

荊芥連翹湯 추출물의 經口投與가 rat의 受胎能 및 初期 胚發生에 미치는 影響

김은희^{1,2}, 황순이^{1,2}, 김상찬^{1,3}, 지선영^{1,2}

대구한의대학교 ¹한학과대학, ²안이비인후피부과, ³한방신약개발연구팀(BK21)

ABSTRACT

The Effect of Hyeonggaeyeongyotang Extract on the Fertility, Early Embryonic Development in Wistar rats by Oral Gavage Administration

Eun-Hee Kim^{1,2}, Sun-Yi Hwang^{1,2}, Sang-Chan Kim^{1,3}, Seon-Young Jee^{1,2}

¹College of Oriental Medicine, ²Dept. of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, ³Development Team for The New Drug of Oriental Medicine (BK21 program) Daegu Haany University,

Objectives : this study was to access the effect of Hyeonggaeyeongyotang water extracts, a polyherbal formula has been used as folk medicine, on the fertility and early embryonic development of male and female Wistar rats when administered by oral gavage.

Methods : In male rats, Hyeonggaeyeongyotang extract were dosed 4 weeks before pairing and 2 weeks after mating including the mating periods up to termination after necropsy of the majority of the females. In female rats, they were dosed 2 weeks before pairing, and from Day 0 to Day 7 of gestation. This study was conducted in accordance with the recommendations of the KFDA Guideline [2005-60] for Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products.

-
- 교신저자 : 지선영
 - 대구 수성구 상동 165 대구한의대학교 부속 대구한방병원 안이비인후피부과교실
 - Tel : 053-770-2118 Fax : 053-768-6340 E-mail : jeesy@dhu.ac.kr
 - 접수 : 2008/ 06/ 09 채택 : 2008/ 06/ 12

Results :

1. No Hyeonggaeyeongyotang extract treatment-related changes on the clinical signs and mortalities, the Food consumptions, the Body weights and gains were demonstrated in all dosed levels tested in this study except for 500ml/kg-dosing male group in which a significant($p < 0.05$) increase of body gains was detected during day 0-7 after dosing.

2. No Hyeonggaeyeongyotang extract treatment-related changes on the pre-coital intervals, the estrus cycles, the mating index, conception rate and fertility index were demonstrated in all dosed levels tested in this study.

3. No Hyeonggaeyeongyotang extract treatment-related gross findings on reproductive organs, the weights of reproductive organs, histopathological findings on reproductive organs, the corpora lutea number, implantation site number, live fetus number, number of resorpted embryo and pre- and post-implatation loss were demonstrated in all dosed levels tested in this study.

Conclusions : Base on the results, it is considered that the NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect Level) for fertility and early embryonic development toxicity of Hyeonggaeyeongyotang extract was under 2000ml/kg/day in Wistar male and female rats because there no treatment-related changes on the fertility and early embryonic developmental index were demonstrated in all dosed levels tested.

Key word : HYT (Hyeonggaeyeongyotang), Fertility, Embryonic development, toxicity

1. 서 론

천연물을 기원으로 하는 한약은 질병의 치료제나 예방의 목적으로 널리 사용되어 왔으며, 최근에는 각종 식품 감미료, 향료, 건강 보조식품이나 기능성 식품, 기능성 화장품, 천연 살충제 등의 원료로 다양하게 개발되고 있다¹⁾. 그러나 오래전부터 사용되어 왔다는 사실만으로 이에 대한 안전성은 충분히 검토되지 않고 있다.

한약을 만성질환이나 예방의 목적으로 장기간

복용한다는 가정하에 다음 세대에 미치는 잠재적인 독성 역시 간과할 수 없다. 그러나 현재까지 한약 처방으로 생식·발생 독성평가를 수행한 연구는 매우 적다.

초기 배발생에 미치는 배자독성에 관한 연구는 *Tripterigium wilfordii*²⁾, polysaccharopeptide³⁾ 등이 있으며, 牛膝(Radix Achyranthis bidentatae)과 햇볕을 받은 감자의 배자독성에 관한 보고⁴⁻⁵⁾에 따르면 한약 추출물 역시 생식독성에서 완전히 안전한 것은 아님을 알 수 있다. 한편 일부 추출물에

의한 독성증상이 다른 추출물의 조합에 의해 현저히 감소되는 것으로 알려져 있어⁶⁾ 각각의 단일 추출물의 독성도 매우 중요하지만 각각의 독성학적 소견으로 복합처방의 독성을 짐작하기에는 어려운 점이 많다.

최근 한약 처방에 대한 독성 측면의 검사가 진행되고 있으며⁷⁻⁹⁾, 이러한 한약 처방에 대한 독성평가는 한약을 소재로 한 기능성 식품의 개발 또는 대중화를 위해 반드시 선행되어야 할 것으로 판단된다.

荊芥連翹湯은 龔¹⁰⁾의 《萬病回春》에 처음 수록된 처방으로 上焦風熱을 다스리며 각종 耳鼻咽喉科疾患에 많이 활용되어 왔다. 그러나 아직까지 荊芥連翹湯 추출물의 수태능 및 초기 배발생에 대한 독성학적 보고는 찾아볼 수 없다.

