

새로운 플라보노이드 유도체인 DA-6034에 대한 유전독성에 관한 연구

강병철^{1*} · 권은아¹ · 이나래¹ · 안병옥² · 김원배² · 이상구¹ · 이국현¹ · 정진호¹ · 성명훈¹

¹서울대학교병원 임상의학연구소, ²동아제약 (주) 연구소

Genotoxicity Studies of DA-6034, a New Flavonoid Derivative

Byeong-Cheol Kang^{1*}, Euna Kwon¹, Na-Rae Lee¹, Byoung Ok Ahn², Won Bae Kim²,
Sang-Koo Lee¹, Kook-Hyun Lee¹, Jin Ho Chung¹ and Myung-Whun Sung¹

¹Laboratory for Experimental Animal Research, Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, 28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-744, Korea

²Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd., 47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up, Yongin-si, Kyunggi-do 449-900, Korea

(Received September 24, 2002)

(Accepted November 12, 2002)

ABSTRACT : Inflammatory bowel disease (IBD) is a multifactorial disorder with unknown etiology and pathogenesis. Eupatilin, a kind of flavonoids, has been known to be effective for chronic diarrhea in Korea. In this study, we have investigated the genotoxicity of DA-6034, a new synthetic derivative of Eupatilin, using in vitro and in vivo system such as Ames reverse mutation test, chromosomal aberration test and micronucleus test. In Ames reverse mutation test, DA-6034 treatment at the dose range up to 5,000 µg/plate did not induced mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537 with and without metabolic activation. Any significant aberration wasn't observed in chinese hamster lung(CHL) fibroblast cells treated with DA-6034 at the concentration of 5, 2.5, 1.25 mg/ml both in the absence and presence of metabolic activation system. In mouse micronucleus test, no significant increase in the occurrence of micronucleated polychromatic erythrocytes was observed in ICR male mice orally administered with DA-6034 at the doses of 2.0, 1.0, 0.5 g/kg. These results indicate that DA-6034 has no mutagenic potential under the conditions in this study.

Key Words : Genotoxicity, DA-6034, reverse mutation, chromosomal aberration, micronucleus

I. 서 론

Flavonoids 화합물은 저분자량으로 과일이나 야채 및 음료수 등에 꽤 넓게 존재하며 수많은 유도체가 알려져 있다. 이들 화합물은 항균작용, 항바이러스 작용, 혈관계 조절작용, 간보호작용, 항염증 및 항알러지 작용, 항암작용, 항산화작용 등 다양한 생물활성들이 보고되고 있으며, 작용기전 또한 활발히 연구되고 있다(Lee *et al.*, 1998; Jang *et al.*, 1998).

만성염증대장염 질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 궤양성 대장염(Ulcerative colitis)과 크론병(Crohn's disease)으로 분류되며 지난 수십년간 전세계적으로 많은 연구자들에 의해 연구되어오고 있으나 이러한 노력에도 불구

하고 이 질환의 병인과 병태생리 및 효과적인 치료는 여전히 불분명한 상태이다. 증상의 악화와 회복단계를 반복하는 특징을 지닌 만성질환으로 장기간 치료를 요하는 IBD 질환은 만족할 만한 치료법이 없는 상태이며 최근 우리나라에서 도 발생빈도가 높아지고 있는 추세이므로 임상분야에서 관심이 고조되고 있다(Son *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998).

DA-6034는 동아제약(주)에서 합성한 새로운 flavonoid 인 eupatilin의 합성유도체로서 강력한 장질환 억제작용을 나타내는 물질이다(Lee *et al.*, 1998). DA-6034는 염증성 장질환 치료제 신약 후보물질로서, 만성염증성 장질환 모델인 TNBS-Induced IBD model, DDS-induced IBD model, acetic acid-induced IBD model에서 prednisolone 보다 유사한 효력을 나타내었고, sulfasalazine 보다 우수한 효력을 나타내었으며, 이러한 효력은 경구투여와 직장내투여, 정맥주사 모두에서 나타내었다(Son *et al.*, 1998;

*To whom correspondence should be addressed

Jang *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999). 사람의 염증질환과 관련있는 HLA-B27 유전자를 발현시킨 만성염증모델인 HLA-B27 transgenic rat model에서 6주 투여시 prednisolone 보다 우수한 효력을 나타내었고 특히 조직학적으로 우수한 효력을 나타내었다(Kim *et al.*, 1999). 염증성 장질환의 항염증 작용의 작용기전에 대해서는 연구 중에 있으며, flavonoid 계열 화합물들이 갖는 5-lipoxygenase 활성 억제작용과 장점막 보호 작용 등의 활성을 나타내었으며 염증과 관련된 signal trasduction pathway에서의 영향을 연구 중에 있다.

