

# 길경 사포닌 분획의 NO생성과 관련된 면역조절작용을 통한 대식세포의 항암활성에 미치는 효과

정명근, 손은화\*

강원대학교 생약자원개발학과

## Anti-tumor Activity of Saponin Fraction of *Platycodon grandiflorum* through Immunomodulatory Effects associated with NO production in RAW264.7 cells

Myoung-Gun Choung and Eun-Hwa Sohn\*

Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-907, Korea

**Abstract** - *Platycodon grandiflorum* (Korean name, Doraji) has been widely used in traditional herbal medicine as an expectorant for pulmonary disease and a remedy for respiratory disorders in Asia. Here, we investigated the effects of BtOH extract saponin fraction of *P. grandiflorum* (PGS) on phagocytosis and anti-tumor activity with related cytokine productions in RAW264.7 macrophage cells. The results showed that PGS increased phagocytosis, anti-tumor activity, TNF- $\alpha$  and nitric oxide (NO) production without direct tumor cell cytotoxicity. To further investigate whether NO is involved in anti-tumor and phagocytic activities of PGS, cells were co-treated with specific iNOS inhibitors, L-NIL (N6-(1-iminoethyl)-L-lysine, dihydrochloride), to block NO production. PGS decreased anti-tumor activity in L-NIL-treated cells, whereas phagocytic activity was not inhibited under the same conditions, indicating that the anti-tumor activity by PGS appears to be conducted by NO. These findings suggest that *P. grandiflorum* could be used a potential nutrition therapeutic agent for cancer patients.

**Key words** - Anti-tumor activity, Nitric oxide, Phagocytosis, *Platycodon grandiflorum*, RAW264.7

### 서 언

지난 수 십 년간 암이나 염증성 질환 등을 치료하는데 주로 합성 의약품들이 이용되었으나, 합성 의약품 사용으로 인한 부작용이 심각히 나타남으로써 최근의 연구 방향은 안전성이 보장된 식물, 미생물 유래 등 천연자원을 이용한 기능성 식품 개발 및 의약품 연구에 관심이 집중되고 있다.

길경(도라지; *Platycodon grandiflorum* A. DC)은 초롱꽃과(*Campanulaceae*)에 속하는 다년생 초본류로서 주로 뿌리를 전통적인 생약재 및 식품으로 활용하고 있다. 길경에 대한 관심과 연구가 활발해지면서 길경으로부터 트리테르펜(triterpene) 사포닌 등의 몇몇 활성물질들이 분리 동정되었다(Tada *et al.*, 1975). 지금까지 보고된 길경 사포

닌 성분으로 프라티코디제닌(platycodigenin)의 배당체로 프라티코딘(platycodin) A, C, D, D2와 2종의 모노아세테이트 프라티코딘 D3, 디피오(deepio)-프라티코딘 D3가 보고되었으며, 폴리갈락산(polygalacic acid)의 배당체로 폴리갈라신(polygalacin) D와 2종의 모노아세테이트, 폴리갈라신 D2와 모노아세테이트가 있고, 프라티코젠산(platycogenic acid) A의 배당체로 메틸 플라티코네이트 A, 메틸-2-메톡시 플라티코네이트 A 등 10 여종의 트리테르펜 사포닌이 보고되었다. 그 외 아글리콘으로 프라티코젠산 B 및 C가 보고된 바 있다(Ouyang *et al.*, 2011).

길경은 아시아계에서 이미 감기 등의 민간요법제로 사용되면서 면역력을 높이는 생약 또는 식품으로 인식되어 있으며, 기관지염, 천식, 폐결핵 등 호흡기계에 주로 효능을 나타낸다고 보고된 바 있다(Han *et al.*, 2000). 최근에는 길경이 비만과 관련된 대사성 질환 및 간손상에 대한 보호

\*교신저자(E-mail) : ehson@kangwon.ac.kr

효과가 있다고 보고되었다. 길경의 주요 활성은 길경의 근(radix) 부위에 다량 포함된 사포닌 성분에 의한 것이라고 알려져 있으나, 실제로 길경의 사포닌 성분에 대한 항염증 및 항암작용 등의 면역조절능에 대한 구체적인 효과 및 작용기전에 대한 실험 결과는 미흡한 실정이다(Han *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 1981; Ishii *et al.*, 1984; Noh *et al.*, 2010).

