

Original Article

Elastase 매개성 폐조직 손상에 대한 麥門冬湯의 보호효과

김형원¹, 양수영¹, 김민희², 남궁옥², 박양춘¹

¹대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

²대전대학교 한의과대학 신경생리학교실

Protective Effects of Maekmundong-tang on Elastase-induced Lung Injury

Hyoung-Won Kim¹, Su-Young Yang¹, Min-Hee Kim², Uk Namgung², Yang-Chun Park¹

¹Division of Respiratory System, Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

²Dept. of Neurophysiology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objective: This study aimed to evaluate the protective effects of Maekmundong-tang (MMDT) on an elastase-induced COPD model.

Materials and Methods: The extract of MMDT was treated to A549 cells and elastase-induced COPD mice model. Then, various parameters such as cell-based cytoprotective activity and histopathological findings were analyzed.

Results: MMDT showed a protective effect on elastase-induced cytotoxicity in A549 cells. This effect was correlated with analysis for caspase 3 levels, collagen and elastin contents, protein level of Cdk1, and gene expression of TNF- α and IL-1 β in A549 cells. MMDT treatment also revealed a protective effect on the elastase-induced COPD mice model. This effect was evidenced via histopathological finding including immunofluorescence stains against elastin, collagen, and caspase 3, and protein level of Cdc2 in lung tissue.

Conclusion: These data suggest that MMDT has pharmaceutical properties on COPD. This study can provide scientific evidence for the efficacy of MMDT for clinical application to patients with COPD.

Key Words : Maekmundong-tang (Maimendong-tang), chronic obstructive pulmonary disease, A549 cell, elastase

서론

만성폐쇄성폐질환(Chronic obstructive pulmonary disease, 이하 COPD)은 유해한 기체나 입자들의 흡입으로 유발된 폐의 만성적인 염증과 손상에 따라 폐실질의 파괴와 폐탄성의 소실로 기도저항이 증가하고 비가역적인 기류제한이 점차 진행되는 만성질환이다^{1,2)}. COPD는 현재 우리나라와 미국에서 각각 7위와 4위의 사망원인을 차지하고 있으며 지속적인

사망률의 증가로 2020년에는 전 세계 사망원인 중 3위에 이를 것으로 예측되고 있다^{3,5)}.

COPD의 대표적 병리변화인 폐기종은 기도벽의 파괴를 동반한 종말 세기관지(terminal bronchiole) 이하 공기공간의 비정상적, 영구적 확장으로 정의되고 있다⁶⁾. 폐기종의 대표적인 병인으로는 단백분해 효소와 항단백분해효소의 불균형으로 인해 결합조직인 elastin의 손상으로 인해 발생한다고 잘 알려져 있다²⁾. 폐조직에서 탄성을 유지하는 물질이 elastin

• Received : 7 February 2011

• Revised : 3 March 2011

• Accepted : 3 March 2011

• Correspondence to : 박양춘(Yang-Chun Park)

대전광역시 중구 대흥동 22-5 대전대학교대전한방병원 호흡기내과

Tel : +82-42-229-6919, Fax : +82-42-254-3403, E-mail : omdpyc@dju.kr

인데, elastin이 분해되어 폐조직의 탄성이 감소되는 것이다^{7,8)}. COPD로 인해 폐조직이 지속적인 손상을 받으면 대식세포와 호중구에서 elastin을 분해하는 elastase를 다량으로 분비하게 되고, 세포외부의 조직성분도 흡연과 산화스트레스로 인해서 손상을 받으면 합성과 복구에 장애가 발생하여 폐기종이 유발된다고 알려져 있다^{9,10)}. 또한 세포자사에 의한 폐포 세포의 소실이 COPD의 병리기전에서 중요한 개념으로 부각되고 있으며^{11,12)}, 특히 흡연에 대한 반응으로 혈관내피세포 성장인자 수용체가 차단되어 폐기종이 발생한다는 가설이 동물모델에서 확인되었다¹³⁾.

麥門冬湯은 장¹⁴⁾의 《金匱要略》에 처음 기재된 처방으로 火逆上氣, 咽喉不利에 止逆下氣하는 목적으로 사용한다고 하였으며, 《東醫寶鑑》에서는 八喘證의 하나인 火喘에 사용한다고 하였다¹⁵⁾. 麥門冬湯에 대한 실험적 논문으로 전 등¹⁶⁾은 항암 및 항전이 효능을, 김 등¹⁷⁾은 비장 및 흉선세포를 이용한 면역조절 효과를, 정 등¹⁸⁾은 심폐기능 및 피로회복 효과를, 김 등¹⁹⁾은 흰쥐 천식모델에 대한 영향을 관찰하였으나, COPD 병태모델을 이용하여 폐 조직세포에 미치는 영향에 대한 연구 논문은 없었다.

이에 저자는 손상 폐조직에 대한 麥門冬湯의 보호효과를 조사하기 위하여 사람 폐포의 기저 상피세포에서 유래된 A549 세포주와 elastase의 기도흡입 동물모델에서 세포의 생존 혹은 사멸에 관련된 단백질 인자들과 cytokines 및 형태학적 변화를 평가하여 유효한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료와 방법

1. 재료

1) 麥門冬湯의 구성과 추출

麥門冬湯(Maekmundong-tang: MMDT)의 구성 약물은 (주) 휴먼허브(Kyeongbuk, Korea)에서 지원받아 사용하였다(Table 1).

麥門冬湯 4첩 분량(108 g)에 증류수 1,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 동안 가열하여 얻은 액

Table 1. The Composition of Maekmundong-tang

Herbal Name	Pharmacognostic Name	Amount (g)
麥門冬	<i>Liriope Tuber</i>	10
半夏	<i>Pinellia Rhizoma</i>	5
粳米	<i>Oryzae Semen</i>	5
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	3
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2
Total		27

을 여과하였다. 이를 감압 증류장치(Rotary evaporator, Buchi B-480, Switzerland)로 농축하고, 다시 동결 건조기(Freeze dryer, Eyla FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 추출물을 냉동(-84oC) 보관하면서 생리식염수에 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. 麥門冬湯의 초기 약재 108 g으로부터 30.8 g의 추출물을 얻어 28.5%의 수율을 나타내었다.

2) A549 세포

A549 세포는 사람의 폐포 기저상피세포에서 유래된 aneuploid cell line으로서, 한국세포주 은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다.

3) ICR 수컷 생쥐

실험동물은 albino ICR 계열의 수컷 생쥐로서 고형 사료와 물을 어떠한 제약 없이 섭취하도록 하였으며, 온도는 22-24oC, 습도는 50±10 %가 유지되도록 하고, 조명은 밤낮 주기(12시간 주/야)가 조절되는 실험실 환경에서 사육하였다.

4) 시약

본 실험에 사용한 elastase는 Sigma에서 구입하였으며, 80 unit의 농도로 증류수에 녹여 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다. Anti-elastin rabbit polyclonal antibody(Calbiochem, USA), monoclonal anti-collagen (Sigma, USA), cleaved caspase 3(Cell signaling, USA), fluorescein goat anti-mouse IgG(Invitrogen,

USA), rhodamine red-X goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA), Hoechst 33258(St. Louis, USA), anti-Cyclin B1 developed in rabbit IgG fraction of antiserum(Sigma, USA), polyclonal anti-cdc2(1:1,500, Santa Cruz biotechnology, USA), phospho-p44/42 Erk1/2 kinase antibody(1:4,000, Cell Signaling, USA), p44/42 Erk1/2 kinase antibody(1:4,000, Cell Signaling, USA), Actin(MP Biomedicals, USA), goat anti-rabbit IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) *In vitro* 실험

(1) 세포 배양

A549 세포는 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)과 penicillin(100 units/ml)/streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 media(Lonza, USA)로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. Cell은 75 cm² flask(SPL, Korea)에서 충분히 증식시킨 후, 3일 간격으로 계대 배양하였다.

