

凉膈散火湯 추출액이 ICR mouse에서의 경구 투여 급성독성에 미치는 영향

마진열* · 황대선** · 서창섭** · 이시우*** · 김종열*** · 신현규**

*한국한의학연구원 한의융합연구본부, **한국한의학연구원 표준화연구본부
***한국한의학연구원 체질의학연구본부

Abstract

Acute Toxicity Study on Yangkyuksanhwa-tang in Mice

Ma Jin-Yeul*, Huang Dae-Sun**, Seo Chang-Seob**, Lee Si-woo***, Kim Jong-Yeol***, Shin Hyeun-Kyoo**

*TKM Converging Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, Korea

**Standard Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, Korea

***Constitutional Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, Korea

1. Objectives

The aim of this study is data analysis for acute toxicity and safety of Yangkyuksanhwa-tang.

2. Methods

We investigated the acute toxicity for water-extracted Yangkyuksanhwa-tang. 25 male and 25 female mice were observed for 14 days after one day oral administration of Yangkyuksanhwa-tang at the respective doses of 0(control group), 2560, 3200, 4000 and 5000 mg/kg.

3. Results

We observed survival rates, general toxicity, change of body weight and autopsy.

4. Conclusions

The data confirmed that Yangkyuksanhwa-tang is free from the toxicity and safety problems in oral route respectively. Compared with the control group, we could not find any toxic alteration in all treated groups(2560, 3200, 4000 and 5000 mg/kg). In conclusion, LD50 of Yangkyuksanhwa-tang was over 5000 mg/kg and it is very safe to mice.

Key Words: Yangkyuksanhwa-tang, Acute Toxicity, Safety, LD50

• 접수일 2009년 10월 22일; 심사일 2009년 11월 5일;

승인일 2009년 12월 02일

• 교신저자: 신현규

대전시 유성구 엑스포로 483

한국한의학연구원 한약EBM연구센터

Tel : +82-42-868-9464 Fax : +82-42-864-2120

E-mail : hkshin@kiom.re.kr

• 본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '표준한방처방 EBM 구축사업'에 의해 수행되었다.

I. 緒 論

凉膈散火湯은 四象醫學에서 少陽人의 胃受熱裏熱證을 치료하며, 胸膈의 熱癥을 제거하는 처방으로 李濟馬의 『東醫壽世保元』 중 「少陽人胃受熱裏熱病論」에 收錄된 新定處方으로 生地黃, 忍冬藤, 連翹, 山梔子, 薄荷, 知母, 石膏, 防風, 荊芥로 구성된 처방이다¹⁾. 또한 凉膈散火湯은 熱證, 斑疹, 燥病, 痰滯, 吞酸嘈雜, 脹滿, 頭痛 등과 心火上炎, 多渴, 目赤 등과 같이 매우 광범위한 적응증을 가지고 있다²⁾.

凉膈散火湯에 관한 實驗的 研究로는 中풍환자의 세포활성 물질 조절 효과³⁾, 알러지성 접촉피부염에 미치는 영향⁴⁾, 중풍으로 유발된 배뇨·배변장애 치료 사례⁵⁾, 노령 흰쥐의 뇌허혈 손상 시 뇌해마의 신경세포 및 HSP72에 미치는 영향⁶⁾, 소양인 당뇨병 환자에 투여한 증례⁷⁾, 소양인 뇌경색증 환자의 세포활성물질 생성 조절에 미치는 영향⁸⁾ 등이 있다.

