

Research Article

Open Access

수용성 님추출물이 랫드의 간 독성에 미치는 영향

박경훈,¹ 윤현주,¹ 한범석,² 이제봉,³ 정미혜,³ 조남준,¹ 엄애선,⁴ 백민경^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 화학물질안전과, ²호서대 안전성평가센터, ³농촌진흥청 국립농업과학원 농자재평가과,
⁴한양대학교 식품영양학과

Effects of Aqueous *Azadirachta indica* Extract on Hepatotoxicity in Rats

Kyung-Hun Park,¹ Hyunjoo Yoon,¹ Beom Seok Han,² Je-Bong Lee,³ Mi Hye Jeong,³ Namjun Cho,¹ Ae Son Om⁴ and Min-Kyoung Paik^{1*} (¹Chemical Safety Division, National Academy of Agricultural Science, 166 Nongsaengmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 565-851, Korea, ²Hoseo Toxicological Research Center, Hoseo University, Asan 336-795, Korea, ³Agro-material Safety Evaluation Division, National Academy of Agricultural Science, 166 Nongsaengmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 565-851, Korea, ⁴Dept. of Food Science and Nutrition, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)

Received: 14 May 2014 / Revised: 21 August 2014 / Accepted: 20 October 2014

Copyright © 2014 The Korean Society of Environmental Agriculture

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.

Abstract

BACKGROUND: *Azadirachta indica* Extract(AIE) containing azadirachtin as active ingredient have been used worldwide as environment-friendly organic material having pest control properties. However, the extracts prepared with different solvent and from different plant site is very diverse and have different toxicity.

METHODS AND RESULTS: In this study, the four week repeated oral dose toxicity test of aqueous AIE in Sprague-Dawley rats was carried out to investigate the toxic effect of liver, main toxicity target organ of AIE. The male and female rats were divided into 4 groups, respectively; control(0 g/Kg bw), low-dose group(0.5 g/Kg bw), middle-dose(1.0 g/Kg bw) and high-dose group(2.0 g/Kg bw). As a results, relative liver weight increased with dose-dependent of AIE($p<0.05$). Serum LDH in all AIE-treated groups were significantly lower than the control in male rats($p<0.05$). However, serum GOT and

GPT were significantly increased in all male AIE-treated groups in male rats($p<0.05$) and, in particular, increase of serum GPT in dose-dependent manner raise the possibility of liver damage. Even through serum GLU was increased significantly in high-dose group in male rats compared to control, there were no significant differences of urinary GLU among all groups($p<0.05$). In addition, histopathological examination of the liver did not reveal any lesions in all AIE-treated groups.

CONCLUSION: In conclusion, 4 weeks of the repeated oral administration of AIE 2.0 g/Kg to rats has resulted no toxic response in liver. Therefore, AIE was no indicated to have any toxic effect in the SD rats, when it was orally administrated below the dosage 2.0 g/Kg/day for 4weeks.

Key words: *Azadirachta indica* extract, Hepatotoxicity, Oral administration, Rat

*교신저자(corresponding author): Min-Kyoung Paik
Phone: +82-63-238-3253; Fax: +82-63-238-3837;
E-mail: mink1114@korea.kr

서론

최근 토양이나 작물체내에 잔류하거나 화학적 변화를 일으키는 잔류농약에 대한 관심과 우려가 더욱 커짐에 따라 (Woo *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010), 농산물에 잔류되어 있는 살충제나 살균제를 피할 수 있는 친환경 농산물의 선호도가 높아지고 있다(Choi *et al.*, 2011). 특히 천연 식물추출물은 유기농업자재의 인체 안전에 대한 소비자의 신뢰에 힘입어 농작물 재배에 사용되는 빈도가 점점 늘어나 2014년 현재 우리나라에 100여종이 목록공시 및 품질인증 되어 있다.

천연 식물추출물 유기농업자재에 대한 연구는 고추씨나 겨자씨 추출물의 복숭아혹진딧물 방제효과, 황련 추출물과 고추씨 추출물이 배추좀나방 방제에 효과 등 주로 약효 위주의 연구가 진행되어 왔다(Madhumathy *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). 그 중에서도 님(*Azadirachta Indica*)은 나이지리아, 아프리카, 아시아와 미국 등에 분포된 식물로서(Mohammed *et al.*, 2012), 님추출물 내 유효성분(active ingredient)으로 azadirachtin을 함유 하여 우리나라뿐만 아니라 전세계적으로 해충을 방지하는데 널리 사용하고 있다(Schmutter, 1990).

님을 원료로 한 님추출물의 종류는 매우 다양하고 추출부위 및 추출용매에 따라 그 효능 및 안전성이 달리 보고되고 있다. 님 종자에서 추출한 유지는 근육통, 말라리아, 결핵, 당뇨에 효과가 있으며(Dixit *et al.*, 1986; Boeke *et al.*, 2001), 님의 수용성추출물은 면역조절작용(Kroes *et al.*, 1993), 항당뇨(Khosla *et al.*, 2000), 간 보호작용(Bhanwra *et al.*, 2000)이 있다고 보고되었다. 반면, 다양한 님추출물 중에서도 비수용성 추출물이 님에서 유래된 시료 중 가장 독성이 높으며, 종자에서 추출한 유지와 수용성추출물은 상대적으로 그 독성이 약하다고 보고되었다(Boeke *et al.*, 2004).

