

桔梗의 適應免疫界 增強 效果

경희대학교 한의과대학 한방부인과 교실

박준홍, 이진무, 이창훈, 조정훈, 장준복, 이경섭

ABSTRACT

Enhancing the Immunogenicity of *Platycodon Grandiflorum* on Adaptive Immune System

Joon-Hong Park, Jin-Moo Lee, Chang-Hoon Lee, Jung-Hoon Cho,
Jun-Bock Jang, Khung-Sub Lee

Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

Purpose: This study was designed to investigate enhancing the immunogenicity effects of *Platycodon grandiflorum*(PG) on adaptive immune system.

Methods: To investigate the effect of PG as an adjuvant, we used the ovalbumin (OVA) as an antigen at first. The proliferation of lymphocytes, the antibody titer, the subisotypes of antibodies and the production of cytokines were measured.

Results: The proliferation of lymphocytes and the antibody titer were increased after PG treatment. The increased subisotypes of antibodies were IgG2 and IgG3 induced from T1-helper cells. However IgE induced from T2-helper cells was decreased. The production of cytokines derived from T1-helper cells was increased but that from T2-helper cells was decreased.

Conclusion: It is supposed that PG has an immunogenicity effect as an adjuvant on adaptive immune system.

Key Words: *Platycodon Grandiflorum*, Adjuvant, Antibody, Adaptive immunity

I. 서 론

면역 반응으로 종양 억제 효과가 보고 된 후¹⁾, 악성 종양에 대한 다양한 면역학적 치료법이 제시되고 있다²⁾. 부인과 적 악성 종양의 치료에 있어서도 인유두 종 바이러스에 대한 백신 치료는 보편화 되었고, 난소암에 대한 보조요법으로 면역학적 치료가 대두되고 있다³⁾. 따라서 효과적인 면역반응을 위해서는 면역세포의 기능을 조절하여 특이 항원에 대한 면역자극활성을 유도함으로써 항원 특이적인 체액 및 세포성 면역증강 활성을 유도케 하는 물질이 필요하다⁴⁾.

최근까지 가장 흔히 인체에 사용되었던 면역증강제는 1926년 Glenny AT 등⁵⁾이 개발한 aluminum-based mineral salts 이었으나, 인체 알러지 반응과 관련되는 IgE를 유발시키는 등의 부작용이 밝혀져 새로운 면역증강제의 개발이 요구되고 있다⁶⁾.

도라지과에 속하는 多年生 草本인 도라지의 뿌리를 건조한 桔梗은 宣肺利咽, 祛痰排膿의 목적으로 사용되어 왔으며⁷⁾, 최근 면역기능과 관련된 특정 암세포에 대한 항암효과가 보고되었다^{8,9)}. 이 등¹⁰⁾은 선천면역계를 통한 桔梗의 항암 효과를 보고한 바 있어, 적응면역계를 통한 효과도 있을 것으로 생각되나 이에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

이에 저자는 桔梗이 면역증강제로서 적응면역계에 대한 효과를 확인하고자 단백질 항원에 대한 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험 방법

1. 재 료

1) 藥 材

도라지과(Campanulaceae)에 속하는 多年生 草本인 도라지 *Platycodon grandiflorum* A.(Jacq) DC.의 건조된 뿌리를 HPLC (methanol, 50°C)로 추출하여 tube에 분주한 후 45°C에서 감압 농축법으로 제조한 한국식물추출물은행의 제품CW03-013)을 구매하여 사용하였다.

2) 動 物

생후 6-8주령의 雌性 BALB/c를 (주) 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 분양 받아 정수된 물과 사료(Samyang Co. Ltd., Korea)를 자유 공급하면서 온도 22°C, 습도 50% 및 12시간 간격으로 자동 조명되는 상태에서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 무균상태로 사육하였다.

