

RAW264.7 세포주를 통한 복분자 30% 에탄올 추출물의 면역기능 활성증진효과 검토

조재경 · 최한석 · 김민수 · 김용국 · 김치홍 · 신용철 · 고성규*

경희대학교 한의과대학 예방의학교실

Immune enhancement effect of *Rubus coreanus* Miquel (RC) (30% EtOH extract) in RAW264.7 cells

Jae-Kyung Cho, Han-Seok Choi, Min-Su Kim, Young-Gook Kim,
Chi-Hong Kim, Yong-Cheol Shin & Seong-Gyu Ko*

Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Kyunghee University

Abstract

Objective : The object of this study is to confirm the immune enhancement effect of *Rubus coreanus* Miquel (RC) (30% EtOH extract) on RAW264.7 mouse macrophage cell line.

Methods : RAW264.7 cells were treated with 10-500µg/mL RC for 24 hours. Cell viability was then measured using WST assays. Levels of intracellular NO and ROS were measured by Griess reagent and DCFH-DA staining respectively. Levels of iNOS and COX-2 mRNA was determined by RT-PCR. Secretion levels of IL-1β and IL-6 cytokines were evaluated by sandwich ELISA assay. Western blot analysis was performed to measure the levels of intracellular molecules related to MAPKs pathways.

Results : RC suppressed the growth of RAW264.7 cells. RC increased the production of NO and ROS. RC increased the mRNA and protein levels of COX-2 and iNOS. RC augmented the levels of secreted IL-1β and IL-6 cytokines. RC increased MAPKs phosphorylation.

Conclusion : In summary, our result shows that RC has inflammatory effect increasing the levels of NO, ROS and secreted cytokines and activating MAPKs. Hence, RC seems to have an immune enhancement effect.

· 접수 : 2012년 11월 28일 · 수정접수 : 2012년 12월 24일 · 채택 : 2012년 12월 26일

* 교신저자 : 고성규, 130-872 서울특별시 동대문구 회기동 1번지, 경희대학교 한의과대학 예방의학교실
전화 : 02-961-0329, 팩스 : 02-966-1165, 전자우편 : epiko@khu.ac.kr

Key words : *Rubus coreanus* Miquel (RC), nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS), cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide (iNOS), mitogen-activated protein kinase (MAPK)

I. 서 론

면역이란 면역세포에 일어나는 반응으로 자기(self)와 비자기(nonself)를 식별하여 자기를 지키고 비자기를 죽이는 작용이며 면역으로 인해 개체의 완전성(integrity) 혹은 항상성을 유지하려는 방어기전이다.¹⁾ 면역기능에 대한 연구는 임파구의 양, immunoglobulin(IG) 생성, mitogen에 대한 임파구 증식반응, 자연살해세포 활성화도(NK cell activity), 과민반응과 이식편대숙주반응(graft-versus-host reaction) 등을 측정하여 이루어 졌다.

면역반응은 면역세포 간에 정보전달에 쓰이는 세포간 전령(intracellular messenger)인 사이토카인(cytokines)에 의해 조절된다고 알려져 있다. 사이토카인의 변화를 조사하여 몸에서 일어나는 면역반응 변화를 구체적으로 알아볼 수 있다. 사이토카인은 면역세포의 분화 증식, T 및 B 세포의 활성화, 세포성 면역의 작동세포의 기능 등에 관여하는 것으로 나뉘어 살펴볼 수 있다.²⁾ 그 종류에는 interleukins(IL-1~IL-13), interferons (IFN), tumor necrosis factor(TNF)와 다양한 granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF)가 포함된다.³⁾

산딸기 속(*Rubus*)은 250종의 유성생식 종으로 구성될 정도로 가장 다양성이 풍부한 식물속 중 하나이며 그 중 가장 가치 있다는 종 중 하나인 복분자(*Rubus coreanus* Miq.)는 장미목(Rosales), 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽관목으로 높이가 1.5~3m에 달하며 우리나라의 제주도를 비롯한 남부지방과 중부지방의 해발

50~1000m 지역의 산기슭 양지바른 곳에서 자라난다. 표면은 황록색(黃綠色) 또는 옅은 갈색(褐色)으로 정단(頂端)은 둔한 원형(圓形)이며 기부의 중심은 움푹 들어갔다. 소과(小果)는 쉽게 떨어지며 하나의 소과(小果)는 반월형으로 배면은 용모로 덮여 있다. 잎은 호생하며 우상복엽이며 산방화서는 가지 끝에 달리며 털이 있고 5~6월에 연한 홍색의 꽃이 피며, 7~8월에는 열매가 성숙되어 둥글고 붉은색으로 익은 후 흑색이 된다.^{4,5)} 복분자에는 다양한 phytochemical인 anthocyanin, flavonoid, tannin, stilbenoids, phenolic acid를 다량 함유하고 있다.^{6,7)}

