흑도라지의 천식 동물모델에 대한 면역조절효과

김진우^{1,3} · 하미애² · 신용욱^{1,2,3*}

¹경남과학기술대학교 식물자원학과, ²경남과학기술대학교 농학·한약자원학부, ³경남과학기술대학교 국제정원연구소

Nine Repetitive Steamed *Platycodon grandiflorum* Root Restores Th1/Th2 Cytokine Imbalance in an Ovalbumin-Induced Asthmatic Mouse Model

Jin Woo Kim^{1,3}, Mi Ae Ha², and Yong Wook Shin^{1,2,3*}

¹Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, South Korea

²Department of Plant Resources, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, South Korea

³International Garden Institute, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, South Korea

Abstract

This study was performed to compare the effect of Platycodi Radix (PG) and Black Platycodi Radix (BPG; developed from fresh *Platycodon grandiflorum* root by steaming nine times at 80°C for 36 hr and drying nine times at 30°C for 24 hr, at which point it becomes black in color.) on anti-oxidant effect, anti-bacterial properties and ovalbumin (OVA)-induced allergic asthma mouse model by calculating serum cytokines and IgE. To induce the allergic asthma, in the control group and the sample treated group, mice of each group were sensitized intraperitoneally with OVA solution at the 1st, the 7th and the 14th day. Sensitization was performed by aerosol allergen challenges with 1% OVA solution intratracheally at the 21th, the 23th, the 25th and the 27th day. At the 29th day, the mice were killed and the levels of interferon- γ , interleukin-4, 5 and 10, total IgE and OVA-specific IgE were measured. IFN- γ was not different among the PG, BPG, and control groups. IL-4, IL-5, IL-13, total IgE, and OVA-specific IgE were significantly in the BPG group compared with the control group. Considering the above experimental results, this study showed that nine times-repetitive steaming process on the roots of *Platycodon grandiflorum* could enhance reduction of the allergic reaction by reducing level of OVA specific IgE and immune cell infiltration and restoring Th1/Th2 cytokine imbalance.

Key words : 9 repetitive steaming, asthma, *Platycodon grandiflorum* root, Th1/Th2 cytokine balance

I. 서론

한약은 채취한 후 생품 혹은 단순 건조과정을 거쳐 약재로서 사용하기도 하지만 일반적으로 포제 또는 수치라고 하는 가공과정을 거친 후 약재로 이용한다. 이러한 포제 과정에 의해 동일한 약재의 효능의 정도가 변하기도 하고 원래의 효능과는 다른 작용을 나타내기도 한다는 사실이 잘 알려져 있다. 전통문헌에 수록된 포제과정은 현대의 한약재의 가공에 있어서도 전해지고 있다. 다만 포제과정에서 발생하는 물리화학적 변화에 대하여 반하와 같이 독성이 있

는 약재, 대황, 지황과 같이 사하작용이 있는 약재 또는 인삼, 감초 등 사용 빈도가 높은 약재를 중심으로 물리화학적 변화에 대하여 과학적으로 입증되고 있다(Oh et al., 2009). 우리나라에서 전해오는 약재의 전통 가공방법 중에 구증구포(9 Repetitive Steaming)란 방법이 있다. 이는 약재를 찜통에 넣고 가열하고 건조하기를 9번 반복하는 것으로 주로 수분이 많은 식물의 뿌리·인삼, 숙지황, 하수오 등을 가공하는 데에 이용되어져 왔다. 구증구포를 통한 가공 방법에 대한 연구는 지황의 조혈작용 증가, 인삼의 혈당강화작용 증가, 인삼의 항산화효능 증가됨이 보고되어지고 있다(Ma et al., 2000; Kim and Kang, 2009; Kim et al.). 이와 같이 특히 가열을 통한 가공방법을 통하여 항산화력이 증가되는 결과가 빈번하게 나타나는데 이러한 원인으로 수확 후 가공과정을 거치면서 내인성항산화효소 혹은 이차대사산물의 생성에 의한 것으로 보고(Tomaino et al., 2005)된 바 있다.

Received on August 13, 2016. Revised on August 14, 2016.

Accepted on August 16, 2016.

*Corresponding author: ywsynn@gntech.ac.kr

이 논문은 2014년도 경남과학기술대학교 기성회 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

한편 도라지(*Platycodi Radix*)는 항 알레르기 작용(Park et al., 2012) 거담작용이 보고된 바 있다(Shin et al., 2002). 특히 Han et al.(2009)은 도라지에서 분리된 사포닌의 비만세포의 IgE 매개의 아나필라시스 억제효과를 Choi et al.(2009)에 의해 오브알부민(ovalbumin)으로 유도한 알레르기성 천식모델에서 도라지 물 추출물의 대식세포 침윤억제효과가 보고한 바 있다. Lee et al.(2014) 및 Wee(2005)은 외래종에 비해 국내산 토종 도라지는 사포닌이 platycodin D에 편중되지 않고 재배기간이 길어질수록, 측근이 발달할수록 극성이 큰 사포닌 생성이 되므로 이러한 사포닌에 대한 생체이용률을 높이기 위해서는 발효 또는 가열처리에 대한 연구가 필요하다고 밝힌 바 있다. Ha et al.(2014)은 효모발효를 거친 도라지의 80% 에탄올추출물은 알레르기 면역반응 유도 매개물질들의 분비를 감소시키고, 체내의 항산화계를 회복시킴으로써 알레르기 증상을 완화한 것으로 보고 하였다. Huang et al.(2011)은 열처리에 따른 더덕과 도라지의 성분과 항산화활성 변화를 살펴보기 위하여 2시간 열처리한 후 항산화활성을 측정된 결과 총 폴리페놀, 항산화활성은 열처리 온도의 증가에 따라 증가 하였다고 보고하였다. 이렇듯 가공과정을 거치면서 도라지의 항산화작용과 항알레르기 작용이 증가되는 결과가 보고되고 있다.

