

## 홍도라지 추출물이 마우스 모델에서 Cyclophosphamide에 의한 면역력 저하 억제에 미치는 영향

이은별<sup>1</sup> · 최지혜<sup>1</sup> · 장환희<sup>1</sup> · 홍하철<sup>1</sup> · 이해정<sup>2</sup> · 정현철<sup>3</sup> · 이성진<sup>3</sup> · 이성현<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원, <sup>2</sup>가천대학교 식품영양학과, <sup>3</sup>현대바이오랜드

### Effects of Aged *Platycodon grandiflorum* on Cyclophosphamide-induced Immunosuppression in Mice

Eun Byeol Lee<sup>1</sup>, Ji-Hye Choi<sup>1</sup>, Hwan-Hee Jang<sup>1</sup>, Ha-Cheol Hong<sup>1</sup>, Hae-Jeung Lee<sup>2</sup>,  
Hyun Cheol Jeong<sup>3</sup>, Sung-Jin Lee<sup>3</sup>, and Sung Hyen Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju, Jeollabuk-do 55365, Korea

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Gachon University, Seongnam, Gyeonggi-do 13120, Korea

<sup>3</sup>Food R&D Center, Hyundai Bioland Co., Ltd., Ansan, Gyeonggi-do 15407, Korea

**Abstract** – This study was conducted to evaluate the immunomodulatory effects of red doraji (*Platycodon grandiflorum*, RD) prepared by repeated steaming and drying process in the immune-suppressed mice induced by pre (RD-A) or post-treatment (RD-B) with cyclophosphamide. The immune-stimulating effects of ethanol RD extract in *in vivo* at 150 (RD-1) and 300 mg/kg body weight (RD-2) for RD-A and RD-B groups were measured and compared to the NC group supplied with distilled water only or positive control group. After 14 days of oral supplement, serum IgA, IgG, and cytokine levels, splenocytes proliferation rate, NK cell activity, and gene expression of cytokines were measured as immune related biomarkers. Serum IgA, IgG, IL-1 $\beta$ , and IL-12 levels increased in both RD-A and RD-B groups while serum TNF- $\alpha$  level decreased in RD-A group compared to the NC group. Splenocytes proliferation rate, NK cell activity, and cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ) expression levels were also improved by RD supplement in the both groups. The RD showed more significant immunomodulatory effects at higher dose (RD-2) rather than the lower dose (RD-1). Thus, RD has an immune efficacy in a dose dependent manner and can be used as an immune stimulating source to improve immunity.

**Keywords** – *Platycodon grandiflorum*, Immune, CPA, Immunoglobulin, NK cell activity

면역 체계는 외부에서 유입되는 박테리아, 바이러스와 같은 다양한 감염원으로부터 체내를 보호하기 위한 방어작용이다. 다양한 면역 조절 작용을 매개하는 단백질을 통해 병원체와 손상된 조직 세포를 인지하고 세포 사멸, 사이토카인 조절 등으로 감염원을 예방 및 억제한다. 면역 체계는 선천 면역과 후천 면역 두가지 형태의 유기적인 상호작용으로 면역을 조절한다. 선천 면역은 특정한 항원을 인식하지 않은 광범위한 병원체에 대한 비특이적인 면역 방어의 중요한 측면으로 감염 초기 질병에 대한 내성이 생겨 저항력이 생긴다. 대조적으로, 후천 면역은 활성화된 T 림프구가 표적을 인식해 B 림프구에서 항체를 만들도록 하여 2차 감염에 대한 빠른 반응이 일어나며, 특정 감염원에 대한 기억

반응으로 질병 유발을 예방할 수 있다.<sup>1,2)</sup>

최근 사회적 이슈인 COVID-19 감염증과 같은 바이러스 질환도 면역기능 조절이 약화되면서 다양한 감염원들에 노출되어 생기는 질병으로 면역 체계와 깊은 관련이 있다.<sup>3)</sup> 면역 체계의 조절 장애는 면역 조절 인자의 변화나 환경, 스트레스 등과 같은 요인에 의해 발생하는 불균형으로 암, 전염병, 알레르기, 천식, 관절염과 같은 질환을 유발한다. 이에 따라 현대 사회는 건강한 인체를 유지하기 위해 면역조절제에 대한 연구가 지속적으로 요구되고 있다. 화학 면역조절제의 장기적인 투여로 인한 부작용과 높은 비용을 해결하기 위하여 연구되고 있는 천연 면역조절제는 손상된 체내의 숙주 방어 체계를 활성화할 뿐 아니라 자가 면역 장애와 같은 비특이적인 면역 반응을 억제한다.<sup>4,5)</sup> 천연 식품의 다양한 영양 성분은 염증, 바이러스 감염으로부터 약리학적

\*교신저자(E-mail): lshin@korea.kr

(Tel): +82-63-238-3681

으로 유의한 효과를 주며,<sup>6)</sup> 식품의 면역 증진에 대한 연구는 우리의 건강한 신체를 질병으로부터 직간접적으로 예방 및 치료하는 것에 도움이 된다. 국내 “2019 건강기능식품 시장현황 및 소비자 실태조사(한국건강기능식품협회)”에 따르면 면역력 개선을 목적으로 구매하는 소비자가 59.7%로 나타났다. 면역 향상에 도움을 주는 기능성 식품을 찾는 소비자들이 점차 증가하고 있으며, 면역 증진 소재를 발굴하고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>6,7)</sup>

도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 전통적으로 천식, 항염증 등의 목적으로 식용 및 약용으로 널리 사용되어 온 초롱과(Campanulaceae)의 여러 해 살이 풀이다.<sup>8)</sup> 다양한 기능성이 밝혀져 건강기능식품으로 활용되고 있는 도라지 추출물에서 약리 활성을 갖는 주성분인 platycoside 69종이 보고되었고, 사포닌 성분을 분석한 결과, platycodin D와 platycoside E 함량이 가장 높게 나타났다. 특히 트리테르페노이드 사포닌인 platycoside는 천연 의약 성분으로 도라지 전체 성분의 약 2% 함유되어 있으며, 총 함량은 도라지의 토양, 재배 방법 등의 생육 방식과 추출 방법에 따라 달라질 수 있다.<sup>8-10)</sup> 도라지의 주요 성분들은 약리학적 생리 활성으로 식품 및 화장품 뿐만 아니라 제약 산업에서 건강식품 보조제로 다양한 연구가 진행되고 있다. 특히 platycoside는 항암, 항염, 당뇨 예방, 신경 보호 활성, 항바이러스 활성 등이 지속적으로 보고됨에 따라 주요 질병의 치료제로 사용 가능성이 있다.<sup>8,11,12)</sup>

