

## Ovalbumin과 미세먼지로 유도된 호흡기 염증에 대한 손바닥선인장 (*Opuntia ficus-indica*) 줄기 추출물의 보호효과

김현정<sup>1</sup> · 장민철<sup>1</sup> · 김봉균<sup>1</sup> · 김승형<sup>2</sup> · 박인재<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>주식회사 휴럼 기능성소재연구소, <sup>2</sup>대전대학교 동서생명과학연구원

### Protective Effects of *Opuntia ficus-indica* Stem Extract on Ovalbumin and PM10-induced Respiratory Inflammation

Hyun-Jung Kim<sup>1</sup>, Min Cheol Jang<sup>1</sup>, Bong-Kyun Kim<sup>1</sup>, Seung-Hyung Kim<sup>2</sup>, and In-Jae Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Hurum Co., Ltd. Research Center

<sup>2</sup>Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University

#### Abstract

*Opuntia ficus-indica* (OFI), or Prickly Pear Cactus, is effective in cough, fever, pain and anti-inflammatory action, and asthma. This study aims to investigate the effect of OFI stem extract on the respiratory system of animal models induced by ovalbumin (OVA) and fine dust (PM10) and to analyze the indicator substances of OFI stem extract. In the OFI stem 50% ethanol extract (OFI-50E) administration group, the number of immune cells and inflammatory cytokines in the lungs and BAL decreased to a similar level to the positive control group administered with dexamethasone. In addition, OVA-specific IgE and airway hyper-reactivity (AHR) were significantly reduced. Also, the deposition of PM10 observed through staining of lung tissue was clearly reduced in the OFI-50E 200 mg/kg administration group. The anti-inflammatory mechanism in the lung was found to obstruct the production of inflammatory cytokines by impeding the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways through the inhibition of IRAK-1 active cells. The main component of OFI stem 50% ethanol extract was identified to be narcissin. According to the study results, OFI is expected to be a respiratory health functional food.

**Keywords:** *Opuntia ficus-indica*, asthma, respiratory inflammation, PM10, fine dust

#### 서 론

미세먼지는 대기의 총 부유 분진(total suspended, TSP) 중 지름이 10  $\mu$ m 보다 작은 미세먼지(PM10)와 지름이 2.5  $\mu$ m보다 작은 초미세먼지(PM2.5)로 구분되며, 이는 호흡 시 체내 침착이 가능한 호흡성 먼지(respirable dust)로 알려져 있다. 미세먼지는 디젤배기가스 및 다양한 원인으로 발생하는 질소산화물, 황산화물 등이 공기 중에서 화학 반응하여 생성되는 황산염, 질산염과 흙먼지, 꽃가루 등으로 구성되어 있다(Mangia et al., 2015). 미세먼지는 입자가 매우 작아 폐포까지 깊숙하게 침투하여 기도의 상피세포에 염증 반응을 유발하고, 기도의 염증을 흉부교감, 기침, 천명 등의 증상을 나타내며 각종 호흡기 질환이 기도 염증과 관련이 있다(Doeing & Solway, 2013). 일반적으로 기

도 염증이 유발되면 기관지 폐포세척액 내의 과립구와 림프구의 총 세포수가 늘어나면서 기도 및 폐포에 침윤한다. 또한 호산구, T helper 2 cell, mast cell 등 염증 세포에서 분비되는 tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-6, IL-13, IL-33 등의 염증성 cytokine은 점액 세포의 크기와 점액 물질의 양을 가중시켜 염증을 발생시킨다(Barnes, 1994; Nials & Uddin, 2008; Ghio et al., 2012). OECD 보고서에 따르면 대기오염으로 인한 전 세계의 조기 사망자는 2010년 300만 명에서 2060년 약 900만 명에 이를 것으로 추정하며, 국내의 경우 인구 100만 명당 2010년 360명에서 2060년 1,109명으로 약 3배 증가할 것으로 전망된다(Lanzi, 2016). 그러나 현재까지 미세먼지에 의한 기관지 염증에 관하여 보호 및 완화에 대한 뚜렷한 대책이 없는 상황이며, 미세먼지에 노출되었을 때 발생하는 호흡기 염증을 개선할 수 있는 천연물 소재에 대한 관심이 높아지고 있다. 국내에서 재배되는 대표적인 선인장인 손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica*)은 기온이 따뜻한 제주도, 남해안 일대에서 재배되며, 부채선인장과에 속한다. 형태가 사람의 손바닥을 닮아서 손바닥선인장이라

\*Corresponding author: In-Jae Park, Hurum Co., Ltd. Room 416, Daeryung Techno-Town3, 115, Gasan Digital 2-ro, Geumcheon-gu, Seoul 08505, Korea  
Tel: +82-43-217-1077; Fax: +82-43-217-1088  
E-mail: [fungi1978@hurumcorp.com](mailto:fungi1978@hurumcorp.com)  
Received May 17, 2023; revised June 9, 2023; accepted June 16, 2023

불리는데, 백년초라고도 불린다. 예로부터 식용으로 섭취되어 왔으며 <중약대사전>, <본초강목>에서 기침, 해열진통제, 천식 등에 효능이 있는 것으로 기록되어 민간요법에 활용되어 왔다. 또한 보고된 연구 자료에 의하면 진통, 소염 작용(Choi et al., 2002), 항당뇨 활성(Shin et al., 2002), 항산화 작용(Hwang et al., 2015) 등의 효과가 있는 것으로 보고되어 있다. 손바닥선인장의 항염증 효능 등이 ovalbumin (OVA) 및 미세먼지에 의한 호흡기 염증을 개선할 수 있을 것으로 판단됨에 따라 본 연구에서는 손바닥선인장의 줄기 추출물(OFI extract)이 OVA와 미세먼지에 의한 호흡기 염증 개선 효능에 대하여 MH-S 세포주에서 작용 기전을 규명하고자 하였으며 동물 모델을 통하여 염증 개선 효과를 살펴보고자 하였다. 또한, 손바닥선인장 줄기 추출물의 지표 물질을 분석하고 해당 물질의 분석법을 확립하며, 세포 실험을 통하여 항염증 효능을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 손바닥선인장 줄기 추출물(OFI extract) 및 미세먼지복합물(FDM)의 제조

