

생강과 법제생강의 DSS(Dextran Sulfate Sodium)로 유도된 마우스의 대장염 억제 효과

김신정¹ · 김소희² · 임양이³ · 김용규⁴ · 박건영^{1*}

¹부산대학교 식품영양학과, ²동주대학 외식조리영양계열

³성신여자대학교 식품영양학과, ⁴가화웰푸드

Inhibitory Effects of Ginger and Beopje Ginger on DSS-induced Colitis in Mice

Sin-Jeong Kim¹, So-Hee Kim², Yaung-Iee Lim³, Yong-Gyu Kim⁴, and Kun-Young Park^{1*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²School of Culinary Art and Baking Technology, Dong Ju College, Busan 604-715, Korea

³Dept. of Food and Nutrition, Sungshin Women's University, Seoul 142-732, Korea

⁴Ga Hwa Welfood Co., Gyeonggi 446-902, Korea

ABSTRACT The purpose of this study was to examine the anti-inflammatory effects of ginger and processed (Beopje) ginger on colitis induced by 2.5% dextran sulfate sodium (DSS) in Balb/c mice. Beopje means a process that herbal medicines are treated by a specific Korean traditional method in order to obtain better pharmacological effects. Mice were fed saline or two different doses of ethanol extracts (ginger and processed (Beopje) ginger) once a day for 14 days. Colitis was induced from day 7 to 14 via administration of 2.5% DSS in drinking water. Experimental animals were divided into four groups: Nor (Normal, 200 μ L of saline without 2.5% DSS-treated group), Con (Control, 200 μ L of saline and 2.5% DSS treated group), G (500 mg/kg of ginger and 2.5% DSS treated group), and BG (500 mg/kg of Beopje ginger and 2.5% DSS treated group). Body weights of both ginger-administered groups increased compared to the control. Colon length increased to 7.6, and 8.0 cm in the G and BG groups, respectively, whereas that of control was 5.7 cm. Histological colon injury induced by DSS-induced colitis was reduced ($P < 0.05$). In serum and DSS-treated colon tissues, mRNA expression levels of IFN- γ , IL-6, TNF- α , and IL-12 of the Beopje ginger-treated group were significantly suppressed compared to those of the ginger-treated groups. Expression levels of iNOS and COX-2 of the Beopje ginger-treated group were significantly reduced compared to those of the ginger-treated groups ($P < 0.05$), and BG showed stronger anti-inflammatory effects on colitis. These results indicated that ginger exerted anti-inflammatory effects on DSS-induced colitis in mice, and its effects could be increased through Beopje.

Key words: ginger, Beopje, DSS, colitis

서 론

궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)이나 크론병(Crohn's disease, CD) 등의 염증성 대장질환(inflammatory bowel disease, IBD)은 특정한 병인 없이 소화기계에 반복적으로 재발되는 염증과 관련이 있으며, 대장상피세포의 병원체 및 장내 세균총의 비정상적인 면역반응 등에 의해 촉진되어 소화기계에 염증이 발생하는 것을 의미한다(1,2). 흰쥐, 마우스 및 햄스터에서 DSS(dextran sulfate sodium)로 유발시킨 궤양성 동물 모델의 경우 초기에는 혈변, 체중 감소, 대장의 축소 및 점막궤양 등이 생긴다. 또한 조직학적으로 대장

상피세포에 손상을 유발해 상피층의 장섬이 염증 없이 떨어져 가는 것이 특징이다(3). 이러한 양상은 사람의 궤양성 대장염과 흡사한 부분이 많아 DSS는 실험동물 모델을 만드는 데 널리 쓰인다(4,5).

생강은 아열대 및 열대성 다년생 식물로서 근경을 주로 식용하며, 그 특유한 향기와 매운맛으로 인하여 오랫동안 향신료로서 사용되어지고 있다. 생강의 생리활성 성분은 항암 및 항염증 효과(6,7), 위보호 및 항궤양 효과(8), 항구토제 효과(9,10)를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 생강의 주요 성분으로 zingiberol, zingibrone, zingiberene, gingerol과 shogaol이 알려져 있으며(11), 6-shogaol과 6-gingerol의 cyclooxygenase-2 억제 효과(12,13) 및 해열 진통 효과(14) 등 다양하게 연구되어 있다. 생강은 한방에서 생강(生薑), 건강(乾薑), 포강(砲腔), 생강즙(生薑汁), 생강피(生薑皮), 외강(煨薑)의 형태로 사용된다. 약성이 맵고 따뜻하

Received 5 December 2013; Accepted 19 February 2014

*Corresponding author.

E-mail: kunypark@pusan.ac.kr, Phone: +82-51-510-2839

여 폐, 비, 위경에 작용하고, 진토제, 구풍제, 건위제로 사용되며 소화기계의 복통이나 소화불량 등에 사용된다(15). 생강처럼 한의학에서는 한약재를 여러 형태로 사용하고 있다. 한약재를 한의학 이론에 근거해 가공 처리하여 독성의 경감, 효능 개선 또는 보관 등에 편리하게 변형시키는 한방제제기술을 수치(修治), 포제(炮製) 또는 법제(法制)라고 하고(16), 이러한 한약재의 가공은 한약의 효능이나 독성 및 안정성을 변하게 하므로 예로부터 중시되어온 과정이다. 한약재의 가공처리 방법을 사용한 기록은 이미 신농본초경(神農本草經)에서부터 볼 수 있다. 근대 한의학에서 포제학은 현대 과학과 포제의 전통기술을 연구하고 개선하여 새로운 제조기법을 발전시켰으며, 동서의학의 결합과 발전의 실현을 위해서 중요한 의의를 가지고 있다(17).