님추출물은 유효성분인 azadirachtin으로 우리나라에서 농약으로 등록되어 있기도 한 물질로서, 유럽식품안전청에서는 시판하고 있는 님 제품에 대한 시험결과를 근거로 단기독성시험에서 주요 독성기관(target organ)을 간으로 보고, NOAEL(No Observable Adverse Effect Level)을 32 mg/Kg bw/day로 설정한 바 있으며(EFSA, 2011), 미국 환경보호청에서도 암수 랫드에 대한 90일 시험에서 간 중량 및 GGT(Gamma-glutamyl transpeptidase)의 증가가 관찰되어 NOAEL을 수컷에서 2.3 mg/Kg bw/day, 암컷에서 2.7 mg/Kg bw/day로 설정한 바 있다(EPA, 1991).

이상과 같이 님추출물이 간 손상에 미치는 영향에 관한 연구들이 활발하게 진행되고 있으나, 대부분 vepacide 등 시판되는 상업제품 위주로 이루어지고 있으며, 실제 우리나라 유기농업자재 제품의 조제에 사용되는 님추출물 원제에 대한 안전성 시험은 미비한 상황이다. 따라서, 본 연구에서는 우리나라에서 유기농업자재 제품의 조제에 사용되는 수용성 님추출물 시료를 이용하여 간에 미치는 독성 영향을 확인하고자, 랫드에 4주 반복경구독성시험을 수행하여, 혈액생화학적 지표 및 간 조직 병리학적 변화를 관찰함으로써 수용성 님추출물의 안전성을 확인하였다.

재료 및 방법

시험 물질

시료는 시중에 유통되는 미안마산 수용성 님추출물 시료를 구입하여 사용하였다. 총 18.42 g/Kg의 azadirachtin을 함유(azadirachtin A 8.2 g/Kg, azadirachtin B 3.45 g/Kg, deacetylsalannin 1.65 g/Kg, salannin 5.12 g/Kg 등)하는 시료를 실험기간 동안 빛이 통하지 않는 불투명한 용기에 담아 실온에서 보관하였으며, 사용직전 0.22 μ L filter를 이용하여 여과 후 멸균수에 희석하여 사용하였다.

시험동물 및 사육조건

본 동물시험은 국립농업과학원의 동물윤리위원회 승인(NAAS 1305)을 받아 진행하였으며, 시험동물은 SPF Sprague-Dawley(SD)계 랫드를 (주)Koatech(Kyunggi-Do, Korea)으로부터 분양 받아 1주일간 순화 후 사용하였다. 시험동물은 평균체중의 $\pm 20\%$ 범위 내에 있는 4주령의 암컷 및 수컷으로 군당 10마리의 동물을 사용하였고, 실험실 조건은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$, 조명시간 12시간으로 하였다. 4주의 시험기간 동안 폴리카보네이트 사육상자에 2~3마리씩 넣어 시험하였으며, 물과 사료는 자유섭취 시켰다.

시험농도 및 투여방법

아급성경구시험은 농진청 고시 제 2012-37호의 반복투여 경구독성 시험에 준하여 시행하였다. 시험용량 선정은 선행시험(Yoon *et al.*, 2014)의 급성독성시험을 통해 얻어진 LD₅₀ (Lethal Dose for 50 percent)을 근거로 저농도(0.5 g/Kg; LD₅₀의 1/4), 중농도(1.0 g/Kg; LD₅₀의 1/2), 고농도(2.0 g/Kg; LD₅₀의 3농도를 선정하여 암컷과 수컷에 투여하였고, 대조군은 멸균수를 사용하였다. 시험물질은 존데를 이용하여 4주간 1일 1회, 주말을 제외한 주 5회 투여하되 하루 중 동일한 시간에 위 내 강제 경구투여 하였다.

임상 증상은 모든 시험동물에 대해 매일 1회 이상씩 일정 시간에 일반상태의 변화, 중독증상발현, 사망동물의 유무를 관찰하였다. 또한, 시험에 사용된 모든 시험동물에 대하여 체중을 시험기간 중 매주 2회, 사료 섭취량과 물 섭취량은 주 1회 측정하였다.

시료채취 및 분석

모든 시험동물에 대하여 시험물질 투여 개시일로부터 4주 후에 부검을 실시하였으며, 부검을 위해 CO₂로 마취하여 혈액 채취 한 후 해부하여 육안으로 간을 검사하여 이상소견을 관찰하고 중량을 측정하였다.

채취한 혈액은 4°C 냉장 보관 한 후 10,000 rpm에서 15분간 원심분리(Hanil, supra 22K, Incheon, Korea)하였으며, 노 채취를 위해 부검 전일 대사케이지에 넣어 노 시료를 수집하였다. 혈액 및 뇨의 생화학적 분석을 위해 자동생화학 분석기(Beckman coulter, AU480, Miami, USA)를 이용하여 ALB(Albumin) 및 ALP(Alkaline phosphatase), GOT

Table 1. Effects of *Azadirachta indica* extract on relative liver weights in Sprague-Dawley rats for 4 weeks

Sex	Concentration (g/Kg)	Relative liver weight
Male	Control	0.034±0.002 ^c
	0.5	0.035±0.003 ^c
	1.0	0.038±0.003 ^b
	2.0	0.041±0.002 ^a
Female	Control	0.030±0.002 ^c
	0.5	0.032±0.003 ^c
	1.0	0.036±0.002 ^b
	2.0	0.042±0.004 ^a

Mean±SD with different alphabetical superscript along a column are significantly different ($p < 0.05$) among groups administrated by different concentration of AIE.

