대한침구의학회지 제32권 제4호 (2015년 12월) : 77-89
The Acupuncture Vol. 32 No. 4 December 2015 : 77-89
pISSN 1229-1137 eISSN 2287-7797
http://dx.doi.org/10.13045/acupunct.2015063

Original Article

SD(Sprague-Dawley) 랫드를 이용한 신바로 약침의 4주 반복 근육투여 독성시험※

이진호, 하인혁, 김미령, 김민정, 이재웅, 이인희, 정화진, 김은지*

자생의료재단, 척추관절연구소

[Abstract]

Multiple-dose Intramuscular Toxicity Study of Shinbaro Pharmacopuncture in Sprague-Dawley Rats over a 4-week period※

Jin Ho Lee, In Hyuk Ha, Me Riong Kim, Min Jeong Kim, Jae Woong Lee, In Hee Lee, Hwa Jin Chung and Eun Jee Kim*

Jaseng Spine and Joint Research Institute, Jaseng Medical Foundation

Objectives : To evaluate the safety of multiple-dose intramuscular Shinbaro Pharmacopuncture in male and female Sprague-Dawley(SD) rats over a period of 4 weeks(12 sessions).

Methods : In order to test the safety of multiple-dose intramuscular Shinbaro Pharmacopuncture we used 40 healthy male and female 6-week old SD rats(male weight 171.79~196.37 g, female weight 127.93~146.43 g). Shinbaro Pharmacopuncture was administered intramuscularly to male and female SD rats at doses of 4.6 (low dose group, n=10), 9.2 (moderate dose group, n=10), and 18.5 mg/kg(high dose group, n=10), respectively. General symptoms, body weight changes, blood tests, biochemical testing, necropsy, organ weight and histopathogical findings were examined over a 4-week period.

Results :

1. No mortalities or adverse effects were caused by the investigational substance were observed during the study period.
2. There was no significant difference in body weight caused by the the investigational substance across all groups.
3. No significant between-group difference was found to be caused by the investigational substance in blood tests and biochemical testing.
4. No abnormalities were detected by a necropsy examination with the unaided eye at the macro level after treatment with the investigational substance.
5. Difference in organ weight between groups caused by the investigational substance was not found.
6. All groups did not exhibit pathological findings caused by the investigational substance in histopathogical examination.

Conclusions : According to these results, Shinbaro Pharmacopuncture has no systemic or organ toxicity with multiple-dose intramuscular administrations in male and female SD rats over a 4-week period (12 sessions). These results imply that no adverse effects are observed at a level (NOAEL) of Shinbaro Pharmacopuncture of 18.5 mg/kg.

Key words : Shinbaro ; Pharmacopuncture ; Multiple-dose toxicity test ; Spraque-Dawley rat

Received : 2015. 11. 13.
Revised : 2015. 12. 09.
Accepted : 2015. 12. 11.
On-line : 2015. 12. 18.

※ The authors are grateful to korea promotion institute for traditional medicine industry (KOTMIN) for their support (No. 20150602383).

* Corresponding author : Jaseng Spine and Joint Research Institute, Jaseng Medical Foundation, 5, Eonju-ro 170-gil, Gangnam-gu, Seoul, Republic of Korea
Tel : +82-10-5342-7720 E-mail : letmelove57@hanmail.net

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
The Acupuncture is the Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. (http://www.TheAcupuncture.org)
Copyright © 2014 KAMMS. Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. All rights reserved.

Ⅰ. 서론

약침요법은 기존의 침법과 한약을 결합한 것으로 극소량의 한약재를 침 놓는 자리(경혈)에 주입함으로써 한약의 작용과 침의 작용을 극대화시키는 신침요법이다. 현재까지 약침 연구는 봉독 약침에 대한 연구가 다수 보고되어 있지만, 최근에는 여러 종류의 약침에 대한 연구 수가 점차 증가하고 있다[1]. 김(2014)[1]에 의하면 경추 통증 환자의 치료에 이용되고 있는 일반적인 약침은 봉독 약침, 홍화 약침, 지네 약침, 어혈 약침, 황련 약침, 코퍼스 약침, 소염 약침, 황련해독탕 약침, 신바로 약침 등이 사용되고 있다고 보고되어 있다. 이 중 신바로 약침은 연골보호[2], 항염증[3], 신경재생효과[4] 등의 효능을 지닌 약침으로 자생한방병원의 골관절 질환 치료 한약인 '청파전(GCSB-5)'을 바탕으로 개발된 약침이다. 신바로 약침을 요추 추간판 탈출증 환자의 치료에 사용한 결과 봉독 약침과 유의한 수준의 효과를 내며 부작용은 없는 것으로 확인되었다[5]. 또한, 요추 추간판 탈출증 환자에게 신바로 약침 처치군과 비처치군으로 무작위 대조군 실험을 시행한 결과, 요통의 NRS가 2배 이상 감소되어 신바로 약침이 허리 통증을 개선시키는데 유효한 효능이 있는 것으로 보고되었다[6].

