



천연식물자원 지모와 황백피 혼합 수추출물의 안전성평가

정영신* · 박철범¹

호서대학교 생명공학과, ¹호서대학교 융합기술원

Evaluation of Genotoxicity and 14-day Repeat Dose Toxicity of Water Extract of the Mixture of Natural Plants, *Anemarrhena* and *Phellodendron*

Young-Shin Chung* and Cheol-beom Park¹

Department of Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

¹Hoseo Fusion Technology Research Center, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

(Received March 11, 2014/Revised May 6, 2014/Accepted August 15, 2014)

ABSTRACT - The safety of a new natural plant composition (ADP) was assessed on the genotoxicity study and 14-day repeat dose toxicity study. ADP contains a mixed water extract obtained from the mixture of *Phellodendron* cortex (*Phellodendron amurense*) and *Anemarrhena* rhizoma (*Anemarrhena asphodeloides*), and poses the contractile properties mediated by alpha-adrenoceptor of the prostate and urethra as well as antioxidant and anti-inflammatory properties. In order to evaluate genetic safety, *in vivo* micronucleus test was performed in ICR mice orally administered with three dose levels of 1250, 2500, 5000 mg/kg body weight, and vehicle and positive control. In the 14 days study, Sprague-Dawley rats were treated with ADP at the dose levels of 500, 1000, 2000 mg/kg once a day, and clinical signs, body weights, hematology, serum biochemistry, necropsy findings and organ weights were monitored and examined. In experimental results, ADP treatment, compared with vehicle control, did not induce the micronucleated erythrocytes from mouse bone marrow. In the 14 days study, any significant and toxicological differences in all measurements of parameters were not observed in ADP treatment groups of animals, compared with vehicle treatment. The No-Observed-Adverse-Effect-Level (NOAEL) of ADP in the 14 days study was determined to be greater than 2000 mg/kg/day in both sexes.

Key words : *Anemarrhena asphodeloides*, *Phellodendron amurense*, genetic safety, 14-day repeat dose toxicity, NOAEL

지모(*Anemarrhena asphodeloides*)와 황백(*Phellodendron amurense*)은 천연식물로서 전통 및 민간 요법에서 오랫동안 사용해 오던 식물자원이며 각각 또는 또 다른 식물들과 혼합하여 열탕추출물로 사용해 왔다. 지모는 사포닌, 플라보노이드, 탄닌 성분들이 함유되어 있는 근경(rhizoma)을 주로 사용하며, 사포닌 성분이 주 기능성 성분으로 알려져 있고 지모사포닌(timosaponin), 살사사포게닌(sarsasapogenin), 네오기토게닌(neogitogenin) 등의 사포닌 성분을 함유하고 있다¹⁾. 민간에서는 설사, 염증, 요통 및 당뇨에 사용되었고¹⁾, 최근 연구에서 추출물과 유효성분에 의한 작용 및 기전이 보고되고 있다. 살사사포게닌은 신장유래세포에서 초기 활성산소를 발생시켜 미토콘드리아 작용을 교란시키며

소포체 스트레스에 의한 암세포 소멸을 유도하였다²⁾. 지모사포닌은 대장암세포의 세포 주기를 통해 성장분화를 억제시키고(timosaponin A-III)³⁾, 혈액응고를 억제하는 활성이 있으며(timosaponin B-II)⁴⁾, 지모의 페놀성 성분들은 *in vitro*에서 비만세포의 분화를 억제하였고⁵⁾, 추출에 의한 항알러지 효과가 마우스 생체내 시험에서 대식세포를 통해 나타남을 보고 하였다⁶⁾. 황백피는 황백나무의 껍질로서 베르베린(berberine), 팔마틴(palmatine), 마그노후로린(magnoflorine), 자테오리진(jateorrhizine) 등의 알칼로이드 성분이 함유되어 있으며, 그 외에도 β-시토스테롤(β-sitosterol) 및 고미질 등이 함유되어 있어 여러가지 생리활성을 나타내고 있다⁷⁾. 항균작용 및 항염작용^{8,9,10)}, 아세틸콜린 억제작용¹¹⁾, 혈당조절작용¹²⁾, 면역세포인 비장세포의 활성¹³⁾ 및 간보호작용¹⁴⁾ 등의 생리활성이 보고된 바 있다. 최근 황백피의 추출물과 베르베린에 의한 폐암세포억제 작용이 세포주기 억제에 의한 것으로 확인되었고¹⁵⁾ 추출물에 의한 전립선암 억제 활성도 보고되었다¹⁶⁾.

*Correspondence to: Young-Shin Chung, Department of Biotechnology Hoseo University 20, Hoseo-ro 79beon-gil, Baebang-eup, Asan, Chungcheongnam-do 336-795, Korea
Tel: 82-41-540-9671, Fax: 82-41-548-6231
E-mail:yschung@hoseo.edu

본 연구에서 사용한 ADP는 지모와 황백피를 혼합하여 열탕으로 추출한 혼합 수추출물이며 전립선 및 요도 평활근의 수축이완 작용을 확인한 바 있어서 전립선 비대 또는 방광의 염증에 사용할 수 있도록 국내기업이 개발하고 있는 물질이며, ADP의 지표성분인 알칼로이드 베르베린의 요도 및 전립선 평활근에 관한 작용을 입증한바 있다^{17,18)}. 최근의 연구보고에 따르면, 지모 추출물이 전립선비대를 촉진시키는 testosterone 5- α -reductase를 억제하는 것으로 관찰되었고¹⁹⁾ 랫드에서 추출한 전립선에 전기적 자극 또는 직접적인 자극을 주었을 때 황백피가 평활근을 이완시키는 활성이 보고되었다²⁰⁾.

