J. Fd Hyg. Safety 20(1), 18–21 (2005)

옻나무 추출액(Rhus-II)의 안전성에 관한 유전독성학적 평가

최창순 · 한동운*†

*오하이오 주립대학 수의과대학 병리학교실, *동물보호계열 천안연암대학**

Genotoxicicological Safety Estimate for the Rhus-II

Changsun Choi and Dong Un Han*†

Department of Pathology, College of Veterinary Medicine, Ohio State University

**Department of Animal Care, Cheonan Yonam College*

ABSTRACT – These observations were performed to investigate the safety of the natural herbs (Rhus-II) in respect of genotoxicity. This substance was examined in two in-vitro tests : (1) *Salmonella typhimurium* reversion assay (Ames test) in strain TA 98, TA 100, TA 1535 and TA 1537, (2) *in vitro* chromosome aberration test in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. In the reverse mutation test, Rhus-II did not induced mutagenicity in *Salmonella typhimurium* reversion assay(Ames test) with or without metabolic activation. In the chromosome aberration assay using CHO cells, there was no increased incidence of structural and numerical aberrations with or without metabolic activation. These results indicated that, the Rhus-II had no genotoxicity.

Key words: genotoxicity, chromosome aberration assay, Rhus-II, mutagenicity

옻나무(*Rhus Veniciflua* stokes)는 옻나무과(Anacardiaceae)에 속하는 자웅이성의 낙엽교목이다.[1] 옻나무과는 세계적으로 분포하고 있으며, 5아과에 77개의 속으로 나누어진다. 옻나무속에는 약 200여종이 존재하고 있으며 이들 대부분이 온대지방에 분포하고 일부는 아열대와 열대지방에서도 서식한다.[2] 국내에 서식하는 옻나무속 식물로는 옻나무(*Rhus Veniciflua*), 개옻나무(*Rhus trichocarpa*), 붉나무(*Rhus Chinensis*), 검양옻나무(*Rhus succedanea*), 산검양옻나무(*Rhus sylvestris*) 등이 있다.[3]

옻나무 껍질에서 분비되는 옻나무 수액은 전통적인 민속도료로 사용되어 왔는데, 이러한 도료의 피막을 구성하는 성분은 옻나무에서 나오는 urushiol의 polymer로 이루어져 있다.[4]

한편, 옻나무는 약용으로도 사용되어 왔는데, 옻나무 수피를 혈액순환 및 통경의 목적으로 사용하거나 닭이나 산양과 같이 조리하여 건강 보양식식품으로 이용하였다.[5] 옻의 유도물질이라 할수 있는 urushiol은 강력한 항암작용 및 항산화 작용이 알려져 있을 뿐만 아니라 AIDS 환자에서도 면역증강작용을 유발한다고 보고되어 있다.[6] 그렇지만 urushiol은 단백질과 비특이적인 결합 및 피부에 대한 심한 알러지 작용을 유발하는 것으로 알려지고 있다. 옻의 목질부분은 옻나무 껍질에서 나타나는 알러지 작용이 거의 없는 것으로 알려져 건강음료, 강장, 강정은 물론 암의 예방에도 효력이 있는 것으로 보고되고 있다.[7] 옻나무는 생리활성물질의 약리적 가치로 인하여 우리 선조들은 한방에서 내종의 치료제로서 사용해 왔다.[8]

유전물질의 손상으로 야기되는 암에 대한 관심이 높아지면서 유전자 손상을 단기적으로 쉽게 검색할 수 있는 유전독성 시험법의 개발이 진행되어 왔으며, *in vitro* 시험으로 Ames *et al.*(1975)이 개발한 복귀 돌연변이시험 및 포유동물 배양세포를 이용한 소핵시험이 유전독성 평가법으로 국제적으로 널리 이용되고 있다.[9]

본 연구에서는 이러한 효능을 가진 옻나무에 대하여 알러지를 유발하는 성분을 제거하고 생약제와 혼합하여 만든 수용액 추출물을 진공 건조시킨 Rhus-II를 사용하여 *in vitro*상에서 유전독성을 평가하기 위하여 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 5개 균주에 있어서의 복귀돌연변이 유발 여부를 지표로 검색하고 배양된 Chinease Hamster Ovary cell(CHO) 세포를 이용한 소핵시험 등을 실시하였다.

