

압출성형된 무청으로 제조한 야채스프의 면역활성 증강 효과

김이은 · 조은지 · 전형광¹ · 류기형² · 성낙윤 · 변의홍^{2*}
공주대학교 식품공학과, ¹(주)하늘빛, ²공주대학교 식품과학연구소

Immunological Activity of Vegetable Soup Made by Extruded Radish

Yi-Eun Kim, Eun-Ji Cho, Hyeong-Kwang Jun¹, Gi-Hyung Ryu²,
Nak-Yun Sung, and Eui-Hong Byun^{2*}

Department of Food Science and Technology, Kongju National University

¹Hanbit Food

²Food Science Research Institute, Kongju National University

ABSTRACT

This study was to demonstrate the comparison of immunological activity between vegetable soup made by fresh and extruded radish in in-vitro (bone marrow-derived macrophages and dendritic cells, and mouse splenocytes) and in-vivo models. In cell survival tests, extruded radish added to vegetable soup (EVS) and non-extruded radish added to vegetable soup powder (NEVS) were treated with bone-marrow derived macrophages, dendritic cells, and mouse splenocytes, and showed no cytotoxic effect at a dose below 1000 µg/mL. EVS treated cells had greater cell proliferation and cytokine [tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-6, IL-1β, IL-2, interferon (INF)-γ] production when compared to the NEVS treated group. Cell surface marker (CD 80/86, MHC class I/II) expression in bone marrow-derived macrophages and dendritic cells was evenly increased in the EVS treated group. In in-vivo study, administration of EVS increased for the CD4 and CD8 T cell population in splenocyte and cytokine production (IL-2, IFN-γ, TNF-α) but not Th2 type cytokines (IL-4). Therefore, adding the extruded radish is a more effective method for vegetable soup to increase immunological activity against immune cells.

Key words: vegetable soup, extruded radish, immuno-modulatory activity, cell proliferation, cytokine production

서 론

면역반응은 외부 병원성 항원으로부터 우리 몸을 보호하기 위한 생체 방어체계로서 선천성 면역반응과 후천성 면역반응으로 구분된다. 선천성 면역반응에 관여하는 면역세포로는 호중구, 단핵구, 수지상세포, 대식세포와 같은 탐식세포들이 있으며, 이중 대식세포와 수지상세포는 면역반응의 개시자로서 외부로부터 들어오는 항원에 가장 빠르게 대응하여 포식하는 작용을 하며, 사이토카인을 분비해 선천면역세포의 활성을 높이거나 외부로부터 유입된 항원을 면역 T세포에 전달하여 후천면역계의 활성 유도한다고 보고되고 있다(Byun, 2017; Cho et al., 2017; Kim et al., 2017). 후천성면역계에 관여하는 면역세포로는 T 세포 및 B 세포가 있으며, 선천성 면역반응 후 대식세포 및 수지상세포와

같은 탐식포식세포들이 제시한 특이 항원을 T세포가 인식하면서 T세포 및 B세포의 활성이 일어나고, 활성화된 T세포에 의해 발현되는 사이토카인의 작용으로 후천면역반응이 증폭된다(Klump et al., 2002; Schepetkin & Quinn 2006; Sung et al., 2016).

면역조절 물질로서 합성 의약품 및 생물제제 등이 연구되고 있지만 이러한 물질들은 대부분 부작용 또는 독성으로 인하여 생체에 적용하기에는 한계점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 식품소재 또는 천연물로부터 추출한 물질을 면역조절물질로서 분리하여 개발하는 연구가 활발히 수행되고 있으며(Byrd et al., 2000; Byun, 2015), 이러한 천연물은 비특이적으로 면역세포들을 자극하여 생체의 면역기능을 활성화시킴으로써 질병요인으로부터 생체의 방어력을 증강시킨다.

천연물을 통한 건강법 중 일상생활에서 쉽게 섭취 가능한 당근, 무, 무청, 우엉, 표고버섯과 같은 채소들로 이루어진 야채스프가 국내에서 암 환자 및 자가 면역성 질환의 환자들에게 많은 관심을 받아 다양한 많은 제품들이 판매가 되고 있다. 당근은 비타민A의 전구체인 β-carotene을 다

*Corresponding author: Eui-Hong Byun, Department of Food Science and Technology, 54, Daehak-ro, Yesan-eup, Yesan-gun, Chungcheongnam-do, Republic of Korea
Tel: +82-41-330-1481; Fax: +82-41-330-1489
E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr
Received April 16, 2018; revised May 14, 2018; accepted May 16, 2018

량 함유하고 있어, 활성산소를 억제해 암, 노화, 및 각종 성인병을 예방한다(Heinonen, 1990; Simon, 1990; Weisburger, 1991; Bendich et al., 1994). 무는 대표적인 항산화 성분인 phenolic compound, flavonoid와 각종 무기질과 소화효소인 amylase 등이 있으며, 소화불량, 숙취해소 및 항산화 등의 효과가 있다고 보고되어진다(Shimotoyodome et al., 2001). 무청은 35% 이상의 식이섬유와 20% 내외의 단백질과 철분, 칼슘 등을 함유하고 있으며, 에탄올 추출물이 항암효과, 위장내 자극 및 자궁 수축 활성능, 장내 자극활성 등에 대한 효과가 있다고 알려져 있다(Gilani & Ghayur, 2004; Yim et al., 2004; Ghayur & Gilani, 2005; Ku et al., 2006). 우영은 폴리페놀 화합물인 caffeic acid 및 chlorogenic acid 등을 함유하고 항균작용, 항염증 등에 대한 연구가 보고되고 있다(Takeda & Kiriyama, 1991a; Takeda & Kiriyama, 1991b). 표고버섯은 면역기능을 높여 항암 효과를 나타내는 lentinan, 혈액 중 콜레스테롤을 제거하여 고혈압 및 동맥경화와 같은 성인병 예방 효과를 나타내는 eritadenine, 체내에서 비타민 D로 생성되어 칼슘의 흡수를 높여 주는 ergosterin 등을 포함하고 있다고 보고되었다(Lee et al., 1997; Hatvani 2001; Enman et al., 2007; Kim et al., 2013).

일반적으로 식물의 세포벽은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 펙틴 및 리그닌 등과 같은 고분자물질로 구성되어 있다. 이러한 식물 세포벽 구성성분들은 상호 간에 이온, 공유 및 수소결합 등을 통해 단단한 결합조직을 이루고 있어 식물 내부 유효성분을 추출하는데 제한적이다(Sung et al., 2016). 따라서 식물 세포벽의 강한 결합을 물리적 및 화학적인 방법으로 수용성화 함으로써 식물 함유 유효성분을 다량으로 용출시키기 위한 연구들이 다양하게 시도되고 있다(Hwang et al., 1994). 압출성형은 혼합, 분쇄, 가열, 성형 및 건조와 같은 연속적인 물리적인 조작을 통해서 전분의 수화, 팽윤, 호화, 단백질의 변성, 미생물의 사멸, 독성 물질 파괴 및 이취물질 제거 반응 등이 연속적으로 일어나는 공정이다. 스크류 회전속도, 수분 함량 및 배럴 온도 등의 공정변수 조절에 의해 다양한 특성의 압출성형물을 제조할 수 있다(Hwang et al., 1994; Shin et al., 2003). 국내에서 압출성형공정을 이용하여 무청분말의 폴리페놀 추출함량 증가 및 이취감소(Sung et al., 2016), 사과주스의 착즙 부산물인 사과박의 압출성형공정에 따른 수용성 식이섬유 및 펙틴의 함량 증가(Hwang et al., 1994) 등과 같은 다양한 식품 분야에서 적용되고 있으며, 식품의 물리적 및 화학적 특성 뿐만 아니라 유용성분들의 추출효율을 개선하고자 하는 다양한 연구들이 진행되고 있다.

본 연구는 압출성형 무청을 사용하여 제조한 야채스프(EVS)와 일반 무청을 사용하여 제조한 야채스프(NEVS)의 면역활성능에 관하여 알아보기 위하여 마우스 골수세포로부터 분화된 다양한 면역세포(대식세포, 수지상세포) 및 비장으로부터 적출한 비장세포에 NEVS와 EVS를 처리하여

세포생존율, 면역조절 물질인 사이토카인의 분비능, 세포표면 활성인자(CD80/86, MHC class I/II)들의 발현 등에 미치는 영향에 관하여 알아보았으며, NEVS와 EVS를 투여가 BALB/c 마우스의 비장세포에서 후천성 면역반응에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

야채스프의 압출성형

압출성형 야채스프의 제조에 사용된 압출성형기는 자체 제작 한 실험용 쌍축 압출성형기(THK 31T, Incheon Machinery Co., Incheon, Korea)이며 압출성형기의 스크류 직경은 29.0 mm, 직경과 길이의 비(L/D ratio)는 25:1이다. 압출성형 공정변수(배럴온도, 수분함량, 스크류 회전속도)는 Sung et al. (2016)의 연구에서 무청의 압출성형 최적조건으로 제시한 130°C, 20%, 250 rpm으로 설정하였고, 그 밖의 원료사입량 및 사출구직경은 100 g/min, 3.0 mm로 고정하였다.

