

두릅나무 추출물의 유전독성평가

정영신^{1*} · 이석종¹ · 최선아¹ · 이장하¹ · 류재천² · 홍은경¹

¹*(주)메드빌 중앙 연구소, ²한국과학기술연구원

Genotoxicity study of *Aralia elata* extract in bacterial and mammalian cell system

Young-Shin Chung^{1*}, Seok-Jong Lee¹, Sun a Choi¹, Jang-ha Lee¹,
Jae-Chun Ryu² and Eun-Kyung Hong¹

¹*Medvill Research Laboratory, Pyungchang-dong, Jongro-gu, Seoul 110-102, Korea

²Toxicology Laboratory, Korea Institute of Science and Technology, PO Box 131, Seoul, 130-650, Korea

(Received December 14, 2002 / Accepted December 30, 2002)

ABSTRACT: In order to investigate the safety of *Aralia elata* extract causing the reduction in the blood glucose level and oxidative stress in diabetes animals, these genotoxicity studies in bacterial and mammalian cell assay system such as Ames bacterial reverse mutation test and chromosomal aberration assay were performed. As results, in Ames bacterial reversion assay the extract in the range of 5,000~625 ug/plate did not induce mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535 and TA 1537 strains with and without metabolic activation of S-9 mixture. For chromosomal aberration assay, IC₅₀ (50% inhibition concentration of cell growth) of the extract were determined; 792 µg/ml without and 524 µg/ml with S-9 mixture in Chinese hamster lung (CHL) fibroblast cell culture. Any significant chromosomal aberration was not observed in CHL cells treated with the extract at the concentrations of 792, 396 and 198 µg/ml or 524, 262 and 131 µg/ml in the absence or presence of S-9 metabolic activation, respectively. From these results, *Aralia elata* extract did not induce any harmful effects on the gene in bacteria and mammalian cell system used in these experiments.

Keywords : reverse mutation assay, chromosome aberration assay, *Aralia elata* extract

서 론

인삼(*Panax schinseng* Nees) 및 오가피(*Acanthopanax*) 류와 함께 아라리아속에 속하는 두릅나무(*Aralia elata*)는 일본, 만주, 사할린 등 주로 동아시아 각지에서 자생하는 다년생 초본이다. 이 두릅나무의 껍질에는 saponin을 포함한 여러 종류의 triterpenoids가 있는 것으로 알려져 있으며, 수피에는 혈당강하 효과가 있는 elatoside E를 포함해 elatoside F와 oleanolic acid glycosides 등 몇 가지 glycosides가 함유되어 있다(안덕균, 1998). 예부터 민간이나 한방에서는 두릅나무의 근피와 수피를 자노아(刺老鴉)라하여 신경안정, 풍습성관절염, 신(腎)기능보완, 당뇨병 등에 이용해왔다(안덕균, 1998). 이에 대해 최근에 두릅나무의 추출물이 쥐를 사용한 당뇨병 모델에서 당뇨의 치료 효과가 탁월함이 보고되었다. 쥐에게 두릅나무에서 분리한 triterpenoid glycoside를

먹이고 포도당을 투여했을 때 혈당 강하작용과 혈액 내의 β-lipoprotein 수준을 감소시켰다(문관심, 1984). 또, 두릅 추출물이 PI₃-kinase와 ERK₂를 자극하여 간에서 glycogen 함량을 증가시킨다고 보고된 바 있다(Kim *et al.*, 1998). Streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 쥐에서 두릅 추출물이 혈액의 콜레스테롤과 중성지방(triglyceride)을 감소시키며 신장에서 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)와 carbonylated protein을 감소시키고(Seo and Kim, 1997), GST/GSSG의 비율을 증가시키는 것으로 평가되었다(Lee *et al.*, 1999). 또한 두릅 추출물은 항피로 작용이 있으며 면역기능향진, 중추신경 흥분, 혈압강하 등의 작용도 가지고 있는 것으로 알려져 있다(안덕균, 1998). 본 연구소의 최근 연구 결과에 따르면 두릅추출물이 당뇨성 백내장의 발생을 억제하는 작용이 있는 것으로 확인되었다.

