

한국산 겨우살이 추출물의 안전성 평가

김인보 · 정주성 · 윤택준* · †김종배

한동대학교 생명과학부, *유한대학교 식품영양과

Safety Evaluation of Korean Mistletoe Extract

Inbo Kim, Ju-seong Jeong, Taek Joon Yoon* and †Jong Bae Kim

School of Life Sciences, Handong Global University, Pohang 791-708, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Yuhan University, Bucheon 422-749, Korea

Abstract

Mistlero C was shown to be non-genotoxic in a series of genotoxicity tests, including a bacterial reverse mutation test and a combined *in vivo* mammalian erythrocyte micronucleus test. In a bacterial reverse mutation assay, no significant increases in the number of revertant colonies, compared to the negative control, was detected in 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ of Mistlero C. In addition, with Mistlero C, no changes were shown in the number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) among 2,000 polychromatic erythrocytes compared to the negative control. Mistlero C was administered orally in rats to investigate acute toxicity. The LD_{50} values in rats were above 2,000 mg/kg . In a repeated dose, 13-week, oral toxicity study conducted in rats, no compound-related adverse effects were shown at doses of Mistlero C of up to 1,000 mg/kg body weight/day. The results of these studies support the safe use of Mistlero C in food for human consumption.

Key words: mistletoe, genetic toxicity, micronucleus test, bacterial reverse mutation assay, toxicity

서 론

겨우살이(Mistletoe, *Viscum album*)는 세계 전역에서 여러 가지 나무를 숙주로 하여 성장하는 반기생식물이며, 우리나라를 포함한 동아시아 및 유럽에서 예로부터 여러 가지 질병에 대한 민간의학 물질로 사용하여 왔다(Bloksma 등 1979; Rentea 등 1981; Kang 등 2001). 여러 종류의 겨우살이 중에서 민간에서 약제로 이용한 것은 주로 *Viscum* 속의 식물로서, 유럽지역에서 서식하는 것은 *Viscum album loranthacea*이며, 한국에서 서식하는 것은 *Viscum album coloratum*으로 분류학상 그 차별성이 인정되고 있다(Khwaja 등 1986). 유럽지역에서 서식하는 겨우살이 추출물은 1921년 Rudolf, S.에 의하여 항종양 활성이 인정된 후, Helisor, Iscador 등의 이름으로 항암 치료제 혹은 그의 보조제로 이용되고 있다(Bloksma 등 1979). 또한 유럽에서는 항암제로서 뿐 아니라, 고혈압 및 동맥경화

에 기능이 있는 기능성 식품으로 시판되고 있다. 전 세계적으로 겨우살이 추출물에 대한 여러 병증에 대한 활성 및 그의 활성 성분에 대한 많은 연구가 진행되어 2,500편 이상의 겨우살이 관련 논문이 발표된 바 있다(Kang 등 2001).

한편, 우리나라에서도 한방에서 겨우살이(*Viscum album coloratum*)를 사용하였으며, 요통, 고혈압, 유산 방지, 치통 등에 대한 약제로 사용하여 왔다(Khwaja 등 1986). 한국산 겨우살이(*Viscum album* var. *coloratum*)의 항암 활성 연구는 유럽에 비하여 비교적 늦게 시작이 되었으나, 현재 우리나라에서도 100여 편에 달하는 논문이 발표되어 많은 연구자들의 관심을 끌고 있다. 한국산 겨우살이 활성에 대하여 본 연구실에서도 1994년 한국산 겨우살이 추출물의 면역자극 활성에 대한 발표를 시작으로 최근 한국산 겨우살이 추출물의 효과 및 대표활성 성분과 그 작동기전에 대한 연구를 진행하고 있다(Khwaja 등 1986; Yoon 등 1994; Yoon 등 1995; Yoon 등 1998). 즉, 한국

† Corresponding author: Jong Bae Kim, School of Life Sciences, Handong Global University, Pohang 791-708, Korea. Tel: +82-54-260-1350, Fax: +82-54-261-6705, E-mail: jbkim@handong.edu

