

미세먼지 유발 폐기능 손상 동물모델에서 RML의 호흡기 보호 효과

김수현^{1#}, 김민주^{1#}, 신미래¹, 노성수¹, 김승형², 박해진^{3*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 대전대학교 동서생명과학연구원
3 : 대구한의대학교 DHU바이오융복합시험센터

Respiratory Protective Effect of a RML on PM10D-induced Lung Injury Mouse Model

Soo Hyun Kim^{1#}, Min Ju Kim^{1#}, Mi-Rae Shin¹, Seong-Soo Roh¹
Seung Hyung Kim², Hae-Jin Park^{3*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea
2 : Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, Daejeon, Republic of Korea,
3 : DHU Bio Convergence Testing Center, Daegu Haany University, Republic of Korea

ABSTRACT

Objective : This study is aimed to evaluate the protective effects of Rehmanniae Radix, Mori Folium, and Liriopie Tuber mixture (RML) on lung injury of Particulate matter less than 10 um in diameter and diesel exhaust particles (PM10D) mice model.

Methods : To investigate the anti-inflammatory activity of RML, PM10D was diluted in aluminum hydroxide (Alum) in 7-week-old male mice and induced by Intra-Nazal-Tracheal (INT) injection method. Animal experiments were divided into 5 groups. Nor (normal mice), CTL (PM10D-induced mice with the administration of distilled water), DEXA (PM10D-induced mice with the administration of 3 mg/kg Dexamethasone), RML 100 (PM10D-induced mice treated with RML 100 mg/kg weight), and RML 200 (PM10D-induced mice treated with RML 200 mg/kg body weight). After 11 days administration, mice were sacrificed and inflammation-related immune cells in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) were analyzed. Inflammation-related biomarkers were also analyzed in blood and lungs. Lung tissue was observed through histological examination.

Results : In the PM10D induced model, the PML showed decreases in CXCL-1 and IL-17A in BALF. Expression of inflammatory cytokines and cough-related mRNA genes was significantly decreased in serum and lung tissue. The mixture treatment of RML significantly improved the immune related cells in the serum. In addition, histological observations showed a tendency to decrease the severity of lung injury.

Conclusions : Overall, these results confirmed the respiratory protective effect of the RML mixture in a model of lung injury induced by air pollution (PM10+DEP), suggesting that it is a potential treatment for respiratory damage.

Key words : PM10-D, Lung Injury, Rehmanniae Radix, Mori Folium, Liriopis Tuber

*Corresponding author : Hae-Jin Park, DHU Bio Convergence Testing Center, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 38610, Republic of Korea,

· Tel : +82-53-819-7876 · Fax : +82-53-819-1496 · E-mail : hjpark@dhu.ac.kr

#First author : Soo Hyun Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea,

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : hyunsk0513@gmail.com

Min Ju Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea,

· Tel : +82-53-770-2258, · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : mj8976@naver.com

· Received : 28 March 2022 · Revised : 19 May 2022 · Accepted : 25 May 2022

I. 서론

최근 산업화로 인해 급격한 환경 변화 및 미세먼지의 증가로 인하여 대기오염이 급속도로 진행되고 있어 호흡기 질환이 증가하고 있다. 2016년 경제협력개발기구 (OECD) 발표에 따르면 우리나라는 미세먼지와 오존 등의 대기오염으로 인한 조기 사망률이 OECD 가입국 중에서 가장 높다고 알려져 있다^{1, 2)}.

미세먼지 (fine dust, particulate matter, PM)는 육안적으로 식별할 수 없으며 직경 10 μm 보다 작은 입자상 물질을 말한다³⁾. 세계보건기구 (WHO)는 미세먼지와 대기오염을 사람에게 영향을 미치는 1군 발암물질로 지정하여 위험성을 높게 평가하였다⁴⁾. 미세먼지는 대기 중 떠다니는 자동차 매연이나 공업에 의한 화학 유독물질인 황산화물, 납 (Pb), 일산화탄소 (CO) 등과 함께 수많은 오염물질을 포함하며, 특히 디젤배기가스 (diesel exhaust particles, DEPs)는 천식을 악화시킨다고 알려져 있다⁵⁾.

미세먼지의 흡입은 인체의 기도과 폐포에 도달하여 염증을 유도하며 기침, 호흡곤란, 천명음 등의 증상을 유발하고 많은 호흡기 관련 질환을 발생시킨다⁶⁾. 미세먼지에 의한 질병은 호흡기 질환 뿐만 아니라 혈액순환 장애, 치매, 뇌졸중 등 다양한 질병에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다⁷⁻⁹⁾. 기도에서 염증이 발생하게 되면 기관지폐포세척액에서 면역 세포가 증가하고 혈관에서 기인한 면역세포들은 기도와 폐포로 침윤된다. 또한, 염증성 사이토카인은 점액의 양을 증가시키고 염증 반응을 유도시킨다^{10, 11)}. 이러한 염증이 장기간 지속되었을 때, 알려지지 않은 폐포염, 만성기관지염 등으로 발전될 수 있다¹²⁾. 미세먼지로 인한 대표적인 만성호흡기 질환인 만성폐쇄성폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)은 폐의 비정상적인 염증반응으로 인해 폐 기능이 저하되는 질병이다¹³⁾. COPD의 약물치료는 기도 평활근의 긴장을 개선시키는 기관지확장제가 주로 사용되며 베타2항진제, 아미노필린, 항콜린제 등이 있으나 사망률을 개선시키는 직접적인 증거는 아직 부족하다¹⁴⁾. 장기적인 관점에서 비교적 부작용이 적고 효과적으로 치료할 수 있는 안전한 치료제 개발이 필요한 실정이다.

地黃 (Rehmanniae Radix)은 현삼과 (Scrophulariaceae)에 속하는 다년초 지황 (*Rehmannia glutinosa* Liboschitz)의 뿌리로서 동북아시아에서 주로 재배된다. 地黃은 용도에 따라서 生地黃, 熟地黃, 乾地黃으로 나누어 사용되어진다¹⁵⁾. 한의학에서는 地黃은 性味が 寒 · 甘 · 苦 · 無毒하고, 歸經은 心 · 肝 · 腎의 三經이고 淸熱生津, 涼血止血의 효능이 있어 熱病傷陰, 舌絳煩渴 發斑發疹 등의 증상에 사용된다¹⁶⁾. 또한 항산화 효과¹⁷⁾, 항염증 효과¹⁸⁾ 및 면역조절¹⁹⁾ 등 다양한 연구결과가 보고되어 있다.

桑葉 (Mori Folium)은 뽕나무과 (Moraceae)에 속하는 뽕나무 (*Morus alba* Linné)의 잎으로 열대지방부터 온대지역까지 널리 분포되어 있다²⁰⁾. 한의학에서 桑葉은 疏散風熱, 淸肺潤燥 효능이 있으며 頭痛, 口渴, 肺熱로 인한 咳嗽, 風痺를 치료한다고 알려져 있다²¹⁾. 또한 桑葉의 현대의 연구 결과는 항당뇨²²⁾, 지질대사 개선²³⁾, 콜레스테롤 저하²⁴⁾ 등의 치료에 효과 있는 것으로 밝혀져 있다.

麥門冬 (*Liriope platyphylla* Wang et Tang)은 백합과 (Liliaceae)에 속하는 다년생 초본의 괴근이다²⁵⁾. 麥門冬은 性

은 微寒하고 味는 甘微苦하여 益胃生津, 養陰潤肺의 효능을 지니고 있으며 주치로는 吐血, 咯血, 肺燥乾咳, 陰虛勞嗽, 肺痿, 肺癰 등이 있다²⁶⁾. 현대 연구로는 면역조절²⁷⁾, 항염증²⁸⁾, 간 보호효과²⁹⁾, 당뇨 개선³⁰⁾, 항바이러스 효과³¹⁾ 등이 보고된 바 있다.