전립선비대는 50대 남성에 50%, 80대에 90%를 위협하는 퇴행성 질환으로 나이에 따른 호르몬 변화가 주 원인으로 알려져 있으며²¹⁾ 중년에 삶의 질을 악화시키거나 완치가 어려워 만성적 질환으로 이어지므로 치료제 또는 건강기능식품의 개발이 시급히 요구되고 있다. 이에 따라, ADP를 건강기능식품으로 개발하기 위해서는 중·단기 또는 장기 적용이 필요하므로 우선적으로 안전성을 확보하기 위해 본 연구를 진행하게 되었다.

ADP의 단회투여 독성시험을 통하여 LD₅₀가 5000 mg/kg 이상인 것이 확인되었고²²⁾, *in vitro* 유전독성시험(박테리아 복귀돌연변이시험 및 CHL 세포에서 염색체이상시험)에서 음성결과를 관찰하였다²³⁾. 따라서, 본 연구에서는 생체내(*in vivo*)에서 유전적인 안전성을 평가하기 위한 마우스 소핵시험과 반복경구투여(14일) 독성시험을 통해 안전성을 확보하고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험 시료 및 재료

본 시험에 사용한 지모와 황백피의 혼합 수추출물(ADP)은 (주)메드빌 중앙연구소(대한민국 서울시 금천구)의 천연식물 추출 시료인 ADP(a voucher specimen No. ADP100)를 사용하였고 다음과 같은 방법으로 추출하여 품질을 확인한 시료를 사용하였다. 지모의 뿌리(Rhizoma)와 황백나무의 껍질(Cortex)은 경동시장에서 구입하였고 배기환교수(충남대학 약학대학, 대전)에 작물분류 확인을 받았다. 지모와 황백피를 1:1로 섞어 1시간 열탕추출(121°C)을 하였고 동결건조 후 냉건소에 보관하고 사용하였다. 추출물의 지표성분인 베르베린(berberine)을 HPLC로 분석하였고 베르베린의 함량이 0.33%로 확인하였다. 본시험에 사용한 시약으로 mitomycin C (MMC)는 시그마-알드리치(St. Louis, MO)에서 구입하였다.

실험 동물 및 관리

소핵시험을 위해서 SPF (specific pathogen free) ICR 마우스 (6주령, 수컷)와 14일 반복투여독성시험을 위한 SPF

Sprague-Dawley (SD) 랫트(4~5주령, 암·수)를 오리엔트 바이오(대한민국 경기도 성남시)에서 제공받았고, 마우스는 한 케이지(polycarbonate, 200 × 260 × 130 mm)에 5마리, 랫드는 한 케이지(polycarbonate, 260 × 420 × 180 mm)에 2~3마리씩 넣어 사육하였으며, 사육환경은 실온 22 ± 3°C, 상대습도 50 ± 10%, 명암주기 12시간(오전 8시~오후 8시), 환기횟수 10~20/hr, 조도 150~300 Lux 조건에서 사육관리하였다. 1주간의 순화기간 동안 육안적으로 일반증상을 관찰하고 건강한 동물만 사용하였다. 모든 동물은 NIH 기준에 의해 마련된 동물윤리 기준 및 우수동물실험실 표준작업 수순의 관리기준에 따라 사육 관리되었다.

마우스를 이용한 소핵시험

Schmid 등²⁴⁾의 시험방법과 OECD guideline (TG 474)²⁵⁾에 따라 마우스 소핵시험을 수행하였고 상세하게는 다음과 같다. ADP에 대한 랫드의 단회 경구투여 독성시험²²⁾에서 5000 mg/kg에 의한 사망개체가 발견되지 않았으므로 본 소핵시험에서 ADP의 최고용량을 5000 mg/kg로 하고 공비 2로 3농도(1250, 2500 and 5000 mg/kg)를, 음성대조군에는 멸균중류수, 양성대조군에는 MMC (1 mg/kg)를 사용하였다. 군당 6마리로 하여 ADP와 음성대조물질은 경구로 24시간 간격으로 2회 투여하였고, 양성대조물질은 복강으로 1회 투여하였다. 마우스는 최종 투여 후 24시간에 희생시켰다. 대퇴골을 채취하였고 각 개체당 2개의 골수 도말 슬라이드를 제작하고 5% Giemsa 염색시약으로 염색하였다. 현미경 1000배 배율로 슬라이드를 관찰하여 다염성적혈구(PCE, polychromatic erythrocyte)와 정염성적혈구(NCE, normochromatic erythrocyte)의 합이 200개가 되도록 계수하고 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비[PCE/(PCE+NCE)]를 구하였다. 또한, PCE 지름의 1/5 to 1/20 크기에 Giemsa 로 염색된 작고 둥근 모양을 소핵으로 정의하였고, PCE가 2000개가 되도록 계수하여 소핵다염성적혈구(MNPCE, micronucleated polychromatic erythrocyte)의 비[MNPCE/(2000PCE)]를 구하였다. MNPCE의 비율이 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 상승하고 용량 의존적으로 증가하거나 적어도 1개 이상의 용량군에서 통계적으로 재현성이 관찰될 때 유전독성 양성으로 판정하였다.

14일 반복 경구투여 독성시험

랫트를 사용한 단회 경구투여 독성시험²²⁾ 결과, 투여용량인 5000 mg/kg에서 사망 및 이상소견이 관찰되지 않았고, ADP의 임상예정용량이 10 mg/kg이므로, 14일 반복 경구투여 독성시험에서 ADP의 투여 최고용량을 2000 mg/kg로 하고 공비 2로 3용량(500, 1000, 2000 mg/kg)을 사용하였다. 군당 암·수 각 5마리로 하고 매일 동일한 시간에 경구로 투여하였고 투여 전과 투여 후에 일반증상 및 사망동물 유무를 관찰하여 기록하였다. 투여 시작전과 주

1회 체중을 측정하였으며, 부검을 위해 전날 절식시키고, 부검 당일 isoflurane으로 마취 후, 후대정맥에서 혈액을 채취하였다. 장기 적출 전 체표, 피하, 흉강 및 복강의 모든 장기를 육안적으로 관찰하고 다음 장기들을 적출하여 무게를 측정하였다. 적출장기는 뇌 및 뇌하수체, 부신, 간, 비장, 신장, 심장, 가슴샘, 폐, 타액선, 갑상선(수컷), 고환, 부고환, 전립선, 난소(자궁 포함)의 중량을 측정하였으며, 양측성 장기를 모두 측정하였고 체중비례 상대중량으로도 환산하였다.

