

호박고구마 물 추출물 투여가 마우스의 비장세포와 사이토카인의 분비량에 미치는 영향

†류 혜 숙

상지대학교 보건의료과학대학 식품영양학과 부교수

Effect of Pumpkin Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Water Extracts on Mouse Spleen and Cytokine Cell Activation

†Hye-Sook Ryu

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

Abstract

Pumpkin sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) has been known as a traditional remedy and food source, not only in South Korea but worldwide. It is rich in fiber, potassium, vitamin C, and other minerals and vitamins, making it a nutritional food loved by many. showed that pumpkin sweet potato had antioxidant biological effects. The *in vitro* study showed that both splenocytes and cytokine production byactivated peritoneal macrophages increased when water extracts were supplemented at 100 and 250 μ L/mL. Notably, the production of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ by splenocytes was significantly increased at 100 μ L/mL. The results suggest that supplementation with pumpkin sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) water extract may enhance immune function by stimulating splenocyte proliferation and improving cytokine production, activating macrophages *in vitro*.

Key words: splenocytes proliferation, pumpkin sweet potato, cytokine production

서 론

고구마 육질이 오렌지색을 띠는 호박고구마는 보통고구마에 비해 β -카로틴 함량이 많아 항산화 효과, 항암작용, 심혈관계 질병예방 등의 생리활성 기능성이 우수한 것으로 알려져 있다(Lee 등 2006). 고구마의 우수한 영양성분으로 비타민 C, β -카로틴, 무기질, 칼슘과 칼륨, 식이섬유소 등 풍부한 것으로 밝혀져 있다(Lee 등 1999; Kim 등 2010). 또한 고구마 폴리페놀성분의 항산화 효과 등이 보고되면서 고구마의 영양적인 가치를 인정받아 건강식품으로 널리 이용되고 있는 실정이다(Kim HS 2013). 이러한 고구마의 소비 증가의 수요에 맞춰 고구마를 활용한 제과, 빵(Ko & Seo 2010; Lee & Park 2011), 된장(Bae 등 2012), 청국장(Cha 등 2017), 고구마 음료(Chun 등 2000) 등 다양한 가공식품이 개발되어지고 있

다. 최근에는 유산균을 활용한 발효고구마의 항산화 활성 효과에 대한 연구가 보고되어진바 있으며(Ha 등 2019), 항암작용, 심혈관계 질환 예방 효과 연구가 알려져 있다(Kurata 등 2007; Oki 등 2016). 호박고구마를 이용한 연구로 호박고구마 효소 분해물을 이용한 장상피세포 부착능 연구에서 동결건조 분말에 비해 분무 건조 분말에서 더 효능을 보여준 연구 보고가 있다(Lee 등 2017). 반면, 고구마를 이용한 면역효과에 대한 연구는 거의 알려져 있는 않은 수준이다. 다른 식품의 생리활성 효과 연구로 질경이, 팽이버섯, 연근 물 추출물이 마우스의 비장세포 증식과 사이토카인 생성을 촉진시켜, 면역세포 활성화 효과가 보고된 연구결과가 있다(Ryu HS 2017; Kim & Ryu 2018; Ryu HS 2019). 이 연구의 목적은 우리나라에서 건강식품으로 활용되는 호박고구마를 이용하여 면역 증진효과를 갖는 식품소재로서의 기능성 가치를 찾아내어,

† 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

호박고구마를 활용한 다양한 제품개발의 기초자료로 활용하는데 기여하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시료 및 실험동물

실험에 사용된 호박 고구마는 2018년 해남군에서 재배된 것을 농협 하나로 마트에서 구입하였다. 시료는 흐르는 물에 충분히 세척한 후 얇게 잘라 바람이 잘 통하는 실험실에서 신문지를 깔고 일주일 동안 건조하여 사용하였다. 건조된 호박고구마 510 g을 감압 농축의 방법으로 물 추출 3회 반복하여 65.5 g의 추출물을 얻었으며, 이를 동결 건조하여 사용하였다. 이 실험에 사용한 동물은 8-9주령된 암컷 ICR mouse를 (주)대한실험동물센터로부터 구입하여 물과 고형 사료를 자유로이 공급하면서 5일 정도 적응시킨 후 체중이 16-17 g 내외인 마우스를 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 실험에 사용하였다(승인번호 2018-10). 동물을 실험에 최적화하기 위해 안정시키는 동안의 실험실 온도는 22-23°C, 습도는 50-60%로 조절하며 유지하였다.

