

# ICR계 마우스에 대한 當歸補血湯의 급성 경구 독성시험

강순아 · 장문석<sup>1</sup> · 오명숙<sup>3</sup> · 박완수<sup>3</sup> · 강지웅<sup>3</sup> · 김원남<sup>3</sup> · 양웅모<sup>3</sup> · 이병희<sup>3</sup> · 배오성<sup>2</sup> · 박성규<sup>3\*</sup>

서울벤처정보대학원대학교 발효식품학과, 1: 하버드대학교 의과대학 소아병원, 2: 동방대학원대학교, 3: 경희대학교 한의과대학

## Acute Oral Toxicity of Dangguibohyel-tang in ICR Mice

Soon Ah Kang, Mun Seog Chang<sup>1</sup>, Myung Sook Oh<sup>3</sup>, Wansu Park<sup>3</sup>, Ji Wung Kang<sup>3</sup>, Won Nam Kim<sup>3</sup>,  
Woong Mo Yang<sup>3</sup>, Byong Hee Lee<sup>3</sup>, Oh Sung Bae<sup>2</sup>, Seong Kyu Park<sup>3\*</sup>

Department of Fermented Food Science, Seoul University of Venture & Information.

1: Department of Medicine, Division of Newborn Medicine, Children's Hospital and Harvard Medical School.

2: Department of Natural Healing Science, Dong Bang University of Graduate School.

3: College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

The Dangguibohyel-tang (DBT) was used to treat anemia in traditional Korean medicine. Acute oral toxicity of DBT was studied in ICR mice. ICR mice were administered orally with dosages of 100 mg/kg (low dosage group), 200 mg/kg (middle dosage group), and 400 mg/kg (high dosage group) of DBT. We daily examined number of deaths, clinical signs, body weights and gross findings for 14 days. DBT did not show any toxic effect in ICR mice and oral LD50 value was over 400 mg/kg in ICR mice.

Key words : Dangguibohyel-tang (DBT), acute toxicity, LD<sub>50</sub>, body weights, clinical signs

### 서론

빈혈은 적혈구 수 또는 헤모글로빈의 농도가 정상수준 이하로 감소하게 되면 발생하며, 원인에 따라 출혈성, 용혈성, 철분 및 비타민 B12 등의 영양소 결핍, 또는 다른 질환에 의한 적혈구 생산부족, 선천성, 약물치료에 의한 재생불량성 빈혈 등으로 구분한다<sup>1-3)</sup>.

當歸補血湯은 黃芪와 當歸 두 가지 약물로 구성되어 補氣生血의 효능으로 血虛로 인한 發熱, 頭痛 등에 주로 활용되어 온 처방이다<sup>4)</sup>. 당귀보혈탕의 黃芪와 當歸의 구성 비율은 5:1의 중량 비율로 배합되어 있는 것이 특징이다.

항암치료 중 발생하는 빈혈 증상의 예방 및 치료에 적합한 한약 치료제를 개발하기 위하여 한약재 및 복합처방을 대상으로 조절작용에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 이러한 연구의 결과로서 본 연구팀은 항암제인 cyclophosphamide로 빈혈을 유발시킨 흰쥐에 당귀보혈탕의 빈혈 회복 효과를 보고한 바 있다<sup>5)</sup>.

본 연구에서는 빈혈치료제로 개발 중인 당귀보혈탕에 대한

안정성을 평가하기 위하여 급성독성시험을 ICR계 마우스에서 실시하였다.

### 실험방법

#### 1. 시험물질

본 연구의 시험물질인 당귀보혈탕은 서울특별시 동대문구 제기동 경동약력시장의 원광약업사를 통하여 구입한 黃芪 250 g 과 강원도 평창군 진부면에서 구입한 當歸 50 g을 혼합하여 round flask에 넣고 증류수 6,000 ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간동안 가열한 다음 여과지로 감압 여과한 여과액을 rotary vaccum evaporator (Eyela, Japan)를 사용하여 감압농축한 후, 농축액을 동결 건조하여 시험에 사용하였다 (수율 22.2%).

