

## 복분자 추출물의 Sprague-Dawley rat를 이용한 단회 경구 투여 독성시험

이주영<sup>#</sup>, 지건영, 송광훈<sup>\*</sup>

한국한의학연구원

### Single Oral Dose Toxicity Study of Black Raspberry Extract in Sprague-Dawley Rats

Joo Young Lee<sup>#</sup>, Kon-Young Ji, Kwang Hoon Song<sup>\*</sup>

Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon, 34054, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objective** : This study was performed to evaluate the toxicity after a single oral administration of black raspberry extract to male and female Sprague-Dawley (SD) rats and to determine the approximate lethal dose (ALD).

**Methods** : We previously showed that the black raspberry extract repressed the simvastatin-mediated expression of Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and improved Low-Density Lipoprotein cholesterol (LDL-C) uptake by hepatocytes through the induction of the Low-Density Lipoprotein Receptor expression in hepatocytes. The groups consisted of black raspberry extract groups, as an oral dose of 2,000 mg/kg and a control group. 5 weeks SD rats were randomly assigned to 4 groups of 5 rats. Each male and female SD rats were administered orally once. For 14 days after the administration, mortality, clinical signs, changes in body weight, and necropsy findings were observed according to the "Standard for Toxicity Study of Pharmaceuticals" of Korea Food and Drug Administration (KFDA) guideline and "Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure" of OECD Test Guideline.

**Results** : There were no cases of mortality in the group administered with 2,000 mg/kg of male and female, and no abnormalities in body weight change and clinical signs. Also, no gross abnormalities were observed at the autopsy.

**Conclusions** : As a result of a single oral administration of the black raspberry extract to SD rats, the ALD was determined to exceed 2,000 mg/kg for both male and female SD rats.

**Key words** : Black raspberry, *Rubus coreanus* Miquel, Single oral dose toxicity

## I. 서 론

의학기술과 생활수준의 발달로 세계적으로 평균 수명이 증가하고 고령화 사회에 진입하면서 단순히 오래 사는 것뿐만 아니라 건강하게 오래 사는 것에 대한 관심이 증가하고 있다. 최근 건강 및 질병예방에 대한 관심이 높아지면서 면역력 증진,

항산화, 항노화에 관련된 과일, 채소, 그리고 건강 기능성 식품 등에 대한 수요가 증가하고 있다<sup>1,2)</sup>.

복분자(覆盆子)는 장미과(薔薇果)에 속한 낙엽관목(落葉灌木)인 복분자 딸기나무(*Rubus coreanus* Miquel)의 열매이다. 성(性)은 온(溫), 무독(無毒)하고, 미(味)는 감산(甘酸)하다. 간(肝), 신(腎)으로 귀경(歸經)한다. 한의학에서는 발기부전, 야뇨증, 빈뇨 등을 치료하는데 사용하였으며, 최근 연

\*Corresponding author : Kwang Hoon Song, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon, 34054, Republic of Korea

· Tel : +82-42-868-9390 · E-mail : ksong@kiom.re.kr

#First author : Joo Young Lee, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon, 34054, Republic of Korea

· Tel : +82-42-868-9614 · E-mail : jy0130@kiom.re.kr

· Received : 05 June 2020 · Revised : 17 July 2020 · Accepted : 25 July 2020

구에 따르면 triterpenoids, diterpenoids, flavonoids, 그리고 organic acids 등의 성분들을 함유하고 있으며 항산화, 항암, 항염증, 그리고 노화방지와 같은 약리작용이 있는 것으로 보고되었다<sup>3-5)</sup>. 또한 복분자 추출물은 간 건강과 항산화에 도움을 주는 것으로 건강기능식품 기능성 원료로 인정받았으나<sup>6)</sup> 현재 이에 대한 독성 연구는 미비하다.

