J Korean Soc Food Sci Nutr
40(5), 704~711(2011)

한국식품영양과학회지
DOI: 10.3746/jkfn.2011.40.5.704

20 kGy 감마선으로 조사된 겨우살이 냉수 추출물의 90일 반복투여 독성평가

김진경[1] · 전영은[2] · 윤성복[2] · 이주운[3] · 강일준[2†]

[1]대구가톨릭대학교 의생명과학과
[2]한림대학교 식품영양학과 · 한국영양연구소
[3]한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소

90-day Repeated-dose Oral Toxicity Study of 20 kGy Irradiated Cold Water Extract Powder of Mistletoe

Jin Kyung Kim[1], Young Eun Jeon[2], Xing Fu Yin[2], Ju-Woon Lee[3], and Il-Jun Kang[2†]

[1]Dept. of Medical Life Science, Catholic University of Daegu, Gyeonbuk 712-702, Korea
[2]Dept. of Food Science and Nutrition & The Korean Institute of Nutrition, Hallym University, Gangwon 200-702, Korea
[3]Division of Radiation Application Research, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeonbuk 580-185, Korea

Abstract

Traditionally, mistletoes have been used as immunostimulant for the management of certain diseases such as cancer with high profile immune depleting potentials. In order to examine the safety of the 20 kGy irradiated cold water extract powder of mistletoes, we performed a 90-day repeated-dose toxicity study with ICR mice. The mice were treated with daily doses of the 20 kGy irradiated cold water extract powder of mistletoes by gavage at 0, 20, 100, and 500 mg/kg/day for 90 consecutive days. We recorded clinical signs of toxicity, body weight, organ weights, histological changes in target organs, hematology, and clinical blood chemistry analysis data for all mice. There were no significant changes in body and organ weights during the experimental period. The hematological analysis and clinical blood chemistry data revealed no toxic effects from the 20 kGy irradiated cold water extract powder of mistletoes. Pathologically, neither gross abnormalities nor histopathological changes were observed between the control and treated mice of both sexes. Collectively, these data suggest that the 20 kGy irradiated cold water extract powder of mistletoes have a high margin of safety.

Key words: mistletoes, gamma irradiation, 90-day repeated-dose oral toxity

서 론

겨우살이는 나무줄기 위에 사는 착생식물로 참나무, 팽나무, 뽕나무, 떡갈나무, 자작나무, 버드나무, 오리나무, 밤나무 등의 나무줄기에 뿌리를 박아 물을 흡수하며 기생하는 다년생 반 기생 상록식물로, 엽록소를 갖고 있어 자체에서 탄소동화작용을 하여 영양분을 생산한다(1). 겨우살이는 전통적으로 동·서양을 막론하고 다양한 질병 치료에 사용되어져 왔으며, 특히 동맥경화증, 고혈압, 폐암, 결장암, 유방암 등의 항암활성 및 면역 증강 작용이 있는 것으로 알려져 있다(2-4). 현재 lectin, viscotoxin, flavonoid, triterpene, polysaccharide, alkaloid 등 겨우살이로부터 분리된 다양한 성분이 보고되어 있고, 그 생리활성 또한 다수 보고되어 있다(5-8). 그 생리활성 성분 중 강력한 항종양활성을 보이는 lectin은 한국산(*Viscum album* L. var. coloratum)이 유럽산(Viscum album Loranthaceae)에 비하는 우수한 효능을 보였으며, 특히 한국산은 apoptosis를 유발시킴으로 항암효과를 발휘하는 것으로 알려졌다(7,8). 유럽에서는 민간에서 전통적으로 사용하여 오던 겨우살이(*Viscum albumloranthacea*)를 1920년대부터 겨우살이의 잎과 줄기를 물로 추출 후 멸균여과하거나 발효시키는 방법으로 주사제를 만들어 종양에 대한 치료 및 그 보조제로 임상에서 사용하였고(9), 현재는 겨우살이를 이용한 기능성식품 및 보조약재 등의 개념으로 차 및 타블렛의 형태로 시판되고 있다(10,11). 그러나 겨우살이의 주요 생리활성성분인 lectin과 viscotoxin은 알레르기 반응을 유발시키는 등의 독성이 알려져 있어(6,12-14) 방사선 구조변환을 통해 lectin과 viscotoxin의 독성을 감소시키면서 항종양활성 및 면역증강활성은 유지시키려는 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 방사선 구조변환 생물분자 및 소재의 안전성을 검토할 목적으로 20 kGy의 감마선을 조사한 겨우살이 냉수 추출물의 90일 반복경구투여 독성시험을 수행하였다.

†Corresponding author. E-mail: ijkang@hallym.ac.kr
Phone: 82-33-248-2135, Fax: 82-33-255-4787

재료 및 방법

실험재료 및 시료의 제조

겨우살이는 2009년 대광약업사(Chuncheon, Korea)에서 구입하여 동결 보관한 후 해동하여 D.W.로 균질화(1:9, w/v) 시킨 다음, 4°C에서 하룻밤 stirring하였다. 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 상등액을 취한 다음, 0.2 μm filter로 여과하고 그 여액을 동결 건조하여 겨우살이 냉수 추출물 건조분말을 얻었다. 겨우살이 냉수 추출물 건조분말의 감마선 조사를 위해 한국원자력연구원 방사선과학연구소(Jeong-eup, Korea) 내 선원 11.1 PBq, Co-60 감마선 조사시설(point source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co., Ltd., Ottawa, ON, Canada)을 이용하였다. 즉, 실온(14±14°C)에서 시간당 10 kGy의 선량율로 20 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 흡수선량 확인은 alanine dosimeter(5 mm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2% 이내였다.

실험동물 및 사육환경

실험동물은 6주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)의 ICR계열 마우스를 (주)코아텍((Koatech Laboratory Animal Research Co., Pyeongtaek, Korea)으로부터 구입하였다. 7일간의 검역 및 순화과정을 거친 뒤 체중감소가 없는 건강한 동물을 선별하여 시험에 사용하였다. 실험동물은 온도 20.9~22.6°C, 상대습도 45~55%, 환기회수 및 방식 10~15회/시간, 전배기방식, 조명시간 12시간(08:00~20:00) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(278×420×200 mm, (주)쓰리사인, 금산)에 2~3마리씩 수용하였다. 폴라스인터내셔널로(Folas International Inc., Seoul, Korea)부터 구입한 실험동물용 멸균 고형사료(Harlan, Madison, WI, USA)를 자유로이 섭취시켰고, 필터와 유수 살균기를 이용하여 여과·살균된 정제수를 자유급식시켰다.

