



Assessment of the 4-week repeated dose oral toxicity test of *Smilax sieboldii* extract in ICR mice

Jung A Lee · Min-Hee Hwang · Young-Rak Cho · Eun-Kyung Ahn

ICR 마우스에서 청가시덩굴 추출물의 4주간 반복 투여 독성시험

이정아 · 황민희 · 조영락 · 안은경

Received: 4 November 2022 / Accepted: 1 December 2022 / Published Online: 31 December 2022

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2022

Abstract *Smilax sieboldii* is one of the *Smilax* species. A number of *Smilax* plants have long been used in traditional medicine in the tropics and subtropics worldwide. Repeated dose oral toxicity test is an essential experiment for toxicity evaluation before efficacy evaluation. The purpose of this study is to evaluate toxicity and the no-observed adverse effect level (NOAEL) using oral administration of *Smilax sieboldii* extract (SSE) in male and female ICR mice for 4 weeks. SSE was orally administered daily for 4 weeks at a dose of 500, 1000, and 2000 mg/kg/day (MPK). There were no significant differences in mortalities, clinical signs, body weight changes, food intake, hematological analysis, serum clinical chemistry test and relative organ weights in all animals administrated with SSE. The results obtained in this study suggest that SSE did not show any toxic effect in ICR mice and the NOAEL of SSE was regarded as over 2000 MPK.

Keywords 4-week repeated dose oral toxicity · ICR mouse · No-observed adverse effect level · *Smilax sieboldii*

서론

천연물은 예로부터 우리나라를 비롯한 여러나라에서 질병을 예방하고 건강을 증진시키는데 널리 사용되어 왔다. 천연물은 일반적으로 뿌리, 줄기, 잎, 씨앗 및 꽃 등 일부를 사용하거나 전초인 식물 전체를 이용하여 추출한 추출물로 다양한 유기물질이 포함된 복합물로 구성되어 있다[1].

청가시덩굴은 우리나라에서 흔하게 자라는 낙엽 덩굴식물로 청가시나무라고도 불리운다. 청가시덩굴의 뿌리와 뿌리줄기는 점어수라고 하여 약재로 사용하였고 이는 통증을 없애는 효능이 있다고 알려져 있다[2,3]. 그러나 아직까지 청가시덩굴에 대한 독성학적 영향은 거의 알려져 있지 않으며, 활성 평가에 대한 연구결과들도 많이 부족한 실정이다. 최근에 천연물을 이용하여 비만 및 체중조절, 혈행개선 등에 대한 연구들이 많이 진행되고 있다[4,5,6,7]. 본 연구진은 사전연구를 통해 청가시덩굴 추출물이 지질개선에 우수한 효능을 나타내는 것을 확인하였으나 어떤 물질이든 효과가 우수하더라도 그 물질이 독성을 나타낸다면 향후 건강기능식품이나 신약으로 개발할 수 없다. 따라서 본 연구는 청가시덩굴의 전초를 이용하여 추출물을 제조한 후 향후 질환 동물모델에서의 활성검증을 진행하기 전, 동물 실험에서 발생 될 수 있는 독성을 미리 확인하여 안전한 투약 농도 및 실험 진행 여부 등을 결정하기 위하여 4주간 반복적으로 수컷과 암컷 ICR 마우스에 경구투여를 진행하였다. 이를 통해 청가시덩굴 추출물의 향후 비임상 유효성 평가 가능여부 및 그 추출물속 안전성을 4주 반복투여 독성시험으로 확인하였다.

재료 및 방법

청가시덩굴 에탄올 추출물 제조

청가시덩굴(*Smilax sieboldii*)은 2021년 경기도 연천군으로부터

Eun-Kyung Ahn (✉)
E-mail: aek@gsa.or.kr

¹Bio-center, Gyeonggido Business and Science Accelerator, Gwanggyo-ro 147, Yeongtong, Suwon, Gyeonggi 16229, Republic of Korea

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.

채집하였으며, 형태학적 평가를 동정하였다. 표본은 (재)경기도 경제과학진흥원 바이오센터 천연물연구팀에 보관중이다. 청가시딩굴 추출물의 제조는 건조 분말에 10배 중량의 70% 에탄올(95% 발효주정, Samchun chemical)을 첨가하여 상온에서 24시간 침출한 뒤 여과하였다. 여과된 70% 에탄올 청가시딩굴 추출물은 감압 농축(Rotavapor N-1000, Eyela, Tokyo, Japan)후 동결 건조(FD8508, Ilshin Lab CO. Ltd., Suwon, Korea)하여 고형상의 청가시딩굴 추출물(추출수율 4%) 얻었다.

