

생쥐에 있어 Enalapril 및 *Ginkgo biloba* Extract(EGb 761) 복합제의 경구 아급성 독성실험

김은진 · 김진이 · 이영미 · 안형수 · 신완균*
동덕여자대학교 약학대학, *한영제약 중앙연구소

Subacute Toxicity Study of Enalapril and *Ginkgo biloba* Extract (EGb 761) Combinations in Mice

Eun Jin Kim, Jin Lee Kim, Young Mi Lee, Hyung Soo Ann and Wan Kyun Shin*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

*Research Center, Hanyoung Pharmaceutical Co. Seoul 151-080, Korea

(Received May 12, 1998)

(Accepted August 22, 1998)

ABSTRACT : Group of 40 male and 40 female ICR mice was given daily per oral treatment with the combination of enalapril plus *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), 3+9 mg/kg/day (low dosage group), 10+30 mg/kg/day (middle dosage group), 30+90 mg/kg/day (high dosage group) for 3 months in drinking water according to Established Regulation of Korean National Institute of Safety Research (1994. 4. 14). Appearance, behavior, mortality, and food consumption of mouse of treated groups were not affected during the experimental periods. No significant the combination of enalapril plus *Ginkgo biloba* extract (EGb 761)-related changes were found in urinalysis, hematology, serum chemistry, and organ weight. Lung edema were observed and the weight of lung were increased in low dosage treated group of the male mice, which might be associated with enalapril treatment, but these changes were not found in middle and high dosage group. Our results suggest that no toxic changes were found in rat treated orally with the combination of enalapril plus *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) for 3 months.

Key Words : *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), Enalapril, Subacute toxicity, Mice

I. 서 론

고혈압 치료에 임상적으로 가장 널리 사용되고 있는 것은 enalapril이며, 이 약물의 작용기전은 angiotensin converting enzyme 억제작용이다(Materson *et al.*, 1994). 그러나 폐에 bradykinin, substance P, prostaglandin의 축적에 의해 환자의 5~20%에서 마른기침이 초래되며, 그외에도 혈관부종, 발열 등을 초래할 수 있다(Materson, 1992). 또한 angiotensin II의 생성을 억제하므로 반사적으로 renin의 유리가 증가되며, 신장장애가 있는 환자의 경우 호중구 감소증 및 고K⁺ 혈증을 초래할 수 있다.

한편, *Ginkgo biloba* extract는 은행나무(*Ginkgo biloba* Linne)의 잎을 acetone-물로 추출한 것으로, 그 대표적인 성분은 24%의 flavonoids(ginkgo-flavone glycosides)

와 6%의 terpenoids(ginkgolides, bilobalide)이며, 그외에 proanthocyanidin과 유기산 등을 함유한다(Vanhaelen *et al.*, 1989). 즉, ginkgo-flavone glycosides는 주로 free radical scavenger로서 작용한다. 한편, *Ginkgo biloba* extract의 주성분인 ginkgolide B는 PAF 길항작용을 지닌다. 따라서 ginkgolide가 PAF-acether에 의한 기관지 수축을 억제하는 것으로 보고되었으며, 또한 백혈구 감소증을 감소시키는 것으로 보고되었다(Desquand, 1986). 임상적으로 *Ginkgo biloba* extract는 여러 주성분들의 독립적인 작용에 의해서라기 보다는 복합적인 작용에 의해 말초동맥 순환장애 및 치매성 증상을 수반하는 기질성 뇌기능장애의 치료에 응용되고 있어 어지러움, 이명, 두통, 기억력감퇴, 집중력장애, 우울감 등의 증상을 개선시킨다. 그런데 이러한 증상은 치매뿐만 아니라 고혈압 환자에게도 초래되는 일반적인 증상이므로 *Ginkgo biloba* extract를 투여시 고혈압의 일반적인 증상을 완화시킬 수 있을 것이다. 또한, 임상적

*To whom correspondence should be addressed.

으로 *Ginkgo biloba extract*를 1일 240 mg씩 12주간 연 용시 혈액의 점도를 저하시켜 고혈압에 유익한 효과를 나타내었다고 보고되었다(Witte *et al.*, 1992). 우리는 guinea pig에서 enalapril의 연용시 대표적인 부작용인 마른기침 및 과립구 감소증을 *Ginkgo biloba extract*와 병용처치시 감소시킬 수 있음을 검토하였으며, 폐고혈 압을 유발시킨 흰쥐에 있어서도 enalapril과 *Ginkgo biloba extract*의 복합제제를 처치시 유익한 효과를 얻 었다. 따라서 고혈압의 일반적 증상을 완화시키고, enalapril의 독성을 경감시킬 목적으로 혈압강하제인 enalapril과 혈류촉진제인 *Ginkgo biloba extract*의 1 : 3 복합제제를 고혈압 치료약으로 개발하고자 한다.

이에 본 시험에서는 안전성 평가를 위해 생쥐에게 임상적 투여경로인 경구로 3개월간 연속투여하여 초래 되는 아급성 독성을 관찰하였다.

II. 실험 방법

본 연구는 국립보건 안전연구원 고시94-3호 “의약품 등의 독성시험 기준(1994년 4월14일)에 준하여 실시하 였다.

1. 실험 동물

동일조건에서 사육한 생후 12 주령의 ICR계 생쥐를 실험에 사용하였다. 즉, 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$ 의 사육 환경에서 polycarbonate 사육상자에 생쥐 5마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 멸균된 실험동물용 고형사료를 자유롭게 섭취시켰다. 식수는 정제수를 자 유롭게 섭취토록 하였으며, 약물을 식수에 녹여 3개월 간 경구로 투여하였다. 생쥐는 암수 각각 대조군 (control), 저용량(low), 중간용량(middle), 고용량(high)의 4군으로 나누고 각군당 10마리씩으로 분류하였다.