시험군의 구성 및 시험물질의 투여

7일간의 검역 및 순화과정을 거친 뒤, 체중감소가 없는 건강한 동물을 선별하여 무작위법으로 군을 분리하였다. 시험동물은 각 군에 암수 각 5마리 이상을 사용하였으며, 시험군은 대조군과 0 kGy 및 20 kGy 감마선 조사 겨우살이 냉수 추출물 건조분말 투여군으로 설정하였다. 0 kGy 및 20 kGy 감마선 조사 겨우살이 냉수추출물 건조분말은 각각 500 mg/kg/day을 최고 용량으로 설정하였고 100 mg/kg/day의 중간 용량군과 20 mg/kg/day의 저 용량군을 설정하였다. 시험물질은 phosphate-buffered saline(PBS)에 용해하여 경구투여용 존데를 사용하여 매일 1회, 90일간 일정 시간 오전 10시 맞춰 경구투여 하였다. 대조군은 시험물질을 용해할 때에 사용한 PBS를 같은 방법으로 경구투여 하였다.

일반증상 및 폐사의 관찰

투여 당일은 투여 후 1시간부터 6시간째까지 관찰하였고, 투여 다음날부터 90일까지는 매일 1회 모든 동물에 대해 일정한 시간에 일반 증상 및 중독 증상, 사망의 유무를 전 실험기간 동안 관찰하였으며, 이상증상 및 정도를 개별적으로 기록하였다.

체중변화, 사료 섭취량 및 음수 섭취량 측정

시험 기간 중 모든 동물의 체중은 투여개시 전에 실시하였으며, 투여 후 90일까지의 체중을 매주 일회 측정하였다. 사료 및 물은 각 사육 상자의 사료통과 음수통에 사육하는 마우스가 충분히 먹을 수 있도록 공급하였다. 사료 섭취량 및 음수량을 측정하기 위해 사료의 공급량과 잔량, 물의 공급량과 잔량을 일주일간씩 통계분석 하였다.

동물의 도살처리 및 장기무게

사육이 끝난 실험동물을 12시간 동안 절식시키고 에테르로 마취시킨 후 경추 탈골법에 의하여 도살하였다. 간, 비장, 신장, 고환, 난소, 폐, 심장은 혈액채취 후 즉시 적출하여 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 수분을 제거한 다음 무게를 측정하였다. 장기 및 혈청의 시료는 분석 전까지 -70°C 냉동고에 보관하였다.

혈액학적 검사

부검당일에 안와 채혈을 통해 EDTA-2K가 코팅된 튜브(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 혈액을 채취한 후 자동혈구계측장치(HEMA VET 950, Drew Inc, Cumbria, UK)를 이용하여 총 백혈구 수(white blood cell, WBC), 중성구(neutrophil), 림프구(lymphocyte), 단핵구(monocyte), 산성구(eosinophil), 염기성 구(basophil) 수를 측정하였다. 나아가 총 적혈구 수(red blood cell, RBC), 헤모글로빈 함량(hemoglobin, Hb), 혈중 적혈구 비율(hematocrit, HCT), 평균 적혈구 용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균 헤모글로빈 함유량(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균 헤모글로빈 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 적혈구 크기 분포폭(red blood cell distribution width, RDW), 혈소판 수(platelet, PLT), 평균 혈소판 용적(mean plasma volume, MPV)도 측정하였다.

혈액의 생화학적 검사

부검 당일 채취된 혈액에서 분리한 혈청을 혈액생화학 분석기기(KoneLab 20, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Finland)를 이용하여 알부민(albumin, ALB), alkaline phosphatase(ALP), alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), blood urea nitrogen(BUN), 콜레스테롤(cholesterol, CHOL), creatinine(CREA), bilirubin direct(D-BIL), 포도당(glucose, GLUC), 총 빌리루빈(total bilirubin, T-BIL), 중성지방(triglycerides, TG), 총 단백질

(total protein, TP)을 측정하였다.

조직학적 검사

조직학적 검사를 위하여 간과 신장을 4% 파라포름알데하이드 용액에 고정시킨 후, 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매를 하였다. 포매된 각 조직은 마이크로톰(Lecia RM2255, Lecia, Wetzlar, Germany)으로 7 μm 박절한 후 hematoxylin & eosin 염색을 실시하여 광학현미경(Axio-imager M1, Carlziess, Niedersachsen, Germany)으로 관찰하였다.

부검소견의 관찰

투여 후 90일간의 투여 및 관찰기간이 종료된 후에 모든 실험동물을 Ketamin(Yuhan Corporation, Seoul, Korea)으로 근육마취 시킨 후, 육안으로 각종 장기의 소견을 관찰하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, Sigma Stat(Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA)을 사용하여 ANOVA one-way로 유의차 검정을 실시하여 $p<0.05$인 경우에만 그룹 간 유의차가 있는 것으로 인정하였다.

결과 및 고찰

사망률 및 임상증상

시험 전 기간 동안 대조군을 포함하여 암수 모든 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 임상증상을 관찰한 결과, 대조군 및 각 시험물질의 저(20 mg/kg/day), 중(100 mg/kg/day), 고(500 mg/kg/day) 용량 투여군에서 추출물의 투여에 기인한 이상증상은 관찰되지 않았다.

체중변화 및 사료섭취량

전 시험기간 중 암수 모든 군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 대조군과 비교하여 겨우살이 냉수 추출물 및 감마선 조사 겨우살이 냉수 추출물 투여에 의한 사료섭취량의 변화도 관찰되지 않았다(Table 1).

부검결과 및 장기무게

감마선 조사 겨우살이 냉수 추출물의 투여가 주요 장기에 미치는 영향을 측정하였다. 조사한 결과, 부검 후 모든 개체의 장기에서 유의성 있는 변화나 시험물질 투여로 인한 용량의존적인 특이할 만한 부검소견은 관찰되지 않았다. 각 장기의 무게를 살펴보면 수컷의 경우, 대조군 및 각 시험물질 투여군에서 간장(liver), 비장(spleen), 신장(kidney), 고환(testis), 폐(lung), 심장(heart)에서 유의적인 무게 증가나 감소는 관찰되지 않았다(Table 2). 암컷의 장기무게의 경우, 대조군과 비교하여 저 용량(20 mg/kg/day)의 겨우살이 냉수추출물과 고 용량(500 mg/kg/day)의 감마선 조사 겨우살이 냉수추출물 투여군의 우측신장의 무게가 유의적으로 증가하였으나(Table 2) 감마선 조사에 의한 변화는 관찰되지 않았고, 용량상관성이 결핍되어 시험물질과는 무관한 자연발생적 소견으로 사료되었다. 따라서 겨우살이 냉수 추출물 및 감마선 조사 겨우살이 냉수 추출물 투여는 장기의 임상적인 변화나 무게의 변화에 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다.