연구방법

시료 조제

실험 대상 생약제는 옻나무와 삼백초, 천궁, 백봉령, 산사자, 하수오, 복분자, 토사자, 사인, 숙지황, 원지, 녹각, 녹차,

†Author to whom correspondence should be addressed.

생강의 혼합제제로 여주신바람 영농조합에서 시판하는 원제를 공급받아 농축 건조하여 분말화시킨 다음 실험에 공시하였다.

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀 돌연변이 실험

시험을 위한 배지 및 시약 및 S9 의 조제와 시험 방법은 Marton & Ames의 방법에 따랐다. S9 분획은 Microbiological Associaates(Bethesda, Maryland, U,S,A)에서 구입하였다.

예비 독성 시험은 TA100 균주를 이용하여 DMSO를 용매로 하여 15 mg/plate를 최고농도로 제조하여 직접법과 S-9 mix를 이용한 대사활성법을 실시하였다. 예비독성시험결과 15 mg/plate의 농도에서 시험물질에 의한 세포독성을 보이지 않아 본 시험에서 최고농도로 설정하고 투여 군을 15,000 μg/plate, 5,000 μg/plate, 1,667 μg/plate, 556 μg/plate, 185 μg/plate로 설정하였다.

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA100, TA1535 및 TA 1537은 화학연구소 안정성 평가센터로부터 분양받았다. 각 균주는 histidine 요구성, deep rough(rfa) 특성, UV에 대한 민감도(uvrB 돌연변이), R-factor에 의한 ampicilin 또는 tetracycline 내성등의 유전형질을 확인한 후 시험에 사용하였다. 시험은 대사 활성화를 시키지 않은 경우(standard plate incorporation test)와 대사활성화를 시킨 경우(preincubatiuon test)로 나누어서 시행하였다.

Salmonella typhimurium 균주를 2.5% Oxoid nutrient broth에 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 하룻밤동안 배양시킨 배양액 0.1 ml과 인산완충액 0.5 ml(대사 활성화를 시키는 경우에는 S9 mix 0.5 ml), 시험물질용액을 각 단계별로 0.1 ml씩 첨가하여 가볍게 vortex 하였다. S9 mix를 이용하여 대사 활성화를 시킨 경우는 37°C에서 30분간 예비 배양을 실시한 다음 histidine/biotine이 첨가된 top agar(45°C)를 2 ml 첨가하고 2-3초간 vortex 하여 minimal glucose agar plate 상에 부어서 평판 응고시켰다. 37°C 배양기에서 48시간 배양한 다음 recertant colony를 계수하였다. 돌연변이 유발성의 판정은 원저의 제시에 따라 복귀 돌연변이 집락수가 용매 대조군의 2배 이상이면서 용량의존성을 갖는 경우를 양성으로 하였다.

포유류 배양세포를 이용한 소핵시험

Rhus-II를 DMSO에 녹인 후 세포배양배지에서 10%되게 첨가하여 세포독성 시험을 실시하였다. 세포계대시에 1회용 24 well plate에 1 well당 1×10^4개의 세포를 파종하여 2일간 배양한 후 최고투여용량인 배지의 0.5%(v/v)의 농도로부터 공비로 5단계의 농도를 설정하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 PBS(phosphate bufferd saline pH 7.4) 0.5 ml로 2회세척하고 methanol로 2분간 고정하여 3% Giemsa(in phosphate buffer, pH 6.8)로 20분간 염색한 후 광학현미경으로 관찰하여 50% 세포독성을 보이는 농도를 구하였다. 예비 독성시험을 시행한 결과 2,000 μg/ml에서 50%의 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 따라서 Rhus-II의 염색체 이상시험의 본시험 농도를 2,000 μg/ml, 667 μg/ml, 222 μg/ml, 74 μg/ml, 25 μg/ml로 설정하였다.

