

까마귀쪽나무열매추출물의 유전독성 평가

윤지현 · 박인재 · 박성환 · 최구희 · 김현정 · 조주현*

(주)휴림중앙연구소

Genotoxicity Study of *Litsea japonica* Fruit Flesh Extract

Ji-Hyun Yun, In-Jae Park, Sung-Hwan Park, Goo-Hee Choi, Hyun-Jung Kim, and Ju-Hyun Cho*

Hurum Central research institute Co., Ltd, Segwipo, Korea

(Received November 1, 2017/Revised January 10, 2018/Accepted May 8, 2018)

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the genotoxicity of *Litsea japonica* fruit-hexane extract (LJF-HE). In order to examine the genotoxicity, we carried out bacterial reverse mutation assay, chromosome aberration assay, and a micronucleus induction (MN) test according to the OECD and the Korea Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) toxicity test guidelines. In the bacterial reverse mutation assay, no significant increase in revertant colonies, nor bacterial toxicity, was observed in the LJF-HE treatment group, regardless of the absence or presence of metabolic activation by the S9 mixture. However, in the positive control group, revertant colony counts were shown to be more than twice that of the negative control group. The chromosome aberration test showed that the repetition rate of abnormal chromosome aberration was less than 5%, regardless of the treatment time, and with or without the S9 mixture. No significant change was observed when ($p < 0.05$) compared with the negative control group. The micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) repetition rate of the polychromatic erythrocytes (PCE) showed no significant changes when compared with the negative control group ($p < 0.05$). The PCE portion of total erythrocytes also showed no significant changes ($p < 0.05$). These results showed that LJF-HE had no significant genotoxic effects.

Key words : *Litsea japonica*, Genotoxicity, Reverse mutation, Micronucleus test

까마귀쪽나무(*Litsea japonica*)는 한국의 남부지역 및 일본 등지에 분포하는 상록엽소교목으로 국내에서는 제주도를 비롯한 남해안 섬 및 울릉도 등에서 주로 자생한다¹⁾. 까마귀쪽나무 속은 설사, 구토, 뼈의 통증, 산후조리 목욕제 등으로 사용되어졌다고 보고되고 있으나²⁾, 까마귀쪽나무에 대한 생리활성 연구는 많이 이루어져 있지 않다. 까마귀쪽나무에는 lactones, terpenoids 및 alkaloids 등과 같은 다양한 생리활성 물질들이 함유되어 있으며, 이러한 성분들의 분리정제 및 구조를 확인하는 연구가 주로 이루어져왔다^{3,4)}. 까마귀쪽나무 대한 연구보고 등에 따르면, 까마귀쪽나무 잎추출물의 생리활성으로는 항산화 효과, HL60 암세포의 apoptosis를 유도효과 및 항염증 효과가 보고되었다^{5,6)}. 또한, 까마귀쪽나무의 잎에서 litsealactone A와 B, hamabiwalactone A와 B, akolactone B 등 5가지 lactone 성

분이 분리되었으며, 이 중 hamabiwalactone B와 akolactone B에서는 항보체활성(anti-complement activity)이 있으며, hamabiwalactone A와 B 성분이 진통 및 항염증 효과가 있다고 보고되었다^{1,7)}. 까마귀쪽나무의 열매추출물에 대하여 보고된 바에 의하면 까마귀쪽나무 열매 70% 에탄올 추출물이 NF- κ B억제 및 JNK/p38 MAPK의 활성화에 의하여 진통과 염증이 억제되었다⁷⁾. 또한 까마귀쪽나무의 열매와 잎의 항염증 작용을 비교하여 까마귀쪽나무의 열매 70% 에탄올 추출물이 NO생성억제, PGE₂ 생성억제, iNOS발현 억제 및 염증성 사이토카인인 TNF α , IL-1 β , IL-6가 모두 억제됨이 보고되었다⁸⁾. 본 연구에서는 까마귀쪽나무열매추출물을 건강기능식품소재로 개발하기 위한 안전성 확인을 위해 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵유발시험을 통하여 유전독성을 평가하고자 하였다.

