

우황청심원의 마우스 단회 경구투여 독성시험 연구

이제원 · 백경민* · 장우석

대구한의대학교 부속 대구한방병원 심계내과학교실

Single-Dose Oral Toxicity Test of *Woohwangchungshim-won* in Mice

Je Won Lee, Kyung Min Baek*, Woo Seok Chang

Department of Cardiovascular and Neurologic Diseases, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

The object of this study was to obtain acute toxicity information (single-dose oral toxicity) of *Woohwangchungshim-won* (WHCSW), a pill type herbal medicine used in Korean Medicine (KM) for treating stroke. In order to obtain the 50% lethal dose (LD50), approximate lethal dosage (ALD) and target organs, WHCSW powders were once orally administered to female and male ICR mice at dose levels of 2,000, 1,000, 500 and 0 (control) mg/kg (body weight.) according to the recommendation of Korea Food and Drug Administration (KFDA) Guidelines (Notification No. 2009-116). The mortality and changes in the body weight, clinical signs and gross observation were monitored for 14 days after single-dose oral administration of WHCSW according to KFDA Guidelines with organ weights and histopathological changes were observed in 12 principle organs. After single-dose oral administration of WHCSW, we could not find any mortality and toxicological evidences up to 2,000 mg/kg-administered group, except for some accidental findings and dose-independent increases of body weight gains in female 1,000 and 500 mg/kg-administered female mice. The results obtained in this study suggest that the LD50 and ALD of WHCSW in both female and male mice after single-dose oral administration were considered as over 2,000 mg/kg because no mortalities were detected up to 2,000 mg/kg that was the highest dose recommended by KFDA and Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD), and can be safely used in clinics.

Key words : *Woohwangchungshim-won*, single-dose oral toxicity

서 론

우황청심원은 太平惠民和劑局方¹⁾에 최초로 기재된 처방으로 약성은 涼하고 五臟六腑에 모두 歸經하며, 淸血瀉火, 解毒作用을 하며, 開竅化痰, 養血生津하는 효능이 있어^{2,3)}, 중풍의 구급약 뿐만 아니라 심·뇌혈관계 및 신경계질환에 응용되고 있는 약물이다. 국내에서는 東醫寶鑑에 수록된 우황청심원의 처방 구성 약물 중 朱砂, 石雄黃과 같은 광물성 생약과 수입이 금지된 犀角을 제외하고 丸으로 만든 다음, 金箔을 입혀 심·뇌혈관계 및 신경계질환에 사용하고 있으며, 복용을 편리하게 하고 소화흡수를 촉진시키기 위한 현탁액 제제도 생산 및 유통되고 있다⁴⁾.

* To whom correspondence should be addressed at : Kyung Min Baek, Sang-dong 165, Soosung-gu, Daegu, Daegu Haany University Oriental Hospital

· E-mail : kmb1004@hanmail.net, · Tel : 053-770-2133

· Received : 2014/01/23 · Revised : 2014/03/24 · Accepted : 2014/03/31

우황청심원의 심·뇌혈관계 및 신경계 관련 연구로는 뇌혈류 개선효과^{5,6)}, 뇌 신경 보호효과^{7,8)}, 혈압강하 효과^{9,10)}, 학습 및 기억장애 개선효과¹¹⁾ 등이 있다. 우황청심원은 금박을 포함한 총 28가지에 해당하는 많은 약재로 구성되어 있으며, 안전성에 관한 문제로서 마우스에서 예비 급성 독성시험¹²⁾, 랫트에서 급성 및 아급성(30일 연속 경구투여) 간독성 실험이 진행되었으나¹³⁾, 뚜렷한 독성 증상은 보고된 바 없었다. 우황청심원에 대한 독성시험은 주로 약학대학 및 제약회사를 주축으로 1990년대 중후반에 많이 이루어졌으나 이후에는 독성시험이 실시되지 않았다. 한방병원에서 일반적으로 사용되고 있는 朱砂, 石雄黃 및 犀角을 제외한 우황청심원에 대한 독성시험은 현재까지 이루어지지 않았으며, 현재 사용되고 있는 한국식품의약품안전청(KFDA) 고시 제2009-116호 “의약품 등의 독성시험기준”에 명시되어 있는 독성시험은 수행된 바 없다^{4,14)}. 따라서 우황청심원의 일반 독성시험 중 마우스 경구 단회투여독성 시험을 실시하여, 장기투여 독성 시험과 생식·발생독성 시험을 위시한 특수 독성시험에 대한

기초자료 제공 및 우황청심원에 대한 유효성 평가, 임상적 유효 용량 설정 및 적정 투여용량, 최대 용량 설정을 위한 연구에 근거를 제공하기 위하여 본 연구를 진행하였다.

본 실험에서는 반수치사율(50% lethal dose, LD50), 개략적 치사량(approximate lethal dosage; ALD), 최대 내성 용량(maximum tolerance dosage; MTD) 및 표적장기(target organ)를 산출하기 위하여, 한국식품의약품안전청 고시¹⁴⁾에 따라 우황청심원 2,000, 1,000 및 500 mg/kg을 단회 경구 투여한 다음 14일간 체중 및 임상증상을 관찰하였으며, 14일 후 최종 부검을 통하여 12개의 주요 장기에 대한 장기 중량 측정, 육안 부검 및 조직병리학적 검사를 각각 실시하여 유의한 결과를 얻어 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

본 실험에서 모든 실험동물은 대구한의대학교 실험동물윤리 위원회의 기준에 준하여 취급하였다.

1. 실험동물 및 사육관리

암수 각 20마리의 ICR 마우스(6-week old upon receipt, SLC, Japan; ANNEX I~III)를 8일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간동안 온도(20~24℃)와 습도(48~52%)가 조절된 사육실에서 마우스용 polycarbonate 사육 상자에 5마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기(light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료(Samyang, Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였다. 모든 실험동물은 투여일 및 최종 부검일 18시간 전 절식을 실시하였으며(이 기간에도 음수는 자유롭게 공급하였다), picric acid로 개체를 식별하였다.

2. 우황청심원

본 실험에 사용된 우황청심원은 대구한의대학교 부속 대구 한방병원에서 제조, 처방되는 제품을 사용 하였으며, 본 실험에 사용된 우황청심원 1환(5 g/pill) 분량의 조성은 Table 1과 같다. 우황청심원 5환(25 g)을 전기 미세분쇄기(Sungchang Machine Co., Sungnam, Korea)로 세말하여, 진갈색의 분말을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 우황청심원 세말 분말은 -20℃의 냉동 보관 후 실험에 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 용매인 증류수에 100 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 현탁되었다.

