

브로콜리 새싹 용매 추출물의 항산화 및 면역조절 활성

고종호 · 김 훈^{*,**} · 황종현^{***} · 유광원^{***}

한국폴리텍대학 바이오캠퍼스 바이오식품분석학과 교수, ^{*}경희대학교 피부생명공학센터 연구교수,
^{**}고려대학교 생물신소재연구소 연구원, ^{***}한국교통대학교 식품영양학과 교수

Anti-oxidative and Immunomodulating Activities of Solvent Extracts from Broccoli (*Brassica oleracea*) Sprouts

Jong-Ho Koh, Hoon Kim^{*,**}, Jong-Hyun Hwang^{***} and Kwang-Won Yu^{***}

^{*}Professor, Dept. of Bio Food Analysis, Korea Bio-Polytechnic University, Chungnam 32943, Korea

^{**}Research Professor, Skin Biotechnology Center, Kyung Hee University, Suwon 16229, Korea

^{***}Researcher, Institute of Biomaterials, Korea University, Seoul 02841, Korea

^{***}Professor, Dept. of Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Chungbuk 27909, Korea

Abstract

In order to examine the functionality of broccoli sprout (*Brassica oleracea*, BS), solvent extracts were prepared and their anti-oxidative and immunomodulating activities were compared with those of broccoli (B). EtOH extracts (E) were potently higher than hot-water extracts (HW) in the antioxidant contents and radical scavenging activity. In particular, the total polyphenolic contents in addition to ABTS and DPPH radical scavenging activity were significantly higher in EtOH extract of broccoli sprout (BS-E; 9.15 mg GAE/g, 4.52 mg AEAC/g, and 1.14 mg AEAC/g) compared with that of broccoli (B-E; 7.83 mg GAE/g, 3.63 mg AEAC/g, and 0.97 mg/AEAC/g). Whereas, total flavonoid content was significantly higher in B-E (1.60 mg QE/g) than BS-E (1.43 mg QE/g). Anti-inflammatory activity was investigated using LPS-induced cell line model at a concentration of 10~100 µg/mL, in which all solvent extracts of both broccoli sprouts and broccoli were not toxic to RAW 264.7 cell lines. In anti-inflammatory activity of broccoli sprouts, EtOH extracts also showed significantly more potent activity than hot-water extracts in all sample concentrations tested. In addition, BS-E (100 µg/mL) inhibited nitric oxide (NO) and IL-6 production to 60.9% and 68.9% compared with the LPS inflammation group (without extracts), whereas B-E inhibited 49.6% and 54.9%. On the other hand, in immunostimulating activity by splenocytes and macrophages, hot-water extract showed significantly higher activity than EtOH extract. Especially, BS-HW stimulated the splenocyte proliferation (1.2-fold against saline group) and IFN-γ production (264.39 pg/mL) at 100 µg/mL, and the production of IL-6 (1.33-fold), IL-12 (1.09-fold) and TNF-α (1.49-fold) from macrophages was also significantly enhanced over broccoli. In conclusion, broccoli sprouts showed more potent anti-oxidative, anti-inflammatory and immunostimulating activity than broccoli, suggesting the possibility of using broccoli sprouts as functional food materials.

Key words: broccoli sprout, solvent extract, anti-oxidation, anti-inflammation, immunostimulation

서 론

채소 위주의 식단이 거의 모든 종류의 암을 20~50% 가량

예방하는 것으로 보고되면서 질병예방을 위해 채소를 많이 섭취할 것을 권고하고 있는데, 특히 브로콜리, 양배추, 콜리플라워 등의 십자화과 채소는 지방성분이 거의 없고, 열량이

[†] Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Dept. of Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Chungbuk 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

낮으며, 비타민, 무기질, 섬유질이 풍부해 암을 예방하는 것으로 알려져 있다(Steinmetz & Potter 1996). 이와 함께 최근에는 발아채소(seed sprout)의 기능성에 대한 관심이 증가하면서 발아채소류에 대한 소비량이 증가하고, 다양하게 이용되고 있다는 점에서 채소류의 새싹에 대한 식품소재로서의 폭넓은 활용 가능성도 보여주고 있다. 일반적으로 발아채소는 씨앗에서 싹이 나온 후 잎이 생기는 싹이 발아한지 1주일 남짓 된 어린잎의 채소를 말하는데 새싹채소로도 불린다. 적당한 수분과 온도를 맞추어 주면 씨앗에서 싹이 트면서 식물은 곰팡이, 박테리아 등으로부터 자신을 방어하기 위한 생리활성 물질을 생산하게 되어 어린 떡잎일 때 생리활성 물질의 생성량이 최대가 되며, 완전히 자란 식물보다 수배에서 수십 배 함유되어 있다고 알려져 있다(Sattar 등 1995; El-Adawy TA 2002). 발아채소의 생리활성 효능 검증에 관한 연구로는 무순 싹의 당뇨유발 실험동물로부터 고혈당 완화(Taniguchi 등 2006), 발아생식 섭취 후 체중과 피하지방 두께 감소와 혈당 및 혈청지질 개선(Seo 등 2001)과 함께 Lee 등(2007)의 고지방식이 급여 흰쥐에서 새싹채소 분말 급여로 지질대사 개선효과와 항비만 효과 등이 보고되었다.

건강야채로서 많은 관심을 받으며 소비가 급증하고 있는 브로콜리(*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck)는 ascorbic acid, β -carotene, rutin, selenium, glutathione, quercetin 등의 항산화 성분을 다량 함유하고 있어 항동맥경화 및 해독효소의 유도효과가 큰 것으로 알려져 있다(Lee & Park 2005; Kwon 등 2008; Ravikumar C 2015). 또한, sulforaphane과 indole-3-carbinol, glucaric acid 및 isothiocyanates 등의 항암효과(Sok 등 2003; Dinkova-Kostova 등 2006; Herr & Buchler 2010), *in vitro*에서의 콜레스테롤 저하효과(Kahlon 등 2007) 및 브로콜리와 양배추 혼합 음료에 대한 인체의 LDL-콜레스테롤 저하효과(Takai 등 2003)도 보고되었다. 그러나 브로콜리와 달리 sulforaphane 함량이 브로콜리보다 더 많이 함유되어 있는 브로콜리 새싹에 대한 다양한 생리활성의 체계적인 보고는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 이미 알려진 sulforaphane의 항암효과 이외 브로콜리 새싹의 항산화 활성과 함께 면역조절 효과를 검토하기 위하여 대식세포주를 이용한 항염증 및 비장세포와 대식세포 활성을 평가하고자 하였다. 이를 위해 브로콜리 새싹은 주정 및 열수추출물로 조제되었으며, 브로콜리 용매 추출물과 생리활성을 비교함으로써 건강기능성 식품 소재로의 적용가능성을 타진하기 위한 기초 자료로 활용하고, 브로콜리 새싹의 식품분야에서의 이용성을 증대시키는데 기여하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료 및 방법

