

고메이신 함유 옥수수수염 추출물의 유전독성학적 안전성 연구

하애화¹ · 강현중² · 김선림³ · 김명환⁴ · 김우경¹

¹단국대학교 자연과학대학 식품영양학과

²농촌진흥청 국립식량과학원 작물기초기반과

³농촌진흥청 국립식량과학원 중부작물부, 수확후이용과

⁴단국대학교 융합기술대학 식품공학과

Genotoxicity Studies on Corn Silk Extract Containing High Maysin

Ae Wha Ha¹, Hyeon Jung Kang², Sun Lim Kim³, Myung Hwan Kim⁴, and Woo Kyoung Kim¹

¹Department of Food Science and Nutrition and ⁴Department of Food Engineering, Dankook University

²Crop Foundation Division and ³Crop Post-Harvest Technology Division,
National Institute of Crop Science, Rural Development Administration

ABSTRACT In this study, a battery of genetic-toxicity studies on corn silk extract with high maysin content were performed according to internationally accepted protocols. In a mutation test using *Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98, and TA100, the number of mutant colonies did not significantly increase up to a maximum concentration of 5,000 µg/plate in the presence or absence of the S9 metabolic activation system. In the chromosome aberration test using Chinese hamster lung fibroblasts, negative results were observed in the concentration up to 1,250 µg/mL of corn silk extract. In the micronucleus test using ICR mice, incidence of polymorphonuclear erythrocytes with a maximum concentration of 2,000 mg/kg corn silk extract did not show any significant difference compared to the negative control group. Based on these results, the test substance, con silk extract, did not influence genotoxicity.

Key words: corn silk, genotoxicity, reverse mutation, micronucleus test, chromosome aberration

서 론

옥수수수염(corn silk)은 옥수수(*Zea mays* L.)의 부산물로 녹색이나 황색을 띠고 있으며 예로부터 한방에서 이뇨, 혈압 강하, 전립선 비대 치료 등에 효과가 있는 것으로 알려져 왔다(1-3). 특히 옥수수수염에는 옥수수 특유의 플라보노이드(flavonoid) 계열의 물질인 메이신(maysin) 및 유사 물질을 다량 함유하고 있다(3). 옥수수수염에 들어 있는 메이신은 항산화, 항암성이 매우 강한 물질로 알려진 활성물질 루티올린(luteolin)에 당이 결합해 있는 물질이다(4). 선행 연구로 메이신의 지질대사 개선, 항비만, 항암효능, 면역증강, 항염증 및 항알레르기성 항천식, 항산화, 항치매 등 기초 효능을 평가한 결과, 면역증강, 지방축적 저해, 항산화 작용에 의한 뇌신경세포 보호 및 전립선암 효과가 있는 것으로 나타났다(4-7). 이처럼 옥수수수염의 약리작용에 관한 연구들은 많으나 옥수수수염의 유전독성에 대한 연구는 매우 제한적이다(8). 천연식의약품 개발에 있어서 유전독성의 연구

는 천연식의약품 제제의 안전성 평가를 위한 중요한 부분이다. 유전독성시험은 특정 화학물질 노출이 유전자 혹은 염색체 수준에서 직접 손상을 주어서 형태적 변화나 기능성 이상을 일으키는지를 평가하는 방법이다(9). 유전독성 실험은 세균성 복귀돌연변이 실험과 소핵실험에 의한 시험관 내에서의 유전독성 잠재력에 대한 자료를 우선으로 수행하기를 권장한다. 시험관 내 결과가 긍정적인 경우 시험관 내에서 관찰된 유전독성 잠재성이 생체 내에서 발견되는지를 평가하기 위한 적절한 생체 내 시험(*in vivo*)으로 포유류 적혈구 소핵시험, 형질전환쥐 시험법 및 해성시험 등이 있다(10). 돌연복귀 실험(bacterial reverse mutation test, Ames test)은 *Salmonella* Typhimurium LT2 strain에서 유래한 히스티딘 요구성 돌연변이주를 이용하여 간단히 복귀돌연변이를 검출할 수 있는 시험법이다(11). 염색체 이상 시험(*in vitro* chromosomal aberration assay)은 배양한 포유동물 세포인 Chinese Hamster Lung(CHL) 세포를 이용하여 대사활성계 적용 및 비적용하에서 염색체형과 염색체분형의 절단(deletion) 및 교환(exchange)으로 구분하여 염색체 이상을 계수하여 염색체 수나 구조의 변화에 의한 이상을 가진 증기상의 출현 빈도를 조사하여 염색체 이상 유발성 여부를 판정하는 연구이다(12). 소핵시험(*in vivo* micronucleus

Received 2 March 2017; Accepted 24 May 2017

Corresponding author: Woo Kyoung Kim, Department of Food Science and Nutrition, Dankook University, Cheonan, Chungnam 31116, Korea
E-mail: wkkim@dankook.ac.kr, Phone: +82-43-550-3471

assay)은 동물의 골수세포 또는 말초혈액을 사용하여 최종적으로 유전독성을 판정하는 실험으로 소핵을 가진 다염색적혈구의 증가 여부를 판정하여 시험물질에 의한 염색체 이상 유무를 평가하는 방법이다(13). 본 연구에서는 메이신고 함유 옥수수수염 추출물의 유전독성에 대한 안전성을 규명하고자 마우스 골수세포에 있어서 염색체 이상 유발성 유무, 소핵 유발성 여부와 시험, 세균에서의 복귀돌연변이 유발성 여부를 실험하였다.