(Glutamic oxaloacetic transaminase), GPT(Glutamic pyruvic transaminase), GGT(Gamma glutamyltransferase), D-Bil(Direct bilirubin), TP(Total protein), LDH(Lactate dehydrogenase), GLU(Glucose)와 U-GLU(Unine-Glucose)를 측정하였다. 또한, 혈액학적 변화를 살펴보기 위하여 혈구 계수기(Scil, Vet ABC, Colorado, United States)를 이용하여 WBC(White Blood Cells) 및 RBC(Red Blood Cells), HGB(Hemoglobin), HCT, MCV(Mean Corpuscular Volume), MCH(Mean Corpuscular Hemoglobin), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), PLT (Platelet)를 측정하였다.

모든 시험동물에서 적출한 간은 10% 중성 포르말린으로 고정시켜 Hematoxylin Eosin(H&E) 염색 후 광학현미경으로 400배에서 관찰하였다.

통계처리

자료에 대한 통계분석은 SAS(version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하였다. 시험물질 투

여군과 대조군의 차이를 비교하기 위하여 general linear procedure로 분석하였으며 pairwise t-test를 이용하여 유의차 0.05 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

체중 및 간의 상대중량 변화

넙추출물 시료 0.5, 1.0, 2.0 g/Kg을 랫드에 4주간 경구 투여 하였을 때 체중은 암수 모든 군에서 정상적으로 증가하였고, 투여용량간의 유의적인 차이는 보이지 않았으며, 사료 및 물 섭취량도 대조군과 비교하여 유의적 차이도 보이지 않았다. 또한, 실험 종료 후 모든 실험동물을 부검하여 간을 육안으로 관찰한 결과 넙추출물 시료를 투여한 암수 모두에서 간에 대한 외관상의 어떠한 이상 병변도 나타나지 않았다.

간의 상대중량은 암수 모두 저농도인 0.5 g/Kg 투여군은 대조군에 비해 차이가 없었으나 중농도(1.0 g/Kg 투여군)와 고농도(2.0 g/Kg 투여군)에서 농도의존적으로 증가하였다 ($p < 0.05$, Table 1). 따라서, 넙추출물 시험물질의 투여 농도가 증가함에 따라 간의 상대중량이 증가하는 것을 알 수 있다.

Ashafa 등(2012)은 수컷 랫드에 넙 나무줄기의 에탄올 추출물을 21일간 0.05 및, 0.1, 0.2, 0.3 g/Kg으로 경구투여 하였을 때 투여용량이 증가함에 따라 간의 상대무게가 유의적으로 증가한다고 보고하여, 본 시험에서 투여 용량이 증가함에 따라 간의 중량이 증가한 결과와 유사하였다. 반면, Deng 등(2013)은 마우스에 넙 종실류에서 추출한 넙 오일 0.18, 0.53, 1.60 g/Kg을 28일간 경구투여 했을 때 간의 상대중량 차이가 나타나지 않았다고 보고하였으며, 랫드에 0.2, 0.3 g/Kg의 넙 잎 추출물을 7일동안 경구투여 하였을 때 대조군에 비해 0.2 g/Kg 투여군은 간 중량이 증가하였으나, 0.3 g/Kg 투여군은 간 중량이 감소하였다(El Hawary *et al.*, 1990). 따라서, 간의 중량 차이는 넙추출물의 투여 용량에서만 영향을 아니며 넙의 원료 부위 차이, 추출 용매 등의 요인에 따른 것이라 생각된다.

Table 2. Effects of *Azadirachta indica* extract on serum biochemical parameters in Sprague-Dawley rats for 4 weeks

Sex	Concentration (g/Kg)	Parameter								
		ALB (g/dL)	ALP (U/L)	GOT (U/L)	GPT (U/L)	GGT (U/L)	D-Bil (mg/dL)	TP (g/dL)	LDH (U/L)	GLU (mg/dL)
Male	Control	3.56±0.17	142.08±24.00	104.42±18.70 ^{ab}	45.58±7.51 ^{cb}	0.00±0.00 ^b	0.06±0.05 ^b	7.10±0.37 ^a	448.27±253.98 ^a	153.57±55.23 ^b
	0.5	3.51±0.14	139.72±14.37	97.49±19.15 ^{ab}	47.71±13.92 ^b	0.10±0.19 ^b	0.06±0.05 ^b	7.05±0.23 ^a	382.09±190.22 ^{ab}	141.64±45.98 ^b
	1.0	3.44±0.18	142.67±35.73	89.91±11.62 ^b	58.21±14.23 ^{ab}	0.12±0.19 ^b	0.13±0.09 ^a	6.66±0.30 ^b	280.09±110.55 ^b	320.46±88.25 ^a
	2.0	3.51±0.10	144.13±14.65	120.82±48.00 ^a	69.80±17.88 ^a	0.45±0.57 ^a	0.17±0.05 ^a	6.89±0.17 ^{ab}	306.82±115.97 ^{ab}	339.35±65.45 ^a
Female	Control	3.46±0.16	109.67±14.85 ^a	103.63±24.25 ^a	41.90±4.61	0.54±0.43 ^b	0.06±0.07 ^b	6.64±0.28	554.91±358.86	96.21±35.53 ^a
	0.5	3.39±0.15	88.12±15.10 ^b	89.51±9.36 ^{ab}	35.21±4.88	0.29±0.33 ^b	0.09±0.06 ^{ab}	6.66±0.30	409.09±219.71	77.48±30.87 ^{ab}
	1.0	3.32±0.17	80.02±9.88 ^{bc}	99.25±42.25 ^{ab}	42.68±19.87	0.49±0.32 ^b	0.07±0.06 ^b	6.66±0.38	468.80±372.48	61.32±20.97 ^b
	2.0	3.45±0.22	71.38±11.65 ^c	79.83±11.81 ^b	33.39±5.97	1.01±0.39 ^a	0.14±0.03 ^a	6.80±0.41	347.00±189.12	70.52±27.75 ^{ab}

