

연근 열수추출물 투여가 마우스의 비장세포와 사이토카인의 분비량에 미치는 영향

†류 혜 숙

상지대학교 보건과학대학 식품영양학과 부교수

Effect of *Nelumbo nucifera* Gaertn Water Extracts on Mouse Spleen and Cytokine Cells Activation

†Hye-Sook Ryu

Associate Professor, Dept. of Food and Nutrition, College of Health Sciences, Sangji University, Wonju 26339, Korea

Abstract

Nelumbo nucifera Gaertn has been used as a traditional remedy and food source in South Korea. It promotes gastrointestinal function and controls blood pressures. *Nelumbo nucifera* Gaertn water extracts supplement at 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 µg/mL after a 48 h pre-treatment with the mitogen (ConA or LPS) increased the mouse splenocytes proliferation. Water extract supplement also increased the cytokine production (IL-1β, TNF-α and IFN-γ), measured by a cytokine ELISA kit. For the result of *in vitro* study, the proliferation of splenocytes and cytokine production activated by peritoneal macrophages increased when water extracts were supplemented in the range of 50~500 µL/mL concentration. Specifically, the levels of the splenocytes proliferation, IL-1β, TNF-α and IFN-γ were the highest at 250 µL/mL concentration. This *in vitro* study suggested that supplementation with *Nelumbo nucifera* Gaertn water extracts may enhance the immune function by regulating the splenocyte proliferation and enhancing the cytokine production activating macrophage *in vitro*.

Key words: splenocyte proliferation, *Nelumbo nucifera*, macrophage, cytokine, immune.

서 론

연(*Nelumbo nucifera*)은 한국을 비롯한 중국, 인도, 일본 등의 지역의 늪이나 연못에서 자라는 다년생 수초로 식용이나 약용으로 널리 이용되고 있다(Yang 등 1985; Kim 등 1996). 연의 뿌리인 연근(*Nelumbo nucifera* Gaertn)은 식용으로 사용하여 스트레스, 출혈성 위궤양 등의 약리 효과가 알려져 있다(Lee 등 2006a; Bae 등 2008). 연근의 생리활성 효과에 관한 연구로는 연근의 혈장 콜레스테롤 감소 효과, 대장암 예방 효과, 당뇨병 예방 및 항산화, 항암효과 등이 알려져 있다(Jung 등 2003; Ling 등 2005; Lee 등 2006b). 또, 다른 연구에서는 연근의 에탄올 추출물이 고혈압을 강하시키고(Park 등 2005a), 신장보호 효과가 보고되었다(Cho & Kim 2003). 특히 연근의

nuferrine 성분은 부정맥을 비롯한 심혈관 질환 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(Qian JQ 2002), Lee 등(2006c)의 연구에서는 알코올로 유발된 흰쥐의 간 손상에 연근 추출물이 간을 보호하는 연근을 이용한 면역효과에 대한 연구는 미미한 수준이다. 식품을 소재로 한 면역증진에 관한 연구보고로는 옥수수과 더덕, 톳, 수수 물 추출물이 마우스의 비장세포 증식과 사이토카인 생성을 촉진시켜 면역세포 활성화 효과가 보고된 연구결과가 있다(Ryu & Kim 2004; Park 등 2005b; Ryu 등 2007). 느타리버섯 연구의 50~500 µg/mL에서 높은 면역 활성화효과를 나타낸 사례가 있다(Ryu HS 2014). 본 연구는 우리나라에서 널리 식품 소재로 이용되고 있는 연근을 이용하여 연근 열수 추출물이 마우스 비장세포와 사이토카인에 작용하여 면역세포를 변화시키는지 확인함으로써 면역 증진효과를

† Corresponding author: Hye-Sook Ryu, Associate Professor, Dept. of Food and Nutrition, College of Health Sciences, Sangji University, Wonju 26339, Korea. Tel: +82-33-738-7641, Fax: +82-33-730-0186, E-mail: rhs7420@hanmail.net