재료 및 방법

시험물질의 추출 및 조제

본 실험에서 사용된 실험재료는 국립식량과학원(Suwon, Korea)에서 재배 생산된 '광평옥'의 옥수수수염(*Zea mays* L.)을 원료로 사용하였고, 미수정된 옥수수수염을 사용하기 위해 옥수수이삭에 수염이 출사하기 전에 실크백 처리를 하였다(14). 옥수수수염이 출사한 후 3일이 경과된 옥수수수염을 채취하였다. 옥수수수염은 채취 즉시 약 5~10 cm 크기로 세절하여 옥수수수염 1 kg에 주정(C_2H_5OH , Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 상온에서 추출하였다. 추출물을 두 번 여과한 후 감압 농축(Rotary Vacuum Evaporator, EYELA, Tokyo, Japan)하여 옥수수수염 추출물을 수득하였다. 옥수수수염 추출물에 염화메틸렌(methylene chloride, CH_2Cl_2 , Sigma-Aldrich Co.)을 1:1.5(v:v)의 비율로 첨가하여 분액깔때기로 분액하여 염색소를 제거하였다. 분액된 옥수수수염 추출물을 다시 감압 농축하였다. 분리된 옥수수수염 에탄올 추출물에서 메이신의 흡광도는 UV/Vis spectrophotometer(U-2900, Hitachi, Tokyo, Japan)로 확인하였다.

옥수수수염 추출물에 함유된 메이신의 함량은 HPLC(Waters, Milford, MA, USA)로 분석을 하였다(14). 분석칼럼은 Ultrasphere C18(4.6×250 mm, 5 μ m, Waters) 칼럼이었고, 0.1% 인산(phosphoric acid)을 함유한 초순수(A)와 0.1% 인산을 함유한 100% 메탄올 용액(B)을 이동상으로 하여 20% 메탄올에서 90% 메탄올이 될 때까지 35분간 분당 1.0 mL의 유속으로 이동상을 흘려주었고, 파장 352 nm에서 농도를 측정하였다. 분석 결과 본 연구에 사용된 옥수수수염에는 maysin 함량이 2,783.54 mg/100 g이었다. 1 kg의 옥수수수염에서 3.5 g의 추출물을 얻었으며, 이중 40%가 메이신이였다. 시료는 건조하여 고체 분말 형태로 사용하였으며, 사용 당일 전자저울(Explorer Ex224G, OHAUS, Parsippany, NJ, USA)로 시험물질을 칭량한 후, 부형제를 가하여 규정농도(200 mg/mL)로 조제하였다.

복귀돌연변이 실험

시험물질 고메이신 함유 옥수수 추출물의 복귀돌연변이 실험을 위하여 *S. Typhimurium* 히스티딘 요구성 4개 균주 *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537과

Escherichia coli 균주인 WP2 uvrA(pKM101)를 이용하였으며(15) 이 균주들은 Molecular Toxicology Inc.(Moltox, Boone, NC, USA)에서 분양받아 사용하였다. 대사활성계 비적용균의 양성대조물질로는 TA98에 2-nitrofluorene(2-NF, Sigma-Aldrich Co.), TA100, TA1535 균주는 sodium azide(SA, Sigma-Aldrich Co.), TA1537은 9-aminoacridine(9-AA, Sigma-Aldrich Co.), WP2 uvrA는 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG, Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다. 대사활성계 적용균에서는 모든 균주에 대해 2-aminoanthracene(2-AA, Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다. 양성대조물질은 특성에 따라 주사용수 또는 DMSO(dimethyl sulfoxide, Daejeong, Siheung, Korea)로 용해하여 사용하였다.

각 균주를 액체배지(1.6% nutrient broth)에 접종하고 10시간 동안 shaking incubator 조건으로 배양(37°C, 200 ±30 rpm, BS-31, Jeotech, Seoul, Korea)하였다. UV/VIS spectrophotometer(측정파장 660 nm, Jasco, Tokyo, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하여 균수가 1×10^9 cells/mL인 것을 확인한 후 시험에 사용하였다. 멸균시험관에 시험물질, 음성 및 양성대조물질을 100 μ L씩 각각 넣고 대사활성계 적용균에는 S9 Mix를, 대사활성계 비적용균에는 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4, Sigma-Aldrich Co.)를 각 500 μ L씩 첨가하였다. 음성대조균에는 주사용수 100 μ L를 처리하였다. 각 시험관에 top agar를 2 mL씩 첨가하여 vortexing 한 후 최소영양평판배지(MNA)에 붓고 도말하였다. Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C incubator에서 48~72시간 배양 후 집락을 표시하면서 계수하였다. 별도로 시험물질 최고농도액 및 S9 Mix(Moltox)에 각각 top agar(0.6% agar and 0.6% NaCl) 2 mL를 첨가하여 혼합한 후, 최소영양평판배지에 부어 시험물질과 S9 Mix의 오염 여부를 확인하였다. 시험 결과는 복귀돌연변이 집락수의 평균과 표준편차로 나타내었으며, 돌연변이 유발성의 판정은 복귀변이집락수가 용매 대조균의 2배 이상이면서 용량 의존성을 갖는 경우를 양성으로 하였다(16). 모든 실험은 GLP 기관인 (주)메트빌(Seoul, Korea)에서 수행하였다.

