

# Rec assay 및 효소학적 방법을 이용한 감궁탕의 안전성평가

손윤희 · 백태선 · 문지선 · 김미경 · 김철호<sup>1</sup> · 전병훈<sup>2</sup> · 남경수\*

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구소,  
1: 동국대학교 한의과대학 생화학분자생물학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

## Evaluation of Safety with Gamgung-tang Using Rec assay and Enzymatic Methods

Yun Hee Shon, Tae Seon Baek, Ji Sun Moon, Mee Kyung Kim, Cheorl Ho Kim<sup>1</sup>, Byung Hun Jeon<sup>2</sup>, Kyung Soo Nam\*

Department of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Disease Research Center, Dongguk University.  
1: Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Oriental Medicine, Dongguk University.  
2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Gamgung-tang(GGT) that is included in Gamdu-tang(consists of Glycyrrhizae Radix, black beans) and Gunggui-tang(consists of Angelicae Radix and Cnidii Rhizoma), showed therapeutic effects of autoimmune thyroiditis in the previous reports. GGT was tested for the safety using Rec assay and enzymatic methods. In the Rec assay, *Bacillus subtilis* H-17(Rec<sup>+</sup>) and M-45(Rec<sup>-</sup>) strains were used to test DNA damage activity. From the results, there was no DNA damage of GGT. Hepatotoxicity of GGT to female ICR mice was also monitored by the measurements of serum(s)-GOT, s-GPT and LDH activities after oral feeding for 15 days. GGT was not shown any significant changes of s-GOT, s-GPT and LDH activities in mice sera.

Key words : Gamgung-tang, DNA damage, Rec assay, Hepatotoxicity

### 서 론

감궁탕(Gamgung-tang, GGT)은 감초, 천궁, 당귀 및 흑두로 구성된 복방으로 이전의 연구결과에서 흰쥐의 thyrocyte인 FRTL 세포에서 cytokine-induced cytotoxicity를 억제하고 MHC class II antigen과 관련된 세포사멸 방지등의 효능을 가지며<sup>1)</sup> 또한 감궁탕 가미방이 갑상샘 기능장애에 효능이 있음을 보고하였다<sup>2)</sup>. 감궁탕과 갑상선기능저하증 및 자가항체와의 상관성에 관한 연구는 진행중이며<sup>3,4)</sup>, 최근에는 자가면역성 갑상선기능저하증의 실험적 유도(experimental autoimmune thyroiditis)에는 thyroglobulin에서 당을 제거한 non-glycosylated thyroglobulin이 갑상선기능저하증 유발의 핵심임이 밝혀졌다<sup>5)</sup>. 따라서 감궁탕을 이용한 갑상선기능저하증의 치료를 위해서라면 환자는 장기간 감궁탕 구성생약에 노출되어야 하기때문에 감궁탕의 안전성에 관한실험은 반드시 필요하다.

일반적으로 생약은 구전에 의한 민간요법으로 사용의 폭

이 비교적 넓고 장기간 투여되기 쉽다. 따라서 생약이 인체에 적용될 경우에는 치료효과는 물론 그 약물의 인체에 대한 안전성도 매우 중요하다. 특히 감궁탕의 경우 남성보다는 여성에게 처방될 확률이 높아, 그 구성약물들은 약성이 온화하더라도 임신중인 여성에게도 사용될 수 있는 약물이어서 경우에 따라서는 태아에까지도 그 영향을 줄 수 있다고 판단됨으로 안전성 평가에 대한 의의는 아무리 강조해도 지나치지 않는다. 이전에도 본 연구실에는 암예방 활성 및 면역증강 활성을 갖는 수종의 생약들과 기능성식품에 대해 안전성, 항암 및 항돌연변이원성 등을 보고한 적이 있다<sup>6-11)</sup>.

본 연구에서는 감궁탕에 대하여 그 안전성평가를 위한 독성 실험의 일환으로 DNA손상성 유무에 대한 실험을 행하였다. 고초균(*Bacillus subtilis*)을 이용한 Rec assay법으로 감궁탕의 DNA 손상 유무를 조사하고 실제로 마우스에 투여 했을 경우 마우스의 간세포에 미치는 영향을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 시약

\* 교신저자 : 남경수, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 의과대학  
· E-mail : namks@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2412  
· 접수 : 2004/11/26 · 수정 : 2004/12/27 · 채택 : 2005/01/28

본 실험에 사용한 시약중 B-2 broth, yeast extract 및 agar는 Difco사 (Detroit, MI, U.S.A.)의 제품을 그리고 AF-2(furylfuramide)는 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 사용하였다. 한편 혈청중 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic pyruvate transaminase (GPT)의 활성도 및 lactate dehydrogenase(LDH) 활성도는 kit제품(아산제약주식회사, 한국)을 사용하였다. 그외 사용된 모든 시약들은 Sigma사 및 Wako사의 특급제품들을 사용하였다.

