

Ames 및 *umu* assay를 이용한 감궁탕의 안전성평가

손윤희 · 김철호¹ · 남경수*

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구소, ¹동국대학교 한의과대학 생화학분자생물학교실

Received January 31, 2005 / Accepted March 25, 2005

Evaluation of Safety with Gangung-tang Using Ames and *umu* Assays. Yun Hee Shon, Cheorl Ho Kim¹ and Kyung Soo Nam*. *Department of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Disease Research Center, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea, Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea* – Gangung-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 effect of autoimmune thyroiditis in the previous reports. GGT was tested for the safety using Ames and *umu* gene expression mutagenicity tests. In Ames test, *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 were used to identify mutagenic property, and the number of histidine revertants was measured. In SOS *umu* test, *Salmonella typhimurium* TA1535 containing plasmid pSK1002 was used as a test strain, and we monitored the levels of *umu* operon expression by measuring the β -galactosidase activity. Mutagenic activity in any assays we tested was not found. After treating S-9 mixture with GGT, mutagenic activity was also not found. The results of this study suggested that there was no DNA damage and mutagenicity of GGT.

Key words – Gangung-tang, mutagenicity, Ames test, SOS *umu* test

생약은 일반적으로 사용의 폭이 비교적 넓고 장기간 환자에게 적용되기 쉽다. 따라서 생약처방이 인체에 적용될 경우 치료 효과는 물론 그 처방의 안전성도 매우 중요하다. 감궁탕(Gangung-tang, GGT)은 감두탕(감초, 흑두)과 궁귀탕(궁귀, 당귀)으로 구성된 복합으로 이전의 연구결과에서 흰쥐의 thyrocyte인 FRTL세포에서 cytokine-induced cytotoxicity를 억제하고 MHC class II antigen과 관련된 세포사멸 방지등의 효능을 가지며 [13], 또한 감궁탕가미방이 갑상샘 기능장애에 효능이 있음을 보고하였다[1]. 최근에는 자가면역성 갑상선기능저하증의 실험적 유도(experimental autoimmune thyroiditis)에는 thyroglobulin에서 당을 제거한 non-glycosylated thyroglobulin이 갑상선기능저하증 유발의 핵심임이 밝혀졌다[7].

감궁탕의 경우 그 구성약물들은 약성이 온화하여 임신중인 여성에게도 사용될 수 있는 처방이어서 경우에 따라서는 태아에까지도 그 영향을 줄 수 있다고 판단됨으로 안전성 평가에 대한 의의는 아무리 강조해도 지나치지 않는다. 또한 처방에 의해 구성된 복합은 개개의 생약이 이미 안전성이 확보되었다고 하더라도 복용시 체내에서 복합적으로 대사되어 나타나는 영향에 대해서는 아직 연구가 미흡하다. 이전의 실험에서 감궁탕은 *Bacillus subtilis*균을 이용한 Rec assay에서 DNA 손상성이 없으며 마우스의 간에도 별다른 독작용을 나타내지 않는 것으로 나타났으나[11], 감궁탕을 이용한 갑상선기능저하증(hypothyroidism)에 대한 효율적인 치료를 위해서라면 환자는 장기

간 구성생약들에 노출되어야 하기때문에 감궁탕의 돌연변이원성 및 발암성 유무에 관한 실험은 반드시 필요하다. 이전에도 본 연구실에서는 생약 및 기능성식품에 대한 항암 및 항돌연변이원성에 대해 보고한 적이 있다[8,12,14].

본 연구에서는 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*)을 이용한 Ames test 및 *umu* test로 감궁탕의 돌연변이원성을 조사하였다.

재료 및 방법

시약

본 실험에 사용한 시약중 agar와 tryptone은 Difco (Detroit, MI, U.S.A.)의 제품을 그리고 L-histidine, biotin, glucose, ampicillin, glucose-6-phosphate, NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), Na₃N₃, NPD (4-nitro-o-phenylenediamine), B[a]P (benzo[a]pyrene), AF-2 (furylfuramide) 및 2-AA (2-aminoanthracene)는 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 사용하였다. 한편 SOS *umu* test용 kit는 오츠카제약사(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였으며 그의 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 SD계 웅성 흰쥐(체중 150 g 내외)를 대한실험동물센터(충북, 음성)에서 구입하여 본 대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도 20±2°C, 습도 40~60%)

*Corresponding author

Tel : +82-54-770-2412, Fax : +82-54-770-2477

E-mail : namks@dongguk.ac.kr

하에서 7일간 안정시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험시작 전 까지 사료와 물은 자유로이 먹게 하였다.

감궁탕의 조제(18)

감궁탕(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 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.

