J. Fd Hyg. Safety 12(2), 141 - 152(1997)

흰쥐에 있어서 *Symphytum officinale* L. 추출액의 독성에 관한 연구

방형애† · 이용욱
서울대학교 보건대학원

Toxicological Study on the Water Extract of *Symphytum officinale* L. in Rats

Hyeong Ae Bang† and Yong Wook Lee
Graduate School of Public Health, Seoul National University, Seoul, 110-799, Korea

ABSTRACT — This study was performed to investigate the toxic effect of pyrrolizidine alkaloids from *Symphytum officinale* in rat. For this experiment, 120 male and female rats of Sprague-Dawley strain were used. The experimental groups were divided into five: Group CM and CF served as normal control with its gender. Group EM1 and EF1 were fed a 1% *Symphytum officinal* extract diet for 8 weeks. Group EM2 and EF2 fed a diet containing 2% extract diet. 4% extract diet into group EM3 and EF3 and 8% extract diet into group EM4 and EF4 were given. The results were as follows: 1. The major alkaloids of *Symphytum officinale* extract were symphytine, echimidine, and lasiocarpine. The amounts of total alkaloid were 168 μg PAs/ml extract. And contents of PAs in leaves were 0.05% wt.. 2. Total serum bilirubin concentrations increased significantly in group EM2, EM3, and EM4. Group EF1, EF2, EF3,and EF 4 showed statistical significance for the group CF ($p<0.05$). 3. Aspartate transaminase activities were increased significantly in group EM3 and EM4 ($p<0.05$). Aspartate transaminase activities of EF1, EF2, EF3, and EF4 showed statistical significance for the group CF ($p<0.05$). 4. Alanine transaminase activities increased significantly in group EM3, EM4 ($p<0.05$). Alanine transaminase activities of EF1, EF2, EF3, and EF4 showed statistical significance for the group CF ($p<0.05$). 5. Alkaline phosphatase activities increased significantly in group EM2, EM3, and EM4 ($p<0.05$). Alkaline phosphatase activities of EF1, EF2, EF3, and EF4 showed statistical significance for the group CF ($p<0.05$). 6. Histopathological analysis of liver specimens from group EM3 and EM4 showed focal necrosis, periportal necrosis and apoptosis. Hepatocytes obtained from group EM2 showed fatty change and hydropic degeneration in group EM3 and EM4. Chromatolysis and chromatin margination was shown in group EF2 and EF3. With the above results, it was demonstrated that the *Symphytum officinale* extract could induce functional change of liver, and histopathological change of liver in rats fed a diet containing extract. In conclusion, because of the risk of intoxication or adverse effect, the composition, dosage and mode of administration of herbal products should be monitored strictly. And this study serves as a reminder that herbal as well as orthodox medications may have serious side effects.

Key wordse □ *Symphytum officinale* extract, pyrrolizidine alkaloids, experimental diets, hepatotoxicity, serum enzyme activity, histopathological analysis

서 론

Pyrrolizidine alkaloids(PAs)는 여러 科(Family)의 식물들에 함유되어 있으며 이러한 식물들의 분포 지역은 전 세계적으로 넓다. 식물에 있어서 PAs의 機能은 明確하지는 않으나 쓴 맛을 내어 동물의 먹이로 부터 보호하는 役割이 있는 듯 하다.

PAs를 含有하는 주요 식물체들에는 Boraginaceae(all genera), Compositae(tribes *Senecionae, Eupatoriae*), Leguminosae(genus Crotalaria) 등이 알려져 있다.[1] PAs에 대한 관

† Author to whom correspondence should be addressed.

심은 1900년 초에 특정지역에서 가축들이 攝取하는 목초로 인해 간장, 폐, 신장 등에 ascites, veno-oclusive disease, edema, haemorrhage, cirrhosis 등의 病變이 관찰됨에 따라 연구가 시작되었다. 1950년대에 들어와 Roger Adams, Menshikov, 그리고 Warren 등에 의해 Senecio alkaloids의 基本構造가 밝혀지게 되었다.

그 이후에 Davidson[6]은 PAs의 간독성(hepatotoxicity)에 대한 연구에서 식품, 차(tea), 민간약(home remedies), 또는 生藥((herbal medicine)의 형태로 PAs가 들어 있는 식물들을 섭취하고 있는 개발도상국들에서 특히 사람의 간질환 發生率이 높은 이유를 지적함으로써 이 물질이 사람의 肝疾患에 중요한 병인 물질일 가능성을 提示하였다. Bras 등[7]은 간소엽(liver lobule)의 중심소엽정맥(centrilobular veins)의 혈전을 特徵으로 하는 Veno-occlusive disease(VOD)의 발생도 이러한 알카로이드들이 原因이 될 수 있음을 보고하였다. Gupta 등[8]에 따르면 Veno-occlusive disease는 특히 개발도상국가들에서 성인의 간경변증(liver cirrhosis)의 주요인이라 여겨지고있다.[9]

그러나 이러한 有毒한 알카로이드들을 含有하고 있는 것으로 알려져 있거나 의심되는 식물들이 體系的인 安全性 試驗도 거치지 않은 채 대부분의 지역에서 폭넓게 민간치료용, 또는 식품으로 조차 사용되고 있다.[10] Schoental[2]과 Burns[11]에 의하면 영국에서는 *Senecio jacobaea*를 약초상(herbalists shops)에서 판매하고 있으며 *Symphytum* spp. (comfrey)는 채소, 음료 또는 藥用으로 여전히 이용되고 있다.[12] Stillman 등[13]은 미국에서의 PAs로 인한 중독증을 빙산질병(iceberg disease)으로 나타냄으로써 특히 멕시코계 미국인을 고려시 이 질병이 실제로 보고된 것보다 훨씬 더 많으리라는 것을 암시하고 있다.[14] *Petasites japonicus* Maxim의 화경(花梗), *Tussilago farfara*의 개화기 전 꽃, *Symphytum officinale*의 잎과 뿌리, *Farfugium japonicum*와 *Senecio cannabifolius*의 어린 잎과 줄기 등은 모두 일본에서 식품이나 약초로 이용되고 있는 것들이다.[3]

따라서 이러한 지역에서의 전래 민간약의 상용은 PAs를 함유한 식물들의 위험성과 질병양상, 병리학적 진단 상(diagnostic pathological picture) 등에 관한 충분한 연구를 필요로 한다. 더구나 PAs로 인해 발생한 질병의 대부분이 보고되지 않거나 영양실조(malnutrition)[15] 등이 원인인 것으로 보고되기도 한다. 또한 식품중에 존재하는 自然毒素들에 관한 많은 文獻들에서 조차 PAs로 인한 사람의 질병발생 가능성에 대해서는 언급하고 있지 않다. 그러나 이것은 PAs가 함유되어 있는 식물의 섭취로 인한 질병발생이 急性의 형태보다는 慢性的으로 나타나기 쉬움에 따른 인과관계의 認識不足에서 비롯된 것이다. PAs는 건강상 매우 위해한 요소이나 이 물질의 출처와 관련된 질병등에 관한 정확한 지식과 인식만 있게되면 얼마든지 예방이 가능한 자연독소 성분의 危害物質이다.

