

생강 추출물 투여가 마우스 면역세포 활성화에 미치는 영향

류혜숙·김현숙[§]

숙명여자대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effect of Zingiber Officinale Roscoe Extracts on Mice Immune Cell Activation

Ryu, Hye Sook · Kim, Hyun Sook[§]

Major in Food and Nutrition, College of Life Science, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

ABSTRACT

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) has been used as a raw material in many traditional preparations since the ancient time. As a component of traditional health products, Ginger is known to be effective as appetite enhancer, anti-cold and anti-inflammation. This study was performed to investigate the immunomodulative effects of Ginger in mouse, using *in vitro* and *ex vivo* experiments. *In vitro* experiment, the mice splenocytes proliferation and three kinds of cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) production by peritoneal macrophages cultured with ethanol and water extracts of Ginger were used to indicate the immunomodulative effect. In order to elucidate the immunomodulative effects of Ginger *ex vivo*, water extract of Ginger was orally administrated into mice, and isolated splenocytes and macrophages were used as experimental model. *Ex vivo* experiment, six to seven week old mice were fed ad libitum on a chow diet, and water extract of Ginger was orally administrated every other day for four weeks at two different concentrations (50 and 500 mg/kg B.W./day). *In vitro* study, the splenocytes proliferation was increased when water extract was supplemented in the range of 50–500 μ l/ml concentration. In case of cytokines production, IL-1 β , IL-6 and TNF- α released by activated peritoneal macrophages were augmented by the supplementation of water extract of the Ginger. *Ex vivo* experiment, the highest proliferation of splenocytes and production of cytokines by activated peritoneal macrophages were seen in the mice orally administrated at the concentration of 500 mg/kg B.W./day. In conclusion, this study suggests that Ginger extracts may enhance the immune function by regulating the splenocytes proliferation and enhancing the cytokine production capacity by activated macrophages in mice. (*Korean J Nutrition* 37 (1) : 23~30, 2004)

KEY WORDS : ginger extracts, immunomodulating, splenocytes proliferation, IL-1 β , IL-6, TNF- α .

서론

식품 중에 존재하는 성분들의 단순한 영양소 역할 외에 기능성 물질로서의 역할에 대한 관심이 높아지고 있다. 이러한 추세에 부응하여 천연 식물 자원을 대상으로 노화방지 성인병 예방, 면역증강효과 등에 대한 연구가 항체 생성 및 항산화 효과와 같은 각종 생리활성을 나타내는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁻³⁾

생강은 아열대 및 열대성 다년생 식물로서 근경을 주로 식용하며, 그 특유한 향기와 매운맛으로 인하여 오랫동안 향신료로서 사용되어 왔으며, 또한 약리작용도 갖고 있어 한방에서 건위제 및 발한제로 사용되고 있다.⁴⁾ 생강의 풍

미성분은 정유성분 (essential oil)과 매운맛 성분을 함유하는 올레오레진 (oleresin)으로 분류되며 특히 매운맛 성분인 gingerol, ginerone 및 shogaol 등이 항산화효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.^{5,6)} 최근 들어 생강의 oleresin, gingerol, shogaol fraction이 NK cell 용해를 활성화시켜 면역능 증진에 효과가 있다는 것으로 보고되고 있다.⁷⁾ 따라서 본 연구에서는 면역증진능을 갖는 천연 식물소재로서 생강의 면역 증강효과 검색을 다음과 같은 단계로 검증하고자 하였다.

In vitro 실험에서는 생강의 물 추출물과 에탄올 추출물 첨가에 의한 마우스 비장세포 증식능과 활성화 복강대식세포에서 분비되는 대표적인 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성량의 변화를 통해 생강의 면역활성 증진효과를 검증하고자 하였다. *Ex vivo* 실험에서는 생강을 물 추출하여 실험 동물에 4주간 직접 경구 투여함으로써 이들 시료가 마우스 생체내에서 면역능에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

접수일 : 2003년 9월 17일

채택일 : 2003년 12월 15일

[§]To whom correspondence should be addressed.

4주간 격일로 생강 물 추출물을 경구투여한 마우스의 비장세포 증식능, 활성 복강대식세포에서 분비되는 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성량의 변화를 측정하여 생강 추출물이 마우스 면역능에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

1. 시료추출 및 실험동물

생강 추출물은 Fig. 1의 방법으로 제조하였다. 동결 건조된 시료를 증류수 또는 에탄올로 환류 냉각시키면서 80°C 수욕상에서 3시간씩 3회 반복 추출한 후 감압농축하여 물 추출물과 에탄올 추출물을 얻었다.

본 연구에 사용된 동물은 7~주령된 암컷 Balb/c mouse를 (주) 대한실험동물센터로부터 분양받아 고형 사료와 물을 자유로이 공급하면서 7~일 정도 실험 동물실에서 적응시킨 후 체중이 15 g 내외인 마우스를 실험에 사용하였다. 실험 동물실 온도는 22 \pm 2°C, 습도는 40~60%로 유지하였고, 명암주기 (Light and dark cycle)는 12시간 단위로 조절하였다.

