

# 맥문동이 LPS로 유도된 폐손상에 미치는 영향

이응석 · 양수영 · 김민희<sup>1</sup> · 남궁욱<sup>1</sup> · 박양춘\*

대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 1: 신경생리학교실

## Effects of Root of *Liriope Spicata* on LPS-induced Lung Injury

Eung Seok Lee, Soo Young Yang, Min Hee Kim<sup>1</sup>, Uk Namgung<sup>1</sup>, Yang Chun Park\*

*Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine,  
1: Department of Neurophysiology, College of Oriental Medicine, Daejeon University*

This study was purposed to evaluate the effects of root of *Liriope spicata* (RLS) on LPS-induced COPD (chronic obstructive pulmonary disease) model. The extract of RLS was treated to A549 cells and LPS-induced COPD mice model. Then, various parameters such as cell-based cyto-protective activity and histopathological finding were analyzed. RLS showed a protective effect on LPS-induced cytotoxicity in A549 cells. This effect was correlated with analysis for caspase 3 levels, protein level of cyclin B1, Cdc2, and phospho-Erk1/2, and gene expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in A549 cells. RLS treatment also revealed the protective effect on LPS-induced lung injury in COPD mice model. This effect was evidenced via histopathological finding including immunofluorescence stains against caspase 3, and protein level of cyclin B1, Cdc2, and Erk1/2 in lung tissue. These data suggest that RLS has a pharmaceutical properties on lung injury. This study would provide an scientific evidence for the efficacy of RLS for clinical application to patients with COPD.

Key words : root of *Liriope spicata*, chronic obstructive pulmonary disease, emphysema, A549 cell

### 서 론

만성폐쇄성폐질환 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)은 최근 질병률과 사망률을 높이는 주요 원인이 되고 있으며 광범위한 역학 조사에서 폐기능 검사 결과 40세 이상 성인의 10%정도에서 중등도 이상의 COPD가 관찰되었다<sup>1)</sup>. 만성폐쇄성폐질환의 병리적 특징은 흡연 등의 자극에 의해 반복적으로 손상 받은 폐조직에서 보이는 만성적 염증 반응이 조직의 복구와 기도 개형으로 이어져 기도 저항의 증가와 폐실질의 파괴를 가져오는 것이다<sup>2,3)</sup>. 폐실질의 파괴는 탄력반동 (elastic recoil)의 감소를 가져와 폐유순도 (lung compliance)의 증가를 초래하며 이는 기도 저항의 증가와 함께 만성폐쇄성폐질환에서 기류제한을 나타나게 하는 가장 중요한 기전이다<sup>4,5)</sup>. 만성폐쇄성 폐질환에서의 기류제한은 부분적으로만 가역적이며 지속적으로 증가하는데 아직까지 이를 막아줄 수 있는 근본적인 치료방법은 없는 실정이다<sup>6)</sup>.

본 연구에서는 만성폐쇄성폐질환의 실험적 병태 모델로 그림 음성균의 세포벽 구성성분인 lipopolysaccharide (LPS)를 기관지내에 투여하는 방식을 이용하였다. LPS는 인체의 선천성 면역반응에 관여하는 단핵구, 대식세포 등의 면역세포를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  등 염증성 cytokine들을 분비시켜 염증반응을 일으킴으로써 폐손상을 유도한다<sup>7)</sup>.

맥문동 (Root of *Liriope spicata*: RLS)은 백합과에 속하는 다년생 상록 초본인 맥문동의 괴근으로<sup>8)</sup>, 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津의 효능이 있어 肺燥乾咳, 吐血咯血, 肺痿, 肺癰, 虛勞煩熱 등에 사용되고 있다<sup>9)</sup>. 맥문동에 관한 연구로는 spicatoside를 포함한 유효성분에 대한 보고들<sup>10-13)</sup>이 있었고, 호흡기질환을 포함한 다양한 효과에 대한 연구들<sup>14-27)</sup>이 있었다. 한편 COPD에 대한 한약의 효과를 평가한 연구는 많지 않은 실정으로 최근 金銀花가 LPS로 유도된 COPD 동물모형에서 중성구와 염증 사이토카인의 발현 및 폐조직의 손상을 억제한다는 보고가 있었으며<sup>28)</sup>, 加味八味丸과 宣肺定喘湯의 elastase로 유도된 COPD 모형에서의 폐손상 보호효과에 대한 연구들<sup>29,30)</sup>이 있었다.

따라서 본 연구에서는 손상 폐조직에 대한 맥문동의 보호효과를 조사하기 위하여 기존의 보고와 유사한 방법으로 in vitro

\* 교신저자 : 박양춘, 대전시 중구 대흥동 22-5 대전대학교 대전한방병원

· E-mail : omdpyc@dju.ac.kr · Tel : 042-229-6919

· 접수 : 2011/05/16 · 수정 : 2011/06/13 · 채택 : 2011/06/27

A549 배양세포와 생쥐동물모델을 이용하였다<sup>31,32</sup>). 사람 폐포의 기저 상피세포에서 유래된 A549 세포주와 LPS의 기도흡입 동물 모델에서 세포의 생존 혹은 사멸에 관련된 단백질 인자들의 생성수준에 대한 맥문동의 영향을 western blot 분석과 면역형광염색 분석을 통하여 조사하였다. 본 실험결과 맥문동은 다양한 수준에서 손상자극에 노출된 폐세포와 조직에 대한 보호효과를 나타냄을 확인하였기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) A549 세포

실험에 사용된 A549 세포는 사람의 폐포 기저 상피세포에서 유래된 aneuploid cell line으로, 한국세포주 은행 (Korea)에서 구입하였다.

#### 2) ICR 수컷 생쥐

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

#### 3) 약제 추출

맥문동 (Root of *Liriope spicata*)은 휴먼허브 (Kyeongbuk, Korea)에서 지원받아 실험에 사용하였다. 맥문동 20 g에 증류수 1,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 동안 가열하여 얻은 액을 여과하였다. 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, Buchi B-480, Switzerland)로 농축하고, 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, Eyela FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 추출물을 냉동 (-84°C) 보관하면서 생리식염수에 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. 맥문동의 초기 약제 20 g 으로부터 13 g의 추출물을 얻어 65%의 수율을 나타내었다.