Symphytum officinale(comfrey)[3,43-44]은 높이 50~60 cm되는 여러해살이 풀로 잎은 긴 타원형이거나 좁고 긴 계란 모양이며 부드러운 흰털이 많다. 꽃은 붉은 보라색이고 줄기 끝에 핀다. 뿌리와 지상부의 pyrrolizidine alkaloids성분은 symphytine, echmidine, lasiocarpine, heliosupine, viridiflorine, echinatine, acethyechimidine, 7-acethylycopsamine, lycopsamine, intermedine, 7-acethyintermedine, symlandine, myoscorpine 등이 分離되었다. 알카로이드 含量은 지상부에서 봄과 가을철에 낮고(0.03~0.13%) 꽃봉오리와 꽃필 때 높다(0.06~0.18%).

우리나라 국민은 傳來로부터 生藥(herbal medicine)에 대한 依存度가 높고 口傳되어 내려오는 많은 식물들을 민간약의 형태로 自家處方하여 섭취하는 경우도 주변에서 쉽게 찾아볼 수 있다. '93년도 통계연감에 의하면 한국인의 만성간질환및 간경화중의 發生率은 28.6/100,000명으로 세계 최고의 발생률을 나타내고 있다. 이에 대해서는 aflatoxin에 汚染된 穀類의 攝取, 알코올의 消費, 또는 높은 바이러스 肝炎 感染率 등이 주원인으로 提示되고 있으나 PAs로 인한 질병발생시 주요 標的臟器가 肝임을 나타내는 많은 연구결과들을 토대로 할 때 이를 간질환의 原因物質중의 하나로 고려하지 않을 수 없다.

기존에 보고된 연구내용들 중 事例報告를 제외한 동물실험들은 주로 순수 분리된 단일 알카로이드만을 일회 대용량 투여하는 急性毒性 실험들로 이루어져 있으나 이 때, 분리된 알카로이드 성분만으로 어떤 식물 전체의 독성을 평가한다는 것은 불가능 하다. 또한 경구투여, 복강내 투여 그리고 정맥주사 등과 같은 투여방법들 보다 食餌와 함께 *Symphytum officinale*(comfrey)시료의 추출액을 投與함으로서 나타나는 독성을 간기능 및 면역기능에 걸쳐 기술한 연구 문헌들이 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 이와 같은 背景을 根據로 하여 PAs를 함유한 식물 속(genus)으로 우리나라에서 자라며 약용 및 식용으로 민간에서 널리 사용되고 있는 것으로 알려진 *Symphytum officinale*를 대상으로 하여 알카로이드 함량 측정과 독성여부를 동물실험을 통하여 究明함으로써 안전성에 대한 기본적인 시험조차 거치지 않은 채 무차별적으로 사용되고 있는 많은 식물들에 대해 체계적인 연구의 필요성이 중요함을 제시하는 기초자료를 提供함으로써 국민보건에 기여하고자 한다.

實驗材料 및 方法

實驗動物

서울대학교 중앙 동물사육실에서 供給받은 離乳 직후의 3주령 된 Sprague-Dawley계 랫트 암수 각각 60마리씩 120마리(체중 ♀60~105 g,♂ 55~80 g)를 일반 고형사료로 2주간 실험실 환경에 적응 시킨 후 體重에 따라 난괴법(Randomized complete block design)으로 1군당 12마리씩 총 5개군으로 나누어 8주간 실험에 사용하였다.실험기간 중 물과 사료는 制限없이 공급하며 사육실의 온도는 20±2℃로 유지하고 자연채광하에서 랫트용 케이지에 넣어 사육하였다.

實驗食餌

실험군은 암수 각각의 정상군(CM, CF)과 4개의 *Symphytum officinale* 투여군(EM1, EM2, EM3, EM4 및 EF1, EF2, EF3, EF4)으로 나누어 정상군에는 랫트용 펠레트 사료를 공급하고 실험군에는 *Symphytum officinale* 추출액을 1~8%(v/W)첨가한 조제사료를 投與하였다(Table 1).

Symphytum officinale(Comfrey) 抽出液(water extract)

Comfrey의 잎부위를 500 g 정도 취하여 이물질을 제거하고 난 후에 증류수를 넣어 2시간 동안 加熱하여 용해되는 成分을 추출하고 이 추출액을 round flask에 넣어 Rotary vacuum evaporator(Buchi, Rotavapor RE 120, Switzerland)를 이용하여 물을 증발시킨 후 시료의 추출액을 얻었다.[45] 이 추출액은 -20℃에서 냉동보관한 후 사용시마다 蒸溜水에 稀釋하여 실험에 사용하였다.

血液 및 臟器採取

血液採取—각 실험군을 犧牲시키기 12시간 전에 절식시킨 후 Ketamine hydrochloride를 사용하여 마취시킨 상태에서 심장천자(heart puncture)법으로 혈액을 채취한 후 1300×g에서 15분간 원심분리(Hitachi Co.,Rotanta/RP)시켜 혈청을 얻었다.

Table 1. Experimental design by doses of *Symphytum officinale* extracts

Group	No. of rats	% Extracts in diet	Duration of administration
CM/CF	12/12*	0	8 weeks
EM1/EF1	12/12	1	8 weeks
EM2/EF2	12/12	2	8 weeks
EM3/EF3	12/12	4	8 weeks
EM4/EF4	12/12	8	8 weeks

* Male/Female rats

臟器의 摘出 및 處理—혈액 채취 후 즉시 開腹하여 간, 폐, 신장, 심장, 비장 및 임파선(Cervical lymph node)을 적출하였다. 적출한 장기는 생리식염수로 씻어낸 후 수분제거를 위해 여과지에 blotting한 다음 각각의 중량을 측정하여 체중 100g당 장기무게로 환산하였다.

Pyrrolizidine alkaloids의 含量 測定[48-49]

*Symphytum officinale*의 추출액 중 含有되어 있는 PAs의 함량 측정을 위해 시료중에 염기형태(Basic form)로 존재하는 알카로이드를 N-oxide로 산화시킨 후 acetic anhydride를 넣어 加熱反應을 거쳐 pyrrole형태로 전환시킨 다음 4-dimethylaminobenzaldehyde(Ehrlich reagent)를 이용하여 색깔반응(color reaction)을 유도하였다(Fig. 1). 이러한 원리는 색깔반응을 나타내는 모든 알카로이드가 간에 독성을 나타내는 것은 아니나 간독성을 지니는 3-pyrrole system 알카로이드들은 모두 색깔반응을 나타내는 것을 이용한 것이다. 순수한 Pyrrolizidine alkaloid는 acetic anhydride와 색깔반응을 일으키지 않으며 N-oxide만이 반응하게 되는 데 아래 절차 중 N-oxide만을 測定하기 위해서는 酸化反應을 유도하기 위한 단계 A만을 생략한 후 동일과정을 거친다. 반응과정 중 Ehrlich reagent와 색깔반응을 일으키는 pyrrole & indole 유도체를 고려하여 시료 2개 중 1개는 단계 C를 거쳐 565 nm에서 흡광도를 측정 후 전과정(full procedure)을 거쳐 얻은 값으로 부터 제하였다.

