

상지추출물의 단회/반복투여 독성 및 복귀돌연변이능 평가

한태원^{1*} · 엄민영^{1*} · 임영희² · 김정근³ · 김인호¹

¹한국식품연구원 기능성식품 연구본부

²고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부

³한국산업기술대학교 생명화학공학과

Single- and Repeated-Dose Oral Toxicity in Rats and Bacterial Reverse Mutation Test of *Morus alba* L. Extracts

Taewon Han^{1*}, Min Young Um^{1*}, Young Hee Lim², Jeong-Keun Kim³, and In-Ho Kim¹

¹Division of Functional Food Research, Korea Food Research Institute

²School of Biosystem and Biomedical Science, College of Health Science, Korea University

³Department of Chemical Engineering and Biotechnology, Korea Polytechnic University

ABSTRACT This study was carried out to evaluate the toxicity of ethanolic extracts of *Morus alba* L. branch (ME). In the reverse mutation test, *Salmonella* Typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1357, and *Escherichia coli* WP2uvrA were used to estimate the mutagenic potential of ME. Sprague-Dawley rats were orally administered ME at levels of 1,250, 2,500, and 5,000 mg/kg for the single-dose toxicity test and 500, 1,000, and 2,000 mg/kg/d for the repeated-dose toxicity test for 28 consecutive days. As expected, reverse mutation was not detected at any concentration of ME, regardless of application of the metabolic activation system with or without S9 mix. In the single-dose toxicity test, ME caused neither significant visible signs of toxicity nor mortality in rats, and LD₅₀ was estimated to be over 5,000 mg/kg. In the repeated-dose toxicity test, ME administration at 500, 1,000, and 2,000 mg/kg for 28 days to male or female rats did not result in mortality. Similarly, no toxicologically significant treatment-related changes in body weight, food intake, or organ weights were noted. Several hematological and biochemical parameters in both genders showed significant differences, but these were within normal ranges. These results support the safe use of ME.

Key words: *Morus alba* ethanol extracts, mutagenic toxicity, single-dose toxicity, repeated-dose toxicity

서 론

최근 국내외적으로 건강증진 및 질병 예방을 목적으로 하는 건강기능식품에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이에 따라 생약을 원료로 하는 기능성 식품과 천연물 의약품의 사용도 증가하고 있다. 그러나 생약의 경우 전통적으로 오랜 기간 사용되었기 때문에 안전할 것이라는 인식으로 인해 독성과 부작용에 대한 과학적인 근거가 확보되지 않은 경우가 존재한다. 천연물 및 생약제들이 기능성 식품의 안전한 원료로 사용되기 위해서는 기능성에 대한 생리활성 검증과 더불어 생체독성에 대한 심층적인 연구가 필요하다.

상지는 뽕나무(*Morus alba* L.)의 어린 가지로 늦은 봄과 초여름에 채취하여 건조한 후, 부종, 당뇨, 기침 및 가래 등의

치료에 사용되어 온 생약 중의 하나이다(1). 상지의 주요 유효성분으로는 mulberroside A, oxyresveratrol, resveratrol, 4-hydroxycinnamic acid, 7-hydroxycoumarin, morin 등이 알려져 있다(2,3). 선천성 고혈압 쥐인 SHR 및 수컷 Sprague-Dawley(SD) rat을 이용한 Kim(4)과 Ham 등(5)의 연구에 따르면 상지추출물을 경구투여 한 결과 혈압 강화 효과가 있다고 보고하였고, Kim과 Jeong(6)은 고지방 식이로 유도된 흰쥐에서 상지추출물이 항비만 효과가 있다는 것을 확인하였다. 또한, streptozotocin으로 유발된 당뇨병 동물모델에서 항당뇨 효과를 나타냈다(5). 상지추출물은 높은 free radical 소거 활성과 FRAP 및 환원력이 우수하여 항산화 활성이 높다는 연구(7,8)가 알려져 있고, tyrosinase 저해 활성 및 멜라닌 세포 감소를 통한 미백 효과(9,10) 및 elastase 활성 억제제를 통한 주름 개선 효과(11) 등이 보고됨에 따라 고부가가치 식의약 소재로 다양하게 조명되고 있다. 그러나 이와 같은 상지추출물의 복합적인 효능에도 불구하고 지속적이고 장기적인 이용에 따른 부작용과 안전성 및 독성 평가의 과학적인 근거는 명확히 제시되지 않은 실정이다.

Received 14 June 2016; Accepted 17 August 2016

Corresponding author: In-Ho Kim, Division of Functional Food Research, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 13539, Korea

E-mail: skihs@kfri.re.kr, Phone: +82-31-780-9221

*These authors contributed equally to this work.

상지추출물의 안전성에 대한 독성시험 결과를 확보하기 위해 시험물질이 유전자 또는 염색체에 미치는 상해작용인 유전독성은 복귀돌연변이 시험을 통해 확인하였고, 실험동물을 이용한 독성평가는 단회 및 28일 반복투여 독성시험을 하여 상지추출물을 건강기능식품으로 적용하기 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시험 시료 및 제조

본 실험에 사용한 상지는 경기도 양평에서 생산되는 뽕나무(*Morus alba* L.)를 사용하였다. 채집된 상지는 증류수에 세척한 후 절단기를 이용하여 6~22 mm 크기로 세절하였고, 25~30°C에서 5일간 건조시켰다. 분쇄한 상지에 8배(w/v)의 80% 에탄올을 넣고, 환류 냉각장치를 이용하여 98°C에서 4시간 추출하였다. 이를 여과(Whatman No. 4, Whatman, Maidstone, UK)한 후 40°C 이하에서 감압농축(N-21NS, EYELA, Tokyo, Japan) 하고 동결 건조한 다음 시험시료로 사용하였다.