#### 4) 시약

본 실험에서 시약은 LPS (Sigma, USA), cleaved caspase 3 (Cell Signaling, USA), fluorescein goat anti-mouse IgG (Invitrogen, USA), rhodamine red-X goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA), Hoechst 33258 (Invitrogen, USA), anti-Cyclin B1 developed in rabbit IgG fraction of antiserum (Sigma, USA), polyclonal anti-cdc2 (Santa Cruz Biotechnology, USA), phospho-p44/42 Erk1/2 kinase antibody (Cell Signaling, USA), p44/42 Erk1/2 kinase antibody (Cell Signaling, USA), actin (MP Biomedicals, USA), goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, USA) 등을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) In vitro 실험

##### (1) 세포 배양

A549 cell은 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) 과 penicillin (100 units/ml)/streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 media (Lonza, USA)로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양

하였다. Cell은 75 cm<sup>2</sup> flask (SPL, Korea)에서 충분히 증식시킨 후, 3일 간격으로 계대 배양하였다.

##### (2) 세포 생존율

MTT[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 환원법을 이용하여 측정하였다. 먼저 96 well plate에 1 × 10<sup>5</sup> 개의 A549 cell을 분주하고, (i) 정상군 (생리식염수), (ii) LPS (1 µg/µl) 처리 대조군, (iii) LPS (1 µg/µl)와 맥문동 추출물을 각각 농도별 (0.3 - 1 mg/ml)로 처리한 실험군으로 나누어, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간동안 배양하였다. 각 well에 MTT solution을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포의 생존율은 다음과 같이 계산하였다.

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

##### (3) 면역형광염색

이중 면역형광 염색법 (double immunofluorescence staining)을 수행하기 위하여, 유리 coverslip을 poly-L-ornithine (0.1 mg/ml, Sigma, USA)과 laminin (0.02 mg/ml, Collaborate Research, USA) 용액에 넣어 실온에서 pre-coating 하였다. 1 × 10<sup>5</sup> 개의 A549 cell을 pre-coating된 coverslip에 분주하고, (i) 정상군 (생리식염수), (ii) LPS (1 µg/µl) 처리 대조군, (iii) LPS (1 µg/µl)와 맥문동 추출물 0.5 mg/ml 처리 실험군으로 나누어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. Coverslip 표면에서 자란 세포를 4% paraformaldehyde/4% sucrose가 혼합된 인산완충용액 (phosphate bufferersaline;PBS)으로 상온에서 40분 동안 고정하였다. 비특이적 결합을 막기 위해 blocking buffer에 담근 후 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 1차 항체는 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 정해진 비율로 혼합하여 처리한 후, 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 PBST (PBS plus 0.1% triton X-100)로 조직을 씻어내고, 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 Fluorescein-goat anti-mouse antibody (green)와 Rhodamine-goat anti-rabbit antibody (red)를 1:400으로 혼합하여 암실에서 1시간 30분 동안 2차 항체 처리를 수행하였다. 2차 항체 처리 후 3회에 걸쳐 PBST로 세척을 수행하였다. Hoechst 핵 염색을 수행하는 경우 2회 세척 후 0.25% Hoechst 33258 형광염료를 함유한 PBST 용액으로 처리 후 다시 PBST 용액으로 세척하였다. 2차 항체는 빛에 민감하기 때문에 반응시간 동안 암실에서 수행하였다. 염색된 세포들은 형광현미경 (Zeiss fluorescent microscope)을 통해 관찰하였고, 디지털 카메라로 찍은 모든 images는 Adobe Photoshop (version 5.5)을 이용하여 green과 red의 밝기와 강도를 같은 비율로 조절하여 관찰하였다. 그리고 Photoshop program의 Layer blending mode options를 이용하여 images를 중복시켜 관찰함으로써 각 단백질의 발현 위치를 관찰하였다.

##### (4) Western blot 분석

A549 세포를 60 mm culture dish에  $2 \times 10^5$  cells/ml 로 분주한 후 (i) 정상군 (생리식염수), (ii) LPS ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 처리 대조군, (iii) LPS ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )와 맥문동 추출물  $0.5 \text{ mg}/\text{ml}$  처리 실험군으로 나누어 24시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하였다. 배양한 A549 cell은 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후 50 - 200  $\mu\text{l}$ 의 triton lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, pH 7.14, 2 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1% Tririon X-100, 10% glycerol, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 2  $\mu\text{M}$  benzamidine, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF)에 담가 초음파 분해하였다. 그 다음 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 그 중 10  $\mu\text{g}$  단백질을 western blot 분석에 사용하였다. 정량한 단백질은 12% SDS-polyacrylamide gel (1.5 M Trisma base, 10% sodium dodecyl sulfate, 30% acrylamide, 10% ammonium sulfate, TEMED) 상에서 전기영동 시킨 후 PVDF membrane (Pall Corporation, USA)에 전기이동 시켰다. Antibody와의 비특이적 결합을 막기 위해 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA), 0.1% Tween 20을 함유하고 있는 TBS buffer에서 membrane을 1시간 동안 상온 반응시키고  $4^\circ\text{C}$ 에서 16시간 동안 blocking buffer 상에서 반응을 진행하였다. 반응을 끝낸 membrane을 washing한 후 1차 항체를 blocking buffer ( $1 \times$  TBS buffer, 3% BSA, 0.1% Tween 20)에 정해진 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 처리 하고 다시 한 번 씻어냈다. 마지막으로 membrane에 부착된 단백질을 western blotting detection system을 이용하여 측정하였으며 Kodak Scientific Imaging Film (Eastman Kodak Co., USA)에 감광하였다.