Salmonella typhimurium TA series에 의한 돌연변이원성 검증

Salmonella typhimurium TA98 및 TA100을 본 실험에 사용하였다[16]. 이 균주들은 매 실험 직전 histidine 요구성, deep rough (rfa)돌연변이, uvrB돌연변이, R factor등의 유전형질을 확인한 후 실험에 사용하였다. 먼저 Vogel-Bonner citrate medium E (agar 1.5 g을 증류수 1,000 ml에 녹인 후, 50배의 VB salts 2.0 ml 및 40% glucose 5.0 ml를 첨가) 배지를 멸균하여 잘 섞은 뒤 plate를 만든다. 고압멸균한 100 ml top agar (agar 0.6 g, NaCl 0.5 g) 당 여과멸균한 0.5 mM L-histidine · HCl · H₂O와 0.5 mM biotin 용액을 각각 10 ml씩 혼합하여 사용하였다. 45°C의 top agar 2 ml에 최종 24시간 배양한 균 현탁액을 0.1 ml (1~2×10⁹ cells/ml) 가했으며, microsomal activation system을 사용할 경우에는 S-9 mixture를 100 µl 및 각 농도의 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. 시료용액은 모두 사용직전에 조제하여 사용하였다.

S-9 mixture의 조제

S-9 mixture를 조제[4]하기 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 개방한 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 1).

SOS umu test에 의한 돌연변이원성 시험

본 실험에서는 umu test kit를 사용하여 다음과 같이 측정하였다[9,10]. 먼저 냉동 보관중인 TGA (tryptone 10 g, NaCl 5 g, glucose 2 g, ampicillin 20 mg/1,000 ml 증류수) 배양액 10.4 ml를 실온(10~25°C)에서 용해하여 umu test용 균(Salmonella typhimurium 1535/pSK 1002)에 넣어서 교반하고 10분간 정지시킨 다음, 37°C에서 3시간 배양하였다. 위의 과정동안 양성대조물질인 AF-2 (0.9 µg/ml)와 S-9 처리용 양성대조물질인 2-AA (30 µg/ml), 음성대조물질인 5% DMSO 및 농도별 시료를 96 well plate에 10 µl씩 분주하였다. 그리고 S-9 mixture 동결건조품에 멸균증류수 1 ml를 넣고 잘 교반한 후, 적정량의 균액과 혼합하여 준비한다. 준비가 완료되면 균액을 well당 100 µl씩 분주하고, microsomal activation system을 사용하는 경우에는 위에서 준비한 S-9 mixture를 well당 100 µl씩 분주하여, 37°C에서 2시간 배양시킨다. 그 후 37°C에서 예열한 발색기질액(O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 4 mg/0.1 M phosphate buffer pH 7.0)을 100 µl씩 분주하고, 다시 37°C에서 1시간 배양시킨다. 배양이 완료되면 반응정지액(1 M Na₂CO₃)을 100 µl씩 가하여 반응을 종결시키고, 2~3분간 정지하여 색조를 안정시킨 다음, OD_{620nm}에서 흡광도를 측정한다. 결과 판정은 음성대조에 비하여 흡광도가 2배 이상 높으면 그 검체는 돌연변이원성을 보유하고 있는 것으로 판정하고, 반면 음성대조보다 흡광도가 오히려 낮을 경우에는 검체가 균의 생육을 저해한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

갑상선기능저하증(hypothyroidism)은 남성보다 여성에게

Table 1. Composition of S-9 mixture

Components	Quantity per ml	Volume per ml	Final concentration
S-9 fraction	300 µl	300 µl	30%
MgCl ₂	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	

다발하는 질환으로 기초체온 저하, 성장 및 발육저하등을 동반하는 자가면역성질환(autoimmune disease)인 경우가 많다. 지금까지는 갑상선호르몬의 기능을 대신할 수 있는 약물들이 치료제로 복용되어지고 있으나 심계항진, 빈맥 그리고 심근경색등의 부작용을 동반함으로 문제를 야기하고 있다[3]. 따라서 예비실험에서 활성이 확인된 갑초, 천궁, 당귀 및 흑두를 사용하여 감궁탕을 조제하고 그 효능을 검토한 결과 갑상선세포의 기능저하를 개선하는 효능이 확인되었기에 치료용 약물로 처방될 수 있어 그 독성평가가 반드시 필요한 실정이다. 생약은 과거 경험적 혹은 문헌적으로 안전하다고 인정되어온 약제 혹은 처방일지라도 실험적인 방법에 의한 안전성 평가가 필요하다고 보여진다.

