

# 당뇨한약복합처방(Herbal Remedy for Diabetes Mellitus-01, HRDM-01)이 당뇨병성 흰쥐의 간 및 혈중 지질에 미치는 영향

김형우<sup>1</sup>, 하태훈<sup>2</sup>, 조명래<sup>3</sup>, 조수인<sup>1\*</sup>

1 : 부산대학교 한의학전문대학원, 2 : 동의대학교 일반대학원 한의학과, 3 : 동신대학교 한의과대학

## Effects of Herbal Remedy for Diabetes Mellitus-01 (HRDM-01) on Liver and Serum Lipid Level in Diabetic Rats

Hyung-Woo Kim<sup>1</sup>, Tae-Hoon Ha<sup>2</sup>, Myung-Rae Cho<sup>3</sup>, Su-In Cho<sup>\*1</sup>

1 : School of Korean medicine, Pusan National University, 2 : Department of Oriental medicine, Graduated school of Donggeui University, 3 : College of Oriental medicine, Dongshin University

### ABSTRACT

**Objective :** The Herbal Remedy for Diabetes Mellitus-01 (HRDM-01) is composed of 11 species of medicinal plants. HRDM-01 is used as anti-hyperglycaemic agent. Anti-hyperglycaemic agents in western medicine often have hepatotoxicities. Therefore, we investigated safety of HRDM-01, especially in liver functions.

**Methods :** We investigated the effects of HRDM-01 on liver function measuring serum AST, ALT and LDH levels and histopathological changes of liver tissue using photomicroscope. In addition, we also investigated the effects on serum lipid levels such as total cholesterol, HDL-cholesterol and triglyceride.

**Results :** In our experiment, single injection of streptozotocin elevated levels of AST and ALT in serum. But LDH level was not affected. In addition, our animal model showed elevated levels of total cholesterol and triglyceride in serum. 30 days treatment with HRDM-01 lowered serum AST level. Serum levels of ALT and LDH did not affected. In addition, HRDM-01 lowered serum triglyceride level significantly. In histopathological observation, we did not find any abnormal changes in all experimental groups.

**Conclusions :** Briefly, HRDM-01 did not elevate serum levels of ALT, LDH, total cholesterol and did not affect histopathological changes in liver tissues. Moreover, HRDM-01 lowered serum AST, triglyceride, which are elevated by induction of diabetes mellitus. These results suggest the safety of HRDM-01 in diabetic treatment.

**Key words :** Herbal Remedy for Diabetes Mellitus-01, hyperglycaemia, hypercholesterolemia, Herbal medicine

## 서 론

Alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate aminotransferase (AST)는 간세포 내에 존재하는 효소인 aminotransferase로 간기능 검사 (Liver function tests, LFT)의 주요한 측정 항목이다<sup>1,2)</sup>. 이들 효소는 간세포가 손상 되었을 때 혈중으로 분비 되므로 간기능 저하나 간세포 손상의 표지로 활용되고 있다<sup>1,2)</sup>.

AST나 ALT의 정상 수치는 30-40 Units/L이며, 6개월 이상 만성으로 최대 250 Units/L 미만으로 증가하는 경우를

만성 간기능 이상으로 판단하며, 이러한 경우가 급성에 비하여 임상적으로 훨씬 흔하다<sup>2)</sup>. 실제로 당뇨병 환자에게서 비교적 흔하게 관찰 할 수 있는 경우도 이에 속한다<sup>2)</sup>.

당뇨병이 유발되어 인슐린 저항성이 생기면 인슐린에 민감한 조직인 간에서 중성 지방의 저장과 지방 분해에 문제가 발생하게 되며, 결과적으로 간세포 내에 지방 축적되는데, 이는 당뇨병 환자에서 공복시 혈당이 상승하기 이전에 이미 나타난다는 사실이 알려져 있다<sup>2,3)</sup>.

