

## 황기 지상부로부터 장관면역 활성 다당체의 분리 및 단회 경구 투여 독성시험

최리나\* · 박영철\*\* · 이지선\*\* · 김정우\*\* · 김종봉\*\* · 최유순\*\*\* · 김광기\*\*\*  
이재근\*\*\*\* · 유창연\*\*\*\* · 김승현\*\*\*\*\* · 정일민\*\*\*\*\* · 김재광\*\*\*\*\* · 임정대\*†

\*강원대학교 생약자원개발학과, \*\*대구 가톨릭대학교 GLP 센터 및 의생명학과, \*\*\*강원정선군농업기술센터,  
\*\*\*\*강원대학교 식물자원응용공학과, \*\*\*\*\*건국대학교 응용생물과학과, \*\*\*\*\*인천대학교 생명과학부

### Isolation of Polysaccharides Modulating Intestinal Immune System and Single Oral Dose Toxicity Test in *Astragalus membranaceus* Aboveground Parts

Ri Na Choi\*, Yeong Chul Park\*\*, Ji Sun Lee\*\*, Jung Woo Kim\*\*, Jong Bong Kim\*\*,  
Yu Soon Cheoi\*\*\*, Kwang Ki Kim\*\*\*, Jae Geun Lee\*\*\*\*, Chang Yeon Yu\*\*\*\*,  
Seung Hyn Kim\*\*\*\*\*, Ill Min Chung\*\*\*\*\*, Jae Kwang Kim\*\*\*\*\* and Jung Dae Lim\*†

\*Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-905, Korea.

\*\*GLP Center, Catholic University of Daegu, Keongsan 712-702, Korea.

\*\*\*Kangwon Jeongseon Agricultural Extension Center, Jeongseon 233-852, Korea.

\*\*\*\*Department of Applied Plant Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

\*\*\*\*\*Department of Applied Bioscience, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea.

\*\*\*\*\*Division of Life Sciences, Incheon National University, Incheon 406-772, Korea.

**ABSTRACT :** The six polysaccharide fractions were prepared by chromatographic procedure from the hot water extracts of the aboveground parts of *Astragalus membranaceus*. These six polysaccharides from aboveground parts of *Astragalus membranaceus* Bunge were tested for gut-mucosal immune activity and acute toxicity. In a view of molecular weight, the six fractions were estimated to be 75000, 88000, 129000 and 345000 Da, respectively. Component sugar analysis indicated that these fractions were mainly consisted of galactose (46.3 ~ 11.8%) and arabinose (35.4 ~ 9.9%) in addition to glucose, rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, glucuronic acid and galacturonic acid. Among the six major purified polysaccharides, AMA-1-b-PS2 showed highest bone marrow cell proliferation and lymphocyte of Peyer's patch stimulating activity. It may be concluded that intestinal immune system modulating activity of aboveground parts from *Astragalus membranaceus* Bunge is caused by polysaccharides having a polygalacturonan moiety with neutral sugars such as arabinose and galactose. In single oral dose toxicity study, no differences were observed between control and treated groups in clinical signs. The results indicated that lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) of water extracts from *Astragalus membranaceus*-aboveground parts was found to be higher than 5000 mg/kg/day in this experiment. From the above results, we may suggest that *Astragalus membranaceus*-aboveground parts might have useful as a safe material for functional food and pharmaceuticals.

**Key Words :** *Astragalus membranaceus*, Aboveground Parts, Polysaccharide, Intestinal Immune System Modulating Activity, Single Dose Oral Toxicity

## 서 언

장관림프상 조직 (Gut Associated Lymphoid Tissue, GALT)은 수많은 영양소의 소화와 흡수의 장소이면서 유해한

이물질과 미생물들에 대한 물리적 장벽역할을 수행할 뿐 아니라 면역반응을 이용한 생체방어에 중요한 역할을 담당하고 있다 (Mowat and Viney, 1997). GALT에서의 여러 면역기관 중 peyer's patch (파이엘판)는 장관 내 핵심적인 림프기관일

†Corresponding author: (Phone) +82-33-540-3323 (E-mail) ijdae@kangwon.ac.kr

Received 2014 May 10 / 1st Revised 2014 June 1 / 2nd Revised 2014 June 17 / 3rd Revised 2014 June 26 / Accepted 2014 June 26

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.

뿐만 아니라 IgA 생산을 위한 중요한 유도부위 (inductive site)로서 기능을 하고 있고 (Sminia *et al.*, 1983), 항원의 흡수에 중요한 전문화된 M cell로 구성된 flattered epithelium을 포함한다 (Trier, 1991). 장관 내에 있는 peyer's patch의 림프구들은 M cell에 의해 섭취된 항원과 반응하여 활성화된 후 림프소절의 germinal center에서 분화하고 성숙하게 되며, 장으로부터 빠르게 이동하여 장관막 림프절 (Mesenteric Lymph Node, MLN)을 거쳐 체내를 순환하게 된다 (Jang *et al.*, 2006). 그러므로 peyer's patch에 작용하여 면역세포의 기능을 증강하거나 저하된 면역세포를 부활시킬 수 있는 물질은 국소 점막의 생체방어기구를 증강시킬 수 있을 뿐만 아니라 전신성 염증 (systemic inflammation)을 조절하여 결과적으로 알레르기반응, 자가 면역질환 등을 효과적으로 억제할 수 있는 것으로 보고되고 (James and Zeitz, 1994) 있어 peyer's patch의 면역담당세포의 기능을 부활시키는 것을 지표로 하여 생체방어기구를 부활할 수 있는 물질을 선별할 수 있을 것으로 생각된다.

천연에서 유래한 다당체는 면역시스템이 영향을 미치는 거대분자로서 면역조절제로서의 잠재성을 가지고 있어 광범위한 임상적 적용이 이루어지고 있다. 예를 들면 버섯류로부터 분리되어진 다당체인 베타글루칸은 대식세포의 활성화를 통한 항암활성을 가지는 것으로 보고되고 있고 (Wasser, 2002; Ooi and Liu, 2000) 식물체의 세포벽이나 담자균류 박테리아로부터 분리 되어진 베타글루칸은 포도당중합체로서 항암활성과 항감염활성을 가지고 있다고 한다 (Kataoka *et al.*, 2002; Ohno *et al.*, 2001). 또한 현재까지 처방되는 한방제제 중, 「보제(補劑)」로 분류된 십전대보탕과 소자호탕 등에 대한 활성검정에서, 이런 한방제제가 각종 면역세포를 부활시키는 효능을 나타내는데 그 효능이 제제에 포함되어진 고분자성 다당성분에 기인한다는 것이 증명되고 있으며 (Yamada, 1999; Borchers *et al.*, 2000) 또, 십전대보탕에서 구성 약재 중 「창출 ( *atractylodes lances* DC.의 근경)」에 포함되어진 다당성분에 의해 *Candida albicans* 감염된 마우스에 대해 감염방어와 억제 활성이 보고되고 있다 (Inagaki *et al.*, 2001). 이런 점에서 한방제제에 포함되어진 식물성 생약에서 기원하는 고분자 다당 성분이 생체방어기구의 저하와 면역능 감소에 의해 유도되는 감염증 치료와 예방에 사용되어질 수 있을 것으로 생각된다.

생약제제들은 신체의 항상성 (homeostasis)을 유지시키고 면역계 내 분비계, 신경계 및 순환계에 조절 역할을 담당하는 biological response modifier (BRM)로서 작용할 뿐만 아니라 여러 종류의 세포들의 receptor 기능을 조절함으로써 치료효과를 나타낸다. 그럼에도 불구하고 이러한 생약제제들의 사용은 아직도 과학적 입증 없이 경험적으로 처방 사용되고 있으므로 이들의 치료효과 및 작용기구의 과학적 해석과 구조의 판명

등은 시급히 연구되어야 할 과제 중의 하나라고 생각된다. 또한 이러한 생약제제들이 오랜 시간동안 임상적으로 적용되어져 왔고 혼합물로서 존재하여 단일성분에 의한 독성의 발현이 적어 비교적 독성의 문제를 초기에 배제할 수 있는 효과가 인정되고 있다 하더라도 새로운 가공방법의 적용되거나 활용 부위가 달라지는 경우, 소재에 대한 안전성 자료 확보는 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다.

황기 (*Astragali Radix*)는 콩과 (Fabaceae)에 속하는 다년생 초로 주로 *Astragalus membranaceus*의 뿌리를 일컫는다. 황기의 뿌리는 다당류, 사포닌, 플라보노이드, 아미노산과 미량원소 등의 약리작용을 하는 다양한 성분이 함유되어 있어 면역증강을 비롯하여 심혈관 기능과 생리적 활성 증진을 위해 임상에서 응용되어 왔다 (He and Findlay, 1991; Kitagawa *et al.*, 1983; Toda and Shirataki, 1999; Jeon *et al.*, 2010). 특히 황기 뿌리에는 glucan을 비롯한 이형다당류 (heteropolysaccharide)와 astrogaloside I~IV의 사포닌 등이 풍부하게 존재하며 이들 다당류와 사포닌 성분의 면역조절 기능에 기인하여 근래에 약물개발 분야에서 많은 관심을 받고 있다 (Zhong *et al.*, 2012). 황기는 전통적으로 약용으로 사용되어온 지하부 뿐만 아니라 싹과 잎으로 구성되는 지상부에도 생리적 및 약리적 효능이 있는 것으로 여겨지는데 면역 활성이 감소한 mice에서 황기 잎과 줄기에 포함되어진 플라보노이드 성분이 LAK (lymphokine activated killer) 세포의 활성을 증대시키고 T cell을 활성화하여 면역능을 증가시킨다고 하였다 (Jiao *et al.*, 1999). 또한 최근 연구에 의하면 황기의 지상부는 지하부 보다 더 높은 수준의 페놀성 화합물을 포함하고 있으며 페놀성 화합물 중에서도 phenolic acid (chlorogenic, caffeic, ferulic, p-coumaric)보다 flavonoids (formononetin 및 quercetin, rutin, quercitrin, isorhamnetin, kaempferol, luteolin)가 더 높은 비율로 포함되어져 있음을 보고 (Jun *et al.*, 2012) 하였고, 황기 지상부와 지하부에서 astrogaloside I~IV 등의 사포닌 성분을 비교한 결과 지상부에서 일부 astrogaloside의 함량은 지하부와 유사하거나 지하부 보다 더 높은 수준으로 나타난다고 보고되고 있다 (Kim *et al.*, 2012).