본 연구에서는 고콜레스테롤혈증 실험모델에서 Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)의 발현을 억제하는 효능<sup>7)</sup>을 보인 복분자 추출물의 개발 연구를 진행하면서, 안전성에 대한 연구로 복분자 추출물의 단회 경구 투여 시 나타나는 독성을 평가하고자 식품의약품안전처에서 고시한 제 2014-136호<sup>8)</sup> 의약품 등의 독성시험기준에 근거하여 Sprague-Dawley 랫드에 복분자 추출물의 단회 경구 투여 독성시험을 GLP기관에서 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험기관

GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 실험의 전 과정을 진행하였다. 본 실험은 동물보호법 (제4379호, 제13023호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 150427).

### 2. 실험물질

본 실험에 사용한 복분자는 (주)내몸에당 (울산, 대한민국)에서 구매하였다. 증류수 3 L에 건조 복분자 300 g을 넣어 90 ~ 100°C에서 3시간 가열 추출하였으며, 얻은 추출물을 여과 후 농축, 동결 건조하였다. 최종적으로 얻어진 추출물의 수율은 13.18%였다.

### 3. 실험동물 및 사육환경

5주령의 Sprague-Dawley (SD)계 랫드 암수 각 12마리를 (주)오리엔트바이오 (성남, 대한민국)에서 구입하여 사용하였으며, 입수 시 수컷 체중은 119.3~133.9 g, 암컷 체중은 110.4 ~ 123.4 g이었다. 일주일의 순환기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하였으며 순환기간 종료일에 체중을 측정하고 이상이 없음을 확인하였다.

실험기간 중 사육 환경 조건은 실내온도 22 ± 3°C, 상대 습도 30 ~ 70%, 조명 시간 12시간/일 (오전 7시부터 오후 7시), 환기 횟수 10~15회/시간, 조도 150 ~ 300 Lux의 사육 환경을 유지하였고, 실험동물용 고품사료 (Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)와 물을 자유 섭취하도록 하였다.

### 4. 투여용량 및 시험군 구성

본 실험의 예비시험으로 실험동물 암컷, 수컷 각 1마리씩 복분자 추출물 2,000 mg/kg을 단회 경구 투여한 결과 사망례가 나타나지 않았다. 예비시험 결과에 따라 본 시험의 투여용량을 2,000 mg/kg으로 설정하였으며, 평균체중을 기준으로 군당 5마리씩, 암수 각 2군으로 군 분리하였다.

모든 동물은 투여 전에 약 16시간 이상 절식시키고, 투여 당일 체중을 기준으로 투여량을 산출하여 경구 투여하였다. 투여 후 약 4시간 지나 사료를 급여하였다.

### 5. 관찰 및 검사

#### 1) 일반증상

투여당일 (0일)에는 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6 시간째에 일반상태 (독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망 유무를 관찰하였다. 투여 후 1일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

#### 2) 체중측정

체중은 투여당일 (투여 전), 투여 후 1, 3, 7 및 14일 (부검일)에 측정하였다.

#### 3) 부검

관찰기간 종료 후, 모든 동물에 대해서 isoflurane으로 마취하여 복대동맥에서 방혈하여 안락사 시키고 부검하였으며 전신 장기·조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였다.

### 6. 통계처리

실험에서 얻어진 체중 결과는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., USA)를 사용하여 검정하였다. Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산인 경우 Student t-test를, 등분산이 기가되면 Aspin-Welch t-test를 실시하여 유의성을 확인하였다 (유의수준: 양측 0.5 및 0.01).

## III. 결 과

### 1. 일반증상 및 사망유무

투여 후 30분, 1, 2, 4, 6시간 그리고 1일부터 14일까지 암수 대조군 및 2,000 mg/kg 투여군에서 일반증상의 이상은 관찰되지 않았으며, 사망례 또한 관찰되지 않았다 (Table 1-3). 따라서 본 추출물의 최소 치사량은 암수 모두 2,000 mg/kg 이상으로 사료된다.

