

## Gene Expression Analysis of Immune Cell Activation Markers in Extracts of *Platycodon grandiflorum* Containing Medicinal Herbs

Shin Ae Kang<sup>1,2</sup>, Sung Sik Chun<sup>3\*</sup>, Shin Kwon Kang<sup>3</sup>, Young Chul Chung<sup>3</sup>, Eun Woo Cheon<sup>3</sup>, Sang Uk Cho<sup>4</sup>, Kyung Hwa Jung<sup>5</sup>, Soon Cheol Ahn<sup>2,6</sup> and Hak Sun Yu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Parasitology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 626-870, Korea

<sup>2</sup>Immunoregulatory Therapeutics Group in Brain Busan 21 Project

<sup>3</sup>Department of Medicinal Food, International University of Korea, Jinju 660-759, Korea

<sup>4</sup>JangSaeng Doraji Research Institute of Biotechnology, JangSaeng Doraji Co. LTD., Jinju 660-833, Korea

<sup>5</sup>Department of Food Science and Biotechnology, KyungSung Univeristy, Busan 608-736, Korea

<sup>6</sup>Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 626-870, Korea

Received February 6, 2014 / Revised March 13, 2014 / Accepted April 16, 2014

Extracts of *Platycodon grandiflorum* have been reported to show anti-inflammatory, antioxidant, anti-metastatic, and hepato-protective effects. This study was designed to evaluate T-cell activation and M1/M2 differential macrophage activation by extracts of *P. grandiflorum* or *P. grandiflorum* containing various medicinal herbs. Using real-time RT-PCR, we analyzed expression levels of *c-fos*, and *CD40L* (T-cell activation markers) in splenocytes and *iNOS*, *Ym1*, and *ARG1* in RAW 246.7 cells after treatment of CC (hot water extract of *P. grandiflorum*), MAEK (hot water extract of *P. grandiflorum* [82%] and six different plants), and HWAL (hot water extract of *P. grandiflorum* [7%] and eight different plants). The results showed that MAEK significantly elevated the expression of T-cell activation markers of splenocytes, with the *c-fos* gene activated more than 10-fold and the *CD40L* gene activated more than 6-fold. Although *CD40L* was significantly increased by CC and HWAL, the increase was only about 2-fold. In addition, CC and HWAL did not significantly activate the expression of the *c-fos* gene. On the other hand, CC elevated the M1 activation marker *iNOS*, and HWAL elevated the M2 activation marker *Ym1* and *ARG1* gene expression. In conclusion, MAEK could be used as an immune stimulant because of its ability to activate T cells (elicited *c-fos* and *CD40L* gene expression), whereas HWAL could serve as an anti-inflammatory agent because of its differential activation of M2 macrophages.

**Key words** : Anti-inflammation, immune activation, macrophages, *Platycodon grandiflorum*, splenocytes

### 서 론

도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 보통 3~5년 정도 재배하는 초롱꽃과에 속하는 다년생 채소로 진정, 해열, 진통 및 항염증 효과가 알려져 있으며, triterpenoid계 사포닌과 당질, 섬유질을 상당히 함유하고 있어 만성질환예방, 항암효과 간기능강화 등에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[1, 8, 10, 18, 21]. 사포닌의 주성분으로서 platycodin A, C 및 D와 platycoside A, B, C, D 및 E도 함유되어 있다고 알려져 있고 triterpenoid와 함께 도라지 사포닌의 주성분 중 하나로 꼽히는 platy-

codin D는 진통, 항염효과 뿐 아니라 항암효과를 가진다[16].

