

브로콜리로부터 분리한 추출물의 *In vitro* 면역증진 활성평가 및 화학적 특성

곽봉신 · 박혜령 · 이수정 · 최혁준* · †신광순
경기대학교 식품생물공학과, * (주)비케이바이오

Chemical Properties and Assessment of Immunomodulatory Activities of Extracts isolated from Broccoli

Bong-Shin Kwak, Hye-Ryung Park, Sue Jung Lee, Hyuk-Joon Choi* and †Kwang-Soon Shin

Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16227, Korea

*BK-Bio Co. Ltd., Jeju 63359, Korea

Abstract

For the purpose of developing new immunomodulatory agents from broccoli, ethanol extract (BCEE), hot water extract (BCHW), and crude polysaccharide (BCCP) were isolated from broccoli, and their immunomodulatory activities and chemical properties were examined. In the *in vitro* cytotoxicity analysis, BCHW and BCCP did not affect the growth of tumor cells and normal cells. Murine peritoneal macrophages stimulated with BCCP showed higher production of IL-6, IL-12, and TNF- α cytokines than those stimulated with BCHW. Also, BCHW and BCCP did not show proliferation of splenic lymphocytes. In the *in vitro* assay for intestinal immunomodulatory activities, only BCCP enhanced GM-CSF secretion and the bone marrow cell-proliferating activity via cells in Peyer's patches at 1,000 $\mu\text{g/mL}$. Also, BCHW mainly contained 33.7% neutral sugars, such as arabinose, glucose, and galactose, and 30.7% uronic acid, and BCCP consisted of 42.6% neutral sugars, including arabinose, galactose, and glucose, and 50.5% uronic acid. The above results lead us to conclude that crude polysaccharide (BCCP) isolated from broccoli causes considerably high cytokine production in peritoneal macrophages and bone marrow cell proliferation, and the polysaccharide extraction process is indispensable for separation of new immunomodulatory agents from broccoli.

Key words: broccoli, polysaccharide, macrophage, lymphocyte, Peyer's patch

서 론

면역계는 외부인자(항원)에 의해 발생하는 이상 반응을 제거하여 신체 내의 항상성을 유지시켜주는 생명현상으로, 항원을 제거할 뿐만 아니라, 생체 내에서 발생하는 돌연변이 및 노화된 세포를 제거해준다. 면역계는 크게 선천면역(innate immunity)과 후천면역(adaptive immunity)으로 나누어지게 되며, 선천면역의 경우, 외부 감염(항원)에 대한 1차 방어막이며, 항원에 비특이적으로 반응한다. 여기에는 특히 보체(com-

plement), 포식세포(phagocyte), 자연 살해세포(NK cell) 및 수지상세포(dendritic cell)와 같은 다양한 면역세포들이 관여한다. 선천 면역과 관련된 대표적 면역세포인 대식세포(macrophage)는 조직 내에서 탐식작용을 하며, 선천면역과 후천면역 모두에 관여한다. Macrophage는 항원에 대한 탐식 작용뿐 아니라, 이를 소화·분해하는 선천성 작용 및 항원의 일부를 세포 표면에 제시하여 후천성 면역계 세포가 이를 인식, 활성화하도록 도와주는 antigen-presenting cell(APC)의 역할도 수행하며(Cebra & Shroff 1988; James & Zeitz 1994), 종양 및 돌

† Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16227, Korea.
Tel: +82-31-249-9655, Fax: +82-31-249-9655, E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr

연변이 세포에 대한 살해능도 갖는다(Kuby J 2006).

반면 후천면역은 항원에 특이적으로 작용하며, 이는 다시 체액성 면역(humoral immunity)과 세포성 면역(cellular immunity)으로 나누어지게 된다. 체액성 면역은 B cell에서 생성되는 항체에 의한 혈액 내 반응으로 항원에 대한 immunoglobulins를 생성하며, 세포성 면역는 cytotoxic T lymphocytes(CTLs), helper T cell(T_h), regulator T cell(T_{reg}) 등이 관여한다. CTLs는 외부세포, 암세포, 바이러스나 세포 내 미생물에 감염된 세포의 표면 항원과 결합한 이후 직접적으로 파괴시키는 역할을 하며, T_h 는 B 세포 및 T_c 세포의 활성을 촉진한다고 보고되어 있다. 또한, T_{reg} 은 면역 반응을 억제하는 것으로 알려져 있고(Kuby J 2006), 이러한 면역계는 다양한 종류의 cytokine에 통해 긴밀한 상호작용으로 활성화가 이루어지게 된다(Lee & Gray 1988).

십자화과(Brassicaceae family) 식물에 속하는 브로콜리(*Brassica oleracea* var. *italica*)는 쌍떡잎식물로서 미국 및 유럽에서 소개되어 현재 국내에서는 주로 제주도 및 일부 강원도와 충청도에서 재배되고 있다. 브로콜리는 혈중 콜레스테롤 감소, 항산화 및 암 예방 등의 효과가 있다고 보고되고 있으며(Ravikumar 2015), 이러한 활성은 주로 sulforaphane, β -carotene, vitamin B₁ 및 B₂, vitamin C, tannins, polyphenols, potassium, selenium에서 다양한 생리활성 효과를 나타낸다고 보고되고 있다(Lee & Rhee 1997). 특히 sulforaphane은 폐암, 대장암, 직장암 및 전립선암 등의 발병을 감소시켜준다고 알려져 있지만(Gamet-Payraastre 등 2000), 이러한 저분자들은 가열 등의 가공공정과 저장을 거치게 되면 서서히 파괴된다(Shim 등 1992). 따라서 브로콜리의 저분자 물질들이 브로콜리에서 나타나는 대부분의 생리활성에 관여한다고 설명하기는 어렵다. 최근, 천연물 유래 다당은 물에 잘 용해되고, 낮거나 거의 없는 독성을 나타내며, 다양한 약리활성을 보이고 있다고 알려져 있는데(Maxwell 등 2012), 특히 cytokine 생산자극(Shin 등 1998), macrophage 활성화, NK cell 자극활성(Mueller & Anderer 1990; Yoon 등 2003) 등과 같은 여러 약리활성에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있어, 브로콜리에 존재하는 새로운 활성물질 즉, 고분자 다당에서 면역활성이 존재할 가능성이 있을 것이라 사료되었다.

