

Short Communication

Open Access

Chinese Hamster Lung Cell의 소핵시험을 이용한 식물추출물 유기농업자재의 유전독성평가

조현조,¹ 박경훈,¹ 정미혜,² 박수진,³ 오진아,¹ 김원일,⁴ 조남준,¹ 류재기,⁴ 백민경^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 화학물질안전과, ²농촌진흥청 국립농업과학원 농자재평가과, ³한국생물안전성연구소,
⁴농촌진흥청 국립농업과학원 유해생물팀

Genotoxicity of Environment-friendly Organic Materials of Plant Origin in the Micronucleus Test Using Chinese Hamster Lung Cells

Hyeon-Jo Cho,¹ Kyung-Hun Park,¹ Mi Hye Jeong,² Soo Jin Park,³ Jin-Ah Oh,¹ Won-Il Kim,⁴ Namjun Cho,¹ Jae-Gee Ryu,⁴ and Min-Kyoung Paik^{1*} (¹Chemical Safety Division, ²Agro-Material Safety Evaluation Division, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea, ³Korea Bio-Safety Institute Co., Ltd, Seongju-ro, Gamgok-myeon, Eumseong-gun, Chungcheongbuk-do 369-850, Korea, ⁴Microbial Safety Team, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea)

Received: 8 May 2014 / Revised: 19 May 2014 / Accepted: 10 June 2014
Copyright © 2014 The Korean Society of Environmental Agriculture

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.

Abstract

BACKGROUND: *Azadirachta Indica* extract(AIE) and *Sophorae radix* extract(SRE) are widely used as environment-friendly organic materials of plant origin in South Korea.

METHODS AND RESULTS: In this study, the *in vitro* micronucleus(vitMN) tests of two samples of AIE and SRE were conducted to evaluate their genotoxicity using the Chinese hamster lung(CHL) cell. This study was composed of two parts; cytochalasin B(cyto B) test and non-cyto B test. Mitomycin C and colchicine were used as positive controls. As a result, the incidence of micronucleus(MN) in all AIE and SRE treated groups increased in dose-dependent manner, but were less than 2.2% in 1,000 binucleated cells. In addition, there were no significant increases of MN incidence in all AIE and SRE treated

groups, compared with the negative control group.

CONCLUSION: Therefore, we suggest that AIE samples and SRE samples used in this study may have no genotoxicity in the *in vitro* micronucleus test using the CHL cells. In our previous study, we reported that AIE and SRE did not cause genotoxicity in Ames test. According to the genotoxicity battery system, we concluded that AIE and SRE used in this study have no genotoxic effects to humans.

Key words: *Azadirachta indica* extract, Genotoxicity, *In vitro* micronucleus test, *Sophorae radix* extract

서론

최근 농산물에 살포된 농약의 작물체내 잔류성으로 인해 인체 노출에 대한 우려가 커지고 친환경농산물 생산을 위한 유기농업자재의 사용이 늘어나고 있다(Woo *et al.*, 2010). 그 중 식물추출물은 인체 안전성이 높은 것으로 알려져, 2013년 현재 우리나라에 공시 및 품질인증 된 전체 유기농업자재 중 21.4%를 차지할 정도로 비중이 높다. 특히 식물추출물과 고

*교신저자(Corresponding author): Min-Kyoung Paik
Phone: +82-31-290-0526; Fax: +82-31-290-0506;
E-mail: mink1114@korea.kr

삼추출물은 각각 azadirachtin과 matrine을 유효성분(active ingredient)으로 함유하여 총해방제성이 높아 전체 식물추출물 유래 유기농업자재 중 각각 32.4%와 40.3%를 차지할 정도로 널리 사용되고 있다.

우리나라에 공시 및 품질인증 되는 총해방제용 유기농업자재는 평가 단계에서 인체에 대한 안전성을 확인하고자 급성독성 및 자극성시험 결과를 확인하고 있다(농촌진흥청 고시 제2013-13호). 그러나 이는 최종 유기농업자재 제품에만 제한되어 평가되는 것으로, 실제 원제로 사용되고 있는 식물성추출물에 대한 안전성은 식물원료의 추출부위 및 추출용매 등으로 확인되고 있을 뿐 인체에 미치는 장기적인 영향에 대한 연구 및 평가는 미비한 실정이다(Wang *et al.*, 2010).

