

# IL-1 $\beta$ 處理 糖尿病 마우스의 胰臟 glucokinase 및 hexokinase 活性에 對한 枇杷葉의 影響

東國大學校 韓醫科大學 內科學教室

尹哲浩 · 申鉉喆 · 鄭智天

## I. 緒論

당뇨병은 당질 대사의 이상을 특징으로 하는 인슐린 작용 부전에 의해 고혈당을 나타내며 갈증, 多尿, 多食 등의 증상을 주요 특징으로 하는 대표적인 성인병이다.<sup>1)</sup> 국내의 당뇨병 유병율은 약 3%로 추정되고 있으며,<sup>2)</sup> 고칼로리 식이 섭취, 진단 방법의 개선 및 평균 수명의 연장 등으로 점차 증가되고 있는 추세이다.<sup>3)</sup>

실험연구에 의하면 glucose의 초기 인산화효소인 glucokinase와 hexokinase가 활성화되지 못하면 결정적으로 당뇨병을 유도한다고 보고되고 있다.<sup>4-7)</sup> Glucokinase는 췌장의  $\beta$ -cell에서 대사 과정에 필요한 glucose 인산화 효소로 glucose를 glucose-6-phosphate (G-6-P)로 인산화시켜 glycogen을 합성시킴으로서 간에서의 포도당 합성에 관계한다.<sup>4,5)</sup> 또한, 간의 glucokinase는 인슐린에 의해 활성도가 좌우되고 췌장의 glucokinase는 혈당에 의해 효소 활성이 변화하여 glucokinase의 역할은 당대사와 인슐린 분비조절 인자임을 시사하였다.<sup>6)</sup>

또한, hexokinase는 혈중 당을 조직내로 흡수하여 G-6-P로 바꾸어 주어 일정한 동적 평형 상태를 유지시켜 주는데, cytokine의 일종인 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )는 염증 질환시 췌장의  $\beta$ -cell에 손상을 주어 인슐린 의존형 당뇨병을 동시에 생성시키며,<sup>8)</sup> IL-1 $\beta$ 의 과잉 발현이 췌장에서의 glucose 산화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.<sup>9)</sup>

동양 의학에서 당뇨병은 消渴의 範疇에 屬하며,<sup>10,11)</sup> 陰津虧損하여 燥熱內生하는 것을 기본 病因으로 하고<sup>10)</sup> 臨床上 上消, 中消, 下消로 大別되나<sup>10,12)</sup> 이 중 中消와 가장 유사하며<sup>13)</sup> “清熱生津止渴”<sup>12)</sup>의 治法이 응용된다. 현재까지 消渴의 치료에 활용되는 약제와 처방에 대한 실험적 연구<sup>14-20)</sup>는 많이 보고되었으나 대부분 혈당, insulin 및 혈청 중 효소들의 변화 또는 췌장  $\beta$ -cell의 조직학적인 변화를 살펴본 것만을 인슐린 분비를 자극할 수 있는 glucose 인산화 효소에 대한 연구는 그다지 보이지 않는다.

枇杷葉은 清涼生津, 解渴止嘔 등의 효능이 있어,<sup>30,31)</sup> 消渴의 치료에 활용되어 왔으며,<sup>32,33)</sup> 실험 연구에 의하면 alloxan에 의해 유도된 당뇨병의 고혈당을 감소시키고  $\beta$ -cell에서 insulin 분비세포의 수를 증가시킨다고 하였다.<sup>20)</sup>

저자들은 이전 연구<sup>34)</sup>에서 枇杷葉이 alloxan으로 유도된 당뇨병에서 glucokinase와 hexokinase를 활성화시켜 당뇨병에 효과가 있다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 IL-1 $\beta$ 로 인슐린 의존형 당뇨병을 유도한 후 마우스의 혈당, insulin 및 glucokinase와 hexokinase 활성에 미치는 영향을 관찰하였던 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗

## 1. 材料

### 1) 藥材

枇杷葉(*Eriobotryae folium*)은 동국대학교 부속 경주 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

### 2) 動物

Male mice는 생후 3주째에 (체중 12-18 g) 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자원 센터 실험동물 사업실에서 분양 받았다. 모든 마우스들은 10마리씩 마누어 플라스틱 cage에 수용하고 물과 식이를 자유롭게 섭취할 수 있도록 충분히 공급하였다. 실험기간 동안 사육 환경은 실온에서, 습도는 60%, 명암주기는 12 시간 간격으로 유지하였다.

### 3) 試藥

모든 일반적인 시약들은 주로 Sigma Co. 및 Wako Pure Chemicals Co. (Tokyo, Japan) 제품의 특급품을 구입하여 사용하였다. 면역 및 활성 시약은 일본의 Daiichi Co.와 Boehringer Mannheim Biochemicals Co.에서 구입하였다. Cytokine인 Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )는 동국대학교 한의과대학 생화학 교실에서 클로닝한 재조합 마우스 IL-1 $\beta$ 를 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) 檢液의 調製

枇杷葉 500 g을 증류수로 추출, 여과하여 그 용액을 동결 건조한 후 분말화시킨뒤 필요에 따라 증류수에 녹여 검액으로 사용하였다.