산 겨우살이 추출물은 선천면역계 즉 대식세포 및 자연살해세포의 활성화(Yoon 등 1998) 및 혈관내피세포의 증식과 관련되는 암 유도 혈관 신생(tumor-induce angiogenesis)을 억제함으로써 종양의 전이뿐만 아니라, 전이 암의 증식을 억제하는 기능이 있음을 확인하였다(Yoon 등 1995). 또한 한국산 겨우살이 추출물은 단백질 항원에 대한 면역반응을 증진시키는 adjuvant 활성이 있음을 보고하였다(Yoon 등 1999; Yoon 등 2001). 이러한 면역계의 자극활성을 유도하는 대표성분으로 분리한 렉틴(lectin) 성분(KML-C)은 유럽산 렉틴(ML-I)과 비교하여 아미노산 배열(amino acid sequence) 및 당 특이성의 구조적 특성을 달리하는 활성성분을 분리하였다(Kang 등 2007). 이들 한국산 겨우살이의 렉틴 성분은 세포 독성 외에도 강력한 면역자극 활성을 가지고 있어 생체 탐식세포 및 자연살해세포를 활성화시킴으로써 종양의 전이를 유의하게 억제하는 활성이 있음이 보고되었다(Kang 등 2007). 최근, 한국산 겨우살이 추출물 혹은 렉틴 성분의 경구 투여는 장관 면역계를 활성화시킴으로써 항종양 활성 및 항원에 대한 면역증강 활성을 포함하는 생체방어 효과가 유도된다는 것을 보고하였다(Yoon 등 1998; Jung 등 2011; Kim 등 2011). 이러한 결과는 이전의 주사에 의한 전신투여법에 의한 면역 활성의 증진 효과와 비교되는 기능으로서 한국산 겨우살이 추출물이 생체방어기구를 활성화시키는 기능성 식품으로의 개발 가능성이 있음을 시사하였다.

천연물의 기능성 식품으로의 응용을 포함하여 약품 개발에 대한 관심은 국내외적으로 높은 관심을 가지고 있으며, 여러 가지 질병에 대하여 민간에서는 지금도 많이 사용하고 있다. 그러나 대부분의 민간요법은 그 효능에 대한 과학적 근거를 명확히 제시하지 못하였을 뿐 아니라, 일부 생약들은 잠재적 독성을 가지고 있어 장기간 복용할 경우 동물, 사람 건강에 치명적인 영향을 초래할 수 있다(Mei 등 2006). 따라서 생약이 건강식품 또는 의약품으로서 기능을 수행하기 위해서 그 활성에 대한 규명은 물론 독성에 관한 체계적인 연구가 필수적이다(Mei 등 2006; An 등 2012).

따라서 본 연구는 겨우살이 추출물의 안전성을 검토할 목적으로 시료의 유전 독성 및 발암 원성의 유무를 예측할 수 있는 유전 독성 시험으로 미생물 복귀돌연변이 시험 및 염색체이상 시험을 실시하였고, 실험동물을 이용하여 경구 투여법으로 단회 및 13주 반복투여 독성실험을 실시함으로써 한국산 겨우살이 추출물을 기능성 식품에 적용하기 위한 기초 자료를 제공하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험을 위한 ICR 계통의 마우스 및 Sprague-Dawley(SD) 계통의 특정병원균 부재(specific pathogen free, SPF) 랫드는 (주)오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 구입하여 한국건설생활환경시험연구원(Korea Conformity Laboratories, Incheon, Korea) SPF 사육구역에서 사육하였다. 사육 환경은 항온 항습된 시설에서 12시간 간격으로 명암 주기를 조절하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(Harlan, USA)를 자유 섭취시켰으며, 식수는 정수과정을 거친 인천광역시 음용 상수도수를 자유 섭취시켰다.

2. 겨우살이 추출물 제조

본 연구에 사용된 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*)는 한국에서 서식하는 참나무를 숙주로 하여 성장하는 겨우살이로서 1월에 채취하였다. 겨우살이의 추출은 기존의 방법으로 추출 후 동결 건조하였다(Yoon 등 1994). 약술하면, 100g의 겨우살이 잎 및 줄기를 세절 후, 10배 부피(w/v)의 증류수를 넣고 믹서기로 분쇄 후 4°C에서 16시간 교반하였다. 그 후 원심분리(10,000 rpm, 30분, 4°C)를 통하여 얻은 상등액을 동결 건조하였다. 제조된 겨우살이 동결건조물은 phosphate buffered saline(PBS)를 이용하여 50 mg/ml의 농도로 조정 후, 0.2 μm의 pore size를 가지는 membrane filter(Whatman, Philadelphia, PA, USA)를 이용하여 필터 후 편이상 미슬로 C(Mistlero C)라 칭하였다. 미슬로 C는 4°C에 저장하면서 실험에 적용하였다.

