

생강 분획에 따른 추출물이 마우스의 비장세포와 Cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 생성량에 미치는 영향

†류 혜 숙

상지대학교 보건과학대학 식품영양학과

Effect of *Zingiber officinale* Roscoe Fractionation of Extracts on Mouse Spleen and Macrophage Cells Activation

†Hye-Sook Ryu

Dept. of Food and Nutrition, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract

Ginger(*Zingiber officinale* Roscoe) has long been used as a food source in Koera, and it is widely used as a dietary condiment throughout the world. The present study focused on the immunomodulative effects of ginger extracts via *in vitro* experiments. To indentify the immune-activating fractions of the plant, we performed the systematic fractionation of ginger with methanol, hexane, chloroform, butanol and water for separation and refining. The results showed that the chloroform fraction had the highest immune cell activating properties. In conclusion, this study suggests that ginger extracts may enhance immune function by regulating the splenocyte proliferation as well as the cytokine production capacity of activated macrophages.

Key words: chloroform fraction, immunomodulative, splenocyte proliferation, IL-1 β , IL-6, TNF- α .

서 론

식품 중에 존재하는 성분들의 단순한 영양소 역할 외에 기능성 물질로서의 역할에 대한 관심이 높아지고 있다¹⁻²⁾. 특히 천연 식물 자원을 대상으로 노화 방지, 성인병 예방, 면역증강 효과 등에 대한 연구가 항체 생성 및 항산화 효과와 같은 각종 생리 활성을 나타내는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다³⁾. 생강은 아열대 및 열대성 다년생 식물로서 근경을 주로 식용하며, 그 특유한 향기와 매운맛으로 인하여 오랫동안 향신료로서 사용되어지고 있다. 생강의 주요 성분으로는 hydrocarbon류, ketone류, alcohol류 등의 중류 성분과⁴⁻⁵⁾ zingiberene, α -cadinene 등의 향기 성분 등이 있으며, 특히 정유 성분 중 생강의 매운맛의 주성분인 6-gingerol은 항산화 및 항염증의 특성을 가진 것으로 알려져 있다⁶⁻⁷⁾. 또 생강의 생리활성 성분이 항균 작용⁸⁾, 항염 작용⁹⁻¹⁰⁾, 혈청 콜레스테

롤 저하 효과¹¹⁾, 항산화 작용¹²⁾을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 최근 한 연구에서는 생강을 첨가한 된장을 투여한 쥐의 Sarcoma-180 종양세포에서 항암 효과를 나타낸 것으로 보고한 바 있다¹³⁾. 또한 약리 작용도 갖고 있어 한방에서 건위제 및 발한제로 사용되고 있다¹⁴⁾. 생강의 면역과 관련된 연구로는 생강의 올레오레진(oleoresin), 진저롤(gingerol), 쇼가올(shogaol) 분획이 자연 살해 세포 기능을 활성화시켜 면역증진에 효과가 있는 것으로 보고하였다^{15,16)}. 따라서 본 연구에서는 면역 증진능을 갖는 천연 식물 소재로서 생강의 분획별 면역 증강 효과를 조사하고자 면역 활성 지표로 마우스의 비장 세포 증식능과 활성 복강 대식 세포에서 분비되는 cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성량의 변화를 측정하여 면역 활성이 높은 생강 추출물의 분획별 활성을 규명하여 아울러 새로운 천연 식품의 기능성 식품 개발의 가능성과 이 연구를 바탕으로 보다 더 쉽게 생강 추출물로부터 면역 활성을 가진

† Corresponding author: Hye-Sook Ryu, Dept. of Food and Nutrition, Sangji University, Wonju 220-702, Korea.
Tel: +82-33-738-7641, Fax: +82-33-730-0186, E-mail: rhs7420@hanmail.net

단일 물질 분리의 가능성을 제시하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

1. 생강의 추출 및 분획

동결 건조된 생강(700 g)을 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 메탄올로 환류 냉각시키면서 80°C 수욕상에서 3시간씩 3회 반복 추출한 후 감압 농축하여 메탄올 추출물(69 g)을 얻었다. 메탄올 추출물을 증류수에 현탁한 후 헥산, 클로로포름, 부탄올 순으로 추출하여 여과 감압 농축하여 헥산 분획물(3.7 g), 클로로포름 분획물(20 g), 부탄올 분획물(3.1 g)을 각각 얻었다. 남은 수층은 감압 농축하여 최종 수층(35 g)을 얻었다.

2. 생강 클로로포름 분획으로부터 활성 분획 정제

클로로포름 분획 20 g을 Fig. 2에서와 같이 클로로포름으로 녹여 silica gel column(SiO₂, 7734, 4.7×40 cm)에 걸고 클로로포름과 메탄올을 이용하여 단계적(클로로포름:메탄올=20:1 → 3:1)으로 극성을 높여가며 column chromatography를 실시하고 TLC로 확인하면서 4개의 소 분획[ZOA(15 g), ZOB(2 g), ZOC(1 g), ZOD(2 g)]을 얻었다. ZOB를 silica gel column(SiO₂, 7734, 3×30 cm)에 걸고 클로로포름과 메탄올 용매로 극성을 높여가며(클로로포름:메탄올=15:1→8:1)으로 극성을 높여가

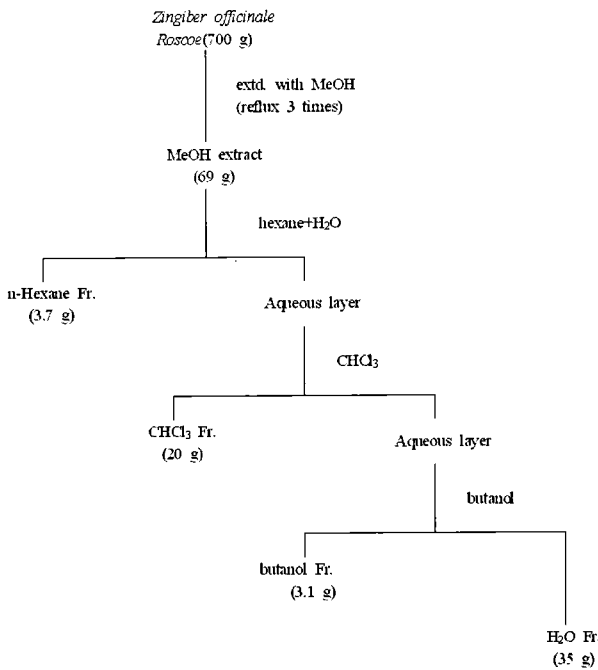


Fig. 1. Solvent fractionations of MeOH extract from *Zingiber officinale* Roscoe.