Table 1. Mortality in Male and Female Sprague-Dawley Rats after Single Oral Treatment of Black Raspberry Extracts.

Sex	Group/Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after dosing														Mortality	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G2 2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G2 2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Table 2. Time-dependent Clinical Signs in Male and Female Sprague-Dawley Rats after Single Oral Treatment of Black Raspberry Extracts on Day 0.

Sex	Group/Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Hours (Day 0) after dosing				
				0.5	1	2	4	6
Male	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
	G2 2,000	5	NOA	5	5	5	5	5
Female	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
	G2 2,000	5	NOA	5	5	5	5	5

NOA: No Observable Abnormality

Table 3. Clinical Signs in Male and Female Sprague-Dawley Rats after Single Oral Treatment of Black Raspberry Extracts.

Sex	Group/Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing														
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Male	G1 0	5	NOA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G2 2,000	5	NOA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Female	G1 0	5	NOA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G2 2,000	5	NOA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

NOA: No Observable Abnormality

2. 체중 변화

암수 대조군 및 투여군 모두 체중이 유사하게 증가하였으며,

투여 후 대조군과 약물 투여군 간의 유의성 있는 체중변화는 나타나지 않았다 (Figure 1,2, Table 4).

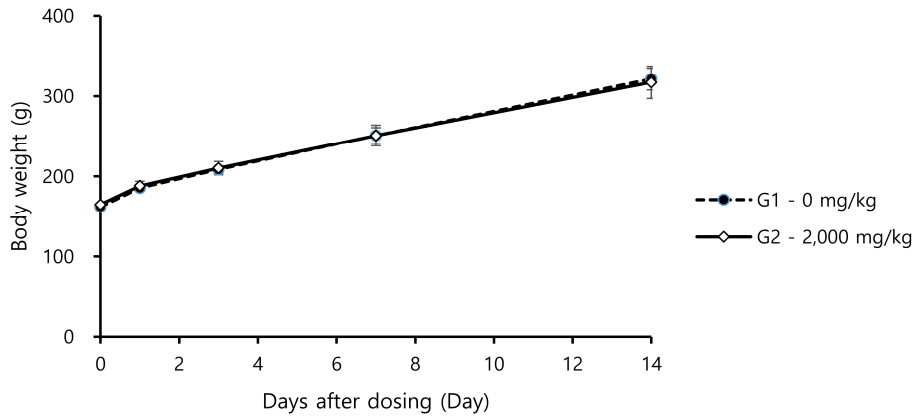


Fig. 1. Body weight in male SD rats after single oral treatment of black raspberry extracts. No significant changes on body weights were detected in black raspberry extract treated group as compared with control group. Values are expressed as the mean ± standard deviation (n=5). G1-0 mg/kg = single oral treatment of black raspberry extract 0 mg/kg, G2-2,000 mg/kg = single oral treatment of black raspberry extract 2,000 mg/kg.