일반적으로 한방에서는 복분자의 덜 익은 미성숙 과일을 이용하며 명안, 태생, 지사, 음위, 강장, 양모 등에 사용되어 왔다.⁸⁾ 또한 한방에서 복분자는 당뇨병(diabetes mellitus), 성욕감퇴(sexual disinclination), 정액루(spermatorrhea), 유뇨증(enuresis), 천식(asthma) 및 알레르기 관련 질병의 치료에 사용되어왔고⁹⁾ 높은 항산화 활성,¹⁰⁾ 면역활성 증가,¹¹⁾ B형 간염바이러스(HBV)를 억제¹²⁾하는 효능을 가졌고 최근에는 복분자가 인간 유래의 다양한 종양 세포주(HT-29, HCT116, KB, CAL-27, MCF-7, LNCaP 등)에 대한 증식을 억제하는 효과¹³⁾가 보고된 바가 있다.

최근 우리나라의 국민 소득이 향상되고 노령화 등 사회적 변화에 따라 건강에 대한 관심도가 높아지고 있다. 그래서 각종 건강과 관련된 식품들이 개발되고 그 수요 또한 증가하고 있는 실정이다.¹⁴⁾ 하지만 합성물질들로 만들어진 건강보조식품들에 의해 많은 부작용들이 나타나 천연물질 중에서 항산화기능 및 면역증진을 갖고 있는 생리활성물질을 찾고 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있다.¹⁵⁾

이에 본 실험에서는 수율을 높이기 위하여 복분자를 30% 에탄올로 추출하여 RAW264.7 mouse macrophage cells에 처리하여 면역반응시 일어나는 지표들의 변화를 확인함으로써 복분자의 면역증진효과를 확인하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 약재인 복분자는 옴니허브(Korea)에서 구입하여 100g 정량 후 1L의 30% 에탄올에 30분 동안 초음파분해 하였다. 3mm 여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압하여 여과한 후, 여과된 에탄올 추출물을 감압농축기(Eyela, Japan)를 이용하여 농축한 후, 동결건조(Freezedryer, Matsushita, Japan)하였다. 얼은 분말은 -80°C 에서 보관하고 실험시 3차 증류수에 200mg/ml 농도로 녹인 후 사용하였다.

2) 세포주

RAW264.7 cell은 한국 세포주 은행에서 분양 받아 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS와 1%의 Antibiotic-antimycotic이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하였으며 2일 1회 배지를 교환하였다. FBS는 잔존하는 보체 성분을 불활성화시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation(56°C water bath에 30분간 가열)하여 사용하였다.

3) 시약 및 항체

세포의 활성을 유도하기 위한 lipopolysaccharide(LPS)와 ROS를 측정하는 DCFH-DA는

sigma(USA) 제품을 사용하였으며, NO 측정에 사용한 Griess reagent는 invitrogen(USA)의 제품을 사용하였고, RT-PCR을 수행하기 위하여 Intron(Korea)에서 RNA extraction kit를, Takara(Japan)에서 cDNA 합성 kit를 구매하여 사용하였다. 세포활성을 측정하는 WST 시약으로 EZ-CyTox(DOGEN, Korea)를 구입하였고, 프라이머는 코스모진텍(Korea)에서 제작하였으며, cytokines을 측정하기 위하여 ELISA kit를 BD bioscience(USA)에서 구입하였다. western blot을 수행하기 위한 antibody는 santa cruz(USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포활성 측정

96well plate에 well당 1×10^4 의 RAW264.7 cell을 분주한 뒤 24시간 동안 37°C , 5% CO_2 세포배양기에서 배양한 후 복분자 추출물을 각각의 well에 10~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 WST 시약을 10 μl 첨가하고 2시간 후에 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 세포내 ROS 측정

100 π dish에 1×10^6 으로 분주한 세포에 복분자 추출물을 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 1시간 뒤에 LPS를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 주었다. 추출물을 처리할 때 DCFH-DA를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 같이 처리하여 주고 24시간 동안 배양하였다. 세포를 걷은 뒤 PBS로 2회 씻어준 후 FACScalibur(BD bioscience, USA)로 세포내 ROS를 측정하였다.

3) NO 발현 측정

세포를 배양한 배양액을 회수하여 griess rea-

Table 1. Sequences of the oligonucleotide used in reverse transcription-PCR.

