

고삼추출물의 *in vitro* 항돌연변이원성과 유전독성 연구

조현조¹ · 윤현주¹ · 박경훈¹ · 이재봉² · 심창기³ · 김진호¹ · 정미혜² · 오진아¹ · 김두호¹ · 백민경^{1*}

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 ¹화학물질안전과, ²농자재평가과, ³유기농업과

In vitro Antimutagenic and Genotoxic Effects of *Sophora Radix* Extracts

Hyeon-Jo Cho¹, Hyunjoo Yoon¹, Kyung-Hun Park¹, Je-Bong Lee², Chang-Ki Shim³, Jin Hyo Kim¹, Mi Hye Jeong², Jin-Ah Oh¹, Doo-Ho Kim¹ and Min-Kyoung Paik^{1*}

¹Chemical Safety Division

²Agro-Material Safety Evaluation Division

³Organic Agriculture Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

(Received on October 4, 2013. Revised on November 13, 2013. Accepted on December 4, 2013)

Abstract *Sophorae radix* extract (SRE) has been registered as an environment-friendly organic material that is widely used in the cultivation of crops in Korea. Matrine, the active ingredient in SRE, was reported as a toxic substance in the nervous system in mice. However, no information is available on its toxic effects in other organisms. Therefore, antimutagenicity and two kinds of genotoxicity tests (bacterial reverse mutation and chromosome aberration test) of two samples of SRE were investigated in this study. Antimutagenicity test was experimented by using bacterial reverse mutation test. In the reverse mutation test, *Salmonella* Typhimurim TA98, TA1535 and TA1537 were used to evaluate the mutagenic potential of SRE. Bacterial reverse mutation test was also performed on positive and negative control groups in the presence of the metabolic activation system (with S-9 mix) and metabolic non-activation system (without S-9 mix). In the chromosome aberration test, Chinese hamster lung cells were exposed to SRE for 6 or 24 hours without S-9 mix, or for 6 hours with S-9 mix. Negative and positive control groups were experimented for chromosome aberration test. As a result, the number of mutated colonies induced by 4-NQO were reduced by SRE treatment in all strains, indicating that SRE may have antimutagenic effects. Reverse mutation was not shown at all concentrations of SRE, regardless of application of the metabolic activation system. In the chromosomal aberration test, one of the SRE sample gave a suspicious positive result at 250 µg/ml in the presence of S-9 mix. For the more adequate evaluation of the genotoxic potential of SRE samples, other *in vivo* genotoxicity study is needed.

Key words Antimutagenic, Genotoxicity, *Sophorae Radix* Extracts

서론

우리나라에서는 농업 환경의 부하를 최소화하기 위해 2013년까지 2003년 대비 화학비료와 농약 사용량을 40% 감소시킨다는 계획아래 병해충종합관리시스템 도입과 화학

비료 줄이기 및 친환경농업 확대 등 친환경농업 육성시책을 펴고 있다(RDA, 2004a; RDA, 2004b). 따라서, 농산물 재배 과정에서 유기농업자재 사용 빈도가 높아져 우리나라 친환경농업 실천농가가 2001년 5천호에서 2010년 184천호로 급증하고 국내 유기농업자재 시장규모가 약 7조원 규모로 성장하였다(KEFAM, 2012).

한편, 국내 유기농업자재로 공시 및 품질 인증된 제품은 2013년 8월 현재 1,141종에 달하고 있으며 이와 더불어 유

*Corresponding author

Tel: +82-31-290-0526, Fax: +82-31-290-0506

E-mail: mink1114@korea.kr

기능성소재의 약효 등에 대한 개발 연구도 활발히 진행되고 있다(Lim et al., 2007; Hwang et al., 2009). 유기농업소재 중에서 식물추출물의 공시 및 인증 비율이 2013년 현재 20%에 달하고 있으며, 특히 고삼추출물은 뛰어난 살충효과를 가지는 것으로 알려져(Hwang et al., 2009), 우리나라에서 유기농업소재 제품에 널리 활용되고 있다.

고삼은 약 4%의 alkaloid 성분으로 이루어져 있으며(Ding et al., 1992), alkaloid 성분으로 matrine과 oxymatrine 등으로 함유되어 있다(Kyogoku et al., 1973). Matrine과 oxymatrine은 유기농업소재 제품에 사용되는 고삼추출물(*Sophora Radix* Extracts; SRE)에서 병해충 예방과 살충효과를 보이는 유효성분(active ingredient)으로 우리나라 유기농업소재 목록공시와 품질인증 단계에서 관리되고 있다

고삼추출물에 대한 연구는 항균성(Park et al., 2003), 항염증성(Royer, 2010), 항아토피피부염성(Song and Kim, 2009) 등 주로 효능측면이나 유효성분인 matrine의 분석법 개발(Kim et al., 2000) 연구 위주로 이루어져 왔을 뿐, 그 특성 및 지속적인 이용에 따른 안전성평가는 매우 미미하게 이루어져 왔다(Wang et al., 2010).