2. 시약 및 배지

본 연구에 사용된 배지는 RPMI medium 1640의 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였고, fetal bovine serum (FBS), lipopolysaccharide (LPS), concanavalin A (ConA), thioglycollate, sodium bicarbonate, ammonium chloride, TRIZMA[®] base, TRIZMA[®] hydrochloride, trypan blue solution (0.4%), DMSO (dimethyl

sulfide), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 등의 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

3. 생강 추출물의 투여

In vitro 실험에서는 생강 에탄올 추출물 및 물 추출물을 세포배양액 (10% FBS-RPMI 1640; GIBCO)에 용해시킨 다음 실험하고자 하는 농도가 되도록 희석하여 세포배양시 첨가하였다.

Ex vivo 실험에서는 생강 물 추출물을 멸균 증류수로 용해시킨 후 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 마우스를 임의 배치법에 의해 대조군과 투여군으로 나누었으며, 실험군마다 6마리씩 사용하였다. 대조군에는 생리 식염수를, 투여군에는 검액을 각각 50 mg/kg B.W./day과 500 mg/kg B.W.의 농도가 되도록 멸균 증류수로 희석하여 0.2 ml/day씩 4주간 격일로 경구 투여하였다.

4. 마우스 비장세포의 분리 및 배양

마우스 비장세포의 분리는 Mishell 등⁸⁾의 방법에 의해 실행하였다. 경추 탈골법으로 희생시킨 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI 1640 용액으로 씻은 다음 멸균 유리병으로 가볍게 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 분리된 세포 현탁액을 200 mesh stainless steel sieve (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 통과시킨후 50 ml의 원심관에 넣고 4°C, 3000 rpm에서 10분간 원침시킨 후 cell pellet을 lysing buffer (Tris-buffered ammonium chloride; 0.87% NH₄Cl, pH 7.2)에 5분간 현탁시켜 적혈구를 제거하였다. 위의 세포는 다시 RPMI로 2회 원심 세척한 다음, 10%-FBS RPMI 1640으로 5.0 \times 10⁶ cell/ml의 농도로 희석하여 96-well plate에 90 μ l씩 분주한 후 세포 증식능 측정에 사용하였다.

5. 비장세포 증식능 측정

각 군별로 마우스 비장세포 현탁액을 5.0 \times 10⁶ cell/ml이 되도록 희석하여 96 well plate의 각 well에 90 μ l씩 분주하고 각 군당 mitogen으로 ConA (5 μ g/ml), LPS (15 μ g/ml)를 10 μ l씩 분주하고 대조군에는 배지를 동량으로 분주하였다. 각 plate는 37°C, 5% CO₂ incubator (Sanyo)에서 44시간 배양하여 MTT assay를 실시하였다. 배양후 MTT를 10 μ l 가하고, 알루미늄 호일로 빛을 차단한 상태에서 4시간 동안 다시 배양한 후 formazan crystal 형성을 유도하였다. 4°C, 1500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 각 well에 150 μ l의 DMSO를 가하여 10분간 방치한 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm의 파

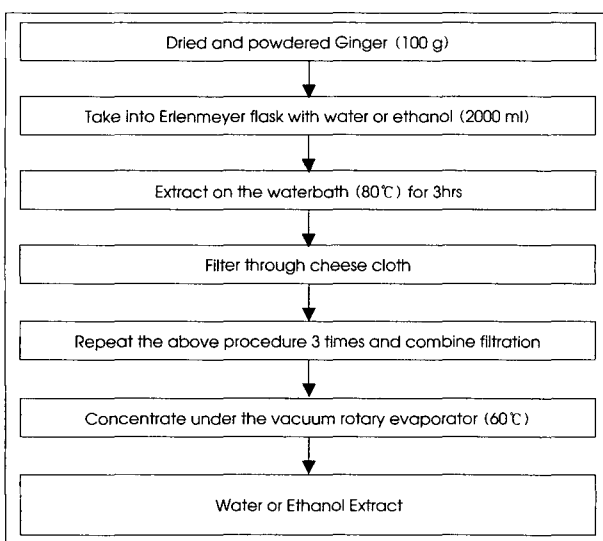


Fig. 1. Flow diagram for water or ethanol extraction procedure.

장에서 흡광도를 측정하였다. 마우스 비장세포의 증식능은 다음의 공식에 의해 계산되었다.

$$\text{Proliferation Index} = \frac{\text{Sample의 흡광도}}{\text{Control의 흡광도}}$$

6. 사이토카인 (IL-1β, IL-6, TNF-α) 분비능 측정

생강 물 추출물을 경구 투여한 마우스의 복강내 대식세포를 추출하여 배양시킨 다음 배양 상층액으로부터 분비되는 사이토카인 (IL-1β, IL-6, TNF-α) 분비량을 각각 측정하였다. 비부착성 세포를 제거하고 부착성 세포만을 얻은 후, 10%-FBS RPMI 1640 900 μl와 대식세포를 활성화시키는 mitogen인 LPS와 배지를 100 μl 가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator (Sanyo)에서 48시간 배양하였다. 배양 상층액을 분리하여 배양액에 축적된 IL-1β, IL-6, TNF-α의 양을 ELISA 사이토카인 kit (R & D system, USA)를 이용하여 측정하였다.