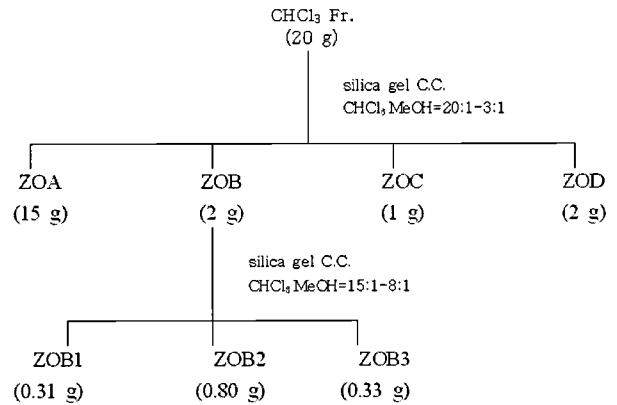


Fig. 2. Purification of immunomodulator from chloroform fraction of *Zingiber officinale* Roscoe samples.

며 소 분획 ZOB1(0.31 g), ZOB2(0.80 g), ZOB3(0.33 g)을 얻었다.

3. 분석시약

Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(70-230 mesh, Merck Art. 7734)를 사용하였고, thin layer chromatography(이하 TLC)용 precoated plate는 Kiesel gel 60 F₂₅₄(0.25 mm, 20×20 cm, Merck Art. 5715)를 사용하였으며, TLC spot의 발색은 254 nm와 365 nm UV lamp, 10% H₂SO₄ ethanolic solution 및 iodine(I₂) 증기를 사용하였다. 용매는 1급 시약(EP)을 사용하였고, NMR 용매로 사용된 CDCl₃는 Cambridge Isotope Laboratories사의 제품을 사용하였다.

4. 실험동물 및 사육조건

본 연구에 사용된 동물은 7~8주령 된 암컷 Balb/c mouse를 (주)대한실험동물센터로부터 분양받아 고형 사료와 물을 자유로이 공급하면서 7~8일 정도 실험 동물실에서 적응시킨 후 체중이 15 g 내외인 마우스를 실험에 사용하였다. 실험 동물실 온도는 22±2°C, 습도는 40~60%로 유지하였고, 명암 주기(light and dark cycle)는 12시간 단위로 조절하였다.

5. 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.

6. 생강 추출물이 시험관내에서 비장세포 증식능에 미치는 영향

생강 추출물은 10%의 불활성화 된 FBS를 함유한 RPMI 1640 용액으로 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 조제하고, 비장세포가 5.0×10^6 cell/ml의 농도로 90 μl 씩 분주된 96-well plate에 10 μl 씩 가하여 최종농도가 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 하였다. 또한, 미토젠으로 Con A(5 $\mu\text{g/ml}$), LPS(15 $\mu\text{g/ml}$)를 첨가하고 대조군에는 배지를 동량 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator (Sanyo, St. Louis, MO, USA)에서 44시간 배양 후 MTT(5 mg/ml PBS)를 10 μl 가하고, 알루미늄 호일로 밀폐하여 4시간 동안 다시 배양하여 formazan crystal 형성을 유도하였다. 배양이 끝난 후 plate를 4°C, 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 각 well에 150 μl 의 DMSO를 가하여 10분간 방치한 후 ELISA reader를 이용하여 30초간 shaking하고 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 마우스 비장세포의 증식 능은 다음의 공식에 의해 계산되었다.

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

7. 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 분비능 측정

생강 분획 추출물을 경구 투여한 마우스의 복강내 대식세포를 추출하여 배양시킨 다음 배양 상층액으로부터 분비되는 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 분비량을 각각 측정하였다. 비부착성 세포를 제거하고 부착성 세포만을 얻은 후, 10%-FBS RPMI 1640 900 μl 와 대식세포를 활성화시키는 mitogen인 LPS와 배지를 100 μl 가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 배양 상층액을 분리하여 배양액에 축적된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 양을 ELISA 사이토카인 kit (Biosource International, INC, NY, USA)를 이용하여 측정하였다.

8. 통계분석

모든 실험 결과의 자료는 Statistic Analysis System(SAS, ver. 8.2)¹⁷⁾ 통계 프로그램을 이용하여 평균 및 표준편차를 구하였다. 각 군간의 평균치의 차이는 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA) 및 Duncan's multiple range test를 사용하여 $\alpha=0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 생강 용매분획물이 마우스 비장세포 활성화에 미치는 영향

생강의 면역 활성화 물질을 분리할 목적으로 메탄올(methanol) 추출물, 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 부탄올(bu-

tanol), 물(water) 순으로 점차 극성을 높여서 분획하여⁷⁾ 면역 활성을 검색한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 생강의 메탄올 분획 추출물은 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 높은 면역 활성을 나타냈으며 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 점차 떨어지는 경향을 보였고, 헥산 분획 추출물의 경우 10 $\mu\text{g/ml}$ 와 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 높았으며, 클로로포름 분획의 경우 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 증가하다가 고농도에서는 감소하는 경향을 보였으며, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장 높은 활성을 보였다. 부탄올 분획물의 경우 저 농도인 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 증식능이 좋았으며, 고농도(500 $\mu\text{g/ml}$)에서 감소하는 결과를 나타내었다. 물 추출물의 경우 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 높은 활성이 나타났으며, 10 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도와 1000 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 활성이 저해되는 효과를 보였다. 이는 생강 물 추출물을 첨가하여 배양한 경우 농도 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 1.22 ± 0.55 , 1.13 ± 0.09 , 1.15 ± 0.05 , 2.00 ± 0.05 , 1.43 ± 0.10 로, 에탄올 추출물을 첨가하여 배양한 경우 농도 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 1.15 ± 0.11 , 1.47 ± 0.03 , 1.06 ± 0.01 로 비장세포 증식이 높은 경향을 보인 선행 연구 결과와도 유사한 경향을 보였다.¹⁸⁾