염색체 이상실험

옥수수수염 추출물의 염색체 이상 유발성의 확인을 위해 Chinese Hamster Lung(CHL/IU) 세포주를 America Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)으로부터 분양받아 시험물질의 염색체 구조 이상 및 수적 이상을 분석하였다. 본 시험의 처리농도는 농도설정시험의 결과를 근거로 설정하였으며, 대사활성계 적용 및 비적용 6시간 처리균의 경우 156.25, 312.5, 625, 1,250 μ g/mL의 농도를 설정하였다. 대사활성계 비적용 24시간 처리균은 31.25, 62.5, 125, 250 μ g/mL의 농도를 설정하였다. 양성대조균은 대사활성계 적용 시 cytophosphamide monohydrate(CP, Sigma-

Aldrich Co.) 5 µg/mL, 대사활성계 비적용 시는 mitomycin (MMC, Sigma-Aldrich Co.) 0.1 µg/mL, 음성대조군에는 부형제를 첨가하였다. 플라스크에 세포($2\sim5\times 10^5$ cells/mL)를 2~3일 간격으로 0.25% trypsin-EDTA 용액을 이용하여 계대 배양(5%의 CO₂, 37°C)하였다. 시험물질 처리를 위해 배양액을 모두 제거한 후, 대사활성계를 처리하여 배양액을 분주하고 1시간 이상 경과한 다음 옥수수수염 추출물을 처리하거나 양성대조물질 및 음성대조물질을 처리하였다. 시험물질 처리 전과 후에 혼탁, 침전, 색의 변화 등을 관찰하였고, 세포독성(relative increase in cell counts, RICC)은 시험물질 처리 개시로부터 약 22시간 후에 0.12 µg/mL Colcemid 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 처리하여 2시간 경과한 다음 세포를 수집하여 세포독성을 산출하였다(17).

$$\text{RICC}(\%) = \frac{\text{처리된 배양에서의 세포수 증가(최종~시작)}}{\text{대조군 배양에서의 세포수 증가(최종~시작)}} \times 100$$

수거한 세포 현탁액을 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액을 제거한 다음 샘플시료에 저장액(75 mM KCl) 처리 및 고정액(methanol : acetic acid=3:1 v/v)을 넣고 5% Giemsa 용액(0.01 mol/L Sörenson 인산 완충액(pH 6.8)의 최종농도로 조제)으로 염색체 이상을 계수하였다. 구조 이상으로서 염색분체 결손(chromatid gap, CTG), 염색분체 절단(chromatid breakage, CTB), 염색분체 교환(chromatid exchange, CTE), 염색체 결손(chromosome gap, CSG), 염색체 절단(chromosome breakage, CSB) 및 염색체 교환(chromosome exchange, CSE)으로 분류하여 계수하였으며, 그 수와 출현 빈도를 각각 gap을 포함한 경우와 제외한 경우로 명시하였다. 모든 실험은 GLP 기관인 (주)메드빌에서 수행하였다.

경구 투여 소핵실험

실험동물로는 7주령(IcrTac:ICR, SPF) 수컷 마우스(29.0~30.8 g) 25마리를 (주)나라바이오텍(Seoul, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 반입 시 동물의 일반증상 관찰 및 체중 측정 후, 6일 이상의 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하였고, 일반증상 및 체중 변화를 확인하여 이상이 없는 동물을 시험에 사용하였다. 실험동물의 사육환경은 온도 19.0~25.3°C, 상대습도 49.2~70.3%, 환기 횟수 10~20회/시간, 조명시간 12시간/일(오전 8시~20:00시) 및 조도 150~300 Lux로 설정하였으며, 실험동물용 고형사료(LabDiet 5053, Zeigler Bros, Gardners, PA, USA)와 여과된 정제수를 자유 섭취 시켰다. 본시험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용할 수 있는 모든 규정을 준수하며, 동물보호법(법률 제4379호, 1991. 5. 31, 법률 제13023호, 2015. 1. 20 일부 개정)에 근거한 (주)메드빌 동물실험 윤리위원회(IACUC)에 의해 승인되었다(승인번호: 15-27).