Primer Name		Sequences
IL-1 β	Forward	5' — ATG GCA ACT GTT CCT GAA CTC AAC T —3'
	Reverse	5' — CAG GAC AGG TAT AGA TTC TTT CCT T —3'
IL-6	Forward	5' — CAA GAG ACT TCC ATC CAG TTG C —3'
	Reverse	5' — TTG CCG AGT TCT CAA AGT GAC —3'
iNOS	Forward	5' — AAT GGC AAC ATC AGG TCG GCC ATC ACT —3'
	Reverse	5' — GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA CTC —3'
COX-2	Forward	5' — GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT —3'
	Reverse	5' — ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA —3'
GAPDH	Forward	5' — GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC —3'
	Reverse	5' — CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG —3'

gent를 이용하여 96well plate에 증류수 150 μ l와 시약 20 μ l, 샘플 150 μ l를 loading 하여 30분간 반응시킨 후 585nm에서의 흡광도를 측정하여 분석하였다.

4) Reverse transcription PCR

세포 배양 후에 세포를 잘 회수하여 RNA extraction kit를 사용하여 RNA를 얻는다. 분리해낸 RNA의 1 μ g을 cDNA synthesis를 이용하여 cDNA를 합성한다. cDNA 합성 후 각 프라이머와 합성한 cDNA로 denature 94 $^{\circ}$ C 45초, annealing 58 $^{\circ}$ C 35초, extension 72 $^{\circ}$ C 45초로 26 주기로 RT-PCR을 수행하였다. 이때 사용한 각 프라이머는 table 1과 같다.

5) 염증성 cytokines의 분비량 측정

6well plate에 2 \times 10⁶의 세포를 각 well 당 분주하였다. 복분자 추출물과 LPS 처리 후 24시간 뒤에 배양액만 회수하여 분석에 사용하였다. IL-1 β 와 IL-6를 ELISA kit를 이용하여 450nm에서의 흡광도를 측정하여 각 cytokine의 배양액 내 농도를 확인하였다.

6) Western blotting

복분자 추출물을 처리 후 얻은 세포를 PBS로 세척하고 RIPA buffer로 용해한 후 원심분리하여 단백질을 얻었다. 10% SDS-PAGE gel을 이용하여 분리한 다음, 단백질을 nitrocellulose membrane에 전이시키고 특정 항체를 처리한 뒤 필름에 현상하여 특정 단백질 띠를 찾았다.

7) 통계분석

실험결과와 모든 분석은 각 그룹의 측정값을 Mean(평균) \pm S.E(표준오차)로 요약하였으며, student *t*-test method로 분석하여 p-value가 0.05이하일 경우 유의성을 인정하였다.

III. 연구결과

1. 복분자 추출물에 의한 세포활성 변화

복분자 추출물이 RAW264.7 cell line에 대한 세포독성과 세포활성에의 영향을 알아보기 위하

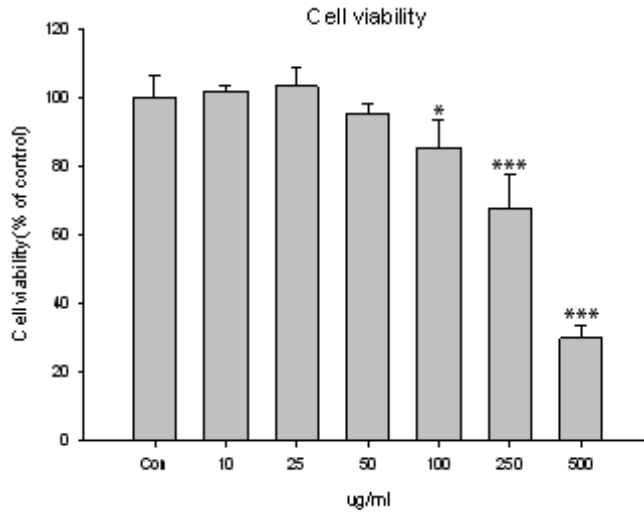


Figure 1. Effect of RC extract on RAW264.7 cell viability. Cytotoxicity of *Rubus coreanus* Miq. extract on culture of RAW264.7 mouse macrophage cells. Cells were treated with RC extract (10–500µg/mL) for 24 hours. Cell viability was determined using the WST assays. Results are expressed as a percentage viability relative to vehicle-treated controls. Data are shown as the mean of three independent experiments (error bars are mean ± standard error (SE)). (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001).

