

산 · 학 · 연 논문

해바라기를 주원료로 한 복합조성물(해바톤, HYEBATON)의 면역활성 증진효과와 당뇨 및 지질대사에 미치는 영향

조성기 · 정차권* · 변명우†

한국원자력연구소 방사선식품 · 생명공학 연구팀,

*한림대학교 생명과학부

Effects of HYEBATON, an Extract from Herb Mixture Containing Sunflower, on Immune Activity and Metabolism of Glucose and Lipid

Sung-Kee Jo, Cha-Kwon Chung* and Myung-Woo Byun†

Radiation Food Technology and Bioscience team, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejeon 305-353, Korea

*Division of Life Science, Hanllm University, Chuncheon 200-702, Korea

서론

최근 천연 생리활성물질 등을 활용하는 기능성 식품 및 대체의학의 개념 정립으로 생리활성물질을 이용한 치료제 또는 기능성식품의 수용 급증에 따라 생약재와 같은 천연물의 식품 · 생물 산업적 활용이 증가되고 있다. 이에 우리나라 식품공전에서 식품 원재료가 아니지만 식품에 사용 가능성이 있는 천연 동 · 식물 소재들을 “주원료”, “부원료”, “제한적 원료”로 사용 가능한 것, “사용 불가 원료” 등으로 분류 등재함으로써 식품 산업계에서의 그 이용을 뒷받침해 주고 있다. 특히, 항암, 면역조절, 생체기능조절 등을 위한 생리활성물질 개발연구가 급증하고 있다.

면역조절물질은 비특이적으로 면역 세포들을 자극하여 생체의 면역기능을 증진시킴으로써, 질병요인으로부터 생체의 방어력을 증강시키는 것이다(1). 이러한 면역조절 물질로 화학 합성물질, 미생물 조성물, 생물체제 등이 연구되었다. 그러나 상기의 면역조절 물질의 대부분은 부작용 또는 독성으로 인하여 실제 생체에 적용하기에는 한계가 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 최근에는 독성이 없는 식품소재 또는 천연물로부터 추출한 유효성분이나 기존의 한방제의 효능검증을 통해 면역조절물질 개발의 연구가 수행되고 있다(2-6).

한편, 당뇨, 고혈압 등 뚜렷한 치료방법이 없는 만성질환의 증가에 따라 그 예방 및 치료를 위한 생체기능조절 물질의 연구도 활발히 진행되고 있다. 실제로 이러한 물질은 노인성 또는 퇴행성 질환에 효과가 높은 것으로 입증되고 있다(7,8).

본 연구에서는 면역기능 증진 및 당뇨 개선과 지질대사 조절 효과를 갖는 복합물질 개발의 일환으로 천연물 또는 종래의 한방약재 중에서 식품원료로 사용 가능한 생약류의 복합 조성물을 개발하였다. 즉, 해바라기의 잎 및 씨를 주 성분으로 하고 몇 가지 생약재를 복합하여 추출물을 제조하였다. 해바라기(*Helianthus annuus*)는 국화과에 속하며, 혈전억제, 류마티스, 위통진경, 항암, 면역조절 및 지질대사 개선에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(9-12). 본 실험에서는 해바라기(잎 및 씨)를 주 원료로 제조한 시제품인 ‘해바톤(HYEBAAYON, (주)새벽을여는사람들)’의 면역증진효과와 혈당 및 지질대사 조절효과를 실험동물시험으로 검토하였다.

재료 및 방법

시료조제

해바라기를 주원료로 한 복합조성물인 ‘해바톤(HYE-BATON)’은 “(주)새벽을여는사람들”로부터 제공받아 시험에 사용하였다. 그의 제조과정을 요약하면, 해바라기(잎 90% 및 씨 10%)를 주성분으로 하고 몇가지 생약재를 건조 중량을 기준으로 혼합한 다음, 총 무게에 대하여 10 배의 증류수를 가하여 92℃ 이상에서 8~10 시간동안 열탕 추출하였다. 상기 추출물을 여과한 후, 여액을 감압농축하여 적정농도로 제조하였다. 상기와 같이 제조된 복합조성물을 증류수로 적정농도로 희석하여, 무균 상태로 적용하기 위하여 무균 여과지(0.45 μm, Millipore membrane)로 여과

†Corresponding author. E-mail: mwbyun@kaeri.re.kr
Phone: 042-868-8060. Fax: 042-868-8043

하여 실험에 사용하였다.

실험동물

실험에 사용한 생쥐(C57BL/6, DBA/2 and NIH/GP mouse)와 흰쥐(Sprague-Dawley rat)는 대한실험동물센터에서 구입하였으며, 온도가 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도가 55~60%로 유지되며 명암이 12 시간씩 조절되는 표준사육 환경에서 생육하고, 고형사료와 물을 제한없이 공급하였다.

세포배양액

실험에 사용한 세포 배양액은 RPMI1640(Rosewell Park Memorial Institute; GIBCO)에 2 mg/mL sodium bicarbonate(GIBCO), 2×10^{-2} M HEPES buffer(GIBCO), 5×10^{-3} N HCl(GIBCO), 10% 우태아혈청(Fetal bovine serum, FBS; GIBCO), 100 U/mL penicillin (GIBCO), 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin(GIBCO), 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Sigma)를 첨가하여 완전배지로 사용하였다.

