SD 랫트를 이용하여 四物湯의 아급성 독성에 관한 연구

마진열 · 유영법 · 하혜경 · 황대선 · 신현규*

한국한의학연구원

Subacute Toxicity Study on *Samul-tang* in SD Rats

Jin Yeul Ma, Young Beob Yu, Hye Kyung Ha, Dae Sun Huang, Hyun Kyoo Shin*

Korea Institute of Oriental Medicine

Samul-tang(*Siwu-tang*) has been traditionally prescribed as a restorative. The present study was undertaken to determine the possible toxic effects of *Samul-tang* on SD rats. In this study, we investigated the subacute toxicity of water-extracted *Samul-tang*(*Siwu-tang*) on SD rats. Twenty rats were orally adiministered *Samul-tang* for 28 days at a dose of 0 ㎎/kg(control group) or 1500 ㎎/kg(treated group), respectively. All of subjects was survived. No significant difference in abnormal clinical signs, related to hematological values, serum biochemical values, water and feed intake, coagulation time, autopsy analysis, organ weight, tissue microscopically, funduscopy, urine intake and urinalysis, was detected. Compared with the control group, we could not find any subacute toxic alteration in treated group (1500 ㎎/kg) for 28 days. This result suggests that *Samul-tang*(Siwu-tang), a herbal medicine prescription, is a safe prescription to body.

Key words : *Samul-tang*(*Siwu-tang*), Subacute toxicity, Safety

서 론

四物湯은 營衛氣血과 衝任脈이 虛損된 病症을 해결하는 補劑로 중국 宋代 陳師文의 『太平惠民和劑局方』에 최초로 수재된 것으로 알려져 있다. 이후 四物湯은 月經不調, 崩漏, 下血, 少腹痛, 胎動不安, 惡露不下 등 血虛 및 血不和로 인한 증세를 다스리는 대표적인 補血劑로 사용되어왔고, 金元代에 이르러서는 氣虛를 다스리는 대표처방인 四君子湯과 합하여 氣血이 모두 虛한 것을 치료하는 八物湯의 부속 처방이기도 하다.

韓醫學의 관점에서 造血작용을 하는 四物湯에 대해 보다 객관적인 효능을 확인하기 위해 다양한 효능 평가가 이루어지고 있다. 이러한 시도는 4가지 원료만으로 구성된 四物湯을 비롯하여 다른 약재를 첨가한 加味四物湯에까지 광범위하게 시도되고 있다. 四物湯의 효능 연구에는 면역기능[1-3]에 미치는 영향을 평가하기 위해 수행된 실험이 다수 있으며, 혈당[4]에 미치는 효과를 확인하기 위해 스트렙토조톡신으로 유도된 당뇨 쥐에서의 인슐린 함량 실험과 항당뇨 효과에 대한 실험이 실행되기도 하였다. 이외에도 난소가 적출된 실험동물에서의 골 대사 지표와 뇌 위축에 미치는 영향을 평가한 실험[5] 및 자궁수축력에 미치는 효과[6], 세포독성에 대한 방어작용[7], 항스트레스 효과[8], 四物湯 복용이 성장[9]에 미치는 영향 등이 연구된 바 있다.

본 연구에서는 方劑學에서 가장 기본적이고 널리 사용되는 대표적 處方 중 하나인 四物湯을 대상으로 독성과 안전성 문제에 대한 자료를 확보하기 위해 실험동물(SD, 랫트)을 이용하여 1일 임상용량의 20배 (1500 ㎎/㎏) 용량으로 4주간 반복 경구 투여하여 亞急性毒性[10]을 실험적으로 평가하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질

본 연구의 시험물질인 當歸(Angelica Gigas Root), 川芎(Cnidium Rhizome), 熟地黃(Steamed Rehmannia Root), 芍藥(Peony Root)은 생산자 및 제조자, 소매자가 명확한 韓藥材를 구입을 하여(Table 1), 전탕 추출법(한국, 경서추출기 cosmos-600)에 의한 시험 물질 조제를 실시하였다. 각 韓藥材 100 g[11]을 8000 ㎖의 증류수에 넣어 120분간 열탕 추출한 후, 건조분무기(Japan, Eyela SD-1000)를 사용하여 분말 형태로 조제하였다. 이를 투여 직전에 3차 증류수에 용해하여 실험에 공시하였다(수율 21.1%).