본 실험에 사용된 브로콜리 새싹은 2017년 충북에서 동일 기간(1주일) 재배된 출시 직전의 원료를 입수하였으며, 브로콜리는 대형마트(Chungbuk, Korea)에서 출하일자가 같은 제품을 구입한 후 동결건조 하였다. 세포 독성 및 증식활성에 사용된 EZ-cytox는 DoGenBio Co., Ltd.(Seoul, Korea)에서 동물세포 배양 및 사이토카인 측정에 사용된 RPMI-1640 및 DMEM 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin과 streptomycin은 GenDepot사(Katy, TX, USA)에서 구입하였다. 항염증 활성 및 면역활성 실험의 유용성을 평가하기 위해 사용된 endotoxin은 *Escherichia coli* O127:B8 유래 lipopolysaccharide (LPS)를 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 브로콜리 새싹 용매추출물의 제조

Grinder(Bazzatra, Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 일정크기로 분쇄한 동결건조한 브로콜리 새싹 마쇄물을 환류 플라스크에 넣고 95% 주정을 5배(w/v) 첨가한 후 환류관에 연결하여 2시간 동안 처리(50~60°C, 5회)하고, 여과액을 모아 농축한 후 원심분리(9,000×g, 5°C, 30 min)로 얻은 상등액을 동결건조하여 주정추출물(BS-E)을 조제하였다. 또한, 마쇄한 브로콜리 새싹에 20배(w/v)의 증류수를 첨가하고, decoction 방법으로 처리(90~95°C, 3회)한 후 여과액을 모아 농축 및 원심분리하고 상등액을 열수추출물(BS-HW)로 동결건조하였다. 한편, 브로콜리 새싹과의 생리활성을 비교하기 위하여 브로콜리도 동결건조한 후 동일한 용매 추출방법으로 처리하여 브로콜리 주정(B-E) 및 열수추출물(B-HW)로 조제하였다.

3. 브로콜리 새싹 용매추출물의 항산화 활성

항산화 활성에 기여하는 항산화 성분 중 총 폴리페놀 화합물의 함량은 적당한 농도로 희석한 동결건조된 브로콜리 새싹 및 브로콜리 용매추출물 100 μ L에 2% Na_2CO_3 1 mL와 50% Folin-Ciocalteu 시약(Sigma-Aldrich) 100 μ L를 첨가해 반응시킨 후 750 nm(Nanoquant Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)에서 측정하였다(Marinova 등 2005). 표준곡선은 gallic acid를 이용하였으며, 함량은 추출물 g중의 mg gallic acid equivalent(GAE, dry basis)로 나타내었다. 또, 다른 항산화 성분인 총 플라보노이드는 용매 추출물 100 μ L에 80% 에탄올, 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ 및 1 M potassium acetate 용액을 첨가하여 반응시킨 후 흡광도를 415 nm에서 측정하였고(Stankovic MS 2011), 표준물질로 quercetin을 사용하여 표준곡선을 작성한 후 추출물 g중의 mg quercetin equivalent(QE)로 나타내었다. 한편, 브로콜리 새싹과 브로콜리 용매추출물의 항산화 활성은 potassium persulphate와 반응시켜 형성한 ABTS 라디칼

(Choi 등 2006)과 Sigma-Aldrich의 DPPH 라디칼(Goupy 등 2003)을 용매추출물과 반응시켜 나타나는 흡광도 변화를 734 nm와 517 nm로 측정하였는데, 표준물질로는 L-ascorbic acid를 사용하여 검량선을 작성하였고, 항산화 활성은 시료 g당 mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity(AEAC)로 나타내었다.

4. 브로콜리 새싹 용매추출물의 항염증 활성

LPS로 자극받은 RAW 264.7 마우스 대식세포주(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)는 염증반응을 촉진하는 세포주 모델을 이용하여 브로콜리 새싹과 브로콜리 용매추출물의 항염증 활성을 검토하였다. 배양한 RAW 264.7 대식세포를 적당한 농도(1×10^6 /mL)로 희석하여 96 well plate 각 well에 200 μ L씩 분주하고, 12시간 배양하여 배양액을 버리고 새로운 DMEM 배지를 첨가한 후 추출물 시료를 일정 농도(최종농도 10과 100 μ g/mL)로 처리하여 30분간 배양한다. 다음으로 LPS를 적당한 농도(1 또는 10 μ g/mL)로 처리하여 24시간 배양을 통해 염증반응을 유발한 후 배양액을 다른 96 well plate에 회수하였다. 냉장보관된 배양액의 염증촉진 사이토카인 IL-6는 BD Biosciences(San Diego, CA, USA)사 메뉴얼에 따라 ELISA법으로 처리하고, 또 다른 중요한 염증촉진 인자인 nitric oxide(NO)는 조제한 Griess 시약을 사용하고, 각 표준물질의 검량곡선으로부터 그 양을 산출하여 이러한 물질의 생산억제능을 항염증활성으로 나타내었다. 한편, 추출물의 RAW 264.7 세포주에 대한 독성 여부 및 처리할 추출물 농도는 시료와 세포주를 배양한 후 EZ-cytox 용액을 이용하여 세포 생존율을 측정하고, saline 대조군과 비교하여 독성이 없는 농도로 처리하였다(Ishiyama 등 1996).

5. 브로콜리 새싹 용매추출물의 면역활성

생후 6주령 웅성의 ICR 마우스를 DBL사(Chungbuk, Korea)로부터 구입하여 정수와 실험동물용 펠릿사료(Samyang Co., Incheon, Korea)를 자유공급하면서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였고, 모든 실험은 고려대학교 실험동물윤리위원회(KUIACUC-2017-53) 규정에 입각하여 진행하였다.