본 실험에 사용한 손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica*)은 제주산으로 농업법인삼원네이처(제주시, 제주특별자치도)에서 손바닥선인장 줄기 건조물로 구입하여 사용하였다. 열수추출물(OFI-W)은 손바닥선인장 건조물에 10-15배수(w/v) 열수를 가하여 95±5°C에서 5시간 동안 2회 환류추출한 후, 100 마이크론 필터로 여과하였다. 감압농축기로 농축한 후 동결 건조하여 시료로 사용하였다. 50% 주정추출물(OFI-50E)은 손바닥선인장 건조물에 10-15배수(w/v) 50% 농도의 주정을 가하여 65±5°C에서 5시간 동안 2회 환류추출한 후, 100 마이크론 필터로 여과하였다. 감압농축기로 농축한 후 동결 건조하여 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 미세먼지복합물(fine dust + diesel particulate matter, FDM)은 1%의 명반(aluminium hydroxide) gell adjuvant가 혼합된 saline 용액에 PM10 (ERM CZ-120; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 3 mg/mL 농도와 diesel particulate matter (DPM) (SRM 2975, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.6 mg/mL 농도가 되도록 제조하여 사용하였다. FDM은 100 µL씩 intranasal tracheal (INT) injection 방법으로 3일에 한 번씩 총 3회(약물투여 3일 후, 6일 후, 9일 후) 기도를 통해 폐로 직접 주입하였다. Dexamethasone은 3 mg/kg 씩 매일 1회, 11일간 복강주사로 투여하였다. FDM 마지막 투여 3일 후 실험동물을 희생시켜 효능평가를 실시하였다(Lee et al., 2022).

### HPLC 분석

손바닥선인장 줄기 50% (w/v) ethanol extract (OFI-50E)

**Table 1** Mobile phase condition for HPLC analysis of *Opuntia ficus-indica* extract (OFI-50E)

Time (min)	% A (0.1% C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O)	% B (CH <sub>3</sub> CN)
0	80	20
10	80	20
50	50	50
53	0	100
73	0	100
75	80	20
95	80	20

의 지표 물질 시험법 설정을 위해 HPLC (high performance liquid chromatography) 분석을 실시하였다. 손바닥선인장 줄기 추출물(OFI-50E)을 80% (w/v) methanol에 용해하여 PVDF syringe filter로 여과한 후 분석에 사용하였다. 분석 기기는 Waters 1500 Series System, Waters 2998 PDA Detector (Waters Corp., Worcester, MA, USA), Capcell Pak C18 column MGII (250×4.6 mm I.D., 5 µm, Shiseido, Japan)를 사용하였고 분석에 사용된 모든 용매는 J.T Baker (Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구매한 HPLC grade를 사용하였다. 이동상으로 0.1% trifluoroacetic acid (A)와 acetonitrile (B)를 사용하였고 분석 조건은 Table 1과 같다. 363 nm에서 크로마토그램을 추출한 후 주요 peak의 화합물을 회수하여 <sup>1</sup>H NMR 분석을 실시하였다.

### 호흡기 손상 복합동물모델 제작

본 동물 실험은 대전대학교 동물윤리 심의위원회의 심의를 받아 진행되었으며(동물 실험 승인번호 DJUAR2019-021), 동물 실험 윤리위원회 가이드라인을 준수하여 시행되었다. 7주령의 수컷 Balb/c 마우스(Orient Bio Co., Ltd. Gyenggi)를 7 군으로 나누어 실험하였으며, 각 군당 8마리씩 구성하였다. 정상군(Balb/c Normal), 대조군(OVA+PM10-CTL), 양성대조군(OVA+PM10-Dexamethasone 3 mg/kg), OVA+PM10+OFI-W 100 mg/kg, OVA+PM10+OFI-W 200 mg/kg, OVA+PM10+OFI-50E 100 mg/kg, OVA+PM10+OFI-50E 200 mg/kg으로 실험을 진행하였다. OVA에 의한 호흡기 손상 모델의 제작을 위해 PBS에 500 µg/mL 난황 알부민(OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) alum (aluminum potassium sulfate; Sigma)을 용해하였다. 10 N NaOH를 이용하여 혼합물의 pH를 6.5로 조정하고 상온에서 1시간 방치한 후 750 x g에서 5분 동안 원심 분리하여 얻은 OVA/Alum 침전물(pellet)을 증류수에 용해하였다. 100 µg OVA/Alum를 0.2 mL로 조정하고 0일과 7일째에 복강 내 주사하여 전신 감각 시켰다. 3일과 10일째에 2% OVA 100 µL를 기도 투여(i.t) 하고, 2주째에 1% OVA 용액을 하루 1회 30분, 일주일에 3회 분무하여 비강과 기도를 통해 흡입시켰다. 안와채혈법으로 채혈하여 anti-OVA

antibody 수준을 측정하여 천식 유발 마우스를 선별하였다. 제조된 미세먼지 PM10의 intranasal tracheal injection은 OVA 감작 22일째에 1% OVA 용액 분부와 동시 시작하여 기도를 통해 폐로 직접 주입하였다. 손바닥선인장 줄기 추출물의 투여는 OVA 감작 21일째부터 손바닥선인장 줄기 추출물은 매일 1회, 24일간 경구 투여하였고, dexamethasone은 3 mg/kg씩 매일 1회, 24일간 복강 주사 투여하였다.

#### 폐 조직, 기관지 폐포에서의 세포 분리

마우스의 기관지 폐포(bronchoalveolar lavage, BAL)로부터 세포를 분리하기 위해 기관지에 fetal bovine serum (FBS)-free Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배양액 1 mL를 반복 순환시켜 회수한 후, ammonium chloride potassium (ACK) 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 FBS-free DMEM 배지로 세척하였다. 이를 기관지 폐포세척액(bronchoalveolar lavage Fluid, BALF)으로 사용하였다. 또한 마우스로부터 적출한 폐조직을 파쇄한 후 3 mL DMEM 배지에 넣고 1 mg/mL의 collagenase IV (C5138, Sigma)를 가하여 shaking incubator에서 37 °C, 30분 동안 4회 이상 조직 분해를 통해 폐 세포를 분리하였고, DMEM 배지로 세척 후 현탄하여 cell strainer (352350, FALCON)으로 불순물을 제거하였고 이를 실험에 사용하였다.