여 WST assay로 그 변화를 관찰하였다. 이 결과(Fig 1)를 통해 복분자 추출물에 의해 세포의 활성이 농도의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 복분자 추출물의 농도가 높으면 세포활성을 줄여주게 되므로 앞으로의 실험에서 200µg/ml 이하의 농도로 실험을 수행하였다.

NO뿐만 아니라 ROS 또한 세포내 농도가 올라가 있는 것을 확인할 수 있는데(Fig 2B), ROS는 NO와 다르게 50µg/ml에서부터 높게 발현되지는 않고 50, 100, 200µg/ml일 때, 각각 13.05, 16.94, 38.70%로 농도의존적으로 차츰 증가하였음을 확인하였다.

2. NO와 ROS의 증가

복분자 추출물에 의한 면역기능증진효과를 알아보기 위하여 우선 NO와 ROS의 변화를 측정하였다. 외부 침입물에 대한 식세포의 식작용이 일어나면서 ROS와 NO가 증가되고 면역세포들이 활성화되고,¹⁶⁾ ROS는 NO와 함께 작용을 하는 경향이 있다.¹⁷⁾ 배양액에 분비되어 있는 NO의 농도를 측정한 결과 50µg/ml의 농도에서부터 세포를 LPS로 자극시켰을 때와 비슷한 농도로 NO가 발현되어 있음을 확인할 수 있다(Fig 2A).

3. COX-2와 iNOS의 발현 변화

앞의 결과를 통해 복분자 추출물이 RAW264.7 cell에서의 ROS와 NO를 증가시키는 것을 볼 수 있었다. COX-2는 NO에 의해 활성화되며 면역반응을 위한 PGE2를 생성하며,¹⁸⁾ NO는 iNOS에 의해 합성되고 iNOS는 면역반응을 위해 활성화된다.¹⁹⁾ RT-PCR을 통하여 COX-2와 iNOS의 mRNA 발현이 복분자 추출물에 의해 증가되어 있음을 확인할 수 있다. LPS로 자극하여 준 그룹에 비해 그 발현양이 작지만 발현이 되어 있

