Korean J. Food Preserv.
Vol. 16, No. 3. pp. 449-453, June 2009

사단법인 한국식품저장유통학회
THE KOREAN SOCIETY OF FOOD PRESERVATION

콩으로부터 추출한 Pinitol의 면역억제 활성 비교

박철홍 · 허진철 · 남동윤 · 이시림 · 남소현 · 손민식 · 황영현[1] · 이상한†
경북대학교 농업생명과학대학 식품공학과 및 [1]식품생명과학부

Comparison of Immuno-Suppressive Activities of Pinitol Isolated from Soybean

Chul-Hong Park, Jin-Chul Heo, Dong-Yun Nam, Si-Rim Lee, So-Hyun Nam, Minsik Son, Young-Hyun Hwang[1] and Sang-Han Lee†
Department, of Food Science & Technology, and [1]Agronomy, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

The experiment was conducted to validate anti-inflammatory effects of pinitol from bean. It was evaluated for some molecule targets by wound healing assay and RT-PCR. The results of wound healing assay was shown dose-dependent inhibition of cell migration in cancer cells and inhibited RNA expression of ICAM-1, CD 44, MMP-17, MMP-14 and ARF2. Immune suppression activity in a mouse provoked by DNFB observed that inflammatory reaction with pinitol were reduced ear swelling and inflammatory cells infiltration in mouse atopic models. The result confirmed that pinitol have the effect of dose-dependent immune suppression activity.

Key words : **p**initol, anti-cancer, anti-inflammation, wound assay, atopic induction animal model

서 론

피니톨(Pinitol)은 식품으로 널리 사용하는 식물 가운데 콩, 솔잎, 헛개나무 열매 등에 0.1-2% 정도로 분포되어 있는데(1), 이들 성분의 식물에서의 기능은 환경변화에 대한 저항성을 높여 가뭄이나 염도에 대해 식물을 보호하는 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(2).

피니톨은 생체 내 다양한 신호 전달체계의 구성 성분인 카이로이노시톨(Chiro-Inositol)과 유사한 화학 구조 및 생화학적 작용을 가지는 이노시톨(Inositol) 유도체로 섭취 후, 체내에서 카이로이노시톨로 전환되는데 인체의 여러 대사에 필요한 신호전달물질인 카이로이노시톨을 보충하여 체내 카이로이노시톨의 상대적 결핍현상을 개선해 주는 역할을 한다(3). 이 때문에 현재 피니톨은 건강기능성 식품소재 및 식품첨가물로 카이로이노시톨을 보충하기 위하여 여러 분야에 이용되 있으며, 콩과 식물에서 추출한 안전한 소재로서 혈당조절 기능 저하 동물에 피니톨 섭취 후 혈당 조절 기능의 개선이 확인되어 식약청으로부 개별인정형 건강기능식품으로 허가 받았다.

제2형 당뇨병(Diabetes Type2)은 인슐린 저항성(Insulin Resistance, 인슐린 신호전달체계에 이상)이 증가하여 발병하며 전체 당뇨병의 90%를 차지한다. 제2형 당뇨병 환자의 소변에 배출된 카이로이노시톨의 양이 정상인에 비해 현저히 낮다는 사실이 보고된 후(4), 피니톨과 카이로이노시톨의 혈당강화 효과와 그 작용원리에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 카이로이노시톨이 결핍된 정상인은 간, 지방조직, 근육에서 마이오이노시톨로(myo-inositol)부터 카이로이노시톨로 전환이 되지만, 제2형 당뇨환자는 카이로이노시톨로의 전환에 문제가 생겨 카이로이노시톨 결핍현상이 나타나게 된다. 따라서 피니톨을 복용하면 체내에서 카이로이노시톨로 전환되고, 이것이 인슐린 신호전달체인 이토시톨 포스포글라이칸(inositol phosphoglycan)을 합성하는데 사용되어 인슐린의 신호전달이 정상적으로 이루어져 세포의 포도당 대사가 정상화되고 혈당치가 저하되는 효과를 보인다(3-7).

