

마우스에서 회양목 추출물의 단회투여독성시험

오정민^{1,2}, 조재훈¹, 김봉희¹, 김상겸^{1,2,*}

¹충남대학교 약학대학,
²충남대학교 형질전환 복제돼지 센터

Single Dose Toxicity Study of *Buxus Microphylla* var. *Koreana* Nakai Extract in Mice

Jung Min Oh^{1,2}, Jaehoon Jo¹, Bong-Hee Kim¹ and Sang Kyum Kim^{1,2,*}

¹College of Pharmacy, ²Research Center for Transgenic Cloned Pigs,
Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

ABSTRACT

The single dose toxicity of *Buxus microphylla* var. *koreana* Nakai was evaluated in ICR mice. Twenty five mice of each sex were randomly assigned to five groups of 5 mice each and were administered singly by gavage at dose of 0, 222, 667, 2,000 and 5,000 mg/kg body weight. After single administration, signs of toxicity were observed every hour for the first 6 hours and every day for 14 days. At the end of 14-day observation period, all animals were sacrificed for gross postmortem examinations. Neither significant toxic signs nor death was observed during the observation period. In addition, no pathological changes were noticed in macroscopic examination at necropsy. These results indicate that the single oral administration of *Buxus microphylla* var. *koreana* Nakai did not cause any toxic effect at the dose of 5,000 mg/kg body weight for both sexes and LD₅₀ of *Buxus microphylla* var. *koreana* Nakai is greater than 5,000 mg/kg body weight.

Key words : single dose toxicity test, *Buxus microphylla*, mice

서 론

한국인의 평균 수명은 1997년 기준으로 남자 70.6세, 여자 78.1세이며 2020년에는 각각 77.5세와 84.1세로 증가할 것으로 예상된다 (통계청, 1999). 평균 수명의 증가와 함께 신경계질환, 심혈관계질환, 대사질환, 암 등과 같은 만성질환의 발생이 건강을 위협하는 중요한 질환으로 부각되고 있

다. 이런 만성질환은 환경적인 요인과 유전적인 요인에 의해 발생하나 직접적인 원인을 규명하는 것은 어렵다. 만성질환의 치료를 위해 다양한 화학요법이 시도되고 있으나 약물을 통한 치료는 약물상호작용 등을 통하여 부작용을 발생시킬 수 있다. 최근에는 건강기능식품을 통하여 만성질환의 발생을 예방 또는 치료하기 위한 노력이 시도되고 있으며 건강기능식품은 환자의 거부감과 부작용이 적은 장점이 있다.

회양목 (*Buxus microphylla* var. *koreana* Nakai)은 상록활엽 관목으로 주로 정원수로 사용되며 진해,

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-42-821-5930, E-mail: sangkim@cnu.ac.kr

진통, 거풍 등의 효능이 있다. 회양목의 steroidal alkaloid인 cyclobuxine은 랫트의 심장적출실험에서 허혈 및 재관류에 의한 심근세포의 손상을 억제하는 것으로 보고되었다(Lee *et al.*, 1993). 회양목 alkaloid의 하나인 cyclovirobuxine D는 심혈관계 및 뇌혈관계 질환의 치료제로 중국에서 광범위하게 사용되고 있다(Grossini *et al.*, 2005). Cyclovirobuxine D의 약리기전은 불분명하나 ECV304 내피세포를 이용한 실험에서 칼슘 이온의 항상성을 유지시키는 것(Grossini *et al.*, 2005)과 돼지의 관상동맥 적출실험에서 nitric oxide의 유리를 증가시키는 것이 중요한 기전으로 제안되었다(Grossini *et al.*, 1999). 회양목의 약리활성에 주목하여 건강기능성 식품의 소재로 개발이 진행되고 있으나 현재까지 회양목의 성분에 대한 안전성평가 자료는 전무하다.

본 연구는 회양목에 대한 안전성평가의 일환으로 단회투여에 의해 발생할 수 있는 급성독성을 평가하기 위해 식품의약품안전청 고시 제1999-61호 의약품 등의 독성 시험 기준(1999년 12월 22일)에 준하여 수행되었다.

