

녹차 효소 처리 다당의 화학적 특성 및 면역증진 활성

박혜령^{1,2} · 서형주² · 유광원³ · 김태영⁴ · 신광순¹

¹경기대학교 식품생물공학과, ²고려대학교 보건과학대학 의생명융합학과
³한국교통대학교 식품영양학과, ⁴(주)비티씨

Chemical Properties and Immuno-Stimulating Activities of Crude Polysaccharides from Enzyme Digests of Tea Leaves

Hye-Ryung Park^{1,2}, Hyung Joo Suh², Kwang-Won Yu³, Tae Young Kim⁴, and Kwang-Soon Shin¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University

²Department of Integrated Biomedical and Life Science, College of Health Science, Korea University

³Department of Food and Nutrition, Korea University of Transportation

⁴Bionic Trading Corporation

ABSTRACT In order to develop new immuno-stimulating ingredients from mature leaves of green tea, crude polysaccharides were isolated from pectinase digests of tea leaves (green tea enzyme digestion, GTE-0), after which their immuno-stimulating activities and chemical properties were examined. GTE-0 mainly contained neutral sugars (54.9%) such as glucose (14.2%), arabinose (12.2%), rhamnose (11.1%), and galacturonic acid (45.1%), which are characteristic of pectic polysaccharides. The anti-complementary activity of GTE-0 was similar to that of polysaccharide K (used as positive control). Number of morphologically activated macrophages was significantly increased in the GTE-0-treated group. GTE-0 significantly augmented H₂O₂ and reactive oxygen species production by murine peritoneal macrophage cells in a dose-dependent manner, whereas production of nitric oxide showed the highest activity at a dose of 100 µg/mL among all tested concentrations. Murine peritoneal macrophages stimulated with GTE-0 showed enhanced production of various cytokines such as interleukin (IL)-6, IL-12, and tumor necrosis factors-α in a dose-dependent manner. Further, GTE-0 induced higher phagocytic activity in a dose-dependent manner. In *ex vivo* assay for cytolytic activity of murine peritoneal macrophages, GTE-0-treated group showed significantly higher activity compared to the untreated group at an effector-to-target cell ratio of 20. The above results lead us to conclude that polysaccharides from leaves of green tea have a potent immuno-stimulating effect on murine peritoneal macrophage cells.

Key words: green tea, polysaccharide, macrophage, cytokine, complement

서 론

외래 항원에 대하여 인체를 방어하는 면역계는 크게 선천 면역(innate immunity)과 획득면역(adaptive immunity)으로 분류되고 있다. 선천면역은 항원에 비의존적이고 인체에 침입한 이물(non-self)에 대해 비특이적으로 빠르게 일어나는 반응이며, 피부나 점막과 같은 물리적 방어막 이외에도 보체계(complement system) 활성화의 부경로(alternative pathway)와 대식세포(macrophage), 자연 살해세포(NK cell) 등의 면역세포들이 관여한다고 보고되어 있다(1). 이 중에서 대식세포는 호중구와 함께 상피세포 장벽 이후의 생체방어에 있어 최초 대응세포로 계통 발생학적으로 모든 동

물류에서 관찰된다(2). 대식세포 방어 기전과 관련된 수용체는 미생물을 인식하고 살해하는 탐식 패턴 인식 수용체(endocytic pattern-recognition receptors) 및 면역계의 활성화를 조절하는 신호 패턴 인식 수용체(signaling pattern-recognition receptors)로 나눌 수 있다(3). 즉 탐식 패턴 인식 수용체에 인식된 외래 물질은 식세포(phagocytes)에 의하여 살해되고, 신호 패턴 인식 수용체에 인식된 물질들은 TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-12와 같은 다양한 cytokine들을 생산함으로써 선천면역 및 적응면역계에 항원 제시를 하는 작동 세포의 활성화에 관여한다(3). 이러한 면역반응은 항원제시세포(antigen presenting cell)로서의 기능도 수행하고 후천적 면역반응을 조절하는 T-lymphocyte와 반응하여(2) 이후의 면역반응에도 영향을 주게 된다. 더욱이 대식세포는 배아 발생(embryogenesis), 상처 치유, apoptotic cell의 제거, 혈세포 증식(hematopoiesis) 과정 동안 조직의 재형성에도 관여하는 것으로 알려져 있다(4,5).

Received 29 December 2014; Accepted 9 April 2015

Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon, Gyeonggi 443-760, Korea

E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr, Phone: +82-31-249-9655

녹차는 산차과(Theaceae)에 속하는 차나무(*Camellia sinensis* L.) 잎에서 생산된 차엽을 물에 우려내어 마시는 음료로 신라시대 사신 대령이 당나라에서 차 종자를 가져와 보급된 이후 커피, 코코아와 함께 카페인을 함유한 비알콜성 기호음료로서 아시아를 비롯한 160여 개 나라에서 널리 음용되어 왔다(6). 녹차에는 카테킨, 카페인, 아미노산, 섬유소, 펙틴 등과 엽록소 플라보놀 유도체, 안토시안 등의 식물 색소 그리고 지질, 수지류, 정유, 비타민 등 다양한 성분이 함유되어 있는데(7), 특히 caffeine이나 tea catechins(tannins) 등은 약리적 활성 효과가 크다는 연구 결과들이 발표되고 있다. 차엽 중 catechin류는 물에 가용되는 성분들 중 그 함유량이 비교적 많은 polyphenol 성분으로 (+)-catechin(C), (+)-gallocatechin(GC), (-)-epicatechin(EC), (-)-epigallocatechin(EGC)과 ester형인 (-)-epicatechin gallate(EGCg), (-)-epigallocatechin gallate(EGCG) 등 6 종류로 구성되어 있고, 이 가운데 EGCG가 주요 구성성분으로 항산화, 항동맥경화 및 암세포 성장억제 작용 활성이 높은 것으로 보고되고 있다(8). 하지만 녹차에는 주요 생리활성 물질로 알려진 catechin류 이외에도 세포벽 성분 중 하나인 펙틴(pectin)류 다당이 존재하며, 이는 혈당상승 억제(9), 항산화 활성(10), 식세포 활성(11)이 있다고 보고되어 있을 뿐만 아니라 펙틴의 구조적 특성으로 인해 인체 내에서 다이옥신 등의 유해물질 제거, 대장암 예방 효과, 전립선암 억제 효과, 항콜레스테롤 등의 작용이 기대되는 대표적 식이섬유소로 보고되어 있다(7). 그러나 녹차에 존재하는 펙틴류 다당에 관한 면역 활성화에 대한 보고는 거의 전무한 실정에 있다.