### 2) 糖尿病의 誘導 및 檢液의 投與

실험 동물은 정상군, IL-1 $\beta$ 처리 당뇨군 (이하 대조군이라 함), IL-1 $\beta$ 처리 당뇨 유발 후枇杷葉 처리군 (이하枇杷葉 처리군이라 함)으로 각 군에 20 마리씩 배정하여 실험에 사용하였다. 대조군과枇杷葉 처리군은 IL-1 $\beta$  (10

$\mu\text{g}/10\text{ g}$ )를 마우스 10  $\mu\text{g}/10\text{ g}$ 씩 복강내 3일 간에 걸쳐 3회 주사하였다.枇杷葉 처리군은 IL-1 $\beta$ 주사 후枇杷葉 농축액을 0.2 mg/20 g씩 1일 2회 2주간 경구로 투여하였으며, 대조군은 증류수를 2주간 경구 투여하였다.

### 3) 試料 收集 및 前 處理

반복적으로 혈당을 측정하고자 할 때는 heparin 처리 모세관으로 안구하 정맥에서 혈액을 약 200  $\mu\text{l}$  뽑아 사용하였다. 마우스들은 decapitation 방법으로 희생시킨 후 혈액을 eppendorf tube에 받아 30분간 세워둔 후 microcentrifuge로 10분간 15000 rpm에서 원심 분리하였다. 혈청은 바로 50  $\mu\text{l}$ 씩 分注하여 보관하였고 혈청 인슐린 분석시 사용하였다. 췌장 조직은 적출하여 차가운 식염수에 세척한 후 흡습지로 물기를 제거한 후 중량을 측정하였다. 췌장 조직은 곧바로 10배의 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)을 가하여 Homogenizer로 균질화하고 4 $^{\circ}\text{C}$ , 100,000 $\times g$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획을 얻었다. 이 중 일부를 냉동 보관하거나 효소 활성 측정과 단백질 함량 분석에 이용하였다.

### 4) 血糖 및 血清 인슐린 定量

혈당은 Glucose oxidase법으로 측정하였고 인슐린은 mouse insulin assay kit (Daiichi radioisotope Labs, Tokyo, Japan, #20008)을 사용하거나 KIST 부설 생명공학 연구소와 청도제약(주)에서 개발한 당뇨 자동 분석기기로 측정하였다.

### 5) Glucokinase와 hexokinase 活性 測定

Glucokinase와 hexokinase 활성 측정은 Walker 방법<sup>35)</sup>을 약간 수정하여 측정하였다. 반응 완충용액 {50 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 0.2 unit glucose-6-phosphate dehydrogenase} 1.0 ml에 (A) 100 mM glucose, (B) 0.1 mM glucose, (C) 100 mM N-acetylglucosamine

100  $\mu$ l씩과 조직 추출물 100  $\mu$ l, 증류수 300  $\mu$ l를 각각 넣어 반응시켰다. 반응후 분광 광도계를 사용하여 340 nm에서 분당 흡광도 변화를 측정 한 다음 (A)-(B)=glucokinase 활성, (B)-(C)=hexokinase 활성으로 계산하였다. 동시에 보다 정확하게 하기 위해서 D-[U-<sup>14</sup>C]glucose (1900-1920 dpm/nmol)로부터 생성되는 D-[U-<sup>14</sup>C]glucose-6-phosphate 양을 측정하였다.<sup>36,37)</sup>

### 6) 蛋白質의 定量

단백질의 정량은 Lowry 방법<sup>38)</sup>을 사용하였으며 비활성도 측정에 사용하였다. 한편, 실험 결과의 유의성 검정은 Student's t-test를 이용하여 상호비교하여 관찰하였으며, 검정시 P 값이 0.05미만일 때를 통계적으로 유의하다고 보았다.<sup>39)</sup>

## III. 成 績

### 1. IL-1 $\beta$ 處理 糖尿 마우스의 體重, 血糖 및 인슐린 分泌의 變化

재조합 IL-1 $\beta$ 를 마우스의 체중 10 g당 (10  $\mu$ g/10 g) 씩 복강내 3일간, 6회에 걸쳐 주사한 후 1일, 7일, 14일 3회에 걸쳐 정상군, 대조군 및 枇杷葉 처리군의 체중 변화를 관찰하였다. 그 결과, IL-1 $\beta$ 만 주사한 대조군의 체중 증가가 가장 심하였으며 다음으로 枇杷葉 처리군에서 증가가 인정되었다. 그 중 1주일 후의 체중 변화 살펴보면 정상군의 체중이 13.4 g인데 반하여 IL-1 $\beta$ 만을 주사한 대조군은 19.5 g을 나타내어 심한 체중 증가가 인정되었으며 IL-1 $\beta$ 주사 후 枇杷葉 처리군은 16.5 g으로 상당한 체중 감소 현상을 보였다. (Table 1) 그러나, IL-1 $\beta$ 처리 마우스의 골절 부분에서 심한 염증성 열반응이 수반되어 당뇨병 이외에 염증을 수반하는 것으로 생각되었다.