시험에 사용된 Chinease hamster ovary cell은 한국원자력 연구소에서 분양받았다. 배지는 fetal bovine serum, 100 U/ml penicilline, 100 μg/ml streptomycin, 5×10^5 M 2-mercaptocthanol 및 20 mM HEPES buffer를 첨가시킨 McCoy's 5A 배지를 사용하였으며 모두 GIBCO BRL, Inc.(U.S.A.)에서 구입하였다. 배양은 포화 상대습도 조건하에서 5% CO_2를 공급하는 37°C의 CO_2 incubator에서 수행하였다.

시험방법은 CHO 세포 8×10^4개를 Flaskette(19.8×51.8 mm, Nunc) 에 파종하여 48시간 배양한 다음 시험물질을 첨가하고 24시간 후에 세포 표본을 만들었다. Fenech and Morley의 cytokinasis-block(CB) method에 따라 cytochalasin B(Cyt-B; 3 μg/ml, Aldrich)를 시험물질과 함께 첨가하였다. 배양액을 suction out 시킨 다음 고정액(methanol : acetic acid, 3:1)으로 3회 고정시킨 후 공기 건조법으로 세포표본을 만들었다. 3% Giemsa 염색액(pH 6.5)으로 20분간 염색하여 광학견미경으로 400배에서 경검하였다. Cyt-B는 DMSO 에 2 mg/ml로 녹여 -70°C에 보관하면서 사용하기 직전에 녹여 Hank's balanced salt solution으로 희석하여 사용하였다. 대사활성 존재하의 시험은 같은 방법으로 세포를 배양한 후 시험물질과 S9 mix(배지의 20% 비율)를 첨가하여 6시간동안 배양한 다음 신선한 배지로 교화하였고 Cyt-B를 첨가하여 18시간 더 배양한 후 세포표본을 만들었다.

시험물질은 생리적 식염수에 용해하여 공경 0.2 μm의 membrane filter로 여과한 것을 단계별로 적절히 희석하여 조제하였다. 시험물질의 첨가량은 배양용량의 1/10(methanol 가용분의 경우 에는 1/200)을 넘지 않게 하였다. 음성대조군으로는 희석액인 시료용매를 양성대조군으로는 직접법에서는 증류수에 녹인 mytomycin C(Sigma)를 0.1 μg/ml로 대사화성화법에서는 DMSO에 녹인 benzo(α)pyrene(Sigma)을 0.02 mg/ml로 첨가하였다.

Micronucleus(MN)의 판독은 Almassy 등의 기준에 따랐다.[12] 1,000개의 binucleated CB 세포들 중 MN을 갖는 세포를 계수하였다.

결과 및 고찰

복귀 돌연변이 실험

옻 추출물 생약제인 Rhus-II의 유전독성학적 안전성을 평가하기 위하여 *Salmonella typhimurium*균주를 이용한 유전자 복귀 돌연변이 시험(Ames test)과 배양된 Chinese hanster ovary(CHO) 세포를 이용한 소핵시험을 시행하였다.

대상물질이 천연 생약제 혼합물임을 고려하여 50%의 균주 생장억제를 나타내는 농도를 최고농도로 하여 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537의 복귀 돌연변이 집락수를 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. 각 시험에서 음성대조군의 복귀 돌연변이 집락수는 기준 범위이내에 들었고, 양성대조 화합물에 의해서 복귀변이 집락수가 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 수행되었음을 보여주었다.

시험물질의 유전독성을 판정하기 위한 실험은 세균의 유전자 돌연변이 실험, 포유류 세포의 염색체 이상 시험 등의 *in-vitro* 시험법과 설치류에서의 소핵시험 및 우성치사 시험, 초파리에서의 반성열성치사 시험, 포유류 골수 세포의 유전

Table 1. Revertant colonies in the *S. typhimurium* reversion assay with water-soluble fraction Rhus-II