인체의 면역조절작용에서 대식세포(macrophage)는 체내의 모든 조직에 분포하면서 1차적으로 세균(bacteria), 바이러스 등의 감염성 병원체뿐만 아니라 노화된 정상세포, 암세포 등에 대해 탐식작용(phagocytosis)을 일으켜 인체 불필요한 요소를 제거하는 방어능력을 가지고 있다. 뿐만 아니라 항원제시작용 및 여러 가지 cytokine과 생리활성물질을 분비하여 2차 면역반응을 극대화 시키는 중요한 매개체 역할을 나타낸다. 이외에도 대식세포는 직접적으로 암세포를 억제하는 항암효과를 나타내기도 하는데, 활성화된 대식세포에서 분비하는 IL-1, hydrogen peroxide, nitric oxide(NO), TNF- $\alpha$  등이 암세포에 대한 독성을 나타내는 대표적 물질들로 알려져 있다(Zhang *et al.*, 2007; Kang and Sohn, 2010; Hamsa and Kuttan, 2011). 또한, 병원미생물의 침입 등에 대항하여 대식세포는 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NO 등을 분비하여 만성적인 염증반응을 일으키기도 한다. 이와 같이 면역조절작용에 있어서 매우 다양하고 중요한 역할을 하는 대식세포의 활성조절에 대한 연구는 각종 감염성 질환과 암치료 개발에 유용한 천연물을 탐색하고 개발하는데 매우 유용한 단계로 인식되고 있다(Shen *et al.*, 2008; Jofre-Monseny *et al.*, 2007).

이에 본 연구에서는 길경의 사포닌 추출물이 대식세포의 항암작용, 탐식능, 항염증 작용 등에 미치는 영향과 작용기전을 규명함으로써 길경의 사포닌 성분이 생리활성소재로서 활용될 수 있는지에 대한 가능성을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 길경 사포닌 추출물의 제조

강원도 삼척시가 재배한 6년근 길경(*Playcodon gradiflourm* A. De Candolle)을 수확, 수세 및 정선 후 상온 음건하고, 분쇄하여 분말상태로 제조하였다. 길경 분말 500 g에 80% 에탄올 5 L를 첨가하여 40°C에서 30분간 초음파 추출 후 30분간 방치하고, Whatman No. 2번 여과지로 여과하였다.

잔류물은 다시 80% 에탄올을 처음과 동량 첨가하여 초음파 추출, 방치 및 여과를 3회 반복 수행하여 50°C에서 감압농축 하였다. 농축물은 -50°C 이하의 저온에서 동결건조기(PVTF 200K:Ilshin Lab Co, Korea)로 건조시켜 길경 에탄올 조추출물을 획득하였다. 길경 에탄올 조추출물 20 g을 에탄올 2 L에 용해시키고 이 중 400 mL을 아세톤 1200 mL와 혼합하여 흰색 침전물을 형성시키고 이를 여과하여 일부 용해도가 낮아진 수용성 다당체 및 단백질을 제거하였다. 여과된 에탄올-아세톤 혼합용액은 50°C로 감압농축하고, 농축물에 다시 증류수 400 mL을 첨가하여 재용해시켰다. 동량의 에칠아세테이트를 첨가하여 액-액 분배를 연속하여 3회 실시하여 상층을 제거하고, 물 층은 다시 동량의 수포화 부탄올을 넣어 액-액 분배를 동일하게 3회 실시하였으며, 층 분리 후 상층의 부탄올층을 회수하여 60°C로 감압농축하여 길경 부탄올 분획물을 제조하였다. 길경 부탄올 분획물 2 g을 다시 증류수 100 mL에 용해시키고 활성화된 역상 고형상 카트릿지(Sep-pak C18 Vac 6cc, Waters, USA)에 10 mL를 하적한 후 증류수와 40% 에탄올을 각 10 mL씩 순차적으로 흘려 흡착된 극성물질을 제거하고, 다시 60% 에탄올 10 mL로 고형상 카트릿지에 흡착된 길경 사포닌을 추출하였다. 이 과정을 수회 반복하여 얻어진 고형상 카트릿지 분리 60% 에탄올 분획물을 50°C에서 감압농축하여 최종 길경 사포닌 추출물(saponin fraction of *P. gradiflourm*; PGS)을 제조하였다.

