

효소 처리에 따른 당귀·천궁·작약 유래 다당체의 정제 및 면역활성 평가

최은진 · 신지은 · 김상백 · 김주경 · 박수빈 · 김용무*

콜마비앤에이치

Immunomodulatory Effects of Enzymatically Purified Polysaccharides Derived from *Angelica gigas*, *Cnidium officinale*, and *Paeonia lactiflora*

En Jin Choi, Ji Eun Shin, Sang Back Kim, Ju Gyeong Kim, Su Bin Bak, and Yong Mu Kim*

Kolmar BNH Co., Ltd., 61, Heolleung-ro 8-gil, Seocho-gu, Seoul 06802, Korea

Abstract – The present study focused on characterizing the structural changes induced by enzymatic treatment and fractionation in polysaccharides originating from *Angelica gigas*, *Cnidium officinale*, *Paeonia lactiflora*, and a mixture of these herbal extracts, and on evaluating the resulting immunomodulatory activities. Using hot-water extraction, crude polysaccharides were obtained, and the homogalacturonan (HG) portions considered inactive were selectively broken down through enzymatic hydrolysis with endo-polygalacturonanase. The enzyme-treated polysaccharides were subsequently separated using Sephadex G-75 gel filtration chromatography, resulting in the purified fractions HHE-I, AGE-I, COE-I, and PLE-I. Compositional profiling showed that the purified polysaccharides were rich in arabinose, galactose, rhamnose, and galacturonic acid, a pattern characteristic of rhamnogalacturonan-I (RG-I) type structures. The enzymatic treatment shifted the polysaccharide composition toward RG-I-rich structures by removing inactive starch and HG elements. When evaluated in murine peritoneal macrophages and splenocyte cultures, the purified high-molecular-weight RG-I fractions induced strong, dose-dependent upregulation of cytokines such as IL-6, IL-12, TNF- α , IL-10, and IFN- γ . In vivo treatment with the purified fractions led to a pronounced increase in NK cell-mediated cytotoxicity, demonstrating an enhancement of about two- to five-fold compared with the control group. These observations imply that reducing HG content while enriching RG-I motifs strengthens immune regulation via TLR4-associated recognition pathways, resulting in harmonized activation of innate and adaptive immune responses. Taken together, these findings highlight that RG-I type polysaccharides, obtained via enzymatic purification from *Angelica gigas*, *Cnidium officinale*, and *Paeonia lactiflora*, may serve as effective natural immunomodulators and valuable candidates for functional food applications.

Keywords – Polysaccharides, Enzymatic purification, Rhamnogalacturonan-I, Immunomodulatory activity

현대 의학의 발전은 항생제와 같은 치료제의 개발로 감염성 질환을 극복하는 데 큰 기여를 하였으나, 만성 대사성 질환 및 면역 관련 질환과 같은 현대적 건강 문제의 증가로 인해 새로운 치료 방식에 대한 요구가 증가하고 있다.^{1,2)} 특히, 체내 면역계를 활성화하여 질환 예방과 치료를 가능하게 하는 면역조절제의 활용은 의약품과 건강기능식품의 주요 연구 분야로 떠오르고 있다.³⁾ 이러한 면역조절제는 기존 합성

의약품의 부작용 문제를 완화할 수 있어 주목받고 있다.⁴⁾

당귀(*Angelica gigas*)는 산형과(Umbelliferae)에 속하는 *Angelica*속 식물로서 주로 뿌리 약재로 사용하며, 민간요법으로 빈혈증, 부인병 약으로 통경과 산후 진정에 유효하게 쓰이는 생약이다. 보혈, 화혈, 지통 작용으로 월경부조, 혈허, 두통, 타박상에 이용된다. 참당귀의 효능 성분은 decursin, decursinol, nodakenetin, umbelliferon, β -eudesmol, α -pinene, elemol, limonene 등의 성분이 함유되어 있으며, 이들 성분은 진정, 진통, 자궁기능조절, 이뇨, 항균작용 등 다양한 약리활성과 관련되는 것으로 보고되고 있다.^{5,6,27,28)} 천궁(*Cnidium*

*교신저자(E-mail): cej@kolmarbnh.co.kr, yongmu73@kolmarbnh.co.kr

officinale)은 다년생 초본으로 산형과(Umbelliferae)에 속하는 식물로서 주로 뿌리 줄기를 약재로 사용하며, 한방에서는 두통, 빈혈, 월경불순, 불임과 같은 부인과 질환에 사용되어 왔으며, 다양한 연구를 통해 항산화, 소염, 진통, 진경, 항균 작용, 염증 완화, 항암 및 혈관신생억제에 효과가 알려져 있다. 천궁의 효능 성분으로는 tetramethylpyrazin, ligustilide, cnidilide, neocnidilide, caffeic acid, ferulic acid, perlolyrine 등이 있다. Ligustilide의 경우 난소암, 골관절염, 알츠하이머, 당뇨병 신장병에 효능이 있는 것으로 알려져 있다.^{7-9,29)} 작약(*Paeonia lactiflora*)은 작약과(Paeoniaceae)에 속하는 식물로 토혈, 어혈, 진통, 복통, 월경 및 빈혈 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 작약의 효능 성분으로는 paeoniflorin, albiflorin, gallic acid, paeonol, oxipaeoniflorin, benzolopaeoniflorin 등이 있다. 항암, 항염, 신경 보호 간세포 보호, 항경련, 항바이러스 신경 보호, 진정 효과가 있다.^{10,11)} 천궁, 당귀 및 작약 및 복합 추출물은 면역기능 개선 효과를 지닌 것으로 알려져 있다. 생약재 복합 추출물은 각 생약재들의 단일 추출물의 효과보다 우수한 면역활성을 나타냈으며, 이러한 효과는 구성 성분인 저분자 화합물과 고분자 다당체의 작용에 의한 것으로 사료된다.¹²⁻¹⁷⁾

천연물에서 유래된 다당체는 면역 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 선천 면역세포인 대식세포에서 IL-6, IL-12과 종양괴사인자(TNF- α) 등의 사이토카인 분비를 유도할 수 있다.¹⁸⁻²²⁾ 면역 증진은 외부로부터 체내를 보호하는 방어 메커니즘을 강화하여 종양 및 병원성 미생물로부터 몸을 보호하는 저항력을 높여준다.²³⁻²⁵⁾ 또한 당귀, 천궁, 작약은 각각 다양한 약리 효과를 지니지만, 이들 조합을 통해 나타나는 면역 활성화의 증대는 단일 성분의 효과를 뛰어넘는 결과를 보여주었다.¹²⁻¹⁷⁾

본 연구에서는 당귀, 천궁, 작약의 개별추출물과 복합 추출물 원료의 면역활성을 높이기 위해 효소처리를 통해 다당체를 분리, 정제하였다. 이들이 지닌 면역 활성화 기전과 시너지 효과를 확인하여, 다당체의 화학적 특성이 면역 활성화에 미치는 영향을 분석하였다. 또한, 당귀, 천궁 및 작약 유래 다당체가 대식세포 활성화, 비장세포 증식, 자연 살해 세포(NK cell) 활성화 증가에 미치는 다양한 면역학적 효과를 확인하여 원료의 효능을 검증하고 건강기능식품 소재로의 활용 가능성을 논의하였다. 이를 통해, 당귀, 천궁, 작약 유래 천연 원료의 면역조절제 개발에 활용 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

천연 추출물 제조 – 당귀(*Angelica gigas* Nakai), 천궁(*Cnidium officinale* Makino), 작약(*Paeonia lactiflora* Pallas)은 근오농림 영농조합 법인(경기 여주)에서 구입하였으며, 생약 복합추출물은 당귀, 천궁, 작약을 동일 비율 1:1:1 (w/w)로

혼합하였다. 각각의 천연물들은 끓는 물에서 4시간 추출하여 추출물을 얻고 절반에 에탄올 침전을 실시하여 수용성 다당체 분획을 분리하였다. 이렇게 얻은 다당체 분획은 천궁·당귀·작약 및 복합추출물의 조다당 시료(AGW-P, COW-P, PLW-P, HHW-P)로 명명하였다.

효소처리에 의한 시료의 비활성 부위 제거 및 정제 – 당귀·천궁·작약 및 복합추출물의 조다당 시료(AGW-P, COW-P, PLW-P, HHW-P)를 0.2 N NaOH에 용해하여 12시간 방치함으로써 de-esterification하였다. 이후 HCl로 pH를 endopolygalacturonanase의 최적 반응 pH인 6으로 조정하였다. 이어서 1,000 unit의 효소를 처리하여 50℃에서 72시간 반응시킨 뒤, 100℃에서 10분 가열하여 효소 반응을 종결하였다.

원심분리(6,000 rpm, 15 min, 4℃)하여 침전된 효소와 반응액을 분리하였고, dialysis tubing bag(MW-cut off: 14,000 Da)으로 3일 투석하여 효소 반응을 통해 생성된 저분자 단편을 제거하였다. 마지막으로 농축 및 동결건조를 통해 효소 처리 조다당(HHE-0, AGE-0, COE-0, PLE-0)을 얻었다.

오픈컬럼을 이용한 효소처리된 조다당의 분획 – 효소처리 조다당(AGE-0, COE-0, PLE-0, HHE-0)은 Sephadex G-75 resin을 사용한 오픈컬럼으로 분리하였다. Swelling된 Sephadex G-75 resin을 오픈 컬럼(diameter 2.5 cm, length 90 cm)에 packing하고 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)로 평형화하였다. 각 효소처리 조다당 시료를 loading하여 100 개의 fraction으로 분리하였으며, 각 fraction의 중성당, 산성당, 단백질, KDO (2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid) 등의 구성 성분을 분석하여 분자량이 상이한 세 개의 정제획분으로 분리하였다. 분획 샘플을 HHE-0는 HHE-I, -II 및 -III로, AGE-0는 AGE-I, -II 및 -III로, COE-0는 COE-I, -II 및 -III로, PLE-0는 PLE-I, -II 및 -III로 명명하였다.