인체에 유전자독성 및 암을 일으키는 물질중 85% 이상이 환경중에 존재하는 화학물질이 원인이 된다는 보고[2,15,17]가 있어 사람들이 일상생활에서 손쉽게 접하게되는 의약품(생약 포함), 식품, 농약등을 비롯한 많은 화학물질의 발암성 유무를 단시일 내에 검색하는 일은 매우 중요한 일이라 생각된다. 현재 우리나라를 비롯해 미국, 일본 및 유럽등에서도 안전성 평가방법 가운데 시료물질의 발암성 유무와 유전자에 미치는 영향을 검색하는 것이 필수적으로 규정되어 있다. Ames등에 의해 기존의 발암성물질의 약 90% 이상이 세균에 대해서도 돌연변이원성을 가진다는 보고 이래[5,6], 세균을 사용한 돌연변이원성 실험이 발암성 물질검출의 단기 스크리닝법으로서 세계적으로 가장 널리 이용되고 있다.

Salmonella typhimurium TA series에 의한 돌연변이원성 검토

Salmonella typhimurium TA98 및 TA100을 사용하여 감궁탕의 돌연변이원성을 실험한 결과를 Table 2에 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 때문

에 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 활성화된 후 작용을 나타내는 경우도 많이 있다. 이를 위해서 미생물에 일종의 약물대사 효소계인 S-9 mixture (Table 1)를 가해 시료가 대사를 받은 후에 돌연변이원성의 유무를 아울러 알아보고자 하였다. S-9 mixture를 첨가하지 않았을 경우에는 음성대조군을 DMSO (5%)로, 양성대조군은 TA98에는 NPD를, TA100에는 NaN₃를 각각 사용하였다. 감궁탕의 각 농도(3.0 mg/ml, 30 mg/ml 및 150 mg/ml)에서 TA98 및 TA100은 revertant colony 수가 각각의 음성대조군의 수준으로 나타났으므로 돌연변이원성이 없는 것으로 판정하였다. 한편 S-9 mixture를 첨가한 경우에서도 음성대조군을 DMSO (5%)로, 양성대조군은 TA98에는 NPD를, TA100에는 NaN₃를 각각 사용하였다. Table 2에 나타낸 바와 같이 S-9 mixture의 존재하에서는 revertant colony수가 S-9 mixture를 첨가하지 않은 경우보다는 다소 증가했으나 각 농도에서 음성대조군 정도 밖에 나타나지 않음으로 감궁탕은 대사가 된 후에도 돌연변이원성이 없는 것으로 판단되었다.

SOS umu test에 의한 돌연변이원성 시험

Salmonella typhimurium 1535/pSK 1002를 사용하여 감궁탕 물추출액의 돌연변이원성을 관찰한 것이 Table 3이다. 음성대조군(5% DMSO)에 비해 β-galactosidase활성이 2배 이상 증가할 때 돌연변이원성이 있는 것으로 판정하였다. 음성대조군의 β-galactosidase활성이 S-9를 첨가하지 않았을 경우 0.127인데 비해 AF-2로 유도한 효소활성은 0.1 μg/ml이상의 농도에서는 0.268이상이므로 돌연변이원성을 관찰할 수 있었다. 한편 감궁탕의 경우에는 모든 농도에서 0.180이하로 나타남으로 돌연변이원성이 나타나지 않았다. 한편, S-9를 첨가시킨 경우에서는 음성대조군에서 0.101의 흡광도를 보였으며 2AA를 투여한 양성대조군의 경우에는 1.1 μg/ml이상의 농도부터 돌연변이원성이 나타남을 알았다. 그러나 감궁탕의 경우에는 실험농도

Table 2. 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 ^a	149 ± 11	35 ± 3	139 ± 9
NPD	0.1	409 ± 49	-	-	-
NaN ₃	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

^aValues are mean±SD (standard deviation) of three experiments, each plated in triplicate.

Table 3. Assay of mutagenicity in the SOS *umu* test.

Groups	Concentration	β -galactosidase activity (OD 630 nm)	
		-S-9	+S-9
Negative Control (5% DMSO)		0.127 \pm 0.017 ^a	0.101 \pm 0.009
Positive Control (AF-2)	0.90 μ g/ml	0.348 \pm 0.031	-
	0.30 μ g/ml	0.331 \pm 0.029	-
	0.10 μ g/ml	0.268 \pm 0.022	-
	0.03 μ g/ml	0.177 \pm 0.021	-
	0.01 μ g/ml	0.144 \pm 0.017	-
Positive Control (2AA)	30 μ g/ml	-	0.618 \pm 0.071
	10 μ g/ml	-	0.501 \pm 0.067
	3.3 μ g/ml	-	0.337 \pm 0.048
	1.1 μ g/ml	-	0.242 \pm 0.031
	0.37 μ g/ml	-	0.192 \pm 0.024
Gangung-tang	3 μ g/ml	0.160 \pm 0.019	0.166 \pm 0.020
	30 μ g/ml	0.181 \pm 0.025	0.173 \pm 0.019
	150 μ g/ml	0.174 \pm 0.010	0.181 \pm 0.013

Two-fold increase in β -galactosidase activity above the control levels was defined to be positive. ^aValues are means \pm SD for triplicate experiments.