본 연구에서는 이러한 荊芥連翹湯의 생식·발생 독성시험의 일환으로 荊芥連翹湯 추출물의 경구투여가 암수 rat의 수태능과 초기 배발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 식품의약품안전청고시 의약품등독성시험기준[제 2005-60호]¹¹⁾에 따라 수컷의 경우 교미 전 4주와 교미기를 포함한 2주 총 6주간 荊芥連翹湯 추출물을 경구투여한 후 수태능 및 생식기에 미치는 영향을 평가하였고, 암컷에서는 교미 전 2주와 임신 후 1주 총 3주간 荊芥連翹湯 추출물을 투여한 후 수태능, 초기 배발생 및 생식기에 미치는 영향을 종합적으로 평가하였다.

II. 재료 및 방법

본 실험은 식품의약품안전청고시 의약품등독성 시험기준[제 4장 생식·발생 독성시험(reproductive and developmental toxicity studies)]¹¹⁾에 준하여 실험을 실시하였으며, 모든 실험동물은 《Guide for the Care and Use of Laboratory Animals¹²⁾》에 준하여 취급하였다.

1. 실험동물 및 실험군

암수 각각 20마리의 CD(WI) BR Wistar계의 rats(Charles Rivier, Japan)를 본 실험에 사용하였다. 입수 시 수컷은 6주령(체중 220-230g)이었고, 암컷은 8주령(체중 215-220g)이었으며, 각각 1주간의 순화를 거쳐 7주령 수컷과 9주령 암컷을 선별하여 사용하였다. 실험동물은 한 그룹에 5마리씩, 암수 각각 매체대조군, 2000, 1000 및 500ml/kg의 荊芥連翹湯 추출물을 공급한 실험군의 총 8개의 군으로 구분하였다(Table 1). 온도 약 22-25℃, 습도 40-45%, 명암주기 12:12hr로 조절된 실험동물 사육실에서 사육하였으며, 고품사료(삼양사, 서울) 및 수도수를 자유롭게 공급하였다. 실험동물은 순화기간 동안 한 cage에 5마리씩 수용하였으며, 실험기간 동안은 개체별로 individual cage에 수용하였고, 동물은 picric acid를 이용하여 개체를 식별하였다(Table 1).

Table 1. Experimental design in this study

Group ID	Treatment	Dosage	Number of animal	Sex of animal
VCM	DW	0	5	Male
G1M	HYTE	2000 ml/kg	5	
G2M	HYTE	1000 ml/kg	5	
G3M	HYTE	500 ml/kg	5	
VCF	DW	0	5	Female
G1F	HYTE	2000 ml/kg	5	
G2F	HYTE	1000 ml/kg	5	
G3F	HYTE	500 ml/kg	5	

HYTE: Hyeonggaeyeongyotang extract

DW: Distilled Water

AC Extracts were suspended in DW and dosed by gastric gavage at 10ml/kg.

VCM: Vehicle Control Male

VCF: Vehicle Control Female

G1, G2, G3M: Group1, 2, 3Male

G2, G2, G3F: Group1, 2, 3Female

2. 투여용량 설정

본 실험의 투여농도는 <Table 1>에서와 같이

식품의약품안전청고시 의약품등독성시험기준¹¹⁾에 준하여 설치류 최대 투여 한계 용량인 2000ml/kg을 최고 용량으로 결정하였으며, 공비 2로 1000 및 500ml/kg의 4 단계의 용량군을 설정하였다.

3. 荊芥連翹湯의 조성 및 추출

1) 조성

본 실험에 사용된 약재는 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 구입·엄선한 것을 사용하였으며, 龔¹⁰⁾의 《萬病回春》에 준하여 荊芥連翹湯 1첩 분량의 조성은 <Table 2>와 같다.

Table 2. Composition of Hyeonggaeyeongyotang used in this study

藥物名	生藥名	用量 (g)	藥物名	生藥名	用量 (g)
荊芥	Schizonepetae Herba	2.63	枳殼	Aurantii Fructus	2.63
連翹	Forsythiae Fructus	2.63	黃芩	Scutellariae Radix	2.63
防風	Ledebouriellae Radix	2.63	梔子	Gardeniae Fructus	2.63
當歸	Angelicae gigantis Radix	2.63	白芷	Angelicae dahuricae Radix	2.63
川芎	Cnidii Rhizoma	2.63	桔梗	Platycodi Radix	2.63
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	2.63	甘草	Glycyrrhizae Radix	1.88
柴胡	Bupleuri Radix	2.63			
總量					33.44

2) 추출

선정된 약재 15첩 분량(501.60g)을 취하여 정제수 5000ml로 3시간 동안 가열 추출한 후 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator(N-N type; LAB Camp, Dajeon, Korea)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer(PVTFD10A; IlShin Lab., Seoul, Korea)를 사용하여 동결 건조시켜 1첩 당 3.70g, 총 55.53g(수율 약 11.07%)의 추출물을 얻어 실험에 사용하였다.

4. 荊芥連翹湯 추출물의 투여

荊芥連翹湯 추출물은 멸균 주사용 증류수(중외제약, 서울)에 현탁하여 체중을 기준으로 10ml/kg로 경구용 존데(Sonde)를 이용하여 투여하였으며, 매체대조군에서는 멸균 주사용 증류수를 체중을 기준으로 10ml/kg로 동일한 방법으로 투여하였다.

