



미세먼지 유도 기도염증에 대한 배암차즈기 추출물의 호흡기 보호 효과

송형우* · 지건영* · 김복규** · 양원경** · 한창균*** · 신한재**** · 박양춘***** · 황지숙***** · 강형식* · 김승형**†

*전남대학교 생물과학·생명기술학부, **대전대학교 동서생명과학연구원, ***KT&G 중앙연구원,
****KGC 중앙연구원, *****대전대학교 폐계내과학교실

Respiratory Protective Effect of *Salvia plebeia* R. Br. Extracts against Ambient Particulate Matter-induced Airway Inflammation

Hyeongwoo Song*, Kon Young Ji*, Bok Kyu Kim**, Won Kyung Yang**, Chang Kyun Han***, Han Jae Shin****, Yang Chun Park*****, Ji Sook Hwang*****, Hyung Sik Kang* and Seung Hyung Kim**†

*School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea.

**Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, Daejeon 34520, Korea.

***KT&G Research Institute, Daejeon 34128, Korea.

****KGC Research Institute, Daejeon 34128, Korea.

*****Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine, Daejeon University, Daejeon 34520, Korea.

ABSTRACT

Background: Small particles increase airway inflammation upon reaching the alveoli. Here, we investigated the protective or therapeutic effects of *Salvia plebeia* R. Br. (SP_R) extracts on airway inflammation.

Methods and Results: To investigate the anti-inflammatory activity of SP_R extracts, we measured their inhibitory effect on the production of reactive oxygen species (ROS) expression of inflammatory mediators, and immune cell infiltration in MH-S alveolar macrophage cells and in the ambient particulate matter (APM)-exposed airway inflammation mice model. The SP_R extracts inhibited the production of ROS and expression of IL-4, IL-10, IL-15, and IL-17A mRNA in APM-stimulated MH-S cells. Oral administration of SP_R extracts suppressed APM-induced inflammatory symptoms, such as high alveolar wall thickness, excess collagen fibers, decreased mRNA expression of chemokines (*Ccr9*, *Ccl5*, *Ccr3*), inflammatory cytokines (IL-15, TNF- α), and IL-4 Th2 cytokine in the lung. The SP_R extracts also inhibited ROS production, granulocyte (CD11b⁺Gr-1⁺) infiltration, IL-17A, TNF- α , macrophage inflammatory protein (*Mip-2*), and chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (*Cxcl-1*) production in the airway. The specific compounds in the SR-R extracts that mediate the anti-inflammatory effects were identified.

Conclusions: In this study, SP_R extracts effectively inhibited airway inflammatory responses, such as ROS production and granulocyte infiltration into the airway, by regulating the expression of chemokines and inflammatory cytokines.

Key Words: *Salvia plebeia* R. Br., Airway Inflammation, Ambient Particulate Matter, Chemokine, Reactive Oxygen Species

서 언

미세먼지는 아주 작은 물질로 직경 10 μ m 이하의 입자상 물질을 말한다. 자동차 매연이나 공업에 의한 화학 유독물질, 중금속 등이 주요 원인으로 입자가 매우 작아 기도와 폐포에 도

달하여 염증을 유도한다. 기도의 염증은 흉부고협감 (chest tightness), 천명, 기침 등의 증상을 유발한다. 많은 수의 호흡기 관련 질병이 기도의 염증과 관련이 있다 (Doering and Solway, 2013).

일반적으로 기도의 염증이 일어나게 되면 폐포세척액의 과

†Corresponding author: (Phone) +82-42-280-2642 (E-mail) sksh518@dju.kr

Received 2017 August 18 / 1st Revised 2017 September 6 / 2nd Revised 2017 September 28 / 3rd Revised 2017 October 16 / Accepted 2017 October 16

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

림구와 림프구의 절대 총 세포 수가 증가하고 기도과 폐포로 침윤을 한다. 또한 호산구, Th2 세포, 비만세포 등 염증 세포에서 분비된 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-6, IL-13, IL-33 등의 염증성 사이토카인은 점액세포의 크기 비대, 점액의 양을 증가시켜 염증 반응을 유도한다 (Ghio *et al.*, 2012; Barnes, 1994; Nials and Uddin, 2008).

염증에 관여하는 것으로 알려진 과립구 중 호산구는 항원에 의해 기도가 반응을 하면 Th2 세포에서 T 세포의 생산을 돕고, 비만 세포에서 분비된 Th2 사이토카인 IL-5와 eotaxin이 호산구의 생산 및 활성화를 돕는다.

Chemokine (C-C motif) receptor 3 (*Ccr3*) 유전자가 발현하는 호산구는 폐에서 점증되며 기도에 도달했을 때 과립단백질을 방출하여 면역반응을 하게 된다. 수지상세포, 호산구 및 대식세포는 chemokine (C-C motif) ligand 25 (*Ccl25*)와 특이적으로 결합하는 chemokine (C-C motif) receptor 9 (*Ccr9*) 유전자 발현을 증가시킴으로써 기도 sensitization의 초기 과정 및 염증세포 침윤 등의 기도 염증 반응을 유도하며, 이들 세포에서의 *Ccr9*의 유전자 발현은 Th2 사이토카인 IL-4의 조절에 의해 증가하게 된다 (López-Pacheco *et al.*, 2016).

미세먼지의 흡입은 기관지의 염증을 불러일으키며 이러한 염증이 지속되었을 때, 만성기관지염, 천식, 알러지성 폐포염 등을 초래한다 (Bohadana *et al.*, 2000). 미세먼지로 인한 질환 중 대표적인 만성폐쇄성폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)은 비정상적인 염증 반응으로 인해 폐 조직의 기능 저하가 일어나고 호흡곤란을 겪게 되는 질환이다. 미세먼지에 의한 질병은 폐질환 뿐만 아니라 뇌졸중, 치매, 동맥경화, 고혈압, 혈액순환 장애 등 다양한 질병을 유발 혹은 악화시킬 위험이 크다 (Fuks *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2015; Korzh *et al.*, 1993; Peters *et al.*, 2013). 특히 미세먼지 성분 중 디젤배기가스 (diesel exhaust particles, DEPs)가 IL-17A 분비량을 증가 시켜 기관지 천식을 악화시킨다 (Brandt *et al.*, 2013).

최근 DEPs에 노출된 사람들에서 IgE 생산량과 Th2/Th17 사이토카인을 증가시켜 알레르기 염증을 유도하는 원일물질이라고 발표하였다 (Yang *et al.*, 2014). 그러나 미세먼지에 대한 직접적인 치료 약물에 대한 연구는 아직까지 잘 이뤄지고 있지 않기 때문에 미세먼지에 의한 신체손상을 직접적으로 완화 할 수 있는 대책이 시급하다.

꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 일년생 또는 이년생 식립초목인 배암차즈기 (*Salvia plebeia* R. Br., 이하 영문약어 SP_R)는 우리나라 산간지역에서 자생하며, 아시아에서는 예로부터 간염, 독감, 감기 등의 치료를 위한 약초로 사용을 한 기록이 있다 (Choi *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2011; Lu and Foo, 2002). 기존에 배암차즈기는 기관지 항염증 작용 (Jang *et al.*,

2016), 항산화 작용, 간 보호 (Gu and Weng, 2001), 아토피 개선 효과 (Choi *et al.*, 2014)가 있는 것으로 보고되었다.

배암차즈기의 주요 성분으로 폴리페놀류 화합물 중 phenolic acid인 rosmarinic acid와 flavonoid계 화합물인 luteolin, nepetin, hispidulin, 그리고 saponin, 강심배당체, 불포화 스테롤, 정유 등이 있으며 종자의 지방유등이 보고되어 있다 (Gu and Weng, 2001; Kim *et al.*, 2014). 이 중 rosmarinic acids는 알레르기성 질환 (Liang *et al.*, 2016) 및 호산구성 기도염증에 개선효과 (Costa *et al.*, 2012)가 보고되었고 luteolin은 알레르기성 천식 및 비염 억제효과 (Jang *et al.*, 2017), 항염증 (Choi *et al.*, 2015) 및 간보호작용 (Lee *et al.*, 2011)이 보고되었다. Nepetin은 항균작용 (Talib *et al.*, 2012)이 알려져 있고, 또한 hispidulin 이라는 성분은 항염작용 (Yin *et al.*, 2008), 항혈전제 및 항진균제와 같은 효과와 AMPK (AMP-activated kinase)를 활성화시키는 연구가 보고되었다 (Yang *et al.*, 2010).

