

Single Dose Oral Toxicity Test of Ethanol Extracts of *Schisandrae fructus* and *Mori folium*, and their Mixture in ICR Mice

Eun Ok Choi^{1,2}, Da Hye Kwon², Min Young Kim¹, Hyun Hwang-Bo², Hong Jae Kim², Kyu Im Ahn¹, Jin-Woo Jeong^{1,2}, Ki Won Lee³, Ki Young Kim³, Sung Goo Kim³, Young Whan Choi⁴, Su Hyun Hong¹, Cheol Park⁵ and Yung Hyun Choi^{1,2*}

¹Department of Biochemistry, Donggeui University College of Korean Medicine, Busan 614-052, Korea

²Anti-Aging Research Center, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

³Research Institute, Bio-Port Korea INC, MarineBio-industry Development Center, Busan 619-912, Korea

⁴Department of Horticultural Bioscience, College of Natural Resource and Life Sciences, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

⁵Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences and Human Ecology, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

Received September 20, 2016 / Revised October 2, 2016 / Accepted October 3, 2016

Schisandrae fructus (SF) and *Mori folium* (MF) have been used as traditional medicines for thousands of years in parts of Asia, including Korea, China, and Japan. Recent researches on SF and MF have documented a wide spectrum of therapeutic properties, including anti-microbial, anti-inflammatory, anti-oxidative, immunomodulatory and anti-angiogenesis effects. However, the toxicity and safety of SF and MF, and their mixture (medicinal herber mixture, MHMIX) were not confirmed. Therefore, this study was performed to evaluate the acute toxicity and safety of SF, MF and MHMIX. SF, MF and MHMIX were orally administered at a dose of 5,000 mg/kg in ICR mice. Animals were monitored for the mortality and changes in the body weight, clinical signs and gross observation during the 14 days after dosing, upon necropsy. We also measured parameters of organ weight, clinical chemistry, and hematology. No dead and no clinical signs were found during the experiment period after administration of a single oral dose of SF, MF and MHMIX. There were no adverse effects on clinical signs, body weight, or organ weight and no gross pathological findings in any treatment group. Therefore, LD₅₀ value of SF, MF and MHMIX may be over 5,000 mg/kg and it may have no side toxic effect to ICR mice. The results on the single-dose toxicity of SF, MF and MHMIX indicate that it is not possible to reach oral dose levels related to death or dose levels with any harmful side effects.

Key words : ICR mice, *Mori folium*, *Schisandrae fructus*, single dose oral toxicity, safety

서 론

최근 건강과 웰빙에 대한 관심이 증가하면서 기능성 식품에 대한 일반인의 관심과 수요가 증가되고 있으며, 그 중 한약 및 생약은 약용자원으로써 뿐만 아니라 주요한 식품자원으로써 사용 범위와 빈도가 점차 증가하는 추세이다[13, 23]. 이로 인해 다양한 한약과 생약을 원료로 하는 기능성 식품과 천연물 의약품 등의 무분별한 사용이 증가하고 있으며, 특별한 규제 없이 광범위한 구매와 이용이 가능한 실정이다[14, 19]. 또한 천연물 유래의 생약과 한약은 오랜 기간 사용되어 왔기 때문에 안전할 것이라는 인식과 예로부터 한의학 및 민간처방

으로 사용되어 왔다는 사실만으로 그 독성과 부작용에 대한 과학적인 근거가 확보되지 않아 그에 대한 근거 확립 및 검증 과정이 필수적으로 요구된다[10, 21]. 또한 최근에는 인체에 대한 안전성 문제가 무엇보다 중요시되고 있어 안전성이 확보되지 않은 기능성 소재는 아무리 효능이 탁월하다 해도 그 이용가치를 인정받지 못하고 있다[7]. 따라서 천연물 유래 생약 및 한약의 안전성에 대한 지속적이고 체계적인 연구가 이루어져야 할 것이며, 이에 표준화된 최신 평가법을 이용하여 천연물 소재로부터 추출 및 정제된 유효성분의 독성 및 부작용을 정확히 평가하는 일은 매우 중요해지고 있다.

오미자나무(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.)의 열매인 오미자(*Schisandrae fructus*, 五味子)와 뽕나무과의 뽕나무(*Morus alba* L.) 또는 동속 근연식물의 잎을 말린 약재인 상엽(*Mori folium*, 桑葉)은 polyphenol을 비롯한 다양한 생리활성 물질을 다량으로 함유하고 있어 항산화 및 항염증 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다[4, 11, 12]. 오미자는 예로부터 한방에서 진정, 진해, 해열제 등으로 이용되었으며, 혈당 강하, 콜레스테롤 저하, 면역 조절, 항암 및 항종양 등 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고되고 있다[5, 8, 16, 20]. 상엽은 한방에서

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

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.

