

Sprague-Dawley 랫드를 이용한 설편정천탕의 단회투여독성시험

이응석¹, 한종민¹, 양수영¹, 김민희^{2,3}, 김승형³, 남궁옥^{2,3}, 박양춘^{1,3}

¹대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실, ²대전대학교 한의과대학 신경생리학교실, ³대전대학교 동서생명과학연구소

Single Dose Toxicity Study of *Seonpyejeongcheon-tang* in Sprague-Dawley Rats

Eung-seok Lee¹, Jong-min Han¹, Su-young Yang¹, Min-hee Kim^{2,3}
Seung-hyung Kim³, Uk Namgung^{2,3}, Yang-chun Park^{1,3}

¹Division of Respiratory System, Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

²Dept. of Neurophysiology, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

³Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Dae-Jeon University

ABSTRACT

Objectives : This study aimed to evaluate the single oral dose toxicity of *Seonpyejeongcheon-tang* (SJT) in male and female Sprague-Dawley rats.

Methods : In this single oral toxicity study, rats were orally administrated in a single dose of 0 or 5,000 mg/kg SJT. There were 7 rats in each group. After single administration, mortality, clinical signs, body weight changes and gross pathological findings were observed for 14 days. Organ weight, clinical chemistry and hematology were tested after 14 days.

Results : There was no mortality or other clinical signs for 14 days. There were also no significant differences in body weight, organ weights, hematological and serum chemical parameters between the SJT and control groups.

Conclusions : The results obtained in this study suggest that the 50% lethal dose of SJT is over 5,000 mg/kg, so this finding can be expected to provide scientific evidence for the safety of SJT.

Key words : *Seonpyejeongcheon-tang* (*Xuanfeidingchuan-tang*), Safety, Single dose toxicity, LD₅₀

1. 서론

기침은 외부에서 들어오는 이물질이나 자극으로부터 우리 몸을 지키는 중요한 신체 방어 작용이기도 하지만, 기침 자체가 사회생활, 작업수행, 여가생활, 취침 등 활동 전반에 지장을 주고, 피로감 등의 신체적 증상과 암 등 중대한 질환에 대한 정신적 불안감을 가져오며, 합병증으로 흉통, 두통,

오실금에서부터 심하면 늑골 골절, 실신까지 일으킬 수 있어 환자가 병원에 오는 가장 흔한 증상의 하나로 알려져 있다¹.

기침이 8주 이상 지속되는 경우를 만성기침으로 분류하며 상기도기침증후군, 기침이형 천식, 위식도 역류가 주된 원인으로 알려져 있다². 기침이형 천식은 기침만을 유일한 증상으로 하는 천식으로 만성기침 환자의 20-40%가 이에 속한다고 하며³, 적절한 치료를 하지 않는 경우 성인 기침이형 천식 환자의 약 30-40%가 전형적인 천식으로 진행되는 것으로 알려져 있다⁴.

설편정천탕은哮喘에 사용하는定喘湯⁵에서 白

· 교신저자: 박양춘 대전시 중구 대흥로 170
대전대학교대전한방병원 내과면역센터
TEL: 042-229-6919 FAX: 042-254-3403
E-mail: omdpyc@dju.kr

과와 蘇子 대신 化痰止咳하는 桔梗, 貝母, 清熱解毒하는 金銀花, 養陰潤肺하는 麥門冬, 斂肺止咳하는 五味子⁶를 가한 처방으로 대전대학교부속한방병원 폐계내과에서 기침을 주증상으로 하는 다양한 호흡기질환에 다용하고 있다.

선편정천탕의 기반이 되는 定喘湯은 張⁷의 攝生衆妙方에 처음 수록된 처방으로 三拗湯에 桑白皮, 黃芩, 半夏, 蘇子, 款冬花, 銀杏을 배합하여 구성되어 宣肺平喘 清熱化痰 清降肺氣 定喘化痰하는 효능이 있다. 또한 기존의 연구에서 정 등⁸⁻¹¹은 定喘湯이 다양한 천식모델을 이용한 동물실험에서 유의한 효과를 나타낸다고 보고하고 있다. 定喘湯의 加味方인 선편정천탕은 단백질해소로 폐손상이 유도된 COPD 실험모델에서 세포의 생존 및 사멸에 관련된 단백질의 발현을 조절하는 보호효과를 나타내었고¹², 만성기침에 대한 후향연구에서 유의한 기침 감소효과를 나타냈다¹³.

