

# 복분자가 생쥐의 특이적 면역반응에 미치는 영향

원경숙 · 이태원 · 은재순 · 송정모<sup>1\*</sup>

우석대학교 약학대학, 1: 우석대학교 한의과대학

## Effect of *Rubus coreanus* Miquel on the Specific Immune Response in Mice

Kyung Sook Won, Tae Won Lee, Jae Soon Eun, Jung Mo Song<sup>1\*</sup>

Department of College of pharmacy, 1: College of Oriental Medicine, Woosuk University

The specific immune response of unripened fruits and ripened fruits of *Rubus coreanus* Miquel was examined in BALB/C mice. 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. RCE-I and RCE-II decreased the viability of thymocytes, but increased the viability of splenocytes. Also, RCE-I enhanced the population of helper T and cytotoxic T cells in thymocytes and RCE-II enhanced the population of helper T cells. Furthermore, RCE-I and RCE-II decreased the population of B220<sup>+</sup> cells and Thy1<sup>+</sup> cells and helper T cells in splenocytes. In a general way, the immunosuppressive action of RCE-I was more potent than those of RCE-II. These results suggest that RCE-I and RCE-II have a regulative action of immune response *via* decrease the viability of thymocytes and increase the viability of splenocytes.

Key words : *Rubus coreanus* Miquel, thymocyte, splenocyte

### 서 론

복분자 (*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과 (Rosaceae)에 속하는 우리나라 중부 이남의 산기슭 양지에 자라는 낙엽관목으로 높이가 2~3 m 정도이며, 줄기는 흰 분이 덮여 있고 갈고리 모양의 가시가 있는 것이 특징이다. 열매는 핵과가 모여서 반달모양의 검은 복과를 형성하고 5~6월에 장미색으로 개화하고 과실군은 7~8월에 열매가 성숙되어 둥글고 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 있고, 일본의 경우 복분자와 유사한 품종을 70 여종으로 분류하고 있다. 유럽과 미국 등에서는 *Rubus* 속 식물의 열매를 raspberry류로 통칭하며, red raspberry, purple raspberry 및 black raspberry류로 대별한다. 주로 우리나라에서 사용하고 있는 것은 black raspberry

로 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 등정되었으며, 생리활성은 항산화작용<sup>7-9)</sup>, 항암작용<sup>10,11)</sup> 및 항알러지작용<sup>12)</sup> 등이 보고되었다.

본 연구는 예비실험에서 복분자의 미숙과와 완숙과에서 약리작용에 차이가 있음을 확인하고, 이러한 약리작용의 변화가 미숙과와 완숙과에 함유된 성분의 차이 때문이라 사료되어, 복분자를 미숙과와 완숙과로 구별하여 면역계에 미치는 영향을 관찰한 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, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

#### 2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate

\* 교신저자 : 송정모, 전북 전주시 중화산동 2가, 우석대학교 부속한방병원

· E-mail : soo-dang@hanmail.net · Tel : 063-220-8600

· 접수 : 2003/03/11 · 수정 : 2003/04/21 · 채택 : 2003/05/23

buffered saline, MTT, concanavalin A, lipopolysaccharide는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., PE-conjugated anti-CD4 antibody, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220 antibody, FITC-conjugated anti-Thy1 antibody는 Dainippon seiyaku 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.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL) 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 각각 400g을 70% ethanol로 가름 진탕하면서 24 시간씩 50 °C에서 2회 온침 추출하였다. 추출액을 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 미숙과 15.5g (이하 RCE-I 이라 칭함), 완숙과 30.7g (이하 RCE-II라 칭함)을 얻어, 동물실험 시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

### 4. Thymocytes 및 splenocytes 분리

생쥐의 thymocytes 및 splenocytes 분리는 Wysocki<sup>13)</sup> 및 Mizel<sup>14)</sup> 등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 RCE-I 및 RCE-II를 각각 20 mg/kg 또는 100 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 8일째 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 적출한 흉선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음 (1,500 rpm에서 10 분간 원심) thymocytes 및 splenocytes 부유액으로 하였다. 세포배양시에는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