그러나 이제까지 황기의 잎을 포함한 지상부는 약용으로 사용되는 황기의 지하부의 생육을 위해 재배하는 동안 가지치기를 통해 제거되어 왔으며 약재로의 생산을 위한 가공과정 중 잔유물로서 버려지고 있는 실정이다. 황기와 같은 근류 혹은 근경류를 사용하는 약용작물의 경우 부가가치가 높은 상태로 지하부를 수확하기 위해서는 파종 후 수확까지 최소 4~6년 까지의 장기간이 소요되는 단점을 가지고 있는 반면 지상부의 경우 재배기간 동안 수시로 수확이 가능하다는 장점을 가지고 있으며 현재 대부분 폐기되고 있는 현실을 고려할 때 폐자원 이용이라고 하는 장점을 가지고 있다. 그러므로 황기와 같이 오랫동안 뿌리만을 이용하였고 식용 및 약용으로의 활용 근거

가 빈약한 지상부를 활성 소재로 이용하기 위해서는 그들의 약리적 효과 및 생리활성 검증 뿐만 아니라 독성시험을 통한 안전성자료를 구축하는 것이 필수적이라고 하겠다.

따라서 본 연구에서는 황기의 지상부의 열수 추출물로부터 장관 peyer's patch 속의 면역담당세포의 기능을 부활시키고, 면역능 증강 작용을 가진 고분자 다당 성분을 탐색하여, 강력한 장관면역개선 효과를 보이는 다당체를 분리하고 그 활성을 평가하였다. 또한 황기의 지상부를 식품원료로 사용하거나 식품공전이나 기능성식품공전에 등록하기 위한 안정성 평가의 일환으로 황기 지상부 추출물의 단회 경구 투여 시 나타날 수 있는 독성의 질적, 양적인 평가는 의약품 등에 관한 식품의약품안전처 독성시험관리기준 (Ministry of Food and Drug Safety, 2013)과 OECD 검정기준 (Organization for Economic Co-operation and Development, 2001)에 준하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용한 황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge)는 막협황기 (膜莢黃耆)로서 태백수집종을 선발하여 1999년 작물과학원에서 육성한 품종인 “풍성황기”이며 정선군농업기술센터에서 2년 동안 재배된 것의 전초를 채취하였다 (2012. 7. 23). 황기 지상부로부터 다당체를 획득하고 이들의 장관면역 증강활성 및 단회 경구 투여 독성시험을 위하여 지상부 (AMA, 잎과 줄기)의 시료를 잘게 잘라 50°C의 dry oven에서 5시간 동안 건조하여 분쇄한 후 40 mesh 이하의 체에 통과시켜 분말시료로 준비하였다.

### 2. 황기 지상부로부터 조다당 획분 (AMA-0)의 제조

황기 지상부의 조다당 획분의 제조에서는 분말화된 황기 지상부 시료 1 kg에 대해 20배 부피의 증류수를 첨가하고 교반 후 처음 첨가된 증류수의 절반이 되는 양까지 가열하였다. 다시 동일한 양의 증류수를 이용해 2회 반복 추출하고 추출액을 합하여 흡인 여과한 후 여과액을 합하여 감압농축하고 농축된 양의 5배의 EtOH을 첨가하여 침전시키고 4°C에서 30분간 7,000 rpm으로 원심분리하여 상등액과 잔사로 분리하였다. 남은 잔사를 대상으로 투석을 실시한 후 다시 -70°C 조건에서 동결한 후 동결 건조하여 황기 지상부 조다당 획분을 얻었다.

### 3. 효소·화학적 처리에 의한 황기 지상부 조다당 획분 (AMA-0)의 확인

황기 지상부 열수 추출물로부터 제조된 황기 지상부 조다당 획분이 당구조를 가진 고분자 화합물인지의 여부와 이들이 실제 장관면역활성을 물질을 포함하고 있는지의 여부를 판단하기 위하여 황기 지상부 조다당 획분을 대상으로 하여 NaIO<sub>4</sub>

에 의한 산화 처리와 pronase에 의한 가수분해 처리를 수행하고 처리 전·후의 장관면역 활성을 검증하였다. 장관면역 활성검정은 하기 기술하는 분리된 장관면역 활성 다당체 활성검정과 동일한 방법을 적용하였으며 NaIO<sub>4</sub>에 의한 산화 처리와 pronase 효소에 의한 가수분해 처리는 Yamada 등 (1990)의 방법에 의거하여 실시하였다. 즉 조다당 획분 (AMA-0) 50 mg에 25 mM NaIO<sub>4</sub>가 함유된 50 mM acetate buffer (pH 4.5) 50 ml를 첨가하고 암실, 4°C에서 96시간 교반하였다. 잔여 periodate를 제거하기 위해 ethylene glycol을 첨가하고 투석을 행하여 얻은 비투석액에 NaBH<sub>4</sub>를 첨가하여 환원시키고 초산으로 중화 후 투석, 동결 건조하여 AMA-0의 NaIO<sub>4</sub> 산화물 (periodate-oxidized AMA-0, 수율; 56.2%)을 조제하였다. Pronase 효소에 의한 가수분해 처리는 조다당 획분 (AMA-0) 20 mg을 10 mg CaCl<sub>2</sub>가 함유된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.9) 20 ml에 용해시킨 후 4,000 units/ml의 pronase (30 mg, Actinase E, Kaken Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)를 가하여 37°C에서 48시간 가수분해 시켰다. 효소반응은 0.1 N HCl로 중지시키고 투석 후 동결 건조하여 AMA-0의 단백질 분해물 (pronase-digested AMA-0, 수율; 64.3%)로 조제하였다.

### 4. 황기 지상부로부터 다당체의 분리 및 정제

#### 1) 황기 지상부 기원 다당체의 획분 제조 및 순도확인

황기 지상부 조다당 획분 (AMA-0, 10.0 g)을 증류수 500 ml에 재용해 한 후, QAE-Sepharose FF (HCO<sub>3</sub>) column (5.6 × 38 cm)에 첨가하여 흡착시키고, 증류수 1.5 l를 사용하여 세정해서 미흡착 분획을 제거하였다. 흡착 분획을 0.068 M, 0.115 M, 0.159 M 및 0.582 M의 Ammonium bicarbonate (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 용액으로 차례로 용출시켜 각 획분을 투석 (Spectra/por4 with MWCO 3500, 12000-14000 Da), 농축 및 동결 건조하여 4개의 획분 즉, AMA-1-a 용출분획 (2.0 l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 4.8%), AMA-1-b 용출분획 (1.8 l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 3.2%), AMA-1-c 용출분획 (2.0 l NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>, 3.3%), AMA-1-d 용출분획 (8.0 l NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>, 33.4%)을 획득하였다.

4개의 분획 중 AMA-1-a에 대하여 0.2 M NaCl 용액으로 평형화된 Sepharose CL-6B column (2.5 × 94 cm)에서 gel filtration chromatography를 실행하여 1개의 획분을 얻었으며 (AMA-1-a-PS1, 0.54%), AMA-1-b 분획은 0.2 M NaCl 용액으로 평형화된 Sephacryl S-200 (1.7 × 82 cm)에서 gel filtration chromatography를 행하여 2개의 획분 (AMA-1-b-PS2, 0.13%; AMA-1-b-PS3, 0.52%)를 얻었고 AMA-1-c에서도 Sephacryl S-300 (2.6 × 85 cm)을 이용하여 1개의 획분 (AMA-1-c-PS4, 0.04%)을 얻었다. AMA-1-d에서는 0.2 M NaCl로 평형화된 Sephacryl S-300 column (2.6 × 90 cm)과 Sepharose CL-6B column (2.6 × 85 cm)을 사용해 분획하고,

AMA-1-d-PS5, (다당획분으로 수율 2.4%) 및 AMA-1-d-PS6, (다당획분으로 수율 2.9%)을 얻었다.

획득된 다당체 (AMA-1-a-PS1 ~ AMA-1-d-PS6)의 순도를 확인하기 위하여 Shodex OHPak SB-805 (8 × 300 mm, Showa Denko, Tokyo, Japan) column이 장착된 Waters 2690 HPLC (Waters, Miliford, MA, USA)를 0.2 M NaCl 용액으로 용출시키면서 (0.5 ml/min) RI (refractive index) detector를 이용하여 실행하였으며, 정제 다당의 분자량 측정을 위해 표준물질로 dextran T-2000 (2 × 106), T-500, T-70 및 포도당을 사용하여 구한 표준곡선과 Kav값을 비교하여 측정하였다.

