

當歸補血湯의 SD계 흰쥐에 대한 아급성경구독성시험

강순아¹, 장문석², 오명숙³, 박완수³, 김원남³, 양웅모³, 이병희³, 박성규^{3*}

1: 국군백제병원 한방과, 2: 서울대학교 물리학과 한의학물리 연구실, 3: 경희대학교 한의과대학

A 4-weeks Oral Toxicity of Dangguibohyel-tang in Sprague-Dawley Rats

Soon Ah Kang, Mun Seog Chang², Myung Sook Oh³, Wansu Park³, Won Nam Kim³,
Woong Mo Yang³, Byong Hee Lee³ and Seong Kyu Park^{3*}

1: Dept. of Fermented Food Science, Seoul University of Venture & Information

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

3: College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : The subacute toxicity was investigated in Sprague-Dawley rats orally treated with Dangguibohyel-tang (DBT). DBT has been used for anemia, in Korean medicine.

Methods : Sprague-Dawley rats were administered orally with DBT at the dosages of 1,000 mg/kg for 14 days. We daily examined number of deaths, clinical signs, body weights and gross findings during the 14 days.

Results : There were no clinical signs and pathological changes compared with control group. Body weights were not significantly changed between control and treatment groups. In hematological and biochemical serum parameters, all mean values appear to be within the normal range.

Conclusion : These results suggest that DBT dose not induce any significant subacute oral toxicities in Sprague-Dawley rats.

Key words : Dangguibohyel-tang (DBT)), subacute toxicity, body weights, clinical signs

* 교신저자 : 박성규. 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실. tel:(02) 961-0330, E-mail: comskp@khu.ac.kr
제1저자 : 강순아. 서울벤처정보대학원대학교 발효식품과학과.tel: (02) 3470-5273, E-mail: sakang@suv.ac.kr
· 접수 : 2006년 5월 10일 · 수정 : 2006년 5월 25일 · 채택 : 2006년 6월 25일

서론

當歸補血湯은 『內外傷辨惑論』에 수록된 이후 補氣生血의 효능으로 血虛로 인한 發熱, 頭痛 등에 주로 활용되어 온 처방이다¹⁾. 당귀보혈탕의 구성약물은 黃芪와 當歸 두 가지 약물이며, 구성 비율은 5:1의 중량비율로 배합되어 있는 것이 특징이다.

當歸補血湯은 飢困勞役, 瘡瘍潰後의 氣血久虛 및 產後血脫 등 세가지 病因으로 발생한 血虛證에 적용되며, 구체적인 임상증상으로는 飢困勞役으로 인한 血虛發熱, 瘡瘍潰後의 發熱 및 煩渴²⁾, 產後血脫로 인한 煩渴引飲, 출산으로 인한 虛勞와 脫血로 인한 血虛發熱에 사용되어 왔으며³⁾, 용량을 변화시키거나 여러 약물을 가감하여 婦人下利腹痛, 小便澀, 男子衄血便血, 婦人產後, 崩漏, 亡血過多, 血虛頭痛, 血熱亡行, 九竅出血, 打撲傷 등 血虛로 인한 여러 증상의 치료에 다양하게 활용되어 왔다⁴⁾.

최근의 연구에서 당귀보혈탕은 항암제인 cyclophosphamide로 빈혈을 유발시킨 흰쥐에 빈혈 회복에 우수한 효과가 있음이 확인되었고⁵⁾, 당귀보혈탕 구성 약물의 DPPH에 의한 free radical에 대한 소거 활성이 보고된바 있으며⁶⁾, 항암치료 중 발생하는 빈혈 증상의 예방 및 치료에 적합한 한약 치료제로서 개발이 진행 중이다.

따라서 당귀보혈탕의 단회경구독성시험 결과와 더불어 흰쥐에서 치사율 및 독성증상 등의 안전성 자료를 확보하기 위하여 의약품등의 독성시험기준 (식품의약품 안전청 고시 제 1999-61호) 및 비임상시험 관리기준 (식품의약품 안전청 고시 제 2000-63호)에 따라 14 일간 반복 경구독성 시험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질

본 연구의 시험물질인 당귀보혈탕은 서울특별시 동대문구 제기동 경동약령시장의 원광약업을 통하여 구입한 黃芪 250 g과 강원도 평창군 진부면에서 구입한 當歸 50 g을 혼합하여 round flask에 넣고 증류수 6,000 ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간 동안 가열한 다음 여과지로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum 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) SD계의 4 주령 된 수컷 흰쥐를 중앙실험동물 (Japan)로부터 분양받아 온도 23±3℃, 습도 55±5%, 배기 10-18회/h, light/dark 12h, 조도 300-500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자 (280 W × 420 L × 170 H mm)에 각각 5 마리씩 넣어 사육하였다. 1주일간의 순화사육 기간 동안에 증상관찰 등을 시행하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 실험동물용 고행사료 (Samyang Co., Korea)를 자유롭게 먹도록 하였으며, 물은 멸균 수도물을 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 측정 후 구분시켜 두었다. 그리고 평균체중에 가까운 개체를 각 군에 5마리씩 균등히 들어가도록 체중을 이용한 무작위법을 이용하여 분배하였다. 동물의 개체식별은 피모색소마킹법 및 개체식별카드 표시법으로 실시하였다. 시험물질을 투여하기 직전 시험동물의 체중범위는 145-164 g이었고, 주령은 약 5 주령이었다.