한편, 혈청 glucose 양은 정상군이 56.4 mg/l, IL-1 $\beta$ 주사 대조군은 221.5 mgU/l로 나타나 혈당이 크게 증가하였으나 IL-1 $\beta$ 주사 후 枇杷葉 처리군에서는 125.7 mg/l로서 정상군의 수치의 약 1/2까지 감소하여 회복되는 효과가 인정되었다. (Table 2)

그리고, 혈청 인슐린의 양도 정상군이 26.4 nU/ml인 반면, IL-1 $\beta$ 만을 주사한 대조군은 63.5 nU/ml로 나타나 인슐린 분비가 심하게 나타났으며, IL-1 $\beta$ 주사 후 枇杷葉 처리군에서는 52.1 nU/ml으로 나타나 인슐린의 분비가 대조군에 비하여 억제되는 것으로 나타났다. (Table 3)

### 2. IL-1 $\beta$ 處理 糖尿 마우스의 胰臟 glucokinase 活性 變化

IL-1 $\beta$ 를 주사한 대조군에서는 정상군에 비하여 췌장내에서의 glucokinase 활성이 현저히 저하되는 사실이 발견되었다. 즉, IL-1 $\beta$ 를 주사한 직후 glucokinase 활성은 0.18 mU/mg 이었으나 시간이 경과함에 따라 점차 감소하여 1 시간후에는 0.16 mU/mg 이었으며, 10 시간후에는 0.15 mU/mg로 더욱 감소하였다. 그러나, 48 시간째에는 약간의 증가 현상이 보였다.

그리고, IL-1 $\beta$ 주사 후 枇杷葉엑기스를 투여한 마우스의 경우 glucokinase 활성은 주사 직후 0.18 mU/mg 이었으나 시간이 경과함에 따라 점차 증가하여 1 시간후에는 0.20 mU/mg 이었으며, 10 시간후에는 0.24 mU/mg로 더욱 증가하였다. 그러나, 48 시간째에서도 0.24 mU/mg으로 효소활성이 안정되어 있었다.(Fig. 1)

### 3. IL-1 $\beta$ 처리에 의한 당뇨마우스의 췌장 hexokinase활성 변화

IL-1 $\beta$ 를 주사한 후 hexokinase 활성은 주사 직후 4.02 mU/mg 이었으나 시간이 경과함에

따라 점차 감소하여 1 시간후에는 3.42 mU/mg, 10 시간후에는 3.0 mU/mg로 더욱 감소하였고 48 시간째에서도 hexokinase 활성은 3.0 mU/mg으로 변동이 없었으며 이는 glucokinase 경우와는 반대되는 결과였다. 한편, IL-1 $\beta$  주사 후 枇杷葉 엑기스를 투여한 경우 hexokinase 활성은 주사 직후 5.0 mU/mg이었으나 시간이 경과함에 따라 점차 증가하여 1 시간후에는 5.20 mU/mg, 10 시간후에는 5.4 mU/mg로 더욱 증가하였다. 그러나, 48 시간째에서도 5.3 mU/mg으로 효소활성이 안정되었는데 이는 glucokinase의 경우와 유사하였다.

Table 1. Body weight and diet intake of normal, control and *Eriobotryae Folium* (EF)-treated diabetic mice

	Normal	Control	<i>Eriobotryae Folium</i>
Body weight (g)	13.4 $\pm$ 1.4	19.5 $\pm$ 5.4*	16.5 $\pm$ 3.7
Diet intake(g/day)	2.5 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.9	3.0 $\pm$ 0.8

Values are mean  $\pm$  S.E. for 20 animals.

\* : significantly different from normal mice at  $P < 0.05$  by  $t$ -test.

Table 2. Serum glucose levels of normal, control and EF-treated diabetic mice

Serum glucose (mg/l)	Normal	Control	<i>Eriobotryae Folium</i>
feed	147.4 $\pm$ 18.2	267.4 $\pm$ 92.2	155.4 $\pm$ 15.5
fast	56.4 $\pm$ 6.5	221.5 $\pm$ 65.4*	125.7 $\pm$ 17.6

Values are mean  $\pm$  S.E. for 20 animals.

\* : significantly different from normal mice at  $P < 0.05$  by  $t$ -test.

Table 3. Plasma insulin levels of normal, control and EF-treated diabetic mice

Plasma insulin (nU/ml)	Normal	Control	<i>Eriobotryae Folium</i>
feed	42.5 $\pm$ 6.7	72.1 $\pm$ 5.6	64.5 $\pm$ 7.7
fast	26.4 $\pm$ 3.2	63.5 $\pm$ 6.5*	52.1 $\pm$ 2.3#

Values are mean  $\pm$  S.E. for 20 animals.

\* : significantly different from normal mice at  $P < 0.05$  by  $t$ -test.