순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정하여 1군당 5마리씩 균일하게 분리하였다. 단회 경구 투여 독성실험 결과 2,000 mg/kg의 용량에서 용량별 사망, 일반증상(입모, 저체온, 운동실조 등), 체중 변화가 관찰되지 않아 2,000 mg/kg을 본시험의 최고용량으로 하고 이하 0, 500, 1,000 mg/kg의 4용량의 실험군과 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 투여액량은 10 mL/kg으로 하여 군 분리 시의 체중으로부터 투여액량을 산출하였으며, 실험군 및 음성대조군은 24시간 간격으로 2회 투여하였고 음성대조군(mitomycin C, Sigma-Aldrich Co.)의 경우 주사침이 부착된 일회용 주사기(1 mL)를 사용하여 1회 복강투여 하였다. 일반증상 관찰은 투여 후 골수 채취 전까지의 1일 2회 이상 동물의 일반증상을 관찰하였고 체중은 투여 직전 및 골수 채취 직전에 측정하였다.

골수세포의 채취는 시험물질 최종 투여 후 24시간에 대퇴골을 적출하여 골수세포를 수집하였다. 채취한 골수세포는 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 2장으로 슬라이드에 소량의 부유액을 떨어뜨려 골수검체를 도말, 건조한 후 메탄올로 고정하고, 5% Giemsa 염색액으로 약 30분간 염색하였다. 다염성 적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성 적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 합이 500개가 되도록 계수하여 총 적혈구 중 다염성 적혈구의 비[PCE/(PCE+NCE)]를 구하였다. 이어서 다염성 적혈구가 2,000개가 되도록 계수하여 소핵을 가지고 있는 다염성 적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 비(MNPCE/2000 PCE)를 구하였다(13).

소핵 이상의 판단은 소핵다염성 적혈구의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하였거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타냈을 때 소핵 유발성이 있다고 하고 총 적혈구 수 중 다염성 적혈구가 30% 이하로 되었을 때를 조혈기능 억제 등의 세포 독성이 있다고 판정하였다(18,19).

통계분석

모든 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences 10.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 one-way analysis of variance(ANOVA) 분석을 하였으며 시료 간의 유의성은 Duncan's multiple range test 또는 Dunnett's t-test로 P<0.05 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 메이션 고 함유 옥수수수염 추출물의 유전독성으로부터의 안전성을 과학적으로 구명하고자 하였다. 천연식물에서 독성을 일으키는 기작은 매우 다양하므로 시험물질에 대한 정확한 유전독성을 측정하기 위해서 3가지 독성 실험을 수행하였다. *In vitro* 실험으로는 세균에서의

복귀돌연변이 실험(Ames test), 염색체 이상 실험을 수행하였고, 생체 내에서의 유전독성 여부를 판정할 수 있는 *in vivo* 소핵실험을 수행하였다.

복귀돌연변이 실험

세균에서의 복귀돌연변이 유발성 여부는 *S. Typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주인 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개의 균주와 대장균 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 *uvrA*를 이용하여 대사활성계 적용(+ S9 Mix) 및 비적용(-S9 Mix)하에서 DNA의 single base level에서의 유전 손상을 측정하였다(Table 1). 연속하는 5단계의 옥수수수염 추출물의 농도에서 TA 균주와 WP2 균주의 생육저해 및 침전은 모든 균주에서 관찰되지 않았다(data not shown). 모든 양성대조군의 복귀돌연변이 집락수는 음성대조군보다 최소 2배 이상 증가하여 통계적으로 유의적인 복귀돌연변이 양성반응을 나타냈다. 대사활성계 적용 및 비적용 시 처리농도(5,000 µg/plate)에 따른 복귀돌연변이 평균 집락수는 대조군의 2.0배를 초과하지 않았으며 농도 의존적인 증가도 관찰되지 않았다.

본 연구에서는 1.6, 8, 40, 200, 1,000, 2,500, 5,000 µg/plate의 옥수수수염 추출물과 음성 및 양성대조군으로 시험균을 구성하여 시험한 결과 집락수의 증가 및 감소가 관찰되지 않아서 모든 균주에 대해 5,000 µg/plate를 최고농도로 하고 5단계 희석(5,000, 1,666.7, 555.6, 185.19, 61.7 µg/plate)하여 사용하였다. 시험물질 최고농도 및 S9 Mix의 무

균성을 확인하기 위한 플레이트에서 미생물 오염으로 인한 복귀돌연변이 집락은 나타나지 않았다. 동시에 모든 양성대조군에서는 음성대조군보다 현저한 집락수의 증가를 보였으나, 시험물질 투여군에서는 최고농도에 이르기까지 음성대조군에 비하여 집락수의 유의한 증가가 나타나지 않았다.

옥수수에서 복귀 돌연변이는 샘플 처리 중에 생기는 불순물질 또는 식물 병폐 원인인 mycotoxins에 의해 옥수수 식물이 감염되었을 때 일어날 수 있는데, atrazine을 처리한 토양에서 자란 옥수수의 추출물이 *S. Typhimurium*에 의한 복귀돌연변이가 없었으며 돌연변이 유발성 물질도 생성되지 않았음을 보고하였다(20). 옥수수수염 추출물의 세균 복귀돌연변이 실험에 대한 논문이 존재하지 않아 다른 연구와의 비교가 어려우나, 본 연구 결과에서 옥수수수염 추출물의 최고농도인 5,000 µm/plate에서도 복귀돌연변이를 일으키지 않는 것으로 판정되었다.