다낭성난소 증후군(polycystic ovary syndrome)을 갖는

†Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

비만 여성들에게도 카이로이노시톨을 섭취하게 하면 카이로이노시톨이 인슐린의 작용을 증가시켜 배란기능이 향상되고 안드로젠(androgens) 농도, 혈압, 혈장 내 트라이글라이세라이드(triglyceride) 농도가 감소된다는 연구도 있다(8-9). 지난 10년 동안 인슐린 저항성과 고인슐린혈증(hyperinsulinemia)이 다낭성난소 증후군에서 중요한 역할을 하기 때문에 피니톨을 섭취하면 배란 빈도가 증가하고 혈액 내의 안드로젠이 감소하여 다낭성난소 증후군이 개선된다는 과학적인 결과가 또한 있다(8-10).

본 연구에서는 대두에서 추출한 피니톨을 이용하여 면역활성(immunomodulatory activity)을 알아보기 위하여 wound healing assay를 비롯하여 분자생물학적인 기법과 조직학적인 기법을 통하여 활성을 검증하였다.

재료 및 방법

실험재료

피니톨(C7H14O6; MW, 194.18)은 콩류나 솔잎 등에 포함되어 있는 천연 혈당강하 성분으로서 카이로이노시톨의 3번 탄소에 methyl기가 붙은 ether 화합물이다(Fig. 1). 사용한 시료는 콩과식물인 carob에서 추출한 원료로써 순도는 98% 이상이며 아미코젠(주)로부터 구입하여 사용하였다.

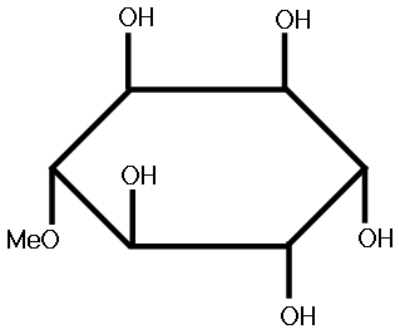

Fig. 1. Chemical structure of pinitol.

Wound healing assay

Wound healing assay는 B16F1 세포를 culture dish에 분주한 다음, CO_2 배양기에서 세포가 confluent한 상태가 될 때까지 배양하였다. 배양은 RPMI 1640 배지에 10% FBS를 첨가하여 5% CO_2 incubator에서 37℃로 배양하였다. Wound는 yellow tip을 이용하여 약 1 mm의 상처를 만든 다음, 배양액을 교체한 후 시료를 농도별로 처리하였다. 그 후 24시간 동안 배양하여 상처의 치유정도를 현미경을 통하여 관찰하였다. Wound healing 비율은 현미경을 통하여 남아있는 상처가 회복되는 정도 즉 상처의 폭(width)을 측정한 다음, 무처리군과 비교하여 억제활성 정도를 비교하였다(11).

RT-PCR

RPMI 1640 배지에 10% FBS, 5% CO2, 37℃의 incubator에서 배양되고 있는 B16F1세포에 pinitol을 0, 100, 300, 1000 μM 단위로 처리하여 20 hr 동안 배양하였다. Tri-Reagent (MRC, USA)를 이용하여 RNA를 추출한 뒤, RT-kit (Intron, Korea)을 이용하여 역전사를 하고, PCR 반응조건은 94℃ (45 sec), 54℃ (45 sec), 72℃ (45 sec)의 조건으로 34 cycle을 실시하였다. PCR primer로는 ICAM-1, CD44, VEGF-A, MMP-17, MMP-14, ARF-2 유전자(Table 1)를 이용하였다.

Table 1. List of oligonucleotide primers for RT-PCR

No	Name		Sequence (5'-3')
1	mICAM-1	F	AGGCATGGCACACGTATGTA
		R	CGAAGGTGGTTCTTCTGAGC
2	mCD44	F	TCGATTTGAATGTAACCTGCC
		R	TGGTGTGTTCTATACTCGCCC
3	mVEGF-A	F	GAGACCCTGGTGGACATCTT
		R	AACGCGAGTCTGTGTTTTTG
4	mMMP-17	F	AGGCGAAGCATTCTTTTTCA
		R	GCCGTGTGTGGTCATCATAG
5	mMMP-14	F	GGCCTGGAACATTCTAACGA
		R	GCATTGGGTATCCATCCATC
6	mARF-2	F	CACAGTCTGGGATGTTGGTG
		R	TTCGTAAAGCCCATCTCCAC
7	GAPDH	F	ATGTTCCAGTATGACTCCAC
		R	GCCAAAGTTGTCATGGATGA