3. 군분리 및 약물 투여

실험동물은 군당 5마리씩 Table 2에 기록한 8그룹으로 구분하였다. 기존에 수행된 7일간의 예비 독성 실험¹²⁾ 및 간 독성에 대한 랫트 급성 및 아급성 독성 실험¹³⁾에서, 뚜렷한 독성 증상이 나타나지 않았다. 그래서 본 연구에서는 한국식품의약품안전청 고시 제2009-116호¹⁴⁾와 OECD 실험기준 #423¹⁵⁾에 의거하여, 설치류 최고 한계투여용량인 2,000 mg/kg을 최고 용량으로 설정하였으며, 공비 2로 1,000 및 500 mg/kg을 중간 및 저용량 투여군으로 설정하였다. 또한 암수 각각에 대한 매체 대조군(vehicle)을

추가 하였다. 모든 투여군에서는 우황청심원 세말 분말을 멸균 증류수에 현탁시켜 20 ml/kg의 용량으로 overnight 절식(대략 18 시간, 음수는 제한하지 않음) 후 존테(sonde)가 부착된 1 ml 주사기를 이용하여 경구 투여하였다. 식이와 음수에 따른 약물의 흡수 변화를 최소화하기 위해, 투여 후 대략 3시간 동안 사료와 음수 공급을 제한하였다.

Table 1. Composition of WHCSW Used in This Study

Herbal Name	Botanical Herb Name	Weight (g/pill)
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	0.342
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	0.228
人參	<i>Ginseng Radix</i>	0.114
蒲黃	<i>Typhae Pollen</i>	0.114
神麩	<i>Massa Medicata Fermentata</i>	0.114
大豆黃卷	<i>Glycine Semen Germinatum</i>	0.080
肉桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	0.080
阿膠	<i>Asini Corii Colla</i>	0.080
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	0.068
麥門冬	<i>Liriope seu Ophiopogonis Tuber</i>	0.068
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	0.068
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	0.068
防風	<i>Saposhnikoviae Radix</i>	0.068
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	0.068
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	0.057
桔梗	<i>Platycodonis Radix</i>	0.057
杏仁	<i>Armeniaca Semen</i>	0.057
白茯苓	<i>Poria Sclerotium</i>	0.057
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	0.057
龍腦	<i>Borneolum</i>	0.046
羚羊角	<i>Gazellae seu Saigae Cornu</i>	0.046
麝香	<i>Moschus</i>	0.046
白蘞	<i>Ampelopsis Radix</i>	0.034
乾薑(炮)	<i>Zingiberis Rhizoma Praeparatum</i>	0.034
牛黃	<i>Bovis Calculus</i>	0.052
大棗	<i>Zizyphi Fructus</i>	0.797
蜂蜜	<i>Mel</i>	2.094
金箔	<i>Aurum</i>	0.006
Total	28 types	5

WHCSW, *Woohwangchungshim-won*. WHCSW was obtained from Daegu Oriental Hospital, Daegu Haany University.

Table 2. Experimental Design Used in This Study

Group	Sex	No. of animals	Dose (mg/kg) of WHCSW	Animal No.
Vehicle control*	Male	5	0	M-01 ~ M-05
The highest dosage	Male	5	2,000	M-06 ~ M-10
The middle dosage	Male	5	1,000	M-11 ~ M-15
The lowest dosage	Male	5	500	M-16 ~ M-20
Vehicle control*	Female	5	0	F-01 ~ F-05
The highest dosage	Female	5	2,000	F-06 ~ F-10
The middle dosage	Female	5	1,000	F-11 ~ F-15
The lowest dosage	Female	5	500	F-16 ~ F-20

* Vehicle control: distilled water 20 ml/kg as vehicle in this study WHCSW, *Woohwangchungshim-won* All test articles in vehicle were once orally administered in a volume of 20 ml/kg, dissolved in distilled water.

4. 임상증상 관찰

모든 실험동물의 임상증상을 투여 전후에 각각 Functional

Observational Battery Test^{16,17}를 기초하여 동물의 행동, 자극에 대한 반응성, 각성도 및 경계성, 자세 및 보행 이상 등에 관한 일 반증상을 관찰, 기록하였으며, 투여일 이후에도 하루에 최소한 2 번씩 모든 실험동물의 임상증상을 관찰, 기록하였다.

5. 체중 측정

모든 실험동물의 체중을 투여전 1일, 투여직전, 투여 후 1, 2, 7, 13 및 14일(최종 희생일)에 각각 측정하였으며, 투여일~투여 후 7일, 투여 후 7일~13일 및 투여일~투여 후 14일간의 체중증 가량을 각각의 체중을 이용하여 산출하였다.

6. 육안부검

투여 14일 후 모든 실험동물은 overnight 절식(대략 18시간, 음수는 제한하지 않음)을 실시하였으며, ethyl ether(덕산 공업 주식회사, Korea) 마취하에 부검을 실시하고, 아래의 주요 장기를 위주로 이상 육안소견을 각각 관찰, 기록하였다.

육안 부검시 관찰한 주요장기는 폐, 흉선, 부신, 심장, 신장, 비장, 고환, 전립선, 간, 췌장, 부고환, 악하임파절, 난소, 뇌, 피부, 소화관, 기도, 난관 및 자궁이었다.

7. 장기 중량 측정

모든 실험동물은 육안부검 소견을 관찰 기록한 후 아래의 장기에 대한 절대 중량을 각각 측정하였으며, 체중 변화에 수반된 이차적 변화를 최소화하기 위해 체중에 대한 각각의 장기 절 대중량의 비율인 상대 중량을 산출하였다.

폐, 심장, 흉선, 좌측 신장, 좌측 부신, 비장, 좌측 고환, 간, 췌장 비장엽, 좌측 부고환, 좌측 악하임파절, 좌측 난소, 뇌 및 자 궁의 무게를 측정하였다.

8. 조직병리학적 관찰

아래의 12개 주요 장기의 일부 조직을 10 % 중성포르말린에 18시간 이상 고정시킨 다음, 탈수를 거쳐 파라핀 포매 후 4 μm의 절편을 제작하였다. 이후 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 실 시하고, 광학현미경 하에서 이상 유무를 관찰, 기록하였다.

폐, 심장, 흉선, 좌측 신장, 좌측 부신, 비장, 좌측 고환, 간, 췌장 비장엽, 좌측 부고환, 좌측 악하임파절, 좌측 난소, 뇌 및 자 궁의 조직에 대한 병리학적인 소견을 관찰 하였다.

9. 통계처리

모든 수치는 '평균±표준편차'로 표시하였으며, 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산 동질성을 Levene test 를 실시하여 검증하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test 를 실시한 다음 Scheffe test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유 의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 있는 경우에는, Mann-Whitney U (MW) test를 실시하여 군간의 유의성을 검증 하였다. 단회 투여독성시험의 경우, 반수치사량 및 95% 신뢰한 계(confidence limits)를 Probit 방법으로 측정하였으며, 임상 증

상, 육안부검 및 조직병리학적 소견은 각각 그 정도에 따라 0 (normal), 1+ (slight), 2+ (moderate) 및 3+ (severe)로 구분하였 다. 통계처리 및 Probit 방법은 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 사망률

우황청심원 투여와 관련 있는 사망례는 실험 전 기간동안 관찰되지 않았다.

