

## 더덕 에탄올 추출물의 도시미세먼지 노출로 인한 폐 세포 산화스트레스 발생과 세포밀착연접 손상 억제 효과

소희정<sup>1,†</sup> · 전수현<sup>2,†</sup> · 이진원<sup>3</sup> · 이광원<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 생명환경과학대학원 식품공학과, <sup>2</sup>고려대학교 식품생의학안전연구소

<sup>3</sup>수원여자대학교 보건식품학부 약용식물과, <sup>4</sup>고려대학교 일반대학원 생명공학과

### Inhibitory effect of ethanol extract of *Codonopsis lanceolata* against oxidative stress and disruption of tight cell junction in NCI-H441 cells after exposure to urban particulate matter

Hee-Jung So<sup>1,†</sup>, Su-Hyun Chun<sup>2,†</sup>, Jin-Won Lee<sup>3</sup>, and Kwang-Won Lee<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Bioscience and Technology, Graduate School of Life and Environmental Science, Korea University

<sup>2</sup>Institute of Biomedical Science and Food Safety, Korea University

<sup>3</sup>Faculty of Health and Food/Medicinal Plant, Suwon Women University

<sup>4</sup>Department of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

**Abstract** One of the major sources of air pollution is urban particulate matter (UPM), which causes lung diseases involving oxidative stress, inflammation, and cancer. *Codonopsis lanceolata* (CL) has been used in East Asia as a traditional oriental medicinal ingredient for lung diseases (e.g., asthma and bronchitis). However, the connection between the impact of CL and UPM in the lungs has rarely been investigated. This study aimed to confirm the inhibitory activity of the ethanol extract of CL (ECL) against oxidative stress and disruption of tight cell junctions in human pulmonary epithelial cells after exposure to UPM. As the lung cells were pre-treated with ECL, the UPM-induced increase in cellular reactive oxygen species production suppressed tight junction proteins (e.g., N-cadherin, fibronectin, occludin, zonula occludens-1, and claudin-4). These results suggest that ECL prevents the possible effects of UPM toxicity on the lungs.

**Keywords:** Urban particulate matter, oxidative stress, *Codonopsis lanceolata*, antioxidant, tight junction

## 서 론

미세먼지(particulate matter, PM)는 대기오염 물질 중 하나로 연료의 연소, 차량의 배기가스 등 산업화로 인하여 대기 중에 방출되거나 화산재, 화재, 먼지와 같은 자연 상태에서도 발생 가능하다(Anderson 등, 2012). 전 세계 대부분의 지역은 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서 설정한 대기 질 기준(Air quality guideline, AQG)과 비교하여 오염 수준이 높은 것으로 나타났다(Anderson 등, 2012). 전 세계 대부분의 지역은 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서 설정한 대기 질 기준(Air quality guideline, AQG)과 비교하여 오염 수준이 높은 것으로 나타났다(Anderson 등, 2012). 특히 도시에서 연 평균 미세먼지의 농도가 더욱 높은 것으로 나타났다(Anderson 등, 2012). 대기오염은 폐암, 만성 호흡기 질환, 뇌졸중, 심장병 등을 야기하며 그 중 미세먼지는 호흡계와 뇌, 심혈관계의 염증과 노화에 영향을 주고 모세혈관으로 침투할

시 세포의 정상적인 작용을 억제한다고 알려져 있다(Lee 등, 2019c; Ljubimova 등, 2018; WHO, 2017). 또한 WHO의 국제 암 연구 기관(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서는 미세먼지를 폐암의 주된 원인으로 발표하였다(IARC, 2015). 국내에서는 1990년대 후반부터 대기오염의 심각성을 깨닫고 관련한 연구를 활발히 진행해왔다(Park 등, 2016). 2000년대에는 미디어의 발달과 검출 방법의 구체화로 인해 대기의 오염 정도 및 건강과의 관련성 등 다양한 정보를 접하기 쉬워졌으며 국민 소득 수준의 향상으로 더 나은 삶에 대한 욕구가 환경에 대한 관심으로 이어졌다(Ghim 등, 2017). 대기환경보전법 시행령에서는 미세먼지와 초미세먼지를 오염물질로 정의하였고 흡인성 먼지의 지름이 10 µm 이하인 경우 미세먼지(PM<sub>10</sub>), 2.5 µm 이하인 경우 초미세먼지(PM<sub>2.5</sub>)라고 명명하여 입자의 지름으로 구분하였다(ME, 2019). 환경부에서는 2007년 PM<sub>10</sub>과 NO<sub>2</sub>의 기준을 강화하고, 2010년 벤젠의 기준을 신설하였으며(Ahn 등, 2008), 2010년대 이후로는 PM<sub>10</sub>과 PM<sub>2.5</sub>의 환경기준을 설정하는 등 국가적으로 대기오염으로부터 국민의 건강을 보호하고자하는 꾸준한 노력이 이어져왔다(ME, 2020).

미세먼지가 신체에 미치는 위해서는 입자의 크기와 모양 등에 의해 영향을 받을 수 있다(Guan 등, 2016). 미세먼지가 폐로 침투 시 입자가 큰 PM<sub>10</sub>은 주기관지에 정착되는 비율이 높지만 그보다 작은 PM<sub>2.5</sub> 이하의 입자는 세기관지 및 폐포에 정착되고 흡

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work as first authors.

\*Corresponding author: Kwang-Won Lee, Department of Biotechnology, College of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 02841, Korea

Tel: +82-2-3290-3027

Fax: +82-2-927-1970

E-mail: kwangwon@korea.ac.kr

Received January 26, 2021; revised March 11, 2021;

accepted March 12, 2021

수될 수 있으며(Wang 등, 2017), 흡수된 미세먼지는 혈액으로 이동하며 호흡계 및 심혈관계의 장기 세포에 물리적으로 영향을 미칠 수 있다(Ljubimova 등, 2018). 뿐만 아니라 미세먼지는 폐 상피세포에서 mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)의 작용으로 인하여 산화스트레스 및 염증성 사이토카인인 interleukin (IL)-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 의 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 폐 세포 독성으로 인하여 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성을 유도하고 효소적 항산화 방어기작을 손상시켜 산화 스트레스를 유발할 수 있다고 알려져 있다(Donaldson과 Stone, 2003; Park 등 2008; Quay 등, 1998; Wang 등, 2017). 이와 같이 미세먼지는 산화스트레스 발생으로 인하여 세포 분열과 상피 장벽 기능을 손상 시킴으로써 폐와 호흡계에서 발생할 수 있는 여러 질환을 야기시킬 수 있는 주된 요인으로 다뤄지고 있다(Ha와 Jung, 2017).

화학적으로 합성되거나 제조된 약물류는 부작용의 위험이나 고가의 치료비용이 요구되는 경우가 있고 정제되어 있어 과량 섭취 시 오히려 독성을 나타낼 수 있어 합성물을 대체할 수 있는 안전한 식품으로서 천연 작물에 대한 요구가 갈수록 높아지고 있는 추세이다(Choe와 Yang, 1982; Patel 등, 2018). 대부분의 항산화 활성을 띠는 천연물은 식물의 폐놀 물질 혹은 식물 자체로 활성을 나타낸다(Park 등, 2009). 식물에서 유래한 천연물은 고대부터 민간 의학에서 오랫동안 이용해왔으며 몇 가지 식물은 염증성 폐질환에 효과적으로 사용되었다고 알려져 있다(Santana 등, 2016). 과일 및 채소에 풍부한 flavonoid나 quercetin 등의 파이토케미컬을 섭취 시 천식 발생률이 낮아지거나 강황의 curcumin, 인삼의 ginsenoside Rg5 등이 NF- $\kappa$ B pathway에 작용하여 염증을 감소시킨다는 보고와 같이 천연물과 폐 건강에 관련한 효능 연구는 계속되어 왔다(Barnes, 2000; Kim 등, 2012; Knekt 등, 2002; Yuan 등, 2012).