2. 시약 및 조제

시험물질인 enalapril maleate(Lot No. 86ENA104; 이 하 “enalapril”로 표기)는 미국 MS&D Co.로 부터 공급 받아 사용하였으며, *Ginkgo biloba extract*(EGb 761; Lot No. GE96112717)는 독일 Subabbe사로부터 공급 받아 사용하였다. 이들 약물은 각각의 1일 상용량이 40 mg 과 120 mg 이므로 이를 기준으로하여 1 : 3의 비율 로 식수 중에 혼합 용해하여 3개월간 경구로 투여하였 다. 즉, 저용량군은 enalapril 과 *Ginkgo biloba extract*를 3+9 mg/kg/day(약 15 mg/l+45 mg/l), 중간용량은 10+

30mg/kg/day(약 50 mg/l+150 mg/l), 고용량군은 30+90 mg/kg/day(약 150 mg/l+450 mg/l)의 용량이 되도록 식 수중에 매일 용해 조제하였다. Enalapril은 증류수에 용 해하여 사용하였으며, 갈색 분말인 *Ginkgo biloba extract*는 ethanol 10 ml/l에 완전히 용해한 후, 증류수 로 희석하여 각각을 식수 중에 희석하여 경구로 투여 하였다.

3. 일반상태 관찰

약물을 생쥐에게 투여하는 도중에 치사여부를 매일 확인하고, 만일 치사시에는 부검을 실시하여 사망 원 인을 검사토록하였다. 또한 투여기간 중 외관상 중독 증상의 발현 여부를 검사하였다.

4. 체중, 사료섭취량 및 식수섭취량 측정

약물투여 직전및 약물투여 후 3개월 동안 매 10일 마다 체중을 측정하고, 또한 사료섭취량 및 식수섭취 량을 측정하였다. 단, 섭취량은 매일 측정하여 다음날 약물투여농도를 환산 조절토록하였다.

5. 혈액학적 검사 및 혈청 생화학적 검사

3개월간 약물투여한 후 치사전날 절식시킨 생쥐를 ether 마취하 복부대정맥에서 채혈하였다. 혈액학적 검 사는 혈액을 CBC bottle에 넣은 후, 4시간 이내에 적혈 구수(RBC), 백혈구수(WBC), 백혈구 분획, 헤모글로빈 (Hgb), 혈소판수(PLT)를 Culter Counter로 측정하였다. 혈청 생화학적 검사는 채취한 혈액의 일부를 실온에 15분 정도 방치하여 응고시키고, 원심분리(3,000 rpm \times 15 min)하여 얻은 혈청에 대해 alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase(AST), alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol, glucose, total protein, bilirubin, blood urea nitrogen(BUN), creatinine, albumin, Ca^{++} , Na^{+} , Cl^{-} , P 및 K^{+} 을 혈청 생화학 자동분석기(550 Express, Ciba-Corning, USA)를 이용하여 측정하였다.

6. 뇨 검사

치사 3일 전 생쥐를 대사 cage에 넣고 뇨를 수집하였 다. Uriscan[®](영동시약 수입) test kit를 사용하여 뇨중의 protein, glucose 및 pH를 측정하였다.

7. 장기중량 측정

3개월간 약물투여 후 ether 마취하에 채혈 후, 간장, 신장, 비장, 심장, 폐, 뇌, 위, 흉선, 부신, 전립선(숫컷), 고환(숫컷), 자궁(암컷), 난소(암컷)의 장기를 적출하여 습식 중량을 측정하였고, 또한 체중에 대한 상대적인 장기 중량비율을 %로 산출하였다.

8. 병리조직학적 검사

장기중량 측정 후, 모든 장기를 10% 중성 포르말린 액에 고정하였다. 육안적 장기검사는 각 기관의 위치, 형태, 크기, 경도, 색조 등을 검사하였다. 조직학적 검사는 2주간 이상의 충분한 고정을 거친 간, 신장, 폐를 파라핀 포매기(Tissue Embedding Center, Reicher-Jung, Germany)에 포매하여 Microtome(Microtome 820 Mark II, Reichert-Jung, Germany)으로 4~5 μm 절편을 만든 후, Hematoxylin & Eosin 염색을 하여 200배율로 관찰하였다.

9. 통계처리

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 unpaired Student's *t*-test를 이용하여 유의성 검정을 실시하였다.

III. 실험 결과

1. 일반상태 관찰

생쥐 숫컷 및 암컷에게 대조군을 비롯하여 enalapril 과 *Ginkgo biloba* extract를 혼합하여 저용량군(3+9 mg/kg/day), 중간용량군(10+30 mg/kg/day) 및 고용량군(30+90 mg/kg)으로 3개월간 경구투여시 치사된 생쥐는 없었다. 일반적으로 저용량 투여군의 경우 대조군에 비해 운동량의 감소가 외관상 일부 관찰 되었다.

