

## Platycodin D 길경성분의 면역보조효과

한 용 문<sup>#</sup>

동덕여자대학교 약학대학 면역·미생물학교실

(Received June 17, 2015; Revised August 3, 2015; Accepted August 4, 2015)

### Immunoadjuvant Effect of Platycodin D from *Platycodon grandiflorum*

Yongmoon Han<sup>#</sup>

Department of ImmunoMicrobiology, College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

**Abstract** — In vaccine development, the major points may be induction of effective and increased levels of antibody production. This is especially the case when the antigenic sources are carbohydrates. For many years, thus, we have researched various types of formulations such as liposomal and conjugate vaccines. However, the fastidious formulation process and high costs are a problem. For this reason, there is currently a focus on utilizing immunoadjuvants. In this present study, we tested if platycodin D (PLD) from *Platycodon Radix* have immunoadjuvant activity against the cell wall of *Candida albicans* (CACW). The resulting data showed that in the murine model of antibody production, CACW combined with PLD [CACW/PLD/IFA] increased the production of antibodies specific to *C. albicans* when compared to the antibody production by [CACW/IFA]-induction, which was used as a negative control ( $P < 0.05$ ). In the case of [CACW/PLD/IFA], the antibody production was 1.4 times as that of the CFA. In addition, formulations containing either had a prolonged antibody inducing activity maintaining the initial titers of antibody as compared to the CFA formula. Cytokine profiling with the antisera displayed that the PLD produced both Th1 and Th2 immunoresponses, but Th1 dominant was much greater ( $P < 0.05$ ). Furthermore, [CACW/PLD/IFA] formula enhanced resistance of mice against disseminated candidiasis, whereas the CFA had no such effect. In conclusion, PLD has an immunologic activity, which is protective against the disease. Thus, PLD can be a good candidate for a new immunoadjuvant in development of the fungal vaccine.

**Keywords** □ immunoadjuvant, PLD, CACW, antibody production, cytokine profile, disseminated candidiasis

항체요법은 혈청병(serum sickness)과 같은 부작용에도 불구하고 감염질환 치료에 주요한 역할을 담당했으나, 항생제의 발견으로 인하여 한 동안 항체요법에 대한 개발은 중단된 적이 있다. 하지만, 1980년 전 후로 하여 다재내성 병원균(예: super bacteria)의 출현으로 인하여 새로운 항생제의 개발과 아울러 감염성 질환에 대처하기 위한 백신개발을 통한 항체요법이 새롭게 주목을 받게 되었다. 하지만 백신개발에서 가장 큰 걸림돌은 모든 항원(예: 병원균)에 대하여 항체가 항상 유도되는 것은 아니라는 점이다. 주된 이유는 대부분의 병원균 표면이 단백질에 비

해 항원성(antigenicity)이 현저히 떨어지는 탄수화물로 구성되어 있기 때문이다.<sup>1,2)</sup> 항원이 단백질인 경우에는 항체 유도성에는 큰 어려움이 없다. 반면에, 탄수화물성 항원의 경우에 면역성이 매우 낮아서 면역성 증진에는 고비용과 제조과정이 까다로운 단점이 있다. 일례로, 본 연구실의 기 연구에서 탄수화물항원을 리포솜(liposome)에 포접한 리포솜백신(liposomal vaccine) 제형과<sup>3)</sup> 탄수화물성 항원에 항원과는 전혀 관련이 없는 단백질을 부착한 접합백신(conjugate vaccine) 제형<sup>4)</sup>에 관한 연구를 통해서 인지한 바가 있다. 그러므로, 상기와 같이 까다로운 백신제형화 대신에 단순히 면역성을 증진하는 물질을 첨가하여 유효한 항체의 생성이 가능하다면 이는 매우 고무적일 것이다. 이런 면역보조 효능을 갖추고 인체에 사용이 허용된 면역보조제는 Alum과 MF59만 있다.<sup>5,6)</sup> 이런 관점에서, 본 연구에서는 탄수화물항원의 면역성을 증진하는 면역보조효과가 있는 성분을 약용식물에서 규명하고자 하였다. 이에, 본 연구에서는 문헌고찰을 통해 도라지(길

<sup>#</sup>Corresponding Author

Yongmoon Han

Department of ImmunoMicrobiology, College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Tel.: 02-940-4521 Fax.: 02-940-4195

E-mail: ymhan@dongduk.ac.kr

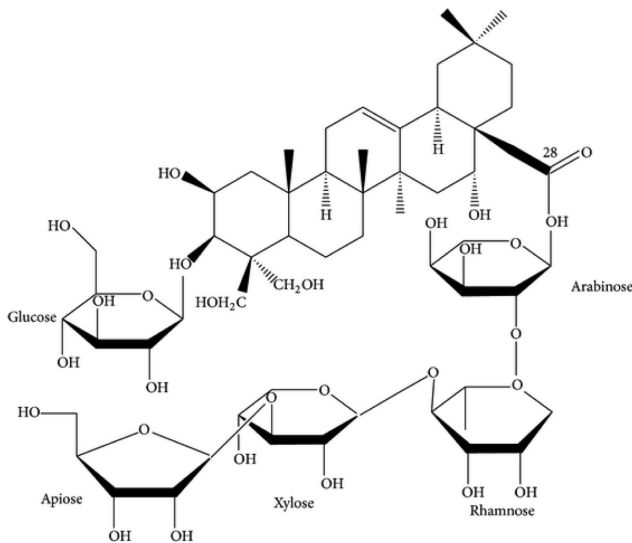


Fig. 1 – Chemical structure of platycodin D.

