



과도 운동 후 면역능 개선에 미치는 황기 다당체의 효과

이시영*¹ · 이한나*¹ · 고은지* · 박영철** · 최선강*** · 유창연**** · 임정대*[†]

*강원대학교 생약자원개발학과, **대구가톨릭대학교 GLP센터,
강원대학교 농생명산업학과, *강원대학교 식물자원응용공학과

Effect of *Astragalus membranaceus* Polysaccharides on Improves Immune Response after Exhaustive Exercise Rats

Si Young Lee*¹, Hannah Lee*¹, Eun Ji Go*, Yeong Chul Park**, Seon Kang Choi***, Chang Yeon Yu**** and Jung Dae Lim*[†]

*Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea.

**GLP Center, Catholic University of Daegu, Keongsan 38430, Korea.

***Department of Agricultural Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

****Department of Applied Plant Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

ABSTRACT

Background: Polysaccharides are the most important functional constituent in *Astragalus membranaceus*. The purpose of the present study was to evaluate the effect of polysaccharides isolated from the aboveground parts of *A. membranaceus* (AMA) and polysaccharides isolated from the roots of *A. membranaceus* (AMR) immune function by modulated cytotoxic T cell and Th1- and Th2-related cytokines kinetics.

Methods and Results: Sprague-Dawley rats were randomly divided into exhaustive exercise case groups and non-exercise case, AMA and AMR samples were administered orally for 30 days (500 mg/kg/day and 10 mg/kg/day, respectively) and were compared to those rats in the groups fed commercial sports drink (SPD) and vehicle. Both exhaustive exercise groups and non-exercise groups had a lower ratio of CD4⁺ and CD8⁺ cells in the spleens of the rat fed AMA and AMR compared to those in the rats fed SPD and vehicle group. These results suggested that AMA and AMR promote an increase in the proportion of cytotoxic T cells. The IL-4-producing T lymphocytes decreased significantly in the AMR (10 mg/kg/day) group compared to SPD and vehicle, whereas the AMA group increased the IL-4 concentration more than the SPD and vehicle in exhaustive exercise group. However, the population of IFN- γ -producing T lymphocytes of AMR and AMA increased. AMA decreased the concentration of IFN- γ to inhibit the Th1 response and thereby increased the concentration of IL-4 to induce a Th2 response that was related to humoral immunity in the non-exercise group.

Conclusions: These results showed that, in addition to Th1/Th2 regulation, AMR and AMA played an important immuno-modulatory role after exhaustive exercise-induced Th1/Th2 lymphocyte imbalance, which might be correlated with cytokine producing immunoregulatory cells.

Key Words: *Astragalus membranaceus* Bunge, Aboveground Part, Exhaustive Exercise, Immune Response, Polysaccharide, Root Part

서 언

운동은 인간수명과 삶의 질 개선에 필요한 신체활동을 제공함으로써 일상생활도와 밀접한 연관이 있고, 운동자체 뿐만 아

니라 일상 중에 노출되는 스트레스와도 관련되어 면역력에 상당한 영향력을 주는 것으로 보고되고 있다 (Nieman, 2007). 운동은 체내의 항상성을 교란시키는 생리학적 변화를 유도하고 촉진하기 때문에 (Rosa, 2004) 생리학적 스트레스에 대한

¹Si Young Lee and Hannah Lee are contributed equally to this paper

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

Received 2018 January 15 / 1st Revised 2018 February 8 / 2nd Revised 2018 February 12 / 3rd Revised 2018 February 19 / Accepted 2018 February 20
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.

신체의 적응 능력에 대한 연구에 있어 좋은 모델이 되고 있다.

규칙적인 운동은 백혈구, 대식세포, 림프구 등의 활성을 유도하는 초기면역반응 (innate immunity) 세포매개성 면역반응 (cell immune response)의 상승과 항체의 생성을 유도하는 항체 매개 면역반응 (antibody mediated response)과 같은 적응성 면역반응 (adaptive immunity)을 향상 시킨다 (Jeurissen *et al.*, 2003).

반면 불규칙적이고 과도하게 장시간 지속하는 일회성 한계운동은 림프구의 증식반응을 억제할 뿐 아니라 운동으로 유발되는 염증반응을 더욱 증가시키고 (Penkowa *et al.*, 2003) 과민 면역반응을 야기하며 상기도 감염을 포함한 감염 발병률을 증가시키는 면역체계의 이상 유발 뿐 아니라 세포 내에서 많은 양의 활성 산소를 발생시켜 세포사를 촉진시킬 수 있다고 보고하고 있다 (Nieman, 2007).

실제로 과도하고 경쟁적인 운동 이후에 모든 운동선수에게서 폐렴이 발생한 보고가 있으며 운동선수의 질환 역학 조사를 통해 가장 유행하는 전염성 질환 중 하나가 면역능 저하에 의해 상부 호흡기 감염이라는 사실이 보고되었다 (Cowles, 1918; Mackinon and Hopper, 1994). 또한 과도하거나 급속한 운동 및 훈련은 면역능을 저하시키는 이유가 혈청 및 지방 조직 및 골격근과 같은 조직에서 면역과 연관된 사이토카인 수준을 조절하기 때문이라고 보고되고 있다 (Rosa *et al.*, 2009).

운동 상시성과 강도에 있어서 일시적인 과도한 운동이나 급작스런 운동은 자연살해세포 (natural killer cell), 림포카인 활성화 살해 세포 (lyphokine activated killer cell) 및 림프구 (lymphocyte)에 연관된 면역 억제와 관련이 있다 (Rohde *et al.*, 1996).

운동이 여러 가지 측면에서 인체의 면역능 향상에 유익한 효과를 미친다는 것은 중요한 사실이나 불규칙적이고 과도하게 장시간 지속하는 일회성 한계운동이 면역반응에서 중요하게 영향을 미치는 이유는 T 림프구의 분화가 비균형적으로 일어나기 때문이다.

다시 말해 불규칙적이고 과도하게 장시간 지속하는 일회성 한계운동이 체내의 면역반응에 대한 균형에 있어서 T 림프구는 분화 방향을 세포매개성 면역반응의 증가보다는 항체 매개 면역반응 (antibody mediated response)에 기여하는 Th2 림프구의 증식을 과도하게 유도하여 항체생성 면역반응에 집중하게 함으로써 면역반응이 편중되어 일어나기 때문이다 (Kim *et al.*, 2013).

이러한 반응은 Th2 림프구관련 사이토카인을 유도하여, 항체 매개 면역반응을 지속시키게 하며, 이에 따른 알레르기 면역반응을 야기하는 IgE 항체 생성을 지속하게 한다고 보고 (Rihoux, 1988)되고 있다.

전 염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokine)과 항염

증성 사이토카인 (anti-inflammatory cytokine) 사이에는 역동적으로 평형 상태에 있으며 생체 내 전체의 사이토카인 효과는 사이토카인의 시간에 따른 방출, 국소적인 환경에서의 사이토카인 농도, 자극 및 인자의 존재 유무, 수용체의 밀도 등에 의해 결정되며 (Kilciler *et al.*, 2008) T세포의 사이토카인 농도는 감염병원체에 대한 면역 반응을 촉진하는데 있어 중추적인 역할을 한다 (Dinarello, 1998).