선행연구에서 생강 추출물의 위염 억제 효과가 한약재의 가공처리 방법인 법제과정으로 증진되었음을 *in vivo* 실험을 통하여 규명한 바 있다(18). Ryu 등(19)의 연구에서 생강 추출물 500 mg/kg 섭취는 면역세포 분비량을 유도 조절함으로써 체내 면역 기능을 증강시킬 수 있다고 하였다. 본 연구에서는 선행 연구(18)와 Ryu 등(19)의 결과를 기초로 하여 2.5% DSS로 궤양성 대장염을 유발한 마우스에 일반생강과 법제생강 에탄올 추출물을 500 mg/kg으로 투여하고 궤양성 대장염에 대한 감소 효과를 실험하였고, 한약재의 가공처리 방법인 법제가공 처리가 생강의 항염증 효과를 증진시킬 수 있는지에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 추출물의 조제

본 실험에 사용된 일반생강과 법제생강은 (주)가화웰푸드(Yongin, Korea)에서 제공받아 실험에 사용하였다. 법제생강은 (주)가화웰푸드에서 증제법과 초제법(20)을 병행하여 조제하였다. 일반생강은 생강(국내산)을 씻어 60°C 건조기에서 건조하고, 법제생강은 생강을 수세한 후 4분간 스팀에 쪄 후 그늘에 방랭 하였다. 이를 3분간 약한 불에서 볶은 후 그늘에서 2시간 동안 건조시키고 다시 스팀으로 찌고 볶는 과정을 3번 반복한 후 60°C 건조기에서 건조시켜 제조하였다(18).

일반생강과 법제생강은 분말로 하여 100 g씩 70% 에탄올 1,000 mL를 넣고 water bath 내에서 추출온도 80°C, 추출시간 6시간으로 3회 반복 추출하였다. 생강 추출액은 여과장치를 사용하여 고형분을 제거하고 여기서 얻은 생강 추출액은 회전식 진공 증발기(rotary vacuum evaporator, EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 60°C에서 감압농축 건조하여 일반생강 추출물(24.9 g), 법제생강 추출물(32.3 g)을 얻었으며, 이 추출물을 실험에 사용하였다.

실험동물

본 실험에 사용한 동물은 5주령 male Balb/c 마우스((주)

샘타코, Osan, Korea)로 체중이 20 g 전후의 것을 사용하였으며, 1주일간 표준사료(SAM #3 쥐사료, (주)샘타코)로 사육하여 적응시킨 후 실험하였다. 구입한 마우스는 12시간 dark-light cycle로 조절된 실험실 내에 설치한 micro ventilation cage system(온도 23±2°C, 습도 50±5%) 내에서 물과 사료는 충분한 양을 공급하여 사육하였다.

시료의 투여 및 궤양성 대장염 유도

실험동물은 1주일간의 적응기간을 가진 뒤 무게를 측정하고 임의로 각 군당 7마리씩 나누어서 총 4군으로 하여 실험하였다. 정상군(Nor)과 대조군(Con)은 생리식염수, 일반생강군(G)은 일반생강 추출물 500 mg/kg, 법제생강군(BG)은 법제생강 추출물 500 mg/kg의 농도로 증류수에 희석하여 14일간 시험물질을 경구 투여하였다. DSS 염증성 장질환의 동물모델에 의하면 2.5~10% 정도의 DSS를 음용수에 섞어 5~7일간 투여하여 대장염을 유발한다(21). 본 연구에서는 Vieira 등(22)과 Geier 등(23)의 연구를 참조하여 DSS의 농도를 2.5%로 정하였으며, 시료 투여는 적응기간이 끝나고 14일간 200 µL씩 경구 투여하였다. 정상군을 제외한 실험군은 시료 투여 후 7일째부터 음수에 녹인 2.5% DSS를 7일간 자유롭게 섭취하게 하여 대장염을 유도하였다. 실험기간 중 이틀에 한 번씩 개체별 체중을 측정하였고, 체중 측정은 매 측정 시 오차를 최소화하기 위하여 동일한 시간대에 동일한 저울을 사용하여 측정하였다. 이 실험은 부산대학교 동물실험 윤리위원회 허가(PNU-2011-000409)를 받아 진행하였다(24).

혈청 분리 및 대장 길이 측정

실험동물은 희생 12시간 전에 절식시켰으며, ether로 가볍게 마취한 후 복부 대동맥으로부터 채혈하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분 정도 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 얻은 후 -80°C에서 냉동 보관하였다. 채혈 직후 대장을 분리하여 생리식염수에 담가 겉에 묻어 있는 혈액과 지방을 제거하고 흡습지에 수분을 제거한 뒤 대장의 길이를 측정하고 -80°C에서 냉동 보관하였다.

조직학적 관찰

실험동물의 대장을 적출하여 생리식염수를 사용하여 깨끗이 씻어 10% 중성 포르말린 용액(NBF: natural buffered formalin)에 넣어 고정시킨 뒤 조직학적 평가를 위해 파라핀 조직표본을 제작하여 각 조직표본을 4 µm 두께로 절편하였다. 조직학적 검사를 위해 hematoxylin & eosin으로 염색하고 광학 현미경(Olympus, Waltham, MA, USA)을 이용하여 ×100의 배율에서 관찰하였다(25).