시험물질의 조제 및 투여

시험물질 보관 냉장고에 보관된 시험물질은 순도에 대한 보정 없이 전자저울로 칭량하여 중량 그대로를 조제에 사용하였고 정량의 시험물질을 멸균주사용수(JW Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 사용하여 교반기로 현탁시켜 500, 1000, 및 2000 mg/kg (MPK)을 규정 농도로 설정하여 조제하여 투여하였다. 경구 투여 한계용량으로 가장 많이 사용되는 2000 MPK로 설정한 후, 청가시딩굴 추출물을 멸균주사용수에 균일하게 용해시켜 조제하였다. 청가시딩굴 추출물은 경구투여 방법으로 1회/일, 6일/주, 4주간 진행하였고, 조제 후 바로 투여되기 때문에 안정성 시험은 수행하지 않았다[8].

실험동물

실험동물은 5주령의 특정병원균 부재(Specific Pathogen Free, SPF) 수컷과 암컷 CrI: CD1(ICR mouse) 쥐로써 4주 반복 투여 독성시험을 위해 (주)오리엔트바이오 (Seongnam, Korea)에서 구입하였다. 실험실에서 1주일 순화기간 동안 실험동물의 일반 증상을 관찰하여 이상이 없는 실험동물을 선택하여 군당 4마리씩 배치하였다. 시험 동물 중 ICR계 마우스는 전 세계적으로 독성시험에 널리 사용되어 왔기 때문에 생리, 해부 및 독성학적 기초자료가 풍부하여 그 결과를 비교하기가 유리하여 본 시험에 사용하였다[9-11].

사육환경

실험기간 중 사육실 환경조건은 실내온도 22±3 °C, 상대습도 50±20%, 환기횟수 15-20회/h, 조명시간 12시간(오전 7시-오후 7시) 및 조도 150-300 Lux, 소음 60 dB 이하를 유지하였으며 모든 실험동물은 마우스용 polycarbonate 케이지(200 L×260 W×130 H mm)에 4마리씩 분리하여 사육하였다. 본 연구에서의 모든 동물실험은 국제실험동물관리평가인증협회(AAALAC-I) 완전 인증을 받은 (재)경기도경제과학진흥원 바이오센터에서 동물보호법(제정 1991년 5월 31일 법률 제 4379호, 일부 개정 2017년 3월 21일 법률 제 4651호)을 근거로 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인(승인번호: 2021-10-0005)하에 표준작업지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행하였다.

사료 및 물의 급여방법

사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% protein Rodent Diet, Harlan Laboratories, Inc., USA)는 자율 급여 방식으로

급이기에 넣고 제공하였다. 음수는 500 mL 폴리카보네이트 물병에 수도물을 넣고 자율급수 하였다.

일반증상관찰, 체중 및 사료섭취량 측정

모든 실험동물은 매일 1회 이상 일반 상태의 변화, 독성증상 및 사망 동물의 유무를 전 실험 기간 동안 관찰하였다. 체중 측정은 투여 개시일부터 주 2회씩 4주간 측정하였으며, 4주 마지막 체중 측정은 부검 전일에 측정하였다. 사료섭취량은 투여 개시 전, 투여 개시 후 주 2회 측정하였으며 공급과 동일한 시간대에 잔량을 측정하여 섭취량을 산출하였다[12].

혈액학적 검사

시험 종료 후 생존한 모든 동물을 대상으로 부검 전일 음수는 자유섭취시키면서 절식을 진행하였다. 실험동물은 아이소플로란을 이용하여 호흡 마취 후, 개복하여 복대 동맥에서 혈액을 채혈하여 항 응고제인 EDTA가 들어있는 채혈튜브(BD Caribe, Ltd., Franklin Lakes, NJ, USA)에 넣어 혈구분석기(MEK6550, NIHON KOHDEN, Tokyo, Japan)를 이용하여 white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC), hematocrit (HCT), mean corpuscular hemoglobin (MCV), platelet (PLT), red cell distribution width (RDW), platelet distribution width (PDW), mean platelet volume (MPV)를 측정하였다[13].

