

## 청목향 *Aristolochiae radix*에 있어 F344 랫드의 독성

김충용 · 김용범 · 양병철 · 이종화 · 정문구 · 양기화<sup>1</sup> · 장동덕<sup>1</sup> · 한상섭\* · 강부현

한국화학연구원 부설 안전성평가연구소

<sup>1</sup>국립독성연구원

(게재승인: 2004년 11월 21일)

### Toxicity of *Aristolochiae radix* in F344 rats

Choong-Yong Kim, Yong-Bum Kim, Byung-Chul Yang, Jong-Hwa Lee, Moon-Koo Chung,  
Ki-Hwa Yang<sup>1</sup>, Dong-Deuk Jang<sup>1</sup>, Sang-Seop Han\*, Boo-Hyon Kang

Toxicology Division, Korea Institute of Toxicology, Daejeon 305-600, Korea

<sup>1</sup>National Institute of Toxicology Research, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

(Accepted: November 21, 2004)

**Abstract** : 13-week orally repeated dose toxicity was investigated to ascertain the toxic effects of *Aristolochiae radix* in F344 rats at dose levels of 0, 1 (0.003 AA, aristolochic acid, mg/kg), 5 (0.014 AA mg/kg), 25 (0.068 AA mg/kg), 125 (0.34 AA mg/kg), and 500 mg/kg (AA 1.36 mg/kg). No mortalities were found in any of the dose groups including vehicle control groups of both sexes during the study period. Hematologic and serum biochemical examinations revealed no changes related to the test item in any of the dose groups of both sexes. However, gross findings at necropsy implicated thickening of the stomach wall. In histopathological examinations, prominent findings related to the test item treatment were observed in the stomach and urinary bladder. There were squamous cell papilloma, squamous cell hyperplasia, ulceration and erosion observed in the non-glandular stomach. Squamous cell hyperplasia was observed at dose levels of more than 125 mg/kg in both sexes and squamous cell papilloma was observed at dose level of 500 mg/kg in both sexes. The incidence and severity of these proliferating lesions including squamous cell hyperplasia and squamous cell papilloma increased with dose dependency. Transitional cell hyperplasia was also observed in the urinary bladder at dose levels of more than 25 mg/kg in both sexes and the incidence and severity of the lesion increased with dose dependency. In conclusion, the toxic changes related to the test item treatment were observed in the stomach and urinary bladder, and the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) was estimated to be 5 mg/kg/day for both males and females in F344 rats.

**Key words** : *Aristolochiae radix*, aristolochic acid, stomach, urinary bladder, F344 rats

### 서 론

생약 및 한약제제에는 천연물에서 유래하는 의약품으로서 일반적으로 그 독성이나 부작용이 합성의약품과 달리 경미하거나 거의 없는 것으로 알려져 있다. 그러나 최근 생약(한약)제제의 부작용 사례가 보고되기 시작하

면서 그 인식이 조금씩 바뀌고 있다. 그 대표적인 예가 중국산 방기인 광방기에서 나타난 신장독성이다. 벨기에에서 처음으로 광방기에 함유된 AA(aristolochic acid, AA)에 심각한 발암성 및 신장독성이 보고되면서 유럽 등 구미 각국에서는 AA을 함유하는 한약재의 수출금지 조치가 내려지고 있다 [1, 6]. 또한 *Aristolochia fanchi*(A.

본 연구는 2003년도 KNTP 과제지원에 의하여 이루어짐(과제번호: 03-D-09)

\*Corresponding author: Sang-Seop Han

Korea Institute of Toxicology, Daejeon 305-600, Korea

[Tel: +82-42-610-8002, Fax: +81-42-610-8100, E-mail: sshan@kitox.re.kr]

*fanchi*)라는 중국산 생약제를 함유한 체중감량제를 장기 복용한 젊은 여성들에게서 신장 기능이상, 신장암 및 방광암 발생이 보고 [5, 10]되었고, *A. fanchi* 성분 중 강력한 발암물질인 AA가 원인물질임이 보고되었고, 발암과정에 있어 AA가 효소작용에 의해 환원된 후 DNA와 covalent binding과의 관련성이 보고되었다 [3].

국내에서는 AA를 함유하는 쥐방울덩굴(Aristolochiaceae)이 열매와 뿌리를 약재로 쓰이는데, 열매인 마두령(*Aristolochiae fructus*)은 해수, 가래, 천식, 치질에 사용하고 혈압을 내리는 효과가 있으며, 뿌리인 청목향(*Aristolochiae radix*)은 장염·이질·중기·복부팽만에 사용하고 혈압을 내리는 효과가 있어 특히 널리 사용되어온 생약제이다. 한편, 국내에 있어 쥐방울덩굴은 제주를 제외한 전 지역에서 생산된 쥐방울덩굴(*Aristolochia concorta*)이 유통되고 있으나 최근 중국산 쥐방울덩굴(*Aristolochia debilis*)도 수입되어 함께 유통되고 있어 한약재가 구분별 하게 사용되는 가능성이 대두되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 국내산 쥐방울덩굴(*Aristolochia concorta*)에 있어서 청목향을 13주간 반복 투여하여 그 독성에 대한 정보를 파악하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시험동물 및 사육환경

4주령 암수 특정병원체부재(SPF) F344 랫드를 Japan SLC, Inc.에서 암수 144마리씩 구입하여 11일간의 순화기간을 거친 후 암수 랫드 각기 120마리씩 사용하였다. 투여시 수컷 체중은 112.2~135.0 g이었으며, 암컷 체중은 95.1~117.1 g이었다. 본 시험은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 환기횟수 10~20회/hr., 조명시간 12 hr(08:00 점등~20:00 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 안전성시험 연구동에서 실시하였다.