### 5. 세포증식능 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes의 증식에 미치는 RCE의 영향은 MTT법으로 측정하였다. 본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann<sup>15)</sup>이 개발하여 Kotnik 등<sup>16)</sup>이 변형시킨 방법으로, 96-well plate의 각 well에 분리한 thymocytes 및 splenocytes를 각각 RPMI 1640 배지로 희석하고 각 well에 1 × 10<sup>7</sup> cells/ml 농도로 분주하여 thymocytes는 concanavalin A (Con A) 5 µg/ml를, splenocytes는 lipopolysaccharide (LPS) 10 µg/ml를 첨가한 후, 37 °C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양한 다음 배양 종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료시 0.1N-HCl에 용해시킨 10% SDS 100 µl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에

대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다. *In vitro* 실험에서는 분리한 thymocytes 및 splenocytes 1 × 10<sup>7</sup> cells/ml에 RCE-I 및 RCE-II를 각각 0.1 및 1 mg/ml를 가하고 48 시간 배양한 후 동일한 방법으로 세포생존율을 측정하였다.

### 6. Thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes를 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4 °C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation: 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다<sup>17)</sup>.

### 7. 통계처리

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

## 실험성적

### 1. Thymocytes의 증식에 미치는 효과

*In vivo* 실험에서 대조군의 thymocytes에 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A (Con A)를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 125.7±1.1%로 증가하였으며, RCE-I 20 및 100 mg/kg을 투여하고 분리한 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 각각 72.3±1.3% 및 67.6±1.4%로, Con A를 처리하였을 때의 세포생존율은 93.9±1.7%, 88.7±1.5%로 대조군에 비해 감소하였으며, RCE-II를 20 및 100 mg/kg을 투여하고 분리한 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 각각 80.6±1.4%, 75.8±1.2%로 Con A를 처리하였을 때의 세포생존율은 102.5±1.5% 및 96.4±1.3%로 대조군에 비해 감소하였다(Table 1).

Table 1. Effect of the administration of RCE on the cell viability of mitogen treated-thymocytes in mice

| Samples | Dose (mg/kg) | Cell viability (%)         |                        |
|---------|--------------|----------------------------|------------------------|
|         |              | Concanavalin A non-treated | Concanavalin A treated |
| Control | -            | 100.0±1.2                  | 125.7±1.1              |
| RCE-I   | 20           | 72.3±1.3*                  | 93.9±1.7*              |
| RCE-I   | 100          | 67.6±1.4*                  | 88.7±1.5*              |
| RCE-II  | 20           | 80.6±1.4*                  | 102.5±1.5*             |
| RCE-II  | 100          | 75.8±1.2*                  | 96.4±1.3*              |

RCE-I and -II (20 or 100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated thymocytes (1 × 10<sup>7</sup> cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with Concanavalin A (Con A), an activating mitogen of thymocyte. The data represents the mean±SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group (p<0.001).

*In vitro* 실험에서 대조군의 thymocytes에 Con A를 처리하

지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, RCE-I 0.1 및 1 mg/ml를 처리하였을 때의 세포생존율은 103.6±1.4%, 78.9±0.8%로 1 mg/ml 처리시 대조군에 비해 감소하였으며, RCE-II 0.1 및 1 mg/ml를 처리시 세포생존율은 100.9±1.6% 및 82.7±1.4%로 대조군에 비해 감소하였다(Table 2).

**Table 2. Effect of RCE on the cell viability of mitogen treated-thymocytes in vitro**

| Samples | Dose (mg/ml) | Cell viability (%) |
|---------|--------------|--------------------|
| Control | -            | 100.0±1.2          |
| RCE- I  | 0.1          | 103.6±1.4          |
| RCE- I  | 1            | 78.9±0.8*          |
| RCE- II | 0.1          | 100.9±1.6          |
| RCE- II | 1            | 82.7±1.4*          |

The separated thymocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with RCE-I and -II (0.1 or 1 mg/ml). The data represents the mean±SE of 4 experiments. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.001$ ).

