

나노 입자화 한 복분자 저온 추출물의 면역 활성 증진

한재건* · 권민철* · 하지혜* · 정향숙* · 김 영* · 정명훈* · 김진철* · 이현용***†

*강원대학교 BT특성화화학부대학, **강원대학교 생명공학연구소

Enhancement of Immuno Modulatory Activities of *Rubus coreanus* Miquel Extracts by Nano-encapsulation Process

Jae Gun Han*, Min Chul Kwon*, Ji Hye Ha*, Hyang Suk Jeong*, Young Kim*, Myoung hoon Jeong*, Jin Chul Kim*, and Hyeon Yong Lee***†

*College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National Univ., Chuncheon 200-701, Korea.

**Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National Univ., Chuncheon 200-701, Korea.

ABSTRACT : This study was performed to improve immune activities of *Rubus coreanus* Miquel by encapsulation of nanoparticles. Immuno-activities of *R. coreanus* were investigated through aqueous extracts associated with process of water at 60 °C. It showed high promotion of human B and T cells growth about 50%, compared to the case of other conditions. The secretion of IL-6 and TNF- α was also enhanced as 2.44×10^{-4} pg/cell and 1.94×10^{-4} pg/cell, results by adding nano samples. NK cell activation was improved up to 29% higher than the conventional extraction process. The secretion of NO from macrophage showed 14.9 μ M on the nano-encapsulation process extracts, which was higher than others. The size of nanoparticles was in the range of 50~300 nm, which can effect the penetration into the cells. It was clearly observed by real time confocal microscope.

Key Words : *Rubus coreanus* Miquel, Eatable Nano-Encapsulation, Immuno modulatory Activities

서 언

복분자 (*Rubus coreanus*)는 오래전부터 약용으로 사용되어 왔으며, 또한 식용으로 사용된 베리류에 속한다. 장미과에 속하는 우리나라 중부 이남의 산기슭 양지에 자라는 식물로 높이가 2~3 m 정도이며, 줄기는 흰 분이 덮여 있고 갈고리 모양의 가시가 있는 것이 특징이다. 5~6월에 꽃이 피어 7~8월에 열매가 성숙되어 둥글고 붉은색으로 익다가 나중에 흑색으로 완숙되는데, 이것의 미숙과를 한방에서 복분자라 하였다 (Bae *et al.*, 2000). 간 손상을 보호하고 눈을 밝게 할뿐만 아니라 이노제에 효능이 있다. 이외에 양기, 신기부족으로 인한 발기 부전에 효과가 있어 성기능을 높인다고 한다 (Kim and Lee, 1991).

복분자 추출물은 인간면역체계에서 항체 생성에 중요한 역할을 하는 인간 면역체계에서 B세포와 T 세포주의 생육을 촉진한다고 알려져 있다. 성분 연구로는 복분자 줄기로부터 2종의 flavan-3-ol과 1종의 proanthocyanidin 및 1종의 ellagitannin이 분리된 바 있으며 복분자 잎으로부터 4종의 flavonoids를 분리하여 그 구조를 밝힌 보고가 있다 (Lee *et al.*, 2002). 그러나

복분자에 대한 연구는 유전, 육종분야, 성분분석 등에 관하여 이루어져 있으나 복분자의 생리활성에 관한 연구는 미흡한 편이다 (Hong *et al.*, 2002).

나노입자 (10억분의 1 m, 10⁻⁹)는 인체에 쉽게 용이하게 침투할 수 있으며, 순환을 통하여 각기 다른 신체 부위에 전달되며, 특히 100 nm 이하의 친수성 표면을 갖는 나노입자는 혈액 내에서 더욱 긴 순환 시간을 갖는 것이 밝혀 졌다. 이러한 약물 전달 시스템은 (Drug Delivery System, DDS)은 신약개발에 대한 비용보다 훨씬 저렴하면서 효과적인 치료 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 수용성성분은 용매에 이온상태로 존재하여 그 활용성이 높을 것으로 기대된다. 하지만 인체 세포의 외막은 인지질로 구성되어 있어 수용성 성분이 침투하기 어려운 구조로 되어 있다. 따라서 수용성 물질의 세포내 침투 효율 향상을 위해서 활성물질을 유상이 포집한 리포솜 형태로 제조하고 이를 생체에 적용시켜 높은 침투력 및 생체활용성을 나타내고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다 (Kim and Kwak, 2004). 그러나 천연물수용성 생리활성 물질에 대한 나노입자화 기술의 결합은 생체 적합성, 생체 분

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr
Received December 11, 2008/ Revised January 30, 2009 /Accepted February 4, 2008

해성, 화학적 생물학적 무독성, 독특한 물성을 지닌 특성과 더불어 많은 연구가 이루어져야 하나 전문적인 실정이다.