따라서 본 연구에서는 녹차 제품으로 가공하기 힘든 등의 품 녹차 성숙잎을 이용하여 pectinase 처리에 의해 homogalacturonan 부분을 분해하여 면역 활성이 우수한 다당체를 분리하고 이들의 항보체 활성 및 대식세포의 면역기능 활성 효과를 확인함으로써 녹차 다당의 고부가가치 기능성 소재로서의 이용방안을 모색하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용된 녹차 성숙잎은 2010년 7월 경상남도 하동군에서 수확한 녹차의 성숙잎을 하동군청으로부터 제공받아 실험에 사용하였다.

녹차 효소 처리 조다당의 분리

녹차 성숙잎으로부터 다당을 분리하기 위하여 두 가지 방법을 이용하였다. 단순 열수 추출물은 녹차 성숙잎 분말 100 g에 10배 부피의 증류수를 가하여 100°C에서 추출하였다. 이를 4배 부피의 95% ethanol을 가하고 침전물은 소량의 증류수에 용해하여 투석 및 동결건조를 거쳐 녹차 성숙잎 열수 추출 조다당 GTW-0(green tea hot water)을 얻었다. 이와 별도로 녹차 성숙잎 분말 100 g에 0.5% pectinase

(from *Aspergillus niger*; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 처리(pH 5.0, 50°C, 3일)하였고, 이를 6,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 잔사를 제거하고 여기에 4배(v/v) 부피의 95% ethanol을 가하여 24시간 교반하면서 다당을 침전시켰다. 이때 발생한 침전물은 7,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 침전물을 회수하고 이를 소량의 증류수에 용해시킨 후, dialysis tubing(MW cut-off 2,000)을 이용하여 2~3일간 투석을 행하고 이를 동결 건조하여 효소 처리 조다당 획득, GTE-0(green tea enzyme digestion)을 얻었다.

일반 분석 방법

시료의 중성당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(12)으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl법(13)으로, TBA-positive material의 함량은 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid(KDO)를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid법(14)으로, 단백질 함량은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Bradford법(15)을 실험실 여건에 맞게 변형하여 사용하였다.

구성당 분석은 다당 시료를 2 M trifluoro-acetic acid (TFA)로 121°C에서 1.5시간 가수분해하여 각각 alditol acetate 유도체(16)로 전환시킨 후 GC로 분석하였다. GC의 분석은 SP-2380 capillary column(0.2 µm film, 0.25 mm × 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°C→220°C(30°C/min), 220°C(12 min), 220°C→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.

항보체 활성 측정

보체계의 활성화(항보체 활성, anti-complementary activity)는 Mayer법(17)을 이용하여 시료에 의한 보체 활성화 후, 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 활성에 근거를 둔 complement fixation test로 측정하였다. 즉 정상인의 혈청과 2% gelatin, 3 mM Ca²⁺, 10 mM Mg²⁺이 함유된 GVB²⁺ 완충용액(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 및 시료를 혼합하여 1차 반응시킨 후, 양의 감작적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocytes, Biotest Co., Tokyo, Japan)를 넣어 2차 반응을 시킨 다음 4°C의 PBS(phosphate buffered saline)를 가하여 반응을 정지시켰다. 각 반응액을 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였으며 상등액의 흡광도를 412 nm에서 측정하였다. 항보체 활성은 총 보체 용혈 저지율(ITCH₅₀: inhibition of 50% total complement hemolysis)로 나타낸 후 양성대조군인 PSK의 활

성을 사용하여 보정 후 수치화하였다(18).

실험동물

생후 5~6주령의 웅성 BALB/c를 G-Bio(Seoul, Korea)에서 구입하여 3일간 적응을 거친 후 실험에 사용하였다. Mouse는 사육조에 5~10마리씩 넣어 온도 23±3°C, 습도 55~70%에서 사육하였으며 물과 사료는 자유 급식 형태로 유지하였다. 실험은 경기대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후 이의 규정에 따라 실시하였다(2011-01).

대식세포의 형태적 활성화도 측정

6주령의 웅성 BALB/c mouse의 복강에 5% thioglycolate(TG) 배지(Sigma-Aldrich Co.)를 2 mL 주입하고 72시간 동안 유도된 macrophage를 회수한 후 MEM 배지로 2~3회 세척하고, 세포수를 4×10⁵ cells/mL로 조정하여 slide glass 위에 seeding 하고 30분 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 비부착된 세포는 MEM 배지를 이용하여 세척하고 제거한 후, 100 µg/mL의 농도로 GTE-0 시료를 조제하여 가한 다음 48시간 배양하였다. Slide glass는 PBS로 세척 후 Bouin's solution(Sigma-Aldrich Co.)으로 5분 동안 고정시켜준 다음 Giemsa stain으로 2시간 동안 염색하였으며, acetone으로 탈수 후 광학현미경(Olympus BX40, Tokyo, Japan)으로 400배 시야 5곳에서 활성화된 macrophage를 계수하였다(19).

NO, ROS, H₂O₂ 생산능 측정

상기에 제시된 방법으로 세포수를 2×10⁵ cells/well로 조정하여 세포를 24시간 배양하고, macrophage에 의해 유도, 분비된 세포 배양액을 원심분리(900 rpm, 4°C, 5분) 후 회수하여 배양액 중 생산된 NO(nitric oxide), H₂O₂(hydrogen peroxide) 및 ROS(reactive oxygen species) 생산능을 확인하였다. 세포 배양액 내의 NO는 Griess reagent(Promega Co., Madison, WI, USA)를 이용, 제조사의 지침에 따라 측정하였다. 세포 내의 H₂O₂(20)는 Krebs-Ringer phosphate buffer(pH 7.4)에 30 µM scopoletin, 1 mM NaN₃, 1 unit/mL horse radish peroxidase, 5.5 mM glucose와 100 ng/mL phorbol myristic acetate(PMA)가 포함된 용액을 100 µL씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 동안 배양 후 365 nm와 450 nm에서 relative fluorescence unit(RFU)을 측정하였다. 세포 내의 ROS 분비능 측정은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA, Invitrogen, Eugene, OR, USA)가 활성 산소에 의해 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)을 형성하는 반응을 이용, 배양 후의 세포에 10 µM의 DCFH-DA를 첨가하여 2시간 동안 배양시킨 후 세포를 용해시켜 상등액의 형광값을 형광측정기(Victor-2, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA)를 이용해 excitation 450 nm, emission 530 nm에서 측정하였다.