면역시스템은 침입해 온 바이러스, 박테리아, 기생충에 대하여 저항하고, 내부에 생긴 암세포를 저항 혹은 제거하는데 있어서 매우 중요하다[4]. 특히 T세포의 활성이 이러한 역할을 하는 것으로 가장 많이 알려져 있다[4]. 미감작 T세포들은 Toll-like receptor(TLRs)에 부착된 병원균 연관 분자 유형(PAMP)에 의하여 활성화된 항원제시세포들의 표면에 있는 Peptide-MHC 복합체에 의하여 활성화된다. 항원제시세포들이 항원을 인식할 때 동시에 결합한 CD28의 활성화에 의하여 활성화된 T세포들의 표면에는 CD40 리간드(CD40L)의 발현이 유도된다. T세포의 CD40L는 항원제시세포의 표면의 CD40와 결합하여 B7분자의 발현을 자극함과 동시에 T세포를 활성화시키는 사이토카인들을 분비한다[4]. 그러므로써 B7과 CD40 신호경로들은 서로를 자극하게 한다[19]. 항원들과 동시 자극자들(co-stimulators)에 의하여 활성화된 T 림프구는 새로운 유전자들을 발현한다. *c-Fos*의 경우 자극에 노출된 1~2시간 사이 최대 발현이 되며, *CD40L*의 경우, 노출 3시간째부터 발현이 증가하기 시작하여 36시간째까지 발현이 되며 특히, 활

#### \*Corresponding authors

Tel : +82-51-510-8022, Fax : +82-51-980-0872

E-mail : hsyu@pusan.ac.kr (Hak Sun Yu)

fnsschun@hanmail.net (Sung Sik Chun)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

성화된 CD4<sup>+</sup>T세포가 주로 발현하는 사이토카인, T세포의 자가분비 성장인자인 IL-2와 같은 경우, 4시간째부터 발현이 증가하여 2일째까지 발현이 지속된다[5]. 항암작용에 있어서도 T세포의 활성이 매우 중요하며 이러한 활성이 *c-fos* 신호전달과 CD40L의 발현이 중요한 것이 이미 알려져 있다[11, 19, 22].

대식세포는 면역을 담당하는 세포로 M1과 M2의 두 종의 대식세포 아형이 존재하며 침입한 세균 등을 잡아먹고 그에 대항하는 면역정보를 림프구에 전달한다. 대식세포는 Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 에 의한 classical activation (M1)과 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-13에 의한 alternative activation (M2)가 존재하는 것으로 알려져 있다. M1 대식세포는 초기염증성 사이토카인을 분비하고, 보체매개 탐식작용으로 세균감염에 대한 방어기작으로 작용하는 데 반해 M2 대식세포는 항염증반응 유도 특성을 가지며 세포의 기생충 및 곰팡이 등에 대한 방어, 체내 과도 염증반응의 종결, 조직재생 담당한다[12]. M1 대식세포의 표식인자로는 *iNOS* 발현이 대표적이며 M2 대식세포의 표식인자는 *arginase 1(ARG1)*, *Yml*, *Ym2* 유전자 발현 및 CD206 막단백질 등이 알려져 있다.

도라지는 다른 식용식물의 추출물과의 혼합하여 여러 가지 한의학 재료로도 많이 사용되고 있다. 이러한 식물추출물과의 혼합 비율에 따른 도라지 효능의 증감에 대한 보고는 잘 알려지지 않았으며, 또한 면역활성 및 조절 기능이 있는 T 세포나 M2 대식세포에 대한 활성여부를 특이 유전자의 발현을 가지고 평가 연구한 논문은 없다. 이번 연구에서는 도라지 추출액과 도라지를 함유한 한약재 추출액(맥환, 활맥단)들의 T 세포 활성화 여부(*c-fos*, *CD40L*)와 M1 & M2 대식세포 분화 능력 여부(*iNOS*, *Yml*, *ARG1*)를 조사하기 위하여 각각의 특이 유전자의 발현을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양

마우스 대식세포인 RAW 264.7은 penicillin/streptomycin (Gibco) 100 unit/ml과 10% FBS이 함유된 DMEM (HyClone) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, 2일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다