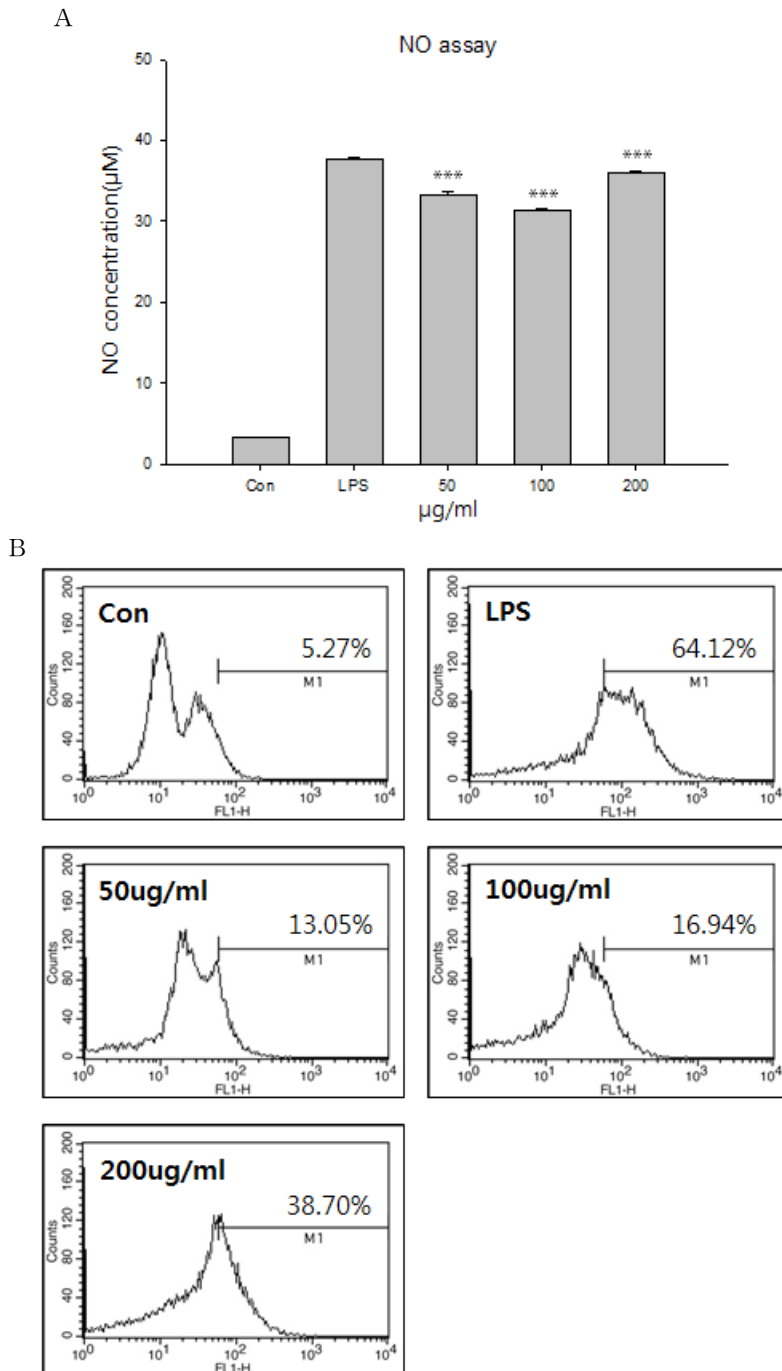


Figure 2. Stimulatory effect of RC extract on NO and ROS generation. Stimulatory effect of RC extract on NO (A) and ROS (B) generation of RAW264.7 mouse macrophage cells. RAW264.7 cells were treated with RC extract(50–300µg/mL) or stimulated with LPS(1µg/mL). Each bar represents the mean ± SD of NO concentration in media (***) : p<0.001)

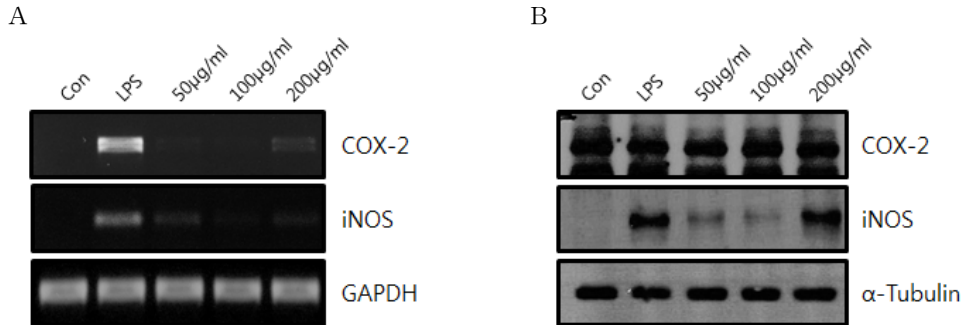


Figure 3. RC extract enhances the production of COX-2 and iNOS mRNA and protein. (A) Influence of RC extract on the mRNA expression of COX-2 and iNOS. (B) RC extract up-regulates COX-2 and iNOS protein level. RAW264.7 cells were treated with RC extract(50-300µg/mL) or stimulated with LPS(1µg/mL) for 24 hours.

음을 볼 수 있다. 그러나 western blot을 통하여 COX-2는 그룹간 생성의 차이가 크게 나지 않음에 비해 iNOS는 200µg/ml일 때 LPS 그룹과 거의 비슷하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig 3B).

4. MAPKs의 활성화

앞에서 NO와 ROS, COX-2와 iNOS를 확인하였으므로 세포내 신호전달 단백질인 MAPKs를 확인해보았다. MAPKs는 3가지 주된 그룹으

로 나눌 수 있는데 p38, ERK, JNK가 그것이다.²⁰⁾ MAPKs는 NO, cytokines, 병원체 등에 의해 활성화되어 COX-2, cytokines 등을 생성하고 세포 활성화, 분화 등을 조절하는 역할을 한다.²¹⁾ MAPKs의 활성을 확인하여 위하여 western blot 방법으로 각 단백질을 확인하였다. Fig 4의 결과에 의하면 MAPKs의 인산화형이 증가되어 있는 것을 알 수 있다. ERK의 경우 50µg/ml부터 인산화가 증가되어 있고, JNK와 p38는 복분자 추출물의 농도가 증가됨에 따라 활성화되었음을 확인할 수 있다.

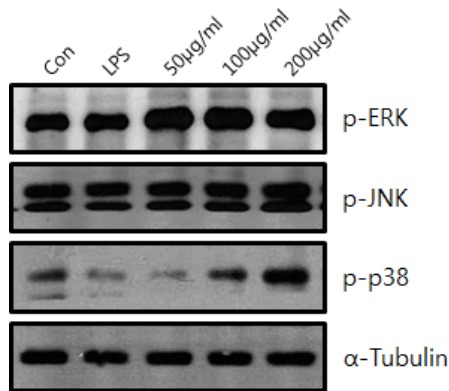


Figure 4. RC extract activates MAPKs phosphorylation in RAW264.7 cells. RC extract up-regulates MAPK phosphorylation. Cells were treated with RC extract (50-300µg/mL) or LPS(1µg/mL) for 24 hours.