가는 식품소재로 연근의 활용가능성을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 연근은 건조된 뿌리부분을 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 연근을 증류수로 환류 냉각시키면서 3회에 걸쳐 반복 추출한 후 감압 농축의 방법으로 연근 열수추출물을 얻어 동결 건조하여 사용하였다. 이 실험에 사용한 동물은 7~8 주령된 암컷 ICR mouse를 (주)대한실험동물센터로부터 구입하여 물과 고형 사료를 자유로이 공급하면서 일주일 정도 적응시킨 후 체중이 15~18 g 내외인 마우스를 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 실험에 사용하였다(승인번호 2018-10). 동물실험실 온도는 22~24°C, 습도는 40~60%로 유지하였고, 명암주기(light and dark cycle)는 12시간 단위로 조절하여 관리하였다.

2. 마우스 비장세포의 분리 및 배양

경추 탈골방법으로 처리한 마우스에서 비장을 분리, 적출하여 RPMI 1640(Sigma, USA) 배양액으로 세척해 멸균 유리 병으로 분쇄한 후 세포를 유리시켰다. 분리된 세포 현탁액을 200 mesh stainless steel sieve(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 통과시킨 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 과정 후 적혈구를 제거한 비장세포는 RPMI 1640 medium 용액에 분산시켜 이용하였다. 세포 수 측정은 trypan blue solution(Sigma, USA)으로 염색한 다음 측정하였다. 세포의 분주는 96-well plate에 90 µL씩 분주하고, 각 군당 mitogen으로 ConA (5 µg/mL), LPS(15 µg/mL)를 10 µL씩 하였다. 대조군은 동량의 배지를 분주하여 측정하였다. 마우스 비장세포의 증식능에 이용한 공식은 다음과 같다.

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

3. 사이토카인(IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) 분비량 측정

마우스의 복부에서 채취한 대식세포는 세척액을 4°C, 3,000 rpm에서 10분 동안 원심 침전시킨 다음 cell pellet을 얻었다. RPMI 1640 용액으로 3회 원심 세척하여 얻어진 대식세포를 10%의 불활성화된 FBS를 함유한 RPMI 1640 용액에 분산시킨 후 trypan blue solution으로 염색한 후 hemacytometer를 이용하여 세포수를 측정하였다. 세포수 농도 희석은 1 \times 10⁶ cell/mL의 방법으로 하였다. 희석후 24-well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 2시간이 지난 후 well의 상층액을 걷어낸 부착 세포(adherent cells)를 이용하여 분석

하였다. 사이토카인(IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) 분비량의 측정하였다. 최종농도가 0 µg/mL와 1,000 µg/mL가 되게 하였으며, 부착성 마우스 복강 대식세포에 10%의 불활성화된 FBS를 함유한 RPMI 1640 용액을 900 µL 넣고 맞췄다. 연근 열수추출물을 각 100 µL씩 분주하여 이용하였다. 이때 온도는 37°C, 배양은 5% CO₂ 인큐베이터(Sanyo, St. Louis, MO, USA)에서 48 시간 후 배양 후 IL-1 β , TNF- α , IFN- γ 의 분비량을 ELISA 사이토카인 kit(R&D system, NY, USA)를 이용하여 분비량을 측정하였다.

4. 통계분석

연구결과의 자료 분석은 통계 프로그램인 SAS package (ver. 12.0)를 이용하였다. 평균값과 표준편차를 구한 후 각 군간의 차이를 분석하기 위해 일원분산분석(Analysis of Variance: ANOVA)을 사용하였으며, Duncan's multiple range test로 $p=0.05$ 수준에서 사후검정하였다.