## 2) 황기 지상부 기원 다당체 (AMA-1-a-PS1 ~ AMA-1-d-PS6)의 구성당 분석

총 6개 획분 다당체의 총당, 산성당 및 단백질 함량은 각각 galactose, galacturonic acid 및 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법, m-hydroxybiphenyl법, Lowry법으로 정량하였다.

각각의 분리 및 정제단계에서 얻은 시료에 대하여 중성당의 경우 Jones와 Albersheim의 방법 (1972)으로 2.0 M TFA (trifluoroacetic acid)로 121°C에서 1.5시간 동안 시료를 가수분해시킨 후 NaBH<sub>4</sub>를 이용하여 중성당을 alditol로 환원시키고, (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O를 이용하여 alditol acetate 유도체로 전환시켜 SP-2380 column (0.2 μm film, 0.25 mm i.d × 30 m, Supelco, Bellefontem PA, USA)이 장착된 gas-liquid chromatography (HP-6890 II GLC, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)로 구성당을 분석하였다. 또한 산성당의 경우에 있어서는 0.1M TFA로 100°C에서 1시간 동안 가수분해 시킨 후 NaBD<sub>4</sub>를 이용하여 중성당의 경우와 유사한 조건으로 alditol acetate 유도체로 전환시켜 GLC를 실시하였다. 구성당의 분석을 위한 GLC의 온도조건은 injector 250°C, detector 250°C이었고 column은 60°C에서 1분이 경과하면 30°C/분의 속도로 220°C까지 상승시킨 후 12분간 유지하고 다시 8°C/분의 속도로 250°C까지 상승시켜 15분을 유지하는 조건이었으며, 표준당류의 retention time과 비교하여 시료 중의 구성당을 분석하였고 구성당의 mol%는 각 peak들의 면적비와 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산한 후 molar ratio로 표기하였다.

## 5. 황기 지상부 기원 다당체 (AMA-1-a-PS1 ~ AMA-1-d-PS6)의 장관면역 활성 검증

### 1) 실험동물

생후 5주령의 건강상태가 양호한 C3H/He의 암컷 마우스를 (주)대한실험동물센터로부터 구입하여 사용하였다. 사료는 실험동물용 사료를, 물은 정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였으며 환경은 항온, 항습 조건 (온도 22 ± 0.5°C, 상대습도 55 ± 5%)

및 인공조명에서 명암교대 1일 12시간씩 (오전 9시 ~ 오후 9시)을 유지하였다.

### 2) 황기 지상부 기원 다당체의 골수세포증식 효과 검증

황기 지상부로부터 획득한 다당체 (AMA-1-a-PS1 ~ AMA-1-d-PS6)의 장관면역 활성 검증은 Hong 등 (1998)의 방법에 의거하여 측정하였다. 즉, CH3/He 마우스의 소장벽 상에 존재하는 peyer' patch를 조심스럽게 잘라내어 Hank's balanced salt solution (HBSS)이 담겨진 petri dish에 옮기고 조직을 파괴하여 peyer's patch로부터 세포를 방출시킨다. 세포현탁액을 금속체 (No. 200)로 여과한 후 RPMI 1640-FBS (5% fetal bovine serum 함유된 RPMI-1640)로 세척하고 다시 RPMI 1640-FBS로 세포농도를 2 × 10<sup>6</sup> cell/ml 이 되도록 조정 한 후 96-well plate에 180 μl 씩 분주하고 활성을 측정하고자 하는 시료를 농도별로 희석하여 20 μl 씩 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 골수세포 증식 활성 측정에 사용하였다. 골수세포는 동일종 마우스의 대퇴부 뼈에서 회수하였는데, 즉 주사기를 이용하여 뼈 속으로 HBSS를 주입하여 시편관에 받은 후 상기와 같이 여과, 세척하여 2.5 × 10<sup>5</sup> cell/ml RPMI 1640-FBS로 세포농도를 조정하고 96-well plate에 100 μl 씩 분주하였다. 다음으로 위에서 얻은 골수세포 증식활성 측정용 상등액과 RPMI 1640-FBS를 각각 50 μl 씩 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 6일간 배양하였다. 직접적인 장관면역 활성도는 시료와 peyer's patch 세포와의 반응 후 회수한 상등액을 골수세포와 반응시켜 골수세포가 증식되는 정도로서 나타내는데, 증식도 측정은 Alamar Blue™의 형광시약이 살아 있는 골수세포의 전자전달계에서 방출되는 전자에 의해 환원되어 발색되는 측정법을 사용하였다 (Pag *et al.*, 1993). 즉, 골수세포와 위에서 얻은 배양 상등액과의 배양종료 12시간 전에 Alamar Blue™ 20 μl를 첨가한 다음 형광도를 SpectroFluor Plus (Tecan, Durham, NC, USA)를 이용해 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 측정하여, 생리식염수를 시료 대신 사용한 대조구와 골수세포의 증식도를 비교하여 정량화하였다.

### 3) 황기 지상부 기원 다당체의 골수세포증식 촉진인자의 생산 증가 효과 검증

일반적으로 골수세포 증식 촉진인자로 알려져 있는 IL-6의 함량 측정은 sandwich ELISA법을 이용하였다. 분석 하루 전 ELISA용 plate (Immunoplate, Maxisorp, NUNC, Basel, Switzerland)에 50 mM의 carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)에서 1 μg/ml 로 희석한 마우스 IL-6 antibody (100 μl/well, pharmingen, Sandiego, CA, USA)를 분주하여, 4°C에서 하루 동안 반응시켜 well 표면에 흡착시켰다. 다음날 plate를 0.05% Tween 20을 함유한 PBST (Phosphate Buffer Saline-

Tween 20)로 3회 세척한 후, assay diluent (PBS-10% FBS)를 200  $\mu$ l 씩 분주하고 실온에서 1시간 방치하여 항체가 붙지 않은 well의 표면을 blocking하였다. 이 후 plate를 PBST로 각 well을 3회 세척하고 표준물질인 IL-6를 연속 희석한 용액 또는 5일간 배양한 peyer's patch 반응 상등액인 시료와 assay diluent를 50  $\mu$ l 씩 분주하여 well 표면을 30분 동안 blocking 시킨 후에 PBS로 5회 세척하였다. 이렇게 처리되어진 plate에 biotinylate anti-IL-6와 avidin-horseradish peroxidase (Pierce, Rockford, IL, USA)의 conjugation을 assay diluent에 희석하여 분주하고 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 각 well에 존재하는 상등액을 제거하고 PBS로 7회 세척한 후 TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) substrate (Pierce, Rockford, IL, USA)를 첨가하여 30분 배양하였으며 50  $\mu$ l의 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 반응을 중지하고 405 nm에서 microplate reader (Vmax Kinetic Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

## 6. 랫드를 이용한 황기 지상부 조다당 획득 (AMA-0)의 단회 경구 투여 독성시험

### 1) 실험동물 및 시험방법

실험동물의 이용은 대구가톨릭대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (승인번호 제IACUC-2011-007호)하에 이루어졌다. 시험동물은 미국 Taconic 사에서 생산 및 제공하고 있는 특정병원체 부재 (specific pathogen-free, SPF) Sprague-Dawley 계통의 랫드를 사용하였고 단회 경구 투여 독성시험을 위해서 암·수 7주령 44마리를 대한바이오링크로부터 입수하였다. 입수 및 검수 후 7일간의 검역과 순화 과정을 거쳐 건강한 동물 암·수 각각 20마리를 선발하여 암·수 4군에 군 당 5마리를 시험에 사용하였다. 사육환경은 시험의 전체 기간 동안 온도 23±3°C, 상대습도 50±20%, 환기횟수 10~20회/시간, 조명 12시간 (08:00 점등 ~ 20:00 소등), 조도 150~300 Lux, 소음 60 dB 이하, 암모니아농도 20 ppm 이하로 설정되었다. 순화, 투여 및 관찰기간 중 Polysulfone 사육상자 (260W×420L×150H mm)에 2~3 마리씩 수용하였으며 사육상자 및 급수병은 주 1회 교환하였으며, 모든 사육기자재는 고압증기멸균기 (121°C, 20 min)로 멸균하여 사용하였다. 실험동물용 고행사료는 방사선 멸균사료 (Zeigler Bros., Inc., Gardners, PA, USA)를 자유로 섭취시켰으며 여과살균된 정제수를 자유섭취 시켰다.

### 2) 시험군 구성 및 투여용량

순화 후 각 군의 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 2군, 군당 5마리로 군을 구성하였고 총 20마리를 시험에 사용하였다. 단회 경구 투여 독성시험에 있어서 용량설정은 암수 랫드 모두 일반적인 천연소재 추출물 적용의 한계용량으로 하여 5,000 mg/kg/day을 투여한 결과 사망한 시험체가 없는 것으

로 확인되어 대조군 (평균중류수) 더불어 투여군은 5,000 mg/kg/day으로 설정되었다. 랫드를 투여 전날 절식시키고 황기 지상부 추출물을 투여당일에 측정된 체중을 기준으로 10 ml/kg의 농도로 조제하여 1회/1일로 투여하였으며 랫드의 경배부 피부를 고정하고 금속제 경구투여용 존테를 이용하여 강제 경구투여한 후 14일 동안 관찰하였다.

