

종합비타민의 랫드에서 반복투여독성 시험과 대식세포 기능 활성 평가

김혜리 · 장혜연 · 이해님 · 박영석 · 박병권 · 김병수 · 김상기 · 조성대¹ · 남정석² · 최창순³ · 장순혁⁴ · 정지윤*

공주대학교 특수동물학과, ¹전북대학교 구강병리학교실,

²가천의과학대학교 이길여암당뇨연구원, ³중앙대학교 식품공학부, ⁴주식회사 우리가제약

Evaluation of Macrophage Activity and Repeated Oral Dose Toxicity in Sprague-Dawley Rats on Multivitamin

Hye-Ri Kim, Hye-Yeon Jang, Hae-Nim Lee, Young-Seok Park, Byung-Kwon Park, Byeong-Soo Kim, Sang-Ki Kim,
Sung-Dae Cho¹, Jeong-Seok Nam², Chang-Sun Choi³, Soon-Hyuk Chang⁴, and Ji-Youn Jung*

Dept. of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea

¹School of dentistry, Institute of Oral Bioscience, Chongbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

²Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute, Gachon University of Medicine and Science, Incheon 406-840, Korea

³School of Food Science and Technology, Chungang University Ansung 456-756, Korea

⁴Woorigapharm. co., Ltd, Seongnam 462-807, Korea

(Received November 28, 2013/Revised December 5, 2013/Accepted December 9, 2013)

ABSTRACT - The objective of this study is to investigate the effect of multivitamin on macrophage activity in Raw 264.7 cell and repeated oral dose toxicity in Sprague-Dawley rat of multivitamin. Raw 264.7 cells were treated with 50 and 100 µg/mL multivitamin for 24 h. To measure the activity of macrophages, NO and TNF-α assays were performed in Raw 264.7 cells. Treatment with 50 and 100 µg/mL multivitamin for 24 h significantly increased production of NO and TNF-α compared with control groups, indicating activation of macrophages. The female rats were treated with multivitamin of control group, low group (0.24 g/kg), medium group (1 g/kg) and high group (2 g/kg) intragastrically for 4 weeks, respectively. We examined the body weight, the feed intake, the clinical signs and serum biochemical analysis. We also observed the histopathological changes of liver, ovary, brain, adrenal gland, spleen, kidney, heart and lung in rats. No significant differences in body weights, feed intake, biochemical analysis and histopathological observations between control and multivitamin treatment group were found. In conclusion, multivitamin is physiologically safe and improve macrophage activity.

Key words : Multivitamin, Toxicity, Macrophage

산업이 발달함에 따라 바빠지는 현대인들에게 음식 섭취를 통한 충분한 비타민 공급은 쉽지 않다. 그렇기 때문에 질병을 예방하거나 건강증진을 목적으로 하는 건강 보조식품에 대한 관심이 높아지고 있다. 비타민은 생체 내의 물질대사를 조절하는 작용을 하는 필수 영양소 중 하나로써 우리 몸에 꼭 필요한 작용을 하므로 소량으로도 우리 몸의 신진대사에 큰 영향을 줘 부족하면 면역력 결핍 등 문제가 생긴다. 또한 최근 비타민의 성인병 예방이나 질병치료 보조제로서의 효과가 연구 발표로 드러나 보다 적

극적인 의미에서 임상활용이 확대되어가고 있다. 생체 내 필수 영양소 중 하나인 비타민은 수용성 비타민과 지용성 비타민으로 나뉘며 비타민제는 단백질 성분은 포함하고 있지 않아 그 자체가 알레르겐으로 작용하지 않을 가능성이 높지만 비타민제를 투여한 후 과민반응을 보이는 경우가 드물지 않게 발생한다¹⁾.

수용성과 지용성으로 나뉘는 비타민은 용해성에 따라 나눌 수 있는데 지용성 비타민은 구조적으로 긴 탄소사슬을 가지고 있어 물에 녹지 않으며 수용성 비타민은 극성 작용기를 가져 물에 잘 녹는다. 대표적으로 비타민 A, D, E, K를 지용성 비타민으로 구분하고, 비타민 B, C를 수용성 비타민이라고 하는데 비타민 E는 흡수율을 높이기 위해 물에 가용성으로 만들지만 일단 소장에서 흡수된 후 지용성으로 변환되어 작용하기 때문에 지용성 비타민으로 분