이처럼, 신바로 약침의 효능에 대한 연구에 비하여 표준화 및 안전성에 대한 연구가 부족한 시점에서, 최근 신바로 약침 중 대표적인 구성 약재인 구척, 식방풍, 두충, 오가피, 우슬의 표준화 작업에 대한 연구를 실시하여 과학적인 품질관리에 대한 방안을 제시하였다[7]. 또한 rats와 Beagle dogs을 사용해 단회 독성에 대한 연구를 진행하여 급성 독성이 없음을 확인하였다[8]. 과학적인 검증을 통해 신약의 안전성을 확보하기 위한 독성 연구는 독성시험의 기간에 따라 단회투여 독성시험(급성 독성실험) 및 반복투여 독성시험으로 분류할 수 있다. 이에 CA-약침[9], Sweet bee venom[10], 신바로3(천수근) 약침[11] 등은 rats나 Beagle dogs을 이용해 단회 독성시험과 반복 독성시험을 통하여 약침에 대한 안전성을 확보하고 있다. 따라서 본 연구는 신바로 약침의 무독성량 및 표적장기를 Sprague-Dawley(SD) 계통 암 · 수 rats에 4주(12회) 반복 근육투여를 하여 독성 시험을 실시하고 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 신바로 약침의 조제방법

신바로 약침의 약재인 구척, 식방풍, 두충, 오가피, 우슬, 오공, 강활, 독활, 작약으로 9가지 약재는 그린명품제약(경기도 남양주)에서 구입하였으며 총 150 g을 넣고 70 % 주정을 이용하여 3시간 동안 환류 추출하였다. 이때 추출에 사용된 물은 water purification system(Model : ABB-OTA NEO)을 이용하여 제조된 3차 증류수를 사용하였고, 추출액 여과 후 여액을 감압 농축하였다. 농축된 추출물을 80~90 % 주정을 이용하여 알코올 수침을 통해 정제하였으며 정제된 추출물은 여과 후 동결 건조하여 약침의 원료로 사용하였다. 정제된 약침 원료를 정제수에 녹이고 121 ℃에서 15분 멸균하여 사용하였다.

2. 실험동물

1) 실험동물 및 사육환경

특정병원균이 부재(Specific Pathogene Free, SPF)된 SD 계통의 rats는 오리엔트바이오에서 구입하였으며, 5주령된 암수 각 55마리를 5일 이상 순화기간을 두었다. 실험에 사용한 rats는 순화기간 중 일반 증상을 관찰하여 건강한 6주령(수컷 171.79~196.37 g, 암컷 127.93~146.43 g)의 암수 각 40마리를 선택하여 사용하였다. 동물실 및 사육환경은 온도 22.4±0.9 ℃, 상대습도 45.2±4.4 % RH, 환기횟수 10~15회/hr을 유지하였으며, 명암 cycle은 12hr(08 : 00 점등~20 : 00 소등)과 조도 280 Lux로 조절하였다. 실험동물의 사육밀도는 검역, 순화, 투여 및 관찰기간 중 스테인레스제 망사육상자(250 W×350 L×180 H mm)에 2마리 이하로 수용하였다. 사료(Teklad Certified Irradiated Global 18 % Protein Rodent Diet, Harlan Co. Ltd., USA)는 급이기에 넣고, 물은 음용 상수도수를 정수시킨 후 폴리카보네이트제 물병에 넣어 자유 섭취시켰다.

해당 시험은 본 시험기관 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 : IA13-00074)을 거쳐 수행되었다.

2) 시험군의 구성

군 분리는 투여 전일에 체중을 측정하고 이를 토대로 암 · 수 각각 대조군 10마리와 신바로 시험군(저, 중, 고용량) 10마리씩 분리하였다.

본 시험군은 임상예정용량인 1.11 mg/60 kg (약 18.5 μg/kg)의 약 1,000배인 18.5 mg/kg을 고용량 투여군으로 정하고, 공비를 2로 두어 각각 9.2 및 4.6 mg/kg을 중용량과 저용량으로 설정하였으며, 주사용수를 투여하는 부형제 대조군을 두었다. 이를 4주 반복투여 용량결정시험을 실시하였다(Table 1).

Table 1. Group composition for assessment of four weeks repeated-dose toxic test in SD rats

Group	Sex	Animal No.[1]	Dose (mg/kg/day)
G1[2]	Male	G1-1~G1-10	0
	Female	G1-51~G1-60	
G2	Male	G2-16~G2-25	4.6
	Female	G2-66~G2-75	
G3	Male	G3-26~G3-35	9.2
	Female	G3-76~G3-85	
G4	Male	G4-36~G4-45	18.5
	Female	G4-86~G4-95	

1. No: Numbers, 2. G1: Control group(0 mg/kg), G2~G4 : Experimental group (4.6, 9.2, 18.5 mg/kg)

3) 시술 용량의 설정 및 시술방법

시술 용량 및 방법은 사람에 대한 임상 예정경로로서 근육투여 시의 독성을 알아보기 위하여 선택하였다. 투여경로는 동물을 대퇴부 내측이 위로 오도록 배부에서 요부의 피부를 보정하고 알코올 솜을 이용하여 투여 부위를 소독하였다. 대퇴부 좌측 근육 내에 주사침을 찌르고 피스톤을 살짝 후퇴해서 혈액의 유입이 없으면 시험물질을 천천히 주입하였다. 투여횟수 및 시각은 1회/일, 3일/주, 4주간 12회 투여하였고, 투여 당일 오전 중에 투여하였다. 본 시험물질을 이용한 2주 반복투여 용량결정시험과 동일하게 가장 최근에 측정한 체중을 기준으로 1 mL/kg으로 투여량을 계산하였다. 이는 식품의약품안전청 고시 제 2012-86호(2012년 08월 24일) '의약품등의 독성시험기준' 및 OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 407 'Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents' (Adopted 27th July, 1995)에 의거하였다.

3. 관찰 및 검사

1) 일반 증상 관찰

투여 전 기간에 걸쳐 1일 1회 투여 직후의 일반 증상을 관찰하였다. 일반 증상의 관찰은 사망여부, 증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 개체별로 기록하였다.

2) 체중측정

모든 동물에 대하여 입수 시, 군 분리 시, 투여개시 시, 투여 후 주 1회 및 부검일에 측정하였다.