최근 우리의 대기환경은 황사, PM10, PM2.5 및 극미세먼지를 포함하는 대기오염물질과 최근 그 응용범위가 급격히 확산되고 있는 산업용 나노파티클이 인체에 노출되고 있다. 이러한 미세먼지 및 미세먼지에 함유된 유해화학물질은 산화적 스트레스 및 염증반응 등 기관지 염증기전을 통해 인체에 유해한 영향을 초래한다는 것이 알려져 있다 (Kyung *et al.*, 2015). 그러나, 미세먼지에 관한 기관지염의 발생에 대한 뚜렷한 대책이 없는 상황이기 때문에 미세먼지를 흡입했을 때 호흡기를 보호할 수 있는 천연물질에 대해 관심이 높아지고 있다. 따라서 본 연구에서는 기관지 염증 치료효과에 관한 연구가 아직까지 보고된 바가 없는 천연물 자원인 배암차즈기 추출물을 대상으로 호흡기 염증 개선 효과를 확인하고자 하였다. 이를 위해 마우스 MH-S 대식세포주에 미세먼지 (APM)로 산화적 스트레스를 유도하였고 배암차즈기 추출물에 의한 활성산소종 (ROS) 및 염증사이토카인 발현 억제효과를 관찰하였고, 또한 미세먼지로 유도된 호흡기 손상 마우스모델을 통하여 호흡기 염증개선효과도 검증하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

실험에 사용한 acetonitrile, ethyl alcohol, methyl alcohol은 Merck Millipore (Billerica, MA, USA)에서, dimethyl sulfoxide (DMSO), formalin solution, phosphate buffered saline (PBS), hispidulin, luteolin, rosmarinic acid, nepetin, montelukast, 2-7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA), aluminium hydroxide는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin-

amphotericin 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, Mip-2 (DY452-05)와 Cxcl-1 (DY453-05)는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)에서 구매하여 사용하였다.

2. 배암차즈기 분리 및 제조

우리가 사용한 배암차즈기 (*Salvia plebeia* R. Br.)는 추출물 및 유효성분 분석을 위해 2014 또는 2015년 4월에 수확해서 지상부를 세척 및 건조한 시료를 부안동진농장 (전라북도 부안군 동진면 지비길 38-1)으로부터 구입하여 지상부 500 g을 고루 섞은 후 3 차 증류수에 희석하여 제조한 30% 주정 (식품추출원료 사용 시 안전성검사를 하지 않아도 되는 추출법) 10 l 이용해서 80°C에서 2.5 시간동안 열탕 추출하였다. 여액을 모은 후 잔사는 동일한 방법으로 재추출 하여 그 여액을 합하여 45°C에서 배암차즈기 추출물이 건조될 때까지 감압 농축하였다. 이후 2 l의 증류수를 가해 현탁시킨 후 동결 건조하여 분말상태로 제조하였다 (Shin *et al.*, 2016). 배암차즈기 추출물은 초저온냉동고 (-84°C)에 보관 (표분시료: SP_R-70MeOH)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

3. 배암차즈기 HPLC 분석

HPLC 분석을 위한 acetonitrile과 water는 HPLC용 특급용매로, trifluoroacetic acid (TFA)는 분석용 등급의 용매로 Merck Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. Hispidulin (SML0582), luteolin (L9283), 그리고 rosmarinic acid (536954)등 표준품들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, 또한 nepetin (ASB-00005380-005)은 ChromaDex (Irvine, CA, USA)사에서 구입하여 사용하였다. HPLC 분석은 waters 2695 및 996 photodiode array detector에 의하여 수행하였다.

배암차즈기 추출물을 20 mg/ml로 70% 메탄올에 용해한 후, PVDF syringe filter를 사용하여 여과한 후 분석에 사용하였다. Optima pak C₁₈ column (5 μm, 4.6 mm × 250 mm)을 사용하여 수행되었으며, 칼럼의 온도는 40°C로 유지하였고, 검출은 PDA detector를 사용하였다. 이동상은 acetonitrile (A) 및 0.1% TFA 함유 water (B)를 이용한 gradient system (0 min, 10% A; 10 min, 10% A; 50 min, 50% A; 52 min, 100% A; 62 min, 100% A; 65 min, 10% A; 75 min, 10% A)으로 최적화 하였고, 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 20 μl로 하였다.

4. 미세먼지혼합물 (ambient particulate matter) 제조

미세먼지는 여러 가지 복잡한 성분을 가진 대기 중 부유 물질인데, 그 중 미세먼지의 구성성분인 석탄연소물 (coal)은 5 g의 석탄을 700°C의 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 용액을사용해서 10 mg TPM/ml로 농도로 추출해서 석탄 연소물실험에 사용하였다. 제조된 석탄연소물은 KT&G 중앙연구원에서 공급하였고, 플라이애쉬 (fly ash)는 일본 JIS type-II fly ash (Yoshitaka, 2007)를 제공받아 사용하였으며, 각각을 디젤연소분진 (DEP) (Lim and Kim, 2009)과 혼합하여 미세먼지 혼합물을 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 혼합물 (ambient particulate matter, APM)을 제조하였다.

5. Cell culture

MH-S murine alveolar macrophage cell line (ATCC, Rockville, MD, USA)는 RPMI 1640 medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)과 1% antibiotics (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 첨가하여 사용하였고, 항온 (37°C)과 습도를 유지하는 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

6. MTS cell proliferation assay

MH-S alveolar macrophage cell을 96 well plate에 well당 2 × 10⁴ cell이 되도록 분주하여 배양하였다. 미세먼지 (25, 50, 100, 200 μg/ml)와 배암차즈기 추출물 (25, 50, 100, 200, 400 μg/ml)을 농도별로 처리하여 24 시간 배양한 다음 MTS tetrazolium salt와 electron coupling reagent (phenazine methosulfate, PMS)를 20:1의 비율로 섞어 각 well당 MTS + PMS 용액 50 μl 와 RPMI 1640 media 50 μl 를 혼합하여 100 μl 씩 분주하였다. 37°C에서 4 시간 배양한 후 차광 반응으로 plate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. DCF-DA cellular reactive oxygen species detection assay

MH-S 세포를 분리하여 5 × 10⁵ cell을 FACS tube에 분주하고 FACS buffer로 2 회 세척한 다음, DCF-DA 용액을 각

Table 1. Mouse oligonucleotide primer sequence.

Genes symbol	Primer/ Probe	Sequence	mRNA targets
Ccr9	Forward	5'-ATTGCACAAGAGTGAAGACC-3'	Ccr9
	Reverse	5'-GTCAACAGCCTGCACTACAA-3'	
Ccl5	Forward	5'-TACACCAGTGGCAAGTGCTC-3'	Ccr5
	Reverse	5'-TGTACTCCCGAACCCATTTTC-3'	
Ccr3	Forward	5'-CCCCAACTGTGACTTTTGCT-3'	Ccr3
	Reverse	5'-CCTCTGGATAGCGAGGACTG-3'	
Il4	Forward	5'-GGATGTAACGACAGCCCTCT-3'	IL-4
	Reverse	5'-GTGTTCCCTTGTGGCCGTAAG-3'	
Il10	Forward	5'-AAGCAGCCTTGCAGAAAAGA-3'	IL-10
	Reverse	5'-TGGGAAGTGGGTGCAGTTAT-3'	
Il15	Forward	5'-CATCCATCTCGTCTACTTGTGTT-3'	IL-15
	Reverse	5'-CATCTATCCAGTTGGCCTCTGTTT-3'	
Il17a	Forward	5'-TCTCATCCAGCAAGAGATCC-3'	IL-17A
	Reverse	5'-AGTTTGGGACCCCTTTACAC-3'	
Tnf	Forward	5'-GGCTTCCGAATTCCTGGAGCCT-3'	TNF- α
	Reverse	5'-CCCCGGCCTTCCAATAAATACATTCATA-3'	
Gapdh	Probe_VIC	5'-TGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAG-3'	GAPDH

tube당 10 μ M의 농도로 분주하여 세포를 현탁하였다. 37°C 암실에서 30 분간 staining한 후 FACSCalibur™ flow cytometry system (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 분석하였다.

8. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR)

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 2 시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 2 x SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), 200 nM primers, Rox dye를 넣은 후 각 cycle은 95°C 15 sec, 55°C 15 sec, 72°C 15 sec의 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 비교분석하였다 (Table 1).

9. Histopathology

기관지 삽입에 의한 기도세척 (airway lamina washing)을 통해 마우스의 기도세척액 (airway lavage)으로부터 기관지폐포세척액 (bronchoalveolar lavage fluid, BAL fluid)을 분리한 다음, 분리한 BAL fluid를 cytospin에 넣어 슬라이드 도말

한 후 Diff-quick 용액으로 염색하여 neutrophils의 감별을 실시하였다. 동물로부터 분리한 폐 조직은 10% 포르말린 용액에 고정하여 sucrose를 이용해 탈수과정을 거친 후 hematoxylin과 eosin 용액을 이용하여 염색한 다음 조직병리학적 검사를 실시하였다. 다른 section은 Masson's trichrome 용액 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 염색한 후 light microscopy를 이용하여 교원섬유의 감별을 실시하였다.

10. Flow cytometric analysis

세포의 차이를 분석하기 위하여 각 샘플은 staining solution (PBS containing 1% FBS and 0.01% NaN₃)에서 정해진 antibody를 이용하여 10 분간 염색한 다음 FACSCalibur flow cytometry system (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 유세포 분석을 하였다. 결과는 CellQuest software (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 세포를 분석하였고, 분석한 세포 수와 백분율을 이용해 총 세포 수를 구하였다. 유세포 분석을 위한 antibody는 BD Pharmingen (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였다.

11. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

단백질의 생성정도를 측정하기 위해 ELISA를 이용하여 분석하였다. IL-17A (M17AFO), TNF- α (MTA00B), Mip-2 (MM200), 그리고 Cxcl-1 (MKC00B) 단백질량을 BAL fluid에서 ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 시행하였다.

먼저, coating antibody를 microplate에 100 μ l 씩 분주하고

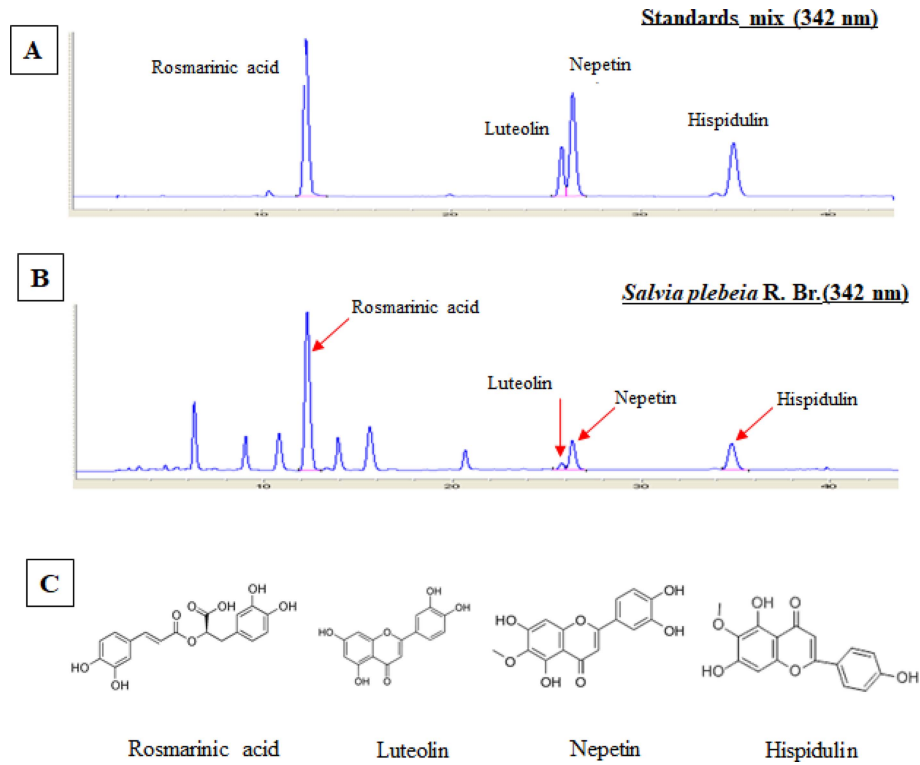


Fig. 1. Chromatogram and structure of four compounds purified from *S. Plebera* R. Br. (SP_R). A; HPLC of four compound standard, B; active ingredients of SP_R extracts were analyzed by HPLC, C; structural formula of four indicative compounds.

4°C에서 24 시간 반응시켰다. 각 well을 wash buffer로 세 번 세척하고 assay diluent를 200 μ l 씩 넣어서 1 시간 동안 실온에서 배양하였다. 배양하는 동안 표준품과 상등액을 준비하고 완료되면 microplate를 세 번 세척한 후 각 표준품과 상등액을 100 μ l 씩 넣고 2 시간 동안 실온에서 배양하였다. Microplate를 세 번 세척하고 detection antibody를 만들어서 각 well에 100 μ l 씩 넣고 실온에서 배양하였다. 1 시간 후, microplate를 다섯 번 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 μ l 씩 넣고 30 분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. Stop solution을 각 well에 넣고 microplate spectrophotometer를 이용하여 흡광도 450 nm로 측정하였다.

12. 호흡기 손상 동물 모델 제작

본 연구는 수컷 C57BL/6J 마우스 (20-22 g, 대한바이오, 음성)를 실험 기간 동안 평균 온도 23 \pm 2°C, 습도 50 \pm 2%로 유지하였으며, 밤낮 주기 (12 시간 light/12 시간 dark, light turn on 9 am)가 조절되는 환경에 수용하였다. 실험 기간 동안 물과 고형사료는 자유롭게 섭취할 수 있도록 제공하였다. 호흡기 손상 미세먼지는 석탄연소물인 coal과 fly ash, diesel exhaust particles (DEP)를 섞은 4 mg/kg 미세먼지혼합물

(APM)을 aluminium hydroxide (alum)에 희석시켜 intranasal-trachea (INT) injection 방법을 이용하여 기도를 통해 폐로 직접 주입하는 동물모델을 제작하였다.

배암차즈기 추출물 (식품으로 안전한 농도인 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg) (Choi *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016)과 양성대조군 montelukast (10 mg/kg)를 각각 10 일 간 투여하였고 투여시작일로부터 3 일 후, 6 일 후에 미세먼지혼합물을 주입하였다.

13. 통계분석

실험 집단 간 수치 데이터는 각 실험군 결과값 mean \pm standard error (SEM)로 나타내었으며, 동물실험에서는 SPSS 11.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 일원배치 분산분석 (One-way analysis of variance, ANOVA) 후에 Duncan's Multiple Comparison Tests (DMRT)로 유의성을 검증하였고, 세포실험에서는 독립표본 T-검정 (independent samples *t*-test)을 이용하여 유의성을 검증하였다. *p* 값이 0.05, 0.01 혹은 0.001 보다 작은 경우를 구분하여 분석하였으며, 각 경우에 해당 시 통계적으로 유의적 차이가 있는 것으로 판정하였다.