한약처방은 안전성에 관한 문제가 항상 대두되어 왔다. 최근의 韓醫學계에서는 한약 자체의 안전성에 대한 소비자의 욕구를 충족시키기 위해 四君子湯, 四物湯, 八物湯, 十全大補湯 등의 급성독성⁹⁻¹¹⁾과 아급성독성^{12,13)}에 대한 실험 등의 연구가 활발하게 진행되고 있으나 사상체질 처방에 대한 독성 실험은 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구자는 이전에 발표한 太陰人의 대표처방인 熱多寒少湯¹⁴⁾에 이어 少陽人의 대표 처방인 凉膈散火湯으로 급성

독성시험에 대한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 試驗 方法

1. 검액의 제조

凉膈散火湯의 급성독성시험을 하기 위하여 식품의약품안전청고시 제1999-61호(1999년 12월 22일)의 ‘의약품등의 독성시험기준’¹⁵⁾에 따라 실시하였다. 한약처방 凉膈散火湯의 한약재는 대한약전 및 대한약전외한약(생약)규격집을 기준으로 Table 1과 같이 구매하여 전탕하였다.

凉膈散火湯의 구성은 『東醫壽世保元』¹⁾을 참고하였으며 추출은 경서기계산업의 열수추출기(COSMOS 660)를 사용하여 100℃에서 120분간 전탕한 후 여과하여 농축기(Eyela N-11)로 농축 후 동결건조기(일신랩 PVTFD100R)를 사용하여 실험에 사용하여 29.0%의 수율로 분말 시료를 얻었다.

2. 실험동물 및 사육환경

4주령의 ICR Mouse(오리엔트, 서울시 금천구 가산동 459-24)를 사용하였다. 3주령의 마우스를 입수하여 7일간 시험동물실에서 순화하고 마우스의 체중을 측정 후 2 g 간격으로 구분하여 암·수 각각 25마리씩 건강한 동물을 선정하여 각 군에 5마리씩 균등한 체중으로 분배되도록 순위화한 체중과 난수를 이용한 무작위법으로 분배하였다. 동물의 개체식별은 꼬미의

Table 1. Prescription of Yangkyuksanhwa-tang.

	Crude drugs	Crude drug ratio (%)	Purchase place	Source
生地黃	Steamed Rehmannia Root	16.6	Omnierb	Korea
忍冬藤	Lonicerae Caulis	16.6	HMAX	Korea
連翹	Forsythia Fruit	16.6	HMAX	Korea
山梔子	Gardenia Fruit	8.3	HMAX	China
薄荷	Mentha Herb	8.3	HMAX	Korea
知母	Anemarrhena Rhizome	8.3	HMAX	Korea
石膏	Gypsum	8.3	HMAX	China
防風	Saposhnikovia Root	8.3	HMAX	Korea
荊芥	Schizonepeta Spike	8.3	Omnierb	Korea

Table 2. Experimental Groups.

Sex	Groups	Number of animals	No.	Volume of medication (ml/kg)	Dose (mg/kg)
Male	C	5	1~5	10	0
	T1	5	6~10	10	2560
	T2	5	11~15	10	3200
	T3	5	16~20	10	4000
	T4	5	21~25	10	5000
Female	C	5	26~30	10	0
	T1	5	31~35	10	2560
	T2	5	36~40	10	3200
	T3	5	41~45	10	4000
	T4	5	46~50	10	5000

색소염색법과 개체식별카드 표시법으로 실시하였다.

순화 및 실험기간 동안의 사육환경은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 환기횟수 10~20회/hr. 및 조도 150~300 Lux로 조정하여 일정한 사육환경을 유지하였으며 실험동물용 고형사료(삼양사료주식회사)와 물은 자유섭취 조건으로 한국한의학연구원 실험동물실에서 시험하였다.

3. 실험 군 및 한약재 투여

4주령 마우스에 대한 단회 투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 암·수 마우스를 각각 5개의 용량 군으로 나누었다 (Table 2). 투여 경로는 한방 임상에서 사용하는 경구 투여법을 사용하였으며 경구투여 가능 최대용량인 5000 mg/kg/day을 기준으로 공비 0.8로 하여 0, 2560, 3200, 4000 및 5000 mg/kg의 용량으로 단회 경구투여하고 14일간의 탈모, 설사, 당뇨증, 변, 활동성, 떨림 및 부종 등과 같은 일반증상과 사망률, 체중 변화 및 부검소견을 관찰하였다.