복귀돌연변이 시험

본 실험은 Ames 시험법(12,13)에 따라 (주)캠온 비임상연구소(Yongin, Korea)에 의뢰하여 실시하였다. 시험용 균주로는 히스티민 요구성 균주인 *Salmonella* Typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537과 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2uvrA를 사용하였으며, 미생물 대사 활성화 효소로 S9 mix를 사용하였다. 시험물질 처리는 다음과 같은 방법으로 실시하였다.

용량설정시험은 식품의약품안전처의 '의약품 등의 독성 시험기준'에 따라 최고용량을 5,000 µg/plate로 설정하였고 그 이하 5단계 용량군(1,500, 500, 150, 50, 15 µg/plate)을 설정하였으며, S9 mix의 첨가 여부와 균주의 종류에 따라 시험물질군의 최고용량을 설정하였다. 시험물질용액, 음성 대조물질용액, 양성대조물질용액을 각각 조제하였다. 각각의 시험물질액 100 µL에 S9 mix 미첨가군은 인산완충액(pH 7.4) 500 µL를, S9 mix 첨가군은 S9 mix 500 µL를 이미 건열 멸균된 시험관에 넣고 균현탁액 100 µL를 첨가하여 37°C 진탕배양기에서 20분간 배양한 후, 45°C에서 용해한 top agar 2 mL를 첨가하여 잘 혼합한 다음 minimal glucose agar plate에 증충하여 고정한 후 37°C에서 48시간 동안 배양하여 복귀돌연변이성 콜로니 수를 계측하였다. 균의 생육저해 및 시험물질의 침전, 분출의 관찰은 육안 및 현미경으로 실시하였다. 콜로니는 colony counter 위에서 background lawn보다 큰 콜로니를 계산하였으며, 복귀돌연변이 시험 결과의 판정은 복귀돌연변이 콜로니 수가 음성대조군의 2배 이상이며, 용량 의존적으로 증가하고 재현성을 관찰하여 모두 충족할 때 복귀돌연변이 유발능 양성으로 판정하였다. 또한, 음성 결과에 대해서는 필요에 따라 재현성을 확인하였다.

단회투여 독성 시험

본 시험과정은 한국식품연구원 동물실험윤리위원회에 승인(KFRI-M-15019)을 받았으며, 식품의약품안전처 '의약품 등의 독성시험기준(고시 제 2015-82호)'과 '비임상시험관리기준(고시 제 2014-67호)'을 바탕으로 수행하였다. 6주령 SD rats 수컷(207±7 g)과 암컷(162±4 g)을 (주)코아텍(Pyeongtaek, Korea)에서 공급받아 1주일간 검역 및 순화 과정을 거친 후 체중감소가 없는 건강한 동물을 선택하여 무작위법으로 군을 정하였다. 건강기능식품의 경우 장기간 복용하기 때문에 일반적으로 이용되고 있는 한계용량인 1,000 mg/kg보다 5배 높은 5,000 mg/kg을 최고용량으로 설정하였다. 시험동물은 각 군에 암수 각 5마리를 사용하였고, 밤새 절식시킨 후 시료처리 하지 않은 대조군(평균 증류수)과 시험군(1,250, 2,500, 5,000 mg/kg)을 랫드용 존데를 부착한 일회용 주사기를 사용하여 1회 경구 투여하고, 4시간 후 사료를 재급여하였다. 투여 후 14일 동안 일반증상, 운동성, 식이섭취량, 사망 여부 등을 관찰하였고, 체중은 모든 동물에 대하여 투여 전, 투여 후 1, 4, 7, 10 및 14일에 측정하였다. 실험기간이 종료된 시점에서 12시간 동안 절식시킨 후, 육안관찰로 부위별 장기를 검사하고 무게를 측정하였다.

반복투여 독성 시험

본 실험은 한국식품연구원 동물실험윤리위원회에 승인(KFRI-M-15021)을 받았으며, 식품의약품안전처 '의약품 등의 독성시험기준(고시 제 2015-82호)'과 '비임상시험관리기준(고시 제 2014-67호)'을 바탕으로 수행하였다. 6주령의 암수 SD rat 80마리를 (주)코아텍에서 구입하여 입수 시 외관검사를 실시하고 저울로 체중을 측정 후 1주일 동안 순화를 시켰다. 식품의약품안전처의 '의약품 등의 독성시험기준'에 따라 2,000 mg/kg/d를 최고농도로 정하여 수행하였다. 실험동물을 1개의 대조군(평균 증류수)과 3개의 상지추출물 시험군(500, 1,000, 2,000 mg/kg/d)으로 설정하였고, 각 군당 10수씩 구성하였다. 용량별 상지추출물은 28일 동안 매일 같은 시간 랫드용 존데를 사용하여 경구투여하였으며, 시험기간 동안 매일 일정한 시간에 일반증상(식욕부진, 설사, 구토, 다뇨 및 무뇨, 분변의 변화 등)과 사망동물의 유무를 관찰하였고 주 1회 체중을 측정하였다. 실험기간이 종료되는 시점에서 12시간 절식한 후 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 안와정맥에서 채혈을 하였다. 부검 시 적출한 뇌, 흉선, 갑상선, 비장, 폐, 심장, 간, 신장, 전립선, 고환, 자궁, 난소의 중량을 측정하였다.

