

山茱萸와 補骨脂 복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주 반복경구투여 독성시험 및 4 주 회복시험

심서아^{1#}, 강성철^{1#}, 진보람¹, 김민정², 여수정³, 박인화⁴, 정의민⁵, 차윤엽⁴, 안지혜⁶, 안효진^{1*}

1 : 상지대학교 한의과대학 약리학교실, 2 : 상지대학교 한의과대학 침구의학교실
3 : 상지대학교 한의과대학 경혈학교실, 4 : 상지대학교 한의과대학 한의학과 재활의학과
5 : 상지대학교 한의과대학 내과, 6 : 우석대학교 약학대학 한약학과

A 13-Week Repeated Oral Dose Toxicity Test and a 4-Week Recovery Test of Standardized *Cornus officinalis* and *Psoralea corylifolia* L. in Sprague-Dawley Rats

Seo-Ah Sim^{1#}, Sung-Chul Kang^{1#}, Bo-Ram Jin¹, Min-jeong Kim², Sujung Yeo³
In-hwa Park⁴, Ui Min Jerng⁵, Yun-yeop Cha⁴, Ji-Hye Ahn⁶, Hyo-Jin An^{1*}

1 : Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Sangji University
2 : Department of Acupuncture and Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Sangji University
3 : Department of Meridian & Acupoint, College of Korean Medicine, Sangji University
4 : Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Sangji University
5 : Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Sangji University
6 : Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Woosuk University

ABSTRACT

Objectives : In the current study, we performed the 13-week repeated oral dose toxicity test and a 4-week recovery test of standardized *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. and *Psoralea corylifolia* L. 30 % ethanol extract (SCP) in Sprague-Dawley (SD) rats owing to aims for verifying no observed adverse effect level (NOAEL).

Methods : The animal study was performed according to OECD guidelines for the testing of chemicals section 4 health effects test No.408 repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents (03 October 2008). In the repeated dose toxicity study, SCP was orally administered to female and male rats at dose levels of 1,000, 2,000, and 4,000 mg/kg/day for 13-week. The control group and high dose (4,000 mg/kg/day) group were then monitored for 4 extra weeks to determine recovery time after the study period.

Results : Compared with the control group, there were no treatment-related adverse effects in clinical signs, body weight, hematology, serum biochemistry (Aspartate aminotransferase, Alanine aminotransferase, Alkaline phosphatase, γ -Glutamyl transpeptidase, Blood urea nitrogen, Creatinine, Glucose, Total cholesterol, Total protein, Creatine phosphokinase, Albumin, Total bilirubin, Triglyceride, Inorganic phosphorus, Albumin/Globulin ratio, Calcium ion, Sodium ion, Potassium ion, Chloride ion), necropsy findings and organ weight (Ovary, Adrenal gland, Pituitary, Thymus, Prostate, Testis, Epididymis, Spleen, Kidney, Heart, Lung, Brain, Liver) at any dose tested.

*Corresponding author : Hyo-Jin An, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Sangji University, 83 Sangjidae-gil, Wonju-si, Gangwon-do 26339, Republic of Korea.

· Tel : +82-33-738-7503 · Fax : +82-33-730-0679 · E-mail : hjan@sj.ac.kr

#First author : Seo-Ah Sim, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Sangji University, 83 Sangjidae-gil, Wonju-si, Gangwon-do 26339, Republic of Korea.

· Tel : +82-33-738-8075 · E-mail : dusdl404@naver.com

Sung-Chul Kang, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Sangji University, 83 Sangjidae-gil, Wonju-si, Gangwon-do 26339, Republic of Korea.

· Tel : +82-33-738-8075 · E-mail : schk315@daum.net

· Received : 12 October 2021

· Revised : 03 November 2021

· Accepted : 25 November 2021

Conclusions : Taken together, these results suggest that the NOAEL of SCP in both genders was considered as over 4,000 mg/kg. Results from this study provide scientific evidence for the safety of SCP.

Key words : *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc., *Psoralea corylifolia* L., repeated oral dose toxicity, recovery test, SD rats

I. 서 론

山茱萸 (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)는 층층나무과 (Cornaceae)에 속하는 산수유나무의 성숙과실의 과육이며 한국, 중국, 일본을 포함한 동아시아 지역에 널리 분포되어 있는 식물이다¹⁻²⁾. 山茱萸는 2,000년 전부터 사용된 약재로 그 기원은 神農本草經에서 찾을 수 있다²⁻³⁾. 한의학에서는 山茱萸는 蜀棗, 肉棗, 雞足, 魁實이라고도 불리며, 酸味が 있으며 性은 溫하며, 肝腎經에 작용하여 肝腎을 강화시키고 遺精을 치료하며 止汗의 효능으로 알려져 있다⁴⁾.

山茱萸는 약리학적으로 면역계에 작용하는 약물로 분류되며, 항알레르기 효과⁵⁾, 정자 운동성 증가 효과⁵⁾가 있으며, 내분비계에 대한 작용으로 항당뇨 효과⁵⁾, 항전립선비대 효과⁶⁾가 보고되어 있다. 山茱萸는 Triterpenoids 화합물인 Urolic acid, Oleanolic acid와 Saponin 계열의 cornin, Iridoidial glycoside 화합물인 Morroniside, Loganin, Sweroside 성분과 그 외의 Tartaric acid, Malic acid, Gallic acid, Vitamin A를 포함하고 있는 것으로 알려져 있다⁵⁾.

補骨脂 (*Psoralea corylifolia* L.)는 콩과 (Leguminosae)에 속하는 補骨脂의 씨로 破古紙라고도 불리며, 한의학에서는 辛味が 있으며 性은 溫하며, 腎脾心包經에 작용하여 腎陽, 脾를 補하며 止瀉작용이 있다⁴⁾. 陽痿遺精, 遺尿등을 치료하며, 주된 효능으로 남성의 양기를 돕는 작용을 한다. 補骨脂에는 Bavachin, Corylin, Psoralen, Isoporalen, Bakuchiol 성분이 있음이 알려져 있고, Psoralen, Isoporalen에서 항암효과, Bakuchiol에서 항산화 효과가 있으며, 간보호작용, 조골작용, 구강 미생물 억제 효과가 있음이 보고되어 있다⁵⁾.

