

혈관질환 억제 효능이 있는 WK-38의 백서 신장 독성연구

김은주¹, 이안숙¹, 신 신¹, 김성연², 장보윤², 이호섭^{1,3}, 강대길^{1,3}
¹원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, ²원광대학교 약학대학 약학과
³원광대학교 한의과대학 생리학 교실

ABSTRACT

Study on Kidney Toxicities of WK-38 for Treatment Vascular Diseases in Rats

Eun-Ju Kim¹, An-Sook Lee¹, Sun Shin¹, Sung-Yeon Kim², Bo-Yoon Chang², Ho-Sub Lee^{1,3}, Dae-Gill Kang^{1,3}
¹Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,
²Dept. of Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang University,
³Dept. of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The kidney toxicities of WK-38 used for improvement of the vascular diseases, was examined using male and female Sprague-Dawley rats. The male and female rats were divided into 4 groups for intragastrical treatment with doses of 0, 5, 50, and 500 mg/kg/day for 13 weeks, respectively.

In all male and female rats treated with WK-38, no mortality and gross pathological findings were shown for 13 weeks. There was substantially no change in body weight in all rats with treatment of WK-38. Urine osmolality as renal functional parameters were not exchanged in all rats treated with WK-38. The renal functional parameters including electrolytes excretory rate,

-
- 교신저자 : 강대길
 - 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 생리학교실
 - Tel : 063-850-6933 E-mail : dgkang@wku.ac.kr
 - 접수 : 2009/ 07/ 08 수정 : 2009/ 12/ 03 채택 : 2009/ 12/ 10

creatinine clearance, and solute-free water reabsorption were significantly augmented on account of increase in urinary volume in female rats treated with WK-38, but not male.

In summary, this study demonstrates that WK-38 exhibits no toxicity on kidney in all male and female rats.

Key word : WK-38, Kidney toxicity, In vivo

1. 서 론

최근 서구화된 식습관에 의한 영양과잉섭취, 의료기술의 발달로 인한 고령화, 자동화에 따른 운동부족과 과도한 스트레스 등으로 뇌혈관 질환 및 심장질환과 같은 심혈관계 질환이 두드러지게 증가되는 추세이다¹⁾. 2007년 통계청 발표에 의하면, 뇌졸중, 심장병, 동맥경화 등의 심혈관계 질환으로 사망한 경우가 교통사고, 간 질환에 의한 사망률보다 높다. 이러한 심혈관계 질환의 주원인 중 하나로 혈관 내벽에 지방이나 콜레스테롤 등의 침착으로 나타나는 혈액순환 장애현상인 죽상경화증(atherosclerosis)이 제시되고 있다²⁾.

죽상경화증을 억제하는 약물로는 혈관확장제, 교감신경 차단제, 칼슘길항제, 항혈소판제 등이 임상에서 사용되고 있으나 장기간 복용해야 하기 때문에 약의 종류에 따라서 체위성 저혈압, 저칼륨혈증, 기침, 두통, 현기증, 부종, 식욕부진 등의 부작용을 동반할 수 있다³⁾. 특히 장기간에 걸쳐 약물을 투여해야 하는 단점이 있는 죽상경화증은 상대적으로 부작용이 적은 천연물 유래의 의약품이 부작용면에서 매우 유리할 수 있다. 그러나 천연물들의 약효는 고전적인 민중요법과 경험에 근거한 것이므로, 현대 약물학적 관점으로는 해석이

어려운 경우가 많다. 특히, 일부 한약재들은 잠재적 독성을 가지고 있어 장기간 복용하는 경우 건강에 치명적인 영향을 초래할 수 있다⁴⁻⁷⁾. 따라서 효능뿐만 아니라 안전성이 확보된 한약재를 이용한 심혈관계 질환에 효과적인 기능성 식품 및 의약품의 개발이 절실히 요구되고 있다.

