

Research Article

Open Access

## 넙추출물의 경구투여에 따른 랫드의 신장독성 연구

윤현주,<sup>1</sup> 최미선,<sup>1</sup> 조현조,<sup>1</sup> 한범석,<sup>2</sup> 박경훈,<sup>1</sup> 오진아,<sup>1</sup> 조남준,<sup>1</sup> 백민경<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 화학물질안전과, <sup>2</sup>호서대 안전성평가센터

### Study of Kidney Toxicity of *Azadirachta Indica* Extract for Oral Administration in Rats

Hyunjoo Yoon,<sup>1</sup> Miseon Choe,<sup>1</sup> Hyeon-Jo Cho,<sup>1</sup> Beom Seok Han,<sup>2</sup> Kyung-Hun Park,<sup>1</sup> Jin-Ah Oh,<sup>1</sup> Namjun Cho<sup>1</sup> and Min-Kyoung Paik<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>Chemical Safety Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea, <sup>2</sup>Hoseo Toxicological Research Center, Hoseo University, Asan 336-795, Korea)

Received: 5 December 2013 / Revised: 18 March 2014 / Accepted: 26 March 2014

Copyright © 2014 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

#### Abstract

**BACKGROUND:** *Azadirachta indica* has been widely used as environment-friendly organic materials because of its insecticidal properties. This study was carried out to investigate the acute toxicity and the subacute toxicity of *Azadirachta indica* extract(AIE) in rats.

**METHODS AND RESULTS:** For the oral acute toxicity test, Sprague-Dawley rats were gavaged with 2.0 g/Kg bw of AIE. The LD<sub>50</sub> value was greater than 2.0 g/Kg bw for both male and female rats. For the subacute toxicity study, rats were treated with AIE at doses of 0.5, 1.0, 2.0 mg/Kg bw once a day for 4 weeks(n=10 animals per each group). There were no significant changes in body weight, food intake and water consumption observed during the experimental duration. In addition, no difference of relative kidney weight was observed among all treated groups. Serum creatinine level in the AIE 2.0 g/Kg group increased significantly compared with that of control group in male rats, but serum blood urea nitrogen was significantly

decreased in a dose-dependent manner ( $p<0.05$ ). Significant increase of serum cholesterol levels were observed in all AIE groups, compared with the control group, in the female rats ( $p<0.05$ ). However, histopathological examination of the kidney did not reveal any significant lesions in all groups.

**CONCLUSION:** On the basis of results, it could be concluded that oral administration AIE didn't cause any toxic response in kidney, except the increased serum cholesterol.

**Key words:** *Azadirachta indica* extract, Kidney, Subacute toxicity

#### 서론

경제 성장 및 소득의 증가로 인해 소비자의 건강에 대한 인식과 관심이 높아짐에 따라 친환경농산물 생산을 위한 유기농업자재 사용 비율도 증가하고 있다(Choi *et al.*, 2011). 특히 우리나라에서는 총해방제용 유기농업자재인 넙추출물, 고삼추출물 등의 식물추출물의 공시 및 인증 비율이 2013년 현재 약 20%에 달할 정도로 비중이 매우 높다.

넙추출물은 유기농업자재 외에도 농약으로 등록된 Azadirachtin

\*교신저자(corresponding author): Min-Kyoung Paik  
Phone: +82-31-290-0526; Fax: +82-31-290-0506;  
E-mail: [mink1114@korea.kr](mailto:mink1114@korea.kr)

을 함유하는 식물추출물로 병충해방제효과가 우수하다고 알려져 있으며(Das *et al.*, 2002), 그 원료인 님(*Azadirachta Indica*) 또한 나무 껍질, 과일, 꽃 등의 다양한 부위가 당뇨병(Alam *et al.*, 1990), 고혈압(Biswas *et al.*, 2002), 심장 질환(Singh *et al.*, 1990), 암(Kumar *et al.*, 2010), 췌장(Bandyopadhyay *et al.*, 2004), 피부질환(Garg *et al.*, 1993) 및 항균작용(Das *et al.*, 1999)이 있다고 보고된 바 있다.

님추출물은 효능연구 뿐만 아니라 과량 사용에 대한 독성 연구도 활발히 진행되어 왔다. 그 결과로 님오일에 대한 랫드와 토끼의 LD<sub>50</sub>은 각각 14 mL/Kg과 24 mL/Kg으로 보고되고 있으며(Gandhi *et al.*, 1988), 님을 10주간 랫드에 투여 시 간접적으로 생식능을 저해한다고 보고된 바 있다(Parshad *et al.*, 1994). 또한 님추출물을 이용한 급성 및 반복투여 경구투여시험에서 간의 상대중량과 혈중 GGT, GOT 증가, 간 조직의 병리적 손상이 관찰됨에 따라(EPA 1996; Koner *et al.*, 1997; Abdel Megeed *et al.*, 2001; EFSA 2011), EFSA에서는 님추출물의 아만성 노출 시 주요 독성기관을 간으로 판정하고 경구 무독성량(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)을 32 mg/Kg bw/day로 산정한 바 있다(EFSA, 2011).