실험재료 및 실험동물

본 실험에서 사용한 야채스프(제품명: 하늘빛 유기야채스프) 및 압출성형 무청을 사용하여 제조한 야채스프는 (주)하늘빛(Gongju, Korea)에서 제공받아 동결건조하여 사용하였고, 야채스프의 구성성분과 함량은 Table 1과 같다. 실험동물은 6주령(18-20 g)의 C57BL/6 웅성 마우스를 오리엔트바이오(Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 분양받은 마우스는 동물사육실 내부 환경에 1주간 순화시킨 후 미분화 골수세포 및 비장세포를 채취하기 위하여 사용하였다. 야채스프의 섭취가 면역계에 미치는 영향에 관하여 관찰하기 위하여 암컷 BALB/c 마우스(6주령, 체중 15-18 g)를 오리엔트바이오로부터 구입하여 7일간 순화시켰다. 사육실의 온도는 23±2°C, 상대습도 50±5%, 명암주기는 12시간으로 일정하게 유지하였다. 동물실험을 위하여 마우스는 총 3군(n=10)으로 분류하였으며, 첫 번째 그룹은 정상군(PBS 투여군), 두 번째 그룹은 NEVS (100 mg/kg body weight)투여군, 세 번째 그룹은 EVS (100 mg/kg body weight)투여군으로, 1일 1회 7일동안 경구투여 하였다.

Table 1. Compositions of the vegetable soup

NEVS ¹⁾		EVS ²⁾	
Ingredients	Gram/100 mL	Ingredients	Gram/100 mL
Radish	13.16	Radish	13.16
Radish leaves	0.24	Extruded radish leaves	0.24
Burdock	2.40	Burdock	2.40
Carrot	4.00	Carrot	4.00
Shiitake	0.20	Shiitake	0.20

¹⁾NEVS: non-extruded radish leaves adding vegetable soup

²⁾EVS: extruded radish leaves adding vegetable soup

골수세포로부터 대식세포 및 수지상세포로의 분화 유도

골수세포로부터 대식세포 및 수지상세포로의 분화를 유도하기 위하여 C57BL/6 마우스로부터 골수 채취용 주사기 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용해 대퇴부 골수를 채취하였다. 채취한 골수를 차가운 phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)으로 3회 세척한 후 적혈구를 제거하기 위하여 red blood cell (RBC) lysis buffer (Invitrogen Co.)를 5 mL 처리하여 10분간 방치하였다. PBS로 3번 세척하여 적혈구 찌꺼기를 완전히 제거하였다. 분리한 미분화 골수세포를 수지상세포로 분화시키기 위하여 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함되어 있는 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지 (Invitrogen Co.)에 2 mM L-glutamin, 100 unit/mL penicillin/streptomycin, 50 µM mercaptoethanol, 0.1 mM non-essential amino acid, 1 mM sodium pyruvate, 20 ng/mL granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 20 ng/mL IL-4 (R&D Systems)를 첨가하여 8일 동안 배양하였다. 또한 대식세포로의 분화를 유도하기 위해 10% FBS가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, WelGene, Daegu, Korea)에 2 mM L-glutamin, 100 unit/mL penicillin/streptomycin, 50 µM mercaptoethanol, 0.1 mM non-essential amino acid, 1 mM sodium pyruvate, 25 ng/mL macrophage colony stimulating factor (MC-SF, R&D Systems)를 첨가하여 4일 동안 배양하였다.

대식세포 및 수지상세포로의 세포 증식능 평가

NEVS와 EVS의 처리가 대식세포 및 수지상세포의 세포 증식능에 미치는 영향을 측정하기 위하여 마우스 골수세포로부터 분화 된 대식세포 및 수지상세포를 각각 96 well plate (BD Biosciences)에 well당 3×10^5 개로 분주한 후, NEVS와 EVS를 각각 500 µg/mL 및 1000 µg/mL의 농도 처리하여 37°C로 유지되는 5% CO₂ 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, 대식세포 및 수지상세포의 세포 증식능을 MTT 방법 및 WST-1 방법에 의하여 측정하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 방법은 시약을 PBS에 5 mg/mL의 농도로 용해하여 well당 30 µL씩 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후, 배양 상등액을 제거하고 세포 내 생성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. WST-1 방법은 각 well에 WST-1 용액(Daeillab service, Seoul, Korea) 10 µL를 첨가하여 30분 동안 반응시킨 다음 multi-mode microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대식세포 및 수지상세포로의 세포 독성 평가

세포사의 분석을 위하여 FITC Annexin V Apoptosis De-

tection Kit I (556547, BD Biosciences)를 이용하여 Flow Cytometer (FACS, Cytomics FC 500, Beckman Coulter, Pasadena, California, USA) 분석을 실시하였다. 세포자살이 진행되는 과정 중 세포막 내측에 위치하는 Phosphatidyl serine (PS)이 전위되며, PS는 Annexin V와 강한 친화력을 지닌다. 또한 Propidium iodide (PI)는 분해된 DNA의 절편과 친화력이 크므로 사멸된 세포를 분석하는 데 이용되고 있다(Vermes et al., 1995). 먼저, 세포를 1× PBS로 두 번 세척한 후 1× Binding Buffer를 이용하여 1×10^6 cells/mL 농도로 현탁시킨다. 이 용액으로부터 100 µL (1×10^5 cells)의 세포를 채취하여 5 mL culture tube에 분주하고, Annexin V-FITC (5 µL)와 PI (5 µL)를 첨가하여 15분 동안 실온에서 염색을 실시한다. 염색된 혼합액에 1× Binding Buffer (400 µL)를 첨가한 후 FACS를 이용하여 분석하였다.

대식세포 및 수지상세포에 대한 사이토카인 분비능

NEVS와 EVS의 처리가 대식세포 및 수지상세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향을 측정하기 위하여 마우스 골수 세포로부터 분화된 대식세포 및 수지상세포를 각각 48 well plate에 well당 7×10^5 개로 분주한 후, NEVS와 EVS를 각각 500 µg/mL 및 1000 µg/mL의 농도로 처리하여 37°C로 유지되는 5% CO₂ 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, 배양 상등액에 포함되어 있는 TNF-α, IL-6 및 IL-1β의 함량을 측정하였다. 사이토카인의 측정은 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BD Biosciences)를 사용하여 측정하였다.

대식세포 및 수지상세포의 세포 표면 활성 인자(cell surface marker)에 미치는 영향

NEVS와 EVS의 처리가 대식세포 및 수지상세포의 세포 표면 활성 인자의 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여 마우스 골수세포로부터 분화된 대식세포 및 수지상세포를 각각 6 well plate에 well당 1×10^6 개로 분주한 후, NEVS와 EVS를 각각 500 µg/mL 및 1000 g/mL의 농도로 처리한 후 24시간 동안 반응시키고 각각의 세포를 회수하였다. 항체의 비 특이적인 결합을 방지하기 위하여 회수된 각각의 세포에 1 µg/mL의 Fcy I/III (BD Biosciences)을 처리하여 4°C에서 20분간 반응시킨 후, 대식세포와 수지상 세포 표면 활성 인자 분석을 위하여 anti-CD80-PE, anti-CD86-PE, anti-MHC I 및 II-PE (BD Biosciences)와 같은 세포 표면 항체를 각각 1000배 희석하여 각각의 세포에 처리하고 30분 동안 반응시키고 FACS를 이용하여 NEVS와 EVS의 처리가 대식세포 및 수지상세포의 세포 표면 활성 인자의 발현에 미치는 영향에 관하여 분석하였다.

비장세포 분리

1주간의 순화를 마친 마우스를 경추 탈골법으로 희생시

킨 후 비장을 무균적으로 적출하여 10% FBS, 100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 함유한 RPMI1640 배지로 3회 세척한 후 조직균질기(tissue grinder, Corning Costar, Corning, NY, USA)로 균질화하여 비장세포를 유리시켰다. 세포현탁액에 적혈구를 제거하기 위하여 RBC lysis buffer (BD Biosciences)를 첨가하여 적혈구를 제거하였고, 혈구계 수기를 이용하여 세포수를 측정하였다.

비장세포의 세포 증식능 평가

96 well plate에 well당 1×10^6 개의 비장세포를 분주한 후, NEVS와 EVS를 500 및 1000 µg/mL과 양성 대조구인 ConA를 1 µg/mL의 농도로 처리하였고, 37°C로 유지되는 5% CO₂ 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, WST-1 (Daecillap service) 용액을 각 각의 well에 10 µL씩 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포증식능을 평가하였다.