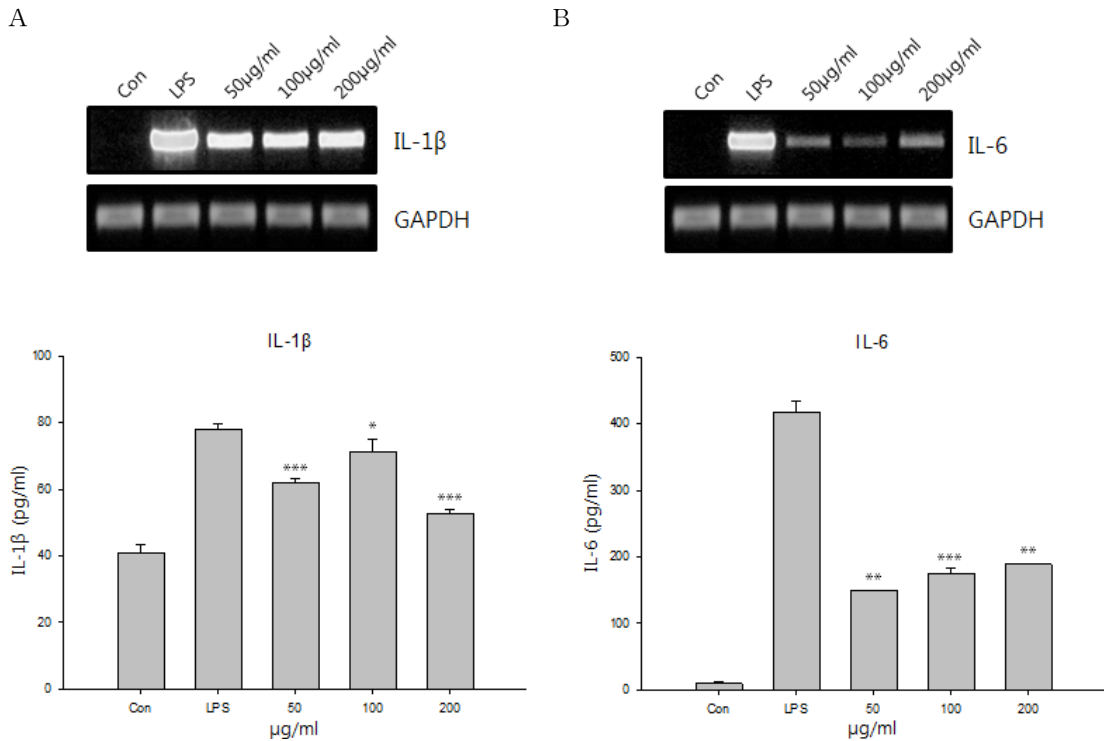


Figure 5. RC extract increases the mRNA and secreted protein level of IL-1 β and IL-6. RC increases the level of IL-1 β mRNA and secreted protein (A) and IL-6 mRNA and secreted protein (B) RAW264.7 cells were treated with RC extract (50–300 μ g/mL) or LPS (1 μ g/ml). Each bar represents the mean \pm SD of IL-1 β or IL-6 concentration in media (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)

5. Cytokines의 생성

IL-1 β 와 IL-6는 전염증성 cytokine으로 감염, 염증에 따른 내재면역반응을 촉진하는 역할을 지니는 것으로,²²⁾ 다양한 세포에서 발현이 되며 대식세포, 호중구, 호산구 등의 면역관리 세포들의 활성화 분화, 생존을 조절하여 준다.²³⁾ RT-PCR을 확인한 결과(Fig 5A) IL-1 β 는 50 μ g/ml에서부터 mRNA가 많이 발현되어 있으며 cytokine 또한 control 그룹에 비하여 세포배양액에 분비되어 있는 농도가 높은 것을 관찰할 수 있다. IL-1 β 와 마찬가지로 IL-6의 경우 복분자 추출물 처리군에서 RNA와 cytokines의 발현이

증가되어 있음을 확인할 수 있으며, IL-6의 경우 농도의존적인 경향을 보여주었다.

