(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0103933
(43) 공개일자 2024년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/355 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 11/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2023.01)
A61P 39/06 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/355 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0055639
(22) 출원일자 2023년04월27일
심사청구일자 2023년04월27일
(30) 우선권주장
1020220186053 2022년12월27일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
허호진
경상남도 진주시 초장로 120, 504동 501호
(74) 대리인
위병갑

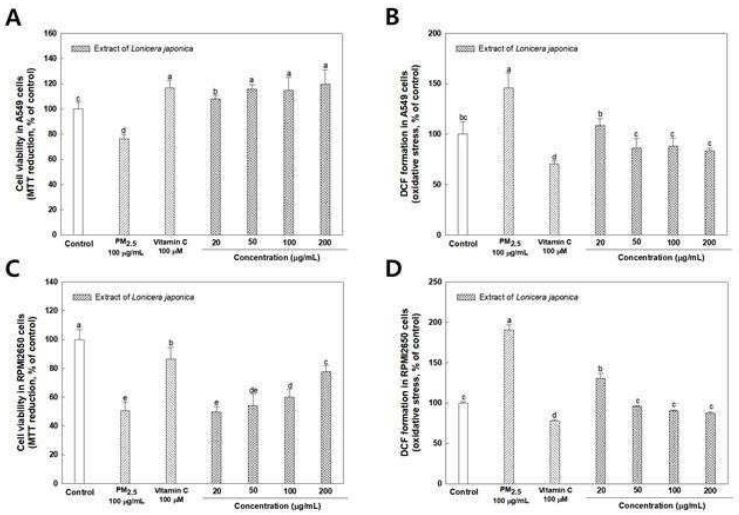
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 **금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 미세먼지로 인한 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 금은화 추출물 처리에 따른 호흡기 세포의 세포 생존율, 산화적 스트레스 생성 억제 활성, 염증 및 세포사멸 바이오마커, 항산화 활성, 미토콘드리아 개선 효과, 면역세포 수 변화, 면역물질 함량 변화, 염증 관련 단백질 발현 변화, 폐 섬유화 마커, matrix metalloproteinases (MMPs) 관련 단백질 발현을 확인하여, 금은화 추출물이 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물로 이용될 수 있음을 확인하였다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 11/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 39/06 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/314 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345361545
과제번호 BRIDGE-2022-B04
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 산학연협력고도화지원
연구과제명 대학 창의적 자산 실용화 지원(BRIDGE+)사업
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경상대학
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

금은화(*Lonicera japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 금은화 추출물은 물, C1~C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출한 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 금은화 추출물은 30~100 ℃, 60~360분 조건으로 추출한 것인, 조성물

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 금은화는, 꽃, 잎, 줄기, 뿌리, 열매, 지상부 및 지하부로 이루어진 군에서 선택된 부위인 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 금은화 추출물은 항산화 활성을 갖는 것인, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 항산화 활성은 Malondialdehyde(MDA) 감소 및 지질과산화를 억제하는 것인, 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 항산화 활성은 Superoxide dismutase(SOD) 또는 환원형 글루타치온(Reduced glutathione, GSH)을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 금은화 추출물은 미토콘드리아 기능을 개선 시키는 것인, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 미토콘드리아 기능 개선은 활성산소 생성을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 미토콘드리아 기능 개선은 미토콘드리아 막 전위(MMP)를 증가시키는 것인, 조성물

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 미토콘드리아 기능 개선은 Adenosine triphosphate (ATP) 생성을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 금은화 추출물은 혈액 내 면역세포를 조절하는 것인, 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 면역세포 조절은 보조 T세포(helper T cell) 또는 세포독성 T세포(cytotoxic T cell)의 수를 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 금은화 추출물은 혈액 내 면역물질을 조절하는 것인, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 면역물질 조절은 인터루킨 4(interleukin 4, IL-4), Immunoglobulin G(IgG) 또는 Immunoglobulin G(IgE)의 분비를 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 금은화 추출물은 미세먼지로 유도된 염증반응을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 미세먼지로 유도된 염증반응 억제는 p-Akt, p-IκB-α, p-NF-κB, TNF-α, IL-1β, COX-2의 발현을 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서,

상기 금은화 추출물은 미세먼지로 유도된 폐 손상을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 폐 손상 억제는 p-JNK 및 Bax 발현을 감소시키고, Bcl-2 발현을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 20

제1항에 있어서,

상기 금은화 추출물은 미세먼지로 유도된 폐 섬유화를 억제하는 것인, 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 폐 섬유화 억제는 TGF-β1, p-smad-2 및 p-smad-3 발현을 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 22

제1항에 있어서,

상기 금은화 추출물은 미세먼지로 유도된 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 또는 matrix metalloproteinase-2(MMP-2)의 발현을 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 23

제1항에 있어서,

상기 호흡기 질환은 미세먼지로 인한 호흡기 질환인 것인 조성물.

청구항 24

제1항에 있어서,

상기 호흡기 질환은 호흡기 염증성 폐 질환, 만성 폐쇄성 폐질환 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease;

COPD), 부비강염, 알레르기성 비염, 하기도 감염증, 급만성 기관지염, 폐기종, 폐렴, 기관지 천식, 기관지 확장증, 폐기종, 폐결핵 후유증, 급성 호흡 궁박증후군(窮迫症候群), 낭포성 섬유증, 중이염 및 폐섬유증으로 이루어진 군에서 1종 이상 선택된 것인, 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 호흡기 질환은 호흡기 염증성 폐 질환 또는 폐섬유증인 것인, 조성물.

청구항 26

제 1항에 있어서,

상기 호흡기 질환은 MMP-1, BAX 및 p-JNK의 발현량이 대조군에 비하여 증가되고, BCL-2가 대조군에 비하여 감소된 호흡기 질환인 것인, 조성물.

청구항 27

금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 28

금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 미세먼지로 인한 호흡기 질환에서 미토콘드리아의 기능 증진용 조성물.

청구항 29

금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는, 미세먼지로 인한 염증 또는 산화 작용에 대한 항염증 또는 항산화용 조성물.

청구항 30

(a) 금은화(*Lonicera japonica*)를 건조하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 건조된 금은화를 분쇄하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계에서 분쇄된 금은화를 용매로 추출하는 단계;를 포함하는 금은화 추출물 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 미세먼지로 인한 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대기오염은 중금속, 일산화탄소, 이산화황, 다환방향족탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 및 오존을 포함하는 복잡한 형태의 입자상 물질(particulate matter, PM)로서 인간의 건강에 해로운 것으로 알려져 있다. PM은 입자의 크기에 따라 PM_{10}(≤10 ㎛), $PM_{2.5}$(≤2.5 ㎛)로 분류되며, 전 세계적으로 산업의 급속한 발

전으로 인해 나타난다. 특히 $PM_{2.5}$는 흔히 대기 오염의 지표로 여겨지며, 인체에 유해한 독성을 나타낸다. $PM_{2.5}$에 대한 대부분의 연구는 호흡기 및 심혈관계 손상과 관련되어 있으나, 피부, 비강, 호흡기관, 소화기 등과 같은 다양한 경로를 통해 흡수되어 제2형 당뇨, 호흡기 감염, 심혈관 질환 및 전신 염증 등을 유발한다.

[0003] $PM_{2.5}$는 폐 조직에 침착되기 쉬운 구조와 크기를 가지고 있으며, 폐 조직에서 다양한 산화적 스트레스와 염증 반응을 촉진한다. 특히, 장시간 $PM_{2.5}$에 노출될 경우, 천식, 기관지염, 만성 폐쇄성 폐질환, 관상동맥 등과 같은 다양한 심폐질환을 야기할 수 있다. $PM_{2.5}$는 폐 조직에서 면역 세포의 활성화를 통해 염증성 사이토카인과 산화적 스트레스가 생성되며, 섬유화 등과 병리학적 손상이 유도되어 폐 기능 상실에 영향을 끼친다. 이로 인한 폐 기능 저하는 체내 산소의 공급을 억제해 염증 반응과 더불어 신체 전체에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

[0004] 금은화(*Lonicera japonica*)는 중국, 일본, 한국 등 동아시아에서 자라는 품종으로서, 인동과(*Caprifoliaceae*)에 속하는 인동덩굴의 꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃이다. 금은화는 항균 활성, 피부 미백, 간 보호 효과, 혈소판 활성, 뇌 신경 세포 보호 효과와 같은 다양한 생리활성 효능이 보고되고 있음에도 미세먼지($PM_{2.5}$)로 유도되는 호흡기 손상에 대한 보호 효과 및 염증 억제 기전과 관련된 연구는 현재 미흡한 실정이다.

