

유색미 미강발효물의 면역활성 효과

김동주 · 류수노* · 한상준* · 김화영 · 김중학 · †홍성길

(주)이롬 생명과학연구원, *한국방송통신대학 농학과

In Vivo Immunological Activity in Fermentation with Black Rice Bran

Dong Ju Kim, Su Noh Ryu*, Sang Jun Han*, Hwa-Young Kim, Jung-Hak Kim and †Seong-Gil Hong

Erom Co., Ltd R&D Center, Chuncheon 200-944, Korea

*Dept. of Agricultural Science, Korean National Open University, Seoul 110-791, Korea

Abstract

Rice bran is byproducts of the hulling of rice, an important food resource in Korea. Various studies have been reported immune-enhancing effects of rice bran cultured with *Lentinus edodes*. In particular black rice bran contains anthocyanin, and the effects of antioxidant have been reported. The objective of the this study was to investigate the possible immune-enhancing effects of black rice bran substance extracted from a submerged culture of *Lentinus edodes* with black rice bran (crude fermentation-polysaccharide, CFP) and products(crude fermentation-polysaccharide-*S. cerevisiae* CFP-S, crude fermentation-polysaccharide-*L. gasseri*, CFP-L) which are of secondary fermentation of by using *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus gasseri* in the Blab/c male mice. We found that supplementation of CFP, CFP-S and CFP-L enhanced macrophage and splenocyte proliferation compared to the control group(NC) in mice. Also, we measured the concentration of cytokines(IFN- γ , TNF- α , IL-6) secreted by activated macrophage and splenocyte. The results of the experiment are that supplementation of CFP and CFP-S increased the macrophage and splenocyte proliferation compared to the control group but supplementation of CFP-L decreased the splenocyte proliferation compared to the control group(without mitogen and treated with LPS). When macrophage and splenocyte were stimulated by CFP and CFP-S supplementation, it was increased IFN- γ , TNF- α and IL-6 concentration compared with the control group. These results suggest that the capacity of CFP and CFP-S seem to act as a potent immune modulator causing augmentation of immune cell activity, and enhance the immune function through regulating cytokine production capacity by activated macrophage and splenocyte in mice.

Key words: *Lentinus edodes*, black rice bran, immune function, cytokine

서론

쌀은 주로 아시아 국가의 주요 식량원이며, 영양적으로 에너지 공급원으로서 인식되어 왔다. 그러나 최근 쌀의 생리적 효능이 규명되면서, 기능성 쌀 개발에 대한 연구가 활발해지고 있다. 특히 만성질환자가 많은 서구에서는 쌀에 대한 관심이 높아지고 있으며, 미국 암 연구소(NCI)의 Designer Food Program에서는 암 예방 식품 소재 40가지 안에 현미가 선정

되기도 하였다(U.S. National Cancer Institute 1991). 그리고 최근에는 기능성 소재에 대한 관심이 급증하면서 기능성이 부여된 특수미에 대한 관심이 높아지고 있다. 특수미 중 유색미는 품종이 개량된 고기능성 쌀로서 독특한 향미와 각종 무기질, 비타민 불포화지방산 및 단백질 등이 함유되어 있어 항암, 항산화 작용과 면역기능을 강화시켜 노화 방지, 특정 질병 예방 등 건강기능성 소재로서의 이용치가 높다(Seo 등 2008). 유색미의 색소는 적갈색에서 흑자색이 이르는 다양한 안토

† Corresponding author: Seong-Gil Hong, Erom Co., Ltd R&D Center, Chuncheon 200-944, Korea. Tel: +82-33-248-8300, Fax: +82-33-248-8350, E-mail: antioxidant@erom.co.kr

시아닌 색소이다. 특히 쌀에 존재하는 안토시아닌은 cyanindin-3-glucoside 및 peonidin-3-glucoside 등이 많이 보고되고 있다 (Cho 등 1996). 유색미의 색소 분획은 높은 항산화 활성과 항암 활성, 그리고 염증 발생에 대한 억제 활성 등이 보고되고 있다 (Stoclet 등 2004; Manach 등 2005; Ling 등 2001; Xia 등 2003; McGhie 등 2003; Williams 등 2002).

유색미의 색소는 대부분 과피인 미강에 존재한다. 그리고 유색미의 미강에는 안토시아닌뿐만 아니라 오리지놀(oryzanol), 피틴산(phytic acid), 페루릭산(ferulic acid), 헤미셀룰로오스(hemicelluloses), 토크페롤(tocopherol), 옥타코사놀(Octacosanol) 등이 함유되어 있다. 이 중 식물체의 세포벽을 구성하는 헤미셀룰로오스는 오탄당과 육탄당, 우론산(uronic acid) 등을 함유하고 있고, 비 셀룰로오스계 고분자 다당류로서 미강에 약 20~21% 함유되어 있다. 1998년 미국의 UCLA대학의 Mamdoh Ghoneum 박사는 미강에 다량 함유된 식이섬유소인 헤미셀룰로오스를 표고버섯 균사체의 특수효소로 분해하여 만든 아라비노실란(arabinoxylan)이라는 생리활성물질을 발견하였다. 아라비노실란은 면역세포 중 암세포와 최전선에서 싸우는 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)를 활성화시켜 암세포를 파괴하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Ghoneum 등 1999; William DG 1998; Ghoneum M 1998). 현재 일본의 대화제약에서는 바이오브랜(Biobran)이라는 제품명으로 기능성 다당체를 주 원료로 하여 일본 국내뿐 아니라 미국과 유럽, 국내 시장에까지 판매하고 있다.

