동의신경정신과 학회지 제21권 제3호(2010년 09월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(3):87-93

Sprague-Dawley 랫드를 이용한 Up & Down 법 (UDP)에 의한 LMK02의 단회 경구투여 독성시험

강형원*†, 권영미‡, 이상원§, 김지휜*, 이효경*, 장현호*, 박보라*, 류영수*

원광대학교 한의과대학 한방신경정신과교실*, 원광대학교 산본병원 인암뇌신경센타†
원광대학교 전주한방병원 방사선과교실‡, 인삼특용작목반§

Up-and-Down Procedure(UDP) Determinations of Acute Oral Toxicity of LMK02-Jangwonhwan in SD Rats

Hyung-Won Kang*†, Yeong-Mi Kwon‡, Sang-Won Lee§, Ji-Hwon Kim*,
Hyo-Gyung Lee, Hyun-Ho Jang*, Bo-Ra Park*, Yeoung-Su Lyu*

Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Won-Kwang University*
Inam Neuroscience Research Center, Won-Kwang University, Sanbon Medical Center†
Dept. of Diagnositic Radiology, College of Oriental Medicine Won-Kwang University‡
National Institute of Horticultural and Herbal Science, Korea§

Abstract

Objectives :
The oriental medicine Jangwonhwan originally described in the Korean medical text, DonguiBogam(amnesia chapter). Recently, a modified formula of Jangwonhwan(LMK02-Jangwonhwan), was shown to reduce β-amyloid deposition in the brain of Tg-APPswe/PS1dE9 mouse model for Alzheimer's disease. This experiment aimed to investigate the acute oral toxicity of LMK02 in SD rats by up-and-down procedure determinations.

Methods :
Quality control of tablet form of LMK02 was established by estimating indicative components, Ginsenoside Rg3 of Red Ginseng and Decursin of Angelicagigas Nakai.
The toxicity of LMK02 was investigated in 6 week old, specific pathogen free(SPF), Sprageu-Dawley rats .
3 female rats received 5,000 mg/10 ml/kg of test substance and their death rate, clinical sings, weight changes and autopsy findings had been observed for 2 weeks.

Results :
Any specific symptoms or death were resulted in this experiment. No significant changes in rats' weight. No significant differences in atopsy.

Conclusions :
The minimum lethal dose(MLD) of LMK02 for female Sprauge-Dawley rats were more than 5,000mg/kg in this experiment.

Key Words :
Oriental medicine, Alzheimer disease, LMK02-Jangwonhwan, Toxicity test

투고 : 2010. 8. 10. 수정 : 2010. 9. 3. 채택 : 2010. 9. 4.
교신저자 : 류영수, 전북 익산시 신용동 344-2번지 원광대학교 한의과대학
Tel) 0063-270-1021, E-mail) yslyu@wonkwang.ac.kr

Ⅰ. 서 론

LMK02는『東醫寶鑑·神門』[1]에서 건망증에 활용되던 壯元丸 處方에서 시작하여 실험과 임상적 선별 과정을 걸쳐 紅蔘, 當歸 등의 7가지로 구성된 補腎益氣醒腦 효능의 복합한약제제이다. 품질규격화는 처방구성약물중 홍삼의 Ginsenoside Rg3와 당귀의 총데쿠르신를 지표물질로 설정하였으며[2], 주요 실험적 연구에서 Aβ oligomer에 의해 유도된 해마세포주 H19-7에서와[2], 알츠하이머병 마우스모델인 Tg-APPswe/PS1dE9에서[3] 항치매 효과를 확인하였다. 또한 oxidative stress 유발 손상에 대한 壯元丸加減方의 비교에서 LMK02가 壯元丸原方보다 항산화적 효과가 더 우수한 것으로 보고되었고[4], LMK02의 안전성에 대한 연구 일환으로 의약품등의 품목허가·신고·심사 규정(2009. 6. 30 식품의약품안전청 고시 제2009-42호)에 따라 본 연구에 착수하게 되었다[5-7].