# : significantly different from control mice at  $P < 0.05$  by  $t$ -test.

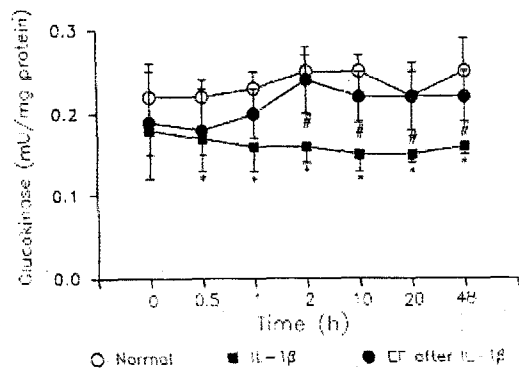


Fig. 1. Effects of IL-1 $\beta$  on the glucokinase activity in pancreatic cells.

Glycolytic enzyme activity was assayed in pancreatic tissues as described in experimental section and was calculated by least squares regression analysis. Results are means  $\pm$  S.E. for 20 animals. \* : significantly different from normal mice at  $P < 0.05$  by  $t$ -test. # : significantly different from IL-1 $\beta$  mice at  $P < 0.05$  by  $t$ -test

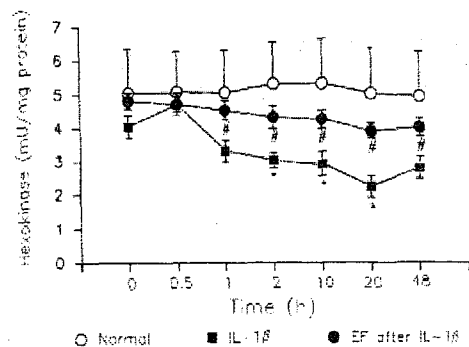


Fig. 2. Effects of IL-1 $\beta$  on the hexokinase activity in pancreatic cells.

Glycolytic enzyme activity was assayed in pancreatic tissues as described in experimental section and was calculated by least squares regression analysis. Results are means  $\pm$  S.E. for 20 animals. \* : significantly different from normal mice at  $P < 0.05$  by  $t$ -test. # : significantly different from IL-1 $\beta$  mice at  $P < 0.05$  by  $t$ -test

#### IV. 考 察

당뇨병은 동양 의학에서 消渴의 症候와 유사한데<sup>10,11</sup> 陰津虧損하여 燥熱内生하는 것을 기본 病因으로 하며<sup>10</sup> 臨床上 肺燥, 胃熱, 腎虛의 주된 原因에 따라 上消, 中消, 下消로 분류된다.<sup>10,12</sup> 上消는 “多飲水而少食, 大小便如常”, 中消는 “多飲食而小便赤黃”, 下消는 “小便濁淋如膏淋之狀” 등으로 증상을 표현<sup>40</sup> 하였으며, 각기 “清熱瀉火 生津止渴”, “清胃瀉火 養陰潤燥”, “清熱生津 滋陰補腎”의 治法을 활용하고 있다.<sup>12</sup>

枇杷葉은 味苦 性凉하고 肺·胃經에 歸經하여 清涼生津, 解渴止嘔의 효능이 있어 肺熱·胃熱로 因한 咳嗽, 口渴, 呃逆 噯氣 등의 증상을 치료하고,<sup>30,31</sup> 生地黃飮子<sup>32</sup>에 포함되어 消渴의 通治方으로 활용되어 왔다.

그러므로, 저자들은 동양의학에서 消渴의 치료에 활용되어 온 枇杷葉이 cytokine의 관여로 인하여 韃장  $\beta$ -cell이 손상을 받아 나타나는 인슐린의존형 당뇨병(IDDM)에 어떠한 작용을 하는지 살펴보기 위하여 실험동물에 IL-1 $\beta$ 를 주사한 후 혈당, 인슐린분비, glucokinase 활성 및 hexokinase 활성 등을 검토하였다.

체중에 있어서 정상군의  $13.4 \pm 1.4$  g에 비하여 IL-1 $\beta$ 로 당뇨가 유발된 대조군은 1주일 후  $19.5 \pm 5.4$  g으로 유의성 있는 증가를 보였으며, IL-1 $\beta$ 주사 후 枇杷葉을 투여한 실험군의 경우는  $16.5 \pm 3.7$  g으로 감소하는 경향을 보였다. 또한, 공복시의 혈청 중 glucose와 insulin 양

이 대조군에서는 정상군에 비하여 모두 유의성 있는 증가를 나타내었으며, 枇杷葉 투여군에서는 당뇨병으로 증가된 insulin 양을 유의있게 감소시키는 것으로 나타나 당뇨병에 효과가 있음을 시사하였다. 이러한 결과는 비만한 상태에서는 인슐린이 과다 분비된다는 것을<sup>41</sup> 다시 입증한 것이며, 당뇨병이 있는 경우 비만의 발생 빈도가 정상인에 비하여 약 2배정도 높으며, 체중이 표준보다 증가할 수록 당뇨병의 빈도가 높다는 보고<sup>42</sup>와 관련시켜 볼 때 의미하는 바가 크다고 여겨진다.

