

## *In vitro* Antimutagenic and Genotoxic Effects of *Azadirachta indica* Extract

Hyunjoon Yoon · Hyeon-Jo Cho · Jin Hyo Kim · Kyung-Hun Park ·  
Geun-Hwan Gil · Jin-Ah Oh · Namjun Cho · Min-Kyoung Paik\*

### 넝추출물의 *in vitro* 항돌연변이원성 및 유전독성 영향

윤현주 · 조현조 · 김진효 · 박경훈 · 길근환 · 오진아 · 조남준 · 백민경\*

Received: 21 October 2013 / Accepted: 7 February 2014 / Published Online: 30 September 2014  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2014

**Abstract** *Azadirachta indica* extract (AIE) has been regarded as a promising source of environment-friendly organic materials owing to their low mammalian toxicity. However, quite a bit of research has been reported that AIE may cause clastogens in human lymphocytes. Therefore, this study was conducted to evaluate the antimutagenic and genotoxicity of two samples of AIE. Antimutagenic test was experimented by using bacterial reverse mutation test. In the bacterial reverse mutation test, five strains *Salmonella* Typhimurim of two samples of AIE in order to evaluate its mutagenic potential. Bacterial reverse mutation test was also performed on positive control and negative control groups in the presence of the metabolic activation system (S-9 mix) and metabolic non-activation system. In the chromosome aberration test, Chinese hamster lung cells were exposed to AIE for 6 or 24 h with BPS, or for 6 h 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 AIE treatment in all strains, indicating that AIE may have antimutagenic effects. Bacterial reverse mutation and chromosomal aberration were not shown at all concentration of AIE, regardless of activation of the metabolic system. we concluded that two AIE samples used in this study have no genotoxic effects to human, according to the genotoxicity battery system suggested by ICH (International Conference on Harmonization).

**Keywords** antimutagenic · *azadirachta indica* extract · bacterial reverse mutation test · chromosomal aberration test

### 서론

경제 성장 및 소득의 증가로 인해 소비자의 건강에 대한 인식과 관심이 높아지고 친환경 농산물의 소비가 증가함에 따라 친환경농산물 시장 규모가 '10년 약 3조 6,500억원에 달하였으며, '20년에는 6.6조에 이를 것으로 예상하고 있다(Park 등, 2011; KEFAM, 2012). 이에 발 맞추어 유기농업자재들의 사용도 급증하여 2013년 8월 현재 우리나라 유기농업자재 공시 및 품질인증된 제품인 1,141종에 해당되며, 이 중에서도 고삼 추출물, 넝 추출물, 데리스 추출물과 같은 천연식물추출물의 비율이 약 20%에 달하고 있다.

넝(*Azadirachta indica*)은 치료 목적으로도 많이 사용되는 식물로서 azadirachtin, azadiradione, salannin, epoxyazadiradione 등의 주성분을 가지며, 혈압강하, 고지혈증 개선, 항종양효과, 항염증에도 효과를 가지고 있다(Han, 1989; Govindachari 등, 1998; Paterson, 2006), 특히 azadirachtin은 triterpenoid 물질로 곤충의 작물의 섭식을 기피 및 방지하는 효과가 뛰어나고, 탈피호르몬에 작용하여 번식을 억제함으로써(Schutterer, 1990) 작

H. Yoon · H.-J. Cho · J. H. Kim · K.-H. Park · J.-A. Oh · N. Cho ·  
M.-K. Paik

Chemical Safety Division, National Academy of Agricultural Sciences,  
Rural Development Administration, 166 Nongsaengmyeong-ro, Iseo-myeon,  
Wanju-gun, Jeollabuk-do, Republic of Korea

G.-H. Gil  
Agro-Material Safety Evaluation Division, National Academy of Agricultural  
Sciences, Rural Development Administration, 166 Nongsaengmyeong-ro,  
Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do, Republic of Korea

\*Corresponding author (M.-K. Paik: [mink1114@korea.kr](mailto:mink1114@korea.kr))

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

물을 병해충으로부터 예방하는 효과가 있어 유기농업자재로도 널리 사용되고 있다(Boeke 등, 2004).

한편, 님 추출물의 azadirachtin 성분이 염색체의 구조 이상을 일으키고(Rosenkranz와 Klopman, 1995), 동물실험에서 말초혈액에서 분열중기의 변화를 초래할 수 있다고 보고되는 등 님 추출물이 인체에 미치는 독성영향도 알려져 있다(Awashy 등, 1995; 1999). 또한, 님을 추출할 때 사용된 용매나 추출방법에 따라 최대허용독성수준(NOEAL; No Observable Adverse Effect level)이 다르게 보고되고 있어(Singh 등, 1987; El-Hawary와 Kholief, 1990; Tandan 등, 1995) 우리나라에서 유기농업자재 제품에 사용되는 님추출물의 안전성 확인이 필요할 것으로 생각된다.

따라서 본 실험에서는 2종의 님추출물을 이용하여 항돌연변이원성 시험과 함께 유전독성시험인 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험과 체외 염색체이상 시험을 시행함으로써, 님 추출물을 농업현장에서 사용하는 농민 및 소비자의 인체에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료.** 본 시험에서는 시중에 유통되는 인도산 님추출물 2종(A, B)을 구입하여 시험에 사용하였다. 시험물질은 사용기간 동안 빛이 통하지 않는 불투명한 용기에 담아 실온에서 보관하였으며, 사용직전 0.22 µL filter를 이용하여 정제 후 사용하였다.