따라서 선행연구를 통해 지황 (地黃), 상엽 (桑葉), 맥문동 (麥門冬)의 최적 혼합비율을 설정한 후 혼합하여 실험에 사용하였다. 미세먼지로 유발한 폐기능 손상 *in vivo* 동물모델에서 복합추출물 (RML)의 미치는 영향을 알아보고자 면역반응과 항염증 기전에 대한 연구를 진행하였다. 이에 地黃, 桑葉, 麥門冬 복합물인 RML의 미세먼지 유발 폐기능 손상모델에서 유의한 치료 효과를 얻었기에 보고하고자 하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시료

본 실험에서 사용한 地黃, 桑葉, 麥門冬은 (주)한약인 (영천, 한국)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 관능검사 후, 약전규격에 적합한 것만을 사용하였다. 약재를 각각 분쇄하여 증류수 10배를 가하고 100°C에서 3시간 동안 열수추출하였으며, 얻어진 추출물은 농축한 후 동결건조기를 이용하여 완전 건조시켜 파우더를 얻었다 (Table 1). RML은 Carboxymethyl cellulose (CMC) 0.25%에 분산시켜 농도별로 동물실험에 사용하였다.

Table 1. Composition of RML

Scientific name	Latin name	Yield(%)	Ratio(%)
<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz	Rehmanniae Radix	52.10	50
<i>Morus alba</i> Linné	Mori Folium	52.25	20
<i>Liriope platyphylla</i> Wang et Tang	Liriopis Tuber	50.16	30

2. 시약 및 기기

실험에 사용한 acetonitrile, ethyl alcohol, methyl alcohol은 Merck Millipore (Billerica, MA, USA)에서, dimethyl sulfoxide (DMSO), formalin solution, phosphate buffered saline (PBS), 2-7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), aluminium hydroxide, hispidulin, luteolin, rosmarinic acid, nepetin montelukast는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycinamphotericin B (antibiotics), 0.25% trypsin-EDTA (TE)는 Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구매하여 사용하였고 FACS 분석용 항체는 R-phycoerythrin (PE) anti-mouse CD11b (aM, rat

IgG2b)과 FITC anti-mouse Gr-1 (RB6-8C5, rat IgG2b)는 Biosciences (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구매하였고, CXCL-1 (DY453-05)는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)에서 구매하여 사용하였다.

3. 실험동물

7주령 수컷 Balb/c 마우스 (대한바이오링크, 충북, 한국)를 구입하여 물과 고형사료를 충분히 공급하였으며, 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 온도 22 ~ 24℃, 습도 50 ± 10%, 명암주기는 12시간 주기로 조절하였다. 실험은 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대전대학교 동물실험윤리 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인 (DJUAR2020-039)을 얻어 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다.

4. PM10D 모델 제작 및 약물투여

미세먼지는 여러 가지 복잡한 성분을 가진 대기 중 부유 물질인데, 그 중 미세먼지의 구성성분인 석탄연소물 (coal)은 5 g의 석탄을 700℃의 가열로 (ULVAC-RIKO TPC5000, ULVAC Technologies Inc., Methuen, MA, USA)에서 10 분간 연소시키면서 발생하는 연소물을 glass fiber filter pad에 포집하였고, 포집된 TPM (total particulate matter)은 DMSO 용액을 사용해서 10 mg TPM/ml로 농도로 추출해서 석탄 연소물 실험에 사용하였다. 제조된 석탄연소물은 KT&G 중앙연구원에서 공급하였고, 플라이애쉬 (fly ash)는 일본 JIS type-II fly ash³²⁾를 제공받아 사용하였으며, 각각을 디젤연소 분진 (DEP)³³⁾과 혼합하여 미세먼지 복합물을 제조하였다. 구체적으로는 디메틸설폭사이드 (DMSO)에 녹인 석탄연소물 (5 mg/ml), 플라이애쉬 (10 mg/ml), 디젤연소분진 (5 mg/ml)을 각각 최종농도가 석탄연소물 (0.25 mg/ml), 플라이애쉬 (0.5 mg/ml), 디젤연소분진 (0.75 mg/ml)로 희석하여 혼합하고, 명반 (aluminium hydroxide) gel adjuvant를 8%로 희석되게 하여 최종적으로 미세먼지 복합물 (ambient particulate matter, APM)을 제조하였다.

호흡기 손상 미세먼지 (PM10)에 각각 diesel exhaust particles (DEP)를 섞은 4 mg/ml 미세먼지복합물 (PM10D)을 aluminium hydroxide (Alum)에 희석시켜 약물 투여 시작일로부터 3일 후, 6일 후, 9일 후에 미세먼지혼합물을 Intra-Nasal-Tracheal (INT) injection 방법을 이용하여 주입하였으며, 동물군은 아무런 처치를 하지 않는 정상군 (Normal mice; Balb/c Normal), 폐 손상 유발 및 증류수를 투여한 대조군 (PM10D-induced mice; PM10D_CTL), 폐 손상 유발 및 Dexamethasone 3 mg/kg 농도로 투여한 양성대조군 (PM10D-induced mice treated with Dexamethasone 3 mg/kg body weight; PM10D_DEXA), 폐 손상 유발 및 RML 100 mg/kg 농도 투여군 (PM10D-induced mice treated with RML 100 mg/kg body weight; PM10D_100mpk), PM10D 유발 및 RML 200 mg/kg 농도 투여군 (PM10D-induced mice treated

with RML 200 mg/kg body weight; PM10D_200mpk)으로 총 5그룹으로 분류하여 마우스용 zonde로 200µl씩 강제경구 투여 11일 후 희생하였다 (Fig 1). 희생시 마취는 Avertin 마취용액을 0.3ml/25g mouse에 복강주사하여 가마취상태에서 Intra nasal instillation를 실행하였다.

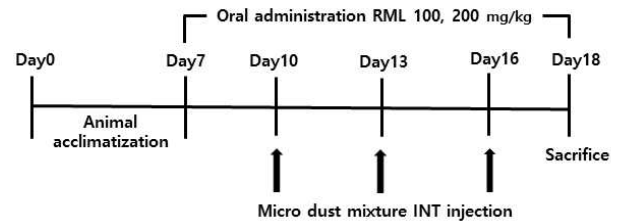


Fig. 1. The animal experimental scheme.

5. 기관지폐포 세척액 (BAL fluid; BALF) 분리

실험동물들을 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℃의 조건에서 5분간 원심분리한 뒤, cytokine 측정을 위해 상층액은 따로 냉동보관하고, 세척액에서 분리한 세포는 ACK 용액으로 3분을 처리하여 적혈구를 용해시킨 뒤, 1% FBS free DMEM 배양액으로 세척하고 hemocytometer로 총 세포수를 측정하였다.

6. 혈액 CBC 및 PBMCs 분리 측정

실험종료 후 3 ml 주사기에 50 I.U. 헤파린 (APU8AF, 중외제약) 20 µl를 넣어 놓고 생쥐를 ethyl ether로 마취한 후 심장천자법으로 800~1000 µl를 채혈하였다. 채혈된 혈액을 (주차온 (용인, 경기도)에 의뢰하여 백혈구, 호중구, 림프구, 호산구 및 호염기성의 총 세포수를 측정하였다. 생쥐에서 분리한 혈청에서 Symmetric dimethylarginine (SDMA, MBS2605912, MyBioSource, USA) 수준, 및 혈청에서 호흡량 대체 바이오마커 (SDMA) ELISA 측정을 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 측정하였다. 백혈구수는 자동혈구측정기 (MS9-5, MELET SCHLOESING, France)로 Fonio법³⁴⁾에 준하여 Minos-ST로 측정하고, 채혈된 혈액 500 µl를 9.5ml의 ACK 용액에 넣고 5분 동안 방치한 후 적혈구를 용해시키고 1200rpm에서 5분간 원심분리하여 PBMCs를 분리하여 0.04% trypan blue로 염색한다.