7. 통계분석

모든 실험결과와 자료는 SAS (Statistic Analysis System) 통계 프로그램을 이용하여 평균 및 표준편차를 구하였다. 각 군간의 평균치의 차이는 분산분석 (Analysis of Variance, ANOVA) 및 Duncan's multiple range test를 사용하여 α = 0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 생강 추출물이 마우스 면역활성에 미치는 영향: *In vitro* 실험

1) 생강 추출물이 마우스 비장세포 증식능에 미치는 영향

생강 추출물을 10, 50, 100, 250, 500, 1000 μg/ml의 농도로 첨가하여 배양하였고 음의 대조군 (negative control)으로는 생강 추출물 대신 배양액 (10% FBS-RPMI 1640)을 첨가하고 양의 대조군 (positive control)으로는

Con A (5 μg/ml)와 LPS (15 μg/ml)를 첨가하여 배양하였다. Con A는 T세포를 LPS는 B세포를 선택적으로 증가시키고 이들의 mitogen effect는 농도 의존적이어서 본 실험에서는 선행연구⁹⁾에서 가장 높은 증식능을 보였던 농도인 5 μg/ml (Con A)와 15 μg/ml (LPS)를 첨가하였다. 비장세포 증식능은 배양액 10% FBS-RPMI 1640을 넣은 대조군의 흡광도를 1로 하여 비교하였다.

생강 물 추출물과 에탄올 추출물의 첨가가 비장세포 증식능에 미치는 영향에 대한 검색 결과는 Table 1과 같다. Con A와 LPS를 첨가하여 배양한 경우 생강 추출물을 첨가하지 않은 대조군에 비해 세포 증식능이 1.70 ± 0.60, 1.33 ± 0.14로 상승하였다. 생강 물 추출물을 첨가하여 배양한 경우 농도 50, 100, 250, 500, 1000 μg/ml에서 각각 1.22 ± 0.55, 1.13 ± 0.09, 1.15 ± 0.05, 2.00 ± 0.05, 1.43 ± 0.10로, 에탄올 추출물을 첨가하여 배양한 경우 농도 250, 500, 1000 μg/ml에서 각각 1.15 ± 0.11, 1.47 ± 0.03, 1.06 ± 0.01로 비장세포 증식이 높은 경향을 보였다. 이는 고들빼기 물 추출물에서 100, 250, 500 μg/ml 농도에서 유의적인 증식능을 나타낸¹⁰⁾ 연구와 유사한 결과라 할 수 있다. 이 등¹¹⁾의 연구에서도 솔잎의 계통별 추출물 중 물 추출물을 첨가하여 배양한 경우 5~500 μg/ml의 모든 농도에서 비장세포 증식을 촉진하는 것으로 나타났으며 맨드라미 분획 추출물에 의한 비장세포 증식능 효과를 관찰한 결과 역시 물 층에서 대조군에 비해 가장 높은 증식을 보인 것으로 확인¹²⁾되었다. 따라서 50~500 μg/ml 농도의 생강 추출물은 비장 세포의 활성을 촉진시키거나 면역 반응을 증가시킬 수 있는 면역활성 물질이 있으리라 사료된다.

2) 생강 추출물이 마우스 복강 대식세포의 활성 능에 미치는 영향

대식세포는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 사이토카인을 분비하여 면역현상을 조절하며, 염

Table 1. Proliferation index of mice splenocyte cultured with *Zingiber officinale Roscoe* water or ethanol extracts in various concentration and mitogens

Conc. (μg/ml)	Proliferation index ¹⁾		Mitogen	
	Water	Ethanol	Con A	LPS
0	1 ^b	1 ^{ab}		
10	0.95 ± 0.15 ^{b2)}	0.71 ± 0.04 ^b		
50	1.22 ± 0.05 ^b	0.91 ± 0.06 ^{ab}		
100	1.13 ± 0.09 ^b	0.84 ± 0.09 ^{ab}	1.70 ± 0.60	1.33 ± 0.14
250	1.15 ± 0.05 ^{ab}	1.15 ± 0.11 ^{ab}		
500	2.00 ± 0.05 ^a	1.47 ± 0.03 ^a		
1000	1.43 ± 0.10 ^{ab}	1.06 ± 0.01 ^{ab}		

1) Proliferation index = mean of O.D. in test wells/mean of O.D. in control wells

2) Means with different letters (a, b) within a column significantly different from each other at α = 0.05 as determined by Duncan's multiple range test (a > b)

증반응과 조혈기구 등에도 관여하고 있다.¹³⁾ LPS (lipopolysaccharide)와 IFN- γ (interferon- γ) 등에 의해 활성화된 대식세포는 암세포에 대한 세포 독성작용을 나타내게 되는데, 활성화된 대식세포에 의해 분비된 사이토카인 (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), hydrogen peroxide (H₂O₂), nitric oxide (NO) 등이 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 물질로 제시되어 왔다.¹⁴⁾ 특히 IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ 는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 대표적인 사이토카인으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 본 실험에서는 선행연구^{10,16)}에서 실시한 세포독성이 나타나지 않는 농도 중 10 μ g/ml와 100 μ g/ml의 농도에서 사이토카인 분비량을 측정하였다.