**시험균주 및 세포.** *Salmonella* Typhimurium TA98 (*hisD3052*,  $\Delta$ *uvrB*, rfa/pKM101), TA100 (*hisG46*,  $\Delta$ *uvrB*, rfa/pKM101), TA102 (*hisG428*, rfa/pKM101), TA1535 (*hisG46*,  $\Delta$ *uvrB*, rfa), TA1537 (*hisC3076*,  $\Delta$ *uvrB*, rfa) 모두 5개 균주를 Moltox (USA)에서 분양 받아 형질확인 후 계대배양한 것을 항돌연변이원성과 복귀돌연변이시험에 사용하였다. 염색체이상 시험에서는 Chinese Hamster Lung cell (ATCC, USA)를 사용하였으며, 세포주를 Minimum Essential Medium (Gibco, USA) 액체배지에 10% FBS (Gibco), Pen strep (Gibco) 5.5 mL, L-glutamine 200 mM (100X) (Gibco) 5.5 mL을 혼합하여 사용하였다. 세포는 37°C 배양기(5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하여 2-3일마다 세포를 계대배양하여 사용하였다.

**시약.** 님추출물의 유효성분 분석을 위해 사용된 표준물질 azadirachtin A, azadirachtin B, deacetylsalannin과 salannin은 ChromaDex (USA)에서 구매하여 사용하였다. 복귀돌연변이 시험에 사용되는 양성물질은 2-nitrofluorene (2NF), sodium azide (SA), mitomycin C (MMC), 9-aminoacridine (9AA), 2-aminoanthracene (2AA)를, 염색체이상시험의 양성대조물질은 benzo[e]pyrene와 MMC를 Sigma (USA)에서 구매하여 사용하였다. 항돌연변이원성과 복귀돌연변이의 음성대조군에는 dimethyl sulfoxide (Sigma)를 이용한다.

항돌연변이 및 유전독성시험에서 대사활성물질로 사용된 S-9은 Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간을 사용한 것을 Moltox Inc.로 부터 구입 하였으며 사용 전까지 -20°C에서 냉동 보관하였다. Cofactor I (Wako Pure Chem. Ind. Ltd, Japan)은 4°C에서 냉장 보관하였으며, S-9 mix는 S-9과 Cofactor I을 1:9의 비율로 혼합한 후 사용하였다.

**Azadirachtin 및 이성질체 분석.** 시험에 사용된 님 추출물 시

료에 대한 정확한 유효성분의 함량을 확인하고자 유기농업자재의 유효성분인 azadirachtin 및 그 이성질체들을 분석하였다. 시료의 정제 및 정량분석은 Lee 등 (2013)의 방법에 따라 아래와 같이 수행하였다. 추출물 시료 1 mL 를 증류수 49 mL 를 사용하여 50배 희석하고, Dichloromethane (25 mL×3)으로 분액정제 한 후, 감압농축하였다. 농축액은 methanol 0.5 mL에 재용해 후, 증류수 9.5 mL 로 희석하였다. 준비된 시료 1 mL 를 hydrophilic-lipophilic balanced 카트리지 (60 mg, Oasis, Waters Co., USA)에 옮겨 넣고, 5% methanol수용액 2 mL로 씻은 후, methanol 5 mL로 용출한 용액을 감압농축 후 UPLC기기분석용 시료로 사용하였다. 정량분석은 BEH Phenyl column (1.7 mm, 3 mm×100 mm, Waters, Ireland) 을 분리용 칼럼으로 사용하였고, 217 nm에서 정량 측정하였다.

**항돌연변이원성 시험.** 항돌연변이원성 시험은 복귀돌연변이 (Maron과 Ames, 1983)의 전배양법을 개량하여 시험을 실시하였다.

*S. Typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 및 TA1537을 10 mL의 nutrient broth (Difco™, USA)에 접종해 진탕배양하였다(37°C, 16시간, 200 rpm). 5 mL round bottom tube (Korea)에 님 추출물 시료와 4NQO를 각각 50 µL씩 첨가한 후 배양시킨 균을 100 µL씩 접종하여 대사활성계 미처리군에는 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)를, 대사활성계 처리군에는 S-9 mix를 첨가하여 최종 용량이 700 µL가 되도록 하여 37°C에서 진탕배양한 후(20분, 200 rpm) 1 mM histidine/biotin을 첨가된 연한천 2 mL을 균액과 혼합하여 최소글루코스배지에 부어 균한 후 37°C에서 48시간 동안 배양 후 집락을 계수하였다. 돌연변이유도제에 대한 저해율(inhibition rate, %)은 Jeun 등(2011)의 방법에 따라 계산하였다.

**복귀돌연변이 시험.** 복귀돌연변이시험은 Maron과 Ames(1983)에 따라 전배양법 시험에 따랐으며, 대사활성계 처리군(S-9 mix)과 대사활성계 미처리군(PBS)으로 나누어 시험하였다. 본 시험농도를 결정하기 위하여 예비독성 실험을 통해 최고농도 결정 5.0 mL/plate에 등비 2로 3농도에서 시험하였다.