2. 체중, 사료섭취량 및 식수섭취량 변화

10일 마다 측정한 각 군의 체중변화를 Fig. 1에 나타내었다. 즉, 약물투여를 시작할 때 생후 12주령된 생쥐 숫컷의 경우 체중이 약 37 g 정도이었으며, 대조군과 enalapril과 *Ginkgo biloba* extract를 저용량, 중간용량, 고용량의 3군으로 나누어 3개월간 병용투여시 지속적으로 체중이 증가하여 약 43 g으로 되었다. 한편, 암컷의 경우 처음에 체중이 약 30 g 정도이었으며, 3개월간 약물을 병용투여시 역시 지속적으로 체중이 증가하여

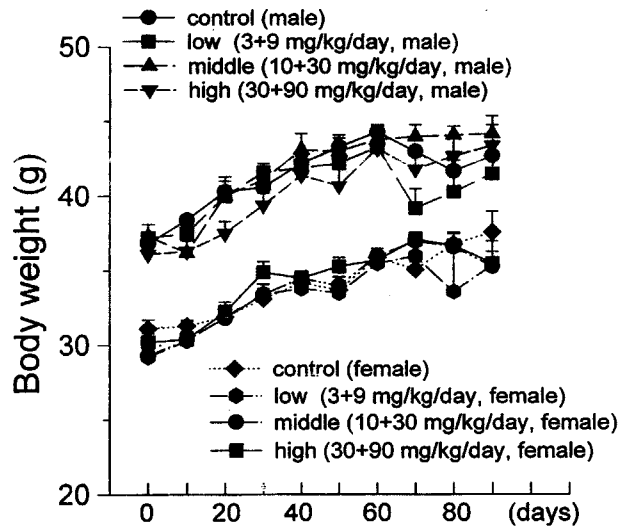


Fig. 1. Body weight changes of mice administered orally with the combination of enalapril and *Ginkgo biloba* extract for 3 months.

약 35 g으로 되었다. 이 경우 약물투여 후 2개월째부터 숫컷 및 암컷 생쥐의 저용량 투여군의 체중이 가장 낮은 경향을 나타내었으나, 대조군에 비해 각 군간에 유의성 있는 차이는 없었다.

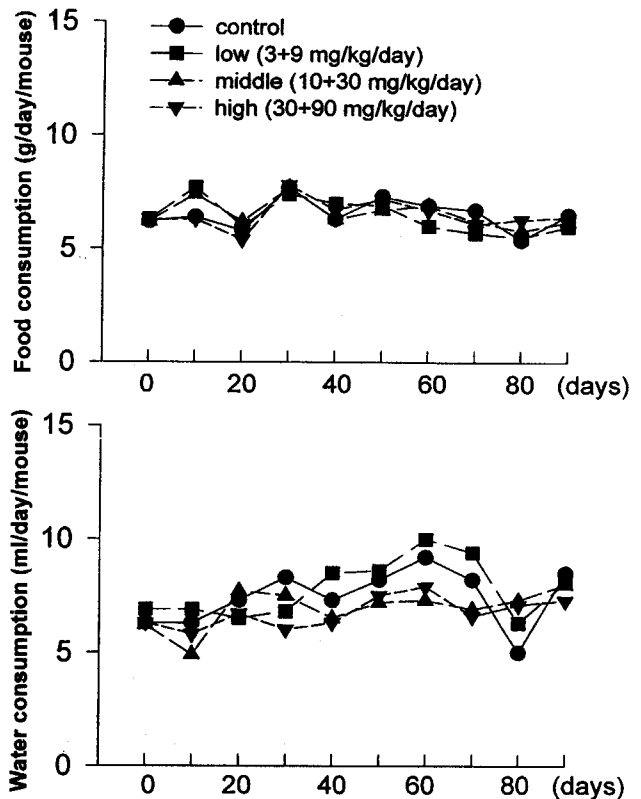


Fig. 2. Food and Water consumption of male mice administered orally with the combination of enalapril *Ginkgo biloba* extract for 3 months.

한편, 숯컷 투여군의 사료섭취량과 식수섭취량을 Fig. 2에 나타내었다. 숯컷 생쥐 1마리의 경우 1일 평균 사료섭취량은 약 7g이었으며, 식수섭취량은 약 7ml로 3개월간 비교적 변화가 없이 일정한 결과를 나타내었다. 또한 약물의 저용량, 중간용량 및 고용량 투여군에 있어서도 대조군에 비해 유의성 있는 차이가 없었다. 다만, 약물을 식수 중에 용해하여 투여시 처음 2~3일간 식수섭취량이 극히 적었으나, 약 1주일 후부터는 정상으로 회복되었다.

암컷 투여군의 사료섭취량과 식수섭취량을 Fig. 3에 나타내었다. 암컷 생쥐 1마리의 경우 1일 평균 사료섭

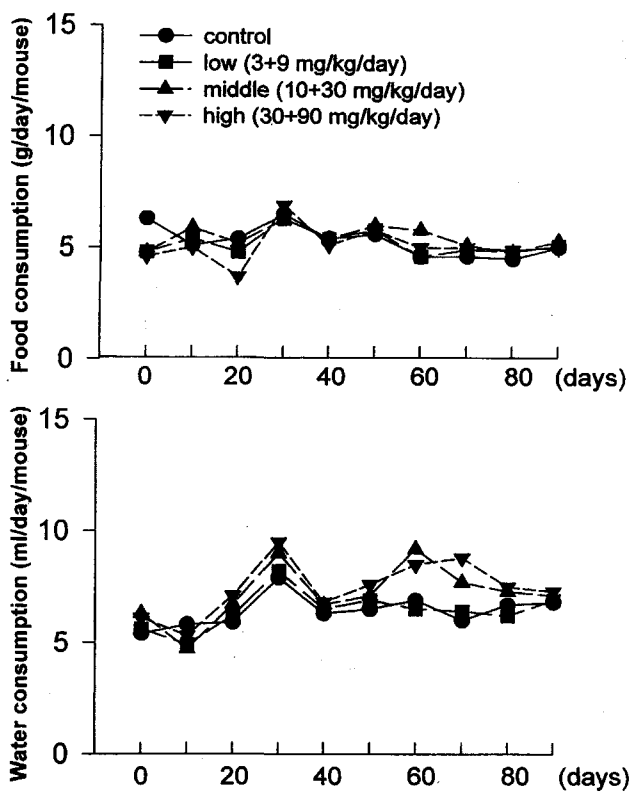


Fig. 3. Food and Water consumption of female mice administered orally with the combination of enalapril and *Ginkgo biloba* extract for 3 months.