### 시험물질

#### (1) 시험물질의 추출

생약규격집의 규격에 적합한 청목향(*Aristolochia concorta*의 뿌리)를 강원도 양구군 대암산 일대에서 채취한 것으로 경희대학교 한약학과에서 국내산으로 감별 확인 후 시험에 사용하였다. 청목향 25 kg을 10배량의 물을 넣고 3시간 동안 환류추출 하였다. 여과한 추출액을 50 L 정도로 감압농축한 후 5.8 kg으로 동결건조시켰다. 동결 건조된 청목향 추출물 10 mg 정도를 정확히 달아 MeOH-H<sub>2</sub>O(3:1) 용액을 가해 10 mg/ml로 맞춘 후

20분 동안 초음파로 추출하였다. 추출액을 여과(0.45 μm membrane filter) 하여 검액으로 하였다.

#### (2) 추출 건조물의 분석조건

Aristolochic acid I 및 II의 분석은 일본약국방 제 14개정에 명시된 방법으로 분석하였다. 고정상은 Bondapak TM C18 column(3.9 300 mm; Waters, USA)을, 이동상은 0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2 ml/L)CH<sub>3</sub>CN(V/V, 55:45) 용액을, 유속은 1 ml/min, 온도는 35°C로 하여 UV 400 nm에서 검출하였다.

### 시험군 구성 및 용량설정

#### (1) 시험군 구성 및 투여

시험군은 1(0.003 AA mg/kg), 5(0.014 AA mg/kg), 25(0.068 AA mg/kg), 125(0.34 AA mg/kg), 500 mg/kg(AA 1.36 mg/kg)의 투여군 및 부형제대조군 총 6개군으로서 각 군당 암수 20마리씩으로 구성되며, sacrifice시키는 시기에 따라 21일째 special study 및 최종 core study에 각 군당 암수 랫드 10마리씩으로 구성하였다. 또한 투여는 1일 1회씩 주 5회로 주중에만 체중 kg당 10 ml로 13주간 반복 투여하였다.

#### (2) 용량설정

랫드를 이용한 청목향의 예비독성시험은 0, 31.3, 125, 500, 2,000 및 5,000 mg/kg 용량으로 2주간 반복 경구투여 독성시험을 수행한 결과, 투여 직후의 유언 및 일시적 하복부 오염이 관찰되었으며, 체중 및 사료섭취량은 최고농도용량에서만 감소경향이 관찰되었다. 또한 부검 소견 결과, 2,000 mg/kg 이상의 투여군에서 위의 비후 및 수컷 5,000 mg/kg 투여군에서 전립선위축, 정낭위축 및 고환위축 등이 관찰되었고 조직병리학적 소견으로 500 mg/kg 이상의 투여군에서 위의 편평상피세포 과형성, 궤양 및 점막하 염증이 관찰되었고, 최고농도군에서 선위의 점막위축이 관찰되었다. 따라서 본 시험에서의 최고용량을 500 mg/kg으로 설정하였다.

### 시험수행

#### (1) 일반검사

일반증상 관찰은 1일 2회 실시하였고, 체중은 투여개시 전, 투여개시 후 7일까지는 매일 1회, 7일 후부터는 주 1회씩 및 부검일에 체중을 측정하였다. 사료 및 물 섭취량 측정은 투여개시일과 투여개시 후 주 1회씩 측정일에 사육 상자별로 정량을 급여하고 익일에 잔량을 측정하여 1일간의 섭취량을 계산하며, 개체당 일일 평균 섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다.

안 검사는 투여개시 전에는 모든 동물에 대하여 눈의

외관을 검사하고, 투여 후에는 부형제대조군 및 투여군의 전례에 관해서 부검 1주일 이내에 눈의 외관을 육안적으로 관찰한 다음 양안 간접안저검사기(IO-H)를 이용하여 안저를 관찰하였다.

노 검사는 부검 전 1주일 이내에 부형제대조군 및 투여군의 암수 랫드 각각 5례에 대하여 17시간의 노(16:00~익일 아침 09:00)를 채취하여 노량을 측정하고, 검사 당일의 신선노를 이용하여 비중, 색조, 정성검사 및 침사 검사를 실시하였다.

#### (2) 혈액학적 및 혈액생화학적 검사

계획 도살되는 모든 동물에 대하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 동물을 CO<sub>2</sub> 경마취하에 안와정맥총으로부터 채혈하였고 혈액응고방지제로서는 EDTA-2K를 이용하였다. 혈구자동계측장치(ADVIA 120; Bayer, USA)를 이용하여 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 헤모글로빈 농도(hemoglobin), 헤마토크리트(hematocrit), 평균적혈구 용적(MCV), 평균 헤모글로빈량(MCH), 평균헤모글로빈 농도(MCHC), 혈소판(platelet), 망상적혈구수(reticulocyte)를 측정하였으며 백혈구 감별계산으로 호중구(neutrophil), 림프구(lymphocyte), 단구(monocyte), 호산구(eosinophil), 호염기구(basophil) 등을 측정하였다. 혈액생화학적 검사는 안와정맥총으로부터 채혈된 혈액을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청에서 자동혈액화학 분석기(644 Na/K/Cl Analyzer, Ciba-Corning, USA)를 이용하여 alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, urea nitrogen, creatinine, total protein, albumin, creatine kinase, total bilirubin을 측정하였다.

