J. Fd Hyg. Safety 20(1), 58-63 (2005)

산삼배양추출물의 ICR 마우스 골수세포를 이용한 복강 투여 소핵시험

송시환* · 양덕춘** · 정세영***†

*(주) Chemon, **경희대학교 한방재료가공센터, ***경희대학교 약학대학 위생화학교실

Micronucleus Test of Wild Ginseng Culture Extract Using the Marrow Cells in ICR Mice

Si-Whan Song*, Deok Chun Yang, and Se Young Choung*****†

*Chemon Inc., 334 Jeil-ri, Yangji-myun, Yongin-si, Gyenggi-do, 449-826, Korea

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

***Department of Hygenic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT – To assess clastogenic effects of the wild ginseng culture extract (WGCE) *in vivo* micronucleus test was performed using 7 weeks old ICR mice. At 24 hours after 2nd treatment with wild ginseng culture extract at the doses of 0, 500, 1,000, and 2,000 mg/kg/day by peritoneal route mice were sacrified and marrow cells were prepared for smear slides. As a result of counting the micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) of 2,000 polychromatic erythrocyte(PCE), all treatment groups did not show statistically significant increase than negative control group. And there was no clinical sign connected with injection of wild ginseng culture extract. It was concluded that wild ginseng culture extract did not induce micronucleus in the marrow cells of ICR mice.

Key words: wild ginseng culture extract, micronucleus, polychromate erythrocyte, marrow cell

최근 세계적으로 삶의 질적 향상과 함께 건강과 장수에 대해 관심이 높아지고 있으며, 이러한 추세에 따라 기존에 건강을 주로 담당하던 의약품을 비롯한 의료제품에 추가하여 건강식품에 대한 선호 또한 높아지고 있다. 산삼은 예로부터 한방서 등을 통해 신비의 영약으로 당뇨, 암, 혈압, 간, 심장 질환 등 각종 성인병 예방은 물론이고 신진대사 촉진 작용을 하며 인체의 저항력을 높임과 동시에 면역기능을 향상시켜 준다고 알려져 왔다.[1] 또한 근래에 들어서는 산삼의 성분 연구[2]와 함께 *in vitro*와 *in vivo*실험을 통한 면역활성 증강 효과가 입증된 바 있으며,[3] 최근에는 산삼 배양근의 콜레스테롤 저하 효과[4]와 미백 효과[5]가 보고된 바 있다.

이렇듯 산삼은 그 뛰어난 약리 효과가 고대부터 전해오고 있으나, 장기 휴면 특성 때문에 크게 번식하지 못해 품질 좋은 산삼의 안정된 수량 확보가 대단히 어려운 실정이다. 이러한 산삼의 효능을 지닌 산삼 배양근은 6주만에 수확할 수 있어 산삼에 비해 그 기간이 훨씬 단축되고, 완전히 멸균된 환경(생물배양기)에서 배양됨으로써 재배삼에서 나타날 수 있는 유해 환경으로 인한 피해를 줄여 궁극적으로 건강기능식품/제약 원료의 위생화를 꾀할 수 있다. 또한 원료배양세포주인 산삼의 특정 성분을 고스란히 담는다는 데에 그 이점이 있다. 이러한 이점을 활용하여 대량 생산 및 산삼의 특정 ginsenoside를 일시에 얻어 의약품, 건강기능식품 등에의 활용이 기대된다.

그러나 현재까지 생물반응기에서 배양된 산삼배양근의 식품 원료로서의 안전성 여부가 확인되지 않아 이를 활용한 제품 개발에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 사람의 건강에 중요한 의미를 가질 수 있는 포유 동물계에서의 *in vivo*연구를 통하여 산삼배양추출물의 안전성 여부를 확인하고 나아가 건강기능식품 및 제약 원료의 안정 공급에 기여할 것이다.

시험물질의 유전 독성 여부를 검사하는 연구 방법 중 소핵(micronucleus, MN) 시험은 시험물질을 마우스 복강 내에 주사하고 24시간 후 골수를 채취하여 소핵의 유발성 유무를 관찰하는 *in vivo* 독성실험법의 하나이다. 소핵 생성 원리는 마우스 골수 내에서 erythroblast가 최종 분열한 후 탈핵 과정을 거쳐 미성숙 적혈구인 다염성적혈구(PCE, polychromatic erythrocyte)가 되고 이 PCE는 약 10시간 후 성숙적혈구가 되어 혈관으로 가게 되는데 핵이 있는 erythrocyte 상태에서 돌연변이 물질의 영향을 받으면 염색체가 깨어져 더 이상 분화하지 못하고 파편으로 남아 PCE 내

†Author to whom correspondence should be addressed.