취량은 약 5g이었으며, 식수섭취량은 약 7ml이었다. 사료섭취량과 식수섭취량은 비교적 일정하였으며, 약물의 저용량, 중간용량 및 고용량 투여군에 있어서도 대조군에 비해 유의성 있는 차이가 없었다.

3. 혈액학적 검사 및 혈청 생화학적 검사

Enalapril과 *Ginkgo biloba* extract를 병용하여 저용량, 중간용량, 고용량으로 생쥐에게 3개월간 연속투여한 후 혈액학적 검사 결과를 Table 1에 나타내었다.

숯컷 및 암컷 생쥐의 경우 백혈구수에 있어 약물투여시 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 초래하지 않았으나, 백혈구 분획중 과립구의 비율이 암컷 생쥐의 중간용량과 고용량 투여군에 있어 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 반면에 임파구 비율은 증가를 초래하였다. 그러나 숯컷 생쥐의 경우에는 약물투여군의 백혈구분획이 대조군에 비해 유의성 있는 차이가 없었다. 적혈구수 및 hemoglobin 양에 있어 약물투여시 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 초래하지 않았다. 한편, 혈소판의 경우 숯컷 중간용량 및 암컷 저용량 투여군의 경우 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다. 그러나 이들 각 수치는 정상적인 혈구수의 범위내에 해당되었다.

생쥐 숯컷의 혈청 생화학적 검사결과를 Table 2에 나타내었고, 암컷의 경우 Table 3에 나타내었다. 약물투여군의 경우 대조군에 비해 그 변화가 미미한 정도로서 모두 정상 범위에 속하였다. 다만, 숯컷 흰쥐의 경우 저용량 투여군에서 triglyceride치가 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 초래하였으나, 오히려 암컷 흰쥐의 경우 중간용량 투여군에서 triglyceride치가 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 초래하였다.

그러나 모두 정상 범위에 속하였으며, 용량 의존성을 보이지 않았다.

4. 노검사

Table 1. Hematological results of mice treated orally with the combination of enalapril and *Ginkgo biloba* extract for three months

Sex	Dose	WBC ($10^3/mm^3$)	Lymph. (%)	Mono. (%)	Granul. (%)	RBC ($10^6/mm^3$)	HGB (g/dl)	Platelet ($10^3/mm^3$)
male	control	11.1±0.4	73.2±1.3	4.1±0.7	22.7±1.6	8.2±0.3	13.7±0.6	462.3±35.2
	low	13.9±1.1	75.5±1.5	3.8±1.0	19.6±1.8	7.6±0.5	13.1±0.7	396.3±33.2
	middle	10.8±1.2	76.1±3.0	4.2±0.5	19.8±2.5	8.3±0.1	14.0±0.1	368.8±26.7*
	high	12.6±1.1	75.5±2.0	4.5±0.7	20.0±2.1	7.8±0.1	13.2±0.2	422.2±40.1
female	control	11.2±1.5	72.6±1.9	4.8±0.7	22.6±2.1	8.5±0.1	15.0±0.2	408.1±20.1
	low	10.4±1.0	77.7±2.2	4.0±0.7	18.3±1.6	8.3±0.4	14.1±0.5	340.9±17.6*
	middle	10.3±1.2	82.0±2.5*	4.3±0.6	15.7±2.1*	8.3±0.2	14.4±0.2	443.0±41.9
	high	9.7±0.9	83.2±1.0***	4.8±0.8	13.2±0.8***	8.6±0.1	14.4±0.1	434.9±23.0

Values are represents mean ± S.E. (n=10).

*, *** Significantly different from control (p<0.05, 0.001).

Table 2. Blood biochemistry of male mice treated orally with the combination of enalapril and *Ginkgo biloba* extract for three months

compound	control	low	middle	high
Glucose (mg/dl)	107.4±3.6	108.0±4.4	120.2±12.4	123.6±12.3
Protein (g/dl)	6.4±1.4	6.4±0.2	6.1±0.1	6.1±0.2
Albumin (g/dl)	2.9±0.2	2.7±0.1	2.9±0.1	2.8±0.1
Cholesterol (mg/dl)	96.4±6.5	89.0±3.9	100.6±7.3	101.2±5.1
Triglyceride (mg/dl)	100.4±3.8	82.8±5.8*	101.1±8.4	96.0±4.8
Bilirubin (mg/dl)	0.2±0.04	0.2±0.04	0.2±0.02	0.2±0.02
BUN (mg/dl)	27.4±1.4	27.9±2.6	28.1±2.6	27.5±2.3
Creatinine (mg/dl)	0.5±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.38±0.0
AST (U/L)	69.2±8.2	70.2±1.0	57.2±5.8	69.6±7.2
ALT (U/L)	32.2±3.8	39.4±5.6	32.0±5.8	35.2±3.5
ALP (U/L)	26.8±1.5	29.6±3.7	29.4±3.0	27.8±2.3
Ca ⁺⁺ (mg/dl)	9.5±0.7	9.7±0.6	9.5±0.4	8.8±0.5
Na ⁺ (mmol/l)	150.6±1.8	151.0±3.9	151.1±2.1	148.0±2.0
Cl ⁻ (mmol/l)	111.0±1.6	113.8±2.2	114.8±2.6	109.6±1.4
P (mg/dl)	8.4±0.9	7.8±0.6	8.0±0.5	7.4±0.3
K ⁺ (mmol/l)	5.4±0.3	5.0±0.2	5.4±0.3	5.5±0.1

Values are represents mean ± S.E. (n=10).