(5) RNA 추출 및 RT-PCR

A549 Cell을 60 mm culture dish에  $2 \times 10^5$  cells/ml 로 분주한 후 (i) 정상군 (생리식염수), (ii) LPS ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 처리 대조군, (iii) LPS ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )와 맥문동 추출물  $0.5 \text{ mg}/\text{ml}$  처리 실험군으로 나누어 24시간 동안 배양하였다. RNA는 약제 처리 후 24시간 뒤에 easy-BLUE 시약 (Intron Biotechnology, Korea)을 사용하여 분리하였다. 배양된 세포에 1 ml의 easy-BLUE 시약을 넣고, 상온에서 10초간 세포를 용해시킨 후, 여기에 200  $\mu\text{l}$ 의 chloroform을 추가하여 잘 혼합한 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 분리된 상층액 400  $\mu\text{l}$ 에 동일한 양의 2-propanol을 첨가하고 상온에 10분간 방치시킨 후, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 분리된 RNA는 1 ml의 75% ethanol을 첨가하여, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 75% ethanol을 제거한 뒤, diethylpyrocarbonate (DEPC) 첨가된 증류수에 용해시킨 후 260 nm에서 흡광도를 측정하고, 농도를 정량하여 실험에 사용하였다. cDNA 합성은 1  $\mu\text{g}$  oligo-dT와 역전사효소 (MMLV-RT, Promega, USA)를 사용하여 합성하였다. PCR은 Taq polymerase (Promega, USA)와 각각의 특이 primer를 이용하여 실험하였으

며, PCR 조건은  $94^\circ\text{C}$ -5min,  $94^\circ\text{C}$ -30sec,  $55^\circ\text{C}$ -30sec,  $72^\circ\text{C}$ -30sec,  $72^\circ\text{C}$ -7min으로 30 cycle로 진행하였다. 실험에 사용된 primer는 IL-1 $\beta$  (Bioneer, Korea)와 TNF- $\alpha$  (Bioneer, Korea) cDNA에 대응하는 서열로 합성하였다(Table 1).

Table 1. Primer Sequences

Target Gene		Primer Sequence	Product Size (bp)
IL-1 $\beta$	Forward	GCT GAT GGC CCT AAA CAG	672
	Reverse	GAA GAC GGG CAT GTT TTC	
TNF- $\alpha$	Forward	AGC CCA TGT TGT AGC AAA CC	516
	Reverse	GGT TGA GGG TGT CTG AAG GA	

2) In vivo 실험

(1) LPS 폐손상 모델

7주령 ICR계 수컷 생쥐에 대해 LPS를 기도에  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 100  $\mu\text{l}$  흡입시킨 후 2일 동안 경과를 지켜본 후 폐조직 손상을 유도하였다. LPS는 마취를 약간만 시킨 후 움직임이 없을 때 생쥐의 앞니를 고정시킨 상태에서 코에 LPS를 흡입시켰다. 실험에는 각각 5마리의 동물을 (i) 아무런 처리를 하지 않은 정상군, (ii) LPS ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ ) 처리한 대조군, (iii) LPS 처리 후 맥문동 추출물 (400 mg/kg, p.o) 투여 실험군으로 나누어 배정하였다. 실험군에만 7일간 맥문동 추출물을 경구 투여하였고 정상군과 대조군은 멸균 증류수를 투여하였으며, 실험이 끝난 후 각 군 생쥐의 폐조직을 분리하였다.

(2) Hemotoxylin & Eosin 염색

폐조직은  $-20^\circ\text{C}$ 에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20  $\mu\text{m}$ 의 두께로 잘라 슬라이드에 붙였다. H & E staining을 실시하기 위하여 슬라이드를 hematoxylin에 1분 동안 담가 둔 후 흐르는 증류수에 여러 번 세척 후 eosin에 30초간 담그고 흐르는 증류수로 여러 번 세척하였다. 그 다음 50%, 70%, 95% ethanol에 차례로 여러 번 씻으며 염색을 적당히 제거한 후 xylene에 1분간 담가두었다. 마지막으로 gelatin mount medium을 이용하여 cover-slide를 영구 부착하였으며, 이러한 샘플들은 광학현미경 (Light microscope, Nikon, Japan)을 통해 관찰하였다.

(3) 면역형광염색

생쥐 폐조직은  $-20^\circ\text{C}$ 에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20  $\mu\text{m}$ 의 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켰다. 이중 면역형광 염색법 (double immunofluorescence staining)을 수행하기 위해, 4% paraformaldehyde, 4% sucrose가 혼합된 인산완충용액 (phosphate buffered saline; PBS)에 45분 동안 슬라이드를 넣어 조직을 고정하였다. 이후의 실험 과정은 in vitro 실험과정과 동일하게 하였다.

(4) Western blot 분석

폐조직을 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후 50-200  $\mu\text{l}$ 의 triton lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, pH 7.14, 2 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1% Tririon X-100, 10% glycerol, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 3  $\mu\text{M}$  benzamidine, 0.5 mM

DTT, 1 mM PMSF) 용액 하에서 분해하였다. 그 다음 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 15 µg의 단백질을 western blot 분석에 사용하였다. 이후의 실험 과정은 in vitro 실험과정과 동일하게 하였다.

(5) 조직 sample의 현미경 분석

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

3) 통계분석

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

결 과

1. In vitro

1) 세포 생존율에 미치는 영향

A549 세포에 맥문동을 농도에 따라 처리하였을 때 세포내 독성을 유발시키는지 확인하기 위해 MTT assay를 실시하였다. A549 세포를 이용하여 정상군의 생존율을 100%라고 할 때, 맥문동을 0.1 mg/ml에서 1.0 mg/ml 농도범위로 처리하여 생존율을 계산하였다. 맥문동을 처리한 모든 농도에서 90% 이상의 세포생존율을 유지하여 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig. 1A). A549 세포에 LPS를 24시간 처리한 결과, 세포생존율은 아무런 처리도 하지 않은 정상군에 비해 60% 이하로 감소하였으나 맥문동 0.3 mg/ml과 0.5 mg/ml 처리시에는 세포생존율이 정상군에 비해 70~80% 정도로 유의성 있게 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B).

2) Caspase 3 생성에 미치는 영향

LPS 및 맥문동 처리에 의한 세포 생존의 변화에 apoptosis 기전이 관여하는지 여부를 조사하기 위해 caspase 3 단백질의 생성여부를 조사하였다. 아무런 처리를 하지 않은 A549 세포에서 caspase 3 단백질의 양성반응을 나타내는 세포가 거의 관찰되지 않았으나, LPS를 24시간 처리한 경우 양성반응을 나타내는 세포가 다수 관찰되었다. LPS와 맥문동을 동시에 처리한 경우에는 caspase 3 단백질에 양성반응을 나타내는 세포가 LPS만 처리한 경우에 비해 증가가 억제되었다(Fig. 2).