1) 비장세포 증식활성

ICR 마우스를 경구투여한 후 복강을 절개하여 비장을 조심스럽게 꺼내어 마쇄하고 적혈구를 용혈시키기 위하여 0.2% NaCl 용액을 처리한 후 원심분리(3,000 \times g, 5 $^{\circ}$ C, 10 min)하여 비장세포를 회수한 후 RPMI-1640 배지를 첨가하여 적당한 농도로 희석하였다. 비장세포 현탁액은 5×10^6 /mL의 농도로 희석한 후 각 well에 180 μ L씩 분주하고 최종 농도가 10 및 100 μ g/mL이 되도록 브로콜리 새싹과 브로콜리 용매추출

물을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양완료와 함께 배양액은 다른 well plate에 옮겨 냉장고에 보관하고, 남은 비장세포의 well에는 EZ-cytox 용액을 첨가하여 증식능을 측정하였다. 한편, 추출물의 비장세포 증식 촉진 정도는 시료의 자극에 따라 활성화된 비장세포로부터 배양액에 생산되는 사이토카인(IFN- γ 와 TNF- α) 생산능력으로도 확인하였는데, 냉장보관된 세포배양 상등액을 취하여 BD Biosciences사(East Rutherford, NJ, USA) 메뉴얼에 따라 ELISA법으로 측정하고, 각각의 사이토카인 표준물질을 이용하여 그 양을 산출하였다.

2) 대식세포 활성화

ICR 마우스 복강에 thioglycollate medium(Sigma-Aldrich)을 주입하여 모세혈관으로부터 복강조직으로의 단구세포 침출을 촉진한 후(96시간)에 RPMI-1640 배지를 복강에 주입하여 대식세포를 회수하고, 1×10^6 cells/RPMI-1640 배지 mL가 되도록 현탁하였다. 96 well plate의 각 well에 대식세포 현탁액을 200 μ L씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하여 각 well plate 기벽에 부착한 대식세포 단층을 형성시켰다(Conrad RE 1981). 배양 완료 후 well에 미부착된 세포는 RPMI-1640 배지로 세척과정을 통해 제거하고, FBS가 함유된 RPMI-1640 배지를 각 well에 180 μ L씩 분주한 후 일정 농도로 희석한 추출물을 대식세포 단층에 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 대식세포와 배양하였다. 추출물의 대식세포 활성화 정도는 시료의 자극에 따라 활성화된 대식세포로부터 생산되는 사이토카인(TNF- α , IL-6와 IL-12)과 nitric oxide(NO) 생산능으로 확인하였다. 즉, 사이토카인은 세포배양 상등액을 취하여 BD Biosciences사 메뉴얼에 따라 ELISA법으로 측정하였고, NO는 Griess 시약을 이용하여 표준물질의 검량곡선으로부터 그 양을 산출하였다.

6. 통계처리

모든 실험은 3번 반복하여 측정하였으며, 결과는 평균치 \pm SD(standard deviation)로 나타내었고, 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's *t*-test로 계산하여 각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다. 한편, 항산화 활성의 경우에는 유의성 평가를 위해 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 브로콜리 새싹의 용매추출물 조제

최근 건강식품으로 알려져 소비가 급증하고 있는 채소류

새싹에 대한 생리활성을 기초자료로 제시하기 위하여 항암 활성을 갖는 sulforaphane 함량이 브로콜리(broccoli, B)보다도 월등히 함량이 높다고 알려진 브로콜리 새싹(broccoli sprout, BS)의 생리활성을 검토하고, 브로콜리와 비교하여 그 차이를 체계적으로 확인하였다. 채소류의 발아에 따른 영양소의 함량이나 생리활성의 검토 시에는 고형분의 효과가 중요하기 때문에 본 연구에서는 브로콜리 새싹과 브로콜리를 동결건조하여 사용하였는데, 동결건조한 브로콜리 새싹의 수분함량은 7.2%이었고, 브로콜리 채소는 6.8%를 나타내었다. 동결건조된 브로콜리 새싹의 용매추출물은 grinder로 마쇄한 브로콜리 새싹 원료에 95% 주정을 5배(w/v) 첨가하여 환류방법(reflux)으로 제조한 브로콜리 새싹 주정추출물(BS-E, 원료 대비 수율 5.8%)과 원료에 20배(w/v)의 증류수를 첨가하고 decoction 방법으로 제조한 브로콜리 새싹 열수추출물(BS-HW, 수율 15.1%)로 동결건조하였다. 또한, 브로콜리 새싹과의 생리활성을 비교하기 위하여 브로콜리 채소류도 동결건조한 후 동일한 방법으로 주정(B-E, 수율 6.1%)과 열수추출물(B-HW, 수율 16.5%)로 조제하였다.

2. 브로콜리 새싹 용매추출물의 항산화 활성

브로콜리는 노화억제와 만성질환의 원인물질로 알려진 다양한 활성산소를 감소시키는 항산화 물질인 ascorbic acid, β -carotene, rutin, selenium, glutathione, quercetin과 sulforaphane 등의 함량이 많아 암세포 증식억제의 항암작용, 고혈압 예방 및 콜레스테롤 감소 등에 기인하는 심혈관 질환 예방과 비만 억제 등의 효용성이 높은 것으로 보고되고 있다(Kim & Kim 2015). 이러한 항산화 물질 중 특히, 항암성분으로도 알려진 sulforaphane은 브로콜리보다 더 많은 양이 포함되어진 것으로 보고되어 있다(Sok 등 2003). 본 연구에서는 브로콜리 새싹의 항산화 성분이나 활성이 브로콜리보다 증진되는지를 확인하기 위하여 먼저 용매추출물에 대한 항산화 성분을 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물 함량에서는 브로콜리 새싹의 주정추출물(BS-E)이 g당 9.15 mg gallic acid equivalent(GAE)으로 유의적으로 가장 높은 함량을 보인 반면, 비교군인 브로콜리 주정추출물(B-E)은 이보다는 낮은 7.83 mg GAE/g을 나타내었고($p < 0.05$, Fig. 1), 열수추출물은 주정추출물보다 낮은 수준으로 브로콜리 새싹과 브로콜리간 유의적인 차이는 보이지 않았다(6.37~6.53 mg GAE/g). 또, 다른 중요한 항산화 성분인 총 플라보노이드 화합물의 경우에는 폴리페놀보다 현저히 낮은 수준으로 나타났다. B-E에서 g당 1.60 mg quercetin equivalent(QE)로 가장 높은 플라보노이드 함량을 보였으며, BS-E(1.43 mg QE/g)와 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 열수추출물은 주정추출물보다 낮은 0.82(BS-HW)와 1.08 mg QE/g (B-HW) 함량을 나타내었으며, 이들은 모두 통계적으로 유

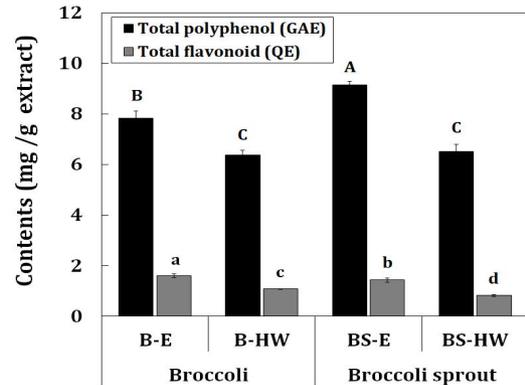


Fig. 1. Antioxidative component content of solvent extract from broccoli sprout and broccoli. Results are presented as mean±standard deviation of three independent experiments. B-E & B-HW : EtOH and hot-water from broccoli; BS-E & BS-HW : EtOH and hot-water extract from broccoli sprout. Content : total polyphenol (mg gallic acid equivalent (GAE)/extract g), total flavonoid (mg quercetin equivalent (QE)/extract g). Value with different letter (small; total flavonoid, capital; total polyphenol) within the same antioxidative component means a significant difference at $p < 0.05$.