*Significantly different from control (p<0.05).

Table 3. Blood biochemistry of female mice treated orally with the combination of enalapril and *Ginkgo biloba* extract for three months

compound	control	low	middle	high
Glucose (mg/dl)	102.6±8.9	97.6±4.3	95.4±5.4	110.0±6.5
Protein (g/dl)	5.8±0.1	5.9±0.3	5.5±0.2	5.5±0.3
Albumin (g/dl)	3.0±0.1	3.1±0.1	2.7±0.0	2.9±0.1
Cholesterol (mg/dl)	99.6±4.4	103.8±6.4	94.4±6.0	95.2±2.7
Triglyceride (mg/dl)	97.9±2.5	100.2±6.4	125.2±11.2*	110.3±9.7
Bilirubin (mg/dl)	0.32±0.05	0.40±0.03	0.44±0.05	0.58±0.05
BUN (mg/dl)	23.1±1.5	21.2±1.0	31.7±6.0	39.5±8.1
Creatinine (mg/dl)	0.4±0.0	0.4±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1
AST (U/L)	75.6±8.8	70.2±5.2	65.2±8.3	64.0±11.4
ALT (U/L)	40.4±5.0	38.6±2.3	38.4±4.7	40.0±3.5
ALP (U/L)	39.2±4.9	46.0±3.1	34.8±1.9	34.4±1.9
Ca ⁺⁺ (mg/dl)	9.7±0.1	9.5±0.2	9.2±0.2	9.5±0.1
Na ⁺ (mmol/l)	145.8±1.1	147.2±2.1	145.0±0.7	146.2±1.2
Cl ⁻ (mmol/l)	109.2±1.1	112.0±0.9	110.4±0.9	114.2±1.3
P (mg/dl)	7.7±0.5	7.3±0.5	5.7±0.8	6.0±0.6
K ⁺ (mmol/l)	4.9±0.2	5.0±0.2	4.5±0.2	4.4±0.2

Values are represents mean ± S.E. (n=10).

*Significantly different from control (p<0.05).

Enalapril과 *Ginkgo biloba* extract를 병용하여 저용량, 중간용량, 고용량으로 생쥐에게 3개월간 연속투여한 후 뇨검사 결과 대조군에 비해 용량의존적으로 초래되는 특이한 결과를 관찰할 수 없었다(Table 4).

5. 장기중량

Enalapril과 *Ginkgo biloba* extract를 병용하여 저용량,

중간용량, 고용량으로 암수 각각의 생쥐에게 3개월간 연속투여한 후 장기의 절대적 무게(g) 칭량 및 체중에 대한 상대적 무게비(%)를 산출한바, Table 5 및 6과 같다.

폐무게가 숫컷의 저용량 투여군의 경우 및 암컷 고용량 투여군의 경우 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다. 또한 숫컷 저용량 투여군의 경우 비장의 무게비도 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다.

한편, 간무게는 숫컷의 중간용량 및 고용량 투여군

Table 4. Number of mice in urinalysis after three months oral treatment with the combination of enalapril and *Ginkgo biloba* extract

Sex	Group	male				female			
		control	low	middle	high	control	low	middle	high
	No. of animal	10	10	10	10	10	10	10	10
	Glucose (mg/100 ml)	-	-	-	-	-	-	1	-
	Protein (mg/100 ml)	1	3	0	1	2	0	4	2
	pH.	10	7	10	9	8	10	6	8
	5~6	3	3	2	5	10	7	6	3
	6~7	6	6	7	5	-	3	4	7
	7~8	1	1	1	-	-	-	0	-

Table 5. Absolute and relative organ weight of male mice treated orally with the combination of enalapril and *Ginkgo biloba* extract for three months

organ	unit	control	low	middle	high
Brain	g	0.47±0.01	0.47±0.01	0.49±0.02	0.50±0.01
	%	1.10±0.03	1.14±0.04	1.13±0.05	1.16±0.04
Thymus	g	0.07±0.04	0.05±0.01	0.05±0.00	0.05±0.00
	%	0.16±0.08	0.12±0.02	0.12±0.01	0.10±0.01
Lung	g	0.31±0.02	0.45±0.05*	0.28±0.01	0.27±0.01
	%	0.72±0.04	1.13±0.13*	0.65±0.03	0.62±0.02*
Heart	g	0.18±0.01	0.17±0.01	0.18±0.01	0.16±0.01
	%	0.42±0.02	0.41±0.03	0.40±0.02	0.38±0.02
Liver	g	1.65±0.06	1.73±0.06	2.11±0.05***	2.11±0.06***
	%	3.92±0.22	4.18±0.16	4.81±0.16**	4.63±0.27
Stomach	g	0.32±0.02	0.32±0.02	0.33±0.01	0.30±0.02
	%	0.75±0.06	0.77±0.04	0.75±0.03	0.69±0.04
Spleen	g	0.25±0.03	0.33±0.03	0.18±0.01	0.17±0.01
	%	0.59±0.07	0.81±0.07*	0.43±0.03	0.40±0.03
Right Kidney	g	0.27±0.02	0.30±0.02	0.32±0.01	0.32±0.01
	%	0.64±0.04	0.73±0.05	0.72±0.03	0.73±0.02
Right Adrenal	g	0.01±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	%	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001
Seminal vesicle	g	0.33±0.03	0.37±0.01	0.40±0.02	0.40±0.02
	%	0.77±0.05	0.88±0.03	0.90±0.06	0.92±0.05
Right Testes	g	0.14±0.01	0.15±0.01	0.13±0.01	0.15±0.01
	%	0.32±0.02	0.36±0.02	0.30±0.01	0.34±0.01

Values are represents as mean ± S.E. (n=10).

