

## 천연 수용성 설포라판의 나노입자화를 통한 면역 활성 증진

하지혜\* · 한재건\* · 정향숙\* · 오성호\* · 권민철\* · 최영범\*\* · 고정림\*\* · 이현용\*\*\*\*†

\*강원대학교 BT특성화학부대학, \*\*정우식품, \*\*\*강원대학교 생명공학연구소

### Enhancement of Immune Activities of Natural Water-Soluble Sulforaphane by Nano Encapsulation Process

Ji Hye Ha\*, Jae Gun Han\*, Hyang Suk Jeong\*, Sung Ho Oh\*, Min Chul Kwon\*, Young Beom Choi\*\*, Jung Rim Ko\*\*, and Hyeon Yong Lee\*\*\*\*†

\*College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

\*\*Jeong Woo Foods Co., Jeju Special Self-Governing Province 690-804, Korea.

\*\*\*Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University Chuncheon 200-701, Korea.

**ABSTRACT :** This study was performed to investigate improving immune activities of natural water-soluble sulforaphane extracted from *Brassica oleracea* var. *italica* by nano encapsulation process. The nanoparticles of the sulforaphane extracted with ultrasonification process at 60 °C promoted human B and T cell growth, about 7~35% compared to the control. The secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$  from T cells were also enhanced as  $2.6 \times 10^{-4}$  pg/cell and  $2.1 \times 10^{-4}$  pg/cell, respectively, by the adding nano samples. NK cell activation was improved about 8%, compare to the control in adding cultured medium of T cell added nano samples. It was also found that sulforaphane extracted from *B. oleracea* var. *italica* had highly inhibitory activity on hyaluronidase as IC<sub>50</sub> about 200  $\mu$ g/ml. It can be concluded that natural water-soluble sulforaphane samples by nano-encapsulation, each size is 200 nm, extracted from *B. oleracea* var. *italica* has high immune activities through higher efficiency of bio-activation than conventional extracts.

**Key Words :** Natural Sulforaphane, Nano-encapsulation, Immune activity, *Brassica oleracea* var. *italica*

## 서 언

십자화과에 속하는 작물들에 주로 함유된 함황 phytochemicals는 대부분 glucosinolates의 효소적 가수분해 산물인 isothiocyanates, nitriles 및 sulfides 등의 화합물에 기인하는데 (Matusheski *et al.*, 2006), 이들 함황 화합물은 십자화과 식물 각각의 독특한 향기를 내는데 기여할 뿐 아니라, 생체 내에서 암을 예방하거나 돌연변이를 억제하는 작용 등 다양한 생리활성 효과를 나타낸다 (Sok *et al.*, 2003). 특히 브로콜리 추출물에 가장 많이 함유되어있는 것으로 알려진 S-methylsulfanylbutyl isothiocyanate (sulforaphane)는 이물질 (xenobiotics) 대사에 관여하는 phase 효소들을 선택적으로 유도하여 발암 (carcinogenesis)과 관련해 보호작용 (chemoprotection)이 크다는 연구 (Thornalley, 2002)가 보고되었다. 하지만 브로콜리 추출물의 이러한 유도효과는 isothiocyanates를 비롯한 여러 종류의 bioactive organosulfur phytochemicals에 의한 복합 효

과로 사료되며, 브로콜리 내 함황 화합물의 함량이나 활성을 나타내기 위한 농도 및 기작 등에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다 (Kim *et al.*, 1997).

일반적으로 수용성성분을 용매에 녹였을 경우 이온상태로 존재하여 그 활용성이 높을 것으로 기대되나, 인체 세포의 외막은 인지질로 구성되어 있어 수용성 성분이 침투하기 어려운 구조로 되어 있다. 따라서 수용성 물질의 세포내 침투 효율 향상을 위해서 활성물질을 유상이 포집한 리포솜 형태로 제조하고 이를 생체에 적용시켜 높은 침투력 및 생체활용성을 나타내고자 하는 연구 (Lee *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2002)가 많이 진행되고 있다.

나노기술은 나노미터 (10<sup>-9</sup>m) 수준을 제어하는 기술로 최근 나노 의약품으로 개발되어 특정 질병부위에 선택적 미사일 치료요법이 가능하기 때문에 질병치료의 새로운 수단으로 각광받고 있다. 나노기술은 유효 성분의 지속시간을 늘려 줄 뿐만 아니라 나노 소재화된 성분이 원하는 시간에 원하는 장소에서 작

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr  
Received July 14, 2008 / Revised September 14, 2008 / Accepted October 27, 2008

용하도록 조절이 가능해 그것의 이용 (Seo *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2006) 면에서도 점차 증가하는 추세이다. 하지만 활용가치가 높음에도 나노 기술과 천연물 소재의 fusion technology 기술이 전무한 상태이기 때문에 이러한 두 가지 기술을 접목시켜 새로운 기능성 소재화 및 유용성분의 기능성 증진 효과뿐만 아니라 생체에 적합성을 향상시킬 수 있는 천연 면역제재 개발을 위한 기초자료로 이용하고자 본 연구를 수행하였다.

