

Cyclophosphamide에 의해 유도된 면역 저하 마우스에서 흑미 (*Oryza sativa* L.) 호분층의 면역 활성화 효과

이은별 · 최지혜 · 김시현 · 장환희 · 이성현*

농촌진흥청 국립농업과학원

Effects of Black rice (*Oryza sativa* L.) Aleurone layer on Cyclophosphamide-induced Immunosuppression in Mice

Eun Byeol Lee, Ji-Hye Choi, Si Hyun Kim, Hwan Hee Jang, and Sung Hyen Lee*

National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju-Gun, Jeollabuk-do 55365, Korea

Abstract – Anthocyanins are considered as one of the major functional components including cyanidin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside anthocyanins of black rice (*Oryza sativa* L., BR) aleurone layer (OAL) extract. The immunomodulatory biological effects of OAL has rarely been evaluated. This study has extensively studied the immunomodulatory effects of BR in immunosuppressed mice by CPA. The immunostimulatory effects of BR extract in *in vivo* at 150 (OAL-1) and 300 mg/kg body weight (OAL-2) for OAL groups were measured and compared to the normal group (CON) ingested with distilled water only or other groups. After the 14 days of oral administration, immune related organ weights, serum immunoglobulin (Ig) A and IgG, and cytokines (IL-12, TNF- α) levels, splenocytes proliferation rate, and NK cell activity were evaluated as immune related biomarkers. The serum IgA and IgG values in the OAL-treated groups increased to the level of the CON. OAL significantly and effectively controlled the IL-12 and TNF- α levels and NK activity compared to the negative control (NC) group. The results suggest that BR aleurone layer with immunomodulatory activities has a great potential as a functional food by itself or as a supplement.

Keywords – Black rice, Aleurone layer, Immune, Cyclophosphamide, NK activity

면역체계는 자기방어능을 갖는 기관, 세포 및 분자들로 이루어져, 자가 항원과 외부 병원균들을 인지하고 생리적 균형을 유지 할 수 있도록 작용한다. 다양한 환경적인 요인으로 인해 면역 조절능이 저하되거나 결핍되었을 때 anergy, T세포의 불균형과 사이토카인 과잉 발현 등의 장애를 일으켜 면역 항상성의 저하 및 전염증성 반응을 유발하게 된다.¹⁻³⁾ 세계보건기구(WHO)의 보고에 따르면 비 전염성 만성질환이나 장애로 인한 면역체계의 손상이 COVID-19로 인한 사망 위험을 높인다고 보고하고 있다.⁴⁾ 관절염, 당뇨 및 암 등 다양한 감염을 포함한 질병 예방 및 치료에 있어 면역 기능의 조절은 중요한 역할을 한다. 면역 조절제는 억제, 자극, 보조제로 분류할 수 있으며, HIV/AIDS 및 암 환자의 면역 반응을 향상시키고, 자가면역질환 환자의 과도한 면역 반응 억제를 유도하는 등 불

균형을 개선하기 위해 필수적이다. 백혈구 감소증, 알레르기 반응 등의 부작용을 유발하는 합성 면역 조절제의 대안으로 면역 체계 기능을 조절하는 천연 식품을 원료로 한 건강 기능성 식품 및 보조제 개발 연구가 주목 받고 있다.^{1,5,6)}

알킬화제인 cyclophosphamide(CPA)는 여러 악성 종양과 자가면역질환에 사용되어 왔지만 심각한 부작용을 유발한다. CPA는 DNA 결합 후 손상시켜 질소 염기의 합성을 저해하고, 체액성과 세포성 면역을 모두 억제하여 체내 세포 사멸을 초래하는 세포 독성 약물로, 산화스트레스 손상을 포함한 HA, DTH, 백혈구 감소증과 같은 유해한 질병에 광범위한 활성을 나타낸다. 면역 억제는 고 용량의 CPA에 의한 주요 부작용으로 대식세포 식균 작용 및 자연 살해 세포 활성 저하 등의 증상이 보고되었고, 면역 억제 마우스 모델을 기반으로 한 연구에 약물로 사용되어 왔다.^{3,7,8)}

통계청에 따르면 쌀의 소비량은 57.7 kg으로 전년 대비 2.5% 감소하고 있는 반면 기타 양곡 소비량은 8.7 kg으로 전년 대비 6.1% 증가하고 있다(통계청, 2020년 양곡소비량