당뇨병 관리의 약물 요법은 인슐린 저항성을 경감시키는 것을 최우선으로 하고 있고, thiazolidinediones (TZDs)의 발견은

\*Corresponding author : Su In Cho, Division of Pharmacology, School of Korean medicine, Yangsan Campus of Pusan National Univ., Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, SEOUL KOREA, 626-870  
· Tel : +82-51-510-8457. · Fax : +82-51-510-8420. · E-mail : sicho@pusan.ac.kr  
· 접수 : 2010년 8월 13일 · 수정 : 2010년 9월 5일 · 채택 : 2010년 9월 13일

당뇨병의 연구 및 치료에 있어 획기적인 발전이었다<sup>4)</sup>. 그러나, 이러한 인슐린 저항성 경감제들은 종종 간부전을 유발함이 알려져 있으며, 최초로 FDA에 승인된 troglitazone이 대표적이다<sup>4)</sup>.

본 연구진은 이전 연구에서 임상에서 다용하고 있는 당뇨 한약복합처방 (Herbal Remedy for Diabetes Mellitus-01, HRDM-01)의 항당뇨 효과를 확인하였다<sup>5)</sup>. 본 연구에서는 HRDM-01의 안전성 검증 목적으로 당뇨병성 흰쥐 모델에서 간효소 수치 및 간조직 변화 그리고 혈중 지질 함량에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험동물은 160~180 g의 Wistar계 수컷 백서를 섀타코 (Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 실험이 진행되는 동안 고형사료(삼양 배합사료 실험동물용, Korea)와 물을 충분히 공급하였다. 실험실 환경은 온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 를 유지하면서 12시간 단위로 낮과 밤이 계속되는 상황을 실험 종료 시까지 유지하였다.

#### 2) 처방 및 구성 약재

HRDM-01은 임상에서 사용되고 있는 처방으로 이를 구성하는 총 11종의 약재는 동신대학교 목동한방병원에서 구입하였다. 처방의 내용은 Table I과 같다.

Table I. Prescription of HRDM-01

韓藥名 (Herbal Name)	生藥名 (Scientific Name)	重量
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	各 等分 Share equally
生地黃	Rehmanniae Radix	
玄蔘	Scrophulariae Radix	
丹蔘	Salvia Miltiorrhizae Radix	
知母	Anemarrhenae Rhizoma	
石斛	Dendrobii Herba	
麥門冬	Liriope Tuber	
天花粉	Tricosanthis Radix	
石膏	Gypsum	
黃芪	Astragali Radix	
烏梅	Mume Fructus	

### 3) 시약

Alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate aminotransferase (AST) 및 total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride 함량은 각각의 측정 전용 kit (아산제약, 한국)을 사용하였으며, LDH 측정 역시 전용 kit (Sigma, USA)을 이용하였다. Streptozotocin(STZ, Sigma, USA) 및 Citric acid 등의 기타 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)제품을 구입하였다.

## 2. 방법

#### 1) 시료의 조제

上記한 총 11개 약물을 세말하여 산제로 조제된

HRDM-01은 경구 투여일의 하루 전날, 3차 증류수에 120 mg/ml 분량으로 녹여 준비하였다.

#### 2) 당뇨병의 유발

Streptozotocin(Sigma, USA)의 1회 복강 주사법을 이용하여 당뇨병을 유발하였다. 0.1 M의 citrate(sigma) buffer를 pH 4.5로 적정한 다음 Streptozotocin을 녹인 후, 0.22 um Syringe Filter(Whatman)로 걸러 줌으로써 멸균을 대신하였다. 이렇게 하여 얻어진 STZ용액을 80 mg/kg의 분량으로 1회 복강 주사하였고, 정상군은 동일한 양의 0.1 M citrate buffer를 복강 주사하였다. 48시간 후, 공복 시 혈당을 측정한 결과 200 mg/dl가 넘는 쥐를 당뇨병이 유발되었다고 생각하고 실험에 사용하였다. 약물의 투여기간은 총 4주간이었다.