알레르기 중에서도 천식의 발병 기작은 체내로 알레르겐이 유입되면 항원 제시 세포(antigen presenting cell)가 이를 인지하여 원시 T 세포에 전달한다. 이때 항원을 제공받은 원시 T 세포는 Th2 세포로 분화하게 되어 IL-4, IL-5, IL-13 등을 분비하여 기도 염증을 유발하고, 다양한 면역 세포를 자극하여 IgE 및 histamine과 leukotriene 그리고 prostaglandin 등의 염증매개 물질들이 분비됨으로써 과민 반응이 촉발된다(Ying et al., 1995; Zhu et al., 2004). 한편 Th2 세포와는 달리 Th1 사이토카인인 IFN-gamma와 IL-12는 Th2 세포 반응과 IgE 합성을 억제하여 천식의 진행을 제한한다. 따라서 천식은 Th1/Th2의 비율을 조정함으로써 천식을 치료하는데 Th1 면역반응을 증진시키고 Th2면역반응은 억제시키는 것이 효과적이다(Holgate and Polosa, 2008; Yuan et al., 2013).

도라지의 거담, 소염, 항알레르기작용이 가공과정을 거치면서 증가되는 것에 착안하여 경남지역에서 도라지를 전통의 방식으로 9중9포하는 방법으로 가공된 흑도라지의 Th1/Th2의 비율을 조정 작용을 가공전 도라지와 비교하여 9중9포 한 흑도라지의 항알레르기 기능성을 규명하고자 본 실험을 수행하고자 하였다.

II. 연구방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 도라지(*Platycodi Radix*; PG), 흑도라지

(Black *Platycodi Radix*;BPG, 구증구포한 도라지)는 삼위거제도흑삼(Geogje-si, Gyeongsangnam-do, Korea)에서 제공받아서 80% 에탄올로 추출하여 동결건조한 뒤 사용했다. 본 실험에서는 체중 18 ± 2 g의 female BALB/c mouse 6주령을 주식회사 코아텍(Gyeonggi-do, Korea)에서 제공받아 항온($22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$), 항습($55\%\pm 3\%$)과 12시간 명암주기(오전 8시 점등, 오후 8시 소등)가 유지되는 사육장 환경에서 4마리씩 polycarbonate 마우스케이지에 수용하여 7일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사용한 시약으로는 Compound 48/80, Evans Blue, Ovalbumin, ketotifen, caffeic acid는 Sigma-Aldrich사(St Louice, CA, USA)로부터 구입하였으며, Al(OH)₃ gel(InvivoGen, San Diego, USA), Mouse IgE ELISA kit(BD, San Diego, USA), ELISA kit(Assay Designs, Ann Arbor, MI) Diff-Quickkit(Inter-national Reagents Corp., Kobe, Japan), histamine ELISA Kit(Immunotech [IVD] MBL Co., LTD. Code No. IM-2562)를 사용하였으며 실험기기로는 Agilent 1260 Series HPLC system(Agilent Technologies, USA), Rotary Evaporator(Eyela, Japan), 동결 건조기(FD 5508, Ilshin Lab, Korea), nebulizer(Clenly 2 Aerosol, Medel, Italy), microplatereader(Anthos2020, Asys Hitech GmbH, Austria), Microtome RM2145, Microscope(LEICA, Germany), Cytospin(Shandon Cyto-spin 4, Thermo Fisher Scientific Inc., UK), Mx3000 qPCR system(Agilent Tech. CA, USA) 등을 사용하였다.

2. 실험방법

1) Saponin 정량 ; HPLC 분석

HPLC 조건은(Park et al., 2000)의 조건을 따랐으며 실험에 사용된 HPLC는 Agilent 1260 Series HPLC system(Agilent Technologies, USA)으로 C18(4.6×250 mm, $5\mu\text{m}$, Shiseido, Japan) column를 이용하여 측정하였다. 이동상은 water, acetonitrile을 사용하여, acetonitrile 비율을 0 min(18%) - 22 min(18%) - 32 min(30%) - 60 min(50%)로 순차적으로 조절하였다. Column 온도는 35°C 로 유지 하였고, injection volume은 $10\mu\text{l}$, 유속은 1 ml/min로 하여 검출파장 203nm에서 측정하였다.

2) 조사포닌 정량

도라지와 흑도라지의 사포닌 함량은 식품 공전의 방법에 의거하여 측정하였다. 즉, 도라지 약 4 g(고형분 함량)에 70% ethanol 20 배를 가한 뒤, 70°C 에서 12시간 동안 환류 추출 하고 여과하여, 여과액을 빈 수기에 넣고 $45\sim 50^{\circ}\text{C}$ 에서 감압 농축한 다음, 증류수 120mL에 녹여 분액 깔때기에 붓고 diethyl ether 120mL을 가한 다음 시료가 골고루 섞이도록 잘 흔들어준 후 물 층과 에테르 층으

로 분리 될 때까지 방치시켰다. 분리된 에테르 층은 버리고 남아있는 물 층에 다시 수포화 부탄올 120mL을 더하여 다시 잘 흔들어 준 후 분리 될 때까지 방치시켰다. 분리된 수포화 부탄올 층은 따로 모아놓고 물 층에 다시 수포화 부탄올을 붓는 과정을 3회 반복하였다. 분리된 수포화 부탄올에 증류수 120mL을 넣고 잘 흔들어 준 후 다시 분리 될 때까지 방치시킨 후 물 층을 제거하여 사포닌 성분을 수포화 부탄올층으로 이행시킨 후, 감압농축기를 사용하여 미리 항량된 수기에 넣고 감압농축하였다. 감압 농축 후 dry oven에서 2시간 건조 항량시킨 후 무게를 측정하여 조사포닌 함량을 측정하였다.

3) 총 페놀 정량

도라지와 흑도라지의 총페놀 화합물 함량은 Folin-denis 방법(Nowak et al., 1992)에 의해 측정하였다. 메탄올에 녹여 추출한 시료 1mL와 10% Na₂CO₃ 1mL를 혼합하고 2 N Folin-denis 시약 1mL를 가하여 30분간 방치 후 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 화합물 함량은 caffeic acid(Sigma, MO, USA)를 이용하여 검량곡선을 작성하고 이를 이용하여 총페놀 화합물 함량을 환산하였다.

4) 항산화측정

DPPH free radical scavenger 효과를 Bolois법(Bolois 1958.)법에 의하여 항산화효과를 측정하였다.

5) 항균활성측정

도라지와 흑도라지의 항균활성 측정을 위해 사용된 미생물은 천식환자의 객담에서 주로 분리되는 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621 을 한국생명공학연구원, 세포주은행으로부터 구입·분양받았다. 배지로서 nutrient agar를 사용하였다. 시료의 항균성 검색은 paper disk(φ6mm)를 이용한 agar diffusion법으로 실험하였다. 즉, Agar plate에 미리 배양한 균 배양액을 610nm O'D 0.5 농도가 되게 희석시킨 후 멸균 면봉으로 도말하고 추출물을 100ug/ul의 농도가 되게 DMSO:Me-OH=9:1에 용해한 후 paper disk에 50μL를 흡수시켜 건조시켰다. 용매를 완전히 휘발시킨 다음 agar plate 표면에 paper disk를 놓아 밀착시켰다. 배양기에서 24~48시간 배양한 후, disk 주위의 inhibition zone(mm)의 직경을 측정하였다.