브로콜리는 십자화과에 속하는 채소로 최근, 항발암 및 해독효소의 유도효과가 크다고 알려져 많은 연구가 진행됨은 물론 서양을 비롯하여 우리나라에서도 소비량이 크게 증가되고 있는 실정이다. 작은 꽃봉오리가 다발로 이루어진 꽃을 식용하는데, 한 줄기에서 꽃이 4~5개 정도도 맺히고, 잎은 10~15장 이상 나와 매우 무성하나 꽃만 식용으로 하기 때문에 잎은 버려지고 있다 (Kim *et al.*, 1999).

이처럼 본 연구의 나노입자화는 통상적으로 식·의약분야에서 연구되어 오던 물질의 분쇄 및 미립화를 통한 나노화 연구와 달리 브로콜리로부터 추출된 천연 수용성 sulforaphane의 생체활용성을 증진시킬 수 있는 수용성 물질의 나노입자화 공정에 관한 것으로 효율적인 활성물질의 송달 및 이의 생체활용성 증진을 통한 브로콜리 수용성 추출물의 활성 증진 효과를 탐색하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 추출방법

본 실험에 사용된 브로콜리 (*Brassica oleracea* var. *italica*)는 2007년 03월 제주도에서 수확된 것을 제주도 제주시 소재 정우식품에서 지원받아 사용하였다. 시료는 각각 10배의 증류수를 이용하여 60°C와 100°C에서 24시간동안 추출하였으며, 60°C 추출물은 다시 초음파 발생기 (Ultrasonic extraction system, Asia industry, Incheon, Korea)를 이용하여 추출온도에서 60 kHz의 초음파로 30분간 초음파 공정을 병행한 것을 이용하였다. 각 시료들은 감압여과 및 농축 후 동결건조를 통해 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

### 2. 나노입자 제조

본 실험에서는 나노입자화를 통한 생체활용성 증진효과의 탐색을 위해 천연 항발암제재 및 면역제재로 효과가 기대되는 브로콜리 추출물을 이용해 nanoparticle을 제조하였다. 브로콜리 추출 시료 중 초음파를 병행한 60°C 물 추출 시료 50 mg을 1 mg/ml의 농도로 증류수에 녹이고, 용매에 녹였다가 건조한 유상 5 mg과 섞은 후 초음파분산기 (VCX 500, Sonics & Materials, CT, USA)를 이용하여 상온에서 2시간 동안 균질화시켜 수용성 나노입자를 제조하였다. 이를 통해 제조된 나노입자는 수용성 추출물을 유상이 포함된 w/o 형식의 리포솜으로 구성되는데, 입도분석장치 (Dynamic Light Scattering,

DLS) 및 image analyzer로 측정된 결과 제조된 나노입자는 50~300 nm의 범위로 형성된 것을 확인하였다.

### 3. 브로콜리 추출물의 HPLC 분석

각 추출공정을 통한 브로콜리 시료의 성분 차이를 알아보고자 천연물의 일반성분분석에 통상적으로 사용되는 고성능 액체 크로마토그래피 (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용하여 각 추출공정을 통한 브로콜리 추출물의 peak를 얻고 공정간 상호 비교 분석을 시도하였다.

시료의 분석을 위해 HPLC 분석용 water에 각각 100 ppm의 농도로 시료를 조제하고 0.2 µm syringe filter로 여과하여 injection volume 20 µl로 측정하였다. HPLC 기기는 BIO-TEK instrument (Italy)사 HPLC 500 series의 BIO-TEK 522 controller Pump와 BIO-TEK HPLC 535 UV Detector (214 nm)를 사용하였고, Column은 Alltech사의 Prevail C18 (5 µm, 4.6 × 250 mm)을 사용하였다. 이동상은 물과 메탄올 (50:50, v/v)의 혼합용액을 사용하였고, 유속은 0.40 ml/min로 흘러주었다.

### 4. 나노입자 투과전자현미경 (Transmission Electron Microscopy) 관찰

활성성분을 포집한 나노캡슐을 음성 염색방법 (negative staining)으로 염색하고 EF-TEM으로 크기와 모양을 관찰하였다. 포스포텅스텐산 (phosphotungstic acid, pH 6.8, 0.1%) 용액과 나노캡슐이 1:1의 부피비율이 되도록 하여 1시간 동안 염색 시킨 후 폼바 (formvar)와 탄소필름 (carbon film)이 코팅되어 있는 쿠퍼그리드 (copper grid) 위에 얇게 올려 24시간 동안 건조시켜 수분을 모두 제거한 뒤 EF-TEM, 120 kV에서 나노캡슐의 형상을 관찰 하였다.