이에 선편정천탕의 기침이형 천식에 대한 효능을 평가하기 위한 임상연구의 예비연구로서 선편정천탕의 랫드에 대한 식품의약품안전청 독성시험기준¹⁴에 따른 단회투여 독성시험을 통하여 반수치사량 (lethal dose 50: LD₅₀), 간 및 신장독성, 혈액학적 영향을 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 선편정천탕의 구성과 추출

선편정천탕의 구성 약물은 휴먼허브(주)에서 지원받아 사용하였으며 약물의 구성과 용량은 Table 1의 내용과 같다. 선편정천탕 1첩 분량(44 g)에 증류수 1,000 ml를 가하여 2시간 동안 전탕추출법(대용약탕기, 한국)에 의하여 얻은 액을 여과하였다. 이를 감압 증류장치(Rotary evaporator, Buchi B-480, Switzerland)로 농축하고, 다시 동결 건조기(Freeze dryer, Eyela FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 추출물을 냉동(-84 °C) 보관하면서 생리식염수에 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

최종적으로 선편정천탕의 초기 약재 176 g으로부터 46 g의 추출물을 얻어 26.1%의 수율을 나타내었다.

Table 1. The Composition of *Seonpyejeongcheon-tang* (SJT).

Herbal name (Korea)	Herbal name	Amount (g)
금은화	Lonicerae Flos	6
관동화	Farfarae Flos	6
마황	Ephedrae Herba	6
행인	Armeniaca Amaram Semen	4
황금	Scutellariae Radix	3
반하	Pinelliae Tuber	3
상백피	Mori Cortex	3
길경	Platycodi Radix	3
패모	Fritillariae Cirrhosae Bulbus	3
맥문동	Liriope Tuber	3
오미자	Schizandrae Fructus	2
감초	Glycyrrhizae Radix	2
Total		44

2. 실험동물 및 사육환경

실험동물은 7주령의 SPF Sprague-Dawley 랫드(대한바이오링크, 한국)를 사용하였다. 본 실험은 동물실험윤리위원회의 심의를 거쳤으며, 실험동물은 고품 사료와 물을 어떠한 제약 없이 섭취하도록 하였고, 온도는 22±2 °C, 습도는 50±10%가 유지 되도록 하였으며, 조명은 밤낮 주기(12시간 주/야)가 조절되는 실험실 환경에서 사육하였다.

3. 투여용량의 설정 및 투여방법

용량 설정을 위한 예비시험에서 0, 1,000, 3,000 및 5,000 mg/kg의 용량으로 각각 2마리의 암·수 랫드들에게 단회경구투여한 결과, 모든 투여군에서 독성소견이 나타나지 않아, 본 시험에서는 5,000 mg/kg의 선편정천탕 투여군을 한계용량군으로 설정하였고, 멸균수를 투여한 대조군(positive control)과 무투여 대조군(negative control)으로 나누어 설

정하였으며, 각 군당 7마리의 암·수 랫드를 이용하여 실험하였다. 투여경로는 경구투여법을 사용하였으며, 모든 랫드는 투여 전 24시간동안 절식시킨 후, 경구투여용 금속제 sonde를 이용하여 위내로 강제 경구투여를 시행하였다. 투여당일의 체중을 기준으로 10 ml/kg을 단회투여 하였다.

4. 일반 임상증상 및 사망동물 관찰

투여 당일에는 투여 후 매 시간 일반상태의 변화, 중독증상, 운동성, 외관 등을 관찰하였다. 투여 후 14일 동안 매일 1회씩 일반 임상증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

5. 체중 측정

모든 랫드에 대하여 투여개시 직전과 투여 후 5, 10 및 14일째에 체중을 측정하였다. 투여개시 직전의 랫드의 평균무게는 수컷은 230 g, 암컷은 175 g 이었다.

