

LMK02의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4 주간 반복 경구투여 DRF 독성시험

류영수 · 김지훤 · 박현제¹ · 이경희² · 이종화² · 강형원*

원광대학교 한의과대학 한방신경정신과교실, 1: 유한양행 중앙연구소 천연물신약유통, 2: 원광대학교 산본병원 소아과학교실

4 Weeks Repeated Oral Dose Toxicity Studies with LMK02-Jangwonhwan in SD Rats

Yeoung Su Lyu, Ji Hwon Kim, Hyun Je Park¹, Kyung Hee Yi², Jong Hwa Lee², Hyung Won Kang*

Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,

1: Herbal Medicines Unit, Yuhan Research Institute,

2: Department of Pediatrics, College of Medicine, Wonkwang University, Sanbon Medical Center

The oriental medicine Jangwonhwan, which is a boiled extract of 12 medicinal herbs/mushroom, has been prescribed for patients with cognitive dysfunction and it is originally from the Korean medical text, DonguiBogam(amenia chapter). Recently, a modified recipe of Jangwonhwan (LMK02-Jangwonhwan) consisting of seven medicinal plants/mushroom, was shown to reduce β -amyloid deposition in the brain of Tg-APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. The toxicity of LMK02 was investigated in SD rats by oral repeated administration for 4 weeks and we tried to determine test doses for 13 weeks repeated study. Quality control of tablet form of LMK02 was established by estimating indicative components, Ginsenoside Rg3 of Red Ginseng and Decursin of Angelicagigas Nakai. The toxicity of LMK02 was investigated in 6 weeks old specific pathogen free (SPF) Sprague-Dawley rats by oral administration. Each test group were consist of 5 male and 5 female and they received doses of 500, 1,000 and 2,000 mg/kg/day of test substance for 4 weeks. The clinical signs, death rate, body weight, food consumption, ophthalmic examination, urinalysis, hematological and serum biochemistry, organ weight and pathological changes were examined and compared with those of control group. Urinalysis : We observed increase of PRO($p<0.01$), SG($p<0.01$) in female rats of 1,000 mg/kg/day and 2,000 mg/kg/day($p<0.01$). Also, we observed increase of pH and KET in female rats of 1,000 mg/kg/day($p<0.05$) and of 2,000 mg/kg/day($p<0.01$). WBC in female rats in 1,000 mg/kg/day and 2,000 mg/kg/day were on increase. Hematological test : We observed increase of MCV in male rats of 250 mg/kg/day. ($p<0.05$) Serum biochemistry test : We found increase of CHO in female rats of 2,000 mg/kg/day($p<0.05$). During the experimental period, there were no animals dead or moribund. There were no treatment related changes of general symptom, food and water consumption, organ weight and autopsy According to the results of 4-week repeated dose range finding study, the highest dose was established as 1000 mg/kg for 13-week repeated dose toxicity study and we determined to put 2 more groups by common ratio two.

Key words : oriental medicine, Alzheimer disease, LMK02-Jangwonhwan, toxicity test

서 론

알츠하이머형 치매(Alzheimer's disease, AD)는 대뇌피질을

* 교신저자 : 강형원, 군포시 산본동 1126-1 산본한방병원 신경정신과

· E-mail : dskhw@wonkwang.ac.kr, · Tel : 031-390-2762

· 접수 : 2010/10/18 · 수정 : 2010/11/26 · 채택 : 2010/12/01

침범하는 신경계 퇴행성질환으로서, 병리기전에 대한 주된 가설은 β -amyloid 증폭가설이다¹⁾. 즉 아밀로이드 전구단백질인 APP(amyloid precursor protein)의 비정상적 대사가 β -amyloid 축적으로 이어져 노인반(senile plaque)이 형성되고 신경세포 내에서는 tau 단백질이 실타래처럼 엉켜있는 신경섬유농축체가 형성되는데, 이러한 독성 단백질이 신경세포의 사멸을 일으켜 치매에

이르게 된다는 것이다^{2,3}). 이외에도 치매환자의 뇌에서는 기억과 학습에 관련된 인자인 P-CREB와 calbindin(CB)의 감소가 나타나고^{4,6}), 지방산화수치가 증가하는⁷) 등 세포와 분자 기능상의 다양한 변화가 나타난다.

따라서 Aβ생성 억제, Aβ제거 활성화, 항산화능 보충과 같이 병리 과정을 억제하는 전략이 알츠하이머병의 치료 가능성을 가지고 있음이 증명되어 왔다^{8,9}). 하지만 아직까지 효과가 입증된 질병경과변형치료법(disease modifying therapy)이 없는 상황이며, 그 약효 또한 제한적인 것이 현실이다¹¹).

최근 한의학계에서는 AD 치료제로서의 한약에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데, 특히 『東醫寶鑑·神門』¹⁰)에서 건망증에 활용되던 壯元丸 處方에서 시작하여 실험과 임상적 선별 과정을 거쳐 紅蔘, 當歸 등의 7가지로 구성된 補腎益氣醒腦 효능의 LMK02에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 壯元丸 加減方인 LMK02의 품질규격화는 처방구성약물 중 홍삼의 Ginsenoside Rg3와 당귀의 총데쿠르신을 지표물질로 설정하였으며¹¹), 유효성 평가에서는 알츠하이머병 마우스모델인 Tg-APP^{swe}/PS1^{dE9} 유전자 형질전환 생쥐의 뇌에서 Aβ의 양과 plaque 침착 그리고 지방산화수치를 현저하게 감소시켰으며, 뇌해마에서 phospho-CREB 수치와 calbindin 수치를 유의미하게 증가시켰다. 또한 H₂O₂와 Aβ(1-42)로 유발된 신경독성에서 LMK02가 농도의존적으로 세포생존율을 유의성 있게 높였고, 특히 항산화 효과가 뛰어난 것으로 알려진 Vitamin C, Trolox 보다 더 세포생존율이 높은 것으로 보고하였다¹²).