6) OVA 유도 기관지 알레르기 질환 억제효과

난황 알부민(chicken egg albumin, grade V) 0.2% 함유 용액에 수산화알루미늄겔[Al(OH)₃ gel]을 1:1로 혼합한 액을 0.2mL 복강투여로 최초 감작시키고, 복강투여 후 14일에 최초감작과 같은 방법으로 재 감작시킨다. 최초 복강투여 21일부터 30일까지 10

일간 매일 네블라이저를 이용하여 0.2%의 OVA를 1시간 흡입시켰다. 마지막 분무를 시행한 12시간 후에 케타민(1mg/kg)을 마우스의 복강 내에 주사하여 마취하여, 개복하여 대정맥으로부터 혈액을 채취했다. 채취한 혈액은 4°C에서 2~4시간 보관 후 원심분리(1,200g, 15분)를 시행하여 혈청을 분리하고 혈청은 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 혈액을 채취하고 난 후 기관절개를 가하고 기관절개창을 통해 cut-down tube를 삽입하여 37°C에서 10% fetal bovine serum DMEM 배양액을 기도에 주사기로 주입하고 흡입하여 얻었으며, 이 과정을 3회 반복하여 기관지폐포세정액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)을 채취했다.

(1) 혈청 총IgE 농도 측정

분리한 혈청에서 총 IgE양을 ELISA kit로 정량하였다. 즉, Capture 항체를 coating 완충용액에 희석하여 96-well에 코팅하고 4°C에서 20시간 배양한다. 각 well을 3회 세척하고 혈청(2배 희석)을 100μL씩 분주하고, 2시간 동안 실온에서 배양하였다. 5회 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100μL를 처리하고, 1시간 실온에서 배양한 뒤, 다시 세척하고, 여기에 TMB 기질을 100μL씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50μL의 반응정지 용액을 처리한 뒤 ELISA reader 450nm에서 흡광도를 측정했다.

(2) 혈청 OVA 특이 IgE 측정

분리한 혈청에서 OVA-specific IgE level을 측정하기 위하여 ELISA로 측정하였다. 항원으로 OVA 20ug/mL의 농도로 코팅한 완충용액에 희석하여 96-well에 코팅하고 4°C에서 20시간 방치하고, 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 혈청(2배 희석)을 100μL씩 분주했다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 5회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100μL를 처리하고, 1시간 실온에서 방치하고 이어서 세척했다. 여기에 TMB 기질을 100μL씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50μL의 반응정지 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정했다.

(3) 히스타민 정량

혈청중의 히스타민양은 histamine ELISA Kit로 측정했다. 먼저, 혈청 200μL와 유도체화 완충용액 50μL를 잘 섞어 반응시킨 다음 유도체화 시약 20μL를 넣어 혼합시킴으로써 혈청 내 히스타민 유도체화를 유도하였다. 유도체화 된 혈청을 히스타민에 대한 항체가 붙어있는 96-well plate에 100μL씩 넣은 후 enzyme conjugate 100μL를 첨가하여 4°C에서 overnight로 반응시켰다. 다음날 plate를 5회 washing buffer로 세척한 다음 색소기질(chromogenic substrate) 200μL를 넣고 암실상태에서 60~90분 동안 상온에서 반

응시했다. 반응이 끝난 후 발색 정도를 microplate reader의 405nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈청 내 히스타민의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

(4) BALF IL-4, 6, 10 및 IFN- γ , TNF- α 농도 측정

폐포세정액(BALF)중의 IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α 의 양은 ELISA kit(Assay Designs, Ann Arbor, MI)를 이용하여 측정했다. 즉, 96-well flat-bottom ELISA plate에 0.1 M sodium carbonate 용액으로 희석한 capture antibody(1:250)를 100 μ l씩 넣은 후 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 washing buffer로 3회 세척하였다. 각 well에 10% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 1× PBS를 넣고 실온에서 1시간 동안 정치함으로써 blocking한 후 혈청을 100 μ l씩 넣어 실온에서 2시간 반응시켰다. 이를 다시 5회 washing buffer로 세척한 다음 peroxidase가 결합된 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체를 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 plate를 5회 세척한 다음 각 well에 기질용액인 TMB를 넣어 10분 동안 암실상태에서 반응시킴으로써 발색을 유도하였다. 반응이 끝난 후 각 well에 정지액을 50 μ l씩 넣어 효소반응을 정지시킨 후 microplate reader의 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈청 내 각각의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

(5) BALF Eosinophil 계수 및 총면역세포계수

Cytospin에 슬라이드를 장착하고, 50~100 μ L의 기관지폐포세정액(Bronchoal-veolar lavage fluid, BALF)을 용기에 넣은 후 5분간저속(1,000 RPM)으로 원심하여 슬라이드 위 5mm 직경의 원안에 세포들이 고르게 분포하여 Diff-Quickkit(Inter-national

Reagents Corp., Kobe, Japan)를 이용하여 Wright-Giemsa염색하여 호산구, 호염구 등의 세포수를 계수했다. 폐 세정액의 상층액은 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

(6) 적출 폐조직에서의 RNA 정량

채취한 마우스 폐조직 각각 추출된 전체 RNA를 대상으로 qPCR system을 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 추출되어진 RNA는 10pmole의 Primer와 함께 SuPrime Script RT-PCR Premix (2X)와 iTag™Universal SYBR®Green Supermix(Bio Rad, CA, USA)를 사용하여 최종 반응물은 20 μ l 맞추었으며, 반응 조건은 다음과 같다. 모든 유전자의 증폭을 위한 프라이머 정보는 Table 1에 제시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 도라지와 흑도라지의 사포닌 정량

도라지를 반복적인 증숙(9중9포)을 통한 흑도라지의 사포닌의 변화를 측정하기 위해서 Platycodin D3, Platycodin D 그리고 Polygalacin D를 정량하여 이를 비교하였다. 이를 3 사포닌의 정량을 위해 검량선을 제작한 결과 Table 2에 제시한 바와 같이 공히 r^2 값이 0.99이상을 나타내어 검량선의 직선상을 확인하였다.