A: Sample (preferably contain 5-30μg of alkaloid)
↓
To the sample added 0.5ml(±5%)of oxidation reagent(test tube 15x120mm)
↓
The lower half of the unstoppered tube is immersed in a boiling water bath for 20-30min.
↓
B: Diglyme(1ml) is added, the acetic anhydride(0.5ml±0.5%), and the tube is again heated in the boiling water bath for 1 min.± 10sec. (avoid any contamination by water, acids, or hydrogen peroxide)
↓
C: Tube is cooled to room temp. add modified Ehrlich reagent (1ml±5%), and heat the tube in a water bath at 55-60℃ for 4-5min. to develop the color
↓
The cooled solution is diluted with acetone to 4.0ml
↓
Absorbance is measured with a spectrophotometer at 565nm
Blank is prepared by duplicating the above procedure, but omitting the sample

Fig. 1. Procedure of alkaloid, or alkaloid + N-oxide determination.

光學 顯微鏡 觀察[51-52]

채취한 장기들은 조직검사를 위하여 10% 중성 formaline 용액(Formaldehyde solution)에 2일 이상 고정시킨 다음 alcohol탈수 과정을 거쳐 파라핀 포매(Embedding) 후 microtome(Reichert-Jung, No. 820s)을 이용 5 μm의 박편을 만들어 hematoxyline-eosin 염색처리 후 광학현미경으로 관찰하였다.

資料의 處理와 分析

실험분석 결과의 統計處理 방법은 각 실험별 평균치와 표준편차를 계산하고 분산분석을 한 후에 α=0.05수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 군별 평균치간의 有意性을 檢證하였다.

結果 및 考察

Symphytum officinale 抽出液 중의 PAs 含量

Symphytum officinale(comfrey)중에 包含되어 있는 알카로이드의 含量은 계절 및 부위에 따라 매우 多樣하게 나타나 일반적으로 잎 중에는 0.003%~0.115%, 뿌리에는 0.14%~0.4% 가량이 존재하는 것으로 알려져 있다.알카로이드의 함량결정시[37-39] 추출액 중에는 많은 종류의 알카로이드들이 함께 존재하게 되므로 알카로이드 및 알카로이드+ N-oxides의 총 알카로이드 함량은 이들 알카로이드 중 主要成分(major alkaloid)으로 존재하는 open diester 構造의 symphytine, echimidine, lasiocarpine들이 나타내는 흡광도를 고려하여 결정하였다.

이때, 회수율은 알카로이드 0.95이며 estimation curve slope는 0.068 이었다. Curve slope는 absorbance/μg으로 나타나므로 565 nm에서 시료의 흡광도가 1.095일 때 시료 추출액 중의 PAs함량은 $\frac{1.095-0.01}{0.068\times 0.95}\times 10$ folds = 168 μg PAs/m*l* extract으로 나타내어 진다. 이를 신선한 comfrey 생잎 중에 포함된 총 알카로이드 함량으로 환산하면 30 g에서 얻어 진 추출액이 90 m*l*이므로 $\frac{168\times 90}{3\times 10^7}\times 100 = 0.05\%$ wt.이다.

실험군에서 식이 섭취량이 30~40 g/day/rat 범위이므로 시료 추출액 1%투여군은 48~64 μg PAs/day/rat의 알카로이드의 함량을 투여하였고 추출액 2%투여군에는 96~128 μg PAs/day/rat, 4%투여군에는 192~256 μg PAs/day/rat 그리고 8% 투여군에는 384~512 μg PAs/day/rat를 투여한 것으로 나타났다.

*Symphytum officinale*이 肝 機能 變化 徵相에 미치는 影響

Total serum bilirubin 의 濃度 變化—Total serum bilirubin의 농도 변화는 Table 2, 3과 같다. 수컷 랫트에서 대조군(CM)의 bilirubin농도는 실험군 EM2, EM3, EM4와 유의한 차이를 나타내었고 암컷 랫트에서도 대조군(CF)과 모든 실험군 EF1, EF2, EF3, EF4간에 통계적으로 유의한 수준의 변화를 나타내었다($p<0.05$). 수컷 랫트에서는 투여한 食餌 중의 *Symphytum officinale* 추출액의 量이 증가할수록 total bilirubin농도가 증가하는 量反應關係(Dose-response relationship)를 나타내었다. 혈청내 bilirubin의 농도가 증가하는 경우는 간 세포 損傷(Hepatic cellular damage)이나 膽管의 閉塞(Biliary duct obstructions) 또는 용혈성 질환이나 장기간에 걸친 飢餓상태가 유지될 때 발생하는 것으로 알려져 있으며[37] 본 실험에서 나타난 serum bilirubin의 농도 증가는 *Symphytum officinale*의 투여에 의한 간 세포의 손상때문이라 여겨진다.

Aspartate transaminase(AST, SGOT)—Aspartate transaminase의 농도변화는 Table 4, 5와 같다. 수컷 랫트에서

Table 2. The Concentration of total serum bilirubin after administration of experimental diet in male rats (Unit: mg/d*l*)

	CM	EM1	EM2	EM3	EM4
Conc. of Total bilirubin	0.517±0.071	0.563±0.085	0.628±0.102*	0.664±0.134**	0.713±0.098**

All values represent Mean±S.D.
*: Significantly different from control group ($p<0.05$)
**: Significantly different from control group ($p<0.01$).

Table 3. The Concentration of total serum bilirubin after administration of experimental diet in female rats (Unit: mg/d*l*)

	CF	EF1	EF2	EF3	EF4
Conc. of Total bilirubin	0.566±0.094	0.745±0.067	0.779±0.125	0.737±0.127*	0.763±0.101**

All values represent Mean±S.D.
*: Significantly different from control group ($p<0.05$)
**: Significantly different from control group ($p<0.01$).

Table 4. The Concentration of Aspartate transaminase after administration with experimental diet (unit: U/L)

	CM	EM1	EM2	EM3	EM4
Conc. of AST	74.36±15.47	87.20±11.85	85.42±16.41	97.09±18.34*	103.08±19.10**

All values represent Mean±S.D.
*: Significantly different from control group ($p<0.05$)
**: Significantly different from control group ($p<0.01$).

Table 5. The Concentration of Aspartate transaminase after administration with experimental diet (unit: U/L)

	CF	EF1	EF2	EF3	EF4
Conc. of AST	71.25±10.37	85.60±9.465*	90.17±12.31*	90.33±12.70*	98.77±17.15*

All values represent Mean±S.D.
*: Significantly different from control group ($p<0.05$).

대조군(CM)과 실험군 EM3, EM4간에 유의할 만한 수준의 濃度 增加가 나타났고 암컷 랫트에서는 대조군(CF)과 모든 실험군 EF1, EF2, EF3, EF4간에 유의한 차이를 나타내었다 ($p<0.05$). 실험군간에도 EF1과 EF4 사이에 유의한 차이를 보여 *Symphytum officinale* 투여 농도에 따라 간 損傷에 미치는 影響이 큰 것으로 나타났다.또한 수컷 랫트에서는 투여한 食餌 중의 *Symphytum officinale* 추출액의 量이 증가할수록 SGOT의 농도도 증가하는 量反應關係(Dose-response relationship)를 나타내었다. Aspartate transaminase는 parenchymal cell의 괴사(Necrosis)가 進行 중인 간 질환이 있는 경우에 증가되므로 *Symphytum officinale* 투여로 위와 같은 상태가 진행되고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 herbal tea 長期飮用에 관한 Sperl 등[53]의 보고와 일치하고 있다.