2. 생강 클로로포름 용매분획이 마우스 비장세포 활성화에 미치는 영향

계통 분획 결과를 근거로 클로로포름 분획물로부터 면역 활성화 물질을 추적하는 실험을 진행한 결과는 Table 1에 나타

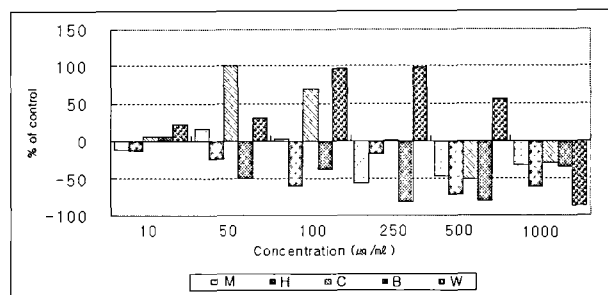


Fig. 3. Proliferations of mouse splenocytes cultured with different fractions and various levels of *Zingiber officinale* Roscoe extracts.

Proliferation(%)=(mean of O.D. in test wells/mean of O.D. in control well-1)×100.

Spleen cells(5×10^6 cells/ml) were cultured with fraction of the extract on 96-well flat bottomed plates for 48hrs. After cultured, the degree of impocyte proliferation was measured by MTT assay. The data present the mean values \pm S.D. of three experiments.

M: Methanol, H: Hexane, C: Chloroform, B: Butanol, W: Water.

내었다. 클로로포름 분획물을 칼럼으로 분리하여 4개의 면역 활성 분획(fraction)을 얻었다. 4가지 분획의 비장 증식능을 살펴보면 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 ZOB 분획(1.35 \pm 0.01, 1.25 \pm 0.08)에서 각각 높은 활성을 보였다. ZOB 분획을 클로로포름과 메탄올 용매로 극성을 높여가며(클로로포름:메탄올=15:1 \rightarrow 8:1) 분리하여 소분획 ZOB1, ZOB2, ZOB3 분획을 얻었다. 이들 분획의 비장 증식능은 Table 2에 나타낸 것처럼 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 1.19 \pm 0.10, 1.23 \pm 0.60으로서 ZOB3 분획이 가장 높은 활성을 나타냈다.

3. 생강 용매분획의 마우스 복강대식세포 사이토카인 활성에 미치는 영향

대식세포는 세균이나 이물질을 탐식 제거하는 과정에서 여러 가지 사이토카인을 분비하여 면역 활성을 조절한다¹⁹⁾. IL-1과 IL-6, TNF- α 는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 염증성 사이토카인으로, 초기 면역반응에서 염증을 유발시켜 면역 기능을 하는 반면, 지나치게 분비될 경우 병리학적인 패혈증 등의 지표로 이용되기도 한다. 또한 Interferon(IFN) 대식세포는 lipopolysaccharide(LPS) 등의 면역 조절 물질에 의해 활성화되어 TNF- α , IL-1, nitrite(NO) 등 암세포에 독성이 있는 여러 가지 물질을 분비하기도 한다^{20~21)}.

1) IL-1 β 분비량

대식세포의 활성화에 대한 지표로 세포 배양액에 축적된 IL-1 β 의 함량을 ELISA 사이토카인 kit를 이용하여 측정할 결과는 Table 3에 나타내었다. 활성화된 대식세포에서 첫 번

Table 1. Proliferation of mice splenocytes treated with column fractions of chloroform layer of *Zingiber officinale* Roscoe extracts or mitogens

Fraction ³⁾	Proliferation index ¹⁾	
	10($\mu\text{g}/\text{ml}$)	100($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Control	1 ^{a)}	1 ^{ab)}
LPS	1.05 \pm 1.01 ^{a)}	1.05 \pm 1.01 ^{a)}
ConA	1.15 \pm 0.08 ^{a)}	1.15 \pm 0.08 ^{a)}
ZOA	1.24 \pm 0.21 ^{a2)}	1.00 \pm 0.03 ^{ab)}
ZOB	1.35 \pm 0.01 ^{a)}	1.25 \pm 0.08 ^{a)}
ZOC	1.18 \pm 0.07 ^{a)}	0.26 \pm 0.21 ^{b)}
ZOD	1.01 \pm 0.06 ^{a)}	0.89 \pm 0.14 ^{ab)}

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

²⁾ Values are mean \pm S.D. of triplicates,

³⁾ ZOA. B. C. D: A, B, C, D fraction of *Zingiber officinale* Roscoe extracts.

Table 2. Proliferation of mice splenocytes treated with column fractions of chloroform *Zingiber officinale* Roscoe extracts or mitogens

Fraction ³⁾	Proliferation index ¹⁾	
	10($\mu\text{g}/\text{ml}$)	100($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Control	1 ^{de)}	1 ^{b)}
LPS	1.02 \pm 0.09 ^{bc)}	1.02 \pm 0.09 ^{b)}
ConA	0.93 \pm 0.08 ^{d)}	0.93 \pm 0.08 ^{b)}
ZOB1	1.07 \pm 0.08 ^{bc2)}	0.99 \pm 0.01 ^{b)}
ZOB2	1.25 \pm 0.10 ^{a)}	0.99 \pm 0.16 ^{b)}
ZOB3	1.19 \pm 0.10 ^{ab)}	1.23 \pm 0.06 ^{a)}

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

²⁾ Values are mean \pm S.D. of triplicates,

³⁾ ZOA. B. C. D: A, B, C, D fraction of *Zingiber officinale* Roscoe extracts.