더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 초롱꽃과 식물로 동의보감 등 고서에서 폐의 기를 보한다고 기록된 바 있고(Hur 등, 2008; KIOM, 2014), 동북아시아에서 유래한 민간요법에서는 천식이나 기관지염 등을 치료하는 약용 작물로 사용해왔다(Hur 등, 2008). 더덕에는 탄닌, 사포닌 등의 생리활성 물질이 풍부하고 폐의 염증을 억제시킨다는 보고가 있으며(Lee 등, 2007b; Valavanidis 등, 2013; Xu 등, 2008), 항염증 뿐만 아니라 천식, 기관지염, 기침, 경련, 고혈압 등에도 효과가 있다고 알려져 있다(Lee 등, 2005a; Seo 등, 2019; Shin 등, 2019). 한 편 미세먼지로 인하여 발생할 수 있는 폐 손상은  $\alpha$ -lipoic acid, 비타민 D, 감태 에탄올 추출물 등으로 억제할 수 있다는 연구가 발표된 바 있고(Lee 등, 2019a; Mann 등, 2017; Park 등, 2019), 전통적인 민간요법으로 사용해온 약용 식물로는 가자(*Terminalia chebula*)가 중국, 인도, 동남아시아 지역 등에서 널리 사용된 것으로 알려져 있다(Wang 등, 2015). 가자 열매의 단일 물질인 chebulic acid는 pulmonary alveolar epithelial (PAE) 세포에서 도시미세먼지(urban particulate matter, UPM)에 의한 ROS 생성을 억제하고 세포의 tight junction 을 보호하는 효과가 연구된 바 있으며(Lee 등, 2007a; Lee 등, 2017), UPM에 의한 상피-간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition)의 진행을 억제함으로써 회복의 효과를 보인다는 연구가 있었다(Lee 등, 2019d). 그러나 가자는 국내 수입 및 섭취가 허용되지 않은 작물로 국내에서는 폐 질환 치료를 위한 약용식물로 더덕을 사용해왔으나 이를 활용한 추출물이 UPM에 의한 폐 세포의 산화스트레스로부터 발생하는 손상을 보호하는 효과에 대해서는 연구가 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 UPM에 의해 발생한 산화스트레스로 폐 세포가 손상되고 전통적인 약용식물인 더

덕의 추출물이 이를 예방 및 보호하는 효과를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에 사용한 더덕은 3년산 고랭지 밭더덕으로 강원도 횡성의 직관장에서 2019년 5월에 구입하여 사용하였다. Ascorbic acid, dextrose, 2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA), dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu 시약, gallic acid, hydroxyethyl piperazine ethane sulfonic acid (HEPES), sodium bicarbonate, sodium pyruvate, 2,4,6-tripryridyl-S-triazine (TPTZ) 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS)와 penicillin, streptomycin 등은 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였으며, 그 외 Iron(III) chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Shinyo Pure Chemicals, Osaka, Japan), iron(II) sulfate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Showa Chemical, Tokyo, Japan), LeGene Premium Express first-strand cDNA Synthesis System (Legene Biosciences, San Diego, CA, USA), RNAiso PLUS (Takara Korea Biomedical, Seoul, Korea), RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA), sodium carbonate (Samchun Chemicals, Seoul, Korea), TOPreal™ qPCR 2xPreMIX SYBR green (Enzynomics, Daejeon, Korea) 등을 구입하여 실험에 사용하였다.

### 더덕 에탄올 추출물(Ethanol extract of *Codonopsis lanceolata*, ECL)의 제조

ECL은 Lee 등(2019b)의 주정에탄올 추출 방법을 참고하여 다음과 같이 제조하였다. 우선, 더덕에 묻은 흙과 이물을 제거하기 위해 흐르는 물에 세척 후 10×10 mm로 잘라 동결건조 하였다. 건조된 더덕 절편을 55% (v/v) 주정에탄올과 1:10의 무게 비율(w/w)로 배합한 후, 약제 추출용 전기약탕기(HD-A80, Habdong Machinery Co., Kyeonggi, Korea)를 이용하여 60°C에서 4.5시간 동안 추출하였다. 추출물은 여과지(Whatman No.4, Clifton, NY, USA)로 여과 후 회전감압증발기(Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 주정에탄올을 제거하였다. 얻어진 더덕 농축액은 동결건조하여 분말 형태로 보관하였으며 사용 직전에 100 mg/mL의 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

### 총 폴리페놀 함량 측정

ECL에 함유된 총 폴리페놀 함량은 Hagerman 등(2000)의 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 실험에 사용하였다. 1 mg/mL의 ECL 시료는 Folin-Ciocalteu 시약 및 20% sodium carbonate 용액과 2:1:5 (v/v/v)의 비율로 섞은 뒤 암실에서 40분간 정치하였으며, multiple reader (EL-808, BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 750 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 gallic acid를 사용하여 작성하였으며, 결과는 표준곡선의 수식에 시료의 결과값을 대입하여 ECL 건조물(dry matter, DM) g 당 gallic acid 환산 농도(gallic acid equivalent, GAE)로 표현하였다.

### DPPH 자유 라디칼 소거능 측정

DPPH 자유 라디칼 소거능은 Kitagaki와 Tsugawa (1999)의 실험 방법을 참고하였다. 다섯 포인트의 농도 구간으로 ECL 시료(1.5-25  $\mu\text{g/mL}$ )와 비교군으로 사용된 ascorbic acid (6.2-100  $\mu\text{g/mL}$ )를 단계적으로 희석하여 실험에 사용하였다. 각 농도의 시료 및

비교군과 700 μM의 DPPH 시약을 섞은 다음 빛이 차단된 37°C의 항온항습기에서 30분간 반응시켰다. 이후 515 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며 결과는 시료가 첨가되지 않은 대조군 흡광도에서 실험군의 흡광도를 빼준 뒤 이를 대조군의 흡광도로 나누어 산출하였다. 최종적으로 DPPH 자유 라디칼을 50% 소거하는 시료의 양(50% scavenging capacity, SC<sub>50</sub>)을 구하였다.

**Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 측정**

FRAP은 Lee 등(2005b)의 방법에 따라 실험하였으며 ECL은 100 mg/mL로 제조하여 실험에 사용하였다. FRAP 시약은 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ/40 mM HCl 혼합물, 20 mM iron(III) chloride hexahydrate (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O)를 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합하여 제조하였다. 단계적으로 희석한 ECL 시료와 FRAP 시약을 각각 1:30 (v/v)의 비율로 섞어 37°C에서 5분간 반응시킨 후 593 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 iron(II) sulfate heptahydrate (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)를 사용하여 작성하였으며 표준곡선 수식에 시료의 결과값을 대입하여 ECL의 DM g 당 μmol FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O로 산출하였다.

**세포 배양**

인간 폐 상피 세포인 NCI-H441 (ATCC, Manassas, VA, USA) 세포는 2.0×10<sup>5</sup> cell/mL의 밀도로 10% FBS (v/v)를 함유한 RPMI-1640 배지를 이용하여 5%의 CO<sub>2</sub> 농도가 유지되는 인큐베이터 (37°C)에서 배양하였다. RPMI-1640 배지는 2.5 g/L dextrose, 2.4 g/L HEPES, 0.11 g/L sodium pyruvate, 2 g/L sodium bicarbonate 및 100 units/mL의 penicillin과 streptomycin을 첨가하여 사용하였다.

**UPM 표준 시료 제조**

UPM (SRM 1648a)은 12개월 이상 Missouri 주의 St. Louis에서 수집된 미립자 물질을 여과한 것으로 National Institutes of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA)에서 판매하는 제품을 사용하였다. 실험 전 10 mg의 UPM을 1 mL의 DMSO에 충분히 용해 후 여과하여 실험의 표준 시료로 사용하였다.