비장세포에 대한 사이토카인 분비능 평가

비장 조직으로부터 분리된 비장세포를 48 well plate에 well당 2×10^6 개씩 분주한 후 NEVS와 EVS를 500 및 1000 µg/mL의 농도로 처리하였고, 또한 양성 대조구인 ConA를 1 µg/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 배양 후, 배양 상등액에 존재하는 사이토카인(IFN- γ , IL-2, 4)의 함량에 관하여 측정하였다. 사이토카인의 함량측정은 ELISA kit (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

동물실험

실험동물에서 비장을 적출하여 mesh를 이용하여 단일 세포 부유액으로 만들었다. 원심분리(1,800 rpm, 3 min, 4°C)하여 상등액을 제거하고 RBC lysis buffer (Sigma-Aldrich)에 5분간 현탁시켜 적혈구를 제거하였다. 위의 세포를 RPMI 1640 용액으로 원심 세척한 후, 10% FBS와 1% streptomycin이 함유된 RPMI 1640 용액으로 세포를 희석한 후 CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포를 측정하기 위해 PerCP-Cy5.5-conjugated anti-mouse CD4, PE-Cy7-conjugated anti-CD8a (BD Bioscience)를 tube당 1 µg의 농도로 상온에서 15분간 염색하였다. 1 mL의 PBS를 넣어 3회 세척한 후, flow cytometry (Cytomics FC500, Beckman, Miami, FL, USA)로 측정하였다. NEVS와 EVS를 경구투여한 마우스의 비장에서 분리한 T 세포의 cytokine 생성변화를 알아보기 위하여, 비장에서 분리한 세포를 48 well plate에 well당 0.5×10^6 개씩 분주한 후, purified anti-mouse CD3e 및 CD28를 0.5 µg/mL의 농도로 처리하여 세포를 자극하였다. 24시간 배양 후 세포의 상등액을 이용하여 ELISA를 실시하였다. IFN- γ , IL-2, IL-4 및 TNF- α 각각의 ELISA kit (eBioscience)를 이용하여 제조사의 지침대로 측정하였다.

통계처리

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical package for social sciences (SPSS, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) software를 이용 하여 one way ANOVA test로 분석하였으며, 시료간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

NEVS와 EVS의 처리가 대식세포 및 수지상세포의 세포 생존율에 미치는 영향

NEVS와 EVS의 처리가 대식세포 및 수지상세포의 세포 생존율에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위하여 대식세포 및 수지상 세포에 NEVS와 EVS를 처리하여 MTT 및 WST-1 방법으로 세포 생존율을 관찰하였다(Fig. 1). 그 결과, NEVS와 EVS의 모든 처리군에서 500 µg/mL, 1000 µg/mL 처리시 세포독성이 나타나지 않는 것으로 관찰되었다. 또한 NEVS와 EVS의 대식세포 및 수지상세포에 세포자살(apoptosis)을 유발 시키는지에 관하여 알아보기 위하여 NEVS와 EVS를 500 µg/mL, 1000 µg/mL로 각각 24시간 동안 처리하고 Annexin V 및 PI로 염색한 후 FACS분석을 통해 세포자살 유무를 관찰 하였다(Fig. 2). 대식세포에 NEVS와 EVS를 처리한 결과, 대조군(Con) (1.77%)과 큰 차이가 나타나지 않았으며, LPS 처리군(12.5%)의 경우 대조군과 비교하여 일부 세포자살을 유도하는 것으로 관찰되었다(Fig. 2A). 수지상세포에 NEVS와 EVS를 처리한 결과, 대식세포 실험결과와 유사하게 샘플처리구에서는 큰 차이가 나타나지 않았으며, LPS 처리군(11.6%)의 경우 대조군(1.67%)과 비교하여 일부 세포자살을 유도하는 것으로 관찰되었다(Fig. 2B). 세포내 세포자살이 유발되면 세포막의 유동성 증가로 인하여, 막 인지질의 비대칭성이 소실되어 내부에 존재하는 phosphatidyl serine이 세포표면으로 노출이 된다(Kim et al., 2016). Annexin V는 phosphatidyl serine과 특이적으로 결합하여, 세포자살의 표본으로 사용되고 있다. PI는 핵에 결합하는 물질로, 세포자살이 진행되면 세포의 세포막에 생긴 구멍을 통해 세포막으로 들어가 핵을 염색한다. 따라서 이러한 결과로 미루어 보아 NEVS 및 EVS의 처리는 대식세포 및 수지상세포에서 세포독성에 영향을 미치지 않았으며, 추후 NEVS 및 EVS의 처리가 면역활성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 NEVS 및 EVS의 농도를 1000 µg/mL 이하로 고정하여 실험하였다.

NEVS와 EVS의 대식세포 및 수지상세포에 대한 사이토카인 분비능에 미치는 영향

대식세포 및 수지상세포는 선천면역에 관여하는 대표적인 탐식세포로서, 외부로부터 생체로 유입된 바이러스 및 세균과 같은 병원체를 직접적으로 탐식하거나, 사이토카인

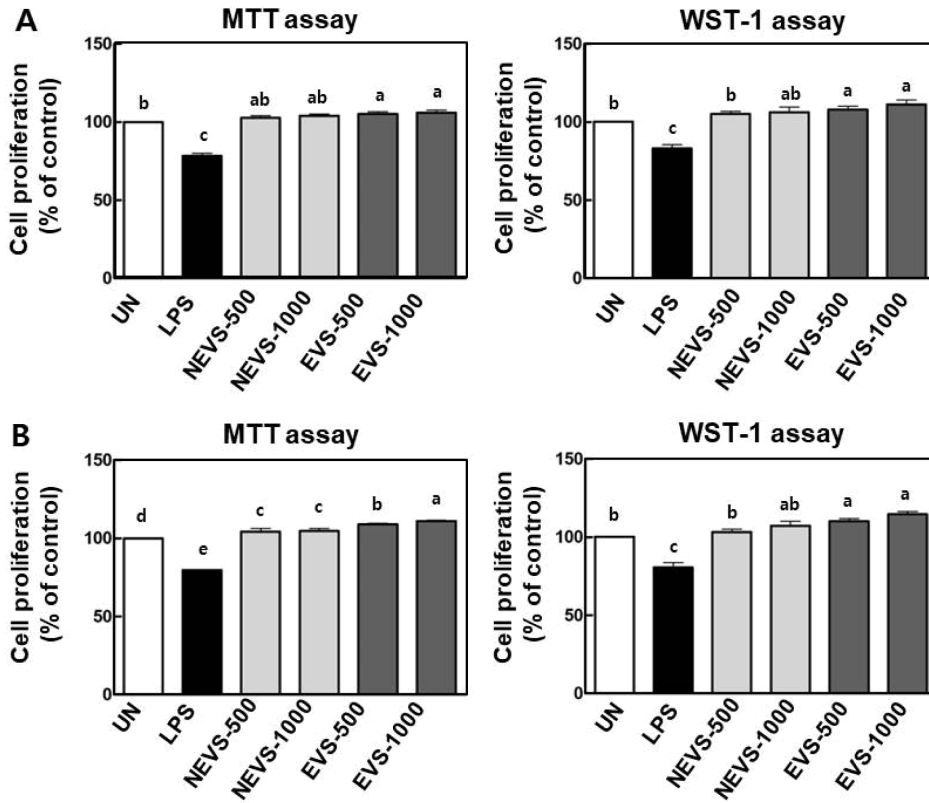


Fig. 1. Cell proliferation activity of non-extruded vegetable soup powder (NEVS) and extruded vegetable soup powder (EVS) in bone-marrow derived macrophage and dendritic cell. Each samples were treated at the concentration of 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in bone-marrow derived macrophage (A) and bone-marrow derived dendritic cell (B). Cell proliferation was conducted in triplicates ($n=3$), and the results are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using the Duncan's multiple range test and ^{a-d}values with different letters were significantly different ($p<0.05$).