의적인 차이로 나타내었다($p < 0.05$, Fig. 1). 다음은 브로콜리 새싹 용매추출물의 직접적인 항산화 활성을 라디칼 소거능 측정법으로 평가하였다. 시료의 항산화력을 측정하는 방법 중 라디칼 소거능은 전자공여체를 가진 항산화 성분에 의해 환원되면서 흡광도가 변하는 성질을 이용하는 것으로 먼저 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)가 $K_2S_2O_8$ 에 의해 청록색의 ABTS 양이온 라디칼을 형성한 후 시료에 의해 변색되는 정도를 측정하였다. Fig. 2에서 보이는 것처럼 모든 시료는 유의적인 차이를 나타내었는데($p < 0.05$), BS-E는 g당 4.52 mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity(AEAC)를 보여 가장 우수한 활성을 나타내었고, 다음으로 B-E가 3.63 mg AEAC/g의 ABTS 라디칼 소거능이 확인되었다. 열수추출물의 경우, 주정추출물보다는 유의적으로 낮은 수준을 보였다(BS-HW 2.85 mg AEAC/g 및 B-HW 3.15 mg AEAC/g, $p < 0.05$). 한편, 보라색을 띠는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 화학적으로 안정한 수용성 자유라디칼로서 시료에 의해 환원되면 노란색으로 변색되는 정도를 측정하는 방법으로 BS-E는 g당 1.14 mg AEAC/g으로 가장 높았으나, ABTS 라디칼 소거능의 결과보다 현저히 낮은 수준이었고, B-E(0.97 mg AEAC/g)와는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 2). 식물은 발아가 진행되면서 비타민, 무기질, 식이섬유소 및 생리활성 물질이 성숙한 채소류에 비하여 증가하는 것으로 알려져 있는데(Kim 등 2004; Tian 등 2005), 유채는 필

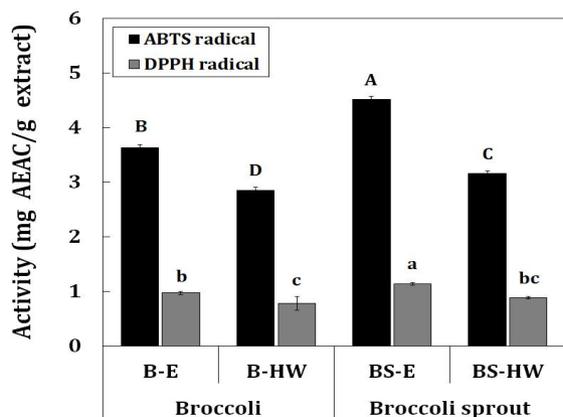


Fig. 2. Antioxidant activity of solvent extract from broccoli sprout and broccoli. Results are presented as mean± standard deviation of three independent experiments. Solvent extracts refer to Fig. 1. Activity : ABTS and DPPH radical scavenging (mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC)/extract g). Value with different letter (small; DPPH, capital; ABTS) within the same radical means a significant difference at $p < 0.05$.

수아미노산과 항산화 비타민(Kim 등 1997), 무순은 항산화 비타민과 isothiocyanate(Song MR 2001), 메밀은 rutin(Kim 등 2005) 및 알팔파는 폴리페놀 등이 새싹류에서 채소류보다 증가하였다(Lee 등 2005). 본 연구에서도 브로콜리 새싹의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 브로콜리보다 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.05$), ABTS 라디칼 소거능에서도 동일한 활성 경향을 보임으로써 앞선 연구들에서 보고된 것처럼 새싹이 발아되는 과정에서 생리활성에 기여하는 유용한 물질의 생산이 성숙된 채소류보다 증가됨을 추정할 수 있었다.

3. 브로콜리 새싹 용매추출물의 항염증 활성

염증반응(inflammatory responses)은 세균 및 바이러스 감염이나 조직 손상에 따른 상처와 독소 등의 외부물질 침입으로부터 생체를 보호하기 위한 방어기전으로 면역반응 초기에 유도되는데, 손상 받은 조직과 세포들이 특정 화학물질을 분비하여 주변 혈관을 이완시키고, 혈관의 투과성을 증가시켜 면역세포를 침입조직 부위로 이끌어 들이는(화학주화성) 생체의 생존을 위한 필수적인 과정으로 국부적인 혈류, 혈장 및 세포 등의 증가는 각각 발진, 발열, 부종 등 염증반응의 특성으로 나타나게 된다(Kim 등 2017). 그러나 이러한 국부적인 염증반응은 치료단계에 필수적이지만, 보다 광범위한 면역반응은 위협할 수 있으며, 적절히 조절되어 종결되지 못한 면역과 염증반응은 퇴행성 질환의 병태생리로 작용할 수 있다는 이론적 근거도 보고되고 있다(Alazawi 등 2016). 또한, 염증이 오랫동안 지속되는 만성 염증은 암을 비롯한 다양한 질병을

야기시킬 가능성이 높아 염증반응이 초기에 제어되지 못하면 생체 내부의 기능 손실 및 항상성 불균형에 의해 만성감염과 자가면역질환, 대사성질환 등으로 발전될 수 있기 때문에 과도한 염증반응의 조절은 생체 건강을 위해 대단히 중요하다(Cao 등 2015). 본 연구에서는 브로콜리 새싹 용매추출물의 항염증 활성을 검토하기 위하여 염증반응에 대표적으로 관여하는 대식세포(RAW 264.7 마우스 대식세포주)를 내독소인 lipopolysaccharide로 자극하여 염증반응을 유발하고, 이로부터 대표적인 염증 촉진인자인 nitric oxide(NO) 및 IL-6 생성 억제에 미치는 브로콜리 새싹 용매추출물의 효과를 검토하였다. 먼저, 대식세포에 대한 시료의 처리농도를 결정하기 위하여 시료를 10과 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 최종농도로 처리한 후 EZ-cytox 시약을 이용하여 세포에 미치는 독성을 검토한 결과, 브로콜리 새싹뿐만 아니라, 브로콜리의 용매추출물 어느 것도 RAW 264.7 대식세포주에 독성을 보이지 않아 항염증 활성시험의 모든 시료농도는 최종농도 10과 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 진행하였다(Fig. 3). LPS 유도-RAW 264.7 세포주 염증모델에서 NO는 inducible nitric oxide synthases(iNOS)에 의하여 L-arginine으로부터 다량으로 합성되어(Korhonen 등 2002) 세균 침입을 억제하거나, T-세포 증식을 억제하여 국소 염증반응을 하향시키는 방어에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되고 있다(Wang 등 2002). 그러나 과도한 iNOS 발현에 따른 NO 생성량 증가는 그 자체의 독성 효과에 의해 주위 세포의 손상을 야기한다(Hanisch UK 2002). 따라서 NO 생산의 조절은 과도한 염증반응 조절과 밀접하므로, 본 연구에서 NO 생성에 대한 브로콜리 새싹 용매추출물의 억제효과를 조사한