*교신저자(E-mail): lshin@korea.kr
(Tel): +82-63-238-3681

조사 결과, 2020).⁹⁾ 이는 소비자들의 건강 기능성에 대한 관심이 증대됨에 따라 주식으로 이용되어온 쌀에서 다른 형태의 곡물 섭취량이 증가하고 있는 것으로 보여진다. 현대사회 식습관 변화에 따라 파이토케미컬에 기인하는 통곡물의 섭취 증가와 유색 식품에 대한 연구 개발이 증가하고 있다. 품종에 따라 천연색을 함유하고 있고 백미보다 영양적 가치가 높은 유색미에 대한 관심이 높아지고 있으며, 유색미 형태 중에 흑미는 겉껍질이 제거된 현미 상태로 사용하기 때문에 영양적 가치가 높은 것으로 알려져 있다. 흑미에는 식이섬유, 비타민, 무기질 및 불포화지방산을 비롯한 기본 성분 외에도 좋은 영양 공급원이며 polyphenol, anthocyanin, γ -orizanol 등의 기능성 성분을 다량 함유하고 있다.¹⁰⁻¹³⁾ 영양적인 측면에서도 우수한 흑미의 cyanidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside 같은 anthocyanin과 각종 페놀산 성분은 주로 겨, 과립과 호분층에 집중 함유되어 있으며, 흑미의 미강은 백미보다 세포 손상에 대한 항산화 활성이 높다고 알려져 있다.^{11,12,14)} 흑미 미강의 주요성분인 안토시아닌은 종양세포를 억제하는 활성을 가지며, 페놀화합물은 항비만, 항염과 같은 건강 증진에 유익한 것으로 보고되었다.¹⁵⁻¹⁷⁾

선행연구에서 흑미 호분층의 체내 지방, 혈중 지질 및 뼈 건강 관련 호르몬에 미치는 영향,¹⁸⁾ 산화방지와 항염증 활성 증진 등의 연구가 진행된 바 있으나,¹⁹⁾ 호분층 추출물에 관련된 면역 기능성 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 CPA를 투여한 마우스 모델에서 우수한 생리활성 성분이 다량 함유된 흑미 호분층 추출물을 사용하여 면역 증진 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 흑미(*Oryza sativa* L.)는 조생흑찰 품종으로 진도 소재 정미소에서 구입하였고, 도정기를 이용해 쌀겨 제거방법으로 흑미현미를 10도미까지 절삭하고 흑미 호분 세포층을 분리하여 사용하였다. 흑미 호분층을 분쇄(FM909T, Hanil, Korea)하고 10배의 50% 발효 주정으로 40°C에서 100 g을 48시간 추출하였으며, 동결건조 후 10 g(10%)을 얻어 실험에 사용하였다. 시험 시료로 사용한 증거 표본(RDABRA01)은 국립농업과학원 농식품자원부에 보관하였다.

실험동물의 사육 및 시료 투여 - 본 시험에는 Specific-pathogen free(SPF) 상태의 6주령 수컷 C57BL/6 mouse 40마리(실험군당 8마리)를 샘타코(Osan, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 사육기간 중의 식이로 고형사료와 물을 자유 섭취 시켰으며, 온도 23±2°C, 습도 50±10%, 12시간 단위로 명암주기를 조절하였다. 마우스는 1주일 동안 실험 환경에 적응시킨 후, cyclophosphamide(CPA)를 경구 투여

3일전에 150 mg/kg 체중, 경구 투여 1일전에 110 mg/kg 체중을 복강 투여하여 면역 저하 모델을 만들었다. 실험동물의 체중을 CPA 투여가 끝난 24시간 후에 측정하였고 난괴법에 따라 다음과 같이 분류하였다. 흑미 호분층 실험군은 추출 분말의 투여량을 기준으로 OAL-1(150 mg/kg 체중) 그리고 OAL-2(300 mg/kg 체중)으로 구성하였다. 추출물을 용해한 증류수는 CON군과 NC군에, PC군은 면역 증진에 효능이 있다고 알려진 β -glucan(50 mg/kg 체중, Sigma-Aldrich Co.)을²⁰⁾ 용해시켜 사용하였고, 모든 실험군은 14일간 경구로 투여(1회/일)하였다. 본 연구에 사용된 동물실험에 관련된 모든 실험 과정과 절차는 농촌진흥청 국립농업과학원 동물실험윤리위원회의 승인(NAS 202106) 절차와 윤리규정을 준수하여 수행되었다.

혈액 및 면역장기의 채취 - 실험 기간이 종료된 마우스는 체중을 측정 후 CO₂로 마취한 후 혈액을 복대정맥에서 채취하였다. 채취된 혈액은 원심분리용 시험관에 담아 4°C, 2,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 얻었으며, 면역글로불린 및 면역 관련 사이토카인, NK 세포의 분석에 이용하였다. 혈액 채취 후, 마우스는 안락사 시키고 간, 비장과 흉선을 적출하여 무게를 측정하였으며, 조직 분석 시험에 사용하였다.

혈청 내 면역글로불린의 농도 측정 - 흑미 호분층 추출물이 마우스의 혈청 IgA와 IgG 농도에 미치는 영향은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(Abcam, London, UK)를 이용하여 분석하였다. IgA와 IgG 항체가 코팅 되어있는 96-well plate에 혈청을 50 μ L씩 분주하여 상온에서 2시간 배양하였고, 세척 용액으로 3번 세척 후 1×HRP antibody를 각 well 당 50 μ L씩 분주하여 1시간 동안 상온 배양하였다. 다시 세척 후 TMB 용액을 50 μ L씩 분주하여 상온에서 15분 배양하였고, 반응 정지 용액을 50 μ L씩 첨가하여 반응을 정지시켰다. 색의 변화를 확인하고 흡광도(OD)는 microplate reader(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 450 nm에서 측정하였다. 면역글로불린(IgA와 IgG)의 농도는 ELISA kit에 포함되어 있는 표준 용액에서 산출된 곡선을 생성한 후 계산하여 사용하였다.