#### 염증성 cytokine 발현 정도 분석

BALF 및 비장 세포에서 염증성 cytokine인 IL-17, TNF- $\alpha$ , CXCL-1, MIP-2 등의 발현 정도를 측정하기 위해 ELISA (enzyme linked immune sorbent assay)를 이용하였다. 각 항체(antibody)를 microwell에 coating한 후 4°C에서 24시간 반응시켰다. 각 well을 3회 washing buffer로 세척한 후에 10배 희석한 혈청을 100  $\mu$ L씩 분주하였다. 실온에서 1시간 방치한 후 washing buffer로 2회 세척한 다음, antibody Avidin-HRP conjugated (R&D system) 100  $\mu$ L를 처리하고 실온에서 1시간 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu$ L씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50  $\mu$ L의 stop solution을 처리하여 ELISA reader (Emax, Molecular Devices) 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 세포 수 산정

폐 조직 및 BAL의 총 세포수 측정을 위해 0.04% trypan blue로 염색하고 현미경을 이용하였고, Diff-Quik Stain으로 호중구 수의 증가를 확인하였다. 면역세포수 측정을 위해 분리한 BALF, 폐 세포를  $5 \times 10^5$  cell로 맞춘 후 4°C에서 면역형광염색(Immunofluorescence staining)하였고 fluorescence activated cell sorter (FACS) 분석하였다. Staining한 후 3회 이상 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램(BD Biosciences, San Diego, CA)을 통해 세포 빈도수를 백분율(%)로 측정하였

고, 각 조직의 절대 총 세포수를 계산하였다.

#### Western blot

MH-S alveolar macrophage를  $1 \times 10^6$  cell/well로 분주하고 6시간 된 6 well plate에 OFI-50E를 농도별 처리하고 30분 후 미세먼지 50  $\mu$ g/mL를 처리하였다. 24시간 배양한 후 PBS로 3회 세척하고 원심분리 한 pellet에 lysis buffer를 가하였다. 이를 4°C에서 30분 방치한 후, 12,000 rpm에서 30분 원심분리하여 상등액을 사용하였다. 다양한 단백질의 정량을 위해 BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하였다. 희석한 sample buffer에 단백질 10  $\mu$ g을 넣어 100°C에서 10분간 불활성화 시킨 후 10% SDS polyacrylamidegel에 전기영동 하였다. SDS polyacrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 transfer하여 5% non fat dry milk에서 1시간 blocking 하였다. 1차, 2차 항체를 상온에서 1시간씩 부착시켰고 사이에 washing을 TBST buffer로 3번씩 진행하였다. ECL (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA)을 처리한 membrane을 암실에서 X-ray film에 감광시켜 현상하였고, 각 밴드는 Image J 소프트웨어를 이용하여 정량화 하였다.

#### 면역형광염색(immunofluorescence staining)

폐 조직에 대한 신호전달 단백질의 발현 양상을 확인하기 위해 면역형광염색을 하였다. 냉동 폐조직을 cryostat microtome (CM 3050S; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 이용하여 20  $\mu$ m 두께로 자른 후 4% paraformaldehyde와 4% sucrose가 포함된 PBS로 40분 동안 고정하였다. 이를 0.5% Nonidet P-40이 포함된 PBS로 투과시켰으며 2.5% 말 혈청과 2.5% BSA (bovine serum albumin)로 16시간 blocking 하였다. 2중 면역형광염색은 interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK-1), TNF- $\alpha$ , CXCL-2, STAT3 등의 항체로 4°C에서 overnight 반응시켰고, 형광으로 표지 된 2차 항체로 2시간 추가 반응시켰다. 핵 염색은 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 사용하였고 조직 절편은 Eclipse Ti-E inverted fluorescence microscope (Nikon Instruments Inc., Mississauga, Canada)로 관찰하였다.

#### 폐조직의 조직병리학적 분석

Formalin으로 고정한 폐조직을 paraffin으로 포매한 후 5  $\mu$ m 두께로 절편하였다. 폐 조직 절편은 hematoxylin and eosin (H&E)과 Masson's trichrome 염색을 하였고 Alcian blue/Periodic acid-Schiff stain (AB/PAS) 염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

#### 기도 저항성(AHR; airway hyper-reactivity) 측정

실험은 Peebles Rs Jr의 방법을 변형하여 시행하였다. 마

지막 분무 24시간 후, methacholine (Sigma, USA)을 PBS에 희석하여 3.125 mg/mL, 6.25 mg/mL, 12.5 mg/mL 및 25 mg/mL의 농도로 각각 5분간 분무를 통해 노출시킨 후 동물용 체적변동측정기를 사용하여 Penh 값을 5초 간격으로 3분간 측정하였으며, 측정값의 평균을 대푯값으로 취하였다.

**Narcissin의 세포독성 측정**

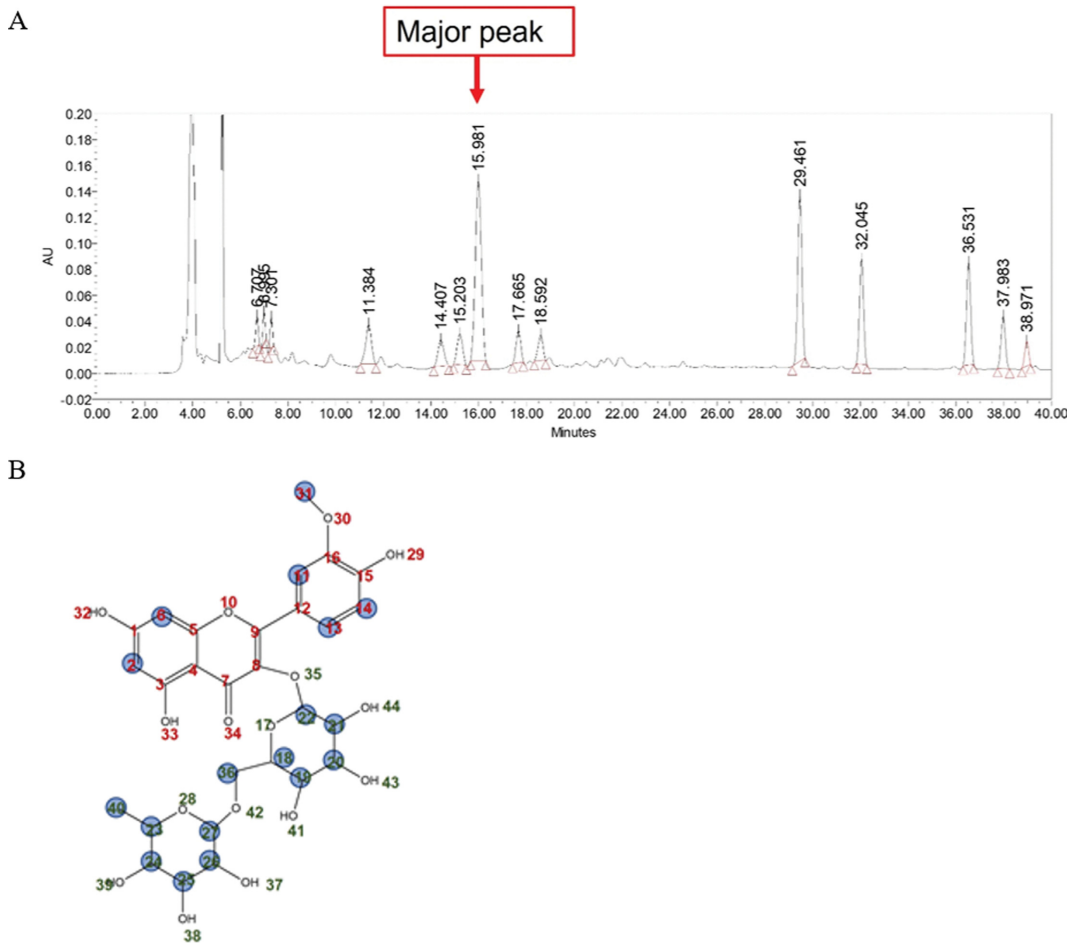
MH-S alveolar macrophage cell (ATCC, Rockville, MD, USA)을 1640 media (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에 10% FBS (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)와 1% antibiotics (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 첨가한 배지를 사용하여 96 well plate에 well당  $2 \times 10^4$  cell이 되도록 분주하고, narcissin을 0.75, 3, 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처리한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 항온 및 항습 조건에서 24시간 배양하였다. MTS tetrazolium salt와 electron coupling reagent (Phenazine methosulfate, PMS)를 20:1 비율로 혼합한 후, 혼합액과 RPMI 1640 media를 각 50 µL씩 well 당 총 100 µL를 분주하였다. 4시간 배양 후 plate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**NO (nitric oxide) 생성량, IL-6 및 TNF-α 생성량 측정**