반면, 최근에는 님추출물에 대한 여러 안전성시험 결과, Deng 등(2013)은 님추출물을 최고 1.6 g/Kg bw로 28일간 반복투여 경구투여 하였을 때 간 뿐만 아니라 신장에서 조직병리학적 이상을 관찰하였다고 보고한 바 있으며, Rahman 등(2002) 또한 90일간 투여시험에서 신장조직에서 LDH (lactate dehydrogenas) 활성이 감소하고 괴사가 관찰되었다고 보고하는 등 님추출물이 신장에 미치는 독성에 대한 결과가 다수 보고되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 님추출물이 신장에 미치는 독성 여부를 확인하고자 우리나라에서 유통되는 님추출물 시료를 이용하여 랫드에서 급성경구독성시험을 진행하고 이를 근거로 4주 반복투여 경구독성시험을 수행하여 님추출물이 신장관련 혈액생화학적 지표 및 신장 조직에 미치는 영향을 관찰함으로써 유기농업자재로 사용되는 님추출물의 안전성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시험 물질

시료는 시중에 유통되는 미얀마산 님추출물을 구입하여 시험에 사용하였다. 시험물질은 사용기간 동안 빛이 통하지 않는 불투명한 용기에 담아 실온에서 보관하였으며, 사용직전 0.22 µL filter를 이용하여 정제 후 멸균증류수에 희석하여 사용하였다.

### Azadirachtin 및 이성질체 분석

시험에 사용된 님추출물 시료의 정확한 유효성분 함량의 확인을 위해 유기농업자재의 유효성분으로 목록공시 및 품질인증되는 azadirachtin 및 그 이성질체 4종을 분석하였다.

시료의 정제 및 정량분석은 Lee 등(2013)의 방법에 따라 수행하였다.

### 시험동물 및 사육조건

본 동물시험은 국립농업과학원의 동물윤리위원회 승인(NAAS 1305)을 얻어 연구를 진행하였다. 시험동물은 SPF Sprague-Dawley(SD)계 랫드를 (주)Koatech (Gyeonggi-Do, Korea)으로 부터 분양 받아 1주일간 순화 후 사용하였다. 시험동물은 평균체중의 ±20% 범위 내에 있는 암컷과 수컷으로, 급성경구독성 시험에서 8주령의 군당 3마리, 반복투여 경구독성시험에서 5주령의 군당 10마리의 동물을 사용하였다. 시험실 조건은 온도 23±2°C, 상대습도 55±5 %, 조명시간 12시간으로 하였다. 전 시험기간 동안 폴리카보네이트 사육상자에 2~3마리씩 넣어 시험하였으며, 물과 사료는 자유 섭취시켰다.

### 급성경구독성시험

급성경구독성시험은 실험동물 수를 줄여서 실험하기 위하여 개발된 농촌진흥청 고시 제2012-37호 「농약 및 원제의 등록기준」의 급성독성등급법에 근거하여 시험하였다. 시험 전 날 물을 제외하고 금식시켰고, 시험물질은 존데를 이용하여 1회 위 내에 강제 경구투여 하였다. 시험물질 투여 후 14일 동안 독성징후의 종류, 회복시기 및 치사 시간 등 모든 관찰사항을 기록하였으며, 시험 종료 후 시험 절차를 따라 LD<sub>50</sub>을 산출하였다. 급성독성시험에 사용된 모든 시험동물의 체중은 투여 전과 투여기간 중 0, 3, 5, 7, 14일에 측정하였다.

### 반복투여 경구독성시험

아급성경구독성시험은 농촌진흥청 고시 제 2012-37호의 반복투여경구독성 시험에 준하여 시행하였으며, 시험용량을 급성독성시험을 통해 판정된 LD<sub>50</sub>용량을 포함해 LD<sub>50</sub>의 1/2와 1/4에 해당하는 농도를 선정하여, 0.5, 1.0, 2.0 g/Kg bw/day로 투여하였다. 시험물질은 존데를 이용하여 4주간 1일 1회, 주말을 제외한 주 5회 투여하되 매일 오전 위 내 강제 경구투여 하였으며, 대조군은 멸균수를 사용하였다.

임상 증상은 모든 시험동물에 대해 매일 1회 이상씩 일정 시간에 일반상태의 변화, 중독증상발현, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 주의하여 관찰하였다. 또한, 시험에 사용된 모든 시험동물에 대하여 체중을 시험기간 중 매주 2회, 사료 섭취량과 물 섭취량은 주 1회 측정하였다.

노 채취를 위해 부검 전일 대사케이지에 넣어 뇨 시료를 수집하였다. 모든 시험물질 투여군의 생존동물에 대하여 시험물질 투여 개시일로부터 4주 후에 부검을 실시하였으며, 부검을 위해 CO<sub>2</sub>로 마취하여 혈액 채취 한 후 해부하여 육안으로 신장을 검사하여 이상소견을 기록하고 신장의 중량을 측정하였다.

채혈한 혈액은 4°C 냉장 보관 한 후 10,000 rpm에서 15분간 원심분리(Hanil, Supra 22K, Incheon, Korea)하여 자동생화학검사기(Beckman coulter, AU480, Miami, USA)를

**Table 1. Composition of active ingredients in *Azadirachta indica* extract used in this study**

Active ingredients (g/Kg)				
Azadirachtin A	Azadirachtin B	Deacetylsalannin	Salannin	Total
8.2	3.45	1.65	5.12	18.42

이용하여 Blood urea nitrogen(BUN), Cholesterol(CHO), Creatinine(CREA), Inorganic phosphorous(IP), Triglycerol (TG), Total protein(TP), Uric acid(UA) 등을 측정하였다. 뇨 검사는 비중, pH, Urine-Creatinine(U-CREA), Urine-Glucose (U-GLU), Urine-Inorganic phosphorous(U-IP), Urine-Blood urea nitrogen(U-BUN), Urine-Uric acid(U-UA)에 대해 행하였다.