山茱萸 補骨脂 복합추출물(SCP)의 기반이 되는 처방인 HBX-5 (巴戟天, 肉蓯蓉, 山茱萸, 菟絲子, 破古紙, 石斛, 葫蘆巴, 茴香, 附子 추출물)는 東醫寶鑑 원방을 근거하여 구성된 처방으로 전립선 정상세포주 RWPE-1, WPMY-1에서 항전립선비대 효능이 있고⁷⁾, 관련 인자 단백질의 발현을 억제하는 효능이 보고되어 있다. 또한 SCP의 전립선 비대에 대한 약리학적 효능이 보고되어 있다⁸⁾. HBX-5를 바탕으로 한약제제 개발을 목적으로 만들어진 시험 물질인 SCP는 약리학적 실험 결과를 바탕으로 효율적인 제제 개발을 위해 간략화를 진행한 山茱萸와 補骨脂 30% 에탄올 추출물이다. 山茱萸와 補骨脂의 약리학적 연구⁹⁾가 진행된 바 있고, SCP의 단회투여 독성 연구 결과⁷⁾도 보고된 바 있으나 반복 독성과 회복에 관한 연구 결과는 보고된 바 없다. 이에 대한 독성실험은 안정성 측면에서 생리학적, 약리학적 효능을 보여주기 이전에 중요한 부분이라고 할 수 있다.

한약재의 경우 예로부터 오랫동안 사용된 치료약으로 민간에서도 널리 사용되고 있다. 하지만, 잠재적인 독성을 가진

한약재도 일부 존재하며, 장기간 복용 시 부작용이 발생될 수 있으나, 오랜 기간 사용되었기 때문에 안전하다는 인식으로 한약재의 부작용과 독성에 관한 과학적인 근거가 미흡한 실정이다⁹⁻¹⁰⁾. 본 논문에서는 Sprague-Dawley (SD) rats에서 山茱萸와 補骨脂 복합추출물의 안전성평가의 일환으로 13주간 반복 경구 투여하여 발생할 수 있는 독성을 측정하고, 기능과 형태의 변화를 확인함으로써 시험물질의 독성을 평가하였다. “의약품 등의 독성시험관리기준 (식품의약품안전처고시 제 2017-71 호)¹¹⁾”에 따라 진행된 실험으로 13주간의 경구 투여 독성시험 이후 4주 회복시험을 진행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험기관

실험의 전 과정을 GLP 기관인 대구가톨릭대학교 GLP센터 (경산, 대한민국)에서 진행하였다. 본 실험은 동물보호법 (법률 제 13023 호, 2015. 1. 20.)을 근거한 대구가톨릭대학교 IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) 심의를 통과하였다. (승인번호 : 제 IACUC-2017-029 호)

2. 실험물질

본 연구의 실험물질인 山茱萸, 補骨脂는 (주) 화평 디엔에프 (경기도, 대한민국)에서 구매하였으며, 山茱萸, 補骨脂 복합추출물인 SCP는 하원제약 (서울, 대한민국)에서 표준화하여 공급받았다. SCP의 구성은 山茱萸 650 g, 補骨脂 350 g으로 30% 에탄올로 추출한 후 추출액을 동결 건조하여 분말로 만들었다. 건조엑스 분말은 차광, 냉장, 방습 보관조건을 유지하여 보관하였다. 하원제약에서 제공한 정보를 바탕으로 부형제에 대한 시험물질의 물리적 특성을 실험한 결과 멸균증류수로 선정하였다. 투여 직전 선정된 부형제인 멸균증류수 (대한약품)에 실험물질을 현탁시켜 제조하였다.

3. 실험동물

본 실험에서는 Specific Pathogen-Free SD계 랫드를 사용하였다. 입수 시에는 5주령 암컷 55마리, 110.8 g ~ 127.2 g, 5주령 수컷 55마리, 140.0 g ~ 157.6 g이었으며 투여 개시 시에는 7주령 암컷 50마리, 172.8 g ~ 219.4 g 7주령 수컷 50마리, 277.7 g ~ 337.5 g이었다. 동물 입수 시 검역하였으며, 동물공급업체에서 제공한 시험계의 병원체 검사 성적서를

검토한 결과 시험에 영향을 줄 요인이 없음을 확인하였다. 동물의 순화는 입수 후 암컷 15일, 수컷 14일간 해당 동물 실험실 내에서 실시하였으며, 순화 기간 중 매일 1회 일반 증상을 관찰하고, 투여 전일 및 투여 당일에 체중을 측정하여 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

4. 동물사육조건

온도 22 ± 3℃, 상대습도 30% ~ 70%, 조명 시간 12시간/일(08시 점등 ~ 20시 소등), 환기 횟수 10 ~ 20회/시간, 조도 150 ~ 300 Lux의 사육환경을 유지하였다. 사료는 ENVIGO 사로 부터 공급받은 감마선 멸균 실험동물용 고형사료를 사용하였으며, 급이기에 넣어 자유섭취 시켰다. 급수의 경우 수도수를 자외선 유수 살균기로 여과 후 사용하였으며 공급은 급수병을 통해 자유 섭취 시켰다. 모든 사육기자재는 멸균하여 사용

하였고, 사육 상자는 주 1회, 급수 병은 주 2회 교환하였다.

5. 실험군의 구성과 투여량 설정

실험군의 구성은 동물 실험실 환경에서 1주간 순화시킨 실험 동물을 사용하였으며 시험 군의 구성은 아래와 같다 (Table 1). SCP는 천연물복합추출물로 한약 제제 의약품의 등록을 목적으로 개발되었으며, 용량설정을 위해 동일한 시험물질로 진행한 28일 용량설정 시험 결과, 암수 모두에서 NOAEL (최대무독성용량)이 4,000 mg/kg/day으로 추정되었다. 따라서 4,000 mg/kg/day를 고용량으로 하고 2,000 mg/kg/day, 1,000 mg/kg/day를 중, 저용량으로 설정하여 실험을 진행하였다. 대조군으로는 부형제인 멸균중류수를 투여하는 군으로 설정하였다 (Table 1).