한편, 유전독성시험은 특정 화학물질 노출이 DNA, 유전자 혹은 염색체 수준에서 유전적 손상을 유발하는지를 평가하는 방법으로, 보다 장기적인 독성인 발암성을 모니터링 하는데 유효한 방법으로 알려져 있다(OECD, 2012). 그 중 소핵시험은 염색체의 구조적 이상과 수적이상까지 검출해낼 수 있다는 점에서 다른 유전독성 시험법에 비해 상대적으로 더 넓은 범위의 유전독성을 검출할 수 있다는 장점이 있다(Corvi *et al.*, 2008).

최근 동물대체시험이 활성화되고 국제적인 시험법으로 인정받으면서, 기존의 *in vivo* 소핵시험법 또한 배양세포를 이용한 시험(*in vitro* micronucleus test; vitMN test)으로 2012년 OECD 유전독성시험 가이드라인으로 제정되어 국제적으로 시험되고 있다(Lilienblum *et al.*, 2008). 이러한 vitMN 시험은 다른 *in vitro* 유전독성시험인 염색체 이상시험에 비해 더욱 객관적인 방법으로 평가가 가능하고 판독이 용이하다는 점에서 유전독성시험 초기단계에서 스크리닝 시험으로 선호되고 있다(Garriott *et al.*, 2002).

본 연구에서는 국내 유통되고 있는 님추출물과 고삼추출물 시료 각 2종에 대해서 CHL(Chinese Hamster Lung) cell을 이용하여 vitMN 시험을 수행함으로써 우리나라 유기농업자재의 원제로 활용도가 높은 식물성추출물에 대한 인체의 안전성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시험재료

본 시험에서는 유기농업자재 제조를 위해 사용되는 님추출물과 고삼추출물 시료 각 2종을 구입하여 시료로 사용하였다. 님추출물 시료는 2종 모두 인도산으로 시료 A와 B의 총 azadirachtin 함량은 각각 0.03%와 0.35% 였으며, 고삼추출물 시료는 모두 중국산으로 시료 A와 B의 총 matrine 함량은 각각 0.31%와 0.26% 였다. 시험물질은 사용기간 동안 빛이 통하지 않는 불투명한 용기에 담아 실온에서 보관하였으며, 사용직전 0.22 μ L membrane filter로 여과하여 사용하였다.

시험 세포 및 시약

사용 세포주는 CHL cell을 American Type Culture

Collection(ATCC)로부터 구입해 사용하였다. 배양액은 10% Fetal Bovine Serum(Gibco)을 포함한 MEM(Minimum Essential Medium, Gibco)을 사용하였으며, 5% CO₂, 37°C 조건에서 2~3일 간격으로 계대배양하여 사용하였다. 액틴의 polymerizationin 저해제로 사용되는 cytochalasin B(cyto B)는 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 양성 대조물 질로는 염색체의 구조적 이상을 유발하는 mitomycin C(MMC, Sigma)와 수적 이상을 유발하는 colchicine(Sigma)을 사용하였다. 님추출물 시료는 난용성으로 물에 용해되지 않아 전체 농도가 3% 이내인 경우 유전독성이 없다고 보고된 acetone(Tedia)으로 물질을 용해하였기에(OECD SIDS, 1999), acetone을 음성대조군으로 사용하였으며, 고삼추출물은 멸균증류수를 음성대조군으로 하였다.

시험물질 처리농도 결정

본시험의 물질 처리를 위한 최고농도를 선정하고자 예비시험을 시행하였다. 소핵을 가지는 세포가 최소한 1회 이상 분열한 상태에서 계수되는 조건도 같이 확인하기 위해서 cyto B를 처리한 시험도 같이 진행하였다. Cyto B 적용군과 미적용군은 각각 RI(Replicative Index)와RPD(Relative Population Doubling)가 55±5% 인 농도를 본 시험의 최고 농도로 선정하고 공비 2로 하위 시험농도 2개로 총 3개의 농도를 시험농도로 선정하였다.

