생강(*Zingiber officinale* Roscoe) 뿌리, 줄기, 잎의 라디칼 소거 활성을 통한 산화스트레스 억제 효과

임푸름 · 황혜정 · 임정연 · 황유진 · 남동건 · 최정숙 · 황경아

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

Inhibitory Effects of *Zingiber officinale* Roscoe Roots, Stems, and Leaves on Oxidative Stress through Free Radical Scavenging Activity

Pu Reum Im, Hye-Jeong Hwang, Jeong Yeon Im, Yu-Jin Hwang, Dong-Geon Nam,
Jeong-Sook Choe, and Kyung-A Hwang

Department of Agrofood Resources, National Institute of Agricultural Sciences, RDA

ABSTRACT In this study, the antioxidant effects of *Zingiber officinale* Roscoe leaves and stems which have been registered as new food ingredients were comparatively analyzed with *Z. officinale* Rosc. roots. The increase in antioxidant activity was concentration-dependent in all extracts, and excellent antioxidant activity was confirmed in the roots (58%) and leaves (35%) at 100 µg/mL. The inhibitory effect of nitric oxide production was found in all samples. In particular, the leaves showed an inhibitory rate of 25~31%, an effect similar to that of the roots (22~37%), confirming their excellent efficacy. The stems showed a 24~26% inhibition rate, but the inhibition was not concentration-dependent. The inhibitory effect of the roots, stems and leaves of *Z. officinale* Rosc. on the reactive oxygen species production was highest in the roots (21~46%), followed by leaves (15~30%) and stems (2~11%). Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) and Mn-SOD mRNA expressions were increased to high levels by the leaves. Glutathione peroxidase and catalase levels were increased in the roots, leaves, and stems, in that order. Through the results of this study, the antioxidant effects of *Z. officinale* Rosc. leaves and stems were confirmed, and excellent antioxidant activity was confirmed in the leaves. *Z. officinale* Rosc. leaves can therefore be considered for use as an antioxidant functional health food material in the future. However, since studies on the leaves are insufficient, additional studies in animals are needed to investigate the mechanism of the physiological activity of *Z. officinale* Rosc. leaves in the body.

Key words: *Zingiber officinale* Roscoe, root, leaf, stem, reactive oxidative stress

서 론

최근 현대인들은 급속한 공업화로 인한 환경오염과 식생활 변화로 인해 과도한 산화스트레스 환경에 노출되어 있다(Kwon 등, 2020). 체외의 다양한 자극들은 인체 내 스트레스를 유발하고 활성산소를 생성시켜 세포와 조직을 구성하는 단백질, 지질, 세포막과 DNA를 손상시키고 이러한 일련의 과정은 염증반응을 시작으로 알레르기 및 노화 등 다양한 질환을 유발하게 된다(Anwar 등, 2013; Furukawa 등, 2004; Griendling과 FitzGerald, 2003; Tang 등, 2012). 인체는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase 등과 같이 항산화계 효소를 비롯한 다

양한 항산화 시스템을 작동시켜 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 포함하는 자유라디칼을 조절하여 체내를 보호한다. 그러나 최근 산화스트레스 자극이 증가함에 따라 관련 질환을 예방 및 개선할 수 있으며 부작용이 적어 일상에서 꾸준히 섭취할 수 있는 항산화 효능이 우수한 기능성 천연물 소재에 대한 관심이 증가하고 있다(Kwon 등, 2020; Seol 등, 2020).

생강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 생강과 계통에 속하는 다년생 식물로 지하부의 뿌리 줄기에서 지상부로 가짜 줄기가 뻗어 나오고 가짜 줄기 윗부분에 잎이 자란다(Hosseinzadeh 등, 2017). 생강은 특유의 매운맛과 향을 가지고 있는 전 세계적으로 널리 애용되는 향신료이며 항산화, 항염증, 항당뇨, 면역증진 및 항암 등의 효과가 알려져 약용으로도 사용된다(O'Hara 등, 1998). 생강에는 6-gingerol, 6-shogaol, zingiberene, γ -cardinen 등의 휘발성 향기 성분 및 zingiberol, zingiberene 등의 정유 성분을 포함한 다양한 생리활성 성분이 함유되어 있다(Connell, 1970; Cooksley,