면역세포(비장 림프구) 분리

생쥐의 비장 림프구를 얻기 위하여, 생쥐(C57BL/6 mouse)를 경추 탈구법으로 희생시킨 뒤, 복부를 절개하여 비장을 무균적으로 적출하고 멸균된 핀셋과 수술용 칼로 지분거러 생리식염수(HBSS)에 세포를 부유시켰다. 상기 비장세포 부유액을 2 분간 방치하여 부유되지 않은 세포 덩어리를 제거한 후, 암모늄 완충용액(Tris-NH₄Cl용액)을 가하여 적혈구를 제거하고 HBSS로 2 회 세척하여 비장 림프구를 얻었다. 상기에서 얻은 비장 림프구를 trypan blue 염색법으로 세포 수를 측정 후, 배양액으로 적정 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

면역세포 활성화 효과 측정(Lymphocyte proliferation test)

HYEBATON의 면역세포 활성화 효과를 측정하기 위하여, HYEBATON(0.125 mg/mL)과 비교 물질로서 사물당, 사군자당, 보중익기당, 삼령백출산, 십전대보탕 및 양성대조 물질로서 PHA 및 LPS를 면역세포 배양 시험관에 첨가하고 배양하여 면역세포 증식 정도를 H³-thymidine uptake 법으로 측정하였다. 즉, 면역세포가 활성화되면 세포대사 증폭, 세포 분열로 이어지게 되므로 DNA를 복제하게 되는데, 이때 배양액에 DNA의 전구물질의 하나인 thymidine에 동위원소(³H)가 표지된 것을 첨가하여 세포가 흡수한 ³H의 양을 측정함으로써 면역세포의 활성화 정도를 산정하는 방법을 이용하였다.

면역세포로는 실험용 생쥐의 비장 림프구를 사용하였다. 먼저 비장 림프구를 96-well microplate에 2×10^5 cells/well의 농도로 분주하고, 각 시료를 첨가한 다음 세포

배양기(CO₂-incubater)에서 3 일동안 배양하였다. 배양 후, 1.5 $\mu\text{Ci/well}$ 의 ³H-thymidine을 첨가한 다음 4 시간 추가로 배양하였고, 세포수집기(cell harvester)로 세포를 glass fiber filter strip 상에 수거하였다. 이 filter strip을 건조시킨 후 세포가 흡착된 부분을 떼어 vial에 옮긴 후 scintillation cocktail을 2.5 mL씩 첨가하여, β -scintillation counter로 세포가 흡수한 ³H-thymidine의 양을 분당 카운트 수(cpm)로 측정하였다.

세포 매개성 면역반응(cell-mediated cytotoxicity) 측정 : Cr⁵¹ 유리법

HYEBATON이 항암 면역반응에 미치는 효과를 알아보기 위하여, 생쥐에 시료를 투여한 후 비장 림프구의 세포 매개성 면역반응(cell-mediated cytotoxicity) 즉, 암세포 살해능을 측정하였다.

생쥐에 4 일간 125 mg/kg B.W의 시료를 주사한 다음, 생쥐의 비장으로부터 분리한 림프구를 작동세포(effector cells)로 하여, 시험관 내에서 암세포를 표적세포(target cell)로 하여 암세포 살해능(cytotoxicity)을 크롬유리법(⁵¹Cr-release assay)으로 측정하였다.

즉, 세포 매개성 암세포 살해능(cytotoxicity) 측정을 위하여, 방사성 동위원소 크롬(⁵¹Cr)을 표지시킨 암세포와 림프구를 혼합하여 반응시킨 다음, 암세포 살해 결과로 그 상층액에 유리된 ⁵¹Cr의 양을 측정하여 암세포 살해능(cytotoxicity)을 산출하였다.

표적세포(target cells)로 사용된 림프종 세포는 세포 배양용 플라스크에서 배양하였다. 상기 림프종 세포는 YAC-1 세포주로서, A/Sn 계통 생쥐에서 Moloney leukemia virus에 의해 유발된 T 세포 림프종으로부터 유래된 세포주이다.

표적세포인 림프종 세포(YAC-1세포)를 현탁액에 Na₂⁵¹CrO₄(NEN, U.S.A) 200 $\mu\text{Ci}/10^7$ cells/mL의 농도로 첨가하여 37°C에서 45 분간 표지하여 사용하였다. ⁵¹Cr이 표지된 표적세포(1×10^5 cells/mL) 100 μL 와 필요한 농도로 조정된 작동 세포 100 μL 를 96-well plate(round bottom)의 각 well에 혼합한 후 배양기에서 4 시간동안 배양하였다. 그 후 plate를 500 \times g에서 10 분간 원심한 후 상층액 100 μL 씩을 취하여, 표적세포(암세포)의 살해에 따라 상층액에 유리되어 나온 ⁵¹Cr의 양을 γ -counter에서 분당 방사능 카운트 수(cpm; count per minute)로 측정하였다.

각 실험은 3 배수로 실시하였으며 작동세포의 암세포 살해능(% cytotoxicity)을 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{cpmER} - \text{cpmSR}}{\text{cpmMR} - \text{cpmSR}} \times 100$$

여기에서, ER(Experimental Release)은 시험군의 크롬 유리정도이며, SR(Spontaneous Release)은 음성대조군에서 자연적으로 유리되는 정도이고, MR(Maximal Release)은 최대 유리량이다. 즉, SR은 작동세포가 들어 있지 않고 표적세포만 들어 있는 대조군의 상층액 100 μ L의 방사선량이고, MR은 표적세포에 Triton X-100 1% 수용액 100 μ L를 가하여 얻었으며 표지된 방사능의 95% 이상이 되도록 하였다. SR은 MR의 10% 이내가 되게 하였다.