혈액생화학학적 검사

복대정맥으로 채혈한 실험동물의 혈액을 3000 rpm, 15분간 원심분리기(Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 혈장을 얻었다. 원심 분리하여 얻은 혈장을 자동생화학분석기(7020, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 glucose (GLU), creatinine (CREA), total protein (TP), albumin (ALB), alkaline phosphatase (ALP), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), total bilirubin (T-BIL), cholesterol (CHO), triglyceride (TG), high density lipoprotein (HDL), blood urea nitrogen (BUN), low density lipoprotein (LDL), inorganic phosphorous (IP), direct bilirubin (D-BIL), urinalysis (UA) 를 측정하였다[14].

부검 및 장기무게 측정

시험 종료 후 모든 생존동물은 아이소플로란으로 호흡 마취 후 복대정맥에서 혈액을 채취한 후, 복대정맥을 절단하여 방혈치사하고 육안으로 내부의 장기이상 유무를 관찰하였다. 관찰 후 심장, 폐, 간, 비장, 신장, 고환 및 난소를 적출하여 무게를 측정 후 부검 전 절식된 체중과 비교하여 상대적 장기중량을 산출하였다[15].

통계 처리

본 시험에서 확인된 결과는 one-way analysis of variance (ANOVA) 분석을 통하여 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 유의성이 인정될 경우 Student's t-test를 실시하여 대조군과 시험군 간의 통계학적 유의성을 검정하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Table 1 Necropsy findings of male and female ICR mice treated with SSE for 4 weeks

Sex: Male						
Test article	Group (mg/kg)	No. of animals	Organs	Findings	No. of animals affected	
-	0	4	All	No remarkable findings	0	
SSE	500	4	All	No remarkable findings	0	
SSE	1000	4	All	No remarkable findings	0	
SSE	2000	4	All	No remarkable findings	0	
Sex: Female						
Test article	Group (mg/kg)	No. of animals	Organs	Findings	No. of animals affected	
-	0	4	All	No remarkable findings	0	
SSE	500	4	All	No remarkable findings	0	
SSE	1000	4	All	No remarkable findings	0	
SSE	2000	4	All	No remarkable findings	0	

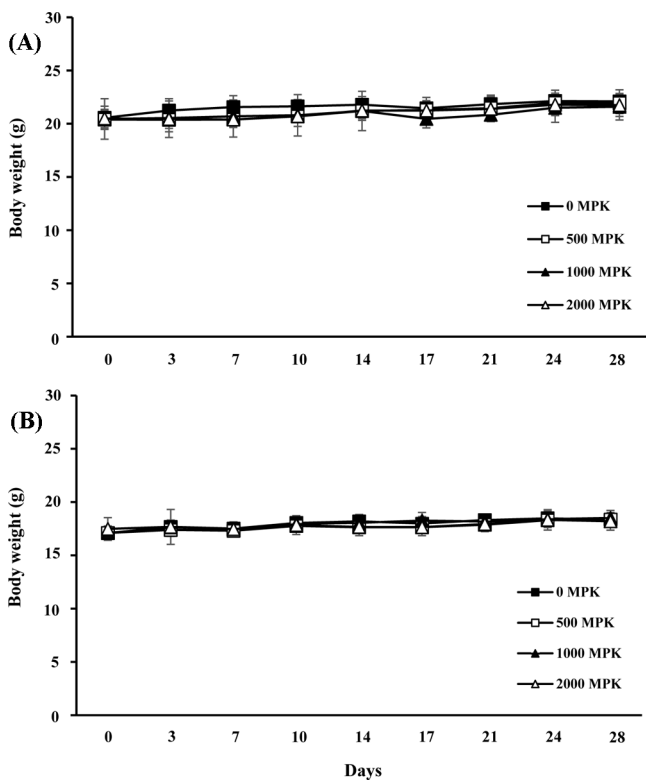


Fig. 1 Change in body weight of male and female ICR mouse during oral administration treated with *Smilax sieboldii* extract for 4 weeks. (A) Male and (B) female mouse divided into 4 groups and administrated daily with SSE (0, 500, 1000 and 2000 MPK) for 4 weeks. ■, 0; □, SSE 500 MPK; ▲, SSE 1000 MPK; ○, SSE 2000 MPK