혈액학적 검사

각 시험물질을 투여한 마우스의 혈액학적 검사를 수행한 결과, 수컷동물의 혈액학적 검사 시 대조군과 비교하여 고 용량(500 mg/kg/day)의 겨우살이 냉수추출물 투여군에서 총 백혈구 수, 중성구의 유의적인 증가가 관찰되었고, 산성구의 유의적인 감소가 관찰되었다(Table 3). 또한, 저 용량(20 mg/kg/day)과 중 용량(100 mg/kg/day)의 겨우살이 냉수추출물 투여군에서는 단핵구의 유의적인 감소가 관찰되었다(Table 3). 고 용량(500 mg/kg/day)의 감마선 조사 겨우살이 냉수추출물 투여군에서는 총 백혈구 수와 림프구의 유

Table 1. Effects of 20 kGy-irradiated cold water extract powder of mistletoe on body weight and food consumption of ICR mouse

Sex	Group (μg/kg/day)		Initial body weights (g)	Final body weights (g)	Body weight gain (g)	Food intake (g/day)
Male	Control		28.78±1.10^{NS}	38.43±1.65^{NS}	9.61±1.81^{NS}	4.58±0.51^{NS}
	0 kGy	20	28.83±0.67	38.30±1.46	9.47±1.30	4.71±0.70
		100	29.08±1.20	38.43±1.12	9.35±1.37	4.49±0.75
		500	28.44±1.05	37.92±1.86	9.48±1.75	4.75±0.73
	20 kGy	20	28.83±0.85	38.77±1.23	9.94±1.82	4.82±0.93
		100	28.03±1.77	37.83±1.53	9.80±1.72	4.76±0.82
		500	29.37±0.91	38.95±1.35	9.58±1.33	4.63±0.74
Female	Control		22.47±1.00^{NS}	32.67±1.21^{NS}	10.20±0.56^{NS}	4.21±0.45^{NS}
	0 kGy	20	23.03±0.83	32.68±1.18	9.65±1.64	3.93±0.42
		100	23.03±1.16	33.63±2.37	10.60±3.42	4.27±0.64
		500	22.56±1.68	32.10±1.97	9.54±2.23	4.10±0.37
	20 kGy	20	23.08±1.74	32.98±1.88	9.90±1.82	4.13±0.62
		100	22.70±1.21	32.47±1.38	9.77±1.41	4.13±0.65
		500	22.63±1.55	32.83±1.82	10.20±1.08	3.96±0.53

Values are expressed as mean±SEM (n=5). ^{NS}Not significant at 5% level.

Table 2. Effects of 20 kGy-irradiated cold water extract powder of mistletoe on the organ weight of ICR mouse

(unit: g/100 g BW)

Sex	Group (μg/kg/day)		Liver	Spleen	Kidney (left)	Kidney (right)	Testis /Ovary	Lung	Heart
Male	Control		4.95±0.33^{a}	0.29±0.03^{a}	0.76±0.05^{a}	0.68±0.05^{a}	0.75±0.05^{a}	0.54±0.06^{a}	0.52±0.04^{a}
	0 kGy	20	5.15±0.22^{a}	0.27±0.03^{a}	0.72±0.06^{a}	0.69±0.03^{a}	0.69±0.06^{a}	0.51±0.07^{a}	0.56±0.05^{a}
		100	5.05±0.22^{a}	0.28±0.04^{a}	0.74±0.04^{a}	0.69±0.03^{a}	0.70±0.07^{a}	0.53±0.07^{a}	0.55±0.04^{a}
		500	4.89±0.17^{a}	0.30±0.04^{a}	0.73±0.04^{a}	0.69±0.03^{a}	0.74±0.06^{a}	0.54±0.04^{a}	0.50±0.05^{a}
	20 kGy	20	5.12±0.14^{a}	0.26±0.03^{a}	0.74±0.03^{a}	0.71±0.05^{a}	0.74±0.05^{a}	0.55±0.04^{a}	0.52±0.03^{a}
		100	4.92±0.27^{a}	0.28±0.02^{a}	0.74±0.02^{a}	0.65±0.06^{a}	0.70±0.08^{a}	0.56±0.06^{a}	0.54±0.04^{a}
		500	5.14±0.21^{a}	0.27±0.03^{a}	0.75±0.04^{a}	0.67±0.04^{a}	0.67±0.06^{a}	0.54±0.04^{a}	0.53±0.04^{a}
Female	Control		4.42±0.22^{ab}	0.32±0.05^{a}	0.50±0.02^{ab}	0.48±0.03^{b}	0.35±0.03^{ab}	0.56±0.03^{ab}	0.43±0.02^{a}
	0 kGy	20	4.82±0.46^{a}	0.30±0.06^{a}	0.56±0.05^{a}	0.54±0.04^{a}	0.36±0.12^{a}	0.60±0.04^{ab}	0.45±0.03^{a}
		100	4.44±0.40^{ab}	0.32±0.07^{a}	0.55±0.03^{ab}	0.51±0.02^{ab}	0.32±0.05^{ab}	0.62±0.01^{a}	0.44±0.04^{a}
		500	4.23±0.22^{b}	0.29±0.04^{a}	0.53±0.06^{ab}	0.51±0.03^{ab}	0.30±0.08^{ab}	0.60±0.05^{ab}	0.41±0.01^{a}
	20 kGy	20	4.45±0.33^{ab}	0.28±0.04^{a}	0.49±0.04^{b}	0.47±0.04^{b}	0.24±0.03^{b}	0.63±0.06^{a}	0.41±0.02^{a}
		100	4.70±0.03^{ab}	0.30±0.04^{a}	0.54±0.02^{ab}	0.52±0.01^{ab}	0.36±0.03^{a}	0.55±0.03^{b}	0.45±0.04^{a}
		500	4.47±0.46^{ab}	0.33±0.06^{a}	0.52±0.04^{ab}	0.54±0.02^{a}	0.27±0.07^{ab}	0.58±0.04^{ab}	0.44±0.03^{a}

Values are expressed as mean±SEM (n=5). Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level.

