



# Sprague-Dawley 랫드를 이용한 소핵시험을 통한 SU어혈약침의 안전성 평가

구자승<sup>1</sup> · 정 철<sup>2</sup> · 황지혜<sup>3</sup>

<sup>1</sup>보광한의원, <sup>2</sup>남상천한의원, <sup>3</sup>가천대학교 한의과대학 침구의학과

## Toxicological Study of SU-Eohyeol Pharmacopuncture in an In Vivo Micronucleus Test in Sprague-Dawley Rats

Jaseung Ku<sup>1</sup>, Chul Jung<sup>2</sup>, Ji Hye Hwang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bogwang Korean Medicine Clinic,

<sup>2</sup>Namsangcheon Korean Medicine Clinic,

<sup>3</sup>Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Gachon University

**Objectives :** The purpose of this study was to evaluate the potential of the test substance, SU-Eohyeol Pharmacopuncture (SUEP), to induce micronuclei in bone marrow cells of Sprague-Dawley (SD) Rats. **Methods :** The dose range preliminary study was performed first. 1 ml/animal was selected as the high dose of this study. Two additional lower dose levels (0.5 and 0.25 ml/animal) were produced by applying a geometric ratio of 2. In addition, the positive and negative control groups were set. Then, after intramuscular administration (1 ml/animal) of SUEP to 8-week-old male SD rats, an in vivo micronucleus test was performed to evaluate the induction of micronuclei in SD rat bone marrow cells. **Results :** As a result of the main study, the incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in polychromatic erythrocytes (PCE) in the test substance SUEP groups was not statistically significantly different from the negative control group. In addition, the ratio of PCE to total erythrocytes in the test substance SUEP groups was not statistically significantly different from the negative control group. In the positive control group, the incidence of MNPCE in PCE was statistically significantly increased when compared to the negative control group. The ratio of PCE to total erythrocytes in the positive control group was not statistically significantly different from the negative control group. **Conclusions :** Based on these results, the test substance, SUEP, did not have any potential to induce micronuclei formation in bone marrow cells of rats under the conditions of this study.

**Key words :** micronucleus test, Cervi Parvum Cornu, SU-Eohyeol, Jungsongouhyul pharmacopuncture, Immuno-Pharmacopuncture, toxicity test

### 서 론

약침요법은 단일 또는 복합 한약을 다양한 추출 방법을 통해

약침액으로 제조하여 질병과 연관된 경혈, 체표 촉진에 의해 얻어진 양성반응점(陽性反應點, 압통점, 아시혈) 및 혈관에 약침주입용 주사기로 시술하는 방법으로, 자침(刺鍼) 효과와 약물의 효능을 이

Received April 18, 2022, Revised May 27, 2022, Accepted May 27, 2022

Corresponding author: Ji Hye Hwang

Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam 13120, Korea

Tel: +82-32-770-1342, Fax: +82-32-764-9990, E-mail: jhbori@nate.com

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No. NRF-2022R1A2C1013518).

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

용하여 인체의 기능 조정 및 병리상태 개선을 통해 질병을 치료하는 신침요법(新鍼療法)의 일종이다<sup>1,2)</sup>. 약침요법은 남상천이 1965년 약업신문에 “경락주입치료(經絡注入治療)”라는 글을 발표한 후, 1967년 《경락(經絡)》 1·2권을 저술함으로써 보급되기 시작하였으며, 면역약침은 현재 경락약침, 경락장약침으로 혼용되고 있으나, 1997년 남상천의 《면역의학》이라는 책이 발행되면서 남상천 이론을 토대로 하는 약침은 면역약침으로 정리되었기에<sup>2)</sup>, 향후 명칭 정리가 필요할 것이다. 면역약침의 경우, 동통 치료에 대한 장점 뿐 아니라 인체의 운(潤)과 기(氣)를 보충하여 면역을 강화시켜 인체를 건강한 상태로 유지하고 난치병에 대처할 수 있게 해준다고 알려져 있다<sup>1,2)</sup>.

약침은 이전 연구<sup>3)</sup>에서 2017년 기준으로 전체 한의사 중 67.5%가 약침을 사용하고 있다고 보고되었고, 한국의 약침 이용 현황 및 만족도에 대한 한의사 대상 설문조사 연구<sup>4)</sup>에서, 응답자의 88%가 전년도에 약침을 사용한 적이 있고, 약침으로 치료받은 환자의 비율은 39.2%였으며, 약침은 주로 근골격계, 신경계, 위장병 치료에 사용되었다고 보고되는 등 한의 임상에서 널리 사용되는 것으로 보고되었다. 약침에 사용되는 약침제제의 경우, 현재 다양한 종류들이 한의 임상에서 사용되고 있으며, 새로운 약침제제들이 문헌적 근거 및 한의사들의 임상적 경험을 근거로 하여 꾸준히 개발되고 있다.