혈청에서의 pro-inflammatory cytokines의 농도 측정

염증유발 cytokine인 IFN-γ, IL-6, TNF-α 및 IL-12의

농도는 ELISA(ELISA MAX, Biolegend, San Diego, CA, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 측정하였다. 96 wells microplate에 mouse IFN- γ , IL-6, TNF- α 및 IL-12에 대한 capture 항체를 coating buffer에 희석하여 100 μ L씩을 분주한 후 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 다음날 plate를 세척용 완충액(phosphate-buffered saline+0.05% tween-20, pH 7.4) 300 μ L를 가하여 4번 세척한 후 1 \times assay diluent A 200 μ L를 분주한 후 실온에서 1시간 동안 shaking 하면서 방치하였다. 세척용 완충액 300 μ L를 가하여 4번 세척한 후 plate의 각 well에 dilute standards와 시료 100 μ L씩을 가하여 실온에서 2시간 동안 shaking 하면서 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 detection 항체 100 μ L를 분주한 후 실온에서 1시간 동안 shaking 하면서 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 avidin-horse-radish peroxidase액 100 μ L를 가하여 다시 실온에서 30분 shaking 하면서 방치하고, 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 TMB substrate solution이 포함된 기질액 100 μ L를 가하여 실온에서 15분 동안 방치한 후 stop액 100 μ L를 가하여 반응을 정지시켰다. Optical density는 ELISA reader로 450 nm에서 측정하였다.

대장조직에서의 pro-inflammatory cytokines과 염증관련 유전자(iNOS와 COX-2)의 mRNA 발현 분석

유전자 발현은 ExiCycler(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 역전사 증합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)으로 측정하였다. Total DNA는 마우스의 대장조직에서 Trizol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였다. Total RNA는 RNase-free DNase(Roche, Indianapolis, IN, USA)로 15분간 37°C에서 반응시키고 RNase kit(Qiagen, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 다시 정제하였다. 제조사의 설명에 따라 cDNA는 total RNA 2 μ L와 AMV reverse transcriptase(Amersham, Piscataway, NJ, USA)와 random hexanucleotide 함께 37°C에서 1시간 동안 반응하여 합성하였다.

합성된 cDNA에 PCR을 수행하기 위해 cDNA 1 μ L에 primer 1 μ L 및 10 \times buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μ M dNTP, 1 U Tag polymerase를 혼합하여 IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-12와 iNOS, COX-2의 유전자를 증폭시켰다. Internal control은 housekeeping 유전자인 β -actin을 이용하여 이들의 발현 정도를 비교하였다.

각 유전자의 primer sequence는 IFN- γ 의 증폭을 위하여 5'-TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA-3'(forward), 5'-TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG-3'(reverse), TNF- α 의 증폭을 위하여 5'-CGG AGT CCG TCC GGG CAG GT-3'(forward), 5'-GCT GGG TAG AGA ATG GAT GAA CA-3'(reverse), IL-6의 증폭을 위하여

5'-CTG CAA GAG ACT TCC ATC CAG TT-3'(forward), 5'-AGG GAA GGC CGG TGG TTG T-3'(reverse), IL-12의 증폭을 위하여 5'-CTC CAC AAA GGA GGC GAG ACT C-3'(forward), 5'-CAT ATT TAT TCT GCA GCC GAG CTT C-3'(reverse), iNOS의 증폭을 위하여 5'-GCA GCT GGG CTG TAC AAA-3'(forward), 5'-AGC GTT TCG GGA TCT GAA T-3'(reverse), COX-2 증폭을 위하여 5'-GAA TCA TTC ACC AGG CAA ATT G-3'(forward), 5'-TCT GTA CTG CGG GTG GAA CA-3'(reverse), β -actin 증폭을 위하여 5'-TGA CGC TGG ACC AAT CAG-3'(forward), 5'-ACC TCA TTG GAC TGC ATA GC-3'(reverse)를 사용하였다. PCR은 automatic BIONEER thermocycler(Bioneer)로 모든 유전자는 initial denaturation 94°C에서 3분 동안 1 cycle 수행하였고, denaturation 94°C 45초, annealing 58°C 45초, extension 72°C 1분 동안 35회 반복하였으며 마지막 extension은 72°C에서 10분간 수행하였다. 이후 증폭된 DNA 산물들을 2% agarose gel(Invitrogen Co.)을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다(26).

통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 SPSS(v18.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다. P 값이 5% 미만일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

일반생강과 법제생강의 추출

일반생강과 법제생강은 100 g씩을 70% 에탄올로 80°C에서 추출하여 일반생강 24.9 g과 법제생강 32.3 g의 고형분을 획득하였다. 일반생강의 추출률은 다른 연구에서 말린 생강 5 kg에서 1.1 kg을 추출한 결과(22.8%)와 비슷하였다(27). 법제생강의 추출률은 Bang 등(27)의 연구에 비해 추출률이 10% 증가하였고, 본 연구의 일반생강보다 추출률이 8% 증가하였다. 법제가공의 주요 목적은 조제(調製), 제제(製劑), 분쇄(粉碎)를 쉽게 하고 짧은 시간 안에 유효성분의 용출을 쉽게 하여 임상에서의 치료 효과를 확보하는데 있고, 법제가공 과정은 약물의 질을 부드럽고 연하게 하여煎출(煎出)에 편리하게 만든다(20)고 하였다. 법제가공 과정이 법제생강의 추출률에 영향을 미친 것으로 생각된다.

체중 변화 및 대장 길이에 대한 영향

체중 변화와 대장 길이는 Table 1에 나타내었다. 궤양성

Table 1. Effect of ginger extracts on the changes of body weight and colon length in DSS-treated Balb/c mice

Groups ¹⁾	Body weight (g)			Colon length (cm)
	Initial	7th day	14th day	
Nor	20.6±0.4 ^{a2)}	22.8±1.8	23.3±0.6 ^a	8.5±0.4 ^a
Con	18.3±0.4 ^c	21.8±0.6	17.9±0.6 ^c	5.7±0.6 ^c
G	19.9±0.3 ^b	22.5±0.6	20.4±0.7 ^b	7.6±0.6 ^b
BG	18.8±0.6 ^c	21.7±0.5	20.2±0.6 ^b	8.0±0.9 ^{ab}

¹⁾Nor, group received saline without 2.5% DSS; Con, group received saline and induced colitis by 2.5% DSS; G, group received 500 mg/kg of ginger extract and induced colitis by 2.5% DSS; BG, group received 500 mg/kg of Beopje ginger extract and induced colitis by 2.5% DSS.

