

삼정환의 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

김민지 · 이명종 · 김호준

동국대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Single Oral Dose Toxicity Study of Modified Samjung-Hwan in Sprague-Dawley Rats

Min-Jee Kim, Myeong-Jong Lee, Hojun Kim

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

Received: November 6, 2017

Revised: December 7, 2017

Accepted: December 8, 2017

Correspondence to: Hojun Kim
Department of Rehabilitation Medicine
of Korean Medicine, Dongguk
University Medical Center, 27
Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang
10326, Korea
Tel: +82-31-961-9111
Fax: +82-31-961-9009
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2017 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: Samjung-hwan (SJH) is a Korean herbal formula that has been used for antilipidemic, antioxidant, and antidepressant effects. As a part of safety evaluation, single oral dose toxicity study of modified SJH in Sprague-Dawley (SD) rats was carried out.

Methods: Modified SJH extract was administered orally in male and female SD rats at dose of 5,000 mg/kg. After single oral administration of modified SJH, we monitored the changes of mortalities, clinical signs, and body weight daily for 14 days. Gross necropsy findings were also evaluated at the end of the experiment.

Results: Modified SJH extract did not induce any toxic signs in the changes of mortalities, clinical signs, and body weight. There were also observed no gross necropsy findings in rats.

Conclusions: As results, the approximate lethal dose of modified SJH extract in SD rats was considered to be over 5,000 mg/kg. This suggests that modified SJH is safe herbal formula for the treatment with.

Key Words: Samjung-hwan, Safety, Single dose toxicity

서론

최근 운동부족과 복부비만, 생활습관의 서구화, 스트레스 등 복합적인 요인으로 대사증후군 환자 수가 급격히 증가하여 보건복지부가 2007년부터 2010년까지 실시한 국민건강영양조사 결과에 따르면 30세 이상 성인 3명 중 1명이 대사증후군을 앓고 있다. 대사증후군이란 복부비만, 내당능장애, 지질대사이상, 고혈압 같은 관상동맥질환 위험인자들이 동시에 나타나는 증후군으로 2001년 미국에서 발표한 제3차 콜레스테롤 관리지침(National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III)에서는 5가지 관상동맥 위험인자 중 3가지 이상이 해당한 경우로 정의하였다¹⁾. 이 중 비만, 지질대사이상의 치료와 관련하여 천연물과 한약재의 개선 효과에 대한 연구가 최근 활발히 이루어지고 있다.

삼정환(samjung-hwan)은 동의보감 신형(身形)문²⁾에서 “오랫 동안 먹으면 몸이 가벼워지고 오래 살게 되며, 얼굴이 어린 아이처럼 된다(久服輕身 延年益壽 面如童子).”고 기록되어 있으며, 주로 고지혈증, 비만의 치료에 처방되고 있다. 삼정환의 현대 약리실험연구로 동물 및 세포모델에서의 항산화 효과³⁾, 면역반응 개선효과⁴⁾, 신경보호효과⁵⁾, 항우울 효과⁶⁾, 항비만 효과⁷⁾ 등에 대해 보고되었다. 또한 삼정환의 구성 약재인 창출(*Atractylodes japonica*)^{8,9)}, 지골피(*Cortex lycii radices*)¹⁰⁻¹³⁾, 상삼자(*Morus alba Linne*)¹⁴⁻¹⁶⁾의 항고지혈증, 항산화, 혈당강하, 혈압강압효과 등에 관한 연구도 보고되었다. 이에 삼정환을 대사증후군 및 비만치료에 응용할 수 있을 것이라 판단되어 먼저 독성시험을 통한 안전성을 평가하였다.