#### 2. 실험동물 및 사육환경

시험구역은 경희대학교 한의과대학의 청정 동물실험실에서 실시하였으며, 청정구역에서 생산된 SPF (특정병원체 부재) ICR 계의 4주령 된 수컷 마우스를 중앙실험동물 (Japan)로부터 분양 받아 온도 23±3℃, 습도 55±5%, 배기 10-18회/h, light/dark 12h, 조도 150-300 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자 (280W × 420L × 170H mm)에 각각 5마리씩 넣어 사육하였

\* 교신저자 : 박성규, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학

E-mail : comskp@khu.ac.kr, Tel : 02-961-0330

접수 : 2006/04/11 · 수정 : 2006/05/16 · 채택 : 2006/06/02

다. 1주일간의 순화사육 기간 동안에 증상관찰 등을 시행하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 실험동물용 교형사료 (Samyang Co., Korea)를 자유롭게 먹도록 하였으며, 물은 별 균수도물을 자유롭게 섭취시켰다. 시험자들은 모두 고압증기멸균 (121℃, 20 min)된 작업복, 두건, 마스크 및 장갑 등을 착용하고 작업을 실시하였다.

3. 투여량 및 시험군의 구성

1주간 실험실 환경에 적응시킨 실험동물을 대조군과 당귀보혈탕 투여군으로 나누었으며, 각 군은 5마리로 하였다. 동물의 군 분리는 다음과 같이 실시하였다. 우선, 순화 기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정후 구분시켜 두었다. 그리고 평균체중에 가까운 개체를 각 군에 5마리씩 균등히 들어가도록 체중을 이용한 무작위법을 이용하여 분배하였다. 동물의 개체식별은 피모색소마킹법 및 개체식별카드 표시법으로 실시하였다.

본 시험물질은 한약재로서 식품의약품 안전청의 "의약품 등의 독성시험기준"에는 한계용량에 대한 기준이 없기 때문에, 시험물질의 투여용량은 예비실험 결과와 시험물질의 용해도 등을 고려하여 고용량군 (400 mg/kg), 중간용량군 (200 mg/kg), 저용량군 (100 mg/kg)을 투여 농도로 설정하고 대조군을 포함하여 모두 4개 군으로 정하였다.

4. 시험물질의 조제 및 투여

투여 직전에 주사용 생리식염수를 매체로 하여 시험물질을 100, 200, 400 mg/10ml/kg으로 조제하였다. 대조군 (vehicle control)의 동물에는 매체인 생리식염수만을 투여하였다. 시험물질은 투여 전날 하룻밤을 절식시킨 후 경구투여용 존데 (zonde)를 장착한 주사기를 이용하여 조제시험물질을 강제 경구투여하였다. 시험물질의 투여 경로는 임상예정 경로로서 경구투여를 선택하였다. 투여 당일 오전에 개체별로 단회 투여하였다. 투여 액량은 투여 당일의 측정된 체중을 기준으로 투여액량(10 ml/kg)을 계산하였다.

5. 관찰 및 검사항목

1) 일반증상 및 사망동물의 관찰

시험물질을 투여한 후 매 시간마다 6시간 동안, 투여 다음 날부터 14일까지는 1일 1회씩 일정 시간에 투여 동물의 일반상태, 중독증상 및 사망유무를 대조군과 비교 관찰하였다.

2) 체중측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여 당일을 0일로 하여 투여 후 매일 2주일간 체중을 측정하였다.

3) 부검소견

투여 후 14일째 모든 생존 동물을 ether로 흡입 마취하여 개복 및 복대동맥 절단법으로 방혈 치사시킨 다음 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안적으로 해부소견을 관찰하였다.

6. 통계 처리

체중의 변화에 대한 통계학적 분석은 one-way analysis of

variance test (ANOVA) 검정에 의해 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였고, LD50치는 Pharmacologic Calculating System을 이용하여 Litchfield-Wilcoxon법에 의하여 95% 신뢰 한계 내에서 결정하였다.

결 과

1. 폐사율

마우스에 대한 경구투여 시 대조군 및 당귀보혈탕 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서 시험물질 투여 후 1일부터 14일까지 시험 전 기간을 통하여 사망한 예는 관찰되지 않았다 (Table 1).

