



산삼배양추출물의 배양 Chinese Hamster Lung 세포를 이용한 염색체이상시험

송시환¹ · 양덕춘² · 정세영³

¹주) Chemon, ²경희대학교 한방재료가공센터, ³경희대학교 약학대학 위생화학교실

The Chromosomal Aberration Test of Wild Ginseng Culture Extract in Chinese Hamster Lung Cell

Si-Whan Song¹, Deok Chun Yang² and Se Young Choung³

¹Chemon Inc., Gyenggi-do 449-826

²Oriental Medicine Material and Processing Center, Kyung Hee University, Yongin 449-701

³Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Received January 20, 2005; Accepted March 3, 2005

ABSTRACT. To investigate the mutant induction of wild ginseng culture extract, we performed chromosomal aberration assay with chinese hamster lung cell *in vitro*. The test concentration of the extract was decided for the standard with the 50% suppression of cell propagation in the cell. The concentrations for the chromosome test were 1,250, 2,500 and 5,000 $\mu\text{g/ml}$ with metabolic activation (+S, 6 hours treatment), 1,100, 2,200 and 4,400 $\mu\text{g/ml}$ without metabolic activation (-S, 6 hours treatment) 800, 1,600 and 3,200 $\mu\text{g/ml}$ without metabolic activation (-S, 24 hours treatment). No significant increase in chromosome aberrations was observed at any of these concentrations both in the absence and presence of metabolic activation system. Cyclophosphamide monohydrate (CPA) and ethylmethanesulfonate (EMS) caused a significant increase in chromosome aberration. These results may be concluded that wild ginseng culture extract is not capable of inducing chromosome aberration in cultured chinese hamster lung cell regardless of metabolic activation and genotoxicity of that is negative under the present experimental condition.

Keywords: Wild ginseng culture extract, Chromosomal aberration assay, Cyclophosphamide monohydrate, Ethylmethanesulfonate.

서 론

산삼(Panax ginseng C.A. Meyer)은 식물학적으로 오가피과, 현화식물, 피자식물에 속하며, 그 자생조건이 매우 까다롭고 환경조건에 많은 영향을 받기 때문에 환경조건이 적절하지 않는 곳에서는 자라지 않는다. 또한 예로부터 원기회복에 탁월한 효능이 있는 약재로 알려져 있다. 중국 최고의 약물서인 "본초신농경"에 보면 "오장을 보호하고 정신을 안정시키고 혼백(魂魄)을 고정하여 경계(驚悸)를 멈추게 하고, 외부로부터 침입하는 병사(病邪)를 제거해

주며, 눈을 맑게하고 마음을 열어 지혜롭게 한다"라고 기술되어 있고, 산삼은 다른 식물이 가지고 있지 않은 사포닌 등 생리활성 물질을 다량 함유하고 있어서 면역기능 강화, 강장효과, 뇌기능 강화, 노화억제, 허약체질 개선 등의 효능이 있으며 약리적인 효능이 매우 뛰어나 오랫동안 동양의 신비한 영약으로 알려져 왔다(Nam, 1996).

산삼에 대한 연구는 산삼의 성분연구(Yamaguchi *et al.*, 1988)와 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통한 면역활성 증강 효과가 입증된 바 있으며(Mizuno *et al.*, 1994), 근래에 들어와서 산삼배양근의 콜레스테롤 저하 효과(Lee *et al.*, 2003)와 미백효과(Shin, 2001)가 보고된바 있다.

천연산삼은 예로부터 그 효능이 알려지면서 과다한 채굴로 점차적으로 고갈되기 시작하여 현재는 거의 남아있지 않은 상태이다. 그리하여 인위적으로 산삼의 일종인

Correspondence to: Se Young Choung, Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea
E-mail: sychoung@khu.ac.kr

장뇌삼을 재배하기 시작하였다. 그러나 토양의 오염과 오염된 대기환경으로 인하여 예전과 같은 양질의 산삼을 재배하는데 어려움이 있고, 수확확보에 많은 시간이 걸린다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 산삼의 조직배양을 통하여 부정근을 유도하여 생물 반응기를 이용한 산삼 대량배양에 성공하여 그 효능을 밝히려는 노력이 점차 고조되고 있다(Hahn *et al.*, 2003; Yoo *et al.*, 2003).