시험동물에서 적출한 신장은 10% 중성 포르말린으로 고정시켜 Hematoxylin-Eosin(H&E)염색과 Periodic Acid Schiff(PAS)염색을 하여 조직을 관찰 후 광학현미경으로 400 배에서 관찰하였다.

### 통계처리

자료에 대한 통계분석은 SAS(version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하였다. 시험물질 투여군과 대조군의 차이를 비교하기 위하여 general linear procedure로 분석하였으며 pairwise t-test를 이용하여 유의차 0.05 수준에서 평가하였다.

## 결과 및 고찰

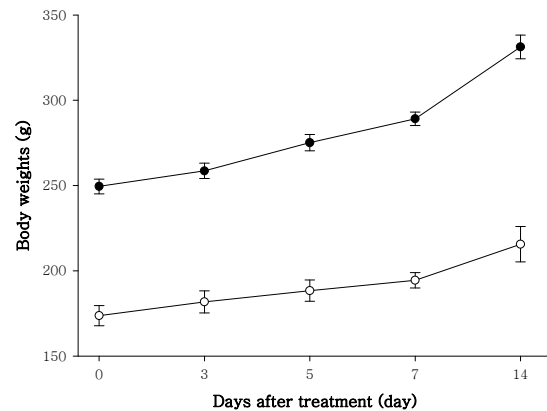
### 유효성분 함량

본 시험에서 사용된 nimchuchul 시료의 유효성분을 분석한 결과, azadirachtin A 8.2 g/Kg, azadirachtin B 3.45 g/Kg, deacetylsalannin 1.65 g/Kg, salannin 5.12 g/Kg으로 총 18.42 g/Kg의 azadirachtin을 함유하였다(Table 1).

### 급성경구독성시험

급성경구독성시험을 통한 반수치사량(LD<sub>50</sub>) 측정을 위해 1단계로 2.0 g/Kg 투여하여 암수의 체중변화를 살펴본 결과 Fig. 1과 같이 모든 군에서 체중이 정상적으로 증가하였다. nimchuchul 투여 후 2주 동안 시험동물의 임상학적 변화를 관찰한 결과 암수 모든 시험물질투여군에서 특별한 이상 증상이나 사망동물이 관찰되지 않았다.

추가로 2.0 g/Kg의 nimchuchul에 대해 2단계 시험을 진행한 결과 1단계와 동일한 결과가 나타나며 따라 랫드를 이용한 nimchuchul의 LD<sub>50</sub>은 최종적으로 2.0 g/Kg 이상으로 판단하였다. 선행연구로서 랫드에 대한 급성독성연구에서도 nimchuchul의 LD<sub>50</sub>이 14.1 mL/Kg이라고 보고하였다(Gandhi *et al.*, 1988). 또한 본 시험에서 사용된 시료보다 약 6.5배 높은 12%의 azadirachtin을 함유하는 nimchuchul 시료를 땅콩기름에 녹여 랫드에 급성 경구투여한 시험에서도 LD<sub>50</sub>이 5.0 g/Kg 이상으로 보고된 바 있어(Raizada *et al.*, 2001), nimchuchul

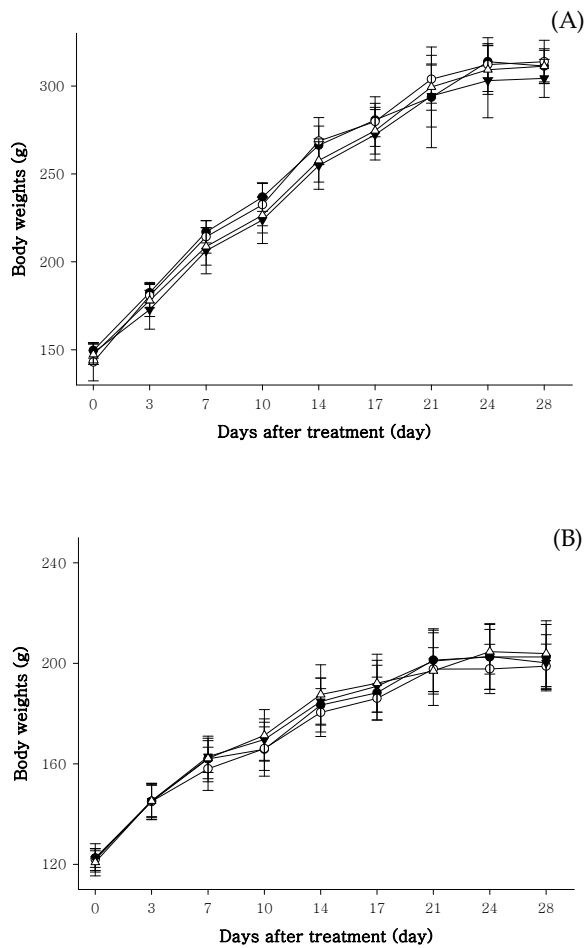


**Fig. 1. Changes of body weights of male (●) and female (○) Sprague-Dawley rats after oral administration of *Azadirachta indica* extract.**

출물의 LD<sub>50</sub>이 azadirachtin 함량에 용량의존적으로 증가하지 않음을 알 수 있다.