[0005] 따라서 본 발명에서는 금은화 추출물의 미세먼지로 유도되는 호흡기 손상에 대한 보호 효과 및 염증 억제기전에 대해 확인하기 위하여, 금은화 추출물에 적용에 따른 호흡기 세포 생존율, 산화적 스트레스 생성 억제 활성, 염증 및 세포사멸 바이오마커, 항산화 활성, 미토콘드리아 개선 효과, 면역세포 수 변화, 면역물질 함량 변화, 염증 관련 단백질 발현 변화, 폐 섬유화 마커, matrix metalloproteinases (MMPs) 관련 단백질 발현에 대해 확인하였다. 이와 같은 금은화 추출물의 호흡기 손상 개선 효과에 대해 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2021-0055859호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 미세먼지로 인한 호흡기 질환에서 미토콘드리아의 기능 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는, 미세먼지로 인한 염증 또는 산화 작용에 대한 항염증 또는 항산화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 (a) 금은화(*Lonicera japonica*)를 건조하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 건조된 금은화를 분쇄하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 분쇄된 금은화를 용매로 추출하는 단계;를 포함하는 금은화 추출물 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 미세먼지로 인한 호흡기 질환에서 미토콘드리아의 기

능 증진용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는, 미세먼지로 인한 염증 또는 산화 작용에 대한 항염증 또는 항산화용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 (a) 금은화(*Lonicera japonica*)를 건조하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 건조된 금은화를 분쇄하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 분쇄된 금은화를 용매로 추출하는 단계;를 포함하는 금은화 추출물 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 금은화 추출물 처리에 따른 호흡기 세포의 세포 생존율, 산화적 스트레스 생성 억제 활성, 염증 및 세포사멸 바이오마커, 항산화 활성, 미토콘드리아 개선 효과, 면역세포 수 변화, 면역물질 함량 변화, 염증 관련 단백질 발현 변화, 폐 섬유화 마커, matrix metalloproteinases (MMPs) 관련 단백질 발현을 확인하여, 본 발명을 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물로 사용할 수 있으므로, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 미세먼지 처리된 호흡기 세포의 세포생존능 및 산화스트레스에 대한 금은화 추출물의 효과를 나타낸 도이다.

A 및 C: 세포생존능

B 및 D: 산화 스트레스

도 2는 미세먼지 처리된 호흡기 세포의 염증반응 관련 물질에 대한 금은화 추출물의 효과를 나타낸 도이다.

A: 웨스턴 블롯 결과

B: phospho nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells(p-NF-κB)의 상대적 발현

C: inducible nitric oxygen synthase(iNOS)의 상대적 발현

D: cyclooxygenase-2(COX-2)의 상대적 발현

E: tumor necrosis factor-α(TNF-α)의 상대적 발현

도 3은 미세먼지 처리된 폐 조직에 대한 금은화 추출물의 항산화 효과에 대한 도이다.

A: Malondialdehyde (MDA) 함량

B: Superoxide dismutase (SOD) 수준

C: 환원형 글루타치온(reduced glutathione, GSH) 수준

도 4는 미세먼지 처리된 폐 조직에 대한 금은화 추출물의 항산화 효과에 대한 도이다.

A: 활성산소(ROS) 함량

B: mitochondrial membrane potential (MMP)

C: Adenosine triphosphate (ATP) 함량

도 5는 미세먼지 처리된 마우스의 혈액내 백혈구 대비 T세포의 비율에 대한 금은화 추출물의 효과를 나타낸 도이다.

A: CD4 및 CD8에 부착된 형광염색 시약과 반응하는 세포에 대한 soring plot

B: 전체 T 세포 대비 helper T cells (CD4)의 비율

C: 전체 T 세포 대비 cytotoxicity T cells (CD8)의 비율

D: helper T cells (CD4) 대비 IL-4의 비율

도 6은 미세먼지 처리된 마우스의 혈청내 Immunoglobulin IgG 및 IgE 수준에 대한 금은화 추출물의 효과를 나타

낸 도이다.

도 7은 미세먼지 처리된 마우스 폐 조직의 염증성 반응 관련 인자에 대한 금은화 추출물의 효과를 나타낸 도이다.

A: 웨스턴 블롯 결과

B: phospho Akt (p-Akt)의 상대적 발현

C: phospho-IκB (p-IκB)-α의 상대적 발현

D: phospho nuclear factor kappa B (p-NF-κB)의 상대적 발현

E: tumor necrosis factor-α(TNF-α)의 상대적 발현

F: Interleukin (IL)-1β의 상대적 발현

G: cyclooxygenase-2 (COX-2)의 상대적 발현

도 8은 미세먼지 처리된 마우스 폐 조직의 아폽토시스 관련 인자에 대한 금은화 추출물의 효과를 나타낸 도이다.

A: 웨스턴 블롯 결과

B: phspho-c-Jun N-terminal kinases (p-JNK)의 상대적 발현

C: B-cell lymphoma 2 (BCL-2)의 상대적 발현

D: BCL-2-associated X protein (BAX)의 상대적 발현

E: BAX/BCL-2 비율

도 9는 미세먼지 처리된 마우스 폐 조직의 섬유화에 대한 금은화 추출물의 효과를 나타낸 도이다.

A: 웨스턴 블롯 결과

B: transforming growth factor β1 (TGF-β1)의 상대적 발현

C: phosphorylated SMAD family member (p-smad)-2의 상대적 발현

D: phosphorylated SMAD family member (p-smad)-3의 상대적 발현

도 10은 미세먼지 처리된 마우스 폐 조직의 matrix metalloproteinases (MMPs) 활성에 금은화 추출물의 효과를 나타낸 도이다.

A: 웨스턴 블롯 결과

B: matrix metalloproteinase-1의 상대적 발현

C: matrix metalloproteinase-2의 상대적 발현

도 11은 금은화 추출물의 High performance liquid chromatography (HPLC) 측정결과를 나타낸 도이다.

A: HPLC 측정결과

B: secologanic acid의 피크

C: chlorogenic acid의 피크

D: 254 nm에서 secologanic acid의 calibration curve

E: 254 nm에서 chlorogenic acid의 calibration curve

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부

분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0021] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0022]

[0023] 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 금은화 추출물은 금은화에 용매를 5~50배(w/w) 첨가한 후 30~100 ℃에서 60~360분 간 추출한 추출물 일 수 있으며, 바람직하게는 용매를 5~30배(w/w) 첨가한 후 50~100 ℃로 60~240분 동안 추출한 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 용매는 물, C1~C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 금은화는, 꽃, 잎, 줄기, 뿌리, 열매, 지상부 및 지하부로 이루어진 군에서 선택된 부위인 것이며, 바람직하게는 꽃 부위인 것이나 이에 제한되지는 않는다.

[0027] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 "추출물"은 적절한 용매를 이용하여 금은화로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 상기 금은화로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다.

[0028] 본 발명의 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다. 따라서 본 발명에 있어서 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0029] 상기 "예방"은 병리학적 현상의 발생 빈도 또는 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 개체 내의 질병으로 인한 증상이 상기 조성물을 사용 하지 않은 경우와 비교하여 감소하는 현상을 의미할 수 있다.

[0030] 상기 "치료"는 치료하고자 하는 대상 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위하여 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하며, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위하여 수행할 수 있다. 목적하는 치료효과는 질병의 발생 또는 재발을 예방하거나, 증상을 완화시키거나, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키거나, 전이를 예방하거나, 질병 진행 속도를 감소시키거나, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키거나, 예후를 개선시키는 것을 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다.

[0032] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학

조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0034] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0036] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하다.

[0037] 상기 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다.

[0038] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/ 또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0039] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.

[0040] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 금은화 추출물은 클로로겐산(chlorogenic acid), 세콜로간산(secologanic acid) 및 세콜로가닌(secoxyloganin)을 포함하는 것일 수 있다.

[0042] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 금은화 추출물은 항산화 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 항산화 활성은 Malondialdehyde(MDA) 감소 및 지질과산화를 억제하는 것일 수 있다.

[0044] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 항산화 활성은 Superoxide dismutase(SOD) 또는 환원형 글루타치온(Reduced glutathione, GSH)을 증가시키는 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 금은화 추출물은 미토콘드리아 기능을 개선 시키는 것일 수 있다.

[0046] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 미토콘드리아 기능 개선은 활성산소 생성을 억제 하는 것일 수 있다.

[0047] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 미토콘드리아 기능 개선은 미토콘드리아 막 전위(MMP)를 증가시키는 것일 수 있다.

[0048] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 미토콘드리아 기능 개선은 Adenosine triphosphate (ATP) 생성을 증가시키는 것일 수 있다.

[0049] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 금은화 추출물은 혈액 내 면역세포를 조절하는 것일 수 있다.

[0050] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 면역세포 조절은 보조 T세포(helper T cell) 또는 세포독성 T세포(cytotoxic T cell)의 수를 감소시키는 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 금은화 추출물은 혈액 내 면역물질을 조절하는 것일 수 있다.

[0052] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 면역물질 조절은 인터루킨 4(interleukin 4, IL-4), Immunoglobulin G(IgG) 또는 Immunoglobulin E(IgE)의 분비를 감소시키는 것일 수 있다.

[0053] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 금은화 추출물은 미세먼지로 유도된 염증반응을 억제하는 것일 수 있다.

[0054] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 미세먼지로 유도된 염증반응 억제는 p-Akt, p-IκB-α, p-NF-κB, TNF-α, IL-1β, COX-2의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.

[0055] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 금은화 추출물은 미세먼지로 유도된 폐 손상을 억제하는 것일 수 있다.

[0056] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 폐 손상 억제는 p-JNK 및 Bax 발현을 감소시키고, Bcl-2 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0057] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 금은화 추출물은 미세먼지로 유도된 폐 섬유화를 억제하는 것일 수 있다.

[0058] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 폐 섬유화 억제는 TGF-β1, p-smad-2 및 p-smad-3 발현을 감소시키는 것일 수 있다.