따라서 본 연구에서는 유기농업소재인 고삼추출물에 대한 항돌연변이원성과 유전독성 시험인 복귀돌연변이 시험과 염색체이상 시험을 시행함으로써, 고삼추출물의 농업현장 사용으로 인한 농민과 소비자에 대한 안전성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시험재료

본 시험에 사용된 시료는 시중에 유통되는 고삼추출물로서 유효성분인 matrine을 각각 0.31%와 0.26% 함유하는 시료 2종을 사용하였다. 시험물질은 사용기간 동안 빛이 통하지 않는 불투명한 용기에 담아 실온에서 보관하였으며, 사용직전 0.22 µm filter로 정제하여 시료로 사용하였다.

시험 균주 및 세포

항돌연변이원성과 복귀돌연변이시험에 사용된 균주는 히스티딘 오페론에 변이를 가지고 있는 *Salmonella Typhimurium* TA98 (*hisD3052*), TA1535 (*hisG46*), TA1537 (*hisC3076*)의 3개 균주를 Molttox Inc. 로 부터 분양 받아 사용하였다. 염색체이상시험에 사용된 세포주는 Chinese hamster lung cell로서 American Type Culture Collection (ATCC)로 부터 구입해 사용하였다. 배양액은 10% Fetal Bovine Serum (Gibco)를 포함한 MEM(Minimum Essential Medium, Gibco)을 사용하였으며, 5% CO₂, 37°C 조건에서 2~3일 간격으로 계대 배양하여 사용하였다.

항돌연변이원성 시험의 돌연변이 유발원인 양성물질로 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO; Sigma)를 이용하였다. 복귀

돌연변이시험을 위한 양성대조물질로는 대사활성계 미처리균의 양성대조물질로 *S. Typhimurium* TA98은 2-Nitrofluorene (2NF, Sigma), TA1535는 Sodium azide (SA, Sigma), TA1537은 9-Aminoacridine (9AA, Sigma)를 이용하였고, 대사활성계 처리균의 양성대조물질은 2-Aminoanthracene (2AA, Sigma)를 사용하였다. 염색체이상시험의 양성대조물질은 benzo[e]pyrene (BP, Sigma Aldrich)와 mitomycin C (MMC, Sigma)를 사용하였다. 음성 대조물질은 멸균증류수를 사용하였다.

대사활성물질인 S-9 mix는 Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간을 사용한 것을 Molttox Inc.로 부터 구입하여 사용하였다. S-9 mix는 사용시까지 -20°C에서 냉동 보관하였으며, 사용직전에 4°C에서 냉장보관 된 cofactor I (Wako Pure Chem.)과 1 : 9의 비율로 혼합 후 사용하였다.

항돌연변이원 시험

항돌연변이원 시험은 복귀돌연변이시험을 개량한 preincubation법(Ames et al., 1975; Han et al., 2003)으로 다음과 같이 실시하였다. 고삼추출물의 처리농도는 5,000 µg/plate, 2,500 µg/plate, 1,250 µg/plate로 하였다. 5 mL glass bottom tube에 고삼추출물 50 µL와 4-NQO 50 µL씩 처리한 후 전배양 시킨 균액을 100 µL씩 접종하였다. 대사활성계 미처리균에는 PBS (Phosphate buffer solution, Gibco)를 500 µL 처리하고, 대사활성계 처리균에는 S-9 mix과 PBS를 각각 250 µL씩 처리한 후, 20분 동안 진탕 배양(37°C, 200 rpm)하였다. 1 mM histidine/biotin을 처리한 연한천 2 mL을 진탕 배양한 균액과 혼합하여 최소글루코스배지에 부어 굳힌 후 37°C에서 48시간 배양하여 집락을 계수하였다.

항돌연변이원성 시험은 돌연변이유도제에 대한 저해율(inhibition rate, %)로 나타내며 다음과 같이 계산하였다(Jeun et al., 2011).

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [(M - S_1) / (M - S_0)] \times 100$$

M: 4-NQO처리균에서 복귀된 집락의 수

S₁: 4-NQO와 시료 처리균의 복귀된 집락의 수

S₀: 시료 비처리균에서 자연발생적으로 복귀된 집락의 수

복귀돌연변이 시험

복귀돌연변이시험은 Ames test (Ames et al., 1975; Maron and Ames, 1983)에 따라 전배양법 시험을 실시하였다. 돌연변이원성의 검사를 위해서 S-9 mix와 PBS를 사용하였다. Master plate에서 배양시킨 균주 *S. Typhimurium* TA98, TA1535, TA1537을 10 mL의 nutrient broth (Dibco)에 접종해 37°C에서 200 rpm으로 배양시켰다.

5 mL glass bottom tube에 고삼추출물을 100 µL씩 처리한 후 전배양 시킨 균액을 100 µL씩 접종하였다. 대사활성

계 미처리군에는 PBS를 500 μ L, 대사활성계 처리군에는 S-9 mix를 500 μ L씩 처리하였으며, 30분 동안 진탕 배양하였다. 1 mM histidine/biotin을 처리한 연한천 2 mL을 진탕 배양한 균액과 혼합하여 최소글루코스배지에 부어 굳힌 후 37°C에서 48시간 배양하여 집락을 계수하였다.

결과판정은 복귀돌연변이 집락수가 용량 의존적으로 증가하고 그 수가 음성 대조군에 비해서 2배 이상이거나 통계학적 유의성을 나타낼 경우에 양성으로 판정하였다(Maron and Ames, 1983).

