

인공피부모델 KeraSkin™을 이용한 유전독성 평가

이수현·정행선·김설영·김혜수·임경민*·정영신**·최태부***†

(주)바이오솔루션 부설연구소, *이화여자대학교 약학대학 약학과,
호서대학교 생명보건과학대학 생명공학과, *건국대학교 공과대학 생물공학과
(2016년 6월 15일 접수, 2016년 9월 9일 수정, 2016년 9월 13일 채택)

Evaluating the Micronucleus Induction Potential for the Genotoxicity Assay Using the Human Skin Model, KeraSkin™

Su-Hyon Lee, Haeng-Sun Jung, Seol-Yeong Kim, Hye Soo Kim,
Kyung-Min Lim*, Young-Shin Chung**, and Tae-Boo Choe***†

R&D Institute, Biosolution Co., Ltd. RM516, Seoul TechnoPark, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

*Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 03760, Korea

**Department of Biotechnology, College of Life and Health Sciences, Hoseo University, Chungcheongnam-do 31499, Korea

***Department of Biological Engineering, College of Engineering, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

(Received June 15, 2016; Revised September 9, 2016; Accepted September 13, 2016)

요약: 소핵시험은 세포분열 단계 중 간기 세포의 세포질 내 소핵 유무를 조사함으로써 유전독성을 평가하는 시험법이다. 최근 화장품 안전성 평가에 동물실험을 금지하거나 최소화하려는 노력이 확산되고 있어 유전독성 평가에 있어서도 기존의 동물실험이 아닌 새로운 *in vitro* 시험법이 요구되고 있다. 본 연구에서는 3차원 배양 인공피부모델인 KeraSkin™을 이용하여 도포 처리된 물질의 유전독성을 평가하였다. 2종의 유전독성물질인 mitomycin C (MMC)와 methyl methanesulfonate (MMS)는 농도 의존적으로 세포독성과 소핵 형성이 유도된 반면, 대조물질인 4-nitrophenol (4-NP)와 trichloroethylene (TCE)에서는 농도 의존적으로 세포독성은 관찰되었으나 소핵은 형성되지 않았다. 따라서 인공피부모델을 이용한 소핵시험이 화장품과 같은 피부적용물질의 *in vitro* 유전독성 평가에 유용할 것으로 사료된다.

Abstract: Micronucleus test is genotoxicity assay for detection of micronuclei in the cytoplasm of interphase cells. The reduction and replacement of *in vivo* toxicity testing on animals require the development of *in vitro* models to predict the genotoxicity or other tests for cosmetic products. In this study, we evaluated a genotoxicity assay for topically applied chemicals using a three-dimensional human reconstructed skin model, KeraSkin™. Two genotoxins, mitomycin C (MMC) and methyl methanesulfonate (MMS), induced significant dose-related increases in cytotoxicity and micronuclei induction in the skin model. In contrast, two non-genotoxins, 4-nitrophenol (4-NP) and trichloroethylene (TCE), induced cytotoxicity but not micronucleus formation. In conclusion, micronucleus test using human skin model may be useful for predicting *in vitro* genotoxic potentials of cosmetic products.

Keywords: reconstructed human epidermis, KeraSkin™, genotoxicity, micronucleustest

† 주 저자 (e-mail: tbchoe@konkuk.ac.kr)
call: 02)450-3523

1. 서 론

현행 유전독성 표준조합 시험법은 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험, 포유류 배양세포를 이용한 *in vitro* 염색체이상시험 또는 마우스 림포마 TK (thymidine kinase) 시험, 설치류 조혈모세포를 이용한 *in vivo* 소핵 시험이 전세계적으로 사용하고 있으며 OECD에서도 동일 가이드라인을 따르고 있다[1-4]. ICH에서는 기존의 유전독성 가이드라인에 *in vitro* 포유류 배양세포를 이용한 소핵시험과 *in vivo* 동물 조직에서의 유전자해성시험(comet assay)을 추가하여 유전독성 가이드라인 ICH S2R1을 수정하였으며[5], 국내 의약품 등의 독성 시험기준(식약처 고시 2014-136호)에서도 이와 같은 유전독성 표준조합 시험법을 권고하고 있다[6].

소핵(micronucleus)은 세포의 주핵에서 분리된 작은 핵으로, *in vitro* 소핵시험은 포유류 배양세포의 세포 분열 단계의 세포질 내 소핵 형성 유무를 조사함으로써 이수체 유발원(aneuploidy)과 염색체이상 유발원(clastogen)을 모두 선별하는 염색체 손상에 대한 포괄적인 근거를 제공하는 시험법이다[7-10].

