

ICR 마우스를 이용한 이중탕 및 발효이중탕의 급성독성 연구

정영필, 황윤환, 이지혜, 임남희, 조원경, 마진열

한국한의학연구원 한의신약연구그룹

A Study on the Acute Toxicity of *Leejung-tang(Lizhong-tang)* and Fermented *Leejung-tang(Lizhong-tang)* Extract in ICR Mice

Young-pil Jung, Yun-hwan Hwang, Ji-hye Lee, Nam-hui Yim, Won-kyung Cho, Jin-yeul Ma

KM-Based Herbal Drug Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : This study was carried out to investigate the acute toxicity and safety of *Leejung-tang(Lizhong-tang)* and fermented *Leejung-tang(Lizhong-tang)* extract.

Methods : To evaluate their acute toxicity and safety, 0(control group), 1250, 2500 and 5000 mg/kg of *Leejung-tang(Lizhong-tang)* and fermented *Leejung-tang(Lizhong-tang)* extracts were orally administered to 35 male and 35 female ICR mice. After a single administration, we observed survival rates, general toxicity, changes of body weight, and autopsy.

Results : Compared with the control group, we could not find any toxic alteration in any of treated groups (1250, 2500 and 5000 mg/kg).

Conclusions : LD₅₀ of *Leejung-tang(Lizhong-tang)* and fermented *Leejung-tang(Lizhong-tang)* were over 5000 mg/kg and it is very safe to ICR mice.

Key words : *Leejung-tang(Lizhong-tang)*, Acute toxicity, Fermentation, Safety, LD₅₀

서론

이중탕(理中湯)은 최초 한대(漢代) 장중경(張仲景)의 상한론(傷寒論)¹⁾에 이중환으로 기록되어 ‘곽란(藿亂)으로 두통(頭痛)이 있고 열이 나며 통증이 심하고(身疼痛), 심한 열 때문에 물을 많이 마시고(熱多欲飲水者) 싶으면 오령산을 사용하고, 속이 차서 물을 마시고 싶지 않으면(寒多不用水者) 이중환(理中丸)을 반드시 사용한다. 큰 병이 나은 후에(大病差後) 침이 잘 생기며(喜唾) 오래도록 계속되는 것은 위장에 寒이 있다(胃上有寒). 마땅히 환약으로 따뜻하게 해야 한다(當以丸藥溫之). 이중환(理中丸)이 좋다.’ 라고 기재되어 있다. 이중탕은 처방으로써 인삼, 백출, 건강, 감초로 구성되며 한냉성 위장 질환(寒冷性胃腸疾患)에 널리 응용되며 우리나라 의학서적은 동의보감(東醫寶鑑)²⁾과 제중신편(濟衆新編)³⁾ 및 방약합편(方藥合編)⁴⁾에 실려 있다. 동의보감에는 태음병으로 황달과 배가 아프고 설사를 하며 갈증이 없는 것을 치료하고, 그 처방서인 방약합편에 따르면 이중탕은 비토(脾土)를 조리하는 족태음의

약으로 심폐는 격상(隔上)에 있어 양에 속하고, 신간은 격하(隔下)에 있어 음(陰)에 속하는데, 비위는 속토(屬土), 재중주(在中州)하므로, 오장면(五臟面)에서 볼 때 비위는 토장(土臟)이며 삼초면(三焦面)에서 볼 때 중초에 속한다. 따라서 중초의 부조(不調)를 조리하는 것이 곧 이중탕이다. 본방(本方)을 환제로 하면 이중환이라 하며 인삼탕(人蔘湯)이라고도 한다. 태음병으로 복통(腹痛), 자리부갈(自利不渴), 한다이구(寒多而嘔), 중한곽란(中寒霍亂), 위중한음(胃中寒飲), 희타연말(喜唾涎沫) 등을 다스리는 효과가 있다고 하였다. 이중탕은 한방에서 즐겨 사용되고 있는 처방중의 하나로써 이중탕의 효능에 관한 연구^{5,6)}가 보고되었고, 이중탕을 과체중에 이용한 사례⁷⁾, 항 알레르기⁸⁾ 및 아토피 피부부에 효과^{9,10)}가 있는 것으로 알려지는 등 다방면으로 약리작용이 보고되고 있다. 이중탕은 본방(本方)뿐 아니라 다양한 질환에 가감응용(加減應用)될 수 있는 데 항암작용¹¹⁾, 대식세포의 산화분출(oxidative burst)^{12,13)}, 면역력 증가¹⁴⁾, 비염치료¹⁵⁾에 효과가 있다고 보고되어 있다. 한약의 특성은 특정 표적을 가지고 개발된 합성의약품과는 달

*교신저자 : 마진열, 대전광역시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원
· Tel 042-868-9466 · Fax 042-868-9573 · E-mail jyma@kiom.re.kr
· 접수 : 2012년 4월 18일 · 수정 : 2012년 4월 26일 · 채택 : 2012년 4월 27일