암세포 성장억제 효과 측정

HYEBATON의 생체내 항암 효과를 평가하기 위하여, 암세포가 이식된 생쥐에 시료를 투여한 다음 암세포의 성장 정도 및 생쥐의 생존기간을 측정하였다. 생후 10 주령의 생쥐(DBA/2)의 대퇴부에 림프구성 백혈병 세포(L1210: lymphocyte leukemia, ATCC #CCL-219)를 10^6 개씩 이식하였다. 암세포를 이식한 다음 날부터 10 일동안 하루에 한번씩 125 mg/kg B.W의 시료를 복강으로 주사하였다. 시일 경과에 따라 종양의 크기를 관찰하였으며, 생존 생쥐의 수를 측정하였다.

지질대사 및 경구포도당 내성 실험을 위한 실험군별 디자인

실험동물은 체중 100g 정도 되는 Sprague-Dawley계의 수컷흰쥐를 대한실험 동물센터로부터 분양 받아 일주일간 적응 사육시킨 후 체중에 따른 난피법에 의하여 각 군 당 6마리씩 24개 군으로 나누어 7주간 동안 사육하였다. 실험군은 정상식이군(CON), HYEBATON 투여군(HBT), streptozotocin 투여군(STZ), STZ 및 HYEBATON 투여군(STZ+HBT), 고지방 및 ethanol투여군(F+E) 그리고 고지방+ethanol+HBT 투여군(F+E+HBT)으로 구분하였다. 동물 사육은 표준조건하에서 실시하였으며, 물은 자유로이 먹을 수 있도록 하였으며 사료는 매일 일정한 시간에 일정량을 주고, 체중은 일주일에 2번씩 측정하였다.

실험동물의 diet는 식이재료들을 혼합한 형태인 powdered mixed diet를 사용하였으며 대조군의 식이구성은 casein 20%, AIN-76 mineral mix 3.5%, AIN-76 vitamin mix 1%, DL-methionine 0.18%, α -cellulose 2.0%, corn starch 15%, corn oil 4%, sucrose 51.07%, sodium cholate 0.25% 였다. 실험동물의 칼로리 공급은 쥐가 마음대로 섭취할 수 있게 하고 섭취하는 칼로리에 제한을 두지 않았다. HYEBATON은 물병을 통하여 일정량을 매일 신선하게 공급하였다.

당뇨 유도 물질의 투여

당뇨유발 물질인 Streptozotocin(STZ)은 45mg/kg Body weight 농도로 2회 tail vein으로 투여, 당뇨를 유발시키고

공복시 혈당을 조사하였다. STZ를 투여한 군과 STZ를 투여하지 않은 대조군(CON)의 공복시 혈당을 분석하였고 혈당은 해부직후 바로 심장혈액을 채취하여 혈당을 분석하였다.

시료의 수집 및 처리

사육이 끝난 실험동물을 12시간 동안 절식시키고 에테르로 마취시킨 후 경추탈골법에 의하여 도살하고, 심장으로부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 3000rpm(4°C)에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 기타 장기 특히 간, 신장은 혈액채취 후 즉시 적출하여 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다. 간 시료는 분석 전까지 -70°C 냉동고에 보관하였다.

경구 포도당 내성 검사(Oral Glucose Tolerance Test)

실험동물을 12시간 절식시킨 후 공복상태에서 경구 포도당 내성검사를 수행하였다. 실험동물에 포도당을 3g/kg-body weight의 농도로 경구 투여하였다. 포도당 투여 후 각각 0, 15, 30, 60, 120분 후에 실험동물의 꼬리정맥으로부터 혈액을 채취하여, 혈당측정 kit(아산제약, Korea)를 이용하여 혈중 포도당 농도를 측정하였다.

간과 혈청의 지질 분석

간의 총지질은 Folch법(13)으로 추출하고 적출된 간조직은 무게측정 후 chloroform-methanol(2:1, v/v) 용매를 가하여 homogenizer로 균질화한 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 취하여 감압 건조시킨 후 무게를 측정하여 총지질 함량을 구하였다. 그후 총지질을 chloroform 3mL에 용해한 다음 total cholesterol, HDL-cholesterol은 효소비색법을 이용한 kit(아산제약, Korea)를 사용하여, 분광광도계 (spectrophotometer-1601)로 500nm에서 측정하고 triglyceride는 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈청내 지질인 total cholesterol, HDL-cholesterol(High Density Lipoprotein-cholesterol)의 분석은 kit(아산제약, Korea)를 사용하여 분광광도법으로 37°C, 500 nm에서 5분간 측정하였고 triglyceride는 550nm에서 측정하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SAS (statistical analysis system) program을 이용하여 실험군당 평균(Mean)±표준편차(SD)로 표시하고 각 군의 평균치의 통계적 유의성을 $p<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

시험관내에서 유전 독성학적 안전성 검증시험

HYEBATON에 대한 유전 독성학적 안전성을 평가하기 위하여, *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀 돌연변이 시험을 수행하였다(14). 실험에 사용된 균주는 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100을 사용하였으며 유전형질을 확인한 후 실험에 적용하였다. 실험은 대사를 활성화시키지 않는 직접법 및 대사를 활성화시키는 간접법을 이용하여 수행하였다.

직접법의 경우 시험관에 인산완충용액 0.5 mL, 시료 0.1 mL 및 12 시간 배양된 균 배양액 0.1 mL을 가볍게 혼합하고, 상기의 혼합액에 histidine/biotin이 첨가된 0.6%의 저농도 한천 수용액(Top agar, 45°C)을 2 mL 추가로 첨가하고 3 초간 혼합 후, 최소 포도당 한천배지 상에 부어 평판화시켰다. 37°C에서 48 시간 배양하여 복귀 돌연변이 집락수를 계수하였다. 간접법의 경우에는 시험관에 간효소 혼합물(S9 mix) 0.5 mL, 시료 0.1 mL 및 균 배양액 0.1 mL을 가볍게 혼합하여 37°C에서 30 분간 예비 배양한 후, top agar를 가하는 단계부터는 상기와 같은 방법으로 시행하였다. 또한, 실험조건의 적합성 여부를 판정하기 위하여, 양성대조물질로서 직접법의 경우 4-nitro-*o*-phenylenediamine (NPD) 또는 sodium azide(Na-Azide)를, 간접법의 경우 2-aminofluorene(2-AF)를 실험 균주의 특성에 따라 사용하였다. 돌연변이 유발성의 판정은 원저의 제시에 따라 복귀돌연변이 집락수가 용매대조군의 2배 이상이면서 용량의존성을 갖는 경우를 양성으로 판정하였다.