도라지(PG)와 흑도라지(BPG)의 3개 사포닌 정량결과를 Table 3에 제시하였다. 즉, Retention time이 빠르게 나온 분자량이 큰 platycodin D3의 경우 9중9포를 통하여서 1/10로 감소한 것을 확인할 수 있었고, 분자량이 상대적으로 작은 Polygalacin D의 경우

Table 1. Oligonucleotide sequences of cytokines in quantitative real-time PCR.

Cytokine	Primer	Sequences
TNF- α	Forward	5'-AGC CGA TGG GTT GTA CCT T-3'
	Reverse	5'-GGA GGT TGA CTT TCT CCT GGT-3'
IL-4	Forward	5'-TGT ACC AGG AGC CAT ATC CA-3'
	Reverse	5'-TTC TTC GTT GCT GTG AGG AC-3'
IL-5	Forward	5'-CAA GCA ATG AGA CGA TGA GG-3'
	Reverse	5'-CCC ACG GAC AGT TTG ATT CT-3'
IL-13	Forward	5'-AGC AAC ATC ACA CAA GAC CAG-3'
	Reverse	5'-ATC CAG GGC TAC ACA GAA CC-3'
β -actin	Forward	5'-CTG TAT TCC CCT CCA TCG T-3'
	Reverse	5'-CCA TGT TCA ATG GGG TAC TT-3'

The RT-PCR conditions were as follows: cDNA synthesis at 50°C for 30 min, initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s; annealing at 55°C; extension at 72°C for 60 s; β -Actin was used as the internal control for each qPCR reaction.

Table 2. Calibration curves for the three saponins of *Platycodon grandiflorum* radix.

Saponin	Standard curves	r^2	Retention time (min)
Platycodin D3	$y=5.07e^{-1}+1.72$	0.99735	33.914
Platycodin D	$y=9.35e^{-1}+3.53$	0.99675	37.046
Polygalacin D	$y=7.24e^{-1}+2.90$	0.99636	37.536

Table 3. Saponins and total saponin contents of Platycodon Root and its nine times-repetative steam and drying-processed product.

	(mg/100g)			
	Platycodin D3	Platycodin D	Polygalacin D	Total saponin contents (%)
PG	103.93	551.95	44.64	5 $\pm$ 0.21
BPG	10.37	191.37	24.64	12 $\pm$ 0.25

PG; *Platycodon grandiflorum* root. BPG; Black *Platycodon grandiflorum* root is developed from raw *Platycodon grandiflorum* root by steaming nine times at 80°C for 36 h and drying nine times at 30°C for 24 h, at which point it becomes black in color.

는 1/1.8의 감소한 것으로 나타나 9중9포를 통하여 큰 분자량의 사포닌이 분해되어 분자량이 작은 사포닌이 생성되는 양상을 추측케 하였다. 이러한 결과는 조사포닌 함량을 통하여서 다시 확인하였다. 즉, HPLC 로 정량한 3개의 사포닌 모두에서 도라지의 9중9포를 통하여 1/10 ~ 1/1.8로 감소한 반면 조사포닌의 함량은 오히려 5 ± 0.21 에서 12 ± 0.25 로 증가함을 나타내어 Polygalcin D 보다 분자량이 작은 사포닌함량이 오히려 증가한 것을 뒷받침해주었다. 즉 큰 분자량의 사포닌이 줄고 오히려 생체이용률이 높은 작은 분자량의 사포닌이 늘어남을 통하여서 체내 흡수가 증가할 수 있음을 시사하였다.

2. 항산화능 비교

9중9포를 통하여 도라지사포닌의 구조가 사포닌 이외에 다른 성분으로 분해되었는지의 여부와 변화함이 효능으로 연결되는지의 여부를 확인하기 위하여 먼저 항산화능을 비교하였다. Table 4에 제시한 바와 같이 도라지(PG)와 9중9포를 통해 흑색으로 변한 흑도라지(BPG) 그리고 도라지(csPG)와 흑도라지(csBPG)의 조사포닌 분획(Crude Sapoin)의 총 페놀량과 DPPH 소거능의 IC₅₀를 측정하였다.

Table 4에 제시한 바와 같이 총 폴리페놀은 도라지 추출물이 0.3 mg/g 인데 비해 구중구포 도라지는 73.63mg/g을 나타내어 9중9포를 통하여서 245.4배 증가한 것을 확인할 수 있었다. 한편 조사포닌 분획에서는 도라지 조사포닌이 167.27로 흑도라지의 128.87 보다 더 높게 나온 것을 확인할 수 있었다. 전체 도라지 중에서는 흑도라지의 폴리페놀이 많은데 비하여 사포닌 내에서 만으로 비교하면 흑도라지의 폴리페놀의 함량이 도라지에 비해 적음을 나타내고 있다. 이어서 각 시료의 항산화효과를 비교한 결과 도라지(PG)의 활성산소 50% 소거능력을 가진 농도가 5.01을 나타내는 데 비해 흑

도라지(BPG)의 경우 활성산소의 50%를 소거하는 농도가 1.95로 나타나 9중9포에 의해 항산화효과가 증가됨을 알 수 있었다. 조사포닌의 경우 도라지 및 흑도라지에 비해 더욱 작은 농도에서도 활성산소의 50%를 소거할 수 있음을 나타내어 도라지조사포닌(csPG)와 흑도라지 조사포닌(csBPG)는 IC₅₀가 각각 1.12μg/mL 및 1.05 μg/mL를 나타내었다.