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

류한다. 지용성 비타민은 소장에서 chylomicron이라는 단백질에 의하여 흡수된 후 림프관을 거쳐 혈액으로 들어간 후 통과해 전신을 순환한다. 지용성 비타민은 지방이 들어있는 음식과 함께 섭취하게 되면 흡수율이 더욱 좋으며, 지방의 배설과 유사하게 담즙을 통하여 대부분 대변으로 배설된다. 비타민 A 중 레티놀과 비타민 D는 신체에서 필요로 하는 양이 소량이고 축적이 잘되어 독성을 일으킬 수 있다. 그 외에도 비타민 A는 시각기능에 관여하고 성장인자로 작용하는 비타민으로 눈의 망막에서 대사 산물인, 흡광 분자 레티놀의 형태로 작용하는데 레티놀은 박명시와 색조 감각에 절대적으로 필요하다. 비타민 A는 또한 레티놀이 비가역적으로 산화된 형태인 레티노산의 형태로 상피 세포 등에서 호르몬과 같이 중요한 성장 인자로서 기능을 한다. 항산화제로 알려진 비타민 E는 주로 세포막, 적혈구막 그리고 미토콘드리아막에서 유리기 포착제로서 산화적 손상에 대한 보호작용을 하고, 막 속의 인지질과 황을 함유한 단백질과 결합하여 막 안정화에 기여한다는 보고들이 발표가 되었다^{2,4)}. 비타민 D는 태양광선에 통해 광합성 되고 체내에 흡수된 칼슘, 뼈와 치아에 축적되고 흉선에서 면역세포 생산에 작용하는 일종의 호르몬이다. 또한 비타민 D는 식이를 통해 비타민 D2와 비타민 D3의 형태로 섭취가 된다. 비타민 D는 체내에서 세포증식과 분화의 조절작용, 면역기능조절작용, 항암작용을 보이지만^{5,6)} 주요기능은 칼슘염과 인삼염의 흡수를 촉진하여 골격형성에 도움을 준다. 비타민 B1 (Thiamin)은 신경계 질환인 각기병을 예방하고 치료하며 비타민 B2 (Riboflavin)는 비타민 G라고도 하며 각종 대사에 중요한 역할을 하는 조효소 구성 성분으로 세포가 탄수화물, 지방, 단백질로부터 에너지를 공급받는 물질대사에 참여한다. 비타민 B6는 피리독신(pyridoxine), 피리독살(pyridoxal), 피리독사민(pyridoxamine)의 세가지 화합물로 구성되어 있으며 아미노산 대사, 헴합성, 탄수화물 대사 신경전달물질 합성, 비타민 형성, 면역대사와 지질대사에 관여한다. 비타민 C는 항산화 물질로 자유라디칼의 억제제로서 지질과 산화연쇄반응을 차단시켜 간 조직의 지방대사에 영향을 줄 수 있음이 보고되었으며⁷⁾ 일부 상황에 따라 활성산소를 제거하기도 하고 반대로 오히려 생성하기도 한다. 또한 면역체계도 강화시킬 뿐만 아니라 결합조직과 지지조직의 형성에 가담하여 피부와 잇몸의 건강유지에도 기여한다.

종합비타민은 다양하고 많은 종류의 비타민과 권장되는 주요 영양소 섭취량의 미네랄이 포함되어 있다⁸⁾. 현재 이 종합비타민과 미네랄 보충제는 미국에서도 가장 일반적으로 사용되는 영양 보조 식품이다⁹⁾. 면역계 기능이 최적의 상태로 올바르게 작동되기 위해서는 체계적이고 알맞은 비타민 공급은 필수 요소다. 생체 내의 면역력 약화로 인한 스트레스와 노화는 신체 여러 기관의 세포와 조직의 구조를 변화시키고 기능을 저하시킨다. 또한, 강력한 항레

트로바이러스 치료(highly active antiretroviral therapy, HAART) 기간에 종합비타민 보충제의 사용은 바이러스 숫자(viral load)를 경감시키고 면역 반응을 강화하며 일반적으로 HIV 감염 성인의 임상 결과를 개선할 수 있다¹⁰⁾. 중국 Linxian에서 행한 연구에 의하면 종합비타민과 미네랄 보충제를 섭취하면 위암과 뇌졸중에 의한 사망률을 9% 낮추준다는 효과가 있다고 연구 발표하였다^{11,12)}. 이는 비타민의 항산화 효과에 의한 것으로 암의 예방 및 치료에서도 종합비타민과 미네랄 보충제의 섭취는 중요하게 작용한다. 또한 Cole 등¹³⁾은 필수 영양소의 대부분은 면역기능과 관계하며, 특히 미네랄과 비타민이 면역 기능과 직접적인 관계를 가진다 보고하였다.