2. 마우스 비장세포의 분리, 배양 및 측정

경추 탈골방법으로 처리한 마우스 비장을 분리, 적출하였고, 적출된 비장의 세척과 분쇄는 RPMI 1640(Sigma, USA)용액과 멸균된 유리봉을 이용하여 세포를 유리시커 200 µm cell strainer에 여과 후 10분간 원심분리(4°C, 3,000 rpm)한 다음, 세포 현탁액을 200 mesh stainless steel sieve(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 통과시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 적혈구를 제거한 비장세포는 trypan blue solution(Sigma, USA)으로 염색하여 세포 수를 확인하였다. 세포는 90 µL씩 분주하고, 각 군당 mitogen 10 µL씩 분주하였다. 비장세포 농도는 5.0×10^6 cell/mL로 10% FBS-RPMI 1640을 사용하였고, 비장세포의 증식능에 이용한 공식은 다음과 같다.

Proliferation index = Sample의 흡광도/Control의 흡광도

흡광도(optical density, O.D.) 측정은 ELISA reader(R&D system, NY, USA)를 이용하여 분석하였다.

3. 사이토카인(IL-1β, IFN-γ, TNF-α) 분비량 측정

대식세포에서 분리된 사이토카인은 마우스 복강 내에서 분리하여 사용하였다. 사이토카인 분비량의 측정은 최종농도가 0 µg/mL와 1,000 µg/mL가 되게 하였으며, 부착성 마우스 복강 대식세포에 10%의 불활성화된 FBS를 함유한 RPMI

1640 용액 900 µL와 호박고구마 물 추출물을 100 µL씩을 각각 분주하였다. 세포배양은 5% CO₂ 인큐베이터(Sanyo, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 37°C, 48시간 동안 배양하였다. 대식세포 상층액의 IL-1β, TNF-α, IFN-γ의 분비량은 ELISA 사이토카인 kit(R&D system, NY, USA)를 이용하여 측정하였다. 각각의 시험관에 50 µL의 샘플과 각각의 사이토카인 bead를 혼합한 capture bead 50 µL를 투여하여 빛이 차단된 실온에 1시간 방치한 다음, mixed PE detection reagent를 각 시험관에 50 µL 첨가하여 빛이 차단된 실온에 다시 방치하였다. 그런 다음 상층액을 버리고 wash buffer 200 µL씩을 상층액을 제거한 시험관에 가하여 FACS Canto II(BD Biosciences, USA)를 사용하여 사이토카인 분비량을 확인하였다.

4. 통계처리

연구 결과에 대한 자료 분석은 통계 프로그램인 SAS package(ver. 12.0)를 이용하였다. 표준편차와 평균값을 구한 뒤 각 군 간의 차이를 분석하기 위해 일원분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 수행하였고, 다중범위검증법 중 Duncan's multiple range test로 확인하였다. 유의성 검정은 $p=0.05$ 수준에서 사후검정하였다.

결과 및 고찰

1. 호박고구마 물 추출물이 마우스 비장세포 활성효과 -*In vitro* 실험

호박고구마 물 추출물을 첨가한 비장세포 활성 효과에 대한 연구 결과는 Table 1에 나타내었다. 호박 고구마 물 추출

Table 1. Proliferation index of mice splenocyte cultured with water extracts of pumpkin sweet potato and mitogen

	Conc. (µg/mL)	Proliferation index ¹⁾
	0	1.00±0.09 ^{ab2)}
	5	0.71±0.04 ^a
	10	0.98±0.23 ^{ab}
Without	50	0.93±0.23 ^a
mitogen	100	2.28±0.46 ^c
	250	1.39±0.27 ^b
	500	1.09±0.23 ^{ab}
	1,000	0.73±0.21 ^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 including different letter (^{a-c}) on the column substantially different from each other ($p<0.05$) as demonstrated by Duncan's multiple range test ($a<b<c$).