Table 1. Mortality of ICR mice treated orally with WDB

| Sex  | Dose (mg/kg) | Days after treatment |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    | Final Mortality <sup>a)</sup> |     |
|------|--------------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|-------------------------------|-----|
|      |              | 0                    | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |                               | 14  |
| male | 0            | 0                    | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0                             | 0/5 |
|      | 100          | 0                    | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0                             | 0/5 |
|      | 200          | 0                    | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0                             | 0/5 |
|      | 400          | 0                    | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0                             | 0/5 |

a) Values are expressed as dead number/total number of animals.

2. 체중변화

모든 시험군에서 투여 후 꾸준히 체중이 증가하였으며, 6일째 100 mg/kg 와 400 mg/kg 투여군에서 약간의 체중감소를 보였으나 14일째에는 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었다. 마우스에 대한 당귀보혈탕 3개 용량으로 경구투여한 군에서 대조군에 비하여 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. 또한 투여 용량군 사이의 체중변화는 용량의존성을 나타내지 않았다 (Table 2).

Table 2. Body weights of ICR mice treated orally with WDB

| Sex  | Dose (mg/kg) | No. of animals | Days after treatment(g) |          |          |          |          |          |  |
|------|--------------|----------------|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--|
|      |              |                | 0                       | 3        | 6        | 9        | 12       | 14       |  |
| Male | 0            | 5              | 28.8±1.5                | 30.4±1.1 | 30.8±2.4 | 30.6±2.6 | 31.8±2.2 | 31.6±2.7 |  |
|      | 100          | 5              | 29.2±1.1                | 29.2±1.3 | 28.8±2.9 | 31.8±2.2 | 31.8±2.7 | 33.2±2.3 |  |
|      | 200          | 5              | 29.0±1.2                | 30.6±2.1 | 31.6±1.8 | 31.6±1.5 | 32.8±1.8 | 33.6±1.8 |  |
|      | 400          | 5              | 29.4±1.9                | 30.0±1.6 | 28.0±2.5 | 29.0±3.8 | 30.4±4.2 | 30.4±3.8 |  |

3. 일반증상

마우스에 대한 당귀보혈탕의 투여 후 대조군에 비해 특이적으로 관찰된 일반증상의 변화는 없었다 (Table 3).

Table 3. Clinical signs in ICR mice treated orally with WDB

| Sex  | Dose (mg/kg) | Signs observation |                |                                 |                            |             |       |
|------|--------------|-------------------|----------------|---------------------------------|----------------------------|-------------|-------|
|      |              | Appears normal    | Prone position | Decrease of locomotive activity | Decreased respiration rate | Lacrimation | Death |
| Male | 0            | 5/5 <sup>a)</sup> | 0/5            | 0/5                             | 0/5                        | 0/5         | 0/5   |
|      | 100          | 5/5               | 0/5            | 0/5                             | 0/5                        | 0/5         | 0/5   |
|      | 200          | 5/5               | 0/5            | 0/5                             | 0/5                        | 0/5         | 0/5   |
|      | 400          | 5/5               | 0/5            | 0/5                             | 0/5                        | 0/5         | 0/5   |

a) Number of animals with the sign/total number of animals examined.

4. 육안적 해부소견

마우스에 대한 당귀보혈탕의 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 병변을 관찰하지 못하였다 (Table 4).

Table 4. Organ weights in ICR mice treated orally with WDB

| Sex  | Dose (mg/kg) | Organ(g)   |              |             |
|------|--------------|------------|--------------|-------------|
|      |              | Liver      | Kidney       | Testis      |
| Male | 0            | 1.51±0.14  | 0.21±0.03    | 0.10±0.01   |
|      | 100          | 1.63±0.14  | 0.29±0.02*** | 0.14±0.01** |
|      | 200          | 1.88±0.22* | 0.27±0.02**  | 0.12±0.03   |
|      | 400          | 1.46±0.09  | 0.24±0.02    | 0.13±0.02*  |

All values are expressed as mean ± S.D. \* Significantly different from the control value (\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01 and \*\*\*: p < 0.001)

### 고찰 및 결론

當歸補血湯은 『內外傷辨惑論』에 수록된 이후 血虛가 원인이 되어 발생하는 血虛發熱 증상을 補氣生血의 효능으로 치료하는 補血劑의 대표 처방이다<sup>4)</sup>.