앞서 나타난 枇杷葉의 혈당과 인슐린 분비저하 작용을 보다 자세히 규명하기 위하여 IL-1 $\beta$  유발 당뇨마우스의 glucose의 초기 인산화 효소인 glucokinase와 hexokinase의 활성에 대한 영향을 살펴 보았다.

Cytokine인 IL-1 $\beta$ 는 IDDM에 동반되는  $\beta$ -cell의 기능적, 구조적 손상을 증대하는 항원 특이성 당단백으로 韃장 도세포를 침윤한 탐식 세포에서 분비된다.<sup>8</sup> IL-1 $\beta$ 는 韃장 도세포에서의 인슐린 분비와  $\beta$ -cell에 대한 세포 독성을 효과적으로 조절하여 최근에 많은 연구의 대상이 되고 있다.<sup>8,43,44</sup> 韃장 도세포를 IL-1 $\beta$ 에 짧게(1시간 정도) 노출시키면 인슐린 분비를 상승시키지만, 길게(48시간 정도) 노출시키면 인슐린 분비와 생합성을 저해하며<sup>45-47</sup> 더 오랫동안 노출시키면  $\beta$ -cell을 파괴하게 되고 사멸시키게 된다.<sup>9</sup> 결국, 탐식 세포에서 분비되는 IL-1 $\beta$ 가 과잉 발현되면  $\beta$ -cell의 기능적, 구조적 손상을 초래하여 韃장의 glucose 산화에 영향을 주어 IDDM을 유발하는데, 이는 IL-1 $\beta$ 가  $\beta$ -cell의 미토콘드리아 기능을 저해함을 알 수 있다.<sup>46,47</sup> 그런데, 韃장 세포는 여러 가지 세포 형태가 혼재된 군집이므로 IL-1 $\beta$ 가 각 세포의 대사 상태에 각기 다르게 효과를 줄 수 있음을 시사한다.

또한, glucokinase는 간과 韃장에 특이하게 존재하며 간의 glucokinase는 인슐린의 조절을 받아 포도당 이용 및 glycogen 저장 등에 관여하고 韃장 glucokinase의 경우 혈중내 포도

당의 농도를 감지하여 인슐린 분비를 조절하는 것으로 알려져 있어 NIDDM의 병인에 관련되는 중요한 효소로 인식되고 있다.<sup>48,49)</sup> 본 효소의  $K_m$ 은 약 5.7 mM로서 포도당에 대한 친화력이 다른 포도당 인산화 효소, 즉 hexokinase의  $K_m$  100 mM보다 훨씬 낮아 공복시나 식이 섭취 후와 같은 생리적인 당농도 변화에 효소 활성도 차이가 급격하게 변화한다.<sup>50-52)</sup> 췌장 glucokinase는 생명을 저해를 받지 않고 실험 동물의 식이 상태를 민감하게 반영한다는 등의 특징으로 미루어 보아 glucokinase가 glucose receptor 역할을 하고 있을 것으로 추정되고 있다.<sup>51)</sup> 또한, glucose 이외의 당류는 기질로 사용치 않는 매우 특이적인 기질 특이성을 갖고 있다. 즉,  $\alpha$ -glucose와  $\beta$ -glucose의 anomeric form에 대한 다른 친화성을 갖고 있어 NIDDM 환자의 췌장은  $\beta$ -glucose 자극에 정상적으로 반응을 하지만  $\alpha$ -glucose에 대해서는 정상인보다 효소 활성이 약한 것으로 알려져 있다.<sup>53)</sup>

Cytokine인 IL-1 $\beta$ 이 췌장에서의 glucose 대사에 어떠한 영향이 있는지를 알아보기 위하여 마우스에 IL-1 $\beta$  처리를 한 후 glucose를 복강내에 주사한 다음 48시간 동안 췌장에서의 glucokinase와 hexokinase 활성 변동을 관찰하였다. IL-1 $\beta$ 를 주사한 대조군에서는 정상군에 비하여 췌장내에서의 glucokinase 활성이 현저히 저하되는 사실이 발견되었다. 즉, IL-1 $\beta$ 를 주사한 후 glucokinase 활성은 0.18 mU/mg이었으나 시간이 경과함에 따라 점차 감소하여 1 시간후에는 0.16 mU/mg 이었고, 10 시간후에는 0.15 mU/mg로 더욱 감소하였다. 그러나, 48 시간째에는 약간의 증가 현상이 보여 혈중에 주사된 IL-1 $\beta$ 양이 점차 감소되어 가는 것으로 생각되었다. 이러한 결과는 IL-1 $\beta$ 이 당뇨병 유발에 직접 관여하고 있음을 강하게 시사하는 것으로 분자생물학적인 해명이 필요하다고 여겨진다.