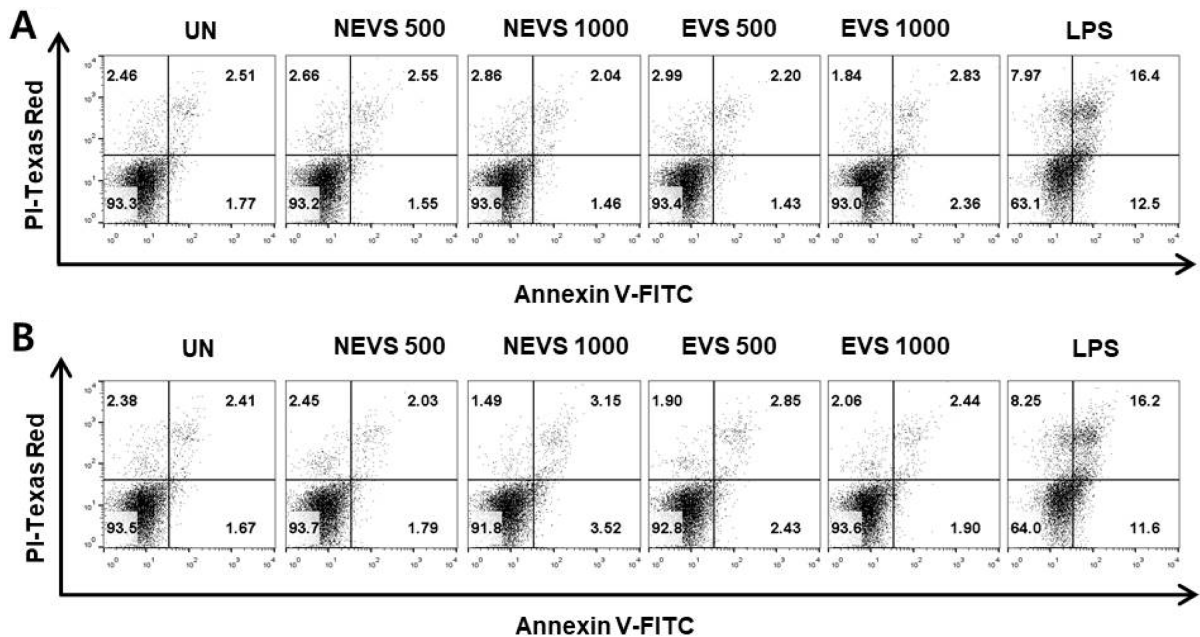


Fig. 2. Cytotoxicity of non-extruded vegetable soup powder (NEVS) and extruded vegetable soup powder (EVS) on the PI and Annexin V stained cells. flow cytometry analysis were applied to identify the mechanism of cells death. Each samples were treated at the concentration of 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in bone-marrow derived macrophage (A) and bone-marrow derived dendritic cell (B). All experiments were conducted in triplicates ($n=3$), and the results are expressed as mean \pm SD.

과 같은 면역 매개물질을 분비함으로써 면역반응을 유도한다(Byun & Byun, 2015). 사이토카인은 면역세포 간 신호 전달을 위한 중요한 면역조절인자이며, 대식세포 및 수지상세포가 생산하는 대표적인 사이토카인으로 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 등이 있다(Kim et al., 2017). TNF- α 는 중앙괴사 인자로서 병원체에 의해 오염된 세포에 대한 세포독성을 일으켜 숙주 방어작용을 유도하며, 감염범위를 극소화 시켜 초기 면역반응의 중요한 역할 매개한다(Sung et al., 2016). IL-6는 B 세포와 T 세포를 자극시켜 체액성 면역반응을 조절하고 조혈작용을 증가시키며, IL-1 β 는 TNF- α 와 유사하게 병원성 항원의 확산을 감소시키며, B세포와 T세포의 세포활성에 관여하여 후천성 면역반응을 촉진시킨다(Byun, 2017).

NEVS와 EVS의 처리가 대식세포 및 수지상세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 대식세포 및 수지상세포에 NEVS와 EVS를 처리하여 배양 상등액에 존재하는 사이토카인의 함량을 ELISA법으로 측정 하

였다(Fig. 3). 양성대조구인 LPS 처리시, 대식세포의 사이토카인(TNF- α ; 1331.34 \pm 74.2 pg/mL, IL-6; 1061.91 \pm 56.3 pg/mL, IL-1 β ; 1056.41 \pm 53.2 pg/mL)이 유의적으로 증가하였고, 수지상세포의 사이토카인(TNF- α ; 1444.85 \pm 55.5 pg/mL, IL-6; 1245.19 \pm 43.9 pg/mL, IL-1 β ; 956.77 \pm 52.8 pg/mL)도 증가되는 것으로 관찰되었다. 농도별(500 및 1000 μ g/mL) 대식세포의 NEVS 처리구에서 TNF- α 의 분비량은, 481.83 \pm 76.1 및 635.54 \pm 54.7 pg/mL로 나타났으며, IL-6의 분비량은, 390.02 \pm 18.8 및 514.20 \pm 73.3 pg/mL로 나타났으며, IL-1 β 의 분비량은 416.21 \pm 49.2 및 522.82 \pm 19.7 pg/mL로 나타났다. 한편 EVS 처리구에서 TNF- α 의 분비량은, 829.46 \pm 20.8 및 954.40 \pm 46.2 pg/mL로 나타났으며, IL-6의 분비량은, 625.53 \pm 25.5 및 835.25 \pm 45.5 pg/mL로 나타났으며, IL-1 β 의 분비량은, 708.22 \pm 42.8 및 919.85 \pm 37.1 pg/mL (n=3)로 나타났다. 두 그룹간의 수치를 비교하여 보면 EVS 처리구에서 사이토카인의 분비량이 유의적으로 증가된 것으로 관찰되었다.

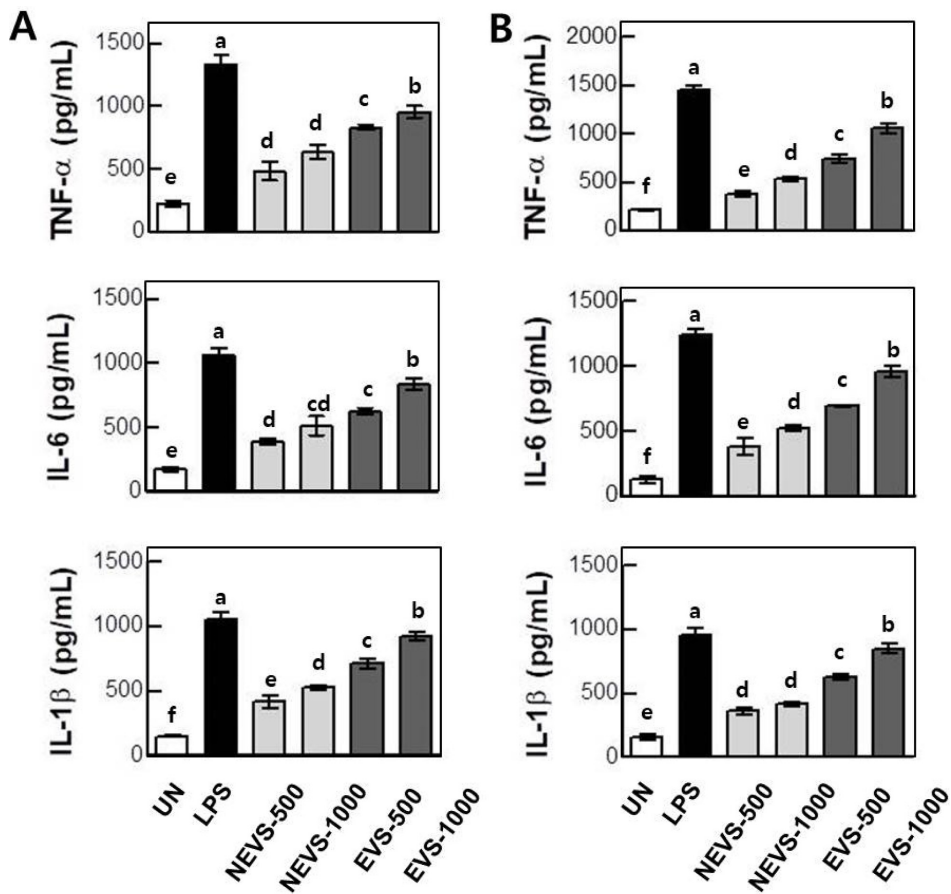


Fig. 3. Cytokine (TNF- α and IL-6) production activity of non-extruded vegetable soup powder (NEVS) and Extruded vegetable soup powder (EVS) in bone-marrow derived macrophage and dendritic cell. NEVS and EVS was treated at the concentration of 500 and 1000 μ g/mL. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 0.2 μ g/mL in bone-marrow derived macrophage (A) and bone-marrow derived dendritic cell (B). Cytokine production was conducted in triplicates (n=3), and the results are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using the Duncan's multiple range test and ^{a-f}values with different letters were significantly different (p<0.05).

수지상세포에서 NEVS 처리시 TNF- α 의 분비량은, 375.36 \pm 25.0 및 530.33 \pm 20.0 pg/mL로 나타났으며, IL-6의 분비량은, 385.41 \pm 65.0 및 520.79 \pm 19.9 pg/mL로 나타났으며, IL-1 β 의 분비량은, 361.05 \pm 25.1 및 415.33 \pm 14.8 pg/mL로 NEVS 처리 농도가 증가할수록 사이토카인의 분비량 또한 증가하는 것으로 관찰되었다. 한편, EVS 처리구에서 TNF- α 의 분비량은, 744.87 \pm 44.4 및 1054.19 \pm 45.8 pg/mL로 나타났으며, IL-6의 분비량은, 694.85 \pm 5.3 및 955.15 \pm 45.8 pg/mL로 나타났으며, IL-1 β 의 분비량은, 628.82 \pm 21.7 및 847.53 \pm 41.6 pg/mL로 관찰되었으며, 대식세포의 결과와 유사하게 EVS 처리구에서 사이토카인의 분비능이 유의적으로 증가되는 것으로 관찰되었다. 따라서, 이러한 결과로 미루어 보아 압출성형 무청을 첨가하여 제조한 야채스프의 경우, 압출성형 처리하지 않은 무청을 첨가하여 제조한 야채스프보다 면역활성이 더욱더 증가한다고 사료된다.