따라서 이번 연구에서는 복분자 수용성 추출물의 식용 가능한 나노 입자화를 통해 리포솜 입자크기는 물론 저장 기간 연장과 효율적인 활성물질의 송달 및 이의 생체활용성 증진을 통하여 나노기술과 천연물 소재 복분자 수용성 추출물의 접목을 통하여 새로운 기능성 소재화를 통하여 유용생리 활성 성분의 생체 내 증진 효과를 탐색하였다. 실제 섭취 가능한 천연물에 대해 나노 입자화를 적용하므로 생체에 무해하고 경제적인 공급이 가능한 젤라틴을 선택하여 천연물을 포집함으로써 나노입자를 제조하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출방법

본 실험에 사용된 복분자(*Rubus coreanus*)는 2008년 7월에 발교산 부근에서 채취한 것을 구입하였으며 재료를 실온에서 음건 시킨 후 사용하였다. 일반적인 추출방법은 시료에 각각 10배의 증류수를 이용하여 60°C 및 100°C에서 24시간 동안 추출하였으며, 각 시료들은 감압여과 및 농축 후 동결건조를 통해 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

2. 나노입자 제조 및 확인

본 실험에서는 나노입자화를 통한 생체활용성 증진효과의 탐색을 위해 천연 면역제재로 효과가 기대되는 복분자 추출물을 이용해 nanoparticle을 제조하였다. 복분자 추출 시료 중 60°C 물 추출 시료 50 mg을 1 mg/ml의 농도로 증류수에 녹인다. 둥근바닥플라스크에 젤라틴을 녹여 감압기를 사용해 multilayer를 형성시킨다. 완전히 건조되어 layer가 형성된 둥근바닥플라스크에 액상의 복분자 추출시료를 넣고, 초음파 분산기를 이용하여 상온에서 2시간 동안 균질화시켜 수용성 나노입자를 제조하였다 (Kang *et al.*, 2005).

3. 시약

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Alpha minimum essential medium (α -MEM, GIBCO, USA)을 사용하였고, 그 밖에 배양에 필요한 시약으로 hepes buffer (SIGMA, USA)와 fetal bovine serum (GIBCO, USA), gentamycin sulfate (SIGMA, USA), trysin-EDTA (SIGMA, USA)를 사용하였다.

4. 세포주 및 세포 생육 배지

추출물 및 나노입자의 정상 세포에 대한 독성을 알아보기 위해 인간 신장세포인 HEK293 (Kidney normal, Human, ATCC, USA)를 사용하였고 RPMI 1640배지에서 10% heating-inactivated FBS (fetal bovine serum)으로 적응시켜

배양하여 실험에 이용하였다. 세포독성 측정을 위해서는 SRB assay를 이용하여 측정하였다. sulforhodamine B (SRB) assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 HEK293 (in 10% FBS media)의 농도를 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 96 well plate의 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 100 μ l씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) TCA (tri chloroacetic acid) 100 μ l를 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 100 μ l씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 μ l를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 면역 실험에서의 세포주는 면역 세포 생육 증진 효과를 알 수 있는 인간 면역 세포인 T cell (Jurkat, ATCC, USA)과 B cell (Raji, ATCC, USA)을 이용하여 검증하였으며 RPMI 1640배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였다. NK cell은 D-MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10-4M2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)을 첨가시켜 배양하였다. J774.1 macrophage (mouse) 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI1640배지를 이용하여 24 well plate에 $4\sim 5 \times 10^4$ cell/ml의 농도로 넣은 후 5% CO₂, 37°C에서 48시간 동안 배양하였으며 실험에 사용하였다. .

4. 면역세포 생육 증진 효과

면역기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell (Jurkat)과 B cell (Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역기능 증강 효과는 6 well plate에 세포를 1.0×10^4 cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 6일 동안 배양하면서 매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포 수를 측정하여 생육도를 측정하는 방법을 사용하였다 (Lee *et al.*, 2002).