3. 미생물 복귀돌연변이 시험

본 실험에서는 히스티딘을 이용하는 박테리아가 히스티딘이 필요 없는 종으로 변화하는 유전자의 변화를 이용하여 변이 여부를 측정하는 방법인 Ames 시험법(Maron & Ames 1983)으로 한국건설생활환경시험연구원에 의뢰하여 실시하였다. 시험용 균주로는 염기쌍 치환형(base-pair substitution type) 돌연변이 검색을 위하여는 히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537과 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2uvrA를 이용하였다. TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA의 균주는 Molecular Toxicology, Inc.(BOONE, NC 28607, USA)로부터 구입하여 사용하였고, 균현탁액 0.8 ml, DMSO(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.07 ml의 조성으로 -80°C deep freezer(DF9007, Ilshin, Dongducheon, Korea)으로 동결 보관하여 사용하였다. 미생물대사 활성화 효소인 S9 Mix는 기 발표된 방법으로 제조하여 사용하였다. 또 미생물 복귀돌연변이를 유도하는 양성 대조물질인 Sodium azide (NaN₃), 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate(9-AA), 2-Aminoanthracene(2-AA)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide(AF-2)는 Wako(Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 미슬로 C는 S9 mix 첨가 혹은 미

첨가군에서 최고용량도 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 부터 2배 희석법을 이용하여 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 가 되게 조정하였으며, 음성 대조군으로는 미슬로 C를 첨가하지 않았다. 결과의 판정은 대사활성체인 S9 첨가 유·무에 관계없이 최소 1개 군주에서 평균 당 복귀된 집락수에 있어서 농도 의존적이거나 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다. 또한, 음성 결과에 대해서는 필요에 따라 재현성을 확인하였다.

4. 소핵 시험

시험물질인 미슬로 C의 유전독성을 평가하기 위하여 수컷 ICR 마우스의 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 7주령 수컷 ICR 마우스를 7일간 순화시킨 후 시험물질을 멸균 증류수에 용해하여 500, 1,000 및 2,000 mg/kg을 매일 1회 총 3일간 경구 투여하였다. 최종 시험물질 투여 후 24시간 후 부검하여 골수세포를 수거하였고, 군 당 2,000개의 다염성 적혈구(Pormochromatic 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)에 대한 다염성 적혈구의 출현빈도를 구하였다(Hong 등 2008). 결과의 판정은 PCE/(PCE+NCE) 비율(Mean \pm SD, %)이 0.1 이상인 경우 시험이 타당한 것으로 하고, 소핵 유발빈도(MNPCE/2000PCEs, Mean \pm S.D., %)가 통계학적으로 유의하며, 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다. 본 실험 과정은 한국건설환경시험연구원 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었다(승인번호: IA11-00256).

5. 단회투여독성 시험

7주령 SD 랫드를 6일간의 검역 및 순화과정을 거친 뒤, 체중 감소가 없는 건강한 동물을 선별하여 무작위법으로 군을 분리하였다. 시험동물은 각 군에 암수 각 5마리를 사용하여, 밤새 절식시킨 후 시료 처리하지 않은 대조군과 시험군(500, 1,000 및 2,000 mg/kg)을 1회 경구 투여하고, 4시간 후 사료를 재급여하였다. 투여 후 14일간 매일 1회 일반증상 관찰을 실시하였으며, 투여 전, 투여 후 1, 4, 7 및 14일에 체중을 측정하였다. 투여 후 14일 째에 부검을 실시하고, 대사와 관련된 장기를 적출하여 병리조직학적 검사를 실시하였다. 본 실험 과정은 한국건설환경시험연구원 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었다(승인번호: IA11-00170).

6. 13주 반복투여독성 시험

시험물질을 시험동물에 90일간 반복 투여하여 시험물질의 무해용량(no observed adverse effect level, NOAEL) 및 표적장

기에 미치는 효과를 한국건설환경시험연구원에 의뢰하여 확인하였다. 실험동물은 각 군에 암수 각 10마리씩 F344 계통의 특정병원균 부재 랫드를 사용하였으며, 13주 동안 매일 250, 500 및 1,000 mg/kg의 미슬로 C를 투여하였다. 투여기간 동안 매일 일반증상을 관찰하였으며, 체중은 입수 시, 군 분리 시, 투여 개시 시, 투여 후 주 1회, 절식 후 부검일에 각각 측정하였다. 사료섭취량과 음수섭취량은 투여 개시일 및 투여 후 주 1회 측정하였다. 투여 완료 후 랫드를 희생시키고, 일반 혈액학적 검사로 백혈구(white blood cell, WBC), 호중구(neutrophil, NE), 림파구(lymphocyte, LY), 단핵구(monocyte, MO), 호산구(eosinophil, EO) 및 호염구(basophil, BA)를 측정하였다. 동시에 혈액생화학검사로 아스파테이트 아미노 전이효소(aspartate aminotransferase, AST), 알라닌 아미노 전이효소(alanine aminotransferase, ALT), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase, ALP), 혈액요소성 질소(blood urea nitrogen, BUN), 크레아티닌(creatinine, CRE), 혈당(glucose, GLU), 총 콜레스테롤(total cholesterol, CHOL), 총 단백질(Total protein, TP) 등의 검사를 실시하였다. 또한 실험 랫드의 장기를 이용하여 병리조직학적 검사를 실시하였다. 본 실험과정은 한국건설환경시험연구원 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었다(승인번호 IA11-00294).