식품의약품안전청에서는 생약 제제 등의 안정성을 검증할 수 있는 방법으로 단회투여 독성시험, 반복투여 독성시험, 생식·발암성 시험 등을 독성시험기준으로 제시하고 있다. 시험방법에 있어서 서로 다른 2종 이상의 암/수에서 검증하고, 투여방법, 투여경로, 용량등도 모두 기준화하였다. 또한 생약제제 투여 시 나타나는 독성징후 발견을 위해 매일 1회 이상 실험동물을 관찰하고, 체중 및 사료 섭취량, 물 섭취량, 혈액검사, 요 검사, 병리학 적 검사 등 다방면의 검사를 실시하도록 기준을 정하였다. 일반적으로 시험물질이 흡수되어 대사되고, 배설되는 장기인 신장과 간의 독성을 데이터로 많이 활용하는데, 요와 혈액검사를 통해 신기능, 간 기능, 혈관 기능을 확인한다.

본 연구에서 사용된 WK-38은 심혈관계 질환의 예방과 치료목적으로 자체 구성된 처방이다. WK-38은 대황(大黃, *Radix Et Rhizoma rhei*), 후박(厚朴, *Cortex Magnoliae officinalis*), 목단피(牡丹皮,

Cortex *Moutan radicis*) 3 가지 약재로 구성된 복합처방으로 죽상경화의 예방과 치료를 목적으로 구성되었다.

WK-38에 포함된 각각의 한약재들은 현재 한방 처방에 많이 사용되는 약재들이다. 그러나 이들 한약재에 대한 약리학적 작용과 임상적 이용가치에 대한 일부 정보가 있으나, WK-38 복합제제의 반복 투여에 대한 안전성 및 독성에 대한 검증은 되지 않은 상태다.

따라서 이 실험에서는 건강하게 발육한 백서의 암, 수를 이용하여 WK-38 복합제제의 반복 투여 시 나타날 수 있는 신장독성 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 실험 동물

실험동물은 (주)샘타코 바이오코리아(경기도 오산)에서 구입한 7 주령의 Sprague-Dawley 계 암, 수컷 흰쥐를 사용하였으며, 물과 고형사료를 충분히 공급하면서 1주 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 표준적인 사육조건인 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대 습도 $55 \pm 10\%$, 환기횟수 10-15 회/hr의 환경조건을 유지한다.

2) 실험물질의 제조 및 투여용량

WK-38은 대황, 후박, 목단피 각 100 g을 증류수 2.5 L에 넣고 냉각기가 설치된 삼각플라스크에 넣은 후 120분간 가열하였다. 추출 된 전탕액을 3,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 얻은 전탕액을 회전식 증발기로 농축한 후 동결건조 하여 45 g (수득율 15%)의 분말을 얻었다.

WK-38의 반복투여 독성시험에서는 500 mg/kg을 최고 용량으로 정하고, 정제 증류수로 희석하여 50 mg/kg, 5mg/kg의 시험물질을 제조하였다. 투여경로는 한방임상에서 많이 쓰이는 경구투여를 선택하였다. 금속제 동물용 위관 (sondae)을 이용

하여 위내에 직접 주입하였다. 1일 1회이며 액량은 5 ml/kg으로 계산하여 13주간 투여하였다.

3) 시료 채취

채뇨는 백서를 자유롭게 물과 먹이에 접근할 수 있는 metabolic cage에 넣어 3일간 적응시킨 후 실험을 시작하였다. 3일의 대조 기간 동안 24시간 요를 채취하였으며, 채뇨 용기, 먹이통, 물통, cage의 청소는 오전 9시-11시에 실시하였다.

채혈은 의식이 있는 상태의 백서를 ethyl ether로 마취하여 복대 동맥으로부터 얻어진 혈액을 실온에서 30분간 방치하여 응고시킨 후 원심분리 (3000rpm, 15분) 하여 혈청을 분리하였다.

2. 방 법

1) 임상증상 관찰

시험기간 중 매일 식품의약품안전청의 독성시험기준에 따라 투여 후 6시간까지 매시간 일반상태의 변화, 중독증상, 운동성, 외관, 자율신경 및 사망 유무를 관찰하였다.

2) 요중 creatinine 및 전해질 농도의 측정

요와 혈청의 creatinine은 분광광도계(Miloton Roy, Rochester, NY, USA)를 이용해 정량하였고, 전해질 농도는 전해 질분석기(NOVA 5⁺, Biochemical, Waltham, MA, USA)를 이용하여 분석하였으며, osmolality는 osmometer (Model 3900, Advanced Instruments Inc., Norwood, MS, USA)를 이용하여 측정하였다.