6. 실험동물의 부검 및 장기중량 측정

시험기간 종료 후, 모든 랫드를 ketamine(80 mg/kg)과 xylazine(5 mg/kg)으로 마취한 후 심장천자법으로 혈액을 채취하였고, 내부장기의 이상 유무를 육안으로 상세히 관찰한 후, 간과 신장을 적출하여 중량을 측정하였다.

7. 혈액 생화학적 검사

부검 하루 전 절식시킨 랫드를 실험 최종일에 ketamine(80 mg/kg)과 xylazine(5 mg/kg)으로 마취한 후 심장천자법으로 혈액을 채취하였다. 이 혈액을 상온에서 40분 동안 방치하여 응고시킨 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 serum을 사용하였다. 혈액 생화학적 검사는 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), blood urea nitrogen(BUN) 등을 측정하기 위하여 자동혈액생화학분석기(AU400, Olympus, Japan)를 사용하였다.

8. 혈액학적 검사

채혈 후, 항응고제인 EDTA가 들어있는 채혈관을 이용하였다. 혈액학적 검사는 white blood cell (WBC), red blood cell(RBC), hemoglobin(HGB), hematocrit(HCT), platelet(PLT) 등을 자동혈구분석기(HEMAVET, CDC Technolgy, USA)를 사용하여 분석하였다.

9. 통계처리

모든 실험결과는 SPSS 12.0K을 이용하여 one-way ANOVA 분석을 실시하였으며, Duncan's multiple comparison test에 의하여 $p < 0.001$ 수준에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 일반 임상증상

선페정천탕 5,000 mg/kg 투여군과 대조군을 14일 동안 관찰한 결과, 보행장애, 행동이상, 실사, 부종, 구토, 마비 등 모든 랫드에 있어 선페정천탕 투여에 의한 독성증상은 관찰되지 않았다.

2. 치사율 및 LD₅₀

선페정천탕 5,000 mg/kg 투여군과 대조군을 14일 동안 관찰한 결과, 모든 실험군에서 시험물질에 기인한 사망이 관찰되지 않아 선페정천탕의 LD₅₀ 값은 5,000 mg/kg 이상일 것으로 추정되었다.

3. 체중의 변화

선페정천탕 5,000 mg/kg 투여군과 대조군을 투여개시 직전, 5일, 10일 및 14일 동안의 체중 변화를 관찰한 결과, 경구 투여 후 선페정천탕 투여군과 대조군 모두 체중이 증가하였으며, 투여개시 직전, 투여 후 5일, 10일 및 14일 모두 대조군과 선페정천탕 투여군 간의 유의적인 체중변화의 차이는 나타나지 않았다(Fig. 1).

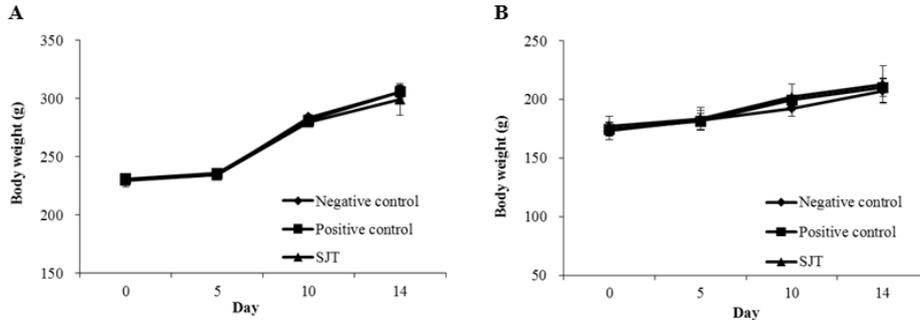


Fig. 1. Body weight (g) changes of male (A), female (B) rats in 14 days single dose toxicity study of SJT.

Values are expressed as mean±S.D. (n=7). Negative control: not treated group. Positive control: sterile water administration group, SJT: SJT extract 5,000 mg/kg administration group.

4. 부검시 육안소견

실험 종료시, 모든 랫드를 부검하여 주요 내부 장기의 육안적 소견을 관찰한 결과, 설편정천탕 5,000 mg/kg 투여군과 대조군 모두에서 심장, 폐, 흉선, 간, 신장, 위, 비장, 대장 등 주요 내부 장기에 대한 외관상의 어떠한 이상 병변도 발견되지 않았다.