*Correspondence to: Ju-Hyun Cho, Hurum Central research institute Co., Ltd, 121-17, Sillyedong-ro, Namwon-eup, Seogwipo-si, Jeju-do 63608, Korea

Tel: 82-70-4231-1078, Fax: 82-64-767-1076

E-mail: dusvnd608@hanmail.net

Materials and Methods

까마귀쪽나무열매추출물(LJF-HE) 제조

제주도 해안가에 자생하고 있는 까마귀쪽나무열매(2015

년)를 채취하여 본 연구에 사용하였다. 까마귀쪽나무열매의 씨앗을 분리한 후, 과육 부분을 동결건조 하였다. 동결건조된 까마귀쪽나무열매(1,000 g)을 실온에서 24시간 동안 n-hexane으로 1회 추출하였다. 추출물은 n-hexane을 제거하기 위하여 감압농축하였으며, 추출물의 n-hexane의 잔류량은 식품의약품안전처의 건강기능식품소재로 활용가능한 규격(0.005 g/kg 이하)에 적합한 0.001 g/kg으로 분석되었다. 추출물의 수율은 약 30.6%(w/w)이고, 사용 전까지 4°C에서 보관하였다.

까마귀쪽나무열매추출물(LJF-HE)의

지표성분분석(Hamabiwalactone B) 함량분석

표준용액은 Hamabiwalactone B(주)천연물화학, Daejeon, Korea)를 사용하여 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 표준용액을 제조하였다. 시험용액은 시료(LJF-HE) 약 150 mg을 무게 칭량 후 ethanol 15 mL을 넣어 Ultrasonic cleaner (Powersonic 420, Hwashin Tech, Daegu, Korea)에서 30분간 초음파 추출하고 25 mL로 정용하여 0.45 µm Syringe filter (Whatman, PTFE, USA)로 여과 후 시험용액으로 사용하였다. 표준용액과 시험용액을 HPLC (Waters 2695 Separations Module, Milford, MA, USA)로 분석하였다. 검출기는 Photodiode Array Detector (Waters 996, Milford, MA, USA)로 검출파장은 254 nm로 설정하였다. Column은 Cadenza C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, particle size 5 µm, Imtakt, Portland, OR, USA)을 사용하였고, Column 온도는 30°C로 유지하였다. 이동상조건은 water (0.5% acetic acid)와 acetonitrile을 구배용매조성법으로 Flow를 1.2 mL/min 속도로 10 µL를 주입하여 아래와 같은 식(a)으로 함량을 구하였다.

$$\text{Hamabiwalactone B (mg/g)} = [\text{검량선결과}(\mu\text{g/mL}) \times \text{최종량(mL)} \times \text{희석배수} \times \text{표준품순도}] / \text{시료채취량(mg)} \quad (\text{a})$$

세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험에 사용된 균주는 변이원성물질에 대한 감수성이 높고, 변이원성시험에 가장 일반적으로 사용되고 있으며, OECD guideline⁹⁾에서 추천되고 있는 균주를 사용하였다 (*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, *Escherichia coli* WP2uvrA (pKM101)). 이들 균주는 2013년 9월 11일 Molecular Toxicology, Inc. (USA)에서 구입한 후, 입수된 각 균주를 nutrient broth 배지에 접종하여 10시간 동안 진탕배양(37°C, 120rpm)하고, 균주 현탁액과 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA)를 1:0.09의 비율로 혼합하여 동결보존용 튜브에 분주하고 초저온 냉동고(-80°C ~ -60°C)에 보관하였다. 균주의 사용에 앞서 histidine 요구성, crystal violet 감수성, ampicillin 내성, spontaneous 복귀변이 수 등을 확인하였다. 본 실험 전에