2. 실험방법

1) 단백질 항원에 대한 면역증강 효과

(1) 시험군 설정과 1차 면역 유도

모든 시험군은 6주령 BALB/c 마우스에 단백질 항원인 ovalbumin(이하 OVA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 대한 면역을 유도하였으며, 대조군은 무처치군으로 하였다. OVA군은 20µg의 ovalbumin만, 桔梗처치군은 20µg OVA와 200µg 桔梗 추출물을, alum처치군은 20 µg OVA와 1mg aluminium hydroxide(이하 alum; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을, 桔梗-alum처치군은 20µg OVA, 1mg alum 및 200µg 桔梗 추출물을 혼합하여 면역원으로 사용하였다. 1차 면역은 각 면역원을 2주 간격으로 3회 피하 주사하여 유도하였다.

(2) 항원 특이적 비장세포 증식 측정 최종 면역 3일 후 마우스에서 비장을

적출하여 10% fetal bovine serum(이하 FBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA)가 함유된 RPMI-1640 배지(Gibco, Carlsbad, CA, USA)에 부유시킨 후, 2.5×10^5 cells/well로 세포 농도를 조절하여 96-well culture plate에 분주하였다. 대조군을 포함한 모든 시험군에 OVA를 500 μ g/ml부터 5배 희석법으로 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 배양기(Thermo, MA, USA)에서 72시간 동안 배양하였다. Cell counting kit(EZ-Cytox, Daeil Lab. Seoul, Korea)을 배양 완료 6시간 전에 첨가한 후, spectrophotometer(Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450nm에서 비장세포의 증식을 측정하였다.

(3) 총 항체가 측정

최종 면역 3일 후 마우스에서 혈액 500 μ l를 cardiac puncture로 채취한 후, 혈청을 분리하여 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. Flat-bottomed microtiter plate의 각 well에 50 μ g/ml의 OVA 100 μ l을 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 부착시켰다. PBS-Tween 20(이하 PBST)으로 각 well을 3회 세척 후, 3% BSA로 blocking하고 PBST로 다시 세척하였다.

-20 $^{\circ}$ C에서 보관하던 혈청을 각 well에 100배부터 2배 희석법으로 첨가한 후, 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. PBST로 ELISA plate를 세척하고 2차 항체(Peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgGAM-HRP; Zymed, CA, USA)를 PBS에 희석하여 각 well에 첨가하고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, spectrophotometer를 이용하여 450nm의 흡광도에서 총 항체를 측정하였다.

(4) 항체의 subisotype 측정

마우스 혈청에 항체 subisotype 특이

적 2차 항체(Peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgA; Pierce, Rockford, USA)를 가하고, 발색기질로 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 용액을 가하였다. 30분 후 2N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, spectrophotometer를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

Capture antibody인 anti-mouse IgE를 coating buffer(0.1M carbonate, pH9.6)를 이용하여 ELISA plate의 각 well에 coating하고, 3% skim milk를 이용하여 blocking 후, 40배 희석된 항혈청을 첨가하였다. 동시에 혈청 중의 IgE의 함량 분석을 위해 standard로 IgE를 1.6~100ng/ml이 되게 조정하여 첨가하였다. 그 후 biotinylated anti-mouse IgE와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하고 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 완료 후 ELISA plate의 각 well을 PBST를 이용하여 세척하고, 기질로 TMB를 첨가하였다. 2N H₂SO₄를 이용하여 반응을 정지시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈청 중의 IgE 함량은 standard IgE에 대한 표준곡선에 대입하여 측정하였다.

(5) Cytokines 측정

최종 면역 3일 후에 비장세포를 분리하여 1×10^6 cell을 48-well culture plate에 분주하였다. 각 well에 최종농도 10 μ g/ml의 OVA를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 배양 완료 후 배양 상등액을 900rpm/10minute로 원심 분리하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다. Interleukin(이하 IL)-2, 4, 6, 10, interferon(이하 IFN)- γ , 및 glanulocyte-macrophage colony-stimulating factor(이하 GM-CSF)를 측

정하기 위하여 ELISA kit(Pharmingen, San Jose, CA, USA)를 사용하였다.

3. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS for windows(version 13)을 이용하였으며, 구간 비교는 *t*-test로 분석하였고, $p < 0.05$ 인 경우를 유의한 것으로 하였다.