T세포가 생산하는 사이토카인은 두 종류의 명확한 subtype으로 나누어지는데 CD4⁺ T helper 도우미와 CD8⁺ T cytotoxic이 사이토카인 생산 종류의 프로파일에 기초로 하여 각각 type 1 (Th1)과 type 2 (Th2)의 림프구가 된다 (Mosmann *et al.*, 1986). Type 1의 림프구는 인터페론 γ (IFN γ), 인터루킨 2 (IL-2) 및 베타 종양 괴사 인자 (TNF- β) 사이토카인을 생산함으로써 세포 내 병원체에 대한 세포매개성 면역반응에 필수적인 역할을 하는 반면 type 2의 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 및 IL-13 등의 사이토카인을 생산하여 세포 외 병원균에 대한 방어 작용을 담당하는 항체매개 면역반응에 기인하는 체액성 면역의 발달을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Abbas *et al.*, 2012).

이 두 종류의 사이토카인에는 교차 조절 신호로 작용하는데 예를 들면 IL-4 및 IL-10 분비는 대식세포에서 유도되는 IL-12 생산을 하향 조절함으로써 Th1 면역 반응의 억제를 유발하는 반면 IFN γ 는 Th2 면역 반응을 억제함으로써 Th1/Th2 균형의 변화를 유도하는 형태이다 (Kaiko *et al.*, 2008).

많은 역학적 연구에 의하면 적당한 운동은 면역 기능을 향상시키고 감염에 대한 저항력을 증가시킨다는 것이 증명되고 있으나 과도한 한계운동을 하게 되면 그 반대의 효과를 나타낸다고 보고되고 있다 (Nieman, 2007; dos Santos *et al.*, 2009).

과도한 한계 운동은 면역능 유지에 중요한 Th1/Th2 ratio의 불균형을 초래할 수 있고 운동선수의 면역기능의 불균형을 발생시킬 수 있다고 보고될 뿐만 아니라 Th1/Th2 ratio의 불균형이 급성 및 만성 감염을 유발하고 천식이나 암과 같은 질병이 유발 될 수 있다고 보고 (Schroder *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011) 되기 때문에 Th1/Th2 ratio의 불균형을 해소하고 면역기능을 부활시킬 수 있는 소재의 선별은 매우 중요하다 하겠다.

운동이 상시화 되면서 운동선수뿐만 아니라 여가활동을 즐기는 일반인들에게 운동에 의해 비균형적 면역반응의 증식과 활성산소의 과도분비가 발생하며 이에 따라 운동선수에게서만 관찰되던 과훈련 증후군과 운동 유발성 알레르기 질환이 증가한다는 연구결과가 있으나 (Hackney and Koltun, 2012; Kim and Kwak, 2012) 이러한 증상이 일어나는 데에도 불구하고 여가 활동이나 계획에 따른 운동일정, 운동습관, 운동욕구 및 운동 중독 등의 이유로 운동을 제한하기가 어렵다.

이에 따라 불규칙적이고 과도하게 장시간 지속하는 일회성 한계운동에 의한 면역능 저하에 노출되는 운동선수와 일반인을 대상으로 한 비균형적 면역반응을 회복하고 비균형적 면역반응에 따르는 운동에 의해 유발되는 천식, 두드러기 및 알레르기 등의 면역질환을 예방하고 개선시킬 수 있는 소재의 개발이 필요하다.

천연에서 유래한 다당체는 면역시스템에 영향을 미치는 거대분자이며 많은 연구에서 자연계에 존재하는 식물체로부터 분리된 다당체가 면역조절제로서의 잠재성이 검증되고 있는바 식물에 포함되어진 다당류는 세포성 면역뿐만 아니라 체액성 면역을 독성 없이 안전하게 유도할 수 있으며 면역조절 능력이 있는 합성물질들이 나타내는 심각한 부작용을 일으키지 않는 수준에서 신체의 항상성 (homeostasis)을 유지시키고 면역계, 내분비계, 신경계 및 순환계에 조절할 수 있다고 보고되고 있다 (Schepetkin and Quinn, 2006).

구체적으로 다당체를 풍부하게 포함하는 북미 인삼 (*Panax quinquefolius*) 추출물인 COLD-FX[®]이 급성호흡기 질환 및 감기의 발병률과 증상 중증도에 효과가 있음이 보고되고 있다 (McElhane et al., 2004; Predy et al., 2005).

황기 지하부로부터 분리되어진 polysaccharide는 astragalactan으로 macrophage의 기능을 활성화 시키고 (Lee and Jeon, 2005), tumor necrosis factor의 생산을 촉진하며, lymphokine activated killer를 유도함에 따라 항암활성 (Cho and Leung, 2007a)을 나타낼 뿐만 아니라, 황기 지하부로부터 분리되어진 F3 fraction이 면역조절효과에 효능을 가지고 있음을 보고하였다 (Cho and Leung, 2007b).

황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge)는 콩과에 속하는 다년생 초본으로 뿌리를 생약으로, 지상부는 식품원료 이용하고 있으며 이들의 약리적 효과는 saponin과 polysaccharide 및 flavonoid 성분에 기인하는 것으로 알려져 있다.

C3H/HeN mice 동물모델 기원 대식세포에서 황기의 물 추출물이 IL-6와 TNF 생산을 증가시킬 수 있음을 보고하였으며 (Yoshida et al., 1997) 황기 지하부에 포함되어진 saponin 성분이 Con A로 활성화된 T lymphocytes에서 면역세포 활성화에 필요한 cytokine 생산을 촉진 시킨다는 것을 확인하였다 (Sun et al., 1996).

전통적으로 약용으로 사용되어온 황기의 지하부와 함께 지상부의 polysaccharide도 면역능을 개선시킬 수 있는 효능이 있는 것이 입증되고 있는 바 황기 지상부로부터 분리되어진 다당체가 장관 Peyer's patch를 매개로 하는 골수세포의 증식을 유도하고 이들이 분비하는 cytokine이 전신면역계를 활성화 시킬 수 있다고 보고되었다 (Choi et al., 2014).

또한 황기 지상부로부터 345,000 Da의 분자량을 가지며 3-linked galactose 구조를 기본골격으로 하여 3,6 branch galactose의 당쇄구조가 교호적으로 연결되어 있고 galactose가

풍부한 oligosaccharide가 부착되어 있는 arabino-3,6-galactan을 분리함과 동시에 이들이 장관면역 활성을 증대시킨다고 보고하였다 (Lim et al., 2016).

최근 식물에 존재하는 이러한 다당체의 용도 및 활용이 단순한 1 차 추출물에 의한 건강 기능성 증진에만 제한적으로 사용되는 것이 아니라 체내의 항상성을 파괴시키는 생리학적 스트레스에 의한 면역저하 질환에 널리 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 과도한 운동으로 인한 Th1/Th2 비율의 불균형은 운동선수 뿐만 아니라 일반인의 면역 기능에 불균형을 일으킬 수 있기 때문에 명확한 면역 사이토키닌 프로파일의 생성 및 분비의 조절을 기초로 하여 Th1/Th2 비율을 회복시킬 수 있는 소재 및 약리활성물질을 찾는 것은 매우 중요하다.

