

Original Article

만성폐쇄성폐질환 동물모델에서 GGX의 폐손상 억제 효과

김태현^{1†}, 양원경^{1,2†}, 이수원¹, 김승형², 유이란¹, 박양춘^{1,2*}

¹대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실, ²대전대학교 동서생명과학연구소

Inhibitory Effects of GGX on Lung Injury of Chronic Obstructive Lung Disease (COPD) Mice Model

Tae Hyeon Kim^{1†}, Won Kyung Yang^{1,2†}, Su Won Lee¹, Seung Hyung Kim², Yee Ran Lyu¹,
Yang Chun Park^{1,2*}

¹Division of Respiratory Medicine, Dep. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea.

²Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, Daejeon, Korea.

Objectives: This study is aimed to evaluate the protective effects of GGX on lung injury of Chronic Obstructive Lung Disease (COPD) mice model.

Materials and Methods: C57BL/6 mice were challenged with lipopolysaccharide (LPS) and cigarette smoke extract (CSE) and then treated with vehicle only (Control group), dexamethasone 3 mg/kg (Dexa group), gam-gil-tang 200 mg/kg (GGT group), GGX 100, 200, and 400 mg/kg (GGX group). After sacrifice, its bronchoalveolar lavage fluid (BALF) or lung tissue was analyzed with cytospin, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), real-time polymerase chain reaction (PCR) and hematoxylin & eosin (H&E), and Masson's trichrome staining.

Results: In the COPD model, GGX significantly inhibited the increase of neutrophils, TNF- α , IL-17A, CXCL-1, MIP2 in BALF and TNF- α , IL-1 β , IL-10 mRNA expression in lung tissue. It also decreased the severity of histological lung injury.

Conclusion: This study suggests the usability of GGX for COPD patients by controlling lung tissue injury.

Key Words : Chronic Obstructive Lung Disease, GGX, Herbal drug, Korean medicine

서론

대표적인 만성호흡기 질환인 만성 폐쇄성 폐질환 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) 은 가스 또는 유해한 흡입물질, 입자에 노출되어 발생하며, 폐의 비정상적인 염증반응과 이에 동반되어

나타나는 완전히 가역적이지는 않으면서 점차 진행되는 기류제한을 보이는 질환이다¹⁾. COPD의 병리학 적 변화는 기도, 폐실질 및 폐혈관계에 걸쳐 발생하는데 만성 염증 반응은 폐실질 파괴와 정상복구 시스템의 이상을 일으켜 탄성반동의 감소를 동반하는 폐기종과 기도저항을 증가시키는 소기도 섬유화를 초

· Received : 3 May 2021

· Revised : 7 June 2021

· Accepted : 28 July 2021

· Correspondence to : Yang-Chun Park

Korean Internal Medicine, Daejeon Korean Medicine Hospital of Daejeon University

75, Daedeok-daero 176-beongil, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea 35235

Tel : +82-42-470-9126 (clinic), 229-6763 (office, Munchang Campus), Fax : +82-42-470-9486, E-mail : omdpyc@dju.kr

[†] These authors contributed equally to this work

래한다²⁾.

COPD의 약물치료는 기도 평활근의 긴장도를 변화시켜 폐기능을 개선시키는 기관제확장제가 중심이 되는데 베타2항진제, 아미노필린, 항콜린제 등이 여기에 속한다³⁾. 기관제확장제는 증상을 완화시키고, 운동능력이나 삶의 질 등을 향상시켜 주고, 급성악화의 감소에 도움을 주나 폐기능의 감소를 억제시키거나 사망률을 개선시킨다는 증거는 아직 없다⁴⁾. 부신피질 호르몬제의 경우 피부 명, 부신 억제, 골밀도 감소 등의 전신부작용과 폐렴의 발생을 증가시킬 수 있어 흡입스테로이드 단독 투여는 천식을 동반한 특수한 임상상황에 한정되어야 한다⁵⁾. 이에 따라 COPD 환자의 예후가 악화되는 것을 막으면서 장기적으로는 COPD의 증상을 부작용 없이 조절할 수 있는 안전하고 효과적인 치료제를 개발하는 것이 필요하다⁶⁾.

COPD의 한의학 처방의 치료 효과에 대한 기존 연구로는 소청룡탕^{7,8)}, 생맥청폐음⁹⁾, 맥문동탕¹⁰⁾, 청상보하탕에서 유래한 PM014¹¹⁾, 사간탕¹²⁾, 및 사간탕에서 유래한 SGX01¹³⁾, 과루행련환에서 유래한 GHX02¹⁴⁾ 등이 있었다. 또 다른 연구에서는 COPD 모델에서 감초와 곽향 조합의 효과를 평가하는 연구에서 한약 혼합물은 IL-17/STAT3 경로를 차단하여 염증성 사이토카인과 CXCL-2의 발현을 조절함으로써 호중구 기도 염증을 보다 효과적으로 억제함을 밝혔고¹⁵⁾, COPD 모델에서 보폐익신탕의 작용 메커니즘을 분석하기 위한 연구에서 대사산물의 경로의 분석을 통하여 COPD 치료에 아라키돈산 관련 경로가 표적이 될 수 있음을 제안하였다¹⁶⁾.

GGX는 방약합편¹⁷⁾에 기재되어 少陰客寒咽痛에 사용하는 감길탕(甘桔湯)에 금은화, 상백피를 더하여 구성된 처방으로 미세먼지 유발 폐손상에 대한 보호 효과에 대한 연구가 보고되었고¹⁸⁾, 대전대학교 한방병원에서 기침, 가래 등의 호흡기 질환에 활용되고 있다. 감길탕(甘桔湯) 관련 연구로는 흰쥐를 담배연기에 노출시키기 전 감길탕을 경구투여하고 4주간의 실험기간 후 폐조직을 관찰한 결과 감길탕은 oxidative

stress 및 apoptosis의 억제, angiogenesis의 활성화를 통하여 간접흡연으로 인한 폐조직 손상에 대한 보호 작용을 가지고 있다고 보고하였다¹⁹⁾.

본 연구에서는 COPD에 대한 GGX의 효과를 평가하기 위하여 lipopolysaccharide(LPS)와 표준담배 추출물(Cigarette Smoke Extract, CSE)로 유발한 COPD 동물모델²⁰⁾을 이용하여 cytospin을 통해 neutrophil 분화수준을 측정하였고, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 관련 cytokines를 분석하였으며, real-time polymerase chain reaction(PCR)을 통해 연관 유전자의 발현 정도를 측정하였고, 폐 생검을 통해 폐조직 손상 억제 작용을 확인하여 유의한 효과를 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

GGX를 구성하는 약물은 (주)휴먼허브(Gyeongbuk, Korea)의 지원을 받았다. Table 1에는 1첩의 용량, 처방의 내용이 나타나 있다. GGX 40 g에 10배의 증류수를 가하여 2시간 동안, 2회에 걸쳐 환류 추출기에서 얻은 액을 여과하였다. 그 후 감압 증류기(Buchi B-480, Switzerland)로 여과액을 농축하였다. 그리고 나서 동결 건조장치(Eyela FDU-540, Japan)로 건조시킨 후, 냉동(-84℃) 보관하여 사용하였다. 최종적으로 GGX는 초기 약재 40 g으로부터 14.5 g

Table 1. The Composition of GGX

Herb	Pharmacognostic name	Amount (g)
Gilgyeong	<i>Platycodi Radix</i>	14.00
Gamcho	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6.00
Geumeunhwa	<i>Lonicerae Flos</i>	14.00
Sangbaekpi	<i>Mori Radicis Cortex</i>	6.00
Total amount		40.00

의 추출물을 얻어 36.25%의 수율을 나타냈다.

