

말 태반 가수분해 추출물의 Sprague-Dawley Rat를 이용한 단회 경구투여 독성시험

여인호¹, 김이화², 이은용^{1,*}

¹세명대학교 부속충주한방병원 침구의학과

²세명대학교 한의과대학 경혈학교실



[Abstract]

Study on a Single Oral Dose Toxicity Test of Horse Placenta Hydrolysate Extract in Sprague-Dawley Rats

In Ho Yeo¹, Ee Hwa Kim² and Eun Yong Lee^{1,*}

¹Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Chung-Ju Hospital of Traditional Korean Medicine, Semyung University

²Department of Meridianology, College of Traditional Korean Medicine, Semyung University

Objectives : The objective of this study is to analyze the single-dose toxicity of horse placenta hydrolysate extracts.

Methods : Sprague-Dawley rats were chosen for the study. Doses of horse placenta hydrolysate extracts, 2,000 mg/kg, 1,000 mg/kg and 500 mg/kg, were administered to the experimental group, and the same doses of normal saline solution were administered to the control group. This study was conducted under the approval of the Institutional Animal Ethics Committee.

Results : In all 4 groups, no deaths occurred, and the horse placenta hydrolysate extracts administered by oral was over 2,000 mg/kg.

No significant changes in the weight between the control group and the experimental group were observed.

To check for abnormalities in organs and tissues, we used microscopy to examine representative histological sections of each specified organ, the results showed no significant differences in any organs or tissues.

Conclusions : The above findings suggest that treatment with horse placenta hydrolysate extracts is relatively safe. Further studies on this subject should be conducted to yield more concrete evidence.

Key words :
Horse placenta;
Single oral dose toxicity test;
SD rats;
LD₅₀

Received : 2014. 02. 15.

Revised : 2014. 03. 05.

Accepted : 2014. 03. 07.

On-line : 2014. 03. 20.

* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Chung-Ju Hospital of Traditional Korean Medicine, Semyung University, 63, Sangbang 4-gil, Chungju-si, Chungcheongbuk-do 380-080, Republic of Korea
 Tel : +82-43-841-1735 E-mail : acupley@semyung.ac.kr

I. 서 론

최근 안전성이 확보되지 않은 식품 및 의약품의 오남용으로 인한 독성 및 부작용이 늘어나고 있어 이에 대한 철저한 규제 및 관리가 필요한 실정이다¹⁾. 이에 대하여 독성시험에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있는데, 최근의 단회 투여 독성시험에 대한 연구경향은 급성 및 아급성 독성에 대한 연구가 많다²⁾.

태반은 한의학에서는 자하거라고 부르며, 오래전부터 약재로 사용하여 왔다. 태반의性は溫하고味는甘鹹하며,補氣, 養血, 益精하는 효능이 있어 虛損羸瘦, 勞熱骨蒸, 咳嗽, 咯血, 盜汗, 遺精, 陽痿, 婦女血氣不足, 不孕, 乳少 등의 질환을 치료하는 효과가 있다³⁾.

태반(자하거)에 관한 국내의 기존 연구를 살펴보면 면역력 강화, 항산화력, 항염증 등의 효과가 있어 각종 만성병 및 통증질환, 마비질환, 골다공증, 피로개선, 미용치료 등 다양한 분야에 쓰이고 있다⁴⁻⁸⁾.

이처럼 태반의 효과에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 국내에서는 대부분 사람 태반이 쓰이나 국외에서는 기능성 식품 및 약재로서 말 태반도 이용되고 있다. 말 태반도 사람 태반과 비슷한 효과가 있을 것으로 생각되나 말 태반에 대한 독성시험 및 효과 연구는 없는 실정이다.

이에 저자는 말 태반의 급성 독성에 대한 안전성을 확인하려고 한다. 말 태반 가수분해 추출물을 Sprague-Dawley 계통 수컷 5주령 rat에 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 개략의 치사량을 구하고자 독성시험을 진행한 결과 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질은 Corner Point Co, Ltd(Mongolia)에서 공급 받은 말 태반 가수분해 추출물을 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육조건

실험동물은 specific pathogen free(SPF, 특정병원체

부재) Sprague-Dawley 계통 흰쥐 수컷 5주령을 중앙실험동물(주)로부터 구매하여 약 1주일간 본 사육장의 조건에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 23 ± 3℃, 상대습도 50 ± 10 %, 배기 10~12 회, 형광등 명암 12 hrs cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간 동안 폴리카보네이트 사육상자(260W × 420L × 180H mm)에 5마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121 ℃에서 15 분간 멸균된 것을 사용하였고, 멸균된 물과 사료는 자유로이 공급하였다.

