

六味地黃湯의 마우스에 대한 급성독성

전원경, 이재훈, 이지혜, 김미연, 마진열
한국한의학연구원 신한방제제연구센터

ABSTRACT

Acute Toxicity of *Yukmijihwang-tang* in ICR Mice

Won-Kyung Jeon, Jae-Hoon Lee, Ji-Hye Lee, Mi-Yeon Kim, Jin-Yeul Ma
Center for Herbal Medicine Improvement Research, Korea Institute of Oriental Medicine

Objectives : *Yukmijihwang-tang* (YJT) is known as a tonifying formula for reinforcement of yin deficiency conditions. The present study was carried out to investigate the potential acute toxicity of YJT in ICR male and female mice.

Methods : We investigated the acute toxicity about boiling water-extracted YJT. The test article was orally administered once by gavage to 20 male and 20 female mice at dose levels of 0 (control group), 1250, 2500 and 5000 mg/kg body weight. Mortalities, clinical findings, autopsy and body weight changes were monitored daily for the 14 days following the administration according to the Regulation of Korean Food and Drug Administration.

Results : We observed survival rates, general toxicity, change of body weight, and autopsy. Single oral administration of YJT with different dosages, no animals died of the test drug. Autopsy of animal revealed no abnormal gross finding. Therefore, LD₅₀ value of YJT for ICR mice was more than 5000 mg/kg on oral route.

-
- 교신저자 : 마진열
 - 대전시 유성구 엑스포로 483 한국한의학연구원 신한방제제연구센터
 - Tel : 042-868-9466 Fax : 042-868-9573 E-mail : jyma@kiom.re.kr
 - 접수 : 2009/ 08/ 03 채택 : 2009/ 11/ 25

Conclusions : These results suggest that no toxic dose level of YJT in mice is considered to be more than 5000 mg/kg. Consequently, it was concluded that YJT have no effect on acute toxicity and side effect in ICR mice.

Key word : Yukmijihwang-tang, Acute toxicity, LD₅₀

I. 서 론

중국에서 liuweidihuang-tang으로 알려져 있는 육미지황탕은 동양의학에서 腎陰을 보하는 처방으로 신장질환을 치료하기위해 주로 사용되어왔다¹⁾. 육미지황탕은 「金匱要略」에서 기원하고 八味地黄丸을 변형한 것인데 宋代의 錢乙의 「小兒藥證直訣」에서 육계와 부자를 처방에서 제외하고 六味地黄元이라고 명명되었으며 탕제로 복용가능 하도록 조절한 처방으로 숙지황, 산약, 산수유, 택사, 복령, 목단피 등 6종의 약재로 구성되어져 있으며 지금까지 임상에서 널리 활용되어 왔다²⁾. 최근에는 한의학계를 중심으로 육미지황탕에 대해 실험적 효능연구 및 성분분석 연구 그리고 임상치료사례에 대해 다수 보고되고 있다. 특히 육미지황탕의 주 효능이 腎情, 腎陰을 보하는 보음처방이므로 신장 기능 조절 및 신장 조직 보호효과에 관한 연구³⁻⁶⁾가 가장 많았고, 이외에 인지기능 강화 및 뇌조직 보호효과⁷⁻⁹⁾, 성장 및 골 형성에 미치는 영향¹⁰⁻¹³⁾, 항당뇨 효능¹⁴⁻¹⁵⁾, 면역기능 조절 효능¹⁶⁻¹⁷⁾, 항산화 효능¹⁸⁻¹⁹⁾, 근육운동과 피로 회복에 미치는 영향²⁰⁾, 간기능^{18, 21)}, 생식능력 증강²²⁾, 항암²³⁻²⁴⁾, 혈압강하²⁵⁾ 등 다양한 효능에 대한 실험적 기초자료가 보고된 바 있다. 그 외 許²⁷⁾ 등이 육미지황탕 엑스를 흰쥐에 투여한 결과 혈청 중 albumin의