또한 LMK02의 안전성에 대한 연구 일환으로 의약품등의 품목허가·신고·심사 규정(2009.6.30 식품의약품안전청 고시 제 2009-42호)에 따라¹³⁻¹⁵) 단회독성 평가를 한 결과, 최소치사량(MLD : Minimum Lethal Dose)은 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 나타났다¹⁶).

이제 저자는 특정병원균 부재(SPF) Sprague-Dawley 계통의 랫드에 4 주간 반복 경구투여하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 파악하고, 13 주 반복 경구투여 독성시험의 용량을 정하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 시험동물 및 사육환경

본 시험에서는 특정병원체부재(specific pathogen-free SPF) HsdKoaat Sprague Dawley 랫드를 코아텍(경기도 평택)으로부터 구입하여 사용하였다. 성 성숙이 완료된 5주령의 암수를 입수한 후 1주일간 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판단되는 랫드를 선발하여 시험에 공시하였다.

동물실의 사육환경은 온도 23±3℃, 상대습도 55±15%, 환기 횟수 10~20회/hr, 조명시간 12시간(오전 8시 점등~오후 8시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정한 시설에서 수행하였다. 검역, 순화 및 투여, 관찰기간 중 동물은 적량의 깔개를 담은 폴리카보네이트 사육상자(W 235 x L 380 x H 175 mm) 에서 2마리씩 수용하여, 균일한 조건을 유지하였다.

시험기간 중 실험동물용 사료(Harian Co. Ltd., USA, 폴라스 인터내셔널 공급)와 자외선 살균기 및 미세 여과장치로 소독한 수질 검사 결과 '먹는물수질기준'에 적합한 지하수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 실험에 사용된 모든 동물은 (주)캠온의 동물실험윤리규정을 준수하여 실시하였다.

2. 시험물질 및 투여절차

1) 시험물질

본 실험에 사용한 LMK02의 처방에 사용된 약제는 유일제약(주)에서 최상품으로 인정된 약제를 엄선하여 한풍제약(주)에서 다음과 같은 제조공정을 걸쳐 얻은 건조엑스 95 g를 사용 전 -80℃에 보관하여 3차 증류수로 1 mg/mL 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

(1) LMK02 단미 총 312 g를 정선하여 약전통치 중 질도 및 분말도에 따라 조절로 하고

(2) 추출기에 넣은 다음

(3) 정제수(약전) 약2.5 L 가량 넣고

(4) 95~100℃에서 3시간 가온 추출한 후

(5) 25 μm필터를 사용하여 여과하고 여액을 농축기를 이용하여 50~60℃에서 감압 농축한다.

(6) 한약 잔류물에 (3)~(6) 과정을 1회 반복하여 농축액을 전부 합한다.

(7) 합한 농축액을 건조기에 넣고 60℃이하에서 건조한다.

(8) 건조물을 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분말화한다.

(9) 건조엑스 95 g를 얻는다(수득률 약 30.4%).

2) 투여절차

시험물질의 조제본 시험물질은 생약추출물로서 습기에 약하므로 데시케이터에 보관하였으며, 순도에 대한 보정 없이 증량 그대로를 조제에 사용하였다.

먼저 시험물질을 칭량한 후 부형제에 현탁하여 고용량군 투여액을 조제하였으며, 중간용량군 및 저용량군에 투여할 시험물질은 먼저 조제한 고용량군 투여액을 동일한 부형제로 단계별 희석하여 조제하였으며, 투여 직전에 매일 조제하였다. 시험물질의 투여는 경구투여용 존대를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 1회/일, 7회/주, 4주간 반복 경구투여 하였다.

투여액량은 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 하여 10 ml/kg/day로 계산하였으며, 부형제대조군 동물은 멸균증류수만을 투여하였다. 관찰 및 검사 항목으로는 사망률, 일반증상, 체중 변화, 사료 및 물섭취량, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학 검사, 부검조건, 장기중량이다.

3. 방법

1) 시험군의 구성

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하고, 평균 체중에 가까운 동물들을 암수 각각 25마리씩 선택하여, 선택한 동물들은 순위화한 체중에 따라 '시험군의 구성'표에 지정된 수가 되도록 하였다. '시험군의 구성'표에 따른 군 분리 후 잔여동물은 연습동물로 사용하였다.

군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (ml/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)
G1 ^{a)}	M / F	5 / 5	1~5 / 26~30	10	0
G2	M / F	5 / 5	6~10 / 31~35	10	250
G3	M / F	5 / 5	11~15 / 36~40	10	500
G4	M / F	5 / 5	16~20 / 41~45	10	1,000
G5	M / F	5 / 5	21~25 / 46~50	10	2,000

a) Vehicle control (평균주사용수)

2) 투여용량의 설정

본 시험의 용량을 설정하기 위해 본 시험물질을 이용하여 Up & Down 법(UDP)으로 실시한 단회 경구투여 독성시험에서 5,000 mg/10 ml/kg 용량으로 암컷 3 마리에 투여한 결과, 사망이나 특이소견이 관찰되지 않았다. 따라서, OECD 가이드라인에서는 반복 경구투여 독성시험 한계용량을 1,000 mg/kg/day으로 권장하고 있으나, 본 시험물질이 생략성분이므로 독성이 적을 것으로 예상되어 2,000 mg/kg/day를 고용량으로 하고, 1,000, 500, 250 mg/kg/day 군을 두었으며, 평균주사용수를 투여하는 부형 제대조군을 두었다.