#### (3) 성주기 및 정자검사

암컷 랫드 중 부형제대조군, 125 및 500 mg/kg 투여군의 각 군당 10마리의 동물에 대하여 시험물질의 투여 종료 전 2주간 질도말검사를 실시한 후 성주기의 규칙성과 기간을 조사하였다. 계획도살일에 수컷 랫드의 부형제대조군, 125 및 500 mg/kg 투여군의 각 군당 10마리의 동물에 대하여 고환의 정자두부수와 그리고 부고환의 정자수 및 정자운동성, 그리고 형태학적 이상 유무를 조사하였다.

#### (4) 부검 및 장기중량측정

계획도살 시까지 생존한 모든 동물에 대하여 부검 후 육안적 이상유무를 관찰한 다음, 뇌, 뇌하수체, 간, 비장, 심장, 흉선, 폐, 타액선, 췌장, 전립선, 신장, 부신, 갑상선, 고환, 부고환, 난소, 및 자궁의 절대장기 중량을 전자저울(Sartorius, Germany)을 이용하여 측정하였다.

#### (5) 조직병리학적 검사

모든 동물에 대하여 육안적 이상 병변, 피부(유선포함), 비장, 췌장, 공장, 위, 십이지장, 회장, 맹장, 결장, 장림프절, 타액선, 하악림프절, 난소, 자궁, 질, 방광, 고환, 부고환, 전립선, 정낭, 직장, 신장, 부신, 간장, 흉골, 흉선, 심장, 폐, 기관, 식도, 갑상선(부갑상선 포함), 혀, 대동맥, 좌골신경, 골격근, 대퇴골, 흉척수, 하더신, 뇌, 뇌하수체, 안구, 하더리안선, 비강, 인두, 후두, 음핵선, 포피선을 적출하여 10% 중성완충 포르말린액에 고정시켰으며 이중에서 고환 및 부고환은 Bouin 액에, 안구는 Davidson액에 고정하였다. 고정된 조직장기는 조직처리과정에 따라 처리한 후, 파라핀 포매, 3-5  $\mu$ m 두께로 박절, 그리고 hematoxylin & eosin(H&E) 염색하여 광학현미경으로 병리조직학적 관찰을 실시하였다.

#### (6) 통계학적 방법

얻어진 자료에 대한 통계분석은 다중비교검정법을 실시하였다. 검사항목에 대해 Bartlett 법으로 등분산 검정을 실시하여 유의성이 인정되지 않을 경우에는 일원배치분산분석(ANOVA)을 유의수준  $\alpha=0.05$ 로 검정하였다. 검정결과 유의성이 인정된 경우에만 유의한 결과가 부형제대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 다중비교법인 Dunnett test를 실시하였다.

## 결 과

#### Aristolochic acid 정량분석

청목향 3종류의 검액(1, 2, 3)에 대한 HPLC 분석 결과, 청목향 추출물 (1), (2), (3)에는 retention time(tR)이 15.1 min 정도인 AA I이 각각 21.9, 23.4, 21.7 g/ml 함유되어 있는 것으로 나타났으며, AA II(tR 12.2 min)는 각각 4.8, 5.0, 4.8  $\mu$ g/ml 함유되어 있는 것으로 나타났다. 즉, 동결건조된 추출물 중에는 AA I이 약 0.223%, AA II는 약 0.049% 함유되어 전체 0.272%가 있는 것으로 나타났다. 따라서, 2.72  $\mu$ g AA/mg 동결건조물을 함유하였다.

#### 체중변화 및 기초검사에 대한 영향

체중측정 결과(Fig. 1), 물 섭취량 및 사료섭취량 측정 결과, 안검사 결과, 노검사 결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다. 또한 시험기간 동안 시험물질 투여후 일반증상은 암수 랫드 500 mg/kg 투여군에서 유연이 수컷 랫드의 75% 및 암컷 랫드의 60%가 관찰되었다(Table 2).

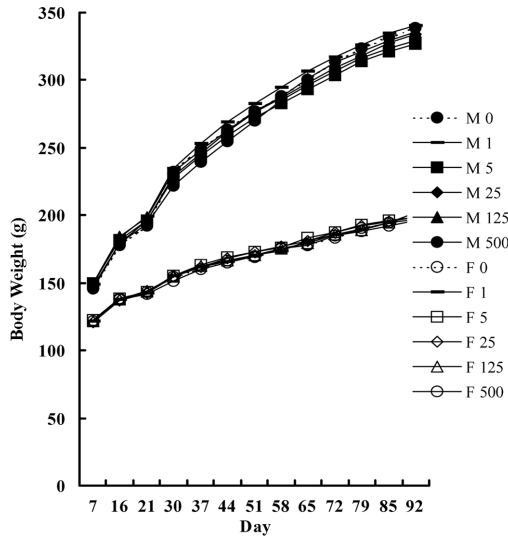


Fig. 1. Body weight of male and female rats treated with *Aristolochiae radix* for 13 weeks.

#### 장기중량 및 부검에 대한 영향

수컷 랫드 500 mg/kg 투여군에서 고환(testis)의 절대중량이 부형제대조군의 결과에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다(Table 1). 수컷 랫드 125 및 500 mg/kg 투여군 그리고 암컷 랫드 500 mg/kg 투여군에서 위의 비후가 관찰되었다.