CPA(cyclophosphamide)는 암, 류마티스 관절염, 백혈병, 림프종 등의 질환에 대해 광범위하게 사용되고 있는 면역억제제이다. 림프계를 손상하여 백혈구 및 림프구 감소를 통한 면역 활성 억제와 산화 스트레스를 유도하는 DNA 알킬화 화합물로 알려져 있다. DNA 및 단백질을 알킬레이션시켜 생성되는 CPA 반응성 대사산물은 NK 세포, T 및 B 세포에서 면역 억제 반응을 유발시키고 비선택적인 독성 반응을 나타낸다.<sup>13-15)</sup> CPA가 동물의 면역 체계에 미치는 영향은 용량과 기간에 따라 다르며, 고 용량 투여 시 면역억제 마우스 모델로서 면역 활성 물질 연구에 사용되고 있다.<sup>16,17)</sup>

선행 연구에서 홍도라지 주정 추출물은 면역 저하 마우스의 면역력을 유의적으로 개선하였고,<sup>18)</sup> 본 연구에서는 platycoside E를 지표성분으로 하여 홍도라지 추출물을 급여한 면역력 저해 억제 효과도 있는지 평가하였다. 즉, 홍도라지 추출물을 투여하고, CPA로 면역을 저해시킨 마우스에서 CPA에 의한 선천성 및 후천성 면역 반응에 대하여 홍도라지 추출물의 면역글로불린 생성능, 사이토카인 수준, NK 세포 활성 등 체내 면역능에 미치는 영향을 확인하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료.** 연구에 사용된 도라지(*Platycodon grandiflorum*)

**Table I.** HPLC condition for the platycoside E analysis

Conditions			
HPLC system	Agilent 1260 Infinity		
Column	Cadebza C18 (150 mm × 4.6 mm, 3 μm)		
	A: 0.05% Trifluoroacetic acid B: ACN		
	Time(min)	Solvent	
		% A	% B
Mobile phase	0	80	20
	10	80	20
	15	77.5	22.5
	23	77.5	22.5
	35	20	80
	36	80	20
	45	80	20
Flow rate, Injection volume	0.6 mL/min, 20 μL		
Detector	ELSD		
	Drift tube temp: 80°C		
	Gas flow: 1.5 mL/min		
	Gain: 1		

는 숙성 과정을 거친 홍도라지 추출물로 현대바이오랜드에서 제공받았고, 증거 표본(RDAAD03)은 국립농업과학원 농식품자원부에 보관하였다. 홍도라지는 국내산 생도라지 뿌리를 증숙 및 건조하는 과정을 4번 반복하여 제조하였다. 홍도라지를 50% 주정으로 80°C에서 8시간 동안 2회 추출하여 필터프레스로 여과하고 감압농축 후, 고형분 대비 동량의 부형제를 첨가하고 건조하여 본 실험에 사용하였다. 도라지 추출물의 지표성분으로 사용된 platycoside E 함량은 HPLC법을 이용하여 정량 하였다. 표준용액(platycoside E)은 표준물질 약 5 mg에 DMSO 0.4 mL와 50% MeOH을 넣고 초음파 추출하여 녹여서, MeOH로 정용하여 사용하였다. 시험용액은 도라지 추출분말 1.5 g을 20 mL 플라스크에 담고 DMSO 0.4 mL와 증류수 5 mL을 넣고 10분 동안 초음파 추출하였다. 그 후, MeOH 5 mL를 넣고 10분간 초음파 추출하고 50% MeOH을 이용하여 정용 후 0.20 μm nylon syringe filter(Whatman, Clifton, NJ, USA)로 여과하였다. 이를 HPLC 최종 시험용액으로 사용하였으며 분석조건은 Table I과 같다.

**실험동물의 사육 및 시료 투여** - 본 실험에는 Specific-pathogen free(SPF) 상태의 6주령 수컷 C57BL/6 mouse 72 마리(실험군당 8마리)를 (주)샘타코(Osan, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 사육기간 중의 식이로 일반 고형사료와 물을 자유섭취 시켰으며, 온도 23±2°C, 습도 50±10%, 12시간 단위로 명암주기를 조절하였다. 마우스는 1주 동안 실험

환경에 적응시킨 후, 면역 억제 동물 A그룹(RD-A1, RD-A2)은 cyclophosphamide(CPA)를 경구 투여 3일 전에 150 mg/kg B.W., 경구 투여 1일전에 110 mg/kg B.W.을 복강 투여하였고, 면역 저하 동물 B그룹(RD-B1, RD-B2)은 흉도라지 추출물을 투여하고 부검 2일 전에 CPA를 150 mg/kg B.W.을 복강 투여하여 면역 저하 모델을 만들었다. A그룹은 CPA 마지막 투여가 끝난 24시간 후에 실험동물의 체중을 측정하였고 난괴법(randomized complete block design)에 따라 다음과 같이 분류하였다. 실험군은 대조군(Nor), 음성대조군(NC), 양성대조군(PC), 흉도라지 RD-A1군과 RD-B1군(150 mg/kg B.W.), RD-A2군과 RD-B2군(300 mg/kg B.W.)으로 구성하였다. 추출물을 용해한 증류수는 Nor군과 NC군에, PC군은 면역 증진에 효능이 있다고 알려진  $\beta$ -glucan(50 mg/kg B.W., Sigma-Aldrich Co.)을<sup>18)</sup> 용해시켜 사용하였고, 모든 실험군은 14일간 경구로 투여(1회/일)하였다. 본 연구에서 동물실험에 관련된 모든 실험은 농촌진흥청 국립농업과학원 동물실험윤리위원회의 승인(NAS-202005) 절차와 윤리 규정을 준수하여 수행되었다.

**혈액 및 면역장기의 채취** - 실험 기간이 종료된 마우스는 체중을 측정한 뒤 CO<sub>2</sub>로 마취하고 복대정맥에서 채혈하였다. 채취된 혈액은 원심 분리용 시험관에 담아 1,300 xg, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 얻었으며, 면역 관련 사이토카인 및 면역글로불린의 함량 분석에 이용되었다.

**혈청 내 면역글로불린의 농도 측정** - 흉도라지 추출물(RD)이 마우스의 혈청 IgA와 IgG 농도에 미치는 영향은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kits(Abcam, London, UK)를 이용하여 분석하였다. 각 항체가 코팅되어 있는 96-well plate에 혈청을 50  $\mu$ L씩 분주하여 실온에서 2시간 배양하였고, 세척 용액으로 2번 세척 후 1 $\times$ HRP antibody를 50  $\mu$ L씩 분주한 후에 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 다시 세척 후 TMB 용액을 50  $\mu$ L씩 분주하여 상온에서 15분 배양한 후에 색의 변화를 확인하고 stop 용액을 50  $\mu$ L씩 첨가하여 반응을 정지시켰다. 흡광도(OD)는 microplate reader(Molecular Devices, San Jose, Ca, USA)로 450 nm에서 측정하였고, 각 면역글로불린의 농도는 ELISA kit에 포함되어 있는 표준 용액에서 산출된 곡선으로부터 계산하여 사용하였다.