Alanine transaminase(ALT, SGPT)—Alanine transaminase의 농도 변화는 Table 6, 7과 같다. 수컷 랫트는 대조군(CM)과 실험군 EM3, EM4간에 有意한 水準의 차이가 있었고 각 실험군간에도 EM1, EM2와 EM4간에 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$). 암컷 랫트는 대조군(CF)과 실험군 EF1, EF2, EF3, EF4 모두에서 유의한 수준의 농도 증가를 보였다($p<0.05$). 또한 수컷 랫트에서는 투여한 食餌 중의 *Symphytum officinale* 추출액의 量이 증가할수록 SGPT의 농도도 증가하는 量反應關係(Dose-response relationship)를 나타내었다. SGPT는 일반적으로 SGOT와 유사하게 증가하지만 만성간염(Chronic hepatitis), 간경화(Cirrhosis), 간의 울혈성 변화(Congestive change in liver) 등이 있을 때에는 증가 폭이 작고 급성간염(Acute hepatitis) 및 괴사(Necrosis) 시에는 SGOT 보다 현저히 증가하는 것으로 알려져 있으므로 본 실험 결과와 비교시 SGPT의 증가 폭이 SGOT보다 작게 나타난 것은 *Symphytum officinale* 투여로 인해 만성적인 肝 損傷의 단계로 질환이 진행된 것으로 판단된다.[54,55] 이는 Carlsson 등[56]이 보고한 결과와 일치한다.

Serum alkaline phosphatase(ALP)—Alkaline phosphatase의 농도 변화는 Table 8, 9와 같다. 수컷 랫트는 대조군(CM)과 실험군 EM2, EM3, EM4간에 유의한 수준의 濃度變化를 나타내었고 각 실험군간에도 모두 유의한 수준의 농도 增加를 보였다. 암컷 랫트는 대조군(CF)과 실험

Table 6. The Concentration of Alanine transaminase after administration with experimental diet in male rats (unit: U/L)

	CM	EM1	EM2	EM3	EM4
Conc. of ALT	22.09±6.09	30.50b±5.48	29.25±7.16	34.36±6.12*	39.25±5.30**

All values represent Mean±S.D.
*: Significantly different from control group ($p<0.05$)
**: Significantly different from control group ($p<0.01$).

Table 7. The Concentration of Alanine transaminase after administration with experimental diet in female rats (unit: U/L)

	CF	EF1	EF2	EF3	EF4
Conc. of ALT	22.17±7.13	33.90±6.28*	34.25±6.51*	35.83±4.20*	34.38±5.98*

All values represent Mean±S.D.
*: Significantly different from control group ($p<0.05$).

Table 8. The Concentration of serum alkaline phosphatase after administration of experimental diet in male rats (unit: U/L)

	CM	EM1	EM2	EM3	EM4
Conc. of ALP	24.46±4.21	34.70±6.38	57.50±7.91*	72.00±9.32**	82.67±10.04***

All values represent Mean±S.D.
*: Significantly different from control group ($p<0.05$)
**: Significantly different from control group ($p<0.01$)
***: Significantly different from control group ($p<0.001$).

Table 9. The Concentration of serum alkaline phosphatase after administration of experimental diet in female rats (unit: U/L)

	CF	EF1	EF2	EF3	
Conc. of ALP	40.33±9.38	78.60±11.11*	84.17±12.07*	84.58±10.83*	89.15±7.99**

All values represent Mean±S.D.
*: Significantly different from control group ($p<0.05$)
**: Significantly different from control group ($p<0.01$).

군 EF1, EF2, EF3, EF4 모두에서 유의한 수준의 농도변화가 있었고 각 실험군간에도 EF1과 EF4 사이에 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$). 또한 수컷 랫트에서는 투여한 食餌 중의 *Symphytum officinale* 추출액의 量이 증가할수록 ALP의 농도도 증가하는 量反應關係(Dose-response relationship)를 나타내었다. ALP는 일반적으로 담관의 閉塞이나 간에 nodule이 형성된 경우 등에 따라 수치가 증가하는 것으로 알려져 있다.[57]

病理組織學的 所見

*Symphytum officinale*의 추출액 투여로 誘發된 組織의 병변을 관찰한 결과 간장, 신장, 비장, 폐, 임파구 중 간장에서 局所性 壞死(Focal necrosis), Periportal necrosis, 枯死(Apoptosis), Chromatolysis, Chromatin margination, Fatty change, Hydropic degeneration 등의 주목할 만한 병리현상들이 주로 나타나고 기타 장기의 조직에서는 특이할 만한 현상이 관찰되지 않았다. 간조직의 변화에 미치는 *Symphytum officinale* 抽出液의 영향은 Photo. 1~6에 나타내었다. 실험동물이 특정 물질에 노출될 때 毒性反應이 상대적으로 간장에서 빈번히 나타나는 데 이는 간장이 다른 장기에 비해 物質代謝性이 높고 문맥으로부터 혈액공급이 이루어 지는 것이 주된 이유이다. 간장은 외부약물이나 화학물질이 活性化되어 독성이 발현되는 대사과정이 일어나는 주된 장기이며 대사능력이 없거나 상당히 떨어지는 기타 장기들은 대사적 활성이 요구되는 독소에 대해서는 덜 敏感하게 반응한다. 또한 간장은 문맥으로부터 혈액공급을 받고 있기 때문에 섭취된 독소에 가장 먼저 露出되는 주요 장기이다. 그러므로 문맥에서부터 혈류내의 독소의 부분적인 減少가 일어나므로 다른 장기는 최소한 간장과 같은 정도의 損傷은 방지되는 것으로 알려져 있다.

局所性 壞死(Focal necrosis)—Photo. 1의 실험군 EM3와 EM4에서 보여지는 국소성 괴사는 실험동물에 간독소를 投與했을 때에 일반적으로 나타난다. 이러한 형태의 괴사는

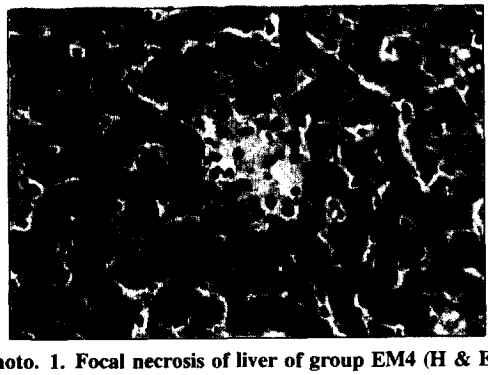

Photo. 1. Focal necrosis of liver of group EM4 (H & E, × 400).

Photo. 2. Apoptosis, chromatolysis and hydropic degeneration of hepatocytes of group EM4 (H & E, × 400).

사람에서 여러 종류의 약물을 투여한 후에 나타나는 것으로 보고되고 있으나 실험동물의 독성연구에서는 자주 나타나지는 않는다.[58-59] 국소성 괴사는 소엽의 어느 지역에서든지 나타날 수 있는 明瞭한 괴사된 간세포로 構成되며 괴사면적은 좁은 것이 보통으로 3-4개의 세포로 구성되어 있는 것을 볼 수 있다. 괴사된 간세포 외에도 종종 단핵의 염증세포가 다수 介入되어 있는 것을 볼 수 있다. 육안적으로는 대개 1 mm 이내의 백색반점들로 나타나나 특히 염증세포가 나타날때 보다 명확하게 관찰된다. 섬유조직의 증식은 觀察되지 않았다.