최근 화장품의 동물실험 금지 조치에 따라 기존의 동물실험을 대체할 수 있는 여러 동물대체시험법이 개발되고 있으며 특히 실제 인체 피부와 유사한 인공피부모형을 이용한 연구가 활발히 진행 중이다. 인공피부모형을 활용한 관련 연구로는 피부 흡수, 분포 및 피부 자극 시험들이 보고되고 있으며 OECD 테스트 가이드라인으로는 TG 431, “*In vitro* skin corrosion: human skin model test” (adopted 2004.4.13.)와 TG 439, “*In vitro* skin irritation: human epidermis test method” (adopted 2010.7.22.) 시험법이 인정되었고 유럽연합 ECVAM (European center for validation of alternative method)에서도 여러 번의 타당성 검증을 통해 신뢰성 있는 결과 도출 시험으로 인정하였다[11-12]. 국내에서도 2007년부터 인공피부모형을 이용하여 피부자극시험에 활용하고자 연구개발을 진행하여 KeraSkin™을 이용한 피부자극 동물대체시험법 검증연구를 수행 중에 있다 [13-16].

인체피부와 유사한 인공피부모형인 KeraSkin™은 인체 유래 피부각질세포로부터 조직배양기술을 이용하여 제조한 것으로, 표피의 분화된 4개 층인 기저층, 유극층, 과립층, 각질층으로 구성되어 있으며 인체피

부와 같은 피부 방어막 기능을 가지고 있어 피부자극 시험을 비롯한 여러 동물실험대체법 연구와 화장품 효능평가 연구에 활용되고 있다[17-21].

화장품은 피부를 통해 흡수되고 대사되기 때문에 피부 장벽기능과 대사활성을 가진 인공피부모형에서의 유전독성시험은 화장품 안전성 평가에 있어 중요한 정보를 제공할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 *in vitro* 소핵시험 가이드라인 OECD TG 487, “*In vitro* mammalian cell micronucleous test” (adopted 2014.9.26.)를 참고하여[22], 인공피부모형에서 *in vitro* 소핵시험을 가능성을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시험모델

사람 정상 피부각질세포를 분화시켜서 제조한 인공피부인 KeraSkin™ (Biosolution, Korea)을 사용하였다. KeraSkin™은 사람 피부각질세포를 12 mm Millicell® (Millicell cell culture insert, MerckMillipore, Germany)에 접종하여 단층세포층 배양을 위해 7일간 서브머지 배양(submerged culture)하고 각질화 분화를 위해 14일간 기-액 배양(air-liquid interface culture)하여 제조하였다.

2.2. 시험물질

소핵시험에 사용된 물질은 기존의 보고를 참고하여 [23], 독성이 잘 알려진 2종의 genotoxin과 2종의 dermal non-carcinogens을 사용하였다(Table 1).

2.3. 시험물질 처치

6-well plate에 배양중인 KeraSkin™을 PBS로 1회 세척 후 PBS를 제거하고 3 µg/mL cytochalasin B (Sigma, USA)가 포함된 0.9 mL의 배양 배지로 교체한 후 4종의 시험물질을 각각 10 µL씩 인공피부에 도포하였다. 시험물질을 처치하고 24 h 배양 후 시험물질을 다시 한번 처치하여 인공피부에 총 48 h 동안 시험물질을 노출하였다.

2.4. 세포 회수 및 슬라이드 준비

물질처리 후 KeraSkin™에 0.1% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma, USA)를 처리하여 케라틴 패드를 분리하고 여기에 trypsin-EDTA (Welgene, Korea)

Table 1. List of Test Compounds

Compound	Abbreviation	CAS No.	Supplier	Feature
Mitomycin C	MMC	50-07-7	Sigma	Genotoxin
Methyl methanesulfonate	MMS	66-27-3	Sigma	Genotoxin
4-Nitrophenol	4-NP	100-02-7	Sigma	Non-genotoxin
Trichloroethylene	TCE	79-01-6	Sigma	Non-genotoxin

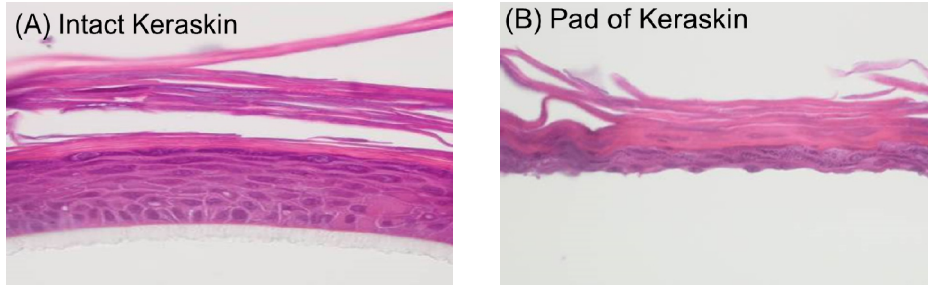


Figure 1. A cross-section through the (A) intact KeraSkin™ and (B) “pad” of KeraSkin™. Generally, only stratum corneum and stratum granulosum were observed in this keratin pad. H&E stain.