본 연구는 삼정환의 단회 투여 시 발현될 수 있는 독성을

평가하고자 식품의약품안전처에서 고시한 제2015-82호 의약품 등의 독성시험기준(2015)에 따라 삼정환을 랫드(rat)에 단회 경구 투여 독성시험을 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험물질

본 시험에 사용한 삼정환추출물은 (주)대평(Busan, Korea)에서 중금속, 잔류농약 및 미생물한도시험 등을 통과한 상심자, 지골피, 창출을 3:1:1 비율로 섞은 후 중량의 5배에 달하는 30% 에탄올을 투입하여 75°C~80°C에서 4시간 가열 추출하여 40°C 이하에서 냉각 후 여과하였다. 그리고 다시 중량의 2.5배에 달하는 30% 에탄올을 투입하여 75°C~80°C에서 2시간 추출하여 40°C 이하 냉각 후 여과하였다. 이후 50°C±5°C에서 감압농축하여 농축액 건조물과 텍스트린을 7:3 비율로 혼합, 용해하여 spray dryer로 건조하였다(수율 21.9%). 랫드에 투여 직전 칭량한 후 멸균증류수(KAI5038; JW중외제약, Seoul, Korea)에 용해시켜 투여하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

단회 경구투여 독성 시험은 특정병원균부재 Sprague-Dawley (SD)계 암수 7주령 랫드(나라바이오텍, Seoul, Korea)를 대상으로 수행되었다. 시험 실시 전 일주일간 순화과정을 거친 후 일반증상에 이상이 없음을 확인한 동물을 암수 각 10마리씩 선정하였다. 순화검역, 투여 및 관찰기간에는 polysulfone 사육상자(280 [width, W]×420 [length, L]×200 [height, H] mm)에서, 절식기간에는 대사케이지(260 W×420 L×150 H mm)에서 3마리씩 수용하였다. 순화 및 시험

실시 동안 온도 223°C±3°C, 상대습도 30%~70%, 환기횟수 시간당 10~20회, 조명 12시간 명암주기(점등 8:00, 소등 20:00), 조도 150~300 lx로 조건으로 일정한 사육환경 조건을 유지하였고, 실험동물용 고행사료와 물을 자유 섭취하도록 하였다. 본 연구는 동물보호법(법률 제13023호, 2015. 1. 20)을 근거한 대구가톨릭대학교 IACUC 심의를 통과하였다(승인번호: 제 IACUC-2016-005호).

3. 실험군 및 한약재 투여

삼정환의 단회 경구투여 독성을 평가하기 위하여 실험군은 정상군과 대조군에 암수 각 2개 군으로 설정하였으며, 군당 5마리의 실험동물을 구성하였다. 시험물질(삼정환 추출물)의 임상 예정용량을 고려하여 5,000 mg/kg을 최고 용량으로 설정하였으며, 대조군으로는 멸균증류수를 투여하는 군으로 하였다. 실험군에서는 투여 당일에 측정된 체중을 기준으로 시험물질 투여량을 10 ml/kg의 용량으로 산출하여 멸균증류수에 용해시켜 사용하였다. 투여경로는 임상에서 주로 적용되고 있는 경구투여를 이용하였으며, 경구투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 투여하였다. 실험물질에 의한 독성을 평가하기 위하여 실험물질 투여 전 동물을 약 15~18시간 절식시켰다.

4. 임상증상 및 부검

임상증상은 투여 당일투여 후 시간대별(0.5, 1, 2, 4, 6 시간) 관찰하였으며, 그 후 14일 동안 매일 1회 일반 증상을 관찰하였다. 체중변화는 투여 후 1, 3, 7, 14일에 측정하였고, 실험동물을 희생 전날 밤 18시간 절식시킨 후 부검하였으며, 마취제는 isoflurane을 사용하였다. 개복 후 복대동맥 및 정맥을 절단하여 방혈치사시킨 후 모든 내부 장기의 이상 유무를 육안으로 관찰하였다.