#### 3) 실험군 선정

정상군 (Normal group, n=6)은 당뇨병을 유발하지 않고, 1 ml의 증류수 (D/W)를 하루 1회 oral zonde를 이용하여 경구 투여하였다. 당뇨병 대조군 (Control group, n=6)은 당뇨병을 유발시킨 후, 1ml의 증류수 (D/W)를 하루 1회 경구 투여하였다. 당뇨한약복합처방군 (HRDM-01 group, n=6)은 당뇨병을 유발시킨 후, 120 mg/ml의 농도로 녹인 HRDM-01용액을 1ml (600 mg/kg)씩 하루 1회 경구 투여하였다. HRDM-01의 1일 권장량은 9g으로 본 연구에서 투여한 용량 (600 mg/kg)은 성인 기준의 4배에 해당한다. 양약 대조군 (MF group, n=6)에는 식이요법 및 운동요법을 통해 혈당 조절이 충분치 않은 당뇨병환자의 치료에 단독 혹은 인슐린과 병용하여 사용되는 Metformin hydrochloride (글루코닐, 셀트리온, 한국)을 200 mg/kg 농도로 하루 1회 경구 투여하였다.

#### 4) 혈중 AST/ALT 측정

2주간의 약물 투여가 끝난 후, Ether로 흰쥐를 마취시키고 심장채혈법으로 혈액을 얻었다. 얻어진 혈액을 5,000 x g로 20분간 원심분리하여 혈청을 얻은 후, Reitman-Frankel 법<sup>6)</sup>을 이용하여 혈중 AST/ALT의 함량을 측정하였다. OD (Optical Density)값은 분광광도계 (Hitachi, U-2800, Japan)를 이용하여 측정하였다.

#### 5) 혈중 LDH 측정

혈청 LDH 함량은 LQ DIA LDH detection kit (아산제약, 한국)을 이용하여 측정하여 UV rate 법으로 측정하였으며, 측정 기기로는 전용 자동분석기 (Hitachi 747, Japan)를 사용하였다.

#### 6) 혈중 지질 측정

혈청 중 Total cholesterol, HDL-cholesterol, 및 Triglyceride의 함량은 각각의 측정용 키트(아산제약, 한국)를 사용하였으며, OD (Optical Density)값은 분광광도계 (Hitachi, Japan)를 이용하여 측정하였다.

#### 7) 간조직의 조직병리학적 소견 관찰

4주간의 HRDM-01 투여가 끝난 후, 흰쥐를 희생시키고

간조직을 적출하였다. 적출된 간조직은 10% 포르말린에 3일 동안 담가둔 후, Xylen을 이용하여 탈수 시켰다. 탈수된 조직으로 파라핀 블록을 만들고, 다시 박절하여 슬라이드 글라스에 부착 시키고 hematoxylin 과 eosin으로 염색 한 후 광학 현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

### 3. 통계 처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 Sigma plot (Sigma plot for Windows, ver. 9.0, USA)를 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준편차 (mean±SD)로 나타내었으며, 실험군 간 평균의 차이를 검정할 때에는 Student's t-test로 검정하여 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 혈중 AST/ALT 함량 변화에 미치는 영향

4주간의 HRDM-01 투여가 끝난 후, 흰쥐의 혈액으로부터 AST/ALT 함량 변화를 관찰한 결과 당뇨병 유발군에서 AST, ALT가 각각 306.6±78.0 mg/dl, 64.7±27.6 mg/dl로 나타나 정상군에 비하여 유의한 증가를 보였다. HRDM-01 투여군에서는 AST의 경우 169.0±57.9 mg/dl로 당뇨병 유발군에 비하여 유의한 감소를 보였고, ALT는 44.13±14.9 mg/dl로 감소하는 경향을 보였으나, 통계적 유의성은 없었다. 메트포르민군에서는 당뇨병 대조군에서의 결과와 유사한 수준의 AST 및 ALT 함량이 관찰되었다(Fig. 1).

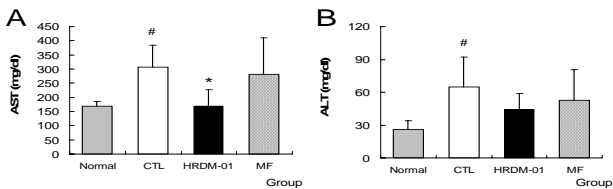


Fig. 1. Effects of HRDM-01 on AST/ALT Levels in Diabetic Rats. Levels of AST and ALT in serum were measured using spectrophotometry. Normal : naive Rats, CTL : Diabetic Rats, HRDM-01 : HRDM-01 administered Rats, MF : metformin administered Rats. Values are represented as mean±SD. <sup>#</sup>P < 0.05 as compared to normal group, <sup>\*</sup>P < 0.05 as compared to control group (n=6).