3) 혈액학적 검사

혈액학적 검사는 부검 동물을 하룻밤 절식한 후 CO_2 가스에 마취하에 개복하여 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하였으며, 채취한 혈액을 항응고제인 EDTA-2K를 사용하였다. 혈액학적 검사는 보관된 혈액을 혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, Germany ; MAI-105-01)를 이용하여 검사를 실시하였다. 검사항목은 White blood cell count(WBC), Red cell distribution width(RDW), Red blood cell count(RBC), Platelet(PLT), Hemoglobin conc.(Hb), Mean Platelet Volume(MPV), Hematocrit(HCT), 백혈구감별계산, Mean corpuscular volume (MCV), Large unstained cells(LUC), Mean corpuscular hemoglobin(MCH), Reticulocyte(Reti), Mean-corpuscular-hemoglobin conc.(MCHC)으로 총 13가지 항목에 대한 혈액학적 검사를 실시하였다.

4) 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 부검 시 복대동맥에서 채혈한 혈액을 3,000 rpm, 10분간 원심분리하여 얻은 혈청을 이용하였다. 이때 사용한 기기는 혈액생화학검사기(Hitachi7180, HITACHI, Japan ; MAI-059-01)를 이용하여 실시하였다. 검사항목은 Aspartate aminotransferase(AST), Albumin(ALB), Alanine aminotransferase (ALT), Total bilirubin(T-BIL), Alkaline phosphatase(ALP), A/G ratio, Gamma(γ)-glutamyl transferase(GGT), Uric acid (UA), Lactate dehydrogenase(LDH), Triglyceride(TG), Blood urea nitrogen(BUN), Calcium(Ca), Creatinine(CRE), Inorganic phosphorus(IP), Glucose (GLU), Chloride(Cl), Total cholesterol(CHO), Magnesium(Mg), Total protein(TP), Sodium(Na), Creatine phosphokinase(CPK), Potassium(K)으로 총 22가지 항목에 대한 혈액 생화학적 검사를 실시하였다.

5) 부검

부검은 투여종료 후에 부형제 대조군 및 모든 시험군의 생존동물에 대하여 최종계획부검을 실시하여 모든 장기에 대하여 상세한 육안검사를 시행하였다.

6) 장기중량측정

장기중량측정은 투여 종류 후 부검하여, 고환, 전립선, 난소, 자궁, 비장, 간장, 흉선, 부신, 신장, 심장, 폐, 뇌, 뇌하수체의 장기를 적출하여 전자저울을 이용하여 측정하였다.

7) 조직병리학적 검사

조직병리학적 검사는 부형제 대조군 및 고용량군의 모든 고정장기에 대해 조직표본을 제작하여 검경하였다.

4. 통계처리

통계처리는 암 · 수 각각 부형제 대조군과 시험군(저, 중, 고용량) 간의 비교를 하였으며, 일반적으로 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용하였다. 발생률의 표기는 일반적으로 백분율로 나타내었다. 통계 방법은 상용되는 통계 패키지인 SPSS 12.0K 프로그램을 이용하였다.

1) 연속자료의 분석(체중, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량)

일반적인 정규성을 가정하고 통계처리를 실시하였다. 일원배치 분산분석을 통하여 군 간 유의성을 확인하고 등분산을 검정하였다. 일원배치 분산분석에서 유의성이 인정되고 등분산이 인정되면 Duncan test를, 등분산이 인정되지 않으면 Dunnett's T test를 사용하였다.

Ⅲ. 결과

1. 일반 증상 및 사망률

실험기간 동안 암 · 수 모든 투여군에서 사망동물 및 특이한 이상증상은 관찰되지 않았다.

2. 체중변화

주요군 암컷 18.5 mg/kg 신바로 약침 투여군에서 투여 4주차 체중이 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 그 외 모든 투여군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1).

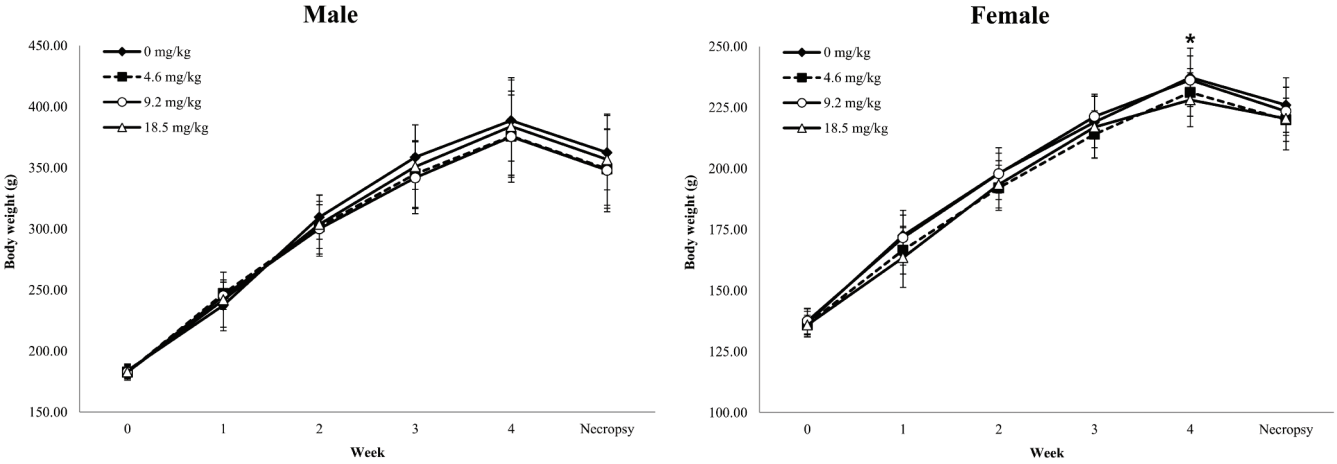

Fig. 1. Body weight changes of male and female SD rat with shinbaro pharmacopuncture for four weeks

* : Significant difference between control and 18.5 mg/kg group value by Dunnett's T test, $p<0.0$

3. 혈액학적 검사

주요군 수컷 4.6 mg/kg, 9.2 mg/kg 투여군의 neutrophil (NE) 수치, 주요군 수컷 9.2 mg/kg 투여군의 percentage of neutropohil(NEP) 수치가 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가($p<0.05$)하였고, 주요군 암컷 4.6 mg/kg, 9.2 mg/kg 투여군의 MCHC 농도가 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$). 그 외 모든 투여군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 2).