부검 시 채혈한 혈액 중 1 ml를 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)로 분석 항목들(white blood cell, WBC; red blood cell, RBC; hemoglobin, HGB; hematocrit, HCT; mean cell volume, MCV; mean cell hemoglobin, MCH; mean cell hemoglobin concentration; red cell distribution width, RDW; hemoglobin distribution width, HDW; platelet count, PLT; mean platelet volume, MPV)을 측정하였다. 또한, 혈액 일부를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube (Insepack, Sekisui, Japan)에 주입하고 15-20 분간 상온에 방치하여 응고시킨 후 10 분간

원심분리하여 얻은 혈청으로 AU400 혈액생화학분석기(Olympus, Japan)를 활용하여 혈액생화학적 검사 항목(aspartate aminotransferase, AST; alanine aminotransferase, ALT; alkaline phosphatase, ALP; blood urea nitrogen, BUN; creatinine, CRE; glucose, GLU, total cholesterol, CHO; total protein, TP; creatine phosphokinase, CPK; albumin, ALB, total bilirubin, T-BIL; triglyceride, TG; inorganic phosphorus, IP)을 측정하였고, 전해질(calcium, Ca; sodium, Na; potassium, K; chloride, Cl)은 전해질 분석기(644 Na, K, Cl Analyzer, Ciba-Corning, USA)로 측정하였다.

통계학적 분석

유전독성시험 결과에서 소핵의 유발빈도에 대해서는 Fisher's exact test를 실시하여 유의성(유의수준: 0.05)을 검증하였고, 다염성적혈구의 출현빈도와 체중의 변화는 One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성(유의수준: 0.05)을 검증하였다.

반복투여 독성시험에서 모수적인 다중비교를 위해 일원 배치분산분석(ANOVA)을 실시하여 군간 유의성을 관찰한 후(유의수준: 0.05), 유의성이 인정되면 Levene test를 실

Table 1. *In vivo* micronucleus assay for ADP in mice

	Dose (mg/kg)	No. of Animal	Body weight (g) ¹⁾	MNPCE/ 2000 PCEs	PCE/ PCE+NCE
ADP	0	6	26.4 ± 2.7	1.8 ± 1.3 ²⁾	0.45 ± 0.03
	1250	6	28.4 ± 1.5	2.0 ± 1.4	0.44 ± 0.04
	2500	6	28.3 ± 1.0	1.8 ± 0.8	0.44 ± 0.07
	5000	6	26.0 ± 2.3	2.8 ± 1.9	0.46 ± 0.05
MMC	1	6	28.4 ± 1.4	23.7 ± 4.6*	0.33 ± 0.05*

¹⁾: Body weight right before necropsy

²⁾: Values are mean ± Standard deviation

*: Significantly different from negative control at $P < 0.05$

Abbreviations

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Normochromatic erythrocyte

MNPCE: PCE with one or more micronuclei

MMC: mitomycin C (positive control)

Table 2. Body weights of male and female rats orally administered with ADP

Period (weeks)	Dose group (mg/kg/day)			
	Control	500	1000	2000
Body weights (g) of male rats				
0	291.2 ± 12.5 ¹⁾	291.3 ± 10.9	290.9 ± 11.4	290.9 ± 11.2
1	341.7 ± 8.6	331.5 ± 13.0	350.5 ± 23.0	345.3 ± 18.2
2	364.4 ± 13.4	366.2 ± 16.0	380.2 ± 23.9	372.8 ± 24.8
Body weights (g) of female rats				
0	193.9 ± 18.8	193.7 ± 13.4	193.9 ± 12.2	194.4 ± 11.4
1	202.1 ± 21.4	210.2 ± 13.5	209.8 ± 17.2	211.0 ± 17.5
2	214.5 ± 25.5	222.9 ± 17.3	218.2 ± 22.4	222.7 ± 15.9

¹⁾: Values are mean ± Standard deviation.

Table 3. Hematological values of male SD rats orally administered with ADP

Parameter	Dose group (mg/kg/day)			
	Control	500	1000	2000
WBC (10 ³ /ul)	10.7 ± 3.12 ¹⁾	16.0 ± 5.06	13.8 ± 0.90	15.3 ± 3.93
RBC (10 ⁶ /ul)	8.9 ± 1.02	8.5 ± 0.28	8.4 ± 0.30	8.5 ± 0.40
HGB (g/dl)	17.3 ± 2.20	16.2 ± 0.77	15.7 ± 0.26	16.0 ± 0.13
HCT (%)	54.3 ± 8.04	49.4 ± 2.52	48.6 ± 1.17	48.7 ± 1.23
MCV (fl)	60.5 ± 2.43	58.3 ± 1.12	58.1 ± 1.21	57.2 ± 1.17
MCH (pg)	19.3 ± 0.47	19.1 ± 0.33	18.8 ± 0.46	18.9 ± 0.83
MCHC (g/dl)	32.0 ± 0.70	32.8 ± 0.31	32.3 ± 0.20	33.0 ± 0.73
RDW (%)	11.4 ± 0.05	11.1 ± 0.24	11.8 ± 0.49	11.0 ± 0.33
HDW (g/dl)	2.3 ± 0.06	2.4 ± 0.08	2.5 ± 0.09	2.4 ± 0.11
PLT (10 ³ /ul)	987 ± 115	1255 ± 146*	1100 ± 140	1291 ± 144*
MPV (fl)	6.9 ± 0.91	6.9 ± 0.13	7.2 ± 0.26	7.3 ± 0.41
RET (%)	2.6 ± 0.47	2.5 ± 0.21	2.8 ± 0.27	2.1 ± 0.22
NEU (%)	12.7 ± 2.65	8.6 ± 3.27	7.8 ± 3.10	7.4 ± 2.58
LYM (%)	82.8 ± 4.64	87.7 ± 3.08	89.0 ± 3.15	88.2 ± 2.76
MONO (%)	2.2 ± 1.19	1.8 ± 0.30	1.2 ± 0.32	2.3 ± 0.91
EOS (%)	1.0 ± 0.47	0.7 ± 0.24	0.9 ± 0.10	0.7 ± 0.24
BASO (%)	0.5 ± 0.41	0.4 ± 0.14	0.3 ± 0.06	0.4 ± 0.05
LUC (%)	0.8 ± 0.68	0.8 ± 0.21	0.8 ± 0.12	1.1 ± 0.29