폐열로 인한 안구충혈, 기침이나 갈증이 있을 경우에 사용하며, 식후 혈당 조절을 통한 혈당강하 활성을 가지는 것으로 보고되어 있다[2, 9]. 또한 상업은 고지혈증 동물모델에서 혈당강하 효과와 함께 콜레스테롤과 혈관 기능을 개선하는 효과가 있는 것으로 보고되었다[1, 17]. 최근 연구에 따르면 구기자, 의이인, 택사 및 황기 추출물의 배합이 체중, 지질대사, 염증 및 면역기능에 효과를 나타낸다고 알려졌으며[15], 홍삼과 천마의 혼합 투여시 단독 투여에 비하여 고지혈증 및 혈관 염증 질환의 억제효과를 증가시킨다는 것을 확인하였다[18]. 이와 같이 복합추출물이 단독추출물의 효과를 상승 또는 개선시키는 것으로 확인되면서 다양한 복합추출물의 사용도 증가하고 있는 추세이다.

특히 오미자와 상업 추출물의 생리활성 및 다양한 활용 가능성에 대해서는 비교적 많은 연구가 진행되었으나 각각의 단독추출물과 복합추출물의 안전성과 독성에 관한 정보는 극히 제한적이다. 본 연구에서는 최근 제기되고 있는 한약 및 생약의 오남용으로 인한 독성과 안전성 문제에 대한 자료를 확보하기 위하여 ICR mouse를 이용하여 오미자 에탄올 단독추출물(SF), 상업 에탄올 단독추출물(MF) 및 오미자와 상업 에탄올 복합추출물(MHMIX)에 대한 단회투여독성시험을 수행하여 기능성 천연물 소재로서의 안전성을 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에서는 (주)샘타코(Osan, Korea)로부터 구입한 5주령의 SPF ICR 마우스를 동의대학교 한의과대학 동물사육 시설에서 1주일 간 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선발하여 6주령의 수컷(체중 27.00 ± 0.96 g)을 시험에 사용하였다. 실험동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조명시간 12시간(08:00~20:00) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 사육 환경 조건을 유지하였으며, polycarbonate cage에 사육상자 당 5마리 이하로 수용하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(샘타코)를 사용하였고, 물은 프리필터한 상수도수를 사용하였으며, 자유 섭취 조건으로 실험을 진행하였다. 동물실험은 동의대학교 동물실험윤리위원회의 사전 심의를 받아 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 수행하였다(승인번호: A2015-019).

시료준비

본 실험에서 사용한 오미자 및 상업의 20% 에탄올 추출물 분말은 (주)바이오포트코리아(Busan, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 각 에탄올 추출물 분말은 멸균수에 녹인 현탁액인 단독 현탁 추출물인 SF 및 MF를 조성하였으며, SF 및 MF를 1:1의 비율로 혼합하여 복합 현탁 추출물인 MHMIX를 조성한 후 각각 단회경구 독성테스트를 실시하였다.

투여용량 설정 및 투여 방법

군 분리는 모든 동물에 대하여 순화 적응 종료일에 실시하였고, 선발한 동물 30마리를 각 군 평균체중이 균등하도록 5마리씩 무작위로 분리하였다. 본 실험에 대한 예비실험으로 미국 환경보호청(US environmental protection agency, US EPA)에서 설정한 무해 물질 분류 기준인 5,000 mg/kg을 기준으로 하여 ICR 마우스 2마리를 대상으로 SF, MF 및 MHMIX 5,000 mg/10 ml/kg을 단회 경구투여한 결과 사망 사례가 관찰되지 않아, 5,000 mg/kg을 최고용량으로 설정하고, 2,500 mg/kg과 대조군을 포함하여 6개의 군으로 실험을 진행하였다. 실험물질의 임상적용 예정경로가 경구이므로 투여경로는 경구투여법을 사용하였으며, 개체별 투여액은 10 ml/kg을 기준으로 하여 투여당일 절식 후 체중을 기준으로 산출하였다. 모든 실험동물은 투여 전 12시간 동안 절식시킨 후 경구투여용 금속제 sonde를 이용하여 위내로 강제 경구투여를 시행하였다. 대조군에는 SF, MF 및 MHMIX 투여군과 동일한 액량의 생리식염수를 투여하였다. SF, MF 및 MHMIX 투여 후 2시간 동안은 사료를 제한하였으며 음수는 제한 없이 계속 공급하였다.