생물 반응기를 통한 산삼 배양근은 짧은 기간에 수확되어 다량으로 생산할 수 있고, 천연산삼과 같은 기능의 효과를 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 재배삼은 환경오염에 노출되어 생산되지만 생물 반응기의 산삼 배양근은 오염되지 않은 환경에서 자라기 때문에 믿을 수 있고, 산삼 배양 추출물을 이용하여 건강식품 및 의약품 등으로서 개발하여 많은 이익을 창출해 낼 것이다.

국내에서의 산삼 배양 추출물에 대한 과학적인 연구가 거의 보고되지 않고 있고 또한 현재까지 생물 반응기에서 배양된 산삼배양근의 식품으로서의 안전성 여부가 확인되지 않아 이를 활용한 제품 개발에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 생물 반응기를 통하여 대량생산한 산삼 배양근으로부터 추출한 산삼 배양추출물에 대한 식품원료로서의 안전성 평가를 위하여 chinese hamster lung cell을 이용하여 염색체 이상실험을 식품의약품안전청 고시 제2000-63호 "비임상시험 관리기준"(식품의약품안전청, 2000)와 제1999-61호 "의약품 등의 독성시험기준"(식품의약품안전청, 2000)에 준하여 수행하였다.

재료 및 방법

시험물질

야생 산삼으로부터 유도한 산삼 배양근을 영양배지에서 4주간 배양한 후 배양근을 수거하여 물로 3회 수세하고 45°C 건조기에서 12시간 건조하였다. 건조된 산삼 배양근 1 kg에 대하여 1차 증류수 150 l(1 : 10)를 첨가하고 85°C의 수조에서 4시간 동안 추출하고 회전진공농축기를 사용하여 60 brix 이상으로 농축하여 산삼배양 추출물을 조제하였으며, 냉장 보관하면서 시험에 사용하였다.

시험계

시험계는 식품의약품안전청 국립독성연구원 유전독성과로 부터 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소를 경유하여 분양 받은 Chinese Hamster Lung cell(CHL)(Koyama *et al.*, 1970)를 (주)켄온 전임상연구센터에서 계대배양한 것을 시험에 사용하였다.

세포는 액체질소내에 냉동 보관하였으며, 세포를 해동

하여 7일 이상 배양한 후 도립현미경으로 미생물 오염 여부를 확인하고, 증식 속도 및 핵형 등을 확인한 후 시험에 사용하였다.

배양방법

시험은 Ishidate(Ishidate *et al.*, 1981) 및 Dean(Dean *et al.*, 1984)의 방법을 응용하여 실시하였다.

배양액은 Minimum Essential Medium(MEM, GIBCOBRL 41500-034)에 sodium bicarbonate(NaHCO₃ 2200 mg), L-glutamine(292 mg), 항생제로 streptomycin sulfate(100 mg)와 penicillin G · Na(105 unit)를 첨가하고, 주사용 증류수를 가해 용해하여 최종 액량을 1000 ml로 조정하였다. 이를 membrane filter(pore size 0.2 μm)로 여과한 후 소태아 혈청(FBS, GIBCOBRL) 100 ml를 첨가해 사용하였다.

배양조건은 세포는 포화수증기와 이산화탄소 농도 5%를 유지하는 37°C 항온 배양기(Forma 3110 및 3111)에서 세포배양용 플라스크(배양면적 75 cm², Falcon)를 사용하여 배양하였으며 매 2~3일 마다 0.1% 트립신액으로 세포를 분리하여 계대배양 하였다.

시험물질처리를 위한 배양은 충분한 수의 세포를 트립신으로 분리한 다음 Coulter counter로 ml당 세포수를 구하였다. 이를 근거로 배양면적 25 cm² 플라스크 당 2×10⁴개의 세포를 5 ml의 배양액으로 파종, 약 3일간 배양한 후 시험물질을 처리하였다.

대사활성계

S-9는 Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간(111 Gibraltar avenue, Annapolis, MD21401, USA)을 사용하였고 단백질함량은 36.40 mg/ml, -20°C에서 보관하였다.