2) 시약 및 기기

본 실험에서 사용된 LPS는 Sigma사에서 구입한 것이며, 1 mg/ml 농도로 생리식염수에 녹여 사용하였고, 사용 전까지는 -20℃에서 보관하였다. 그 외에 mouse tumor necrosis factor- α (TNF- α), mouse Interleukin-17(IL-17), mouse Macrophage inflammatory protein 2(MIP2), mouse Chemokine ligand-1(CXCL-1)은 R&D systems사(MN, USA) 제품을 사용하였다. Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, DMEM, RPMI-1640 배양액은 Sigma사(MA, USA) 제품을, Fetal Bovine Serum(FBS)는 Serum Source사(NC, USA) 제품을 사용하였고, 이외의 일반 시약은 특급을 사용하였다.

기기는 CO2 incubator(Forma Scientific, USA), chemical balance(Cas, Korea), freeze dryer(EYELA, Japan), clean bench(Vision Scientific, Korea), ice-maker(Vision scientific, Korea), Biosystem XA(Buxco Research System, USA), water bath(Vision scientific, Korea), deep-freezer(Sanyo, Japan), autoclave (Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech, Germany), 열탕추출기(대웅, Korea), spectrophotometer(Shimadzu, Japan), rotary vacuum evaporator(Büchi, Switzerland), vortex mixer(Vision scientific, Korea), centrifuge(Sigma, USA), micro-pipet (Gilson, France), plate shaker(Lab-Line, USA), homogenizer(OMNI, USA), ELISA reader(Molecular Devices, USA) 및 chemical balance(Cas, Korea) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 동물

사용된 실험 동물은 C57BL/6 계열이고, 연령은 7주령, 성별은 수컷인 생쥐(오리엔트바이오, Korea)이며, 제약을 두지 않고 물, 고형 사료를 섭취하게 하였

다. 22~24℃의 온도에서, 50±10%의 습도를 맞추었다. 또한 밤낮 주기(12시간 주/야)의 조절이 되는 조명이 갖추어진 실험실 환경에서 사육하였다. 실험에 사용된 동물의 평균 몸무게는 24±4 g으로 측정되었다. 본 실험은 규정에 따라 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 통하여 시행되었다(승인번호: DJUAR2019-026).

2) CSE의 제조

(1) 표준담배 연소 및 연기 포집

표준담배로서 Coresta Monitoring Cigarette 7(Heinr Borgwaldt, Germany)의 연기 포집은 ISO3402 규정에 의해 온도 22±2℃ 및 상대습도 60±5%의 흡연공간에서 실시하였다. 자동흡연기 (RM20/CS, Heinr Borgwaldt, Germany)를 사용하였고, ISO3308 규정에 따랐다. 풍초 길이가 팁 페이퍼(tip paper)의 길이 + 3 mm가 되도록 2.00±0.02초의 흡연시간으로 연소하였다. 또한 흡연 부피는 35.0±0.3ml로 연소하였고, 흡연주기는 60±0.5초의 범위에서 ISO 표준 흡연 방법을 이용해 연소시켰다. 92 mm 케임브리지 필터(ISO3308 규격품, USA)를 사용해 연기 응축물을 포집하였다.

(2) 표준담배의 연기응축물 추출

Cigarette holder(RM20, Heinr Borgwaldt, Germany)로부터 표준담배의 연기응축물이 포집되어 있는 cambridge filter를 분리한 뒤, 각각 100 ml의 삼각플라스크에 넣고 추출용매로서 isopropanol 50 ml를 첨가하여 잘 흔든 다음, 실온에서 8시간 이상을 방치한 후 추출하였다. 추출 후 여과한 뒤에 감압여과 농축기로 농축을 하였으며, 3개의 삼각플라스크에 담겨진 농축액을 Scintillation vial(03-340-25N, WHEATON, USA)에 모아 질소 가스를 사용하여 완전 농축하였다. Fig. 1의 공식으로 표준담배 주류연(主流煙)에서의 Total Particulate Matter(TPM) 함량을 계산하였다.

3) COPD 모델 제작 및 약물 투여

C57BL/6 계열 수컷 생쥐에 LPS 100 µg/ml, 표준 담배 추출물(Cigarette smoke extract, CSE) 1 mg/ml 을 1:1로 혼합하여 주 1회씩 3주간 50 µl씩 흡입시켜 COPD를 유발시켰다. LPS는 7% 농도의 Chloral hydrate(C8383, Sigma, USA)를 이용해 생쥐에게 복강 주사하여 마취한 뒤 투여하고, 생쥐의 앞니를 고무밴드를 이용하여 고정시켜 기도로 투여하였고, 표준담배 추출물 또한 같은 방식으로 투여 하였다. 각 군당 8마리씩 실험에 배정하였고, 실험군은 유발물질 처리를 하지 않은 정상군(Normal), LPS와 CSE를 처리한 대조군(Control), LPS와 CSE 처리 후 dexamethasone(3 mg/kg, p.o.)을 투여한 양성대조군(Positive control), LPS와 CSE 처리 후 감길탕(Gamgil-tang) 추출물(200 mg/kg, p.o) 투여군(GGT), LPS와 CSE 처리 후 GGX 추출물(100, 200, 400 mg/kg, p.o) 투여군(GGX)으로 나누었다. 약물을 주입하는 2주 동안 매일 경구로 약물을 주입 하였으며, 실험이 끝난 후 각 군에 속한 생쥐에서 폐조직(lung tissue)과 기관지폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)을 분리하였다.

4) 기관지폐포 세척액(BALF) 분리

실험동물들을 실험 마지막 날에 ethyl ether로 마취시키고 채혈한 후, 흉부를 열어 기도를 노출시키고, 주사기를 기도 내로 삽입해 끈으로 묶어 고정시켰다. 그 후 FBS가 없는 1 ml의 DMEM 배지를 3회 순환시키는 방법으로 기관지폐포 세척액(BALF)을 얻었다. 기관지폐포 세척액을 1,750 rpm, 4°C의 조건에서 5분간 원심분리한 뒤, cytokine측정을 위해 상층액은 따로 냉동보관하고, 세척액에서 분리한 세포는 ACK 용액으로 3분을 처리하여 적혈구를 용해시킨 뒤, 1% FBS free DMEM 배양액으로 세척하고 hemocytometer로 총 세포수를 측정하였다.

$$TPM (mc/cig) = \frac{W_{FHA} - W_{FHB}}{N}$$

Fig. 1. Total particulate matter of cigarette smoke solution. TPM: total particulate matter, WFHA: Weight of filter holder after smoke, WFHB: Weight of filter holder before smoke, N: Cigarette number of each trap.

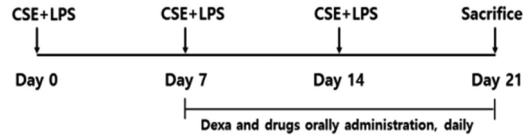


Fig. 2. Experimental plan of repeated CSE+LPS exposure. CSE+LPS: Intranasal instillation of LPS 100 µg/ml and cigarette smoke extract 1 mg/ml.

5) 기관지폐포 세척액(BALF) 중 총 neutrophils 수 측정

기관지폐포 세척액 내 neutrophils 수 측정을 위해 cytopsin을 시행하였다. 여기서 침전된 혈구를 분리하고, Diff-Quick staining을 3회 시행한 다음, 2회에 걸쳐 PBS로 세척한 후, slide를 군별로 9개씩을 제작하고 광학현미경(Nikon, Japan)으로 400배율에서 계수하였다.

6) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

기관지폐포 세척액 내 존재하는 IL-17A, TNF-α, MIP2, CXCL-1의 양 측정을 위해 ELISA를 수행했다. Coating buffer에 capture antibody를 혼합 후, 각 well에 100 µl씩 첨가하여, 4°C에서 overnight 한 후, 4회에 걸쳐 washing buffer로 세척하였다. Well 당 assay diluent를 200 µl씩 넣어, 실온에서 1시간 동안 blocking을 한 뒤, 4회에 걸쳐 washing buffer로 세척하였다. 실험군 각각의 혈청과 standard를 10 배의 농도에서 assay diluent 용액으로 희석한 뒤, capture antibody가 코팅된 96 well plate에 100 µl씩 이를 첨가하여 2시간 동안 실온에서 반응을 시켰

다. 이후 washing buffer로 3회 세척한 뒤, 각 well에 biotin-conjugate antibody reagent 100 μ l을 처리하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 2회에 걸쳐 세척한 뒤, 각 well에 streptavidin-HRP solution 100 μ l을 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시키고, 그 후 2회에 걸쳐 washing buffer를 사용하여 세척하였다. 이어 substrate solution을 각각 100 μ l씩 처리하여 20분간 반응시킨 후, stop solution 50 μ l을 처리하고 반응을 종결시킨 후, 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

7) Real-time Polymerase chain reaction(PCR) 분석

폐조직에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 mRNA가 얼마나 발현되는지를 측정하고자 real-time PCR을 수행하였다. 생쥐의 폐조직을 적출해 RNazol (CS-105B, Tel-Test, USA) 500 μ l를 첨가한 뒤 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃)을 50 μ l 첨가한 뒤 다시 15초간 혼합하였다. 이 혼합액을 얼음에 15분간 방치한 뒤 13,000 rpm 조건으로 원심분리 한 후에, 약 200 μ l의 상층액을 분리하여 2-propranolol 200 μ l와 동량으로 혼합하여 천천히 흔들어준 다음, 15분간 얼음에 방치하였다. 다시 이를 13,000 rpm 조건으로 원심분리한 뒤, 80% EtOH로 세척한 후 vacuum pump (ULVAC, USA)에서 3분 동안 건조시켜 RNA를 추출하였다.

DEPC(Diethyl pyrocarbonate, IBS-BW1004, Intron, Korea)를 처리한 증류수 20 μ l에 추출한 RNA를 녹인 뒤, 75 $^{\circ}$ C의 heating block(2050, Lab-Line, India)에서 불활성화시켜 이를 first cDNA 합성에 이용하였다. 역전사 반응을 위해 2 μ g의 total RNA와 DNase I(10 U/ml) 2U/tube를 30분 동안 37 $^{\circ}$ C의 heating block에서 반응시킨 뒤 75 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성시켰다. 그 후 10 mM dNTP Mix(4026, 4027, 4028, 4029, TaKaRa, Japan) 2.5 μ l와, 100 mM DTT(P1171, Promega, USA) 1 μ l, 그리고 5X reaction buffer(M531A, Promega, USA) 4.5 μ l를 첨가한 다음, M-MLV RT(M1705, Promega, USA) 1 μ l를 가하고, diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 처리된 증류수를 사용하여 최종 부피가 20 μ l 되도록 하였다. 위의 과정을 거쳐 얻은 반응 혼합액 20 μ l를 혼합하여 5초간 2,000 rpm에서 원심 침강시키고 37 $^{\circ}$ C의 가열블록에서 60분 동안 반응시켜서 first-strand cDNA를 합성시킨 뒤, 5분 동안 95 $^{\circ}$ C에 방치하고 M-MLV RT를 불활성화하여 합성을 완료시킨 cDNA를 실시간 PCR에 사용하였다.

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)으로 합성한 cDNA의 실시간 PCR을 수행하였다. 사용된 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 시발체는 Power SYBR Green PCR Master Mix(ABi, USA)를 사용했다. 대조군으로는 생쥐 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Table 2. Oligonucleotide Sequence Used for Mouse Real-time PCR

Gene	Primer	Sequence
TNF- α	FAM	5'-CACGTCGTAGCAAACCACCAAGTGGA-3'
	Forward	5'-CACCTTCCTTTTCCTTCATCTT-3'
IL-1 β	Reverse	5'-GTCGTTGCTTGTCTCTCCTTGTA-3'
	Forward	5'-TACCCCCAGGAGAAGATTCC-3'
IL-6	Reverse	5'-TTTTCTGCCAGTGCC TCTTT-3'
	Forward	5'-GATGCCTTCAGCAGAGTGAAGA-3'
IL-10	Reverse	5'-CATGGCTTTGTAGATGCCTTTC-3'
	VIC	5'-TGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAG-3'

(G3PDH) cDNA probe (Applied Biosystems, USA)를 사용하였다. Probe의 sequence와 primer는 Table 2에 기재하였고, Taqman PCR Master mix를 반응액으로 사용했다. Probe 최종농도는 200 nM가 될 수 있도록 반응시켰다. Real time quantitative PCR 조건에서 pre-denaturation은 50 °C로 2 min, 94 °C로 10 min, 40 cycles를 95 °C로 15 sec, 60 °C로 1 min 수행하였다. GGX 투여군과 대조군의 내부표준으로는 G3PDH를 사용하였다. RQ(relative quantitative)는 target group의 Quantitative PCR $y=x(1+e)^n$ 로 계산하였다(y = yield, x = starting quantity, e = efficiency, n = number of cycles).

8) Hematoxylin & Eosin과 Masson's trichrome 염색

폐손상 정도의 측정을 위해 폐조직을 10% neutral buffered formalin에 24시간을 고정시킨 후, graded alcohol로 탈수시켰다. 그리고 파라핀에 포매하여 block을 만든 후에, microtome을 이용하여 4 μ m 두께로 조직 절편을 만들었으며 hematoxylin & eosin(H&E) 염색에 이용하였다. H&E staining을 실시하기 위해 hematoxylin에 슬라이드를 1분 동안 담가 둔 뒤, 흐르는 증류수로 여러 번 세척하고 eosin에 30초간 담그고, 흐르는 증류수에 다시 여러 번 세척하였다. 이후 70%→95%→100% ethanol의 과정으로 여러 번 씻어서 염색을 적절히 제거한 뒤 1분간 xylene에 담가두었다. 마지막으로 mounting medium xylene을 사용하여 cover-slide를 영구적으로 부착시켜 광학현미경(Nikon, Japan) 200배율에서 관찰하였다. Masson's trichrome을 실시하기 위해 박 절편을 4 μ m 두께로 제작하고 탈 파라핀, 함수, 증류수에 수세한 다음, bouin 용액에 옮겨 56 °C에서 1시간 매염처리 후 수세한 뒤, Weigert's iron hematoxylin 용액으로 10분간 염색한 뒤 10분간 수세하였다. 이어 Biebrich scarlet-acid fuchsin 용액으로 5분간 염색한 뒤 증류수에 수세하고, phosphomolybdic

phosphotungstic acid 용액을 사용하여 15분간 분별 염색한 뒤 aniline blue 용액에서 5분간 염색하였다. Glacial acetic acid 0.5% 용액에서 3분간 감별하고 탈수 및 청명 과정을 거친 뒤, cover-slide를 영구적으로 부착시켜 광학현미경(Nikon, Japan) 200배율에서 관찰하였다.

10) 통계분석

각각의 실험군 데이터는 SPSS software(version 12.0, SPSS Inc., USA)를 활용하여 독립표본 T검정으로 비교분석 하였고, 다중비교로 인한 유의수준을 교정하지 않았다. P value는 0.05보다 작으면 통계적으로 유의한 것으로 판정하였고, 0.05, 0.01, 0.001보다 작은 경우로 나누어 구분하였다.