일반증상 관찰 및 체중측정

7일간의 순화 적응기간 중에 매일 1회 일반 증상을 관찰하였고, SF, MF 및 MHMIX 투여 당일에는 투여 후 6시간까지 매 시간, 투여 후 1일부터 14일까지는 1일 1회 이상씩 피부, 털, 눈, 점막 등의 일반 상태의 변화, 중독 증상의 발현, 사망 동물의 유무 및 투여 후 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 관찰하였으며, 체중은 모든 동물에 대하여 투여 직전과 투여 후 1일부터 14일까지 2일 간격으로 측정하였다.

부검

실험동물을 희생하기 전날 밤 12시간 절식시키고, ether를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 혈액을 채취하였다. 혈액 채취 및 방혈 후에 나타나는 주요 내부 장기의 병변을 육안적으로 관찰하였고, 부검 시 육안적 이상 소견이 관찰되지 않아 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다. 간, 심장, 신장, 폐, 비장, 고환, 흉선 및 뇌를 적출하여 생리식염수로 3회 이상 세척한 후 수분을 제거하고 무게를 측정하였으며, 양측정 장기는 모두 측정하였다.

혈액학적 검사

혈액학적 검사는 전혈을 이용하여 백혈구(white blood cell, WBC), 적혈구(red blood cell, RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), 혈구 hemoglobin 부피(mean corpuscular volume, MCV), 혈구 hemoglobin 농도(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 혈구 hemoglobin 평균 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판 농도(platelet,

PLT) 등을 혈구분석기(Coulter counter, Coulter Co., Miami, FL, USA)를 이용하여 측정하였다.

혈액 생화학적 검사

혈액 생화학적 검사는 채혈된 혈액을 30분 이상 방치하여 응고시킨 다음 3,000 rpm, 10분간 원심분리하여 얻은 혈청을 이용하여, aspartate aminotransferase (AST; glutamic oxaloacetic transaminase, GOT), alanine aminotransferase (ALT; glutamic pyruvic transaminase, GPT), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CREA), lactate dehydrogenase (LDH) 등을 측정하기 위하여 자동혈액생화학분석기(Prestige 24i, Tokyo Boeki Medical System Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 SPSS ver. 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 평균(mean) ± 표준편차(SD)로 나타냈다. 각 실험군의 분석 항목별 통계의 유의성 검증은 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)을 한 후, Student t-test와 Duncan's multiple range test를 이용하여 p<0.05 수준에서 검증하였다.

결 과

치사율 및 LD₅₀값

ICR 마우스를 대상으로 SF, MF 및 MHMIX가 유발하는 독성 징후와 사망개체 수를 관찰한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 2,500 및 5,000 mg/kg 용량의 SF, MF 및 MHMIX를 단회 경구 투여한 실험군과 멸균생리식염수를 단회 경구 투여한 대조군을 14일 동안 관찰한 결과, 최고 용량 투여군을 포함한 모든 투여군에서 사망동물은 발생되지 않았다. 따라서 ICR 마우스에서 SF, MF 및 MHMIX에 의한 독성학적 영향을 받지 않는 최소치사량(minimal lethal dose)은 5,000 mg/kg을 초과하는 것으로 관찰되었다. 또한 SF, MF 및 MHMIX에 의한

LD₅₀의 경우에도 5,000 mg/kg 이상으로 추정된다.

음수율, 사료섭취량 및 임상증상

SF, MF 및 MHMIX 단회 경구 투여에 따른 음수율 및 사료섭취량의 변화를 멸균생리식염수를 단회 경구 투여한 대조군과 비교한 결과 실험물질 투여로 인한 음수율 및 사료섭취량의 변화에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(data not shown). 또한 멸균생리식염수, SF, MF 및 MHMIX 단회 경구 투여에 따른 털 빠짐 현상, 활동저하현상, 보행 장애, 행동이상, 웅크림, 설사, 부종, 호흡축박, 몸단장, 뛰어오름, 유루, 무기력증, 다뇨, 구토, 비루, 마비, 유연 등과 같은 시험물질 투여와 관련된 어떠한 임상증상의 이상 소견도 관찰되지 않았다(data not shown).