급성 독성실험

HYEBATON의 생체내 급성 독성 유무를 알아보기 위하여 생쥐를 대상으로 실험하였다. 실험군 당 생쥐(NIH/GP mouse) 6 마리씩 사용하여, 본 복합조성물을 최대 2,000 mg/kg의 용량으로 각 용량 단계별로 경구투여 또는 복강내 주사하였다. 경구투여군은 2 주간 관찰하였으며, 복강내 투여군은 1 주간 관찰하였다. 시험물질 투여후 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 복강장기와 흉강장기의 이상 여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

면역세포 활성화 효과(Lymphocyte proliferation)

면역세포 배양액에 시료를 첨가하여 3일 동안 배양한 후, 면역세포의 활성화를 ^3H -thymidine uptake 정도(cpm)로 측정된 결과를 Fig 1에 나타내었다. HYEBA-TON은 시료를 첨가하지 않고 실시한 대조군 뿐만아니라 종래의 보기 및 보혈 한방제인 사물탕(Si-Wu-Tang), 사군자탕(Si-Jun-Zi-Tang), 보중익기탕(Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang),

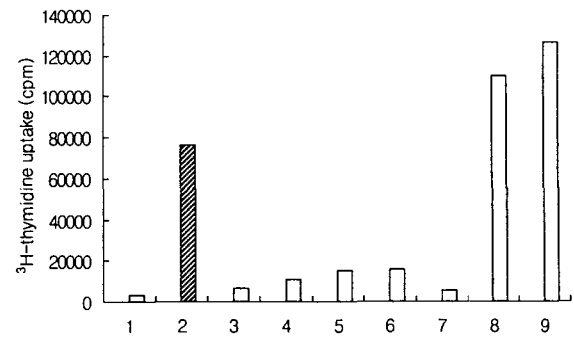


Fig. 1. Lymphocyte proliferation by HYEBA-TON *in vitro*. Spleen cells were cultured with HYEBA-TON (0.125 mg/mL) on 96-well flat-bottomed plates. On day 3, the proliferation of lymphocytes was determined by the incorporation of ^3H -thymidine after 4 hours pulsing with $1.5 \mu\text{Ci } ^3\text{H-TdR}$. 1, medium control; 2, HYEBA-TON; 3, Si-Wu-Tang; 4, Si-Jun-Zi-Tang; 5, Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang; 6, San-Ling-Bai-Shu-San; 7, Shi-Quan-Dai-Bu-Tang; 8, PHA as positive control; 9, LPS as positive control.

삼령백출산(San-Ling-Bai-Shu-San) 및 십전대보탕(Shi-Quan-Dai-Bu-Tang) 보다 월등히 높은 면역세포 활성화 효과를 보였다. 또한, 양성대조군으로 측정된 phytohemagglutinin(PHA) 및 lipopolysaccharide(LPS)은 HYEBA-TON 보다 높은 면역세포 활성화 효과를 보였으나, 상기 PHA 및 LPS는 생체 내에 적용하면 독성이 심하여 실용화되지 못하고 있다. 반면에, HYEBA-TON은 높은 면역세포 활성화 효과를 보일 뿐만 아니라 식용가능한 식물소재로 구성됨으로써 독성의 문제가 없고 생체 내에 직접 적용할 수 있다.

생체내의 세포 매개성 면역반응(cell-mediated cytotoxicity) 증진효과

HYEBATON이 항암 면역반응에 미치는 효과를 알아보기 위하여, 생쥐에 시료를 투여한 후 비장 림프구의 세포 매개성 면역반응(cell-mediated cytotoxicity) 즉, YAC-1 암세포에 대한 살해능을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이, 생리식염수를 투여하여 시험한 음성대조군 생쥐의 면역세포는 14%의 암세포 살해능(% cytotoxicity)을 보인 반면에, HYEBA-TON을 투여한 생쥐의 면역세포는 24%의 암세포 살해능을 나타냄으로써, HYEBA-TON 투여에 의해 세포 매개성 면역반응의 정도가 증가됨을 확인할 수 있었다. 이 결과로 보아, 음성대조군에서도 미약하나마 암세포에 대한 면역반응을 나타내고 있음을 알 수 있으며, HYEBA-TON은 이 세포 매개성 면역반응을 증가시킴으로써 항암 효과에 유용하게 이용될 수 있는 것으로 생각된다.

생쥐에 이식된 암세포의 성장 억제효과

HYEBATON으로 면역세포를 활성화시킴으로써 암세포

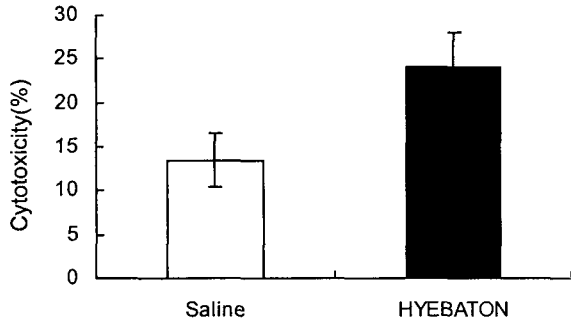


Fig. 2. Effect of HYEBATON on cell-mediated immune response in mice.