SU어혈약침은 중성어혈약침에 녹용을 추가하여 개발된 약침이다. 면역약침에서 녹용은 보윤보기(補潤補氣)의 기능을 가지고 있으며, 뼈 쪽에 문제가 있을 때나 폐경기, 성장 등 호르몬 부족, 퇴행성 질환 등에 사용하면 좋은 결과를 얻을 수 있다고 하였다<sup>1)</sup>. 녹용 약침의 경우 많은 실험연구에서 관절염에 대한 항염증 효과 및 근골격계 질환에서 임상효능이 보고된 바 있다<sup>5,6)</sup>. 중성어혈약침은 치자, 현호색, 유향, 몰약, 도인, 적작약, 단삼, 소목 등의 청열망혈(淸熱涼血), 활혈거어(活血祛瘀)하는 약으로 구성되어 활혈거어지통(活血祛瘀止痛) 효과에 해열소염(解熱消炎)의 작용이 강화된 약침으로 기체혈어로 인한 제반 통증, 어혈저체로 기혈의 순행이 불량하여 근맥실양(筋脈失養)으로 유발된 마비질환 등에 주로 사용되고 있다<sup>7,8)</sup>. SU는 빼어나다는 의미의 수(秀)라는 한자의 영문발음 표기이며, SU어혈약침은 활혈거어, 소염지통의 중성어혈약침 효과와 자음윤조(滋陰潤燥), 강근건골(強筋健骨), 조직에 운(潤)을 보충하는 녹용약침의 효능<sup>1)</sup>을 합쳐서 통증치료와 운과 진액을 보충하는 효과가 최적화되도록 기제(氣劑) 형태로 개발된 약침으로, 급성 손상에 따른 통증에서부터 만성 근육통, 근긴장이상, 관절통, 관절변형, 인대염증, 신경인성 통증까지 관리하는데 사용될 수 있다.

한약 및 한약제제들은 오랜 기간 축적된 임상 경험을 통해 그

안전성과 효능이 입증되었다고 볼 수 있다. 하지만, 한약의 부작용 및 안전성 관련 보고들<sup>9,10)</sup>이 있기에, 한약 및 한약제제의 독성평가를 통한 안전성 검증이 매우 중요하다. 새롭게 개발된 약침제제들의 경우 안전성 검증을 위한 여러 가지 독성평가 자료가 더욱 중요할 것이다. 임상에서 널리 사용되고 있는 중성어혈약침의 경우 치료 유효성 관련 많은 연구보고들이 있지만<sup>7,8)</sup>, 독성평가 결과는 없었고, 비슷한 약침액 관련하여 중성어혈-녹용 혼합약침의 단순 유효성 관련 임상연구가 1건 보고된 바 있었다<sup>11)</sup>. 이에 본 연구에서는 안전한 약침제제로 인정받기 위해 요구되는 독성평가 근거 확보를 하고자, 약침액 관련 다수 진행되었던<sup>12-15)</sup> 유전독성평가항목 중 소핵시험을 실시하여 SU어혈약침의 안전성에 대한 근거를 확보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

1) **시험물질:** SU어혈약침액은 녹용 (50 mg/ml), 치자 (75 mg/ml), 유향, 몰약, 현호색 (각 30 mg/ml), 도인, 단삼, 적작, 소목 (각 22.5 mg/ml)으로 구성되어 있다. 모든 한약재는 ㈜자연담은 (양주시, 경기도, 한국)에서 구입 후, KGMP 시설을 갖춘 보건복지부 인증 약침 원외탕전원 중 한 곳인 남상천원외탕전실(용인, 한국)에서 아래의 조제방법을 통해 얇은 노란색의 투명한 액체의 바이알 형태로 제공받아 4.2~5.4℃의 냉장고에 보관하였다.

SU어혈약침액 제조 과정에서 두 가지 추출 방법이 사용되었다. 먼저, 녹용의 경우 러시아산 분골을 추말하여 증류추출기에 주사용수를 넣고 순환추출하여 추출물을 회수하여 주정을 넣고 교반 후 종이여과하였다. 이 여과액의 주정을 감압농축기를 이용해서 제거한 후 분자량 분율 10,000 달톤으로 한외여과하였다. 다음으로, 다른 한약재들의 경우 증류추출기에 주사용수를 넣고 순환 후 증류액을 회수하였다. 녹용 농축액과 다른 한약재들 증류액을 혼합하여 0.9% NaCl을 넣고 교반하여 녹인 다음 pH 7.4로 적정한 후, 최종 0.45~0.2 μm filter로 여과하여 용기에 담아 밀봉하였다.

2) **음성 및 양성 대조물질:** 음성 대조물질로는 일반적으로 사용하는 생리식염주사액(Lot No./Batch No. 21081, JW Pharmaceutical Co., Ltd., Korea)을 사용하였다. 양성 대조물질로는 Cyclophosphamide (CPA) (Lot No./Batch No. MKCJ4697, Sigma-Aldrich, Co., USA)를 사용하였다. CPA는 면역억제제로, 림프계를 손상시켜 백혈구 및 림프구 감소를 통한 면역 활성 억제와 산화 스트레스를 유도하는 DNA 알킬화 화합물로 알려져 있으

며<sup>16)</sup>, 이전 여러 소핵시험<sup>17,18)</sup>에서 양성 대조물질로 사용되어 왔다.

**3) 실험동물 및 사육환경:** 본 시험에서 specific pathogen-free (SPF) Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)) rat를 사용하였다. SD rat는 소핵시험을 비롯한 안전성시험에 가장 널리 사용되고 있으며 비교할 많은 기초자료가 축적되어 있고<sup>19)</sup>, 가이드라인에서 추천하는 동물종으로서 선택하였다. 7주령 수컷 SD rat (ORIENTBIO INC., 성남, 한국) 27마리의 입수시 체중은 196.0~215.6 g이었고, 반입시 동물의 일반상태 검사를 실시한 후, 체중을 측정하였고, 5일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 검역 및 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 동물의 건강 상태에 이상없음을 확인하였다. 검역·순화기간 종료 시, 건강상태에 이상이 없는 동물 중에서 순화기간 동안의 체중변화를 참고하여 선발하였으며, 선발된 동물은 순화기간 종료일의 체중을 기초로 하여 각 군의 평균체중이 균등하도록 5 마리씩 총 5군으로 구분하였다. 잔여동물은 구분별 종료 후 시험계로부터 제외시켰다.