[0059] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 금은화 추출물은 미세먼지로 유도된 matrix metalloproteinase-1(MMP-1) 또는 matrix metalloproteinase-2(MMP-2)의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.

[0060] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 호흡기 질환은 미세먼지로 인한 호흡기 질환인 것일 수 있다.

[0061] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 호흡기 질환은 호흡기 염증성 폐 질환, 만성 폐쇄성 폐질환 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD), 부비강염, 알레르기성 비염, 하기도 감염증, 급만성 기관지염, 폐기종, 폐렴, 기관지 천식, 기관지 확장증, 폐기종, 폐결핵 후유증, 급성 호흡 궁박증후군(窮迫症候群), 낭포성 섬유증, 중이염 및 폐섬유증으로 이루어진 군에서 1종 이상 선택된 것일 수 있다.

[0062] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 호흡기 질환은 호흡기 염증성 폐 질환 또는 폐섬유증인 것일 수 있다.

[0063] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 호흡기 질환은 MMP-1, BAX 및 p-JNK의 발현량이 정상군에 비하여 증가되고, BCL-2가 정상군에 비하여 감소된 호흡기 질환인 것일 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0066] 본 발명의 식품 조성물은 금은화 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0067] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨,소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0068] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기

산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0069] 본 발명의 기능성 식품 조성물은, 정제,캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능성 식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0071] 또한, 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 미세먼지로 인한 호흡기 질환에서 미토콘드리아의 기능 증진용 조성물을 제공한다.

[0073] 또한, 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는, 미세먼지로 인한 염증 또는 산화 작용에 대한 항염증 또는 항산화용 조성물을 제공한다.

[0075] 또한, 본 발명은 (a) 금은화(*Lonicera japonica*)를 건조하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 건조된 금은화를 분쇄하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 분쇄된 금은화를 용매로 추출하는 단계;를 포함하는 금은화 추출물 제조방법을 제공한다.

[0077] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0079] **<준비예 1> 금은화 추출물의 제조**

[0080] 본 발명에서 사용된 금은화(*Lonicera japonica*)는 건조물의 형태로 ㈜빅썸바이오(bigsomebio, 진주, 한국)로부터 제공받았다. 금은화의 건조 중량을 기준으 물을 20배(w/w)첨가한 후 75℃에서 2시간 환류추출한 후, 60mesh 크기에서 여과하고, 75℃ 농축하여 금은화 추출물을 제조하였다.

[0082] **<준비예 2> 호흡기 세포배양**

[0083] 본 발명에서 사용된 폐 세포(A549) 및 비강 세포(RPMI2650)는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양받았다. 10% FBS, 50 units/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신이 포함된 Roswell Park Memorial Institute (RPMI1640) 또는 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)배지에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 비강 세포(RPMI2650 cells)와 폐 세포(A549 cells)를 배양하였다.

[0085] **<준비예 3> 미세먼지**

[0086] 본 발명에서 사용된 초미세먼지인 $PM_{2.5}$(평균 직경: 1.06μm)는 Power Technology INC. (Arizona Test Dust, Arden Hills, MN, USA)에서 구입하였다. 중금속의 구성 분포 및 함량은 Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) 기기를 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0087]

Unit: mg/g

Al	Fe	Mg	Mn	Ba	Zn	Cu	Pb	Li	Cr
30.36	16.91	6.26	0.58	0.22	0.07	0.05	0.03	0.02	0.01

[0088] **<준비예 4> 미세먼지 유도성 호흡기 질환 모델 디자인**

[0089] BALB/c 마우스(6 weeks, male)을 7일 동안 적응 후, 3개월 동안 $PM_{2.5}$ air와 clean air 노출과 동시에 매일 금은화 추출물을 저농도(20 mg/kg of body weight), 중농도(50 mg/kg of body weight) 및 고농도(100 mg/kg of body weight)로 경구투여를 통해 식이하였다. 마우스를 20마리씩 아무런 스트레스를 주지 않은 청정구역에서 사육한 sham 그룹, clean air 노출 후 식수를 식이한 normal control (NC) 그룹, clean air 노출 후 인동덩굴 추출물을 고농도로 투여한 그룹인 normal sample (NS) 그룹, $PM_{2.5}$ air를 노출하고 식수를 식이한 PM 그룹, $PM_{2.5}$ air를 노출한 후 인동덩굴 추출물을 농도 별로 식이한 sample low (SL, 20 mg/kg of body weight), sample middle (SM, 50 mg/kg of body weight), sample high (SH, 100 mg/kg of body weight) 그룹으로 나누어 금은화 추출물의 효과를 확인하였다. 모든 실험 절차는 경상국립대학교 동물실험 윤리위원회의 승인(승인번호: GNU-220831-M0098)을 받아 수행되었다.

[0091] **<실험예 1> 금은화 추출물의 세포보호 효과**

[0092] 1-1. 호흡기 세포 생존율 측정

[0093] 준비예 2에서 배양된 비강 세포 및 폐 세포를 1×10^4 cells/well 농도로 분주하고 24시간 동안 배양한 후 20,50,100,200 μg/mL 농도의 금은화 추출물과 양성대조군(비타민 C 100 μM)을 처리하였다. 처리 후 1시간 뒤 미세먼지를 적용하여 24시간 반응시킨 후 37℃에서 3시간에서 MTT 시약 처리하여 배양시켰다. 그 후, 배양액을 제거하고 DMSO를 첨가하여 흡광도 570 nm (determination)와 655 nm (reference)에서 측정하였다.

[0094] 측정결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타난 바와 같이, 미세먼지 처리군(PM그룹)에서 폐 세포(A549 cells)와 비강 세포(RPMI2650 cells)의 세포 생존율은 대조군 대비 각각 76.22%와 50.61%로 나타났다(도 1A 및 1C). 그러나, 200 μg/mL 농도의 금은화 추출물 처리군에서의 세포 생존율은 폐 세포와 비강 세포에서 각각 119.63%와 77.64%로, PM 그룹 대비 세포생존율이 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 금은화 추출물군은 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 증가하는 경향을 나타내었다.

[0096] 1-2. 산화적스트레스 생성 억제 활성 측정

[0097] 준비예 2에서 배양된 비강 세포 및 폐 세포를 1×10^4 cells/well 농도로 black 96-well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 20,50,100,200 μg/mL 농도의 금은화 추출물과 양성대조군(비타민 C 100 μM)을 처리하였다. 처리 후 1시간 뒤 미세먼지를 적용하여 24시간 반응시키고 DCF-DA 시약을 처리하여 50분간 배양시

켰다. 그 후, fluorometer을 이용하여 485 nm 들뜸 파장 및 535 nm 방출 파장의 형광을 측정하였다.

[0098] 측정결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타난 바와 같이, 미세먼지 처리군(PM그룹)에서 폐 세포(A549 cells)와 비강 세포(RPMI2650 cells)의 산화적 스트레스는 대조군 대비 각각 145.90%와 190.40%로 증가하였다. 그러나, 200 μg/mL 농도의 금은화 추출물 처리군에서의 산화적 스트레스는 폐 세포와 비강 세포에서 각각 83.62%와 87.21%로, PM 그룹 대비 산화적 스트레스가 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 금은화 추출물군은 농도가 증가함에 따라 산화적 스트레스가 감소하는 경향을 나타내었다. 상기 결과를 통해, 금은화 추출물이 미세먼지로 유도된 호흡기 세포를 산화 스트레스로부터 보호하는 효과 있음을 확인하였다(도 1B 및 1D).

[0100] 1-3. 염증 및 세포사멸과 관련된 단백질 발현 측정

[0101] 준비예 2에서 배양한 폐 세포(A549 cells)를 배양 상등액을 제거한 후, 1% protease inhibitor가 함유된 RIPA buffer에 넣어 균질화(homogenization) 한 뒤, 원심 분리하여 상등액을 얻었다, 그 후, 동일한 양의 단백질이 되도록 정량화 한 뒤, 이를 biochemical 분석장치를 이용하여 염증 및 세포사멸 바이오 마커를 측정하였다. phospho nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells(p-NF-κB), inducible nitric oxygen synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2) 및 tumor necrosis factor-α(TNF-α)의 발현에 대해 확인하였다.

[0102] 측정결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, PM그룹에서 염증반응 조절, 세포증식에 관여하는 단백질로 알려진 p-NF-κB, 산화질소 생성 효소인 iNOS, 염증을 유발하는 프로스타글란딘 생성에 관련된 COX-2, 염증성 사이토카인의 일종인 TNF-α의 발현은 대조군 대비 각각 1.19, 1.66, 2.02, 1.79로 증가하는 것을 확인하였다. 그러나, 200 μg/mL 농도의 금은화 추출물 처리군에서는 대조군 대비 p-NF-κB, iNOS, COX-2, TNF-α의 발현은 0.96, 0.75, 1.01, 1.15로 감소하는 결과를 나타내었다. 상기 결과를 통하여, 금은화 추출물이 미세먼지에 의한 세포의 염증반응을 완화시켜주는 효과 있음을 확인하였다.