한편, 열(heat)이나 산(acid)에 의해서 가수 분해되어 생성되는 인삼의 prosapogenin 성분은 천연에 존재하는 인삼사포닌 배당체(glycoside)보다 체내의 흡수력이 좋아서 약리효능이 강화되는 것(Jo et al., 2014)으로 알려져 있다. 도라지도 이와 다르지 않을 것으로 여겨지며, 특히 9중9포와 같은 증숙을 통하여 전분이 호화되고 amino-carbonyl reaction인 maillard 반응에 의하여 내용조직이 담황갈색~적갈색을 띠는 아미노산 유도체가 생긴다(Matatusuda, 1999). 즉 arginine과 maltose가 결합하여 아미노산유도체인 maltosyl arginine 이 생성되며 이 성분 가운데 하나인 Arginine-Fructose- Glucose는 백삼보다 증숙을 거친 홍삼에서 현저히 증가된다고 알려져 있다(Takaku, 1996) 이러한 Arg-Fru-Glu 가 생성되는 Maillard 반응 조건은 수분함량이 비교적 적고 산성조건하에서 잘 일어나므로 같은 열처리라도 물에 넣고 끓일 때 보다 수증기로 찐 다음 건조할 때 Maillard 반응이 잘 일어나고 이로 인해 항산화작용이 더욱 증가되는 것으로 알려져 있다(Park et al., 2001). 즉 생도라지를 가정에서 물에 넣고 오랫동안 끓일 때 보다 미리 증숙의 과정을 거치는 것이 항산화효과 증가에 기여함으로 건강에 기여하는 점이 더욱 크므로 이러한 점은 농가에 보급하여 농가소득증진에 기여할 것으로 여겨지므로 보급할 만한 가치가 있다고 하겠다.

3. 항균작용의 비교

비염, 천식환자의 콧물과 객담에는 *S.aureus* 균이 관찰되는데

Table 4. Polyphenol contents and free radical scavenging activity (IC₅₀) of Platycodon Root and its nine times-repetative steam and drying-processed Product and theses total crude saponin.

	Total polyphenols (mg/g-extract powder)	DPPH IC ₅₀ (μg/mL)
PG	0.30	5.01
BPG	73.63	1.95
csPG	167.27	1.12
csBPG	128.87	1.05

PG; *Platycodon grandiflorus* root. BPG; Black *Platycodon grandiflorus* root is developed from raw *Platycodon grandiflorum* root by steaming nine times at 80°C for 36 h and drying nine times at 30°C for 24 h, at which point it becomes black in color. csPG; Crude Sapoin of *Platycodon grandiflorus* root. csBPG; Crude Sapoin of Black *Platycodon grandiflorus* root.

Table 5. Antimicrobial activity of Platycodon Root and its nine times-repetative steam and drying-processed Product and theses total crude saponin against *S. aureus*.

	Diameter of clear zone, mm
PG	NC
BPG	12 ± 0.74
csPG	17 ± 1.68
csBPG	14 ± 1.53

1) Sample concentration (100 mg/mL), 2) Mean±SD (n=3), disk diameter (6 mm) was included. 3) NC. No Clear zone. PG; *Platycodon grandiflorus* root. BPG; Black *Platycodon grandiflorus* root is developed from raw *Platycodon grandiflorus* root by steaming nine times at 80°C for 36 h and drying nine times at 30°C for 24 h, at which point it becomes black in color. csPG; Crude Sapoin of *Platycodon grandiflorus* root. csBPG; Crude Sapoin of Black *Platycodon grandiflorus* root.

이러한 *S.aureus*에 대한 항균력을 증명하면 비염 및 천식환자의 증상을 개선하는데 유의할 것으로 여겨서 이 균주에 대한 항균력을 비교하였다. 비교 결과는 Table 5에 제시하였다. 도라지(PG)는 *S.aureus*에 대한 항균력을 전혀 나타내지 못하였다. 하지만 9중9포를 통하여서 생성된 흑도라지(BPG)는 균에 대한 저지력을 나타내는 저지환의 지름이 12mm를 나타내어 항균력이 있음을 나타냈다. 도라지조사포닌(csPG)와 흑도라지 조사포닌(csBPG)도 저지환의 지름이 각각 $17 \pm 1.68\text{mm}$ 및 $14 \pm 1.53\text{mm}$ 를 나타내었다.

4. 도라지와 흑도라지의 천식억제효과

1) 혈청 총IgE와 OVA 특이 IgE 분비에 대한 효과

난알부민으로 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 도라지(PG)와 흑도라지의 에탄올추출물(BPG)의 IgE 항체 생성에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 혈청 내 IgE의 농도를 효소면역반응법으로 측정하였다. 그 결과, Fig. 1에서와 같이 IgE의 농도는 정상

군(Normal)에 비해 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유발된 대조군(Control)에서 현저히 증가되었다. 반면, 대조약물인 Dexamethasone을 3mg/kg 투여한 군(Dexamethasone)에서는 대조군에 비해 IgE의 농도가 유의적으로 감소하였다. 또한 도라지 추출물 100mg/kg 투여한 군(PG 100)과 흑도라지 100mg/kg 투여한 군(BPG 100)에서는 대조군에 비해 감소하였으나 유의적인 차이는 없었다. 혈청내의 난알부민-특이 IgE 농도를 측정한 결과 혈청 내 난알부민 특이 IgE 농도는 정상군에 비해 대조군에서 현저히 증가되었으며 대조약물인 Montel 10mg/kg 투여군에서와 흑도라지 100mg/kg 투여한 군(BPG 100)에서는 대조군에 비해 유의적으로 감소함을 확인 할 수 있었다.

2) 혈청내 IL-4 농도 측정

IgE는 기도 염증이 확장되거나 특히 급성 알레르기반응으로 나타나는 기관지 천식 발증에 중추적인 역할을 담당한다(Kuhl and Hananial, 2012). 알레르기를 일으키는 항원이 생체에 들어오면,

Fig. 1. Effects of PG and BPG on total and OVA-specific IgE levels in serum. Serum was collected 48 hr after the final OVA challenge in mice. PG; *Platycodon grandiflorus* root. BPG; Black *Platycodon grandiflorus* root is developed from raw *Platycodon grandiflorus* root by steaming nine times at 80°C for 36 h and drying nine times at 30°C for 24 h, at which point it becomes black in color. Each sample was analyzed using ELISA. (A) Total IgE level (B) OVA-specific IgE level. (C) IL-4 level, (D) Histamine contents NOR, Normal control (PBS only); CTR, OVA-sensitized/challenged mice; PG 100, PG (100 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; BPG 100, BPG (100 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; Montel, montelukast (10 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. Dexamethasone, Dexamethasone (3 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. PG and BPG or montelukast, Dexamethasone treatment was performed 1 h before challenge. *Significant difference from NOR, $P < 0.05$, and #significant difference from CTR, $P < 0.05$.