본 연구에서는 동아제약(주)에서 염증성 장질환 치료제로 개발된 DA-6034에 대한 유전독성시험의 일환으로 *Salmonella typhimurium* 균주를 이용한 복귀돌연변이시험, Chinese hamster lung fibroblast를 이용한 염색체이상시험 및 ICR 마우스의 골수세포를 이용한 소핵시험을 의약품등의 독성시험기준(식품의약품안전청 고시 제1999-61호)에서 정하는 요건에 적합하게 계획하여 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질 및 시약

본 시험에 사용한 DA-6034는 동아제약(주) 연구소에서 제조된 순도 99.5%의 노란색의 결정성 분말로서 기밀용기로 냉암소에 보관하여 사용하였다. 시험물질인 DA-6034는 약산성으로 물에는 잘 녹지 않으나 DMSO에는 녹는 성질을 갖고 있다. 그러나 DMSO에 용해된 시험물질이 배지의 수분과 만날 경우 침전물을 형성하는 경향이 있어, 복귀돌연변이시험과 염색체이상시험에서는 배양 및 실험 진행에 어려움이 있을 것으로 판단하여 시험물질을 0.1 N NaOH(Sigma)에 포화용해시켰다. 시험물질을 0.1 N NaOH에 포화용해할 경우 pH 또한 7.0에 가까운 수치로 시험계에 미치는 영향을 최소화하고, 희석단계에서는 pH 변화를 막기 위해 용매인 0.1 N NaOH 대신에 PBS(phosphate buffer saline, pH 7.0)로 희석하여 사용하였다. 마우스를 이용한 소핵시험에서는 매체물질인 5% HPMC(Hydroxypropyl Methylcellulose, Shin-Etsu Chemical, Japan) 용액으로 혼탁시켜 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. *Salmonella typhimurium* 균주를 이용한 복귀돌연변이시험

1) 시험용 균주

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* Strain TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537 주는 식품의약품안전청에서 미국 캘리포니아대학 B. N. Ames 교수로부터 직접

분양받아 계대배양하여 -80°C에 보관 중이던 균주를 분양 받아 사용하였다. 각 균주는 본 시험에 앞서 histidine 요구성, crystal violet 감수성, UV 감수성, ampicillin 내성, 자발복귀돌연변이 빈도 등의 유전적 특성을 확인하였다.

2) 시험물질 및 대조물질

DA-6034는 최고용량을 5,000 µg/plate로 0.1 N NaOH에 완전용해시킨 후 PBS로 일정한 공비(×1/2)로 희석하여 5 단계의 농도를 설정하되 시험물질의 액량이 0.1 ml/plate가 되도록 조정하였다. 예비독성시험결과 5,000 µg/plate의 농도에서 시험물질에 의한 세포독성을 보이지 않아 본시험에서의 최고농도로 설정하였다. 양성대조물질 중 sodium azide(SA, Sigma), mitomycin C(MMC, Sigma)는 3차 중 류수에, 9-aminoacridine(9-AA, Sigma), 2-nitrofluorene (2-NF, Aldrich), 2-aminoanthracene(2-AA, Sigma)는 DMSO에 용해하여 사용하였다.