III. 결 과

1. 단백질 항원에 대한 면역증강 효과

1) 비장세포 증식에 미치는 영향

1차 면역 후 OVA 재자극 시 비장세포의 증식을 알아본 결과, OVA군의 비장세포 증식은 대조군에 비하여 모두 증가하였으나, 100과 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서만 유의하였다($p < 0.05$).桔梗처치군의 비장세포 증식은 OVA군에 비하여 모두 증가하였으나, 4 $\mu\text{g/ml}$ 에서만 유의하였고($p < 0.05$),桔梗-alum처치군의 비장세포 증식은 alum처치군에 비하여 모두 증가하였고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 모든 농도군에서 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 1).

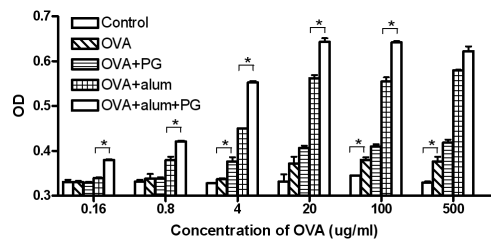


Fig. 1. Lymphocyte proliferative effect of *Platycodon grandiflorum* after OVA stimulation.

OD: optical density, OVA; ovalumin, PG; *Platycodon grandiflorum*, alum; aluminium hydroxide

2) 총 항체에 미치는 영향

1차 면역 후 OVA 재자극시 총 항체를 알아본 결과,桔梗처치군의 총 항체는 OVA군에 비하여 대부분 증가하였으나, 200배와 800배 희석군에서만 유의하였다($p < 0.05$).桔梗-alum처치군의 총 항체는 alum처치군에 비하여 모두 증가하였으나, 200배와 400배 희석군에서만 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 2).

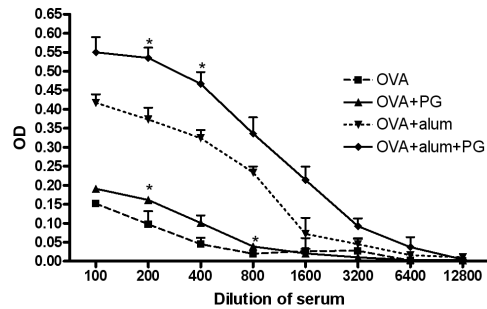


Fig. 2. Antibody proliferative effect of *Platycodon grandiflorum* after OVA stimulation.

OD: optical density, OVA; ovalumin, PG; *Platycodon grandiflorum*, alum; aluminium hydroxide

3) 항체 subisotype에 미치는 영향

1차 면역 후 OVA 재자극시 생산된 항체의 subisotype을 알아본 결과, IgG1은 시험군의 항체가가 대조군에 비하여 모두 유의한($p < 0.05$) 증가를 나타내었으나, 시험군 간의 차이는 없었다.

IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgA는 OVA군의 항체가가 대조군에 비하여 모두 증가하였으나 IgG2b와 IgA에서만 유의하였다($p < 0.05$).桔梗처치군의 항체가는 OVA군에 비하여 모두 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았으며,桔梗-alum처치군의 항체가는 alum처치군에 비하여 모두 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 3).

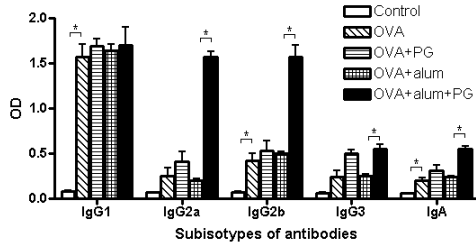


Fig. 3. Effect of *Platycodon grandifloru* on the profile of antibody subisotypes after OVA stimulation.

OD: optical density, OVA; ovalumin, PG; *Platycodon grandiflorum*, alum; aluminium hydroxide, Ig; immunoglobulin

4) IgE 함량에 미치는 영향

1차 면역 후 OVA 재자극시 생산된 IgE의 농도를 알아본 결과, OVA군의 IgE 농도는 대조군에 비하여 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였다.

그러나 桔梗처치군의 IgE 농도는 OVA군에 비하여 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였으며, 桔梗-alum처치군의 IgE 농도 역시 alum처치군에 비하여 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다(Fig. 4).