7. 통계처리

대조군에 대한 실험군 간의 통계적 유의성은 Student's two-tailed *t*-test로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 미생물 복귀돌연변이 실험

유전 독성 시험은 시험물질의 유전 독성 및 발암 원성을 예측하는 실험법이다(Rim 등 2009). 본 시험에서 *S. typhimurium* 4개 군주의 경우 대사활성화 적용 및 비적용 시 모두 시험물질인 미슬로 C의 처리 농도의 증가에 따른 복귀돌연변이 콜로니 수의 증가나 항균성은 나타나지 않았다. *E. coli* WP2uvrA의 경우에도 대사활성화 적용 및 비적용 시 모두 3가지 시험물질 농도의 증가에 따른 콜로니 수의 증가나 항균성이 나타나지 않았다. 동시에 미슬로 C를 처리하지 않은 군의 콜로니 생성수가 시료처리군과의 비교에서 2배를 초과하는 복귀돌연변이 콜로니의 상승도 S9 Mix를 처리한 대사 활성화의 유무와 관계없이 관찰되지 않았다. 한편, 양성 대조군에서는 각각의 군주에서 양성으로 판단할 수 있는 범위의 복귀돌연변이 콜로니가 유발됨으로써 본 시험은 적절히 수행되었다고 할 수 있었다(Kim 등 2006; Rim 등 2009). 이상의 결과를 볼 때 시험물질 미슬로 C는 본 시험조건 하에서 해당 군주에 대한

Table 1. Bacterial reverse mutation assay with Mistlero C in male ICR mice

Metabolic activation	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of colony/plate				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 Mix(-)	0	103 \pm 3.0 ¹⁾	11 \pm 3.1	37 \pm 3.2	50 \pm 2.5	8 \pm 3.2
	313	102 \pm 3.2	12 \pm 1.5	41 \pm 3.8	61 \pm 4.6	6 \pm 2.6
	625	107 \pm 7.5	7 \pm 1.5	44 \pm 10.6	50 \pm 5.5	6 \pm 1.5
	1,250	97 \pm 3.6	11 \pm 6.2	49 \pm 11.9	52 \pm 6.7	8 \pm 1.0
	2,500	101 \pm 7.2	12 \pm 2.0	50 \pm 3.8	52 \pm 10.8	8 \pm 1.7
	5,000	100 \pm 15.7	9 \pm 3.6	44 \pm 5.3	62 \pm 2.5	8 \pm 2.0
S9 Mix(+)	0	114 \pm 5.5	18 \pm 1.5	51 \pm 2.3	59 \pm 3.2	11 \pm 2.3
	313	120 \pm 17.7	16 \pm 2.6	51 \pm 4.6	54 \pm 4.9	9 \pm 2.5
	625	116 \pm 7.9	11 \pm 3.2	59 \pm 5.0	59 \pm 5.7	11 \pm 1.5
	1,250	106 \pm 15.8	12 \pm 1.2	54 \pm 7.6	64 \pm 9.6	10 \pm 2.5
	2,500	108 \pm 13.5	25 \pm 4.9	49 \pm 7.1	67 \pm 3.8	14 \pm 3.0
	5,000	112 \pm 2.6	21 \pm 4.5	56 \pm 6.8	69 \pm 5.5	14 \pm 4.2
Positive controls	Positive controls	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colony	481 \pm 42.3	350 \pm 15.6	319 \pm 11.7	596 \pm 52.0	2,235 \pm 96.8
	Positive controls	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	1	2
	Number of colony	1,027 \pm 80.8	244 \pm 8.7	330 \pm 13.9	434 \pm 21.2	273 \pm 37.8

Reverse mutation(Ames) assay using *S. typhimurium* and *E. coli* treated with Mistlero C without(upper panel) and with metabolic activation (middle panel), respectively. The lower panel is positive control(without and with metabolic activation)

¹⁾ Values are expressed as mean \pm S.D.

복귀돌연변이를 유발하지 않음으로 음성인 결과를 보였다.