혈액학적, 혈액생화학적 검사

혈액학적 검사는 채취한 혈액을 즉시 EDTA(ethylene-diamine-tetra-acetic acid)가 함유된 tube에 넣고 자동혈구분석기(XN 9000, SYSMEX, Kobe, Japan)로 검사하였다. 혈액학적 검사 항목으로는 적혈구, 백혈구, 헤마토크릿,

헤모글로빈, 평균적혈구용적(mean corpuscular volume; MCV), 평균적혈구혈색소량(mean corpuscular hemoglobin; MCH), 평균적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration; MCHC), 혈소판 및 백혈구 감별 계수(neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil)이다.

혈액생화학적 검사는 채취한 혈액 일부를 실온에 30분간 방치하여 응고 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 얻은 혈청을 가지고 자동혈액분석기(Modular analytics, Mannheim, Roche, Germany)로 분석하였다. 혈액생화학 적 검사 항목은 알부민(albumin), 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase; ALP), 아스파르테이트 아미노전이 효소(aspartate aminotransferase; AST), 알라닌 아미노 전이효소(alanine aminotransferase; ALT), 혈당, 총콜레 스테롤, 중성지방, 크레아티닌, 혈액요소질소(blood urea nitrogen; BUN), 칼륨, 염소, 칼슘, 인산, 총단백질, 글로블린, 알부민/글로블린 비율(albumin/globulin ratio; A/G ratio) 등을 선별하여 검사를 시행하였다. 혈액학적 검사와 혈청생 화학적 검사는 녹십자 의료제단에 의뢰하여 측정하였다.

통계처리

모든 자료들은 평균과 표준편차로 나타내었고, SPSS program(Version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계분석을 하였다. 각 군간 유의성은 one-way

ANOVA, Tukey's test로 분석하여 $P < 0.05$ 일 경우에만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

복귀돌연변이 시험

본 시험에서는 유전독성시험 중 하나인 돌연변이 유발성 시험을 시행하였다. *Salmonella* Typhimurium을 이용한 복귀돌연변이 시험은 Maron과 Ames(13)에 의해 개발된 것으로 신속성 및 간편성 때문에 *in vitro*에서 돌연변이 물질 검색법으로 현재 가장 널리 이용되고 있는 시험법이다. 상지 추출물의 세균에 대한 돌연변이 유발성 검토를 위해 *S. Typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537의 4개 균주와 대장균 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA 균주를 이용한 복귀돌연변이 집락 수를 조사하여 Table 1에 나타내었다.

각각의 균주에서 양성으로 판단할 수 있는 범위의 복귀돌연변이 콜로니가 유발되어 본 시험이 적절한 조건에서 수행되었음을 확인할 수 있었다. 시험균주인 *S. Typhimurium*의 4개 균주와 *E. coli* WP2uvrA에서 대사활성계 유무에 상관 없이 상지추출물에 대한 복귀돌연변이 콜로니 수는 용량 의존적으로 증가하지 않았으며, 2배 이상의 증가도 관찰되지 않아 음성으로 판정하였다.

Table 1. Bacterial reverse mutation assay with ethanolic extracts of *Morus alba* L. branch

Metabolic activation	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of colonies/plate					
		Base-pair substitution type			FrAmeshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 Mix (-)	0	156 \pm 12	14 \pm 1	18 \pm 1	18 \pm 1	11 \pm 1	
	15	158 \pm 7	14 \pm 1	12 \pm 1	16 \pm 1	8 \pm 2	
	50	158 \pm 1	15 \pm 0	19 \pm 4	22 \pm 1	10 \pm 0	
	150	171 \pm 5	14 \pm 0	10 \pm 1	21 \pm 1	10 \pm 5	
	500	164 \pm 0	10 \pm 2	12 \pm 3	16 \pm 1	8 \pm 0	
	1,500	153 \pm 3	12 \pm 5	16 \pm 4	23 \pm 2	13 \pm 4	
	5,000	161 \pm 1	12 \pm 3	15 \pm 1	22 \pm 4	9 \pm 4	
S9 Mix (+)	0	143 \pm 5	11 \pm 1	21 \pm 3	24 \pm 5	15 \pm 2	
	15	167 \pm 1	12 \pm 3	16 \pm 1	29 \pm 1	13 \pm 4	
	50	141 \pm 4	14 \pm 0	18 \pm 1	19 \pm 5	13 \pm 1	
	150	180 \pm 4	15 \pm 5	13 \pm 4	27 \pm 4	13 \pm 4	
	500	181 \pm 0	15 \pm 3	16 \pm 1	33 \pm 3	15 \pm 2	
	1,500	190 \pm 1	10 \pm 1	16 \pm 4	25 \pm 1	13 \pm 1	
	5,000	187 \pm 6	13 \pm 3	20 \pm 4	41 \pm 5	16 \pm 2	
Positive controls	S9 Mix (-)	Positive controls	SA	SA	4NQO	2-NF	ICR-191
		Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.5	0.5	0.5	2.0	0.5
		Number of colony	360 \pm 3	208 \pm 11	66 \pm 5	224 \pm 1	56 \pm 5
	S9 Mix (+)	Positive controls	2-AA	2-AA	2-AA	B[a]P	2-AA
		Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.5	0.5	2.0	1.0	1.0
		Number of colony	1,764 \pm 40	136 \pm 25	114 \pm 5	170 \pm 1	60 \pm 8

Value are expressed as mean \pm SD.

2-AA: 2-aminoanthracene, B[a]P: benzo[a]pyrene, SA: sodium azide, 2-NF: 2-nitrofluorene, 4NQO: 4-nitroquinoline N-oxide, ICR-191: acridine mutagen ICR 191.