용량설정시험을 수행한 결과, 대사활성계 미적용(S9-) 및 적용(S9+)에서 TA100, TA1535, TA1537 균주의 500 µg/plate 이상의 농도에서 생육저해가 확인되어 LJF-HE를 50 mg/mL 용액(5000 µg/plate)으로 조제하였다. 이 용액의 일부를 용매로 단계 희석하여 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 µg/plate 농도로 시험물질을 조제하였고, TA98 균주 및 WP2uvrA 균주에 사용되는 시험물질은 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate 농도로 조제 하였다. 시험은 S9 mixture를 가하지 않은 대사 활성 부재 시스템과 S9 mixture를 가한 대사 활성 적용 시스템으로 나누어 본 시험을 수행하였다. 균주를 nutrient broth에 하룻밤 동안 배양하여 대수기(2×10^9 cells/mL) 상태에 이르도록 한 다음 배양액 0.1 mL에 시험물질(LJF-HE) 0.1 mL, S9 mixture 또는 0.2 M sodium phosphate buffer 0.5 mL를 혼합하여 37°C에서 30분간 preincubation 하였다. Histidine/biotin을 함유한 top agar 2.5 mL를 가하여 minimal glucose agar 배지에 부어 굳은 후에 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 복귀돌연변이 집락을 계수하였다¹⁰⁾. 양성대조물질로는 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan), sodium azide (NaN₃, Sigma-Aldrich, USA), 2-aminoanthracene (2AA, Sigma-Aldrich, USA), 9-Aminoacridine (9AA, Sigma-Aldrich, USA) 등을 각 시험균주의 특성에 맞추어 사용하였다.

염색체 이상 시험

Chinese hamster lung (CHL) fibroblast를 사용하여 LJF-HE의 염색체 이상 시험을 실시하였다. 배지는 minimum essential medium에 fetal bovine serum (FBS, Life Technologies Corp, USA) 10%, penicillin/streptomycin (Life Technologies Corp, USA) 1% 비율로 첨가하여 사용하였으며, 음성대조물질로는 시험물질의 용매인 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA)를, 양성대조군은 대사활성계의 존재(S9+)하에는 Cyclophosphamide (CPA)를 대사활성계의 비존재(S9-)하에는 mitomycin C (MMC)를 사용하였다¹¹⁾. 예비시험에서 시험물질(LJF-HE)을 처리하여 독성 여부를 관찰하고, 그 결과에 따라 농도를 10~80 µg/mL로 설정하여 본 시험을 하였다.

염색체이상시험에서 LJF-HE의 6시간 처리군은 75 cm² 세포배양용 플레이트에 계대배양된 Chinese hamster lung (CHL) fibroblast 세포부유액의 세포수를 4×10^3 cells/mL의 세포 농도로 조정 후, 25 cm² 세포배양용 플라스크에 5 mL씩 분주하여 3일간 배양하였다. 그 후, 각 플라스크의 기존 배양액을 제거하고, 신선한 배양액 4.5 mL, 각 농도의 시험물질용액 0.05 mL 및 S9 Mix 0.5 mL를 분주하였다. 대사활성계의 비존재군(S9-)은 신선한 배양액 5 mL와 시험물질용액 0.05 mL만 첨가하였다. 6시간 후, 배양액을 제거하고 신선한 배양액으로 교환 후 18시간동안 추가

배양하였다.

LJF-HE의 24시간 처리군은 75 cm² 세포배양용 플레이트에 계대 배양된 Chinese hamster lung (CHL) fibroblast 세포부유액의 세포수를 4 × 10³ cells/mL의 세포 농도로 조정 후, 25 cm² 세포배양용 플라스크에 5 mL씩 분주하여 3일간 배양하였다. 그 후, 각 플라스크의 기존 배양액을 제거하고, 신선한 배양액 5 mL, 각 농도의 시험물질용액 0.05 mL을 처리 후, 24시간동안 배양하였다. 처리종료 2 시간 전에 colcemid를 처리한 다음 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 모아 염색체 이상 시험을 위한 표본을 제작하였다. 광학현미경 하에서 1,000배의 배율로 각 시험군당 100개의 잘 퍼진 분열 중기 상에 대하여 동원체 수 및 염색체 이상의 유무를 관찰하고, 이상의 종류와 수를 기록하였다¹²⁾.