추출물 다당체 및 효소처리 정제다당 획분의 화학적 특성 평가 – 구성당 분석은 HPLC 시스템(LC-20AD, Shimadzu)을 사용하였다. UV/VIS detector (SPD-20A, Shimadzu)를 장착하였고, AcclaimTM TM 120 C18 column (4.6×250 mm, Thermo Scientific)에서 분리하였다. Column 온도는 30℃로 유지하였으며, flow rate는 1.0 mL/min이었다. Eluent는 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.7)와 acetonitrile을 82:18(v/v)로 혼합하여 사용하였다. Injection volume은 10 μ L였고, wavelength 254 nm에서 검출하였다. 데이터 적분 및 정량은 Shimadzu data module을 이용하였다.

대식세포 및 비장세포의 면역 활성화 평가 – 당귀·천궁·작약 및 복합추출물의 효소처리 및 정제 과정을 통해 얻어진 총 20종의 다당 시료를 대상으로 대식세포 및 비장세포 면역활성을 측정하였다. BALB/c 마우스로부터 복강 유래 대식세포 및 비장세포를 회수한 후 다양한 농도로 용해된 시료를 함께 처리하였다. 이후 대식세포는 24시간, 비장세포는 96시간 배양한 뒤 상등액을 채취하여 ELISA kit로 사이토카인을

측정하였다(대식세포 IL-6, IL-12, TNF- α ; 비장세포 IL-10, IFN- γ).

자연살해세포(NK)의 면역 활성 평가 - 0.5, 5, 50 mg/kg의 시료를 BALB/c 마우스 미정맥에 투여하여 NK 세포 활성을 유도하였다. 세포 회수 3일 전과 1일 전 총 2회 정맥 주사하였으며, 실험 당일 비장세포를 획득한 뒤 YAC-1 cell과 co-culture하여 NK 세포의 세포 용혈효과를 비교·분석하였다 (5% CO₂, 36.5°C, 6 h, E/T 10:1 및 20:1).

통계처리방법 - 모든 실험은 독립적으로 3회 이상 반복하였다. 측정값은 평균±표준편차(SD)로 표시하였다. SPSS Statistics (ver. 26.0, IBM)를 이용하여 one-way ANOVA로 구간 차이를 분석하였고, 유의한 차이가 관찰된 경우 Duncan's multiple range test 또는 Tukey's post-hoc test로 집단 간 평균값 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

효소처리에 따른 당귀, 천궁, 작약 및 생약복합추출물의 비활성 부위 제거 및 정제 - 식물 유래 다당체 중 pectin은 비활성 부위 homogalacturonan (HG) region과 활성 부위 rhamnogalacturonan (RG)-I과 RG-II region을 지니고 있다 (Fig. 1).²⁶⁾ 비활성 부위인 HG region을 제거하여 시료내 RG의 상대적인 함량을 증가시켜 생리활성을 높였다. 당귀, 천궁,

작약 및 생약 복합추출물의 조다당 시료(AGW-P, COW-P, PLW-P 및 HHW-P)를 효소처리하고, 농축 및 동결건조하여 얻은 효소처리 조다당 시료(AGE-0, COE-0, PLE-0 및 HHE-0)의 size exclusion chromatography를 통해 성분 변화를 확인하기 위해 HPLC를 이용하여 분리하였다. 실험 결과, 모두 효소처리 전에 비해 저분자획분이 상대적으로 증가한 것으로 HG가 분해되었음을 시사한다(Fig. 2).

당귀, 천궁, 작약 및 생약 복합추출물의 효소처리된 조다당 시료(AGE-0, COE-0, PLE-0 및 HHE-0)를 구성하는 성분을 분석하기 위해 오픈컬럼으로 100개의 분획으로 분리하고 중성당, 산성당, 단백질, KDO와 같은 구성 성분을 분석하여 시료를 분자량이 상이한 3개의 정제획분으로 분리하여 평가하였다.

생약 복합추출물 조다당(HHW-P)을 효소 처리하여 획득한 HHE-O의 성분을 분석하고자 오픈 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 총 100개의 분획으로 분리하였다. 이후 HPLC 분석을 통해 분자량 차이에 따라 3개의 주요 정제획분(HHE-I, HHE-II, HHE-III)을 확보하였으며, 이들의 elution pattern을 확인하였다. 분석 결과, 각 획분은 순차적으로 고분자, 중분자, 저분자 물질임이 밝혀졌으며, 이 중 고분자 획분인 HHE-I이 가장 우수한 순도로 정제되었음을 확인하였다(Fig. 3a).

당귀 유래 조다당(AGW-P)을 효소 처리하여 얻은 AGE-0도 동일한 분리, 정제하였으며, AGE-I, -II 및 -III로 각각은 elution

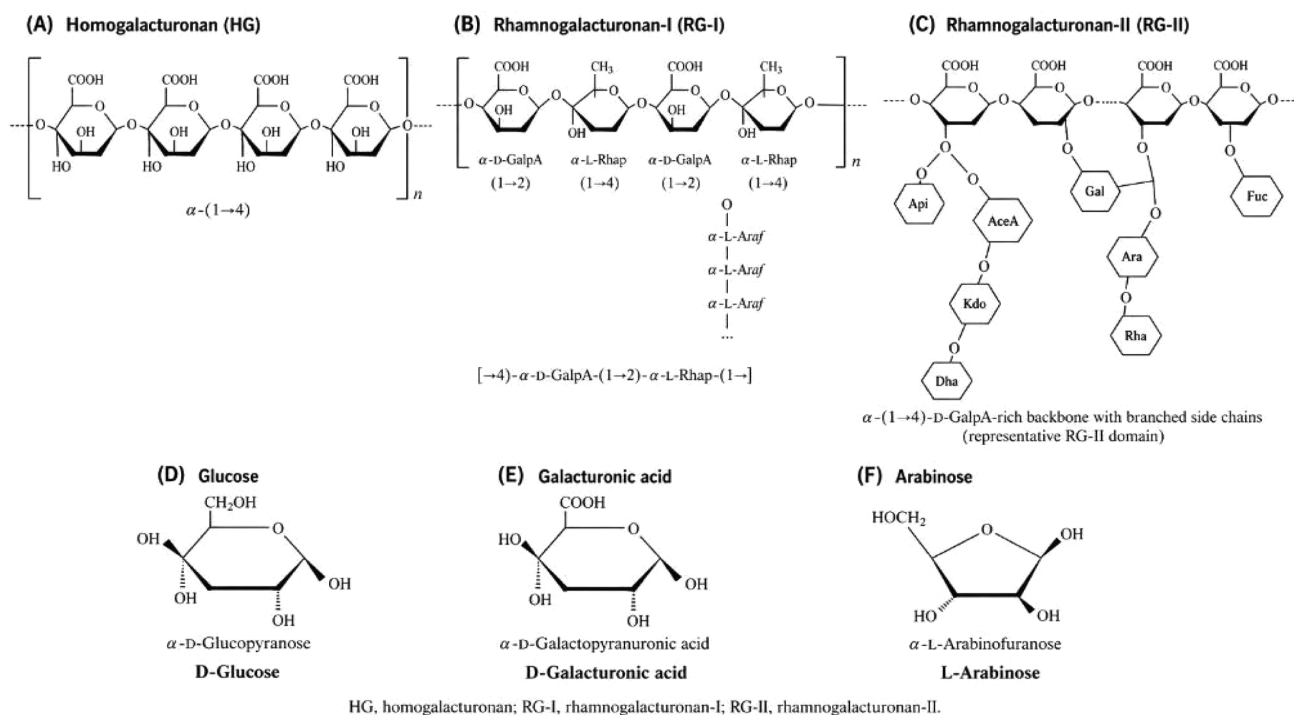


Fig. 1. Representative structures of pectic polysaccharides and major constituent monosaccharides. Schematic structures of homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan-I (RG-I), rhamnogalacturonan-II (RG-II), glucose, galacturonic acid, and arabinose.

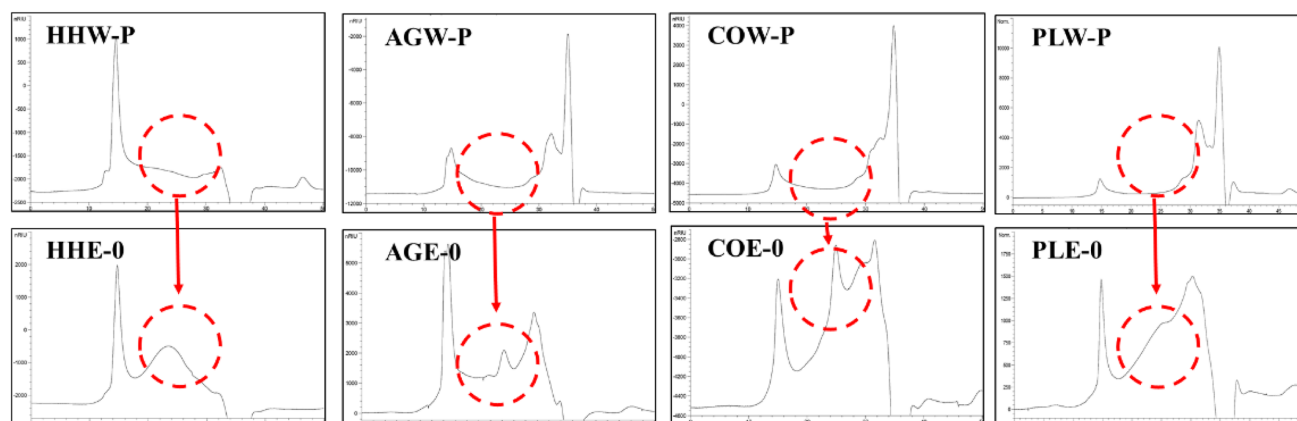


Fig. 2. Elution patterns of crude polysaccharide samples (AGW-P, COW-P, PLW-P and HHW-P) and enzyme treated polysaccharide samples (AGE-0, COE-0, PLE-0 and HHE-0).