1996; Lee 등, 2014; Sheo, 1999; Thomson 등, 2002). 또한 생강 잎과 줄기에도 다양한 생리활성 성분이 함유되어 있는데, 특히 뿌리보다 조섬유 4~5배, 조사포닌 1.7배, 일부 무기질(Ca, Sr, K) 4~5배, 필수 지방산 5배, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 2~3배가 더 높게 함유되어 있다(Lee 등, 2014). 그러나 생강 잎과 줄기는 식품공전에 등재되지 않아 식품으로 활용할 수 없었고, 재배하는 과정에서 폐기 또는 다음 경작을 위한 거름으로 활용되는 등 제한적으로만 사용되어왔다. 이에 따라 2016년 농촌진흥청에서 식품 원료등록 연구를 통해 “식품에 사용할 수 있는 원료” 목록에 등록시켜 식품 원료로 사용할 수 있게 되었다. 또한, 2010년 나고야 의정서가 발효된 이후 자국의 천연물자원 확보가 중요해짐에 따라 기능성 우수 농산물자원의 적극적 발굴 및 자국의 천연물자원에 대한 주권 확보를 위해 국산 농산물의 생리활성 구명 연구의 필요성이 증가하였다. 따라서 본 연구에서는 신규 식품 원료로 등록된 생강 잎 및 줄기와 생강 뿌리의 라디칼 소거 활성을 통한 산화스트레스 억제 효과를 비교 평가하여 생강 잎 및 줄기의 기능성 소재로서의 가치를 확인하고 관련 연구에 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

실험에 사용한 생강 뿌리, 생강 잎 및 생강 줄기는 2018년 충청남도 서산시에서 재배된 것을 구매하여 사용하였다. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azno-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonia acid)(ABTS), potassium peroxodisulfate, lipopolysaccharide(LPS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(P/S), phosphate buffered saline(PBS)은 Gibco(Waltham, MA, USA)를, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 Molecular probe(Eugene, OR, USA) 제품을 구매하여 사용하였다. 이외의 분석용 시약은 필요에 따라 특급 또는 1급을 구매하여 사용하였다.

추출물 제조

생강 뿌리, 잎 및 줄기는 이물질을 제거하고 물로 깨끗이 씻어서 뿌리는 1 cm, 잎과 줄기는 3 cm 크기로 세절한 후 60°C에서 48시간 열풍 건조(DS-240BC, DooSung Co., Ltd., Gwangju, Korea)하여 분쇄(SMX-C4000WK, Shinil Co., Incheon, Korea)하였다. 분쇄된 시료는 30 mesh 체에 내려 -70°C 초저온 냉동고(GS28130416-141, GMS Co., Ltd., Yangju, Korea)에서 냉동 보관하면서 시료로 사용하였다.

각 시료의 추출은 건조물 80 g에 70% 에탄올 1,600 mL를 가하여 70°C에서 8시간 동안 교반(SMHS-6, DAIHAN Co., Wonju, Korea)하여 추출하였다. 추출물은 여과지(No. 2, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 감압 여과한 후 여액은 감압 농축(EYELA CCA-1110, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)하여 동결건조(LP30-CXX, Ilsin Co., Dongducheon, Korea) 후 -70°C 초저온 냉동고에 보관하며 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능 측정은 Blois(1958)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. DPPH 시약은 무수에탄올에 희석하여 0.15 mM DPPH 용액을 만들어 사용하였고 시료는 70% 에탄올에 농도별(20, 50, 100 µg/mL)로 희석하여 사용하였다. DPPH 용액 160 µL와 시료 40 µL를 혼합하여 암실에서 30분간 반응시킨 후, microplate reader(SpectraMax M2[®], Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도(518 nm)를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 70% 에탄올을 사용하였고, 라디칼 소거능은 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{ABS}_{\text{sample}}}{\text{ABS}_{\text{control}}}\right) \times 100$$

ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능 측정은 Re 등(1999)의 방법을 일부 변형하여 수행하였다. ABTS 시약은 무수에탄올에 희석하여 7 mM의 ABTS 용액을 제조하였고 potassium persulfate는 증류수에 희석하여 2.45 mM 농도로 용액을 제조하였다. ABTS 용액과 potassium persulfate 용액은 1:1로 혼합하고 실온의 암실에서 12시간 동안 보관하여 ABTS 라디칼을 생성시켰다. 혼합된 ABTS 용액은 734 nm에서 흡광도 1.20±0.20이 될 때까지 에탄올로 희석하여 사용하였으며, 시료는 70% 에탄올에 농도별(20, 50, 100 µg/mL)로 희석하여 사용하였다. 농도가 조정된 ABTS 용액 180 µL에 시료 20 µL를 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader(SpectraMax M2[®], Molecular Devices, LLC)를 이용하여 흡광도(734 nm)를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 70% 에탄올을 처리하였고, 라디칼 소거능은 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{ABS}_{\text{sample}}}{\text{ABS}_{\text{control}}}\right) \times 100$$

세포 배양

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구매하여 실험에 사용하였다. 세포는 10% FBS와 1% P/S를 포함한 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 incubator(311-TIF, Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA, USA)에서 배양하

였으며 2일 주기로 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

세포 독성 측정

RAW 264.7 세포는 1×10^4 cells/well이 되도록 96-well plate에 분주하여 2시간 동안 전 배양한 후 각 시료 추출물을 농도별(20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT 용액 5 mg/mL를 각 well에 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 재배양하여 formazan을 생성시키고 DMSO에 녹여 microplate reader(SpectraMax M2[®], Molecular Devices, LLC)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Intracellular ROS 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포는 2.5×10^4 cells/well이 되도록 96-well plate에 분주하여 2시간 동안 전 배양한 후 각 시료 추출물을 농도별(20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하였으며, 산화스트레스 유발을 위해 1시간 후에 LPS(1 $\mu\text{g/mL}$)를 각 well에 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 세포 내 생성된 ROS는 cellular ROS assay kit(Abcam, Cambridge, MA, USA)을 이용하여 측정하였다. 즉, 세포배양 상등액을 제거 후 buffer로 2회 세척하고 20 μM DCFH-DA를 분주하여 37°C에서 45분간 배양하였다. 배양을 마친 후 상등액을 제거하고 buffer 100 μL 를 분주하여 GloMax discover microplate reader(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 485 nm(excitation), 535 nm(emission)로 형광값을 측정하였다. 세포 내 ROS 생성량은 LPS 처리 대조군 대비 백분율(%)로 나타내었다.

Nitric oxide(NO) 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포는 96-well plate에 2×10^4 cells/well이 되도록 분주하여 2시간 동안 전 배양한 후 시료 추출물을 농도별(20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하였으며, 1시간 후 LPS(1 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 이후 세포 배양 상등액을 회수하여 sulfanilamide 용액과 1:1 비율로 10분 반응시킨 후, n-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride 용액을 넣고 10분 반응시켜 microplate read-

er(SpectraMax M2[®], Molecular Devices, LLC)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 sodium nitrite를 사용하여 검량선을 작성한 후 NO 생성량을 환산하여 나타내었다.

항산화 효소의 유전자 발현

RAW 264.7 세포는 5×10^5 cell/well이 되도록 12-well plate에 분주하여 2시간 동안 전 배양한 후 시료 추출물을 농도별(20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하였으며, LPS(1 $\mu\text{g/mL}$)를 1시간 뒤에 각 well에 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양한 세포의 total RNA의 추출은 RNeasy mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하였고, cDNA는 reverse transcription system kit(Promega)을 사용하여 합성하였으며 SYBR Green mix(Qiagen)와 혼합하였다. mRNA 발현 정도는 real-time PCR detection system(CFX96TM, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 분석하였다. GAPDH는 endogenous control로 사용되었으며, 유전자 발현에 이용된 항산화 효소 Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, catalase의 primer는 Table 1과 같다.

통계분석

항산화 분석은 각 실험군의 평균과 표준편차를 산출하고, 실험군 간의 차이를 one-way analysis of variance (ANOVA)로 분석한 다음 신뢰구간 $P < 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test로 사후 검정하였다. 이외 실험은 각 실험군의 평균과 표준편차를 산출하고, 실험군 간의 차이를 Student's *t*-test로 분석한 다음 $P < 0.05$ 인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다. 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Ver. 21.0.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하였다.