아토피 유발 동물 모델과 면역억제 실험

아토피 유발 동물모델은 C57BL/6 마우스의 귀에 DNFB (dinitrofluorobenzene, Sigma Chemical, MO)를 처리하여 유도하였고, 마우스는 4-5주령의 수컷 마우스를 1주일 순화시켜 사용하였으며 animal care는 KGLP의 guideline을 준수하며 실험하였다. 우선 0.5% DNFB (acetone : olive oil = 4:1) 25 μL를 마우스 복강에 처리하고 5일 후, 0.2% DNFB 4 μL를 마우스의 귀 좌우측에 정해진 기간에 따라 6회 도포하였다(Fig. 2, Table 2). Pinitol 처리는 0.2% DNFB를 처리하는 중간에 4회 도포하였고, 이후 귀의 두께 측정과 hematoxiline-eosin (HE)염색을 하여 세포의 침투현상을 관찰하였다(12).

결과 및 고찰

피니톨의 약리 효능은 다양한 것으로 알려져 있는데, 그 중 남아프리카에서 African Ginseng 이라고도 불리는 *Sutherlandia* sp. 식물의 잎을 전통적으로 당뇨병을 포함한 질병치료에 도움을 주는 민간요법으로 사용하여 왔는데, 그 유효성분 중의 하나가 피니톨로 밝혀져 있다(13). 또한, 남아메리카, 브라질 지역에서 콩과류 식물의 잎을 당뇨병

치료에 민간요법으로 사용하였으며 그 유효성분이 피니톨인 것으로 보고되어 있다. 이 외에도, 다낭포성 난소증에 대한 치료효과와 지질대사 정상화 효과 등 대사이상 증후군(metabolic disorder syndrome)에 의한 질병에 대하여 효과가 있는 것으로 밝혀졌다(14,15).

피니톨은 자연계에 존재하는 콩과식물을 비롯한 다양한 식물에 존재하며 특히, 민간요법으로 각광받고 있는 대두를 비롯하여 쥐눈이콩, 가시오가피, 누에가루, 헛개나무 등에서 다량 존재함이 보고되었다(1). 이에 피니톨의 항암활성을 알아보기 위하여 wound healing assay와 항암 분자마커로 알려진 ICAM-1, CD44, VEGF-A, MMP-17, MMP-14, ARF-2 유전자의 발현여부를 RT-PCR을 수행함으로서 비교하고자 하였다.

MMP와 같은 세포막 단백질의 발현과 관계가 있는 것으로 알려져 있다(11,16,17). 본 실험에서 피니톨은 암세포의 운동성을 저해하는 역할을 하는 것으로 확인되었고, 또한 농도에 따라 운동성의 저해가 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 피니톨이 세포 내에 운동성 관련 단백질의 발현에도 직·간접적으로 영향을 미칠 것으로 판단하고, 이들 항암 분자마커들의 mRNA수준을 비교함으로서 면역 활성에 대한 결과를 얻을 수 있었다.

RT-PCR에 의한 면역억제활성 비교

피니톨의 면역 활성을 알아보기 위해 몇 가지의 분자마커로 유전자의 발현 정도를 mRNA수준에서 확인하였다. 배양 중인 B16F1 세포주에 피니톨을 처리하고 20 시간 후

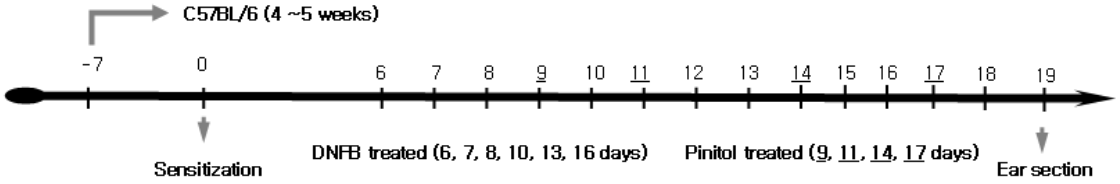

Fig. 2. Experimental schedule for the DNFB-induced atopic animal model.