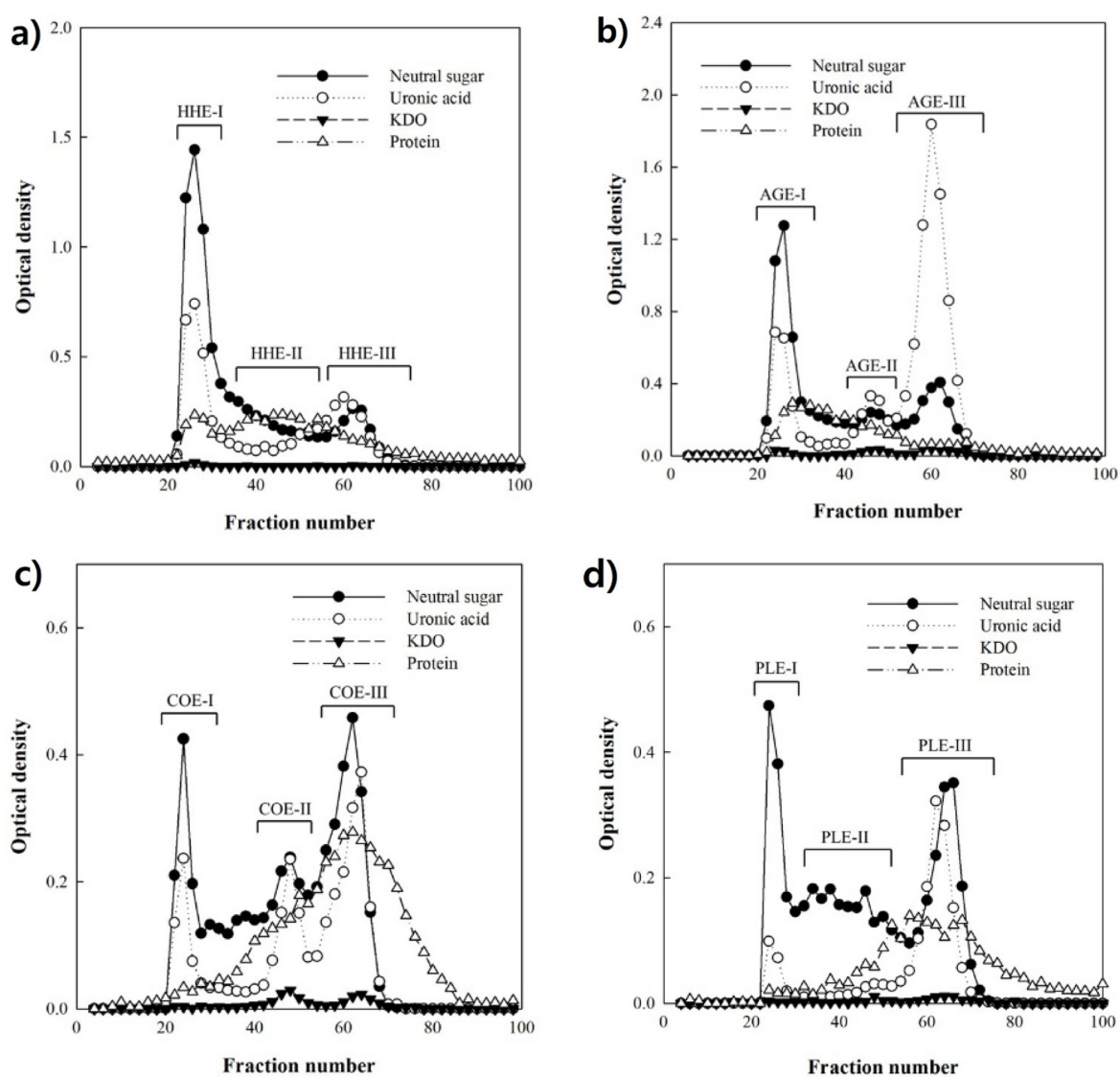


Fig. 3. Elution profiles of neutral sugar, uronic acid, KDO, and protein in polysaccharide fractions from HHE-0, AGE-0, COE-0, and PLE-0.

pattern이 각각 고분자, 중분자, 저분자가 차지하는 비율이 높은 것을 확인하였다(Fig. 3b).

천궁 유래 조다당(COW-P)을 효소 처리하여 얻은 COE-0도 동일방법으로 정제하여 3개의 정제획분으로 분리하였으며, COE-I, -II 및 -III이 각각 고분자, 중분자, 저분자가 차지하는 비율이 높은 것을 확인하였다(Fig. 3c).

작약 유래 조다당(PLW-P) 효소 처리하여 얻은 PLE-0를 정제하여 PLE-I, -II 및 -III이 각각 고분자, 중분자, 저분자가 차지하는 비율이 높은 것을 확인하였다(Fig. 3d).

효소처리에 따른 당귀, 천궁, 작약 및 생약 복합추출물

유래 다당류의 면역 특성 변화 – 당귀, 천궁, 작약 및 생약 복합추출물 및 효소처리 및 정제 과정을 통해 얻어진 총 20종의 다당 시료들을 면역 특성을 평가하기 위해 대식세포, 비장세포 및 자연살해세포(NK cell) 활성을 측정하였다.

당귀 유래 5종의 다당류(AGW-P, AGE-0, AGE-I, -II, -III)는 대식세포에서 1000 µg/mL까지 독성은 나타나지 않았다(Fig. 4a). AGW-P는 100 µg/mL 이상의 농도에서만 IL-6, -12 및 TNF-α 분비를 증가시켰으며, 효소 처리된 AGE-0는 10 µg/mL 농도부터 사이토카인 분비 효과를 증가시켰다. 또한, AGE-I, -II 및 -III 모두 우수한 사이토카인 분비능을 나타냈다(Fig.

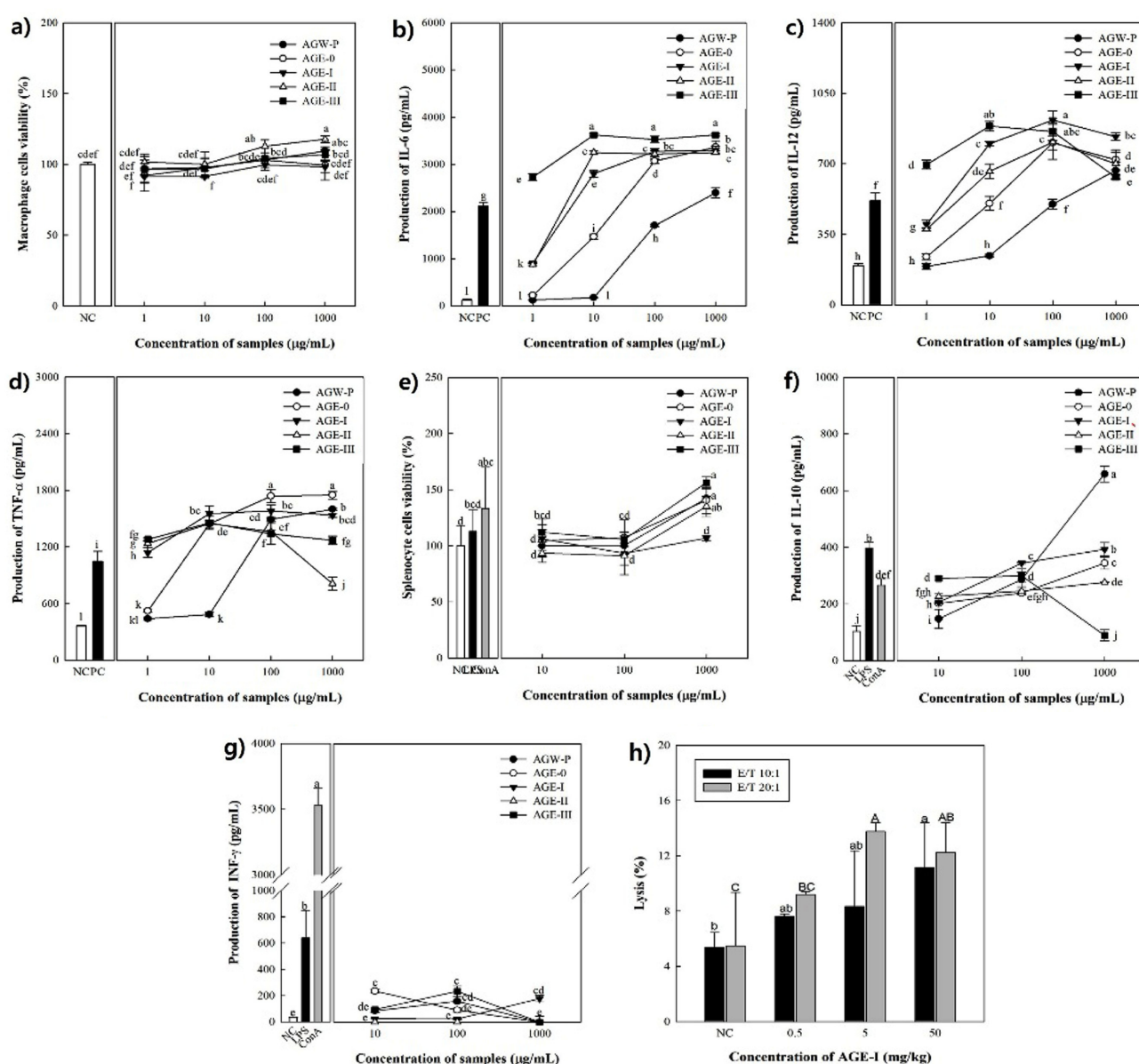


Fig. 4. Immunostimulatory activity of *Angelica giga*-derived polysaccharides and fractions. Macrophage viability (a), production of IL-6 (b), IL-12 (c), and TNF-α (d) in macrophages, splenocyte viability (e), production of IL-10 (f) and IFN-γ (g) in splenocytes, and tumor cell lysis following tail vein injection of AGE-I (h).