를 15 min 처리하여 피부조직으로부터 피부각질세포를 회수하였다. 회수된 세포는 혈청이 첨가된 배지로 희석하여 trypsin-EDTA를 중화시키고 원심분리 하여 세포 펠렛을 얻었다. 세포 펠렛은 -20 °C의 메탄올과 아세트산 3 : 1 혼합액 3 mL로 희석하여 원심분리하고 또 다시 -20 °C의 메탄올과 아세트산 99 : 1 혼합액 4 mL를 첨가하여 고정하였다. 원심분리 후 얻은 세포현탁액을 슬라이드 글라스 위에 접종하고 10% Giemsa (Sigma, USA) 용액으로 20 min 간 염색하여 소핵의 형성을 관찰하였다.

2.5. 분석

슬라이드당 2000개의 세포를 계수하고 이 중 binucleated cell과 micronuclei가 형성된 세포 수를 측정하여 binucleated cell 중 소핵이 생성된 세포의 비율(% of micronuclei / binucleated cell / 2,000 cells)을 산출하였다. 세포독성은 MTT assay (Sigma, USA)를 실시하여 세포생존율을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. KeraSkin™의 형태

KeraSkin™은 사람 정상 피부각질세포를 공기 중에

노출시켜 분화를 유도하며 기저층, 유극층, 과립층, 각질층의 표피의 4개의 분화된 세포층을 보유하고 있다 (Figure 1A). 시험물질을 KeraSkin™ 표면에 도포하여 처리하고 배양한 후 인공피부 조직을 2단계에 걸쳐 효소 처리하였다. 0.1% EDTA에 의해 케라틴 패드와 나머지 층으로 분리되며(Figure 1B), 이 두 조직을 각각 trypsin-EDTA를 처리하여 단일 세포를 획득하였다.

3.2. 소핵 형성 관찰

대조군과 MMC를 도포한 시험군에서 Giemsa staining 후 소핵의 형성을 관찰하였다. 대조군에서는 소핵의 형성이 관찰되지 않으나 MMC를 처리한 시험군에서 소핵이 유발됨을 확인하였다(Figure 2).

3.3. 결과분석

인공피부모델에 cytochalasin B을 처리하고 시료는 농도별로 24 h 간격으로 2회 표면 도포하였다. 최종 표면 도포 24 h에 인공피부모델을 채취하여 슬라이드를 제작하고 2000개 세포에서 소핵을 관찰하였다. 유전독성여부가 확인된 물질 2종 MMC, MMS과 non-genotoxin 2종 4-NP, TCE을 사용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

유전독성 물질인 MMC (0, 1, 3, 6, 10, 30 µg/mL),

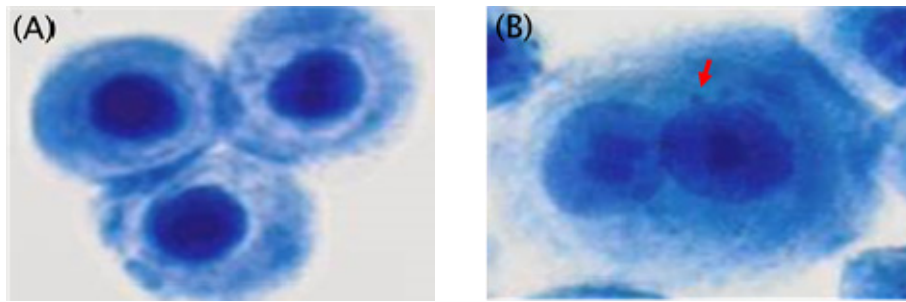


Figure 2. Examples of micronucleus identified in binuclear human keratinocytes isolated from KeraSkin™ tissues. Cells stained with Giemsa. (A) Control KeraSkin™ and (B) MMC treated KeraSkin™.