대식세포 cytokine 생산자극 활성 측정

상기에 제시된 방법으로 세포를 24시간 배양하여 원심분리(900 rpm, 4°C, 5분) 한 후 세포 배양액을 회수하여 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, San Diego, CA, USA)을 이용, 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

대식세포 식작용 활성 측정

상기에 제시된 방법으로 세포수를 2×10⁵ cells/well로 조정하여 24시간 동안 세포를 배양한 후 *Escherichia coli* 와 fluorescein이 결합된 fluorescent particles(Invitrogen)을 effector cell과 target cell의 비율(E/T ratio)이 10, 20이 되도록 조정하여 100 µL씩 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 60분 동안 배양하였다. 이를 5번 PBS로 세척하고 lysis buffer를 100 µL씩 넣고 60분 후에 365 nm와 450 nm에서 RFU를 측정하였다.

활성화된 대식세포의 YAC-1 세포 치사 활성 측정

GTE-0에 의해 활성화된 macrophage를 얻기 위해 5% TG 2 mL를 복강 내 주입하여 24시간 동안 세포를 배양한 후, 100 µg/mL의 GTE-0 시료를 200 µL 투여하여 48시간 동안 활성화된 effector cell인 macrophage cell을 얻었다. Effector cell에 의한 세포독성 효과를 측정하기 위한 암세포(target cell)는 YAC-1을 사용하였다. 즉 flat-bottom 96-well microplate에 effector cell과 target cell의 비율(E/T ratio)이 10, 20이 되도록 조정하여 분주 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 18~24시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 culture plate를 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포 배양액 상등액을 100 µL 회수하였다. 이 상등액에 effector cell의 살해능에 의해 target cell로부터 유리되는 lactate dehydrogenase(LDH)를 LDH assay kit(Promega, Oxford, MI, USA)을 사용하여 측정하였다. Macrophage의 암세포 독성은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Lysis (\%)} = \frac{(\text{experimental from effector cell} - \text{average spontaneous release from target cell})}{(\text{maximum release from target cell} - \text{spontaneous release from target cell})} \times 100$$

통계처리

실험 결과는 SPSS 20.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계 처리하였으며 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 시료 간 및 처리 농도 간 유의성은 two-way ANOVA 실시한 다음 Duncan's multiple range test로 사후 검정을 실시하여 P<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

녹차 유래 조다당의 화학적 특성

식물체를 물로 추출할 경우 수용화되어 분리되는 다당류는 대부분 pectin류로 알려져 있다(21). 펙틴은 과거 D-galacturonic acid(GalA)가 α-1,4 결합으로 연결된 고분자 물질(α-D-1,4-polygalacturonan)로, 구성 GalA의 carboxyl기가 methylester화 되어 있거나 염 형태 혹은 free acid 형태를 가지고 있다고 알려져 왔으나 실제로 자연계에 존재하는 펙틴은 이보다 훨씬 복잡한 구조를 가지고 있다고 보고되고 있는데, 전체 분자의 많은 부분은 직쇄상의 homogalacturonan(HG)으로 구성(펙틴의 smooth region)되어 있지만 여기에 다양한 oligosaccharide가 고도로 분지(branched)된 rhamnogalacturonan류[rhamnogalacturonan(RG)-I 및 II]가 공유적으로 결합(펙틴의 hairy region을 구성)되어 있는 것으로 보고되고 있다(22). 이들의 구조는 RG-I의 경우 GalA와 rhamnose(Rha)로 구성된 [-4)-α-D-GalA-(1,2)-α-L-Rha-(1)n의 이당류가 반복되어 연결된 backbone(rhamnogalacturonan core)에 arabinan, galactan, arabinogalactan 및 oligosaccharide류가 Rha를 경유하여 고도로 분지된 구조를 가지고 있으며(23), RG-II(24,25)는 α-1,4 결합으로 연결된 homogalacturonan을 주쇄로 하고, 여기에 일반 다당류에서는 거의 관찰되지 않는 2-methylfucose(2-Me-Fuc), 2-methylxylose(2-Me-Xyl), apiose(Api), aceric acid(AceA), 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid(KDO) 및 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid(DHA)와 GalA, glucuronic acid(GlcA), rhamnose(Rha), arabinose(Ara) 등을 구성당으로 하는 oligosaccharide가 아주 복잡한 형태로 분지되어 존재하고 있으며 RG-I에 비해 크기가 작은 다당으로 알려져 있다. Pectin류에서 관찰되는 면역증진 활성을 포함한 대부분의 약리활성(26)은 HG main chain에서는 거의 보고된 바 없고, 주로 복잡한 구조의 RG-I과 RG-II의 미세구조의 차이에 기인한 것으로 알려지고 있다(27). 따라서 본 연구진은 높은 약리활성을 소유한 RG-I 및 RG-II 다당이 풍부한 획분을 선택적으로 조제하기 위해 pectinase 처리로 HG 부분을 제거하고 본 실험에 사용하였다.