4b-d). 비장세포에서, 당귀 유래 5종의 다당류 모두 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 독성이 나타나지 않았다(Fig. 4e). 그리고 저분자획분이 포함되어 있는 AGW-P, AGE-0, AGE-II 및 AGE-III는 농도 의존적인 비장세포 증식 효과를 나타냈으며, 고분자획분인 AGE-I은 뚜렷한 비장세포 증식 효과를 나타내지 않았다. 사이토카인 분비에서, AGW-P와 AGE-0는 IL-10 분비를 증가시켰으나, IFN- γ 분비에는 영향을 미치지 않았고, AGE-I은 두 사이토카인의 분비량을 크게 증가시켰으며, AGE-II 및 AGE-III는 그 효과가 미미했다(Fig. 4f,g). 종합적으로 효과가 우수한 AGE-I으로 자연살해세포 활성화 효과를 확인하고자

하였다. 앞선 대식세포 및 비장세포 활성화에 주요 역할을 하는 당귀 유래 다당류들 중 AGE-I으로 자연살해세포의 증양세포 사멸 효과를 확인하였다. AGE-I은 농도 의존적인 자연살해세포 활성화 효과를 나타냈으며, 5 및 50 mg/kg 을 투여한 실험군에서 PBS만을 투여한 음성대조군 대비 약 2배 이상의 효과를 나타냈다(Fig. 4h). 결론적으로, AGE-I은 대식세포와 비장세포의 면역활성을 대변하는 사이토카인 분비를 유도할 뿐만 아니라 생체 내 투여 시, 자연살해세포의 증양세포 사멸효과를 증가시키는 것을 확인하였다.

천궁 유래 5종의 다당류들(COW-P, COE-0, COE-I, -II, -III)은

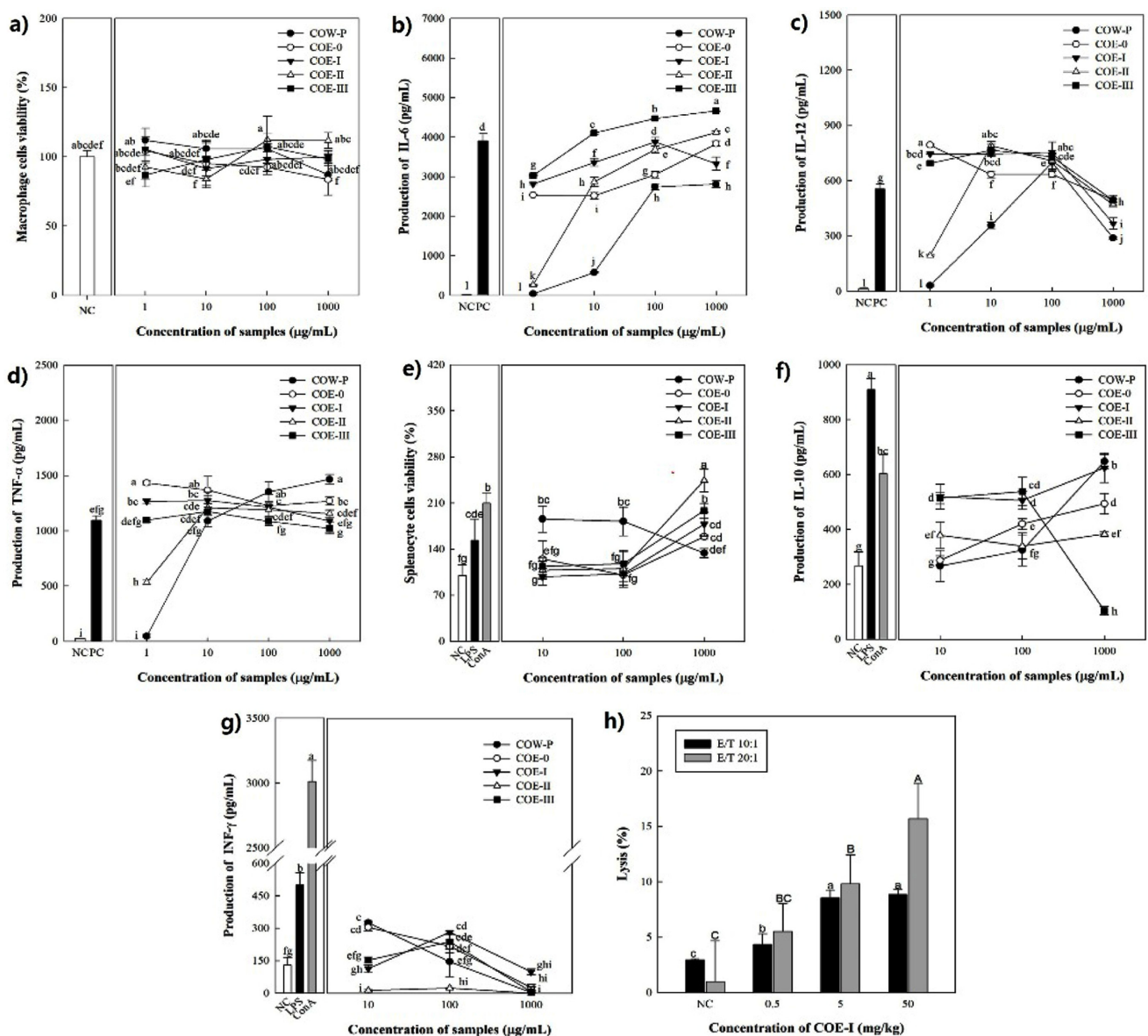


Fig. 5. Immunostimulatory activity of *Cnidium officinale*-derived polysaccharides and fractions. Macrophage viability (a), production of IL-6 (b), IL-12 (c), and TNF- α (d) in macrophages, splenocyte viability (e), production of IL-10 (f) and IFN- γ (g) in splenocytes, and tumor cell lysis following tail vein injection of COE-I (h).

대식세포에서 1000 $\mu\text{g/mL}$ 까지 독성이 나타나지 않았다(Fig. 5a). COW-P는 10 $\mu\text{g/mL}$ 부터 IL-6, -12 및 TNF- α 분비를 증가시켰으며, 효소처리된 COE-0는 1 $\mu\text{g/mL}$ 부터 사이토카인 분비 효과가 나타났다. COE-I, -II 및 -III 모두 우수한 사이토카인 분비능을 나타냈으며, COE-I은 가장 우수한 효과를 나타냈다(Fig. 5b-d). 비장세포에서, 천궁 유래 5종의 다당류들은 1000 $\mu\text{g/mL}$ 까지 독성을 나타내지 않으며 모든 시료에서 비장세포 증식효과를 보였다(Fig. 5e). COW-P와 COE-0은 농도 의존적으로 IL-10 분비량은 증가시켰으나, IFN- γ 분비량은 감소시켰다. COE-I은 IL-10과 IFN- γ 분비에 우수한 활성을 나타냈으며, COE-II 및 COE-III는 상대적으로 미미한 효과를 보였다(Fig. 5f-g). 앞선 대식세포 및 비장세포 활성

화에 주요역할을 하는 COE-I의 자연살해세포의 종양세포 살해 효과를 확인하였다. COE-I은 농도 의존적으로 자연살해세포 활성 효과를 나타냈으며, 0.5, 5 및 50 mg/kg에서 PBS만을 투여한 음성대조군 대비 각각 2배, 3배, 5배 이상의 효과를 나타냈다(Fig. 5h). 결론적으로, COE-I은 대식세포와 비장세포의 면역활성을 대변하는 사이토카인 분비를 유도할 뿐만 아니라 생체 내 투여 시, 자연살해세포의 암세포 사멸 효과를 증가시키는 것을 확인하였다.