4. 시험물질의 투여

涼膈散火湯 추출 분말 10 g을 멸균증류수 20 ml에 녹여 고농도(T4군)로 사용하였으며, 나머지군은 주 사용 멸균 증류수를 첨가하여 차례로 희석하여 투여 물질로 사용하였다.

투여방법은 피부 고정법으로 고정하고 경구투여용 금속제 sonde와 주사관을 이용하여 투여 당일 투여당

일의 측정된 체중을 기준으로 하여 각각의 군별 투여 량에 맞게 투여액량을 계산하여 오전에 개체별로 1회 위내에 강제 경구 투여하였다.

5. 임상증상 및 부검

실험동물의 임상 증상관찰은 투여당일은 최종 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매 시간마다 일반증상을 관찰하였고, 투여 익일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상의 변화, 독성증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

6. 체중측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 경구 투여 개시 전과 투여 후 1, 3, 7일과 부검 직전인 14일에 체중 측정을 하였다.

7. 부검소견 관찰

투여 후 14 일째에 모든 생존동물의 외관 이상 유무를 관찰하였으며, 내부 장기의 이상 유무는 Ether 마취 하에서 개복한 후에 복대동맥을 절단하여 방혈치사 시킨 후 육안으로 관찰하였다.

8. 통계학적 방법

모든 실험군에서 동물측정용 저울을 이용하여 체중을 측정하여 평균과 표준 편차를 구하였다. 용매 대조군과 처치군 사이의 통계학적 유의차는 Dunnett

Table 3. Mortality of Male and Female ICR Mice treated orally with Yangkyuksanhwa-tang.

Sex	Dose (mg/kg)	Days after treatment					Final Mortality	LD50 (mg/kg)
		0	1	3	7	14		
Male	C Vehicle	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T1 2560	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T2 3200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T3 4000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T4 5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	C Vehicle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T1 2560	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T2 3200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T3 4000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T4 5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

*Values are expressed as number of dead animals/number of animals examined.

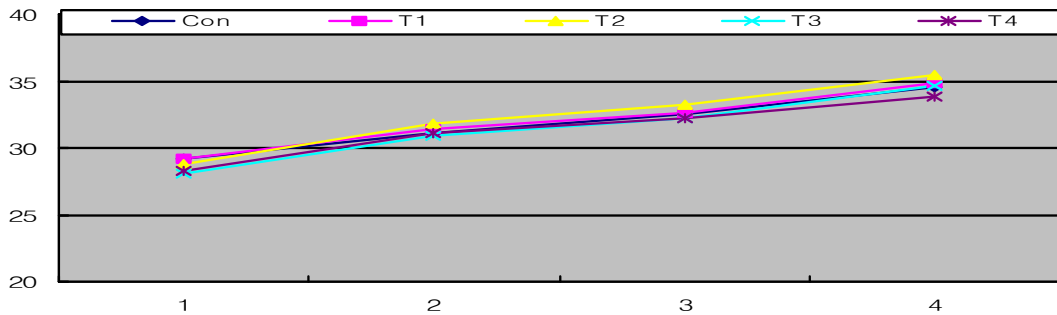


Figure 1. Mean body weight changes of male ICR mouse orally treated with Yangkyuksanhwa-tang(**p<0.01).

C; Control group, T1; Extraction of Yangkyuksanhwa-tang 2560mg/kg(day) medication group, T2; Extraction of Yangkyuksanhwa-tang 3200mg/kg(day) medication group, T3; Extraction of Yangkyuksanhwa-tang 4000mg/kg(day) medication group, T4; Extraction of Yangkyuksanhwa-tang 5000mg/kg(day) medication group.