### 세포주

RAW264.7(murine macrophage cells), B16(murine melanoma) 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)에서 구입하여, 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin(10,000 U pen/mL, 10,000  $\mu$ g strep/ml)을 첨가한 RPMI 1640(GIBCO BRL, Grand Island, NY) 배지에 부착 배양하였으며 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건을 유지하였다. 사용된 시약들은 특별한 언급이 없으면 모두 Sigma-Aldrich Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 세포의 생존능

RAW264.7 세포( $1 \times 10^6$  cell/mL)를 96-well microplate에 100  $\mu$ L씩 부착시킨 후 PGS를 농도별로 처리한 후 24시간 후에 MTT solution 2 mg/mL을 25  $\mu$ L씩 처리하였다. 4시간 더 배양 후에 상등액을 제거하여 살아있는 세포

에서 생성된 formazan의 양을 DMSO로 녹여서 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 대식세포매개 항암활성

RAW264.7 세포를 96-well plate에  $1 \times 10^5$  cell/well이 되도록 분주하고 effector cell로 사용하였다. RAW264.7 대식세포에 다양한 농도의 PGS 추출물을 처리하여 target cell로 B16 세포와 함께 24시간동안 배양한 후에 MTT assay를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대식세포의 활성화에 의한 암세포 독성효과는 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Tumoricidal activity (\%)} = \left\{ \frac{\text{O.D. (Effector cells + Tumor cells)} - \text{O.D. (Effector cells)}}{\text{O.D. (Tumor cells)}} \times 100 \right\}$$

### 대식세포의 탐식작용

대식세포의 탐식능력은 zymosan particle 도입 방법과 NBT(nitro blue tetrazolium chloride) 환원법을 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포를 96-well plate에  $1 \times 10^5$  cell/well이 되도록 하여 부착시켜 PGS를 농도별로 처리하고 세척한 후, 탄소원인  $5 \times 10^5$  particle/mL zymosan과 0.6 mg/mL NBT시약을 각각 첨가하여 zymosan과 함께 NBT 시약이 탐식하도록 하였다. NBT 환원 물질인 청보라색 불용성 formazan의 생성량을 540 nm에서 측정함으로써 대식세포의 탐식능을 측정하였다.

### 대식세포의 일산화질소 생산

RAW264.7 세포( $1 \times 10^6$  cell/mL)를 10% FBS, penicillin/streptomycin을 함유한 RPMI 1640에 부유한 후 세포 부유액을 96 well microplate에 100  $\mu$ L씩 부착시킨 후 PGS를 농도별로 처리하였다. 24시간 후에 배양 상등액 100  $\mu$ L를 취하여 96 well microplate로 옮긴후 100  $\mu$ L Griess Reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride/2.5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )를 넣고 10분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader를 사용하여 흡광도 540 nm에서 측정하였다. Sodium nitrite 표준검량선으로부터 대식세포가 분비하는 nitric oxide를 계산하였다.