리 다양한 성분을 함유하고 있어 생약의 약리성은 약효 성분 간의 상가, 상승 및 상쇄(相殺) 작용 등에 의하여 변하는 특징을 가진다¹⁶⁾. 장내세균의 대사 작용이 약리효과 발현에 영향을 미친다는 연구결과 또한 보고되면서¹⁷⁾ 장내 세균을 이용한 발효를 통해 특정성분을 활성성분으로 전환시키는 방법의 개발에 대한 필요성이 대두되고 있기 때문에¹⁸⁾ 한의학계에서도 발효한약에 대한 관심이 급증하고 있다. 이에 본 실험은 이중탕과 발효이중탕을 실험동물에 한계용량을 단회 경구투여하는 급성독성을 실시하여 이중탕과 발효이중탕의 투여용량에 대한 전신 또는 국소 독성여부의 관련성을 연구하였다. 최근 연구식품 및 의약품의 안전성이 주요 사회적 이슈로 대두되어¹⁹⁾ 한약재 및 한방처방의 안전성에 대한 근거 자료의 요구도가 점차 높아지고 있고 독성 및 안전성 문제에 대한 자료를 확보하기 위해 진행되었다.

재료 및 방법

1. 시험물질

실험에 사용한 이중탕의 처방 내용은 Table 1과 같으며, 인삼은 농협중앙회(충남 금산군 금산읍 상리 292), 백출은 영천현대약업사(경북 영천시 화북면 구전리 685)에서, 건강은 영천현대약업사(전북 완주군 봉동읍 장기리 214)에서 감초는 허브팜(경기도 남양주시 진건읍 용정리 800-5)에서 각각 제조업소 및 재배지역이 명확한 한약재를 구입하였다. 처방구성에 따른 각 한약재들은 중량의 10배에 달하는 생수(화이트, 경남 산청군 삼장면 덕교리 800)에 1시간동안 침적시킨 다음 180분 동안 전탕추출법(한국, 경서추출기 cosmos-660)에 의한 시험물질 추출을 실시하였으며, 추출한 시험물질은 동결건조기(한국, 일신 FD5512)를 사용하여 분말 형태로 조제하여 실험에 이용하였다. 시험물질의 발효는 한국식품연구원(Korea Food Research Institute: KFRI) 식품미생물 유전자은행에서 분양받은 *Lactobacillus casei* (KFRI 127)을 1%(v/v)로 하여 접종 한 후, 37℃의 항온실에서 48시간동안 통기 배양하여 액체 발효를 실시하였으며, 동결건조기(한국, 일신 FD5512)를 사용하여 분말 형태로 조제하였다.

Table 1. The Prescription of *Leejung-tang(Lizhong-tang)*

| Herb | Drug Name | Scientific Name | Dose(g) |
|--------------|-----------------------------|----------------------------------|---------|
| 人蔘 | Ginseng Radix | <i>Panax ginseng</i> | 8 |
| 白朮 | <i>Atractylodes Rhizoma</i> | <i>Atractylodes japonica</i> | 8 |
| 乾薑 | <i>Zingiberis Rhizoma</i> | <i>Zingiber officinale</i> Rosc. | 8 |
| 甘草 | <i>Glycyrrhizae Radix</i> | <i>Glycyrrhiza uralensis</i> | 4 |
| Total weight | | | 28 |

2. 실험동물 및 사육환경

실험은 한국한의학연구원 동물실험실에서 실시하였으며, 암·수 ICR 마우스(오리엔트 바이오)를 사용하였다. 동물 입수 시, 외관을 육안으로 검사한 후, 일주일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키고 그 중 건강한 동물을 골라 실험에 사용하였다. 순화 기간 중, 일반 임상증상을 관찰하여 건강한 동물을 암·수 35마리씩 선정하여 체중범위에 따른 무작위법에 의하여 군 분리를 실시한 후, 본 실험에 사용하였다. 본 실험은 실험동물윤리위원회의 심의를 거쳤으며, 순화 및 실험 기간 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 (PMI nutrition, USA)와 물은 자유 섭취 조건으로 하였다.

3. 실험군 및 한약재투여

4주령 마우스에 대한 급성 경구독성을 평가하기 위하여 이중탕 및 발효이중탕의 투여 용량은 경구투여 한계용량 5000 mg/kg를 기준으로 하여 공비 0.5로 각각 3개 군을 설정하였으며, 대조군을 포함하여 암·수 ICR 마우스를 각각 7개의 용량군으로 나누었다(Table 2). 본 연구에서는 대조군과 비교하여 시험물질 투여로 인한 급성독성 여부를 관찰하였고, 이중탕과 발효이중탕을 투여한 시험물질 투여군 간의 체중 및 임상증상 등을 비교하였다. 투여 경로는 한방 임상에서 가장 널리 이용되고 있는 경구투여법을 이용하였으며, 각 용량군의 한약재는 투여 직전에 3차 종류수에 희석하여 실험에 공시하였으며 동물을 하룻밤 절식시킨 후 배부 피부 고정법으로 고정하고 경구투여용 금속제 존테와 주사관을 이용하여 강제 경구 투여 하였다.