에서 흡광도는 음성대조군의 2배 이하로 나타나 돌연변이원성이 없다고 판정되었다. 또한 S-9를 첨가한 경우에서도 돌연변이원성이 없는 것으로 판정되었다(Table 3).

요 약

감궁탕의 돌연변이원성을 유무를 알아보기 위해 *Salmonella typhimurium* TA 98 및 TA100을 이용한 돌연변이원성 실험에서도 감궁탕은 어느 균에서도 돌연변이원성을 나타내지 않았으며, 이는 S-9 mixture에 의해 감궁탕이 대사가 된 후에도 이와 유사한 경향을 나타내었다. 또한, SOS *umu* test의 경우에서도 β -galactosidase활성에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 보아 감궁탕은 돌연변이원성을 일으키지 않는 것으로 판정되었으며 S-9 mixture 처리에 의한 대사 후에도 이와 유사한 실험결과가 나타났다. 따라서 감궁탕은 그 자체 및 대사 후에도 DNA에 별다른 영향을 미치지 못하는 비교적 안전한 생약처방으로 여겨진다.

감사의 글

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

참 고 문 헌

1. Choi, H.S., Y.M. Kim, J.K. Kim, Y.H. Shon, K.S. Nam, C.H. Kim and B.H. Jeon. 2003. Effects of Gangung-tang Gamibang

on 3,5,3-triiodothyronine- induced hyperthyroidism in rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* **17**, 648-655.

2. Doll, S.R. 1977. Strategy for detection of cancer hazards to man. *Nature* **265**, 589-596.

3. Katzung, B.G. 2004. Basic & Clinical Pharmacology pp. 625-640, The McGraw-Hill Com., U.S.A.

4. Maron D.M. and B.N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-215.

5. McCann, J. and B.N. Ames. 1976. Dection of carcinogens as mutagen in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**, 950-954.

6. McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B.N. Ames. 1975. Dection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* microsome test. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 5135-5139.

7. Moon, S.K., B.S. Kang, Y.G. Kim, T.W. Chung, J.R. Kim, B.Y. Cha, J.Y. Moon, J.K. Lim, Y.H. Shon, K.S. Nam, J.H. Ko, B.H. Jeon and C.H. Kim. 2004. Induction of an autoimmune thyroiditis by deglycosylated thyroglobulin induction of a TcI-mediated experimental autoimmune thyroiditis by deglycosylated porcine thyroglobulin. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **26**, 355-372.

8. Nam, K.S., Y.R. Choi and Y.H. Shon. 2001. Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide : *Rec, Ames and Umu* assays. *Biotechnology letters* **23**, 971-975.

9. Oda, Y., S. Nakamura, I. Oki, T. Kato and H. Shinagawa. 1985. Evaluation of the new (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* **147**, 219-229.

10. Quillardet, P. and M. Hofnung. 1985. The SOS chromatest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures. *Mutat. Res.* **147**, 65-78.

11. Shon, Y.H., J.S. Moon, M.K. Kim, T.S. Baek, C.H. Kim, B.H. Jeon and K.S. Nam. 2005. Evaluation of Safety with Gangung-tang using Rec assay and enzymatic methods. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* **19**, 98-101.

12. Shon, Y.H., J.S. Lee, H.W. Lee and K.S. Nam. 1999. Antimutagenic potential of *Phellinus Igniarius*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **9**, 525-528.
13. Shon, Y.H., H.S. Lee, J.K. Lim, C.H. Kim, B.H. Jeon and K.S. Nam. 2004. Effect of herbal medicines on cytokine-induced cytotoxicity and MHC class II antigen expression in rat thyroid cells. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 371-374.
14. Shon, Y.H. and K.S. Nam. 2001. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *J. of Ethnopharmacology* **77**, 103-109.
15. Sugimura, T. 1985. Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food. *Cancer* **49**, 1970-1984.
16. Tajima, Y. T., Kada, S. Kondo and A. Tonomura. 1980. Experimental method of Chemical mutagens, pp. 56-68, Kodansha, Tokyo, Japan.
17. Wynder, E.L. and G.B. Gori. 1977. Contribution of the environment to cancer incidence: An epidemiologic exercise. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 825-832.
18. 錢百炎. 1981. 中草藥注射劑, pp. 71-130, 上海科學技術出版社, 中國.