Table 2. Hematological values of male and female SD rat with shinbaro pharmacopuncture for four weeks

sex: Male

Hematological	G1[24] (n=10)	G2 (n=10)	G3 (n=10)	G4 (n=10)
	0 mg/kg	4.6 mg/kg	9.2 mg/kg	18.5 mg/kg
WBC[1](K/μL)	8.99±2.42	11.04±2.82	10.16±2.72	9.24±3.26
NE[2](K/μL)	0.89±0.24	1.37±0.47*	1.38±0.40*	1.09±0.23
LY[3](K/μL)	7.68±2.15	9.27±2.42	8.41±2.35	7.84±2.95
MO[4](K/μL)	0.18±0.05	0.22±0.08	0.18±0.08	0.16±0.08
EO[5](K/μL)	0.05±0.01	0.05±0.02	0.05±0.02	0.05±0.03
BA[6](K/μL)	0.00±0.00	0.01±0.00	0.01±0.01	0.01±0.01
LUC[7](K/μL)	0.19±0.15	0.12±0.06	0.13±0.10	0.10±0.07
NEP[8](%)	10.25±2.42	12.35±2.75	13.77±2.51*	12.36±2.28
LYP[9](%)	85.14±2.94	84.04±2.78	82.49±2.91	84.32±2.41
MOP[10](%)	1.95±0.37	1.92±0.48	1.84±0.71	1.68±0.44
EOP[11](%)	0.63±0.21	0.49±0.31	0.53±0.23	0.51±0.23
BAP[12](%)	0.05±0.05	0.08±0.04	0.07±0.08	0.11±0.12
LUP[13](%)	1.97±1.23	1.12±0.70	1.26±1.22	0.99±0.41
RBC[14](M/μL)	7.90±0.20	8.18±0.32	8.12±0.36	7.94±0.24
Hb[15](g/dL)	17.22±0.47	17.86±0.67	17.58±0.78	17.35±0.62
HCT[16](%)	47.30±1.49	48.55±2.02	48.17±1.57	47.72±1.48
MCV[17](fL)	59.90±1.64	59.43±2.12	59.37±1.93	60.13±1.65
MCH[18](pg)	21.80±0.55	21.82±0.60	21.69±0.85	21.88±0.66
MCHC[19](g/dL)	36.38±0.46	36.76±0.74	36.51±0.67	36.35±0.97
RDW[20](%)	11.39±0.30	11.13±0.30	11.37±0.36	11.17±0.40
PLT[21](K/μL)	1077.90±89.33	1154.80±129.89	1115.10±218.20	1117.50±92.20
MPV[22](fL)	6.76±0.36	6.48±0.24	6.91±0.39	6.69±0.54
Reti[23](%)	2.61±0.48	2.46±0.37	2.47±0.48	2.65±0.23

1: White blood cell, 2: Neutrophils, 3: Lymphocyte, 4: Monocyte, 5: Eosinophil, 6: Basophil, 7: Large unstained cell, 8: Percent of neutrophils, 9: Percent of lymphocyte, 10: Percent of monocyte, 11: Percent of eosinophil, 12: Percent of basophil, 13: Percent of large unstained cel, 14: Red blood cell, 15: Hemoglobin, 16: Hematocrit, 17: Mean corpuscular volume, 18: Mean corpuscular hemoglobin, 19: Mean corpuscular hemoglobin concentration, 20: Red cell distribution width, 21: Platelet, 22: Mean platelet volume, 23: Reticulocyte, 24. G1: Control group(0 mg/kg), G2~G4 : Experimental group(4.6, 9.2, 18.5 mg/kg), * : Significant difference compared with control value by Dunnett's T test, $p<0.05$

Table 2. Hematological values of male and female SD rat with shinbaro pharmacopuncture for four weeks (continued)

sex: Female

Hematological	G1[24] (n=10)	G2 (n=10)	G3 (n=10)	G4 (n=10)
	0 mg/kg	4.6 mg/kg	9.2 mg/kg	18.5 mg/kg
WBC[1](K/μL)	7.02±0.88	7.72±1.43	6.41±1.06	7.11±2.40
NE[2](K/μL)	0.76±0.31	1.59±2.36	0.69±0.21	0.51±0.21
LY[3](K/μL)	5.91±0.68	5.66±1.88	5.48±0.94	6.35±2.36
MO[4](K/μL)	0.15±0.05	0.27±0.36	0.12±0.03	0.11±0.03
EO[5](K/μL)	0.07±0.04	0.05±0.03	0.05±0.01	0.05±0.02
BA[6](K/μL)	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00
LUC[7](K/μL)	0.12±0.13	0.14±0.14	0.08±0.03	0.09±0.06
NEP[8](%)	10.70±3.80	18.09±20.42	10.74±2.51	8.05±4.43
LYP[9](%)	84.46±4.90	75.96±22.76	85.40±2.54	88.31±4.83
MOP[10](%)	2.17±0.50	3.01±3.12	1.85±0.44	1.67±0.44
EOP[11](%)	0.99±0.56	0.71±0.36	0.76±0.24	0.72±0.26
BAP[12](%)	0.09±0.07	0.12±0.09	0.10±0.04	0.09±0.05
LUP[13](%)	1.59±1.35	2.09±2.29	1.15±0.36	1.15±0.48
RBC[14](M/μL)	7.84±0.34	7.76±0.36	7.81±0.39	7.83±0.37
Hb[15](g/dL)	17.26±0.80	16.63±0.79	16.88±0.83	16.93±0.94
HCT[16](%)	45.44±2.43	44.56±2.23	45.68±2.41	45.30±2.89
MCV[17](fL)	57.92±1.10	57.48±2.01	58.52±1.70	57.86±1.56
MCH[18](pg)	22.00±0.38	21.45±0.70	21.64±0.36	21.65±0.53
MCHC[19](g/dL)	38.02±0.84	37.34±0.45*	37.00±0.72*	37.40±0.57
RDW[20](%)	10.62±0.98	10.51±0.38	10.43±0.28	10.33±0.24
PLT[21](K/μL)	1240.30±147.30	1209.30±129.69	1165.00±169.52	1193.50±88.04
MPV[22](fL)	6.63±0.29	6.69±0.42	6.76±0.28	6.66±0.25
Reti[23](%)	2.50±1.16	2.28±0.45	2.22±0.35	2.11±0.45