Table 1. The SCP Composition of Group.

군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (ml/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)
G1 ^{a)}	M / F	15 ^{b)} / 15 ^{b)}	1101 ~ 1115 / 2101 ~ 2115	10	0
G2 (저용량군)	M / F	10 / 10	1201 ~ 1210 / 2201 ~ 2210	10	1,000
G3 (중용량군)	M / F	10 / 10	1301 ~ 1310 / 2301 ~ 2310	10	2,000
G4 (고용량군)	M / F	15 ^{b)} / 15 ^{b)}	1401 ~ 1415 / 2401 ~ 2415	10	4,000

a) G1: Vehicle control, b) 동물번호 마지막 5마리는 회복군

6. 관찰 및 검사항목

1) 일반증상 및 체중

모든 동물에 대해 1일 1회 일반증상으로 流涎 등의 약물에 대한 이상 반응, 특이행동, 병리적 현상의 유무를 관찰하였고, 1일 2회 사망, 빈사 동물 유무를 관찰하였다. 투여일부터 90일간 관찰하였으며, 회복 군의 경우 투여 후 28일간 1일 1회 증상관찰 하였다. 투여개시일에 모든 동물의 체중을 측정하고, 주 1회, 부검 전일, 부검 일에 체중을 측정하였다. 절식하여 부검일 체중을 측정하였으며, 부검일 체중은 절식 후 측정하여, 체중평가에서 제외하고 평가하였다.

2) 부검 및 채혈

부검 전 절식 (17 시간 이상)한 계획 부검 동물의 경우, 부검 당일 Isoflurane (Ifran Liq 100 ml)으로 흡입마취하여 복대동맥에서 채혈하였다. 모든 장기에 대해 부검소견을 관찰하였다. 이는 채혈 후, 복대동맥과 복대 정맥을 절단하여 방혈, 치사시킨 다음 진행되었다.

3) 혈액학적 검사

항응고제인 EDTA-2K가 들어 있는 Vacutainer tube (Vacutainer 3 ml, BD, USA)에 부검 시 복대동맥에서 채혈한 혈액 일부를 주입 후 자동혈액 분석기:K-96 (ADVIA 2120, SIEMENS, USA)를 통해 일반혈액학적 검사, 백혈구감별계수를 측정하였다.

4) 혈액 생화학적 검사

Clot activator가 들어있는 Vacutainer tube (Vacutainer 3.5 ml, BD, UK)에 채혈한 혈액 일부를 주입하고 10 ~ 15분간 상온에 방치하여 응고시킨 후, 10 분간 3,000 rpm으로 원심분리 (MF80, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청을 혈액 생화학분석기 : K-97 (KONELAB 20XT, Thermo, USA)를 사용하여 Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP), γ -Glutamyl transpeptidase (γ -GTP), 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), Albumin/Globulin ratio (A/G ratio), Calcium ion (Ca²⁺)를 측정하였다. 전해질은 전해질 분석기 : K-99 (744 Na⁺/K⁺/Cl⁻ Analyzer, SIEMENS, USA)를 사용하여 Sodium ion (Na⁺), Potassium ion (K⁺), Chloride ion (Cl⁻)를 측정하였다.

5) 장기중량 측정

정밀저울 (K-110)을 이용하여 부검 시 적출한 난소 (Ovary), 부신 (Adrenal gland), 뇌하수체 (Pituitary), 가슴샘 (Thymus), 전립샘 (Prostate), 고환 (Testis), 부고환 (Epididymis), 비장 (Spleen), 신장 (Kidney), 심장 (Heart), 폐 (Lung), 뇌 (Brain) 및 간 (Liver)의 중량을 측정하였다. 양측성 장기의 경우 양측 장기를 각각의 중량을 측정하였다. 부검 시 체중을 기준으로 중량측정 장기에 대한 상대 중량을 산출하였다.

7. 통계분석

모수적인 다중비교 (Parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교 (Non parametric multiple comparison procedures)를 사용하여 대조군과 투여군의 평균을 비교하고, 통계 패키지 SPSS 19.0k를 이용하여 통계학적 분석을 하였다. One-way ANOVA test를 통해 연속적인 자료 (체중, 혈액학적 검사, 혈액 생화학적 검사, 장기중량)의 분석에 대하여 평균치에 대한 유의성 검정하였다. 유의성이 있으면 Levene test로 등분산성을 검정하였다. 이 분산일 경우에는 Dunnett's T-test, 등분산일 경우에는 Duncan multiple range test를 이용하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 일반 증상 및 체중

실험 기간 중 모든 실험동물에서 사망 동물은 없었다. 투여 기간 중 일반적인 증상으로 수컷 고용량 군 3 레, 암컷 고용량 군 1 레에서 流涎이 관찰되었고, 이외의 특이행동, 병리적 현상은 관찰되지 않았다. 流涎의 경우 시험물질의 쓴맛이 원인인 것으로 사료된다.

주요 군에서는 대조군과 비교하여 고용량 군 (4,000 mg/kg/day) 수컷의 체중 변화가 투여 후 6주, 8주 ~ 13주차에서, 고용량 군 (4,000 mg/kg/day) 암컷의 체중 변화가 투여 후 9주 ~ 13주차에서 체중의 감소가 나타났고, 회복 군에서는 대조군과 비교하여 고용량 군 (4,000 mg/kg/day) 수컷의 체중 변화가 투여 종료 후 회복 1주 ~ 4주차에서, 고용량 군 (4,000 mg/kg/day) 암컷의 체중 변화의 경우 투여 종료 후 회복 1주 ~ 3주차에서 감소가 나타났지만, 독성학적 유의미한 감소를 나타내지 않았다 (Figure 1).