염색체 이상 실험

포유류 동물세포인 CHL/IU 세포를 이용한 염색체 이상 실험의 세포독성 결과는 Table 2와 같다. 대사활성계 적용 6시간 처리군의 시험물질 0, 156.25, 312.5, 625.0 및 1,250 µg/mL 농도에서 세포독성지표인 RICC 결과, 100, 105, 95.8, 95.2 및 66.6%로 확인되었으며, 대사활성계 비적용 6시간 처리군의 경우 세포독성지표인 RICC 결과, 100, 111, 84.2, 67.6 및 62.8%로 확인되었다. 대사활성계 비적용 24시간 처리군에서 RICC는 100, 81.9, 80.8, 73.1 및

Table 1. Results of bacterial reverse mutation assay with or without S9 metabolic activation mix

Corn silk extract (µg/plate)	S9 Mix	No of revertant/plate ¹⁾				
		TA 98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 <i>uvrA</i>
0	+	91±4 ⁷⁾	300±38	27±3	16±3	199±16
61.73	+	85±14	316±14	24±5	12±3	202±23
185.19	+	85±2	269±32	25±4	13±3	186±18
555.56	+	85±6	282±41	28±4	10±2	197±15
1,666.67	+	74±2	331±74	27±1	11±2	193±12
5,000	+	82±4	275±26	27±2	11±3	144±20
2-AA ²⁾		1,204±94*	1,616±446*	429±8*	442±27*	2,330±185*
0	-	62±8	371±16	22±3	14±3	131±10
61.73	-	44±10	342±36	21±3	12±4	89±9
185.19	-	46±9	328±33	18±2	15±4	123±3
555.56	-	54±7	322±18	21±3	13±2	124±4
1,666.67	-	58±8	380±25	15±1	10±5	128±7
5,000	-	72±10	352±42	17±6	14±4	130±10
2-NF ³⁾		342±34*	NE ⁸⁾	NE	NE	NE
SA ⁴⁾		NE	1,899±88*	813±129*	NE	NE
9-AA ⁵⁾		NE	NE	NE	245±20*	NE
MNNG ⁶⁾		NE	NE	NE	NE	1,079±91*

¹⁾Each value expresses number of revertant colonies per plate.

²⁾2-AA: 2-aminoanthracene (0.5 µg/plate) as a positive control.

³⁾2-NF: 2-nitrofluorene (1.0 µg/plate) as a positive control.

⁴⁾SA: sodium azide (1.0 µg/plate) as a positive control.

⁵⁾9-AA: 9-aminoacridine (90 µg/plate) as a positive control.

⁶⁾MNNG: *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (1.5 µg/plate) as a positive control.

⁷⁾Data are mean±SD. ⁸⁾NE: not examined.

*Significantly different from the control ($P < 0.05$).

Table 2. Viable cell counts of chromosome aberration test

Corn silk extract (µg/mL)	S9 Mix	Tre-Rec time (h) ¹⁾	Cell counts (×10 ⁴ cells/mL)		
			Starting	Final	RICC ²⁾ (%)
0	+	6~18	134.7±14.6 ⁵⁾	313.0±2.8	100.0
156.25	+	6~18	134.7±14.6	322.0±2.8	105.0
312.5	+	6~18	134.7±14.6	305.5±17.7	95.8
625.0	+	6~18	134.7±14.6	304.5±26.2	95.2
1,250	+	6~18	134.7±14.6	253.5±26.2	66.6
CP ³⁾	+	6~18	134.7±14.6	314.5±13.4	100.8
0	-	6~18	134.7±14.6	312.0±11.3	100.0
156.25	-	6~18	134.7±14.6	331.5±43.1	111.0
312.5	-	6~18	134.7±14.6	284.0±2.8	84.2
625.0	-	6~18	134.7±14.6	254.5±0.7	67.6
1,250	-	6~18	134.7±14.6	246.0±9.9	62.8
MMC ⁴⁾	-	6~18	134.7±14.6	307.0±14.1	97.2
0	-	24~0	134.7±14.6	316.5±6.4	100.0
31.25	-	24~0	134.7±14.6	283.5±24.7	81.9
62.5	-	24~0	134.7±14.6	281.5±16.3	80.8
125.0	-	24~0	134.7±14.6	267.5±33.2	73.1
250.0	-	24~0	134.7±14.6	233.5±31.8	54.4
MMC	-	24~0	134.7±14.6	308.5±12.0	95.6

¹⁾Tre-Rec time: treatment-recovery time.

²⁾Relative increase in cell counts (RICC)=increase in number of cells in treated cultures (final-starting)/increase in number of cells in control cultures (final-starting)×100.

³⁾CP: cytophosphamide monohydrate (5 µg/mL) as a positive control.

⁴⁾MMC: mitomycin C (0.1 µg/mL) as a positive control.

⁵⁾Data are mean±SD.

54.4%였다. 모든 양성대조군에서는 세포독성이 관찰되지 않았다.