결과 및 고찰

1. *In vitro* 실험에서의 연근 열수추출물이 마우스 비장세포 활성효과

연근 열수추출물 첨가의 비장세포 활성 효과에 대한 검색 결과는 Table 1과 같다. 연근열수추출물은 0, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 µg/mL의 농도로 배양하였다. 연근 추출물 대신 배양액(10% FBS-RPMI 1640)을 대조군(negative control)으

Table 1. Proliferation index of mice splenocyte cultured with water extracts of *Nelumbo nucifera* and mitogen

	Conc. (µg/mL)	Proliferation index ¹⁾
	0	1.00±0.09 ^{ab2)}
	5	1.84±0.21 ^{ab}
	10	0.10±0.16 ^{bc}
Without mitogen	50	1.32±0.19 ^c
	100	1.40±0.20 ^c
	250	0.74±0.14 ^d
	500	1.39±0.24 ^c
	1,000	0.74±0.20 ^a
	ConA	2.67±0.12 ^c

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

²⁾ Means±S.D.

^{a-c}: Means with different superscript (^{a-c}) within a column significantly different from each other ($p<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test ($a<b<c<d<e$).

로 첨가하여 결과를 확인하였고, 반면, 양의 대조군(positive control)으로는 ConA(5 $\mu\text{g/mL}$)로 검색하였다. ConA를 첨가하여 배양한 경우, 연근 열수추출물을 첨가하지 않은 대조군에 비해 각각 2.67 ± 0.12 로 비장세포 분비가 증가되었다. 연근 열수추출물을 첨가하여 배양한 경우 농도 0, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 1.00 ± 0.09 , 0.84 ± 0.21 , 1.10 ± 0.16 , 1.32 ± 0.19 , 1.40 ± 0.20 , 1.74 ± 0.14 , 1.39 ± 0.24 , 0.74 ± 0.20 로 나타났다. 연구결과에 의하면 음의 대조군(1.00 ± 0.09)에 비해 연근 열수추출물을 첨가한 50 $\mu\text{g/mL}$ 와 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의적으로 증가하였다. 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 와 같은 고농도에서는 감소하는 경향을 보였다. 이는 생강 물 추출물 50-500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의적인 활성효과를 나타낸 연구 결과(Ryu & Kim 2004)와 유사하였다. 이와 같이 50-500 $\mu\text{g/mL}$ 농도군에서 연근 열수추출물이 비장세포 활성을 촉진시켜, 면역 반응을 증가시킬 가능성이 있는 것으로 보여진다.

2. 연근 열수추출물이 사이토카인 분비량에 미치는 영향

IL-1 β , IL-2, IL-6과 TNF- α 와 같은 cytokine과 nitric oxide 등이 암세포에 세포독성을 나타낸다는 연구(Kim 등 2004)가 보고된바 있으며, 특히 초기염증반응에서 IFN- γ , IL-1 β , TNF- α 는 세포의 신호전달을 통한 면역작용에 의미 있는 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다(Barnes & Liew 1995; Ryu HS 2010).

1) IL-1 β 분비량

IL-1 β 생성량은 Fig. 1에 나타내었다. 연근 열수추출물을 첨가하지 않은 음의 대조군(3.71 ± 0.54 pg/mL)은 IL-1 β 를 분비하였고, 양의 대조군에서 136.47 ± 10.11 pg/mL로 유의적인 분비량을 보였다($p<0.05$). 연근 열수추출물 5, 10, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농

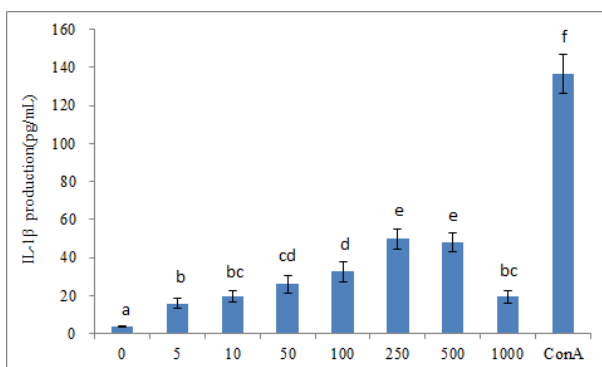


Fig. 1. IL-1 β production by activated peritoneal macrophage cultured with *Nelumbo nucifera* water extracts. * Significant difference from control at $p<0.05$. ¹⁾ Means \pm S.D. a-f: Means with different superscript (a-f) within a column significantly different from each other ($p<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test (a<b<c<d<e<f).