* 교신저자 : 신현규, 대전시 유성구 전민동 한국한의학연구원 한약제제연구부

· E-mail : hkshin@kiom.re.kr, · Tel : 042-868-9464

· 접수 : 2007/11/05 · 채택 : 2008/01/21

Table 1. Buy of Raw Material Herbs

약재명	생산자(수입자)	제조자	소매자
당귀	강원도 평창		강원 평창진부 하진부 681-1
천궁	전북 무주군 설천면 삼거리 226	전북 무주군 무주읍 가옥리 631-2 남영제약	
숙지황	전북 정읍	전북 정읍시 옹동면 칠석리 150-2 칠보 농협 옹동제약사	
작약	전남 화순	전남 화순군 능주면 백암리 871-1	전남 화순군 화순읍 교리 243-5 전남생약농업협동조합

2. 실험동물 및 사육환경

흰쥐 수컷 (오리엔트, 서울시 금천구 가산동 459-24) 4주령을 사용하였다. 동물입수 시, 외관을 육안으로 검사한 후, 7일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키고 그 중 건강한 동물을 골라 실험에 사용하였다. 순화 기간 중, 일반 임상증상을 관찰하여 건강한 동물을 20마리씩 선정하여 체중범위에 따른 무작위법에 의하여 군분리를 실시한 후, 본 실험에 사용하였다. 순화 및 실험기간 동안의 사육환경은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수는 시간당 12~16회, 조명은 12시간 명암주기(점등 7:00, 소등 19:00), 조도는 150~300 Lx로 조정하여 일정한 사육환경 조건을 유지하였다. 그리고 실험동물용 고형사료(삼양사료주식회사)와 물은 자유섭취 조건으로 하였다.

3. 실험군 및 韓藥材투여

급성독성 실험시 고농도(5000 ㎎/kg/day)군에서 아무런 임상증상이 관찰되지 않았으므로, 본 실험에서는 아급성 경구독성을 평가하기 위하여 임상 1일 복용용량의 20배인 1500 ㎎/kg/day으로 투여량을 설정하였다(Table 2). 투여 경로는 韓方임상에서 가장 널리 이용되고 있는 경구 투여법을 사용하였다.

Table 2. Experimental Groups

Group	Number of animal	Volume	Dose (㎎/㎏/day)
Control	10	10	0
Treatment	10	10	1500

4. 임상증상 및 부검

임상 증상은 투여기간(1일 1회) 동안의 일반증상 관찰법에 의하여 조사되었다(Hayes, 1984). 모든 동물에 대하여 매주 체중변화 및 사료음수 섭취량을 관찰하였으며, 실험 4주차에 뇨검사, 안저검사 등을 실시하였다. 실험 종료 후, 에테르로 마취하여 후대정맥에서 채혈후 혈구검사, 혈액 생화학검사 등을 분석하였다.

5. 통계처리

대조군과 투여군 사이의 통계학적 유의차는 Dunnett test에 의하여 평균과 표준편차를 구하고 통계처리(*$p<0.05$, **$p<0.01$)하였다.

결 과

1. 치사율

시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.

2. 임상 증상

임상용량의 20배인 사물탕 4주간 연속경구투여에 의한, 어떠한 독성증상도 관찰되지 않았다.