### 반복투여 경구독성시험

nimchuchul 0.5, 1.0, 2.0 g/Kg을 랫드에 4주간 경구투여하였을 때 체중의 변화는 Fig. 2와 같다. 시험기간 동안 암수 모든 군에서 체중이 정상적으로 증가하였으며, 투여용량간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 투여기간 동안 사료 및 물 섭취량 또한 암수 모든 시험물질 투여군이 대조군에 비해 유의적인 차이는 보이지 않았다(자료 미기재). 이는 수용성 nimchuchul 0.01, 0.03, 0.10 g/Kg을 마우스에 21일간 경구투여 결과 시험물질 투여군 간에 체중 변화가 나타나지 않았다는 연구결과(Ray *et al.* 1996)와 유사하였다. 반면, 랫드에 nimchuchul을 18일간 아급성 경구 투여한 결과 2.0과 3.3 mL/Kg의 투여용량군에서 체중의 차이가 나타나지 않았으나 4.6 mL/Kg의 고용량 투여 군에서 체중이 유의적으로 감소하였다고 보고하여(Dhaliwal *et al.* 1998) 고 농도로서 더 짧은 기간의 투여 시 체중 감소가 나타남을 알 수 있다. 또한, nimchuchul 0.08, 0.16, 0.32 g/Kg을 90일 동안 랫드에 투여한 결과 체중과 사료섭취량이 용량의존적으로 감소하였다(Rahman *et al.*, 2001). 이상의 선행연구에서 볼 때 nimchuchul 시료가 투여된 용량이 높거나 투여기간이 길어지는 경우 시험동물의 체중 및 사료섭취량이 감소되는 것을 알 수 있다. 이는 추가로 시료의 추출용매나 추출부위, 함유된 azadirachtin 양 등 다른 요인에 의한 연관성이 있는지도 확인할 필요가 있을 것으로 생각된다.



**Fig. 2.** Changes of body weights of male(A) and female(B) Sprague-Dawley rats after oral administration of *Azadirachta indica* extract of dose in control (●), 0.5 g/Kg(○), 1.0 g/Kg(▼) and 2.0 g/Kg(△).

시험 종료 후 모든 시험동물을 부검하여 신장을 육안으로 관찰한 결과 님추출물을 투여한 암수 모두에서 신장에 대한 외관상의 어떠한 이상 병변은 보이지 않았다. 또한, 암수 모든 시험 물질 투여군에서 신장의 상대중량 차가 나타나지 않

았다(Table 2). Deng 등(2013)도 마우스에 28일간 님중실류에서 추출한 님오일 0.177, 0.533, 1.600 g/Kg을 경구투여한 결과 신장의 상대중량에 차이가 나타나지 않았다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 반면, Ashafa 등(2012)은 수컷 Wistar 랫드에 님나무줄기의 에탄올 추출물을 21일간 0.05, 0.1, 0.2과 0.3 g/Kg으로 경구투여 하였을 때 신장의 상대중량이 투여용량이 증가함에 따라 유의적으로 증가한다고 보고하였다. 본 시험에서 사용된 최고용량은 Ashafa 등(2012)의 연구에서 사용된 최고용량인 0.3 g/Kg에 비해 6.6 배 높은 수준으로 유사한 기간 동안 투여했음에도 신장 중량의 유의차가 나타나지 않은 것을 고려할 때, 님추출물을 14일간 경구를 통한 반복 투여 시 나타나는 신장 중량의 차는 단순히 님추출물의 투여용량에서 기인하는 것은 아니며, 추출에 사용된 용매나 님원료의 부위, 함유하는 azadirachtin양 등 다른 요인들에 의한 것임으로 생각된다.

시험동물의 혈액 중 신장기능과 관련된 지표(BUN, CREA, IP, UA) 및 혈중 지질 성분(CHO, TG)는 결과는 Table 3과 같다. CREA는 수컷에서 대조군과 비교했을 때 저용량 및 중간용량 투여군은 유의적인 차이가 없었으나 고용량 투여군에서 유의적으로 증가하는 양상을 보인 반면, BUN은 투여용량이 증가함에 따라 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). IP과 UA는 수컷의 투여 군간에 유의적인 차이가 없었으며, 암컷에서는 이상의 항목에 대해 모든 투여군 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

선행연구로서 님중실류를 마우스에 0.177, 0.533, 1.6 g/Kg 투여하였을 때 BUN과 CREA이 투여용량에 따라 차이를 보이지 않았으며(Deng *et al.*, 2013), 님 잎의 메탄올 추출물 0.5 g/Kg을 랫드에 각각 5일과 10일 동안 경구투여 하였을 때에도 CREA이 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고하였다(Ezz-Din *et al.*, 2011). CREA는 특히 신장에서 체내 전해질을 투과하는 기능이 감소하는 신장기능 저하시 유의적으로 증가하는 대표적인 신장손상의 예측지표로 사용되는데(Cheesbrough, 1991), 본 연구에서 님추출물을 고용량으로 투여한 군에서 유의적으로 증가하였으나 또 다른 신장손상 지표인 BUN이 감소함에 따라 신장손상으로 단정하기는 어