7. 기관지 폐포세척액 (BALF) 분리 및 총세포수 측정

혈액 채혈 후 해부하여 폐포 세척액 (BALF)으로부터 세포를 분리하기 위해 FBS-free /DMEM 배양액 1ml을 넣은 주사기를 기관지 (trachea)에 주입시키고 끈으로 묶어 고정한 후 3회 순환 시켜 분리하여 ACK 용액을 37℃에서 5분 동안 처리

하여 적혈구를 용해시키고 다시 FBS-free /DMEM 배양액으로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 총세포수를 측정하였다. 또한 BAL cell cytospin 후 Diff-Quik stain으로 eosinophils의 증가를 확인한다. BALF에서 ELISA로 CXCL-1, IL-17A의 수준을 측정하고, 유세포형광분석기(flow cytometry)를 사용하여 FACS 총염증세포수, FACS 분석을 실시하였다.

8. 폐 (Lung) 세포 분리 및 총세포수 측정

폐세포적액 (BALF)을 분리하지 않은 생쥐에서 폐를 적출하여 폐조직을 잘게 절편한 후 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 포함되지 않은 3 ml DMEM 배지에 넣고, 1 mg/ml의 collagenase IV (C5138, Sigma)를 가하여 37°C shaking 배양기에서 30분 동안 4회 이상 조직을 분해 (digestion) 하여 폐세포를 분리한다. 폐세포는 배지로 세척한 후 cell strainer (352350, FALCON)에 통과시켜 세포이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하고 총폐세포수를 측정한다.

9. ELISA 분석

각각의 항체 (antibody)를 coating 완충용액 (291195, R&D system)에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후에 혈청(10배 희석)을 100 μ l씩 분주하여 1 시간 동안

실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated (R&D system) 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader (Emax, Molecular Devices) 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10. 폐조직에서 mRNA 발현 (real-time RT-PCR) 분석

각 세포와 조직들로부터 유전자의 발현을 분석하기 위해 TRIzol reagent 용액 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 추출한 RNA를 RTase, dNTP, buffer, oligo-dT를 넣은 후 42°C water bath에서 2시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 2 \times SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), 200 nM primers, Rox dye를 넣은 후 각 cycle은 95°C 15sec, 55°C 15sec, 72°C 15sec의 조건으로 Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 각 유전자의 발현은 housekeeping 유전자 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하여 상대적 정량값을 비교 분석하였다 (Table 2).

Table 2. Sequence of Mouse Real-time PCR Oligonucleotide

Gene	Primer	Sequence
COX-2	Forward	5'GGGTGTCCCTTCACTTCTTTCA3'
	Reverse	5'TGGGAGGCACTTGCATTGA3'
NOS-II	Forward	5'CGAAACGCTTCACTTCCAA3'
	Reverse	5'TGAGCCTATATGCTGTGGCT3'
TNF- α	Forward	5'GGCTTTCCGAATCACTGGAGCCT 3'
	Reverse	5'CCCCGGCCTTCCAAATAAATACATTGATA 3'
GAPDH	VIC	5'CATCCTGCACCACCACTGCTTAGCC3'

11. 면역형광염색(immunofluorescence staining)

마우스의 폐조직을 적출한 뒤 냉동절편기를 이용하여 -20°C에서 조직을 20 μ m의 두께로 절편을 자른 뒤 슬라이드에 부착시켜 면역형광염색법(IHF) 실험을 진행하였다. 조직을 고정시키기 위해 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, USA)와 4% sucrose를 넣고 실온에서 45분간 고정시켰다. PBST (PBS, 0.1% Triton X-100을 넣은 용액)에 추가적으로 10 mM Glycine을 첨가하여 5분씩 3회 세척 후 PBS에 0.5% NP-40 (Sigma-Aldrich, USA)를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 이후 PBST로 5분간 세척하고, PBS-T용액에 5% goat serum (Biowest, USA)와 5% horse serum (Biowest, USA)와 3% bovine serum albumin (Sigma-aldrich,

USA)를 섞은 blocking buffer용액으로 4°C에서 밤새 blocking 반응을 진행하였다. 1차 항체 (TNF- α)는 blocking buffer에 희석하여 상온에서 4시간동안 반응시키고 PBST로 10분씩 3번 세척하였다. 이후 2차 항체도 blocking buffer에 희석하여 빛을 차단한 조건하에 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBST로 10분 동안 1회 세척하였다. 핵 염색을 위해 PBST용액에 Hoechst 33258를 반응하고 PBST로 10분 동안 세척 후 GEL/MOUNT (Biomedica, CA)를 사용하여 Cover Glass (22 X 50 mm, Marienfeld-superior, Germany)를 슬라이드 위에 덮고 상온의 암실에서 건조시켰다. 염색에 사용된 1차 항체는 MCP-1을 사용하였다. 2차 항체는 fluorescein goat anti-mouse IgG antibody (H+L) (Invitrogen, Eugene, USA;

1:400), rhodamine goat anti-rabbit antibody (invitrogen, Eugene, USA; 1:400)을 사용하였다. 핵염색을 위한 Hoechst 33258 pentahydrate (25 mg/ml, invitrogen, Eugene)를 사용하였다. 염색한 슬라이드는 형광카메라 (fluorescence microscope, Nikon, Japan)와 ACT-1 software를 사용해서 image를 얻었다.

12. 조직병리학적 관찰

실험종료 후 폐조직을 절단하여 10% EDTA가 포함된 10% formalin 용액에 넣어 폐조직을 decalcification 하였다. Radiographic technique을 이용하여 decalcification 유무를 확인한 후 parafin wax에 폐조직을 넣고 고정한 다음 coronal section을 실시하였다. decalcification과정을 거쳐 파라핀으로 고정된 조직을 7 μ m의 크기로 자른 뒤, hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 실시하여 조직의 상태를 관찰하였다. 염증반응 발생 유무나 염증세포 (iBALT)의 조직침윤 여부는 H&E 염색 결과에서 확인할 수 있었다.

13. 통계분석

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error of mean (SEM)로 기록하고, 유의성 검증은 student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다. SPSS (Version 19.0, IBM,

Armonk, NY, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하여 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 유의수준에서 검증하였다.

III. 결 과

1. BALF 및 lung 내 총 세포수 측정

미세먼지 유발 (PM10+DEP) 동물모델실험 종료 후 폐세척액 (BALF) 내에 있는 총 세포수를 분석한 결과, 정상군에 비하여 대조군의 BALF 내 세포수는 유의성 ($p < 0.01$) 있게 증가를 나타냈다. 대조군에 비하여 양성대조군과 RML 100 mg/kg 투여군은 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였으며 RML 200 mg/kg 투여군은 유의성은 없으나 감소하는 경향을 나타냈다 (Fig. 2A).

폐조직 (Lung)에서 총 세포수는 정상군에 비하여 대조군이 2배 이상 유의성 ($p < 0.01$) 있는 세포수 증가를 나타내었다. 대조군에 비하여 양성대조군과 RML 200 mg/kg 투여군은 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였으며 RML 100 mg/kg 투여군은 유의성은 없으나 감소하는 경향을 나타냈다 (Fig. 2B).