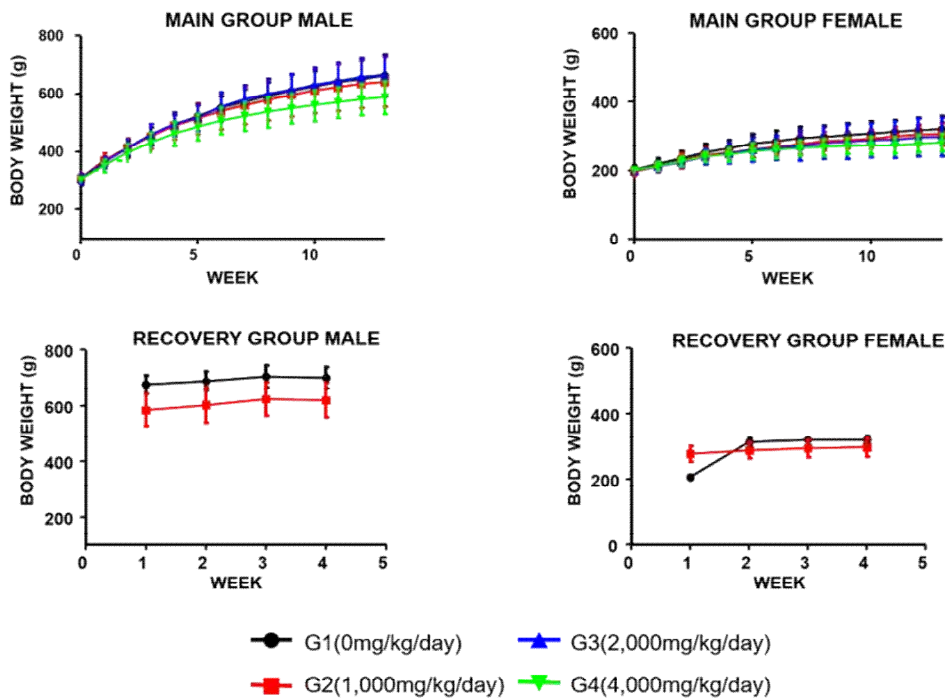


Figure 1. Body weight change of male and female rats treated with SCP for 13 weeks of the main group and 4 weeks of a recovery group.

2. 혈액학적 검사

부검 시 채혈한 혈액을 혈액학적 검사를 시행한 결과 주요 군에서 대조군과 비교하여 고용량 군 (4,000 mg/kg/day) 수컷의 Hematocrit (HCT), Hemoglobin conc. (HGB), Red Blood Cell (RBC), Eosinophil (EOS)수치가 감소하였고, 대조군과 비교하여 고용량 Red cell distribution width (RDW) 수치가 증가하였으나, 정상 범위 (Historical data)내의 변화

였다 (Table 2). 회복군에서 대조군과 비교하여 수컷의 고용량 군 (4,000 mg/kg/day)의 Hemoglobin conc. (HGB)가 증가하고, Red cell distribution width (RDW), Hb conc. distribution width (HDW), Mean platelet volume (MPV), Reticulocyte (RET)의 수치가 감소하였고, 암컷의 고용량 군 (4,000 mg/kg/day)의 Red cell distribution width (RDW)가 감소하였지만, 정상범위 (Historical data)내의 변화로 독성학적으로 유의미한 변화가 보이지 않았다 (Table 3).

Table 2. Individual of Hematological Values Result in the Main Group.

TESTS	UNITS	GROUPS / DOSE (mg/kg/day) SEX : MALE				GROUPS / DOSE (mg/kg/day) SEX : FEMALE			
		G1 0	G2 1,000	G3 2,000	G4 4,000	G1 0	G2 1,000	G3 2,000	G4 4,000
WBC	10 ³ /μL	6.94±2.268	6.38±2.190	8.24±2.105	7.33±1.698	2.46±0.599	3.05±0.891	2.53±0.303	3.04±1.040
RBC	10 ⁶ /μL	8.52±0.243	8.50±0.240	8.08±0.427	7.82±0.345	7.64±0.345	7.40±0.213	7.41±0.247	7.15±0.378
HGB	g/dL	14.6±0.34	14.2±0.46	14.1±0.59	13.9±0.71	13.9±0.33	13.7±0.46	13.7±0.22	13.5±0.55
HCT	%	46.2±0.83	44.9±1.71	44.5±2.10	44.0±2.60	42.5±1.02	41.9±1.15	42.3±0.87	41.5±1.97
MCV	fL	54.3±1.67	52.9±2.24	55.1±1.88	56.2±1.80	55.7±1.40	56.5±0.82	57.1±1.26	58.1±1.59
MCH	pg	17.1±0.58	16.7±0.72	17.5±0.72	17.8±0.55	18.2±0.54	18.5±0.45	18.5±0.52	18.9±0.61
MCHC	g/dL	31.6±0.36	31.5±0.37	31.8±0.64	31.7±0.55	32.7±0.24	32.8±0.45	32.5±0.55	32.6±0.60
RDW	%	13.1±0.94	13.5±0.54	13.6±0.65	13.8±0.64	11.6±0.39	11.6±0.35	11.4±0.45	11.2±0.43
HDW	g/dL	2.82±0.191	2.97±0.138	2.88±0.195	2.85±0.154	2.40±0.071	2.34±0.097	2.26±0.094	2.37±0.110
PLT	10 ³ /μL	970±117.0	968±132.3	1008±87.5	1104±86.3	967±81.5	1005±99.9	1021±135.1	1052±176.4
MPV	fL	6.9±0.23	6.9±0.17	7.0±0.13	6.9±0.23	6.9±0.16	6.9±0.19	6.9±0.21	7.1±0.21
RET	%	2.36±0.376	2.50±0.358	3.20±0.303	3.51±0.500	2.11±0.402	2.49±0.570	2.36±0.437	2.78±0.445
NEU	%	21.9±11.06	18.9±4.35	20.4±6.07	19.6±5.28	19.8±6.86	17.2±7.98	18.4±3.63	20.2±8.00
	10 ³ /μL	1.45±0.620	1.16±0.365	1.65±0.565	1.43±0.479	0.50±0.237	0.53±0.338	0.47±0.117	0.60±0.276
	%	71.5±11.02	75.9±4.58	74.0±6.53	75.7±5.56	74.5±6.66	78.0±8.24	76.5±4.08	74.7±9.03
LYM	10 ³ /μL	5.01±1.726	4.87±1.847	6.14±1.835	5.56±1.420	1.82±0.393	2.38±0.778	1.94±0.240	2.28±0.909
MONO	%	4.0±1.50	3.1±1.09	3.8±0.96	2.9±0.46	3.7±1.09	2.8±0.85	3.3±1.55	3.2±1.42
EOS	%	1.5±0.46	1.3±0.49	1.0±0.38	0.9±0.38	1.5±0.40	1.2±0.47	1.2±0.37	1.1±0.37
BASO	%	0.2±0.10	0.2±0.08	0.2±0.07	0.2±0.07	0.1±0.06	0.1±0.10	0.2±0.08	0.2±0.09
LUC	%	0.8±0.54	0.7±0.82	0.6±0.21	0.7±0.38	0.4±0.16	0.7±0.32	0.4±0.18	0.6±0.38
NO. OF ANIMALS		10	10	10	10	10	10	10	10