GTE-0의 일반 화학특성을 살펴본 결과는 Table 1과 같다. GTE-0은 중성당 54.9%, 산성당 45.1%를 함유하고 있었다. 한편 GTE-0을 가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하고 구성당을 분석한 결과 12종의 구성당이 분석되었으며, glucose(14.2%), arabinose(12.2%), rhamnose(11.1%)가 높은 비율로 함유되어 있었고 자연계에서 거의 발견되지 않는 2-O-methyl-fucose, 2-O-methyl-xylose, apiose, aceric acid와 같은 특이당이 미량 검출되었다. 이러한 사실은 pectinase 효소를 처리함으로써 pectin 형태로 존재하는 다당에서 α-1,4 결합의 GalA 중합체인 HG 영역이 절단되어 제거되고 GTE-0에는 pectin에 공유적으로 결

Table 1. Chemical properties of crude polysaccharide isolated from the pectinase digests of tea leaves (GTE-0)

Chemical composition (%)	GTE-0
Neutral sugar	54.9
Uronic acid	45.1
Protein	-
KDO-liked materials ¹⁾	-
Component sugar composition ²⁾	(Mole%) ³⁾
2-Methyl fucose	2.1
Rhamnose	11.1
Fucose	1.5
2-Methyl xylose	1.7
Arabinose	12.2
Xylose	0.6
Apiose	0.7
Aceric acid	0.9
Mannose	2.5
Galactose	7.3
Glucose	14.2
Galacturonic acid	45.1

¹⁾KDO means 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid.
²⁾Monosaccharides were analyzed using alditol acetates.
³⁾Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.

합되어 있다고 보고되고 있는 hetero polysaccharide류인 RG-I 및 II 다당이 분리되어 이들의 혼합물 형태로 존재함을 추정하게 하였다.

녹차 유래 조다당의 보체계 활성화능

보체계(complement)는 C1~C9의 활성화 단백질과 조절인자를 포함하여 약 20여 종의 혈중 순환 단백질들로 구성된 효소반응계로 적혈구, 백혈구, 망상내피계 세포나 다른 여러 조직의 세포들의 보체 수용체를 통해 보체계 단백질과 이러한 면역 세포 간의 일련의 정보 전달이 가능하며, 외부감염 병원체 등 침입인자를 항체의 존재 또는 비존재 하에 비특이적으로 제거하는 생체의 주요 방어기구이다(28). 보체계가 활성화되면 연속적인 cascade 반응에 의하여 보체 단백질이 활성화 분자로 분해되고 이들이 침입인자의 표면에 부착되어 최종적으로 MAC(membrane attack complex)를 형성하여 감염 병원체 등을 제거하는 것으로 알려져 있다. 또한 보체 활성화 과정 중 생성되는 여러 보체 분해산물은 각종 생리반응을 매개한다고 알려져 있으며, 특히 macrophage와 lymphocyte의 활성화, 면역증강 등과 밀접한 상관관계가 있다고 보고되고 있다(29).

GTE-0의 활성화 여부를 측정하기 위해 GTW-0과 비교, 항보체 활성을 측정하였다. 양성대조군으로는 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 면역 활성화 다당체인 PSK(polysaccharide-K)를 사용하였으며(30), 음성대조군으로는 시료를 첨가하지 않은 증류수를 이용하였다. 음성대조군에서의 활성화 정도를 ITCH₅₀ 0%로 하여 GTE-0과 GTW-0의 활성화능을 확인한 결과(Fig. 1), GTE-0 1,000 mg/mL의 고농도에서 동일 농도를 가한 양성대조군에 준하는 56%의

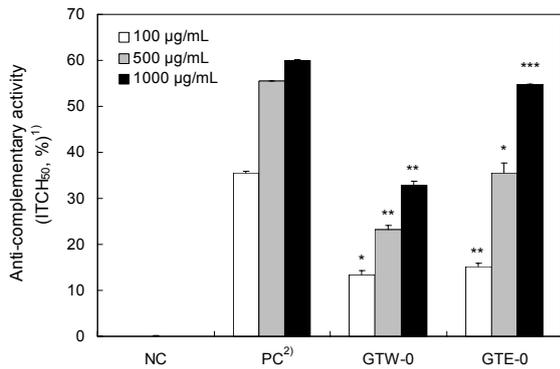


Fig. 1. Anti-complementary activity of the two crude polysaccharides (GTW-0 and GTE-0) isolated from the mature tea leaves of *Camellia sinensis*. ¹⁾Anti-complementary activity was presented as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. ²⁾Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as a positive control (PC) and distilled water as negative control (NC). The data were expressed as mean±SD of three separate experiments. Values indicate significant (Student's t-test, **P*<0.05 ***P*<0.01, ****P*<0.001) differences between the NC value and the corresponding GTE-0 value.

우수한 항보체 활성을 보였으며, GTW-0보다 GTE-0이 훨씬 높은 활성을 가지고 있었다. 또한 시료의 농도에 차이를 두어 실험한 결과 농도 의존적인 활성임을 알 수 있었다. 이 결과로부터 GTE-0이 보체를 활성화시킬 수 있으며, 보체의 활성화산물에 의해 생체 내 대식세포 등의 면역세포를 자극할 가능성이 예견되었으므로 이후 실험에서는 GTE-0만을 이용하여 실험을 진행하였다.

녹차 유래 조다당에 의한 대식세포의 형태적 활성화

대식세포는 체내 면역방어 시스템에서 중요한 역할을 하는 세포로 대식세포가 활성화되면 중요한 protease나 증식

인자를 분비하게 되고 상처 수복과 같은 역할들이 조직에서 일어나게 된다(31). 또한 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine을 분비하여 면역현상을 조절하고 항원제시와 림프구의 비특이적인 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타낸다(32). 천연물 중 다당은 macrophage를 활성화하여 T세포와 B세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성화, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF-α와 같은 cytokine을 생산한다고 알려져 있다(33).

천연물 유래 다당에 의한 대식세포 활성화는 대식세포의 특이 수용체(specific receptor)에 다당 분자가 인식(recognition)되면서 매개된다고 생각되고 있다. 이들 수용체는 pattern recognition 분자로 알려진 세포막 결합 단백질로 면역반응 초기에 외부에서 들어온 ligand를 인식할 수 있는 분자이다(34). 특히 대식세포는 toll-like receptor(TLR), CD14, complement receptor 3(CR3), scavenger receptor, dectin-1 및 mannose receptor를 경유하여 식물 기원의 다당 또는 당단백질과 결합이 가능하다(35-37). 이들 수용체의 활성화는 일련의 연속된 세포 내 신호전달을 유도하고 결과적으로 핵 내에서 iNOS(inducible nitric oxide synthase) 및 ROS의 생산과 관련된 특정 유전자의 전사의 활성화 및 다양한 cytokine의 생산으로 이어지며, 또한 이들 다양한 활성 당백질의 유도는 세포의 탐식능 증가 및 증식을 유도하기도 한다.