Table 2. Experimental schedule for pinitol treatment on an atopic-induced model

No	0.2% DNFB 처리	Treatment of Compound	Note
1	No treatment	-	Negative control
2	0.2% DNFB	50% Acetone	Asthma induced model
3	0.2% DNFB	Pinitol (100mM)	Experiment group

Wound healing assay

암의 전이는 암세포의 특징으로 전이에서 가장 중요한 요소로서 암세포의 운동성을 들 수 있다. 세포의 운동성은 세포의 형태가 바뀌면서 일정한 방향성과 함께 관찰을 할 수 있다. B16F1 세포주를 이용하여 상처를 형성한 후, 콩에서 추출한 피니톨에 의한 이동정도를 실험한 결과 피니톨의 농도에 따른 세포의 이동성이 줄어드는 것을 확인할 수 있는데(Fig. 3), 처리한 농도에 의존적으로 그 효과가 나타났다. 피니톨을 10 μM을 처리한 군에선 20%정도의 세포 운동성 저해활성(wound inhibition activity)을 가지는 것으로 확인되었다. 30 μM의 피니톨을 처리한 군에서는 40%정도의 저해활성을 보이고, 100 μM을 처리한 군에선 60%정도의 저해활성을 보이는 것으로 확인되었다. 이것으로 피니톨이 세포의 운동성을 저하시켜 암세포의 전이를 억제하는 것으로 유추할 수 있다. 세포의 운동성은 CD44, ICAM,

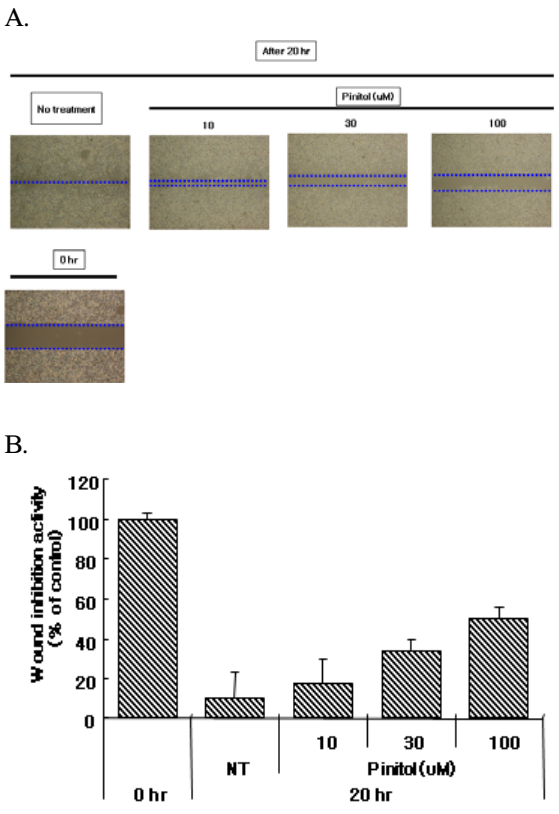

Fig. 3. Effects of wound healing activity by pinitol.

A. Analysis of B16F1 migration at a concentration of 10, 30, and 100 μM of pinitol.
B. Quantification of the wound healing. Cell migration was quantified by a method to recover the wound width after 20 hr on the cells. Data show the mean±SD of three independent determinations.

RNA를 추출하여 발현량의 차이를 비교하였다. 그 결과 처리한 피니톨의 농도에 의존적으로 ICAM-1, CD44, MMP-17, MMP-14, ARF-2 유전자들의 mRNA 발현 정도가 억제되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 앞의 여러 유전자들은 암세포가 전이되거나 혈관 신생시 세포막에 많이 존재하게 되는 단백질로서 이러한 단백질이 mRNA수준에서 발현이 억제되었다는 것은 피니톨이 암세포의 전이나 혈관 신생을 억제하는 것으로 판단할 수 있다.

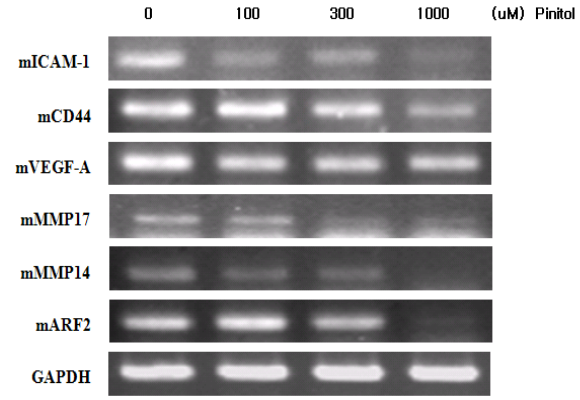

Fig. 4. Comparison of mRNA expression levels by RT-PCR.