혈청 사이토카인의 함량 측정 - 흑미 호분층 추출물의 혈청 면역 지표에 미치는 영향을 평가하기 위해 사이토카인(IL-12, TNF- α)을 ELISA kits(Abcam, London, UK)으로 분석하였다. IL-12 분석은 96-well plate에 각 군의 혈청 100 μ L를 넣고 2시간 30분 동안 배양 후 3회 세척하였다. IL-12 antibody를 부착 후 1시간, HRP-streptavidin 용액을 넣고 45분 동안 상온에서 반응시켰다. 세척 후 각 well에 100 μ L의 TMB 용액을 넣고 10분간 반응 처리 후, 100 μ L의 반응 정지 용액을 넣어 활성을 정지시키고 450 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도(OD)를 측정하였다. TNF- α 분석은 TNF- α antibody

가 부착되어 있는 well plate에 antibody cocktail 50 μ L과 혈청 및 표준 용액을 각 50 μ L 넣은 후, 1시간 동안 실온에서 400 rpm 교반기를 이용하여 배양하고 3회 세척하였다. 100 μ L의 TMB 용액을 넣고 10분 동안 반응시킨 후, 100 μ L의 stop 용액을 넣고 반응을 정지시켜 450 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 각 사이토카인의 농도는 ELISA kit에 포함되어 있는 표준 용액에서 산출된 곡선을 생성한 후에 계산하여 사용하였다.

비장 면역세포의 증식능 측정 - 실험동물에서 비장을 적출하여 배양액(DMEM, 2% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin)으로 2회 세척하였고, 세포 배양 접시에서 10 mL의 배양액을 가한 뒤, 40 μ m nylon cell strainer(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 균질화 하였다. 이렇게 얻어진 비장세포를 Histopaque(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 넣고 원심 분리 하여 림프구를 분리하였으며, 세포를 세척한 후 배양액에서 3.0×10^6 cells/mL로 조정 하였다. 96-well plate(Nunc, Roskilde, Denmark)에 100 μ L씩 분주하여 사용하였다. Con A(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 LPS(Sigma-Aldrich, USA)는 최종 농도를 4 μ g/mL, 1 μ g/mL 되도록 첨가하였고, 대조군에는 배양액을 동량 분주하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간 후, 각 well 당 10 μ L의 MTS(Promega Corporation, USA)를 이용하여 2시간 동안 반응시켰고, microplate reader(Molecular Devices)를 이용, 490 nm에서 흡광도(OD)를 측정하여 활성을 비교하였다.

NK 세포의 활성 측정 - NK(natural killer) 세포 활성도는 NK Vue kit(Murine NK activity kit, ATGen Co., Korea)를 이용하여 NK 세포로부터 분비되는 IFN- γ 측정 검사로 시행하였다. 채혈 즉시, 전혈을 Heparine 처리된 전용 용기에 담고, 37°C에 24시간 배양하였다. IFN- γ 농도는 배양된 전혈을 원심분리(15분, 2,000 rpm)하여 얻은 상층액을 ELISA 키트로 처리한 후 450 nm에서 microplate reader(Molecular Devices)로 측정하였다. IFN- γ 값은 제공된 표준곡선을 생성한 후 결과를 계산하여 얻었다.

통계처리 - 모든 결과는 Mean \pm S.E.로 나타내었고 자료는 SPSS 프로그램(Statistical Package for the Science ver. 24, IBM Corp, Armonk, NY, USA)을 이용하여 one-way ANOVA(one-way analysis of variance)를 실시한 후, Duncan's multiple range test에서 $p < 0.05$ 수준인 경우에 유의성을 표시하였다.

결과 및 고찰

흑미 호분층 추출물의 체중과 장기무게에 미치는 영향 - 면역 억제제인 CPA 투여로 인한 면역 저하 동물 모델에

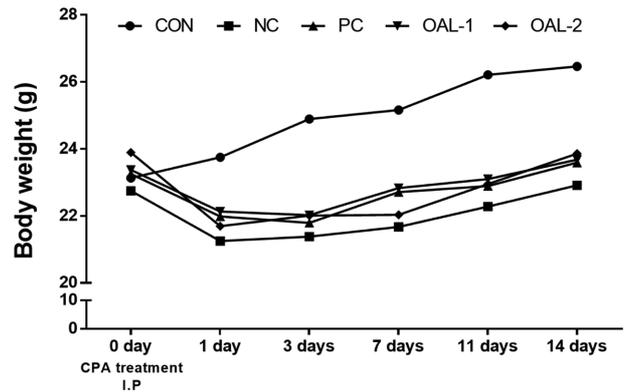


Fig. 1. Effects of black rice(*Oryza stiva* L.) aleurone layer (OAL) extracts on the body weights of C57BL/6 mice immunosuppressed by cyclophosphamide. OAL-1, 150 mg/kg BW; OAL-2, 300 mg/kg BW.