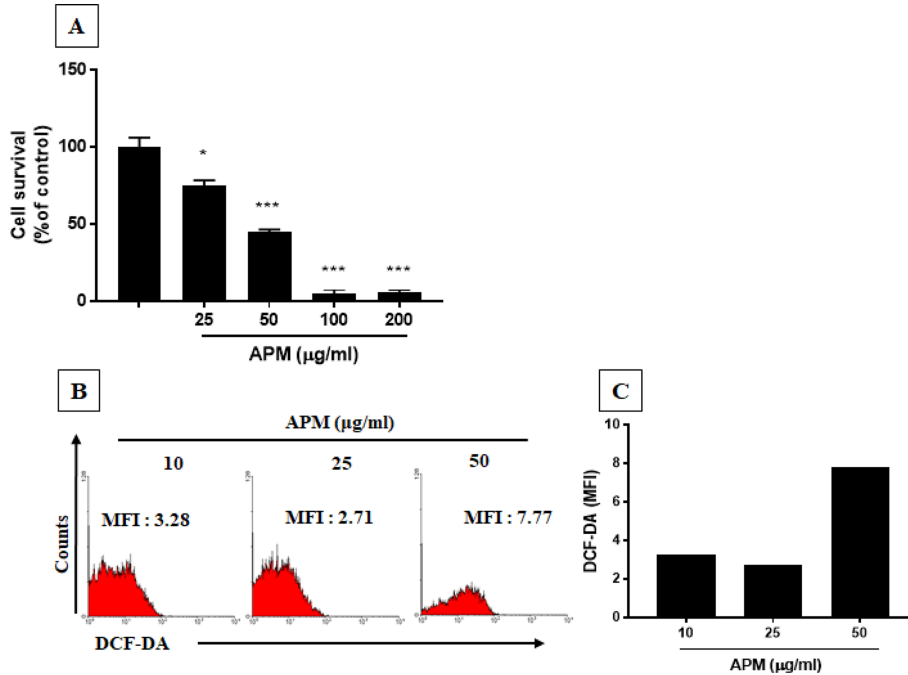


Fig. 2. The determination of optimal concentration of APM in MH-S alveolar macrophage cells. The cell survival A and ROS levels B of MH-S cells stimulated with APM (ambient particulate matter) were analyzed by MTS assay and flow cytometry C and appeared graph. The 50 $\mu\text{g/ml}$ of APM was suitable concentration for *in vitro*. Data are shown as means \pm SEM. Significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$). difference between value for control cells and the APM-stimulated cells.

결 과

1. 항염증 효과를 가진 배암차즈기 추출물의 HPLC 분석

본 연구에서 이용한 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 추출물의 지표성분 분석을 위해 표준품과 함께 배암차즈기 추출물을 HPLC로 분석한 결과, 배암차즈기 추출물에서 rosmarinic acid (69.86 mg/g), luteolin (1.72 mg/g), nepetin (8.26 mg/g), hispidulin (7.56 mg/g)의 성분함량을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

2. *In vitro* 실험을 위한 미세먼지의 처리 농도 결정

폐의 대식세포인 MH-S 세포주를 통하여 배암차즈기 추출물의 항염증 효능을 분석하고 *in vitro* 실험의 적정 투여량을 설정하기 위하여 우선 미세먼지의 처리 농도를 결정하였다. 미세먼지 (APM)를 농도별 (25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) 로 처리한 후 MTS assay를 통해 세포생존율을 관찰한 결과, 미세먼지 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리농도에서는 세포독성에 의해 거의 모든 세포가 death되었고 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리농도 이하에서 50% 이상 세포생존율이 관찰되었다 (Fig. 2A). *In vitro*에서 미세먼지 (APM)에 의한 MH-S 세포주의 산화적 스트레스 (oxidative stress) 유도는 DCF-DA staining법으로 측정된 ROS의 생산량이 극대화되는 미세먼지 농도를 관찰하였고, 그 결과 50 $\mu\text{g/ml}$

처리농도에서 25 $\mu\text{g/ml}$ 이하 처리농도 보다도 2 배 이상 ROS 생산량이 증가되는 것을 관찰하였다 (Fig. 2B와 2C). 즉, 미세먼지 처리에 의한 세포생존율은 농도 의존적으로 감소하였으며 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 95% 이상의 감소 수준을 보였다. 그러므로 약 50%의 세포생존율을 보이면서 ROS 생산량이 가장 높은 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 다음 실험을 위한 미세먼지의 처리 농도 값으로 선정하였다.

3. MH-S 세포에서 배암차즈기 추출물 처리에 따른 세포 증식능력과 미세먼지 자극 후 ROS 생성량 분석

배암차즈기 추출물의 적절한 처리 농도를 관찰하기 위하여 MTS assay를 통해 세포의 증식에 영향을 끼치는지 관찰한 결과 배암차즈기 추출물을 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 MH-S 세포의 세포 증식 능력이 증가함을 확인할 수 있었고, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리농도에서는 세포독성이 관찰되었다 (Fig. 3A). 이를 토대로, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 미세먼지를 처리한 MH-S 세포에 배암차즈기 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과, 미세먼지에 의해 증가된 ROS의 생성량이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3B). 또한 염증 사이토카인으로 알려진 IL-4, IL-15, IL-17A와 함께 호중구에서 분비되는 IL-10 (Tosello *et al.*, 2012)의 유

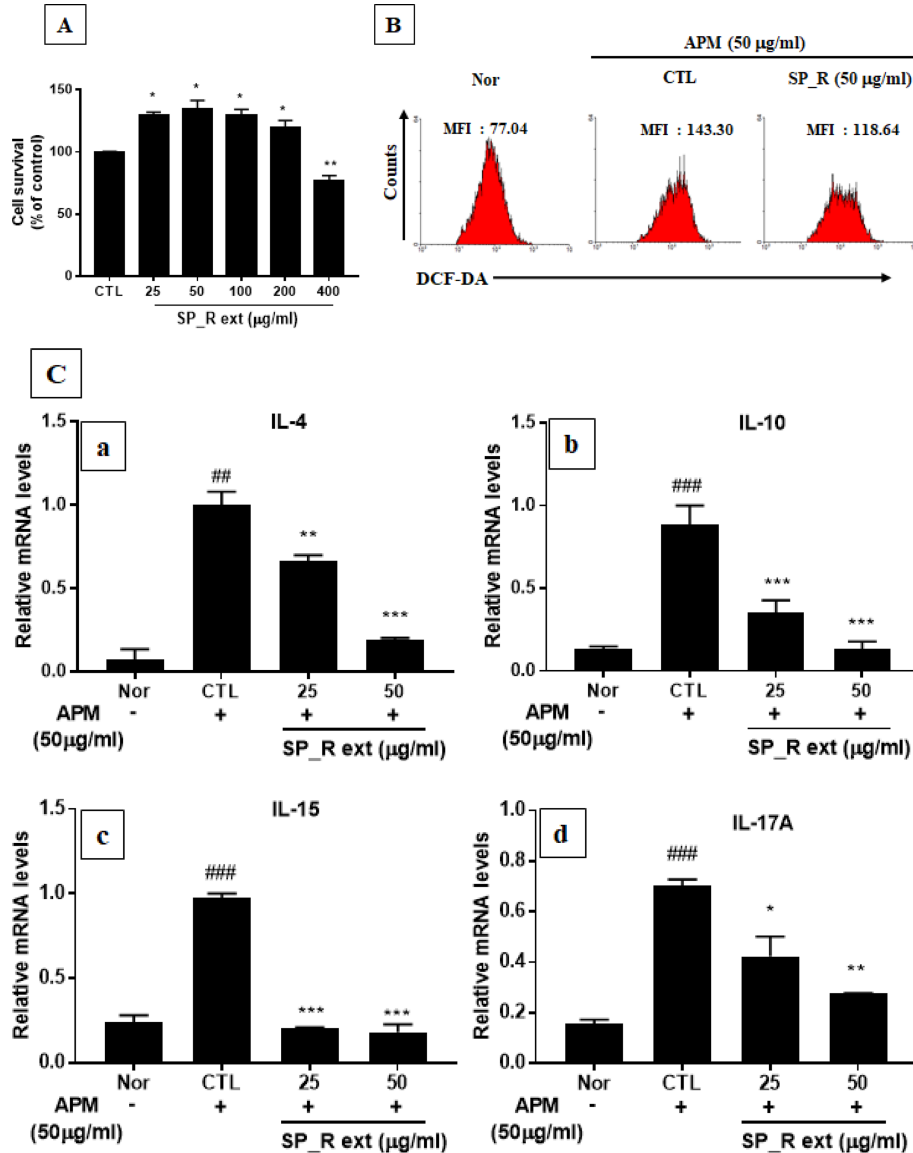


Fig. 3. The determination of optimal concentration of the *Salvia plebeian* R. Br. (SP_R) in MH-S alveolar macrophage cells. A; the cell survival of MH-S cells was measured by MTS assay after treatment of SP_R extracts indicated concentration. The 50 µg/ml of SP_R extracts was suitable concentration for *in vitro*. B; the MH-S cells were treated with SP_R extracts after stimulation of APM (ambient particulate matter), C; the reduced expression of IL-4 mRNA (a), IL-10 mRNA (b), IL-15 mRNA (c), IL-17A mRNA (d) by the SP_R extracts in MH-S cells stimulated with APM using real-time PCR analysis. The production of ROS in MH-S cells were analyzed by flow cytometry after staining with DCF-DA. Data are shown as mean ± SEM. ##*p* < 0.005, ###*p* < 0.0005 vs Nor; **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001. vs CTL.