3) 복귀돌연변이시험

시험은 Ames 방법(Ames *et al.*, 1975; Maron *et al.*, 1983, Kristien *et al.*, 2000)을 참고하여 그에 준하여 비교적 감도가 높은 preincubation 법으로 수행하였다. -80°C의 DMSO 동결보존한 각 균주를 해동시켜 nutrient broth (Becton Dickinson)에 접종한 후 37°C에서 10시간 동안 180회/분의 속도로 진탕배양하였다. 각 균주의 배양액 0.1 ml, 각 농도의 시험물질 0.1 ml, 인산완충액(0.2 M phosphate buffer, pH 7.4) 0.5 ml을 첨가하여 혼합한 후 37°C water bath에서 30분간 preincubation을 하였다. 이 때 대사활성화법에서는 인산완충액 대신 rat의 S-9 혼합액(10% v/v, Oriental Yeast Co. Ltd.) 0.5 ml을 첨가하였다. 그 후 top agar 2.0 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후 minimal glucose agar plate에 중층하여 37°C에서 48시간 배양 후 복귀변이 콜로니 수를 계수하였다. 균의 생육저해 및 시험물질의 침전, 분출의 관찰은 실체현미경을 이용하여 40배의 배율로 모든 플레이트를 관찰하였고, 각 용량 당 3매의 플레이트를 사용하였다. 시험물질을 처리한 모든 균에서 복귀변이 접락수가 음성대조에 비하여 2배 이상 증가하고, 용량의존성을 보이며 현저한 증가를 보이는 경우 양성으로 판단하였고, 음성대조군과 각 용량군 사이의 유의성을 Kruskal-Wallis test를 이용하여 검정하였다.

3. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

1) 시험용 세포주

시험에 사용된 Chinese Hamster Lung Fibroblast cell line(CHL)은 서울대학교 수의과대학으로부터 분양받아 형질검사 후 서울대학교병원 임상의학연구소에서 유지하던

것을 사용하였다. NaHCO_3 2.2 g, 1% Penicillin-streptomycin와 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)이 첨가된 Minimum Essential Medium(Gibco)을 사용하였고, 5% CO_2 가 공급되는 37°C 배양기 내에서 배양하였고 매 2~3일마다 0.25% Trypsin-EDTA solution으로 계대배양하였다.

2) 시험물질 및 대조물질

DA-6034를 0.1 N NaOH에 50 mg/ml 농도로 용해하여 시험물질 원액을 조제한 후 PBS로 일정한 공비(1/2)로 희석하여 사용하였으며, 배양액에 첨가되는 시험물질은 최종농도가 10%(v/v)가 되도록 하였다. 시험물질의 처리농도를 정하기 위하여 세포독성시험방법 중 Neutral red test를 S9 혼합액(10% v/v, Oriental Yeast Co. Ltd.) 존재하와 부재하에서 실시하여 처리 최고농도인 5 mg/ml에서 독성이 나타나지 않아 이를 본시험의 최고농도로 설정하였다. 최고농도를 포함하여 일정한 공비(1/2)로 희석하여 3단계의 시험물질처리군 및 양성대조군, 용매대조군으로 시험군을 구성하여 용량마다 2개의 플라스크를 사용하였다. 직접법의 양성대조물질인 Mitomycin C(MMC)는 3차 중류수에, 대사활성법에 사용되는 Cyclophosphamide· H_2O (CPA)는 DMSO에 용해하여 최종농도가 각각 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 사용하였다.

3) 염색체이상시험

25 cm² 플라스크당 1×10^5 세포를 5 ml의 배양액으로 파종하여 약 3일간 배양한 후, 간접법인 대사활성효소계 적용 처리군의 경우 신선한 배양액 4 ml, 시험물질액 0.5 ml 및 S-9 mix 0.5 ml을 분주, 합계 5 ml이 되도록 처리하였으며, 직접법인 대사활성효소계 미적용 처리군의 경우 신선한 배양액 4.5 ml, 시험물질액 0.5 ml을 분주하여 합계 5 ml이 되도록 각각 처리하였다. 시험물질은 간접법에서는 6시간, 직접법은 6시간 및 24시간 동안 적용하였고, 6시간 동안 시험물질을 적용하는 경우 처리종료 시각에 처리액을 제거하고 신선한 배양액으로 교환하여 18시간 더 배양하였다. 모든 플라스크에 대해 분열증기세포 수거 2시간 전에 colcemid를 최종농도 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 처리하고, 시험물질 처리 개시 후 24시간에 분열증기세포를 수거하였다. 수거한 분열증기세포를 저장액(0.075 M KCl)으로 37°C 수육상에서 15분간 처리 후 냉각된 고정액(메틸알콜 : 빙초산 = 3 : 1 v/v)으로 3회 고정시킨 후 염색체 표본을 만들고 5% Giemsa 염색 후 현미경으로 관찰하였다. 각 농도군당 200개의 중기상으로부터 결과를 해석하고, 결과해석을 위해 구조이상과 숫적이상으로 나누어 계수하였다(Ishidate *et al.*, 1977, Ivett *et al.*, 1989).