**Table 2.** Relative kidney weights of oral administration of *Azadirachta indica* extract in male and female Sprague-Dawley rats for 4 weeks

Sex	Concentration (mg/Kg)	Kidney (Left)	Kidney (Right)
Male	Control	3.91±0.40*	3.87±0.38
	0.5	4.03±0.30	3.99±0.34
	1.0	3.73±0.38	3.84±0.35
	2.0	4.01±0.40	4.06±0.33
Female	Control	3.58±0.26	3.51±0.29
	0.5	3.67±0.23	3.63±0.27
	1.0	3.62±0.34	3.66±0.42
	2.0	3.85±0.31	3.75±0.34

\*Relative kidney weight was expressed as a relative percentage to the whole body weight

렵다고 생각된다,

한편, 고지혈증이 수컷 랫드에서 신장질환을 유도하며 (Selim *et al.*, 2013), 신기능의 저하가 혈중 지질의 변화와 밀접하게 관련된다는 많은 보고가 있다(Chan, 2005). 본 연구에서도 님추출물의 반복투여 경구투여가 랫드에서 신장에 미치는 영향을 살펴보기 위해 혈중 지질의 수준을 확인하였으며, 시험 결과 혈중 지질 중 CHO는 암컷의 시험물질 투여군의 용량이 증가할 수록 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으나 수컷에서 반대 경향을 보였다( $p < 0.05$ ). 반면, TG는 암컷의 모든 시험물질 투여군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 수컷에서는 투여군간 차이가 없었다. Ashafa 등(2012)의 연구에서도 마찬가지로 랫드에 님 줄기 추출물을 21일 동안 경구 투여한 결과 대조군에 비해 CHO는 유의적

으로 증가하였고 TG는 유의적으로 감소하였는데, 이는 님추출물이 lipolysis 작용을 손상시킴으로써 혈중 TG를 감소시키고 혈중 LDL(Low density lipoprotein)-CHO은 증가하나 HDL(High density lipoprotein)-CHO을 감소시켜 혈중의 콜레스테롤이 간으로 옮겨주는 작용을 저해함으로써 혈중 CHO가 증가한다고 보고하였다. 또한 만성 신장질환을 가진 사람에서 혈중 총 TG와 콜레스테롤이 증가하였다. 따라서 본 연구에서도 암컷에서 님추출물의 투여에 의해 lipolysis가 저해되고 혈중 총 CHO은 증가하며, 이는 LDL-CHO이 증가하고 HDL-CHO이 감소하기 때문으로 간의 콜레스테롤이 혈중으로 유리되는 것으로 생각된다.

채취된 뇨 시료의 검사결과는 Table 4와 같이 모든 동물의 시험물질 투여군에서 유의적인 차이는 보이지 않았다.

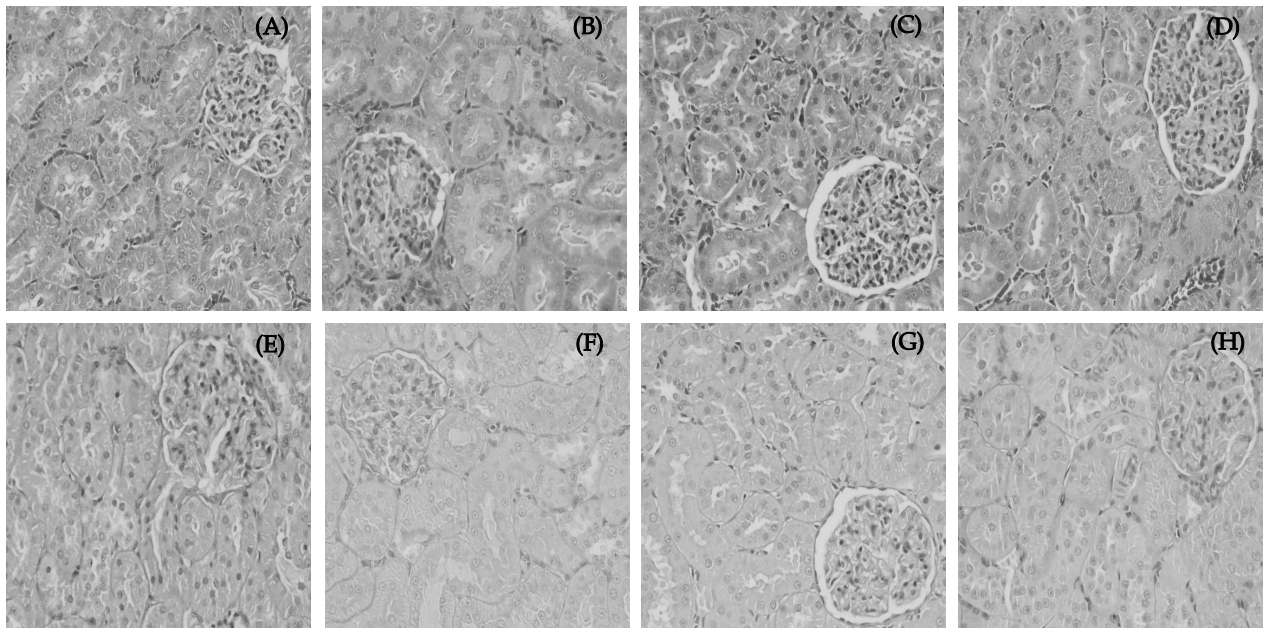
**Table 3. Effects of *Azadirachta indica* extract on kidney markers and lipid profiles in male and female Sprague-Dawley rats for 4 weeks**

