pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 1, pp. 96~102 (2012)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

랫드에서 백두옹과 청호의 경구투여에 의한 반복 투여독성 시험과 면역 활성 평가

안인정 · 권중기 · 이진석 · 이성호 · 박영석 · 박병권 · 김상기 · 김병수
조성대[1] · 최창순[2] · 이병희[3] · 강병곤[4] · 정지윤[5]*
공주대학교 특수동물학과, [1]전북대학교 구강병리학교실, [2]중앙대학교 식품공학부,
[3]국립생물자원관, [4](주)신일바이오젠, [5]공주대학교 두과녹비자원센터

Evaluate a Repeated Oral Dose Toxicity and Immunomodulating Activity of *Pulsatilla koreana* and *Artemisiae annuae* in Sprague-Dawley Rats

In-Jung An, Jung-Ki Kwon, Jin-Seok Lee, Seung-Ho Lee, Young-Seok Park, Byung-Kwon Park, Sang-Ki Kim, Byeong-Soo Kim, Sung-Dae Cho[1], Chang-sun Choi[2], Byoung-Hee Lee[3], Byeong-Kon Kang[4], and Ji-Youn Jung[5]*
Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea
[1]School of dentistry, Institute of Oral Bioscience, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
[2]School of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea
[3]National Institute of Biological Resources, Incheon 404-170, Korea
[4]Shinil Biogen, Anyang 6-dong, Anyang-si 254-10, Korea
[5]Legume Bio-Resource Center of Green Manure (LBRCGM), Kongju National University, Yesan 340-702, Korea
(Received November 22, 2011/Revised November 29, 2011/Accepted December 5, 2011)

ABSTRACT - This study was designed to evaluate a repeated oral dose toxicity and immunomodulating activity of *Pulsatilla koreana* and *Artemisiae annuae* in Sprague-Dawley rats. The female rats were treated with *Pulsatilla koreana* and *Artemisiae annuae* of control group, low group (0.5 ml/kg), medium group (1 ml/kg), high group (2 ml/kg) for distilled water, intragastrically for 4 weeks, respectively. To ensure the safety of *Pulsatilla koreana* and *Artemisiae annuae* such as the following were observed and tested. We examined the body weight, the feed intake, the clinical signs, the ophthalmological test, the hematological and the serum biochemical analysis. We also observed the histopathological changes of liver and kidney in rats. Hematological results were the increase of neutrophils, lymphocytes and monocytes in the high dose group of *Pulsatilla koreana*. The increase immune cells in the high dose group of *Pulsatilla koreana* might immunomodulating activity. No significant differences in body weight, feed intake, serum biochemical analysis and histopathological between control and fed group were found. In conclusion, *Pulsatilla koreana* and *Artemisiae annuae* is physiologically safe and improve immunomodulating activity.

Key words : *Pulsatilla koreana*, *Artemisiae annuae*, Toxicity

서 론

WTO/FTA 체결이 이루어짐에 따라서 축산식품의 수입 개방화에 대응하고 웰빙 시대 소비자들의 건강지향성 먹을거리에 대한 관심이 높아지면서 친환경유기농업이 시작되고 있다. 친환경유기농업은 특히 자연 순환 유기농업의 목표로서 생태적 유기적 순환시스템으로 전환되어야 하며, 유기축산을 실현하기 위하여 유기사료를 충족할 수 있는 사육시스템이 요구된다. 현대식 공장집약형 축산에서 가축의 높은 질병감염 위험성과 면역력 저하로 인한 생산성 저하는 가장 큰 문제점으로 지적되고 있으며 유기축산에 의해 생산된 축산식품의 품질향상에 대한 새로운 방법을 모색할 필요가 있다[1)].

유기축산으로 전환 시 현재가축사료 첨가제로서 사용하는 항생제는 페니실린을 발견한 이래 동물과 인류의 감염치료를 위한 의약품으로 지대한 공헌을 하였고, 축산분야에서도 가축의 생산성 향상과 질병 치료에 널리 사용되고 있다. 하지만 최근까지 과도한 항생제의 오·남용에 의하여 항생제 내성 세균의 증가[2)], 치료 약제의 효력 감소, 의

*Correspondence to: Ji-Youn Jung. Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan Chungnam 340-702, Korea
Tel: 82-41-330-1526, Fax: 82-41-330-1529
E-mail: wangza@kongju.ac.kr

료비 증가 등 항생제 사용에 따른 부작용이 주요한 사회적 이슈로 대두되면서 전 세계적으로 항생제에 대한 사용규제가 일반화되고 있는 추세이다[3]. 이에 따라 현재 가축 사료 첨가제로서 사용하는 백신, 항생제를 비롯한 화학적인 물질을 금지하고[4], 석회석 등의 자연산 보조사료 및 천연식물로부터 추출된 물질을 사용할 것을 규정하고 있어 이제 대한 유기축산 사료원료의 마련이 시급한 실정이다[5].