Table 3. Leukocyte values in the male and female ICR mouse treated orally with 20 kGy-irradiated cold water extract powder of mistletoe for 3 months

Sex	Group (μg/kg/day)		WBC (k/mL)	Neutrophil (k/mL)	Lymopocyte (k/mL)	Monocyte (k/mL)	Eosinophil (k/mL)	Basophil (k/mL)
Male	Control		7.81±0.61^{bc}	3.01±0.59^{bc}	4.23±0.19^{abc}	0.37±0.05^{a}	0.14±0.03^{a}	0.04±0.02^{ab}
	0 kGy	20	6.45±1.22^{cd}	2.07±0.40^{c}	4.00±1.11^{abcd}	0.16±0.06^{c}	0.16±0.02^{a}	0.07±0.02^{a}
		100	7.10±0.83^{cd}	3.24±0.72^{abc}	3.40±0.65^{cd}	0.24±0.07^{bc}	0.17±0.06^{a}	0.05±0.04^{a}
		500	9.68±0.79^{a}	4.53±1.13^{a}	4.80±0.71^{a}	0.28±0.03^{ab}	0.06±0.05^{b}	0.01±0.02^{b}
	20 kGy	20	8.83±0.84^{ab}	3.59±0.48^{ab}	4.73±0.39^{ab}	0.26±0.03^{b}	0.19±0.02^{a}	0.06±0.03^{a}
		100	6.93±0.48^{cd}	2.82±0.95^{bc}	3.59±0.45^{bcd}	0.29±0.02^{ab}	0.17±0.04^{a}	0.05±0.02^{a}
		500	5.92±0.54^{d}	2.56±0.36^{bc}	2.89±0.38^{d}	0.30±0.08^{ab}	0.14±0.03^{a}	0.03±0.01^{ab}
Female	Control		7.71±0.66^{a}	1.84±0.08^{a}	5.42±0.74^{a}	0.32±0.02^{a}	0.09±0.05^{a}	0.03±0.01^{a}
	0 kGy	20	4.41±0.39^{c}	1.36±0.09^{bc}	2.79±0.48^{bc}	0.16±0.05^{b}	0.08±0.02^{a}	0.02±0.01^{a}
		100	4.37±0.95^{c}	1.28±0.44^{cd}	2.78±0.79^{bc}	0.17±0.11^{b}	0.11±0.07^{a}	0.04±0.03^{a}
		500	5.42±0.09^{b}	1.68±0.23^{ab}	3.51±0.16^{b}	0.16±0.03^{b}	0.06±0.02^{a}	0.02±0.01^{a}
	20 kGy	20	3.44±0.59^{cd}	0.89±0.06^{e}	2.31±0.56^{c}	0.19±0.07^{b}	0.04±0.01^{a}	0.02±0.01^{a}
		100	3.32±0.38^{d}	0.99±0.06^{cde}	2.08±0.40^{c}	0.16±0.04^{b}	0.08±0.04^{a}	0.02±0.01^{a}
		500	3.32±0.11^{d}	0.92±0.15^{de}	2.16±0.04^{c}	0.15±0.06^{b}	0.06±0.02^{a}	0.02±0.01^{a}

Values are expressed as mean±SEM (n=5). Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level. WBC, white blood cell.

의적인 감소가 관찰되었고, 저 용량(20 mg/kg/day)의 감마선 조사 겨우살이 추출물 투여군에서는 단핵구의 유의적인 감소가 관찰되었다(Table 3). 암컷의 경우, 대조군과 비교하여 겨우살이 냉수추출물 및 감마선 조사 겨우살이 냉수추출물 투여군 모두에서 총 백혈구 수, 중성구(0 kGy 고용량군 제외), 림프구, 단핵구의 유의적인 감소가 관찰되었으나, 산성구와 염기성 구는 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(Table 3).

시험물질 투여에 의한 적혈구의 변화를 살펴보면, 겨우살이 냉수 추출물의 경우 적혈구 수에는 큰 영향을 미치지 않았으나, 수컷에서는 헤모글로빈의 증가, 평균 헤모글로빈의 함량(MCH), 평균 헤모글로빈 농도(MCHC)의 증가 및 적혈구 크기 분포폭(RDW)의 감소를 관찰할 수 있었다(Table 4). 암컷에서는 겨우살이 냉수 추출물 투여군에서 평균 헤모글로빈의 함량 및 평균헤모글로빈 농도의 증가가 유의적으로 나타났으나, 감마선 조사가 이들의 변화를 증폭시키지는 않았다(Table 4). 감마선 조사 겨우살이 냉수 추출물 투여군에서는 대조군과 비교하여 혈중 적혈구 비율(HCT)의 유의적인 감소가 관찰되었다(Table 4). 저 용량(20 mg/kg/day)의 감마선 조사 겨우살이 냉수 추출물 투여군에서는 혈소판의 유의적인 감소 또한 관찰되었다. 대조군을 포함한 모든 시험물질 투여군의 혈액학적 분석의 결과는 Wolford 등(15)이 제시한 실험동물의 혈액학적 기초자료에서 제시한 측정치와 비교하였을 때 측정치가 모두 정상범위 내에 속하였으므로, 겨우살이 냉수 추출물 및 감마선 조사 겨우살이 냉수 추출물의 독성에 기인한 결과는 아닌 것으로 판단된다.

Table 4. Erythrocyte and thrombocyte values in the male and female ICR mouse treated orally with 20 kGy-irradiated cold water extract powder of mistletoe for 3 months

