

# 복분자 미숙과 및 성숙과가 생쥐의 복강 Macrophages에 미치는 영향

이택열 · 김대근 · 소준노<sup>1</sup> · 권진<sup>2</sup> · 송정모<sup>3</sup> · 은재순\*

우석대학교 약학대학, 1: 이공대학, 2: 군장대학 보건행정과, 3: 한의과대학

## Effect of Unripened fruits and Ripened fruits of *Rubus coreanus* Miquel on Murine Peritoneal Macrophages

Taek Yul Lee, Dae Keun Kim, June No So<sup>1</sup>, Jin Kwon<sup>2</sup>, Jung Mo Song<sup>3</sup>, Jae Soon Eun\*

College of Pharmacy, 1: College of Science and Technology, 2: Department of Health Administration, Kunjang College, 3: College of Oriental Medicine, Woosuk University

The purpose of this research was to investigate the effects of unripened fruits and ripened fruits of *Rubus coreanus* Miquel on murine peritoneal macrophages. The 70% ethyl alcohol extracts (20 or 100 mg/kg) of unripened fruits (RCE-I) and of ripened fruits (RCE-II) were administered *p.o.* once a day for 7 days to mice. RCE-I and RCE-II decreased the phagocytic activity of murine peritoneal macrophages and the production of nitric oxide. Also, RCE-I and RCE-II increased the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  from peritoneal macrophages. In general, the immuno-suppressive action of RCE-I on macrophages was more potent than those of RCE-II. These results suggest that the fruits of *Rubus coreanus* Miquel regulates the non-specific immune response via decrease of phagocytic activity and increase of production of tumor necrosis factor- $\alpha$  from murine peritoneal macrophages.

Key words : *Rubus coreanus* Miquel, peritoneal macrophage, phagocytosis, tumor necrosis factor- $\alpha$

### 서론

복분자 (*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과 (Rosaceae)에 속하는 우리나라 중부 이남의 산기슭 양지에 자라는 낙엽관목으로 갈고리 모양의 가시가 있는 것이 특징이다. 열매는 핵과가 모여서 반달모양의 검은 복과를 형성하고 5~6월에 장미색으로 개화하고 과실군은 7~8월에 열매가 성숙되어 등글고 붉은 색으로 익다가 나중에는 흑색으로 완숙된다. 한방에서는 복분자딸기 나무의 덜 익은 열매, 즉 미숙과를 복분자라고 하며 補肝腎, 明目, 이뇨제의 효능이 있고, 정력감퇴, 유정, 빈뇨를 치료한다고 알려져 있으며 그 사용법으로는 미숙과를 물에 넣고 달여서 복용하거나 술에 담가 복용한다<sup>1)</sup>. 원산지인 중국에서는 미성숙 과실을 증기로 찌서 햇볕에 말려 강장제 등 약용으로 사용하고 있다. 일본에서는 복분자와 유사한 품종을 약 70 여종으로 분류하고 있으며, 유럽과 미국 등에서도 *Rubus* 속 식물의 열매를 raspberry류로 통칭하고, red raspberry, purple raspberry 및

black raspberry류로 대별한다. 주로 우리나라에서 사용하고 있는 것은 black raspberry로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 복분자에 함유된 성분은 phenolic 화합물<sup>3)</sup>, tannin 화합물<sup>4)</sup> 및 terpenoids 화합물<sup>5,6)</sup> 등이 확인, 동정되었으며, 생리활성은 항산화작용<sup>7,8)</sup>, 항암작용<sup>10,11)</sup> 및 항알러지작용<sup>12)</sup> 등이 보고되었다.