Table 3. Individual of Hematological Values Result in a Recovery Group.

TESTS	UNITS	GROUPS / DOSE (mg/kg/day) SEX : MALE		GROUPS / DOSE (mg/kg/day) SEX : FEMALE	
		G1 0	G4 4,000	G1 0	G4 4,000
WBC	10 ³ /μL	5.50±1.145	5.30±0.906	2.55±0.430	2.34±0.488
RBC	10 ⁶ /μL	8.15±0.185	8.16±0.225	7.39±0.215	7.52±0.414
HGB	g/dL	13.8±0.30	14.3±0.16	13.6±0.40	13.8±0.72
HCT	%	43.5±1.02	44.9±0.84	41.6±1.02	42.4±2.23
MCV	fL	53.4±0.56	55.1±2.09	56.3±1.83	56.4±1.13
MCH	pg	17.0±0.22	17.5±0.54	18.5±0.70	18.4±0.38
MCHC	g/dL	31.8±0.18	31.8±0.24	32.8±0.29	32.7±0.31
RDW	%	14.4±1.01	12.0±0.76	11.4±0.61	10.5±0.40
HDW	g/dL	3.22±0.322	2.77±0.219	2.36±0.085	2.25±0.092
PLT	10 ³ /μL	930±225.2	946±143.4	968±72.7	817±145.8
MPV	fL	7.4±0.22	7.1±0.12	7.3±0.12	7.3±0.30
RET	%	2.67±0.354	1.99±0.252	2.01±0.331	1.86±0.191
NEU	%	30.4±14.00	24.5±5.08	26.2±11.52	21.7±4.45
	10 ³ /μL	1.68±0.873	1.32±0.446	0.69±0.330	0.51±0.134
	%	63.9±14.79	69.9±6.53	68.8±12.32	73.0±4.85
LYM	10 ³ /μL	3.53±1.083	3.67±0.487	1.74±0.325	1.72±0.409
MONO	%	3.6±1.89	3.5±1.23	3.2±1.05	3.4±0.94
EOS	%	1.6±0.58	1.4±0.22	1.2±0.30	1.6±0.45
BASO	%	0.1±0.05	0.1±0.04	0.1±0.11	0.1±0.08
LUC	%	0.4±0.24	0.6±0.37	0.5±0.27	0.2±0.09
NO. OF ANIMALS		5	5	5	5

Table 5. Individual of Serum Biochemical Values Result in a Recovery Group.

TESTS	UNITS	GROUPS / DOSE (mg/kg/day) SEX : MALE		GROUPS / DOSE (mg/kg/day) SEX : FEMALE	
		G1 0	G4 4,000	G1 0	G4 4,000
ALB	g/dl	3,2±0,03	3,3±0,15	3,8±0,15	3,7±0,20
ALP	U/l	203,8±32,19	159,1±52,97	79±20,5	117±22,9
ALT	U/l	34,5±7,87	23,0±0,72	48±56,3	24±4,1
AST	U/l	166,4±87,35	96,0±22,56	224±285,1	98±13,5
BIL	mg/dL	0,1±0,02	0,1±0,01	0,2±0,05	0,2±0,02
BUN	mg/dL	15,8±3,17	15,0±2,24	17,8±2,77	17,7±3,30
CHO	mg/dL	68,1±14,27	83,7±24,92	99±36,6	75±10,0
CPK	U/l	283,1±212,31	155,0±98,98	125±63,0	118±57,1
CRE	mg/dL	0,6±0,03	0,6±0,04	0,7±0,05	0,7±0,05
GGT	U/l	3,3±0,48	3,0±0,37	2,8±0,56	3,0±0,55
GLU	mg/dL	159,8±13,54	163,7±11,54	136±5,1	131±13,3
IP	mg/dL	6,4±0,69	6,2±0,21	4,87±0,575	5,68±0,903
PRO	g/dl	6,1±0,19	6,4±0,27	6,8±0,40	6,6±0,38
TG	mg/dL	69,4±18,26	94,2±31,27	49±6,1	48±20,5
A/G	ratio	1,1±0,06	1,1±0,04	1,3±0,11	1,2±0,02
CA ²⁺	mg/dL	10,3±0,06	10,6±0,21	10,9±0,31	10,6±0,35
Na ⁺	mmol/L	140,1±0,60	139,9±0,90	139,2±1,50	138,6±1,19
K ⁺	mmol/L	4,52±0,23	4,57±0,26	4,00±0,35	4,06±0,33
Cl ⁻	mmol/L	107,7±2,26	107,3±1,06	108,5±1,44	107,6±1,18
NO. OF ANIMALS		5	5	5	5

4. 장기중량

부검 후 고환 (Testis), 비장 (Spleen), 폐 (Lung), 신장 (Kidney), 간 (Liver), 뇌 (Brain), 뇌하수체 (Pituitary)의 중량 결과를 절대 중량 (Absolute organ weights)과 부검 전 체중 대비 상대 중량 (Relative organ weights)을 측정 한 결과, 주요 군에서 대조군과 비교하여 수컷의 우측 고환 (Testis), 비장 (Spleen)과 폐 (Lung)의 상대 중량 (Relative organ weights)의 경우 고용량 군 (4,000 mg/kg/day)에서 증가를 나타냈고, 신장 (Kidney)의 상대 중량 (Relative organ weights)이 고용량 군 (4,000 mg/kg/day)에서, 간 (Liver)의 상대 중량 (Relative organ weights)이 모든 시험 군 (1,000, 2,000, 4,000 mg/kg/day)에서의 증가를 나타내었으나 독성학적으로 유의미한 변화가 나타나지 않았다 (Table 6).