2. 소핵 시험

유전 독성 여부를 검사하는 연구 방법 중 소핵(micronucleus) 시험은 시험물질을 마우스에 경구 투여하고, 24시간 후 골수를 채취하여 소핵 유발 유무를 관찰하는 *in vivo* 독성실험법의 하나이다. 소핵의 생성은 마우스 골수 내에서 erythroblast가 최종 분열한 후 탈핵 과정을 거쳐 미성숙 적혈구인 다염성 적혈구가 되고, 이 다염성 적혈구는 약 10시간 후 성숙 적혈구가 되어 혈관으로 가게 되는데, 핵이 있는 적혈구 상태에서 시험물질이 돌연변이를 유발하는 특성이 있다면 염색체가 깨어져 더 이상 분화하지 못하고 파편으로 남아 다염성 적혈구 내에 있게 된다(Hong 등 2008). 이를 소핵이라고 하며, 소핵이 많이 관찰될수록 시험물질이 돌연변이를 유발하는 특성이 많다고 판단한다.

미슬로 C의 투여량 및 투여기간 결정을 위하여 500, 1,000 및 2,000 mg/kg을 1일 1회, 3일간 경구 투여하고 관찰한 결과, 특별한 육안적 이상조건이 관찰되지 않았다(결과 미제시). 따

Table 2. Micronucleus test of Mistlero C in male ICR mice

Groups	Dose (mg/kg)	MNPCE/2000 PCEs(%)	PCE/(PCE+NCE)
Vehicle control	0	0.16 \pm 0.05 ¹⁾	0.45 \pm 0.08 ¹⁾
	500	0.23 \pm 0.14	0.45 \pm 0.04
Mistlero C	1,000	0.18 \pm 0.08	0.42 \pm 0.04
	2,000	0.23 \pm 0.07	0.46 \pm 0.07
MMC	2.0	11.08 \pm 0.92**	0.32 \pm 0.04**

** Significantly different from the control at $P<0.01$ (One-way ANOVA)

MNPCE; PCE with one or more micronuclei, PCE; polychromatic erythrocyte, NCE; normochromatic erythrocyte, MMC; mitomycin C

¹⁾ Values are expressed as mean \pm S.D.(n=6)

라서 본 실험에서 1일 1회 3일간 경구 투여하고, 24시간 후에 마우스로부터 골수세포를 수집하고, 소핵과 세포 독성을 관찰하였다. 실험 결과, 용매대조군과 비교하여 500, 1,000, 2,000

mg/kg의 미슬로 C 투여군에서 특이한 일반증상은 관찰되지 않았으며, 개체 당 약 2,000개의 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵 유발빈도는 모든 시험물질투여군 용매대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았다(Table 2). 한편, mitomycin C를 처리한 양성대조군은 소핵 유발빈도에서 용매대조군에 비해 통계적으로 유의하며 현저한 증가를 보였다($P<0.01$). 세포 독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율도 실험에 적용한 모든 미슬로 C 투여군에서 멸균증류수를 사용한 음성대조군에 비하여 유의한 감소가 나타나지 않았다. 그러나 mitomycin C를 처리한 양성대조군에서는 유의한 감소 효과가 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 시험물질 미슬로 C는 식품의약품안전청 고시 제 2005-60의 의약품 등의 독성시험기준에 명시된 마우스 최대 투여용량인 2,000 mg/kg/day의 범위에서 미생물복귀 돌연변이 및 마우스 골수세포에 소핵을 유발하는 유전독성 효과는 없는 결과를 보였다(Kim 등 2006; Hong 등 2008).

3. 단회 투여 독성 시험

시험물질 미슬로 C의 단회 투여 독성 및 개략적인 치사량을

조사하기 위하여, SD 계통 암·수 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경구 투여하였다. 대조군과 3개의 시험군(500, 1,000 및 2,000 mg/kg)으로 시험을 수행하였으며, 시험기간 동안 일반증상, 체중 변화, 시험 중 동물의 사망 유무와 사망동물 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다. 실험 결과, 모든 시험군의 실험동물에서 특이한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 동시에 단회 투여 후 14일까지의 체중 변화를 관찰한 결과, 모든 시험군에서 시험물질에 의한 체중 변화는 관찰되지 않았다(Table 3). 이상의 결과로 보아 시험물질 미슬로 C의 LD₅₀은 2,000 mg/kg 이상인 것으로 사료되었다.