### 3) 관찰 및 검사항목

독성시험은 식품의약품안전처 독성시험관리기준 (Ministry of Food and Drug Safety, 2013)과 OECD 검정기준 (Organization for Economic Co-operation and Development, 2001) 및 GLP센터 표준작업 순서에 따라 진행된 독성 검정에서 임상증상 관찰은 모든 실험동물에 대하여 투여 당일은 투여 후 1시간부터 6시간까지 관찰하였고, 투여 다음날부터 투여 및 관찰기간 동안 매일 2회 모든 동물에 대해 일정한 시간에 사망여부, 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 개별적으로 관찰하여 기록하였다. 또한 시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여개시 전에 체중을 측정하였고 투여 후 3일, 7일, 14일째 체중을 측정하였다. 부검일의 체중은 부검 전일에 하루 밤 절식시킨 후에 측정하였다. 시험 종료 후 실험동물을 부검 당일에 isofluran으로 흡입하여 마취하고 복대동물 절단방법으로 치사 시킨 다음 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안적으로 관찰하였다.

### 7. 통계학적 분석

본 시험 결과는 평균값과 표준편차로 표기하였으며 통계학적 분석은 SPSS 14.0K를 이용하였고 측정 항목 중 황기 지상부 열수 추출물로부터 획득된 다당체의 장관면역 활성관련 결과 및 단회 경구 투여 독성시험 중 체중 결과에 대하여 oneway analysis of variance (ANOVA) 검정법을 사용하였고, 이때 p-value가 0.05 이하일 경우 유의한 것으로 판정하였다. 단회 경구 투여 독성시험에서 사망동물이 관찰되지 않아 반수 치사량 (LD<sub>50</sub>)의 산출을 위한 통계는 실시하지 않았다.

## 결과 및 고찰

### 1. 황기 지상부로부터 조다당 획득의 제조 및 확인

분말화된 황기 지상부 시료로부터 얻은 조다당 분획을 대상으로 하여 장관면역 활성을 검정한 결과 AMA-0 획득은 10  $\mu$ g/ml를 처리한 경우 F. I. 값이 786.5±28.8를 나타내어 대조군 [F. I. (Fluorescence intensity): 602.0±12.4]보다 높은 활성을 나타내었으며 100  $\mu$ g/ml를 처리한 경우 F. I. 값이 1145.8±62.6를 나타내어 대조군에 비하여 1.9배 이상 증가된 활성을 나타내었다 (Table 1). 이러한 결과는 장관면역 활성을 나타내는 물질들은 저분자 물질들이 주로 추출되는 MeOH나

**Table 1.** Effect of chemical and enzymatic treatments of crude polysaccharide (AMA-0) from aboveground of *Astragalus membraanaceus* Bunge on intestinal immune system modulating activity.

Sample	Treatment	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Fluorescence intensity <sup>†</sup>
Control <sup>‡</sup>	-	-	602.0 $\pm$ 12.4*
Crude polysaccharide (AMA-0)	No treatment	10	786.5 $\pm$ 28.8*
	Periodate oxidation	100	1145.8 $\pm$ 62.6*
	Periodate oxidation	10	414.2 $\pm$ 31.9 <sup>#</sup>
	Periodate oxidation	100	598.3 $\pm$ 61.4 <sup>#</sup>
	Pronase digestion	10	654.2 $\pm$ 23.5 <sup>#</sup>
	Pronase digestion	100	1025.5 $\pm$ 56.4*

<sup>†</sup>The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay. <sup>‡</sup>For control, only saline without sample. \*and <sup>#</sup>,  $p < 0.05$ ; Significance between the control and treated fraction and significance between no treatment fraction, crude polysaccharide fraction from hot-water extract (AMA-0) and treated fraction.

EtOH 추출보다 열수 추출과 주로 고분자류가 침전되는 에탄올 침전을 통해 얻을 수 있다는 보고 (Yang *et al.*, 2004)와 인삼 잎에서부터 면역활성이 높은 다당체를 얻기 위해서는 냉수나 열수의 추출조건이 다당이나 단백질 및 고분자류의 추출에 적합한 조건이고 이 고분자가 macrophage의 활성을 자극하는 활성물질이라는 보고 (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2002)와도 유사하였으며 황기 지상부를 대상으로 열수추출과 에탄올 침전을 통해 얻어지는 조다당 획분인 AMA-0 중에 장관면역 활성을 가지는 물질이 포함되어져 있는 것으로 추정하였다.

황기 지상부를 대상으로 열수추출과 에탄올 침전을 통해 얻어지는 조다당 획분인 AMA-0에 포함된 활성물질을 검토하기 위하여 AMA-0를 periodate (NaIO<sub>4</sub>) 산화 및 단백질 분해효소인 pronase로 가수분해한 이후 그 반응산물들에 대하여 골수세포 증식능을 통한 장관면역 활성을 비교 검토하였다. Table 1에서 보이는 것처럼 periodate 산화 및 pronase에 의한 가수분해로 처리군에서 모든 농도의 AMA-0의 장관면역 활성이 감소하였으나 황기 지상부 조다당 획분 100  $\mu\text{g/ml}$  에 pronase를 처리한 경우의 장관면역 활성 감소는 통계적으로 유의한 수준이 아니었다. periodate 산화 및 pronase에 의한 가수분해에 의한 황기 지상부 조다당 획분의 장관면역 활성 감소 비율 중 특히 periodate에 의한 산화가 가장 많은 활성 감소 비율을 나타내었다 (시료농도 100  $\mu\text{g/ml}$ , AMA-0 활성의 47.4% 감소). Periodate는 당의 구조에서 인접한 hydroxyl기를 갖는 탄소와 탄소 사이를 산화시키는 특성을 갖는다고 보고되고 있으므로 (Goldstein *et al.*, 1965) 황기 지상부 조다당 획분이 장관면역 활성을 나타내는데 있어 중요하게 관여하는 물질이 당류일 가능성을 높게 해주고 있으며, 결과적으로

periodate 처리에 의한 산화에 따라 황기 지상부 조다당 획분의 장관면역 활성이 감소한 것은 황기 지상부에 포함되어진 장관면역 활성 다당체의 다당류의 당 구조가 파괴되어 활성이 감소된 것으로 생각된다. 반면, pronase 처리에 의한 장관면역 활성 감소의 변화가 periodate 산화와 비교하여 상대적으로 크지 않았고 통계적으로도 유의한 수준이 아니었다 (시료농도 100  $\mu\text{g/ml}$ , AMA-0 활성의 10.5% 감소). 이러한 결과로 미루어 황기 지상부 조다당 획분 AMA-0에 포함된 여러 물질 중 황기 지상부에서 장관면역 활성에 중요하게 관여하는 고분자 획분의 활성물질은 단백질보다는 다당체일 것으로 추정되며 이러한 활성물질을 밝히기 위하여 조다당 획분의 분리를 진행하였다.

## 2. 황기 지상부로부터 다당체의 분리 및 정제

황기의 지상부로부터 얻어진 조다당 획분으로부터 총 6개의 다당성분을 분리하고 총당량, 분자량, 우론산 함량, 단백질 함량, 산성당 함량을 검정한 결과는 Table 2와 같다.

황기 지상부로부터 분리된 6개의 다당체 중 AMA-1-a-PS1의 분자량은 75,000 Da으로 당함량은 96.2%를 나타내었고 당표준물질인 arabinose, mannose, galactose, glucose의 mol 비가 1.4 : 1.3 : 2.6 : 1.0 (Ara : Man : Gal : Glc = 1.4 : 1.3 : 2.6 : 1.0)을 나타내었으며 산성당은 1.3% 단백질은 0.3%, 우론산 함량은 3.5%로 구성된 다당류가 주 구성성분인 획분이었다.

DEAE-Sepharose FF의 0.115 M NaCl 용출액을 통하여 얻은 활성 획분인 AMA-1-b 분획에서 gel filtration chromatography를 행하여 얻은 2개의 획분 (AMA-1-b-PS2, AMA-1-b-PS3) 중 AMA-1-b-PS2의 분자량은 345000 Da, 당함량은 92.1%, 당표준물질 당표준물질인 arabinose, mannose, galactose, glucose의 mol 비가 0.5 : 1.1 : 1.1 : 1.0로 나타났고 산성당은 2.9%, 단백질은 4.7%, 우론산 함량은 3.2%로 구성된 다당류가 주 구성성분인 획분으로 확인되었다. AMA-1-b-PS3 획분은 모분획인 AMA-1-b로부터 PS-2를 얻는 과정과 동일하게 적용하여 분자량 87000 Da의 다당체 획분을 획득하였다, AMA-1-b-PS3는 당표준물질인 arabinose, galactose mol 비가 1.3 : 1로 나타났고 산성당은 3.0%, 단백질은 4.6%, 우론산 함량은 3.6%로 구성된 다당류가 주 구성성분으로 나타났다.

AMA-1-c-PS4의 분자량은 345000 Da, 당표준물질 arabinose, mannose, galactose, glucose mol 비가 0.9 : 1.6 : 1.4 : 1로 나타났고 산성당은 4.9%, 단백질은 5.2%, 우론산 함량은 3.3%로 구성된 다당류가 주 구성성분으로 확인되었다.