3) Cdk1, cyclin B1 및 Phospho-Erk1/2 생성에 미치는 영향

세포의 증식을 유도하는 단백질인 Cdk1, cyclin B1 및 Phospho-Erk1/2 단백질 발현 수준을 A549 세포에서 western blot 방법으로 조사하였다. LPS 처리는 Cdk1, cyclin B1 및 Phospho-Erk1/2 단백질의 발현을 현저하게 감소시킨 반면, 맥문동을 동시에 처리한 경우에는 Cdk1, cyclin B1 및 Phospho-Erk1/2 단백질의 발현의 감소가 억제된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A-C).

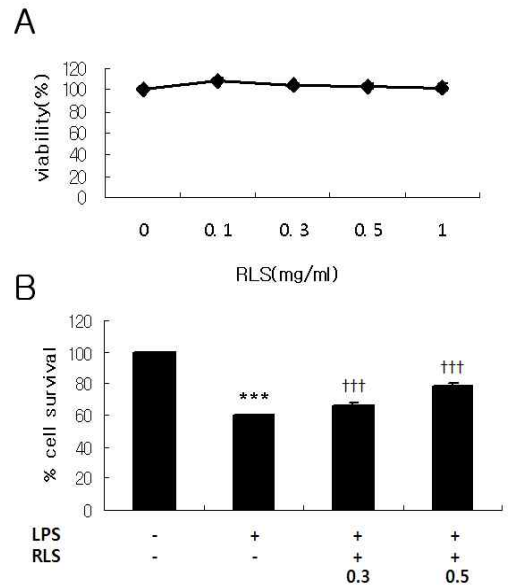


Fig. 1. MTT assay of A549 cells to determine cell viability. (A) A549 cells were treated with different concentrations of RLS for 24 hr and harvested for MTT assay. (B) A549 cells were treated with LPS (1 µg/µl) alone or in the presence of 0.3 or 0.5 mg/ml of RLS. \*\*\*: p<0.001 compared to normal with ANOVA test. † † † : p<0.001 compared to control by ANOVA test.

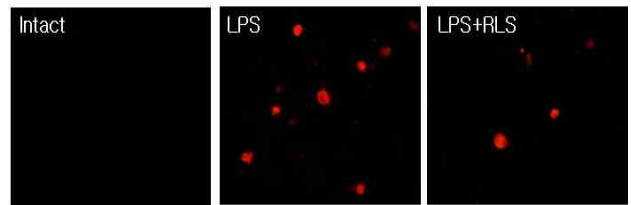


Fig. 2. Identification of caspase 3-positive cells in A549 cells after LPS and RLS treatments. A549 cells were treated with LPS (1 µg/µl) and LPS (1 µg/µl) plus RLS (0.5 mg/ml) for 24 hr and used for caspase 3 immunostaining.

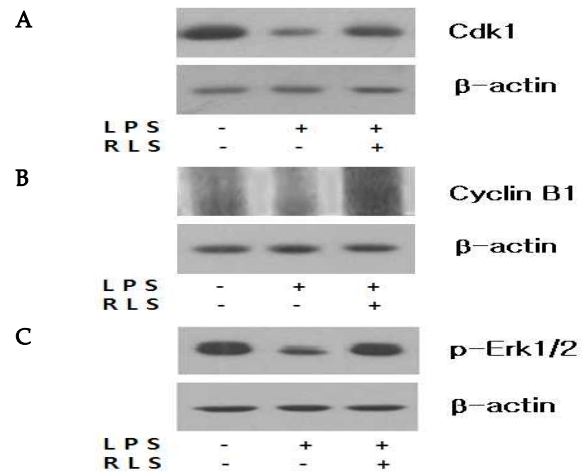


Fig. 3. Changes of cell cycle protein levels in A549 cells by RLS treatment. A549 cells were cultured and treated with LPS (1 µg/µl) and LPS (1 µg/µl) plus RLS (0.5 mg/ml) for 24 hr. Cell lysate was used for western blot analysis with anti-Cdk1 (A), cyclin B1 (B) and Phospho-Erk1/2 (C) antibody.

4) 염증성 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향

A549 세포에 LPS와 맥문동을 처리하여 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 발현 수준을 RT-PCR 방법으로 조사하였다. LPS를 24시간 처리한 세포들은 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 발현이 증가하였고, 맥문동을 동시에 처리한 경우에는 증가를 억제시켰다(Fig. 4A, 4B).

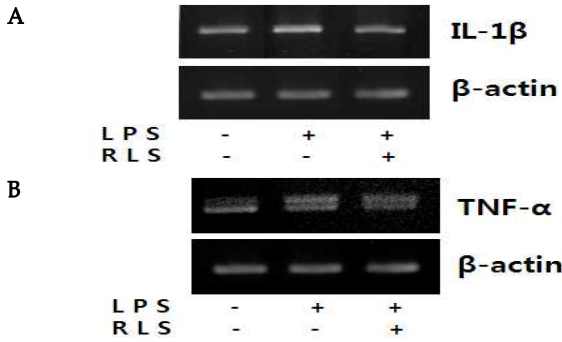


Fig. 4. RT-PCR analysis of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA expression in A549 cells. A549 cells were treated with LPS (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) and LPS (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) plus RLS (0.5  $\text{mg}/\text{ml}$ ) for 24 hr. The gene expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was analyzed as comparing with  $\beta$ -actin by RT-PCR.

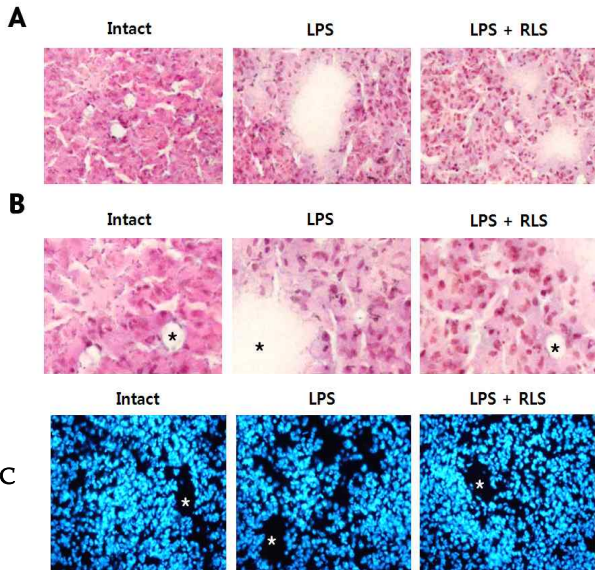


Fig. 5. Histological analysis of lung tissues after H & E staining and Hoechst nuclear staining. Mice were inhaled with LPS once with or without pre-treatment with RLS (400  $\text{mg}/\text{kg}$ , p.o) for 7 days. Lung tissues were examined under microscope (A: 200  $\times$  magnification, B: 400  $\times$  magnification) after H & E staining and (C: 400  $\times$  magnification) after Hoechst nuclear staining. Alveolar ducts are marked by asterisks.