마우스 골수세포를 이용한 소핵시험

LJF-HE의 발암성 유발 유·무 판단의 기초자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다(동물실험계획 승인번호 : IAC2016-0744, IAC2016-0872). 6주령의 수컷 ICR 마우스 25마리를 (주)오리엔트바이오에서 구입 후, 1주일간 동물 사육실 환경에 적응시켜 시험에 사용하였다. 동물사육실은 온도 22 ± 3°C, 상대습도 50 ± 20%, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 조도 150~300 Lux로 유지하였다. 실험동물은 마우스용 와이어 케이지(180W × 300L × 140H mm)에 5마리씩 넣어 사육하였고, 사료는 방사선 멸균된 Rodent Diet 20 5053 (Labdiet, USA)를, 음수는 R/O수를 자유 섭취시켰다. 본시험의 최고농도는 용량설정시험 결과를 토대로 하여 2000 mg/kg B.W.으로 설정하여 각 군당 5 마리의 마우스에 0(음성 대조물질, Corn-oil), 500, 1000, 2000 mg/kg의 농도로 2회(24시간 간격) 강제 경구 투여하였다. 양성대조물질(Cyclophosphamide monohydrate, CPA)은 70 mg/kg의 농도로 단회 복강투여 하였다. 골수세포의 채취는 2일간 마우스에 시험물질을 투여 후, fetal bovine serum을 사용하여 대퇴골에서 골수세포를 수거하였고, 채취한 골수를 4°C의 원심분리기 1,000 rpm에서 약 5분간 원심분리하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 slide glass에 도말하여 골수도말검체를 제작하였다. 골수도말검체는 acridine orange (40 µg/mL)를 처리하여 염색 후, 골수세포증식과 다염성 적혈구에 생성된 소핵을 관찰하였다. 소핵빈도를 관찰하기 위하여 군당 약 4,000개의 다염성 적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE)를 관찰하고, 이중 소핵 다염성 적혈구(PCE with one or more micronuclei, MNPCE)의 출현빈도를 측정하였다. 동시에 정상체 적혈구(Normochromatic erythrocyte, NCE)와 다염성 적혈구를 더한 전 적혈구(PCE+NCE, RBC)에 대한 다염성 적혈구의 출현빈도를 구하였다. 결과의 판정은 소핵을 가진 다염성 적혈구(MNPCE)의 수가 통계학적으로 유의하며, 농도 의존적으

로 증가하는 경우와 하나이상의 농도에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다.

통계학적 분석

본 연구에서 통계적 유의성 검정은 5%의 유의수준($p < 0.05$)에서 ANOVA test와 Dunnett's test 분석을 통해 SPSS 19.0K 통계 프로그램을 이용하여 실시하였다.

Results and Discussion

까마귀쪽나무열매추출물(LJF-HE)의 지표성분 함량

까마귀쪽나무열매추출물(LJF-HE)의 표준화는 지표성분인 Hamabiwalactone B의 함량범위를 12.1~18.3 mg/g 로 설정하여 규격화하였으며, 본 연구에 사용한 까마귀쪽나무열매추출물(LJF-HE)의 Hamabiwalactone B의 함량이 15.23 ± 0.057 mg/g 으로 분석되어 까마귀쪽나무열매추출물의 표준화 규격에 적합한 것으로 확인하였으며, 본 연구에 사용하였다.

복귀돌연변이시험

세균을 이용한 복귀돌연변이시험은 식품의약품안전처 독성시험기준을 준용하여 실시하였다¹³⁾. 시험결과, 대사활성계 미적용(S9-)에서 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535 및 TA1537 균주의 125 µg/plate 이상의 농도에서 생육저해가 확인되었고(Table 1-1), 대사활성계 적용(S9+)에서 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 균주의 500 µg/plate 이상의 농도에서 생육저해가 확인되었다(Table 1-2). 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니 수는 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았다. 또한 대사활성계 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 plate 위에 석출은 확인되지 않았다. 본시험의 음성(용매)대조값 및 양성 대조값은 시험시설의 적정 범위 내였다. 또한 양성 대조물질에서 유발된 복귀돌연변이 콜로니 수는 대사활성계 미적용(S9-) 및 적용(S9+)의 모든 시험 군주에 대하여 음성(용매)대조 값의 2배를 넘어 증가하였고 분명한 양성 결과를 보였다.