#### 혈액학 및 혈액생화학 지표에 대한 영향

혈액학적 검사결과(Table 4), 암컷 랫드 5 및 25 mg/kg 투여군에서 혈소판수 및 혈소판용적치(Plateletcrit, PCT)가 부형제대조군의 결과에 비해 유의성 있게 감소하였다. 백혈구감별계산 결과, 암컷 랫드 500 mg/kg 투여군에서 부형제대조군의 결과에 비해 호염구(basophils)율이 유의성 있게 증가하였다. 수컷 500 mg/kg 투여군에서 부형제대조군의 결과에 비해 호산구(eosinophil)율이 유의성 있게 감소하였다. 혈액생화학적 검사 결과(Table 5), 암수 랫드 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련하여 통계학적으로 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

Table 1. Absolute organ weights of rats treated with *Aristolochiae radix*

	Dose (mg/kg/day)					
	0	1	5	25	125	500
<b>Male</b>						
Brain	1.87±0.044	1.84±0.064	1.86±0.074	1.90±0.039	1.87±0.025	1.89±0.024
Pituitary gland <sup>a</sup>	9±1.4	8±1.4	8±1.4	9±1.5	8±1.2	9±1.1
Liver	9.15±0.774	9.15±0.839	8.63±0.530	8.88±0.624	8.93±0.864	9.21±0.588
Spleen	0.62±0.056	0.65±0.058	0.60±0.003	0.63±0.04	0.66±0.102	0.63±0.063
Heart	0.98±0.116	1.00±0.068	0.93±0.089	0.94±0.076	0.97±0.080	0.900±0.077
Thymus	0.26±0.037	0.25±0.057	0.23±0.044	0.28±0.035	0.26±0.042	0.25±0.035
Lungs	1.43±0.161	1.54±0.306	1.48±0.123	1.52±0.229	1.56±0.259	1.42±0.140
Salivary gland	0.51±0.021	0.52±0.039	0.49±0.050	0.53±0.033	0.50±0.024	0.52±0.040
Seminal vesicle	0.72±0.129	0.68±0.119	0.70±0.163	0.77±0.120	0.73±0.132	0.670±0.150
Prostate	0.28±0.068	0.22±0.075	0.24±0.067	0.28±0.043	0.24±0.033	0.24±0.062
Kidneys	1.93±0.101	2.00±0.127	1.89±0.128	1.95±0.122	1.95±0.110	1.97±0.134
Adrenal gland <sup>a</sup>	53±4.0	54±5.5	50±4.4	53±5.0	52±4.0	49±4.1
Thyroid gland <sup>a</sup>	17±3.0	16±3.0	16±3.7	17±2.8	17±2.4	16±3.8
Testes	2.89±0.095	2.97±0.131	2.95±0.078	2.94±0.095	3.00±0.118	3.05±0.103*
Epididymis	0.93±0.035	0.95±0.039	0.95±0.046	0.97±0.054	0.95±0.038	0.94±0.037
<b>Female</b>						
Brain	1.75±0.044	1.76±0.038	1.75±0.030	1.75±0.057	1.74±0.048	1.74±0.031
Pituitary gland <sup>a</sup>	11±1.6	13±2.4	12±1.6	12±2.0	11±2.9	12±2.9
Liver	4.80±0.467	4.85±0.264	4.66±0.364	4.66±0.264	4.87±0.316	4.94±0.423
Spleen	0.41±0.027	0.39±0.034	0.41±0.040	0.42±0.039	0.42±0.023	0.41±0.042
Heart	0.63±0.048	0.65±0.055	0.64±0.076	0.63±0.031	0.61±0.027	0.64±0.048
Thymus	0.22±0.022	0.22±0.017	0.21±0.025	0.21±0.026	0.21±0.011	0.20±0.020
Lungs	0.98±0.108	1.01±0.080	0.99±0.096	1.05±0.138	1.03±0.110	1.00±0.101
Salivary gland	0.36±0.018	0.36±0.025	0.36±0.025	0.36±0.020	0.36±0.031	0.36±0.048
Ovaries <sup>a</sup>	61±14.1	57±4.4	59±3.5	55±5.6	58±8.9	61±9.5
Kidneys	1.20±0.032	1.22±0.067	1.23±0.060	1.22±0.069	1.23±0.065	1.24±0.110
Adrenal gland <sup>a</sup>	57±3.2	57±3.6	53±2.9	55±5.9	55±5.3	56±7.1
Thyroid gland <sup>a</sup>	12±2.0	13±2.3	12±2.8	11±1.5	12±1.8	11±1.6
Uterus	0.31±0.047	0.36±0.060	0.33±0.082	0.33±0.061	0.35±0.099	0.34±0.059

- Each value represents mean±SD(n=10). <sup>a</sup>The unit of organs is milligram.

**Table 2.** Clinical findings of rats treated with *Aristolochiae radix*

	Dose (mg/kg/day)											
	0		1		5		25		125		500	
<b>Male</b>												
Normal	20 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	20	100	20	100	20	100	20	100	20	100
Loss of Fur	1	5	1	5	1	5	0	0	0	0	0	5
Anemic	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0
Periocular nodule	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0
Bite wound	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0
Scratched wound	0	0	1	5	0	0	2	10	0	0	1	5
Lacrimation	1	5	2	10	1	5	2	10	2	10	2	10
Eye discharge	1	5	3	15	2	10	3	15	3	15	3	15
Nasal discharge	1	5	2	10	0	0	3	15	1	5	2	10
Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	75
Gingival bleeding	0	0	0	0	0	0	1	5	1	0	0	0
<b>Female</b>												
Normal	20	100	20	100	20	100	20	100	20	100	20	100
Loss of Fur	0	5	3	15	0	0	3	15	3	15	0	5
Scratched wound	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	5
Lacrimation	3	15	1	5	1	5	2	10	2	10	2	10
Eye discharge	2	10	1	5	1	5	5	25	1	5	4	20
Nasal discharge	2	10	1	5	1	5	3	15	1	5	1	5
Salivation	0	0	2	10	2	10	2	10	2	10	12	60

