA, Allen JA, Amphlett G, Chanter DO, Phillips B. Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In : *statistical evaluation of mutagenicity test data* (Kirkland DJ ed). Cambridge, UK : Cambridge University Press. 1989 ; 141-54.
17. Lovell DP, Anderson DR, Albanese GE, Amphlett G, Clare R, Ferguson M, Richold DG, Papworth Savage JRK. Statistical analysis on In Vivo Cytogenetic Assays, In : *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data* (Kirkland DJ ed.), Cambridge, UK : Cambridge University Press. 1989 ; 184-232.
18. Park SH, Cho SS, Kim SS. SPSS for statistical analyses (in Korean). SPSS Academy. 1999.