흑미 호분층 추출물이 실험동물의 체중과 장기무게에 미치는 영향을 평가하였다. 경구 투여 시작 전에 CPA를 투여한 후 실험군의 체중은 23.9 g에서 21.8 g으로 모든 군에서 감소가 나타났으며, CPA는 특이적인 세포 독성으로 인해 체중, 비장과 흉선의 무게가 감소된다고 보고되어 있다.^{3,21)} 체중은 음성대조군(NC)군에서 가장 적었고, 흑미 호분층 추출물 투여군(OAL)에서 유의적이지는 않았으나 NC군에 비하여 체중 감소가 개선되는 경향을 보였다(Fig. 1). 또한 사육 기간 중, 실험동물의 식이 및 음용수 섭취량과 행동 유형은 흑미 호분층의 사용된 수준(150, 300 mg/kg 체중)과 정상(CON)군 사이에 차이를 보이지 않았고, 독성이 없는 것으로 나타났다. 따라서, 흑미 호분층 추출물은 안전성에 문제가 없으면서 CPA 투여로 감소된 체중의 정상 회복에 도움을 주는 것으로 보인다. 또한 흑미 호분층 추출물이 체중, 간, 면역 세포의 분화와 성장 관련²²⁾ 장기인 비장 및 흉선 무게에 미치는 영향을 살펴보았다. 간의 무게가 CON군 5.77 ± 0.10 g에서 NC군 5.43 ± 0.04 g으로 유의하게 감소하였으며, OAL-2군에서는 5.75 ± 0.06 g으로 CPA투여로 감소된 간 무게의 증가가 관찰되었다. 또한 대표적인 면역 장기인 비장 무게는 유의적인 차이는 없었으나, 흑미 호분층 추출물의 투여군에서 높게 나타나 CPA로 인해 감소된 비장의 무게의 회복에 도움을 줄 수 있을 것으로 보인다. 또한 다른 면역 장기인 흉선은 CON군 0.18 ± 0.01 g에서 NC군 0.10 ± 0.02 g으로 유의적인 흉선의 무게 감소가 관찰되었으나, OAL-1군 0.15 ± 0.02 g과 OAL-2군 0.16 ± 0.03 g으로 감소된 흉선 무게의 회복이 확인되었다(Table I).

혈중 면역글로불린 수준에 미치는 영향 - 흑미 호분층 추출물의 급여가 마우스의 혈중 면역 체계 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 혈액의 면역글로불린 수준을 분석하였다(Fig. 2). 면역 글로불린은 항체의 생성을 유도하

Table I. Effects of black rice(*Oryza stiva* L.) aleurone layer(OAL) extracts on the organ weights of C57BL/6 mice immunosuppressed by cyclophosphamide

Treatment group	Body weight	Index of organs (/body weight)		
		Liver	Spleen	Thymus
CON	26.5±0.5 ^a	5.77±0.10 ^a	0.32±0.01 ^{NS}	0.18±0.01 ^a
NC	22.9±0.6 ^b	5.43±0.04 ^b	0.28±0.02	0.10±0.02 ^b
PC	23.6±0.5 ^b	6.00±0.11 ^a	0.36±0.04	0.16±0.01 ^a
OAL-1	23.7±0.5 ^b	5.39±0.17 ^b	0.32±0.02	0.15±0.02 ^{ab}
OAL-2	23.9±0.6 ^b	5.75±0.06 ^a	0.39±0.04	0.16±0.03 ^a

OAL-1, 150 mg/kg BW; OAL-2, 300 mg/kg BW. The data was analyzed by one-way ANOVA using SPSS software and was presented as mean±S.E. (n=8). ^{ab}Different letters in each column are significantly different among groups by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

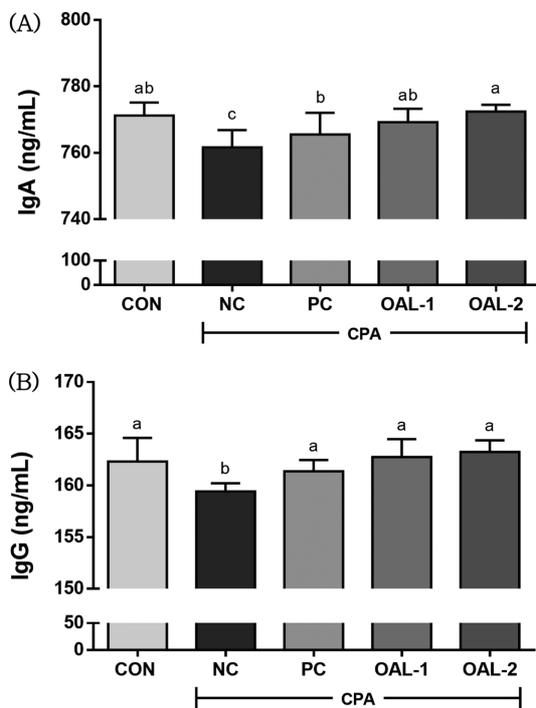


Fig. 2. Effects of OAL extracts on the serum (A) IgA and (B) IgG levels in C57BL/6 mice immunosuppressed by CPA. The data was analyzed by one-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the mean±S.E. (n=8). ^{abc}Different letters on bars are significantly different from each other by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