### 2. 혈중 LDH 함량 변화에 미치는 영향

상기한 바와 같이 얻어진 혈청에서 LDH의 함량을 측정된 결과 모든 군에서 특별한 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 2).

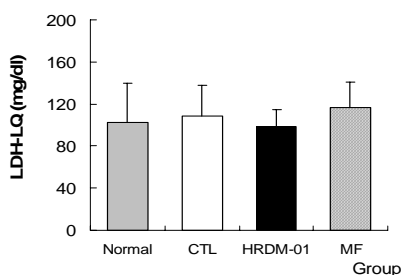


Fig. 2. Effects of HRDM-01 on LDH Levels in Diabetic Rats. LDH level in serum was measured using UV rate method. Normal : naive Rats, CTL : Diabetic Rats, HRDM-01 : HRDM-01 administered Rats, MF : metformin administered Rats. Values are represented as mean±SD (n=6).

### 3. 혈중 지질 함량 변화에 미치는 영향

흰쥐의 혈액으로부터 total cholesterol 함량 변화를 관찰한 결과 당뇨병 유발군에서 80.2±6.0 mg/dl로 나타나 정상군에 비해 유의한 증가를 보였고, HDL-cholesterol 함량은 특별한 변화를 보이지 않았으며, triglyceride 함량은 200.6±65.5 mg/dl로 유의한 증가를 보였다. HRDM-01 투여에 의하여 total cholesterol 함량은 특별한 변화를 보이지 않았고, HDL-cholesterol은 57.6±8.2 mg/dl로 유의한 증가를, triglyceride 함량은 112.7±42.2 mg/dl로 유의한 감소를 보였다. 메트포르민군은 혈중 지질 함량 변화에 특별한 영향을 미치지 않았다(Fig. 3).

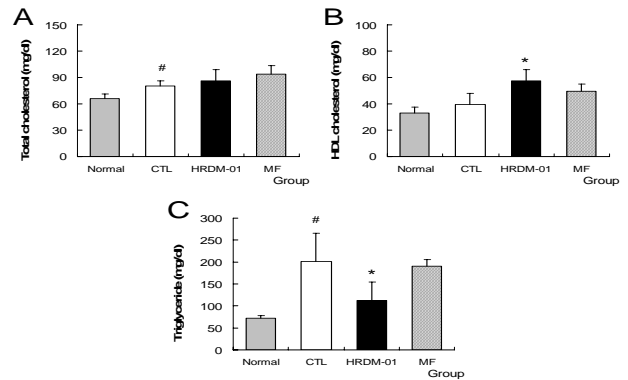


Fig. 3. Effects of HRDM-01 on Serum Lipid Levels in Diabetic Rats. Total cholesterol, HDL-cholesterol, and Triglyceride levels in serum were measured using spectrophotometry. Normal : naive Rats, CTL : Diabetic Rats, HRDM-01 : HRDM-01 administered Rats, MF : metformin administered Rats. Values are represented as mean±SD. <sup>#</sup>P < 0.05 as compared to normal group, <sup>\*</sup>P < 0.05 as compared to control group (n=6).

### 4. 간조직의 조직병리학적 소견에 미치는 효과

4주간의 HRDM-01 투여가 끝난 후, 흰쥐를 희생시키고, 간 조직을 적출하여 현미경적으로 관찰 한 결과, 당뇨병 유발에 의하여 특별한 간조직의 손상은 발견되지 않았으며, HRDM-01 및 메트포르민군에서 특별한 간조직의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4).

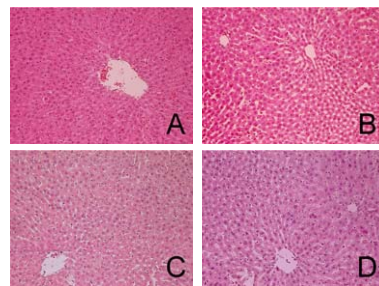


Fig. 4. Effects of HRDM-01 on Histopathological Changes of Liver tissue in Diabetic Rats. The tissues were obtained and prepared as described in Materials and Methods, and stained with hematoxylin and eosin. (A) Normal group, (B) CTL group, (C) HRDM-01 group, (D) MF group. (x200).