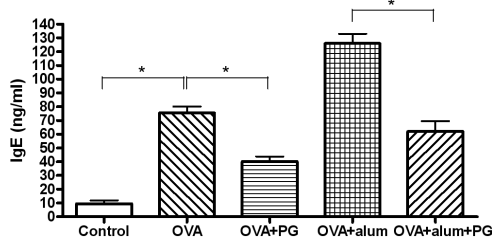


Fig. 4. Effect of *Platycodon grandifloru* on the production of IgE after OVA stimulation.

OD: optical density, OVA; ovalumin, PG; *Platycodon grandiflorum*, alum; aluminium hydroxide, Ig; immunoglobulin

5) Cytokines 생산에 미치는 영향

1차 면역 후 OVA 재자극시 생산된 cytokines의 농도를 알아본 결과, IL-2, GM-CSF 및 IFN- γ 는 OVA군의 농도가

대조군에 비하여 모두 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였고, 桔梗처치군이 OVA군에 비하여 모두 증가하였고 IL-2와 GM-CSF에서만 유의하였다 ($p < 0.05$). 桔梗-alum처치군이 alum처치군에 비하여 모두 증가하였고 IL-2와 GM-CSF에서만 유의하였다 ($p < 0.05$). IL-4, 6 및 10은 OVA군의 농도가 대조군에 비하여 모두 증가하였으나, IL-4와 10에서만 유의하였다 ($p < 0.05$). 桔梗처치군의 농도는 OVA군에 비하여 IL-6에서만 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였으며, 桔梗-alum처치군의 농도는 alum처치군에 비하여 IL-4에서 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다(Fig. 5).

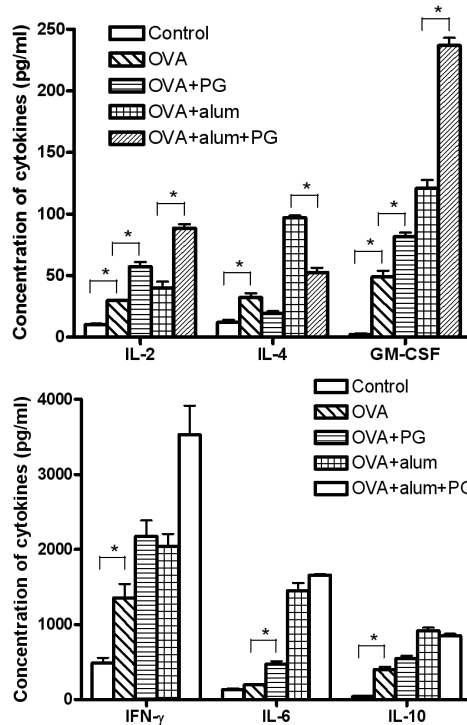


Fig. 5. Effect of *Platycodon grandifloru* on the production of cytokines after OVA stimulation.

OVA; ovalumin, PG; *Platycodon grandiflorum*, alum; aluminium hydroxide, IFN; interferon, IL; interleukin, GM-CSF; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

IV. 고 찰

인유두종 바이러스에 대한 vaccine의 유용성이 확인되면서¹¹⁾, AIDS, chlamydia 및 매독 등의 질환에 대한 면역학적 방법을 통한 치료에 대한 계획이 발표되고 있으나¹²⁾ 아직도 장기적 효과에 대한 연구가 요구되고 있다¹³⁾.

면역학적 치료 모델 중 특히 종양에 대한 vaccine의 개발에는 다양한 제약이 따르므로, 개발된 vaccine의 작용을 강화할 수 있는 면역증강제에 대한 관심이 함께 증가되고 있어¹⁴⁾, Öhlschläger P 등¹⁵⁾은 인유두종 바이러스에 대한 vaccine과 함께 adjuvant gene의 활용 가능성을 보고한 바 있다.

최근까지 흔히 사용된 면역증강제는 세균성 polysaccharide 등을 이용하여 높은 활성을 유도하는 것이었으나, 이는 강한 염증반응과 함께 국소부위에 육종을 야기하는 등의 한계를 가지고 있다¹⁶⁾. 이러한 세균성 면역증강제의 한계를 극복하기 위하여 Sun 등¹⁷⁾은 人蔘의 한 성분인 saponin을 이용한 식물성 면역증강제를 개발하였다.