Mean±SD with different alphabetical superscript along a column are significantly different ($p < 0.05$) among groups administrated by different concentration of AIE

혈액생화학적 변화

넙추출물을 투여한 랫드에서 채취한 혈액을 혈액생화학분석 통하여 간 기능과 관련된 성분인 ALB, ALP, GOT, GPT, GGT, D-Bil, TP, LDH와 혈중 GLU의 함량 변화를 살펴본 결과는 Table 2와 같다. GOT, GPT, LDH활성은 세포손상과 세포 사멸 후 순환계로 분비되어 혈중 활성이 증가하는 등 간 손상과 밀접한 연관성을 가지고 있다(Ozaki *et al.*, 1997). 특히, GOT와 GPT는 간, 신장, 심장 등에 많이 분포되어 지방간과 간염 등의 간질환에 의해 세포나 조직에 이상이 생길 시 혈중으로 유리되어 농도가 높아져 간 손상의 판단지표로 이용된다(Reitman *et al.*, 1957).

본 시험에서 수컷의 경우, GOT는 대조군과 비교하였을 때 고농도 투여군에서 유의적으로 증가하였다. 또한, GPT는 시험물질의 투여용량이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였지만, LDH는 투여 농도에 따라 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). 반면, 암컷에서는 GOT가 시험물질 투여용량이 증가할수록 유의적으로 감소하여 수컷과 반대 경향을 보였으며 ($p < 0.05$), GPT와 LDH는 투여용량에 따른 차이가 없었다.

이는 선행연구에서 랫드에게 azadirachtin을 0.5, 1.5, 4.5 mg/Kg 60일 동안 경구투여 하였을 때 GOT는 유의적으로 증가하였으나, GPT는 변화가 없었으며(Gupta *et al.*, 1998), 넙 제품(vepacide)을 albino 수컷 랫드에 90일동안 0.08, 0.16, 0.32 g/Kg 투여한 결과 GOT와 GPT는 증가한 것으로 나타나(Rahman *et al.*, 2001) 본 실험의 수컷 결과와 유사하였다. 반면, 수컷 랫드에 넙 씨앗을 에테르에 추출한 시험물질을 60 일 동안 0.360, 0.566 mg/Kg을 투여하였을 때 GOT와 GPT가 감소하였다고 보고되었으며(Gupta *et al.*, 2001), 넙 잎 에탄올 추출물의 azadirachtin 성분이 마우스 간의 지질 과산화 수준과 LDH를 감소시켜 발암 물질의 해독과 발암 억제효과가 있다고 보고하였다(Dasgupta *et al.*, 2004). 본 시험 결과에서는 대조군에 비해 시료처리군의 LDH는 감소하였으나 GOT와 GPT가 증가하였으며 특히 GPT가 시료에 농도 의존적으로 증가하였으므로, 수컷에서 간 손상의 가능성이 있다고 생각되었다.

D-Bil은 본 시험의 연구결과 수컷과 암컷 모두에서 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). D-Bil은 간부전, 간경변, 담즙정체, 침윤성 질환이나 간 내외 담도 폐쇄의 지표로 사용되며, 황달과 같은 해로운 영향을 미치는 독성 산물로 알려져 있다(Lee, 2002). 그러나, 여러 연구에서 bilirubin이 강력한 항산화 효과가 있다고 보고(Stocker *et al.*, 1987; Neuzil *et al.*, 1994; Siow *et al.*, 1999)되고 있어, 수용성 넙추출물로 인한 D-Bil의 증가와 간 손상의 관계에 관련하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

간 효소인 ALP는 담관 손상의 지표로서 중양, 간염, 간경화 등에 의한 담관 폐쇄 등에서 증가한다(Song *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2003). GGT는 내부 장기 지방의 지표로 내장지방, 지방간, 인슐린 저항성을 알 수 있으며, GGT가 높은 경우 제 2형 당뇨병 발생의 위험인자로 작용할 수 있다. 하지만, GGT의 증가만으로 지방간을 진단하여서는 안되고, ALP가

정상이라면 지방간의 확률이 낮아지는 것으로 보고되어 진다(Lee, 2002). 따라서, 본 논문의 결과를 보면 암컷과 수컷 모두 GGT가 대조군에 비해 유의적으로 증가해 간 손상의 가능성이 있으나($p < 0.05$), ALP가 수컷에서는 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이는 보이지 않고 암컷에서는 오히려 감소해 지방간에 미치는 영향은 아닌 것으로 판단된다.

혈중GLU는 수컷에서 대조군과 비교했을 때 시험물질의 투여농도에 따라 유의적으로 증가하였고, 반대로 암컷에서는 시험물질을 중농도 처리한 군의 혈중 GLU가 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으나, 다른 시험군에서 차이가 없었다 ($p < 0.05$). 선행 연구로, 랫드에게 0.2, 0.3 g/Kg의 넙의 잎 추출물을 7일동안 경구투여 하였을 때 대조군에 비해 유의적으로 혈당이 감소하였으며(El Hawary *et al.*, 1990), 마우스에 넙 잎 추출물을 마리당 0.5 mL 을 단회 경구투여한 경우 정상 마우스에 비해 혈당이 낮았다고 보고되었다(Mossa, 1985). 또한, 토끼에게 28일 동안 넙오일(5 mL/Kg)과 넙잎 추출물(5 mL/Kg)을 투여한 경우에도 혈당을 낮추는 효과가 있었다(Khosla *et al.*, 2000). 반면, 넙종실류 5 mL/Kg을 랫드에게 21일 동안 경구투여하였을 때 혈중 GLU의 변화는 없었다(Basha *et al.*, 2012). 본 연구에서는 암컷에서 시험물질을 중농도 처리한 군의 혈중 GLU가 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으나, 다른 시험군에서 차이가 없었으며 수컷에서는 오히려 증가하는 것으로 나타났다. 따라서, 본 시험에서 사용된 수용성 넙추출물 시료는 혈중 GLU를 감소시키는 효과는 없으며, 넙추출물의 고농도 처리시 수컷의 혈중 GGT가 급격히 증가한 것과 관련해서 넙추출물의 고농도 처리는 오히려 제2형 당뇨의 위험인자로서 혈중 GLU를 상승시킬 수 있음을 알 수 있다.