### 도라지 및 한약재 함유 도라지 추출액 제조

본 연구에 사용한 생약 원료인 도라지는 경상남도 진주시 인근에서 재배된 것으로 (주)장생도라지로부터 공급받았으며, 상황버섯 등 기타 약재는 경남 진주시 소재의 약재 시장에서 구입하였다. 도라지 추출액(CC)은 동결건조 상태의 건조도라지만을, 맥환 추출액(MAEK)은 도라지(82%)에 구기자(3%), 결명자(3%), 산약(3%), 두충(3%), 황기(3%), 감초(3%) 등 6가지 한약재(18%)를 합한 총 100 kg의 시료에 물 800 l를 가하고 80°C 에서 6시간 동안 열수 추출하였으며 45°C에서 감압농축

후 4°C 냉장 보관하면서 사용하였다. 활맥단 추출액(HWAL)은 도라지(7%)에 당귀(10%), 천궁(10%), 숙지황(18%), 백작약(10%), 백출(10%), 상황버섯(20%), 영지버섯(5%), 표고버섯(10%) 등 8가지 한약재(93%)를 합한 총 100 kg을 맥환 추출액과 동일한 방법으로 추출하여 제조하였다.

### 마우스 지라세포(splenocyte)의 분리

마우스 지라세포의 분리는 이전 실험과 동일한 방법 에 의해 실행하였다[7]. CO<sub>2</sub> 안락사기로 희생시킨 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI 1640 용액으로 세척한 다음 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 분리된 세포 현탁액을 200 mesh stainless steel sieve (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 통과시킨 후 15 ml의 원심관에 넣고 4°C, 1,200 rpm에서 3분간 원침시킨 후 cell pellet을 ACK buffer (RBC lysis buffer)에 5분간 현탁시켜 적혈구를 제거하였다. 위의 세포는 다시 RPMI로 2회 원심하고 세척한 다음, 10%-FBS RPMI 1640으로 1.0×10<sup>6</sup> cell/ml의 농도로 희석하여 24-well plate에 1 ml 씩 분주하였다.

### T세포 활성 및 M1 및 M2 대식세포 활성 특이 유전자 발현 분석

T 세포의 활성여부를 알기 위해 분리한 지라세포를 1×10<sup>6</sup> /ml 농도로 24-well plates에 분주하고 50 µg/ml의 농도로 도라지 추출액(CC), 맥환 추출액(MAEK), 활맥단 추출액(HWAL)을 각각 처리하였다. 양성 대조군에는 concavalin A (conA)을 5 µg/ml를 각각 처리하였다. 대식세포의 M1, M2 분화 정도를 분석하기 위해 RAW 264.7 세포를 1×10<sup>6</sup> /ml 농도로 24-well plates에 분주하고 50 µg/ml의 농도로 도라지 추출액, 맥환 추출액, 활맥단 추출액을 각각 처리하였다. M1 분화의 양성 대조군에는 LPS를 5 µg/ml를, M2 분화의 양성 대조군으로는 IL-4 40 ng/ml를 처리하였다. 위와 같이 처리된 세포군들은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 2시간 동안 배양 후 각각 RNA를 분리 한 후, Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase kits (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 Reverse RNA transcription 합성한 후 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 지라세포의 경우 *c-FOS*, *CD40L* 그리고 대식세포의 경우 *iNOS*, *Yml*, *ARG1* 유전자의 발현 정도를 Real-time PCR 법을 통해 비교하였다. 본 실험에 사용한 primer sequence는 Table 1에 기술되어 있다.

### 통계처리

본 연구에서 수집된 자료의 분석은 나온 결과는 PASW 통계프로그램(SPSS Ver 17.0, Chicago, IL, USA)을 이용하여 모든 변인에 대한 평균값과 표준편차를 산출하였으며 대응표본 t검정(paired t-test)로 분석하였다.