2. 균주 및 실험동물

본 실험에 사용한 *Bacillus subtilis*의 Rec<sup>+</sup>(H17) 야생균주와 Rec<sup>-</sup>(M45) DNA 손상성 수복능결여 균주는 경상북도 보건환경연구원(대구, 한국)에서 분양받아 사용하였다. 실험동물은 8 주령의 자성 ICR mouse (체중 20-25 g)를 대한실험동물센터(충북, 음성)에서 구입하여 본 대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도 20±2℃, 습도 40~60%)하에서 7일간 안정시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험시작 전 까지 사료와 물은 자유로이 먹게 하였다.

3. 감공탕의 조제<sup>12)</sup>

감공탕(감초 15 g, 흑두 15 g, 당귀 15 g, 천궁 15 g) 60 g에 증류수 400 ml를 가한 후, 3시간 전탕하여 추출하고 여과하였다. 여액을 rotary evaporator로 전량을 200 ml가 되도록 감압농축한다. 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 한 다음, 저온에서 24시간 방치한 후 membrane filter (0.22 μm, 직경 25 mm, Whatman®, Germany)로 여과 멸균하여 시료로 사용하였다. 여액 1 ml당 30 mg의 추출물을 얻었다.

4. Rec-assay에 의한 DNA 손상성 검토

배지는 B-2 육즙배지 10 g, 효모추출물 10 g 및 NaCl 5 g을 증류수 1,000 ml에 완전히 녹인 후, pH 7.0으로 조정해서 고압멸균한다<sup>13,14)</sup>. 고형배지 조제를 위해서는 한천분말을 1.5 % 되도록 가한다. 조제한 배지를 적당히 건조시킨 다음 배지표면에 1 ml 피펫으로 Rec<sup>+</sup> (H17, *Bacillus subtilis*의 야생균주) 및 Rec<sup>-</sup>(M45, *Bacillus subtilis*의 DNA 손상성 수복능 결손균주) 균을 streak한다. 시료를 용매인 증류수에 녹여 직경 12 mm의 멸균여지 disk에 균등히 퍼지게 한 다음, 시료를 흡수시킨 disk를 Rec<sup>+</sup> 와 Rec<sup>-</sup> 균을 길게 그은 기점에 덮어서 37℃에서 24시간 배양시킨다. 이때 용매인 물을 음성대조군으로, 양성대조군으로는 저지대의 길이가 잘 알려진 AF-2를 사용하였다.

5. 감공탕이 자성 마우스의 간에 미치는 영향

자성 ICR 마우스를 각 군당 10마리로 하여 물을 15일간 자유로이 먹도록 한 군과 감공탕을 2배 희석(1.5 g/100 ml)하여 15일간 먹인 군에서 혈액을 채취하여 혈청을 대상으로 몇가지 간경변 지표의 변화를 측정하였다. 혈청중 GOT(s-GOT) 및 GPT(s-GPT)의 활성도는 혈청중 transaminase측정용 kit를 사용

하여 Reitman-Frankel법에 의하여 측정하였다. 그리고 GOT, GPT의 활성도는 표준곡선에의해 활성치를 계산하여, 혈청 1 ml 당 Karmen unit로 표기하였다. 또한 혈청중 LDH의 활성도는 LDH 측정용 kit를 사용하여 효소법(젓산기질법)에 의하여 측정하였으며, LDH의 활성도는 표준혈청으로 작성한 표준검량곡선에 의해 계산하여 Wroblewski unit로 표기하였다.