[0104] **<실험예 2> 항산화 효과 분석**

[0105] 2-1. Malondialdehyde (MDA) 함량 분석

[0106] 마우스의 폐 조직을 PBS를 넣고 균질화한 후 6000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 분리한 상등액에 1% 인산(Phosphoric acid)과, 0.67% 타이오바비투르산(thiobarbituric acid)을 넣고 혼합한 다음 95℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응 종료 후 원심분리하여 얻은 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0107] 측정결과는 도 3A에 나타내었다. 도 3A에 나타난 바와 같이, 아무런 처리하지 않은 Sham 그룹, 신선한 공기에 노출시킨 NC 그룹, NC 그룹 후 금은화 추출물을 처리한 NS 그룹의 MDA 함량은 각각 2.28 μmole/mg of protein, 2.51 μmole/mg of protein, 2.44 μmole/mg of protein로 그룹 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 반면, 미세먼지 노출군인 PM 그룹의 MDA 함량은 4.06 μmole/mg of protein 대조군인 NC 그룹 대비 증가하는 결과를 나타냈다. 그러나 금은화 추출물 처리한 SL, SM, SH 그룹에서 MDA 함량은 각각 2.30 μmole/mg of protein, 2.57 μmole/mg of protein, 2.55 μmole/mg of protein로 나타났다. MDA 함량은 화학적스트레스로 유도된 지질과산화물 생성 지표로써, 금은화 추출물 적용시 MDA 함량이 감소하였는바, 금은화 추출물이 지질과산화 억제하는 효과 있음을 확인하였다.

[0109] 2-2. Superoxide dismutase (SOD) 함량 분석

[0110] 마우스의 폐 조직을 PBS를 이용하여 균질화한 뒤, 400×g에서 10분간 원심분리하고 얻은 펠릿을 세포 추출 용액으로 4℃에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 이용하여 SOD kit (Dojindo, Kumamoto, Japan) 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

[0111] 측정결과는 도 3B에 나타내었다. 도 3B에 나타난 바와 같이, Sham 그룹, NC 그룹 및 NS 그룹에서 SOD 값은 각각 13.53 unit/mg of protein, 13.62 unit/mg of protein, 15.66 unit/mg of protein로 그룹 간 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 반면, PM 그룹의 SOD 값은 10.50 unit/mg of protein로 나타나, 대조군인 NC 그룹에 비해 감소하였다. 그러나 금은화 추출물 처리한 SL, SM, SH 그룹에서 SOD 값은 각각 13.55 unit/mg of protein, 16.72 unit/mg of protein, 15.66 unit/mg of protein로 나타나 PM 그룹 대비 증가하고 추출물 농도가 높아질수록 증가하는 것을 확인하였다. 체내 항산화 효소 중 하나인 SOD값이 금은화 추출물의 농도가 높아질수록 증가하였는

바, 금은화 추출물이 항산화 효과 있음을 확인하였다.

[0113] 2-3. Reduced glutathione (GSH) 함량 분석

[0114] 마우스의 폐 조직을 1 mM EDTA가 포함된 10 mM sodium phosphated buffer (pH 6.0)을 이용하여 균질화한 뒤, 균질액을 10,000×g에서 15분 동안 원심분리하였다. 이후 상등액과 5% metaphosphoric acid를 1:1로 혼합하여 2,000×g에서 2분 동안 원심분리하여 얻어진 상등액으로 분석에 이용하였다. 상등액과 0.26 M tris-HCl (pH 7.8)과 0.65 N-NaOH, OPT (in methanol)을 넣고 암실에서 15분 동안 반응시킨 뒤 형광광도계 (Infinite F200, Tecan)를 사용하여 excitation wave 320 nm 및 emission wave 420 nm에서 측정하였다.

[0115] 측정결과는 도 3C에 나타내었다. 도 3C에 나타난 바와 같이, Sham 그룹, NC 그룹 및 NS 그룹에서 환원형 GSH 함량은 각각 NC 그룹 대비 102.72%, 100.00%, 109.63%로 NS 그룹에서 환원형 GSH 함량이 증가하였다. 반면, PM 그룹의 환원형 GSH 함량은 NC 그룹 대비 79.38%로 나타나, 대조군인 NC 그룹에 비해 감소하였다. 그러나 금은화 추출물 처리한 SL, SM, SH 그룹에서 환원형 GSH 함량은 각각 NC 그룹 대비 86.07%, 102.56%, 105.38%로 나타나 PM 그룹 대비 증가하고 추출물 농도가 높아질수록 증가하는 것을 확인하였다. 체내의 항산화제 역할을 하는 환원형 GSH이 금은화 추출물의 농도가 증가할수록 증가하는 것을 통해, 금은화 추출물의 항산화 효과에 대해 확인하였다.

[0117] **<실험예 3> 미토콘드리아 기능 개선 효과 분석**

[0118] 3-1. 미토콘드리아 분리

[0119] 마우스 뇌 조직의 미토콘드리아 활성을 평가하기 위해 뇌 및 폐 조직에서 미토콘드리아를 추출하였다. 215 mM mannitol, 75 mM sucrose, 0.1% bovine serum albumin (BSA), 20 mM HEPES (Na+)로 이루어진 isolation buffer (pH 7.2)와 20 mM EGTA를 혼합된 버퍼를 이용해 뇌 및 폐 조직은 균질화하였고, 균질액은 1,300×g에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리를 통해 획득된 상등액을 13,000×g에서 10분 동안 다시 원심분리하였고, 펠렛을 획득하였다. 상기 펠렛에 20 mM EGTA와 0.1% digitonin이 함유된 isolation buffer를 첨가하여 ice에서 5분 동안 방치시킨 후, 이는 13,000×g에서 15분 동안 다시 원심분리하였다. 이를 통해 획득된 펠렛은 isolation buffer와 혼합하여 10,000×g에서 10분 동안 원심분리하였고, 최종적으로 획득된 펠렛을 이용하여 미토콘드리아 활성을 평가하였다.

[0121] 3-2. Reactive oxygen species (ROS) 함량 분석

[0122] 최종 펠렛을 미토콘드리아 분리 완충액에 첨가하여 최종 단백질 농도를 Bradford 단백질 분석 assay를 이용하여 약 10 mg/mL로 맞추어 사용하였으며, 25 μM DCF-DA 시약과 혼합하여 암흑에서 20분 동안 반응시켰다. 이 반응액은 형광광도계 (Infinite F200, Tecan)를 사용하여 excitation wave 485 nm 및 emission wave 535 nm에서 측정하였다.

[0123] 측정결과는 도 4A에 나타내었다. 도 4A에 나타난 바와 같이, Sham 그룹, NC 그룹 및 NS 그룹에서 ROS 함량은 각각 116.88 relative unites/mg of protein, 100.00 relative unites/mg of protein, 107.75 relative unites/mg of protein로 그룹간 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 반면, PM 그룹의 ROS 함량은 178.83 relative unites/mg of protein로 나타나, 대조군인 NC 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다. 그러나 금은화 추출물 처리한 SL, SM, SH 그룹에서 ROS 함량은 각각 116.09 relative unites/mg of protein, 125.99 relative unites/mg of protein, 116.09 relative unites/mg of protein로 나타나 PM 그룹 대비 감소하였고 추출물 농도가 높아질수록 감소하는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 금은화 추출물의 ROS 생성 억제 효과를 확인하였다.

[0125] 3-3. Mitochondrial membrane potential (MMP) 측정

[0126] 마우스의 폐 조직으로부터 추출한 미토콘드리아 추출물을 MMP 활성을 측정하기위해 단백질 농도 1.2 mg/mL로 맞추어서 사용하였으며, 미토콘드리아 추출물은 5 mM pyruvate와 5 mM malate가 함유된 미토콘드리아 isolation

buffer와 혼합하였고 이후, 1 μM JC-1을 첨가하여 20분 동안 암조건에서 반응시켰다. 반응액은 형광광도계(Infinite F200, Tecan)를 사용하여 excitation wave 530 nm 및 emission wave 590 nm에서 측정하였다.

[0127] 측정결과는 도 4B에 나타내었다. 도 4B에 나타난 바와 같이, Sham 그룹, NC 그룹 및 NS 그룹에서 MMP는 각각 NC 그룹 대비 107.66%, 100.00%, 102.58%로 그룹간 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 반면, PM 그룹의 MMP는 NC 그룹 대비 61.53%로 나타나, 대조군인 NC 그룹에 비해 유의적으로 감소하였다. 그러나 금은화 추출물을 처리한 SL, SM, SH 그룹에서 MMP는 각각 NC 그룹 대비 91.40%, 130.96%, 154.36%로 나타나 PM 그룹 대비 증가하였고 추출물 농도가 높아질수록 증가하는 것을 확인하였다.

[0129] 3-4. Adenosine triphosphate (ATP) 함량 측정

[0130] 마우스의 폐 조직으로부터 추출된 미토콘드리아 추출물에서 ATP level을 측정하기 위해, 추출물은 10,000×g에서 10분 동안 원심분리하였고, 이를 통해 획득된 펠렛을 1% trichloroacetic acid (TCA)와 혼합하여 ice에서 10분 동안 반응시켰다. 이후 25 mM Tris-acetate buffer (pH7.7)과 혼합한 뒤, 10,000×g에서 15분 원심분리하였고 이를 통해 획득된 상등액을 ATP assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 luminometer (GloMax-Multi Detection System, Promega, Corp., Madison, WI, USA)를 이용하여 ATP level을 측정하였다.