Sex	Group (μg/kg/day)		RBC (M/mL)	Hb (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	PLT (k/mL)	MPV (fL)
Male	Control		8.66 ±0.85^{a}	12.67 ±0.64^{c}	43.77 ±4.05^{a}	50.63 ±2.75^{a}	14.67 ±0.86^{b}	29.07 ±2.34^{c}	22.47 ±4.55^{a}	775.00 ±144.63^{c}	4.73 ±0.25^{a}
	0 kGy	20	9.02 ±0.69^{a}	14.73 ±1.70^{ab}	41.83 ±3.60^{a}	54.13 ±4.65^{a}	15.97 ±0.67^{a}	29.63 ±2.48^{bc}	19.13 ±0.80^{ab}	898.67 ±78.64^{bc}	4.57 ±0.21^{a}
		100	8.79 ±0.57^{a}	14.87 ±1.04^{ab}	44.38 ±3.59^{a}	48.17 ±2.11^{a}	16.77 ±0.31^{a}	34.87 ±1.63^{a}	18.27 ±0.32^{b}	1047.67 ±55.19^{ab}	4.53 ±0.25^{a}
		500	8.80 ±0.62^{a}	16.53 ±1.29^{a}	45.03 ±5.45^{a}	51.03 ±2.06^{a}	16.97 ±0.80^{a}	33.27 ±1.05^{ab}	18.67 ±0.40^{b}	894.33 ±117.46^{bc}	4.67 ±0.06^{a}
	20 kGy	20	8.98 ±0.78^{a}	15.10 ±1.18^{ab}	45.23 ±3.07^{a}	48.80 ±0.17^{a}	16.30 ±0.17^{a}	33.37 ±0.40^{ab}	17.53 ±0.95^{b}	1176.00 ±94.93^{a}	4.63 ±0.32^{a}
		100	8.57 ±0.52^{a}	13.10 ±0.66^{bc}	42.05 ±4.92^{a}	54.60 ±9.69^{a}	16.80 ±0.62^{a}	31.27 ±4.22^{abc}	18.60 ±0.89^{b}	910.67 ±158.24^{bc}	4.57 ±0.21^{a}
		500	8.95 ±0.47^{a}	15.07 ±0.35^{ab}	45.65 ±3.34^{a}	52.63 ±2.66^{a}	17.00 ±0.36^{a}	27.17 ±0.64^{c}	19.70 ±0.82^{ab}	823.67 ±77.02^{c}	4.63 ±0.23^{a}
Female	Control		10.06 ±0.43^{a}	13.67 ±0.76^{b}	53.43 ±4.14^{a}	53.23 ±6.03^{a}	13.60 ±0.17^{b}	25.77 ±3.50^{c}	17.53 ±0.61^{a}	759.33 ±86.05^{ab}	4.63 ±0.29^{ab}
	0 kGy	20	9.00 ±0.51^{abc}	14.83 ±0.42^{ab}	48.60 ±6.97^{ab}	54.33 ±10.30^{a}	16.50 ±1.20^{a}	30.83 ±3.45^{ab}	17.63 ±0.51^{a}	867.33 ±106.04^{a}	4.33 ±0.15^{b}
		100	9.31 ±0.43^{ab}	16.13 ±0.64^{a}	48.77 ±6.34^{ab}	52.30 ±4.85^{a}	17.30 ±0.10^{a}	33.33 ±3.16^{ab}	17.57 ±0.31^{a}	932.33 ±64.63^{a}	4.83 ±0.06^{a}
		500	8.80 ±0.45^{bc}	14.70 ±0.46^{ab}	44.03 ±1.80^{ab}	50.07 ±1.95^{a}	16.73 ±0.40^{a}	33.40 ±0.66^{ab}	17.30 ±0.36^{a}	740.67 ±114.42^{ab}	4.83 ±0.31^{a}
	20 kGy	20	7.80 ±1.30^{c}	12.90 ±2.43^{b}	43.47 ±7.41^{b}	56.20 ±6.85^{a}	16.47 ±0.42^{a}	29.77 ±3.93^{bc}	17.33 ±0.31^{a}	598.00 ±51.22^{b}	4.60 ±0.36^{ab}
		100	8.38 ±0.53^{bc}	14.47 ±0.57^{ab}	41.20 ±1.15^{b}	49.23 ±2.11^{a}	17.27 ±0.45^{a}	35.10 ±0.56^{a}	16.77 ±0.21^{a}	881.67 ±219.76^{a}	4.77 ±0.32^{ab}
		500	9.05 ±0.32^{ab}	14.97 ±1.26^{ab}	43.20 ±3.64^{b}	47.67 ±2.40^{a}	16.50 ±0.87^{a}	34.67 ±0.75^{ab}	17.63 ±0.72^{a}	939.67 ±117.36^{a}	4.70 ±0.10^{ab}

Values are expressed as mean±SEM (n=5). Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level. RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red blood cell distribution width; PLT, platelet; MPV, mean plasma volume.

혈액 생화학적 검사

혈액 생화학 측정기기를 이용하여 각 실험군의 혈청을 분석한 결과, 수컷동물의 저(20 mg/kg), 중(100 mg/kg/day), 고(500 mg/kg/day) 용량의 겨우살이 냉수 추출물 투여군에서 alanine aminotransferase(ALT)가 대조군과 비교할 때에 통계학적으로 유의성 있는 증가를 나타냈다. 감마선 조사 겨우살이 냉수추출물의 경우, 고(500 mg/kg/day) 용량에서만 대조군보다 유의적으로 높은 ALT의 증가를 보였다. Aspartate aminotransferase(AST)는 대조군에 비해 중 용량(100 mg/kg/day)의 겨우살이 냉수 추출물 투여군에서 증가하는 양상을 보였으나, 감마선 조사 겨우살이 냉수 추출의 투여는 대조군과 비교할 때 유의적인 변화를 나타내지는 않았다(Table 5). 수컷의 경우, 저(20 mg/kg), 중(100 mg/kg/day) 용량의 감마선 조사 겨우살이 냉수 추출물 투여군의 ALT는 같은 용량의 0 kGy 겨우살이 냉수 추출물 투여군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타냈다(Table 5). 또한, 저(20 mg/kg) 용량의 감마선 조사 겨우살이 냉수 추출물 투여군의 경우, 0 kGy 겨우살이 냉수 추출물에 비해 유의적으로 낮은 AST의 수치를 나타냈다(Table 5). 암컷의 경우 겨우살이 냉수 추출물 투여군에서 ALT, AST 및 콜레스테롤 수치에서 유의적인 감소를 관찰할 수 있었으나, 감마선 조사가 이들의 변화를 증폭시키지는 않았다(Table 5). 그러나 이러한 변화들은 모두 정상범위 내에서의 변화였으며 시험물질 투여로 인한 결과는 아닌 것으로 판단된다(15).

병리학적 조직검사

감마선 조사 겨우살이 냉수 추출물을 투여한 마우스의 병리학적 조직검사를 위해, 간장과 신장을 hematoxylin과 eosin으로 염색 하여 조직학적인 관찰을 수행하였다. 그 결과, 간에서는 모든 군에서 염증, 괴사, bilirubin 침착, iron 침착 등의 병적인 변화를 보이지 않았고 간세포의 구조도 변화를 보이지 않았다(Fig. 1). 신장에서도 염증, 괴사 등의 병적인 변화를 보이지 않았고 신장세포도 정상적인 구조를 유지하고 있었다. 면역학적 요인이나 독성 물질에 기인하는 사구체 및 신세관의 괴사도 관찰되지 않았고 세관세포들이 잘 밀집되어 있어 부종도 없음이 확인되었다(Fig. 2).