3) 용질-자유 수분 재흡수 (T^oH₂O)의 측정

혈청과 요의 osmolality를 측정한 후 다음 식을 이용하여 용질-자유 수분 재흡수를 계산하였다.

$T^{\circ}H_2O = V(U_{osmol}/P_{osmol}-1)$, $V =$ urine volume, $U_{osmol} =$ urinary osmolality, $P_{osmol} =$ plasma osmolality.

4) 통계 처리

실험 군 간의 유의성은 실험 결과를 Student's t-test나 one-way ANOVA test를 통하여 p값이 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였고, 실험

값은 mean ± S.E로 나타내었다.

III. 결 과

1. 치사율 및 임상증상

WK-38을 13주 투여 후 사망유무를 관찰한 결과, 모든 백서에서 WK-38 투여에 의한 사망은 관찰되지 않았고 실험기간 동안 유의할 만한 행동변화 및 이상 증상은 관찰되지 않았다.

2. 체중에 미치는 영향

13주 실험 기간 동안 모든 실험 백서군의 체중 변화는 시간에 따라 일정하게 증가하였으며, 특이적인 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1A, B).

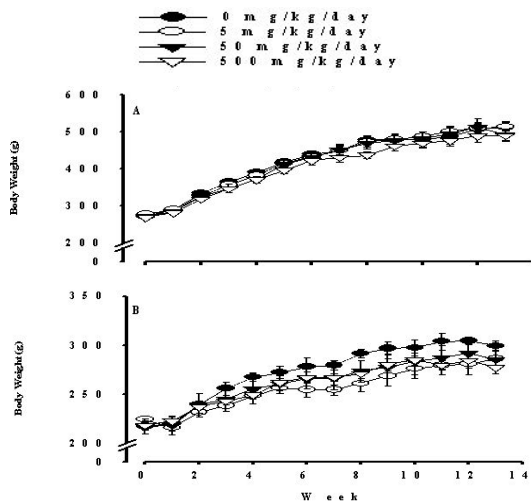


Fig. 1. Body weight changes in male (A) and female (B) rats treated with WK-38 for 13 weeks.

Each value represents the mean ± S.E of 5 experiments.

3. 요량에 미치는 영향

WK-38 투여 시 요량은 수컷에서는 현저한 차이가 관찰되지 않았으나, 암컷에서는 각각 5 mg/kg, 500 mg/kg에서 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다(Fig. 2A).

4. 요 중 삼투질 농도 배설에 미치는 영향

모든 실험 백서군의 요 중 삼투질 농도 (Uosmol)는 WK-38 투여에 의해 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2B).

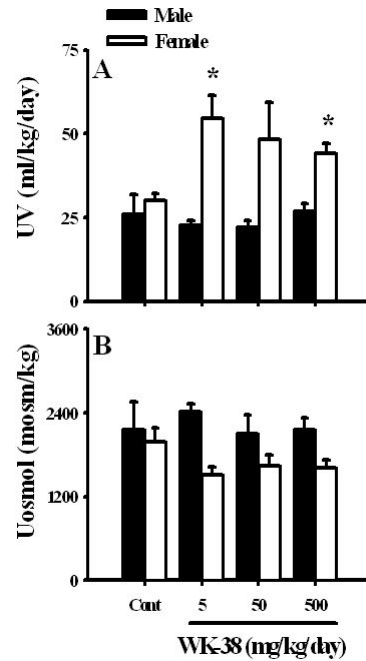


Fig. 2. Changes in urine volume (A) and urine osmolality (B) of rats treated with WK-38 for 13 weeks.

Each value represents the mean ± S.E of 5 experiments. *p<0.05, vs. control group.

5. 요 중 전해질 배설에 미치는 영향

WK-38 투여 시 요 중 Na⁺ 배설율, K⁺ 배설율, Cl⁻ 배설율은 각각 수컷에서는 현저한 차이가 관찰되지 않았으나, 암컷의 5 mg/kg에서는 각각 일시적인 유의성이 관찰되었다(Fig. 3A, B, C).