따라서 본 연구진은 브로콜리로부터 새로운 활성물질을 찾고자 여러 추출법으로 분리된 추출물을 이용하여 이들이 갖고 있는 대식세포 활성 및 장관면역 활성을 *in vitro* 상에서 검토함으로써, 브로콜리 유래 면역증강 기능성 소재로서의 활용가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용된 브로콜리는 2014년 제주도에서 재배된 것으로 가식부 부분만을 사용하여 실험을 진행하였다. 세포독성 실험에 사용된 EZ-cytox는 Daeil lab service(Seoul, Korea)사에서 구입하여 사용하였다. Macrophage cytokine 측정 실험에 사용된 Dulbecco Modified Eagle's Medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin은 Welgene(Daegu, Korea)사에서 구입하였으며, 활성 측정 시 양성대조군으로 사용된 lipopolysaccharide from *E. coli* O127:B8(LPS)은 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였다. 한편, 항보체 활성에서 사용된 양의 감작적혈구(IgM-hemolysis sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본의 Biotest(Tokyo, Japan)사 제품을 사용하였으며, polysaccharide K(PSK) from *Coriolus versicolor*는 한국 광동제약(Seoul, Korea)에서 시판하는 코포링[®]을 사용하였다. 또한, 실험에 사용된 종양세포주는 Korea Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 본 실험에서 사용된 모든 시약은 시판 1급 이상의 분석용 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 브로콜리 추출물의 분리

브로콜리로부터 두 가지 방법을 이용하여 면역활성 시료를 분리하였다. 먼저 브로콜리 가식부만을 얻어 거칠게 마쇄한 후 deionized water(DIW)를 2배 첨가하여 1시간 동안 정치하였다. 그 후, 8배 부피의 ethanol(EtOH)을 첨가하여 2 h 동안 stirring을 진행하고, 원심분리(6,500 rpm, 20 min, 4°C)하여 상등액을 얻었다. 이를 동결건조하여 에탄올 추출물(Broccoli ethanol extract; BCEE)을 얻었다. 에탄올 상등액을 회수하고, 남은 잔사(Alcohol insoluble residues; AIR)에 10배의 DIW를 첨가한 후, 전체 부피의 절반이 되는 시점까지 100°C에서 열수추출을 진행하였다. 그 후, 원심분리(6,500 rpm, 30 min, 4°C)하여 상등액을 회수한 후, 일부는 동결건조하여 단순 열수추출물(Broccoli hot water extract: BCHW)을 얻었다. 나머지 상등액에 전체부피의 4배 EtOH을 첨가하여 24 h 방치하고, 원심분리(6,500 rpm, 30 min, 4°C)하여 침전물을 얻었다. 침전물은 소량의 DIW에 재용해한 다음 투석 및 동결건조하여 조다당 시료(Broccoli crude polysaccharide: BCCP)를 얻었다(Fig. 1).

브로콜리 유래 에탄올 추출물 BCEE, 단순 열수추출물 BCHW와 조다당 BCCP의 정제도를 확인하기 위해 시료(10 mg/mL)를 조제하여 여과한 후, 50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5)로 평형화된 Superdex 75 GL 10/300 column(GE Healthcare Life Science, Uppsala, Sweden)이 장착된 high performance liquid chromatography(HPLC)(Agilent Technologies Co.,

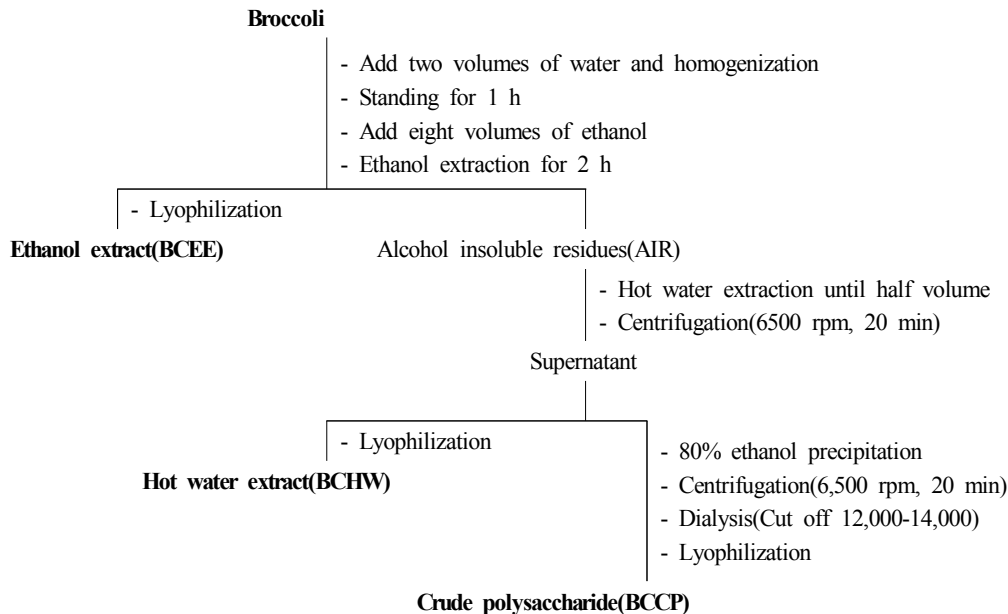


Fig. 1. Isolation of ethanol extract(BCEE), hot water extract(BCHW) and crude polysaccharide(BCCP) from broccoli.

Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

3. 실험 동물

BALB/c(6주령, female)를 새론바이오(Gyeonggi, Korea)에서 구입하여 일주일간 순응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. Mouse는 사육조에 5마리씩 넣어 온도 23±3°C, 습도 55~70% 및 12시간 간격의 light-dark cycle이 유지되는 공간에서 물과 사료는 자유 급식 형태로 공급하였다. 실험은 경기대학교 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 실시하였다(2015-001).

4. 정상세포주 및 일반세포주에 대한 세포독성

브로콜리 유래 에탄올 추출물 BCEE, 열수추출물 BCHW 및 조다당 BCCP에 대한 종양세포주 및 일반세포에 대한 세포독성을 확인하고자 human 유래 SW-620과 HT-29 colon cancer cells, A549와 NCI-H460 lung cancer cells를 이용하였고, mouse 유래 Colon26-M3.1 colon cancer cells와 B16-BL6 lung cancer cells, 그리고 정상세포인 마우스 복강 유래 대식세포를 이용하였다. 종양세포주의 경우, 각각 1×10⁵ cells/well의 농도로 계수한 후 96-well microplate(flat-bottom type)에 100 µL씩 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였고, mouse 복강 유래 macrophages의 경우, 2×10⁵ cells/well의 농도로 계수한 후 96-well microplate(flat-bottom type)에 100 µL씩 분주하였다. 그 후, 모든 세포에 1,000 µg/mL 농도의 시료를 각 well에 100 µL씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 시료의 세포독성 측정은 상등액을 제거한 뒤, PBS에 10배 희석한 EZ-cytox(Daeil lab service)

를 well 당 200 µL씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30~90분간 반응시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 대식세포(Macrophage)로부터 cytokine 생산능

BALB/c(6주령, female) mouse의 복강에 5% thioglycollate (TG)(Sigma Aldrich)를 1 mL 주입하고, 96시간 동안 유도된 macrophage를 회수한 후 DMEM 배지로 4~5회 세척하고, 세포수를 2×10⁵ cells/well로 조정하여 24시간 배양하고, macrophage에 의해 분비된 세포 배양액을 원심분리(900 rpm, 4°C, 5 min)하여 배양액에서 생산된 cytokine 분비능을 확인하였다. Macrophage에 의해 유도, 분비된 배양 상등액 중의 cytokines (IL-6, IL-12 및 TNF-α) 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(BD Bio-sciences and eBiosciences, San Diego, CA, USA)를 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

6. 림프구(Lymphocyte) 증식능

BALB/c(6주령, female) mouse를 경추탈골법으로 치사시킨 후 무균상태에서 비장(spleen)을 적출하여 PBS 상에서 마쇄(100 mesh)한 후 여과(200 mesh)하여 비장세포를 획득하였다. 0.2% NaCl 1 mL를 1분 동안 가하여 혼재된 적혈구를 파괴하고, hemocytometer를 이용하여 세포수를 6×10⁵ cells/well이 되도록 조정하였다. 분리된 비장세포 100 µL와 다양한 농도로 희석된 시료 100 µL를 96-well microplate(flat-bottom type)에 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 배양 종료 후 원심분리(900 rpm, 4°C, 5 min)하여 세포배양액을 회수하고, 증식능(lymphocyte proliferation)을 측정하기 위해

10배 희석한 EZ-cytox(Daeil lab service)를 well 당 200 μ L씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3~6시간 반응시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. Peyer's patch 세포로부터 cytokine 활성능

C3H/HeN(6주령, female) mouse 소장 외벽에 존재하는 Peyer's patch를 회수한 후, stainless steel mesh(100 mesh)를 이용하여 조직을 파쇄하여 Peyer's patch로부터 세포를 얻었다. 세포현탁액은 stainless steel mesh(200 mesh)로 여과한 후, FBS-DMEM(with 10% FBS, Welgene Inc.)으로 세척하고 1×10^6 cells/well로 세포농도를 조정하고, 96-well microplate(flat-bottom type)에 100 μ L씩 분주하고, 다양한 농도로 희석된 시료를 100 μ L씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 동안 배양하였다. 이후, 배양상등액을 회수하여 Peyer's patch cells로부터 생성되는 대표적 cytokine GM-CSF(BD biosciences Co., Ltd., San Diego, CA, USA)를 ELISA kit를 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

8. 골수세포 증식능

골수세포 증식은 Hong 등(1998)의 방법을 실험실 여건에 맞게 일부 변형하여 측정하였다. C3H/HeN mouse 소장 외벽에 존재하는 Peyer's patch를 회수, 여과, 세척하고 2×10^5 cells/well로 세포농도를 조정하고 후 96-well microplate(flat-bottom type)에 180 μ L씩 분주하고, 시료를 다양한 농도로 희석하여 20 μ L씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일간 배양한 후, 상등액을 이용하여 골수세포 증식능을 측정하였다. 골수세포는 동일종 mouse의 대퇴부 뼈 속으로 PBS를 넣은 주사기를 주입하여 골수세포를 시험관에 받은 후, 200 mesh로 여과한 후 2.5×10^4 cells/well로 세포농도를 조정하고 96-well microplate(flat-bottom type)에 100 μ L씩 분주하였다. 다음으로 위에서 얻은 골수세포 상등액과 DMEM medium을 각각 50 μ L씩 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일간 배양하였다. 장관면역 활성도는 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응 후 회수한 상등액을 골수세포와 반응시켜 골수세포가 증식되는 정도를 EZ-cytox(Daeil lab service)로 측정하였다. PBS에 10배 희석하여 well 당 200 μ L씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3~6시간 반응시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이를 수치화하기 위해 PBS를 사용한 대조군과 골수세포의 증식도를 비교하여 정량화하였다.