5. Cytokine 분비량 측정

Cytokine은 IL-6와 TNF- α 의 정량을 Chemicon (USA)사의 IL-6와 TNF- α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 $1.0\sim 2.0 \times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료의 최종농도를 0.5 g/l로 100 μ l씩 첨가하여 다시

배양 (37°C, 5% CO₂)하였다. 원심분리기를 이용하여 배양배지의 상층액을 취한 다음 450 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Han *et al.*, 1998).

6. Natural Killer cell(NK cell)의 면역증진 효과

ATCC로부터 분양 받은 NK-92MI cell을 D-MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10⁻⁴M 2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)에 2 × 10⁷ cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T세포를 T-25 Flask에 배양하면서 sample을 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 3~4번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI cell을 24 well plate에 4~5 × 10⁴ cells/ml로 900 μl씩 분주하고 24시간 후 T세포의 상층액을 각 plate에 100 μl씩 투여하여 배양 48시간 후 6일 동안 NK-92MI cell의 활성도를 cell counter를 이용하여 생세포수를 이용하여 NK-92MI cell의 활성도를 측정한다 (Yueran Z *et al.*, 2003).

7. 대식세포에서의 nitric oxide 생성능 측정

J774.1 macrophage (mouse)이며, 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI1640배지를 이용하여 24well plate에 4~5 × 10⁴ cells/ml의 농도로 넣은 5% CO₂, 37°C에서 48시간 동안 배양하였으며 실험에 사용하였다. Macrophage에서 발생하는 nitric oxide의 양은 활성화 되는 대식세포 배양액에 축적되어 있는 nitric의 양을 microplate assay를 이용하여 정량함으로써 측정하였다. 먼저 시료를 처리하고 48시간 동안 세포를 배양하고 상층액 50 μl를 취하여 동일 부피의 Griessdir (1% sulfanilamide/0.1%, N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 32 μM에서부터 0.25 μM까지 RPMI 1640 medium으로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다. NO 생성능의 양성 대조구 물질로는 lipopolysaccharide (LPS)를 사용하였다 (Lee *et al.*, 2006).

8. Confocal microscope 측정

복분자 (*Rubus coreanus*) 나노 시료가 면역세포 (Raji)에 결합한다는 사실에 근거하여 나노시료에 의한 면역세포이 분포양상을 공초점 레이저 주사 현미경 (Confocal laser scanning microscopy)을 통해 관찰하였다. 1 ml의 면역세포(Raji)들 (2 × 10⁸)을 Incubator에서 CO₂ 농도 5%, 30°C에서 100 μl의 복분

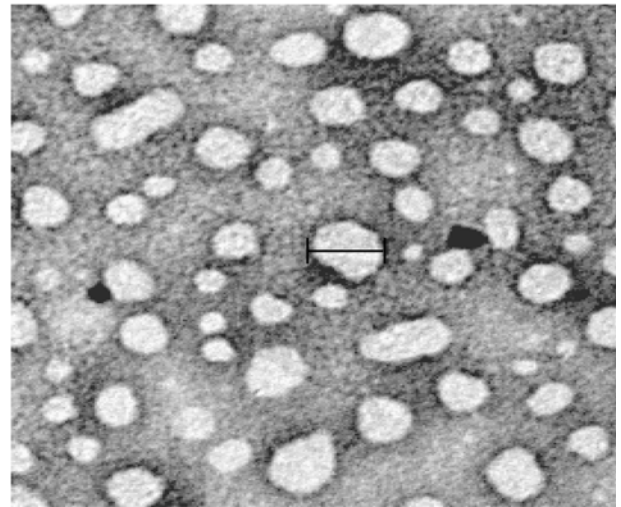


Fig. 1. TEM micrograph of nanoparticle from the extract of *R. coreanus*. Scale of bar is 200 nm.

자 (*Rubus coreanus*) 나노시료 (1 mg/ml)와 일반열수 추출물을 1시간 동안 반응시켰다. 세포들을 공초점 레이저 주사 현미경 FV500 (Olympus, Japan)으로 관찰하였다(Lee *et al.*, 2007).