는 항원과 반응하는 항원-항체 복합체를 형성하는 단백질로, 병원체를 불활성화하여 쉽게 제거되도록 돕는다.^{5,23} 트랜스사이토시스(transcytosis)에 의한 점막 면역의 중요한 역할을 하며, 병원체에 대해 작용하는 초기 방어자 역할을 하는 분비성 면역글로블린 IgA의 함량은²⁴ CPA 투여로 인하여, CON군 771.2±1.8 ng/mL에서 NC군 761.6±2.3 ng/mL으로 유의적인 함량 감소를 보였다(Fig. 2A). OAL-1군은 769.2±1.8 ng/mL으로 정상 범위 수준으로 향상되었으며,

특히 OAL-2군은 772.4±0.9 ng/mL로 NC 및 PC군보다 유의적으로 높은 수준을 보였다. IgG는 체내 면역글로블린의 주요 구성원이며, 대식세포의 식균작용을 도와 감염에 대해 지속적으로 방어하는 역할을 한다.^{5,25} 혈청 IgG 함량은 OAL-1군 162.8±0.7 ng/mL 및 OAL-2 163.2±0.5 ng/mL으로 NC군 159.4±0.3 ng/mL보다 높고, CON군 수준(162.3±0.9 ng/mL)으로 향상 시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

혈청 사이토카인 함량에 미치는 영향 - Helper-T세포는 항원 반응에 의해 IL-2, IFN- γ , IL-12를 생성 및 세포 매개 반응 역할을 하는 Th1과 IL-4, IL-6을 분비하여 체액성 면역을 촉진하는 Th2 사이토카인으로 분화되어 균형적인 상태를 유지하기 위해 면역 반응을 조절 한다.^{8,26} CPA 투여로 인해 저하된 사이토카인 수준에 미치는 영향을 분석하였을 때, IL-12는 Th1 세포 증식을 촉진하고 NK 세포가 IFN- γ 를 분비하도록 돕는다.⁸ CPA를 투여한 NC군은 459.9±8.6 pg/mL으로 CON군(1116.2±10.5 pg/mL)에 비하여 혈중 IL-12 수준이 현저하게 감소하였다(Fig. 3A). 감소된 혈중 IL-12는 OAL-2군에서 875.1±15.7 pg/mL으로 NC군에 비하여 유의적인 회복이 관찰되었다. 선천면역에 의해 생성되며 Th2 염증과 세포 반응에 관여하는 TNF- α 수준을²⁷ 분석한 결과, NC군 30.0±3.1 pg/mL은 CPA를 투여 받지 않은 CON군 18.4±3.0 pg/mL과 비하여 유의적인 혈중 TNF- α 의 증가를 보였으며(Fig. 3B), 증가된 TNF- α 는 β -glucan을 투여 받은 PC군(23.1±1.1 pg/mL) 및 흑미 호분층을 투여 받은 OAL-1군 23.6±2.8 pg/mL과 OAL-2군 22.0±2.3 pg/mL에서 분비 조절에 영향을 줄 수 있는 것으로 나타났다. 면역 조절 및 염증을 유도하여 종양 세포를 제거할 수 있는 TNF- α 는 과 발현할 경우 급성 염증 반응을 초래할 수 있다.^{22,28} 이러한 결과로 볼 때, 흑미 호분층 추출물은 Th1 세포와 Th2 세포 사이토카인의 균형적인 조절을 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

비장 림프구 증식능에 미치는 영향 - 약물에 의해 유도된 비특이적 면역 반응을 나타내는 비장 림프구의 증식은 세포 매개 T림프구 면역 반응을 유도하기 위한 Con A와

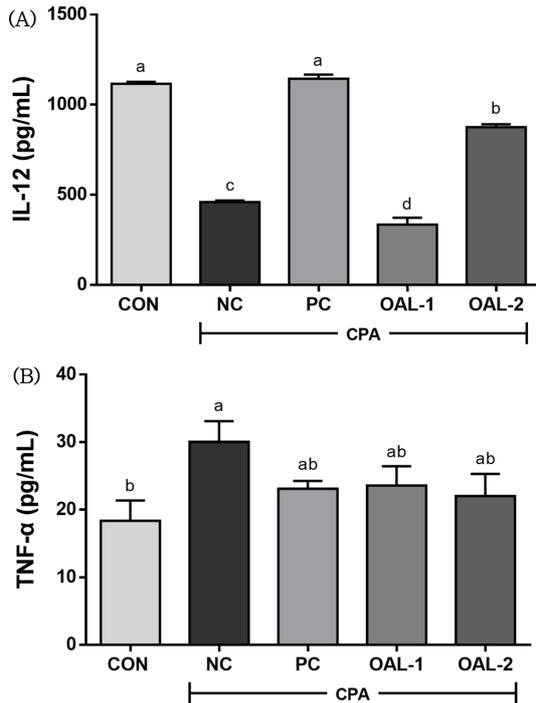


Fig. 3. Effects of OAL extracts on the serum (A) IL-12 and (B) TNF- α levels of C57BL/6 mice immunosuppressed by cyclophosphamide. The data was analyzed by one-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the mean \pm S.E. (n=8). ^{a-d}Different letters on bars are significantly different from each other by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