TP는 넙추출물을 투여한 수컷의 경우, 대조군에 비해 시험물질 투여농도가 증가할수록 유의적으로 감소하지만, 암컷의 경우에는 농도에 따른 유의적인 변화는 관찰되지 않았다 ($p < 0.05$). 또한, ALB는 수컷과 암컷 랫드에서 투여농도에 따른 유의적인 차이는 없었으며, 혈청의 TP와 ALB 농도는 대조군과 각 농도별 넙 추출물 투여군이 비슷한 경향으로 선행 연구와 비교했을 때 정상 범위를 유지하였다(Kim *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 1995).

혈액학적 변화

본 연구의 혈액학적 검사 결과 범위는 Table 3과 같다. 간염, 악성종양, 골수 이상 등과 같은 원인 질환에서 증가하는 PLT의 경우(Buss *et al.*, 1994) 본 시험에서는 암컷과 수컷 모두에서 대조군과 비교했을 때 넙추출물 시험물질 투여군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 골수 질환으로 인한 혈소판 증가증에서 상승하기도 하는 HCT수치(Elliott *et al.*, 2005) 또한 모든 시험동물에서 정상 수준을 유지하였다(Kim *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 1995).

또한, WBC 및 RBC, HGB, MCV, MCH, MCHC도 수컷과 암컷 랫드 모두에서 투여 농도에 따른 유의적인 변화가 없는 것으로 나타나, 넙추출물 시험물질에 따른 감염이나 흑

Table 3. Effects of *Azadirachta indica* extract on hematological parameters in Sprague-Dawley rats for 4 weeks

Sex	Concentration (g/Kg)	Parameter							
		WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
Male	Control	2.9±1.9	7.5±3.1	12.4±3.5	41.3±18.8	51.0±16.9	15.1±1.2	27.0±2.0	138.6±143.8
	0.5	4.6±2.1	9.7±1.5	13.4±1.9	53.9±8.2	55.8±1.3	13.9±1.7	25.0±3.0	414.4±120.4
	1.0	6.4±2.5	8.7±1.4	13.6±2.2	48.6±7.8	56.1±1.8	15.7±0.5	27.9±0.4	227.0±265.8
	2.0	5.2±3.4	6.7±2.6	10.2±4.5	37.2±15.2	54.8±1.8	14.8±2.2	26.9±3.6	147.8±123.8
Female	Control	2.7±3.1	5.7±2.7	8.2±4.3	31.2±15.3	54.8±0.9	14.3±1.2	26.0 ±1.9	190.2±210.4
	0.5	3.0±2.7	6.9±2.2	9.9±3.1	37.1±12.4	53.6±1.3	14.3±1.0	26.7±2.1	173.5±153.5
	1.0	2.8±3.2	6.8±2.4	9.0±3.8	36.9±13.4	54.3±1.8	12.0±3.6	22.1±6.6	203.3±203.0
	2.0	3.7±2.9	6.5±2.8	8.5±4.5	35.3±15.8	53.7±1.6	12.1±4.2	22.3±7.7	208.7±180.7

은 중앙, 염증반응의 가능성은 낮은 것으로 판단된다. Eyong 등(2013)은 마우스에 28일간 님 잎 에탄올 추출물을 200 mg/Kg bw 투여하였을 때 대조군과 비교하여 WBC와 PLT 수치가 감소하였지만 유의적인 차이는 보이지 않았다고 보고하였으며, Gangar 등(2010)의 연구에서도 님 추출물 100 mg/Kg을 24주간 경구 투여하였을 때 대조군과 비교하여 WBC, RBC, HGB수치의 유의적인 변화는 나타나지 않았다고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다.

뇨성분 변화

님추출물 시료투여에 따른 뇨 중 GLU의 변화는 Table 4 과 같이, 암수 모든 동물에서 대조군에 비하여 모든 님추출물 투여군에서 유의적인 변화가 관찰되지 않고 정상 수준을 유지하였다. Table 2에 의하면 수컷의 혈중 GLU이 님추출물 중농도 및 고농도 처리군에서 급격히 증가함에 따라 당뇨의 가능성을 예측하였으나 실제 뇨를 통한 GLU의 배설은 정상 수준으로 유지됨에 따라 님추출물 물질 투여로 인한 당뇨의 가능성은 낮다고 보여진다.

Modak 등(2007)은 님을 당뇨병 치료에 효과가 있다고 보고하였으며, Gonzalez 등(2010)도 님 잎의 열수추출물을 암컷 마우스에 15일, 30일 동안 40 mg/Kg 경구 투여하였을 때 뇨 중 당 뿐만 아니라 케톤체가 감소하였다고 보고한 바

있다. 본 연구에서는 님추출물의 농도증가에 따른 뇨 중 GLU가 변화하지 않음에 따라 당뇨 치료에 대한 효과를 확인할 수 없었다.