Parameter	Male (g/Kg)				Female (g/Kg)			
	Control	0.5	1.0	2.0	Control	0.5	1.0	2.0
BUN (mg/dL)	26.62±5.33 <sup>a</sup>	24.33±4.63 <sup>a</sup>	17.15±4.32 <sup>c</sup>	19.58±3.18 <sup>b</sup>	24.43±5.22	25.51±3.96	26.83±5.24	28.72±5.16
CREA (mg/dL)	0.65±0.09 <sup>b</sup>	0.65±0.10 <sup>b</sup>	0.64±0.07 <sup>b</sup>	0.73±0.08 <sup>a</sup>	0.62±0.06	0.63±0.05	0.66±0.08	0.67±0.06
IP (mg/dL)	13.84±1.36	13.67±1.02	13.32±1.12	13.54±1.05	13.77±0.88	14.26±0.81	14.03±2.57	14.28±1.05
UA (mg/dL)	5.41±1.60	5.18±0.97	5.43±1.12	4.92±0.96	3.89±0.62	4.25±0.75	4.56±1.40	4.55±0.37
CHO (mg/dL)	89.80±7.46 <sup>a</sup>	86.68±11.54 <sup>ab</sup>	79.24±10.31 <sup>bc</sup>	77.97±9.68 <sup>c</sup>	103.02±11.32 <sup>c</sup>	108.32±13.23 <sup>bc</sup>	118.42±24.41 <sup>ab</sup>	126.90±17.86 <sup>a</sup>
TG (mg/dL)	33.56±6.09	27.04±13.68	30.43±17.43	36.07±5.45	71.74±14.77 <sup>a</sup>	52.12±11.71 <sup>c</sup>	63.39±12.53 <sup>ab</sup>	53.59±6.97 <sup>bc</sup>

Values (mean±SD) with different alphabetical superscript along a column are significantly different at  $p < 0.05$

**Table 4. Urinalysis of oral administration of *Azadirachta indica* extract in male and female Sprague-Dawley rats for 4 weeks**

Parameter	Male (g/Kg)				Female (g/Kg)			
	Control	0.5	1.0	2.0	Control	0.5	1.0	2.0
Gravity	1.04±0.01	1.04±0.01	1.04±0.01	1.04±0.01	1.05±0.01	1.06±0.01	1.06±0.00	1.06±0.01
pH	8.33±1.15	8.67±0.58	8.67±0.58	8.33±0.58	9.00±0.00	9.00±0.00	8.33±0.58	8.33±0.58
U-CREA (mg/dL)	66.53±11.44	66.20±8.13	60.00±19.51	59.60±9.68	78.23±16.71	84.95±2.09	79.98±15.10	77.20±12.42
U-GLU (mg/dL)	27.71±15.14	31.02±4.80	30.59±10.09	27.47±10.90	26.73±6.37	23.62±0.07	25.95±6.79	27.31±5.34
U-IP (mg/dL)	5.85±2.33	3.72±1.42	4.07±2.06	4.00±0.13	7.60±3.31	7.27±8.69	8.32±5.92	8.44±5.90
U-BUN (mg/dL)	979.64±23.82	979.51±17.42	975.28±22.46	979.56±23.55	971.91±38.47	965.69±30.49	955.67±11.24	965.50±24.22
U-UA (mg/dL)	18.38±4.02	16.61±1.96	15.27±4.45	15.79±4.20	18.57±2.27	17.58±0.59	16.90±2.54	15.45±1.75



**Fig. 3.** Effect of *Azadirachta indica* extract on the kidney microscopic findings of Sprague-Dawley rats after oral administration for 28 days.

Panel A, Control H&E 400X; Panel B, 0.5 g/Kg H&E 400X; Panel C, 1.0 g/Kg H&E 400X; Panel D, 2.0 g/Kg H&E 400X; Panel E, Control PAS 400X; Panel F, 0.5 g/Kg PAS 400X; Panel G, 1.0 g/Kg PAS 400X; Panel H, 2.0 g/Kg PAS 400X