이에 본 실험에서는 종합비타민을 사용하여 랫드의 여러 장기에 미치는 영향에 대하여 확인하였다. 종합비타민을 각각 투여한 랫드의 몸무게, 사료섭취량, 혈청생화학검사와 조직학적 검사를 통해 종합비타민의 독성유무를 판단하였고 macrophage를 이용한 nitric oxide (NO) 및 TNF- α assay를 통한 결과를 바탕으로 면역증강 효능이 있는지 확인하였다.

재료 및 방법

시험물질

본 연구에서는 (주)우리가제약에서 제공한 종합비타민을 시험에 사용하였다. 원료약품 및 분량으로는 본제 1정(300 mg) 중 비타민 A (Vitamin A)가 500 IU, 비타민 D3 (Cholecalciferol)가 100 IU, 비타민 E (Tocopherol acetate)는 0.3 mg, 비타민 B1 (Thiamin hydrochloride)은 0.2 mg, 비타민 B2 (Riboflavin)는 0.5 mg, 비타민 B6 (Pyridoxine hydrochloride)는 0.2 mg, 비타민 C (Vitamin C)는 0.4 mg, 비타민 K3 (Menadion sodium bisulfite)는 0.05 mg, 나이아신아미드(Nicotinamide)가 0.6 mg, 엽산(Folic acid)이 0.01 mg, 판토텐산칼슘(Calcium pantothenate)은 0.4 mg, DL-메티오닌(DL-methionin)이 1.5 mg, L-카르니틴(L-carnitine)이 0.3 mg 첨가되어 있다. 또한, 제형으로는 경구용 정제이고 성상은 암갈색의 정제이다.

세포배양

본 연구에서는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받은 RAW 264.7 세포주를 사용하였다. Raw 264.7 대식세포는 DMEM (Hyclone Laboratoris Inc., Logan, UT, USA)에 10% fetal bovine serum, 1% streptomycin/penicillin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

NO assay

NO assay는 CAYMAN (Denver, CO, USA)의 NO kit를

사용하였다. Raw 264.7 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/mL로 분주한 후에 24시간 동안 배양시킨 다음, Raw 264.7 세포주에 시험물질을 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24시간 동안 배양한 후 상등액을 취하였다. 상등액 중 100 μL 를 취하여 새로운 96 well plate에 옮긴 후 100 μL Griegre reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride/2.5% H_3PO_4)를 넣고 10분간 실온에서 방치한 후 ELISA-reager (Bio-Rad Laboratories Inc.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite 검량선으로부터 세포가 분비하는 nitric oxide를 계산하였다.

TNF- α assay

TNF- α assay는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)의 TNF- α kit를 사용하였다. Raw 264.7 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/mL로 분주 후에 24시간 동안 배양시킨 다음 Raw 264.7 세포주에 시험물질을 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24시간 동안 배양한 후 상등액을 취하였다. 상등액 중 50 μL 를 취하여 TNF- α antibody-coated 처리된 96 well plate에 옮긴 후 standard diluents buffer와 biotinylated anti-TNF- α solution을 각각 50 μL 첨가한 후 90분간 실온에서 배양하였다. 배양 후, wash buffer를 이용하여 4번 washing 한 후 streptomycin-HRP 100 μL 를 첨가하고 30분간 실온에서 반응시켰다. 이를 4번 washing 한 후 stabilized chromegen을 각 well에 100 μL 첨가한 후, 차광하여 30분간 실온에서 반응시켰다. 각 well에 stop solution 100 μL 를 첨가한 후 30분 이내로 ELISA-reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

실험동물

실험동물로는 4주령의 Sprague-Dawley계통의 암컷 랫드 25마리를 Orient-Bio Inc. (Seongnam, Gyeonggi do, Korea)에서 구입하여 2주간에 걸쳐 환경적응을 위한 예비사육을 실시하였으며, 예비사육기간동안 모든 동물의 일반 건강 상태에 대한 수의학적 검역을 실시하여 20마리를 선별하였다. 선별된 동물의 난괴법(randomized block design)에 의해 각 군별로 5마리씩 구성하였으며, 군분리시 균평균 체중 및 군표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다. 실험기간 중 사육실 환경조건은 실내온도 $24 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조명시간 12시간(08:00 점등, 20:00 소등), 조도는 150~200 Lux로 유지하였다. 사육환경 모니터링을 위하여 온도, 습도는 주기적으로 측정하였으며 기타 환경은 정기적으로 점검하여 일정한 표준치를 유지하였다. 동물의 개체식별은 문신법을 사용하였으며, 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여용량, 실험기간 및 실험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하였다. 모든 실험동물은 매일 일정한 시간에 실험동물용 고형사료(Samtako Co., O San, Korea)와 음수를 급

여하여 자유 섭취토록 하였다.