Master plate에서 배양시킨 균주 *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537을 10 mL의 nutrient broth (Difco™)에 접종해 37°C에서 진탕배양(16시간, 200 rpm) 하였다. 배양시킨 균 100 µL와 님추출물 시료 100 µL와 PBS 또는 S-9 mix 500 µL씩 분주하여 균질화한 다음 진탕배양(37°C, 200 rpm, 30분)하였으며, 이후는 항돌연변이원성 시험과 동일하게 진행하였다. 결과관정은 복귀돌연변이 집락의 수가 용량 의존적으로 증가하고 그 수가 음성대조군에 비해서 2배 이상이거나 통계학적 유의성을 나타낼 경우에 양성으로 판정하였다 (Maron과 Ames, 1983).

**염색체이상시험.** 세포를 이용한 염색체 이상시험은 농약관리법 제5조 제1항 제3호 관련 ‘임축독성 시험기준과 방법’(농촌진흥청 고시 제 2013-21호)에 근거하여 시행되었다. 직경 60 mm plate에 1.6×10<sup>5</sup> 세포를 5 mL의 배양액에 파종하여 24시간 배양 한 후, 시험물질을 처리 하였다. 님 추출물은 난용성 물질로 용해되지 않으므로, 전체 배지의 3% 이내로 물질처리할 경우 독성이 없다고 보여지는(OECD SIDS, 1999) Acetone (Tedia, USA)을 이용하여 물질을 용해하였다. 그 후 동일한 부형제로 적절히 희석 조제하여 사용하였다. 실험물질은 대사활성계 처리군(6시간 처리)과 대사활성계 미처리군(6시간 및 24시간 처리)으로 나누어 실시하였다. 6시간 물질 처리군의 경

우, 처리종료 시각에 신선한 배양액으로 교환하여 18시간 추가 배양하여 24시간이 되도록 하였다. Plate 수거 2시간 전에 Colcemid (Gibco)를 최종농도의 0.2 µg/mL가 되도록 처리한 후, 2시간을 추가로 더 배양하여 분열중기세포를 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco)를 이용하여 수거하였다. 수거한 세포에 저장액 (0.75M KCl, Sigma) 4 mL을 가하여 37°C 수욕상에서 15분간 처리한 후 냉각 고정액으로 고정 및 표본을 제작하였으며, Giemsa (Fluka, USA) 염색 후 현미경(Nikon, Eclipse 80i, Japan)으로 관찰하였다.

결과해석을 위해 구조이상(structural aberration)과 수적이상(numerical aberration)으로 나누어 계수하였다(JEMS-MMS, 1988). 염색체 이상을 가진 분열중기상의 빈도가 음성대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다(Song, 2005). 염색체이상 시험은 최종 판정은 gap을 제외한 이상세포의 평균 출현율이 5% 미만일 때 음성, 5 이상 10% 미만일 때는 의양성, 10% 이상일 때 양성으로 최종 판정한 Ishidate와 Odashima(1977)의 자료를 근거로 최종 염색체이상결과를 판정 하였다.

**결과 및 고찰**

**Azadirachtin 및 이성질체 함량.** 본 시험에 사용된 님 추출물 시료 2종에 대해 Azadirachtin 및 이성질체 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 님추출물 시료 A를 분석한 결과 Azadirachtin A 98.2 ppm, Azadirachtin B 180.4 ppm, Deacetylsalannin 6,762.0 ppm, Salannin 434.3 ppm을 함유하고 있었으며, 님추출물 시료 B는 Azadirachtin A와 Azadirachtin B 만을 각각 2,102.2 ppm과 904.9 ppm 함유하였다.

**항돌연변이원성 시험.** 님 추출물에 4NQO를 이용하여 항돌연변이원성을 시험한 결과는 다음과 같다(Fig. 1). 본 시험에서 사용된 님 추출물 시료 A와 B의 3수준의 처리농도인 5.0, 2.5, 1.25 mL/plate에서 각각 73.2-99.0, 85.9-97.8, 76.6-98.5%의 범위로 나타남에 따라, 님 추출물 2종은 돌연변이 유발 억제효과가 있는 것으로 생각된다. 이는 Vinod 등(2011)의 연구에서 님 추출물은 돌연변이 활성을 가지지 않고 항돌연변이 활성을 가지고 있다고 보고한 결과와도 유사한 경향을 나타내었다. 또한, 고삼 추출물의 항돌연변이 억제율이 71.0-98.2, 76.3-96.7%로 나타났다는 연구결과(Cho 등, 2013)와 비교했을 때, 식물성추출물로서 우리나라에서 널리 사용되고 있는 유기농업자재에 해당하는 고삼추출물보다 님 추출물이 더 높은 항돌연변이원성을 보임을 알 수 있다.