3) 일반증상관찰

투여 및 관찰기간동안에는 전 동물에 대하여 매일 1 회씩 동물의 일반상태, 증독증상 및 사망유무에 대해서 관찰하였고, 이상이 있으면 증상의 종류, 발현일과 시각, 지속시간, 증상의 정도를 개체별로 기록하였다.

4) 사료섭취량의 산출

사료섭취량 산출은 투여 개시일과 시험기간 중 주 1 회 실시하였으며, 그 방법은 사료를 정량급여한 후, 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하였고, 마리당 평균섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다.

5) 물섭취량 산정

물섭취량 측정은 사료섭취량 측정과 같은 주기로 실시하였으며, 물을 정량급여한 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하는 방법으로 산정하였다. 물섭취량은 마리당 평균섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다.

6) 요검사

투여 마지막 주에 군당 5 마리를 대사 케이지에 수용하여 3 ~4 시간동안 체뇨한 신선뇨 중 약 1 ml를 취하여 다음 항목을 검사하였으며, 24 시간의 요량을 측정하였다.

(1) 일반검사

약 0.3 ml의 요를 요검사용 시험지(Multistix 10SG, SIEMENS, USA)에 묻힌 후, 요자동분석기(CliniTek 100, SIEMENS, USA)를 이용하여 아래의 항목을 측정하였다. 요당(glucose), 빌리루빈(bilirubin), 케톤체(ketone body), 요비중(specific gravity), 잠혈(occult blood), pH, 요단백(protein), 유로빌리노겐(urobilinogen), 아질산염(nitrite) 및 백혈구(leukocyte)

(2) 요색조 검사

동물실에서 관찰한 결과를 요자동분석기에 입력하였다.

(3) 요침사 검사

일반검사 후 남은 약 0.7 ml의 요를 1,500 rpm (408 RCF)으로 5 분간 원심분리(MF300, Hanil, Korea)한 후, 그 침전물을

S.M (Sternheimer-Malbin)법으로 염색한 다음, 현미경으로 관찰하여 적혈구, 백혈구, 상피세포 및 원주(cast)를 관찰하였다.

7) 부검

부검 전날 절식한 계획부검 동물에 대하여 부검 당일에 Ether로 흡입마취하여, 마취가 확인되면 개복하여 후대정맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 그 후 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈/치사시킨 다음, 체표, 피하, 두부, 흉강 및 복강의 모든 장기에 대해 부검조건을 관찰하여 부검조건기록지에 기록하고, 장기중량 측정 및 조직 고정을 실시하였다.

8) 혈액학적 검사

부검시 채혈한 혈액 일부를 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle(Vacutainer 3 ml, BD, USA)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)로 다음 항목을 측정하였다.

9) 혈액생화학적 검사

부검시 채혈한 혈액 일부를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube (IMPROVE, IMPROVE, Germany)에 주입하고 15~20 분간 상온에 방치하여 응고시킨 후, 3,000 rpm (1,630 RCF)으로 10 분간 원심분리(MF300, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(AU400, Olympus, Japan)를 활용하여 아래 항목에 대하여 측정하였으며, 전해질은 전해질 분석기(RAPIDCHEM 744 Na⁺/K⁺/Cl⁻ Analyzer, SIEMENS, USA)로 측정하였다. 주요 검사항목으로는 Aspartate aminotransferase(AST), Alanine aminotransferase(ALT), Alkaline phosphatase(ALP), Blood urea nitrogen(BUN), Creatinine(CRE), Glucose(GLU), Total cholesterol(CHO), Total protein(PRO), Creatine phosphokinase(CPK), Albumin(ALB), Total bilirubin(BIL), Triglyceride(TG), Inorganic phosphorus(IP), Calcium ion(Ca²⁺), Albumin/Globulin ratio(A/G ratio), Sodium ion(Na⁺), Potassium ion(K⁺), Chloride ion(Cl⁻) 등이다.

10) 장기중량 측정

부검시 아래의 장기를 적출한 후 전자저울을 이용하여 난소, 부신, 뇌하수체, 가슴샘, 전립샘, 고환, 부고환, 비장, 신장, 심장, 폐, 뇌 및 간장의 중량을 측정하였다.

11) 기관 및 조직의 보존

모든 동물의 아래 장기는 10% 중성완충포르말린용액에 고정되되, 안구는 Davidson's 용액에, 고환과 부고환은 Bouin's 액에 고정하였다.

고환, 부고환, 정낭, 전립샘, 난소, 자궁, 질, 방광, 비장, 위, 췌장, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 장간막립프절, 부신, 신장, 간장, 골격근, 좌골신경, 대퇴골, 턱밑립프절, 침샘, 흉골, 가슴샘, 심장, 폐, 대동맥, 흉척수, 혀, 기관, 식도, 갑상샘, 안구, 뇌, 뇌하수체, 피부(젓샘)

4. 통계학적 분석

본 시험에서의 반수치사량(LD50)은 AOT425StatPgm 전산프

로그랩¹⁷⁾을 이용하여 산출하였다.

결 과

1. 사망

시험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았다.

2. 일반증상

부형제 대조군 및 250 mg/kg/day 투여군 수컷에서 투여 후 22 일째에 유연(salivation)이 각 1 레 관찰되었다. 부형제 대조군 암컷 1 마리에서 투여 후 5~15 일간 탈모(loss of fur)가 관찰되었으나, 빈도가 낮았을 뿐 아니라 용량상관성이 없어 시험물질 투여에 의한 변화로 판단되지 않았다.

3. 체중, 사료섭취량

모든 군에서의 결과가 비슷하였다(Table 2, 3).

4. 물섭취량

500 mg/kg/day 투여군 암컷에서 투여당일의 물섭취량이 부형제대조군에 비해 증가하였으나(p<0.05), 용량상관성이 없었다(Table 4).