체액성 매개 면역 반응 B 림프구를 자극하기 위해 LPS를 처리하여 증식능을 확인한다.^{29,30} CPA에 의하여 저해된 면역 상태에서 흑미 호분층 추출물에 의한 비장 림프구 증식능에 미치는 영향을 측정하였다. 비장 T 림프구에 유사 분열 자극제로 세포 대사와 세포 분열을 촉진하는²⁹ Con A를 처리한 NC군의 1.13에 비교하여, OAL-2군은 1.80으로 유의적인 증가를 보였다(Fig. 4A). LPS를 처리하였을 때, NC군(0.61)과 비교하여 OAL-1군(1.19) 및 OAL-2군(1.23)에서 50% 수준에서 유의적인 증식 효과를 나타내었다(Fig. 4B). 이러한 결과로 볼 때, 흑미 호분층 추출물은 T 및 B 림프구에 의한 면역 활성을 나타내는데 도움을 주는 것으로 나타났고, 곡물 추출물이 비장 림프구 분석에서 T 및 B 세포의 증식을 유도하고 NK 세포의 활성을 개선하였다는 선행 연구와 유사한 결과를 보였다.³¹⁾

NK 세포 활성에 미치는 영향 -NK 세포는 면역계의 주요 구성원인 선천 림프구 세포로 사전 면역 반응 없이 형질 전환된 표적 세포를 제거하고 미생물 감염으로부터 신체를 방어한다. 리간드와 결합에 의해 활성화된 NK 세포는 표적 세포 사멸 작용, 사이토카인 및 케모카인을 분비하여 면역 반응을 조절한다. 활성화된 NK 세포에서 분비되는

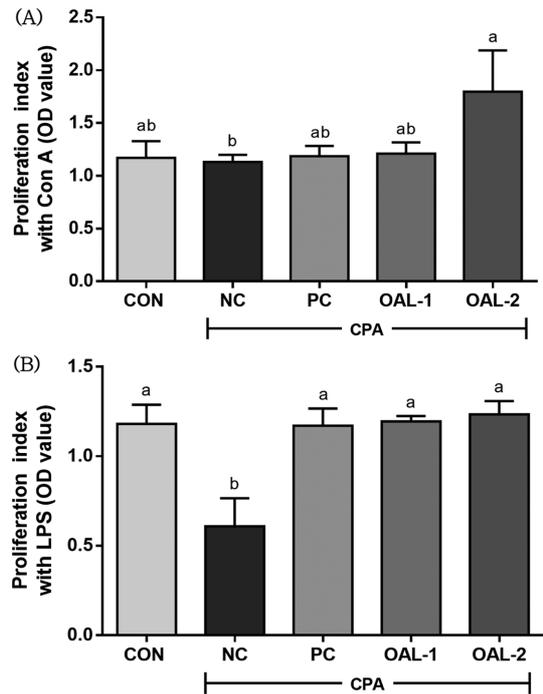


Fig. 4. Effects of OAL extracts on T and B cell (A, B) proliferation in splenocytes of C57BL/6 mice immunosuppressed by cyclophosphamide. The data was analyzed by one-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the mean \pm S.E. (n=8). ^{a,b}Different letters on bars are significantly different from each other by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

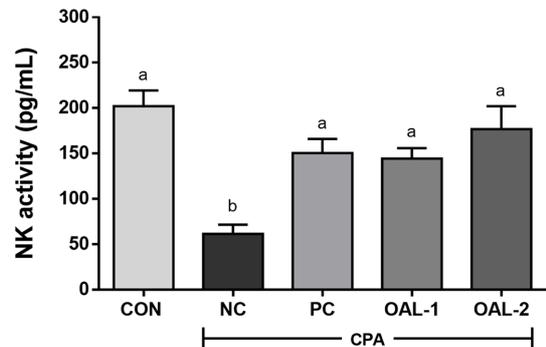


Fig. 5. Effects of OAL extracts on NK cell activity in blood of C57BL/6 mice immunosuppressed by cyclophosphamide. The data was analyzed by one-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the mean \pm S.E. (n=8). ^{a,b}Different letters on bars are significantly different from each other by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

IFN- γ 는 체내 유입되는 병원체에 대해 면역 반응을 나타내었다.^{32,33)} 본 연구에서는 면역이 저하된 마우스 혈액의 NK 세포에서 흑미 호분층 추출물이 미치는 영향을 분석하기 위해, CD56bright, CD56dim을 포함하는 NK 세포의 특이적으로 활성화된 면역 반응을 증폭시켜 이펙터 사이

토카인의 분비능을 측정하였다.³⁴⁾ 흑미 호분층 추출물 투여는 저하된 NK 세포의 활성을 정상군 상태로 회복하는데 도움을 주어 체내 면역 조절에 관여할 수 있는 것으로 보인다. CPA를 처리한 NC군에서 IFN- γ 의 농도는 61.7 \pm 10.0 pg/mL으로 CON군 202.2 \pm 17.2 pg/mL에 비하여 현저한 감소를 보여 CPA로 인한 NK 세포 활성의 감소를 확인하였다(Fig. 5). 감소된 NK 세포의 활성은 OAL-1군 144.5 \pm 11.5 pg/mL 및 OAL-2군 176.8 \pm 25.2 pg/mL으로 유의하게 농도 의존적인 영향을 줄 수 있는 것으로 나타났다.