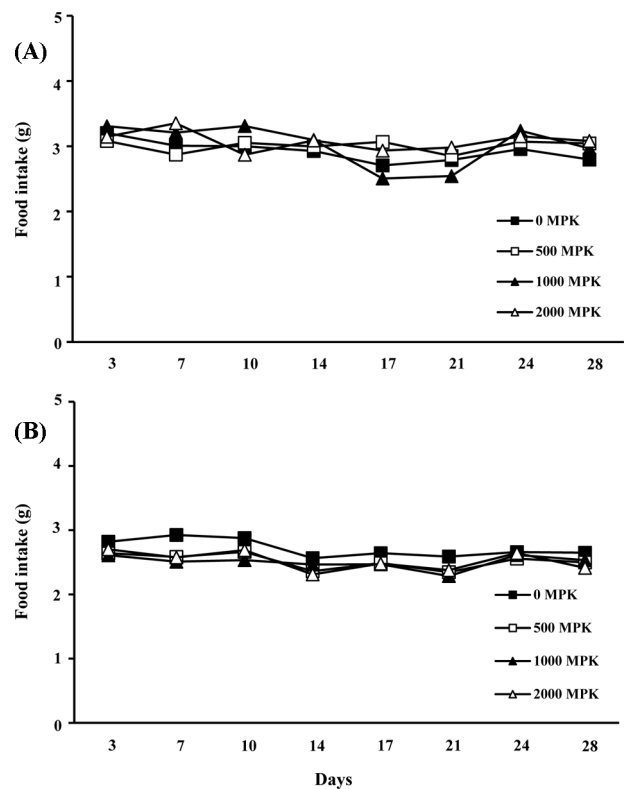


Fig. 2 Food intake of male and female ICR mouse treated with SSE extract for 4 weeks. A) Male and (B) female mouse divided into 4 groups and administrated daily with SSE (0, 500, 1000 and 2000 MPK) for 4 weeks. ■, 0; □, SSE 500 MPK; ▲, SSE 1000 MPK; ○, SSE 2000 MPK

결 과

일반증상 및 사망률

모든 실험동물은 전 시험기간인 4주동안 매일 한번씩 일반증상 및 사망률을 확인하였다. 그 결과 대조군과 청가시덩굴 추출물을 투여한 모든 시험군에서 유의할 만한 이상증상은 관찰되지 않았으며 사망한 동물도 없었다. 따라서 본 시험에서 실험동물

의 개략치사량은 2000 MPK 이상으로 사료된다(Table 1).

체중변화 및 사료섭취량

청가시덩굴 추출물 투여기간인 4주 동안 체중 변화를 측정 한 결과 대조군과 모든 실험군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고(Fig. 1). 청가시덩굴 추출물의 투여는 체중변화에 유의성 있는 변화를 주지 않았다. 또한 시험기간 동안 모든 시험군의 사

Table 2 Hematology routine test of male and female ICR mice treated with SSE for 4 weeks

Sex: Male					
Test article	Group (mg/kg)	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	HCT (g/dL)	MCV (fL)
-	0	2.43±0.65	8.98±0.72	46.03±4.02	51.25±0.67
SSE	500	1.70±0.23	8.90±0.33	45.73±1.85	51.35±0.24
SSE	1000	1.6±0.49	7.85±0.94	39.95±4.55	50.93±0.54
SSE	2000	2.05±0.30	8.69±0.45	44.28±2.43	50.93±0.34
Test article	Group (mg/kg)	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	RDW (%)	PDW (%)	MPV (%)
-	0	600.25±29.98	13.05±0.34	16.70±0.95	6.08±0.38
SSE	500	539.00±34.74	13.05±0.13	16.38±0.05	5.85±0.10
SSE	1000	433.00±183.65	13.00±0.44	16.28±0.55	6.00±0.28
SSE	2000	534.25±56.04	12.90±0.29	16.58±0.61	5.90±0.12
Sex: Female					
Test article	Group (mg/kg)	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	HCT (g/dL)	MCV (fL)
-	0	1.43±0.81	8.80±0.66	45.68±3.51	51.90±0.22
SSE	500	1.28±0.17	8.33±1.62	42.23±8.32	50.68±0.22
SSE	1000	1.58±0.33	9.70±0.74	49.10±3.67	50.65±0.38
SSE	2000	0.83±0.15	9.92±0.65	49.98±2.94	50.48±0.48
Test article	Group (mg/kg)	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	RDW (%)	PDW (%)	MPV (%)
-	0	502.50±45.89	12.95±0.06	16.13±0.49	5.90±0.12
SSE	500	432.25±169.70	12.78±0.30	16.65±0.68	6.28±0.22
SSE	1000	546.00±46.54	12.83±0.33	16.78±0.49	6.18±0.35
SSE	2000	620.75±75.15	12.73±0.05	16.48±0.51	6.10±0.12

Values are presented as the means ± standard deviations. WBC; white blood cell count, RBC; red blood cell count, HCT; hematocrit, MCV; mean corpuscular hemoglobin, PLT; platelet, RDW; red cell distribution width, PDW; platelet distribution width, MPV; mean platelet volume

료섭취량은 정상군과 유사한 사료섭취량이 관찰되었고 청가시딩굴 추출물 투여는 사료섭취량의 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 2).