**혈청 사이토카인의 함량 측정** - 도라지 추출물의 혈청 면역 지표에 미치는 영향을 평가하기 위해 사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ )을 ELISA kits(Abcam)으로 분석하였다. capture antibody가 부착되어 있는 96-well plate에 혈청 50  $\mu$ L와 사이토카인 antibody cocktail 50  $\mu$ L를 넣고 1시간 동안 실온에서 배양하고 3회 세척하였으며 각 well에 100  $\mu$ L의 TMB 용액을 넣고 10분간 반응시켰다. 마지막으로 well에 100  $\mu$ L의 stop 용액을 넣어 반응을 정지시키고, microplate reader(Molecular Devices)를 이용하여 450 nm에서 흡광도

(OD)를 측정하였다. 각 사이토카인의 농도는 ELISA kit에 포함되어 있는 표준 용액에서 산출된 곡선으로부터 계산하여 사용하였다.

**비장 면역세포의 증식능 측정** - 적출한 비장은 배양액(RPMI 1640, 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin)으로 2회 세척하였고, 세포 배양접시에 10 mL의 배양액을 가한 뒤, 40  $\mu$ m nylon cell strainer(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 균질화 하였다. 이렇게 얻어진 비장세포를 histopaque(Sigma, USA) 위에서 처리하여 림프구를 분리하고, 세포를 세척한 후 배양액에서 3.0 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL로 분산시켰으며, 96-well plate(Nunc, Roskilde, Denmark)에 100  $\mu$ L씩 분주하여 세포 증식능 측정에 사용하였다. LPS(Sigma-Aldrich Co, USA)는 최종 농도를 1  $\mu$ g/mL 되도록 첨가하였고, 대조군에는 배양액을 동량 분주하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 배양기에서 배양하였다. 46시간 배양이 끝난 후, 각 well 당 10  $\mu$ L의 MTS (Promega Corporation, Madison, WI, USA)를 이용하여 2시간 동안 반응시켰고, microplate reader(Molecular Devices)를 이용, 490 nm에서 흡광도(OD)를 측정하여 비장 면역세포의 증식능을 비교하였다. 비장세포 증식능은 다음의 공식에 따라 계산하였다.

$$\text{Proliferation index} = \text{Sample (OD)}/\text{Control (OD)}.$$

**NK 세포의 활성 측정** - NK 세포 활성도 평가를 위해 NK Vue kit(Murine NK activity kit, ATGen Co., Korea)를 이용하여 NK 세포로부터 분비되는 IFN- $\gamma$  측정 검사를 시행하였다. 채혈 즉시, 전혈을 전용 용기에 Heparine과 함께 혼합한 후 37°C에 24시간 배양하였다. IFN- $\gamma$  농도는 배양액을 원심분리(15분, 11,500 xg)하여 얻은 상층액을 ELISA kits로 처리한 후 450 nm에서 microplate reader로 측정하였다. IFN- $\gamma$  값은 2,000 pg/mL, 500 pg/mL, 125 pg/mL, 0-blank로 희석한 4가지 표준액으로부터 표준곡선을 생성한 후 결과를 계산하여 얻었다.

**Real-time PCR을 통한 면역 관련 사이토카인의 유전자 발현 측정** - 적출된 비장 조직의 total RNA는 RNeasy mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 추출하고 template로 사용하였다. One-step Real time PCR 반응은 quantitect SYBR green RT-PCR master mix kit 방법에 따라 template 5  $\mu$ L, 각각의 primer set(20 pmol) 2.5  $\mu$ L, 2x quantifast SYBR green RT-PCR mixture 12.5  $\mu$ L, RT MIX 0.2  $\mu$ L, RNase-free water 4.98  $\mu$ L를 넣어 총 25  $\mu$ L를 맞추어 사용하였다. 반응액은 BioRad CFX-96 real time system (Bio-Rad, Hercules, USA)을 이용하여 조건에 맞게 증폭하였다. 그 결과는 housekeeping gene(GAPDH)의 발현양으로 보정하여 CFX Manager Software(Bio-Rad) 프로그램으로 분석 결과를 normalization하였다. 실험에 사용한 primer

(Quantitect primer assay)의 유전자 정보는 GAPDH (QT01658692), IL-1 $\beta$ (QT01048355), IL-6(QT00098875), IFN- $\gamma$ (QT01038821) 및 TNF- $\alpha$ (QT00104006)와 같다.

**통계처리** - 모든 결과는 Mean  $\pm$  S.E.로 나타내었고 자료는 SPSS 프로그램(Statistical Package for the Science ver. 24, IBM Corp, Armonk, NY, USA)을 이용하여 one-way ANOVA(one-way analysis of variance)를 실시한 후, Duncan's multiple range test에서  $p < 0.05$  수준인 경우에 유의성을 표시하였다.

**결과 및 고찰**

**Platycoside E 함량** - 홍도라지는 4중 4포(4 repetitive steaming) 방법으로 도라지를 4회에 걸쳐 가열·건조하여 제조(red doraji, RD)하였다. 내부표준법으로 분석한 홍도라지의 지표성분 platycoside E 함량은 0.6 mg/g으로 Table II에 제시하였다(Fig. 1).

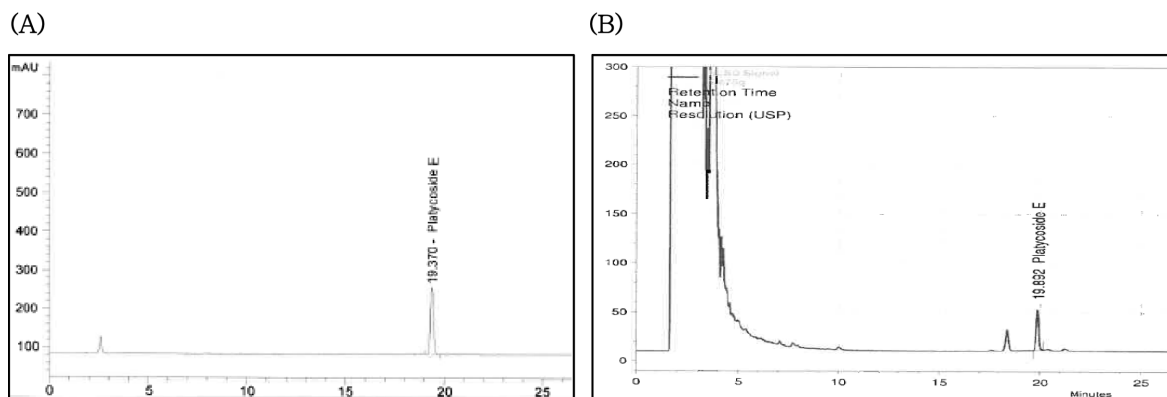
**혈중 면역글로불린 수준에 미치는 영향** - 병원체로부터 체내를 보호하기 위해 생산되는 혈청 내 면역글로불린(immunoglobulin, Ig)은 5가지로 구성되며, 각각은 내부 면역계에서 다른 기능을 한다. 주로 IgA는 점막 면역 체계를 통하여 소화기와 호흡기로 분비되어 바이러스, 세균 등의 외부 분비물로부터 침입을 보호하는 항체 작용을 한다. 혈청과 조직액에 대부분 속해 있는 IgG는 바이러스 및 독소에 대한 보호 활성화와 항 알레르기 반응을 나타낸다.<sup>19,20</sup> 홍도라지 추출물의 급여가 마우스의 면역 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해, 혈중 면역 관련 지표인 IgA와 IgG 수준을 분석하였다. IgA 함량은 CPA 전처리 그룹에서 Fig.