(2) 세포 생존율

MTT[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 환원법을 이용하여 측정하였다. 먼저 96 well plate에 1 × 10⁵ 개의 A549 세포를 분주하고, (i) 정상군(생리식염수), (ii) elastase(1 unit) 처리 대조군, (iii) elastase(1 unit)와 麥門冬湯 추출물을 각각 (0.1 - 1 mg/ml)로 처리한 실험군으로 나누어, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양하였다. 각 well에 MTT solution을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포의 생존율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{시료처리군의 흡광도}}{\text{정상군의 흡광도}} \times 100$$

(3) 면역형광염색

이중 면역형광 염색법(double immunofluorescence

staining)을 수행하기 위하여, 유리 coverslip을 poly-L-ornithine(0.1 mg/ml, Sigma, USA)과 laminin(0.02 mg/ml, Collaborate Research, USA) 용액에 넣어 실온에서 pre-coating 하였다. 1 × 10⁵ 개의 A549 세포를 pre-coating된 coverslip에 분주하고, (i) 정상군(생리식염수), (ii) elastase(1 unit) 처리 대조군, (iii) elastase(1 unit)와 麥門冬湯 추출물 0.5 mg/ml 처리 실험군으로 나누어 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. Coverslip 표면에서 자란 세포를 4% paraformaldehyde/4% sucrose가 혼합된 인산완충용액(phosphate buffer saline; PBS)으로 상온에서 40분 동안 고정하였다. 비특이적 결합을 막기 위해 blocking buffer에 담근 후 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 1차 항체는 2.5% bovine serum albumin(BSA, Sigma, USA), 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 정해진 비율로 혼합하여 처리한 후, 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 PBST(PBS plus 0.1% triton X-100)로 조직을 씻어내고, 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 Fluorescein-goat anti-mouse antibody(green)와 Rhodamine-goat anti-rabbit antibody(red)를 1:400으로 혼합하여 암실에서 1시간 30분 동안 2차 항체 처리를 수행하였다. 2차 항체 처리 후 3회에 걸쳐 PBST로 세척을 수행하였다. Hoechst 핵 염색을 수행하는 경우 2회 세척 후 0.25% Hoechst 33258 형광염료를 함유한 PBST 용액으로 처리 후 다시 PBST 용액으로 세척하였다. 2차 항체는 빛에 민감하기 때문에 반응시간 동안 암실에서 수행하였다. 염색된 세포들은 형광현미경(Zeiss fluorescent microscope)을 통해 관찰하였고, 디지털 카메라로 찍은 모든 images는 Adobe Photoshop(version 5.5)을 이용하여 green과 red의 밝기와 강도를 같은 비율로 조절하여 관찰하였다. 그리고 Photoshop program의 Layer blending mode options를 이용하여 images를 중복시켜 관찰함으로써 각 단백질의 발현 위치를 관찰하였다. 본 실험에 사용한 1차 항체는 anti-elastin rabbit polyclonal antibody(1:500, Calbiochem, Germany),

monoclonal anti-collagen(1:400, Sigma, USA), 그리고 cleaved caspase-3 antibody(1:500, Cell Signaling, USA) 등 이었다.

(4) Western blot 분석

A549 세포를 60 mm culture dish에 2×10^5 cells/ml 로 분주한 후 (i) 정상군(생리식염수), (ii) elastase (1 unit) 처리 대조군, (iii) elastase(1 unit)와 麥門冬湯 추출물 0.3, 0.5 mg/ml 처리 실험군으로 나누어 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양한 A549 세포는 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄(pH 7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후 50 - 200 µl의 triton lysis buffer(20 mM Tris, pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM β-glycerophosphate, pH 7.14, 2 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 2 µM benzamidin, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF)에 담가 초음파 분해하였다. 그 다음 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 그 중 10 µg 단백질을 western blot 분석에 사용하였다. 정량한 단백질은 12% SDS-polyacrylamide gel(1.5M Tris base, 10% sodium dodecyl sulfate, 30% acrylamide, 10% ammonium sulfate, TEMED) 상에서 전기영동 시킨 후 PVDF membrane(Pall Corporation, USA)에 전기이동 시켰다. Antibody와의 비특이적 결합을 막기 위해 3% BSA, 0.1% Tween 20을 함유하고 있는 TBS buffer에서 membrane을 1시간 동안 상온 반응시키고 4°C에서 16시간 동안 blocking buffer 상에서 반응을 진행하였다. 반응을 끝낸 membrane을 washing 한 후 1차 항체를 blocking buffer(1 × TBS buffer, 3% BSA, 0.1% Tween 20)에 정해진 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 그 다음 membrane을 씻어내고 goat anti-rabbit IgG(Santa Cruz Biotechnology, USA) 또는 anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA)가 결합되어 있는 horseradish peroxidase를 1:2000의 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 처리하고 다시 한 번 씻어냈다. 마지막으로 membrane에

부착된 단백질을 western blotting detection system을 이용하여 측정하였으며 Kodak Scientific Imaging Film(Eastman Kodak Co., USA)에 감광 하였다. 본 실험에 사용한 1차 항체는 anti-elastin rabbit polyclonal antibody(1:1,000, Calbiochem, Germany), monoclonal anti-collagen(1:400, Sigma, USA), anti-cyclin B1(1:1,500, Sigma, USA), polyclonal anti-cdc2(1:1,500, Santa Cruz, Biotechnology, USA), cleaved caspase-3 antibody(1:1,500, Cell Signaling, USA), phospho-p44/42 Erk1/2 kinase antibody (1:4,000, Cell Signaling, USA), p44/42 Erk1/2 kinase antibody(1:4,000, Cell Signaling, USA), actin (1:15,000, Biomedicals, USA) 등 이었다.

(5) RNA 추출 및 RT-PCR

A549 세포를 60 mm culture dish에 2×10^5 cells/ml 로 분주한 후 (i) 정상군(생리식염수), (ii) elastase(1 unit) 처리 대조군, (iii) elastase(1 unit)와 麥門冬湯 추출물 0.3, 0.5 mg/ml 처리 실험군으로 나누어 24시간 동안 배양하였다. RNA는 약제 처리 후 24시간 뒤에 easy-BLUE 시약(Intron Biotechnology, Korea)을 사용하여 분리하였다. 배양된 세포에 1 ml의 easy-BLUE 시약을 넣고, 상온에서 10초간 세포를 용해시킨 후, 여기에 200 µl의 chloroform을 추가하여 잘 혼합한 후 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리 하였다. 분리된 상층액 400 µl에 동일한 양의 2-propanol을 첨가하고 상온에 10분간 방치시킨 후, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 분리된 RNA는 1 ml의 75% ethanol을 첨가하여, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 75% ethanol을 제거한 뒤, diethylpyrocarbonate(DEPC) 첨가된 증류수에 용해시킨 후 260 nm에서 흡광도를 측정하고, 농도를 정량하여 실험에 사용하였다. cDNA 합성은 1 µg oligo-dT와 역전사효소(MMLV-RT, Promega, USA)를 사용하여 합성하였다. PCR은 Taq polymerase (Promega, USA)와 각각의 특이 primer를 이용하여 실험하였으며, PCR 조건은 94°C-5min, 94°C-30sec, 55°C-30sec, 72°C-30sec, 72°C-7min으로 30 cycle로

진행하였다. 실험에 사용된 primer β -actin, IL-1 β , TNF- α 는 (주) Bioneer(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 cDNA에 대응하는 서열로 합성하였다(Table 2).