Cofactor로 Wako Pure Chem. Ind. Ltd.(Japan)을 사용하였고, 4°C 냉장 보관하였다.

S-9 mix 1 ml 중의 조성 및 사용은 8 μmol MgCl₂ · H₂O₂, 33 μmol KCl, 5 μmol G-6-P, 4 μmol NADPH, 4 μmol NADH, 100 μmol sodium phosphate buffer (pH 7.4) 및 0.3 ml S-9 mix는 0.5 ml/3 ml/T-25 flask로 처리하고, 그의 활성은 CPA에 의한 염색체이상 유발로 확인하였다.

시험물질 및 양성대조물질의 조제

시험물질 조제법은 시험물질 적량을 전술한 부형제에 현탁하여 50 mg/ml로 조제한 것을 사용한 부형제(배양액)를 사용하였으며, 조제 시험물질의 안정성 및 균질성의 측정은 측정하지 않았고, 양성대조물질 조제법은 CPA 및

EMS는 사용직전 배양액에 용해하였다.

처리농도 결정

시험물질의 용매와 처리 농도 et al.을 결정하기 위하여 예비시험을 실시하여 5,000 µg/ml을 최고 농도로 하고 0, 5, 50, 500 및 5,000 µg/ml 범위를 설정, 본시험과 동일한 방법으로 시험물질을 처리한 후 처리개시로부터 약 24 시간 후에 각 플라스크의 세포를 분리, 계수하여 상대세포수(Relative Cell Count, RCC)를 산출해 세포증식 억제도의 지표로 하였다. 이를 근거로 시험물질 농도를 적절히 재 설정하여 1, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500 및 5,000 µg/ml의 범위를 시험하였다(Table 1).

그 결과로부터 세포증식이 약 50% 이상 억제되는 농도

를 산출하여 본시험의 최고농도로 하고, 농도군당 두 개의 플라스크를 사용해 시험하였다(Table 2).

시험물질 처리 및 검체 제작

시험물질 처리는 본 시험에서 세포는 series 1, 2, 3으로 나누어 준비하고, 시험물질 처리 전에 미리 각 플라스크의 배양액을 모두 제거한 후 대사활성계 적용군(series 1)은 2.5 ml, 미 적용군(series 2 및 3)은 5 ml의 배양액을 분주, 1시간 이상 경과한 후 시험물질을 처리했으며, 처리양 만큼의 배양액을 제거한 후 50 mg/ml 농도로 조제한 시험물질 용액을 각 농도에 맞게 처리하였다.

대사활성계 적용 및 미적용 6시간 처리군의 경우 처리개시로부터 약 6시간 경과 후 플라스크로부터 시험물질을 함유한 처리액을 제거하고 5 ml의 CMF D-PBS(Ca⁺⁺ &

Table 1. Results of range-finding test^{a)}

Dose of WGCE (µg/ml)	S-9 mix	Treatment schedule (hours) ^{b)}	Cell	Counts	Mean	Relative cell counts (%) ^{c)}
0	+	6~18	2547	2558	2553	100
1,000	+	6~18	2590	2454	2522	99
1,500	+	6~18	2377	2314	2346	92
2,000	+	6~18	2737	2619	2678	105
2,500	+	6~18	2744	2760	2752	108
3,000	+	6~18	2368	2373	2371	93
3,500	+	6~18	2588	2597	2593	102
4,000	+	6~18	2715	2689	2702	106
4,500	+	6~18	2626	2654	2640	103
5,000	+	6~18	2997	3064	3031	119
0	-	6~18	3308	3320	3314	100
1,000	-	6~18	3193	3258	3326	100
1,500	-	6~18	2926	3169	3048	92
2,000	-	6~18	3214	3330	3272	99
2,500	-	6~18	2653	2718	2686	81
3,000	-	6~18	2312	2300	2306	70
3,500	-	6~18	2455	2473	2464	74
4,000	-	6~18	1735	1752	1744	53
4,500	-	6~18	1367	1417	1392	42
5,000	-	6~18	1175	1133	1154	35
0	-	24~0	3471	3372	3422	100
1,000	-	24~0	2906	3037	2972	87
1,500	-	24~0	2675	2821	2748	80
2,000	-	24~0	2762	2587	2675	78
2,500	-	24~0	2379	2288	2334	68
3,000	-	24~0	1868	1912	1890	55
3,500	-	24~0	1394	1446	1420	41
4,000	-	24~0	1051	1058	1055	31
4,500	-	24~0	886	842	864	25
5,000	-	24~0	656	704	680	8

WGCE : wild ginseng culture extract.