4. 13주 연속투여독성 시험

미슬로 C의 13주 반복 경구 투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 SD 계통 암·수 랫드를 이용하여 시험물질 250, 500 및 1,000 mg/kg 용량으로 투여군을 설정하고 부형제로 물을 섭취시킨 대조군과 비교하였다. 각 군별 동물 수는 암수 각 10마리를 사용하였고, 13주 반복 투여에 의한 사망률, 임상증상, 체중 변화, 사료 및 음수 섭취량, 안검사, 뇨검사, 혈액학

Table 3. Body weight changes of rats orally one time administered with Mislero C

Sex	Dose(mg/kg)	Body weight(g)				
		0 day	1 day	4 day	7 day	14 day
Male	0	229.6±9.7 ¹⁾	260.9±11.2	280.4±10.4	302.3± 9.9	342.2± 8.0
	500	227.4±8.3	256.2± 8.6	271.5± 9.5	290.8±14.7	329.0±20.6
	1,000	230.4±4.3	260.3± 6.6	273.7±13.8	306.5±10.4	352.0±16.4
	2,000	232.6±6.7	262.6± 6.5	278.0± 9.7	302.8± 7.1	344.3± 9.6
Female	0	179.5±7.5	200.7± 7.2	213.2± 9.6	221.8±13.2	244.2±19.2
	500	179.9±8.4	202.8±11.9	211.9± 7.8	221.3± 9.6	240.9±15.6
	1,000	180.7±5.3	204.8± 8.8	214.4± 6.9	226.3± 6.8	248.1± 8.7
	2,000	178.6±8.5	205.9±11.0	213.2±14.3	222.9± 6.5	239.2± 5.9

¹⁾ Values are expressed as mean±S.D.(n=5)

Table 4. Body weight changes of rats in the 13 weeks oral repeated toxicity study

Sex	Dose(mg/kg)	Body weight(g) weeks after administration				
		0	3	7	10	13
Male	0	206.1±5.9 ¹⁾	380.9±23.2	504.9±47.6	564.1±61.0	596.9±70.8
	250	209.6±4.6	387.9±22.5	514.1±41.0	571.2±46.7	610.2±45.8
	500	209.8±6.2	383.3±14.1	513.4±26.0	560.3±31.7	606.8±34.0
	1,000	208.7±5.9	389.0±23.3	528.7±49.3	583.8±65.5	629.6±67.4
Female	0	166.3±8.0	226.5±13.5	267.1±21.1	285.9±24.2	299.2±25.2
	250	170.3±4.4	237.3±14.9	285.9±21.5	305.9±21.9	323.2±25.5
	500	168.7±6.4	231.6±17.2	275.0±25.7	293.1±26.4	309.1±26.0
	1,000	166.3±4.7	228.3±11.2	275.4±14.9	294.4±15.7	306.7±18.0

¹⁾ Values are expressed as mean±S.D.(n=10)

및 혈액생화학 검사, 부검소견 및 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

시험 전 기간 중 대조군 및 미슬로 C 투여한 암수 모든 군에서 정상적인 체중 증가가 관찰되었고(Table 4), 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다. 또한 대조군 및 시험물질 투여군의 혈액학적 검사를 수행한 결과, 백혈구, 호중구, 림파구, 단핵구, 호산구 및 호염구의 변화는 대조군에 비교하여 변화가 없는 결과를 보였다(Table 5).

혈액생화학 측정기를 이용하여 각 실험군의 혈청 분석을 실시한 결과, 250, 500 및 1,000 mg/kg 용량이 투여된 미슬로 C 투여군은 암·수 동물 모두에서 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 한편, 기타 실험으로 사료 섭취량, 음수 섭취량, 혈액 응고 현상 및 장기 중량을 측정된 결과, 모든 시험군에서 시험물질 투여와 관련된 유의한 변화는 관찰되지 않았다(결과 미제시). 또한 육안적 부검 및 조직병리학적 검사 결과도 모든 시험군에서

시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다(결과 미제시). 안검사와 노검사 결과 역시 모든 시험동물에서 시험물질 투여와 관련된 독성학적 이상소견은 관찰되지 않았다(결과 미제시). 이상의 결과로 보아 본 시험 조건 하에서 미슬로 C의 랫드에 대한 13주 반복 경구 투여 결과, 무독성량은 $\leq 1,000$ mg/kg이며, 표적장기(target organ)는 관찰되지 않았다.

요 약

본 연구에서는 겨우살이 열수 추출물인 미슬로 C의 안전성을 검토하고자 유전 독성 및 실험동물을 이용한 안전성 검사를 실시하였다. 미슬로 C의 미생물 돌연변이 실험을 *S. typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주와 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주를 이용하여 대사 활성계 적용 및 비적용 하에서 복귀돌연변이 실험을 실시한 바, 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 처리 농도까지 복귀돌연변이 집락은 나타나지 않았다. ICR 마우스에게 500,

Table 5. Hematological values of rats in the 13 weeks oral repeated toxicity study