Table 5. Serum biochemical values in the male and female ICR mouse treated orally with 20 kGy-irradiated cold water extract powder of mistletoe for 3 months

Sex	Group		ALB (g/dL)	ALP (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	CHOL (mg/dL)
Male	Control		3.14±0.19[a]	71.27±10.47[a]	69.73±13.24[b]	96.10±20.12[bc]	14.60±0.85[a]	143.71±17.30[a]
	0 kGy	20 μg/kg/day	3.10±0.07[a]	84.58±7.87[a]	116.77±23.96[a]	108.94±37.26[ab]	16.63±1.63[a]	143.65±2.73[a]
		100 μg/kg/day	3.11±0.05[a]	77.46±18.03[a]	132.16±31.01[a]	138.84±12.37[a]	17.68±2.66[a]	132.82±28.03[a]
		500 μg/kg/day	3.11±0.13[a]	82.10±7.97[a]	117.04±30.46[a]	112.39±29.64[ab]	14.96±0.37[a]	140.98±13.15[a]
	20 kGy	20 μg/kg/day	3.14±0.09[a]	72.52±5.95[a]	59.90±17.74[b]	68.00±9.87[c]	15.64±0.57[a]	139.79±9.35[a]
		100 μg/kg/day	3.22±0.02[a]	62.42±17.94[a]	50.26±9.75[b]	111.42±10.42[ab]	16.77±1.70[a]	148.66±11.46[a]
		500 μg/kg/day	3.17±0.12[a]	68.61±9.79[a]	116.25±30.50[a]	117.72±5.25[ab]	14.67±2.19[a]	147.29±8.43[a]
Female	Control		3.41±0.13[a]	177.65±46.73[a]	153.53±39.06[a]	244.14±43.47[a]	15.01±2.04[a]	104.63±8.95[a]
	0 kGy	20 μg/kg/day	3.45±0.09[a]	208.70±13.52[a]	58.34±34.33[b]	83.38±17.73[b]	13.68±1.15[a]	77.34±11.15[b]
		100 μg/kg/day	3.38±0.03[a]	209.41±17.35[a]	67.61±16.01[b]	100.08±36.22[b]	13.94±0.43[a]	75.94±8.56[b]
		500 μg/kg/day	3.39±0.08[a]	165.26±63.66[a]	41.12±4.41[b]	75.34±22.25[b]	13.76±0.97[a]	83.74±17.78[ab]
	20 kGy	20 μg/kg/day	3.47±0.11[a]	154.02±25.52[a]	61.39±22.07[b]	93.12±19.10[b]	14.24±0.84[a]	84.95±15.16[ab]
		100 μg/kg/day	3.57±0.12[a]	148.62±42.23[a]	61.08±17.01[b]	102.11±27.36[b]	13.52±0.36[a]	88.38±13.20[ab]
		500 μg/kg/day	3.53±0.13[a]	156.52±26.62[a]	47.53±10.68[b]	81.69±22.77[b]	15.18±0.96[a]	81.68±9.85[ab]

Sex	Group		CREA (mg/dL)	D-BIL (mg/dL)	GLUC (mg/dL)	T-BIL (mg/dL)	TG (mg/dL)	TP (g/dL)
Male	Control		0.45±0.04[ab]	0.29±0.04[a]	179.58±39.53[a]	0.30±0.04[a]	91.95±17.84[a]	4.48±0.25[a]
	0 kGy	20 μg/kg/day	0.46±0.02[a]	0.36±0.10[a]	197.86±10.04[a]	0.36±0.10[a]	122.00±10.68[a]	4.74±0.36[a]
		100 μg/kg/day	0.42±0.02[ab]	0.31±0.03[a]	182.09±24.05[a]	0.30±0.03[a]	102.86±23.84[a]	4.63±0.03[a]
		500 μg/kg/day	0.41±0.02[b]	0.29±0.06[a]	157.36±13.34[a]	0.29±0.05[a]	127.99±22.66[a]	4.67±0.26[a]
	20 kGy	20 μg/kg/day	0.45±0.03[ab]	0.29±0.09[a]	198.59±10.01[a]	0.32±0.09[a]	96.18±16.12[a]	4.60±0.09[a]
		100 μg/kg/day	0.43±0.01[ab]	0.29±0.10[a]	192.41±11.07[a]	0.30±0.08[a]	100.81±36.97[a]	4.68±0.08[a]
		500 μg/kg/day	0.44±0.03[ab]	0.34±0.08[a]	197.55±44.95[a]	0.32±0.04[a]	107.04±6.69[a]	4.64±0.13[a]
Female	Control		0.51±0.03[a]	0.50±0.23[a]	188.00±17.52[a]	0.47±0.17[a]	114.94±34.96[b]	4.61±0.20[abc]
	0 kGy	20 μg/kg/day	0.49±0.02[a]	0.38±0.12[a]	183.75±15.20[a]	0.30±0.06[b]	168.54±22.99[a]	4.71±0.10[ab]
		100 μg/kg/day	0.48±0.02[a]	0.41±0.02[a]	186.93±13.25[a]	0.36±0.08[ab]	107.04±10.66[b]	4.41±0.09[c]
		500 μg/kg/day	0.47±0.04[a]	0.39±0.15[a]	181.01±19.06[a]	0.34±0.08[ab]	96.74±7.20[b]	4.49±0.02[bc]
	20 kGy	20 μg/kg/day	0.47±0.05[a]	0.33±0.07[a]	187.56±20.58[a]	0.34±0.04[ab]	109.65±12.71[b]	4.62±0.20[abc]
		100 μg/kg/day	0.47±0.02[a]	0.32±0.03[a]	188.92±24.76[a]	0.32±0.02[ab]	98.78±10.15[b]	4.79±0.08[a]
		500 μg/kg/day	0.45±0.02[a]	0.42±0.04[a]	183.89±14.02[a]	0.33±0.05[ab]	142.14±43.01[ab]	4.66±0.06[ab]

Values are expressed as mean±SEM (n=5). Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level. ALB, albumin; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; CHOL, cholesterol; CREA, creatinine; D-BIL, bilirubin direct, GLUC, glucose; T-BIL, bilirubin total; TG, Triglycerides; TP, total protein.