결과 및 고찰

생강 뿌리, 잎 및 줄기의 라디칼 소거능

항산화 활성을 가진 천연물은 전자를 공여하는 능력을 지니고 있어 신체 내 활성산소에 의한 세포 손상을 방지하는

Table 1. Primers used for semi-quantitative RT-PCR of the antioxidant enzymes

Target gene	Primer	Sequence (5'→3')
Mn-SOD	Forward	GGGTTGGCTTGGTTTCAATAAGGAA
	Reverse	AGGTAGTAAGCGTGCTCCACACAT
Cu/Zn-SOD	Forward	CAGCATGGGTTCACGTCCA
	Reverse	CACATTGGCCACACCGTCCT
Catalase	Forward	AAGACAATGTCACTCAGGTGCGGA
	Reverse	GGCAATGTTCTCACACAGGCGTTT
Glutathione peroxidase	Forward	CTCGGTTTCCCGTGCAATCAG
	Reverse	GTGCAGCCAGTAATCACCAAG
GAPDH	Forward	GAGCCAAAAGGGTCATCATC
	Reverse	TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG

Table 2. DPPH and ABTS radical scavenging activities of *Z. officinale* Rosc. roots, leaves, and stems extracts

Sample	Concentration (μg/mL)	DPPH radical scavenging activity (%)	ABTS radical scavenging activity (%)
<i>Z. officinale</i> Rosc. roots	20	29.07±2.07 ^d	38.33±0.91 ^c
	50	48.13±2.25 ^b	62.26±3.99 ^b
	100	57.55±2.21 ^a	81.59±3.44 ^a
<i>Z. officinale</i> Rosc. leaves	20	7.74±3.40 ^{fg}	21.69±1.17 ^{ef}
	50	16.95±4.13 ^c	29.50±1.00 ^d
	100	34.65±3.47 ^c	40.01±4.67 ^c
<i>Z. officinale</i> Rosc. stems	20	3.68±2.58 ^g	17.76±0.99 ^f
	50	4.71±2.77 ^{fg}	18.79±0.54 ^{ef}
	100	9.85±2.85 ^f	22.40±1.81 ^e
Ascorbic acid	50	57.07±4.95 ^a	82.74±2.45 ^a

Values are the mean±SD of three replications (n=3). Different letters (a-g) indicate significant differences ($P<0.05$) by one-way ANOVA using Duncan's multiple range test.

역할을 한다. 이러한 천연물의 항산화 활성을 측정하는 데는 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정하는 방법이 가장 널리 활용되고 있다(Hwang 등, 2016). 각 분석법은 자유라디칼과 양이온 라디칼을 측정하는데 항산화 물질의 종류에 따라 라디칼에 대한 결합도가 다르므로 이를 통해 항산화능의 차이를 비교 분석할 수 있다(Wang 등, 1998).

생강 뿌리, 잎 및 줄기 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 평가한 결과 20 μg/mL 농도에서 생강 뿌리 29%, 생강 잎 8%, 생강 줄기 4%의 라디칼 소거 활성이 나타났으며, 50 μg/mL 농도에서는 생강 뿌리, 잎 및 줄기 각각 48%, 17%, 5%로 소거 활성이 나타났다. 특히 100 μg/mL 농도에서 생강 뿌리는 58%, 생강 잎은 35%의 높은 소거 활성을 나타냈고 생강 줄기는 10% 소거 활성을 나타내었다(Table 2). 따라서 모든 시료 추출물은 농도 의존적으로 라디칼 소거 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 본 연구 결과는 Kim 등(2009)의 연구에서 14종의 채소류 중 생강 뿌리의 경우 55%로 높은 라디칼 소거 활성을 나타냈다는 보고와 일치하는 결과이며, Oh 등(2010)의 연구에서 생강과 뿌리채소인 울금, 강황이 DPPH 라디칼 소거 활성 50%를 나타내는 농도가 각각 124, 222 μg/mL인 것과 비교해볼 때 생강은 100 μg/mL에서 58%로 나타나 DPPH 라디칼 소거 활성이 우수한 것으로 판단된다. 또한, Chan 등(2011)의 연구에서 14종의 생강과 식물의 잎을 비교한 결과 생강의 잎은 3번째로 높은 항산화력을 나타내 항산화 활성이 우수함을 확인하였고, 생강 뿌리, 생강 잎 순으로 항산화력이 높게 나타나 본 연구 결과와 일치함을 확인하였다.