Table 1. Gene-specific primer for Real time PCR

Primer	Sequences
GAPDH forward	5'-TACCCCAATGTGTCGTC-3'
GAPDH reverse	5'-AAGAGTGGGAGTTGCTGTTGAAG-3'
c-FOS forward	5'-CCTTCGGATTCTCCGTTTCTCT-3'
c-FOS reverse	5'-TGGTGAAGACCGTGCAGGA-3'
CD40L forward	5'-GACGCTAGCATGATAGAAA-3'
CD40L reverse	5'-GCCGAATTCTCAGAGTTTGA-3'
iNOS forward	5'-CCTCCTCCACCTACCAAGT-3'
iNOS reverse	5'-CACCCAAAGTGCTTCAGTCA-3'
YM1 forward	5'-TCACAGGTCTGGCAATTCCTCTG-3'
YM1 reverse	5'-TTTGTCTTAGGAGGGGCTTCCTC-3'
ARG1 forward	5'-GGGGAAAGCCAATGAAG-3'
ARG1 reverse	5'-TGGTTGCAGGGGAGTGT-3'

결과 및 고찰

맥한 농축액에 의한 지라세포내 T세포 활성화 유전자 발현 증가

지라는 중요한 제2차 면역기관으로 노화된 적혈구가 사멸될 뿐만 아니라 항원을 탐지한 항원제시세포(대식세포, 수지상세포)들과 임파구(T세포, B세포) 들과 간에 다양한 면역 상호 자극이 일어나며 이러한 자극의 결과 다양한 항체의 생성은 물론 T세포의 활성화 일어난다[14]. 지라세포에서 T 세포의 활성화 여부를 측정 한 결과, 맥한 추출액을 처리한 세포에서 T세포 활성화인자인 conA를 5 µg/ml을 처리한 양성 대조군과 유사하게 대조군에 비해 *c-fos*와 *CD40L* 유전자의 발현을 각각 10배 이상, 6배 이상 증가시켰다. 하지만 도라지 추출액과 활맥단 추출액을 처리한 군에서는 *c-fos*의 경우, 거의 증가하지 않았으나 *CD40L*의 경우, 대조군에 비해 2배이상 발현이 증가되는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 맥한 추출액은 도라지가 80% 이상 함유되어 있고, 구기자, 결명자, 산약, 두충, 황기, 감초 등의 한약재가 포함되어 있다. 김 등에 의하면, 도라지 추출물을 B16-F1 mouse melanoma cell 세포주에 1, 0.5, 0.125, 0.062, 0.031 mg/ml의 농도로 각각 한 시간 동안 처리한 경우, 0.125

mg/ml이상 처리한 세포주에서 종양세포 접착이 저해되는 현상이 관찰되었고, 일부 종양에 대해서는 종양억제율이 60%로 나타날 정도로 높은 항종양활성이 관찰되었다. 이러한 항종양활성은 세포독성으로 인한 직접적인 종양세포의 파괴에 의한 것이 아니라 면역세포의 활성화에 의한 종양의 전이억제로 인한 것으로 보고 되었다[9]. 구기자의 경우, 항암효과 및 항균 효과가 매우 높고 또한 세포면역반응을 증가시키는 것으로 보고되었으며[17], 산약의 경우, 점질다당류에 의한 임파계 면역세포의 활성화가 보고되었다[3]. 따라서 맥한 추출액에는 도라지(25%) 외에도 이러한 면역활성인자들로 구성되어 있는 한약재가 포함되었기 때문에 *c-FOS*와 *CD40L*과 같은 T세포의 활성화인자들을 매우 높게 증가시키는 것으로 사료되었다(Fig. 1).