NEVS와 EVS의 대식세포 및 수지상세포의 세포 표면 활성 인자에 미치는 영향

NEVS와 EVS의 처리가 대식세포 및 수지상세포의 세포 표면활성 인자 CD80과 86 및 MHC class I과 II의 발현량에 미치는 영향을 유세포 분석기를 통하여 관찰하였다(Fig. 4, 5). 대식세포에서 NEVS (500 및 1000 μ g/mL) 처리시 세포표면활성 인자의 발현량은, CD80; 39.9, 42.9% CD86; 44.3, 50.1%, MHC class I; 40.3, 43.8%, MHC classII; 36.2, 36.5%로 나타났으며, EVS (500 및 1000 μ g/mL) 처리시 CD80; 51.6, 66.9% CD86; 58.5, 69.6%, MHC class I; 52.3, 75.7%, MHC classII; 43.0, 55.0%로 처리농도가 증가할수록 발현량이 증가되는 것으로 나타났다.

수지상세포에서 NEVS (500 및 1000 μ g/mL) 처리시 세포표면활성 인자의 발현량은, CD80; 51.0, 51.8% CD86; 55.5, 60.8%, MHC class I; 50.0, 54.5%, MHC classII; 33.3, 35.0%로 나타났으며, EVS (500 및 1000 μ g/mL) 처

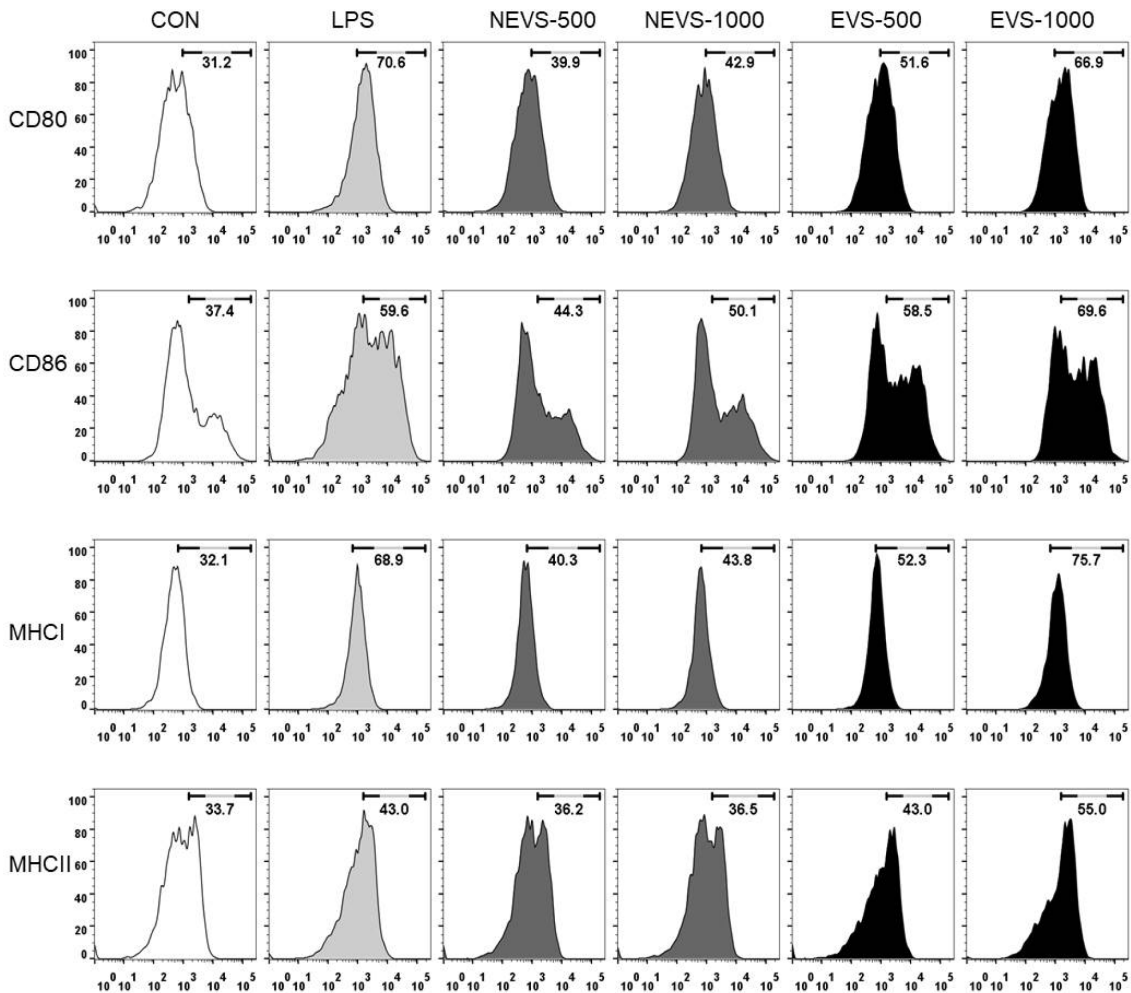


Fig. 4. Expression of costimulatory (CD80, 86) and MHC class (I, II) molecules by non-extruded vegetable soup powder (NEVS) and extruded vegetable soup powder (EVS) in bone-marrow derived macrophage. NEVS and EVS was treated at the concentration of 500 and 1000 μ g/mL. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 0.2 μ g/mL in bone-marrow derived macrophage. All experiments were conducted in triplicates (n=3), and the results are expressed as mean \pm SD.

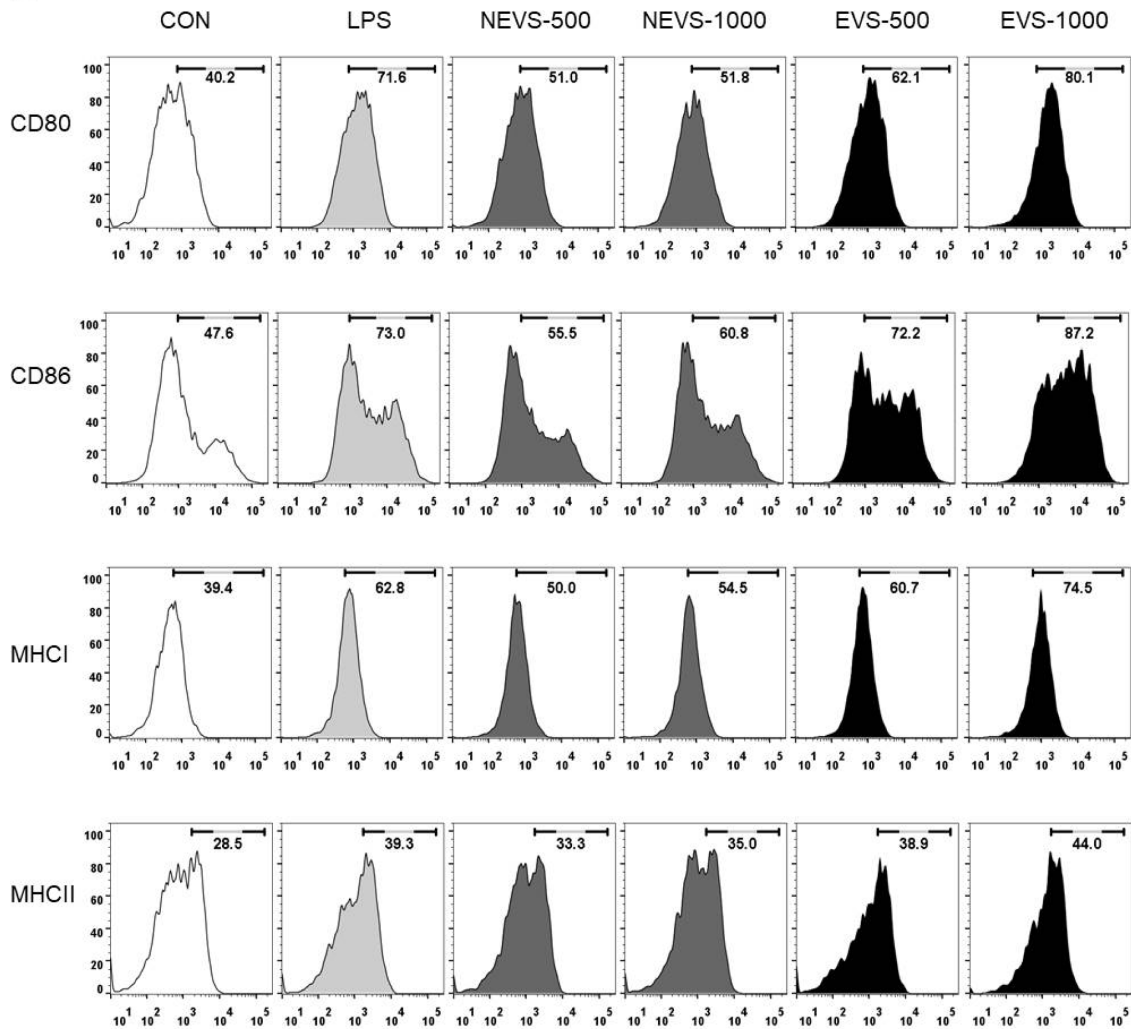


Fig. 5. Expression of costimulatory (CD80, 86) and MHC class (I, II) molecules by non-extruded vegetable soup powder (NEVS) and extruded vegetable soup powder (EVS) in bone-marrow derived dendritic cell. NEVS and EVS was treated at the concentration of 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in bone-marrow derived dendritic cell. All experiments were conducted in triplicates (n=3), and the results are expressed as mean \pm SD.