2. 임상증상

실험동물의 행동, 자극에 대한 반응성, 각성도 및 경계성, 자세 및 보행 이상 등에서 우황청심원 투여와 관련된 특이한 임상 증상은 실험 전 기간 동안 관찰되지 않았다.

3. 체중 변화

본 실험의 결과, 암컷 1,000 및 500 mg/kg 투여군에서만 투여 일 ~ 투여 후 7일 동안의 체중이 암컷 매체 대조군에 비해 유의 성 있는(p<0.05) 증가를 나타내었으며, 우황청심원 투여와 관련 된 체중 변화는 나타나지 않았다(Table 3).

Table 3. Body Weight Gains in Female and Male Mice after Single-dose Oral Administration of WHCSW

Groups	Intervals		
	Day 0 ^a ~ Day 7	Day 7~ Day 13	Day 0~Day 14 ^b
Vehicle control			
Male	9.08±0.58	2.14±1.39	4.26±1.43
Female	5.56±0.47	1.16±0.63	2.10±1.90
WHCSW administered male groups			
2,000 mg/kg	9.08±1.37	2.34±0.76	5.14±1.44
1,000 mg/kg	10.08±1.75	2.06±0.93	6.10±1.33
500 mg/kg	9.34±1.07	1.86±0.78	5.44±1.24
WHCSW administered female groups			
2,000 mg/kg	6.60±1.78	1.00±2.36	3.48±0.61
1,000 mg/kg	7.52±1.52*	2.00±1.45	4.24±1.01
500 mg/kg	6.86±0.82*	1.78±1.40	3.76±1.42

Values are expressed as mean ± SD g of five mice. WHCSW, *Woohwangchungshim-won*. a Day of administration after overnight fast. b Day of sacrifice after overnight fast. * p<0.05 as compared with female vehicle control by MW test.

4. 장기 중량 변화

각각의 동일 성별 매체 대조군에 비해 의미 있는 장기 중량 변 화는 모든 우황청심원 투여군에서 관찰되지 않았다(Table 4-7).

5. 부검소견

폐충혈은 암컷 500 mg/kg 투여군을 제외한 모든 실험군 및 암수 매체 대조군에서 관찰되었다. 흉선 위축은 암수 매체 대조 군을 포함한 수컷 1,000 및 2,000 mg/kg 투여군에서 관찰되었다. 비장 위축은 암수 매체 대조군을 포함한 수컷 1,000 mg/kg 투여 군, 암컷 500 및 1,000 mg/kg 투여군에서 관찰되었다. 악하임파절 종대는 수컷 매체 대조군 및 500 mg/kg 투여군, 암컷 500, 1,000

및 2,000 mg/kg 투여군에서 관찰되었으며, 자궁 부종 소견이 암컷 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에서 관찰되었다. 결론적으로 우황청심원 투여와 관련된, 또는 우황청심원에 대한 용량의존적인 육안적 부검소견은 관찰되지 않았다(Table 8 & 9).

Table 4. Changes on the Absolute Organ Weights Observed in Male Mice after Single-dose Oral Administration of WHCSW

Groups	Principal Organs		
	Lung	Heart	Thymus
Vehicle control	0.197±0.013	0.175±0.015	0.052±0.011
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.204±0.020	0.186±0.020	0.056±0.019
1,000 mg/kg	0.215±0.015	0.172±0.011	0.063±0.018
500 mg/kg	0.218±0.016	0.178±0.017	0.050±0.007
Groups	Kidney L	Adrenal gland L	Spleen
Vehicle control	0.305±0.018	0.002±0.002	0.110±0.017
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.294±0.031	0.003±0.002	0.118±0.027
1,000 mg/kg	0.301±0.024	0.003±0.002	0.109±0.012
500 mg/kg	0.333±0.041	0.004±0.002	0.112±0.019
Groups	Testis L	Liver	Pancreas S
Vehicle control	0.115±0.011	1.670±0.080	0.187±0.029
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.122±0.009	1.676±0.119	0.186±0.012
1,000 mg/kg	0.114±0.003	1.624±0.154	0.176±0.021
500 mg/kg	0.121±0.015	1.640±0.111	0.196±0.016
Groups	Brain	Epididymis L	Lymph node L ^a
Vehicle control	0.482±0.022	0.066±0.016	0.003±0.001
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.493±0.014	0.067±0.011	0.002±0.001
1,000 mg/kg	0.477±0.016	0.070±0.015	0.002±0.002
500 mg/kg	0.479±0.018	0.067±0.009	0.002±0.001

Values are expressed as mean ± SD of five mice, g.WHCSW, *Woohwangchungshim-won* L, left sides: S, splenic lobes a Submandibular lymph node

Table 5. Changes on the Absolute Organ Weights Observed in Female Mice after Single-dose Oral Administration of WHCSW

Groups	Principal Organs		
	Lung	Heart	Thymus
Vehicle control	0.180±0.013	0.140±0.007	0.057±0.023
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.183±0.018	0.146±0.005	0.056±0.011
1,000 mg/kg	0.188±0.006	0.146±0.008	0.070±0.016
500 mg/kg	0.186±0.009	0.143±0.012	0.068±0.017
Groups	Kidney L	Adrenal gland L	Spleen
Vehicle control	0.198±0.012	0.003±0.001	0.108±0.024
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.199±0.016	0.005±0.003	0.124±0.020
1,000 mg/kg	0.205±0.009	0.008±0.003	0.124±0.025
500 mg/kg	0.201±0.012	0.005±0.001	0.113±0.030
Groups	Ovary L	Liver	Pancreas S
Vehicle control	0.015±0.004	1.189±0.129	0.159±0.033
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.020±0.005	1.301±0.070	0.176±0.021
1,000 mg/kg	0.020±0.004	1.332±0.138	0.187±0.014
500 mg/kg	0.020±0.003	1.304±0.200	0.168±0.022
Groups	Brain	Uterus	Lymph node L ^a
Vehicle control	0.480±0.017	0.157±0.056	0.003±0.001
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.470±0.029	0.169±0.068	0.005±0.004
1,000 mg/kg	0.463±0.022	0.196±0.066	0.009±0.009
500 mg/kg	0.451±0.019	0.183±0.061	0.006±0.005

Values are expressed as mean ± SD of five mice, g. WHCSW, *Woohwangchungshim-won* L, left sides: S, splenic lobes a Submandibular lymph node

Table 6. Changes on the Relative Organ Weights Observed in Male Mice after Single-dose Oral Administration of WHCSW