여성의 생식기관에 발생하는 종괴를 통칭하는 癥瘕의 주된 병리는 氣滯血瘀이며 濕痰, 濕熱, 食積 등도 모두 氣滯血瘀를 이루는 병리인자가 되므로, 그에 따른 치료로 行氣導滯, 活血化瘀, 理氣化痰하여 破瘀消癥하는 治法이 이용된다¹⁸⁾.

桔梗은 《神農本草經》¹⁹⁾에 ‘辛微溫 主胸脇痛如刀刺 腹滿腸鳴幽幽 驚恐悸氣’라고 기술된 후, 咳嗽痰多, 胸悶不暢, 咽痛音啞, 肺癰吐膿, 瘡瘍膿成不潰 등의 치료에 응용되는 약물로⁷⁾, 淸肺提氣, 祛痰排

膿하는 작용은 理氣化痰, 破瘀消癥함으로 癥瘕의 치료에도 유효할 것으로 기대된다.

桔梗의 항염증 작용 및 면역계활성과 연관된 연구²⁰⁻²²⁾는 생체 내 항암작용 효과가 있을 것으로 기대되어 최근 이에 대한 연구가 활발히 진행 중이다^{23,24)}. 특히 이 등¹⁰⁾은桔梗이 선천면역계의 기능 향상에 유효함을 보고하면서 적응면역계를 통한 면역기능 향상의 가능성을 제시한 바 있으나, 적응면역계에 미치는 효과에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

이에桔梗의 적응면역계를 통한 항암 효과를 확인하고자 단백질 항원인 OVA에 대한桔梗의 면역증강 효과를 알아보았다. OVA 1차 면역 후 재자극시 비장세포의 증식을 알아본 결과, OVA군에 비하여桔梗처치군의 비장세포수가 모든 농도에서 증가하였고, 기존의 adjuvant인 alum처치군에 비하여桔梗-alum처치군의 비장세포수도 모든 농도에서 증가하였다.

이 결과는 식물에서 추출한 수용성 polysaccharide를 이용한 Sun²⁵⁾의 결과와 달리, 단백질 항원에 대하여桔梗이 adjuvant로 작용함과 더불어 기존의 adjuvant인 alum과 동시 사용 시 그 효과를 증가시킴을 의미하는 것이다.

비장세포의 증가가 면역 기능 활성을 위해 효과적으로 작용하기 위해서는 비장세포 중 B cell의 항체 생산으로 이어져야 하므로²⁶⁾,桔梗의 비장세포 증가 효과가 항체 생산에 미치는 영향을 확인하고자 1차 면역 후 OVA 재자극시 총 항체가의 변화를 알아본 결과,桔梗처치군의 총 항체가가 OVA군에 비하여 대

부분 증가하였고, 桔梗-alum처치군의 총 항체가가 alum처치군에 비하여 모두 증가하였다. 이 결과는 adjuvant로서의 桔梗의 효과가 비장세포의 증식을 거쳐 항체의 생산으로 이어짐을 의미하는 것이다.

인체에 존재하는 항체는 T-helper cell에서 분비되는 cytokines의 자극에 의해 B cell에서 이루어지는데, T-helper cell은 2가지 종류가 있다고 알려져 있다. 인체의 정상적인 면역 반응을 유도하는 T1-helper cell은 B cell에서 IgG2와 IgG3를 생산하게 하며, 알러지 또는 자가면역 반응을 유도하는 T2-helper cell은 B cell에서 IgG1과 IgE 생산을 유도한다²⁷⁾.

桔梗의 adjuvant 효과로 증가된 항체의 구성을 확인하고자 1차 면역 후 OVA 재자극시 항체의 subisotype을 알아본 결과, IgG1은 모든 시험군에서 유사한 항체가를 보였고, T1-helper cell에서 유래되는 IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgA는 桔梗처치군에서 OVA군에 비하여 모두 증가하였고, 桔梗-alum처치군에서 alum처치군에 비하여 모두 유의하게 증가하였다. 이 결과는 桔梗 첨가가 비장세포 중 특히 정상면역 반응에 유익한 T1-helper cell의 기능과 관련되나 T2-helper cell에는 영향을 미치지 않음을 의미하는 것이다.