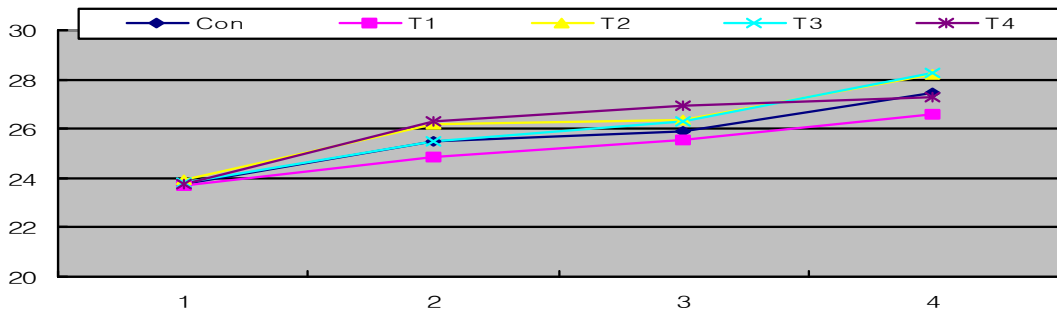


Figure 2. Mean body weight changes of female ICR mouse orally treated with Yangkyuksanhwa-tang(**p<0.01).

C; Control group, T1; Extraction of Yangkyuksanhwa-tang 2560mg/kg(day) medication group, T2; Extraction of Yangkyuksanhwa-tang 3200mg/kg(day) medication group, T3; Extraction of Yangkyuksanhwa-tang 4000mg/kg(day) medication group, T4; Extraction of Yangkyuksanhwa-tang 5000mg/kg(day) medication group.

test에 의하여 검정하였고, $p < 0.05$ 를 실험군간의 유의성 있는 차이로 판정하였다. 그리고 사망동물이 관찰되지 않아 LD50 값의 산출은 실시하지 않았다.

III. 結 果

1. 사망률 및 LD50값

涼膈散火湯을 경구투여한 후 암수 ICR 마우스를 14일 동안 관찰한 결과 사망동물과 LD50 값은 Table 3과 같다. 본 시험에서 경구투여의 최대용량인 5000 mg/kg까지 투여하여도 ICR 마우스의 사망은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 LD50값은 암·수 모두 5000 mg/kg 이상으로 사료된다.

2. 체중변화

涼膈散火湯을 경구로 단회투여한 후 체중 증감의 변화는 암컷(Fig. 1)과 수컷(Fig. 2) 모두 대조군과 시료 투여군간의 차이 없이 정상적인 체중의 증가가 관찰되었다.

3. 일반증상

涼膈散火湯을 투여한 경구투여급성독성시험의 일반증상을 관찰한 결과는 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았다(Table 4).

4. 부검소견

부검소견에서는 암·수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰되지 않았다(Table 5).

IV. 考 察 및 結 論

본 연구는 涼膈散火湯 추출 분말가루에 대한 단회 경구 투여 독성시험을 ICR 계통의 Mouse 암·수컷에 각각 0, 2560, 3200, 4000 및 5000 mg/kg 용량으로 경구 투여하고 14일간의 사망률, 일반증상, 체중의 변화 및 부검소견을 관찰하여 독성증상 발현 여부를 관찰하였다. 본 시험에서 시험물질 涼膈散火湯 투여와 관련된 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았으며 LD50 값은 5000 mg/kg을 훨씬 상회할 것으로 사료된다. 체중 변화에 있어서 모든 실험군에서 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으며, 외관 및 부검결과 내부 장기의 육안적 이상소견도 관찰되지 않았으며, 시험동물에서 사망례가 없어서 평균치사량 산출은 불가능 하였다.

이상의 실험결과에서 涼膈散火湯 추출 분말액의 LD50은 실험동물 마우스 암·수컷에 경구투여가 5000 mg/kg 이상으로 저독성인 안전한 물질로 작용되는 것으로 사료된다.

Table 4. Clinical Signs in Male and Female ICR Mice treated orally with Yangkyuksanhwa-tang.

Sex	Dose (mg/kg)	Signs							
		Loss of Fur	Diarrhea	Polyuria	Soft Stool	Decreased Motor Activity	Tremor	Edema	
Male	C Vehicle	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T1 2560	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T2 3200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T3 4000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T4 5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	C Vehicle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T1 2560	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T2 3200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T3 4000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T4 5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

*Values are expressed as number of animals with the sign/number of animals examined.