[0131] 측정결과는 도 4C에 나타내었다. 도 4C에 나타난 바와 같이, Sham 그룹, NC 그룹 및 NS 그룹에서 ROS 함량은 각각 4.66 nmole/mg of protein, 4.10 nmole/mg of protein, 4.25 nmole/mg of protein로 NS그룹이 Sham그룹 대비 ATP 수준이 감소하였다. 반면, PM 그룹의 ATP 수준은 2.76 nmole/mg of protein로 나타나, 대조군인 NC 그룹에 비해 유의적으로 감소하였다. 그러나 금은화 추출물 처리한 SL, SM, SH 그룹에서 ATP 수준은 각각 3.44 nmole/mg of protein, 3.63 nmole/mg of protein, 4.35 nmole/mg of protein로 나타나 PM 그룹 대비 증가하였고, 추출물 농도가 높아질수록 증가하는 것을 확인하였다.

[0133] **<실험예 4> 혈액내 면역세포 수 변화 측정**

[0134] 마우스의 혈액에서의 면역세포 변화를 확인하기 위해 백혈구를 분리하여 T 세포, helper T 세포 및 cytotoxic T 세포에 특이적인 표면 항원 마커인 CD3, CD4, CD8에 특이적인 항체를 사용하여 형광 염색하였다. 그 후, helper T 세포에서 분비하는 사이토카인(cytokines)을 확인하기 위해 type 1 helper T 세포와 type 2 helper T 세포에서 주로 분비되는 cytokine인 INF-γ와 IL-4를 각각 염색하여 BD FACS cantoII 유세포분석 장비(BD Sciences, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 혈액에서의 T 세포, helper T 세포, cytotoxic T 세포 및 helper T 세포에서 분비되는 IL-4 수준을 측정하였다.

[0135] 마우스의 혈액에서 분리한 백혈구 4×10^5 cells에서 T 세포를 얻기 위하여 CD3가 부착된 형광염색 시약에 반응하는 세포를 분리하였다. 그 중 helper T cell과 cytotoxicity T cell을 얻기 위하여 각각 CD4와 CD8가 부착된 형광염색 시약에 반응하는 세포를 분리하였고, helper T cell type 2에서 주로 분비되는 cytokine인 IL-4를 분리하였다(도 5A).

[0136] 측정결과는 도 5에 나타내었다. 도 5B에 나타난 바와 같이, PM 그룹, NC 그룹의 helper T cells (CD4)가 전체 T cells (CD3)에서 차지하는 비율은 각각 77.88%, 72.50%로 PM그룹이 대조군 대비 높게 나타났다. 다만, SH 그룹의 helper T cells (CD4)가 전체 T cells (CD3)에서 차지하는 비율은 72.58%로 PM 그룹 대비 감소하는 결과가 나타났다.

[0137] 또한, 도 5C에 나타난 바와 같이, PM 그룹, NC 그룹의 cytotoxicity T cells (CD8)가 전체 T cells (CD3)에서 차지하는 비율은 각각 22.10%, 13.76%로 PM그룹이 대조군 대비 높게 나타났다. 다만, SH 그룹의 cytotoxicity T cells (CD8)가 전체 T cells (CD3)에서 차지하는 비율은 17.28%로 PM 그룹 대비 감소하는 결과가 나타났다.

[0138] 또한, 도 5D에 나타난 바와 같이, PM 그룹, NC 그룹의 IL-4가 helper T cells (CD4)에서 차지하는 비율은 각각 1.00%, 0.54%로 PM 그룹이 대조군 대비 높게 나타났다. 다만, SH 그룹의 IL-4가 helper T cells (CD4)에서 차지하는 비율은 0.62%로 PM 그룹 대비 감소하는 결과가 나타났다.

[0140] **<실험예 5> 혈액내 면역물질 측정**

[0141] 마우스의 혈액을 4℃에서 10분 동안 10,000×g에서 원심분리하여 상등액을 얻은 다음, IgG ELISA kit (Abbkine, Wuhan, China) 및 IgE ELISA kit(Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 각각의 함량을 측정하였다.

[0142] 측정결과를 도 6에 나타내었다. 도 6A에 나타난 바와 같이, IgG의 경우 PM 그룹, NC 그룹, SH 그룹의 IgG 함량은 0.31 mg/mL, 0.20 mg/mL, 0.24 mg/mL로 미세먼지 처리군인 PM 그룹에서 대조군인 NC 그룹보다 IgG 함량이 증가하였으나, 금은화 추출물 처리군인 SH 그룹에서 PM 그룹보다 IgG 함량이 감소하는 결과가 나타났다.

[0143] 도 6B에 나타난 바와 같이,IgE의 경우 PM 그룹, NC 그룹, SH 그룹의 IgE 함량은 1.01 mg/mL, 0.76 mg/mL, 0.89 mg/mL로 미세먼지 처리군인 PM 그룹에서 대조군인 NC 그룹보다 IgE 함량이 증가하였으나, 금은화 추출물 처리군인 SH 그룹에서 PM 그룹보다 IgE 함량이 감소하는 결과가 나타났다.

[0144] 상기 결과로, 금은화 추출물이 염증을 개선하여 이와 관련된 면역물질인 IgG, IgE의 분비를 감소시키는 효과 가지고 있음을 확인하였다.

[0146] **<실험예 6> Western blot assay를 활용한 단백질 발현 분석**

[0147] 6-1. 미세먼지로 유도된 염증성 반응에 대한 개선 효과 분석

[0148] 폐 조직을 10배의 1% protease inhibitor가 함유된 RIPA buffer에 넣어 균질화(homogenization) 한 뒤, 13,000×g에서 원심분리하여 상등액을 추출하였다. 그 후, 동일한 단백질 함량이 되도록 정량한 뒤, Western blot analysis를 통하여 염증 관련 단백질인 p-Akt, p-IκB-α, p-NF-κB, TNF-α, IL-1β, COX-2의 발현을 측정하였다.

[0149] 측정 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이, PM 그룹에서 p-Akt, p-IκB-α, p-NF-κB, TNF-α, IL-1β, COX-2의 발현은 NC 그룹 대비 1.66, 1.45, 1.58, 1.42, 1.38 및 1.72로 증가하였다. 반면, SH 그룹에서 p-Akt, p-IκB-α, p-NF-κB, TNF-α, IL-1β, COX-2의 발현은 NC 그룹 대비 0.96, 1.04, 1.09, 1.12, 1.01 및 1.07로 감소하였다.

[0150] 상기 결과를 통하여, 미세먼지로 인해 염증성 반응 관련 단백질 발현이 증가하나, 금은화 추출물이 이러한 염증성 반응 단백질의 발현을 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0152] 6-2. 미세먼지로 유도된 폐 세포 손상 마커에 대한 개선 효과 분석

[0153] 폐 조직을 10배의 1% protease inhibitor가 함유된 RIPA buffer에 넣어 균질화(homogenization) 한 뒤, 13,000×g에서 원심분리하여 상등액을 추출하였다. 그 후, 동일한 단백질 함량이 되도록 정량한 뒤, Western blot analysis를 통하여 폐 세포 손상 관련 단백질인 p-JNK, Bax 및 Bcl-2 발현을 측정하였다.

[0154] 측정결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에 나타난 바와 같이, PM 그룹에서 p-JNK, Bax 및 Bcl-2 발현량은 NC 그룹 대비 1.26, 1.48 및 0.89으로 나타나, 미세먼지 처리군에서 대조군 대비하여 p-JNK 발현량은 증가하고 Bax 발현량은 증가하였으며 Bcl-2 발현량은 감소하였다. 반면, SH 그룹에서 Bax 및 Bcl-2 발현량은 NC 그룹 대비 1.01, 0.77 및 0.89로 나타나, 금은화 추출물 처리군에서 p-JNK 발현량은 감소하고 Bax의 발현량은 감소하였으며 Bcl-2 발현량은 증가하였다.

[0155] Bax/Bcl-2 ratio의 경우, PM 그룹에서 NC 그룹 대비 2.01으로 나타나, 미세먼지 처리군에서 대조군 대비하여 증가하였다. 반면, SH 그룹에서 0.84로 나타나, 금은화 추출물 처리군에서 감소함을 확인하였다(도 8E).

[0157] 6-3. 미세먼지로 유도된 폐 섬유화 마커에 대한 개선 효과 분석

[0158] 폐 조직을 10배의 1% protease inhibitor가 함유된 RIPA buffer에 넣어 균질화(homogenization) 한 뒤, 13,000×g에서 원심분리하여 상등액을 추출하였다. 그 후, 동일한 단백질 함량이 되도록 정량한 뒤, Western blot analysis를 통하여 폐 섬유화 관련 단백질인 TGF-β1, p-smad-2 및 p-smad-3 발현을 측정하였다.