님 추출물의 처리 농도에 따른 차이를 살펴보면, 대사활성계 미처리군에서 님 추출물 시료 A는 TA100과 TA1535에서, 시료 B는 TA102를 제외한 나머지 모든 균주들에서 농도가 증가함에 따라 저해율이 감소하였다. 또한, 대사활성계 처리군

(S-9 mix 첨가)에서는 님 추출물 시료 A도 마찬가지로 TA100, TA102와 TA1535에서 시료의 농도가 증가함에 따라 저해율이 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 반대로 시료 B의 경우에는 TA 98, TA 100, TA102에서 농도가 증가할수록 저해율이 증가하는 것을 볼 수 있었다( $p < 0.05$ ).

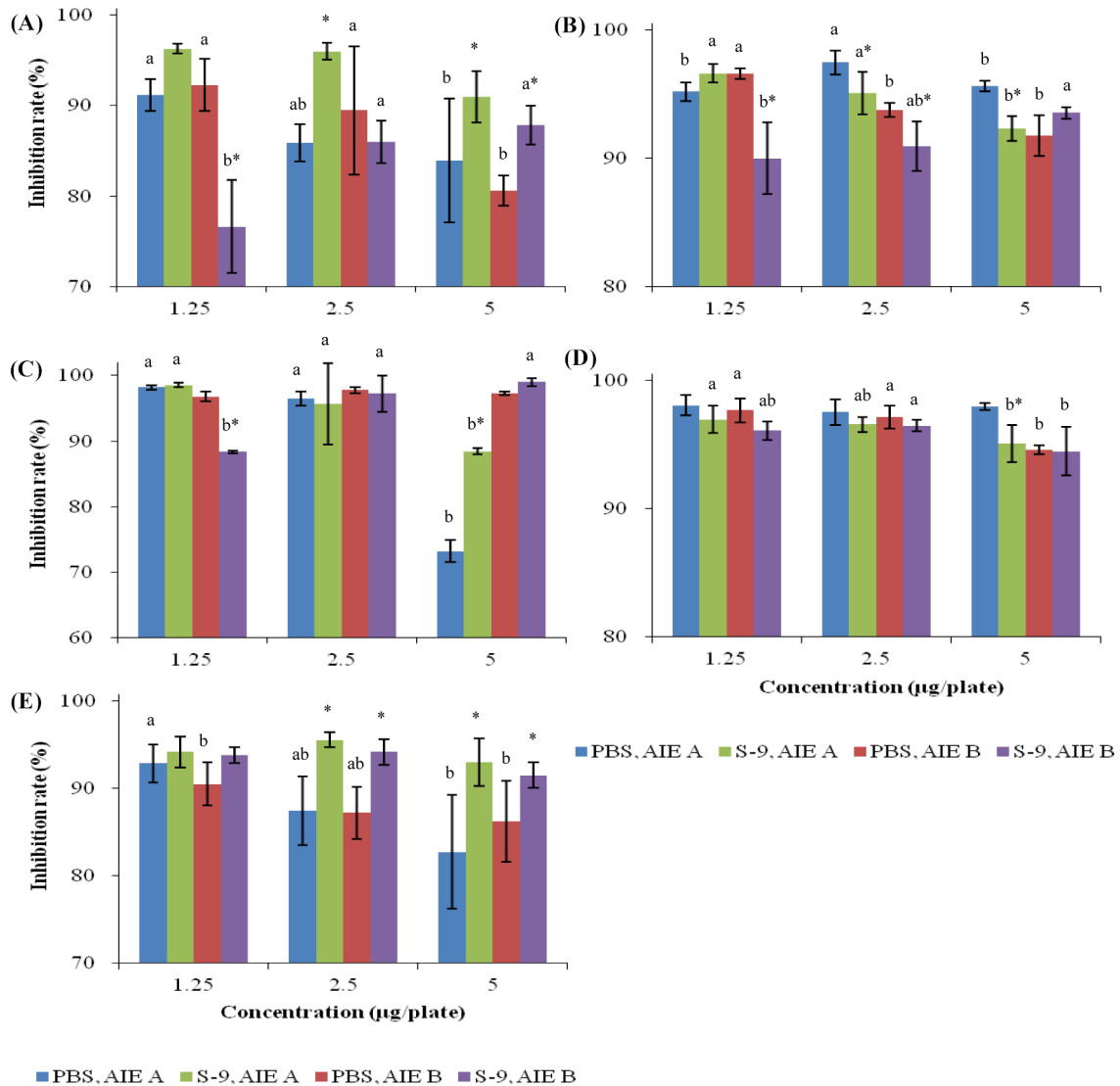
즉, 대사활성계 미처리군에서는 님 추출물 시료 2종 모두에서 농도 증가에 따른 항돌연변이원성의 효과 증가가 나타나지 않았으나, 님 추출물 시료B가 대사활성계 처리군에서 TA98, TA100, TA102에서 유의적으로 증가함으로써( $p < 0.05$ ) 구조이동 돌연변이성(TA98)와 염기쌍 치환에 의한 돌연변이성(TA100, TA102) 저해 효과가 증진되는 것을 알 수 있다. 특히 TA98에서 시료 A와 B 모두가 대사활성계 처리군이 미처리군보다 동일 농도에서 항돌연변이 저해율이 유의적으로 높게 나타남( $p < 0.05$ )에 따라 두 시료 모두 구조이동 돌연변이성을 저해하는 효과가 대사활성처리시 유의적으로 높아짐을 알 수 있다. 이는 님 꽃 추출물의 항돌연변이 효과(Nakahara 등, 2003), TA100 균주에서 님 잎 추출물의 항돌연변이 효과(Kusamran 등, 1998) 등을 보고한 선행연구들과 유사한 경향을 나타내었다. Shin 과 Koo(1998)의 연구에서 마 추출물이 S-9 mix를 처리하였을 때의 항돌연변이 저해율이 S-9 mix를 처리하지 않았을 때보다 높게 나타났다고 보고한 결과에 근거했을 때 본 시험에서도 님 추출물이 *in vitro*로 시험된 항돌연변이원성 저해율은 농도증가에 따른 경향이 일관되게 나타나지 않았으나, 생체조건에 보다 가까운 대사활성계 처리시에는 농도의존적으로 항돌연변이원성 효과가 증가하는 것으로 판단된다.