전자 발현 변화를 확인한 결과, 미세먼지에 의해 염증 사이토카인들의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었으며, 배암차즈기 추출물의 농도별 처리에 의해 염증 사이토카인들의 발현이 유의적으로 감소됨을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 3C).

4. 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델에서 배암차즈기 추출물의 처리에 의한 호흡기 염증 증상 개선

10 일간 미세먼지의 기관지 주입과 함께 배암차즈기 추출물을 매일 경구 투여하여 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환

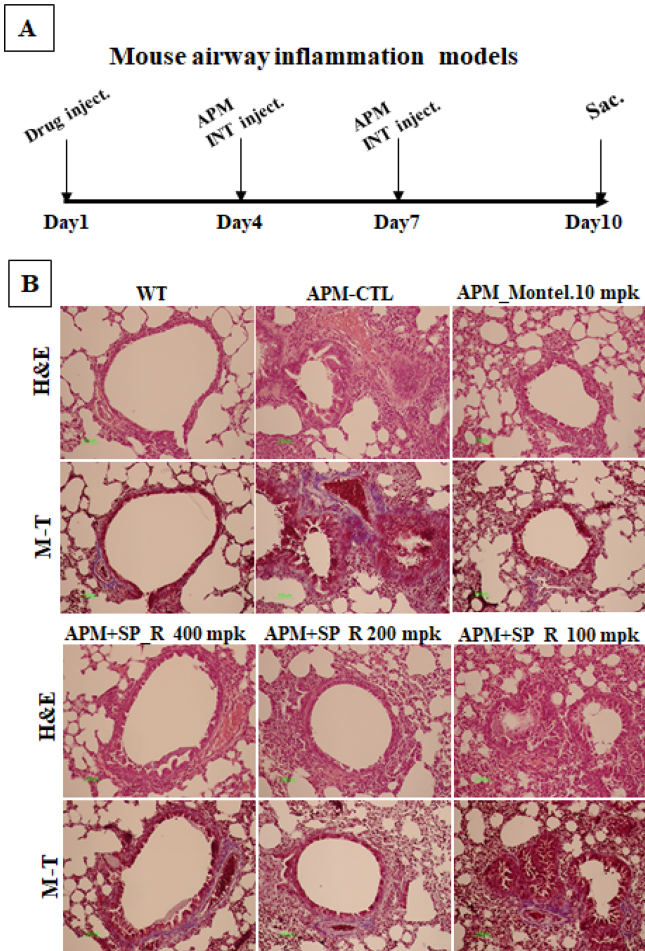


Fig. 4. Experimental schedule to make APM induced mice model and Histopathology. A; mice were treated with the SP_R extracts (400 mg/kg, 200 mg/kg, 100 mg/kg) and montelukast 10 mg/kg daily for 10 days and intra-nasal trachea injected with 4 mg/kg APM (ambient particulate matter) at day 4 and day 7. At day 10, mice were sacrificed. B; the thickness of alveolar wall and detection of collagen fibers in lung tissue was measured by H&E (hematoxylin and eosin) staining and M-T (Masson's trichrome) staining assay, respectively (WT; Balb/c Normal, APM-CTL; APM control, APM + Montel; APM induced and orally administration montelukast, APM + SP_R; APM induced and orally administration SP_R extracts. Lung tissue were observed using a visible-light microscope at a magnification of 200 x (green color bar; 100 μ m). mpk; mg/kg, WT; Wild type.

마우스 모델에서 배암차즈기 추출물의 호흡기 염증 증상의 개선 효과를 관찰하였다. H&E 염색법을 통하여 폐조직의 단면을 검사함으로써 호흡기 염증 증상을 확인하고 M-T 염색법을 통하여 교원 섬유양의 양을 측정하였다. 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델의 폐 세포 조직을 관찰한 결과 폐 세포의 벽이 두꺼워지는 것을 확인하였으며, 교원 섬유양 증가함을 확인하였다. 이러한 염증 증상은 배암차즈기 추출물

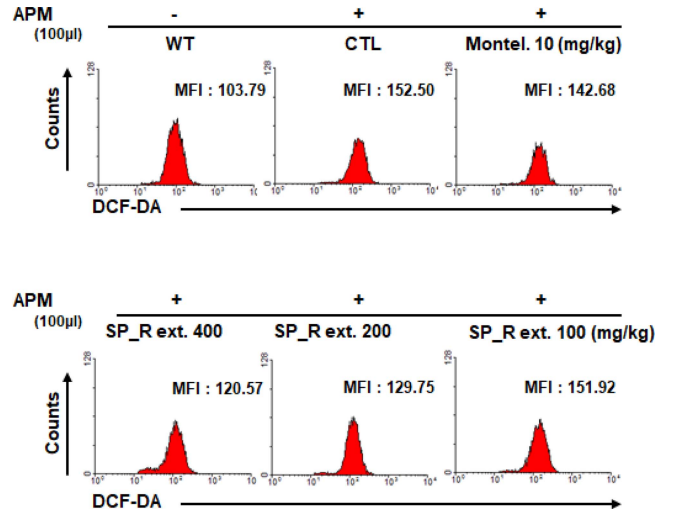


Fig. 5. The reduced production of ROS by the *Salvia plebeian* R. Br. (SP_R) extracts in BAL fluid of APM-induced mice models. The ROS production of BAL fluid was analyzed by flow cytometry after staining with DCF-DA. The extracts of SP_R reduced the ROS production in BAL fluid. APM; Ambient particulate matter, WT; Wild type.

을 경구 투여한 마우스 그룹에서 폐 세포의 벽 및 교원 섬유양 정상군 수준으로 회복되는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 4).

5. 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델의 기관지 폐포세척액에서 ROS 생성량 분석

미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델의 기관지 폐포세척액에서 ROS 생성량을 관찰하기 위해, DCF-DA로 염색한 BAL fluid를 유세포 분석기를 이용하여 분석한 결과, 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 그룹의 BAL fluid에서 ROS의 생성량이 증가됨을 확인하였으며, 증가된 ROS의 생성량은 100, 200, 400 mg/kg의 농도에서 배암차즈기 추출물의 경구 투여에 의해 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다. 또한 양성대조군인 montelukast을 투여한 그룹의 BAL fluid에서도 미세먼지에 의해 증가된 ROS 생성량을 감소시킴을 확인하였다. 따라서 배암차즈기 추출물이 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환에서 미세먼지에 의해 증가된 염증 수준을 회복시킴을 알 수 있었다 (Fig. 5).

6. 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델에서 총 세포수와 과립구의 population 조사

마우스의 BAL 세포와 폐 세포의 총 세포 수를 관찰한 결과 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 그룹에서 BAL 및 폐의 전체 세포 수가 증가하였으며, 증가된 BAL 및 폐의 전체 세포 수가 배암차즈기 추출물을 경구 투여한 마우스 그룹에서 농도별로 감소됨을 확인 할 수 있었다. 또한 BAL 세포에서 호중구 수를 확인하기 위해 Diff-Quik 염색을