- Each value represents mean±SD (n=10). <sup>a</sup>No. of animals affected, <sup>b</sup>Percent of animals with observation during interval

**Table 3.** Sex function in male and female treated with *Aristolochiae radix*

	Dose (mg/kg/day)		
	0	125	500
<b>Male</b>			
No. of male examine	10	10	10
Sperm head count (x 10 <sup>6</sup> /testis)	214.6±29.47	212.9±23.72	221.3±25.25
Sperm count (x 10 <sup>6</sup> /epididymis)	147.4±21.19	143.6±26.83	151.0±21.14
Sperm motility(%)	81.0±8.50	81.2±9.24	84.8±6.01
Sperm abnormality(%)	7.8±2.25	6.7±2.60	6.4±2.16
Small head	31	25	28
Amorphous head	0	0	2
Excessive hook	6	2	5
Blunt hook	68	77	52
Folded tail	0	2	20
Short tail	0	1	1
Two tail	0	0	0
No tail	19	26	18
<b>Female</b>			
No. of female examined	10	10	10
Length (days)	4.6±0.33	4.9±0.41	4.9±0.35
Regularity			
Regular	8 (80)	7 (70)	8 (80)
Irregular	2 (20)	3 (30)	2 (20)

- Each value represents mean±SD (n=10).

**성주기 및 정자에 대한 영향**

성주기의 기간은 암컷 랫드의 125와 500 mg/kg 투여군에서 부형제대조군과 비교할 때 통계학적으로 유의성을 나타내지 않았다(Table 3). 정자검사 결과, 고환내의 정자두부수, 부고환내의 정자수, 부고환 정자의 운동성에 있어 수컷 랫드 125 및 500 mg/kg 투여군은 부형제대조군의 결과에 비교할 때 유의성이 인정되지 않았다(Table 3). 또한 정자의 형태학적 이상을 관찰한 결과, 소두부(small head), 비정형두부(amorphous head), 이중두부(two head), 두부각도과다(excessive hook), 두부각도과소(blunt hook), 미부접합(folded tail), 미부단소(short tail), 이중미부(two tails) 및 미부탈락(no tail) 등의 기형정자가 부형제대조군, 125 및 500 mg/kg의 순으로 각각 7.8, 6.7 및 6.4%의 빈도로 관찰되었으나 시험물질의 영향은 인정되지 않았다.

**조직병리학적 변화에 대한 영향**

시험물질 투여와 관련한 이상소견이 Table 6에서 보는 바와 같이 위와 방광에서 관찰되었다. 위의 경우, 암수 모두에서 편평세포유두종(squamous cell papilloma), 편평세포과형성(squamous cell hyperplasia), 궤양(ulceration) 및 미란(erosion)이 위에 국한되어 발생하였다. 이들 병변은 암컷 랫드보다 수컷 랫드에서 심하게 관찰되었다. 편평세포유두종은 수컷 랫드의 500 mg/kg