Sex	Dose(mg/kg)	Hematological tests(K/ μl)					
		WBC ¹⁾	NE ²⁾	LY ³⁾	MO ⁴⁾	EO ⁵⁾	BA ⁶⁾
Male	0	9.43 \pm 2.71 ⁷⁾	1.21 \pm 0.32	7.90 \pm 2.60	0.20 \pm 0.13	0.09 \pm 0.05	0.01 \pm 0.01
	250	9.37 \pm 2.44	1.23 \pm 0.36	7.83 \pm 2.10	0.18 \pm 0.11	0.11 \pm 0.04	0.01 \pm 0.01
	500	9.87 \pm 1.41	1.59 \pm 0.48	7.89 \pm 1.23	0.24 \pm 0.15	0.13 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00
	1,000	9.53 \pm 2.76	1.54 \pm 0.60	7.57 \pm 2.62	0.27 \pm 0.27	0.13 \pm 0.05	0.01 \pm 0.01
Female	0	5.65 \pm 1.91	0.76 \pm 0.33	4.65 \pm 1.67	0.12 \pm 0.07	0.10 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00
	250	7.14 \pm 2.29	0.86 \pm 0.59	6.03 \pm 1.79	0.15 \pm 0.08	0.09 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00
	500	5.46 \pm 1.59	0.72 \pm 0.24	4.52 \pm 1.40	0.13 \pm 0.09	0.08 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00
	1,000	6.57 \pm 1.76	0.76 \pm 0.31	5.52 \pm 1.53	0.16 \pm 0.10	0.10 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00

¹⁾ white blood cell, ²⁾ neutrophil, ³⁾ lymphocyte, ⁴⁾ monocyte, ⁵⁾ eosinophil, ⁶⁾ basophil, ⁷⁾ values are expressed as mean \pm S.D.(n=10)

Table 6. Serum biochemical values of male rats in the 13 weeks oral repeated toxicity study

Sex	Dose (mg/kg)	Tests							
		AST ¹⁾ (IU/ ℓ)	ALT ²⁾ (IU/ ℓ)	ALP ³⁾ (IU/ ℓ)	BUN ⁴⁾ (mg/d ℓ)	CRE ⁵⁾ (mg/d ℓ)	GLU ⁶⁾ (mg/d ℓ)	CHO ⁷⁾ (mg/d ℓ)	TP ⁸⁾ (g/d ℓ)
Male	0	99 \pm 33 ⁹⁾	37 \pm 8	324 \pm 54	15.9 \pm 2.3	0.63 \pm 0.06	232 \pm 30	87 \pm 33	6.4 \pm 0.4
	250	96 \pm 27	35 \pm 4	309 \pm 50	14.9 \pm 1.4	0.65 \pm 0.06	219 \pm 21	86 \pm 11	6.3 \pm 0.4
	500	102 \pm 31	38 \pm 9	308 \pm 33	16.5 \pm 1.7	0.67 \pm 0.07	212 \pm 22	87 \pm 9	6.2 \pm 0.4
	1,000	121 \pm 62	49 \pm 27	317 \pm 74	16.3 \pm 1.8	0.66 \pm 0.04	215 \pm 41	83 \pm 17	6.1 \pm 0.3
Female	0	136 \pm 76	50 \pm 28	230 \pm 126	18.3 \pm 4.4	0.75 \pm 0.05	156 \pm 37	94 \pm 20	6.6 \pm 0.3
	250	106 \pm 22	38 \pm 11	180 \pm 44	19.4 \pm 5.3	0.81 \pm 0.08	172 \pm 40	90 \pm 12	6.5 \pm 0.4
	500	104 \pm 27	43 \pm 27	159 \pm 61	18.5 \pm 2.2	0.79 \pm 0.03	176 \pm 34	99 \pm 20	6.6 \pm 0.5
	1,000	105 \pm 26	37 \pm 7	158 \pm 53	17.2 \pm 2.0	0.76 \pm 0.04	175 \pm 25	99 \pm 11	6.6 \pm 0.3

¹⁾ aspartate aminotransferase, ²⁾ alanine aminotransferase, ³⁾ alkaline phosphatase, ⁴⁾ blood urea nitrogen, ⁵⁾ creatinine, ⁶⁾ glucose, ⁷⁾ total cholesterol, ⁸⁾ total protein, ⁹⁾ values are expressed as mean \pm S.D.(n=10)