¹⁾: Values are mean ± Standard deviation

*: Significantly different from negative control at $P < 0.05$

Abbreviations

WBC: white blood cell, RBC: red blood cell, HGB: hemoglobin, HCT: hematocrit, MCV: mean cell volume, MCH: mean cell hemoglobin, MCHC: mean cell hemoglobin concentration, RDW: red cell distribution width, HDW: hemoglobin distribution width, PLT: platelet count, MPVP: mean platelet volume, RET: reticulocytes, NEU: neutrophils, LYM: lymphocytes, MONO: monocytes, EOS: eosinophils, BASO: basophils, LUC: large unstained cells

Table 4. Hematological values of female SD rats orally administered with ADP

Parameter	Dose group (mg/kg/day)			
	Control	500	1000	2000
WBC (10 ³ /ul)	6.7 ± 3.39 ¹⁾	9.5 ± 0.56	10.4 ± 3.09	10.8 ± 3.51
RBC (10 ⁶ /ul)	8.3 ± 0.12	8.0 ± 0.18	8.1 ± 0.44	8.3 ± 0.27
HGB (g/dl)	16.0 ± 0.59	15.4 ± 0.70	15.4 ± 0.95	16.0 ± 0.63
HCT (%)	48.5 ± 1.43	45.6 ± 2.53	45.7 ± 2.56	46.7 ± 1.51
MCV (fl)	58.4 ± 1.72	57.2 ± 1.85	56.7 ± 1.58	56.6 ± 1.07
MCH (pg)	19.2 ± 0.61	19.3 ± 0.50	19.1 ± 0.42	19.5 ± 0.61
MCHC (g/dl)	32.9 ± 0.48	33.7 ± 0.61	33.7 ± 0.66	34.4 ± 0.55*
RDW (%)	10.6 ± 0.23	10.5 ± 0.32	10.8 ± 0.31	10.5 ± 0.23
HDW (g/dl)	2.3 ± 0.07	2.2 ± 0.05	2.3 ± 0.04	2.3 ± 0.11
PLT (10 ³ /ul)	1305 ± 59	1387 ± 56	1306 ± 219	1409 ± 173
MPV (fl)	7.4 ± 0.26	8.5 ± 0.85	8.9 ± 0.60	9.3 ± 0.48*
RET (%)	1.9 ± 0.42	1.9 ± 0.71	1.7 ± 0.70	1.6 ± 0.36
NEU (%)	6.2 ± 1.51	6.4 ± 2.19	6.2 ± 2.24	8.5 ± 3.70
LYM (%)	90.6 ± 1.13	89.5 ± 3.61	89.7 ± 3.17	87.9 ± 4.45
MONO (%)	1.3 ± 0.57	1.6 ± 0.87	1.9 ± 1.07	1.6 ± 0.46
EOS (%)	0.9 ± 0.29	1.4 ± 0.79	1.1 ± 0.45	1.2 ± 0.63
BASO (%)	0.2 ± 0.10	0.3 ± 0.06	0.2 ± 0.08	0.3 ± 0.08
LUC (%)	0.9 ± 0.31	0.9 ± 0.50	1.0 ± 0.14	0.6 ± 0.18

¹⁾: Values are mean ± Standard deviation

*: Significantly different from negative control at $P < 0.05$

Abbreviations

WBC: white blood cell, RBC: red blood cell, HGB: hemoglobin, HCT: hematocrit, MCV: mean cell volume, MCH: mean cell hemoglobin, MCHC: mean cell hemoglobin concentration, RDW: red cell distribution width, HDW: hemoglobin distribution width, PLT: platelet count, MPVP: mean platelet volume, RET: reticulocytes, NEU: neutrophils, LYM: lymphocytes, MONO: monocytes, EOS: eosinophils, BASO: basophils, LUC: large unstained cells