Table 1. Mortality of Male and Female Sprague-Dawley Rat Orally Treated with Modified Samjung-Hwan

Group	Dose (mg/kg)	Days after treatment														Lethal dose 50% (mg/kg)	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male	0	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>5,000
	5,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>5,000
Female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>5,000
	5,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>5,000

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

5. 통계적 방법

시험결과는 IBM SPSS Package Program ver. 19.0K (IBM Co., Armonk, NY, USA)를 이용하여 ANOVA test 를 통해 시험군의 독성지표를 정상 대조군과 비교하였다.

결 과

1. 치사율에 대한 효과 및 한계치사 용량

삼정환 추출물을 단회 경구투여한 독성시험에서 2주의 시험기간 동안 사망례는 나타나지 않았다(Table 1). 따라서 삼정환 추출물의 한계치사량(LD₅₀)은 5,000 mg/kg 이상을 상회하는 것으로 추정되었다.

2. 임상 증상에 대한 영향

삼정환 추출물은 시험기간 동안 모든 실험 동물의 행동이상, 설사, 부종, 유루, 비루, 구토, 마비 등 시험물질 투여와 관련하여 임상 증상에서의 이상소견을 나타내지 않았다(Table 2).

Table 2, Clinical Sign of Male and Female Sprague-Dawley Rat Orally Treated with Modified Samjung-Hwan

Group	Dose (mg/kg)	Clinical signs
Male	0	0/5*
	5,000	0/5
Female	0	0/5
	5,000	0/5

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

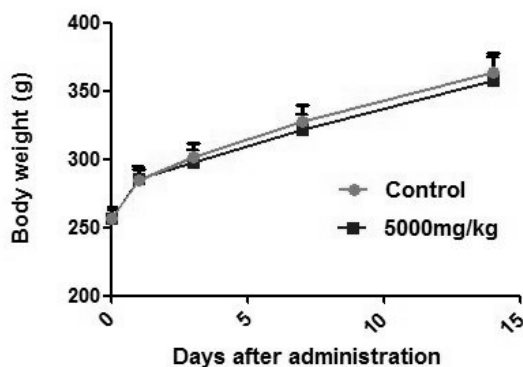


Fig. 1. Body changes in male Sprague-Dawley rat after once oral administration of modified Samjung-whan (SJH). No meaningful changes were detected in all modified SJH treated group as compared with control group. Values are presented as mean±standard deviation of five rat.

3. 체중변화에 대한 영향

삼정환 추출물 투여군과 정상 대조군 모두 개시 체중에 비하여 2주 후 체중이 유사하게 증가하였으며, 투여 후 기간별(1, 3, 7, 14일) 대조군과 약물 투여군 간의 유의적인 체중변화 차이는 나타나지 않았다(Fig. 1, 2).

4. 육안적 부검 소견

시험 종료 후 모든 실험동물을 부검하여 내부 장기의 육안적 소견을 관찰한 결과, 삼정환 추출물 투여군과 정상 대조군 모두 심장, 폐, 흉선, 간, 신장, 부신, 비장, 위, 대장, 맹장 등 내부 장기에서의 어떠한 이상 병변도 발견되지 않았다(Table 3).

고 찰

삼정환은 창출, 지골피, 상삼자로 구성된 처방으로, 최근

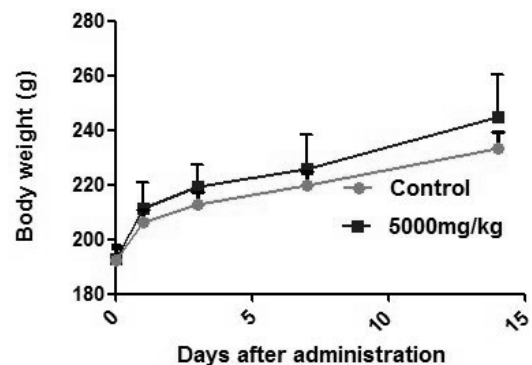


Fig. 2. Body changes in female Sprague-Dawley rat after once oral administration of modified Samjung-whan (SJH). No meaningful changes were detected in all modified SJH treated group as compared with control group. Values are presented as mean±standard deviation of five rat.

