Korean J. Ginseng Sci
Vol. 8, No. 1 (1984)

人蔘抽出成分의 抗變異原性 硏究

(第一報 人蔘等 生藥植物 抽出液의 變異原性)

鄭鎬權 · 趙昌淑* · 金貞孝
建國大學校 微生物工學科, *家政學科

(1983년 7월 15일접수)

Studies on the Antimutagenicity of Ginseng Extracts

1. The mutagenicity of ginseng and medicinal herb extracts.

Ho-Kwon Chung, Chang-Sook Cho and Chung-Hyo Kim

Department of Microbial Engineering, Konkuk University,
Department of Home Economics, Kon Kuk University.

(Received July 15, 1983)

Abstract

In order to confirm the antimutagenicity of ginseng extracts, mutagenicity of ginseng and several medicinal herbs of which extracts were used as drinks, was examined through the method of Ames test. The obtained results were as follows.

1. Strong mutagenicities for *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 were observed in all sample herbs *(Paenonia albiflora, Rehmannia glutinosa, Astragalus membranaceus, Angelica acutiloba, Cnidium officinale, Laurus nobilis* and *Panax ginseng)* without S-9 mix metabolic activation.

2. In the case of S-9 mix metabolic activation, even in a low concentraction, the extracts of *Angelica acutiloba, Cnidium officinale* and *Paenonla albiflora* showed also a high mutagenicities for the strain TA98 and TA1535.

3. Even in high concentration of ginseng extracts, mutagenicity was almost neglectable through the metabolic activation of S-9 mix, compared with other extracts of medicinal herbs.

Ⅰ. 서 론

1955년 Alfred[1]가 化學物質이 細胞에 對하여 遺傳學的 영향의 잠재력을 갖는다고 경고한 이래 化學物質의 毒性을 細胞學的으로 또는 組織學的으로 檢討하게 되었는 바 近來에는 人間이 攝取하거나 접촉하게된 物質의 數가 急激히 증가하여 從來의 動物實驗이나 組織學的試驗方法으로는 毒性을 檢討 判定하기에 時間, 經費, 技術숙련및 動物의 個体差等으로 難點이 컸다.

그런데 1970년대에 와서 미생물의 細胞學的 突然變異를 利用한 毒性判定의 새로운 方法 즉

*Salmonella typhimurium*變異株는 野生株에 없었던 強力한 아미노산 要求性을 갖는 바 어떤 化學物質의 접촉에 依해 예민하게 DNA修復이 되는 復歸突然變異가 일어나 그 아미노산 要求性이 없어지는 特性을 Ames等이[2,3] 發見하였으며 細胞 突然變異를 유발시키는 變異原性物質을 감별하는 方法[4,5] 으로 開發하였다. 이 方法은 차차 認定을 받게 되었고 1975년에는 Ames方法에 依해 밝혀진 變異原性質質과 發癌性物質은 서로 80%의 相關을 갖는 것이 밝혀졌으며[6-9] 近來에는 여러가지 毒性物質을 檢討하는 데 變異原性 判定의 方法을 널리 利用하고 있다. 그러나 食品의 成分이나 食品에 關聯되는 物質에 對한 變異原性을 硏究한 報告는 드물었으며 최근에 Ueno[10]와 Saito[11] 등이 여러가지 食品에서 발생한 곰팡이가 産生하는 mycotoxin의 變異原性을 調査하고 發癌性과 거의 一致하는 結果를 報告한 바 있었고 鄭等[12]이 발효식품중에서 얻어진 代謝物質인 Koji酸과 한약재 大黃의 主成分인 Emodin의 變異原性을 再確認한 바 있었다.

近來 人蔘이 그 藥理學的 效果가 認定되고 需要가 증가되며 특히 茶類, 청량음료 등의 食品으로 開發되어 널리 利用되는 時點에 왔으며 最近에는 抗癌效果도 云云되고 있으나 구체적인 硏究結果는 볼 수 없었다. 筆者등은 이러한 點을 구체적으로 밝히기 위한 實驗의 일환으로 우선 人蔘 抽出液과 最近에 人蔘과 같이 청량음료類로 開發되고 있는 한약의 主材料가 되는 生藥植物中 황기, 작약, 당귀, 지황, 천궁, 계피등을 택하여 그抽出液을 만들어 *Sal. typhimurium* TA 98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538등 특히 예민한 菌株를 利用한 改良된 Ames方法[13]에 따라 그 變異原性을 試驗한 結果를 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 실험방법

1. 재 료

1) 사용균주 : 본 실험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538는 日本 國立衛生試驗所 保有菌株를 分讓받았다.