**세포 생존율 측정**

ECL 시료가 폐 상피 세포 사멸에 영향을 미치지 않는 농도를 설정하기 위해 MTT 검정 방법을 이용하였다(Lee 등, 2017). NCI-H441 세포에 ECL 시료(25, 50, 100, 200 μg/mL)와 UPM (5, 10, 20 μg/mL)을 24시간 처리 후 상층액을 제거하고 MTT 시약을 첨

가하여 2시간 반응시켰다. MTT 용액을 제거한 후 DMSO로 불용성 포마잔 결정을 용해시켜 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 결과는 시료가 첨가되지 않은 대조군 흡광도 값을 기반으로 하여 실험군 흡광도 값의 백분율(%)을 산출하였다.

**ROS 생성 측정**

폐 상피 세포에서 UPM에 의해 생성되는 ROS를 측정하기 위하여 Lee 등(2017)의 방법을 참고하였다. NCI-H441 세포에 ECL 시료를 각각 25, 50, 100 및 200 μg/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였으며, ECL 시료를 제거한 후 100 μM DCFH-DA를 분주하여 37°C에서 30분 간 방치한 후 시약을 제거하였다. 이 후, UPM 10 μg/mL을 처리하여 24시간 동안 배양한 후 phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4)로 치환하였다. Multi-detection microplate reader (HIDEX, Turku, Finland)를 사용하여 excitation (485 nm)과 emission (535 nm)을 측정함으로써 전환된 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF)의 값을 얻었으며 결과는 대조군 값을 기반으로 하여 실험군의 백분율(%)로 나타내었다.

**RNA 추출 및 real-time PCR**

NCI-H441 세포에 ECL 시료를 각각 50, 100, 200 μg/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였으며, ECL 시료를 제거하고 10 μg/mL 농도의 UPM을 6시간 동안 처리하였다. PBS로 2회 세척 후 RNAiso PLUS를 첨가하여 RNA를 추출하였고 LeGene Premium Express first-strand cDNA Synthesis System을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 폐 상피 세포의 tight junction을 확인하기 위해 합성된 cDNA와 tight junction primer 및 TOPreal™ qPCR 2xPreMIX SYBR green을 9:1:10 (v/v/v)으로 혼합 후 Bio-Rad IQ5 thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. PCR의 단계로 95°C 5분의 pre-denaturation 과정을 시행 후, denaturation 과정은 95°C 10초, annealing 과정은 60°C 30초, extension 과정은 72°C 20초로 총 40 cycle을 시행하였다. 실험에 사용한 primer의 염기서열은 Table 1에 제시하였으며, PCR 수행 후 각 유전자의 발현 결과는 각 유전자의 Ct값을 이용하여 β-actin으로 보정하고 delta-delta-Ct (ΔΔCt)법으로 계산하여 나타내었다.

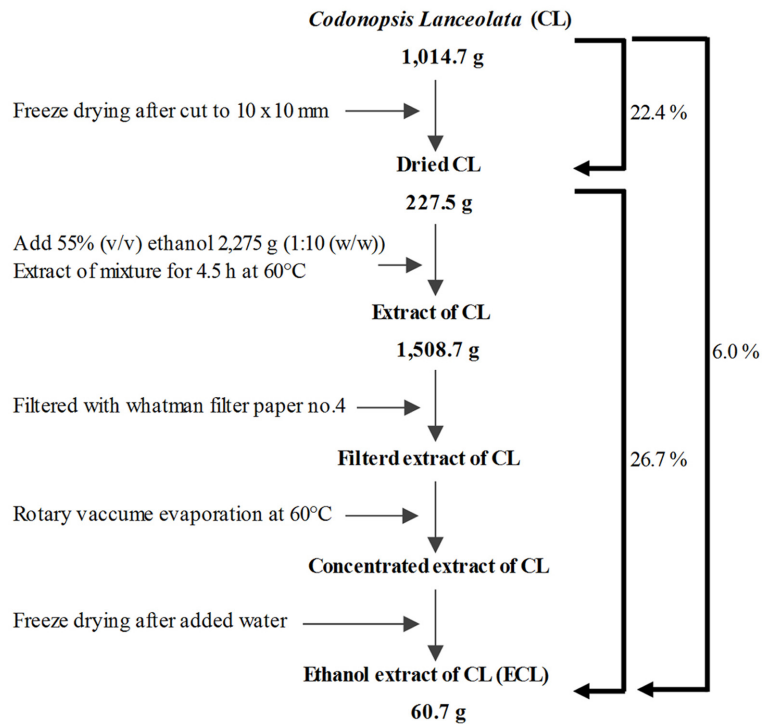
**통계분석**

모든 실험 결과는 3반복을 시행하였고 평균과 표준편차를 이용하여 나타내었다. 실험결과에 대한 통계는 SAS version 9.4 (SAS institute, Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하였으며 Student's

**Table 1. Real-time PCR primer sequences**

Gene	Oligonucleotide sequence	Size
N-cadherin	sense, 5'-CGT GAA GGT TTG CCA GTG T-3'	128 bp
	antisense, 5'-GCA CAA GGA TAA GCA GGA TG-3'	
Fibronectin	sense, 5'-CTG GCC GAA AAT ACA TTG TAA A-3'	114 bp
	antisense, 5'-CCA CAG TCG GGT CAG GAG-3'	
Occludin	sense, 5'-ACA AGC GGT TTT ATC CAG AGT-3'	89 bp
	antisense, 5'-GTC ATC CAC AGG CGA AGT TAA T-3'	
ZO-1	sense, 5'-GCA GCT AGC CAG TGT ACA GTA TAC-3'	194 bp
	antisense, 5'-GCC TCA GAA ATC CAG CTT CAC GAA-3'	
Claudine 4	sense, 5'-CGG CCC ACA ACA TCA TCC AA-3'	170 bp
	antisense, 5'-GGC GGA GTA AGG CTT GTC T-3'	
β-Actin	sense, 5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT-3'	285 bp
	antisense, 5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3'	

N-cadherin, neural cadherin 2; ZO-1, zonula occludens



**Fig. 1.** Scheme of ethanol extract from *Codonopsis lanceolata* (ECL).

*t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) 및 Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )를 실시하여 통계 처리하였다.

## 결과 및 고찰

### ECL의 제조 단계별 수율

더덕으로부터 ECL 시료를 제조하는 추출 단계는 Fig. 1과 같다. 추출 수율을 높이고 보관의 용이성을 위해 생더덕을 동결 건조하여 더덕 내 함유된 수분을 제거하였다. 이 과정에서 약 22.4%의 동결건조 수율을 얻었으며, 이를 통해 생더덕은 약 77.6%의 수분을 함유하고 있는 것을 확인할 수 있다. 다음 단계로 건조더덕으로부터 추출, 여과, 진공농축 및 동결건조를 통해 ECL 시료를 획득하였다. 이 과정에서 건조더덕을 기반으로 하였을 때 약 26.7%의 추출 수율을 얻었으며, 이는 생더덕을 기반으로 하였을 때 약 6.0%의 추출 수율로 환산되었다. 이는 ECL 시료를 제조하는 추출 방법을 참고한 Lee 등(2019d)의 연구 결과와 비교하여 1.7배 낮은 수율이었다.

Lee 등(2019d)의 연구에서는 건조더덕으로부터 추출, 여과, 진공농축 및 동결건조 후 ECL 시료의 수율은 46.3%로 보고되었다. 본 연구에서 시료로 사용한 더덕의 원산지(강원도 횡성), 수확시기(3년근), 및 재배방법(밭더덕) 등을 선행 연구(Lee 등, 2019d)와 동일하게 준비하였음에도 불구하고, 농작물인 관계로 재배 환경인 토양 및 기후와 재배 시기 등에 영향을 받아 다양한 변형이 있을 수 있으며 강원도 횡성 더덕 중 구체적인 생산지를 확인할 수 없었던 점에서 농작물인 더덕 생물의 차이로부터 수율의 차이가 발생한 것으로 판단된다. 또한 Lee 등(2019d)은 동결건조더덕을 곱게 갈은 후 환류추출기를 사용하였으나 본 실험에서는 10×10 mm의 절편으로 잘라 동결건조한 더덕을 전기약탕기에서 침출시키는 과정에서 더덕 시료의 처리방법과 추출방법이 달라 추출 수율의 차이가 발생한 것으로 보여진다.