9. 통계처리

SPSS program(ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 T-test로 검정하였으며 모든 data는 평균 ± 표준오차(Mean ± standard error)로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 나노입자의 확인

Fig. 1은 TEM으로 촬영한 나노입자의 모습이다. 입자들의 모양은 구형이다. 나노입자들은 negative staining에 의해서 하얗게 보이는 구형들이다. 염색에 사용한 phosphotungstic acid는 수용성 부분을 염색시킨다. 그러므로 지질인 stearic acid가 포함되어 있는 나노입자에는 염색이 되지 않아 하얗게 보인다. 이를 통해 제조된 나노입자는 수용성 추출물을 유상이 포집한 w/o 형태의 리포솜으로 구성되는데, Image analyzer로 측정한 결과, Fig. 2에서 보이는 제조된 나노입자는 50~300 nm의 범위로 형성된 것을 확인하였다. 분포의 정도를 피크로 나타내었는데 50 nm에서 조밀한 분포를 나타낸다. 본 복분자 나노입자의 나노식품화가 Image analyzer 측정치의 균일한 분포를 가짐으로써 안정성이 있다고 평가할 수 있다.

2. 나노입자의 세포독성

SRB assay를 통해 세포 독성을 측정하였는데 Fig. 3에서 복분자는 1.0 mg/ml 최고 농도에서도 모두 25% 이하의 세포독성을 보였다. 1.0 mg/ml의 농도에서 NE100, NE60, NEGE의

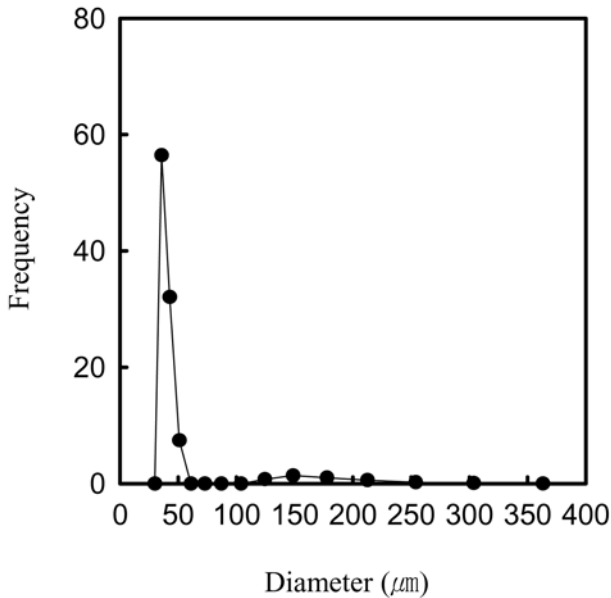


Fig. 2. Size distribution of nanoparticles with 0.2% gelatin using image analyzer.

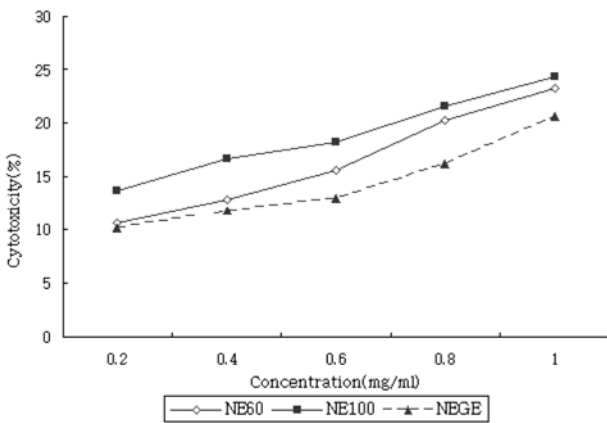


Fig. 3. Cytotoxicity on the nano particle of *R. coreanus*.

순서로 각각 24.23%, 23.21%, 20.57%의 세포독성을 보였다. 젤라틴으로 포집한 복분자의 경우 보통 열수추출물들과 대조했을 때 비슷하거나 낮은 세포독성을 보임으로써, 정상세포에서 나노입자의 안전성을 확인할 수 있다.