**2. Splenocytes의 증식에 미치는 효과**

*In vivo* 실험에서 대조군의 splenocytes에 B-lymphocyte mitogen인 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은 146.3±1.8%로 증가하였으며, RCE-I 20 및 100 mg/kg을 투여하고 분리한 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 101.2±1.5% 및 120.8±1.5%로, LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은 144.0±1.5% 및 179.5±2.1%로 100 mg/kg 투여하였을 때 대조군에 비해 증가하였으며, RCE-II 20 및 100 mg/kg을 투여하고 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 120.9±1.9% 및 124.2±1.3%로 LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은 167.2±1.0% 및 186.5±2.1%로 100 mg/kg 투여하였을 때 대조군에 비해 증가하였다(Table 3).

**Table 3. Effect of the administration of RCE on the cell viability of mitogen treated-splenocytes in mice**

| Samples | Dose (mg/kg) | Cell viability (%)   |                   |
|---------|--------------|----------------------|-------------------|
|         |              | LPS-nontreated group | LPS-treated group |
| Control | -            | 100.0±1.7            | 146.3±1.8         |
| RCE- I  | 20           | 101.2±1.5            | 144.0±1.5         |
| RCE- I  | 100          | 120.8±1.5*           | 179.5±2.1*        |
| RCE- II | 20           | 120.9±1.9*           | 167.2±1.0*        |
| RCE- II | 100          | 124.2±1.3*           | 186.5±2.1*        |

RCE-I and -II (20 or 100 mg/kg), was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated splenocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with lipopolysaccharide (LPS), an activating mitogen of splenocyte. The data represents the mean±SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.001$ ).

*In vitro* 실험에서 대조군의 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, RCE-I 0.1 및 1 mg/ml를 처리하였을 때의 세포생존율은 105.6±1.7% 및 98.2±1.4%로 0.1 mg/ml 처리하였을 때 대조군에 비해 증가하였으며, RCE-II 0.1 및 1 mg/ml를 처리하였을 때의 세포생존율은 108.9±1.7% 및 101.8±1.2%로 0.1 mg/ml 처리하였을 때 대조군에 비해 증가하였다(Table 4).

**Table 4. Effect of RCE on the cell viability of mitogen treated-splenocytes in vitro**

| Samples | Dose (mg/ml) | Cell viability (%) |
|---------|--------------|--------------------|
| Control | -            | 100.0±2.0          |
| RCE- I  | 0.1          | 105.6±1.7*         |
| RCE- I  | 1            | 98.2±1.4           |
| RCE- II | 0.1          | 108.9±1.7**        |
| RCE- II | 1            | 101.8±1.2          |

The separated splenocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with RCE-I and -II (0.1 or 1 mg/ml). The data represents the mean±SE of 4 experiments. \*: Significantly different from control group (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

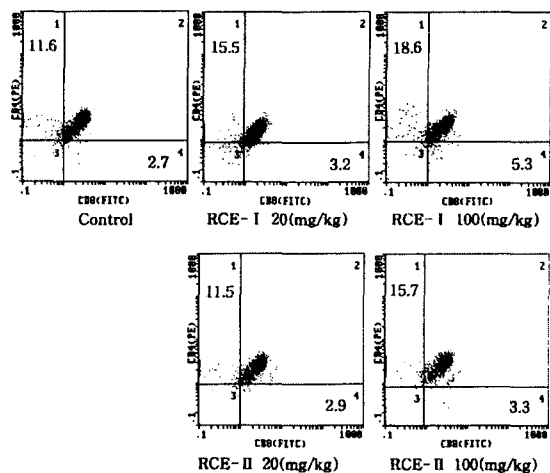
**3. Thymocytes의 subpopulation에 미치는 효과**