3. 시험군의 구성 및 용량 설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군 분리를 실시하였으며 각 군의 평균체중에 대한 군간 차이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 단회 투여 시험에서 각 군은 수컷 각 5마리로 구성하였으며, 투여용량의 설정은 예비시험결과를 고려하여 3단계의 등비용량(공비 2)으로 고용량군(2,000 mg/kg), 중용량군(1,000 mg/kg) 및 저용량군(500 mg/kg)으로 설정하였으며, 대조군은 생리식염수군으로 하여 1회 경구투여 하였고, 2주간 관찰하였다.

4. 투여약액의 조제 및 투여방법

제공받은 시험물질인 말 태반 가수분해 추출물을 투여용량별로 투여 직전 제조하여 사용하였으며, 투여 직전에 측정된 체중에 따라 시험물질의 투여량을 산출하여 흰쥐에 경구투여 하였다.

5. 관찰 및 검사 항목

1) 일반증상 관찰

모든 실험동물에 대한 임상증상은 투여 당일에는 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매시간, 투여 1일부터 7일까지는 1일 1회 이상씩 일정시간에 관찰하여 14일 동안 일반상태의 변화, 중독증상 발현, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대해 주의하여 관찰하였다.

2) 체중 측정

시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여당 일(0일), 7일, 부검 시에 측정하여 기록하였다.

산출하며, 그 외 본 실험에서 얻어진 체중 등의 자료에 대한 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 대조군과의 균간 유의성을 검정하였다.

3) 부검

시험 종료 후 생존례는 부검 전에 체중을 측정하고 ether 마취하에 방혈치사시킨 다음 외관 및 내부장기 이상 유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다.

III. 결 과

1. 사망동물 및 임상증상의 관찰

4) 통계학적 분석

시험물질에 대한 LD₅₀는 Litchfield & Wilcoxon법으로

전 투여군에서 사망 개체가 관찰되지 않았으며(Table 1), 특이할 만한 임상증상도 관찰되지 않았다(Table 2).

Table 1. Mortality of the Rats Orally Treated with Horse Placenta Hydrolysate Extract Once

Sex	Dose (mg/kg)	No. of rats	Hours after administration						Days after administration						Final mortality		
			1	2	3	4	5	6	3	6	10	11	12	13		14	
Male	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Table 2. Clinical Signs of the Rats Orally Treated with Horse Placenta Hydrolysate Extract Once

Sex	Dose (mg/kg)	Clinical signs	Days after administration								
			0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	Control	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	500	NAD	5	5	5	5	5	5	5	4	5
	1,000	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2,000	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5

NAD : no abnormalities detected.

Table 3. Body Weights of the Rats Orally Treated with Horse Placenta Hydrolysate Extract Once

Sex	Dose (mg/kg)	Number of rats	Days after administration			
			0	7	14	
Male	Control	5	Mean	178.7	197.3	257.3
			SD	5.82	7.18	6.33
	500	5	Mean	178.2	191.25	251.32
			SD	6.23	8.19	8.88
	1000	5	Mean	176.8	195.65	259.32
			SD	5.24	5.84	9.94
	2000	5	Mean	179.5	180.26	254.32
			SD	6.12	9.05	5.85

SD : standard deviation.

Table 4. Gross Findings of the Rats Orally Treated with Horse Placenta Hydrolysate Extract Once

		Incidence of gross findings			
		Male			
Dose(mg/kg)	No. of rats	Control	500	1,000	2,000
Items		5	5	5	5
Adrenal gland NGF		5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)
Brain NGF		5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)
Heart NGF		5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)
Liver NGF		5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)
Kidney NGF		5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)
Spleen NGF		5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)
Testis NGF		5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)
Thymus NGF		5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)	5(100 %)

NGF : no gross finding, () : percent of no gross finding.

2. 체중 변화

모든 생존개체 투여 용량군에서 유의성 있는 체중 증가는 관찰되지 않았다(Table 3).

3. 육안적 부검소견

전 투여군 모두에서 특이할 만한 부검소견이 관찰되지 않았다(Table 4).

IV. 고 찰

태반은 甘味에 鹹味를 겸하고, 性이 溫하되 燥하지 않아 肺·肝·腎 三經에 들어가 氣血을 크게 補하고 腎精을 補益시켜 久病으로 인한 신체허약이나 혹은 체질허약과 기혈부족 및 腎虛精虧 등의 병증을 치료하는데 單味 또는 複方에 배합하여 응용하면 좋은 효과가 있다. 오늘날 임상에서는 강장약으로 인체의 저항력을 증강케 하여 폐결핵, 신경쇠약, 빈혈, 기관지천식 등의 만성병에 응용하고 있다¹⁾.