실험결과 및 고찰

1. Rec-assay에 의한 DNA 손상성 검토

미생물의 DNA 손상회복 방법은 크게 나누어 excision repair와 recombination repair의 2가지의 형이 있는데 전자가 결여된 균을 Hcr<sup>-</sup> 변이주라 하며, 후자가 결여된 균을 Rec<sup>-</sup> 라고한다. 본 실험에서 사용한 고초균(*Bacillus subtilis*)의 Rec<sup>-</sup> (M45)는 DNA에 손상이 생기면 그 손상을 수복할 수 없기 때문에 수복능을 갖는 Rec<sup>+</sup>(H17)에 비하여 변이원에 노출 되었을 때 쉽게 죽는다. 여기서 야생균주와 수복능 결여균주와의 치사감수성을 비교 조사함으로써 DNA 손상성 유무를 간단히 알 수 있다. Rec assay에 의한 실험결과를 Table 1에 나타내었다. 감공탕을 흡착시킨 멸균 disc(직경 12 mm)의 기점에서 균이 성장한 점까지의 길이를 측정하여 Rec<sup>+</sup> 와 Rec<sup>-</sup>균의 저지대의 차이가 2.0 mm 이상일 때 DNA손상성이 있는 것으로 판정하였다. 양성대조군인 AF-2를 사용한 경우는 5.1 mm의 생육 저지현상이 나타났으며 물을 사용한 경우에는 DNA손상에 의한 생육저지 현상을 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 감공탕의 경우에는 3.0 mg/ml, 30 mg/ml 및 150 mg/ml의 농도에서 Rec<sup>+</sup> 및 Rec<sup>-</sup>의 저지대가 나타나지 않는 것으로 봐서 본 감공탕에 의한 DNA손상성은 관찰되지 않음을 알 수 있었다(Table 1).

Table 1. Evaluation of mutagenicity of Gamgung-tang by the Rec assay.

Groups	Concentration(mg/ml)	Length of inhibition zone(mm)	
		M45(Rec <sup>-</sup> )	H15(Rec <sup>+</sup> )
H <sub>2</sub> O		0.0±0.0	0.0±0.0
AF-2 <sup>a</sup>	5μg/30μl	5.1±0.3 <sup>b</sup>	0.5±0.0
Gamgung-tang	3	0.0±0.0	0.0±0.0
	30	0.0±0.0	0.0±0.0
	150	0.0±0.0	0.0±0.0

<sup>a</sup>AF-2 is positive control that is well known to its inhibition length. <sup>b</sup>More than 2 mm of inhibition zone. Each value represents the mean±SD of three experiments.

2. 혈청 GOT 및 GPT 활성도의 측정

생약처방에서는 각 생약 특유의 배당체가 다량 용출되어 나오므로 실제로 사람이 처방약을 장기간 복용할 때 각 생약에서 추출되어지는 여러 배당체들로 인한 인체의 여러 장기중 특히 간손상을 우려하지 않을 수 없다. 본 실험에서는 15일간 감공탕을 음료대신 먹게한 자성 ICR 마우스의 혈청을 대상으로 간세포 이상의 지표로 널리 측정하고 있는 s-GOT 및 s-GPT를 측정하여 간세포에 미치는 작용을 알아 보았다. Table 2에 그 결과를 나타낸 바와 같이 감공탕을 투여한 군에서는 물을 투여한 음성대조

군에 비해 s-GOT 및 s-GPT의 활성이 약간 증가하였으나 통계적으로 유의성이 없었다. 따라서 감공탕 투여기간중에는 간세포에는 별다른 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

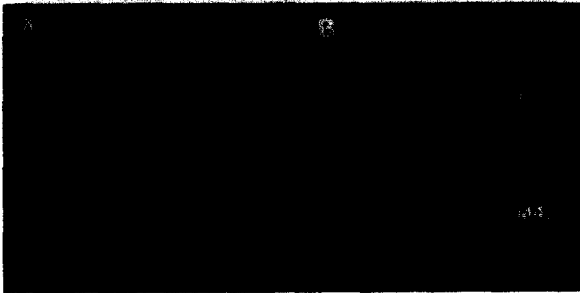


Fig. 1. Rec assay of Gamgung-tang. A : Positive control (AF-2)  
B : Negative control (H<sub>2</sub>O)

### 3. 혈청 LDH 활성도의 측정

LDH는 대표적인 혈청 비특이적인 효소로서 5종류의 isoenzyme이 있으며 그 종류에 따라 장기특이성이 있으나 본 실험에서는 혈청중의 total enzyme을 사용하였으므로 간질환, 심근경색, 심폐질환 및 기타 혈액질환의 유무를 알아내는 지표로 사용하였다. Table 2에 그 결과를 나타낸 바와 같이 감공탕을 투여한 군에서는 물을 투여한 음성대조군에 비해 LDH의 활성에는 별다른 변화가 관찰되지 않았다. 그러므로 감공탕투여 기간중 s-GOT, s-GPT 및 LDH의 활성에는 유의성있는 변화를 보이지 않으므로 간세포에는 별다른 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

Table 2. Effects of Gamgung-tang on GOT, GPT and LDH enzyme activities in mice.