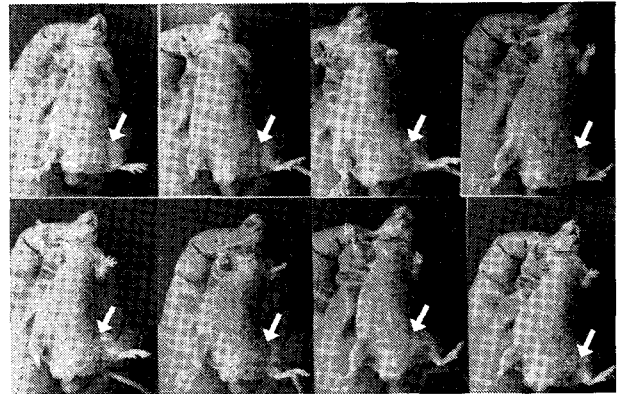
Spleen cells from C57BL/6 mice administrated with HYEBA-TON(125 mg/kg) were coincubated with ⁵¹Cr-labeled YAC-1 cancer cells. After 4 hours of incubation, the cytotoxicity was determined by measuring the radioactivity of ⁵¹Cr released in the culture supernatant. Triplicate wells were performed in each culture. Data was mean ±SD of 4 mice.

생장을 억제할 수 있는지 알아 보기 위하여, 생쥐(DBA/2)에 백혈병 세포(L1210: lymphocyte leukemia)를 이식한 후 10일 동안 시료를 투여한 다음, 종양의 크기 및 생쥐의 생존기간을 관찰하였다. 암세포 이식 후 12일째에 종양의 크기를 관찰한 결과 Fig. 3에 나타낸 바와 같이, 생리식염수를 투여한 대조군에 비하여 HYEBATON을 투여한 경우 종양의 크기가 현저하게 작은 것을 볼 수 있었다. 그 후 시일 경과에 따른 생쥐의 생존율을 관찰한 결과 Fig. 4에 나타낸 바와 같이, 대조군의 경우 암세포 이식 후 15일까지 100%의 생존율을 보이다가 15일 경과 직후부터 생존율이 떨어져서 19일째에 생존율 0%를 보였다. 반면에, HYE-BATON을 투여한 경우 16 일째까지 100%의 생존율을 보였고 최대 22 일까지 생존함으로써 대조군에 비하여 13%의 생존일수 증가를 보였다. 이 결과로 보아 HYEBATON은 면역세포를 활성화시킴으로써 암세포 성장을 억제하는 것으로 사료된다.

HYEBATON(HBT)의 투여가 혈청 총콜레스테롤, 중성지질, HDL에 미치는 영향

혈청 총 콜레스테롤은 HBT의 투여에 의해 대조군보다 30%(p<0.05) 감소하였다(Table 1). 반면, 당뇨 유발을 위해 streptozotocin을 투여한 STZ 군에서는 혈청 총 콜레스테롤이 대조군에 비해 53%(p<0.05) 증가하였다. STZ와 HBT를 병용 투여한 군 역시 HBT 투여에 의해 총 콜레스테롤이 STZ 단독군에 비해 26.5%(p<0.05) 감소하였다. 고지방 투여군에서도 단독투여군(F+E)에 비해 HBT의 병용 투여는 총 콜레스테롤을 16.8%(p<0.05) 감소시키는 효과가 있었다. 혈청 중성지질 또한 HBT에 의해 17.1% (p<0.05) 감소하였다. STZ 투여에 의해 중성지질은 대조군보다 54%(p<0.05) 증가하였으며 HBT 병용투여 시 대조군과

A: Saline control group



B: HYEBATON administered group

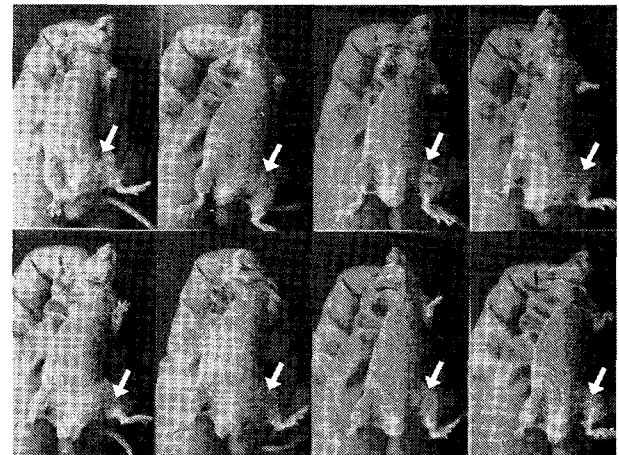


Fig. 3. Growth inhibition of L1210 cancer cells by HBT. DBA/2 mice were implanted with L1210 leukemia cells in femur. HYEBATON (HBT) was intraperitoneally administered at 125 mg/kg B.W. for 10 days beginning at one day after cancer inoculation. Mice were photographed on day 12.

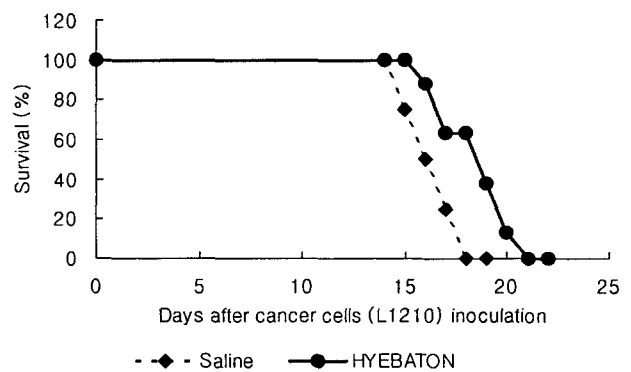


Fig. 4. Effect of HYEBATON on the survival of mice inoculated with cancer cells.