荊芥連翹湯 추출물은 수컷의 경우, 교미 전 4주

및 교미기를 포함하여 교미 후 2주, 총 6주간 荊芥連翹湯 추출물을 투여하였으며, 암컷의 경우에는 교미 전 2주 및 임신 후 1주, 총 3주간 荊芥連翹湯 추출물을 투여하였다.

5. 체중의 변화

실험동물은 투여 전 1일(Day -1)부터 투여 종료 시까지 매주 2회 이상 체중을 측정하였다. 수컷의 경우, 투여 전 1일, 투여일, 투여 후 1, 7, 14, 28(교미일), 35, 41, 및 42일의 체중을 기록하였으며, 암컷의 경우에는 투여 전 1일, 투여일, 투여 후 1, 7 및 14일(교미일), 임신일, 임신 후 7, 13 및 14일에 체중을 측정하여 기록하였다. 또한 위 내용물에 의한 약물의 흡수장애를 최소화하고, 사료섭취량의 차이에 의한 장기무게의 변화를 최소화하기 위하여, 최초 약물투여 및 부검 전에 18시간 이상 절식시켰다. 荊芥連翹湯 추출물 투여 후 체중의 변화를 명확히 하고, 荊芥連翹湯 추출

물 투여 시의 개체 차이에 의한 변화를 줄이기 위해 하기의 공식을 이용하여 증체량을 계산하였다.

Body weight gains =

Body weight at "Check point" - Body weight at initial dosing

Check point:

Male: 7, 14, 28, 35, 41 and 42 days after dosing

Female: 7 and 14 days after dosing

7, 13 and 14 days after gestation.

수컷의 경우, 투여 후 0-7, 0-14, 0-28, 0-35, 0-41 및 0-42일간의 증체량을 기록하였으며, 암컷에서는 투여 후 0-7 및 0-14일간의 증체량과 함께 임신 후 0-7, 0-13 및 0-14일간의 증체량을 기록하였다.

6. 임상증상의 관찰

실험동물은 투여 전 1일부터 투여 종료 시까지 매일 오전, 오후 2회씩 이상 증상을 관찰하였다. 관찰된 임상증상은 개체별로 기록하였다.

7. 사료섭취량의 측정

실험동물의 하루 사료섭취량(Food consumption: g/rat/day)은 절식을 실시한 투여 전 1일과 최종 부검일을 제외한 실험 전 기간동안 하기의 공식을 이용하여 측정하였다.

Daily food consumption(g/rat/day) =

Amounts of food which were supplied to individual cage - Their remnants that were measured next day.

실험동물의 사료섭취량은 일정기간 동안의 하루 사료섭취량을 합산하여 편의상 수컷의 경우에는 荊芥連翹湯 추출물 투여 후 1-7, 7-14, 14-28, 28-35, 35-41 및 전 기간동안의 사료섭취량(Day 1-41)을 기록하였으며, 암컷의 경우에는 荊芥連翹

湯 추출물 투여 후 1-7 및 7-14, 임신 후 0-7 및 7-13일, 임신기간 동안의 총 사료섭취량과 실험 전 기간동안의 사료섭취량(Day 1-34)을 기록하였다.

8. 생리주기(Estrous cycle)의 측정

암컷의 경우, 생리주기의 길이 및 荊芥連翹湯 추출물 투여 후 생리주기의 변화를 관찰하기 위하여, 교미 10일 전부터 한 주기가 완료될 때까지 질 도말 (vaginal smear) 표본 내 조직세포의 변화를 관찰 기록하였다.

질 도말 표본은 암컷의 질 부위를 면봉으로 채취한 후, slide glass에 도말하고, DiffQuik (American Scientific Products, IL, USA)으로 염색한 후 관찰하였다.

9. 교미행동 및 수태율의 관찰

일정기간 荊芥連翹湯 추출물을 투여한 후, 동일한 용량 투여군을 성비 1:1로 교미를 시켰다. 교미 후 다음날 오전에 질 도말 표본을 통해 정충(spermatozoa)을 확인하였다. 질 도말 표본에서 정충이 관찰된 날을 임신일(dat 0 of gestation)로 정하고, 암수를 분리하였으며, 질 도말을 중지하였다.

10. 성교 전 기간(Pre-coital interval)

암컷은 교미 시작일로부터 질 도말 표본에서 정충이 관찰될 때까지 기간 즉, 교배까지의 기간인 성교 전 기간(pre-coital interval)을 관찰 기록하였다.

11. 교미율, 임신율 및 수태율의 계산

교미율, 임신율 및 수태율을 하기의 공식을 이용하여 계산하였다.

Mating index (%) =

[Animal mated/Animal paired] × 100

Conception rate (%) =

[Animals that achieved a pregnancy/Animal mated] × 100

Fertility index (%) =

[Animals that achieved a pregnancy/Animal paired] × 100

12. 부검소견 및 장기무게의 측정

모든 실험동물은 최종 부검일에 ethyl ether로 마취하고 방혈한 후 육안적인 병변의 유무를 관찰하였다. 이후 수컷의 경우에는 부고환(epididymis), 전립선 (prostate), 정낭선(seminal vesicle), 고환(testis) 및 간(liver)을 적출하여 무게를 기록하였고, 암컷의 경우에는 난소(ovary)와 간(liver)을 적출하여 무게를 기록하였다. 부고환, 고환 및 난소는 양쪽의 무게를 동시에 측정하였다. 모든 실험동물은 사료섭취에 따른 차이를 최소화하기 위하여 부검 전 18시간 이상 절식시켰으며, 개체별 체중 차이에 의한 장기중량의 변화를 최소화하기 위해 하기의 공식을 이용하여 이들 장기들의 상대중량을 계산하였다.