기도염증에 대한 배암차즈기 추출물의 호흡기 보호 효과

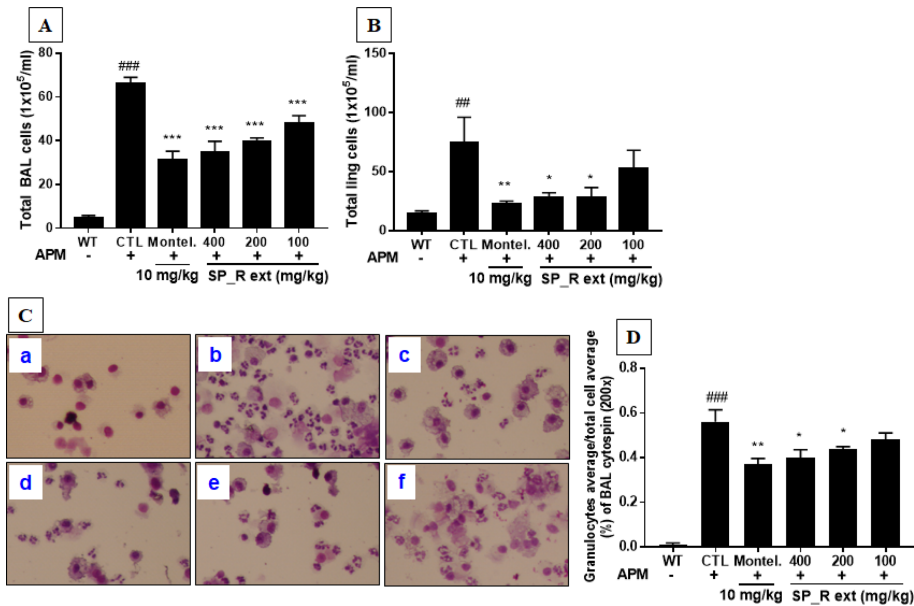


Fig. 6. The inhibition of infiltrated granulocytes by the *Salvia plebeian* R. Br. (SP R) extracts in airway of APM-induced mice model. The total BAL A and lung cells B were counted using flow cytometry and the granulocytes infiltrated to BAL, C photomicrograph (original magnification, $\times 200$) of BALF cytopins from a sensitized mouse exposed repeatedly to allergen (Diff-Quik stain). (a; Balb/c WT, b; APM control, c; APM-monteleukast 10 mg/kg d; APM-SP_R 400 mg/kg, e; APM-SP_R 200 mg/kg, f; APM-SP_R 100 mg/kg), D; granulocytes total cells No. in BALF. Data are shown as mean \pm SEM. ## $p < 0.005$, ### $p < 0.0005$ vs WT; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs CTL. APM; Ambient particulate matter, WT; Wild type.

한 결과, 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 그룹에서 호중구의 수가 증가하였으며, 이는 폐의 염증 수치가 증가함을 의미한다. 미세먼지에 의해 증가된 호중구의 수가 배암차즈기 추출물을 경구 투여한 그룹에서 감소됨을 확인 하였으며 따라서 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환에서 배암차즈기 추출물이 주요 염증 세포인 호중구 수의 감소를 통해 폐의 염증 반응을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다 (Fig. 6).

7. 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델에서 chemokine (C-X-C motif) ligand (Cxcl)의 유전자 발현과 과립구 수의 상관관계

마우스의 BAL과 폐 조직에서 flow cytometry 분석을 통해 세포빈도를 CD11b⁺/Gr-1⁺ 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 총 세포 수를 산출하였다. 그 결과 미세먼지를 주입한 대조군의 BAL과 폐에서 CD11b⁺/Gr-1⁺ 면역 세포 수가 유의성 있게 증가함을 확인하였다.

배암차즈기 투여군의 BAL과 폐에서는 배암차즈기 추출물의 농도별 투여에 따라 CD11b⁺/Gr-1⁺ 면역 세포 수가 유의성 있는 수준으로 감소함을 확인하였다. 또한 BAL fluid에서 ELISA를 통해 염증유발인자 IL-17A, TNF- α , Mip-2, 그리고 Cxcl-1의 생산량을 측정된 결과 대조군의 BAL fluid에서 IL-

17A, TNF- α , Mip-2, 그리고 Cxcl-1의 생산량이 모두 통계학 적 유의성 있게 증가하였다. 그러나 배암차즈기 투여군에서 투여한 배암차즈기의 농도 의존적으로 IL-17A, TNF- α , Mip-2, 그리고 Cxcl-1의 생산량이 감소함을 확인하였다.

Mip-2는 monocyte chemotactic protein-1 (Mcp-1), macrophage inflammatory protein 1-alpha (Mip-1 α)와 함께 단핵세포와 면역세포의 이동 및 침윤에 관여한다 (Ajuebor *et al.*, 1999). 염증사이토카인인 IL-17A과 TNF- α , 그리고 CXC 케모카인 ligand 계열인 Cxcl 유전자가 염증과 관련하여 염증 세포인 호중구의 염증반응에 관여한다는 연구결과들이 다수 보고됨에 따라 (Amulic *et al.*, 2012; De Filippo *et al.*, 2013; Kolaczowska and Kubes, 2013; Quinton *et al.*, 2004), 과립구의 세포 수 조절에 있어서 Cxcl-2와 함께 Cxcl-1이 관여하는 것으로 예측 된다 (Fig. 7)

8. 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델에서 배암차즈기 추출물의 처리에 따른 염증관련 케모카인과 사이토카인 조사

CC 케모카인 수용체 Ccr9과 Ccr3, 케모카인 ligand인 Ccl5 는 기도의 염증에 반응하여 과립구의 염증을 증가시키고 기관지의 면역반응을 높이는 것으로 알려져 있다. 이에 미세먼지

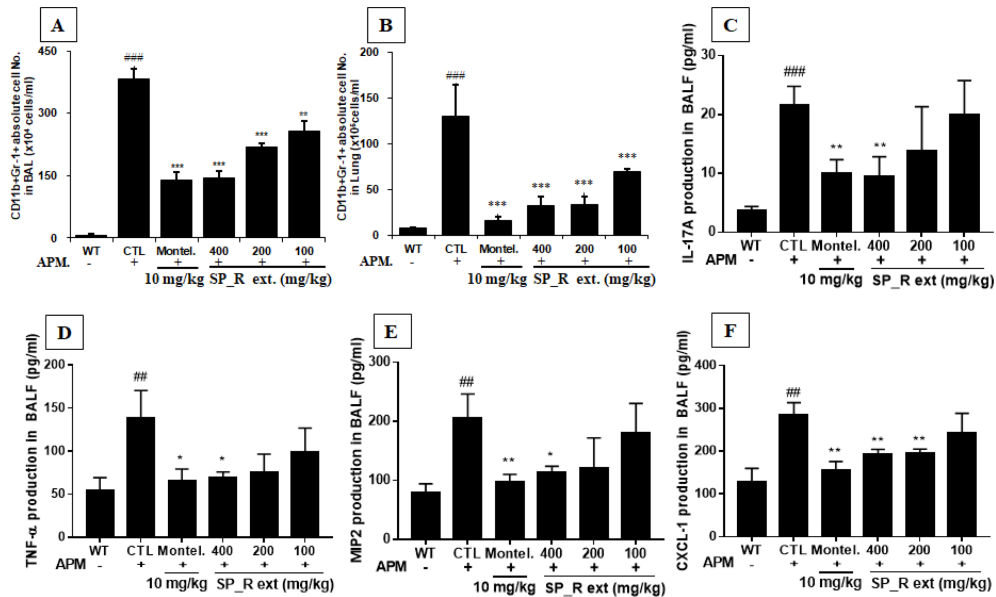


Fig. 7. The reduction of CD11b⁺/Gr-1⁺ cells number by the *Salvia plebeian* R. Br. (SP_R) extracts through inhibiting expression of IL-17A, TNF-α, Mip-2 and Cxcl-1 in airway of APM-induced mice model. The absolute number of CD11b⁺/Gr-1⁺ cells in airway (A - B) was evaluated by flow-cytometry. The production of IL-17A (C), TNF-α (D), Mip-2 (E), and Cxcl-1 (F) proteins in airway was measured by ELISA. Data are shown as mean ± SEM. ##*p* < 0.005, ###*p* < 0.0005 vs WT, **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001. vs CTL. APM; Ambient particulate matter, WT; Wild type.