Table 2. Experimental Groups

| Group | Number of Animal | Sex | Volume (ml/kg) | Dose (mg/kg/day) |
|-------------------|------------------|--------|----------------|------------------|
| CON* | 5 | Male | 10 | 0 |
| LJ† ₁ | 5 | Male | 10 | 1250 |
| LJ ₂ | 5 | Male | 10 | 2500 |
| LJ ₃ | 5 | Male | 10 | 5000 |
| FLJ† ₁ | 5 | Male | 10 | 1250 |
| FLJ ₂ | 5 | Male | 10 | 2500 |
| FLJ ₃ | 5 | Male | 10 | 5000 |
| CON | 5 | Female | 10 | 0 |
| LJ ₁ | 5 | Female | 10 | 1250 |
| LJ ₂ | 5 | Female | 10 | 2500 |
| LJ ₃ | 5 | Female | 10 | 5000 |
| FLJ ₁ | 5 | Female | 10 | 1250 |
| FLJ ₂ | 5 | Female | 10 | 2500 |
| FLJ ₃ | 5 | Female | 10 | 5000 |

* : Control group

† : *Leejung-tang(Lizhong-tang)* Extract Treatment group

† : Fermented *Leejung-tang(Lizhong-tang)* Extract Treatment group

4. 임상증상 및 부검

임상 증상은 투여 직후부터 6시간 동안 매시간 관찰하였으며, 그 후 14일(1일 1회) 동안 일반증상 관찰법에 의하여 관찰하였으며^{20,21)}, 모든 동물에 대하여 투여전과 투여 후 1, 3, 7, 14일에 체중변화를 측정하였다. 실험동물을 희생하기 전날 밤 18시간 절식시킨 후 다음날 아침 Zoletil 50(Virbac S.A, France)과 Xylazine hydrochloride(바이엘 코리아 주식회사, 경기도)을 복강 내 주사하여 마취시킨 후 개복하여 혈액을 채취하였으며 방혈 후, 주요 내부장기의 병변을 육안적으로 관찰하였다. 이후 간, 심장, 신장, 폐, 비장을 적출하여 생리식염수로 3회 이상 세척 후 수분을 제거하고 무게를 측정하였다.

5. 혈구분석

혈액학적 검사는 WBC(white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin), HCT(hematocrit), MCV(Mean

Corpuscular Volume), MCH(Mean Corpuscular Hemoglobin), MCHC(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), PLT(platelet), #NEUT, #LYMPH, #MONO를 혈구분석기 Coulter counter(Coulter Co., Miami, FL, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

6. 통계학적 방법

실험결과는 SPSS package program(version 12.0)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였으며 실험군간의 차이의 유의성은 one-way ANOVA(analysis of variance)와 Tukey test에 의하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결 과

Table 3. Mortality of Male and Female ICR Mice Treated with *Leejung-tang* (*Lizhong-tang*) and Fermented *Leejung-tang*(*Lizhong-tang*) Extracts

| Sex | Group | Days after treatment | | | | | | | | | | | | | | LD50 (mg/kg) | |
|--------|------------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------|----------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | | 14 |
| Male | CON | 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 | >5000 mg/kg |
| | LJ ₁ | 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 | |
| | LJ ₂ | 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 | |
| | LJ ₃ | 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 | |
| | FLJ ₁ | 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 | |
| | FLJ ₂ | 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 | |
| | FLJ ₃ | 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 | |
| Female | CON | 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 | >5000 mg/kg |
| | LJ ₁ | 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 | |
| | LJ ₂ | 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 | |
| | LJ ₃ | 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 | |
| | FLJ ₁ | 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 | |
| | FLJ ₂ | 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 | |
| | FLJ ₃ | 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 | |

CON; Control group, LJ₁ Extraction of *Leejung-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, LJ₂ Extraction of *Leejung-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, LJ₃ Extraction of *Leejung-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₁ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₂ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₃ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group.

* : Values are expressed as No. Dead/No. animal.

