

홍도라지 추출물이 마우스에서 분리한 비장세포에서 lipopolysaccharide로 유도된 염증에 미치는 영향*

박은정¹, 이유희¹, 정현철², 이성현³, 이해정^{1†}

¹가천대학교 식품영양학과, ²SK바이오랜드 식품연구소, ³농촌진흥청 국립농업과학원

Mitigation effects of red *Platycodon grandiflorum* extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in splenocytes isolated from mice*

Eun-Jung Park¹, You-Suk Lee¹, Hyun Cheol Jeong², Sung-Hyen Lee³ and Hae-Jeung Lee^{1†}

¹Department of Food and Nutrition, Gachon University, Seongnam, Gyeonggi 13120, Korea

²Food R&D Center, SK Bioland Co., Ltd, Ansan, Gyeonggi 15407, Korea

³National Institute of Agricultural Sciences, Rural Department Administration, Wanju, Jeonbuk 55365, Korea

ABSTRACT

Purpose: *Platycodon grandiflorum* (PG) is known to have effective antimicrobial and anticancer activity. The main bioactive components of PG are saponins, and these could contribute to anti-inflammatory activity. However, little is known about the anti-inflammatory effect of PG. In this study, we aim to assess the anti-inflammatory response to Red PG Extract (RPGE) in splenocytes under *ex vivo* conditions. **Methods:** The cell viability of isolated splenocytes taken from mice was analyzed by performing a Cell Counting Kit-8 assay. The productions of nitric oxide (NO) and cytokines (specifically interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10)) were measured utilizing Griess reagent and ELISA, respectively. **Results:** We found that co-treatment with RPGE and Lipopolysaccharide (LPS) decreased isolated splenocyte proliferation as compared with that of the LPS-stimulated control. We also observed that RPGE markedly suppressed NO synthesis and IL-6 production that was induced by LPS. There were no significant differences of IL-10 production between co-treatment with RPGE plus LPS and treatment with LPS alone. **Conclusion:** When taken together, our data has shown that RPGE mitigates LPS-induced inflammation in splenocytes isolated from mice. Further research is surely needed to confirm the anti-inflammation effects of RPGE in an *in vivo* model.

KEY WORDS: *Platycodon grandiflorum*, anti-inflammatory, splenocytes

서 론

면역은 세균이나 바이러스 같은 내부 및 외부 병원성 물질로부터 신체를 보호하는 인체 방어시스템이다 [1]. 최근 전국적으로 메르스, 독감 등과 같은 전염성 질병과 천식, 크론병과 같은 알레르기성 질환이 증가추세에 있어 [2] 연령과 성별의 구분 없이 면역에 대한 관심이 증가하고 있다.

염증은 감염 또는 손상에 대한 숙주의 초기 면역 반응이며 [3] 문제가 된 자극을 제거하고, 회복을 촉진하며 면역계가 기억하게 하여 추후 같은 감염이 일어났을 때 숙주가

빠른 대처를 할 수 있게 한다 [4]. 염증 반응은 대식세포, 림프구 등 면역세포의 활성화를 일으켜 사이토카인 및 케모카인 등을 분비하는 것으로 시작된다 [5]. 염증은 숙주의 건강에 필수적이나, 염증 매개체의 과잉생산은 많은 급성 및 만성 염증성 질환 (관절염, 암, 뇌졸중, 천식 등)의 병인을 유발할 수 있다 [6].

비장은 초기 면역반응을 담당하는 주요 말초 면역기관으로, 가로막 아래 복부의 왼쪽 윗부분에 위치하고 있다 [7]. 비장은 혈액 유래 항원에 대한 면역반응을 하며, 노화된 적혈구 및 손상된 세포를 제거하는 역할을 수행 한다

Received: May 13, 2019 / Revised: June 3, 2019 / Accepted: June 3, 2019

* This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development (Project No. PJ01381002)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

† To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-31-750-5968, e-mail: skysea@gachon.ac.kr

© 2019 The Korean Nutrition Society

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.