동물사육실은 260W×350D×210H (mm)의 스테인레스 철망 사육상자를 사용하여, 온도 20.9~24.3°C, 상대습도 51.5~58.8%, 환기횟수 10~15회/hr, 명암주기 12시간 (오전 7시 점등~오후 7시 소등), 조도 150~300 Lux의 환경으로 관리했다. 실험동물용 고품사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C, Lot No. 2918C-080221MA, Envigo RMS, Inc., USA)를 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 음수의 경우, 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사한 정제수를 사용했다.

모든 실험은 식품의약품안전처 <비임상시험 관리기준><sup>20)</sup>, OECD의 Good Laboratory Practices (GLP) 규정<sup>21)</sup>, 중국 국가식품약품감독관리총국(CFDA) GLP 규정 등의 GLP 규정들을 준수하여, “의약품 등의 독성시험기준”(식품의약품안전처 고시 제

2017-71호(2017년 8월 30일))의 실험기준을 근거하여 (주)바이오톡스텍(청원군, 한국)에서 실시되었다(시험번호: B211220). (주)바이오톡스텍은 2010년 AAALAC International (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) 완전인증을 획득하였으며, 본 시험은 동물보호법(제정1991년 5월 31일 법률 제4379호, 일부개정 2020년 2월 11일 법률 제16977호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(승인번호: 210805). 본 시험은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

## 2. 방법

**1) 용량설정 및 군 구성:** 시험물질인 SU어혈약침의 임상적용에 정경로가 근육이므로 근육경로를 선택하였고, SU어혈약침군은 일회용 주사기(화진, 1ml, 26G×1.5 mm)를 사용하여 대퇴부의 근육 내에 저용량(G2) 및 중용량(G3)은 각각 0.25 및 0.5 ml/animal을, 고용량(G4) 및 음성대조물질(G1)은 1 ml/animal을 약 24시간 간격으로 2회 투여하였다. 투여는 1 site 당 0.5 ml를 초과하지 않도록 분할 투여하였다. 양성대조군(G5)은 양성대조물질은 일회용 주사기를 사용하여 시험물질 2차 투여시 1회 10 ml/kg (20 mg/kg)을 경구 투여하였다(Table 1).

SU어혈약침의 SD rat를 이용한 단회 근육투여 독성시험의 예비시험 (Biotoxtech Study No.: B211217P1)의 결과, 1 ml/animal 투여군에서 사망이 관찰되지 않았기 때문에, 본시험에서는 최고용량을 1 ml/animal로 설정하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 0.5 및 0.25 ml/animal 을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 일반적으로 소핵시험에 사용되는 수컷<sup>22)</sup>을 사용하였다.

**2) 일반증상 및 체중변화 관찰:** 투여기간 동안 2회/일 (투여직전 및 투여직후), 그 외 기간 동안 1회/일, 외관, 행동 및 배설물 등의

**Table 1.** Group designation of micronucleus test in Sprague-Dawley Rats

Group	Dose (ml/animal)	Dose amount (ml/animal)	Number of dose	Number of animals (object number)
G1 Negative Control	0	1	2	5 (1101-1105)
G2 Low-Dose SUEP	0.25	0.25	2	5 (1201-1205)
G3 Mid-Dose SUEP	0.5	0.5	2	5 (1301-1305)
G4 High-Dose SUEP	1.0	1.0	2	5 (1401-1405)
G5 Positive Control	20 mg/kg	10 ml/kg	1	5 (1501-1505)

SUEP : SU-Eohyeol pharmacopuncture agent with 9 herbs such as Cervi Parvum Cornu (50 mg/ml), Gardeniae Fructus (75 mg/ml), Olibanum (30 mg/ml), Myrrha (30 mg/ml), Corydalis Tuber (30 mg/ml), Persicae Semen (22.5 mg/ml), Salviae Miltiorrhizae Rrdix (22.5 mg/ml), Paeoniae Radix (22.5 mg/ml), and Sappan Lignum (22.5 mg/ml).

일반증상을 관찰하였다. 체중은 투여개시일 및 골수채취일에 측정하였다.

**3) 검체제작 및 관찰:** 시험물질 2차 투여 후 24시간 후에 동물을 CO<sub>2</sub> 가스 마취로 안락사시켰다. 대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 그 양 끝단을 가위로 절단하여 0.5 ml의 phosphate buffered saline (PBS, Lot No.: 0000918562, Lonza Walkersville Inc., U.S.A.)을 관류시켜 골수세포를 채취하였다. 골수세포 부유액에 10% 중성포르말린 0.5 ml를 넣고 5분간 고정한 뒤, 5분간 원심분리 (4°C, 1,000 rpm, Micro17TR, Hanil Science Industrial, Republic of Korea)하여 상층액을 제거하였다. 그 후, 침전된 골수세포에 10% 중성포르말린 0.3 ml를 넣어 부유시킨 후 cell strain로 여과하여 보관용 튜브로 옮겼다. 보관용 튜브에 코드 번호를 기입하고, 관찰 시까지 실온 보관하였다.