재료 및 방법

1. 시험동물

본 시험에서는 중앙실험동물(서울시, 서초구)로부터 입수한 7주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free) ICR 마우스를 사용하였다. 약 1주일간 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 사용하였다. 시험동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조명시간 12시간(08:00~20:00) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 사육환경에서 스테인레스제 망사육상자에 사육상자(27×20×13 cm; 폴리카바메이트)당 5마리 이하로 수용하였으며 고형사료(애그리브랜드퓨리나코리아, 경기도 성남시)와 상수도수를 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다.

2. 시험물질의 추출 및 조제

회양목을 수육상에서 추출한 후 원심분리하여 고형성분을 제거하였다. 추출액을 동결건조하여 분말상태로 만들었으며 추출액의 건조중량은 약

2.4% (w/v)였다. 건조분말을 -20°C 에서 차광 및 밀봉하여 보관한 후 투여직전에 건조분말을 주사용 증류수(중외제약, 서울)에 용해시켜 시험물질을 제조하였다.

3. 단회투여독성시험 설정

암수 각각 25마리의 시험동물을 5마리씩 무작위로 군 분리하고 체중을 측정하였다. 투여 용량은 미국 환경보호청(US environmental protection agency)에서 무해 물질 분류 기준인 5,000 mg/kg을 최고용량으로(EPA, 1998), OECD의 급성독성시험 허용 한계용량인 2,000 mg/kg을 중고용량군으로(OECD, 2000), 667 mg/kg을 중용량군으로, 222 mg/kg을 저용량군으로 설정하였다. 시험물질의 임상적 용을 고려하여 경구로 투여하였으며 투여부피는 20 mL/kg이었다.

4. 일반증상 관찰

투여 당일에는 투여 후 6시간까지 매 시간, 투여 후 1일부터 14일까지는 1일 1회 이상씩 일반상태의 변화, 중독증상의 발현, 사망 동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의하여 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 관찰하였다.

5. 체중측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여 직전과 투여 후 1, 3, 8, 11 및 14일에 체중을 측정하였다.

6. 부검

14일의 시험기간이 끝난 후 생존한 모든 마우스를 ether로 마취시킨 후 치사시켜 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안으로 관찰하였다.

7. 통계처리

본 시험에서 사망동물이 관찰되지 않아 LD₅₀ 값의 산출은 불가능하였다. 몸무게의 변화는 ANOVA test 후 Newman-Keuls multiple comparison test를 실시하였고, 임상증상 및 부검시 이상 장기의 발생 빈도는 multiple chi-square test로 유의성을 검정하였다.

Table 3. Body weight of male and female mice orally treated with a *Buxus microphylla* var. *koreana* Nakai extract

Sex	Dose (mg/kg)	Days after treatment						Net body weight gain (g)
		Day 0	Day 1	Day 3	Day 8	Day 11	Day 14	
Male	0	40.4±1.8 ¹⁾	40.8±1.7	42.1±2.9	42.8±2.2	43.6±2.5	45.0±2.5	4.6±1.3
	222	38.6±1.1	38.8±1.5	39.8±1.4	40.8±1.5	41.9±1.4	43.4±1.3	4.8±0.8
	667	40.0±1.2	39.8±1.7	40.5±2.0	42.7±2.2	43.6±1.9	45.7±2.6	5.7±1.5
	2,000	40.0±1.2	39.8±1.4	40.5±1.9	42.1±2.0	42.0±2.0	44.1±2.3	4.1±1.4
	5,000	40.2±2.2	39.5±2.0	40.9±2.1	42.4±3.4	43.5±2.4	45.2±3.0	5.0±2.6
Female	0	31.4±1.1	31.8±0.9	31.7±0.9	33.0±1.0	33.2±1.8	35.5±0.8	4.1±1.0
	222	31.0±0.7	30.8±2.0	31.1±1.5	33.3±1.5	34.7±1.7	35.5±1.5	4.5±0.9
	667	31.2±0.4	31.9±0.7	33.2±0.8	34.9±0.9	35.6±1.0	36.2±1.1	5.0±1.3
	2,000	32.3±1.7	31.8±2.0	32.9±1.2	34.0±1.2	34.9±0.9	36.6±1.5	4.3±1.1
	5,000	31.2±1.7	30.9±1.7	31.2±1.5	33.2±1.6	33.9±1.5	35.0±1.8	3.8±1.2