혈액학적 검사

4주 동안 청가시딩굴 추출물을 반복 투여한 후 복대정맥에서 혈액을 채혈하여 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 헤마토크리트(HCT), 평균적혈구용적(MCV), 혈소판수(PLT), 적혈구크기분포(RDW), 혈소판분포폭(PDW), 평균혈소판용적(MPV)을 분석하였다(Table 2). 혈액학적 수치를 측정된 결과, 대조군과 청가시딩굴 추출물 투여군 모두에서 정상수치를 나타내었다[12].

혈액생화학학적검사

복대정맥에서 채혈한 혈액을 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈액생화학 분석기를 이용하여 혈액 생화학 지표인 당(GLU), 크레아티닌(CREA), 총단백질(TP), 알부민(ALB), 알칼리성 아미노산 전이효소(ALP), 글루탐산-옥살로아세트산아미노기전달효소(GOT), 글루탐산-피루브산아미노기전달효소(GPT), 총빌리루빈(T-BIL), 총콜레스테롤(CHO), triglyceride (TG), 고밀도지질단백(HDL), 혈액요소질소(BUN), 저밀도지질단백(LDL), inorganic phosphorous (IP), 빌리루빈(D-BIL), 혈액요소질소(UA) 분석하였다(Table 3). 측정된 결과 대조군과 비교하여 수컷 GLU 수치가 청가시딩굴 추출물 500, 1000, 및 2000 MPK에서 통계적으로 유의하게 증가하였고 간기능 지표인 T-BIL에서 500 MPK를

제외하고 통계적으로 유의하게 감소하였다. 또한 암컷 GLU 수치가 청가시딩굴 추출물 2000 MPK에서 통계적으로 유의하게 감소하였고 TG 수치는 1000 MPK에서만 유의하게 감소하였다. 하지만 이는 정상 범위 내에서의 증가와 감소로 청가시딩굴 추출물의 투여에 의한 변화는 아닌 것으로 판단된다.

부검 및 장기무게 측정

4주 반복 투여 시험기간 동안 사망한 동물은 없었으며 부검을 실시한 결과 특이적 독성 소견이 관찰되지 않았다. 청가시딩굴 추출물을 투여한 모든 실험동물의 장기인 심장(Herat), 폐(Lung), 간(Liver), 비장(Spleen), 신장(Kidney), 고환(Testis) 또는 난소(Ovary) 등에서 특이점이나 유의적인 변화는 나타나지 않았다(Table 4).

고찰

청가시딩굴 추출물에 관한 생리활성은 아직 보고된 것이 거의 없으며 독성 및 안전성에 관한 연구 결과도 보고된 바가 없다. 우리는 선행연구에서 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 청가시딩굴 추출물의 세포독성을 확인하였고 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 세포독성이 나타나지 않았다. 또한 지방세포 분화 억제 활성을 세포 수준에서 확인하였고(data not shown), 다음으로 동물 수준에서의 평가를 위해 청가시딩굴 추출물의 독성평가를 계획하였다.

Table 3 Serum clinical analysis of male and female ICR mice treated with SSE for 4 weeks