Table 1. Results of 4-weeks repeated oral Toxicity DRF Study on LMK02 in Rats

TEST ITEMS		MALE				FEMALE			
		G2	G3	G4	G5	G2	G3	G4	G5
		250	500	1000	2000	250	500	1000	2000
W.C	W 0								
	W 1					<			
Urinalysis	SG	≥	≥					>>	>>
	pH				≤			<	<<
	WBC	≥	≥		≥	≤		≤	≤
	KET		≤		≤				<
	PRO				≤	≤		>>	>>
	OB	≤	≤						
	NIT				≤				
HEM./BIOCHEM.	MCV	>							
	ALP								≤
	CHO			<	≤	≤		≤	<
	PRO								≤
	CPK				≥	≥		≤	
A/G				≥	≥				
ORG	Spleen							<	<
	Spleen%							≤	≤

>>>: Representsignificantdecreasefromvehiclecontrolgroupat0.05/0.01levels. (≥: Tendency to decrease) <<< Representsignificantincreasefromvehiclecontrolgroupat0.05/0.01levels.(≤: Tendency to increase) GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, OB:Occultblood, WBC: Leukocyte, MCV: Mean corpuscular volume, CHO: Total cholesterol

Table 2. Body weight changes of male and female rats

WEEKS	BODY WEIGHT CHANGES (g)									
	GROUPS (mg/kg/day) MALE					GROUPS (mg/kg/day) FEMALE				
	G1(0)	G2 (250)	G3 (500)	G4 (1,000)	G5 (2,000)	G1 (0)	G2 (250)	G3 (500)	G4 (1,000)	G5 (2,000)
0	181.62± 3.48	180.57±4.28	181.87±3.29	182.06±3.99	182.65±10.25	148.10±3.79	146.56±2.04	144.92±4.49	145.66±2.84	144.26±5.11
1	237.24±6.92	235.52±5.30	233.94±3.65	236.36±9.41	238.33±15.89	166.99±6.62	170.92±3.66	165.89±9.01	166.00±1.40	165.07±7.92
2	289.79±15.00	285.17±7.48	285.69±10.25	292.96±9.96	294.13±18.39	190.83±10.76	195.59±3.78	191.47±11.70	190.96±3.40	186.36±9.70
3	323.90±21.78	319.99±8.13	318.90±13.56	330.15±13.14	333.43±23.99	201.88±11.00	209.53±9.76	207.06±13.68	206.77±5.81	201.40±9.05
4	349.82±29.41	342.46±10.95	347.48±21.11	359.22±16.42	360.38±28.81	217.50±13.66	223.09±5.14	219.83±15.26	219.15±6.90	216.90±14.04
Weight gains ^{a)}	168.21±27.46	161.89±8.18	165.61±20.76	177.16±12.79	177.73±19.90	69.40±13.31	76.53±6.07	74.91±12.15	73.49±9.64	72.65±9.67
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

a) Weight gains are body weight difference between week 4 and the 1st dosed day.

Table 3. Food consumptions of male and female rats

WEEKS	FOOD CONSUMPTIONS (g)									
	GROUPS (mg/kg/day) MALE					GROUPS (mg/kg/day) FEMALE				
	G1 (0)	G2 (250)	G3 (500)	G4 (1,000)	G5 (2,000)	G1 (0)	G2 (250)	G3 (500)	G4 (1,000)	G5 (2,000)
0	23.26±2.28	23.12±1.38	22.41±1.19	22.88±1.13	23.82±0.29	14.95±0.14	16.63±0.91	16.19±1.02	16.97±0.96	13.98±1.77
1	23.91±0.25	24.39±1.70	22.72±0.47	23.56±0.98	24.01±0.38	17.31±0.77	17.94±2.33	17.23±0.28	16.20±0.52	16.56±0.99
2	23.24±1.74	21.42±3.84	20.30±0.37	22.11±1.16	22.93±0.80	15.46±1.36	15.86±0.38	16.11±0.13	15.91±1.38	15.22±0.31
3	23.04±0.27	21.47±1.28	22.35±0.60	22.58±1.00	23.37±0.41	15.31±1.27	17.03±3.07	15.84±0.20	15.10±0.60	15.95±0.09
4	24.25±0.58	22.14±1.54	23.21±0.79	23.56±0.93	23.84±0.39	16.60±0.27	16.92±2.88	16.45±0.85	15.46±1.25	16.03±1.22
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 4. Water consumptions of male and female rats

WEEKS	WATER CONSUMPTIONS (g)									
	GROUPS (mg/kg/day) MALE					GROUPS (mg/kg/day) FEMALE				
	G1 (0)	G2 (250)	G3 (500)	G4 (1,000)	G5 (2,000)	G1 (0)	G2 (250)	G3 (500)	G4 (1,000)	G5 (2,000)
0	25.48±0.71	25.49±0.93	26.84±0.55	28.21±2.06	33.86±1.89	18.27±0.76	22.48±2.26	21.98±0.83	26.10±3.23	18.11±0.24
1	26.84±0.12	26.21±1.81	24.39±0.79	25.03±5.00	28.71±1.24	19.90±0.85	24.11±1.03	22.60±0.43	24.14±0.66	19.02±2.01
2	24.89±1.59	23.02±0.14	23.44±0.83	23.62±2.47	28.18±0.10	18.92±1.94	24.16±0.09	24.33±0.35	25.72±0.38	18.97±0.40
3	23.55±3.10	24.01±0.69	23.32±1.47	23.87±4.55	27.51±0.23	19.57±1.89	25.72±1.66	23.29±0.75	24.93±3.40	19.29±0.24
4	30.27±2.01	25.10±3.62	25.65±1.96	25.65±3.93	30.80±0.26	24.00±2.42	29.30±6.06	26.38±1.27	29.83±3.56	21.68±1.69
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

5. 요 검사

암수간에 일관성을 보인 항목은 관찰되지 않았다. 유의성이 확인된 항목은 암컷에서만 관찰되었는데, SG와 PRO가 1,000 mg/kg/day 용량 이상에서 부형제대조군에 비해 증가하였으며 (p<0.01), pH와 KET가 1,000 이상 또는 2,000 mg/kg/day 투여군에서 부형제대조군에 비해 증가하였다(p<0.05 또는 p<0.01). 1,000 mg/kg/day 용량 이상의 암컷에서 WBC가 증가경향을 보였으나, 유의성은 확인되지 않았다(Table 1).