현재 우리나라에서는 연간 미강이 40~60톤 가량 버 도정 부산물로 발생하고 있다. 그러나 그 중 20% 정도만 이용되고 있을 뿐 대부분이 폐기물로 버려지고 있는 실정이다. 특히 유색미는 연간 약 18,000톤 정도가 사용되고 있으며, 가공 시 발생하는 부산물인 미강은 사료용으로만 사용되고 있다. 따라서 저가의 미강을 이용한 기능성 식품 소재의 개발은 부가가치가 높은 생산품으로 농가 소득의 증대를 불러올 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 차후 면역 관련 기능성 소재로 새로운 건강기능식품 개발을 이끌 수도 있다. 여러 연구 결과, 유색미 미강에 색소로 존재하는 안토시아닌은 항산화 활성이 있음이 보고되어 왔고, 미강의 표고버섯 균사체 발효로 생성된 다당체 성분은 면역 증진 작용 및 항암 작용을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 유색미의 미강을 표고버섯 균사체로 발효한 1차 발효물과 2차 발효물을 통해 생성된 다당체 성분을 효모와 유산균으로 2차 발효시킨 2차 발효물을 이용해 *in vivo*상에서 면역활성을 평가하였다. 이로써 유색미 미강의 1차 발효물과 2차 발효물이 보유한 생리활성을 규명하고 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료의 제조

본 연구에 사용한 시료는 (주) STR 바이오텍(한국)에서 공급 받았다. 탈지공정으로 탈지한 미강을 발효 배지에 2%가 되도록 첨가하고, PDA 배지에서 배양한 표고버섯 균사체인 *Lentinus edodes*를 접종하여 28°C에서 5일간 배양한 후 회수하여 열수 추출, 농축 및 멸균 공정을 거치고 동결건조하였다. 2차 발효 공정은 *Lentinus edodes* 발효를 통해 얻은 발효물을 회수하여 별도로 종균 배양된 *Lactobacillus gasseri* 유산균종 및 *Saccharomyces cerevisiae* 효모 균주를 각기 접종하여 30°C에서 2일간 추가 배양 후 회수, 멸균, 동결건조 공정을 통해 제조했다.

2) 시약 및 배지

본 연구에 사용된 배지는 RPMI 1640의 GIBCO BRL(Grand Island, N.Y, USA) 제품을 사용하였고, fetal bovine serum(FBS)는 GenDEPOT Inc.(Baker, TX, USA)에서 구입하였다. Lipopolysaccharide(LPS), concanavalin A(ConA), thioglycollate, sodium bicarbonate, ρ -nitrophenyl phosphate, triton X-100, citrate, sodium citrate, ammonium chloride, potassium bicarbonate, ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt 등의 시약은 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. TNF- α , IFN- γ , IL-6 kit는 Research & Diagnostics Systems, Inc(Minneapolis, MN USA) kit를 구입하여 측정하였다. Aqueous One solution Cell Proliferation Assay(MTS)는 Promega Co.(Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험동물 및 처리

5주령 Balb/c mouse를 (주)오리엔트바이오(한국)에서 분양 받아 사용하였으며, 사육환경은 온도 22±2°C, 습도 50±20%, 12시간 조명하에 사육하였다. 사료는 마우스용 고형사료를, 음수는 상수도수를 제한 없이 섭취시켰다. 동물은 1주일 동안 실험 동물실에서 적응시킨 후 실험하였다. 시료는 (주)STR 바이오텍에서 공급받았으며, 멸균증류수에 용해시킨 후 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 마우스는 임의 배치법에 의해 대조군과 투여군으로 나누었으며, 실험군마다 10마리씩 사용하였다. 대조군에는 멸균증류수를 투여군에는 250 mg/kg BW/day씩 4주간 경구 투여하였다(Fig. 1).

3. 대식세포의 활성측정

대식세포 활성화 능력을 측정하기 위하여 총 4주간 시료를 섭취시킨 실험동물에게 3% thioglycollate 1 ml를 투여하고 72시간 이후 희생시켰다. 이후 RPMI 1640 배지 3 ml를 복강에 주입하여 세척한 후 다시 회수한 뒤 원심분리하여 대식세

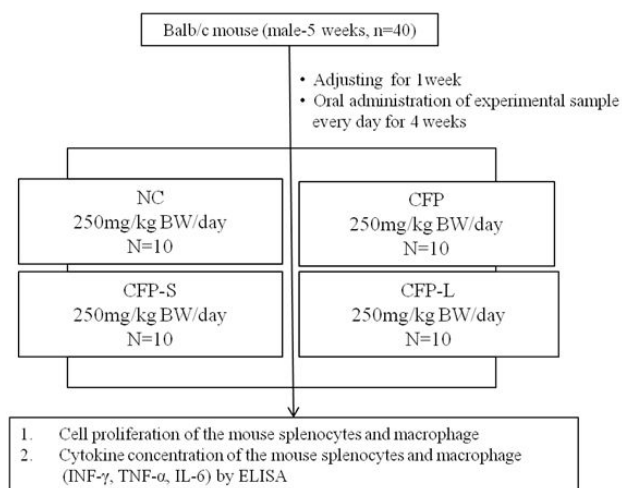


Fig. 1. Study design of experiment. NC: Negative control, CFP: Crude fermentation-polysaccharide, CFP-S: Crude fermentation-polysaccharide-*Saccharomyces cerevisiae*, CFP-L: Crude fermentation-polysaccharide-*Lactobillus gasseri*.

포를 분리하였다. 분리된 대식세포를 1×10^5 cell/well이 되도록 희석한 뒤 일정량을 96 well microplate에 분주하였다. 이후 37°C 에서 2시간 동안 배양한 이후 상층액을 제거하고 새로운 RPMI 1640(FBS 10%) 배지를 첨가하여 24시간 추가 배양하였다. 이 때 미토젠인 LPS($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가한 것과 첨가하지 않은 것으로 나누어 배양하였다. 대식세포의 증식능은 대식세포가 활성화되었을 때 분비되는 lysosomal enzyme의 활성을 측정하여 반영하였다. 실험방법은 추가 배양된 대식세포의 배양액을 제거하고 0.1% Triton X-100을 첨가한 이후 10 mM의 p -nitrophenyl phosphate와 0.1 M citrate buffer(pH 6.0)를 첨가하여 37°C , 5% CO_2 조건에서 1시간 동안 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(Song 등 2003; Jeong 2006).

4. 비장세포의 활성화 측정

비장세포의 활성화 능력을 측정하기 위하여 실험동물 비장을 적출하여 비장세포를 분리하였다. 총 4주간 시료를 섭취시킨 실험동물을 경추탈골한 후 복강내 대식세포를 회수하고 곧바로 복강을 개복하여 비장을 적출하였다. 적출해낸 비장은 mesh를 통하여 분쇄하고 원심분리하여 상층액을 제거하여 비장세포를 회수하였다. 이후 RBC lysis buffer로 잔여 적혈구를 제거한 뒤 RPMI 1640 배지를 이용하여 2회 세척하였다. 회수된 비장세포를 5×10^5 cell/well 농도로 조절한 후 96 well microplate에 분주하고 72시간 동안 추가 배양하였다. 이 때, T 세포의 활성화 유도물질인 LPS와 B 세포 활성화 유도물질인 ConA를 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 것과 첨가하지 않은 것으로 나누어 배양하였다(Song 등 2003). 배양 이후 비장세포의 활

성은 세포 생육도를 통하여 분석하였다. 측정은 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(MTS), kit(Promega, USA)로 측정하였다(Desai 등 2008).