대조군의 thymocytes 중 CD4 single positive (CD4<sup>+</sup>) 세포의 population은 11.6±0.3% 이었으며, CD8 single positive (CD8<sup>+</sup>) 세포의 population은 2.7±0.3%이었다. RCE-I 20 및 100 mg/kg을 투여하고 분리한 생쥐 thymocytes의 CD4<sup>+</sup> 세포는 15.5±0.4% 및 18.6±0.3%로 대조군에 비해 population이 증가하였으며, CD8<sup>+</sup> 세포는 3.2±0.3% 및 5.3±0.2%로 100 mg/kg 투여하였을 때 대조군에 비해 population이 증가하였다. RCE-II 20 및 100 mg/kg을 투여하고 분리한 thymocytes의 CD4<sup>+</sup> 세포는 11.5±0.3% 및 15.7±0.5%로 100 mg/kg 투여하였을 때 대조군에 비해 population이 증가하였으며, CD8<sup>+</sup> 세포는 2.9±0.2% 및 3.3±0.4%로 대조군과 별 차이가 없었다(Table 5, Fig. 1).

**Table 5. Effect of RCE on the subpopulation of murine thymocytes**

| Samples | Dose (mg/kg, p.o.) | Thymocytes Subpopulation (%)           |  |
|---------|--------------------|--|--|
|         |                    | CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> cell | CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> cell |
| Control | -                  | 11.6±0.3                               | 2.7±0.3                                |
| RCE- I  | 20                 | 15.5±0.4*                              | 3.2±0.3                                |
| RCE- I  | 100                | 18.6±0.3**                             | 5.3±0.2**                              |
| RCE- II | 20                 | 11.5±0.3                               | 2.9±0.2                                |
| RCE- II | 100                | 15.7±0.5*                              | 3.3±0.4                                |

RCE-I and -II (20 or 100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4°C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean±SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group (\*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.001$ ).



**Fig. 1. Cytofluorometric pattern of thymocytes subpopulation change by the administration of RCE.**

4. Splenocytes의 subpopulation에 미치는 효과

대조군의 splenocytes 중 B220 positive 세포 (B220<sup>+</sup>)의 population은 31.6±1.0% 이었으며, Thy1 positive 세포 (Thy1<sup>+</sup>)의 population은 23.1±1.5% 이었다. RCE-I 20 및 100 mg/kg을 투여하고 분리한 생쥐 splenocytes 중 B220<sup>+</sup> 세포의 population은 32.6±1.5% 및 26.9±1.3%로, Thy1<sup>+</sup> 세포는 24.5±1.3% 및 16.8±2.1%로 100 mg/kg 투여하였을 때 대조군에 비해 population이 감소하였다. RCE-II 20 및 100 mg/kg 투여하였을 때 B220<sup>+</sup> 세포의 population은 31.8±2.1% 및 28.0±1.7%로, Thy1<sup>+</sup> 세포의 population은 24.2±1.2% 및 18.5±1.4%로 100 mg/kg 투여하였을 때 population이 대조군에 비해 감소하였다.

Splenic T-lymphocytes 중 대조군의 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 세포는 15.3±1.2% 및 6.7±0.5% 이었으며, RCE-I 20 및 100 mg/kg을 투여하고 분리한 splenic T-lymphocytes 중 CD4<sup>+</sup> 세포의 population은 14.2±1.3% 및 12.2±0.8%로 100 mg/kg 투여하였을 때 CD4<sup>+</sup> 세포의 population이 대조군에 비해 감소하였으며, CD8<sup>+</sup> 세포의 population은 6.3±0.2% 및 7.0±0.5%로 대조군에 비해 별 차이가 없었다. RCE-II 20 및 100 mg/kg을 투여하였을 때 CD4<sup>+</sup> 세포의 population은 14.4±1.1% 및 13.1±0.4%로 100 mg/kg 투여하였을 때 CD4<sup>+</sup> 세포의 population이 대조군에 비해 감소하였으며, CD8<sup>+</sup> 세포의 population은 7.1±0.4% 및 5.7±0.4%로 대조군에 비해 별 차이가 없었다(Table 6, Fig. 2).