2. In vivo

1) 조직학적 변화

정상 폐조직, LPS 처리, 그리고 LPS와 맥문동을 동시에 처리한 폐조직을 H&E 염색으로 비교하였다. 정상 폐조직에서는 폐포가 일정한 형태로 나타나는 반면, LPS 처리한 경우에는 폐포가 확장되었고, 폐포 주변부에 핵이 많이 몰려있는 것을 관찰할 수 있었다. LPS와 맥문동을 동시에 처리한 경우에는 폐포의 확장이 LPS 단독 처리한 대조군보다 감소하였다(Fig. 5A, 5B).

LPS 처리에 따른 세포수의 변화를 관찰하기 위해 Hoechst 33258을 이용한 세포핵의 청색형광염색을 시행하여 확인 분석하였다. 정상조직의 경우 폐포 부분을 제외한 조직부위에서 핵들은 일정한 분포를 나타내었으나 LPS를 처리한 경우 폐포의 크기가 일정하지 않고 정상조직보다 확장된 것을 관찰할 수 있었다. LPS와 맥문동을 동시에 처리한 경우 염색된 핵 수는 정상 폐조직과 유사한 수준으로 관찰되었다(Fig. 5C).

2) Caspase 3 생성에 미치는 영향

폐조직상에서 면역형광염색을 통해 caspase 3 단백질 신호를 관찰할 수 있었다. 정상 폐조직에서는 caspase 3 단백질 신호가 약하게 나타났으나, LPS를 처리한 경우 폐포 주변을 중심으로 뚜렷한 caspase 3 단백질 신호가 나타났으며, LPS와 맥문동을 동시에 처리한 경우 caspase 3의 발현이 감소하였다(Fig. 6).

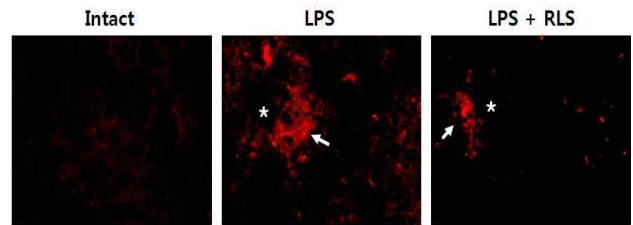


Fig. 6. Immunofluorescence analysis for caspase 3 in lung tissue. Mice were inhaled with LPS once with or without pre-treatment with RLS (400  $\text{mg}/\text{kg}$ , p.o) for 7 days. The tissue was examined under microscope after immunofluorescence staining against caspase 3. Alveolar ducts are marked by asterisk, and the arrows indicate the densely stained area of caspase 3.

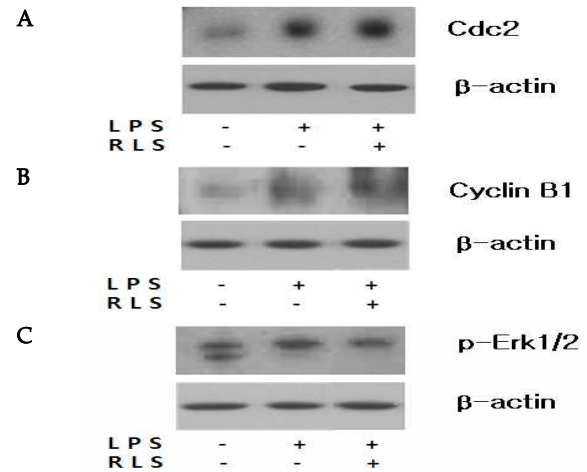


Fig. 7. Protein analysis for Cdc2 (A), cyclin B1 (B) and phospho-Erk1/2 (C) in lung tissue. Mice were inhaled with LPS once with or without pre-treatment with RLS (400  $\text{mg}/\text{kg}$ , p.o) for 7 days. Cdc2 (A), cyclin B1 (B) and phospho-Erk1/2 (C) protein was analyzed as comparing to  $\beta$ -actin by western blotting.

3) Cdc2, cyclin B1, phospho-Erk1/2 생성에 미치는 영향

Cdc2, cyclin B1, phospho-Erk1/2 단백질의 생성 수준의 변화를 western blot 방법으로 조사한 결과, 아무 것도 처리하지 않은 정상군에서 Cdc2, cyclin B1, phospho-Erk1/2 단백질의 생성 수준은 낮았으나, LPS 처리한 경우에는 Cdc2, cyclin B1, phospho-Erk1/2 단백질의 수준이 증가하였으며, LPS와 맥문동

을 동시 처리한 경우에는 Cdc2, cyclin B1 단백질 수준은 더 증가하였고, phospho-Erk1/2 단백질 수준은 증가가 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 7A-C).

## 고찰

COPD는 기침, 객담, 호흡곤란이 주증상으로 나타나고 기도의 변형과 폐실질의 파괴를 동반하여 한의학에서는 呼吸促急한喘證 및 肺傷證의 하나로 咳而上氣하고 煩燥하는 肺脹證의 범주에 해당하는데, 氣의 出納을 조절하는 肺腎의 기능 이상이 가장 중요한 병리기전이다<sup>33</sup>. 맥문동은 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津하는 효능이 있어<sup>9</sup> 호흡기질환에 활용도가 매우 높은 약물로 COPD 실험연구에서 폐손상 억제효과를 나타낸 加味八味丸<sup>29</sup>과 宣肺定喘湯<sup>30</sup>의 구성약물이면서, 친식유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis를 조절하고<sup>20</sup>, bleomycin으로 유도된 실험동물의 폐섬유화(肺纖維化)를 억제한다고<sup>22</sup> 보고되고 있다.