5. 장기의 중량 비교

설편정천탕 5,000 mg/kg 투여군과 대조군의 모두 간과 신장의 중량을 비교하였을 때, 모두 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Table 2).

Table 2. Organ Weight of Rats Administered SJT for 14 Days Single Dose Toxicity Study.

		Negative control	Positive control	SJT
Male	Liver	8.54±0.40	8.53±0.23	8.30±0.65
	Kidney	2.51±0.10	2.54±0.24	2.38±0.23
Female	Liver	6.10±0.58	6.41±0.65	6.16±0.52
	Kidney	1.70±0.17	1.74±0.17	1.66±0.15

Values are expressed as mean ± S.D. (n=7). Negative control: not treated group, Positive control: sterile water administration group, SJT: SJT extract 5,000 mg/kg administration group.

6. 혈액 생화학적 검사

독성을 평가하는 지표에 있어 손상여부를 반영하는 여러 지표들이 있으나 가장 중요하다고 사료되는 간독성지표인 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT), 신

장독성지표인 blood urea nitrogen(BUN)을 측정하였다. 검사 결과, 설편정천탕 5,000 mg/kg 투여군은 대조군과 비교할 때 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Table 3).

Table 3. Clinical Chemistry Values of Rats Administered SJT for 14 Days Single Dose Toxicity Study.

		Negative control	Positive control	SJT
Male	GOT (U/L)	114.43±39.78	110.83±21.93	95.86±16.14
	GPT (U/L)	57.86±7.58	61.83±8.93	65.29±7.54
	BUN (mg/dl)	11.53±1.60	10.31±2.23	12.43±2.67
Female	GOT (U/L)	101.43±29.47	151.71±32.46	165.17±91.09
	GPT (U/L)	36.29±8.88	36.43±5.06	46.29±8.20
	BUN (mg/dl)	14.63±2.64	16.66±3.45	18.30±2.70

Values are expressed as mean ± S.D. (n=7). Negative control: not treated group, Positive control: sterile water administration group, SJT: SJT extract 5,000 mg/kg administration group.

7. 혈액학적 검사

혈액학적 검사 결과, 설편정천탕 5,000 mg/kg 투

여군은 대조군과 비교할 때 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Table 4).

Table 4. Hematological Values of Rats Administered SJT for 14 Days Single Dose Toxicity Study.

		Negative control	Positive control	SJT
Male	WBC (10 ³ /mm ³)	7.30±1.96	8.44±2.81	9.73±1.61
	RBC (10 ⁶ /mm ³)	7.43±1.07	7.56±1.25	8.36±0.27
	HB (g/dL)	12.21±0.84	12.47±0.48	13.16±0.45
	HCT (%)	41.34±4.79	42.70±6.13	47.53±1.75
	PLT (10 ³ /mm ³)	950.71±462.02	1081.43±383.71	1306.57±174.86
Female	WBC (10 ³ /mm ³)	5.66±1.15	6.19±2.09	7.63±2.37
	RBC (10 ⁶ /mm ³)	8.12±0.82	7.58±1.14	8.39±0.36
	HB (g/dL)	13.11±0.83	12.51±1.86	13.93±0.36
	HCT (%)	42.60±4.04	39.91±6.33	45.07±2.33
	PLT (10 ³ /mm ³)	1042.14±130.01	829.57±412.94	719.14±351.15

Values are expressed as mean±S.D. (n=7). Negative control: not treated group, Positive control: sterile water administration group, SJT: SJT extract 5,000 mg/kg administration group.

IV. 고찰

건강에 대한 관심과 함께 한의학에 대한 기대도 높아지고 있으나 한편으로는 한약의 안정성에 대한 문제제기도 끊임없이 이어지고 있다¹⁵. 따라서 실제 임상에서 다용하고 있는 한약처방에 대하여는 제한적으로 일정한 안전성을 인정해주는 제도에도 불구하고¹⁶ 실질적으로는 실험적 근거를 제시해야 하는 상황이 요구되고 있다. 본 연구에서는 대

전대학교부속한방병원 폐계내과에서 호흡기질환에 다용하고 있는 설편정천탕의 효능을 평가하는 임상연구의 선행 기초 연구로서 기본적인 안전성을 평가하고자 실험동물에 대한 단회투여 독성시험을 실시하였다.

