

ICR 마우스 골수세포를 이용한 십전대보탕 소핵시험

마진열, 이남헌, 황대선, 하혜경, 유영법, 신현규
한국한의학연구원 한약제제연구부

ABSTRACT

Micronucleus test of *Sipjeondaebo-tang* extract using the bone marrow cells in ICR mice

Jin-Yeul Ma, Nam-Hun Lee, Dae-Sun Huang, Hye-Kyung Ha, Young-Beob Yu, Hyun-Kyoo Shin
Korea Institute of Oriental Medicine

Objectives : This study was to assessment the toxicity of *Sipjeondaebo-tang*(*Shiquan dabu-decoction*) by micronucleus test.

Methods : *Sipjeondaebo-tang*(*Shiquan dabu-decoction*) water-extract in vivo micronucleus test was performed using 7 weeks ICR mice. At 24 hours after with *Sipjeondaebo-tang* extract at the doses of 0, 500, 1000 and 2000 mg/kg/day by peritoneal route mice were sacrificed and bone marrow cells were prepared for smear slides.

Results : As a result of counting the micronucleus polychromate erythrocyte of 2000 polychromate erythrocyte, all treatment groups did not show statistically significant increase than negative control group. and there was no clinical sign and body weight connected with injection of *Sipjeondaebo-tang*(*Shiquan dabu-decoction*) extract.

-
- 교신저자 : 신현규
 - 대전 유성구 전민동 엑스포로 483 한국한의학연구원, 한약제제연구부
 - Tel : 042-868-9464 Fax : 042-868-9471 E-mail : hkshin@kiom.re.kr
 - 접수 : 2008/ 03/ 12 채택 : 2008/ 06/ 05

Conclusions : It was concluded that *Sipjeondaebo-tang* extract did not induce micronucleus in the bone marrow cells of ICR mice

Key word : *Sipjeondaebo-tang*, Shiquan dabu-decoction, micronucleus, polychromate erythrocyte, bone marrow cells

1. 서 론

韓醫學에서 十全大補湯은 補藥의 일종으로 補氣의 四君子湯과 補血의 四物湯을 合方하여 溫陽祛寒의 性質이 있는 黃芪와 肉桂를 加味하여 위로 固表하고 아래로 引火歸元하게 함을 뜻하며 左血右氣와 음양의 쇠함을 온전케 함을 의미한다고 알려져 있다.

十全大補湯은 오랫동안 암치료에 응용되어 왔는데, 항암 화학요법과 방사선치료 및 수술후의 부작용을 줄이고 전이를 억제시키는 것으로 알려져 왔다¹⁻³⁾. 그 외 NK cell 및 NKT cell을 활성화시키고 IFN- γ 생성을 늘려서 항암효과를 가진다는 연구보고가 있었다⁴⁻⁶⁾. 또한 동물실험모델에서 이식된 종양세포의 성장을 억제시킴을 관찰하였고⁷⁾, 그 기전으로는 macrophage, T cell⁸⁻⁹⁾ 및 NKT cell¹⁰⁻¹¹⁾ 이 관여하는 것으로 알려져 있다.

면역학 관련 연구도 많이 이루어졌는데 hematopoietic stem cell 성장을 촉진하고¹²⁾ melanocytic tumor cell 성장의 T cell 매개 억제를 촉진한다는¹³⁾ 연구 결과도 보고되었다. 또한 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ 등의 사이토카인 활성화에 영향을 미친다는 보고가 있었다¹⁴⁻¹⁶⁾.

最近에 효능평가와 별개로 근래 논쟁이 되고 있

는 韓藥處方의 毒性和 安全性 問題에 대한 資料를 확보하기 위하여, 十全大補湯에 대한 유전독성 시험중 소핵시험¹⁷⁻¹⁸⁾을 식품의약품 안전청 고시 제 2005-60호 "비 임상시험 관리기준¹⁹⁾" 및 OECD guidelines²⁰⁾에 따라 수행함으로써 십전대보탕의 遺傳毒性 安全性 評價를 소핵시험을 통하여 實驗적으로 證明하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

韓方處方인 十全大補湯의 韓藥材 구성은 人蔘 (Ginseng Radix Alba), 白朮(Atractylodes Rhizome White), 白茯苓(Poria), 甘草(Glycyrrhizae Radix), 當歸(Angelicae gigantis Radix), 川芎(Cnidii Rhizome), 熟地黃(Rehmannia Radix), 芍藥(Paeoniae Radix), 黃芪(Astragali Radix), 肉桂(Cinnamomi Cortex)로 생산자 및 재배지역이 명확한 한약재를 구입하였다(Table 1). 본 연구에서는 전탕 추출법(한국, 경서추출기 cosmos-600)에 의한 시험물질 조제를 실시하였으며 각 韓藥材 100 g(Table 1)을 8000 ml의 증류수에 넣어 120분간 열탕 추출한 후, 건조분무기(Japan, Eyela SD-1000)를 사용하여 분말 형태로 조제하였다. 이를 투여 직전에 3차 증류수에 용해하여 실험에 공시하였다(수율 16.5%).