DEAE-Sepharose FF의 0.582 M NaCl 용출액을 통하여 얻은 활성 획분인 AMA-1-d 분획으로부터 gel filtration chromatography를 행하여 얻은 2개의 획분 (AMA-1-d-PS5, AMA-1-d-PS6) 중 AMA-1-d-PS5의 분자량은 129000 Da, 당표준물질 arabinose, galactose, galacturonic acid mol 비가

**Table 2.** Physicochemical properties of the active polysaccharides isolated from aboveground of *Astragalus membraanaceus* Bunge on DEAE-Sepharose FF, Sepharose CL-6B and Sephacryl S-200.

Fractions <sup>†</sup>	AMA-1-a-PS1	AMA-1-b-PS2	AMA-1-b-PS3	AMA-1-c-PS4	AMA-1-d-PS5	AMA-1-d-PS6
Yield (%)	0.54	0.13	0.52	0.04	2.4	2.9
Molecular weight (Da)	75000	345000	87000	345000	129000	88000
Contents (%)						
Carbohydrate <sup>‡</sup>	96.2	92.1	91.8	91.5	72.6	54.1
Uronic acid <sup>§</sup>	3.5	3.2	3.6	3.3	25.0	43.2
Protein <sup>¶</sup>	0.3	4.7	4.6	5.2	2.4	2.6
Component sugar (molar ration)						
Arabinose	19.1	12.8	35.4	15.2	25.3	9.9
Fucose	0.8	4.5	0.6	4.0	0.3	0.2
Galactose	36.0	25.6	46.3	24.1	26.2	11.8
Glucose	14.8	23.6	4.1	17.6	3.9	4.1
Mannose	17.8	24.8	4.6	28.5	4.6	5.2
Rhamnose	4.1	5.1	2.5	5.3	9.0	6.1
Xylose	6.1	0.7	3.5	0.4	2.3	1.0
Galacturonic acid	0.5	1.5	0.5	2.4	24.9	58.6
Glucuronic acid	0.8	1.4	2.5	2.5	3.5	3.1

<sup>†</sup>Fractions: AMA-1-a-PS1, 0.2 M NaCl-eluted fraction fractions obtained by Sepharose CL-6B of AMA-1-a; AMA-1-b-PS2 and AMA-1-b-PS3, fractions obtained by Sephacryl S-200 of AMA-1-b; AMA-1-c-PS4, fraction obtained by by Sephacryl S-300 of AMA-1-c; AMA-1-d-PS5 and AMA-1-d-PS6 fractions obtained by Sephacryl S-300 and Sepharose CL-6B.

<sup>‡</sup>Carbohydrate content: phenol-sulfuric acid method (as galactose).

<sup>§</sup>Uronic acid content: *m*-hydroxydiphenyl method (as galacturonic acid).

<sup>¶</sup>Protein content: Lowry method (as bovine serum albumin).

1.0 : 1.0로 나타났고 산성당은 28.4%, 단백질은 2.4%, 우론산 함량은 25.0%로 구성된 다당류가 주 구성성분인 획분으로 나타났다. AMA-1-d-PS6 획분은 모분획인 AMA-1-b로부터 PS-5를 얻는 과정과 동일하게 적용하여 분자량 88000 Da의 PS-6를 획득하였다. AMA-1-d-PS6의 galactose, galacturonic acid mol 비는 5.0:1.0으로 나타났고 산성당은 61.7%, 단백질은 2.6%, 우론산 함량은 43.2%로 구성된 다당류가 주 구성성분인 획분으로 나타났다.

## 2. 황기 지상부 기원 다당체의 골수세포증식 효과를 통한 면역증강 활성 검증

골수는 다양한 면역세포들이 유래하고 성숙하는 장소이며 면역계의 백혈구를 포함한 적혈구, 혈소판 등 혈액 내 대부분의 세포들은 궁극적으로 골수 내 조혈모세포 (hematopoietic stem cell) 라는 동일한 전구세포에서 생성되어 진식을 순환하며 각종 생체반응을 유도하기 때문에 골수세포의 증식은 면역계에서 매우 중요하다고 할 수 있으며 (Charles *et al.*, 1994) 황기 지상부로부터 분리된 6종류의 다당체에 대하여 골수세포 증식효과를 통해 면역 증강 활성을 검증하여 본 결과 다당체 6개 모두 50 µg/ml 의 농도 이상에서 골수세포 증식효과를 나타내었으며 특히 DEAE-Sepharose FF의 0.115 M NaCl 용출액을 통하여 얻은 활성 획분인 AMA-1-b 분획에서 Sephacryl S-200 (1.7 × 82 cm)의 gel filtration chromatography를 통하여

분리된 AMA-1-b-PS2 (100 µg/ml 처리 시, 대조군에 2.42배)와 DEAE-Sepharose FF의 0.582 M NaCl 용출액을 통하여 얻은 활성 획분인 AMA-1-d 분획으로부터 Sepharose CL-6B column chromatography과 Sephacryl S-300 (2.6 × 90 cm)를 이용한 gel filtration chromatography를 수행하여 분리된 2개의 획분, AMA-1-d-PS5 (100 µg/ml 처리 시, 대조군에 1.98배)과 AMA-1-d-PS6 (100 µg/ml 처리 시, 대조군에 2.26배)에서 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 1).

AMA-1-b-PS2 다당체는 총당 92.1%와 산성당 3.9%, 단백질 4.7%로 구성되어있으며 중성당으로는 arabinose, mannose, galactose, glucose mol 비가 0.5 : 1.1 : 1.1 : 1.0로 포함되었고, glucuronic acid와 galacturonic acid로 구성된 산성당이 2.9%로 구성되어 중성당이 주 구성물질인 반면 AMA-1-d-PS5과 AMA-1-d-PS6는 총당이 각각 72.6%, 54.1%, 단백질이 2.4, 2.6%, 우론산 함량이 25.3, 43.2로 구성되어 있고 산성당이 28.4, 61.7%로 구성되어 주로 산성당이 활성화에 관여하는 물질로서 함유되어진 다당체인 것으로 추정된다.

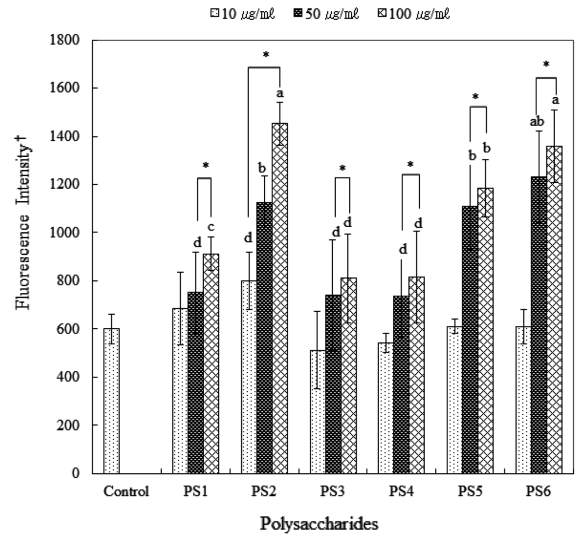
AMA-1-b-PS2 다당체가 분리된 모분획 AMA-1-b의 경우 arabinose와 galactose의 중성당이 주 구성당으로 구성되어 있었고 (자료 미제시) 골수세포 증식능이 가장 높았던 AMA-1-b-PS2와 동일한 모분획으로 분리된 AMA-1-b-PS3의 경우 backbone 및 framework에 galactosyl residue와 arabinosyl residue가 풍부하게 존재하는 특정 polysaccharide일 것으로 생

각된다. 자연계에는 이러한 galactosyl residue와 arabinosyl residue가 풍부하게 존재하는 다당체로서 arabinogalactan과 단백질의 복합체가 존재하는데 (Bacic *et al.*, 1996) 식물에서 이들은 세포의 정체성 (cell identity) 이나 세포와 세포 신호 전달 (cell-to-cell signaling), 세포의 증식 (cell proliferation), 체세포배 형성 (somatic embryogenesis) 및 화분관 성장 (pollen tube growth) 등의 생리적 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Kreuger and Holst, 1996). 뿐만 아니라 일당귀의 뿌리로부터 분리된 arabino-3-6-galactan이 고전적 경로 (classical pathway) 및 부경로 (alternative pathway) 모두에서 보체계를 활성화시킨다고 보고하였으며 (Yamada *et al.*, 1985) lack wood에서 분리한 arabinogalactan의 경우 NK (natural killer) 세포를 활성화 시키거나 macrophage에서 세포활성화 cytokine인 TNF- $\alpha$ 의 생성을 촉진시키는 기능이 있다고 보고 (Kelly, 1999) 하고 있어 황기 지상부로부터 분리된 AMA-1-b-PS2 다당체는 식물의 arabinogalactan backbone을 가지고 있는 면역증강 활성 다당체로서 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

AMA-1-d 분획으로부터 분리된 2개의 다당체, AMA-1-d-PS5와 AMA-1-d-PS6의 경우 galacturonic acid가 각각 24.9, 58.6%의 수준으로 함유되어 있고 산성의 복합 다당류로 분류되어 질 수 있으며 arbinose와 galactose의 비율이 다른 중성 다의 비율보다 높게 나타나 galactosyl residue와 arabinosyl residue가 비교적 풍부하게 존재하는 다당체로 높은 골수세포 증식효능 및 면역증강 효과를 나타내는 것으로 생각되어진다. 이러한 결과는 계피나무의 어린 가지인 계지 (桂枝)에서 분리한 보체계 활성화 다당체가 산성당이 중심이 된 산성 복합다당으로 비환원말단의 galctopyranose와 glucopyranose가 확인되었고 직접적인 보체계 증식과 면역능 증대에 이러한 산성 복합 다당성분이 작용한다고 한 보고 (Ra *et al.*, 1997)와 유사하였으며 병풀 (*Centella asiatica*)로부터 분리된 수용성의 산성 복합다당이 T세포와 B세포를 활성화 시켜 면역능을 증가시킬 수 있다는 결과 (Wang *et al.*, 2005)와도 유사하였다.