따라서, 본 시험에서 hexan을 사용하여 제조된 추출물인 LJF-HE는 변이원성을 보유하지 않은 음성으로 판단된다. Kim 등¹⁴⁾의 연구에서 도라지추출물을 hexan(Hexane) 등 여러 가지 유기용매로 분획한 추출물을 50~1000 µg/plate로 처리한 여러 가지 농도에서도 음성대조군에 비하여 농도에 따른 유의적인변화를 나타내지 않았다고 보고한 내용과 유사한 결과를 보였다.

염색체 이상 시험

단시간처리법 시험에서 시험물질처리 개시 시에 시험물질의 석출이나 부유물은 확인되지 않았다. 표본관찰 결과,

Table 1-1. The number of revertant colonies in absence of metabolic activation

Strain	Test substance	Dose (µg/plate)	Colonies/plate (Mean ± S.D)	
TA98	LJF-HE	0	25 ± 3	
		313	27 ± 3	
		625	25 ± 1	
		1250	25 ± 3	
		2500	24 ± 2	
		5000	24 ± 3	
	AF-2	0.1	501 ± 12	
	TA100	LJF-HE	0	101 ± 5
			7.8	99 ± 8
			15.6	100 ± 3
31.3			92 ± 2	
62.5			77 ± 7	
125			79 ± 8*	
250			62 ± 2*	
500			44 ± 7*	
AF-2		0.01	451 ± 24	
TA1535		LJF-HE	0	10 ± 1
	7.8		9 ± 2	
	15.6		8 ± 1	
	31.3		7 ± 1	
	62.5		5 ± 2	
	125		2 ± 1*	
	250		1 ± 1*	
	500		0 ± 1*	
	NaN ₃	0.5	369 ± 9	
	TA1537	LJF-HE	0	11 ± 3
7.8			9 ± 1	
15.6			10 ± 1	
31.3			7 ± 1	
62.5			6 ± 1	
125			3 ± 2*	
250			1 ± 1*	
500			0 ± 1*	
9-AA		40.0	235 ± 7	
WP2 _{uvrA}		LJF-HE	0	35 ± 2
	313		31 ± 1	
	625		37 ± 2	
	1250		32 ± 4	
	2500		32 ± 2	
	5000		32 ± 3	
	AF-2		0.01	421 ± 9

S.D. : Standard deviation
 NaN₃ : Sodium azide (Positive control)
 AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (Positive control)
 9-AA : 9-Aminoacridine (Positive control), 2-AA : 2-Aminoanthracene (Positive control)
 *: Significant difference (P < 0.05)

대사활성계 미적용(S9-)의 0, 10, 15, 20, 25, 30, 35 µg/mL 에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0,

Table 1-2. The number of revertant colonies in presence of metabolic activation

Strain	Test substance	Dose (µg/plate)	Colonies/plate (Mean ± S.D)	
TA98	LJF-HE	0	34 ± 2	
		313	33 ± 5	
		625	34 ± 3	
		1250	33 ± 2	
		2500	30 ± 1	
		5000	32 ± 4	
	AF-2	0.1	264 ± 9	
	TA100	LJF-HE	0	110 ± 8
			7.8	106 ± 5
			15.6	101 ± 5
31.3			97 ± 10	
62.5			107 ± 5	
125			102 ± 3	
250			91 ± 3	
500			78 ± 9*	
AF-2		0.01	509 ± 18	
TA1535		LJF-HE	0	15 ± 2
	7.8		12 ± 2	
	15.6		11 ± 1	
	31.3		11 ± 1	
	62.5		11 ± 1	
	125		7 ± 3	
	250		3 ± 2	
	500		1 ± 1*	
	NaN ₃	0.5	198 ± 12	
	TA1537	LJF-HE	0	11 ± 1
7.8			11 ± 2	
15.6			9 ± 1	
31.3			11 ± 2	
62.5			11 ± 1	
125			9 ± 1	
250			7 ± 1	
500			0 ± 0*	
9-AA		40.0	214 ± 13	
WP2 _{uvrA}		LJF-HE	0	38 ± 4
	313		33 ± 3	
	625		35 ± 3	
	1250		36 ± 4	
	2500		36 ± 4	
	5000		34 ± 3	
	AF-2		0.01	411 ± 17