Table 2. Body weight in the acute toxicity study

Group (n=5) (mg/kg/d)	Body weight (g)					
	1 day	4 day	7 day	10 day	14 day	
Male	Control	207.4±8.4	227.8±8.2	251.3±10.3	272.0±11.9	298.7±10.7
	1,250	206.9±6.8	227.0±8.0	249.2±9.3	267.4±10.1	289.9±11.8
	2,500	206.4±7.5	230.4±3.8	246.8±12.4	269.1±11.8	290.2±8.8
	5,000	206.7±7.0	227.6±7.5	248.3±12.4	268.4±14.9	291.8±15.6
Female	Control	162.4±4.8	174.2±4.1	180.8±2.8	186.0±2.3	195.3±2.9
	1,250	162.3±4.5	174.2±6.0	184.4±9.0	189.1±13.8	199.1±10.5
	2,500	162.2±4.3	173.4±2.3	183.1±3.9	188.6±6.7	196.4±6.3
	5,000	161.8±3.8	171.1±4.5	180.9±5.5	188.9±4.3	200.9±4.0

Value are expressed as mean±SD (N=5/sex/group).

Table 3. Organ weights in the acute toxicity study

Organs (g)	Male				Female			
	Control	1,250 (mg/kg)	2,500 (mg/kg)	5,000 (mg/kg)	Control	1,250 (mg/kg)	2,500 (mg/kg)	5,000 (mg/kg)
Brain	1.82±0.11	1.72±0.09	1.71±0.10	1.72±0.14	1.65±0.03	1.58±0.08	1.60±0.06	1.61±0.13
Liver	9.01±0.71	8.32±0.38	8.26±0.41	8.53±0.53	5.30±0.25	5.93±0.53	5.67±0.29	5.69±0.24
Kidney	2.07±0.10	2.06±0.14	1.96±0.13	2.02±0.12	1.31±0.08	1.28±0.07	1.32±0.07	1.40±0.06
Heart	0.97±0.12	0.89±0.13	1.00±0.05	0.92±0.07	0.68±0.08	0.72±0.07	0.66±0.04	0.69±0.06
Thymus	0.54±0.20	0.44±0.06	0.48±0.06	0.54±0.14	0.36±0.07	0.35±0.04	0.36±0.07	0.39±0.03
Spleen	0.74±0.06	0.73±0.07	0.76±0.05	0.75±0.05	0.54±0.05	0.56±0.03	0.58±0.03	0.56±0.03
Lungs	1.31±0.13	1.33±0.13	1.31±0.15	1.29±0.09	1.08±0.14	1.05±0.10	1.02±0.06	1.08±0.07
Thyroid	0.62±0.19	0.54±0.02	0.55±0.08	0.57±0.05	0.41±0.04	0.44±0.03	0.43±0.03	0.41±0.03
Prostate	0.49±0.17	0.53±0.08	0.60±0.13	0.56±0.05				
Testis	2.98±1.21	3.41±0.27	3.56±0.14	3.38±0.21				
Uterus					0.32±0.04	0.37±0.04	0.31±0.02	0.38±0.07
Ovarium					0.11±0.01	0.11±0.02	0.10±0.01	0.11±0.02

Value are expressed as mean±SD (N=5/sex/group).

단회투여 독성 시험

상지추출물의 단회투여 독성 및 개략적인 치사량을 조사하기 위하여 SD 암수 rat을 사용하여 시험물질을 단회 경구투여 하였다. 시험물질을 투여한 후 14일간 사망 여부를 관찰한 결과 암수 대조군 및 시험물질 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았다(data not shown).

또한, 14일 시험기간 동안 매일 1회 피부, 털, 눈, 호흡, 운동 상태 및 설사 등 일반증상을 관찰한 결과 대조군과 비교하여 시험기간 동안 이상 징후를 보이는 동물은 관찰되지 않았다. 14일간 체중 변화에서도 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었으며, 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(Table 2). 실험 완료 후 부검하여 뇌, 흉선, 폐, 갑상선, 심장, 비장, 간, 신장, 고환, 자궁, 난소 등의 장기를 관찰한 결과 유의할만한 특이한 소견은 관찰되지 않았다. 장기 무게도 대조군과 시험물질 투여군 사이에 통계학적으로 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Table 3). 이상의 결과로 보아 상지추출물의 LD₅₀은 암수 모두 5,000 mg/kg 이상이며 단회 경구투여에 대한 독성을 가지지 않는 것으로 판단하였다.

반복투여 독성 시험

상지추출물의 28일 반복 경구투여에 의한 독성을 조사하

기 위하여 SD 암수 rat을 이용하여 시험물질 500, 1,000 및 2,000 mg/kg 용량으로 투여군을 설정하고 대조군과 비교하였다. 실험 결과 대조군을 포함한 모든 시험군에서 사망 동물은 관찰되지 않았다(Table 4). 시험기간 중 대조군과 상지추출물을 투여한 모든 군에서 정상적인 체중 증가가 관찰되었고, 대조군과 비교하여 시험물질의 투여에 따른 유의성이 있는 체중 변화는 나타나지 않았다(Fig. 1). 또한, 암수 모두 대조군과 비교하여 식이섭취량의 차이 및 특이한 일반증상도 관찰되지 않았다(Table 5).