²⁾Values are mean±SD.

^{a-c)}Means with the different letters in the same columns are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

대장염 동물모델의 초기의 주요 증상이 체중 감소와 대장 길이의 축소로 알려져 있다(24). 2.5% DSS 섭취에 의해 케양성 대장염이 유도된 대조군의 체중은 2.1% 감소되었고 정상군은 체중이 13.1% 증가되었다. 일반생강 추출물 투여군은 2.5%의 체중이, 법제생강 추출물 투여군은 7.4%의 체중이 증가하였다. 2.5% DSS 섭취 3일 후부터 체중이 감소하기 시작하였고, 모든 실험군은 대조군보다 체중 감소가 억제되었다($P<0.05$). 법제생강 추출물 투여군의 체중 증가 정도가 일반생강 추출물 투여군보다 더 크게 나타났다.

2.5% DSS 섭취에 의해 케양성 대장염이 유도된 마우스의 대장은 항문에서 회맹부(ileocecal junction)까지의 대장을 적출하여 맹장부터 항문까지의 길이를 측정하여 Table 1에 나타내었다. 대조군의 대장의 길이는 5.7 cm로 정상군 8.5 cm에 비해 32.9%가 축소되어 DSS 섭취로 케양성 대장염이 유도되었음을 확인하였다. 일반생강과 법제생강 추출물의 대장 길이는 각각 7.6 cm, 8.0 cm로 대조군보다 유의적으로 길게 나타나($P<0.05$) 대장염의 증상이 완화되었고, 법제생강 추출물 투여군의 대장의 길이가 일반생강 추출물 투여군보다 더 길었다. 일반생강과 법제생강 추출물 투여군

모두에서 대장염 초기 증상인 체중 감소와 대장 길이의 축소 현상이 유의적으로 나타났으며, 특히 법제생강 추출물의 대장염 초기 증상의 개선 효과가 더 우수하였다.

조직 변화에 대한 영향

대장의 조직학적 검사를 위해 H&E로 염색하고 광학 현미경을 이용하여 $\times 100$ 의 배율에서 관찰하여 Fig. 1에 나타내었다. 장상피의 점막층은 상피세포층(epithelial cell layer)과 고유판(lamina propria)으로 구성되어 있고 상피세포층에는 선와(crypt)가 있으며, 선와의 기저부에는 미분화세포(undifferentiated cell)가 위치하고 선와의 벽을 따라 많은 술잔세포(goblet cell)와 일부 흡수세포가 존재한다(25). 대장조직의 H&E 이중염색 소견에서 정상군은 대장상피의 점막층은 정상적이었고 염증과 관련된 소견은 보이지 않았다. DSS 유도군에서는 점막 및 점막하층에 경미한 부종과 염증 소견이 보였으므로 2.5% DSS의 7일간 투여로 인하여 염증 반응이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 대조군에서는 상피 점막층 여러 곳에서 선와 부위가 파괴되었고, 일반생강 추출물군은 법제생강 추출물군에 비해 상피 점막층의 손상이 더 많이 관찰되었다. Song 등(25)에 의하면 조직 소견의 악화 정도와 대장의 길이가 서로 비례하는 것으로 나타나 대장의 길이 변화와 대장염의 중증도와 상관관계가 있음을 알 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 조직의 관찰을 통해 대장의 길이 축소의 억제 효과가 증가함에 따라 대장 상피 점막층의 파괴도 줄어들었음을 관찰하였고, 법제생강 추출물이 일반생강 추출물보다 더 높은 염증 억제 효과를 나타내었다.

혈청에서 전 염증성 사이토카인(IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-12)에 대한 영향

Interleukin(IL)-6의 레벨은 케양성 대장염 환자에서 현저히 증가되고(28), IL-12를 억제하면 점막 면역세포에 의한 친염증 사이토카인 생성을 낮출 수 있다(29). TNF- α 가 다량 분비될 경우 prostaglandins, leukotrienes, NO, pla-

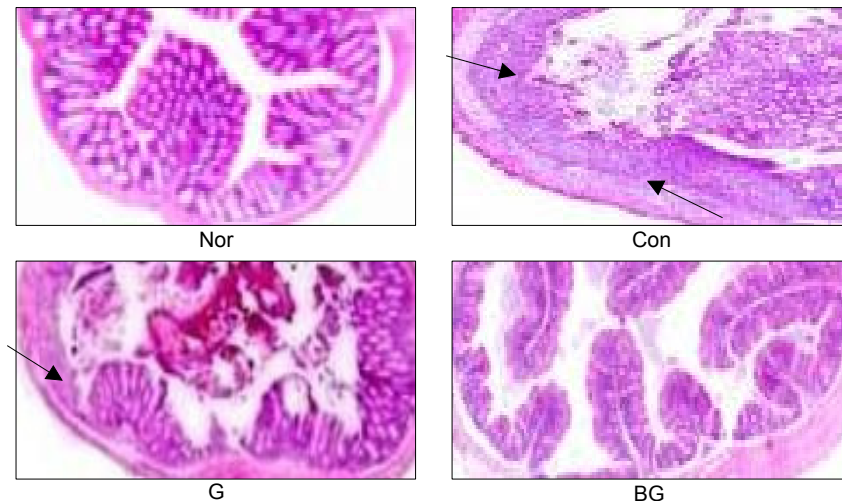


Fig. 1. Histological microphotograph of colonic tissue of DSS-treated Balb/c mice (H&E stain, $\times 100$). Groups are the same as in Table 1.