### 대식세포의 TNF- $\alpha$ 생산

대조군과 LPS를 처리한 군 및 LPS와 PGS를 농도별로

처리한 군에서 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) gel에 전기 영동한 후 PVDF membrane으로 Tank-type transfer unit(Hoefler™ TE22)을 이용하여 transfer 하였다. 단백질이 옮겨진 membrane은 1시간 동안 상온에서 blocking buffer(5% skim milk와 0.1% Tween20을 함유한 TBST용액)를 처리한 후 TNF- $\alpha$  단백질에 대한 1차 항체를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어 0.1% Tween 20을 함유한 TBST용액으로 10 분간 3회 이상 세척 후 2차 항체(HRP-conjugated anti-IgG antibody)를 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 3회 이상 세척 후에 detection reagent(Amersham™)를 가한 후 Fuji Mmedical X-ray film(Biomax Light)에 노출시켜 TNF- $\alpha$  단백질의 발현량을 확인하였다.

### 통계분석

실험 결과는 3회 반복하였으며, 가장 대표적인 실험결과를 평균  $\pm$  표준오차(mean  $\pm$  S.E.M)로 나타내었고, 유의수준은 \*p<0.05와 \*\*p<0.01로 Student t'-test를 실시한 결과를 표시하였다.

## 결과 및 고찰

### 대식세포의 생존능에 미치는 영향

대식세포의 생존능은 MTT assay를 사용하여 측정하였다(Fig. 1). PGS를 첨가한 대식세포의 생존능이 1  $\mu$ g/mL 및 10  $\mu$ g/mL의 처리농도에서 증가하였다. 그러나 PGS 100  $\mu$ g/mL 처리농도에서는 대식세포의 세포독성이 크게 나타났다. 이러한 결과로부터 1, 10  $\mu$ g/mL에서는 대식세포의 생존능에 영향을 미치지만 100  $\mu$ g/mL에서는 오히려 대식세포에 독성이 있으므로 100  $\mu$ g/mL 보다 낮은 0.1, 1, 10  $\mu$ g/mL 농도에서 다음에 진행하고자 하는 대식세포의 활성을 측정하기로 하였다.

### 암세포주에 대한 대식세포의 항암활성

PGS의 항암효과를 측정하기 위하여 대식세포와 B16 암세포를 co-culture함으로써 대식세포에 의한 항암효과를 측정하였다(Fig. 2a). PGS의 처리는 B16세포에 직접적인 세포독성이 없이(data not shown) 대식세포의 항암효과를 매우 유의성 있게 증가시켰다.

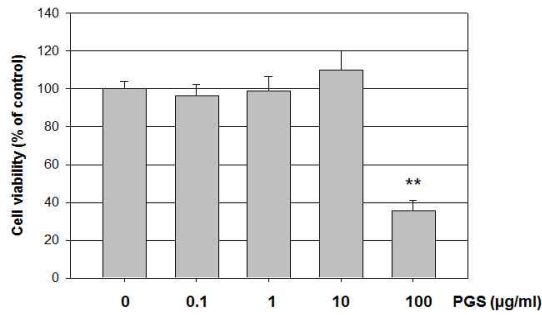


Fig. 1. (a) The effect of PGS (saponin fraction of *P. gradiflourm*) on RAW264.7 cell viability. RAW264.7 cells were treated with PGS for 24 hrs. The cell viability of PGS was assessed by MTT assay. Cell density was measured at 540 nm. The results are mean  $\pm$  S.E.M of quintuplicates from a representative experiment (\*\* $p < 0.01$ ; significantly different from the control).