5. 사이토카인(IFN- γ , TNF- α , IL-6) 분비능 측정

각 시료를 경구 투여한 마우스의 복강 내 대식세포와 비장에서 분리한 비장세포를 배양시킨 다음 배양 상층액으로부터 분비되는 사이토카인(IFN- γ , TNF- α , IL-6) 분비량을 측정하였다. 비부착성 세포를 제거하고 부착성 세포만을 얻은 후 대식세포는 대식세포를 활성화시키는 미토젠인 LPS를 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 것과 처리하지 않은 것으로 나누어 배양하였다. 반면, 비장세포는 LPS와 ConA를 처리한 것과 처리하지 않은 것을 나누어 배양하였다. 배양은 37°C , 5% CO_2 의 환경에서 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양 상층액을 분리하여 배양액에 측정된 IFN- γ , TNF- α , IL-6 사이토카인의 농도를 ELISA 사이토카인 kit(R&D system, USA)를 이용하여 측정하였다.

6. 통계분석

모든 실험 결과의 자료는 SPSS 통계프로그램을 이용하여 평균 및 표준편차를 구하였다. 그룹간의 유의적인 통계차를 분석하기 위하여 $p < 0.05$ 의 유의수준으로 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)을 이용하여 사후검증을 하였다.

결과 및 고찰

1. 유색미 미강발효물의 경구 투여가 마우스의 대식세포와 비장세포 증식에 미치는 영향

유색미 미강발효물을 $250 \text{ mg}/\text{kg BW}/\text{day}$ 의 농도로 경구 투여한 마우스로부터 대식세포와 비장세포를 분리한 후 각 세포의 증식능을 측정하였다.

1) 대식세포 증식능 측정

유색미 미강발효물의 경구 투여에 의한 대식세포의 활성화를 평가한 결과는 Fig. 2와 같이 나타났다. 대식세포의 활성 측정은 대식세포의 활성을 유도하는 미토젠(mitogen)인 LPS를 첨가하여 증식시킨 것과 첨가하지 않고 증식시킨 것으로 나누어 측정하였다. 실험에서 대식세포 활성을 보기 위해 측정된 lysosomal acid phosphatase(lysosomal enzyme) 활성은 외부 자극에 의해 대식세포에서 생산되는 효소로 lysosomal acid phosphatase는 대식세포가 침입한 미생물에 대해 공격할 수 있는 1차 반응물질이다. 본 실험에서는 lysosomal acid phosphatase의 농도를 측정함으로써 대식세포의 활성을 반영하였다

(Page 등 1978). LPS를 첨가하지 않고 증식시킨 대식세포에서 대조군과 비교 시 CFP군 104.60±10.97%, CPF-S군 115.21±18.94%, CFP-L군 97.99±16.79%의 상대활성도를 나타내었다. LPS를 첨가하여 배양한 대식세포에서는 CPF군은 113.21±13.10%, CFP-S군 138.78±24.41%, CFP-L군 93.60±15.34%로 대조군과 비교하여 상대활성을 나타내었다(Fig. 2). 실험 결과, LPS로 자극하지 않고 배양한 대식세포에서는 CFP-S군이, LPS로 자극하여 배양한 대식세포에서는 CFP군과 CFP-S군이 대조군에 비해 유의적으로 대식세포 활성이 높았다(Fig. 2).

대식세포는 단핵 포식세포들로 항원제시세포이며, 체액성 면역와 세포 매개성 면역의 효과세포로 숙주반응의 초기 비 적응면역기인 내재면역에 중요한 인자이다(Sunderkotter 등 1994). 대식세포는 미생물 및 암세포를 죽이거나 감염으로부터 손상된 조직에 산화적 기작으로 작용하는데, NADPH oxidase와 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 superoxide anion (O_2^-)와 nitric oxide(NO)를 합성한다(Morel 등 1991). 대식세포는 또한 다양한 면역반응 관련 사이토카인의 생성에 영향을 미친다. Interleukin(IL), interferon(IFN), tumor necrosis factor (TNF)와 같은 사이토카인 생성에 영향을 주며, 프로스타글란딘(prostaglandin)과 같은 물질의 활성화에 영향을 준다(Ramesh 등 2002). 여러 연구 결과에서도 대식세포의 활성화와 면역의 상관관계에 대해서 밝히고 있다. 최근 Kim 등(2005)의 연구에서는 미강을 표고버섯균사체(*Lentinus edodes*)로 발효해서 획득한 미강발효물을 대식세포에 처리했을 때 대식세포의 활성이 증가됨을 확인하였다. 또한 미강발효물을 마우스에게

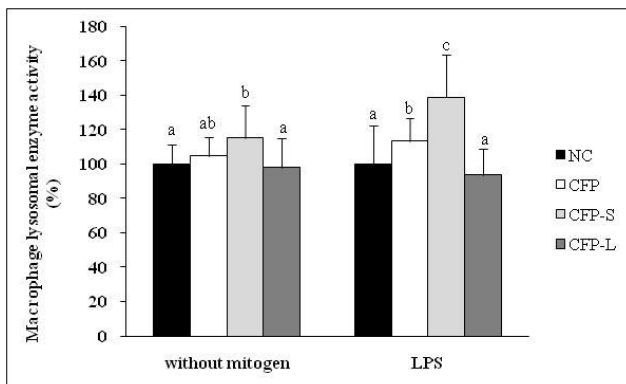


Fig. 2. Effects of CFP, CFP-S and CFP-L on the activity macrophage. Macrophage stimulating activity is expressed as the stimulation of cellular lysosomal enzymes compare with NC values represent mean±S.E., n=10, ^{a-c} Means are significantly different between group at $p < 0.05$. LPS: Lipopolysaccharide.

NC: Negative control, CFP: Crude fermentation-polysaccharide, CFP-S: Crude fermentation-polysaccharide-*Saccharomyces cerevisiae*, CFP-L: Crude fermentation-polysaccharide-*Lactobillus gasserii*.