작약 유래 5종의 다당류(PLW-P, PLE-0, PLE-I, -II, -III)은 대식세포에서 1000 $\mu\text{g/mL}$ 까지 독성이 나타나지 않았다(Fig. 6a). PLW-P는 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 IL-6, -12 및 TNF- α 분비량을 증가시켰으며, 효소 처리된 PLE-0는 1 $\mu\text{g/mL}$ 부터

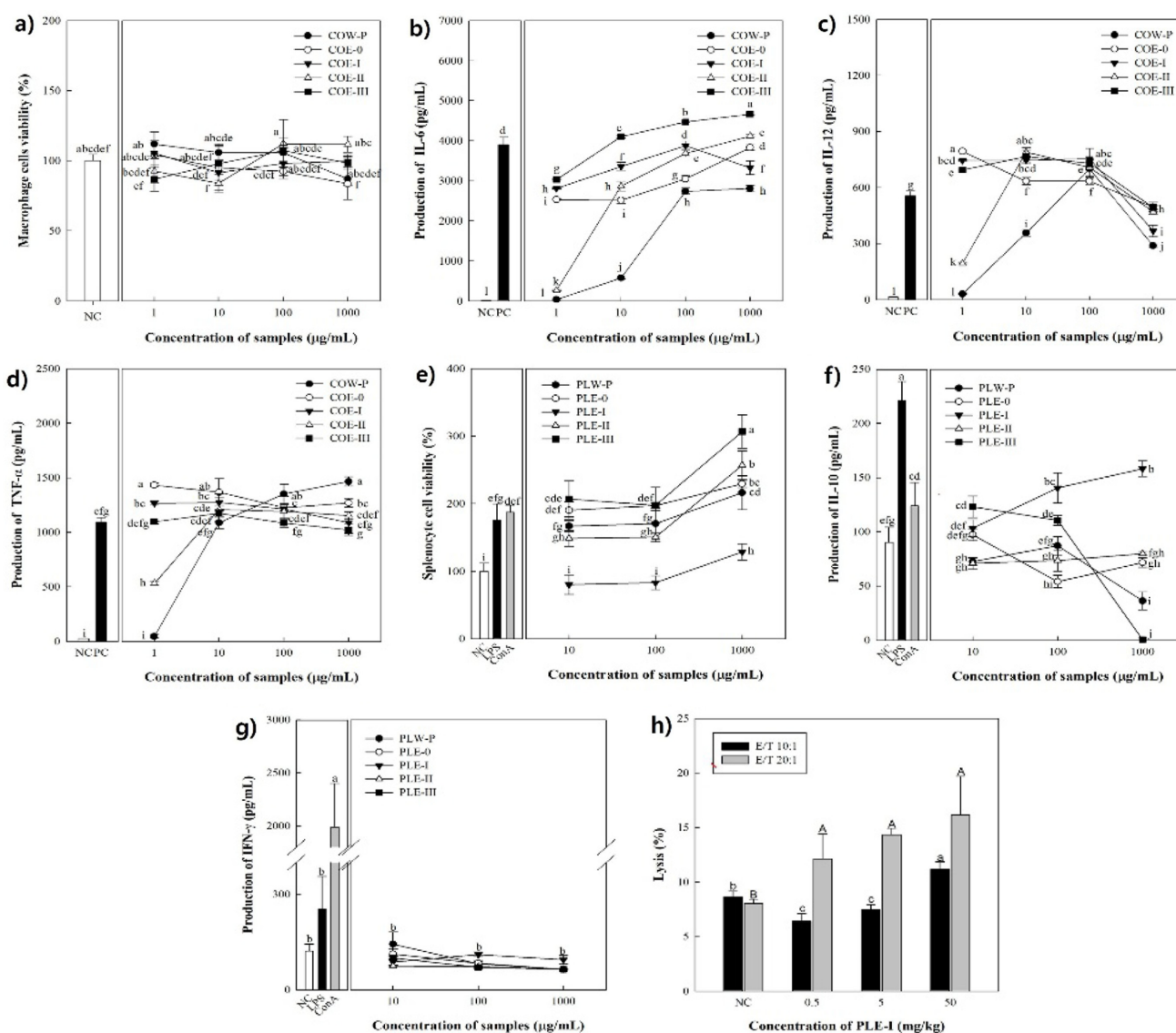


Fig. 6. Immunostimulatory activity of *Paeonia lactiflora*-derived polysaccharides and fractions. Macrophage viability (a), production of IL-6 (b), IL-12 (c), and TNF- α (d) in macrophages, splenocyte viability (e), production of IL-10 (f) and IFN- γ (g) in splenocytes, and tumor cell lysis following tail vein injection of PLE-I (h).

사이토카인 분비가 증가하였다. 정제된 분획분 PLE-I, -II 및 -III은 모두 우수한 사이토카인 분비능을 나타냈다(Fig. 6b-d). 비장세포에서 작약 유래 5종의 다당류들은 1000 $\mu\text{g/mL}$ 까지 독성을 나타내지 않았다(Fig. 6e). 그리고 PLE-I을 제외한 모든 시료에서 비장세포 증식 효과가 나타났다. 사이토카인 평가에서, PLW-P와 PLE-0는 IL-10에서 효과가 없었으나, PLE-I은 농도 의존적으로 IL-10 분비량을 증가시켰다. 반면에 작약 유래 5종의 다당류 모두 IFN- γ 의 분비에는 효과가 없었다(Fig. 6f-g). 앞선 대식세포 및 비장세포 활성화에 주요 역할을

하는 PLE-I의 자연살해세포의 종양세포 사멸 효과를 확인하였다. PLE-I는 농도 의존적인 자연살해세포 활성화 효과를 나타냈으며, 5 및 50 mg/kg에서 PBS만을 투여한 음성대조군 대비 약 2배 이상의 효과를 나타냈다(Fig. 6h). 결론적으로, PLE-I는 대식세포와 비장세포의 면역활성을 대변하는 사이토카인 분비를 유도할 뿐만 아니라 생체 내 투여 시, 자연살해세포의 암세포 사멸 효과를 증가시키는 것을 확인하였다.

생약 복합추출물 유래 5종의 다당류들(HHW-P, HHE-0, HHE-I, -II, -III)은 대식세포에서 1000 $\mu\text{g/mL}$ 까지 독성이 나

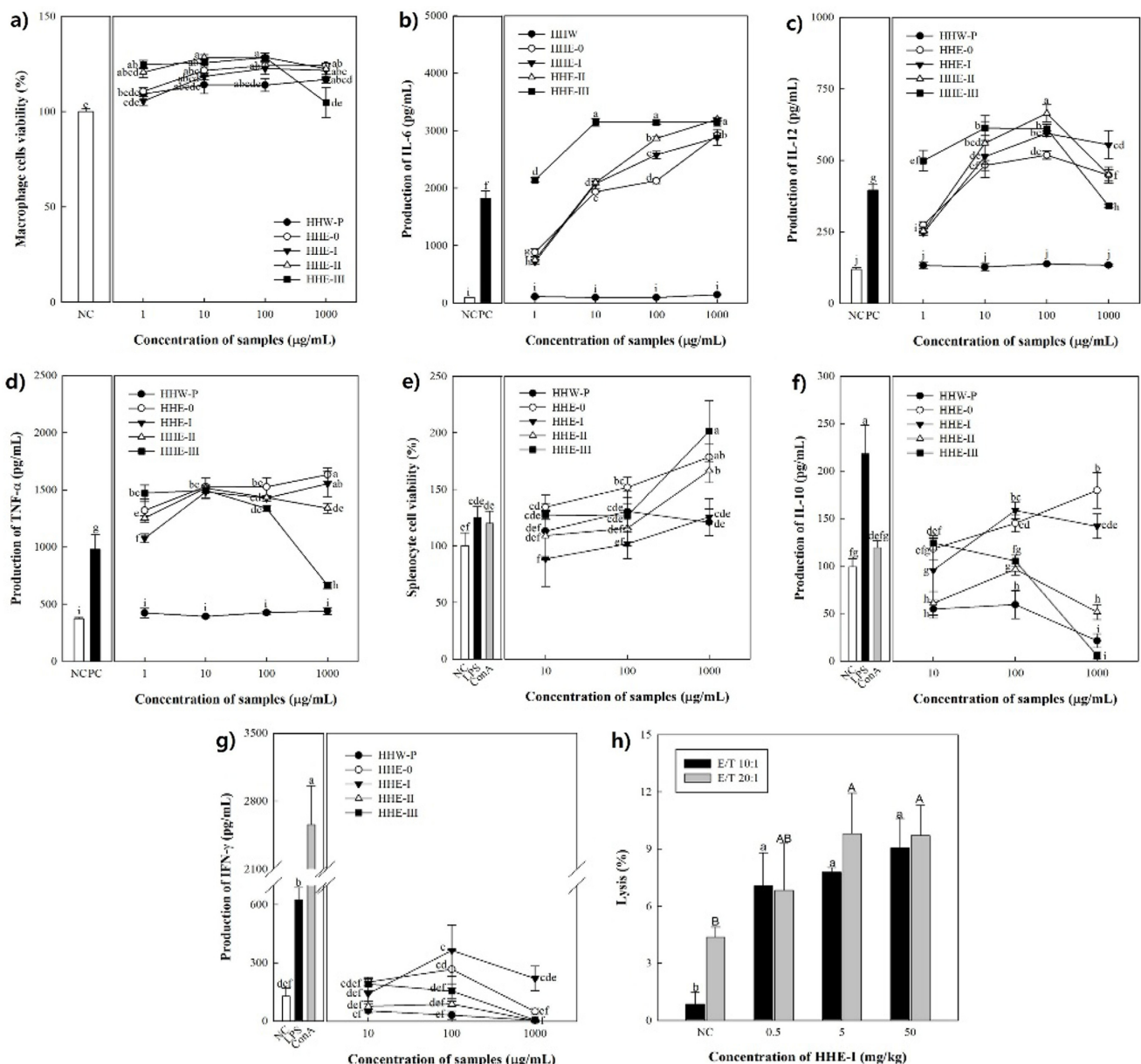


Fig. 7. Immunostimulatory activity of *Herbal mixture*-derived polysaccharides and fractions. Macrophage viability (a), production of IL-6 (b), IL-12 (c), and TNF- α (d) in macrophages, splenocyte viability (e), production of IL-10 (f) and IFN- γ (g) in splenocytes, and tumor cell lysis following tail vein injection of HHE-I (h).

타나지 않았다(Fig. 7a). HHW-P는 IL-6, -12 및 TNF- α 분비에 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 관찰되었으나 효소처리된 HHE-0는 사이토카인 분비가 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 7b-d). 또한, HHE-I, -II 및 -III 모두 우수한 사이토카인 분비능을 갖는 것으로 확인되었다.