2) *In vivo* 실험

(1) Elastase 폐손상 모델

7주령 ICR계 수컷 생쥐를 각각 3마리씩 (i) 아무런 처리를 하지 않은 정상군, (ii) elastase(0.4 unit, 100 μ l) 처리한 대조군, (iii) elastase 처리 후 麥門冬湯 추출물(400 mg/kg, *p.o*) 투여 실험군으로 나누었다. 대조군과 실험군은 마취를 약간 시킨 후 움직임이 없을 때 앞니를 고정시킨 상태에서 코에 elastase를 0.4 unit의 농도로 100 μ l 흡입시켰다. 폐조직 손상을 유도한 후 2일 동안 경과를 관찰한 다음, 3일째부터 약물을 투여하였다. 실험군에만 7일간 麥門冬湯 추출물을 경구 투여하였고 정상군과 대조군은 멸균 증류수를 투여하였으며, 실험이 끝난 후 각 군 생쥐의 폐조직을 분리하였다(Scheme 1).

(2) Hemotoxylin & Eosin 염색

폐조직은 -20°C에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20 μ m의 두께로 잘라 슬라이드에 붙였다. H & E

staining을 실시하기 위하여 슬라이드를 hematoxylin에 1분 동안 담가 둔 후 흐르는 증류수에 여러 번 세척 후 eosin에 30초간 담그고 흐르는 증류수로 여러 번 세척하였다. 그 다음 50%, 70%, 95% ethanol에 차례로 여러 번 씻으며 염색을 적당히 제거한 후 xylene에 1분간 담가두었다. 마지막으로 gelatin mount medium을 이용하여 cover-slide를 영구 부착하였으며, 이러한 샘플들은 광학현미경(Light microscope, Nikon, Japan)을 통해 관찰하였다.

(3) 면역형광염색

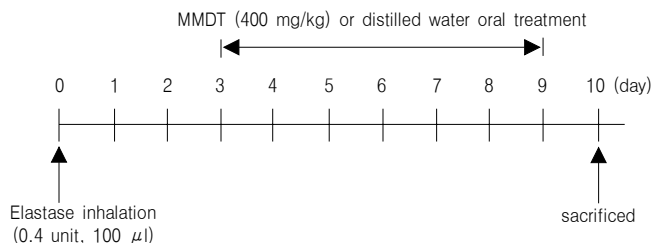
생쥐 폐조직은 -20°C에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20 μ m의 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켰다. 이중 면역형광 염색법(double immunofluorescence staining)을 수행하기 위해, 4% paraformaldehyde, 4% sucrose가 혼합된 PBS에 45분 동안 슬라이드를 넣어 조직을 고정하였다. 이후의 실험 과정은 *in vitro* 실험과정과 동일하였다.

(4) Western blot 분석

폐조직을 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄(pH 7.4)가 함유된 PBS로

Table 2. Primer Sequences

Target Gene		Primer Sequence	Product Size (bp)
β -actin	Forward	CAC ACT GTG CCC ATC TAT GA	409
	Reverse	TAC GGA TGT CAA CGT CAC AC	
IL-1 β	Forward	GCT GAT GGC CCT AAA CAG	672
	Reverse	GAA GAC GGG CAT GTT TTC	
TNF- α	Forward	AGC CCA TGT TGT AGC AAA CC	516
	Reverse	GGT TGA GGG TGT CTG AAG GA	



Scheme 1. Elastase induced lung injury model.

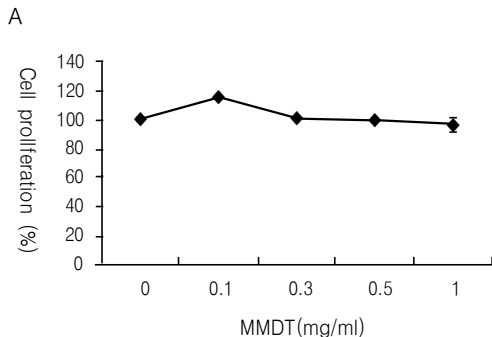
씻은 후 50-200 μl 의 triton lysis buffer(20 mM Tris, pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM β -glycerophosphate, pH 7.14, 2 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 1% Triton X-100, 10% glycerol, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 3 μM benzamidine, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF) 용액 하에서 분해하였다. 그 다음 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 15 μg 의 단백질을 western blot 분석에 사용하였다. 이후의 실험 과정은 *in vitro* 실험 과정과 동일하였다.

(5) 조직 sample의 현미경 분석

면역형광조직 및 H & E 염색조직은 Nikon 형광 현미경을 이용하여 분석한 후 현미경에 부착된 디지털 카메라로 이미지를 포착하여 ACT-1 software를 이용하여 분석하였다. 중첩이미지는 Photoshop 프로그램 상의 image blend 모드를 이용하여 분석하였다.

3) 통계분석

실험에서 얻은 결과를 one-way ANOVA(SPSS Ver 12.0)로 분석하였으며 Duncan의 방법으로 사후 검정을 하였다. 대조군을 정상군과, 실험군을 대조군과 비교하여 $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.



결과

1. *In vitro*

1) 세포생존에 미치는 영향

A549 세포에 麥門冬湯을 0.1 mg/ml에서 1.0 mg/ml의 농도범위로 처리한 결과, 세포생존율은 100 - 120%의 생존율 범위를 유지하는 것으로 나타났다 (Fig. 1A). A549 세포에 elastase를 처리하여 유도된 세포독성에서, elastase를 단독으로 처리한 세포는 정상군에 비해 78%의 세포생존율을 보여 elastase에 의한 세포독성을 확인할 수 있었고, 반면에 麥門冬湯과 elastase를 같이 처리한 세포에서는 0.3 mg/ml과 0.5 mg/ml의 농도에서 각각 정상군 대비 97%와 99%의 세포생존율을 나타내어 麥門冬湯이 elastase가 유도하는 세포독성으로부터 세포를 보호하고 있다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

2) Caspase 3 생성에 미치는 영향

Elastase로 유도시킨 세포사멸에 대한 麥門冬湯의 효과를 알아보기 위하여 세포사멸 과정을 예측하는데 유용한 표지 단백질인 caspase 3의 활성을 면역형광염색을 통해 관찰하였다. 정상군에서는 caspase 3의 활성이 관찰되지 않았으며, A549 세포에 elastase

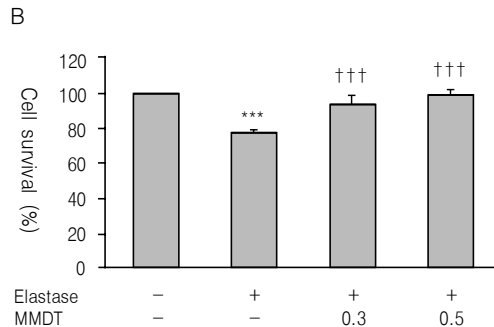


Fig. 1. Effect of MMDT on proliferation of A549 cell. (A) A549 cells were harvested for MTT assay after treatment with various concentrations of MMDT. (B) A549 cells were treated with elastase (1 unit) alone or in the presence of 0.3 mg/ml and 0.5 mg/ml of MMDT.

***: $p < 0.001$ compared to control by ANOVA test.

†††: $p < 0.001$ compared to elastase by ANOVA test.

를 처리한 경우 caspase 3 활성을 나타내는 세포가 관찰되었다. 반면에 麥門冬湯을 동시 처리한 경우에는 caspase 3 활성을 나타내는 세포의 증가 억제 양상을 나타내었다(Fig. 2).