한편, IL-1 $\beta$ 를 주사한 후 당뇨병 유발이 확인된 상기 마우스에 대한 枇杷葉 엑기스가 미

치는 효과를 알아보기 위하여 재차 枇杷葉 추출물을 투여하였다. 그 결과, 실험군에서는 glucokinase의 활성이 거의 정상에 가깝게 증가되는 것을 알 수 있었다. 詳述하면, IL-1 $\beta$ 주사 후 枇杷葉 엑기스를 투여한 경우의 glucokinase 활성은 주사직후 0.18 mU/mg이었으나 시간이 경과함에 따라 점차 증가하여 1 시간후에는 0.20 mU/mg, 10 시간후에는 0.24 mU/mg로 더욱 증가하였다. 그러나, 48 시간째에서도 0.24 mU/mg으로 효소활성이 안정되어 있었다. 이러한 결과는 枇杷葉 엑기스가 glucokinase 불활성에 의한 당뇨병에 대한 개선효과가 있음을 시사하였다.

또한, IL-1 $\beta$ 처리로 hexokinase 활성에는 어떠한 변화가 있는지를 살펴보았다. 그 결과, hexokinase 활성 또한 IL-1 $\beta$ 를 주사한 대조군에서는 현저하게 정상군에 비하여 효소 활성이 감소되었다. 즉, IL-1 $\beta$ 를 주사한 후 hexokinase 활성은 주사 직후에는 4.02 mU/mg이었으나 시간이 경과함에 따라 점차 감소하여 10 시간후에는 3.0 mU/mg로 더욱 감소하였고 48 시간에서도 3.0 mU/mg으로 변동이 없었는데 이는 glucokinase 경우와는 반대되는 결과였다.

그러나, IL-1 $\beta$  처리 후 枇杷葉을 투여한 경우 효소 활성이 주사직후 5.0 mU/mg이었으나 시간이 경과함에 따라 점차 증가하여 1 시간후에는 5.20 mU/mg, 10 시간후에는 5.4 mU/mg로 더욱 증가하였다. 그러나, 48 시간째에서도 5.3 mU/mg으로 효소활성이 안정되었는데 이는 glucokinase의 경우와 유사하였으며, 枇杷葉 엑기스는 실험적으로 유발된 당뇨병 마우스의 췌장 hexokinase 불활성에 큰 개선 효과가 있음을 시사하였다.

이상의 결과를 종합하면, 枇杷葉은 IL-1 $\beta$ 로 유발된 당뇨병 마우스에서 glucose 인산화 효소인 glucokinase와 hexokinase의 활성을 증가시키는 효과가 있는 것으로 나타나 枇杷葉이 IDDM에도 효과가 있을 것으로 여겨진다. 또한, 실험 도중 IL-1 $\beta$ 가 glucokinase 활성을 감

소시켜 당 대사과정 중 초기 인산화 반응에 작용하고 있다는 새로운 사실을 발견하였는데, IL-1 $\beta$ 의 glucokinase에 대한 작용 기전을 분자 수준에서 해명해야 할 것으로 사료된다.

으로 나타나 IDDM의 치료에 효과가 있는 것으로 여겨진다.

## V. 結 論

枇杷葉이 cytokine의 관여로 나타나는 인슐린의존형 당뇨병(IDDM)에 대한 영향을 알아보기 위하여 마우스를 IL-1 $\beta$ 로 처리하여 실험적으로 IDDM을 유발한 후 glucose의 초기 인산화에 관여하는 glucokinase와 hexokinase의 활성을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. IL-1 $\beta$ 주사에 의해 체중과 공복시의 glucose 및 insulin 분비가 증가되었으나,枇杷葉 투여에 의해 공복시의 insulin 분비가 유의성 있게 감소하였으며 체중과 공복시의 glucose는 유의성은 없었으나 대조군에 비하여 감소하였다.

2. IL-1 $\beta$ 주사에 의해 혈청 중 glucose치가 정상군에 비하여 현저하게 증가되었으나枇杷葉 투여에 의해 현저히 감소되었다. Insulin 치의 상승과 분비 지연도枇杷葉 투여군에서는 정상군과 유사한 경향을 보였다.

3. Glucokinase와 hexokinase의 활성은 IL-1 $\beta$ 주사에 의해 현저히 감소되었으나,枇杷葉 투여에 의해 유의성 있게 상승되었다.

4. IL-1 $\beta$ 는 glucokinase와 hexokinase의 활성을 저해하였으며,枇杷葉 투여군은 IL-1 $\beta$  주사로 저하된 glucokinase의 활성을 거의 정상 수준으로 회복시켰으며 hexokinase의 활성도 유의성 있게 증가시켰다.