[8]. 비장 세포는 주로 T림프구, B림프구, 대식세포와 같은 다양한 면역세포로 구성되어 있어 [8] 항염증 연구에 적합하게 이용되고 있다.

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성 박테리아의 외막의 주요 구성요소로 포유류의 면역계에 중대한 영향을 미친다 [9]. LPS는 선천면역 반응을 활성화 시켜 interleukin-6 (IL-6)와 같은 pro-inflammatory cytokine을 방출시키는데, 이는 염증을 촉진하여 숙주에게 큰 이익을 준다 [10]. 하지만 앞서 설명하였듯이 사이토카인의 과다 분비는 천식, 아토피 피부염, 호산구 식도염과 같은 다양한 질병의 주요 원인이 될 수 있으므로 [11,12] LPS는 면역반응의 증폭 메커니즘 연구뿐만 아니라, 다양한 항염증 반응 연구에 사용되어져 왔다 [13]. LPS로 유도된 과도한 염증반응을 조절하기 위하여 기능성을 가진 다양한 천연물들이 연구되고 있다 [5]. 현재 식품의약품안전처 인정을 받은 천연물 유래 과민면역반응 개선에 도움을 주는 건강기능식품은 구아바잎 추출물 등 복합물, 다래추출물, 피카오프레토 분말 등 복합물, 소엽추출물의 4종이다.

도라지는 인삼과 마찬가지로 사포닌 함량이 풍부해 예로부터 항균, 항암 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 중국, 일본, 우리나라에서만 유일하게 자생하는 식물로 전국 각지에서 야생하여 다년생 약용으로 사용되어 왔다 [14,15]. 도라지의 항염증 효과에 대한 기능성 연구는 미흡한 실정이나, 도라지의 유효성분인 platycodin D는 LPS와 interferon- γ 에 의하여 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서 nitric oxide (NO)의 생성과 tumor necrosis factor alpha (TNF- α)의 분비를 억제하여 항염증 효과의 가능성을 보였다 [16]. 하지만, 현재까지의 연구에서 비장세포를 활용한 도라지의 항염증 효과를 평가한 연구는 진행된 바 없다.

기능성식품산업에서는 원물 소재의 기능성분을 증가시키기 위한 다양한 가공방법을 시도하고 있다 [17]. 홍도라지는 고려도경의 고 문헌에서 언급된 바와 같이 인삼을 말리고 찌는 과정을 반복한 홍삼의 가공방법과 유사하게 제조하며 붉은 색이 특징이다 [18]. 따라서 본 연구에서는 홍도라지 추출물 (red *Platycodon grandiflorum* extract, RPGE)의 항염증 효능을 알아보기 위하여 LPS로 활성화된 마우스 비장세포에서 NO 생성 및 염증 관련 사이토카인을 측정하였다.

연구방법

실험재료

실험에 사용된 홍도라지 추출물은 생산관리 기준에 따

라 엄격히 관리 및 생산하고 있는 SK바이오랜드 (Ansan, Gyeonggi, Korea)에서 제공받았다. 국내산 생 도라지 뿌리를 2회 세척하여 120분 동안 증숙하고, 이를 24시간 건조하여 다시 90분 증숙하는 것을 9번 반복한 뒤, 72시간 건조하여 홍도라지를 제조하였다. 홍도라지 원료 10 kg과 50% 주정을 원료 대비 15배수 첨가하여 80°C에서 8시간 동안 추출하였다. 1차 추출액을 회수하고 50% 주정으로 80°C에서 8시간 동안 2차 추출하였다. 추출액을 모두 혼합하여 필터프레스 여과하였다. 이를 고형분 60% 이상 감압 농축하고 살균하였다. 추출물은 dimethyl sulfoxide를 용매로 100 mg/mL stock으로 제조하여 각 실험방법에 제시한 농도를 최종농도 (working concentration)로 사용하였다.