2) 사용배지 : Nutrinet agar, Minimal glucose medium 및 Top agar를 사용하였다. 단 Minimal glucose medium은 Table 1과 같은 조성의 배지를 고압증기 멸균하여 C에 B를 1ml 가하고 평

Table 1. Minimal glucose medium

	$(NH_4)_2SO_4$	10g
	KH_2PO_4	100g
A	Na_3-citrate	5g
	KOH	25g
	H_2O	500ml
	Adjust pH7.0 with KOH	0.1m
B	$MgSO_4\ 7H_2O\ 10_7$	10%용액
C	Salt mixture A	50ml
	Glucose	5g
	Agar	15g
	10% $MgSO_4$-$7H_2O$	1ml
	D.W	1000ml

판 배지 제조시는 100mm Petri dish에 20ml씩 분주하여 하루동안 실온에 방치한후 사용하였다.

한편 Top agar는 1mM L-histidine과 1mM biotin을 동량 섞어서 만든 0.5mM histidine-biotin 용액과 한천-식염수용액(agar 0.6%, Nacl 0.5%)을 1 : 10의 비율로 혼합하여 121℃,15분간 멸균한것을 사용하였다.

3) S-9 mix : Sprague-Dawley계의 생후 7주(체중 200g)의 male rat에 1일째는 phenol barbitol(10mg/1ml 생리식염수)을, 2～4일째는 농도를 배로한 phenol barbitol(20mg/10ml 생리식염수)을 각각 0.6ml씩 1회 정기적으로 복강주사한후 쥐의 간을 생리식염수로 간장 동맥을 통하여 통과시켜 혈액을 제거하였다. 이렇게 처리한 간장을 적출하여 0.5M KCl 수용액으로 세척하고 다시 이 용액을 간장중량의 3배 가하여 분쇄 균질화한것을 9,000G에서 10분간 원심분리하여 상등액을 모아 S-9 mix를 변이원성 시험법[12]에 따라 제조하였다.

4) 생약식물추출액 : 當歸(*Angelica acutiloba*), 地黃(*Rehmannia glutinosa*), 川芎(*Cnidium officinale*), 桂皮(Cassia bark, *Laurus nobilis*), 芍藥(*Paenonia albiflora*) 및 黃蓍(*Astragalus membranaceus*) 등은 한약건재상에서 구입하여 각각 20g씩을 분쇄하고 증류수 400ml에 넣어 100℃의 Water bath 상에서 7시간 침출시킨 것을 직접 가열하여 100ml가 되도록 1차농축하였다. 이것을 여과하여 불순물을 제거한 다음 다시 가열하여 300ml로 농축하고, 이것을 여과한 여액을 evaporator에서 10ml로 농축하여 사용하였다.

한편 인삼(*Panax ginseng*)은 한국인삼연초연구소에서 분양받은 인삼엑기스를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 균주의 특성 확인 : 공시 균주인 ***Salmonella typhimurium***균주는 자연상태에서 매우 쉽게 복귀 돌연변이가 수시로 일어나므로 실험직전에 그 특성을 확인하여야 하는 바 본 균주의 히스티딘 요구성을 확인하기 위하여 minimal glucose와 이 배지에 0.5mM histidine을 10 : 1로 혼합한 배지를 멸균하여 1～2일 배양했을때 히스티딘혼합배지에서만 균이 발육하는 것을 매번 확인하였다. 따라서 히스티딘 요구성이 명확하여 공시균주로 사용할 수 있음이 확인되었다.

한편 약제 내성인자 R-factor plasmid의 유무를 확인하기 위하여 본 균주를 nutrient agar에 접종한 후 10㎍ ampicillin disk를 넣어 37℃에서 24시간 배양하였던 바 TA98과 TA100은 ampicillin에 내성이 있었고 TA1535, TA1537 및 TA1538은 감수성이 있었다.

2) 시험균주의 전배양 : 공시균주를 nutrient broth에 접종하여 37℃에서 16～18시간 진탕 배양후 McFarlant의 방법[10]에 따른 표준 barium sulfate를 이용하여 균농도가 1～2×10^8/ml이 되도록 하였다.

3) 대사 활성화법에 의하지 않는 평판배양 : 검체용액을 10^2, 5×10^2, 10^3, 5×10^3, 10^4, 5×10^4, 10^5, 5×10^5, 10^6, 10^7, 10^8 및 10^9배로 희석하고 이미 멸균한 시험관에 검체용액을 각각 0.1ml씩 취하였다. 여기에 0.1M인산 나트륨완충액(pH 7.4)을 각각 0.5ml씩 가하고 전배양한 공시균주 현탁액을 0.1ml씩 가한 다음 60℃의 top agar를 2ml를 가하여 잘 혼합한 후 minimal glucose배지 위에 첨가하여 잘 펴고 top agar가 굳으면 37℃에서 48시간 배양하였다. 이렇게 배양한 평판상의 공시균주의 생육저해 여부를 실체 현미경을 통하여 조사하고 복귀돌연변이에 의하여 생긴 colony의 수를 계측하였다.