그리고 최근 국내외적으로 천연물을 이용한 식품이나 의약품 개발에 관한 관심이 증가되고 있으며, 많은 한약재들이 한약제제의 원료로서 뿐만 아니라 건강기능성 식품의 재료나 일반인들에게 민간요법용으로 사용되어 왔으나, 이의 효능에 대한 과학적 근거를 명확히 제시하지 못하여 상대적으로 그 활용도가 낮았다. 최근 건강의 증진과 질병을 예방할 수 있는 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[6-8]. 그러나 일부 한약재들은 잠재적 독성을 가지고 있어 장기간 복용할 경우 동물, 사람 건강에 치명적인 영향을 초래할 수 있다[9]. 따라서 한방제제가 의약품 또는 건강식품으로서 기능을 수행하기 위해서 독성에 관한 체계적인 연구가 필수적이다.

국화과는 세계적으로 가장 많이 분포하고 있는 식물 중의 하나이고 본 연구에 사용한 시험 물질인 백두옹(白頭翁)은 미나리아제비과(ranunculaceae)에 속하는 다년생 초본인 할미꽃(*Pulsatilla koreana*)속 식물의 뿌리를 건조한 것으로[10,11], 할미꽃은 동아시아와 유럽지역에 약 30여 종이 자생하고 있으며 우리나라에는 가는잎할미꽃(*Pulsatilla cernula*), 분홍할미꽃(*P. davuraca*), 산할미꽃(*P. nivalis*) 등이 분포하고 있다. 할미꽃의 잎은 뿌리에서 뭉쳐서 나며, 새의 털처럼 깊게 갈라지는데 꽃은 적자색으로 4~5월에 피고, 흰색의 긴 털이 붙어 있다[12].

할미꽃은 아름다워 조경, 분식 등에 이용하고 뿌리는 hederagenin glucoside 화합물인 사포닌이 풍부해서 옛날부터 한방에서는 진통, 지혈, 소염, 건위, 익혈, 풍상, 산기, 수렴, 이질, 지사, 신경통 등에 약재로 사용할 뿐만 아니라 뿌리의 살충효과를 이용하여 구충제로도 이용하는 등 용도가 다양한 식물이다[13].

백두옹의 약리작용에 관한 연구로는 백두옹의 메탄올 추출물이 alloxan 투여에 의해 현저하게 증가하는 혈당량과 혈청 total cholesterol량을 정상치로 회복시켜 준다는 보고가 있고[14], 백두옹에 함유된 아네모닌이란 성분은 적은 양에서는 심장 박동의 진폭을 축소시키고, 많은 양에서는 심장을 정지시키는 작용이 있다고 밝혀있다[15]. 이에 따라 천연물질에 관한 많은 연구가 국내외에서 진행되고 있으며 최근에는 약리성분이 풍부하고 항미생물성, 항산화성을 함유하고 있는 한약재를 육제품 생산 시 이용하려는 연구가 진행되고 있다[16]. 하지만 백두옹에 대해서는 독이 없다고 하는 본초 서적도 있으나[17], 약간의 독이 있다고 하는 서적도 있어서[18], 백두옹의 독성에 관하여 언급하고 있다. 또한 일부 서적에서는 부작용이 있으므로 쓰는 양에 주의해야 한다고 기재하고 있다[19]. 문헌에 의하면 신선한 백두옹을 추출한 물은 protoanemonin을 함유하고 있어서 피부 점막에 강렬한 자극작용이 있고 내복하여도 또한 중독을 일으킬 수 있으므로 사용상 주의해야 된다[18].

청호는 국화과 Artemisia속으로 allelopathy효과를 나타내거나 다수의 terpenoid allelochemicals를 생산해 내는 것으로 알려져 있으며[20], 쑥속(Artemisia L.) 식물은 국화과에 속하는 북방계 식물로서 북아시아를 중심으로, 북반구의 극지방, 남반구의 열대 및 아열대, 더운 사막까지 광범위하고 다양한 환경적 조건에서 분포하고 있다[21]. 또한 한국에서는 쑥속 식물들이 애엽, 인진, 유기노, 암려 등의 생약명으로 불리며, 쑥뜸, 쑥찜질, 항비만, 항동맥경화, 혈당개선, 간기능 개선 등 오랫동안 민간의약 및 한의약재로 이용해 왔다[22].

그 중 개똥쑥은 국화과(Compositae) 쑥속(Artemisia)에 속하는 한해살이풀로서 전체에 털이 없고 특수한 냄새를 풍기며[23], 청호(菁蒿), 황화호(黃花蒿) 등의 생약명으로 불러 오고 있다[24]. 한방에서는 전체를 건위제로 사용하고 황무지에 나며, 한국・일본・타이완・중국・인도・시베리아・서부 아시아・동부 유럽에 분포한다. 세계보건기구로부터 한약재로 지정돼 있으며 말라리아 치료제로도 주목받고 있으며[9], 해열, 이담, 악창 등의 질병을 다스려 왔다[25]. 오늘날에는 유방의 암세포를 선택적으로 괴사시키는 항암효능 등이 입증됨으로써 국내뿐만 아니라 세계적으로 주목 받고 있는 생약제로 평가 받고 있다[26]. 주요성분으로는 arteannuin, arteanuin B, scopoletin, coumarin, eupatin 등의 성분이 함유되어 있고, 이러한 성분들이 항암, 항균작용과 관계가 깊어 이들의 화학적 구조를 밝혀내는 연구가 수반되었으며[27], 주요성분을 대량 생산하기 위한 조직배양 및 유전자 형질전환 연구까지도 수행되어 왔다[28]. 따라서 청호는 강력한 항암, 항균 효과 등을 지닌 천연 물질로서 항생제 사용 금지에 대한 대체제로서의 사용 가능성과 동물의 건강 증진을 꽤하여 생산성을 높임과 동시에 고품질의 축산 식품 생산에 기여할 것으로 생각 된다[29].