경)에 함유된 platycodin D(PLD)을 선정하여 이 성분의 탄수화물성 향원에 대한 면역보조효과를 연구조사하였다.

길경(Platycodi Radix, Campanulaceae)은 한의학에서 거담 진해와 기관지 천식 치료에 오래전부터 유용하게 사용해진 중요한 약재이며,<sup>7)</sup> 최근에는 면역증강효과도 보고되고 있다.<sup>8)</sup> 길경에는 triterpenoid saponin과 phytosterol 성분을 함유하고 있는데, 본 연구에서 선정한 platycodin D(Fig. 1)는 triterpenoid saponin의 일종으로서 항염효과가 있고,<sup>9,10)</sup> 최근에 platycodin D(PLD)가 간염바이러스 B의 단백질성 표면항원 (HBsAg)의 면역성 증진을 돕는 면역보조효과가 있음이 보고되었다.<sup>11)</sup> HBsAg은 단백질성 항원으로 Th1(T-helper 1) 및 Th2 면역반응을 모두 발현한다.<sup>12)</sup>

인체에서 중요한 면역세포중의 하나인 CD4+ T helper lymphocyte(Th 세포)는 숙주의 면역반응 발현과 조절에 중요한 역할을 한다.<sup>13)</sup> Th 세포는 주변의 조건에 따라 Th1과 Th2로 분화하여 사이토카인(cytokine) 분비와 면역반응성 발현에 차이를 보이며, 이 subtype의 상호조절을 통한 면역반응의 조절은 매우 중요하게 여겨지고 있다.<sup>14)</sup> Th1 세포는 IFN- $\gamma$ 를 특이적으로 분비하고 macrophage의 활성화에 의한 세포매개성 면역성을 유도하여 염증반응을 발현하는 반면에, Th2는 주로 IL-4와 IL-10의 사이토카인 분비를 통한 체액성 면역반응을 유도하여 상대의 면역반응을 억제한다.<sup>15)</sup> 질환발생의 측면에서 예를 들자면, 만약 Th1 면역유도성이 과도하게 발현하면 세포매개성 면역력의 비정상적 발현으로 인한 CTL(cytotoxic T lymphocyte)이 정상 이상으로 작동하게 되어서 세포와 조직의 파괴를 초래하게 되어 자가 면역질환을 일으키기도 한다.<sup>16)</sup> 그래서 특정 질환이 발생하면 Th1과 Th2 중 어느 한 쪽의 면역반응이 우세하게 발현된다.<sup>15)</sup> 일례로, 자가 면역질환인 제1형 당뇨병에서는 Th1 면역반응이 우

세하고,<sup>16,17)</sup> 감염성질환인 경우에는 Th2 면역반응이 우세하다.<sup>18)</sup> 그러므로 질환의 선호하는 면역반응 환경을 역으로 바꿔준다면 치료가 가능할 것으로 예상된다.

이에, 본 연구에서는 PLD의 탄수화물향원에 대한 면역보조효과 여부를 연구 조사하였다. 이 연구를 위해서, 탄수화물성 향원으로는 *C. albicans*의 세포벽에서 분리한 물질(CACW)을 사용하였다. CACW는 95% 이상이 탄수화물로 구성되어 있다.<sup>3,19,20)</sup> CACW와 PLD를 기름에 혼합하여 유화(emulsion)한 백신체형의 항체생성 유도성 및 Th1과 Th2의 면역반응성을 검색하고 *C. albicans* 기인성 전신성 캔디다증 동물모델에서 이 백신체형의 예방효과를 조사하였다.

## 실험방법

### 실험동물

중앙실험동물(Central Lab. Animal Inc., Korea)에서 5~6주령의 BALB/c 암컷 생쥐를 구입한 후, 본 약학대학의 동물실험실 환경에서 1주일 간 적응시킨 후 실험하였다. 사육기간 동안 멸균된 filter-top cage에 사육하며 멸균된 사료와 물을 자유롭게 먹도록 하였으며, 동물실의 환경은 온도  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도  $50\pm 10\%$ 가 유지되도록 하고 조명은 12시간 간격으로 주야를 자동으로 조절하였다. 동물관리는 동덕여자대학교 동물관리규정과 동물사용윤리위원회 승인[IRB: 동덕동물201403-02]에 따라 동물을 관리 및 사용하였다.