ABTS 라디칼 소거 활성은 Table 2에 나타난 바와 같이 20 μg/mL 농도에서 생강 뿌리 38%, 생강 잎 22%, 생강 줄기 18%의 소거 활성을 나타냈고 50 μg/mL 농도에서 생강 뿌리, 잎 및 줄기 각각 62%, 30%, 19%의 소거 활성이 나타났으며, 100 μg/mL 농도에서 생강 뿌리 81%, 생강 잎 40%, 생강 줄기 22% 순으로 활성이 나타나 DPPH와 마찬가지로 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 본 연구 결과 생강 뿌리, 잎 및 줄기 추출물의 ABTS 라디칼 소거능

은 DPPH 라디칼 소거능보다 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 ABTS의 경우 수소 공여 항산화제와 연쇄 절단형 항산화제로서의 활성을 모두 측정 가능함에 따라 친수성과 소수성 항산화력이 모두 측정되었고, DPPH는 소수성 물질의 항산화 활성만 측정된 결과로 판단된다(Re 등, 1999).

세포독성 평가

Raw 264.7 세포에 대한 독성 평가를 위해 생강 뿌리, 잎 및 줄기 추출물을 농도별로 처리하였으며 그 결과는 Fig. 1에 나타났다. 모든 추출물은 20~100 μg/mL 범위에서 세포 독성을 보이지 않았으나, 200 μg/mL 농도에서는 약 30% 정도의 세포독성을 나타내었다. 이는 Unnikrishnan 등(1988)의 연구에서 생강 에탄올 추출물이 250 μg/mL 농도 이상에서는 20~88%의 세포독성을 보였으나, 100 μg/mL 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다는 보고와 유사하였다. 또한, Hosseinzadeh 등(2017)의 연구에서 생강 추출물이 100 μg/mL 농도 미만에서 세포독성이 나타나지 않았다는 보고와 일치하였다. 따라서 RAW 264.7 세포에 대한 항산화 활성 연구를 위한 추출물 농도를 20~100 μg/mL 범위로 설정하고 실험에 사용하였다.

NO 억제 활성

활성산소 중 하나인 NO는 정상적인 상태에서 신경전달, 혈관 확장, 혈소판 응집 및 면역 반응에서의 생리적인 기능을 조절하는 주요한 역할을 하지만, 과도한 NO 생성은 중추 신경계에서 세포독성과 신경염증 반응을 유발하는 것으로 보고되었다(Boje와 Arora, 1992; Griendling과 FitzGerald, 2003). 생강 뿌리, 잎 및 줄기 추출물의 NO 억제 활성을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 모든 시료에서 NO 생성 억제 효과가 나타났다. 특히 생강 뿌리는 LPS 대조군 대비 NO 생성이 약 22~37% 감소되었고, 생강 잎은 약 25~31% 감소됨에 따라 높은 NO 억제 활성을 나타냈다. 생강 줄기의 경우 24~26%의 억제 활성을 보였으나 농도 의존성은 없음을 확인하였다. LPS는 그람 음성 세균의 세포 외벽 물질로

Fig. 1. Effects of *Z. officinale* Rosc. roots, leaves, and stems extracts on cell viability in RAW 264.7 cells. ZR, *Z. officinale* Rosc. roots; ZL, *Z. officinale* Rosc. leaves; ZS, *Z. officinale* Rosc. stems. Values are the mean±SD of three replications (n=3). * $P<0.05$ compared to PBS.

Fig. 2. Inhibitory effect of *Z. officinale* Rosc. roots, leaves, and stems extracts on NO production. ZR, *Z. officinale* Rosc. roots; ZL, *Z. officinale* Rosc. leaves; ZS, *Z. officinale* Rosc. stems. Values are the mean±SD of three replications (n=3). * $P<0.05$ compared to LPS control.