**Table 4.** Hematological variables in male and female rats treated with *Aristolochiae radix*

	Dose (mg/kg/day)					
	0	1	5	25	125	500
<b>Male</b>						
General hematology						
White blood cells (WBC) ( $10^3/\mu\text{l}$ )	9.87±1.16	9.89±1.66	10.43±1.58	10.56±1.47	9.63±1.34	10.65±1.77
Red blood cells (RBC) ( $10^6/\mu\text{l}$ )	8.99±0.48	9.05±0.32	9.07±0.39	9.06±0.32	8.84±1.27	8.90±0.49
Hemoglobin (g/dl)	15.3±0.7	15.3±0.5	15.3±0.7	15.3±0.5	15.0±1.9	15.2±0.7
Hematocrit (%)	50.2±1.8	50.6±1.5	50.2±1.5	50.3±1.1	49.9±5.4	50.6±2.2
Mean corpuscular volume (fL)	55.9±2.1	56.0±1.3	55.3±1.1	55.5±1.2	56.9±3.1	56.9±1.9
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	17.0±0.3	16.9±0.2	16.9±0.2	16.9±0.2	17.0±0.6	17.1±0.6
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dl)	30.4±0.7	30.1±0.7	30.6±0.6	30.5±0.6	30.0±0.9	30.1±0.6
Platelet ( $10^3/\mu\text{l}$ )	790±41	762±59	772±79	782±45	913±395	859±91
Reticulocyte (%)	2.8±0.3	2.8±0.3	2.7±0.2	2.8±0.2	5.6±8.9	3.5±1.7
WBC differential counts						
Neutrophils (%)	20.4±3.3	20.7±2.8	20.9±2.6	19.7±2.8	19.1±4.3	21.6±3.2
Lymphocytes (%)	72.6±4.0	72.4±2.4	71.9±2.3	73.8±2.5	74.4±4.1	72.4±3.6
Monocytes (%)	3.3±0.9	3.0±0.5	2.8±0.7	2.7±0.5	2.8±0.8	2.6±1.0
Eosinophils (%)	1.0±0.2	1.0±0.2	1.0±0.1	0.9±0.3	0.9±0.2	0.7±0.2*
Basophils (%)	3.4±2.4	4.1±1.6	3.0±1.1	3.1±1.3	3.1±1.6	2.9±1.4
RBC morphologic assessment						
Red distribution width (%)	12.3±0.4	12.5±0.2	12.4±0.2	12.5±0.3	13.7±4.5	13.2±1.8
Platelet morphologic assessment						
Platelet distribution width (%)	86.4±12.1	85.8±13.0	82.1±10.0	86.1±8.3	90.0±12.7	92.0±9.10
Mean platelet volume (fL)	8.8±2.8	9.5±4.1	8.0±1.6	8.2±1.5	8.8±2.0	8.5±1.6
Plateletcrit (%)	0.70±0.23	0.68±0.19	0.63±0.18	0.64±0.13	0.81±0.45	0.74±0.16
<b>Female</b>						
General hematology						
White blood cells ( $10^3/\mu\text{l}$ )	7.85±1.07	7.78±2.56	8.52±2.13	8.10±1.32	9.02±1.30	8.48±1.18
Red blood cells ( $10^6/\mu\text{l}$ )	8.52±0.36	8.45±0.55	8.56±0.40	8.62±0.25	8.57±0.33	8.47±0.31
Hemoglobin (g/dl)	15.5±0.6	15.3±0.1	15.5±0.7	15.7±0.5	15.5±0.6	15.5±0.6
Hematocrit (%)	50.2±2.5	50.2±2.2	50.0±2.1	49.7±2.0	49.9±1.5	49.6±1.4
Mean corpuscular volume (fL)	58.9±1.1	59.4±1.9	58.4±1.0	57.6±2.1	58.3±0.8	58.6±0.8
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	18.2±0.2	18.1±0.2	18.2±0.2	18.2±0.3	18.2±0.1	18.3±0.1
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dl)	30.9±0.6	30.5±0.9	31.1±0.5	31.6±1.3	31.1±0.3	31.2±0.4
Platelet ( $10^3/\mu\text{l}$ )	880±43	862±52	808±37*	790±31*	876±63	827±45
Reticulocyte (%)	2.7±0.4	2.4±0.2	2.2±0.2	2.3±0.1	2.7±0.5	2.6±0.5
WBC differential counts						
Neutrophils (%)	15.1±4.0	15.6±4.7	17.3±6.3	15.8±3.1	15.7±3.7	17.9±4.5
Lymphocytes (%)	78.3±3.6	78.3±5.8	76.2±6.8	77.7±4.0	78.5±3.3	75.2±4.6
Monocytes (%)	4.4±1.1	3.9±1.3	4.0±1.3	3.9±0.7	3.7±0.7	4.3±0.7
Eosinophils (%)	1.0±0.2	1.3±0.5	1.2±0.4	1.3±0.3	1.2±0.4	1.1±0.3
Basophils (%)	0.4±0.24	0.3±0.1	0.5±0.3	0.5±0.2	0.5±0.2	0.7±0.3*
RBC morphologic assessment						
Red distribution width (%)	11.0±0.1	10.8±0.1	10.9±0.1	10.8±0.1	10.9±0.2	10.9±0.2
Platelet morphologic assessment						
Platelet distribution width (%)	73.9±6.6	79.8±14.4	74.1±8.0	70.3±10.9	71.3±6.5	73.1±8.9
Mean platelet volume (fL)	7.4±0.5	7.7±0.9	7.3±0.3	7.3±0.5	7.3±0.3	7.3±0.4
Plateletcrit (%)	0.66±0.26	0.66±0.10	0.59±0.03*	0.58±0.05*	0.64±0.07	0.60±0.05

- Each value represents mean±SD (n = 10).

\*Significant difference from vehicle control group (p < 0.01)

투여군에서 4레와 암컷 랫드의 500 mg/kg 투여군에서 3레가 관찰되었다. 편평세포과형성은 수컷 랫드의 125 mg/kg 투여군에서 3레와 암컷 랫드의 500 mg/kg 투여

군에서 6레가 관찰되었고 암컷 랫드의 125 mg/kg 투여군에서 1레와 암컷 랫드의 500 mg/kg 투여군에서 5레가 관찰되었다. 웨양과 미란은 수컷 랫드의 500 mg/kg

**Table 5.** Serum biochemical variables in male and female rats treated with *Aristolochiae radix*

	Dose (mg/kg/day)					
	0	1	5	25	125	500
<b>Male</b>						
ALT (IU/l)	53.3±5.9	51.9±12.1	51.2±12.1	51.0±10.6	50.2±6.8	51.5±3.9
ALP (IU/l)	548±63	561±79	538±60	557±73	530±102	498±58
BUN (mg/dl)	17.2±2.2	36.3±2.2	16.3±2.6	16.4±2.3	16.2±3.6	16.1±2.2
CREA (mg/dl)	0.52±0.09	0.55±0.09	0.54±0.08	0.47±0.10	0.49±0.04	0.50±0.06
TP (g/dl)	7.58±0.27	7.47±0.45	7.48±0.32	7.54±0.33	7.64±0.33	7.46±0.32
ALB (g/dl)	4.70±0.12	4.70±0.16	4.69±0.11	4.70±0.14	4.74±0.11	4.71±0.11
CK (IU/l)	331±123	281±126	234±58	264±74	257±56	246±55
Total bilirubin (mg/dl)	0.117±0.008	0.120±0.010	0.114±0.014	0.119±0.017	0.116±0.014	0.109±0.012
<b>Female</b>						
ALT (IU/l)	50.2±13.6	56.9±19.3	44.5±2.4	46.0±8.2	43.1±5.2	50.1±13.3
ALP (IU/l)	530±52	482±86	497±63	492±48	543±568	483±69
BUN (mg/dl)	18.8±1.8	19.5±1.2	19.3±2.1	19.3±3.0	18.6±1.9	21.8±3.4
CREA (mg/dl)	0.51±0.25	0.52±0.06	0.49±0.06	0.49±0.03	0.48±0.04	0.50±0.07
TP (g/dl)	7.12±0.23	7.14±0.22	7.02±0.14	7.06±0.20	7.00±0.29	6.89±0.23
ALB (g/dl)	4.56±0.07	4.59±0.12	4.56±0.06	4.57±0.09	4.51±0.13	4.52±0.12
CK (IU/l)	296±93	245±80	196±56	208±45	246±51	233±91
Total bilirubin (mg/dl)	0.095±0.007	0.098±0.012	0.094±0.010	0.095±0.012	0.095±0.012	0.088±0.008

-Each value represents mean±SD (n=10).