도 첨가군에서 각각 15.84 ± 2.79 , 19.86 ± 2.99 , 25.97 ± 4.53 pg/mL로 대조군(3.71 ± 0.54 pg/mL)에 비해 높은 IL-1 β 를 생성하여 유의성을 보였다($p<0.05$). 100, 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도 첨가시에도 각각 32.51 ± 5.05 , 49.74 ± 5.35 pg/mL로 대조군 3.71 ± 0.54 pg/mL에 비해 높은 IL-1 β 를 분비능을 보였다($p<0.05$). 또한 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 고농도의 연근 열수추출물을 첨가한 경우에서도 각각 47.92 ± 4.89 , 19.49 ± 3.33 pg/mL로 유의적인 분비량을 나타냈다($p<0.05$). 이는 연근 열수추출물이 외부에서의 항원자극에 대항하여 면역반응을 증진시킬 가능성이 있음을 보여주는 결과로 보여진다. 관련 연구 사례로는 더덕 물 추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도군에서 림프구가 증식되었다는 연구 결과가 있다(Lee 등 1995). 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 더덕 물 추출물 첨가군에서 더덕 추출물을 첨가하지 않은 군에 비해 림프절 세포가 11.2배 증식되었다는 또 다른 연구가 보고된바 있다(Lee JH 2002).

2) TNF- α 분비량

TNF- α 분비량의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 본 실험에서 양의 대조군 첨가의 경우, $2,499.09\pm 215.23$ pg/mL로 유의적인 분비량을 보였고, 음의 대조군은 180.28 ± 29.20 pg/mL의 TNF- α 가 분비되었다. 연근 열수추출물 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도를 첨가한 경우, 각 농도별 356.46 ± 88.56 , 280.28 ± 30.77 , 698.86 ± 82.09 , 557.12 ± 73.49 , 750.15 ± 82.98 , 679.74 ± 102.62 , 680.74 ± 79.22 pg/mL로 50-1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도군에서 유의적으로 높은 TNF- α 분비량을 보였다($p<0.05$). 이러한 결과에 의하면 연근 열수추출물은 면역세포에 하나인 마크로파지를 활성화시켜 초기 염증반응을 유도할 것으로 사료된다. 따라서 연구결과를 종합해 보면 연근 열수추출물을 첨가한 50-1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 높은 분비량을 나타내어 유의성

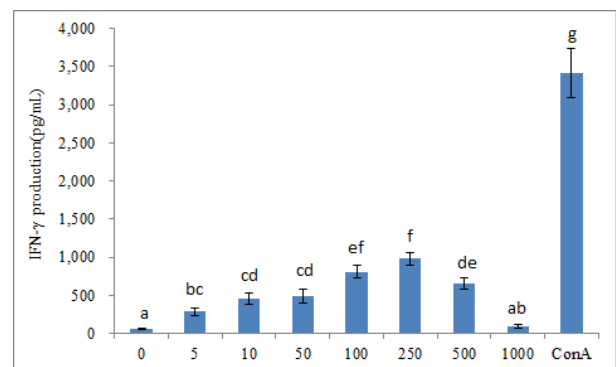


Fig. 2. IFN- γ production by activated peritoneal macrophage cultured with *Nelumbo nucifera* water extracts. * Significant difference from control at $p<0.05$. ¹⁾ Means \pm S.D. a-f: Means with different superscript (a-f) within a column significantly different from each other ($p<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test (a<b<c<d<e<f).

을 보였다. 이러한 결과는 100~1,000 µg/mL 농도에서 유의성을 보여준 질경이 물 추출물의 면역효과(Ryu & Kim 2004)와 50~1,000 µg/mL 농도 모두에서 유의적인 생성량을 나타낸 가시오가피 물 추출물 결과(Ryu HS 2015)와 유사한 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과에 따라 연근 열수추출물이 면역 세포 활성을 높여 면역증식 효과를 나타낼 가능성이 있을 것으로 보여진다. TNF-α는 T 림프구의 성장 및 활성화에 관여하여 암세포의 세포 용해를 유도함으로써 항암 작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Balkwill 등 1990).