염색체이상시험

고삼추출물의 염색체이상시험은 ‘인축독성 시험기준과 방법’(농촌진흥청 고시 제 2013-21호)에 근거하여 수행되었다. 직경 60 mm plate에 1.6×10^5 세포를 5 mL의 배양액에 파종하여 24시간 배양 한 후, 간접적인 대사활성효소계 적용 처리군의 경우 신선한 배양액 4.35 mL, 시험물질액 0.15 mL 및 S-9 mix 0.5 mL를 분주하여 합계 5 mL가 되도록 처리하였으며, 직접적인 대사활성효소계 미적용 처리군의 경우 신선한 배양액 4.85 mL, 시험물질액 0.15 mL를 분주하여 합계 5 mL가 되도록 각각 처리하였다.

시험물질은 간접법에서는 6시간, 직접법에서는 6시간 및 24시간 동안 실시하였으며, 6시간 시험물질을 적용하는 경우 처리종료 시각에 처리액을 제거하고 신선한 배양액으로 교환하여 18시간 동안 추가 배양하였다. 모든 plate에 대해 분열중기세포 수거 2시간 전에 colcemid (Gibco)를 최종농도 0.2 μ L/mL가 되도록 처리하고, 시험물질 처리 개시 후 24시간에 Trypsin-EDTA 를 사용하여 분열중기세포를 수거하였다. 수거한 분열중기세포에 저장액(0.75 M KCl) 4 mL를 가하여 37°C 수욕상에서 15분간 처리 후 냉각 고정액(메탄올 : 빙초산 = 3 : 1)으로 3회 고정시킨 후 염색체 표본을 만들고 10% giemsa (Fluka) 염색 후 현미경(Nikon, Eclipse 80i, Japan)으로 관찰하였다.

각 농도군당 300개의 중기상으로부터 결과를 해석하고, 결과해석을 위해 구조이상(structural aberration)과 수적이상(numerical aberration)으로 나누어 계수하였다(JEMS-MMS, 1988). 염색체이상 여부의 판정은 Motoi and Odashima (1977)의 자료를 근거로 하여 gap을 제외한 이상세포의 평균 출현율이 5% 이상 10% 미만이면 의양성, 10% 이상이면 양성으로 최종 판정 하였다.

결과 및 고찰

항돌연변이 시험

고삼 추출물(5.0, 2.5, 1.25 mL/plate)의 항돌연변이효과를 살펴보고자 4-NQO(0.15 μ g/plate)를 이용한 항돌연변이 시험을 시행한 결과는 Fig. 1과 같다. 항돌연변이원성은 돌연

변이 유발물질로 사용된 4-NQO에 의한 돌연변이 집락수를 0%로 하여 시험물질의 항돌연변이 비율로 살펴보았으며, 고삼추출물 시료A와 B는 모든 농도 처리군에서 각각 71.0-98.2%, 76.3-96.7%로 나타나 항돌연변이효과가 있는 것으로 생각된다.

대사활성계 미처리군의 경우, 고삼추출물 시료 A와 B의 농도별 처리에서 농도 증가에 따른 의존성이 일치되게 나타나지 않았으나 시료 B에서 TA1537은 농도의존적으로 저해율이 증가하였다. 반면, 대사활성계 처리군(S-9 mix 처리)의 경우 고삼추출물 시료 A, B 모두에서 TA1535에 대해 항돌연변이 저해율이 농도 의존적으로 증가하였다. 특히 시료 B에서는 구조이동 돌연변이 균주인 TA98과 TA1537에서 고삼추출물 처리농도 증가에 따라 항돌연변이 저해율이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 Jeun et al. (2011)의 연구에서 식물추출물인 삼중실유가 항돌연변이효과를 가지며, 특히 구조이동 돌연변이 균주인 TA98에 대한 항돌연변이효과가 염기쌍 치환 균주인 TA100 보다 높게 나타난다고 보고함으로써 본 연구 결과와 유사한 경향을 보였다.

항돌연변이원성은 대사활성계 미처리군에서 고삼추출물의 농도가 증가 할수록 항돌연변이 저해율이 감소하는 경향을 보였으며, 특히 TA1535, TA1537에서 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 반면 TA98, TA1535와 TA1537의 모든 균주에서 대사활성 처리군이 미처리군에 비해 저해율이 유의적으로 낮았고, 이는 농도가 증가함에 따라 항돌연변이 저해율이 증가하는 것으로 나타났다.

본 고삼추출물의 항돌연변이원성 시험에서는 대사활성계 미처리군에서 시험농도 증가에 따른 항돌연변이 저해율의 증가 양상이 일관되지 않았다. 한편, Shin and Koo (1998)는 마 추출물의 항돌연변이성 연구에서 S-9 mix를 처리하였을 때의 항돌연변이 저해율이 S-9 mix을 처리하지 않았을 때보다 높게 나타났다고 보고하였다. 따라서, 본 연구에서도 생체와 유사한 조건인 대사활성계 처리군의 항돌연변이 저해율이 미처리군에 비해 높게 나타날 것으로 예측하였으나, 시험결과 고삼추출물을 저농도로 처리한 경우 *in vitro* 조건인 대사활성계 미처리군의 저해율이 처리군에 비해 낮게 나타나 선행연구 결과와 차이를 보였다. 그러나, 대사활성계 처리군에서 고삼추출물의 시험농도가 증가할수록 항돌연변이 저해율이 유의적으로 증가함에 따라, 고삼추출물은 농도의존적으로 항돌연변이효과가 증가하는 것으로 생각된다.