시험 종료 시 부검하여 모든 실험동물의 장기를 육안적 검사를 통해 병변의 유무를 관찰한 결과 상지추출물 투여에 따른 독성학적 이상소견은 관찰되지 않았다. 또한, 시험군의 뇌, 간, 신장, 심장, 흉선, 비장, 폐, 갑상선 및 생식기(수컷: 전립선, 고환, 암컷: 자궁, 난소)의 무게와 대조군의 장기 무게 사이에 통계학적으로 유의성 있는 변화는 나타나지 않았으며, 이러한 결과는 암수 모두에서 유사하게 관찰되었다(Table 6). 특히 해독작용을 하는 간은 독성물질을 섭취하게 되면 비대해져 무게가 증가하게 되는데(14), 본 연구 결과에서는 대조군과 상지추출물 투여군의 간 무게 비교 시 유의적인 차이가 없었다.

혈액학적 검사 결과 백혈구, 호중구, 림프구, 단핵구, 호산구, 호염구의 변화는 대조군과 비교하여 유의적인 차이가

Table 4. Mortality of male and female rats orally administered with ethanolic extracts of *Morus alba* L. branch for 4 weeks

Weeks	Male				Female			
	Control	500 (mg/kg)	1,000 (mg/kg)	2,000 (mg/kg)	Control	500 (mg/kg)	1,000 (mg/kg)	2,000 (mg/kg)
0	0/0/10 ¹⁾	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10
1	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10
2	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10
3	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10
4	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10

¹⁾Number of animals with the sign / number of dead animals / number of animals examined.

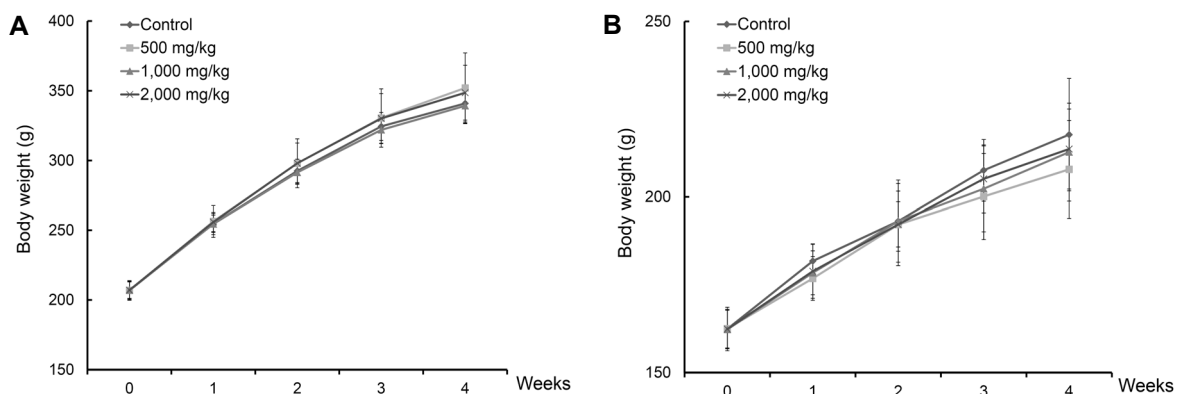


Fig. 1. Mean body weight of rats during 28 days treatment with ethanolic extracts of *Morus alba* L. branch. (A) male (B) female. Value are expressed as mean±SD (N=10/sex/group).

Table 5. Clinical signs and food intake of male and female rats orally administered with ethanolic extracts of *Morus alba* L. branch for 4 weeks

Weeks	Observed signs	Male				Female			
		Control	500 (mg/kg)	1,000 (mg/kg)	2,000 (mg/kg)	Control	500 (mg/kg)	1,000 (mg/kg)	2,000 (mg/kg)
0	No finding								
1	No finding	21.5±0.3	21.5±0.4	20.6±1.0	21.3±0.3	14.8±0.4	13.8±1.6	14.5±0.5	14.8±0.7
2	No finding	22.5±0.4	23.1±1.1	22.2±0.3	23.2±1.4	15.1±0.8	14.6±0.6	14.8±1.3	14.9±0.3
3	No finding	22.7±0.4	22.6±0.9	22.0±0.4	22.5±0.7	15.7±0.9	14.5±0.8	15.0±0.6	15.5±0.6
4	No finding	22.7±1.0	23.0±1.2	22.2±0.4	23.1±0.9	16.7±1.9	15.3±0.9	15.6±1.0	15.7±0.4

Value are expressed as mean±SD (N=10/sex/group).

Table 6. Organ weights of male and female rats orally administered with ethanolic extracts of *Morus alba* L. branch for 4 weeks

Organs (g)	Male				Female			
	Control	500 (mg/kg)	1,000 (mg/kg)	2,000 (mg/kg)	Control	500 (mg/kg)	1,000 (mg/kg)	2,000 (mg/kg)
Brain	1.77±0.06	1.80±0.07	1.78±0.06	1.81±0.10	1.68±0.06	1.64±0.05	1.64±0.08	1.65±0.08
Liver	10.43±0.71	10.51±1.02	9.66±0.98	10.14±0.85	5.90±0.70	5.10±1.67	5.60±0.51	5.83±0.60
Kidney	2.31±0.15	2.36±0.21	0.32±0.15	2.31±0.09	1.43±0.09	1.38±0.08	1.42±0.13	1.42±0.10
Heart	1.05±0.06	1.03±0.09	1.00±0.05	0.98±0.07	0.74±0.06	0.75±0.06	0.71±0.06	0.77±0.02
Thymus	0.46±0.06	0.48±0.09	0.43±0.08	0.47±0.08	0.32±0.07	0.29±0.05	0.30±0.07	0.29±0.05
Spleen	0.73±0.08	0.75±0.10	0.74±0.09	0.71±0.11	0.61±0.09	0.57±0.07	0.56±0.07	0.54±0.08
Lungs	1.29±0.11	1.34±0.13	1.35±0.10	1.29±0.09	1.15±0.18	1.09±0.12	1.08±0.07	1.14±0.12
Thyroid	0.62±0.05	0.60±0.04	0.62±0.06	0.62±0.05	0.41±0.06	0.41±0.03	0.39±0.03	0.43±0.04
Prostate	0.61±0.12	0.58±0.15	0.58±0.06	0.55±0.07				
Testis	3.91±0.16	3.57±0.95	3.85±0.27	3.99±0.33				
Uterus					0.49±0.14	0.39±0.05	0.46±0.11	0.47±0.09
Ovarium					0.11±0.02	0.11±0.01	0.11±0.04	0.11±0.02

Value are expressed as mean±SD (N=10/sex/group).