Table 3은 염색체 이상 시험의 결과로 염색체 이상을 계수하여 증기상의 출현 빈도를 조사한 결과이다. 대사활성계 적용 6시간 처리군에서 gap을 제외한 이상 증기상 발현 빈도는 0.0, 0.0, 0.0, 0.5 및 2.0%(gap 포함 시 0.5, 0.0, 0.5, 0.5 및 2.0)로 염색체 이상을 유발하지 않았다. 양성대조군 CP 5 µg/mL 농도에서는 gap을 제외한 이상 증기상 발현 빈도가 9.5%(gap 포함 시 10.0%)로 음성대조군에 비하여 유의하게 증가하였다($P<0.05$). 대사활성계 비적용 6시간 처리군에서는 gap을 제외한 이상 증기상 발현 빈도가 0.5, 0.0, 1.5, 0.0 및 2.0%(gap 포함 시 1.5, 0.0, 2.0, 2.0 및 2.5)로 염색체 이상을 유발하지 않았다. 양성대조군 MMC 0.1 µg/mL 농도에서는 gap을 제외한 이상 증기상 발현 빈도가 10.0%(gap 포함 시 10.5%)로 음성대조군에 비하여 유의하게 증가하였다($P<0.05$). 대사활성계 비적용 24시간 처리군에서 옥수수수염 추출물의 최고농도인 250.0 µg/mL에서도 gap을 제외한 이상 증기상 발현 빈도가 3.0%(gap 포함 시 4.0%)로 염색체 이상이 나타나지 않았으나, 양성대조군 MMC 0.1 µg/mL의 경우 염색체 이상 증기상 발현 빈도가 5%를 넘어서 염색체 이상을 일으키는 것으로 나타났다($P<0.05$).

실험 결과 대사활성계 적용 및 비적용 처리군에서 이상 증기상 발현 빈도는 0.0~2.0%로 확인되었고 염색체 이상이 없음을 확인하였다. 반면에 모든 양성 대조군에서는 음성대

조군에 비하여 이상 증기상 발현 빈도가 통계적으로 유의적인 증가가 확인되었다.

이상의 결과로부터 본 실험조건에서 시험물질인 고메이신 함유 옥수수수염 추출물은 CHL/IU 세포를 이용한 염색체 이상실험에서 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 판단되었다. 옥수수수염 추출물과 염색체 이상에 관련된 연구보고는 없으나, 기존의 동물실험을 통해 플라보노이드 고농도를 함유한 옥수수 추출물의 경구 투여는 30 g/kg까지는 부작용이 나타나지 않으며, 평균 치사량(LD₅₀)은 30 g/kg 이상으로 판단한 연구보고가 있다(20). 본 연구에서도 고메이신 함유 옥수수수염 추출물을 대사 적용 6시간 처리군의 경우 최고농도인 1,250 µg/mL 및 대사활성계 비적용 24시간의 경우 최고농도인 250 µg/mL 농도에서 염색체 이상을 유발하지 않는 안전한 농도임을 확인하였다.

소핵 유발 빈도 실험

소핵실험은 유전독성의 좋은 지표이며 염색체 구조 이상을 쉽고 빨리 검색할 수 있는 방법으로 알려져 있다. 소핵실험은 설치류의 골수세포를 고정시킨 후 형광현미경하에서 마우스 1마리당 1,000개의 다염성적혈구(PCE)를 관찰하여 그중에서 초록색 형광을 띠는 소핵을 가진 다염성적혈구(MNPCE)를 측정하여 소핵 생성빈도를 계산하는 것이다(17). 소핵은 적혈구에서 관찰되는 과립으로 염색체 상해와 관련되어 세포핵으로부터 분리되어 존재하는 물질이다(18). 염색체의 형태 변화(구조 이상)에는 다양한 종류가 있으나

Table 3. Summary of results obtained from chromosome aberration test

Corn silk extract (µg/mL)	S9 mix	Time ¹⁾	CSG	CTG	CSB	CTB	CSE	CTE	-Gap aberration (%)	+Gap aberration (%)	Nor
0	+	6 h	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	100.0
156.25	+	6 h	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
312.5	+	6 h	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	100.0
625.0	+	6 h	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.5	99.5
1,250	+	6 h	0.0	1.0	0.0	0.0	0.5	1.5	2.0	2.0	98.0
CP ²⁾	+	6 h	0.5	2.5	0.5	1.0	2.0	7.0	9.5*	10.0*	90.5*
0	-	6 h	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	1.5	99.5
156.25	-	6 h	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
312.5	-	6 h	0.0	0.5	0.0	1.0	0.0	0.5	1.5	2.0	98.5
625.0	-	6 h	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	100.0
1,250	-	6 h	0.0	0.5	1.5	0.0	0.0	0.5	2.0	2.5	98.0
MMC ³⁾	-	6 h	0.0	0.5	0.5	1.5	6.5	9.0	10.0*	10.5*	90.0*
0	-	24 h	0.5	1.0	0.0	0.5	0.5	0.0	1.0	2.5	99.0
31.25	-	24 h	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.5	100.0
62.5	-	24 h	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	1.0	1.0	99.0
125.0	-	24 h	0.0	2.0	0.0	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	98.5
250.0	-	24 h	0.0	1.5	2.0	0.5	1.5	0.0	3.0	4.0	97.0
MMC	-	24 h	0.5	0.1	3.5	1.5	5.5	7.5	10.0*	10.0*	90.0*

¹⁾Time: treatment-recovery time, CSG: chromosome gap, CTG: chromatid gap, CSB: chromosome breakage, CTB: chromatid breakage, CSE: chromosome exchange, CTE: chromatid exchange, -Gap aberration: gaps excluded, 100 metaphases per culture, +Gap aberration: gaps included, 100 metaphases per culture, Nor: normal.