Table 5. Serum biochemical values of male SD rats orally administered with ADP

Parameter	Dose group (mg/kg/day)			
	Control	500	1000	2000
AST (U/L)	98.8 ± 24.00 ¹⁾	113.3 ± 53.12	105.9 ± 27.04	84.3 ± 21.43
ALT (U/L)	43.3 ± 7.47	45.1 ± 7.08	47.1 ± 9.62	44.8 ± 16.51
ALP (U/L)	198.7 ± 36.63	197.5 ± 48.86	180.0 ± 17.90	174.9 ± 70.63
BUN (mg/dl)	15.6 ± 0.28	18.2 ± 2.47	14.8 ± 2.01	14.4 ± 2.19
CRE (mg/dl)	0.55 ± .05	0.48 ± 0.03	0.49 ± 0.04	0.50 ± 0.04
GLU (mg/dl)	118.8 ± 31.41	139.1 ± 10.34	156.2 ± 35.10	158.4 ± 12.96
CHO (mg/dl)	68.8 ± 14.67	77.4 ± 14.81	59.6 ± 8.32	61.6 ± 14.52
PRO (g/dl)	6.48 ± 0.21	6.31 ± 0.42	5.96 ± 0.23*	6.08 ± 0.11*
CPK (U/L)	241.2 ± 118.1	445.4 ± 400.6	337.2 ± 169.4	179.0 ± 35.0
ALB (g/dl)	3.36 ± 0.12	3.28 ± 0.16	3.10 ± 0.13*	3.17 ± 0.09*
T-BIL (mg/dl)	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.05	1.02 ± 0.02
A/G (%)	1.08 ± 0.02	1.08 ± 0.08	1.08 ± 0.02	1.09 ± 0.03
TG (mg/dl)	65.4 ± 8.29	65.6 ± 25.07	58.6 ± 12.18	66.0 ± 11.98
IP (mg/dl)	10.24 ± 2.59	8.84 ± 0.88	10.00 ± 0.79	8.69 ± 1.35
Ca (mg/dl)	10.15 ± 0.07	9.4 ± 0.30	9.48 ± 0.34	9.56 ± 0.35
Na (mmol/L)	145.6 ± 1.14	142.0 ± 1.41*	141.6 ± 1.34*	143.4 ± 1.52*
K (mmol/L)	5.19 ± 2.23	4.55 ± 1.31	5.03 ± 1.03	4.47 ± 1.42
Cl (mmol/L)	107.0 ± 1.58	105.2 ± 0.45	106.4 ± 1.67	107.0 ± 1.22

¹⁾: Values are mean ± Standard deviation

*: Significantly different from negative control at $P < 0.05$

Abbreviations

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaline phosphatase, BUN: blood urea nitrogen, CRE: creatinine, GLU: glucose, CHO: total cholesterol, TP: total protein, CPK: creatine phosphokinase, ALB: albumin, T-BIL: total bilirubin, TG: triglyceride, IP: inorganic phosphorus, Ca: calcium, Na: sodium, K: potassium, Cl: chloride

Table 6. Serum biochemical values of female SD rats orally administered with ADP

Parameter	Dose group (mg/kg/day)			
	Control	500	1000	2000
AST (U/L)	167.2 ± 57.11 ¹⁾	165.7 ± 25.48	122.7 ± 16.72	137.2 ± 30.28
ALT (U/L)	42.6 ± 13.97	33.5 ± 5.73	40.6 ± 7.74	34.9 ± 7.76
ALP (U/L)	101.9 ± 32.77	75.4 ± 18.25	86.7 ± 13.82	110.0 ± 34.52
BUN (mg/dl)	16.1 ± 2.94	16.5 ± 2.28	14.1 ± 1.01	16.7 ± 3.17
CRE (mg/dl)	0.55 ± 0.03	0.55 ± 0.05	0.53 ± 0.05	0.56 ± 0.07
GLU (mg/dl)	73.8 ± 15.6	74.4 ± 5.0	81.2 ± 20.3	100.6 ± 12.4*
CHO (mg/dl)	97.0 ± 31.98	85.3 ± 33.06	78.6 ± 21.51	69.6 ± 25.30
PRO (g/dl)	6.30 ± 0.53	6.32 ± 0.55	6.08 ± 0.26	6.19 ± 0.14
CPK (U/L)	626.4 ± 268.0	738.8 ± 85.4	340.0 ± 58.1*	524.6 ± 175.6
ALB (g/dl)	3.40 ± 0.16	3.41 ± 0.22	3.26 ± 0.12	3.34 ± 0.07
T-BIL (mg/dl)	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.01
A/G (%)	1.19 ± 0.10	1.18 ± 0.07	1.16 ± 0.04	1.17 ± 0.03
TG (mg/dl)	51.4 ± 15.21	60.0 ± 9.42	57.0 ± 20.06	46.6 ± 19.17
IP (mg/dl)	7.61 ± 1.15	7.61 ± 1.25	7.25 ± 0.35	7.27 ± 0.46
Ca (mg/dl)	9.16 ± 0.66	9.04 ± 0.46	9.01 ± 0.34	9.05 ± 0.33
Na (mmol/L)	144.0 ± 1.22	146.3 ± 1.89*	144.8 ± 1.30	143.0 ± 1.22
K (mmol/L)	4.78 ± 1.32	4.79 ± 1.27	4.31 ± 0.60	4.50 ± 0.35
Cl (mmol/L)	106.2 ± 1.30	107.0 ± 2.16	107.2 ± 2.17	106.4 ± 1.52

¹⁾: Values are mean ± Standard deviation

*: Significantly different from negative control at $P < 0.05$

Abbreviations

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaline phosphatase, BUN: blood urea nitrogen, CRE: creatinine, GLU: glucose, CHO: total cholesterol, TP: total protein, CPK: creatine phosphokinase, ALB: albumin, T-BIL: total bilirubin, TG: triglyceride, IP: inorganic phosphorus, Ca: calcium, Na: sodium, K: potassium, Cl: chloride

시한 다음, 분산의 동질성이 인정되면(유의수준: 0.05) Dunnett's *t*-test의 다중검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

마우스를 이용한 소핵시험

최고투여용량을 5000 mg/kg로 수행한 마우스 소핵시험에서 ADP의 투여기간 동안 사망동물은 발생하지 않았으며 투여로 인한 특별한 육안적 이상조건도 관찰되지 않았다. 체중변화에 있어서 시험군간 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 개체 당 2000개의 PCE를 관찰한 결과(Table 1), MNPCE의 수는 음성대조군, ADP 1250, 2500, 5000 mg/kg/day 용량군에서 평균 1.8, 2.0, 1.8, 2.8이었으며 소핵 출현빈도에 있어서 ADP 투여군과 음성대조군 간에 통계적으로 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다. 양성대조군에서는 MNPCE의 수가 평균 23.7로 음성대조군에 비해 통