2. 임상 증상

Table 4와 같이 1250, 2500, 5000 mg/kg 용량의 이충탕 및 발효이충탕 추출물을 경구로 단회 투여한 시험물질 투여군과 대조군의 암수 ICR 마우스를 14일 동안 관찰한 결과 보

1. 치사율 및 LD₅₀

실험물질 투여 14일 간 실험동물의 사망개체 수를 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 1250, 2500, 5000 mg/kg 용량의 이충탕 추출물 및 멸균생리식염수를 단회 경구 투여 후, 사망을 관찰한 결과, 모든 실험동물에서 사망이 관찰되지 않았다. US Environmental Protection Agency OPPTS 870.100²²⁾에 따르면 일반적으로 반수 치사량이 5000~15000 mg/kg인 물질을 무독성 물질로 규정하고 있다. 본 연구에서는 이충탕을 ICR 마우스에 투여 할 수 있는 최고용량인 체중 kg 당 5000 mg의 용량으로 경구투여 시, 사망 예 가 관찰되지 않아, LD₅₀ 값은 5000 mg 이상으로 사료된다.

행장애, 행동이상, 웅크림, 설사, 부종, 호흡축박, 몸단장, 뒤어오름, 유루, 무기력증, 구토, 비루, 마비, 유연 등 시험물질투여와 관련된 어떠한 임상증상의 이상소견도 관찰되지 않았다.

Table 4. Clinical Signs of Male and Female ICR Mice Treated with *Leejung-tang* (*Lizhong-tang*) and Fermented *Leejung-tang* (*Lizhong-tang*) extracts

| Variable | Sex Group | Male | | | | | | Female | | | | | | | |
|------------------|--------------|------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| | | CON | LJ ₁ | LJ ₂ | LJ ₃ | FLJ ₁ | FLJ ₂ | FLJ ₃ | CON | LJ ₁ | LJ ₂ | LJ ₃ | FLJ ₁ | FLJ ₂ | FLJ ₃ |
| | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Ataxia | | 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 |
| Bizarre Behavior | | 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 |
| Crouching | | 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 |
| Diarrhea | | 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 |
| Edema | | 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 |
| Gasping | | 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 |
| Grooming | | 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 |
| Jumping | | 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 |
| Lacrimation | | 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 |
| Lethargy | | 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 |
| Nausea | | 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 |
| Nasal Discharge | | 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 |
| Paralysis | | 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 |
| Salivation | | 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 |

CON; Control group, LJ₁ Extraction of *Leejung-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, LJ₂ Extraction of *Leejung-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, LJ₃ Extraction of *Leejung-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₁ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₂ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₃ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group.

* : Values are expressed as No. abnormal/No. animal.

3. 체중 변화

1250, 2500, 5000 mg/kg 용량의 이종탕 및 발효이종탕 추출물을 경구로 단회 투여한 시험물질 투여군 및 대조군의 체중 변화를 관찰한 결과는 Table 5와 같다. 경구 투여 후 시험물질 투여군과 대조군 모두 개시체중에 비하여 체중이 증

가하였으며, 투여 전, 투여 후 1, 3, 7, 14일 모두 대조군과 이종탕 및 발효이종탕 추출물 투여군 간의 유의적인 체중변화의 차이는 관찰할 수 없었으며, 이종탕 추출물 투여군과 발효이종탕 추출물 투여군 간의 유의적인 체중변화 차이 또한 관찰할 수 없었다.

Table 5. Means of Body Weights of Male and Female ICR Mice Treated with *Leejung-tang* (*Lizhong-tang*) and Fermented *Leejung-tang* (*Lizhong-tang*) Extracts

| Sex | Group | Body Weights(g) | | | | |
|--------|------------------|----------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | Days after treatment | | | | |
| | | 0 | 1 | 3 | 7 | 14 |
| Male | CON | 28,17±2,05 | 30,88±2,22 | 31,81±2,60 | 34,08±2,56 | 36,18±3,01 |
| | LJ ₁ | 28,44±1,98 | 31,30±2,62 | 32,48±2,72 | 34,59±3,34 | 36,72±3,30 |
| | LJ ₂ | 28,34±2,17 | 30,40±1,56 | 31,26±1,44 | 33,17±1,45 | 35,00±2,09 |
| | LJ ₃ | 28,26±0,86 | 30,58±1,08 | 31,53±1,17 | 33,58±1,85 | 35,45±2,02 |
| | FLJ ₁ | 28,76±2,79 | 30,41±2,23 | 31,49±2,24 | 34,11±2,39 | 35,09±2,29 |
| | FLJ ₂ | 28,55±2,16 | 30,68±2,17 | 31,90±2,37 | 33,79±2,53 | 35,34±3,08 |
| | FLJ ₃ | 28,39±3,11 | 29,93±2,25 | 31,24±2,65 | 33,76±3,53 | 35,20±4,12 |
| Female | CON | 22,21±2,98 | 25,37±2,35 | 25,10±3,04 | 26,08±3,56 | 28,42±4,05 |
| | LJ ₁ | 22,68±2,30 | 24,20±2,62 | 25,15±2,51 | 25,71±2,66 | 27,83±3,92 |
| | LJ ₂ | 22,50±2,44 | 23,88±2,19 | 24,67±2,20 | 25,53±2,24 | 27,09±2,14 |
| | LJ ₃ | 22,58±2,12 | 24,44±1,85 | 25,27±2,29 | 26,59±2,88 | 28,67±2,92 |
| | FLJ ₁ | 22,53±2,48 | 23,56±1,81 | 24,41±2,42 | 25,33±2,51 | 26,74±2,62 |
| | FLJ ₂ | 22,87±2,40 | 24,50±3,00 | 25,08±2,58 | 26,90±2,92 | 28,95±3,55 |
| | FLJ ₃ | 22,89±1,92 | 24,23±2,13 | 24,66±2,88 | 25,82±2,52 | 28,16±3,51 |