²⁾CP: cytophosphamide monohydrate (5 µg/mL) as a positive control.

³⁾MMC: mitomycin C (0.1 µg/mL) as a positive control.

*Significantly different from the control ($P < 0.05$).

최초로 염색체 절단이 일어나고 이것이 수복되지 않으면 염색체 단편이 형성되며 이 단편이 세포분열 시에 잔존하여 소핵을 형성하므로 소핵은 염색체의 구조 이상을 의미한다. 또한, 세포의 분열장치에 대한 장애가 원인이 되어 염색체 분열 시에 잔존하게 되어도 소핵화가 된다는 점에서 염색체의 수적 이상까지도 검출할 수 있다(18).

각 군 간의 체중을 비교한 결과 500 mg/kg의 옥수수수염

추출물 처리군에서만 체중이 약간 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이가 없었으며, 모든 농도의 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 변화는 나타나지 않았다(Table 4). 모든 투여용량에서 다염성 적혈구 중 소핵다염성 적혈구(MNPCE)의 출현 빈도는 음성대조군의 1.6에 비교하여 전 시험처리군 농도에서 통계적으로 유의한 증가는 없었다(Table 5). 그러나 양성대조군의 소핵다염성 적혈구의 출현

Table 4. Body weight changes after 14 days of corn silk extract feeding

(g)

	Com silk extract (mg/kg)				
	0	500	1,000	2,000	MMC ¹⁾
Day 0	32.8±1.0 ²⁾	32.9±1.2	31.0±0.6	32.8±0.5	32.4±0.8
Day 14	32.7±1.7 ^{NS3)}	31.7±0.7 ^{NS}	32.7±1.2 ^{NS}	33.1±1.3 ^{NS}	32.5±0.8 ^{NS}

¹⁾MMC: mitomycin C (2 mg/kg) as positive control.

²⁾Data are mean±SD.

³⁾NS: not significantly different from the day 0.

Table 5. Results of micronucleus test in ICR mice treated intraperitoneally with corn silk extract

Corn silk extract (mg/kg)	NCE ¹⁾	PCE	PCE/(PCE+NCE) (%)	MNPCE/2000PCE
0	269.4±11.3 ³⁾	230.6±11.3	46.1±2.3	1.6±0.5
500	276.8±13.5	223.2±13.5	44.2±2.6	1.2±0.8
1,000	276.8±13.5	223.2±13.5	44.6±2.7	1.4±1.7
2,000	283.2±13.4	216.8±13.4	43.4±2.7	1.0±1.0
MMC ²⁾	272.2±14.5	227.8±14.5	45.6±2.9	69.4±5.9*

¹⁾NCE: normochromatic erythrocyte, PCE: polychromatic erythrocyte, MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocyte.

²⁾MMC: mitomycin C (2 mg/kg) as a positive control.

³⁾Data are mean±SD.

*Significantly different from positive control ($P < 0.05$).

빈도 69.4로 음성대조군에 비하여 유의하게 증가하여 본 시험이 적합하게 수행되었음을 알 수 있었다($P < 0.05$). 또한, 모든 투여용량에서 총 적혈구에 대한 다염성 적혈구의 출현 빈도[PCE/(PCE+NCE)]도 음성대조군과 비교하여 유의적인 차이가 없었다. 그러나 양성대조군에서는 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다($P < 0.05$).

따라서 옥수수수염 추출물은 골수세포의 독성을 유발하지 않으며, 소핵유발 빈도도 증가시키지 않았으므로 소핵시험에 대해 음성으로 판정한 것은 타당한 것으로 생각된다. 본 연구 결과로 나타난 결과 유전독성학적 안정성 평가는 Peng 등(21) 연구 결과와도 일치한다. Peng 등(21)의 연구에서는 옥수수수염으로 처리한 군과 음성대조군 사이의 PCE/RBC 비율과 소핵 유발 빈도는 통계적으로 유의한 차이가 없었으며($P < 0.05$), 옥수수수염 추출물을 처리한 군의 경우 골수 줄기세포에서 유전독성을 나타내지 않았음을 보고하였다.