DBA/2 mice were implanted with L1210 leukemia cells in femur. HYEBATON was intraperitoneally administered at 125 mg/kg B.W. for 10 days beginning at one day after cancer inoculation. Mice of the control group were given saline. Eight mice were used in each group.

Table 1. Changes of the serum lipids by the extract (mg/dL)

Group ¹⁾	Total-cholesterol	Triglyceride	HDL-cholesterol
CON	58.08 ± 3.69 ^{2)a3)}	78.31 ± 6.93 ^{cd}	26.04 ± 3.15 ^{cb}
HBT	40.70 ± 7.88 ^b	64.88 ± 1.07 ^e	28.45 ± 5.43 ^{cb}
STZ	88.63 ± 9.06 ^{cd}	120.47 ± 6.42 ^a	44.27 ± 7.72 ^a
STZ+HBT	65.15 ± 3.47 ^a	74.77 ± 1.85 ^d	23.41 ± 2.09 ^c
F+E	72.58 ± 6.43 ^b	85.01 ± 11.11 ^{cb}	46.17 ± 3.99 ^{cb}
F+E+HBT	60.39 ± 3.20 ^c	80.34 ± 4.72 ^{cd}	40.04 ± 5.71 ^{cb}

¹⁾CON: control, HBT: HBT fed group, STZ: streptozotocin group, STZ+HBT: STZ plus HBT, F+E: high fat plus ethanol fed group, F+E+HBT: high fat plus ethanol and HBT fed group.

²⁾Values are mean ± SD.

³⁾Values followed by the different letter within the column are significantly different at p<0.05.

비슷한 수준으로 감소되었다. 고지방 식이에 의해 증가된 중성지질은 HBT에 의해 감소하는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었다. HDL은 총 콜레스테롤 및 중성지질과는 달리 HBT군이 대조군과는 차이가 없었다. STZ군과 F+E군은 대조군(CON)에 비하여 HDL이 증가하였으나 HBT의 투여에 따른 총콜레스테롤의 감소현상과 더불어 HDL 역시 감소를 나타내었다. 위의 결과로 미루어 HBT의 투여는 혈청지질의 억제 효과가 있는 것으로 사료된다. 이러한 혈청지질 억제 효과에 대하여 Bordia의 연구(15)와 여러가지 자연 식이 소재를 이용한 유사 연구 결과들(16-20)이 보고되고 있다.

HYEBATON의 투여가 간 지질 대사에 미치는 영향

HYEBATON(HBT)의 투여는 대조군(CON)에 비하여 총지질을 15%(p<0.05) 감소시켰고 중성지질과 총 콜레스테롤을 감소시키는 경향을 나타내었다(Table 2). 당뇨 유발을 위해 streptozotocin을 투여한 군에 비해 HBT를 병용 투여한 군 역시 이와 유사한 경향을 현상을 보였다.

유의성은 없었으나 HBT 투여시 간조직에서 총지질, 중성지질, 총 콜레스테롤이 모두 전반적으로 감소하는 경

향을 나타내었다. 고지방군(F+E)에서는 총지질, 중성지질, 총 콜레스테롤이 모두 증가를 나타내었는데 이는 Sung 등(21)과 Kim 등(22)의 결과와 유사하다. 그러나 HBT 병용 투여군(F+E+HBT)은 29.4%(p<0.05)의 총지질의 감소를 나타내었으며 중성지질 또한 33%(p<0.05)가 감소하였고 총콜레스테롤 역시 43%(p<0.05) 감소를 나타내었다. HBT의 투여는 혈청지질과 더불어 간의 지질을 감소시키는 현상에 기여하였다. 이러한 간에서의 중성지질의 감소 및 총 콜레스테롤의 감소 현상은 혈청 지질의 감소 현상과 직접적으로 관련성이 있는 것으로 생각되며 간에서의 감소현상이 나타난 후에 혈청지질에 감소 현상을 야기시키는 것으로 생각된다.

HYEBATON(HBT)의 투여가 Oral Glucose Tolerance Test에 미치는 영향

Sprague Dawley(SD) 쥐(rat)에 당뇨유발 물질인 streptozotocin(STZ)을 투여하여 당뇨를 유발시킨 결과 공복시 혈당이 234.67mg/dL이었으나 STZ를 투여하지 않은 대조군(CON)은 공복시 혈당이 89.50mg/dL이었다(Table 3). 그러나 HBT를 섭취한 쥐는 당뇨 유발물질인 STZ를 함께 투여하여도 공복시 혈당이 167.38mg/dL로 낮게 나타났다. 포도당을 경구 투여하여 생체내에서 당의 내성(tolerance)을 측정하기 위해 실시한 경구 포도당 내성검사(OGTT: Oral Glucose Tolerance Test)에서 STZ를 투여한 군은 포도당 투여 30분 후에는 혈당이 287.75mg/dL로 증가하였으나 HBT를 투여한 쥐는 STZ를 병용 투여하였음에도 불구하고 30분 후의 혈당은 219.00mg/dL로 낮게 유지되었다. 전체적인 포도당의 내성이 HBT의 투여로 증가하였다. 이 결과로 미루어 HBT는 혈당의 증가를 억제하는 작용이 있는 것으로 판단되며 동맥경화를 비롯한 심혈관질환의 위험요인으로 보고(23, 24)되고 있는 지질대사를 개선하고 당뇨병자들에 있어서 공복시 뿐 아니라 식후의 과도한 혈당 증가를 방지하는데 유효한 효과를 나타내리라고 판단된다.