3. 면역세포 생육 증진 효과

Table 1은 인간의 면역체계와 항암에 중요한 역할을 하는 B cell과 T cell에 대하여 면역 증진효과를 확인하기 위해 cytokine 분비량을 통해 면역세포의 생육촉진효과를 알아보았다. 저온 추출인 60°C에서는 100°C 열수 추출보다 생육촉진 면에서 0.8배로 촉진효과가 떨어짐을 보이나, 시료첨가 시점으로 6일째에 일반추출 (100°C)에 비해 나노 입자화 시료는 B cell의 경우 약 1.6배 높은 16.04 ($\times 10^{-4}$ cell/ml) T cell에서

Table 1. The B and T cell growth by adding 0.5 mg/ml of *R. coreanus*.

Sample	Time (day)	Concentration	
		B cell ($\times 10^4$ cell/ml)	T cell (10^{-4} pg/ml)
*NE60	1	1.89 \pm 0.21	1.68 \pm 0.12
	2	3.64 \pm 0.22	2.86 \pm 0.32
	3	5.12 \pm 0.55	4.06 \pm 0.44
	4	7.06 \pm 0.95	5.32 \pm 0.51
	5	8.33 \pm 0.13	7.32 \pm 0.11
	6	9.88 \pm 1.21	10.98 \pm 0.25
**NE100	1	1.95 \pm 0.53	1.59 \pm 0.11
	2	3.54 \pm 0.13	3.88 \pm 0.65
	3	5.65 \pm 0.66	5.59 \pm 1.23
	4	6.78 \pm 1.65	7.23 \pm 0.32
	5	9.23 \pm 2.30	10.88 \pm 0.22
	6	10.91 \pm 1.22	12.15 \pm 1.35
***NEGE	1	2.68 \pm 0.61	3.02 \pm 0.36
	2	4.96 \pm 2.36	5.22 \pm 0.95
	3	7.30 \pm 1.32	8.19 \pm 1.30
	4	10.12 \pm 0.62	12.42 \pm 0.26
	5	13.11 \pm 0.89	16.22 \pm 1.32
	6	16.04 \pm 1.33	14.88 \pm 1.39

*NE60 : Normal Water Extraction (60°C)

**NE100 : Normal Water Extraction (100°C)

***NEGE : Nano Encapsulation in NE60

는 약 1.2배 높은 14.88 ($\times 10^{-4}$ pg/cell)로 가장 높은 생육도로 나타내었다. 따라서 복분자에는 면역세포의 생육을 증진시키는 성분이 함유되어 있으며 저온에서의 낮은 생육활성도를 보이지만 나노 제조 공정이 병행되면서 세포내의 침투가 용이해져 생육촉진을 높이는 것을 확인할 수 가 있었다. 더욱이 초고압공정에 의한 복분자 추출물을 통한 연구 등과도 비교하였을 때도 유사한 면역세포 생육촉진을 확인할 수 있다 (Lee *et al.*, 2007). 따라서 Table 1의 결과를 토대로 초고압 공정을 통한 공동효과에 따른 활성 물질의 유도가 가능할 것으로 사료된다.

4. Cytokine 분비량 측정

Table 2는 표적세포의 수용체에 결합해서 세포내 활성화 메커니즘을 발현 시켜 인간 면역세포이 생육 증진도를 뒷받침하는 cytokine (IL-6와 TNF- α)의 분비량을 B, T 세포에서 측정된 결과이다.

시료 종류에 따른 세포 당 IL-6의 경우 분비량을 보면, 나노 입자화 시료에서 6일째에 각각 B cell과 T cell의 경우 2.44 ($\times 10^{-4}$ pg/cell), 2.32 ($\times 10^{-4}$ pg/cell) 로 최대 분비량을 나타내었다. TNF- α 도 마찬가지로 나노 입자화 시료에서 1.94 ($\times 10^{-4}$ pg/cell), 1.88 ($\times 10^{-4}$ pg/cell)로 많은 분비량을 나타내었다. 이는 일반열수 추출 (60°C)에 비해 2배 정도 높으며 초고

Table 2. The secretion of IL-6, TNF- α from human B and T cells of *R. coreanus* extracts (0.5 mg/ml).