Table 2. Effect of ginger extracts on serum proinflammatory cytokines level of IFN- γ , IL-6, TNF- α and IL12 in DSS-treated Balb/c mice (unit: pg/mL)

Groups ¹⁾	IFN- γ	IL-6	TNF- α	IL-12
Nor	104.1 \pm 2.4 ²⁾	82.9 \pm 2.3 ^d	75.7 \pm 1.3 ^d	684.7 \pm 2.4 ^d
Con	823.8 \pm 11.8 ^a	203.1 \pm 3.6 ^a	102.4 \pm 1.7 ^a	991.0 \pm 25.8 ^a
G	434.1 \pm 7.1 ^b	162.6 \pm 1.8 ^b	92.8 \pm 0.5 ^b	893.5 \pm 27.8 ^b
BG	121.3 \pm 12.3 ^c	115.6 \pm 2.9 ^c	88.8 \pm 1.3 ^c	727.7 \pm 27.0 ^c

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾Values are mean \pm SD, n=7.

^{a-d}Means with the different letters on the column are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

telet activating factor 등의 매개물질들의 합성을 증가시키고 조직의 손상을 유도하여 각종 염증질환을 일으킨다(30). 이에 혈청에서의 전염증성 사이토카인(IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-12)의 농도를 측정하여 Table 2에 나타내었다. 정상군의 IFN- γ 와 IL-6, TNF- α , IL-12의 혈청 농도는 각각 104.1 pg/mL, 82.9 pg/mL, 75.7 pg/mL, 684.7 pg/mL 이었고, 대조군의 전염증성 사이토카인의 혈청 농도는 정상군에 비해 유의적으로 증가되어 DSS 유도도 염증이 진행되었다는 것을 확인하였다.

일반생강 추출물의 IFN- γ 와 IL-6, TNF- α , IL-12의 혈청 농도는 대조군보다 9.4~47.3% 감소하였고, 법제생강 추출물의 전염증성 사이토카인의 혈청 농도는 대조군보다 13.2~85.2% 감소되었다($P < 0.05$). 법제생강 추출물의 염증성 사이토카인들의 혈청 농도는 일반생강 추출물보다 4.3~72.1%의 낮은 농도를 나타내었다($P < 0.05$). 체중 감소와 대장의 길이 및 조직학적 연구 결과와 같이 IFN- γ 와 IL-6, TNF- α , IL-12의 혈청 농도 측정에서도 법제생강 추출물의 염증 억제 효과가 더 우수하였다. Hsiang 등(31)은 생강과 생강의 구성성분인 zingerone이 흰쥐에서 대장염을 개선하였고, IL-17과 IL-1 β , IL-6, IFN- γ , tumour necrosis factor signaling pathways를 유의적으로 조절하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 일반생강과 법제생강 추출물이 혈청에서 전염증성 사이토카인의 농도를 억제하였고, 이는 생강의 zingerone과 같은 구성성분의 물질들의 염증 억제 효과 때문으로 생각된다. Lee와 Kim(16)은 법제된 생강(포강)의 경우, 특히 6-gingerol의 함량이 증가되었다고 하였고, 본 연구에서도 법제생강이 32.3 g 추출되어 일반생강 24.9 g보다 더 많이 되었다. 법제방법은 불, 물 또는 불과 물을 같이 이용하여 가공하는 다양한 방법이 있다. 법제가공은 유효성분의 용출을 짧은 시간에 쉽게 하여 임상에서의 치료 효과를 확보하는데 있고, 한약의 효능, 독성 및 안정성을 변하게 한다(20). 생강과 법제생강의 DPPH와 hydroxyl radical 소거능 비교에서 법제생강의 항산화 효과가 유의적으로 높았다(32). 이와 같이 본 연구에서도 법제가공 과정으로 생강의 유효성분들의 용출이 많이 되어 법제생강 추출물 투여군에서 염증 억제 효과가 더 증대되었다고 생각된다. 그러나 본연구의 법제 과정으로 증가된 생강의 유효성분의 성분에 대한 추후 연구가 필요하다 하겠다.

장 조직의 IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-12 및 iNOS와 COX-2 발현에 대한 영향

본 연구에서는 RT-PCR을 이용하여 2.5% DSS로 케양성 대장염을 유도한 마우스의 대장조직에서 IFN- γ 와 IL-6, TNF- α , IL-12의 발현을 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 대조군은 정상군에 비해 IFN- γ 와 IL-6, TNF- α , IL-12의 mRNA 발현이 크게 증가하였다. 일반생강과 법제생강 추출물은 대조군에 비하여 IFN- γ 와 IL-6, TNF- α , IL-12의 발현이 현저히 줄어들었고 법제생강 추출물은 정상군보다도 더 낮은 mRNA의 발현을 나타내었으며($P < 0.05$), 혈청의 전염증성 사이토카인의 농도 결과와 같은 경향을 보였다.