따라서 본 논문에서는 과도운동 동물모델에 황기의 지상부 및 지하부의 다당체를 적용하고 이들의 면역 사이토키닌 프로파일과 Th1/Th2을 조사하고 비 운동의 상태와 일반적인 스포츠 음료와 비교하여 황기 지상부 및 지하부 다당체가 운동 후 면역조절 효과를 있다는 것을 확인하였다. 또한 이러한 결과를 통하여 황기의 지상부 및 지하부의 다당체가 과도한 운동 이후 감소되는 면역조절과 이에 상응하는 염증반응과 천식과 알레르기반응과 같은 과민면역반응, 상기도 감염을 포함하는 감염발병률을 저해할 수 있는 소재로 사용되어질 수 있음을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

6 주령의 수컷 랫드를 대한 바이오 링크 (Daehan Biolink Co., Ltd., Eumseong, Korea)에서 2014년 5월 22일에 입수하여 SPF 실험동물실내 사육실에서 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$ 를 유지하여 자동 명암 사이클 시스템에서 사육하며 실험에 사용하였다. 동물실험은 실험동물 관리규정을 준수하였으며 대구가톨릭대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다 (승인번호: 14-CRO-001).

2. 황기 지상부로부터 다당체의 제조

황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge) 지하부 및 지상부는 정선군농업기술센터 포장에 재배되고 있는 3 년생 황기 (막힘황기)로부터 채취 하여 사용하였으며 (지상부; 2013. 7. 21, 지하부; 2013. 11. 21) 황기 지하부 및 지상부의 다당체를 얻기 위하여 Hao와 Wang (2010)이 사용한 방법을 변형하여 사용하였다.

지상부 1kg에 대해 20 배 부피의 증류수를 첨가하고 2 회 가열 추출한 후 filter paper (No. 2, Whatman Co., Maidstone, England)로 여과 하였으며 여과액을 합하여 전체 추출액이 1 l 가 될 때까지 감압농축 (N-1110S, EYELA Rikakikai Co.,

과도 운동 후 면역능 개선에 미치는 황기 다당체의 효과

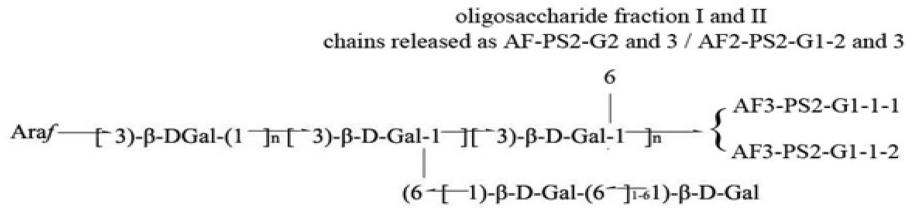


Fig. 1. Polysaccharide fraction purified from the above-ground parts of *Astragalus membranaceus* (AMA) containing gut mucosal immune active arabino 3,6-galactans molecule, AMA-1-b-PS2 (Lim *et al.*, 2016).

Ltd., Tokyo, Japan)한 후 농축된 양의 5 배의 에탄올을 천천히 첨가하였고 4℃ 하루 동안 방치하여 침전시켰다. 이후 4℃에서 30 분간 7,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액과 잔사로 분리하였으며 상층액을 제거하고 잔사를 다시 동결 건조하여 황기 지상부 다당체 분획 (AMA; 19.42 g, 수율; 1.942%)과 황기 지하부 다당체 분획 (AMR; 62.41 g, 수율; 6.241%)을 획득하였다.

황기 지상부 다당체 분획 (AMA)에는 장관면역 활성을 나타내며 arabino-3,6-galactan과 oligosaccharide가 복합적으로 구성되어 있는 AMA-1-b-PS2가 0.13% 수준으로 포함되어져 있음이 보고된 바 있다 (Fig. 1, Lim *et al.*, 2016).

3. 황기 지상부 및 지하부 다당체 경구투여

황기 지상부 및 지하부의 다당체를 대상으로 하여 6 주령의 Sprague-Dawley rat을 운동계열 (E)과 비운동계열 (NE)으로 크게 2 개 계열로 나누고 각 군은 4 개의 처리군 (8 처리군)을 두었다. 각 처리군 8 마리로 구성하였다.

1.5 ml의 sterile normal saline (vehicle)투여군 (C)으로 하고 황기 지상부 다당체 투여군 (AMA)은 rat에 경구투여 시 hamolytic acitivity를 나타내지 않는 최대 농도인 500 mg/ml를 처리농도로 정하였고 (Yang *et al.*, 2016) 황기 지하부 다당체 투여군 (AMR)은 경구투여 시 면역증대 효과를 나타내는 최소 농도 10 mg/ml를 처리농도로 정하였다 (자료 미제시).

투여액량 10 ml/kg을 기준으로 일주일에 한번 조제하여 30 일 동안 하루에 2-3 회 경구 투여하였고 당을 고함유한 스포츠 음료 (게토레이)를 투여군 (SPD)과 비교하였으며 스포츠 이온음료의 경우 액체 상태이므로 원체 그대로 투여액량에 맞게 준비하였다.

4. 실험동물의 운동검사

시료 투입 및 한계운동 검사 전에 실험동물을 대상으로 하여 운동에 적응하도록 treadmill (PBC47700 treadmill device; Coulbourn Instruments, LLC., Holliston, MA, USA)을 이용하여 7 일 동안 15 m/min으로 15 분 동안 운동시켰으며 (Ji *et al.*, 1991) treadmill에는 전기충격장치를 부착하여 운동 동

기를 부여할 수 있도록 하였다.

한계운동 검사당일에 treadmill에 경사를 10°로 기울이고 30 m/min으로 최대운동을 수행하게 하였다 (Brooks and White, 1978, 최대 O₂ 소비의 약 70-75% 수준, 최대 O₂ 소비는 실험동물이 treadmill에서 더 이상 유지할 수 없을 때의 산소소비량).

5. 실험동물에서의 면역능 검정

1) 림프구 분리

운동계열 (E)과 비운동계열 (NE)의 4 개의 처리군 (Vehicle 투여군 C, AMA 500 mg/ml, AMR 10 mg/ml, 스포츠 음료 투여군, SPD)에서 운동검사를 실시한 실험동물에서 림프구를 분리하였다.

각 처리군에서의 림프구의 분리는 무균상태에서 Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 rat의 비장을 적출하고 still mesh를 통과시켜 균질화된 세포 suspension을 얻었고 RBC lysis buffer (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 적혈구를 제거하였으며 여기에 다시 ammonium chloride (0.8%, w/v)를 처리하여 erythrocyte를 분해시켰다.

얻어진 세포 부유물을 원심분리 (380 × g, 4℃, 10 min)하였고 형성된 pellet을 PBS (phosphate buffer saline)로 3 회 세척하고 1% penicillin-streptomycin (P/S, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 각각 배양하였다.

2) CD4⁺/CD8⁺의 측정

10% FBS를 함유한 phosphate buffer saline (PBS) 100 ml 당 2 × 10⁶ cell의 수준으로 부유된 비장 림프구에 phycoerythrine anti-rat CD4⁺ (0.2 μg/ l × 10⁵ cells, PharMingen, BD Biosciences, San Diego, CA, USA)나 biotin anti-rat CD8⁺ (0.2 μg/ l × 10⁵ cells, PharMingen, BD Biosciences, San Diego, CA, USA)을 5 μl 을 첨가하고 4℃에서 30 분간 배양하

였으며 secondary antibody는 streptavidin fluorescein isothiocyanate (FITC, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 또는 streptavidin phycoerythrin을 첨가하였다.