(1) IL-1 β 분비량

복강 대식세포 배양액의 IL-1 β 생성량은 Table 2에 나타내었다. 추출물을 첨가하지 않은 대조군은 54.77 \pm 1.98 pg/ml의 IL-1 β 를 생성하였고, mitogen인 LPS (15 μ g/ml)를 첨가한 경우에는 116.16 \pm 4.13 pg/ml로 높은 IL-1 β 생성량을 보였다. 생강 추출물 첨가에 의한 결과를 살펴보면, 에탄올 추출물 첨가시 LPS를 첨가한 군에 비해 다소 낮은 양의 IL-1 β 가 분비되었으나, 물 추출물 100 μ g/ml를 첨가한 경우 134.67 \pm 2.00 pg/ml로 대조군에 비해 유의적으로 높은 생성량을 보였고 10 μ g/ml의 농도에서는 44.81 \pm 1.00 pg/ml로 유의적으로 감소하는 경향을 보였다. 윤 등¹⁷⁾은 한국산 겨우살이 추출물의 면역활성을 측정 한 결과 100 μ g/ml에서 IL-1 β 의 생성량이 가장 높았다

Table 2. IL-1 β production by mice peritoneal macrophages cultured with water or ethanol extract of *Zingiber officinale Roscoe*

Fraction	IL-1 β production (pg/ml)	
	10 μ g/ml	100 μ g/ml
Water	44.81 \pm 1.00 ^{d1)}	134.67 \pm 2.00 ^a
Ethanol	67.09 \pm 1.92 ^b	64.35 \pm 1.00 ^c
Control	54.77 \pm 1.98 ^c	54.77 \pm 1.98 ^d
LPS	116.16 \pm 4.13 ^a	116.16 \pm 4.13 ^b

1) Means with different letters (a, b) within a column significantly different from each other at $\alpha = 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test ($a > b > c > d$)

Table 3. IL-6 production by mice peritoneal macrophages cultured with water or ethanol extract of *Zingiber officinale Roscoe*

Fraction	IL-6 production (pg/ml)	
	10 μ g/ml	100 μ g/ml
Water	242.22 \pm 6.23 ^{b1)}	627.84 \pm 11.36 ^a
Ethanol	19.00 \pm 0.20 ^d	18.00 \pm 6.55 ^c
Control	66.32 \pm 7.14 ^c	66.32 \pm 7.14 ^b
LPS	612.62 \pm 13.33 ^a	612.62 \pm 13.33 ^a

1) Means with different letters (a, b) within a column significantly different from each other at $\alpha = 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test ($a > b > c > d$)

고 보고하였으며, 고들빼기나 톳 물 추출물의^{10,16)} 면역 활성 검색에서도 같은 농도 수준에서 면역활성이 나타났다.

본 실험 결과 생강의 물 추출물 100 μ g/ml에서 대조군에 비해 높은 생성량을 보여 생강 물 추출물의 첨가가 마우스 복강 대식세포 활성화에 영향을 줄 수 있는 가능성을 제시하였다.

(2) IL-6 분비량

복강 대식세포 배양액의 IL-6 생성량은 Table 3에 제시하였다. 추출물을 첨가하지 않은 대조군은 66.32 \pm 7.14 pg/ml의 IL-6를 생성하였고, mitogen인 LPS (15 mg/ml)를 첨가한 경우에는 612.62 \pm 13.33 pg/ml의 IL-6를 생성하여 대조군에 비해 대식세포에 의한 IL-6 분비능이 상승된 것으로 나타났다. 물 추출물의 경우 10 μ g/ml를 첨가했을 때 242.22 \pm 6.23 pg/ml로 대조군 보다 유의적으로 높은 IL-6 생성량을 보였고 100 μ g/ml의 농도로 추출물을 첨가한 경우에는 627.84 \pm 11.36 pg/ml의 높은 생성능을 보여 LPS에 의한 IL-6 생성과도 유의적 차이를 나타내지 않았다.

반면, 에탄올 추출물의 경우에는 10 μ g/ml와 100 μ g/ml의 농도에서 각각 19.00 \pm 0.20 pg/ml와 18.00 \pm 6.55 pg/ml로 대조군보다 낮은 IL-6 생성량을 보였다. 속단 에탄올 추출물의 IL-6 생성을 관찰한 실험에서도 1, 10, 100 μ g/ml의 농도에서 대조군과 유사하거나 오히려 낮은 생성을 나타내어 속단 에탄올 추출물에 의한 영향을 기대하기 어려웠고,¹⁸⁾ 솔잎 부탄올 추출물 첨가 역시 IL-6 생성 분비를 자극하지 못하는 것으로 나타났으며^{9,17)} 메밀¹⁰⁾의 에탄올 추출물 첨가 실험에서도 유사한 결과를 보였다.

본 실험 결과 물 추출물 10 μ g/ml와 100 μ g/ml 농도에서 대조군보다 높은 IL-6 생성량을 보였고 특히 100 μ g/ml의 농도에서는 B세포의 면역반응을 활성화시키는 mitogen인 LPS (15 μ g/ml)보다 높은 IL-6 생성량을 보여 생강 열수 추출물이 B세포 mitogen의 역할을 할 수 있거나, B세포 면역 반응을 활성화시킬 것으로 기대 된다.