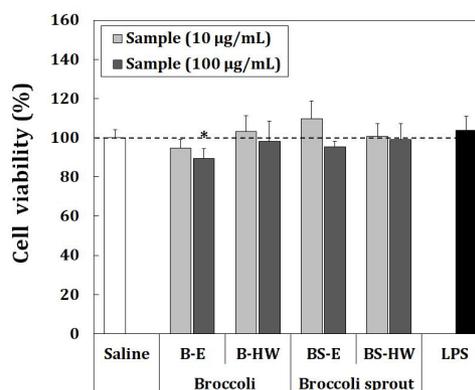


Fig. 3. Macrophage (RAW 264.7 cell line) viability of solvent extract from broccoli sprout and broccoli. Results are presented as mean±standard deviation of three independent experiments. Solvent extracts refer to Fig. 1. Cell viability : viability of solvent extract treated-RAW 264.7 cell viability of saline treated-cell. * $p < 0.05$; significant difference between saline group and each sample group.

결과, 주정추출물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LPS 처리군(10.0 μM)과 비교하여 60.9%(BS-E, 3.91 μM)와 49.6%(B-E, 5.04 μM)의 억제능을 나타내어 BS-E가 유의적으로 우수한 활성을 보인 반면($p < 0.001$), 열수추출물의 경우, 7.90 μM (BS-HW)과 7.18 μM (B-HW)의 NO 함량을 보여 NO 생산 억제능이 주정추출물에 비해 상대적으로 낮은 것으로 확인되었다(Fig. 4A). 다음으로는 LPS 유도-RAW 264.7 세포주 염증모델에서 interleukin-6(IL-6)의 생산에 미치는 브로콜리 새싹 추출물의 영향을 검토하였는데, IL-6는 선천면역과 적응면역 모두에서 중요한 기능을 하는 다기능성 사이토카인으로 림프성 혹은 비림프성 세포 즉, 단구, B 세포, T 세포, 혈관내피세포, 섬유모세포, 피부각질세포 등에서 생성되며, 면역반응과 함께 급성기 염증반응 등에 관여하는 대표적 염증성 사이토카인이다(Tanaka 등 2016). 대조군의 경우, LPS 무처리 saline군은 0.1 pg/mL의 수준인 반면 LPS 처리군에서는 13.23 pg/mL의 IL-6가 생산되어 염증반응의 유도가 확인되었으며, 시료 처리군에서는 브로콜리 새싹 주정추출물인 BS-E가 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 4.12 pg/mL 생산(LPS 대조군의 68.9% 억제)으로 가장 우수한 항염증 활성을 보였고, 다음으로 브로콜리 주정추출물(B-E)이 50.3% 억제능을 나타내었다(Fig. 4B). 열수추출물의 경우에는 BS-HW가 7.12 pg/mL, B-HW는 7.64 pg/mL의 생산으로 NO와 마찬가지로 주정추출물보다는 낮은 IL-6 생산억제능을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과로부터 LPS에 의해 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포주 모델에서 브로콜리 새싹이 브로콜리보다 우수한 항염증 활성을 나타내었으며, 주정추출물이 열수추출물보다 유의적으로 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다($p < 0.001$). 또한, 항산화 활성과 마찬가지로 저분자가 주성분인 주정추출물에서 높은 항염증

활성이 나타난 결과로부터 고분자보다는 저분자 물질이 항염증 활성과 연관이 높은 것으로 추정된다.

4. 브로콜리 새싹 용매추출물의 면역활성

병원미생물을 포함한 외부 물질의 침입과 정상세포의 변형을 감지하여 신체를 보호하는 림프계는 대식세포와 보체계 등의 선천면역과 림프구에 의해 조절되는 후천면역계로 구분되는데, 이들에 대한 브로콜리 새싹 추출물의 면역증진 활성을 측정하기 위하여 먼저 비장을 이용하여 후천면역계의 림프구 증식활성을 검토하였다. 림프구(T와 B 세포)는 후천면역기능을 나타내는 작동세포로 여러 면역반응에 주요한 기능을 수행하기 위해서는 효과적인 면역반응을 나타내도록 클론확장을 포함한 분열증식을 해야 한다(Quigley 등 2009). 림프구의 분열증식이 면역반응에 중요하다는 뜻은 그만큼 작동세포로 작용할 수 있는 림프구가 양적으로 중요하다는 의미이기 때문에, 림프구의 생존능력과 면역반응에 중요한 측면이 된다. 비장은 림프구와 함께 다양한 면역 보조세포로 구성되어 있는 중요한 면역기관으로, 혈액에서 유래된 항원에 대한 면역반응을 하며, 노화된 세포 및 손상된 세포를 제거하는 역할도 수행한다(Smith & Johnston 1979). 따라서 이로부터 비장세포 현탁액을 조제한 후 브로콜리 새싹 용매추출물의 면역세포 증식능에 따른 면역반응 활성화를 조사한 결과, 큰 차이를 보이지는 않았으나, 브로콜리 새싹의 열수추출물(BS-E)에서 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 saline 대조군에 비하여 1.22배 수준으로 증식능이 촉진되는 결과를 얻을 수 있었다. 주정추출물(B-E와 BS-E)과 브로콜리 열수추출물(B-HW)의 경우에는 saline 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5A). 비장세포 증식과 함께 비장세포 증식 및 활성화