枯死(Apoptosis)— Photo. 2의 실험군 EM4에서 관찰된 고사는 特異的인 조직학적 소견을 보이는 간세포의 개별적인 죽음의 한 형태로 괴사와는 달리 죽은 세포로 부터 세포성분의 溶出이 전혀없고 염증세포의 개입도 관찰되지 않는 것으로 나타났다. Apoptotic body는 개개의 간 세포가 자연위축과정을 걸어가고 있는 것으로 조직학적으로는 진하고 때로는 분절된 염색질을 갖고 있는 호산성의 작고 진한 구조물로 나타난다. 간장에서는 고사된 세포가 발견되는 比率이 매우 낮으며 일차적으로 발생지역은 수명을 다한 간세포가 生理的으로 소멸되는 소엽중심부로 제한되는 것이 일반적이다. 그러나 EM4군에서 관찰된 고사는 소엽주변부에서 주로 고사가 나타나는 것이 특징적으로 주목할만한 병변으로 여겨진다.

脂肪化(Fatty change of liver)— 간장은 전신적 脂肪代謝의 중추기관이며, 지방의 출입이 활발하다. 간내 혈액순환의 말초에 해당하는 소엽중심대의 간세포는 산소결핍, 울혈, 중독 등에 의해 지방변성을 일으키기 쉬우며 소엽중심대에 주로 나타나는 지방변성을 간장의 중심성 지방변성이라 한다. 중심성 지방변성에 비해, Photo. 3의 실험군 EM2에서와 같이 관찰소엽주변대에 비교적 큰 지방방울이 나타날 때가 있는 데 이를 지방침윤이라한다. 이는 간장으로 지방공급이 과잉되거나 그 이용기전의 장애가 그 원인이며[0]지방침윤이 고도로 되면 지방침착은 간 전체로 波及되고 큰 지방방울이 간장에 충만하게 되어 지방간(Fatty liver)이 될 수 있다.

水腫樣 變性(Hydropic degeneration)— Photo. 4에서는

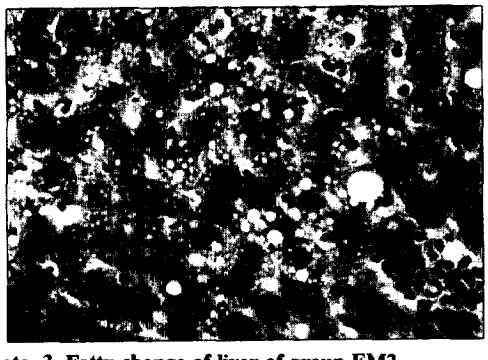

Photo. 3. Fatty change of liver of group EM2.
The Variability in size of vacuoles is evident (H & E, ×400).

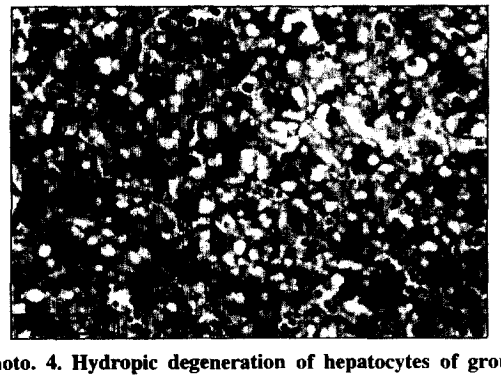

Photo. 4. Hydropic degeneration of hepatocytes of group EM4 (H & E, ×400).

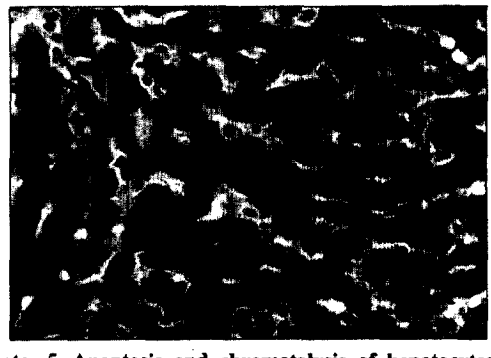

Photo. 5. Apoptosis and chromatolysis of hepatocytes of group EF3 (H & E, ×400).

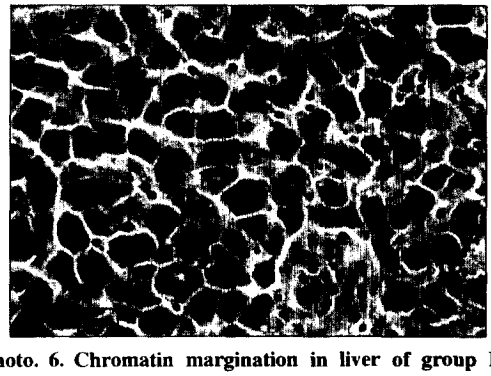

Photo. 6. Chromatin margination in liver of group EF2 (H & E, ×400).

EM4군에서 간장세포의 細胞體가 소형핵을 지닌 수종양 또는 공포상으로 변성된 所見이 관찰된다.[61]

염색질 용해(Chromatolysis) 및 Chromatin margination—Photo. 5와 6에서는 실험군 EF3와 EF2에서 세포핵(Cell nucleus)의 염색질이 融解된 것과 염색질이 혈관벽의 邊緣에 부착된 Chromatin margination 소견이 관찰되었다.

要約 및 結論

본 연구는 *Symphytum officinale*의 추출액이 Sprague-Dawley계 랫트의 혈액학적 性狀의 變化 및 조직학적 병변 誘發에 미치는 영향을 조사하고자 수행되었다. 실험동물은 암 · 수 랫트 120마리를 사용했으며, 대조군(CM, CF)에는 正常食餌를 투여하고 실험군을 1%,2%, 4% 및 8% 실험식이를 투여한 정도에 따라 EM1-4, EF1-4로 나누어 8주 동안 실험하였다. *Symphytum officinale* 추출액의 毒性影響을 파악하기 위해 간기능변화에 미치는 영향(Serum total bilirubin, AST, ALT, ALP), 組織의 병리현상 유발정도 그리고 *Symphytum officinale*의 추출액중 이러한 毒性의 직접적 原因物質인 Pyrrolizidine alkaloids의 함량 결정을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

Symphytum officinale 抽出液 중의 PAs 含量

총 알카로이드 함량은 이들 알카로이드 중 主要成分(major alkaloid)으로 존재하는 open diester구조의 symphytine, echimidine, lasiocarpine들이 나타내는 흡광도를 고려하여 결정하였다. 시료 추출액 중의 PAs함량은 168 μg PAs/m*l* extract 이며 이를 comfrey 생잎 중에 포함된 총 알카로이드 함량으로 환산하면 0.05% wt.이다.

실험군에서 식이 섭취량이 30~40 g/day/rat 범위이므로 시료 추출액 1%투여군은 48~64 μg PAs/day/rat의 알카로이드의 함량을 투여하였고 추출액 2%투여군에는 96~128 μg PAs/day/rat, 4%투여군에는 192~256 μg PAs/day/rat 그리고 8% 투여군에는 384~512 μg PAs/day/rat를 투여한 것으로 나타났다.

*Symphytum officinale*이 肝機能 變化 樣相에 미치는 影響

Total serum bilirubin의 濃度 變化—수컷 랫트에서 대조군(CM)의 bilirubin濃度는 실험군 EM2, EM3, EM4와 有意한 차이를 나타내었고 암컷 랫트에서도 대조군(CF)과 모든 실험군 EF1, EF2, EF3, EF4간에 통계적으로 유의한 수준의 變化를 나타내었다($p<0.05$).