녹차 성숙잎 유래 다당에 의한 macrophage 활성화를 현미경 검정하여 형태적으로 관찰한 다음 활성화된 macrophage(Fig. 2A)를 계수하고 결과를 산출하였다. 일반적으로 대식세포는 시료에 의해 활성화할 경우 세포질의 부피가 증가하고 상대적으로 밝고 큰 핵이 관찰되며, 세포 표면에 위족(pseudo-leg)의 돌출이 많아지고 이들이 glass 표면

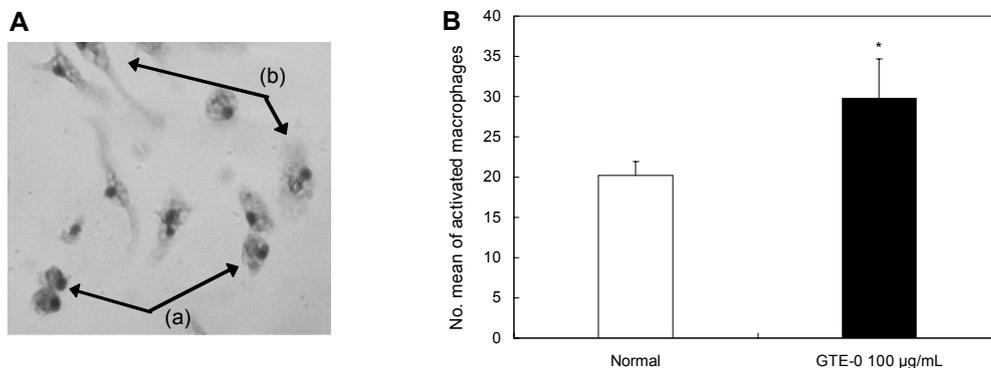


Fig. 2. Effect of GTE-0 from the pectinase-digests of mature tea leaves on activation of murine peritoneal macrophages (B) *in vitro* and photograph images (A) of resident macrophages (a) and the macrophages (b) activated by GTE-0. Peritoneal macrophages were harvested from thioglycollate (TG)-treated 6-week-old BALB/c mice. The cells (4×10^5 /well) were plated in slide glass and incubated for 30 min in 5% humidified CO₂ incubator. After incubating with a dose of 100 µg/mL GTE-0 for 48 h, slide glass was fixed by Bouin's solution for 5 min and dyed by Giemsa stain for 2 h. The data were expressed as mean±SD of three separate experiments. The value indicates a significant (Student's t-test, **P*<0.05) difference between the Normal value and the corresponding GTE-0 value.

위에서 잘 펼쳐지는(spreading) 형태적 특징을 보인다고 알려져 있다(19). 녹차 유래 효소 처리 다당을 100 µg/mL 농도로 처리하여 검정한 결과(Fig. 2B) 무처리 대조군에 비해 약 25% 이상 활성화 대식세포 수가 증가한 결과를 보여 주었는데, 이는 macrophage 표면에 존재하는 특정 수용체에 다당 분자가 인식되면서 활성화되었다고 생각된다. 따라서 녹차 유래 다당의 대식세포 활성화를 확인하고 이후 대식세포 관련 면역 활성화 실험을 진행하였다.

녹차 유래 조다당의 macrophage 자극에 의한 NO, ROS, H₂O₂ 생산 활성화

NO는 반응성이 높은 자유 라디칼 중의 하나로 산소나 superoxide에 의해 N₂O₃, NO₂, nitrite 및 nitrate 등의 안정한 nitrogen oxide로 전환된다(31). NO는 NO 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 세포 내의 L-arginine으로부터 만들어지며, 체내 항상성 유지를 위한 endothelial NOS(eNOS)와 neuronal NOS(nNOS), 염증성 인자에 의해 생산되는 inducible NOS(iNOS)로 분류된다(38). 특히 iNOS에 의해 생산되는 NO는 외부로부터 유입된 병원체로부터 인체를 방어하는 데 중요한 역할을 하며, 순환계 질환, 염증 질환 및 암과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다(39).

ROS는 세포 내에서 생산되는 물질로 인체 내로 바이러스나 세균 등의 각종 병원체 및 외부물질이 침입하면 다양한 면역 염증반응을 유발한다. 그중 대식세포의 산화분출(oxidative burst)은 병원체를 제거하는 데 효과적인 방법으로 대식세포의 ROS 생산 증가는 이러한 외부물질을 제거하기 위한 중요 기전으로 설명되고 있다(40). 또한 ROS는 인체 내부에서 발생하는 세포 노폐물 및 비정상 세포를 제거하는 역할과 T 세포와 관련된 자가 면역질환을 방어한다고 보고되고 있다(41). ROS와 더불어 대식세포가 활성화되면 분비되는 대표적인 화학물질인 H₂O₂는 세포의 산화적 stress를 유발하며, 염증반응에서 neutrophils 등의 세포가 ROS를 많이 생성하여 immunologic reaction을 유발한다고 보고되었다(42). 최근 연구에서는 macrophage의 hydrogen per-

oxide 생성 증가가 T-cell과 관련된 arthritis를 억제함으로써 자가면역 질환 발생을 저해하는 작용이 있다고 보고되고 있다(43).

GTE-0을 다양한 농도로 처리하여 macrophage 세포의 NO 생산능을 측정한 결과(Table 2) 모든 농도에서 대조군보다 우수한 생산능을 나타내었으며, 특히 1,000 mg/mL의 고농도보다 100 mg/mL의 저농도에서 대조군보다 NO 생산이 약 10배 정도 우수하였다. ROS와 H₂O₂의 생산능은 모두 GTE-0 1,000 mg/mL의 고농도에서 대식세포로부터 ROS와 H₂O₂ 생산을 농도 의존적으로 증가시키는 것이 확인되었다(Table 2). 이상의 결과로부터 판단할 때 GTE-0은 대식세포로부터 NO, ROS 및 H₂O₂의 생산을 유도하여 면역기능 활성화에 기여할 가능성이 있음이 추정되었다.