경구 투여시켰을 때 미강발효물의 농도의존적으로 대식세포의 활성이 증가됨을 확인하였다(Kim 등 2005). Ghoneum 등의 연구 결과에서도 미강을 발효해서 제조한 효소분해미강 분말(MGN-3/arabinoxylan)을 인간 유래 다형백혈구(PMN)에 처리 시 *E. coil*에 대한 식균작용이 증가함을 확인할 수 있었다(Ghoneum 등 2005).

본 연구 결과에서는 유색미 미강을 발효한 시료 CFP와 효모로 2차 발효한 CFP-S가 대식세포 증식을 증가시켰다. 특히, LPS를 첨가했을 때 대식세포의 활성이 더 높게 나타났다. 이는 LPS가 대식세포의 B 세포를 자극시키는 미토젠으로 작용하여 대식세포의 활성을 자극했기 때문으로, 대식세포는 외부 자극이나 특정 물질에 의해 자극 받아 활성화되어 활동을 하게 된다. 또한 본 연구에서는 2차 발효물 중 효모로 발효한 CFP-S의 대식세포 활성이 가장 높게 나타났다. 효모는 인체에 무해한 GRAS 미생물로 오래 전부터 식품분야에 사용되어 왔다. 효모의 세포벽 주성분은 베타-글루칸(β -glucan)이다(Klis 등 1973). 베타-글루칸은 동물의 면역기능을 강화시키는 물질로 보고되고 있으며, 내성이 없는 천연 면역조절제로서 주목을 받으면서 많은 연구 결과들이 베타-글루칸의 탁월성을 밝히고 있다(Cleary 등 1999; DiLuzio 등 1983; Reynolds 등 1980). 또한 Kim 등(2008)의 연구 결과에 의하면 베타-글루칸을 대식세포주에 처리하였을 때, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α 의 유전자발현이 자극되었다. 따라서 본 연구에서 CFP-S군의 대식세포 활성이 가장 높게 나타난 것은 미강발효물의 기능성 다당체 성분과 효모의 베타 글루칸이 함께 작용하여 면역기능에 시너지 효과를 가져온 것으로 판단된다. 더 나아가 2차 발효로 생성된 물질이 면역에 관여할 가능성도 높다. 효모 발효물에 대한 연구 결과 중 다시마의 기능성 다당체를 효모로 발효한 물질이 항염 활성을 나타낸 것으로 보고되었다(Eom 등 2010). 따라서 차후 CFP-S의 성분을 분석하고, 면역에 영향을 주는 기능성 성분에 대한 연구가 수행되어야 한다고 생각된다.

2) 비장세포 증식능 측정

유색미 미강 발효물의 경구 투여가 마우스의 비장세포 증식능에 미치는 영향을 확인하기 위한 지표로 세포의 MTS 분석을 이용하였다. 유색미 미강발효물의 비장세포 증식능 측정 결과는 Fig. 3과 같다. 비장세포의 측정은 세포성 면역과 관련된 T세포의 활성을 유도하는 물질인 LPS를 첨가한 것과 체액성 면역과 관련 있는 B세포의 활성을 유도하는 물질인 ConA를 첨가한 것, 그리고 미토젠을 첨가하지 않은 것으로 나누어 측정하였다. 실험 결과, 미토젠을 첨가하지 않은 비장세포는 CFP군이 124.69±20.65%, CFP-S군이 126.38±33.66% 그리고 CFP-L군은 118.88±28.86%로 대조군에 비해 높은 상대

활성을 나타내었고, 모두 유의적인 차이를 나타내었다. ConA를 첨가하여 배양한 비장세포에서는 대조군에 비해 CFP군이 $128.33 \pm 21.29\%$ 로 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. LPS를 첨가한 군에서도 역시 CFP군이 $119.48 \pm 22.18\%$ 의 상대활성을 나타내었고, 대조군에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3).

체내에서 비장(spleen)은 혈액에서 유래되는 항원에 대한 주된 보호 면역 반응을 담당하는 장기로 B 및 T 림프구의 성숙과 항원의 자극에 의한 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프 기관이다. 따라서 비장 내 림프구의 증식은 면역 시스템에서 매우 중요한 의미를 갖는다(Cyster 등 1999). 특히 비장세포는 면역 반응과 밀접한 관련을 나타내며, 그 크기나 수가 직접적인 지표로 이용될 수 있어 대표적인 면역지표로 사용된다(Zalys 등 200; James 1995). Chea 등(2004)의 연구 결과에 의하면 미강에서 추출한 아라비녹실란을 비장세포에 처리시 농도의존적으로 비장세포 증식능이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 Kim 등(2005)의 연구에서도 미강을 표고버섯 균사체로 발효시킨 미강발효물이 비장세포 증식능이 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서도 각 시료들의 경구 투여가 비장세포를 증식을 활성화시키는 결과를 나타내었다. 특히 대조군과 상대 비교 시 미토젠을 첨가한 조건보다 첨가하지 않고 배양한 조건에서 유의적인 차이를 나타내었다. 미토젠과 관련하여 Cho 등(1998)은 다시마 분말 투여에 의한 당뇨쥐의 비장 세포 기능에 관한 연구에서 4주간의 투여에

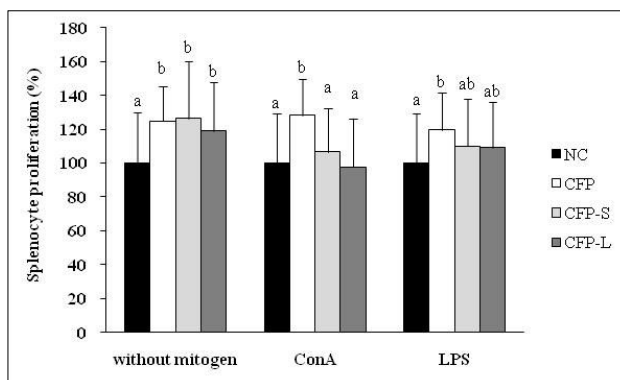


Fig. 3. Effects of CFP, CFP-S and CFP-L on the proliferation of spleen cells. The proliferation of splenocytes is expressed as the stimulation of cell growth of spleen cells to that of NC. Values represent mean \pm S.E., n=10, ^{a,b} Means are significantly different between group at $p < 0.05$. ConA: Concanavalin A, LPS: Lipopolysaccharide.