본 시험물질은 한약재로서 식품의약품 안전청의 "의약품 등의 독성시험기준"에는 한계용량에 대한 기준이 없기 때문에, 시험물질의 투여용량은 예비실험결과와 시험물질의 용해도 등을 고려하여 1,000 mg/kg을 투여 농도로 설정하고 대조군을 포함하여 모두 2개 군으로 정하였다.

4. 시험물질의 조제 및 투여

투여 직전에 주사용 생리식염수를 매체로 하여 시험물질을 1,000 mg/10 ml/kg으로 조제하였다. 대조군 (vehicle control)의 동물에는 매체인 생리식염수만을 투여하였다. 시험물질은 경구투여용 зонде (zonde)를 장착한 주사기를 이용하여 조제시험물질을 강제 경구 투여 하였다. 시험물질의 투여 경로는 임상예정 경로로서 경구투여를 선택하였다. 투여용량의 차이를 배제하기 위하여 각 시험물질 용액을 동물 체중 kg당 10 ml에 매일 투여하였다. 14 일간 시험물질을 1 일

1 회 14 일간 연속으로 투여하여 2 주 아급성독성시험을 수행하였다.

0.05 수준에서 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였다.

5. 관찰 및 검사항목

1) 일반증상 및 사망동물의 관찰

모든 시험동물에 대하여 매일 1 회 이상 사망 유무 확인과 함께 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망 유무를 대조군과 비교 관찰하였다. 일반증상은 식욕 부진, 타액분비, 설사, 구토, 다뇨 및 무뇨, 분변의 변화를 중심으로 관찰하였다⁷⁾.

2) 체중측정

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

3) 혈액학적 및 혈액생화학적 검사

부검시에 모든 동물을 ether로 마취한 후 heart puncture방법으로 채혈한 혈액 중에서 백혈구 수 (white blood cell, WBC), 적혈구 수 (red blood cell, RBC), 혈색소 (hemoglobin, Hgb) 농도, 적혈구 용적 (hematocrit, Hct), 평균적혈구 용적 (mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구 혈색소량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균적혈구 혈색소 농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판 수 (platelet count)를 ADIVATM 120 hematology system (Bayer co. U.S.A.) 기기를 사용하여 측정하였다. 혈액생화학치는 총단백, 알부민, BUN, creatinine, globulin, AST (GOT) 및 ALT (GPT) 및 ALP를 대상으로 ADIVA 1650 (Bayer, Germany) 기기를 사용하여 측정하였다.

4) 육안소견 및 장기 중량

투여 후 14일째 모든 생존 동물을 ether로 흡입 마취하여 개복 및 복대동맥 절단법으로 방혈 치사시킨 다음 부검하였으며 흡선, 부신, 정소, 심장, 폐, 신장, 비장, 간장을 포함한 주요 장기를 육안으로 관찰하였다. 간장, 신장, 정소는 장기 중량을 측정하였다.

6. 통계 처리

본 실험에서 얻은 체중, 혈액학치, 혈액생화학치 등 모든 자료는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 통계학적 분석은 Student's t-test 검정법에 의해 p <

결 과

1. 일반증상 및 사망동물

시험 전 기간 동안 대조군을 포함한 당귀보혈탕 투여군 모두에서 사망한 동물은 없었다 (Table 1). 또한 모든 동물에서 시험물질 투여후 자발적인 운동 및 호흡율의 증가 등과 같은 특이할 만한 임상증상은 관찰되지 않았으며 최종투여일에 실시한 안구검사에서 특이한 안구부위의 이상소견은 관찰되지 않았다 (Table 2).

Table 1. Mortality in rats orally treated with DBT for 14 days

Dose Sex (mg/ kg)	Days after treatment											Final Mortality ^{a)}	
	()	()	()	()	()	()
0	()	()	()	()	()	()	0/5
male													
1,000	()	()	()	()	()	()	0/5

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

Table 2. Clinical signs in rats orally treated with DBT for 14 days

Dose Se (mg/k g)	Signs observation					
	Appe ars normal	Prone positi on	ease of comotive activity	Decre ased respiratio n rate	Lacrim ation	Deat h
0	5/5 ^{a)}	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Ma						
1,000	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

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

2. 체중변화

시험물질을 투여한 후 14 일 동안 체중 변화를 관찰하였을 때, 대조군 및 시험물질 투여군에서 시간이

경과함에 따라 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었다 (Table 3).