에 있게 된다.[6] 이를 소핵이라 하며 소핵이 많이 관찰될수록 돌연변이 물질의 영향을 많이 받은 것이라 할 수 있다.

본 연구는 설치류인 ICR 마우스의 골수 세포에 있어서 소핵 유발성 여부를 지표로 하여 산삼배양추출물의 소핵생성 여부를 조사하고자 식품의약품안전청 고시 제 2000-63호 "비임상시험관리기준"과 제 1999-61호 "의약품등의 독성시험기준"에 따라 수행하였다.

재료 및 방법

시료 조제

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 brix 60 이상으로 농축하여 산삼배양 추출물을 조제하였으며, 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

실험동물의 군 배정 및 사육 조건

마우스는 소핵 시험에 널리 사용되며 시험 기초자료가 풍부하므로 본 실험에서는 ICR 계통 특정병원균 부재(SPF)마우스를 선택하였다. 공급원은 대한 바이오링크로 입수 시 동물은 약 6주령의 마우스로 입수 시 체중 범위는 28.63-31.17 g 이었다. 입수일을 포함한 7일간의 검역 및 순화 기간을 두어 일반 증상을 관찰한 후, 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 실험군 분리 시에는 체중에 따른 무작위법을 실시하였으며, 식이는 자유 식이를 행하였다. 사육장 내의 온도는 23±3°C를 유지하였으며, 상대습도 55±15%, 환기 횟수 10~20회/hr, 조명시간 12시간, 조도 150~300 Lux로 관리하였다.

시험물질의 조제

시험물질 요구량을 산출한 후 칭량하여 주사용 멸균 생리식염수로 최고용량군의 농도가 되도록 용해하여 조제하였다. 조제는 투여 당일 실시하며 여과 과정은 시험물질의 용해성에 따라 생략하며 시험물질의 균질성을 기하기 위하여 현탁물을 초음파 세척조에서 10-20분간 처리하였다. 조제된 최고용량 시험물질 용액을 주사용 멸균 식염수로 부형제로 투여량에 따라 단계별 희석 조제한 것을 사용하였다(Table 1).

시험물질의 투여방법

약 7주령의 마우스에 시험물질 0, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg의 용량을 1일 1회 2일간 복강 내 투여하고, cyclophosphamide monohydrate(CPA)는 시험물질 2회차 투여일에만 1회 투여하였다.

Table 1. Doses and route for treatment groups

Treatment Groups	Animals per dose	Animal No.	Dose (mg/kg)	Volume (ml/kg)	Route
Vehicle	6	1-6	0×2	10	I.P.
WGCE (G1)	6	7-12	500×2	10	I.P.
WGCE (G2)	6	13-18	1,000×2	10	I.P.
WGCE (G3)	6	19-24	2,000×2	10	I.P.
CPA†	6	25-30	70×1	10	I.P.

WGCE : wild ginseng culture extract
†CPA : cyclophosphamide · H_2O (Positive control item)

골수 채취 및 검체 제작

최종 투여로부터 약 24시간 후에 골수 세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가하였다. 각 동물체로부터 적출한 대퇴골로부터 23게이지 주사침을 사용, 3 ml의 FBS(우태아 혈청, GIBCOBRL #26140-079)으로 골수를 씻어내려 현탁시킨 다음 100 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상징액을 제거한 후 침전된 골수 세포를 슬라이드글라스에 도말, 실온에서 충분히 건조한 후 메틸알콜에 5분간 침지하여 세포를 고정하였다. 고정 및 건조가 끝난 검체는 May-Grunwald 염색액 원액 3분, May-Grunwald 염색액 1:1 희석액(증류수) 2분, Giemsa 염색액(5% in PBS, pH 6.8)의 순서로 염색하여 1,000배의 배율로 검경하였다.[7]

소핵의 계수

각 투여군의 동물로부터 제작한 검체 중 염색 상태가 양호한 1매를 선택하여 무작위로 코드화한 후 검경하였다. 시험 결과는 개체 당 2,000개의 PCE 중에 나타나는 MNPCE를 계수하여 mean±S.D.로 표시하였으며 이를 소핵 유발빈도로 하였다. 계수시 세포 직경의 1/5-1/20의 크기로 주변 유핵세포의 핵과 동이한 염색상을 나타내는 원형-타원형 소체를 소핵으로 계수하였으며, 소핵과 이물질의 구별에 주의하였다. 소핵 계수 후에 소핵 유무에 상관없이 합계 500개의 PCE와 normochromatic erythrocyte(NCE)를 계수하여 PCE/(PCE+NCE)의 비율을 산출, 세포독성의 지표로 삼았다.