Table 1. Origins of ten constituent herbs of *Sipjeondaebo-tang*.

약재명	생산자(수입자)	제조사	소매자
인삼	충청남도 금산군	충남 금산군 금산읍 하옥리 386-22	대전 동구 중동 23-4번지 백제건재도매
백출	강원도 영월군 읍덕포 5리 화림백출	화림제약	부산광역시 남구 용호 3동 377-3 시범공단내 화림제약(주)
백복령	강원도 고성군 거진읍 거진 7리 2반 구강물산	경북 영주시 하망동 548-3 감초당 약업사	서울 동대문구 제기동 837번지 농림생약
감초(灸)	중국	전남여수시 오천동 174-1 신흥제약	전남여수시 오천동 174-1 신흥제약
당귀	강원도 평창군	강원 평창진부 하진부 681-1	강원 평창진부 하진부 681-1
천궁	전북 무주군 설천면 삼거리 226	전북 무주읍 가옥리 631-2 남영제약	전북 무주군 무주읍 가옥리 631-2 남영제약
숙지황	전북 정읍시	전북 정읍시 응동면 칠석리 150-2 칠보 농협 응동제약사	전북 정읍시 응동면 칠석리 150-2 칠보 농협 응동제약사
작약	전라남도 화순군	전남 화순군 능주면 백암리 871-1	전남 화순군 화순읍 교리 243-5 전남생약농업협동조합
황기	강원도 정선군	강원도 정선군 정선읍 봉양리 354-1 정선농협	강원도 정선군 정선읍 봉양리 354-1 정선농협
육계	베트남	부산광역시 남구 용호3동 377-3 시범공단내 화림제약(주)	부산광역시 남구 용호3동 377-3 시범공단내 화림제약(주)

2. 실험동물의 사육조건 및 투여방법

ICR (crjBgi : CD-1)계통 SPF mouse는 소핵 시험에 널리 사용되고 있으며 소핵시험에 대해 축적된 기초자료가 많으므로 본 동물 종을 선택하였다. 입수시 6 주령(25.24 ~ 30.31 g) 숫컷을 (주)오리엔트(경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1)로부터 입수하여 온도 22 ± 3 °C, 습도 30 ~ 70 %, 명암주기 12시간, 환기회수 12 ~ 15 회/시간, 조명 150 ~ 300 Lux,로 관리하였다. 용매대조군 1군 및 투여군 3군과 양성대조군 1군으로 군을 구성하였으며, 5군에 대해 각 군당 6마리의 동물을 사용하였다. 투여방법은 7주령의 마우스에 시험물질 0, 500, 1000 및 2000 mg/kg의 용량으로 1일 복강투여 후, Cyclophosphamide monohydrate(CPA) 1회 투여하여 십전대보탕 추출액의 소핵시험을 평가하였

다(Table 2).

Table 2. Experimental Groups

Group	Number of animal	Volume	Dose (mg/kg)
Vehicle	6	10	0
Test item	6	10	500
Test item	6	10	1000
Test item	6	10	2000
CPA	6	10	70

MG: Extraction of *Sipjeondaebo-tang*(shiquan dabu decoction)

CPA: cyclophosphamide · H₂O (Positive control group)

3. 골수 채취 및 검체 제작

투여농도를 결정하여 1회 시험물질을 복강 투

여하고, 24시간 후에 계획 도살하여 대퇴골을 절취한 후, Fetal bovine serum(FBS) 을 사용하여 대퇴골에서 골수세포를 추출한다. FBS를 사용하여 골수세포를 원심 관에 씻어 모은 후 1000 rpm 에서 5분간 원심 분리시켜 상등액을 버리고 소량의 혈청으로 세포를 현탁 시킨 다음 세포 현탁액을 도말하여 실온에서 건조시킨 후 메탄올로 5분간 고정하였다. 메탄올로 고정된 표본을 acridine orange액 60 µg/mL로 점적하고 cover glass를 덮어서 형광 염색하여 광학현미경으로 표본을 관찰한다.

4. 골수 표본의 관찰방법

표본의 관찰은 맹검법(blind method) 으로 하되 400배 이상 배율에서 형광현미경으로 관찰하였다. 소핵의 판정기준은 관찰 시야에서 핵이 없이 적색 형광 빛을 보이는 것을 다염성 적혈구로 하였다. 정염성 적혈구의 구별은 관찰시야에서 다염성 적혈구의 크기로 형광 빛을 전혀 나타내지 않고 음영으로만 구분되는 것을 계수하였다. 다염성 적혈구중의 소핵출현빈도 및 전체 적혈구중의 다염성 적혈구의 비율을 구하여 세포독성의 지표로 삼았다.