시험물질 처리 및 방법

시험은 OECD TG 487의 *in vitro* 소핵시험법(OECD, 2012)을 근거로 하였다. 시험물질 처리시간 및 방법에 대해서 Fig. 1.과 같이, 전체 4개의 series로 구성되며 series 1과 2는 cyto B를 처리하지 않고, series 3과 4는 cyto B를 처리하였다. 또한, series 1과 3은 시험물질은 3시간 노출하였으며, series 2와 4는 시험물질을 24시간 노출하였다(Wakata *et al.*, 2006).

시험방법으로 cyto B 미적용군은 1.0 x 10⁵ 세포를, cyto B 적용군은 2.0 x 10⁵ 세포를 직경 60 mm plate에 파종하여 24시간 배양한 다음 시험물질을 처리하였다. Cyto B 적용군인 series 3과 4는 cytokinase-block method에 따라 cyto B(3 μ g/ml)를 시험물질과 함께 첨가하였다.

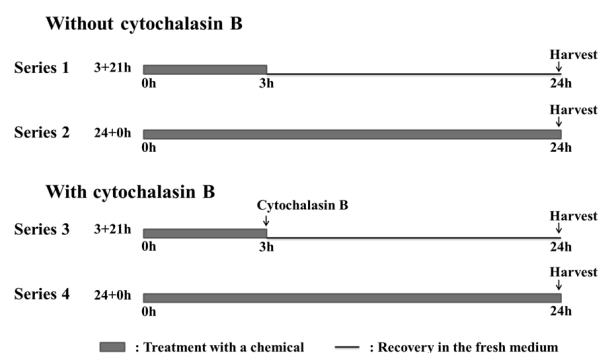


Fig. 1. Treatment and recovery schedules.

시험물질 처리 개시로부터 24시간 후 세포를 수거하여 고정액(methanol:acetic acid, 3:1)으로 2회 고정시켰으며 최종적으로 1% acetic acid를 포함한 고정액으로 추가 고정한 후 공기 건조법으로 세포표본을 만들었다. 10% Giemsa(Fluka) 염색액으로 염색 후 현미경(Nikon, Eclipse 80i, Japan)으로 1,000배에서 관찰하였다.

소핵 판정기준

소핵의 판독은 Fenech 등(2003)이 제시한 기준에 따라 판정하였다. Cyto B 미적용군은 각 농도군당 2,000개의 단핵세포(mononucleated cell)로 부터 소핵을 가진 세포(micronucleated cell, MNC)를 계수하였다. Cyto B 적용군은 단핵세포(mononucleated cell), 이핵세포(binucleated cell), 다핵세포(multinucleated cell)의 합계가 500개가 될 때까지 세포를 계수하였으며, 이핵세포가 1000개가 될 때까지 소핵을 계수하여 기록하였다. 결과 해석을 위해 cyto B 미적용군은 RPD와 RICC(Relative Cell Count), RCC (Relative Increased Cell Count)를 이용하여, cyto B 적용군은 RI와 CBPI(Cytokinesis-Block Proliferation index)를 산출하여 평가하였다.

통계처리 및 판정은 SPSS(Statistical Package for the Social Sciences, version 18.0)를 이용하여 양성대조물질 검증을 위해서 Chi-square test를, 시험물질의 농도별 검증을 위해서 one-way ANOVA(Analysis of variance)를 실시하였으며, 유의수준 0.05에서 유의성을 검증하였다. 판정기준은 시험물질 처리군이 소핵 발생빈도가 용량상관성을 나타내면서 음성대조군에 비해 3배 이상의 소핵 형성과 통계적인 유의성을 보일 때 양성으로 판정하였다(Miller *et al.*, 1995).

결과 및 고찰

예비시험 결과

넙추출물과 고삼추출물 시료에 대해 예비시험을 통해 세포증식 억제율 cyto B 미적용군은 RPD 55±5% 유발농도를, cyto B 적용군은 RI 55±5% 농도를 본 시험의 최고농도로 선정하였다.