^{a)}One flask/dose was used. Each culture was trypsinized and suspended with 0.5 ml of 0.1% trypsin and 5 ml of culture medium. The cell suspension of 0.4 ml/culture was diluted 50 times with 19.6 ml of isoton sol. The cells in 0.5 ml iso ton sol. were counted twice/culture using Coulter Counter model Z2. Actual number of cells per flask=Mean Count × 550.

^{b)}Treatment - recovery time.

^{c)}Relative cell counts = $\frac{\text{Cell counts of treated flask}}{\text{Cell counts of control flask}} \times 100$.

Table 2. Cell counts of main study^{a)}

Dose of test item ($\mu\text{g/ml}$)	S-9 mix	Treatmen schedule (hours) ^{b)}	Cell counts				Mean	Relative cell counts (%) ^{c)}
			Flask A		Flask B			
0	+	6~8	2,745	2,834	2,820	2,859	2,815	100
WGCE 1,250	+	6~8	2,752	2,786	2,672	2,629	2,710	96
WGCE 2,500	+	6~8	2,731	2,781	2,706	2,674	2,723	97
WGCE 5,000	+	6~8	2,771	2,691	2,693	2,726	2,720	97
CAP 8	+	6~8	1,988	1,949	1,895	1,953	1,946	69
0	-	6~8	3,953	3,957	4,041	4,150	4,025	100
WGCE 1,100	-	6~8	3,901	3,856	4,041	3,971	3,942	98
WGCE 2,200	-	6~8	3,706	3,690	3,804	3,723	3,731	93
WGCE 4,400	-	6~8	2,336	2,395	2,659	2,556	2,487	62
EMS 800	-	6~8	1,932	2,075	1,990	2,034	2,008	50
0	-	24~0	3,499	3,430	3,881	3,866	3,669	100
WGCE 800	-	24~0	3,082	3,175	3,561	3,682	3,375	92
WGCE 1,600	-	24~0	3,029	3,163	2,973	2,943	3,027	83
WGCE 3,200	-	24~0	2,511	2,462	2,651	2,588	2,553	70
EMS 600	-	24~0	1,717	1,709	1,824	1,864	1,779	48

WGCE : wild ginseng culture extract.

CAP : cyclophosphamide monohydrate.

EMS : ethylmethanesulfonate.

^{a)}Two flask/dose was used. After harvesting mitotic cell, each culture was trypsinized and suspended with 0.5 ml of 0.1% trypsin and 5 ml of culture medium. The cell suspension of 0.4 ml/culture was diluted 50times with 19.6 ml of Isoton sol. The cells in 0.5 ml Isoton sol. were counted twice/culture using Coulter Counter model Z2. Actual number of cells per flask=Mean Count \times 550.

^{b)}Treatment - recovery time.

^{c)}Relative cell counts = $\frac{\text{Cell counts of treated flask}}{\text{Cell counts of control flask}} \times 100$.

Mg⁺⁺ free Dulbecco's phosphate buffered saline)로 세포층을 1회 세척한 후 신선한 배양액 5 ml을 가하여 증기 세포 수거시까지 계속 배양하였으며, 대사활성계 미적용 24시간 처리군의 경우 세척 없이 증기세포 수거시까지 계속 처리하였다.