체중 변화

2,500 및 5,000 mg/kg 용량의 SF, MF 및 MHMIX를 단회 경구 투여한 실험군과 멸균생리식염수를 단회 경구 투여한 대조군의 체중 변화를 관찰한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 경구 투여 후 SF, MF 및 MHMIX 투여군과 대조군 모두 투여 전 체중에 비하여 시간 경과에 따른 정상적인 체중증가가 관찰되었으며, 투여 전과 투여 후 모두 대조군과 모든 실험물질 투여군(SF, MF 및 MHMIX) 사이에 유의적인 체중변화의 차이는 나타나지 않았으므로 SF, MF 및 MHMIX는 독성이 없는 것으로 판단되었다.

부검 소견 및 장기무게 변화

멸균생리식염수를 단회 경구 투여한 대조군과 SF, MF 및 MHMIX를 단회 경구 투여한 실험군을 대상으로 14일간의 관찰기간 종료 후 모든 ICR 마우스를 부검하여 주요 장기에 대한 육안적 소견을 관찰한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 부검 결과 대조군과 실험군 등의 모든 실험동물에서 본 실험물질의 투여에 의하여 이상이 유발될 것으로 의심되는 주요 내부 장기에 대한 어떠한 육안적 이상소견이나 이상병변도

Table 1. Mortality of ICR mice orally treated with SF, MF and MHMIX for 14 days

Group	Days after treatment															LD ₅₀ (mg/kg)	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
CON	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
SF ₁	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
SF ₂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>5,000
MF ₁	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	mg/kg
MF ₂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
MHMIX	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

CON; Control group, SF₁; SF 2,500 mg/kg (day) medication group, SF₂; SF 5,000 mg/kg (day) medication group, MF₁; MF 2,500 mg/kg (day) medication group, MF₂; SF 5,000 mg/kg (day) medication group, MHMIX; MHMIX 5,000 mg/kg (day) medication group.

*; Values are expressed as Number of dead animals/ Number of animals examined.

Table 2. Body weights change of ICR mice orally treated with SF, MF and MHMIX for 16 days

Group	No. of animals	Body weights (g)								
		0 day	2 day*	4 day	6 day	8 day	10 day	12 day	14 day	16 day
CON	5	27.11±0.70	27.95±0.89	29.81±1.38	30.78±1.74	30.95±1.81	32.29±2.26	32.92±2.26	33.47±2.48	33.03±2.50
SF ₁	5	27.15±0.98	27.52±1.53	29.53±2.84	30.61±2.59	30.80±2.86	32.06±2.29	32.56±2.36	33.29±2.30	33.49±1.64
SF ₂	5	27.35±1.30	28.98±1.48	27.96±2.05	29.27±1.39	29.55±1.51	31.47±1.19	31.99±1.86	32.38±1.55	32.90±1.49
MF ₁	5	26.64±0.39	28.26±1.78	28.96±0.32	30.10±0.51	29.93±0.66	31.56±1.22	31.15±1.51	32.98±0.82	33.71±1.38
MF ₂	5	26.81±1.76	28.60±1.36	29.22±1.28	30.21±1.13	30.61±1.45	31.90±1.38	32.62±1.34	33.05±1.60	32.35±1.06
MHMIX	5	27.06±0.51	28.01±0.24	28.78±0.88	29.92±1.07	30.11±1.06	31.89±1.23	32.75±0.89	33.23±1.05	33.66±0.98

CON; Control group, SF₁; SF 2,500 mg/kg (day) medication group, SF₂; SF 5,000 mg/kg (day) medication group, MF₁; MF 2,500 mg/kg (day) medication group, MF₂; SF 5,000 mg/kg (day) medication group, MHMIX; MHMIX 5,000 mg/kg (day) medication group.

The data are presented as mean ± SD.

*; Day of treatment after SF, MF and MHMIX.

Table 3. Organ weights of ICR mice orally treated with SF, MF and MHMIX

Group	No. of animals	Organ weights (g)							
		Thymus	Lung	Heart	Spleen	Liver	Kidney	Testis	Brain
CON	5	0.057±0.014	0.188±0.014	0.145±0.012	0.123±0.022	1.770±0.213	0.559±0.047	0.194±0.017	0.470±0.024
SF ₁	5	0.062±0.015	0.186±0.011	0.142±0.011	0.108±0.006	1.880±0.075	0.559±0.106	0.190±0.073	0.466±0.023
SF ₂	5	0.053±0.008	0.174±0.015	0.133±0.011	0.107±0.006	1.778±0.079	0.529±0.065	0.194±0.011	0.467±0.025
MF ₁	5	0.060±0.015	0.183±0.009	0.139±0.008	0.123±0.013	1.805±0.229	0.545±0.078	0.205±0.008	0.491±0.021
MF ₂	5	0.054±0.010	0.180±0.011	0.133±0.005	0.109±0.026	1.678±0.190	0.536±0.038	0.205±0.013	0.464±0.010
MHMIX	5	0.061±0.014	0.180±0.007	0.138±0.010	0.111±0.016	1.872±0.178	0.540±0.079	0.198±0.005	0.462±0.034

CON; Control group, SF₁; SF 2,500 mg/kg (day) medication group, SF₂; SF 5,000 mg/kg (day) medication group, MF₁; MF 2,500 mg/kg (day) medication group, MF₂; SF 5,000 mg/kg (day) medication group, MHMIX; MHMIX 5,000 mg/kg (day) medication group.