째로 분비되는 대표적인 사이토카인인 IL-1 β 의 경우, 농도에 따라 다소 차이를 보이긴 했으나 모든 생강 용매 분획의 처리에 의해 대조군(220.84 \pm 2.50 pg/ml)에 비해 높은 양이 분비되었다. 농도별 활성을 살펴보면 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시 물층(329.96 \pm 2.50 pg/ml)과 클로로포름(257.86 \pm 3.40 pg/ml) 분획에서 많은 양의 IL-1 β 를 분비하였다. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 헥산(320.34 \pm 0.60 pg/ml), 클로로포름(300.23 \pm 2.81 pg/ml), 부탄올(535.35 \pm 3.42 pg/ml), 물층(285.79 \pm 2.98 pg/ml)과 같이 메탄올 분획을 제외한 모든 분획에서 대조군(220.84 \pm 2.50 pg/ml)에 비해 유의적으로 높았고, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 물층(435 \pm 0.98 pg/ml), 헥산(324 \pm 5.23 pg/ml), 클로로포름(316.32 \pm 0.35 pg/ml)순으로 대조군에 비해 높은 수준의 IL-1 β 를 분비하였다. 이상의 생강 분획 추출물의 IL-1 β 분비능을 본 결과에서 물층과 클로로포름 분획에서 높은 분비능을 보였고, 농도별 결과에서는 10, 50과 100의 농도에서 대부분의 분획에서 높은 분비량을 보였으나, 특히 50과 100의 농도에서 더 높은 분비능을 보였다. 이러한 분획별 면역 활성 결과를 근거로 IL-1 β 분비량이 높은 클로로포름 분획을 칼럼을 이용하여 활성 분획을 추적한 결과는 Table 4에 나타내었다. Silica gel column(SiO₂, 7734, 4.7 \times 40 cm)에 걸고 클로로포름과 메탄올을 이용하여 단계적(클로로포름:메탄올= 20:1 \rightarrow 3:1)으로 극성을 높여가며 column chromatography를 실시하고 TLC로 확인하면서 4개의 소분획을 얻었다. ZOA, ZOB, ZOC, ZOD 네가지 칼럼(column) 분획의 활성을 살펴보면, 대조군(222.84 \pm 0.07 pg/ml)에 비해 농도 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ZOB, ZOC, ZOD 분획처리에 의해 각각 880.76 \pm 0.03 pg/ml, 782.67 \pm 0.09 pg/ml, 881.39 \pm 4.89 pg/ml로 유의적으로 높은 면역활성을 보였으며, 그 중

Table 3. IL-1 β production by activated mice peritoneal macrophages treated with solvent fractions of the *Zingiber officinale* Roscoe extracts or mitogens

Fractions	IL-1 β production(pg/ml) ¹⁾		
	10(μ g/ml)	50(μ g/ml)	100(μ g/ml)
Control	220.84 \pm 2.50 ^{b)}	220.84 \pm 2.50 ^{c)}	220.84 \pm 2.50 ^{c)}
LPS	501.43 \pm 4.30 ^{a)}	501.43 \pm 4.30 ^{b)}	501.43 \pm 4.30 ^{a)}
Methanol	186.42 \pm 0.50 ^{e2)3)}	203.95 \pm 0.40 ^{e)}	273.45 \pm 4.42 ^{e)}
Hexane	235.78 \pm 2.07 ^{d)}	320.34 \pm 0.60 ^{d)}	324.76 \pm 5.23 ^{c)}
Chloroform	257.86 \pm 3.40 ^{c)}	300.23 \pm 2.81 ^{e)}	316.32 \pm 0.35 ^{dd)}
Buthanol	171.48 \pm 3.80 ^{f)}	535.85 \pm 3.42 ^{a)}	73.39 \pm 2.78 ^{f)}
Water	329.96 \pm 2.50 ^{b)}	285.79 \pm 2.98 ^{f)}	435.83 \pm 0.98 ^{b)}

¹⁾ Macrophages were incubated with or without *Zingiber officinale* Roscoe extracts for 48h,

²⁾ The cytokine concentrations were determined by duplicate cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D.,

³⁾ Mean with different letters are significantly different from each other $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

Table 4. IL-1 β production by activated mice peritoneal macrophages cultured on the second chloroform fractions of the *Zingiber officinale* Roscoe extracts

Fractions	IL-1 β production(pg/ml) ¹⁾	
	10(μ g/ml)	100(μ g/ml)
Control	20.84 \pm 0.07 ^{d)}	20.84 \pm 0.07 ^{e)}
LPS	501.43 \pm 0.02 ^{c)}	501.43 \pm 0.02 ^{a)}
ZOA ⁴⁾	179.92 \pm 8.67 ^{e2)3)}	129.91 \pm 3.12 ^{f)}
ZOB	880.76 \pm 0.03 ^{a)}	189.66 \pm 0.56 ^{d)}
ZOC	782.67 \pm 0.09 ^{b)}	280.59 \pm 10.12 ^{b)}
ZOD	881.39 \pm 4.89 ^{a)}	140.23 \pm 1.12 ^{e)}

¹⁾ Macrophages were incubated with or without *Zingiber officinale* Roscoe extracts for 48h,

²⁾ The cytokine concentrations were determined by duplicate cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D.,

³⁾ Mean with different letters are significantly different from each other $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test,

⁴⁾ ZOA. B. C. D: A, B, C, D fraction of *Zingiber officinale* Roscoe extracts.

ZOB에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 클로로포름과 메탄올 용매로 극성을 높여가며(클로로포름:메탄올=15:1 \rightarrow 8:1) 소분획 ZOB1, ZOB2, ZOB3을 얻었으며 이들에 대한 활성 검색 결과는 Table 5에 나타내었다. 10 μ g/ml 농도에서는 대조군(220.84 \pm 0.04 pg/ml)과 비교하여 ZOB1(254.61 \pm 5.76pg/ml), ZOB3(255.65 \pm 0.76 pg/ml)에 높은 면역 활성을 나타내었다.