2A와 같이 RD-A1군(769.6 ng/mL)과 RD-A2군(765.4 ng/mL)으로 홍도라지 추출물군은 음성대조군(NC-A, 762.5 ng/mL) 대비 혈중 면역글로불린 A 수준을 향상 시키는 것으로 나타났다. 또한 CPA 후처리 그룹에서도 RD-B1군(764.6 ng/mL)과 RD-B2군(766.1 ng/mL)은 음성대조군(NC-B, 760.1 ng/mL)보다 높은 수준을 보였다. IgG 함량은 CPA 전처리 음성대조군 159.7 ng/mL, 홍도라지 추출물 투여군 RD-A1군(161.8 ng/mL)과 RD-A2군(163.3 ng/mL)으로 음성대조군 뿐만 아니라 정상 범위 (161.8 ng/mL)까지 향상시켰으며, RD-B1군 164.0 ng/mL과 RD-B2군은 164.1 ng/mL으로 후처리 음성대조군(NC-B, 159.4 ng/mL)보다 유의적으로 증가하였다(Fig. 2B). 면역글로불린의 결핍으로 인한 체액성 면역 결핍증에 있어서 면역글로불린 생성과 이를 통한 면역 질환 개선의 효과가 꾸준히 보고되어지고 있다.<sup>21</sup> 식물성 추출물과 식품 성분이 마우스 체내 림프구의 면역글로불린 생성에 기여한다는 선행 연구와 같이<sup>20</sup> 숙성과정을 거친 홍도라지 추출물은 혈중 면역 관련 지표인 면역글로불린 A와 G 수준에 영향을 줄 수 있는 것으로 보인다.

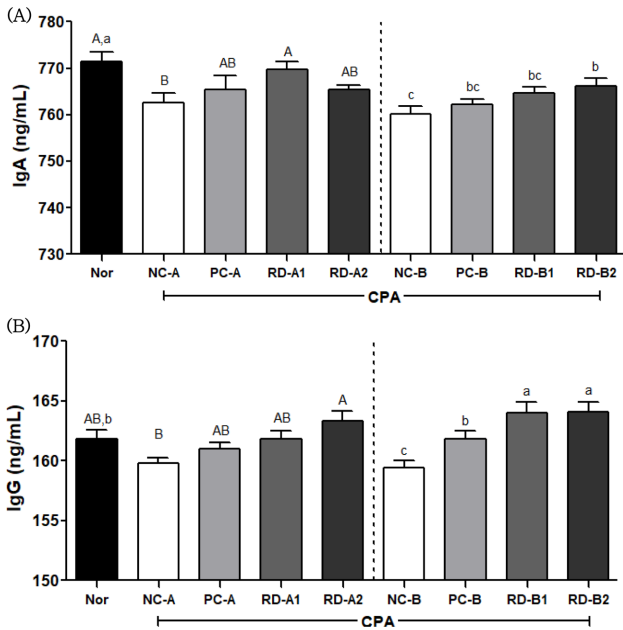
**혈청 사이토카인 함량에 미치는 영향** - 면역 세포 중 Th(T helper) 세포는 다양한 유형의 사이토카인을 분비하여 체액성 면역 반응을 향상시키며, 항원에 의해 Th1과 Th2 두 가지 유형으로 나뉜다.<sup>17</sup> 세포 내 감염원을 제거하며 면역 과민 반응과 관련이 있는 Th1과 세포 외 감염에 대항하고 체액성 면역 반응에 관여하는 Th2는 상호 작용을 통하여 체내 균형을 유지한다.<sup>22,23</sup> Th1 세포가 분비하는 IL-1 $\beta$ 와 IL-12 수준을 분석한 결과, 정상군에서 혈중 IL-1 $\beta$  수준은 5.7 pg/mL이었으나 CPA를 전처리한 A그룹의 음성대조군(NC-A, 2.9 pg/mL)에서 정상군보다 유의적으로 감소하였고, 양성대조군(5.0 pg/mL)과 홍도라지 추출물 RD-A1군(5.7 pg/mL)에서 음성대조군보다 유의적으로 증가하였다. CPA를 후처리한 B그룹에서 음성대조군(NC-B, 2.0 pg/mL)은 정상군보다 유의적으로 감소하였고, 양성대조군(2.5 pg/mL)도 정상군의 수준으로 회복되지 못하였다. 그러나 홍도라지 RD-

**Table II.** The content of platycoside E in aged red Doraji (*Platycodon grandiflorum*) extracts analyzed by the HPLC

	RT	Area	Amount (mg/g)
Red doraji (RD)	19.89	369860	0.6-

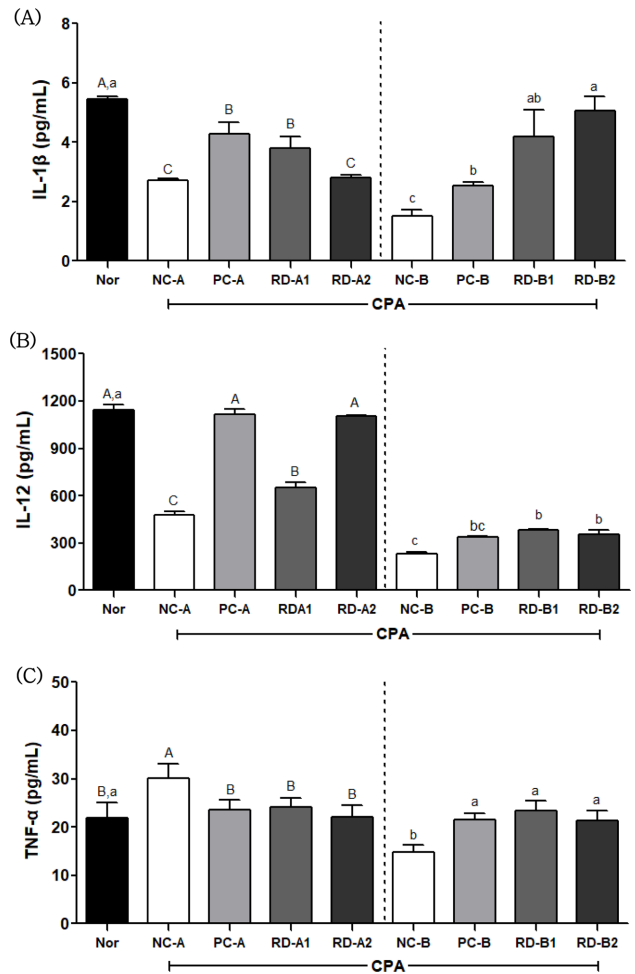


**Fig. 1.** Chromatograms of platycoside E analyzed by HPLC in the *Platycodon grandiflorum*. (A) Standard, (B) Red doraji



**Fig. 2.** Effects of RD extracts on the serum (A) IgA and (B) IgG levels in C57BL/6 mice immunosuppressed by CPA. The data was analyzed by one-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the mean±S.E. (n=8). <sup>A-B, a-c</sup> Different letters on bars are significantly different from each other (<sup>A-B</sup>, among CPA pre-treatment; <sup>a-c</sup>, among CPA post-treatment) by Duncan's multiple range test (*p*<0.05).