증가를 보고하였으며, 金²⁵⁾ 등은 육미지황탕 전탕액을 가토에 투여한바 사염화탄소 단독치치군은 정상군에 비하여 지질과산화가 상승하였으며 육미지황탕 처치군은 거의 정상치로 감소하였다고 보고하였다. 또한 柳²⁷⁾ 등은 육미지황탕을 처치한 신염 백서의 뇨 중 단백질 함량이 투약 30일에 유의성 있는 감소를 나타냈다고 보고한 바 있고, 林²⁸⁾ 등은 Cd를 투여한 쥐의 신장성 고혈압에 육미지황탕이 유의성 있는 회복효과가 있음을 보고한 바 있다. 이에 육미지황탕의 다양한 효능에 대해 연구가 되었고 신장(腎臟)과 관련된 실험적 효능 연구는 많이 되어있었다²⁹⁻³⁰⁾. 이와 같이 실험적 효능연구는 문헌연구와 비교하여 많이 이루어지고 있으나 육미지황탕의 안전성에 관련된 실험적 연구는 거의 없는 것으로 조사되었으며 특히 마우스를 이용한 급성독성에 대한 연구보고는 없었다. 따라서 본 연구에서는 한방의료기관의 다빈도 처방 중에 하나인 육미지황탕을 대상으로 안전성을 평가하고자 식품의약품안전청의 「의약품 등의 독성시험 기준」³¹⁾에 따라 마우스에서 단회투여에 의한 독성시험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 조제

육미지황탕 처방의 구성은 숙지황 (Rehmanniae Radix Preparat), 산약 (Dioscoreae Rhizoma), 산수유 (Corni Fructus), 택사 (Alismatis Rhizoma), 복령 (Poria), 목단피 (Moutan Cortex)로³²⁻³³⁾ 생산자 및 재배지역이 명확한 한약재를 구입하였다 (Table 1). 육미지황탕을 구성하고 있는 한약재를 Table 2와 같이 정량한 다음 조합하여 실험에 사용하였다. 본 연구에서는 열수추출법 (한국, 경서추출기 cosmos-600)에 의한 시험물질 조제를 실시하였으며 처방구성에 따른 육미지황탕을 25L 생수 (화이트, 경남 산청군 삼장면 덕교리 800)에 넣어 180분간 열수 추출한 후, 건조분무기 (Japan, Eyela SD-1000)를 사용하여 분말 형태로 조제하였다(수율: 36.71%).

Table 1. Buy of raw material herbs

한약재명	원산지	생산자 (수입자)	소매자
숙지황	한국	경북 군위군 우보면 선곡리 박재대	경북 영천시 대전동 596-1 진영
산약	한국	경북 영주시 태은면 지낙1리 557 강낙구	경북 영천시 완산동 925-15 영천현대약업사
산수유	한국	전남 구례군 산동면 원촌리 247-2 박태간	경북 영천시 완산동 925-15 영천현대약업사
택사	한국	전남 순천시 풍덕동 1290-16 채규삼	경북 영천시 완산동 925-15 영천현대약업사
복령	한국	강원도 영원군 주천면 주천리 박태화	경북 영천시 완산동 925-15 영천현대약업사
목단피	중국	서울 서대문구 제기동 930-4 동경종합상사(주)	경북 영천시 완산동 925-15 영천현대약업사

Table 2. Composition of Yukmijihwang-tang(YJT)

Herbal medicines	Weight (g)
Rehmanniae Radix Preparat	800.0
Dioscoreae Rhizoma	400.0
Corni Fructus	400.0
Alismatis Rhizoma	300.0
Poria	300.0
Moutan Cortex	300.0

2. 실험동물 및 사육환경

시험구역은 한국한의학연구원 동물실험실에서 실시하였으며, 시험동물은 4주령 암수 ICR계 마우스를 오리엔트 바이오 (경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1)에서 분양받아 사용하였다. 동물입수 시, 외관을 육안으로 검사한 다음 1주일간의 순화기간동안에 임상관찰 등을 통하여 정상적인 동물만 암·수 20마리씩 선발하여 체중범위에 따른 무작위법에 의하여 군 분리를 실시한 후, 본 실험에 사용하였다. 순화 및 실험기간 동안의 사육환경은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수는 시간당 12~16회, 조명은 12시간 명암주기 (점등 7:00, 소등 19:00), 조도는 150~300 Lx로 조정하여 일정한 사육환경 조건을 유지하였다. 사료는 실험동물용 고품사료 (PMI nutrition, USA)와 음수는 상수도수를 자유섭취 시켰다.