**Table 2.** Antioxidant activities of the ethanol extract of *Codonopsis lanceolata* (ECL)

	Antioxidant activity <sup>3)</sup>
Total polyphenol (mg GAE <sup>1)/g DM<sup>2)</sup>)</sup>	13.29±0.5
DPPH SC <sub>50</sub> (mg DM/mL) <sup>4)</sup>	17.41±0.34
FRAP (μM FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O/g DM) <sup>5)</sup>	28.50±0.32

<sup>1)</sup>Total polyphenol contents of ECL was expressed as mg/g gallic acid equivalent (GAE)

<sup>2)</sup>DM, Dry matter

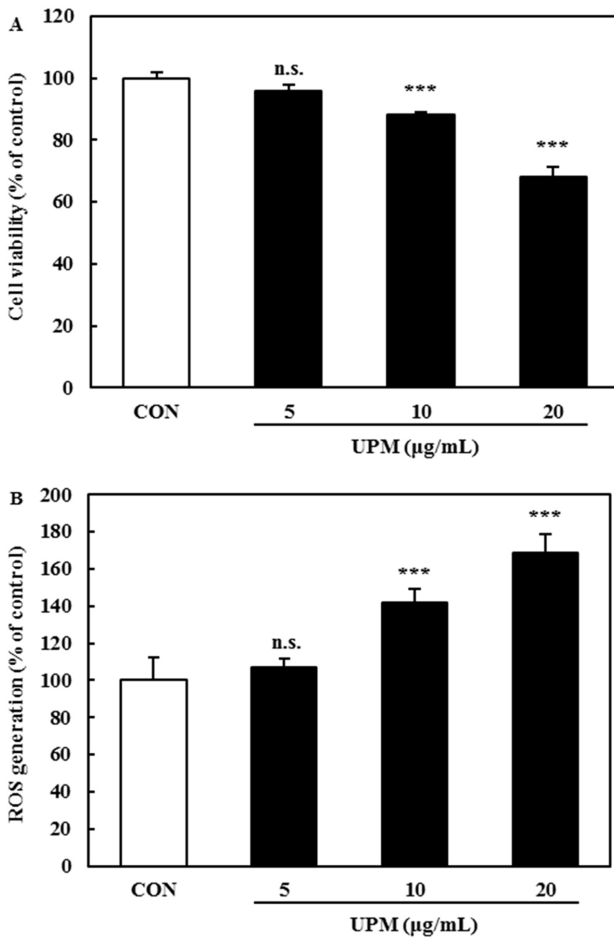
<sup>3)</sup>Values are expressed as mean±standard deviation (SD) of triplicate experiments.

<sup>4)</sup>DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

<sup>5)</sup>FRAP, Ferric reducing antioxidant power

### ECL의 항산화 활성 확인

ECL의 항산화 활성 분석 결과(Table 2), 총 폴리페놀 함량은 13.3±0.5 mg GAE/g DM으로 나타났으며, 이는 Jeon 등(2013)의 연구에서 검출한 70% 에탄올로 추출한 더덕 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량(15.7±0.5 mg GAE/g)과 유사하였다. 또한, 본 실험에서 FRAP 값은 28.5±0.3 μM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/g DM으로 산출되었고, 이는 Jeon 등(2013)의 연구에서 확인된 70% 에탄올로 추출한 더덕 에탄올 추출물의 FRAP 값(29.5±3.0 μM Fe(II)/g)과 유사한 항산화 활성을 보였다. 반면, DPPH 자유 라디칼 소거능의 경우, ECL의 SC<sub>50</sub>은 17.4±0.3 mg DM/mL으로 나타났다. 이는 Song 등(2012)의 연구에서는 생더덕을 10배수(v/w)의 70% 에탄올 용매를 사용하여 80°C에서 24시간 동안 수직 환류냉각기로 추출 후 진공농축 및 동결건조한 더덕추출물의 SC<sub>50</sub>은 6.04±0.01 mg/mL로 검출된 결과와 비교해 보았을 때 본 연구의 추출 조건으로 얻어진 ECL의 DPPH 자유 라디칼 소거능은 약 3배 정도 낮은 것으로 나타났다.

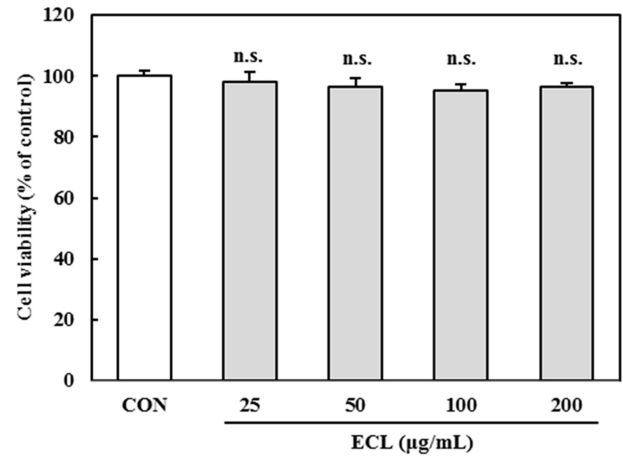


**Fig. 2.** Effect of exposure to urban particulate matter (UPM) on viability and reactive oxygen species (ROS) production of NCI-H441 cells. NCI-H441 cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were incubated with different concentration of UPM (5, 10, and 20 µg/mL) for 24 h. (A) Cell viability was measured by MTT assay. (B) ROS production was measured to be converted from 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) to 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). Cell viability and ROS production were expressed as a percentage of the control (CON). Values are expressed as mean ± standard deviation (SD) of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  are compared to control according to Student's *t*-test. n.s. is not significant compared to control at  $p < 0.05$  according to Student's *t*-test.

더덕은 탄닌, 폴리페놀, 스테로이드 등의 다양한 생리활성물질을 포함한다고 보고된 바 있으며(Hur 등, 2008), 식물의 폐놀 화합물들이 자유 라디칼을 소거하고 항산화제를 환원시켜 항산화 활성이 나타나는 것으로 알려져 있다(Li 등, 2008). 자유 라디칼은 체내에서 여러 과정을 통해 세포 및 기관에 손상을 입히고 스트레스를 유발하기에 항산화 활성은 건강 증진과 밀접한 연관이 있다(Song 등, 2012). 본 연구에서 얻은 ECL 추출물은 추출 조건이나 원물의 처리 방법 등에 따라 차이는 있으나 Jeon 등(2013) 및 Song 등(2012)의 연구 결과와 마찬가지로 항산화 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

**ECL과 UPM의 폐 상피 세포 독성 확인**

NCI-H441 세포에 ECL 및 UPM을 각각 24시간 처리 후 사멸하지 않고 효과를 나타낼 수 있는 적절한 농도를 선정하기 위해



**Fig. 3.** Effect of ECL on viability of NCI-H441 cells. NCI-H441 cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were incubated with different concentration of ECL (25, 50, 100, and 200 µg/mL) for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay and was expressed as a percentage of the CON. Values are expressed as mean ± SD of triplicate experiments. n.s. is not significant compared to control at  $p < 0.05$  according to Student's *t*-test.