macrophage가 인식, helper T 세포에서 관련 cytokine이 유리, 그리고 B세포에서 IgE항체가 만들어져 mast 세포에 부착시킨다. 그 다음 mast세포는 히스타민, ECF-A, prostaglandin, thromboxane, leucotriene C4, leucotriene D4, leucotriene E4 및 PAF를 생성하여 유리하는 특징을 갖고 있는데, 특히 히스타민의 유리는 혈액에서 기관지조직에 호산구를 침윤시켜 활성화하는 작용을 하여 알레르기성 기관지 천식발증에 중요한 역할을 한다고 알려지고 있다 (Tomas et al., 2011) 이에 B세포의 IgE항체생성 촉진작용을 나타내는 IL-4와 B세포의 분화 및 항체생성을 자극하므로 혈청 내 Th2 사이토카인인 IL-4의 농도를 효소면역반응법으로 측정하였다. 그 결과, Fig. 1 좌측 하단에 제시한 바와 같이 혈청 내 IL-4의 농도는 정상군(Normal)보다 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 대조군(Control)에서 현저히 증가하였다. 대조약물인 Dexamethasone을 3mg/kg 투여한 군(Dexamethasone)에서는 대조군에 비해 IL-4 level을 줄이지는 못하였으나 도라지 추출물 100mg/kg 투여한 군(PG 100)과 흑도라지 100mg/kg 투여한 군(BPG 100)에서는 대조군에 비해 유의적으로 감소시켰다. 특히 흑도라지의 경우 대조약물인 Montel 10mg/kg 투여군의 효과보다 뛰어난 효과를 확인 할 수 있었다.

3) 혈청 내 히스타민 분비에 대한 효과

난알부민으로 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 도라지와 흑도라지 에탄올추출물 의 히스타민 생성에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 혈청 내 히스타민의 농도를 효소면역반응법으로 측정하였다. 그 결과, Fig. 2 우측하단의 그림에서와 같이 혈청 내 히스타민의 농도는 정상군(Normal)에 비하여 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 대조군(Control)에서 현저히 증가되었다. 반면, 대조약물인 Dexamethasone을 3mg/kg 투여한 군(Dexamethasone)에서는 대조군에 비해 히스타민의 분비를 유의적으로 현저히 감소하였다. 또한 도라지 추출물 100mg/kg 투여한 군(PG 100)과 흑도라지 100mg/kg 투여한 군(BPG 100)에서는 대조군에 비해 유의적으로 감소시켰다. 이는 대조약물인 Montel 10mg/kg 투여군의 효과보다 뛰어난 효과를 확인 할 수 있었다.

4) BALF에서의 사이토카인의 변화

난알부민으로 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 도라지와 흑도라지 에탄올추출물 의 히스타민 생성에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 BALF IL-4 와 IL-6의 level을 효소면역반응법으로 측정하였다. 그 결과, Fig. 1 상단의 그림에서와 같이 BALF 내

Fig. 2. Effects of PG and BPG on cytokine levels in BALF. BALF were collected 48 hr after the last OVA challenge of mice. PG; *Platycodon grandiflorus* root. BPG; Black *Platycodon grandiflorus* root is developed from raw *Platycodon grandiflorus* root by steaming nine times at 80°C for 36 h and drying nine times at 30°C for 24 h, at which point it becomes black in color. Individual samples were analyzed using ELISA. (A) IL-4 level in BALF; (B) IL-6 level in BALF; (C) IL-10 level in BALF; and (D) IFN-γ level in BALF. (E) TNF-α level in BALF; NOR, Normal control (PBS only); CTR, OVA-sensitized/challenged mice; PG 100, PG (100 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; BPG 100, BPG (100 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; Montel, montelukast (10 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. Dexamethasone, Dexamethasone (3 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. PG and BPG or montelukast, Dexamethasone treatment was performed 1 h before challenge. *Significant difference from NOR, $P < 0.05$, and #significant difference from CTR, $P < 0.05$.

IL-4와 IL-6의 농도는 정상군(Normal)에 비하여 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 대조군(Control)에서 현저히 증가되었다. 반면, BALF 내의 IL-4의 경우 대조약을 포함한 실험군 모두에서 저해작용을 나타내지 못하였다. IL-6의 경우 Dexamethasone을 3mg/kg 투여한 군(Dexamethasone)에서는 대조군에 비해 유의적으로 현저히 감소하였다. 또한 도라지 추출물 100mg/kg 투여한 군(PG 100)과 흑도라지 100mg/kg 투여한 군(BPG 100)에서는 대조군에 비해 감소시켰으며 이는 대조약물인 Montelukast 10mg/kg 투여군의 효과보다 뛰어남을 확인 할 수 있었다. 그 정도는 BPG가 더 효과적으로 저해함을 나타내었으나 유의성은 발견되지 않았다. Fig. 2 하단에 제시한 그림과 같이 BALF 내 IL-10과 IFN- γ 의 농도는 동일한 양상으로 정상군(Normal)보다 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 대조군(OVA-Control)에서 알레르기 유발에 따라 IFN- γ 의 농도가 증가하였다. 하지만 실험군 모두에서 대조군(CTR)에 비해 증가된 것을 확인 할 수 있었다. 이로써 양성 대조군을 포함한 실험군 모두에서 Th1을 증가시켜 Th2를 억제함을 알 수 있었다.

5) BALF에서 세포수의 변화

Fig. 3에 생쥐에 장기간 OVA 감작화와 함께 식도내로 도라지와 흑도라지의 에탄올 추출물을 투여했을 때 BALF에서 총 세포수 및 호산구수를 측정된 결과를 제시하였다. BALF에서 총세포수는 CTR 그룹이 정상군(NOR)에 비해 크게 증가되었으며($p < 0.05$),

Dexamethasone 처치군의 경우 정상군(NOR)보다 더 낮은 총세포수를 나타내었고 다른 실험군 3군에서도 대조군에 비해 낮은 세포수를 확인 할 수 있었다. 이는 흑도라지 이외에 군에서 모두 유의성이 인정되었다. 이와 유사한 양상으로 폐 세정액에서 호산구 수도 대조군(CTR)에서는 정상군에 비해 약 300% 증가되었으나 실험군 모두에서 대조군 대비 호산구 숫자는 감소됨을 확인할 수 있었다. 호산구 숫자는 전체 세포수와 마찬가지로 도라지 추출물(PG)이 대조군에 비해 유의적으로 억제함으로 그 억제효과가 흑도라지(BPG)의 효과보다 우수함을 확인 할 수 있었다($p < 0.05$).