검체제작은 모든 플라스크에 대하여 시험물질 처리 개시로부터 약 22시간 후에 각각 배양액 양의 1%에 해당하는 100 μM 콜히친 용액(50 μl)을 각 플라스크에 처리해(최종농도 1 μM) 2시간 경과한 후 증기세포를 수집하였다. 플라스크를 가볍게 쳐서 증기세포를 분리, 수거하여 150 \times g로 5분간 원심분리하여 세포를 모아 75 mM KCl 용액 5 ml을 가해 10분간 실온에서 저장액 처리하였다. 저장액 처리 후 고정액(메틸알콜 : 빙초산=3 : 1 v/v) 5 ml을 기존 75 mM KCl 용액에 혼합하여 20분간 전 고정을 실시한 다음 300 \times g로 원심분리하여 고정액을 2회 교환해 준 후 공기 건조법으로 검체를 제작하고 5% Giemsa 액으로 염색하였다. 검체는 각 플라스크 당 2매씩 제작하였으며 염색, 수세, 건조 및 봉입을 마친 검체는 계수시까지 보관상자에 보존하였다.

증기세포 수거 후 플라스크에 남은 세포들은 예비시험에서와 같은 방법으로 분리, 계수하여 세포증식 억제 지표로 활용하였다.

염색체이상의 계수

각 플라스크당 제작된 검체 중 염색 상태가 양호한 1매씩을 선정하여, 관찰자가 그 내용을 알 수 없도록 코드화 한 후 1,000 배의 배율로 관찰 계수 하였다. 염색체이상의 형태 판별 및 계수는 일본 환경변이원학회(JEMS) 포유동물 시험 분과회(MMS)판 염색체이상 아틀라스(JEMS-MMS, 1988)에 따랐다. 이상은 염색체형 절단 및 교환과 염색분체형 절단 및 교환으로 대별해 계수 하였으며, 분열 중기상(이하중기상) 중 이상을, 가지 중기상(이상 중기상)의 빈도 및 염색체이상의 수는 gap을 포함한 경우와 제외된 경우를 병기하였다.

구조적 이상의 계수는 각 검체당 염색체가 잘 퍼진 100개의 중기상(23-27 동원체)에 대하여 염색체 수 및 염색체이상의 유무를 관찰하고, 염색체 이상이 관찰되면 이상의 종류와 수 및 슬라이드상의 위치를 기록하였다.

숫적 이상의 계수는 염색체이상의 유무에 관계없이 염색체 수에 따라 diploid(DP, 23-36 동원체), polyploid(PP, 37 \leq 동원체) 및 핵내배화(ER, endoreduplication)로 분류, 100 중기상당 관찰되는 빈도를 기록하였다.

통계처리 및 판정

이상중기상의 빈도에 대한 통계처리는 OECD guideline

Table 3. Chromosome aberration test in the presence of S-9 mix

Dose of test item ($\mu\text{g/ml}$)	Treatment schedule (hours) ^{a)}	Mean aberrant metaphases ^b	Mean total aberrations ^{c)}	Mean of PP+ER	RCC (%)
0	6~18	3.0/2.5	3.0/2.5	0.5+1.0	100
WGCE 1,250	6~18	2.0/2.0	2.5/2.5	1.0+0.0	96
WGCE 2,500	6~18	2.5/2.5	2.5/2.5	2.0+0.0	97
WGCE 5,000	6~18	2.0/1.5	2.5/1.5	2.5+0.5	97
CPA 8	6~18	62.0/60.0	112.0/108.0	1.5+1.5	69

WGCE : wild ginseng culture extract.

CPA : cyclophosphamide monohydrate.

ER : endoreduplication.

PP : polyploid.

^{a)}Treatment time-recovery time.

^{b)}Gaps include/exclude, means of duplicate cultures.

^{c)}Fisher's exact test.

(OECD, 1997)등을 참조하여 gap을 제외한 숫자만을 대상으로 실시하였으며, 각 시험 기초자료에 대한 통계처리는 SAS Institute(SAS Institute, 1989)의 방법을 응용하였다. 먼저 각 중기상을 염색체 이상이 없는 것(normal metaphase, 정상중기상)과 1개 이상의 이상을 포함한 것(aberrant metaphase, 이상중기상)으로 나누고, 이상중기상의 빈도에 대해 다음과 같이 통계처리를 실시하였다. 숫적 이상에 대해서는 중기상을 DP, PP 및 ER로 분류하여 PP+ER의 빈도에 대해 같은 방법으로 실시하였다.