Relative organ weights (%) =

(Absolute organ weight/Body weight at sacrifice) × 100

13. 조직표본의 제작 및 관찰

장기중량을 측정한 후, 수컷의 경우에는 부고환, 전립선, 정낭선 및 고환을, 암컷의 경우에는 난소를 10% neutral buffered formalin에 24시간 이상 고정하였다. 고정한 조직은 에탄올 계열에 탈수한 후 paraffin에 포매하였으며, 3-4 μ m의 연속절편을 제작하였다. 각 조직절편은 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 실시하여 조직학적 변화를 광학현미경을 이용하여 확인하였다.

14. 초기 배발생에 미치는 영향

암컷의 경우, 부검 시 모든 실험동물의 양쪽 난소에 존재하는 황체의 수를 기록하였으며, Salewski의 염색방법¹³⁾으로 자궁내에 존재하는 착상부위(implantation site)의 개수를 기록하였다. 또한 자궁내에 존재하는 태자의 수를 기록하였으며, 생존 태자 수와 착상부위의 개수를 이용하여 하기의 공식으로 흡수된 배자의 수를 계산하였다.

Number of resorption embryo =

Number of implantation - Number of live fetus
또한 기록된 황체 수, 착상부위의 개수 및 생존 태자의 수를 이용하여 하기의 공식으로 착상 전·후 消失率을 계산하였다.

Pre-implantation loss (%) =

[(Number of CL - Number of implantation)/Number of CL] × 100

CL: Corpora Lutea

Post-implantation loss (%) =

[(Number of IP - Number of live fetus)/Number of IP] × 100

IP: Implantation

15. 통계처리

모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 각각의 매체대조군과 비교하여 유의성을 검증하였다. 유의성 검증은 Mann-Whitney test, Wilcoxon test로 실시하였으며, p-value가 0.05 이하일 때 유의성을 인정하였다. 통계처리는 SPSS for Window(Release 6.1.2, SPSS Inc., USA)를 사용하여 처리하였다.

III. 결 과

1. 임상증상 및 사망률

Table 3. Summary of clinical signs, mortality and adult performance

Group*		VC	G1	G2	G3	Group*		VC	G1	G2	G3
M a l e	Initial group size	5	5	5	5	F e m a l e	Initial group size	5	5	5	5
	Paired	5	5	5	5		Paired	5	5	5	5
	Induced pregnancy in female partner	5	5	5	5		Not pregnancy	0	0	0	0
	Mortality	0	0	0	0		Mortality	0	0	0	0
	Clinical signs	ND ¹⁾	ND	ND	ND		Clinical signs	ND	ND	ND	ND
	Survive to terminal necropsy	5	5	5	5		With live young on day 14 of gestation	5	5	5	5

* Group ID was listed in Table 1

1) ND, not detected

2. 체중의 변화

Table 4. Changes of Body weights during treatment of Hyeonggaeyeongyotang extract on male and female Wistar rats (Mean±SD, g)

Group ID ¹⁾	VC	Hyeonggaeyeongyotang extract treating group			
		G1	G2	G3	
M a l e	Day -1	252.80±13.26	255.00±16.51	254.80±8.17	251.80±9.42
	Day 0 ^{a,b)}	233.40±14.91	234.40±15.22	234.80±7.66	231.00±10.30
	Day 1	252.40±13.45	254.80±13.94	254.40±7.83	255.60±6.88
	Day 7	277.60±14.89	278.20±19.43	282.40±9.10	284.40±10.90
	Day 14	300.00±9.82	307.80±19.64	302.40±8.05	306.40±7.23
	Day 28 ^{c)}	331.60±14.06	329.20±15.06	330.60±11.72	339.20±12.34
	Day 35	380.40±11.10	378.20±16.12	377.80±11.63	376.60±13.79
	Day 41	394.60±10.81	392.40±20.88	395.80±13.99	390.60±15.90
	Day 42 ^{a,d)}	356.20±12.99	349.80±21.05	357.40±12.86	351.20±20.23
F e m a l e	Day -1	242.20±9.88	242.00±6.60	242.00±8.60	241.40±11.59
	Day 0 ^{a,b)}	221.00±12.35	221.60±7.73	226.80±10.96	223.20±8.90
	Day 1	241.80±8.90	243.20±4.76	243.80±8.44	241.60±9.86
	Day 7	256.60±8.08	258.40±5.37	255.80±7.66	252.00±9.35
	Day 14 ^{c)}	264.40±9.32	267.80±4.87	269.20±7.36	267.40±5.13
	Ges 0 ^{d)}	268.80±11.19	278.40±4.98	276.40±6.23	275.80±6.10
	Ges 7	288.60±13.58	297.80±5.40	297.20±15.59	296.20±7.95
	Ges 13	301.00±15.98	309.80±5.45	311.20±12.99	313.40±4.39
	Ges 14 ^{a,e)}	291.20±17.92	298.60±4.39	294.60±16.13	297.60±8.53

1) Group ID was listed in Table 1 Day, Days after dosing Ges, Days after gestation

a) About 18 hr fasted b) At initial dosing c) At paring d) At sacrifice e) At sacrifice