이제 저자는 특정병원균 부재(SPF) Sprague-Dawley 계통의 암컷 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 Up & Down 법(UDP)으로 알아보기 위하여 수행하였다. 시험물질을 암컷 랫드 3 마리에 5,000 mg/10 ml/kg으로 투여한 후 2 주간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하여 안전성을 평가하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시험동물 및 사육환경

1) 시험동물

(1) 종 및 계통

특정병원균 부재(SPF) 암컷 랫드 HsdKoat : Sprague-Dawley SD

(2) 공급원

코아텍(경기도평택시진위면동천리 406, Tel : 031-611-8222)

(3) 시험계의 선택이유

본 시험에 사용하는 랫드는 크기가 작고, 다루기가 쉬우며, 계절변동이 적은 장점이 있는 동시에 스트레스에 덜 민감하면서 병에 대한 저항력이 강하다. 또한 공급체제가 확립되어 있고, 약물에 대한 반응이 일정하며, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어서, 사람에의 외삽(extrapolation)이 가능하므로 일반독성시험에 널리 사용되고 있다. 본 시험에서는 UDP 가이드라인에 근거하여 암컷 랫드만을 사용하였다.

(4) 주령 및 체중범위

① 입수시 성별 및 주령 : 암컷, 7 주령

② 입수시 동물수 : 8 마리

③ 입수시 체중 : 159.13~173.96 g

④ 투여시 주령 : 8 주령

⑤ 투여시 동물수 : 3 마리

⑥ 투여시 체중 : 1차 투여 - 164.36 g, 2 차 투여 - 176.11 g, 173.76 g

(5) 검역 및 순화(Annex 2)

입수 후 동물을 운반상자로부터 꺼내 외관 관찰을 실시한 후 시험을 실시하는 동물실의 사육상자에 옮겨 1 차 투여 동물은 7 일, 2 차 투여 동물은 8 일간 순화시켰다. 동물공급업체에서 제공한 시험계의 건강 및 병원체 검사 성적서를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었으며, 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.

2) 사육환경

(1) 환경조건

본 시험은 온도 23±3℃, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10~20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8시 점등~오후 8시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정한 ㈜켐온 전임상연구센터 제2동물사육구역 6 호실에서 수행하였다. 시험자들은 모두 고압증기멸균(121℃, 20 분)한 작업복과 보호장구를 착용하고 작업을 실시하였다.

(2) 사육환경 모니터링

시험기간 중 동물실의 온도와 습도는 컴퓨터 시스템을 이용한 자동 온×습도측정기로 매시간마다 측정하였으며, 환기횟수 및 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정하였다. 환경측정 결과 실험기간 동안 사육실의 온도 및 상대습도는 평균 24.2±0.18℃ 및 59.8±1.33% 였으며, 온×습도, 환기횟수, 조도 등에서 설정범위를 벗어나 시험의 결과에 나쁜 영향을 끼칠만한 이상은 관찰되지 않았다.

(3) 사육상자 및 사육밀도

동물은 스테인레스제 망 사육상자(W 215 × L 355 × H 200 mm)에서 검역 및 순화기간에는 5마리/사육상자 이하, 투여 및 관찰기간에는 2마리/사육상자 이하로 사육하였다.

(4) 사료 및 물(Annex 3 및 Annex 4)

사료는 방사선조사로 멸균한 실험동물용 고형사료(Harlan Co. Ltd, USA. TEKLADCERTIFIEDGLOBAL 18% PROTEINRODENTDIET, 2918C)를 폴라스 인터내셔날로부터 공급받아 자유섭취토록 하였으며, 성분분석성적서를 검토한 결과 사료조성 및 오염물질 등에서 시험에 악영향을 줄만한 요인은 없었다.

물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후 물병을 이용하여 자유섭취토록 하였다. 시험에 앞서 공인기관인 ㈜워트랩생활환경연구원(경기도 수원시 권선구 서둔동 14-3)에 의뢰하여 수질검사를 실시한 결과 '먹는물수질기준' 적합 판정을 받았다.

(5) 동물실험윤리규정의 준수

본 시험은 ㈜켐온 동물실험윤리규정을 준수하여 실시하였다.

2. 시험물질 및 투여절차

1) 시험물질

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

(1) LMK02 단미 총 312 g를 정선하여 약전통칙 중 절도 및 분말도에 따라 조절로 하고

(2) 추출기에 넣은 다음

(3) 정제수(약전) 약 2.5 L 가량 넣고

(4) 95~100℃에서 3시간 가온 추출한 후

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

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

(7) 합한 농축액을 건조기에 넣고 60℃이하에서 건조한다.