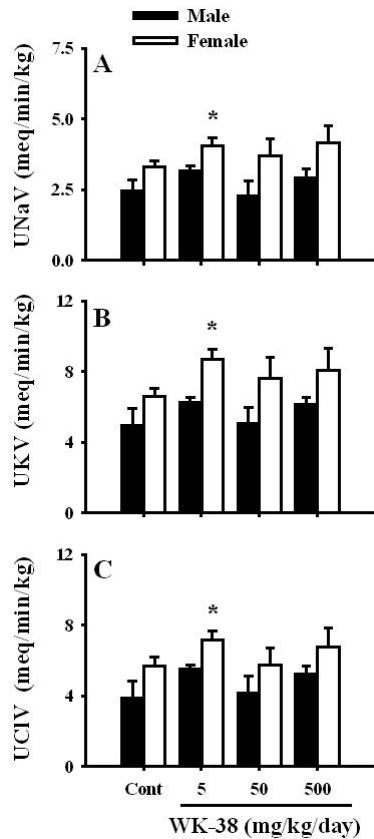


Fig. 3. Changes in UNaV (A), UKV (B) and UCIV (C) of rats treated with WK-38 for 13 weeks.

Each value represents the mean ± S.E of 5 experiments. *p<0.05, vs. control group.

6. Creatinine 청소율 및 용질-자유수분 재흡수에 미치는 영향

WK-38 투여 시 creatinine 청소율 (Ccr)과 용질-자유수분 재흡수를 각각 측정된 결과 수컷에서는 현저한 차이가 관찰되지 않았으나, 암컷의 5 mg/kg에서는 각각 일시적인 유의성이 관찰되었다 (Fig. 4A, B).

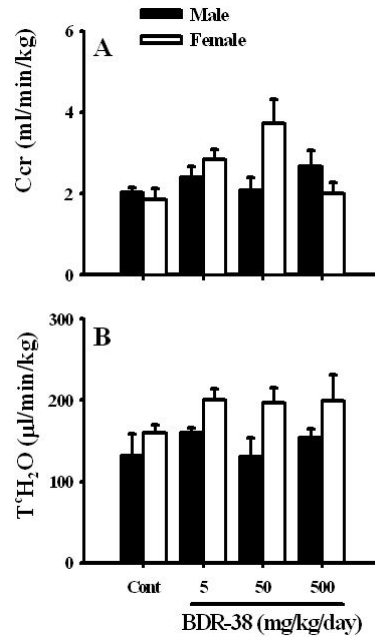


Fig. 4. Changes in creatinine clearance (A) and solute-free water reabsorption (B) of rats treated with WK-38 for 13 weeks.

Each value represents the mean ± S.E of 5 experiments.

IV. 고 찰

이 연구에서는 죽상경화증의 예방 및 치료를 목적으로 구성된 처방인 WK-38을 Sprague-Dawley 계통 백서에 13주간 투여하여 신장에 미치는 독성을 관찰하였다.

복방 추출물인 WK-38은 대황, 후박, 목단피로 구성된 한방복방으로 순환기계 질환발생의 주원인인 동맥경화증의 예방 및 치료를 목적으로 구성된 처방이다. 대황(大黃, *Radix Et Rhizoma rhei*)은 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 여러해살이풀인 대황 (*Rheum undulatum* L.)의 뿌리나 뿌리 근으로, 아시아의 온대와 아열대지역에 서식하며 전통적으로 진정, 지혈, 구충, 향균, 향종양, 혈압강하 등에 효과가 있음이 알려져 있으며⁸⁾, 한방에서는 변비, 만성설사, 장염, 황달, 복막염, 담석증의 치료