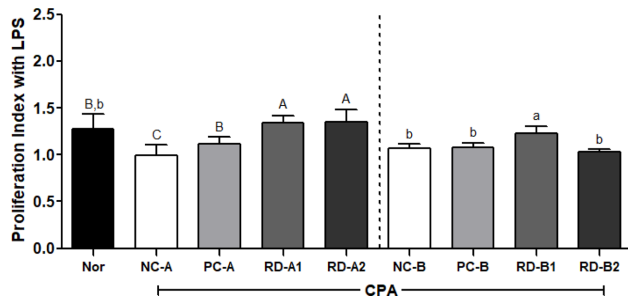
B1군(4.2 pg/mL)과 RD-B2군(5.3 pg/mL)은 음성대조군 및 양성대조군보다 유의적으로 수준이 개선되었고 농도 의존적인 효과를 보였다(Fig. 3A). NK 세포를 활성화시키며 NK 세포와 T 세포가 IFN- $\gamma$ 를 분비하도록 돕는 IL-12 수준을<sup>17)</sup> 분석한 결과, CPA를 전처리한 A그룹에서 정상군 1145.6 pg/mL 대비, 음성대조군(NC-A) 479.3 pg/mL으로 유의하게 감소하였으며 홍도라지 투여군은 RD-A1군(649.8 pg/mL)과 RD-A2군(1106.3 pg/mL)으로 농도 의존적으로 IL-12 함량을 증가시키는 효과가 있었다. CPA를 후처리한 B그룹에서 음성대조군은 정상군보다 유의적으로 감소하였고, 홍도라지군 RD-B1군(383.0 pg/mL)과 RD-B2군(352.7 pg/mL)은 음성대조군(NC-B) 234.0 pg/mL보다 유의적으로 증가하였으며 양성대조군(PC-B) 335.0 pg/mL과 유사한 효과를 보였으나 정상군에 미치지 못하는 듯하였다(Fig. 3B). 주로 염증반응을 유도하여 세포사멸을 일으키는 Th2 세포가 분비하는 TNF- $\alpha$  수준을 분석한 결과<sup>15,24)</sup> 정상군 21.8 pg/mL이었으나, CPA를 전처리한 A그룹에서 음성대조군 30.0 pg/mL로 정상군보다 유의적으로 증가하였고, 홍도라지 RD-A1군(24.1 pg/mL)과 RD-A2군(22.0 pg/mL)은 음성대조군보다 각각 감소하여 정상군과 같은 수준을 보였다(Fig. 3C). 그러나 CPA를 후처리한 B그룹에서 홍도라지 RD-B1군(23.3 pg/mL)과 RD-B2군(21.1 pg/mL)은 음성대조군(NC-B)의 14.8 pg/



**Fig. 3.** Effects of RD extracts on the serum (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-12 and (C) TNF- $\alpha$  levels of C57BL/6 mice immunosuppressed by cyclophosphamide. The data was analyzed by one-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the mean±S.E. (n=8). <sup>A-C, a-c</sup> Different letters on bars are significantly different from each other (<sup>A-C</sup>, among CPA pre-treatment; <sup>a-c</sup>, among CPA post-treatment) by Duncan's multiple range test (*p*<0.05).

mL보다 증가하였고, 정상군 및 양성대조군과 유사한 수준으로 나타났다. 이와 같은 결과는 선행 연구에서와 같이 기능성 추출물이 면역 결핍 동물 모델에서 과하게 항진된 Th2 사이토카인을 조절하는 것으로 확인되었다.<sup>24,25)</sup> 따라서 홍도라지 추출물의 Th1과 Th2의 사이토카인 조절은 상호간의 균형을 맞추어 면역 항상성 유지에 도움을 줄 수 있는 것으로 보인다.<sup>16)</sup>

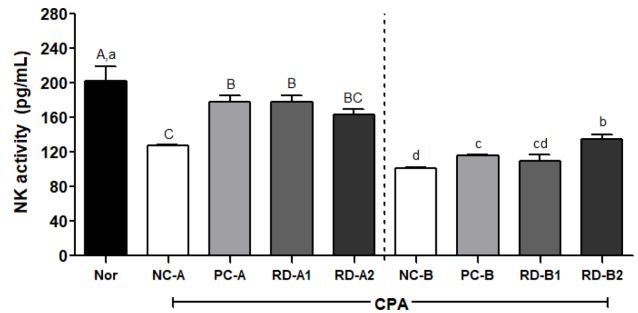
**비장 림프구의 증식능에 미치는 영향** - CPA는 백혈구 및 림프구 감소를 통한 면역 활성 억제와 산화 스트레스를 유도하고 비장의 무게를 감소시켜 면역 저하에 영향을 준다.<sup>26)</sup> T 세포는 대식세포를 활성화하여 감염 세포에 독성을 일으켜 병원체를 방어하고 B 세포는 항원 특이적 항체인 면역



**Fig. 4.** Effects of RD extracts on B cell proliferation in splenocytes of C57BL/6 mice immunosuppressed by cyclophosphamide. The data was analyzed by one-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the mean±S.E. (n=8). <sup>A-C, a-b</sup> Different letters on bars are significantly different from each other (<sup>A-C</sup>, among CPA pre-treatment; <sup>a-b</sup>, among CPA post-treatment) by Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ ).

글로불린을 분비한다.<sup>1)</sup> CPA에 의해 저해된 면역 세포 반응에서 홍도라지 추출물의 영향을 평가하기 위해 미토젠을 첨가하여 배양하였고, 비장세포의 증식을 비교하였다. 그 결과, LPS를 처리하였을 때 CPA를 전처리한 A그룹에서 음성대조군의 면역 세포 증식능(PI) 1.0과 비교하여 RD-A1군 1.3과 RD-A2군 1.4으로 34% 수준에서 음성대조군 및 양성대조군 보다 우수한 증식능을 보였다. CPA를 후처리한 B그룹에서 PI는 음성대조군 1.1과 비교하여 RD-B1군(1.23)에서 15% 증식 효과를 나타냈다(Fig. 4). 따라서 홍도라지 추출물의 투여는 선행연구에서와 같이 CPA에 의해 저하된 비장세포의 증식능을 향상시키는 효과가 있는 것으로 보인다.<sup>18)</sup>