*, **, *** Significantly different from control (p<0.05, 0.01, 0.001).

Table 6. Absolute and relative organ weight of female mice treated orally with the combination of enalapril and *Ginkgo biloba* extract for three months

organ	unit	control	low	middle	high
Brain	g	0.52±0.01	0.49±0.03	0.51±0.01	0.51±0.01
	%	1.39±0.05	1.39±0.10	1.45±0.04	1.57±0.03**
Thymus	g	0.07±0.01	0.07±0.00	0.06±0.00	0.05±0.00
	%	0.36±0.18	0.33±0.14	0.31±0.13	0.14±0.01
Lung	g	0.22±0.01	0.21±0.01	0.21±0.00	0.22±0.01
	%	0.52±0.02	0.58±0.03	0.60±0.10	0.66±0.01**
Heart	g	0.13±0.00	0.13±0.01	0.13±0.00	0.12±0.00
	%	0.35±0.01	0.38±0.01	0.36±0.01	0.36±0.01
Liver	g	1.64±0.09	1.57±0.08	1.71±0.05	1.63±0.07
	%	4.36±0.13	4.44±0.12	4.84±0.13	4.95±0.12
Stomach	g	0.30±0.02	0.32±0.03	0.35±0.02	0.31±0.01
	%	0.80±0.05	0.98±0.12	1.00±0.04	0.94±0.03
Spleen	g	0.17±0.02	0.17±0.01	0.16±0.01	0.15±0.01
	%	0.45±0.04	0.50±0.03	0.46±0.02	0.44±0.03
Right Kidney	g	0.20±0.01	0.19±0.01	0.19±0.01	0.18±0.01
	%	0.53±0.02	0.54±0.01	0.54±0.01	0.56±0.02
Right Adrenal	g	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.003	0.01±0.001
	%	0.02±0.001	0.02±0.002	0.02±0.001	0.02±0.002
Uterus	g	0.15±0.01	0.16±0.01	0.15±0.01	0.16±0.01
	%	0.40±0.03	0.47±0.04	0.42±0.03	0.49±0.03
Right Ovary	g	0.02±0.00	0.02±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00
	%	0.06±0.01	0.06±0.02	0.06±0.01	0.05±0.003

Values are represents as mean ± S.E. (n=10).

** Significantly different from control (p<0.01).

의 경우 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 초래하였으나, 암컷의 경우에는 유의성있는 차이가 없었다.

6. 병리학적 검사

1) 육안적 소견

Enalapril과 *Ginkgo biloba* extract를 병용하여 저용량, 중간용량, 고용량으로 암수 각각의 생쥐에게 3개월간 연속투여한 후 장기를 육안적으로 관찰한 바, Table 7과 같

다. 숫컷 생쥐의 경우 저용량 투여군 10마리 중 3마리가 폐에 부종 및 종창이 초래되고, 국소적인 괴사와 혈액이 유출된 색조를 나타내었으며, 크기도 비대해졌다.

2) 병리조직학적 소견

Enalapril과 *Ginkgo biloba* extract를 병용하여 저용량, 중간용량, 고용량으로 암수 각각의 생쥐에게 3개월간 연속투여한 후 간, 신장 및 폐의 병리조직학적 검사 결과는 Fig. 4와 같다. 간조직의 경우 정상군에 있어 일

Table 7. Abnormal number on the visual examination of the organs in mice treated orally with the combination of enalapril and *Ginkgo biloba* extract for three months

Sex	male				female			
	control 10	low 10	middle 10	high 10	control 10	low 10	middle 10	high 10
Kidney	0	0	0	0	0	0	0	0
Spleen	0	0	0	0	0	0	0	0
Liver	0	0	0	0	0	0	0	0
Stomach	0	0	0	0	0	0	0	0
Heart	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung	0	3	0	0	0	0	0	0
Adrenal gland	0	0	0	0	0	0	0	0
Reproductive-system	0	0	0	0	0	0	0	0

부 실질조직 간세포 핵내 봉입체가 발견되었다. 숫컷의 경우 약한 염증이 발견되었으며, 암컷 생쥐의 경우

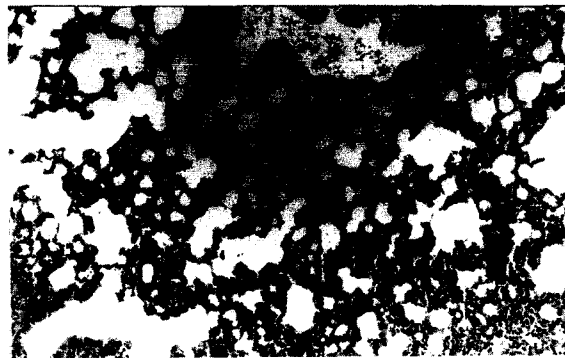
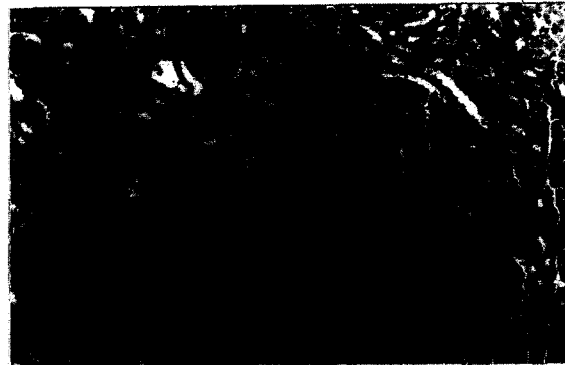
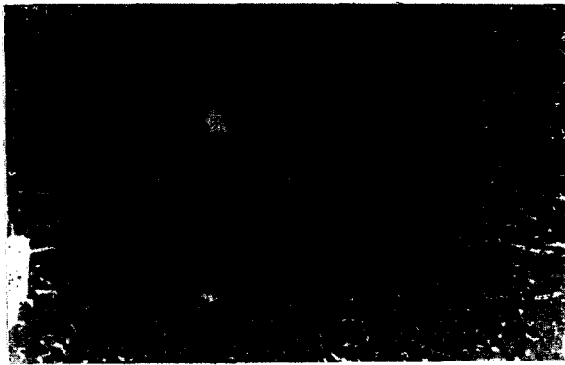