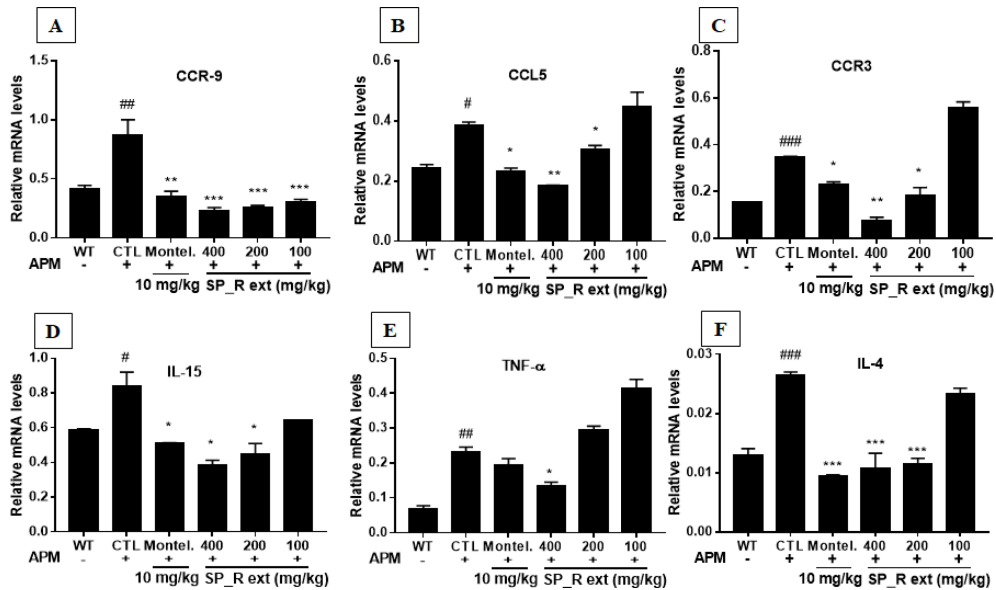


Fig. 8. The restoration of airway immune response associated chemokines and inflammatory cytokines by the *Salvia plebeian* R. Br. (SP_R) extracts in APM-induced mice models. The gene expression of airway immune response associated chemokines (A - C) and inflammatory cytokines (D - F) in lung isolated from APM-induced mice models were analyzed by real-time PCR. Data are shown as mean ± SEM. #*p* < 0.05, ##*p* < 0.005, ###*p* < 0.0005 vs WT, **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 vs CTL. APM; Ambient particulate matter, WT; Wild type.

에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델의 폐 조직에서 염증 관련 케모카인 수용체와 케모카인 ligand의 유전자 발현을 측

정한 결과, 미세머지에 의해 이들 염증유발인자들의 발현이 증가하였으며 배암차즈기 추출물 투여에 의해 감소하였다. 또한

염증반응에 대항하여 기관지의 면역반응을 높이는 염증성 사이토카인 IL-15, TNF- α , IL-4의 유전자 발현이 미세먼지에 의해 유도된 대조군에서 증가함을 확인하였으며, 증가된 사이토카인 발현은 배암차즈기 투여군에서 농도 의존적으로 회복하는 경향을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 8).

고 찰

미세먼지는 국내외에서 각종 호흡기 질환을 유발하며 현재 개발된 의약품 등 해결방안이 나타나지 않은 실정이므로, 그에 관한 예방 및 치료법이 필요하다. 미세먼지에 의한 질환들은 수많은 질병을 야기하기 때문에 미세먼지에 특정적으로 적용할 수 있는 약물이나 천연물질 등이 필요하다. 미세입자의 주요부분을 점하는 디젤배기입자 (DEP)는 연료의 불완전 연소에서 유래한 입자를 중심으로, 그 주변에 엔진 오일과 연소되지 않은 연료 및 생체에 자극을 주는 포름알데히드 등의 산화물이나 니트로 화합물 등의 유기성분과 황산염 및 질산염 등이 부착 한 것으로, 동물실험을 하여 DEP와 OVA에 노출된 마우스에서 기도 염증 및 과민 반응, 혈청 OVA 특이 IgE 수준 증가, 폐 및 전신 TH2 및 TH17 사이토카인 수준의 증가시켜 알레르기 및 호흡-순환기능의 장애를 유발한다고 발표하였다 (Manners *et al.*, 2014). 인간기관지상피세포에서 오미자 추출액으로 염증을 관여하는 *Mmp-2*, *Mmp-11*, *Mmp-14*, *Mmp-15*, *Mmp-16*, *Mmp-19*, *Mmp-25*, *Mmp-27*, *Mmp-28* 등의 유전자의 발현 감소를 보였지만 (Jung *et al.*, 2008), 그러나 아직까지 특정 물질의 미세먼지에 대한 특이적 효능에 대하여 보고된 바는 없다. 이러한 가운데 본 연구는 배암차즈기가 미세먼지에 의해 유도된 염증반응에 미치는 효능에 대하여 탐색하였다.

호흡기관의 대식세포 세포주인 MH-S 세포에서 미세먼지로 자극을 시켜 배암차즈기 (*Salvia plebeia* R. Br.) 추출물의 효과를 보았을 때, 염증을 일으키는 매개체 중 하나인 ROS의 생성량을 줄였고 염증 사이토카인의 발현을 정상군의 수준으로 회복하는 것을 볼 수 있었다. 이러한 효능을 토대로 동물모델에 대기오염물질을 INT injection을 시켜 호흡기 손상 모델을 만들고 배암차즈기 추출물을 경구투여 하여 염증 억제 효과를 살펴보았다. 실험결과 미세먼지의 유도에 의해 폐포의 벽이 두꺼워지고 교원 섬유양의 양이 증가했으며 이러한 증가된 염증 반응을 배암차즈기 추출물이 다시 정상군 수준으로 회복시키는 것을 확인하였다. 염증세포 중 미세먼지에 의해 기관지세포 세척액으로 infiltration 되었던 과립구들이 배암차즈기 추출물의 투여에 의해 억제 되는 것을 확인하였다. BALF에서 미세먼지에 의해 증가되었던 ROS의 생성 수준이 배암차즈기 추출물에 의해 감소되는 것을 확인하였고 또한 폐 조직에서 기관지의 면역 반응을 높이는 케모카인과 염증 사이토카인 (IL-

17A, TNF- α , *Mip-2*, *Cxcl-1*)의 유전자 발현 수준을 보았을 때 배암차즈기 추출물의 경구 투여에 의한 회복효과가 큰 것으로 보인다. 이러한 배암차즈기 추출물의 회복 효과는 일반적으로 천식의 약제로 사용되는 montelukast를 양성대조군으로 투여한 그룹과 비슷한 수준으로 회복하는 것을 통해 배암차즈기 추출물이 미세먼지에 의한 기관지염증에 효과를 보이는 것을 알 수 있다. montelukast를 포함한 기존 허가 의약품들에 대하여 외국기술에 높은 의존도 및 그에 따른 부작용 등이 우려되므로, 목적에 맞는 배암차즈기 추출물 같은 천연물질이 효과를 보이는 것은 안전성 등 부작용을 크게 줄일 수 있기 때문에 큰 기대를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 추가적으로 배암차즈기 추출물 내에서 지표성분 분석을 통하여 rosmarinic acid, luteolin, nepetin, hispidulin이 함유되어 있음을 확인하였다. 배암차즈기 추출물의 구성성분으로 알려진 이들 화합물은 앞서 *in vitro* 연구 결과에서 염증유발인자인 nitric oxide와 prostaglandin E2 및 leukotriene의 발현 억제 활성을 통해 탁월한 항염증 효과를 보임으로써 (Akram *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2016), 본 연구에서 항염 효과를 나타내는 배암차즈기 추출물의 표준화를 위한 지표성분 및 항염 효과를 유도하는 주요 유효성분으로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

종합하여 볼 때, 미세먼지에 의해 염증반응이 유도된 모델에서 배암차즈기 추출물이 시중에 있는 약제와 비슷한 회복효과를 보였고, 또한 염증 사이토카인과 케모카인의 회복을 관찰 할 수 있었다. 이는 미세먼지에 의해 유도된 염증을 배암차즈기 천연물질에 의해 회복되는 것으로 보인다. 따라서 배암차즈기 추출물이 호흡기의 염증을 개선하고 호흡기 관련 질병의 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업(과제번호: 115002-03)의 연구비 지원으로 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCE

- Ajuebor MN, Das AM, Virág L, Flower RJ, Szabó C and Perretti M. (1999). Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: Evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *The Journal of Immunology*. 162:1685-1691.
- Akram M, Syed AS, Kim KA, Lee JS, Chang SY, Kim CY and Bae ON. (2015). Heme oxygenase 1-mediated novel anti-inflammatory activities of *Salvia plebeia* and its active components. *Journal of Ethnopharmacology*. 174:322-330.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD and Zychlinsky A.