1,000 및 2,000 mg/kg를 경구 투여하고, 골수세포를 수집하여 소핵을 측정된 결과, 정상마우스의 경우와 비교하여 유의한 소핵은 관찰되지 않았기에 미슬로 C는 유전독성을 유발하지 않는 것으로 판단되었다. 식품의약품안전청의 의약품 등의 독성시험기준에 따라 암·수 SD 계열의 랫드에 시험물질을 0, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로 1회 경구 투여한 후, 14일간의 체중 변화 및 사망률을 조사한 결과, 대조군과 비교하여 유의한 체중 변화는 없었으며, LD₅₀은 2,000 mg/kg 이상인 것으로 사료된다. 또한 0, 250, 500 및 1,000 mg/kg/day의 용량으로 13주간 반복 투여하면서 실험동물의 일반증상, 체중변화, 혈액 및 혈액생화학적 변화, 부검소견, 조직학적인 변화를 관찰하였다. 시험기간 중 암·수 모든 군에서 시험물질 투여에 기인한 일반적인 증상 변화는 관찰되지 않았고, 시험물질의 반복 투여로 인한 사망 마우스 역시 관찰되지 않았다. 따라서 미슬로 C를 13주간의 랫드에 대한 13주 반복 경구 투여 결과, 무독성량은 최소한 1,000 mg/kg 이하인 결과를 나타냈으며, 이 농도에서 독성을 유발하는 표적장기는 관찰되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 2011년도 식품기능성평가지원 사업에 의해 수행되었습니다.

References

- An IJ, Kwon JK, Lee JS, Lee SH, Park YS, Park BK, Kim SK, Kim BS, Cho SD, Choi CS, Lee BH, Kang BK, Jung JY. 2012. Evaluate a repeated oral dose toxicity and immunomodulating activity of *Pulsatilla koreana* and *Artemisia annua* in Sprague-Dawley rats. *J Fd Hyg Safety* 27:96-102
- Bloksma N, Van DH, Korst P, Willers JM. 1979. Cellular and humoral adjuvant activity of a mistletoe extract. *Immunobiology* 156:309-318
- Hong SG, Chung SG, Hyun SH. 2008. The micronucleus test of the diglyceride preparation with conjugated linoleic acid by using mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:853-857
- Jung JH, Kim YH, Song TJ, An HS, Kim KD, Kim IB, Yoon TJ, Kim JB. 2011. Adjuvant effect of Korean mistletoe lectin on mucosal immunity induction following intranasal immunization with hemagglutinin antigen. *Food Sci Biotechnol* 20:629-634
- Kang TB, Song SK, Yoon TJ, Yoo YC, Lee KH, Her E, Kim JB. 2007. Isolation and characterization of two Korean mistletoe lectins. *J Biochem Mol Biol* 40:959-965
- Kang TB, Yoon TJ, Kim JB, Song SK, Lee KH, Kwak JH. 2001. Preliminary toxicity and general pharmacology of KML-IIU, a purified lectin from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*). *Yakhak Hoeji* 45:251-257
- 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
- Kim JC, Yoon TJ, Song TJ, Kim YH, An HS, Kim JB. 2011. Mucosal immunoadjuvant activity of Korean mistletoe lectin-C. *Korean J Food Sci Technol* 43:72-76
- Kim SJ, Cho HW, Rim KT, Maeng SH, Kim HY. 2006. Bacterial reverse mutation test of 1,2,4-trimethylbenzene. *J Environ Toxicol* 21:317-322
- Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113:173-215
- Mei N, Arlt VM, Phillips DH, Heflich RH, Chen T. 2006. DNA adduct formation and mutation induction by aristolochic acid in rat kidney and liver. *Mutat Res* 602:83-91
- 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
- Rim KT, Kim SJ, Kim JG, Kim HY, Yang JS. 2009. Bacterial reverse mutation (AMES) test of aluminum oxide, calcium oxide, and sodium tetraborate. *J of the Korean Society for Environmental Analysis* 12:196-203
- Yoon TJ, Yoo YC, Choi OB, Do MS, Kang TB, Lee SW, Azuma I, Kim JB. 1995. Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice. *Cancer Lett* 97:83-91
- Yoon TJ, Yoo YC, Hong EK, Cho YH, Lee SW, Azuma I, Yoo BI, Kim JB. 1994. Effect of Korean mistletoe extracts on the induction of IL-1 and TNF- α from mouse macrophages. *Kor J Pharmacogn* 25:132-139
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I, Kim JB. 1998. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int J Immunopharmacol* 20:163-172
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Her E, Kim SH, Kim K, Azuma I, Kim JB. 2001. Cellular and humoral adjuvant activity of lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*).

Int Immunopharmacol 1:881-889

Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Song SK, Doo MS, Kim JB. 1999.
Immumoadjuvant activitiy of Korean mistletoe extract (*Viscum
album coloratum*) to enhance humoral and cellular immune

response. *Korean J Immunol* 21:63-70

접 수 : 2013년 6월 3일
최종수정 : 2013년 8월 9일
채 택 : 2013년 8월 16일