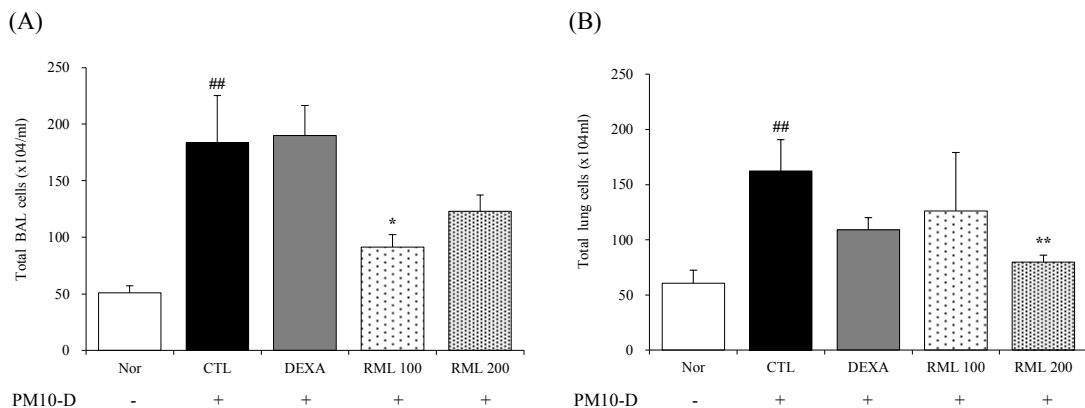


Fig. 2. Effect of RML on total cell in BALF, Lung. (A) Total bal cells; (B) Total lung cells. Nor, normal mice; CTL, PM10D-induced mice with the administration of distilled water; DEXA, PM10D-induced mice with the administration of 3 mg/kg Dexamethasone; RML 100, PM10D-induced mice with the administration of 100 mg/kg RML; RML 200, PM10D-induced mice with the administration of 200 mg/kg RML. All values are mean \pm SEM (n=8). Significance: ## $P < 0.01$ vs. normal mice, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. PM10D-induced mice.

2. 기관지 폐포 세척액에서 ELISA 측정

미세먼지 유발 (PM10+DEP) 동물모델실험 종료 후 BALF에서 염증성 사이토카인 (CXCL-1, IL-17A) ELISA로 측정 분석한 결과, 정상군에 비하여 대조군이 유의성 ($p < 0.001$) 있게 염증성 사이토카인 생산량이 증가하였다. 양성대조군과 RML 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였다. 또한 RML 100 mg/kg 투여군은 대조군에 비해 CXCL-1이 감소하는 경향을 나타냈으나 IL-17A는 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 3A, 3B).

3. 기관지 폐기능 지표 (SDMA)와 기침 관련 유전자 발현량 측정

혈청에서 기도저항인자 (SDMA, symmetric dimethylarginine) ELISA로 측정 분석한 결과, 정상군에 비하여 대조군이 약 30.8% 이상 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.001$). 대조군에 비하여 RML 100 mg/kg 투여군은 유의성은 없으나 감소하는 경향을 나타냈으며, 양성대조군 ($p < 0.01$)과 RML 200 mg/kg 투여군 ($p < 0.01$)은 유의성 있게 감소를 나타냈다 (Fig. 4A).

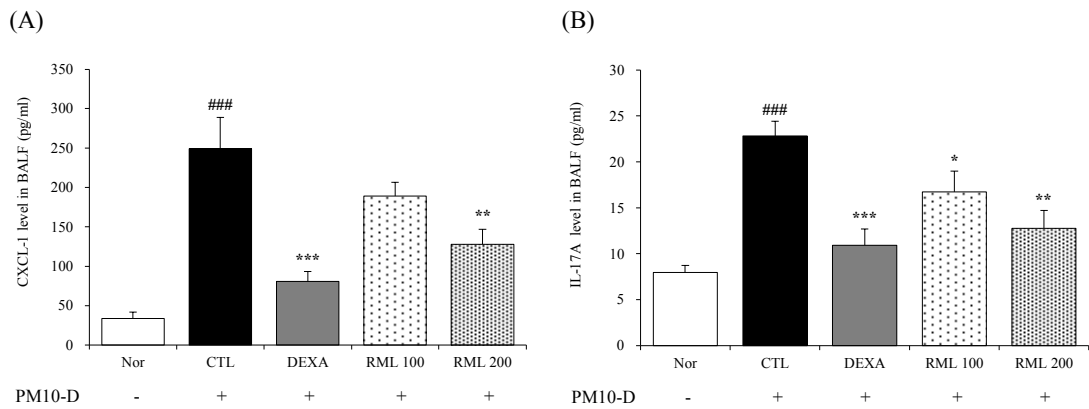


Fig. 3. Effect of RML on CXCL-1 and IL-17A levels expression in BALF. (A) C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 (CXCL-1); (B) Interleukin-17 (IL-17). Nor, normal mice; CTL, PM10D-induced mice with the administration of distilled water; DEXA, PM10D-induced mice with the administration of 3 mg/kg Dexamethasone; RML 100, PM10D-induced mice with the administration of 100 mg/kg RML; RML 200, PM10D-induced mice with the administration of 200 mg/kg RML. All values are mean±SEM (n=8). Significance: ^{###}*P*<0.001 vs. normal mice, ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01, ^{***}*P*<0.001 vs. PM10D-induced mice.

Real-time PCR을 통하여 폐조직에서 기침 관련 유전자 mRNA 발현량을 측정 한 결과, MUC5AC 발현량은 정상군에 비하여 대조군은 유의성 (*p*<0.01) 있게 증가를 나타냈다. 대조군에 비해 양성대조군은 유의성 (*p*<0.05) 있는 감소를 나타냈으나 RML 투여군은 모두 유의성은 없으나 감소하는 경향을 나타냈다 (Fig. 4B).

TRPV1의 발현량은 정상군에 비하여 대조군은 (*p*<0.001) 유의성 있는 증가를 나타냈다. 대조군에 비해 양성대조군 (*p*

<0.01), RML 100 mg/kg 투여군 (*p*<0.05) RML 200 mg/kg 투여군 (*p*<0.05) 모두 유의성 있는 감소를 나타냈다 (Fig. 3C). TRPA1의 mRNA 발현량 측정 결과, 정상군에 비하여 대조군은 (*p*<0.001) 유의성 있는 증가를 나타냈다. 대조군에 비해 양성대조군 (*p*<0.01), RML 100 mg/kg 투여군 (*p*<0.05), RML 200 mg/kg 투여군 (*p*<0.05) 모두 유의성 있는 감소를 나타냈다 (Fig. 4D).