- (2012). Neutrophil function: From mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*. 30:459-489.
- Barnes PJ.** (1994). Cytokines as mediators of chronic asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 150:S42-S49.
- Bohadana AB, Massin N, Wild P, Toamain JP, Engel S and Goutet P.** (2000). Symptoms, airway responsiveness, and exposure to dust in beech and oak wood workers. *Occupational and Environmental Medicine*. 57:268-273.
- Brandt EB, Kovacic MB, Lee GB, Gibson AM, Acciani TH, Le Cras TD, Ryan PH, Budelsky AL and Hershey GKK.** (2013). Diesel exhaust particle induction of IL-17A contributes to severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 132:1194-1204.
- Choi BO, Yin HH, Fang CZ, Ha HO, Kim SJ, Jeong SJ and Jang SI.** (2015). Synergistic anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and luteolin in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 47:119-125.
- Choi JK, Oh HM, Lee S, Kwon TK, Shin TY, Rho MC and Kim SH.** (2014). *Salvia plebeia* suppresses atopic dermatitis-like skin lesions. *The American Journal of Chinese Medicine*. 42:967-985.
- Choi SI, Cho IH, Han SH, Jeon YJ, Choi JG, Kim JS and Lee JH.** (2016). Antiobesity effects of *Salvia plebeia* R. Br. extract in high-fat diet-induced obese mice. *Journal of Medicinal Food*. 19:1048-1056.
- Costa RS, Carneiro TCB, Cerqueira-Lima AT, Queiroz NV, Alcântara-Neves NM, Pontes-de-Carvalho LC, Velozo Eda S, Oliveira EJ and Figueiredo CA.** (2012). *Ocimum gratissimum* Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. *International Immunopharmacology*. 13:126-134.
- De Filippo K, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, van Rooijen N, Hartmann K, Gunzer M, Roers A and Hogg N.** (2013). Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*. 121:4930-4937.
- Doering DC and Solway J.** (2013). Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *Journal of Applied Physiology*. 114:834-843.
- Fuks K, Moebus S, Hertel S, Viehmann A, Nonnemacher M, Dragano N, Möhlenkamp S, Jakobs H, Kessler C, Erbel R and Hoffmann B.** (2011). Long-term urban particulate air pollution, traffic, noise and arterial blood pressure. *Environmental Health Perspectives*. 119:1706-1711.
- Ghio AJ, Smith CB and Madden MC.** (2012). Diesel exhaust particles and airway inflammation. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 18:144-150.
- Gu L and Weng X.** (2001). Antioxidant activity and components of *Salvia plebeia* R. Br. a Chinese Herb. *Food Chemistry*. 73:299-305.
- Hoffmann B, Weinmayr G, Hennig F, Fuks K, Moebus S, Weimar C, Dragano N, Hermann DM, Kälsch H, Mahabadi AA, Erbel R and Jöckel KH.** (2015). Air quality, stroke, and coronary events: Results of the heinz nixdorf recall study from the ruhr region. *Deutsches Ärzteblatt International*. 112:195-201.
- Jang HH, Cho SY, Kim MJ, Kim JB, Lee SH, Lee MY and Lee YM.** (2016). Anti-inflammatory effects of *Salvia plebeia* R. Br extract in vitro and in ovalbumin-induced mouse model. *Biological Research*. 49:41-51.
- Jang TY, Jung AY, Kyung TS, Kim DY, Hwang JH and Kim YH.** (2017). Anti-allergic effect of luteolin in mice with allergic asthma and rhinitis. *Central European Journal of Immunology*. 42:24-29.
- Jin XF, Qian J and Lu YH.** (2011). The role of hepatoprotective effect of a flavonoid-rich extracts of *Salvia plebeia* R. Br. on carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5:1558-1563.
- Jung JY, Jung SK, Jung HJ and Rhee HK.** (2008). Microarray analysis of gene expression profile by treatment of *Schizandrae fructus* extract in inflammation-induced human epithelial A549 Cells. *The Journal of Korean Oriental Internal Medicine*. 29:543-553.
- Kim MH, Jung K, Nam KH, Jang HJ, Lee SW, Kim Y, Park CS, Lee TH, Park JH, Choi JH, Rho MC and Oh HM.** (2016). *Salvia plebeia* R.Br. inhibits signal transduction of IL-6 and prevents ovariectomy-induced bone loss by suppressing osteoclastogenesis. *Archives of Pharmacol Research*. 39:1671-1681.
- Kim YJ, Jeong JS, Park NJ, Go GB and Son BG.** (2014). Active ingredients and antioxidant activities of *Salvia plebeia* R. Br. according to pretreatment conditions. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 43:1948-1953.
- Kolaczowska E and Kubes P.** (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 13:159-175.
- Korzh EV, Valutsina VM and Protsiuk RG.** (1993). State of pulmonary surfactant and hemodynamics of lesser blood circulation in Donets Basin coal miners during development of dust-induced respiratory tract diseases. *Meditsina Truda i Promyshlenniaia Ekologiya*. 3:26-28.
- Kyung SY, Kim YS, Kim WJ, Park MS, Song JW, Yum H, Yoon HK, Rhee CK and Jeong SH.** (2015). Guideline for the prevention and management of particulate matter/Asian dust particle-induced adverse health effect on the patients with pulmonary diseases. *Journal of the Korean Medical Association*. 58:1060-1069.
- Lee WC, Jung HA, Choi JS, Kim YS and Lee SM.** (2011). Protective effects of luteolin against apoptotic liver damage induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide in mice. *Journal of Natural Productions*. 74:1916-1921.
- Liang Z, Nie H, Xu Y, Peng J, Zeng Y, Wei Y, Wen X, Qiu J, Zhong W, Deng X and He J.** (2016). Therapeutic effects of rosmarinic acid on airway responses in a murine model of asthma. *International Immunopharmacology*. 41:90-97.
- Lim HB and Kim SH.** (2009). 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*. 17:90-96.
- López-Pacheco C, Soldevila G, Du Pont G, Hernández-Pando R and García-Zepeda EA.** (2016). CCR9 is a key regulator of early phases of allergic airway inflammation. *mediators of inflammation*. 2016:3635809. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3635809>

- (cited by 2016 Aug 8).
- Lu Y and Foo LY.** (2002). Polyphenolics of *salvia*-a review. *Phytochemistry*. 59:117-140.
- Manners S, Alam R, Schwartz DA and Gorska MM.** (2014) A mouse model links asthma susceptibility to prenatal exposure to diesel exhaust. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 134:63-72.
- Nials AT and Uddin S.** (2008). Mouse models of allergic asthma: Acute and chronic allergen challenge. *Disease Models and Mechanisms*. 1:213-220.
- Peters S, Reid A, Fritschi L, de Klerk N and Musk AW.** (2013). Long-term effects of aluminium dust inhalation. *Occupational and Environmental Medicine*. 70:864-868.
- Quinton LJ, Nelson S, Zhang P, Boé DM, Happel KI, Pan W and Bagby GJ.** (2004). Selective transport of cytokine-induced neutrophil chemoattractant from the lung to the blood facilitates pulmonary neutrophil recruitment. *American journal of physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 286:L465-L472.
- Shin HJ, Gwak HM, Jang M, Park SH, Min HJ, Lee JM, Lee MY, Kim JH, Kim SW, Han CK and Kim SH.** (2016). Anti-inflammatory activity of three kinds of *Salvia* and its active compounds. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 24:401-407.
- Talib WH, Zarga MH and Mahasneh AM.** (2012). Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*. *Molecules*. 17:3291-3303.
- Tosello Boari J, Amezcua Vesely MC, Bermejo DA, Ramello MC, Montes CL, Cejas H, Gruppi A and Acosta Rodríguez EV.** (2012). IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS Pathogens*, 8: e1002658. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002658> (cited by 2017 Sep 11).
- Yang JM, Hung CM, Fu CN, Lee JC, Huang CH, Yang MH, Lin CL, Kao JY and Way TD.** (2010). Hispidulin sensitizes human ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by AMPK activation leading to Mcl-1 block in translation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:10020-10026.
- Yang SN, Hsieh CC, Kuo HF, Lee MS, Huang MY, Kuo CH and Hung CH.** (2014). The effects of environmental toxins on allergic inflammation. *Allergy Asthma Immunology Research*. 6:478-484.
- Yin Y, Gong FY, Wu XX, Sun Y, Li YH, Chen T and Xu Q.** (2008). Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *Journal of Ethnopharmacology*. 120:1-6.
- Yoshitaka I.** (2007). 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).