당귀보혈탕은 혈액소 농도, 적혈구 수의 회복에서 일정한 회복효과가 있음이 증명되었고, 항암제 투여로 인한 빈혈 발생의 부작용 증상에 대하여 기존의 빈혈 치료제를 대체할 수 있는 한약 치료제로의 개발 가능성이 있음이 보고되었다<sup>5)</sup>.

당귀보혈탕이 빈혈 치료제로 개발되기 위해서는 경구 투여 독성 시험이 필수적이다. 마우스는 독성시험에 적당한 실험동물로서 급성독성시험에 널리 사용되고 있다. 본 ICR계 계통의 마우스는 풍부한 시험 기초 자료가 축적되어 있어서, 시험결과 해석 및 평가 시에 이러한 자료를 활용하는 것이 용이하다. 본 연구는 당귀보혈탕의 ICR계 마우스를 이용한 단회 경구투여에 의한 독성시험의 정보를 얻기 위하여, 의약품등의 독성시험기준(식품의약품안전청 고시 제 1999-61호) 및 비임상시험 관리 기준(식품의약품 안전청 고시 제 2000-63호)에 준하여 단회 경구 독성시험을 실시하였다<sup>6,7)</sup>. 시험물질인 당귀보혈탕은 한약재로서 “의약품등의 독성시험기준”에는 한계용량에 대한 기준이 없기 때문에 단회 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 ICR계 마우스에 각각 고용량군 (400 mg/kg), 중간용량군 (200 mg/kg), 저용량군 (100 mg/kg)으로 시험물질 투여군을 나누었으며, 대조군은 멸균 생리식염수를 투여하였다.

당귀보혈탕에 대한 안전성 평가의 일환으로 실시한 급성 경구 독성시험에서 시험 물질에 의한 영향으로 평가되는 일반적인 독성 증상은 없었다. 본 시험물질인 당귀보혈탕의 ICR계

마우스에 대한 최고용량 400 mg/kg까지 경구 투여한 결과 사망 예는 관찰되지 않았다. 자발운동 저하, 호흡수 감소, 유루 및 복외위 등의 일반증상과 모든 생존동물에 대한 해부병리 소견에서 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 시험물질인 당귀보혈탕은 경구투여 시 마우스에서 아무런 급성독성을 나타내지 않았고, LD50값은 마우스에서 경구 투여 최고용량인 400 mg/kg 이상일 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(20050401-034-787-188-00-00)의 지원에 의해 이루어진 것임

### 참고문헌

1. 이문호. 내과학. 서울, 금강출판사. pp 339-353, 1979.
2. 대한임상병리학회. 임상병리학. 서울, 고려의학. pp 173-188, 1996.
3. 서울대학교의과대학. Hematology. 서울, 서울대학교출판부. pp 1-3, 1993.
4. 彭懷仁. 中醫方劑大辭典. 北京, 人民衛生出版社. 4, 389-392, 1995.
5. 강순아, 장문석, 오명숙, 김도립, 김지숙, 박성규. 當歸補血湯과 erythropoietin이 cyclophosphamide로 유도된 흰쥐의 빈혈에 미치는 영향 비교 연구. 동의생리병리학회지 20(1): 31-36, 2006.
6. 식품의약품안전청. 의약품 등의 독성시험기준. 식품의약품안전청고시 제 1999-6호. 1999.
7. 식품의약품안전청. 비임상시험 관리기준, 식품의약품안전청 고시 제 2000-63호. 2000.
8. 교병섭, 박민정, 박소민, 전원경, 천진미, 정필문, 박선민, 최수봉, 오명숙, 장문석, 박성규. 가미옥천산의 ICR 마우스 경구 투여에 의한 급성 독성시험 연구. 동의생리병리학회지 19(5):1200-1203, 2005.