예비시험을 통해 Series1, 3과 Series 2, 4에서 넙추출물은 시료 A에 대해 각각 1,200 µg/mL와 800 µg/mL, 시료 B에 대해 2,000 µg/mL와 1,600 µg/mL 을, 고삼추출물은 시료 A에 대해 200 µg/mL와 125 µg/mL, 시료 B에 대해 250 µg/mL와 250 µg/mL 을 최고농도로 선정하였다.

넙추출물

음성대조군으로 사용된 아세트론에 대해 4개의 Series로 시험한 결과 발생된 소핵은 최대 11.5±0.7개로 1,000개의 세포 중에 1-2% 의 소핵발생 빈도를 보였다(Fig. 2와 Fig.3.). 염색체의 구조이상을 유발하는 양성대조물질로 사용된 MMC와 염색체 숫적 이상을 유발하는 양성대조물질로 사용된 colchicine 처리군은 36.5±7.8~92.0±8.5개의 소핵을 유도하

여, 음성대조물질로 사용된 아세트론 처리군에 비해 소핵 발생 빈도가 약 4-8배로 유의적인 증가를 보임에 따라($p<0.05$), 본 시험법에 대한 신뢰도가 높은 것으로 판단하였다.

넙추출물 시료 A의 시험결과는 Fig. 2와 같이 물질처리 농도가 증가함에 따라 소핵발생이 증가하는 경향을 보였으나, 모든 처리군(200-1200 µg/mL)에서 전체 소핵발생율이 2% 미만으로 관찰되었다. Cyto B는 세포분열기에 시험물질에 의해 소핵이 형성됨을 알 수 있으나, cyto B에 의해 소핵이 유도될 수 있으므로 cyto B 처리군과 미처리군으로 구분하여 동시에 진행하였다. 그 결과, 본 시험에서는 cyto B 처리 유무에 따라 차이가 없는 것으로 나타났다. 넙추출물 시료 B의 시험(Fig. 3.) 결과에서도 시료 A와 유사한 경향을 보였다. 또한, 시험에 사용된 넙추출물 시료 2종 모두 소핵발생 빈도가 음성대조군과 비교할 때 2배 미만으로 나타남에 따라 모든 시료가 소핵형성을 유발시키지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 vitMN 결과 넙추출물 시료 2종 모두 음성으로 최종 판정하였다. EFSA(European Food Safety Authority)에서도 시판되고 있는 넙추출물 시료 3종에 대한 유전독성평가에서 *in vitro* 소핵시험 결과 3종 모두 음성이라고 보고한 바 있다(EFSA, 2011).

유전독성 시험 및 데이터 해석을 위한 지침인 International Conference on Harmonization(ICH)의 유전독성 battery system에 의하면, 2개의 *in vitro* 시험을 수행하여 두 결과가 모두 음성인 경우 유전독성이 없다고 최종 판정하도록 하고 있다(ICH, 2012). 본 시험의 선행연구에서 진행된 넙추출물 시료에 대해 복귀돌연변이 시험결과 본 시험과 동일한 시료에서 음성으로 나타났다(Yoon *et al.*, 2014). 이상의 결과를 토대로 유전독성 battery system를 적용하였을 때, 본 연구에서 사용된 넙추출물 2종은 유전독성을 일으키지 않는 것으로 최종 판단되며, 따라서 유기농업자재로서 사용에도 적합할 것으로 생각된다.

고삼추출물

음성대조물질로 사용된 증류수 처리군에 대해 4개의 Series로 시험한 결과 발생된 소핵의 수는 최대 12.0±1.4개로 Wakata 등(2006)의 연구결과와 유사한 수준이었다. 양성대조물질로 사용된 MMC와 colchicine 처리군은 음성대조물질로 사용된 증류수 처리군과 비교하여 소핵 발생빈도가 약 4-8배로 유의적인 증가를 보였다($p<0.05$).

고삼추출물 시료 2종의 시험결과, 시료 처리 농도에 따라 소핵발생 비율이 증가하는 경향을 보였으나 모든 시료 처리군에서 전체 발생률이 2.2% 미만이었으며 음성대조군 대비 3배 미만의 소핵이 관찰되었다(시료 A; Fig. 4., 시료 B; Fig. 5.). 이는 cyto B 처리 유무에 따른 차이가 없었다. 따라서, 본 연구에서 사용된 고삼추출물 시료 2종에 대한 vitMN 결과 음성으로 판정하였다. 이는 고삼추출물 분말 시료에 대해 ICR mouse를 이용한 *in vivo* 소핵시험 결과 음성이라고 보고한 연구결과와 유사한 경향을 보였다(KFDA, 2006).