(3) TNF- α 분비량

대식세포의 활성화의 지표로 세포 배양액의 TNF- α 함량을 측정하였으며 그 결과는 Table 4에 나타내었다. LPS (15 μ g/ml)를 첨가한 양의 대조군은 302.92 \pm 5.11 pg/ml의 분비능을 보였다. 에탄올 추출물의 경우 대조군에 비해 낮은 분비능을 보였으나, 물 추출물의 경우 10 μ g/ml와 100 μ g/ml의 농도에서 각각 160.12 \pm 4.40 pg/ml와 270.34 \pm 7.03 pg/ml로 대조군에 비해 높은 TNF- α 생성능을 보였다.

Table 4. TNF- α production by mice peritoneal macrophages cultured with water or ethanol extracts of *Zingiber officinale Roscoe*

Fraction	TNF- α production (pg/ml)	
	10 μ g/ml	100 μ g/ml
Water	160.12 \pm 4.40 ^{b1)}	270.34 \pm 7.03 ^b
Ethanol	107.71 \pm 2.11 ^d	131.14 \pm 0.45 ^d
Control	145.24 \pm 5.02 ^c	145.24 \pm 5.02 ^c
LPS	302.92 \pm 5.11 ^e	302.92 \pm 5.12 ^e

1) Means with different letters (a, b, c, d) within a column significantly different from each other at $\alpha = 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test (a > b > c > d)

뜻¹⁷⁾ 물 추출물의 연구에서도 10 μ g/ml와 100 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 유의적으로 높은 증가를 보였으며, 돌미나리¹⁰⁾의 실험에서도 100 pg/ml의 농도 유의적으로 높은 분비능을 나타내었다.

본 실험 결과 생강 물 추출물은 10 μ g/ml와 100 μ g/ml 농도에서 TNF- α 생성이 대조군에 비해 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 생강 물 추출물이 마우스 복강 대식세포의 TNF- α 분비를 촉진하는데 영향을 미치는 것으로 사료된다.

2. 생강 물 추출물의 경구투여가 마우스 면역기능에 미치는 영향
측정: Ex vivo 실험

In vitro 실험에서 생강 물 추출물이 비장세포 증식능과 복강 대식세포의 사이토카인 분비를 촉진하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 바탕으로 *ex vivo* 실험에서는 생강 물 추출물의 경구투여가 마우스 비장세포 증식능, 복강 대식세포에서 분비하는 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성량에 어떠한 영향을 미치는지 관찰함으로써 생체 내에서 생강 물 추출물의 면역활성효과를 검증하고자 하였다.

1) 생강 물 추출물의 경구투여가 마우스 비장세포 증식능

식이 섭취가 생체내 미치는 영향을 알아보기 위해 식이를 섭취한 실험 동물의 장기로부터 세포 증식능이나 체혈을 통한 효소활성능 등이 면역지표로서 사용되고 있다.¹⁸⁻²⁰⁾

본 실험에서는 생강 열수 추출물의 경구투여가 마우스 비장세포 증식능에 미치는 영향을 검색하기 위한 지표로 MTT assay를 이용하여 비장세포 증식능을 측정하였고, 이는 세포증식능 측정 도구로서 가장 적합한 ³H-thymidine uptake의 결과와 비교적 유사한 것으로 보고되고 있다.²¹⁻²⁵⁾ 그 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

생강 물 추출물을 4주 투여한 경우 50 mg/kg B.W./day 과 500 mg/kg B.W./day 투여군에서 1.52 \pm 0.68 and 2.40 \pm 0.71로 대조군에 비해 증식능 증가를 나타냈다. Mitogen에 대한 반응을 보면, 세포성 면역과 관련된 T세

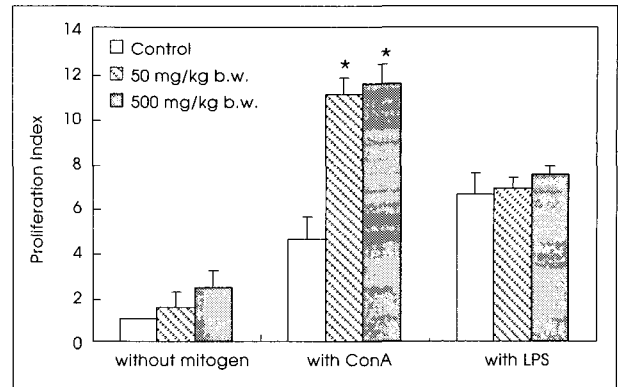


Fig. 2. Proliferation index of splenocyte of mice orally administered with different levels of *Zingiber officinale Roscoe* water extract for 4weeks. *: Significant difference from control at p < 0.05.

포를 선택적으로 증식시키는 mitogen인 Con A 첨가시 4주 간의 투여시에 50 mg/kg B.W./day와 500 mg/kg B.W./day 농도군에서 10.96 \pm 0.80 and 11.46 \pm 0.93으로 유의적으로 높은 증식능을 나타냈다. 체액성 면역과 관련이 있는 B세포를 선택적으로 증식시키는 mitogen인 LPS 첨가시 50 mg/kg B.W./day와 500 mg/kg B.W./day 투여군에서 대조군 보다 높은 증식능을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다