The data are presented as mean ± SD.

나타나지 않았다. 또한 실험동물의 장기무게 변화를 관찰한 결과 흉선, 폐, 심장, 비장, 간, 신장, 고환, 뇌 모두에서 정상 대조군과 비교하여 실험물질 투여 농도 증가에 따른 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

혈액학적 검사

평균생리식염수, SF, MF 및 MHMIX를 단회 경구 투여하고 14일 경과 후 혈액학적인 변화를 확인하기 위하여 혈구분석기를 이용하여 WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC 및 PLT를 측정 한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다. 대조군과 실험군에서 채혈된 전혈을 이용하여 혈액학적 검사를 실시

Table 4. Levels of hematological analysis in ICR mice orally treated with SF, MF and MHMIX

Group	No. of animals	WBC (10 ³ /μL)	RBC (10 ⁶ /μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT (10 ³ /μL)
CON	5	2.31±0.74	8.69±1.01	15.18±1.72	58.75±6.54	67.70±2.83	17.45±0.62	25.78±0.83	1442.50±385.37
SF ₁	5	2.05±0.62	8.80±0.60	15.33±0.84	57.77±4.57	65.57±0.95	17.40±0.44	26.53±0.65	1471.67±144.23
SF ₂	5	2.01±0.30	8.44±0.28	14.50±0.36	55.83±2.02	66.20±2.09	17.23±0.61	26.03±0.40	1267.00±219.34
MF ₁	5	2.45±0.12	8.72±0.25	14.85±0.21	58.00±1.27	66.60±0.42	17.10±0.28	25.65±0.21	1461.50±154.86
MF ₂	5	2.37±0.18	8.90±0.49	15.33±0.32	58.37±1.91	65.73±3.71	17.27±0.60	26.30±0.98	1362.33±97.21
MHMIX	5	2.28±0.86	8.74±0.33	15.37±0.61	57.70±2.86	66.00±0.82	17.53±0.15	26.60±0.44	1340.00±213.16

CON; Control group, SF₁; SF 2,500 mg/kg (day) medication group, SF₂; SF 5,000 mg/kg (day) medication group, MF₁; MF 2,500 mg/kg (day) medication group, MF₂; SF 5,000 mg/kg (day) medication group, MHMIX; MHMIX 5,000 mg/kg (day) medication group.

The data are presented as mean ± SD.

Table 5. Levels of serum biochemistry analysis in ICR mice orally treated with SF, MF and MHMIX

Group	No. of animals	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	CREA (mg/dL)	LDH (U/L)
CON	5	33.00±3.39	111.20±21.32	28.30±4.82	0.25±0.04	892.00±39.70
SF ₁	5	34.00±4.75	121.50±13.84	25.30±2.83	0.28±0.00	954.00±30.24
SF ₂	5	26.50±3.54	136.50±9.19	21.30±0.85	0.25±0.04	878.00±25.20
MF ₁	5	32.50±4.95	122.00±11.31	24.05±1.34	0.27±0.04	995.00±25.66
MF ₂	5	24.00±2.83	111.00±12.73	21.15±0.64	0.27±0.01	917.50±35.06
MHMIX	5	34.00±2.56	130.00±10.50	35.40±0.00	0.30±0.00	920.00±15.22

CON; Control group, SF₁; SF 2,500 mg/kg (day) medication group, SF₂; SF 5,000 mg/kg (day) medication group, MF₁; MF 2,500 mg/kg (day) medication group, MF₂; SF 5,000 mg/kg (day) medication group, MHMIX; MHMIX 5,000 mg/kg (day) medication group.

The data are presented as mean ± SD.

한 결과 PLT의 경우 대조군과 비교하여 SF, MF 및 MHMIX 처리에 의한 약간의 감소현상이 나타났지만 유의성이 없는 것으로 확인되었으며, 그 외의 모든 항목에서도 대조군과 실험군 사이의 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다.

