

Mouse에 있어서 시험물질 淸心蓮子湯 추출액의 급성독성 시험

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

*한국한의학연구원 한의융합연구본부

†한국한의학연구원 표준화연구본부

‡한국한의학연구원 체질의학연구본부

Abstract

Acute Toxicity Study on Cheongsimyeonja-tang in Mice

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

*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 Cheongsimyeonja-tang.

2. Methods

We investigated the acute toxicity for water-extracted Cheongsimyeonja-tang. Fifty five male and female mice were observed for 14 days after one day oral administration of Cheongsimyeonja-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. In animals administered with Cheongsimyeonja-tang, there were neither dead animals nor significant changes of body weights. In addition, no differences were found between control and treated groups in clinical sign and autopsy.

4. Conclusion

The data confirmed that Cheongsimyeonja-tang is free from the toxicity and safety problems in treated groups. Compared with the control group, we could not find any toxic alteration in all treated groups(2560, 3200, 4000 and 5000 mg/kg). Lethal Dose 50 (LD50) value for mice was more than 5000 mg/kg per oral for both male and females. It suggest that Cheongsimyeonja-tang in mice is considered to be safe.

Key Words : Cheongsimyeonja-tang(Qingxinlianzi-tang), Acute Toxicity, Toxicity Test, LD50

• 접수일 2009년 10월 22일; 심사일 2009년 11월 05일
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

I. 緒 論

대표적인 太陰人 處方 중의 하나인 淸心蓮子湯은 太陰人 肝受熱裏熱病에 사용되는 處方으로 李濟馬의 『東醫壽世保元』에 처음 수록되어 있으며, 蓮子肉, 山藥, 天門冬, 麥門冬, 遠志, 石菖蒲, 酸棗仁, 龍眼肉, 栝子仁, 黃芩, 蘿菔子, 甘菊花의 열두 가지 약재로 구성된 처방이다. 본 방은 虛勞, 夢泄無度, 食滯, 胸腹痛, 泄瀉, 中風, 舌卷 등을 치료하며, 開竅醒腦, 安神情志, 補肺調氣, 安神安意 등의 효능이 있다^{2,3}. 淸心蓮子湯에 관한 연구로는 항산화 및 면역조절 효과에 관한 연구⁴, 뇌질환 및 심장 질환에 관련된 연구⁵⁻⁹, 간질환에 관한 연구^{10,11}, 항 allergy 작용에 관한 연구¹² 등이 있다.

한약처방은 안전성에 관한 문제가 항상 대두되어 왔다. 최근 한의학계에서는 한약물의 농약 및 중금속 등 위해물질 오염 연구 이외에 한약의 안전성에 대한 소비자의 욕구를 충족시키기 위한 연구로 四君子湯, 四物湯, 八物湯, 十全大補湯 등의 급성독성¹³⁻¹⁵과 아급성독성^{16,17}에 대한 실험 등의 연구가 활발하게 진행되고 있으나 사상처방에 대한 급성독성 실험은 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 실험에서는 전권에 발표한 太陰人의 대표처방인 熱多寒少湯¹⁸에 이어 淸心蓮子湯의 급성독성시험에 대한 연구로 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 試驗 方法

1. 검액의 제조

淸心蓮子湯의 급성독성시험을 하기 위하여 식품의약품안전청고시 제1999-61호(1999년 12월 22일)의 ‘의약품등의 독성시험기준’을 변형하여 실시하였다.

한약처방 淸心蓮子湯의 한약재는 대한약전 및 대한약전의한약(생약)규격집을 기준으로 구매하여 Table 1과 같은 비율로 전탕하였다.

淸心蓮子湯의 구성은 『東醫壽世保元』¹⁴을 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 측정한 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 피모의

Table 1. Prescription of Cheongsimyeonja-tang.