이러한 두릅의 기능성으로 인하여 두릅의 재배가 늘고 있고, 식품에도 기능을 부가시키려는 움직임에 따라 이러한 물질들의 안전성이 확인되어야 할 필요성이 대두되었다. 최근

*To whom correspondence should be addressed

건강기능식품에 관한 법률이 통과됨에 따라 두릅추출물을 좀 더 안전한 식품 소재로 활용하고, 경제적인 이용가치를 높이기 위하여도 여러 부분의 안전성 확보가 필요하다.

본 연구는 혈당 및 지질의 과산화를 억제하는 물질로 보고되고 있는 두릅나무 추출물이 유전적으로 안전한지 여부를 평가하고자 *Salmonella typhimurium* 균주를 이용한 복귀돌연변이 시험과 포유동물 배양세포를 이용한 염색체 이상 시험을 수행하였다. 이상의 시험들은 식품의약품안전청 고시 제1999-61호의 “의약품 등의 독성시험기준”에 따라 실시하였다.

재료 및 방법

시험물질

Aralia elata extract는 황색 고형분말로 두릅나무 가지의 수추출물이며 본 연구소에서 제조하였고, flavonoids들로 품질관리를 수행하였다. 4°C에 보관하였으며, 시험 당일에 증류수에 용해시켜 사용하였다. Eagle's minimum essential medium(EMEM), 0.25% trypsin-EDTA, trypan blue, colcemid, fetal bovine serum(FBS)는 Invitrogen Corporation, Inc.에서 구입하였다. 모든 화학물질은 분석용(analytical grade or highest grade) 시약을 사용하였고, S-9 혼합액은 Maron과 Ames 방법(Ames *et al.*, 1973; Maron and Ames, 1983)으로 준비하여 즉각적으로 -80°C에 보관하였던 것을 사용하였다.

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험 균주 및 배양조건

복귀돌연변이 시험을 위하여 균주로는 *Salmonella typhimurium* LT2주 유래의 histidine 요구성 변이주인 TA 98, TA 100, TA 1535 그리고 TA 1537을 사용하였다. 0.8% oxid nutrient broth No.2 배양액에 접종한 다음 37°C에 16시간동안 200회/분의 속도로 선회 배양하였다. 각 균주는 본 시험에 앞서 histidine 요구성, crystal violet 감수성, UV 감수성, ampicillin 또는 tetracyclin 내성 및 자발 복귀돌연변이 빈도 등의 유전적인 특성을 확인하였다.

시험물질 및 대조물질

*Aralia*는 시험당일 멸균증류수에 농도별로 희석하여 plate에 시험물질의 액량이 0.1 ml/plate가 되도록 제조하여 사용하였다. 각각의 균주에 대한 양성대조물질 sodium azide(SA), 2-aminoanthracene(2-AA), 2-nitrofluorene(2-NF) 및 9-aminoacridine(9-AA)은 DMSO에 용해하여 사용하였고 음성대조물질로 멸균증류수를 사용하였다.

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험

Ames(Ames *et al.*, 1975; Maron *et al.*, 1983)에 의하여 확립된 방법을 사용하여 다음의 복귀돌연변이시험을 수행하였다. 시험물질의 농도 설정을 위한 예비독성시험은 TA 100 균주를 사용하였으며, 5mg/plate를 최고농도로 하고 공비 2로 5단계 농도를 취하여 균주에 처리하였으며 직접법과 S-9 혼합액을 이용한 대사활성법을 수행하였다. 예비독성시험 결과 5000, 2500, 1250, 625, 313 µg/plate의 농도에서 시험물질에 의한 세포독성이 보이지 않아 본시험에서도 동일한 5000, 2500, 1250, 625 µg/plate의 농도를 사용하였다.

균 현탁액(약 2×10^9 cells/ml) 0.1 ml에, 여러 농도의 두릅나무 추출물 및 멸균 증류수 0.5 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 이때 S-9 혼합액에 의한 대사를 위해서는 인산완충액 대신 S-9 혼합액(10% v/v, S9 함유) 0.5 ml를 첨가하였다. 배양 종료 후 45°C에서 용해한 top agar(연한천 용액) 2 ml를 첨가하여 잘 혼합한 후, 변이원성 검색용 배지(Vogel-Bonner minimal medium E) 위에 중층하여 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 콜로니수를 계측하였다. 균의 생육저해와 시험물질의 침전, 분출을 육안 및 실제 현미경을 사용하여 관찰하였다. 독성여부의 판정을 위해서는 각 용량당 3장의 plate를 사용하여 복귀변이성 콜로니 수의 평균치를 구하였다. 시험물질을 처리한 모든 균에서 복귀변이성 콜로니수가 TA 98과 TA 100 균주에서는 음성대조군의 2배 이상이고 TA 1535나 TA 1537에서는 3배 이상이며, 용량반응관계가 인정될 때, 복귀변이 유발능 양성으로 판정하였다(Kim and Margolin, 1999).