배양된 림프구를 다시 10% FBS (fetal bovine serum, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)가 함유된 PBS를 첨가하여 $300 \times g$ 에서 5 분간 3 번 원심분리하였고 염색된 임파구는 2% paraformaldehyde로 고정시켰으며 염색된 림프구의 subset을 flow cytometry (FACScan, Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA)로 측정하였다.

3) 처리군 별 실험동물의 림프구에서의 cytokine (IL-2, IL-4, IFN- γ) 함량 및 Th1/Th2 balance 검정

각 처리군의 실험동물로부터 분리된 비장 림프구 24 well plate에서 각각 2×10^6 cells/ml 로 분주하고 하루 정도 부착시킨 다음 lymphocyte의 mitogen concanavalin A (Con A; $5 \mu g/ml$, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 처리한 군과 PBS를 처리한 군 (normal)으로 나누어 $37^\circ C$ 에서 72 시간 반응 시켰다. Normal 상태와 Con A처리 상태를 나누어 비장 림프구가 분비하는 IFN- γ , IL-2 및 IL-4를 rat ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

IL-2은 QuantikineTM Mouse IL-2 ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), IL-4은 QuantikineTM Mouse IL-4 ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), IFN- γ 는 OptEIATM Rat IFN-g kits (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)을 이용하였다. 각 cytokine에 대한 모노클론 항체가 부착된 96 wells microplate의 각 well에 시료 희석액 $50 \mu l$ 씩을 분주하고 시료 $50 \mu l$ 씩을 적하하여 실온에서 2 시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5 번 세척한 후 horseradish peroxidase가 함유된 항체액 $100 \mu l$ 씩을 적하하여 다시 실온에서 2 시간 동안 방치한다. 세척용 완충액으로 5 번 세척한 후 hydrogen peroxide와 tetramethylbenzidine이 포함된 기질액 $100 \mu l$ 씩을 적하하여 실온에서 30 분 동안 방치한 후 stop액 $100 \mu l$ 씩을 가하였다.

Optical density는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm 에서 측정하였다. Th1/Th2 balance는 IFN- γ 및 IL-4의 상대적 비율로 측정하여 비교하였다.

6. 통계처리

모든 실험결과들은 평균치 \pm 표준편차 (means \pm SD)로 나타내었으며 각 실험군 간의 통계학적 분석은 Statistical Analysis System (SAS v9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시한 후 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)를 통해 유의성을 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 의 수준에서 각각 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 실험동물 한계운동 후 $CD4^+$, $CD8^+$ 의 세포수에 대한 황기 지하부 및 지상부 다당체의 영향

T세포는 흉선내 분화과정에서 $CD4^+$ 분자와 $CD8^+$ 분자의 양쪽 모두를 발현하는 이중양성 (double positive) 세포가 되지만 T세포 항원수용체 (T cell receptor, TCR)를 발현한 후 흉선 상피에 발현하는 주요 조직 적합유전자 복합체 (major histocompatibility complex, MHC)에 의해서 classII 분자 제시 항원에 반응하는 helper T세포 (Th cell)와 classI 분자 제시 항원에 반응하는 (cytotoxic T세포, Tc cell)로 성숙하게 되는데 반응하지 못한 세포 또는 자기반응성이 있는 세포는 아포토시스 (apoptosis)에 의해 사멸한다 (Mosmann *et al.*, 1986). 이때 Th세포는 $CD4$ 분자, Tc세포는 $CD8$ 분자의 단일양성 (single positive) 세포가 된다.

명확히 다른 cytokine을 생산하는 T세포의 2 개의 $CD4^+$ T helper 세포와 $CD8^+$ T cytotoxic 세포이며 이들이 생산하는 cytokine의 profile에 따른 Type 1 T 림프구 (Th1)와 type 2 T 림프구 (Th2)로 나누어 진다 (Abbas *et al.*, 2012).

본 연구에서 황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge) 지상부 및 지하부 다당체를 투여한 실험동물에서 한계운동 후 적출된 비장에서 $CD4^+$, $CD8^+$ 의 세포수를 검정하고 기존 스포츠음료와 비교한 결과 $CD4^+$ 의 경우 vehicle 투여군에서 비운동계열은 19.3%를 수준을 나타낸 반면 운동계열에서는 16.1%로 감소하였고 $CD8^+$ 의 경우에서도 비운동계열이 15.1%, 운동계열이 8.8%로 급격히 감소하는 경향을 나타내었다 (Table 1). 이러한 결과는 극심한 한계운동 이후 즉시 림프구의 subtype을 조사하여 본 결과 $CD8^+$ 의 세포수가 급격히 감소되어진다는 결과 (Kwon *et al.*, 2008)와 유사하였다.

반면 황기 지상부 다당체 투여군 및 황기 지하부 다당체 투여군의 경우 운동계열 및 비운동계열 모두에서 $CD4^+$, $CD8^+$ 의 세포수를 증대시켰으며 특히 vehicle 투여군에서 운동 후 급격히 감소하였던 $CD8^+$ 의 세포수를 높은 수준으로 유지시키는 결과를 나타내었다. $CD4^+/CD8^+$ ratio의 경우 vehicle 투여군에서는 비운동 시 약 1.33의 비율을 나타낸 반면 동일 군에서 운동 후에는 1.86으로 증가하였다 (Table 1).

피로 축적과 활력의 감소가 T helper cells ($CD4^+$)/ suppressor T cells ($CD8^+$) ratio와 높은 상관관계를 보였다고 보고 (Verde *et al.*, 1992)와 비교하는 경우 vehicle 투여군의 경우 운동에 의해 급격한 면역 저하를 나타내는 반면 황기 지상부 다당체 투여군 및 황기 지하부 다당체 투여군의 경우 비운동 시에는 $CD4^+/CD8^+$ ratio가 각각 1.06, 1.18, 운동 이후에도 1.14, 1.08을 나타내어 비운동 시에도 운동 이후에도 cytotoxic T lymphocyte ($CD8^+$)로의 분화를 촉진시켜 $CD8^+$ 세포 수를 증대함으로써 $CD4^+/CD8^+$ ratio의 감소시켜 변화를

Table 1. Effect of polysaccharide from aboveground part (AMA) and root (AMR) in *Astragalus membranaceus* on ratio of lymphocytes population presenting CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in splenocytes from endurance exhaustive exercised Sprague-Dawley rat.

Groups		CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
Non-exercise	NE-C	19.3±2.1 ^a	15.1±0.6 ^a	1.33±0.11 ^c
	NE-AMA	20.9±1.7 ^{ab}	19.4±0.6 ^b	1.06±0.15 ^a
	NE-AMR	23.6±1.3 ^b	19.9±0.5 ^b	1.18±0.19 ^{ab}
	NE-SPD	18.8±1.1 ^a	14.6±1.3 ^a	1.29±0.13 ^b
Exhaustive exercise	E-C	16.1±0.8 ^a	8.8±0.4 ^a	1.86±0.09 ^c
	E-AMA	23.6±0.3 ^b	21.5±1.1 ^c	1.14±0.12 ^a
	E-AMR	25.5±0.8 ^c	24.6±0.5 ^d	1.08±0.10 ^a
	E-SPD	15.6±0.4 ^a	12.1±0.8 ^b	1.34±0.04 ^b

Eight rats were observed and tested for each group during the experimental period. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Value marked by different letters in each column are significantly different by Duncan's Multiple Range Test ($p < 0.05$) compared the non-exercise (NE-C) or exercise vehicle group (E-C).