결 론

면역체계의 불균형 장애에 관련된 질환이 빈번해짐에 따라 면역력 조절에 관한 다양한 식의약 소재가 연구되고 있다. 본 연구에서는 다양한 기능성을 함유하는 유색미 중에 대표적인 흑미 호분층 추출물을 이용하여 면역 조절 효과를 평가하였다. CPA에 의한 면역 저하 마우스 모델에 흑미 호분층 추출물을 14일 동안 경구투여하고 관련 지표들을 분석하였다. 그 결과, 면역 억제물질인 CPA로 인해 저하된 체중 감소는 흑미 호분층 추출물(OAL-1, OAL-2)의 투여 후 회복을 보였고, 실험동물에 대한 안전성에 영향이 없는 것으로 나타났다. 흑미 호분층 추출물은 면역이 저하된 마우스에서 감소된 혈중 면역글로불린 A와 G 수준을 정상군(CON) 수준으로 농도 의존적인 증가를 보였고, 사이토카인 IL-12와 TNF- α 의 함량을 효과적으로 조절하였다. 또한, 흑미 호분층 추출물은 Con A와 LPS에 대한 비장 세포 증식능에 유의한 영향을 주었으며, NK 세포 활성을 농도 의존적으로 향상시켜 선천 면역 조절에 관여하는 것으로 나타났다. 따라서, 흑미 호분층 추출물은 면역 조절 효과가 우수하여 면역 기능 개선에 관련된 다양한 건강기능식품의 기능성 원료 후보 소재로 기대된다.

사 사

본 연구는 2021년도 농촌진흥청 시험연구사업(PJ01586301)의 연구비 지원으로 이루어졌습니다.

인용문헌

1. Yu, F., Zhang, Z., Ye, S., Hong, X., Jin, H., Huang, F., Yang, Z., Tang, Y., Chen, Y. and Ding, G. (2019) Immuno-enhancement effects of pentadecapeptide derived from *Cyclina sinensis* on immune-deficient mice induced by Cyclophosphamide. *J. Funct. Foods* **60**: 103408.
2. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A. and Delgado, M. (2007) Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuro-peptides. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 52-63.
3. Shirani, K., Hassani, F. V., Razavi-Azarkhiavi, K., Heidari, S., Zanjani, B. R. and Karimi, G. (2015) Phytotrapy of cyclophosphamide-induced immunosuppression. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **39**: 1262-1275.
4. World Health Organization. (2020). International guidelines for certification and classification (coding) of COVID-19 as cause of death. *International Statistical Classification of Diseases*.
5. Sujono, T. A., Kusumowati, I. T. D. and Munawaroh, R. (2021) Effects of Jamaican cherry (*Muntingia calabura* L.) Fruits Extract on Immunoglobulin G Levels and Hematological Profiles in Mice. *Pharmacogn. J.* **13**: 535-541.
6. Ilangkovan, M., Jantan, I., Mesaik, M. A. and Bukhari, S. N. A. (2015) Immunosuppressive effects of the standardized extract of *Phyllanthus amarus* on cellular immune responses in Wistar-Kyoto rats. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**: 4917.
7. Cheng, D., Wan, Z., Zhang, X., Li, J., Li, H. and Wang, C. (2017) Dietary *Chlorella vulgaris* ameliorates altered immunomodulatory functions in cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice. *Nutrients*. **9**: 708.
8. Zhou, Y., Chen, X., Yi, R., Li, G., Sun, P., Qian, Y. and Zhao, X. (2018) Immunomodulatory effect of tremella polysaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Molecules* **23**: 239.
9. Korean Statistical Information Service. (2020) Food grain consumption survey. *Statistics Korea*.
10. Lee, H. M., Im, J. S., Park, J. D., Kum, J. S., Lee, H. Y. and Lee, Y. T. (2013) Amylolytic activity of brown rice and black rice during germination. *J. Food Sci. Technol.* **45**: 333-338.
11. Zhang, M. W., Zhang, R. F., Zhang, F. X. and Liu, R. H. (2010) Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 7580-7587.
12. Kong, S., Kim, D. J., Oh, S. K., Choi, I. S., Jeong, H. S. and Lee, J. (2012) Black rice bran as an ingredient in noodles: chemical and functional evaluation. *J. Food Sci.* **77**: C303-C307.
13. Kim, H. J., Park, H. Y., Kim, M. Y., Lee, J. Y., Lee, J. H., Lee, J. Y., Lee, B. W., Kim, M. and Lee, B. (2021) Physicochemical characteristics of brown rice porridge added with colored rice cultivars. *JKFN* **50**: 279-284.
14. Min, S. W., Ryu, S. N. and Kim, D. H. (2010) Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O- β -D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. *Int. Immunopharmacol.* **10**: 959-966.
15. Shin, H. Y., Kim, S. M., Lee, J. H. and Lim, S. T. (2019) Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. *Food Chem.* **272**: 235-241.
16. Chen, P. N., Kuo, W. H., Chiang, C. L., Chiou, H. L., Hsieh,