이상의 결과로,枇杷葉은 IL-1 $\beta$ 로 유발된 IDDM에서 glucose 인산화 효소인 glucokinase와 hexokinase의 활성을 증가시키는 것

## 參考文獻

- 1) 杜鎬京 : 東醫腎系學(下), 東洋醫學研究院, pp.1142,1158, 1993.
- 2) 민현기 : 한국인 당뇨병의 임상적 특징, 당뇨병, 16(3):163-174, 1992.
- 3) 安弼濬 : 保健社會白書, 보건사회부, pp. 87-88, 1992.
- 4) Sharma, C., Manjeshwar, R., Weinhouse, S. : Effects of diet and insulin on glucoseadenosine triphosphate phosphotransferases of rat liver, J. Biol. Chem., 238:3841-3845, 1963.
- 5) Walker, D., Rao. S. : The role of glucokinase in the phosphorylation of glucose by rat liver, Biochem. J., 190:360, 1964.
- 6) Bedoya, F. J., Wilson, J. M., Ghosh, A. K., Finegold, D., Matschinsky, F. M. : The glucokinase glucose sensor in Human pancreatic islet tissue, Diabetes, 35:61-67, 1986.
- 7) Lenzen, S., Penten, U. : Glucokinase in pancreatic  $\beta$ -cell and its inhibition by alloxan, Acta. Endocrinol., 115:21-29, 1987.
- 8) Mandrup-Poulsen T., Bendtzen K., Nielsen, J. H., Bendixen, G., Nerup, J. : Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans, Allergy, 40:424-429, 1985.
- 9) Sandler, S., Anderson, A., Hellerström, C. : Inhibitory effects of interleukin-1 on insulin secretion, insulin biosynthesis and oxidase metabolism of isolated rat pancreatic islets, Endocrinology, 121: 1424-1431, 1987.
- 10) 方藥中 : 實用中醫內科學, 上海科學技術出版社, pp. 477, 1986.
- 11) 柴瑞霽 : 基層中醫學習園地, 消渴, 山西中醫, (1):56, 1993.
- 12) 余永譜 : 中醫治療內分泌代謝病, 浙江科學技術出版社, pp.239,243, 1992.
- 13) 杜鎬京 : 東醫腎系學研究, 東醫腎系研究會, p.430, 1994.
- 14) 姜庭鎬 : 活血潤燥生津飲이 Alloxan投與 白鼠에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院 學位 論文集 第 5集, pp. 255-277, 1982.
- 15) 郭桂豪 : 六味地黃湯加山藥이 Alloxan 糖尿 白鼠의 血糖 및 血清 變化에 미치는 影響, 大田大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1992.
- 16) 權寧哲 : 蠶이 Alloxan投與 家兎의 血糖量에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士 學位 論文, 1986.
- 17) 金勁宅 : 六味地黃湯이 Alloxan投與 흰쥐의 糖尿病 및 腎障礙에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士 學位 論文, 1988.
- 18) 金完熙 : 消渴에 應用되는 白虎湯이 Alloxan 糖尿에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士 學位 論文, 1978.
- 19) 金雄時 : 水蓼, 白蓼 및 紅蓼水鍼이 Alloxan 糖尿病 흰쥐에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1989.
- 20) 金熙哲 : 枇杷葉이 糖尿 흰쥐의 脾臟 內分泌 細胞에 미치는 影響에 關한 研究, 東國大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1992.
- 21) 盧宗植 : 鹿茸, 人蔘, 鴨跖草 水鍼의 糖尿病에 對한 效果 및 免疫機能에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士 學位 論文, 1988.
- 22) 朴振成 : 人蔘茯苓散이 Alloxan 投與 白鼠의 Juxtglomerular cell에 미치는 影響, 東國大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1991.
- 23) 孫洛源 : Alloxan糖尿에 白虎湯이 미치는 影響에 對한 免疫組織化學의 研究, 慶熙大學校 大學院 博士 學位 論文, 1990.
- 24) 申載鏞 : 生脈散 薔薇根의 Alloxan投與 白鼠의 血糖量에 미치는 影響, 醫林, 158:12,