[0159] 측정결과는 도 9에 나타내었다. 도 9에 나타난 바와 같이, TGF-β1의 발현량은 PM 그룹에서 NC 그룹 대비 2.03으로 나타나, 미세먼지 처리군에서 대조군 대비하여 증가하였다. 반면, SH 그룹에서 1.14로 나타나, 금은화 추출물 처리군에서 TGF-β1 발현이 감소함을 확인하였다. PM 그룹에서 p-smad-2의 발현량은 NC그룹 대비 1.70으로

나타나, 미세먼지 처리군에서 대조군 대비하여 증가하였다. 반면, SH 그룹에서 p-smad-2의 발현량은 NC 그룹 대비 1.27로 나타나, 금은화 추출물 처리군에서 p-smad-2 발현이 감소함을 확인하였다. PM 그룹에서 p-smad-3의 발현량은 NC 그룹 대비 1.60으로 나타나, 미세먼지 처리군에서 대조군 대비하여 증가하였다. 반면, SH 그룹에서 p-smad-3의 발현량은 NC 그룹 대비 1.08로 나타나, 금은화 추출물 처리군에서 p-smad-3 발현이 감소함을 확인하였다.

[0160] 상기 결과를 통하여, 금은화 추출물이 fibroblast의 성장 및 collagen 분비를 활성화 하여 조직 내 섬유화 유발하는 단백질인 TGF-β1의 발현을 감소시키고, 폐 섬유화를 유도하는 p-smad-2 및 p-smad-3의 발현을 감소시키는 것을 확인하였고, 금은화 추출물의 폐 섬유화 개선 효과를 확인하였다.

[0162] 6-4. 미세먼지로 유도된 matrix metalloproteinases (MMPs) 활성화에 대한 개선 효과 분석

[0163] 폐 조직을 10배의 1% protease inhibitor가 함유된 RIPA buffer에 넣어 균질화(homogenization) 한 뒤, 13,000 ×g에서 원심분리하여 상등액을 추출하였다. 그 후, 동일한 단백질 함량이 되도록 정량한 뒤, Western blot analysis를 통하여 MMP-1 및 MMP-2 단백질 발현을 측정하였다.

[0164] 측정결과는 도 10에 나타내었다. 도 10에 나타난 바와 같이, MMP-1의 발현량은 PM 그룹에서 NC 그룹 대비 1.27으로 나타나, 미세먼지 처리군에서 대조군 대비하여 증가하였다. 반면, SH 그룹에서 MMP-1의 발현량은 NC 그룹 대비 0.98로 나타나, 금은화 추출물 처리군에서 MMP-1 발현이 감소함을 확인하였다. MMP-2의 발현량은 PM 그룹에서 NC 그룹 대비 1.71로 나타나, 미세먼지 처리군에서 대조군 대비하여 증가하였다. 반면, MMP-2의 발현량은 SH 그룹에서 NC 그룹 대비 1.29로 나타나, 금은화 추출물 처리군에서 MMP-2의 발현이 감소함을 확인하였다.

[0165] 상기 결과를 통하여, 금은화 추출물이 콜라겐, 엘라스틴 등의 분해, 섬유증, 세포 손상 및 염증 반응에 관여하는 효소인 MMP 발현을 감소시키는 효과 가짐을 확인하였다.

[0167] **<실험예 7> 금은화 추출물의 지표성분 분석**

[0168] high performance liquid chromatography (HPLC)방법을 사용하여 표준물질(standard)을 통해 시료 속 물질을 정량하였다. 금은화에 함유된 생리활성(지표성분) 물질을 분석하기 위해 고성능 액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC, Ultramate 3000 series, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 수행하였다.

[0169] 금은화를 HPLC 분석한 결과, chromatogram을 도 11에 나타내었고, 정량분석 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0170]

(unit: μg/mg of dried weight)	
	Lonicera japonica
Secologanic acid	12.74 ± 0.12
Chlorogenic acid	9.20 ± 0.15

[0171] 도 11에 나타난 바와 같이, 금은화 추출물에서 2개의 main peak로 확인할 수 있는 화합물을 포함하여 총 3개의 화합물이 존재함을 확인하였다. 12.83 min에서 확인된 peak는 secologanic acid (UC-VIS spectrum similarity: 999.90)에 의한 것으로 확인되었으며, 13.20 min에서 확인된 peak은 chlorogenic acid (UC-VIS spectrum similarity: 999.89)에 의한 것으로 확인되었고, 14.94 min에서 확인된 peak은 secoxyloganin (UC-VIS spectrum similarity: 999.24)에 의한 것으로 확인되었다.

[0172] 상기 결과를 통하여, 금은화 추출물의 항산화 활성, 함염증 활성은 클로로겐산(chlorogenic acid), 세콜로간산(secologanic acid) 및 세콜로가닌(secoxyloganin) 등의 화합물에 기인한 것임을 확인하였다.

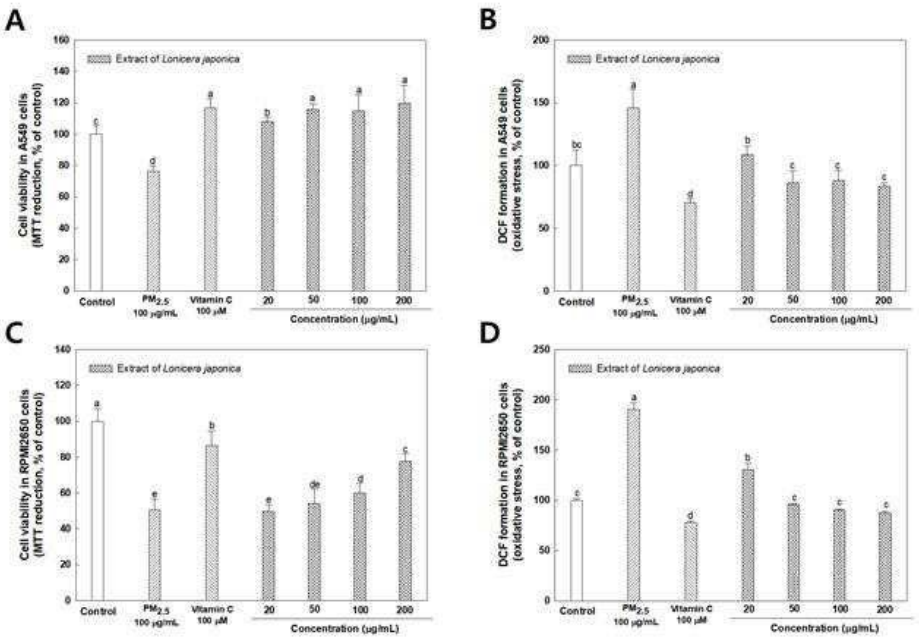
[0174] **<실시예 1> 통계분석**

[0175] 통계분석은 Window 용 SAS 9.4 version을 이용하여 분산분석(analysis of variance)을 실시하며, Duncan의 다

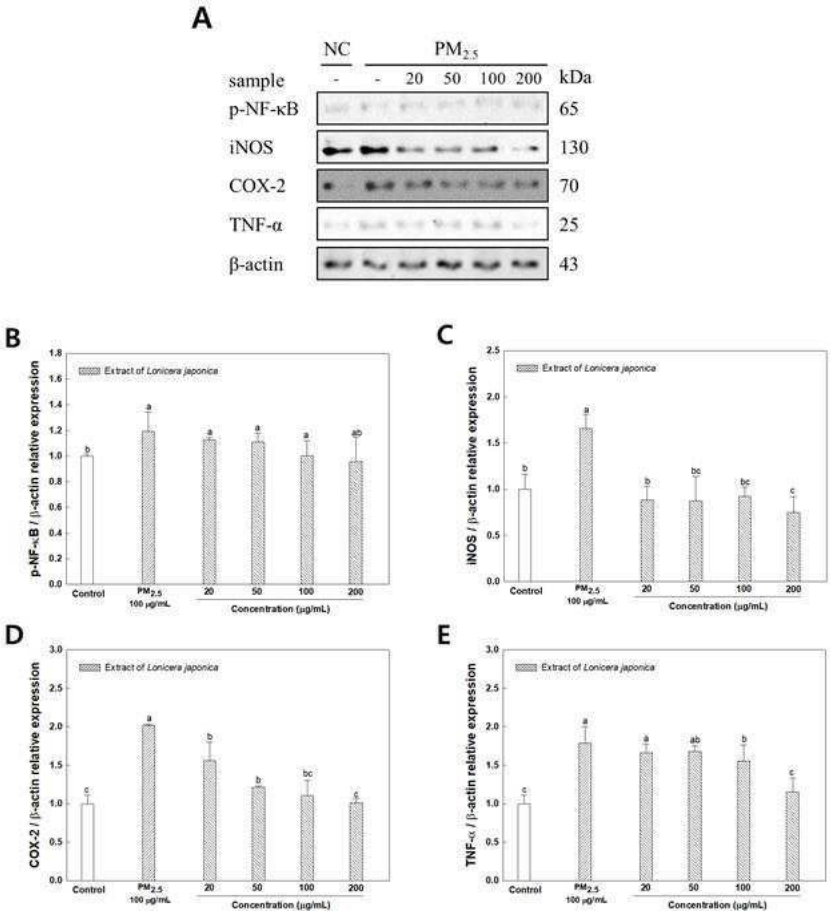
중범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검정하였다.