태반의 주요 성분을 살펴보면 필수 아미노산 외에 수십 종류의 아미노산과 약리 활성의 중심인 각종 활성 펩타이드, 비타민, 당류, 핵산, 미네랄 그리고 수백 종의 효소로 이루어져 있다. 그 외에는 여러 세포와 장기의 분화를 유도하는 성장인자인 hepatocyte growth factor(HGF), fibroblast

growth factor(FGF), insulin-like growth factor(IGF))와 우리 몸의 면역기전에 필수적인 인터루킨(IL-1~4) 등을 생성하여 신체의 여러 세포와 조직들을 활성화시키고 면역력을 강화시켜 각종 신체 기능을 정상화시키는 역할을 한다고 알려져 있다^{9,10)}.

현재까지 보고되어 있는 태반의 효능은 신체의 면역력 강화, 항산화력, 항염증, 항알레르기 작용, 체내균형 유지, 인터페론 생산, 부신기능 강화작용 등이 있으며, 간 질환, 통증질환, 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 갱년기 장애, 미용치료 등에 응용되고 있다^{11,12)}.

毒(poison, toxin, toxicant)이란 '여러 가지 경로를 통해서 소량이 체내로 들어오면, 생체조직에 기능적 혹은 형태적으로 장애를 주거나 혹은 치사작용을 일으키는 물질'로 정의된다¹³⁾.

한의학에서도 약재에 대하여 有毒, 無毒 등의 표현으로 독성을 분류하여 임상에 사용하고 있고, 본초학의 고서인 《神農本草經》에서도 독성의 強弱에 따라 上藥·中藥·下藥의 세 가지로 나누어 上藥은 거의 無毒하면서 장기간 복용하여 輕身益氣, 不老延年 등의 효능이 있는 약으로, 中藥은 약간의 독성을 지니면서 질병의 예방과 치료에 사용되는 약으로, 下藥은 독성이 강하여 장기간의 복용이 곤란하면서 질병을 치료하는 효과가 강한 약재로 구분하고 있다³⁾.

어떤 물질에 대한 독성을 평가하기 위해서는 그 물질이 일으킬 수 있는 급성 또는 만성적인 유해 작용과 이들 유해 작용 각각의 용량-반응관계를 확인해야 하는데 이러한 정보를 얻기 위해 가장 중요한 것이 바로 동물을 이용한 시험

성적이다. 즉, 독성실험은 의약품 등의 시험물질 안전성 평가를 하기 위하여 중요한 기초자료이며, 필수적이라 할 수 있다⁴⁾. 독성연구의 주요목적은 신약의 안정성을 평가하여 임상적 용약의 안전을 확보하기 위해 시행하는 것으로, 독성실험은 크게 급성 독성실험(단회 투여 독성시험), 아급성 독성실험(1개월 반복 투여 독성시험), 그리고 만성 독성실험(3개월 이상 반복 투여 독성시험)으로 나눈다³⁾.

한약제제의 연구개발에서 실험실내의 유효성 탐색과 효능 검증을 기초로 실용화 연구를 연결하는 임상연구는 근거중심의 한의학 확립하는 중요한 수단이 된다. 최근 한약의 안정성에 대한 논란이 제기되고 있는 상황에서 한약의 유효성을 바탕으로 한 단회 및 반복 투여에 의한 독성시험은 한약의 안전성 확보는 물론 한약제제 개발의 필수 조건이 되고 있다⁵⁾.

원치 않는 독성효과에 대한 기준을 마련하기 위하여 이미 오랜 기간 독성의 성적 수집을 촉진시키는 일련의 시험계획 지침서(testing protocol guideline)와 급·만성 또는 특수 독성 시험에 관한 지침이 공포되어 적용되고 있다⁶⁾. 식품의약품 안전청에서도 독성시험기준을 엄격하게 제안하고 있고, 이러한 시험은 모두 good laboratory practice(GLP) 규정에 의해 평가되어야 인정을 받을 수 있다⁴⁾.

본 연구에서는 기능성 식품으로서의 말 태반 가수분해 추출물의 독성유무를 규명하기 위하여 식품의약품 안전청 고시(2005. 10. 21.)의 의약품 등의 독성시험기준 제 2005-60호에 준하여 시험물질인 말 태반 가수분해 추출물을 Sprague-Dawley 계통 수컷 5주령 rat에 단회 경구투여하여 독성을 관찰하였다.

군구성은 최고용량군(2,000 mg/kg), 중간농도군(1,000 mg/kg), 저농도군(500 mg/kg) 및 대조군(생리식염수사액) 4개 군으로 수컷 각각 5마리씩 단회 경구투여 하였다. 투여 후 14일 동안 일반증상의 관찰, 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 후 부검을 수행하였다. 시험물질 투여 후 전 농도군에서 대조군에 비해 유의성 있는 변화나 폐사가 관찰되지 않았다. 또한 일반증상, 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다. 본 시험의 조건 하에서 시험물질인 말 태반 가수분해 추출물을 rat에 단회 경구투여한 결과, LD₅₀(반수치사량) 값은 2,000 mg/kg 이상을 상회하는 것으로 판단된다. 이상의 결과를 바탕으로 반복 투여 독성 시험 및 사람에 대한 임상시험 등을 추가적으로 진행하여 향후 말 태반이 기능성 식품 및 약재로서 활용되는 데 있어 안전성을 검증해야 한다고 생각한다.