동물실험은 공주대학교 동물실험윤리위원회의 사전 심의를 받아 동물실험윤리위원회규정에 따라 수행되었다.

시험군의 구성, 투여용량 및 용량

시험군의 구성은 동물전용 반려동물 전문영양제 펫튼 헬스케어7을 distilled water에 용해시켜 저용량군(0.24 g/kg), 중간용량군(1 g/kg), 고용량군(2 g/kg)의 용량으로 암컷 SD rat에 경구투여하였고, 용매 대조군에서는 D.W를 동일하게 투여하였다. 시험물질의 제조는 랫드의 하루 사료섭취량을 기초로 계산하여 체중치량 직전에 제조하여 투여하였다. 시험물질의 투여는 4주 동안 주 5회(월~금) 일정한 시간에 (10:00) 경구투여하였다.

일반증상 관찰 및 안과학적 검사

일반증상 관찰은 모든 실험동물에 대하여 시험기간 중 1일 1회 실시하였고, 일반 임상증상 항목으로써 anorexia, salivation, diarrhea, vomiting, polyuria, anuria, fecal change의 정도를 기록하였다. 또한 안과학적 검사는 랫드에서 투여기간 중 각 군당 5마리씩의 동물에 대하여 육안 및 검안경을 이용한 안과학적 검사를 실시하였다.

체중, 사료섭취량 및 음수량 측정

모든 동물에 대하여 시험개시일로부터 시험종료일까지 매주 1회 체중을 측정하였다. 사육상자별로 당일 급여 및 급수총량과 익일 잔량의 차를 시험개시 후 매주 1회 측정하여 일일 사료섭취량 및 음수섭취량으로 하였다.

혈청생화학적 검사

부검 전에 모든 실험동물에 대하여 채혈을 실시하였다. 혈청 생화학적 검사는 채취한 혈액의 일부를 실온에 30분간 방치하여 응고 후 원심분리(3000rpm, 30min)하여 얻은 혈청에 대해서 혈청자동분석기(BS-400, MINDRAY, China)를 이용하여 총 단백(total protein), 총 빌리루빈(total bilirubin), 혈액요소질소(Blood urea nitrogen ; BUN), CRE(creatinine), 아스파르테이트 아미노전이효소(aspartate transaminase ; AST), 알라닌 아미노전이효소(alanine transaminase; ALT), 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphate ; ALP), 총 콜레스테롤(total cholesterol)을 측정하였다. 전해질자동분석장치(EAE electrolyses, Medica, USA)를 이용하여 sodium (Na^+), potassium (K^+), chloride (Cl^-) 농도를 측정하였다. 혈청생화학적 검사는 (주) 네오딘벳랩에 의뢰하여 측정하였다.

장기 중량 측정

장기 무게를 조사하기 위하여 실험 종료시 모든 실험동물을 해부하여 간, 신장(좌,우), 폐, 비장, 심장, 부신(좌,우), 난소(좌,우), 뇌를 적출하여 ice-cold physiological saline

(0.9% NaCl)에 혈액과 체액을 거즈로 제거한 후 실험 중량을 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(Shacon Inc, USA)으로 5 μ m 절편을 만들어 hematoxylin & Eosin 염색을 하여 광학현미경($\times 200$)으로 관찰하였다.

통계학적 방법

모든 실험결과는 평균치와 표준오차(mean \pm SE)를 사용하여 나타내고 각 군간 비교는 one-way ANOVA에 이은 t-test 분석을 실시하였다. 대조군과 비교하여 p값이 0.05 미만일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다. 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

시험물질 처리에 의한 대식세포 NO 및 TNF- α 분비 확인

본 연구에서는 시험물질에 의한 대식세포의 활성을 평가하기 위하여 NO 및 TNF- α assay를 실시하였다. 감염된 미생물의 방어를 위해 대식세포가 effector function을 갖기 위해서는 nitric oxide (NO)가 중요하다고 알려져 있다¹⁴⁾. 따

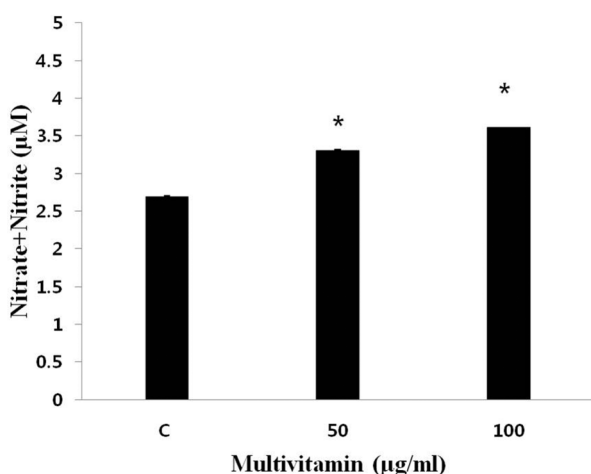


Fig. 1. The effect of multivitamin on nitric oxide (NO) production in Raw 264.7 cells.