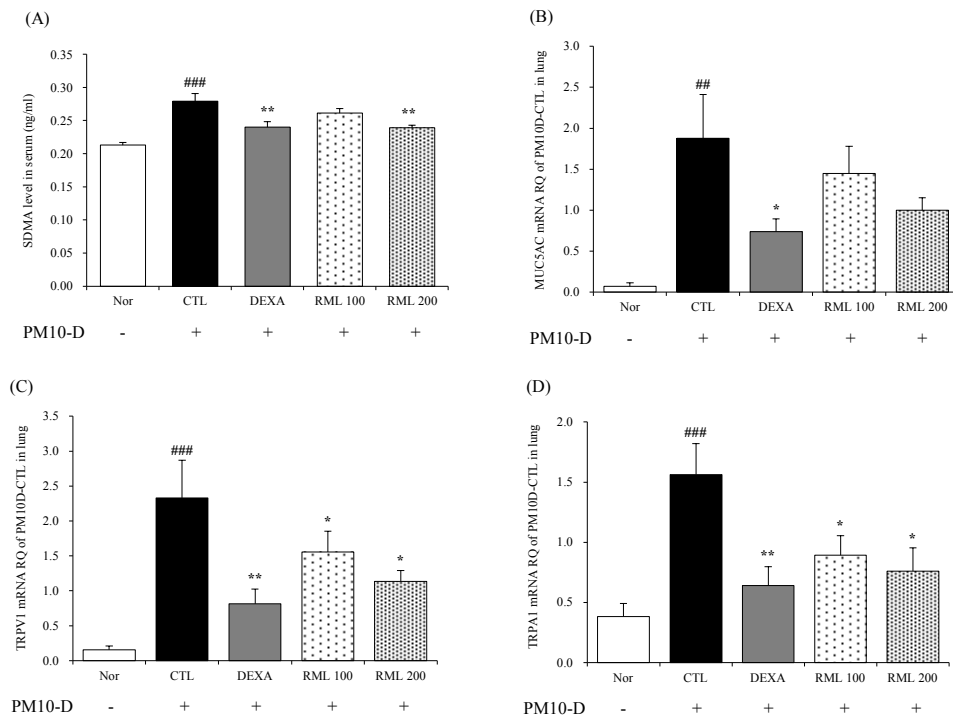


Fig. 4. Effect of RML on SDMA in serum, and cough related Real-time PCR mRNA in Lung. (A) Symmetric dimethylarginine, (SDMA); (B) Mucin 5AC, (MUC5AC); (C) Transient receptor potential vanilloid 1, (TRPV1); (D) Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1, (TRPA1). Nor, normal mice; CTL, PM10D-induced mice with the administration of distilled water; DEXA, PM10D-induced mice with the administration of 3 mg/kg Dexamethasone; RML 100, PM10D-induced mice with the administration of 100 mg/kg RML; RML 200, PM10D-induced mice with the administration of 200 mg/kg RML. All values are mean±SEM (n=8). Significance: [#]*P*<0.01, ^{###}*P*<0.001 vs. normal mice, ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01 vs. PM10D-induced mice.

4. 폐조직에서 염증조절 유전자 발현 분석

폐조직에서 real-time PCR을 통하여 염증조절에 관련된 인자의 mRNA 발현량을 측정된 결과, COX-2는 정상군에 비하여 대조군이 2배 이상 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타냈다. 대조군에 비하여 RML 100 mg/kg 투여군은 유의성은 없으나 감소하는 경향을 나타냈으나, 양성대조군 ($p < 0.01$)과 RML 200 mg/kg 투여군 ($p < 0.01$)은 모두 유의성 있는 감소를 나타냈다 (Fig. 5A).

NOS-II는 정상군에 비하여 대조군이 2배 이상 유의성 ($p <$

0.001) 있는 증가를 나타냈다. 대조군에 비하여 양성대조군 ($p < 0.01$), RML 100 mg/kg 투여군 ($p < 0.05$), RML 200 mg/kg 투여군 ($p < 0.01$)은 모두 유의성 있는 감소를 나타냈다 (Fig. 5B).

TNF- α 정상군에 비하여 대조군이 2배 이상 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타냈다. 대조군에 비하여 RML 100 mg/kg 투여군은 유의성은 없으나 감소하는 경향을 나타냈으나, 양성대조군 ($p < 0.01$)과 RML 200 mg/kg 투여군 ($p < 0.01$)은 모두 유의성 있는 감소를 나타냈다 (Fig. 5C).

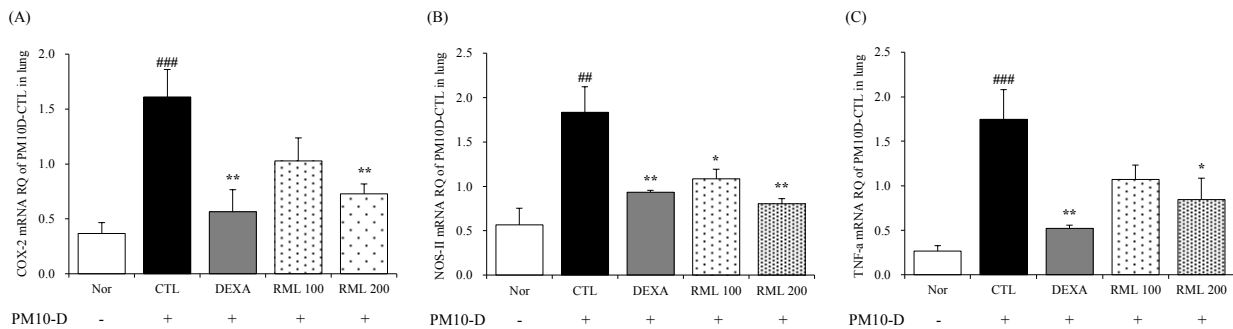


Fig. 5. Effect of RML on inflammatory mediator-related Real-time PCR mRNA in Lung. (A) Cyclooxygenase-2, (COX-2); (B) Nitric oxide synthase 2, (NOS-II); (C) Tumor necrosis factor- α , (TNF- α). Nor, normal mice; CTL, PM10D-induced mice with the administration of distilled water; DEXA, PM10D-induced mice with the administration of 3 mg/kg Dexamethasone; RML 100, PM10D-induced mice with the administration of 100 mg/kg RML; RML 200, PM10D-induced mice with the administration of 200 mg/kg RML. All values are mean \pm SEM (n=8). Significance: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. normal mice, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. PM10D-induced mice.

5. PBMC에서 총 leucocytes 세포빈도수 분석

PBMC 세포를 FACS 분석법을 통하여 백혈구 (lymphocytes, granulocyte)의 세포 빈도수 (%)를 분석하였다. Lymphocytes는 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다. 양성대조군은 정상군에 비해 유의성 없으나 감소하는 경향을 나타냈으나, RML 투여군은 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의성 ($p < 0.05, 0.01$) 있게 증가를 나타냈다. Neutrophils는 정상군에 비해 대조군은 유의성은 없으나 증가하는 경향을 나타냈다. 대조군에 비하여 양성대조군 ($p < 0.01$,

RML 100 mg/kg ($p < 0.05$), 200 mg/kg 투여군 ($p < 0.01$) 모두 유의성 있는 감소를 나타냈다 (Fig. 6A).

Monocytes는 정상군에 비해 대조군은 유의성은 없으나 감소하는 경향을 나타냈다. 대조군에 비해 양성대조군 ($p < 0.001$), RML 100 mg/kg 투여군 ($p < 0.01$)은 유의성 있게 증가를 나타냈으며, RML 200 mg/kg 투여군은 유의성은 없으나 증가하는 경향을 나타냈다. Eosinophils은 정상군에 비해 대조군은 유의성 ($p < 0.01$) 있게 증가하였으나 약물 투여군은 모두 유의성이 나타나지 않았다 (Fig. 6B).