Sample	Time (day)	Concentration			
		B cell (10^{-4} pg/ml)		T cell (10^{-4} pg/ml)	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
*NE60	1	0.38	0.42	0.37	0.40
	2	0.51	0.67	0.50	0.61
	3	0.63	0.84	0.72	0.66
	4	0.82	0.91	0.88	0.87
	5	0.97	1.10	0.98	0.94
	6	1.05	1.18	1.14	1.12
**NE100	1	0.23	0.33	0.41	0.39
	2	0.44	0.56	0.59	0.47
	3	0.35	0.69	0.71	0.59
	4	0.99	0.81	0.93	0.71
	5	1.25	1.34	1.12	0.94
	6	1.36	1.43	1.47	1.25
***NEGE	1	0.48	0.66	0.72	0.64
	2	0.86	0.94	1.12	0.83
	3	1.22	1.06	1.50	1.02
	4	1.96	1.22	1.98	1.40
	5	2.02	1.56	2.66	1.62
	6	2.44	1.94	2.32	1.88

*NE60 : Normal Water Extraction (60°C)
 **NE100 : Normal Water Extraction (100°C)
 ***NEGE : Nano Encapsulation in NE60

압공정에 의한 복분자 추출물을 통한 연구 (Lee *et al.*, 2007) 등과도 비교하여 cytokine 분비량이 1.8배 정도 높은 수치를 나타낸다. 따라서 초고압 추출과 나노 입자화 공정을 병행한다면 이보다 높은 면역 활성 능의 증진을 예상 할 수 있다.

5. Natural Killer cell(NK cell)의 면역증진 효과

자연세포독성세포 (NK-cell)의 활성 측정은 B cell을 각각의 시료에 첨가한 후 그 배양액을 NK-cell에 첨가함에 따라 비교하여 활성을 측정하였다. Fig. 4에서 두 시료에서 2일간은 NK의 세포에 활성도에서 차이가 나지 않지만 3일째에서는 나노시료에서 일반열수 추출물과 비교하여 1.5배 증가된 생육도를 확인 할 수 있으며 6일째는 15.1 cell/ml로 가장 높은 활성을 나타내었다. 이처럼 기존의 추출방법에 나노공정을 거친 물질에서 T세포의 활성을 증가시켰고, 이 T세포를 통한 cytokine 분비량 측정 실험에서도 더 좋은 활성 증가를 나타냈다. 이는 나노공정 병행 추출물이 세포에 빠르게 반응하여 세포내의 신호전달 체계에 영향을 미쳐 반응이 빠르게 일어나게 한 것으로 나노공정에 의한 상승효과로 생각되어 진다.

6. 대식세포에서의 nitric oxide 생성능 측정

대식세포를 이용하여 NO 생성능을 확인한 결과를 Fig. 5

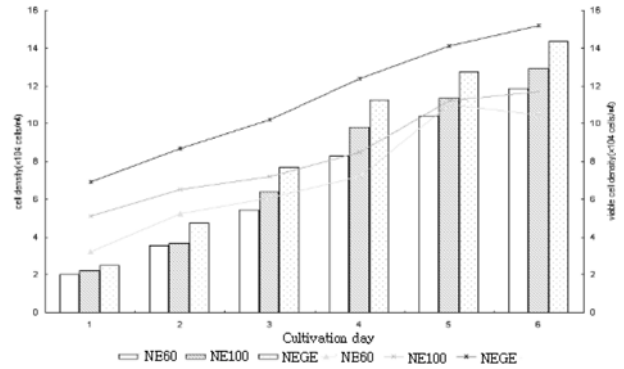


Fig. 4. The NK cell growth by adding the supernatant of B cells containing normal-extracts and nanoparticle of *R. coreanus*.

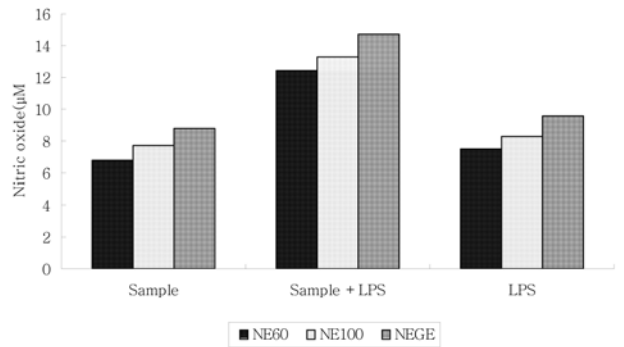


Fig. 5. Stimulation of nitric oxide production by adding the extracts from *R. coreanus* ($p < 0.05$).