시험관내에서 유전 독성학적 안전성 검증

HYEBATON에 대한 유전 독성학적 안전성을 평가하기 위하여, Ames test 방법에 따라 시료가 *Salmonella typhimurium* 균주의 복귀 돌연변이를 유발하는지를 시험하였다. 시료 5 mg/plate를 최고농도로 5단계의 용량으로 하여 균주 TA98과 TA100의 복귀돌연변이 집락수를 조사한 결과를 Table 4에 나타내었다. 각 시험에서 음성대조군의 복귀변이 집락수는 문헌치(14,25)의 범위 이내이었고, 양성대조 화합물에 의해 복귀돌연변이 집락수가 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 수행되었음을 확인하였다. 물질대사를 활성화시키지 않은 경우와 활성화시킨 경우

Table 2. Changes of rat liver lipids by HYEBATON

Group ¹⁾	(mg/g liver)		
	Total-lipids	Triglyceride	Total-cholesterol
CON	77.98 ± 1.91 ^{2)a3)}	26.64 ± 27.04 ^{cd}	9.43 ± 1.15 ^{bce}
HBT	66.20 ± 4.53 ^b	24.87 ± 16.62 ^{cb}	8.12 ± 0.82 ^{ba}
STZ	46.54 ± 1.89 ^c	19.21 ± 4.39 ^e	7.01 ± 0.68 ^{be}
STZ+HBT	41.78 ± 2.61 ^c	17.49 ± 13.28 ^e	6.70 ± 0.92 ^b
F+E	84.20 ± 0.43 ^a	55.64 ± 45.13 ^a	17.92 ± 2.18 ^a
F+E+HBT	59.42 ± 1.25 ^b	37.30 ± 42.54 ^b	10.16 ± 2.26 ^{dc}

¹⁾Refer to Table 1 for group legend.

²⁾Values are mean ± SD.

³⁾Values followed by the different letter within the column are significantly different at p<0.05.

Table 3. Enhancement of oral glucose tolerance by HYEBA-TON (mg/dL)

Groups ¹⁾	0 Min	15 Min	30 Min	60 Min	120 Min
CON	89.50 ± 4.59 ^{2)ab3)}	125.50 ± 8.72 ^b	104.50 ± 5.25 ^{ab}	86.00 ± 7.67 ^{ab}	72.25 ± 8.67 ^{bc}
STZ	234.67 ± 11.87 ^c	283.60 ± 15.95 ^{bc}	287.75 ± 19.10 ^{cb}	241.25 ± 14.65 ^c	208.50 ± 18.59 ^{ab}
STZ + HBT	167.38 ± 12.54 ^{cb}	217.13 ± 12.53 ^{ac}	219.00 ± 13.50 ^{bc}	179.75 ± 12.59 ^{cb}	119.25 ± 9.29 ^c

¹⁾Refer to Table 1 for group legend.

²⁾Values are mean ± SD.

³⁾Values followed by the different letter within the column are significantly different at p<0.05.

Table 4. Revertant colonies of the *S. typhimurium* strains in Ames test with HYEBA-TON

Test material	S9 mix	Dose (mg/plate)	No. of revertant colonies (His ^r) per plate	
			TA98	TA100
H ₂ O	-		23 ± 1.5	161 ± 14.9
HYEBATON	-	5	26 ± 2.1	167 ± 14.1
	-	1.65	21 ± 2.4	163 ± 7.8
	-	0.55	23 ± 2.4	150 ± 3.5
	-	0.18	17 ± 2.8	145 ± 5.1
	-	0.06	17 ± 1.4	132 ± 4.9
NPD	-	0.02	1995 ± 37.5	
Na-Azide	-	0.0015	1195 ± 104.5	
H ₂ O	+		40 ± 6.3	153 ± 7.8
HYEBATON	+	5	45 ± 3.5	177 ± 9.6
	+	1.65	41 ± 4.2	155 ± 4.9
	+	0.55	43 ± 0.7	150 ± 7.1
	+	0.18	36 ± 2.1	149 ± 3.5
	+	0.06	41 ± 0.3	143 ± 0.7
2-AF	+	0.010	762 ± 42.4	2324 ± 168.9

*Positive control: NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine), Na-Azide and 2-AF (2-aminofluorene).

공히 각 용량단계에서 시료가 각 균주의 복귀돌연변이 집락수를 증가시키지 않은 결과를 관찰함으로써, 시료가 직접적으로 혹은 물질대사를 통하여 돌연변이원성을 나타내지 않음을 알았다. 이 결과로 보아 본 복합조성물의 구성재료로 식용 가능한 원료를 사용하였으므로 독성학적으로 안전한 것으로 생각된다.

생쥐에 대한 급성 독성실험에서 안전성 검증

HYEBATON을 생쥐에 투여한 후 생체내 급성독성 유무를 관찰하였다. 그 결과, HYEBA-TON은 생쥐에서 경구 투여 또는 복강내 주사의 경우 모두 반치사량 (LD₅₀)이 2,000 mg/kg 이상으로 독성을 전혀 나타내지 않았다. 이 결과로 보아 HYEBA-TON은 식품으로서 생체에 대해 급성독성을 야기하지 않으며 안전성이 높다는 것을 알 수 있었다.