Fig. 4. Histopathological examination of the liver (top), kidney (middle) and lung (bottom) tissue in mice treated orally with high dose of the combination of enalapril and *Ginkgo biloba* extract for three months. H & E ($\times 200$).

glycogen의 축적이 일부 발견되었다. 폐의 경우 숫컷 저용량 투여군의 경우 3마리에 있어 세기관지 및 실질 세포에 호중구 침윤을 지닌 기관지 폐렴의 증상이 관찰되었으며, 고용량 투여군에 있어 1마리에 있어 실질 조직에 있어 염증세포의 응집이 나타났다. 암컷의 경우에도 간질성 폐염 증상이 일부 관찰되었다. 그러나, 정상군에 있어서도 혈관주위의 까만점과 염증소견이 발견되었다. 신장의 경우 약물투여에 기인된 특이한 병리조직학적 소견은 없었다.

IV. 고 찰

Ginkgo biloba extract를 혈압강하제인 enalapril과 병용처치시 enalapril에 의한 혈압 강하작용과 더불어 고혈압의 일반적인 제증상인 두통, 어지러움, 이명, 집중력 장애, 우울을 완화시킬 수 있을 것으로 고려된다. 또한 enalapril의 연용시 대표적인 부작용인 마른기침을 *Ginkgo biloba* extract와 병용처치시 감소시킬 수 있었다. 따라서 고혈압의 일반적 증상을 완화시키고, enalapril의 독성을 경감시킬 목적으로 혈압강하제인 enalapril과 혈류촉진제인 *Ginkgo biloba* extract의 1:3 복합제제를 고혈압 치료약으로 개발하고자, 안전성 평가를 위해 생쥐에게 임상적 투여경로인 경구로 3개월간 연속투여시 나타나는 독성을 관찰하였다. 생쥐에 있어 enalapril maleate의 경구투여시 LD₅₀치는 2000~3500 mg/kg이라고 보고되었다(McEvoy, 1994). 또한 *Ginkgo biloba* extract는 생쥐에게 경구투여시 급성독성이 없으며, 정맥주사 및 복강내주사시 LD₅₀이 1~2 g/kg으로 보고되었다(Lee, Y.S., 1996).

본 실험에서 enalapril과 *Ginkgo biloba* extract의 1:3 복합제제의 저용량, 중간용량, 고용량의 전투여군 및 대조군에서 특이한 임상증상 및 폐사동물을 관찰할 수 없었다. 체중증가에 따른 변화를 측정된 결과 숫컷 및 암컷 생쥐에 있어 약물투여 2개월 후 enalapril과

Ginkgo biloba extract의 1:3 복합제제의 저용량 투여군에서 체중증가가 대조군에 비해 감소되는 경향이 관찰되었으나, 그 정도는 5% 이내 범위로서 통계적인 유의성이 없었다. 사료 및 식수섭취량은 시험기간 동안 암수 모두 큰 변화를 나타내지 않았으며, enalapril과 *Ginkgo biloba* extract의 1:3 복합제제 전 투여군의 경우 대조군에 비해 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

혈액학적 검사결과 암컷 생쥐의 경우 enalapril과 *Ginkgo biloba* extract의 1:3 복합제제의 중간용량 및 고용량을 3개월간 연속투여시 대조군에 비해 과립구의 비율이 감소되었다. 그러나 백혈구의 전체 숫자는 차이가 없었으므로 상대적으로 임파구의 증가를 초래하였다. 반면에, 숫컷 생쥐의 경우에는 과립구의 비율이 대조군에 비해 통계적인 차이가 없었다. 한편, enalapril 단독처치시 과립구 감소증이 임상적인 부작용으로 보고된 바 있다(Materson, 1992). 반면에 *Ginkgo biloba* extract의 주성분인 ginkgolide가 PAF-acether에 의해 유발된 백혈구 감소증을 억제한다고 보고된 바 있다(Witte, 1992). 따라서 enalapril에 의한 과립구 감소증의 독성이 *Ginkgo biloba* extract와 복합제로 투여시 오히려 감소될 수 있을 것으로 고려된다. 또한 enalapril 투여시 혈소판감소증의 발생이 임상적으로 보고된 바 있으며(Materson, 1992), 본 실험에서도 enalapril과 *Ginkgo biloba* extract 복합제의 투여시 숫컷생쥐 중간용량 및 암컷생쥐 저용량의 경우 대조군에 비해 유의성있는 감소를 초래하였다. 그러나 고용량투여시에는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 혈청생화학적 검사에 있어서는 약물투여군의 경우 대조군에 비해 뚜렷한 차이를 초래하지 않았다. 임상적으로 고혈압환자에게 enalapril 단독투여시 BUN과 creatinine치의 일시적인 증가가 0.2%의 경우 초래되었다고 하였다(McEvoy, 1994). 그러나 생쥐 투여군에서는 이러한 BUN치의 증가가 나타나지 않았으며, creatinine치의 변화도 초래되지 않았으므로 enalapril과 *Ginkgo biloba* extract 복합제에 의한 신장손상의 지표로 보기 어렵다. 뇨검사 결과 enalapril과 *Ginkgo biloba* extract 복합제의 투여군에 있어 단백뇨나 당뇨의 뚜렷한 증상을 초래하지 않았다.