**복귀돌연변이 시험.** *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535와 TA1537을 이용하여 님 추출물 시료 A와 B에 대해 복귀돌연변이시험을 시행한 결과는 Table 2와 같다. 양성대조군은 음성대조군과 유의적인 차이를 보여 본 시험방법의 적절성을 확인 할 수 있었다( $p < 0.05$ ). 님 추출물 시료 A와 B의 모든 농도에서 대사활성계 처리여부와 상관없이 음성대조군과 비교했을 때 비슷한 수준으로 나타나 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서, 본 시험에 사용된 님 추출물 시료는 복귀돌연변이 시험에서 안전한 것으로 판정되어 유기농업자재로서의 사용이 적합한 것으로 사료된다.

Polasa와 Rukmini(1987)은 님 추출물이 S-9 mix 사용여부와 관계없이 독성을 보이지 않았다고 하였으며, Jongen과 Koeman (1983) 또한 님 씨앗으로부터 추출한 오일을 사용하여 복귀돌연변이 시험을 시행한 결과 독성이 나타나지 않았다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향을 보인 반면, Rojanapo와 Tepsuwan(1992)은 님 꽃 추출물에 대한 시험에서 TA98 균주에 대해서 독성이 있다고 보고하기도 하였다. 선행 결과와 같이, 시험에 사용된 님 추출물의 식물 중 추출 부위의 차이에 따라 독성이 다르게 나타난다고 보고되고 있어(Boeke 등, 2004), 님을 유기농업자재의 원료로 사용하기 위해서는 사용된 님 추출물의 정확한 추출 부위를 목록공시 및 품질인증 등 료단계에 기재하는 것이 안전성을 확보하는데 도움이 될 것

**Table 1** Composition of active ingredients in two samples of *Azadirachta indica* Extract

No.	Country of origin	Active ingredients (ppm)				
		Azadirachtin A	Azadirachtin B	Deacetylsalannin	Salannin	Total
Sample A	India	98.2	180.4	6,762.0	434.3	7,475.0
Salmpe B	India	2,102.0	904.9	-	-	3,007.1



**Fig. 1** Antimutagenic effect of *Azadirachta indica* extract sample A and B against 4NQO (0.15 µL/plate) in *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535, and TA1537.

<sup>abc</sup>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.

으로 생각된다.

**염색체이상시험.** 님 추출물의 염색체이상 시험 농도를 결정하기 위한 예비시험으로 MTT를 수행하여 본 시험의 최고농도를 선정한 결과, 님 추출물 시료 A는 최고농도로 6시간 대사활성계 미처리군 2000 µg/mL, 6시간 대사활성계 처리군 4000 µg/mL, 24시간 대사활성계 미처리군 1600 µg/mL에서 시험하였으며, 시료 B는 6시간 대사활성계 미처리군 1200 µg/mL, 6시간 대사활성계 처리군 1200 µg/mL, 24시간 대사활성계 미처리군 800 µg/mL에서 시험하였다.

분열중기 상의 세포는 각 농도당 100개씩 총 300개의 세포를 계수하여 Table 3에 나타내었다. 시험결과, 음성대조군은 대사활성 처리유무에 관계없이 모든 조건에서 염색체이상 나타나지 않았다. 대사활성계 미처리군에서 사용된 양성대조물질인 MMC는 6시간 및 24시간 처리시 각각 38.0% 및

27.5%의 염색체이상을 보였으며, 대사활성계 처리군에서 사용된 Benzo[e]pyren도 22.5%의 염색체이상을 보여 모든 조건에서 음성대조군에 비해 유의적인 차이를 보였다( $p < 0.05$ ).

님 추출물 시료 A와 B를 이용한 염색체이상 시험결과, 대사활성 처리유무에 관계없이 모든 농도에서 gap을 제외한 구조적 염색체이상 발생율이 최고 2.7%로 나타남에 따라, 본 시험에서 사용된 님 추출물 A와 B 시료 모두 염색체이상 시험에서 최종적으로 음성으로 판정하였다.