구조적 이상은 염색체(chromosome) 이상과 염색분체(chromatid) 이상에 대해 각각을 결손형(deletion), 교환형(exchange)으로 분류계수하였고, 이상중기상 및 염색체 이

상의 빈도는 gap을 포함한 경우와 제외한 경우를 병기하였다. 수적 이상은 동원체에 따라 diploid(DP, 23-36 동원체), polyploid(PP, 37≤동원체) 및 핵내배화(ER, endoreduplication)로 분류, 그 수를 기록하였다. 염색체이상을 가진 분열 중기상의 빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였고, 통계처리방법으로는 이상중기상의 빈도와 (PP + ER)의 출현빈도에 대한 용매대조군과 시험물질처리군 및 음성대조군과 양성대조군간의 유의차는 χ^2 검정법을 이용하여 검정하였다.

4. 마우스 골수 세포를 이용한 소핵시험

1) 실험동물

SLC 社(Japan)로부터 수컷 6주령 ICR 마우스를 구입하여 약 2주간의 검역 및 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 선발하여 사용하였다. 사육환경은 온도 22±2°C, 상대습도 50±10%, 환기회수 12~18회/hr, 조명 12시간, 조도 150~300 lux로 유지하였으며, polycarbonate 케이지(200×260×120 mm, (주)엠제이엘티디 제작)에 사육상자 당 5마리씩 사육하였다. 사료는 실험동물용 고형사료((주)퓨리나코리아)를 감마선조사멸균하여 자유급이하였으며, 음수는 상수도수를 고온고압멸균(autoclave)하여 공급하였다.

2) 시험물질 및 대조물질

DA-6034는 급성독성시험에서 최대내성용량(Minimum Tolerance Dose, MTD)이 체중 kg당 5 g 이상으로 설정되었으나, 시험물질의 물리적 투여한계와 3일 연속투여로 할 경우 총 투여용량이 5 g/kg B.W를 넘게 되어 급성독성의 자료를 이용하기에 불충분하므로 최고용량을 2 g/kg B.W로 설정하였다. 약산성으로 물에 대한 용해도가 낮으므로 매체물질인 5% HPMC(Hydroxypropylmethylcellulose, Shin-Etsu Chemical., Japan) 용액에 마우스 체중 kg 당 10 ml의 부피가 되도록 혼탁하여 사용하였다. 양성대조물질인 MMC(Mitomycin C, Sigma)는 3차 중류수에 녹여 마우스 체중 kg 당 2 mg/10 ml의 용량으로 제조하여 사용하였다.

3) 소핵시험

시험은 Schmid 방법(Schmid *et al.*, 1975, Gopala *et al.*, 2000)에 따라 실시하였다. 최고농도를 포함하여 일정한 공비(1/2)로 희석하여 3단계의 시험물질투여군 및 음성대조군과 양성대조군을 두어 군 당 5마리로 시험하였다. 음성대조군에는 부형제만을 투여하였다. 시험물질의 시간요소에 따른 영향을 고려하여 음성대조군과 시험물질투여군은 1일 1회, 3일간 경구투여한 후 최종투여 24시간 경과 후에

검체를 제작하였고, 양성대조군은 복강내로 단회투여 후 24시간 경과시 검체를 제작하였다. 대퇴골 내부를 FBS로 씻어 골수세포 혼탁액을 얻어내었고, 원심분리(1,000 rpm, 5 min)하여 상청액을 버린 후 최종 혼탁액을 슬라이드글라스에 도말하여 실온전조 후 메탄올에서 5분 고정하여 Giemsa 염색을 하였다. 각 개체마다 3배씩 슬라이드를 제작하여 1000배의 광학현미경(BX40, Olympus, Japan)으로 관찰하였고, 소핵의 계수는 각 개체 당 2000개의 다염성 적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE)에 대해서 소핵의 유무를 검색하여 1000개의 PCE에 대한 소핵다염성적혈구(Micronucleated Polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도를 구하였다. 동시에 골수세포의 중식억제지표로 다염성적혈구(PCE)에 대한 정염성적혈구(Normochromatic erythrocyte, NCE)의 출현빈도를 구하였다. 소핵 이상의 판정은 소핵다염성적혈구의 수가 통계학적으로 유의성있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응이 나타날 경우를 소핵유발성이 있다고 하고 총 적혈구 중 다염성 적혈구비가 30%이하로 되었을 때를 조혈기능 억제 등의 세포독성이 있다고 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 복귀돌연변이 유발 효과(Table 1)