- 1983.
- 25) 吳政錫 : 玉泉散이 Alloxan投與 白鼠 血清의 代謝 基質에 미치는 影響, 東國大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1990.
- 26) 李惠貞 : Alloxan 糖尿病 家兔에 대한 人蔘 水鉾의 效果 및 Horseradish peroxidase의 軸突逆輸性에 關한 研究, 慶熙大學校 大學院 博士 學位 論文, 1986.
- 27) 田成珠 : 枸杞子 抽出物이 家兔의 實驗的 肝臟障 礙 및 Alloxan 負荷 糖尿病에 미치는 影響, 朝鮮大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1985.
- 28) 黃敬淑 : 五味子 抽出物이 Alloxan負荷家兔의 血清成分에 미치는 影響, 朝鮮大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1986.
- 29) 黃承贊 : 纈芎의 Alloxan糖尿에 白虎湯 및 人蔘白虎湯이 미치는 影響에 關한 研究, 大邱 韓醫科大學 大學院 博士 學位 論文, 1991.
- 30) 李尙仁 : 本草學, 修書院, pp. 340-341, 1981.
- 31) 高學敏 : 中草學, 中國醫學技術出版社, pp. 275-276, 1989.
- 32) 許 凌 : 東醫寶鑑, 南山堂, p. 508, 1989.
- 33) 韓 明 : 糖尿病治療與康復指南, 中國中醫藥出版社, p.61,72, 1993.
- 34) 鄭昌煥, 尹哲浩, 鄭智天, 金鐵虎 : Alloxan處理 糖尿病 마우스의 胰臟 glucokinase 및 hexokinase에 對한 枇杷葉의 效果에 關한 研究, 東國韓醫學研究所論文集, 6(1): 151-161, 1997.
- 35) Walker, D. G., Parry, M. J. : Glucokinase in liver, Methods in enzymology, Bergmayer ed., pp. 380-389, 1986.
- 36) Stanley, J. C., Dohm, G. L., McManus, B. S., Newsholm, E. A. : Biochem. J. 224:667-671, 1984.
- 37) Waddell, I.D., Burchell, A. : Biochemical J. 255: 471-476, 1988.
- 38) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
- 39) Zar, J. H. : Biostatistical Analysis, N. J. Prentice Hall, Inc., p.96, 1984.
- 40) 虞 搏 : 醫學正傳, 成輔社, p. 277, 1986.
- 41) Karam, J. H., Grodsky, G. M., Forsham, P. H. : Excessive insulin response to glucose in obese subjects as measured by immunochemical assay, Diabetes, 12: 197, 1963.
- 42) 이광우, 손호형, 강성구, 방병기, 박두호, 민병석, 송혜향 : 한국인 18,201명에서 당뇨병과 관련질환에 관한 역학적 연구, 당뇨병, 8(1): 5-14, 1984.
- 43) Mandrup-Poulsen T., Bendtzen K., Nerup, J., Dinarello C. A., Svenson, M., Nielsen, J. H. : Affinity-purified human interleukin 1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans, Diabetologia, 29: 63-67, 1986.
- 44) Rabinoviich, A., Pukel, C., Baquerizo, H. : Interleukin 1 inhibits glucose-mediated insulin and glucagon secretion in rat islet monolayer cultures, Endocrinology, 122: 2393-2398, 1988.
- 45) Bendtzen, K. Mandrup-Poulsen, T., Dinarello, C. A., Nerup, J., Nielsen, J. H., Svenson, M. : Cytotoxicity of human P17 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans, Science., 232: 1545-1547, 1986.
- 46) Spinas, G. A., Hansen, B. S., Linde, S., Kastern, W., Molvig, J., Mandrup-Poulsen, T., Dinarello, C. A. Nielsen, J. H., Nerup, J. : Interleukin 1 dose-dependently affects the biosynthesis of (pro) insulin in isolated rat islets of Langerhans, Diabetologia, 30:474-480,

1987.

- 47) Zawalich, W. S., Diaz, V. A. : Interleukin 1 inhibits insulin secretion from isolated perfused rat islets, *Diabetes*, 35:1119-1123, 1986.
- 48) Matschinsky, F. M. : Glucokinase gene structure : Functional implications of molecular genetic studies. *Diabetes*, 39:523-527, 1990.
- 49) Permutt, M. A., Chiu, K. C., Tanizawa, Y. : Perspective in diabetes Glucokinase and NIDDM : A candidate gene that paid off. *Diabetes*, 41:1367-1372, 1992.
- 50) Meglasson, M. D., Marchisky, F. M. : New perspectives on pancreatic islet glucokinase, *Am. J. Physiol.*, 246 (Endocrinol Metab. 9): E1-E13, 1984.
- 51) Meglasson, M. D., Marchisky, F. M. : Purification of the putative islet cell glucose sensor GK from isolated pancreatic islets and insulinoma tissue, *J. Biol. Chem.*, 259: 343-346, 1984.
- 52) Niki, A., Niki, H., Kunoh, Y. : Insulin release by glucose anomers in a rat model of non-insulin-dependent diabetes, *Diabetologia*, 31: 65-67, 1988.
- 53) Lenzen, S., Freytag, S., Penten, U. : Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in the sugar-binding site of the enzyme, *Molecular. Pharmacol.*, 34:395-400, 1988.

ABSTRACT

**Effect of *Eriobotryae folium* extract on glucokinase and hexokinase activities of diabetes mellitus mice induced by interleukin-1 $\beta$**

Yoon Cheol-Ho, Shin Hyeon-Chul, Jeong Ji-Cheon  
Department of Internal Medicine, College of Orient Medicine,  
Dongguk University

We investigated the *in vivo* effect of an aqueous extract (referred to as EF) from *Eriobotryae folium* on glucokinase and hexokinase activities of diabetes mellitus induced by interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). After 1 week of IL-1 $\beta$  injection, the levels of serum glucose concentration and insulin secretion were dramatically increased. However, the insulin secretion was decreased with administration of EF. The level of glucose concentration was decreased by EF administration. Furthermore, it was observed that EF was effective in recovering the levels of insulin secretion. Enzyme activities of the glucokinase and hexokinase, which are key enzymes of glucose phosphorylation, were decreased by IL-1 $\beta$ . EF administration to the mice allowed proportional increasing by stimulation of induction of enzyme activities as high as normal group. These results suggested that EF is highly effective in treatment of diabetes mellitus induced by IL-1 $\beta$ .

Key Words : *Eriobotryae folium*, diabetes mellitus, interleukin-1 $\beta$ , glucokinase, hexokinase