결 과

1. 기관지 폐포 세척액 내 neutrophil의 증가에 미치는 영향

COPD가 유발된 대조군에서 neutrophil은 232.88 ± 14.68 개로 나타나 정상군의 8.75 ± 2.29 개보다 유의하게 증가하였으며, 양성대조군은 70.25 ± 9.48 개, GGT 200 mg/kg 투여군은 126.25 ± 10.99 개, GGX 100, 200 및 400 mg/kg를 투여한 실험군은 각각 107.63 ± 3.25 , 123.50 ± 5.24 , 86.75 ± 9.93 개로 나와 대조군과 비교해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3).

2. BALF 내 cytokines 생성에 미치는 영향

1) TNF- α 생성에 미치는 영향

COPD가 유발된 대조군에서 TNF- α 는 322.37 ± 17.41 pg/ml로 나타나 정상군의 98.68 ± 17.69 pg/ml보다 유의한 증가를 보였으며, 양성대조군은 162.59 ± 15.48 pg/ml, GGT 200 mg/kg 투여군은 257.33 ± 12.38 pg/ml, GGX 100, 200 및 400 mg/kg를 투여한 실험군은 각각 232.30 ± 24.78 , 193.96 ± 13.81 , 183.11 ± 22.16 pg/ml로 나와 대조군과 비교해 유의성 있게 감소하였

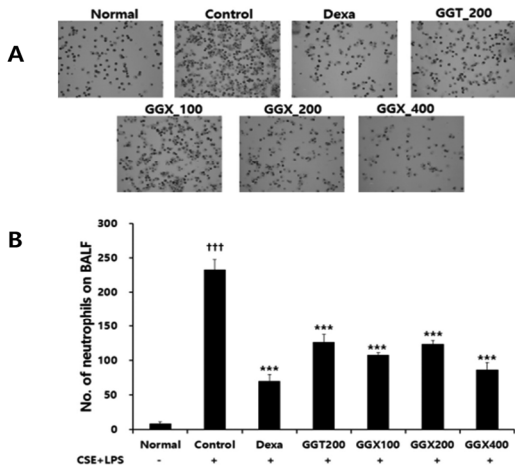


Fig. 3. Effect of GGX on cytospin image (A) and neutrophils count (B) in BALF of COPD mice.

Mice were challenged by aspiration of LPS+CSE (Control), and then treated with Dexamethasone (3 mg/kg), GGT (200 mg/kg) and GGX (100, 200, 400 mg/kg) for 21 days (n=8). All values are presented as mean±SE. †: Significant difference with the non-treated group (††† p<0.001), *: Significant difference with the Control (*** p<0.001).

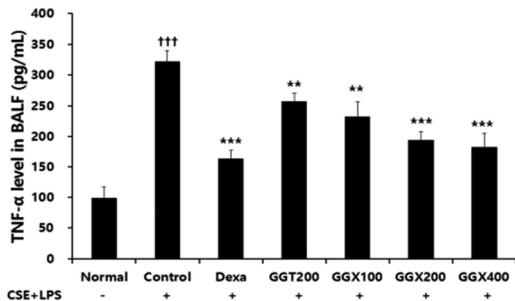


Fig. 4. Effect of GGX on TNF-α production in BALF of COPD mice.

Mice were challenged by an aspiration of LPS+CSE (Control), and treated with Dexamethasone (3 mg/kg), GGT (200 mg/kg) and GGX (100, 200, 400 mg/kg) for 21 days (n=8). Level of TNF-α was determined with ELISA. All values are presented as mean±SE. †: Significant difference with the non-treated group (††† p<0.001), *: Significant difference with the Control (** p<0.01, *** p<0.001).

다(Fig. 4).

2) IL-17A 생성에 미치는 영향

COPD가 유발된 대조군에서 IL-17A는 69.83±10.08 pg/ml로 나타나 정상군의 7.76±0.23 pg/ml보다 유의

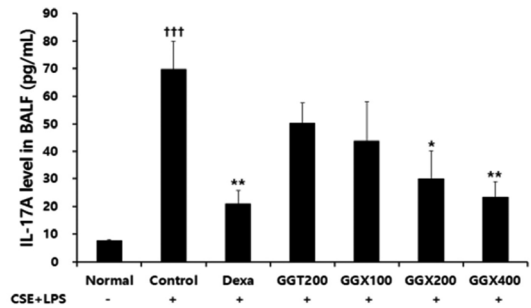


Fig. 5. Effect of GGX on IL-17A production of BALF in COPD mice.

Mice were challenged by an aspiration of LPS+CSE (Control), and treated with Dexamethasone (3 mg/kg), GGT (200 mg/kg) and GGX (100, 200, 400 mg/kg) for 21 days (n=8). Level of TNF-α was determined with ELISA. All values are presented as mean±SE. †: Significant difference with the non-treated group (††† p<0.001), *: Significant difference with the Control (* p<0.05, ** p<0.01).

한 증가를 보였으며, 양성대조군은 21.04±4.51 pg/ml, GGT 200 mg/kg 투여군은 50.28±7.35 pg/ml, GGX 100, 200 및 400 mg/kg를 투여한 실험군은 각각 44.04±13.88, 30.08±10.21, 23.37±5.41 pg/ml로 나타나 GGX 200 및 400 mg/kg 투여군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

3) MIP2 생성에 미치는 영향

COPD가 유발된 대조군에서 MIP2는 428.04±32.11 pg/ml로 나타나 정상군의 163.76±8.01 pg/ml보다 유의한 증가를 보였으며, 양성대조군은 239.44±6.36 pg/ml, GGT 200 mg/kg 투여군은 305.15±14.41 pg/ml, GGX 100, 200 및 400 mg/kg를 투여한 실험군은 각각 269.38±7.91, 287.56±10.43, 198.80±10.71 pg/ml로 나타나 대조군과 비교해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 6).

4) CXCL-1 생성에 미치는 영향

COPD 유발 대조군에서 CXCL-1은 205.29±7.02 pg/ml로 나타나 정상군의 77.66±6.55 pg/ml보다 유의한 증가를 보였으며, 양성대조군은 105.73±19.08 pg/ml로 유의하게 감소하였고, GGT 200 mg/kg 투여

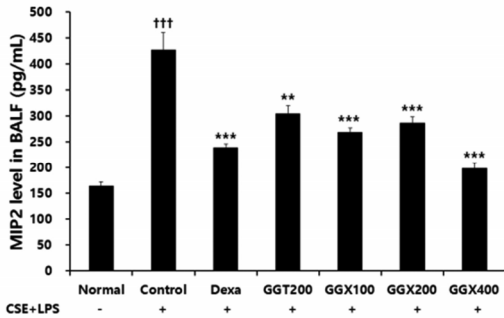


Fig. 6. Effect of GGX on MIP2 production in BALF of COPD mice.

Mice were challenged by an aspiration of LPS+CSE (Control), and treated with Dexa (dexamethasone 3 mg/kg), GGT (200 mg/kg) and GGX (100, 200, 400 mg/kg) for 21 days (n=8). Level of TNF- α was determined with ELISA. All values are presented as mean \pm SE. †: Significant difference with the non-treated group (††† p<0.001), *: Significant difference with the Control (** p<0.01, *** p<0.001).

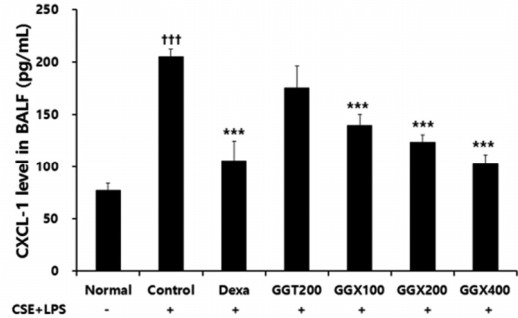


Fig. 7. Effect of GGX on CXCL-1 production in BALF of COPD mice.