5. 소핵의 판정기준

크기는 제일 큰 것은 적혈구 직경의 1/2로, 제일 작은 것은 식별이 가능한 것까지로 하였으며 형태는 원형이나 기타 도너츠형, 반원형 등을 포함 시켰다. 색깔 근접한 유핵세포의 핵과 동일하게 녹색 형광빛을 띠는 것으로 하였다.

6. 소핵의 계수

세포도말상태가 좋은 곳을 선택하여 다염성 적혈구 (PCE) 2000개에서 소핵을 갖는 세포를 계수

한다. 또 전체 적혈구 (다염성적혈구 및 정염성 적혈구) 100개를 관찰하여 그 중 다염성 적혈구의 비율을 계측하였다.

7. 통계처리

용매대조군에 대한 시험물질의 투여군의 소핵 출현빈도의 유의차 검정은 5 % 유의 수준 에서 실시하였다.

III. 결 과

소핵시험의 결과는 다음의 표(Table 3)와 같았다. 용매대조군의 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 $0.11 \pm 0.03(\%)$ 이었으며, 500 mg/kg 투여군의 소핵출현빈도는 $0.14 \pm 0.04(\%)$, 1000 mg/kg 투여군의 빈도는 $0.10 \pm 0.03(\%)$, 2000 mg/kg 투여군의 빈도는 $0.13 \pm 0.06(\%)$, 양성대조군의 빈도는 $6.37 \pm 0.38(\%)$ 의 빈도를 나타내었다. 즉 시험물질을 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 용매대조군에 비해 모든 투여군에서 소핵출현 빈도는 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 한편 양성대조군에서는 소핵 빈도에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났다($P < 0.01$). 세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 위와 같은 순서로 평균 50.72, 50.58, 50.35, 51.39 및 49.74이었으며, 양성대조군을 제외한 모든 투여군에서도 음성대조군에 비해 통계학적인 차이는 없었다. 일반증상은 모든 시험군에서 부검 당일까지 사망 동물은 관찰되지 않았으며 시험물질투여에 의한 체중변화 및 임상 증상이 나타나지 않았다. 투여시와 부검시의 체중을 비교한 결과 어느 투여군에서도 음성대조군에 비해 통계학적인 유의성은 없었다(Table 4).

Table 3. Micronucleus test of Radachlorin in ICR mice.

Sex	Chemical Treated	Dose(mg/kg)	No. fo Animal	MNPCE/2000PCE's (Mean±S.D.,%)	PCE/(PCE+NCE) (Mean±S.D.,%)
Male	Vehicle	0	6	0.11±0.03	50.72±0.65
	Test item	500	6	0.14±0.04	50.58±1.39
	Test item	1000	6	0.10±0.03	50.35±0.96
	Test item	2000	6	0.13±0.06	51.39±0.96
	CPA	70	6	6.37±0.38*	49.74±0.93

* P<0.01

Vehicle : Water

MNPCE : PCE with one or more micronuclei

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

CPA : Cyclophosphamide (positive control)

Table 4. Body weights of animals

Sex	Chemical Treated	Dose(mg/kg)	Body weights(mean±S.D. g)at the time of	
			Adimistration(No. of animal)	Sacrifice(No. of animal)
Male	Vehicle	0	33.56±1.17 (6)	32.22±1.07 (6)
	Test item	500	33.17±1.30 (6)	31.43±2.04 (6)
	Test item	1000	32.84±1.26 (6)	30.19±0.96 (6)
	Test item	2000	32.99±1.38 (6)	29.31±1.39 (6)
	CPA	70	33.25±1.29 (6)	31.87±1.34 (6)

CPA : Cyclophosphamide (positive control)

VI. 고찰 및 결론

시험물질 십전대보탕의 유전독성을 평가하기 위하여 수컷 마우스 (ICR) 골수세포를 이용한 소핵 시험을 실시하였다. 시험물질 투여 고농도는 2000 mg/kg으로 설정하였으며 1000, 500 및 0 mg/kg의 농도로 6마리 단회 복강 투여하였다. 투여 24시간에 골수세포를 수집하여 소핵유발과 세포독성을 평가하였다. 개체당 2000개의 다염성 적혈구 (Polychromatic Erythrocyte, PCE) 중에 나타나는 소핵을 가진 다염성 적혈구(Micronucleated Polychromatic Erythrocyte, MNPCE)의 수를 계수한 결과 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 나타나

지 않았으며, 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율도 시험물질을 투여한 모든 군에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 따라서 시험물질 십전대보탕은 마우스의 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Saiki I. A Kampo medicine "Juzen-taiho-to" -prevention of malignant progression and metastasis of tumor cells and the mechanism of action. Biol Pharm Bull 2000;23:677-688.
2. Ohnishi Y. Fujii H. Hayakawa Y. Yamamura T. Sakamoto T. Tsukada K. Fujimaki M.