계학적으로 유의한 증가($P < 0.05$)를 보였다. 세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 위와 같은 순서로 평균 0.45, 0.44, 0.44, 0.46 였고($P > 0.05$) 양성대조군의 PCE/(PCE+NCE)비율은 0.33으로 음성대조군과 통계학적으로 유의성 있는 차이를 보였다($P < 0.05$). 양성대조물질인 MMC 투여 시 통계적으로 유의한 소핵의 증가가 관찰되었으므로 본시험의 타당성이 입증되었으며, ADP 투여에 의해 소핵이 증가하지 않았으므로 본 시험조건에서 ADP는 소핵 시험에서 음성으로 평가되었다.

ADP의 유전독성 평가는 *in vitro* 유전독성시험에서 확인하여 보고한 바 있다¹⁹⁾. ADP를 박테리아에 노출시켰을 때, 최고 노출 용량인 5000 µg/plate에서 변이원성 콜로니가 증가하지 않았으며, 햄스터 세포주 CHL (Chinese hamster lung fibroblast)에서도 최고노출 용량, 대사활성화제(S9+) 존재시 8126 µg/ml, 비존재시 2425 µg/ml까지 염색체이상을 유발하지 않았다. 따라서, ADP는 박테리아, 체

Table 7. Absolute and relative organ weights of male SD rats orally administered with ADP

Parameter	Dose group (mg/kg/day)			
	Control	500	1000	2000
Body weight (g) ¹⁾	350.8 ± 11.8 ²⁾	358.5 ± 26.0	368.9 ± 26.3	359.1 ± 21.5
Brain	1.914 ± 0.025	1.786 ± 0.137	1.882 ± 0.119	1.930 ± 0.091
% to body weight	0.540 ± 0.008	0.502 ± 0.070	0.512 ± 0.045	0.538 ± 0.016
Pituitary gland	0.019 ± 0.018	-	0.008 ± 0.000	0.028 ± 0.012
% to body weight	0.001 ± 0.001	-	0.002 ± 0.000	0.008 ± 0.003
Adrenal gland	0.032 ± 0.007	0.028 ± 0.007	0.030 ± 0.007	0.026 ± 0.011
% to body weight	0.0090 ± 0.002	0.008 ± 0.002	0.008 ± 0.002	0.007 ± 0.003
Liver	11.102 ± 1.631	10.861 ± 1.153	11.918 ± 1.283	11.451 ± 2.355
% to body weight	3.166 ± 0.462	3.025 ± 0.139	3.228 ± 0.216	3.169 ± 0.452
Spleen	0.600 ± 0.106	0.615 ± 0.126	0.596 ± 0.091	0.571 ± 0.152
% to body weight	0.170 ± 0.025	0.171 ± 0.028	0.161 ± 0.020	0.158 ± 0.033
Kidney	1.367 ± 0.167	1.301 ± 0.104	1.444 ± 0.177	1.280 ± 0.209
% to body weight	0.389 ± 0.041	0.363 ± 0.022	0.391 ± 0.032	0.355 ± 0.038
Heart	1.152 ± 0.126	1.214 ± 0.129	1.182 ± 0.131	1.180 ± 0.082
% to body weight	0.328 ± 0.028	0.339 ± 0.024	0.320 ± 0.026	0.329 ± 0.010
Thymus	0.419 ± 0.165	0.436 ± 0.087	0.497 ± 0.106	0.382 ± 0.110
% to body weight	0.119 ± 0.046	0.123 ± 0.032	0.132 ± 0.020	0.107 ± 0.034
Lung	1.729 ± 0.267	1.654 ± 0.226	1.657 ± 0.239	1.814 ± 0.464
% to body weight	0.494 ± 0.086	0.462 ± 0.057	0.451 ± 0.073	0.504 ± 0.118
Salivary gland	0.321 ± 0.127	0.287 ± 0.031	0.302 ± 0.043	0.256 ± 0.070
% to body weight	0.091 ± 0.034	0.080 ± 0.005	0.082 ± 0.006	0.071 ± 0.017
Testis	1.504 ± 0.116	1.589 ± 0.076	1.478 ± 0.102	1.393 ± 0.165
% to body weight	0.432 ± 0.026	0.444 ± 0.019	0.403 ± 0.041	0.388 ± 0.037
Epididymis	0.439 ± 0.048	0.435 ± 0.042	0.451 ± 0.028	0.400 ± 0.046
% to body weight	0.126 ± 0.010	0.122 ± 0.013	0.123 ± 0.010	0.111 ± 0.011
Prostate	1.298 ± 0.303	1.384 ± 0.100	1.395 ± 0.230	1.346 ± 0.358
% to body weight	0.369 ± 0.080	0.389 ± 0.051	0.377 ± 0.045	0.374 ± 0.097

¹⁾: Body weight right before necropsy after overnight fasting

²⁾: Values are mean ± Standard deviation

의 포유동물 세포주 그리고 마우스의 생체 내에서 유전독성을 유발할 가능성이 적은 것으로 평가되었다.

14일 반복 경구투여 독성시험

시험기간 동안 사망동물은 발생하지 않았고 모든 동물에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다. 체중측정 결과, ADP 투여군(1000, 2000 mg/kg)에서 수컷의 체중이 음성대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으나 유의적이지 않았고 용량-상관관계가 관찰되지 않았다(Table 2).

혈액(Table 3,4) 및 혈액생화학적(Table 5,6) 검사에서 통계학적인 유의성이 관찰된 모든 항목(혈소판수, 평균혈색소농도, 총단백질, 알부민, 혈당, CPK, 나트륨)은 암·수에서 동일하게 관찰되지 않았으며 용량의존적이지 않았고 모두 정상범위의 변동으로 독성학적으로 의미있는 변화는 없는 것을 평가되었다.