3) Elastin 및 collagen 생성에 미치는 영향

Elastase로 유도시킨 A549 세포의 elastin 분해에 대한 麥門冬湯의 보호효과를 면역형광염색을 이용하여 관찰하였다. 아무것도 처리하지 않은 정상군 세포의 경우 elastin 단백질은 세포질 부분에서 잘 관찰되었고, elastase를 처리한 경우 elastin에 의하여

염색된 정도가 감소하였으며, 세포가 작은 구형 형태로 염색된 것을 관찰할 수 있었다. 麥門冬湯을 동시에 처리한 경우, elastin에 의하여 염색된 정도가 정상군과 유사한 형태를 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 3A). Elastase로 유도시킨 A549 세포의 collagen 분해에 대한 麥門冬湯의 보호효과를 면역형광염색을 이용하여 관찰하였다. 아무것도 처리하지 않은 정상군 세포의 경우 collagen 단백질은 세포질 부분에서 잘 관찰되었고, elastase를 처리한 경우 collagen에 의하여 염색된 정도가 감소하였으며, 麥門冬湯을 동시에 처리한 경우 collagen에 의하여

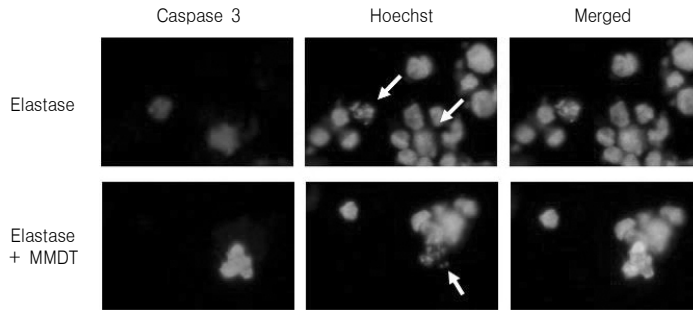


Fig. 2. Effect of MMDT on elastase-induced apoptosis via immunofluorescence staining of caspase 3. A549 cells were treated with elastase or elastase plus MMDT (0.5 mg/ml) for 24 hr and used for caspase 3 immunostaining (red) and Hoechst nuclear staining (blue). The nuclei positive to caspase 3 were marked by arrows in Hoechst-stained image.

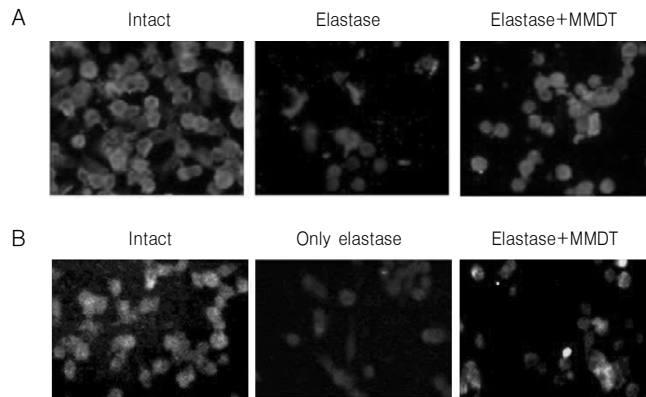


Fig. 3. Effect of MMDT on intra-cellular elastin (A) and collagen (B) level in elastase-treated A549 cells. A549 cells were cultured and treated with elastase or elastase plus MMDT (0.5 mg/ml) for 24 hr. Immunofluorescence staining against elastin (red) and collagen (green) were performed.

염색된 정도가 정상군과 유사한 형태를 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 3B).

4) Cdk1, cyclin B1 및 phospho-Erk1 생성에

미치는 영향

세포의 증식을 유도하는 단백질인 Cdk1 단백질 생성 수준을 A549 세포에서 western blot 방법으로 조사한 결과, elastase 처리는 Cdk1 단백질의 발현을 현저하게 감소시킨 반면, 麥門冬湯을 동시에 처리한 경우에는 Cdk1 단백질의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 세포 증식의 변화에 대한 Cdk1의 활성도 변화를 Cdk1의 조절 단백질인 cyclin B1 단백질 발현 수준의 변화를 통하여 조사한 결과, elastase 처리는 cyclin B1 단백질의 발현을 증가시켰으며, 麥門冬湯을 동시에 처리한 실험군도 대조군과 유사한 발현 수준을 나타내었다(Fig. 4B). 세포 증식과 생존에 관여하는 대표적인 단백질인 Erk1/2 단백질의 활성도를 알아보기 위하여 A549 세포에서 western blot 방법으로 조사한 결과, A549 세포에 elastase를 처리한 결과, phospho-Erk1/2 단

백질 수준은 정상군에 비해 현저히 감소한 것으로 관찰되었고, 麥門冬湯의 동시 처리도 대조군과 유사한 양상을 나타내었다(Fig. 4C).

5) 염증성 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향

A549 세포에 elastase와 麥門冬湯의 처리에 의한 대표적 염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현 수준을 RT-PCR 방법으로 조사하였다. Elastase를 처리한 세포는 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현이 증가하였고, 麥門冬湯을 동시에 처리한 세포에서는 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현의 증가를 억제시켰다(Fig. 5).

2. In vivo

1) 조직학적 변화

폐조직에서 elastase 처리에 의해 조직학적인 변화를 보기 위해 H & E 염색을 통해 비교하였다. 정상 폐조직에서는 폐포관의 크기가 균일하고 일정하게 보이는 반면, elastase 처리한 폐조직에서는 폐포관이 불규칙하게 확장되고 점막 상피층의 비후와 세포의 침윤을 관찰할 수 있었다. Elastase와 麥門冬湯

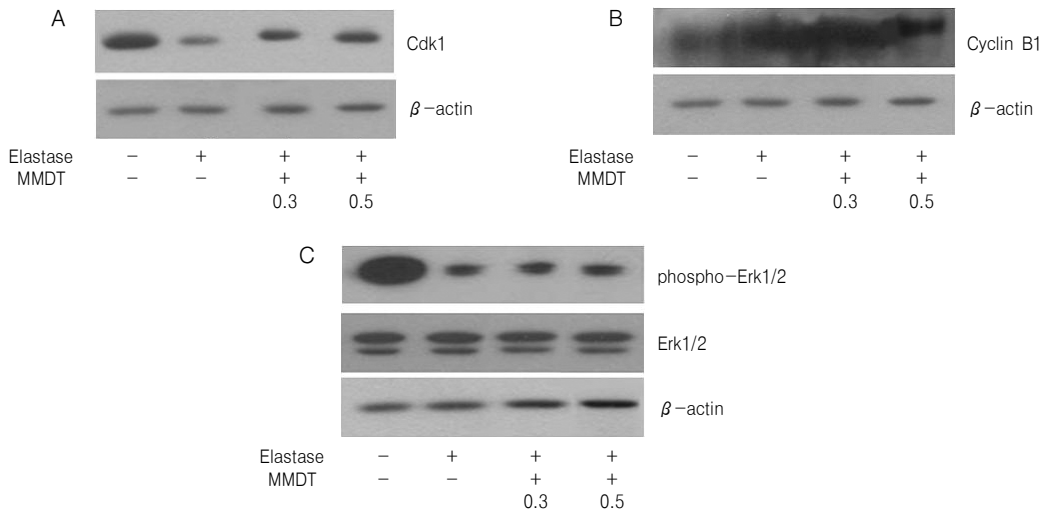


Fig. 4. Effects of MMDT on Cdk1 (A), cyclin B1 (B) and phospho-Erk1/2 (C) protein level in elastase-treated A549 cells. A549 cells were cultured and treated with elastase or elastase plus MMDT (0.3 or 0.5 mg/ml) for 24 hr. Cell lysate was used for western blot analysis with anti-Cdk1 antibody. Western blot analysis for actin protein was performed as an internal control.

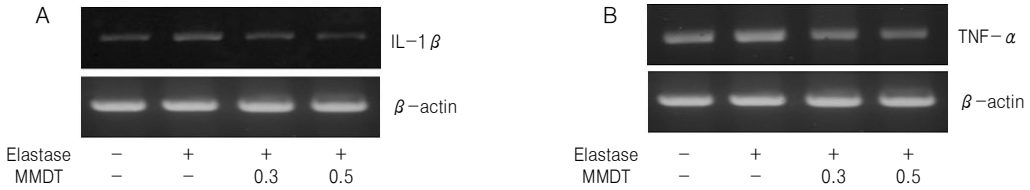


Fig. 5. Effects of MMDT on IL-1β mRNA (A) and TNF-α mRNA (B) expression in elastase-treated A549 cells. A549 cells were cultured and treated with elastase or elastase plus MMDT (0.3 or 0.5 mg/ml) for 24 hr. RT-PCR analysis of IL-1β mRNA and TNF-α mRNA expression was performed with β-actin as an internal control.