Table 4. Effects of *Azadirachta indica* extract on urinary parameters in Sprague-Dawley rats for 4 weeks

Sex	Concentration (g/Kg)	U-GLU (mg/dL)
Male	Control	27.71±15.14
	0.5	31.02±4.80
	1.0	30.59±10.09
	2.0	27.47±10.90
Female	Control	26.73±6.37
	0.5	23.62±0.07
	1.0	25.95±6.79
	2.0	27.31±5.34

간의 조직학적 변화

간의 손상 정도를 H&E 염색해 400배로 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 시험결과, 4주간 0.5, 1.0, 2.0 g/Kg을 수컷 랫드에 반복경구 투여한 결과 울혈(congestion), 괴립상 변

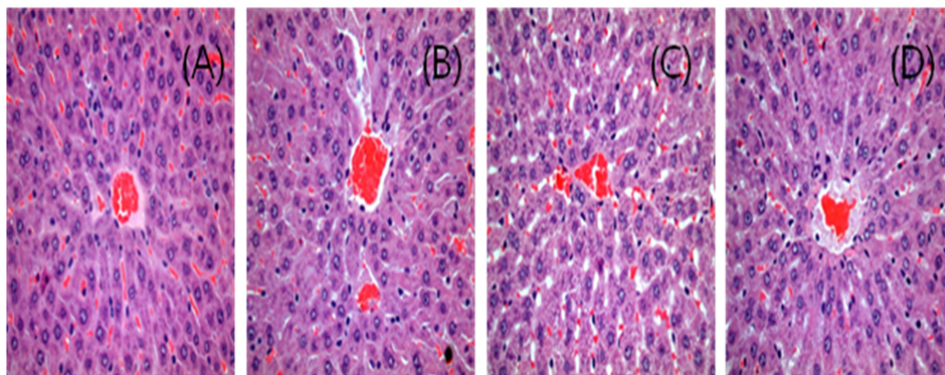


Fig. 1. Effect of *Azadirachta indica* extract on the liver microscopic findings of Sprague-Dawley male rats after oral administration for 4 weeks. Panel A: Control, H&E 400X, Panel B: 0.5 g/Kg, H&E 400X, Panel C: 1.0 g/Kg, H&E 400X, Panel D: 2.0 g/Kg, H&E 400X.

성(granular degeneration), 괴사(necrosis), 림프구 침윤(lymphocytic infiltration) 등 간 조직에서의 어떠한 이상 병변도 관찰되지 않았다. Deng 등(2013)은 본 연구에서 사용한 랫드가 아닌 마우스에서 님 종실류에서 추출한 님오일을 최고 1.6 g/Kg bw로 28일간 아급성 경구투여 하였을 때 간 조직에서 간 소엽(liver lobule)의 중심정맥 울혈(central venous congestion), 간세포의 지방 과립상 변성(fatty and granular degeneration)이 관찰되었다고 보고하였다. 또한, Rahman 등(2001)도 님의 상업용 제품인 vepacide를 0.08, 0.16, 0.32 g/Kg의 용량으로 90일 동안 투여했을 때 간의 괴사가 있었다고 보고하였는데, 사용된 시료가 님 종실류의 껍질에서 분리되어 azadirachtin 함량이 12%에 이르는 분말 형태였으며 실험동물에 투여되는 농도는 본 연구와 비슷한 수준이었다. 순수한 azadirachtin 성분을 이용하여 LD₅₀의 1/10수준인 57 ppm으로 랫드에 1~3일 처리한 연구 결과에서도 간에 울혈(congestion), 수종변성(hydropic degeneration), 괴사(necrosis)와 림프구 침윤(lymphocytic infiltration)과 같은 조직병리학적 변화가 관찰되었다(Abdel Megeed *et al.*, 2001). 반면, 님 잎의 메탄올 추출물 0.5 g/Kg을 랫드에 각각 5일과 10일 동안 경구투여 하여 간 조직을 관찰한 결과 추출물 투여에 따른 간 이상이 나타나지 않았다고 보고하여 (Ezz-Din *et al.*, 2011), 본 연구결과와 유사하였다. 본 연구 결과, 실험동물에 투여되는 용량의 수준 외에도 투여되는 시험물질의 님 식물의 추출부위나 추출용매에 따른 독성영향이 크게 차이를 보이는 것을 알 수 있다.

이상과 같이 본 시험에 사용된 수용성 님추출물은 수컷에서 혈중 GOT 및 GPT가 증가하였으며 특히 GPT가 시료에 농도 의존적으로 증가하여 수컷의 간 손상 가능성이 있다고 생각되었으나 조직병리학적 관찰 결과 이상 병변이 확인되지 않음에 따라 간 독성에 영향을 미치지 않고 안전한 것으로 판단하였다. 본 연구에서 사용된 시료는 수용성으로 많은 선행 연구에서 유기용매 등의 추출용매를 사용한 님추출물의 간 독성 연구 결과가 차이가 나며, 님 추출 부위의 차이에 따른 azadirachtin의 함량 차 등이 독성영향에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

요 약

님추출물은 유효성분(active ingredient)으로 azadirachtin을 함유하여 전세계적으로 충해방제용 유기농업자재로 널리 사용되고 있다. 그러나, 님추출물은 님 원료부위 및 추출용매에 따라 종류가 매우 다양하고 안전성에 크게 차이가 난다고 보고되고 있다. 본 연구에서는 우리나라에서 유기농업자재 제품의 원제로 사용되는 수용성 님추출물이 주요 독성기관인 간에 미치는 영향에 대해서 살펴보고자 SD 랫드를 이용하여 4주 반복경구독성시험을 수행하였다. 시험결과, 님추출물 시험물질의 투여 농도가 증가함에 따라 간의 상대중량이 증가하였다($p<0.05$). 혈액 생화학분석 결과, 수컷에서 대조군에 비해 시험물질 처리시 혈중 LDH는 감소하였으나 GOT와