Groups	Principal Organs		
	Lung	Heart	Thymus
Vehicle control	0.569±0.051	0.503±0.034	0.149±0.027
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.568±0.049	0.517±0.062	0.156±0.058
1,000 mg/kg	0.585±0.027	0.469±0.027	0.169±0.033
500 mg/kg	0.599±0.025	0.488±0.030	0.139±0.021
Groups	Kidney L	Adrenal gland L	Spleen
Vehicle control	0.879±0.073	0.006±0.005	0.315±0.036
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.816±0.068	0.010±0.005	0.330±0.079
1,000 mg/kg	0.819±0.059	0.009±0.005	0.297±0.027
500 mg/kg	0.914±0.073	0.011±0.004	0.309±0.051
Groups	Testis L	Liver	Pancreas S
Vehicle control	0.330±0.035	4.809±0.224	0.538±0.080
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.341±0.023	4.664±0.293	0.518±0.024
1,000 mg/kg	0.313±0.027	4.411±0.151	0.477±0.038
500 mg/kg	0.332±0.036	4.505±0.179	0.539±0.049
Groups	Brain	Epididymis L	Lymph node L ^a
Vehicle control	1.388±0.088	0.190±0.041	0.007±0.003
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	1.375±0.072	0.185±0.024	0.006±0.002
1,000 mg/kg	1.303±0.099	0.188±0.031	0.006±0.004
500 mg/kg	1.318±0.073	0.185±0.023	0.006±0.002

Values are expressed as mean ± SD of five mice, % of body weight.WHCSW, *Woohwangchungshim-won* L, left sides: S, splenic lobes a Submandibular lymph node

Table 7. Changes on the Relative Organ Weights Observed in Female Mice after Single-dose Oral Administration of WHCSW

Groups	Principal Organs		
	Lung	Heart	Thymus
Vehicle control	0.655±0.025	0.513±0.072	0.201±0.068
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.635±0.056	0.507±0.026	0.196±0.036
1,000 mg/kg	0.643±0.034	0.498±0.026	0.241±0.070
500 mg/kg	0.645±0.048	0.495±0.028	0.236±0.057
Groups	Kidney L	Adrenal gland L	Spleen
Vehicle control	0.724±0.071	0.012±0.002	0.388±0.060
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.691±0.031	0.019±0.010	0.429±0.061
1,000 mg/kg	0.702±0.052	0.026±0.010	0.421±0.077
500 mg/kg	0.700±0.068	0.017±0.003	0.387±0.087
Groups	Ovary L	Liver	Pancreas S
Vehicle control	0.052±0.011	4.307±0.154	0.572±0.076
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	0.070±0.017	4.515±0.166	0.608±0.051
1,000 mg/kg	0.069±0.015	4.545±0.317	0.642±0.063
500 mg/kg	0.072±0.014	4.497±0.305	0.582±0.036
Groups	Brain	Uterus	Lymph node L ^a
Vehicle control	1.753±0.189	0.562±0.165	0.010±0.003
WHCSW administered groups			
2,000 mg/kg	1.632±0.082	0.583±0.224	0.017±0.014
1,000 mg/kg	1.586±0.115	0.672±0.228	0.031±0.027
500 mg/kg	1.570±0.145	0.631±0.191	0.019±0.014

Values are expressed as mean ± SD of five mice, % of body weight. WHCSW, *Woohwangchungshim-won* L, left sides: S, splenic lobes a Submandibular lymph node

Table 8. Necropsy Findings Observed in Male Mice after Single-dose Oral Administration of WHCSW

Groups Organs-Findings	Vehicle control	WHCSW administered as		
		2,000 mg/kg	1,000 mg/kg	500 mg/kg
Lung				4
Normal	3/5	4/5	3/5	1/5
Congestion	2/5	1/5	2/5	1/5
Heart				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Thymus				
Normal	4/5	4/5	4/5	5/5
Atrophy	1/5	1/5	1/5	0/5
Kidney				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Adrenal gland				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Spleen				
Normal	4/5	5/5	4/5	5/5
Atrophy	1/5	0/5	1/5	0/5
Testis				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Liver				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Pancreas				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Brain				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Epididymis				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Lymph node ^a				
Normal	4/5	5/5	5/5	4/5
Hypertrophy	1/5	0/5	0/5	1/5
Others				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5

Gross Findings at Sacrifice (Day 14) Observed animals/total observed animals of five mice WHCSW, *Woohwangchungshim-won* a Bilateral submandibular lymph node

Table 9. Necropsy Findings Observed in Female Mice after Single-dose Oral Administration of WHCSW

Groups Organs-Findings	Vehicle control	WHCSW administered as		
		2,000 mg/kg	1,000 mg/kg	500 mg/kg
Lung				
Normal	3/5	3/5	3/5	5/5
Congestion	2/5	2/5	2/5	0/5
Heart				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Thymus				
Normal	3/5	5/5	5/5	5/5
Atrophy	2/5	0/5	0/5	0/5
Kidney				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Adrenal gland				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Spleen				
Normal	3/5	5/5	4/5	4/5
Atrophy	2/5	0/5	1/5	1/5
Ovary				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Liver				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Pancreas				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Brain				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Uterus				
Normal	3/5	3/5	2/5	2/5
Edematous	2/5	2/5	3/5	3/5
Lymph node ^a				
Normal	5/5	4/5	4/5	4/5
Hypertrophy	0/5	1/5	1/5	1/5
Others				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5

Gross Findings at Sacrifice (Day 14) Observed animals/total observed animals of five mice WHCSW, *Woohwangchungshim-won* a Bilateral submandibular lymph node

Table 10. Histopathological Findings Observed in Male Mice after Single-dose Oral Administration of WHCSW

Groups Organs-Findings	Vehicle control	WHCSW administered as		
		2,000 mg/kg	1,000 mg/kg	500 mg/kg
Lung				
Normal	3/5	4/5	3/5	3/5
Congestion	2/5	1/5	2/5	2/5
Heart				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Thymus				
Normal	4/5	4/5	3/5	5/5
cDE [†]	1/5	1/5	2/5	0/5
Kidney				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Adrenal gland				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Spleen				
Normal	3/5	3/5	5/5	5/5
rHP [†]	2/5	2/5	0/5	0/5
Testis				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Liver				
Normal	4/5	5/5	5/5	4/5
fFC [†]	1/5	0/5	0/5	0/5
IF [†]	0/5	0/5	0/5	1/5
Pancreas				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Brain				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Epididymis				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Lymph node ^a				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5

Microscopical Findings at Sacrifice (Day 14) Observed animals/total observed animals of five mice WHCSW, *Woohwangchungshim-won* a Left submandibular lymph node [†] Abbreviations: cDE, decreases of cortex lymphoid cells; rHP, hyperplasia of red pulp lymphoid cells; fFC, focal fatty changes; IF, focal inflammatory cell infiltration

Table 11. Histopathological Findings Observed in Female Mice after Single-dose Oral Administration of WHCSW