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 세포 및 배양조건

포유동물 세포인 Chinese hamster lung fibroblast(CHL)을 5% CO₂ 배양기에서 37°C 온도로 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 10 µg/ml의 penicillin과 10 µg/ml의 streptomycin이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, GIBCO)에 단층 배양하여 사용하였다.

시험물질 및 대조물질

*Aralia elata*에서 추출한 시험물질은 멸균증류수에 희석하였고 시험물질의 농도를 결정하기 위하여 예비독성시험을 실시하였다. 1×10^5 세포를 사용하였고, 6시간동안 추출물을 농도별(공비 2로 3단계의 농도)로 처리하고 0.4% trypan blue로 염색하여 염색 세포 수를 세어서 세포증식을 50% 억제하는 농도를 산출하고 본 시험의 최고 농도로 하였다. 양성대조물질인 mitomycin C와 cyclophosphamide는 멸균증류수에 용해하여 각각 1과 10 µg/ml의 농도로 사용하였

다. 음성대조물질은 멸균증류수를 사용하였다. 모든 시험은 2회 반복하여 수행하였다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상 시험

시험물질의 염색체 이상 여부를 판단하기 위하여 OECD (1993)와 Ishidate & Odashima(1977)의 방법을 조금 변형한(Ryu *et al.*, 1993, 1994, 1996a,b) 다음과 같은 방법을 사용하였다.

예비독성시험에서 결정된 50% 세포독성 농도를 최고 농도로 하고, 공비 2로 3단계의 농도를 시험농도로 하였다. 대사활성 존재하의 시험은 CHL 세포를 petridish에서 3일간 배양한 후 시험물질 및 양성대조물질(cyclophosphamide 10 µg/ml) 함유 배양액에 S-9 혼합액(배양액의 20%비율)을 첨가하여 6시간 배양하고 보통 배양액으로 교환하여 18시간 이상 더 배양하였다. 세포 수거 2시간 전에 colcemid (sigma)를 처리한 후, trypsin을 사용하여 세포를 분리하고 원심분리하였다. 세포를 KCl 저장액(37°C)에서 20분간 방치한 후, 고정액(methanol:glacial acetic acid = 3:1)으로 3번 반복하여 고정시킨 후 Slide를 제작하였다. Slide를 완전하게 말린 후 5% Giemsa(Gibco) 용액으로 염색하고 현미경으로 관찰하였다. 200백개의 metaphase 세포에서 염색체 이상을 관찰하였고 염색체 이상의 분류는 JEMS-MMS (1988)을 따랐다. 특별히 본 시험에서는, gap을 chromatid의 폭보다 좁은 결손으로 분류하였다. 수적 이상은 4배수체 이상간 기록하였고, 구조이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를

양성세포 1개로 계수하고 종류를 각각 기록하여 염색체 이상을 보이는 세포의 퍼센트 값을 구하고, Fishers exact test(Altman, 1993)를 사용하여 통계적인 유의치를 분석하였다. 따라서 용량 의존적인 증가와 유의차 분석에 의한 p-value값에 따라 양성 여부를 판정하였다.

대사활성 부재하의 시험은 CHL 세포를 petridish에서 3일간 배양 후 시험물질 및 양성대조물질(mitomycin C, 1 µg/ml) 함유배양액을 첨가하여 6시간 배양하고 보통 배양액으로 교환하여 18시간 이상 더 배양하였다. 또는, 시험물질 및 양성대조물질 함유배양액으로 24시간을 배양하였고 세포 수거 2시간 전에 colcemid를 처리한 후 위의 방법에 따라 세포를 처리하여 염색체 이상을 관찰하였다.