Table 3. Necropsy Findings Observed of Male and Female Sprague-Dawley Rat Orally Treated with Modified Samjung-Hwan

Group	Dose (mg/kg)	Necropsy findings	
		Observation	Frequency
Male	0	NGF	0/5*
	5,000	NGF	0/5
Female	0	NGF	0/5
	5,000	NGF	0/5

NGF: no gross finding.

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

삼정환의 항고지혈증 효과를 연구에서 고지방식이 유도 비만 마우스에 삼정환추출물을 투여한 결과 체중, 간 중량 및 체지방량 증가가 감소되었고, 렙틴(leptin)의 발현 증가와 HMG-CoA 수치가 감소되는 것으로 보고된 바 있다¹⁷⁾. 삼정환에 대한 현대 약리효능으로는 항산화, 항비만, 항우울 등에 대한 연구들이 진행되었다. Jeong 등¹⁸⁾의 연구에 따르면 삼정환 투여군에서 체중, 지방, 간장의 중량, 총지질 증가가 억제되었고 렙틴, acetyl-CoA carboxylase 및 fatty acid synthetase의 활성 또한 감소되어 삼정환이 비만을 개선시킬 수 있을 것으로 보였다. 또한 Lee 등¹⁹⁾의 연구에 따르면 삼정환 투여군에서 혈중 corticosterone 및 부신피질자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone) 수치 증가가 대조군에 비해 현저하게 억제되었다. 본 연구에서는 일반적인 약물 독성시험 중 랫드에서의 단회 경구투여 독성시험을 실시하여 안정성을 확보하고 향후 반복 투여 독성시험을 위한 독성 용량 범위의 기초자료를 제공하고자 수행하였다.

본 연구에서는 삼정환의 높은 임상 예정 용량을 고려하여 5,000 mg/kg으로 한계독성시험을 실시하였으며, 정상군과 독성 정도를 비교 관찰하였다. 14일의 독성시험에서 삼정환 추출물 5,000 mg/kg의 단회 경구투여는 삼정환 추출물과 관련된 사망례가 발생하지 않았으며, 임상증상 및 육안적 변화 역시 정상 대조군과 마찬가지로 관찰되지 않았다.

미국 Environmental Protection Agency OPPTS 870.100에 따르면 일반적으로 반수 치사량(LD₅₀)이 5,000~15,000 mg/kg인 물질을 무독성 물질로 보고 있으며, 500~5,000 mg/kg 용량 범위를 비교적 저독성(class III) 물질로 규정하고 있다. 본 단회 경구투여 독성시험 결과에서 삼정환 추출물의 개략적 치사량은 5,000 mg/kg 이상으로 나타나서 비교적 안전한 약물로 판단된다. 본 연구 결과는 삼정환에 대한 유효성 평가, 임상적 유효용량 및 적정 투여용량 설정, 최대용량 설정 등을 위한 근거로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 한약의 안정성을 평가할 수 있는 간수치 등 혈액검사가 시행되지 않아 향후 이에 대한 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 판단된다.

결 론

본 연구에서는 삼정환의 안전성을 확인하고자 단회 투여

독성시험을 대구가톨릭대학교 GLP센터에서 실시하였다. 삼정환 추출물을 5000 mg/kg 용량으로 SD 랫드에 경구투여한 후 14일 간 사망률, 임상증상을 관찰한 결과 정상군과 비교하여 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으며, 부검에 의한 심장, 폐, 흉선, 간, 신장, 부신, 비장, 위, 대장, 맹장 등 주요 장기에 대한 육안적 검사에서도 이상소견이나 병변이 관찰되지 않았다. 체중변화에서도 정상군과 삼정환 투여군 간 증체량에 있어서 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 따라서 삼정환의 개략치사량(approximate lethal dose)은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 추정된다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원을 통해 보건복지부 ‘한의약 선도기술개발사업’의 재정 지원을 받아 수행된 연구임 (과제고유번호: HI14C0556).