HPLC 분석

홍도라지 추출물의 유효성분인 platycodin D를 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)-ELSD (Evaporative Light Scattering Detector, Waters 2424 ELSD, Waters, Milford, MA, USA)로 분석하였다. 컬럼은 Sunfire C18 (3.5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고, 컬럼 온도는 25°C로 설정하였으며, 이동상으로는 0.0015% formic acid (Solvent A, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 아세트오니트릴 (Solvent B, Burdick & Jackson, Morristown, NJ, USA), 메탄올 (Solvent C, Burdick & Jackson, Morristown, NJ, USA)을 사용하여 0.6 mL/min 유속으로 시료 20 μ L를 주입하여 Table 1에 나타낸 gradient 조건으로 분석하였다.

비장세포 분리

5주령의 마우스는 Orient Bio (Seongnam, Gyeonggi, Korea)에서 구입하여 무균적으로 비장을 적출하여 RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA)배지로 씻어준 뒤 분

Table 1. Gradient mobile phase conditions

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Solvent C (%)
0	75	20	5
10	75	20	5
17	72.5	22.5	5
25	72.5	22.5	5
34	71	24	5
42	71	24	5
52	70	25	5
60	70	25	5
67.5	0	50	50
77.5	0	50	50
82.5	75	20	5
90	75	20	5

쇄한 세포를 200 μm cell strainer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 여과하고 원심분리 (4°C, 3,000 rpm, 10 min)하였다. 상층액을 제거한 세포에 적혈구 제거를 위하여 lysing buffer를 넣고 5분 후 원심분리 (4°C, 3,000 rpm, 10 min)하였다. RPMI 1640 배지로 세척하여 원심분리 (4°C, 3,000 rpm, 10 min)하여 비장세포를 얻었다. 본 연구에 사용된 동물실험은 국립농업과학원 동물실험윤리위원회의 승인 (NAS-201807) 후 수행하였다.

비장세포 증식능 측정

마우스 비장세포를 10% FBS RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지에 5.0×10^6 cells/mL의 농도로 96-well plate에 well 당 100 μL 씩 분주한 뒤, 홍도라지 추출물 0.8, 4, 20, 100, 500 $\mu\text{g/mL}$ 단독 또는 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 홍도라지 추출물을 함께 처리하였다. 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양 후에 각 well에 Cell Counting Kit-8 (CKK-8, Dojindo Molecular Technologies, Tokyo, Japan) 용액 10 μL 가하여 2시간 동안 다시 배양하고 Microplate reader (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek Inc., Winooski, VT, USA)로 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric Oxide 측정

마우스 비장세포를 1.6×10^6 cells/mL의 농도로 12-well plate에 well 당 1mL 씩 분주한 뒤, LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)과 홍도라지 추출물을 20, 100, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였다. 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양 후에 상층액을 수거하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 시료를 Griess reagent (Promega, Madison, WI, USA)와 섞어 상온에서 10분간 반응시킨 뒤 coloring solution을 섞고 상온에서 차광하고 10분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. nitrite 표준액을 이용하여 0 ~ 1,000 μM 농도 범위에서 표준곡선을 작성한 후 시료의 nitrite를 계산하였다.

Cytokine 측정

IL-6와 interleukin-10 (IL-10)은 마우스 비장세포에서 Mouse Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 이용하여 제조사의 권고방법대로 측정하였다. 비장세포를 1.6×10^6 cells/mL의 농도로 12-well plate에 well 당 1 mL 씩 분주한 뒤, LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)과 홍도라지 추출물을 20, 100, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였다. 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양 후에 상층액을 수거하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 시료로 사용하였다.

통계분석

통계분석은 Graphpad Prism 5 (Graphpad software, San Diego, CA, USA)를 이용하였다. 실험 결과는 평균 \pm 표준오차 (mean \pm SEM)로 표시 하였으며, One-way ANOVA를 수행하여 사후검증은 Tukey test로 하였고, $p < 0.05$ 인 경우를 유의한 것으로 인정하였다.