### 5. Image analyzer를 이용한 size 측정

본 실험을 통해 제조된 나노입자의 크기를 알아보기 위해 Image analyzer (image pro-plus1) 프로그램을 이용하여 광학현미경으로 찍은 nano sample의 크기를 측정하였다.

### 6. 세포주 및 세포 생육 배지

면역세포 생육 증진 효과는 인간 면역 세포인 T세포 (Jurkat, ATCC, USA)와 B세포 (Raji, ATCC, USA)를 이용하여 검증하였다. 실험에 사용된 면역세포는 RPMI 1640배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였고, NK 세포는 α-MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10-4M2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)을 첨가시켜 배양하였다.

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Alpha minimum essential medium (α-MEM)은 Gibco (Grand Island, NY,

USA)사로부터 구입하였고, hepes buffer는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하여 사용하였다. 혈청은 Gibco의 fetal bovine serum과 horse serum을 이용하였고 gentamycin sulfate, trysin-EDTA는 Sigma사의 것을 사용하였다. 세포염색을 위한 sulforhodamine B(SRB)는 Sigma사로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

### 7. 면역세포 생육 증진 효과

면역기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T세포 (Jurkat)와 B 세포 (Raji)를 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였으며, 면역기능 증강 효과는 24 well plate에 세포를 1.0×10<sup>4</sup> cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양하면서 매일 각 well의 세포 수를 hemacytometer로 측정하여 확인하였다 (Kwon *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2002).

### 8. Cytokine 분비량 측정

Cytokine은 IL-6와 TNF-α의 정량을 Chemicon (USA)사의 IL-6와 TNF-α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 1.0~2.0×10<sup>4</sup> cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μl 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)시킨 후 시료의 최종농도를 0.5 mg/ml로 100 μl 씩 첨가하여 다시 배양 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)하였다. 원심분리기를 이용하여 배양배지의 상층액을 취한 다음 450 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D.값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Lim *et al.*, 2008; Han *et al.*, 1998).

### 9. NK 세포(Natural Killer cell)의 면역증진 효과

ATCC로부터 분양 받은 NK-92MI 세포를 α-MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10<sup>-4</sup> M 2-mercaptoethanol, 12.5% FBS와 12.5% horse serum 첨가하고, 2×10<sup>7</sup> cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T세포를 T-25 Flask에 배양하면서 sample을 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 3~4번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI 세포를 24 well plate에 4~5×10<sup>4</sup> cells/ml로 900 μl 씩 분주하고 24시간 후 T세포의 상층액을 각 plate에 100 μl 씩 투여하고 배양 48시간 후부터 6일 동안 생세포 수를 측정하여 NK-92MI 세포의 활성도를 확인하였다 (Yueran *et al.*, 2003; Cecilia 2002).

### 10. 피부 면역 및 항염증 관련 hyaluronidase 활성 저해 효과

Hyaluronidase 억제 효과는 Rooster Comb에서 형성된 N-acetylglucosamine의 양을 분광광도계로 측정하여 활성을 판단하였다. 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronidase

(7,900 unit/ml) 50 μl에 시료의 추출물을 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml가 되도록 20 μl 가하고, 효소의 활성화를 위해 12.5 mM의 CaCl<sub>2</sub> 200 μl를 혼합한 후 37°C 수욕 상에서 20분간 배양시켰다. 대조군은 DMSO 용액을 넣고 수욕 상에서 20분간 배양하였다. Ca<sup>2+</sup>로 활성화된 hyaluronidase 용액에 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronic acid (12 mg/5 ml) 250 μl를 첨가하여 다시 수욕 상에서 40분간 배양하였다. 배양 후 0.4 N NaOH 용액 100 μl와 0.4 M potassium tetraborate 100 μl를 반응 혼합물에 첨가하여 끓는 수조에서 3분간 배양시킨 후 냉각시켰다. 냉각시킨 반응물에 dimethyl aminobenzaldehyde 용액(p-dimethyl amino-benzaldehyde 4 g, 100% acetic acid 350 ml 및 10 N HCl 50 ml 혼합액) 3.28 ml를 반응 혼합물에 첨가하고 37°C 수욕 상에서 20분간 배양한 후 585 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해비율은 다음과 같이 계산하고, 효소의 활성을 50% 저해하는 농도를 구해 이를 IC<sub>50</sub> 값으로 한다.

$$\text{Hyaluronidase Inhibition (\%)} = [(ODc - ODs) / ODc] \times 100$$

여기서 ODc는 대조군의 O.D. (optical density)이고, ODs는 시료 용액의 585 nm에서의 O.D. 값이다.

### 11. 통계

본 연구에서 실험값의 통계는 SPSS package program의 paired *t*-test로 검증하였으며 모든 실험값은 평균 ± 표준오차 (Mean ± standard error)로 나타내었다.