Table 6. Effect of RCE on the subpopulation of murine splenocytes

| Samples | Dose (mg/kg) | Splenocytes Subpopulation (%) |                   |                                   |                                   |
|---------|--------------|-------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|         |              | B220 <sup>+</sup>             | Thy1 <sup>+</sup> | CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> | CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> |
| Control | -            | 31.6±1.0                      | 23.1±1.5          | 15.3±1.2                          | 6.7±0.5                           |
| RCE- I  | 20           | 32.6±1.5                      | 24.5±1.3          | 14.2±1.3                          | 6.3±0.2                           |
| RCE- I  | 100          | 26.9±1.3*                     | 16.8±2.1**        | 12.2±0.8*                         | 7.0±0.5                           |
| RCE- II | 20           | 31.8±2.1                      | 24.2±1.2          | 14.4±1.1                          | 7.1±0.4                           |
| RCE- II | 100          | 28.0±1.7*                     | 18.5±1.4*         | 13.1±0.4*                         | 5.7±0.4                           |

RCE-I and -II (20 or 100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 and FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean±SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01).

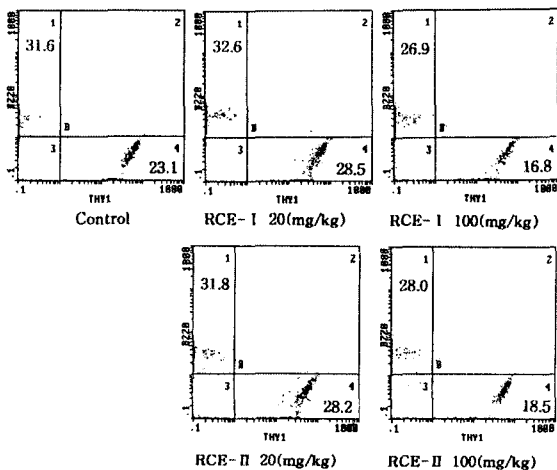


Fig. 2. Cytofluorometric pattern of splenocytes subpopulation change (B220<sup>+</sup>/Thy1<sup>+</sup>) by the administration of RCE.