Salmonella typhimurium 균주 TA98, TA100, TA102,

Table 1. Reverse mutation test of DA-6034 in *Salmonella typhimurium*

S-9 mix	Compounds	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	His+ revertant colonys/plate					
			TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537	
S-9 mix (-)	DA-6034	Vehicle	0.1 N NaOH	12 \pm 2	131 \pm 7	352 \pm 12	8 \pm 3	14 \pm 2
		312.5	14 \pm 1	143 \pm 24	309 \pm 30	9 \pm 2	8 \pm 3	
		625	14 \pm 3	114 \pm 11	331 \pm 10	12 \pm 1	10 \pm 1	
		1,250	16 \pm 2	129 \pm 3	351 \pm 12	10 \pm 2	6 \pm 2	
		2,500	12 \pm 1	126 \pm 2	350 \pm 2	9 \pm 2	9 \pm 1	
		5,000	13 \pm 1	117 \pm 7	360 \pm 12	10 \pm 4	5 \pm 2	
S-9 mix (+)	Positive control	compounds	2-NF	NaN ₃	MMC	NaN ₃	9-AA	
		concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	10.0	5.0	0.5	0.5	80.0	
		No. of colonies/plate	212 \pm 31*	825 \pm 39*	1,459 \pm 390*	162 \pm 10*	400 \pm 42*	
S-9 mix (+)	DA-6034	Vehicle	0.1 N NaOH	25 \pm 6	141 \pm 12	448 \pm 40	10 \pm 5	17 \pm 3
		312.5	26 \pm 3	127 \pm 14	456 \pm 20	10 \pm 2	14 \pm 4	
		625	22 \pm 2	131 \pm 11	451 \pm 6	7 \pm 2	15 \pm 1	
		1,250	18 \pm 2	132 \pm 6	438 \pm 4	7 \pm 2	18 \pm 2	
		2,500	20 \pm 2	138 \pm 3	452 \pm 10	6 \pm 2	11 \pm 1	
		5,000	18 \pm 2	162 \pm 13	510 \pm 12	12 \pm 1	12 \pm 3	
S-9 mix (+)	Positive control	compounds	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
		concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.5	1.0	5.0	2.0	2.0	
		No. of colonies/plate	91 \pm 6*	406 \pm 62*	983 \pm 259*	53 \pm 16*	80 \pm 9*	

Each value represents mean \pm S.D (n = 3); 2-NF: 2-nitrofluorene, NaN₃: sodium azide, MMC: Mitomycin C, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene.

*Significantly different from the control (P < 0.05).

TA1535, TA1537를 이용하여 수행한 DA-6034의 Ames test 결과를 Table 1에 제시하였다. 최고용량인 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 을 포함한 2,500, 1,250, 625, 312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 모든 농도에서 대사활성화 여부에 관계없이, DA-6034를 처리한 모든 시험군에서 생육저해가 관찰되지 않았다. 또한 음성대조군과 비교하여 시험물질처리군에 있어서 콜로니 수의 증가 및 시험물질의 농도 증가에 따른 용량의존적 콜로니 수의 증가는 관찰되지 않았으며, 음성대조군과 각 시험물질 용량군 사이의 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다. 또한 용매물질(0.1 N NaOH)만을 처리한 음성대조치는 자발복귀돌연변이 수치와 비교하여 유의한 차를 나타내지 않았으며, 각 군주에 대한 양성대조치 또한 음성대조치의 2배 이상으로 본 시험의 음성대조치 및 양성대조치의 수치가 적절함을 확인하였다. 따라서 DA-6034는 *Salmonella typhimurium* 균주를 이용한 복귀돌연변이시험을 통해 유전독성을 평가한 결과 변이원성이 없는 것으로 사료된다.