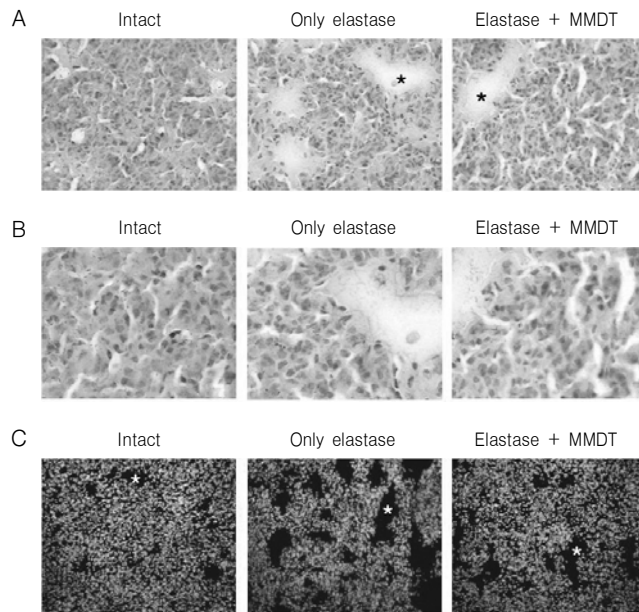


Fig. 6. Histopathological analysis of lung tissues. Mice were inhaled with elastase (0.4 unit) once, and then treated with MMDT (400 mg/kg, *p.o.*) or distilled water for 7 days. Lung tissues were examined under microscope after H & E staining (A: 200 × magnification, B: 400 × magnification) and Hoechst nuclear staining (C: 200 × magnification). Alveolar ducts are marked by asterisks.

을 동시에 처리한 경우에는 폐포관의 크기는 커졌지만 elastase만 처리한 경우보다는 조직학적 형태의 변화가 적게 관찰되었다(Fig. 6A, 6B). Elastase 처리에 따른 세포수의 변화를 관찰하기 위해 Hoechst 33258을 이용한 세포핵의 염색을 통해 분석하였다. 정상 조직의 경우 핵이 일정한 분포를 나타내었으나 elastase 처리를 한 경우 폐포관의 형태가 커지고, 주변부에 핵이 높은 밀도를 나타내었다. Elastase와 麥門冬湯을 동시에 처리한 경우에는 정상 조직과 유사

한 수준으로 세포핵이 염색된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6C).

2) Caspase 3 생성에 미치는 영향

폐조직상에서 caspase 3 단백질의 생성 정도를 확인하고자 면역형광염색을 통해 관찰하였다. 정상군에서는 caspase 3 단백질 신호가 나타나지 않았으나, elastase 처리한 경우에는 폐포 주변에서 caspase 3 신호가 뚜렷하게 관찰되었다. Elastase와 麥門冬湯

을 동시에 처리한 경우에는 폐조직 전체적으로 caspase 3 신호가 나타났으며 elastase만 처리한 경우보다는 약한 신호가 나타났다(Fig. 7).

3) Elastin 및 collagen 생성에 미치는 영향

Elastase 처리에 의한 elastin과 collagen 단백질의 생성수준을 알아보기 위해 western blot을 실시한 결과, 아무것도 처리하지 않은 정상군에 비해 elastase 처리한 경우 elastin 수준이 감소하였고, elastase와 麥門冬湯을 동시에 처리한 경우 정상군과 유사한 수준으로 증가하는 것이 관찰되었으나 collagen 수준은 세 군에서 차이가 없었다(Fig. 8A, 8B). Elastase 처리에 의한 elastin과 collagen 생성수준을 폐조직

상에서 생성 및 분포를 관찰하기 위해 면역형광염색을 실시한 결과, 정상군에서는 폐조직 전체적으로 균일하게 elastin과 collagen 단백질이 관찰되는 반면, elastase 처리에 의해 elastin과 collagen 단백질의 수준이 크게 감소하였고, elastase와 麥門冬湯을 동시에 처리한 경우 정상군과 유사하게 조직 전체에서 걸쳐 고르게 관찰되었다(Fig. 8C, 8D).

4) Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1 생성에 미치는 영향

Western blot 실시한 결과, 아무 것도 처리하지 않은 정상군에서 Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1 단백질의 생성수준은 낮았으나, elastase 처리한 경

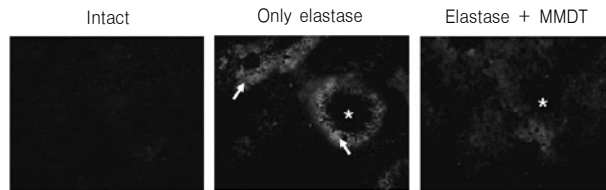


Fig. 7. Immunofluorescence analysis for caspase 3 in lung tissue. Mice were inhaled with elastase (0.4 unit) once, and then treated with MMDT (400 mg/kg, *p.o*) or distilled water for 7 days. The tissue was examined under microscope after immunofluorescence staining against caspase 3. Asterisks indicate alveolar ducts, and the arrows indicate the densely stained area of caspase 3.

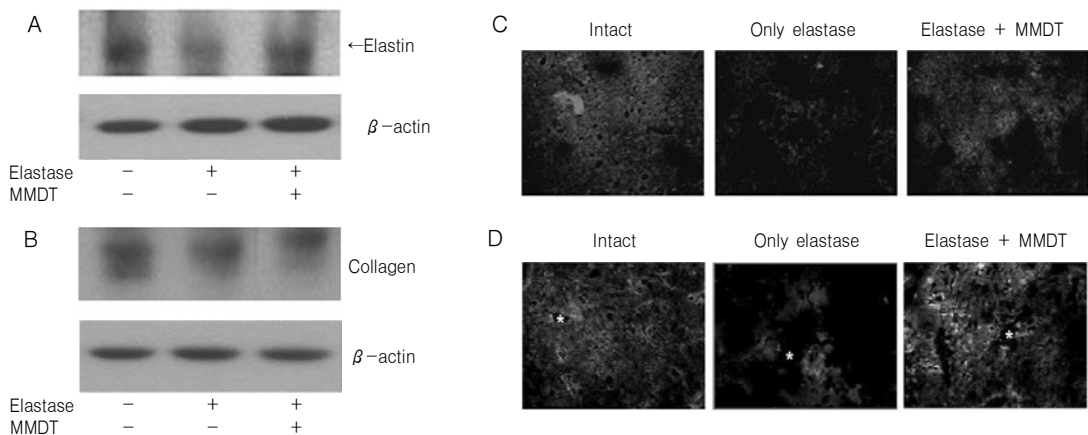


Fig. 8. Elastin and collagen protein analysis in lung tissue. Mice were inhaled with elastase (0.4 unit) once, and then treated with MMDT (400 mg/kg, *p.o*) or distilled water for 7 days. Elastin (A) and collagen (B) protein was analyzed as comparing to actin by western blotting. The tissue was examined under microscope after immunofluorescence staining against elastin (C) and collagen (D). Asterisks indicate alveolar ducts.

우에는 Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1 단백질의 수준이 증가하였으며, elastase와 麥門冬湯을 동시 처리한 경우에는 Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1 단백질 수준이 더욱 증가하거나 대조군과 유사하였다(Fig. 9A-C). 폐조직에서 Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1 단백질의 분포를 보기위해 면역형광 염색을 실시한 결과, 정상군에서는 폐조직에 약하게 관찰되었고, elastase 처리한 경우에는 폐포 주변부분에서 Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1 단백질 신호를 관찰할 수 있었다. Elastase와 麥門冬湯을 동시 처리한 경우에는 Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1 단백질 신호가 대조군에 비하여 폐조직 전체적으로 고르게 관찰되었다(Fig. 9D-F).