NC: Negative control, CFP: Crude fermentation-polysaccharide, CFP-S: Crude fermentation-polysaccharide-*Saccharomyces cerevisiae*, CFP-L: Crude fermentation-polysaccharide-*Lactobillus gasseri*.

의해 비당뇨군의 비장 세포 증식능이 촉진되었고, 특히 LPS와 Con A 첨가에 의해 비장 세포 증식능이 3배까지 상승하였음을 보고하였으며, Kwon 등(2001)은 동충하초를 4주간 투여한 마우스의 비장세포를 미토젠과 같이 배양 시 비장세포 증식능이 상승하였음을 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 LPS와 ConA를 처리한 비장세포의 증식능이 대조군과 비교 시 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이와 같은 결과는 대조군의 비장세포가 첨가된 미토젠에 의해 자극을 받아 증식이 활성화된 되어 실험군과 상대적 비교 시 평가에 제한점이 있는 것으로 판단된다. Park 등의 연구 결과에 의하면 LPS와 PHA(phytohemagglutinin)의 단독처리만으로도 마우스의 비장세포가 증식되었음을 나타내었다(Hyeon 등 1998). 비록, 본 연구에서는 미토젠 처리시 군간의 유의성은 없었지만 미토젠을 처리하지 않은 조건의 실험 결과에서 모든 실험군이 대조군과 비교 시 유의성을 나타내었다. 따라서 CFP, CFP-S, CFP-L을 섭취한 모든 군은 비장세포의 증식을 활성화시키는 것으로 판단된다.

2. 유색미 미강발효물의 경구 투여가 사이토카인 분비에 미치는 영향

1) 대식세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향

유색미 미강발효물의 경구 투여가 대식세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향은 Table 1과 같이 나타났다. IFN- γ 의 농도는 LPS로 처리하지 않은 경우 CFP-S군이 8.99 ± 2.51 pg/ml로 대조군에 비해 31% 높은 분비량을 나타내었고, 군간의 유의적인 차이도 나타났다. LPS를 처리한 경우, 군간의 유의적인 차이는 없었으나 CFP, CFP-S, CFP-L의 모든 군에서 대조군에 비해 각각 27%, 17%, 16%씩 증가하였다. TNF- α 농도는 LPS로 처리한 것은 CFP-S군이 495.13 ± 69.91 pg/ml로 대조군과 유의적인 차이를 나타내었고, 나머지 두 군(CFP, CFP-L)은 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. LPS 처리한 경우에는 CFP-L군이 907.28 ± 52.35 pg/ml로 대조군과 유의적인 차이를 나타내었다. 대조군과는 유의적인 차이는 없었으나, CFP-S를 경구 투여한 군에서 874.25 ± 100.46 pg/ml의 농도를 나타내어 대조군과 비교 시 6% 높은 TNF- α 분비량을 나타내었다. IL-6는 LPS를 처리하지 않은 경우 군간의 차이가 나타나지 않았다. 그러나 CFP-S군은 $1,357.04 \pm 428.79$ pg/ml로 대조군에 비해 20% 높은 분비량을 나타냈다. LPS를 처리한 경우 CFP-S군이 $4,767.62 \pm 584.18$ pg/ml로 대조군에 비해 28% 높은 분비량을 나타내었고, CFP는 $4,186.04 \pm 643.55$ pg/ml로 대조군에 비해 18% 높은 분비량을 나타내었다(Table 1).

앞서 언급했듯이 대식세포는 세균이나 이물질을 탐식 제거하는 과정에서 여러 가지 사이토카인을 생성하며 면역반

Table 1. Effects of CFP, CFP-S and CFP-L on concentration of cytokines secreted by activation macrophage

Group	IFN- γ (pg/ml)		TNF- α (pg/ml)		IL-6 (pg/ml)	
	Without mitogen	LPS	Without mitogen	LPS	Without mitogen	LPS
NC	6.23 \pm 1.15 ^a	9.76 \pm 2.95	269.00 \pm 40.24 ^a	817.62 \pm 138.01 ^{ab}	1,082.45 \pm 420.20 ^b	3,445.74 \pm 662.61 ^a
CFP	5.98 \pm 0.62 ^a	13.43 \pm 3.16	182.61 \pm 64.65 ^a	740.77 \pm 82.11 ^a	1,039.80 \pm 290.28 ^b	4,186.04 \pm 643.55 ^a
CFP-S	8.99 \pm 2.51 ^b	11.74 \pm 3.63	495.13 \pm 69.91 ^b	874.25 \pm 100.46 ^{ab}	1,357.04 \pm 428.79 ^b	4,767.62 \pm 584.18 ^b
CFP-L	5.28 \pm 0.59 ^a	5.28 \pm 2.46	256.49 \pm 94.12 ^a	907.28 \pm 52.35 ^b	653.21 \pm 228.03 ^a	3,412.72 \pm 853.91 ^a

Macrophage cells were stimulated with CFP, CFP-S and CFP-L for 24 hours and the supernatants were assayed for various cytokines. Cytokine concentration in culture supernatants were determined as described under materials and methods. The results are expressed as mean \pm S.E., n=10, abmeans are significantly different between group at $p < 0.05$. LPS: Lipopolysaccharide.

NC: Negative control, CFP: Crude fermentation-polysaccharide, CFP-S: Crude fermentation-polysaccharide-*Saccharomyces cerevisiae*, CFP-L: Crude fermentation-polysaccharide-*Lactobillus gasseri*.

을 조절한다(Roitt 등 1996). 대식세포가 활성화되고 종양 세포치사가 대식세포가 되기 위해서는 먼저 T-림프구에서 분비된 IFN- γ 나 염증환경이 필요하고, 그 다음에 LPS와 같은 박테리아 유래 물질이 필요한 것으로 알려져 있다. 이렇게 활성화된 대식세포는 IL-6, TNF- α 와 같은 사이토카인을 분비하며, 이 같은 물질들을 동물에 투여했을 때 바이러스나 암에 대한 저항력을 증가시키는 것으로 보고되고 있다(Singh 등 1989; Sarzotti 등 1989; Nathan 등 1992). TNF- α 는 종양괴사인자(tumor necrosis factor)로 알려진 물질로 종양세포를 파괴하는 사이토카인이고(Wajant 등 1999), IL-6는 간세포가 피브리노젠(fibrinogen)과 같은 몇 가지 혈장 단백질을 합성하도록 유도하며, B세포 분화를 활성화 시키는 B세포 성장 인자로 작용한다(Larsson 등 1999).