IV. 고찰

감염성 질병들에 대한 면역계의 저항성을 전혀 지니지 못하거나 손상된 경우 면역결핍이 일어나게 된다. 면역결핍은 대부분 후천적으로 일어나게 되는데, 영양실조, 노화, 암 등의 다양한 면역억제요인들에 의해 일어나게 된다.²⁴⁾ 한 예로 암의 화학적 치료요법에 의해 호중구감소증 같은 질환이 부작용으로 나타날 수가 있는데,

이 경우 granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) 또는 GM-CSF를 투여하여 호중구감소증을 줄여주고,²⁵⁾ 단핵구와 수지상세포의 발현을 증가시켜 감염을 줄여주며 세포성면역을 증가시켜 직, 간접적으로 항암면역효과를 올려준다.²⁶⁾

복분자는 생약재에 대한 관심이 높아지면서 각종 실험이 많이 사용되고 있는데, 다양한 물 추출 방법에서 면역증진 효과가 있다는 보고가 있으며,^{27, 28)} 복분자 술에서도 면역활성 다당류가 포함되어 있음이 밝혀졌다.²⁹⁾

본 실험에서는 복분자를 30% 에탄올로 초음파를 이용하여 추출한 복분자 추출물이 면역증진의 효과를 보이는지 확인하기 위하여 RAW264.7 mouse macrophage cells에서 실험을 진행하였다. 복분자 추출물이 세포의 활성변화에 크게 영향을 주지 않는 범위내에서 실험하기 위하여 WST assay를 통하여 50~200 μ g/ml의 농도를 설정하여 실험을 진행하였다.

면역반응시에 증가하는 NO와 ROS를 측정된 결과 50 μ g/ml 농도에서부터 LPS로 자극한 경우와 비슷한 NO의 생성 수준을 보였으며, 세포내 ROS의 생성량을 FACScalibur를 통하여 분석하였을 때 세포내에 생성된 ROS가 13.05, 16.94, 38.70%로 복분자 추출물의 농도가 증가함에 따라 점차 증가하는 것을 확인하여 복분자 추출물이 면역반응을 활성화시킴을 추측할 수 있었다. NO에 의해 활성화되는 COX-2와 NO를 생성하는 iNOS의 변화를 RT-PCR과 western blot으로 확인해본 결과 농도의존적으로 COX-2와 iNOS mRNA의 발현양이 증가하였음을 확인할 수 있었다. 그러나 COX-2의 단백질 발현의 변화는 확인할 수 없었으나, iNOS는 50과 100 μ g/ml에서 약하게 발현되다가 200 μ g/ml에서 많이 발현되어 있음을 볼 수 있었다. 또한 세포의 활성과 분화를 촉진시키는 신호전달단백질인 MAPKs 중 ERK와 p38의 인산화형이 복분자의 농도에 따라 점진적으로 증가되어 있음을 관

찰할 수 있었고, 면역반응시에 증가되는 전염증성 cytokine인 IL-1 β 와 IL-6의 mRNA와 분비량이 control 그룹에 비해 증가되어 있음을 ELISA를 통하여 확인할 수 있다. 이 결과들을 종합하여 본 결과 복분자 추출물이 RAW264.7 cell에서 면역증진효과를 지닌다는 것으로 추측할 수 있었고, 그 활성 정도가 추출물의 농도에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험에 의한 복분자 추출물의 면역증진 기대효과를 확인해 본 결과, 면역시 일어나는 일련의 반응들을 활성화시키는 것을 확인함으로써 30% 에탄올에 의한 복분자의 추출물의 면역증진효과로 면역결핍질환의 완화와 치료효과를 보일 수 있을 것으로 기대된다. 추후 동물실험을 통한 효과 검증과 면역세포를 활용한 면역증진효과를 확인과 분석을 앞으로 더 연구해야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

본 실험은 복분자의 30% 에탄올 추출물에 의한 면역증진효과를 확인하기 위하여 복분자 추출물을 RAW264.7 mouse 대식세포에 농도별로 24시간 동안 처리하여 변화양상을 관찰하였다.

먼저 NO와 ROS의 생성을 확인한 결과 NO가 낮은 농도에서부터 크게 증가하였고, 세포내의 ROS가 농도에 따라 변화하는 것을 확인하였다. COX-2와 iNOS를 확인한 실험에서도 mRNA는 많이 발현되지 않았지만 iNOS가 200 μ g에서 많이 생성되었음을 알 수 있었다. 면역반응시에 활성화되는 MAPKs 또한 추출물 처리시에 활성화되었음을 확인할 수 있었고, 전염증성 cytokines의 mRNA 발현과 분비량도 유의성있게 증가하였다.

이에 본 실험에서 사용한 복분자 추출물은 면역반응과 관련된 일련의 과정들을 활성화시키는 효과를 지니고 있으므로 면역결핍질환의 개

선에 도움이 될 것으로 기대된다.

감사의 글

이 연구는 농진청(PJ008328)과 보건복지부(B110017)의 지원을 받아 수행하였음.