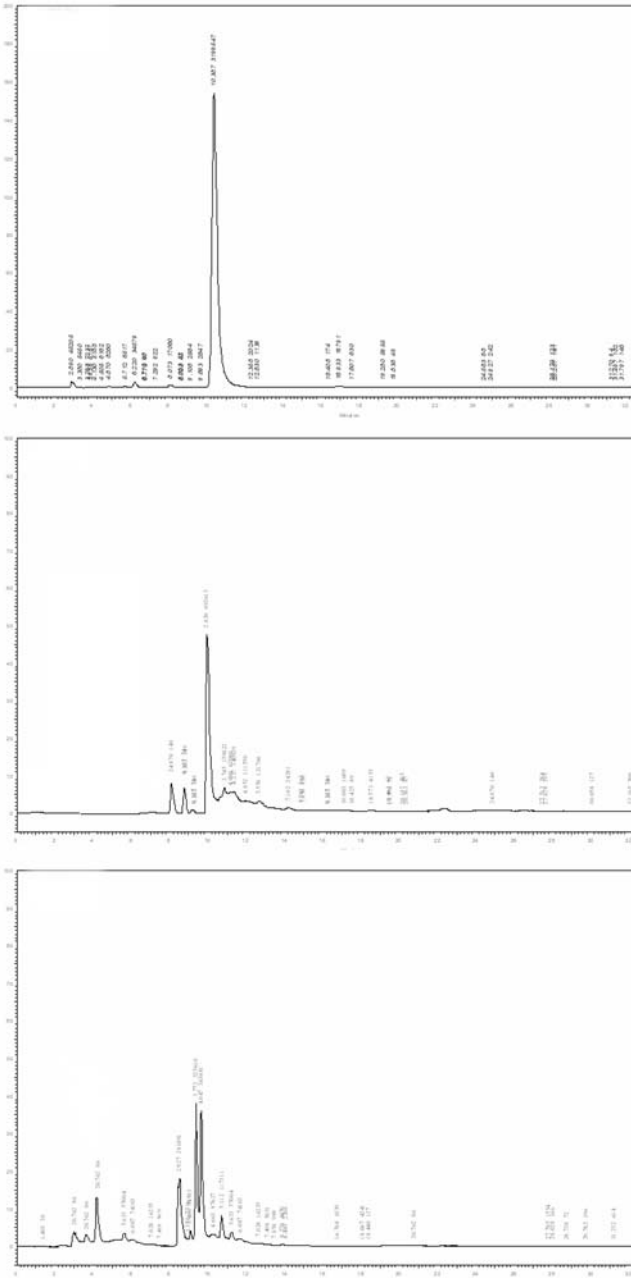
## 결과 및 고찰

### 1. 브로콜리 추출물의 HPLC 분석

HPLC를 이용한 브로콜리의 분석 결과는 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1의 (A)는 브로콜리의 주요 활성성분으로 알려진 L-sulforophane의 standard peak로 나머지 추출물의 peak와 비교하여 각 추출공정에 따른 활성성분의 용출 정도를 확인하는데 이용하였다. (B)와 (C)는 각각 100°C 물 추출물과 초음파를 병행한 60°C 물 추출물의 HPLC 분석 peak로서 각 추출 공정에 따른 용출 성분의 차이를 나타내었다. 결과로부터 (C)의 60°C 초음파 공정이 L-sulforophane을 비롯한 다양한 성분의 용출을 가장 효율적으로 증진하였음을 확인하였다. 따라서 브로콜리의 유용활성 성분은 온도를 높이는 공정 보다는 초음파 공정을 통해 수율의 향상이 가능할 것으로 사료된다.

### 2. 나노입자 투과전자현미경 (Transmission Electron Microscopy) 관찰

Fig. 2는 브로콜리 추출물을 함유하는 나노입자의 TEM micrograph이다. TEM micrograph를 분석한 결과 나노캡슐은

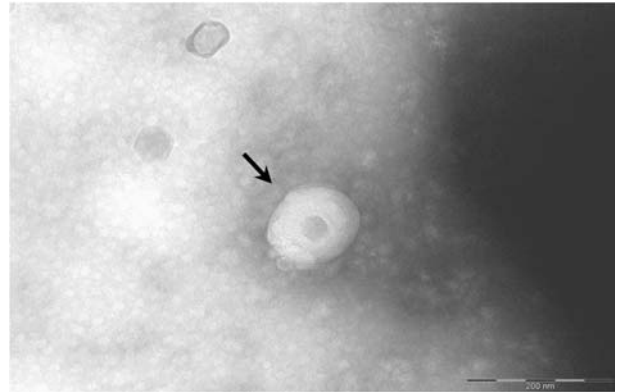


**Fig. 1.** Comparison of peak of extracts under different extraction conditions from *B. oleracea* var. *italica* using HPLC (A; asiaticoside standard, B; 100°C water extracts, C; 60°C water extracts with ultrasonification 60 kHz, 30 min).