통계처리는 SAS program을 이용했으며, p value가 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

음성대조군과 처리군의 비교는 Chi-square test 및 Fisher's exact test로 하였고, 검정에서 $p < 0.05$ 인 경우에는 용량상관성이 있는가를 알아보기 위해 Cochran-Armitage trend test를 적용하였다.

음성대조군과 양성대조군의 비교는 Fisher's exact test 하였고, 판정은 시험물질 처리군에 있어서 염색체 이상을 가진 중기상의 빈도가 통계학적으로 유의성 있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다.

결 과

대사활성계 적용군의 이상중기상 빈도

이상중기상(gap 제외)의 빈도는 음성대조군, 1,250 $\mu\text{g/ml}$ 처리군, 2,500 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 및 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 순으로 2.5, 2.0, 2.5, 및 1.5였으며, 산삼 배양 추출물에 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았지만, 양성대조군(CPA)의 8 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때 이상중기상의 빈도(60.0)는 통계학적으로 유의하며 음성대조군에 비해 현저히 높은 것을 볼 수 있었다($p < 0.01$).

음성대조군의 polyploid 및 핵내배화의 빈도는 각각 0.5 및 1.0이었으며, 산삼 배양 추출물에 시험물질 처리군의 polyploid 및 핵내배화 빈도는 각각 1.0~2.5 및 0~0.5로 관찰되어 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았고, 양성대조군의 polyploid 및 핵내배화의 빈도는 각각 1.5로 관찰되었다(Table 3).

대사활성계 미적용군의 이상중기상 빈도

6시간 처리군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군, 1,100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군, 2,200 $\mu\text{g/ml}$ 및 4,400 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 순으로 0.5, 0.5, 0.5 및 1.0이었으며, 산삼배양추출물에 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상중기상의 빈도는 0.5~1.0으로 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았고, 양성대조군(EMS)의 800 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때 이상중기상의 빈도(71.0)에서 통계학적으로 유의하며 확실한 증가가 관찰되었다($p < 0.01$).

음성대조군의 polyploid 및 핵내배화 빈도는 각각 1.0 및 0으로 관찰되었으며 산삼 배양 추출물에 시험물질 처리군의 polyploid 및 핵내배화 빈도는 각각 1.0~1.5 및 0으로 관찰되어 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다(Table 4).

24시간 처리군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군, 800 $\mu\text{g/ml}$ 처리군, 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 및 3,200 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 순으로 0.5, 1.0, 0.5, 및 0.5였으며, 산삼 배양 추출물에 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상중기상의 빈도는 0.5~1.0으로 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았고, 양성대조군(EMS)의 600 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때 이상중기상의 빈도(84.0)에서 통계학적으로 유의하며 확실한 증가가 관찰되었다($p < 0.01$)(Table 4). 산삼 배양 추출물 시험물질을 처리한 모든 군에서 음성대조군의 polyploid의 빈도는 2.0이었으며 핵내배화는 관찰되지 않았다. 산삼 배양 추출물 시험물질 처리군의 polyploid

Table 4. Chromosome aberration test in the absence of S-9mix

Dose of test item ($\mu\text{g/ml}$)	Treatment schedule (hours) ^{a)}	Mean aberrant metaphases ^{b)}	Mean total aberrations ^{c)}	Mean of PP+ER	RCC (%)
0		1.0/0.5	1.0/0.5	1.0+0.0	100
WGCE 1,100	6~18	1.5/0.5	1.5/0.5	1.0+0.0	98
WGCE 2,200		0.5/0.5	1.0/1.0	1.5+0.0	93
WGCE 4,400		1.0/1.0	1.0/1.0	1.5+0.0	62
EMS 800		73.0/71.0	157.0/151.0	1.0+1.0	50
0		1.0/0.5	1.0/0.5	2.0+0.0	100
WGCE 800	24~0	1.0/1.0	1.0/1.0	1.5+0.0	92
WGCE 1,600		0.5/0.5	0.5/0.5	1.0+0.0	83
WGCE 3,200		1.0/0.5	1.0/0.5	1.0+0.0	70
EMS 600		86.5/84.0	264.0/254.5	2.0+0.0	48

WGCE : wild ginseng culture extract.

EMS : ethylmethanesulfonate.

PP : polyploid.

ER : endoreduplication.