또한, 신장의 손상 여부를 조직병리학적 변화로 확인하고자 H&E와 PAS염색하여 400배로 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 시험결과, 일부 실험동물에서 초차양 물질(hyaline cast)이 관찰되기는 하였으며 이는 장기간 사육에 의한 자연 발생 병변으로 판단되었다. 또한, 대조군을 포함한 모든 시험물질 투여군에서 사구체와 세뇨관 구조가 정상적인 것으로 나타났고 사구체 혈관과 모세관 또한 다른 이상을 보이지 않았다. Ezz-Din 등(2011)의 연구에서도 님 잎의 메탄올 추출물 0.5 g/Kg 을 랫드에 각각 5일과 10일간 경구 투여한 결과 신장의 병리학적 변화는 관찰되지 않았다고 보고하였다. 반면, 님 제품(vepacid)을 90일 동안 0.08, 0.16, 0.32 g/Kg을 투여한 경우 신장조직에서 괴사가 관찰되었고(Rahman *et al.*, 2002), 님 종실유 1.6 g/Kg 투여로 인해 신장에서 울혈(congestion)과 신세뇨관 상피세포의 변성(renal tubular epithelial cells degeneration), 호산구 단백질(eosinophilic protein) 변화 등 신장 세뇨관 내강(renal tubule lumen) 변화와 사구체간질(glomerulus)의 혈관확장(angiectasis) 등의 신장독성이 보고되기도 하였다(Deng *et al.*, 2013). 본 연구결과에서는 님추출물의 4주간 저용량, 중간용량, 고용량 투여군 모두에서 신장의 조직병리학적 이상 소견이 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 시험에서 님추출물의 급성경구독성시험을 통해 LD<sub>50</sub>은 5 g/Kg 이상으로 판정하였다. 또한, 4주간의 반복투여기간에 걸쳐 님추출물 0.5, 1.0, 2.0 g/Kg을 랫드에게 경구투여한 결과, CREA이 고용량의 님추출물 투여군에서 유의적으로 증가하였으나 또 다른 신장 손상 지표인 BUN은 용량의존적으로 감소하였다. 또한 암컷에서 혈중 지질 관련 지표인 TG가 모든 시험물질투여군에서

감소하였으며 님추출물의 투여용량이 증가할수록 CHO가 증가함으로써 lipolysis 저해가 진행되는 것으로 생각된다. 신장의 조직병리학적 관찰 결과 모든 시험물질투여군에서 이상 병변이 관찰되지 않았다. 따라서 님추출물의 반복투여 시 암컷에서 혈중 콜레스테롤 증가가 나타난 것을 제외하면 신장에 독성영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

한편, Han과 Kim (2013)은 유기농자재로 사용되는 님 원재료(unprocessed materials), 종자오일, 수성과 비수성추출물 및 순수화합물(pure compound)과 같은 다양한 재료들의 독성을 평가한 결과 종자오일과 순수화합물의 독성이 소원재료나 추출물보다 낮으며, 추출에 사용된 님의 부위나 추출 및 제조공정에 따른 영향이 크다고 보고하였다. 따라서, 유기농업자재의 생산 및 수입 시 사용된 님의 추출부위와 추출용매 등을 구체적으로 기재하도록 하고 목록공시 및 품질인증 단계에서도 이를 명시하게 하여, 유기농업자재 제조업자가 님추출물을 유기농업자재의 원료로 사용함에 있어 해당 원재에 대한 안전성 확인이 용이하도록 제도화 하는 것이 도움이 될 것이다.

## 요 약

*Azadirachta indica*는 살충작용을 가진 약용 식물 중 하나로 우리나라에서 유기농업자재로 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 님추출물의 인체 안전성을 확인하기 위하여, SD 랫드를 이용하여 님추출물의 급성경구독성시험과 4주 반복투여 경구독성시험을 수행하여 신장의 조직변화 및 혈액생화학적 지표를 관찰하였다. 급성 독성시험 결과 님추출물의 LD<sub>50</sub>

은 2.0 g/Kg 이상으로 나타났다. 반복투여 경구독성시험으로 님추출물을 각각 0.5, 1.0, 2.0 g/Kg으로 투여한 결과, 체중 변화, 사료 및 물 섭취량에서는 유의적인 차이가 없었으며, 시험물질투여군의 상대 신장중량 또한 유의적인 차이를 보이지 않았다. 혈중 CREA는 수컷에서 님추출물 고용량 투여군에서 유의적으로 증가하였으나 BUN은 투여용량이 증가할수록 유의적으로 감소하였다. 신장과 관련된 혈중 지표인 CHO는 암컷에서 시험물질 투여군의 용량이 증가할수록 유의적으로 증가하였다. 그러나, 조직 병리학적 분석결과 모든 시험물질투여군에서 이상이 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 님추출물은 암컷에서 혈중 콜레스테롤 증가 경향을 보인 것을 제외하고는 모든 용량처리군에서 신장에 독성 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

### Acknowledgment

This study was carried out with the support of "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ00995001)", National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