9. 항보체 활성

항보체 활성(anti-complementary activity)은 Mayer법(Kabat & Mayer 1971)을 이용하여 다양한 농도의 시료로 보체를 활성화 시킨 후, 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈활성에 근거

를 둔 complement fixation test로 측정하였다. 즉, 정상인의 혈청과 2% gelatin, 3 mM Ca²⁺, 10 mM Mg²⁺가 함유된 GVB²⁺ 완충용액(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 및 시료를 각각 50 μ L씩 혼합하여 30분 동안 1차 반응시킨 후, 양의 감작적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocytes, EA Cell, Biotest Co., Tokyo, Japan)를 넣어 1시간 동안 2차 반응을 시킨 다음 PBS(phosphate buffered saline)를 가하여 반응을 정지시켰다. 각 반응액을 원심분리(2,000 rpm, 4°C, 10min)하여 얻은 상등액을 412 nm에서 측정하였다. 항보체 활성은 총보체 용혈 저지율(ITCH₅₀: Inhibition of 50% total complement hemolysis)로 나타낸 후, PSK의 활성을 양성대조군으로 사용하여 보정한 다음 %로 수치화하였다(Yamada 등 1989).

10. 일반 분석 및 구성당 분석

시료의 화학적 특성을 확인하기 위해 중성당 함량은 phenol-sulfuric acid법(Dubois 등 1956)(standard: galactose)으로, 산성당 함량은 *m*-hydroxybiphenyl 법(Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973)(standard: galacturonic acid)으로, TBA-positive material의 함량은 thiobarbituric acid법(Karkhanis 등 1978)(standard: 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid(KDO)으로 단백질 함량은 Bradford법(Bradford 1972)(standard: bovine serum albumin(BSA))을 실험실 여건에 맞게 변형하여 사용하였다.

구성당 분석은 다당 시료를 2 M trifluoroacetic acid(TFA)로 121°C에서 1.5시간 산가수분해하고, ring을 개환한 후 acetylation을 거쳐 각각 alditol acetate 유도체(Jones & Albersheim 1972)로 전환시킨 후, acetone에 희석하여 GC로 분석하였다. GC의 분석은 SP-2380 capillary column(0.2 μ m film, 0.25 mm \times 30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 GC ACME-6100(Young-Lin Co. Ltd., Anyang, Korea)을 이용하였으며, 표준온도조건[60°C(1 min), 60 \rightarrow 220°C(30°C/min), 220°C(12 min), 220 \rightarrow 250°C(8°C/min), 250°C(15 min)]에서 분석을 실시하였다. 구성당의 mole%는 peak의 면적비, flame ionization detector(FID)에 대한 반응계수 및 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

11. 통계처리

모든 실험결과는 SPSS 20.0(SPSS Inc, IL, USA)을 사용하여 통계 처리하였으며, 평균값 \pm 표준편차(mean \pm S.D.)로 나타내었다. 시료간 및 처리 농도간 유의성은 two-way ANOVA 실시한 다음 Duncan's multiple range test로 사후 검정을 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 브로콜리 유래 추출물의 정상세포주 및 종양세포주에 대한 세포독성 측정

시료에 대한 직접적인 세포독성 여부를 측정하기 위해 브로콜리 유래 에탄올 추출물 BCEE, 열수추출물 BCHW 및 조다당 BCCP 시료를 이용, human 유래 종양세포주인 대장암 유래의 SW-620 세포주와 HT-29 세포주, 폐암 유래의 A549 세포주와 NCI-H460 세포주, mouse 유래 종양세포는 대장암 유래의 Colon26-M3.1 세포주와 흑색종 유래의 B16-BL6 총 6종의 종양세포주, 그리고 정상세포주인 mouse 복강 유래 macrophage에 대한 세포독성을 측정하였다(Table 1). 그 결과, 브로콜리 유래 열수추출물 BCHW 및 조다당 BCCP 시료의 경우, 6종의 종양세포주 및 정상세포주에서 어떠한 독성도 나타내지 않은 반면, 에탄올 추출물 BCEE에서는 SW-620, HT-29, A549, NCI-H460 및 B16-BL6 세포주에 대해 약간의 성장억제능을 보여주었다.

따라서 본 연구에서는 정상세포 및 종양세포주에 대한 직접적인 세포독성을 나타내지 않는다고 판단, 브로콜리 유래 열수추출물 BCHW 및 조다당 BCCP 시료에 초점을 두어 차후 면역활성 실험을 진행하기로 하였다.

2. 브로콜리 유래 추출물의 macrophage 자극에 의한 cytokine 생산능 측정

Macrophage는 선천면역계의 대표적인 면역세포 중 하나로서, 세포막 표면에 TLRs(toll like receptors), CR3, MR, SR 등과 같은 수용체가 있으며, 활성화 시 식세포작용, 적응면역세포의 증식, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- α 와 같은 여러 cytokine을 생산한다고 알려져 있다(Uranue 1984; Wang 등 2003).

Macrophage가 활성화되면 분비되는 대표적인 cytokine인 IL-6, IL-12 및 TNF- α 는 외부 미생물 감염에 따른 염증반응에 있어서 중추적인 역할을 한다고 알려져 있다. IL-6는 T세포와 B세포의 분화에 관여하여 항암작용이 있다고 보고되었으며(Kuby J 2006), IL-12는 NK cell의 활성화하여 체내에서 생성된 암세포를 공격하여 사멸시키거나, 적응면역세포인 T_H1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로 알려져 있다(Meyer 2007). TNF- α 의 경우, 특정 암세포 및 바이러스에 대하여 일부 직접적으로 독성을 일으키며, 만성 및 급성 염증 질환에서 발생하는 여러 가지 생체반응에도 중요한 역할을

Table 1. Cytotoxicity of ethanol extract (BCEE), hot water extract (BCHW) and crude polysaccharide (BCCP) isolated from broccoli on normal cells and tumor cells

Origin	Mouse			Human			
	Normal cell	Colon cancer	Melanoma	Colon cancer		Lung cancer	
	Cell	Peritoneal macrophage	Colon26-M3.1	B16-BL6	SW-620	HT-29	A549
BCEE	-	-	++	++	++	+	++
BCHW	-	-	-	-	-	-	-
BCCP	-	-	-	-	-	-	-

* Dose of sample at 1,000 μ g/mL.