Sex: Male					
Test article	Group (mg/kg)	GLU (mg/dL)	CREA (ng/dL)	TP (mg/dL)	ALB (mg/dL)
-	0	173.97±38.95	0.38±0.04	3.68±0.09	1.50±0.05
SSE	500	270.42±21.37**	0.37±0.06	3.52±0.08	1.46±0.02
SSE	1000	251.81±25.55*	0.38±0.06	3.64±0.08	1.48±0.04
SSE	2000	269.29±42.61*	0.33±0.04	3.61±0.10	1.48±0.03
Test article	Group (mg/kg)	ALP (U/L)	GOT (U/L)	GPT (U/L)	T-BIL (mg/dL)
-	0	380.83±27.07	59.65±7.58	26.88±1.99	0.04±0.01
SSE	500	393.31±20.53	55.79±10.20	28.00±2.73	0.04±0.01
SSE	1000	396.79±48.82	52.29±2.85	29.39±1.46	0.01±0.01**
SSE	2000	402.47±47.32	62.92±6.01	39.33±5.95	0.02±0.01*
Test article	Group (mg/kg)	CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL (mg/dL)	BUN (mg/dL)
-	0	117.08±2.93	26.18±5.76	90.35±1.41	16.38±2.21
SSE	500	120.67±7.39	30.34±6.31	90.22±4.97	20.12±1.56
SSE	1000	128.68±9.24	24.24±3.59	95.98±4.18	16.35±1.73
SSE	2000	124.31±2.45	28.84±4.74	91.60±2.69	17.33±3.29
Test article	Group (mg/kg)	LDL (mg/dL)	IP (mg/dL)	D-BIL (mg/dL)	UA (mg/dL)
-	0	2.61±0.16	12.49±0.87	0.05±0.01	3.37±0.80
SSE	500	2.52±0.17	13.52±0.34	0.04±0.01	3.27±0.43
SSE	1000	2.79±0.41	14.23±0.63	0.04±0.01*	3.00±0.75
SSE	2000	2.75±0.32	14.16±0.86*	0.04±0.01	3.33±0.39
Sex: Female					
Test article	Group (mg/kg)	GLU (mg/dL)	CREA (ng/dL)	TP (mg/dL)	ALB (mg/dL)
-	0	205.64±30.35	0.34±0.04	3.47±0.08	1.47±0.05
SSE	500	143.68±57.53	0.30±0.05	3.49±0.17	1.48±0.07
SSE	1000	135.47±54.35	0.38±0.09	4.09±0.24	1.71±0.10
SSE	2000	82.83±21.31**	0.32±0.04	4.09±0.27	1.71±0.10
Test article	Group (mg/kg)	ALP (U/L)	GOT (U/L)	GPT (U/L)	T-BIL (mg/dL)
-	0	407.87±15.62	61.06±4.99	29.78±3.22	0.01±0.03
SSE	500	394.39±25.23	63.71±6.87	26.01±4.44	0.00±0.01
SSE	1000	451.17±27.92*	88.23±34.46	40.18±18.46	0.01±0.01
SSE	2000	432.19±58.93	96.06±49.21	49.63±28.58	0.01±0.01
Test article	Group (mg/kg)	CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL (mg/dL)	BUN (mg/dL)
-	0	88.31±4.79	30.00±2.66	61.29±4.36	20.36±3.33
SSE	500	85.88±7.68	22.65±2.30	57.65±4.03	19.35±3.66
SSE	1000	101.56±10.88	17.03±6.28**	70.02±6.89	23.40±7.39
SSE	2000	100.73±11.69	22.84±10.73	68.71±7.64	20.96±5.82
Test article	Group (mg/kg)	LDL (mg/dL)	IP (mg/dL)	D-BIL (mg/dL)	UA (mg/dL)
-	0	3.25±0.41	15.45±0.62	0.03±0.00	2.02±0.74
SSE	500	3.41±0.35	15.42±0.53	0.04±0.01	1.77±0.37
SSE	1000	4.12±0.71	16.35±2.69	0.03±0.01	3.76±2.08
SSE	2000	4.40±1.23	14.47±1.10	0.03±0.01	6.96±1.01

Values are presented as the means ± standard deviations. GLU; glucose, CREA; creatinine, TP; total protein, ALB; albumin, ALP; alkaline phosphatase, GOT; glutamate oxaloacetate transaminase, GPT; glutamate pyruvate transaminase, T-BIL; total bilirubin, CHO; cholesterol, TG; triglyceride, HDL; high density lipoprotein, BUN; blood urea nitrogen, LDL; low density lipoprotein, IP; inorganic phosphorous, D-BIL; direct bilirubin, UA; urinalysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Significantly different from the naive by Student's t-test

Table 4 Relative organ weights (%) of male and female ICR mice treated with SSE for 4 weeks