Crude drugs		Crude drug ratio (%)
蓮子肉	Nelumbo Semen	15.0
山藥	Dioscorea Rhizoma	15.0
天門冬	Asparagus Tuber	7.5
麥門冬	Liriope Tuber	7.5
遠志	Polygala Radix	7.5
石菖蒲	Acori gramineri Rhizoma	7.5
酸棗仁	Zizyphus Semen	7.5
龍眼肉	Longan Arillus	7.5
栝子仁	Thujae Semen	7.5
黃芩	Scutellaria Radix	7.5
蘿菔子	Raphani Semen	7.5
甘菊花	Chrysanthemi Flos	2.3

색소염색법과 개체식별카드 표시법으로 실시하였다.

순화 및 실험기간 동안의 사육환경은 온도 $23\pm3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm10\%$, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 환기횟수 10~20회/hr 및 조도 $150\sim300\text{ Lux}$ 로 조정하여 일정한 사육환경을 유지하였으며 실험동물용 고형사료(삼양사료 주식회사)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 경구 투여 가능 최대 용량인 5000 mg/kg/day 을 기준으로 공비 0.8로 하여 0(control group), 2560(T1 group), 3200(T2 group), 4000(T3 group) 및 5000(T4 group) mg/kg 의 용량투여용량에 따라 각각 5마리씩 5개의 용량군으로 나누었다. 투여 경로는 한방 임상에서 사용하는 단회 경구 투여법을 사용하였으며, 단회 경구 투여 후 14일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

4. 시험물질의 투여

淸心蓮子湯 추출 분말 10g을 멸균증류수 20 ml에 녹여 고농도(T4군)로 사용하였으며, 나머지군은 주사용 멸균 증류수를 첨가하여 차례로 희석하여 투여물질로 사용하였다.

투여방법은 피부 고정법으로 고정하고 경구 투여용 금속제 sonde와 주사관을 이용하여 투여 당일 투여량의 측정된 체중을 기준으로 하여 각각의 군별 투여량에 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 방혈치사시킨 후 육안으로 관찰하였다.

8. 통계학적 방법

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

淸心蓮子湯을 경구 투여한 후 암·수 ICR 마우스를 14일 동안 관찰한 결과 사망동물과 LD50값은 Table 2와 같다. 본 실험에서 경구 투여의 최대용량인 5000 mg/kg 까지 투여하여도 모든 암·수 ICR 마우스의 사망은 관찰되지 않았다. 따라서 본 실험에서 LD50값은 암·수 모두 5000 mg/kg 이상으로 사료된다.

2. 체중변화

淸心蓮子湯을 경구로 단회투여한 후 체중 증감의 변화는 암컷(Fig. 1)과 수컷(Fig. 2) 모두 대조군과 시료투여군간의 유의한 차이 없이 정상적인 체중의 증가가 관찰되었다.

3. 일반증상

淸心蓮子湯을 투여한 경구 투여급성독성 시험 결과 탈모, 설사, 다뇨, 활동력 및 부종 등과 같은 일반 증상 소견 결과 암·수 ICR 마우스의 모든 투여군에서 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았다. (Table 3)

Table 2. Mortality of Male and Female ICR Mice Treated Orally with Cheongsimyeonja-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
	T1 [†]	2560	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
	T3 [§]	4000	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
Female	C	Vehicle	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
	T2	3200	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
	T4	5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

*C=Control group. [†]T1=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 2560mg/kg(day) medication group;

[‡]T2=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 3200mg/kg(day) medication group;

[§]T3=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 4000mg/kg(day) medication group;

^{||}T4=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 5000mg/kg(day) medication group.