본 연구에서 진행된 고삼추출물 2종은 선행연구를 통해

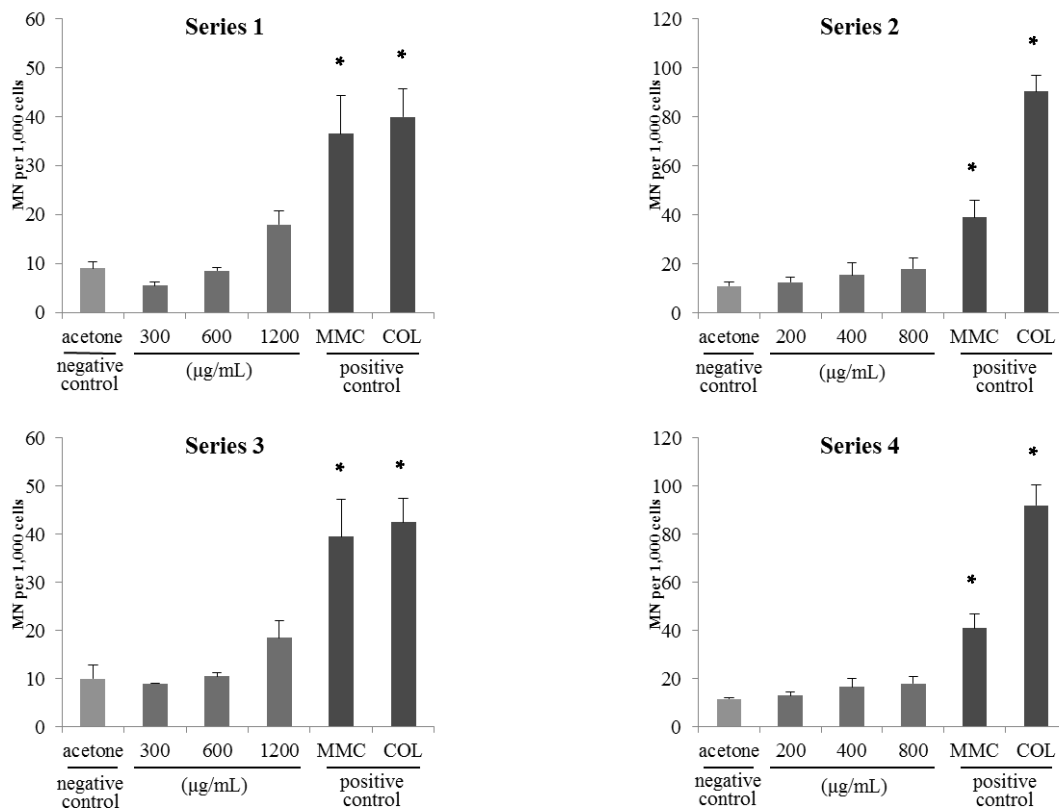


Fig. 2. Micronucleus(MN) formation induced by *Azadirachta Indica* extract(AIE) samples A in four series in CHL cells. MMC, Mitomycin C; COL, Colchicine; * $p < 0.05$