Test material	Dose (μg/ml)	S9 Mix	Number of revertant colonies per plate (Mean±SD)			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
H_2O		-	32.7±2.0	183.0±6.6	28.3±4.0	13.0±2.6
Rhus-II	15,000	-	34.3±3.5	171.3±7.1	26.3±3.5	16.7±3.2
	5,000	-	30.7±4.2	174.3±4.2	24.7±5.5	12.3±2.5
	1,667	-	33.0±1.7	168.7±8.5	22.3±4.7	11.0±2.0
	556	-	29.0±4.0	184.3±7.2	19.7±4.2	12.3±1.5
	185	-	31.7±4.2	164.7±4.5	20.7±4.7	11.7±4.0
NPD	20	-	2,076.3±77.5			
Na-Azide	1.5	-		1,257±117.5	836.2±67.9	
MMC	0.5	-				4,193.2±139.3
H_2O		-	35.3±2.5	163.5±4.5	23.0±1.2	10.3±3.8
Rhus-II	15,000	+	33.0±5.0	174.7±22.6	20.3±1.5	12.0±2.1
	5,000	+	28.0±3.5	181.3±9.3	19.7±1.5	13.3±3.2
	1,667	+	31.0±5.0	164.7±8.5	20.3±2.5	9.3±1.5
	556	+	29.7±6.1	171.0±16.4	18.7±3.2	9.0±1.0
	185	+	28.7±3.2	161.3±2.1	18.0±6.6	10.0±3.5
2-AF	10	+	1,207±128.0	826.5±102.0	54.5±6.0	49.2±3.7

Table 2. Frequency of micronuclei (MN) in cytokinesis-blocked CHO cells following treatment with water-soluble fraction Rhus-II

Compound	Dose (μg/ml)	S9 Mix	Cells without MN	Frequency of the cells with MN				No. of MN	MN/1000 cells* (Mean±SD)
				1	2	3	4		
H_2O		-	2,939	57	3	1	0	66	22.1±5.6
Rhus-II	2,000	-	2,937	55	8	2	0	77	25.8±5.3
	667	-	2,948	48	3	1	0	57	19.9±3.8
	222	-	2,936	69	4	1	0	70	23.3±5.7
	74	-	2,943	51	5	1	0	64	21.3±3.8
	25	-	2,932	61	5	2	0	77	25.7±2.8
MMC		-	2,714	243	34	8	1	339	113.0±12.5
H_2O		-	2,942	54	3	1	0	63	21.0±4.9
Rhus-II	2,000	+	2,958	38	4	0	0	46	15.3±3.7
	667	+	2,945	50	4	1	0	61	20.3±2.9
	222	+	2,554	42	3	0	0	49	16.3±2.1
	74	+	2,960	35	4	1	0	46	15.3±5.1
	25	+	2,946	47	7	0	0	62	20.7±5.7
B(α)P		+	2,658	297	38	6	1	395	131.6±19.7

*Number of MN.1000 binucleated cells in the triplicate experiments in which 1,000 cells were scored. MMC(Mitomycin C) and B(α)P(benzo(α)pyrene) were used as positive controls.

학적 시험 등의 *in-vivo* 시험법이 있다.[10-18] 본 실험에서는 1차적으로 세균의 돌연변이 시험들 중 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀 돌연변이 시험과 포유류 배양세포를 이용한 소핵시험을 시행하여 천연혼합물 생약제의 추출물이 직접변이원 또는 간접변이원으로 작용하지 않음을 알 수 있었다.

대사활성화를 시키지 않은 군과 대사활성화를 시킨 군 모두에서 Rhus-II에 의한 각 균주의 복귀 돌연변이 집락수의 유의성 있는 증가가 관찰되지 않았다. 시험물질의 농도가 높아 짐에 따라 집락수가 다소 증가한 개체가 관찰되었는데, 이는 용매에 포함된 histidine에 의한 증식작용에 기인한 것으로 사료된다. 그러나 일반적으로 각 용량에서의 집락수는 거의 일정하였다. 따라서 본 실험에 사용된 Rhus-II는 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않음을 알 수 있었다.

소핵 유발성 검증

CHO 세포배양에서 50%농도의 세포 증식억제를 보인 시험물질의 농도를 최고 농도로하여 수행한 소핵시험에서는 cytokinesis bloked binucleated(CB) cell 내에 생성된 소핵을 계수한 결과 음성대조군의 소핵수가 22.1±5.6개/1,000 CB cell(2.2±0.56%)로서 문헌에 보고된 수치[13,14,16] 수준이내에 들었고 양성대조 화합물에 의해 소핵 수가 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 수행되었음을 보여주었다.