따라서 생쥐에게 OVA 감작화와 함께 OVA를 비강으로 점적할 경우 생체의 방어작용의 일환으로 혈액의 염증세포가 기도내로 크게 침윤하며, 염증세포 중에서도 특히 호산구의 침윤이 급증하여 천식성 만성 기도염증이 크게 증가되었다. 그러나 생쥐에 OVA 감작화와 함께 장기간 도라지 추출물을 병용 투여하면 혈액에서 기도내로 침윤하는 총 염증세포 수의 증가가 크게 완화되고, 특히 크게 증가하는 호산구의 침윤도 조절될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

6) 비염 유도 생쥐의 폐조직에서의 사이토카인의 변화

난알부민으로 알레르기 면역반응이 유도된 마우스의 폐 조직에서 도라지와 흑도라지 에탄올추출물의 기도과민반응 억제 효과를 확인하기 위해 기도과민반응에 관여하는 RNA를 정량하기 위해 RT-aPCR을 시행하였다. 그 결과, Fig. 2의 그림에서와 같이 폐 조직 내의 IL-4와 IL-5 및 IL-13과 염증지표로서의 TNF- α 의 농도

Fig. 3. Effects of PG and BPG on recruitment of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice 48 hr after the final OVA challenge. PG; *Platycodon grandiflorus* root. BPG; Black *Platycodon grandiflorus* root is developed from raw *Platycodon grandiflorus* root by steaming nine times at 80°C for 36 h and drying nine times at 30°C for 24 h, at which point it becomes black in color. (A) Cells were isolated by centrifugation and stained with Diff-Quik® Stain reagent. Cell numbers were determined by counting within at least five squares of a hemocytometer under a light microscope. Dead cells, stained with trypan blue, were excluded from the total cell number. NOR, Normal control (PBS only); CTR, OVA-sensitized/challenged mice; PG 100, PG (100 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; BPG 100, BPG (100 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; Montel, montelukast (10 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. Dexamethasone, Dexamethasone (3 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. PG and BPG or montelukast, Dexamethasone treatment was performed 1 h before challenge. *Significant difference from NOR, $P < 0.05$, and #significant difference from CTR, $P < 0.05$.

는 정상군(Normal)에 비하여 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 대조군(Control)에서 현저히 증가되었다. 즉, 백혈구 중 호산구를 활성화시키는 IL-5와 IL-13과 같은 helper T2 세포형 cytokine의 함량이 폐 조직 내에서 크게 증가됨을 확인할 수 있었다.

특히 IL-4의 경우 전체의 실험군에서 현저한 저해효과를 나타내었다. 특히 도라지 추출물 투여군(PG 100)($P < 0.05$)을 제외한 양성대조군 및 흑도라지 투여군(BPG 100)에서는 현격한 저해작용을 나타내었다($P < 0.001$). IL-5의 경우 도라지 추출물 투여군(PG 100)과 흑도라지 투여군(BPG 100)에서 공히 현저한 저해작용을 나타내었다($P < 0.01$). IL-13의 경우 정상군(NOR)에 비해 대조군(CTR)의 증가가 현저하지 않았으나 도라지 추출물 투여군(PG 100)과 흑도라지 투여군(BPG 100)에서 공히 유의적인 저해작용을 나타내었다($P < 0.05$). TNF- α 는 정상군(Normal)보다 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 대조군(Control)에서 알레르기 유발에 따라 TNF- α 가 증가하였다. 이에 대해 실험군 모두에서 유의한 저해작용을 나타내었다($P < 0.01$).

즉, 생쥐에 장기간 도라지추출물의 투여는 OVA 감작화로 인한 폐조직내의 IL-4, IL-5 및 IL-13와 TNF- α 의 증가를 억제하였다. 따라서 도라지추출물은 알레르기원에 의한 천식성 기도 염증과 기도과민성의 특징인 cytokine IL-4, IL-5와 IL-13 함량의 증가를 완하시

킬 수 있는 효과가 있다는 것을 나타내는 결과로 판단할 수 있으며 그 저해작용은 9중9포를 통하여 더욱 증가될 수 있음을 판단하였다.

IV. 적요

도라지는 구증구포를 통해서 도라지의 saponin 조성의 변화가 생김을 확인할 수 있었다. 즉, 큰 분자량의 사포닌이 분해되어 분자량이 큰 사포닌의 양은 감소되고 분자량이 작은 사포닌과 총사포닌 양은 오히려 증가되는 것으로 보아 분자량이 작은 사포닌이 생성되는 것을 유추할 수 있었다. 또한 구증구포를 통해서 도라지가 흑도라지로 변하면 총 폴리페놀이 증가하고 항산화작용이 증가함을 확인할 수 있었다.

비염 및 천식환자의 콧물과 객담에서 관찰되는 병원균의 항균작용을 구증구포 전후의 도라지 추출물로 비교한 결과 구증구포 전에는 항균력을 전혀 나타내지 못했다가 구증구포 후에 항균력을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

흑도라지 추출물 투여군에서는 급성알레르기 반응을 유발하는 IgE항체생성 촉진작용을 나타내는 혈청 내 Th2 사이토카인인 IL-4을 양성대조군약물투여군 보다 저해하는 효과를 나타내었다. 또한 백혈구 중 호산구를 활성화시키는 IL-5와 IL-13과 같은 helper T2 세포형 cytokine의 함량이 천식 유도된 동물의 폐 조직 내에서 크

Fig. 4. Effects of PG and BPG on recruitment of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice 48 hr after the final OVA challenge. PG; *Platycodon grandiflorus* root. BPG; Black *Platycodon grandiflorus* root is developed from raw *Platycodon grandiflorus* root by steaming nine times at 80°C for 36 h and drying nine times at 30°C for 24 h, at which point it becomes black in color. (A) Cells were isolated by centrifugation and stained with Diff-Quik® Stain reagent. Cell numbers were determined by counting within at least five squares of a hemocytometer under a light microscope. Dead cells, stained with trypan blue, were excluded from the total cell number. NOR, Normal control (PBS only); CTR, OVA-sensitized/challenged mice; PG 100, PG (100 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; BPG 100, BPG (100 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; Montel, montelukast (10 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. Dexamethasone, Dexamethasone (3 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. PG and BPG or montelukast, Dexamethasone treatment was performed 1 h before challenge. *Significant difference from NOR, $P < 0.05$, and #significant difference from CTR, $P < 0.05$.

게 증가되었으나 흑도라지 추출물 투여군에서는 유의적으로 감소시켰다. 즉 구증구포를 거친 도라지 추출물 투여군은 Th1/Th2 비율을 조정하여 난황알부민으로 유도한 동물모델의 천식증상을 개선하였다.