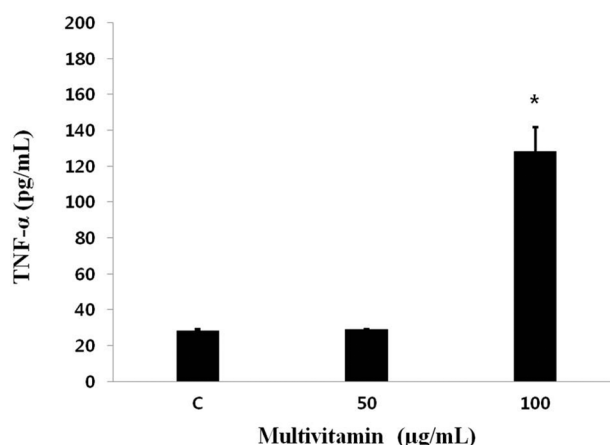


Fig. 2. The effect of multivitamin on TNF- α production in Raw 264.7 cells.

라서 Fig. 1에서는 시험물질을 50, 100 μ g/mL 의 농도로 24시간 동안 처리한 후 대식세포의 활성화 단계에 따라 NO 분비의 발현이 어떻게 변화하는지 확인해 보았다. NO의 분비는 농도의존적으로 증가하였으며, 시험물질 처리군에서 모두 유의적인 차이를 나타내었다. 이는 종합비타민 처리가 NO 생성량 증가에 영향을 끼칠 수 있다고 사료된다.

감염된 미생물의 방어를 위해 대식세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로 TNF- α 가 알려져 있다¹⁴⁾. 비정상적인 세포, 즉 종양세포나 바이러스에 감염된 세포에서는 항미생물 작용이나 항바이러스성 작용, 면역 조절 등의 방호기능이 역부족해서 산화적 스트레스에 민감할 수밖에 없으나, TNF- α 는 활성화된 대식세포나 림프세포 그리고 신경세포 등 여러 세포에서 생성된다¹⁵⁾. 따라서, Fig. 2에서는 시험물질에 의한 대식세포의 TNF- α 의 분비에 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보았다. TNF- α 의 분비는 고농도에서 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. NO 및 TNF- α 의 생산이 증가한 것으로 볼 때 종합비타민이 macrophage인 Raw 264.7 세포를 활성화시키는 것으로 사료된다.

임상증상 및 안과학적 검사

식품의약품안전청의 독성시험기준을 참고하여 암컷 랫드에서의 반복 투여독성시험에서 전 시험기간동안 매일 일회씩 임상증상을 관찰한 결과 모든 투여군에서 대조군과 비교하였을 때 시험물질 투여로 인한 임상증상은 관찰되지 않았다(data not shown). 5주간의 실험기간 동안 대조군을 포함한 모든 투여군에서 별다른 임상증상은 관찰되지 않았고 폐사개체도 없었다.

투여기간 중 각 동물에 대하여 육안 및 검안경을 이용한 안과학적 검사를 실시하였을 때 랫드의 대조군 및 투여군 모두에서 유의할만한 이상은 나타나지 않았다(data not shown).

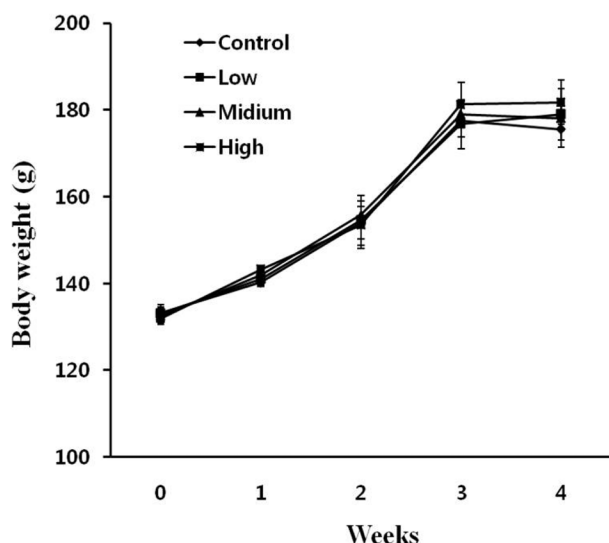


Fig. 3. Body weight in rats treated orally with multivitamin for 4 weeks.