6. 혈액학적 검사

250 mg/kg/day투여군 수컷에서 MCV가 부형제대조군에 비해 감소하였으나(p<0.05), 용량상관성이 없었다(Table 1).

7. 혈액생화학적 검사

CHO가 2,000 또는 1,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 부형제대조군에 비해 증가하였다(p<0.05)(Table 1).

8. 장기중량

250 또는 1,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 비장의 절대 및 상대중량이 증가경향을 보였으며, 그 중 절대중량이 부형제대조군

에 비해 증가하였으나(p<0.05), 용량상관성이 없었다(Table 5-1, 2).

9. 부검소견

250 mg/kg/day투여군 암컷 1 레의 자궁에서 맑은액체저류(Retention of clear fluid)가 관찰되었으나, 자연발생적인 것으로 판단되었다(Table 1).

고 찰

현재 우리나라의 치매 유병률은 6.3%에서 13%에 이르며, 환자 수는 약 42만 명으로 추산되고 있다. 노인인구의 급격한 증가를 고려한다면, 2012년에 50만 명을 넘어서고, 2027년에는 100만 명, 2050년에는 212만 명에 이를 것으로 예상되어¹⁸⁾, 21세기 보건 의료의 중요한 화두가 되고 있다.

치매의 종류에는 알츠하이머형 치매(Alzheimer's disease, AD)와 혈관성 치매(Vascular dementia, VD)가 있고, 그 외에도 파킨슨병, 픽크병, 크로이츠펠트-야콥병, 헌팅턴병 등의 기타질병으로 인한 치매가 있다. 이 중 AD는 병리학적으로 진단된痴呆 환자의 약 50~60%를 차지하고 있을 정도로 가장 흔한 유형의 치매이다¹⁹⁾.

Table 5-1. Absolute & Relative organ weights(g) of male rats

GROUPS (mg/kg/day)	G1 (0)	G2 (250)	G3 (500)	G4 (1,000)	G5 (2,000)
BODY WEIGHT	324.80±27.26 ^{a)}	318.78±9.56	322.55±19.83	335.12±14.56	336.62±25.13
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0255±0.0025	0.0247±0.0034	0.0249±0.0016	0.0266±0.0008	0.0273±0.0024
% BODY WEIGHT	0.0079±0.0005	0.0077±0.0010	0.0077±0.0006	0.0079±0.0004	0.0081±0.0008
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0259±0.0025	0.0252±0.0022	0.0246±0.0024	0.0263±0.0013	0.0262±0.0030
% BODY WEIGHT	0.0080±0.0005	0.0079±0.0006	0.0077±0.0007	0.0079±0.0005	0.0078±0.0009
PITUITARY GLAND	0.0111±0.0012	0.0109±0.0011	0.0106±0.0008	0.0118±0.0020	0.0116±0.0010
% BODY WEIGHT	0.0034±0.0004	0.0034±0.0003	0.0033±0.0002	0.0035±0.0004	0.0035±0.0003
THYMUS	0.5024±0.0257	0.5330±0.0656	0.5268±0.0306	0.5548±0.0574	0.5138±0.1013
% BODY WEIGHT	0.1556±0.0161	0.1670±0.0180	0.1638±0.0130	0.1661±0.0220	0.1539±0.0334
PROSTATE	0.4012±0.0758	0.3972±0.0735	0.3660±0.0425	0.4738±0.0272	0.3998±0.0944
% BODY WEIGHT	0.1255±0.0338	0.1252±0.0263	0.1140±0.0163	0.1414±0.0053	0.1195±0.0281
TESTIS-LEFT	1.9446±0.1994	1.9028±0.0920	1.9250±0.1546	1.9060±0.1323	1.9514±0.1313
% BODY WEIGHT	0.6012±0.0684	0.5968±0.0180	0.5990±0.0652	0.5690±0.0375	0.5823±0.0310
TESTIS-RIGHT	1.9722±0.1551	1.9050±0.1173	1.9378±0.1605	1.9922±0.1351	1.9966±0.1322
% BODY WEIGHT	0.6101±0.0624	0.5973±0.0258	0.6032±0.0690	0.5956±0.0520	0.5956±0.0247
ADRENAL GLAND-LEFT	0.4572±0.0521	0.4596±0.0312	0.4838±0.0262	0.4762±0.0275	0.4690±0.0421
% BODY WEIGHT	0.1414±0.0181	0.1443±0.0116	0.1507±0.0157	0.1421±0.0067	0.1400±0.0126
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.4760±0.0305	0.4776±0.0334	0.4798±0.0231	0.4850±0.0350	0.4894±0.0275
% BODY WEIGHT	0.1473±0.0135	0.1501±0.0140	0.1493±0.0135	0.1447±0.0068	0.1462±0.0089
SPLEEN	0.7944±0.0949	0.8042±0.0800	0.7276±0.0835	0.8072±0.1370	0.7960±0.1162
% BODY WEIGHT	0.2442±0.0147	0.2524±0.0248	0.2252±0.0161	0.2400±0.0317	0.2373±0.0313
KIDNEY-LEFT	1.0452±0.1063	1.0948±0.0493	1.0938±0.1191	1.1702±0.0664	1.0936±0.1157
% BODY WEIGHT	0.3220±0.0213	0.3436±0.0159	0.3388±0.0250	0.3491±0.0081	0.3272±0.0421
KIDNEY-RIGHT	1.0970±0.1083	1.1012±0.0680	1.1254±0.0979	1.1636±0.0734	1.1390±0.1089
% BODY WEIGHT	0.3375±0.0114	0.3456±0.0214	0.3487±0.0179	0.3472±0.0142	0.3403±0.0356
HEART	1.2396±0.1212	1.1618±0.0700	1.2778±0.1399	1.2180±0.0563	1.2942±0.1282
% BODY WEIGHT	0.3818±0.0205	0.3644±0.0179	0.3989±0.0640	0.3638±0.0203	0.3869±0.0434
LUNG	1.5804±0.2083	1.5268±0.1145	1.4292±0.2113	1.5438±0.0886	1.5716±0.0877
% BODY WEIGHT	0.4863±0.0458	0.4788±0.0297	0.4424±0.0544	0.4608±0.0231	0.4693±0.0253
BRAIN	1.8014±0.0784	1.8692±0.0419	1.8138±0.0906	1.8236±0.0348	1.8258±0.0587
% BODY WEIGHT	0.5566±0.0320	0.5867±0.0188	0.5634±0.0326	0.5449±0.0226	0.5456±0.0293
LIVER	9.7194±0.8583	9.7240±0.3517	9.6954±1.0048	10.2134±0.6428	10.3784±1.0033
% BODY WEIGHT	2.9932±0.1007	3.0522±0.1332	3.0030±0.1988	3.0475±0.1311	3.0969±0.2707