Table 3. Body weight of rats orally treated with DBT for 14 days

Dose of Se (mg/kg)	No. animals	Days after treatment(g)					
		0	3	6	9	12	14
0	5	156.0±4.9	180.4±4.9	188.2±7.0	192.0±7.0	190.4±2.8	187.3±5.4
	5	152.7±7.8	181.4±5.0	194.1±8.0	200.0±1.8	205.2±5.5	205.6±5.3

All values are expressed as mean ± S.D.

3. 혈액학적 검사

혈액학적 검사 소견은 Table 4에 요약하였다. 적혈구 용적을 제외한 모든 혈액학적 검사 항목에서 투여군과 대조군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Table 4).

Table 4. Levels of hematological analysis in rats orally treated with DBT for 14 days

Dose Se (mg/kg)	WBC	RBC	HB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
0	11.8±4.4	7.5±0.6	15.0±1.1	46.8±0.8	62.6±2.9	20.0±0.5	32.0±1.7	862.6±188.0
	13.6±4.3	7.0±0.6	14.1±1.2	42.6±0.8	60.9±1.2	20.1±0.4	33.0±0.3	748.7±271.5

All values are expressed as mean ± S.D.

WBC, white blood cell count (10³/mm³); RBC, red blood cell count (10⁶/mm³); HB, hemoglobin (g/dl); HCT, hematocrit (%); MCV, mean corpuscular volume (fl); MCH, mean corpuscular hemoglobin (pg); MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration (%); PLT, platelet (10⁹/mm³)

4. 혈액생화학적인 검사

시험물질에 의한 혈액생화학적인 검사 결과를 Table 5에 요약하였다. 모든 혈액생화학적인 검사 항목에서 투여군과 대조군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를

나타내지 않았다 (Table 5).

Table 5. Levels of serum biochemical analysis in rats orally treated with DBT for 14 days

Dose Se (mg/kg)	Prot ein (g/d L)	ALB (g/d L)	BUN (mg/d L)	Creati nine (mg/d L)	Glob ulin (g/d L)	A/G Ratio	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (U/L)
0	5.2±1.0	3.0±0.5	16.4±2.6	0.5±0.1	2.2±0.6	1.4±0.2	81.3±29.4	349±12.4	216.8±68.6
	5.0±0.6	2.9±0.4	16.1±3.5	0.5±0.1	2.2±0.3	1.4±0.2	83.0±14.8	31.1±8.1	203.6±46.7

All values are expressed as mean ± S.D.

5. 육안소견 및 장기중량의 변화

시험물질 투여에 의한 육안 소견상 이상이 있는 개체는 관찰되지 않았다. 모든 투여 군에서 시험물질 투여에 의한 변화는 인정되지 않았다 (Table 6).

Table 6. Organ weights in rats orally treated with DBT for 14 days

All values are expressed as mean ± S.D.

Dose Sex (mg/kg)	Organ(g)		
	Liver	Kidney	Testis
0	7.59±0.92	0.75±0.07	1.46±0.08
1,000	7.39±0.69	0.77±0.07	1.47±0.05

고찰 및 결론

빈혈은 적혈구 수 또는 헤모글로빈의 농도가 정상 수준 이하로 감소하게 되면 발생한다⁸⁾. 빈혈은 발생 원인에 따라 출혈성, 용혈성, 철분 및 비타민 B₁₂ 등의 영양소 결핍, 또는 다른 질환에 의한 적혈구 생산 부족, 선천성, 약물치료에 의한 재생불량성 빈혈 등으로 구분한다^{9,10)}. 항암제 부작용의 공통적 증상은 소화기 장애, 골수조혈장애 등이 수반되는 것으로 보고되고 있다. Cyclophosphamide는 알킬화 약물로서 항암범위가 넓어서 각종 병용요법의 기본 약물로 많이 사용되고 있으나, 급성 독성으로 오심과 구토가 나타나며, 지연 독성으로 말초 혈구수의 중등도 억제, 과량 투여시 심한 골수억제로 백혈구 감소증 (leukopenia), 혈소판 감소증 (thrombocytopenia) 및

출혈 초래, 출혈성 방광염을 유발한다¹¹⁾. 이러한 항암 치료의 부작용으로 발생하는 재생불량성 빈혈은 조혈 세포의 감소와 체내 erythropoietin의 생성저하로 인해 헤모글로빈 농도의 저하와 빈혈증상을 유발한다¹²⁾. 이러한 증상에 대해 수혈을 하거나 약물치료로서 erythropoietin을 사용하여 빈혈을 치료하고 있으나 혈구증가나 증세호전의 효과가 일시적이며 근본적인 질환의 호전은 기대할 수 없으므로 항암제의 부작용을 보완하기에 적합한 한약 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

당귀보혈탕은 경구투여 시 마우스에서 아무런 급성독성을 나타내지 않았고, LD₅₀값은 마우스에서 경구 투여 최고용량인 400 mg/kg 이상일 것으로 보고 되었다.