Groups Organs-Findings	Vehicle control	WHCSW administered as		
		2,000 mg/kg	1,000 mg/kg	500 mg/kg
Lung				
Normal	3/5	3/5	3/5	5/5
Congestion	2/5	2/5	2/5	0/5
Heart				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Thymus				
Normal	2/5	5/5	5/5	4/5
Congestion	1/5	0/5	0/5	0/5
cDE [†]	2/5	0/5	0/5	1/5
Kidney				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Adrenal gland				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Spleen				
Normal	3/5	4/5	3/5	4/5
rHP [†]	1/5	1/5	2/5	1/5
wDE [†]	1/5	0/5	0/5	0/5
Ovary				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Liver				
Normal	5/5	5/5	5/5	4/5
IF [†]	0/5	0/5	0/5	1/5
Pancreas				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Brain				
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Uterus				
Normal	4/5	4/5	3/5	5/5
DM [†]	1/5	1/5	2/5	0/5
Lymph node ^a				
Normal	4/5	5/5	5/5	5/5
cDE [†]	1/5	0/5	0/5	0/5

Microscopical Findings at Sacrifice (Day 14) Observed animals/total observed animals of five mice WHCSW, *Woohwangchungshim-won* a Left submandibular lymph node [†] Abbreviations: cDE, decreases of cortex lymphoid cells; rHP, hyperplasia of red pulp lymphoid cells; wDE, decreases of white pulp lymphoid cells; IF, focal inflammatory cell infiltration; DM, desquamation of mucosa layers

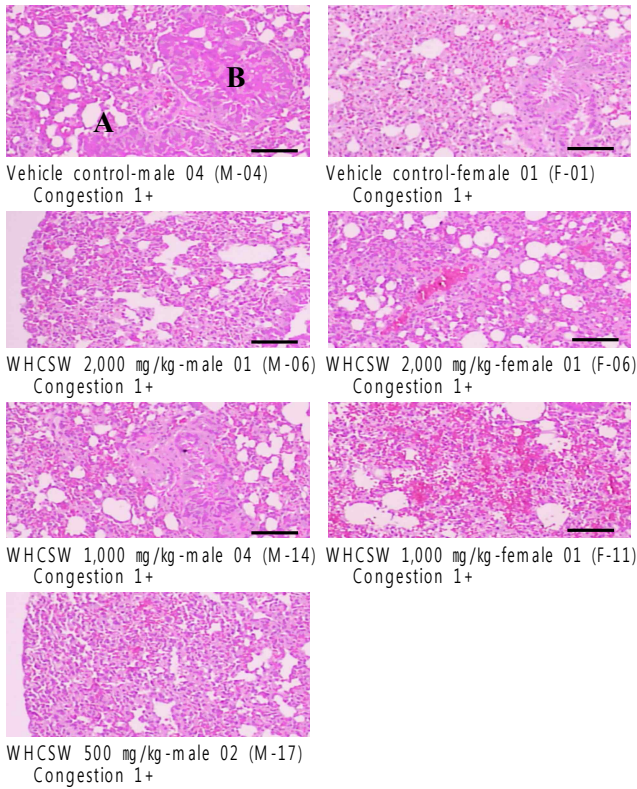


Fig. 1. Histopathological changes detected in the lung after single-dose oral administration of WHCSW. Note that slight [1+] lung focal congestional spots - thickening of alveolar lung inflammatory cell infiltration with/without focal hemorrhages were randomly detected throughout the experimental groups tested regardless of genders including both genders of vehicle controls as sporadic findings not WHCSW administration related toxicological signs. WHCSW, *Woohwangchungshim-won* A, alveolar sac respiratory bronchiole; B, bronchiole All hematoxylin & eosin stain; Scale bars = 200 μ m.

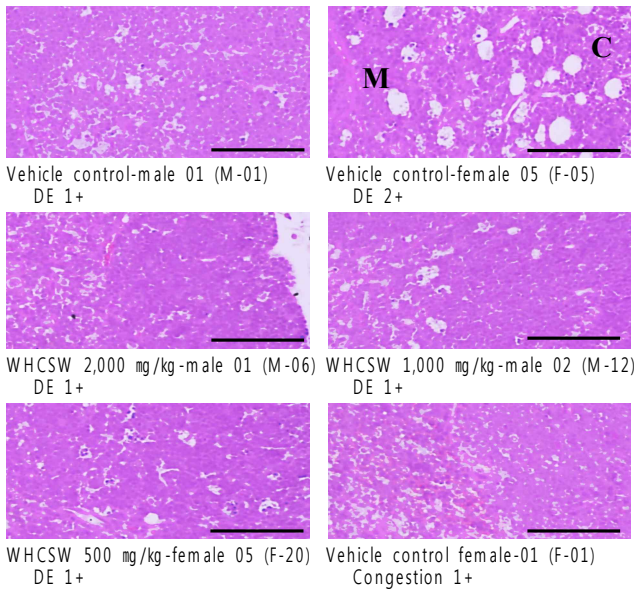


Fig. 2. Histopathological changes detected in the thymus. Note that slight [1+] or moderate [2+] decreases of lymphoid cells (DE; as seen vacuoles or loosening) in the thymic cortex were randomly detected throughout the experimental groups tested regardless of genders including both genders of vehicle controls as sporadic findings not WHCSW administration related toxicological signs. In addition, one mouse (1/5; 20 %) in female vehicle control showed slight congestion as sporadic findings. HCSW, *Woohwangchungshim-won* DE, decreases of lymphoid cells C, cortex; M, medulla All hematoxylin & eosin stain; Scale bars = 200 μ m.

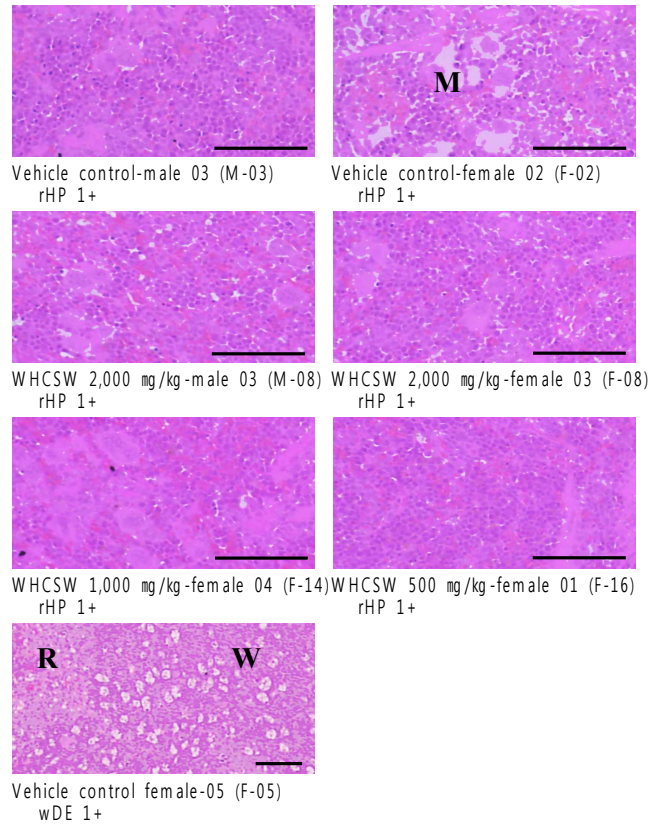


Fig. 3. Histopathological changes detected in the spleen. Note that slight [1+] hyperplasia of lymphoid cells and megakaryocytes in the red pulp (rHP) were randomly detected throughout the experimental groups tested regardless of genders including both genders of vehicle controls as sporadic findings not WHCSW administration related toxicological signs. In addition, one mouse (1/5; 20 %) in female vehicle control showed slight decreases of white pulp lymphoid cells (wDE; as seen vacuoles) as sporadic findings. HCSW, *Woohwangchungshim-won* rHP, hyperplasia of lymphoid cells and megakaryocytes in the red pulp wDE, decreases of white pulp lymphoid cells R, red pulps; W, white pulps; M, megakaryocytes All hematoxylin & eosin stain; Scale bars = 200 μ m.