본 연구는 전보<sup>13)</sup>에서 복분자의 미숙과와 완숙과에서 특이적 면역조절작용에 차이가 있음을 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 복분자의 미숙과와 완숙과가 비특이적 면역조절작용에 미치는 영향을 관찰하고자 murine peritoneal macrophages에 미치는 영향에 대해 연구한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 8 주령 BALB/c계 수컷을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 20±3℃, 습도 50±5%, dark/light 12 시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 교형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

\* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학  
· E-mail : jseun@core.woosuk.ac.kr · Tel : 063-290-1569  
· 접수 : 2003/04/19 · 수정 : 2003/05/31 · 채택 : 2003/07/23

## 2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline, lipopolysaccharide(LPS),  $\gamma$ -interferon( $\gamma$ -IFN), lucigenin, N-naphthylethylenediamine · 2HCl, zymosan, RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), trypsin은 Gibco Co., mouse TNF- $\alpha$  immunoassay kit는 R&D Co., FITC-conjugated *E. coli* particles은 Molecular Probes Co., 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), microplate-reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope(Zeiss Co.), freeze dry apparatus (Ilsin Co.), luminometer(Berthold 96LP) 등을 사용하였다.

## 3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 복분자는 2002년 6월에서 7월 사이에 채취한 것을 전북 고창군 농업기술센터 복분자 시험장에서 제공받아 사용하였으며, 성숙도에 따라 미숙과와 완숙과로 구분하여 실험하였다. 미숙과 및 완숙과 각 400g을 70% ethanol에 넣어 가끔 진탕하면서 24 시간씩 50 °C에서 2회 온침 추출하였다. 추출액을 여과하여 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 미숙과 15.5g (이하 RCE-I 이라 칭함), 완숙과 30.7g (이하 RCE-II라 칭함)을 얻어, 실험시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

## 4. 복강 macrophages 분리

생쥐의 복강 macrophage의 분리는 RCE-I 및 RCE-II를 각각 20 mg/kg 또는 100mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였다. 약물 투여 4일째 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 8일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4 °C에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시키고 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 macrophage를 cell scraper로 분리하였다. 배양할 때는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 사용하였다.

## 5. 복강 macrophages의 phagocytic activity 측정

분리한 macrophage를  $2 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Lucigenin 용액의 제조는 10 ml의 DPBS-A에 용해한 후, 여과 멸균하여 -20 °C에서 보관하면서 사용하였다 (stock solution). Lucigenin stock solution은 사용하기 직전에 DME 배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37 °C에서 측정하였다<sup>14,15</sup>. 측정용 microplate (white)의 각 well에 준비된 macrophage 부유액 50  $\mu$ l와 lucigenin 용액 50  $\mu$ l 및 zymosan

용액 30  $\mu$ l를 첨가하여 최종 volume이 200  $\mu$ l가 되도록 한 후, 37 °C에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다. *In vitro* 실험에서는 분리한 macrophages에 RCE-I 및 RCE-II를 각각 1, 10 및 100  $\mu$ g/ml를 가하고 동일한 방법으로 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

## 6. 복강 macrophages의 engulfment 측정

FITC-conjugated *E. coli* particle을 HBSS에 1 mg/ml 농도로 현탁시켜 sonification한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer (pH 4.4)에 250  $\mu$ g/ml 농도로 용해하여 사용하였다. RCE-I 및 RCE-II 100 mg/kg을 투여하고 분리한 macrophage를 RPMI1640 배지로  $1 \times 10^5$  cells/ml 되도록 조정 한 후, 100  $\mu$ l를 96 well에 분주하고 *E. coli* 현탁액 25  $\mu$ l를 가하여 1 시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100  $\mu$ l를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다<sup>16</sup>.

## 7. 복강 macrophages로부터 nitric oxide 생성량 측정

분리한 macrophages를 24 well plate에 well당  $2 \times 10^6$  cells을 분주한 후 macrophages로부터 생성되는 nitric oxide (NO)의 양을 Griess법<sup>17</sup>으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1  $\mu$ g/ml와  $\gamma$ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 24 시간 배양한 후, 배양액 100  $\mu$ l와 Griess 시약 (1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100  $\mu$ l를 혼합하여 96 well module에 넣고, 37 °C에서 10분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO<sub>2</sub>의 검량선에 의해 NO<sub>2</sub>의 농도를 환산하였다.