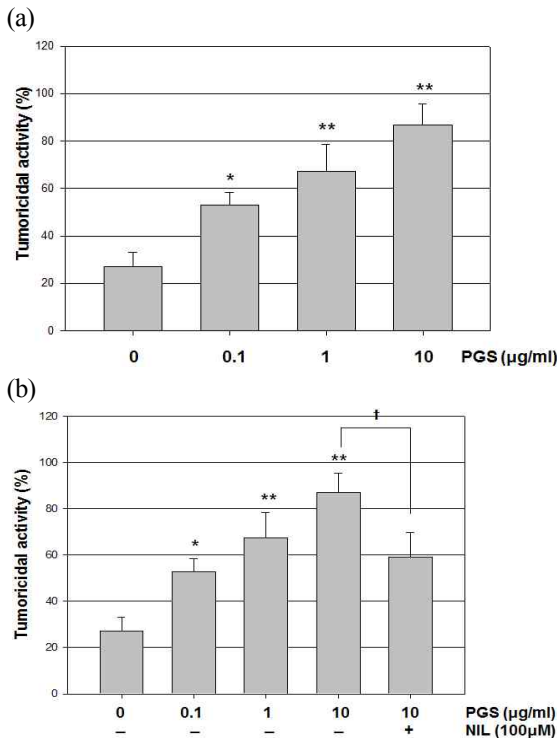


Fig. 2. (a) The effect of PGS on macrophage-mediated tumoricidal activity. (b) The effect of PGS on macrophage-mediated tumoricidal activity in the presence of NIL. RAW264.7 cells were pretreated with various doses of RGS and co-cultured with B16 target cells for 24 hrs. The macrophage-mediated tumoricidal activity of RGS was assessed by MTT assay. Cell density was measured at 540 nm. The results are mean  $\pm$  S.E.M of quintuplicates from a representative experiment (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; significantly different from the control. † $p < 0.05$ : significantly different from the PGS-treated group).

활성화된 대식세포에서 과도하게 분비하는 산화질소 (nitric oxide; NO)는 암세포에 대해 독성을 나타내는 물질로 알려져 있다(Hibbs *et al.*, 1998; Hamsa and Kuttan, 2011). 따라서 PGS가 농도 의존적으로 나타낸 항암작용이 NO의 생성에 의한 것인지 그 기전을 확인하기 위하여 항암 효과가 가장 크게 나타났던 10 µg/mL의 PGS와 NO 생성억제제 NIL(N6-(1-iminoethyl)-L-lysine, dihydrochloride)을 함께 처리하여 다시 항암효과를 측정하였다. Figure 2(b)에서 나타내는 바와 같이 PGS에 의한 항암효과는 NIL 처리에 의해 증가되지 않았다. 이는 PGS에 의한 대식세포의 항암작용이 NO 분비 증가에 의한 기전임을 직접적으로 증명해 준 것이다. 그러나 NIL의 처리가 PGS의 암세포주에 대한 독성 효과(약 88%)를 완전히 억제하지 못하는 것으로 보아 PGS의 항암효과는 NO 분비 외에 TNF- $\alpha$ , IL-1 등의 암세포 독성효과가 있는 cytokine의 분비나 암세포와의 접촉 등의 조절에 의한 항암 효과가 존재할 것으로 보인다(Zhang *et al.*, 2007; Hamsa and Kuttan, 2011).

**NO 분비량에 미치는 영향**

PGS에 의한 항암효과가 NO의 생성에 의한 것인지 재확인하기 위하여 PGS 처리에 의한 NO의 생성량을 확인하였다(Fig. 3). 실험 결과 PGS 10 µg/mL 처리농도에서 NO 생성 및 분비가 증가하였음을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 Figure 2(b)에서 나타난 바와 같이 PGS와 NO 생성억제물질NIL을 함께 처리했을 때 항암효과가 감소하는 결과를 뒷받침해 준다. 그러나 예상과는 달리 PGS가 NO 생성에 미치는 영향은 PGS 0.1, 1, 10 µg/mL 농도에서 항암효과를 나타낸 패턴과 일치하지 않는다. 이것은 PGS가 대식세포의 항암활성을 나타내는데 NO 생성외에도 다른 기전이 존재함을 의미한다.

**탐식능에 미치는 영향**

탐식능은 대식세포가 외부 물질을 제거하기 위해 가장 먼저 일어나는 면역반응이다(Adams *et al.*, 1984). 외부 자극에 의하여 활성화되면 대식세포는 탐식 능력이 증가되어 외부물질을 제거하게 된다. 대식세포의 탐식능력은 항암효과에 영향을 미칠 수 있기 때문에 PGS가 탐식능에 미치는 영향을 측정하였다. 실험 결과 PGS의 처리는 1, 10 µg/mL 에서 대식세포의 탐식능을 증가시켰으나 항암효과가 크게 나타났던 100 µg/mL 에서는 탐식능을 증가시키지