## 2. 황기 지상부 기원 다당체의 장관 파이엘판을 매개로 한 면역증강 활성 검증

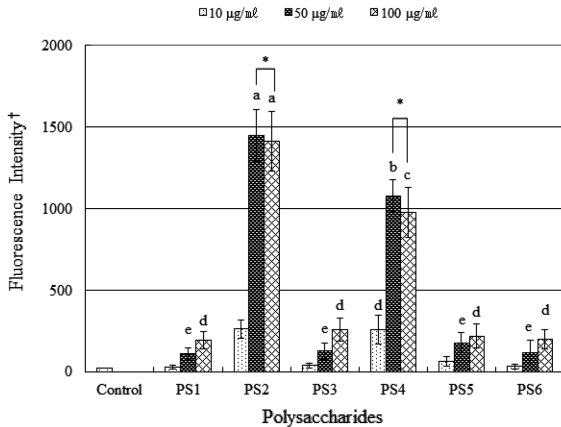
골수세포 증식에 관계된 활성소재의 평가에 있어 골수세포의 증식이 직접적인 시료와 반응에서 기인된 것인지, 장관면역계를 통한 증식활성인지를 구분하여 평가하는 것이 중요하다고 할 수 있다. 황기 지상부로부터 분리된 6개의 다당체를 대상으로 장관면역 활성을 peyer's patch를 매개로 하는 기작을 이용하는 지를 동시에 확인할 수 있는 활성 측정방법을 통하여 비교하였다. 그 결과, AMA-1-b-PS2에서 peyer's patch를 매개로 한 기작을 통하여 가장 높은 활성 (시료농도 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 대조군의 11배, 시료농도 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 경우, 대



**Fig. 1.** Direct effect of the six polysaccharide fraction isolated from aboveground of *Astragalus membranaceus* Bunge on bone marrow cell proliferation. Control, (only saline without samples); PS1 (AMA-1-a-PS1), 0.2 M NaCl-eluted fraction fractions obtained by Sepharose CL-6B of AMA-1-a; PS2 (AMA-1-b-PS2) and PS3 (AMA-1-b-PS3) fractions obtained by Sephacryl S-200 of AMA-1-b; PS4 (AMA-1-c-PS4) fraction obtained by Sephacryl S-300 of AMA-1-c; PS5 (AMA-1-d-PS5) and PS6 (AMA-1-d-PS6) fractions obtained by Sephacryl S-300 and Sepharose CL-6B. †The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method directly, using the Alamar Blue™ reduction assay, and each value was expressed as the mean  $\pm$  SD of quadruplicate assays; Mean with difference letter (a-d) within a column are significantly different at  $p < 0.05$ ; \*Significance between the control and fractions ( $p < 0.05$ ).

조군의 60배)을 나타내었으므로 AMA-1-b-PS2의 경우 직접적으로 다당체가 골수세포의 증식에 직접적으로 영향을 미칠 뿐만 아니라 peyer's patch의 세포를 자극하고 활성화 시켜 세포포로 하여금 cytokine 및 lymphokine류의 생산을 증대시킴으로 골수세포 증식에 영향을 미칠 수도 있음을 나타내었다 (Fig. 2). 반면 AMA-1-c-PS4의 경우, 상기 기술한 바와 같이 직접적인 골수세포에 미치는 영향은 크지 않으나 peyer's patch를 매개로 하는 골수세포 증식비율이 시료농도 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 대조군의 11배, 시료농도 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 경우, 대조군의 45배로 높게 나타났기 때문에 장관면역의 활성기작이 직접적으로 활성화분이 골수세포의 증식에 영향을 미치는 것이 아닌 장관점막림프조직 peyer's patch의 세포만을 경유하여 골수세포 증식에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다 (Fig. 2). 반면 산성당 함량이 높게 나타난 AMA-1-d-PS5과 AMA-1-d-PS6의 경우에는 peyer's patch를 매개로 하는 기작을 이용하지 않고 직접적인 골수세포증식효과를 나타내는 것으로





**Fig. 2. Lymphocyte of peyer's patch stimulating activity of six polysaccharide fraction isolated from aboveground of *Astragalus membranaceus* Bunge.** Control, (only saline without samples); PS1 (AMA-1-a-PS1), 0.2 M NaCl-eluted fraction fractions obtained by Sepharose CL-6B of AMA-1-a; PS2 (AMA-1-b-PS2) and PS3 (AMA-1-b-PS3) fractions obtained by Sephacryl S-200 of AMA-1-b; PS4 (AMA-1-c-PS4) fraction obtained by Sephacryl S-300 of AMA-1-c; PS5 (AMA-1-d-PS5) and PS6 (AMA-1-d-PS6) fractions obtained by Sephacryl S-300 and Sepharose CL-6B. †The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method through peyer's patch, using the Alamar Blue™ reduction assay, and each value was expressed as the mean ± SD of quadruplicate assays; Mean with difference letter (a-e) between control and fractions are significantly different at  $p < 0.05$ ; \*Significance between the column of fractions ( $p < 0.05$ ).

생각되어진다.

이러한 결과는 GALT의 peyer's patch에 존재하는 림프구는 장간막 림프절 (mesenteric lymph nodes)를 통하여 이동하고 체순환계 (systemic circulation)를 통해 말초 림프절, 신장 (spleen), 및 다른 장점막 부위에 도달하여 작용하기 때문에 장관면역시스템은 점막면역 뿐만 아니라 전신면역계 (systemic immune system)을 조절하는 역할을 수행한다고 알려져 있고 창출 (*Atractylodes lancea* DC.)의 뿌리에서 분리한 다당체인 arabino-3,6-galactan (ALR5IIa-1-1)이 그 구조적 특성에 의하여 peyer's patch를 경유하여 장관면역을 조절할 수 있는 능력을 가지게 되며 대부분의 전통적으로 질병 치료를 위해 경구 투여로 사용하는 생약재 및 한약재는 이러한 장관면역시스템을 경유하여 임상적 효과를 나타낼 수 있다고 보고 (Yu *et al.*, 2001) 되어지고 있으므로 황기 지상부의 경구투여는 그들이 가지고 있는 다당체에 의해 peyer's patch를 경유하는 장관면역시스템을 활성화 하여 점막면역 뿐만 아니라 전신면역 면역증강에 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

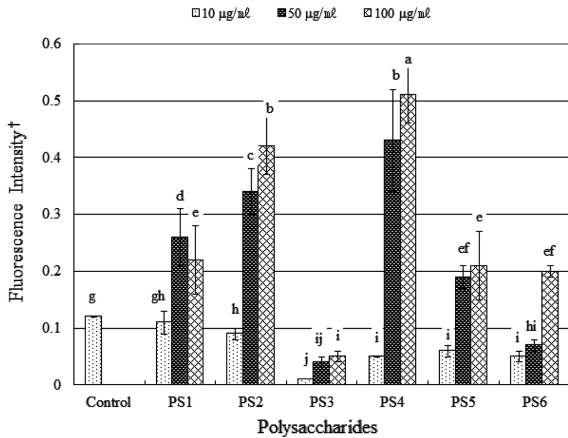
황기 지상부 다당체 중 peyer's patch를 매개로 하는 골수세포증식 기작이 예상되어지는 AMA-1-b-PS2와 AMA-1-c-

PS4의 경우 단백질 함량은 매우 낮았고, 중성당을 주 구성당으로서 하고 있으며 arabinose와, galactose 간의 교호적인 결합으로 이루어진 주쇄에 다양한 종류의 중성당이 측쇄로 결합되어 있는 형태의 갈락탄 계통의 다당류일 것으로 추정되나, 보다 확실한 활성 획득의 구조를 밝히기 위한 구조분석이 필요할 것으로 생각된다.