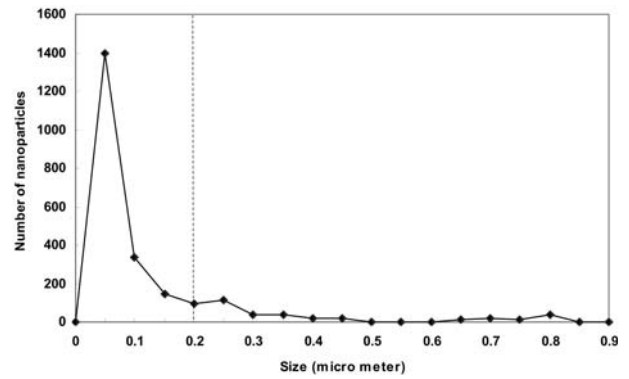
50~200 nm 정도의 크기를 가진 구형의 입자임을 알 수 있으며, 실제로 DLS 등으로 나노캡슐의 크기를 분석하여 50~100 nm의 크기로 측정되었다.

### 3. Image analyzer 측정 결과

Fig. 3은 전자현미경을 통해 촬영된 브로콜리 나노입자를



**Fig. 2.** TEM micrograph of nanoparticle from the extract of *B. oleracea* var. *italica*. Scale of bar is 200 nm.



**Fig. 3.** Size distribution of nanoparticles with 0.2% gelatin using image analyzer.

image analyzer를 이용하여 측정한 입자크기별 분포이다. 100 nm의 나노입자가 전체의 70% 이상으로 브로콜리 수용성 추출물 나노입자의 대부분이 100 nm 이하의 크기로 균일하게 형성되었음을 확인할 수 있다. 일반적으로 나노입자는 200 nm 이하의 크기에서 세포 침투성이 높은 것으로 알려져 있어 브로콜리 수용성 추출물 나노입자도 체내에서 높은 생체활용성을 보일 것으로 기대된다.

### 4. Cytokine 분비량 측정

Table 1은 인간면역 세포의 생육도를 뒷받침하는 자료로서 인간 면역체계에서 중요한 역할을 담당하는 B, T 세포에서 면역 세포들이 분비한 cytokine (IL-6와 TNF- $\alpha$ )의 분비량 측정 결과를 나타낸 것이다. 각 시료 첨가에 따른 cytokine의 분비량은 면역세포의 생육도와 유사한 경향을 나타내었는데, B세포에서 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 살펴보면, 나노입자 첨가군이 6일째 각각  $2.6 \times 10^{-4}$  pg/cell과  $2.1 \times 10^{-4}$  pg/cell을 나타내며 무첨가 대조군에 비해 유의적으로 가장 높은 분비량을 나타내었고, 다음으로는 초음파 병행 60°C 물 추출물이 각각  $2.36 \times 10^{-4}$  pg/cell과  $2.20 \times 10^{-4}$  pg/cell을 나타낸 것을 확인할

**Table 1.** Comparison of IL-6, TNF- $\alpha$  secretion from human B and T cells growth after adding the extracts of *B. oleracea* under several conditions and nanoparticles.

Extraction Condition of Sample	Cultivation time (DAY)	Specific secretion from B cell ( $10^{-4}$ pg/cell)		Specific secretion from T cell ( $10^{-4}$ pg/cell)	
		IL-6	TNF- $\alpha$	IL-6	TNF- $\alpha$
Control	1	0.6 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
	2	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1
	3	1.2 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1
	4	1.4 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.1
	5	1.6 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.1
	6	1.7 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.1
100°C Water	1	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.2
	2	1.1 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2
	3	1.4 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.3
	4	2.0 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2
	5	2.2 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.2
	6	2.2 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.2
60°C Water <sup>†</sup>	1	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1
	2	1.2 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2
	3	1.7 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.1
	4	1.9 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.2
	5	2.3 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.2
	6	2.4 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.1
Nanoparticles <sup>‡</sup>	1	0.6 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2
	2	1.2 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2
	3	1.7 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.2
	4	2.2 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.2
	5	2.5 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.2
	6	2.6 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.2

<sup>†</sup>Ultrasonification (60 kHz) at 60°C.

<sup>‡</sup>Nanoparticles were encapsulated with ultrasonicated 60°C water extracts at 60 kHz.

<sup>1)</sup> Data values are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate determinations. Each value were compared with control at P < 0.05 by Student t-test.