### *C. albicans* cell wall(CACW)의 추출

*C. albicans*의 세포벽 추출은 본 연구실에서 기 보고한 방법을 사용하였다.<sup>3,4,19-22)</sup> 이 추출방법을 간략하게 기술하면, *C. albicans* CA-1 균주를 GYEP(glucose-yeast extract-peptone) 액체 배지에 접종하여  $37^{\circ}\text{C}$  incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 원심분리법으로 인산염완충용액(DPBS, Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 세척하고 DPBS에 다시 부유시켰다. 이후, 0.1 M disodium EDTA(pH 7.5)와 0.1 M trisodium EDTA(pH 9.0)로 처리하고 0.3 M  $\beta$ -mercaptoethanol(2-ME)을 첨가한 후에 실온에서 30분간 방치한 다음에 상등액을 수집하였다. 이 상등액을 투석막(membrane cut-off=12,000 Da)에 넣고 멸균된 탈 이온수를 투석액으로 사용하여 6시간 마다 투석액을 갈아주면서 3일간 투석하였다. 투석이 완료된 다음에 투석막 내부물질들을 수집하여  $-50^{\circ}\text{C}$  이하에서 동결건조 하였다. 분말화 된 CACW는 desiccator안에 저장하며 실험에 사용하였다.

### Platycodin D(PLD)

PLD는 서울대학교 약학대학 김영식 교수로부터 기증받아 본 실험에 사용하였다. PLD 성분의 분리는 platycoside에 효소변형

(enzymatic transformation) 방법을 적용한 후 PLD를 초고속역류크로마토그래피(high-speed countercurrent chromatography)으로 분리하였으며, 이와 같이 분리된 PLD의 순도는 99.8%로 평가되었다.<sup>23)</sup> 이 PLD를 본 실험에 사용하기 전에 생물학적 검증법의 일환으로 LAL(*Limulus* amoebocyte lysate) test kit (Sigma)을 사용해서 내독소(endotoxin)의 혼재 여부를 조사하였다. 조사한 결과, 이 성분에는 내독소가 혼재되어 있지 않음을 확인하였다(data not shown).

### 면역보조제 효과 검색

PLD의 면역보조제로서의 효과를 조사하기 위해서 기 연구에서 사용한 방법에 따라,<sup>24,26)</sup> CACW 항원을 혼합하여 *Candida* 백신을 제조하였다. 이들 백신제형의 제조법은 다음과 같다. 1 ml DPBS(인산완충용액; Dulbecco's phosphate buffer solution, Sigma)에 400 µg CACW(항원)과 10 mg PLD를 넣고 용해한 후, 1 ml의 IFA(Incomplete Freund's Adjuvant)를 첨가하고 sonicator로 유화(emulsion)시켰다. 대조 백신제형은 PLD 없이 오직 CACW에 1 ml의 IFA 또는 CFA(Complete Freund's Adjuvant)를 첨가하고 상기와 같이 동일한 방법으로 유화시켰다. 광물기름(mineral oil)으로만 구성된 IFA와 광물기름과 mycolate 등으로 혼합된 CFA는 Becton, Dickinson Co., USA에서 구입하였다. IFA는 유화를 하기 위해 사용하였다. 백신접종 일정은, 각 백신제형을 각 그룹의 생쥐의 복강에 100 µl 용량으로 1차 접종하고(day 0), 21일 후에 2차 접종을 하였다. 2차 접종 일주일 후(day 28)에, 각 그룹에서 채혈하고 혈청부분을 분리 수집하였다. PLD의 면역보조제 효과의 평가는 [CACW/PLD/IFA]으로 접종한 생쥐그룹에서 수집한 항체의 역가를 [CACW와 IFA]로 접종한 음성대조군 생쥐와 [CACW/CFA]로 접종한 양성대조군 생쥐에서 수집한 항체의 역가와 각각 비교하여 평가하였다.

다른 실험에서는 이들 백신의 예방효과를 검색하기 위해서 상기와 동일한 방법으로 제조한 [CACW/PLD/IFA] 백신 또는 [CACW/CFA] 백신을 동일한 접종일정에 따라 각 그룹의 생쥐에게 각각 주사하였다. 대조군 생쥐는 백신 대신에 오직 DPBS만을 투여 받았다. 2차 접종 후 일주일째(day 28),  $25 \times 10^5$  cells/ml 농도로 준비된 *C. albicans*를 각 생쥐마다 200 ml씩 꼬리정맥으로 주사하여 전신감염 시킨 뒤 이들 생쥐의 생존시간을 측정하였다. 이 전신성 칸디다증(disseminated candidiasis)의 동물모델은 본 연구실의 기 연구에서 고안한 방법으로<sup>27-29)</sup> 본 연구에 적용하였다.