### 3. 황기 지상부 기원 다당체의 골수세포증식촉진인자의 생산 증가 효과

Cytokine은 면역세포에서 분비되는 용해성 단백질로 자신이나 타 세포의 특성과 작용을 변화시킬 수 있는 활성물질이며 면역세포에서 분비되는 각종 cytokine은 타 면역세포의 기능 조절과 신호전달에 중요한 역할을 하며 면역세포 상호간에 복합한 cytokine network를 형성하여 전체 면역계 반응과 효율화에 공헌한다고 알려져 있고 (Charles *et al.*, 1994). 한약재로부터 추출한 면역 활성성분에 의해 peyer's patch의 T cell을 활성화 시켜 IL-6 및 GM-CSF와 같은 조혈계 세포의 성숙 및 분화에 필요한 cytokine을 생산함으로써 골수세포를 증식시킨다는 연구결과 (Hong *et al.*, 1998)에 근거하여 황기 지상부에서 분리된 다당체의 장관면역 활성을 통한 전신면역계 활성화 증대에 대한 가능성 예측과 골수세포 증식 활성의 원인을 구명하기 위하여 6종의 황기 지상부 기원의 다당체 처리에 따른 장관 peyer's patch 면역담당세포에서 interlekin-6 (IL-6) 등의 골수세포증식촉진인자의 생성 촉진 여부를 검정하였다. 그 결과 peyer's patch를 매개로 하는 골수세포증식 효과를 나타내었던 AMA-1-b-PS2와 AMA-1-c-PS4 처리구에서 IL-6의 세포증식 촉진인자를 높은 수준으로 생성하였다. AMA-1-b-PS2의 경우, IL-6의 생성 증대비율은 대조군에 비하여 시료농도 100 µg/ml 처리 시 약 3.5배, AMA-1-c-PS4의 경우 시료농도 100 µg/ml 처리 시 대조군에 비해 4.2배를 나타낸 반면 골수세포 증식에 있어 직접처리 효과를 나타내었던 AMA-1-d-PS5과 AMA-1-d-PS6는 IL-6의 생성증대에 크게 영향을 미치지 못하였다 (Fig. 3). 이러한 것은 황기 지상부 다당체인 AMA-1-b-PS2 및 AMA-1-c-PS4와 반응시킨 peyer's patch 배양 상등액이 높은 골수세포 증식능력을 보인 결과가 황기 지상부 다당체와 반응한 peyer's patch 세포에서 골수세포의 증식을 유도하는 cytokine인 IL-6의 분비가 증대되었음을 의미하는 것으로서 황기 지상부 다당체 AMA-1-b-PS2 및 AMA-1-c-PS4는 장관면역계 peyer's patch로부터 IL-6 등의 hematopoietic growth factor로서의 cytokine류의 분비를 촉진한다고 할 수 있겠다.

Peyer's patch를 매개로 하는 림프구 활성화 측정에서 AMA-1-b-PS2가 AMA-1-c-PS4 보다 높은 활성을 나타낸 반면 세포증식촉진인자 중 IL-6의 생성에 있어서는 AMA-1-c-PS4가 AMA-1-b-PS2 보다 더 높은 효과를 나타내었다. 이러한 결과



**Fig. 3.** Effect of the six polysaccharide fraction isolated from aboveground of *Astragalus membranaceus* Bunge on cytokines production (IL-6) in the culture supernatant of peyer's patch cell. Control, (only saline without samples); PS1 (AMA-1-a-PS1), 0.2 M NaCl-eluted fraction fractions obtained by Sepharose CL-6B of AMA-1-a; PS2 (AMA-1-b-PS2) and PS3 (AMA-1-b-PS3) fractions obtained by Sephacryl S-200 of AMA-1-b; PS4 (AMA-1-c-PS4) fraction obtained by Sephacryl S-300 of AMA-1-c; PS5 (AMA-1-d-PS5) and PS6 (AMA-1-d-PS6) fractions obtained by Sephacryl S-300 and Sepharose CL-6B. †The proliferation of bone marrow cells was measured by avfluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay, and each value was expressed as the mean ± SD of quadruplicate assays; Mean with difference letter (a-e) between control and fractions are significantly different at  $p < 0.05$ ; \*Significance between the column of fractions ( $p < 0.05$ ).

는 peyer's patch가 T세포와 B세포로 구성되어 있고 특히, T 세포는 IL-6 등의 cytokine에 중요한 공급원으로 알려져 있는 사실을 고려하여 볼 때 AMA-1-b-PS2 보다는 AMA-1-c-PS4가 T 세포의 활성화에 더 특이적인 효능을 나타내는 것으로 생각되고 반대로 AMA-1-b-PS2의 경우 다른 IL-6 이외에 다른 세포증식촉진인자를 활성화 및 T 세포 이외의 다른 면역 세포의 활성화를 통한 골수세포 증식효과가 기대되어진다.

뿐만 아니라 interlekin-6 (IL-6)와 같은 cytokine류의 분비는 순환계 면역세포에서도 중요한 역할을 수행하기 때문에

(Lotz *et al.*, 1988) 황기 지상부 다당체 처리에 의한 장관 peyer's patch의 활성화는 골수세포 증식 유도 뿐만 아니라 이들 cytokine이 전신을 순환하며 타 면역세포를 자극하여 결국 전신면역계의 활성화를 유도할 수 있을것으로 생각되어 진다.

#### 4. 황기 지상부 추출물의 단회 경구 투여 독성 평가

##### 1) 일반증상 및 사망동물

황기 지상부 추출물 (AMA) 투여에 의해 실험기간 중 대조군을 포함한 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았으며 (Table 3) 시험물질에 의한 독성증상과 특이적 임상소견도 나타나지 않았다. 따라서 황기 지상부 추출물을 단회 경구 투여 하였을 때 랫드의 최소치사량은 암컷과 수컷 모두에서 5,000 mg/kg을 상회함을 알 수 있었고 한약재로 널리 알려진 도라지의 뿌리로부터 분리·정제된 platycodin D의 단회 경구 투여 독성평가에서 LD<sub>50</sub>이 2,000 mg/kg 이상이었음을 보고한 결과 (Lee *et al.*, 2011)와 랫드에서 장수버섯으로 발효시킨 옻나무 추출물의 단회 경구 독성시험 결과, 5,000 mg/kg 투여 군에서도 사망이 관찰되지 않아 안전한 동물사료첨가제 및 기능성 식품 개발에 소재임을 확인한 연구 결과 (Choi *et al.*, 2010)를 비교하여 볼 때 단회 경구 투여 시 랫드의 최소치사량이 암컷과 수컷 모두에서 5,000 mg/kg을 상회하는 황기 지상부 추출물은 안전한 추출물로 산업적으로 응용이 가능할 것으로 생각된다.

##### 2) 체중 변화

황기 지상부 추출물 단회 경구 투여에 의한 14일간 암수 랫드의 체중 변화 (body weight changes)와 증체량 (weight gains)를 검정하여 본 결과 암수 시험물질 투여군에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중변화는 없었다. 증체중 (weight gain)의 경우 수컷 대조군과 황기 지상부 추출물 투여군은 각각  $132.1 \pm 11.97$  g과  $137.2 \pm 6.96$  g의 증체량을 나타내 황기 지상부 추출물 투여군은 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다 ( $p < 0.05$ ). 그리고 암컷 대조군과 시험군은 각각  $49.4 \pm 6.79$  g 및  $51.0 \pm 7.80$  g으로 중간 증체량에 있어서 유의한 차이가 없었다 ( $p < 0.05$ ) (Table 4).

**Table 3.** Mortality and lethal dose in SD rats treated orally with hot water extracts of *Astragalus membranaceus* aboveground parts for 14 days.

Dose (mg/kg)	Sex	Hours after treatment						Days after treatment							Final mortality	
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7-14		
0	Male	0†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	Female	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
5,000	Male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	Female	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

†Number of dead animals.

**Table 4.** Body weight changes in SD rats after single oral administration of hot water extracts of *Astragalus membranaceus* aboveground parts for 14 days.

Dose (mg/kg)	Sex	Body weights (g, gram)					
		0 days	1 days	3 days	7 days	14 days	Gain
0	Male	235.3 ± 7.0 <sup>†</sup>	238.9 ± 7.3	283.6 ± 8.4	326.0 ± 7.7	367.5 ± 10.7	132.1 ± 12.0
	Female	170.2 ± 4.3	186.3 ± 2.7	191.7 ± 4.9	201.2 ± 4.1	219.6 ± 3.8	49.4 ± 6.8
5,000	Male	234.3 ± 7.1	259.9 ± 10.0	283.9 ± 9.2	325.1 ± 12.8	371.5 ± 12.8	137.2 ± 7.0
	Female	169.5 ± 4.1	185.9 ± 4.4	194.8 ± 3.7	205.1 ± 4.7	220.5 ± 10.9	51.0 ± 7.8

<sup>†</sup>Values are presented as mean ± SD of total number of tested animals (n = 5). No significant difference observed (p < 0.05).

### 3) 독성의 판단

14일 동안의 시험기간 종료 후 내부 장기에 대하여 육안적 병변을 관찰한 결과 이상 소견이 발견되지 않았다. 또한 간, 신장, 비장의 무게를 관찰한 결과 유의적인 변화가 관찰되지 않았다 (자료 미제시). 이상의 결과를 통하여 황기 지상부 추출물의 랫드에 있어서 단회 경구 투여에 의한 독성지표인 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰한 결과, 대조군과 시험군의 유의한 차이는 발견되지 않았으며 따라서 본 단회 경구 투여 독성시험에서 시험물질이 랫드에서의 개락치사랑 (ALD)은 한계량인 5,000mg/kg을 상회하는 것으로 추정된다고 하겠다. 이러한 결과는 황기의 지상부 추출물을 랫드를 대상으로 90일 반복 경구투여하고 독성 검정을 수행한 결과 수컷의 경우 NOEL (no observed effect level)은 5,000 mg/kg/day으로 추정되고, 암컷의 경우 NOAEL (no observed adverse effect level)이 5,000 mg/kg/day로 추정된다고 보고한 결과 (Park *et al.*, 2013)와 유의한 상관관계가 있음을 확인할 수 있었고 황기 지상부 추출물이 천연물의 투여가능 최대 용량에서도 독성이 없는 안전한 천연물임을 입증하였다.

상기 결과를 통하여 뿌리만 활용하던 황기의 지상부로부터 장관면역 활성 성분으로 분리 정제된 다당류가 분자량 345000 Da의 arabinogalactan 계열임을 확인할 수 있었고 황기 지상부 다당체 추출물은 단회 경구 투여 시 투여 가능 최대 용량에서도 독성이 없는 안전한 천연물이라는 것을 확인하였다.