S.D. : Standard deviation
 NaN₃ : Sodium azide (Positive control)
 AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (Positive control)
 9-AA : 9-Aminoacridine (Positive control), 2-AA : 2-Aminoanthracene (Positive control)
 *: Significant difference (P < 0.05)

0.0, 0.0, 0.0, 0.3, 0.0, 0.7% 이었으며, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0% 이었다.

Table 2. Results of chromosome aberration test with short-term treatments

Test substance	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix	Trt-Rec Time	Number of structural aberrations (frequencies %)					Total (cells %)	gap	Number of numerical aberrations (%)		Total (%)
				ctb	cte	csb	cse	other			Pol	Endo	
LJF-HE	0 (DMSO)	-	6-18	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	10	-	6-18	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	15	-	6-18	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	20	-	6-18	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	25	-	6-18	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	30	-	6-18	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	35	-	6-18	0 (0.0)	2 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.7)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
MMC	0.1	-	6-18	3 (1.0)	70 (23.3)	3 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	76 (25.3)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
LJF-HE	0 (DMSO)	+	6-18	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	20	+	6-18	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	40	+	6-18	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	60	+	6-18	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	80	+	6-18	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
CPA	5	+	6-18	5 (1.7)	68 (22.7)	3 (1.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	77 (25.7)	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO : Dimethylsulfoxide (Negative control)

MMC : Mitomycin C (Positive control), CPA : Cyclophosphamide (Positive control)

ctb : chromatid type break, cte : chromatid type exchange, csb : chromoso-type break, cse : chromosome type exchange, other : fragmentation etc., Pol : polyploids, Endo : endoreduplication

Table 3. Results of chromosome aberration test with continuous treatments

Test substance	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix	Trt-Rec Time	Number of structural aberrations (frequencies %)					Total (cells %)	gap	Number of numerical aberrations (%)		Total (%)
				ctb	cte	csb	cse	other			Pol	Endo	
LJF-HE	0 (DMSO)	-	24-0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	2.5	-	24-0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	5	-	24-0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	10	-	24-0	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	15	-	24-0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	20	-	24-0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
MMC	0.05	-	24-0	2 (0.7)	65 (21.7)	5 (1.7)	2 (0.7)	0 (0.0)	74 (24.7)	1	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)

DMSO : Dimethylsulfoxide (Negative control)

MMC : Mitomycin C (Positive control)

ctb : chromatid type break, cte : chromatid type exchange, csb : chromoso-type break, cse : chromosome type exchange, other : fragmentation etc., Pol : polyploids, Endo : endoreduplication

그리고 대사활성계 적용(S9+)의 0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0% 이었으며, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0% 이었다(Table 2). 연속처리법 시험에서도 마찬가지로 시험물질처리 개시 시에 시험물질의 석출이나 부유물은 확인되지 않았다. 표본관찰 결과, 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현

빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.3, 0.0, 0.0% 이었고 염색체 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0% 이었다(Table 3).

각 처리조건의 음성대조군의 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5% 미만이었으며, 양성대조군의 경우 구조이상 세포의 출현빈도는 10% 이상이었다. 이상의 결과로 LJF-HE는 염색체이상을 유발하지 않는 것으로

Table 4. Micronucleus test in ICR mice

Sex	Test substance	Dose (mg/kg)	No. of animal	MNPCE/4000PCEs (Mean \pm S.D., %)	PCE/(PCE+NCE) (Mean \pm S.D., %)
male	LJF-HE	0 (Corn-oil)	5	0.18 \pm 0.03	58.15 \pm 2.91
		500	5	0.17 \pm 0.05	59.82 \pm 1.91
		1000	5	0.20 \pm 0.04	60.03 \pm 2.23
		2000	5	0.18 \pm 0.04	57.61 \pm 2.75
	CPA	70	5	6.99 \pm 0.54	42.50 \pm 1.84

*P < 0.05

MNPCE : PCE with one or more micronuclei

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

CPA : Cyclophosphamide monohydrate (positive control)

Corn-oil : negative control

판단하였다.