결과 및 고찰

Salmonella typhimurium을 이용한 복귀돌연변이시험

Ames 방법은 유전자 한 염기 쌍의 대체(substitution)나 변형(frameshift)에 의한 돌연변이를 검색하는 방법으로 박테리아 시스템에서 널리 사용하는 대표적인 평가 방법이다. 본 연구에서도, 두릅 추출물의 유전독성 평가를 위하여 4종의 다른 균주, Salmonella typhimurium strains을 사용하였고, S-9 혼합액의 첨가 하에서도 시험을 수행하였다.

그 결과를 Table 1에 정리하였다. S-9 혼합액을 적용하지 않은 직접법의 경우, 두릅 추출물을 Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA 1537, 4종의 시험용 균주에

Table 1. Mutagenicity of Aralia in Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA 1535 and TA 1537 in the presence and absence of S-9 metabolic activation system

Compound	Dose (µg/plate)	S-9 mix	His+revertants/plate (Mean±S.D)			
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537
D.W		-	46 ± 4	239 ± 7	7 ± 2	26 ± 5
Ara	625	-	56 ± 5	242 ± 15	9 ± 2	24 ± 6
	1250	-	45 ± 4	255 ± 31	8 ± 1	18 ± 1
	2500	-	51 ± 1	227 ± 10	6 ± 2	28 ± 3
	5000	-	75 ± 5	265 ± 14	13 ± 2	29 ± 4
SA	1	-	-	1070 ± 68	95 ± 22	-
2-NF	1	-	677 ± 10	-	-	-
9-AA	80	-	-	-	-	236 ± 22
D.W		+	22 ± 3	179 ± 9	13 ± 1	39 ± 2
Ara	625	+	31 ± 2	211 ± 14	12 ± 1	50 ± 10
	1250	+	40 ± 10	238 ± 5	9 ± 3	41 ± 8
	2500	+	32 ± 3	228 ± 49	19 ± 3	43 ± 9
	5000	+	23 ± 0	267 ± 6	16 ± 3	38 ± 3
2-AA	0.5	+	944 ± 69	-	-	-
2-AA	1	+	-	1872 ± 72	-	-
2-AA	2	+	-	-	153 ± 16	379 ± 30

SA: Sodium Azide, 2-NF: 2-Nitrofluorene, 9-AA: 9-Aminoacridine, 2-AA: 2-Aminoanthracene

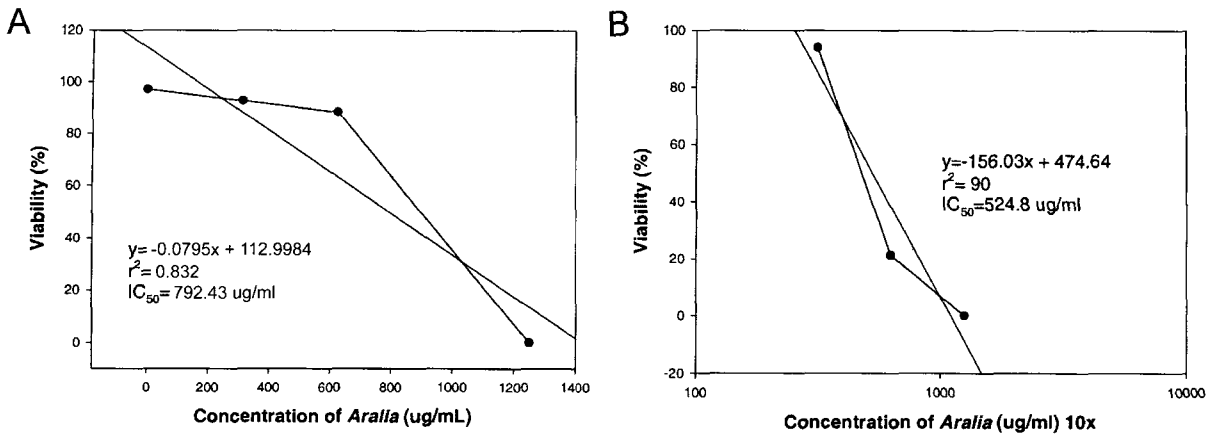


Fig. 1. Cytotoxicity of Aralia in Chinese hamster lung (CHL) fibroblast cell line in the absence(A) and presence of S-9 metabolic activation.