리시 CD80; 62.1, 80.1% CD86; 72.2, 87.2%, MHC class I; 60.7, 74.5%, MHC classII; 38.9, 44.0%로 나타났다. 대식세포 및 수지상세포에서 NEVS와 EVS 처리군의 CD80 과 86 및 MHC class I과 II의 발현량을 비교하였을 때 동일 농도에서 EVS 처리군에서 발현량이 크게 증가하는 것으로 확인되었다.

다양한 면역세포구들은 세포 표면에 가지고 있는 표면 분자구조에 따라 서로를 구분하며, 이러한 구분은 분화집단(CD)이라는 표현형을 사용한다(Lee et al., 2001). CD는 활성화된 T세포의 분열을 촉진시키는 항원제시 세포로서의 역할시 필수적으로 요구되는 세포막 단백질로 세포의 활성화와 관련하여 중요한 지표로 이용된다(Cho et al., 2007). 구조적합성 복합체(major histocompatibility complex; MHC)는 선천성면역 세포들이 후천성 면역세포인 T세포에 외부로부터 유입된 병원체의 항원을 제시할 때 사용하는

막 단백질로 면역반응을 전개한다(Piani et al., 2000). 탐식 세포가 포함하고 있는 구조적합성 복합체로는 MHC class I과 II가 존재하며 대식세포 및 수지상세포와 같은 탐식세포가 활성화 되지 않았을 때는 적은 양의 발현이지만, 면역세포들이 활성화가 되면 많은 양이 발현이 된다. MHC class I는 모든 세포에 발현이 되어 있으며, 세포독성 T세포에 항원을 제시하여 항원을 제시한 세포가 세포독성 T세포에 의해 제거되며, MHC class II는 특정 면역 세포에만 존재하며 탐식세포가 B세포나 보조T세포에 항원을 제시하면 그 항원에 대한 면역작용을 활발하게 진행한다. 따라서 CD80, 86, MHC class I 및 II의 발현 증가는 대식세포와 수지상세포와 같은 탐식세포의 활성화에 매우 밀접한 관련이 있다(Mo et al., 2017). 이러한 결과로 미루어 보아 EVS의 처리는 대식세포 및 수지상세포의 세포 표면활성 인자들의 발현을 직접적으로 증가시켜 면역세

포를 활성화시키는 것으로 사료된다.

NEVS와 EVS의 처리가 비장세포의 증식능 및 사이토카인 분비능에 미치는 영향

NEVS 및 EVS의 처리가 후천면역체계를 담당하는 대표적인 면역세포인 비장세포의 세포증식능 및 사이토카인 분비능에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위하여 마우스 비장조직으로부터 비장세포 유리시켜 NEVS와 EVS를 처리하였다.

NEVS와 EVS를 농도별(500 및 1000 µg/mL)로 처리한 결과, NEVS 처리구에서는 101.54±5.0 및 105.78±1.9 pg/mL로 유의적인 변화가 나타나지 않았지만, EVS 처리구에서는 109.12±1.4 및 119.65±3.5 pg/mL로 비장세포의 생존율이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 6). 비장은 혈액으로부터 항원을 수집하여, T 및 B세포의 성숙과 분열 및 분화가 이루어지는 주요 림프기관으로 주로 T세포, B세포 및 대식세포로 구성이 되어있다(Ahn et al., 2014). 따라서 비장세포의 증식은 면역 시스템 활성화에 매우 중요한 의미를 가져 면역활성 물질을 확인시 면역 T

세포의 활성화 정도를 알아보기 위하여 주로 비장세포를 사용한다(Shan et al., 1999). 이러한 결과로 미루어 보아 NEVS 및 EVS의 처리는 상기 제시된 농도에서 비장세포에 독성을 미치지 않는 것으로 사료되며, EVS의 처리는 대식세포 및 수지상세포와 같은 선천면역계를 담당하는 탐식세포뿐만 아니라 후천면역을 담당하는 T 및 B 세포가 다량 존재하는 비장세포에서도 유의적으로 세포 증식능을 증가시켜 면역활성을 유도하는 것으로 판단된다.

NEVS와 EVS 500 및 1000 µg/mL의 농도로 처리하여, 비장 세포의 사이토카인 분비 특성에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 Th1 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인인 IFN-γ, IL-2와 Th2 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인인 IL-4의 분비능을 측정하였다(Fig. 6). 면역 T 세포는 Th1 세포와 Th2 세포로 분화하며, Th1 세포에서 분비되는 사이토카인의 경우 세포간 신호전달을 수행하여 면역반응에 중요한 역할을 하여 면역활성능을 나타내는 지표로서 이용되고 있으며, Th2 세포에서 분비되는 사이토카인은 알레르기 및 아토피와 같은 염증성 반응을 유도한다고 보고되어 있다(Medzhitov, 2001).

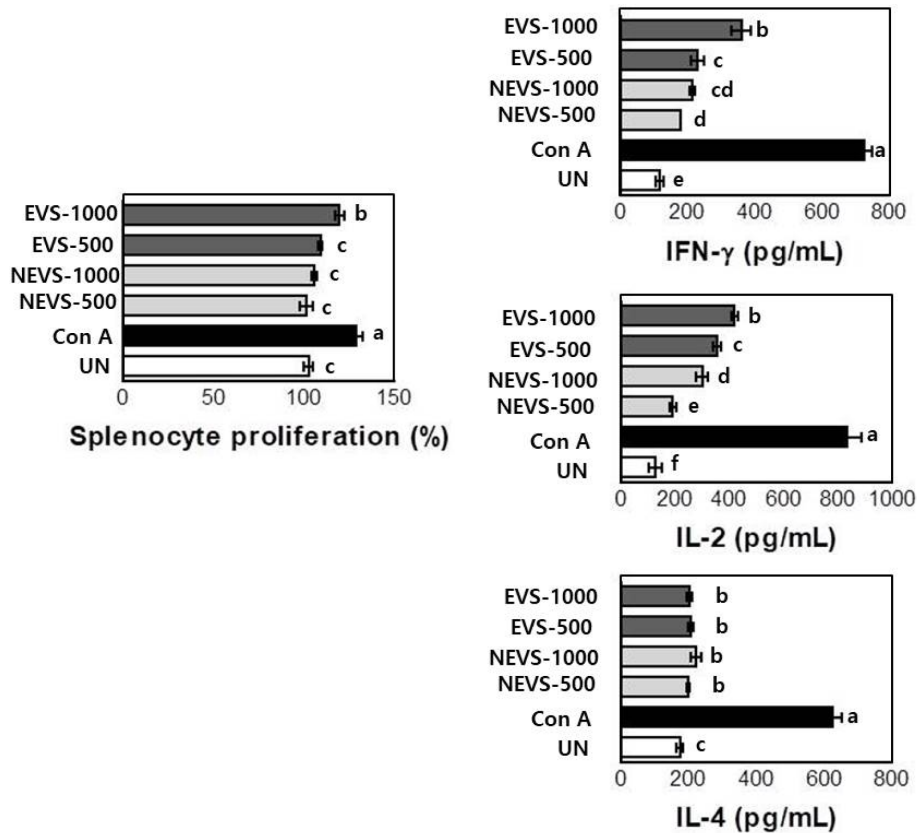


Fig. 6. Cell proliferation and cytokine production activity of treatment with non-extruded vegetable soup powder (NEVS) and extruded vegetable soup powder (EVS) in splenocyte. NEVS and EVS was treated at the concentration of 500 and 1000 µg/mL and concanavalin A (ConA) was treated at the concentration of 1 µg/mL as a positive control. After 24 h, splenocyte proliferation was evaluated by WST-1 assay. Statistical analysis was performed using the Duncan's multiple range test and ^{abcde} values with different letters were significantly different (*p*<0.05).

Th1세포가 분비하는 사이토카인인 IFN- γ 와 IL-2중 IFN- γ 는 대부분의 세포를 표적기관으로 하여 분비되며, 대식세포에 대해 강력한 활성화 기능을 가지며 항원제시세포에서 MHC class I과 II의 발현을 유도하고 T세포의 분화를 촉진시켜 호중구와 혈관내피세포의 활성화를 시킨다(Pisa et al., 1992; Sypek et al., 1993; Lee et al., 2013). IL-2는 주로 활성화된 T세포에서 분비되는 사이토카인으로 T림프구의 증강효과를 확인할 수 있는 지표로서 사용된다(Grabstein et al., 1994; Howard et al., 1994; Ryu, 2010).