본 실험물질인 Rhus-II는 대사활성화를 시키지 않은 경우와 대사활성화를 시킨 두 경우 모두에서 본 시험물질인 Rhus-II에 의한 소핵수의 증가가 인정되지 않았고 각 용량 단계에서 모두 3% 이하의 소핵 빈도를 보여 음성으로 판정되었다(Table 2). 이 결과는 다른 연구자들이 생약제에 대한 유전독성학적 안전성 평가의 일부분으로 수행한 염색체 이상 유발성 실험의 결과와 유사한 소견으로 여겨진다. 따라서 본 시험물질이 직접변이원이나 간접변이원으로서 세포 핵분열 중에 이상을 유발하지 않음을 알 수 있었다.

이상의 결과 본 실험에 사용된 Rhus-II는 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않으며 세포분열중에 유전학적으로 독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 이 결과로 보아 생체내 유전독성학 시험, 만성독성 시험 및 생식독성 시험등이 추가된다면 이 약제의 안전성을 명확히 할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 김태정. 한국의 자원식물. 294. 서울대학교 출판부. p. 194 (1996).
2. Fernald M.I. Gray's manual of botany 8th ed., American book Company, New York. pp. 976-979 (1950).
3. 김삼식, 정재민. 한국산 옻나무과의 분류학적 연구. 한국임학회지 **84**:151-165 (1995)
4. 김만조, 김갑태, 최태봉, 현정오. 기상요인과 채취시기가 옻나무 칠액채취량 및 칠액의 질에 미치는 영향. 한국자원식물학회지 **11**:70-79 (1998).
5. Namba, T. Coloured illustrations of Wakan Yaku, Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka. p. 215 (1980).
6. Miller, W.C., Thielman, N.M., Swai, N., Cegielski, J.P., Shao, J., Ting, D., Mlalasi, J., Manyenga, D., and lallinger, G.J. Delayed-type hypersensitivity testing in Tanzanian adults with HIV infection. J. Acq. Immune Defic. Synd. Human Retrovir. **12**:303-308 (1996).
7. 박희준, 권상혁, 김갑태, 이경태, 최정혜, 최종원, 박건영. 옻나무 목질부에서 분리된 플라보노이드의 이화학적 및 생물학적 특성. 생약학회지, **31**:345-350 92000).
8. 최영전. 한국 민속식물. 아카데미, pp.247-248 (1992).
9. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens & mutagenes with Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res*. **31**:347-364 (1975).
10. Marton D.M., and Ames B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res*. **113**:173-215 (1983).
11. Fenech M. and Morley, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res*. **147**:29-36 (1985).
12. Almassy Z., Krepinsk A.A., Bianco A. and Koteles GJ. The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl. Radiat. Isot*. **34**:241-249 (1987).
13. Wakata, A. and Sasaki, M.S. Measurement of miconuclei by cytokinesis0block method in cultured Chinese hamster cells : comparison with type and rates of chromosome aberration. *Mutat. Res*. **190**:51-57 (1987).
14. Lasne, C., Gu, Z.W., Venegas, W. and Chouroulinkov, I. The in vitro micronucleus assay for detection of cytogenetic effect induced by mutagen-carcinogens: comparison with the in vitro sister-chromatid exchange assay. *Mutat. Res*. **130**:273-282 (1984).
15. Lin, R.H., Wu L.J., Lee C.H. and Lin-Shiau S.Y. Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res*. **319**:197-203 (1993).
16. Savage, J.R.K. Acentric chromosomal fragment, and micronuclei : the displacement factor. *Mutat. Res*. **225**:171-173 (1989).
17. Brusick, D. Genetic toxicology. In principle and methods of toxicology (3rd Ed.), Hayes A.W.(Ed.), Raven Press, New York, p545 (1994).
18. Depatmant of health : Guidelines for the testing of chemicals in food, consumer products and the environment. Report on health social security No. 35. HMSO, London (1989).