3. 증체량(Body weight gains)의 변화

Table 5. Changes of Body weight gains during treatment of Hyeonggaeyeongyotang extract on male and female Wistar rats (Mean±SD, g)

Group ID ¹⁾	VC	Hyeonggaeyeongyotang extract treating group			
		G1	G2	G3	
M a l e s	Day 0-7	44.20±8.81	43.80±13.75	47.60±4.83	53.40±6.77*
	Day 0-14	66.60±10.90	73.40±10.21	67.60±5.22	75.40±12.90
	Day 0-28	98.20±9.15	94.80±9.60	95.80±7.33	108.20±19.78
	Day 0-35	147.00±13.49	143.80±10.23	143.00±11.98	145.60±19.93
	Day 0-41	161.20±9.31	158.00±11.75	161.00±15.18	159.60±21.61
	Total ²⁾	122.80±11.12	115.40±13.52	122.60±13.37	120.20±26.25
F e m a l e	Day 0-7	35.60±6.54	36.80±8.53	29.00±5.92	28.80±7.26
	Day 0-14	43.40±5.13	46.20±10.18	42.40±9.50	44.20±11.23
	Ges 0-7	19.80±6.76	19.40±0.89	20.80±10.28	20.40±4.10
	Ges 0-13	32.20±10.76	31.40±3.21	34.80±7.92	37.60±4.51
	Ges 0-14	22.40±15.04	20.20±5.54	18.20±10.08	21.80±5.22
	Total ³⁾	70.20±15.37	77.00±11.60	67.80±16.10	74.40±12.10

1) Group ID was listed in Table 1

2) Total, Body weight gains throughout the whole experimental periods; Day, Days after dosing; Animals were fasted at Day 0 and Day 41

Body weight gains = Body weight at "Check point" - Body weight at initial dosing [Check point: 7, 14, 28, 35, 41 and 42 days after dosing]

3) Total, Body weight gains throughout the whole experimental periods; Day, Days after dosing; Ges, Days of gestation; Animals were fasted at Day 0 and Ges 14

Body weight gains = Body weight at "Check point" - Body weight at initial dosing [Check point: 7 and 14 days after dosing, and 7, 13 and 14 days after gestation]

* p<0.05 compared to that of VCM by MW test

4. 사료섭취량(Food consumption)의 변화

Table 6. Changes of Food consumption during treatment of Hyeonggaeyeongyotang extract on male and female Wistar rats (Mean±SD, g/head)

Group ID ¹⁾	VC	Hyeonggaeyeongyotang extract treating group			
		G1	G2	G3	
M a l e	Day 1-7	33.20±3.27	31.80±2.39	30.80±1.30	32.60±3.36
	Day 7-14	32.20±3.56	31.20±2.59	34.00±1.58	31.80±1.30
	Day 14-28	33.60±2.07	33.00±1.22	32.20±2.39	32.60±2.30
	Day 28-35	32.80±1.30	33.20±3.27	32.40±1.52	32.20±1.48
	Day 35-41	32.60±2.30	32.40±2.41	33.20±1.10	32.40±2.19
	Total ²⁾	154.40±3.58	161.60±6.11	162.60±1.52	161.60±4.51
F e m a l e	Day 1-7	21.20±0.84	21.40±1.52	21.40±1.14	20.40±1.14
	Day 7-14	21.40±1.82	20.80±1.92	21.20±1.30	21.60±1.14
	Ges 0-7	20.80±1.30	21.20±1.79	20.40±2.07	20.20±1.30
	Ges 7-13	19.80±1.79	20.00±2.65	19.40±1.67	20.60±2.07
	G-Total ³⁾	40.60±1.34	41.20±3.03	39.80±1.79	40.80±2.77
	Total ⁴⁾	83.20±1.48	83.40±3.36	82.40±1.52	82.80±4.02

1) Group ID was listed in Table 1

2) Total, Total Food consumption throughout the whole experimental periods

3) G-Total, Total Food consumption during gestation (up to 2 weeks of gestation):

4) Total, Total Food consumption throughout the whole experimental periods
Day, Days after dosing.

5. 생리주기(Estrous cycle)의 변화

Table 7. Length and regularity of Estrous cycles during treatment of Hyeonggaeyeongyotang extract on female Wistar rats (Mean±SD, day)

Group ID ¹⁾	Length of Estrous cycle	Regularity of Estrous cycle ²⁾			
		Regular ^{a)}	Shorted ^{b)}	Extended ^{c)}	Acyclic ^{d)}
VCF	4.80±0.84	4/5 (80%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)
G1F	4.20±0.84	4/5 (80%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
G2F	5.00±0.71	5/5 (100%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
G3F	4.60±0.89	4/5 (80%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)

- 1) Group ID was listed in Table 1
- 2) Observed animals/total observed animals (n = 5)(percentage)
 - a) Regular 4 or 5 days cycle
 - b) Below 3 days cycle
 - c) Over 6 days cycle
 - d) At least ten days without Estrous cycle

6. 성교 전 기간(Pre-coital interval)

Table 8. Pre-coital intervals during treatment of Hyeonggaeyeongyotang extract on female Wistar rats (Mean±SD, day)

Group ID ¹⁾	VCF	G1F	G2F	G3F
Interval	3.00±1.00	2.80±1.30	3.20±0.84	3.20±0.84

- 1) Group ID was listed in Table 1

7. 교미율, 임신율 및 수태율의 변화

Table 9. Mating performance and fertility after treatment of Hyeonggaeyeongyotang extract on female and male Wistar rats (Mean±SD, day)