V. 결 론

시험물질인 말 태반 가수분해 추출물의 독성을 조사하기 위하여 공비를 2로 하여 0, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg의 용량으로 Sprague-Dawley 계통 수컷 흰쥐에 각 군당 5마리씩 단회 경구투여 하였다. 이상의 시험 결과는 다음과 같았다.

1. 시험기간 중 시험물질의 투여에 기인한 사망동물은 관찰되지 않았고, 특이할 만한 임상증상도 관찰되지 않았다.
2. 체중변화의 경우 모든 생존개체 투여용량군에서 유의성 있는 체중 증감은 관찰되지 않았다.
3. 육안적 부검소견의 경우 사망개체나 생존개체 모두에서 특이할 만한 부검소견이 관찰되지 않았다.

이상의 결과에서 흰쥐에 있어서 말 태반 가수분해 추출물의 LD₅₀ 값은 2,000 mg/kg 이상일 것으로 예상된다.

VI. References

1. Kyung Hee University College of Pharmacy, Studies on establishment of functional food evaluation standard system, Seoul(Korea) : Korea Food & Drug Administration, 2002 : 1-2.
2. Kang JG, Lee EY, Song BK et al, Study on a Single-Dose Toxicity Test of D-Amino Acid Oxidase (DAAO) Extracts Injected into the Tail Vein of Rats, Journal of Pharmacopuncture, 2013 ; 16(2) : 28-32.
3. The Korea Association of Herbology, Herbology, Seoul : Younglimsa, 2006 : 91-3, 619-20.
4. Seo JC, Lee JD, Park DS et al, Protective Mechanism of Hominis Placenta Extract Against H₂O₂-Induced Apoptosis in PGT-β Cells, Journal of Korean Medicine, 2001 ; 22(3) : 92-7.
5. Hwang JH, Cho HS, Lee HJ et al, Effect of Inhibition Macrophage Migration Inhibitory Factor Activation by Hominis Placenta Herbal Acupuncture on Rheumatic Arthritis, The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society, 2008 ; 25(3) :

- 41-51.
6. Park JH, Jang SH, Lee CH et al. The Clinical Research of the Effectiveness of Pharmacopuncture Complex Therapy on Peripheral Facial Paralysis: Hominis Placenta Pharmacopuncture Therapy and Sweet Bee Venom Therapy. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2010 ; 27(2) : 79-87.
 7. Kim MJ, Yum DY, Koo BT et al. Effects on osteoporosis of Senescence Accelerated Mice (SAM) P6 by Injection of Placenta extracts (Beuronel®). *Kor J Herbology*. 2007 ; 22(3) : 77-83.
 8. Cho TH, Park SS, Park KM. Efficacy of Human Placental Extract Pharmacopuncture into Kwanwon on Fatigue in Students. *Journal of Korean Medicine*. 2013 ; 34(1) : 29-34.
 9. Park NJ. Safety, Efficacy and Limitations of Medical Use of Placental Extract. *Journal of the Korean Medical Association*. 2005 ; 58(10) : 1013-21.
 10. Watanabe S, Togashi S, Takahashi N, Fukui T. L-tryptophan as an antioxidant in human placenta extract. *J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo)*. 2002 ; 48(1) : 36-9.
 11. Kim YB, Nam HJ, Park OS, Kim HJ, Kim KS, Cha JH. The effects of the Hominis placenta on skin barrier. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. 2006 ; 19(2) : 99-107.
 12. Mallick S, Mandal SK, Bhadra R. Human placental lipid induces mitogenesis and melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *J Biosci*. 2002 ; 27(3) : 243-9.
 13. Heo IH. *Toxicology*. Seoul : Shinilbooks, 1993 : 9-10, 185-6.
 14. Kim YG. *Toxicology*. Paju(Korea) : Donghwagisul, 1984 : 15-8.
 15. Shin HM. Repeated Dose 4-Week Oral-Treatment for DRF Toxicity Test of HMC05 in Sprague-Dawley Rats. *J Korean Oriental Med*. 2009 ; 30(5) : 102-14.
 16. Kim YJ, Lim CS, Kwon KR. Study of single dose test of Sweet Bee Venom in rats. *Journal of Pharmacopuncture*. 2009 ; 12(4) : 5-31.