## 고찰

인슐린 저항성과 지방간의 발생 사이에는 밀접한 연관성이 존재한다. 인슐린은 세포막의 전사인자인 sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)를 활성화시키며, 이는 지방의 합성을 촉진한다는 사실이 알려져 있다<sup>7)</sup>. 지방간의 간세포 축적은 결국 유리 산소라디칼을 발생시키고 이는 산화적 스트레스를 유발하여 간조직을 파괴하는 과정을 거친다<sup>2,8)</sup>.

본 연구에서 대조 약으로 사용한 metformin은 phenformin과 함께 Biguanide의 일종으로 췌장의  $\beta$  세포를 자극하는 설폰 효소제들과는 달리 간에서의 당 신생을 억제함으로써 혈당을 감소시키고<sup>9)</sup> 말초 조직에서 포도당의 이용을 증가시키며 지방산의 산화를 억제시키는 작용이 알려져 있다<sup>10)</sup>. 현재 metformin은 2형 당뇨병에서 보이는 비알콜성 지방간염의 치료에 사용하는 것을 연구 중이다<sup>4)</sup>.

많은 수의 혈청 효소에 대한 분석이 간세포 손상의 표식으로 제안되었지만, 그 중, AST 및 ALT가 가장 유용하다<sup>11)</sup>. 또한, 상술한 바와 같이 많은 당뇨병 환자에서 만성적으로 증가함이 알려져 있다<sup>2)</sup>. 본 연구의 결과에서 당뇨병 유발군의 AST, ALT 수치가 모두 유의한 수준으로 상승하였으며, HRDM-01은 혈중 AST를 유의한 수준으로 감소시켰다(Fig. 1). 이는 HRDM-01이 간세포의 손상을 보호해 줄 가능성이 있음을 시사하는 바이며, 선행 연구에서 HRDM-01 (Herb-Combined Remedy, HCR)이 SOD 함량에 영향을 미친 점을 감안 할 때<sup>5)</sup>, AST 감소 기전에는 산화적 스트레스로부터 간세포를 보호하는 작용이 관여할 가능성이 있으며, 후속 연구를 통하여 확인해야 할 것으로 생각한다. 메트포르민군에서는 HRDM-01과 달리 특별한 변화를 관찰 할 수 없었는데, metformin은 현재까지 알려진 간독성이나 간보호 작용은 없다<sup>4)</sup>는 선행 연구 결과와 일치한다.

이상지질혈증 역시 당뇨병 환자에게 비교적 흔하게 동반되는 질환 중의 하나이다. 당뇨병환자에서 주요 사망원인은 죽상경화증이며, 당뇨병 환자에서 심혈관질환 발생율은 일반인의 2 ~ 5배로 알려져 있다<sup>12,13)</sup>. 본 연구의 결과에서 당뇨병 유발에 의하여 total cholesterol 및 triglyceride가 유의한 수준으로 상승되었고, HRDM-01의 투여는 total cholesterol 함량에는 영향을 미치지 않았지만, triglyceride 함량은 유의한 수준으로 감소시켰다(Fig. 3). 또한, HDL-cholesterol을 유의한 수준으로 상승시키는 관찰되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 HRDM-01이 단순하게 혈당조절의 역할만을 수행하는 것이 아니라 체내에서 항고지혈증 효과를 나타낼 가능성으로 해석될 수 있다. 상기한 AST 감소 효과와 total cholesterol 및 triglyceride 감소 효과가 간세포의 손상 방지 또는 간세포 기능저하 방지라는 유사한 기전에서 발생하는지 아니면 어떤 미지의 서로 다른 경로를 통해 이루어지는지에 대하여 후속 연구가 뒤따라야 한다고 생각한다.