고정한 골수세포 부유액을 커버글라스에 떨어뜨린 후, 20 μl의 0.05% acridine orange가 도포된 슬라이드글라스를 덮어 관찰용 슬라이드를 제작하였다. 관찰용 슬라이드를 현미경(600배 배율, BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 1개체당 다염성적혈구(PCE, Polychromatic erythrocyte)를 4,000개씩 관찰하여 개체마다 다염성적혈구에 대한 소핵다염성적혈구(MNPCE, Micro-nucleated polychromatic erythrocyte)의 출현율을 구하였다. 관찰결과에서 시험물질군의 총 적혈구 수에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군의 20% 이상으로 나타나는지를 확인하였다. 골수세포의 증식억제의 지표로서, 1개체당 총 적혈구 500개를 관찰하여 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비를 구하였다.

**4) 시험의 성립조건 및 결과의 판정:** 시험의 성립조건은 1) 음성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있을 것, 2) 양성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가할 것, 3) 투여군과 관찰용 세포수가 적절할 것, 4) 용량 설정 기준에 따라 최고 투여용량을 설정할 것 등의 조건을 만족하는 경우 성립으로 하였다.

결과의 판정은 1) 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 한 용량 이상에서 통계학적으로 유의하게 증가할 것, 2) 증가에 따른 용량의존성이 있을 것, 3) 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군의 historical control data의 관리범위 이상으로 증가할 것 등의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다. 그외는 음성으로 판정하였다.

**5) 자료의 통계처리:** 소핵다염성적혈구의 출현빈도, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중의 변화는 SAS (version

9.4, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 통계해석을 실시하였다. 소핵다염성적혈구의 출현빈도에 대하여 Kruskal-Wallis test 및 Mann-Whitney U test를 실시하여 음성대조군과 시험물질군 간의 유의성과 음성대조군과 양성대조군 간의 유의성을 검정하였다( $p < 0.05$  및  $p < 0.01$ ). 시험물질군의 용량의존성에 대하여 Cochran-Armitage trend test를 실시하여 음성대조군과 시험물질군 간의 유의성을 검정하였다( $p < 0.05$  및  $p < 0.01$ ). 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중에 대하여 Bartlett's test를 실시하여 음성대조군과 시험물질군 간의 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산인 경우, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성(유의수준: 0.05)을 확인하였다. 음성대조군과 양성대조군 간의 비교에 대해서는 Folded-F test를 실시하여 등분산성을 검정하였다( $p < 0.05$ ). 등분산이 인정되어, Student's t-test를 실시하여 유의성을 확인( $p < 0.05$  및  $p < 0.01$ )하였다.

## 결 과

### 1. 일반증상 관찰 결과

관찰기간 동안, 시험물질인 SU어혈약침 투여군의 0.25, 0.5, 1.0 ml/animal 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다(Table 2).

### 2. 체중변화 관찰 결과

관찰기간 동안, 시험물질인 SU어혈약침 투여군의 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 투여개시일 및 골수채취일에 측정된 체중에 있어서 통계학적으로 유의한 체중 변화는 확인되지 않았다(Table 3).

### 3. 소핵 유발 출현빈도 결과

다염성적혈구(PCE) 중 소핵다염성적혈구(MNPCE)의 비율이 시험물질인 SU어혈약침 투여군의 0.25, 0.5, 1.0 ml/animal 모든 용량에서 음성대조군과 비교했을 때 통계적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다. 그리고, 총 적혈구 중 다염성적혈구(PCE)의 비율 역시 음성대조군과 비교 시 통계적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다. CPA 양성대조군에서는 다염성적혈구(PCE) 중 소핵다염성적혈구(MNPCE)의 출현빈도가 음성대조군과 비교했을 때 통계적으로 유의한 증가가 확인되었다( $p < 0.01$ ). 총 적혈구 중 다염성적혈구(PCE)의 비율은 음성대조군과 비교했을 때 통계적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다(Table 4).

**Table 2.** Clinical signs of main study in male Sprague-Dawley Rats

Group	Dose (ml/animal)	Route	Animal ID	Clinical Signs					
				1 <sup>st</sup> dosing		2 <sup>nd</sup> dosing		1 day after 2 <sup>nd</sup> dosing	
				before dosing	immediately after dosing	before dosing	immediately after dosing		
Negative Control	Normal Saline	0	I.M.	1101	-	-	-	-	-
				1102	-	-	-	-	-
				1103	-	-	-	-	-
				1104	-	-	-	-	-
				1105	-	-	-	-	-
Test substance	SUEP	0.25	I.M.	1201	-	-	-	-	-
				1202	-	-	-	-	-
				1203	-	-	-	-	-
				1204	-	-	-	-	-
				1205	-	-	-	-	-
		0.5	I.M.	1301	-	-	-	-	-
				1302	-	-	-	-	-
				1303	-	-	-	-	-
				1304	-	-	-	-	-
				1305	-	-	-	-	-
	1.0	I.M.	1401	-	-	-	-	-	
			1402	-	-	-	-	-	
			1403	-	-	-	-	-	
			1404	-	-	-	-	-	
			1405	-	-	-	-	-	
Positive Control*	CPA	20 mg/kg	P.O.	1501	-	-	-	-	-
				1502	-	-	-	-	-
				1503	-	-	-	-	-
				1504	-	-	-	-	-
				1505	-	-	-	-	-

I.M. : Intramuscular, P.O. : Per Os. (by mouth), SUEP: SU-Eohyeol pharmacopuncture agent with 9 herbs such as Cervi Parvum Cornu (50 mg/ml), Gardeniae Fructus (75 mg/ml), Olibanum (30 mg/ml), Myrrha (30 mg/ml), Corydalis Tuber(30 mg/ml), Persicae Semen (22.5 mg/ml), Salviae Miltiorrhizae Rrdix (22.5 mg/ml), Paeoniae Radix (22.5 mg/ml), and Sappan Lignum (22.5 mg/ml), CPA: Cyclophosphamide, -: No observavle abnormality. \*The positive control substance was administered once at 24 hours prior to sampling time.