### References

- Abdel Megeed, M.I., Radwan, U.M., Hindy, A.Z., El Zarook, A., 2001. Liver functions under stress of certain common pesticides residue used on fruits and vegetables orally administrated, *Annals Agric. Sci.* 46, 383-404.
- Alam, M.M., Siddiqui, M.B., Husain, W., 1990. Treatment of diabetes through herbal drug in rural India, *Fitoterapia* 61, 240-242.
- Ashafa, A.O.T., Orekoya, L.O., Yakuba, M.T., 2012. Toxicity profile of ethanolic extract of *Azadirachta indica* stem bark in male Wistar rats, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 811-817.
- Bandyopadhyay, U., Biswas, K., Sengupta, A., Moitra, P., Dutta, P., Sarkar, D., Debnath, P., Ganguly, C.K., Banerjee, R.K., 2004. Clinical studies on the effect of Neem (*Azadirachta indica*) bark extract on gastric secretion and gastroduodenal ulcer, *Life Sci.* 75, 2867-2878.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R. K., Bandyopadhyay, U., 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*), *Indian Acad. Sci.* 82, 1336-1345.
- Kaysan, G.A., 2007. Hyperlipidemia in chronic kidney disease, *Int. J. Artif. Organs* 30, 987-992.
- Cheesbrough, M., 1991. *Medical Laboratory Manual for Tropical Countries*, pp. 133-160, 2nd ed. University Press, Cambridge, Great Britain.
- Choi, H. S., Wu, X. Y., Kim, W. S., Lee, Y., Choi, B. M., Kuk, Y. I., 2011. Effects of organic materials on insect and disease occurrence and fruit quality in pear orchards, *Korean J. Org. Agric.* 19, 405-416.
- Das, B.K., Mukherjee, S.C., Murjani, O., 2002. Acute toxicity of neem (*Azadirachta indica*) in Indian major carps, *J. Aquac. Trop.* 17, 23-33.
- Das, B.K., Mukherjee, S.C., Sahu, B.B., Murjani, G., 1999. Neem (*Azadirachta indica*) extract as an antibacterial agent against fish pathogenic bacteria, *Indian J. Exp. Biol.* 37, 1097-1100.
- Deng, Y.X., Cao, M., Shi, D.X., Yin, Z.Q., Jia, R.Y., Xu, J., Wang, C., Lv, C., Liang, X.X., He, C.L., Yang, Z.R., Zhao, J., 2013. Toxicological evaluation of neem (*Azadirachta indica*) oil: acute and subacute toxicity, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35, 240-246.
- Dhaliwal, P.K., Roop, J.K., Guraya, S.S., Dhawan, A.K., 1998. Antifertility activity of neem-seed oil in cyclic female rats, in: Dhaliwal, P.K., Randhawa, N.S., Arora, A. and Dhawan, A.K. (Eds), *Ecological agriculture and sustainable development*, Center for Research in Rural & Industrial Development, Ludhiana, India. pp. 340-346.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2011. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance azadirachtin, *EFSA J.* 9, 1858.
- Ezz-Din, D., Gabry, M.S., Farrag, A.R.H., Abdel Moneim, A.E., 2011. Physiological and histological impact of *Azadirachta indica* (neem) leaves extract in a rat model of cisplatin-induced hepato and nephrotoxicity, *J. Med. Plants Res.* 5, 5499-5506.
- Gandhi, M., Lal, R., Sankaranarayanan, A., Banerjee, C.K., Sharma, P.L., 1988. Acute toxicity study of the oil from *Azadirachta indica* seed (neem oil), *J. Ethnopharmacol.* 23, 39-51.
- Garg, S., Taluja, V., Upadhyay, S.N., Talwar, G.P., 1993. Studies on the contraceptive efficacy of pranem polyherbal cream, *Contraception.* 48, 596-591.
- Han, S.B., Kim, J.H., 2013. Research trend of neem based biopesticides, *Korean J. Pestic. Sci.* 17, 220-230.
- Koner, B.C., Banerjee, B.D., Ray, A., 1997. Effects of stress on gamma glutamyl transpeptidase (GGT) activity in lymphoid system of rats: modulation by drugs, *Indian J. Exp. Biol.* 35, 222-224.
- Kumar, G.H., Priyadarsini, R.V., Vinothini, G., Letchoumy, P.V., Nagini, S., 2010. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit cell proliferation and induce

- apoptosis in an animal model of oral oncogenesis, *Invest New Drugs*. 4, 392-401.
- Lee, J.W., Jin, C.L., Jang, K.C., Choi, G.H., Lee, D., Kim, J.H., 2013. Investigation on the insecticidal limonoid content of commercial biopesticides and neem extract using solid phase extraction, *J. Agric. Chem. Environ.* 2, 81-85.
- Parshad, O., Singh, P., Gardner, M., Fletcher, C., Rickards, E., Choo-Kang, E., 1994. Effect of aqueous neem (*Azadirachta indica*) extract on testosterone and other blood constituents in male rats. A pilot study, *West Indian Med. J.* 43, 71-74.
- Rahman, M.F., Siddiqui, M.K.J., Jamil, K., 2001. Effects of vepacide (*Azadirachta indica*) on aspartate and alanine aminotransferase profiles in a subchronic study with rats, *Hum. Exp. Toxicol.* 20, 243-249.
- Rahman, M.F., Siddiqui, M.K.J., Jamil, K., 2002. LDH profiles of male and female rats treated with vepacide, *Phytother. Res.* 16, 122-126.
- Raizada, R.B., Srivastava, M.K., Kaushal, R.A., Singh, R.P., 2001. Azadirachtin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. *Food and Chemical Toxicology* 39, 477-483.
- Ray, A., Banerjee, B.D., Sen, P., 1996. Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by *Azadirachta indica* (Neem) in mice, *Indian J. Exp. Biol.* 34, 698-701.
- Selim, M.E., Yousef, O.M., Hamid, S.H., Aleisa, N.A., 2013. Hyperlipidemia aggravated renal disease in bacteremic male albino rats, *J. Med. Sci.* 1, 9-22.
- Singh, P.P., Junnarkar, A.Y., Thomas, G.P., Tripathi, R.M., Varma, R.K., 1990. A pharmacological study of *Azadirachta indica*, *Fitoterapia* 61, 164-168.