Group ID ¹⁾	NP ^{a)}	NM ^{b)}	NAP ^{c)}	MI ^{d)}	CR ^{e)}	FI ^{f)}
VCM	5	5	5	100	100	100
G1M	5	5	5	100	100	100
G2M	5	5	5	100	100	100
G3M	5	5	5	100	100	100
VCF	5	5	5	100	100	100
G1F	5	5	5	100	100	100
G2F	5	5	5	100	100	100
G3F	5	5	5	100	100	100

- 1) Group ID was listed in Table 1
- a) NP, Number of Paired
- b) NM, Number of Mating
- c) NAP, Number of Achieving Pregnancy
- d) MI Mating Index (%) = [Animal mated/Animal paired] × 100
- e) CR, Conception Rate (%) = [Animals that achieved a pregnancy/Animal mated] × 100; f)
- FI, Fertility Index (%) = [Animals that achieved a pregnancy/Animal paired] × 100

8. 부검소견

Table 10. Gross findings observed in male and female rats after treatment of Hyeonggaeyeongyotang extract (Observed animals/total observed animals (percentages))

Group ID ¹⁾	Male treated groups			
	VCM	G1M	G2M	G3M
Epididymis Normal	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
Prostate Normal	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
S.V. ^{a)} Normal	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
Testis Normal	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)

Group ID	Female treated groups			
	VCM	G1F	G2F	G3F
Ovary Normal	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)

1) Group ID was listed in Table 1 a) Seminal Vesicle

9. 수컷 장기무게(Organ weight of male)

Table 11. Changes of absolute and relative organ weight after treatment of Hyeonggaeyeongyotang extract on male Wistar rats (Mean±SD, g)

Group ID ¹⁾		VCM	G1M	G2M	G3M
Absolute	Epididymus ^{a)}	1.360±0.066	1.374±0.069	1.342±0.054	1.352±0.075
	Prostate	0.626±0.027	0.648±0.044	0.612±0.031	0.622±0.068
	SV ^{b)}	2.348±0.128	2.396±0.090	2.388±0.080	2.366±0.173
	Testis ^{a)}	3.866±0.190	3.826±0.170	3.832±0.244	3.858±0.199
Relative	Epididymus ^{a)}	0.382±0.013	0.394±0.026	0.376±0.018	0.387±0.038
	Prostate	0.176±0.002	0.185±0.009	0.171±0.012	0.177±0.018
	SV ^{b)}	0.660±0.050	0.686±0.024	0.669±0.030	0.674±0.045
	Testis ^{a)}	1.086±0.051	1.095±0.032	1.074±0.087	1.102±0.098

1) Group ID was listed in Table 1 a) Sum of bilateral sides b) Seminal Vesicle

Relative organ weights (%) = (Absolute organ weight / Body weight at sacrifice) × 100.

10. 암컷 장기무게(Organ weight of female)

Table 12. Changes of absolute and relative organ weight after treatment of Hyeonggaeyeongyotang extract on female Wistar rats (Mean±SD, g or %)

Group ID ¹⁾	Absolute weight (g)	Relative weight (%)
	Ovary ^{a)}	Ovary ^{a)}
VCF	0.102±0.034	0.035±0.013
G1F	0.096±0.021	0.032±0.007
G2F	0.100±0.023	0.034±0.010
G3F	0.092±0.033	0.031±0.011

1) Group ID was listed in Table 1

a) Sum of bilateral sides

Relative organ weights (%) = (Absolute organ weight / Body weight at sacrifice) × 100

11. 조직병리학적 변화(Histopathological observation)

Table 13. Histopathological findings observed in male and female rats after treatment of Hyeonggaeyeongyotang extract (Observed animals/total observed animals (percentages))

Group ID ¹⁾	Male treated groups			
	VCM	G1M	G2M	G3M
Epididymis Normal	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
Prostate Normal	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
SV ^{a)} Normal	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
Testis Normal	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)

Group ID	Female treated groups			
	VCM	G1F	G2F	G3F
Ovary Normal	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)

1) Group ID was listed in Table 1 a) Seminal Vesicle

12. 초기 배발생에 미치는 영향

Table 14. Changes of litter data after treatment of Hyeonggaeyeongyotang extract on 14 days of gestation of female Wistar rats

Group ID ¹⁾	VCF	G1F	G2F	G3F
NCL ^{a)}	14.60±1.14	14.00±2.00	15.00±1.87	14.20±1.79
NI ^{b)}	13.40±1.14	12.80±1.92	12.40±1.14	13.00±2.35
NLF ^{c)}	12.20±1.30	12.00±2.00	11.80±0.84	12.00±1.58
NRE ^{d)}	1.20±0.45	0.80±0.84	0.60±0.55	1.00±1.22
PrIL ^{e)}	8.13±5.33	8.46±6.13	16.37±12.18	8.74±7.82
PoIL ^{f)}	9.04±3.60	6.25±6.91	4.63±4.25	6.90±7.75