Awasthy 등(1995; 1999)의 연구에서는 님 잎의 추출물이 생쥐의 골수 세포에서 염색체이상을 초래한다고 보고하였다. 또한, EFSA(2011) 농약으로 등록되어 사용되고 있는 님 추출물 3종을 인체 배양 lymphocyte를 이용한 *in vitro* 염색체이상 시험을 시행한 결과 3종 모두에서 구조적 염색체이상을 보였으나, *in vivo* 시험을 통해 2종의 님 추출물이 음성으로 최종 판

**Table 2** Bacterial reverse mutation test using *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 and TA1537 treated with *Azadirachta indica* extract sample A and B

Test strain	Test substance	Concentration (µg/plate)	Colonies/plate (Mean ± SD)			
			AIE sample A		AIE sample B	
			S-9 mix (-)	S-9 mix (+)	S-9 mix (-)	S-9 mix (+)
TA98	SDW	-	20.8±2.9	29.0±1.8	20.8±2.9	29.0±1.8
	2NF	1.0	48.2±3.7		48.2±3.7	
	2AA	10		61.2±4.9		61.2±4.9
		5000	20.2±3.5	27.0±1.9	20.8±2.5	28.7±2.9
	AIE	2500	22.7±2.1	27.7±1.9	20.5±2.9	28.7±1.6
		1250	21.7±2.2	27.7±4.7	21.0±1.8	29.7±2.8
TA100	SDW	-	14.8±2.9	21.2±2.4	14.8±2.9	21.2±2.4
	SA	1.0	35.3±3.4		35.3±3.4	
	2AA	2.5		46.0±5.2		46.0±5.2
		5000	18.0±1.8	19.3±6.0	15.0±3.0	20.2±3.1
	AIE	2500	18.7±2.7	14.7±2.9	17.8±2.2	17.0±2.6
		1250	17.8±2.0	20.0±2.1	15.0±2.1	20.3±2.7
TA102	SDW	-	18.2±1.7	22.5±2.3	18.2±1.7	22.5±2.3
	MMC	0.5	344.5±42.2		344.5±42.2	
	2AA	5		64.8±7.7		64.8±7.7
		5000	22.5±3.4	20.0±1.7	20.5±1.9	21.8±2.6
	AIE	2500	19.8±3.3	20.3±2.0	21.2±1.9	19.8±3.8
		1250	21.0±5.3	21.5±4.4	18.0±1.1	22.3±3.3
TA1535	SDW	-	5.7±1.5	10.0±1.5	5.7±1.5	10.0±1.5
	SA	1.0	19.5±1.0		19.5±1.0	
	2AA	2.5		33.8±3.3		33.8±3.3
		5000	5.8±1.0	12.2±1.6	5.2±1.5	12.7±2.6
	AIE	2500	4.7±1.2	12.7±0.8	5.0±1.5	12.3±1.6
		1250	4.3±1.5	13.2±2.5	4.8±1.7	13.0±1.8
TA1537	SDW	-	5.2±1.5	10.7±2.7	5.2±1.5	10.7±2.7
	9AA	50	106.2±20.7		106.2±20.7	
	2AA	10		29.2±2.5		29.2±2.5
		5000	5.0±1.3	12.2±1.0	4.7±0.8	6.8±1.2
	AIE	2500	4.8±1.7	12.5±1.9	4.5±0.5	8.5±1.9
		1250	5.0±1.5	9.5±1.6	5.0±1.5	6.7±1.0

SDW: sterile distilled water, 2NF: 2-Nitrofluorene, SA: Sodium azide, MMC: Mitomycin C, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene. AIE: *azadirachta indica* extract.

정된 바 있다.

최근 ICH (Internationally Chemical Harmonization)에서는 유전독성 시험 및 데이터 해석을 위한 지침(S2R1)을 통해 Battery system을 도입하여 새로운 유전독성의 평가 기준을 확립하였는데(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 또는 마우스림포마 assay 중 한 시험을 수행하여 두 결과가 모두 음성인 경우 유전독성이 없다고 최종 판정하도록 하고 있다. 따라서, 본 연구에서 시험된 님 추출물 2종은 복귀돌연변이 시험과 포유류 배양세포를 이용한 *in vitro* 염색체이상 시험 결과 모든 시험군에서 음성을 나타냄에 따라 최종적으로 유전독성이 없는 것으로 판정하였다.

### 초 록

님 추출물은 포유류에 낮은 독성을 가지고 있기 때문에 유기농업자재로 주로 이용되고 있다. 그러나 님 추출물은 림프구의 염색체 이상을 야기한다는 연구결과가 보고되었다. 따라서, 본 연구는 님 추출물을 이용하여 항돌연변이원성 시험 및 유전독성을 평가하였다. 항돌연변이원성 시험은 복귀돌연변이 시험을 이용하여 시험하였다. 복귀돌연변이 시험은 2개의 님 추출물을 *Salmonella Typhimurium* 5개 균주를 이용하여 돌연변이 유발 가능성을 평가하였다. 복귀돌연변이시험과 염색체이상시험은 대사활성계 처리군(S-9 mix)과 대사활성계 미처리군(PBS)으로 나누어 양성대조군과 음성대조군을 사용하여 실시하였다. 염색체이상시험은 Chinese hamster lung cell을 이용