NEVS를 농도(500 및 1000 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 결과, IFN- γ 의 분비량은, 179.97 \pm 1.3 및 214.20 \pm 6.7 pg/mL로 나타났으며 IL-2의 분비량은, 193.69 \pm 11.3 및 300.38 \pm 20.1 pg/mL로 NEVS 처리 농도가 증가할수록 사이토카인의 분비량이 증가하는 것으로 관찰되었지만, 대조적으로 IL-4의 분비량에 대한 변화는 관찰되지 않았다. 또한 EVS (500 및 1000 $\mu\text{g/mL}$) 처리한 결과, IFN- γ 의 분비량은, 230.65 \pm 20.4 및 359.97 \pm 29.8 pg/mL로 나타났으며 IL-2의 분비량은, 354.74 \pm 13.9 및 419.45 \pm 10.6 pg/mL로 EVS의 처리 농도가 증가할수록 사이토카인의 분비량이 증가하는 것으로 관찰되었지만, 앞선 결과와 같이 IL-4의 분비량에 대한 변화는 관찰되지 않았

다. 이러한 결과로 미루어 보아 EVS의 처리는 Th2 세포의 활성화에는 영향을 주지 않는 것으로 사료되며, 면역활성과 직접적으로 관련이 있는 Th1 세포의 활성화를 통하여 비장세포의 활성을 유도하는 것으로 판단된다.

NEVS와 EVS의 투여가 마우스의 면역활성에 미치는 영향

NEVS와 EVS의 투여가 마우스의 면역활성에 미치는 영향에 관하여 관찰하기 위하여 NEVS와 EVS를 7일동안 100 mg/kg의 농도로 경구투여 후 마우스의 비장조직을 적출하여 비장세포를 유리시켜 T세포의 분포(Fig. 7A) 및 비장세포 사이토카인 분비능(Fig. 7B)에 관하여 관찰하였다. 후천성면역은 B 세포 및 T세포에 의해 이루어지며, 면역반응의 전환은 T림프구의 활성화에 따른 매개반응으로 이루어진다(Clerici et al., 1994; Cannon, 2000). T세포는 수용체 유전자가 활성화되어 분화단계에서 CD4⁺와 CD8⁺로 분류되며, CD4⁺ T림프구는 사이토카인의 생산에 밀접한 관련이 있으며, CD8⁺ T림프구는 종양세포와 같은 표적세포를 직접적으로 파괴하는 역할을 수행한다.

NEVS와 EVS의 투여 후 CD4⁺ 및 CD8⁺ T세포 수의 변화에 관하여 관찰한 결과 두 그룹 모두에서 CD4⁺ 및

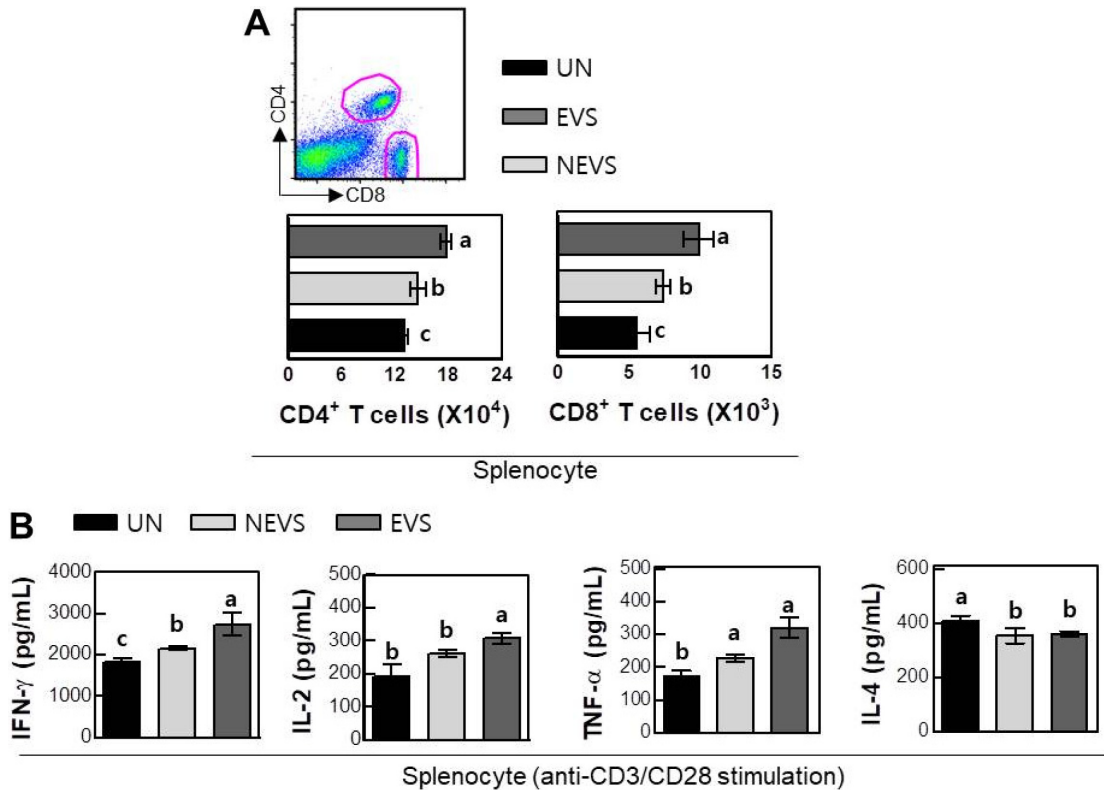


Fig. 7. T cell population and cytokine (IFN- γ , IL-2, TNF- α and IL-4) productions activity in splenocyte separated from mouse administrated with non-extruded vegetable soup powder (NEVS; 100 mg/kg body weight) and extruded vegetable soup powder (EVS; 100 mg/kg body weight). NEVS and EVS was fed with NEVS and EVS for 7 days. On days 8, mice were sacrificed and splenocyte was separated from spleen. T cell population was calculated by flow cytometer. Cytokine productions in culture supernatant were measured by using ELISA kit. The results are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using the Duncan's multiple range test and a-c values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

CD8⁺의 분포가 증가된 것을 확인 할 수 있었으며, 두 그룹간의 차이를 비교하였을 때 EVS 투여군에서 CD4⁺ 및 CD8⁺의 분포가 유의적으로 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 EVS의 투여는 후천성 면역반응의 대표적인 T세포를 활성화시켜 면역반응을 조절하는 것으로 사료된다.

T세포 활성화에 의해 생성되는 사이토카인들 중 IFN- γ 는 면역시스템을 자극하여 Th1 면역반응을 유도한다고 알려져 있으며, IL-2는 세포매개성 면역반응에 중요한 역할을 하며, TNF- α 는 면역세포들을 염증 부위로 보이게 하며 T세포의 분화와 증식에 관여한다(Knutson & Disis, 2005; Weiss et al., 2007). IL-4는 알레르기과 같은 과민성 면역반응에 관련된 Th2 세포의 활성화에 의해 생성되는 대표적인 사이토카인이다. NEVS와 EVS의 투여에 따른 후천성면역반응의 활성을 관찰하고자 비장세포를 통해 대표적인 사이토카인인 IFN- γ , IL-2, TNF- α 및 IL-4의 분비량을 측정하였다(Fig. 7B). 그 결과 NEVS 투여군에서 사이토카인의 분비량은 IFN- γ ; 2275.6 \pm 147.86 pg/mL, IL-2; 261.03 \pm 11.04 pg/mL, TNF- α ; 259.85 \pm 38.73 pg/mL으로 대조구와 비교하였을때 유의적으로 증가하였다. EVS 투여군의 사이토카인 분비량은 IFN- γ ; 2738.80 \pm 256.05 pg/mL, IL-2; 307.63 \pm 14.79 pg/mL, TNF- α ; 307.60 \pm 36.03 pg/mL으로 NEVS 투여군과 비교하였을 때 유의적으로 사이토카인의 함량이 증가된 것으로 관찰되었다. 또한 NEVS 및 EVS 투여군에서의 IL-4의 분비량은 358.80 \pm 24.73 및 360.25 \pm 8.75 pg/mL로 대조구와 비교하였을 때 두 그룹 모두 유의적인 감소가 나타났으나, 두 그룹간의 차이는 나타나지 않았다. 따라서 NEVS 및 EVS 투여는 Th2 세포의 활성화에는 별다른 영향을 주지 않고, Th1 세포의 활성화에 직접적으로 영향을 주어 면역활성에 기여한다고 판단된다.