비장 세포에서, 생약 복합추출물 유래 다당류들은 1000 $\mu\text{g/mL}$ 까지 비장세포에서 독성을 나타내지 않았다(Fig. 7e). 저분자획분이 포함되어 있는 HHE-0, HHE-II 및 HHE-III는 농도 의존적인 비장세포 증식 효과를 나타냈으나, HHW-P 및 HHE-I는 증식 효과가 나타나지 않았다. 또한, HHW-P는 IL-10 및 IFN- γ 분비량에 영향이 없었으며, 효소 처리된 HHE-0는 사이토카인 분비 효과가 증가했다(Fig. 7f-g). 그리고 HHE-I은 두 사이토카인의 분비량을 크게 증가시켰으며, HHE-II 및 HHE-III는 그 효과가 미미했다. 앞선 대식세포 및 비장세포 활성화에 주요 역할을 하는 생약 복합추출물 유래 다당류들 중 HHE-I으로 자연살해세포의 종양세포 사멸 효과를 확인하였다. HHE-I는 농도 의존적으로 자연살해세포 활성화 효과가 증가했으며, 5 및 50 mg/kg에서 PBS만을 투여한 음성 대조군 대비 약 2배 이상의 효과를 나타냈다(Fig. 7h). 결론적으로, HHE-I은 대식세포와 비장세포의 면역활성을 대변하는 사이토카인 분비를 유도할 뿐만 아니라 생체 내 투여 시, 자연살해세포의 암세포 사멸효과를 증가시키는 것을 확인하였다.

각 정제된 다당체 획분(AGE-I, COE-I, PLE-I, HHE-I)의 면역 활성 평가 결과, 효소 처리 및 분획을 거친 고분자 다당체들이 면역계를 현저히 자극함을 확인하였다. 대식세포 면역 활성 평가에서, 정제된 다당체들은 농도 의존적으로 IL-6, IL-12 및 TNF- α 사이토카인 분비를 유의하게 증가시켰다. 특히, 천궁 유래의 COE-I 획분은 1 $\mu\text{g/mL}$ 수준의 낮은 농도에서도 대식세포에서 사이토카인 생성을 증가시켰다.^{7,30)} 이는 대식세포가 해당 다당류를 인식하여 M1 타입 활성화되면서, 염증성 사이토카인 분비를 증가시켜 선천면역을 활성화시킨 것으로 사료된다.^{3,25)} 다음으로 비장세포(주로 T/B 림프구 등으로 구성) 증식 및 사이토카인 분비를 조사한 결과, 효소 처리 다당 획분들은 세포독성 없이 면역세포 증식을 유도하고 IL-10 (Th2형 사이토카인)과 IFN- γ (Th1형 사이토카인) 분비를 모두 증가시켰다. 예를 들어 COE-I은 대조군 보다 사이토카인 IL-10과 IFN- γ 를 동시에 증가시켰으며, 반면 효소 처리 전인 조다당(COW-P)은 IL-10은 분비가 소폭 증가시키고, IFN- γ 는 오히려 감소시키는 상반된 경향을 보였다.^{6,7)} 이는 RG-I이 풍부한 다당체 분획이 선천 면역 활성화뿐만 아니라 적응면역 반응 조절에도 균형적으로 자극하고, 특히 Th1/Th2 면역반응의 조절에 영향을 준 것으로 예상된다.^{3,17)} 마지막으로, 정제된 다당체들은 생체 내 투여가 NK 세포에 의한 암세포 살해능을 유의적으로 향상시켰다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 특히, COE-I을 BALB/c 마우스에 정맥 투여한 결과, 대조군 대비 NK 세포의

종양세포 용해 활성이 0.5 mg/kg 투여군에서 2배 증가했고, 50 mg/kg 투여 시 5배 이상 증가하였다. 이처럼 NK 세포 활성 증진은 다당체에 의해 활성화된 대식세포 및 수지상세포의 사이토카인(IL-12, IFN- γ 등) 분비에 따른 2차 효과로 볼 수 있다. 그리고 NK 세포의 IFN- γ 분비 및 세포독성 활성을 통한 바이러스 감염세포 및 종양세포 제거를 촉진하는 선천면역의 중요 요소임을 확인했다.^{17,19,25)} 본 연구에서 활용된 당귀, 천궁, 작약들이 지닌 다당체가 항암 및 항바이러스 면역 잠재력을 지니고 있음을 시사한다.

효소처리에 따른 당귀, 천궁, 작약 및 생약 복합추출물 유래 조다당의 구성성분 변화 – 효소 처리 및 정제과정을 통해 확보된 당귀 유래 조다당들(AGW-P, AGE-0, -I, -II 및 -III) 천궁 유래 조다당들(COW-P, COE-0, -I, -II 및 -III), 작약 유래 조다당(PLW-P, PLE-0, PLE-I, -II 및 -III) 및 생약 복합추출물 유래 조다당들(HHW-P, HHE-0, -I, -II 및 -III)의 구성성분을 분석하였다(Table I).

당귀 추출물(AGW-P)은 64.7%의 중성당과 24.9%의 산성당으로 확인되어 대부분 당으로 이루어졌음을 알 수 있었다. 구성당 조성 분석 결과, 50.2%의 glucose, 37.6%의 galacturonic acid, 5.6%의 arabinose, 5.6%의 galactose 및 0.9%의 rhamnose가 검출되었다. 이는 HHW-P와 마찬가지로 AGW-P 내에 다량의 glucan이 존재함을 나타낸다. 각각의 정제 다당의 구성당 조성을 재차 확인한 결과 AGE-I은 arabinose 41.3%, galactose 36.3%, galacturonic acid 14.4%, rhamnose가 6.0%로 이루어진 것으로 보았을 때 전형적인 RG-I 형태의 구성당과 일치하였다. 그리고 AGE-II와 -III 획분은 상대적으로 많은 양의 glucose와 galacturonic acid가 각각 검출되었다. 특히, AGE-III는 비교적 많은 양의 단백질(29.1%)과 폴리페놀(15.7%)이 검출되었으며, 이는 AGE-0의 저분자 영역에 일부 존재하던 단백질과 폴리페놀이 정제 과정에 의해 AGE-II와 -III로 분리된 것으로 확인된다.

천궁 추출물(COW-P)은 79.8%의 중성당과 18.1%의 산성당으로 대부분이 당으로 이루어진 물질임을 확인할 수 있었다. 구성당 조성 분석 결과, 74.6%의 glucose, 14.9%의 galacturonic acid, 3.1%의 arabinose, 6.2%의 galactose 및 0.4%의 rhamnose가 검출되었다. 이는 대부분을 glucan이 차지하고 있으며, 일부 pectin성 물질이 존재함을 확인하였다. COE-I은 galactose 46.3%, arabinose 26.7%, galacturonic acid 9.8%, rhamnose 8.3%로 전형적인 RG-I 형태의 구성당과 일치하였다. 하지만 HHE-I과는 다르게 고분자 획분에서 glucan의 존재를 시사하는 glucose가 소량만 검출되는 것으로 확인되었다. 이에 반해 COE-II와 -III 획분은 상대적으로 많은 양의 galacturonic acid와 glucose가 검출된 것으로 보아 작은 형태의 glucan과 효소처리에 의해 저분자화된 HG인 것으로 확인되었다. 저분자 영역인 COE-III는 비교적 많은 양의 단백질(20.8%)과 폴리페놀(5.0%)이 검출되었는데, 이는 COE-0에서 분리된

Table I. Chemical and monosaccharide composition of polysaccharide fractions isolated from *Angelica gigas*, *Cnidium officinale*, and *Paeonia lactiflora* and herbal mixture