부검시 체표, 피하, 흉강 및 복강의 모든 장기를 육안적으로 관찰하였을 때, 모든 동물에서 특이소견이 관찰되지 않았으며 장기중량 측정 결과에서도, 수컷 및 암컷 시험물질 투여군에서 특이변화가 관찰되지 않았다(Table 7,8).

이상의 결과로 보아, ADP를 Sprague-Dawley (SD)계통의

암·수 랫드에 2주간 반복경구투여하였을 때, 독성학적으로 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험조건 하에서 ADP의 무독성량(NOAEL: no observed adverse effect level)이 암·수 모두 2000 mg/kg 이상으로 평가되었다. ADP의 인체적용 예정용량은 10 mg/kg body weight/day 이며 최소 3일에서 7일 또는 최대 14~28일 적용을 예정하고 있으므로 최소 안전성이 확보된 것으로 판단되나 건강기능식품으로의 소재로 개발가능성을 고려할 때, 장기시험을 진행하는 것이 요구된다 하겠다.

결론

본 연구는 천연식물자원을 활용하여 전립선비대와 방광의 염증에 생리활성이 있는 새로운 천연식물 추출물인 ADP의 안전성을 평가하였다. ADP는 지모와 황백피의 혼합 수추출물로서 마우스 소핵시험과 14일 반복경구투여시험을 수행하였다. 소핵시험은 ICR 마우스 대퇴골에서 채취한 적혈구의 소핵을 관찰하였고, 14일 반복경구투여시험에서는 사망률, 일반증상, 체중변화, 혈액학 검사, 혈액생화학적 검사, 부검소견 및 장기중량을 관찰하였다. 본

Table 8. Absolute and relative organ weights of female SD rats orally administered with ADP

Parameter	Dose group (mg/kg/day)			
	Control	500	1000	2000
Body weight (g) ¹⁾	195.5 ± 25.1 ²⁾	205.0 ± 16.5	199.1 ± 19.9	204.2 ± 15.6
Brain	1.802 ± 0.096	1.782 ± 0.227	1.904 ± 0.127	1.815 ± 0.154
% to body weight	0.931 ± 0.105	0.873 ± 0.129	0.963 ± 0.107	0.892 ± 0.096
Pituitary gland	0.009 ± 0.003	0.012 ± 0.007	0.005 ± 0.001	0.010 ± 0.006
% to body weight	0.005 ± 0.001	0.006 ± 0.003	0.002 ± 0.001	0.005 ± 0.003
Adrenal gland	0.050 ± 0.015	0.046 ± 0.013	0.046 ± 0.009	0.057 ± 0.014
% to body weight	0.026 ± 0.008	0.023 ± 0.007	0.023 ± 0.004	0.028 ± 0.008
Liver	5.633 ± 0.695	5.750 ± 0.918	5.666 ± 0.790	5.852 ± 0.634
% to body weight	2.885 ± 0.153	2.794 ± 0.248	2.839 ± 0.214	2.862 ± 0.140
Spleen	0.356 ± 0.046	0.408 ± 0.057	0.381 ± 0.061	0.411 ± 0.056
% to body weight	0.184 ± 0.036	0.199 ± 0.015	0.191 ± 0.021	0.202 ± 0.032
Kidney	1.484 ± 0.221	1.423 ± 0.252	1.376 ± 0.170	1.423 ± 0.165
% to body weight	0.760 ± 0.070	0.691 ± 0.079	0.691 ± 0.048	0.695 ± 0.029
Heart	0.673 ± 0.058	0.686 ± 0.064	0.731 ± 0.101	0.760 ± 0.095
% to body weight	0.346 ± 0.016	0.336 ± 0.034	0.366 ± 0.029	0.371 ± 0.026
Thymus	0.403 ± 0.034	0.486 ± 0.115	0.491 ± 0.110	0.449 ± 0.036
% to body weight	0.209 ± 0.034	0.240 ± 0.069	0.245 ± 0.034	0.220 ± 0.014
Lung	1.090 ± 0.085	1.040 ± 0.177	0.993 ± 0.132	1.195 ± 0.137
% to body weight	0.564 ± 0.080	0.509 ± 0.093	0.502 ± 0.079	0.586 ± 0.059
Salivary gland	0.334 ± 0.037	0.329 ± 0.072	0.325 ± 0.051	0.347 ± 0.076
% to body weight	0.173 ± 0.016	0.169 ± 0.033	0.163 ± 0.021	0.170 ± 0.036
Ovary-oviduct	0.679 ± 0.104	0.803 ± 0.283	0.692 ± 0.235	0.751 ± 0.203
% to body weight	0.347 ± 0.029	0.386 ± 0.108	0.350 ± 0.125	0.370 ± 0.098

¹⁾ Body weight right before necropsy after overnight fasting

²⁾ Values are mean ± Standard deviation

시험의 결과, ADP 투여(1250, 2500, 5000 mg/kg)에 의해 적혈구의 소핵이 증가하지 않았고, 14일 반복 투여(500, 1000, 2000 mg/kg)했을 때에도 독성학적으로 유해한 증상이 관찰되지 않았다. 따라서, ADP는 본 시험조건하에서 2000 mg/kg까지 안전한 식물자원으로 평가되었다.

감사의 말씀

본 연구는 2013년도 호서대학교의 재원으로 학술연구비를 지원 받은 연구보고(2013-0079)입니다.