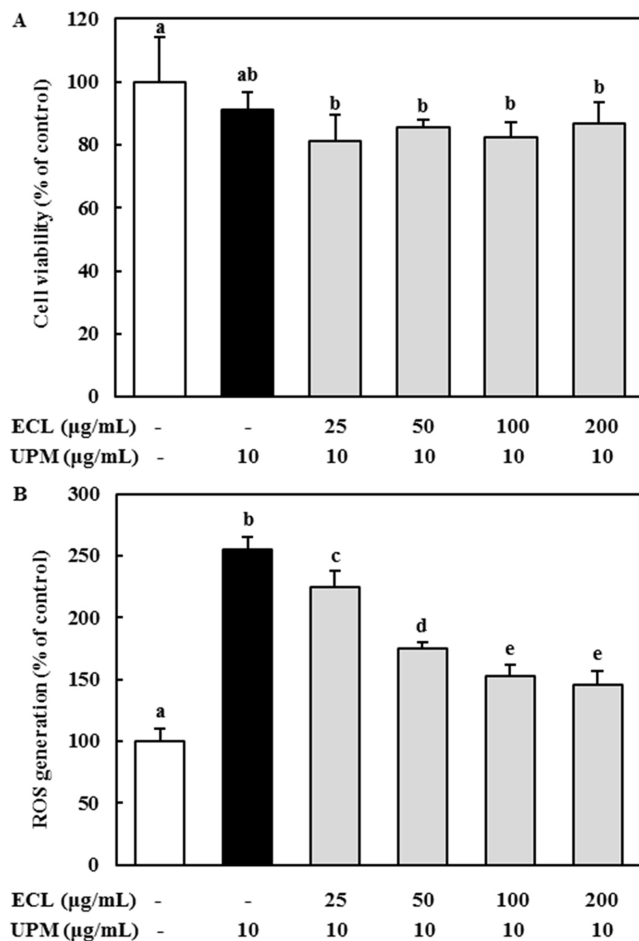
세포 생존율을 확인하였다(Fig. 2, 3). 산화스트레스 유발 물질로 사용할 UPM의 처리 농도는 Fig. 2의 결과를 기반으로 세포 독성이 적으면서 ROS가 많이 생성되는 농도를 기준으로 선정하였다. 농도별 UPM을 24시간 NCI-H441 세포에 처리 시 20 µg/mL의 농도에서 세포 생존율이 67.9±3.2%로 낮아지는 경향을 보여 세포 독성이 나타나 선정에서 제외되었다( $p < 0.001$ ). 그러나 10 µg/mL의 UPM 처리 농도에서는 세포 생존율이 88.3±0.5%로 나타났으며( $p < 0.001$ ), 5 µg/mL의 농도에서는  $p < 0.05$  이하에서 UPM이 처리되지 않은 대조군(CON)과 유사한 수준 (95.9±1.7%)의 생존율을 보여 NCI-H441 세포에 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 2A).

또한, UPM 처리 농도 별 ROS 생성량을 확인한 결과(Fig. 2B), 세포 생존율이 대조군(CON)과 유사한 수준으로 나타났던 5 µg/mL의 UPM 처리군에서는  $p < 0.05$  이하에서 ROS 생성량이 대조군(CON)과 비교하여 유의적인 차이가 나타나지 않아 선정에서 제외되었으며, 10 µg/mL의 농도에서 대조군(CON)보다 40% 이상 높은 ROS가 생성되어( $p < 0.001$ ), 10 µg/mL의 UPM은 UPM 처리에 따른 효과를 비교할 수 있는 가장 적합한 농도라고 판단하여 최종적으로 실험에 사용하였다.

ECL은 25, 50, 100, 200 µg/mL의 모든 농도에서 세포 생존율이 95.3-97.9%로 나타나 모든 더덕 농도 구간에서 폐 상피 세포에 독성을 보이지 않았다( $p < 0.05$ , Fig. 3). 또한 ECL (25, 50, 100, 200 µg/mL)을 24시간 전처리 후 10 µg/mL의 UPM을 24시간 처리한 결과, 모든 실험군의 세포 생존율은 81.2-86.8%로 나타났으며, UPM 단독 처리군(91.3±5.3)과 비교하여 조금 낮아지는 경향은 보였으나  $p < 0.05$ 에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Fig. 4A).

**ECL의 미세먼지 유도성 산화 스트레스 발생 억제 효과**

본 연구에서는 UPM으로 인한 ROS 생성량 증가와 ECL에 의한 ROS 생성 예방효과를 확인하고자 하였다. Fig. 4B에 나타난 바와 같이, UPM만 단독으로 처리한 경우(255.1±10.4%), 세포 내 ROS 생성량이 대조군(100.0±10.1%)과 비교하여 유의적으로 2.5 배 증가하였다. 반면, ECL을 처리 후 UPM을 처리한 모든 실험



**Fig. 4. Effect of ECL pre-treatment before UPM on viability and ROS production of NCI-H441 cells.** NCI-H441 cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were incubated with different concentration of ECL (25, 50, 100, and 200  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h and then were incubated with UPM (10  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. (A) Cell viability was measured by MTT assay. (B) ROS production was measured to be converted from DCFH-DA to DCF-DA. Cell viability and ROS production were expressed as a percentage of the CON. Values are expressed as mean $\pm$ SD of triplicate experiments. Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  and each value is according to Duncan's multiple range test.

군에서 UPM에 의한 ROS 생성량이 UPM 단독 처리군에 비해 감소하였으며, 특히 25-100  $\mu\text{g/mL}$ 의 ECL 농도 구간에서는 처리 농도가 증가함에 따라 ROS의 생성량이 농도 의존적으로 감소하였다. 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 ECL 처리군에서 ROS 생성량(153.1 $\pm$ 8.9%)은 UPM 단독 처리군과 비교하여 약 40% 감소하였으며 감소폭은 최대로 나타났다. 또한 200  $\mu\text{g/mL}$ 의 ECL 처리군(146.1 $\pm$ 10.6%)에서는 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 ECL 처리군과 유사한 수준의 ROS 생성량을 보였으며, 유의적인 농도 의존성은 관찰되지 않았다.

UPM에 의해 생성된 ROS를 저감시키는 물질로서 감태 에탄올 추출물, chebulic acid,  $\alpha$ -lipoic acid 등의 원료를 이용한 연구가 알려져 있다(Lee 등, 2017; Lee 등, 2019a; Lee 등, 2019d; Park 등, 2019). Park 등(2019)의 연구에 따르면 감태 에탄올 추출물(100  $\mu\text{g/mL}$ )은 폐세포(A549)에서 UPM 단독 처리군보다 ROS 생성량을 약 25%로 감소시켰고, Lee 등(2017)의 연구에서는 폐 상피세포(NCI-H441)에 10  $\mu\text{M}$ 의 농도로 chebulic acid를 전처리한 경우 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 UPM 단독 처리군보다 ROS 생성량을 약 50% 수

준으로 저감시켰다. 또한 Lee 등(2019a)의 연구에서는  $\alpha$ -lipoic acid 100  $\mu\text{M}$ 와 UPM 200  $\mu\text{g/mL}$ 를 동시 처리 시 UPM 단독처리군보다 ROS 생성량을 약 50% 정도 감소시키는 것으로 나타났다. 이와 같이 본 연구의 ECL (100  $\mu\text{g/mL}$ )도 UPM으로 인해 유발되는 ROS 발생량을 다른 연구에서와 유사한 수준까지 효과적으로 낮추는 것으로 확인되었다.