고 찰

복분자딸기 미숙과와 완숙과에는 성분의 차이가 있어, glucose와 fructose는 미숙과에 비해 완숙과에 다량 함유되어 있고, 미숙과에는 sucrose가 함유되어 있지 않고 citric acid가 완숙과에 비해 다량 함유되어 있는 것으로 보고되었다<sup>2)</sup>. 본 실험에서는 생쥐의 특이적 면역반응에 미치는 복분자 미숙과 (RCE-I) 및 완숙과 (RCE-II)의 영향을 관찰하기 위해, thymocytes 및 splenocytes를 분리하여 실험하였다. RCE-I 및 II 20 및 100 mg/kg을 경구로 투여하고 분리한 thymocytes의 생존율은 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A (Con A)를 처리하지 않았을 때나 처리하였을 때 모두 대조군에 비해 세포생존율이 감소하였으며, RCE-I이 RCE-II 보다 thymocytes의 생존율을 더욱 강하게 감소시켰다. 이는 복분자 미숙과가 완숙과에 비해 thymocytes에 대한 세포독성이 강함을 의미하는 것이다. 이러한 결과가 thymocytes에 대한 직접작용 또는 간접작용에 의한 것인가를 확인하기 위해 *in vitro* 실험을 실시한 결과, RCE-I 및 II 에서 0.1 mg/ml에서는 세포독성을 나타내지 않았으나, 1 mg/ml의 고농도에서는 세포독성을 나타내었다. 이는 RCE가 생체에 투여되었을 때 thymocytes에 직접작용하여 세포독성을 나타내고 있음을 시사하는 것이다. RCE-I 및 II 20 및 100 mg/kg을 경구로 투여하고 분리한 splenocytes의 세포생존율은 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하지 않았을 때나 처리하였을 때 모두 대조군에 비해 증가되었으며, RCE-II가 RCE-I에 비해 더욱 증가시켰다. 이는 완숙과가 미숙과에 비해 splenocytes의 생존율을 더욱 증강시킴을 의미하는 것이다. *In vitro* 실험에서는 RCE-I 및 II 0.1 mg/ml를 처리하였을 때 대조군에 비해 splenocytes의 생존율이 증가되었으나, 1 mg/ml의 고농도를 처리하였을 때는 대조군에 비해 별 차이가 없었다. 이 결과는 RCE가 splenocytes에 직접작용하여 세포생존율을 증강시킴을 시사하는 것이다. 이러한 실험 결과는 복분자 미숙과 및 완숙과는 thymocytes의 생존율은 억제하고, splenocytes의 생존율은 증강시켜 생체의 면역능을 조절하고 있다고 사료된다. Thymocytes는 thymus의 피질 및 수질에서 증식 및 분화과정을 거쳐 helper T lymphocyte (Th) 및 cytotoxic T lymphocyte (Tc)로 분화되며, Th 세포로 분화된 세포들은 각종 cytokine을 분비하여 다른 T 세포, B 세포 및 macrophage의 증식과 분화를 촉진하며, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시키는 것으로 알려져 있다<sup>18)</sup>. 대조군의 thymocytes 중 Th (CD4 single positive cell) 세포는 11.6%, Tc (CD8 single positive cell) 세포는 2.7%로 정상 생쥐 흉선에서 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells은 약 12%, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells은 약 3%로 보고된 내용과 비슷한 결과를 나타내었으며<sup>19)</sup>, RCE-I 20 및 100 mg/kg 투여하였을 때 CD4<sup>+</sup> 세포는 15.5% 및 18.6%로 대조군에 비해 모두 증가하였고, CD8<sup>+</sup> 세포는 3.2% 및 5.3%로 100 mg/kg 투여하였을 때 대조군에 비해 증가하였다. 이는 RCE-I 이 thymocytes 중 Th 세포 및 Tc 세포의 population을 증가시켜 면역능을 증가시킬 수 있음을 의미하는 것이다. RCE-II 20 및