** Relative inhibitory activity on tumor cell lines(+): 10~20%,(++): 20~50%.

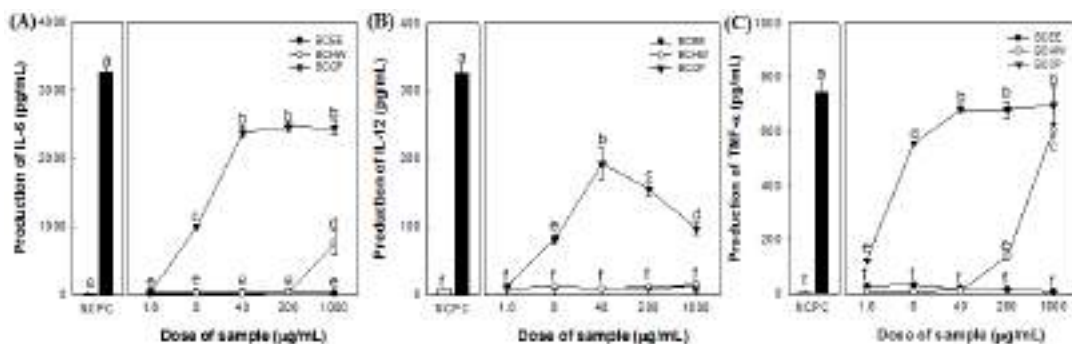


Fig. 2. Effect of BCEE, BCHW and BCCP on cytokine secretion such as IL-6 (A), IL-12 (B) and TNF- α (C) by murine peritoneal macrophages. NC used media as a negative control, PC used 5 μ g/mL of lipopolysaccharide (LPS) as a positive control. Means with different superscript letters (a~f) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

한다고 알려져 있다.

브로콜리 유래 에탄올 추출물 BCEE, 열수추출물 BCHW 및 조다당 BCCP 시료에 대한 mouse 복강 유래 macrophage의 cytokine 생산을 *in vitro*에서 측정하였다. 그 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 먼저 에탄올 추출물 BCEE의 경우에는 1,000 µg/mL의 고농도에서도 IL-6, IL-12 및 TNF-α의 생산능에 전혀 영향을 주지 않았으며, 열수추출물 BCHW에서는 1,000 µg/mL의 고농도에서만 IL-6와 TNF-α의 생산능을 positive control인 lipopolysaccharide(LPS) 대비 각각 20%와 80% 정도로 보여주었다.

반면, 조다당 BCCP의 경우에는 8 µg/mL의 저농도부터 우수한 IL-6와 TNF-α의 생산능을 보여주었으며, IL-12의 경우에는 40 µg/mL의 농도에서 가장 우수한 생산능을 나타냈고, 고농도로 갈수록 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 브로콜리 유래 에탄올 추출물 BCEE와 열수추출물 BCHW보다 조다당 BCCP가 더 우수한 cytokine 생산능을 나타내었다.

따라서 브로콜리 유래 조다당 BCCP가 에탄올 추출물 BCEE와 열수추출물 BCHW보다 NK cell 활성화 및 면역세포 활성화와 같은 생체반응을 일으켜 면역활성을 유도하는데 더 우수하다고 확인되었다.

3. 브로콜리 유래 추출물의 림프구 활성화 측정

체내에 외부 항원이 들어오게 되면 감염이 발생하는 것을 막기 위하여 여러 가지 면역계가 작동하게 된다. 이 때, 1차적으로 대식세포와 보체계 등의 선천면역세포가 작동하여 항원을 직접적으로 제거한다. 그러나 선천면역세포의 경우, 외부 항원에 대하여 반응하지만, 감염이 반복될 경우, 기억능력이 없어 반응이 동일하게 계속 나타나게 된다(Abbas 등 2014). 반면, 적응면역계는 항원을 인식하면 특이적으로 반응하며, 특히 동일 항원에 대하여 재감염이 일어나면 면역학적 기억능력이 작용하게 되어 더욱더 강력한 면역반응이 일어난다고 알려져 있다(Kuby J 2006).

B 및 T림프구를 통하여 적응 면역을 담당하는 2차 림프조직인 비장(spleen)에서 얻은 세포를 이용하여 macrophage에 의한 cytokine 생산능을 높게 보여주었던 브로콜리 유래 열수추출물 BCHW와 조다당 BCCP 시료를 첨가하여 그 증식 정도를 확인한 결과, 모든 시료에서 유효한 증식 활성화는 나타나지 않았다(Fig. 3).

4. 브로콜리 유래 추출물의 장관면역 활성화 측정

장관 관련 림프상조직(Gut-Associated Lymphatic Tissue: GALT)에 존재하는 Peyer's patch는 소장과 회장 전반에 걸쳐 분포되어 있으며, 면역 관련 세포인 T세포, B세포, macrophage와 dendritic cell 등으로 구성되어 있다(David 등 2003). 특히 T세포와 macrophage는 활성화되면 다양한 cytokine을 생산하