(8) 건조물을 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분말화한다.

(9) 건조엑스 95 g를 얻는다. (수득률 약30.4%)

2) 투여절차

시험물질의 조제 본 시험물질은 생약추출물로서 습기에 약하므로 데시케이터에 보관하였으며, 순도에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였다. 사람에 대한 임상 예정 경로로서 경구투여를 선택하였고, 투여 전에 하룻밤 절식시켜 위 내용물을 비운 후, 경구투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 투여하였다. 투여 후 약 4 시간째에 사료를 다시 급여하였다. 투여 당일에 측정한 절식시의 체중을 기준으로 10 ml/kg으로 투여액량을 산출하였다. 1회/일, 단회 투여하였고, 투여는 12:00이전에 완료하였다.

시험물질 투여는 1 차와 2 차로 나눠서 실시하였다. 1 차 투여는 시험물질을 5,000 mg/kg의 투여량으로 1 마리에 투여한 후 1 일간 일반증상 관찰을 실시하였다. 그 결과, 사망동물이나 이상증상이 관찰되지 않아 다음 날에 2 차 투여를 실시하였다. 2 차 투여는 시험물질을 1 차 투여와 동일한 투여량으로 2 마리 동물에 투여하였다.

3. 실험방법

1) 시험군의 구성

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여용량 (mg/kg)
1 차 투여	Female	1	1	10	5,000
2 차 투여	Female	2	2, 3	10	5,000

2) 일반증상관찰

전 동물에 대하여 매일 1 회 이상 증상관찰을 실시하였다. 단, 투여 당일에는 투여 후 1 시간까지는 지속적으로, 이후 4 시간까지는 매시간마다 관찰하였다. 일반증상관찰은 투여 후 14 일까지 실시하였다. 일반증상의 관찰은 개체별로 기록하였다.

3) 체중측정

1차 투여 동물은 투여 전, 투여 후 1, 3, 7 및 14 일째에, 2차 투여 동물은 투여 전, 투여 후 3, 7 및 14 일째에 체중을 측정하였다.

4) 부검

투여 후 14 일째에 모든 생존동물을 Ether를 이용하여 흡입 마취시킨 후 개복하여 후대정맥 및 복대동맥을 절단하는 방법으로 방혈치사하여 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

5. 통계학적 분석

본 시험에서의 반수치사량(LD_{50})은 AOT425StatPgm 전산프로그램[4]을 이용하여 산출하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 사망률

실험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다(Table Ⅰ).

2. 일반증상

실험기간 중 시험물질을 투여한 모든 동물에서 이상증상은 관찰되지 않았다(Table Ⅰ).

3. 체중

투여 후 14 일간의 체중변화(Body weight changes)와 증체량(Body weight gains)을 관찰한 결과, 시험물질의 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다(Table Ⅰ).

4. 부검소견

육안적인 부검소견 관찰결과, 이상소견은 관찰되지 않았다(Table Ⅰ).

Table 1. Individual data of female rat following oral administration of LMK02

DAYS AFTER DOSE	Dose Level (mg/kg) : 5,000 BODY WEIGHTS (g) 0	3	7	14
ANIMAL ID: 1	164.36	191.86	200.90	218.68
ANIMAL ID: 2	176.11	200.02	206.14	209.76
ANIMAL ID: 3	173.76	197.45	209.74	223.94

DAYS	TIME (hrs)	CLINICAL SIGNS
0	0	Appears normal
	1	Appears normal
	2	Appears normal
	3	Appears normal
	4	Appears normal
1		Appears normal
2		Appears normal
3		Appears normal
4		Appears normal
5		Appears normal
6		Appears normal
7		Appears normal
8		Appears normal
9		Appears normal
10		Appears normal
11		Appears normal
12		Appears normal
13		Appears normal
14		Appears normal
		Terminal sacrifice

NECROPSY FINDINGS

〈NONE〉

Ⅳ. 고 찰

최근 노인인구의 급격한 증가로 치매가 보건의료의 중요한 화두가 되고 있다. 아직 명확한 원인과 치료약물이 없는 가운데 임상적 경험이 풍부한 한약물을 이용한 천연물 신약에 대한 관심과 연구가 집중되고 있다. 특히 최근에는 건망증 치료제로 多用되는 壯元丸에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[8,9].