염증성 유전자 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 대조군은 정상군에 비해 대장조직 염증관련 유전자인 iNOS와 COX-2의 발현이 크게 증가하였으며, 모든 실험군의 iNOS와 COX-2 유전자 발현은 대조군보다 유의적으로 감소하였고, 법제생강 추출물 투여군의 iNOS와 COX-2의 유전자 발현이 일반생강 추출물 투여군보다 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$). 대식세포에서 cytokines, tumor necrosis factor(TNF- α), lipopolysaccharide(LPS)와 같은 자극은 염증 반응의 전사인자 NF- κ B를 활성화시키며 그 결과 iNOS, COX-2를 발현시켜 nitric oxide(NO)와 prostaglandin E₂(PGE₂)를 생성하여 염증을 일으킨다(30,31). COX-2 발현 증가는 염증반응을 더욱 악화시키고 케양성 환자의 염증 부위의 점막에서 COX-2의 발현이 증가된다(14). COX-1은 모든 조직에 존재하지만 COX-2는 염증, 종양 생성으로 유도되며 생강의 구성성분인 gingerols과 shogaols은 선택적으로 COX-2를 억제한다. COX-1의 억제는 위장관을 자극하므로 COX-2의 선택적 억제는 염증 치료에서 부작용을 최소화하는데 아주 중요하며, 생강은 COX-1보다 COX-2를 3배 더 억제하는 항염증 활성을 가진다(33). 또한 생강에 포함되어 있는 phytochemicals 중의 하나인 6-gingerol은 여러 agonist에 의해서 NF- κ B 활성화와 COX-2 발현을 억제시킨다고 알려져 있다(3).

본 연구에서 일반생강과 이를 법제의 가공과정을 거쳐 제조한 법제생강 추출물은 항염증 효과가 있었으며, 법제생강 추출물 500 mg/kg을 흰쥐에 투여하였을 때 대장염을 억제하는 효과가 훨씬 우수하여, 법제가공 처리가 일반 생강의

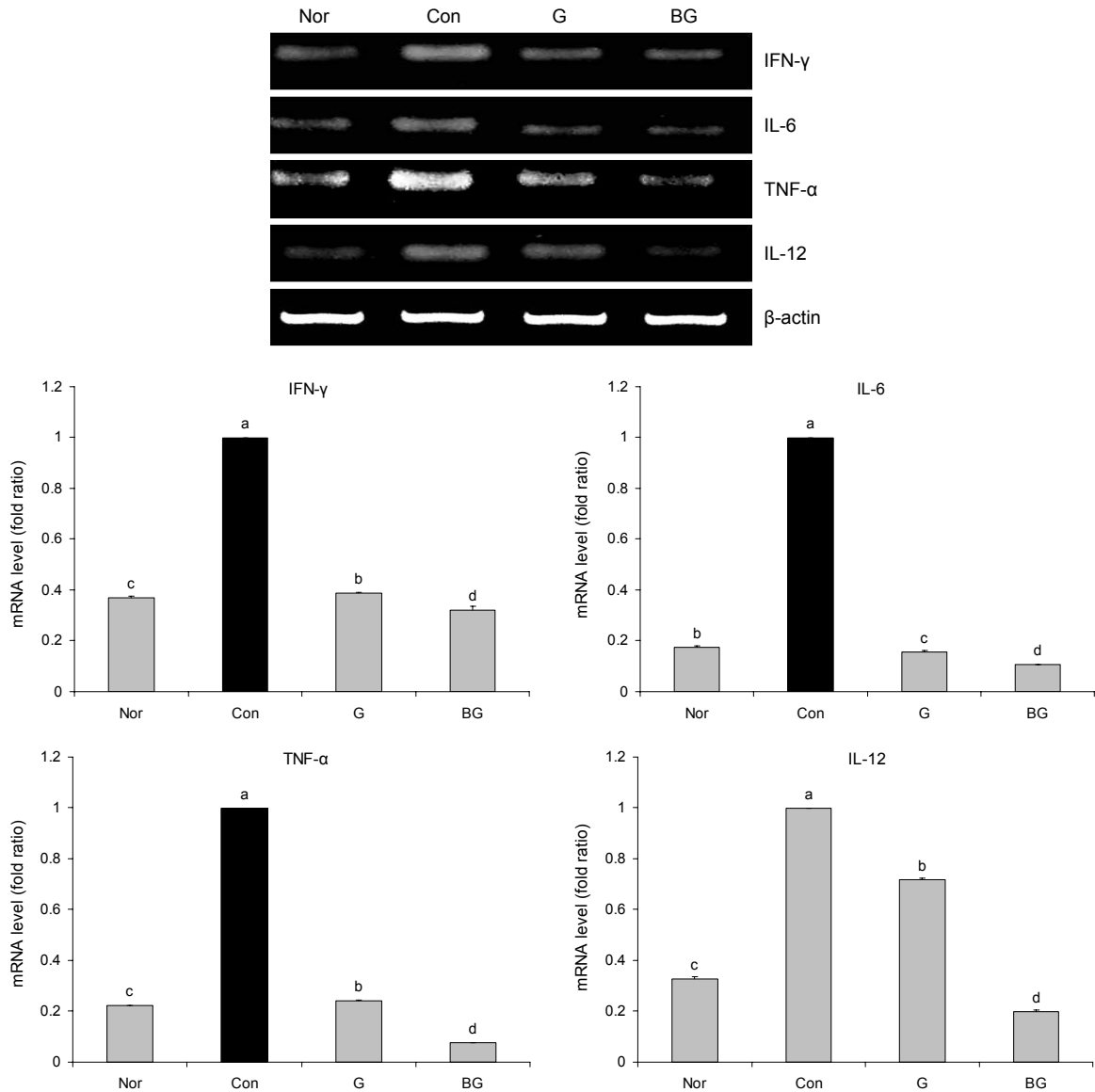


Fig. 2. Effects of ginger extracts on mRNA expression of IFN- γ , IL-6, TNF- α , and IL-12 in DSS-treated colitis Balb/c mice. Groups are the same as in Table 1. Means with the different letters (a-d) above the bars are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