처리하였을 때, 모든 용량 단계에서 음성대조물질과 같은 정도 또는 그 이하의 복귀변이성 콜로니수를 나타내었다. S-9 혼합액을 적용하지 한 대사활성화법의 경우에도 음성대조군과 같은 정도의 콜로니수를 나타내어, 두릅추출물은 복귀돌연변이시험 조건에서 어떤 유전적인 변이도 일으키지 않는 것으로 판단되었다. 양성대조물질은 직접법과 S-9 혼합액을 첨가한 대사활성화법 모두에서 각각의 시험용 균주에 대하여 복귀변이성 콜로니수를 증가시켜 본 시험이 적정하게 시행되어졌음을 확인하였다.

포유동물세포를 이용한 Chromosomal aberration 시험

포유동물세포를 이용한 염색체이상시험에서 세포 내 독성 시험을 실시하여 세포증식 50% 억제 농도를 트리판블루 염색을 통해 확인하였다(Fig. 1A & 1B). 세포증식 50% 억제 농도가 대사활성부재하에서는 792 µg/ml이었고, S-9 혼합액을 함께 처리하였을 때는 524 µg/ml이었다. 따라서 염색체 이상시험의 본 시험에서는, 시험물질을 S-9 혼합액을 처리하지 않은 직접법의 경우 50%의 세포독성을 나타내는 792 µg/ml 농도와 공비 2로 나눈 396 µg/ml, 198 µg/ml 농

Table 2. Chromosomal aberration assay for Aralia in Chinese hamster lung(CHL) cells in the persence and absence of S-9 metabolic activation system

Treatment			Chromosome aberrations / 200 cells						Extra aberration				
Compound	Con.(µg/ml)	h	S-9 mix	Chromatid Type		Chromosome Type		Total Aberration (%)	Extra aberration				
				Br	Ex	Br	Ex		ctg	csg	poly	endo	nor
D.W.	-	6	-	2	1	0	0	1.5	1	0	0	0	193
MMC	1	6	-	35	43	11	4	39	6	2	0	0	138
Aralia	792	6	-	2	1	0	0	1.5	2	0	0	0	196
	396	6	-	2	1	0	0	1.5	1	0	0	0	197
	198	6	-	1	0	0	0	0.5	1	0	0	0	198
D.W.	-	6	+	1	1	0	0	1	2	0	0	0	196
CP	10	6	+	33	39	14	2	29.5	12	4	0	0	141
Aralia	524	6	+	2	1	0	0	1.5	1	0	0	0	196
	262	6	+	1	0	0	0	0.5	1	0	0	0	198
	131	6	+	1	0	0	0	0.5	1	0	0	0	198
D.W.	-	24	-	2	0	0	0	1	3	0	0	0	195
MMC	1	24	-	24	17	2	3	22	9	3	2	0	156
Aralia	792	24	-	5	1	2	1	4.5	1	0	2	0	188
	396	24	-	4	1	0	0	2.5	2	1	0	0	192
	198	24	-	2	0	0	0	1	1	1	0	0	196

Con.: concentration, Br: breakage, Ex: exchange, ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, poly: polyploid, endo: endoreduplicate, nor: normal, MMC: mitomycin C, CP: cyclophosphamide.

도로 처리하였다. 또한 S-9 혼합액을 처리한 대사활성존재하에서는 524 µg/ml, 262 µg/ml, 131 µg/ml 농도로 본 시험을 수행하였다.

시험결과에 따라, 염색체와 염색분체를 나누어 결손형과 교환형의 이상을 계수하였고, gap, polyploid, endoreduplicate 등을 계수하였다. Table 2에서 S-9 대사활성존재하의 시험에서와 대사활성 부재 하에 6시간을 처리했을때, 두릅 추출물은 1~2%의 염색체 이상을 보이며, 이것은 음성대조군에서의 통상 3%이하의 염색체 이상 수준 정도로 통계적으로도 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다. 또한, 대사활성 부재하의 24시간에서 최고농도인 792 µg/ml과 396 µg/ml, 198 µg/ml로 처리했을 때, 각각의 p-value값이 0.11, 0.16 그리고 0.65로 0.05보다 크므로 염색체 이상시험에서 유의한 차가 없음을 확인하였다. 이 모든 시험에서 양성대조물질은 대사활성 존재 하에서나 부재 하에서 모두 22-40%의 염색체 이상을 보여 본 시험이 적절히 수행되었음을 확인하였다.