**Table 3.** Changes in body weight of Male Sprague-Dawley Rats in the in vivo micronucleus test

Group	Dose (ml/animal)	Route	Days after dosing (g)		
			before 1 <sup>st</sup> dosing	1 day after 2 <sup>nd</sup> dosing	
Negative Control	Normal Saline	0	I.M.	261.8±4.24	276.0±7.05
Test substance	SUEP	0.25	I.M.	262.3±3.44	277.6±5.86
		0.5	I.M.	260.8±8.85	273.0±10.2
		1.0	I.M.	261.7±6.51	273.1±10.9
Positive Control*	CPA	20 mg/kg	P.O.	261.8±9.90	269.4±12.3

Data are presented as mean±S.D. (standard deviation). I.M. : Intramuscular, P.O. : Per Os. (by mouth), SUEP: SU-Eohyeol pharmacopuncture agent with 9 herbs such as Cervi Parvum Cornu (50 mg/ml), Gardeniae Fructus (75 mg/ml), Olibanum (30 mg/ml), Myrrha (30 mg/ml), Corydalis Tuber (30 mg/ml), Persicae Semen (22.5 mg/ml), Salviae Miltiorrhizae Rrdix (22.5 mg/ml), Paeoniae Radix (22.5 mg/ml), and Sappan Lignum (22.5 mg/ml), CPA: Cyclophosphamide. \*The positive control substance was administered once at 24 hours prior to sampling time.

**4. 시험의 성립**

음성대조군에서 소핵다염성적혈구(MNPCE)의 출현빈도가 historical control data (Table 5)의 관리범위 내에 있고, historical

control data의 95% 범위 내에 있었다. 또한, CPA 양성대조군에서 소핵다염성적혈구(MNPCE)의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교했을 때 통계적으

**Table 4.** The ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) to total erythrocytes in male mice in vivo micronucleus test

Group		Dose (ml/animal)	Route	Hours after dosing (hr)		PCE (PCE+NCE)	MNPCE/PCE
Negative control	Normal saline	0	I.M.	24	Total	782/2,500	10/20,000
					% (Mean±S.D.)	31.3±0.90	0.050±0.018
Test substance	SUEP	0.25	I.M.	24	Total	782/2,500	10/20,000
					% (Mean±S.D.)	31.3±0.88	0.050±0.018
		0.5	I.M.	24	Total	803/2,500	9/20,000
					% (Mean±S.D.)	32.1±0.41	0.045±0.033
1.0	I.M.	24	Total	795/2,500	13/20,000		
			% (Mean±S.D.)	31.8±1.38	0.065±0.014		
Positive control*	CPA	20 mg/kg	P.O.	24	Total	795/2,500	852 <sup>††</sup> /20,000
					% (Mean±S.D.)	31.8±1.24	4.260±0.060

I.M. : Intramuscular, P.O. : Per Os. (by mouth), SUEP : SU-Eohyeol pharmacopuncture agent with 9 herbs such as Cervi Parvum Cornu (50 mg/ml), Gardeniae Fructus (75 mg/ml), Olibanum (30 mg/ml), Myrrha (30 mg/ml), Corydalis Tuber (30 mg/ml), Persicae Semen (22.5 mg/ml), Salviae Miltiorrhizae Rrdix (22.5 mg/ml), Paeoniae Radix (22.5 mg/ml), and Sappan Lignum (22.5 mg/ml), CPA : Cyclophosphamide, MNPCE : Micro nucleated polychromatic erythrocytes, PCE : Polychromatic erythrocytes, NCE : Nomochromatic erythrocytes, MMC : mitomycin C, S.D. : Standard Deviation. \*The positive control substance was administered once at 24 hours prior to sampling time. Significant difference from negative control by Mann-Whitney U test: <sup>††</sup>  $p < 0.01$ .

**Table 5.** Historical control data

Historical control values of micro nucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE)							
Group	Hours after dosing (hr)	Dose (mg/kg)	N	MNPCE/PCE (%) (Mean±S.D.)	Range [MNPCE/PCE] (%)		95% control limit <sup>3)</sup> [MNPCE/PCE]
					MIN	MAX	
Negative control	24	0	7	0.04±0.02	0	0.084*	< 13
Positive control	24	20	5	4.18±1.26	3.530*	4.835*	-

  

Historical control values of ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) to total erythrocytes						
Group	Hours after dosing (hr)	Dose (mg/kg)	N	PCE/(NCE+PCE) (%) (Mean±S.D.)	Range [PCE/(NCE+PCE)] (%)	
					MIN	MAX
Negative control	24	0	7	34.2±4.37	30.6*	37.8*
Positive control	24	20	5	30.3±3.90	26.5*	34.1*

Negative control : Water for injection, Phosphate buffered solution, 0.5% methyl cellulose 1500 centipoise solution, etc., Positive control : Cyclophosphamide (20 mg/kg, P.O., single dosing), N : The total number of micronucleus test, - : No data. The above historical control values were obtained from the data pooled from Feb. 26, 2016 to Apr. 24, 2020. \*The range was calculated by the control limit of X derived from X-R value. a) Poisson-based 95% control limits of the historical negative control data.