관찰되지 않았다(Table 7). 반면 암컷 rat의 2,000 mg/kg 투여군에서 혈소판 수가 유의적으로 감소하였으나 농도 의존성을 나타내지 않았다. 이는 SD rat을 이용한 4주간 반복 투여 독성시험의 혈액학적 기초자료에서 보이는 혈소판 수치($674\sim 1,373\times 10^3/\mu\text{L}$) 이내에서의 변화(15)로서 상지추출물 섭취에 따른 효과와는 무관한 것으로 판단하였다.

혈청생화학적 검사 결과를 살펴보면 수컷 rat의 경우(Table 8) 상지추출물을 섭취한 모든 군의 혈액 칼륨 농도가 대조군보다 유의적으로 증가하였고, 혈액 중 칼슘 농도는 2,000 mg/kg 투여군에서 유의적으로 높았다. 그러나 본 연구에서 측정된 수치는 SD rat을 이용한 반복투여 독성시험에서 관찰된 혈액 내 칼슘 농도(9.2~12.0 mg/dL) 범위에 해당하는 것으로서 시험물질 투여에 의한 독성과는 무관한 것으로 판단하였다(15). 그 외 분석 인자들에서는 상지추출물의 투여에 따른 통계학적으로 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 암컷 rat의 경우(Table 9) 상지추출물 500 mg/kg 군의 globulin과 A/G ratio 수치가 대조군과 비교하여 유의미한 변화를 보였으나, 농도 의존성이 없어 상지추출물에 의한 변화는 아니라고 생각한다. 특히 간 기능 지표 효소로

알려진 AST, ALT, ALP의 혈액 내 수치는 대조군과 시험군 사이에서 통계학적으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Zimmerman(14)에 따르면 독성물질이 체내에 들어오면 간 손상을 일으키고, 간 손상에 따라 간 기능 지표 효소가 혈액 내로 유입되어 혈액 내 수치가 높아지게 된다. 간 기능 지표 효소들의 유의적인 차이를 나타내지 않은 본 실험의 결과로부터 상지추출물이 간 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었고, 이는 뽕나무 껍질인 상백피를 이용하여 28일간 반복독성시험을 한 Hwang 등(16)의 혈액생화학적 검사 결과와도 유사한 결과를 나타내었다. 결과적으로 상지추출물을 암컷 및 수컷 SD rats에 28일간 반복 경구투여 했을 때 혈액학적 지표 및 혈액생화학적 지표에서 일부 변화를 초래하였으나, 모두 농도 의존성이 없고 정상적인 범위 내에서의 변화로 시료에 의한 변화는 아닌 것으로 판단하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 상지추출물은 본 시험조건에서는 독성이 없는 안전한 천연물이라는 것으로 판명되었고, 의약품이나 기능성 식품으로서의 개발 가능성을 확인하였다. 그러나 건강기능식품의 경우 1회 섭취가 아닌 장기적 섭취이므로 추후 13주 반복투여 독성시험을 수행하여 장기

Table 7. Hematological analysis of SD rats treated orally with ethanolic extracts of *Morus alba* L. branch for 4 weeks

Hematological parameters	Group			
	Control	500 (mg/kg)	1,000 (mg/kg)	2,000 (mg/kg)
Male				
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	8.6±0.2	8.6±0.3	8.6±0.2	8.6±0.2
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	7.4±1.9	5.7±1.7	8.0±1.0	8.0±1.3
Hct (%)	51.0±1.2	51.1±1.0	50.7±1.8	51.0±1.3
Hb (g/dL)	16.5±0.3	16.6±0.3	16.6±0.6	6.7±0.6
MCV (fL)	59.5±1.5	59.8±1.3	58.8±1.4	59.0±1.2
MCH (pg)	19.7±0.5	19.4±0.5	19.2±0.5	19.3±0.6
MCHC (g/dL)	32.2±0.4	32.5±0.4	32.7±0.3	32.7±0.5
Platelet ($10^3/\mu\text{L}$)	938.6±146.8	945.1±172.9	927.8±178.0	962.9±145.4
S.Neutrophil (%)	14.7±3.5	14.5±4.4	17.4±7.4	11.9±2.1
Lymphocyte (%)	79.9±4.0	80.8±5.5	77.7±8.6	83.7±3.3
Monocyte (%)	0.67±0.22	0.62±0.13	0.85±0.29	0.74±0.25
Eosinophil (%)	4.6±2.2	4.0±1.2	4.0±2.0	3.5±1.5
Basophil (%)	0.10±0.05	0.09±0.07	0.16±0.05	0.12±0.04
Female				
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	8.0±0.3	7.9±0.4	8.2±0.3	8.2±0.5
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	5.3±0.9	6.0±1.3	5.9±0.7	6.3±1.3
Hct (%)	45.1±0.9	44.1±1.9	45.7±2.0	45.1±2.5
Hb (g/dL)	15.5±0.4	15.3±0.4	15.8±0.6	14.7±2.0
MCV (fL)	56.1±1.4	55.6±1.2	56.0±1.7	54.9±2.4
MCH (pg)	19.3±0.7	19.4±0.8	19.4±0.8	18.1±2.9
MCHC (g/dL)	34.4±0.8	34.8±1.0	34.6±1.1	32.8±4.6
Platelet ($10^3/\mu\text{L}$)	1,186.0±150.7 ^b	1,083.1±235.8 ^{ab}	1,095.5±176.8 ^{ab}	893.9±144.8 ^a
S.Neutrophil (%)	16.8±3.6	18.6±6.1	14.0±4.3	16.4±4.3
Lymphocyte (%)	79.5±3.8	75.5±7.4	80.5±5.6	77.2±5.9
Monocyte (%)	1.0±0.3	1.1±0.2	1.2±0.5	1.0±0.3
Eosinophil (%)	2.6±0.5	4.6±2.2	4.2±2.3	5.3±2.6
Basophil (%)	0.11±0.03	0.12±0.08	0.15±0.07	0.13±0.05