References

1. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Execute summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). JAMA. 2001 ; 258(19) : 2486-96.
2. Huh J. Dongyibogam. Seoul : Bubin Press. 2012 : 221.
3. Han KS, Wang J, Lim D, Chin YW, Choi YH, Choi HS, et al. Anti-oxidative and anti-obesity effect of combined extract and individual extract of samjunghwan. J Korean Med Obes Res. 2014 ; 14(2) : 47-54.
4. Kim SY, Jeong JC. Effects of samjunghwan on the IL-1 gene expression in the macrophage. Korean J Orient Intern Med. 2006 ; 27(1) : 228-36.
5. Kim HG, Ju MS, Park H, Seo Y, Jang YP, Hong J, et al. Evaluation of samjunghwan, a traditional medicine, for neuroprotection against damage by amyloid-beta in rat cortical neurons. J Ethnopharmacol. 2010 ; 130(3) : 625-30.
6. Lee DJ, Jeong JC. Peroxynitrite scavenging activity of Samjunghwan. Korean J Orient Intern Med. 2006 ; 27(1) : 178-87.
7. Song M, Bose S, Kim H. Effect of probiotics-fermented Samjunghwan on differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2013 ; 42(1) : 1-7.
8. Kim AJ, Park SJ, Rho JO. Mulberry fruit extract consumption is inversely associated with hyperlipidemia in middle-aged men.

- Korean J Food Nutr. 2008 ; 21 : 121-6.
9. Ko ST, Moon YH, Kim SO. Effect on hypertension of Rhizoma Atractylodis. *Yakhak Hoeji*. 1973 ; 17 : 103-10.
 10. Han HK, Yoon SJ, Kim KH. Effects of compositae plants on plasma glucose and lipid level in streptozotocin induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2009 ; 38 : 674-82.
 11. Sung NK, Kim SH, Seo YB, Oh AH. Effect on blood glucose, hypertension of Lycium chinense miller. *J Herbol*. 1994 ; 9 : 161-71.
 12. Jung YS, Park CH, Shin HC. Antioxidative effects of Lycium chinense Miller on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Korean J Orient Int Med*. 2014 ; 34(1) : 92-105.
 13. Han YK, Park YK. The comparisons of lycium radices cortex and corni fructus water extract effects on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Korea J Herbol*. 2013 ; 28(6) : 71-7.
 14. Lee EJ, Bae JH. Study on the alleviation of an alcohol induced hangover and the antioxidant activity by mulberry fruit. *Korean J Food Nutr*. 2011 ; 24 : 204-9.
 15. Kwon EH, Jang HS, Kim SW, Choi SW, Rhee SJ, Cho SH. Effects of mulberry juice and cake powders on blood glucose and lipid lowering and erythrocytic antioxidative enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr*. 2007 ; 40 : 199-210.
 16. Jun HI, Kim YA, Kim YS. Antioxidant activities of Rubus coreanus miquel Morus alba L. fruits. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2014 ; 43(3) : 381-8.
 17. Lim DW, Bose S, Wang JH, Choi HS, Kim YM, Chin YW, et al. Modified SJH alleviates FFAs-induced hepatic steatosis through leptin signaling pathways. *Sci Rep*. 2017 ; 7 : 45425.
 18. Jeong HJ, Kim SY, Jeong JC. Effects of samjung-hwan on obesity and lipid metabolism in high fat diet rats. *J Korean Orient Med*. 2006 ; 27(3) : 24-35.
 19. Lee S, Kim G, Koo B. Experimental study on the antidepressant effect of Sam-Jeong-Hwan. *J Orient Neuropsychiatry*. 2008 ; 19(3) : 101-15.