도면

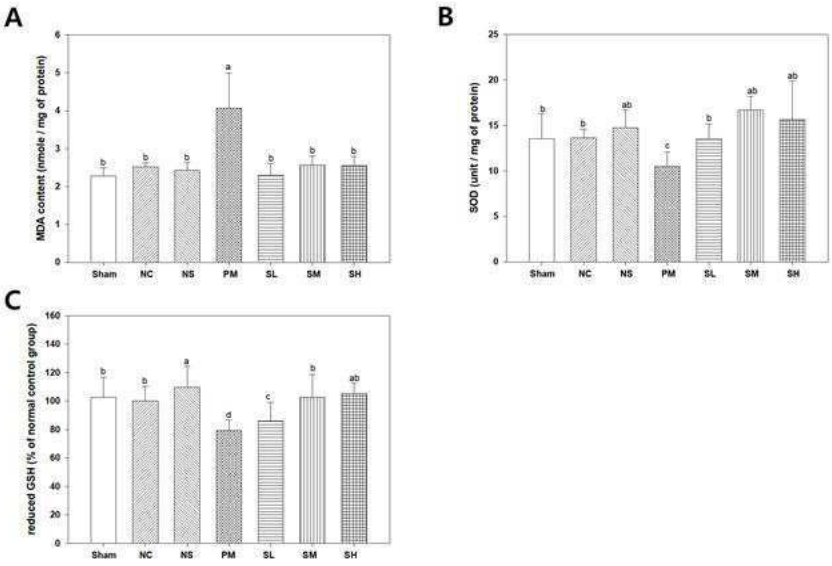
도면1



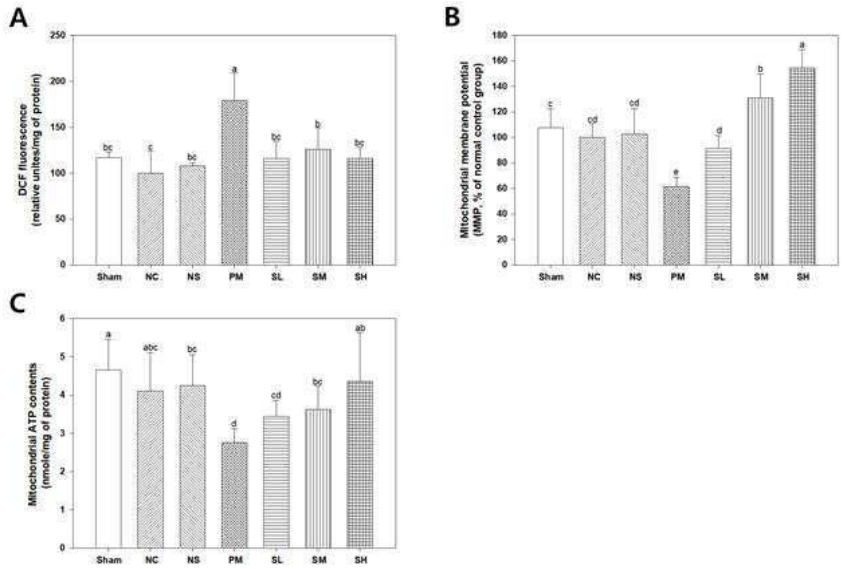
도면2


A
NC
PM2.5
sample
- - 20 50 100 200 kDa
p-NF-κB 65
iNOS 130
COX-2 70
TNF-α 25
β-actin 43
B
p-NF-κB / β-actin relative expression
C
iNOS / β-actin relative expression
D
COX-2 / β-actin relative expression
E
TNF-α / β-actin relative expression
Extract of Lonicera japonica
Control
PM2.5 100 μg/mL
Concentration (μg/mL)

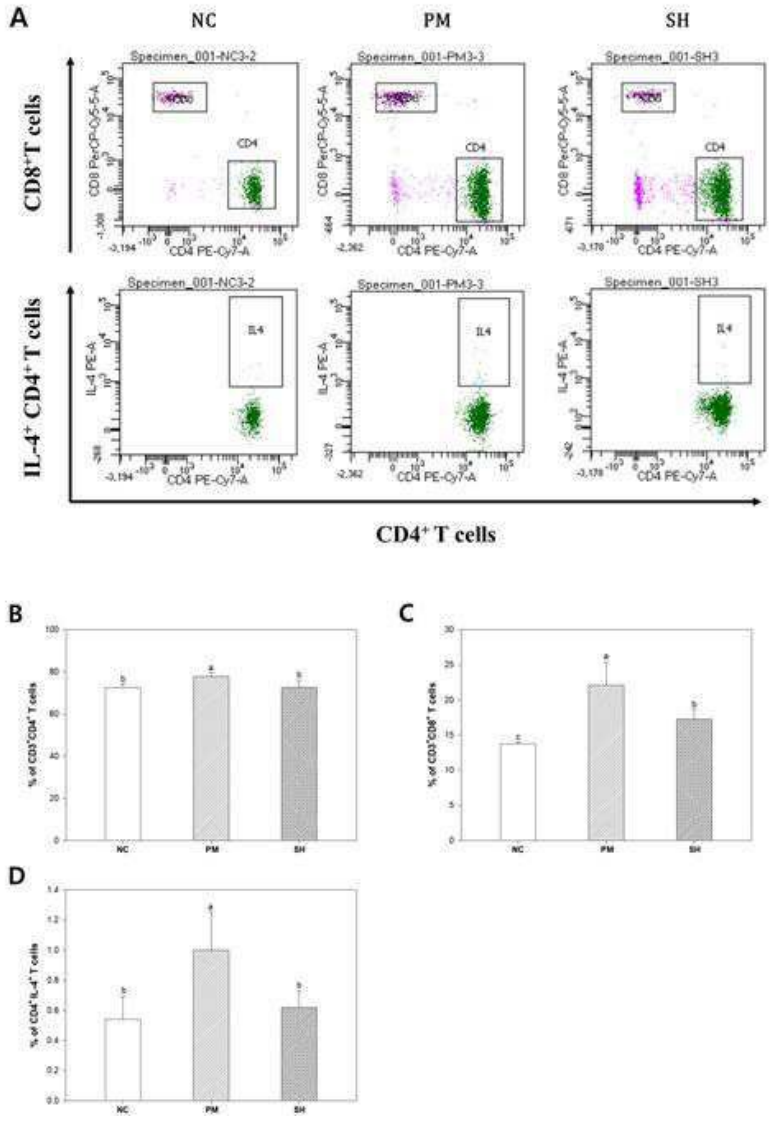
도면3


A
MDA content (nmole / mg of protein)
B
SOD (unit / mg of protein)
C
reduced GSH (% of normal control group)
Sham NC NS PM SL SM SH

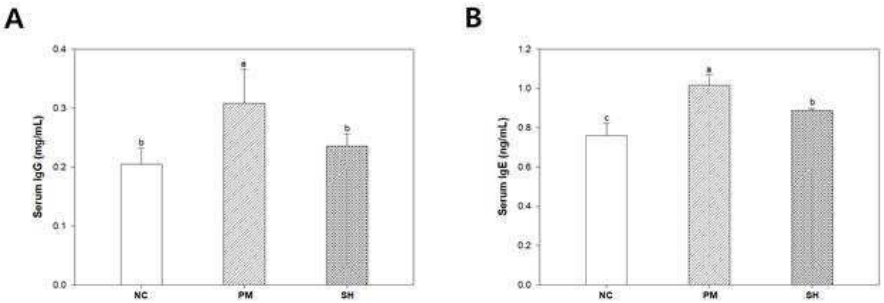
도면4


A
DCF fluorescence (relative unites/mg of protein)
B
Mitochondrial membrane potential (MMP, % of normal control group)
C
Mitochondrial ATP contents (nmole/mg of protein)
Sham
NC
NS
PM
SL
SM
SH

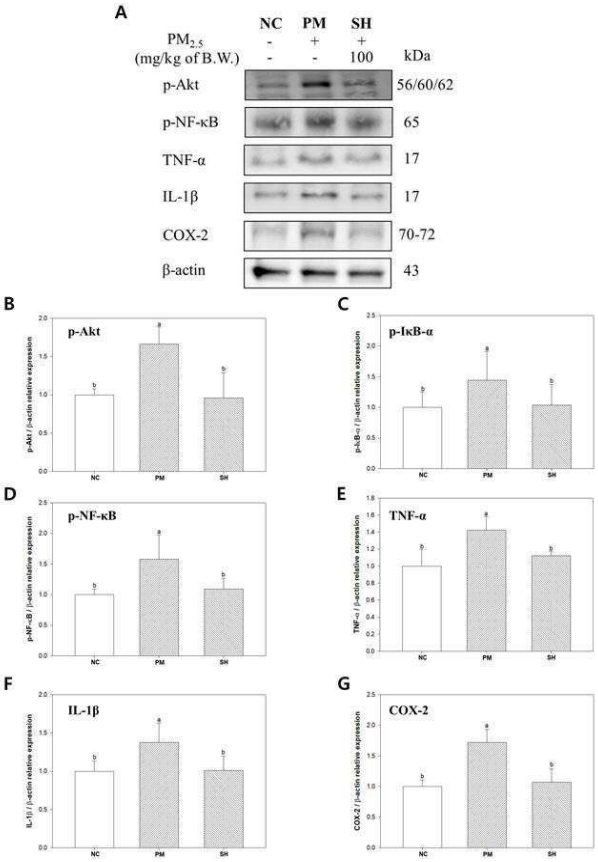
도면5


A
NC
PM
SH
CD8+T cells
IL-4+ CD4+ T cells
CD4+ T cells
Specimen_001-NC3-2
Specimen_001-PM3-3
Specimen_001-SH3
CD4
IL4
B
C
D
NC
PM
SH