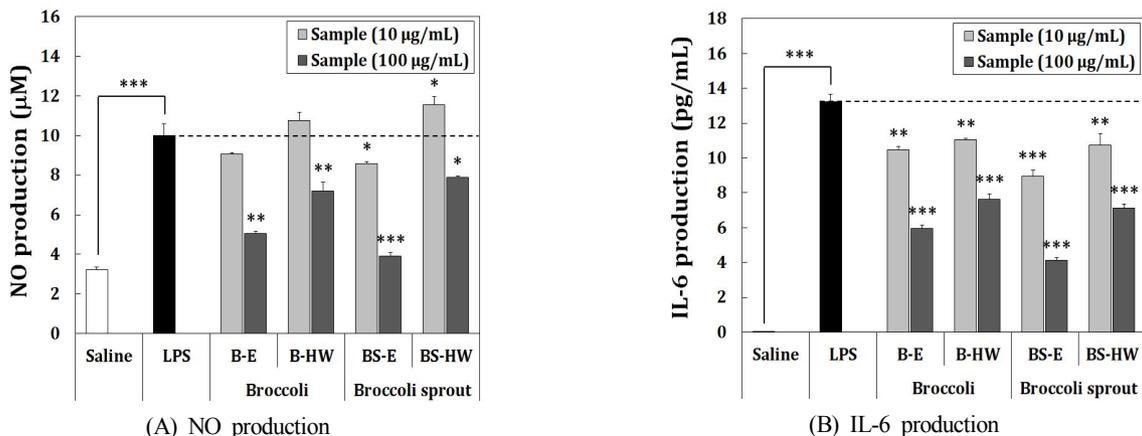


Fig. 4. Anti-inflammatory activity of solvent extract from broccoli sprout and broccoli in LPS-induced RAW 264.7 cell. Results are presented as mean \pm standard deviation of three independent experiments. Solvent extracts refer to Fig. 1. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; significant difference between LPS-stimulated group used as inflammation-induced control and each sample group.

에 관련된 중요한 사이토카인 생산 증진 여부를 검토하였다. Interferon(IFN)- γ 는 다양한 면역세포의 분화와 활성을 조절하는 helper T 세포 중 Th1으로부터 분비되어 대식세포의 활성화에 기여하는 사이토카인(Schroder 등 2004)으로 브로콜리 새싹과 브로콜리 열수추출물이 주정추출물보다 우수한 IFN- γ 생산 활성을 보였는데, 특히 BS-HW 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 264.39 pg/mL(saline 대조군; 4.87 pg/mL)로 B-HW(184.18 pg/mL)보다 유의적으로 높은 IFN- γ 생산능을 나타내었다($p < 0.001$, Fig. 5B). 그러나 주정추출물은 브로콜리 새싹과 브로콜리 모두에서 saline 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한, 활성화된 비장세포로부터 생산되는 또 다른 사이토카인인 TNF- α 는 변형된 정상세포나 암세포 및 바이러스 감염세포에 직접적으로 작용하거나, 면역세포를 조절하는 중요한 종양괴사인자이다(Keystone & Ware 2010). 시료에 대한 TNF- α 의 생산 활성도 IFN- γ 와 마찬가지로 브로콜리 새싹과 브로콜리 모두 주정추출물에서는 saline 대조군(10.04 pg/mL) 수준의 낮은 생산(BS-E; 10 pg/mL, B-E; 10.22 pg/mL)을 나타낸 반면, 열수추출물의 경우에는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 79.90 pg/mL(B-HW, $p < 0.001$)와 75.41 pg/mL(BS-HW, $p < 0.01$)의 생산으로 시료간 유의차 없이 우수한 생산능을 보여 시료에 의해 비장세포가 활성화되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 5C). 한편, 브로콜리 새싹 용매추출물이 선천면역계도 자극할 수 있는지를 알아보기 위하여 시료의 대식세포의 활성화에 따라 생산되는 면역촉진 사이토카인의 생산을 검토하였다. 대식세포는 식세포작용, 항원-항체복합체 제거 및 선천면역계 조절 작용 등으로 생체 면역증진에 중요하게 관여한다(Jackaman 등 2017). 시료로 자극된 대식세포로부터 생산되는 사이토카인 중 TNF- α 생산에서는 브로콜리 새싹 열수추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ (BS-HW, 828.2 pg/mL)에서 브로콜리 열수추출물(B-HW, 555.15 pg/mL)보다 유의적으로 1.49배 높은 가장 우수한 활성을 나

타내었고, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서도 BS-HW는 151.38 pg/mL로 saline 대조군(11.99 pg/mL)보다 높은 생산능을 보였다($p < 0.001$, Fig. 6A). 그러나 주정추출물의 경우에는 가장 높은 BS-E가 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 57.05 pg/mL 수준으로 saline 대조군보다는 높았으나, 열수추출물보다 유의적으로 낮은 TNF- α 생산능을 나타내었다. IL-6에서도 TNF- α 와 마찬가지로 열수추출물만이 유의적으로 높은 생산능을 나타내었는데, 100 $\mu\text{g/mL}$ 시료농도에서 BS-HW는 1,188.8 pg/mL로 B-HW(896.6 pg/mL, $p < 0.01$)보다 현저히 높은 생산능을 보였고, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서도 BS-HW는 492.2 pg/mL로 B-HW(318.8 pg/mL)보다는 1.5배나 높은 IL-6 생산능을 나타내었다(Fig. 6B). 그러나 주정추출물에서는 브로콜리 새싹과 브로콜리 모두 시료농도와 무관하게 미비한 생산을 나타내어 주정에서 주로 추출되는 폴리페놀이나 플라보노이드 등의 저분자 물질은 마크로파지로의 자극에 따른 IL-6 생산에 관여하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 마지막으로 활성화된 마크로파지로부터 분비되는 자연살해세포와 Th 세포의 성숙 및 분화촉진에 관련된 사이토카인인(Ruhland & Kima 2009) IL-12 생산에서도 TNF- α 및 IL-6 생산과 유사하게 브로콜리 새싹과 브로콜리 열수추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 134.0 pg/mL(BS-HW, $p < 0.01$)와 122.7 pg/mL(B-HW, $p < 0.001$)의 수준을 보여 saline 대조군(2.7 pg/mL)보다 유의적인 증가를 보일 뿐만 아니라, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서도 saline 대조군보다는 높은 생산능(30.0 & 28.9 pg/mL)을 나타내었다(Fig. 6C). 그러나 주정추출물의 경우에는 유의적으로 매우 낮은 수준임이 확인되었다(3.2-6.4 pg/mL). 결론적으로 브로콜리 새싹의 면역활성은 항염증과는 달리 열수추출물에서 높은 활성을 보임으로써 고분자 물질의 관여하고 있음을 추정할 수 있었고, 브로콜리 채소 자체보다도 더 대식세포와 림프구를 활성화하여 IL-6와 IL-12 및 IFN- γ 와 TNF- α 등의 다양한 사이토카인 생산을 촉진함으로