2. 염색체이상시험(Table 2)

DA-6034의 염색체이상시험 결과를 Table 2에 제시하였다. 용량당 200개의 세포의 분열 중기상 염색체를 관찰한 결과, 최고용량인 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 을 포함한 2,500, 1,250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 모든 농도에서 대사활성화 여부에 관계없이, DA-6034를 처리한 모든 시험군에서 음성대조군과 비교하여

Table 2. Chromosome aberration test of DA-6034 in CHL cells

Compounds	Concentration (ug/ml)	without(–) or with(+) S-9 mix	Time (hour)	Aberration frequency (%)				Total aberration (%)	Extra aberrations (%)				
				Chromosome		Chromatid			ctg	csg	poly	endo	
				Del	Ex	Del	Ex						
DA-6034	0.1 N NaOH	0	+ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Media	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,250			0	0	0	0	0	1*	0	0	0	
	2,500			0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5,000			0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	CPA	5		0	0	0	5±7.07*	5±7.07*	0.5±0.71*	0	0	0	
DA-6034	0.1 N NaOH	0	- 6	0	0	0	0	0	0.5±0.71*	0	0	0	
	Media	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,250			0	0	0	0	0	0.5±0.71*	0	0	0	
	2,500			0	0	0	0	0	1*	0	0	0	
	5,000			0	0	0	0	0	0.5±0.71*	0	0	0	
	MMC	0.03		0	0	0.5±0.71*	5.5±3.54*	6±4.25*	0.5±0.71*	0	0	0	
DA-6034	0.1 N NaOH	0	- 24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Media	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,250			0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2,500			0	0	0	0	0	0.5±0.71*	0	0	0	
	5,000			0	0	0	0	0	1.5±2.12*	0	0	0	
	MMC	0.03		0	0	0.5±0.71*	3*	3.5±0.71*	0	0	0	0	

*Significant different from control ($p < 0.05$).

Del: Deletion, Ex.: Exchange, ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, poly: polyploid, endo: endoreduplication, CPA: cyclophosphamide, MMC: mitomycin C, The values are expressed as mean±S.D.

통계적으로 유의한 염색체의 구조적 이상 및 수적 이상이 관찰되지 않았고, 처리군의 염색체 이상이 시험물질의 농도 증가에 따른 용량의 존적 증가를 보이지 않았다. 또한 extra aberration에서도 시험물질 처리군의 염색체 이상은 용량의 존적으로 증가하지 않았다. 결론적으로, 염색체 이상 시험을 통해 DA-6034의 유전독성을 평가한 결과, DA-6034는 CHL cell에서 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 판정되었다.

3. 소핵시험(Table 3)

마우스를 이용한 소핵시험에서 시험 전 기간을 통해 DA-6034를 2 g/kg까지 투여한 모든 동물에서 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상, 행동이상, 사망례

등은 관찰되지 않았다. 또한 각 시험군간에 유의한 체중변화도 관찰되지 않았다. 소핵 발생빈도에 관한 결과는 Table 3에 제시하였다. 1000개의 다염성적혈구(PCE)에 대한 소핵다염성적혈구(MNPCE)의 출현빈도를 구한 결과 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 유의한 증가 및 시험물질의 용량 의존적인 증가는 관찰되지 않았다. 동시에 다염성적혈구(PCE)에 대한 정염성적혈구(NCE)의 출현빈도를 구한 결과 정염성적혈구(NCE)의 증가 및 다염성적혈구(PCE)의 감소가 관찰되지 않아 골수세포의 증식 억제효과가 없는 것으로 사료되었고, 또한 음성대조군과 비교하여 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다. 따라서 DA-6034는 ICR 마우스를 이용한 소핵시험을 통해 유전독성을 평가한 결과 소핵유발성이 없는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 염증성 장질환 치료제로 개발중인 DA-

Table 3. Micronucleus test in mice orally treated with DA-6034.

Compounds	Dose (g/kg B.W.)	Route	Frequency of admin.	Sampling time	No. of animal	MNPCE ^a	PCE/PCE + NCE ^b
DA-6034	5% HPMC	i.p.	3	72 hr	5	1.6±0.4	0.534±0.015
	0.5	i.p.	3	72 hr	5	2.7±0.8	0.539±0.012
	1.0	i.p.	3	72 hr	5	1.9±1.2	0.562±0.029
	2.0	i.p.	3	72 hr	5	2.5±0.5	0.562±0.014
MMC	0.002	i.p.	1	24 hr	5	12.9±2.3*	0.459±0.007*

Each value represents mean±S.D.