암컷의 경우 뇌하수체 (Pituitary)의 상대 중량 (Relative organ weights)이 저용량 군 (1,000 mg/kg/day)과 고용량 군 (4,000 mg/kg/day)에서, 뇌 (Brain)의 상대 중량 (Relative

organ weights)이 중용량 군 (2,000 mg/kg/day)에서, 비장 (Spleen)과 폐 (Lung)의 상대 중량 (Relative organ weights)이 고용량 군 (4,000 mg/kg/day)에서 증가를 나타냈고, 간 (Liver)의 상대 중량이 중용량 군 (2,000 mg/kg/day)과 고용량 군 (4,000 mg/kg/day)에서 신장 (Kidney)의 상대 중량 (Relative organ weights)이 모든 시험 군 (1,000, 2,000, 4,000 mg/kg/day)에서 증가를 나타냈으나 독성학적으로 유의미한 변화가 나타나지 않았다 (Table 7).

회복 군의 경우 대조군과 비교하였을 때 수컷의 고환 (Testis)과 부고환의 상대 중량 (Relative organ weights)이 고용량 군 (4,000 mg/kg/day)에서 증가를 나타냈고, 간 (Liver)의 상대 중량 (Relative organ weights)이 고용량 군 (4,000 mg/kg/day)에서 증가가 나타났고 (Table 6), 암컷에서는 비장 (Spleen)의 상대 중량이 고용량 군 (4,000 mg/kg/day)에서 증가가 나타났지만 (Table 7), 정상 범위 (Historical data) 내의 변화로 독성학적으로 유의미한 변화가 나타나지 않았다.

Table 6. Summary of Relative Organ Weight of Male Rats in the Main Group and a Recovery Group.

ORGAN WEIGHT(g)	MALE					
	MAIN GROUP				RECOVERY GROUP	
	G1	G2	G3	G4	G1	G4
Body Weight	634.35	610.94	638.93	558.94	666.72	592.66
SD	82.83863	81.19397	70.9875	56.93072	40.53982	62.37265
Adrenal Gland-Left	0.03005	0.02592	0.02908	0.02868	0.03202	0.03064
% Body Weight	0.00476	0.00434	0.00456	0.00514	0.00486	0.00518
SD	0.005047	0.003664	0.003978	0.006618	0.007518	0.003783
Adrenal Gland-Right	0.03115	0.02755	0.03007	0.0298	0.03358	0.031
% Body Weight	0.00492	0.00459	0.00473	0.00533	0.00504	0.00526
SD	0.005048	0.002932	0.004018	0.006236	0.008572	0.003202
Pituitary Gland	0.01481	0.01401	0.01395	0.01408	0.01474	0.0152
% Body Weight	0.00236	0.00232	0.0022	0.00254	0.00222	0.00258
SD	0.0013	0.001376	0.001053	0.001259	0.002947	0.000997
Testis-Left	1.74206	1.63743	1.879	1.93618	1.68398	1.89264
% Body Weight	0.27471	0.26818	0.29957	0.34844	0.25346	0.32124
SD	0.372575	0.344187	0.695154	0.176157	0.212803	0.243661
Testis-Right	1.73855	1.63631	1.65332	1.96449	1.75166	1.92266
% Body Weight	0.27429	0.26736	0.25648	0.35354	0.26348	0.32614
SD	0.367468	0.36061	0.402924	0.177533	0.117832	0.223365
Epididymis-Left	0.87228	0.80871	0.82777	0.75101	0.73028	0.801
% Body Weight	0.14187	0.13848	0.13406	0.13492	0.1099	0.13506
SD	0.351843	0.323353	0.314828	0.07871	0.051329	0.131925
Epididymis-Right	0.87213	0.82445	0.77092	0.74657	0.75704	0.81354
% Body Weight	0.1416	0.14118	0.12372	0.13406	0.11416	0.13688
SD	0.344508	0.310105	0.353328	0.058379	0.05929	0.137486
Thymus	0.60727	0.49304	0.5168	0.43914	0.40972	0.4357
% Body Weight	0.09442	0.07918	0.08109	0.07772	0.06158	0.07376
SD	0.282699	0.161066	0.109147	0.143652	0.134093	0.045988
Prostate	0.6141	0.66937	0.62362	0.63836	0.70902	0.62452
% Body Weight	0.09789	0.11085	0.09935	0.11487	0.1055	0.1047
SD	0.165575	0.191842	0.129703	0.121863	0.225027	0.193363
Spleen	0.97059	0.92307	1.10673	1.05509	0.92528	0.95956
% Body Weight	0.15195	0.15191	0.17343	0.18948	0.14012	0.1606
SD	0.202157	0.135382	0.172577	0.140361	0.226748	0.215941
Kidney-Left	1.67991	1.86463	1.86675	1.90392	1.65934	1.8241
% Body Weight	0.26679	0.30817	0.29465	0.34134	0.24984	0.30934
SD	0.143343	0.166008	0.136156	0.227791	0.09618	0.204477
Kidney-Right	1.70137	1.87812	1.89449	1.97893	1.7	1.9059
% Body Weight	0.27048	0.31024	0.29857	0.35491	0.25576	0.32288
SD	0.1418	0.19581	0.15949	0.230833	0.103054	0.156969
Heart	1.64523	1.64971	1.6172	1.59772	1.69266	1.67242
% Body Weight	0.26109	0.27234	0.25485	0.28643	0.25448	0.28288
SD	0.174035	0.129977	0.11168	0.150821	0.037683	0.157223
Lung	1.84937	1.86642	1.89222	1.93102	1.99808	1.99146
% Body Weight	0.29298	0.30946	0.29961	0.34687	0.30118	0.33642
SD	0.258808	0.095482	0.164674	0.185519	0.131036	0.290061
Brain	2.22117	2.18714	2.37524	2.19957	2.2529	2.18534
% Body Weight	0.35446	0.36362	0.38083	0.39559	0.3391	0.37186
SD	0.111294	0.095551	0.588164	0.142684	0.120072	0.085724
Liver	15.57101	16.79955	19.08316	19.32467	16.1673	18.55148
% Body Weight	2.44189	2.73953	2.98203	3.45503	2.42596	3.11054
SD	2.793457	2.937585	2.595344	2.397279	1.07693	3.55586
N	10	10	10	10	5	5