桔梗 첨가가 비장세포를 자극하여 항체의 생산을 촉진하는 과정에서 인체에 불리한 면역 반응을 야기하는 T2-helper cell에 영향을 미치는지 확인하고자 1차 면역 후 OVA 재자극시 생성되는 IgE의 농도를 알아본 결과, 桔梗처치군이 OVA군에 비하여 유의한 IgE 감소를 보였고, 桔梗-alum처치군이 alum처치군에 비하

여 유의한 IgE 감소를 보였다.

이 결과는 桔梗 첨가가 비장세포 중 특히 정상면역 반응에 유익한 T1-helper cell의 생산을 촉진하지만 비정상 면역 반응을 야기하는 T2-helper cell의 생산은 오히려 감소시킴을 의미하는 것이다.

桔梗 첨가가 비장세포 중 T1-helper cell의 생산을 촉진하지만 T2-helper cell의 생산은 오히려 감소시킨다는 것을 각각에서 분비되는 cytokines 생산을 통해 재확인하고자 1차 면역 후 OVA 재자극시 생성되는 cytokines의 농도를 알아본 결과, T1-helper cell에서 주로 분비되는 것으로 알려진²⁸⁾ IFN- γ , GM-CSF 및 IL-2는 桔梗처치군에서 OVA군에 비하여 모두 증가하였고, 桔梗-alum처치군에서 alum군에 비하여 모두 증가하였다.

그러나 T2-helper cell에서 주로 분비되는 것으로 알려진 IL-6, IL-10 및 IL-4는 桔梗 첨가 시에 다양한 양상을 보여, IL-6은 桔梗처치군에서 OVA군에 비하여 유의하게 증가하였으나 IL-4는 桔梗-alum처치군에서 alum군에 비하여 유의하게 감소하였다.

이 결과는 桔梗이 T1-helper cell의 생산을 촉진하고 이로 인해 IFN- γ , GM-CSF 및 IL-2의 생산이 증가하였고, 이들 cytokines는 B cell로부터 인체 정상 면역 반응을 유도하는 항체인 IgG2와 IgG3의 생산을 증가시키는 것으로, 桔梗이 adjuvant로서 활용 가능성이 있음을 의미하는 것이다. 이는 윤 등²⁹⁾의 결과와 유사한 것으로 biomaterials를 이용한 vaccine adjuvant 개발³⁰⁻³²⁾에 식물성 자원을 이용한 연구 가능성을 제시하는 것이다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 桔梗은

adjuvant로 작용하여 세포살해 및 항체 생산을 통한 항원 특이적 반응을 유도한다고 볼 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

桔梗이 면역증강제로서 적응면역계에 대한 효과를 확인하고자 단백질 항원에 대한 면역증강 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 단백질 항원에桔梗 처치 후 면역성 비장 세포수와 총 항체가가 증가하였다.
2. 단백질 항원에桔梗 처치 후 T1-helper cell에서 유도되는 IgG2와 IgG3는 증가하나, T2-helper cell에서 유도되는 IgE는 감소하였다.
3. 단백질 항원에桔梗 처치 후 T1-helper cell에서 분비되는 cytokines는 증가하였으나 T2-helper cell에서 분비되는 cytokines는 감소하였다.