**Table 3** Result of chromosome aberration test of *Azadirachta indica* extract sample A and B

Conc. of treatment (µg/mL)	Time of treatment (hr)	S9 Mix	No. of structural abnormality <sup>a</sup>								Normal cell <sup>d</sup>	Decision <sup>e</sup>
			chromatid			chromosome			total			
			ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	T(-g) <sup>b</sup>	T(+g) <sup>c</sup>		
0 (Acetone)	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0±0.0	-
300	6	-	1.7±1.2	-	-	-	-	-	0.0±0.0	1.7±1.2	100.0±0.0	-
sample A	600	6	-	2.0±1.0	-	2.7±1.2	-	-	2.7±1.2	4.7±2.1	97.3±1.2	-
1200	6	-	2.0±1.0	-	2.3±2.1	0.3±0.6	-	1±1.41	2.3±2.1	4.7±0.6	97.7±2.1	-
500	6	-	-	-	0.5±0.7	-	-	-	0.3±0.6	0.5±0.7	99.7±0.6	-
sample B	1000	6	-	-	0.7±0.6	-	-	-	0.7±0.6	0.7±0.6	99.3±0.6	-
2000	6	-	1.0±0.0	-	2.3±1.2	-	-	-	2.3±1.2	3.3±1.2	97.7±1.2	-
MMC (0.2 µg/mL)	6	-	7.5±4.9	22.0±1.41	8.5±2.1	1.5±0.7	4.0±2.83	3.5±4.9	38.0±5.7*	47.0±9.9	62.0±5.7	+
0 (Acetone)	6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0±0.0	-
300	6	+	2.0±1.0	-	1.3±0.6	-	-	-	1.3±0.6	3.3±1.2	98.7±0.6	-
sample A	600	+	1.3±1.2	0.3±0.6	0.7±0.6	-	-	-	1.3±0.6	2.7±1.5	98.7±0.6	-
1200	6	+	1.3±0.6	-	2.0±1.0	-	0.3±0.6	-	2.0±1.0	3.3±1.5	98.0±1.0	-
1000	6	+	1.7±0.6	-	-	-	-	-	0.0±0.0	1.7±0.6	100.0±0.0	-
sample B	2000	+	0.7±0.6	-	1.3±0.6	-	-	-	1.3±0.6	2.0±0.0	98.7±0.6	-
4000	6	+	2.3±1.5	-	2.3±0.6	-	-	-	2.3±0.6	4.7±1.2	97.7±0.6	-
BP (20 µg/mL)	6	+	7.0±1.4	9.0±1.41	9.0±0.0	3.0±4.24	4.0±5.7	2.0±1.4	22.5±4.9*	33.0±7.1	77.5±4.9	+
0 (Acetone)	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0±0.0	-
200	24	-	2.7±2.1	-	0.3±0.6	-	-	-	0.3±0.6	3.0±2.6	99.7±0.6	-
sample A	400	-	1.0±1.0	-	2.0±1.0	-	-	-	2.0±1.0	3.0±1.7	98.0±1.0	-
800	24	-	2.7±2.1	-	2.0±1.0	-	-	-	1.0±1.0	4.7±1.5	99.7±0.6	-
400	24	-	0.3±0.6	-	-	-	-	-	0.0±0.0	0.3±0.6	100.0±0.0	-
sample B	800	-	0.7±0.6	-	0.3±0.6	-	-	-	0.3±0.6	1.0±0.0	99.7±0.6	-
1600	24	-	1.7±1.5	-	2.3±0.6	-	-	-	2.3±0.6	4.0±1.7	97.7±0.6	-
MMC (0.2 µg/mL)	24	-	10.5±7.8	14.0±8.5	0.5±0.7	2.0±2.8	4.0±5.7	3.0±0.0	27.5±9.2*	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.

<sup>a</sup>300 cells were analyzed in each group.

<sup>b</sup>total aberrant cells (excluding gaps).

<sup>c</sup>total aberrant cells (including gaps).

<sup>d</sup>total normal cells per 100 cells (excluding gaps).

<sup>e</sup>-, negative, total frequency of chromosomal aberrations <5.0%; ±, suspicious, 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 ± SD.

하여 님추출물 시료에 대사활성계 처리군은 6시간 노출시켰고, 대사활성계 미처리군은 각각 6시간과 24시간 노출시켜 시험하였고, 음성대조군과 양성대조군을 사용하였다. 4 NQO에 의해 유도 된 돌연변이 집락수는 님추출물 시료 처리에 의해 감소되어 SRE는 항 돌연변이 효과가 있을 수 있음을 나타냈다. 복귀돌연변이와 염색체이상시험은 님추출물 모든 시험 농도군에서 대화활성계의 처리 유무와 관계없이 음적으로 판정되었다. 이상의 결과를 ICH에서 제안된 유전독성 battery system에 근거해 살펴 봤을 때 본 연구에서 사용된 님 추출물 2종은 모두 유전독성이 없어 안전함을 확인 할 수 있었다.