고 찰

COPD의 폐기종 양상은 말초기도의 폐쇄, 폐의 탄성 소실과 과도한 팽창, 환기 장애, 가스교환장애, 혈류장애의 특징을 보이며, 한의학의 咳而上氣하고 煩燥하는 肺脹證과 呼吸促急한 喘證의 범주에 속한다²⁰. 麥門冬湯은 맥문동이 주약으로 구성된 처방으로 八喘證에서 火喘의 치료에 사용된다¹⁵. 麥門冬湯의 구성약물을 살펴보면 麥門冬은 養陰潤肺하여 肺胃의 陰不足을 清養하고, 半夏는 燥濕化痰, 開散結取하며, 人蔘, 甘草, 粳米, 大棗는 益氣生津, 補益胃土하여 資助肺金함으로써^{21,22} 麥門冬湯이 肺虛有熱 津短한 제반 虛熱型 肺病證에 작용하고 있음을 알 수 있다.

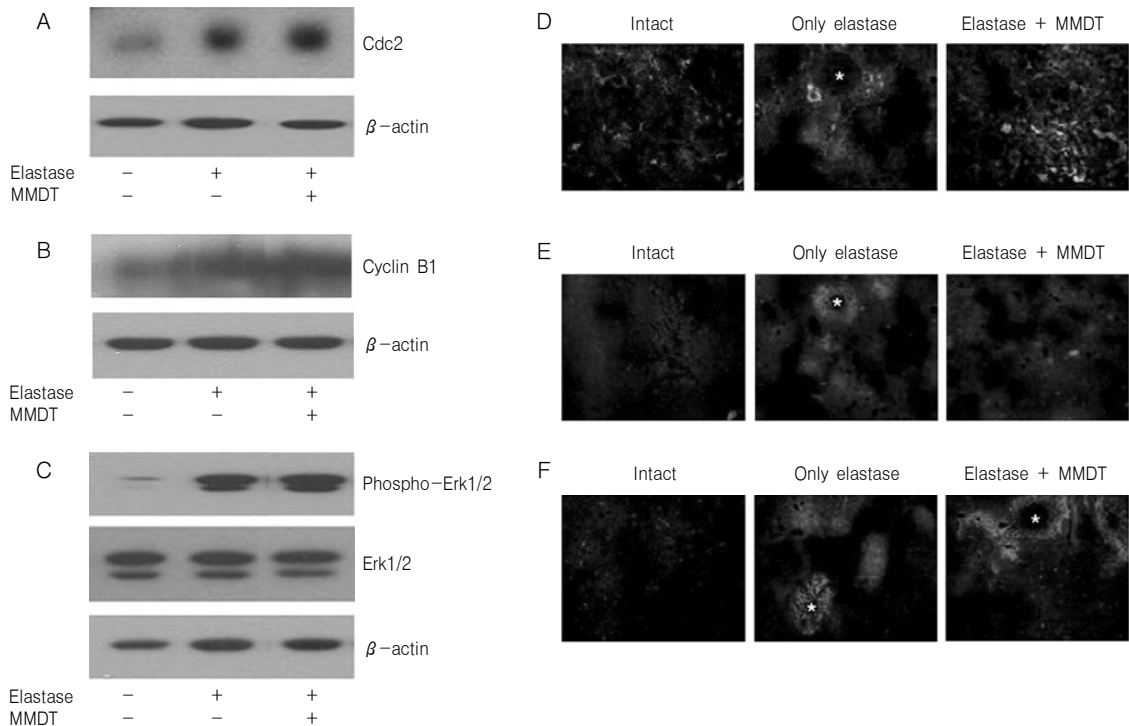


Fig. 9. Cdc2, cyclin B1 and phospho-Erk1 protein analysis in lung tissue. Mice were inhaled with elastase (0.4 unit) once, and then treated with MMDT (400 mg/kg, *p.o*) or distilled water for 7 days. Cdc2 (A), cyclin B1 (B) and phospho-Erk1 (C) protein was analyzed as comparing to actin by western blotting. The tissue was examined under microscope after immunofluorescence staining against Cdc2 (D), cyclin B1 (E) and phospho-Erk1 (F). Asterisks indicate alveolar ducts.

본 연구에서는 폐포상피세포주인 A549 세포에 직접적인 elastase 처리 및 생쥐의 기도내 elastase 흡입을 통한 동물모델을 이용하여 COPD과 유사한 세포손상을 유도하여 麥門冬湯을 처리할 경우 세포의 보호효과 및 치료약물로서의 가능성을 제시하고자 하였다. Elastase 처리를 통해 세포 생존율이 어떻게 변화하는지 알아보고자 *in vitro*에서는 폐포상피세포주인 A549 세포를 이용하였다. A549 세포는 human type II lung cell line으로 BEAS-2B human bronchial cell line과 함께 폐조직의 유해자극에 대한 반응성의 연구에 가장 보편적으로 사용되는 세포주이다²³⁾. *In vivo*에서는 elastase 처리 및 麥門冬湯 처리에 의한 폐조직의 반응성과 보호효과를 알아보고자 생쥐의 기도내 elastase 흡입을 통해 폐조직의 반응성에 대해 생화학적, 조직학적 분석을 실시하였다. *In vitro*와 *in vivo*상의 환경적인 조건차이로 인해 반응성이 다를 수 있으나 본 연구결과 *in vitro* A549 세포와 *in vivo* 폐조직의 elastase 자극에 대한 반응성이 상당히 유사하게 관찰되었다.

먼저 A549 세포를 이용하여 0.1, 0.3, 0.5, 1 mg/ml 처리한 결과, 세포 증식반응이 일정하게 유지되어 약물 자체에 독성이 없는 것으로 판단되었다. 또한 elastase만 처리한 경우 생존율이 정상군에 비해 78% 정도로 감소하였고, 麥門冬湯을 0.3 및 0.5 mg/ml 농도별로 동시에 처리한 경우에는 세포생존율이 정상군과 거의 비슷한 수준을 유지하여 elastase에 의한 자극에 보호효과가 있다고 생각된다. 이러한 결과는 elastase 처리 후 배양한 A549 세포의 핵을 관찰시 상당히 감소한 결과와 일치한다. 세포 사멸에 있어서 세포의 apoptosis가 관여하는 여부를 알아보고자 apoptosis 과정에 주로 관여하는 단백질인 caspase 3를 면역형광염색을 통해 관찰하였다. A549 세포에서는 elastase 처리로 정상군에서는 발현되지 않던 caspase 3 양성 세포가 나타났고, 폐조직에서는 elastase 처리로 폐조직이 분해되어 폐포 주변부가 확장되어 폐포공간이 뚜렷이 증가된 것을 관찰할 수 있었으며 Hoechst 핵 염색 및 H&E 염색 결과에서도 폐포주변부의 세포층에서 강한 염색 반응이 나

타났다. 특히 H&E 염색에서는 hematoxylin이 강하게 염색되었는데 이는 중성구 세포의 침윤과 같은 염증매개성 침윤반응이 진행되고 있음을 보여주는 결과이다. 이와 같은 조직학적 변화와 함께 caspase 3 단백질에 대한 양성반응은 elastase를 처리한 폐포의 주변부에서 뚜렷하게 관찰되었다. 즉, *in vitro*와 *in vivo* 모두에서 elastase에 의해 폐손상과 유사한 기전의 손상반응이 나타나고 있음을 알 수 있었다.

한편 elastase와 麥門冬湯을 동시에 처리할 경우에는 caspase 3 단백질에 양성반응을 나타내는 세포의 수가 elastase만 처리한 경우에 비해 A549 세포 및 폐조직 모두에서 큰 폭으로 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 麥門冬湯이 elastase에 의한 폐조직 손상을 억제시킬 수 있다고 판단되며, 더 나아가 폐조직 손상 억제를 통해 손상이 가속화되지 않고, 손상을 최소화하며 치료약물로의 활용 가능성이 있는 약물로 평가될 수 있을 것이라고 사료된다.