a) Represents body weights right before necropsy, after fasting

Table 5-2. Absolute & Relative organ weights of female rats

GROUPS (mg/kg/day)	G1 (0)	G2 (250)	G3 (500)	G4 (1,000)	G5 (2,000)
BODY WEIGHT	202.27±12.86 ^{a)}	208.54±5.62	205.38±14.43	206.76±4.44	205.14±12.81
OVARY-LEFT	0.0398±0.0071	0.0420±0.0062	0.0422±0.0087	0.0389±0.0048	0.0418±0.0043
% BODY WEIGHT	0.0198±0.0039	0.0202±0.0029	0.0205±0.0038	0.0188±0.0022	0.0202±0.0021
OVARY-RIGHT	0.0445±0.0035	0.0419±0.0091	0.0419±0.0065	0.0431±0.0041	0.0425±0.0080
% BODY WEIGHT	0.0221±0.0022	0.0201±0.0045	0.0204±0.0029	0.0208±0.0019	0.0206±0.0037
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0292±0.0034	0.0305±0.0026	0.0312±0.0038	0.0301±0.0022	0.0283±0.0018
% BODY WEIGHT	0.0145±0.0021	0.0146±0.0015	0.0153±0.0022	0.0146±0.0010	0.0137±0.0011
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0288±0.0021	0.0302±0.0023	0.0291±0.0023	0.0288±0.0036	0.0268±0.0020
% BODY WEIGHT	0.0143±0.0013	0.0145±0.0014	0.0143±0.0018	0.0139±0.0016	0.0130±0.0012
PITUITARY GLAND	0.0109±0.0009	0.0114±0.0009	0.0115±0.0015	0.0107±0.0014	0.0103±0.0009
% BODY WEIGHT	0.0054±0.0005	0.0055±0.0003	0.0056±0.0007	0.0052±0.0007	0.0050±0.0004
THYMUS	0.3826±0.0648	0.3108±0.0568	0.3270±0.0530	0.4016±0.0623	0.3224±0.0606
% BODY WEIGHT	0.1887±0.0257	0.1495±0.0301	0.1596±0.0264	0.1942±0.0295	0.1562±0.0312
UTERUS	0.4190±0.1946	0.5870±0.3930	0.3354±0.0303	0.3892±0.1498	0.4382±0.1538
% BODY WEIGHT	0.2120±0.1141	0.2793±0.1806	0.1635±0.0127	0.1893±0.0769	0.2113±0.0715
SPLEEN	0.5434±0.0902	0.6290±0.0210*	0.5324±0.0665	0.6340±0.0594*	0.5318±0.0303
% BODY WEIGHT	0.2695±0.0455	0.3018±0.0133	0.2588±0.0206	0.3063±0.0237	0.2574±0.0186
KIDNEY-LEFT	0.6676±0.0338	0.6948±0.0522	0.7034±0.0279	0.7086±0.0410	0.6898±0.0441
% BODY WEIGHT	0.3307±0.0184	0.3331±0.0230	0.3433±0.0168	0.3425±0.0128	0.3339±0.0250
KIDNEY-RIGHT	0.6800±0.0383	0.7058±0.0398	0.7042±0.0470	0.7074±0.0363	0.7066±0.0425
% BODY WEIGHT	0.3368±0.0201	0.3385±0.0184	0.3442±0.0322	0.3420±0.0125	0.3419±0.0223
HEART	0.7940±0.0595	0.8184±0.0603	0.8147±0.0324	0.8196±0.0500	0.7896±0.0556
% BODY WEIGHT	0.3928±0.0233	0.3925±0.0273	0.3974±0.0143	0.3963±0.0202	0.3821±0.0293
LUNG	1.1334±0.0679	1.2024±0.0670	1.1634±0.0604	1.2228±0.1557	1.2076±0.0569
% BODY WEIGHT	0.5605±0.0032	0.5773±0.0433	0.5676±0.0296	0.5910±0.0707	0.5842±0.0280
BRAIN	1.6772±0.0451	1.6888±0.0442	1.7156±0.0638	1.6998±0.0460	1.6770±0.0679
% BODY WEIGHT	0.8309±0.0343	0.8104±0.0332	0.8394±0.0778	0.8225±0.0307	0.8114±0.0375
LIVER	5.3642±0.3397	5.5664±0.2079	5.3972±0.4321	5.6446±0.4522	5.7988±0.2058
% BODY WEIGHT	2.6525±0.0526	2.6690±0.0571	2.6267±0.0507	2.7278±0.1752	2.8048±0.0895

a) Represents body weights right before necropsy, after fasting. * Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control.