-ALT (alanine aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase), BUN (urea nitrogen), CREA (creatinine), TP (total protein), ALB (albumin), CK (creatin kinase).

**Table 6.** Histopathological findings in male and female rats treated with *Aristolochiae radix*

	Male (mg/kg/day)						Female (mg/kg/day)					
	0	1	5	25	125	500	0	1	5	25	125	500
<b>Kidney</b>												
Tubular basophilia	3	2	4	4	2	6	0	0	0	0	1	1
<b>Urinary bladder</b>												
Transitional cell hyperplasia	0	0	0	4	10	10	0	0	0	5	10	10
<b>Heart</b>												
Mononuclear cell infiltration	0	2	1	1	1	1	0	1	2	0	0	0
<b>Liver</b>												
Mononuclear cell infiltration	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	1
<b>Pancreas</b>												
Lymphoid cell infiltration	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Basophilic foci	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>Haderian gland</b>												
Lymphoid cell infiltration	0	0	1	2	0	1	3	6	5	1	5	2
<b>Spleen</b>												
Extramedullary haemopoiesis	0	1	0	1	2	3	0	0	0	0	0	0
<b>Adrenal gland</b>												
Cortical vacuolation	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<b>Stomach</b>												
Squamous cell hyperplasia	0	0	0	0	3	6	0	0	0	0	1	5
Ulceration	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Squamous cell papilloma	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	3
Erosion	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<b>Femur</b>												
Hyperplasia, bone marrow	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
<b>Sternum</b>												
Hyperplasia, bone marrow	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
<b>Preputial gland</b>												
Lymphoid cell infiltration	3	5	2	6	2	1	0	0	0	0	0	0
Granulomatous inflammation	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<b>Clitoral gland</b>												
Lymphoid cell infiltration	0	0	0	0	0	0	7	5	5	7	3	4
Granulomatous inflammation	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0

투여군에서 각각 1례씩 관찰되었다. 방광의 경우, 암컷과 수컷 모두에서 이행상피세포 과형성(transitional cell hyperplasia)이 관찰되었다. 병변은 수컷 랫드보다 암컷 랫드에서 심하게 관찰되었다. 이행상피세포 과형성은 수컷 랫드의 25 mg/kg 투여군에서 4례, 수컷 랫드의 250 및 500 mg/kg 투여군에서 각각 10례가 관찰되었고 암컷 랫드의 25 mg/kg 투여군에서 5례, 암컷 랫드의 250과 500 mg/kg 투여군에서 각각 10례가 관찰되었다.

## 고 찰

청목향은 1990년대 초 벨기에에서 한방 다이어트 제품(AA 포함) 복용 후, 빈혈 및 단백뇨 등의 신장장애가 보고되었고 그 원인물질로 AA가 보고되었다 [3, 4, 11]. 또한 영국, 벨기에 및 대만 등에서는 AA가 신장암 등 비뇨기계 암을 유발 [4]하는 것으로 밝혀져 사용이 금지되고 있으며, 최근 미국 FDA에서도 AA를 함유하는 어떤 한약식물도 사용이 금지되었다. AA성분을 갖는 쥐방울덩굴(Aristolochiaceae)은 한방에서는 열매와 뿌리를 약재로 쓰는데, 열매인 마두령(*Aristolochiae fructus*)은 해수, 가래, 천식, 치질에 사용하고 혈압을 내리는 효과가 있으며, 뿌리인 청목향(*Aristolochiae radix*)는 장염, 이질, 증기, 복부팽만에 사용하고 혈압을 내리는 효과가 있다.

본 연구에서는 AA성분을 갖는 청목향을 F344 랫드에 1, 5, 25, 125 및 500 mg/kg을 13주간 반복 경구투여하여 시험기간중 일반증상, 사망의 관찰, 체중변화, 사료 및 물섭취량 측정, 안검사, 뇨검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 부검소견 관찰, 성주기 및 정자검사, 장기중량 측정 및 조직병리학적 검사를 실시하였다.

시험결과, 사망률, 안검사, 뇨검사, 체중, 물 섭취량, 사료섭취량 측정, 성주기 및 정자검사에서 본 시험물질의 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

일반증상의 관찰 결과, 유연은 암수 500 mg/kg 투여군에서 높은 빈도로 관찰되었으며, 이는 청목향의 쓰고 매운 맛에서 기인하는 것으로 사료된다. 탈모, 유루, 눈곱 및 비루는 부형제대조군을 비롯한 암수 전 투여군에 걸쳐 공통적으로 관찰된 증상이어서 독성학적으로 의미 없는 것으로 판단된다. 이외 소상, 빈혈상, 교상, 치육출혈 및 눈 주위 결절은 발현빈도가 적고 용량의존성이 관찰되지 않아 독성학적 의미가 없는 것으로 판단된다.