## 8. 복강 macrophages로부터 tumor necrosis factor- $\alpha$ 생성량 측정

동일한 방법으로 macrophages를 분리하여  $2 \times 10^7$  cells/ml로 조제한 다음, 96 well plate에 200  $\mu$ l 씩 분주한 후, 72 시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리 (2,500 rpm, 2분, 4 °C) 한 다음, 상등액 50  $\mu$ l를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 양을 측정하였다. 즉 sample 50  $\mu$ l에 assay diluent 50  $\mu$ l를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse TNF- $\alpha$  conjugated concentrate 100  $\mu$ l를 가하여 실온에서 2 시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100  $\mu$ l를 혼합하여 30분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100  $\mu$ l를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정 한 후, 미리 작성한 검량선에 의해 TNF- $\alpha$ 의 양을 환산하였다.

## 9. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean  $\pm$  SE로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

## 실험성적

### 1. 복강 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 효과

Chemiluminescence(CL)은 phagocytosis가 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가는 것으로 알려져 있다<sup>18)</sup>. *In vivo* 실험에서 대조군의 macrophages로부터 생성되는 CL의 양 보다 RCE-I 및 RCE-II 20 및 100 mg/kg을 각각 투여하고 분리한 macrophages에서 생성되는 CL 양은 농도의존적으로 감소하였으며, RCE-II 보다 RCE-I 투여하였을 때 CL 양이 더욱 감소하였다 (Fig. 1).

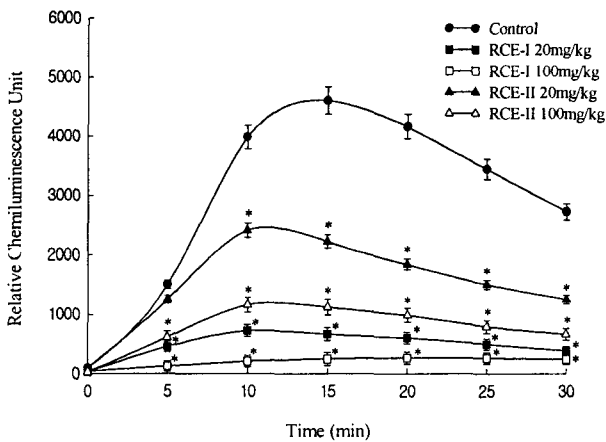


Fig. 1. Effect of the administration of RCE-I and RCE-II on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages. RCE-I or II (20 and 100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days and the separated peritoneal macrophages ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.001$ )

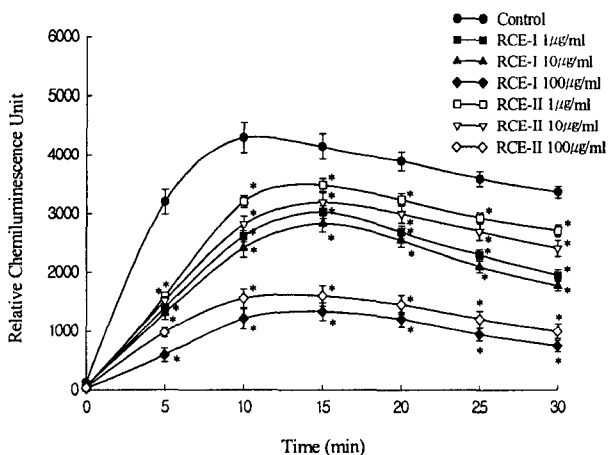


Fig. 2. Effect of RCE-I and RCE-II on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages *in vitro*. The cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan 2h after was cultured with RCE-I or II (1, 10 and 100  $\mu$ g/ml). The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.001$ ).

*In vitro* 실험에서 분리한 macrophages에 RCE-I 및 II 1, 10 및 100  $\mu$ g/ml를 처리하였을 때, CL 양은 대조군에 비해 농도의존적으로 감소하였으며, *In vivo* 실험의 결과와 동일하게 RCE-II 보다 RCE-I 처리하였을 때 CL 양이 더욱 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 2).