복귀돌연변이 시험

본 시험의 최고농도를 결정하기 위하여 5,000 μ g/plate, 2,500 μ g/plate, 1,250 μ g/plate, 625 μ g/plate, 312.5 μ g/plate, 100 μ g/plate에서 예비독성 시험을 수행한 결과, 예비시험의 최고농도인 5,000 μ g/plate에서 세포독성이 나타나지 않아 본 시험의 시험농도를 5,000 μ g/plate, 2,500 μ g/plate, 1,250

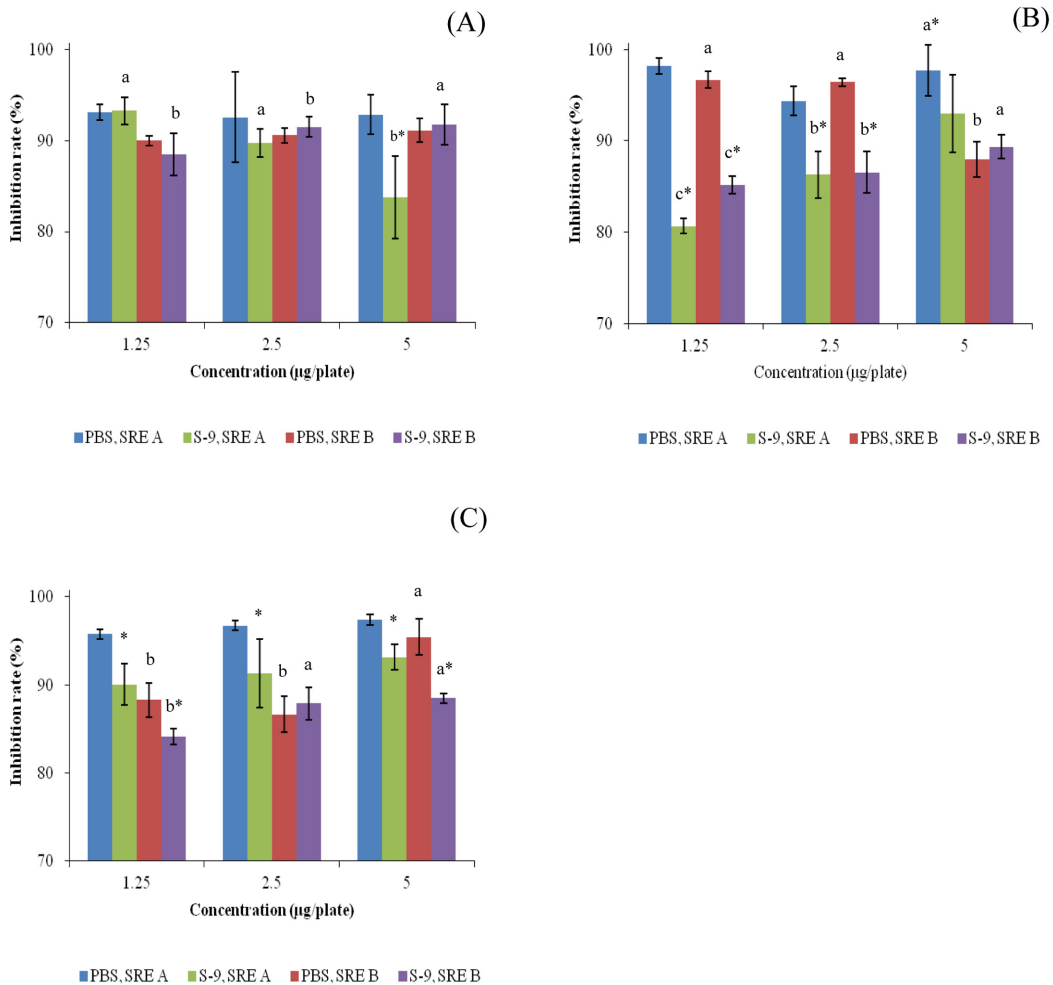


Fig. 1. Antimutagenic effect of SRE A and B against 4-NQO (0.15 µg/plate) in *S. Typhimurium* TA98(A), TA1535(B) and TA1537(C). ^{abc}: Above each histogram means with different superscript letters are different ($p < 0.05$) among groups treated by different concentration of SRE. *: Means with the same histogram means with different superscript letters are different ($p < 0.05$) between groups with and without S-9 mix.

µg/plate로 결정하였다.

고삼추출물 시료를 *S. Typhimurium*을 이용해 복귀돌연변이 시험을 실시한 결과는 Table 1과 같다. 균주별로 사용된 양성대조군의 복귀돌연변이 집락수는 음성대조군의 집락수에 비해 유의적으로 높게 나타나($p < 0.05$) 본 시험이 적절한 조건하에서 실시되었음을 확인할 수 있었다. 고삼추출물 모든 시험 농도군에서 대화활성계의 처리 유무와 관계없이 시험물질에 대한 복귀 돌연변이 집락수는 용량의존적으로 증가되지 않았으며 2배 이상의 증가도 인정되지 않아 음성으로 판정하였다.