### 항체생성의 검색

각 백신제형으로 접종된 생쥐에서의 항체생성의 여부를 검색하기 위해 기 연구에서 사용한 ELISA 방법을 사용하였다.<sup>30)</sup> 또

한, 항체생성의 지속성(maintenance) 정도를 검색하기 위해서, 상기 기술한 동일한 방법으로 각 백신제형으로 접종한 생쥐들의 꼬리동맥에서 1차 채혈(day 28) 한 다음에 항체의 생성여부를 검색하였다. 또한, 1차 채혈 후 60일째에 이 생쥐들로부터 혈청을 채수집해서 초기(day 28)의 항체생성 정도와 60일째에 검출된 항체의 생성정도를 상호 비교하였다. 항체생성 검색은 항원-항체 응집반응 방법을 사용하여 측정하였다. 시험방법은 다음과 같다. 먼저, 시험혈청을 1% BSA를 함유한 DPBS로 계대희석한 후 각의 혈청 10 µl을 지정된 O-ring plate의 well에 넣고, CACW로 코팅한 beads[CACW-beads]를 10 µl 첨가하고 잘 혼합한 다음에 응집여부를 검출하였다. CACW-beads는 기 연구에서 사용한 방법에 따라 제조하여 사용하였다.<sup>3,4)</sup>

### Th1 대 Th2 면역반응성 분석

PLD의 면역유도성을 검색하기 위해, 수집한 혈청에 함유한 cytokine 종류의 검색은 ELISA kit(DuoSet mouse IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10, R&D System)을 사용하여 각각 검색하였다. cytokine의 종류선정은 관련문헌에 따라<sup>31)</sup> Th1 cytokine으로 IFN- $\gamma$ 와 IL-2를 선정하였고, Th2 cytokine으로는 IL-4와 IL-10를 선정하였다. Cytokine profile은 양 면역반응의 분비정도에 따른 Th1 또는 Th2의 우세성 여부를 비교 평가하였다.

### 통계

실험결과는 평균±표준오차(Mean±SE)로 계산하였으며 각 그룹간의 유의성은 Student's *t*-test를 사용하였다. *P* 값이 5% 미만일 때에는 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 생존율의 통계적 유의성은 Kaplan-Meier Test(Systat 7.0: New Statistics of Windows; SPSS, USA) 방법으로 평가하였다.

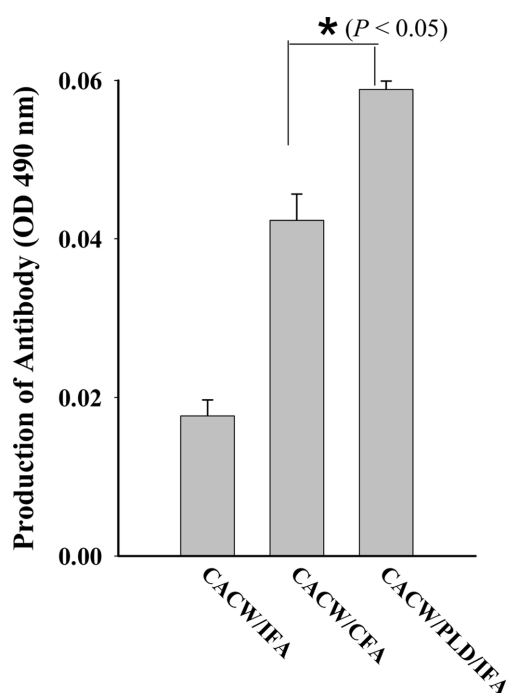
## 실험결과

### 항체생성 검색

실험결과, [CACW/IFA] 제형으로 처리된 생쥐그룹의 흡광도 수치(value)는 평균 0.018 정도인 반면에 동물시험에만 사용하는 CFA로 사용하여 제조된 [CACW/CFA]로 면역된 양성대조군의 흡광도 수치는 0.042이었다(Fig. 2). 하지만, [CACW/PLD/IFA]으로 접종된 생쥐 그룹의 흡광도는 양성대조군으로 사용한 [CACW/CFA]에 비해서 1.4배 더 많은 항 칸디다 항체(anti-Candidal antibody)가 생성되었다(Fig. 2). 이 두 그룹간의 차이점은 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정되었다( $P < 0.05$ ).

### 항체역가의 평가

PLD의 CACW 항원에 대한 면역보조효과를 재확인하고 항체생성의 지속성을 조사하기 위해서 2차접종의 추가 접종 후 7일



**Fig. 2** – Combination of CACW with platycodin D [CACW/PLD/IFA] induces production of antibody specific for *C. albicans*. This production was app. 1.4 times greater than production induced by [CACW/CFA] used as a positive control when determined by ELISA. This difference (\*) between these two groups was statistically significant ( $P < 0.05$ ). These results indicate that PLD has immunoadjuvant activity. Error bar; S.E. Note: CACW, *Candida albicans* cell wall; PLD, platycodin D; IFA, incomplete Freund's adjuvant; CFA, complete Freund's adjuvant.

째와 60일째 혈청의 항체역가를 항원-항체 응집반응 방법으로 검색하였다. 실험결과를 분석해보면, [CACW/PLD/IFA]로 면역된 생쥐그룹에서 수집한 항체의 역가는 32로, 음성대조군 [CACW/IFA]에서 검색된 항체역가보다 16배 높았다( $P < 0.05$ )(Table I-A).

CFA를 사용한 양성대조군의 항체역가는 8로서, 이는 PLD를 보조제로 사용한 경우인 32의 항체역가에 비해서 25% 정도에 불과하였다( $P < 0.05$ )(Table I-A). 이 응집반응 방법에 의한 항체역가의 결과는 ELISA에 의한 항체역가 생성의 순서와 일치하였다. 한편, 항체유도성의 지속성을 평가하기 위해서 추가접종 후 7일째와 60일째에 혈청의 항체역가를 비교한 결과, [CACW/IFA]와 [CACW/CFA]에서의 항체생성은 50% 감소하였지만, PLD를 함유한 제형에서는 항체의 유도성에는 변동이 없었다(Table I-A & B). 이 결과로 항체의 유도성은 적어도 2개월 이상의 지속성이 있음을 알 수가 있었다.