壯元丸은 『東醫寶鑑』神門[1]에서 補心生血 寧神定志하는 효능이 있다고 하였으며, 건망증에 활용되는 처방이다. 전통적 壯元丸은 12가지 한약재/버섯과 소수의 무기질, 황화수은이 주성분인 朱砂로 구성되어 있다. 朱砂는 신경독성이 있어 朱砂를 제외한 다른 壯元丸의 구성성분이 쓰여져 왔다.

이 중에서도 壯元丸의 12개 약재에서 7개 약재로 축약한 壯元丸加減方, LMK02의 AD 치료효과에 대한 연구들이 주목할 만한데, 이 축약된 형태가 壯元丸에서 朱砂만 뺀 처방 보다 항산화 효과가 더 우수했고[4], Aβ oligomer의 신경독성에 대한 항산화작용을 통한 항치매 효과도 뛰어났으며[2], AD 동물 모델인 Tg-APPswe/PS1dE9 유전자 형질전환 생쥐에서의 Aβ의 양과 plaque 침착 억제 효과[3]가 있다는 결과들이 발표되어 LMK02가 AD에 유력한 치료제가 될 수 있음을 시사하는 근거들을 제시하였다.

LMK02의 7가지 구성약물 중 홍삼은 大補元氣, 補脾益氣, 生津止渴, 寧神益智하는 효능이 있고[10], 특히 『중약대사전』[11]에서는 紅蔘이 두뇌활동을 높이고, 피로에 대항하는 작용이 현저하다고 하였다. 최근에는 김 등[10]에 의해 홍삼수추출물이 APP 형질전환된 초파리의 신경세포를 보호하는 효과가 있음이 보고되었다. 石菖蒲는 開竅安神하는 작용이 있으며, 동물실험에서 흰쥐의 뇌혈관을 폐쇄후 재관류 시켰을 때, 석창포를 투여한 경우에서 뇌세포의 사멸이 현저하게 억제되었다는 보고가 있고[13], 또한 pCT105로 유도된 치매모델에서 石菖蒲 수출출액이 유의한 신경세포보호효과가 있음이 보고되었다[14]. 白茯神과 柏子仁은 寧心安神하는 효능이 있으며, 當歸, 麥門冬, 玄蔘은 심혈관계를 보하고 체내의 陰을 補하

는데 사용한다. 當歸는 생체 조건에서 Aβ 저해 활성이 뛰어난 것으로 이미 보고되었으며[15], 당귀추출물로부터 아세틸콜린에스테라아제 저해 활성을 갖는 물질을 분리하여 치매모델 마우스의 뇌조직 활성에 유의한 효과가 있음이 보고[16]되기도 하였다. 현삼 또한 APP로 형질전환된 초파리에서 신경세포 보호효과가 있음이 보고[17]되었다.

항치매 효과가 있는 LMK02의 안전성에 대한 연구는 아직 수행된 바가 없기에 의약품등의 품목허가・신고・심사 규정(2009.6.30 식품의약품안전청 고시 제2009-42호)에 따라 시험물질 LMK02를 Sprague-Dawley 계통의 암컷 랫드에 Up & Down 법(UDP)으로 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.

시험물질 투여는 1 차와 2 차로 나눠서 실시하였다. 1 차 투여는 시험물질을 5,000 mg/kg의 투여량으로 1 마리에 투여한 후 1 일간 일반증상 관찰을 실시하였다. 그 결과, 사망동물이나 이상증상이 관찰되지 않아 다음 날에 2 차 투여를 실시하였다. 2 차 투여는 시험물질을 1 차 투여와 동일한 투여량으로 2 마리 동물에 투여하였다. 시험물질을 암컷 랫드 3 마리에 5,000 mg/kg으로 투여한 후 2 주간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰한 결과, 시험물질과 관련된 어떠한 변화도 관찰되지 않았다(Table Ⅰ).