이는 고삼추출물을 최고농도 5.0 mg/plate로 복귀돌연변이 시험을 시행한 결과, 모든 농도 처리군에서 음성으로 판정되었으며(KFDA, 2006), 한약재로 사용되는 식물성 추출물인 천심련(*Andrographis paniculata*) 추출물도 또한 TA98을 이용한 복귀돌연변이 시험을 실시하였을 때 최고농도인 5000 µL/mL에서 안전한 것으로 나타나(Chandrasekaran et

al., 2009) 본 시험 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

염색체이상시험

염색체이상 시험의 본 시험농도를 결정하기 위해 MTT (MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)) 시험법으로 예비 독성시험을 위하여 시험물질을 5 mg/mL로 공비 2의 8가지 농도로 조제 및 희석하여 시험하였다. 예비 독성시험 결과, 약 50% 세포증식 억제농도는 고삼추출물 시료 A의 6시간 대사활성계 처리군에서 750 µg/mL, 6시간 대사활성계 미처리군에서 400 µg/mL, 24시간 대사활성계 미처리군에서 250 µg/mL 이었으며, 고삼추출물 시료 B의 6시간 대사활성계 미처리군에서 250 µg/mL, 24시간 대사활성계 미처리군에서 250 µg/mL, 6시간 대사활성계 처리군에서 500 µg/mL로 확인되었다. 염색체이상시험의 본 시험에서는 최고농도에서 공비 2로 3가지 농도로 시험물질을 처리하였다.

Table 1. Bacterial reverse mutation test using *S. Typhimurium* TA98, TA1535 and TA1537 treated with SRE A and B

Test strain	Test substance	Concentration (µg/plate)	Colonies/plate (Mean ± SD)			
			SRE A		SRE B	
			S-9 mix (-)	S-9 mix (+)	S-9 mix (-)	S-9 mix (+)
TA98	SDW	-	16.0 ± 3.0	23.8 ± 2.9	16.0 ± 3.0	23.8 ± 2.9
	2NF	1.0	48.2 ± 3.7		48.2 ± 3.7	
	2AA	10		61.2 ± 4.9		61.2 ± 4.9
		5,000	17.0 ± 3.4	25.0 ± 4.3	16.2 ± 2.8	25.5 ± 3.9
	SRE	2,500	17.5 ± 2.1	27.2 ± 1.5	16.7 ± 2.4	23.8 ± 5.3
		1,250	16.5 ± 2.4	21.3 ± 1.6	17.7 ± 2.7	24.3 ± 3.1
TA1535	SDW	-	8.3 ± 1.5	15.2 ± 0.8	8.3 ± 1.5	15.2 ± 0.8
	SA	1.0	19.5 ± 1.0		19.5 ± 1.0	
	2AA	2.5		33.8 ± 3.3		33.8 ± 3.3
		5,000	7.2 ± 1.9	13.0 ± 1.9	8.2 ± 2.3	14.5 ± 2.4
	SRE	2,500	7.0 ± 1.3	16.0 ± 2.0	7.5 ± 1.8	15.2 ± 1.6
		1,250	7.8 ± 1.3	14.5 ± 2.2	6.2 ± 0.8	14.7 ± 2.6
TA1537	SDW	-	7.0 ± 2.2	10.0 ± 2.8	7.0 ± 2.2	10.0 ± 2.8
	9AA	50	106.2 ± 20.7		106.2 ± 20.7	
	2AA	10		29.2 ± 2.5		29.2 ± 2.5
		5,000	5.2 ± 1.2	5.5 ± 1.0	5.8 ± 1.8	10.2 ± 1.9
	SRE	2,500	5.7 ± 1.0	4.7 ± 2.1	6.7 ± 1.4	8.8 ± 2.1
		1,250	5.0 ± 0.6	7.3 ± 1.8	5.8 ± 1.2	10.7 ± 1.4

SDW: sterile distilled water, 2NF: 2-Nitrofluorene, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
 SRE A: *Sophorae radix* extract sample A, SRE B: *Sophorae radix* extract sample

고삼추출물의 염색체이상 시험으로 분열중기 상의 세포를 각 농도당 100개씩 총 300개의 세포를 계수한 결과는 Table 2와 같다. 음성대조군은 대사활성계 처리 유무에 따른 모든 조건에서 구조적 이상 출현이 0%로 염색체 이상이 나타나지 않았으며, 양성대조군으로 사용된 MMC를 대사활성계 미처리 조건으로 6시간 및 24시간 처리시 각각 38.0% 및 27.5%의 염색체 이상을 보였으며, BP는 22.5%로 양성대조군은 모든 조건에서 음성대조군에 비해 유의적으로 염색체 이상이 증가함으로써(p < 0.05) 본 시험과 방법에 대한 신뢰도가 높다고 판단하였다.

고삼추출물의 염색체이상 시험 결과, 시료 A는 대사활성계 처리유무와 관계없이 모든 농도에서 염색체 이상을 유발하지 않았으며, 시료 B는 최고농도, 즉 대사활성계 미처리군(6시간 및 24시간) 250 µg/mL, 대사활성계 처리군 500 µg/mL의 농도에서 6.0~7.7%의 구조적 염색체 이상을 보여 의양성으로 판정되었으나, 그 이하의 농도에서는 모두 음성으로 나타났다. 이는 선행연구에서 고삼추출물 5 mg/mL군이 대사활성계 처리군에서 음성대조군과 비교하여 염색체의 구조적 이상(breakage, exchange)이 유의성있게 증가하였으며, 2.5 mg/mL 이하의 농도에서도 통계학적인 유의성은 인정되지 않았지만 용량의존적으로 증가되는 것이 관찰되었다고

보고되어(KFDA, 2006), 본 연구의 염색체의 구조적이상이 발생하는 농도와 차이가 있으나 유사한 경향을 보였다.