GPT가 증가하였으며($p<0.05$), 특히 GPT가 시험물질에 농도 의존적으로 증가함에 따라 수컷에서 간 손상의 가능성을 나타내었다. 또한, 고농도로 님추출물 시료를 처리한 경우 수컷의 혈중 GGT가 급격히 증가하였으며 혈중 GLU도 유의적으로 증가하였으나($p<0.05$), 뇨 중 GLU는 님추출물의 처리 농도증가에 따른 변화가 나타나지 않았다. 간의 조직병리학적 변화를 살펴본 결과 님추출물 시료 처리에 따른 간의 병변도 확인되지 않았다. 따라서 본 시험에 사용된 수용성 님추출물 시료는 혈액 생화학적 분석 결과 수컷에서 간손상의 가능성은 있었으나 조직병리학적 변화는 관찰되지 않았다. 따라서, 수용성 님추출물 2.0 g/Kg 을 4주간 랫드에 경구투여한 결과 간에 독성을 미치지 않고 안전한 것으로 판단된다.

Acknowledgment

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Project No. PJ00950101" Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Abdel Megeed, M.I., Radwan, U.M., Hindy, A.Z., El Zarook, A., 2001. Liver functions under stress of certain common pesticides residue used on fruits and vegetables orally administrated, *Ann. Agric. Sci. (Cairo)*. 46, 383-404.
- Ashafa, A.O.M., Orekoya, L.O., Yakuba, M.T., 2012. Toxicity profile of ethanolic extract of *Azadirachta indica* stem bark in male Wistar rats, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 811-817.
- Basha, S.S., Baruah, M., Shaker, A., Kondaveeti, S.B., Narayana, S., 2012. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Azadirachta indica* seed oil and Mehani (polyherbal formulation) on alloxan induced diabetic albino rats, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 3, 239-246.
- Bhanwra, S., Singh, J., Khosla, P., 2000. Effect of *Azadirachta indica* (Neem) leaf aqueous extract on paracetamol-induced liver damage in rats, *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 44, 64-68.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R.K., Bandyopadhyay, U., 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*), *Current Sci.* 82, 1336-1345.
- Boeke, S.J., Boersma, M.G., Alink, G.M., van Loon, J.J.A., van Huis, A., Dicke, M., Rietjens, I.M.C.M., 2004. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides, *J. Ethnopharmacol.* 94, 25-41.
- Buss, D.H., Cashell, A.W., O'Connor, M.L., Richards II,