마우스 골수세포를 이용한 소핵시험

수컷 마우스(ICR, 투여 시 7주령)를 이용하여 설치류 조혈세포에 대한 LJF-HE의 소핵 유발성의 유무를 평가하였다.

본시험의 최고농도는 용량설정시험 결과를 토대로 하여 2000 mg/kg으로 설정하였고, 본시험은 각 군당 5 마리의 마우스에 0(음성대조물질, Corn-oil), 500, 1000, 2000 mg/kg의 농도로 2회(24시간 간격) 강제 경구 투여하였다. 양성대조물질(Cyclophosphamide monohydrate, CPA)은 70 mg/kg의 농도로 단회 복강투여 하였다. 시험물질 투여 결과 사망동물은 확인되지 않았으므로 음성 대조군, 시험물질투여군의 500, 1000, 2000 mg/kg 군 및 양성 대조군의 동물에 대하여 소핵을 가지는 다염성적혈구(Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현 빈도를 계수하였다. 시험결과, 시험물질 투여군에서 음성 대조군과 비교하여 소핵을 가진 다염성 적혈구의 증가는 볼 수 없었으며 통계학적인 유의성도 나타나지 않았다. 음성 대조군의 MNPCE 출현 빈도 및 PCE의 비율 평균치는 historical background data의 범위 내 있었다(Table 4). 또한, 양성 대조군에서는 통계학적인 유의성이 나타났다. Ham¹⁵⁾등의 연구에서 참취뿌리추출물을 헥산(Hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol)로 분획하여 소핵생성빈도를 알아본 결과 가장 높은 시료농도인 80 mg/kg의 투여군에서 각각 2.2 \pm 0.1, 204 \pm 0.4, 2.5 \pm 0.5, 3.2 \pm 0.2의 소핵생성빈도를 보였다고 하였으나, Positive control군에 비하여 헥산추출물에서 78.4%의 가장 높은 소핵생성 억제율을 나타내었고, 생리활성 성분은 헥산 추출물에 존재하는 것으로 보고하였다. 이러한 연구결과와 본시험의 연구결과로 볼 때 시험물질인 LJF-HE은 수컷 ICR 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것(음성)으로 판단되며, 소핵생성 억제에 영향을 주는 것으로 사료된다.

까마귀쪽나무열매추출물(LJF-HE)는 세균을 이용한 복귀

돌연변이시험, 염색체이상시험, 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험에서 통계적으로 유의적인 독성을 확인하지 못하였다. 따라서 까마귀쪽나무열매추출물(LJF-HE)은 유전독성을 유발하지 않는 것으로 평가되었다.

Acknowledgements

본 연구는 중소벤처기업부의 기술혁신개발사업의 일환으로 수행하였습니다[S2314842, 천연물 유래의 위 기능 개선 효능을 갖는 건강기능식품소재 개발].

국문요약

본 연구는 까마귀쪽나무열매추출물(LJF-HE)의 유전독성을 평가하고자 하였다. 유전독성연구는 OECD와 MFDS (Korea Ministry of Food and Drug Safety) 지침에 따라 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험은 까마귀쪽나무열매추출물(LJF-HE) 처리군에서 S9 mix 존재유무에 상관없이 복귀돌연변이 콜로니 수는 음성 대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않은 반면에 양성 대조물질에서 유발된 복귀돌연변이 콜로니 수는 대사활성계 미적용(S9-) 및 적용(S9+)의 모든 시험 군주에 대하여 음성(용매)대조 값의 2배를 넘어 증가한 것으로 나타났다. 염색체 이상 시험에서 까마귀쪽나무열매추출물(LJF-HE) 처리군에서 모든 세포주의 처리시간 및 S9 mix 존재유무에 상관없이 5%미만의 비정상적인 염색체이상을 나타내었으나, 음성대조군에 비해 유의적인 변화는 없었다. 소핵시험은 까마귀쪽나무열매추출물(LJF-HE) 처리군에서 음성 대조군과 비교하여 소핵을 가진 다염성 적혈구의 증가는 볼 수 없었으며 통계학적인 유의성도 나타나지 않았다. 상기의 결과를 종합하면 까마귀쪽나무열매추출물(LJF-HE)은 유전독성을 유발하지 않는 것으로 판단되어진다.