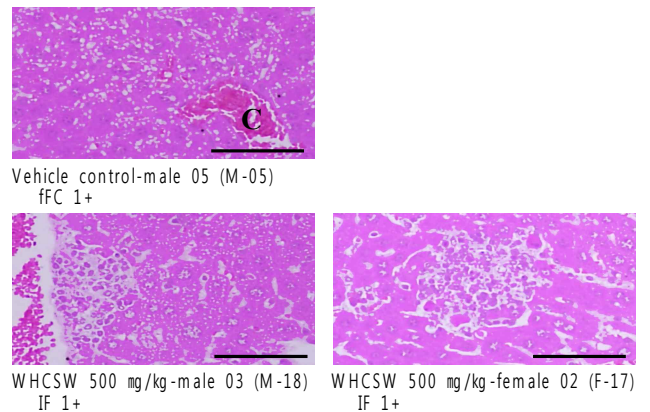


Fig. 4. Histopathological changes detected in the liver. Note that slight [1+] focal fatty changes (fFC) were restrictedly observed in one (1/5; 20 %) male vehicle control as sporadic finding. In addition, slight focal inflammatory cell infiltrations (IF) were also restrictedly detected in one (1/5; 20 %) female and male mice administered WHCSW 500 mg/kg as sporadic finding not WHCSW administration related toxicological signs because of dose independent frequencies. WHCSW, *Woohwangchungshim-won* fFC, focal fatty changes IF, focal inflammatory cell infiltrations C, central vein All hematoxylin & eosin stain; Scale bars = 200 μ m.

6. 조직병리학적 소견

경미[1+]한 폐충혈(폐포 벽의 비후와 염증세포 및 적혈구 축적)이 암수 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에서 산발적으로 관찰되었다(Fig. 1). 경미[1+]하거나 중등도[2+]의 흉선 피질 임파구 감소가 암수 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에서 산발적으로 관찰되었고, 경미[1+]한 흉선 피질 임파구 증혈이 암컷 매체 대조군에서 1례 관찰되었다(Fig. 2). 경미[1+]한 비장 적색수질 임파구 과다증식 또는 백색수질 임파구 감소(Fig. 3), 경미[1+]한 간 국소 지방 변화(Fig. 4), 경미[1+]한 악하임과절 임파구 감소(Fig. 5) 및 경미[1+]하거나 중등도[2+]의 자궁 점막 탈락(Fig. 6) 소견이 암수 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에서 산발적으로 관찰되었다. 한편, 암수 500 mg/kg 투여군에서만, 경미한 간 국소 염증세포 침윤 소견(Fig. 4)이 각각 1례(1/5; 20%) 관찰된 이외에 우황청심원 투여와 관련된 조직병리학적 소견은 나타나지 않았다(Table 10, 11).

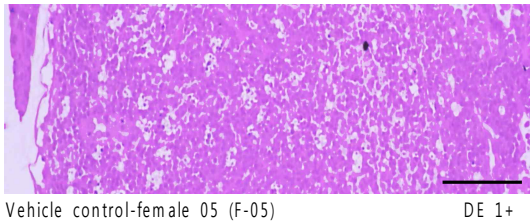


Fig. 5. Histopathological changes detected in the submandibular lymph node. Note that slight [1+] decreases of lymphoid cells (DE; as seen vacuoles) were restrictly detected one (1/5; 20%) mouse in female vehicle control mice as sporadic finings. WHCSW, *Woohwangchungshim-won* DE, decreases of lymphoid cells All hematoxylin & eosin stain; Scale bars = 200 μ m.

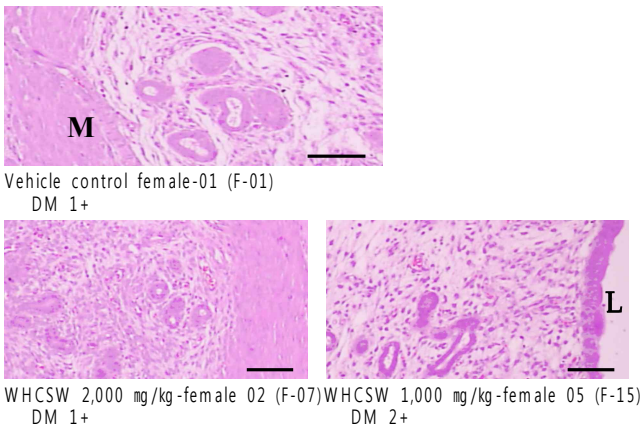


Fig. 6. Histopathological changes detected in the uterus. Note that slight [1+] or moderate [2+] desquamation of uterus mucosa (DM) were observed in one (1/5; 20%) or two (2/5; 40%) female mice in vehicle control, WHCSW 2,000 and 1,000 mg/kg-administered group as a process of estrus cycle. WHCSW, *Woohwangchungshim-won* L, lumen; M, muscle layer All hematoxylin & eosin stain; Scale bars = 200 μ m.

고찰

우황청심원은 宋代(A.D. 1107년경) 太平惠民和劑局에 최초로 기재된 처방으로 心胸熱毒을 치료하는 九味清心元과 虛勞羸瘦, 脾胃虛弱, 飲食減少, 或大病後 氣不復常, 漸成勞損 등을 다스리는 大山芋丸을 合方한 것에서 熟地黃을 去한 處方이다¹⁸⁾. 우

리나라에서는 광해군 5년(A.D. 1613년)에 발간된 東醫寶鑑²⁾에서 처음 수록되었는데, 중풍으로 인한 人事不省, 痰涎壅盛, 言語塞澁, 口眼喎斜, 手足不遂 등의 증상에 사용한다고 하였다.

東醫寶鑑에 수록된 우황청심원의 약물내용은 牛黃, 山藥, 甘草, 人蔘, 蒲黃, 神麩, 麝香 등을 비롯한 총 28종의 한약재로 구성되어 있는데, 최근에는 東醫寶鑑에 수록된 처방 구성 약물 중 朱砂, 石雄黃, 犀角을 제외하고, 大棗, 蜂蜜 등을 가하여 丸로 만든 다음, 金箔을 입혀 丸劑로 많이 사용하고 있으며, 제약 회사를 중심으로 현탁액 제제로의 제형변화를 위한 노력이 이루어졌다^{4,19)}. 제약 회사에서는 麝香의 대체 물질인 l-muscone과 靈貓香이 함유된 새로운 우황청심원의 개발에 성공하여 시판하고 있어 국내에서의 우황청심원에 관한 관심과 연구는 한의학계 뿐만 아니라 제약업계에서도 활발하다⁴⁾.