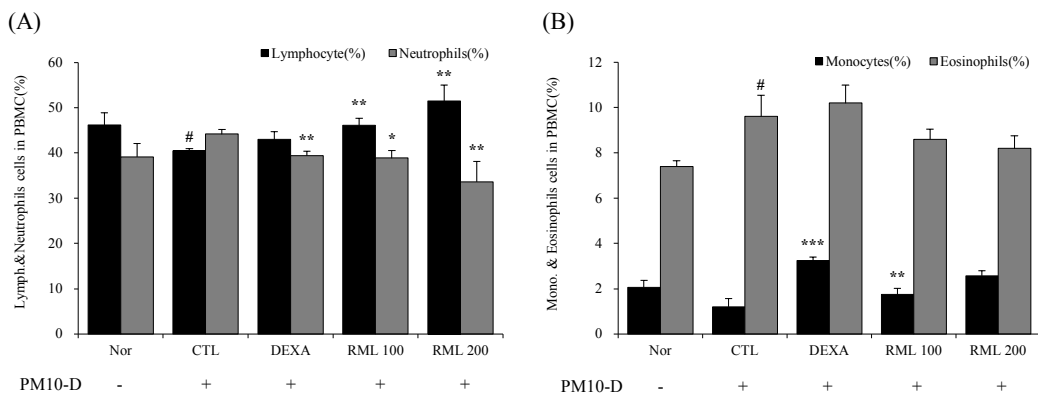


Fig. 6. Effect of RML on immune related cell in Serum. (A) Lymphocyte and Neutrophils; (B) Monocytes and Eosinophils. Nor, normal mice; CTL, PM10D-induced mice with the administration of distilled water; DEXA, PM10D-induced mice with the administration of 3 mg/kg Dexamethasone; RML 100, PM10D-induced mice with the administration of 100 mg/kg RML; RML 200, PM10D-induced mice with the administration of 200 mg/kg RML. All values are mean \pm SEM (n=8). Significance: # $P < 0.05$, vs. normal mice, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. PM10D-induced mice.

6. 폐조직에서 TNF- α 단백질 발현 (IHF) 분석

폐조직에서 염증성 사이토카인으로 알려진 TNF- α 단백질 발현을 면역형광조직염색 (IHF, Immune histology

fluorescent)을 통해 측정된 결과, 대조군에서 TNF- α 단백질 발현이 정상군에 비하여 증가된 결과를 나타냈다. 대조군에 비하여 양성대조군은 현저하게 감소됨을 나타냈고 RML 투여군 또한 농도 의존적으로 현저한 감소를 나타냈다 (Fig. 7).

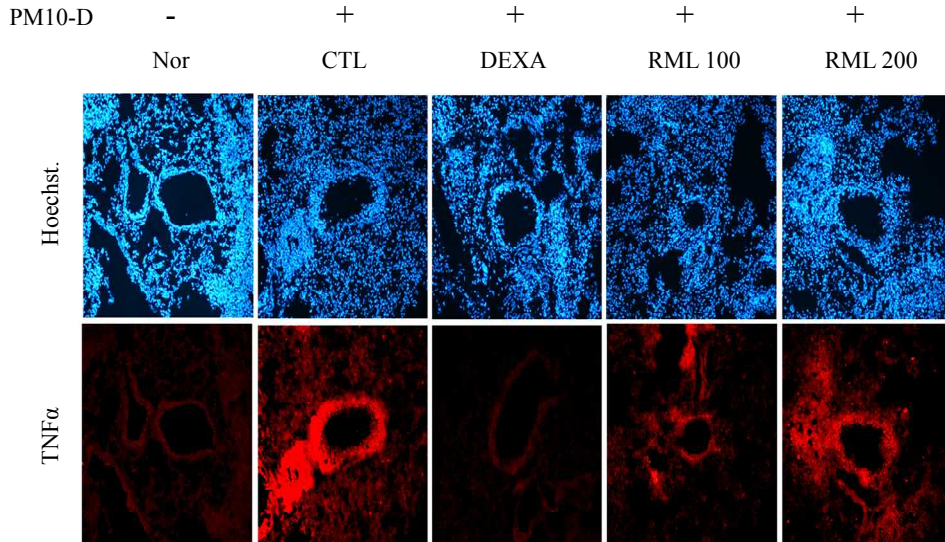


Fig. 7. Effect of RML on signal transduction TNF- α protein expression in lung. Nor, normal mice; CTL, PM10D-induced mice with the administration of distilled water; DEXA, PM10D-induced mice with the administration of 3 mg/kg Dexamethasone; RML 100, PM10D-induced mice with the administration of 100 mg/kg RML; RML 200, PM10D-induced mice with the administration of 200 mg/kg RML.

7. 폐 조직학적 분석

폐조직을 H&E 염색한 결과, 미세먼지 (PM10 & DEP)로 인해 정상군에 비하여 대조군에서 기관지 주변에 염증 면역세포의 침윤과 과립구세포, 그리고 활성화된 대식세포들로 인하여 염증이 심화되어 폐포 세포의 파괴를 관찰 할 수 있었다.

약물처리군은 모두 대조군에 비하여 기관지 주변에 염증면역 세포의 침윤과 과립구세포 (neutrophils, eosinophils), 그리고 활성화된 대식세포들이 크게 감소됨을 나타냈고 RML 투여군은 농도 의존적인 경향을 나타냈다 (Fig. 8).

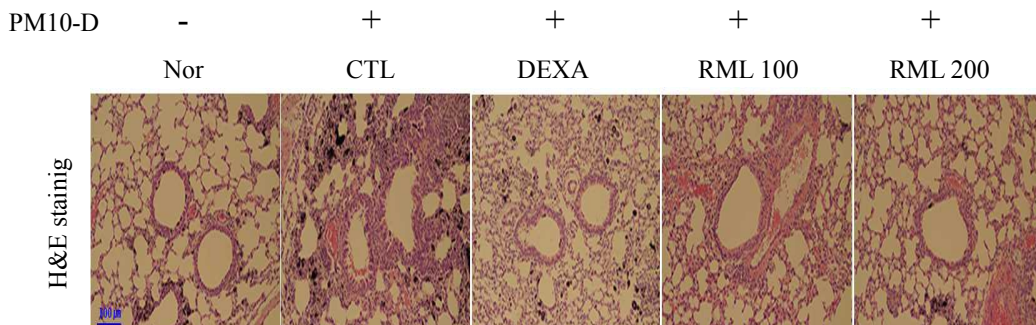


Fig. 8. Effect of GE on the histopathological change in lung tissue, lung tissue was stained with H&E (Original magnification $\times 200$). Nor, normal mice; CTL, PM10D-induced mice with the administration of distilled water; DEXA, PM10D-induced mice with the administration of 3 mg/kg Dexamethasone; RML 100, PM10D-induced mice with the administration of 100 mg/kg RML; RML 200, PM10D-induced mice with the administration of 200 mg/kg RML.

IV. 고 찰

산업의 발전으로 인하여 세계적으로 증가추세에 있는 미세먼지는 각종 호흡기 질환 및 수많은 질병을 유발한다고 알려져 있다. 미세먼지의 치료에 대한 개발된 의약품이 없으므로 새로운 치료방법이 필요한 실정이다. 최근, 천연물이 미세먼지로 인해 유도된 기관지 염증에 유효한 효과를 나타낸다는 것으로 보고되어져 있으며, 이는 미세먼지에 의해 발생한 염증을 억제하여 증상의 개선효과를 나타내는 것을 말한다. 본 연구는 미세먼지로 유발된 호흡기 질환의 새로운 치료제를 개발하기 위한 연구로서 *in vivo* 미세먼지 유발 폐 기능 손상모델에서 RML의 효과를 평가하였다. 이를 위해 PM10-D 유발 후 11일간 RML을 투여하였으며, BALF 및 폐 내 총 세포수, 폐기능 및 호흡기 관련 지표, 염증 및 면역 관련 인자를 측정하였고 조직병리 염색법을 통해 폐조직을 분석하였다.