Sex: Male

Test article	Group (mg/kg)	Heart (%)	Lung (%)	Liver (%)	Spleen (%)	Kidney (%)	Testis (%)
-	0	0.45±0.02	0.58±0.04	4.16±0.22	0.38±0.03	1.48±0.28	0.82±0.06
SSE	500	0.49±0.04	0.60±0.06	4.35±0.16	0.42±0.02	1.48±0.08	0.85±0.10
SSE	1000	0.48±0.02	0.59±0.05	4.65±0.12	0.35±0.05	1.50±0.04	0.84±0.08
SSE	2000	0.45±0.02	0.58±0.02	4.71±0.17	0.39±0.03	1.45±0.06	0.88±0.03

Sex: Female

Test article	Group (mg/kg)	Heart (%)	Lung (%)	Liver (%)	Spleen (%)	Kidney (%)	Ovary (%)
-	0	0.51±0.04	0.69±0.05	4.01±0.13	0.45±0.04	1.24±0.07	0.02±0.00
SSE	500	0.60±0.03	0.72±0.09	3.93±0.07	0.47±0.02	1.26±0.05	0.02±0.00
SSE	1000	0.57±0.06	0.71±0.06	4.17±0.14	0.44±0.06	1.29±0.11	0.03±0.00
SSE	2000	0.55±0.04	0.63±0.03	3.86±0.28	0.40±0.03	1.23±0.07	0.02±0.00

Values are presented as the means ± standard deviations

본 연구는 4주간 수컷과 암컷 ICR 마우스를 이용하여 청가시덩굴 추출물의 반복적인 경구투여를 진행하여 독성여부를 평가하였다[9-12]. 독성시험은 대조군을 포함하여 500, 1000 및 2000 MPK 투여군으로 설정하였으며 청가시덩굴 추출물의 4주 반복 경구투여 후, 일반증상, 무게변화, 혈액학적 및 혈액생화학학적 검사를 하였다. 혈액생화학학적 검사 중 일부 평가 항목에서(GLU, T-BIL, TG, ALP) 대조군과 비교하여 유의적으로 증가와 감소하는 경향을 보였으나 수컷의 GLU의 증가는 용량의존성이 없었고 암컷은 2000 MPK에서만 감소하였다. 간기능과 관련된 T-BIL은 용량의존적으로 감소하지 않았으므로 간독성과 같은 독성학적 의미는 없는 것으로 판단된다. 또한 암컷의 TG 수치도 1000 MPK에서만 감소하였으므로 청가시덩굴 투여에 의한 독성과의 명확한 연관성을 없는 것으로 판단된다. 또한 ALP는 암컷의 1000 MPK에서만 유의성이 나타났고 용량의존성이 없었다. 이러한 혈액생화학학적 증가와 감소의 변화는 청가시덩굴 추출물의 투여로 인한 영향이 아닌 경미한 변동으로서 정상 범위 내에서의 변화로 간주 할 수 있다. 최대무독성용량(NOEL)은 부작용이 관찰되지 않는 최대량으로 통계학적으로나 생물학적으로 대조군과 비교하여 변화가 관찰되지 않는 최대량을 말한다. 본 실험에서 대조군을 포함한 모든 투여 군에서 특별한 이상증상은 나타나지 않았고, 2000 MPK 이상에서 최대무독성용량(NOEL)으로 판단된다.

따라서 본 연구 결과는 청가시덩굴의 과학적 안전성의 기초 자료로 사용될 수 있으며, 향후 추가적인 독성시험에 관한 연구가 진행 시 DRF 자료로도 활용될 수 있다. 또한 비임상 유효성 평가로 동물실험 수준에 적용될 수 있는 자료로 제공될 수 있으므로 향후 건강기능식품 및 천연물 신약 후보물질로 개발가능성을 보여줄 수 있을 것으로 사료된다.

초 록

청가시덩굴은 청미래덩굴속에 속하며 청미래덩굴속 식물들은 전세계적으로 열대 및 아열대 지역에 서식하며 전통 의학에서 오랫동안 사용되어 왔다. 본 연구의 목적은 수컷과 암컷 ICR 마

우스를 이용하여 청가시덩굴의 안전성을 확인하기 위해 청가시덩굴 추출물을 4주 동안 경구 투여하여 최대무독성용량을 평가하였다. 청가시덩굴 추출물 500, 1000 및 2000 MPK 용량으로 4주 동안 매일 경구 투여한 결과 투여한 모든군에서 사망률, 임상 증상, 체중 변화, 섭취량, 혈액학적 분석, 혈청 생화학 검사 및 상대 장기 중량에 유의한 차이가 없었다. 본 연구에서 청가시덩굴 추출물은 ICR 마우스에서 어떠한 독성 효과도 나타나지 않았으며 청가시덩굴 추출물의 최대무독성용량은 2000 MPK 이상으로 간주되었음을 시사한다.