이에 본 실험에서는 백두옹과 청호를 사료첨가제로서 활용하기 위한 기초자료를 얻는데 있으며, 이를 위하여 백두옹과 청호를 사용하여 랫드의 여러 장기에 미치는 영향에 대하여 확인하였다. 백두옹과 청호를 각각 투여한 랫드의 몸무게, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈청생화학적 검사 및 조직학적 검사를 통해 백두옹과 청호의 독성유무를 판단하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

시험물질

(주)신일바이오젠에서 제공한 백두옹과 청호를 시험에

사용하였다.

실험동물

실험동물로는 8주령의 Sprague Dawley계통의 암컷 랫드 40마리를 (주)오리엔트바이오(Seong Nam, Gyeong gido, Korea)에서 구입하여 공주대학교 특수동물학과 실험 동물실에서 약 1주간 순화시키면서 일반증상을 관찰하여 건강한 동물 20마리를 실험에 사용하였다. 실험기간 중 사육실 환경조건은 실내온도 25 ± 5℃, 상대습도 40 ± 10%, 환기횟수 10~12회/hr, 조명시간 12시간(08:00 점등, 20:00 소등), 조도는 150~200Lux로 유지하였다. 랫드는 폴리카보네이트제 케이지에서 케이지당 5두씩 사육하였다. 동물의 개체식별은 문신법을 사용하였으며, tag 표시법에 의해서 사육상자를 구분하였다. 사육 상자는 시험기간, 시험명, 시험책임자명을 기재한 label을 첨부하였다. 모든 실험동물은 실험동물용 고형사료(Samtako. Co)와 음수를 자유 급여하였다. 동물실험은 공주대학교 동물실험윤리위원회의 사전 심의를 받아 동물실험윤리위원회규정에 따라 수행 되었다.

시험군의 구성, 투여용량 및 용량

시험 군의 구성은 대조군(distilled water), 저용량군(0.5 mL/kg), 중간용량군(1 mL/kg), 고용량군(2 mL/kg)으로 분류하였다.

시험물질의 제조는 대조군은 용매제인 D.W를 사용하였고, 저용량군은 백두옹과 청호를 0.5 mL/kg 투여하였다. 중간용량군은 백두옹과 청호를 1 mL/kg 투여하였으며, 고용량군은 백두옹과 청호를 2 mL/kg 투여하였다.

시험물질의 제조는 항상 새롭게 시험물질을 제조하여 투여하였다. 투여는 주 5회(월~금) 일정한 시간에(15:00) 경구투여 하였다.

관찰 및 검사항목

일반증상 관찰

모든 실험동물에 대하여 시험기간 중 1일 1회 실시하였고, 일반 임상증상 항목으로서 anorexia, salivation, diarrhea, vomiting, polyuria, anuria, fecal change의 정도를 기록하였다.

체중측정

모든 동물에 대하여 시험개시일로부터 시험종료일 까지 매주 1회 측정하였다.

사료섭취량 및 음수량 측정

사육상자별로 당일 급여 및 급수총량과 익일 잔량의 차를 시험개시 후 매주 1회 측정하여 일일 사료섭취량 및 음수섭취량으로 하였다.

안과학적 검사

랫드에서 투여기간 중 각 군당 5마리씩의 동물에 대하여 육안 및 검안경을 이용한 안과학적 검사를 실시하였다.

혈액학적 및 혈청생화학적 검사

부검 전에 모든 실험동물에 대하여 채혈을 실시하였다. 일반 혈액학적 검사는 혈액자동분석기(Hemavet 850Fs, CDC tech, USA)를 이용하여 백혈구(WBC), 호중구(neutrophil), 임파구(lymphocyte), monocyte, 호산구(eosinophil), 호염구(basophil), 적혈구(RBC), 헤모글로빈(hemoglobin), hematocrit, MCV, MCH, MCHC, RDW, platelet, MPV수를 측정하였으며, 혈청 생화학적 검사는 채취한 혈액의 일부를 실온에 30분간 방치하여 응고 후 원심분리(3,000rpm, 30min)하여 얻은 혈청에 대해서 혈청자동분석기(BS-400, MINDRAY, China)를 이용하여 총단백(total protein), 총 빌리루빈(total bilirubin), 혈당(blood glucose), 혈액뇨소질소(BUN), creatinine, aspartate transaminase(AST), alanine transaminase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), 총 콜레스테롤(total cholesterol)을 측정하였다. 전해질자동분석장치(EAE electrolyres, Medica, USA)를 이용하여 sodium(Na^+), potassium(K^+), chloride(Cl^-)를 측정하였다. 혈액학적 및 혈청 생화학적 검사는 ㈜네오딘벳랩에 의뢰하여 측정하였다.

장기중량 및 크기측정

모든 실험동물에 대하여 간, 신장(좌·우), 폐, 비장, 심장, 부신(좌·우), 난소(좌·우) 등의 체중에 대한 상대장기 중량 및 크기를 측정하였다.