3. 실험군 설계 및 투여용량 설정

5주령 마우스에 대한 YJT의 급성 경구독성을 평가하기 위하여 무작위법을 이용하여 군분리를 실시하였다. 투여 경로는 한방 임상에서의 주요 적용경로 중의 하나인 경구로 하였으며, 본 연구에서 설정된 투여 용량은 최고용량 5000 mg/kg을 기준으로 하여 공비 0.5로 3개 군 (1250, 2500, 5000 mg/kg)을 각각 설정하고, 대조군 (0 mg/kg)을 포함하여 모두 4개의 군으로 정하였다(Table 3). 각 용량군의 YJT은 투여 직전에 3차 증류수에 희석하여 실험에 공시하였으며 동물을 하룻밤 절식시

2. 임상 증상

시험물질 육미지황탕 투여한 후 전 기간 동안 암수 ICR 마우스 모두 본 실험물질의 투여에 관한 어떠한 독성증상의 이상 소견이 관찰되지 않았다 (Table 5).

Table 5. Clinical signs of male and female ICR mice treated with YJT

Sex	Variable	\Group	C	T ₁	T ₂	T ₃
		\Dose (mg/kg)	0	1,250	2,500	5,000
		\No. of animal	5	5	5	5
Male	normal		5	5	5	5
	abnormal		0	0	0	0
Female	normal		5	5	5	5
	abnormal		0	0	0	0

C : vehicle orally treated group
 T₁ : 5000 mg/kg(day) of YJT orally treated group
 T₂ : 2500 mg/kg(day) of YJT orally treated group
 T₃ : 1250 mg/kg(day) of YJT orally treated group

3. 체중 변화

모든 시험군에서 경구투여 후 체중이 증가하였으며 마우스에 대한 육미지황탕 3개 용량으로 경구투여 한 군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 또한 투여용량군 사이의 체중 변화는 용량의존성을 나타내지 않았다 (Fig. 1, 2).

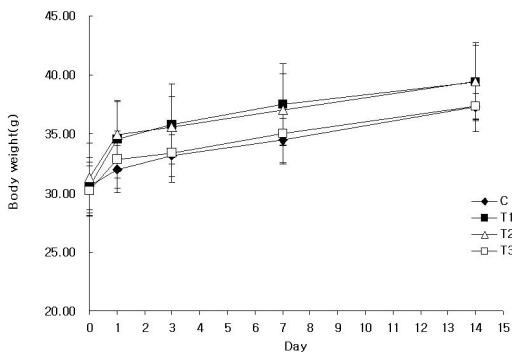


Fig. 1. Effects of YJT and vehicle on body weight in male ICR mice.

C : vehicle orally treated group, T₁ : 5000 mg/kg(day) of YJT orally treated group, T₂ : 2500 mg/kg(day) of YJT orally treated group, T₃ : 1250 mg/kg(day) of YJT orally treated group.

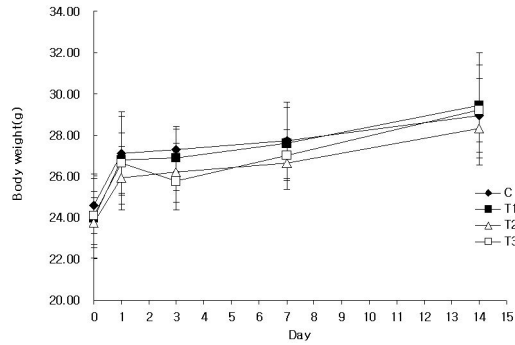


Fig. 2. Effects of YJT and vehicle on body weight in female ICR mice.

C : vehicle orally treated group, T₁ : 5000 mg/kg(day) of YJT orally treated group, T₂ : 2500 mg/kg(day) of YJT orally treated group, T₃ : 1250 mg/kg(day) of YJT orally treated group.

4. 부검 소견

실험 종료 시, 모든 암수 ICR 마우스의 장기에 대하여 육안적 병변을 관찰한 결과 시험물질의 투여에 기인된 어떠한 이상 병변은 관찰되지 않았다 (Table 6).