Value are expressed as mean±SD (N=10/sex/group).

Values with different superscript letters are significantly different among groups at $\alpha=0.05$ by Tukey's multiple range test.

RBC: red blood cell, WBC: white blood cell, Hct: hematocrit, Hb: hemoglobin, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 8. Serum biochemical values of male SD rats treated orally with ethanolic extracts of *Morus alba* L. branch for 4 weeks

Biochemical parameters	Group			
	Control	500 (mg/kg)	1,000 (mg/kg)	2,000 (mg/kg)
Albumin (g/dL)	4.3±0.1	4.34±0.2	4.38±0.2	4.25±0.2
ALP (U/L)	138.8±19.3	140.0±21.7	128.90±9.4	130.1±10.5
AST (U/L)	116.1±8.5	121.2±11.8	119.5±21.3	100.3±7.0
ALT (U/L)	57.9±6.0	58.8±4.1	59.7±7.4	55.3±5.5
Glucose (mg/dL)	104.1±5.5	107.2±8.4	98.4±5.7	111.3±12.4
Total cholesterol (mg/dL)	103.9±11.2	109.5±10.7	114.6±13.9	98.2±15.3
Triglyceride (mg/dL)	79.8±13.8	89.0±38.6	70.8±18.9	73.3±17.5
Creatinine (mg/dL)	0.36±0.04	0.40±0.05	0.40±0.05	0.36±0.04
BUN (mg/dL)	19.0±2.6	20.7±3.0	20.0±2.8	20.3±1.2
K (mmol/L)	6.6±0.2 ^a	7.1±0.2 ^b	7.3±0.4 ^b	7.4±0.3 ^b
Cl (mmol/L)	98.4±0.8	97.8±1.1	98.5±1.3	99.1±1.1
Ca (mg/dL)	10.8±0.1 ^a	10.9±0.3 ^{ab}	11.1±0.3 ^{ab}	11.2±0.3 ^b
P (mg/dL)	9.0±0.3 ^a	10.0±0.5 ^b	10.4±0.7 ^b	10.3±0.4 ^b
Total protein (g/dL)	6.5±0.3	6.5±0.3	6.5±0.3	6.3±0.3
Globulin (g/dL)	2.1±0.1	2.1±0.2	2.1±0.2	2.0±0.2
A/G ratio	2.0±0.1	2.1±0.2	2.1±0.1	2.1±0.1

Value are expressed as mean±SD (N=10/sex/group).

Values with different superscript letters are significantly different among groups at $\alpha=0.05$ by Tukey's multiple range test.

ALP: alkaline phosphatase, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, BUN: blood urea nitrogen, A/G ratio: albumin/globulin ratio.

Table 9. Serum biochemical values of female SD rats treated orally with ethanolic extracts of *Morus alba* L. branch for 4 weeks

Biochemical parameters	Group			
	Control	500 (mg/kg)	1,000 (mg/kg)	2,000 (mg/kg)
Albumin (g/dL)	4.5±0.1	4.6±0.2	4.6±0.2	4.4±0.2
ALP (U/L)	91.5±9.6	99.8±12.6	97.1±17.2	92.1±12.0
AST (U/L)	119.7±13.5	109.7±20.0	115.4±14.5	103.0±11.1
ALT (U/L)	60.2±10.1	57.2±7.5	54.7±11.4	54.7±10.8
Glucose (mg/dL)	105.3±10.1	111.8±8.1	106.1±9.2	116.1±9.5
Total cholesterol (mg/dL)	115.2±7.8	108.6±22.5	106.4±22.0	119.4±13.9
Triglyceride (mg/dL)	48.5±10.4	42.4±9.3	40.6±9.3	40.8±5.4
Creatinine (mg/dL)	0.41±0.04	0.42±0.03	0.43±0.08	0.43±0.04
BUN (mg/dL)	18.9±2.8	19.7±2.1	20.9±5.5	21.4±4.2
K (mmol/L)	6.7±0.4	7.2±0.3	6.8±0.4	7.1±0.4
Cl (mmol/L)	97.0±5.7	99.5±1.0	99.5±1.8	99.6±1.1
Ca (mg/dL)	10.9±0.1	10.9±0.2	10.9±0.2	10.9±0.2
P (mg/dL)	8.3±0.9	8.0±0.6	8.5±0.6	8.5±0.7
Total protein (g/dL)	6.5±0.2	6.4±0.2	6.4±0.2	6.3±0.1
Globulin (g/dL)	1.9±0.2 ^b	1.8±0.1 ^a	1.9±0.1 ^{ab}	1.9±0.2 ^{ab}
A/G ratio	2.3±0.2 ^a	2.6±0.2 ^b	2.5±0.2 ^{ab}	2.4±0.3 ^{ab}

Value are expressed as mean±SD (N=10/sex/group).