병리조직검사

랫드는 diethyl ether로 마취한 다음 복대동맥으로부터 충분한 방혈을 시켰다. 장기중량 측정이 끝난 모든 장기를 10% 중성 포르말린액에 고정시켰고 2주간 충분한 고정을 거친 모든 장기조직은 파라핀 포매기(Shandon Inc, USA)에 포매하여 마이크로톰(Shadon Inc, USA)으로 5 μm절편을 만들어 hematoxylin & Eosin 염색을 하여 광학현미경(× 200)으로 관찰하였다.

통계학적 방법

4주간 반복 투여시험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 등분산 검정 후 one-way ANOVA에서 유의한 F값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 각 투여군 사이에 유의수준 $p < 0.05$로 Dunnett's t-test를 이용하여 비교하였다. 또한, 병리조직학적으로 관찰된 병변의 발생빈도는 χ^2(Chi-square)검정을 하였다.

결과 및 고찰

임상증상

암컷 랫드에서의 반복 투여독성시험에서 저용량군, 중간용량군, 고용량군 및 대조군 투여에서 시험물질 투여로 인한 임상증상은 관찰되지 않았다(data not shown).

체중변화

4주간의 시험기간 동안 대조군을 포함한 모든 투여군에서 별다른 특이한 임상증상이 관찰되지 않았으며 실험도중 폐사한 개체도 없었다(Fig. 1).

사료 및 음수섭취량 변화

전 시험기간을 통해 동물 당 일일 사료 및 음수섭취량은 대조군 및 시험물질 투여군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 시험기간 중 백두옹 대조군, 저용량군, 중간용량군, 고용량군의 동물 당 평균 일일 사료 섭취량은 15.62 ± 0.64, 15.08 ± 0.32, 15.83 ± 0.68, 14.31 ± 0.87(g)이었다. 청호 대조군, 저용량군, 중간용량군, 고용량군의 동물 당 평균 일일 사료섭취량은 14.5 ± 0.21, 14.2 ± 0.11, 14.6 ± 0.31, 14.9 ± 0.40(g)이었다(data not shown).

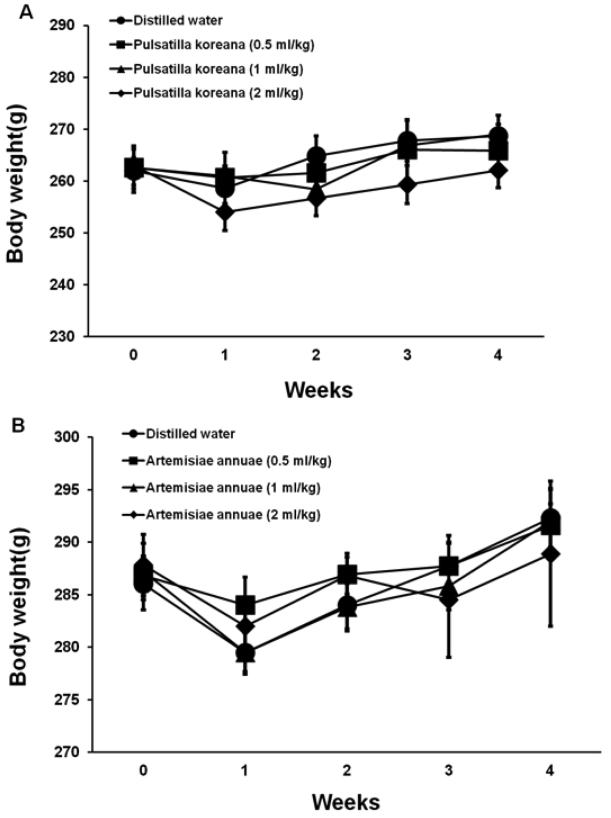

Fig. 1. Body weight in rats treated orally with *Pulsatilla koreana* and *Artemisiae annuae* for 4 weeks. (A) *Pulsatilla koreana* (B) *Artemisiae annuae.*

안과학적 검사소견

랫드의 대조군 및 투여군 모두에서 유의할만한 이상을 나타내지 않았다(data not shown).

혈액학적 검사소견

부검시의 혈액학적 검사에 있어서 투여군은 대조군에 비하여 유의성 있는 변화를 나타냈다. 백두옹 저용량군에서는 BA, MCHC, RDW에서 중간용량군에서는 NEU, LYM, MONO, RBC, HCT, RDW, PLT에서 유의적인 차이를 보였으며, 고용량군에서는 NEU, LYM, MONO, BA, MCHC, PLT에서 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이를 보였다. 청호 저용량군에서는 WBC, EO, BA, RBC, Hb, HCT, MCV, MCH, MCHC에서 중간용량군에서는 MCV, MCH, RDW, PLT에서 유의적인 차이를 보였으며, 고용량군에서는 Hb, PLT에서 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이를 보였다.

그 중 백두옹 시험물질 투여 군에서 NEU, MONO, LYM가 농도 의존적으로 유의적인 상승한 것으로 보아 고용량군에서 면역 활성이 유발된 것으로 사료된다. 일부 몇몇 혈액학적인 수치에서 유의차가 인정되었으나, 모두 정상범위 내에서의 변화이며 용량의존성을 보이지 않았으므로 시험물질에 기인된 변화는 아닌 것으로 사료된다(Table 1).