수 있었다. 마찬가지로 T세포의 cytokine 분비에서도 나노입자 첨가군이 6일째 각각  $2.5 \times 10^{-4}$  pg/cell과  $2.6 \times 10^{-4}$  pg/cell을 나타내며 다른 시료와 비교해 유의적으로 증가된 cytokine 분비량을 나타내었다. 생육도와 cytokine 분비량 측정을 통한 대부분의 조건에서 시료 첨가를 통해 대조군 보다 높은 활성을 나타내었으며, 나노입자, 초음파 병행 60°C 물 추출물, 100°C 물 추출물 순으로 높은 활성을 보였다. 또한 이상의 수치는 해당화의 뿌리 추출물을 통한 연구 (Lee *et al.*, 2003) 등에서 보고된 면역세포 cytokine 분비와 유사한 수치로 브로콜리 추출물이 면역세포의 생육 증진 및 cytokine 분비량 증가를 통한 면역 활성 증진에 가능성이 있으며 초음파병행 추출 및 나노입자화 공정을 통한 추가적인 증진 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

### 5. 면역세포 생육 증진 효과

Cytokine 분비량 증가를 통한 면역증진 효과의 확인을 위해 면역 T세포의 생육도를 측정하고 cytokine 분비량과 생육 촉진 효과를 비교하였다. Fig. 4의 (A)는 시간경과에 따른 T세

포의 생육곡선으로 시료첨가 시점을 기준으로 6일째 최고 생육도를 나타내었다. 6일째 100°C 물 추출물을 제외하면 모든 시료 첨가 조건에서 무첨가 대조군과 비교하여 생육도의 증가를 확인할 수 있었다. 측정을 통해 대조군에 비해 100°C 물 추출물 첨가군이 3%, 초음파 병행 60°C 물 추출물이 12%, 나노입자가 14%의 생육증진을 보인 것을 확인하였다. 그중 가장 높은 활성을 나타낸 것은 나노입자로 4일째  $9.7 \times 10^4$  cells/ml를 나타내 무첨가 대조군의  $7.2 \times 10^4$  cells/ml에 비해 35%까지 T세포의 생육을 증가시키는 것으로 나타났다. 이는 배양시간에 따른 T세포의 cytokine (TNF- $\alpha$ ) 분비 경향과 유사한 결과로 브로콜리 추출물 및 나노입자의 첨가를 통해 인간 면역세포의 생육이 증진되고 이를 통해 면역세포로부터 분비되는 cytokine의 분비량도 증가됨을 확인한 결과이다.

이는 면역 활성을 나타내는 것으로 알려진 사철쑥의 추출물을 통한 면역 활성 연구 (Lee *et al.*, 2004)의 20~50% 생육 증진에는 미치지 못하지만 생육증진을 뚜렷이 확인할 수 있는 수치로 B세포와 T세포의 생육도 측정을 통해 브로콜리에는 면역세포의 생육을 증진시키는 성분이 함유되어 있으며, 초음

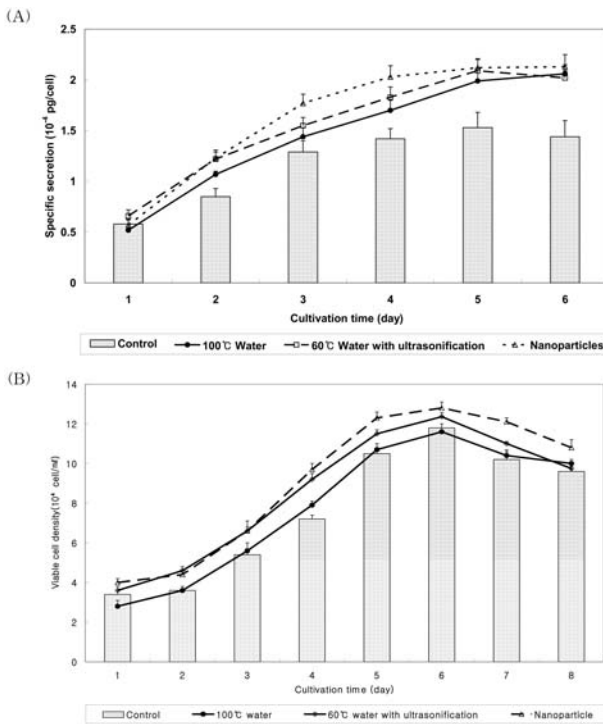
**Table 2.** Comparison of growth effect of NK cells by adding the secretions of T cell in adding the extracts of *B. oleracea* var. *italica* under several conditions and nanoparticles.

Cultivation time (day)	1	2	3	4	5	6
Extraction Condition of Sample	Visible cell density ( $\times 10^4$ cell/ml)					
Control	6.4 $\pm$ 0.2	6.9 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 0.2	10.3 $\pm$ 0.2	11.8 $\pm$ 0.2	12.4 $\pm$ 0.2
100 $^{\circ}$ C water	6.4 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.2	9.1 $\pm$ 0.4	10.7 $\pm$ 0.3	11.6 $\pm$ 0.3	12.0 $\pm$ 0.4
60 $^{\circ}$ C water <sup>†</sup>	6.3 $\pm$ 0.3	7.9 $\pm$ 0.2	9.5 $\pm$ 0.3	11.2 $\pm$ 0.4	12.2 $\pm$ 0.4	12.8 $\pm$ 0.2
Nanoparticles <sup>‡</sup>	6.5 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.4	9.9 $\pm$ 0.5	11.5 $\pm$ 0.3	12.5 $\pm$ 0.3	13.0 $\pm$ 0.3

<sup>†</sup>Ultrasonification (60 kHz) at 60 $^{\circ}$ C.