일정하게 유지시켜주는 효과를 나타내어 운동에 따른 면역력 약화에 효율적으로 사용되어질 수 있음을 나타내었다.

이러한 연구결과는 큰실말 (Okinawa mozuku)로부터 분리된 높은 분자량의 fucoidan을 식이가 마우스의 면역세포 종류의 상대적 비율에서 CD8⁺ 세포를 증대시키고 CD4⁺/CD8⁺ ratio의 감소시켜 murine cytotoxic T cell의 유지에 효율적으로 사용할 수 있을 것이라고 보고한 결과 (Shimizu *et al.*, 2005)와 성인 인간을 대상으로 randomized clinical trial (RCT)에서 *Larix occidentalis* (Western larch)에서 분리되어진 arabinogalactans의 경구투여가 림프구의 증식과 CD8⁺ lymphocytes의 수를 증가시킨다는 보고 (Dion *et al.*, 2016)와 유사하였다. 기존 스포츠 음료 투여군의 경우 CD4⁺/CD8⁺ ratio가 변화가 vehicle 투여군 보다는 크지 않았으나 전반적으로 CD4⁺, CD8⁺의 세포수를 오히려 감소시켜 운동 후 면역능 개선에는 효과를 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

2. 실험동물 한계운동 후 cytokine (IL-2, IL-4, IFN- γ) 함량 및 Th1/Th2 balance에 대한 황기 지하부 및 지상부 다당체의 영향

T helper 세포는 T helper type-1 세포와 T helper type-2 세포로 2 가지 subtype으로 나뉘는데 Th1은 interferon- γ (IFN- γ)와 tumor necrosis factor- β (TNF β)를 생산하고 세포매개성 면역을 담당한다.

Th2는 IL-4, IL-5, IL-9를 생산하고 체액성 면역과 관련이 있고, 두 세포 모두 IL-2, IL-3, IL-10, IL-13을 생산한다. IL-2는 사람에서는 주로 nondifferentiated type-0 (Th0)에 의해 주로 생산 되고, Th1과 Th2에서도 생산되나 쥐에서는 Th0와

Th1에서 만 생산 된다. 그래서 사람에서는 IL-2/IL-4 ratio를 Th1/Th2 balance에 이용할 수 없지만 쥐에게는 유용하게 사용할 수 있다. 따라서 마우스를 대상으로 하여 interferon- γ /IL-4 ratio 또는 IL-2/IL-4 ratio의 측정을 통해 Th1/Th2 balance를 측정할 수 있다.

황기의 경우 이미 많은 *in vitro* 및 *in vivo* 연구에서 면역세포의 증식을 자극하고 이들이 생산하는 cytokine의 생산을 촉진시킨다고 보고되어지고 있다. 특히 murine macrophage의 증식 촉진, interleukin-6 및 tumor necrosis factor의 생산을 촉진시키는 일반적인 면역세포에 영향을 준다는 보고되고 있다 (Yoshida *et al.*, 1997).

또한 세포 배양 연구에 기반으로 황기의 투여가 대식세포의 기능을 감소시키는 암세포의 제거를 통해 항암효과가 있을 뿐만 아니라 (Rittenhouse *et al.*, 1991) 마우스를 이용한 질병 치료를 위한 화학요법 시에 적용되어지는 cyclophosphamide 또는 mitomycin C의 투여에 의해 발생하는 T세포 기능 억제 회복시킬 수 있음을 보고하고 있다 (Chu *et al.*, 1988; Jin *et al.*, 1995).

비운동 계열과 운동계열로 나누고 황기 지상부 및 지하부 다당체를 투여한 실험동물에서 적출된 비장에서 normal 상태와 Con A 처리 상태를 나누어 비장 림프구가 분비하는 IL-4를 검정하고 기존 스포츠음료와 비교한 결과 비운동 계열의 경우 vehicle 처리군 (1.56 pg/ml) 및 황기 지상부, 지하부 다당체 투여군, 스포츠 음료 투여군 모두에서 IL-4의 농도는 큰 변화를 나타내지 않았다. 이러한 경향은 PBS를 투여한 normal 상태에서도 T cell의 반응 촉진물질인 Con A를 처리하는 경우에서도 유사하게 나타났다 (Fig. 2).

반면 운동계열에서는 vehicle 투여군의 경우 한계운동에 의해 IL-4의 농도가 1.98 pg/ml 을 나타내어 비 운동계열의 vehicle 처리군 IL-4의 농도 (1.56 pg/ml) 보다 26.9% 증가하는 결과를 나타내었으나 큰 차이를 나타내지는 않았다 (Fig. 2). 이러한 연구결과는 wistar rat을 대상으로 하여 중간 (적당) 운동과 과운동, 과운동 후 휴식단계로 나누어 혈청 내 Th1/Th2면역반응에 영향을 미치는 cytokine의 농도를 측정한 결과 중간 정도의 운동을 한 경우 IL-4 농도는 운동을 하지 않은 경우보다 감소하나 극심한 운동을 하는 경우 오히려 증가한다는 결과 (Gholamnezhad *et al.*, 2014)와 유사하였다.

운동계열에서 황기 지상부 및 지하부 다당체를 투여하는 경우 PBS를 투여한 normal 상태에서 2.13, 2.23 pg/ml 을 각각 나타내어 vehicle 투여군의 IL-4의 농도 1.98 pg/ml 보다 약간 높은 경향을 나타내었으나 유의수준 95% ($p > 0.05$)에서만 유의한 수준이었고 99% 유의수준에서는 각 처리군이 유사하게 나타나 운동계열에서 황기 지상부 및 지하부 다당체를 투여하는 IL-4의 농도에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다. 반면 기존 스포츠 음료의 경우 IL-4의 농도가 normal

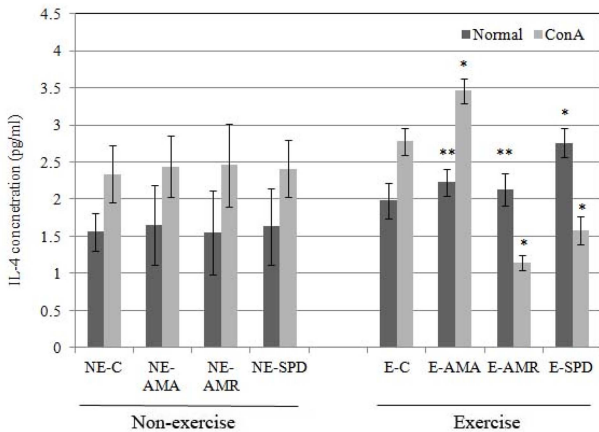


Fig. 2. Effect of polysaccharide isolated from aboveground part (AMA) and root (AMR) of *Astragalus membranaceus* on level of interleukin (IL)-4 concentrations in spleens of endurance exhaustive exercised Sprague-Dawley rat. Eight rats were observed and tested for each group during the experimental period. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Values with an asterisk above the bar are significantly different by Duncan's Multiple Range Test (* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$) compared the non-exercise or exercise vehicle group.