4) 대사활성화법에 의한 평판배양 : 위의 배양 방법에서 0.1M인산나트륨 완충액대신 S-9 mix를 0.5ml가 하고 나머지는 같은 방법으로 실험하였다.

5) Preincubation법에 의한 배양 : 평판배양법과 같이 하되 top agar를 넣기 전에 37℃에서 20분간 진탕배양후 top agar를 넣었다.

Ⅲ. 실험결과

시료 용액을 각 농도별로 희석하여 대사활성법에 의하지 않는 평판업으로 배양하였을때 10^2, 5×10^2배로 희석시에는 colony수를 계측하기 어려울 정도로 많이 형성되었으므로 본 실험에서는 10^3배 이상으로 희석하였고 *Sal. typhimurium* 등은 자연상태에서 복귀돌연변이가 항상 일어나므로 negative control배지에서도 colony를 형성하는것이 plate당 50개 정도로 거의 일정하였다.

대사활성화법에 의하지 않을 경우 변이원성은 모든 시료가 Table 2의 결과에서 처럼 높은 변이원성을 보였고 그중 작약, 당귀 및 천궁은 10^7배의 높은 희석농도에서도 상당히 큰 변이원성을 나타내었고 황기, 지황 계피 및 인삼도 10^4~10^6배의 높은 희석농도에서 큰 변이원성을 보였다.

Table 2. Mutagenicity response of medicinal herb extracts to *Salmonella typhimusium* TA strains

Medicinal-herbs	Test strains	Natural revertant colony	Revertant colonies (crate of diluti ons)				
			10^7	10^6	10^5	10^4	10^3
P. albiflora	TA98	40	1,922	3,720	3,720	3,090	2,294
As. membranaceus	TA100	60	248	1,672	2,480	3,100	2,170
An. acutiloba	TA 98	40	2,480	2,480	6,200	6,200	2,604
R. glutinosa	TA100	60	992	1,984	3,410	4,960	1,612
C. officienale	TA1535	45	1,992	2,480	4,340	6,200	10,000
L. nobilis	TA1537	18	20	2,170	2,294	2,480	3,720

한편 S－9 mix 대사활성에 의한 경우 작약은 Fig. 1과 같이 S－9 mix의 대사활성을 거칠 경우 대사활성을 거치지 않을때보다 복귀돌연변이 colony수는 감소하였지만 10^4~10^7배의 희석

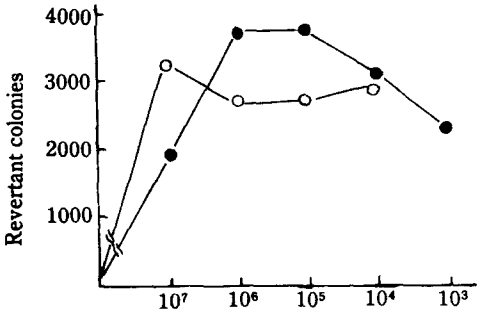

Fig. 1. Response of *Sal. typhimurium* TA 98 to various concentrations of *Paenonia albiflora* —○— without s-q mix,—●—with s-q mix.)

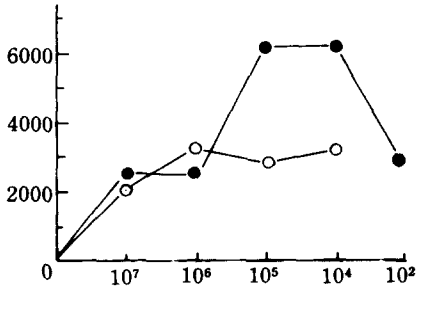

Fig. 2. Response of *Sal. typhimurium* TA 98 to various concentrations of *Angelica acutiloba.* —○— without s-q mix,—●— with s-q mix).

농도에서 균주 TA98에 대하여는 상당한 손상 DNA 회복율이 있음을 알 수 있었다.

당귀에 의한 균주 TA98의 변이는 S－9 mix의 대사활성을 거치지 않을 경우는 Fig. 2에서와 같이 아주 강력한 변이를 보였고 S－9 mix 대사를 거칠 경우 변이량은 절반정도로 감소하였지만 아직도 상당한 변이를 나타냈다.