참고문헌

- Ahn D.K.: Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs. pp. 106. Kyo-Hak Publishing Corporation, Seoul (1998).
- Shen S., Zhang Y., Zhang R., Gong X.: Sarsasapogenin induces apoptosis via the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway and ER stress pathway in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **441**, 519-524 (2013).
- Kang Y.J., Chung H.J., Nam J.W., Park H.J., Seo E.K., Kim Y.S., Lee D., Lee S.K.: Cytotoxic and antineoplastic activity of timosaponin A-III for human colon cancer cells. *J. Nat. Prod.*, **74**, 701-706 (2011).
- Lu W.Q., Qiu Y., Li T.J., Tao X., Sun L.N., Chen W.S.: Antiplatelet and antithrombotic activities of timosaponin B-II, an extract of *Anemarrhena asphodeloides*. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **38**, 430-434 (2011).
- Youn U.J., Lee Y.S., Jeong H., Lee J., Nam J.W., Lee Y.J., Hwang E.S., Lee J.H., Lee D., Kang S.S., Seo E.K.: Identification of antiadipogenic constituents of the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*. *J. Nat. Prod.*, **72**, 1895-1898 (2009).
- Chai O.H., Shon D.H., Han E.H., Kim H.T., Song C.H.: Effects of *Anemarrhena asphodeloides* on IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis, compound 48/80-induced systemic anaphylaxis and mast cell activation. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **65**, 419-426(2013).
- Ahn D.K.: Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs. pp. 124. Kyo-Hak Publishing Corporation, Seoul (1998).
- Uchiyama T., Kamikawa H., Oquita Z.: Anti-ulcer effects of extract from *Phellodendron cortex*. *Yakugaku Zasshi*, **109**, 672-676 (1989).
- Ivanovska N. and Philipov S.: Study on the anti-inflammatory action of *Berberis vulgaris* root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. *Int. J. Immunopharmacol.*, **18**, 553-561 (1996).
- Choi Y.Y., Kim M.H., Han J.M., Hong J., Lee T.H., Kim S.H., Yang W.M.: The anti-inflammatory potential of cortex *Phellodendron* in vivo and in vitro: Down-regulation of NO and iNOS through suppression of NF-kappa B and MAPK activation. *Int. Immunopharmacol.*, **19**, 214-220 (2014).
- Kim J.S., Kim Y.S., Kim S.K., Heor J., Lee B.H., Choi B.W., Ryu G., Park E.K., Zee O.P., Ryu S.Y.: Inhibitory Effects of Some Herbal Extracts on the Acetylcholinesterase (AChE) *In Vitro*. *Kor. J. Pharmacogn.*, **33**, 211-218 (2002).
- Chen Q.M. and Xie M.Z.: Effects of berberine on blood glucose regulation of normal mice. *Yao Hsueh Hsueh Pao.*, **22**, 161-165 (1987).
- Ivanovska N., Philipov S., Hristova M.: Influence of berberine on T-cell mediated immunity. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **21**, 771-786 (1999).
- Chiu H.F., Lin C.C., Yang C.C., Yang F.: The pharmacological and pathological studies on several hepatoprotective crude drugs from Taiwan. *Am. J. Chin. Med.*, **16**, 127-137 (1988).
- James M.A., Fu H., Liu Y., Chen D.R., You M.: Dietary administration of berberine or *Phellodendron amurense* extract inhibits cell cycle progression and lung tumorigenesis. *Mol. Carcinog.*, **50**, 1-7 (2011).
- Ghosh R., Graham H., Rivas P., Tan X.J., Crosby K., Bhaskaran S., Schoolfield J., Banu J., Fernandes G., Yeh I.T., Kumar A.P.: *Phellodendron amurense* bark extract prevents progression of prostate tumors in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate: potential for prostate cancer management. *Anticancer Res.*, **30**, 857-865 (2010).
- Oh S.J., Kim K.M., Chung Y.S., Hong E.K., Shin S.Y., Kim S.J.: Ion channel currents of smooth muscle cells isolated from the prostate of guinea-pig. *BJU Int.*, **92**, 1022-1030 (2003).
- Oh S.J., Kang J.Y., Jeong J.Y., Lee K.H., Kim S.J., Chung Y.S., Hong E.K., Kim K.M.: Pharmacological effects of berberine and palmatine on the prostatic and urethral smooth muscle of the rabbit. *Int. Neurol. J.*, **6**, 62-71 (2002).
- Matsuda H., Sato N., Hamazaki M., Naruto S., Kubo M.: Testosterone 5alpha-reductase inhibitory active constituents from *Anemarrhena Rhizoma*. *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 586-587 (2001).
- Xu Y. and Ventura S.: Extracts of bark from the traditional Chinese herb *Phellodendron amurense* inhibit contractility of the isolated rat prostate gland. *J. Ethnopharmacol.*, **127**, 196-199 (2010).
- McConnel J.D.: Etiology, epidemiology, and pathophysiology, and diagnosis of benign prostatic hyperplasia. In: Walsh P.C., Retik A.B., Vaughan E.D. Jr, Wein A.J., (Eds.), *Campbell's Urology*. 7th ed. Saunders, Philadelphia, pp. 1429-1430 (1998).
- Chung Y.S., Lim K.H., Kang B.H., Kim S.J., Oh S.J., Kim K.M., Lee S.J., Choi S.A., Hong E.K.: A single dose oral toxicity study of 1 : 1 mixture of *Anemarrhena asphodeloides* and *Phellodendron amurense* (ADP) in Sprague-Dawley (SD) rats. *Lab. Anim. Res.*, **18**, 172-176 (2002).
- Chung Y.S., Lee S.J., Choi S.A., Lee J.H., Ryu J.C., Hong E.K.: Genotoxicity Study of Water Extract (ADP) of 1:1 Mixture of *Anemarrhena asphodeloides* and *Phellodendron amurense* in Bacterial and Mammalian Cell Systems. *Toxicol. Res.*, **20**, 43-47 (2004).
- Schmid, W.: The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9-15 (1975).
- OECD (1997). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (July 21, 1997) TG No. 474 'Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test'.