Table 7. Summary of Relative Organ Weight of Female Rats in the Main Group and a Recovery Group.

ORGAN WEIGHT(g)	FEMALE					
	MAIN GROUP				RECOVERY GROUP	
	G1	G2	G3	G4	G1	G4
Body Weight	315.52	289.67	280.84	264.31	302.26	278.56
SD	41.38383	28.77167	54.88036	28.44615	10.59637	23.89902
Adrenal Gland-Left	0.03024	0.02861	0.02671	0.02706	0.02882	0.02958
% Body Weight	0.00972	0.00995	0.0098	0.01034	0.00952	0.01068
SD	0.002281	0.00478	0.003333	0.003849	0.002758	0.003258
Adrenal Gland-Right	0.02943	0.02782	0.02832	0.02599	0.0291	0.02796
% Body Weight	0.00946	0.0097	0.01019	0.00992	0.00962	0.01006
SD	0.003719	0.005666	0.005542	0.002911	0.003934	0.003776
Pituitary Gland	0.0172	0.01895	0.01731	0.01737	0.02348	0.0173
% Body Weight	0.00549	0.00653	0.00629	0.00658	0.00778	0.00624
SD	0.002299	0.003824	0.003263	0.003354	0.007668	0.002065
Ovary-Left	0.0609	0.05955	0.0569	0.05324	0.05218	0.0585
% Body Weight	0.01946	0.02082	0.02056	0.0202	0.0174	0.02114
SD	0.008622	0.010872	0.009832	0.011809	0.017576	0.006195
Ovary-Right	0.06068	0.05528	0.05802	0.05292	0.04926	0.05378
% Body Weight	0.01968	0.01929	0.02105	0.02008	0.01632	0.01952
SD	0.007504	0.011548	0.012029	0.012938	0.012458	0.008524
Thymus	0.31208	0.25643	0.33175	0.25605	0.21284	0.22854
% Body Weight	0.09815	0.08917	0.12212	0.09695	0.0704	0.08202
SD	0.105691	0.040489	0.149906	0.05013	0.026011	0.045615
Spleen	0.54717	0.55096	0.52632	0.57002	0.49332	0.53272
% Body Weight	0.17272	0.1906	0.18957	0.21564	0.16354	0.19194
SD	0.10018	0.057887	0.08574	0.076306	0.062394	0.02428
Kidney-Left	0.87951	0.94395	0.9475	0.96288	0.88316	0.90362
% Body Weight	0.28075	0.32693	0.34332	0.36577	0.2927	0.32522
SD	0.074347	0.094326	0.100852	0.085954	0.060838	0.067928
Kidney-Right	0.90065	0.96737	0.97477	0.98037	0.90606	0.9211
% Body Weight	0.28728	0.33501	0.35317	0.37294	0.3004	0.3326
SD	0.089662	0.100529	0.105592	0.079467	0.091475	0.084993
Heart	0.91768	0.91135	0.84976	0.83937	0.92822	0.91444
% Body Weight	0.29257	0.31424	0.3082	0.3195	0.30692	0.32878
SD	0.08571	0.150752	0.080839	0.060152	0.072371	0.070379
Lung	1.29786	1.24178	1.26145	1.24836	1.27106	1.2269
% Body Weight	0.41563	0.43132	0.4588	0.47362	0.4202	0.44152
SD	0.196296	0.151746	0.074782	0.123871	0.122693	0.065381
Brain	1.96635	1.98185	1.99648	1.89023	1.97958	1.91254
% Body Weight	0.63514	0.69007	0.73036	0.72123	0.6555	0.68998
SD	0.099084	0.057023	0.075835	0.096253	0.026735	0.081485
Liver	7.58521	7.53662	7.54765	8.80364	7.43252	7.17764
% Body Weight	2.41114	2.5939	2.70452	3.3405	2.45552	2.58476
SD	0.968814	1.101436	1.24854	1.000041	0.924183	0.392013
N	10	10	10	10	5	5

5. 부검

주요 군과 회복 군 모두 전날 절식(17 시간 이상)하고, 부검 당일 Isoflurane으로 흡입마취 후 복대동맥 및 복대 정맥을 절단하여 방혈, 치사하였다. 주요 군의 수컷 중용량 군의 1레에서 우측 고환의 비대와 좌측 고환의 왜소가 관찰되었다. 주요 군 암컷의 대조군 1레, 저용량 군 1레, 고용량 군 1레, 회복 군 암컷의 고용량 군 1레에서 자궁 내 맑은 액체 저류가 관찰되었고, 암컷의 중용량 군 1레에서 가슴샘의 발적이 발견되었다. 하지만 이는 개체 간의 차이로 독성학적으로 유의미한 변화로 판단하지 않았다.