연구자는 한의학에서 폐질환에 사용되어온 처방을 분석하였는데, 해수 또는 천식 병증 치료 처방을 검색하고, 구성 약물의 빈도수를 정리하여 후보한약재를 선정하였다. 그 결과, 地黃, 桑葉, 麥門冬을 후보 한약재로 선정하였고, 특히 地黃은 영천지역에서 전략적으로 육성하고자 하는 약용작물이므로, 地黃을 주재료로 하고, 桑葉과 麥門冬의 비율을 달리하여 혼합한 RML의 효능을 평가하였다.

한편, 본 실험결과에 따르면 RML의 투여가 폐포 세척액 내 총 세포수와 폐 내 총세포수를 감소시키는 경향을 확인할 수 있었다. 복합물을 구성하고 있는 성분들의 상호작용으로 생각되어지며, 본 연구에서는 RML의 폐손상 보호 효과의 근거를 마련하고자 실시하였다.

기도에서 신경계가 활성화되면 기관지 수축 및 점액 생성을 유발하며³⁵⁾, 기도내 점액생성을 유발시키는 MUC5AC은 과도하게 발생되면 폐질환 환자들의 증상을 악화시킨다³⁶⁾. 기도 기능 조절에 매우 중요한 역할을 하는 TRPV1과 TRPA1은 화학물질에 매우 민감하여 감각 뉴런에서 반응하여 발현되어지며³⁸⁾, 또한 기도에서 염증성 신호 전달에도 관여한다고 알려져 있다^{38, 39)}. RML은 점액생성 인자와 기도저항인자들을 감소시키는 결과를 바탕으로 기관지 손상을 효과적으로 억제할 수 있는 가능성을 보여준다.

면역체계는 외부의 유해물질이 체내로 유입되면 즉각적으로 macrophage가 활성화되고 CXCL-1과 같은 chemokine으로 인해 neutrophil 등을 유도하며 염증관련 세포들이 병소로 모이도록 하는 역할로 보고 되어져 있다⁴⁰⁾. 또한 IL-17A는 neutrophil의 생존 기간을 연장시키며⁴¹⁾ 염증 유도 관련 효소인 COX-2와 NOS-Ⅱ는 염증 매개 인자 발현에 매우 중요한 역할을 한다⁴²⁾. RML은 폐조직 내 chemokine과 염증 매개 인자를 감소시킴으로써 미세먼지로 인한 neutrophil과 관련되는 염증을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

호흡기에서 호중구, 대식세포, 림프구는 면역반응을 조절하는 중요한 역할한다고 알려져 있다⁴³⁾. RML 투여는 PBMC 내 림프구와 단핵구를 증가시키고 호중구와 호산구를 감소시켰다. RML은 미세먼지로 인해 발생하는 폐 손상에 대하여 면역반응을 효과적으로 조절하여 폐 손상에 대한 회복 가능성을 제시하였다.

미세먼지 유발 동물모델 폐조직에서 현미경 관찰을 통해

조직병리학적 평가를 하였다. 대조군에서는 폐포의 형태가 균일하지 않고, 폐포 주변의 염증세포가 다수 관찰되었으나 RML 처리군은 염증세포의 감소가 관찰되었고 폐포의 크기와 형태가 비교적 균일하게 유지되고 있음을 관찰할 수 있었다. 이를 통해 RML은 미세먼지로 인해 발생하는 폐조직의 손상에 대하여 효과적으로 보호할 수 있는 가능성을 제시하였다.

본 논문의 실험 결과를 종합하여 보면 미세먼지로 인하여 유도된 폐기능 손상 모델에서 천연물 유래 地黃, 桑葉, 麥門冬 복합물이 염증과 관련된 인자들의 감소와 면역반응에 관련된 인자들의 조절하는 결과를 나타냈다. 이에 地黃, 桑葉, 麥門冬 복합물의 심도 깊은 기전 연구가 추후에 필요하다고 사료된다. RML은 염증 및 면역체계 조절로 인하여 폐기능 관련 질환 개선에 활용될 수 있음을 시사하였다.

V. 결 론

본 연구에서는 미세먼지 (PM10-D) 유도에 의한 폐기능 손상 동물모델에서 地黃, 桑葉, 麥門冬 복합물의 폐기능 손상의 보호 효과를 확인하기 위해 혈액, 기관지세척액 (BALF) 및 폐 내 면역 및 염증 관련 인자의 발현과 폐조직의 내부 조직병리학적 변화를 비교·분석한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 地黃, 桑葉, 麥門冬 복합물은 PM10-D 유발 동물모델에서 Lung, BALF 내 총 세포수 감소시켰고, BALF 내 염증성 사이토카인 CXCL-1, IL-17A를 유의하게 감소시켰다.
2. 地黃, 桑葉, 麥門冬 복합물은 PM10-D 유발 동물모델에서 혈청 내 기관지 폐기능 지표인 SDMA와 기침 관련 인자인 MUC5AC, TRPV1, TRPA1을 유의하게 감소시켰다.
3. 地黃, 桑葉, 麥門冬 복합물은 PM10-D 유발 동물모델에서 염증 유도 관련 효소인 COX-2, NOS-Ⅱ, TNF- α 의 단백질 발현을 유의하게 억제하였다.
4. PM10-D 유발 동물모델에서 총 백혈구의 세포빈도수를 측정된 결과, 地黃, 桑葉, 麥門冬 복합물은 림프구, 과립구, 호중구, 단핵구를 감소시켰다.
5. PM10-D 유발 동물모델에서 地黃, 桑葉, 麥門冬 복합물은 폐조직의 신호전달 단백질 TNF- α 를 감소시켰고 H&E 염색을 통해 폐 조직을 관찰한 결과, 폐포의 크기를 일정하게 유지시키고 염증세포를 감소시켰다.

이상의 결과로부터 PM10-D 유발 동물모델에서 地黃, 桑葉, 麥門冬 복합물은 기침 관련 인자와 염증 관련 인자를 감소시키고 면역체계를 조절하여 미세먼지로부터 호흡기 보호 효과가 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2022년도 농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 (과제번호 PJ015272012022)의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

1. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). The economic consequences of outdoor air pollution. 2016 [cited 2019 Nov 26]. Available from: <https://www.oecd.org/environment/indicators-modelling-outlooks/Policy-Highlights-Economic-consequences-of-outdoor-air-pollution-web.pdf>
2. Jo HJ, Park SW, Lee HI, Lee SW. Health effects caused by particulate matter and guidelines for health care. Public Health Weekly Report. 2018 ; 11 : 458-62.
3. Song HW, Ji KY, Kim BK, Yang WK, Han CK, Shin HJ, Park YC, Hwang JS, Kang HS, Kim SH. Respiratory Protective Effect of Salvia plebeia R. Br. Extracts against Ambient Particulate Matter-induced Airway Inflammation. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2017 ; 25(5) : 269-81.
4. WHO. WHO Expert Consultation: Available evidence for the future update of the WHO global air quality guidelines (AQGs). 2016 [cited 2019 Nov 26]. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/air-quality/publications/2016/who-expert-consultation-available-evidence-for-the-future-update-of-the-who-global-air-quality-guidelines-aqgs-2016>.
5. Brandt EB, Kovacic MB, Lee GB, Gibson AM, Acciani TH, Le Cras TD, Ryan PH, Budelsky AL, Hershey GKK. Diesel exhaust particle induction of IL-17A contributes to severe asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2013 ; 132 : 1194-204.
6. Doeing DC, Solway J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. Journal of Applied Physiology. 2013 ; 114 : 834-43.
7. Fuks K, Moebus S, Hertel S, Viehmann A, Nonnemacher M, Dragano N, Möhlenkamp S, Jakobs H, Kessler C, Erbel R, Hoffmann B. Long-term urban particulate air pollution, traffic, noise and arterial blood pressure. Environmental Health Perspectives. 2011 ; 119 : 1706-11.
8. Peters S, Reid A, Fritschi L, de Klerk N, Musk AW. Long-term effects of aluminium dust inhalation. Occupational and Environmental Medicine. 2013 ; 70 : 864-8.
9. Hoffmann B, Weinmayr G, Hennig F, Fuks K, Moebus S, Weimar C, Dragano N, Hermann DM, Kältsch H, Mahabadi AA, Erbel R, Jöckel KH. Air quality, stroke, and coronary events: Results of the heinz nixdorf recall study from the ruhr region. Deutsches Ärzteblatt International. 2015 ; 112 : 195-201.
10. Ghio AJ, Smith CB, Madden MC. Diesel exhaust particles and airway inflammation. Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2012 ; 18 : 144-50.
11. Barnes PJ. Cytokines as mediators of chronic asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1994 ; 150 : S42-9.
12. Bohadana AB, Massin N, Wild P, Toamain JP, Engel S, Goutet P. Symptoms, airway responsiveness, and exposure to dust in beech and oak wood workers. Occupational and Environmental Medicine. 2000 ; 57 : 268-73.
13. Park YB, Rhee CK, Yoon HK, Oh YM, Lim SY, Lee JH, Yoo KH, Ahn JH. COPD clinical practice guideline of the Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease: a summary. Tuberc Respir Dis (Seoul). 2018 ; 81(4) : 261-73.
14. Kim TH, Yang WK, Lee SW, Kim SH, Lyu YR, Park YC. Inhibitory Effects of GGX on Lung Injury of Chronic Obstructive Lung Disease (COPD) Mice Model. J Korean Med. 2021 ; 42(3) : 56-71.
15. Chae BS, Shin TY. Effect of Fresh Rehmanniae Radix Methanol Extracts on the Production of Cytokines. Yakhak Hoeji. 2006 ; 50(1) : 184-90.
16. Herbology editorial committee of Korean medicine schools. Herbology [Boncho-hak]. Seoul : Young-Lim Press. 2016 : 232, 633.
17. Kim JS. Effect of Rehmanniae Radix on the Hyperglycemic Mice Induced with Streptozotocin. The Korean Society of Food Science and Nutrition. 2004 ; 33(7) : 1133-8.
18. Bae HK, Seo BI. Inhibitory Activities of Rehmanniae Radix 30% Ethanol Extract on Acute Gastritis and Peptic Ulcers. Kor. J. Herbol. 2019 ; 34(2) : 1-14.
19. Kwon YD, Song YS. Effects of Rhizoma rehmanniae administration on the Innate and Adaptive Responses in the Mouse. j. of Oriental Rehabilitation Medicine. 1998 ; 8(1) : 233-54.
20. Ju MJ, Kwon JH, Kim HK. Physiological activities of mulberry leaf and fruit extracts with different extraction conditions. Korean J Food Preserv. 2009 ; 16 : 442-8.
21. Byun SH, Park SM, Kim SC, Cho IJ. Anti-fibrotic Effect of Mori Folium Extract in Hepatic Stellate Cells. Kor J Herbology. 2013 ; 28(4) : 49-55.
22. Hunyadi A, Veres K, Danko B, Kele Z, Weber E,

- Hetenyi A, Zupko I, Hsieh T. In vitro anti-diabetic activity and chemical characterization of an apolar fraction of *Morus alba* leaf water extract. *Phytother Res.* 2013 ; 27(6) : 847-51.
23. Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukonqviriyan V, Kongyingyoes B, Kukonqviriyan U. Antihyperglycemic, antioxidant and antiglycation activities of mulberry leaf extract in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2009 ; 64 : 116-21.
24. Freidwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of concentration of the low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972 ; 18(6) : 499-02.
25. Editorial Committee of Oriental Medicine and Herbal Medicine. *Herbal medicine.* Seoul : Younglimsa, 2005 : 647-48.
26. National College of Korean Medicine Textbook Compilation Committee. *Herbology.* Seoul : Youglimsa, 2008 : 644-55.
27. Kim H. Effect of Maekmoondong-Tang on the immunomodulatory action. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology.* 2003 ; 17 : 946-51.
28. Kim HK, Lee JY, Han HS, Kim YJ, Kim HJ, Kim YS, Kim HM, Ko SG, An HJ, Lee YJ, Park W. Immunomodulatory Effects of *Liriope platyphylla* Water Extract on Lipopolysaccharide-Activated Mouse Macrophage. *Nutrients.* 2012 ; 4(12) : 1887-97.
29. Ahn JH. Effect of *Liriope tuber* on Liver function activity. Department of Pharmacy, Catholic University of Daegu, 2000.
30. Choi SB, Wha JD, Park S. The insulin sensitizing effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriope platyphylla* Wang et Tang via PI3-kinase pathway. *Life Sci.* 2004 ; 75(22) : 2653-64.
31. Huang TJ, Tsai YC, Chiang SY, Wang GJ, Kuo YC, Chang YC, Wu YY, Wu YC. Anti-viral effect of a compound isolated from *Liriope platyphylla* against hepatitis B virus in vitro. *Virus Res.* 2014 ; 192 : 16-24.
32. Yoshitaka I. Research on the quality distribution of JIS type-II fly ash in Japan. *World of Coal Ash.* www.flyash.info/2007/67ishikawa.pdf (cited by 2007 May 7).
33. Lim HB, Kim SH. The effect of crude saponins of Korean red ginseng against airway inflammation and airway hyperresponsiveness induced by diesel exhaust particles in mice. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 2009 ; 17 : 90-6.
34. Fonio, A. Über ein neues Verfahren der Blutplättchenzählung. *Dtsch. Z. Chir.* 1912 ; 117, 176.
35. Grace MS, Baxter M, Dubuis E, Birrell MA, Belvisi MG. Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease. *Br J Pharmacol.* 2014 ; 171 : 2593-607.
36. Wang G, Xu Z, Wang R, Al-Hijji M, Salit J, Strulovici-Barel Y, Tilley AE, Mezey JG, Crystal RG. Genes associated with MUC5AC expression in small airway epithelium of human smokers and nonsmokers. *BMC Med Genomics.* 2012 ; 5 : 21.
37. van Manen MJG, Birring SS, Vancheri C, Cottin V, Renzoni EA, Russell AM, Wijsenbeek MS. Cough in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Review.* 2016 ; doi:10.1183/16000617.0090-2015.
38. Park MK, Seong MG, Lee MK. Effects of TRPV1 in formalin-induced nociceptive behavior in the orofacial area of rats. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society.* 2014 ; 15(1) : 316-22.
39. Son HJ, Kim YS, Misaka T, Noh BS, Rhyu MR. Activation of the Chemosensory Ion Channels TRPA1 and TRPV1 by Hydroalcohol Extract of *Kalopanax pictus* Leaves. *Biomol Ther.* 2012 ; 20(6) : 550-5.
40. Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines and their receptors in chronic pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005 ; 4(3) : 313-7.
41. Traves SL, Donnelly LE. Th17 cells in airway diseases. *Curr Mol Med.* 2008 ; 8(5) : 416-26.
42. Ge Y, Huang M, Yao YM. Biology of Interleukin-17 and Its Pathophysiological Significance in Sepsis. *Front. Immunol.* 2020 ; doi.org/10.3389/fimmu.2020.01558.
43. McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen MJ, Stewart-Evans J, Malliarou E, Jarup L, Harrington R, Svartengren M, Han IK, Ohman-Strickland P, Chung KF, Zhang J. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N Engl J Med* 2007 ; 357(23) : 2348-58.