상태에서 2.76 pg/ml 을 나타내어 vehicle 투여군의 IL-4의 농도 1.98 pg/ml 보다 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 2).

하지만 운동계열에서 Con A를 처리하고 IL-4의 농도를 검정하여 본 결과 vehicle 투여군의 경우 2.78 pg/ml의 농도를 나타내어 운동 후 IL-4의 농도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 황기 지하부 다당체 투여군의 경우 IL-4의 농도가 1.14 pg/ml으로 나타나 운동 후 증가된 IL-4의 농도를 감소시키는 효과를 나타내었고 황기 지상부 다당체 투여군의 경우 IL-4의 농도가 3.46 pg/ml으로 나타나 운동 후 증가된 IL-4의 농도를 더욱 증가시키는 결과를 나타내었다 (Fig. 2).

이러한 결과는 rat에 있어서 극심한 운동은 IL-4의 농도를 증가시키거나 황기 지하부 다당체를 투여하는 경우 증가된 IL-4의 농도를 감소시킬 수 있으며 황기 지상부 다당체의 경우 IL-4의 농도를 더욱 증가시킬 수 있는 것으로 확인되었다.

비운동 계열과 운동계열로 나누어 황기 지상부 및 지하부 다당체를 투여한 실험동물에서 적출된 비장에서 normal 상태와 Con A처리 상태를 나누어 비장 림프구가 분비하는 IFN- γ 를 검정하고 기존 스포츠음료와 비교한 결과 vehicle 처리군의 경우 비운동 계열의 IFN- γ 의 농도는 127.4 pg/ml으로 나타났고 운동 계열에서는 57.8 pg/ml으로 운동에 의해 IFN- γ 의 농도가 감소하는 결과를 나타내었다 (Fig. 3).

이러한 결과는 높은 강도의 운동 상황이 Th1 반응을 유도하는 cytokine인 IFN- γ 및 IL-2의 생산을 감소시켜 세포성 면역과 관계있는 이미 존재하는 감염을 제거할 수 있는 기능을

수행하는 Th1 반응을 억제함으로써 질병에 노출 되게 할 수 있다는 결과 (Walsh *et al.*, 2011)와 유사하였으며 극심한 운동 이후 면역능이 감소한다는 결과를 얻을 수 있었다.

비 운동계열에서 normal 상태인 경우 황기 지상부 다당체 투여군 및 스포츠 음료의 경우 IFN- γ 의 농도에 변화가 없었으나 황기 지하부의 경우 192.4 pg/ml의 IFN- γ 의 농도를 나타내 vehicle의 IFN- γ 의 농도인 127.4 pg/ml 보다 높게 나타났으며 Con A를 처리하는 경우에서도 황기 지하부 다당체 투여군은 487.5 pg/ml의 IFN- γ 의 농도를 나타내 vehicle의 IFN- γ 농도인 257.5 pg/ml 보다 89.2% 증가되었다.

이러한 결과는 비 운동 상황에서 황기 지하부 다당체 투여군이 Fig. 2에서 제시하는 바와 같이 IL-4의 농도를 감소시켜 Th2 반응을 억제시키고 동시에 IFN- γ 의 농도를 증가시켜 Th1 반응을 유도할 수 있는 작용기전을 가지고 있음을 나타낸다고 하겠다.

또한 운동 상황에서도 이러한 경향은 유사하였으며 암환자의 경우 면역세포에서 Th2 cytokine의 생산이 증가하고 이것은 종양형성과정을 촉진시키거나 황기 지하부 추출물을 투여하는 경우 폐암환자의 peripheral blood mononuclear cells (PBMC)에서 Th1 cytokine 중 IFN-gamma와 IL-2를 증가시키고 Th2 cytokines의 생산과 분비를 감소 시켰다는 보고 (Wei *et al.*, 2003)에서 보는 바와 같이 황기 지하부의 투여가 폐암환자에서 관찰되는 Th2 세포반응이 우세 상태를 Th1 반응을 촉진시킴으로써 이미 존재하는 외부의 감염을 효과적으로 통제할 수 있는 소재가 될 수 있음을 확인하였다.

비 운동계열에서 황기 지상부 다당체를 투여군의 경우 Con A를 처리상태에서 IFN- γ 의 농도가 198.3 pg/ml를 나타내어 vehicle 대조군의 IFN- γ 의 농도 257.5 pg/ml에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 3).

이러한 결과는 비 운동상황에서 황기 지상부 다당체는 황기 지하부와 반대로 IFN- γ 의 농도를 감소시켜 Th1 반응을 억제하고 이에 따라 IL-4의 농도를 증가시켜 체액성 면역에 관계하는 Th2 반응을 유도 하는 것으로 생각되어진다.

황기 지상부에서 분리한 다당체가 arabinose와 galactose가 풍부한 oligosaccharide를 포함하는 arabinogalactan 계열로서 Peyer's patch를 매개하거나 직접적으로 골수세포를 증식시킬 수 있다는 보고 (Choi *et al.*, 2014)와 arabinogalactan extract (ResistAid™)의 투여가 위약에 비하여 폐렴구균 백신의 Th2 반응이 매개하는 체액성 면역을 증강시키고 항체 형성 반응을 촉진시킨다고 보고 (Udani, 2013)를 고려하는 경우 황기 지상부 다당체의 경구투여는 Th2 반응을 활성화 하여 새로운 감염을 억제할 수 있는 기능을 수행할 수 있으리라 생각한다.

운동 계열의 경우 황기 지상부 다당체 투여에 따른 IFN- γ 의 농도 변화가 비운동 계열에서 감소하는 경향과 상이하게 normal 상태인 경우 IFN- γ 의 농도는 황기 지상부 다당체투여

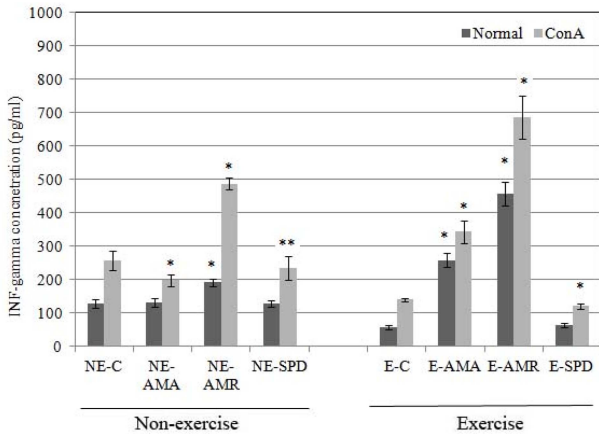


Fig. 3. Effect of polysaccharide isolated from aboveground part (AMA) and root (AMR) of *Astragalus membranaceus* on level of interferon gamma (IFN- γ) concentrations in spleens of endurance exhaustive exercised Sprague-Dawley rat. Eight rats were observed and tested for each group during the experimental period. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Values with an asterisk above the bar are significantly different by Duncan's Multiple Range Test (* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$) compared the non-exercise or exercise vehicle group.

군이 258.6 pg/ml로 vehicle 투여군의 57.8 pg/ml 보다 높게 나타났고 Con A 처리 시 vehicle 투여군이 141.3 pg/ml 인데 반하여 황기 지상부 다당체 투여군의 경우 342.9 pg/ml로 높게 나타났다 (Fig. 3).