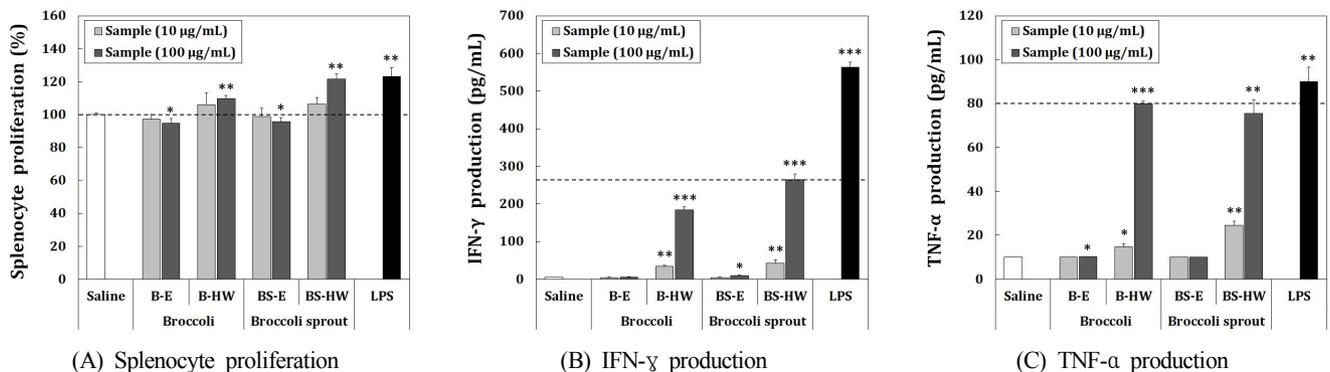


Fig. 5. Splenocyte mitogenic activity of solvent extract from broccoli sprout and broccoli. Results are presented as mean \pm standard deviation of three independent experiments. Solvent extracts refer to Fig. 1. Proliferation : cell number of solvent extract treated-splenocyte/cell number of saline treated-cell. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; significant difference between saline group used as negative control and each sample group.

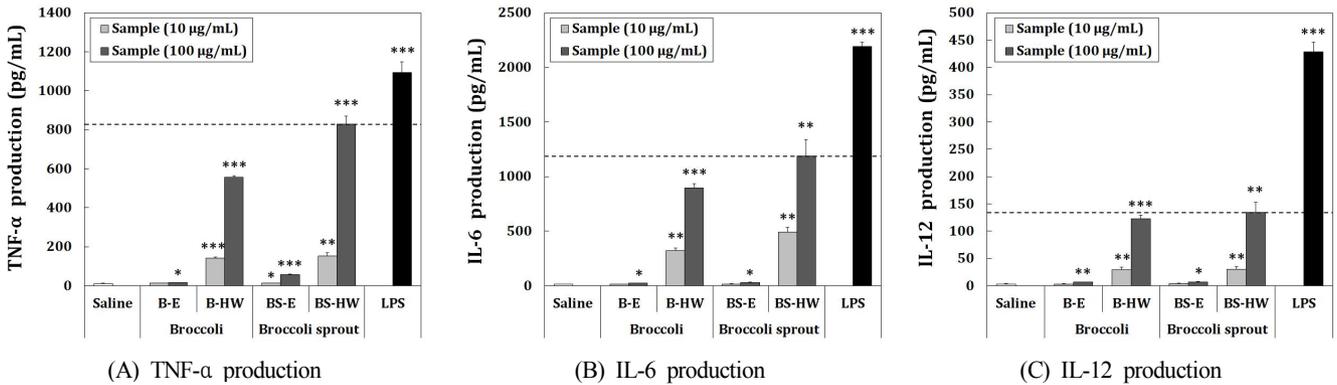


Fig. 6. Macrophage stimulating activity of solvent extract from broccoli sprout and broccoli. Results are presented as mean± standard deviation of three independent experiments. Solvent extracts refer to Fig. 1. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; significant difference between saline group used as negative control and each sample.

써 선천 및 후천면역계의 활성화에 작용할 수 있음을 제시하여 브로콜리 새싹 추출물의 기능성식품 소재로의 활용에 가능성을 확인할 수 있었다.

요약 및 결론

브로콜리 새싹의 기능성 소재로서의 활용가능성을 검토하기 위하여 열수 및 주정추출물을 조제한 후 항산화 및 면역조절 활성을 브로콜리 용매추출물과 비교하였다. 항산화 성분 함량과 라디칼 소거능을 통한 항산화 활성은 주정추출물이 열수추출물보다 유의적으로 높았다. 특히, 브로콜리 새싹 주정추출물(BS-E)은 총 폴리페놀 화합물(9.15 mg GAE/g)과 ABTS 라디칼 소거능(4.52 mg AEAC/g) 및 DPPH 라디칼 소거능(1.14 mg AEAC/g)에서 대조군으로 사용된 브로콜리 주정추출물(B-E; 각각 7.83 mg GAE/g, 3.63 mg AEAC/g 및 0.97 mg AEAC/g)에 비해 유의적으로 높은 항산화 결과를 나타내었다. 그러나 총 플라보노이드 함량에서는 B-E(1.60 mg QE/g)가 BS-E(1.43 mg QE/g)에 비해 유의적으로 높은 함량을 나타내었다. 항염증 활성은 브로콜리 새싹과 브로콜리의 모든 용매추출물이 RAW 264.7 마우스 대식세포주에 대하여 독성을 나타내지 않았던 10~100 µg/mL의 농도에서 LPS 유도 모델로 검토하였다. 브로콜리 새싹의 항염증 활성에서 주정추출물은 항산화 활성과 유사하게 모든 시료농도에서 열수추출물보다 유의적으로 더 우수한 활성을 보였다. 또한, 브로콜리 새싹의 주정추출물 (BS-E)은 100 µg/mL의 농도에서 NO는 LPS 대조군의 60.9%가 억제되었고 IL-6는 68.9% 억제를 보인 반면, 브로콜리의 주정추출물(B-E)는 각각 49.6%와 54.9 %가 억제되었다. 한편, 비장세포와 대식세포를 이용한 면역활성의 경우에는 열수추출물이 주정추출물보다 높은 활성을 나타내었다. 특히, 브로콜린 열수추출물(BS-HW)은 100 µg/mL 농도에서 비

장세포 증식활성(saline 대조군의 1.2배)과 IFN- γ (264.39 pg/mL) 생산을 B-HW(1.1배와 184.18 pg/mL)보다 촉진하였으며, 대식세포로부터의 IL-6(1.33배), IL-12(1.09배)와 TNF- α (1.49배) 생산도 브로콜리보다 유의적으로 증진되었다. 결론적으로 브로콜리 새싹은 브로콜리보다 우수한 항산화, 항염증 및 면역활성을 보여줌으로써 기능성식품 원료로서 브로콜리 새싹의 활용가능성을 제시할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 2018년 한국교통대학교 지원을 받아 수행한 연구로 이에 감사드립니다.