에 나타내었다. 대식세포의 NOS(nitric oxide syntase)는 항상 존재하는 것이 아니라 TNF- α 와 같은 여러 가지 cytokine과 LPS (*E. coli* derived lipopolysaccharide)와 같은 세균 내 독소의 영향을 받아 NOS 유전자의 발현이 유도되기 때문에 이번 실험에서는 시료를 LPS와 같이 투여하여 NO의 생성능을 확인하였다. 결과에서 보여 지듯이 LPS와 J774.1 세포주에 시료를 처리하여 배양한 후 배양액 중에 NO 농도를 측정된 결과 아무처리도 하지 않은 대조군과 비교했을 때 각 시료의 NO 생산량에는 큰 변화를 관찰할 수 없었으나, 시료처리 후 높은 생성능을 확인하였다. 보여지는 바와 같이 모든 추출물에서 높은 NO 생성능이 보여지고 있으며 특히 나노에서 가장 높은 14.9 μ M을 보여 주었다. 이는 NO의 높은 생성능은 복분자에 우수한 면역생리 활성성분이 풍부하여 대식세포의 활성을 높인 것으로 생각되며 위에서 연구한 바와 마찬가지로 저온 추출의 경우지만 나노 입자 제조 공정이 병행된다면 일 반의 추출공정 보다 추가적인 면역 활성의 증진가능성을 보인다고 할 수 있다.

7. 나노입자 추출물의 세포투과 속도 비교

Fig. 6은 1시간에 걸쳐 real time으로 confocal 현미경을 이용해 찍은 사진으로써, 나타난 면역세포에서 복분자 추출물 나

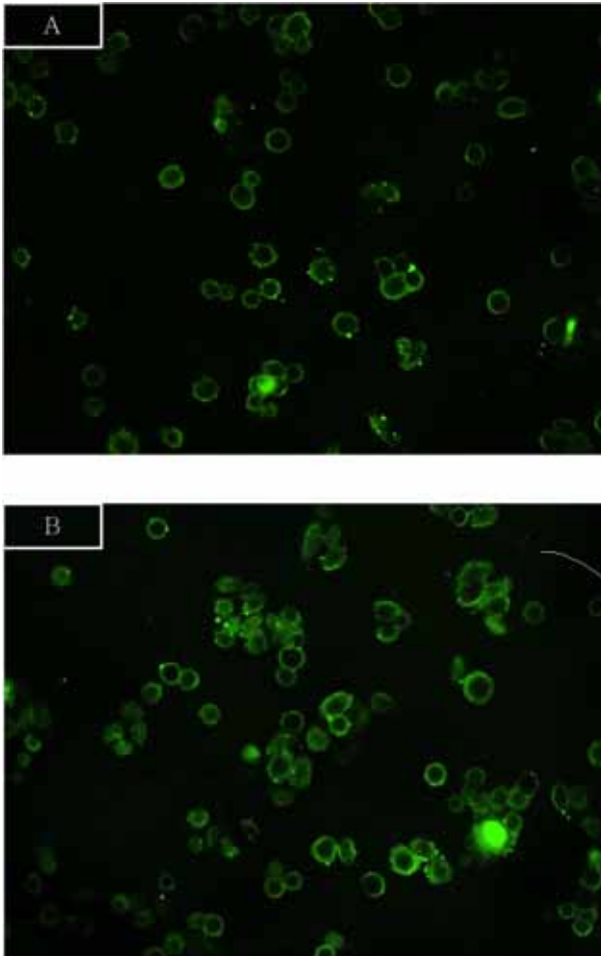


Fig. 6. Confocal microscope photographs of immune cell after 1 hr of growth in media containing nanoparticle of *R. coreanus*. (A : Before penetration of sample, B : After 1 hr)

노 입자의 침투정도를 확인할 수 있다. Real time confocal 현미경 사진을 통해 복분자 나노입자가 세포 내의 세포질에 들어간 것을 알 수 있다. 따라서 본 연구를 위해 제조한 나노 시료의 경우 입자의 크기가 50~300 nm로 분산됨에 따라 세포의 침투의 용이성이 일반 열수 추출물에 비해 뛰어난 것을 확인할 수 있다. 이는 복분자 나노입자화 시료 면역 활성화 실험의 결과로 말미암아 일반 열수 추출물 보다 적은 농도, 적은 양으로도 높은 면역 활성화효과를 나타냄을 알 수 있었다.