혈액학적 검사 결과, 투여 후 93일째 PLT와 PCT가 암컷 5 mg과 25 mg/kg 투여군에서 통계학적으로 유의성 있게 감소되었지만 용량의존성이 보이지 않아 독성학적

의의가 없는 것으로 생각된다. 또한 본 시험 최고용량인 500 mg/kg(AA 1.36 mg/kg) 용량의 3.7배에 해당하는 5 mg AA/kg 용량의 랫드 연구 [2, 9]에 있어 혈액학 및 혈액생화학적 변화가 통계학적으로 유의성이 관찰되지 않아 본 연구결과와 일치하는 결과를 보여주었다. 또한 백혈구감별계산 결과, 투여 후 3일째, 호염구 율의 증가, 투여 후 수컷 500 mg/kg 투여군에서 호산구의 감소가 관찰되었으나 용량의존성이 보이지 않아 독성학적 의미가 없는 것으로 판단된다.

부검소견 결과, 수컷 125 mg/kg 및 500 mg/kg 투여군, 암컷 500 mg/kg 투여군에서 위의 비후는 조직병리검사에서 관찰된 편평세포유두종과 편평세포과형성에 부합되는 소견으로 시험물질에 의한 영향으로 판단된다.

장기중량측정 결과, 수컷의 500 mg/kg 투여군에서 정소의 절대 중량증가는 비록 통계학적으로 유의성을 나타내지만 조직병리검사에서 주목할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 시험물질 투여로 인한 독성영향은 아닌 것으로 판단된다.

조직병리검사결과, 시험물질투여와 관련한 이상소견이 위와 방광에서 관찰되었다. 위의 경우, 편평세포유두종, 편평세포과형성, 궤양 및 미란이 전위에 국한되어 관찰되었다. 이들 소견은 이전의 보고 [2, 7]와 일치하는 것으로 시험물질의 주요성분 중의 하나인 AA의 영향으로 판단된다. 편평세포과형성은 암수 모두 125 mg/kg 투여군 이상에서 관찰되었고 특히 암수 500 mg/kg 투여군에서는 편평세포 유두종이 관찰되었고 투여 용량에 따른 병변정도의 증가를 보였다. 편평세포의 궤양과 미란은 시험물질의 직접적인 자극에 따른 세포손상의 결과로 판단된다. 방광의 경우, 이행상피세포 과형성이 관찰되었다. 이행상피세포 과형성은 이전의 보고 [8, 9]와 일치하는 것으로 시험물질의 주요성분 중에 하나인 AA 영향으로 판단된다. 그러나 신장에서는 이 변화가 관찰되지 않아 이전 보고와 차이를 나타내었다. 이행상피세포 과형성은 암수 모두에서 25 mg/kg 투여군 이상에서 관찰되었고 투여 용량에 따른 병변정도의 증가를 보였다.

이상의 결과를 정리하면, 청목향은 부검소견에서 수컷 125 및 500 mg/kg 투여군 그리고 암컷 500 mg/kg 투여군에서 위의 비후를 유발하며, 조직병리학적으로 위에 있어 암수 모두 125 및 500 mg/kg 투여군에서 비선위부 편평세포과형성, 암수 500 mg/kg 투여군에서는 편평세포 유두종, 아울러, 수컷 500 mg/kg 투여군에서 편평세포의 궤양과 미란을 유발하였다. 또한 방광에 있어 암수 25 mg/kg 이상 투여군에서 이행상피세포 과형성을 유발하였다.



따라서 본 연구 시험조건에 있어 무해용량(NOEL)은 수컷과 암컷에서 5 mg/kg로 판단된다.

## 사 사

이 연구수행을 위해 기술적인 도움을 주신 이갑수와 차경수선생께 감사드린다.

## 참고문헌

1. 허옥순, 이진하, 김세은, 주인선, 신동우, 이정호, 김지연, 강숙경, 이형규, 백승화, 문병우, 김진수. 유통방기의 화학적 분석. The Annual Report of KFDA 2000, **4**, 111-118.
2. 황명실, 박미선, 문지영, 이지선, 염영나, 이효민, 신동환, 강진석, 윤은경, 최미나, 육미영, 장동덕, 길광섭, 김승희, 양기화. 아리스톨로크산 함유 생약제에 대한 안전성평가연구, The Annual Report of KFDA 2001, **5**, 568-578.
3. Arlt VM, Stiborova M, Schmeiser HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies : a review, Mutagenesis 2002, **17**, 265-277.
4. Cosyns JP. Aristolochic acid and chinese herbs nephropathy. Drug Safety 2003, **26**, 33-48.
5. Graham ML, Rajat T, Terry C, Peter G, Gharies DP. Nephropathy caused by chinese herbs in the UK. Lancet 1999, **354**, 481-482.
6. Hashimoto K, Higuch M, Makino B, Sakakibara I, Komatsu Y, Maruno M, Okada M. Quantitative analysis of aristolochic acids, toxic compounds, contained in some medicinal plants. J Ethnopharmacol 1999, **64**, 185-189.
7. Mengs U, Lang W, Poch JA. The Carcinogenic action of aristolochic acid in rats. Arch Toxicol 1982, **51**, 107-119.
8. Mengs U. On the histopathogenesis of rat forestomach carcinoma caused by aristolochic acid. Arch Toxicol 1983, **52**, 209-220.
9. Mengs U, Stotzem CD. Toxicity of aristolochic acid - a subacute study in male rats. Med Sci Res 1992, **20**, 223-224.
10. Nortier JN, Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, Depierreux MF, Depauw L, Abramowicz D, Vereerstraeten P, Vanherweghem J-L. Urothelial carcinoma associated with the use of a chinese herb (*Aristolochia Fanchi*). New Engl J Med 2000, **342**, 1686-1692.
11. WHO. B. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene(*Aristolochia* species and aristolochic acids), IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2002, **82**, 69-128.