### 2. 복강 macrophage의 engulfment에 미치는 효과

FITC-conjugated *E. coli* particles를 이용하여 RCE-I 및 RCE-II 100 mg/kg을 투여하고 분리한 복강 macrophages에 uptake 되는 particles를 관찰한 결과 particles이 대조군에 비해 감소되었으며, RCE-II 보다 RCE-I 투여하였을 때 uptake되는 particles이 더욱 감소하였다 (Fig. 3).

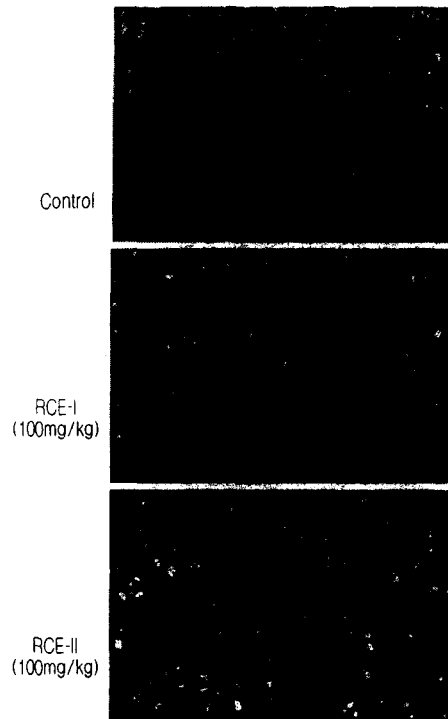


Fig. 3. Photomicrographs of the engulfment of FITC-conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages obtained from RCE-I or RCE-II-administered mice. Photographs (taken at 200  $\times$  magnification) showing the uptake of FITC-conjugated *E. coli* particles.

### 3. 복강 macrophage로부터 nitric oxide의 생성에 미치는 효과

대조군의 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하지 않았을 때 nitric oxide (NO) 생성량은  $2.3 \pm 0.3 \mu$ M 이었으며, LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은 48 시간 후에  $22.9 \pm 1.8 \mu$ M로 증가하였다. RCE-I 20 및 100 mg/kg을 투여하고 분리한 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은  $17.5 \pm 1.3$  및  $7.6 \pm 0.3 \mu$ M로 대조군에 비해 농도의존적으로 감소하였다. 또한, RCE-II 20 및 100 mg/kg을 투여하고 분리한 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은  $6.2 \pm 0.2$  및  $3.6 \pm 0.1 \mu$ M로 대조군에 비해 농도의존적으로 감소하였으며, RCE-I 보다 RCE-II 투여하였을 때 NO 생성량이 더욱 감소하였다 (Table 1).

Table 1. Effect of RCE-I and RCE-II on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages

Samples	Dose (mg/kg)	Nitric oxide ( $\mu$ M)
Control	-	22.9 $\pm$ 1.8
RCE-I	20	17.5 $\pm$ 1.3*
RCE-I	100	7.6 $\pm$ 0.3**
RCE-II	20	6.2 $\pm$ 0.2**
RCE-II	100	3.6 $\pm$ 0.1**

RCE-I or II (20 and 100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioycolate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages ( $2 \times 10^6$  cells/ml) obtained after 2 hr adherence period were cultured for 48 hr in the presence of LPS and  $\gamma$ -IFN. The production of nitric oxide was determined with a Gress reagent. The data represents the mean $\pm$ SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group (\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.001$ ). The production of nitric oxide is  $23\pm 0.3 \mu$  M in the absence of  $\gamma$ -interferon and lipopolysaccharide

#### 4. 복강 macrophage로부터 tumor necrosis factor- $\alpha$ 의 분비에 미치는 효과

대조군의 복강 macrophage에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 의 양은  $358.5\pm 8.9$  pg/ml 이었으며, RCE-I 20 및 100 mg/kg을 투여한 군은  $372.8\pm 10.5$  pg/ml 및  $456.4\pm 12.7$  pg/ml로 100 mg/kg 투여시 대조군에 비해 증가하였으며, RCE-II 20 및 100 mg/kg을 투여한 군은  $394.2\pm 11.8$  pg/ml 및  $498.7\pm 13.5$  pg/ml로 20 mg/kg 이상 투여시 대조군에 비해 증가하였다 (Table 2).