3. 체중 변화

Fig. 1에 나타난 것과 같이 사물탕 투여에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

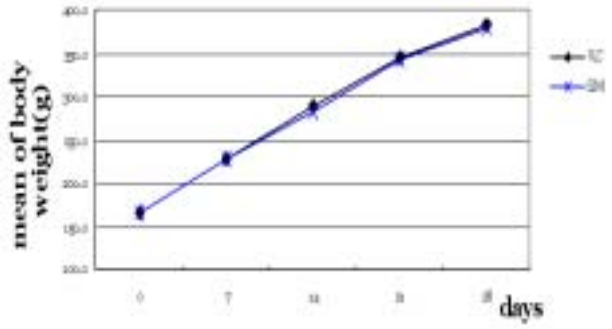

Fig. 1. Mean body weight changes of rat orally treated with herbal prescriptions for 4 weeks. V.C; Vehicle control group, S.M; *Samul-tang* group.

4. 부검 소견

실험 종료시 모든 동물의 장기에 대하여 육안적으로 관찰하였으나, 이상 병변은 관찰되지 않았다.

5. 혈구검사

팔물탕 4주간 연속경구 투여 후, 혈구검사에서는 모두 정상범위내의 수치로 분석되었다(Table 3).

6. 혈액 생화학검사

사물탕의 열수추출액 28일 연속경구 투여 시, 혈액생화학적 변화는 관찰되지 않았다(Table 4).

Table 3. Hematological values of male rats orally treated with *Samul-tang*.

Tested Unit	WBC x1000	#LYM %	#MO %	#NE %	#EO %	#BA %	RBC x10^6	HGB g/dl	HCT %	MCV f1	MCH pg	MCHC g/dl	PLT x1000
Group : V.C(0 ㎎/㎏/day)													
Mean	17.96	82.71	3.34	10.18	0.98	2.78	7.52	15.34	40.57	53.97	20.43	37.83	1061.3
SD	4.82	5.68	1.64	4.51	0.49	0.78	0.25	0.52	1.30	1.48	0.51	0.57	135.6
Group : S.M(1500 ㎎/㎏/day)													
Mean	15.94	81.74	3.40	11.39	0.85	2.63	7.33	15.09	39.76	54.25	20.59	37.96	990.4
SD	3.56	10.67	2.16	8.37	0.24	0.51	0.23	0.52	1.14	1.52	0.59	0.5	156

All hematological values were measured at 4 weeks treatment of herbal prescriptions, V.C; Vehicle control group, S.M; Extraction of Samul-tang group. a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Statistically significantly different from vehicle control group.

Table 4. Serum biochemical values of rats orally treated with *Samul-tang*.

Tested Unit	AST(IU/l) SD	ALT(IU/l) SD	ALP(IU/l) SD	BUN(㎎/dℓ) SD	CRE(㎎/dℓ) SD	CPK(IU/l) SD	GLU(㎎/dℓ) SD	CHO(㎎/dℓ) SD
Group : V.C(0 ㎎/㎏/day)								
Mean SD	139.8[a] (44.3)[b]	36.38 (9.06)	185.38 (49.38)	16.47 (1.82)	0.42 (0.02)	375.07 (237.66)	144.33 (17.67)	70.05 (19.47)
Group : S.M(1500 ㎎/㎏/day)								
Mean SD	134.46 (31.36)	29.82 (3.16)	165.26 (29.74)	16.56 (2.66)	0.41 (0.02)	390.09 (182.34)	132.02 (15.83)	58.42 (14.81)
Tested Unit	TG(㎎/dℓ) SD	PRO(g/dℓ) SD	ALB(g/dℓ) SD	A/G(㎎/dℓ) SD	T-BIL(㎎/dℓ) SD	Ca(㎎/dℓ) SD	IP(㎎/dℓ) SD	Na(nmol/l) SD
Group : V.C(0 ㎎/㎏/day)								
Mean SD	56.60 (20.71)	6.01 (0.22)	3.15 (0.12)	1.11 (0.05)	0.13 (0.01)	9.40 (0.27)	8.82 (0.56)	143.1 (0.99)
Group : S.M(1500 ㎎/㎏/day)								
Mean SD	49.53 (12.86)	5.84 (0.24)	3.09 (0.13)	1.12 (0.03)	0.16 (0.01)	9.00 (0.35)	8.88 (0.94)	142.1 (0.99)

Serum biochemical values at 28 days after treatment of herbal prescriptions, V.C; Vehicle control group, S.M; Extraction of Samul-tang group. a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Statistically significantly different from vehicle control group.