도라지 추출액에 의한 M1 대식세포의 활성화 유전자 발현 증가

대식세포는 외부 병원균의 감염 시 다양한 염증인자 및 항균물질을 분비하거나 식균작용 등을 통해 숙주 방어에 중요한 역할을 수행한다. 대식세포는 선천면역계 및 적응면역계 모두에서 중요한 역할을 수행하여 2차 림프기관 뿐만 아니라 거의 모든 조직에 광범위하게 분포한다[6]. M1 대식세포의 경우, 병원균 유래 위험인자 등에 반응하여 이들을 제거하고 각종 cytokines, chemokines 및 inflammatory mediators를 생성하여 개체의 다른 면역체계에 생체 내 감염이나 상처가 있음을 알리는 일차적인 역할을 수행한다[13]. 또한 M1 대식세포는 보체성분, 인터페론, IL-1β 및 TNF-α와 같은 사이토카인을 생산하여 T-세포로부터 생산되는 여러 가지 사이토카인의 기능을 증가시키는 것으로 알려졌다[15]. 활성화된 M1 대식세포에서 nitric oxide(NO)를 생산하고 이러한 NO는 비특이적 숙주방어 기작인 대식작용과 세균 및 암세포의 증식을 억제하는 활성을 보인다. 또한 이러한 인체면역 기능을 수행함에 있어서 대식세포는 class II MHC 물질을 대량으로 분비함으로써 T-helper lymphocyte와 상호활성화를 이루기도 한다[2]. 이러한 M1 대식세포의 면역 조절활성을 알아보기 위해 *i-NOS* 유

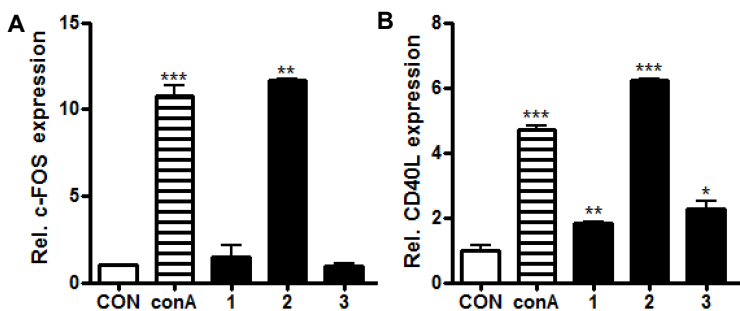


Fig. 1. Analysis of expression level of T cell activation markers in splenocytes after treatment of 3 different herbal extracts. Splenocytes were treated with conA 5 µg/ml or 50 µg/ml of 3 samples and then incubated. After 2hr of culture, cells were assessed for m-RNA expression of *c-FOS* (A) and *CD40L* (B) by real-time PCR. The GAPDH gene was used as a control. All results are the mean ± SD of two independent experiments (significance compare to CON, \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001; CON, D.W. treated; ConA, ConA treated; 1, CC treated; 2, MAEK treated; 3, HWAL treated).