Table 2. Effect of RCE-I and RCE-II on the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  from murine peritoneal macrophages

Samples	Dose (mg/kg)	Tumor necrosis factor- $\alpha$ (pg/ml)
Control	-	358.5 $\pm$ 8.9
RCE-I	20	372.8 $\pm$ 10.5
RCE-I	100	456.4 $\pm$ 12.7**
RCE-II	20	394.2 $\pm$ 11.8*
RCE-II	100	498.7 $\pm$ 13.5**

RCE-I or II (20 and 100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioycolate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages ( $2 \times 10^6$  cells/ml) obtained after 2 h adherence period were cultured for 72 h in RPMI1640 media. The secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  was determined in supernatants of cultures with ELISA kit. The data represents the mean $\pm$ SE of 5 mice. \*Significantly different from control group (\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ ).

## 고찰

생쥐의 비특이적 면역반응에 미치는 복분자 미숙과 및 완숙과의 영향을 관찰하기 위해, 복강 macrophages를 분리하여 실험하였다. 외부로부터 이물질이 침입하게 되면 생체는 자기방어를 위해 macrophages가 활성화되어 phagocytosis가 촉진된다. 이러한 phagocytosis는 polymorphonuclear leukocytes에서도 일어난다<sup>19)</sup>. Phagocytosis는 면역적인 측면에서 중요하지만, 상처치유 과정에서도 매우 중요하다. 본 실험에서 macrophages의 phagocytic activity를 측정하는데 chemiluminescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 이 방법의 원리는 macrophages가 particle을 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 생성하는데, 이때 생성된 oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 lucigenin chemiluminescence를 발생시키는 것을 측정함으로써 phagocytic activity가 진행되는 것을 확인하는 것이다<sup>18)</sup>. Macrophage로부터

생성되는 chemiluminescence (CL)를 측정한 결과 RCE-I 및 II를 투여하고 분리한 macrophages에서 생성되는 CL 양은 감소하였으며, 100 mg/kg 투여하였을 때가 20 mg/kg 투여하였을 때에 비해 CL 양이 더욱 감소하였다. 또한 *In vitro* 실험에서도 농도의존적으로 CL 양이 감소하는 경향을 나타냈으며, RCE-I이 RCE-II보다 CL양을 더욱 감소시켰다. 이는 RCE가 복강 macrophage에 직접작용하여 phagocytic activity를 감소시킴을 의미하는 것이며, 복분자 미숙과가 완숙과에 비해 phagocytic activity를 더욱 감소시켜 비특이적 면역반응을 억제할 수 있음을 시사하는 것이다.

NO는 활성화된 macrophages의 pseudopodia 형성을 억제하며<sup>20)</sup>, Th1 세포에서 분비되는  $\gamma$ -IFN은 macrophages를 활성화시키고<sup>21)</sup>, *in vivo*에서 T-lymphocyte의 생명을 조절하는 인자 중 하나로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 본 실험에서 대조군에서 분비되는 NO 양은  $22.9 \mu$  M 이었으나, RCE-I 20 및 100 mg/kg 투여하였을 때 17.5 및  $7.6 \mu$  M로, RCE-II 20 및 100 mg/kg을 투여하였을 때 6.2 및  $3.6 \mu$  M로 대조군에 비해 감소하였으며, RCE-I 보다 RCE-II 처리하였을 때 NO 생성이 더욱 억제되었다. RCE 투여에 의해 NO 생성이 감소되었다는 실험결과는 RCE 투여로 감소되는 macrophages의 phagocytic activity에 NO가 관련되어 있지 않음을 의미하는 것이며, 복분자 완숙과가 미숙과에 비해 NO 생성을 더 강하게 억제하였으나, phagocytic activity는 미숙과에 비해 덜 감소되었다는 것은 이들 작용이 NO가 아닌 다른 경로를 통하여 작용하고 있음을 시사하는 것이다. RCE를 투여하고 복강 macrophages에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 의 양을 측정한 결과 RCE-II 보다는 RCE-I에서 TNF- $\alpha$ 의 양이 더욱 증가하였다. 이러한 실험결과는 복분자 미숙과가 완숙과에 비해 macrophage에 미치는 영향이 더욱 강함을 의미하는 것이다.