2) 생강 물 추출물의 경구투여와 사이토카인 분비

대식세포는 사이토카인을 분비하여 면역능을 조절하는데, 외부 항원에 대한 면역반응은 여러 면역세포의 상호작용에 달려있으며 이러한 세포간의 협력은 사이토카인이라는 단백질이 증재하므로 증재자의 생성과 분비는 중요한 의미를 가지게 된다.²⁶⁾ 사이토카인은 항원과 기타 외부에서 오는 여러 가지 자극에 대하여 한 개체의 세포와 조직들이 유기적으로 작용하도록 도와줄 뿐만 아니라 조절작용, 면역반응, 일반적 염증과정 등을 조절한다고 밝혀져 여러 가지 병리적인 현상과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려졌다.²⁷⁾ 영양과 관련하여 많이 보고된 IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ 는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 주요 사이토카인으로, 특히 여러 종류의 알러지 반응과 자가면역 질환의 발병과 진행에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{30,31)}

본 실험에서는 생강 물 추출물을 50 mg/kg B.W./day와 500 mg/kg B.W./day의 농도로 경구투여한 마우스로부터 복강 대식세포를 분리해 낸 다음 활성화된 대식세포가 생성해 낸 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 분비량을 측정하였고 각 군별 양의 대조군으로는 LPS (15 mg/ml)로 자극한 대식세포로부터 분비된 사이토카인을 측정함으로써 대식세포의 활성화에 대한 지표로 삼았다.

Table 5. IL-1 β production by activated peritoneal macrophages of mice orally administered with different levels of *Zingiber officinale Roscoe* water extracts for 4weeks

Conc. (mg/kg b.w.)	IL-1 β production (pg/ml)	
	without mitogen	LPS treated
0 (Control)	23.72 \pm 0.68 ^{a1)2)3)}	1500.35 \pm 5.60 ^c
50	65.00 \pm 0.83 ^b	1953.35 \pm 3.15 ^b
500	69.83 \pm 0.91 ^a	2351.88 \pm 4.71 ^a

- 1) Macrophages were incubated with or without (control) *Zingiber officinale Roscoe* water extracts for 48hrs
- 2) The cytokine concentrations were determined by triplicates cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D.
- 3) Means with different letters (a, b, c) are significantly different from each other at $\alpha = 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test (a > b > c)

(1) IL-1 β 생성량

활성화된 대식세포의 지표로 세포배양액의 IL-1 β 의 함량을 ELISA cytokine kit (Biosource, USA)를 이용하여 측정된 결과는 Table 5에 나타내었다. LPS로 처리하지 않은 경우 500 mg/kg B.W./day (69.83 \pm 0.91 pg/ml) 농도에서 유의적으로 높은 IL-1 β 생성량을 보였고 LPS 처리에 의한 영향도 같은 경향을 보였다. 이는 톳¹⁷⁾ 물 추출물의 4주 연구 결과와 일치하는 경향을 보였다. IL-1은 TH cell에 의한 IL-2, IL-4, IFN- γ 등의 생성을 유도시키고 B 림프구가 pre B 림프구로부터 성숙하는 단계와 항원자극에 의해 증식하는 단계에 직접 또는 TH cell을 경유하여 작용함으로써 이들의 분화 및 증식을 촉진시킨다.^{30,31)} 따라서 본 실험의 생강 추출물을 경구 투여한 마우스의 대식세포에서 IL-1 β 분비량이 대조군에 비해 유의적으로 증가되어 생강 추출물이 마우스의 복강 대식세포를 활성화하여 IL-1 β 생성을 촉진시킴으로서 면역증강효과가 있을 것으로 사료된다.

(2) IL-6 생성량

대식세포의 활성화에 대한 지표로 세포 배양액의 IL-6 생성량에 대한 결과는 Table 6에 나타내었다. 4주 투여군을 살펴보면 LPS로 처리하지 않은 경우 50 mg/kg B.W./day와 500 mg/kg B.W./day의 농도 모두에서 대조군보다 유의적으로 높은 생성량을 보였으며, LPS 첨가시에도 유의성은 보이지 않았으나 50 mg/kg B.W./day와 500 mg/kg B.W./day 농도군 모두 780.49 \pm 11.00 pg/ml, 797.14 \pm 9.11 pg/ml로 대조군 (680.52 \pm 6.10 pg/ml)에 비해 높은 IL-6 생성능을 보여, 돌미나리¹⁰⁾ 추출물 4주 경구 투여 실험의 500 mg/kg B.W./day 농도군에서 높은 생성량을 보인 결과와 유사하다. 속단 에탄올 추출물을 경구 투여하여 IL-6 분비량을 측정된 결과에서도 500 mg/kg B.W./day

Table 6. IL-6 production by activated peritoneal macrophages of mice orally administered with different levels of *Zingiber officinale Roscoe* water extracts for 4weeks

Conc. (mg/kg b.w.)	IL-6 production (pg/ml)	
	without mitogen	LPS treated
0 (Control)	152.49 \pm 4.10 ^{a1)}	680.52 \pm 6.10 ^b
50	182.20 \pm 6.90 ^b	780.49 \pm 11.00 ^a
500	251.01 \pm 3.55 ^a	797.14 \pm 9.11 ^a

- 1) Means with different letters (a, b, c) are significantly different from each other at $\alpha = 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test (a, b, c)

Table 7. TNF- α production by activated peritoneal macrophages of mice orally administered with different levels of *Zingiber officinale Roscoe* water extracts for 4weeks