체중, 사료 및 음수섭취량 변화

4주간 반복투여독성시험을 진행하는 동안 대조군 및 투여군 모두에서 시험물질에 의한 유의할 만한 체중 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3). 투여 전 군분리 결과 체중은 대조군 133.25 ± 1.80 , 저용량군 133.00 ± 1.58 g, 중간용량군 132.50 ± 1.66 g, 고용량군 132.00 ± 1.47 g으로 크게 차이가 나지 않았다. 시험 마지막 주인 4주차 체중은 대조군 175.50 ± 4.09 g, 저용량군 179.00 ± 5.96 g, 중간용량군 178.00 ± 2.86 g 그리고 고용량군 181.75 ± 5.07 g으로 군에 따른 체중 증가량이 크게 차이 나지 않고 거의 유사한 증가량을 보이는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 전 시험기간을 통해 동물 당 일일 사료 및 음수섭취량은 대조군 및 시험물질 투여군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 시험기간 중 시험물질 대조군, 저용량군, 중간용량군, 고용량군의 동물 당 평균 일일 사료 섭취량은 16.11 ± 0.74 g, 16.10 ± 0.62 g, 15.74 ± 0.69 g, 16.73 ± 0.72 g이었다(data not shown).

혈청 생화학적 검사조건

부검시의 혈청생화학적 검사에 있어서 일부의 항목에서 시험물질 투여군은 대조군에 비하여 유의성 있는 변화를 나타냈다(Table 1). 시험물질 저용량군에서는 Cl에서 유의적인 차이를 보였으며, 중간용량에서는 T-protein, AST, ALP, Na, K, Cl에서 유의적인 차이를 보였다. 고용량군에서는 T-protein, AST, Na, K, Cl에서 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이를 보였다. ALP는 중간용량군에서는 대조군에 비하여 유의적인 차이를 보였지만 다른 시험물질 투여군에서 용량의존성이 인정되지 않아 시험물질 투여로 인한 현상으로는 여겨지지 않는다.

간기능 검사를 하기 위해 간세포에서 생산되는 효소를 포함, 다양한 종류의 단백질과 이와 관련된 물질들을 측정하였다. ALT, AST는 간세포의 손상을 반영하는 지표로서 시험물질의 투여가 간 기능의 증진을 유도하는 것으로 판단된다.

일부 혈청 생화학적인 수치에서 유의차가 인정되었으며 T-protein의 증가는 간세포의 손상이나 자가 면역성 질환을 의심할 수 있으며 K는 당을 에너지로 전환하며 세포 내 삼투질 농도를 조절하고 수소이온과 세포교환을 통해 산-염기 균형 유지에 도움을 주는 전해질로써 시험물질 투여군에서 용량에 따라 K이 감소하고 T-protein이 증가하는 경향을 보였으나 이는 정상 범위 내에서의 변화로써 시험물질에 의한 영향을 아닌 것으로 사료된다.

체중에 대한 각 장기의 상대장기중량비

시험종료 후 부검하여 모든 생존동물의 장기를 육안 검사한 결과 모든 시험군에서 시험물질 투여에 기인한 이상 소견은 관찰되지 않았다.

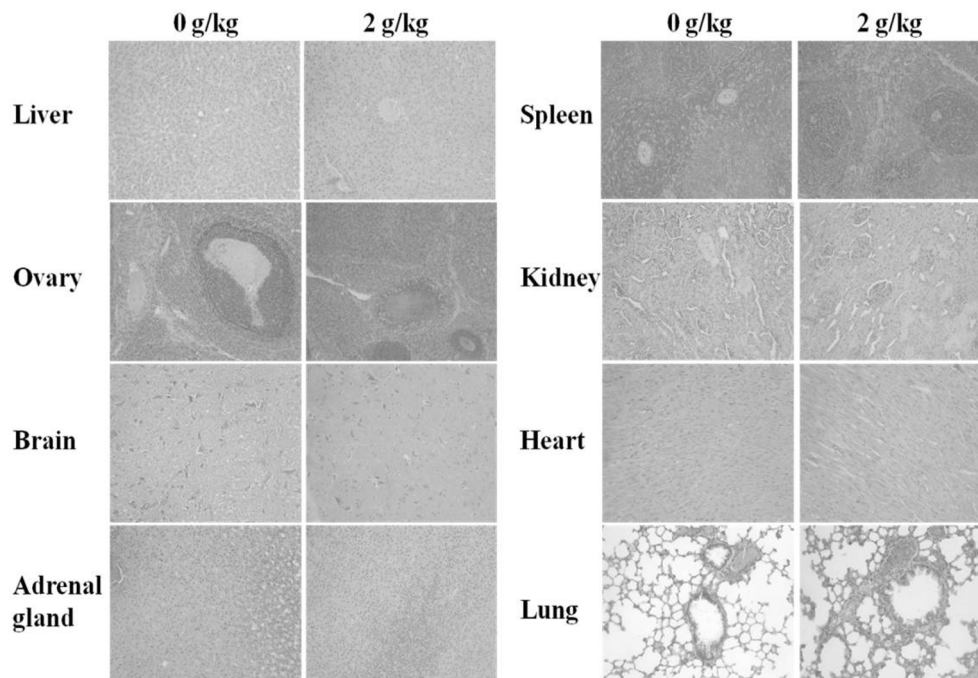
부검시 적출한 랫드의 내부장기의 중량을 측정한 결과, 상대장기중량비에 있어서 투여군과 대조군을 비교하였을 때 일부 장기에서 유의적인 차이를 나타냈다(Table 2). Liver는 고용량군에서 유의적인 차이를 보였고 spleen은 중간용량과 고용량에서 유의적인 차이를 보였으며 heart도