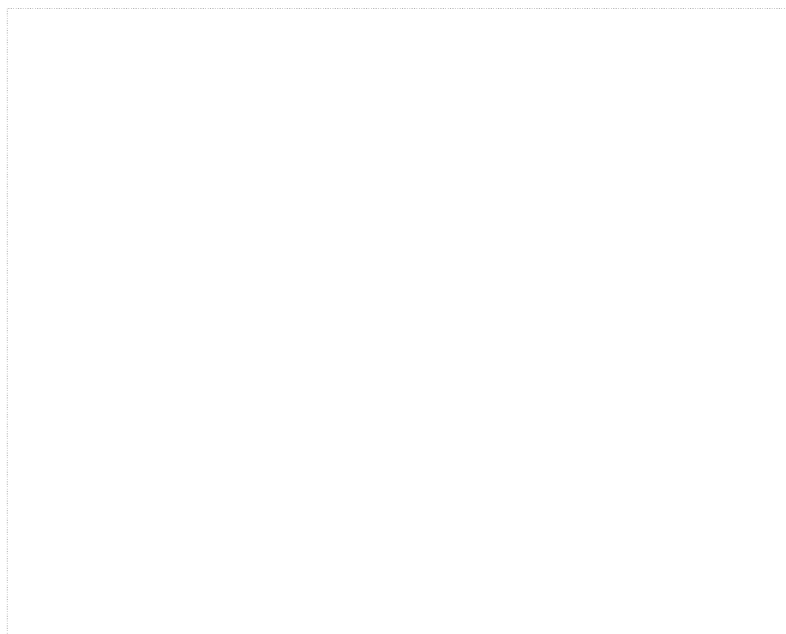


Figure 1. Mean body weight changes of male ICR mouse orally treated with Cheongsimyeonja-tang.

Cont=Control group; T1=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 2560mg/kg(day) medication group; T2=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 3200mg/kg(day) medication group; T3=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 4000mg/kg(day) medication group; T4=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 5000mg/kg(day) medication group.

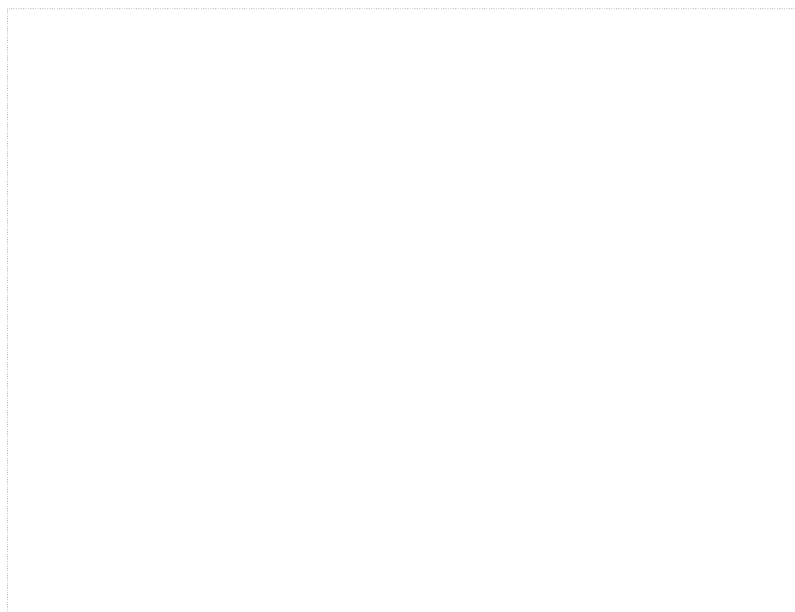


Figure 2. Mean body weight changes of female ICR mouse orally treated with Cheongsimyeonja-tang.

Cont=Control group; T1=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 2560mg/kg(day) medication group; T2=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 3200mg/kg(day) medication group; T3=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 4000mg/kg(day) medication group; T4=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 5000mg/kg(day) medication group.

Table 3. Clinical Signs in Male and Female ICR Mice Treated Orally with Cheongsimyeonja-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
	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

*C=Control group; [†]T1=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 2560mg/kg(day) medication group;

[‡]T2=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 3200mg/kg(day) medication group;

[§]T3=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 4000mg/kg(day) medication group;

^{||}T4=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 5000mg/kg(day) medication group.

Table 4. Autopsy Finding in ICR Mouse Orally Treated with Cheongsimyeonja-tang.

Dose (mg/kg)	C* (Vehicle)		T1† (2560)		T2‡ (3200)		T3§ (4000)		T4 (5000)	
Sex Organs	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
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

*C=Control group; †T1=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 2560mg/kg(day) medication group;

‡T2=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 3200mg/kg(day) medication group;

§T3=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 4000mg/kg(day) medication group;

||T4=Extraction of Cheongsimyeonja-tang 5000mg/kg(day) medication group.