한편, 최근 염색체이상 시험 결과에서 나타나는 발생하는 높은 비율의 양성반응으로 인해 *in vitro* 유전독성시험법의 검증에 대한 필요성이 제기됨에 따라(Kirkland et al., 2005), ICH (Internationally Chemical Harmonization)에서 유전독성 시험과 데이터 해석을 위한 지침(S2R1)을 통해 battery system을 도입하여 새로운 유전독성의 평가 기준을 확립하였다(ICH, 2012). 이 지침에서는 *in vitro* 시험 중 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험(Ames test) 실시와 함께, 포유류 배양세포를 이용한 *in vitro* 염색체이상시험 또는 *in vitro* 소핵시험, 마우스립포마 assay 중 한 시험을 수행하여 두 결과가 모두 음성인 경우 유전독성이 없다고 최종 판정하도록 하고 있다(Dearfield et al., 2011).

본 시험에서는 유전독성 battery system에 따라 2개의 *in vitro* 유전독성으로 복귀돌연변이 시험과 염색체이상 시험을 실시한 결과 한 개의 시료의 최고농도군에서 의양성을 보임에 따라 유전독성 battery system의 *in vivo* 시험을 추가로 실시하여 유전독성 여부를 최종 확인할 필요가 있다.

또한, 선행 결과에서 식물성추출물의 경우 추출 용매의 차이에 따라 독성이 다르게 나타난다고 보고되고 있어

Table 2. Results of chromosome aberration test of *Sophora Radix* Extracts

Conc. of treatment (µg/mL)	Time of treatment (hr)	S9 Mix	No. of structural abnormality ^a										Normal cell ^d	Decision ^e	
			Chromatid			Chromosome				Total					
			ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	T(-g) ^b	T(+g) ^c					
D.W	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0 ± 0.0	-	
100	6	-	0.5 ± 0.7	-	1.0 ± 0.0	-	-	-	-	-	-	1.0 ± 0.0	1.3 ± 0.3	99.0 ± 0.0	-
Sample A	200	-	3.0 ± 1.0	-	1.0 ± 1.0	-	-	-	-	-	-	1.3 ± 1.2	4.0 ± 0.0	98.7 ± 1.2	-
400	6	-	2.3 ± 0.6	0.3 ± 0.6	2.3 ± 1.5	1.0 ± 0.0	-	-	-	-	-	2.7 ± 1.2	6.0 ± 1.0	97.3 ± 1.2	-
62.5	6	-	0.5 ± 0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5 ± 0.7	100.0 ± 0.0	-
Sample B	125	-	0.3 ± 0.6	0.7 ± 0.6	1.0 ± 1.0	-	-	-	-	-	-	1.7 ± 1.2	2.0 ± 1.0	98.3 ± 1.2	-
250	6	-	2.7 ± 0.6	0.3 ± 0.6	2.7 ± 1.2	0.3 ± 0.6	-	-	3.0 ± 1.0	6.0 ± 1.7*	9.0 ± 1.0	6.0 ± 1.7*	9.0 ± 1.0	94.0 ± 1.7	±
MMC (0.2 µg/mL)	6	-	7.5 ± 4.9	22.0 ± 1.4	8.5 ± 2.1	1.5 ± 0.7	11.5 ± 13.4	3.5 ± 4.9	38.0 ± 5.7**	47.0 ± 9.9	62.0 ± 5.7	62.0 ± 5.7	62.0 ± 5.7	62.0 ± 5.7	+
D.W	6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0 ± 0.0	-
187.5	6	+	0.7 ± 0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7 ± 0.6	100.0 ± 0.0	-
Sample A	375	+	1.3 ± 0.6	-	2.0 ± 1.0	0.7 ± 0.6	-	-	-	-	-	2.0 ± 1.0	4.0 ± 1.0	98.0 ± 1.0	-
750	6	+	3.0 ± 1.0	0.3 ± 0.6	2.3 ± 1.5	0.3 ± 0.6	-	-	-	-	-	2.7 ± 1.5	6.0 ± 0.0	97.3 ± 1.5	-
125	6	+	1.0 ± 1.0	-	0.7 ± 0.6	-	-	-	-	-	-	1.0 ± 1.0	2.0 ± 1.0	99.0 ± 1.0	-
Sample B	250	+	-	-	2.3 ± 0.6	-	-	-	-	-	-	2.3 ± 0.6	2.3 ± 0.6	97.7 ± 0.6	-
500	6	+	1.0 ± 1.0	0.3 ± 0.6	2.7 ± 0.6	-	-	-	4.0 ± 1.7	7.3 ± 2.9*	8.0 ± 1.7	7.3 ± 2.9*	8.0 ± 1.7	92.7 ± 2.9	±
BP (20 µg/mL)	6	+	7.0 ± 1.4	9.0 ± 1.4	9.0 ± 0.0	3.0 ± 4.2	3.0 ± 4.2	2.0 ± 1.4	22.5 ± 4.9**	33.0 ± 7.1	77.5 ± 4.9	77.5 ± 4.9	77.5 ± 4.9	77.5 ± 4.9	+
D.W	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0 ± 0.0	-
62.5	24	-	0.7 ± 0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7 ± 0.6	100.0 ± 0.0	-
Sample A	125	-	1.0 ± 1.0	0.3 ± 0.6	1.0 ± 0.0	0.3 ± 0.6	-	0.3 ± 0.6	1.3 ± 1.5	3.0 ± 2.0	98.7 ± 1.5	1.3 ± 1.5	3.0 ± 2.0	98.7 ± 1.5	-
250	24	-	2.0 ± 1.0	-	2.7 ± 1.5	1.0 ± 0.0	-	-	2.7 ± 1.5	5.7 ± 0.6	97.3 ± 1.5	2.7 ± 1.5	5.7 ± 0.6	97.3 ± 1.5	-
62.5	24	-	0.3 ± 0.6	-	-	-	-	-	-	-	100.0 ± 0.0	-	0.3 ± 0.6	100.0 ± 0.0	-
Sample B	125	-	1.7 ± 1.2	0.3 ± 0.6	2.0 ± 1.0	-	-	-	2.3 ± 0.6	4.0 ± 1.7	97.7 ± 0.6	2.3 ± 0.6	4.0 ± 1.7	97.7 ± 0.6	-
250	24	-	1.7 ± 1.2	2.0 ± 1.0	2.0 ± 1.7	0.7 ± 0.6	-	1.3 ± 0.6	5.3 ± 1.5*	7.7 ± 1.5	94.7 ± 1.5	5.3 ± 1.5*	7.7 ± 1.5	94.7 ± 1.5	±
MMC (0.2 µg/mL)	24	-	10.5 ± 7.8	14.0 ± 8.5	10.0 ± 1.4	2.0 ± 2.8	4.0 ± 5.7	3.0 ± 0.0	27.5 ± 9.2**	40.0 ± 1.4	72.5 ± 9.2	40.0 ± 1.4	40.0 ± 1.4	72.5 ± 9.2	+