- F., Case, L.D., 1994. Occurrence, etiology, and clinical significance of extreme thrombocytosis: a study of 280 cases, *Am. J. Med.* 96, 247-253.
- Choi, H.S., Wu, X.Y., Kim, W.S., Lee Y, Choi, B.M., Kuk, Y.I., 2011. Effects of organic materials on insect and disease occurrence and fruit quality in pear orchards, *Korean J. Org. Agric.* 19, 405-416.
- Dasgupta, T., Banerjee, S., Yadava, P.K., Rao, A.R., 2004. Chemopreventive potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine arcinogenesis model systems, *J. Ethnopharmacol.* 92, 23-36.
- Deng, Y.X., Cao, M., Shi, D.X., Yin, Z.Q., Jia, R.Y., Xu, J., Wang, C., Lv, C., Liang, X.X., He, C.L., Yang, Z.R., Zhao, J., 2013. Toxicological evaluation of neem (*Azadirachta indica*) oil: acute and subacute toxicity, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35, 240-246.
- Dixit, V.P., Sinha, R., Tank, R., 1986. Effect of neem seed oil on the blood glucose concentration of normal and alloxan diabetic rats, *J. Ethnopharmacol.* 17, 95-98.
- El Hawary, Z.M., Kholief, T.S., 1990. Biochemical studies on hypoglycemic agents (I) effect of *Azadirachta indica* leaf extract, *Arch. Pharm. Res.* 13, 108-112.
- Elliott, M.A., Tefferi, A., 2005. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia, *Br. J. Haematol.* 128, 275-290.
- Eyong, E.U., Atangwho, I.J., David-Oku, E., Agiang, M.A., Ebong, P.E., 2013. Haematological and immunological effect of coadministration of extracts of *Vernonia amygdalina* and *Azadirachta indica* on normal and diabetic rats, *Afr. J. Biotechnol.* 10, 10258-10262.
- Ezz-Din, D., Gabry, S.M., Farrag, A.H., Abdel Moneim, A.E., 2011. Physiological and histological impact of *Azadirachta indica* (neem) leaves extract in a rat model of cisplatin-induced hepato and nephrotoxicity, *J. Med. Plants Res.* 5, 5499-5506.
- Gangar, S.C., Sandhir, R., Koul, A., 2010. Effects of *Azadirachta indica* on certain hematological parameters during benzo (a) pyrene induced murine forestomach tumorigenesis, *Eur. Rev. Med. Pharmacol.* 14, 1055-72.
- Gonzalez, M.S., Marquez, A.A., Melendez, C.E., Lopez-Ortega, A.A., 2010. Efecto del extracto de hojas de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) en la Diabetes Mellitus inducida por Estreptozotocina en ratones, *Gaceta de Ciencias Veterinarias* 15, 64-71.
- Gupta, S., Gupta, P.K., Kataria, M., Somvanshi, R., Shakoor, A., Vijjan, V.K., 1998. Toxicity of azadirachtin (neem) based formulation in rats, *Indian J. Environ. Toxicol.* 8, 77-80.
- Gupta, S., Kataria, M., Gupta, P.K., Vijjan, V.K., 2001. Effect of petroleum ether extracts of different parts of neem seed (*Azadirachta indica*) on haematological and biochemical parameters in rats, *Indian J. Anim. Res.* 35, 21-26.
- Kang, B.H., Son, H.Y., Ha, C.S., Lee, H.S., Song, S.W., 1995. Reference value of hematology and serum chemistry in Ktc: Sprague-Dawley rats, *Korean J. Lab. Ani. Sci.* 11, 141-145.
- Khosla, P., Bhanwra, S., Singh, J., Seth, S., Srivastava, R.K., 2000. A study of hypoglycaemic effects of *Azadirachta indica* (Neem) in normal and alloxan-diabetic rabbits, *Indian J. Physiol. Pharm.* 44, 69-74.
- Kim, H.S., Yang, J.E., Kim, K.H., 2010. Safety evaluation systems for organic inputs, *Korean. J. Org. Agric.* 2, 266-266.
- Kim, H.Y., Song, S.W., Ha, C.S., Han, S.S., 1993. Effects of the population density on growth and various physiological values of Sprague-Dawley rats, *Kor. J. Lab. Ani. Sci.* 9, 71-78.
- Kroes, B.H., Van deng Berg, A.J.J., Labadie, R.P., Abeysekera, A.M., De Silva, K.T.D., 1993. Impact of the preparation process on immunomodulatory activities of the ayurvedic drug Nimba arishta. *Phytotherapy Research* 7, 35-40.
- Lee, J.H., 2002. Interpretation of liver function tests. *Inje. Med. J.* 23, 33-50.
- Lee, W.Y., Lee, S.D., Son, S.I., Chang, H.S., Kim, Y.H., Oh, T.H., Eom, K.D., Chang, K.H., Park, S.C., Yamato, O., Maede, Y., Lee, K.W., 2003. The effect of *Artemisia capillaris* crude juice extract on CCl₄ induced liver damage in dogs, *J. Vet. Clin.* 20, 389-395.
- Madhumathy, A. P., Aivazi, A., Vijayan, V.A., 2007. Larvicidal efficacy of *Capsicum annum* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*, *J. Vect. Born Dis.* 44, 223-226.
- Mahboob, M., Siddiqui, M.K.J., Jamil, K., 1998. The effect of subacute administration of a neem pesticide on rat metabolic enzymes, *J. Environ. Sci. Health B.* 33, 425-438.
- Mandrup-Poulsen, T., 1998. Recent advances: diabetes, *BMJ* 316, 1221-1225.
- Modak, M., Dixit, P., Londhe, J., Ghaskadbi, S., Devasagayam, T.P.A., 2007. Indian herbs and herbal drugs used for the treatment of diabetes, *J. Clinical. Biochem. Nutri.* 40, 163.
- Mohammed, A., Abubakar, S.A., 2012. Potency of aqueous extract of *Azadirachta indica* A. juss against

- lipid peroxidation and liver damage in rats, *Int. J. Modern Biochem.* 1, 27-35.
- Mossa, J.S., 1985. A study on the crude antidiabetic drugs used in Arabian folk medicine, *Int. J. Crude Drug Res.* 23, 137-145.
- Neuzil, J., Roland S., 1994. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation, *J. Biol. Chem.* 269, 16712-16719.
- Ozaki, M., Nakamura, M., Teraoka, S., Ota, K., 1997. Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. *Transpl. Int.* 96-102.
- Park, J.H., Ryu, K.Y., Jee, H.J., Lee, B.M., Gho, H.G., 2008. Evaluation of insecticidal activity of plant extracts against three insect pests, *Kor. J Appl. Entomol.* 59-64.
- Pingale, S.S., 2010. Hepatoprotection study of leaves power of *Azadirachta indica* A. Juss, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 3, 37-42.
- Rahman, M.F., Siddiqui, M.K.J., Jamil, K., 2001. Effects of vepacide (*Azadirachta indica*) on aspartate and alanine aminotransferase profiles in a subchronic study with rats, *Hum. Exp. Toxicol.* 20, 243-249.
- Reitman, S., Flankel, S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase, *Am. J. Clin. Pathol.* 40, 56-63.
- Schumutter, H., 1990. Properties & potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*, *Annu. Rev. Entomol.* 35, 271-297.
- Siow, R.C., Hideyo, S., Giovanni, E.M., 1999. Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovascular research.* 41, 385-394.
- Song, K.H., Kim, D.H., Choi, K.J., 1996. The effect of aqua-acupuncture of total saponin on the damaged liver induced by carbon tetrachloride in rats, *Kor. J. Vet. Clin. Med.* 13, 108-113.
- Stocker, R., Alexander N.G., Bruce N.A., 1987. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 5918-5922.
- Woo, H.D., Lee, J.K., Han, G.D., 2010. Consumer awareness survey on safety management of pesticide residue, *Food Sci. Industry* 43, 24-40.
- Wilson, P. W., Anderson, K. M., Kannel, W. B., 1986. Epidemiology of diabetes mellitus in the elderly: the Framingham Study, *Am. J. Med.* 80, 3-9.
- Yoon, H., Choe, M., Cho, H., Han, B.S., Park, K, Oh, J, Cho, N., Paik, M., 2014. Study of kidney toxicity of *Azadirachta Indica* extract for oral administration in rats. *Korean J. Environ. Agric.* 103-110.