요 약

본 연구에서는 임상에서 암 치료의 보조제로 사용하고 있는 겨우살이의 독성성분의 구조적인 변화를 유도하여 겨우살이의 기능성을 향상시키는 하나의 방법으로, 감마선을 조사한 겨우살이 냉수 추출물의 안전성을 검토하고자 ICR계열의 암수 마우스에 시험물질을 0, 20, 100 및 500 mg/kg/day의 용량으로 90일간 반복 경구투여한 후, 사망률, 일반증상, 체중변화, 혈액 및 혈액생화학적 변화, 부검소견, 조직학적인 변화를 관찰하였다. 시험기간 중 암수 모든 군에서 시험물질 투여에 기인한 일반적인 증상변화는 관찰되지 않았고, 시험물질의 반복 투여로 인한 사망례 역시 관찰되지 않았다. 시험물질의 투여에 기인한 유의적인 체중감소 또한 나타나지 않았으며, 상기 이외의 육안적인 부검소견에서도 시험물질 투여에 기인한 어떠한 이상소견도 발견되지 않았다. 혈액학적 분석 결과 일부 시험물질 투여군에서 총 백혈구 수와 림프구, 중성구, 단핵구, 헤모글로빈, 혈중 적혈구 비율, 평균 헤모글로빈의 함량, 평균헤모글로빈 농도, 적혈구 크기 분포폭, 혈소판의 수치가 유의적인 변화를 보였으나, 정상범위 내에서의 변화로 감마선조사에 의해 야기된 독성이라고 판단하기는 어렵다. 또한 혈청 중의 alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, 중성지방, 콜레스테롤 수치가 대조군과 비교할 때에 통계학적으로 유의성 있는 변화를 나타냈으나 정상 생리 범위 내에서의 변화로 시험물질에 의한 독성이라 판단하기는 어렵다. 간장과 신장의 조직학적인 관찰에서 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 이상의 독성 시험 결과, 20 kGy 감마선 조사 겨우살이 냉수 추출물을 3개월간 ICR 마우스에 섭취시킨 경우, 시험한 최고 농도인 500 μg/kg/day에서는 독성이 없는 것으로 판명되었다.

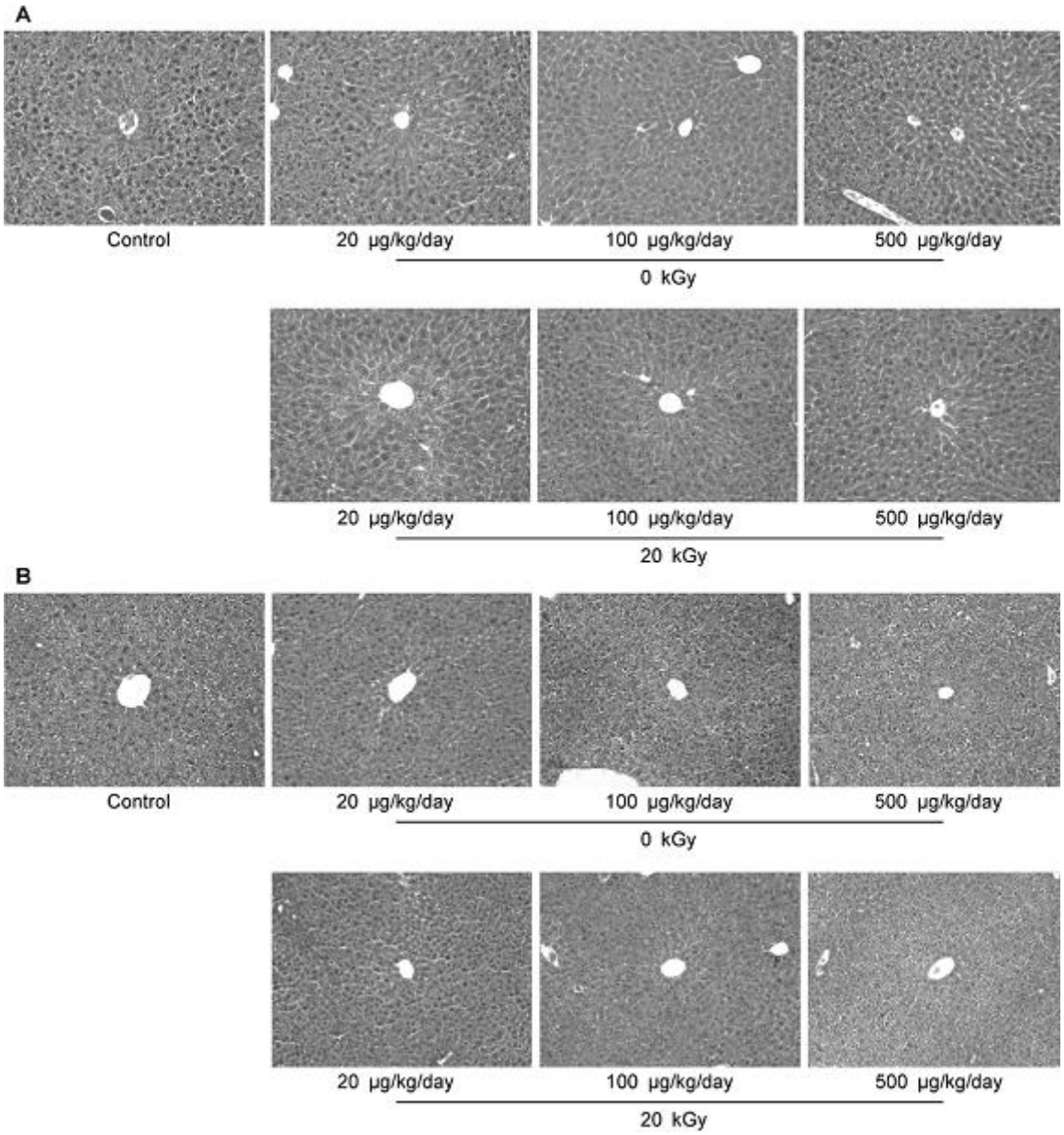

Fig. 1. Histopathological examination of the liver of ICR mouse administered with 0 and 20 kGy irradiated cold water extract powder of mistletoe for 3 months. Original magnification, ×100. A, male; B, female.