혈청 생화학적 검사소견

부검시의 혈청생화학적 검사에 있어서 투여군은 대조군에 비하여 유의성 있는 변화를 나타냈다. 백두옹 저용량군에서는 Glucose, Cholesterol, BUN, Cl에서 유의적인 차이를 보였으며, 중간용량에서는 ALT, BUN, K, Cl에서 유의적인 차이를 보였다. 고용량군에서는 T-protein, Glucose, Cholesterol, BUN, Creatinine, Cl에서 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이를 보였다. 청호 저용량군에서는 BUN, ALP에서 유의적인 차이를 보였으며, 중간용량군에서는 T-Protein, glucose, BUN, CRE, ALP에서 유의적인 차이를 보였다. 고용량군에서는 T-Protein, glucose, BUN, CRE, ALP, NA에서 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이를 보였다.

일부 혈청 생화학적인 수치에서 유의차가 인정되었으며 T-protein의 증가는 간세포의 손상이나 자가 면역성 질환을 의심할 수 있으며 Cholesterol의 증가는 고지혈증, 고혈압, 당뇨병, 간기능장애, 갑상선기능장애 유발이 의심되며 BUN, Creatinine의 증가는 신부전증, 신장염, 위장관출혈 유발되나 대조군과 비교시 수치에 유의적인 변화가 관찰되었으나 그 수치가 정상범위 안에 들어가기 때문에 이상이 없다고 사료된다(Table 2).

체중에 대한 각 장기의 상대중량비

시험종료 후 부검하여 모든 생존동물의 장기를 육안 검사한 결과 모든 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 이상

Table 1. Hematologinal values of rats treated orally with *Pulsatilla koreana* and *Artemisiae annuae* for 4 weeks

Parameter	*Pulsatilla koreana*				*Artemisiae annuae*			
Group Dose	Control 0 mL/kg	Low 0.5 mL/kg	Medium 1 mL/kg	High 2 mL/kg	Control 0 mL/kg	Low 0.5 mL/kg	Medium 1 mL/kg	High 2 mL/kg
WBC(K/uL)	6.23 ± 1.56	7.29 ± 1.78	4.00 ± 0.78	6.70 ± 1.58	7.97 ± 1.02	5.73 ± 0.93*	6.39 ± 0.87	7.38 ± 0.36
NEU(K/uL)	5.88 ± 0.52	6.77 ± 0.79	8.10 ± 0.54*	10.78 ± 2.47*	6.93 ± 1.72	7.59 ± 1.52	5.33 ± 0.21	8.16 ± 0.93
LYM(K/uL)	89.39 ± 0.92	87.49 ± 1.12	86.56 ± 0.52*	81.99 ± 3.29*	87.13 ± 1.86	82.66 ± 3.18	88.63 ± 0.54	85.38 ± 1.57
MONO(K/uL)	3.75 ± 0.35	4.25 ± 0.44	4.34 ± 0.20*	5.86 ± 1.13*	4.23 ± 0.45	5.47 ± 0.85	4.17 ± 0.36	4.99 ± 0.53
EOS(K/uL)	0.53 ± 0.28	0.84 ± 0.22	0.40 ± 0.14	0.47 ± 0.18	1.14 ± 0.59	3.48 ± 1.28*	1.32 ± 0.43	0.90 ± 0.48
BA(K/uL)	0.46 ± 0.04	0.65 ± 0.10*	0.61 ± 0.11	0.90 ± 0.18*	0.57 ± 0.08	0.79 ± 0.09*	0.55 ± 0.07	0.61 ± 0.06
RBC(M/uL)	6.16 ± 0.30	6.36 ± 0.32	6.76 ± 0.14*	6.37 ± 0.07	5.54 ± 0.35	6.33 ± 0.14*	5.94 ± 0.49	5.83 ± 0.60
Hb(g/dL)	12.22 ± 0.60	12.74 ± 0.21	13.08 ± 0.19	12.58 ± 0.24	11.80 ± 0.46	12.60 ± 0.23*	11.76 ± 0.97	13.70 ± 1.24*
HCT(%)	36.47 ± 1.77	39.06 ± 1.15	39.00 ± 0.69*	38.94 ± 1.13	35.40 ± 1.52	38.32 ± 0.81*	35.56 ± 3.32	36.12 ± 4.12
MCV(fL)	59.20 ± 1.01	61.82 ± 1.92	57.70 ± 0.41	61.18 ± 2.04	64.26 ± 1.88	60.54 ± 0.59*	59.66 ± 0.93*	61.60 ± 1.47
MCH(pg)	19.86 ± 0.34	20.20 ± 0.84	19.38 ± 0.18	23.76 ± 3.90	21.50 ± 0.64	19.52 ± 0.48*	19.84 ± 0.10*	26.14 ± 6.65
MCHC(g/dL)	33.50 ± 0.14	32.64 ± 0.47*	33.58 ± 0.34	32.38 ± 0.61*	33.40 ± 0.35	32.90 ± 0.11	33.28 ± 0.60	43.04 ± 11.72
RDW(%)	15.66 ± 0.15	15.12 ± 0.24*	16.00 ± 0.15*	15.22 ± 0.46	14.54 ± 0.26	14.98 ± 0.29	15.42 ± 0.19*	14.34 ± 0.52
PLT(K/uL)	454.40 ± 150.19	632.20 ± 160.34	792.00 ± 40.12*	837.00 ± 155.03*	334.60 ± 121.64	536.40 ± 134.29	650.40 ± 156.60*	674.40 ± 157.82*
MPV(fL)	8.46 ± 0.87	7.67 ± 0.31	7.50 ± 0.21	7.29 ± 0.21*	8.32 ± 0.44	7.56 ± 0.52	8.31 ± 0.92	7.65 ± 0.35