녹차 유래 조다당의 macrophage 자극에 의한 cytokine 생산 활성화

IL-6은 감염과 조직 손상에 따른 면역 초기반응에서 생산되는 주요한 반응 매개물질로 IL-1, TNF-α 등에 의해 IL-6의 유전자 발현이 자극되어 단핵세포, 대식세포, 간질세포 등에 의해 생산되고 급성 염증 반응 촉진 또는 억제하는 것으로 알려졌다(44). IL-12는 암세포에 치사작용을 하는 NK cell 활성화에 직접 관여하여 항암 활성화 유도에 필수적인 cytokine으로 인정되고 있다(45). 또한 TNF-α는 림프구에 의해 생산되는 염증 매개성 cytokine으로 생체 면역반응에서 단독적 혹은 IL-1 등과 같은 cytokine과 복합적으로 작용하여 종양의 혈관을 손상시켜 결과적으로 종양 괴사를 유발하거나 미생물에 의한 감염 저항성을 향상시킨다고 보고되어 있다(45).

GTE-0의 자극에 의한 macrophage의 cytokine 생산을 *in vitro*에서 측정한 결과(Fig. 3.) IL-6, IL-12 및 TNF-α의 생산을 촉진하였다. IL-6(Fig. 3A)과 IL-12(Fig. 3B)의 경우 모두 농도 의존적인 생산량의 증가가 관찰되었고, 특히 100 mg/mL 이상의 농도에서의 활성화는 양성대조군인 LPS에 상당하는 높은 활성화였다. 또한 TNF-α(Fig. 3C)의 경우 농도 의존적인 생산량의 증가가 관찰되었지만, 100 mg/mL

Table 2. Effect of GTE-0 on production of nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS), and hydrogen peroxide (H₂O₂) by murine peritoneal macrophage cells

Sample ¹⁾	Concentration (µg/mL)	NO ²⁾ (µM)	ROS ³⁾ (RFU)	H ₂ O ₂ ⁴⁾ (RFU)
NC		2.0±0.1 ⁵⁾	562.0±2.0	112.7±3.1
PC	10	19.1±0.2	688.3±7.8	129.5±4.8
GTE-0	1	6.1±0.9*	614.7±7.6**	111.7±5.5
	10	11.2±0.0***	621.3±6.4***	112.0±10.4
	100	19.9±0.7***	635.3±11.7**	142.0±14.0*
	1,000	16.6±0.5***	827.3±3.1***	200.7±5.8***

¹⁾NC: negative control (media), PC: positive control (lipopolysaccharide).
²⁾The level of NO in the supernatant was determined by Griess reagent.
³⁾ROS was measured by 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate in the intracellular ROS.
⁴⁾The level of H₂O₂ was determined by PMA methods as described in 'Materials and Methods'.
⁵⁾The data were expressed as mean±SD of three separate experiments. Values are significant (Student's t-test, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001) differences between the Normal value and the corresponding GTE-0 value.

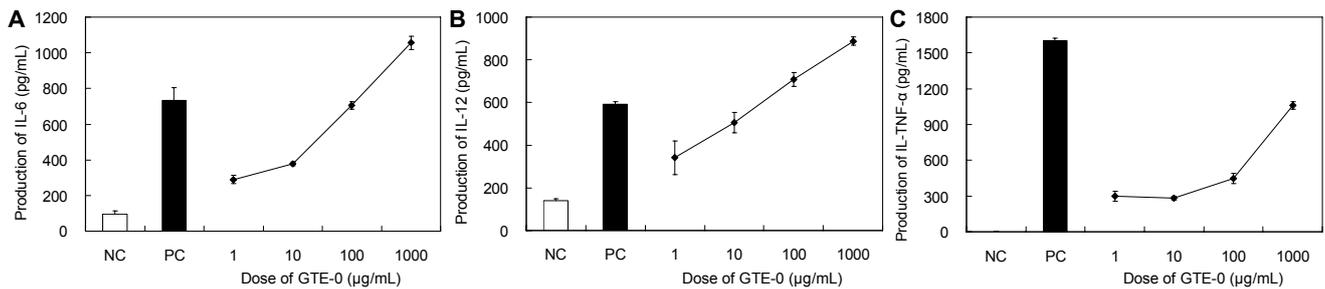


Fig. 3. Effect of GTE-0 from the pectinase-digests of mature tea leaves on cytokine production such as IL-6 (A), IL-12 (B), and TNF- α (C) by murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages (2×10^5 /well) were treated with various concentrations of GTE-0 in 96-well plates for 24 h. The level of each cytokine in the supernatant on the cultures was determined by ELISA kits. LPS, lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O127:B8 was used as the positive control (PC) and media was used as the negative control (NC). The data were expressed as mean \pm SD of three separate experiments.

의 농도 이상에서는 GTE-0의 생산량이 급격히 증가됨을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 GTE-0에 의해 macrophage 생산을 자극한 결과 염증 부위에 면역세포의 귀소와 직접 관련이 있는 염증성 cytokine으로 분류되는 IL-6과 TNF- α 의 생산 및 세포성 면역능의 활성화와 직접 관련이 있는 IL-12를 유의하게 생산하는 활성이 있음이 확인되었으므로 GTE-0은 생체방어에 작용하는 macrophage 수용체에 결합한 다음 세포 내 신호전달을 유도하여 핵 내에서 cytokine을 유도시키는 기능이 있다고 판단되었다.

녹차 유래 조다당의 식작용 촉진 활성

식세포 작용(phagocytosis)은 외부로부터 세균과 같은 미생물 침입 시 숙주를 방어하는 주요 수단 중에 하나이다 (46). Phagocytosis는 면역학적 관점에서 뿐만 아니라 상처 치유 과정에서도 중요한 역할을 수행하며, 약리적 기능을 가진 천연물들이 이 과정에 영향을 미친다고 보고되어 있다 (47). 또한 대식세포의 활성을 측정하는 데 유용한 도구로

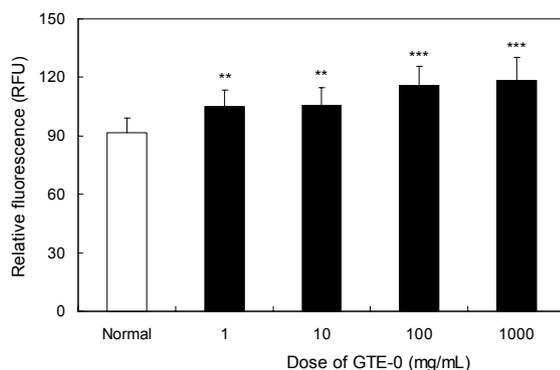


Fig. 4. Effect of GTE-0 from the pectinase-digests of mature tea leaves on phagocytosis by murine peritoneal macrophages *in vitro*. The culture supernatants (2×10^5 /well) and fluorescent *E. coli* particle were incubated for 1 h and then added lysis buffer. The data were expressed as mean \pm SD of three separate experiments. Values are significant (Student's t-test, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) differences between the Normal value and the corresponding GTE-0 value.