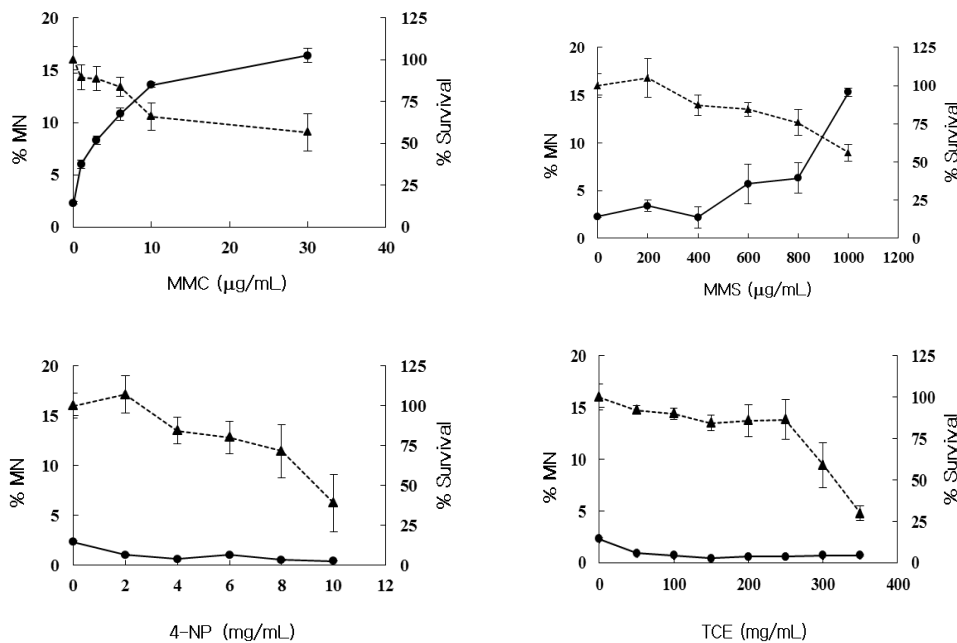


Figure 3. Cytotoxicity and micronucleus induction in Keraskin™ following treatment with test chemicals. Solid lines indicate % micronuclei (left axis), dashed lines indicate % survival relative to untreated tissues (right axis).

MMS (0, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL) 처리군에서 소핵의 형성 정도를 측정한 결과 농도의존적으로 세포독성과 소핵 형성 비율이 증가하였다. 처치 최고 농도인 MMC 30 µg/mL과 MMS 1000 µg/mL에서 각각 16.4%와 15.3%의 소핵 형성을 나타내었다. 반면 non-genotoxins인 4-NP, TCE 처리군에서는 세포생존율이 50% 이하인 세포독성을 나타내는 농도 구간에서도 소핵 형성의 증가가 관찰되지 않았다(Figure 3). 이러한 결과는 인공피부를 이용한 소핵시험이 실제 피부 노출 환경에서 염색체 손상을 평가하는 새로운 *in vitro* 유전독성 평가법으로 활용 가능성을 나타낸다.

4. 결 론

피부 위해성 평가 모델로서 인공피부를 활용한 연구가 활발히 진행 중이며 OECD TG 431과 OECD TG 439에는 이미 피부부식시험과 피부자극시험에 대한 인공피부모델을 이용한 평가법이 등재되어 있다.

본 연구에서는 기존 피부부식시험과 피부자극시험의 평가지표로서 사용한 세포생존율 이외에 인공피부 모델에서의 소핵유발 빈도를 측정함으로써 세포독성 시험뿐 아니라 유전독성시험에서도 인체의 위해성을 예측할 수 있는 시스템으로서의 가능성을 확인하였다.

마우스 소핵 유발 물질인 MMC, MMS는 인공피부모델에 도포하였을 경우 농도의존적으로 소핵을 유발하는 것을 관찰하였고 소핵유발 빈도 등이 소핵관정에 용이한 것으로 사료된다. 이러한 결과를 바탕으로 시험물질의 세포생존율에 근거한 처치 농도 설정과 소핵유발 빈도 증가에 대한 기준 설정 등 세부적인 시험 방법에 대한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

Acknowledgement

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 HI13C1046).