요 약

본 연구에서는 고메이신 함유 옥수수수염 추출물의 유전독성에 대한 안전성을 규명하고자 세균에서의 복귀돌연변이 유발성, 염색체 이상, 마우스 골수세포에 있어서 소핵실험을 수행하였다. 세균에서의 복귀돌연변이 유발성 여부는 *Salmonella* Typhimurium의 히스틴인 요구성 균주인 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개 균주와 대장균 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 uvrA를 이용하여 대사활성계 적용(+ S9 Mix) 및 비적용(-S9 Mix)하에서 유전 손상을 측정하여 모든 균주에서 대사활성계 적용 및 비적용 시 옥수수수염 추출물(5,000, 1,666.67, 555.56, 185.19, 61.73 µg/plate)에서 복귀돌연변이 평균 집락수의 변화 및 농도 의존적인 증가는 관찰되지 않았다. 염색체 이상 실험에서 대사활성계 적용 및 비적용 6시간 처리군(최고 농도 1,250 µg/mL)과 대사활성계 비적용 24시간 처리군(최고 농도 250 µg/mL)에서 이상 증기상 발현 빈도의 증가 및 음성대조군에 비하여 통계적으로 유의성이 확인되지 않았다. 마우스 골수세포에서의 소핵실험에서는 모든 투여용량의 옥수수수염 추출물(0, 500, 1,000, 2,000 mg/kg)에서 다염성 적혈구 중 소핵다염성 적혈구의 출현 빈도 및 총 적혈구에 대한 다염성 적혈구의 출현 빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었으므로 2,000 mg/kg 옥수수수염 추출물의 섭취는 마우스 골수세포의 소핵 유도에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 결론적으로 세균에서의 복귀돌연변이 실험, 염색체 이상 실험 및 생체 내에서의 마우스 골수세포에서의 소핵시험을 통하여 본 실험 조건에서 고메이신 함유 옥수수수염 추출물은 유전독성을 유발하지 않는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 지원(과제 번호: PJ0113052016)으로 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Hasanudin K, Hashim P, Mustafa S. 2012. Corn silk (*Stigma maydis*) in healthcare: a phytochemical and pharmacological review. *Molecules* 17: 9697-9715.
2. Maksimović Z, Dobrić S, Kovacević N, Milovanović Z. 2004. Diuretic activity of *Maydis stigma* extract in rats. *Pharmazie* 59: 967-971.
3. George GO, Idu FK. 2015. Corn silk aqueous extracts and intraocular pressure of systemic and non-systemic hypertensive subjects. *Clin Exp Optom* 98: 138-149.
4. Maksimović Z, Malencić D, Kovacević N. 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresour Technol* 96: 873-877.
5. Weiss AC Jr, Chan BG, Elliger CA, Wiseman BR, McMillian WW, Widstrom NW, Zuber MS, Keaster AJ. 1979. Maysin, a flavone glycoside from corn silks with antibiotic activity toward corn earworm. *J Econ Entomol* 72: 256-158.
6. Choi DJ, Kim SL, Choi JW, Park YI. 2014. Neuroprotective effects of corn silk maysin via inhibition of H₂O₂-induced apoptotic cell death in SK-N-MC cells. *Life Sci* 109: 57-64.
7. Lee J, Kim SL, Lee S, Chung MJ, Park YI. 2014. Immunostimulating activity of maysin isolated from corn silk in murine RAW 264.7 macrophages. *BMB Rep* 47: 382-387.
8. Peng KZ, Zhang SY, Zhou HL. 2016. Toxicological evaluation of the flavonoid-rich extract from *Maydis stigma*: Subchronic toxicity and genotoxicity studies in mice. *J Ethnopharmacol* 192: 161-169.
9. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2014. OECD Guideline for Testing of Chemicals (Guideline 487): *in vitro* Mammalian cells micronucleus test. OECD Publishing, Paris, France. p 1-26.
10. European Food Safety Authority (EFSA). 2011. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA J* 9: 2379.
11. Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31: 347-364.
12. Ishidate M Jr, Miura KF, Sofuni T. 1988. Chromosome aberration assays in genetic toxicology testing *in vitro*. *Mutat Res* 404: 167-172.
13. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2014. OECD Guideline for Testing of Chemicals (Guideline 474): Mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD Publishing, Paris, France. p 1-21.
14. Kim SL, Kim MJ, Lee YY, Jung GH, Son BY, Lee JS, Kwon YU, Park YI. 2014. Isolation and identification of flavonoids from corn silk. *Korean J Crop Sci* 59: 435-444.
15. Mortelmans K, Zeiger E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 455: 29-60.
16. Kim BS, Margolin BH. 1999. Statistical methods for the Ames *Salmonella* assay: a review. *Mutat Res* 436: 113-122.
17. Kim BS, Zhao B, Kim HJ, Cho M. 2000. The statistical analysis of the *in vitro* chromosome aberration assay using Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 469: 243-252.
18. Kastenbaum MA, Bowman KO. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res*

- Res* 9: 527-549.
19. Hayashi M, Yoshimura I, Sofuni T, Ishidate M Jr. 1989. A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control. *Environ Mol Mutagen* 13: 347-356.
 20. Sumner DD, Cassidy JE, Szolics IM, Marco GJ, Bakshi KS, Brusick DJ. 1984. Evaluation of the mutagenic potential of corn (*Zea mays* L.) grown in untreated and atrazine (AAtrex[®]) treated soil in the field. *Drug Chem Toxicol* 7: 243-257.
 21. Peng KZ, Yang X, Zhou HL, Pan SX. 2015. Safety evaluation, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of the flavonoid-rich extract from *Maydis stigma*. *Molecules* 20: 22102-22112.