Ghoneum 등(2005)의 연구에 의하면 효소 분해 미강 분말을 대식세포주인 U937세포에 처리 후 사이토카인의 분비량을 측정된 결과, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 분비량이 농도의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 또한 Chae 등(2004)의 연구에서도 미강에서 추출한 아라비녹실란을 대식세포에 처리한 결과, IL-6와 TNF- α 분비량이 모두 증가하는 결과를 나타내었다. 본 실험에서는 CFP와 CFP-S를 경구 투여한 군에서 대식세포의 사이토카인이 증가하는 결과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 대식세포의 증식능을 평가한 결과(Fig. 2)와 비교해 볼 때 유사한 결과를 보여주고 있다. 즉, 대식세포의 증식이 활성화됨으로써 대식세포에서 분비되는 사이토카인의 분비도 증가된 것을 알 수 있다. Ryu(2008)의 연구 결과에 의하면 울무 추출물이 경구 투여를 통해 면역 활성을 측정할 때 대식세포에서 분비되는 사이토카인을 측정함으로써 대식세포 활성화의 지표로 삼고 있다. 본 연구 결과, CFP와 CFP-S는 대식세포를 활성화시켜 IFN- γ , TNF- α 와 IL-6의 생산을 유도하는 것으로 나타났으며, 이로 인해 면역계 활성을 통한 숙주방어 기전을 한층 더 강화하게 해줄 것으로 기대된다.

2) 비장세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향

비장세포에서 분비되는 사이토카인의 농도를 측정된 결과는 Table 2와 같다. 비장세포는 B세포를 활성화시키는 ConA와 T세포를 활성화시키는 LPS를 처리한 것과 미토젠을 처리하지 않은 것으로 나누어 각각 사이토카인의 농도를 측정하였다.

IFN- γ 의 분비량은 미토젠을 처리하지 않은 비장세포에서는 측정되지 않았다. ConA와 LPS를 처리한 경우 CFP 군이 대조군과 유의적인 차이를 보였다. 결과값을 살펴볼 때 ConA를 처리한 비장세포에서는 대조군에 비해 42%, LPS를 처리한 비장세포는 14% 높게 나타났다. 각 농도는 125.78 \pm 41.25 pg/ml, 220.35 \pm 45.58 pg/ml를 나타내었다(Table 2). TNF- α 의 분비량 역시 미토젠을 처리하지 않은 비장세포에서는 측정되지 않았다. CFP군에서 ConA와 LPS를 처리한 경우 118.90 \pm 19.73 pg/ml, 70.87 \pm 28.01 pg/ml로 나타내었고, 대조군과 비교 시 각각 39%, 34% 높은 분비량을 보였다. IL-6의 분비량을 측정된 결과, 미토젠을 처리하지 않은 비장세포에서는 CFP군이 34.99 \pm 39.43 pg/ml로 대조군에 비해 유의적으로 높은 농도값을 나타내었다. ConA를 처리한 비장세포에서도 역시 CFP군이 186.48 \pm 88.45 pg/ml로 유의적인 차이를 나타내었다. CFP-S군은 130.35 \pm 97.59 pg/ml로 대조군과 유의적인 차이는 나타내지 않았으나, 대조군보다 3% 높게 나타났다. LPS를 처리한 경우 모든 군에서 유의적인 차이는 나타내지 않았으나 CFP군의 IL-6 분비량이 대조군에 비해 28% 높게 나타났다(Table 2).

비장세포의 증식반응이 일어나면 여러 종류의 면역반응을 매개하는 사이토카인을 분비하게 된다. 비장은 면역계에서 중추적인 역할을 하는 B 및 T 림프사이트의 성숙과 항원에 의해 작용을 받은 후 분열과 분화가 이루어지는 주요 임파구이다. 비장세포에서 분비되는 IFN- γ 와 TNF- α 는 T 세포에서 분비되는 사이토카인으로 전구 염증성(pro-inflammatory) 사이토카인이며, 특히 TNF- α 종양괴사인자로 작용한다. 그

Table 2. Effects of CFP, CFP-S and CFP-L on concentration of cytokines secreted by activation splenocyte

Group	IFN- γ (pg/ml)			TNF- α (pg/ml)			IL-6(pg/ml)		
	Without mitogen	ConA	LPS	Without mitogen	ConA	LPS	Without mitogen	ConA	LPS
NC	-	73.51 \pm 67.02 ^b	189.68 \pm 50.00 ^a	-	72.05 \pm 26.90 ^b	46.51 \pm 28.46 ^a	26.85 \pm 49.55 ^{ab}	126.34 \pm 92.45 ^b	193.04 \pm 11.11 ^{ab}
CFP	-	125.78 \pm 41.25 ^b	220.35 \pm 45.58 ^b	-	118.90 \pm 19.73 ^c	70.87 \pm 28.01 ^b	34.99 \pm 39.43 ^b	186.48 \pm 88.45 ^c	266.86 \pm 16.69 ^b
CFP-S	-	56.35 \pm 28.45 ^a	111.88 \pm 44.56 ^a	-	24.41 \pm 23.51 ^a	49.21 \pm 19.72 ^{ab}	18.57 \pm 40.71 ^a	130.35 \pm 97.59 ^b	212.58 \pm 3.09 ^{ab}
CFP-L	-	51.48 \pm 30.66 ^a	97.30 \pm 4.47 ^a	-	10.17 \pm 23.42 ^a	41.70 \pm 4.67 ^a	22.45 \pm 12.75 ^a	66.53 \pm 37.19 ^a	146.12 \pm 6.23 ^a

Spleen cells were stimulated with CFP, CFP-S and CFP-L for 24 hours and the supernatants were assayed for various cytokines. Cytokine concentration in culture supernatants were determined as described under materials and methods. The results are expressed as mean \pm S.E., n=10, abmeans are significantly different between group at $p < 0.05$. ConA: Concanavalin A, LPS: Lipopolysaccharide.

NC: Negative control, CFP: Crude fermentation-polysaccharide, CFP-S: Crude fermentation-polysaccharide-*Saccharomyces cerevisiae*, CFP-L: Crude fermentation-polysaccharide-*Lactobillus gasseri*.