로 유의하게 증가하였다. 투여군과 관찰용 세포 수가 적절하였고, 용량 설정 기준에 따라 최고 투여용량을 설정하였기 때문에 본 시험은 적절한 시험조건 하에서 실시된 것으로 판단할 수 있었다.

## 고 찰

기존 면역약침에서 녹용은 홍화자와 혼합되어 HN약침의 윤제(潤劑) 형태로 사용되었다<sup>1)</sup>. 기존 증류추출 방식에서 약침액 밀도가 낮고 유효성분의 농도가 낮아 허증 환자에게 적용할 때 치료 효과에 한계가 있음을 보완하기 위해서, SU어혈약침에서 녹용은

나노 추출과 감압농축, 한외여과 과정을 통해 약침액의 농도를 높이고 주입시의 통증을 줄이면서 편하게 주입할 수 있는 기제(劑劑)로 만들어져 증성어혈약침과 혼합되었다. 한국의 약침 이용 현황에서 주로 사용되는 약침이 봉독과 어혈약침이 가장 보편적으로 사용된다고 하였다<sup>4)</sup>. 이미 근골격계 질환 임상 효능 및 진통 소염 효과 관련 많은 보고들<sup>7,8)</sup>이 있고 한의사들이 가장 많이 사용하고 있는 약침 중 하나인 증성어혈약침에 윤과 진액을 보충하는 녹용으로 그 효능을 보충해준 SU어혈약침은 향후 그 안전성이 입증된다면, 한의 임상에서 급성 손상에 따른 통증에서부터 만성 근육통, 근긴장이상, 관절통, 관절 변형, 인대 염증, 신경인성 통증 관리 등에 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

현재 약침은 원외탕전실에서 조제되고 있다. 원외탕전실이란 의료법 시행규칙에 따라 의료기관 외부에 별도로 설치돼 한의사의 처방에 따라 탕약(湯藥), 환제(丸劑), 고제(膏劑), 정제(錠劑), 캡슐제 등의 다양한 제형의 한약을 전문적으로 조제하는 시설로, 2008년 보건복지부에 의해 합법화되었다. 2018년 9월 보건복지부 원외탕전실 인증제가 도입되었으며, 원외탕전실 인증제는 한약이 안전하게 조제되는지에 대해 검증하기 위해 도입된 제도로, 탕전시설 및 운영 뿐만 아니라 원료의 입고부터 보관, 조제, 포장, 배송에 이르는 전반적 조제과정을 평가·인증하는 제도이며, 약침조제 원외탕전실 인증의 경우 청정구역 설정 및 환경관리, 멸균 처리공정 등 KGMP에 준하는 항목 등 165개 기준항목에 의해 평가된다<sup>23-25</sup>. 비록 보건복지부 인증 원외탕전실에서 만들어진 약침이라고 하더라도, 제조 과정의 안전성은 인정될 수 있지만, 약침제제 자체의 유효성 및 안전성에 대해서는 비임상 및 임상 평가를 통한 검증이 필요할 것이다.

식품의약품안전처(MFDS)는 한약제제의 임상시험 승인을 위한 기본 자료로, 제제 효능에 대한 비임상 시험자료 외에 안전성 관련 유전독성, 단회투여독성 또는 반복투여독성 등의 비임상 시험 자료들 또한 요구하고 있다<sup>20,22,26</sup>. 유전독성시험 중 소핵시험은 설치류 골수 세포 중 다염성적혈구에 나타나는 소핵을 지표로 하여 소핵을 가진 다염성적혈구의 빈도를 측정하여 시험물질의 염색체 이상 유발을 체내(*in vivo*)에서 평가하는 방법이다. 소핵은 염색체 절단 이후 절단이 수복되지 않아 동원체를 갖지 않는 염색체 단편이 형성되고 이 단편이 세포 분열 시에 잔존하여 형성되는 것으로, 염색체의 구조 이상을 반영하는 물질이다. 또한 세포 분열기전의 장애로 인해 세포 분열 시 염색체가 잔존하게 되어도 소핵화하기 때문에 염색체의 수적 이상까지도 반영하는 물질이다<sup>22,26-28</sup>. 본 연구는 일반적으로 소핵시험에 많이 사용되는 수컷<sup>22</sup>을 사용하여 8주령 수컷 SD rat 골수세포에 대한 소핵 시험을 시행하였다.

SU어혈약침의 임상적용 용량은 0.1~1.0 ml/회이고, SD rat 기준으로 1 ml/회는 대략적으로 1.825 mg/kg으로 독성시험 가이드라인에서 2,000 mg/kg을 최고 투여량으로 설정하고 있는 것<sup>29</sup>을 고려해볼 때도 적정하다고 생각되어, 최대 용량을 1 ml/animal로 설정하고, SD rat를 이용한 단회 근육투여 독성시험의 예비시험에서 1 ml/animal 투여군에서 사망이 관찰되지 않았기 때문에, 본시험에서는 최고용량을 1 ml/animal로 설정하였다. SU어혈약침 투여용량은 공비 2를 적용하여, 1, 0.5 및 0.25 ml/animal을 설정하여 수컷 SD rat의 근육에 총 2회 근육투여하여 결과를 관찰하였다. 관찰기간 동안, 모든 용량의 SU어혈약침액 투여군에서 일반적 증상의 이상반응은 관찰되지 않았고, 투여개시일 및 골수채취일에