References

1. Min B.S., Lee S.Y., Kim J.H., Kwon O.K., Park B.Y., An R.B., Lee J.K., Moon H.I., Kim T.J., Kim Y.H., Joung H., Lee H.K.: Lactones from the leaves of the *Litsea japonica* and their anti-complement activity. *J. Nat. Prod.*, **66**, 1388-1390 (2003).
2. Jiménez-Pérez N del C., Lorea-Hernández F.G., Jankowski C.K., Reyes-Chilpa R.: Essential oils in mexican bays (*Litsea* spp., Lauraceae): Taxonomic assortment and ethnobotanical implications. *Econ. Bot.*, **65**, 178-189 (2011).
3. Tanaka H., Nakamura T., Ichino K.: Butanolides from *Litsea japonica*. *Phytochemistry*, **29**, 857-859 (1990).
4. Takeda K., Sakurawi K., Ishii H.: Components of the Lauraceae family-I. New lactonic compounds from *Litsea japonica*. *Tetrahedron*, **28**, 3757-3766 (1972).
5. Kim E., Boo H.J., Hyun J.H., Kim S.C., Kang J.I., Kim M.K., Yoo E.S., Kang H.K.: The effect of *Litsea japonica* on the apoptosis induction of HL-60 leukemia cells. *Yakhak Hoeji*, **53**, 6-11 (2009).
6. Yoon W.J., Kang S.C., Ham Y.M., Kim K.N., Yang W.H., Kim H.J., Park S.Y., Jung Y.H.: Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Litsea japonica* leaves. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **53**, 27-32 (2010).
7. Koo H.J., Yoon W.J., Sohn E.H., Ham Y.M., Jang S.A., Kwon J.E., Jeong Y.J., Kwak J.H., Sohn E., Park S.Y., Jang K.H., Namkoong S., Han H.S., Jung Y.H., Kang S.C.: The analgesic and anti-inflammatory effects of *Litsea japonica* fruit are mediated via suppression of NF- κ B and JNK/p38 MAPK activation. *Int. Immunopharmacol.*, **22**, 84-97 (2014).
8. Namkoong S., Jang S.A., Sohn E.H., Bak J.P., Sohn E., Koo H.J., Yoon W.J., Kwon J.E., Jeong Y.J., Meng X., Han H.S., Kang S.C.: Comparative Study of *Litsea japonica* Leaf and Fruit Extract on the Anti-inflammatory Effects. *Korean J. Plant Res.*, **28**, 145-152 (2015).
9. OECD: OECD guideline testing of chemicals No. 471 Bacterial Reverse Mutation Test (2001).
10. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173-215 (1983).
11. Lee S.S., Park Y.H., Sohn Y., Ryu S.J., Surh Y.J.: Genotoxicity of capsaicin in cultured human lymphocytes. *Environ Mutagen. Carcinogen.*, **15**, 81-87 (1995).
12. Wakata A., Sasaki M.S.: Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: Comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutat. Res.*, **190**, 51-57 (1987).
13. Ministry of Food and Drug Safety: Guidelines for toxicity tests of drugs and related materials notification. Chungbuk, MFDS (2014).
14. Kim S.H., Chung M.J.: Safety and Anticancer Effects of *Platycodon grandiflorum* Extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **44**, 516-523 (2015).
15. Ham S.S., Hwangbo H.J., Cui C.B., Lee E.Y., Cho M.A., Lee D.S.: Suppressive Effects of Ethanol Extract of *Aster scaber* Root on Genotoxicity. *J. East Asian Soc. Dietary Life*, **11**, 466-471 (2001).