리고 IL-6는 B세포의 활성화와 분화를 자극하는 전구 염증성 사이토카인이다. Chea 등(2004)의 연구 결과에 따르면 미강에서 추출한 PSP를 비장세포에 처리한 결과, 비장세포에서 분비하는 사이토카인인 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ 등의 생성량이 증가되는 것을 확인하였다. Ryu 등(2010)의 연구에서도 도토리 추출물의 경구 투여가 마우스 비장세포의 사이토카인 IL-2, IL-6, IFN- γ 의 분비량을 증가시켜 면역기능 향상에 기여한다고 보고하였다. 본 연구에서는 CFP 경구 투여가 비장세포에서 분비하는 사이토카인의 분비량을 증가시키는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 선행된 연구와 비교할 때 유사한 결과를 나타내주고 있다. 특히 미강에서 추출한 PSP는 본 연구에서 사용한 CFP와 유사한 소재로서 기능성 다당체의 면역효과를 기대해 볼 수 있다(Chea 등 2004). 그러나 2차 발효물인 CFP-S, CFP-L는 유의적인 결과를 나타내지 않았다. 본 연구 결과에서는 명확한 근거자료를 제시할 수 없으나, 비장세포와 관련된 체액성 면역에 관해서는 2차 발효물에 의한 면역 효과보다는 1차 발효물인 CFP의 면역 효과가 더 우수한 것으로 판단된다. 그러나 2차 발효물 중 CFP-S는 대식세포 활성화에 효과적이었으므로 이에 대한 연구는 차후 더 이루어져야 할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 유색미 미강을 표고버섯 균사체로 발효한 1차 발효물(CFP)과 1차 발효물을 효모와 유산균으로 2차 발효시킨 2차 발효물(CFP-S, CFP-L)을 이용하여 *in vivo* 상에서 면역 활성을 측정하였다. 4주간 각 물질을 250 mg/kg BW/day로 경구 투여시킨 후 마우스 복강 대식세포와 비장세포를 분리하여 각각의 세포 증식도를 평가하였으며, 각 세포에서 분비하는 사이토카인의 분비량을 측정하였다. 실험 결과, 마우스 대

식세포의 증식은 CFP 경구 투여군과 CFP-S 경구 투여군이 높게 나타났다. 또한 비장세포의 증식에 있어서는 CFP 경구 투여군이 대조군에 비해 높게 나타났다. 마우스 대식세포에서 분비하는 사이토카인의 분비량을 측정할 결과, CFP-S군은 IFN- γ , TNF- α , IL-6의 분비량을 모두 증가시켰으며, CFP 경구 투여군은 LPS를 처리하여 대식세포를 활성화시킨 세포에서 IFN- γ , IL-6의 분비량이 증가하였다. CFP-L 경구 투여군에서는 LPS를 처리한 세포에서 TNF- α 의 분비량이 증가됨이 관찰되었지만 미비한 수준이었다. 비장세포에서 분비하는 사이토카인의 농도 측정 결과는 CFP 경구 투여군에서 모든 사이토카인(IFN- γ , TNF- α , IL-6) 분비량을 증가시켰으며, CFP-S는 LPS를 처리한 비장세포에서 분비하는 사이토카인 중 TNF- α , IL-6의 분비량이 증가됨을 관찰하였다. CFP-L 경구 투여 군에서는 사이토카인 분비량이 대조군에 비해 모두 감소되었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 유색미 미강 1차 발효물(CFP)와 2차 발효물 중 효모로 발효시킨 CFP-S가 마우스에 경구 투여 시 면역과 관련된 세포의 활성을 증가시키고, 이 세포에서 분비되는 면역인자인 사이토카인의 분비량을 증가시키는 것으로 나타났다. 반면, 2차 발효물 중 유산균으로 2차 발효시킨 CFP-L은 면역 활성화에 효과를 나타내지 않았다. 여러 선행연구에서는 미강 표고버섯 균사체 발효물이 면역 증진작용 가진다고 보고하고 있다. 이는 발효물에 생리활성을 나타내는 기능성 다당체가 포함되어 있기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 일반 미강에서 유색미 미강을 이용하고, 더 나아가 1차 발효물을 효모와 유산균으로 2차 발효를 함으로 좀 더 저분자화된 다당체를 생성함으로써 면역 증진 기능의 상승효과를 기대하였다. 특히, 2차 발효에 사용한 효모는 자체 내 세포벽에 베타-글루칸을 함유한 것으로 현재 기능식품소재로 사용되고 있으며, 여러 연구 결과, 면역 증강 작용이 확인되

었다(Kim 등 2008). 또한 유산균종은 BRM(biological response modifier)이라 불리는 면역조절물질로 알려져 있다(Hong 2005). 그러나 연구 결과, 유산균을 통한 2차 발효물은 면역기능 평가 시 효과적이지 못하였다. 또한 본 연구에서는 유색미 미강 발효물의 면역효과는 기능성 다당체와 더불어 유색미에 포함되어 있는 안토시아닌이라는 항산화 성분의 효과라고 생각된다. 그러나 본 연구에서는 유색미 미강 발효물과 일반미의 미강발효물의 면역활성 효과를 비교하지 않았고, 유색미 미강의 어떤 물질이 면역활성에 기여했을 지는 판단하기 어렵다. 따라서 앞으로 1차 발효물과 2차 발효물의 기능성 다당체의 성분과 또한 항산화 효과를 기대한 안토시아닌 함량 분석하고, 2차 발효시 미강에 존재하는 기능성 다당체들의 수율과 활성의 변화를 평가할 필요가 있다고 판단된다. 이 같은 연구는 유색미 미강의 이용가치를 높이고, 식품 소재 개발에 있어서 중요한 기초자료가 될 것으로 보인다.