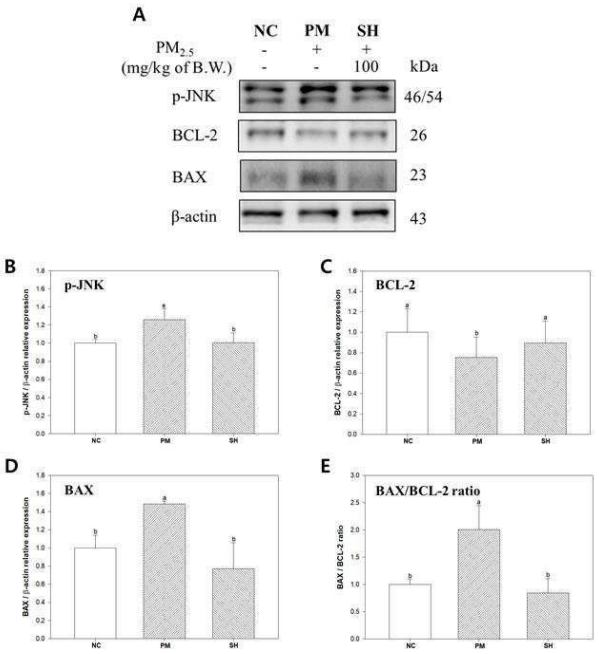
도면6


A
Serum IgG (mg/mL)
NC
PM
SH
B
Serum IgE (ng/mL)
NC
PM
SH

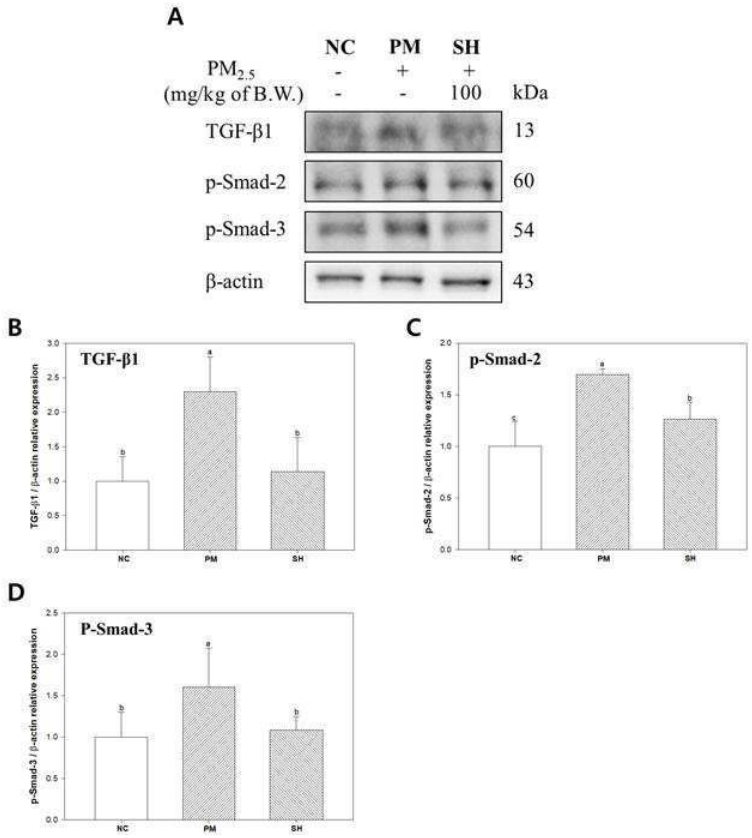
도면7


A
NC
PM
SH
PM2.5 (mg/kg of B.W.)
- - -
+ - +
- - 100
kDa
p-Akt
56/60/62
p-NF-κB
65
TNF-α
17
IL-1β
17
COX-2
70-72
β-actin
43
B
p-Akt
C
p-IκB-α
D
p-NF-κB
E
TNF-α
F
IL-1β
G
COX-2

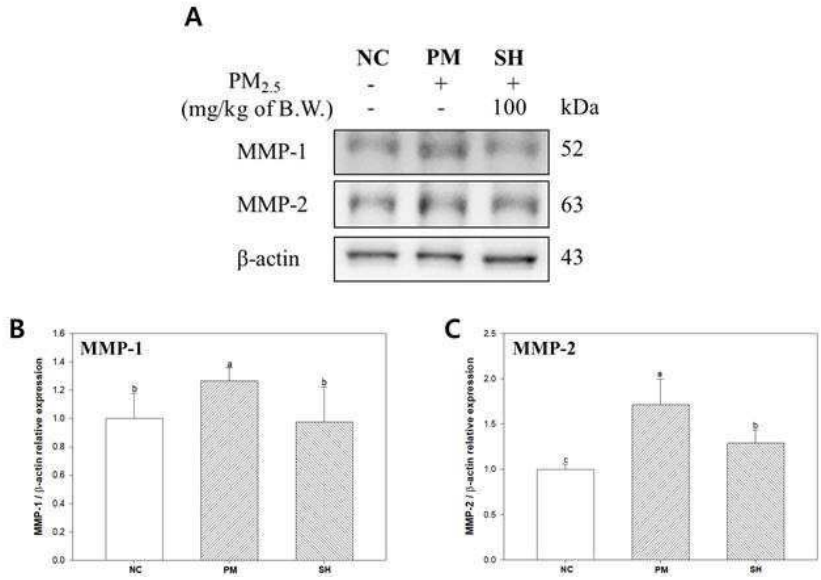
도면8


A
NC
PM
SH
PM2.5
(mg/kg of B.W.)
-
+
+
-
-
100
kDa
p-JNK
46/54
BCL-2
26
BAX
23
β-actin
43
B
p-JNK
C
BCL-2
D
BAX
E
BAX/BCL-2 ratio

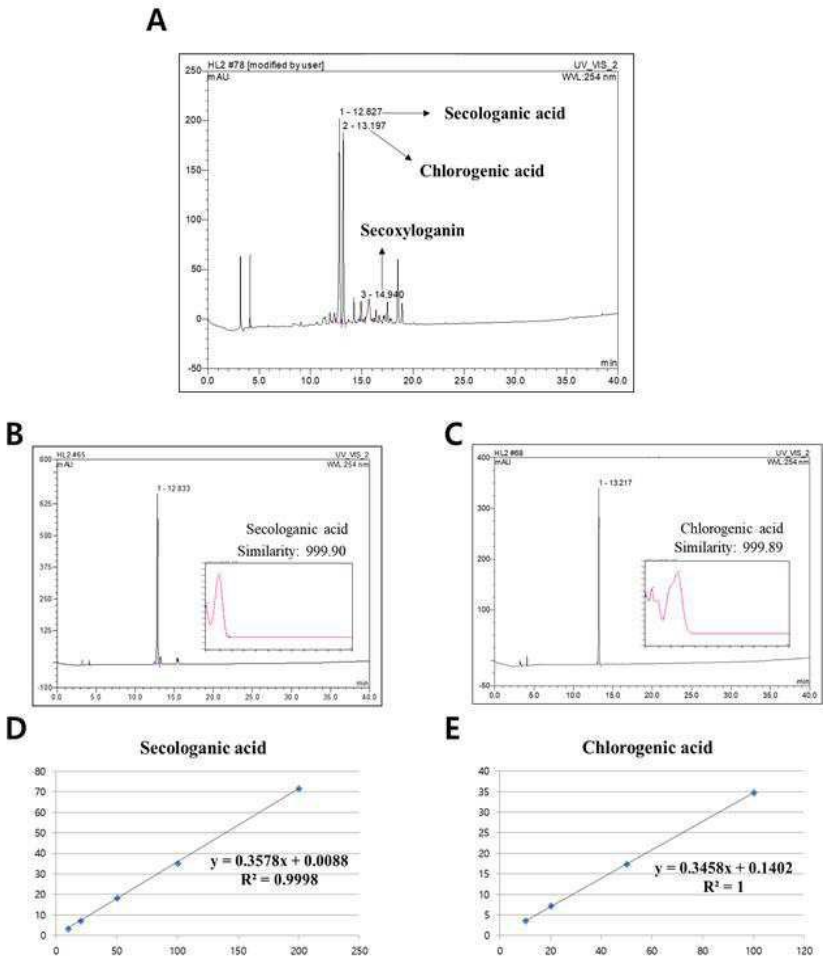
도면9


A
NC
PM
SH
PM2.5
(mg/kg of B.W.)
-
+
+
-
-
100
kDa
TGF-β1
13
p-Smad-2
60
p-Smad-3
54
β-actin
43
B
TGF-β1
C
p-Smad-2
D
P-Smad-3

도면10


A
NC
PM
SH
PM2.5
(mg/kg of B.W.)
-
+
+
-
-
100
kDa
MMP-1
52
MMP-2
63
β-actin
43
B
MMP-1
MMP-1 / β-actin relative expression
NC
PM
SH
C
MMP-2
MMP-2 / β-actin relative expression
NC
PM
SH

도면11


A
Secologanic acid
Chlorogenic acid
Secoxyloganin
B
Secologanic acid
Similarity: 999.90
C
Chlorogenic acid
Similarity: 999.89
D
Secologanic acid
y = 0.3578x + 0.0088
R² = 0.9998
E
Chlorogenic acid
y = 0.3458x + 0.1402
R² = 1