Values with different superscript letters are significantly different among groups at $\alpha=0.05$ by Tukey's multiple range test.

적인 독성 및 안전성 자료의 확보가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

상지추출물의 독성을 복귀돌연변이, 단회투여 및 반복투여 독성 등 다각적으로 적용하여 평가하였다. 상지추출물의 복귀돌연변이 실험을 *Salmonella* Typhimurium의 히스티딘 요구성 균주 4종과 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주 1종을 이용하여 대사활성계 적용 및 비적용 하에서 Ames test를 실시하였다. 대사활성계 유무에 상관없이 5,000 µg/

plate의 처리 농도까지 복귀돌연변이 콜로니 수는 증가되지 않았으므로 상지추출물은 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단하였다. SD rats 암수에 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg의 농도로 단회 경구투여 하고 14일 동안 일반증상, 운동성, 식이섭취량, 사망 여부 및 체중 변화를 조사한 결과, 사망동물은 관찰되지 않았으며 대조군과 비교하여 실험동물의 암수 모두에서 시험물질 투여에 따른 일반적인 증상 변화는 나타나지 않았다. 대조군과 시험군은 모두 정상적인 체중 증가가 관찰되었고 대조군과 비교하여 상지추출물 투여군의 유의적인 체중 변화는 나타나지 않았으며, LD₅₀은

암수 모두 5,000 mg/kg 이상인 것으로 판단하였다. 또한, 상지추출물을 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/d의 용량으로 28일간 반복 경구투여 하면서 실험동물의 일반증상, 사망동물의 유무, 체중 변화, 식이섭취량, 혈액학적 및 혈액생화학 적 변화, 부검 후 육안적 검사를 통한 병변의 유무를 관찰하였다. 시험기간 동안 암수 모든 군에서 반복 투여로 인한 사망동물이 없었으며 정상적인 체중 증가가 나타났다. 대조군과 비교하여 상지추출물의 투여에 따른 체중 변화는 통계학적으로 유의성이 없었으며 암수 모두 대조군과 비교하여 식이섭취량의 차이 및 유의할만한 일반증상도 관찰되지 않았다. 시험물질의 투여에 따른 장기 무게, 혈액학적 분석 결과 및 혈액생화학적 분석 결과 등에서도 독성 및 이상소견이 발견되지 않았다.

감사의 글

본 논문은 농림수산식품기술기획평가원의 노인성 만성질환 완화 소재의 안전성 평가(과제번호: GA141000-02)의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. The Korea Food and Drug Administration. 2013. *National standard of traditional medicinal (herbal and botanical) materials*. Shinilbooks, Seoul, Korea. p 197.
2. Shi YW, Wang CP, Wang X, Zhang YL, Liu L, Wang RW, Ye JF, Hu LS, Kong LD. 2012. Uricosuric and nephroprotective properties of *Ramulus mori* ethanol extract in hyperuricemic mice. *J Ethnopharmacol* 143: 896-904.
3. Lim YH, Kim KH, Kim JK. 2015. Source, biosynthesis, biological activities and pharmacokinetics of oxyresveratrol. *Korean J Food Sci Technol* 47: 545-555.
4. Kim BS. 2008. Antihypertensive effect of active compounds from stem of *Morus alba*. *PhD Dissertation*. Konyang University, Daejeon, Korea.
5. Ham I, Jeong E, Lee B, Chio H. 2008. The study on anti-hypertensive and anti-diabetic effect of *Mori ramulus*. *Kor J Herbology* 23: 203-212.
6. Kim HS, Jeong JC. 2002. Effects of *Ramulus mori* extract on obesity and lipid metabolism in high fat diet rats. *J Korean Oriental Med* 23: 64-72.
7. Cha YY. 2007. Comparative study on antioxidative effects of *Mori ramulus* and *Mori cortex*. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 21: 934-939.
8. Park HM, Hong JH. 2014. Effect of extraction methods on antioxidant activities of *Mori ramulus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1709-1715.
9. Shin JY. 2001. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korean J Food Nutr* 14: 568-572.
10. Park SY, Kim JS, Lee BH, Lim SC, Lee SN, Leem KH, Lee KM. 2009. Whitening effects of *Mori Ramulus*, *Mori Cortex Radicis* and *Mori Folium* herbal-acupuncture solution after fermentation and heating. *J Korean Acupuncture & Moxibustion Society* 26: 91-98.
11. Jeong HL, Kim HW, Kim JH, Kim JH, Kim D. 2012. Cosmetic effect of mixed plant extracts including *Saururus chinensis*, *Morus bombycis* stem and *Morus papyrifera* stem. *Korean Chem Eng Res* 50: 610-613.
12. Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutat Res* 31: 347-364.
13. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
14. Zimmerman HJ. 1982. Chemical hepatic injury and its detection. In *Toxicology of the Liver*. Plaa G, Hewitt WR, eds. Raven Press, New York, NY, USA. p 1-45.
15. Petterino C, Argentino-Storino A. 2006. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Exp Toxicol Pathol* 57: 213-219.
16. Hwang SY, Kwon W, Chai HY, Cho YM, Lee NJ, Ryu JM, Sin JS, Kim TM, Cho JH, Kim EJ, Park JH, Kang JK, Kim YB. 2004. Four-week repeated-dose toxicity study on *Mori radicis* cortex. *Korean J Lab Anim Sci* 20: 283-290.