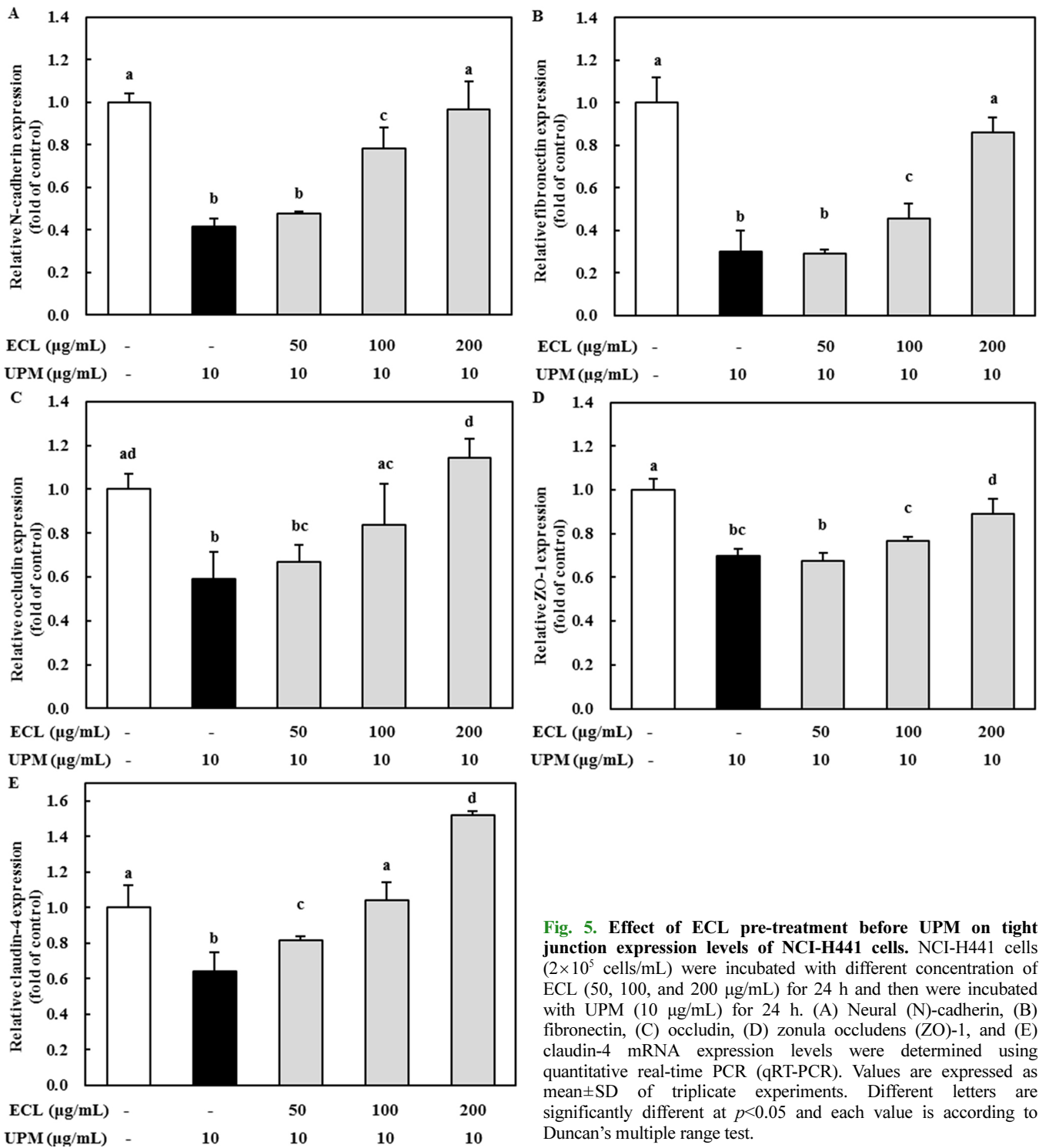
#### ECL의 폐 상피 세포 tight junction 보호 효과

Tight junction은 세포 사이의 단백질 복합체로서 내피 및 상피 세포층에서 신호를 전달하고 상피세포들 간 물질이동, 유전자 발현을 조절하며 세포의 구조적 안정성을 부여하고 항상성을 유지해준다(Cunningham과 Turner, 2012; Gumbiner, 1987; Vermette 등, 2018). 이러한 tight junction은 occludin, junctional adhesion molecules (JAMs) 및 claudins 등으로 구성되어 있으며, 이들이 정상적으로 발현되지 않을 시 모세관 누출, 폐부종, 복합장기부전 등의 기능적인 장애를 나타내는 것으로 알려져 있다(Vermette 등, 2018). Zhao 등(2018)에 따르면 미세먼지에 의해 발생한 ROS는 세포 투과성을 높이고 transepithelial electric resistance (TER)의 기능을 저하시키는 등 tight junction 단백질의 기능에 영향을 주어 코 상피 장벽의 붕괴를 초래한다고 하였으며, Lee 등(2020)은 UPM으로 인하여 발생한 ROS는 염증 사이토카인의 발현양을 증가시키고 zonula occludens (ZO)-1, occludin 및 claudin-1과 같은 tight junction 단백질의 발현양을 감소시킨다고 하였다. 이와 같이 UPM에 의해 생성된 ROS는 tight junction의 기능 장애를 유발하는 요인 중 하나로 tight junction을 구성하는 마커들의 발현 정도를 비교함으로써 UPM에 의한 손상과 ECL 시료의 전처리에 의한 보호 효과를 확인하고자 하였다.

세포 사이의 접착에 관여하는 것으로 알려진 neural (N)-cadherin (Chosa와 Ishisaki, 2018)은 대조군에서의 발현양을 기준으로 하였을 때 폐 상피 세포에 UPM을 단독으로 처리한 군(0.42 $\pm$ 0.04)에서 아무것도 처리되지 않은 대조군(1.00 $\pm$ 0.04)에 비해 유의적으로 약 58%의 감소를 보였다. 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 ECL을 전처리한 실험군(0.48 $\pm$ 0.01)에서는 UPM 단독 처리군과 비교하여 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나, 100  $\mu\text{g/mL}$  (0.78 $\pm$ 0.10) 및 200  $\mu\text{g/mL}$ 의 ECL을 전처리한 실험군(0.97 $\pm$ 0.13)에서 UPM 처리로 인한 N-cadherin의 발현 감소를 농도 의존적인 효과를 보이며 막아주는 것으로 나타났다(Fig. 5A).

세포 외 기질 간 연결 및 결합을 담당하는 fibronectin은 젤라틴과 같이 분자에 결합하여 tight junction으로서의 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다(Pankov와 Yamada, 2002). Fig. 5B에서 나타난 바와 같이, fibronectin은 UPM 단독으로 처리한 군(0.30 $\pm$ 0.10)은 아무것도 처리되지 않은 대조군(1.00 $\pm$ 0.12)의 발현양을 기준으로 약 70%의 감소를 나타내었다. 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 ECL을 전처리한 실험군(0.29 $\pm$ 0.02)에서는 UPM 단독 처리군과 비교하여 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나, 100  $\mu\text{g/mL}$  (0.46 $\pm$ 0.07) 및 200  $\mu\text{g/mL}$ 의 ECL을 전처리한 실험군(0.86 $\pm$ 0.07)에서 UPM 처리로 인한 fibronectin 발현양 감소를 농도 의존적인 효과를 보이며 회복시켜주는 양상을 보였다.

Occludin은 외부 환경으로부터 상피세포를 보호하는 역할을 하며(Beeman 등, 2009), 이는 UPM 단독 처리에 의한 발현양(0.59 $\pm$ 0.12)이 아무것도 처리되지 않은 대조군(1.00 $\pm$ 0.07)의 발현양을 기준으로 약 41% 감소하였다. 모든 ECL 처리 농도에서 UPM 단독 처리군과 비교하여 유의적인 차이를 보이며 대조군과 유사한 수준으로 occludin 발현이 나타남을 확인하였으며, 특히 200  $\mu\text{g/mL}$ 의 ECL을 전처리한 실험군에서 occludin의 발현양(1.15 $\pm$ 0.08)



**Fig. 5.** Effect of ECL pre-treatment before UPM on tight junction expression levels of NCI-H441 cells. NCI-H441 cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were incubated with different concentration of ECL (50, 100, and 200 µg/mL) for 24 h and then were incubated with UPM (10 µg/mL) for 24 h. (A) Neural (N)-cadherin, (B) fibronectin, (C) occludin, (D) zonula occludens (ZO)-1, and (E) claudin-4 mRNA expression levels were determined using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Values are expressed as mean±SD of triplicate experiments. Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  and each value is according to Duncan's multiple range test.

이 아무것도 처리되지 않은 대조군 수준 이상으로 유의미한 증가를 보였다(Fig. 5C).