7. 음수 및 사료 섭취량

음수 및 사료 섭취량의 변화는 관찰되지 않았다.

8. 혈액응고 시간

시험물질 사물탕은 혈액응고 기전에 관련된 PT 및 aPTT 인자에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

9. 장기무게의 변화

사물탕 28일 연속 경구투여 후, 상대적 장기 무게의 변화는 신장에서 유의성($p<0.05$) 있게 증가되었다(Table 5).

Table 5. Relative organ weight of rats orally treated with herbal prescriptions.

Sex	Male	
Group	V.C	S.M
Dose(㎎/㎏)	0	1500
No. of animal	10	10
Body weight(g)	350.6[a] (32.0)[b]	347.7 (27.4)
Pituitary gland	0.0030 (0.0005)	0.0030 (0.0004)
Brain	0.59 (0.14)	0.56 (0.04)
Lung	0.42 (0.03)	0.42 (0.03)
Heart	0.37 (0.03)	0.38 (0.03)
Liver	3.05 (0.13)	3.14 (0.17)
Spleen	0.20 (0.02)	0.19 (0.02)
Thymus	0.16 (0.04)	0.16 (0.03)
adrenal gland left	0.0091 (0.0009)	0.0085 (0.0007)
adrenal gland right	0.0082 (0.0008)	0.0087 (0.0010)
Kidney left	0.39 (0.03)	0.42* (0.04)
Kidney right	0.39 (0.02)	0.42* (0.03)
Testis left	0.44 (0.04)	0.42 (0.09)
Testis right	0.47 (0.13)	0.45 (0.04)

Relative organ weight at 28 days after treatment of herbal prescriptions, a ; Values were expressed as mean, b ; ±S.D., Statistically significantly different from vehicle control group(*$p<0.05$)

10. 장기조직 변화(Fig. 2-3, Table 6)

한약 복합처방 사물탕 4주간 독성시험에서 용매대조군의 경우, 부신에서는 피질공포형성(Cortical vacuolation)이 1/10 례에서 관찰되었고 뇌하수체는 낭포형성(Cyst formation)이 1/10 례에서 관찰되었다. 신장에서는 만성경색(Chronic renal infarct)이 1/10 례에서 나타났다. 그 외에 폐장에서는 간질성 폐렴(Interstitial pneumonia)이 4/10 례와 출혈성 폐포염(Hemorrhagic alveolitis)이 1/10 례에서 각각 관찰되었다. 사물탕 처리시 부신에서는 피질공포 형성이 4/10 례에서 관찰되었고 간장에서는 다발국소성 간염(Multifocal hepatitis)이 1/10 례에서 관찰되었다. 갑상선에서는 아가미끝소체(Ultimobranchial cyst)가 1/10 례에서 나타났다. 전립선에서는 전립선염(Prostatitis)이 1/10 례에서 관찰되었고 폐장에서는 간질성 폐렴이 6/10 례에서 관찰되었다.

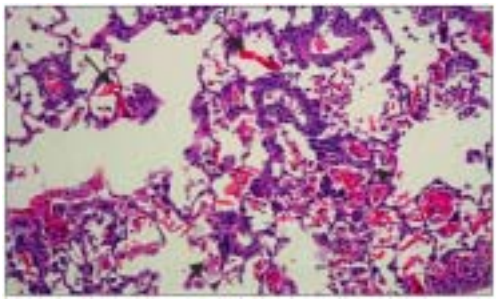

Fig. 2. Focal hemorrhagic alveolitis. Note scattered of hematoidin crystal (arrows) and erythrophages in the alveolar spaces (arrowheads). H&E. x200.