ctg, chromatid gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csg, chromosome gap; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange.

^a300 cells were analyzed in each group.

^btotal aberrant cells (excluding gaps).

^ctotal aberrant cells (including gaps).

^dtotal normal cells per 100 cells (excluding gaps).

^e -, negative, total frequency of chromosomal aberrations < 5.0%; ±, suspicious positive, total frequency of chromosome aberration was 5.0% to < 10.0%; +, positive, total frequency of chromosome aberration was 10.0% and more.

*: significant at p < 0.05.

All values are expressed as Mean ± S.D.

(Boeke et al., 2004), 고삼추출물이 유기농업자재의 원료로 사용하기 위해서는 고삼추출물의 정확한 추출 용매에 대한 정보를 목록공시와 품질인증 등록단계에 기재하는 것이 안전성을 확보하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ00895303)의 지원에 의해 이루어진 것임

Literature Cited

- Ames, B. N., J. McGann and E. Yamasaki (1975) Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31(6):347-364.
- Boeke, S. J., M. G. Boersma, G. M., Alink, J. J., van Loon, A., van Huis, M., Dicke, and I. M. Rietjens (2004) Safety evaluation of neem (*azadirachta indica*) derived pesticides. *J. Ethnopharmacol.* 94(1):25-41.
- Chandrasekaran, C. V., P. Thiyagarajan, K. Sundarajan, K. S. Goudar, M. Deepak, B. Murali, J. J. Allan and A. Agarwal (2009) Evaluation of the genotoxic potential and acute oral toxicity of standardized extract of *Andrographis paniculata* (KalmCold™). *Food Chem. Toxicol.* 47(8):1892-1902.
- Dearfield, K. L., V. Thybaud, M. C. Cimino, L. Custer, A. Czich, J. S. Harvey, S. Hester, J. H. Kim, D. Kirkland, D. D. Levy, E. Lorge, M. M. Moore, G. Ouédraogo-Arras, M. Schuler, W. Suter, K. Sweder, K. Tarlo, J. van Benthem, F. van Goethem and K. L. Witt (2011) Follow-up actions from positive results of *in vitro* genetic toxicity testing. *Environ. mol. mutagen.* 52(3):177-204.
- Ding, Y., R. H. Tian, J. Kinjo, T. Nohara and I. Kitagawa (1992) Three new oleanene glycosides from *sophora flavescens*. *Chem. Pharm. Bull.* 40(11):2990-2994.
- Han, J. K., K. S. Chang and K. C. Nam (2003) Growth of seedling and germination characteristics of *Acanthopanax koreanum* Nakai. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 11(1):24-52.
- Hwang, I., J. Kim, H. Kim, D. Kim, S. Kim, S. Kim and C. Jang (2009) Evaluation of toxicity of plant extract made by neem and matrine against main pests and natural enemies. *Korean J. Appl. Entomol.* 48(1):87-94.
- ICH(International Conference on Harmonization) (2012) Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. pp. 33748-33749.
- JEMS-MMS (Japanese Environmental Mutagen Society-Mammalian Mutagenicity Study Group) (1988) Atlas of chromosome aberration by chemicals. Tokyo, Japan.
- Jeun, J., H. J. Cho, H. Jun, J. H. Lee, Y. Jia, K. S. Cho, E. S. Kim and S. Lee (2011) Mutagenic and antimutagenic effects of hemp seed oil evaluated by Ames *Salmonella* testing. *Korean Food Sci. Technol.* 43(3):396-400.
- KEFAM (Korea Eco-friendly Agro-materials) Association (2012) Standard guidelines of environment-friendly organic materials.
- KFDA (Korea Food and Drug Administration) (2006) 13 week repeated dose toxicity and genotoxicity studies of *Sophorae radix*. pp. 141-160.