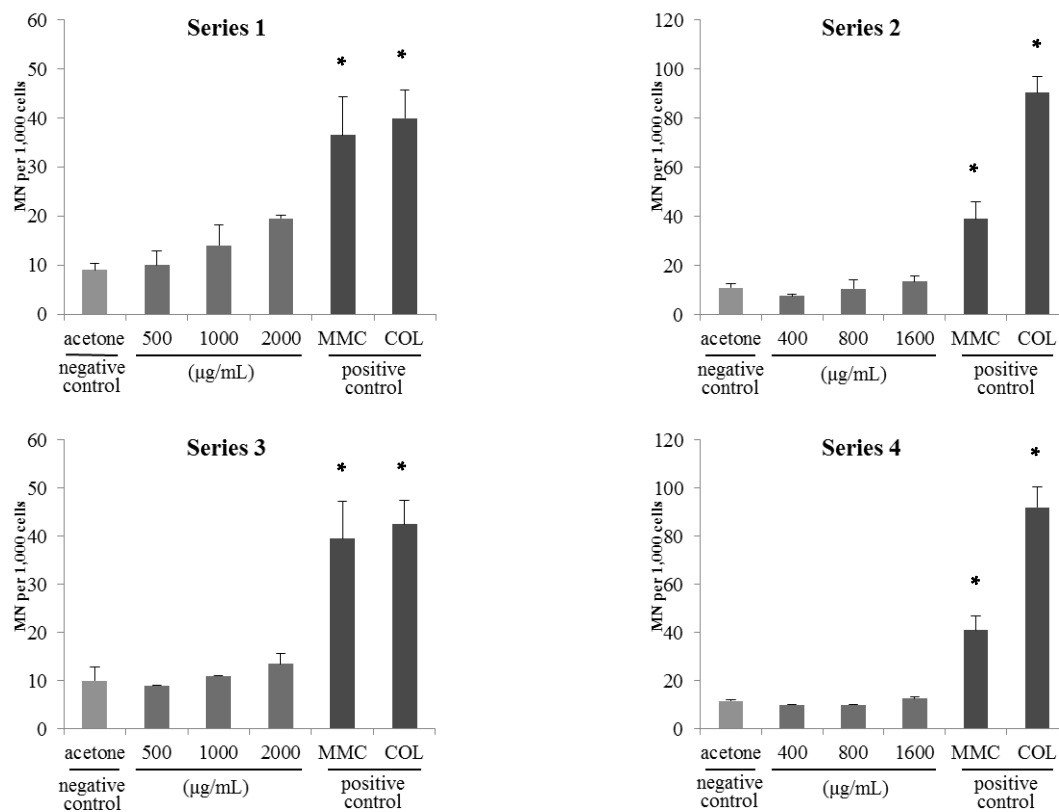


Fig. 3. Micronucleus(MN) formation induced by *Azadirachta Indica* extract(AIE) samples B in four series in CHL cells. MMC, Mitomycin C; COL, Colchicine; * $p < 0.05$