본 연구에서는 맥문동의 폐손상 보호효과를 평가하고자 LPS의 직접적인 처리를 통하여 세포손상을 유도하고, 배양세포와 실험동물에서 세포의 생존력, 폐조직의 형태적 변화, 세포자사 및 세포증식과 관련된 단백질, 염증관련 cytokines에 대하여 생화학적 및 조직학적 분석을 실시하였다. In vitro 실험에 이용한 A549 세포는 human type II lung cell line으로서 BEAS-2B human bronchial cell line과 함께 폐조직의 유해자극에 대한 반응성의 연구에 가장 보편적으로 사용되는 세포주이다<sup>34</sup>.

본 연구에 사용한 A549 세포는 세포증식이 대단히 활발하고 다양한 외부자극에 반응을 잘 나타내기 때문에 손상 후 약재처리에 의한 반응성의 변화 등을 in vitro 상태에서 분석하기 유리하므로 사용하였다. 반면에 A549 세포의 외부자극에 대한 반응성이 in vivo 폐조직의 반응성과 다소 차이가 있을 수도 있으므로 LPS의 처리 및 맥문동 처리에 의한 세포나 조직의 보호효과를 조사하기 위해 LPS를 기도로 흡입시킨 후 폐조직의 반응성도 분석하였다.

먼저 A549 세포에 LPS 처리 후 MTT assay를 통해 세포생존율을 조사한 결과, 생존율이 78% 이하로 감소하는 것을 확인하였고, 이러한 변화는 A549 세포를 배양한 후에 LPS를 24시간 처리 후 세포의 핵 숫자가 상당히 감소하는 결과와 일치하였다. 세포사멸에 있어 apoptosis가 관여하는지 알아보기 위해 apoptosis 과정과 밀접한 관련이 있는 caspase 3 단백질의 생성수준을 조사하였다<sup>35</sup>. LPS를 생쥐의 기도에 흡입시킨 후 폐조직의 변화를 관찰한 결과, 폐포공간이 뚜렷하게 확장된 것을 확인할 수 있었으며 따라서 본 연구에서 실시한 LPS 흡입 동물모델은 폐기종의 조직학적 특성을 잘 나타내는 것으로 평가된다. 또한 폐포주변부에서 강한 hematoxylin 반응과 Hoechst 핵 염색반응을 나타내었는데 이는 침윤된 중성구 세포와 같은 염증매개성 침윤반응이 진행되고 있음을 암시한다. 이러한 조직학적 변화와 함께 LPS를 처리한 대조군에서도 폐조직의 폐포주변부에서 caspase 3 단백질의 반응이 뚜렷하게 관찰되었다. 따라서 A549 세포나 폐조직에서 모두 LPS에 의해 폐기종과 유사한 기전의 손상반응이 나타

나는 것을 알 수 있었다.

이러한 손상 반응에 대해 맥문동을 처리한 경우에는 A549 세포의 MTT assay에서는 세포생존율이 정상군과 유사한 수준으로 회복되었다. 또한 A549 세포에서 caspase 3 양성반응을 나타내는 수준이 감소하였으며, LPS를 처리한 생쥐의 폐조직에서도 caspase 3 양성반응을 비롯하여 폐포의 크기도 정상군과 유사한 수준으로 관찰되었다. 따라서 맥문동이 LPS로 일으킨 폐조직 세포의 병리학적 손상에 대해 보호작용을 한다고 사료되며, 이러한 결과는 A549 세포를 이용하여 加味八味丸의 효능을 평가한 in vitro 연구 결과와도 일치하였다<sup>29</sup>.

LPS와 같은 외부자극에 대해 세포의 손상, 생존율, 그리고 사멸과 관련된 반응은 세포증식과정과 밀접하게 연관되어 있다. 일반적으로 폐조직을 포함한 외피세포들은 빠른 세포생성주기를 가지며, 외부의 유해한 자극에 대해 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다<sup>36</sup>. 본 연구에서는 LPS 및 맥문동 처리에 의해 A549 세포 및 생쥐의 폐조직의 변화를 조사하기 위해 세포증식과정에서 핵심적인 역할을 하는 Cdc2 kinase의 활성도를 조사하였다. 선행연구들에서 Cdc2 단백질은 cell cycle의 G2 phase-M기에 관여하여 세포의 증식을 촉진시킨다고 알려져 있다<sup>37,38</sup>.

Cdc2 kinase는 cyclin B1 조절 단백질의 결합에 의하여 활성화되고 세포분열시 발생하는 주요변화에 관여하는 단백질들을 인산화시킴으로서 세포분열의 진행에 결정적 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>39</sup>. Cdc2 및 cyclin B1 단백질 생성수준을 조사한 결과, in vitro 실험에서는 두 단백질 모두 LPS 처리로 정상군에 비하여 약하게 발현되었으나 맥문동의 동시 처리에서 증가하였다. 반면에 in vivo 실험에서는 두 단백질 모두 LPS 처리로 증가하였으며 맥문동을 같이 처리한 경우에는 대조군보다 더욱 증가하는 것으로 나타났다. 이는 폐조직의 경우 LPS로 손상된 세포의 주변부에서 손상의 회복과정이 이루어지며 Cdc2 및 cyclin B1 단백질의 생성을 촉진한 결과로, 대조군에서도 Cdc2 및 cyclin B1 단백질의 생성이 증가하였고, 맥문동 처리가 이러한 생성과정을 더욱 촉진함으로써 대조군보다 증가된 Cdc2 및 cyclin B1 단백질의 생성을 보인 것으로 생각된다. 따라서 맥문동이 Cdc2 및 cyclin B1 단백질의 활성을 증가시킴으로써 폐조직의 손상을 억제하는 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)는 세포증식, 세포주기 조절, 세포생존, 혈관신생, 세포의 이동 등의 조절에 관여하는데 Erk는 c-Jun N-terminal kinase (JNK)와 p38 kinase와 함께 MAP kinase 계열의 단백질 인산화 효소로서 세포외부에서 주어지는 성장인자 및 스트레스 등의 자극들에 대응하여 세포내부 기질 단백질들의 인산화를 통하여 활성도를 유도하는 단백질 집단이다<sup>40</sup>. 이러한 단백질 인산화 효소들은 이들의 상위 단백질 인산화 효소에 의해 인산화된 후에 활성화되는데 상호 신호전달 경로를 공유하며 생리적 효과를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>41,42</sup>. 선행연구에 따르면 p38 kinase와 JNK 효소의 활성화는 외부 스트레스 자극에 대해 세포 사멸을 유도하는 반면, Erk1/2는 세포의 생존경로의 활성화와 관련되어 Erk1/2의 억제제가 세포자사를 촉진시키는 것으로 보고되고 있다<sup>43,44</sup>. 그러



나 기도점액 분비와 관련되는 MUC5AC 유전자의 전사과정에 기도상피세포의 표피성장인자 수용체가 관여하는데 이때 Erk1/2가 세포내 신호전달에서 중요한 역할을 함으로써 만성폐쇄성폐질환의 점액 과다분비와 관련이 되며, LPS로 유도된 생쥐의 폐손상에서 Erk의 억제가 중성구의 침윤과 TNF- $\alpha$ , MIP-2 발현을 낮추는 것으로 보고되고 있다<sup>45,46</sup>.