WBC : white blood cell count, RBC : red blood cell count, HGB : hemoglobin, HCT : hematocrit, MCV : mean corpuscular volume, MCH : mean corpuscular hemoglobin, MCHC : mean corpuscular hemoglonin concentration, PLT : Platelet, NEU : neutrophil, LYM : lymphocyte, MONO : monocyte, EOS : eosinophile.
Values are presented as mean ± standard deviation (SD). Statistically significant from control (*P < 0.05)

Table 2. Serum biochemical values of rats treated orally with *Pulsatilla koreana* and *Artemisiae annuae* for 4 weeks

Parameter	*Pulsatilla koreana*				*Artemisiae annuae*			
Group Dose	Control 0 mL/kg	Low 0.5 mL/kg	Medium 1 mL/kg	High 2 mL/kg	Control 0 mL/kg	Low 0.5 mL/kg	Medium 1 mL/kg	High 2 mL/kg
T-protein(g/dL)	5.26 ± 0.07	5.16 ± 0.13	5.23 ± 0.23	5.72 ± 0.23*	5.94 ± 0.25	5.64 ± 0.37	5.28 ± 0.26*	4.86 ± 0.34*
T-bilirubin(mg/dL)	0.06 ± 0.04	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.04 ± 0.02
Glucose(mg/dL)	116.40 ± 5.15	131.80 ± 5.45*	112.75 ± 6.84	126.80 ± 3.87*	150.00 ± 8.32	136.20 ± 5.89	133.80 ± 4.04*	119.80 ± 6.97*
AST(IU/L)	76.40 ± 6.47	71.80 ± 9.61	70.25 ± 2.29	74.80 ± 4.79	72.80 ± 10.44	78.20 ± 5.47	67.80 ± 13.90	86.80 ± 8.24
ALT(IU/L)	28.60 ± 1.08	26.40 ± 1.89	25.50 ± 1.94*	27.40 ± 1.69	42.20 ± 8.74	33.80 ± 3.84	34.20 ± 4.75	31.00 ± 3.48
ALP(IU/L)	44.80 ± 0.73	43.00 ± 2.12	45.25 ± 3.47	45.20 ± 2.18	60.80 ± 6.54	47.20 ± 4.08*	40.20 ± 2.56*	41.80 ± 2.96*
Cholesterol(mg/dL)	66.80 ± 3.58	82.80 ± 4.40*	66.25 ± 4.50	84.20 ± 7.12*	68.20 ± 5.30	73.20 ± 5.68	76.60 ± 7.65	62.60 ± 6.92
BUN(mg/dL)	12.26 ± 0.32	13.84 ± 0.51*	13.88 ± 0.38*	15.18 ± 0.83*	15.96 ± 1.24	11.24 ± 1.10*	11.18 ± 0.43*	10.16 ± 1.06*
Creatinine(mg/dL)	0.40 ± 0.00	0.40 ± 0.00	0.40 ± 0.00	0.44 ± 0.02*	0.46 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.40 ± 0.00*	0.40 ± 0.00*
Na(mEq/L)	143.94 ± 2.15	140.60 ± 1.75	144.90 ± 1.34	139.82 ± 0.78*	144.56 ± 1.84	144.26 ± 1.69	142.16 ± 2.20	140.88 ± 0.99*
K(mEq/L)	4.26 ± 0.12	4.06 ± 0.17	3.97 ± 0.16*	4.09 ± 0.18	3.99 ± 0.24	4.13 ± 0.13	4.02 ± 0.08	4.32 ± 0.19
Cl(mEq/L)	103.40 ± 0.82	101.82 ± 0.57*	101.20 ± 0.74*	100.80 ± 0.39*	104.36 ± 1.49	103.24 ± 1.11	103.38 ± 0.67	101.94 ± 0.76*

ALT : alanine transaminase, AST : aspartate transaminase, ALP : alkaline phosphatase, T-protein : total protein, BUN : blood urea nitrogen.
Values are presented as mean ± standard deviation (SD). Statistically significant from control (*P < 0.01)

Table 3. Relative organ weights(%) of female rats orally administered with *Pulsatilla koreana* and *Artemisiae annuae* for 4 weeks

Organs(%)	Group	Pulsatilla koreana				Artemisiae annuae			
	Dose	Control 0 mL/kg	Low 0.5 mL/kg	Medium 1 mL/kg	High 2 mL/kg	Control 0 mL/kg	Low 0.5 mL/kg	Medium 1 mL/kg	High 2 mL/kg
Body weight		269.60 ± 3.97	267.00 ± 4.21	269.75 ± 3.40	262.40 ± 3.08	296.40 ± 2.94	294.20 ± 2.42	297.20 ± 3.58	305.00 ± 9.50
Liver		3.02 ± 0.05	2.96 ± 0.08	2.95 ± 0.05	3.04 ± 0.03	3.15 ± 0.08	2.88 ± 0.07*	3.07 ± 0.11	3.08 ± 0.07
Spleen		0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.15 ± 0.01*	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01
Heart		0.30 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.01*	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.01
Lung		0.36 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.30 ± 0.01*	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.03
Ovary	R	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
	L	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Adrenal gland	R	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
	L	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Kidney	R	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.00	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.26 ± 0.00	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.01
	L	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.00*	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.26 ± 0.00	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01

Values are presented as mean ± standard deviation (SD).