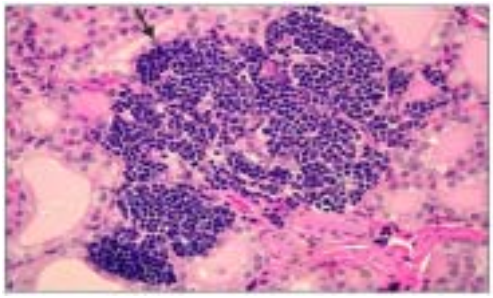

Fig. 3. Focal lymphoid cell infiltration in the thyroid gland (arrow). H&E.x400.

Table 6. Incidence of non-neoplastic microscopic in rats orally treated with herbal prescriptions.

Variable	\ Sex	Male	
	\ Group	V.C	S.M
	\ Dose(㎎/㎏)	0	1500
	\ No. of animal	10	10
Hypophysis	cyst formation	1	0
Thyroid gland	Ultimobranchial cyst	0	1
Liver	Multifocal hepatitis	0	1
Adrenal gland	Cortical vacuolation	1	4
Kidney	Choronic renal infarct	1	0
Lung	Interstitial pneumonia	4	6
	Hemorrhagic alveolitis	1[f.2)]	0
Prostate gland	Focal lymphoid cell infiltration	0	1[f.3)]

V.C; Vehicle control group, S.M; Extraction of Samul-tang group.

11. 안저검사

시험물질 투여 4주후 안저 촬영시, 시험물질 투여와 관련된 이상 소견은 관찰되지 않았다.

12. 뇨검사

사물탕 4주 연속경구 투여 후, 신선뇨 및 24시간 뇨량을 채뇨하여 뇨 분석기를 통하여 분석하였다. 그 결과 시험물질에 의한 뇨량 및 요의 화학적 변화는 나타나지 않았다(Table 7).

Table 7. Urinalysis in rats orally treated herbal prescriptions subacute toxicity.

Parameter	\Sex	Male			
	\Urine	Fresh		24 hour Urine	
	\Group	V.C	S.M	V.C	S.M
	\Dose(㎎/㎏)	0	1500	0	1500
	\No. of animal	5	5		5
Glucose (g/dl)		Trace	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
Bilirubin		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
Ketone body (mg/dl)		-	+(1)	-	Trace
		-	Trace	Trace	+(1)
		Trace	Trace	Trace	Trace
		Trace	Trace	+(1)	Trace
		+(1)	Trace	Trace	+(1)
Gravity		1.025	1.010	1.020	≧1.030
		1.015	1.010	1.020	1.025
		1.025	1.025	1.025	1.025
		1.025	1.015	≧1.030	1.020
		≧1.030	1.020	1.025	≧1.030
pH		8.0	≧9.0	8.5	8.0
		8.0	8.5	8.5	8.5
		8.0	8.5	8.0	8.5
		8.0	8.5	8.0	8.0
		8.0	8.5	8.0	8.0
Protein (mg/dl)		-	+(1)	+(2)	+(1)
		-	+(1)	+(2)	+(2)
		+(2)	+(2)	+(2)	+(1)
		+(1)	Trace	+(1)	+(1)
		+(2)	+(2)	+(1)	+(2)
Urobilinogen (Ehrilich unit/dl)		0.2	0.2	0.2	0.2
		0.2	0.2	0.2	1.0
		0.2	0.2	0.2	1.0
		0.2	0.2	0.2	0.2
		0.2	1.0	0.2	1.0
Nitrite		-	-	-	+
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	+
		-	-	-	-
Occult Blood		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	+(1)	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
WBC		-	Trace	-	Trace
		+(1)	-	Trace	Trace
		Trace	-	Trace	-
		+(1)	Trace	-	Trace
		-	Trace	-	-