결 과

홍도라지 추출물의 유효성분 분석

홍도라지 추출물의 유효성분인 platycodin D의 함유 여부를 확인하기 위하여 HPLC분석을 수행하였다. 표준품과 비교하였을 때, 본 실험에 사용된 홍도라지 추출물에서 platycodin D의 peak가 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 1).

홍도라지 추출물의 LPS로 유도된 비장림프구 증식능 억제 효과

홍도라지 추출물에 의한 비장림프구 증식능 억제 정도를 측정하기 위하여, 마우스 비장 세포를 LPS로 활성화시키고, Fig. 2A에서 나타낸 것과 같이 세포독성이 없는 최

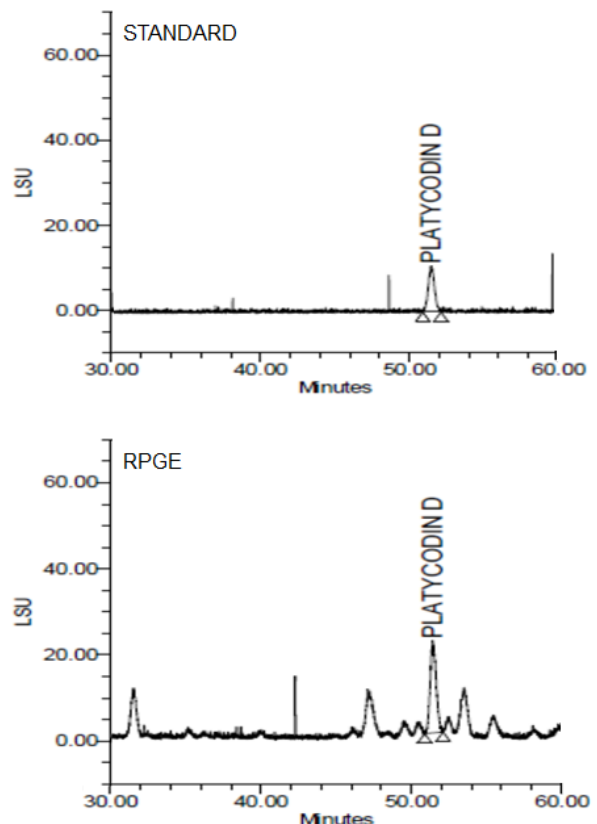
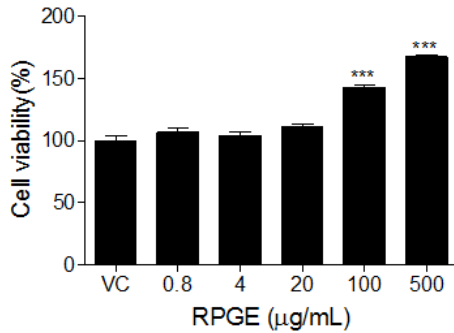


Fig. 1. Chromatograms of active ingredients in Red *Platycodon grandiflorum* Extract (RPGE)

대농도의 홍도라지 추출물을 농도별로 첨가하여 CCK-8 assay로 세포생존율을 측정하였다. LPS를 처리하였을 경우 vehicle control에 비하여 비장세포가 약 3배 이상 증식

하였으며, 홍도라지 추출물 100, 500 $\mu\text{g/mL}$ 을 LPS와 함께 처리 하였을 때, 유의적으로 증식이 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 2B).