이상의 시험에서 두릅의 추출물은 4종의 *Salmonella typhimurium* 균주에서 복귀돌연변이를 일으키지 않았으며, CHL을 이용한 염색체 이상 시험에서도 유의적인 유전 독성을 나타내지 않는 물질로 확인되었다.

참고문헌

- 안덕균(1998): 한국본초도감, 교학사, pp 720.
- 문단심(1984): 약초의 성분과 이용, 과학, 백과사전 출판사, pp 415-417.
- Ames, B.M., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **31**, 347-364.
- Altman, D.G. (1993): Comparing groups-categorical data: Practical statistics for Medical Research, Chapman & Hall, London, pp. 229-276.
- Ishida, Jr. M. and Odashima, S. (1977): Chromosome tests with 34 compounds on chinese hamster cells in vitro-a screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, **48**, 337-354.
- Ivet, J.L., Brown, B.M., Rodgers, C., Anderson, B.E., Resnick, M.A. and Zeiger, E. (1989): Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. IV. Results with 15 chemicals, *Environ Mol. Mutagen.*, **14**(3), 165-187.
- JEMS-MMS (1988): Atlas of chromosome aberration by chemicals, Japanese Environmental Mutagen Society-Mammalian Mutagenicity Study Group, Tokyo, Japan.
- Kim, B. S., Margolin, B. H. (1999): Statistical methods for the Ames Salmonella assay: a review, *Mutat. Res.*(436), 113-122
- Kim, S.J., Kim, Y.Y., Ko, K.H. et al. (1998): Butanol extract of 1:1 mixture of Phellodendron cortex and Aralia cortex stimulates PI3-kinase and ERK2 with increase of glycogen levels in HepG2 cells, *Phytother Res.*, **12**, 1-6.
- Lee, Y., Kim, H., Choi, H.S., Kang, B.H., Han, Y.B. and Kim, S.J. (1999): Effects of water extract of 1:1 mixture of Phellodendron cortex and Aralia cortex on polyol pathway and oxidative damage in lenses of diabetic rats, *Phytother Res.*, **13**, 555-560.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-275.
- OECD (1993): OECD guideline for the testing of chemicals, Documents 473, Genetic toxicology : *in vitro* mammalian cytogenetic test, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Ryu, J.-C., Lee, S., Kim, K.-R., Kim, M., Chang, I.-M. and Park, J. (1993): A study on the clastogenicity of trichothecene mycotoxins in chinese hamster lung cells, *Korean J. Toxicol.*, **9**(1), 13-21.
- Ryu, J.-C., Lee, S., Kim, K.-R., Kim, M. and Park, J. (1994): Evaluation of the genetic toxicity of synthetic chemicals (I). Chromosomal aberration test on chinese hamster lung cell *in vitro*, *Environmen. Mutagens & carcinogens*, **14**(2), 138-144.
- Ryu, J.-C., Kim, K.-R., Kim, H.-J., Ryu, E.-K., Lee, S.-Y., Jung, S.-O., Youn, J.-Y., Kim, M.-H. and Kwon, O.-S. (1996a): Evaluation of the genetic toxicity of synthetic chemicals (II). apyethroid insecticide, fenpropathrin, *Arch Pharm. Res.*, **19**(4), 251-257.
- Ryu, J.-C., Kim, K.-R., Ryu, E.-K., Kim, M.-J., Kwon, O.-S., Song, C.-E., Mar, W. and Chang, I.-M. (1996b): Chromosomal aberration assay of taxol and 10-deacetyl baccatin III in chinese hamster lung cells *in vitro*, *Environmen. Mutagens & carcinogens*, **16**(1), 6-12.
- Ryu, J.-C., Kim, H.-J., Seo, Y.-R. and Kim, K.-R. (1997): Single Cell Gel Electrophoresis (Comet assay) to detect DNA damage and Apoptosis in cell level, *Environmen. Mutagens & carcinogens*, **17**(2), 71-77.
- Salamone, M. (1980): Towards an improved micronucleus test: Studies on 3 model agents, Mitomycin C, Cyclophosphamide and Dimethylbenzanthracene, *Mutat. Res.*, **74**, 347-356.
- Seo, S.Y. and Kim, H. (1997): Effect of P55A extract on lipid peroxide production and glutathione-dependent enzyme activities in liver and pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats, *Korean J. Food Nutr.*, **26**, 689-693.