물은 0, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 배양하였다. 대조군(negative control)으로 호박고구마 물 추출물 대신 배양액(10% FBS-RPMI 1640)을 첨가하여 결과를 비교 관찰하였고, 양의 대조군(positive control)으로는 ConA(5 $\mu\text{g/mL}$)로 확인하였다. ConA를 첨가한 경우 호박고구마 물 추출물을 첨가하지 않은 대조군에 비해 2.67 \pm 0.12로 비장세포 생성량이 증가하였다. 호박고구마 물 추출물을 첨가하여 검색한 결과는 농도 0, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 1.00 \pm 0.09, 0.71 \pm 0.04, 0.98 \pm 0.23, 0.93 \pm 0.23, 2.28 \pm 0.46, 1.39 \pm 0.27, 1.09 \pm 0.23, 0.73 \pm 0.21로 나타났다. 연구결과, 호박고구마 물 추출물을 첨가한 100 $\mu\text{g/mL}$ 와 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 음의 대조군(1.00 \pm 0.09)에 비해 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 이는 느타리버섯 물 추출물 250 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의적인 활성효과를 나타낸 연구 결과(Ryu HS 2014)와 유사한 경향을 보였다. 따라서 100~250 $\mu\text{g/mL}$ 농도군에서 호박고구마 물 추출물이 비장세포 활성을 촉진시켜, 면역 반응을 증가시킬 가능성을 보여준 결과이다. 식물 소재의 물 추출물을 이용한 연근의 면역세포 활성효과 실험에서도 100~250 $\mu\text{g/mL}$ 농도가 포함된 50~500 $\mu\text{g/mL}$ 농도 군에 활성을 보인 연구 결과가 있다(Ryu HS 2019).

2. 호박 고구마 물 추출물이 사이토카인 분비량에 미치는 영향

IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 와 TNF- α 등과 같은 cytokine이 초기 염증반응에서 세포의 신호전달을 통한 면역작용에 의미있는 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다(Barnes & Liew 1995; Kim 등 2004). 특히 IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ 는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 대표적인 사이토카인으로 식품 면역지표로 알려져 있다(Hibbs & Nathan 1991). 또한 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)는 단핵구, 대식세포, 비만세포, 림프구 및 자연살해세포를 비롯한 많은 세포에서 생산되어 감염, 염증 반응에 관여하며, 종양에 항 증식작용을 하고 상처 치료에 도움을 주며, TNF- α 는 T림프구와 상호 작용하여 T림프구의 활성화와 성장 등을 조절한다(Meydani SN 1990).

1) IL-1 β 생성량

IL-1 β 생성량은 Fig. 1에 나타내었다. 호박고구마 물 추출물을 첨가하지 않은 음의 대조군 IL-1 β 생성량은 3.71 \pm 0.54 pg/mL, 반면, 양의 대조군 ConA 첨가군에서는 136.47 \pm 10.11 pg/mL로 유의성을 보였다. 호박고구마 물 추출물 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도 투여군에서 각각 13.79 \pm 3.13, 44.42 \pm 7.89, 30.75 \pm 5.23, 29.82 \pm 4.58, 26.07 \pm 3.09 pg/mL로 대조군(3.71 \pm 0.54 pg/mL)에 비해 높은 IL-1 β 를 생성하여 유의성을 보였다. 이는 호박고구마의 경우 중간 농도에서 면역세포 활