The data are presented as mean±SD

CON; Control group, LJ₁ Extraction of *Leejung-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, LJ₂ Extraction of *Leejung-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, LJ₃ Extraction of *Leejung-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₁ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₂ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₃ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group.

4. 부검 소견 및 장기무게 측정

실험 종료 시, 모든 실험동물들을 부검하여 주요 내부 장기의 육안적 소견을 관찰한 결과, 모든 실험동물에서 심장, 폐, 흉선, 간, 신장, 부신, 비장, 위, 대장 맹장 등의 주요 내부

장기에 대한 외관상의 어떠한 이상 병변도 발견되지 않았다. 또한 장기의 무게 측정 결과 Table 6과 같이 간, 신장, 심장, 폐 모두에서 정상 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다.

Table 6. Organ Weights of Male and Female ICR Mice Orally Treated with *Leejung-tang* (*Lizhong-tang*) and Fermented *Leejung-tang* (*Lizhong-tang*) Extracts

| Sex | Group | No. of animal | Weight of Organs(g) | | | | | |
|--------|------------------|---------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | | Liver | Kidney(L) | Kidney(R) | Spleen | Herat | Lung |
| Male | CON | 5 | 1,67±0,10 | 0,28±0,04 | 0,28±0,05 | 0,11±0,02 | 0,16±0,02 | 0,22±0,02 |
| | LJ ₁ | 5 | 1,83±0,12 | 0,28±0,03 | 0,29±0,04 | 0,12±0,02 | 0,16±0,02 | 0,21±0,02 |
| | LJ ₂ | 5 | 1,70±0,14 | 0,28±0,06 | 0,30±0,07 | 0,11±0,03 | 0,15±0,02 | 0,22±0,01 |
| | LJ ₃ | 5 | 1,48±0,11 | 0,28±0,02 | 0,28±0,03 | 0,12±0,03 | 0,15±0,01 | 0,22±0,02 |
| | FLJ ₁ | 5 | 1,37±0,14 | 0,27±0,03 | 0,28±0,03 | 0,10±0,01 | 0,15±0,02 | 0,22±0,02 |
| | FLJ ₂ | 5 | 1,63±0,22 | 0,28±0,02 | 0,28±0,01 | 0,11±0,02 | 0,15±0,01 | 0,22±0,02 |
| | FLJ ₃ | 5 | 1,44±0,23 | 0,27±0,03 | 0,27±0,02 | 0,11±0,01 | 0,15±0,01 | 0,22±0,02 |
| Female | CON | 5 | 1,63±0,26 | 0,18±0,02 | 0,18±0,02 | 0,12±0,03 | 0,14±0,01 | 0,19±0,02 |
| | LJ ₁ | 5 | 1,40±0,28 | 0,17±0,03 | 0,18±0,03 | 0,12±0,03 | 0,12±0,02 | 0,20±0,02 |
| | LJ ₂ | 5 | 1,43±0,18 | 0,17±0,02 | 0,17±0,02 | 0,12±0,02 | 0,12±0,01 | 0,19±0,01 |
| | LJ ₃ | 5 | 1,40±0,20 | 0,16±0,02 | 0,16±0,02 | 0,13±0,02 | 0,13±0,01 | 0,19±0,02 |
| | FLJ ₁ | 5 | 1,31±0,23 | 0,16±0,02 | 0,17±0,02 | 0,11±0,02 | 0,12±0,01 | 0,18±0,01 |
| | FLJ ₂ | 5 | 1,56±0,22 | 0,18±0,01 | 0,19±0,02 | 0,13±0,03 | 0,14±0,02 | 0,19±0,01 |
| | FLJ ₃ | 5 | 1,43±0,22 | 0,16±0,02 | 0,17±0,02 | 0,12±0,03 | 0,13±0,02 | 0,19±0,02 |

The data are presented as mean±SD

CON; Control group, LJ₁ Extraction of *Leejung-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, LJ₂ Extraction of *Leejung-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, LJ₃ Extraction of *Leejung-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₁ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₂ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₃ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group.