황기 지상부로 분리된 다당체는 한약 및 국내 약용작물 산업에서 전신면역계를 활성화할 수 있는 장관 면역활성 또는 항암제 치료 시 나타날 수 있는 부작용인 골수세포의 증식억제를 완화시킬 수 있는 기능성소재로서 식품 등에 이용가치를 클 것으로 예상될 뿐 아니라 이러한 뿌리 생산을 위한 황기 재배 시 부산물로 발생하는 지상부의 활용은 다년근 재배 시 발생할 수밖에 없는 재배기간 동안의 경제적 손실로부터 농가 소득 보존의 효과와 함께 유용소재 발굴을 통한 소비 촉진 효과도 기대할 수 있을 것으로 사료되어진다. 또한 황기 지상부로부터 분리되어지고 장관면역 증강 작용 효과가 확인된 다당체의 정확한 구조해석 및 활성과 작용기구와의 상관관계에 관

한 연구가 필요할 것으로 생각되어지며 이는 3차 기능성 식품 내지 신약개발로의 발전에 중요한 정보를 제공하리라 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(사업번호: PJ010087)과 2014년도 강원대학교 학술연구조성비(관리번호-22014 0128)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

Bacic A, Du H, Stone BA and Clarke AE. (1996). Arabonogalactan protiens: A family of cell surface and extracellular matrix plant proteoglycans. *In* Apps DK. (ed.). *Asaays in biochemistry*(Vol. 31). Porland Press. London, England. p.91-92.

Borchers AT, Sakai S, Henderson GL, Harkey MR, Keen CL, Stern JS, Terasawa K and Gershwin ME. (2000). Shosaiko-to and other Kampo(Japanese herbal) medicines: A review of their immunomodulatory activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 73:1-13.

Charles AJ, Paul T, Mark W and Mark JS. (1994). The immune system in health and disease. *In* Penelope A and Eleanor L. (eds.). *Immunobiology*(Part V). Garland Publishing Company. New York, New York, USA. p.34-56.

Choi MJ, Lee SJ, Jang SH, Reza MA, Hong JH, Jung HK and Park SC. (2010). Biological activities and single oral dose toxicity in rat of fermented *Rhus verniciflua* extract. *Korean Journal of Veterinary Research*. 50:187-195.

Goldstein IJ, Hay GW, Lewis BA and Smith F. (1965). Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis. *In* Whistler RL. (ed.). *Methods in carbohydrate chemistry*(Vol. 5). Academic Press. London, England. p.361-370.

He ZQ and Findlay JA. (1991). Constituents of *Astragalus membranaceus*. *Journal of Natural Products*. 54:810-815.

Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H and Yamada H. (1998). Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's Patches by oral asmonistration of Kampo(Japanese herbal) medicines, "Juzen-Taiho-To".

- Phytomedicine. 5:353-360.
- Inagaki N, Komatsu Y, Sasaki H, Kiyohara H, Yamada H, Ishibashi H, Tansho S, Yamaguchi H and Abe S.** (2001). Acidic polysaccharides from rhizomes of *Atractylodes lancea* as protective principle in Candida-Infected mice. *Planta Medica*. 67:428-431.
- James SP and Zeitz M.** (1994). Human gastrointestinal mucosal T cells. In Pearay LO. *et al.* (eds.). Handbook of mucosal immunology. Academic Press. London, England. p.275-285.
- Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Ebisuno Y, Yang BG, Seoh JY, Lipp M, Kiyono H and Miyasaka M.** (2006). CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *The Journal of Immunology*. 176:803-810.
- Jeon YH, Moon JW, Kweon HJ, Jeoung YJ, An CS, Jin HL, Hur SJ and Lim BO.** (2010). Effects of *Lycii fructus* and *Astragalus membranaceus* mixed extracts on immunomodulators and prevention of diabetic cataract and retinopathy in streptozotocin-induced diabetes rat model. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:15-21.
- Jiao Y, Wen J and Yu X.** (1999). Influence of flavonoid of *Astragalus membranaceus*'s stem and leaves on the function of cell mediated immunity in mice. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 19:356-358.
- Jones TM and Albersheim P.** (1972). A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiology*. 49:926-936.
- Jun YM, Kim EH, Lim JJI, Kim SH, Kim SH, Lim JD, Cheoi DS, Cheoi YS, Yu CY and Chung IM.** (2012). Variation of phenolic compounds contents in cultivated *Astragalus membranaceus*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:447-453.
- Kataoka K, Muta T, Yamazaki S and Takeshige K.** (2002). Activation of macrophages by linear (1 → 3)-β-D-glucans. *Journal of Biological Chemistry*. 277:36825-36831.
- Kelly GS.** (1999). Larch arabinogalactan: Clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide. *Alternative Medicine Review*. 4:96-103.
- Kim SH, Jun YM, Lim JJ, Kim SH, Chung IM and Kim EH.** (2012). Variation of astragalosides contents in cultivated *Astragalus membranaceus*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:372-380.
- Kitagawa I, Wang H, Saito M and Yoshikawa M.** (1983). Saponin and saponin. XXXVII: Chemical constituents of Astragali Radix, the root of *Astragalus membranaceus* Bunge. (4): Astragalosides VII and VIII. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 31:716-722.
- Kreuger M and Holst GJ.** (1996). Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Molecular Biology*. 30:11-127.
- Lee WH, Gam CO, Ku SK and Choi SH.** (2011). Single oral dose toxicity test of platycodin D, a saponin from Platycodin Radix in mice. *Toxicology Research*. 27:217-224.
- Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T and Carson DA.** (1988). B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant of human thymocytes and T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 167:1253-1258.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(MAFRA).** (2002). Development of immuno-stimulators using extracts from the leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Sejong, Korea. p.182-197.
- Ministry of Food and Drug Safety(MFDS).** (2013). Standards for toxicity study of drugs. Notice No. 2013-121 of the Ministry of Food and Drug Safety. Osong, Korea. p.1-61.
- Mowat AM and Viney JL.** (1997). The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunological Reviews*. 156:145-166.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD).** (2001). OECD guideline 420 for the testing of chemicals, acute oral toxicity: Fixed dose procedure. Organization for Economic Co-operation and Development. Paris, France. p.1-14.
- Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M and Yadomae T.** (2001). Anti-tumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 24:820-828.
- Ooi VE and Liu F.** (2000). Immunomodulation and anticancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry*. 7:715-729.
- Pag B, Pag M and Nol C.** (1993). A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *International Journal of Oncology*. 3:473-476.
- Park YC, Lee JS, Kim DY, Son HY, Lee JW, Cheoi YS, Kim KK, Yu CY, Chung IM, Im MH, Lee KJ, Choi RN, Shim HS and Lim JD.** (2013). A 90 day repeated dose-oral toxicity study of extracts from *Astragalus membranaceus* above ground parts in rats. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:474-485.
- Ra KS, An HJ and Kweon MH.** (1997). Activation mode and glycosidic linkage of anti-complementary polysaccharide isolated from young stem of *Cinnamomum cassia* Blume. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*. 26:248-253.
- Sminia T, Wilders MM, Janse EM and Hoefsmit EC.** (1983). Characterization of non-lymphoid cells in Peyer's patches of the rat. *Immunobiology*. 164:136-143.
- Toda S and Shirataki Y.** (1999). Inhibitory effects of Astragali radix, crude drug in oriental medicines, on lipid peroxidation and protein oxidative modification by copper. *Journal of Ethnopharmacology*. 68:331-333.
- Trier J.** (1991). Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterology Clinics of North America*. 20:531-547.
- Wang XS, Zheng Y, Zuo JP and Fang JN.** (2005). Structural features of an immunoactive acidic arabinogalactan from *Centella asiatica*. *Carbohydrate Polymers*. 59:281-288.
- Wasser SP.** (2002). Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulation polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60:258-274.
- Yamada H.** (1999). The role of bioactive polysaccharides in Kampo medicines. In Watanabe H and Shibuya T. (eds.). Pharmacological research on traditional herbal medicines. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, Netherland. p.179-196.
- Yamada H, Kiyohara H, Cyong JC, Takemoto N, Komatsu Y, Kawamura H, Aburada M and Hosoya E.** (1990).

- Fractionation and characterization of mitogenic and anti-complementary active fraction from Kampo(Japanese herbal) medicine 'Juzen-Taiho-To'. *Planta Medicine*. 56:386-391.
- Yamada H, Kiyohara H, Cyong JC and Otsuka Y.** (1985). Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*-IV. Characterization of anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Molecular Immunology*. 22:295-304.
- Yang HS, Yu KW and Choi YM.** (2004). Isolation of polysaccharides modulating mouse's intestinal immune system from peels of *Citrus unshiu*. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*. 33:1476-1485.
- Yu KW, Kiyohara H, Matsumoto T, Yang HC and Yamada H.** (2001). Structural characterization of intestinal immune system modulating new arabino-3,6-galactan from rhizomes of *Atractylodes lacea* DC. *Carbohydrate Polymers*. 46:147-156.
- Zhong RZ, Yu M, Liu HW, Sun HX, Cao Y and Zhou DW.** (2012). Effects of dietary Astragalus polysaccharide and *Astragalus membranaceus* root supplementation on growth performance, rumen fermentation, immune responses, and antioxidant status of lambs. *Animal Feed Science and Technology*. 174:60-67.