Mice were challenged by an aspiration of LPS+CSE (Control), and treated with Dexa (dexamethasone 3 mg/kg), GGT (200 mg/kg) and GGX (100, 200, 400 mg/kg) for 21 days (n=8). Level of TNF- α was determined with ELISA. All values are presented as mean \pm SE. †: Significant difference with the non-treated group (††† p<0.001), *: Significant difference with the Control (** p<0.01, *** p<0.001).

군은 175.46 \pm 20.93 pg/ml로 감소하였으나 유의성은 없었으며, GGX 100, 200 및 400 mg/kg를 투여한 실험군은 각각 139.86 \pm 10.63, 123.99 \pm 6.42, 103.18 \pm 8.49 pg/ml로 나타나 대조군과 비교해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 7).

3. 폐조직 내 관련 단백질 mRNA 발현에 미치는 영향

1) TNF- α mRNA 생성에 미치는 영향

COPD가 유발된 대조군에서 TNF- α mRNA Relative Quantitative (RQ)는 1.35 \pm 0.28로 나타나 정상군의 0.67 \pm 0.19보다 유의하게 증가하였으며, 양성대조군은 0.72 \pm 0.11로 유의성 있게 감소하였다, GGT 200 mg/kg 투여군은 0.79 \pm 0.08로 감소하였으나 유의성은 없었으며, GGX 100, 200 및 400 mg/kg를 투여한 실험군은 각각 1.05 \pm 0.51, 0.38 \pm 0.05, 0.42 \pm 0.05로 나타나 200 및 400 mg/ml 투여군에서 유의한 감소를 보였다(Fig. 8).

2) IL-1 β mRNA 생성에 미치는 영향

COPD가 유발된 대조군에서 IL-1 β mRNA Relative

Quantitative (RQ)는 8.35 \pm 2.51로 나타나 정상군의 0.92 \pm 0.21보다 유의하게 증가하였으며, 양성대조군은 1.41 \pm 0.35로 유의성 있게 감소하였다, GGT 200 mg/kg 투여군은 3.43 \pm 1.01로 감소하였으나 유의성은 없었으며, GGX 100, 200 및 400 mg/kg를 투여한 실험군은 각각 3.66 \pm 0.58, 3.03 \pm 1.53, 1.31 \pm 0.65로 나타나 400 mg/ml 투여군에서 유의한 감소를 보였다 (Fig. 9).

3) IL-6 mRNA 생성에 미치는 영향

COPD가 유발된 대조군에서는 IL-6 mRNA Relative Quantitative(RQ)가 1.22 \pm 0.41로 나타나 정상군의 0.70 \pm 0.18보다 증가하였으며, 양성대조군은 0.81 \pm 0.52, GGT 200 mg/kg 투여군은 1.01 \pm 0.49, GGX 100, 200 및 400 mg/kg를 투여한 실험군은 각각 0.78 \pm 0.19, 0.68 \pm 0.16, 0.68 \pm 0.13으로 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 10).

4) IL-10 mRNA 생성에 미치는 영향

COPD가 유발된 대조군에서는 IL-10 mRNA Relative Quantitative (RQ)가 1.97 \pm 0.45로 나타나 정

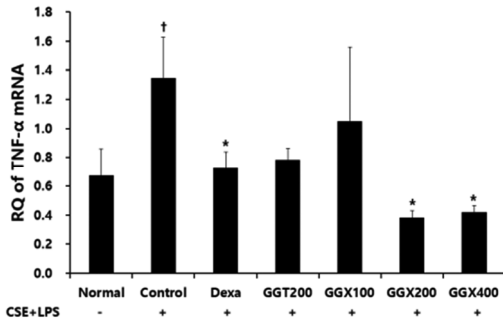


Fig. 8. Effect of GGX on TNF- α mRNA expression in lung tissue of COPD mice.

Mice were challenged by an aspiration of LPS+CSE (Control), and treated with Dexamethasone (3 mg/kg), GGT (200 mg/kg) and GGX (100, 200, 400 mg/kg) for 21 days (n=4). Level of TNF- α was determined with real time PCR. All values are presented as mean \pm SE. †: Significant difference with the non-treated group (\dagger p<0.05), *: Significant difference with the Control (* p<0.05).

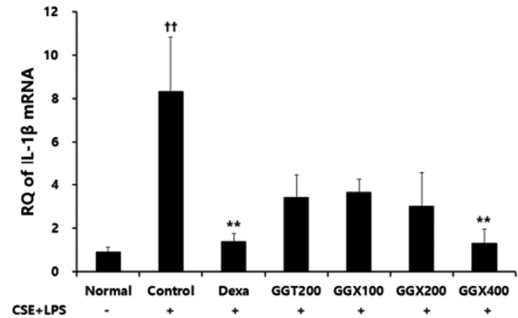


Fig. 9. Effect of GGX on IL-1 β mRNA expression in lung tissue of COPD mice.

Mice were challenged by an aspiration of LPS+CSE (Control), and treated with Dexamethasone (3 mg/kg), GGT (200 mg/kg) and GGX (100, 200, 400 mg/kg) for 21 days (n=4). Level of IL-1 β was determined with real time PCR. All values are presented as mean \pm SE. †: Significant difference with the non-treated group (\dagger p<0.01), *: Significant difference with the Control (** p<0.01).

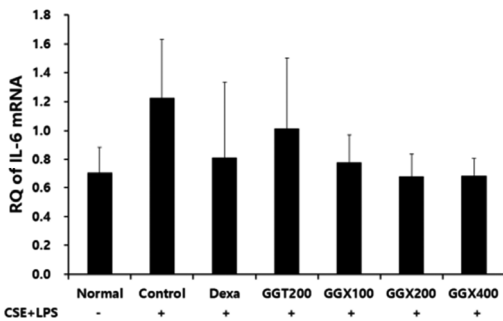


Fig. 10. Effect of GGX on IL-6 mRNA expression in lung tissue of COPD mice.

Mice were challenged by an aspiration of LPS+CSE (Control), and treated with Dexamethasone (3 mg/kg), GGT (200 mg/kg) and GGX (100, 200, 400 mg/kg) for 21 days (n=4). Level of IL-6 was determined with real time PCR. All values are presented as mean \pm SE. †: Significant difference with the non-treated group (\dagger p<0.05), *: Significant difference with the Control (* p<0.05, ** p<0.01).

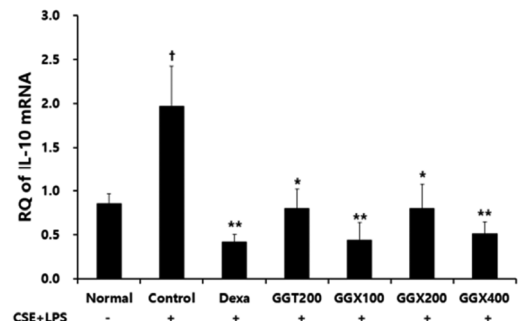


Fig. 10. Effect of GGX on IL-10 mRNA expression in lung tissue of COPD mice.

Mice were challenged by an aspiration of LPS+CSE (Control), and treated with Dexamethasone (3 mg/kg), GGT (200 mg/kg) and GGX (100, 200, 400 mg/kg) for 21 days (n=4). Level of IL-10 was determined with real time PCR. All values are presented as mean \pm SE. †: Significant difference with the non-treated group (\dagger p<0.05), *: Significant difference with the Control (* p<0.05, ** p<0.01).

상군의 0.86 ± 0.11 보다 유의하게 증가하였으며, 양성 대조군은 0.42 ± 0.09 로 유의성 있게 감소하였다. GGT 200 mg/kg 투여군은 0.80 ± 0.22 로 감소하였고, GGX 100, 200 및 400 mg/kg를 투여한 실험군은 각각 0.44 ± 0.19 , 0.80 ± 0.28 , 0.51 ± 0.13 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 보였다(Fig. 11).