혈액생화학적 검사

평균생리식염수를 단회 경구 투여한 대조군과 SF, MF 및 MHMIX를 단회 경구 투여한 실험군을 대상으로 14일 경과 후 혈액생화학적 변화를 확인하기 위하여 자동혈액생화학분석기를 이용하여 ALT, AST, BUN, CREA, LDH를 측정된 결과는 Table 5에 나타난 바와 같다. 혈청을 이용하여 혈액생화학적 검사를 실시한 결과 SF, MF 및 MHMIX 단회 경구 투여에 의하여 검사 항목에 따른 약간의 변화가 나타나는 것으로 확인되었지만 전체적으로 모든 지표 수치에서 대조군과 실험군 사이의 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

고 찰

최근 다양한 종류의 의약품이 사용되고 있지만 독성에 의한 부작용 등과 같은 문제점이 나타나고 있으므로 한약과 생약을 이용한 기능성 식품과 천연물 의약품에 대한 관심이 전세계적으로 증가하고 있을 뿐만 아니라 많은 한약 및 생약들의 효능이 검증되면서 다양한 형태의 천연물 유래 의약품에 대한 수요가 증가하고 있다[3, 6]. 그러나 일반적으로 여러 종류의 생약을 복합 처방하는 한약의 경우 정확한 성분 및 규격이 설정되어 있지 않을 뿐만 아니라 안전성과 독성에 대한 자료가 부족한 경우가 많으므로 이에 대한 정확한 정보가 요구되고 있다[10, 21, 22]. 따라서 본 연구에서는 SF, MF 및 MHMIX의 안전성에 대한 객관적 근거를 확보하기 위하여 급성독성을 실험적으로 평가하기 위하여 ICR 마우스에 실험물질을 투여한 후 임상 증상 및 부검 소견, 치사율과 체중변화 등의 관찰과 함께 혈액학적 검사를 실시하였다. 먼저 실험에 사용한 SF, MF 및 MHMIX의 안전성 유무를 확인하기 위하여 급성독성

시험을 실시한 결과, 평균생리식염수를 처리한 대조군 및 5,000 mg/kg의 SF, MF 및 MHMIX를 처리한 실험군의 모든 ICR 마우스가 사망하지 않았을 뿐만 아니라 SF, MF 및 MHMIX를 처리한 실험군의 경우 실험기간 중 대조군과 비교하여 유의적인 체중변화는 관찰되지 않았다. 따라서 경구투여에 의한 LD₅₀ 값이 5,000 mg/kg 이상일 경우 무해한 물질로 분류하는 미국 환경보호청의 기준으로 볼 때 SF, MF 및 MHMIX는 급성 독성의 측면에서 매우 안전한 물질인 것으로 판단된다.

다음은 SF, MF 및 MHMIX가 주요 내부 장기에 미치는 영향을 확인하기 위하여 부검을 통한 육안적 소견과 장기무게 변화를 확인한 결과 내부 장기에 대한 어떠한 육안적 이상소견이나 이상병변이 나타나지 않았을 뿐만 아니라 주요 장기인 흉선, 폐, 심장, 비장, 간, 신장, 고환, 뇌의 무게에도 SF, MF 및 MHMIX 처리에 따른 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 일반적으로 단회투여 독성시험의 경우 육안적 이상소견이 관찰된 장기 및 조직에 대하여 병리조직학적 검사가 포함되어야 하지만 모든 실험동물에서 이상소견이 관찰되지 않았기에 조직검사는 시행하지 않았다. 또한 혈액학적 및 혈액생화학적 검사를 위하여 실험 종료 시 채취한 전혈 및 혈청을 이용하여 분석한 결과 검사 항목에 따른 약간의 변화가 나타났지만 전체적으로 모든 지표 수치에서 SF, MF 및 MHMIX 처리에 따른 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 SF, MF 및 MHMIX가 실험동물에 대하여 급성 독성이 없다는 것을 알 수 있었으므로 경구 투여에 있어 비교적 안전한 물질이라는 것을 판단할 수 있었다. 아울러 추가 다양한 생리적 효능 규명을 통하여 급성 독성이 없는 천연물 소재로서의 활용이 가능하리라 기대된다. 그러나 단회 경구 투여 급성독성시험만으로 천연물 생약에 대한 독성 유무를 판단하기에는 일정부분 제약이 있으므로 추가적으로 2주 또는 4주에 걸친 반복 경구투여 독성시험 및 13주 반복 경구투여 독성시험 그리고 유전독성에 대한 연구들이 순차적으로 수행되어야 할 것으로 판단된다. 아울러 인체 대한 안전성 평가에 대한 추가 연구가 필수적으로 선행되어야 할

것이며, 이를 통하여 SF, MF 및 MHMIX에 대한 체계적인 독성정보를 구축함으로써 보다 정확하고 과학적 근거에 입각한 안전성 자료가 확보될 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품 기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(No. 314043-3).