1) Group ID was listed in Table 1; Mean±SD

a) NCL, Number of Corpora Lutea, number/head b) NI, Number of Implantation, number/head

c) NLF, Number of Live Fetus, head/head

d) NRE, Number of Resorption Embryo = Number of implantation - Number of live fetus, head/head

e) PrIL, Pre-Implantation Loss = [(Number of Corpora Lutea - Number of implantation)/Number of Corpora Lutea], %

f) PoIL, Post-Implantation loss = [(Number of Implantation - Number of live fetus)/Number of Implantation]

IV. 고찰 및 결론

일반적으로 생식·발생 독성시험은 수태능 및 초기 배발생시험, 출생 전·후 발생 및 모체 기능 시험 및 배·태자 발생시험 등의 3 가지로 구분되

며, 이 중 수태능 및 초기 배발생시험은 암·수 동물에 대하여 교배 전부터 교미, 착상까지 시험 물질을 투여할 때 나타나는 독성 및 장애를 검사 하는 시험을 의미한다¹¹⁾. 한약의 생식·발생 독성 중 수태능에 미치는 영향은 *Tripterigium wilfordii*¹⁴⁻⁵⁾, 상사자 추출물¹⁶⁻⁷⁾, 바질의 잎 추출¹⁸⁾

등의 생식독성이 보고되었다. 특히 *Tripterygium wilfordii* 추출물은 수컷의 수태능에 대해 매우 강한 독성을 나타내는 것으로 알려져²⁾ 수컷의 불임제로써 사용 가능성이 제기됨을 볼 때 한약 역시 잠재적인 수태능 관련 생식독성 가능성이 무시될 수 없을 것이다.

초기 배발생에 미치는 영향에 대해 *Tripterygium wilfordii*²⁾, 인삼 추출물과 선홍초 추출물 및 아주까리 추출물¹⁹⁾ 등의 배자독성이 이미 보고되어 한약의 초기 배발생의 생식독성 가능성은 배제될 수 없다.

荊芥連翹湯은 龔¹⁰⁾의 《萬病回春》에 처음 수록된 處方으로 荊芥, 連翹, 防風, 當歸, 川芎, 白芍, 柴胡, 枳殼, 黃芩, 山梔, 白芷, 桔梗, 甘草로 구성되어 腎經風熱로 인한 兩耳腫痛을 치료하는 方劑이다. 또한 鼻淵을 치료하는 荊芥連翹湯은 처방의 구성에 있어서는 枳殼 대신 薄荷가 들어간 차이가 있다¹⁰⁾. 荊芥連翹湯은 風熱이 上發하여 頭上諸證을 야기시킨 것을 다스린다. 清熱, 和血, 解毒作用이 있기 때문에, 耳病뿐만 아니라 中耳炎, 扁桃腺炎 또는 青年期 腺病質者의 諸證에도 응용된다. 處方 중의 荊芥, 連翹, 防風은 散風熱하여 消腫하고, 當歸, 川芎은 和血行血하여 諸經의 血凝氣聚를 散하며, 白芍藥, 白芷는 除風止痛하고, 柴胡, 黃芩, 梔子是 少陽火를 瀉하며, 桔梗, 枳殼은 胸膈을 利하게 하고 快氣宣通하며, 甘草는 諸藥을 和하고 急迫을 緩和한다²⁰⁾.

그러나 현재까지 荊芥連翹湯 자체의 생식독성 실험은 거의 이루어지지 않고 있어, 본 연구에서는 현재 식품의약품안전고시 의약품등독성시험기준¹¹⁾에 명시되어 있는 생식독성 시험 중 수태능, 초기 배발생 및 생식기에 미치는 영향을 평가하였다.

본 실험의 결과 荊芥連翹湯 추출물 투여와 관련된 임상증상 및 사망률의 변화는 인정되지 않아, 荊芥連翹湯 추출물은 비교적 매우 안전할 것으로 생각되나, 荊芥連翹湯 추출물의 일반 독성에

대한 자료를 찾아볼 수 없는 바 荊芥連翹湯 추출물의 안전성을 결론내리기 어렵다. 따라서 다른 일반 의약품과 마찬가지로 荊芥連翹湯에 대한 일반 독성시험이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

한편 매체대조군의 경우 투여 초기 증체량이 500ml/kg의 荊芥連翹湯 추출물을 투여한 수컷군에 국한되어 유의성 있게($p < 0.05$) 증가된 이외에 荊芥連翹湯 추출물 투여와 관련된 체중 및 증체량의 변화가 투여기간 및 임신기간 동안 전혀 인정되지 않아 荊芥連翹湯 추출물은 임신 중 및 일부 기간 동안의 체중변화에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 한편 암수 rat에서 각각의 매체대조군과 비교하여 의미있는 사료섭취량의 변화 역시 실험 전 기간동안 인정되지 않아 특히 임신기간 중의 사료섭취량에도 荊芥連翹湯 추출물이 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

또한 荊芥連翹湯 추출물 투여와 관련된 생리주기, 성교 전 기간과 교미율, 임신을 및 수태율과 같은 성행위 등과 관련된 변화 역시 전혀 인정되지 않으므로 적어도 2000ml/kg까지의 荊芥連翹湯 추출물 투여는 암수 rat의 성 행동에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

모든 荊芥連翹湯 추출물을 투여해서 매체대조군에 비해 荊芥連翹湯 추출물 투여와 관련된 부고환, 전립선, 정낭선, 고환 또는 난소의 절대 및 상대 중량치의 변화 역시 관찰되지 않아 荊芥連翹湯 추출물이 생식 장기에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었으며, 부검 및 조직병리학적 검사에서도 이들 장기에서 荊芥連翹湯 추출물 투여와 관련된 변화는 전혀 인정되지 않았다.