등에 이용해왔다⁹⁻¹¹⁾. 주요 성분으로는 glycosides rhein-8-mono-glucoside, physcion monoglucoside, aloemodin monoglucoside, emodine monoglucoside, sennoside, tannin, gallic acid, catechin 등이 분리 및 확인 되었다. 후박(厚朴, *Cortex Magnoliae officinalis*)은 목련과(Magnoliaceae)에 속한 낙엽교목인 후박(*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils)의 수피를 건조한 한약재이다¹²⁾. 주성분으로는 magnolol, honokiol, α - β -pinene, camphen, limonene, magnocurarine 등이 보고되어 있고, 약리작용으로는 항균, 진경, 건위, 진충, 진정 등이 보고되어 있다¹³⁾. 厚朴은 <신농본초경>에 중품약으로 수재되어 있으며¹⁴⁾ 溫中下氣, 枳實, 枳殼 등에 진정, 진통작용이 있고, 경련성 복통과 같은 신경성 위장병의 치료약으로¹⁵⁾ 燥濕, 消痰의 효능을 갖는 한약재로 사용되고 있으며 최근에는 Parkinson's disease의 치료약으로 사용한다는 보고도 있다^{15,16)}. 목단피(牡丹皮, *Cortex Moutan radices*)는 갈잎떨기나무에 속하는 모란(*Paeonia suffruticosa* Andrews)의 뿌리껍질로 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하고¹⁷⁾, 한방에서는 소염, 해열, 진통제 등으로 사용하고 있는 중요한 한약재로 항 돌연변이성^{18,19)}, 항 염증성작용²⁰⁾ 등에 관한 연구가 보고된 바가 있으며, 목단피의 성분으로는 paeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, albiflorin 등과 같은 monoterpene glucoside, 당과 결합하지 않은 paeoiflorigenone과 수종의 gallotannin을 함유하고 있다²¹⁾. 목단피의 paeoniflorin은 혈액 응고 저해²²⁾, apoptosis 유도작용²³⁾, 항고지혈증 작용²⁴⁾ 등이 보고 되고 있다.

본 처방은 ApoE knockout 마우스와 고콜레스테롤 식이 랫트에서 LDL-cholesterol의 감소 혈관 죽종의 감소 등과 같은 동맥경화 억제효능이 있는 것으로 나타났다(미발표 data).

3주 동안 WK-38을 투여하면서 사망률, 일반증상, 체중변화, 뇨, 혈액생화학 지표 등을 관찰한 결과, WK-38의 투여 시 암컷에서 총 요배설량인 UV의 현저한 증가와 urine에서 Na^+ 배설을

(UNaV), K^+ 배설을 (UKV), Cl^- 배설을 (UCIV)이 각각 현저히 높게 나타남을 관찰 할 수 있었다. 암컷 대조군과 비교했을 때 urine에서 Na^+ , K^+ , Cl^- 절대량에는 차이가 없었던 점을 고려한다면, Na^+ 배설을 (UNaV), K^+ 배설을 (UKV), Cl^- 배설을 (UCIV)이 각각 높아진 원인으로는 총 요배설량인 UV의 현저한 증가 때문일 것으로 사료된다. 또한, 실험결과에서 보았듯이 암컷에서 요 배설량 증가에 의한 전해질 배설을 증가를 제외하면, 13주 동안 WK-38의 투여 시 암,수의 요에서 측정된 Ccr, $\text{T}^{\circ}\text{H}_2\text{O}$ 등의 신기능 수치 모두 특이적인 이상이 없었다. 또한 WK-38을 13주 투여하는 동안 유의할 만한 행동변화 및 이상증상은 관찰되지 않았으며, 사망 또한 없었다.

따라서 WK-38이 백서의 신장에 미치는 독성은 암, 수에서 모두 미미하여, WK-38은 신장에서 그 안전성이 상당부분 인정된다고 할 수 있다.

V. 결 론

WK-38을 SD 계통 암컷, 수컷 백서에 13주간 투여하여 신장에 미치는 독성을 관찰하였다. WK-38 투여한 모든 암컷, 수컷 백서에서 투여 직후 및 13주 관찰기간 동안 유의할 만한 행동변화 및 이상 증상은 관찰되지 않았고, 체중은 시간에 따라 일정하게 증가하였다. 요 중 삼투질 농도 (Uosmol)는 각각 암컷, 수컷 백서에서 모두 유의한 차이가 없었다. 요량은 수컷 백서에서는 변화가 없었으나, 암컷 백서에서는 각각 5 mg/kg, 500 mg/kg에서 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다. 요 중 Na^+ 배설을, K^+ 배설을, Cl^- 배설을, creatinine 청소율 (Ccr)과 용질-자유 수분 재흡수율은 각각 수컷 백서에서는 변화가 없었고, 암컷 백서의 5 mg/kg에서만 각각 일시적인 유의성이 관찰되었다.