5. 혈구분석

시험물질 단회 투여 14일 후, 혈액학적 검사를 실시한 결과는 Table 7과 같다. WBC(white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin), HCT(hematocrit), MCV(Mean Corpuscular Volume), MCH(Mean Corpuscular Hemoglobin),

MCHC(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), PLT(platelet), #NEUT, #LYMPH, #MONO 수치를 측정한 결과, 모든 지표 수치에서 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

Table 7. Levels of Hematological Analysis in Male and Female ICR Mice Orally Treated with *Leejung-tang* (*Lizhong-tang*) and Fermented *Leejung-tang* (*Lizhong-tang*) Extracts

| Sex | Group | No. of animal | WBC X1000 | RBC X106 | HGB g/dl | HCT % | MCV fl | MCH pg | MCHC g/dl | PLT x1000 | #NEUT | #LYMPH | #MONO |
|--------|------------------|---------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|-------------|----------------|-----------|-----------|-----------|
| Male | CON | 5 | 3.60±0.54 | 8.39±0.41 | 13.54±0.74 | 46.66±2.21 | 55.66±1.64 | 16.18±0.58 | 29.04±0.44 | 1083.20±441.51 | 0.56±0.07 | 2.90±0.48 | 0.03±0.01 |
| | LJ ₁ | 5 | 5.91±3.18 | 8.07±0.38 | 13.60±0.42 | 45.38±1.43 | 56.26±1.85 | 16.88±0.43 | 29.98±0.33 | 1366.40±70.35 | 0.81±0.27 | 4.84±2.76 | 0.08±0.08 |
| | LJ ₂ | 5 | 3.38±1.54 | 8.11±1.45 | 12.68±2.45 | 43.06±7.65 | 53.06±1.31 | 15.60±0.63 | 29.36±0.87 | 1176.00±587.08 | 0.50±0.18 | 2.71±1.32 | 0.04±0.04 |
| | LJ ₃ | 5 | 3.98±1.52 | 8.55±0.34 | 13.54±0.76 | 46.00±1.93 | 53.80±1.85 | 15.84±0.72 | 29.38±0.44 | 1193.20±513.98 | 0.73±0.37 | 3.01±1.11 | 0.05±0.03 |
| | FLJ ₁ | 5 | 4.04±1.79 | 8.98±0.44 | 14.22±0.56 | 48.60±1.88 | 54.14±0.97 | 15.84±0.43 | 29.28±0.75 | 1342.00±322.24 | 0.62±0.24 | 3.22±1.47 | 0.05±0.04 |
| | FLJ ₂ | 5 | 3.64±3.02 | 8.07±0.76 | 10.92±4.99 | 43.34±3.92 | 53.70±0.87 | 13.20±5.76 | 24.52±10.64 | 1180.80±657.77 | 0.49±0.33 | 3.00±2.62 | 0.03±0.02 |
| | FLJ ₃ | 5 | 3.66±1.99 | 9.21±1.03 | 14.38±1.26 | 49.58±5.77 | 53.94±3.49 | 15.64±0.63 | 29.08±1.05 | 1242.20±606.07 | 0.56±0.27 | 2.95±1.85 | 0.05±0.05 |
| Female | CON | 5 | 3.11±0.70 | 8.19±0.67 | 13.38±0.84 | 46.80±5.37 | 57.04±2.30 | 16.38±0.44 | 28.76±1.44 | 1272.00±106.46 | 0.47±0.17 | 2.48±0.70 | 0.03±0.02 |
| | LJ ₁ | 5 | 2.85±0.31 | 8.36±0.33 | 13.54±0.29 | 45.84±1.65 | 54.86±1.43 | 16.22±0.43 | 29.58±0.96 | 1226.60±28.22 | 0.36±0.11 | 2.32±0.24 | 0.03±0.01 |
| | LJ ₂ | 5 | 3.29±1.64 | 7.77±0.43 | 12.80±0.64 | 44.00±3.35 | 56.58±1.44 | 16.46±0.34 | 29.12±0.87 | 1038.00±529.06 | 0.32±0.18 | 2.84±1.42 | 0.04±0.02 |
| | LJ ₃ | 5 | 3.47±1.16 | 8.40±0.17 | 11.20±5.71 | 46.18±1.38 | 54.92±0.98 | 13.24±6.68 | 24.14±12.22 | 804.60±665.24 | 0.38±0.23 | 2.95±1.01 | 0.04±0.03 |
| | FLJ ₁ | 5 | 2.58±1.45 | 8.27±0.37 | 13.66±0.56 | 46.12±2.65 | 55.76±1.32 | 16.48±0.41 | 29.58±0.70 | 955.20±485.83 | 0.32±0.20 | 2.13±1.24 | 0.04±0.05 |
| | FLJ ₂ | 5 | 2.72±1.38 | 8.42±0.54 | 13.64±0.63 | 47.26±2.78 | 56.16±1.71 | 16.24±0.88 | 28.92±1.19 | 1201.60±109.34 | 0.31±0.14 | 2.19±1.16 | 0.05±0.06 |
| | FLJ ₃ | 5 | 3.81±1.38 | 8.35±0.65 | 13.60±0.42 | 46.14±2.21 | 55.38±2.23 | 16.36±1.02 | 29.54±0.76 | 1198.60±185.72 | 0.34±1.19 | 3.28±1.19 | 0.04±0.02 |