MH-S alveolar macrophage cell을 1640 media에 10% FBS와 1% antibiotics를 첨가한 배지를 사용하여 6 well plate에 well당  $1 \times 10^6$  cell이 되도록 분주하고, PM10 50 µg/mL와 narcissin을 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처리한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 항온 및 항습 조건에서 24시간 배양하였고, 배양액을 실험에 사용하였다. NO 생성량을 측정하기 위해 배양액과 griess 시약을 각각 100 µL씩 혼합하여 37°C에서 10분 방치 후, ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrate로 작성한 표준곡선에 대입하여 NO 함량을 산출하였다. 또한, 배양액에서 IL-6 및 TNF-α (R&D system, USA) 수준을 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**통계처리**

실험 집단 간 수치 데이터는 각 실험군 결과값 mean± standard error (SEM)로 나타내었으며, SPSS 11.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 독립 표본 T-검정(independent samples t-test)을 이용하여 유의성을 검증



**Fig. 1.** Chromatogram and structure of compound purified from *Opuntia ficus-indica* (A) Major peak of OFI-50E was analyzed by HPLC, (B) Structural formula of major peak (indicative compound; narcissin) by <sup>1</sup>H NMR.

하였다. *p* 값이 0.05, 0.01 혹은 0.001 보다 작은 경우를 구분하여 분석하였으며, 각 경우에 해당 시 통계적으로 유의적 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### OFI-50E의 HPLC 분석

손바닥선인장 줄기 50% ethanol extract (OFI-50E)의 지

표성분 분석 결과, OFI-50E의 주요 화합물은 narcissin (1.59±0.1 mg/g)으로 확인되었다(Fig. 1).

### 기관지 폐포세척액 및 폐의 총세포수

폐 조직 및 BAL의 총세포수는 OVA와 미세먼지에 노출시킨 대조군(OVA+PM10\_CTL)에서 BAL 및 폐의 전체 세포 수가 증가하였으며, dexamethasone을 투여한 양성대조군(Dexa, 3 mg/kg)에서 유의적으로 감소하였다. OFI-50E