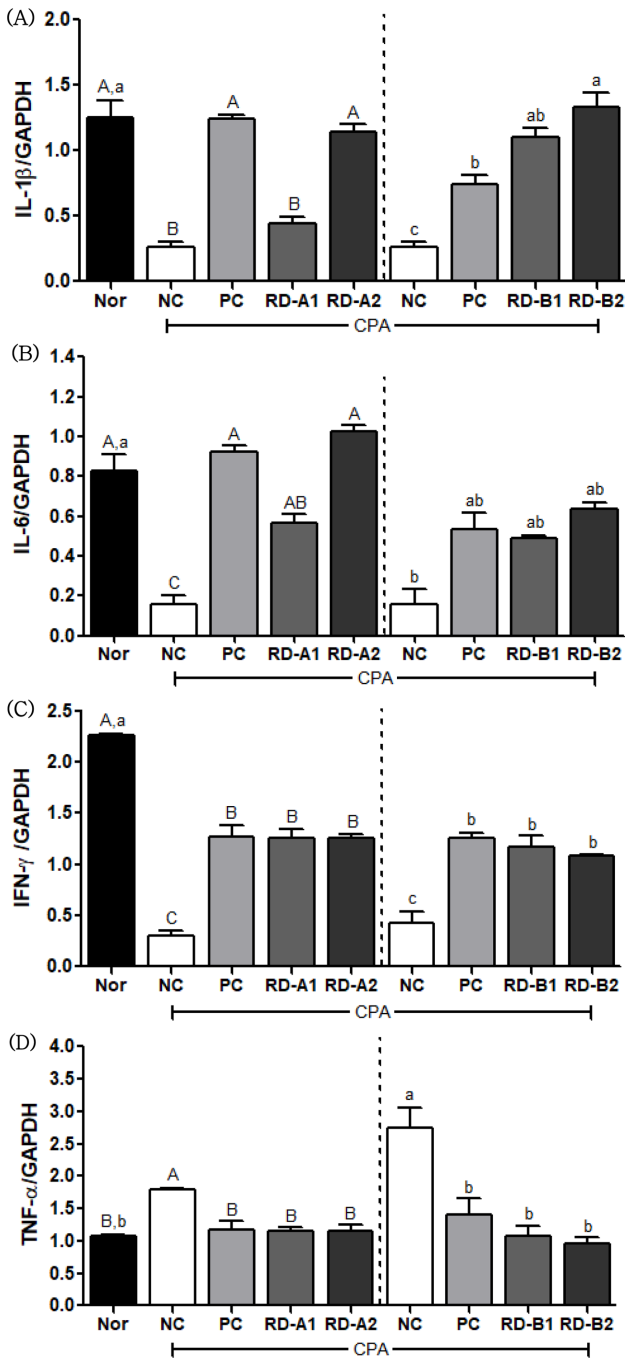
**혈중 NK 세포의 활성화에 미치는 영향** - 자연 살해 세포(NK cell)는 선천적 면역 반응에서 중요한 역할을 하는 선천성 림프구이며, 감염에 대한 신체 반응의 첫 단계에 관여한다. NK 세포는 그랜자임(granzyme) B와 퍼포린(perforin)의 생산을 증가시키고 표적 세포에 사멸 수용체를 관여시켜 표적 세포의 사멸을 유도한다.<sup>27,28)</sup> IFN- $\gamma$ 나 TNF- $\alpha$ 와 같은 주요 사이토카인은 NK 세포에서 분비되어 감염된 세포에 대한 면역 반응을 조절한다.<sup>29)</sup> 질병을 갖는 환자들에서 건강한 성인보다 NK 세포 내 IFN- $\gamma$  생성의 현저한 감소가 관찰되었으며, NK 세포 활성화에 대한 상당한 조절 장애가 발견되었다.<sup>30)</sup> 따라서 NK 세포 내 IFN- $\gamma$  농도 측정으로 NK 활성화와 자가 면역 질환의 상관 관계에 대해 확인할 수 있다.<sup>29)</sup> 본 연구에서 면역이 저하된 마우스 전혈의 NK 세포에 홍도라지 추출물이 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과, CPA를 전처리한 A그룹에서 정상군의 IFN- $\gamma$  농도(202.1 pg/mL)가 음성대조군(127.6 pg/mL)에서 감소하여 NK 세포 활성이 저하된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 RD-A1군(177.7 pg/mL)과 RD-A2군(164.0 pg/mL)은 면역 저하된 상태를 양성대조군(178.0 pg/mL)의 수준으로 회복 시켰다. 또



**Fig. 5.** Effects of RD extracts on NK cell activity in blood of C57BL/6 mice immunosuppressed by cyclophosphamide. The data was analyzed by one-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the mean±S.E. (n=8). <sup>A-C, a-d</sup> Different letters on bars are significantly different from each other (<sup>A-B</sup>, among CPA pre-treatment; <sup>a-b</sup>, among CPA post-treatment) by Duncan's multiple range test( $p<0.05$ ).

한 CPA를 후처리한 B그룹의 NK 세포 활성은 RD-B1군(109.7 pg/mL)과 RD-B2군(135.4 pg/mL)으로 음성대조군(101.2 pg/mL)보다 농도 의존적으로 증가하였고, 양성대조군(115.6 pg/mL)과 유사하거나 높은 수준을 보였다(Fig. 5).

**비장의 사이토카인 발현에 미치는 영향** - 선천성 면역에 중요한 역할을 하는 대식세포의 활성화는 IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 전 염증성 사이토카인의 분비를 유도한다. 이러한 사이토카인은 세포 사멸, 염증, 식균작용 등에 관여하여 면역 기능의 활성화 및 촉진을 한다. 최근 염증과 관련된 MAPK 및 NF- $\kappa$ B 신호 전달 체계는 면역 관련 사이토카인 발현을 조절하는 중요한 전사 인자로 보고되었다.<sup>31)</sup> 홍도라지 추출물이 면역에 관여하는 사이토카인의 생산 및 조절에 영향을 줄 수 있는지 유전자 발현 분석을 통해 확인하였다. 대식세포에서 생성되는 IL-1은 세포 분비형인 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  두 가지 형태로 존재하며, 사이토카인 네트워크에 중요한 역할을 한다.<sup>32)</sup> IL-6는 감염 및 조직 손상에 대한 면역 반응으로 자극을 통해 숙주 방어를 하게 되며 생성이 조절되지 않으면 면역 관련 질환에 병리학적 영향을 미치게 된다.<sup>33)</sup> CPA 투여로 인해 저하된 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 mRNA 발현량이 홍도라지 추출물 투여군에서 음성대조군에 비하여 증가하였고, 농도 의존적인 영향을 보였으며 면역 활성이 유도됨을 나타내었다(Fig. 6A, 6B). IFN- $\gamma$ 는 Th세포에 의해 생성된 면역인자들을 자극시켜 항바이러스 작용을 하는 선천성 면역 매개체이다.<sup>23)</sup> 면역 억제 유도로 저하된 IFN- $\gamma$  발현량은 홍도라지 추출물을 투여함으로써 양성대조군과 비슷한 수준으로 증가하였다(Fig. 6C). 동물 모델이 바이러스에 감염되면 Th2 사이토카인이 과량으로 분비되고 Th1 사이토카인이 저하되는 것으로 보고 되었다.<sup>34)</sup> Th1 사이토카인의 생성량은 억제된 음성대조군 수준에서 홍도라지 추출물의 투여로 증가됨을 확인할 수 있었다. TNF- $\alpha$ 는 세균 감