일반 증상 관찰

시험물질을 투여한 동물에 대하여 투여 당일 및 부검시각 1회 관찰을 실시해 사망 동물 및 이상 징후의 발생 여부를 관찰하였다.

통계처리 및 판정

SAS 통계법[8~10]을 이용하여 다음의 방법으로 통계처리를 실시하고, 그 결과 P<0.05 경우에 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다. 소핵 유발 빈도와 PCE/(PCE+NCE)는 비율데이터(X)로써 일반적으로 arcsin[sqrt(x)] 변환을 통해 정규성을 가정한다. 소핵 유발 빈도는 정규성 검정을 실시한 결과 만족되지 않아, 비모수 방법인 Kruskal-Wallis test를 실시하고 다중비교 검정하였다.

PCE/(PCE+NCE)는 정규성 검사 결과 만족되어, 일원배치 분산분석을 실시하였으며, 다중비교 검정을 실시하였다. 모든 동물에서 PCE/(PCE+NCE) 비율이 0.1 이상일 때 시험이 타당한 것으로 하고[11,12] MNPCE의 빈도가 통계학적으로 유의하며 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성 반응을 나타날 때 양성으로 판정하였으며, 실험동물의 체중에 대해서는 ANOVA's test를 실시하고 다중비교 검정하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

일반 증상 및 체중의 변화

본 시험에서는 소핵시험에 앞서 각각 24마리의 ICR 마우스 수컷과 암컷에게 시험물질인 산삼배양근 추출물을 복강

Table 2. Results of dose-range finding study (Male)

Chemical Treated	Dose (mg/kg)	Animal No.	Body weights (g) at the time of			
			1st Admin.	2nd Admin.	3rd Admin.	Sacrifice
Vehicle	0 x 2	1	32.77	32.40	32.52	32.49
		2	33.73	33.17	33.72	35.76
		3	31.55	31.59	31.48	32.39
		4	32.05	32.52	31.52	33.15
		Mean ± S.D.	32.53±0.947	32.42±0.649	32.31±1.056	33.45±1.578
WGCE	125 x 2	5	35.45	36.05	33.33	37.51
		6	30.60	3.055	31.33	31.86
		7	32.47	32.44	36.85	33.29
		8	33.53	33.46	33.42	34.05
		Mean ± S.D	33.01±2.027	33.18±2.304	33.73±2.291	34.18±2.400
WGCE	250 x 2	9	32.28	30.91	31.22	31.85
		10	33.93	34.81	34.80	35.06
		11	32.74	34.16	34.18	35.15
		12	32.66	32.59	33.89	33.63
		Mean ± S.D	32.90±0.714	33.12±1.742	33.52±1.581	33.92±1.547
WGCE	500 x 2	13	31.90	31.50	31.61	32.07
		14	32.72	33.42	33.71	34.16
		15	35.67	35.39	36.55	36.04
		16	34.45	35.07	35.75	35.62
		Mean ± S.D	33.69±1.697	33.85±1.786	34.41±2.214	34.47±1.793
WGCE	1,000 x 2	17	34.56	34.46	34.16	34.57
		18	34.07	33.56	34.42	34.39
		19	30.39	29.97	29.88	30.78
		20	31.71	32.43	31.66	32.87
		Mean ± S.D	32.68±1.971	32.61±1.943	32.53±2.161	33.15±1.756
WGCE	2,000 x 2	21	32.79	32.00	32.68	33.45
		22	30.67	29.22	30.14	31.00
		23	33.09	33.47	33.68	34.61
		24	33.60	30.89	33.89	34.54
		Mean ± S.D	32.54±1.289	31.40±1.794	32.60±1.721	33.40±1.686

Vehicle : saline
WGCE : wild ginseng culture extract

내 투여한 후 체중 변화를 관찰한 결과, 성별에 따른 독성 발현의 차이는 없는 것으로 나타났다(Table 2, 3).

시험물질 및 양성대조물질을 투여한 후 최종 시간까지 모든 시험군에서 투여로 인한 것으로 판단되는 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. 시험물질 투여 및 골수세포의 수거 직전에 측정한 각 군의 체중을 비교한 결과(Table 4), 최고용량군에서만 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다 ($P<0.05$).