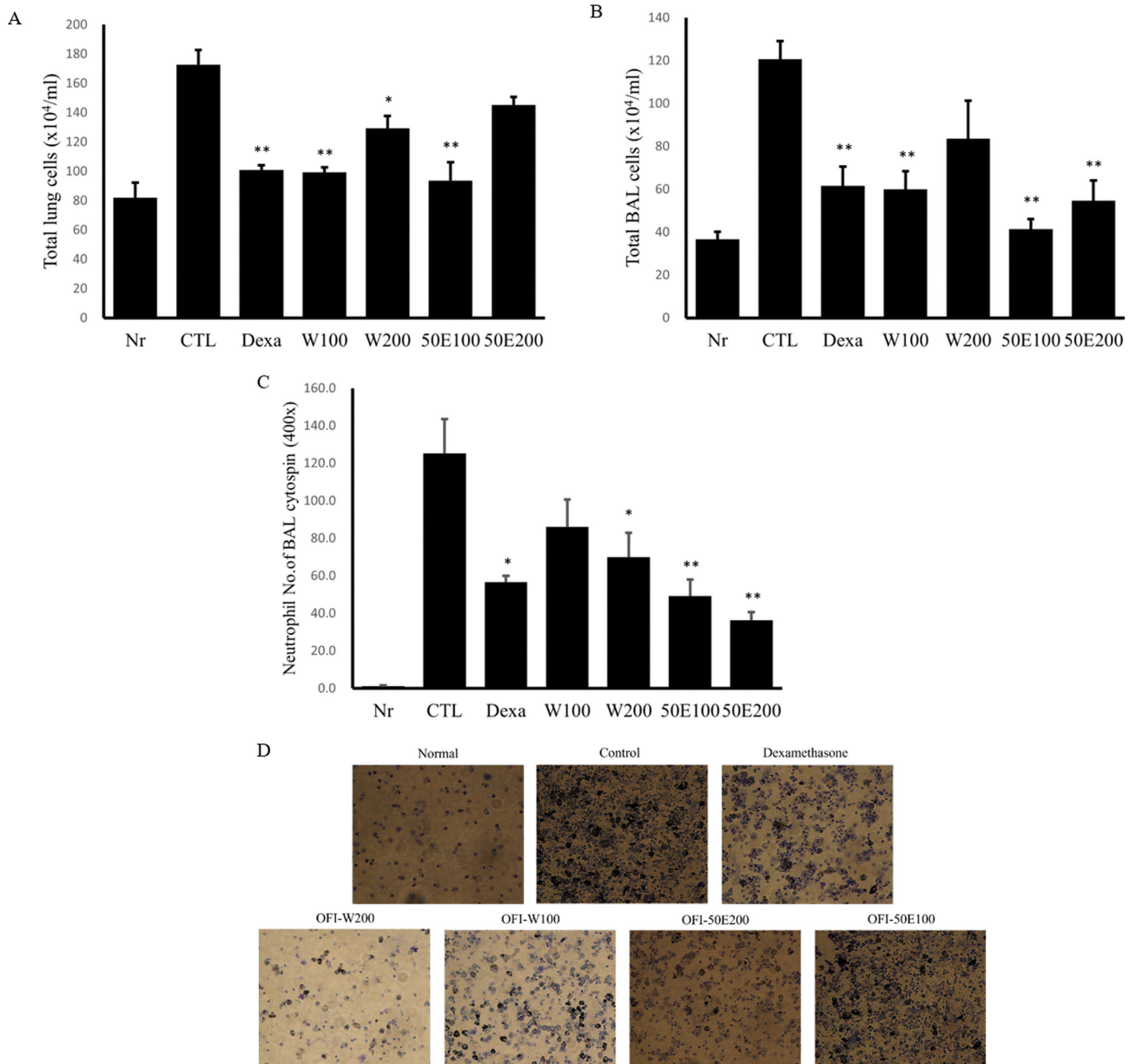


Fig. 2. The effects of OFI-W and OFI-50E on airway immune cell number and neutrophilic airway inflammation in OVA+PM10-sensitized airway inflammation murine model. Total BAL and lung cells of each treatment group. (A) Total Lung cells, (B) Total BAL cells, (C) Neutrophils (D) Diff-Quik Staining. Nr: Normal, CTL: OVA+PM10-sensitized control group, Dexa: 3 mg/kg dexamethasone-treated OVA+PM10-sensitized group, OFI-W 100 and 200: OVA+PM10-sensitized group treated with 100 and 200 mg/kg OFI water extract, OFI-50E 100 and 200: OVA+PM10-sensitized group treated with 100 and 200 mg/kg OFI 50% ethanol extract. Data are expressed as means±standard error of the mean (SEM), n = 8, \* *p*<0.05, \*\* *p*<0.01, and \*\*\* *p*<0.001 vs. CTL.

100 mg/kg 투여군과( $p<0.01$ ) OFI-W 100 mg/kg 투여군( $p<0.01$ )의 폐 총세포수가 유의적으로 감소하였고, BAL 에서는 OFI-50E 100 mg/kg 투여군( $p<0.01$ ), 200 mg/kg 투여군( $p<0.01$ ), OFI-W 100 mg/kg 투여군( $p<0.01$ )의 총세포수가 유의적으로 감소하였다. 또한, OVA와 미세먼지로 유발된 대조군의 호중구(neutrophils) 세포 수가 크게 증가하였으며, 양성대조군 및 OFI-50E 100 mg/kg, 200 mg/kg 투여군에서의 감소( $p<0.01$ )가 눈에 띄었다. 폐의 염증 반응으로 인해 증가된 호중구 세포의 감소로 보아 손바닥선인장 줄기 추출물이 폐의 염증 반응을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 2).

#### 기관지 폐포세척액 및 폐의 면역세포수

폐 조직에서의 면역세포수를 산출한 결과, 활성화된 T helper cell CD4<sup>+</sup>&CD69<sup>+</sup> 절대세포수에서 OFI-50E 100 mg/kg, 200 mg/kg 투여군이 양성대조군(Dexa, 3 mg/kg) 보다 더 높은 유의성을 가지게 감소하였으며( $p<0.01$ ), CD62L<sup>+</sup>/CD44<sup>high</sup> cell, CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> cell의 결과에서는 양성대조군과 함께 OFI-50E 200 mg/kg 투여군이 유의적으로 감소한 것을 확인하였다( $p<0.01$ ). 또한 호중구 세포수는 OFI-50E 200 mg/kg 투여군과 OFI-W 100 mg/kg 투여군이 특히 유의적으로 감소되었다( $p<0.01$ ). 이는 손바닥선인장 줄기 추출물이 OVA 및 미세먼지로 유발한 염증과 관련된 면역세포가 폐 조직으로 침윤되는 것을 억제하거나 염증 관련 면역세포의 활성화를 억제하는 것으로 판단된다. 기관지 폐포세척액(BALF)에서 면역세포수를 분석한 결과, 대조군 대비 OFI-50E 100 mg/kg 투여군의 호중구 세포수 감소가 뚜렷하였으며( $p<0.01$ ), CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> cell에서 OFI-50E 100 mg/kg, 200 mg/kg 투여군이 양성대조군과 같이

유의적인 감소를 보였다. 또한 CD4<sup>+</sup> cell에서 OFI-W 100 mg/kg, 200 mg/kg, OFI-50E 200 mg/kg 투여군의 면역세포수가 유의성 있게 감소하였음을 확인하였다( $p<0.01$ ) (Table 2).

#### 기관지 폐포세척액, 비장 세포 배양액에서의 cytokine

기관지 폐포세척액에서 CXCL-1 및 염증성 cytokine (MIP-2, IL17, TNF- $\alpha$ )을 분석한 결과, CXCL-1의 경우 OFI-50E 200 mg/kg 투여군이 양성대조군과 같이 유의적 감소를 보였다( $p<0.05$ ). MIP-2의 경우 양성대조군 및 투여군이 모두 통계적으로 뚜렷한 감소를 보였으며( $p<0.001$ ), IL-17은 OFI-50E 200 mg/kg 투여군에서 가장 유의미한 감소를 보였다( $p<0.01$ ). 또한 TNF- $\alpha$ 의 경우, OFI-50E 200 mg/kg 투여군( $p<0.01$ )과 OFI-50E 100 mg/kg 투여군( $p<0.01$ )에서 눈에 띄는 감소를 확인하였다(Fig. 3). 비장 세포 배양액에서 Th2 cytokine IL-4, IL-5, IL-13 생산량을 분석한 결과, IL-4, IL-13의 경우 특히 OFI-50E 200 mg/kg 투여군과 OFI-50E 100 mg/kg 투여군이 양성대조군보다도 유의성 높은 감소를 보였으며( $p<0.001$ ), IL-5는 OFI-W 200 mg/kg 투여군과( $p<0.001$ ) OFI-50E 200 mg/kg 투여군( $p<0.001$ ), OFI-50E 100 mg/kg 투여군( $p<0.01$ )이 각각 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4).