## 결론

복분자는 복강 macrophage로부터 nitric oxide의 생성 및 phagocytic activity를 억제하였고, TNF- $\alpha$ 의 생성을 증가시켜 비특이적 면역반응을 조절하는 약제라 사료되며, 미숙과가 완숙과에 비해 그 약성이 더욱 강력하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2003년도 우석대학교 교내학술연구비지원에 의하여 연구되었기에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Bae, G.H.: The Medicinal Plants of Korea. Kyohak Publishing Co., p.231, 2000.
- Cha, H.S., Lee, M.K., Hwang, J.B., Park, M.S. and Park, K.M.: Physicochemical characteristics of *Rubus coreanus* Miquel. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 30(6), 1021-1025, 2001.

3. Kim, M.S.: Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. M.S. Thesis, Chung-Ang Univ., Seoul, 1996.
4. Bang, G.C.: Tannins from the fruits of *Rubus coreanum*. M.S. Thesis, Chung-Ang, Univ. Seoul, 1996.
5. Kim, Y.H.: Triterpenoids from *Rubus fructus* (Bogbunja). *Arch. Pharm. Res.*, 16, 109-113, 1993.
6. Gao, F.: 19 $\alpha$ -hydroxyursane-type triterpene glucosyl esters from the roots of *Rubus suavissimis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 37-41, 1985.
7. Costantino, L., Albasini, A., Rasteli, G. and Benvenuti, S.: Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. *Planta Med.*, 58, 342-345, 1992.
8. Cha, H.S., Park, M.S. and Park, K.M.: Physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 33(4), 409-415, 2001.
9. Heinonen, L.M., Meyer, A.S. and Frankel, E.N.: Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 46(10), 4107-4112, 1998.
10. Daniel, E.M., Krupnick, A.S., Heru, Y.H., Blinzler, J.A., Nims, R.W. and Storer, G.D.: Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *J. Food Compos. Anal.*, 2, 338-349, 1989.
11. De Ancos, B., Gonzalez, E.M. and Cano, M.P.: Ellagic acid, vitamin C and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 48(10), 4565-4570, 2000.
12. Shin, T.Y., Kim, S.H., Lee, E.S., Eom, D.O. and Kim, H.M.: Action of *Rubus coreanus* extract on systemic and local anaphylaxis. *Phytother. Res.*, 16, 508-513, 2002.
13. Won, K. S., Lee, T. W., Eun, J. S. and Song, J. M.: Effect of *Rubus coreanus* Miquel on the Specific Immune Response in Mice. *Kor. J. Oriental Phys. & Pathol.* 17(3), 656-661, 2003.
14. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M.: Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods*, 174, 259-268, 1994.
15. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G.: Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods*, 112, 163-168, 1988.
16. Chok, P.W., Choon, S.P. and Benjamin, H.S.: A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immunol. Methods*, 162, 1, 1993.
17. Rockett, K.A., Auburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A.: Killing of *Plasmodium faciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*, 59(9), 3280-3283, 1991.
18. Channon, J. Y., Leslie, C. C. and Johnston, Jr. R. B.: Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. *J. Leucocyte Biol.*, 41, 450-455, 1987.
19. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C.: Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 45, 1-8, 1984.
20. Jun, C.D., Park, S.K., Kim, J.M., Kim, J.D. and Kim, S.H.: Nitric oxide inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. *Kor. J. Immunol.*, 18, 635-644, 1996.
21. 김대식 외: 면역생물학, 라이프사이언스, 서울, pp.284-296, 2000.
22. Kilbourn, R.G. and Griffith, O.W.: Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J. Natl. Cancer Instit.*, 84(11), 828-831, 1992.