참고문헌

- Chae SY, Shin SH, Bae MJ, Park MH, Song MK, Hwang SJ, Yee ST. 2004. Effect of arabinoxylane and PSP on activation of immune cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 278-286
- Cho MH, Yoon HH, Hahn TR. 1996. Thermal stability of the major color compound, cyanidin-3-glucoside, from a Korean pigmented variety in aqueous solution. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 39:245-248
- Cho SH, Yang K, Bae BS, Im SA, Yu RN. 1998. Effect of sea tangle intake on cytokine production in macrophage from normal and diabetic mice. *J Korean Food Sci Nutr* 27: 952-959
- Cleary JA, Kelly GE, Husband AJ. 1999. The effect of molecular weight and β -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by β -1,3-D-glucan. *Immunol Cell Biol* 77:395-403
- Cyster JG. 1999. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286:2098-2102
- Desai A, Vyas T, Amiji M. 2008. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci* 1999:2745-2756
- DiLuzio NR. 1983. Immunopharmacology of glucan: A broad spectrum enhancer of host defense mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 4:344-347
- Eom SH, Lee BJ, Kim YM. 2010. Effect of yeast fermentation on the antioxidant and anti-inflammatory activity of sea tangle water extract. *Kor J Fish Aquat Sci* 434:117-124
- Ghoneum M, Gollapudi S. 2005. Modified arabinoxylan rice bran(MGN-3/Biobran) enhances yeast-induced apoptosis in human breast cancer cells *in vitro*. *Anticancer Res* 25: 859-870
- Ghoneum M. 1998. Enhancement of human natural killer cell activity by modified arabinoxylane from rice bran(MGN-3). *International Journal of Immunotherapy* XIV:89-99
- Ghoneum M. 1999. NK immunorestitution of cancer patient by MGN-3, A modified arabinoxylan rice bran(study of 32 patients followed for up to 4 years). *American Academy of Anti-Aging Medicine* 1:1-10
- Hong SG. 2005. Development of immunostimulation materials from rice bran. *Food Industry and Nutrition* 10:42-47
- James GL. 1995. Methods in Immunotoxicology. John Wiley Liss, Inc, San Diego. 2:15
- Jeong SC, Yang BK, Kim GN, Jeong H, Michael A, Wilson, Cho Y, Sundar Rao K, Song CH. 2006. Macrophage-stimulating activity of polysaccharides extracted from fruiting bodies of *Coriolus versicolor*(Turkey tail mushroom). *J Med Food* 9:175-181
- Kim HY, Han JT, Hong SG, Yang SB, Hwang SJ, Shin KS. 2005. Enhancement of immunological activity in exo-biopolymer from submerged culture of *Lentinus edodes* with rice bran. *Natural Product Sciences* 11:183-187
- Kim MJ, Ryu HW, Cho GH, Ki HW. 2008. Expression of inflammatory cytokines by beta-glucan in macrophage cell line. *Yakhak Hoeji* 52:73-78
- Klis FM. 1973. Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10: 851-869, 1994. Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC. The structure of a β -(1,3)-D-glucan from yeast cell walls. *J Biochem* 135:19-30
- Kwon SH, Woo HJ, Han DS, Kim MK. 2001. Effect of dried powders and water extracts of *Paecilomyces tenuipes* and *Cordyceps militaris* on lipid metabolism, antioxidative capacity and immune status in rats. *Korean J Nutr* 34: 271-284
- Larsson BM, Larsson K, Malmberg P, Palmberg L. 1999. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation* 23: 217-230
- Ling WH, Cheng QX, Ma J, Wang T. 2001. Red and black rice decrease atherosclerotic plaque formation and increase antioxidant status in rabbits. *J Nutr* 131:1421-1426
- Manach C, Mazur A, Scalbert A. 2005. Polyphenols and pre-

- vention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* 16: 77-84
- McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM, Jensen DJ. 2003. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J Agric Food Chem* 51:4539-4548
- Morel F, Doussiere J, Vignais PV. 1991. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 201:523-546
- Nathan CF. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051-3059
- Page RC, Davies P, Allison AC. 1978. The macrophage as a secretory cell. *Int Rev Cytol* 52:119-123
- Park HA, Kweon MH, Han HM, Sung HC, Yang HC. 1998. Biological activity/nutrition : Effects of the glycoprotein isolated from *Pteridium aquilinum* on the immune function of mice. *Koran J Food Sci Technol* 30:976-982
- Ramesh HP, Yamaki K, Tsushida T. 2002. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. *Carbohydrate polymers* 50: 79-83
- Reynolds JA, Castello MD, Harrington DG, Grabbs CL, Peters CJ, Jemski JV, Scott GH, Diluzio NR. 1980. Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious disease. *Infection Immunity* 30:51-57
- Roitt I, Brostoff J, Male D. 1996. Immunology 4th ed. Mosby
- Ryu HS. 2008. Effect of job's tear(Yul-Moo). Extracts on mouse oral administration IL-1 β -IL-6, TNF- α , IL-10 cytokine production by peritoneal macrophage for two weeks. *Korean J Food & Nutr* 21:204-209
- Ryu HS. 2010. Effects of water extract acorn on mouse immune cell activation *ex vivo*. *Korean J Food & Nutr* 23:135-140
- Sarzotti M, Copenhagen DH, Singh IP, Past J, Baron S. 1989. The *in vivo* antiviral effect of CL246, 738 is mediated by the independent induction of interferon-alpha and interferon-beta. *J Interferon Res* 9:265-272
- Seo SJ, Choi YC, Lee SM, Kong S, Lee J. 2008. Antioxidant activities and antioxidant compounds of some specialty rices. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:129-135
- Singh IP, Sarzotti M, Copenhagen DH, Past J, Baron S. 1989. Postinfection therapy of arbovirus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 33:2126-2131
- Song MK, Woo SG, Jang JS, Kim JH, Kim HW, Hong SG, Lee BW, Park MH, Chung KS. 2003. Immunostimulating and anti-cancer effects of *Pediococcus pentosaceus* ERIM101 isolated from Korea. *Kor J Microbiol Biotechnol* 31:355-361
- Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, Bedoui JE, Chataigneau M, Valerie B. 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 500:299-313
- Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. 1994. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol March* 55:410-422
- U.S. National Cancer Institute. 1991. Designer Food Program Scheduled
- Wajant H, Grell M, Scheurich P. 1999. TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:15-26
- William DG. 1998. MGN-3: Quite possibly the most powerful immune booster known to man. *Alternatives Health Conscious Individual* 7:113-120
- Williams H, Johnson JL, Carson KG, Jackson CL. 2002. Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 788-792
- Xia M, Ling WH, Ma J, Kitts DD, Zawistowski J. 2003. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic. *J Nutr* 133:744-751
- Zalys R, Zagon IS, Bonneau RH, Lang CM, McLaughlin PJ. 2000. *In vivo* effect of chronic treatment with(MET5) enkephalin on hematological values and natural killer cell activity in athymic mice. *Life Sci* 66:829-834

접 수 : 2011년 3월 25일

최종수정 : 2011년 6월 30일

채 택 : 2011년 7월 8일