References

- Alazawi W, Pirmadjid N, Lahiri R, Bhattacharya S. 2016. Inflammatory and immune responses to surgery and their clinical impact. *Ann Surg* 264:73-80
- Cao Y, Zhao D, Xu AT, Shen J, Ran ZH. 2015. Effects of immunosuppressants on immune response to vaccine in inflammatory bowel disease. *Chin Med J (Engl)* 128:835-838
- Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99:381-387
- Conrad RE. 1981. Induction and collection of peritoneal exudates macrophages. In Herscovitz BH, Holden HT, Ballanti JA, Ghaffar A (Eds.), *Manual of Macrophage Methodology*, pp.5-11. Marcel Dekker Incorporation
- Dinkova-Kostova AT, Jenkins SN, Fahey JW, Ye L, Wehage

- SL, Liby KT, Stephenson KK, Wade KL, Talalay P. 2006. Protection against UV-light-induced skin carcinogenesis in SKH-1 high-risk mice by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts. *Cancer Lett* 240:243-252
- El-Adawy TA. 2002. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. *Plant Foods Hum Nutr* 57:83-97
- Goupy P, Dufour C, Loonis M, Dangles O. 2003. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *J Agric Food Chem* 51: 615-622
- Hanisch UK. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140-155
- Herr I, Buchler MW. 2010. Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treat Rev* 36:377-383
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19:1518-1520
- Jackaman C, Tomay F, Duong L, Abdol Razak NB, Pixley FJ, Metharom P, Nelson DJ. 2017. Aging and cancer: The role of macrophages and neutrophils. *Ageing Res Rev* 36:105-116
- Kahlon TS, Chapman MH, Smith GE. 2007. *In vitro* binding of bile acids by spinach, kale, brussels sprouts, broccoli, mustard greens, green bell pepper, cabbage and collards. *Food Chem* 100:1531-1536
- Keystone EC, Ware CF. 2010. Tumor necrosis factor and anti-tumor necrosis factor therapies. *J Rheumatol Suppl* 85:27-39
- Kim EJ, Kim MH. 2015. Antioxidant activity of solvent fraction from broccoli sprouts cultivated at the plant factory system. *Korean J Food Nutr* 28:1-8
- Kim IS, Han SH, Han KW. 1997. Study on the chemical change of amino acid and vitamin of rapeseed during germination. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26:1058-1062
- Kim JH, Yi YS, Kim MY, Cho JY. 2017. Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases. *J Ginseng Res* 41:435-443
- Kim SL, Kim SK, Park CH. 2004. Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetables. *Food Res Int* 37:319-327
- Kim YS, Kim JG, Lee YS, Kang IJ. 2005. Comparison of the chemical components of buckwheat seed and sprout. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34:81-86
- Korhonen R, Lahti A, Hamalainen M, Kankaanranta H, Moilanen E. 2002. Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Mol Pharmacol* 62:698-704
- Kwon YD, Ko ES, Hong SJ, Park SW. 2008. Comparison of sulforaphane and antioxidant contents according to different parts and maturity of broccoli. *Korean J Hort Sci Technol* 26:344-349
- Lee HS, Park YW. 2005. Antioxidant activity and antibacterial activities from different parts of broccoli extracts under high temperature. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34:759-764
- Lee JJ, Lee YM, Shin HD, Jeong YS, Lee MY. 2007. Effects of vegetable sprout power mixture on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 965-974
- Lee YA, Kim HY, Cho EJ. 2005. Comparison of methanol extracts from vegetables on antioxidative effect under *in vitro* and cell system. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34:1151-1156
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J Univ Chem Technol Metall* 40:255-260
- Quigley M, Martinez J, Huang X, Yang Y. 2009. A critical role for direct TLR2-MyD88 signaling in CD8 T-cell clonal expansion and memory formation following vaccinia viral infection. *Blood* 113:2256-2264
- Ravikumar C. 2015. Therapeutic potential of *Brassica oleracea* (Broccoli) - A review. *Int J Drug Dev Res* 7:9-10
- Ruhland A, Kima PE. 2009. Activation of PI3K/Akt signaling has a dominant negative effect on IL-12 production by macrophages infected with *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Exp Parasitol* 122:28-36
- Sattar A, Badshah A, Aurangzeb. 1995. Biosynthesis of ascorbic acid in germinating rapeseed cultivars. *Plant Foods Hum Nutr* 47:63-70
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163-189
- Seo JS, Bang BH, Yeo IB. 2001. Effect of improve obesity with sprout raw grains and vegetables. *Korean J Food Nutr* 14: 150-160
- Smith TF, Johnston RB Jr. 1979. Functions of the spleen in host defense against infection. *Am J Pediatr Hematol Oncol*

- 1:355-362
- Sok DE, Kim JH, Kim MR. 2003. Isolation and identification of bioactive organosulfur phytochemicals from solvent extract of broccoli. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32:315-319
- Song MR. 2001. Volatile flavor component of cultivated radish (*Raphanus sativus* L.) sprout. *Korean J Food Nutr* 14:20-27
- Stankovic MS. 2011. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J Sci* 33:63-72
- Steinmetz KA, Potter JD. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 96:1027-1039
- Takai M, Suido H, Tanaka T, Kotani M, Fujita A, Takeuchi A, Makino T, Sumikawa K, Origasa H, Tsuji K, Nakashima M. 2003. LDL-cholesterol-lowering effects of a mixed green vegetable and fruit beverage containing broccoli and cabbage in hypercholesterolemic subjects. *Rinsho Byori* 51:1073-1083
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2016. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy* 8:959-970
- Taniguchi I, Kobayashi-Hattori K, Tenmyo C, Kamei T, Uda Y, Sugita-Konishi Y, Oishi Y, Takita T. 2006. Effect of Japanese radish (*Raphanus sativus*) sprout (*Kaiware-daikon*) on carbohydrate and lipid metabolism in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 20:274-278
- Tian Q, Rosselot RA, Schwartz SJ. 2005. Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 343:93-99
- Wang MJ, Lin WW, Chen HL, Chang YH, Ou HC, Kuo JS, Hong JS, Jeng KCG. 2002. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Eur J Neurosci* 16:2103-2112

Received 22 November, 2018

Revised 26 December, 2018

Accepted 31 December, 2018