¹⁾Mean ± SD (g)

며 또한 그 기간 동안의 체중 증가량에도 유의적인 차이가 관찰되지 않았다 (Table 3).

4. 육안적 부검소견

2주간의 관찰기간 종료 후 전 동물을 도살하여 모든 주요 장기에 대한 육안적 검사를 실시하였다. 암수의 마우스에서 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 병변도 관찰되지 않았다.

고찰 및 결론

본 실험에서는 회양목 추출물의 경구투여시 급성독성을 식품의약품 안전청 고시 제1999-61호 (1999년 12월 22일) “의약품 등의 독성시험기준”에 준하여 암수의 마우스를 이용하여 측정하였다. 최고용량을 5,000 mg/kg body weight으로 하고 2,000, 667, 222 mg/kg 및 0 mg/kg 용량으로 암수의 마우스에 일회투여하고 2주 동안 관찰하였다. 관찰기간 종료 후 최고용량군 (5,000 mg/kg body weight)을 포함한 암수 동물군 모두에서 체중증가는 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았으며 임상적인 이상증상이나 사망 역시 발견되지 않았다. 일부 동물에서 털이 서는 것이 관찰되었으나 정상 대조군에서도 나타났으며 일시적이었다. 따라서 시험물질의 투여와는 상관성이 없는 것으로 사료된다. 또한 2주 후 실시된 모든 생존동물의 대한 해부병리소견에서 시험물질들의 투여에 기인한다고

사료되는 변화는 관찰되지 않았다. 경구투여에 의한 LD₅₀ 값이 5,000 mg/kg 이상일 경우 무해한 물질로 분류하는 미국 환경보호청 (1998)의 기준으로 볼 때 시험물질인 회양목은 급성독성의 측면에서 매우 안전한 물질인 것으로 판단된다.

종합적으로 이 회양목 추출물은 마우스에게 경구로 투여하였을 때 본 실험에서 사용된 지표상에서 의미 있는 독성을 나타내지 않았으며 경구 LD₅₀는 5,000 mg/kg body weight 이상이였다. 따라서 본 실험조건하에서 이 시험물질에 의한 급성독성은 매우 낮았으며 회양목 추출물의 독성을 평가하기 위해서는 반복투여 독성시험이 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 충남대학교 학술연구비의 지원을 받았음.

참고 문헌

- 대한민국 통계청, 평균수명, 1999.
- 식품의약품안전청, 의약품 등의 독성시험기준. 식품의약품 안전청고시 제1999-61호, 1999.
- Grossini E, Avanzi G, Gallicchio M, Molinari C, Vacca G and Bellomo G. Regulation of Ca²⁺ movements by cyclovirobuxine D in ECV304 endothelial cells, Pharmacol Res 2005; 52: 154-161.

- Grossini E, Battaglia A, Brunelleschi S, Mary DA, Molinari C, Viano I and Vacca G. Coronary effects of cyclovi-roboxine D in anesthetized pigs and in isolated porcine coronary arteries, *Life Sci* 1999; 65: PL59-65.
- Lee JH, Kwon JT, Cho BH and Moon CK. Cyclobuxine protects the isolated rat heart from the myocardial injuries produced by ischemia and reperfusion, *Planta Med* 1993; 59: 296-301.
- OECD, Guidelines for the testing of chemicals revised draft guideline 423, acute oral toxicity, 2000.
- US Environmental Protection Agency, Health effects test guidelines OPPTS 870.1100, acute oral toxicity. U.S. Government printing office, Washington, DC, 1998.