고 찰

四物湯 추출분말 28일간 연속 경구투여에 의한 아급성 독성 및 안전성을 조사하기 위하여, SD 계통의 랫트 수컷에 四物湯 임상복용 1일 용량의 20배(1500 ㎎/kg/day)의 용량으로 각 10마리씩 4주간 경구투여하고 사망동물, 일반증상, 체중변화, 혈액검사, 생화학검사, 음수 및 사료섭취량, 혈액응고시간, 부검소견, 병리조직검사, 장기무게 변화, 안구촬영 및 뇨검사 등을 분석하여 四物湯의 독성정도을 판단하였다. 이와 같이 실험한 결과 시험기간 중 사망동물, 부검소견 및 시험물질 투여와 관련된 일반 독성증상은 관찰되지 않았다. 분석항목인 체중변화, 혈구분석, 음수 및 사료섭취량, 혈액생화학적 변화, 혈액응고와 관련된 지표, 24시간 뇨량 및 뇨의 성분변화 등에도 이상 변화가 관찰되지 않았다. 용매대조군과 四物湯에서 나타난 병리조직소견은(Table 6), 자연에서 발생할 수 있는 병변[12-14]으로 시험물질과는 무관하게 나타난 것으로 사료된다. 또한 상대적 장기 무게의 변화는 신장에서 유의성($p<0.05$) 있게 증가되었으나 정상 범위내의 변화로 사료된다.

이상의 실험 결과에서, 수컷 랫드에 한방처방 四物湯湯 추출분말 4주간 연속 경구투여 시, 용매대조군에 비해 시험물질 투여군에서 다른 특별한 毒性症狀이 나타나지 않았으므로 본 시험물질 四物湯은 랫트에서 無毒하게 작용하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 조무상, 이봉교. 사물탕의 계절별 배미, 가미가 체중변화 및 면역기능에 미치는 실험적 연구. 동서의학, 4: 41-66, 1990.
2. 김성훈. 사군자탕, 사물탕 및 팔물탕이 prednisolone으로 유발된 생쥐의 면역반응저하에 미치는 영향. 대한동의병리학회지 1: 42-59, 1978.
3. 김길수. 월국환합 사물탕이 전기자극 스트레스를 받는 Mouse의 면역기능에 미치는 영향. 동국대학교 대학원 석사

학위논문, 2000.
4. 장세환. 가미사물탕이 당뇨에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대구한의과대학 박사학위논문, 1990.
5. 김기옥. 사물탕과 사물탕가지모황백이 난소적출 흰쥐의 17β-Estradiol, 골대사 지표 및 뇌위축에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사학위논문, 2002.
6. 김양호. 사군자탕, 사물탕 및 팔물탕이 백서 자궁근의 수축력과 자발운동에 미치는 영향. 원광대학교 대학원 석사학위논문, 1992.
7. 김도환. Nitric Oxide에 의해 유발된 C6 glial 세포독성에 대한 사물탕의 방어효과. 원광대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
8. 김도순. 육미지황탕, 사물탕, 사군자탕의 항stress 효과에 관한 실험적 비교 연구. 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1995.
9. 배종국. 사군자탕과 사물탕 Extract 투여가 rat의 성장에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1978.
10. Hayes, A.W. Principles and Methods of Toxicology, New York, Raven press, pp 17-19, 1984.
11. 이경구, 황대선, 유영법, 마진열, 하혜경, 신현규. 사군자탕, 사물탕, 팔물탕 및 십전대보탕의 처방 구성 및 용량 용법에 관한 연구. 대한한의학원전학회, pp 219-226, 2006.
12. 강진석, 남기택, 박인승, 안병우, 양기화, 윤창용, 이국경, 장동덕, 제정환, 홍충만. 독성병리학 도감, pp 80-81, 2001.
13. Ewell, M.R. and Mahler, J.F. Have you seen this, Inflammatory lesions in the lungs of rats, Toxicology and Pathology, 125(5):529-531, 1997.
14. Slaoui M., Dreef H.C. Inflammatory lesions in the lungs of wistar rats, Toxicology and Pathology, 26(5):712-713, 1998.