염증 억제 효과를 증가시켰음을 확인하였다. 이는 생강이 법제의 가공과정을 거치면서 생강의 유효성분으로 잘 알려져 있는 gingerols, shogaols, zingerone 등의 성분들이 추출이 많이 되었기 때문으로 생각된다. 본 연구에서 법제 처리하였을 때 증가된 생강의 추출 성분과 이들의 염증 억제 효과에 대한 연구가 미비하여, 이는 추후 연구를 통해 보완되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 일반생강과 법제생강의 대장염 염증에 대한 억제 효과와 법제의 가공 처리가 일반생강의 염증 억제 효과보다 우수한지를 비교하였다. Balb/c 수컷 마우스에 2.5%

DSS로 케양성 대장염을 유도하고, 일반생강과 법제생강 추출물 500 mg/kg을 투여하여 대장염의 염증 억제 효과를 연구하였다. 일반생강과 법제생강은 70% 에탄올로 열수 추출 및 농축하여 실험에 사용하였다. 일반생강과 법제생강 추출물 투여군 모두 대장 길이의 축소와 체중 감소가 대조군보다 유의적으로 억제되었다($P < 0.05$). 일반생강과 법제생강 추출물 투여군의 대장 길이는 7.6 cm와 8.0 cm로 법제생강 추출물 투여군의 대장 길이가 일반생강 추출물 투여군보다 더 길었다. 대장의 조직학적 관찰에서 대장의 길이의 축소 정도가 증가함에 따라 대장조직 점막층의 선와부의 파괴도 증가되었다. 대장염 염증 초기에 증가하는 염증성 bio-marker인 혈청에서의 IFN- γ , IL-6, TNF- α 및 IL-12의 농도는 일반생강 추출물 투여군보다 법제생강 추출물 투여

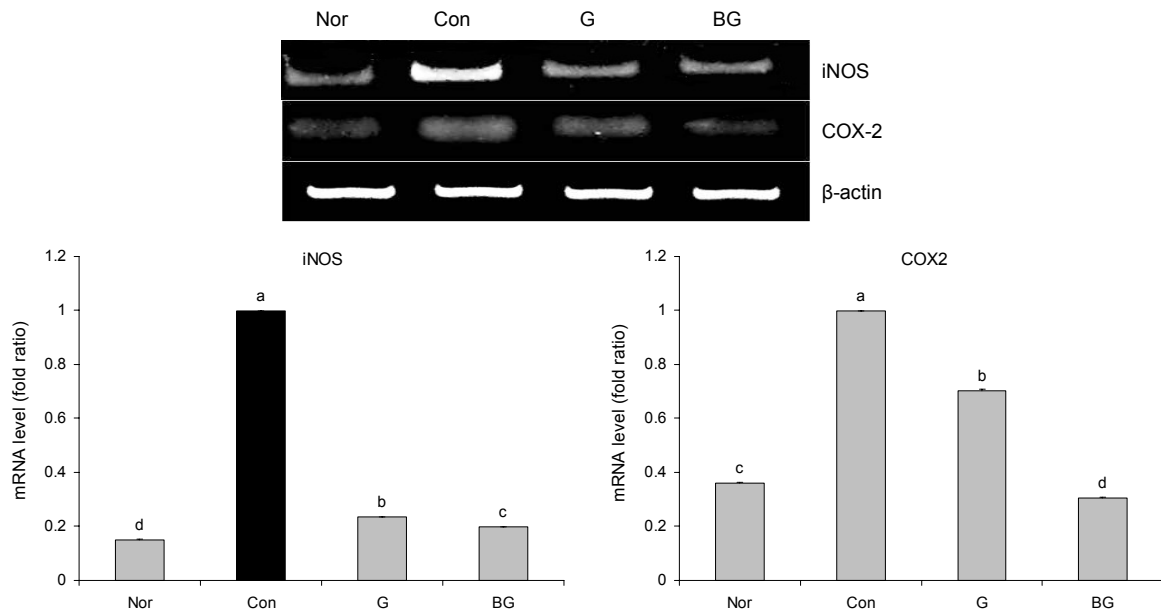


Fig. 3. Effects of ginger extracts on mRNA expression of iNOS and COX-2 in DSS-treated Balb/c mice. Groups are the same as in Table 1. Means with the different letters (a-d) above on the bars are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

군에서 유의적으로 더 감소하였고, 대장 조직에서의 이들 사이토카인의 유전자 발현도 같은 경향을 나타내었다($P<0.05$). 대장염 조직에서의 염증성 인자인 iNOS, COX-2의 유전자 발현에서도 일반생강군보다 법제생강군의 유전자 발현이 더 유의적으로 감소되었다. 이상의 결과로 DSS로 대장염이 유도된 마우스에서 일반생강과 법제생강의 추출물은 항 염증성 효과를 나타내었고, 법제생강 추출물의 대장염 염증 억제 효과가 일반생강 추출물보다 더 우수하였으며, 이는 법제생강 처리에 의해서 일반생강의 대장염 염증 억제 효과가 증가되었다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 인하대병원 국가지정 소화기질환 의료제품 유효성평가 서비스센터(NCEED)의 사업비지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Podolsky DK. 2002. Inflammatory bowel disease. *N Eng J Med* 347: 417-429.
- Adachi M, Kurotani R, Morimura K, Shah Y, Sanford M, Madison BB, Gummucio DL, Marin HE, Peters JM, Young HA, Gonzalez FJ. 2006. Peroxisome proliferator activated receptor gamma in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease. *Gut* 55: 1104-1113.
- Lee KH, Lee KH. 2010. Anti-inflammatory effects of *Glycyrrhiza glabra* Linne extract in a dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model. *Korean J Food Nutr* 23: 435-439.