#### PLD의 면역성

각 백신제형으로 면역된 생쥐에서 수집한 혈청내의 사이토카인의 생성정도를 평가하였다. 그 결과, 검색 대상이 되는 사이토카인(IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10)의 생성정도는 DPBS 희석액으로 처리된 경우와 실험군 간의 생성정도를 비교해볼 때, 그 생성의 정도에 차이가 있었지만 모두 검색이 되었다(Fig. 3). 먼저, [CACW/IFA]와 [CACW/CFA]를 비교해보면, Th1 type인 IFN- $\gamma$  과 IL-2 생성정도는 기존의 CFA 면역보조제를 사용한 경우에서 이들 사이토카인 모두가 CACW만을 사용한 경우 [CACW/IFA]에 비해서 더 많이 생성되었다(Fig. 3). 특히, IL-2의 경우에는 약 1.76배 더 많이 생성되었지만, IFN- $\gamma$ 는 동일하게 생성되었다. 이에 반해서, PLD를 함유한 백신제형의 경우[CACW/PLD/CFA]와 CFA를 함유한 백신[CACW/CFA]과 상호 비교했을 때, PLD는 CFA에 비해서 IFN- $\gamma$ 는 거의 4배가 생성이 되었고( $P < 0.01$ ), IL-2의 경우는 1.8배 이상의 더 많은 생성이 관측되었다( $P < 0.01$ ) (Fig. 4). 모두 제형의 경우에서, Th2 type의 사이토카인(IL-4과 IL-10)의 비교에서는 거의 유사한 형태로 생성이 되었지만, Th1 type의 사이토카인의 생성에 비해서 모두 낮게 생성되었다(Fig. 3).

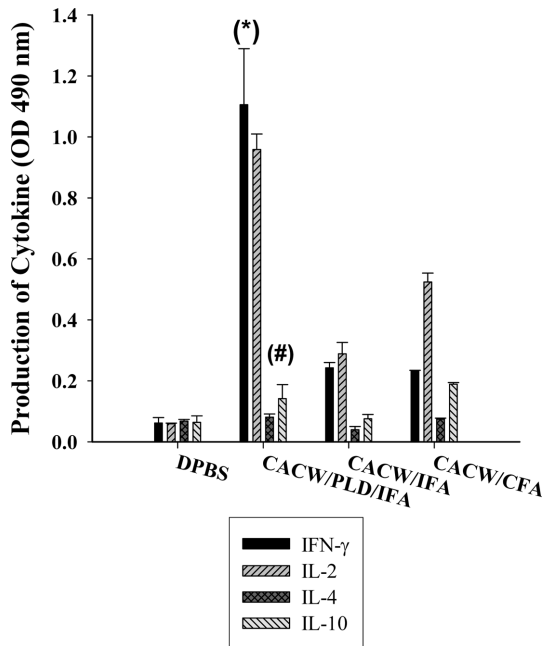
**Table I** – Titers of antibody specific for *C. albicans* measured by the agglutination assay

(A) 7 days after 1st booster

Formulae	Serial dilutions								Antibody titer
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
Diluent only	-								0
CACW/PLD/IFA	+	+	+	+	+	+	-		32
CACW/IFA	+	+	+	-					2
CACW/CFA	+	+	+	+	-				8

(B) 60 days after 1st booster

Formulae	Serial dilutions								Antibody titer
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
Diluent only	-								0
CACW/PLD/IFA	+	+	+	+	+	+	-		32
CACW/IFA	+	-							1
CACW/CFA	+	+	+	-					8



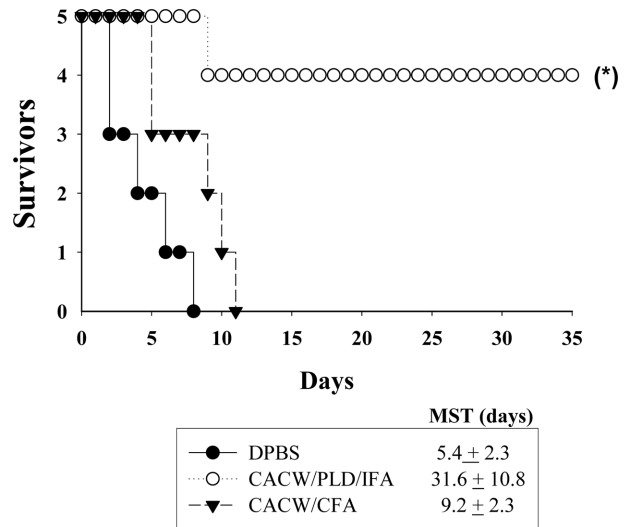
**Fig. 3** – PLD involvement provokes Th1 immunity in mice as determined by cytokine profiling. In the sera collected from mice groups that were immunized with a respective vaccine formula, cytokine profiles of [IFN-γ & IL-2 (Th1 type)] and [IL-4 & IL-10 (Th2 type)] were detected. Results showed that the PLD-contained formula induced a greater amount of Th1-type cytokine (\*) of [IFN-γ & IL-2] than Th2-type cytokine (#) of [IL-4 & IL-10], which indicates that PLD induces Th1 immunity dominantly. In particular, regarding to the Th1-type cytokine production, difference between the induction by PLD formula and induction by CFA formula was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Error bar: S.E.