- Y. S. and Chu, S. C. (2006) Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chem. Biol. Interact.* **163**: 218-229.
17. Min, B., McClung, A. M. and Chen, M. H. (2011) Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *J. Food Sci.* **76**: C117-C126.
 18. Choi, B. K., Nam, S. Y., Lee, Y. M., Kim, J. B., Choe, J. S., Lee, H. J., Lee, S. J. and Lee, S. H. (2015) Supplementary effects of black rice (*Oryza sativa* L.) Aleurone layer extract on body fat, serum lipid, and serum hormone levels in ovariectomized rats. *The Journal of the Korea Contents Association* **15**: 599-605.
 19. Lee, M. K., Ryu, S. I. and Lee, M. H. (2018) Improvement of anti-oxidant and anti-inflammatory activities of aleurone layer extracts of black rice (*Oryza sativa* L.) by enzyme treatment. *J. Food. Sci. Technol.* **50**: 528-534.
 20. Lee, E. B., Lee, S. H., Park, Y. G., Choi, J. H., Lee, H. K., Jang, H. H., Hwang, K. A., Choe, J. S., Park, S. Y., Choi, A. J., Hwnag, I. G., Kim, J. S., Lee, H. J., Lee, S. J. and Jeong, H. C. (2019) *Platycodon grandiflorum* extract ameliorates cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *J. East Asian Soc. Diet. Life* **29**: 303-309.
 21. Hussain, A., Shadma, W., Maksood, A. and Ansari, S. H. (2013) Protective effects of *Picrorhiza kurroa* on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Pharmacognosy Res.* **5**: 30.
 22. Wang, H., Xu, L., Yu, M., Wang, Y., Jiang, T., Yang, S. and Lv, Z. (2019) Glycosaminoglycan from *Apostichopus japonicus* induces immunomodulatory activity in cyclophosphamide-treated mice and in macrophages. *Int. J. Biol. Macromol.* **130**: 229-237.
 23. Marieb, E. N. (1998) Human anatomy and Physiology, Fourth edition, Benjamin / Cummings Publishing Co. California. **612-617**, 723-725.
 24. Cerutti, A., Chen, K. and Chorny, A. (2011). Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu. Rev. Immunol.* **29**: 273-293.
 25. Chen, S., Liu, C., Huang, X., Hu, L., Huang, Y., Chen, H., Fang, Q., Dong, N., Li, M., Tang, W. and Nie, S. (2020) Comparison of immunomodulatory effects of three polysaccharide fractions from *Lentinula edodes* water extracts. *J. Funct. Foods* **66**: 103791.
 26. Yoo, H. J., You, D. J. and Lee, K. W. (2019) Characterization and immunomodulatory effects of high molecular weight fucoidan fraction from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Mar. drugs* **17**: 447.
 27. Choi, J. P., Kim, Y. S., Kim, O. Y., Kim, Y. M., Jeon, S. G., Roh, T. Y., Park, Y. S. and Kim, Y. K. (2012) TNF-alpha is a key mediator in the development of T h2 cell response to inhaled allergens induced by a viral PAMP double-stranded RNA. *Allergy* **67**: 1138-1148.
 28. Byun, E. H. (2015) Comparison study of immunomodulatory activity of polysaccharide and ethanol extracted from *Sargassum fulvellum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**: 1621-1628.
 29. Wang, Y., Qi, Q., Li, A., Yang, M., Huang, W., Xu, H., Zhao, Z. and Li, S. (2016) Immuno-enhancement effects of Yifei Tongluo Granules on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice. *J. Ethnopharmacol.* **194**: 72-82.
 30. Yu, Y., Song, Q., Huang, L., Shen, M., Yu, Q., Chen, Y. and Xie, J. (2020) Immunomodulatory activities of sulfated *Cyclocarya paliurus* polysaccharides with different degrees of substitution on mouse spleen lymphocytes. *J. Funct. Foods* **64**: 103706.
 31. Yang, L. C., Hsieh, C. C. and Lin, W. C. (2015) Characterization and immunomodulatory activity of rice hull polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **124**: 150-156.
 32. Lee, S. B., Cha, J., Kim, I. K., Yoon, J. C., Lee, H. J., Park, S. W., Cho, S. J., Youn, D. Y., Lee, H. J., Lee, C. H., Lee, J. M., Lee, K. Y. and Kim, J. S. (2014) A high-throughput assay of NK cell activity in whole blood and its clinical application. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**: 584-590.
 33. Martín-F, a, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-γ for TH 1 priming. *Nat. Immunol.* **5**: 1260-1265.
 34. Dowell, A. C., Oldham, K. A., Bhatt, R. I., Lee, S. P. and Searle, P. F. (2012) Long-term proliferation of functional human NK cells, with conversion of CD56 dim NK cells to a CD56 bright phenotype, induced by carcinoma cells co-expressing 4-1BBL and IL-12. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**: 615-628.
- (2021. 9. 1 접수; 2021. 9. 14 심사; 2021. 9. 17 게재확정)