않았다(Fig. 4). 대식세포의 활성화에 의하여 항암효과와 탐식 능력이 항상 함께 나타나는 것은 아니지만, 탐식능의 증가는 항암활성을 더욱 증가시킬 수 있다고 보고되고 있다(Adams *et al.*, 1984; Nathan, 1987; Vishvakarma and Singh, 2010). PGS는 대식세포의 항암 효과와 탐식능을 모두(또는 일부) 증가시켰으나, 처리농도에 대한 반응도가 각각 다르게 나타났다. 특히 탐식능이 증가하지 않은 10 µg/mL PGS 처리군에서 항암효과는 가장 크게 나타났다. 이러한 결과는 PGS 자극에 의해 증가되는 대식세포의 항암 작용이 탐식능 증가에 대한 효과보다도 NO 등을 포함한 다

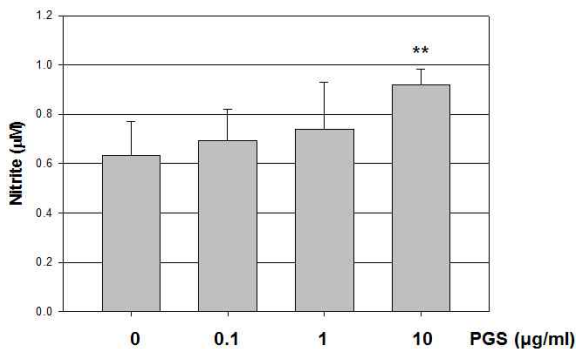


Fig. 3. The effect of PGS on the production of NO by RAW264.7 cells. Cells were treated with various doses of PGS for 24 hrs. The 24 hrs-conditioned media were collected for NO<sub>2</sub><sup>-</sup> assay. The results are mean ± S.E.M of quintuplicates from a representative experiment (\*\*p<0.01; significantly different from the control).

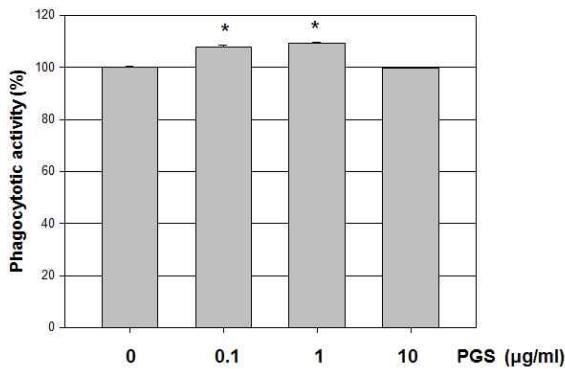


Fig. 4. The effect of PGS on the phagocytosis of RAW264.7 cells. Cells were treated with various doses of PGS for 24 hrs. RAW264.7 cells were then incubated with 5x10<sup>5</sup> particles of zymosan and 0.6 mg/mL of NBT. Phagocytosis was measured at O.D. 540 nm. The results are mean ± S.E.M of quintuplicates from a representative experiment (\*p<0.05; significantly different from the control).

른 cytokine 및 생리활성 분비조절에 의한 효과가 존재함을 보여준다.

### NO 및 TNF-α 억제조절에 의한 항염증작용

NO 및 TNF-α는 주로 LPS에 의해 자극된 대식세포가 염증을 유발할 때 분비하는 물질로도 알려져 있다(Strieter *et al.*, 1993). PGS의 면역조절작용 중에 항염증효과가 있는지 확인하기 위하여 LPS/IFN-γ를 처리하여 인위적으로 염증반응을 일으키고 PGS를 처리하여 NO 및 TNF-α 억제 조절에 대한 항염증작용을 측정하였다(Fig. 5). LPS/IFN-γ만을 처리하여 염증을 일으킨 군과 LPS/IFN-γ에 PGS를 함께 처리한 군을 비교하였을 때, PGS군에서 NO 분비가 통계처리시 유의성 있게 감소하였으나, TNF-α의 생성은