Table 1. Serum biochemical values of rats treated orally with multivitamin for 4 weeks

Parameter	Group Dose	Multivitamin			
		Control 0 g/kg	Low 0.24 g/kg	Medium 1 g/kg	High 2 g/kg
T-protein (g/dL)		6.43 ± 0.46	6.58 ± 0.31	7.10 ± 0.07*	7.23 ± 0.13*
T-bilirubin (mg/dL)		0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
AST (IU/L)		227.00 ± 28.12	200.25 ± 42.13	168.50 ± 20.92*	125.50 ± 20.92*
ALT (IU/L)		26.25 ± 3.94	23.75 ± 1.25	23.00 ± 1.08	22.75 ± 0.85
ALP (IU/L)		125.00 ± 11.79	147.25 ± 10.90	167.75 ± 11.28*	121.75 ± 8.04
Cholesterol (mg/dL)		72.25 ± 12.77	66.50 ± 5.55	82.50 ± 5.06	66.75 ± 7.92
BUN (mg/dL)		22.96 ± 3.06	25.23 ± 0.69	23.24 ± 2.76	27.59 ± 2.05
Creatinine (mg/dL)		0.66 ± 0.07	0.67 ± 0.05	0.66 ± 0.03	0.71 ± 0.06
Na (mEq/L)		143.00 ± 0.53	142.78 ± 0.34	147.28 ± 0.61*	146.18 ± 0.61*
K (mEq/L)		3.94 ± 0.30	4.41 ± 0.40	3.48 ± 0.11*	3.29 ± 0.13*
Cl (mEq/L)		101.10 ± 0.56	103.65 ± 1.85*	106.88 ± 1.96*	103.40 ± 0.72*

Table 2. Realtive organ weight(%) of females rats orally administered with multivitamin for 4 weeks

Organ (%)	Group Dose	Multivitamin			
		Control 0 g/kg	Low 0.24 g/kg	Midium 1 g/kg	High 2 g/kg
Body weight		175.5 ± 4.09	179.00 ± 5.96	178.00 ± 2.86	181.75 ± 5.07
Brain		1.06 ± 0.05	0.97 ± 0.06	1.03 ± 0.03	1.06 ± 0.02
Liver		3.29 ± 0.21	3.05 ± 0.07	3.03 ± 0.08	2.75 ± 0.02*
Spleen		0.23 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.01*	0.18 ± 0.01*
Heart		0.43 ± 0.02	0.38 ± 0.01*	0.35 ± 0.02*	0.37 ± 0.02*
Lung		0.59 ± 0.05	0.60 ± 0.04	0.57 ± 0.04	0.60 ± 0.02
Ovary	R	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00*	0.03 ± 0.00*	0.03 ± 0.00*
	L	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00*	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01*
Adrenal gland	R	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
Kidney	R	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.01*	0.40 ± 0.01
	L	0.37 ± 0.03	0.37 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.39 ± 0.01

**Fig. 4.** Histological observation of rats treated orally with multivitamin for 4 weeks.

모든 시험물질 투여군에서 대조군에 비하여 통계학적으로 유의적인 차이를 보였으나, 모두 정상 범위 내에서의 변화를 보였다. Ovary (L,R), kidney (L,R) 또한 시험물질 투여군에서 유의적인 차이를 보였으나 용량의존성을 보이지 않았으므로 시험물질에 기인된 변화는 아닌 것으로 사료된다.

병리조직검사 소견

랫드의 4주 반복 투여 독성시험에서 시험물질 투여로 인한 특이할만한 조직병리학적 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4). 시험결과에 있어서 모든 시험군 및 대조군에서 별다른 임상증상과 체중변화 그리고 사료섭취량은 관찰되지 않았으며, 폐사 및 빈사 동물은 시험 전기간을 통하여 관찰되지 않았다.