Reference

1. OECD, Genetic toxicology: *saccharomyces cerevisiae* gene mutation assay, OECD Test Guideline No. 480 (1986).
2. OECD, Bacterial reverse mutation test, OECD Test Guideline No. 471 (1997a).
3. OECD, *In vitro* mammalian cell gene mutation test, OECD Test Guideline No. 476 (1997b).
4. OECD, Transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assay, OECD Test Guideline No. 488 (2011).
5. ICH, ICH Harmonised Tripartite Guideline S2 (R1): guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use (2011).
6. 식약처, 의약품등의 독성시험기준: 식품의약품안전처고시 제 2014-136호 (2014).
7. X. C. brevaya, M. A. Carballo, and M. D. Mudry, The bone marrow micronucleus test and metronidazole genotoxicity in different strains of mice, *Genet. Mol. Biol.*, **30**(4), 1139 (2007).
8. Z. Cammerer, A. Elhajouji, and W. Suter, *In vivo* micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals, *Mutat. Res.*, **626**(1-2), 26 (2007).
9. M. Fenech, The *in vitro* micronucleus technique, *Mutat. Res.*, **455**(1-2), 81 (2000).
10. N. Flamand, L. Marrot, J. Belaidi, L. Bourouf, E. Dourille, M. Feltes, and J. Meunier, Development of genotoxicity test procedures with episkin[®], a reconstructed human skin model: towards new tools for *in vitro* risk assessment of dermally applied compounds?, *Mutat. Res.*, **606**(1-2), 39 (2006).
11. OECD, *In vitro* skin corrosion: human skin model test, OECD Test Guideline No. 431 (2004).
12. OECD, *In vitro* skin irritation: human epidermis test method, OECD Test Guideline No. 439 (2010).
13. J. Y. Moon, E. H. Maeng, H. S. Park, M. Kwon, D. H. Jang, Y. M. Cho, E. O. Koh, H. J. Sung, and C. B. Park, Efficacy of reconstructed skin for replacement of skin irritation test using animal model, *Journal of Alternatives to Animal Experiments*, **1**(1), 17 (2007).
14. K. M. Jung, J. Y. Moon, S. H. Lee, C. W. Kim, C. B. Park, and B. H. Kim, The validation of alternative methods of reconstructed human skin equivalents for the assessment of skin irritation, *Journal of Alternatives to Animal Experiments*, **2**(1), 31 (2008).
15. J. Y. Moon, S. H. Lee, H. S. Jung, Y. H. Ryu, K. M. Jung, K. M. Lim, and C. B. Park, Inter-laboratory validation of KeraSkin[™] for replacement of skin irritation test using animal model, *Journal of Alternatives to Animal Experiments*, **4**(2), 5 (2010).
16. K. M. Jung, S. H. Lee, W. H. Jang, H. S. Jung, Y. Heo, Y. H. Park, S. Bae, K. M. Lim, and S. H. Seok, KeraSkin[™] - VM: a novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests, *Toxicol. In Vitro*, **28**(5), 742 (2014).
17. M. J. Kang, C. K. Kim, M. Y. Kim, T. S. Hwang, S. Y. Kang, W. K. Kim, J. J. Ko, and Y. K. Oh, Skin permeation, bio-distribution, and expression of topically applied plasmid DNA, *J. Gene Med.*, **6**, 1238 (2004).
18. J. H. Ahn, K. H. Eum, and M. Lee, Assessment of the dermal and ocular irritation potential of lomefloxacin by using *in vitro* methods, *Toxicol. Res.*, **26**(1), 9 (2010).

19. W. H. Jang, K. M. Jung, S. K. Choi, S. H. Lee, Y. J. Choi, Y. H. Park, and K. M. Lim, Evaluation of moisturizing activity of lipid-coated powder using a reconstructed human epidermis, *Journal of Alternatives to Animal Experiments*, **5**(1), 57 (2011).
20. Y. H. Park, W. H. Jang, K. M. Jung, S. H. Lee, and K. M. Lim, Evaluation of permeability and irritancy of transdermal tranexamic acid formulation using a reconstructed human epidermis, KeraSkin™, *Journal of Alternatives to Animal Experiments*, **6**(1), 27 (2012).
21. J. H. Choi, H. J. Kim, J. H. Choi, S. M. Oh, J. G. Park, and K. S. Park, Skin corrosion and irritation test of sunscreen nanoparticles using reconstructed 3D human skin model, *Environ. Health Toxicol.*, **29**, 1 (2014).
22. OECD, *In vitro* mammalian cell micronucleous test, OECD Test Guideline No. 487 (2014).
23. T. Hu, Y. Kaluzhny, G. C. Mun, B. Barnett, V. Karetsky, N. Wilt, M. Klausner, R. D. Curren, and M. J. Aardema, Intralaboratory and interlaboratory evaluation of the EpiDerm 3D human reconstructed skin micronucleus (RSMN) assay, *Mutation Research*, **673**(2), 100 (2009).