ZO-1은 단백질 수용체로서 세포 사이를 연결하는 역할을 하는 tight junction이다(Vermette 등, 2018). Fig. 5D의 결과에서, ZO-1은 UPM 단독으로 처리한 군( $0.70 \pm 0.03$ )은 아무것도 처리되지 않은 대조군( $1.00 \pm 0.05$ )의 발현양을 기준으로 약 30%의 감소를 보였다. 50 µg/mL의 ECL을 전처리한 실험군( $0.67 \pm 0.04$ )에서는 UPM 단독 처리군과 비교하여 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나, 100

및 200 µg/mL의 ECL을 전처리한 실험군에서는 ZO-1의 발현양이 각각  $0.76 \pm 0.02$  및  $0.89 \pm 0.07$ 으로 나타났으며 이는 ECL의 전처리로 인해 농도 의존적으로 UPM에 의한 ZO-1의 발현양 감소를 방지하였음을 나타내었다.

Claudin-4는 폐포에서 이물을 제거하는 역할을 하며 세포 사이의 장벽 기능을 한다고 보고된 바 있다(Wray 등, 2009). Fig. 5E에서 나타난 바와 같이, UPM 단독으로 처리한 군( $0.64 \pm 0.11$ )은 아무것도 처리되지 않은 대조군( $1.00 \pm 0.13$ )의 발현양을 기준으로

약 36%가 감소하였으며, ECL을 전처리한 실험군에서 claudin-4의 발현양은 각각  $0.82 \pm 0.02$  (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군),  $1.04 \pm 0.10$  (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군) 및  $1.52 \pm 0.02$  (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군)로 농도 의존적인 효과를 보이며 UPM에 의한 claudin-4의 발현양 감소를 유의적으로 억제하였다.

## 요 약

본 연구에서는 UPM에 의해 유발되는 NCI-H441 세포 내 ROS 생성과 그에 따른 tight junction 단백질(N-cadherin, fibronectin, occluding, ZO-1, 및 claudin-4 등)의 발현 억제를 확인하였고 ECL의 전처리로 인하여 해당 ROS 생성 및 tight junction 단백질 발현 억제 현상이 완화된 보호효과를 확인하였다. 그 결과, 폐 세포에서 UPM에 의해 유발된 산화 스트레스 및 tight junction 단백질의 발현 감소가 ECL을 선 처리함으로써 억제되어 결과적으로 산화 스트레스와 같은 미세먼지에 의한 폐 손상으로부터 보호 효과를 나타내고 tight junction 수준의 유지를 확인하였다. 이러한 결과를 통해 ECL 추출물은 폐와 기관지의 보호효과를 나타내며 폐 관련 질병의 예방효과가 있는 기능성 천연 물질로써 활용이 가능할 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 고려대학교 BK21 플러스 생명공학원 사업단의 지원을 받아 수행되었다(This study was supported by a Korea University Grant and partially supported by School of Life Sciences and Biotechnology of Korea University for BK21 PLUS).

## References

- Ahn JY, Kim JS, Lee MD, Lee SU, Jeon HE, Oh J, Park SM, Jo JG, Seo WH, Lee SJ, Do WS, Lee BW, Lee SW, Ha HS, Yu HJ, Seo KY, Kim SH, Kwon SM, Lee KW. Study on the Composition of  $\text{PM}_{2.5}$  in the Yellow Sand and Fine Particle. National Institute of Environmental Research. pp. 1-118 (2008)
- Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. J. Med. Toxicol. 8: 166-175 (2012)
- Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. N. Engl. J. Med. 343: 269-280 (2000)
- Beeman NE, Baumgartner HK, Webb PG, Schaack JB, Neville MC. Disruption of occludin function in polarized epithelial cells activates the extrinsic pathway of apoptosis leading to cell extrusion without loss of transepithelial resistance. BMC Cell Biol. 10: 85 (2009)
- Choe SY, Yang KH. Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxy anisol (BHA). Korean J. Food Sci. Technol. 14:283-288 (1982)
- Chosa N, Ishisaki A. Two novel mechanisms for maintenance of stemness in mesenchymal stem cells: SCRG1/BST1 axis and cell-cell adhesion through N-cadherin. Jpn. Dent. Sci. Rev. 54: 37-44 (2018)
- Cunningham KE, Turner JR. Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1258: 34-42 (2012)
- Donaldson K, Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. Ann. Ist. Super. Sanità. 39: 405-410 (2003)
- Ghim YS, Choi Y, Kim S, Bae CH, Park J, Shin HJ. Evaluation of Model Performance for Forecasting Fine Particle Concentrations in Korea. Aerosol Air Qual. Res. 17: 1856-1864 (2017)
- Guan L, Rui W, Bai R, Zhang W, Zhang F, Ding W. Effects of Size-Fractionated Particulate Matter on Cellular Oxidant Radical Generation in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells. Int. J. Environ. Res. Public Health. 13: 483 (2016)
- Gumbiner B. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 253: 749-758 (1987)
- Ha SJ, Jung SK. Functional Food for Particulate Matter, Food Ind. Nutr. 22: 33-37 (2017)
- Hagerman A, Harvey MI., Makkar HPS. Quantification of tannins in tree foliage: a laboratory manual for the FAO/IAEA co-ordinated research project on 'The use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assays for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants on tanniferous tree foliage.' FAO/IAEA Working Document IAEA, Vienna. pp. 4-7 (2000)
- Hur GY, Choi GS, Park HJ, Ye YM, Park HS. Anaphylactic shock induced by *Codonopsis lanceolata*, traditional Chinese medicine in a patient with allergic rhinitis. Allergy 63: 1406-1407 (2008)
- International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, No. 109-Outdoor air pollution. Lyon, France. pp. 135-188 (2015)
- Jeon SM, Kim SY, Kim IH, Go JS, Kim HR, Jeong JY, Lee HY, Park DS. Antioxidant Activities of Processed Deoduck (*Codonopsis lanceolata*) Extract. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 42: 924-932 (2013)
- Kim TW, Joh EH, Kim B, Kim DH. Ginsenoside Rg5 ameliorates lung inflammation in mice by inhibiting the binding of LPS to toll-like receptor-4 on macrophages. Int. Immunopharmacol. 12: 110-116 (2012)
- Kitagaki H, Tsugawa M. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging ability of sake during storage. J Biosci. Bioeng. 87: 328-332 (1999)
- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. Am. J. Clin. Nutr. 76: 560-568 (2002)
- Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM). Korea Oriental Medicine Data Base Mediclassics- Donguibogam (principles and practice of eastern medicine), No. 4.24-*Codonopsis lanceolata*. Available from: [https://medicclassics.kr/books/8/volume/21#content\\_999](https://medicclassics.kr/books/8/volume/21#content_999) (2014)
- Lee DC, Choi H, Oh JM, Lee DH, Kim SW, Kim SW, Kim BG, Cho JH, Lee J. Protective effects of  $\alpha$ -lipoic acid on cultured human nasal fibroblasts exposed to urban particulate matter. Int. Forum Allergy Rhinol. 9: 638-647 (2019a)
- Lee DC, Choi H, Oh JM, Lee J, Lee JY, Kang JY. Urban particulate matter regulates tight junction proteins by inducing oxidative stress via the Akt signal pathway in human nasal epithelial cells. Toxicol. Lett. 333: 33-41 (2020)
- Lee KW, Jung HJ, Park HJ, Kim DG, Lee JY, Lee KT. Beta-D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucuronopyranosyl echinocystic acid isolated from the roots of *Codonopsis lanceolata* induces caspase-dependent apoptosis in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. Biol. Pharm. Bull. 28: 854-859 (2005a)
- Lee HS, Jung SH, Yun BS, Lee KW. Isolation of chebulic acid from *Terminalia chebula* Retz. and its antioxidant effect in isolated rat hepatocytes. Arch. Toxicol. 81: 211-218 (2007a)
- Lee YG, Kim JY, Lee JY, Byeon SE, Hong EK, Lee J. Regulatory effects of *Codonopsis lanceolata* on macrophage-mediated immune responses. J. Ethnopharmacol. 112: 180-188 (2007b)
- Lee YS, Kim HE, Kim J, Seol GH, Lee KW. Lancemaside A, a major triterpene saponin of *Codonopsis lanceolata* enhances regulation of nitric oxide synthesis via eNOS activation. BMC Complement Altern. Med. 19: 110 (2019b)
- Lee JH, Lee JY, Kim MJ, Kim HJ, Lee SH, Jeon BG. Cytotoxicity of Particulate Matter in Various Human Cells Lines. J. Life Sci. 29: 724-734 (2019c)
- Lee KW, Nam MH, Lee HR, Hong CO, Lee KW. Protective effects of chebulic acid on alveolar epithelial damage induced by urban particulate matter. BMC Complement Altern. Med. 17: 373 (2017)
- Lee HR, Pyo MC, Chae SA, Hong CO, Lee KW. Inhibitory Effect of Chebulic Acid on Alveolar Epithelial to Mesenchymal Transition