Aspartate transaminase(AST, SGOT)—Aspartate transaminase의 농도변화는 수컷 랫트에서 대조군(CM)과 실험군 EM3, EM4간에 有意할 만한 수준의 농도 증가가 나타났고 암컷 랫트에서는 대조군(CF)과 모든 실험군 EF1, EF2, EF3, EF4간에 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$). 실험군간에도 EF1과 EF4 사이에 유의한 差異를 보여 *Symphytum officinale* 투여 농도에 따라 간 損傷에 미치는 영향이 큰 것으로 나타났다.

Alanine transaminase(ALT, SGPT)—Alanine transaminase의 농도 변화는 수컷 랫트에서 대조군(CM)과 실험군 EM3, EM4간에 유의한 수준의 차이가 있었고 각 실험군간에도 EM1, EM2와 EM4간에 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$). 암컷 랫트는 대조군(CF)과 실험군 EF1, EF2, EF3, EF4 모두에서 유의한 수준의 농도 증가를 보였다($p<0.05$).

Serum alkaline phosphatase(ALP)—Alkaline phosphatase의 농도 변화는 수컷 랫트에서 대조군(CM)과 실험군 EM2, EM3, EM4간에 유의한 수준의 농도변화를 나타내었고 각 실험군간에도 모두 유의한 수준의 농도 증가를 보였다. 암컷 랫트는 대조군(CF)과 실험군 EF1, EF2, EF3, EF4 모두에서 유의한 수준의 농도변화가 있었고 각 실험군간에도 EF1과 EF4사이에 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$).

病理組織學的 所見

*Symphytum officinale*의 추출액 투여로 誘發된 組織의 병변을 관찰한 결과 간장, 신장, 비장, 폐, 임파구 중 간장에서 소엽중심성 괴사, 국소성 괴사(Focal necrosis), 고사(Apoptosis), Chromatin margination, Fatty change, Hydropic degeneration 등의 주목할 만한 병리현상들이 주로 나타나고 기타 장기의 조직에서는 특이할 만한 현상이 관찰되지 않았다(Photo. 1~6). 실험군 EM3와 EM4및 EF3에서 局所性 壞死및 Periportal necrosis가 관찰되었으며,실험군 EM4에서 관찰된 고사는 특이적인 조직학적 所見을 보이는 간세포의 개별적인 죽음의 한 형태로 소엽중심부에서 일반적으로 발생하나 EM4군에서 관찰된 고사는 소엽주변부에서 주로 고사가 나타나는 것이 특징적으로 주목할만한 병변으로 여겨진다. 중심성 지방변성에 비해 실험군 EM2에서는 간장으로 지방공급이 과잉되거나 그 이용기전의 장애가 원인일때 나타나는 지방침윤이 소엽주변대에 비교적 큰 지방방울로 관찰되었다. EM3과 EM4군에서는 간장세포의 세포체가 소형핵을 지닌 수종양 또는 공포상으로 변성된 소견이 관찰되었다. 또한 실험군 EF2와 EF3에서는 세포핵(Cell nucleus)의 염색질이 融解된 것과 염색질이 혈관벽의 邊緣에 부착된 Chromatin margination 所見이 관찰되었다.

위와 같은 실험결과들을 바탕으로 할 때 *Symphytum officinale* 추출액의 일정용량을 소량씩 장기간 반복투여시 실

험동물인 흰쥐에서 肝 機能 변화 및 肝세포의 조직학적 병변현상이 유발되며 체내 免疫反應의 변화로 mast cell의 수가 증가하는 독성영향들이 나타난다고 판단된다. 또한 이러한 毒性들의 직접적인 원인물질로는 많은 연구문헌들이 지적한 바와 같이 Pyrrolizidine alkaloids가 주요한 것으로 판단되나 기존질병으로 인해 영양부족이나 신체허약상태가 지속된 상황에서의 PAs함유 식물들의 섭취는 보다 심각한 부작용을 유발하는 것으로 보고되고 있다. 성별에 따른 PAs의 영향에 대해 Mattocks[12]는 retrosine이나 monocrotaline의 급성독성에 대해 수컷 랫트의 경우 암컷보다 감수성이 훨씬 크다고 하였으나 Jago[21]는 lasiocarpine투여시 나타나는 만성독성에서는 암컷에서의 감수성이 크다고 보고함으로써 본 연구에서 암 · 수 모두에서 유사하게 나타난 만성독성의 영향을 뒷받침하고있다.

生藥(herbal medicine)材들은 비교적 가격이 저렴하고 주변에서 손쉽게 구할 수 있다는 이점 때문에 민간에서 많이 사용되고 있는 실정이나 본 연구내용에서 보고된 바와 같은 中毒 또는 副作用이 유발될 수 있으므로 사용시 그 조성이나 용량 또는 처방방법 등을 반드시 전문가의 조언을 거쳐 엄격히 사용해야 하며 국민건강을 위해 현재 안전성이 확보되지 않은 채 무차별적으로 사용되고 있는 많은 생약재들에 대해 보다 과학적이고 체계적인 안전성 규명을 위한 연구들이 조속히 이루어 져야 한다고 판단된다.