Table 6. Autopsy finding of male and female ICR mice orally treated with YJT

Sex	Variable	\Group	C	T ₁	T ₂	T ₃
		\Dose (mg/kg)	0	1250	2500	5000
		\No. of animal	5	5	5	5
Male	normal		5	5	5	5
	abnormal		0	0	0	0
Female	normal		5	5	5	5
	abnormal		0	0	0	0

Autopsy finding at 1 day treatment of test substances.
 C : vehicle orally treated group
 T₁ : 5000 mg/kg(day) of YJT orally treated group
 T₂ : 2500 mg/kg(day) of YJT orally treated group
 T₃ : 1250 mg/kg(day) of YJT orally treated group

5. LD₅₀ 값

육미지황탕을 암수 마우스에 1회 경구투여한 후 관찰한 결과, 5000mg/kg까지는 치사량(LD₅₀)이 산출되지 않아 본 시험물질인 육미지황탕은 무독성 물질로 판단되어진다.

VI. 고찰 및 결론

본 연구는 육미지황탕의 동결건조 시료에 대한 급성독성을 평가하고자 ICR 암수 마우스에게 각각 0, 1250, 2500, 5000 mg/kg 용량으로 단회 경구투여한 후 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검 소견을 관찰하였다. 시험결과 마우스에서 육미지황탕의 경구투여는 모든 마우스가 생존하여 평균치사량을 산출할 수 없었으며, 임상증상 관찰 시 시험물질의 투여에 관한 어떠한 독성증상의 이상 소견이 관찰되지 않았다. 또한 경구투여한 마우스의 체중변화는 대조군과 시험물질 투여군 간의 유의차를 발견할 수 없었고, 모든 장기에 육안적 이상병변은 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 시험물질인 육미지황탕은 암수 ICR 마우스 생체내 안전한 물질로 작용되는 것으로 생각되며 LD₅₀값은 5000 mg/kg을 훨씬 상회할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 교육과학기술부 지원 한국한의학연구원 기관고유사업 K09040의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

1. Kang DG, Sohn EJ, Moon MY, Mun YJ, Woo WH, Kim MK, Lee HS. Yukmijihwang-tang ameliorates ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *J Ethnopharmacology*. 2006;104

:47-53.

2. 이준경, 이남현, 하혜경, 이호영, 정다영, 최지윤, 서창섭, 신현규. EBM 구축을 위한 육미지황탕 문헌 분석 연구. *동의생리병리학회지*. 2009;23:15-26.
3. 신규원. 다용 한약처방투여가 흰쥐의 신장기능에 미치는 영향. *상지대학교 대학원*. 2005.
4. 정은경, 류도곤, 이호섭. 육미지황탕 煎湯液 投與가 白鼠의 腎臟機能에 미치는 影響. *한의생리학회지*. 1996;11:73-9.
5. 정은경, 류도곤, 이호섭. 육미지황탕 煎湯液 投與가 白鼠의 血漿 Renin 活性度, 血漿 Aldosterone 및 Atrial Natriuretic Peptide 濃度에 미치는 影響. *대한한의학회지*. 1997;18:449-55.
6. 최우정, 이연정, 김형균, 이광석, 이대용, 정대영. 左歸飲과 육미지황탕 煎湯液 投與가 家兔腎機能 및 혈장 Aldosterone농도에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*. 2002;16:1263-9.
7. Rho SW, Kang MK, Choi BO, Sim DS, Lee JW, Lee EA. Effects of Yukmijihwang-tang derivatives (YMJD), a memory enhancing herbal extract, on the gene-expression profile in the rat hippocampus. *Biol Pharm Bull*. 2005;28:87-93.
8. Wei XL. Studies on learning and memory function-related genes in the hippocampus and the relationship between the cognitive enhancing effect of liuwe dihuang decoction(LW) and gene expression. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. 2002;31:227-30.
9. Yang S, Zhou W, Zhang Y, Yan C, Zhao Y. Effects of Liuwei Dihuang decoction on ion channels and synaptic transmission in cultured hippocampal neuron of rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;106:166-72.
10. 김민정, 홍권의. 加味歸茸湯 및 육미지황탕 藥鍼이 생쥐의 成長에 미치는 影響. *대한약침학*