2) IL-6 분비량

대식세포의 활성화에 대한 지표로 세포 배양액의 IL-6 함량을 측정된 결과는 Table 6과 같다. IL-6 분비량의 변화는

Table 5. IL-1 β production by activated mice peritoneal macrophages cultured on the third chloroform fractions of the *Zingiber officinale* Roscoe extracts

Fractions	IL-1 β production(pg/ml) ¹⁾	
	10(μ g/ml)	100(μ g/ml)
Control	220.84 \pm 0.04 ^{c)}	220.84 \pm 0.04 ^{b)}
LPS	301.43 \pm 0.67 ^{a)}	301.43 \pm 0.67 ^{a)}
ZOB1 ⁴⁾	254.61 \pm 5.76 ^{b2)3)}	116.27 \pm 0.01 ^{e)}
ZOB2	203.31 \pm 7.42 ^{d)}	149.39 \pm 0.09 ^{d)}
ZOB3	255.65 \pm 0.76 ^{b)}	150.44 \pm 0.00 ^{e)}

¹⁾ Macrophages were incubated with or without *Zingiber officinale* Roscoe extracts for 48h,

²⁾ The cytokine concentrations were determined by duplicate cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D.,

³⁾ Mean with different letters are significantly different from each other $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test,

⁴⁾ ZOA. B. C. D: A,B,C,D fraction of *Zingiber officinale* Roscoe extracts.

LPS를 첨가한 양의 대조군(positive control)은 228.42 \pm 2.01 pg/ml, 음의 대조군(control)에서는 132.09 \pm 1.34 pg/ml이었다. 물(137.13 \pm 0.67, 159.79 \pm 5.31, 217.51 \pm 1.56)과 클로로포름 분획(167.93 \pm 2.12 pg/ml, 147.75 \pm 0.87 pg/ml, 130.05 \pm 0.65 pg/ml)의 10, 50, 100 μ g/ml 농도 모두에서 대조군(132.09 \pm 1.34 pg/ml)에 비해 높은 IL-6 분비량을 보였다. 이는 백작약 추출물²²⁾에 의한 IL-6 분비량 변화 연구에서 클로로포름 층의 10, 100 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 유의적으로 많은 양이 분비된 결과와도 유사한 경향을 보였다. 술잎의 분획물 추출물의 IL-6 분비량 측정 결과에서도 100 μ g/ml 첨가시 클로로포름, 메탄올, 부탄올, 헥산층에서 대조군(26.39 \pm 3.03 pg/ml)에 비해 유

Table 6. IL-6 production by activated mice peritoneal macrophages cultured with different fractions of the *Zingiber officinale* Roscoe extracts or mitogens

Fractions	IL-6 production(pg/ml) ¹⁾		
	10(μ g/ml)	50(μ g/ml)	100(μ g/ml)
Control	132.09 \pm 1.34 ^{d)}	132.09 \pm 1.34 ^{e)}	132.09 \pm 1.34 ^{e)}
LPS	228.42 \pm 2.01 ^{d)}	228.42 \pm 2.01 ^{d)}	228.42 \pm 2.01 ^{e)}
Methanol	122.61 \pm 0.87 ^{e2)3)}	126.51 \pm 3.23 ^e	141.73 \pm 3.45 ^b
Hexane	125.44 \pm 0.77 ^c	175.01 \pm 2.49 ^a	142.08 \pm 0.78 ^b
Chloroform	167.93 \pm 2.12 ^a	147.75 \pm 0.87 ^c	130.05 \pm 0.65 ^c
Buthanol	161.56 \pm 5.61 ^{lb}	176.78 \pm 0.89 ^a	66.67 \pm 0.47 ^d
Water	137.13 \pm 0.67 ^c	159.79 \pm 5.31 ^b	217.51 \pm 1.56 ^a

¹⁾ Macrophages were incubated with or without *Zingiber officinale* Roscoe extracts for 48h,

²⁾ The cytokine concentrations were determined by duplicate cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D.,

³⁾ Mean with different letters are significantly different from each other $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

의적으로 높은 분비량을 보였고, 특히 클로로포름 층에서 가장 높은 분비량(1147.82 \pm 15.66 pg/ml)을 보였다²³⁾. 본 연구 결과 대식세포 배양시 생강 추출물을 10, 50, 100 μ g/ml 농도로 첨가하였을 때 물층과 클로로포름 분획물에서 배양액의 IL-6 분비량이 두드러지게 증가되었으며, 따라서 이 두 분획층에 마우스 복강 대식세포의 활성을 촉진시켜 IL-6 분비량을 자극하는 면역 조절 인자가 존재하는 것으로 사료된다. 이러한 분획 활성의 결과를 근거로 면역 활성이 높게 나타난 클로로포름을 칼럼을 이용한 활성 분획(fraction) 분석한 결과, Silica gel column 이용하여 단계적(클로로포름:메탄올=20:1 \rightarrow 3:1)으로 극성을 높여가며 column chromatography를 실시하고 TLC로 확인하면서 4개의 소분획을 얻었다. ZOA, ZOB, ZOC, ZOD 네 가지 분리물질의 활성은 Table 7, 8에 나타내었다. 10 μ g/ml의 농도에서 대조군(182.09 \pm 1.55 pg/ml)에 비해 ZOA, ZOB, ZOC, ZOD 네 가지 분획 모두(888.07 \pm 0.07 pg/ml, 897.67 \pm 0.01 pg/ml, 849.48 \pm 0.22 pg/ml, 798.98 \pm 2.56 pg/ml)에서 각각 유의적으로 높은 활성을 보였다. 가장 높은 활성을 보인 ZOB 분획을 분리가 가장 용이한 클로로포름:메탄올=15:1 \rightarrow 8:1 비율로 극성을 높여가며 분리한 결과 ZOB1, ZOB2, ZOB3 세 가지의 소분획이 얻어졌다. 분리된 분획물의 활성을 살펴보면 10과 100의 농도 모두에서 대조군(182.09 \pm 1.55 pg/ml)에 비해 높은 활성을 보였다.