<sup>‡</sup>Nanoparticles were encapsulated with ultrasonified 60 $^{\circ}$ C water extracts at 60 kHz.

<sup>1)</sup> Data values are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate determinations. Each value were compared with control at P < 0.05 by Student t-test.

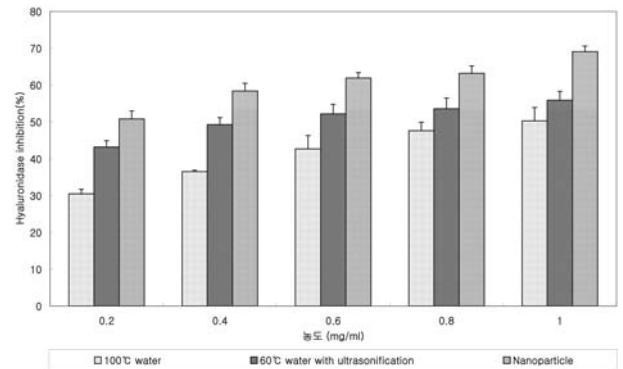


**Fig. 4.** (A) TNF- $\alpha$  secretion from (B) the growth of human T cell "Jurkat" in adding the nanoparticle and extracts of *B. oleracea* var. *italica* under several conditions.

파병형 추출 공정 및 나노입자화를 통해 추가적인 활성의 증진이 가능한 것을 확인할 수 있다. 이는 초음파공정을 통한 공동효과에 따른 활성 물질의 용출량 증가 및 나노입자화에 따른 생체활용성 향상에 기인하는 것으로 사료된다.

**6. NK 세포 (Natural Killer cell)의 면역증진 효과**

NK 세포의 활성은 시료를 첨가한 면역 T세포의 배양액을 NK 세포에 첨가하여 나타나는 생육도의 변화를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 측정하였다. Table 2는 T세포에 각 시료를 첨가하여 배양한 후 그 배양액을 NK 세포에 첨가하였을 때 나타나는 NK 세포의 활성도를 조건별로 비교하여 나타낸 표이다. 6일 동안 생육도를 관찰하였는데 5일과 6일째 100 $^{\circ}$ C



**Fig. 5.** Hyaluronidase inhibitory activity of the nanoparticle and extracts of *B. oleracea* var. *italica* under several conditions.

물 추출물을 제외한 모든 시료첨가 조건에서 대조군과 비교하여 증가된 생육도를 확인할 수 있었다. 가장 높은 활성을 나타낸 것은 나노입자로 6일째 13.0 $\times 10^4$  cells/ml를 나타내어 12.0 $\times 10^4$  cells/ml를 나타낸 대조군에 비해 약 8%의 활성 증가를 확인할 수 있었다. 다음으로 초음파를 병행한 60 $^{\circ}$ C 물 추출물이 12.8 $\times 10^4$  cells/ml를 나타내며 모든 기간에서 증가된 활성을 나타내었다.

**7. 피부 면역 및 항염증 관련 hyaluronidase 활성 저해 효과**

브로콜리 나노입자 및 추출물에 대하여 피부면역 및 항염증 활성과 관련이 있는 hyaluronidase의 저해효과를 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 각 시료는 5가지의 농도를 준비해서 각 농도에 따른 저해율을 구하여 나타내었다.

농도별 저해활성을 통해 모든 시료가 1,000  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서 IC<sub>50</sub>을 나타냄을 확인할 수 있었다. 특히 브로콜리 나노입자는 200  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서 IC<sub>50</sub>을 나타내었으며, 초음파를 병행한 60 $^{\circ}$ C 물 추출물도 약 400  $\mu$ g/ml의 IC<sub>50</sub>으로 hyaluronidase의 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 이는 제주 산 감태에서 분리한 tannin 화합물 연구 (Bu *et al.*, 2006)에서 보고된 화합물 Dieckol의 IC<sub>50</sub> 14.9  $\mu$ g/ml과 비교해서는 현저히 낮은 활성이나, 생약 추출물을 통한 연구 (Cha *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2003)에서 높은 활성을 나타낸 석창포 등