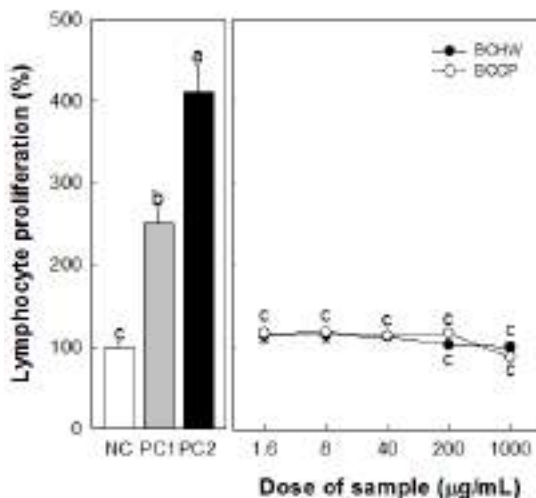


Fig. 3. Effect of BCEE, BCHW and BCWP on lymphocyte cytotoxicity by splenocyte *ex vivo*. NC used media as a negative control, PC1 used 5 µg/mL of LPS as a positive control 1. PC2 used 5 µg/mL of concanavalin A (ConA) as a positive control 2. Means with different superscript letters (a~c) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

게 되는데, 이중 골수증식에 관여하는 IL-6, GM-CSF 등과 같은 cytokine을 분비하여 전신면역으로 확대되게 된다. 골수는 다양한 면역세포들이 만들어지고 성숙되는 장소이며, 혈액 내에 존재하는 백혈구, 적혈구, 혈소판과 같은 세포들은 골수 내 조혈모세포(hematopoietic stem cell)라는 동일한 전구세포에서 생성되어 전신을 순환한다. 따라서 골수세포의 증식은 면역계에서 매우 중요한 역할을 담당하고 있다고 설명할 수 있다(Janeway 등 1996).

이를 확인하기 위하여 Peyer's patch cell에서의 시료에 의

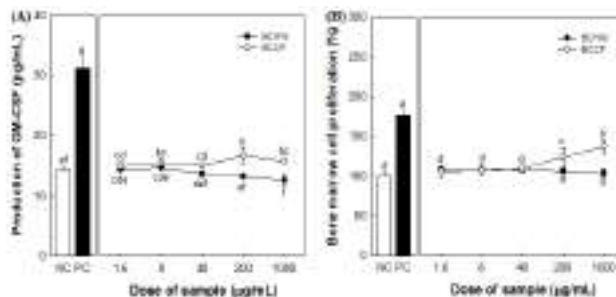


Fig. 4. Effect of BCHW and BCCP on GM-CSF production (A) and bone marrow cell cytotoxicity (B) by Peyer's patch cells *ex vivo*. NC used media as a negative control, PC used 5 µg/mL of LPS as a positive control. Means with different superscript letters (a~f) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

한 GM-CSF 생성량과 Peyer's patch cell 배양 상등액을 mouse bone marrow에 적용하여 골수세포의 proliferation에 미치는 영향을 확인한 결과는 Fig. 4(A)와 같다. 브로콜리 유래 열수추출물 BCHW와 조다당 BCCP를 Peyer's patch cell에 처리하고, 이들이 생산한 GM-CSF의 함량을 ELISA로 측정, 열수추출물 BCHW의 경우, 모든 농도에서 GM-CSF의 생산에 어떠한 영향도 미치지 않았으나, 조다당 BCCP의 경우에는 40 μ g/mL 이상 농도에서 유의적인 수준으로 약간 높은 GM-CSF 생산능을 보여주었다. 이는 아마 브로콜리 유래 조다당 BCCP가 골수 증식에 관여하는 GM-CSF cytokine 생산을 일부 촉진시킬 것이라 예상하였다.

위 결과를 바탕으로, 브로콜리 유래 열수추출물 BCHW와 조다당 BCCP의 Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식활성을 검토한 결과, 열수추출물 BCHW에서는 골수세포 증식능을 나타내지 않은 반면, 조다당 BCCP는 무첨가군에 비해 40 μ g/mL 이상의 농도에서 약간의 골수세포 증식활성을 보여줌으로써 전신순환 후 면역활성에 공헌할 것이라고 확인되었다 (Fig. 4(B)).

따라서 브로콜리 유래 조다당 BCCP가 Peyer's patch cell의 면역세포를 자극한 후 골수세포 증식에 관여하는 GM-CSF와 같은 cytokine을 분비하여 전신면역에 크게 공헌할 것이라고 결론지었다.

5. 브로콜리 유래 추출물의 보체계 활성화능 측정

보체계(complement)는 C1~C9의 활성 단백질과 조절인자를 포함한 약 20여종의 혈중 순환 단백질들로 구성된 효소반응계를 적혈구, 백혈구, 다른 여러 조직의 세포들의 보체 수용체를 통해 보체계 단백질과 면역 세포간의 일련의 정보 전달을 가능케 해주며, 외부 감염 병원체 등을 항체의 존재 또는 비존재하에 비특이적으로 제거하는 주요한 생체방어기구이다(Holers 2003). 보체계가 활성화되면 연속적인 cascade 반응에 의하여 보체 단백질이 활성화되어 분해되고, 이들이 침입인자의 표면에 부착됨으로써 최종적으로 MAC(membrane attack complex)를 형성하여 외부 감염 병원체 등을 제거하는 것으로 알려져 있다. 또한, 보체 활성화 중 생성되는 여러 보체 분해산물은 각종 생리반응에 관여한다고 알려져 있으며, 특히 macrophage와 lymphocyte의 활성화, 면역증강 등과 밀접한 상관관계가 있다고 보고되고 있다(Whaley 1986).