**칸디다 전신성 감염증(Disseminated candidiasis)에 대한 효과**

이들 각 백신제형의 *C. albicans* 기인성 전신성 감염증에 대한 효과를 측정된 결과, 35일 간의 관측기간 동안에 [CACW/PLD/CFA]으로 접종된 생쥐그룹의 평균생존시간(MST: mean survival time)은 (31.6±10.8일)로서 음성대조군의 평균생존시간(5.4±2.3)일 보다 약 26일 이상 평균생존시간이 더 길었고( $P < 0.05$ ), [CACW/CFA]으로 접종된 생쥐그룹의 평균생존시간(9.2±2.3)일에 비해서 22일 정도의 차이가 있었다(Fig. 4). 음성대조군의 생쥐는 관측 9일과 11일 이내에 모두 폐사한 반면에, [CACW/PLD/CFA]로 면역된 생쥐그룹의 80%는 관측기간 종결까지 생존하였다(Fig. 4).

**고찰 및 결론**

지난, 10여 년 동안, 본 연구실에서는 다양한 종류의 한약성분에 대한 면역보조제의 효과를 연구 조사하였다. 이에 관련하여 학



**Fig. 4** – [CACW/PLD/IFA] formula enhances resistance of mice against disseminated candidiasis. The mice immunized with [CACW/PLD/IFA] before intravenous challenge with live *C. albicans* survived approximately 22 days longer than mice received [CACW/CFA] during the entire period of 35 day-observation ( $P < 0.05$ ). [CACW/CFA]-immunized mice all died within 12 days, whereas 4 out of 5 (\*) [CACW/PLD/IFA]-immunized mice survived until the end of the observation. This experiment repeated three times. Each group contained five mice.

회에 보고한 성분들은, 인삼배당체 Rg1<sup>32)</sup>와 Rd,<sup>33)</sup> β-sitosterol,<sup>34)</sup> 18β-glycyrrhetic acid 감초성분,<sup>35)</sup> 그리고 icariin 삼지귀엽초 성분<sup>36)</sup>으로 이 모든 성분은 이 *C. albicans* 기인성 전신성 감염증에 보호효과가 있는 항체를 유도하였다. 동일한 맥락에서, 본 연구에서는 platycodin D(PLD) 길경성분의 면역보조제 효능을 검색하였다.

본 연구를 통해 산출된 데이터를 고찰해보면, 기존의 동물실험에서 빈번하게 사용되는 CFA 면역보조제처럼 PLD도 CACW 항원에 대한 항 칸디다 항체를 유도 생성하였고, 이 유도력은 CFA보다 더 큰 것으로 평가되었다. 또한, [CACW/PLD/IFA]와 [CACW/CFA] 백신제형의 항체생성의 지속성을 비교한 실험결과에서도, PLD를 함유한 제형은 추가접종 후 60일까지에도 항체 역가가 감소하지 않고 지속적으로 유지가 되는 반면에, CFA의 경우에는 항체역가가 50% 감소하였다. 이 결과를 분석했을 때 PLD가 CFA보다는 면역보조효과가 더 우수함을 알 수가 있었다. 이 결과를 고찰해보면, 일반적으로 생쥐의 최대수명이 2년 정도인데,<sup>37)</sup> 그렇다면 5~6주령 때의 생쥐가 60일 후에 대략 18주령[산출방법: 5~6주+면역접종계획에 따른 4주+60일(약 8주)]이 된다. 이를 사람의 나이와 비교하면 5~6주령의 생쥐는 대략 사람의 20대쯤에 해당된다고 할 때, 18주령의 생쥐는 사람의 30대 중, 후반 정도에 버금간다고 할 수 있을 것이다. 그렇다면, [CACW/PLD/IFA] 백신제형의 효능 지속정도는 최소한 15년 이

상 될 것으로 가정된다. 비록, 본 연구결과가 인체가 아닌 동물을 사용하여 산출된 데이터이지만, PLD의 면역보조 효능이 매우 우수하다고 사료된다.