작용한다고 알려져 있다. GTE-0에 의해 활성화된 대식세포의 식세포 작용 활성을 평가한 결과(Fig. 4) GTE-0 처리군은 무처리군보다 농도 의존적으로 약간 높은 활성을 보였으며, 1,000 μ g/mL에서 최대 활성을 보였다.

녹차 유래 조다당에 의해 활성화된 대식세포의 tumor cell에 대한 치사 활성

종양을 제거하는 데 있어 macrophage는 매우 중요한 역할을 하고 있고, 특히 활성화된 macrophage는 암세포의 증식 및 전이를 억제시키거나 파괴할 수 있다고 보고되고 있다 (48). 또한 macrophage는 천연물이나 세균성 산물 등과 같이 다양한 자극이나 cytokine들에 의해 tumoricidal activity가 활성화되는 것으로 알려져 있다(49). 종양세포주에 대한 대식세포의 치사 효과를 확인하기 위하여 BALB/c mouse를 이용, 복강 macrophage를 유도하고 시료를 복강 내로 투여하여 활성화시킨 후 이를 분리하여 tumor cell에

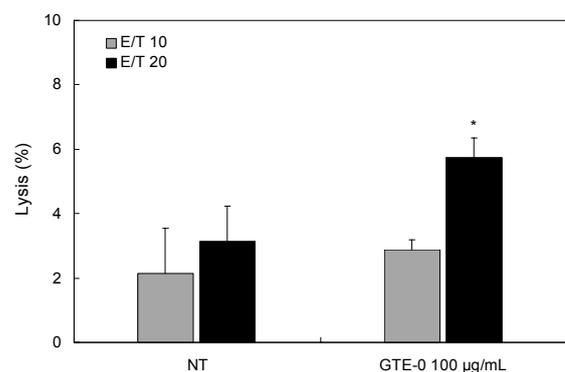


Fig. 5. Effect of GTE-0 from the pectinase-digests of mature tea leaves on the cytolytic activity of murine peritoneal macrophages *ex vivo*. Macrophage-mediated cytotoxicity was determined by using YAC-1 cells (effector cell (macrophage) and target cell (YAC-1) of ratio, E/T ratio). Following incubation, the culture supernatants were assayed with lactate dehydrogenase (LDH) content. The data were expressed as mean \pm SD of three separate experiments. The value is a significant (Student's t-test, * $P < 0.05$) difference between the not treated group (NT) value and the corresponding GTE-0 value.

대한 치사 활성을 *ex vivo*로 측정하였다. 그 결과 Fig. 5에서 나타난 바와 같이 시료를 처리하지 않은 정상군의 macrophage에 비해 100 µg/mouse의 GTE-0을 복강 내 투여하여 얻은 활성화된 macrophage는 YAC-1 종양세포주에 대해 약 3배 정도의 치사 활성을 보였으며, 그 활성이 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 GTE-0에 의해 대식세포가 직접적으로 활성화되면 IL-1β, TNF-α, IL-12 등과 같은 cytokine이 분비되어 암세포의 증식이나 전이를 억제하거나 암세포를 살해하는 활성을 증진시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

요 약

녹차 성숙잎으로부터 새로운 면역 활성 다당 소재를 개발할 목적으로 녹차잎을 pectinase로 처리하여 조다당 GTE-0을 분리하고 이들의 면역증진 활성과 화학적 특성에 대해 조사하였다. GTE-0은 중성당 54.9%, 산성당 45.1%로 이루어져 있었으며, 구성당 분석 결과 주로 glucose(14.2%), arabinose(12.2%), rhamnose(11.1%) 및 galactose(7.3%)로 구성되어 있었다. 한편 GTE-0은 비특이적 면역계에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 보체계에 대하여 양성대조군 PSK에 준하는 우수한 활성이 농도 의존적으로 나타났다. 또한 GTE-0을 처리하고 검경 시 형태적으로 구분이 가능한 활성화된 대식세포의 숫자가 증가되는 경향을 보였다. 대식세포의 NO, ROS 및 H₂O₂ 생산에 미치는 GTE-0의 효과를 검토한 결과 ROS와 H₂O₂는 모두 농도 의존적으로 생산량을 증가시키는 우수한 활성을 나타낸 반면, NO의 생산능은 1,000 mg/mL의 고농도에서보다 오히려 100 mg/mL의 저농도에서 더 우수한 활성을 나타내었다. 또한 GTE-0으로 자극한 대식세포는 무처리 대조군에 비해 IL-6, IL-12 및 TNF-α와 같은 다양한 cytokine들의 생산이 농도 의존적으로 증가되는 경향을 보였다. 대식세포의 식작용 활성을 측정 한 결과 무처리 대조군에 비해 GTE-0 100 mg/mL 농도 이상 처리하였을 때 우수한 활성을 나타내었다. 또한 활성화된 대식세포의 YAC-1 종양세포주에 대한 치사 활성을 *ex vivo*로 측정 한 결과 100 mg/mL의 농도에서 무처리군 대비 유의적으로 높은 치사 활성을 보였다. 이상의 결과로부터 녹차 성숙잎으로부터 분리된 효소 처리 조다당 GTE-0은 강력한 면역 활성 증진 효과를 갖고 있음을 결론지을 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 식품기술개발사업에 의해 수행된 결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Hoebe K, Janssen E, Beutler B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 5: 971-974.
- Birk RW, Gratchev A, Hakiy N, Politz O, Schledzewski K, Guillot P, Orfanos CE, Goerdt S. 2001. Alternative activation of antigen-presenting cells: concepts and clinical relevance. *Hautarzt* 52: 193-200.
- Booth JS, Nichani AK, Benjamin P, Dar A, Krieg AM, Babiuk LA, Mutwiri GK. 2007. Innate immune responses induced by classes of CpG oligodeoxynucleotides in ovine lymph node and blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 115: 24-34.
- Klump AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. 2002. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 44: 143-161.
- Lingen MW. 2001. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 125: 67-71.
- Park YH, Won EK, Son DJ. 2002. Effect of pH on the stability of green tea catechins. *J Fd Hyg Safety* 17: 117-123.
- Nakabayashi T, Ina K, Sakata K. 1994. *Chemistry and function of green, black and oolong tea*. Kogaku Press, Kawasaki, Japan. p 20-51.
- Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. 1997. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89: 1881-1886.
- Kim SH, Lee MH, Jeong YJ. 2014. Current trends and development substitute tea and plan in the Korean green tea industry. *Food Industry and Nutrition* 19(1): 20-25.
- Chen H, Zhang M, Xie B. 2005. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. *Food Chem* 90: 17-21.
- Monobe M, Ema K, Kato F, Maeda-Yamamoto M. 2008. Immunostimulating activity of a crude polysaccharide derived from green tea (*Camellia sinensis*) extract. *J Agric Food Chem* 56: 1423-1427.
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54: 484-489.
- 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.
- 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.
- 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*. Thomas Publisher, Springfield, IL, USA. p 133-240.
- 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.
- Iacomini M, Serrato RV, Sasaki GL, Lopes L, Buchi DF, Gorin PA. 2005. Isolation and partial characterization of a