- Nunome S, Komatsu Y, Saiki I. Oral administration of a Kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to inhibits liver metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res*:1998;89:206-213.
3. Saiki I, Yamamura T, Ohnishi Y, Hayakawa Y, Komatsu Y, Nunome S. HPLC analysis of juzen-taiho-to and its variant formulations and their antimetastatic efficacies. *Chem. Pharm. Bull*:1999;47:1170-1174.
 4. Matsumoto T, Sakurai M, H. Kiyohara H, Yamada H. Immunopharmacol. Orally administered decoction of Kampo (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To" modulates cytokine secretion and induces NKT cells in mouse liver. *Immunopharmacol*:2000;46:149-161.
 5. Miyagami M, Katayama Y. Improvement of host-immunity by adjuvant therapy with juzen-taiho-to for patients with brain tumors. *No Shinkei Geka*:2003;31:401-409.
 6. Utsuyama M, Seidler H, Kitagawa M, Hirokawa K. Immunological restoration and anti-tumor effect by Japanese herbal medicine in aged mice. *Mech. Ageing Dev*:2001;122:341-352.
 7. Ohnishi Y, Fujil H, Kimura F, et al. Inhibitory effect of traditional Chinese medicine Juzentailio-to on progressive growth of weakly malignant clone cells derived from murine fibrosarcoma. *Jpn J Cancer Res*:1996;87:1039-1044.
 8. Maruyama H, Takemoto N, Maruyama N, Kornatsu Y, Kawamura H. Antitumor effect of Juzen-taiho-to, a kampo medicine, combined with surgical excision of transplanted Meth-A fibrosarcoma. *Int J Immunother*:1993;9:117-125.
 9. Zhang YH, Kato M, Isobe K, Hamaguchi M, Yokochi T, Nakashima I. Dissociated control by glycyrrhizin of proliferation and IL-2 production of murine thymocytes. *Cell Immunol*.1995;162:97-104.
 10. Ohnishi Y, Fujil H, Kimura F, et al: Inhibitory effect of traditional Chinese medicine Juzentailio-to on progressive growth of weakly malignant clone cells derived from murine fibrosarcoma. *Jpn J Cancer Res*. 1996;87:1039-1044.
 11. Hisha H, Yamada H, Sakurai MH, Kiyohara H, Li Y, Yu C, Takemoto N, Kawamura H, Yamaura K, Shinohara S, Komatsu Y, Aburada M, Ikehara S. Isolation and identification of hematopoietic stem cell-stimulating substances from Kampo (Japanese herbal) medicine, Juzen-taiho-to. *Blood*:1997;90:1022-1030.
 12. Dai Y, Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, Akhand AA, Hossain K, Suzuki H, Nakashima I. T-cell-immunity-based inhibitory effects of orally administered herbal medicine juzen-taiho-to on the growth of primarily developed melanocytic tumors in RET-transgenic mice. *J Invest Dermatol*:2001;117:694-701.
 13. Kiyohara H, Yamada H, Takemoto N, Kawamura H, Komatsu Y, Oyama T. Characterization of in vitro IL-2-production-enhancing and anticomplementary pectic polysaccharides from Kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to. *Phytotherapy Res*:1993;7:367-375.
 14. Iijima K, Sun S, Cyong JC, Jyonouchi H: Juzen-taiho-to, a Japanese herbal medicine, modulates type-1 and type-2 T cell responses in old BALB/c mice. *Am J Chin Med*:1999;27:191-203.

15. Matsumoto T, Yamada H: Orally administered kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to modulates cytokine secretion in gut associated lymphoreticular tissues in mice. *Phytomedicine* :2000;6:425-430.
16. Matsumoto T, Matsumi H, Sakurai H, Kiyohara H, Yamada H. Orally administered decoction of kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to modulates cytokine secretion and induces NKT cells in mouse liver. *Immunopharmacology*:2000;46:149-161.
17. 송시환, 양덕춘, 정세영. 산삼배양추출물의 ICR 마우스 골수세포를 이용한 복강투여 소핵시험. *J.Fd Hyg. Safety* 2006;20(1),58-63
18. Maron, D.M. and Ames, B.N., Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.* 1983: 113, 173-215
19. 의약품등의 독성시험방법(식품의약품안전청고시 제 2006-60호, 2006)
20. OECD guidelines for the testing of chemicals, No. 474 'Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test' (1997)