荊芥連翹湯 추출물 투여와 관련된 황체 수, 착상 수, 생존 태자 수, 흡수된 배자의 수, 착상 전·후 소실율의 변화는 인정되지 않은 점으로 미루어 보아 2000ml/kg 이하의 荊芥連翹湯 추출물의 경구투여에 의해 초기 배발생은 별다른 영향을 받지 않을 것으로 판단된다.

따라서 荊芥連翹湯 추출물의 수태능 및 초기

배발생에 대한 무해용량 (NOAEL, No-Observed-Adverse-Effect Level)은 대략 2000ml/kg로 사료된다.

이상에서 2000ml/kg 이하의 荊芥連翹湯 추출물 투여는 암수 Wistar rat의 수태능 및 초기 배발생에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되어, 荊芥連翹湯 추출물의 rat에서의 수태능 및 초기 배발생에 대한 무해용량은 2000ml/kg 이하로 판단된다. 그러나 출생 전·후 발생 및 모체 기능과 배·태자 발생에 미치는 영향은 알 수 없으므로 荊芥連翹湯의 생식·발생독성을 정확히 알기 위해서는 금후 이 방면으로 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원 한방바이오퓨전 연구지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다(B05-0035-AM0815-05N1-00020B)

참고문헌

1. 김대병, 박혜경, 박건상, 최윤주, 장재희, 구용의, 김보영, 이재진, 권우정. 기능성식품의 합리적 관리체계 구축을 위한 연구. 식품의약품안전청 연구보고서. 2002:6:1174.
2. Chan WY and Ng TB. Adverse effect of *Tripterygium willfordii* extract on the mouse embryonic development. *Contraception*. 1995;51:65-71.
3. Ng TB and Chan WY. Polysaccharopeptide from the mushroom *Coriolus vesicolor* possesses analgesic activity but does not produce adverse effects on female reproductive or embryonic development in mice. *Gen Pharmacol*. 1997;29:269-73.
4. Nie S, Xue B, Liang A, Li G and Li Z. Effect of processing on specific toxicity of radix *Achyranthis bidentatae*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1995;20:275-8, 318.
5. Jelinek R, Kyzlink V and Blatiny CJr. An evaluation of the embryotoxic effects of blighted potatoes on chicken embryos. *Teratology*. 1976;14:335-42.
6. Akiba K, Onodera K, Kisara K and Fujikura H. Interaction of d-pseudoephedrine with water soluble extracts of *Platycodi Radix* on acute toxicity. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1979;75:201-6.
7. Ryu JC, Kim KR, Kim HJ, Youn JY, Myung SW, Kim GH, Lee MJ and Chang IM. Genotoxicity study of bojungchisup-tang, an oriental herbal decoction-*in vitro* chromosome aberration assay in Chinese hamster lung cells and *in vivo* supravital-staining micronucleus assay with mouse peripheral reticulocytes. *Arch Pharm Res*. 1998;21:391-7.
8. Ninomiya H, Kato S and Okuda H. Effects of Hachimi-jio-gan in aged rats. *J Altern Complement Med*. 2001;7:355-9.
9. Keyler DE, Baker JI, Lee DY, Overstreet DH, Boucher TA and Lenz SK. Toxicity study of an antidipsotropic Chinese herbal mixture in rats: NPI-028. *J Altern Complement Med*. 2002;8:175-83.
10. 龔廷賢. 增補 萬病回春(下券). 일중사, 1994:12, 14
11. 식품의약품안전청. 의약품등독성시험기준. 식품의약품안전청고시 제2005-60호. 식품의약품안전청. 서울. 2005.
12. Department of Health, Education, and Welfare Publication (National Institute of Health). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington DC. National Academy Press. 1985.

13. Salewski E. Farbmethode zum makroskopischen nachweis von implantationstellen am uterus der Ratte. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp Pathol Pharmacol.* 1964:247, 367.
14. Ye W. Antispermatic effects of multiglycosides of *Tripterigium wilfordii* and monomer T4 in the testes and epididymal spermatozoa of rats. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 1991;13:235-40.
15. Lan ZJ, Gu ZP, Lu RF and Zhuang LZ. Effects of multiglycosides of *Tripterigium wilfordii* (GTW) on rat fertility and Leydig and Sertoli cells. *Contraception.* 1992;45:249-61.
16. Rao MV. Antifertility effects of alcoholic seed extract of *Abrus precatorius* Linn. in male albino rats. *Acta Eur Fertil.* 1987;18:217-20.
17. Sinha R. Post-testicular antifertility effects of *Abrus precatorius* seed extract in albino rats. *J Ethnopharmacol.* 1990;28:173-81.
18. Ahmed M, Ahamed RN, Aladakatti RH and Ghosesawar MG. Reversible anti-fertility effect of benzene extract of *Ocimum sanctum* leaves on sperm parameters and fructose content in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2002;13:51-9.
19. Chan WY and Ng TB. Comparison of embryotoxic effects of saponin, agrostin(type 1 ribosome-inactivating proteins) and ricin(a type 2 ribosome-inactivating protein). *Pharmacol Toxicol.* 2001;88:300-3.
20. 申載鏞. 方藥合編解説. 成輔社. 서울. 1989:169.