국문요약

본 연구는 *Symphytum officinale*의 추출액이 Sprague-Dawley계 랫트의 혈액학적 性狀의 變化 및 조직학적 병변 誘發에 미치는 영향을 조사하고자 수행되었다. 실험동물은 암 · 수 랫트 120마리를 사용했으며, 대조군(CM, CF)에는 正當食餌를 투여하고 실험군을 1%, 2%, 4% 및 8% 실험식이를 투여한 정도에 따라 EM1-4, EF1-4로 나누어 8주동안 실험하였다. *Symphytum officinale* 추출액의 毒性影響을 파악하기 위해 실험기간 중 실험동물의 생리적 변화(체중증가량, 식이섭취량, 식이효율)에 미치는 영향, 肝機能 變化에 미치는 영향(Scrum total bilirubin, AST, ALT, ALP), 組織의 병리현상 유발정도 그리고 *Symphytum officinale*의 추출액중 이러한 毒性의 직접적 原因物質인 *Pyrrolizidine alkaloids*의 함량 결정을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다. *1. Symphytum officinale* 抽出液 중의 PAs 含量. 총 알카로이드 함량은 이들 알카로이드 중 生要成分(major alkaloid)으로 존재하는 open diester구조의 symphytine, echimidine, lasiocarpine들이 나타내는 흡광도를 고려하여 결정하였다. 이때, 회수율은 알카로이드 0.95이며 estimation curve slope는 0.068, 흡광도는 1.09이고 시료 추출액 중의 PAs함량은 168 μg PAs/ml extract이다. comfrey 생잎 중에 포함된 총 알카로이드 함량은 0.05% wt.이다. 2. *Symphytum officinale*이 肝組織 變化에 미치는 影響. 1) Total serum bilirubin의 濃度 變化. 수컷 랫트에서 대조군(CM)의 bilirubin濃度는 실험군 EM2, EM3, EM4와 有意한 차이를 나타내었고 암컷 랫트에서도 대조군(CF)과 모든 실험군 EF1, EF2, EF3, EF4간에 통계적으로 유의한 수준의 變化를 나타내었다($p<0.05$). 2) Aspartate transaminase(AST, SGOT). Aspartate transaminasc의 농도변화는 수컷 랫트에서 대조군(CM)과 실험군 EM3, EM4간에 有意할 만한 수준의 농도 증가가 나타났고 암컷 랫트에서는 대조군(CF)과 모든 실험군 EF1, EF2, EF3, EF4간에 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$). 실험군간에도 EF1과 EF4 사이에 유의한 差異를 보여 *Symphytum officinale* 투여 농도에 따라 간 損傷에 미치는 영향이 큰 것으로 나타났다. 3) alanine transaminase(ALT, SGPT). Alanine transaminase의 농도 변화는 수컷 랫트에서 대조군(CM)과 실험군 EM3, EM4간에 유의한 수준의 차이가 있었고 각 실험군간에도 EM1, EM2와 EM4간에 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$). 암컷 랫트는 대조군(CF)과 실험군 EF1, EF2, EF3, EF4 모두에서 유의한 수준의 농도 증가를 보였다($p<0.05$). 4) Serum alkaline phosphatase(ALP). Alkaline phosphatasc의 농도 변화는 수컷 랫트에서 대조군(CM)과 실험군 EM2, EM3, EM4간에 유의한 수준의 농도변화를 나타내었고 각 실험군간에도 모두 유의한 수준의 농도 증가를 보였다. 암컷 랫트는 대조군(CF)과 실험군 EF1, EF2, EF3, EF4 모두에서 유의한 수준의 농도변화가 있었고 각 실험군간에도 EF1과 EF4사이에 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$). 3. 病理組織學的 所見. *Symphytum officinale*의 추출액 투여로 誘發된 組織의 병변을 관찰한 결과 간장, 신장, 비장, 폐, 임파구 중 간장에서 소엽중심성 괴사, 국소성 괴사(Focal necrosis) 고사(Apoptosis), chromatin margination, Fatty change, Ilydropic degeneration 등의 주목할 만한 병리현상들이 주로 나타나고 기타 장기의 조직에서는 특이할 만한 현상이 관찰되

지 않았다. 실험군 EM3와 EM4 및 EF3에서 局所性 壞死 및 periportal necrosis가 관찰되었으며, 실험군 EM4에서 관찰된 고사는 특이적인 조직학적 所見을 보이는 간세포의 개별적인 죽음의 한 형태로 소엽중심부에서 일반적으로 발생하나 EM4군에서 관찰된 고사는 소엽주변부에서 주로 고사가 나타나는 것이 특징적으로 주목할만한 병변으로 여겨진다. 중심성 지방변성에 비해 실험군 EM2에서는 간장으로 지방공급이 과잉되거나 그 이용기전의 장애가 원인일때 나타나는 지방침윤이 세포체가 소엽주변대에서 비교적 큰 지방방울로 관찰되었다. EM3과 EM4군에서는 간장세포의 세포체가 소형핵을 지닌 수종양 또는 공포상으로 변성된 소견이 관찰되었다. 또한 실험군 EF2와 EF3에서는 세포핵(Cell nucleus)의 염색질이 融解된 것과 염색질이 혈관벽의 邊緣에 부착된 Chromatin margination 所見이 관찰되었다.

參考文獻

1. Schoental, R.: Toxicology and carcinogenic action of pyrrolizidine alkaloids. *Cancer Research,* **28**, 2237-2246 (1968).
2. Schoental, R.: Liver disease and 'natural' hepatotoxins. *Bull. World Health Organization,* **29**, 823-833 (1963).
3. WHO: Pyrrolizidine alkaloids, Environmental health criteria 80. World Health Organization, Geneva, 1988.
4. Arora, R.R., Ghosh, T.K., Mathur, K.K. and Tandon, B. N.:Epidemiology of veno-occlusive disease in tribal population of Madhya Pradesh and Bihar. *J. commun. Dis.,* **13**, 147-151 (1981).
5. Arseculeratne, S.N., Gunatilaka, A.A.L. and Panabokke, R.G.: Studies on medicinal plants of Sri Lanka-occurrence of pyrrolizidine alkaloids and hepatotoxic properties in some traditional medicinal herbs. *J. Ethnopharmacol.,* **4**, 159-177 (1981).
6. Davidson, C.S.: Plant and fungi as etiologic agents of cirrhosis. *New Engl. J. Med.,* **268**, 1072-1073 (1963).
7. Bras, G. andHill, K.R.: Veno-occlusive disease of the liver-essential pathology. *Lancet,* **2**, 161-163 (1956).
8. Gupta, P.S., Gupta, G.D., and Sharma, M.L.: Veno-occlusive disease of the liver. *Br. Med. J.* **1**, 1184-1186 (1963).
9. Berry, D. M. and G.Bras: Venous occlusion of the liver in Crotalaria and Senecio poisoning. *North Am. Vet.,* **38**, 323-327 (1957).
10. Smith, L.W. and Culvenor, C.C.J.: Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *J. Nat. Prod.* **44**:129-152(1981).
11. Burns, J.: The heart and pulmonary arteries in rat fed on Senecio jacobaea, *J. Pathol.,* **106**, 187-194 (1972).
12. Mattocks, A.R.: Toxic pyrrolizidine alkaloids in comfrey. *Lancet* **22**, 1136-1137 (1980).
13. Stillman, *A.E.*, Huxtable, R.J., Consroe, P., Kohnen P. and Smith, S.: Hepatic veno-occlusive disease due to pyrrolizidine poisoning in Arizona. *Gastroenterology,* **73**, 349-352 (1977).
14. Birecka, H., Frohlich, M.W., Hull, L. and Chaskes, M.J.: Pyrrolizidine alkaloids of Heliotropium from Mexico and adjacent USA. *Phytochemistry,* **19**, 421-426 (1980).
15. Lancet: Pyrrolizidine alkaloids (editorial). *Lancet,* **1**, 201-202 (1984).
16. Candrian, U., Luthy, J., Schmid, P., Schlatter, CH. and Gallasz, E.: Stability of pyrrolizidine alkaloids in hay and silage. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 935-937 (1984).
17. McLean, E.K.: The toxic action of pyrrolizidine(senecio) alkaloids. *Pharmacological reviews,* **22**(4), 429-483 (1970).
18. Schoental, R.: Hepatotoxic action of pyrrolizidine alkaloids in relation to their structure. *Nature,* **179**, 361-363 (1957).
19. Hayashi, Y.: Excretion and alteration of monocrotaline in rats. *Fed. Proc.* **25**, 688 (1966).
20. Mattocks, A.R.: Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature,* **217**, 723-728 (1968).
21. Jago, M.V.: The development of the hepatic megalocytosis of chronic pyrrolizidine alkaloid poisoning. *Am. J. Pathol.* **56**, 405-422 (1969).
22. Powis, G., Ames, M.M. and Kovach, J.S.: Metabolic conversion of indicine-N-oxide to indicine in rabbits and humans. *Cancer Res.* **39**, 3564-3570 (1979).
23. Amstrong, S.J. and Zuckerman, A.J.: Production of pyrroles from pyrrolizidine alkaloids by human embryo tissue. *Nature,* **228**, 569-570 (1970).
24. Petry, T.W., Bowden, G.P., Buhler, D.R. and Sipes, I.G.: Characterization of hepatic DNA damage induced in rats by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Cancer Res.,* **44**, 1505-1509 (1984).
25. Brick, Y.A.E.: Comparison of the effects of LSD, heliotrine, and X-irradiation on chromosome breakage and the effects of LSD on the rats of cell division. *Nature,* **226**, 1165-1167 (1970).
26. Brick, Y.A.E. and Culvenor, C.C.J.: Effects of dehydroheliotrine,a metabolite of pyrrolizidine alkaloids on chro-