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

이상의 결과로부터 동물전용 반려동물 전문영양제 펫튼 헬스케어는 0.24 g/kg, 1 g/kg, 2 g/kg 수준으로 4주간 경구 투여 시 유의할만한 독성이 유발되지 않았다.

요 약

본 연구는 Spragye-Dawely 계통의 암컷 랫드에서 종합 비타민의 반복경구투여 독성평가와 대식세포 Raw 264.7 세포의 NO 및 TNF- α assay를 통한 면역 활성을 평가하기 위해서 실시하였다. 종합비타민을 대식세포의 활성능

을 측정하기 위해 Raw 264.7 세포에서 NO와 TNF- α 의 생성을 측정하였다. 종합비타민을 대식세포에 24시간 처리한 결과 대조군과 비교 시 NO와 TNF- α 가 유의적으로 상승하였다. 이 결과 종합비타민이 대식세포인 Raw 264.7 세포를 활성화시키는 것으로 사료된다. 또한 랫드에서 종합비타민의 독성평가를 위하여 랫드에 종합비타민을 0.24 g/kg, 1 g/kg 그리고 2 g/kg을 4주 동안 경구투여를 하였다. 종합비타민의 안전성을 확인하기 위해 다음과 같은 관찰 및 검사를 하였다. 검사항목으로는 체중과 사료 섭취량, 임상증상, 혈청생화학적 검사를 관찰한 결과 대조군과 투여군을 비교 시 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 따라서 종합비타민은 생리대사에 무해하며 면역증강의 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Lee IJ, Kim SY, An JS, Son KM, Lee SH, Han CR and Kang HR : Allergic reactions to a multivitamin. *대한내과 학회지*, **77**, S1347-S1351 (2009).
2. Seo JS, Yang KM and Joung YA : Effects of dietary coenzyme Q10 and vitamin E on lipid peroxidation in adriamycin-treated rat. *J Korean Soc Food Nutr*, **20**, 320-328 (1991).
3. Pascoe GA and Reed DJ : Vitamin E protection against chemical-induced cell injury. II. Evidence for a threshold effect of cellular alpha-tocopherol in prevention of adriamycin toxicity. *Arch Biochem Biophys*, **256**, 159-66 (1987).
4. Kharasch ED and Novak RF : Inhibitory effects of anthracenedione antineoplastic agents on hepatic and cardiac lipid peroxidation. *J Pharmacol Exp Ther*, **226**, 500-506 (1983).
5. Lemire JM : Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **53**, 599-602 (1995).
6. Walters MR : Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev*, **13**, 719-764. (1992).
7. Kim YJ : The protect the living organ from free radicals and the failure of protection: age-related disease. *Bull Food Technol*, **10**, 4-26 (1997).
8. Song Y, Xu Q, Park Y, Hollenbeck A, Schatzkin A and Chen H : Multivitamins, individual vitamin and mineral supplements, and risk of diabetes among older U.S. adults. *Diabetes Care*, **34**, 108-114 (2011).
9. Radimer K, Bindewald B, Hughes J, Ervin B, Swanson C and Picciano MF. : 9. Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Am J Epidemiol*, **15**, 339-349 (2004).
10. Guwatudde D, Ezeamama AE, Bagenda D, Kyeyune R, Wabwire-Mangen F, Wamani H, Mugusi F, Spiegelman D, Wang M, Manabe YC and Fawzi WW : Multivitamin supplementation in HIV infected adults initiating antiretroviral therapy in Uganda: the protocol for a randomized double blinded placebo controlled efficacy trial. *BMC Infect Dis*, **15**, 304 (2012).
11. Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, Yang CS, Zheng SF, Gail M, Li GY, et al. : Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst*, **15**, 1483-1492 (1993).
12. Mark SD, Wang W, Fraumeni JF Jr, Li JY, Taylor PR, Wang GQ, Dawsey SM, Li B and Blot WJ : Do nutritional supplements lower the risk of stroke or hypertension? *Epidemiology*, **9**, 9-15 (1998).
13. Cole NA, Hutcheson DP : Influence of dietary protein concentrations on performance and nitrogen repletion in stressed calves. *J Anim Sci*, **68**, 3488-3497 (1990).
14. Lee JH, Cho SM, Song KS, Han SB, Kim HM, Hong ND and Yoo ID : Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from mycelium of *Phellinus linteus*. *J Microbiol Biotechnol*, **6**, 213-218 (1996).
15. Neta R, Sayers T and Oppenheim : In tumor necrosis factor. (Vilcek et al eds) Marcel Dekker, New York, pp 499 (1992).