설편정천탕의 구성은 哮喘에 사용하는 대표적 처방의 하나인 定喘湯⁵에서 白果와 蘇子 대신 桔梗, 貝母, 金銀花, 麥門冬, 五味子를 더하여 구성되었다. 정천탕에 대한 독성시험은 아직까지 없었으며 설편정천탕 개별약물에 대한 기존의 연구를 살

퍼보면 마황은 마황성분 함유제품의 간손상을 포함한 부작용으로 논쟁이 있으나¹⁷ 급성 경구투여 독성시험¹⁸과 4주간 경구투여한 아급성 독성시험¹⁹을 통하여 2,000 mg/kg 용량에서 독성을 나타내지 않았다고 보고되고 있다. 금은화는 2,000 mg/kg/day 용량으로 90일 반복투여 독성시험에서 독성을 나타내지 않았고²⁰, 관동화는 급성 독성시험에서 독성을 나타내지 않았으며²¹, 행인은 랫드를 이용한 독성시험에서 LD50값이 5,000 mg/kg 이상으로 평가되었고²², 반하는 식품의약품안전청의 실험 보고서에서 간독성을 보이지 않았다²³. 황금의 랫드를 이용한 급성독성연구에서 LD50값은 2,000 mg/kg를 상회하는 것으로 확인되었으며²⁴, 감초는 저칼륨혈증, 고혈압, 거짓알도스테론증을 유발할 수 있다고 알려져 있으나 한약의 전통적인 열수 추출과 여과 후 섭취라는 복용법을 고려할 때 1일 안전용량은 5g을 상회할 것으로 생각된다²⁵.

본 연구에서는 단회경구투여에 의한 급성독성시험을 식품의약품안전청 독성시험기준¹⁴ 및 OECD guideline²⁶을 준용하여 실시하였다. 시험 관찰기간을 14일로 설정하였으며, 관찰기간 동안의 사망률, 임상증상, 체중변화, 부검소견, 장기 중량변화, 혈액 생화학적 검사, 혈액학적 검사를 시행하였다. 시험물질의 급성독성에 대한 OECD guideline에 따르면, 2,000 mg/kg의 투여용량에서 사망개체가 없는 투여물질은 무독성으로 간주하고 있다. 본 시험에서는 5,000 mg/kg의 선편정천탕 투여군과 대조군의 모든 랫드가 사망하지 않아 선편정천탕의 LD50은 이를 상회하는 것으로 확인되었으며 유의성 있는 체중 및 장기 무게의 변화가 관찰되지 않았으며, 혈액 생화학적 검사 및 혈액검사학적 검사에서도 유의성 있는 이상이 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 선편정천탕의 안전성에 대한 기초적인 자료를 제시하는 것으로 판단되며, 약물의 복용은 일반적으로 1회 복용이 아닌 장기복용이 요구되므로 향후 장기 반복투여에 대한 독성시험이 필요하리라 생각된다.

V. 결론

본 연구에서는 선편정천탕 5,000 mg/kg을 랫드에 단회투여하여 독성시험을 실시한 결과, 14일 동안 임상증상, 치사율, 부검소견, 체중변화, 장기 중량 변화, 혈액 생화학적 및 혈액학적 검사 등에서 독성소견이 나타나지 않았다. 따라서 선편정천탕의 안전성을 확인할 수 있었으며, 랫드의 선편정천탕에 대한 LD₅₀은 5,000 mg/kg을 초과하는 것으로 확인되었다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업(과제번호: B110021)과 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(과제번호: 2010-0010960).