- 회지. 2007;9:105-16.
11. 이상곤, 권영규, 김광중, 김원희. 四物湯과 육미지황탕이 卵巢摘出로 誘導된 白鼠의 骨多孔症에 미치는 影響. 제한동의학술원 논문집. 1995.
 12. 김우현, 신민규, 김원희. 육미지황탕 投與가 Rat의 成長 및 血清 總Cholesterol 含量에 미치는 影響. 둔산한의대논문집. 1978;1:111-5.
 13. 박병철, 차운엽, 이용세. 육미지황탕의 인체합체 함량과 골형성 관련 遺傳子의 轉寫活性에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2004;15:1769-76.
 14. 서은경, 강동희, 서진우, 김경숙, 이태권, 이영춘, 남경수, 김철호. 비만 실험동물 쥐 (obese Zucker rats)에서의 육미지황탕의 항당뇨 효과. Korea Journal of Life Science. 2000;10:388-96.
 15. Wu YC, Hsu H, Liu IM, Liou SS, Su HC, Cheng JT. Increase of insulin sensitivity in diabetic rats received Die-Huang-Wan, a herbal mixture used in Chinese traditional medicine. Acta Pharmacol Sin. 2002;23:1181-7.
 16. 한일수, 김철중. 육미지황탕 八味地黃湯 및 加味地黃湯이 생쥐의 복강대식세포 활성화에 미치는 영향. 대전대한의과대학원논문집. 1997;6:331-47.
 17. 전진오, 정현우. 육미지황탕이 免疫細胞에 미치는 實驗的 效果. 대한한방내과학회지. 2000;21:243-50.
 18. 박성민, 임명현, 이준희, 박재현. 補中益氣湯과 육미지황탕이 노화촉진생쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18:175-91.
 19. 서영은, 이은아, 배현수, 신민규, 홍무창. 육미지황탕 구성약물이 PC12 세포의 酸化抑制에 미치는 影響. 동의생리병리학회지. 2003;17:203-8.
 20. 김길훤, 김원희. 運動負荷後의 疲勞恢復에 미치는 補中益氣湯 및 六味地黃湯의 效果. 동의생리학회지. 1987;2:1-13.
 21. 한용주, 이선동, 최중환, 박종구, 박해모, 장인수. 다용 한약처방 투여가 흰쥐의 간 기능에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2006;27:78-90.
 22. Oh MS, Chang Ms, Park WS, Kim DR, Bae HS, Huh YB, Park SK. Yukmijihwang-tang protects against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. Reproductive Toxicology. 2007;24:365-70.
 23. Zhao L, Yan S, Jiang T. Inhibitory effect of liuwei dihuang decoction on induced mutation and spontaneous tumor. Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 1990;10:433-5.
 24. Jiang TL, Yan SC, Zhao LF. Preventing effect of "Liuwei dihuang decoction" on esophageal carcinoma. Gan To Kagaku Ryoho. 1989;16:1511-8.
 25. 김우식, 김동희. 육미지황탕 煎湯掖이 家免 血壓 및 白鼠肝 TBA에 미치는 影響에 대한 研究. 대전대한의과대학논문집. 1979;2:142-52.
 26. 허종희. 가미육미지황탕이 Streptozotocin백서의 혈당량에 미치는 영향. 경희한의대 논문집. 1984;7:135.
 27. 유지윤. 육미지황탕 및 팔미지황탕이 항개량형 마빈신염에 미치는 영향. 원광 대학교 대학원 논문집. 1983;3:154.
 28. 임종필, 서은실. 육미지황탕이 카드뮴 중독된 흰쥐의 혈압에 미치는 영향. 한국생약학회지. 1999;30:250.
 29. Chen Y, Qu C, Zhong H, Xue Y, Zhou C, Li W, Cheng X. Effects of liuwei dihuang wan and some other TCM drugs on bone biomechanics and serum 25 (OH)D3 content in rats. Journal of Traditional Chinese Medicine. 1994;14:298-302.
 30. Jiang TL, Yan SC, Wang SF, Wu GL, Feng GW, Li LF, Li XM. Effect of "liuwei dihuang" decoction on prevention and treatment of tumor. Journal of Traditional Chinese Medicine. 1984;4:59-68.

31. 식품의약품안전청. 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시2009-116호, 식품의약품안전청, 서울. 2009.
32. 식품의약품안전청. 대한약전외한약(생약)규격집. 2002.
33. 식품의약품안전청. 대한약전. 제9개정. 신일북스, 2008.