한의학계에서 진행된 대부분의 기존 연구들은 우황청심원의 효능을 입증하는 것에만 초점을 맞추고 있으며, 우황청심원의 부작용 및 인체에 미치는 독성에 대한 한의학계의 연구는 朱砂가 함유된 우황청심원을 장기투여하였을 경우 인체의 혈중 수은 농도와 혈구 및 간, 신기능에 미치는 영향에 대한 임상 연구가 진행된 것이 유일하다. 이 연구의 결과에 따르면 우황청심원의 상용량(1일 1환)을 투여하는 경우에는 수은 중독 및 혈구의 변화, 간, 신기능의 변화는 일으키지 않는 것으로 보고되고 있다^{4,20)}.

본 연구에서는 우황청심원의 일반 독성시험 중 현재 한국식품의약품안전청 고시 “의약품 등의 독성시험기준”¹⁴⁾에 명시되어 있는 마우스 경구 단회투여독성 시험을 실시하여, 장기투여 독성시험과 생식·발생독성 시험을 위시한 특수 독성시험에 대한 기초자료를 제공 및 우황청심원에 대한 유효성 평가, 임상적 유효용량 설정 및 적정 투여용량, 최대 용량 설정을 위한 연구에 근거를 제공하고자 하였다.

본 실험에서는 이전의 우황청심원 환제 및 액제에 대한 마우스에서의 7일간 예비 독성 실험¹²⁾ 및 간 독성에 대한 랫트에서의 급성 및 아급성 독성 실험¹³⁾에서, 뚜렷한 독성 증상이 나타나지 않았기 때문에, 한국식품의약품안전청 고시 제 2009-116호¹⁴⁾와 OECD 실험기준 #423¹⁵⁾에 의거하여, 설치류 최고 한계투여용량인 2,000 mg/kg을 최고 용량으로 설정하였으며, 공비 2로 1,000 및 500 mg/kg을 중간 및 저용량으로 설정하였다. 이후 마우스를 대상으로 단회 경구투여하고, 14일간 체중 및 임상증상을 관찰하였으며, 14일 후 최종 부검을 통하여 12개의 주요 장기에 대한 장기 중량, 육안 부검 및 조직병리학적 관찰을 실시하였다.

그 결과, 단회투여 독성 시험에서 설치류 최대 한계투여 용량인 2,000 mg/kg까지 우황청심원 투여와 관련된 사망례가 관찰되지 않았으며, 우황청심원 투여와 관련된 임상증상, 체중, 체중증가량 및 장기 중량 변화 역시 관찰되지 않았다. 또한 육안부검 시 다양한 정도의 폐충혈, 흉선 위축, 비장 위축, 악하임과절 종대 및 자궁 부종 소견이 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에서 산발적으로 관찰되었다, 한편 조직병리학적 검사시 경미하거나, 중등도의 폐충혈, 흉선 피질 임파구 감소 또는 증혈, 비장 적색수질 임파구 과다증식 또는 백색수질 임파구 감소, 간 국소 지방 변화, 악하임과절 임파구 감소 및 자궁 점막 탈락 소견이 암수 매체 대

조군을 포함한 모든 실험군에서 산발적으로 관찰되었다. 단지, 암수 500 mg/kg 투여군에서만 간에 경미한 국소 염증세포 침윤 소견이 각각 1례(1/5; 20 %) 나타난 이외에 우황청심원 투여와 관련된 육안 부검 및 조직병리학적 소견은 관찰되지 않았다.

본 실험에 사용한 실험동물의 체중 및 장기중량은 동일한 주령의 마우스들의 정상 범주^{21,22)} 내에서 관찰되었으며, 암컷 1,000 및 500 mg/kg 투여군에서만 투여일~투여 후 7일 동안의 체중이 유의성 있게($p<0.05$) 증가했으나, 용량 의존적 변화는 없어 우황청심원 투여와 관련 있는 독성으로 추정하기는 어렵다.

한국식품의약품 안전청 고시 제 2009-116호¹⁴⁾ 및 OECD 기준 #423¹⁵⁾에 따르면, 설치류에서 투여한계 농도를 2,000 mg/kg 또는 최대 용해농도로 규정하고 있고, 투여 용량은 20 ml/kg을 넘지 못하게 규정하고 있다. 본 실험에서 사용한 우황청심원 미세분말은 멸균 증류수에 100 mg/ml까지 비교적 잘 현탁되어, 20 ml/kg의 용량 즉, 2,000 mg/kg을 최고 농도로 투여하였다.

앞에서 살펴본 육안 부검시 나타난 다양한 소견들과 조직병리학적 검사에서 나타난 소견들은 암수 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에서 산발적으로 관찰되었으며, 용량 의존성은 없어, 우황청심원 투여와 관련 없는 우발적 병소로 판단되고, 이들 병소들은 정상 마우스에서도 나타날 수 있는 소견으로 알려져 있다^{23,24)}. 특히 자궁은 estrus cycle에 따라 쉽게 변화할 수 있어^{25,26)}, 자궁 부종은 estrus cycle에 따른 이차적 변화로 판단된다. 또한 암수 500 mg/kg 투여군에 국한된 경미한 간의 국소 염증세포 침윤 소견 역시 용량 의존성이 인정되지 않아, 우황청심원 투여와 관련된 독성증상은 아닌 것으로 판단되며, 이들은 역시 정상 마우스에서도 나타날 수 있는 소견이다^{23,24)}.

US Environmental Protection Agency OPPTS 870.100²⁷⁾에 따르면 일반적으로 반수 치사량이 5,000 ~ 15,000 mg/kg인 물질을 무독성 물질로, 500 ~ 5,000 mg/kg을 비교적 저독성(Class III) 물질로 규정하고 있으나, 한국식품의약품 안전청 고시 제 2009-116호¹⁴⁾ 및 OECD 기준 #423¹⁵⁾에 따르면, 설치류에서 투여한계 농도를 2,000 mg/kg으로 제한하고 있다. 이상의 결과를 볼 때, 본 실험의 마우스 단회 경구투여 독성실험에서 우황청심원의 반수치사량 및 개략적 치사량은 각각 2,000 mg/kg 이상으로 나타나 비교적 안전한 약물로 판단된다. 본 연구는 우황청심원에 대한 유효성 평가, 임상적 유효 용량 설정 및 적정 투여 용량, 최대 용량 설정을 위한 근거로 사용될 수 있을 것으로 생각되며, 향후 이에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 보인다.