Keywords 4주 반복 투여 독성 평가 · 최대무독성용량 · 청가시덩굴 · ICR 마우스

감사의 글 본 연구과제는 산림청(한국임업진흥원) 산림과학기술 연구개발사업(Project No. 2021371B10-2223-BD02)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

References

- Bent S (2008) Herbal medicine in the United States: review of efficacy, safety, and regulation. *J Gen Intern Med* 23(6): 854–859. doi: 10.1007/s11606-008-0632-y
- Lee CB (2003) Coloured Flora of Korea (2003) Korean Plant Encyclopedia, Hyangmunsa, Seoul
- Kim JS, Kim TY (2011) Korean tree. *dolbegae*, Suwon
- Blüher M (2013) Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27: 163–177. doi: 10.1016/j.beem.2013.02.005
- Okerson T, Patel J, DiMario S, Burton T, Seare J, Harrison DJ (2017) Effect of 2013 ACC/AHA Blood Cholesterol Guidelines on Statin Treatment Patterns and Low-Density lipoprotein Cholesterol in Atherosclerotic Cardiovascular Disease Patients. *J Am Heart Assoc* 6: e004909. doi: 10.1161/JAHA.116.004909
- Cho YR, Lee JA, Kim YY, Kang JS, Lee JH, Ahn EK (2018) Anti-obesity effects of *Clausena excavata* in high-fat diet-induced obese mice. *Biomed Pharmacother* 99: 253–260. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.069
- Park JH, Ahn EK, Hwang MH, Park YJ, Cho YR, Ko HJ, Jeong W, Yang SH, Seo DW, Oh JS (2021) Improvement of Obesity and Dyslipidemic Activity of *Amomum tsao-ko* in C57BL/6 Mice Fed a

- High-Carbohydrate Diet. *Molecules* 26(6): 1638. doi: 10.3390/molecules26061638
8. Yoo JG, Jung JY (2012) Studies on the repeated toxicity test of food red No.2 for 4 weeks oral administration in SD Rat. *J Fd Hyg Safety* 27: 42–49. doi: 10.13103/JFHS.2012.27.1.042
 9. Ji KT, Kim KM, Oh JJ, Kim JW, Lee WJ, Cho H, Lee HK, Lee JY, Chae S (2020) Assessment of the 4-week repeated-dose oral toxicity and genotoxicity of GHX02. *J Appl Toxicol* 40(20): 270–284. doi: 10.1002/jat.3902
 10. Aliyu A, Shaari MR, Ahmad Sayuti NS, Reduan MFH, Sithambaram S, Noordin MM, Shaari K, Hamzah H (2020) Subacute Oral Administration of *Clinacanthus nutans* Ethanolic Leaf Extract Induced Liver and Kidney Toxicities in ICR Mice. *Molecules* 25(11): 2631. doi: 10.3390/molecules25112631
 11. Park JH, Cho YR, Kim YM, Kang JS, Oh JS, Ahn EK (2019) 3-week repeated dose oral toxicity study of *Clausena excavate* extract in ICR mice. *J Appl Biol Chem* 62(2): 123–127. doi: 10.3839/jabc.2019.017
 12. Lee JE, Kim HJ, Lee CH, Lee KC, Choi EK, Chai HY, Yun YW, Kim DJ, Nam SY, Lee BJ, Ahn BW, Chang HG, Kim YB (2003) Four-week repeated-dose toxicity study on *Pinellia* extract. *Korean J Lab Anim Sci* 19: 127–141
 13. Kim YB, Hong DH, Cho ES, Lm WJ, Kim IH, Son HY (2014) Effect of repeated *Paecilomyces japonica* treatment on rats. *Korean J Vet Res* 54:31–38. doi: 10.14405/kjvr.2014.54.1.31
 14. Lee JS, Lee JS, Park YC, Choi SM, Lee SH (2014) A repeated-dose 28-day oral toxicity test of *Aconitum jaluense* extract in sprague-dawley rats. *Yakhak Hoeji* 58: 62–70
 15. Roh HS, Seok JH, Jeong JY, Lee JK, Kim TS, Choi HK, Ha HY (2014) Repeated dose oral toxicity study of *Alismatis rhizoma* in SD Rats. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 27:79–90. doi: 10.6114/jkood.2014.27.1.079