References

- Cai, S., Sun, W., Fan, Y., Guo, X., Xu, G., Xu, T., Hou, Y., Zhao, B., Feng, X. and Liu, T. 2016. Effect of mulberry leaf (Folium Mori) on insulin resistance via IRS-1/PI3K/Glut-4 signalling pathway in type 2 diabetes mellitus rats. *Pharm. Biol.* **9**, 1-7.
- Chen, F., Nakashima, N., Kimura, I. and Kimura, M. 1995. Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (folium mori) and cortex mori radices in streptozotocin-induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi* **115**, 476-482.
- Ehling, D. 2001. Oriental medicine: an introduction. *Altern. Ther. Health Med.* **7**, 71-82.
- El-Beshbishy, H. A., Singab, A. N., Sinkkonen, J. and Pihlaja, K. 2006. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. *Life Sci.* **78**, 2724-2733.
- Huang, F., Xiong, Y., Xu, L., Ma, S. and Dou, C. 2007. Sedative and hypnotic activities of the ethanol fraction from Fructus Schisandrae in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* **110**, 471-475.
- Im, P. O. and Yolton, R. L. 2000. Concepts of traditional Oriental medicine. *Optometry* **71**, 621-629.
- Jang, I. S., Yang, C. S., Lee, S. D. and Han, C. H. 2007. A review of herbal medicinal products associated with toxic events in Korea. *J. Kor. Ori. Med.* **28**, 1-10.
- Jeong, J. W., Lee, H. H., Choi, E. O., Lee, K. W., Kim, K. Y., Kim, S. G., Hong, S. H., Kim, G. Y., Park, C., Kim, H. K., Choi, Y. W. and Choi, Y. H. 2015. Schisandrae Fructus inhibits IL-1 β -induced matrix metalloproteinases and inflammatory mediators production in SW1353 human chondrocytes by suppressing NF- κ B and MAPK activation. *Drug Dev. Res.* **76**, 474-483.
- Jo, S. P., Kim, J. K. and Lim, Y. H. 2014. Antihyperlipidemic effects of stilbenoids isolated from *Morus alba* in rats fed a high-cholesterol diet. *Food Chem. Toxicol.* **65**, 213-218.
- Julliard, K. N., Citkovitz, C. and McDaniel, D. 2007. Towards a model for planning clinical research in Oriental medicine. *Explore (NY)* **3**, 118-128.
- Kang, J. S., Han, M. H., Kim, G. Y., Kim, C. M., Chung, H. Y., Hwang, H. J., Kim, B. W. and Choi, Y. H. 2015. Schisandrae semen essential oil attenuates oxidative stress-induced cell damage in C2C12 murine skeletal muscle cells through Nrf2-mediated upregulation of HO1. *Int. J. Mol. Med.* **35**, 453-459.
- Kim, D. S., Kang, Y. M., Jin, W. Y., Sung, Y. Y., Choi, G. and Kim, H. K. 2014. Antioxidant activities and polyphenol content of *Morus alba* leaf extracts collected from varying regions. *Biomed. Rep.* **2**, 675-680.
- Kim, H. U., Ryu, J. Y., Lee, J. O. and Lee, S. Y. 2015. A systems approach to traditional oriental medicine. *Nat. Biotechnol.* **33**, 264-268.
- Kim, T. H., Jang, S., Lee, A. R., Lee, A. Y., Choi, G. and Kim, H. K. 2012. The analysis of residual pesticides and sulfur dioxide in commercial medicinal plants. *Kor. J. Herbology* **27**, 43-48.
- Kim, W. I., Youn, D. H., Kim, H. G. and Na, C. S. 2012. Effect of pear extracts containing herbal medicine (Lycii Fructus, Coicis Semen, Alimatis Rhizoma and Astragali Radix) on body weight, lipid metabolism and immune responses in rats fed high fat diets (II). *Kor. J. Herbology* **27**, 1-7.
- Kwon, D. Y., Kim, D. S., Yang, H. J. and Park, S. 2011. The lignan-rich fractions of Fructus Schisandrae improve insulin sensitivity via the PPAR- γ pathways in *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Ethnopharmacol.* **135**, 455-462.
- Lee, Y. J., Choi, D. H., Kim, E. J., Kim, H. Y., Kwon, T. O., Kang, D. G. and Lee, H. S. 2011. Hypotensive, hypolipidemic, and vascular protective effects of *Morus alba* L. in rats fed an atherogenic diet. *Am. J. Chin. Med.* **39**, 39-52.
- Lee, Y. J., Kim, H. Y., Yoon, J. J., Lee, S. M., Kho, J. H., Lee, H. S., Choi, K. M. and Kang, D. G. 2012. Combination with Korean red ginseng and *Gastrodia rhizoma* enhances vascular protective effects in hyperlipidemic rats. *Kor. J. Orient Med. Prescription* **20**, 1-11.
- Oh, T. W., Bae, H. S., Yoon, C. H. and Park, Y. K. 2010. Thirteen-week repeated-dose oral toxicity study of the modified Wenpitang-Hab-Wulingsan (WHW®) in sprague-dawley rats. *Kor. J. Herbology* **25**, 43-51.
- Pan, S. Y., Yu, Q., Zhang, Y., Wang, X. Y., Sun, N., Yu, Z. L. and Ko, K. M. 2012. Dietary Fructus Schisandrae extracts and fenofibrate regulate the serum/hepatic lipid-profile in normal and hypercholesterolemic mice, with attention to hepatotoxicity. *Lipids Health Dis.* **11**, 120.
- Park, H. M., Shin, H. T. and Lee, S. D. 2008. Herbal toxicological effects on rats' fetus-focusing on ojeoksan-. *Kor. J. Oriental Preventive Medical Soc.* **12**, 27-35.
- Park, J. H., Lee, M. J., Song, M. Y., Bose, S., Shin, B. C. and Kim, H. J. 2012. Efficacy and safety of mixed oriental herbal medicines for treating human obesity: a systematic review of randomized clinical trials. *J. Med. Food* **15**, 589-597.
- Zhou, K., Brogan, M. S., Yang, C., Tutuska, J. and Edsberg, L. 2013. Oriental medicine and chronic wound care: theory, practice, and research. *Ostomy Wound Manage.* **59**, 36-46.