1: White blood cell, 2: Neutrophils, 3: Lymphocyte, 4: Monocyte, 5: Eosinophil, 6: Basophil, 7: Large unstained cell, 8: Percent of neutrophils, 9: Percent of lymphocyte, 10: Percent of monocyte, 11: Percent of eosinophil, 12: Percent of basophil, 13: Percent of large unstained cel, 14: Red blood cell, 15: Hemoglobin, 16: Hematocrit, 17: Mean corpuscular volume, 18: Mean corpuscular hemoglobin, 19: Mean corpuscular hemoglobin concentration, 20: Red cell distribution width, 21: Platelet, 22: Mean platelet volume, 23: Reticulocyte, 24. G1: Control group(0 mg/kg), G2~G4 : Experimental group(4.6, 9.2, 18.5 mg/kg), Group(n) / Dose(mg / kg)

* : Significant difference compared with control value by Dunnett's T test, $p<0.05$

4. 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사 결과, 암 · 수 모든 투여군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 3).

Table 3. Serum biochemical values of male and female SD rat with shinbaro pharmacopuncture for four weeks

sex: Male

Serum	G1[23] (n=10)	G2 (n=10)	G3 (n=10)	G4 (n=10)
	0 mg/kg	4.6 mg/kg	9.2 mg/kg	18.5 mg/kg
AST[1] (IU/L)	133.20±29.70	130.10±35.62	121.60±28.92	121.00±32.86
ALT[2] (IU/L)	31.10±4.01	37.70±7.39	34.60±6.90	34.20±6.14
ALP[3] (IU/L)	707.80±57.14	785.10±137.19	681.50±83.95	719.70±174.69
GGT[4] (IU/L)	0.90±0.30	0.80±0.40	0.90±0.30	1.00±0.00
LDH[5] (IU/L)	1288.80±709.57	1061.70±915.57	847.20±770.71	921.40±766.96
BUN[6] (mg/dL)	17.69±2.34	19.09±2.06	17.94±1.33	17.50±2.34
CRE[7] (mg/dL)	0.52±0.05	0.55±0.05	0.55±0.05	0.51±0.02
GLU[8] (mg/dL)	213.80±22.10	218.40±27.10	203.60±25.80	206.30±41.68
CHO[9] (mg/dL)	68.40±12.00	80.90±10.25	72.00±11.94	73.50±11.67
TP[10] (g/dL)	6.68±0.27	6.88±0.26	6.79±0.31	6.77±0.21
CPK[11] (U/L)	843.30±404.87	726.90±519.65	584.60±392.44	648.80±447.59
ALB[12] (g/dL)	2.75±0.11	2.81±0.13	2.78±0.14	2.76±0.10
T-BIL[13] (mg/dL)	0.04±0.02	0.03±0.02	0.03±0.20	0.04±0.02
A/G ratio[14]	0.70±0.04	0.69±0.04	0.69±0.03	0.69±0.03
TG[15] (mg/dL)	50.20±22.17	51.30±25.41	62.90±16.92	64.00±26.59
UA[16] (mg/dL)	2.63±0.61	3.24±0.74	3.06±0.59	2.88±0.49
Ca[17] (mg/dL)	13.13±0.61	13.18±0.41	13.05±0.47	13.35±0.67
IP[18] (mg/dL)	12.54±0.97	12.72±0.75	12.65±0.99	12.87±0.75
Cl[19] (mmol/L)	105.70±1.42	106.10±1.14	106.20±1.33	106.00±1.41
Mg[20] (mg/dL)	3.10±0.26	3.36±0.34	3.20±0.32	3.21±0.28
Na[21] (mmol/L)	144.80±1.17	144.90±1.45	145.40±0.92	146.10±1.64
K[22] (mmol/L)	5.41±0.62	5.72±0.28	6.06±0.91	5.88±0.67

1: Aspartate aminotransferase, 2: Alanine aminotransferase, 3: alkaline phosphatase, 4: Gamma(γ)-glutamyl transferase, 5: Lactate dehydrogenase, 6: Blood urea nitrogen, 7: Creatinine, 8: Glucose, 9: Total cholesterol, 10: Total protein, 11: Creatine phosphokinase, 12: Albumin, 13: Total bilirubin, 14: Albumin/Globulin ratio, 15: Triglyceride, 16: Uric acid, 17: Calcium, 18: Inorganic phosphorus, 19: Chloride, 20: Magnesium, 21: Sodium, 22: Potassium, 23. G1: Control group(0 mg/kg), G2~G4 : Experimental group(4.6, 9.2, 18.5 mg/kg), Group(n) / Dose(mg / kg)

* : Significant difference compared with control value by Dunnett's T test, $p<0.05$