V. References

- Bolois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 181:1199-1200.
- Choi, J.H., Y.P. Hwang, H.S. Lee, and H.G. Jeong. 2009. Inhibitory effect of *Platycodi Radix* on ovalbumin-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *Food Chem Toxicol*. 47(6):1272-1279.
- Gong, J.H., D. Shin, S.Y. Han, J.L. Kim, and Y.H. Kang. 2012. Kaempferol suppresses eosinophil infiltration and airway inflammation in airway epithelial cells and in mice with allergic asthma. *J. Nutr*. 142(1):47-56.
- Ha, M.A., J.W. Kim, S.W. Lee, H.S. Chun, Y.S. Cho, and Y.W. Shin. 2014. Anti-pruritic effect of ethanol extracts from *platycodon grandiflorum* and its fermented production in scratching Behavior mouse models. *Kor. J. Herbology* 29(6):165-173.
- Han, E.H., J.H. Park, J.Y. Kim, Y.C. Chung, and H.G. Jeong. 2009. Inhibitory mechanism of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic response in mast cells. *Food Chem Toxicol*. 47:1069-1075.
- Holgate, S.T. and R. Polosa. 2008. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol*. 8(3):218-230.
- Hwang, C.R., S.H. Oh, H.Y. Kim, S.H. Lee, I.G. Hwang, Y.S. Shin, J.S. Lee, and H.S. Jeong. 2011. Chemical composition and antioxidant activity of Deoduk (*Codonopsis lanceolata*) and Doragi (*Platycodon grandiflorum*) according to Temperature. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 40:798-803.
- Jo, H.K., H.H. Gwak, B.O. Im, S.H. Cho, and S.K. Ko. 2014. The change of ginsenoside composition in American Ginseng (*Panax quinquefolium*) extract by the microwave and vinegar process. *Kor. J. Pharmacogn*. 45(2):107-112.
- Kuhl, K. and N.A. Hananial. 2012. Targeting IgE in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 18(1):1-5.
- Kim, S.N. and S.J. Kang. 2009. Effects of Black Ginseng (9 Times-Steamg Ginseng) on hypoglycemic action and changes in the composition of ginsenosides on the steaming process. *Kor. J. Food Sci. Technol*. 41(1):77-81.
- Kim, D.W., Y.J. Lee, J.W. Min, Y.J. Kim, Y.D. Rho, and D.C. Yang. 2009. Conversion of acidic polysaccharide and phenolic compound of changed ginseng by 9 repetitive steaming and drying process, and its effects of antioxidation. *Kor. J. Oriental Physiology & Pathology* 23(1):121-126.
- Lee, S.W., Y.S. Cho, and Y.W. Shin. 2014. Current research trends on improvement of balloon flower production and processing. *J. Korean Soc. People Plants Environ*. 17(6):419-432.
- Ma, J.Y., C.S. Ha, H.J. Sung, and O.P. Zee. 2000. Hemopoietic effects of rhizoma rehmanniae preparata on cyclophosphamide-induced pernicious anemia in rats. *Kor. J. Pharmacogn*. 31(3):325-334.
- Matatsuda, H. 1999. Study on efficacy of processed ginseng, redginseng. *Natural medicines*. 53:217-222.
- Nowak, H., K. Kujawa, R. Zadernowski, B. Rocznik, and H. Kozłowska. 1992. Antioxidative and bactericidal properties of phenolic compounds in rapeseeds. *European J. Lipid Sci. Technol*. 94:149-152.
- Oh, J.H., J.S. Sin, E.S. Ahn, S.J. Lee, J.C. Lee, J.H. Lim, S.K. Hong, J.K. Hong, and Y.J. Lee. 2009. A literature survey of the modern techniques used for the processing of herbal medicines. *J. Kor. Pharm. Sci*. 39:275-297.
- Park, I.S., E.M. Kang, and N. Kim. 2000. High-performance liquid chromatographic analysis of saponin compounds in *Bupleurum falcatum*. *J. Chromatogr. Sci*. 38(6):229-233.
- Park, S.J., J.W. Kim, S.J. Park, and T.J. Kim. 2012. Effects of *Platycodon Grandiflorum* including platycodin D in IgE/Ag-Induced type I hypersensitivity. *J. Life Sci*. 22(5):595-599.
- Park, S.Y., I. Jung T.L.Kang and M.K.Park 2001. Difference between steaming and decocting ginseng. *J. Ginseng Res*. 25(1):37-40.
- Shin, C.Y., W.J. Lee, E.B. Lee, E.Y. Choi, and K.H. Ko. 2002. Platycodin D and D3 increase airway mucin release in vivo and in vitro in rats and hamsters. *Planta Med*. 68:221-225.
- Takaku, H. 1996. Production of arginyl-fructosyl-glucose during processing of red ginseng. *J. Trad. Medicines*. 13:118-123.
- Thomas, A., E. Platts-Mills, and J.A. Woodfolk. 2011. Allergens and their role in the allergic immune response. *Immunological Reviews*. 242:51-68.
- Tomaino, A., F. Cimino, V. Zimbalatti, V. Venuti, V. Sulfaro, A. de Pasquale, and A. Saija. 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem*. 89:549-554.
- Wee, H.J. 2005. Transformation of saponin *Platycodi Radix* (Platycodin) by *Aspergillus niger* and bioactivity evaluation of the transformed metabolites. MS thesis, Seoul Natl. Univ. p. 32-57.
- Ying, S., S.R. Durham, C.J. Corrigan, Q. Hamid, and A.B. Kay. 1995. Phenotype of cells expressing mRNA for Th2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and Th1-type (interleukin 2 and interferon γ) cytokine in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatics and normal control subjects. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 12(5):477-487.
- Yuan, Y., B. Yang, Z. Ye, M. Zhang, X. Yang, C. Xin, M. Lin, and P. Huang. 2013. *Sceptridium ternatum* extract exerts antiasthmatic effects by regulating Th1/Th2 balance and the expression levels of leukotriene receptors in a mouse asthma model. *J. Ethnopharmacol*. 149:701-706.
- Zhu, Z., T. Zheng, R.J. Homer, Y.K. Kim, N.Y. Chen, L. Cohn, Q. Hamid, and J.A. Elias. 2004. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 Inflammation and IL-13 pathway activation. *Science*. 304(5677):1678-1682.