4. 폐조직 손상에 미치는 영향

정상군에 비하여 대조군의 폐조직에서는 폐포의 크기가 균일하지 않고 기도벽이 두꺼워지는 변화가 나타났고, 폐포 주변으로 세포들의 침착이 증가하였다. Dexamethasone을 처리한 양성대조군에서는 비교적 폐포의 형태가 균일하게 유지되었다. GGT 및 GGX를 투여한 실험군에서는 세포 침착 현상이 폐포

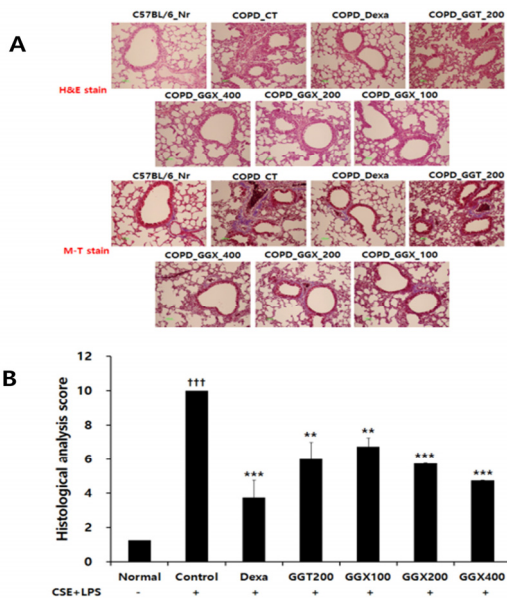


Fig. 12. Effect of GGX on histopathological changes and histology scores in the lung of COPD mice.

Mice were challenged by an aspiration of LPS+CSE (Control), and treated with Dexa (dexamethasone 3 mg/kg), GGT (200 mg/kg) and GGX (100, 200, 400 mg/kg) for 21 days (n=4). (A) Representative sections from each treatment group are shown (Light microscope at 100×magnification). (B) Quantitative analysis of the degree of lung tissue damage in the sections. All values are presented as mean±SE. †: Significant difference with the non-treated group († † † p<0.001), *: Significant difference with the Control (** p<0.01, *** p<0.001).

주변으로 나타났으나 대조군과 비교하여 폐포의 형태가 상대적으로 균일하게 유지되는 것이 보였다 (Fig. 12A).

폐조직의 손상 정도를 정량화하여 비교한 결과 대조군에서 정상군의 1.25±0.00보다 유의하게 증가한 10.00±0.00으로 나타났으며, 양성대조군은 3.75±1.00으로 유의성 있게 감소하였다. GGT 200 mg/kg 투여군은 6.00±1.00로 감소하였고, GGX 100, 200 및 400 mg/kg를 투여한 실험군은 각각 6.75±0.50, 5.75±0.00, 4.75±0.00로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 보였다(Fig. 12B).

고찰

전 세계적으로 COPD는 높은 사망률과 유병률을 나타내는 질환으로 커다란 사회경제적 부담을 초래하고 있다²¹⁾. COPD의 유병률은 세계적으로 11.7%로 추정되며 수십 년에 걸쳐 증가되고 있는데 이는 위험인자에 대한 지속적인 노출과 인구의 고령화에 의한 것으로 앞으로도 이러한 추세는 계속될 것으로 예상된다²²⁾. 우리나라의 경우 2010~2016년 국민 건강 영양 조사에서 COPD 유병률은 13.1%~14.6%로 나타났으며 지속적으로 증가하고 있다²³⁾. WHO는 2007년 기준 세계적으로 약 2억 천만 명이 COPD를 앓고 있는 것으로 추정하나 Global Burden of Disease(GBD) 자료에 의하면 2015년도를 기준으로 대략 2억 5100만 명으로 추정된다²⁴⁾.

COPD에서 흡연은 가장 중요한 위험인자이며²⁾ 20갑년 이상의 흡연자는 비흡연자와 비교했을 때 COPD의 유병률이 1.97배에 이르는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 따라서 흡연시작 연령이 낮을수록 COPD가 발생할 가능성이 높아진다. 우리나라의 경우 2016년도 청소년 흡연의 최초연령이 12.6세로 나타나²⁶⁾ COPD 환자의 지속적 증가를 예측할 수 있고, 이러한 추세는 사회 경제적 부담으로 이어지게 된다. 대한민국 COPD 장애보정 생존년 (Disability adjusted life year, DALY)은 계속 증가하여 2016년에는 인구10만 명당 461년으로 질병 전체로 인한 DALY의 1.96%에 해당하였으며²³⁾, 남녀를 모두 포함하여 3위에 속하는 것으로 나타나 COPD로 인해 발생하는 장애의 영향이 매우 심각함을 알 수 있다²⁷⁾.

COPD의 병리학적 변화는 원위부의 소기도, 근위부 중심성 기도, 폐실질, 폐혈관 등에 걸쳐 만성기관지염, 폐기종, 소기도 질환 등의 양상으로 나타나며, 만성염증과 손상으로 인한 폐실질의 파괴를 특징으로 갖고 있다²⁾. 즉 COPD의 발병과 진행에 있어서 만성염증이 핵심적 역할을 하고, 염증 외에 단백질분해효소/항단백분해효소의 불균형과 산화스트레스 또한

중요한 요인으로 작용하는데 이러한 과정은 염증의 결과일 수도 있으며 환경적, 유전적 요소와 관련이 있을 수도 있다²⁸⁾. 담배연기 등의 유해물질이 호흡기로 흡인되면 염증반응이 발생하며, 폐의 여러 곳에 neutrophil과 macrophage, CD8 positive T 림프구 등의 수가 증가하는 특징을 보인다²⁹⁾. 흡연에 의한 폐기종 모델에서 anti-elastin autoantibody가 중요한 역할을 한다는 보고가 있고, 폐기종은 protease에 의해서 elastin 손상과 더불어 type 1 pneumocyte의 apoptosis에 의해서 생기며, 처음에는 centrilobular 양상에서 점차적으로 panlobular 양상으로 진행 한다³⁰⁾.

실제 COPD 환자의 객담 및 기관지폐포 세척액 (BALF)에서 활성화된 neutrophil의 증가가 나타나며, 이들은 neutrophil elastase, neutrophil proteinase-3, neutrophil cathepsin G 등의 단백분해효소를 분비하게 되고, 폐실질의 파괴에 원인이 된다³¹⁾. 또한 증가된 macrophage는 IL-8, TNF- α , LTB4 와 같은 매개체를 분비하여 호중구성 염증반응을 촉진하고, COPD 발생을 유도하는데 흡연자의 macrophage에서는 macrophage elastase, glutinases B, cathepsins L and S 등의 elastase 활성도를 가진 단백분해효소를 분비한다³²⁾. CD8+ T 림프구는 perforin, granzyme-B, TNF- α 등을 분비하여 폐포 상피에 세포용해 및 apoptosis를 일으키며, 이것은 염증상태를 지속시키는 역할을 한다³³⁾. 즉, 염증반응으로 macrophage 탐식작용의 활성화가 일어나고, CXCL-1, MIP2과 같은 chemokine의 화학주성 때문에 neutrophil이 유도되며, MMP와 같은 단백분해효소의 분비가 증가하게 되고 그 결과로 폐실질의 파괴가 일어난다³⁴⁾. TNF- α 와 IL-6는 염증 cytokine으로 기도 및 폐실질의 염증반응을 증가시키며 IL-6는 조절 T 세포 (regulatory T cell, Treg)가 나타내는 신호를 억제하여 COPD의 염증 반응을 더욱 악화시킨다³⁵⁾.