- pectic polysaccharide from the fruit pulp of *Spondias cytherea* and its effect on peritoneal macrophage activation. *Fitoterapia* 76: 676-683.
20. De la Harpe J, Nathan CF. 1985. A semi-automated microassay for H₂O₂ release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J Immunol Methods* 78: 323-336.
 21. Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-967.
 22. O'Neill M, Albersheim P, Darvill A. 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In *Methods in Plant Biochemistry*. Carbohydrates Academic, London, UK. p 415-441.
 23. Engelsens SB, Cros S, Mackie W, Pérez S. 1996. A molecular builder for carbohydrates: application to polysaccharides and complex carbohydrates. *Biopolymers* 39: 417-433.
 24. Ishii T, Matsunaga T. 2001. Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry* 57: 969-974.
 25. Pérez S, Rodríguez-Carvajal MA, Doco T. 2003. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* 85: 109-121.
 26. Srivastava R, Kulshreshtha DK. 1989. Bioactive polysaccharides from plant. *Phytochemistry* 28: 2877-2883.
 27. Yamada H, Kiyohara H. 1989. Bioactive polysaccharides from Chinese herbal medicines. *Chinese Med* 3: 104-124.
 28. Holers VM. 2003. The complement system as a therapeutic target in autoimmunity. *Clin Immunol* 107: 140-151.
 29. Whaley K. 1986. The complement system. In *Complement in Health and Disease*. Whaley K, ed. MTP Press, Lancaster, PA, USA. p 1-35.
 30. Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G, Kobayashi H, Nomoto K, Orita K. 1984. Krestin (PSK). *Cancer Treat Rev* 11: 131-155.
 31. Wynn TA, Freund YR, Paulnock DM. 1992. TNF-alpha differentially regulates Ia antigen expression and macrophage tumoricidal activity in two murine macrophage cell lines. *Cell Immunol* 140: 184-196.
 32. Keller R, Keist R, Wechsler A, Leist TP, van der Meide PH. 1990. Mechanisms of macrophage-mediated tumor cell killing: a comparative analysis of the roles of reactive nitrogen intermediates and tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 46: 682-686.
 33. 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.
 34. Gordon S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111: 927-930.
 35. Rice PJ, Kelley JL, Kogan G, Ensley HE, Kalbfleisch JH, Browder IW, Williams DL. 2002. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1→3)-beta-D-glucans. *J Leukoc Biol* 72: 140-146.
 36. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SY. 2002. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 169: 3876-3882.
 37. Shao BM, Xu W, Dai H, Tu P, Li Z, Gao XM. 2004. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 1103-1111.
 38. Stuehr DJ. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1411: 217-230.
 39. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases *Clin Exp Immunol* 113: 147-156.
 40. Guinázú N, Carrera-Silva EA, Becerra MC, Pellegrini A, Albesa I, Gea S. 2010. Induction of NADPH oxidase activity and reactive oxygen species production by a single *Trypanosoma cruzi* antigen. *Int J Parasitol* 40: 1531-1538.
 41. Gelderman KA, Hultqvist M, Olsson LM, Bauer K, Pizzolla A, Olofsson P, Holmdahl R. 2007. Rheumatoid arthritis: the role of reactive oxygen species in disease development and therapeutic strategies. *Antioxid Redox Signal* 9: 1541-1567.
 42. Hultqvist M, Bäcklund J, Bauer K, Gelderman KA, Holmdahl R. 2007. Lack of reactive oxygen species breaks T cell tolerance to collagen type II and allows development of arthritis in mice. *J Immunol* 179: 1431-1437.
 43. Hultqvist M, Olofsson P, Holmberg J, Bäckström BT, Tordsson J, Holmdahl R. 2004. Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the Ncf1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12646-12651.
 44. Hamilton TA, Adams DO. 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol Today* 8: 151-158.
 45. Lasek W, Feleszko W, Golab J, Stokłosa T, Marczak M, Dabrowska A, Malejczyk M, Jakóbsiak M. 1997. Antitumor effects of the combination immunotherapy with interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha in mice. *Cancer Immunol Immunother* 45: 100-108.
 46. Lee JN, Lee DY, Ji IH, Kim GE, Kim HN, Sohn J, Kim S, Kim CW. 2001. Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *BioSci Biotechnol Biochem* 65: 837-841.
 47. Wan CP, Park CS, Lau BH. 1993. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J Immunol Methods* 162: 1-7.
 48. Schantz SP, Brown BW, Lira E, Taylor DL, Beddingfield N. 1987. Evidence for the role of natural immunity in the control of metastatic spread of head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 25: 141-148.
 49. Saiki I, Saito S, Fujita C, Ishida H, Iida J, Murata J, Hasegawa A, Azuma I. 1988. Induction of tumoricidal macrophages and production of cytokines by synthetic muramyl dipeptide analogues. *Vaccine* 6: 238-244.