mosome structure and cell division in culture of animal cells. *Cytovios.*, **3**, 245-255 (1971).
27. Bras, G. and Walter, D.C.: Further observations on the morphology of veno-occlusive disease of the liver in Jamaica. *West Indian med. J.* **4**, 201-211(1955).
28. Bull, L.B., Dick, A.T. and Mckenzie, J.S.: The acute toxic effects of heliotrine and lasiocarpine and their N-oxides on the rat. *J. Pathol. Bacteriol.* **75**, 17-25 (1958).
29. Butler, W.H., Mattocks, A.R. and Barnes, J.M.: Lesion in the liver and lungs of rats given pyrrole derivatives of pyrrolizidine alkaloids. *J. Pathol. Bacteriol.* **100**, 169-176 (1970).
30. Schoental, R. and Magee, P.N.: Chronic liver changes in rats after a single dose of lasiocarpine, a pyrrolizidine (senecio) alkaloid. *J. Pathol. Bacteriol.*, **74**, 305-319 (1957).
31. Schoental, R. and Magee, P.N.: Further observations of the subacute and chronic liver changes in rats after a single dose of various Pyrrolizidine (senecio) alkaloid. *J. Pathol. Bacteriol.*, **78**, 471-482 (1959).
32. Schoental, R.: Liver lesion in young rats suckled by mothers treated with the pyrrolizidine alkaloids, lasiocarpine and retorsine. *J. Pathol. Bacteriol.* **77**, 485-495 (1959).
33. McLean, E.K., Bras, G. and Gyorgy, P.: Veno-occlusive lesions in livers of rats fed Crotalaria fulva. *Brit. J. exp. Path.* **45**(3), 242-247 (1963).
34. Barnes, J.M., Magee, P.N. and Schoental, R.: Lesion in the lungs and livers of rats poisoned with the pyrrolizidine alkaloid fulvine and its N-oxide. *J. Pathol. Bacteriol.* **88**, 521-531 (1964).
35. Stirling, G.A. and Urquhart, E.: The toxic effect of Crotalaria extract on the liver of rats. *Brit. J. exp. Path.* **43**(4), 441-443 (1962).
36. Takeoka, O., Angevine, M. and Lalich, J.: Stimulation of mast cells in rats fed various chemicals. *Amer. J. Path.* **40**, 545-554 (1962).
37. Bras G., Brooks, S.E.H. and Walter, D.C.: Cirrhosis of liver in Jamaica. *J. Pathol. Bacteriol.*, **82**, 503-512 (1961).
38. Brooks, W.E.H., Miller, C.G., Mckenzie, K., Audretsch, J.J. and Bras, G.: Acute veno-occlusive disease of the liver. Fine structure in Jamaican children. *Arch. Pathol.* **89**, 507-529 (1970).
39. Tandon, B.N., Tandon, H.D., Tandon, R.K. *et al.*: An epidemic of venooccIusive disease of liver in central India. *Lancet*, **2**, 271-272 (1976).
40. Kumana, C.R., Ng, M., Lin, H.J. *et al.*: Herbal tea induced hepatic veno-occlusive disease: quantification of toxic alkaloid exposure in adults. *Gut.* **26**, 101-104 (1985).
41. Roulet, M., Raurini, R.,Rivier, L. and Calame, A.: Hepatic veno-occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. *J. Pediatr.*, **112**(3), 433-436 (1988).
42. Donald, W.F., Montgomery, C.H., Paul, S.B. *et al.*: Pyrrolizidine intoxication mimicking Reye syndrom. *J. Pediatr.* **93**(6), 980-982 (1978).
43. 일월서각: 약초의 성분과 이용.과학백과사전 출판사.P. 502,1991.
44. Brauchli,J.,J.Luthy,U.Zweifel and C.Schlatter:Pyrrolizidine alkaloids from Symphytum officinale L. and their percutaneous absorption in rats.Experentia 38:1085-1087(1982).
45. Chang, I.M.: Toxicity of herbal drugs, Korean Soci. Toxi. 243-257(1983).
46. Kay, J.M., Gillund, T.D. and Heath, D.: Mast cells in the lungs of rats fed on Crotalaria spectabilis seeds. *Am. J. Pathol.*, **51**, 1031-1044 (1967b).
47. Takeoka O, Murray, A. and Joseph, J.L.: Stimulation of mast cells in rats fed various chemicals. *Am. J. Pathol.*, **40**, 545-554 (1962).
48. Ames, M.M., Powis, G.: Determination of indicine N-oxide and indicine in plasma and urine by electron-capture gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **166**, 519-526 (1978).
49. Bicchi C., D'Amato, A. and Cappelletti, E.:Determination of pyrrolizidine alkaloids in Senecio inaequidens D.C. by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **349**, 23-29 (1985).
50. Mattocks, A.R.: Spectrophotometric determination of unsaturated pyrrolizidine alkaloids. *Anal. Chem.* **39**(4), 443-447 (1967).
51. Jacques Wallach: Interpretation of diagnostic tests. 4th ed., Little,brown and company, Boston/Toronto, 1986.
52. Sobotta, Hammnersen: Histology color atlas of microscopic anatomy. 3rd edition, Urban & Schwarzenberg, Baltimore Munch. 158-169, 1985.
53. Sperl, W., Stuppner, H., Gassner, I., Judmaier, W., Dietze, O. and Vogel, W.: Reversible hepatic veno-occlusive disease in an infant after consumption of pyrrolizidine-containing herbal tea. *Eur. J. Pediatr.* **154**, 112-116 (1995).
54. Ridker, P.M.: Toxic effects of herbal teas. *Arch Environ Health*, **42**, 133-136 (1987).
55. Weston, C.F.M., Cooper, B.T., Davies, J.D. and Levine, D.F.: Veno-occlusive disease of the liver secondary to ingestion of comfrey. *BMJ.*, **295**, 183 (1987).
56. Carlsson C.: Herbs and hepatitis. *Lancet*, **336**, 1068 (1990).
57. Huxtable, R.J., Luthy, J. and Zweifel, V.: Toxicity of comfrey-pepsin preparations. *New Engl. J. Med.* **315**, 1095 (1986).

58. Bull, L.B.: The histological evidence of liver damage from pyrrolizidine alkaloids. *Aust. Vet. J.*, **31**, 33-40 (1955).
59. Bull, L.B. and Dick, A.T.: The chronic pathological effects on the liver of the rat of the pyrrolizidine alkaloids heliotrine,lasiocarpine,and their N-oxides. *J. Pathol. Bacteriol.* **78**, 483-502 (1959).
60. Soichi Iijima *et al.*: 病理組織 아틀라스, 高文社編輯部 譯, 高文社. 129-160, 1984.
61. Robbins, L.S., Cotran, S.R. and Kumar, V.: Pathologic basis of disease, 3rd edition, W.B. Saunders, Washington, 884-959, 1984.