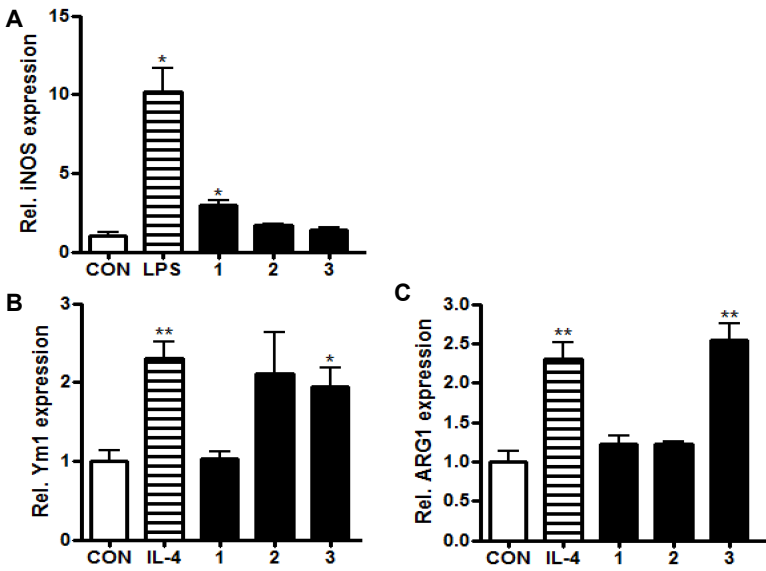


Fig. 2. Analysis of expression level of M1 & M2 macrophage activation markers in RAW 264.7 cells after treatment of 3 different herbal extracts. RAW 264.7 cells were treated with LPS 5 µg/ml or IL-4 40 ng/ml or 50µg/ml of 3 samples and then incubated. After 2hr of culture, cells were assessed for m-RNA expression of *i-NOS* (A), *Ym1* (B) and *arginase1* (B) by real-time PCR. The GAPDH gene was used as a control. All results are the mean ± SD of two independent experiments (significance compare to CON, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; CON, D.W. treated; 1, CC treated; 2, MAEK treated; 3, HWAL treated).

전자 발현 정도를 확인 한 결과, 도라지 추출액에서는 유전자의 발현이 유의적으로 증가되었지만, 도라지 함유가 상대적으로 적은 맥한 추출액과 활맥단 추출액에서는 유전자의 발현 증가가 확인되지 않았다(Fig. 2A). 이 결과는 도라지의 면역강화 기전 중의 하나가 M1 대식세포의 활성화인 것을 증명해주고 있다.

**활맥단 추출액에 의한 M2 대식세포의 활성화 유전자 발현 증가**

M2 대식세포의 경우, 질병을 치료하기 보다는 면역반응을 조절하고 생체내에서 항상성을 유지, 조직재생에 있어서 매우 중요한 역할을 한다[24]. 이들은 IL-4와 IL-13이 관여하며 염증이 있는 조직이나 병변 주변으로 M2 대식세포들이 신속히 이동하여 염증을 억제하는 역할을 한다[24]. M2 대식세포에서의 면역 조절활성을 측정 한 결과, 활맥단 추출액을 처리 한 군에서 M2 대식세포의 활성화인자로 알려진 *Ym1*, *ARG1* 유전자의 발현이 매우 유의적으로 증가하는 것이 관찰되었다. 그러나 맥한 추출액과 도라지 추출액에서는 두 가지 유전자의 유의적인 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 2B, C). 활맥단 추출액에는 도라지(7%) 외에도 당귀, 천, 숙지황, 백작약, 백출, 상황버섯, 영지버섯, 표고버섯 등이 들어있다. 특히 당귀의 경우, 사람의 비만세포 유래 세포주에 처리한 결과, 비만세포의 탈과립표지인자인 β-hexosaminidase 의 분비를 조절하여 히스타민의 분비를 억제시켰고, 또한 알레르기 유발 사이토카인(IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α)의 분비를 유의적으로 억제시켰다고 보고되었다[20]. 또한 숙지황 추출물을 집먼지 진드기로 자극한 아토피 피부염 생쥐 모델을 대상으로 피부에 바른 결과, 아토피 피부염 증상이 크게 개선되는 효과들이 발표되었다[23]. 따라서 활맥단 추출액에는 도라지(7%) 외에도 다양한 면역활성 조절인자들로 구성되어 있는 한약재가 포함되었기 때문에 M2 대식

세포에서의 면역 조절활성에 관련된 유전자들이 발현을 증가시키는 것으로 사료되었다.

이번 연구에서 도라지를 함유하고 있는 한약재 추출액을 투여하여 T세포 활성화와 항알레르기 및 항염증작용에 중요한 역할을 하는 M2 대식세포의 활성화 여부를 관찰하였다. 도라지 추출물은 M1 대식세포의 활성을 통하여 유도하여 세균 및 바이러스 감염에 있어서 방어 기전을 높여 줄 수 있을 것으로 보였다. 도라지를 다량함유하고 있고 세포면역활성 효과가 있는 구기자 등이 혼합된 경우, T세포 활성을 강하게 유도하여 면역활성을 증강하는 것으로 관찰되었다. 도라지는 천식과 같은 알레르기 억제 능력은 M2 대식세포 활성을 통해 이루어지는 것이 아니고 다른 기전이 있을 것으로 사료된다. 도라지와 여러 한약재의 배합 조건에 따라서 면역의 활성화 또는 항 면역반응을 더 활성화 시킬 수 있어서 더욱 강력한 면역강화제 및 항 면역제제의 개발을 위한 최적의 조합을 찾는 것이 필요할 것으로 사료된다.