**Fig. 6.** Effects of RD extracts on mRNA gene expression of C57BL/6 mice immunosuppressed by cyclophosphamide. The data was analyzed by one-way ANOVA using SPSS software and each bar presents the mean±S.E. (n=8). <sup>A-C</sup>, <sup>a-c</sup> Different letters on bars are significantly different from each other (<sup>A-C</sup>, among CPA pre-treatment; <sup>a-c</sup>, among CPA post-treatment) by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

염에 반응하여 만성 염증반응을 유도하고 면역세포 활성 조절에 중요한 역할을 하는 사이토카인이다. 하지만 분비량이 과하게 증가할 경우 급성 및 만성 염증 반응을 유도한다고

보고되었다.<sup>35,36</sup> A그룹에서 CPA 투여로 인해 면역력이 저하되고 음성대조군에서 정상군에 비하여 TNF-α 발현량이 증가하였으나 양성대조군 및 홍도라지 추출물군에서 감소하였다(Fig. 6D). B그룹에서도 CPA 처리 후 증가한 TNF-α 수준이 홍도라지 추출물군에서 정상군 범위 내로 감소되었다. TNF-α의 mRNA 발현량을 제외한 면역 조절 활성에 관련된 유전자들이 음성대조군에서 면역 저하 유도로 감소하였으며 양성대조군과 홍도라지 추출물 투여군에서는 정상군 혹은 양성대조군의 수준으로 관련 사이토카인 발현을 조절하는 효과를 보였다. CPA 후처리한 경우에도 홍도라지 추출물군은 음성대조군의 억제된 발현량을 정상수준으로 촉진하는 효과를 보였다. CPA는 비장의 조직 변화 뿐만 아니라, 세포 내 면역 세포들의 사이토카인 조절에도 영향을 미칠 수 있으나,<sup>22,24</sup> 홍도라지 추출물은 면역 억제된 마우스의 면역 매개 사이토카인의 유전자 발현에 영향을 줄 수 있는 것으로 나타났다.

### 결론

최근 면역기능과 관련된 질병에 관심이 급증하고 있고 항암 및 항염 목적으로 사용되어 온 도라지(*Platycodon grandiflorum*)에 대해 다양한 연구가 추진되고 있다. 본 연구에서는 제품 개발의 효율성을 높이기 위해 4중 4포 처리하여 만들어진 홍도라지 추출물의 면역조절 기능성을 평가하였다. 면역 저하 물질 CPA를 홍도라지 추출물 섭취 기간 전후로 마우스에 복강 투여하고(RD-A, RD-B) 면역 관련 지표들을 분석하였다. 그 결과, 홍도라지 추출물은 농도의존적으로 면역이 감소된 혈중 IgA 및 IgG 수준을 정상 혹은 양성대조군 범위로 증가시켰다. 홍도라지 추출물은 혈중 세포 매개성 면역에 관여하는 Th1(IL-1β, IL-12) 및 체액성 면역에 영향을 미치는 Th2 사이토카인(TNF-α)의 균형을 조절하는 효과가 있는 것으로 확인되었다. 또한, NK 세포 활성에서 β-glucan을 투여한 PC군과 유사한 수준으로 향상시켜, 선천적 면역계에 관여하는 것으로 나타났다. 분석 결과를 종합하여 볼 때, 홍도라지 추출물은 면역 저하 물질의 투여 시기와 관계없이 면역을 조절하여 면역 체계를 강화할 수 있고 CPA 전처리군(RD-A1, RD-A2)은 후처리군(RD-B1, RD-B2)보다 높은 면역 활성을 보였다. 따라서 홍도라지 추출물은 면역 기능 소재로서 활용 가치가 높고, 지속적인 연구를 통해 건강 증진 식품 소재로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 사사

본 연구는 2020년도 농촌진흥청 시험연구사업(PJ01381001, PJ01327901)의 연구비 지원으로 이루어졌습니다.

## 인용문헌

1. Delves, P. J. and Roitt, I. M. (2000) The immune system. *N. Engl. J. Med.* **343**: 37-49.
2. McDade, T. W., Georgiev, A. V. and Kuzawa, C. W. (2016) Trade-offs between acquired and innate immune defenses in humans. *Evol. Med. Public Health.* **2016**: 1-16.
3. Li, X., Geng, M., Peng, Y., Meng, L. and Lu, S. (2020) Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J. Pharm. Anal.* **10**: 102-108.
4. Ilangkovan, M., Jantan, I., Mesaik, M. A. and Bukhari, S. N. A. (2015) Immunosuppressive effects of the standardized extract of *Phyllanthus amarus* on cellular immune responses in Wistar-Kyoto rats. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**: 4917.
5. Kwon, D. H., Cheon, J. M., Choi, E. O., Jeong, J. W., Lee, K. W., Kim, K. Y., Kim, S. G., Kim, S. M., Hong, S. H., Park, C., Hwang, H. J. and Choi, Y. H. (2016) The immunomodulatory activity of mori folium, the leaf of *Morus alba* L., in raw 264.7 macrophages in vitro. *J. Cancer Prev.* **21**: 144-151.
6. Mrityunjaya, M., Pavithra, V., Neelam, R., Janhavi, P., Halami, P. M. and Ravindra, P. V. (2020) Immune-boosting, antioxidant and anti-inflammatory food supplements targeting pathogenesis of COVID-19. *Front. Immunol.* **11**: 570122-570122.
7. Choi, J. H., Kim, N. Y., Kim, S. Y., Park, H. R., Yu, K. W. and Lee, H. S. (2020) Immunoregulatory effects of deer antler mixture extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **49**: 19-27.
8. Na, Y. C., Ha, Y. W., Kim, Y. S. and Kim, K. J. (2008) Structural analysis of platycosides in *Platycodi Radix* by liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1189**: 467-475.
9. Ahn, H. J., You, H. J., Park, M. S., Johnston, T. V., Ku, S. and Ji, G. E. (2018) Biocatalysis of platycoside E and platycodin D3 using fungal extracellular B-glucosidase responsible for rapid platycodin D production. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 2671.
10. Zeng, L., Zhong, J., Zhu, M. and Yan, W. (2016) A feasible scaling-up separation of platycosides from *Platycodi Radix*: From analytical to semi-preparative high performance liquid chromatography coupling with a post-separation flash freezing treatment to obtain highly unstable components. *Sep. Purif. Technol.* **167**: 174-180.
11. Lee, K. S., Seong, B. J., Kim, S. I., Jee, M. G., Park, S. B., Park, M. H., Park, S. Y. and Kim, H. H. (2016) Changes in platycoside components and antimicrobial activities of bronchus disease-inducing bacteria of fermented *Platycodon grandiflorum* root by lactic acid bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **45**: 1017-1025.
12. Li, W., Zhang, W., Xiang, L., Wang, Z., Zheng, Y. N., Wang, Y. P., Zhang, J. and Chen, L. (2010) Platycoside N: a new oleanane-type triterpenoid saponin from the roots of *Platycodon grandiflorum*. *Molecules.* **15**: 8702-8708.
13. Salva, S., Marranzino, G., Villena, J., Agüero, G. and Alvarez, S. (2014) Probiotic *Lactobacillus* strains protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. *Int. Immunopharmacol.* **22**: 209-221.
14. Peng, K. W., Myers, R., Greenslade, A., Mader, E., Greiner, S., Federspiel, M. J., Dispenzieri, A. and Russell, S. J. (2013) Using clinically approved cyclophosphamide regimens to control the humoral immune response to oncolytic viruses. *Gene Ther.* **20**: 255-261.
15. Yoo, H. J., You, D. J. and Lee, K. W. (2019) Characterization and immunomodulatory effects of high molecular weight fucoidan fraction from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Mar. Drugs.* **17**: 447.
16. Yoo, J. H., Lee, Y. S., Ku, S. and Lee, H. J. (2020) *Phellinus baumii* enhances the immune response in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Nutr. Res.* **75**: 15-31.
17. Zhou, Y., Chen, X., Yi, R., Li, G., Sun, P., Qian, Y. and Zhao, X. (2018) Immunomodulatory effect of tremella polysaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Molecules* **23**: 239.
18. Lee, E. B., Lee, S. H., Park, Y. G., Choi, J. H., Lee, H. K., Jang, H. H., Hwang, K. A., Choe, J. S., Park, S. Y., Choi, A. J., Hwang, I. G., Kim, J. S., Lee, H. J., Lee, S. J. and Jeong, H. C. (2019) *Platycodon grandiflorum* extract ameliorates cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* **29**: 303-309.
19. Kim, H. S., Chung, K. T., Lee, I. H., Choi, W. B., Lee, J. H., Hyun, S. K., Kim, B. W. and Hwang, H. J. (2014) Effect of *Alpina Officinarum* ethanol extract on immunoregulatory activities in the mice. *J. Life Sci.* **24**: 61-66.
20. Takai, M., Miyazaki, Y., Tachibana, H. and Yamada, K. (2014) The enhancing effect of fucoidan derived from *Undaria pinnatifida* on immunoglobulin production by mouse spleen lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**: 1743-1747.
21. Jonsson, S., Sveinbjornsson, G., de Lapuente Portilla, A. L., Swaminathan, B., Plomp, R., Dekkers, G., Ajore, R., Al, M., Bentlage, A. E. H., Elmer, E., Eyjolfsson, G. I., Gudjonsson, I., S. A., Gullberg, U., Gylfason, A., Halldorsson, B. V., Hansson, M., Holm, H., Johansson, A., Johnsson, E., Jonasdottir, A., Ludviksson, B. R., Oddsson, A., Olafsson, I., Olafsson, S., Sigurdardottir, O., Sigurdsson, A., Stefansdottir, L., Masson, G., Sulem, P., Wuhler, M., Wihlborg, M. K., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D. F., Thorsteinsdottir, U., Vidarsson, G., Jonsdottir, I., Nilsson, B., and Stefansson, K. (2017) Identification of sequence variants influencing immunoglobulin levels. *Nat. genet.* **49**: 1182.
22. Chen, X., Wang, S., Chen, G., Wang, Z. and Kan, J. (2020) The immunomodulatory effects of *Carapax Trionycis* ultra-fine powder on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice. *J. Sci. Food Agric.* <https://doi.org/>