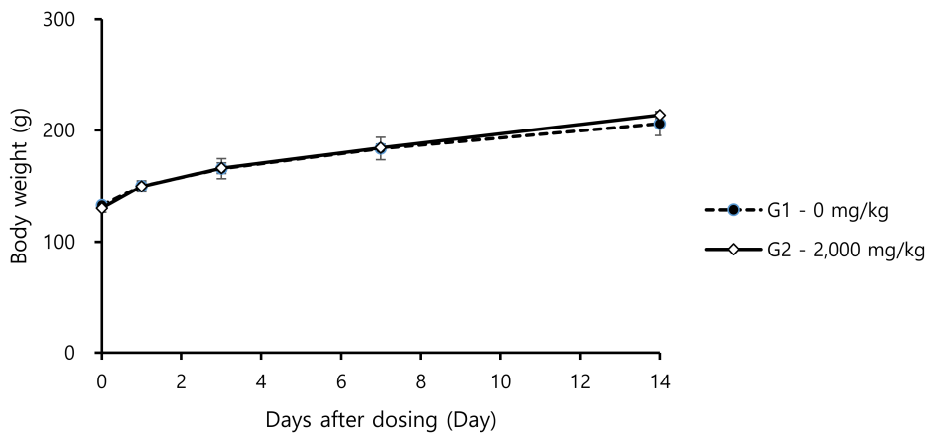


Fig. 2. Body weight in female SD rats after single oral treatment of black raspberry extracts. No significant changes on body weights were detected in black raspberry extract treated group as compared with control group. Values are expressed as the mean ± standard deviation (n=5). G1-0 mg/kg = single oral treatment of black raspberry extract 0 mg/kg, G2-2,000 mg/kg = single oral treatment of black raspberry extract 2,000 mg/kg.

Table 4. Body Weights in Male and Female Sprague-Dawley Rats after Single Oral Treatment of Black Raspberry Extracts.

Sex	Group/Dose (mg/kg)		Days after dosing					Gain (g) 0~14
			0	1	3	7	14	
Male	G1 0	Mean	161.8	185.4	208.6	250.9	321.5	159.7
		S.D.	3.8	3.5	4.7	9.7	13.6	12.0
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 2,000	Mean	164.8	188.0	210.2	250.9	317.3	152.4
		S.D.	3.5	5.7	8.3	12.7	20.3	18.1
		N	5	5	5	5	5	5
Female	G1 0	Mean	132.2	149.5	165.4	183.5	205.8	73.6
		S.D.	2.3	5.0	9.0	10.0	10.6	8.6
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 2,000	Mean	129.7	149.3	165.9	184.2	213.6	83.9
		S.D.	3.5	3.7	4.8	3.3	3.2	5.9
		N	5	5	5	5	5	5

### 3. 부검소견

부검 시, 암수 대조군 및 투여군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다 (Table 5).

Table 5. Necropsy Findings in Male and Female Sprague-Dawley Rats after Single Oral Treatment of Black Raspberry Extracts.

Sex	Group/ Dose (mg/kg)	Observed signs	Frequency	
			Death	Survivors
Male	G1 0	No gross findings	0/0	5/5*
	G2 2,000	No gross findings	0/0	5/5
Female	G1 0	No gross findings	0/0	5/5
	G2 2,000	No gross findings	0/0	5/5

\*: Number of animals with the sign/Number of animals examined

## IV. 고찰 및 결론

이상지질혈증 (dyslipidemia)은 혈액 내 중성지방, 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 (LDL-C)이 증가되거나 HDL-콜레스테롤이 감소된 상태를 의미하는 것으로 특별한 증상은 없으나 동맥경화의 원인이 되어 관상동맥질환의 주요 위험요인으로 작용하며 흡연, 고혈압, 당뇨병, 비만과 더불어 심혈관질환의 주요 위험인자이며 혈중 지질농도의 개선을 통해 심혈관 질환 예방이 필요하다<sup>9)</sup>. LDL-C의 증가는 이상지질혈증 중에서 혈관질환의 발생위험도를 높이는 일차요인이기에, 치료의 일차목표는 상승한 LDL-C의 조절이며, 표준 치료는 스타틴을 사용하여 목표수치의 LDL 콜레스테롤을 낮추거나 고강도 스타틴을 (특히 고위험군에서) 사용하여 LDL-C을 낮추는 치료를 시행중이나 스타틴 계열의 콜레스테롤 강하제는 LDL-C를 20~50% 감소시키지만, 환자들은 장기간에 걸쳐 최대용량을 투여 받아야만 하는 경우가 많고 횡문근융해라는 치명적인 부작용을 일으킬 가능성도 있다<sup>10)</sup>. 최근에는 새로운 계열의 혈중 콜레스테롤 저하제인 PCSK9 억제제 개발에 대해 제약사들이 주목하고 있는데, PCSK9는 혈중 LDL-C에 영향을 미치는 단백질로 혈중 과잉 LDL-C을 캡처하는 LDL 수용체 (LDLR)의 분해촉진 작용을 하며, PCSK9 억제제는 이 작용을 억제해 혈중의 과도한 LDL-C을 캡처 할 수 있도록 한다. PCSK9 억제제 개발이 중요한 이유는 고콜레스테롤혈증의 치료제로써 가장 많이 사용되고 있는 스타틴 계열의 약물이 역설적으로 PCSK9의 발현을 증가시킬 수 있다는 부작용이 보고되었기 때문이다. 스타틴요법을 비롯한 표준치료