(A)



(B)

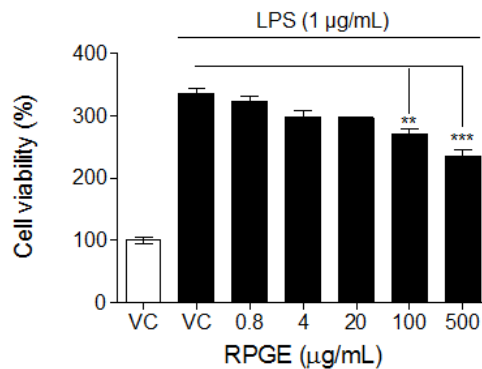


Fig. 2. RPGE reduces LPS-induced cell proliferation in splenocytes. The cells were treated with various concentrations of RPGE for 24 hours in the absence (A) or presence (B) LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Cell viability was measured by CCK-8 assay. LPS, Lipopolysaccharide; VC, vehicle control. The data represents the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

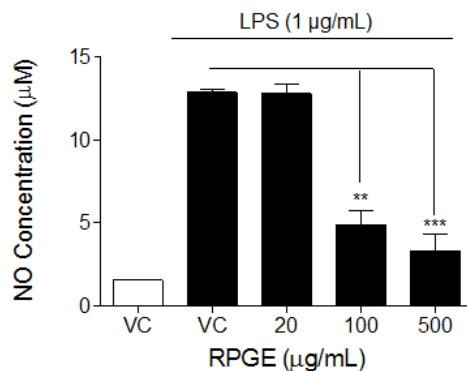


Fig. 3. RPGE inhibits LPS-induced NO synthesis in splenocytes. The cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) and the various concentrations of RPGE for 24 hours. The culture media was collected to measure NO synthesis using Griess reagent. LPS, Lipopolysaccharide; NO, Nitric oxide; VC, vehicle control. The data represents the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

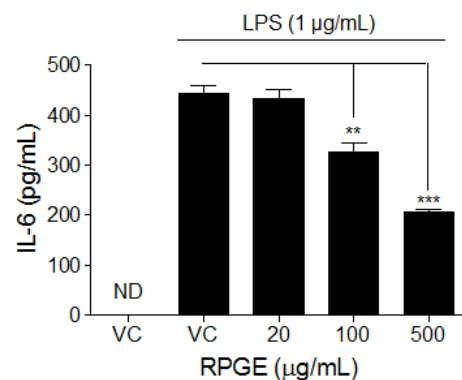
홍도라지 추출물의 LPS로 유도된 NO 생성 억제 효과

홍도라지의 항염증 활성을 NO 생성 억제 여부로 측정하기 위하여 마우스 비장세포에 LPS를 처리하여 NO 생성을 유도하였다. 20, 100, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 홍도라지 추출물을 LPS와 함께 처리하였을 때, LPS에 의해 유도된 NO 생성량이 농도 의존적으로 감소하였다 (Fig. 3). 홍도라지 추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 은 LPS에 의한 비장세포의 NO 생성을 100%로 잡았을 때 62% 감소시켰으며, 홍도라지 추출물 500 $\mu\text{g/mL}$ 은 74% 감소시키는 것으로 나타났다.

홍도라지 추출물의 마우스 비장세포 사이토카인 생성에 미치는 영향

홍도라지 추출물이 비장세포에서 LPS로 유도된 IL-6 생성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 20, 100, 500 $\mu\text{g/mL}$

(A)



(B)

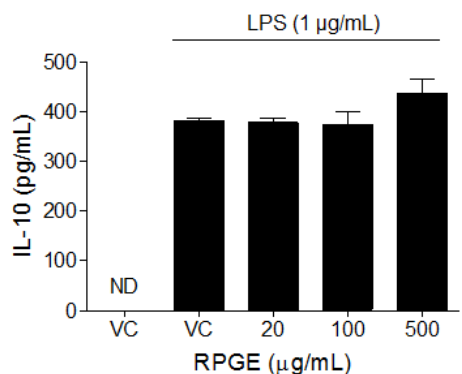


Fig. 4. RPGE modulates LPS-induced cytokine levels in splenocytes. The cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) and the various concentrations of RPGE for 24 hours. The culture media was collected to assess cytokine levels for (A) IL-6 and (B) IL-10. LPS, Lipopolysaccharide; IL, interleukin; ND, not detected; VC, vehicle control. The data represents the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

의 홍도라지 추출물을 LPS와 함께 24시간 동안 처리한 결과 100 µg/mL 이상 농도에서 LPS에 의해 증가한 IL-6 생성이 억제되었다 (Fig. 4A). 같은 방법으로 LPS로 활성화된 비장세포에서 IL-10의 생성 증가에 대한 홍도라지 추출물의 효과를 알아본 결과, LPS에 의한 IL-10의 생성에는 유의적인 변화가 없었다 (Fig. 4B).