초록 : ICR 마우스를 이용한 오미자, 상엽 에탄올 단독추출물 및 복합추출물의 단회경구투여 독성시험

최은옥^{1,2} · 권다혜² · 김민영¹ · 황보현² · 김홍재² · 안규임¹ · 정진우^{1,2} · 이기원³ · 김기영³ · 김성구³ · 최영환⁴ · 홍수현¹ · 박철⁵ · 최영현^{1,2*}

(¹동의대학교 한의과대학 생화학교실, ²동의대학교 향노화연구소, ³(주)바이오포터 코리아, ⁴부산대학교 원예생명과학과, ⁵동의대학교 분자생물학과)

오미자(*Schisandrae Fructus*)와 상엽(*Mori folium*)은 한국, 중국, 일본을 포함한 아시아 지역에서 오랫동안 식품 자원 및 전통 의약제로 광범위하게 사용되어 왔다. 최근 연구에 따르면 오미자와 상엽은 항균, 항염증, 항산화, 면역기능 조절 및 혈관신생억제 등과 같은 많은 효능을 가지는 것으로 알려져 있다. 그러나 오미자(SF), 상엽(MF) 에탄올 단독추출물 및 복합추출물(medicinal herber mixture, MHMIX)에 대한 독성 및 안전성에 대해서는 거의 알려져 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 SF, MF 및 MHMIX가 유발하는 급성독성 및 안전성을 확인하였다. 이를 위하여 ICR mice를 대상으로 SF, MF 및 MHMIX 5,000 mg/kg을 최고농도로 설정하여 단회 경구 투여 하였으며, 투여 후 14일 동안의 치사율, 체중 변화, 임상증상, 음수율 및 사료섭취량과 함께 부검 소견, 장기무게 변화, 혈액학 및 혈액생화학적 검사를 실시하였다. 결과에서 나타난 바와 같이 SF, MF 및 MHMIX의 투여 후 치사율, 임상증상, 체중 및 부검 소견 상의 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 또한 SF, MF 및 MHMIX 투여에 따른 각 장기의 무게, 혈액학적 및 혈청학적 임상 화학적 지표에도 유의적인 변화는 관찰할 수 없었다. 따라서 SF, MF 및 MHMIX는 단회 경구 투여에 따른 치사율이 5,000 mg/kg 이상일 것으로 추정되어 ICR 마우스에 대하여 급성 독성이 없는 비교적 안전한 물질이라는 것을 알 수 있었으며, 향후 천연물 소재로서의 효능 규명을 통한 활용이 기대된다.