- in Response to Urban Particulate Matter Using Co-treatment and Post-treatment Exposure. *Biol. Pharm. Bull.* 42: 1322-1331 (2019d)
- Lee HS, Won NH, Kim KH, Lee H, Jun W, Lee KW. Antioxidant effects of aqueous extract of *Terminalia chebula* in vivo and in vitro. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 1639-1644 (2005b)
- Li HB, Wong CC, Cheng KW, Chen F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Sci. Technol.* 41: 385-390 (2008)
- Ljubimova JY, Braubach O, Patil R, Chiechi A, Tang J, Galstyan A, Shatalova ES, Kleinman MT, Black KL, Holler E. Coarse particulate matter (PM<sub>2.5-10</sub>) in Los Angeles Basin air induces expression of inflammation and cancer biomarkers in rat brains. *Sci. Rep.* 8: 5708 (2018)
- Mann EH, Ho TR, Pfeffer PE, Matthews NC, Chevretton E, Mudway I, Kelly FJ, Hawrylowicz CM. Vitamin D Counteracts an IL-23-Dependent IL-17A<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Response Driven by Urban Particulate Matter. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 57: 1-12 (2017)
- Ministry of Environment (ME). Enforcement Decree of the Clean Air Conservation Act. Ministry of Environment, Sejong, Republic of Korea (2019)
- Ministry of Environment (ME). Enforcement Decree of the Framework Act on Environmental Policy Attached Sheet 1-Environmental standards. Ministry of Environment, Sejong, Republic of Korea (2020)
- Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 115: 3861-3863 (2002)
- Park KH, Kim JH, Yoon HS, Kim IH, Choi IM, Lee JY, Ju MK. Correlation between Coarse Airborne Particulate Matter and Mortality Rates of Malignant Neoplasm. *Korean J. Health Promot.* 16: 215-222 (2016)
- Park SK, Kang JY, Kim JM, Yoo SK, Han HJ, Shin EJ, Heo HJ. Cellular protective effect of *Ecklonia cava* extract on ultra-fine dust (PM<sub>2.5</sub>)-induced cytotoxicity. *Korean J. Food Sci. Technol.* 51: 503-508 (2019)
- Park KS, Kim YJ, Yoon JY, Kyung SY, An CH, Lee SP, Park JW, Jeong SH. Particulate Matter 10 from Asian Dust Storms Induces the Expression of Reactive Oxygen Species, NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$  and Fibronectin in WI-26 VA4 Epithelial Cells. *Tuberc. Respir. Dis.* 65: 504-511 (2008)
- Park SJ, Song SW, Seong DH, Park DS, Kim SS, Gou J, Ahn JH, Yoon WB, Lee HY. Biological Activities in the Extract of Fermented *Codonopsis lanceolata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 983-988 (2009)
- Patel, VJ, Roy SB, Mehta HJ, Joo M, Sadikot RT. Alternative and natural therapies for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *BioMed Res. Int.* 2018: 1-10 (2018)
- Quay JL, Reed W, Samet J, Devlin RB. Air Pollution Particles Induce IL-6 Gene Expression in Human Airway Epithelial Cells via NF- $\kappa$ B Activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 98-106 (1998)
- Santana FPR, Pinheiro NM, Mernak MIB, Righetti RF, Martins MA, Lago JHG, dos Santos Lopes FDTQ, Tibério IFCL, Prado CM. Evidences of Herbal Medicine-Derived Natural Products Effects in Inflammatory Lung Diseases. *Mediators Inflamm.* 2016: 1-14 (2016)
- Seo YS, Kim HS, Lee AY, Chun JM, Kim SB, Moon BC, Kwon BI. *Codonopsis lanceolata* attenuates allergic lung inflammation by inhibiting Th2 cell activation and augmenting mitochondrial ROS dismutase (SOD2) expression. *Sci. Rep.* 9: 2312 (2019)
- Shin YK, Han AY, Hsieh YS, Kwon SH, Kim JH, Lee KW, Seol GH. Lancemaside A from *Codonopsis lanceolata* prevents hypertension by inhibiting NADPH oxidase 2-mediated MAPK signaling and improving NO bioavailability in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 71: 1458-1468 (2019)
- Song CH, Seo YC, Choi WY, Lee CG, Kim DU, Chung JY, Chung HC, Park DS, Ma CJ, Lee HY. Enhancement of Antioxidative Activity of *Codonopsis lanceolata* by Stepwise Steaming Process. *Korean J. Med. Crop Sci.* 20: 238-244 (2012)
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10: 3886-3907 (2013)
- Vermette D, Hu P, Canarie MF, Funaro M, Glover J, Pierce RW. Tight junction structure, function, and assessment in the critically ill: a systematic review. *Intensive Care Med.* 6: 37 (2018)
- Wang J, Huang J, Wang L, Chen C, Yang D, Jin M, Bai C, Song Y. Urban particulate matter triggers lung inflammation via the ROS-MAPK-NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J. Thorac. Dis.* 9: 4398-4412 (2017)
- Wang M, Yang L, Ji M, Zhao P, Sun P, Bai R, Tian Y, Su L, Li C. Aqueous extract of *Terminalia chebula* induces apoptosis in lung cancer cells via a mechanism involving mitochondria-mediated pathways. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 58: 208-215 (2015)
- World Health Organization (WHO). 3rd Meeting of the Global Platform on Air Quality and Health, Madrid, 7-9 March 2017 - Meeting Report (2017). Available from: [https://www.who.int/air-pollution/global-platform/Global\\_Platform\\_Consultation\\_Report\\_3rd\\_Meeting\\_DRAFT\\_30\\_May\\_2017.pdf?ua=1](https://www.who.int/air-pollution/global-platform/Global_Platform_Consultation_Report_3rd_Meeting_DRAFT_30_May_2017.pdf?ua=1). Accessed May (2017)
- World Health Organization (WHO). Exposure to ambient air pollution from particulate matter for 2016. Version 2. Available from: [https://www.who.int/airpollution/ambient/AAP\\_exposure\\_Apr2018\\_final.pdf?ua=1](https://www.who.int/airpollution/ambient/AAP_exposure_Apr2018_final.pdf?ua=1). Accessed Apr. (2018)
- Wray C, Mao Y, Pan J, Chandrasena A, Piasta F, Frank JA. Claudin-4 augments alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 297: L219-L227 (2009)
- Xu LP, Wang H, Yuan Z. Triterpenoid saponins with anti-inflammatory activity from *Codonopsis lanceolata*. *Planta Med.* 74: 1412-1415 (2008)
- Yuan Z, Syed MA, Panchal D, Rogers D, Joo M, Sadikot RT. Curcumin mediated epigenetic modulation inhibits TREM-1 expression in response to lipopolysaccharide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44: 2032-2043 (2012)
- Zhao R, Guo Z, Zhang R, Deng C, Xu J, Dong W, Hong Z, Yu H, Situ H, Liu C, Zhuang G. Nasal epithelial barrier disruption by particulate matter  $\leq 2.5 \mu\text{m}$  via tight junction protein degradation. *J. Appl. Toxicol.* 38: 678-687 (2018)