이상의 결과로 보아, 시험물질 LMK02를 Sprague-Dawley 계통의 암컷 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 본 시험조건하에서 최소치사량(MLD : Minimum Lethal Dose)이 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단하였다.

Ⅴ. 결 론

본 시험은 LMK02를 Sprague-Dawley 계통의 암컷 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 Up & Down 법(UDP)으로 알아보기 위하여 수행하였다. 시험물질을 암컷 랫드 3 마리에 5,000 mg/10 ml/kg으로 투여한 후 2 주간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였으며, 시험결과는 다음과 같았다.

1. 실험기간 동안 사망동물이나 시험물질과 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다.
2. 체중측정 결과, 체중변화의 이상은 관찰되지 않았다.
3. 부검소견 관찰결과, 이상소견이 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 시험물질 LMK02를 Sprague-Dawley 계통의 암컷 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 본 시험조건하에서 최소치사량(MLD : Minimum Lethal Dose)은 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단하였다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. 許俊. 東醫寶鑑. 서울:法仁文化社. 1999:189-91.
2. 강형원, 김상태, 손형진, 한평림, 조형권, 이영재, 류영수. LMK02의 품질규격화와 Aβ oligomer에 의해 유도된 흰쥐해마 H19-7 세포주에 미치는 항치매 효과. 동의생리병리학회지. 2009; 23(2):397-404.
3. Seo JS, Yun JH, Baek IS, Leem YH, Kang

HW, Cho HK, Lyu YS, Son HJ, Han PL. Oriental medicine Jangwonhwan reduces Abeta(1-42) level and beta-amyloid deposition in the brain of Tg-APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. J Ethnopharmacol. 2010; 128(1):206-12.

4. 박용훈, 손일홍, 이상원, 임경헌, 김태헌, 류영수, 강형원. H_2O_2로 유도된 산화적 스트레스에 대한 壯元丸加減方의 PC12 cell에서의 항산화효과. 동의신경정신과학회지. 2009;20(2):19-29.
5. Korea Food and Drug Administration. Toxicity Test Guidelines for Safety Evaluation of Drugs, Notification. 2005:60.
6. Korea Food and Drug Administration. Good Laboratory Practice Regulation For Nonclinical Laboratory Studies, Notification No. 2005-79, Toxicity Test Guidelines for Safety Evaluation of Drugs.
7. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity: Up-and-Down-Procedure (UDP). 2006:425.
8. 김건진, 정대규. 壯元丹이 CT105 및 Aβ로 유발된 치매병태모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(2):91-122.
9. 강형원, 김상태, 이종화, 김태헌, 손형진, 한평림, 류영수. 壯元丸加減方 수추출물이 아밀로이드 전구단백질로 유도된 생쥐의 신경아세포주에서의 항치매 효과. 동의신경정신과학회지. 2007;18(2):13-24.
10. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사. 2000:188.
11. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외. 완역중약대사전. 서울:정담. 1999.
12. 김영준, 김진형, 윤종현, 정은영, 김태현, 유영수, 강형원. 紅蔘 수추출물이 치매단백질 APP 형질전환 초파리에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2009;20(1):235-47.
13. 류성진. 한약재로부터 뇌세포 산화억제와 항허혈 치매물질 탐색. 인제대학교 대학원. 2003.
14. 최혁, 김상호, 이대용, 안대종, 강형원, 류영수 : pCT105로 유도된 치매모델에서 石菖蒲 수추출액이 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2002;3(2):173-94.
15. Research, "Development of Functional foods for the Prevention of the circulatory dieseases and dementia using agricultural and fishery resources" the Ministry of agriculture and forestry. korea. 1998.
16. 장순애. 참당귀(Angelica gigas Nakai)추출물로부터 아세틸콜린에스테라아제 저해 활성을 갖는 물질 분리 및 치매모델 마우스의 뇌 조직 활성에 미치는 영향. 대전 충남대 대학원 박사. 2009.
17. 김진우, 이순이, 이종화, 민상준, 김태헌, 류영수, 강형원. 玄蔘 수추출물이 아밀로이드 전구단백질로 형질전환된 초파리에 미치는 효과. 동의신경정신과학회지. 2009;20(2):121-31.