본 연구의 대상인 GGX는 宣肺利咽, 祛痰排膿하는 길경³⁶⁾, 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥하는 감초³⁶⁾로

구성된 감길탕¹⁷⁾에 清熱解毒, 涼散風熱, 涼血止癩하는 금은화³⁶⁾, 瀉肺平喘, 利水消腫하는 상백피³⁶⁾를 더한 처방으로 COPD를 비롯한 만성폐질환에 사용할 수 있도록 구성되었다. 상백피, 오미자, 천문동의 조합 추출물이 폐 대식세포와 마우스 LPS유도 기관지염 모델에서 항염증 효과가 증명되었고, 금은화의 연구로는 LPS와 흡연에 의해 유발된 폐 조직 손상 모델에서 마이크로 입자 시스템을 사용한 금은화가 항염증 효과를 가지는 결과를 보이므로 본 처방 구성에 추가하는 근거가 되었다³⁷⁾. COPD에 대한 한약제제의 효과를 연구하기 위한 동물모델은 LPS^{9,10)}, elastase^{7,8)}, 담배연기 흡입³⁵⁾ 등의 다양한 방법으로 폐손상을 유발하는 방법이 사용되어 왔다. 본 실험에서는 이 등^{11,12)} 및 Mizutani 등¹⁴⁾의 연구방법을 응용해 C57BL/6 생쥐의 기도 안으로 LPS와 CSE를 흡인시켜 COPD를 발생시킴으로써 가장 주요한 발병인자 흡연을 정량적으로 반영할 수 있는 동물모델을 사용해 GGX의 효과를 평가하고자 하였다.

COPD 동물모델에서 분리된 기관지폐포 세척액의 cytospin 분석 결과, neutrophil이 대조군에서는 232.88±14.68개로 정상군의 8.75±2.29개보다 유의하게 증가하였고, COPD를 유발한 다음 GGX를 투여한 실험군에서는 대조군과 비교하여 유의한 감소를 보였다. 대조군의 neutrophil 증가는 기존의 실험들^{13,14)}과 같은 결과로 흡연자와 COPD 환자의 활성화 neutrophil의 증가는 기류제한 및 이로 인한 폐기능 감소의 진행속도³⁸⁾와 밀접한 연관이 있으며, COPD의 만성염증과 관련된 병리기전에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³¹⁾. 따라서 이러한 결과는 GGX가 COPD의 병리기전에서 주요한 역할을 담당하는 세포인 neutrophil의 증가를 조절하는데 관여하는 것으로 생각된다.

COPD를 일으킨 동물모델의 BALF로 ELISA를 시행한 바에 따르면, 대조군의 TNF- α 및 IL-17A는 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, GGX를 투여한 실험군에서 대조군과 비교하였을 때 유의한

감소를 나타내었고, 특히 GGT 투여군보다 GGX 투여군에서 더 효과적이면서 농도의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다. TNF- α 의 경우 COPD 환자의 객담에서 증가하는데³⁹⁾, 악액질을 동반한 만성폐쇄성 폐질환 환자의 혈청에서 증가된 모습을 보이며⁴⁰⁾, IL-17A는 neutrophil의 생존 기간을 연장시키고⁴¹⁾, 장기간 흡연한 사람의 말초기도에서 neutrophil이 쌓이는데 관여하는 것으로 보고되고 있다⁴²⁾. 따라서 GGX는 이러한 관련 염증 cytokine들을 감소시키고, 이를 통해 neutrophil이 염증에 억제 효과를 보일 것으로 생각된다. 또한 CXCL-1과 MIP2는 대조군에서 정상군과 비교했을 때, 유의성 있는 증가를 나타냈고, GGX를 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 유의하게 감소를 보였다. CXCL-1는 만성 폐쇄성 폐질환 환자의 객담에서 증가된 모습을 보이며⁴³⁾ CXCL-1와 MIP2는 chemokine으로 작용해 주로 macrophage로부터 분비 되어 neutrophil 과 같은 염증세포들이 특정 병소로 모이게 하는 것으로 알려져 있어⁴⁴⁾ 이와 같은 결과는 GGX가 이들 chemokine의 발현을 억제하여 염증세포가 기도로 이동되는 것을 억제할 가능성을 보여준다.

COPD 동물모델 폐조직의 실시간 PCR 분석을 시행한 결과, TNF- α , IL-1 β 및 IL-10 mRNA RQ는 정상군에서 보다 유의미한 증가가 나타났으며, GGX가 투여된 실험군에서는 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다. TNF- α 와 IL-1 β 는 만성 폐쇄성 폐질환 환자에게서 macrophage를 활성화해 MMP9와 같은 chemokines를 분비하도록 만드는 주요 염증전구 cytokine으로 알려져 있다⁴⁵⁾. IL-10은 macrophage와 Treg에서 생성되며 COPD 및 천식 환자에서 과다 발현된다³⁴⁾. 따라서 GGX가 이러한 반응을 억제하는 작용을 통해 대식세포 활성을 억제하여 COPD에서의 염증반응을 조절할 수 있는 가능성이 있음을 시사한다.

COPD 동물모델 폐조직 생검과 현미경 관찰에서 정상군에서는 크기가 작은 폐포들이 균일하게 관찰

되었으나, 대조군에서는 폐포의 형태가 균일하지 않았으며, 기도벽이 비후되어 있고 폐포 주변으로 염증세포가 다수 침윤된 것이 관찰되었다. 이러한 변화는 COPD 기류제한 발생의 주요 위치인 2 mm 이하 소기도에서 섬유화 등의 비가역적인 내경 감소와 비정상적인 영구적 확장을 반영한다³¹⁾. 양성대조군 및 GGX를 투여한 실험군에서는 염증세포의 감소를 볼 수 있었고 폐포의 형태 및 크기가 균일한 것을 관찰할 수 있었고, 정량적으로 분석한 조직학적 손상 정도가 GGX 투여로 유의하게 감소되는 것으로 나타나 GGX가 폐조직이 손상되는 것을 보호할 수 있음이 확인되었다.

결과를 종합하면 GGX는 neutrophil과 염증 cytokine들이 증가하는 것을 억제하고, 폐조직이 손상되는 것을 감소시키는 폐손상 보호효과로 만성 폐쇄성 폐질환에 대한 치료 효과를 나타낼 것으로 사료된다. 또한, 기존의 보고된 GGX의 미세먼지 유발 폐손상에 대한 보호효과와 종합하여 볼 때 GGX는 미세먼지로 인한 폐손상 및 COPD와 같은 만성 호흡기질환에 효과적인 치료제가 될 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구결과를 향후 임상시험을 위한 비임상 효력시험으로 활용하여 GGX의 만성 호흡기질환에의 안전성 및 유효성을 평가하기 위한 임상시험을 계획·수행하고자 한다.

결론

COPD에 대한 GGX의 효과를 평가하기 위해 표준담배 추출물(CSE)과 LPS로 유도한 COPD 동물모델에서 발생한 폐손상과 연관된 cytokine 및 면역세포와 조직학적 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GGX는 BALF 내 neutrophil의 증가를 유의하게 억제시켰다.
2. GGX는 BALF 내 TNF- α , IL-17A, CXCL-1,

MIP2의 증가를 유의하게 억제시켰다.

3. GGX는 폐조직의 TNF- α , IL-1 β , IL-10 mRNA의 발현을 유의하게 감소시켰다.
4. GGX는 폐의 조직학적 분석에서 손상 지수를 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과로 GGX가 COPD 동물모델에서 면역세포와 염증 cytokine의 조절을 통하여 폐손상을 억제시키는 것을 확인하였다.