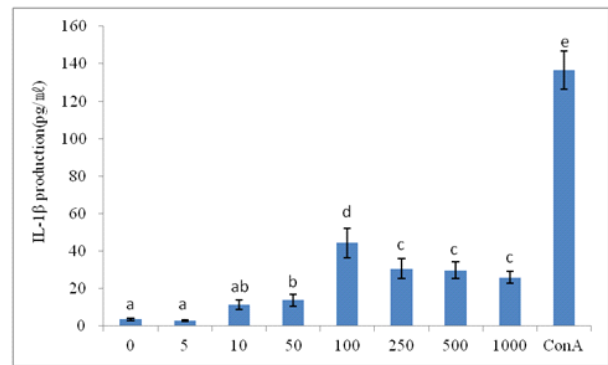


Fig. 1. IL-1 β production by activated peritoneal macrophage cultured with pumpkin sweet potato water extracts. ^{a-c}Means including different letter (^{a-c}) on the column substantially different from each other ($p < 0.05$) as demonstrated by Duncan's multiple range test ($a < b < c < d < e$).

성 효과가 높고, 저농도와 고농도에서는 효과가 떨어지는 경향을 보여주는 결과라 할 수 있다. 또한 호박고구마 물 추출물이 외부에서의 항원자극에 대하여 면역반응을 증진시킬 가능성을 보여주는 결과로 사료된다. 또 다른 연구 사례로는 연근 물 추출물 100~500 $\mu\text{g/mL}$ 농도군에서 IL-1 β 생성량이 높게 나타난 연구가 보고된 바 있다(Ryu HS 2019). Lee JH(2002)의 연구 결과에 따르면 더덕 열수 추출물 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 투여군에서 하자 투여하지 않은 군에 비해 림프구 세포가 11.2배 증식되었다고 보고하였다. 이러한 연구 결과를 종합해보면 호박고구마 물 추출물 투여가 면역세포 활성화에 영향을 미칠 것으로 보여진다.

2) TNF- α 생성량

TNF- α 결과는 Fig. 2와 같다. 본 실험에서 양의 대조군 ConA 투여의 경우 2,499.09 \pm 215.23 pg/mL로 유의적인 생성량을 나타내었고, 음의 대조군은 180.28 \pm 29.20 pg/mL의 TNF- α 가 생성되었다. 호박고구마 물 추출물 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도를 첨가한 경우 각 농도별 666.20 \pm 5.66, 487.42 \pm 70.89, 954.29 \pm 115.09, 756.92 \pm 201.99, 730.88 \pm 163.75, 623.91 \pm 95.08 pg/mL로 유의적으로 높은 TNF- α 생성량을 보였다($p < 0.05$). 이러한 결과에 따라 호박고구마 물 추출물은 대식세포를 활성화시켜 사이토카인 생성량을 자극하여 면역 기능 증강에 관여할 것으로 보여진다. 이러한 결과는 100~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 유의성을 보여준 질경이 물 추출물의 면역효과와 50~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도 모두에서 유의적인 생성량을 나타낸 가시오가피 물 추출물 결과와 유사한 경향을 나타내었다(Ryu & Kim 2005; Ryu HS 2015). 따라서 호박고구마 물 추출물이 면역 세포 활성을 높여 면역 활성 효과의 가능성을 보여준 결과라 할 수 있다. TNF- α 는 T 림프구의 성장과

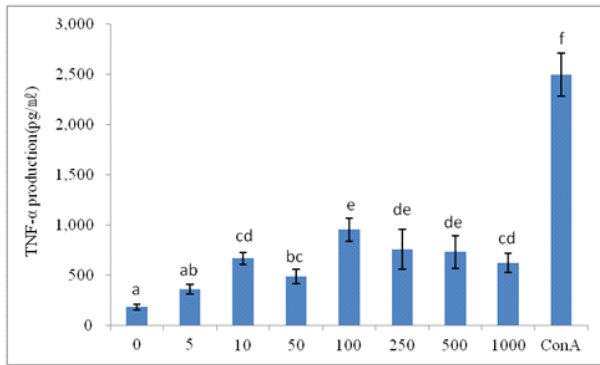


Fig. 2. TNF- α production by activated peritoneal macrophage cultured with pumpkin sweet potato water extracts. ^{a-f}Means including different letter (^{a-f}) on the column substantially different from each other ($p < 0.05$) as demonstrated by Duncan's multiple range test ($a < b < c < d < e < f$).