3) TNF- α 분비량

대식세포의 활성화에 대한 지표로 세포 배양액의 TNF- α 의 함량을 측정하였으며, 그 결과는 Table 9에 나타내었다. 양의 대조군(positive control)인 LPS 첨가군은 659.00 \pm 2.88 pg/ml의 분비량을 보였고, 음의 대조군(control)에서는 272.2 \pm 0.46

Table 7. IL-6 production by activated mice peritoneal macrophages cultured on the second chloroform fractions of the *Zingiber officinale* Roscoe extracts

Fractions	IL-6 production(pg/ml) ¹⁾	
	10(μ g/ml) ²⁾³⁾	100(μ g/ml)
Control	182.09 \pm 1.55 ^{d)}	182.09 \pm 1.55 ^{d)}
LPS	842.78 \pm 3.35 ^{d)}	842.78 \pm 3.35 ^{e)}
ZOA ⁴⁾	888.07 \pm 0.07 ^b	1266.78 \pm 0.76 ^c
ZOB	897.67 \pm 0.01 ^a	1273.7 \pm 1.45 ^b
ZOC	849.48 \pm 0.22 ^c	1300.45 \pm 2.34 ^a
ZOD	798.98 \pm 2.56 ^c	1187.67 \pm 5.90

¹⁾ Macrophages were incubated with or without *Zingiber officinale* Roscoe extracts for 48h,

²⁾ The cytokine concentrations were determined by duplicate cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D.,

³⁾ Mean with different letters are significantly different from each other $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test,

⁴⁾ ZOA, B, C, D: A, B, C, D fraction of *Zingiber officinale* Roscoe extracts.

pg/ml의 TNF- α 분비량을 보였다. 10, 50, 100 μ g/ml 농도의 첨가시 대조군(272.2 \pm 0.46 pg/ml)에 비해 각각 물층(1641.10 \pm 0.68 pg/ml, 1805.87 \pm 4.77 pg/ml, 448.40 \pm 1.74 pg/ml)과 클로로포름 분획(2158.90 \pm 1.79 pg/ml, 2039.68 \pm 0.98 pg/ml, 423.10 \pm 3.23 pg/ml)에서 유의적으로 높은 TNF- α 분비능을 보였으며, 모든 분획에서 10 μ g/ml의 농도가 비교적 높은 수준의 TNF- α 분비되는 결과를 보여 주었다. 이는 어성초 10 μ g/ml 첨가시 부탄올 층을 제외한 모든 층에서 대조군보다 많은 양의 TNF- α 를 분비하였고, 특히 클로로포름과 물층에서 대조군(0.21 \pm 0.18 ng/ml)에 비해 유의적인 수준인 5.58 \pm 0.74 ng/ml,

Table 8. IL-6 production by activated mice peritoneal macrophages cultured on the third chloroform fractions of the *Zingiber officinale* Roscoe extracts

Fractions	IL-6 production(pg/ml) ¹⁾	
	10(μ g/ml)	100(μ g/ml)
Control	182.09 \pm 1.55 ^{e)}	182.09 \pm 1.55 ^{e)}
LPS	842.78 \pm 3.35 ^{d)}	842.78 \pm 3.35 ^{c)}
ZOB1 ⁴⁾	1356.13 \pm 1.56 ^{b2)3)}	837.8 \pm 0.56 ^{d)}
ZOB2	967.38 \pm 3.78 ^{b)}	891.61 \pm 0.03 ^{b)}
ZOB3	1401.45 \pm 0.89 ^{a)}	1301.25 \pm 0.65 ^{a)}

- 1) Macrophages were incubated with or without *Zingiber officinale* Roscoe extracts for 48h,
- 2) The cytokine concentrations were determined by duplicate cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D.,
- 3) Mean with different letters are significantly different from each other $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test,
- 4) ZOA. B. C. D: A, B, C, D fraction of *Zingiber officinale* Roscoe extracts.

3.92 \pm 4.97 ng/ml의 TNF- α 를 각각 분비한 결과와도 경향이 같다²⁾. 따라서 이 두 분획층에 마우스 복강 대식세포의 활성을 촉진시켜 TNF- α 분비량을 자극하는 성분을 가진 면역 조절 인자가 존재하는 것으로 사료된다.

이러한 결과를 통해 생강의 계통 분획물 중 물층과 클로로포름 분획층에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 사이토카인 분비를 유도하는 성분이 존재할 것으로 사료된다. 이와 같이 사이토카인 분비에 관한 선행연구에서 식물로부터 추출된 다당류들은 IL-1 β 와 TNF- α 를 유발시키는 등 면역 활성 증강 효과가 있는 것으로 보고되었다²⁴⁾. 이러한 분획 활성의 결과를 근거

로 면역 활성이 높게 나타난 클로로포름을 칼럼을 이용한 활성 fraction 분석한 결과는 Table 10에 나타내었다. Silica gel column을 이용하여 단계적(클로로포름:메탄올=20:1 \rightarrow 3:1)으로 극성을 높여가며 column chromatography를 실시하고 TLC로 확인하면서 4개의 소분획을 얻었다. ZOA, ZOB, ZOC, ZOD 네 가지 분리물질의 활성을 살펴보면 대조군과 비교하여 10 μ g/ml의 농도에서는 ZOB, ZOC, ZOD 분획에서 각각 500.67 \pm 0.78 pg/ml, 331.9 \pm 0.05 pg/ml, 682.2 \pm 2.3 pg/ml로 높은 면역 활성을 보였으며, 100 μ g/ml의 농도에서는 네 분획 모두

Table 10. TNF- α production by activated mice peritoneal macrophages cultured on the second chloroform fractions of the *Zingiber officinale* Roscoe extracts

Fraction	TNF- α production(pg/ml) ¹⁾	
	10(μ g/ml) ²⁾³⁾	100(μ g/ml)
Control	272.20 \pm 1.15 ^{b)}	272.2 \pm 1.15 ^{d)}
LPS	659.00 \pm 2.12 ^{a)}	659.0 \pm 2.12 ^{c)}
ZOA ⁴⁾	296.60 \pm 5.78 ^{ab)}	507.2 \pm 3.23 ^{e)}
ZOB	500.67 \pm 0.78 ^{ab)}	1001.4 \pm 2.12 ^{a)}
ZOC	331.90 \pm 0.05 ^{b)}	625.5 \pm 1.80 ^{d)}
ZOD	682.20 \pm 2.30 ^{a)}	734.9 \pm 1.29 ^{b)}

- 1) Macrophages were incubated with or without *Zingiber officinale* Roscoe extracts for 48h,
- 2) The cytokine concentrations were determined by duplicate cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D.,
- 3) Mean with different letters are significantly different from each other $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test,
- 4) ZOA. B. C. D: A, B, C, D fraction of *Zingiber officinale* Roscoe extracts.