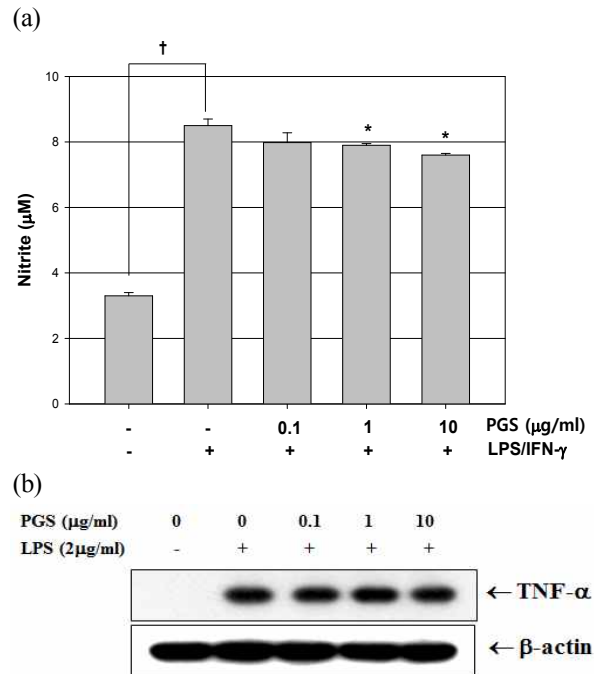


Fig. 5. (a) The effect of PGS on the production of NO by RAW264.7 cells in the presence of LPS/IFN-γ. Cells were treated with various doses of PGS in the presence of LPS (4 µg/mL) and IFN-γ (40 unit/mL) for 24 hrs. The 24 hrs-conditioned media were collected for NO<sub>2</sub><sup>-</sup> assay. (b) The effect of PGS on the production of TNF-α by RAW264.7 cells in the presence of LPS. RAW264.7 cells were treated with PGS in the presence of LPS (10 µg/mL) for 24 hrs. Total protein was extracted and subjected to Western blot analysis for TNF-α production in protein level (\*p<0.05; significantly different from the LPS/IFN-γ-treated group. †P<0.05; significantly different from the untreated group).

억제하지 못했다. PGS 처리군에서 NO의 분비억제가 현저히 나타나지 않았고, 현재 TNF- $\alpha$ 의 생성조절은 항염증 치료제 개발의 작용기전으로 인식되는 만큼 매우 중요한 요소임을 고려해 볼때, PGS의 항염증 효과는 본 실험에서 사용된 농도에서는 미비하게 나타난다고 생각된다.

## 적 요

본 연구는 길경 사포닌 추출물(PGS)를 이용하여 대식세포의 면역조절능력을 평가하였으며, 탐식작용, 항암작용, 항염증 작용에 모두 유의적인 효과를 나타내었다. 특히, 본 연구에서는 농도의존적으로 매우 유의적이게 나타난 PGS의 항암작용 기전을 측정하기 위하여 암세포 독성 물질로 알려진 NO 분비량을 측정하였으며, PGS에 의해 NO의 생성을 증가함을 확인하였다. 또한, PGS가 NO 생성 억제제 NIL을 함께 처리하였을 때 항암효과가 나타나지 않게 됨을 재확인함으로써, PGS 10  $\mu$ g/mL에서 나타난 대식세포의 항암효과는 일부 NO 생성 및 분비에 의한 작용 기전임을 보여주었다. PGS의 면역조절작용 중 항염증효과 실험에서는 PGS가 염증환경에서 과도하게 분비된 NO를 다소 억제하는 경향을 보였으나, 항염증조절에서 대표적인 물질로 알려진 TNF- $\alpha$  조절에는 효과를 나타내지 않았다. PGS가 염증환경에서의 TNF- $\alpha$ 억제조절에는 영향을 미치지 않았으나 TNF- $\alpha$ 는 항암물질로도 알려져 있으므로 향후 PGS의 항암효과에 대한 연구에서 TNF- $\alpha$ 의 생성에 관한 연구는 NO를 매개하는 항암 효과 외에 다른 기전을 설명해줄 수 있을 것으로 보인다. 이러한 결과들은 PGS가 항암요법의 보조제 및 면역보조제로써의 활용에 개발 가능성이 있다는 것을 보여준다.