요 약

해바라기를 주원료로 한 복합조성물인 해바톤(HYEBA-TON, (주)새벽을여는사람들)의 면역활성 증진효과와

당뇨 및 지질대사에 미치는 영향을 분석하였다. 시험관 내에서 HYEBA-TON을 첨가하여 면역세포를 배양한 결과 면역세포가 현저하게 활성화되었다. 생쥐에 HYEBA-TON을 투여한 결과 세포 매개성 면역반응이 증진되었으며, 암세포 이식 생쥐에서 종양의 성장을 억제시켜 생존기간을 연장시키는 경향을 보였다. 또한, HYEBA-TON이 혈당과 지질 대사에 미치는 영향을 흰쥐에서 살펴보았다. 쥐를 정상식이군, streptozotocin (STZ) 투여에 의한 당뇨군, 고지방식이군으로 나누어 HYEBA-TON을 7주간 투여하였다. 경구포도당 내성 검사에서 HYEBA-TON은 당뇨군의 증가된 공복시 혈당을 감소시켰으며, 경구로 포도당을 투여 시에도 당뇨군의 혈당을 계속 낮게 유지시켰다. HYEBA-TON이 지질대사에 미치는 영향을 살펴본 결과, HYEBA-TON은 정상식이군, 당뇨군, 고지방식이군의 혈중 및 간의 콜레스테롤과 지질의 양을 유의성 있게 감소시키거나 혹은 감소시키는 경향을 보였다. 한편, 시험관내 유전독성시험 및 생쥐의 급성독성시험에서 HYEBA-TON은 안전한 것으로 평가되었다. 이러한 결과로 보아 HYEBA-TON은 면역활성 증진효과 뿐만아니라 당뇨 쥐의 혈당 및 지질 대사 개선효과를 보였으므로, 면역증진 및 당뇨와 지질대

사 개선을 위한 기능성 식품으로서 활용이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청 지원 산학연컨소시움사업의 일환으로 수행되었습니다.

문헌

- Hadden JW. 1993. Immunostimulants. *Immunology today* 14: 275-280.
- Chang J. 2000. Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements? *Biochemical Pharmacology* 59: 211-219.
- Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH. 2000. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J Ethnopharmacology* 72: 167-172.
- Chihara G, Suga T, Hamuro J, Takasuka N, Maeda YY, Sasaki T, Shio T. 1987. Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator. *Cancer Detection and Prevention* supplement 1: 423-443.
- Yun YS, Lee YS, Jo SK and Jung IS. 1993. Inhibition of autochthonous tumor by ethanol insoluble fraction from *Panax ginseng* as an immunomodulator. *Planta Medica* 59: 485-578.
- Matsumoto T, Sakurai MH, Kiyohara H, Yamada H. 2000. Orally administered decoction of Kampo(Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To" modulates cytokine secretion and induces NKT cells in mouse liver. *Immunopharmacology* 46: 149-161.
- Meydani SN, Lichtenstein AH, White PJ, Goodnight SH, Elson O, Woods M, Gorbach SL, Schaefer EJ. 1991. Food use and health effects of soybean and sunflower oils. *J AM Coll Nutr* 10: 406-428.
- Hong-Fen L, Waisman T, Maimon Y, Shakhar K, Rosenne E, Ben-Eliyahu S. 2001. The effects of a chinese herb formula, anti-cancer number one (ACNO), on NK cell activity and tumor metastasis in rats. *Int Immunopharmacol* 1: 1947-1956.
- 과학 · 백과사전출판사 편. 1991. 약초의 성분과 이용. 일월서각.
- Belokrylov GA, Molchanova IV. 1992. The immunotropism of sunflower oil and starch in peros administration to mice. *Biull Eksp Biol Med* 114: 633-634.
- Madigan C, Ryan M, Owens D, Collins P, Tomkin GH. 2000. Dietary unsaturated fatty acids in type 2 diabetes: higher levels of postprandial lipoprotein or a linoleic acid-rich sunflower oil diet compared with an oleic acid-rich olive oil diet. *Diabetes Care* 23: 1472-7
- Kloeze J, Abdellatif AM. 1975. Effects of palm-kernel oil and sunflower-seed oil on serum lipids and atherogenesis in alloxan-diabetic rabbits. *Atherosclerosis* 22: 349-68
- Folch, J, Lees M, Sloan-Stanley, GH. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Maron DM and Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res* 113: 173-215.
- Bordia A, Verma SK, Vyas AK, Khabya BL, Rathore AS, Bhu N and Bedi HK. 1977. Effect of essential oil of onion and garlic on experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 26: 379-386.
- Imaizumi K, Nagatomi A, Sato M, Tomimaga A and Sugano M. 1992. Cholesterol metabolism in ExHC(exogenous hypercholesterolemic) rats. *Biochem Biophys Acta* 1123: 101-109.
- Park SO. 1994. Effect of aloe powder on lipid metabolism in rats fed cholesterol enriched diets. Ewha Woman's University Graduate School, *Doctoral Dissertation*.
- Ogston D, McAndrew GM. 1979. Fibrinolysis in obesity. *Lancet* 2: 1205-1209.
- Sohn IS. 1975. Studies on the hypercholesterolemia of Koreans. *Kor J Med* 18: 354-357.
- Lee JS, Lee KH, Jeong JH. 1999. Effects of extract of *Pueraria radix* on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nut* 28: 218-224.
- Sung TS, Sohn GM, Bae MJ, Choi C. 1992. Effect of *Araliaceae Seeman* hot water extract on the lipid accumulation of rat induced obesity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 21: 9-16.
- Kim, SI, Kim YS, Jeon BS, Lim C. 1986. Effect of ginseng on fat accumulation in the obese rats induced by high fat diet. *Korean J Ginseng Sci* 10: 167-172.
- Choi MJ. 1993. Relation of body fat distribution to calorie intake, blood glucose and exercise in female diabetics. *Korean J Nutr* 26: 164-173.
- Stern MP, Haffner SM. 1986. Body fat distribution and hyperinsulinemia as risk factors for diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 6: 123-130.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res* 31: 347.