4. 부검소견

부검소견에서는 암·수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 간, 신장, 폐 등과 같은 내부 장기의 육안적인 이상소견이 관찰되지 않았다. (Table 4)

IV. 考察 및 結論

본 연구는 淸心蓮子湯 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 淸心蓮子湯 투여와 관련된 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았으며 LD50값은 5000 mg/kg을 훨씬 상회할 것으로 사료된다.

체중변화에 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 淸心蓮子湯 추출 분말액의 LD50은 실험동물 마우스 암·수컷에 경구 투여가 5000 mg/kg 이상으로 저독성인 안전한 물질로 작용되는 것으로 사료된다. 또한 장기적인 투여에 의한 독성실험 뿐만 아니라 요량, 혈액학적 변화 및 조직학적 검사

등과 같은 실험도 병행되어야 할 것으로 사료된다.

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. Donguisusebowon. Seoul:Yeogang Publishing Co. 1992:271-272. (Korean)
2. Hwang SY, Lee JH, Kim HS, Bae YC, Kim KY, Won KS. Effects of Cheongsimyeonja-tang water extract on the cultured primary hippocampal cell damage by XO/HX. J of Sasang Constitutional Med. 2002;14(3): 132-145. (Korean)
3. Kim HS, Bae YC, Lee SM, Kim KY. A study of the effects of Cheongsimyeonjatang (CYT) on ECG in comparing before and after CYT medication: case study of hospitalized Tacumin patients. J of Sasang Constitutional Med. 2003;15(3):147-157. (Korean)
4. Lim JP, Ahn TK. The anti-oxidative and immune-regulatory effect of Chungsimyeonja-tang in aged rat.

- J of Sasang Constitutional Med. 2007;19(3):227-241. (Korean)
5. Kim JC, Oh SW, Song CH, Lee SH, Jeong JJ, Kim JY, et al. Case report of Chengsim Yeunja-tang (CYT) for atrial fibrillation with cerebral-infarction. J Kor Oriental Internal Med. 2006;27(3):751-761. (Korean)
6. Kim HS, Bae YC, Lee SM, Kim KY. A study of the effects of Cheongsimyeonjatang(CYT) on ECG in comparing before and after CYT medication. J of Sasang Constitutional Med. 2003;15(3):147-157. (Korean)
7. Noh HS, Kim KS. Studies on the regulatory effect of cytokine production in Taeumin patients with cerebral infarction by Cheongsimyeonjatang. J of Sasang Constitutional Med. 2000;12(2):162-170. (Korean)
8. Lee JH, Kim HS, Bae YC, Kim KY, Won KS, Hwang SY. Effects of Cheongsimyeonja-tang water extract on the cultured primary hippocampal cell damaged by XO/HX. J of Sasang Constitutional Med. 2002;14(3):132-145. (Korean)
9. Yoon HD, Shin OC, Shin YJ, Park CS, Kim SM. Effect of Chungsimyeonjatang on myocardiac cell injury in mouse myoblast C2C12 cells. J Kor Oriental Internal Med. 2007;28(2):333-345. (Korean)
10. Yoon YK, Sun TC, Jang HJ, Song WS. A clinical case of liver injury induced by Chungsim Yeonja-tang. J Oriental Internal Med. 2004;25(3):539-544. (Korean)
11. Mun BH, Kim JG. A case study of hepatitis on drug metabolism improved with Chungsimyeunjatang. J of Sasang Constitutional Med. 2003;15(1):129-132. (Korean)
12. Park SC. Effects CheongSimYeonJaTang(CSYJT) on control of immune-function in highly purified mouse B cells and mast cell. J of Sasang Constitutional Med. 2003;15(2):166-179. (Korean)
13. 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)
14. 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)
15. 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)
16. 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)
17. 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)
18. Ma JY, Huang DS, Lee SW, Kim JY, Shin HK. Acute toxicity study on Yeoldahansotang in mice. J of Sasang Constitutional Med. 2009;21(1):247-253. (Korean)