100 mg/kg 투여하였을 때 CD4<sup>+</sup> 세포는 11.5% 및 15.7%로 100 mg/kg 투여하였을 때 대조군에 비해 증가하였고, CD8<sup>+</sup> 세포는 2.9% 및 3.3%로 대조군에 비해 별 차이가 없었다. 이는 RCE-II가 thymocytes 중 Th 세포의 population을 증가시켜 면역능을 증가시킬 수 있음을 의미하는 것이다. 이러한 결과는 thymus에 존재하는 immature T cell (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)의 population이 감소하고 mature T cell인 single positive cell의 population이 증가하고 있음을 의미하는 것이며, 복분자 미숙과는 Th 및 Tc 세포를 완숙과는 Th 세포를 활성화하고 있음을 시사하는 것이다. 대조군의 splenocytes 중 B220<sup>+</sup> 세포는 31.6%, Thy1<sup>+</sup> 세포는 23.1%이었으나, RCE-I 20 및 100 mg/kg을 투여하였을 때 B220<sup>+</sup> 세포는 32.6% 및 26.9%로, Thy1<sup>+</sup> 세포는 24.5% 및 16.8%로 100 mg/kg 투여하였을 때 대조군에 비해 population이 감소하였다. RCE-I 20 및 100 mg/kg을 투여하였을 때 B220<sup>+</sup> 세포는 32.6% 및 26.9%로, Thy1<sup>+</sup> 세포는 24.5% 및 16.8%로 100 mg/kg 투여하였을 때 대조군에 비해 population이 감소하였다. RCE-II 20 및 100 mg/kg 투여하였을 때는 B220<sup>+</sup> 세포는 31.8% 및 28.0%로, Thy1<sup>+</sup> 세포는 24.2% 및 18.5%로 100 mg/kg 투여하였을 때 대조군에 비해 population이 감소하였다. 이는 RCE-I 및 RCE-II 100 mg/kg 고농도를 투여하였을 때 B 및 T 세포가 감소하며, RCE-I이 RCE-II 보다 더 강하게 B 및 T 세포를 감소시킴을 의미하는 것이다. 이 결과는 복분자 미숙과가 완숙과에 비해 더욱 강하게 B 및 T 세포를 감소시켜 splenocytes에 의한 면역능을 감소시킬 수 있음을 시사하는 것이다. 대조군의 splenic T-lymphocytes 중 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> 세포는 15.3%, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 세포는 6.7%이었으나, RCE-I 20 및 100 mg/kg을 투여하였을 때 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> 세포는 14.2% 및 12.2%로 100 mg/kg 투여하였을 때 대조군에 비해 population이 감소하였으며, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 세포는 6.3% 및 7.0%로 대조군과 별 차이가 없었다. RCE-II 20 및 100 mg/kg 투여하였을 때 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> 세포는 14.4% 및 13.1%로 100 mg/kg 투여하였을 때 대조군에 비해 population이 감소하였으며, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 세포는 7.1% 및 5.7%로 대조군과 별 차이가 없었다. 이는 복분자 미숙과 및 완숙과가 생체에 투여되었을 때 splenocytes의 T 세포의 감소는 주로 Th 세포의 population 감소에 기인되고 있음을 시사하는 것이다.

## 결 론

복분자 미숙과 (RCE-I) 및 완숙과 (RCE-II)를 경구투여하였을 때 생쥐의 특이적 면역반응에 미치는 영향은 다음과 같다.

RCE-I 및 RCE-II는 thymocytes에 직접작용하여 세포생존율을 감소시켰으며, splenocytes에 직접작용하여 세포생존율을 증가시켰다. RCE-I은 thymocytes의 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> cell의 population을 증가시켰으며, RCE-II는 CD4<sup>+</sup> cell의 population을 증가시켰다. RCE-I 및 RCE-II는 B220<sup>+</sup> 및 Thy1<sup>+</sup> cell의 population을 감소시켰으며, splenic T cell 중 CD4<sup>+</sup> cell의 population을 감소시켰다.

이상의 실험결과 복분자를 생쥐에 경구로 투여하였을 때,

thymocytes의 생존율은 감소되고 helper T 세포의 population은 증가되며, splenocytes의 생존율은 증가되고, helper T 세포의 population은 감소되어 특이적 면역반응을 조절하며, 일반적으로 미숙과가 완숙과에 비해 면역억제작용이 강력하였다.

## 감사의 글

이 논문은 우석대학교 교내학술연구비지원에 의하여 연구되었기에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Bae, G.H.: The Medicinal Plants of Korea. Kyohak Publishing Co., p.231, 2000.
2. 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 coreanus*. M.S. Thesis, Chung-Ang Univ., Seoul, 1996.
4. Bang, G.C.: Tannins from the fruits of *Rubus coreanus*. 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. Wysocki, L.J. and Sato, V.L.: Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2844-2848, 1978.
  14. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L.: Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. *J. Immunol.*, 120, 1497-1503, 1979.
  15. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods*, 65, 55-63, 1983.
  16. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr.: A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods*, 129, 23-30, 1990.
  17. Suda, T. and Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.*, 179, 873-879, 1994.
  18. Miceli, M.C. and Parnes, J.R.: The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology*, 53, 59-64, 1993.
  19. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S.: Cellular and molecular immunology. p.177-178 Saunders Company(2ed). U.S.A., 1994.