## 인용문헌

- Adams, D.O. and T.A. Hamilton. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2:283-318.
- Hamsa, T.P. and G. Kuttan. 2011. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-tumor effect of ipomoea obscura (L) and its mode of action through the inhibition of pro inflammatory cytokines, nitric oxide and COX-2. *Inflammation* 34(3):171-183.
- Han, L.K., B.J. Xu, Y. Kimura, Y. Zheng and H. Okuda. 2000. *Platycodi radix* affects lipid metabolism in mice with high fat diet-induced obesity. *J. Nutr.* 130:2760-2764.
- Han, S.B., S.H. Park, K.H. Lee, C.W. Lee, S.H. Lee, H.C. Kim, Y.S. Kim, H.S. Lee and H.M. Kim. 2001. Polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* selectively activates B cells and macrophages but not T cells. *Int. Immunopharmacol.* 1:1969-1978.
- Hibbs, J.B., R.R. Taintor, I. Vavrin and E.M. Rachlin. 1998. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:87-92.
- Ishii, H., K. Tori, T. Tozyo and Y. Yoshimura. 1984. Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. Part 2. Isolation and structure of new triterpene glycosides. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I* 661-668.
- Ishii H., K. Tori and Y. Yoshimura, 1981. Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. Part 1. Structure of prosapogenins. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I* 1928-1933.
- Jofre-Monseny, L., S. de Pascual-Teresa, E. Plonka, P. Huebbe, C. Boesch-Saadatmandi, A.M. Minihane and G. Rimbach. 2007. Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on markers of oxidative status in macrophages. *Br. J. Nutr.* 97:864-871.
- Kang, N.S. and E.H. Sohn. 2010. Immunomodulatory Effects of fructus and semen from *Rosa rugosa* on macrophages. *J. Korean Plant Res.* 23(5):399-405 (in Korean).
- Nathan, C.F. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79:319-326.
- Noh, J.R., Y.H. Kim, G.T. Gang, K.J. Yang, S.K. Kim, S.Y. Ryu, Y.S. Kim, C.H. Lee and H.S. Lee. 2010. Preventative effects of *Platycodon grandiflorum* treatment on hepatic steatosis in high fat diet-fed C57BL/6 mice. *Biol. Pharm. Bull.* 33:450-454.
- Ouyang, K., L. Chen, H. Sun, J. Du and M. Shi. 2011. Screening and appraisal for immunological adjuvant-active fractions from *Platycodon grandiflorum* total saponins. in press.
- Shen, B., M. Hagiwara, Y.Y. Yao, L. Chao and J. Chao. 2008. Salutary effect of kallistatin in saltinduced renal injury, inflammation, and fibrosis via antioxidative stress. *Hypertension* 51:1358-1365.
- Strieter, R., S. Kunkel and R. Bone, 1993. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Critical. Care. Medicine* 21:S447-S463.
- Tada, A., Y. Kaneiwa, J. Shoji, S. Shibata, 1975. Studies on the saponins of the root of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle. I. Isolation and the structure of platycodin-D.

Chem. Pharm. Bull. 23:2965-2972.

Vishvakarma, N.K. and S.M. Singh. 2010. Immunopotentiating effect of proton pump inhibitor pantoprazole in a lymphoma-bearing murine host: Implication in antitumor activation of tumor-associated macrophages. Immunol. Lett. 134:83-92.

Zhang, L., H. Zhu, Y. Lun, D. Yan, L. Yu, B. Du and X.

Zhu. 2007. Proteomic analysis of macrophages: a potential way to identify novel proteins associated with activation of macrophages for tumor cell killing. Cell. Mol. Immunol. 4(5):359-367.

(접수일 2011.7.4; 수정일 2011.8.24; 채택일 2011.9.14)