산화스트레스를 유발하는 인자로 잘 알려져 있다(Nowor-
yta-Sokolowska 등, 2013). LPS에 의한 산화스트레스 자
극은 염증반응을 유발하는 원인 중 하나로 항산화 효과가
뛰어난 성분을 섭취하면 산화적 스트레스 저해 효과로 인해
염증반응이 억제된다고 보고되고 있다(Uttara 등, 2009;
Bak 등, 2009). 본 연구에서 생강 뿌리, 생강 잎은 우수한
항산화 활성을 나타냈으며 산화적 스트레스 보호 효과에 의
한 NO 억제 효과가 우수하게 나타난 것으로 판단된다.

ROS 억제 활성 평가

산화스트레스의 주요인자인 ROS는 생체 내 조직 및 DNA
에 손상을 주고 변형을 유발하여 여러 대사과정 및 생화학적
변화를 일으키는 원인 물질이며(Kader와 Coyle, 2007) 항
산화 연구에서 ROS 소거능은 중요한 지표로 사용된다. Fig.
3에 나타낸 바와 같이 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여
대조군보다 ROS 생성이 높아지는 것을 확인하였으며, ROS
가 생성된 세포에 각 추출물을 농도별로 처리하였을 때 생강

Fig. 3. Effect of *Z. officinale* Rosc. roots, leaves, and stems extracts on the production of reactive oxygen species in RAW 264.7 cells. ZR, *Z. officinale* Rosc. roots; ZL, *Z. officinale* Rosc. leaves; ZS, *Z. officinale* Rosc. stems. Values are the mean±SD of three replications (n=3). * $P<0.05$ compared to LPS control.

Fig. 4. Effect of *Z. officinale* Rosc. roots, leaves, and stems extracts on expression of antioxidant mRNA in RAW 264.7 cells. ZR, *Z. officinale* Rosc. roots; ZL, *Z. officinale* Rosc. leaves; ZS, *Z. officinale* Rosc. stems. Values are the mean±SD of three replications (n=3). **P*<0.05 compared to LPS control.

뿌리는 LPS 대조군 대비 ROS 생성을 약 21~46% 감소시켰고 생강 잎은 약 15~30% 감소시켰으며, 모든 농도에서 유의적으로 ROS 생성을 억제하는 것으로 나타났다($P<0.05$). 생강 줄기의 경우 2~11%의 억제 활성을 보였다. 이와 같은 연구의 결과는 생강 뿌리 추출물의 항산화 효과에 의해 세포 내 ROS 생성이 억제된다는 연구 결과(Oh 등, 2012; Hosseinzadeh 등, 2017)와 유사한 경향을 나타내었다.

항산화 효소의 유전자 발현

SOD, GPx, catalase 등은 세포 내 대표적인 항산화 효소로서 이들의 활성을 증가시키기 위해 많은 연구가 진행되고 있다(Chaudière와 Ferrari-Iliou, 1999). 생강 뿌리, 잎 및 줄기 추출물의 산화스트레스 억제 기전을 확인하기 위해 LPS로 산화스트레스를 유도한 RAW 264.7 세포에 각 시료 추출물을 처리한 후 항산화 효소의 mRNA를 RT-PCR로 측정하였다. 그 결과 Cu/Zn-SOD와 Mn-SOD의 mRNA 발현은 대조군(LPS 자극)에 비해 모든 추출물에서 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4A, B). 생강 잎, 생강 뿌리, 생강 줄기 순으로 유전자 발현을 증가시키는 것으로 나타났으며, 특히 생강 잎 추출물이 높은 수준으로 SOD 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. GPx와 catalase 유전자 발현도 모든 추출물에서 증가하였으며 생강 뿌리, 생강 잎, 생강 줄기 순으로 유전자 발현을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 4C, D).