에 PCSK9 억제제를 병용하면 스타틴에 의한 PCSK9의 발현 증가를 제어함으로써 혈중 콜레스테롤 농도를 효과적으로 감소시킬 수 있으므로 관상동맥질환으로 인한 심장병의 발병률을 줄일 수 있는 고콜레스테롤혈증의 치료 표적으로서 매우 중요한 단백질로 판단되고 있다<sup>7,11)</sup>.

복분자는 동의보감, 당본초, 본초종신록 등 여러 고문헌에 효능이 언급되어 오래전부터 한약재로 친숙하게 사용되어 왔으며<sup>12)</sup>, 복분자에 대한 약리효능으로는 testosterone의 분비량 증가<sup>13)</sup>, 음경해면체 평활근 이완 효과<sup>14)</sup>, 항산화 효과 및 항암효과<sup>15)</sup>, 지질대사 개선 효과<sup>5,7)</sup> 등에 대한 연구들이 보고되었다. 또한 복분자 추출물이 기능성원료로 인정받음으로써 다양한 건강기능식품이 만들어지고 있다<sup>6)</sup>. 본 연구진은 복분자 추출물이 PCSK9 유전자의 발현 억제를 통해 저밀도 지단백 수용체 (LDLR)를 증가시켜 간세포내로의 저밀도 지단백 (LDL)의 유입이 증가되는 것을 확인하였다<sup>7)</sup>.

본 연구에서는 복분자 추출물의 일반 독성실험 중 현재 식품의약품 안전처 고시 “의약품 등의 독성시험기준”<sup>8)</sup>에 명시되어 있는 랫드 경구 단회투여독성 실험을 실시하여, 반복투여 독성시험과 생식·발생독성 시험등 특수 독성시험에 대한 기초자료 제공 및 복분자 추출물에 대한 유효성 평가, 임상적 유효 용량 설정 및 적정 투여용량, 최대 용량 설정 연구의 기초자료로 사용하고자 하였다

복분자 추출물의 단회 경구투여 시 나타나는 독성을 평가하고자 Sprague-Dawley 랫드에 2,000 mg/kg의 용량으로 1회 경구 투여 후 14일간의 일반증상, 체중변화, 부검 소견 및 사망률을 관찰하였다. 투여 전 약 16시간 이상 절식시키고 복분자 추출물을 1회 경구투여하여 14일간 관찰한 결과, 모든 투여군에서 사망례가 발생하지 않았으며, 일반증상의 이상도 관찰되지 않았다. 암수 대조군 및 투여군 모두 체중이 유사하게 증가하였으며, 부검 시 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다.

US Environmental Protection Agency OPPTS 870.100<sup>16)</sup>에 따르면 일반적으로 무독성 물질은 반수 치사량이 5,000 ~ 15,000 mg/kg, 비교적 저독성 (Class III) 물질은 500 ~ 5,000 mg/kg으로 규정하고 있다. 그러나 식품의약품 안전처 고시 제 2014-136호<sup>8)</sup> 및 OECD<sup>17)</sup> 기준에 따르면, 설치류에서 투여 한계 농도를 2,000 mg/kg으로 제한하고 있다. 이상의 결과를 고려하면, 본 실험의 SD 랫드 단회 경구 투여 독성실험 결과에서 복분자 추출물의 개략적 치사량 (ALD)은 암수 모두 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단되며 비교적 안전한 약물로 추정된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 ‘항이상지질혈증 개선 소재의 기술 사업화 (K15700)’ 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## References