감사의 글

본 논문은 한국원자력연구원 기관고유사업에 의하여 연구되었으며 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Park CH, Park CG, Bang KH, Park HW, Seong NS. 2003. Plant growth and anatomical characteristics of Korean mistel (*Viscum album* var. coloratum (kom.) Ohwi). *Korean J Med Crop Sci* 11: 122-126.
2. Kuttan G, Kuttan R. 1992. Immunomodulatory activity of a peptide isolated from *Viscum album* extract (NSC 635 089). *Immunol Invest* 21: 285-296.
3. Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ. 1990. Increased secretion of tumor necrosis factor α, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to β-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res* 50: 3322-3326.
4. Bussing A, Suzart K, Schweizer K. 1997. Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts. *Anti-Cancer Drug* 8(suppl 1): S9-S14.
5. Habeck M. 2003. Mistletoe compound enters clinical trials. *Drug Discov Today* 8: 52-53.
6. Bauer C, Oppel T, Rueff F, Przybilla B. 2005. Anaphylaxis to viscotoxins of mistletoe (*Viscum album*) extracts. *Ann Allergy Asthma Immunol* 94: 86-89.
7. Lyu SY, Park SM, Choung BY, Park WB. 2000. Comparative study of Korean (*Viscum album* var. *coloratum*) and Euro-

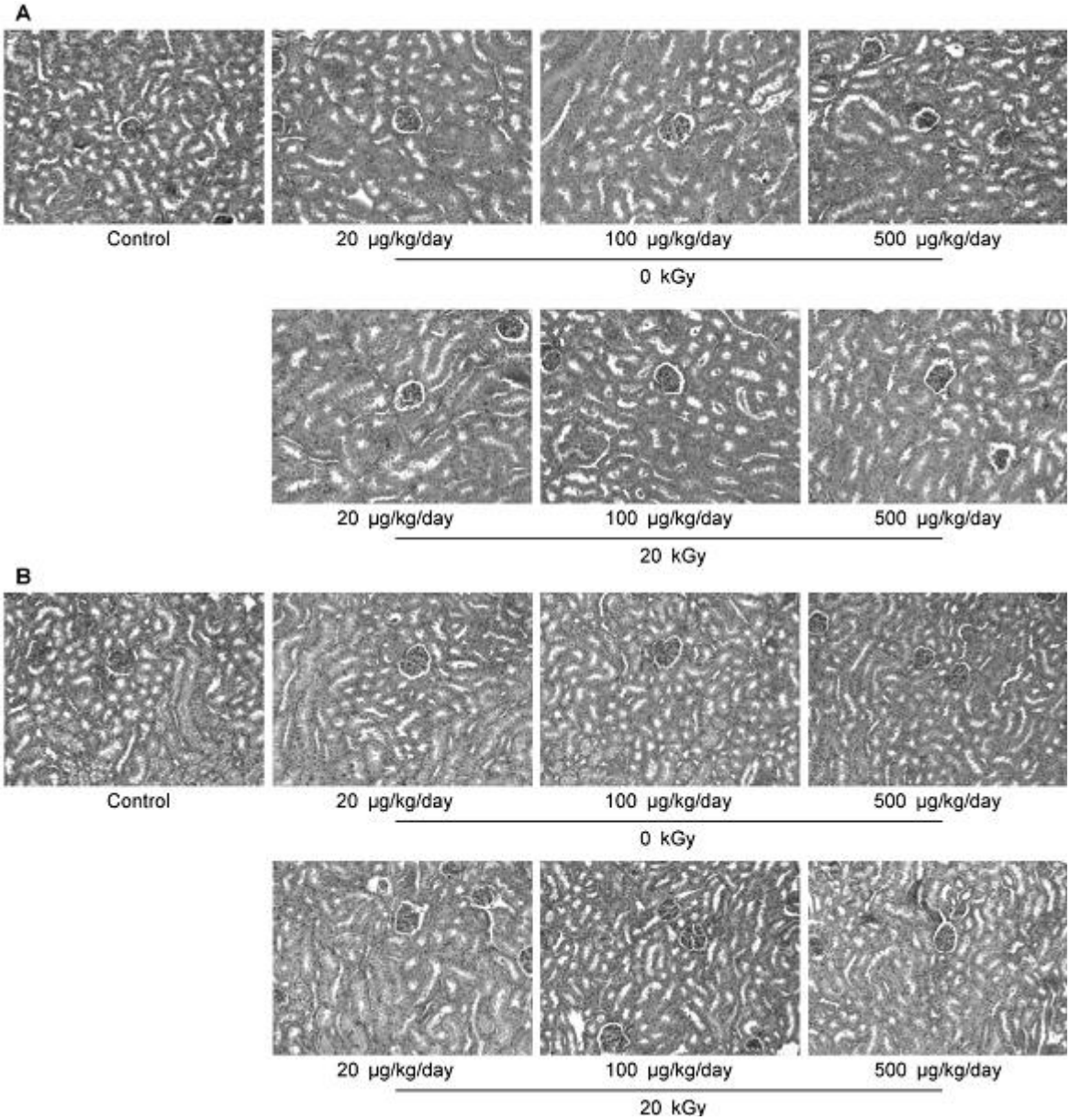

Fig. 2. Histopathological examination of the kidney of ICR mouse administered with 0 and 20 kGy irradiated cold water extract powder of mistletoe for 3 months. Original magnification, ×100. A, male; B, female.

pean mistletoes (*Viscum album*). *Arch Pharm Res* 23: 592-598.
8. Jung MJ, Yoo YC, Lee KB, Kim JB, Song KS. 2004. Isolation of *epi*-oleanolic acid from Korean mistletoe and its apoptosis-inducing activity in tumor cells. *Arch Pharm Res* 27: 840-844.
9. Khwaja TA, Dias CB, Pentecost S. 1986. Recent studies on the anticancer activities of mistletoe (*Viscum album*) and its alkaloids. *Oncology* 43(suppl 1): 42-50.
10. Bussing A. 1997. Mistletoe: a story with an open end. *Anti-Cancer Drug* 8(suppl 1): S1-S2.
11. Rentea R, Lyon E, Hunter R. 1981. Biologic properties of iscador: a *Viscum album* preparation: I. Hyperplasia of the thymic cortex and accelerated regeneration of hematopoietic cells following x-irradiation. *Lab Invest* 44: 43-48.
12. Walzel H, Mix E, Jenssen HL, Ziska P, Franz H. 1982. Estimation of toxicity of the mistletoe lectin 1 using the footpad swelling test in mice. *Acta Histochem* 71: 41-42.
13. Stein GM, Pfuller U, Schietzel M, Bussing A. 2000. Toxic proteins from European mistletoe (*Viscum album* L.): increase of intracellular IL-4 but decrease of IFN-gamma in apoptotic cells. *Anticancer Res* 20: 1673-1678.
14. Gossrau R, Franz H. 1990. Histochemical response of mice to mistletoe lectin I (ML I). *Histochemistry* 94: 531-537.
15. Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX, Gallo PP, Brodec M, Falk HB, Ruhren FR. 1986. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J Toxicol Environ Health* 18: 161-188.

(2010년 10월 14일 접수; 2010년 12월 2일 채택)