*MNPCE (Micronucleated polychromatic erythrocyte) was calculated from 1000 polychromatic erythrocytes (Mean±S.D.).

PCE: Polychromatic erythrocyte, NCE: Normochromatic erythrocyte.

*Significantly different from the control ($p < 0.05$).

6034에 대한 전임상시험으로서 *Salmonella typhimurium* 균주를 이용한 복귀돌연변이시험 및 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험, 그리고 *in vivo* 시험인 마우스를 이용한 소핵시험의 유전독성시험을 수행하였다. 이상의 결과를 통하여 DA-6034는 유전독성을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2000년도 서울대학교병원 정책연구비에 의하여 수행되었으며, 실험에 도움을 주신 동아제약(주) 연구소의 김동환님께 감사드립니다.

참고문헌

- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975): Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the *Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test*, *Mutation Research*, **31**, 347-364.
- Dean, B.J. and Danford, N. (1984): Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In: *Mutagenicity testing - a practical approach*. IRL Press Limited., England., pp. 187-232.
- Hayashi, M., Yoshimura, I. Sofuni T and Ishidate, Jr. M. (1989): A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control, *Environ. Mol. Mutagen.*, **13**, 347-356.
- Hayes, A.W. (1994): *Principles and Methods of Toxicology* (3rd edition), Raven Press, New York, pp. 545-578.
- Ishidate, Jr. M. and Odashima, S. (1997): Chromosome tests with 134 compounds on chinese hamster cells in vitro-a screening for chemical carcinogens, *Mutation Research*, **48**, 337-354.
- Ivett, J.L., Brown, B.M., Rodgers, C., Anderson, B.E., Resnick, M.A. and Zeiger, E. (1989): Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro*. IV. Results with 15 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **14**(3), 165-187.
- Kim, Y.S., Kim, T.H., Jung, H.C., Song, I.S., Kim, C.Y., Ko, J.I., Son, M.W. and Kim, W.B. (1999): The oral therapy of flavonoids derivative DA-6034 in the experimental animal models of inflammatory bowel disease, *The Korean J. of Gastroenterology*, **34**, 317-329.
- Kim, Y.S., Son, M.W., Ko, J.I., Cho, H., Yoo, M.H., Kim, W.B., Song, I.S. and Kim, C.Y. (1999): Effect of DA-6034, a derivative of flavonoid, in experimental animal models of inflammatory bowel disease. *Archives of Pharmacol Research.*, **22**(4), 354-360
- Krishna, G., Urda, G. and Paulissen, J. (2000): Historical Vehicle and Positive Control Micronucleus Data in Mice and Rats, *Mutation Research*, **453**, 45-50.
- Krishna, G. and Hayashi, M. (2000): *In Vivo Rodent Micronucleus Assay: Protocol, Conduct and Data Interpretation*. *Mutation Research*, **455**, 155-166.
- Lee, J.J., Son, M.W., Yoo, M.H., Jang, M.S., Kim, W.B. and Lee, K.C. (1998): Analysis of DA-6034, a new flavonoid derivative in biological fluids by HPLC. *Yakhak Hoeji.*, **42**(2), 149-152.
- Maron, D.M. and Ames B.N. (1983): Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test, *Mutation Research*, **113**, 173-215.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000): The Ames *Salmonella/Microsome Mutagenicity Assay*. *Mutation Research*, **455**, 29-60.
- Schmid, W. (1975): The Micronucleus test. *Mutation Research*, **31**, 9-15.
- Son, M.W., Ko, J.I., Kim, H.K., Jang, D.K., Yoo, M.H., Kim, W.B., Lee, K.C. and Song, I.S. (1998): Effect of DA-6034, a new flavonoid derivative, on TNBS-induced colitis in the rat. *Yakhak Hoeji.*, **42**(2), 205-213.
- 장동경, 진영주, 정현체, 송인성, 김정룡, 손미원, 유무희 (1998) 흰쥐의 Trinitrobezene sulfonic acid(TNBS) 유발성 대장염에서 flavonoid계 Eupatilin 유도체 DA-6034의 효과, *대한내과학회지*, 제55권, 제3호, 302-309.
- 白須泰彥, 吐山豊秋 (昭和63年), 新毒性試験法 - 方法と評價 變異原性試験 Realize inc. pp. 260-287.