Table 9. TNF- α production by activated mice peritoneal macrophages cultured with different fractions of the *Zingiber officinale* Roscoe extracts or mitogens

Fraction	TNF- α production(pg/ml) ¹⁾		
	10(μ g/ml)	50(μ g/ml)	100(μ g/ml)
Control	272.20 \pm 0.46 ^{d)}	272.20 \pm 0.46 ^{c)}	272.2 \pm 0.46 ^{a)}
LPS	659.00 \pm 2.88 ^{d)}	659.00 \pm 2.88 ^{c)}	659.00 \pm 2.88 ^{a)}
Methanol	2108.30 \pm 2.12 ^{b2)3)}	283.10 \pm 0.23 ^{e)}	754.70 \pm 6.43 ^{c)}
Hexane	1108.90 \pm 0.65 ^{e)}	799.90 \pm 5.34 ^{d)}	288.50 \pm 0.45 ^{f)}
Chloroform	2158.90 \pm 1.79 ^{a)}	2039.68 \pm 0.98 ^{a)}	423.10 \pm 3.23 ^{e)}
Buthanol	1898.70 \pm 3.13 ^{c)}	209.00 \pm 2.56 ^{f)}	868.60 \pm 1.55 ^{b)}
Water	1641.10 \pm 0.68 ^{d)}	1805.87 \pm 4.77 ^{b)}	448.40 \pm 1.74 ^{d)}

- 1) Macrophages were incubated with or without *Zingiber officinale* Roscoe extracts for 48h,
- 2) The cytokine concentrations were determined by duplicate cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D.,
- 3) Mean with different letters are significantly different from each other $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

에서 유의적으로 높은 활성을 보였다. 네 가지 분획에서 가장 활성이 높은 ZOB 분획을 클로로포름:메탄올=15:1→8:1 비율로 극성을 높여가며 분리한 결과 ZOB1, ZOB2, ZOB3 세가지의 소 분획이 얻어졌다. 결과는 Table 11에 나타낸 것 처럼 10 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 모두에서 대조군 272.2 \pm 1.15 pg/ml에 비해 각각 유의적으로 높은 활성을 보였다. 이상을 결과를 종합해 보면 생강은 물 분획과 클로로포름 분획에서 10 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 모두에서 비교적 높은 면역 활성을 나타내었고, 클로로포름 분획을 칼럼으로 4개의 분획을 나누어 활성을 silica gel column을 이용하여 높여가며 column chromatography를 실시하고 TLC로 확인한 결과 클로로포름:메탄올=20:1→3:1 극성과 클로로포름:메탄올=15:1→8:1 비율로 본 극성에서 면역 활성이 높은 분획물을 얻을 수 있었다. 이 연구를 바탕으로 보다 더 쉽게 생강 추출물로부터 면역 활성을 가진 단일 물질의 분리가 가능할 것으로 기대된다.

4. 생강 활성 분획의 화학적 특성

생강의 클로로포름 분획물에서 면역 활성을 나타내었던 ZOB를 silica gel chromatography를 실시한 결과 ZOB1(0.31 g), ZOB2(0.8 g), ZOB3(0.33 g) 분획물을 얻었다. 이들 세 분획에서 가장 높은 활성을 나타냈던 ZOB3가 생강의 클로로포름에서 면역 활성을 나타내는 분획임을 알 수 있었다. 이 분획의 물질들의 특성을 알고자 silica gel TLC를 실시한 결과, 용매 클로로포름:메탄올=10:1에서 Rf치 0.3~0.4를 나타냈으며, 10% 황산 발색에서 갈색, FeCl₃ 발색에서 음성을 나타내었다.

Table 11. TNF- α production by activated mice peritoneal macrophages cultured on the third chloroform fractions of the *Zingiber officinale* Roscoe extracts

Fraction	TNF- α production(pg/ml) ¹⁾	
	10($\mu\text{g/ml}$)	100($\mu\text{g/ml}$)
Control	272.2 \pm 1.15 ^{e)}	272.2 \pm 1.15 ^{e)}
LPS	659.0 \pm 2.12 ^{d)}	659.0 \pm 2.12 ^{d)}
ZOB1 ⁴⁾	1674.6 \pm 0.04 ^{c)}	1741.4 \pm 0.96 ^{a)}
ZOB2	2594.4 \pm 1.19 ^{b)}	1717.0 \pm 0.34 ^{b)}
ZOB3	2936.9 \pm 3.37 ^{a)}	1529.1 \pm 0.55 ^{c)}

¹⁾ Macrophages were incubated with or without *Zingiber officinale* Roscoe extracts for 48h,

²⁾ The cytokine concentrations were determined by duplicate cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D.,

³⁾ Mean with different letters are significantly different from each other $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test,

⁴⁾ ZOA. B. C. D: A,B,C,D fraction of *Zingiber officinale* Roscoe extracts.

이상의 분석 결과를 통한 생강의 면역 활성 성분 검색 연구에서는 여러 단계의 칼럼 분석을 시도하여 활성을 검색한 결과 생강의 클로로포름 분획물에서 높은 면역 활성을 볼 수 있었고, 이동상으로 클로로포름을 이용한 실리카 칼럼 크로마토 그래피를 통해 면역 활성이 높은 분획물을 얻을 수 있었다.