소견은 관찰되지 않았다(Table 3).

상대장기중량비에 있어서 투여군과 대조군을 비하여 일부 장기에서 유의성 있는 차이를 나타냈다. 백두옹 저용량군에서는 Kidney(L) 중간용량군에서는 Heart에서 유의적인 차이를 보였으며 청호 저용량군에서는 Liver, Spleen, Lung에서 유의적인 차이를 보였으나 용량의존성을 보이지 않았으므로 시험물질에 기인된 변화는 아닌 것으로 사료된다.

병리조직검사 소견

랫드의 4주 반복 투여독성시험에서 시험물질투여로 인지되는 특이할만한 조직병리학적인 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

시험결과에 있어서 모든 투여군 및 대조군에서 특이할만한 임상증상과 체중변화 그리고 사료섭취량은 관찰되지 않았으며, 폐사 및 빈사 동물은 시험 전 기간을 통하여 관찰되지 않았다. 또한 안검사에서도 랫드의 대조군 및 투여군 모두에서 유의할만한 이상을 나타내지 않았다.

혈액학적 및 혈청 생화학적 검사에서는 대조군과 대조하였을 때 유의적인 차이를 발견하였다. 혈액학적 검사에 있어서 백두옹 고용량군의 NEU, LYM, MONO은 면역 세포로 면역 활성이 유발될 때 증가하므로 백두옹 투여군에서 면역 활성이 유발되었다. 혈청 생화학적 검사에서는 대조군과 비교시 유의적인 변화가 관찰되었지만 그 수치가 정상범위 안에 포함되기 때문에 이상을 나타내지 않았다.

체중에 대한 상대장기중량과 병리조직학적 소견이 시험 전 기간을 통하여 투여군과 대조군 모두에서 시험물질에 의한 변화라고 인지되는 어떠한 변화도 관찰되지 않았다.

따라서, 랫드를 이용한 백두옹과 청호의 반복 투여독성시험 결과 전군에서 특이할만한 독성을 나타내지 않았으며 백두옹 고용량군에서 면역 활성이 유발된다고 사료된다.

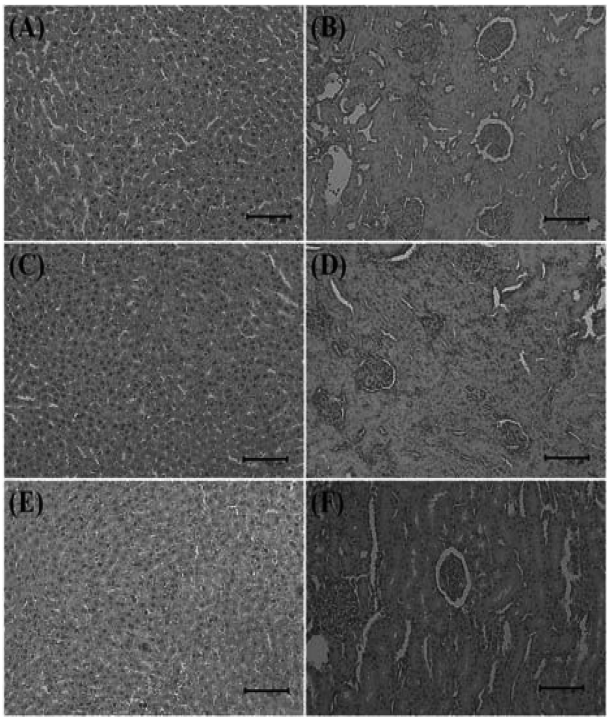

Fig. 2. Histological observation of rats treated orally with *Pulsatilla koreana* and *Artemisiae annuae* for 4 weeks. (A) : Liver (Control) (B) : Kidney (Control) (C) : Liver (*Pulsatilla koreana*, 2 ml/kg) (D) : Kidney (*Pulsatilla koreana*, 2 ml/kg) (E) : Liver (*Artemisiae annuae*, 2 ml/kg) (F) : Kidney (*Artemisiae annuae*, 2 ml/kg).

요 약

본 연구는 Sprague-Dawley 계통의 암컷 랫드에서 백두옹과 청호를 반복경구투여 독성평가와 면역 활성을 평가하기 위해서 시행하였다. 랫드에 처치한 물질은 백두옹과 청호를 0.5 ml/kg, 1 ml/kg, 2 ml/kg를 D.W에 용해시켜 4주 동안 경구투여를 하였다. 백두옹과 청호의 안전성을 확인