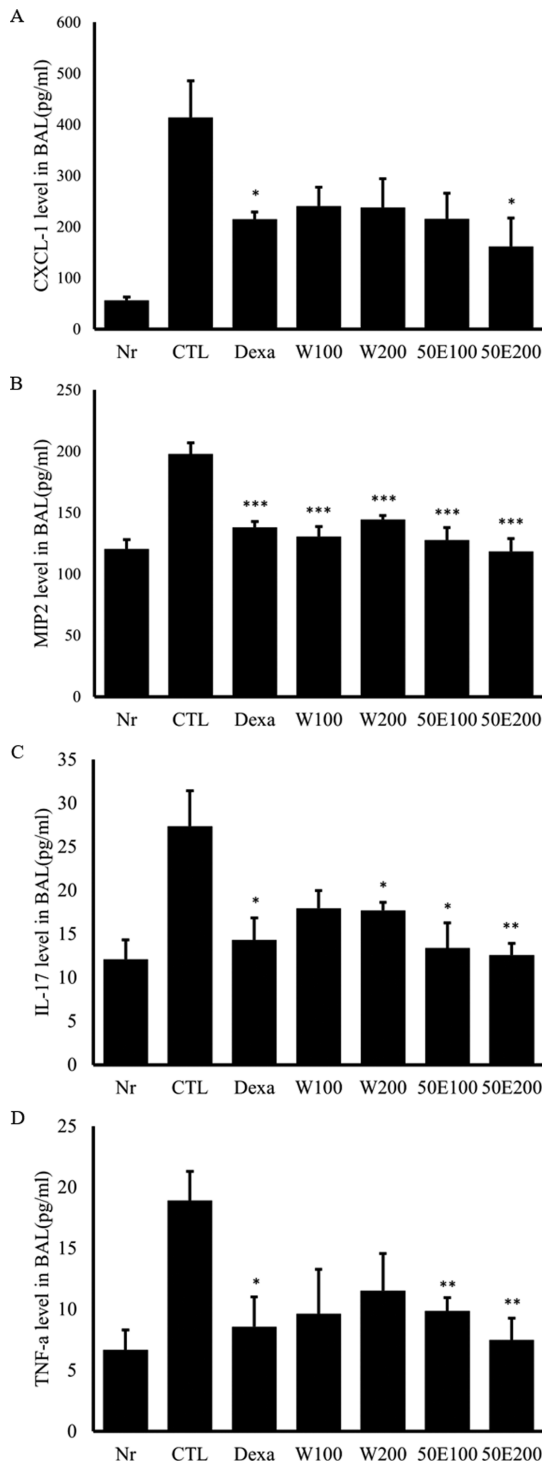
#### 기도저항성 및 Ova-specific Immunoglobulin E

천식이 유발되면 기도내로 들어온 allergen 자극으로 Th2 세포에서 분비하는 IL-4와 IL-13 등에 의해 B 세포로부터 immunoglobulin E (IgE) 항체가 생성되고, 천식 유발 물질인 난황알부민(ovalbumin)에 특이적인 IgE (OVA-specific IgE)가 증가하게 된다. 이에 OVA 및 미세먼지로 유발한 호흡기 염증 모델에서 OVA-specific IgE 수준을 분

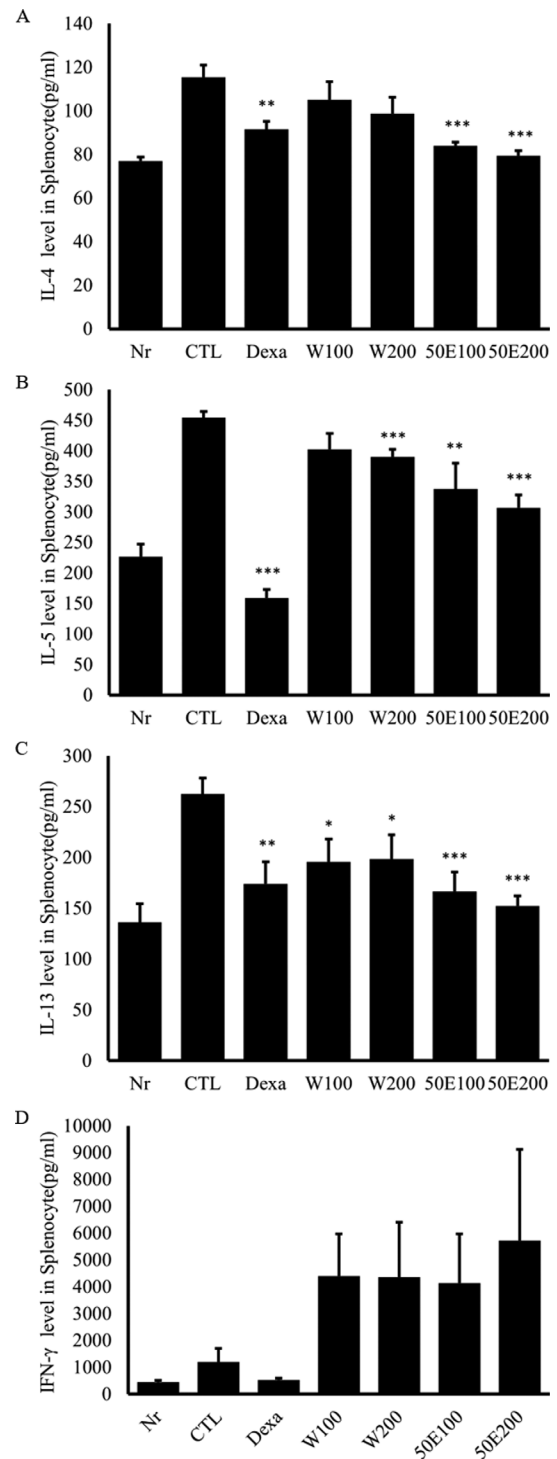
**Table 2** The effects of OFI-W and OFI-50E on airway immune cell number and neutrophilic airway inflammation in OVA and PM10-induced model