본 연구결과에서는 A549 세포에 LPS만 처리한 경우 phospho-Erk1/2 단백질의 생성수준은 감소하였으나, 맥문동의 동시 처리에 의해 증가하는 것이 관찰되었다. 반면에 폐조직에서는 LPS만 처리하였을 경우 phospho-Erk1/2 단백질의 활성이 정상군에 비해 증가하였고, LPS와 맥문동을 함께 처리하였을 경우에는 LPS 단독 처리의 경우보다 감소하는 것으로 나타났다. 이와 같은 차이는 in vitro 실험에서는 LPS의 직접적 세포사멸 작용이 Erk1/2의 발현을 감소시키고, in vivo 실험에서는 침윤된 중성구에 의해 Erk1/2의 활성이 높아져서 나타난 것으로 생각되며, 두 경우 모두 맥문동의 투여가 세포의 생존력을 높이고 염증세포의 침윤을 억제함으로써 Erk1/2의 발현양상을 정상군의 방향으로 유도하는 것으로 사료된다.

대표적 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현에 대하여 RT-PCR을 이용하여 조사한 결과, LPS 처리에 의해 두 염증 사이토카인 mRNA의 생성수준이 증가하였으며 맥문동 처리에 의해 IL-1 $\beta$ 의 유전자 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 맥문동은 LPS 처리에 의해 유도된 염증성 사이토카인의 생성수준을 조절하여 세포의 분화 및 증식에 영향을 미친다고 사료된다.

이상의 결과를 종합해보면 맥문동은 LPS 처리를 통해 만성폐쇄성폐질환과 유사한 병리변화를 유발시킨 폐손상 모델에서 세포의 생존력을 개선시키고, 생존 및 사멸과 관련된 단백질들의 발현을 조절하는 역할을 하며, 염증성 진행을 억제함으로써 폐손상에 대한 보호효과를 나타내어 만성폐쇄성폐질환의 치료약물로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

만성 폐쇄성 폐질환에 대한 맥문동의 효능을 평가하기 위해 LPS로 유도된 A549 세포 손상과 동물모델에서 조직학적인 변화 및 관련된 단백질의 변화를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

맥문동은 A549 세포에서 LPS로 유도된 세포독성을 감소시켰다. 맥문동은 A549 세포에서 LPS로 유도된 caspase 3 단백질 발현의 증가를 억제시켰다. 맥문동은 A549 세포에서 LPS로 유도된 Cdk1, phospho-Erk1/2 단백질 발현의 감소를 억제시켰다. 맥문동은 A549 세포에서 LPS로 유도된 IL-1 $\beta$  유전자 발현의 증가를 억제시켰다. 맥문동은 LPS로 유도된 폐손상 동물모델에서 폐조직의 caspase 3 단백질 발현의 증가를 억제시켰다. 맥문동은 LPS로 유도된 폐손상 동물모델에서 폐조직의 Cdc2, cyclin B1 단백질 발현을 증가시켰고, phospho-Erk1/2 단백질 발현의 증가를 억제시켰다.

## 감사의 글

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

## 참고문헌

1. Buist, A.S., McBurnie, M.A., Vollmer, W.M., Gillespie, S., Burney, P., Mannino, D.M., et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 370(9589):741-750, 2007.
2. 유철규. 만성폐쇄성폐질환의 병인과 병태생리. *대한내과학회지* 77: 383-400, 2009.
3. Curtis, J.L., Freeman, C.M., Hogg, J.C. The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research. *Proc Am Thorac Soc*. 4: 512-521, 2007.
4. Hogg, J.C. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 364: 709-721, 2004.
5. Yanai, M., Sekizawa, K., Ohnishi, T., Sasaki, H., Takishima, T. Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. *J Appl Physiol*. 72: 1016-1023, 1992.
6. 장준. 만성 폐쇄성 폐질환의 약물치료. *결핵 및 호흡기질환* 59(3):231-242, 2005.
7. Martin, T.R. Recognition of bacterial endotoxin in the lungs. *Am J Respir Cell mol Biol*. 23: 128-132, 2000.
8. Shin, J.S. Saponin composition of *Liriope platyphylla* and *Ophiopogon japonicus*. *Korean J Crop Sci*. 47: 236-239, 2002.
9. 전국한의학대학교본초학교실. *本草學*. 서울, 영림사, PP 588-589, 1994.
10. Tomoda, M., Kato, S. Water Soluble carbohydrates of *Ophiopogon tuber*. II, Purification, properties and structures of three oligosaccharides. *Chem Pharm Bull*. 16: 113-116, 1968.
11. Watanabe, Y., Sanada, S., Ida, Y., Shoji, J. Comparative studies on the constituents of *Ophiopogon tuber* and its congeners. III. Studies on the constituents of the subterranean part of *Ophiopogono ohwii* and *O. jaburan* L. *Chem pharm Bull*. 32: 3994-4002, 1984.
12. Lee, D.Y., Son, K.H., Do, J.C., Kang, S.S. The new steroidal saponins from the tuber of *Liriope spicata*. *Arch Pharm Res*. 12: 295-299, 1989
13. Back, N.I., Cho, S.J., Bang, M.H., Lee, I.Z., Park, C.G., Kim, M.S., Kim, K.S., Sung, J.D. pesticide environment chemistry. Cytotoxicity of steroid saponins from the tuber