하기 위해 다음과 같은 관찰 및 검사를 하였다. 검사항목으로는 체중과 사료 섭취량, 임상증상, 안과학적 검사, 혈액학적 검사, 혈청생화학적 검사를 관찰하였다. 또한 랫드에 간과 신장에서의 병리조직학적 변화를 관찰하였다. 백두옹 고용량군의 혈액학적 검사에서 호중구, 림프구, 단핵구의 증가가 관찰되었다. 이러한 증가는 면역세포의 증가로 백두옹 고용량군은 면역 활성이 일어났다고 사료된다. 체중, 사료섭취량, 혈청생화학적 검사, 병리조직학적 변화는 대조군과 비교시 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 따라서 백두옹과 청호는 생리대사에 무해하며 면역 활성이 증가된 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년 지역산업기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구(2011-0514)이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 유덕기 : 유기축산을 위한 농장동물복지의 과제와 평가, 한국유기농업학회지, **15**, 237-256 (2007).
2. Kemp G and J Kiser : Microbial resistance and public health aspects of use of medicated feeds. *J. Anim. Sci,* **31**, 1107-1109 (1970).
3. 이철호. 조익환. 손중천. 이성훈 : 사료내 유기산제 및 항생제의 혼합첨가가 육성 돈의 성장과 혈액성상에 미치는 영향, 한국유기농업학회지, **17**, 237-251 (2009).
4. Ahn J, Grun IU and Mustapha A : Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiol*, **24**, 7-14 (2007).
5. Torras MA, Faura CA, Schonlau F and Rohdewald P : Antimicrobial activity of pycnogenol. *Phytother Res*, **19,** 647-648 (2005).
6. Flood MT, Kondo M : Toxicity evaluation of a beta-galactosidase preparation produced by Penicillium multicolor. Regul. *Toxicol. Pharmacol*. **40**, 281-292 (2004).
7. Flood MT, Kondo M : Safety evaluation of lipase produced from Rhizopus oryzae: summary of toxicological data. Regul. *Toxicol. Pharmacol*. **37**, 293-304 (2003).
8. Wolf BW, Weisbrode SE : Safety evaluation of an extract from Salacia oblonga. *Food Chem. Toxicol*. **41**, 897-974 (2003).
9. Mei N, Arlt VM, Phillips DH, Heflich RH, Chen T : DNA adduxt formation and mutation induction by aristolochic acid in rat kidney and liver. *Mutat. Res*. **602**, 83-91 (2006).
10. 김재길 : 원색 천연약물대사전. 남산당, 서울, 70 (1984).
11. 김재길 : 동양 전통약물 원색도감. 영림사, 서울, 61 (1995).
12. Park GH, Moon JH, MA SJ, Lee YH : Natural Products Organic Chemistry: Isolation and Characterization of 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic Acid and 3,4-Dihydroxycinnamic Acid with Antimicrobial Activity from Root of Pulsatilla koreana, Agricultural Chemistry and Biotechnology, **41**, 191-196 (1996).
13. Ye WC, BX Ou, NN Ji, SX Zaho, T Ye, MA Mckervey, P Stevenson : Patensin, a saponin from Pulsatilla patens var. multifida. *Phytochemistry*, **39**, 937-939 (1995).
14. Kim JG, So EH, Lim SB, Jeong JH : The Effects of Pulsatilla koreana for Anti -Inflammatory and Cellular Activity of Periodontal Tissue. *Korean Journal Phamarcogn*, **31**, 149-167 (2000).
15. Yook CS : Coloured Medicinal Plants of Korea, Academic Publishing Co. Seoul, Korea, (1989).
16. Sofos JN, Beuchat LR, Davison PM, Johnson EA : Naturally occuring antimicrobials in foods. *Toxicol. Pharmacol*, **28**, 71-76 (1998).
17. 서부일, 정국영 : 알기 쉬운 본초학. 대구한의대학교 출판부, 대구, 103 (2007).
18. 楊倉良 : 毒藥本草. 北京 : 中國中醫出版社, 343-346 (1993).
19. 최옥자 : 약초의 성분과 이용. 일월서각, 서울. 238-239 (1991).
20. Marco JA and O Babera : Natural products from the genus artemisia. stud. *Nat. Prod. Chem*. **7**, 201-264 (1990).
21. Lodari C, Hattori K and Futsuhara Y : Morphological difference on leaf surface and pollen grains in genus Artemisia. *Japanese Journal of Breeding*, **39**, 9-14 (1989).
22. Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Ryu J, Kim DH and Eun JS : Antioxidant and antimicrobial activities of Artemisia capillaris Thunberg. Korean Journal of Medicinal Crop Science, **16**, 112-117 (2008).
23. 이기철, 권영한, 김명수, 박수현, 이지숙 : 개똥쑥 종자의 저장 특성. 한국자원 식물학회 학술심포지엄, **10**, 28-28 (2010).
24. Sung JS, Lee JH, Lee JW, Bang KH, Yeo JH, Park CG, Park HK, Seong NS and Moon SH : Phylogenetic analysis of Artemisia spp. by morphological characteristics of reproductive organs in Korea. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **16**, 218-224 (2008).
25. Dhingra V, Rao V and Narasu L : Current state of artemisin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Science*, **66,** 279-300 (2000).
26. Singh N and Lai H : Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferin toward human breast cancer cells. *Life Science*, **70**, 49-56 (2001).
27. Schmid G and Hofheinz W : Total synthesis of qinghaosu. *Journal of the American Chemical Society*, **105**, 624-625 (1983).
28. Paniego NB and Giuletti AM : Artemisia annua L.: Dedifferentiated and differentiated cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **36,** 163-168 (1994).
29. 홍병주, 오진석, 김병완, 박병성 : 유기축산 사료첨가제로서 소나무껍질 추출물 피타민의 산란계에 대한 급여효과. 한국유기농업학회지, **2**, 205-218 (2008).