추출물의 나노입자화의 장점은 제조 시 쉽게 에너지를 형성시킬 수 있다는 것과, 고온을 이용하지 않아서 생리활성 물질이 변형되지 않는다는 것이다.

본 연구를 통해, 복분자 나노 입자화를 통한 면역 활성화 실험 시 일반추출물 (60°C)은 다른 열수 추출물에 비해 낮은 추출물의 용출로 인해 면역 활성화 면에서 낮은 결과를 보인다. 그러나 복분자 저온 추출물을 나노 입자화한 시료가 다른 열

수추출 (100°C)에 비해 독성이 현저히 낮으며 저농도 에서도 우수한 면역 활성도를 보인다. 이에 나노 입자화는 우수한 세포 투과성으로 인하여 면역력을 향상시킬 수 있는 것으로 보인다. 저온에서 에탄올 추출한 병풀의 면역 활성화도 9.5×10^4 cells/ml와 비교했을 때 저온에서 추출한 복분자의 면역세포 밀도는 9.88×10^4 cells/ml로 연구가치가 있는 수치가 나왔음을 알 수 있다 (Kwon *et al.*, 2008).

현재 복분자에 면역 활성화 및 여러 생리활성에 관한 연구결과가 많이 나와 있지만 복분자의 나노 입자화에 관한 연구는 전무한 실정이라서 본 연구를 통하여 현재 상용화 되고 일반 열수 추출물보다 추출의 효율성을 높일 수 있는 연구와 접목할 시, 나노 입자화에 의한 면역증진의 효과가 더욱더 높아질 것으로 기대된다 (Kim *et al.*, 2005).

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 (과제번호: 200704010 34013) 연구지원으로 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

LITERATURE CITED

- Bae GH.** (2000). The medical plants Korea. Kyohak Publishing Co., Ltd. Seoul, Korea. p. 230-231.
- Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo ES and Baik KU.** (1998). Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- α production and T cell proliferation. Korean Journal of Pharmaceutical Society. 42:296-301.
- Kang KC, Lee CI, Pyo HB and Jeong NH.** (2005). Preparation and characterization of nano-liposomes using phosphatidylcholine. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 11:847-851.
- Kim HC and Lee SL.** (1991). A comparative study on the health effect of *Rubus coreanum*. Journal of Herbal Pharmacotherapy. 6:3-11.
- Kim DM and Kwak HS.** (2004). Nano food materials and approachable development of nanofunctional dairy products. Korean Journal of Dairy Technology Science. 22:1-12.
- Kim DH, Park JH, Kim JH, Kim CH, You JH, Kwon MC and Lee HY.** (2005). Enhancement of immune activities of *Ephedrae Herba* and *Rubi Fructus* at low temperature extraction. Korean Journal of Medical Crop Science. 13:81-86.
- Kwon MC, Han JG, Ha JH, Oh SH, Jin L, Jeong HS, Choi GP, Hwang B and Lee HY.** (2008). Immuno-regulatory effect on *Centella asiatica* L. urban extraction solvent associated with ultrasonification process. Korean Journal of Medical Crop Science. 16:294-300.
- Lee HS, Namkoong K, Yook KH, Ahn JS, Noh MS, Kim DJ, YH Chung, Kim SS, Lee WB and Kim KY.** (2006). Alpha-tocopherol prevents H₂O₂-induced tight junction Occludin disruption in blood-brain barrier. Korean Journal of Physiology and Anthropology. 19:223-233.

- Lee HY, Kim JC, Kwak HG, Na CS, Kim CH and Kwon MC.** (2007). Comparison of immuno-modulatory regulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel by ultra high pressure extracts process. Korean Journal of Medical Crop Science. 15:398-404.
- Lee HY, Kim JH, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Song YG, Seong NS, Lee SE, Yi JS and Kwon OW.** (2006). Effect of aqueous extracts from *Rubus coreanus* Miquel and *Angelica gigas* Nakai on anti-tumor and anti-stress activities in mice. Korean Journal of Medical Crop Science. 14:206-211.
- Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH and Lee HY.** (2002). Screening of immune activation activities in the leave of *Dendropanax morbifera* lev. Korean Journal of Medical Crop Science. 10:109-115.
- Yueran Z, Rui S, You L, Chunyi G and Zhigang T.** (2003). Expression of leptin recrptor and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. Biochemical and Biophysical Research communications. 300:247-252.