아토피 유발 동물 모델을 이용한 면역억제 활성 비교

한편, 콩에서 추출한 피니톨을 농도별로 처리하여 아토피 유발 동물 모델에서 아토피 증상의 개선에 대한 영향을 분자표적의 발현 여부로 판단할 수도 있다. 피부조직에 염증반응이 유도되면 염증이 일어난 부위에서 세포의 침투현상이 발생한다(18). 이것은 조직이 느슨한 형태를 유지하게 되어 세포의 이동이 잘 이루어지게 되기 위함이다. 아토피 유발은 DNFB를 처리하여 마우스의 귀에 면역반응을 유도하는 방법을 선택하였다. 이 경우 근육세포가 느슨해지면서 귀의 swelling으로 인하여 두께가 두꺼워지고, 면역 세포들이 DNFB 처리 부위로 집중되는 현상을 확인할 수 있다. 이때 두꺼워진 귀 두께의 비교는 물론 HE염색을 통하여 면역세포들의 몰림 현상과 조직으로 침투된 정도를 확인하는 것은 아토피의 제반 증상의 증가와 감소를 알 수 있는 중요한 지표로 알려져 있다. 이와 같은 아토피 유발 동물모델을 이용하여 피니톨의 활성을 알아본 결과, 아토피를 유도한 동물모델에선 귀의 두께가 두꺼워졌고, 세포들의 집중 현상이 발생한 것을 확인할 수 있으며(Fig. 5-A), 피니톨을 처리한 군에서는 면역세포의 몰림 현상과 귀의 두께가 두꺼워 지는 현상이 아토피 유도군에 비교하여 다소 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 상피의 두께 또한 아토피 유도군에 비해 비후정도가 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). 이의 결과로 말미암아 피니톨은 아토피 유발 동물모델에 적용한 결과 면역억제 활성을 가지는 것으로 판단할 수 있으며, 향후 신호전달 체계에서 분자기전이 명확하게 규명된다면 아토피 증상의 치료나 예방에 대한 중요한 초석이 되리라 사료된다.

피니톨은 다수의 식물에 존재하는 유효성분으로 알려져 있고, 이를 이용하여 여러 나라에서 민간요법으로 사용된다고 알려져 있어서 피니톨이 지니는 기능성에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다. 본 연구에서는, 피니톨이 가지는 면역 억제활성을 검증한 결과, 처리한 농도에 의존하여 면역 억제 활성을 확인할 수 있었다. 향후 신호전달 체계에서 분자기전의 연구를 더 수행하고 건강기능성 식품소재로서의 특성을 명확하게 규명한다면 피니톨의 건강기능성이 활성은 더욱 다양하게 사용되어 질 수 있다고 판단된다.

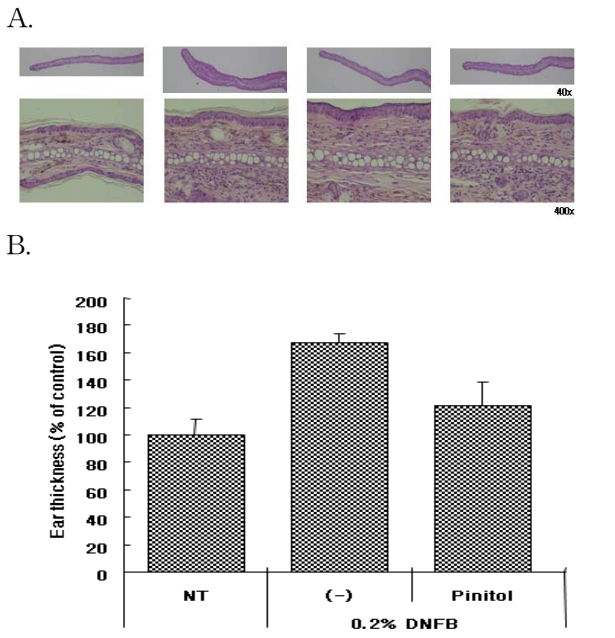

Fig. 5. Analysis of anti-atopic activity.

A. Effects of pinitol on histological features of the atopic-induced ear. Hematoxyline-eosin stained section from ears in the control (NT), atpoic-induced (0.2% DNFB), pinitol groups was shown.
B. Measurement of ear thickness levels of the atopic model.