소핵유발 빈도 및 세포독성

시험물질 산삼배양추출물의 유전독성을 평가하고자 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 약 7주령의 마우스에 시험물질을 1일 1회 2일간 복강 내 투여하고, 최종 투여로부터 약 24시간 후에 골수세포를 수거하여 소핵유발과 세포독성을 평가하였다.

본 시험에서 적용한 용량범위 내에서 개체 당 2,000개의 PCE를 대상으로 소핵을 계수한 결과, 개체 당 2,000개의 PCE에서 관찰된 소핵을 가진 PCE의 빈도는 1회 투여량 기준으로 음성 대조군, 500 mg/kg 투여군(G1), 1,000 mg/kg 투여군(G2), 2,000 mg/kg 투여군(G3) 및 양성대조군의 순으

Table 3. Results of dose-range finding study (Female)

			Body weights(g) at the time of			
			1st Admin.	2nd Admin.	3rd Admin.	Sacrifice
Vehicle	0 x 2	25	25.58	25.45	26.27	26.01
		26	25.03	24.97	24.37	24.94
		27	25.95	25.62	26.11	26.58
		28	24.61	24.69	24.55	24.85
		Mean ± S.D.	25.29±0.592	25.18±0.428	25.33±1.004	25.60±0.842
WGCE	125 x 2	29	25.69	25.45	26.78	26.39
		30	26.92	26.48	26.77	26.95
		31	25.03	24.40	24.81	24.54
		32	24.96	25.67	26.55	26.23
		Mean ± S.D	25.65±0.908	25.50±0.857	26.23±0.951	26.03±1.039
WGCE	250 x 2	33	25.25	24.54	24.61	25.32
		34	25.78	26.62	26.78	27.52
		35	24.79	24.31	24.16	25.14
		36	25.13	25.27	26.13	25.93
		Mean ± S.D	25.24±0.411	25.19±1.041	25.42±1.238	25.98±1.082
WGCE	500 x 2	37	28.48	28.82	29.38	29.33
		38	24.22	25.74	27.30	27.19
		39	25.60	25.17	25.78	25.76
		40	26.89	25.78	25.85	25.76
		Mean ± S.D	26.30±1.818	26.38±1.652	27.08±1.687	27.01±1.687
WGCE	1,000×2	41	25.53	25.49	25.63	26.74
		42	25.92	26.25	27.32	27.68
		43	27.76	28.29	28.24	29.09
		44	25.39	25.35	25.45	26.21
		Mean ± S.D	26.15±1.097	26.35±1.356	26.66±1.349	27.43±1.263
WGCE	2,000×2	45	25.89	27.06	26.93	27.93
		46	25.20	24.74	25.85	26.37
		47	26.26	26.07	27.24	27.93
		48	25.00	24.83	25.90	26.14
		Mean ± S.D	25.59±0.589	25.68±1.105	26.48±0.710	27.09±0.972

Vehicle : saline
WGCE : wild ginseng culture extract

Table 4. Body weights of ICR mice.

Chemical Treatment	Dose (mg/kg)	Animals per dose	Body weights (kg)* at the time of		
			1st Admin.	2nd Admin.	Sacrifice
Vehicle	0×2	6	33.64±1.029	34.02±0.898	34.70±0.864
WGCE (G1)	500×2	6	33.52±1.240	33.32±0.937	34.76±1.085
WGCE (G2)	1,000×2	6	32.77±1.345	32.89±1.187	33.27±0.825
WGCE (G3)	2,000×2	6	33.61±1.290	32.86±0.992	33.10±0.841**
CPA†	70×1	6	32.71±1.020	33.61±1.325	33.37±1.353

Vehicle : saline
WGCE : wild ginseng culture extract
†Cyclophosphamide?H2O (positive control) administered once on the day of 2nd Admin.
*Mean±S.D. g
**Significantly different from the vehicle control group at P<0.05.

Table 5. Micronucleus test of WGCE in male ICR mice.