고 찰

본 연구의 목적은 *ex vivo* 조건에서 비장세포를 이용하여 홍도라지 추출물의 항염증 효과를 평가하는 것이다. 도라지 (*Platycodon grandiflorum*)는 초롱꽃과 (*Campanulaceae*)의 다년생 작물로 섬유질이 풍부하고 칼륨 및 마그네슘 등 무기질에 많이 함유되어 오래전부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔다 [19]. 항균, 항암 및 감기 예방 효과가 있는 소재로 알려져 있으나 [20] 비장세포에서 항염증 효과를 평가한 연구는 진행된 바 없다. 도라지의 유효성분은 대표적으로 platycodin D가 있으며, 그 이외에도 약 30여 종의 사포닌을 함유하고 있다 [21].

홍삼이 인삼에 비하여 제조과정에서 유효성분이 증가하는 것과 같이 [22], 홍도라지 역시 도라지를 아홉 번 증숙하고 건조시켜 유효성분 함량을 증가시켰고 도라지 특유의 아린 맛을 완화시켰으므로, 홍도라지 추출물은 기능뿐만 아니라 관능적으로 도움이 될 것으로 사료된다.

조혈모세포는 백혈구, 적혈구, 혈소판 등의 림프구를 생산하고, 림프구는 비장으로 들어가 분화되고 성숙하여 방출된다 [23]. 이러한 림프구 중 하나인 T세포는 선천면역과 적응면역에서 매우 중요한 역할을 하는데, 특히 사이토카인 분비를 통해서 면역반응을 활성화 시키는 보조 (Helper) T 세포는 주변 자극에 의해서 Th1 세포와 Th2 세포로 나누어진다 [24]. Th1 세포는 세포매개성 (cell-mediated) 면역반응 활성화 시키고, Th2 세포는 주로 체액성 (humoral) 면역반응에 관여한다 [25]. 단핵구는 골수에서 성숙되는데 조직에서는 대식세포로 분화하게 된다 [26]. 대식세포는 환경 신호에 따라 전통적 방법으로 활성화되는 M1, 대체 방법으로 활성화 되는 M2 등으로 나뉘는데, M1 대식세포는 IL-6 등의 사이토카인, 케모카인, NO등을 분비하여 Th1 세포나 자연살해 (NK)세포를 끌어들여 감염된 세포를 공격하게 하는 반면 M2 대식세포는 항염증 반응으로 Th2 세포를 통해 세포독성 T세포의 기능 억제 및 신생혈관 촉진 등의 작용으로 알레르기 반응이나 암세포의 성장을 돕게 된다 [26,27]. IL-10은 수지상세포와 대식세포에 작용하여 Th1 세포의 염증유발 사이토카인인 IL-6 등의 생성을 억제하는 면역 억제 사이토카인으로 알려져 있다

[28], 또한 IL-10은 IL-10을 생산하는 Treg 세포의 발달을 촉진한다 [29]. 이로 인해 IL-10은 만성 염증질환의 치료제로 이용할 수 있다. 예를 들어, *in vivo*에서 증식시킨 FOXP3-expressing CD4⁺ Treg 세포는 효과 (effector) T 세포의 빈도를 감소시켜 알레르기성 염증으로부터 보호 기작을 유도한다 [30].