과 근사한 수치로 브로콜리 추출물이 hyaluronidase 저해를 통한 항염증 및 피부면역에 효과적으로 작용할 것으로 사료된다. 또한 브로콜리 추출물 내 활성성분 분리를 통해 보다 높은 활성도 기대가 가능할 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 통해 브로콜리 추출물은 면역 활성을 나타내는 유용성분을 함유하고 있으며, 나노입자화 공정을 통해 면역활성의 증진이 가능함을 확인하였다. 또한 초음파 추출물을 나노입자화 하여 실시한 실험을 통해 나노입자가 높은 면역 활성을 나타냄에 따라, 나노입자화를 통해 적은 유용성분으로 높은 유용활성을 나타낼 수 있음을 확인하였다. 이는 나노입자화를 통해 유용성분이 200 nm 이하로 분산됨에 따라 세포침투가 용이해지고 생체활용성이 증진되면서 적은 양으로 보다 높은 활성을 나타내는 것으로 사료된다. 이와 같은 수용성 추출물의 나노입자화 및 브로콜리의 면역활성 탐색 연구는 아직 보고된 사례가 없어 본 연구를 기반으로 한 후속 연구를 통해 브로콜리의 기능성 탐색 및 천연 수용성 추출물의 나노입자화를 통한 기능성 증진 등 접목연구의 가능성을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 말

본 연구는 산업자원부에서 시행한 지역산업기술개발사업 (지역산업공동기술개발)의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

## LITERATURE CITED

- Bu HJ, Ham YM, Kim JM, Lee SJ, Hyun JW and Lee NH.** (2006). Elastase and hyaluronidase inhibition activities of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 37:92-96.
- Cecilia KL.** (2002). IL-2 receptor signaling through the Shb adapter protein in T and NK cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 296:929-936.
- Cha BC, Lee EH and Cho JY.** (2004). Glutathione S-transferase activity and hyaluronidase inhibitory effect of medicinal plants. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 35:184-188.
- Choi SI, Lee YM and Heo TR.** (2003). Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity *in vitro* of traditional herbal medicine extracts. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*. 18:282-288.
- Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo ES and Baik KU.** (1998). Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- $\alpha$  production and T cell proliferation. *Yakhak Hoeji*. 42:296-301.
- Kim DW, Cho MH, Park SY, Lee JH, Lee GW, Park MS, Park JK and Jee UK.** (2002). Preparation and evaluation of titrated extract of *Centella asiatica* niosome/W/O system cream for site specific targeting. *Journal of Korean Pharmaceutical Sciences*. 32:291-297.
- Kim JC, Lee HY, Kim MH, Lee HJ, Kang HY and Kim SM.** (2006). Preparation and characterization of chitosan/gelatin microcapsules containing triclosan, colloids and surfaces b: *Biointerfaces*. 52:52-56.
- Kim MR, Kim JH, Wi DS, Na JH and Sok DE.** (1999). Volatile sulfur compounds, proximate components, minerals, vitamin C content and sensory characteristics of the juices of kale and broccoli leaves. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*. 28:1201-1207.
- Kim MR, Lee KJ, Kim JH and Sok DE.** (1997). Determination of sulforaphane in *cruciferous* vegetables by SIM. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 29:882-887.
- Kwon MC, Han JG, Qadir SA, Ahn JH, Lee DH and Lee HY.** (2008). Enhancement of immuno-potential of *Chicorium endivia* L. by ultrasonification extraction process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:9-15.
- Lee HY, Lim NH, Seo JA, Khang GS, Kim JA, Lee HB and Cho SH.** (2005). Preparation of poly (vinylpyrrolidone) coated iron oxide nanoparticles for contrast agent. *Polymer (Korea)* 29:266-270.
- Lee MK, Choi GP, Ryu LH, Lee GY, Yu CY and Lee HY.** (2004). Enhanced immune activity and cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thunb. extracts against human cell lines. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 12:36-42.
- Lee MK., Lee SH, Choi GP, Yu CY, Lee JH and Lee HY.** (2003). Screening of immune enhancement activities of the extracts from *Rosa rugosae* Radix. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 11:13-18.
- Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH and Lee HY.** (2002). Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 10:109-115.
- Lim BO, Park PJ, Choi WS and Kim JD.** (2008). *Scutellaria baicalensis* modulates cytokine production, T cell population and immunoglobulin level by mesenteric lymph node lymphocytes in experimental mice with colitis. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:100-105.
- Matusheski NV, Swarup R, Juvik JA, Mithen R, Bennett M and Jeffery EH.** (2006). Epithiospecifier protein from broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica*) inhibits formation of the anticancer agent sulforaphane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:2069-2076.
- Seo DS, Kim JC, Sohn HH, Cho WG, Lee SU, Kim EY, Tae GY, Kim JD, Lee SY and Lee HY.** (2004). Preparation and characterization of chitosan/gelatin microcapsules containing triclosan. *Journal of Colloid and Interface Science*. 273:596-603.
- Sok DE, Kim JH and Kim MR.** (2003). Isolation and identification of bioactive organosulfur phytochemicals from solvent extract of broccoli. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*. 32:315-319.
- Thornalley PJ.** (2002). Isothiocyanates: mechanism of cancer chemopreventive action. *Anticancer Drugs* 13:331-338.
- Yueran Z, Rui S, You L, Chunyi G and Zhigang T.** (2003). Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 300:247-252.