- Kim, S. J., S. S. Kang, K. S. Lee, S. Chang and D. H. Won (2000) Isolation and quantitative determination of matrine from *Sophorae radix*. *Kor. J. Pharmacogn.* 31(4):421-425.
- Kirkland, D., M. Aardema, L. Herderson and L. Miller (2005) Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat. Res.* 584(1-2):1-256.
- Kyogoku, K., K. Hatayama and M. Komatsu (1973) Constituents of Chinese crude drug "kushen" isolation of five new flavonoids and formononetin. *Chem. Pharm. Bull.* 21(12):2733-2738.
- Lim, K. H., S. J. Kim, K. J. Choi, D. I. Kim, S. G. Kim and Y. H. Lee (2007) Survey of disease and weed control in organic and free-pesticide cultivation of Chunnam area 'Ssam' vegetables. *Korean J. Org. Agric.* 15(1):109-121.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Reversed methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113(3-4):173-215.
- Motoi, I. Jr and S. Odashima (1977) Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*-A for chemicals carcinogens. *Mutation Research*, 48:337-354.
- Park, S., Y. Nam and D. Kim (2003) The antibiosis of moisture water included the *Sophora Radix* Extracted by ethanol solvent on bacteria. *J. Fash. Bus.* 7(5):13-16.
- RDA (Rural Development Administration) (2004a) Organic and environmental friendly agriculture method. pp. 600.
- RDA (Rural Development Administration) (2004b) Technical development plan of environmental-friendly agriculture on crops. pp. 1-25.
- Royer, R. (2010) Anti-inflammatory Effect of *Sophorae Radix* Extract; Anti-inflammatory effect of *Sophorae Radix* Extract. MS Thesis. Kyungwon University, Korea.
- Shin, N. and S. Koo (1998) Antimutagenic effects of dietary fiber from yam (*dioscorea batatas decne*) against 2-AF and MNNG. *Korean J. Soc. Food Sci.* 14(4):333-338.
- Song, D. and H. Kim (2009) The effect of Kushen ethanol extract cream to NC/Nga mice induced by *Dermatophagoides farinae*. *J. Kor. Soc. Cosm.* 15(4):1243-1252.
- Wang, X., L. Liang, J. Chang, M. Yang and Z. Li (2010) Toxicity of matrine in Kunming mice. *J. South Med. Univ.* 30(9):2154-2155.

고삼추출물의 *in vitro* 항돌연변이원성과 유전독성 연구

조현조¹ · 윤현주¹ · 박경훈¹ · 이재봉² · 심창기³ · 김진호¹ · 정미혜² · 오진아¹ · 김두호¹ · 백민경^{1*}

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 ¹화학물질안전과, ²농자재평가과, ³유기농업과

요 약 고삼추출물은 한국에서 유기농업자재로 등록되어 있어 친환경농산물 재배시에 널리 사용되고 있다. 고삼추출물의 유효성분인 *matrine*은 쥐의 신경계에 독성을 나타낸다고 보고된 바 있으나 다른 안전성 확인 연구는 미비한 상황이다. 따라서 본 연구는 고삼추출물 2종을 이용하여 항돌연변이원성 시험과 유전독성시험 2종(복귀돌연변이 및 염색체이상 시험)을 실시하였다. 항돌연변이원성 시험은 복귀돌연변이 시험방법을 이용하여 실시하였으며, 복귀돌연변이 시험으로는 *Salmonella Typhimurium* TA98, TA1535와 TA1537을 이용하여, S-9 mix를 사용한 대사활성계 처리군과 PBS를 사용한 대사활성계 미처리군으로 구분하여 진행하였다. 염색체이상 시험은 Chinese hamster lung cells을 이용하여 고삼추출물 시료에 대사활성계 처리군은 6시간 노출시켰고, 대사활성계 미처리군은 각각 6시간과 24시간 노출시켜 시험하였다. 항돌연변이 시험 결과, 4-NQO에 의해 유도된 돌연변이 집락수는 고삼추출물 시료 처리에 의해 감소되어 항돌연변이 효과가 있는 것으로 나타났다. 시험결과, 복귀돌연변이 시험에서는 고삼추출물의 모든 시험 농도군에서 대사활성계의 처리 유무와 관계없이 독성이 나타나지 않았다. 반면, 염색체이상시험 결과 고삼추출물 시료 1종에서 대사활성계 미처리군에서는 250 µg/mL, 대사활성 처리군에서는 500 µg/mL 의 농도에서 의양성이 나타났고 이 이하의 농도에서는 모두 음성으로 나타났으며, 나머지 시료 1종에서는 모든 처리농도군에서 음성으로 판정되었다. 고삼추출물의 유전독성 가능성을 더 정밀히 평가하기 위해서는 향후 battery system에 포함된 다른 *in vivo* 유전독성 시험을 추가로 시행하여 유전독성 여부를 최종 확인할 필요가 있다고 판단된다.

색인어 항 돌연변이, 유전 독성, 고삼추출물