요 약

본 연구는 기존의 야채스프(NEVS)와 압출성형 무청을 첨가하여 제조한 야채스프(EVS)의 면역활성 차이에 관하여 알아보기 위하여, 마우스의 골수에서 분리한 미분화 골수세포를 대식세포 및 수지상세포로 각각 분화 시킨 후 EVS와 NEVS를 500 및 1000 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때, 대식세포 및 수지상세포의 세포 증식능 및 사이토카인(TNF- α , IL-6 및 IL-1 β)의 분비능이 EVS처리구에서 더욱더 증가되는 것으로 관찰되었다. 또한 활성화된 탐식 세포의 세포 표면에서 발현되는 CD80과 CD86의 발현과 탐식세포의 항원제시에 밀접한 관련이 있는 주 조직적합성 복합체(MHC class I 및 II)의 발현이 EVS 처리구에서 유의적으로 증가되는 것으로 관찰되었다. 또한 후천면역에서 중요한 역할을 수행 하는 면역 T 세포가 다량으로 분포하는 비장 조직으로부터 유리한 비장세포에 NEVS와 EVS를 처리하여 세포 증식능 및 Th1 세포가 분비하는 사이토카인(IFN- γ 및 IL-2)

의 함량을 비교하였을 때 EVS 처리구에서 사이토카인의 함량이 더욱더 증가되는 것을 확인하였다. 또한 NEVS와 EVS를 투여된 마우스의 비장세포로부터 사이토카인(IFN- γ , IL-2 및 TNF- α) 분비능을 측정한 결과 EVS 처리구에서 사이토카인의 분비가 NEVS와 비교하여 유의적으로 증가되는 것으로 나타났다. 따라서 압출성형 처리된 무청을 첨가하여 제조한 야채스프의 경우 기존의 야채스프에 비교하여 면역활성이 월등히 증가하는 것으로 판단된다.

References

- Ahn DH, Kang BK, Kim WR. 2014. Immuno-stimulating activities of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* cooking juice concentrates on mouse macrophages and spleen cells. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* 47: 776-784.
- Bendich A. 1994. Recent advances in clinical research involving carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 66: 1017-1025.
- Byrd JC, Park JH, Schaffer BS, Garmroudi F, MacDonald RG. 2000. Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 25: 18647-18656.
- Byun EH. 2015. Comparison study of immunomodulatory activity of polysaccharide and ethanol extracted from *Sargassum fulvellum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 1621-1628.
- Byun EH. 2017. Immunomodulatory activities of crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. *Korean J. Food Sci. Technol.* 49: 559-566.
- Byun MW, Byun EH. 2015. Immunological synergistic effects of combined treatment with herbal preparation (HemoHIM) and red ginseng extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 182-190.
- Cannon JG. 2000. Inflammatory cytokine in nonpathological states. *News Physiol. Sci.* 15: 298-303.
- Cho EJ, Lee JH, Sung NY, Byun EH. 2017. Anti-inflammatory effects of *Ammona muricata* leaf ethanol extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 46: 6841-687.
- Cho JY, Kim BH, Cho DH. 2007. Modulatory effect of kaempferitrin, a 3,7-diglycosylflavone, on the LPS-mediated up-regulation of surface co-stimulatory molecules and CD29-Mediated cell-cell adhesion in monocytic- and macrophage-like cells. *Yakhak Hoeji.* 51: 482-489.
- Clerici M. and Shearer G. M. 1994. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol. Today.* 15: 575-581.
- Enman J, Rova U, Berglund KA. 2007. Quantification of the bioactive compound eritadenine in selected strains of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J. Agric. Food Chem.* 55: 1177-1180.
- Ghayur MN, Gilani AH. 2005. Gastrointestinal stimulatory and uterotonic activities of dietary radish leaves extract are mediated through multiple pathways. *Phytother. Res.* 19: 750-755.
- Gilani AH, Ghayur MN. 2004. Pharmacological basis for the gut stimulatory activity of *Raphanus sativus* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 95: 169-172.
- Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M, Johnson L, Alderson MA, Watson JD, Anderson DM, Giri JG. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science.* 26: 965-968.

- Hatvani N. 2001. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentimus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 17: 71-74.
- Heinonen MI. 1990. Carotenoids and provitamin A activity of carrot (*Daucus carota* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 38: 609-612.
- Howard B, Burrascano M, McCallister M, Chong K, Gangavalli R, Severinsson L, Jolly DJ, Darrow T, Vervaert C, AbdelWahab Z, Siegler HF, Barber JR. 1994. Retrovirusmediated gene transfer of the human γ -IFN gene: a therapy for cancer. *Ann. NY. Acad. Sci.* 716: 167-187.
- Hwang JK, Kim CT, Hong SI, Kim CJ. 1994. Solubilization of plant cell walls by extrusion. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 23: 358-370.
- Hwang JK, Kim CT, Hong SI, Kim CJ. 1994. Solubilization of plant cell walls by extrusion. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 23: 358-370.
- Kim BW, Jin SJ, Oh YN, Park HJ, Kwon HJ. 2016. Anti-oxidative and Anti-cancer Activities of Methanol Extract of *Machaerium cuspidatum*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 44: 432-441.
- Kim H, You J, Jo Y, Lee Y, Park I, Park J, Jung MA, Kim YS, Kim S. 2013. Inhibitory effects of *Lentimus edodes* and rice with *Lentimus edodes* mycelium on diabetes and obesity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 175-181.
- Kim YE, Lee JH, Sung NY, Ahn DH, Byun EH. 2017. A comparative study of the immuno-modulatory activities of ethanol extracts and crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L. *Korean J. Food Sci. Technol.* 49: 453-458.
- Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. 2002. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 44: 143-161.
- Knutson KL, Disis ML. 2005. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 54: 721-728.
- Ku KH, Lee KA, Kim YL, Lee YW. 2006. Quality characteristics of hot-air dried radish (*Raphanus sativus* L.) leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 780-785.
- Lee GD, Chang HG, Kim HK. 1997. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushroom. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 432-436.
- Lee JK, Lee MK, Yun YP, Kim Y, Kim JS, Kim YS, Kim K, Han SS, Lee CK. 2001. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.* 1: 1275-1284.
- Lee JW, Jang MH, Choi JS and Ahn TW. 2013. The effect of Yongyukjowitang distillate on the immune activity of spleen cells of aged rats. *J. Sasang Constitut. Med.* 25: 218-232.
- Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135-145.
- Mo ZQ, Wang JL, Yang M, Ni LY, Wang HQ, Lao GF, Li YW, Li AX, Luo XC, Dan XM. 2017. Characterization and expression analysis of grouper (*Epinephelus coioides*) co-stimulatory molecules CD83 and CD80/86 postCryptocaryon irritans infection. *Fish. Shellfish. Immun.* 67: 467-474.
- Piani A, Hossle JP, Birchler T, Siegrist CA, Heumann D, Davies G, Loeliger S, Seger R, Lauener RP. 2000. Expression of MHC class II molecules contributes to lipopolysaccharide responsiveness. *Eur. J. Immunol.* 30: 3140-3146.
- Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising C, Buchi A, Gerdin B, Kiessling R. 1992. Selective expression of interleukin 10, interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7708-7712.
- Ryu HS. 2010. Effects of water extract *Acorn* on mouse immune cell activation ex vivo. *Korean J. Food. Nutr.* 23: 135-140.
- Schepetkin IA, Quinn MT. 2006. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.* 6: 317-333.
- Shan BE, Yoshida Y, Kuroda E, Yamashita U. 1999. Immunomodulating activity of seaweed extract on human lymphocytes in vitro. *Int. J. Immunopharmacol.* 21: 59-70.
- Shimotoyodome A, Meguro S, Hase T, Tokimitsu I, Sakata T. 2001. Sulfated polysaccharides, but not cellulose, increase colonic mucus in rats with loperamide-induced constipation. *Digest. Dis. Sci.* 46: 1482-1489.
- Shin HH, Lee SH, Park BS, Rhim TS, Hwang JK. 2003. Solubilization of whole grains by extrusion and enzyme treatment. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 849-855.
- Simon PW. 1990. Carrots and other horticultural crops as a source of provitamin A carotenes. *Hortscience.* 25: 1495-1499.
- Sung NY, Park WY, Kim YE, Cho EJ, Song HY, Jun HK, Park JN, Kim MH, Ryu GH, Byun EH. 2016. Increase in antioxidant components and reduction of off-flavors on radish leaf extracts by extrusion process. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 45: 1769-1775.
- Sung NY, Park YY, Kim YE, Cho EJ, Kim MH, Ryu GH, Byun EH, Park YJ. 2016. Immuno modulatory activities of polysaccharides separated from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* in macrophage cells. *Korean J. Food. Nutr.* 29: 431-437.
- Sypek JP, Chung CL, Mayer SH, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.* 177: 1797-1802.
- Takeda H, Kiriyama S. 1991a. Difference between rats and chicks in the protective effect of dietary fiber against amaranth toxicity. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1299-1305.
- Takeda H, Kiriyama S. 1991b. Effect of feeding amaranth (food red no. 2) on the jejunal sucrase and digestionabsorption capacity of the jejunum in rats. *J. Nutr. Sci Vitaminol.* 37: 611-623.
- Vermes I, Haanen C., Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods.* 184: 39-51.
- Weisburger JH. 1991. Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidants, and carotenoids. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 2265-2375.
- Weiss JM, Subleski J, Wigginton JM, Wilttrout RH. 2007. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert Opin. Biol. Ther.* 7: 1705-1721.
- Yim HB, Lee GS, Chae HJ. 2004. Cytotoxicity of ethanol extract of *Raphanuse sativus* on a human lung cancer cell line. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 287-290.