따라서, WK-38이 백서의 신장에 미치는 독성은 수컷 및 암컷 백서에서 모두 미미하므로 그 안전

성이 상당부분 인정된다고 할 수 있다.

감사의 글

이 연구는 원광대학교 (2008년) 연구비를 지원 받아 수행하였음

참고문헌

- 이정운, 홍성찬, 김자영. 심혈관계질환(CVD) 위험인자 와 혈중 C-reactive protein(CRP) 농도에 미치는 유산소훈련의 효과. 운동영양학회지. 2003;3:297-302.
- Fuster, V., Gotto, A.M. Jr. Risk reduction. *Circulation*. 2000;102(4):94-102.
- 약물학분과회. 약물학. 서울:신일상사. 2002: 426-86.
- 안병민, 이동수, 백종태, 장성희, 장이선. 식물제제에 의한 간손상 빈도. 식품의약품안전청연구보고서. 2002;6:1045-6.
- Nortier, J.L., Vanherweghem, J.L. Renal interstitial fibrosis and urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb(Aristolochia fangchi). *Toxicology*. 2002;181-182:577-80.
- Depierreux, M., Van, D.B., Vanden, H.K., Vanherweghem, J.L. Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs. *Am. J. Kidney Dis*. 1994;24(2):172-80.
- Vanherweghem, J.L., Depierreux, M., Tielemans, C., Abramowicz, D., Dratwa, M., Jadoul, M., Richard, C., Vandervelde, D., Verbeelen, D., Vanhaelen-Fastre, R. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet*. 1993;341(8842):387-91.
- 육창수. 원색 한국약용식물도감. 아카데미서적. 1993:158.
- 육창수. 한약학 II. 동명사. 1992:206.
- 허준. 국역증보동의보감. 남산당. 1981:1204.
- 한대석. 본초학. 동명사. 1962:83.
- 전국 한의학대학 본초학 교수 본초학. 영림사. 1991:291-2.
- 지형준, 이상인. 대한약전 외 한약생약규격집. 한국메디칼인덱스사. 1998:648-9.
- 서수남, 우병점. 신농본초경. 河北:河北科學技術出版社. 1994:90.
- 高木敬次郎, 木村正康, 原田正敏. 和漢藥物學. 南山堂. 1982:248.
- Watanabe, K., Watanabe, H., Goto, Y., Yamaguchi, M., Yamamoto, N., Hagino, K. Pharmacological Properties of Magnolol and Hönokiol Extracted from *Magnolia officinalis*: Central Depressant Effects. *Planta Med*. 1983;49(10):103-8.
- 배기환. 한국의 약용식물. 서울:교학사. 2000: 170.
- Fukuhara, Y., Yoshida, D. Paenil : A bio-antimutagen isplated from a crude drug, Moutan Cortex. *Agric Biol Chem*. 1987;51 :1441-6.
- Ryuichiro, L., Yoshikawa, H., Komura, H., Kada, T. Specificities of bio- antimutagens in plant kingdaom. *Agric Biol Chem*. 1984;48: 2587-91.
- Mitsuo, M., Maruyara, H., Kameoka, H. Essential oil constituents of "Moutan Radics Cortex" *Paeonia moutan* Sims. (=P.suffruticosa Andrews). *Agric Biol Chem*. 1983;47:2925-7.
- 한대석. 생약학. 서울:동명사. 2001:116-8.
- Te, J., Duan, H., Yang, X., Yan, W., Zheng, X. Anti-thrombosis model in vivo. *Planta Med*. 2001;67:766-7.
- Tsuboi, H., Hossain, K., Akhand, A.A., Takeda,

- K., Du, J., Rifa'i, M., Dai Y., Hayakawa, A., Suzuki, H., Nakashima, I. Paeoniflorin induces apoptosis of lymphocytes through a redox-linked mechansim, *J. Cell Biochem.* 2004;93(1):162-72.
24. Yang, H.O., Ko, W.K., Kim, J.Y., Ro, H.S. Paeoniflorin: an antihyperlipidemic agent from *Paeonia lactiflora*. *Fitoterapia.* 2004;75(1):45-9.