AD는 신경세포 외에서의 노인반 침착과 세포 내에서의 과인산화된 tau 단백질로 구성된 신경섬유농축체의 형성 및 신경원 소실이라는 조직병리학적 특성을 갖는다²⁰⁾. 이러한 특성을 근거로 알츠하이머병의 원인을 밝히기 위한 연구가 진행되고 있으며, 병리기전에 대한 다양한 가설이 제시되고 있다.

아직 명확한 원인과 치료약물이 없는 가운데 임상적 경험에 풍부한 한약물을 이용한 천연물 신약에 대한 관심과 연구가 집중되고 있다. 특히 최근에는 건망증 치료제로 多用되는 壯元丸에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다^{21,22)}.

壯元丸은 『東醫寶鑑』 神門¹⁰⁾에서 補心生血 寧神定志하는 효능이 있다고 하였으며, 건망증에 활용되는 처방이다. 전통적 壯元丸은 12가지 한약재/버섯과 소수의 무기질, 황화수은이 주 성분인 朱砂로 구성되어 있다. 朱砂는 신경독성이 있어 朱砂를 제외한 다른 壯元丸의 구성성분이 쓰여져 왔다.

이 중에서도 壯元丸의 12개 약재에서 7개 약재로 축약한 壯元丸加減方, LMK02의 AD 치료효과에 대한 연구들이 주목할 만 한데, Seo 등¹²⁾은 AD 동물 모델인 Tg-APPswe/PS1dE9 유전자형질전환 생쥐에서의 Aβ의 양과 plaque 침착 억제 효과 발표되었고, 그 외에도 뇌 해마에서 phospho-CREB 수치와 calbindin 수치를 유의미하게 증가시키고, 또한 H₂O₂와 Aβ(1-42)로 유발된 신경독성에서 LMK02가 농도의존적으로 세포생존율을 유의성 있게 높였고, 특히 항산화 효과가 뛰어난 것으로 알려진 Vitamin C, Trolox 보다도 더 세포생존율이 높은 것으로 보고하여

LMK02가 AD에 유력한 치료제가 될 수 있음을 시사하였다.

LMK02는 紅蓼, 石菖蒲, 白茯苓, 柏子仁, 當歸, 麥門冬, 玄蔘으로 이루어진 壯元丸 加減方이다. 홍삼은 大補元氣, 補脾益氣, 生津止渴, 寧神益智하는 효능이 있고, 石菖蒲는 開竅安神하는 작용이 있으며, 白茯苓과 柏子仁은 寧心安神하는 효능이 있으며, 當歸, 麥門冬, 玄蔘은 심혈관계를 보하고 체내의 陰을 補하는데 사용한다²³⁾.

이와 같이 항치매 효과가 있는 LMK02의 최소치사량을 파악하기 위한 단회 경구투여 독성평가에서는 최소치사량(MLD : Minimum Lethal Dose)이 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 보고되었다¹⁶⁾.

따라서, 의약품등의 품목허가·신고·심사 규정에 따라 시험물질 LMK02를 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 4 주간 반복 경구투여하였을 때 나타나는 일반적인 독성을 파악하고, 13 주 반복 경구투여 독성시험의 용량을 정하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

요 검사결과, 암컷 1,000 mg/kg/day 용량 이상에서 관찰된 pH의 증가 및 Specific gravity의 감소, WBC의 증가경향은 혈액 생화학적 검사결과, 2,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 관찰된 Total cholesterol의 증가와 연계되어 본 시험물질이 암컷동물의 신장에 영향을 미친 것으로 보이나, 기타 요검사 및 혈액관련검사와 부검 및 장기중량 확인결과, 관련 장기 및 항목에서 변화가 관찰되지 않았으며, 수컷에서는 관찰되지 않았으므로 시험물질

에 의한 독성으로 판단할 수가 없었다. 요검사 결과, 암컷 고용량 이상에서 관찰된 Protein의 감소는 독성학적인 변화와 무관하므로 시험물질에 의한 영향으로 판단하지 않았다.

2,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 관찰된 Total cholesterol의 증가는 동일용량의 요검사 결과에서 관찰된 Ketone body의 증가와 연관되어 본 시험물질이 간장에 영향을 미칠 가능성을 짐작하게 한다. 기타, 일반증상이나 사료 및 물섭취량, 부검 및 장기중량에서는 시험물질에 의한 것으로 판단되는 소견이 관찰되지 않았다.

따라서, 추후 실시될 13주 반복경구투여 독성시험에서는 어느 정도의 독성이 관찰될 것으로 보이는 2,000 mg/kg/day을 고용량으로 하고, 그 아래로 공비 2로 2군을 두는 것이 적절한 것으로 판단된다.

결 론

본 시험은 LMK02를 Sprague-Dawley 계통의 6주령 암컷 랫드에 4주간 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위해 시험물질을 250, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로 경구투여한 후의 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료/물 섭취량, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 부검소견 및 장기중량을 관찰하였으며, 시험결과는 다음과 같았다.