^{a)}Treatment time-recovery time.

^{b)}Gaps include/exclude, means of duplicate cultures 100 metaphases were examined per culture.

^{c)}Fisher's exact test.

및 핵내배화 빈도는 1.0~1.5 및 0으로 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다(Table 4).

산삼배양추출물의 배양 포유동물세포에 있어서의 돌연변이 유발성을 검색하기 위하여 염색체이상 유발성 여부를 지표로 하여 시험하였다. 이를 위하여 Chinese hamster lung 세포(CHL)를 이용하여 대사활성계(S-9 mix) 적용(+S) 및 미적용(-S)하에 염색체이상시험을 수행하였다.

또한 시험기간 중 시험물질은 배양액에 현탁하여 처리하였고, 처리시 및 처리 종료시 육안 관찰 결과 농도 증가에 따라 처리액이 연황색으로 변화하였으나, 이는 시험물질 자체의 색상 때문인 것으로 판단되었다. 처리 농도 범위내에서 육안으로 알아볼 만한 혼탁 생성 등은 나타나지 않았다. 이상의 결과를 종합해 보면 염색체이상을 계수한 결과 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상증기상의 빈도는 음성대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다.

따라서 산삼배양추출물은 본 시험조건 하에서 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료되었다.

참고문헌

Dean, B.J. and Danford, N. (1984): Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells in : Mutagenicity testing-a practical approach (S. Venitt and J.M. Parry eds.) pp. 187-232, IRL Press Ltd., P. O. Box 1, Eynsham, Oxford OX8 1JJ, England.

Hahn, E.J., Kim, S.Y., Yu, K.W., Jeong, C.S. and Paek, K.Y. (2003): Adv entitious root cultures of Panax ginseng C. V. Mayer and ginsenoside production through large-scale bioreactor system. *J. Plant Biotechnology*, **5**(1), 1-6.

Ishidate, M. Jr., Sofuni, T. and Yoshikawa, K. (1981): Chromosomal aberration tests *in vitro* as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. *GANN*

Monograph on Cancer Res., **27**, 95-107.

JEMS-MMS (1988): Atlas of chromosome aberration by chemicals, Japanese Environmental Mutagen Society-Mammalian Mutagenicity Study Group, Tokyo, Japan.

Koyama, H., Utakoji, T. and Ono, T. (1970): A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue. *GANN*, **61**, 161-167.

Lee, E.J., Jhao, H.L., Li, D.W., Jung, C.S., Kim, J.H. and Kim, Y.S. (2003) : Effect of MeOH extract of adventitious root culture of Panax ginseng on hyperlipidemic rat induced by high fat-rich diet. *Korean J. Pharmacogn.*, **34**(2), 179-184.

Mizuno, M., Yamada, J., Terai, H., Kozukue, N, Lee, Y.S. and Tsuchida, H. (1994): Differences in immunomodulating effects between wild and cultured Panax ginseng. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**(3), 1672-1678.

OECD (1997): OECD guideline for the testing of chemicals.

SAS Institute (1989): SAS/STAT User's Guide, Version 6, 4th ed., Vol. 1, Cary, NC., USA.

SAS Institute (1989): SAS/STAT User's Guide, Version 6, 4th ed., Vol. 2, Cary, NC., USA .

Yamaguchi, H., Matsuura, H., Kasai, R., Tanaka, O., Satake, M., Kodha, H., Izumi, H., Nuno, M., Katsuki, S. and Isoda, S. (1988): Analysis of saponins of wild ginseng. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **36**, 4177-4181

Yoo, B.S., Chang, M.S. and Byun, S.Y. (2003): Characterization of cell culture and ginsenoside production by cultured ginseng and mountain ginseng. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 133-139.

남기열 (1996): 최신고려인삼(성분과 효능편), 천일인쇄사, pp. 247-252.

식품의약품안전청 (2000): 비임상시험 관리기준, 식품의약품안전청고시 제2000-63호.

식품의약품안전청 (2000): 의약품 등의 독성시험기준, 식품의약품안전청고시 제1999-61호.

신미희 (2001): 산삼의 배양 및 그 응용에 관한 연구. 대한화장품학회지, **27**, 45-56.