**Keywords** 님추출물 · 복귀돌연변이 시험 · 염색체이상시험 · 항돌연변이

**감사의 글** 본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ00895303)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## References

- Awasthy KS, Chaurasia OP, and Sinha SP (1995) Genotoxic effects of crude extract of neem (*Azadirachta indica*) in bone marrow cells of mice. *Cytologia* **60**, 189–95.
- Awasthy KS, Chaurasia OP, and Sinha SP (1999) Prolonged murine genotoxic effects of crude extracted from neem. *Phytother Res* **11**, 81–3.
- Boeke SJ, Boersma MG, Alink GM, van Loon JJ, van Huis A, Dicke M et al. (2004) Safety evaluation of neem (*azadirachta indica*) derived pesticides. *J Ethnopharmacol* **94**, 25–41.
- Cho HY, Yoon HY, Park KY, Lee JB, Shim CK, Kim JH et al. (2013) In vitro antimutagenic and genotoxic effects of Sophora Radix Extracts. *Korean J Pesticide Science* **17**(4), 1–8.
- EFSA(European Food Safety Authority) (2011) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance azadirachtin. *EFSA Journal* **9**, 1858
- El-Hawary ZM and Kholief TS (1990) Biochemical studies on hypoglycemic agents. I. Effect of *Azadirachta indica* leaf extract. *Arch Pharm Research (Seoul)* **13**, 108–12.

- Govindachari TR, Suresh G, Gopalakrishnan G, Banumathy B, and Masilamani S (1998) Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica* **26**, 109–116.
- Han S (1989) Diversion of locomotor activity rhythm and neural control by Azadirachtin in *Leucophaea maderae*. *Korean J Zool* **32**, 441–9.
- ICH (2012) Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. International Conference on Harmonization, USA.
- Ishidate M Jr and Odashima S (1977) Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro-A screening for chemicals carcinogens. *Mutat Res* **48**, 337–54.
- JEMS-MMS (1988) Atlas of chromosome aberration by chemicals. Japanese Environmental Mutagen Society-Mammalian Mutagenicity Study Group, Japan.
- Jeun J, Cho HJ, Jun H, Lee JH, Jia Y, Cho KS et al. (2011) Mutagenic and antimutagenic effects of hemp seed oil evaluated by ames *Salmonella* testing. *Korean J Food Sci Technol* **43**, 396–400.
- Jongen WM and Koeman JH (1983) Mutagenicity testing of two tropical plant materials with pesticidal potential in *Salmonella typhimurium*: *Phytolacca dodecandra* berries and oil from seeds of *Azadirachta indica*. *Environ Mutagen* **5**, 687–94.
- KEFAM Association (2012) Standard guidelines of environment-friendly organic materials. Korea Eco-friendly Agro-materials, Korea.
- Kusamran WR, Tepsuwan A, and Kupradinun P (1998) Antimutagenic and anticarcinogenic potentials of some Thai vegetables. *Mutat Res* **18**, 247–58.
- Lee J-W, Jin C-L, Jang KC, Choi G-H, Lee H-D, and Kim JH (2013) Investigation on the insecticidal limonoid content of commercial biopesticides and neem extract using solid phase extraction. *J Agric Chem Environ* **2(4)**, 81–5.
- Maron DM and Ames BN (1983) Reversed methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* **113**, 173–215.
- Nakahara K, Roy MK, Ono H, Maeda I, Ohnishi-Kameyama M, Yoshida M et al. (2003) Prenylated flavanones isolated from flowers of antimutagenic constituents against heterocyclic amines. *J Agric Food Chem* **51**, 6456–60.
- OECD SIDS (1999) Acetone, SIDS Initial Assessment Report for the 9th SIAM. UNEP Publications, USA.
- Park M, Kim J, Choi W, and Yoon M (2011) Nematicidal effect of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) by biological nematicide. *Korean J Soil Fert* **44**, 228–35.
- Paterson RR (2006) Ganoderma-a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* **67**, 1985–2001.
- Polasa K and Rukmini C (1987) Mutagenicity tests of cashew nut shell liquid, rice-bran oil and other vegetable oils using the *Salmonella typhimurium*/microsome system. *Food Chem Toxicol* **25**, 763–6.
- Rojanapo W and Tepsuwan A (1992) Matagenic and antimutagenic activities of some vegetables (in Thai). *Bulletin of the Department of Medical Services* **17**, 461–9.
- Rosenkranz HS and Klopman G (1995) An examination of the potential genotoxic carcinogenicity of a biopesticide derived from neem tree. *Environ Mol Mutagen* **26**, 255–60.
- Schmutterer H (1990) Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu Rev Entomol* **35**, 271–97.
- Shin N and Koo S (1998) Antimutagenic effects of dietary fiber from yam (*Dioscorea batatas* decne) against 2-AF and MNNG. *Korean J Soc Food Sci* **14**, 333–8.
- Singh PP, Junnarkar AY, Reddi GS, and Singh KV (1987) *Azadirachta indica*: neuro-sychopharmacological antimicrobial studies. *Fitoterapia* **58**, 235–8.
- Song S, Yang DC, and Choung SY (2005) The chromosomal aberration test of wild ginseng culture extract in chinese hamster lung cell. *J Toxicol Pub Health* **21**, 57–62.
- Tandan SK, Gupta S, Chandra S, Lal J, and Singh R (1995) Safety evaluation of *Azadirachta indica* seed oil, a herbal wound dressing agent. *Fitoterapia* **66**, 69–72.
- Vinod V, Tiwari PK, and Meshram GP (2011) Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of neem (*Azadirachta indica*) seed oil in the *in vitro* Ames *Salmonella*/microsome assay and *in vivo* mouse bone marrow micronucleus test. *J Ethnopharmacol* **134**, 931–7.