Cell phenotype (FACS Analysis) ( $\times 10^3$ mL)	OVA+PM10						
	Nr	CTL	Dexa 3 mg/kg	OFI-W 100 mg/kg	OFI-W 200 mg/kg	OFI-50E 100 mg/kg	OFI-50E 200 mg/kg
Lymphocyte	265.98 $\pm$ 40.46	348.57 $\pm$ 10.75	197.41 $\pm$ 21.89 <sup>***</sup>	201.08 $\pm$ 29.76 <sup>**</sup>	281.98 $\pm$ 7.63 <sup>**</sup>	214.78 $\pm$ 33.80 <sup>*</sup>	474.17 $\pm$ 41.80 <sup>*</sup>
Neutrophils	99.01 $\pm$ 11.70	212.23 $\pm$ 11.34 <sup>###</sup>	188.57 $\pm$ 7.31	116.95 $\pm$ 11.61 <sup>**</sup>	158.05 $\pm$ 23.83	116.35 $\pm$ 17.51 <sup>*</sup>	110.82 $\pm$ 9.22 <sup>**</sup>
Eosinophils_MQ	0.65 $\pm$ 0.30	20.34 $\pm$ 3.04 <sup>###</sup>	3.30 $\pm$ 0.66 <sup>**</sup>	16.38 $\pm$ 6.68	12.72 $\pm$ 1.66	7.92 $\pm$ 0.94 <sup>*</sup>	9.73 $\pm$ 1.77 <sup>*</sup>
CD19 <sup>+</sup>	3.95 $\pm$ 0.32	27.70 $\pm$ 3.67 <sup>###</sup>	12.65 $\pm$ 1.65 <sup>*</sup>	11.11 $\pm$ 2.44 <sup>*</sup>	17.79 $\pm$ 2.38	9.77 $\pm$ 2.32 <sup>*</sup>	19.59 $\pm$ 2.14
CD4 <sup>+</sup>	108.18 $\pm$ 17.88	62.60 $\pm$ 9.91	54.32 $\pm$ 7.71	64.16 $\pm$ 5.32	76.04 $\pm$ 13.87	65.36 $\pm$ 9.92	111.23 $\pm$ 6.76 <sup>*</sup>
CD4 <sup>+</sup> & CD69 <sup>+</sup>	0.30 $\pm$ 0.06	1.95 $\pm$ 0.26 <sup>###</sup>	0.64 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>	0.71 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>	1.05 $\pm$ 0.15 <sup>*</sup>	0.61 $\pm$ 0.05 <sup>**</sup>	0.63 $\pm$ 0.08 <sup>**</sup>
CD62L <sup>+</sup> & CD44 <sup>high</sup>	1.14 $\pm$ 0.45	23.19 $\pm$ 3.26 <sup>###</sup>	6.67 $\pm$ 0.96 <sup>**</sup>	8.57 $\pm$ 0.70 <sup>*</sup>	8.26 $\pm$ 0.42 <sup>*</sup>	6.91 $\pm$ 1.41 <sup>*</sup>	6.39 $\pm$ 0.64 <sup>**</sup>
CD11b <sup>+</sup> & GR-1 <sup>+</sup>	2.63 $\pm$ 0.38	35.50 $\pm$ 6.59 <sup>###</sup>	4.81 $\pm$ 0.37 <sup>**</sup>	9.25 $\pm$ 0.55 <sup>*</sup>	8.60 $\pm$ 0.46 <sup>*</sup>	6.83 $\pm$ 1.51 <sup>*</sup>	3.97 $\pm$ 0.46 <sup>**</sup>
Lymphocyte	18.97 $\pm$ 15.26	16.79 $\pm$ 4.64	2.25 $\pm$ 0.65 <sup>*</sup>	2.82 $\pm$ 0.52 <sup>*</sup>	3.99 $\pm$ 2.00	9.03 $\pm$ 1.97	5.12 $\pm$ 0.74
Neutrophils	113.24 $\pm$ 12.38	577.19 $\pm$ 70.51 <sup>###</sup>	369.59 $\pm$ 60.05	251.58 $\pm$ 30.04 <sup>*</sup>	353.27 $\pm$ 25.83 <sup>*</sup>	153.09 $\pm$ 21.76 <sup>**</sup>	285.52 $\pm$ 60.43 <sup>*</sup>
CD4 <sup>+</sup>	0.06 $\pm$ 0.05	33.69 $\pm$ 4.74 <sup>###</sup>	6.97 $\pm$ 1.30 <sup>**</sup>	10.53 $\pm$ 1.48 <sup>**</sup>	10.25 $\pm$ 1.86 <sup>**</sup>	15.19 $\pm$ 2.10 <sup>*</sup>	8.05 $\pm$ 1.01 <sup>**</sup>
CD62L <sup>+</sup> & CD44 <sup>high</sup>	0.00 $\pm$ 0.00	23.91 $\pm$ 6.28 <sup>#</sup>	3.71 $\pm$ 1.18 <sup>*</sup>	4.93 $\pm$ 1.34 <sup>*</sup>	7.00 $\pm$ 3.44	7.53 $\pm$ 1.88	4.87 $\pm$ 0.41 <sup>*</sup>
CD11b <sup>+</sup> & GR-1 <sup>+</sup>	0.02 $\pm$ 0.01	300.28 $\pm$ 60.88 <sup>###</sup>	3.07 $\pm$ 1.53 <sup>**</sup>	65.23 $\pm$ 4.43 <sup>*</sup>	34.70 $\pm$ 4.34 <sup>*</sup>	19.65 $\pm$ 0.77 <sup>**</sup>	13.58 $\pm$ 5.59 <sup>*</sup>

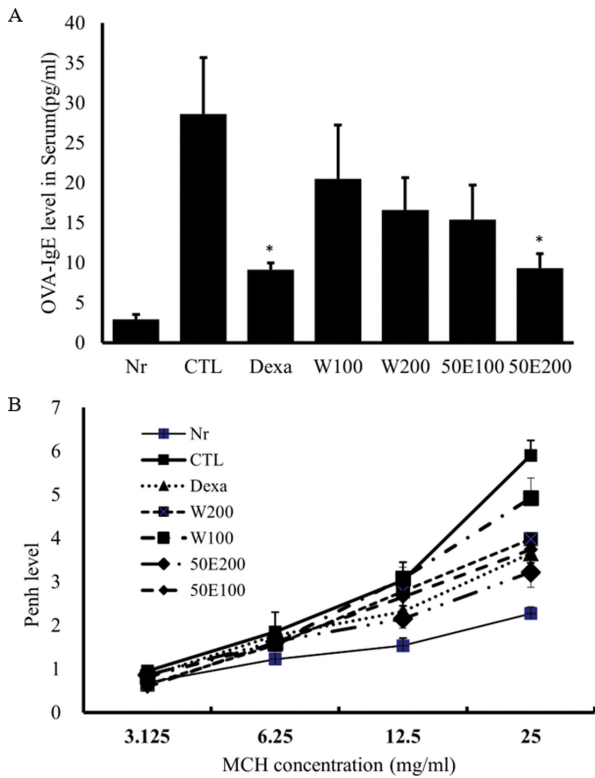
Nr: Normal, CTL: OVA+PM10-sensitized control group, Dexa 3 mg/kg : 3 mg/kg dexamethasone-treated OVA+PM10-sensitized group, OFI-W : OFI water extract treated OVA+PM10-sensitized group and OFI-50E: OFI 50% ethanol extract treated OVA+PM10-sensitized group. Data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM), n = 8, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , and \*\*\*  $p<0.001$  vs. CTL.