활성에 관여하여 암세포의 세포 용해를 유도함으로써 항암 작용에도 효과를 보인 것으로 보고된 바 있다(Balkwill 등 1990). 특히 100~250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서의 높은 생성능은 비장세포 증식능과 유사한 경향을 나타내어 이 농도에 주목하여 *in vivo* 실험의 근거로 활용할 수 있을 것으로 보여진다.

3) IFN- γ 생성량

IFN- γ 생성량은 Fig. 3과 같다. 음의 대조군에서는 56.78 ± 10.88 $\mu\text{g/mL}$, 양의 대조군 ConA 투여군에서 $3,420.95 \pm 325.3$ $\mu\text{g/mL}$ 로 유의적인 생성량을 나타내었다($p < 0.05$). 호박고구마 물 추출물 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 를 첨가한 농도군에서 각각 42.12 ± 8.66 , 98.52 ± 18.07 , 331.74 ± 53.63 , $2,504.00 \pm 307.42$, 769.80 ± 92.61 , 409.70 ± 62.73 , 321.62 ± 42.93 pg/mL 의 IFN- γ

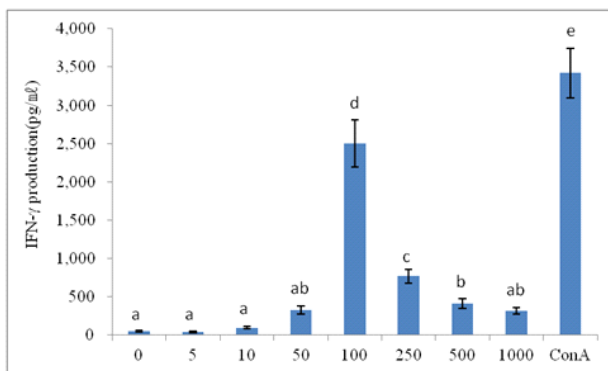


Fig. 3. IFN- γ production by activated peritoneal macrophage cultured with pumpkin sweet potato water. ^{a-e}Means including different letter (^{a-e}) on the column substantially different from each other ($p < 0.05$) as demonstrated by Duncan's multiple range test ($a < b < c < d < e$).

생성량을 보여, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도군에서 유의성을 보였다($p < 0.05$). 이는 울무 물 추출물을 첨가한 50~500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 높은 분비량을 나타낸 연구결과와 유사한 결과이다(Ryu & Kim 2005). 느타리버섯 물 추출물 투여 연구에서도 50~500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 IFN- γ 분비량을 촉진시킨 것으로 보고된바 있다(Ryu HS 2014). 이러한 결과를 종합해 볼 때 호박고구마 물 추출물이 외부 항원에 대응하여 면역 활성화 효과를 나타낼 것으로 사료된다. 이와 같은 결과에 따라 비장세포 증식능과 본 연구에서 지표로 본 세 종류의 사이토인 농도별 결과에서 공통적으로 높은 증식능을 보인 100~250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도는 *in vivo* 실험의 참고 근거로 삼는데 도움이 될 것으로 사료된다.

요약 및 결론

In vitro 실험을 통한 호박고구마 물 추출물 투여가 마우스의 면역기능에 미치는 영향에 대한 연구 결과, 대조군에 비해 호박고구마 물 추출물을 투여한 100~250 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 비장세포 증식능을 보였으며($p < 0.05$), IL-1 β , TNF- α , IFN- γ 사이토카인 생성량을 측정된 결과에서도 IL-1 β 는 50~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서, IFN- γ 는 10~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서, TNF- α 는 100~500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의성을 나타냈으며($p < 0.05$), IL-1 β , TNF- α , IFN- γ 사이토카인 모두 100~500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 대조군보다 높았다($p < 0.05$). 이러한 결과에 의하면 호박 물 추출물은 마우스 비장 세포를 자극하여 면역을 담당하는 기관의 기능을 강화시키고, 사이토카인 생성량을 증가시켜 면역세포 활성화에 영향을 줄 것으로 사료된다. 따라서 호박고구마 물 추출물이 면역세포 활성화에 효과가 있는 식품으로 활용될 수 있기를 기대한다.