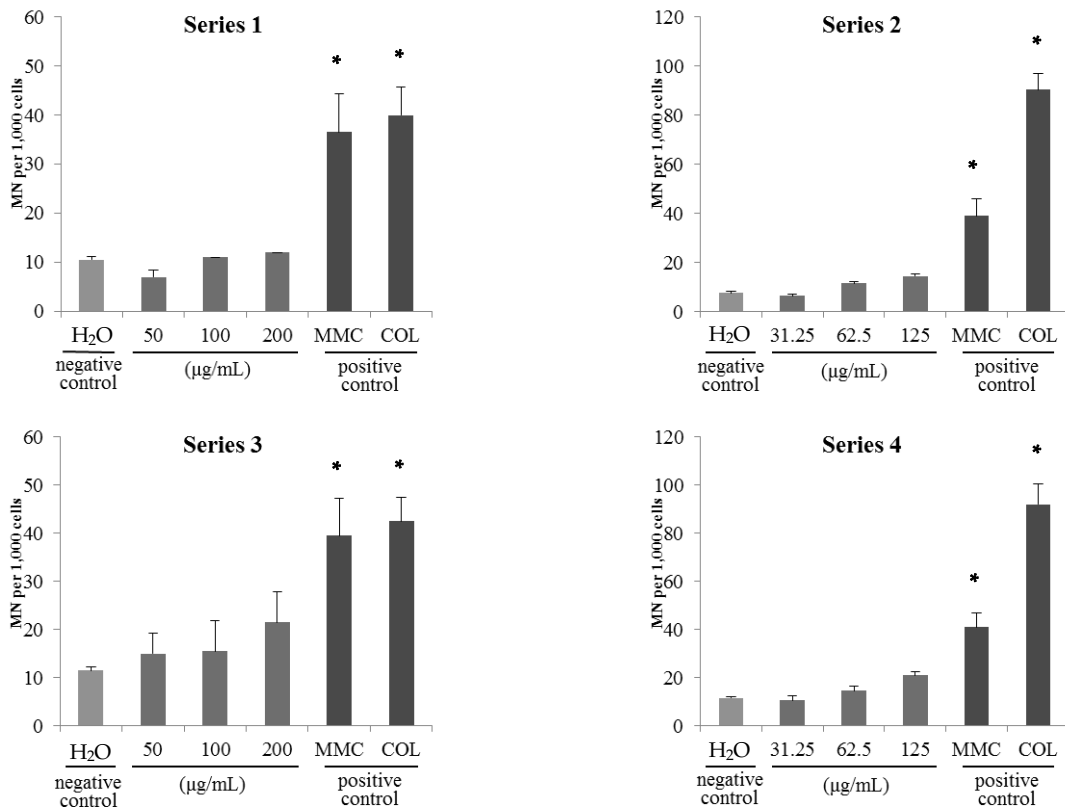


Fig. 4. Micronucleus(MN) formation induced by *Sophorae radix* extract(SRE) samples A in four series in CHL cells. MMC, Mitomycin C; COL, Colchicine; * p<0.05

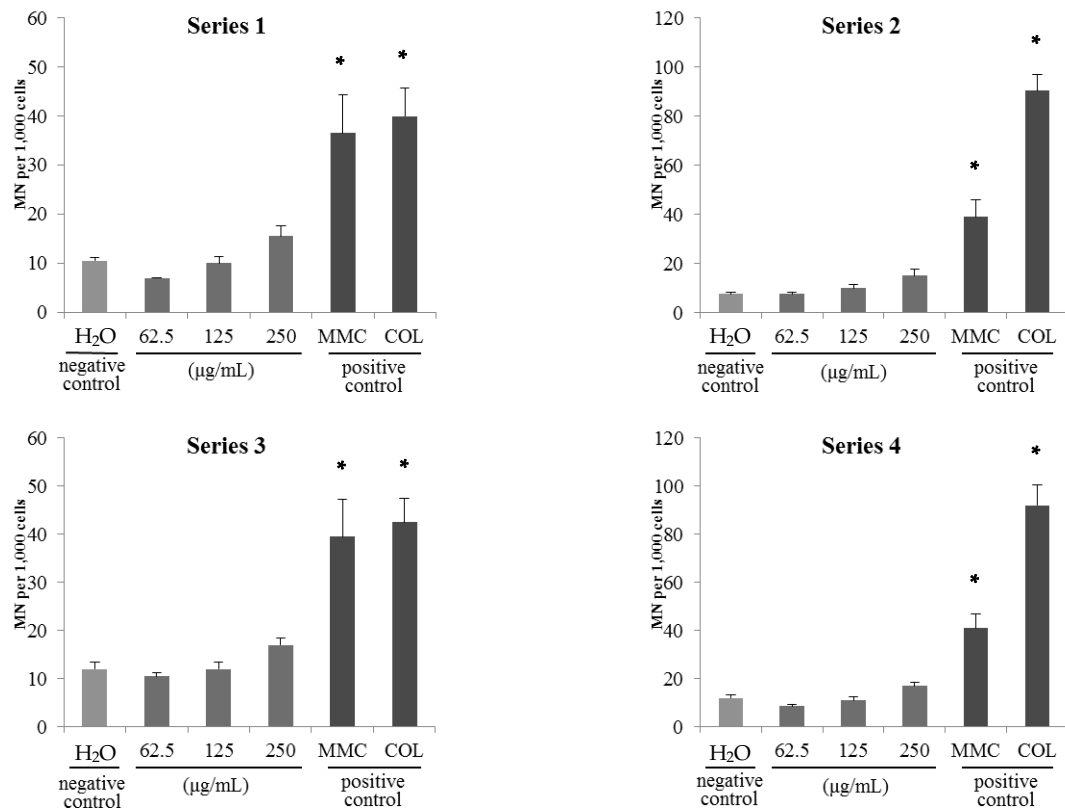


Fig. 5. Micronucleus(MN) formation induced by *Sophorae radix* extract(SRE) samples B in four series in CHL cells. MMC, Mitomycin C; COL, Colchicine; * p<0.05