COPD의 발생기전으로 잘 알려져 있는 가설이 단백분해효소의 불균형으로 인해 발생하는 결합조직의 손상이다. 특히 이 가설에서 결합조직의 손상이란 elastin의 손상을 말하는데 elastin은 폐조직에서 탄성을 유지하는 물질로 elastin이 분해되면 폐조직의 탄성이 감소된다. Elastin이 분해되면 elastin과 결합되어 있는 desmosine이 분리되는데 실제 COPD 환자의 소변에서 desmosine이 증가하였다는 연구결과^{24,25)}를 통해 단백분해효소에 의한 elastin의 분해가 COPD의 병인과 관련이 있음을 알 수 있다. 본 연구에서는 elastase 처리로 감소된 elastin의 발현이 麥門冬湯의 투여로 일정하게 회복되는 양상을 보여 麥門冬湯이 elastin의 분해를 억제하는 작용을 나타내는 것으로 생각된다.

또한 폐손상의 회복과 관련되는 collagen 단백질은 조직 손상시 주로 섬유아세포에서 생성이 증가되거나 기존 손상조직에 존재하는 collagen 섬유 분해반응도 일어난다고 알려져 있다²⁶⁾. 본 연구의 면역형광염색 결과, elastase 처리가 collagen 생성수준을 정상군에 비해 감소시켰고, 麥門冬湯의 동시 처리는 collagen 생성수준을 증가시켰다. 이러한 결과는 宣

肺定喘湯이 elastin과 collagen의 감소를 억제하였던 결과와도 일치하는 것으로²⁷⁾ 麥門冬湯이 collagen 합성과정 촉진 및 collagen 분해 억제를 통해 collagen의 생성을 증가시키는 작용을 나타내는 것으로 생각된다.

일반적으로 폐조직과 같은 외피세포들은 빠른 세포생성주기를 가지며, elastase와 같은 자극물질에 의한 세포의 손상, 생존율과 사멸과 관련된 일련의 반응들은 세포증식과정과 밀접하게 연관되어 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 본 연구에서는 elastase 및 麥門冬湯 처리에 의해 A549 세포 및 생쥐의 폐조직의 변화를 조사하기 위해 세포증식과정에서 핵심적인 역할을 하는 Cdc2 kinase의 활성도를 조사하였다. Cdc2 단백질은 cell cycle의 G2 phase-M기에 관여하여 세포의 증식을 촉진시킨다고 알려져 있다^{29,30)}. 또한 Cdc2 kinase는 cyclin B1 조절 단백질의 결합에 의하여 활성화되고 세포분열시 발생하는 주요변화에 관여하는 단백질들을 인산화시킴으로서 세포분열의 진행에 결정적 역할을 하는 것으로 알려져 있다³¹⁻³⁴⁾.

A549 세포에서 elastase를 처리하여 Cdc2 및 cyclin B1 단백질 생성수준을 조사한 결과, Cdc2 단백질의 경우는 정상군에서는 강하게 생성되며, elastase를 처리한 군에서는 발현은 되나 정상군에 비해 약하게 발현되고, 麥門冬湯을 동시에 처리한 경우에 증가한 것을 확인하였다. 또한 cyclin B1의 생성은 elastase 처리에서 증가하였고 麥門冬湯의 동시 처리로 더욱 증가하는 양상이 관찰되었다. 반면 폐조직에서는 조절의 양상에 다소 차이가 있었다. Cdc2와 cyclin B1 모두 정상군에서는 매우 약하게 생성되었고, elastase 처리에서 증가하였으며, 麥門冬湯을 같이 처리하였을 때는 elastase만 처리한 것에 비해 더욱 증가하였다. 또한 면역형광염색에서 Cdc2와 cyclin B1 모두 elastase만 처리한 경우에는 폐포 주변부에서 주로 활성이 나타났으나 麥門冬湯을 같이 처리한 경우에는 폐포를 비롯한 조직 전체에서 활성이 증가하는 것으로 확인되었다. 이는 폐조직의 경우 elastase에 의해 손상 받은 폐조직의 염증세포에서 Cdc2 활

성도가 증가하여 손상 받은 조직의 재생을 촉진하려는 반응을 나타내는 것으로서, 麥門冬湯이 이러한 작용을 증가시키는 것으로 판단된다. 이와 같은 결과는 elastase를 처리한 폐조직의 폐포주변부에 증가된 Hoechst 염색 핵 숫자가 증가한 것보다도 밀접한 관련이 있으며, elastase 처리에 의해 폐포의 세포 수 자체는 감소하나 손상으로 인한 염증반응성 세포의 증가로 인해 Cdc2 활성도가 증가하고 麥門冬湯이 이러한 활성도를 더욱 증가시키는 것으로 사료된다.

세포 증식과 세포분열과 관련하여 세포내 신호전달경로에서 세포증식, 세포주기 조절, 세포생존, 혈관신생, 세포의 이동 등에 관여하는 경로는 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호전달계로서 척추동물의 세포에서는 extracellular signal-regulated kinase(ERK), c-Jun NH2-terminal kinase(JNK), 그리고 p38 kinase(p38)의 세 가지 신호전달계가 알려져 있다³⁵⁾. 다양한 세포 외부적 자극에 의해 ERK를 비롯한 MEK와 같은 상위경로가 활성화되어 세포막 수용체에서 핵까지 연결해주는 경로를 통해 세포의 증식과 생존에 관여하게 된다³⁶⁾. MAPK 경로에서 가장 많이 연구된 MEK-ERK 경로는 상위과정의 인산화를 통해 활성화되는데 활성화된 MEK는 다시 Erk1과 Erk2를 직접적으로 활성화시키고 Erk1과 Erk2는 핵으로 이동하여 여러 전사인자들을 활성화시킨다. 최종적으로 유전자 발현을 통해 세포증식, 생존, 유사분열, 세포이동 등과 같은 다양한 반응을 유도한다³⁷⁾. Erk1/2 단백질은 대부분의 세포에서 항상 일정한 수준으로 유지되며 상위 MEK에 의해 인산화된 형태인 phospho-Erk1/2 단백질의 발현으로 활성도를 나타낸다. 본 연구에서도 A549 세포와 생쥐의 폐조직 세포에서 Erk1/2 단백질은 일정한 생성수준을 나타내었다. 반면에 A549 세포에서는 elastase 처리와 麥門冬湯의 동시 처리 모두에서 phospho-Erk1/2 생성수준이 정상군에 비해 유사한 수준으로 감소되는 것이 관찰되었고, 생쥐의 폐조직의 경우에는 A549 세포에서의 결과와는 다르게 elastase 처리와 맥문동탕 동시처리 모두에서 phospho-Erk1/2 생성수준이 정상군에 비해 유사한 수준으로 증가하

였다. 이와 같은 결과는 elastase에 의한 phospho-Erk1/2의 반응 양상이 *in vitro*와 *in vivo*에서 다르게 나타난다는 것을 보여주고 있으나 무엇보다도 麥門冬湯이 phospho-Erk1/2의 생성수준에 영향을 나타내지 못하고 있음을 보여준다고 할 수 있다.

A549 세포에 elastase 처리에 의해 손상 받은 세포에서 염증반응 경로가 활성화될 것이라고 제시한 바, 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1 β , TNF- α 의 유전자 발현의 양상을 조사하였다. 각종 염증성 사이토카인은 폐손상에 염증 반응을 시작 및 증폭하며, 지속시키는 중요한 신호물질로서 이 중 가장 중요한 초기 반응 사이토카인은 IL-1 β , TNF- α 이다³⁸⁾. IL-1 β , TNF- α 과 같은 염증성 사이토카인이 분비되면 조직 손상을 일으키고, 내피 세포 응집 물질의 합성과 IL-8, IL-9 같은 호중구-단핵구 주화성 펩타이드의 생성을 유발하여 급성 폐 손상을 일으키게 된다³⁹⁾. 특히 폐손상이 지속이 될 때에는 폐손상의 경과를 IL-1 β , TNF- α 의 증가여부에 따라 판단하는 지표로 사용된다⁴⁰⁾. 따라서 이러한 사이토카인들은 많은 연구에서 폐 손상 지표로 사용되었으며, 이런 이유로 본 연구에서도 A549를 이용하여 elastase 처리 후 염증 반응 사이토카인인 IL-1 β , TNF- α 를 측정하여 차이를 비교하였다. Elastase만 처리한 군에 비해 麥門冬湯 처리군에서는 IL-1 β , TNF- α 의 억제 효과가 나타났다. 이러한 결과는 麥門冬湯의 폐손상 보호효과가 전염증성 사이토카인에 대한 작용과도 관련이 있음을 시사하는 것으로 생각된다.