Groups	GOT activity	GPT activity	LDH activity
	Karmen unit	Wröblewski unit	
Control	89.68±10.10	41.94±5.28	951.41±112.43
Gamgung-tang	91.45±9.11	44.63±3.69	988.62±76.44

## 결 론

감공탕의 안전성 평가를 위하여 DNA 손상성 및 간세포독성 유무를 알아보기 위해 미생물(*Bacillus subtilis*)과 마우스를 사용하여 확인하였다. Rec assay의 경우 감공탕은 실험에 사용한 각 농도에서 *Bacillus subtilis*의 DNA에는 별다른 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 감공탕에 대한 간독성을 알아보기 위한 실험에서 마우스 혈청중의 효소 s-GOT, s-GPT 및 LDH의 활성에는 유의성 있는 증가가 보이지않아 투여기간 중 간세포에는 별다른 영향을 미치지 못하였다. 따라서 감공탕은 DNA와 간 손상에는 별다른 영향을 미치지 못하는 비교적 안전한 생약처방으로 평가된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원 (01-PJ9-PG1-01CO04-0002)에 의해 이루어졌음으로 이에 감사드립니다.

립니다.

## 참고문헌

- Shon, Y.H., Lee, H.S., Lim, J.K., Kim, C.H., Jeon, B.H. and Nam, K.S. Effect of herbal medicines on cytokine-induced cytotoxicity and MHC class II antigen expression in rat thyroid cells. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 371-374, 2004.
- 최호승, 김영목, 임종국, 손유희, 남경수, 김철호, 전병훈. 감공탕 가미방이 갑상샘 기능장애에 미치는 효과. *동의생리병리학회지* 17, 648-655. 2003.
- 손유희, 김철호, 전병훈, 남경수. Thyroglobulin에 대한 단일 클론항체의 혈소판응집 저해작용. *동의생리병리학회지* 18, 534-537, 2004.
- 남경수, 손유희, 백태선, 김철호, 임종국, 황철원. Anti-thyroglobulin monoclonal antibody의 제작 및 특성. *한국생명과학회지* 12, 460-463, 2002.
- 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. Induction of an autoimmune thyroiditis by deglycosylated thyroglobulin induction of a Tc1-mediated experimental autoimmune thyroiditis by deglycosylated porcine thyroglobulin. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 26, 355-372, 2004.
- Nam, K.S., Choi, Y.R. and Shon, Y.H. Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide : Rec, Ames and Umu assays. *Biotechnology letters* 23, 971-975, 2001.
- Shon, Y.H. and Nam, K.S. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *J of Ethnopharmacology* 77, 103-109, 2001.
- Shon, Y.H., Kim, S.Y., Lee, J.S., Lim, J.K. and Nam, K.S. Antimutagenic effects of soybeans fermented with basidiomycetes 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx). *Journal of Microbiology and Biotechnology* 11, 346-349, 2001.
- Kim, S.Y., Shon, Y.H., Lee, J.S., Kim, C.H. and Nam, K.S. Antimutagenic activity of soybeans fermented with basidiomycetes in Ames/Salmonella test. *Biotechnology letter* 22, 1197-1202, 2000.
- Shon, Y.H., Lee, J.S., Lee, H.W. and Nam, K.S. Antimutagenic potential of *Phellinus igniarius*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 9, 525-528, 1999.
- Shon, Y.H., Ha, Y.M., Jeong, T.R., Kim, C.H. and Nam, K.S. Antimutagenic effects of chitosan oligosaccharides 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline (MeIQx). *J. Biochem. Molecular Biology* 34, 90-94, 2001.
- 錢百炎. 中草藥注射劑, p.71-130, 上海科學技術出版社, 中國, 1981.

13. Kada, T., Tutikada, K. and Sadale, Y. *In vitro* and hostmediated "rec-assay" procedures for screening chemical mutagens: and phloxine. A mutagenic Red dye detected. *Mutat. Res.* 16, 165-174, 1972.
14. 田島疆太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶. 環境變異原實驗法, 47-69, 講談社, 東京, 1980.