본 연구에서 LPS로 유도된 마우스 비장세포에서 NO의 생성 및 IL-6의 분비에 대한 홍도라지 추출물의 효과를 확인한 결과, 홍도라지 추출물 100 µg/mL 이상 농도에서 LPS에 의해 증가한 NO 생성 및 IL-6 분비가 억제되었다. 이는 홍도라지 추출물이 염증성 인자 및 사이토카인의 억제를 통해 항염 효과를 나타내는 것으로 생각된다. 또한 같은 조건에서 홍도라지 추출물에 의한 IL-10의 분비에는 변화가 없었는데, 이로 인하여 염증성 사이토카인인 IL-6의 생성이 억제 되었을 것으로 생각된다. 이러한 결과는 비장세포에서 red cabbage juice의 항염증 효과로 측정된 IL-6, IL-10의 분비양상과 비슷하였다 [31]. 이상의 결과는 LPS로 활성화된 비장세포에서 홍도라지 추출물의 항염증 효과를 처음으로 확인한 것이며, 도라지의 항염증 관련 사이토카인 조절 기작은 IL-6는 억제시키고 IL-10은 변화시키지 않는 것과 관련이 있는 것으로 추정되어 진다. 이를 통해 홍도라지 추출물의 과민면역반응 완화를 위한 건강 기능성 물질로서의 잠재성이 확인된 것으로 사료되며, 나아가 자세한 기전을 밝히기 위한 심도 있는 연구가 진행될 필요성이 있다.

요 약

본 연구에서는 LPS로 활성화된 마우스 비장세포에서 Platycodin D가 함유된 홍도라지 추출물의 항염증 효능을 알아보기 위하여 비장세포 증식능과 NO 생성 및 염증 관련 사이토카인을 측정하였다. 결과를 요약하면 다음과 같다. 1. 마우스 비장세포에 1 µg/mL 농도의 LPS를 처리하였을 때 비장세포의 증식능이 3배 이상 증가하였으며 홍도라지 추출물 처리 시 증가된 증식능이 유의하게 감소되었다. 2. 마우스 비장세포에 1 µg/mL 농도의 LPS를 처리하였을 때 비장세포의 NO생성이 증가하였으며, 홍도라지 추출물 처리 시 농도 의존적으로 증가된 NO생성이 줄어들었다. 3. 마우스 비장세포에 1 µg/mL 농도의 LPS를 처리하였을 때 염증관련 사이토카인 IL-6와 항염증 사이토카인 IL-10 분비가 증가되었으며, 홍도라지 추출물 처리 시 농도 의존적으로 증가된 IL-6의 분비가 감소되었다. IL-10 분비에는 유의적인 차이가 없었다. 위의 결과를 종합하여 볼 때, 본 연구는 홍도라지 추출물이 *ex vivo* 실험

을 통해 항염증관련 인자들의 조절을 통하여 과민면역반응을 효과적으로 억제한다는 근거를 확인하였다. 이에 동물실험과 인체적용시험을 통해 홍도라지 추출물의 과민면역반응 억제 효능에 관한 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