브로콜리 유래 열수추출물 BCHW와 조다당 BCCP 시료의 활성화 여부를 측정하기 위해 항보체 활성을 측정하였다. 양성대조군으로는 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 면역활성 다당체인 PSK를 사용하였으며(Tsukagoshi 1984), 음성대조군으로는 증류수를 이용하였다. 음성대조군의 활성화 정도를 ITCH₅₀ 0%로 하여 열수추출물 BCHW와 조다당 BCCP 시료의 활성화능을 각각 확인한 결과(Fig. 5), 1,000 μ g/mL의 고농

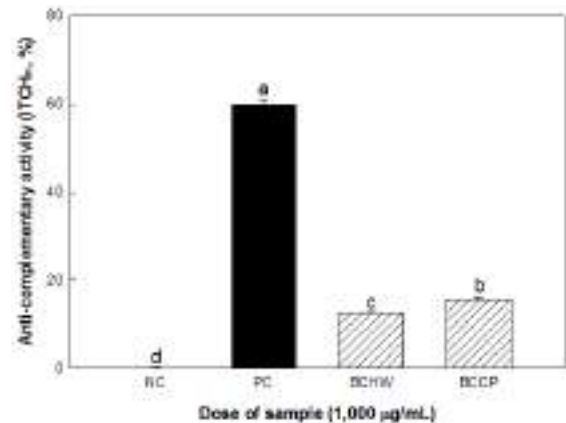


Fig. 5. Anti-complementary activity of BCHW and BCCP isolated from broccoli. NC used media as a negative control, PC used 5 μ g/mL of LPS as a positive control. Means with different superscript letters (a-d) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

도에서 음성대조군 대비 각각 12.6%와 15.5%의 항보체 활성을 나타내었으며, 조다당 BCCP가 열수추출물 BCHW보다 유의적으로 더 우수한 항보체 활성을 나타내었다.

6. 브로콜리 유래 추출물의 일반화학적 특성

앞선 결과를 종합해 보면, 브로콜리 유래 3종의 추출물 중 면역활성에 주로 관여하는 것은 조다당 BCCP라고 결론지었다. 따라서 본 연구진은 브로콜리 유래 열수추출물 BCHW와 조다당 BCCP에 대한 일반 분석 및 구성당 분석을 진행하여 총당 함량과 이에 따른 구성당 비율을 정량분석하여 면역활성에 공헌하는 물질을 확인하고자 하였다.

먼저 브로콜리 유래 단순 열수추출물 BCHW에 대한 화학적 조성을 확인한 결과(Table 2), 중성당 33.7%와 산성당 30.7%로 구성되어 있었으나, 이 외에 미지의 물질도 31.4%를 차지하고 있었다. 반면, 조다당 BCCP의 경우에는 중성당 42.6%, 산성당 50.5%로 구성되어 조다당 BCCP에는 다당이 시료 전체의 90% 이상을 차지하고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 단순 열수추출물 BCHW와 조다당 BCCP의 구성당에 대한 정량분석을 진행한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 단순 열수추출물의 경우, 전체 1g 기준 arabinose 250.1 μ g, glucose 166.7 μ g 및 galactose 147.1 μ g이 다량 함유되어 있었으며, 소량의 rhamnose, mannose와 xylose가 함유되어 있었다. 또한, 조다당 BCCP의 구성당 분석을 정량화한 결과, arabinose 503.9 μ g, galactose 289.6 μ g 및 rhamnose 110.9 μ g으로 구성되어 있었으며, mannose와 xylose가 미량 함유되어 있었다. 이 결과를 바탕으로 단순 열수추출물 BCHW보다 조다당 BCCP에 다량의 다당들이 더 높은 비율로 함유되어 있는 것으로 보아, 아마 브로콜리의 면역활성은 주로 고분자

Table 2. Chemical properties of hot water extract (BCHW) and crude polysaccharide (BCCP) isolated from broccoli

Chemical composition (%)	BCHW	BCCP
Neutral sugar	33.7±2.5	42.6±0.6
Uronic acid	30.7±2.1	50.5±0.7
Kdo-liked material	0.0±0.0	0.0±0.1
Protein	4.3±0.1	4.7±0.2
Unknown materials	31.4±5.0	2.2±2.1
Component sugar (mg/g) ¹⁾		
Rhamnose	56.6±0.6	110.9±2.1
Fucose	0.0±0.0	0.0±0.0
Arabinose	250.1±0.9	503.9±6.3
Xylose	5.2±0.6	7.1±0.6
Mannose	18.3±0.0	19.2±0.0
Galactose	147.1±2.1	289.6±3.9
Glucose	166.7±0.9	3.5±1.5

¹⁾ Quantitative analysis for chemical composition of BCHW and BCCP (mg/1g).

다당이 공현할 것이라 최종 결론지었다.

브로콜리 유래 에탄올 추출물 BCEE, 단순 열수추출물 BCHW와 조다당 BCCP에 대한 HPLC 정제도를 분석한 결과(Fig. 6), 에탄올 추출물 BCEE의 경우, 저분자 물질만 검출되었으며, 단순 열수 추출물 BCHW는 고분자와 저분자가 혼재되어 있었다. 반면, 조다당 BCCP의 경우에는 고분자가 좌우대칭으로 단일피크가 검출된 것으로 보아, 조다당 BCCP에는 분자량이 큰 다당 물질이 주로 존재할 것이라 생각되어 고분자 다당이 브로콜리의 면역활성에 공현할 것이라 재차 확인시켜 주었다.

요약 및 결론

제주산 브로콜리로부터 에탄올과 물을 이용, 3종의 추출물을 분리하여 새로운 면역활성 물질을 확인하고자 하였다. 브

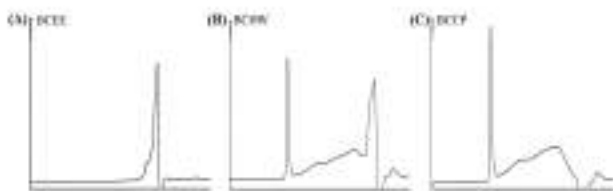


Fig. 6. Elution patterns of BCEE (A), BCHW (B) and BCCP(C) isolated from broccoli on size exclusion HPLC. HPLC was equipped with Superdex 75 GL 10/300 columns.