당뇨병 환자에서 지방간 이환율은 정상인에 비하여 높다. 따라서, 본 연구에서는 간조직을 적출하여 육안적으로 간조직의 손상정도를 관찰하였는데, 당뇨병 유발에 의하여 특별한 간손상을 보이지 않았다(Fig. 4). 이는 당뇨병 유발로부터 지방간 등의 간조직 손상으로 이환되기에는 6주의 실험 기간이 너무 짧은 것 때문으로 생각된다. 그렇다 할지라도,

HRDM-01 및 메트포르민군에서 특별한 간 손상의 소견이 발견되지 않은 것은 HRDM-01의 안전성 특히, 간독성에 대한 자료로서 활용 할 수 있다고 생각된다.

이상의 결과들을 종합하여 보면, HRDM-01은 당뇨병성 흰쥐에서 특별한 간독성을 유발하지 않았으며, 오히려 간세포 손상을 보호할 가능성을 보였다. 또한, 혈중 지질농도를 낮추어 줄 수 있는 것으로 나타났다.

## 결론

당뇨병치료 목적으로 만들어진 한약복합처방이 당뇨병성 흰쥐의 간 효소 수치 및 간조직 변화 혈중 지질 변화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 흰쥐에 당뇨병을 유발하고 4주간 한약복합처방을 투여한 다음 흰쥐의 혈액으로부터 AST/ALT, LDH, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride 함량을 측정하고 간조직을 현미경을 이용하여 관찰한 결과 당뇨병 유발에 의하여 상승된 AST 및 total cholesterol, triglyceride 함량을 유의한 수준으로 감소시켰고, HDL-cholesterol을 유의한 수준으로 증가시켰으며, 혈중 ALT, LDH 및 간조직에는 특별한 영향을 미치지 않았다.

이러한 결과들에서 한약복합처방이 특별한 간독성이 없음을 알 수 있었고, 간세포의 손상을 방지해 줄 수 있는 가능성을 발견하였다. 또한, 당뇨병에 수반될 수 있는 고지혈증에도 유용할 수 있다는 가능성을 제시 하고자 한다.

## 감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비 (2년)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Angulo P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 1221-1231.
2. 김재택. 당뇨병과 간기능 이상 ; 당뇨병환자에서 간효소치 상승의 기전. *임상당뇨병*. 2006 ; 7(2) : 120-123.
3. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, et al. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ab/ab mice. *Mol Cell* 2000 ; 6 : 77-86.
4. 이기영. 당뇨병과 간기능 이상 ; 간기능 이상 당뇨병환자에서 약물사용/경구혈당강하제, 스타틴. *임상당뇨병*. 2006 ; 7(2) : 130-138.
5. 이은방, 조명래, 김재홍, 류충열. 한약복합처방의 경구투여가 Streptozotocin에 의해 유발된 당뇨병 백서의 혈당과 항산화효소계에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 2008 ; 25(1) : 57-72.
6. Crowley LV : The Reitman-Frankel colorimetric transaminase procedure in suspected myocardial

- infarction, *Clin Chem*, 1967 ; 13(6) : 482-487.
7. O'Brien RM, Granner DK. Regulation of gene expression by insulin. *Biochem J*, 1991 ; 278 : 609-619.
  8. Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance : a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005 ; 42 : 987-1000.
  9. DeFronzo RA, Goodman AM. The multicenter metformin study group. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1995 ; 333 : 541-549.
  10. Perriello G, Misericordia P, Volpi E, Santucci A, Ferrannini E, et al. Acute anti-hyperglycemic mechanism of metformin in NIDDM : Evidence for suppression of lipid oxidation and hepatic glucose production. *Diabetes*, 1994 ; 43 : 920-928.
  11. Kurt J, Isselbacher, Eugene Braunwald, Jean D. Wilson, Joseph B. Martin, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper. *Harrison's principles of internal medicine*. Seoul : Jung Dam Publishing Co, 1997 ; 2 : 1553-1555.
  12. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis : epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*, 2002 ; 287 : 2570-5281.
  13. 원규장. 당뇨병과 심혈관질환 : 당뇨병환자에서 심혈관질환의 위험요소. *임상당뇨병*. 2008 ; 9(1) : 27-29.