10.1002/jsfa.10819

23. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A. and Delgado, M. (2007) Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuro-peptides. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 52-63.
24. Kim, O. K., Yoo, S. A., Nam, D. E., Kim, Y., Kim, E., Jun, W., Hwan, K. and Lee, J. (2014) Immunomodulatory effects of *Curcuma longa* L. extract in LP-BM5 murine leukemia viruses-induced murine acquired immune deficiency syndrome. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **43**: 1317-1324.
25. Kim, S. P., Kwon, H. O., Ha, Y., Heo, S. H. and Lee, J. (2017) Immunomodulatory effects of an extract from *Pinus koraiensis* cone peel in LP-BM5 murine leukemia viruses-induced murine acquired immune deficiency syndrome. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **46**: 1027-1034.
26. Artym, J., Zimecki, M. and Kruzal, M. (2004) Normalization of peripheral blood cell composition by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice. *Med. Sci. Monit.* **10**: 84-89.
27. Lee, S. B., Cha, J., Kim, I. K., Yoon, J. C., Lee, H. J., Park, S. W., Cho, S. J., Youn, D. Y., Lee, H. J., Lee, C. H., Lee, J. M., Lee, K. Y. and Kim, J. S. (2014) A high-throughput assay of NK cell activity in whole blood and its clinical application. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**: 584-590.
28. Roberti, M. P., Julia, E. P., Rocca, Y. S., Amat, M., Bravo, A. I., Loza, J., Colo, F., Loza, C. M., Fabiano, V., Maino, M., Podhorzer, A., Fainboim, L., Barrio, M. M., Jos, M. and Estrella M. L. (2015) Overexpression of CD85j in TNBC patients inhibits Cetuximab-mediated NK-cell ADCC but can be restored with CD85j functional blockade. *Eur. J. Immunol.* **45**: 1560-1569.
29. Rocca, Y. S., Roberti, M. P., Julia, E. P., Pampena, M. B., Bruno, L., Rivero, S., Huertas, E., Sanchez Loria, F., Pairola, A., Caignard, A., Mordoh, J. and Levy, E. M. (2016) Phenotypic and functional dysregulated blood NK cells in colorectal cancer patients can be activated by cetuximab plus IL-2 or IL-15. *Front. Immunol.* **7**: 413.
30. Lee, J., Park, K. H., Ryu, J. H., Bae, H. J., Choi, A., Lee, H., Lim, J., Han, K., Park, C. H., Jung, E. S. and Oh, E. J. (2017) Natural killer cell activity for IFN-gamma production as a supportive diagnostic marker for gastric cancer. *Oncotarget.* **8**: 70431.
31. Jin, S. W., Lee, G. H., Jang, M. J., Hong, G. E., Kim, J. Y., Park, G. D., Jin, H., Kim, H. S., Choi, J. H., Choi, C. Y., Lee, S. G., Jeong, H. G. and Hwang, Y. P. (2020) Immunomodulatory activity of *Lactococcus lactis* GCWB1176 in cyclophosphamide-induced immunosuppression model. *Microorganisms.* **8**: 1175.
32. Commins, S. P., Borish, L. and Steinke, J. W. (2010) Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**: S53-S72.
33. Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. (2014) IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**: a016295.
34. Liang, B., Jiang, S., Zhang, Z., Inserra, P., Lee, J., Solkoff, D. and Watson, R. R. (2001) Anti-inflammatory effects of theophylline: modulation of immune functions during murine leukemia virus infection. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **23**: 307-319.
35. Chao, C. C., Hu, S., Molitor, T. W., Brosnan, C. F. and Berman, J. W. (1998) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. *J. Immunol.* **150**: 2659-2660.
36. Byun, E. H. (2015) Comparison study of immunomodulatory activity of polysaccharide and ethanol extracted from *Sargassum fulvellum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**: 1621-1628.

(2020. 11. 22 접수; 2020. 12. 9 심사;  
2020. 12. 10 게재확정)