항체의 유도성을 확인한 후, PLD의 면역반응성을 사이토카인 프로파일(cytokine profile) 방법을 사용하여 Th1 대 Th2의 면역 반응 우세성을 검색하였다. [CACW/PLD/IFA]와 [CACW/CFA] 백신제형에서 수집된 항체에서의 결과를 상호 비교했을 때, 두 제형 모두 Th1과 Th2 면역반응을 발현하였지만 Th1 면역반응이 우세하였다. 팔목한 것은, PLD 함유제형이 CFA 함유제형에 비해서 IFN- $\gamma$ 는 거의 4배가 이상 생성하였고, IL-2의 경우는 1.8 배 이상의 생성이 관측되었다. 이는 PLD가 확연하게 Th1 면역성을 유도하는 것으로 판정이 된다. 그렇다면, Th2 면역환경을 선호하는 *C. albicans* 감염에 대해서 예방효과의 가능성이 매우 높을 것으로 사료되었다. 그래서 상기의 결과를 바탕으로 해서, 전신성 칸디다증 동물모델에서의 [CACW/PLD/IFA] 백신제형의 효능을 조사하였다. 산출된 결과를 고찰해보면, [CACW/PLD/IFA]로 면역된 생쥐그룹의 평균생존시간은 대조군들에 비해서 월등하게 길었다. 더욱 중요한 점은 대조군들에 속한 생쥐들은 관측기간 12일 이내에 모두 폐사하였지만, 본 실험백신으로 면역된 생쥐의 80%는 전체 관측기간 종결까지 생존하였다는 점이다. 반복실험에서도 유사한 결과가 관측되었다. CFA 면역보조제도 Th1 면역반응성을 발현하였지만, 생존율이 없는 이유는, 아마도 Th1 면역성 발현이 약하기 때문으로 추정된다.

결론적으로, 본 연구를 통해서 platycodin D 길경성분은 탄수화물성 항원에 대한 Th1 면역반응성에 기우는 항체를 유도하는 면역보조제로서의 효능이 있다는 것으로 규명되었다. 하지만, PLD가 칸디다증에 보호효과가 있는 항체를 유도하는 작용기전은 아직 알 수가 없다. 본 연구실의 타 천연성분의 면역보조제 효과에 관한 기연구결과<sup>32,33,35</sup>와 비교해볼 때, PLD도 이들 천연성분처럼 T 세포 증식을 통한 항체생성의 촉진을 유도하는 것으로 추정된다. 하지만, PLD는 이 천연성분들에 비해서 독성이 매우 높아서 일정용량 이상에서는 T 세포의 증식을 억제하는 경향이 있지만(unpublished data), 여전히 면역보조효과가 있는 것은 다른 종류의 면역작용기전이 관여하는 것으로 추정된다. 연구조사가 필요한 부분으로 사료된다. 그러므로 작용기전과 함께, PLD의 임상적용 가능성을 위해서 PLD의 독성에 대한 평가가 먼저조사가 되어야 할 것이다. 사실, 대부분의 강력한 시험용 면역보조제의 문제점이 독성에 기인한다. 이에, 본 연구실에서는 현재 PLD 독성의 약화를 통해서도 면역보조제의 효능을 유지할 수 있는 방법론 개발에 대해 집중적으로 연구를 진행 중에 있다.

### 감사의 말씀

본 연구를 위해 platycodin D를 기증해주신 서울대학교 약학

대학 김영식 교수님께 감사드립니다.

### References

- 1) Ronin, C. : Remodeling of glycoprotein and carbohydrate antigens. *Clin. Chem. Lab. Med.* **36**, 373 (1998).
- 2) Ravdin, J. I., Shain, D. C. and Kelsall, B. L. : Antigenicity, immunogenicity and vaccine efficacy of the galactose-specific adherence protein of *Entamoeba histolytica*. *Vaccine* **11**, 241 (1993).
- 3) Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **63**, 2714 (1995).
- 4) Han, Y., Ulrich, M. A. and Cutler, J. E. : *Candida albicans* mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. *J. Infect. Dis.* **179**, 1477 (1999).
- 5) Schijns, V. E. and Lavelle, E. C. : Trends in vaccine adjuvants. *Expert. Rev. Vaccines.* **10**, 539 (2011).
- 6) O'Hagan, D. T., Ott, G. S., De Gregorio, E. and Seubert, A. : The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine* **30**, 4341 (2012).
- 7) Takagi, K. and Lee, E. B. : Pharmacological studies on Platycodon grandiflorum A. DC. II. anti-inflammatory activity of crude platycodin, its activities on isolated organs and other pharmacological activities. *Yakugaku Zasshi* **92**, 961 (1972).
- 8) Sun, H., Chen, L., Wang, J., Wang, K. and Zhou, J. : Structure-function relationship of the saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* for hemolytic and adjuvant activity. *Int. Immunopharmacol.* **12**, 2047 (2011).
- 9) Ida, Y., Hirai, Y., Kajimoto, T., Shingu, K., Miura, T., Kuwahara, N., Taguchi, S., Sasaki, K., Kuroiwa, Y., Yamamoto, T., Arai, I., Amagaya, S. and Komatsu, Y. : Requirement of the glycosyl parts in platycodin D to stimulate pancreatic exocrine secretion. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 2209 (1998).
- 10) Kim, Y. P., Lee, E. B., Kim, S. Y., Li, D., Ban, H. S., Lim, S. S., Shin, K. H. and Ohuchi, K. : Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of *Platycodon grandiflorum*. *Planta Med.* **67**, 362 (2001).
- 11) Xie, Y., Sun, H. X. and Li, D. : Platycodin D is a potent adjuvant of specific cellular and humoral immune responses against recombinant hepatitis B antigen. *Vaccine* **27**, 757 (2009).
- 12) Xie, Y., Deng, W., Sun, H. and Li, D. : Platycodin D2 is a potential less hemolytic saponin adjuvant eliciting Th1 and Th2 immune responses. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 1143 (2008).
- 13) Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y. and O'Shea, J. J. : Helper T cell diversity and plasticity. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 297 (2012).