**감사의 글**

이 논문은 부산대학교 자유 과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

**References**

1. Bendich, A. and Olson, J. A. 1989. Biological actions of carotenoids. *FASEB J* **3**, 1927-1932.
2. Bryant, P. and Ploegh, H. 2004. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr Opin Immunol*. **16**, 96-102.
3. Choi, K. S. 2013. Effects of coated liposome from discorea rhizoma extract (DRE) -on hypoglycemic, serum insulin, and lipid levels in streptozotocin-induced evaluation of

- antioxidant activity of p*Platycodon grandiflorum*. *Korean J Food Nutr* **26**, 310-317.
4. Cronin, S. J. and Penninger, J. M. 2007. From T-cell activation signals to signaling control of anti-cancer immunity. *Immunol Rev* **220**, 151-168.
  5. Hoffman, G. E., Smith, M. S. and Verbalis, J. G. 1993. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* **14**, 173-213.
  6. Janeway, Jr. C. A. and Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216.
  7. Kang, S. A., Cho, M. K., Park, M. K., Kim, D. H., Hong, Y. C., Lee, Y. S., Cha, H. J., Ock, M. S. and Yu, H. S. 2012. Alteration of helper T-cell related cytokine production in splenocytes during *Trichinella spiralis* infection. *Vet Parasitol* **186**, 319-327.
  8. Kim, C. H., Jung, B. Y., Jung, S. K., Lee, C. H., Lee, H. S., Kim, B. and Kim, S. K. 2010. Evaluation of antioxidant activity of *Platycodon grandiflorum*. *Environ Toxicol* **25**, 85-94.
  9. Kim, Y., Lee, B., Kim, K., Lee, Y., Cho, K. and Chung, Y. 1998. Antitumor and immunomodulatory activities of the *P. grandiflorum* cultivated for more than 20 years. *J Pharmaceut Soc Korea* **42**, 382-387.
  10. Le Tran, Q., Adnyana, I. K., Tezuka, Y., Harimaya, Y., Saiki, I., Kurashige, Y., Tran, Q. K. and Kadota, S. 2002. Hepatoprotective effect of majonoside R2, the major saponin from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*). *Planta Med* **68**, 402-406.
  11. Liu, Y., Gao, X., Deeb, D., Arbab, A. S., Dulchavsky, S. A. and Gautam, S. C. 2012. Anticancer agent xanthohumol inhibits IL-2 induced signaling pathways involved in T cell proliferation. *J Exp Ther Oncol* **10**, 1-8.
  12. Martinez, F. O., Helming, L. and Gordon, S. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Ann Rev Immunol* **27**, 451-483.
  13. Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301-305.
  14. Mebius, R. E. and Kraal, G. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* **5**, 606-616.
  15. Nancy, C. A. and Meltzer, M. S. 1991. T-cell-mediated activation of macrophages. *Curr Opin Immunol* **3**, 330-335.
  16. OZAKI, Y. 1995. Studies on Antiinflammatory effect of Japanese oriental medicines (Kampo Medicines) used to treat inflammatory diseases. *Biol Pharm Bull* **18**, 559-562.
  17. Park, J., Park, J., Lee, B., Choi, K., Ra, S. and Chang, K. 2000. Effects of extracts from various parts of *Lycium chinense* Mill on the proliferation of mouse spleen cells. *Korean J Medicinal Crop Sci* **8**, 291-296.
  18. Rao, A. and Sung, M. 1995. Saponins as anticarcinogens. *J Nutr* **125**, 717-724.
  19. Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Ofringa, R. and Melief, C. J. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**, 480-483.
  20. Seo, M. J., Park, H. J. and Lee, H. J. 2013. Anti-allergic effect of the fermented *angelicae gigantis radix* in human mast cell line HMC-1. *Korea J Herbol* **28**, 39-44.
  21. Shin, C. Y., Lee, W. J., Lee, E. B., Choi, E. Y. and Ko, K. H. 2002. Platycodin D and D3 increase airway mucin release *in vivo* and *in vitro* in rats and hamsters. *Planta Med* **68**, 221-225.
  22. Sun, H., Zhong, Y. J., Zheng, X. L., Wang, Q., Yang, L., Shi, F., Yan, J. Q., He, F., Liao, L. C., Lin, Y., Zhang, L. and Wang, X. 2012. Critical role of CD40-mediated autocrine tumor necrosis factor-alpha in potentiation of cisplatin-induced cytotoxicity in cancer cells. *Cancer Sci* **103**, 197-202.
  23. Sung, Y. Y., Yoon, T., Jang, J. Y., Park, S. J. and Kim, H. K. 2011. Topical application of *Rehmannia glutinosa* extract inhibits mite allergen-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol* **134**, 37-44.
  24. Van Dyken, S. J. and Locksley, R. M. 2013. Interleukin-4 and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol* **31**, 317-343.