References

- Bae JO, Lee KJ, Park SJ, Choi DS. 2012. Preparation of sweet potato *Doenjang* using colored sweet potato. *Korean J Food Nutr* 25:529-537
- 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
- Cha SJ, Park SR, Kim DH. 2017. Quality characteristics of doenjang prepared with sweet potato. *Korean J Food Preserv* 24:221-229
- Chun SH, Lee SU, Shin YS, Lee KS, Ryu IW. 2000. Preparation of yogurt from milk added with purple sweet potato. *Korean*

- J Food Nutr* 13:71-77
- Ha GJ, Kim HY, Ha IJ, Cho SR, Moon JY, Seo GI. 2019. Quality and antioxidant properties of fermented sweet potato using lactic acid bacteria. *Korean J Food Nutr* 32:494-503
- Hibbs JB, Nathan CF. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3:65-70
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci* 96:229-245
- Kim HS. 2013. Physicochemical properties of sweet potato starch reclaimed from sweet potato processing sludge. *Korean J Food Sci Technol* 45:747-753
- Kim KE, Kim SS, Lee YT. 2010. Physicochemical properties of flours prepared from sweet potatoes with different flesh colors. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:1476-1480
- Kim KO, Ryu HS. 2018. The effects of *Flammulina velutipes* water extracts on the activation of spleen cell and macrophage in mice. *Korean J Food Nutr* 31:236-241
- Ko SH, Seo EO. 2010. Quality characteristics of muffins containing purple colored sweetpotato powder. *J East Asian Soc Diet Life* 20:272-278
- Kurata R, Adachi M, Yamakawa O, Yoshimoto M. 2007. Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweet potato leaves. *J Agric Food Chem* 55:185-190
- Lee DH, Jang JH, Hong JH. 2017. Spray-dried powder preparation of pumpkin sweet potato hydrolysates and its physicochemical properties. *Korean J Food Preserv* 24:246-253
- Lee HH, Kang SG, Rhim JW. 1999. Characteristics of antioxidative and antimicrobial activities of various cultivars of sweet potato powder. *Korean J Food Sci Technol* 31:1090-1095
- Lee JH 2002. Immunostimulative effect of hot-water extracts from *Codonopsis lanceolata* on lymphocyte and clonal macrophage. *Korean J Food Sci Technol* 34:732-736
- Lee JS, Ahn YS, Kim HS, Chung MN, Jeong BC. 2006. Making techniques of high quality powder in sweetpotato. *Korean J Crop Sci* 51:198-203
- Lee SM, Park GS. 2011. Quality characteristics of bread with various concentrations of purple sweet potato. *Korean J Food Cookery Sci* 27:1-16
- Meydani SN. 1990. Dietary modulation of cytokine production and biologic functions. *Nutr Rev* 48:361-369
- Oki T, Kano M, Watanabe O, Goto K, Boelsma E, Ishikawai F, Suda I. 2016. Effect of consuming a purple-fleshed sweet potato beverage on health-related biomarkers and safety parameters in Caucasian subjects with elevated levels of blood pressure and liver function biomarkers: A 4-week, open-label, non-comparative trial. *Biosci Microbiota Food Health* 35:129-136
- Ryu HS, Kim HS. 2005. Effects of *job's tear(yul-moo)* extracts on mouse immune cell activation. *J Korean Diet Assoc* 11: 44-50
- 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. extracts on mice spleen and cytokine cells activation. *Korean J Food Nutr* 30:510-514
- Ryu HS. 2019. Effect of *Nelumbo nucifera* Gaertn water extracts on mouse spleen and cytokine cells activation. *Korean J Food Nutr* 32:246-250

Received 26 March, 2020
 Revised 12 May, 2020
 Accepted 07 June, 2020