이러한 결과는 황기 지상부 다당체의 투여가 운동이 수반하지 않을 때의 면역 반응을 IFN- γ 의 농도의 감소, IL-4의 생산을 촉진시키는 Th2 반응을 활성화하는 반면 운동이 수반되는 황기 지상부 다당체의 투여의 경우 운동을 수반하지 않을 때의 면역반응과는 반대로 IFN- γ 의 농도를 증가시켜 Th1 반응을 활성화 한다는 것을 의미한다고 하겠다.

보통의 경우 과도한 운동을 하는 경우 운동 조직의 손상을 유발하고 이것은 국소적으로 존재하는 면역세포가 Th2 세포로 분화하도록 자극하는 cytokine을 생산하게 하며 운동에 의해 cortisol 및 catecholimine과 같은 스트레스 호르몬의 순환을 증가시키게 된다 (Lancaster *et al.*, 2004). 이러한 cortisol 및 catecholimine과 같은 스트레스 호르몬은 주로 Th1 세포를 유도하는 IL-12를 생산을 저해하고 Th2 림프구의 반응을 향상시킨다 (McAlees *et al.*, 2011). IL-12는 T cell에서 IFN- γ 분비를 촉진시키고 IL-4의 합성을 저해하는 기능을 하기 때문에 IL-12의 생산 저해는 IFN- γ 의 농도를 감소시키고 IL-4의 합성을 증대 시킨다 (Lakier, 2003).

운동이 수반되는 황기 지상부 다당체의 투여의 경우 IFN- γ 의 농도의 증가시켜 Th1 반응을 활성화 한다는 것은 황기 지상부 다당체의 투여가 IFN- γ 의 농도를 결정하는 상위

cytokine (IL-12)이나 운동에 의한 분비되는 cortisol 및 catecholimine과 같은 stress hormone의 농도를 조절하는 기능이 있을 것으로 추정된다.

황기 지상부 다당체의 운동 이후의 Th1 반응을 활성화하는 면역조절의 특이성을 황기 지상부 다당체 투여와 catecholimine이나 glucocorticoid 등의 운동 스트레스 호르몬의 농도와와의 상관성, cytokine 농도 및 Th1/Th2 balance 등 면역세포 반응을 검정하여야 할 것으로 생각된다.

규칙적이고도 적절한 강도의 운동은 면역력의 증가를 가져 오지만 불규칙적이거나 과도한 운동은 운동스트레스 유발로 인한 면역반응의 중요한 역할을 담당하는 림프구의 수와 증식 반응을 감소시키고, 상기도 감염, 천식 및 결핵과 같은 감염률을 증가시킨다. 비록 규칙적인 훈련을 통해 림프구의 증식이 활성화되더라도 개인의 영양상태, 운동의 시기 및 환경 등을 고려하지 않으면, 운동 유발성 천식이나 운동 유발성 알레르기 반응과 같은 비 균형적인 과민면역반응을 야기할 수 있다. 따라서 운동 시 여러 상황에서 면역력이 감소가 유발되는 기전을 이해하고 면역상황에 맞는 면역조절 소재의 복용을 통해 건강유지와 더불어 수명연장에도 도움이 될 것으로 생각된다.

상기 결과를 통하여 황기 지상부 다당체 및 황기 지하부 다당체의 투여는 운동 후 T cell의 differentiation을 조절하는 CD4⁺, CD8⁺의 세포수를 증대시켜 줄 뿐 아니라 CD4⁺/CD8⁺ ratio를 일정하게 유지시켜주는 효과가 있으며 운동에 의한 스트레스 호르몬 분비 및 이에 따른 cytokine의 농도 변화와 Th1/Th2 반응의 불균형에 의해 유발되는 면역약화를 회복시킬 수 있음을 확인하였다. 황기 지하부 다당체는 Th1 반응의 활성화를 통해 이미 내생하여 있는 감염 진행을 억제하고 황기 지상부 다당체의 경우 새로운 감염에 대한 예방 효과를 가지는 면역소재로의 개발을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2016년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비(관리번호: 620160071)와 중소기업부 풀뿌리기업육성사업(과제번호: R0004048)의 연구비 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. (2012). Cellular and molecular immunology. *In* immunity to microbes. Elsevier/Saunders. Philadelphia, PA, USA. p.339-358.
- Brooks GA and White TP. (1978). Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology*. 45:1009-1015.
- Cho WCS and Leung KN. (2007a). *In vitro* and *in vivo* anti-