로콜리 가식부만을 얻어 8배의 에탄올을 가하여 추출한 에탄올 추출물 BCEE, 이 때 남은 잔사(AIR)에서 열수추출하여 제조한 단순 열수추출물 BCHW, 열수추출 후 4배의 에탄올을 넣고 얻은 침전물을 다시 소량의 물에 용해한 후, 투석 및 동결건조를 거쳐 조다당 BCCP를 얻었다. 브로콜리 유래 단순 열수추출물 BCHW 및 조다당 BCCP는 정상세포주 및 종양 세포주에 대한 직접적인 세포독성을 나타내지 않았으며, 대식세포 자극에 대한 cytokine 생산능을 측정된 결과, IL-6, IL-12 및 TNF- α 모두 브로콜리 유래 조다당 BCCP이 에탄올 추출물 BCEE과 단순 열수추출물 BCHW보다 더 우수한 cytokine 분비능을 보여주었다. 그러나 비장세포의 증식능을 확인한 결과, 단순열수추출물 BCHW 및 조다당 BCCP 시료 모두 증식능을 나타내지 않았다.

또한, 장관 내 분포되어 있는 Peyer's patch를 경유하여 장관면역에 공헌하는지에 대한 여부를 확인한 결과, 브로콜리 유래 조다당 BCCP에서 NC 대비 유의적으로 GM-CSF와 같은 관련 cytokine의 분비 유도가 확인되었으며, 골수세포의 증식능을 확인하였다. 항보체 활성에서도 브로콜리 유래 조다당 BCCP가 단순 열수추출물 BCHW보다 높은 활성을 나타내었다. 이상의 결과로부터 브로콜리로부터 분리한 조다당 BCCP가 대식세포의 기능과 장관면역계를 증진시킬 수 있는 가능성을 제시하였다. 따라서 브로콜리 유래 단순 열수추출물 BCHW와 조다당 BCCP에 대한 화학적 특성을 분석한 결과, 단순 열수추출물 BCHW의 경우, 중성당과 산성당을 포함한 총당이 64.4% 비율로 존재하였으며, 조다당 BCCP는 93.1%의 다당으로 구성되어 있었다. 따라서 브로콜리의 높은 면역활성은 주로 다당이 관여하는 것으로 최종 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(과제번호: 114029-03-1).

References

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2014. Cellular and Molecular Immunology. pp.2-5. Elsevier Health Sciences
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54:484-489
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Cebra JJ, Shroff KE. 1994. Peyer's patches as inductive sites for

- IgA commitment. *Handbook of Mucosal Immunology*. pp. 151-158. Academic Press
- David CW, Norrman J, Hammon H, Davis W, Blum J. 2003. Cell proliferation, apoptosis, and B- and T-lymphocytes in Peyer's patches of the ileum, in thymus and in lymph nodes of preterm calves, and in full-term calves at birth and on day 5 of life. *J Dairy Sci* 86:3321-3329
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers P, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Gamet-Payraastre L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, Gasc N, Tulliez J, Tercé F. 2000. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 60:1426-1433
- Holers VM. 2003. The complement system as a therapeutic target in autoimmunity. *Clin Immunol* 107:140-151
- Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. 1998. Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of *Kampo* (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine* 5:353-360
- James SP, Zeitz M. 1994. Human gastrointestinal mucosal T cells. In *Handbook of Mucosal Immunology*. pp.275-285. Academic Press
- Janeway C, Travers P, Hunt S. 1996. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. pp.26. Garland Pub
- Jones TM, Albersheim P. 1972. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol* 49:926-936
- Kabat EA, Mayer MM. 1971. *Experimental Immunochemistry*. pp.133-240. Immunology
- Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal Biochem* 85:595-601
- Kuby J. 2006. *Immunology*(5th edition). pp.9-19, 32-39, 46-50, 55-75, 315-337. Worldscience
- Lee CK, Gray GR. 1988. A general strategy for the chemical sequencing of polysaccharides. *J Am Chem Soc* 110:1292-1293
- Lee S, Rhee S. 1997. Inhibitory effect of various cruciferous vegetables on the growth of human cancer cells. *Korean J Life Sci* 7:234-240
- Maxwell EG, Belshaw NJ, Waldron KW, Morris VJ. 2012. Pectin-an emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends Food Sci Tech* 24:64-73
- Meyer RA. 2007. *Immunology; From Cell Biology to Disease*. pp.102-107. Wiley-VCH
- Mueller EA, Anderer FA. 1990. Synergistic action of a plant rhamnogalacturonan enhancing antitumor cytotoxicity of human natural killer and lymphokine-activated killer cells: chemical specificity of target cell recognition. *Cancer Res* 50:3646-3651
- Ravikumar C. 2015. Therapeutic potential of *Brassica oleracea* (broccoli) - A review. *Int J Drug Dev & Res* 7:9-10
- Shim KH, Sung NK, Kang KS, Ahn CW, Seo KI. 1992. Analysis of glucosinolates and the change of contents during processing and storage in cruciferous vegetables. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 21:43-48
- Shin KS, Kiyohara H, Matsumoto T, Yamada H. 1998. Rhamnogalacturonan II dimers cross-linked by borate diesters from the leaves of *Panax ginseng* CA Meyer are responsible for expression of their IL-6 production enhancing activities. *Carbohydr Res* 307:97-106
- Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G, Kobayashi H, Nomoto K, Orita K. 1984. Krestin(Psk). *Cancer Treat Rev* 11:131-155
- Unanue ER. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol* 2:395-428
- Wang H, Actor JK, Indrigo J, Olsen M, Dasgupta A. 2003. Asian and Siberian ginseng as a potential modulator of immune function: an *in vitro* cytokine study using mouse macrophages. *Clin Chim Acta* 327:123-128
- Whaley K. 1986. The complement system. In *Complement in Health and Disease*. pp.1-35. MTP Press
- Yamada H, Ra KS, Kiyohara H, Cyong JC, Otsuka Y. 1989. Structural characterization of an anti-complementary pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Carbohydr Res* 189:209-226
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Song SK, Lee KB, Her E, Song KS, Kim JB. 2003. Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. *Arch Pharm Res* 26:861-867

Received 01 August, 2017

Revised 28 August, 2017

Accepted 08 September, 2017