감사의 글

본 연구결과는 농림기술관리센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다. 또한 건강기능성 식품소재 개발 인력양성 BK21사업팀의 지원(허진철, 손민식, 박철홍, 남소현)에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kim, J.I., Kim, J.C., Joo, H.J., Jung, S.H. and Kim, J.J (2005) Determination of total chiro-inositol content in

selected natural materials and evaluation of th antihyperglycemic effect of pinitol isolated from soybean and carob. Food Sci. Technol.. 14, 441-445
2. Changxin, G. and Derrick. M.O. (1997) Effect of water-deficit stress and genotypes on pinitol occurrence in soybean plants. Environ. Exp. Botany, 37, 147-152
3. Bates, S., Jones, R.B. and Bailey, C.J. (2000) Insulin-like effect of pinitol. Br. J. Pharmacol., 130, 1944-1948
4. Kennington, A.S., Hill, C.R., Craig, J., Bogardus, C., Raz, I., Ortmyer, H.K., Hansen, B.C. and Romero, G. (1990) Low urinary chiro inositol excretion in non insulin dependant diabetes mellitus. New Eng. J. Med., 323, 373-378
5. Ortmeyer, H.K., Bodkin, N.L., Lilley, K., Larner, J. and Hansen, B.C. (1993) Chiroinositol deficiency and insulin resistance. I. Urinary excretion rate of chiroinositol is directly associated with insulin resistance in spontaneously diabetic rhesus monkeys. Endocrinol., 132, 640-645
6. Ortmeyer, H.K., Huang, L.C., Zhang, L., Hansen, B.C. and Larner, J. (1993) Chiroinositol deficiency and insulin resistance. II. Acute effects of D-chiroinositol administration in streptozotocin-diabetic rats, normal rats given a glucose load, and spontaneously insulin-resistant rhesus monkeys. Endocrinol., 132, 646-651
7. David, R.J. and Isabel, V.N., (1998) The role of glycosyl‐phosphatidylinositol in signal transduction. Int. J. Biochem. Cell Biol.. 30, 313-326
8. Iuorno, M.J., Jakubowicz, D.J., Baillargeon, J.P., Dillon, P., Gunn, R.D., Allan, G. and Nestler, J.E. (2002) Effects of d-chiro-inositol in lean women with the polycystic ovary syndrome. Endocr. Pract., 8, 417-423
9. Yoshida, K., Yamaguchi, M., Morinaga, T., Ikeuchi, M., Kinehara, M. and Ashida, H. (2005) Genetic modification of *Bacillus subtilis* for production of D-chiro-Inositol, an investigational drug candidate for treatment of type 2 diabetes and polycystic ovary syndrome. Appl. Environ. Microbiol., 72, 1310-1315
10. Davis, A., Christiansen, M., Horowitz, J.F., Klein, s., Hellerstein, M.K. and Ostlund, R.E. (2000) Effect of pinitol treatment on insulin action in subjects with insulin resistance. Diabetes Care, 23, 1000‐1005
11. Heo, J.C., Park, J.Y., Lee, J.M., Kwon, T.K., Kim, S.U., Chung, S.K. and Lee, S.H. (2005) Wisteria floribunda gall extract inhibits cell migration in mouse B16F1 melanoma cells by regulating CD44 expression and GTP-RhoA activity. J. Ethnopharmacol., 102, 10-14
12. Mutou, Y., Ibuki, Y. and Kojima, S. (2007) Immunomodulatory effects of ultraviolet B irradiation on atopic dermatitis in NC/Nga mice. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., 23, 135-144
13. Sia, C. (2004) Spotlight on ethnomedicine: Usability of Sutherlandia flutescens in the treatment of diabetes. Rev. Diabetic Stud., 1, 145-149
14. Nestler J.E., Jakubowicz, D.J., Reamer, P., Gunn, R.D. and Allan, G. (1999) Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome. N. Engl. J. Med., 340, 1314-1320
15. US Patent 5,827,896, (1998) Washington University, St. Louis, MO
16. van Wetering, S., van den Berk, N., van Buul, J.D., Mul, F.P., Lommerse, I., Mous, R., ten Klooster, J.P., Zwaginga, J.J. and Hordijk, P.L. (2003) VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 285, 343-352
17. Zhou, J., Mauerer, K., Farina, L. and Gribben J.G. (2005) The role of the tumor microenvironment in hematological malignancies and implication for therapy. Front Biosci., 10, 1581-1596
18. Barnes, P.J. (2000) New directions in allergic diseases: mechanism-based anti-inflammatory therapies. J. Allergy Clin. Immunol., 106, 5-16

(접수 2009년 3월 8일, 채택 2009년 6월 5일)