Table 5. Autopsy finding in ICR Mouse orally treated with Yangkyuksanхва-tang.

Sex Organs	C (Vehicle)		T1 (2560)		T2 (3200)		T3 (4000)		T4 (5000)	
	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female
Liver	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Heart	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Spleen	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Lung	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Kidney	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Stomach	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

*Values are expressed as number of animals with the abnormal/number of animals examined.

V. 感謝의 글

본 연구는 한의학연구원에서 지원한 ‘표준한방처방 EBM 구축사업’에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

VI. 參考文獻

1. Lee JM. Dong-Eui-Su-Se-Bo-Won. Haenglim Publishing Co, Seoul, 1986:86-91, 104.
2. Won JS. Dongeuisasangsinpyeon. Jonghapeuiwonsa, Seoul, 1974:20-54, 66.
3. Lo HS, Lee SM, Bae YC, Park HS, Lee JH, Song SY, et al. The effect of Yangkyuk-Sanhwa-Tang on cytokine production in the patients with cerebral infarction. J Sasang Constitutional Med. 2004;16(1):120-129. (Korean)
4. Cho SW, Park SS. Effects of Yangkyuksanhawtang on the allergic contact dermatitis. J Sasang Constitutional Med. 2001;13(3):89-101. (Korean)
5. Kim SJ, Kim MS, Seo BI, Gu DM, Seo HG, An HD. One case report of urinary and bowel dysfunction treated with Yangkyuksanхва-tang in cerebrovascular accident patient. Kor. J Herbology. 2003;18(3):1-8. (Korean)
6. Park EK, Shin JW, Sohn YJ, Jung HS, Won R, Sohn NW. Effect of Yanggyuksanхва-tang on pyramidal neuron and HSP72 expression in ischemic damaged hip-

pocampus of aged BCAA rats. Kor J Oriental Physiology & Pathology. 2003;17(3):132-145. (Korean)

7. Jung SI, Kim JW. Clinical study about the diabetes mellitus patients administration of Yangkyuksanхва-tang Kor J Oriental Physiology & Pathology. 2002; 16(6):1308-1313. (Korean)
8. Kweon DY, Kim KY. Studies of the regulatory effect of cytokine production in patients with cerebral infarction by Yangkyuksanhwatang. J Sasang Constitutional Med. 2000;12(2):153-161. (Korean)
9. Ma JY, Yu YB, Ha HK, Huang DS, Ma CJ, Shin HK. Acute toxicity study on Samul-tang(Siwu-tang) in mice. Kor J Oriental Medical Prescription. 2007;15(2): 113-117. (Korean)
10. Ma JY, Huang DS, Lee NH, Ha HK, Yu YB, Shin HK. Acute toxicity study on Sipjeondaebotang in rats. Kor J Oriental Physiology and Pathology. 2008;22(5): 1192-1195. (Korean)
11. Ma JY, Huang DS, Yu YB, Ha HK, Shin HK. Acute toxicity study on Palmul-tang(Bawu-tang) in mice. Kor J Herbology. 2007;22(2):13-16. (Korean)
12. Ma JY, Yu YB, Ha HK, Huang DS, Shin HK. Subacute toxicity study of Sagunja-tang(sijunzi-tang) in SD rats. Kor J Oriental Med. 2007;13(3):151-156. (Korean)
13. Ma JY, Yu YB, Ha HK, Huang DS, Shin HK. Subacute toxicity study on Palmultang(Bawu-Tang) in SD rats. Kor J Herbology. 2007;22(4):59-64. (Korean)

14. Ma JY, Huang DS, Lee SW, Kim JY, Shin HK. Acute toxicity study on Yeoldahanso-tang in mice. J Sasang Constitutional Med. 2009;21(1):247-253. (Korean)
15. KFDA. A notice from 1999-61, Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea, 1999. (Korean)