Conc. (mg/kg b.w.)	TNF- α production (pg/ml)	
	without mitogen	LPS treated
0 (Control)	225.08 \pm 8.60 ^{a1)2)}	1951.92 \pm 9.35 ^c
50	206.15 \pm 4.50 ^b	2016.35 \pm 8.70 ^b
500	236.49 \pm 4.42 ^a	2359.68 \pm 6.10 ^a

- 1) The cytokine concentrations were determined by triplicates cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D.
- 2) Means with different letters (a, b, c) are significantly different from each other at $\alpha = 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test (a > b > c)

농도군에서 최고치를 보인 것으로 나타났다.²⁵⁾ 본 실험의 LPS 처리시 생강 물 추출물 500 mg/kg B.W./day 농도에서 가장 높은 IL-6 분비량 증가를 나타낸 이러한 결과는 *in vitro*에서 생강 물 추출물이 IL-6 생성을 증가시킨 것과도 같은 결과이다. 이는 생강 물 추출물이 마우스의 복강 대식세포를 활성화시켜 IL-6의 생성을 촉진시킴으로서 면역기능 증강에 효과적으로 작용할 수 있으리라 사료된다.

(3) TNF- α 생성량

생강 추출물을 경구 투여 하였을 때 복강 대식세포 배양액의 TNF- α 생성량은 Table 7에 나타내었다. LPS로 처리하지 않은 경우 50 mg/kg B.W./day (206.15 \pm 4.50 pg/ml)의 농도에서는 대조군 (225.08 \pm 8.60 pg/ml)보다 낮은 생성을 보였고 500 mg/kg B.W./day 농도에서는 236.49 \pm 4.42로 높은 생성능을 보였다. LPS 첨가시에는 50 mg/kg B.W./day와 500 mg/kg B.W./day의 농도군 모두에서 2016 \pm 8.70 pg/ml과 2359.68 \pm 6.10로 대조군 (1951.92 \pm 9.35 pg/ml)에 비해 유의적으로 높은 TNF- α 생성량을 나타냈다. 이는 *in vitro*에서 생강 물 추출물이 TNF- α 생성을 증가시킨 것과 같은 결과이다.

우황이 대식세포를 활성화시켜 TNF- α 분비에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 우황을 10 mg/kg/day 씩 단기와 장기로 나누어 매일 경구 주사한 결과 7일 투여

시 단독실험군은 TNF- α 의 유도가 낮았으나 (0.01 U/ml) LPS와 INF- γ 로 활성화시킨 대식세포의 TNF- α 분비량은 대조군 (6.69 U/ml)에 비해 크게 증가하였다.³²⁾ 본 실험 결과 생강 물 추출물을 경구 투여한 경우 500 mg/kg B.W./day 투여한 군에서 대조군보다 유의적으로 높은 수준의 TNF- α 가 분비되었다. 이는 생강 물 추출물의 면역 활성 성분이 복강 대식세포의 활성화에 작용하기 때문인 것으로 사료된다.

이상의 결과로 생강 물 추출물을 경구 투여한 마우스 복강 대식세포의 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성이 LPS 자극에 의해 유의적으로 높게 나타나 세가지 사이토카인의 상관관계²⁰⁾를 확인 할 수 있었다. 이는 생강 물 추출물이 사이토카인 분비량에 영향을 미치는 것을 의미한다.

요약 및 결론

생강의 물 추출물 및 에탄올 추출물에 대한 *in vitro* 실험으로 비장세포 증식능을 검색한 결과, 물 추출물과 에탄올 추출물 모두에서 50~500 μ l/ml의 농도를 첨가했을 때 비장세포 증식능을 촉진하는 효과가 있는 것으로 나타났고, 특히 500 μ l/ml 가장 높은 증식능을 보였고, 10 μ l/ml 이하의 저농도와 1000 μ l/ml 이상의 고농도 첨가시 세포증식이 억제되는 것으로 확인되었다. 복강세포내의 사이토카인 분비량을 측정한 결과, 물 추출물에서 높은 생성능을 나타내었으며, 각 시료 추출물의 농도 500 μ l/ml 첨가가 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α 의 분비를 촉진시키는 것으로 확인되었다. *In vitro* 실험을 근거로 실시된 *ex vivo* 실험은 다음과 같다.

4주간 격일로 50 mg/kg B.W./day와 500 mg/kg B.W./day의 농도로 생강 추출물을 마우스에게 직접 경구 투여한 후 비장세포 증식능과 활성 복강 대식세포에서 분비하는 사이토카인 분비능을 측정하였다. 그 결과 생강 추출물은 50 mg/kg B.W./day과 500 mg/kg B.W./day 모두에서 비장세포 증식을 촉진하는 것으로 보였으며, 500 mg/kg B.W./day에서 비장세포의 최대 증식능을 보였다. 활성화된 복강 대식세포에 의한 사이토카인 분비량을 측정한 결과 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α 모두 50 mg/kg B.W./day과 500 mg/kg B.W./day 농도에서 증가하는 경향을 보였다.