Table 3. Serum biochemical values of male and female SD rat with shinbaro pharmacopuncture for four weeks (continued)

sex: Female

Serum	G1[23] (n=10)	G2 (n=10)	G3 (n=10)	G4 (n=10)
	0 mg/kg	4.6 mg/kg	9.2 mg/kg	18.5 mg/kg
AST[1] (IU/L)	163.40±57.47	129.60±36.10	116.70±18.32	139.70±31.07
ALT[2] (IU/L)	37.10±13.20	34.80±5.74	30.10±4.66	34.80±7.53
ALP[3] (IU/L)	427.60±103.61	408.70±116.02	460.80±86.69	438.10±85.90
GGT[4] (IU/L)	0.30±0.46	0.30±0.46	0.50±0.50	0.60±0.49
LDH[5] (IU/L)	1316.50±704.54	1164.40±941.13	835.20±518.99	1346.80±716.47
BUN[6] (mg/dL)	20.55±2.39	20.00±3.35	21.51±4.38	19.49±1.75
CRE[7] (mg/dL)	0.59±0.06	0.56±0.05	0.61±0.07	0.57±0.05
GLU[8] (mg/dL)	165.40±40.76	167.10±26.18	160.90±28.77	170.30±31.23
CHO[9] (mg/dL)	85.10±13.58	96.40±9.33	99.00±23.32	102.00±17.98
TP[10] (g/dL)	7.35±0.37	7.11±0.41	7.18±0.51	7.17±0.38
CPK[11] (U/L)	807.50±321.17	682.90±472.68	488.60±217.21	731.90±297.78
ALB[12] (g/dL)	3.17±0.24	3.09±0.23	3.12±0.27	3.16±0.21
T-BIL[13] (mg/dL)	0.06±0.04	0.06±0.03	0.05±0.02	0.05±0.02
A/G ratio[14]	0.76±0.10	0.77±0.05	0.77±0.05	0.79±0.06
TG[15] (mg/dL)	26.80±11.14	29.00±6.32	33.40±14.57	26.10±11.16
UA[16] (mg/dL)	2.67±0.52	2.55±0.47	2.64±0.45	2.96±0.62
Ca[17] (mg/dL)	13.10±1.06	13.67±2.23	13.71±1.62	12.90±0.52
IP[18] (mg/dL)	11.46±1.27	12.09±0.70	12.09±0.87	11.59±0.83
Cl[19] (mmol/L)	106.20±1.99	105.30±1.55	106.20±1.83	106.90±4.18
Mg[20] (mg/dL)	3.37±0.17	3.38±0.21	3.46±0.39	3.40±0.47
Na[21] (mmol/L)	143.50±1.69	141.70±1.55	143.40±1.91	144.30±5.50
K[22] (mmol/L)	5.30±1.00	5.90±1.04	5.35±0.86	5.63±0.91

1: Aspartate aminotransferase, 2: Alanine aminotransferase, 3: alkaline phosphatase, 4: Gamma(γ)-glutamyl transferase, 5: Lactate dehydrogenase, 6: Blood urea nitrogen, 7: Creatinine, 8: Glucose, 9: Total cholesterol, 10: Total protein, 11: Creatine phosphokinase, 12: Albumin, 13: Total bilirubin, 14: Albumin/Globulin ratio, 15: Triglyceride, 16: Uric acid, 17: Calcium, 18: Inorganic phosphorus, 19: Chloride, 20: Magnesium, 21: Sodium, 22: Potassium, 23. G1: Control group(0 mg/kg), G2~G4 : Experimental group(4.6, 9.2, 18.5 mg/kg), Group (n) / Dose(mg / kg)

* : Significant difference compared with control value by Dunnett's T test, $p<0.05$

5. 부검

부검은 투여 종료 후에 모든 장기에 대하여 상세한 육안 검사를 시행하였을 때 암·수 모든 투여군에서 이상소견은 발견되지 않았다. 따라서 암·수 모든 투여군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 4).

Table 4. Gross findings of male and female SD rat with shinbaro pharmacopuncture for four weeks

Sex	Organ	Sign	Group (mg/kg)			
			G1[1] (n=10, 0)	G2 (n=10, 4.6)	G3 (n=10, 9.2)	G4 (n=10, 18.5)
Male	All organs	Normal	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
Female	All organs	Normal	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10

* Number of animals with the sign / Number of animals examined
1. G1: Control group(0 mg/kg), G2~G4 : Experimental group(4.6, 9.2, 18.5 mg/kg)

6. 장기중량

장기중량 측정결과, 암·수 모든 투여군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 5).

Table 5. Organ weights of male and female SD rat with shinbaro pharmacopuncture for four weeks

sex: Male (g)

Organ	G1[1] (n=10)	G2 (n=10)	G3 (n=10)	G4 (n=10)
	0 mg/kg	4.6 mg/kg	9.2 mg/kg	18.5 mg/kg
Body weigh	362.46±30.55	349.16±32.27	347.94±33.89	356.71±37.30
Testis(Lt.)	1.61±0.08	1.69±0.15	1.64±0.13	1.71±0.11
Testis(Rt.)	1.64±0.09	1.68±0.13	1.64±0.12	1.69±0.12
Prostate	0.58±0.12	0.62±0.13	0.62±0.10	0.66±0.10
Spleen	0.77±0.09	0.76±0.06	0.69±0.07	0.75±0.12
Liver	10.53±1.05	10.15±1.15	10.42±1.35	10.75±1.54
Adrenal gland(Lt.)	0.03±0.00	0.14±.34	0.03±0.00	0.03±0.00
Adrenal gland(Rt.)	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.00	0.03±0.00
Kidney(Lt.)	1.26±0.12	1.19±0.39	1.28±0.10	1.33±0.12
Kidney(Rt.)	1.30±0.11	1.31±0.09	1.33±0.11	1.36±0.12
Heart	1.33±0.11	1.23±0.10	1.28±0.14	1.34±0.14
Lung	1.47±0.14	1.52±0.14	1.45±0.19	1.53±0.20
Brain	2.02±0.09	2.06±0.10	2.03±0.08	2.04±0.06
Pituitary	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Thymus	0.51±0.15	0.49±0.14	0.48±0.09	0.46±0.10