- Jung JE, Kim SE. Relationship between jobstress, health functional food selection sttributes, and consumption values among workers for information technology in Gyeonggi area. *J Nutr Health*. 2020; 53(1): 54–67.
- Kim MU, Lee EH, Jung HY, Lee SY, Cho YJ. Inhibitory activity against biological activities and antimicrobial activity against bacteria of extracts from *Hericium erinaceus*. *J Appl Biol Chem*. 2019; 62(2): 173–9.
- Lee KG, Cui X, Lim JP. Effects of Rubi Fructus Water Extract On Oxygen Free Radical Metabolizing Enzyme Activites. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2002; 16(5): 911–3.
- Lee KI, Kim SM, Kim SM, Pyo BS. Comparison of Fatty Acids and Antibacterial Activity against Pathogen of Acne in Different Parts of Ripened Black Raspberry (*Rubus coreanus* Miquel). *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2011; 40(3): 466–9.
- Jung MA, Cho SH, Lee SY, Kim JH, Oh KN, Kim YS, Yoo GS, Lee DW, Kim SO. Effects of Unripe *Rubus coreanus* Miquel Extract on Improvement of Lipid Metabolism in C57BL/6 Mice Fed a High-Cholesterol Diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2014; 43(5): 650–5.
- Ministry of Food and Drug Safety. 2016; 11–1471000–000047–14.  
URL: <https://www.khsa.or.kr/assets/extra/hfood/01.pdf>
- Song KH, Kim YH, Im AR, Kim YH. Black Raspberry Extract Enhances LDL Uptake in HepG2 Cells by Suppressing PCSK9 Expression to Upregulate LDLR Expression. *J Med Food*. 2018; 00(0): 1–8.
- Ministry of food and drug safety, Standard for Toxicity study of Pharmaceuticals, Korea National Institute of Health Notification No. 2014–136, 2014.
- Lee YJ, Park JH, Park EJ. Effect of Sulgidduk containing pine needle juice on lipid metabolism in high fat-cholesterol diet induced dyslipidemic rats. *J Nutr Health*. 2019; 52(1): 6–16.
- Kim NY, Baek SY, Nam SM, Jeong HG, Ryu JG. Clinical evaluation of the use of statins in diabetic dyslipidemia. *J Kor Soc Health-Syst Pharm*. 2012; 29(3): 288–99.
- Seidah NG, Prat A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med*. 2007; 85: 685–96.
- Yang HS, Rho JO. The Physiochemical Characteristic and Descriptive Sensory Evaluation of the Blackberry Fruit Beverage. *Korean Journal of Human Ecology*. 2012; 21(2): 363–75.
- Baek BK, Lim CW, Lee EY, Whang IS, Kwon HN, Lee HK, Lee SI, Lee HJ, Jeon BH. Effects of Raspberry Wine on Testosterone Level of Sprague-Dawley Rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2004; 18(4): 1007–13.
- Park SY, Lee PJ, Shin SM, Kim HH. Relaxation Effects of *Rubus coreanus* in Isolated Rabbit Corpus cavernosum Smooth Muscle. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2013; 27(4): 400–8.
- Jung JW, Son MY, Jung SW, Nam PW, Sung JS, Lee SJ, Lee KG. Antioxidant properties of Korean black raspberry wines and their apoptotic effects on cancer cells. *J Sci Food Agric*. 2009; 89: 970–7.
- US Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.100, Acute Toxicity Testing Background, US EPA December–Washington, USA, 2002.
- Organization for Economic Co-Operation and Development(Ed.). OECD guideline (423) for testing of chemicals–acute oral toxicity–acute toxic class method. 2001.