**초록 : 도라지 추출액과 한약재 함유 도라지 추출액에 의한 면역세포 활성화 표지유전자 발현 분석**강신애<sup>1,2</sup> · 전성식<sup>3\*</sup> · 강신권<sup>3</sup> · 정영철<sup>3</sup> · 전은우<sup>3</sup> · 조상욱<sup>4</sup> · 정경화<sup>5</sup> · 안순철<sup>2,6</sup> · 유학선<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>부산대학교 의학전문대학원 기생충학교실, <sup>2</sup>브레인부산21 면역세포치료연구인력양성사업단, <sup>3</sup>한국국제대학교 식품의약학과, <sup>4</sup>장생도라지(주) 장생도라지생명과학연구소, <sup>5</sup>경성대학교 식품영양건강생활학과, <sup>6</sup>부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학교실)

초롱꽃과에 속하는 도라지는 항염증, 항산화, 항암작용뿐 아니라 간기능 강화에도 작용하여 한방에서 만성염증성 질환의 치료제로 널리 사용되고 있다. 이번 연구에서 마우스 대식세포주인 RAW 246.7 세포와 비장으로부터 분리한 T세포에서 도라지 추출액(CC), 도라지 추출물이 함유된 활맥단 추출액(HWAL, 도라지 82% 함유) 및 맥환 추출액(MAEK, 도라지 7% 함유)을 처리하여 대식세포와 T세포의 활성화와 관련 있는 유전자의 발현을 통해 면역증진 및 항염증 효과를 real-time RT-PCR 기법을 통해 확인해 보았다. 그 결과, 활성화된 T세포에서 많이 발현되는 *c-fos* (10배 이상), *CD40L* 유전자(6배 이상)의 경우, 맥환 추출액 처리군에서 가장 높은 발현이 유도되어 면역활성 효과가 높을 것으로 사료되었다. 도라지 추출액과 활맥단 추출액의 경우도 *c-fos* 유전자의 발현을 유의적으로 증가시켰지만 미약하였고, *CD40L*의 경우는 영향을 주지 않았다. 도라지 추출액을 처리한 군에서 면역활성을 유도하는 M1 대식세포에서 많이 발현되는 *iNOS* 유전자의 발현이 유의하게 증가되었다. 반면에 활맥단 추출액을 처리한 대식세포는 M2 표식인자인 *Ym1*, *arginase1 (ARG1)* 유전자의 발현이 유의적으로 상승하였다. 결론적으로 도라지가 다량 포함된 맥환 추출액은 면역활성을 유도하는데 탁월한 효과를 나타내며, 도라지 함유가 적게 포함된 활맥단 추출액은 항염증 작용에 탁월한 효과가 있을 것으로 사료된다.