Acknowledgements

이 논문은 2019년도 한국연구재단 기초연구사업(과제번호: NRF-2019R1A2C1087201)의 지원을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

1. Park YB, Rhee CK, Yoon HK, Oh YM, Lim SY, Lee JH, et al. (2018). COPD clinical practice guideline of the Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease: a summary. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 81:261-73.
2. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. (2003). Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*, 22(4):672-88.
3. Kim IA, Park YB, Yoo KH. (2004). Pharmacotherapy for chronic obstructive pulmonary disease. *J Korean Med Assoc*, Sep;61(9):545-551.
4. Anthonisen NR, Connett JE, Kiley JP, Altose MD, Bailey WC, Buist AS, et al. (1994). Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1: the Lung Health Study. *JAMA*, 272:1497-505.
5. Singh S, Amin AV, Loke YK. (2009). Long-term use of inhaled corticosteroids and the risk of pneumonia in chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Arch Intern Med*, 169:219-29.
6. Barnes PJ. (2013). New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Drug Discov*, 12(7):543-59.
7. Lee ES, Han JM, Kim MH, Namgung U, Yeo Y, Park YC. (2013). Effects of inhalable microparticles of Socheongryong-tang on chronic obstructive pulmonary disease in a mouse model. *J Korean Med*, 34(3):54-68.
8. Lee JG, Yang SY, Kim MH, Namgung U, Park YC. (2011). Protective effects of Socheongryong-tang on elastase-induced lung injury. *J Korean Oriental Med*, 32(4):83-99.
9. Kim Y, Yang SY, Kim MH, Namgung U, Park YC. (2011). Effects of Saengmaekcheongpye-eum on LPS-induced COPD model. *Korean J Oriental Int Med*, 2011;32(2):217-31.
10. Kim HW, Yang SY, Kim MH, Namgung U, Park YC. (2011). Protective effects of Maekmundong-tang on elastase-induced lung injury. *J Korean Oriental Med*, 32(2):63-78.
11. Lee H, Kim Y, Kim HJ, Park S, Jang YP, Jung S, et al. (2012). Herbal Formula, PM014, Attenuates Lung Inflammation in a Murine Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012:769830.
12. Han JM, Yang WK, Kim SH, Park YC. (2015). Effects of Sagan-tang and individual herbs on COPD mice model. *J Korean Med Soc Herb Formula Study*, 23(2):171-87.

13. Park JJ, Yang WK, Lyu YR, Kim SH, Park YC. (2019). Inhibitory effects of SGX01 on lung injury of COPD mice model. *Korean J Int Korean Med*, 40(4):567-81.
14. Yang WK, Lyu YR, Kim SH, Park YC. (2018). Effects of GHX02 on Chronic Obstructive Pulmonary Disease Mouse Model. *J Korean Med*, 39(4):126-35.
15. Kim SH, Hong JH, Yang WK, Geum, et al. (2020). Herbal combinational medication of *Glycyrrhiza glabra*, *Agastache rugosa* containing Glycyrrhizic acid, Tilianin inhibits Neutrophilic lung inflammation by affecting CXCL2, Interleukin-17/STAT3 signal pathways in a murine model of COPD. *Nutrients*, 12(4), 926.
16. Yang, L., Li, J., Li, Y., Tian, Y., Li, S., Jiang, et al. (2015). Identification of metabolites and metabolic pathways related to treatment with Bufei Yishen formula in a rat COPD model using HPLC Q-TOF/MS. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
17. Hwang DY. (1986). *Bang-yak-hap-pyeon*. Seoul: Namsandang, p.240.
18. Lyu YR. (2020). Inhibitory effects of GGX in a particulate matter-induced lung injury mouse model. doctoral dissertation, Daejeon university.
19. Hong HW. (2011). The Effects of Kamgiltang on Passive Smoking in Rats, doctoral dissertation, Dong-eui University.
20. Mizutani N, Fuchikami J, Takahashi M, Nabe T, Yoshino S, Kohno S. (2009). Pulmonary emphysema induced by cigarette smoke solution and lipopolysaccharide in guinea pigs. *Biol Pharm Bull*, 32(9):1559-64.
21. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, et al. (2006). Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J*, 27(2): 397-412.
22. Mathers CD, Loncar D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 3(11):e442
23. An TJ Yoon HK. (2018). Prevalence and socioeconomic burden of chronic obstructive pulmonary disease. *J Korean Med Assoc*, 61(9):533-8.
24. GBD 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators. (2017). Global, regional, and national deaths, prevalence, disabilityadjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Respir Med*, 5(9):691-706.
25. Jung YM, Lee H. (2011). Chronic obstructive pulmonary disease in Korea: Prevalence, risk factors, and quality of life. *J Korean Acad Nurs*, 41(2):149-56.
26. Ministry of Gender Equality & Family (MOGEF). (2014). 2014 Comprehensive survey on the contact with the harmful environment for youth. Available at: URL: <http://www.mogef.go.kr>. Accessed April 1.
27. Yoon J, Seo H, Oh IH, Yoon SJ. (2016). The Non-Communicable Disease Burden in Korea: Findings from the 2012 Korean Burden of Disease Study. *J Korean Med Sci*, Nov;31 (Suppl 2):S158-S167.
28. Park SK. (2002). Chronic obstructive pulmonary disease - definition, severity, risk factors, etiology, pathology, diagnosis. *J Korean Med*,

- 63(2):389-99.
29. Lurwidya F, Damayanti T, Yunus F. (2016). The Role of Innate and Adaptive Immune Cells in the Immunopathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Tuberc Respir Dis(Seoul)*, 79(1):5-13.
 30. Lee S, et al. (2007). Antiastin autoimmunity in tobacco smoking induced emphysema. *Nature Med*, 13:567-569.
 31. Yoo CG. (2009). Pathogenesis and pathophysiology of COPD. *Korean J Med*, 77(4): 383-400.
 32. Barnes PJ. (2004). Macrophages as orchestrators of COPD. *COPD*, 1:59-70.
 33. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. (2001). Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J*, 17:946-53.
 34. Barnes PJ. (2008). The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, 118(11):3546-56.
 35. Rovina N, Koutsoukou A, Koulouris NG. (2013). Inflammation and immune response in COPD: where do we stand?, *Mediators Inflammation*, 2013:413735.
 36. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine schools. (1991). *Boncho-hak*. Seoul: Younglimsa, 124-5, 136-7, 214-5, 448-9, 534-5, 580-1, 588-9.
 37. Park YC, Jin M, Kim SH, Kim MH, et al. (2014). Effects of inhalable microparticle of flower of *Lonicera japonica* in a mouse model of COPD. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 123-130.
 38. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, et al. (1998). Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 158(4):1277-85.
 39. Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, et al. (2001). Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 163(2):349-55.
 40. Deveci Y, Deveci F, Ilhan N, Karaca I, Turgut T, Muz MH. (2010). Serum ghrelin, IL-6 and TNF- α levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Tuberk Toraks*, 58(2):162-72.
 41. Traves SL, Donnelly LE. (2008). Th17 cells in airway diseases. *Curr Mol Med*, 8(5):416-26.
 42. Levänen B, Glader P, Dahlén B, Billing B, Qvarfordt I, Palmberg L, et al. (2016). Impact of tobacco smoking on cytokine signaling via interleukin-17A in the peripheral airways. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 11:2109-16.
 43. Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. (2005). Chemokines and their receptors in chronic pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4(3):313-7.
 44. Traves SL, Culpitt SV, Russell RE, Barnes PJ, Donnelly LE. (2002). Increased levels of the chemokines GRO α and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax*, 57(7):590-5.
 45. Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, De Matos C, Russell RE, Donnelly LE, et al. (2003). Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 167(1): 24-31.

ORCID

김태현 <https://orcid.org/0000-0003-0492-6284>
양원경 <https://orcid.org/0000-0002-4493-9787>

이수원 <https://orcid.org/0000-0003-2473-8686>
김승형 <https://orcid.org/0000-0002-4598-1733>
유이란 <https://orcid.org/0000-0002-9823-0618>
박양춘 <https://orcid.org/0000-0002-5645-869X>