3) IFN-γ 분비량

IFN-γ 분비량은 Fig. 3에 나타내었다. 음의 대조군에서는 56.78±10.08 µg/mL를 나타냈고, 양의 대조군에서 3,420.95±325.3 µg/mL로 유의적인 분비량을 나타내었다($p<0.05$). 연근 열수추출물 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 µg/mL를 첨가한 농도군에서 각각 286.27±51.09, 453.51±78.29, 484.05±93.03, 810.19±87.62, 979.62±84.33, 654.06±72.09, 90.96±24.19 pg/mL의 IFN-γ 생성량을 보여, 1,000 µg/mL의 농도를 제외한 농도군에서 유의적인 차이를 보였다($p<0.05$). 이는 질경이 물 추출물을 첨가한 50~1,000 µg/mL 농도에서 높은 분비량을 나타낸 연구결과와 유사한 경향을 보여주었으며, 연근 열수추출물의 면역활성 효과의 가능성을 보여준 결과라 할 수 있다. 따라서 연근 열수추출물이 외부에서 항원이 자극할 경우, 이에 대응하여 면역활성 효과를 보여준 결과라 할 수 있다. 느타리버섯 물 추출물 투여 연구에서도 5~500 µg/mL의 농도에서 IFN-γ 분비량을 촉진시킨 것으로 보고된바 있다(Ryu HS 2014).

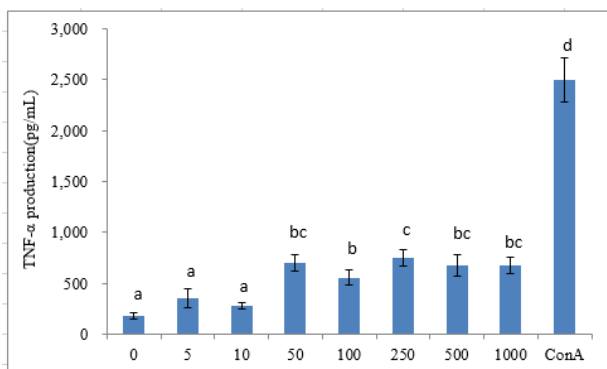


Fig. 3. TNF-α production by activated peritoneal macrophage cultured with *Nelumbo nucifera* water extracts. * Significant difference from control at $p<0.05$. ¹⁾ Means±S.D. a-d: Means with different superscript (a-d) within a column significantly different from each other ($p<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test (a<b<c<d).

요약 및 결론

In vitro 실험을 통한 연근 열수추출물 투여가 마우스의 면역세포 활성화에 미치는 영향에 대한 연구결과, 대조군에 비해 연근 열수 추출물을 투여한 50~500 µg/mL 농도에서 비장세포 증식능을 보였으며, IL-1β, IFN-γ, TNF-α 사이토카인 생성량을 측정된 결과에서도 IL-1β, IFN-γ, TNF-α 사이토카인 모두 50~500 µg/mL 농도에서 대조군보다 유의적으로 높은 분비량을 보였다. 이러한 결과에 의하면 연근 열수추출물은 마우스 비장 세포를 활성화하여 면역 기관의 주요 기능을 증진시키고, 사이토카인 분비량에도 영향을 줄 것으로 보인다. 따라서 연근 열수추출물이 면역 증진 식품 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의한 것임.