측정한 체중은 음성대조군인 식염수 투여군과 비교하여 통계학적으로 유의한 체중 변화는 확인되지 않았다. 시험물질인 SU어혈약침투여군에서는 다염성적혈구(PCE) 중 소핵다염성적혈구(MNPCE)의 비율이 0.25, 0.5, 1.0 ml/animal 모든 용량에서 음성대조군인 식염수 투여군과 비교하여 통계적으로 유의미한 차이가 확인되지 않았고, 총 적혈구 중 다염성적혈구(PCE)의 비율 역시 음성대조군과 비교했을 때 유의한 차이는 확인되지 않았다. 양성대조군인 CPA 투여군에서는 다염성적혈구(PCE) 중 소핵다염성적혈구(MNPCE)의 출현빈도가 음성대조군인 식염수 투여군과 비교하여 통계적으로 유의미한 증가가 확인되었으며, 총 적혈구 중 다염성적혈구(PCE)의 비율은 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의미한 차이가 확인되지 않았다. 이러한 결과로부터, 본 시험조건 하에서 SU어혈약침의 SD 랫드 골수세포에 대한 소핵 유발성이 없는 것으로 판단하였다.

SU어혈약침은 대개 임상에서 성인(60 kg) 기준으로 1회에 1 ml을 사용하고 있으며, 5.083 mg/kg이고, 본 실험에서 사용한 1 ml/animal 용량은 1.825 mg/kg으로, 실제 임상 SU어혈약침의 사용량보다 360배 정도 높은 용량에서 안전함이 확인되었기에, 실제 한의 임상에서 안전한 용량으로 사용한다고 볼 수 있다. 향후 더 많은 안전성 관련 독성평가들이 진행되어야 할 것이며, 또한 SU어혈약침의 일정 품질 유지를 위한 수율관리, 표준물질의 정량, 정성 분석 등이 필요할 것이다.

## 결 론

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 SU어혈약침액의 SD 랫드 골수세포에 대한 소핵 유발성이 없는 것으로 판단되었으며, 이를 통해 SU어혈약침은 염색체 이상을 유발하지 않는 안전한 약침제제로 평가될 수 있다고 생각된다. 다만, 이 결과 하나만으로 안전성 확보에 대한 결론을 내리기에는 한계가 있으며, 향후 많은 추가적 연구들이 필요할 것으로 사료된다.

## Acknowledgement

None.

## Funding

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No. NRF-2022R1A2C1013518).

## Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

## Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

## References

1. Korean Acupuncture and Moxibustion Society. *Acupuncture Medicine*. Seoul (Korea): Hanmi Medical Publishing. 2020 : 204-22.
2. Jung C, Jung JH, Lee MS. A clinical study of immune pharmacopunctureology. Chungnam (Korea): Kyungrak medical publishing. 2011 : 127-33.
3. Park JK, Kim KH. A Survey on Uncovered Services in National Health Insurance of Traditional Korean Medicine Institution. *Journal of Society of Preventive Korean Medicine*. 2017 ; 21(3) : 43-50. <https://doi.org/10.25153/spkom.2017.21.3.005>
4. Park JE, Kim KH, Kang S, Lee EK, Kim JC, Jang BH, et al. Usage status and satisfaction with pharmacopuncture in Korea: A survey among Korean medicine doctors. *Eur J Integr Med*. 2019 ; 27 : 121-30. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.03.001>
5. Lee DJ, Hwangbo M, Kwon K, Seo HS. Review of cervi cornu parvum pharmacopuncture in Korean medicine. *Journal of Pharmacopuncture*. 2013 ; 16(2) : 7-14. <https://doi.org/10.3831/KPI.2013.16.008>
6. Bensky D, Gamble A. *Chinese herbal medicine: materia medica*. Revised ed. Seattle: Eastland Press. 1992 : 32-44.
7. Korean Pharmacopuncture Institute. *Pharmacopunctureology: principles and clinical applications*. Seoul : Elsevier Korea LLC. 2012 : 3.
8. Yoon JW, Kim SJ. A review of clinical study on Jungsongouhyul pharmacopuncture treatment published in Korea. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2017 ; 27(4) : 75-84. <https://doi.org/10.18325/jkmr.2017.27.4.75>
9. Kim EJY, Chen Y, Huang JQ, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Poon J et al. Evidence-based toxicity evaluation and scheduling of Chinese herbal medicines. *J Ethnopharmacol*. 2013 ; 146(1) : 40-61. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.027>
10. Teschke R, Wolff A, Frenzel C, Schulze J. Review article: Herbal hepatotoxicity--an update on traditional Chinese medicine preparations. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014 ; 40(1) : 32-50. <https://doi.org/10.1111/apt.12798>
11. Ryu HS, Kim SP, Chun HS, Ryu MS, Shin JC, Wei TS. The Comparative Study of Effects between Acupuncture Treatment and Cotreatment with Mixed Pharmacopuncture of Jungsongouhyul and Cervi Pantotrichum Cornu on Low Back Pain Patients. *Journal of Acupuncture Research*. 2011 ; 28(6) : 149-57.
12. Hwang JH, Jung HW, Jung C. Toxicity Evaluation of TA, a Pharmacopuncture Medicine, in an in Vivo Micronucleus Test. *Korean Journal of Acupuncture*. 2019 ; 36(1) : 74-80. <https://doi.org/10.14406/acu.2019.002>
13. Hwang JH, Ku J, Jung C. Genotoxicity Evaluation of Capsaicin-Containing (CP) Pharmacopuncture, in an In Vivo Micronucleus Test. *J Pharmacopuncture*. 2020 ; 23(4) : 237-46. <https://doi.org/10.3831/KPI.2020.23.4.237>
14. Jung C. In vivo Micronucleus test of V-YAKCHIM in ICR Mice. *J Korea Immuno-Yakchim Soc*. 2013 ; 2(2) : 5-10.
15. Jung JH, Jung C. In Vivo Micronucleus Test of CA-YAKCHIM in ICR Mice. *J Korea Immuno-Yakchim Soc*. 2014 ; 3(1) : 11-8.
16. Lee EB, Choi JH, Jang HH, Hong HC, Lee HJ, Jeong HC, et al. Effects of Aged Platycodon grandiflorum on Cyclophosphamide-induced Immunosuppression in Mice. *Kor J Pharmacogn*. 2020 ; 51(4) : 340-8. <https://doi.org/10.22889/KJP.2020.51.4.340>
17. Shin HM. Micronucleus Test in Bone Marrow Cells and Bacterial Reverse Mutation Assay of HMC05. *Kor J Herbology*. 2010 ; 25(2) : 137-44. <https://doi.org/10.6116/kjh.2010.25.2.137>
18. Jung IK, Cheon WH, Kang SJ, Ku SK, Lee YJ. Micronucleus Test of Scutellariae Radix Aqueous Extract in Bone Marrow Cells of