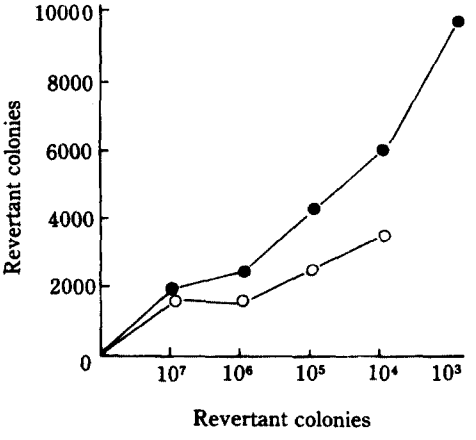

Fig. 3. Response of *Sal. typhimurium* TA 1535 to various concentrations of *Cnidium officinale.* (—●— without s-q mix, —○— with s-q mix).

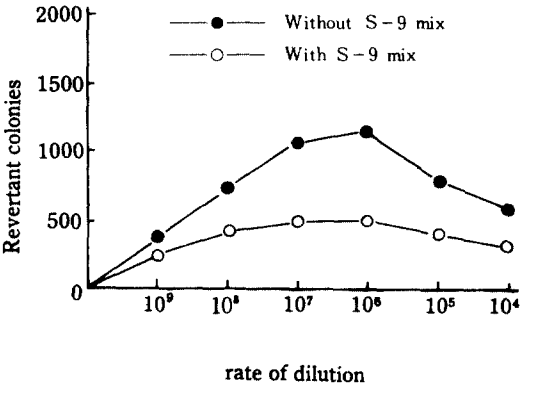

Fig. 4. Response of *Sal. typhimusium* TA 100 to various concentration of *Panax ginseng* extract.

천궁도 S－9 mix 대사활성을 거칠경우 균주 TA1535에서 그 변이원성은 상당히 줄어드는것을 Fig. 3에서 알 수 있었으나 균주 TA1535의 손상된 DNA회복율은 농도가 증가함에 따라 현저히 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 작약과 당귀의 경우에서도 마찬가지였다.

인삼은 옛부터 강장제로 알려져 왔으나 상당히 그 효험이 인정되고 있는것이다. S－9 mix 대사 활성을 거치지 않을 경우 10^5, 10^6 및 10^7배의 희석농도에서 비교적 높은 변이율을 나타냈으나 Fig. 4에서 보는 바와 같이 S－9 mix 대사를 거칠 경우 변이율은 반으로 감소하였다. 다른 생약식물, 즉, 작약, 당귀 및 천궁의 경우와 비교할 때도 현저히 낮은 변이율을 나타내었다.

이 결과로 인삼은 다른 생약재에 비하여 변이원성이 대사활성을 거칠경우 상당히 감소되는 경향을 나타내었으므로 변이원성 물질로 인정하기가 어려움을 알 수 있었다.

Table 3. Mutagenicity response of ginseng extracts to *Salmonella typhimurium* TW strain,

Medicinal-herb	Test strain	Natural revertant colonies	Revertant colonies in various rate of dilution					
			10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4
P. ginseng	TA100	60	420	720	1,060	1,180	820	630

Ⅳ. 고 찰

실험에 사용한 *Salmonella typhimurium*은 TA98, TA100등 공서균주는 히스티딘 요구성이 강

한 돌연변이 균주로서 화학물질들의 변이 유발물질(mutagen)에 쉽게 복귀돌연변이(revertant mutation)되어 히스티딘 요구성이 상실되는 것으로 표준화 된것이다. 이 균주중 TA98, TA1537, TA1538은 frame shift돌연변이성이며 TA100과 TA1535는 one point돌연변이가 쉽게 유도되는 균주이다. 이들 균주의 특성은 histidine mutation은 물론 mutagen에 대한 예민성을 증가시키는 두개의 mutation을 가한 것으로 첫째는 excision repair system의 손실을 일으켰고 둘째는 박테리아표면의 lipopolysaccharide벽을 없애고, mutagen의 침투를 도와 더욱 예민하게 된 것이다.특히 TA100과 TA 98은 resistence transfer factor plasmid pKM101(R－factor plasmid)을 첨가하여 전에는 변이원성으로 검사되지 않은 화학물질이 새로운 발암물질로 검사가 가능하게 되었다.[3,5] 이 pKM101 plasmid를 가진 균주는 약한 변이원도 상당히 예민하므로 매우 유효한 것이라 하겠다.