References

- Bae MJ, Kim SJ, Ye EJ, Nam HS, Park EM. 2008. Study on the chemical composition of lotus root and functional evaluation of fermented lotus root drink. *J Korean Soc Food Cult* 23:222-227
- Balkwill FR, Naylor MS, Malik S. 1990. Tumor necrosis factor as an anticancer agent. *Eur J Cancer* 26:641-644
- Barnes PJ, Liew FY. 1995. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 16:128-130
- Cho SI, Kim HW. 2003. Beneficial effect of *Nodus nelumbinis rhizomatis* extracts on cisplatin-induced kidney toxicity in rats. *Korean J Herbol* 18:127-134
- Jung HA, Kim JE, Chung HY, Chio JS. 2003. Antioxidant principles of *Nelumbo nucifera* stamens. *Arch Pharm Res* 26:279-285
- Kim CK, Chung JD, Lee HS, Kim CB, Yoon JT, Chio BS. 1996. Effect of plant growth regulators on organogenesis of rhizome in mature embryo cultures of *Nelumbo nucifera*. *Korean J Plant Tissue Cult* 23:195-198
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci* 96:229-245
- Lee JH. 2002. Immunostimulative effect of hot-water extract from *Codonopsis lanceolata* on lymphocyte and clonal macrophage.

- Korean J Food Sci Technol* 34:732-736
- Lee JJ, Park SY, Lee MY. 2006a. Effects of lotus root (*Nelumbo nucifera* G.) on lipid metabolism in rats with diet-induced hypercholesterolemia. *Korean J Food Preserv* 13:634-642
- Lee JJ, Park SY, Lee YM, Lee MY. 2006b. Protective effects of lotus extract (*Nelumbo nucifera* G.) on hepatic injury induced by alcohol in rats. *Korean Soc Food Preserv* 13:774-782
- Lee KS, Kim MG, Lee KY. 2006c. Antioxidative activity of ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35:182-185
- Lee YJ, Kim JM, Jung YM. 1995. Effect of *Codonopsis pilosula* on the cellular immunity. *Korean J Vet Public Health* 19: 273-279
- Ling ZQ, Xie BJ, Yang EI. 2005. Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *J Agric Food Chem* 53:2441-2445
- Park KY, Lee SJ, Lee KI, Rhee SH. 2005a. The antitumor effect in Sarcoma-180 tumor cell of mice administered with Japanese apricot, garlic or ginger doenjang. *Korean J Food Cookery Sci* 21:599-606
- Park SH, Hahm TS, Han JH. 2005b. Effects of ethanol extract of lotus root on the renal function and blood pressure of fructose induced-hypertensive rats. *J East Asian Diet Life* 15:165-170
- Qian JQ. 2002. Cardiovascular pharmacological effect of bisbenzylisoquinoline alkaloid derivatives. *Acta Phramacol Sin* 23:1086-1092
- Ryu HS, Jung YH, Kim HS. 2007. Effect of *Hizikia fusiforme* water extracts on mouse immune cell activation. *Korean J Nutr* 40:624-629
- Ryu HS, Kim HS. 2004. Effect of *Zingiber officinale* Roscoe extracts on mice immune cell activation. *Korean J Nutr* 37:23-30
- Ryu HS, Kim J, Kim HS. 2006. Enhancing effect of *Sorghum bicolor* L. Moench (*Sorghum, su-su*) extracts on mouse spleen and macrophage cell activation. *Korean J Food Nutr* 19:176-182
- Ryu HS. 2010. Effects of water extract acorn on mouse immune cell activation *ex vivo*. *Korean J Food Nutr* 23:135-140
- Ryu HS. 2014. Enhancing effect of *Pleurotus ostreatus* extracts on mouse spleen and cytokine cells activation. *Korean J Food Nutr* 27:603-608
- Ryu HS. 2015. Enhancing effect of *Acanthopanax senticosus* extracts on mouse spleen and macrophage cells activation. *Korean J Food Nutr* 28:253-257
- Ryu HS. 2017. Effect of *Plantago asiatica* L. Water extracts on mice spleen and cytokine cells activation. *Korean J Food Nutr* 30:510-514
- Yang HC, Lee TK, Cha YS, Cha YS. 1985. Physicochemical properties of lotus root. *J Korean Agric Chem Soc* 28:239-244

Received 07 March, 2019

Revised 15 May, 2019

Accepted 10 June, 2019