참고문헌

1. Irwin RS, Rosen MJ, Braman SS. Cough. A comprehensive review. *Arch Intern Med* 1977; 137:1186-91.
2. McGarvey LP, Heaney LG, Lawson JT, Johnston BT, Scally CM, Ennis M, et al. Evaluation and outcome of patients with chronic non-productive cough using a comprehensive diagnostic protocol. *Thorax* 1998;53(9):738-43.
3. 김철우. 만성기침을 일으키는 흔한 기도질환. 대한내과학회지 2010;78(6):665-9.
4. Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, Ueda T, Tabuena R, Yamaguchi M, et al. Prognosis of cough variant asthma: a retrospective analysis. *J Asthma* 2006;43(2):131-5.
5. 허준. 동의보감. 서울: 남산당; 1986, p. 480.
6. 전국한의학대학교 본초학교실. 本草學. 서울: 영림

- 사: 1994, p. 121, 178, 198, 294, 369, 370-3, 448, 453, 460, 463, 478, 482-4, 540, 588, 622.
7. 張時徹. 攝生衆妙方. 北京: 中醫古籍出版社; 2004, p. 113.
 8. 정승기, 이형구. 정천탕이 천식에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 경희의학 1987;3(1):91-102.
 9. 왕중권, 정희재, 정승기, 이형구. The Effects of Jungchun-tang (定喘湯) on Respiratory Patterns and Tracheal Tissues in Allergic Asthma. The 10th ICOM 자료집. 1999:102.
 10. 김영우, 정희재, 이형구, 정승기. 정천탕과 청상보하탕이 asthma model 내의 cytokine에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2001;22(3):367-77.
 11. 염종훈, 정희재, 정승기, 이형구. 정천탕과 정천탕가감방이 알레르기 천식모델 흰쥐의 BALF 內 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지 2003;24(1):169-80.
 12. 윤종만, 박양춘. Elastase매개성 폐조직 손상에 대한 宣肺定喘湯의 보호효과. 대한한방내과학회지 2010;31(1):84-101.
 13. 박양춘. 만성기침에서 설편정천탕의 효과에 대한 후향적 분석. 대전대학교한의학연구소논문집 2012 [Forthcoming].
 14. 식품의약품안전청. 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청고시 제2009-116호. 서울: 식품의약품안전청; 2009.
 15. 유태우, 김병익, 김진봉, 김동준, 김재우, 백순구, 등. 독성 간손상 관련 한국인의 약물복용 실태와 건강비용 조사: 독성 간손상의 진단 및 보고체계 구축을 위한 다기관 공동연구. 대한간학회지 2007;13(1):34-43.
 16. 식품의약품안전청. 의약품 임상시험계획 승인 지침, 식품의약품안전청고시 제2010-63호. 서울: 식품의약품안전청; 2010.
 17. Favreau JT, Ryu ML, Braunstein G, Orshansky G, Park SS, Coody GL, et al. Severe hepatotoxicity associated with the dietary supplement LipoKinetix. *Ann Intern Med* 2002;136(8):590-5.
 18. 장문석, 심경준, 오지훈, 윤지원, 최문정, 김도림, 등. SD계 흰쥐에 대한 마황 추출물의 급성 경구투여 독성 시험 연구. 동의생리병리학회지 2008;22(4):762-5.
 19. 최동기, 심경준, 최봉재, 박수연, 장문석, 박성규. SD계 흰쥐에서 마황 추출물의 아급성 경구독성 시험 연구. 대한본초학회지 2008;23(4):1-7.
 20. 한충택, 장호승, 강상철, 길기현, 공광한, 김도형, 등. 금은화 (Flos lonicerae) 추출물의 Fisher 344/N 랫드를 이용한 90일간 반복 경구투여 독성시험. 대한수의학회지 2008;48(4):401-11.
 21. Zhang JW, Dou CG, Zhang M, Ma SP, Huang F. Toxicity of Radix Asteris, Flos Farfarae and their combination. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2007;12:405-11.
 22. 심범상, 최승훈, 박재경. 행인 제제의 독성 및 항암효과와 자연살해세포 활성화에 미치는 효과. 대한한방중앙학회지 2000;6(1):19-28.
 23. 김정숙. 유독 한약재의 한방 임상에서 통상 투여 용량에 의한 간독성 연구. 국립독성연구원 용역연구개발사업 보고서. 2002.
 24. 장보운, 빈두말라, 손동환, 김윤철, 김성연. 황금 및 단삼 표준화시료의 급성독성에 관한 연구. 생약학회지 2011;42(3):265-70.
 25. 박영철, 이선동, 이인선. 감초의 효능과 독성. *J Toxicol Pub Health* 2002;18(3):301-9.
 26. OECD. OECD guideline for testing of chemicals No. 423 Acute oral toxicity-Acute classic method. 2001.