참고문헌

1. 황애란. 번역기전. 대한기초간호자연과학회 하계 학술대회. 2000:9-26
2. Thomson A. The cytokine handbook. San Diego, Academic Press. 1991:1-17
3. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek Cytokines, In Basic & Clinical Immunology 8th ed, Ed by Stites DP, Terr AI, Parslow TG. London, prectice-Hall International Inc. 1994:105-123
4. Lee CB. Encyclopedia of Korea plant. Hyang Moon Publ., Seoul, Korea. 1989:441.
5. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 本草學. 2004:694-695.
6. Seeram NP. Berry fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. J Agric Food Chem. 2008:56(3):627-629.
7. Tulio AZ Jr, Reese RN, Wyzogoski FJ, Rinaldi PL, Fu R, Scheerens JC, Miller AR. Cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-xylosylrutinoside as primary phenolic antioxidants in black raspberry. J Agric Food Chem. 2008:56(6):1880-1888.
8. Lee MK, Lee HS, Choi GP, Oh DH, Kim JD, Yu CY, Lee HY. Screening of biological activities of the extracts from *Rubus coreanus* Miq. Korean J Medicinal Crop Sci. 2003:11(1):5-12
9. Moon GS. Constituents and Uses of Medicinal Herbs. Ilweolseogak, 1991:310-311
10. Wang SY, Lin HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. J Agric Food Chem. 2000:48(2):140-146.
11. Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung JK, Bang JK, Lee HY. Effect of ultrasonification process on enhancement of immuno-stimulatory activity of *Ephedera sinica* Stapf and *Rubus coreanus* Miq. Korean J Biotechnol Bioeng. 2004:19:113-117.
12. Kim TG, Park MS, Han HM, Kang SY, Jung KK, Rheu HM, Kim SH. Inhibitory effects of *Terminalia chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Rheum palmatum* on hepatitis B virus replication in HepG2 2.2.15 cells. Yakhak Hoeji. 1999:43:458-463.
13. Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, Heber D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulated apoptosis of human cancer cells in vitro. J Agric Food Chem. 2006:54:9329-9339
14. Lee MK, Choi YJ, Sung SH, Shin DI, Kim JW, Kim YC. Antihepatotoxic activity of icariin, a major constituent of *Epimedium koreanum*. Plant Med. 1995:61:523-526
15. Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K, Kadota S. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active

- compound of *Zanthoxylum bungeanum*. *J Ethnopharmacol.* 2001; 77(2-3): 209-217
16. Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem.* 2012; doi: 10.1002/jcb.24391
 17. Jeon HJ, Choi HS, Lee OH, Jeon YJ, Lee BY. Inhibition of Reactive Oxygen Species (ROS) and Nitric Oxide(NO) by *Gelidium elegans* Using Alternative Drying and Extraction Conditions in 3T3-L1 and RAW 264.7 Cells. *Prev Nutr Food Sci.* 2012; 17: 122-128
 18. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(10): 787-795.
 19. Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer.* 2007; 121(11): 2357-2363.
 20. Huang P, Han J, Hui L. MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. *Protein Cell.* 2010; 1(3): 218-226
 21. Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(10): 1654-1661
 22. Barker BR, Taxman DJ, Ting JP. Cross-regulation between the IL-1 β /IL-18 processing inflammasome and other inflammatory cytokines. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23(5): 591-597
 23. Chalaris A, Garbers C, Rabe B, Rose-John S, Scheller J. The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol.* 2011; 90(6-7): 484-494.
 24. Saul Greenburg. *Immuno deficiency.* Univ of Toronto. 2009
 25. Roberts AW. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all!. *Growth Factors.* 2005; 23(1): 33-41.
 26. Waller EK. The Role of Sargramostim(rhGM-CSF) as Immunotherapy. *Oncologist.* 2007; 12 Suppl 2: 22-26.
 27. Kim DH, Park JH, Kim JH, Kim CH, You JH, Kwon MC, Lee HY. Enhancement of immune activities *Ephedrae herba* and *Rubi fructus* at low temperature extraction. *Korean J Med Crop Sci.* 2005; 13(3): 81-86
 28. Kwon MC, Kim CH, Na CS, Kwak HG, Kim JC, Lee HY. Comparison of immunomodulatory regulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel by ultra high pressure extracts process. *Korean J Med Crop Sci.* 2007; 15(6): 398-404
 29. Hwang YC, Shin KS. Isolation and characterization of immuno-stimulating polysaccharide in Korean black raspberry wine. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2011; 54(4): 591-599