Chemical Treatment	Dose (mg/kg)	Animals per dose	MNPCE/ 2000 PCE (Mean±S.D.)	PCE/ (PCE+NCE) (Mean±S.D.)
Vehicle	0×2	6	5.17± 2.64	0.36 ± 0.05
WGCE (G1)	500×2	6	5.50± 1.05	0.32 ± 0.07
WGCE (G2)	1,000×2	6	5.00± 1.41	0.33 ± 0.06
WGCE (G3)	2,000×2	6	5.83± 1.47	0.33 ± 0.05
CPA†	70×1	6	65.17± 11.64*	0.38 ± 0.06

Vehicle : saline
WGCE : wild ginseng culture extract
MNPCE : PCE with one or more micronuclei
PCE : polychromatic erythrocyte
NCE : normochromatic erythrocyte
†Cyclophosphamide?H2O (Positive control item) administered once on the day of 2nd Admin.
*Significantly different from the vehicle control group at P<0.01.

로 평균 5.17, 5.50, 5.83 및 65.17 이었다(Table 5). 따라서, 시험물질을 투여한 어느 투여군에서도 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 한편 양성 대조군에서는 소핵 빈도에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났다(P<0.01).

세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 음성 대조군, 500 mg/kg 투여군(G1), 1,000 mg/kg 투여군(G2), 2,000 mg/kg 투여군(G3) 및 양성대조군의 순서로 각각 평균 0.36, 0.32, 0.33, 0.33 및 0.38을 나타내었다(Table 5). 이렇듯 시험물질을 투여한 모든 군이 평균 0.25 이상이었고, 시험물질 투여에 의해 세포 독성 수치가 감소하는 경향이 나타났으나 모든 실험군에서 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

이상의 결과로 볼 때 산삼배양근 추출물은 본 시험조건하에서 마우스골수 세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

국문요약

시험물질 산삼배양추출물의 유전독성 평가를 위해 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 1회 투여 최고량은 예비 시험에서 결정하였다. 약 7주령의 수컷 마우스에 시험물질 0, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg의 용량을 1일 1회 2일간 복강내 투여하고, 최종 투여로부터 약 24시간 후에 골수세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가하였다. 개체당 2,000개의 다염성적혈구(michromatic erythrocyte, PCE)중에 나타나는 소핵을 가진 다염성적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 수를 계수한 결과, 모든 시험물질 투여군은 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았으며 일반 증상에서도 모든 시험군은 투여로 인한 것으로 판단되는 증상은 관찰되지 않았다. 부검시 체중에 있어서는 시험물질 최고 용량군에서 유의한 감소가 관찰되었다. 따라서 산삼배양추출물은 위 시험 조건에서, 본 시험에 사용한 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 남기열: 최신고려인삼 (성분과 효능편). 천일인쇄사, pp. 247-252 (1996).
2. Yamaguchi, H,. Matsuura, H., Kasai, R., Tanaka, O., Satake, M., Kodha, H., Izumi, H., Nuno, M., Katsuki, S. and Isoda, S.: Analysis of saponins of wild ginseng. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(10), 4177-4181 (1988).
3. Mizuno, M., Yamada, J., Terai, H., Kozukue, N., Lee, Y.S. and Tsuchida, H.: Differences in immunomodualating effects between wild and cultured Panax ginseng. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**(3), 1672-1678 (1994).
4. Lee, E.J., Jhao, H.L., Li, D.W., Jung, C.S., Kim, J.H. and Kim, Y.S.: Effect of MeOH extract of adventious root culture of Panax ginseng on hyperlipidemic rat induced by high fat-rich diet. *Korean J. Pharmacogn*,. **34**(2), 179-184 (2003).
5. 신미희: 산삼의 배양 및 그 응용에 관한 연구. 대한화장품학회지, **27**(2), 45-56 (2001).
6. Alder, I.D.: Cytogenetic tests in mammals. In mutagenecity testing a practical approach. Venitt, S. Parry, JM (eds.), IRL press, Oxford, pp. 275-306 (1984).
7. Schmid, W.: The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31:9-15 (1975).
8. SAS Intitute: SAS/STAT User's guide, Version 6, 4th ed., Vol.1, Cary, NC., USA (1989a).
9. SAS Intitute: SAS/STAT User's guide, Version 6, 4th ed., Vol.2, Cary, NC., USA (1989b).
10. Zar JH: Bioststistical Analysis, 2nd Edition, Prentice-Hall International Editions (1990).
11. Heddle, J.A., Stuart, E., Salamone, M.F.: The bone marrow micronucleus test. *In Handbook of mutagenicity test procedures*, 2nd edition Elsevier Science Publishiers BV. pp.441-457 (1984).
12. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K.: Statistical analysis on in vivo cytogenetic assays, *In Statistical evaluation of mutagenicity test data* (Kirkland, D.J. ed), Chambridge University Press, Cambridge, U.K., pp.184-232 (1998).