The data are presented as mean±SD
 CON; Control group, LJ₁ Extraction of *Leejung-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, LJ₂ Extraction of *Leejung-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, LJ₃ Extraction of *Leejung-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₁ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₂ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, FLJ₃ Extraction of Ferment *Leejung-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group.

고찰

이증탕(理中湯)은 비위중초(脾胃中焦)의 허한(虛寒)으로 인한 각종의 소화장애, 설사, 구역, 구토, 헛배부름, 식욕부진, 복통 등의 소화기질환 뿐만 아니라 비위(脾胃)의 양기허(陽氣虛)에서 비롯되는 맥약(脈弱), 맥침무력(脈沈無力), 가슴저림(胸痺), 가슴이 그윽하고 답답함(胸痞), 허한성 복통(腹痛), 사지역냉(四肢逆冷), 음한중증(陰寒重症)에 적용될 수 있는 것으로 알려져 있다^{4,23}. 본 연구에서는 약리성분을 강화하기 위하여 유산균을 이용하여 발효이증탕을 제조하였으며, 그 안전성에 대한 자료를 마련하기 위하여 실험동물에 대한 급성 독성 실험을 실시하였다. 시험물질인 이증탕의 임상적용 경로가 경구이므로, 경구 투여용 주사기를 이용하여 단회 경구 투여를 수행하였으며, 투여용량은 단회 경구투여 최고용량인 5000 mg/kg²⁴을 고농도로 설정하였다. 즉, 이증탕 및 발효이증탕 추출물은 암수 ICR 마우스에 0(control), 1250, 2500, 5000 mg/kg 용량으로 단회 경구투여 하였고, 이후 14일 간 사망율, 체중, 임상증상 및 부검 후 내부 장기의 이상 병변 유무에 대한 육안적 소견을 관찰하였다. 이증탕 및 발효이증탕 추출물에 대한 급성독성 시험을 실시한 결과 0, 1250, 2500, 5000 mg/kg 용량으로 투여한 모든 암수 ICR 마우스에 대하여 사망이 관찰되지 않았고, 이로 인하여 LD₅₀은 5000 mg/kg 이상으로 나타났다. 또한 시험기간 동안 각 농도의 이증탕 및 발효이증탕 추출물을 투여한 시험물질 투여군과 대조군에서 경구투여 후 1, 3, 7, 14일의 체중에서 유의한 차이가 나타나지 않았고, 전 시험기간 동안 특이한 임상증상이 나타나지 않았으며, 부검소견에서도 내부 장기에 대한 어떠한 육안적 이상병변도 관찰되지 않았다. 본 실험에서는 단회투여 독성시험의 경우, 육안적 이상소견이 관찰된 장기 및 조직에 대하여 병리조직학적 검사가 포함되어야 한다는 “의약품등의 독성시험기준(식품의약품안전청고시 제 2005-60호, 2005. 10.21)”에 따라 모든 실험동물에서 이상소견이 관찰되지 않았기에 조직검사는 시행하지 않았으나, 단회경구투여 독성시험의 저독성 기준인 2000 mg/kg을 훨씬 상회하는 5000 mg/kg 용량에서 실험동물에 독성이 나타나지 않았기에 이증탕 및 발효이증탕은 급성독성이 없는 안전한 물질로 생각

된다. 암수 ICR 마우스에 있어 이증탕 및 발효이증탕의 LD₅₀은 5000 mg/kg을 상회할 것으로 생각되어 발효로 인한 급성독성이 발생하지 않는 것으로 사료되나, 추후 실험적 연구를 통하여 포괄적인 연구가 필요할 것이다.

결론

본 연구에서는 이증탕 및 발효이증탕의 급성독성을 실험적으로 평가하고자 ICR 마우스에 시험물질을 투여한 후 임상증상 및 부검소견, 치사율과 체중변화 등을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시험기간 중 모든 실험동물에서 사망동물이 관찰되지 않아, LD₅₀값은 5000 mg/kg 이상으로 나타났다.
2. 시험물질 이증탕 및 발효이증탕 추출물 투여에 의한 어떠한 독성증상도 관찰되지 않았다.
3. 이증탕 및 발효이증탕 추출물 투여로 인한 체중변화 역시 관찰되지 않았다.
4. 실험 종료 시, 모든 동물의 장기에 대하여 육안적 병변을 관찰하였으나 이상 병변은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 이증탕 및 발효이증탕은 실험동물에 대하여 급성 독성이 없는 한의약물로서 그 효능규명을 통한 활용이 기대된다.