IV. 고 찰

고령화에 따른 만성질환 등의 증가로 한방 의료에 대한 관심이 높아지고 있는 현재¹²⁾, 전통적으로 사용되는 처방 원방의 경우 오랫동안 치료된 기록을 바탕으로 부작용이 적으며, 안전성에 대한 신뢰가 있다⁹⁾. 하지만, 관련 문제가 지속적으로 제기되고 있기에 한약제제 개발에 안전성을 확인하는 실험이 필요한 실정이다⁹⁾. 따라서 전통적 처방을 근거로 한 한약제제의 개발에 있어 안전성과 독성평가가 중요하다. 현재 山茱萸와 補骨脂 복합추출물에 대한 독성연구로는 단회 경구투여 독성 시험에 대한 연구가 보고되어 있다⁹⁾. 하지만, 만성질환의 경우 오랜 기간 반복적으로 약물을 투여하기 때문에 반복 경구투여 독성시험의 연구가 필요하다.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Section 4 Health Effects Test No.420 Acute Oral Toxicity Study - Fixed Dose Procedure (17 December 2001) 및 식품의약품안전처 고시 의약품등의 독성시험기준 제 2017-71 호¹¹⁾를 기준으로 Sprague-Dawley rats에 90 일간 반복 경구투여 하였을 때 발현되는 독성적 특성을 바탕으로 표적 장기 및 NOEL (최대무독성용량), NOEL (최대무영향용량), LOEL (최소독성용량)을 설정하여 반복투여 독성실험을 진행하였다.

본 시험물질은 천연물복합추출물로 한약제제 의약품 개발을 목적으로 개발되어 경구투여로 투여를 진행하였고, 용량설정을 위해 동일한 시험물질로 28 일간 용량설정 시험을 진행한 결과 암수 모두에서 NOEL이 4,000 mg/kg/day로 추정되었고, 임상예정 용량이 높을 것으로 예상되어 최고용량을 4,000 mg/kg/day로 설정하고, 중용량 군으로 2,000 mg/kg/day, 저용량 군으로 1,000 mg/kg/day, 부형제 투여군으로 대조군 (0 mg/kg/day)을 설정하였다.

시험 기간 중 대조군을 포함한 모든 시험 군에서 사망 동물은 발생하지 않았다. 일반증상, 체중, 혈액학적 검사, 혈액 생화학 및 전해질 검사, 장기증량 결과 통계적으로 유의미한 감소나 증가가 나타났지만, 독성학적으로 의미 있는 변화가 관찰되지 않았다. SD rats에 대한 SCP의 90 일 반복 경구독성 시험 결과 암수 모두에서 NOEL이 4,000 mg/kg/day로 나타나 비교적 안전한 약물로 추정할 수 있다.

V. 결 론

SD rats에 대한 SCP의 90일 반복 경구독성 시험 결과 4,000 mg/kg/day까지 약물에 의한 사망이 나타나지 않았다. 일반 증상, 체중, 혈액학적검사, 혈액 생화학적 검사, 전해질 검사, 장기증량 검사에서 독성학적 의미 있는 변화가 나타나지 않았다. 실험 결과를 통해 SCP의 4,000 mg/kg/day를 반복투여 하였을 때 독성학적 변화가 나타나지 않음을 확인하였다.

감사의 글

이 연구는 2020년 상지대학교 교내과제 지원사업 및 상지대학교 대학원 지원에 의하여 수행되었음

References

1. Editorial Committee of Flora of China. Flora of China, vol.56. Beijing : Science Press. 1990 : 83.
2. Wei Ma, Kai-Jin Wang, Chen-Shu Cheng, Guo-qing Yan, Wei-Li Lu, Jing-Fang Ge, Yong-Xian Cheng and Ning Li. Bioactive compounds from Cornus officinalis fruits and their effects on diabetic nephropathy. Journal of Ethnopharmacology. 2014 : 153 : 840-845.
3. Editorial Committee of Chinese Herbal Medicine. Chinese Herbal Medicine, vol.13, Shanghai. : Shanghai Science and Technology Press. 1999 : 4931.
4. Oriental Medicine Dictionary Compilation Committee. Oriental Medicine Dictionary. Seoul : Jungdam, 2018 : 587-588, 708.
5. Oriental Pharmacology Compilation Committee. Oriental Pharmacology. Seoul : shinilbooks, 2015 : 868-870, 911-913.
6. Hwang BH, Kwon DH, Choi EO, Kim MY, Ahn KI, Ji SY, Kim JS, Kim KI, Park NJ, Kim BH, Kim GY, Hong SH, Park C, Jeong JS, Choi YH. Corni Fructus attenuates testosterone-induced benign prostatic hyperplasia by suppressing 5 α -reductase and androgen receptor expression in rats. Nutr Res Pract. 2018; 12(5): 378-386.
7. Jin BR, Kim HJ, Park SK, Kim MS, Lee KH, Yoon IJ, An HJ. Anti-Proliferative Effects of HBX-5 on Progression of Benign Prostatic Hyperplasia. Molecules. 2018 ; 23(10) : 2683.
8. Jin BR, Kim HJ, Seo JH, Kim MS, Lee KH, Yoon IJ, An HJ. HBX-6, Standardized Cornus officinalis and Psoralea corylifolia L. Extracts, Suppresses Benign Prostate Hyperplasia by Attenuating E2F1 Activation.

- Molecules, 2019 ; 24(9) : 1719.
9. Jin BR, Kang HA, Cominguez DC, Kim MS, Lee KH, Yoon IJ, An HJ. Single Oral Dose Toxicity Test of Standardized *Cornus officinalis* and *Psoralea corylifolia* L. Extracts in Sprague-Dawley Rat. Kor. J. Herbol. 2019 ; 34(3) : 31-36.
 10. Nho JH, Lee MJ, Jung HK, Jang JH, Sim MO, Jang MC, Yong JH, Seo HS, An BK, Kim JC and Cho HW. A 26-Week Repeated Oral Dose Toxicity Test and a 4-Week Recovery Test of *Cassia tora* L. Water Extract in Sprague-Dawley Rats. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2018 ; 26(2) : 157-169.
 11. Ministry of Food and Drug Safety. Standards for managing toxicity testing of medicines, etc. 2017 ; 2017 : 71.
 12. Ministry of Food and Drug safety. 2019 : 241-246.