- Male ICR Mice. Kor J Oriental Preventive Medical Society. 2012 ; 16(1) : 81-9.
19. Song CW, Hwang HS, Han SS. Studies on the basic data of Ktc: SD rats with age - body weight, hematology, serum chemistry and urine analysis. Korean J Laboratory Animal Science. 1990 ; 6(1) : 33-43.
  20. Ministry of Food and Drug Safety. Good Laboratory Practice Regulation for Nonclinical Laboratory Studies (Notification No. 2018-93). [Internet]. Cheongju: Ministry of Food and Drug Safety [cited 2018 November 21] Available from: URL: <https://www.law.go.kr/LSW/admRulLsInfoP.do?admRulSeq=2100000170349>
  21. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). ENV/MC/CHEM(98)17: OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring number 1. Paris: OECD; 1998. 1-41 [cited 2022 April 1]. Available from: URL: [https://one.oecd.org/document/ENV/MC/CHEM\(98\)17/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/MC/CHEM(98)17/en/pdf)
  22. National Institute of food and drug safety evaluation. Explanation of toxicity test standard of drugs. 2012 [cited 2022 April 1]. Available from: URL: [https://www.mfds.go.kr/brd/m\\_1060/view.do?seq=12255&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm\\_seq\\_1=0&itm\\_seq\\_2=0&multi\\_itm\\_seq=0&company\\_cd=&company\\_nm=&page=98](https://www.mfds.go.kr/brd/m_1060/view.do?seq=12255&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=98)
  23. Sung SH, Shin BC, Park MJ, Kim KH, Kim JW, Ryu JY, et al. Current status of management on pharmacopuncture in Korea through introduction of an accreditation system. J Pharmacopuncture. 2019 ; 22(2) : 75-82. <https://doi.org/10.3831/KPI.2019.22.009>
  24. Korea Ministry of Health and Welfare. Guideline on Installation and Utilization of External Herbal Dispensaries of Traditional Korean Medicine Clinics and Share-use of Herbal Dispensaries. [cited 2022 April 1]. Available from: URL: [http://www.mohw.go.kr/react/jb/sjb0406vw.jsp?PAR\\_MENU\\_ID=03&MENU\\_ID=030406&CONT\\_SEQ=342727&page=1](http://www.mohw.go.kr/react/jb/sjb0406vw.jsp?PAR_MENU_ID=03&MENU_ID=030406&CONT_SEQ=342727&page=1)
  25. Kang SC, Kim SY, Yun YK, Kim JH, Kim YK. A Study on the Management and Dispensing Standards of Herbal Medicine in Herbal Dispensaries. Herbal Formula Science. 2019 ; 27(1) : 31-44. <https://doi.org/10.14374/HFS.2019.27.1.31>
  26. Korea Food and Drug Administration (KFDA). Toxicity test standard of drugs. 2015 [cited 2022 April 1]. Available from: URL: <https://www.law.go.kr/LSW/admRulLsInfoP.do?chrClsCd=010202&admRulSeq=2100000032147>
  27. Kastenbaum MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mut Res. 1970 ; 9(5) : 527-49. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(70\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(70)90038-2)
  28. Lee MY, Seo CS, Kim JY, Shin HK. Genotoxicity evaluation of Guibi-Tang extract using an in vitro bacterial reverse mutation assay, chromosome aberration assay, and in vivo micronucleus test. BMC Complement Altern Med. 2014 ; 14 : 215. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-215>
  29. National Institute of food and drug safety evaluation. Guidelines for non-clinical trial of drugs. 2015 [cited 2022 April 1]. Available from: URL: [https://www.mfds.go.kr/brd/m\\_1060/view.do?seq=12165&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm\\_seq\\_1=0&itm\\_seq\\_2=0&multi\\_itm\\_seq=0&company\\_cd=&company\\_nm=&page=104](https://www.mfds.go.kr/brd/m_1060/view.do?seq=12165&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=104)