1. G1: Control group(0 mg/kg), G2~G4 : Experimental group(4.6, 9.2, 18.5 mg/kg),
* : Significant difference compared with control value by Dunnett's T test, $p<0.05$, Group(n) / Dose(mg /kg)

Table 5. Organ weights of male and female SD rat with shinbaro pharmacopuncture for four weeks (continue)

sex: Female (g)

Organ	G1[1] (n=10)	G2 (n=10)	G3 (n=10)	G4 (n=10)
	0 mg/kg	4.6 mg/kg	9.2 mg/kg	18.5 mg/kg
Body weigh	226.01±11.21	219.97±8.85	223.46±9.87	220.46±12.84
Testis(Lt.)	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.00
Testis(Rt.)	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.00	0.05±0.00
Prostate	0.38±0.07	0.53±0.24	0.49±0.10	0.51±0.15
Spleen	0.53±0.10	0.53±0.11	0.52±0.09	0.51±0.08
Liver	6.82±0.44	6.86±0.37	6.97±0.57	6.83±0.75
Adrenal gland(Lt.)	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.04±0.00
Adrenal gland(Rt.)	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.01	0.04±0.00
Kidney(Lt.)	0.78±0.09	0.79±0.06	0.83±0.07	0.83±0.09
Kidney(Rt.)	0.80±0.07	0.83±0.08	0.86±0.09	0.85±0.08
Heart	0.83±0.08	0.88±0.06	0.88±0.10	0.85±0.07
Lung	1.18±0.11	1.19±0.13	1.24±0.08	1.27±0.22
Brain	1.85±0.06	1.88±0.07	1.91±0.11	1.88±0.06
Pituitary	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Thymus	0.45±0.06	0.45±0.06	0.46±0.06	0.42±0.07

1. G1: Control group(0 mg/kg), G2~G4 : Experimental group(4.6, 9.2, 18.5 mg/kg),

* : Significant difference compared with control value by Dunnett's T test, $p<0.05$, Group(n) / Dose(mg /kg)

7. 조직병리학적 검사

암 · 수 부형제 대조군 및 18.5 mg/kg 시험물질 투여군 간에서 단핵구성 세포침윤 및 국소성의 괴사, 신장에서 국소성의 호염기성 세뇨관 및 피질에 낭, 갑상선의 아가미소체낭 및 이소성 흉선, 폐에 국소성의 폐포대식 세포축적, 혈관 주위에 부종, 골화생, 심장에 국소성의 단핵구성 세포침윤, 뇌하수체 원위부에 낭, 전립선 간질에 단핵구성 세포침윤 등이 관찰되었다(Table 6).

Table 6. Histopathological findings of male and female SD rat with shinbaro pharmacopuncture for four weeks

Organ / findings (Number of animals)		Male		Female	
		G1[1] (n=10, 0 mg/kg)	G4 (n=10, 18.5mg/kg)	G1 (n=10, 0mg/kg)	G4 (n=10, 18.5mg/kg)
Liver	-Bile duct hyperplasia	±2 (n=1)	NR3	NR	NR
	-Cell infiltration, mononuclear, perivascular	± (n=1)	NR	NR	NR
	-Cell infiltration, mononuclear, multifocal	± (n=2)	NR	NR	NR
	-Cell infiltration, mononuclear, focal	± (n=1)	± (n=4)	± (n=3)	± (n=3)
	-Necrosis,focal	NR	NR	± (n=2)	NR
Thyroid	-Ultimobranchial cyst	± (n=1)	± (n=1)	NR	NR
	-Ectopic thymus	± (n=1)	NR	± (n=1)	NR
Lung	-Osseous metaplasia	± (n=1)	NR	NR	NR
	-Accumulation, alveolarmacrophage, focal	NR	± (n=1)	NR	NR
Heart	-Edema,perivascular	NR	± (n=1)	NR	NR
	-Cellinfiltration, mononuclear, focal	± (n=2)	NR	NR	NR
Kidney	-Basophilic tubule, with inflammatory cell infiltration, focal, cortex	NR	± (n=1)	NR	NR
	-Cyst, with inflammatory cell infiltration, cortex	NR	NR	NR	± (n=1)
Pituitary	-Cyst, parsdistalis	NR	± (n=1)	NR	NR
There were no remarkable changes in the other organ.					

1. G1: Control group(0 mg/kg), G2~G4 : Experimental group (4.6, 9.2, 18.5 mg/kg), 2. Grade: minimal(±), mild(+), 3. NR: No remarkable lesions

Ⅳ. 고찰 및 결론

한약제제는 오랜 기간 동안 임상적 효능이 있음을 경험을 통해 입증되어 왔으며, 여러 질병에 대하여 효능이 있음에도 불구하고 과학적인 데이터가 부족하여 안전성과 유효성에 대한 문제들이 끊임없이 제기되고 있다. 이렇듯 천연물을 이용한 약침의 원료는 자연에서 생산되기 때문에 자연조건에 따라 성분량도 달라지고 제제공정 중에서 성분의 분해와 변화가 일어날 수 있다. 최근 이를 극복하기 위해 임상적 효능(clinical studies)뿐 아니라 분석 연구(analytic research), 단회 및 반복 독성시험 등과 같이 안전한 약침을 사용하기 위해서 여러 방법으로 천연물을 이용한 약침에 대한 연구가 보고되고 있다[1]. 그중 신바로 약침은 자생한방병원의 청파전(GCSB-5) 약재를 기반으로 만든 약침으로 동물실험을 통해 항염증 효과[3]와 신경재생 효과[4]를 보고한 바 있다. 따라서 SD rats와 Beagle dogs을 이용한 단회 독성에 대해 신바로 약침의 독성[8]은 미약한 것으로 판단되었기 때문에 4주(12회) 반복 근육투여를 하여 신바로 약침의 독성에 대한 안전성을 평가하여 임상적 용약의 안전을 확보하기 위해 실험을 시행하였다.