결론

만성폐쇄성폐질환에 대한 麥門冬湯의 효능을 평가하기 위해 elastase로 유도된 A549 세포 손상과 동물모델에서 조직학적인 변화 및 관련된 단백질의 변화를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 麥門冬湯은 A549 세포에서 elastase로 유도된 세포독성을 감소시켰다.
2. 麥門冬湯은 A549 세포에서 elastase로 유도된 elastin 및 collagen 단백질의 감소를 억제시켰다.

3. 麥門冬湯은 A549 세포에서 elastase로 유도된 caspase 3 단백질 발현의 증가를 억제시켰다.
4. 麥門冬湯은 A549 세포에서 elastase로 유도된 Cdk1 단백질 발현의 감소를 억제시켰다.
5. 麥門冬湯은 A549 세포에서 elastase로 유도된 IL-1 β 와 TNF- α 유전자 발현의 증가를 억제시켰다.
6. 麥門冬湯은 elastase로 유도된 폐손상 동물모델에서 폐의 조직학적 손상과 elastin 및 collagen 감소를 억제시켰다.
7. 麥門冬湯은 elastase로 유도된 폐손상 동물모델에서 폐조직의 caspase 3 단백질 발현의 증가를 억제시켰다.
8. 麥門冬湯은 elastase로 유도된 폐손상 동물모델에서 폐조직의 Cdc2 단백질 발현을 증가시켰다.

감사의 말씀

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임. (과제번호: 2010-0010960)

참고문헌

1. GOLD. Global strategy for th diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease(updated 2008). 2008.
2. Yoo CG. Pathogenesis and pathophysiology of COPD. Kor J Int Med. 2009;77:383-400.
3. Korea National Statistical Office, Republic of Korea [Internet]. Dajeon: Korea National Statistical Office; c1996-[cited 2008 Mar]. Available from: <http://www.nso.go.kr>.
4. NHLBI. NHLBI morbidity and mortality chartbook, [cited 2005 Feb] 2004. Available from: <http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/cht-book.htm>.
5. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020:

- Global Burden of Disease Study. Lancet 1997; 349:1498-504.
6. American Thoracic Society. Chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema: a statement by the Committee on Diagnostic Standards for Nontuberculous Respiratory Diseases. Am Rev Respir Dis 1962;85:762-8.
 7. Gottlieb DJ, Stone PJ, Sparrow D, Gale ME, Weiss ST, Snider GL et al. Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study. Am J Respir Crit Care Med. 1996;154: 1290-5.
 8. Harel S, Janoff A, Yu SY, Hurewitz A, Bergofsky EH. Desmosine radioimmunoassay for measuring elastin degradation in vivo. Am Rev Respir Dis. 1980;122:769-73.
 9. Cantin A, Crystal RG. Oxidants, antioxidants and the pathogenesis of emphysema. Eur J Respir Dis Suppl. 1985;139:7-17.
 10. Laurent P, Janoff A, Kagan HM. Cigarette smoke blocks cross-linking of elastin in vitro. Am Rev Respir Dis. 1983;127:189-92.
 11. Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. Am J Respir Crit Care Med. 2001;163:737-44.
 12. Tudor RM, Petrache I, Elias JA, Voelkel NF, Henson PM. Apoptosis and emphysema: the missing link. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003;28:551-4.
 13. Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. J Clin Invest. 2000; 106:1311-9.
 14. 장기. 金匱要略. 북경, 인민위생출판사. 1998: 192-3.
 15. 허준. 東醫寶鑑. 서울: 남산당. 1986:477.
 16. Cheon MS, Chun JM, Yoon T, Lee A, Moon BC, Choo BK et al. Anti-carcinogenetic and Anti-metastatic Effects of Extract from *Maekmoondong-tang* in HepG2 Cells. Kor J Herbology. 2009; 24(3):161-7.
 17. Kim H, Jeong HS, Kwon J, Lee KG. Effect of Maekmoondong-tang on the immunomodulatory action. Kor J Orient Physiol & Pathol. 2003; 17(4):946-51.
 18. 정호룡, 김영신, 임윤택, 이응세. 맥문동과 맥문 동탕 투여가 심폐기능 및 피로회복효과에 미치는 영향. 대한스포츠한의학회지 2003;4(1):122-34.
 19. Kim JJ, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK. The effects of Maekmoondong-tang and Jeongcheonhwadam-gangki-tang on immune cell and serum OA-specific IgE in BALF in rat asthma model. J Kor Orient Med. 2002;23(1):37-49.
 20. 전국한의과대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과 학. 서울: 한문화사. 2002:335-46.
 21. 전국한의과대학 본초학교실. 本草學. 서울: 영림 사. 1994:121-622.
 22. 高本釗. 新編중약대사전 (하). 臺北: 신문풍출판 공사. 1983:4277.
 23. Nakajoh M, Fukushima T, Suzuki T, Yamaya M, Nakayama K, Sekizawa K et al. Retinoic acid inhibits elastase-induced injury in human lung epithelial cell lines. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003;28:296-304.
 24. Gottlieb DJ, Stone PJ, Sparrow D, Gale ME, Weiss ST, Snider GL et al. Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study. Am J Respir Crit Care Med. 1996; 154:1290-5.
 25. Harel S, Janoff A, Yu SY, Hurewitz A, Bergofsky EH. Desmosine radioimmunoassay for measuring elastin degradation in vivo. Am Rev Respir Dis. 1980;122:769-73.
 26. Foronjy R, D'Armiento J. The role of collagenase in emphysema. Respir Res. 2001;2:348-52.

27. Yoon JM, Park YC. Protective effects of *Seonpyejeongceon-tang* on elastase-induced lung injury in mice. *J Kor Orient Int Med.* 2010; 31(1):84-101.
28. Uhal BD. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol.* 1997;272:L1031-45.
29. Draetta G, Beach D. The mammalian cdc2 protein kinase: mechanisms of regulation during the cell cycle. *J Cell Sci Suppl.* 1989;12:21-7.
30. Draetta G. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. *Trends Biochem Sci.* 1990;15:378-83.
31. Moreno S, Nurse P. Substrates for p34cdc2: in vivo veritas? *Cell.* 1990;61:549-51.
32. Nigg EA. The substrates of the cdc2 kinase. *Semin Cell Biol.* 1991;2:261-70.
33. Nigg EA, Krek W, Peter M. Vertebrate cdc2 kinase: its regulation by phosphorylation and its mitotic targets. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1991;56:539-47.
34. Enoch T, Nurse P. Coupling M phase and S phase: controls maintaining the dependence of mitosis on chromosome replication. *Cell.* 1991; 65:921-3.
35. Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:463-89.
36. Magnuson NS, Beck T, Vahidi H, Hahn H, Smola U, Rapp UR. The Raf-1 serine/threonine kinase. *Semin Cancer Biol* 1994;5:247-53.
37. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 2006; 24:21-44.
38. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F 2nd, Park DR et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1896-903.
39. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 2008;118(11):3546-56.
40. Karadag F, Karul AB, Cildag O, Yilmaz M, Ozcan H. Biomarkers of systemic inflammation in stable and exacerbation phases of COPD. *Lung.* 2008;186(6):403-9.