- Ishioka T, Kuwabara N, Oohashi Y, Wakabayashi K. 1987. Induction of colorectal tumors in rats by sulfated polysaccharides. *Crit Rev Toxicol* 17: 215-244.
- Frank K, Helmut M, Marianne A, Volker G, Tina B, Jurgen S, Josef R. 2001. Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *Int J Colorectal Dis* 16: 238-246.
- Habib SHM, Makpol S, Hamid NAA, Das S, Ngah WZW, Yusof YAM. 2008. Ginger extract (*Zingiber Officinale*) has anti-cancer and anti-inflammatory effects on ethionine-induced hepatoma rats. *Clinics* 63: 807-813.
- Eguchi A, Murakami A, Ohigashi H. 2005. Novel bioassay system for evaluating anti-oxidative activities of food items: use of basolateral media from differentiated Caco-2 cells. *Free Radic Res* 39: 1367-1375.
- Al-Yahya MA, Rafatullah S, Mossa JS, Ageel AM, Parmar NS, Tariq M. 1989. Gastroprotective activity of ginger *Zingiber officinale* Rosc., in albino rats. *Am J Chin Med* 17: 51-56.
- Holtman S, Clarke AH, Scherer H, Höhn H. 1989. The anti-motion sickness mechanism of ginger. *Acta Otolaryngo* 108: 168-174.
- Bone ME, Wilkinson DJ, Young JR, McNeil J, Charlton S. 1990. Ginger root—a new antiemetic. The effect of ginger root on postoperative nausea and vomiting after major gynaecological surgery. *Anaesthesia* 45: 669-671.
- Qureshi S, Shah AH, Tariq M, Ageel AM. 1989. Studies on herbal aphrodisiacs used in Arab system of medicine. *Am J Chin Med* 17: 57-63.
- Kiuchi F, Iwakami S, Shibuya M, Hanaoka F, Sankawa U. 1992. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chem Pharm Bull* 40: 387-391.
- Tjendraputra E, Tran VH, Lui-Brennan D, Roufogalis BD, Duke CC. 2001. Effect of ginger constituents and synthetic analogues on cyclooxygenase-2 enzyme in intact cells. *Bioorg*

- Chem* 29: 156-163.
14. Suekawa M, Ishige A, Yuasa K, Sudo M, Aburada M, Hosoya E. 1984. Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents (6)-gingerol and (6)-shogaol. *J Pharmacobiodyn* 7: 836-848.
 15. Yang WK, Jung CS, Jung KW, Kim JW, Lee EB. 1992. Antigastritic and antiulcerative action of the extract of *Zingiberis rhizoma*. *Yakhak Hoeji* 36: 173-179.
 16. Lee YM, Kim JS. 2003. Studies on the processing of herbal medicines (VI), HPLC analysis of standard compounds of unprocessed and processed herbal medicines. *Korean J Orient Med* 9: 69-72.
 17. Kim HC. 2001. Study on the standardization of drug processing in traditional Korean medicine. Report of the Ministry of Health & Welfare, Kyung Hee University, Seoul, Korea. p 3-56.
 18. Kim SJ, Kim YG, Park KY. 2012. Inhibitory effects of ginger and processed (Beopje) ginger extracts on HCl-ethanol induced gastritis in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1528-1533.
 19. Ryu HS, Kim J, Park SC, Kim HS. 2004. Enhancing effect of *Zingiber officinale* Roscoe extracts on mouse spleen and macrophage cells activation. *Korean J Nutr* 37: 780-785.
 20. Seo BI, Choi HY. 2004. *Clinical oriental medicine galenic pharmacy*. Younglimsa Publishing Co., Seoul, Korea. p 72-79.
 21. Jang BI. 2008. Animal models of inflammatory bowel disease. *Intest Res* 6: 8-18.
 22. Vieira ELM, Leonel AJ, Sad AP, Beltrão NRM, Costa TF, Ferreira TMR, Gomes-Santos AC, Faria AMC, Peluzio MCG, Cara DC, Alveaz-Leite JI. 2012. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. *Nutr J Biochem* 23: 430-436.
 23. Geier MS, Butler RN, Giffard PM, Howarth GS. 2007. *Lactobacillus fermentum* BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. *Int J Food Microbiol* 114: 267-274.
 24. Kim DB, Sin DG. 2004. *Functional testing guide of functional health food*. Korea Health Supplement Association, Seoul, Korea. p 569-570.
 25. Song YG, Ryu BH, Yoon SW. 2008. The effects of soyum-jungjang-tang on DSS-induced ulcerative colitis in mouse. *Korean J Orient Int Med* 29: 385-400.
 26. Zhao X. 2011. Anticancer and antiinflammatory effects of bamboo salt and *Rubus coreanus* Miquel bamboo salt. *PhD Dissertation*. Pusan National University, Busan, Korea.
 27. Bang MH, Song JC, Kim SH, Baek NI. 2001. Isolation of natural antioxidants from the root of *Zingiber officinale* R. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 44: 202-205.
 28. Huh K, Kim YH, Jin DQ. 2001. Protective effect of an aged garlic-bamboo salt mixture on the rat with the alcohol-salicylate induced gastropathy. *Yakhak Hoeji* 45: 258-268.
 29. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W. 2004. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 351: 2069-2079.
 30. Hanada T, Yoshimura A. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 3: 413-421.
 31. Hsiang CY, Lo HY, Huang HC, Li CC, Wu SL, Ho TY. 2013. Ginger extract and zingerone ameliorated trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in mice via modulation of nuclear factor-kB activity and interleukin-1 β signalling pathway. *Food Chem* 136: 170-177.
 32. Kim SJ. 2012. Preventive effects of Beopje ginger and Taemyeongcheong in *in vivo* gastritis and colitis. *MS Thesis*. Pusan National University, Busan, Korea.
 33. Richard B, Tao Y, Li W. 2011. Cyclooxygenase-2 inhibitors in ginger (*Zingiber officinale*). *Fitoterapia* 82: 38-43.