시험물질 당귀보혈탕에 대한 아급성독성을 평가하기 위해 Sprague-Dawley계 흰쥐에 1,000 mg/kg으로 1일 1회 14 일간 경구투여하였다. 사망여부, 체중변화, 일반증상 관찰, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액 생화학적 검사, 육안적 검사, 장기중량 등을 관찰하여 시험물질의 독성을 평가하였다.

시험기간동안 시험물질 투여에 의한 사망동물은 없었다. 전 시험군은 14 일간의 시험기간 중 지속적인 체중 증가를 보였는데 이는 4 주령에 해당하는 동물의 성장 속도를 반영하였다¹³⁾. 시험물질 투여군은 대조군에 비하여 체중이 증가하였으나, 이는 당귀보혈탕의 치료 효과로 인정되며 시험물질의 부작용으로 인정되지 않았다⁵⁾. 시험물질 투여에 따른 외견상의 임상소견은 발견되지 않았으며 사료섭취량과 음수량도 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

혈액학적 소견에서 시험물질 투여군의 hematocrit치의 감소가 인정되었으나 모두 정상의 범위에 속하였다. 이와같이 혈액학적 소견에서 약물에 기인한다고 생각되는 이상소견은 보이지 않았다. 또한 혈액생화학적 성적에 대하여 대조군과 투여군을 비교하였으나 통계학적으로 유의성 있는 차이를 볼 수 없었으며, 모두 정상적인 지표내에 속하여 약물에 의한 직접적인 영향으로 인정되는 소견은 보이지 않았다.

시험물질을 14 일간 투여 한 후 관찰한 육안적 해부소견에서 이상 소견은 관찰되지 않았다. 시험물질에 투여에 의한 장기중량에 대한 변화는 없는 것으로 나타났다.

이상과 같이 당귀보혈탕에 대한 아급성독성시험에서 체중, 일반증상, 사료섭취량, 음수량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 육안적 소견, 장기 중량, 병리조직학적 검사 등에서 특이한 독성병변은 관찰되지

않았으며, 본 시험조건에서 당귀보혈탕의 SD계 흰쥐에 대한 14 일간 반복 경구 투여시 무관찰부작용량은 1,000 mg/kg 이상인 것으로 인정되었다.

감사의 글

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

This work was supported by a grant (20050401-034-787-188-00-00) from BioGreen 21 Program, Rural Development Administration, Republic of Korea.

참고문헌

1. 彭懷仁. 中醫方劑大辭典. 北京:人民衛生出版社. 1995;4:389-392.
2. 王肯堂. 六科準繩. 서울:東明社. 1975:520.
3. 李明兼. 濟陰綱目. 北京:人民衛生出版社. 1992:696.
4. 謝鳴. 中醫方劑現代研究. 北京:學院出版社. 1997:603-611.
5. 강순아, 장문석, 오명숙, 김도림, 김지숙, 박성규. 當歸補血湯과 erythropoietin이 cyclophosphamide로 유도된 흰쥐의 빈혈에 미치는 영향 비교 연구. 동의생리병리학회지. 2006;20(1):31-36.
6. 강순아, 오명숙, 김도림, 강지웅, 김원남, 박은화, 장문석, 박성규. 當歸와 黃芪의 배합 변화가 DPPH 자유기 소거에 미치는 영향 연구. 대한본초학회지. 2006;21(1):17-24.
7. Lorke, D. A new approach to practical toxicity testing. Arch. Toxicol. 1983;54:275-287.
8. 이문호. 내과학. 서울:금강출판사. 1979:339-353.
9. 대한임상병리학회. 임상병리학. 서울:고려의학. 1996:173-188
10. 서울대학교의과대학. Hematology. 서울:서울대학교출판부. 1993:1-3.
11. 이우주 외. 이우주의 약리학 강의. 서울:의학문화사. 1993:745-747.
12. 김종운. 혈액학. 서울:서울대학교출판부. 1993:117-121.
13. Song, C. W., Hwang, H. S., Han, H. S. Studies on the basic data of ktc: SD rats with age. Kor. J. Ani. Sci. 1990;6:33-43.