- tumor effects of *Astragalus membranaceus*. *Cancer Letters*. 252:43-54.
- Cho WCS and Leung KN.** (2007b). *In vitro* and *in vivo* immunomodulating and immunorestorative effects of *Astragalus membranaceus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 113:132-141.
- Choi RN, Park YC, Lee JS, Kim JW, Kim JB, Cheoi YS, Kim KK, Lee JG, Yu CY, Kim SH, Chung IM, Kim JK and Lim JD.** (2014). Isolation of polysaccharides modulating intestinal immune system and single oral dose toxicity test in *Astragalus membranaceus* aboveground parts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 22:276-288.
- Chu DT, Wong WL and Mavligit GM.** (1988). Immunotherapy with Chinese medicinal herbs. Part II. Reversal of cyclophosphamide-induced immune suppression by administration of fractionated *Astragalus membranaceus in vivo*. *Journal of Clinical and Laboratory Immunology*. 25:125-129.
- Cowles WN.** (1918). Fatigue as a contributory cause of pneumonia. *Boston Medical and Surgical Journal*. 179:555-556.
- Dinarello CA.** (1998). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *International Reviews of Immunology*. 16:457-499.
- Dion C, Chappuis E and Ripoll C.** (2016). Does larch arabinogalactan enhance immune function? A review of mechanistic and clinical trials. *Nutrition and Metabolism*. 13:28. <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12986-016-0086-x?site=nutritionandmetabolism.biomedcentral.com> (cited by 2016 Jun 20).
- dos Santos RV, Caperuto EC, de Mello MT and Costa Rosa LFBP.** (2009). Effect of exercise on glutamine metabolism in macrophages of trained rats. *European Journal of Applied Physiology*. 107:309-315.
- Gholamnezhad Z, Boskabady MH, Hosseini M, Sankian M and Khajavi Rad A.** (2014). Evaluation of immune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 17:1-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3938879/pdf/ijbms-17-001.pdf> (cited by 2016 May 6).
- Gu X, Li P, Liu H, Li N, Li S and Sakuma T.** (2011). The effect of influenza virus A on th1/th2 balance and alveolar fluid clearance in pregnant rats. *Experimental Lung Research*. 37:445-451.
- Hackney AC and Koltun KJ.** (2012). The immune system and overtraining in athletes: Clinical implications. *Acta Clinica Croatica*. 51:633-641.
- Hao S and Wang Z.** (2010). Effects on exercise endurance capacity and antioxidant properties of *Astragalus membranaceus* polysaccharides(APS). *Journal of Medicinal Plants Research*. 4:982-986.
- Jeurissen A, Bossuyt X, Ceuppens JL and Hespel P.** (2003). The effects of physical exercise on the immune system. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*. 147:1347-1351.
- Ji LL, Dillon D and Wu E.** (1991). Myocardial aging: Antioxidant enzyme systems and related biochemical properties. *American Journal of Physiology*. 261:386-392.
- Jin R, Wan LL and Mitsuishi T.** (1995). Effects of shi-ka-ron and Chinese herbs in mice treated with anti-tumor agent mitomycin C. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*. 15:101-103.
- Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW and Hansbro PM.** (2008). Immunological decision-making: How does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*. 123:326-338.
- Kilciler G, Musabak U, Bagci S, Yesilova Z, Tuzun A, Uygun A, Gulsen M, Oren S, Oktenli C and Karaeren N.** (2008). Do the changes in the serum levels of IL-2, IL-4, TNF α , and IL-6 reflect the inflammatory activity in the patients with post-ERCP pancreatitis? *Clinical and Developmental Immunology*. 2008:481560. <https://www.hindawi.com/journals/jir/2008/481560/> (cited by 2017 March 5).
- Kim CW and Kwak YS.** (2012). Effects of different physical frequency on food-dependent exercise induced allergy anaphylaxis (FDEIA) and related mechanisms. *Journal of Life Science*. 22:897-903.
- Kim CW, Figueroa A, Park CH, Kwak YS, Kim KB, Seo DY and Lee HR.** (2013). Combined effects of food and exercise on anaphylaxis. *Nutrition Research and Practice*. 7:347-351.
- Kwon DK, Hwang KH, Kim YK, Lee KH and Song YJ.** (2008). Effect of swimming exercise and soybean supplementation on the immune functions of rats fed a high-fat diet. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 35:638-642.
- Lakier SL.** (2003). Overtraining, excessive exercise, and altered immunity: Is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response? *Sports Medicine*. 33:347-364.
- Lancaster GI, Halson SL, Khan Q, Drysdale P, Wallace F, Jeukendrup AE, Drayton MT and Gleeson M.** (2004). Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exercise Immunology Review*. 10:91-106.
- Lee KY and Jeon YJ.** (2005). Macrophage activation by polysaccharide isolated from *Astragalus membranaceus*. *International Immunopharmacology*. 5:1225-1233.
- Lim JD, Yu CY, Kim SH and Chung IM.** (2016). Structural characterization of an intestinal immune system-modulating arabinogalactan-like polysaccharide from the aboveground part of *Astragalus membranaceus*(Bunge). *Carbohydrate Polymers*. 136:1265-1272.
- Mackinnon LT and Hopper S.** (1994). Mucosal(secretory) immune system responses to exercise of varying intensity and during overtraining. *International Journal of Sports Medicine*. 15:S179-S183.
- McAlees JW, Smith LT, Erbe RS, Jarjoura D, Ponzio NM and Sanders VM.** (2011). Epigenetic regulation of beta2-adrenergic receptor expression in T_H1 and T_H2 cells. *Brain, Behavior, and Immunity*. 25:408-415.
- McElhane JE, Gravenstein S, Cole SK, Davidson E, O'neill D, Petitjean S, Rumble B and Shan JJ.** (2004). A placebo-controlled trial of a proprietary extract of North American ginseng(CVTE002) to prevent acute respiratory illness in institutionalized older adults. *Journal of the American Geriatrics Society*. 52:13-19.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA and Coffman RL.** (1986). Two types of murine helper T cell clone. Part I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*. 136:2348-2357.
- Nieman DC.** (2007). Marathon training and immune function.

- Sports Medicine. 37:412-415.
- Penkowa M, Keller C, Keller P, Jauffred S and Pedersen BK.** (2003). Immunohistochemical detection of IL-6 in human skeletal muscle fibers following exercise. *FASEB Journal*. 17:2166-2168.
- Predy GN, Goel V, Lovlin R, Donner A, Stitt L and Basu TK.** (2005). Efficacy of an extract of North American ginseng containing poly-furanosyl-pyranosyl-saccharides for preventing upper respiratory tract infections: A randomized controlled trial. *Canadian Medical Association Journal*. 173:1043-1048.
- Rihoux JP.** (1988). Understanding allergy. *Allergy Immunology*. 10:5-17.
- Rittenhouse JR, Lui PD and Lau BHS.** (1991). Chinese medicinal herbs reverse macrophage suppression induced by urological tumors. *Journal of Urology*. 146:486-490.
- Rohde T, MacLean DA, Hartkopp A and Pedersen BK.** (1996). The immune system and serum glutamine during a triathlon. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 74:428-434.
- Rosa LFBPC.** (2004). Exercise as a time-conditioning effector in chronic Disease: A complementary treatment strategy. *Evidence Bed Complementary and Alternative Medicine*. 1:63-70.
- Rosa Neto JC, Lira FS, Oyama LM, Zanchi NE, Yamashita AS, Batista ML Jr, Oller do Nascimento CM and Seelaender M.** (2009). Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. *European Journal of Applied Physiology*. 106:697-704.
- Schepetkin IA and Quinn MT.** (2006). Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*. 6:317-323.
- Schroder WA, Gardner J, Le TT, Duke M, Burke ML, Jones MK, McManus DP and Suhrbier A.** (2010). SerpinB2 deficiency modulates Th1/Th2 responses after schistosome infection. *Parasite Immunology*. 32:764-768.
- Shimizu J, Wada-Funada U, Mano H, Matahira Y, Kawaguchi M and Wada M.** (2005). Proportion of murine cytotoxic T cells is increased by high molecular-weight fucoidan extracted from *Okinawa mozuku*(*Cladosiphon okamuramus*). *Journal of Health Science*. 51:394-397.
- Sun CW, Ceng QH, Sun XX, An G and Zhan S.** (1996). Effects of *Astragalus* saponins on Ca²⁺-activated K⁺ channels of mouse T lymphocytes. *Jilin University Norman Bethune College of Medicine*. 2:125-126.
- Udani JK.** (2013). Immunomodulatory effects of ResistAid™: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multidose study. *Journal of the American College of Nutrition*. 32:331-338.
- Verde T, Thomas S and Shephard RJ.** (1992). Potential markers of heavy training in highly trained distance runners. *British Journal of Sports Medicine*. 26:167-173.
- Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A and Simon P.** (2011). Position statement part one: Immune function and exercise. *Exercise Immunology Review*. 17:6-63.
- Wei H, Sun R, Xiao W, Feng J, Zhen C, Xu X and Tian Z.** (2003). Traditional Chinese medicine *Astragalus* reverses predominance of Th2 cytokines and their up-stream transcript factors in lung cancer patients. *Oncology Reports*. 10:1507-1512.
- Yang P, Qiu G, Wang S, Su Z, Chen J, Wong S, Kong F, Lu L, Ezaki T and Xu H.** (2010). The mutations of Th1 cell-specific T-box transcription factor may be associated with a predominant Th2 phenotype in gastric cancers. *International Journal of Immunogenetics*. 37:111-115.
- Yang SJ, Lee SY, Lee H, Park YC, Choi SK, Yu CY, Chung IM and Lim JD.** (2016). Adjuvant effect of polysaccharides from aboveground parts of *Astragalus membranaceus*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 24:408-419.
- Yoshida Y, Wang MQ, Liu JN, Shan BE and Yamashita U.** (1997). Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and *Oldenlandia diffusa* in particular. *International Journal of Immunopharmacology*. 19:359-370.
- Zhao Y, Yang J and Gao YD.** (2011). Altered expressions of helper T cell(Th)1, Th2, and Th17 cytokines in CD8⁺ and $\gamma\delta$ T cells in patients with allergic asthma. *Journal of Asthma*. 48:429-436.