ORCID

박은정: <https://orcid.org/0000-0002-2778-1834>

이유숙: <https://orcid.org/0000-0001-8360-1976>

정현철: <https://orcid.org/0000-0001-5940-0621>

이성현: <https://orcid.org/0000-0002-7886-4752>

이해정: <https://orcid.org/0000-0001-8353-3619>

References

- Kovarik J. From immunosuppression to immunomodulation: current principles and future strategies. *Pathobiology* 2013; 80(6): 275-281.
- Song MR, Kang MH, Park JS, Jo HK. A comparative study of the prevalence of allergic disease between rural and urban elementary school students. *Child Health Nurs Res* 2012; 18(1): 29-35.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 2017; 9(6): 7204-7218.
- Park SO, Han YW, Aleyas AG, George JA, Yoon HA, Eo SK. The kinetics of secondary response of antigen-specific CD4⁺ T cells primed in vitro with antigen. *Immune Netw* 2006; 6(2): 93-101.
- Azab A, Nassar A, Azab AN. Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules* 2016; 21(10): E1321.
- Han HS, Jang E, Shin JS, Inn KS, Lee JH, Park G, et al. Kyungheechunggan-tang-01, a new herbal medication, suppresses LPS-induced inflammatory responses through JAK/STAT signaling pathway in raw 264.7 macrophages. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017; 2017: 7383104.
- Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(8): 606-616.
- Lee CW, Ko EJ, Joo HG. Immunostimulatory effects of BCG-CWS on the proliferation and viability of mouse spleen cells. *Korean J Vet Res* 2012; 52(2): 89-97.
- Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002; 4(8): 837-851.
- Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(4-5): 434-456.
- Matsuda H, Morikawa T, Ando S, Toguchida I, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorg Med Chem* 2003; 11(9): 1995-2000.
- Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med* 2004; 70(2): 93-103.
- Bachus H, Kaur K, Papillion AM, Marquez-Lago TT, Yu Z, Ballesteros-Tato A, et al. Impaired tumor-necrosis-factor- α -driven dendritic cell activation limits lipopolysaccharide-induced protection from allergic inflammation in infants. *Immunity* 2019; 50(1): 225-240.e4.
- Hong MW. Statistical analyses of Platycodi radix prescriptions. *Korean J Pharmacogn* 1975; 19: 177-188.
- Lee SJ, Bang WS, Hong JY, Kwon OJ, Shin SR, Yoon KY. Antioxidant and antimicrobial activities of black Doraji (*Platycodon grandiflorum*). *Korean J Food Preserv* 2013; 20(4): 510-517.
- Wang C, Schuller Levis GB, Lee EB, Levis WR, Lee DW, Kim BS, et al. Platycodin D and D3 isolated from the root of *Platycodon grandiflorum* modulate the production of nitric oxide and secretion of TNF- α in activated RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol* 2004; 4(8): 1039-1049.
- Hwang IG, Woo KS, Jeong HS. Biological activity and heat treatment processing of foods. *Food Sci Ind* 2011; 44(3): 56-65.
- Kim SY, Lee YJ, Park DS, Kim HR, Cho YS. Comparison of quality characteristics of *Platycodon grandiflorum* according to steaming and fermentation. *Korean J Food Preserv* 2015; 22(6): 851-858.
- Lee BJ, Jeon SH, Lee SW, Chun HS, Cho YS. Effect of drying methods on the saponin and mineral contents of *Platycodon grandiflorum* radix. *Korean J Food Sci Technol* 2014; 46(5): 636-640.
- Lee IS, Choi MC, Moon HY. Effect of *Platycodon grandiflorum* A. DC extract on the bronchus diseases bacteria. *Korean J Biotechnol Bioeng* 2000; 15(2): 162-166.
- Nyakudya E, Jeong JH, Lee NK, Jeong YS. Platycosides from the roots of *Platycodon grandiflorum* and their health benefits. *Prev Nutr Food Sci* 2014; 19(2): 59-68.
- Nam KY. The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs, processed ginsengs (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *J Ginseng Res* 2005; 29(1): 1-18.
- Birbrair A, Frenette PS. Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 2016; 1370(1): 82-96.
- O'Garra A, Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* 2000; 10(12): 542-550.
- Lappin MB, Campbell JD. The Th1-Th2 classification of cellular immune responses: concepts, current thinking and applications in haematological malignancy. *Blood Rev* 2000; 14(4): 228-239.
- Mulder R, Banete A, Basta S. Spleen-derived macrophages are readily polarized into classically activated (M1) or alternatively activated (M2) states. *Immunobiology* 2014; 219(10): 737-745.
- Tugal D, Liao X, Jain MK. Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33(6): 1135-1144.
- Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(4): 271-283.
- O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing

- and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004; 114(10): 1372-1378.
30. Chauhan SK, Saban DR, Lee HK, Dana R. Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. *J Immunol* 2009; 182(1): 148-153.
31. Lin JY, Li CY, Hwang IF. Characterisation of the pigment components in red cabbage (*Brassica oleracea* L. var.) juice and their anti-inflammatory effects on LPS-stimulated murine splenocytes. *Food Chem* 2008; 109(4): 771-781.