결 론

우황청심원의 마우스 단회 경구투여 독성평가 실험을 수행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

우황청심원 2,000 mg/kg까지 투여와 관련된 사망례는 관찰되지 않았다. 일부 용량 비의존적으로 나타난 우발적 병소와 체중증가를 제외하고, 우황청심원 투여와 관련된 임상증상, 체중, 체중증가량, 육안부검 및 장기 중량 변화 역시 관찰되지 않았다.

12개 장기에 대한 조직병리학적 검사에서도 우황청심원 투여

와 관련된 이상 변화는 관찰되지 않았다.

이와 같은 결과를 통하여 볼 때, 우황청심원의 반수치사량(LD50) 및 개략적 치사량(ALD)은 각각 2,000 mg/kg이상으로 관찰되어, 비교적 안전한 약물로 판단된다.

References

1. Chen, S.W. Taiping hui min he ji ju fang Taibei:Xuan feng chu ban she. p 81, 1987.
2. Heo, J. Donguibogam Seoul:Nam san dang. 362, 692, 2007.
3. Nam, S.G., Lee, K.S. Experimental Studies on the Effects of Woowhangchungsimwon and Sohaphyangwon. J Kyung-Hee University Medical Center. 6(2):220-223, 1990.
4. Lee, J.W., Baek, K.M., Baek, Y.D., Im, E.Y., Chang, W.S., Cheon, W.H., Chung, I.K. The Latest Research Trends on Woowhangchungsim-won : A Review in Korean Articles. Korean J Orient Int Med. 31(4):775-791, 2010.
5. Cho, S.J., Kim, B.Y., Kim, H.W., Jeong, B.H., Bong, S.J., Kim, Y.S., Lee, J.S., Cho, S.I., Kwon, J.N., Kim, Y.K. Microarray-Based Gene Expression Profiling to Elucidate the Effectiveness of Woowhangchungshim-won on ICH Model in Rats. Kor J Herbology. 22(4):253-260, 2007.
6. Hwang, J.W., Kim, C.H., Min, I.K., Kim, Y.J., Leem, J.T., Na, B.J., Park, S.W., Park, J.M., Ko, C.N., Bae, H.S., Jung, W.S., Moon, S.K., Cho, K.H., Kim, Y.S. A Comparative Study about Cerebrovascular Reactivity from a Single Medication and Continuous Medication on Healthy Subjects. J Korean Orient Med. 30(1):95-108, 2009.
7. Cho, G.S., Chung, S.H., Shin, G.C., Moon, I.S., Lee, W.C. The Effects of Woowhangcheongsim-won on Hypoxic E18 Cortical Neuroblast. Korean J Orient Int Med. 22(2):135-144, 2001.
8. Park, I.S. The Neuroprotective Effects of Woowhangcheongsim-won on Cerebral Ischemia following the Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. Anatomy and Cell Biology. 38(3):227-233, 2005.
9. Choi, E.W., Cho, M.H., Shin, S.D., Mar, W.C. The Comparative examination of pharmacological effects of musk containing and civet containing WooHwangChungSimWon on the hypertension and heart contraction. Korean J Pharmacognosy. 31(3):310-319, 2000.
10. Kim, L.D., Yun, S.P., Lee, S.H., Kim, E.J., Na, B.J., Jung, D.W., Shin, W.J., Moon, S.K., Bae, H.S. Effects of Uwhangchlingsim-won(Niuhuangqingxin-yuan) on Systemic Blood Pressure, Pulse Rate, Cerebral Blood Flow, and Cerebrovascular Reactivity in Humans. Korean J Orient Int Med. 25(3):440-450, 2004.
11. Baek, J.S., Kim, J.W., Whang, W.W. The effect of

- Woohwangchungsimwon on the learning and memory in NOS inhibitor treated rats in Morris water maze. *J Orient Neuropsychiatry*. 10(2):115-126, 1999.
12. Kwack, S.J., Kim, H.S., Chun, S.A., Lim, S.Y., Park, H.S., Hong, C.Y., Han, H.S., Choi, B.C., Lee, B.M. Comparative Acute Toxicity Studies on Woo Whang Chung Shim Won Suspension and Pill in Mice. *Toxicological Research*. 12(2):295-303, 1996.
 13. Kim, H.J., Seo, K.W., Park, K.S. Hepatotoxicity of Uhwangchungsimwon: Acute and Subacute Studies in Rats. *Toxicological Research*. 13(3):265-274, 1997.
 14. Korea Food and Drug Administration(KFDA). Testing Guidelines for Safety Evaluation of Drugs. Notification No. 2009-116, issued by the KFDA on August 24, 2009.
 15. Organization for Economic Co-Operation and Development (Ed.). OECD guideline (423) for testing of chemicals-acute oral toxicity-acute toxic class method, 2001.
 16. Irwin, S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systemic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiological state of the mouse. *Psychopharmacology*. 13: 222-257, 1968.
 17. Dourish, C.T. Effects of drugs on spontaneous motor activity. In: Greenshaw AJ and Dourish CT (Ed). *Experimental Psychopharmacology*, Humana Press: Clifton. pp 325-334, 1987.
 18. Yoon, G.Y. Dong ui im sang bang je hak. Seoul:Myung bo. p 71, 234, 1985.
 19. Ahn, I.W., Mun, B.S., Kim, S.G.I, Shin, M.K. Clinical Study on the Woohwangchungsim-Won (SU-3), Suspension. *The New Medical J*. 33(2):109-116, 1990.
 20. Kim, D.W. Effect of Woohwangchungsimwon on the serum Mercury concentration, blood cells, Liver and Kidney function. *J Trad Kor Med*. 8(1):37-42, 1998.
 21. Plata, E.J., Murphy, W.H. Growth and haematologic properties of the BALB/wm strain of inbred mice. *Lab Anim Sci*. 22(5):712-720, 1972.
 22. Yamaguchi, C., Fujita, S., Obara, T., Ueda, T. Effects of room temperature on reproduction, body weight and organ weights, food and water intakes, and hematology in mice. *Exp Anim*. 32(1):1-11, 1983.
 23. Lee, J.H., Yang, K.J., Shin, H.D., Park, B.R., Son, C.W., Jang, H.J., Park, D.C., Lee, H.S., Ku, S.K. Single subcutaneous dose toxicity of Polycan®, a β -glucan originated from *Aureobasidium* in mice. *Lab Anim Res*. 21(4):299-305, 2005.
 24. Lee, H.S., Lee, I.G., Ku, S.K. Single oral dose toxicity study of water extracts of *Picrorrhiza Rhizoma* in mice. *J Toxicol Pub Health*. 22(2):117-126, 2006.
 25. Banks, W.J. Female reproductive system. In: Banks WJ (Ed). *Applied veterinary histology*, 2nd ed., Williams & Wilkins: Baltimore. pp 506-526, 1986.
 26. Pineda, M.H. Female reproductive system. In: McDonald LE and Pineda MH (Eds). *Veterinary endocrinology and reproduction*, Lea & Febiger: Philadelphia. pp 303-354, 1989.
 27. US Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.100, Acute Toxicity Testing Background. US EPA August, Washington, USA, 1998.