감사의 글

이 연구는 교육과학기술부 지원 한국한의학연구원 기관고유사업 K12050의 지원을 받아 수행되었음.

참고문헌

1. Ko MG, Jang MK, Hyundai-Sanghanron, Seoul : Haneuimunhwasa, 2000 : 647-9.
2. Kang MK, Jejungsinyen, Seoul : Haenglimseowon, 1975 : 150.

3. Huh J, Donguibogam, Seoul : Bubinmunhwasa, 2002 : 1009
4. Hwang DY, Daeyuekjeugmek-Bangyackhappyen, Seoul : Namsandang, 1992 : 127-8.
5. Kim JS, Yoo BH, Park DW, Yoo GW. An experimental studies on the effects of Leejungtang. *K.H.M.* 1996 ; 2(2) : 167-79.
6. Kwak KH, Yoo BH, Yoo KW. Experimental studies on the effects of Yijoongtang and Daeseunggitang. *K.H.Univ.O.Med.J.* 1987 ; 10(1) : 505-29.
7. Park YH. Lizhong-tang on over weight syndrom:A case report. *J Kor Med Obes Res* 2001 ; 1(1) : 43-5.
8. Nam HJ, Chae BY. The experimental study in the anti-allergic effects of Leejungtang and Leejungtanggamibang. *J Kor Ori Med ophthalmol otolaryngol dematol* 2000 ; 13(1) : 60-77.
9. Seo HY, Han JK, Kim YH. The effect of Li zhong tang on the suppression of Th2 differentiation by IFN- γ response in IgE hyperproduction and atopic dermatitis-like skin lesions induced NC/Nga mouse. *J kor ori pediater* 2009 ; 23(1) : 1-22.
10. Seo HY, Han JK, Kim YH. Therapeutic effects of Yijungtang on atopic dermatitis-like skin lesions of NC/Nga mouse induced by mite antigen. *J kor ori pediater*. 2011 ; 25(1) : 1-27.
11. Ha JY, Lee J. Experiment on the Antitumor and Immunomodulatory Effects of Gagamijungtang in BALB/c mice. *Kor J ori Physiol pathol.* 1998 ; 12(2) : 73-81.
12. Park WS. Effects of red ginseng-ujung-tang and white ginseng-ujung-tang water extract on hydrogen peroxide production in RAW 264.7 cells. *Kor J ori Physiol pathol.* 2011 ; 25(1) : 78-83.
13. Lee JY, Kim YJ, Park WS. Effects of White Ginseng-Ejung-tang Acupuncture Solution on Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Production in LPS-induced Mouse Macrophages. *Kor J Acupunc.* 2011 ; 28(1) : 61-9.
14. Kim TG, Park SM, Kang H, Shim BS, Kim SH, Choi SH, et al. Effect of baekhasuoyijung-tang on mouse T cell cytokines. *Kor J Ori physiol pathol* 2008 ; 22(4) : 754-61.
15. Lee SM, Choi IH. Therapeutic effects of Lizhongtang plus baidusan extract in rats with allergic rhinitis. *J Kor Ori Med ophthalmol otolaryngol dematol* 2004 ; 17(2) : 72-80.
16. Kim KS, Ryu SN. Current status and prospects for the quality evaluation of medicinal plants. *Korean J crop sci.* 2002 ; 47(S) : 186-99.
17. Bae EA, Han MJ, Kim EJ, Kim DH. Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. *Arch Pharm Res.* 2004 ; 27(1) : 61-7.
18. Park JH, Kim HJ, Lee MJ. The role of gut microbiota in obesity and utilization of fermented herbal extracts. *J Kor Med Obes Res.* 2009 ; 9(1) : 1-14.
19. Jang IS, Yang CS, Lee SD, Han CH. A review of herbal medicinal products associated with toxic events in korea. *J kor ori med.* 2007 ; 28(1) : 1-10
20. Hayes AW. Principles and methods of toxicology. New York : Raven press, 1984 : 17-9.
21. MA JY, Huang DS, Yu YB, Ha HK, Shin HK. Acute toxicity study on Sagunja-tang(Sijunzi-tang) in ICR mice. *J kor ori med.* 2007 ; 28(2) : 200-4
22. U.S. Enviromental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870. 100, Acute Toxicity Testing Background. Washington : US EPA, 1998.
23. Lee SI, Kim DC, Lee YJ, No SH, Joo YS. Gwangjujeungeuihakwon-Jupyen. Seoul : Younglimsa, 1990 : 144-6.
24. Cho SI, Kim HW, Lee GJ. Biological activities of extracts of fermented camellia japonica leaf and flower. *Kor J herbology.* 2006 ; 21(2) : 55-62.