본 연구에서는 생약식물로 많이 쓰이는 작약, 황기, 당귀, 지황, 천궁, 계피등과 인삼추출액의 변이원성을 비교 조사하였다. 이 결과를 총괄해 고찰하면 대사활성을 거치지 않을 경우 대체적으로 고농도(낮은 희석배율)에서 높은 변이원성을 나타냈고, 특히 작약, 당귀, 및 천궁은 현저하게 복귀돌연변이한 colony가 많이 형성되었으므로 고농도의 추출액을 직접 복용하거나 접촉하는 것은 그 유해성을 고려해 보아야 할것이다.

또 이와 같은 결과는 다른 합성물질[9-15]이나 환경 오염물질[16]의 변이원성에 비하여 못지 않은 큰 값을 나타내었으므로 생약성분의 발암성 여부를 재검토할 필요가 있다고 판단되었다.

대사활성을 거칠경우 대부분이 대사활성을 거치지 않을때 보다 낮은 변이를 나타내었지만 그 변이는 무시할 수 없었으므로 이러한 생약추출물을 사용한 드링크제를 일상 복용하는 것은 재검토 되어야 할것으로 보였다.

그러나 인삼의 경우에는 대사활성을 거치지 않는 경우에도 낮은 변이를 보였을 뿐 아니라 간장효소계에 의한 대사활성을 거친 경우에는 다른 생약제와 비교하여 매우 낮은 변이를 나타내었으므로 변이원성을 인정할 수 없었다.

V. 요 약

Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 TA1538 균주를 이용하여 Ames법으로 작약, 황기, 당귀, 지황, 천궁, 계피 및 인삼의 추출물의 변이원성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 쥐의 간 대사계(S－9 mix대사라 함)를 거치지 않는 경우 작약, 황기, 당귀, 지황, 천궁, 계피 및 인삼의 추출액 모두 균주 TA98, TA100, TA1535, TA1537에 대하여 저농도에서도 높은 변이원성을 나타내었다.

2. S－9 mix대사를 거친 작약, 당귀 및 천궁은 S－9 mix대사를 거치지 않을때 보다 변이원성이 현저하게 감소되었지만 상당한 변이원성을 인정할 수 있었다.

3. 인삼은 S－9 mix대사를 거친 경우 다른 생약재에 비하여 현저히 낮은 변이율을보여 변이원성을 인정하기 어려웠다.

REFERENCES

1. Wassom, J.S.: *Mutation & Toxicology,* **7,** 4, (1979).
2. Ames, B.N., J. Mecann, and E. Yamasaki; *Mutation Res.,* **31,** 347, (1975).
3. Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki and F.D. Lee: *Proc. Natl. Acad. Sci.,* (U.S.A.) **70,** 2281, (1973).
4. Mortelmans, K.E.; *Journal of Food Protection,* **41,** 989, (1978).
5. Skopek, T.R., H.L. Liber, D.A. Kaden, and W.G. Thilly; *Proc. Natl. Acad Sci.* (U.S.A.), **75,** 4465, (1973).
6. Williams, G.M.: Further improvements in the hepatocyte primary culture DNA repair test for carcinogens: Dection of carcinogenic. (1978)
7. Williams, G.M., M.F. Laspia: *Cancer Letters,* **6,** 199, (1979).
8. Mccann, J., N.E. Spingarn, J. Kobori, Band B.N. Ame; *Proc. Natl. Acad. Sci.* (U.S.A.), **72,** 979, (1975).
9. Mccan, J., B.N. Ames: *Proc. Natl. Acad. Sci.* (U.S.A.), **73,** 950, (1976).
10. 上野芳雄 ; Micotoxin의 검색과 問題點 日食衛誌, **21,** 5, 339, (1980).
11. 斉藤和夫 外; 市販 cheese mycotoxin. 日食衛誌, **21,** 6, 472, (1980).
12. 李善宙, 李容柱; 生藥學, 東明社, **14** (1), 67 (1982).
13. 太田敏博(譯) :*Mutation & Toxicology,* **7,** 90-100, (1979).
14. Lennett, E.H., E.H. Spaulding, and J.P. Traunt; Manual of Clinical Microbiology, Ac. p. 993 (1975).
15. De FLORA, S.: Academic Press. *Mutation Res.,* **82,** 213, (1981).
16. Epstein, S.S.: *Cancer.,* **34,** 2425, (1974).
17. Ames, B.N.: *Federation Proc.,* **36,** 1630, (1977).
18. 李春寧 · 安鶴洙 : 韓國植物名鑑, 范學社 (1965).
19. 鄭鎬權 · 金泰雲 : 한국식품학회지 **14**(1), 67, (1974).
20. Meites, L., Handbook of Analytical Chemistry. 11, (1980).