본 연구에서 생강 잎은 다른 효소의 유전자보다 SOD 유전자 발현을 더 증가시키는 것으로 나타났으며 생강 뿌리보다 더 높은 효과를 나타냈다. 이는 생강 뿌리에는 6,8,10-gingerol, 6,8,10-shogaol, capsaicin 등의 기능성 성분이 다량 함유되어 있으며 생강 잎은 폴리페놀 및 플라보노이드 성분이 다량 함유되어 있어(Lee 등, 2014) 각 시료가 함유한 항산화 물질의 종류의 차이에 의한 것으로 생각되나, 항산화 효소의 종류와 물질의 관계에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. SOD는 superoxide(O_2^-)를 과산화수소(H_2O_2)로 전환시켜 superoxide(O_2^-)를 제거하는 효소이며(Del Maestro 등, 1980), GPx와 catalase는 H_2O_2 를 이용하여 물 분자로 전환시키는 효소(Imai와 Nakagawa, 2003; Deisseroth와 Dounce, 1970)이다. SOD, GPx, catalase와 같은 항산화 효소는 생체 내에서 활성산소를 제거하여 생체를 보호하는 역할을 하므로 생강 뿌리, 잎 및 줄기 추출물은 항산화 효소의 활성 증가를 통해 활성산소에 의한 세포 손상을 방지할 수 있을 것으로 판단된다. Lee 등(2014)의 연구에서 생강 잎은 항산화 성분을 다량 함유하고 있어 생강 뿌리 못지않은 항산화 활성을 나타낸다고 보고하였으며, 본 연구에서는 더 나아가 대식세포 내에서 항산화 효과를 확인하였고 그 발현 기전을 탐색하였다. 또한, 본 실험의 결과는 Hwang 등(2016)과 Kim 등(2010)의 논문에서 약용식물에 의해 SOD, catalase, GPx 등 항산화 효소 활성이 증가하고 이를 통해 자유라디칼 생성이 억제되어 활성산

소에 의한 산화적 스트레스로부터 인체를 보호하였다는 결과와 유사하였다.

요 약

본 연구에서는 신규 식품 원료로 등록된 생강 잎과 생강 줄기의 항산화 효과를 생강 뿌리와 비교 분석하였다. DPPH와 ABTS 라디칼 소거능에 의한 항산화력을 측정한 결과 모든 시료 추출물에서 농도 의존적으로 항산화력이 증가하는 경향이 나타났으며, 특히 100 μ g/mL 농도에서 생강 뿌리(58%)와 생강 잎(35%)에서 우수한 항산화 효능을 확인하였다. NO 생성 억제 효과는 모든 시료에서 나타났으며, 특히 생강 잎은 25~31%의 저해율을 보여 생강 뿌리(22~37%)와 유사하게 NO 생성 억제 효과가 나타나 우수한 효능을 확인하였다. 생강 줄기는 24~26%의 저해율을 보였으나 농도 의존성은 없었다. 세포 내 활성산소종 생성은 생강 뿌리(21~46%), 생강 잎(15~30%), 생강 줄기(2~11%) 순서로 억제 효과가 높게 나타났다. 항산화 기전을 확인하기 위해 항산화 효소의 유전자 발현을 평가한 결과 생강 잎은 Cu/Zn-SOD와 Mn-SOD 유전자 발현을 높은 수준으로 증가시켰으며, GPx와 catalase는 생강 뿌리, 생강 잎, 생강 줄기 순서로 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 본 연구 결과를 통해 그동안 버려지던 생강 잎과 생강 줄기의 항산화 효과를 확인하였고 생강 잎에서 우수한 항산화 활성을 확인하여 향후 건강기능식품 소재로서 개발이 가능할 것으로 판단된다. 그러나 생강 잎에 관한 연구는 미비한 실정으로 향후 생강 잎 추출물의 체내 생리활성 메커니즘 구명을 위한 동물실험 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 식품 원료등록 소재의 생리활성 탐색 및 소재화 연구(과제번호: PJ013870)의 지원으로 이루어진 것임.

REFERENCES

- Anwar F, Shaheen N, Shabir G, Ashraf M, Alkharfy KM, Gilani AH. Variation in antioxidant activity and phenolic and flavonoid contents in the flowers and leaves of Ghaneri (*Lantana camara* L.) as affected by different extraction solvents. *Int J Pharmacol*. 2013. 9:442-453.
- Bak MJ, Jeong JH, Kang HS, Jin KS, Ok S, Jeong WS. *Cedrela sinensis* leaves suppress oxidative stress and expressions of iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathways in RAW 264.7 cells. *J Food Sci Nutr*. 2009. 14:269-276.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958. 181:1199-1200.
- Boje KM, Arora PK. Microglia-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxide mediate neuronal cell death. *Brain Res*. 1992. 587:250-256.
- Chan EWC, Lim YY, Wong SK. Antioxidant properties of ginger