- 14) Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. : Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348 (1986).
- 15) Parris, K. : Th1/Th2 Balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* **8**, 3 (2003).
- 16) Yoon, J. W. and Jun, H.-S. : Autoimmune destruction of pancreatic  $\beta$  cells. *Am. J. Ther.* **12**, 580 (2005).
- 17) Singh, B., Nikoopour, E., Huszarik, K., Elliott, J. F. and Jevnikar, A. M. : Immunomodulation and regeneration of islet beta cells by cytokines in autoimmune type 1 diabetes. *J. Interferon Cytokine Res.* **31**, 10 (2011).
- 18) Yordanov, M., Deleva, A. and Ivanovska N. : Host resistance against *Candida albicans* infection in mice with adjuvant induced arthritis. *Mycopathologia* **153**, 77 (2002).
- 19) Kim, J. Y., Germolec, D. R. and Luster, M. I. : *Panax ginseng* as a potential immunomodulator: Studies in mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **12**, 257 (1990).
- 20) Han, Y., Kanbe, T. K., Cherniak, R. and Cutler, J. E. : Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. *Infect. Immun.* **65**, 4100 (1997).
- 21) Han, Y., Kozel, T. R., Zhang, M. X., MacGill, R. S., Carroll, M. C. and Cutler J. E. : Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogeneously disseminated candidiasis. *J. Immunol.* **167**, 1550 (2001).
- 22) Han, Y., Morrison, R. P. and Cutler, J. E. : A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect. Immun.* **66**, 5771 (1998).
- 23) Ha, I. J., Ha, Y. W., Kang, M., Lee, J., Park, D. and Kim, Y. S. : Enzymatic transformation of platycosides and one-step separation of platycodin D by high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.* **33**, 1916 (2010).
- 24) Rhew, K. Y. and Han, Y. : Immunoadjuvant activity of icariin that induces Th1-type antibody in mice. *Arch. Pharm. Res.* **35**, 1685 (2012).
- 25) Kim, J. Han, B. J., Kim, H., Lee, J. Y., Joo, I., Omer, S., Kim, Y. S. and Han, Y. : Th1 immunity induction by ginsenoside Re involves in protection of mice against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. *Int. Immunopharmacol.* **14**, 481 (2012).
- 26) Lee, J. H., Lee, J. Y., Park, J. H., Jung, H. S., Kim, J. S., Kang, S. S., Kim, Y. S. and Han, Y. : Immunoregulatory activity by daucosterol, a  $\beta$ -sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated candidiasis in mice. *Vaccine* **25**, 3834 (2007).
- 27) Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **63**, 2714 (1995).
- 28) Han, Y., Morrison, R. P. and Cutler, J. E. : A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect. Immun.* **66**, 5771 (1998).
- 29) Lee, J. H., Lee, J. Y., Park, J. H., Jung, H. S., Kim, J. S., Kang, S. S., Kim, Y. S. and Han, Y. : Immunoregulatory activity by daucosterol, a  $\beta$ -sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated candidiasis in mice. *Vaccine* **25**, 3834 (2007).
- 30) Joo, I., Kim, H., Kim, J., Shezad, O., Kim, Y. S. and Han, Y. : Effect of ginsenosides Rd and Rg1 on proliferation of B cells and antibody induction. *Yakhak Hoeji* **57**, 1 (2013).
- 31) Parris K. : Th1/Th2 Balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* **8**, 3 (2003).
- 32) Lee, J. H. and Han, Y. : Ginsenoside Rg1 helps mice resist to disseminated candidiasis by Th1 type differentiation of CD4+ T cell. *Int. Immunopharmacol.* **6**, 1424 (2006).
- 33) Han, Y. and Rhew, K. Y. : Ginsenoside Rd induces protective anti-*Candida albicans* antibody through immunological adjuvant activity. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 651 (2013).
- 34) Lee, J. H., Lee, J. Y., Park, J. H., Jung, H. S., Kim, J. S., Kang, S. S., Kim, Y. S. and Han, Y. : Immunoregulatory activity by daucosterol, a  $\beta$ -sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated candidiasis in mice. *Vaccine* **25**, 3834 (2007).
- 35) Kim, J., Joo, I., Kim, H. and Han, Y. : 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid induces immunological adjuvant activity of Th1 against *Candida albicans* surface mannan extract. *Phytomedicine* **20**, 951 (2013).
- 36) Rhew, K. Y. and Han, Y. : Immunoadjuvant activity of icariin that induces Th1-type antibody in mice. *Arch. Pharm. Res.* **35**, 1685 (2012).
- 37) Demetrius, J. : Aging in mouse and human systems: A comparative study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1067**, 66 (2006).