본 연구는 SD 계통 암 · 수 rats에 시험물질인 신바로 약침을 4주(12회) 반복 근육투여에 의한 독성시험을 통하여 무독성량 및 표적장기를 관찰하였다. 시험물질은 4.6(저용량군), 9.2(중용량군) 및 18.5(고용량군) mg/kg 용량으로 설정하였으며, 실험기간 동안 일반 증상, 체중변화, 혈액학적, 혈액생화학적 검사, 부검결과, 장기중량측정 및 조직병리학적 검사를 실시하였다.

시험기간 동안 암 · 수 모든 투여군에서 사망동물 및 특이 일반 증상은 관찰되지 않았다.

체중측정 결과, 암컷 18.5 mg/kg 투여군에서 투여 4주차 체중이 감소하였으나 일시적인 사료섭취량의 감소로 판단되며 암 · 수상관성을 보이지 않거나 생물학적 변동 범위에 속하므로 신바로 약침 투여에 의한 영향은 아닌 것으로 판단되었다.

혈액학적 검사결과, 적혈구 및 백혈구 계의 변동은 암 · 수상관성 또는 용량의존성을 보이지 않거나 생물학적 변동 범위에 속하므로 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단되었다.

혈액생화학적 검사결과, 암 · 수 모든 투여군에서 시험물질과 관련된 통계학적 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

부검결과 암 · 수 모든 투여군에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

장기중량 측정결과 암 · 수 모든 투여군에서 시험물질에 의한 장기 중량의 차이는 관찰되지 않았다.

조직병리학적 검사결과, 신바로 약침에 의한 특이소견은 관찰되지 않았고, 단발성 또는 자연발생적 병변으로 보이는 이상 소견들이 있었지만 이는 독성학적 의미는 없는 것으로 보고되고 있다[12].

본 연구 결과로 보아, 본 시험 조건에서 시험물질인 신바로 약침을 설치류인 SD rats을 이용한 4주간(12회) 반복 근육투여를 실시한 결과 시험물질에 의한 전신적인 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 유해한 영향이 관찰되지 않는 화학물질의 최대 섭취량인 NOAEL(No observed adverse effect level)은 임상예정용량인 1.11 mg/60 kg (약 18.5 μg/kg)의 약 1,000배인 18.5 mg/kg (고용량) 투여군의 암 · 수 rats에서 독성과 표적장기는 관찰되지 않았음을 확인할 수 있었다.

Ⅴ. References

1. Kim SH, Jung DJ, Choi YM, Kim JU, Yook TH. Trend of Pharmacopuncture Therapy for Treating Cervical Disease in Korea. J Pharmacopuncture. 2014 ; 17(4) : 7-14.
2. Kim JK, Park SW, Kang JW et al. Effect of GCSB-5, a Herbal Formulation, on Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis in Rats. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2012 ; 2012 : 1-11.
3. Chung HJ, Lee HS, Shin JS et al. Modulation of acute and chronic inflammatory processes by a traditional medicine preparation GCSB-5 both in vitro and in vivo animal models. J. Ethnopharmacol. 2010 ; 130(3) : 450-9.
4. Kim TH, Yoon SJ, Lee WC et al. Protective effect of GCSB-5, an herbal preparation, against peripheral nerve injury in rats. J. Ethnopharmacol. 2011 ; 136(2) : 297-304.
5. Park OJ, Kim SG, Lee JJ, Lee SM, Kim SJ, Cho NG. The Effect of Shinbaro and Bee Venom Pharmacopuncture in Treating Lumbar Disc Herniations. The Acupuncture. 2013 ; 30(5) : 41-50.
6. Jun BC, Kim ES, Kim DS, Kim TH, Kim JY. Ef-

fectiveness of ShinBaro Pharmacopuncture on Lumbar Spinal Herniated Intervertebral Disc : A Randomized Controlled Trial. J. Korea CHUNA Med. Spine & Nerves. 2011 ; 6(2) : 109-19.

7. Lee JH, Kim MJ, Lee JW, Kim MR, Lee IH, Kim EJ. A Study on Standardization of Shinbaro Pharmacopuncture Using Herbal Medicines Identification Test and HPLC-DAD. The Acupuncture. 2015 ; 32(2) : 1-9.
8. Lee JH, Chung HJ, Lee IH, Lee JW, Kim EJ, Kim MJ. Study on Single-dose Intramuscular Toxicity of Shinbaro Pharmacopuncture in Sprague-Dawley (SD) Rats and Beagle Dogs. JKMR. 2015 ; 25(3) : 1-9.
9. Jung C, Lee MS. Single Intramuscular Dose Toxicity Study of CA-YAKCHIM in Sprague-Dawley Rats. J. Korea Immuno-yakchim society. 2014 ; 3(1) : 19-26.
10. Kwon HY, Kwon KR. Study of four weeks repeated-dose toxic test of Sweet Bee Venom in rats. J. Pharmacopuncture. 2011 ; 14(1) : 5-24
11. Lee JH, Lee IH, Lee JW, Kim EJ, Kim MJ. Single-dose Intramuscular Toxicity Studies of Shinbaro3 Pharmacopunture in Sprague-Dawley Rats and Beagle Dogs. JKMR. 2015 ; 25(2) : 73-80.
12. Park UJ, Na JB, Kang DH et el. 13 weeks oral repeated dose toxicity study and Toxico- kinetics study of stevioside in mice. The Annual Report of KNTP. 2005 ; 4(2) : 451-76.