장기무게 칭량시 enalapril과 *Ginkgo biloba* extract 복합제의 투여군에 있어 숫컷 생쥐의 경우 저용량투여군에 있어 대조군에 비해 폐무게가 유의성 있게 증가되었으며, 암컷의 경우에도 고용량시 일부 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이러한 폐조직의 이상은 육안적인 검사 및 병리학적 조직검사에서도 일치되게 나타

났다. 즉, 숫컷생쥐에 있어 저용량투여군의 경우 10마리 중 3마리에 있어 폐부종상태를 나타내어 폐의 무게가 비대해졌으며, 조직검사시에도 폐렴의 증상이 수반되었다. 그러나 숫컷 생쥐의 경우 중간용량 및 고용량 투여군에서는 이러한 변화가 적었으며, 암컷 생쥐의 경우에 있어서는 숫컷보다 이러한 폐손상이 보다 적게 초래되었다. 한편, enalapril을 장기간 투여시 bradykinin의 증가로 인해 기관지 수축과 혈관부종을 초래하는 독성이 가장 흔한 것으로 보고되었다(Israili, 1992). 반면에 *Ginkgo biloba* extract의 주성분인 ginkgolide는 기관지 수축을 억제하는 것으로 보고되었다(Witte, 1992). 따라서 본 실험에서 심한 폐손상이 enalapril과 *Ginkgo biloba* extract 복합제의 저용량 투여군에서 가장 심하고, 오히려 고용량쪽으로 갈수록 독성이 적게 나타난 점을 고려해 볼 때, enalapril에 의해 초래되는 폐부종의 독성이 *Ginkgo biloba* extract와 병용투여시 오히려 감소됨을 제시해 준다. 한편, 숫컷 생쥐 간장의 경우 enalapril과 *Ginkgo biloba* extract 복합제의 중간용량 및 고용량 투여군에 있어 상대적 장기중량이 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, 핵내 붕입체와 약한 염증조건이 병리조직학적으로 관찰되었다. 이러한 간장의 증가는 *Ginkgo biloba* extract를 단독으로 3개월 정맥투여한 실험결과에서도 증가된 것으로 보고된 바 있다(Lee, Y.S., 1996). 병리조직학적 관찰에서 나타난 간장의 국소적인 임파구 침윤 등은 약물투여군 뿐만 아니라 대조군에서도 관찰되어 약물의 독성에 의한 2차적인 병리작용으로 보기가 어렵고 특히 몇몇 동물에서 관찰된 간장의 담관비후와 결체 조직의 증가 등은 생쥐에서 간혹 발견될 수 있는 소견이다.

이상의 결과를 종합하면 생쥐에게 enalapril과 *Ginkgo biloba* extract 복합제를 저용량, 중간용량, 고용량의 3군으로 나누어 3개월간 경구투여시 치사율, 체중, 식이 및 식수섭취량에서 대조군에 비해 차이가 없었으며, 혈액검사, 혈청생화학적 검사, 뇨검사에서 정상치 범위를 벗어나는 뚜렷한 차이는 없었다. 다만, 장기무게 및 병리조직 검사에서 저용량 투여군의 경우 폐무게의 증가와 일부 폐부종이 초래되었으며, 체중감소, 사료 및 식수 섭취량의 감소경향이 관찰되었으나, 오히려 고용량 투여군에서는 이들 항목에서 독성의 심화작용이 관찰되지 않았다.

참고문헌

- Desquand, S., Touvay, C., Randon, J., Lagente, V., Vilain, B., Maridonneau, P.I., Etienne, A., Lefort,

- J., Braquet, P. and Vargaftig, B.B. (1986). Interference of BN 52021 (ginkgolide B) with the bronchopulmonary effects of PAF-acether in the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.* **127(1-2)**, 83-95.
- Israeli, Z.H. and Hall, W.D. (1992). Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann. Intern. Med.* **117**, 234-242.
- Lee, Y.S., Nam, J.S. and Kang, S.A. (1996). Three month subacute toxicity study of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) in rats. *Korean J. Toxicol.* **12(1)**, 113-119.
- Lee, Y.S., Nam, J.S. and Kang, S.A. (1996). Acute toxicity test with the Ginkgo biloba Extract (EGb 761) in rats and Rabbits. *Korean J. of Lab. Ani. Sci.* **12(1)**, 131-134.
- Materson, B.J. and Preston, R.A. (1994). Angiotensin-converting enzyme inhibitors in hypertension. A dozen years experience. *Arch. Intern. Med.* **154**, 513-23.
- Materson, B.J. (1992). Adverse effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in antihypertensive therapy with focus on quinapril. *Am. J. Cardiol.* **69**, 46C-53C.
- McEvoy, G.K. (1994). American hospital formulary service; Drug Information, p. 999 American Society of Hospital Pharmacists, Baltimore, MD.
- Vanhaelen, M. and Vanhaelen-Fastre, R. (1989). Flavonol triglycerides from Ginkgo biloba. *Planta Med.* **55**, 202.
- Witte, S., Anadere, I. and Walitza, E. (1992). Improvement of hemorheology with ginkgo biloba extract. Decreasing a cardiovascular risk factor. *Fortschr. Med.* **110(13)**, 247-50.