Chemical properties(%)	HHW-P	HHE-0	HHE-I	HHE-II	HHE-III	AGW-P	AGE-0	AGE-I	AGE-II	AGE-III	COW-P	COE-0	COE-I	COE-II	COE-III	PLW-P	PLE-0	PLE-I	PLE-II	PLE-III
Neutral sugar	77.9±1.9	73.3±2.1	74.1±1.4	64.1±2.3	29.6±1.0	64.7±2.4	56.0±2.1	68.5±4.9	41.0±1.8	30.4±3.8	79.8±3.7	68.5±3.9	75.0±10.1	56.7±7.7	34.8±2.4	79.1±2.3	61.7±6.4	76.7±6.0	76.9±9.2	42.7±3.2
Uronic acid	14.4±4.6	17.4±0.2	19.8±1.0	16.2±0.2	17.5±0.4	24.9±0.3	32.5±1.5	20.8±1.3	39.3±1.2	17.4±1.8	18.1±1.0	26.6±0.6	23.3±1.0	36.1±2.6	39.4±1.0	13.6±0.1	22.7±1.3	16.5±1.0	14.0±1.2	21.8±0.7
Protein	2.3±0.7	5.6±0.0	2.1±0.4	15.0±0.1	43.1±2.4	2.2±0.1	4.1±0.2	2.2±0.3	8.9±0.3	29.1±1.7	1.2±0.1	3.1±0.1	1.0±0.1	6.0±0.2	20.8±0.7	0.6±0.5	7.4±0.2	-	4.1±0.6	9.4±0.1
Polyphenol	0.7±0.1	0.4±0.0	0.4±0.1	0.6±0.0	1.8±0.1	4.7±0.0	4.6±0.0	5.7±0.2	5.6±0.1	15.7±0.1	0.9±0.0	1.7±0.0	0.8±0.0	1.2±0.0	5.0±0.0	1.1±0.0	1.5±0.1	0.9±0.1	0.8±0.0	5.3±0.0
KDO-like material	4.7±0.1	3.2±0.1	3.2±0.1	4.1±0.0	8.1±1.7	3.4±0.1	2.8±0.1	2.8±0.1	5.0±0.1	7.3±0.2	-	-	-	-	-	5.6±0.2	6.7±0.1	5.9±3.3	4.2±0.2	20.9±0.0
Component sugar(PMP)																				
Mannose	-	-	-	-	3.2±0.4	-	0.7±0.2	-	0.9±0.1	3.8±0.3	0.5±0.2	0.4±0.2	1.0±0.0	0.6±0.0	7.0±0.2	0.6±0.1	1.5±0.0	0.4±0.0	1.2±0.0	3.5±0.1
Rhamnose	2.1±1.4	1.9±1.2	6.5±1.3	2.8±0.4	8.2±0.0	0.9±0.0	2.6±0.2	6.0±0.2	15.8±0.6	7.2±0.5	0.4±0.0	1.4±0.2	8.3±0.1	11.8±0.2	14.6±0.6	0.4±0.0	1.8±0.2	4.9±0.2	2.6±0.0	5.7±0.3
Glucuronic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	4.8±0.0	5.8±1.6	0.3±0.0	0.2±0.0	2.6±1.2	1.4±0.1	2.5±0.0	-	0.5±0.1	2.0±0.1	0.4±0.0	1.5±0.4
Galacturonic acid	13.9±2.0	14.5±0.9	16.6±0.1	14.9±0.1	25.8±1.4	37.6±0.2	35.4±3.9	14.4±0.7	47.9±5.7	20.7±6.4	14.9±2.3	8.0±2.4	9.8±0.4	27.5±1.7	9.6±0.0	6.0±1.2	9.5±3.4	5.1±0.4	3.7±0.7	-
Glucose	68.2±4.0	63.4±9.4	22.9±0.9	47.9±0.0	27.2±0.6	50.2±0.3	27.5±1.7	2.0±0.0	3.8±0.5	26.7±3.7	74.6±2.3	76.1±3.0	4.6±0.0	14.0±0.3	41.4±0.2	87.6±1.0	52.5±1.7	15.8±0.4	37.2±0.3	74.8±0.8
Galactose	2.7±3.4	7.7±2.9	19.1±0.5	6.9±0.1	19.7±0.3	5.6±0.0	16.6±1.1	36.3±0.5	9.7±1.0	18.2±1.9	6.2±0.1	6.4±0.2	46.3±1.6	15.0±0.5	14.0±0.2	1.8±0.1	8.2±0.5	19.9±0.2	5.1±0.1	5.7±0.1
Xylose	2.4±0.3	-	-	-	-	-	-	-	7.3±10.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	13.2±8.0	12.5±6.2	35.0±0.2	27.5±0.3	15.8±0.1	5.6±0.1	17.3±1.1	41.3±0.4	5.2±7.3	8.9±0.6	3.1±0.2	7.4±0.6	26.7±0.2	27.4±0.5	7.8±0.1	3.6±0.1	26.1±1.1	51.9±0.9	49.4±0.5	5.9±0.2
Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	4.7±0.8	8.9±1.0	-	0.1±0.1	0.8±0.0	2.2±0.2	3.1±0.3	-	-	0.1±0.1	0.3±0.1	2.8±0.3

것으로 확인된다.

작약 추출물(PLW-P)은 79.1%의 중성당과 13.6%의 산성당으로 이루어져 대부분이 당임을 확인하였다. 구성당 조성 분석 결과, 87.6%의 glucose, 6.0%의 galacturonic acid, 3.6%의 arabinose, 1.8%의 galactose 및 0.4%의 rhamnose로 대부분 glucan이 차지하고 일부 소량의 pectin성 물질이 존재하는 것을 확인하였다. PLE-I은 arabinose 51.9%, galactose 19.9%, galacturonic acid 5.1%, rhamnose 4.9%로 전형적인 RG-I 형태의 구성당과 일치하였다. 그리고 15.8%의 glucose로 일부 소량의 glucan이 혼재되어 있음을 확인할 수 있었다. PLE-II와 -III 획분은 상대적으로 많은 양의 glucose가 검출되었으며, 이는 정제 과정 중 생성된 저분자 glucan으로 확인된다.

생약복합추출물(HHW-P)은 77.9%의 중성당과 14.4%의 산성당으로 이루어진 것으로 보았을 때 시료의 대부분이 당으로 이루어진 물질임을 확인할 수 있었다. 한편, 구성당 조성 분석 결과는 68.2%의 glucose, 13.9%의 galacturonic acid, 13.2%의 arabinose, 2.1%의 rhamnose가 검출되었다. HHE-I은 arabinose 35%, glucose 22.9%, galactose 19.1%, galacturonic acid 16.6%, rhamnose가 6.5%로 이루어진 것으로 보았을 때 전형적인 RG-I의 구성당과 glucan이 혼재된 형태임을 시사한다. 이에 반해 HHE-II와 -III 획분은 상대적으로 많은 양의 glucose와 galacturonic acid가 각각 검출되었는데 이는 상대적으로 작은 형태의 glucan과 효소처리에 의해 저분자화된 HG이 함께 검출되었다. 특히, 저분자 획분에 해당하는 HHE-III는 비교적 많은 양의 단백질(43.1%)이 검출되었는데, HHE-0의 저분자 영역에 일부 존재하던 단백질이 정제 과정에 의해 HHE-III으로 분리된 것으로 보인다.

본 연구에서는 당귀, 천궁, 작약 및 생약 복합추출물로부터 얻은 다당체를 효소 처리 및 분획 정제하여, 구조적 변화와

면역활성 간의 상관 관계를 분석하였다.²⁵⁾ 연구의 핵심은 비활성 구조로 알려진 HG를 선택적으로 제거하고, 생리활성의 중심인 RG-I과 RG-II 구조를 강화하여, 면역활성을 증가시킨 것을 확인하였다. 효소 처리 전 천궁, 당귀, 작약 및 이들 복합추출물의 조다당에는 포도당 함량이 높았는데 이는 전분 혹은 셀룰로오스 유래 글루칸(glucan)의 혼재로 인한 것으로 사료된다. 또한, 갈락투론산(GalA)을 주성분으로 하는 HG 영역이 다량 포함되어 있을 것으로 추정된다. HG 영역은 식물 세포벽 펙틴 부위로 α -(1→4) 결합된 galacturonic acid으로 이루어진 균일한 구조를 가지고 있으며, 효소처리 등으로 쉽게 추출되지만, 생리활성이 거의 없는 비활성 부위로 알려져 있다.²⁵⁾ 실제로 효소 처리되지 않은 추출물들(AGW-P, COW-P, PLW-P 및 HHW-P)의 당 조성을 분석한 결과에서 glucose이 50~87%를 차지하여, 전분 등의 비활성 당 성분이 다량 포함되어 있음을 확인하였다.⁶⁾ 반면에 효소 처리된 추출물들(AGE-0, COE-0, PLE-0 및 HHE-0)은 HG 영역이 분해 및 제거되어, 남은 다당체가 주로 Rhamnose와 galacturonic acid이 존재하고 가지당으로 arabinose와 galactose 등을 포함하는 RG-II이 증가했다. 즉, 효소 처리에 의해 비활성 부위인 HG의 제거가 활성 부위인 RG-I 함량을 상대적으로 증가시킨다. 아울러 고분자 획분에서 glucose 및 전분 등 glucan 불순물이 줄어들었다. 이는 효소 처리 및 후속 분획 과정을 통해 활성 성분의 순도가 높아진 것이다. 이러한 조성 변화는 활성 다당 구조를 강화하여 면역 활성을 증진시키기 위한 목적에 부합하며, 펙틴의 RG-I 구조가 HG 대비 높은 생리활성을 지닌다 것을 증명한다.^{23,25)} 특히, 고분자 획분(HHE-I, AGE-I, COE-I 및 PLE-I)에서 소량의 glucose만 검출되고 람노스, 갈락토스 및 아라비노스 등 중성당 비율이 높았던 조성이 높은 면역 활성 효과와 일치하였다.^{6,7)} 반면 효소를 처리 하지않은

조다당이나 효소를 처리한 후의 저분자 획분들은 galacturonic acid 또는 glucose 함량이 높아지면서 단백질 및 폴리페놀 등의 불순물이 일부 포함되면서 상대적으로 고분자 및 중분자 획분보다 면역 활성이 낮았다.²⁵⁾ 이는 다당체의 구조와 생리활성 사이의 밀접한 연관성을 보여주는 사례로써, RG-I의 분자량과 구성당 조성이 면역조절 활성에 영향을 미친다는 것을 의미한다.²⁶⁾ 결론적으로, 효소 처리 및 정제과정에서 확인된 당 조성 변화와 면역 활성 간의 상관관계는 본 연구의 핵심이다. 모든 시료에서 효소 처리 후 펙틴 다당의 비활성부위인 HG가 감소하고, 활성부위인 RG-I 증가가 면역증진의 직접적인 요인으로 작용했음을 시사한다.

결 론

본 연구는 당귀·천궁·작약 및 생약 복합추출물 유래 조다당을 대상으로, 효소 처리로 비활성 부위(homogalacturonan)를 제거하고 rhamnogalacturonan (RG)-I 중심의 활성 획분을 농축·정제함으로써 면역활성을 증대시키는 제조 공정을 확립하였다. 특히 효소 처리 및 분획 정제를 통해 불필요 성분을 줄이고 유효 다당체의 상대 함량과 순도를 높이는 접근을 하였다. 생약 복합처방에서 관찰되는 면역활성 증강을 ‘활성 성분 농축 및 정제’ 관점에서 과학적으로 뒷받침하는 방법론으로 제시된다. 또한 정제된 다당체의 조성/구조적 특징과 면역활성 지표를 연계하여 구조 활성 상관관계를 정량적으로 평가함으로써, 향후 유사 생약 소재 연구에서 효능 향상을 위한 공정 설계의 근거를 제공하였다.