요검사결과, Specific gravity와 Protein가 암컷 1,000 mg/kg/day 용량 이상에서 부형제대조군에 비해 증가하였으며 ($p < 0.01$), pH와 Ketone body가 암컷 1,000 이상 또는 2,000 mg/kg/day 투여군에서 부형제대조군에 비해 증가하였고 ($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$). 암컷 1,000 mg/kg/day 용량 이상에서 WBC가 증가경향을 보였다. 혈액학적 검사에서 250 mg/kg/day 투여군 수컷에서 MCV(mean corpuscular volume)가 부형제대조군에 비해 감소하였다($p < 0.05$). 혈액생화학적 검사에서 Total cholesterol가 2,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 부형제대조군에 비해 증가하였다($p < 0.05$). 실험기간 동안 사망동물이나 시험물질과 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다. 기타 일반증상이나 사료 및 물섭취량, 부검 및 장기중량에서는 시험물질에 의한 것으로 판단되는 소견이 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 추후 실시될 13 주 반복 경구투여 독성 시험에서는 어느 정도의 독성이 관찰될 것으로 보이는 1,000 mg/kg/day을 고용량으로 하고, 그 아래로 공비 2로 2 군을 두는 것이 적절한 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. 한설희. 알츠하이머병의 새로운 약물치료. J Korean Med

Assoc. 52(11):1059-1068, 2009.

2. Arnold, S.E., Lee, E.B., Moberg, P.J., Stutzbach, L., Kazi, H., Han, L.Y., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disea. Ann Neurol. 67(4):462-469, 2010.

3. Rebeck, G.W., Hoe, H.S., Moussa, C.E. Beta-amyloid1-42 gene transfer model exhibits intraneuronal amyloid, gliosis, tau phosphorylation, and neuronal loss. J Biol Chem. 285(10): 7440-7446, 2010.

4. Lee, K.W., Kim, J.B., Seo, J.S., Kim, T.K., Im, J.Y., Baek, I.S., Kim, K.S., Lee, J.K., Han, P.L. Behavioral stress accelerates plaque pathogenesis in the brain of Tg2576 mice via generation of metabolic oxidative stress. J Neurochem. 108(1):165-175, 2009.

5. Iacopino, A.M., Christakos, S. Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 87(11):4078-4082, 1990.

6. Yamamoto-Sasaki, M., Ozawa, H., Saito, T., Rösler, M., Riederer, P. Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. Brain Res. 824(2):300-303, 1999.

7. Greilberger, J., Koidl, C., Greilberger, M., Lamprecht, M., Schroecksnadel, K., Leblhuber, F., Fuchs, D., Oettl, K. Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Free Radic Res. 42(7):633-638, 2008.

8. Ghosh, A.K., Hong, L., Tang, J. Beta-secretase as a therapeutic target for inhibitor drugs. Curr Med Chem. 9(11):1135-1144, 2002.

9. Imbimbo, B.P. Therapeutic potential of gamma-secretase inhibitors and modulators. Curr Top Med Chem. 8(1):54-61, 2008.

10. 許 俊. 東醫寶鑑. 서울, 法仁文化社, pp 189-191, 1999.

11. 강형원, 김상태, 손형진, 한평림, 조형권, 이영재, 류영수. LMK02의 품질규격화와 A β oligomer에 의해 유도된 흰쥐해마 H19-7 세포주에 미치는 항치매 효과. 동의생리병리학회지 23(2):397-404, 2009.

12. Seo, J.S., Yun, J.H., Baek, I.S., Leem, Y.H., Kang, H.W., Cho, H.K., Lyu, Y.S., Son, H.J., Han, P.L. Oriental medicine Jangwonhwan reduces A β (1-42) level and beta-amyloid deposition in the brain of Tg-APP^{sw}/PS1^{de9} mouse model of Alzheimer disease. J Ethnopharmacol. 128(1):206-212, 2010.

13. Korea Food and Drug Administration. Toxicity Test

- Guidelines for Safety Evaluation of Drugs, Notification. 60, 2005.
14. Korea Food and Drug Administration. Good Laboratory Practice Regulation For Nonclinical Laboratory Studies, Notification No. 2005-79, Toxicity Test Guidelines for Safety Evaluation of Drugs.
 15. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity: Up-and-Down-Procedure (UDP). 425, 2006.
 16. 강형원, 권영미, 이상원, 김지환, 이효경, 장현호, 박보라, 류영수. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 Up & Down 법 (UDP)에 의한 LMK02의 단회 경구투여 독성시험. 동의신경정신과학회지 21(3):97-93, 2010.
 17. Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Programme (AOT 425 StatPgm). Version:1.0, 2001. [<http://www.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-document-524-nodirectorate-no-24-6775-8,FF.html>]
 18. 조맹제. 국내 치매 노인 유병률 현황과 위험요인. 서울. 보건복지포럼. 156: 43-48, 2009.
 19. Jellinger, K.A. Clinicopathological analysis of dementia disorders in the elderly. J. Alzheimers Dis. 9(3):61-70, 2006.
 20. Sultana, R., Perluigi, M., Butterfield, D.A. Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD, role of Abeta in pathogenesis. Acta Neuropathol. 118(1):131-150, 2009.
 21. 김진진, 정대규. 壯元丹이 CT105 및 Aβ로 유발된 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지 17(2):91-122, 2006.
 22. 강형원, 김상태, 이종화, 김태현, 손형진, 한평림, 류영수. 壯元丸加減方 수추출물이 아밀로이드 전구단백질로 유도된 생쥐의 신경아세포주에서의 항치매 효과. 동의신경정신과학회지 18(2):13-24, 2007.
 23. 전국한의학대학교 공동교재편찬위원회 편저. 본초학. 서울, 영림사, pp 233-234, 345-347, 532-533, 563-564, 573-576, 630-633, 645-647, 2010.