- 투 고 일 : 2010년 10월 25일
- 심 사 일 : 2010년 11월 2일
- 심사완료일 : 2010년 11월 9일

참고문헌

1. Shankaran V et al. IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumor development and shape tumor immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107-11.
2. Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the

- masses. *Science*. 2004;305(5681):200-5.
3. Kim K et al. Major clinical research advances in gynecologic cancer 2008. *J Gynecol Oncol*. 2008;19(4):209-17.
4. Azuma I. Synthetic immunoadjuvants: application to non-specific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity. *Vaccine*. 1992;10(14):1000-6.
5. Glennly AT, Waddington H, Wallace U. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol*. 1926;29:38-9.
6. Mesa C, Fernandez LE. Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2004;82(6):644-50.
7. 韓醫科大學 本草學 編纂委員會. 本草學. 서울:영림사. 2007:496-7.
8. 이지영, 황우익, 임승택. 도라지(Platycodon grandkflorum DC) 추출 성분의 암세포 증식 억제효과. *한국식품과학회지*. 1998;30(1):13-21.
9. Kim MO et al. Platycodin D induces mitotic arrest in vitro, leading to endoreduplication, inhibition of proliferation and apoptosis in leukemia cells. *Int J Cancer*. 2008;122(12):2674-81.
10. 李智英. 桔梗이 免疫活性 및 抗癌에 미치는 영향. *경희대학교 석사학위논문*. 2009.
11. Koutsky LA, Harper DM. Chapter 13: current findings from prophylactic HPV vaccine trials. *Vaccine*. 2006;24:114-21.
12. Günther OP et al. Protecting the next generation: what is the role of the duration of human papillomavirus vaccine-related immunity? *J Infect*

- Dis. 2008;197(12):1653-61.
13. Frazer I. Correlating immunity with protection for HPV infection. *Int J Infect Dis.* 2007;11:10-6.
 14. Posnett DN et al. Development of effective vaccines for old mice in a tumor model. *Vaccine.* 2009;27(7):1093-100.
 15. Öhlschläger P et al. Enhancement of immunogenicity of a therapeutic cervical cancer DNA-based vaccine by co-application of sequence-optimized genetic adjuvants. *Int J Cancer.* 2009;125(1):189-98.
 16. Mocellin S, Nitti D. Therapeutics targeting tumor immune escape: towards the development of new generation anticancer vaccines. *Med Res Rev.* 2008;28(3):413-44.
 17. Sun HX, Xie Y, Ye YP. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine.* 2009;27(12):1787-96.
 18. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會. 韓醫婦人科學(上). 서울:정담. 2002:303-7.
 19. 吳普. 神農本草經. 서울:醫聖堂. 2003:246.
 20. 박치영, 김영일, 홍권의. 桔梗약침의 천식억제 및 면역조절효과에 대한 실험적 연구. *대한침구학회지.* 2005;22(6):61-74.
 21. 박상현 등. 마행감석탕과 길경이 인 간기관지 상피세포의 cytokine에 미치는 영향. *경희의학.* 2001;17(2):230-41.
 22. Kim JY et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced expression of adhesion molecules in human endothelial cells by the saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum*. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;210(1-2):150-6.
 23. 김영섭 등. 다년생 도라지의 항암 및 면역활성. *약학회지.* 1998;42(4):382-7.
 24. Lee KJ et al. Inhibition of tumor invasion and metastasis by aqueous extract of the radix of *Platycodon grandiflorum*. *Food Chem Toxicol.* 2006;44(11):1890-6.
 25. Sun YX. Immunological adjuvant effect of a water-soluble polysaccharide, CPP, from the roots of *Codonopsis pilosula* on the immune responses to ovalbumin in mice. *Chem Biodivers.* 2009;6(6):890-6.
 26. 김세중. 면역학. 서울:고려의학. 1994:120-31.
 27. 김광혁. Cytokine과 그 역할. *생명과학회지.* 1993;3(3):275-82.
 28. Parmiani G et al. Cytokines in cancer therapy. *Immunol Lett.* 2000;74(1):41-4.
 29. 윤택준 등. 가시오가피 다당체에 의한 항종양면역의 유도. *생약학회지.* 2007;38(2):117-22.
 30. Jones KS. Biomaterials as vaccine adjuvants. *Biotechnol Prog.* 2008;24(4):807-14.
 31. Ma X, Pan H, Yi J. Combination sonodynamic therapy with immunoadjuvant may be a promising new modality for cancer treatment. *Med Hypotheses.* 2009;72(4):418-20.
 32. Vollmers HP, Brändlein S. Natural antibodies and cancer. *N Biotechnol.* 2009;25(5):294-8.