정제된 RG-I 다당체는 체내 면역기능 증진을 목표로 하는 건강기능식품 또는 면역조절 소재로의 개발 가능성이 있으며, 본 연구에서 제안한 효소 처리 및 정제 기법을 적용할 경우 기존 원료 대비 유효 성분 함량을 높이고 불필요 성분을 제거한 고순도 면역조절 천연 원료의 생산이 가능하다. 이러한 고순도 원료는 적은 투여량으로도 효율적인 면역활성 발현이 기대되며, 안전성 확보 및 부작용 감소 측면에서도 유리한 전략이 될 수 있다. 더 나아가 식물 유래 다당체의 낮은 독성과 생체친화성은 백신 면역 보강 보조제 등 차세대 면역조절 물질로의 확장 가능성을 시사한다. 종합하면, 본 연구는 당귀·천궁·작약 유래 RG-I 다당체의 면역 활성과 구조적 특성을 근거로 천연 면역증강 소재의 개발 가능성을 구체화하였으며, 면역기능 개선을 목표로 하는 건강기능식품뿐 아니라 천연물 기반 의약 연구에서도 활용 가능한 방향성을 제시한다.

사 사

본 연구의 실험 수행 및 분석에 도움을 주신 경기대학교 신광순 교수님께 깊이 감사드립니다.

인용문헌

1. Yach, D., Hawkes, C., Gould, C. L. and Hofman, K. J. (2004) The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control. *JAMA* **291**: 2616-2622.
2. Ijnu, T. P., De Lellis, L. F., Shanmugarama, S., Pérez-Gregorio, R., Sasikumar, P., Ullah, H., Buccato, D. G., Di Minno, A., Baldi, A. and Daglia, M. (2023) Anthocyanins as immunomodulatory dietary supplements: a nutraceutical perspective and micro-/nano-strategies for enhanced bioavailability. *Nutrients* **15**: 4152.
3. Kim, J. H., Kim, D. H., Jo, S., Cho, M. J., Cho, Y. R., Lee, Y. J. and Byun, S. (2022) Immunomodulatory functional foods and their molecular mechanisms. *Experimental & Molecular Medicine* **54**: 1-11.
4. Banerjee, M., Khursheed, R., Yadav, A. K., Singh, S. K., Gulati, M., Pandey, D. K., Prabhakar, P. K., Kumar, R., Porwal, O., Awasthi, A., Kumari, Y., Kaur, G., Ayinkamiye, C., Prashar, R., Mankotia, D. and Pandey, N. K. (2020) A systematic review on synthetic drugs and phytopharmaceuticals used to manage diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* **16**: 340-356.
5. Lee, S.-R. and Kim, G.-H. (2001) Development of traditional Korean snack, dasik using *Angelica gigas* Nakai. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* **17**: 421-425.
6. Ahn, K.-S., Sim, W. S., Kim, H. M., Han, S. B. and Kim, I.-H. (1996) Immunostimulating components from the root of *Angelica gigas* Nakai. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**: 254-261.
7. Choi, S.-W., Kim, E.-O., Leem, H.-H. and Kim, J.-K. (2012) Anti-inflammatory effects of volatile flavor extracts from *Cnidium officinale* and *Angelica gigas*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 1057-1065.
8. Um, J. N., Min, J. W., Joo, K. S. and Kang, H. C. (2017) Antioxidant, anti-wrinkle activity and whitening effect of fermented mixture extracts of *Angelica gigas*, *Paeonia lactiflora*, *Rehmannia chinensis* and *Cnidium officinale*. *Korean J. Med. Crop Sci.* **25**: 152-159.
9. Song, H. E., Oh, S. M., Kim, I. S., Kim, D.-Y., Kim, H.-G., Yoon, D., Ryu, H. W. and Lee, D. Y. (2024) Selection of chemical marker for *Cnidii Rhizoma* by Gyeongbuk production area and harvest time using UPLC-QTOF/MS and multivariate statistical analysis techniques. *J. Appl. Biol. Chem.* **67**: 113-122.
10. Park, J. W., Shin, S.-E., Park, H., Kim, J. A., Yang, E.-J. and Song, K. S. (2023) Cytotoxic compounds against adenocarcinoma alveolar epithelial A549 cells from *Paeoniae Radix*. *J. Appl. Biol. Chem.* **66**: 272-281.
11. Lee, Y. J., Choi, M. S. and Choi, P. S. (2022) Optimal conditions for adventitious root organogenesis from peony root explant callus cultures. *J. Plant Biotechnol.* **49**: 207-212.
12. Park, H.-R., Jo, S.-K., Jung, U. and Yee, S.-T. (2008) Restoration of the immune functions in aged mice by supple-

- mentation with a new herbal composition, HemoHIM. *Phytother. Res.* **22**: 36-42.
13. Jo, S.-K., Park, H.-R., Jung, U., Oh, H., Kim, S.-H. and Yee, S.-T. (2005) Protective effect of a herbal preparation (HemoHIM) on the self-renewal tissues and immune system against γ -irradiation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 805-813.
 14. Shin, S.-H., Kim, D.-S., Kim, S.-H., Jo, S.-K., Byun, M.-W. and Yee, S.-T. (2006) Effects of a herbal composition (HemoHIM) on the activation of dendritic cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**: 1322-1328.
 15. Park, H.-R., Jo, S.-K., Jung, U., Kim, S.-H. and Yee, S.-T. (2006) Immunomodulatory effect of a new herbal preparation (HemoHIM) in cyclophosphamide-treated mice. *J. Food Sci. Nutr.* **11**: 54-60.
 16. Kim, J.-J., Jo, S.-K., Jung, U., Park, H.-R. and Yee, S.-T. (2009) Inhibitory effects of a herbal composition (HemoHIM) on the activation of human mast cell line (HMC-1). *J. Life Sci.* **19**: 1808-1814.
 17. Park, H.-R., Jo, S.-K., Choi, N.-H. and Jung, U. (2012) HemoHIM ameliorates the persistent down-regulation of Th1-like immune responses in fractionated γ -irradiated mice by modulating the IL-12p70-STAT4 signaling pathway. *Radiat. Res.* **177**: 676-684.
 18. Kim, J.-J., Cho, H. W., Park, H.-R., Jung, U., Jo, S.-K. and Yee, S.-T. (2013) Preventative effect of an herbal preparation (HemoHIM) on development of airway inflammation in mice via modulation of Th1/2 cells differentiation. *PLoS ONE* **8**: e68552.
 19. Park, H.-R., Jo, S.-K., Jung, U., Yee, S.-T. and Kim, S.-H. (2014) Protective effects of HemoHIM on immune and hematopoietic systems against γ -irradiation. *Phytother. Res.* **28**: 245-251.
 20. Byun, M.-W. and Byun, E.-H. (2015) Immunological synergistic effects of combined treatment with herbal preparation (HemoHIM) and red ginseng extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**: 182-190.
 21. Lee, S. J., Kim, J. J., Kang, K. Y., Hwang, Y. H., Jeong, G. Y., Jo, S. K., Jung, U., Park, H. R. and Yee, S. T. (2016) Herbal preparation (HemoHIM) enhanced functional maturation of bone marrow-derived dendritic cells mediated toll-like receptor 4. *BMC Complement. Altern. Med.* **16**: 67.
 22. Kim, S.-K., Kwon, D.-A., Lee, H. S., Kim, H. K. and Kim, W. K. (2019) Preventive effect of the herbal preparation, HemoHIM, on cisplatin-induced immune suppression. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2019**: 3494806.
 23. Park, H.-R., Kim, S.-H., Yee, S.-T., Byun, M.-W. and Jo, S.-K. (2005) Effect of a herb mixture (HIM-I) on the protection of the hematopoietic-immune system and self-renewal tissues against radiation damage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 605-612.
 24. Jo, S.-K., Jung, U., Park, H.-R., Byun, M.-W., Jeong, I.-Y., Oh, H., Hwang, S.-H., Ryu, C., Lee, Y.-A., Kim, S.-H., Jo, C.-G., Choi, S.-Y., Choi, H.-J., Kim, C.-B., Jeong, S.-H., Cho, K.-Y., Park, B.-J. and Kim, J.-H. (2006) Practical use of herb mixture preparations as functional foods for hemato-immunomodulation and cancer therapy assistance. Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon. KAERI/RR-2607/2004.
 25. Tzianabos, A. O. (2000) Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 523-533.
 26. Popov, S. V., Ovodov, Y. S. (2013) Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. *Biochemistry.* **78**: 823-835
 27. Chung, M.-H., Lim, J.-H. and Oh, H.-S. (1998) Effect of *Angelica gigantis* Radix extract on experimentally induced hyperlipemia in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**: 300-311.
 28. Kang, S.-A., Han, J.-A., Jang, K.-H. and Choue, R. (2004) DPPH radical scavenger activity and antioxidant effects of Cham-Dang-Gui (*Angelica gigas*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 1112-1118.
 29. Ma, J., Liu, W., Wang, X., Lu, C., Hao, Z., Wang, Y., Ding, Y. and Li, Y. (2024) *Cnidium officinale* Makino: phytochemistry, toxicology, pharmacology and prescriptions (1967-2023). *Chem. Biodivers.* **21**: e202301639.
 30. Tran, H. N. K., Cao, T. Q., Kim, J. A., Youn, U. J., Kim, S., Woo, M. H. and Min, B. S. (2018) Anti-inflammatory activity of compounds from the rhizome of *Cnidium officinale*. *Arch. Pharm. Res.* **41**: 977-985.
- (2026. 3. 13 접수; 2026. 4. 24 심사; 2026. 5. 15 게재확정)