이상의 결과에 의하면, 생강 물 추출물 및 에탄올 추출물은 비장세포 증식능과 복강 대식세포에 의한 사이토카인 분비능을 상승시킴으로써 면역 기관의 주요 기능을 증진시키는 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Pyo MY, Hyun SM. Effects of *Phellinus linteus* Extracts on the Humoral Immune Response in Normal and Cyclophosphamide-treated Mice. *The Journal of Applied Phamcology* 9: 194-200, 2001
- 2) Park JS, Chyun JH. Effects of Low Fat Diet and Saturated Fat Supplementation on the Immune Status of BALB/c Mouse. *Korean J Nutrition* 26(5) : 578-585, 1993
- 3) Wagner H. Search for plant derived natural products with immunostimulatory activity. *Pure & Appl Chem* 66(7) : 1271, 1990
- 4) Beak SE. Antioxidant Activity of crude Gingerol. *J Korea SOC Food Sci Nutr* 9(1) : 33-34, 1993
- 5) Connell DW. The chemistry of the essential oil and oleoresin of ginger. *Flavour Industry* 1: 677, 1970
- 6) Ashmore CR, Lee YB, Kim YS. Antioxidant to meat products. *J of Food Science* 51(1) : 20-30, 1986
- 7) Zakari-Rungkat, Nurahman, E Prangdimurt and Tejasari, Antioxidant and Immnoenhancement Activities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Extracts and Compounds in *In Vitro* and *In Vivo* Mouse and Human System. *Nutraceuticals & Food* 8: 96-104, 2003
- 8) Mishell BB, Shigi SM. Selected methods in cellular immunology. 1st ed. San Francisco. WH Freeman and Co. 4, 1980
- 9) Choi SE. Effect of needle extracts on mouse splenocyte proliferation and cytokine production by activated mouse peritoneal macrophage. Master's thesis. Sookmyung Women's university, 2000
- 10) Park HA. Enhancing effect of *Ixeris sonchifolia* Hance *Oenanthe javanica*, and *Fagopyrum escluentum* Moench on Mouse Im-mune Cell Activation. Master's thesis. Sookmyung Women's University, 2003
- 11) Lee JH. Effect of pine needle extracts and powder on modulation of immunocompetence in mice and human subjects. Ph.D. Dissertation Sookmyung Women's University, 2001
- 12) Lee YK. A study of immunomodulating effects and Production of nitric oxide by *C. cristata* L. extracts in mice. Master's Thesis. Sookmyung Women's University, 2001
- 13) Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology 4th ed., *Mosby*, 1996
- 14) Hibbs JB, Nathan CF. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3: 65, 1991
- 15) Munoz C, Schlesinger L, Cavallon JM. Interaction between cytokine, nutrition and infection. *Nurt Res* 15: 1815, 1995
- 16) Jung YH. Effect of *Hizikia fusiforme* water extracts on mouse immune cell activation. Master's thesis. Sookmyung Women's University, 2003
- 17) Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB. Immunological Activities of Korean Mistletoe Extract. *Korean J Immunol* 19: 571-581, 1997
- 18) Kim SH. Effect of *Phlomis umbrosa Turcz* ethanol extract on mouse splenocyte proleferation and cytokine production by activated peritoneal, pp.59-60, 2000
- 19) Kim J. Enhancing effect of *Paeonia japonica*, *Houttuynia cordata*,

- and Aster scaber extracts on the immunoreactivity *in vivo* in mice. Ph.D. Dissertation Sookmyung Women's University, 2003
- 20) Lee YS. Effect of bark Extract on Modulation of Immunocompetence and Irradiation-induced Inflammation Response in Mice. Ph.D. Dissertation Sookmyung Women's University, 2003
- 21) Toshiaki M, Takahiko O, Eri M, Gisho H. Inhibitory Effect of *Perilla frutescens* and its Phenolic Constituents on Cultured Murine Mesangial Cell Proliferation. *Planta Medica* 64: 541, 1998
- 22) Park JG. Natural Killer Activity of peripheral blood Lymphocytes from Normal Volunteers and Cancer Patients. *Korean J of Immunology* 9: 1, 1987
- 23) Yoo YS, Tejune JM, Hahn CS. Interleukin-2 Comparison Study ³H-thymidine Incorporation Assay and MTT Assay in the Measurement of IL-2 Activity. *Korean J of Immunology* 11: 39, 1989
- 24) Starkbaum G. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Science & Medicine March April* 3: 6-15, 1998
- 25) Reubel GH, Bauerfrind R. On the suitability of the MTT assay for evaluation of mitogenic lymphocyte blastogenesis in swine. *Zentralbl Veterinarmed B* 36: 35, 1989
- 26) Matthias W Wichmann. Alfred Ayala and Irshad H. Chaudry, Male sex steroid are responsible for depressing macrophage immune function after trauma-hemorrhage. *The American Physiological Society* 27: C1335-C1340, 1997
- 27) Starkbaum G. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Science & Medicine March April* 3: 6-15, 1998
- 28) Minossec P. Cytokine-induced autoimmune disorders. *Drug Saf* 17: 93-104, 1997
- 29) Meydani SN. Dietary modulation of cytokine production and biologic functions. *Nut Rev* 48: 361, 1990
- 30) Arai S. Studies on Function Foods in Japan-state of Art. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 9-15, 1996
- 31) Thomson AW. The cytokine handbook. Academic press, 1991
- 32) Son EW, Park JH, Kim KR, Kim BO. Effects of the Administration of Bezoar Bovis on Immune Responses of Mice. *Kor J Pharmacogn* 29: 48, 1998