- leaves: an overview. *Free Rad Antiox*. 2011. 1:6-16.
- Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*. 1999. 37:949-962.
- Connell DW. The chemistry of the essential oil and oleoresin of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Flav Ind*. 1970. 1:677-693.
- Cooksley VG. Aromatherapy: a lifetime guide to healing with essential oils. Prentice Hall Press, Upper Saddle River, NJ, USA. 1996. p 349-350.
- Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev*. 1970. 50:319-375.
- Del Maestro R, Thaw HH, Björk J, Planker M, Arfors KE. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1980. 492:43-57.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004. 114:1752-1761.
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury—Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003. 108:1912-1916.
- Hosseinzadeh A, Bahrampour JK, Fatemi MJ, Kamarul T, Bagheri A, Tekiyehmaroof N, et al. Protective effect of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extract against oxidative stress and mitochondrial apoptosis induced by interleukin-1 β in cultured chondrocytes. *Cells Tissues Organs*. 2017. 204:241-250.
- Hwang KA, Kim GR, Hwang YJ, Hwang IG, Song J. Oxidative stress inhibitory effects of low temperature-aged garlic (*Allium sativum* L.) extracts through free radical scavenging activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2016. 45:27-34.
- Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*. 2003. 34:145-169.
- Kader KN, Coyle CH. Reactive oxygen and nitrogen species: implications for cardiovascular device engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007. 83:138-144.
- Kim HJ, Chae IG, Lee SG, Jeong HJ, Lee EJ, Lee IS. Effects of fermented red ginseng extracts on hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ginseng Res*. 2010. 34:104-112.
- Kim JY, Lee CR, Cho KH, Lee JH, Lee KT. Antioxidative and Lp-PLA₂ inhibitory activities in 29 fruits and vegetables. *Korean J Food Preserv*. 2009. 16:512-517.
- Kwon HY, Choi SI, Han X, Men X, Jang GW, Choi YE, et al. Antioxidant components and antioxidant activities of mixtures with *Sasa quelpaertensis* Nakai and *Ficus erecta* var. *sieboldii*. *Korean J Food Sci Technol*. 2020. 52:369-376.
- Lee HR, Lee JH, Park CS, Ra KR, Ha JS, Cha MH, et al. Physicochemical properties and antioxidant capacities of different parts of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2014. 43:1369-1379.
- Noworyta-Sokołowska K, Górska A, Golembiowska K. LPS-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat striatum. *Pharmacol Rep*. 2013. 65:863-869.
- O'Hara M, Kiefer D, Farrell K, Kemper K. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Arch Family Med*. 1998. 7:523-536.
- Oh H, Park H, Ju MS, Jung SY, Oh MS. Comparative study of anti-oxidant and anti-inflammatory activities between *Curcuma longae* radix and *Curcuma longae* rhizoma. *Kor J Herbol*. 2010. 25:83-91.
- Oh SY, Lee JH, Lee JS, Seo S, Ma J. An aqueous extract of *Zingiber officinale* Roscoe protects mouse primary hepatic cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2012. 17:168-175.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999. 26:1231-1237.
- Seol MK, Bae EY, Cho YJ, Park SK, Kim BO. The anti-oxidant and anti-microbial activities of purified syringin from *Cortex Fraxini*. *J Life Sci*. 2020. 30:695-700.
- Sheo HJ. The antibacterial action of garlic, onion, ginger and red pepper juice. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 1999. 28:94-99.
- Tang WH, Martin KA, Hwa J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front Pharmacol*. 2012. 3:87. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00087>
- Thomson M, Al-Qattan KK, Al-Sawan SM, Alnageeb MA, Khan I, Ali M. The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002. 67:475-478.
- Unnikrishnan MC, Kuttan R. Cytotoxicity of extracts of spices to cultured cells. *Nutr Cancer*. 1988. 11:251-257.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*. 2009. 7:65-74.
- Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVoie EJ, Huang TC, et al. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem*. 1998. 46:4869-4873.