- of *Liriope platyphylla* W.T. *Agri Chem Biotechnol.* 41: 390-394, 1998.
14. 김지하, 김지은, 이연경, 남소희, 허윤경, 지승완, 김선진, 박다정, 최영환, 황대연. HIT-T15 체장세포의 인슐린분비 촉진을 유도하는 맥문동(*Liriope platyphylla*) 추출물의 효능 및 독성분석. *생명과학회지* 20(7):1027-1033, 2010.
  15. 이숙경, 박종호, 김연태. 맥문동 열수추출물의 항산화력과 항균력에 관한 연구. *한국식품영양학회지* 22(2):279-285, 2009.
  16. 장승은, 김윤범. 소엽맥문동(小葉麥門冬)이 NC/Nga 아토피 모델에 미치는 영향. *한방안이비인후피부과학회지* 21(3):10-19, 2008.
  17. 노성수, 최학주, 김동희, 서영배. NOD 당뇨병 생쥐에 미치는 맥문동의 항염증 효과. *동의생리병리학회지* 22(4):766-770, 2008.
  18. 박시덕, 이금홍, 이영선, 권영규, 박종현, 최선미, 신상우. 보음약인 사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽, 황정의 면역조절 효과 비교. *동의생리병리학회지* 21(2):414-424, 2007.
  19. 강영건, 이태희. 구속 스트레스로 유발된 기억 손상에 대한 맥문동(麥門冬)의 신경보호 효능. *대한본초학회지* 21(2):63-75, 2006.
  20. 정해준, 정희재, 정승기, 이형구. 맥문동(麥門冬)이 천식유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. *대한한방성인병학회지* 10(1):1-20, 2005.
  21. 임정교, 강명수, 박인경, 김순동. 맥문동 물 추출물의 식이가 Streptozotocin으로 유도한 당뇨 흰쥐의 혈당과 혈청 콜레스테롤 함량에 미치는 영향. *동아시아식생활학회지* 15(1):20-28, 2005.
  22. 이병삼, 이형구, 정승기, 정희재. 맥문동(麥門冬)이 C57BL/6J 생쥐의 Bleomycin 폐섬유화(肺纖維化)에 미치는 영향(影響). *대한한방내과학회지* 25(4):93-104, 2004.
  23. 전성하, 백은기, 홍의실, 박지윤, 한지완, 임영남, 고호연, 김동우, 전창용, 박종형, 한양희. 맥문동이 생쥐의 기아 스트레스에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 25(1):1-15, 2004.
  24. 안지윤, 이인자. 맥문동 열수추출물의 사염화탄소로 유발된 흰쥐의 간 손상에 대한 보호효과. *생약학회지* 23(2):166-171, 2003.
  25. 김은정, 정성훈, 양준호, 이인선, 이인자. 맥문동 엑스가 고콜레스테롤 식이를 급여한 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. *생약학회지* 34(1):65-69, 2003.
  26. 정해준, 정희재, 정승기, 이형구. 맥문동청폐음과 맥문동이 인간기관지 상피세포의 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. *대한한의학회지* 23(1):11-23, 2002.
  27. 조성지, 방면호, 이인자, 박창기, 김무성, 김금숙, 성재덕, 백남인. 맥문동 (*Liriope platyphylla* W. T.) 스테로이드 사포닌의 항암활성. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 41(5):390-394, 1998.
  28. Lee, D.J. The effects of *Lonicera japonica* on the murine model of Chronic obstructive pulmonary disease. *경희대학교박사학위논문*. 2009.
  29. 오지석, 박양춘. 加味八味丸의 elastase 유도성 A549 세포사멸에 대한 보호효과. *대한한의학회지* 31(2):137-148, 2010.
  30. 윤종만, 박양춘. Elastase 매개성 폐조직 손상에 대한 선편정 천탕의 보호효과. *대한한방내과학회지* 31(1):84-101, 2010.
  31. Kawakami, M., Matsuo, Y., Yoshiura, K., Nagase, T., Yamashita, N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biol Pharm Bull.* 31: 1434-1438, 2008.
  32. Nakajoh, M., Fukushima, T., Suzuki, T., Yamaya, M., Nakayama, K., Sekizawa, K., Sasaki, H. Retinoic acid inhibits elastase-induced injury in human lung epithelial cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 28: 296-304, 2003.
  33. 전국한외과대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울, 한문회사, PP 335-346, 2002.
  34. Nakajoh, M., Fukushima, T., Suzuki, T., Yamaya, M., Nakayama, K., Sekizawa, K., Sasaki, H. Retinoic acid inhibits elastase-induced injury in human lung epithelial cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 28: 296-304, 2003.
  35. Grütter, M.G. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* 10: 649-655, 2000.
  36. Uhal, B.D. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol.* 272: L1031-1045, 1997.
  37. Draetta, G., Beach, D. The mammalian cdc2 protein kinase: mechanisms of regulation during the cell cycle. *J Cell Sci Suppl.* 12: 21-27, 1989.
  38. Draetta, G. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. *Trends Biochem Sci.* 15: 378-383, 1990.
  39. Nigg, E.A., Krek, W., Peter, M. Vertebrate cdc2 kinase: its regulation by phosphorylation and its mitotic targets. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 56: 539-547, 1991.
  40. Segal, R.A., Greenberg, M.E. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* 19: 463-489, 1996.
  41. Weston, C.R., Davis, R.J. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev.* 12: 14-21, 2002.
  42. Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med.* 74: 589-607, 1996.
  43. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 270: 1326-1331, 1995.
  44. Flaherty, D.M., Hinde, S.L., Monick, M.M., Powers, L.S., Bradford, M.A., Yarovinsky, T., Hunninghake, G.W. Adenovirus vectors activate survival pathways in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(2):L393-401, 2004.



45. 김용현, 윤형규, 김치홍, 안중현, 권순석, 김영균, 김관형, 문화식, 박성학, 송정섭, 조정숙. 담배 연기에 의한 Muc5ac 유전자 발현에 관여하는 세포 내 신호 전달 경로로서의 ERK1/2와 p38 MAPK. 결핵 및 호흡기질환. 58(6):590-599, 2005.
46. Katrin Schuha, Andreas Pahl. Inhibition of the MAP kinase ERK protects from lipopolysaccharide-induced lung injury. *Biochemical Pharmacology* 77(12):1827-1834, 2009.