복귀돌연변이 시험결과 모두 음성으로 나타난 바 있다(Cho *et al.*, 2013). 따라서, 이상의 결과를 토대로 유전독성 battery system를 종합하여 볼 때, 본 연구에서 사용된 고삼추출물 2종은 유전독성을 일으키지 않는 것으로 최종 판단할 수 있으며, 유기농업자재로서 사용에도 적합할 것으로 생각된다. 그러나, 본 연구는 일부 지역에서 생산된 추출물을 이용한 안전성평가로서, 식물의 추출부위 및 추출용매 등에 따라 안전성의 차이가 클 수 있으므로 이에 대한 추가 확인 및 관리가 필요할 것이다.

요 약

넝추출물과 고삼추출물은 식물추출물 유기농업자재로 우리나라에 등록되어 친환경농산물 재배에 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 넝추출물 2종과 고삼추출물 2종에 대한 안전성을 확인하고자 Chinese hamster lung cells을 이용한 *in vitro* 소핵시험(vitMN)을 통해 유전독성을 평가하였다. 시험은 cytochalasin B 적용군과 비적용군으로 구분하여 시험하였으며, 양성대조물질로 mitomycin C와 colchicine을 사용하였다. 시험 결과, 넝추출물 시료 2종과 고삼추출물 시료 2종은 처리 농도에 따라 소핵발생 비율이 증가하였으나 모든 시료 처리군에서 전체 발생률이 2.2% 미만으로, 음성대조군 대비 2배 미만의 소핵이 관찰되었다. 따라서 넝추출물 및 고삼추출물 시료는 본 시험의 vitMN 결과 최종적으로 음성으로 확인되었다. 또한 본 연구와 동일한 시료를 이용한 선행연구에서 복귀돌연변이 시험에서 음성을 보인 결과를 근거로 battery system에 의거해 종합적으로 평가하였을 때 넝추출물과 고삼추출물 시료는 유전독성을 일으키지 않는 것으로 최종 판정하였다.

Acknowledgments

This study was carried out with the support of "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ00995001)" National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S., van Benthem, J., Vanparys, P., 2008. ECVAM retrospective validation of *in vitro* micronucleus test (MNT), *Mutagenesis* 23, 271-283.
- Cho, H.J., Yoon, H.J., Park, K.H., Lee, J.B., Kim, C.K., Kim, J.H., Jeong, M.H., Oh, J.A., Kim, D.H., Paik, M.K., 2013. *In vitro* Antimutagenic and Genotoxic Effects of Sophora Radix Extracts. *Korean J. Pestic. Sci.* 17, 335-342.
- Fenech, M. Chang, W.P. Kirsch-Volders, M. Holland, N. Bonassi, S., Zeiger, E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534, 65-75.
- Garriott, M.L., Phelps J.B., Hoffman W.P., 2002. A protocol for the *in vitro* micronucleus test I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research* 517, 123-134.
- Lilienblum, W., Dekant, W., Foth, H., Gebel, T., Hengstler, J.G., Kahl, R., Kramer, P.J., Schweinfurth, H., Wollin, K.M., 2008. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Arch.Toxicol.* 82, 211-236.
- Miller, B.M., Pujadas, E., Gocke, E., 1995. Evaluation of the micronucleus test *in vitro* using Chinese hamster cells: results of four chemicals weakly positive in the *in vivo* micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 26, 240-247.
- Wang, X., Liang, L., Chang, J., Yang, M., Li, Z., 2010. Toxicity of matrine in Kunming mice. *J. South Med. Univ.* 30, 2154-2155.
- Woo, H.D., Lee, J.K., Han, G.D., 2010. Consumer awareness survey on safety management of pesticide residue. *Food Sci. Industry* 43, 24-40.
- Yoon, H.J., Cho, H.J., Lee, J.B., Kim, J.H., Park, K.H., Oh, J.A., Kim, D.H., Paik, M.K., 2014 *In vitro* antimutagenic and genotoxic Effects of Azadirachta indica Extract. *J. Appl. Biol. Chem.* <http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2014.035>.