요약 및 결론

본 연구에서는 천연 식품으로부터 면역 증진능을 갖는 식품 소재 연구의 일환으로서 생강의 면역 증강 효과와 생강의 면역 활성 분획을 검색하고자 하였다. 생강의 면역 활성이 높은 분획을 찾아 면역 활성 물질을 검색하였으며, 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

생강을 계통 추출하여 면역 활성이 높게 나타난 용매 분획물로부터 칼럼으로 면역 활성을 추적하여 활성 성분을 추적한 결과 생강의 클로로포름 분획물에서 면역 활성을 나타내었던 ZOB를 silica gel chromatography를 실시한 결과 ZOB1(0.31 g), ZOB2(0.8 g), ZOB3(0.33 g) 분획물을 얻었다. 이들 세 분획에서 가장 높은 활성을 나타냈던 ZOB3가 생강의 클로로포름에서 면역 활성을 나타내는 분획임을 알 수 있었다. 이 분획의 물질들의 특성을 알고자 silica gel TLC를 실시한 결과, 용매 클로로포름:메탄올=10:1에서 Rf치 0.3~0.4를 나타냈으며, 10% 황산발색에서 갈색, FeCl₃ 발색에서 음성을 나타내었다. 시료의 농도는 50 mg/kg BW과 250 mg/kg BW 사이의 농도에서 높은 면역 활성을 보여 주었다. 클로로포름 분획의 사이토카인 분비량은 IL-1, IL-6, TNF- α 의 경우 50 mg/kg b.w의 농도에서 가장 높은 면역 활성이 있는 것으로 나타났다. 이상의 본 연구에서 시험관 내(in vitro) 활성 분획 실험을 통해 생강이 주요 면역기관의 기능을 향진시켜, 염증 반응에 대한 반응 속도를 상승시키고, 항원에 대한 항체 생성능을 증강시킴으로서 면역 증강 효과를 보일 것으로 사료된다. 따라서 이러한 연구를 바탕으로 하여 계속적으로 면역 활성 물질의 순수 분리 및 동정이 이루어져 식품 소재 개발하는데 기초가 될 것으로 기대한다.

참고문헌

1. Pyo, MY and Hyun, SM. Effects of *Phellinus linteus* extracts on the humoral immune response in normal and cyclophosphamide-treated mice. *The J. of Applied Phamcol.* 9: 194-200. 2001
2. Park, JS and Chyun, JH. Effects of low fat diet and saturated fat supplementation on the immune status of BALB/c Mouse. *Kor. J. Nutr.* 26:578-585. 1993

3. Wagner, H. Search for plant derived natural products with immunostimulatory activity. *Pure & Appl. Chem.* 66:1271-1274. 1990
4. Chung, YK. Components of essential oil and antimicrobial of ginger. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 40:524-518. 1997
5. Surh, YJ. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat. Res.* 428:305-327. 1999
6. Azian, MN, Hasnah, MS, Sazalina, MS and Haira MR. Ginger oleoresin from *Zingiber officinale* Roscoe effect of sample preparation yielded and quality. *Paper at the Congress of Sci. and Technol. Assoc. of Malaysia.* 7-11. 2001
7. Lee, BS, Ko, MS, Kim, HJ and Kim, DH. Separation of 6-gingerol from ginger and antioxidative activity. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 21:484-488. 2006
8. Sheo, HJ. The antibacterial action of garlic, onion, ginger and red pepper juice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 18:94-99. 1999
9. Thomson, M, Al-Qattan, K and Al-Sawan, M. The use of ginger(*Zingiber officinale* Roscoe) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. *Elsevier Science Ltd.* 67:475-478. 2002
10. Balkwill, FR, Maylor, MS and Malik, S. Tumor necrosis factor as an anticancer agent. *Eur. J. Cancer.* 26:641-644. 1990.
11. Cooksley, VG. Aromatherapy, pp.349-350, Englewood Cliffs, NJ. UK. 1996
12. Chang, WS, Chang, YH, Lu, FJ and Chiang, HC. Inhibitory effects of phenolics on xanthine. *Anticancer Res.* 14:501-506. 1994
13. Park, KY, Lee, SJ, Lee, KI and Rhee, SH. The antitumor effect in sarcoma-180 tumor cell of mice administered with Japanese apricot, garlic or ginger Doenjang. *Kor. J. Food Cookery Sci.* 21:599-606. 2005
14. Beak, SE. Antioxidant activity of crude gingerol. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 9:1-10. 1993
15. Zakaria-Runkat, Nurahman, E Prangdimurt and Tejasari. Antioxidant and immunoenhancement 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
16. McCartney, FN, Allen, JB, Mizel, DE, Albina, JE, Xie, QW, Nathan, CF and Wahl, SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178:749-754. 1993
17. SAS Institute. SAS/STATTM User's Release 6.03 Edition. SAS Institute Inc, Cary. NC. 1988
18. Ryu, HS, Kim HS. Effect of *Zingiber officinale* Roscoe extracts on mice immune cell activation. *The Kor. J. of Nutr.* 37: 23-30. 2004
19. Hirose, K, Claus, DCZ, Oppenheim, JJ and Matsushima, K. Induction of gene expression and production of immunomodulating cytokines in human peripheral blood mononuclear cells. *Lymphokine Res.* 4:475-480. 1990
20. Thomson, M, Al-Qattan, K and Al-Sawan, M. The use of ginger(*Zingiber officinale* Roscoe) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. *Elsevier Science Ltd.* 67:475-478. 2002
21. Hibbs, JB, Tanitor, RR, Vavrin, I and Rachlin, EM. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:87-92. 1998
22. 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
23. Ji, HL. Effect of pine needle extracts and powder on modulation of immunocompetence in mice and human subjects. Ph.D. Dissertation, Sookmyung Women's University. 2001
24. Adachi, Y, Okazaki, M, Ohno, N and Yadomae, T. *Biol. Pharm. Bull.* 17:1554-1560. 1994

(2007년 4월 27일 접수; 2007년 5월 14일 채택)