**Fig. 3.** The effects of OFI-W and OFI-50E on inflammatory cytokines (A) CXCL-1, (B) MIP2, (C) IL-17, and (D) TNF- $\alpha$  in BAL in OVA+PM10-sensitized airway inflammation model. Nr: Normal, CTL: OVA+PM10-sensitized control group, Dexa: 3 mg/kg dexamethasone-treated OVA+PM10-sensitized group, W100 and W200: OVA+PM10-sensitized group treated with 100 and 200 mg/kg OFI water extract, 50E100 and 50E200: OVA+PM10-sensitized group treated with 100 and 200 mg/kg OFI 50% ethanol extract. Data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM), n = 8, \*  $p$ <0.05, \*\*  $p$ <0.01, and \*\*\*  $p$ <0.001 vs. CTL.



**Fig. 4.** The effects of OFI-W and OFI-50E on Th2 cytokines (A) IL-4, (B) IL-5, (C) IL-13, and (D) IFN- $\gamma$  in splenocyte in OVA+PM10-sensitized airway inflammation model. Nr: Normal, CTL: OVA+PM10-sensitized control group, Dexa: 3 mg/kg dexamethasone-treated OVA+PM10-sensitized group, W100 and W200: OVA+PM10-sensitized group treated with 100 and 200 mg/kg OFI water extract, 50E100 and 50E200: OVA+PM10-sensitized group treated with 100 and 200 mg/kg OFI 50% ethanol extract. Data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM), n = 8, \*  $p$ <0.05, \*\*  $p$ <0.01, and \*\*\*  $p$ <0.001 vs. CTL.



**Fig. 5.** The effects of OFI-W and OFI-50E on (A) OVA-specific IgE level in Serum, (B) Airway hyper-reactivity (AHR) analysis in OVA+PM10-sensitized group treated with methacholine. Nr: Normal, CTL: OVA+PM10-sensitized control group, Dexa: 3 mg/kg dexamethasone-treated OVA+PM10-sensitized group, W100 and W200: OVA+PM10-sensitized group treated with 100 and 200 mg/kg OFI water extract, 50E100 and 50E200: OVA+PM10-sensitized group treated with 100 and 200 mg/kg OFI 50% ethanol extract. Data are expressed as means±standard error of the mean (SEM), n = 8, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. CTL.

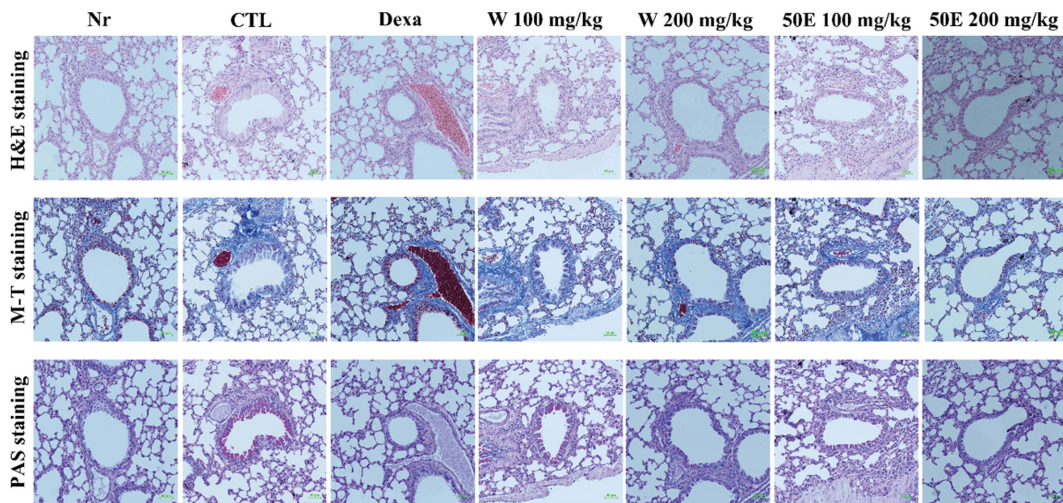
석한 결과, 정상군(Balb/c Nr)에 비하여 대조군이 확인한 증가를 보였으며, 양성대조군과 OFI-50E 200 mg/kg 투여군의 유의적인 감소가 확인되었다(Fig. 5A). 또한 천식이 유발되면 methacholine (MCH)에 의한 기도 저항 Penh 값이 증가하며 이에 기도저항성을 분석한 결과, MCH 25 mg/mL 처리 시 OFI-50E 100 mg/kg, 200 mg/kg 투여군이 dexamethasone을 투여한 양성대조군 보다 현저히 낮은 저항 값을 보여 MCH에 의한 기도 과민 반응 개선 효능을 확인하였다(Fig. 5B).

**폐조직 검사 분석**

OVA 및 미세먼지로 유발된 호흡기 질환 마우스 모델의 폐조직의 단면을 H&E 염색법을 통하여 관찰하였고, M-T 염색법을 통하여 폐포 세포 파괴 정도를 관찰하였다. 미세먼지에 의해 유도된 호흡기 질환 마우스 모델의 폐조직 단면에서 기관지 주변에 미세먼지의 침착이 뚜렷하게 보였고, 기도의 두께가 크게 증가하였으며 염증에 의한 폐포 세포 파괴가 관찰되었다. 양성대조군(dexa, 3 mg/kg)과 OFI-W 200 mg/kg, OFI-50E 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 기관지의 미세먼지 침착이 뚜렷하게 감소하였고, 기도의 두께가 정상군에 가깝게 감소됨을 관찰할 수 있었다. 또한 폐포 세포 파괴에 의한 콜라겐 침착, goblet 세포의 침착 정도도 대조군에 비하여 눈에 띄게 개선됨을 확인하였다 (Fig. 6).

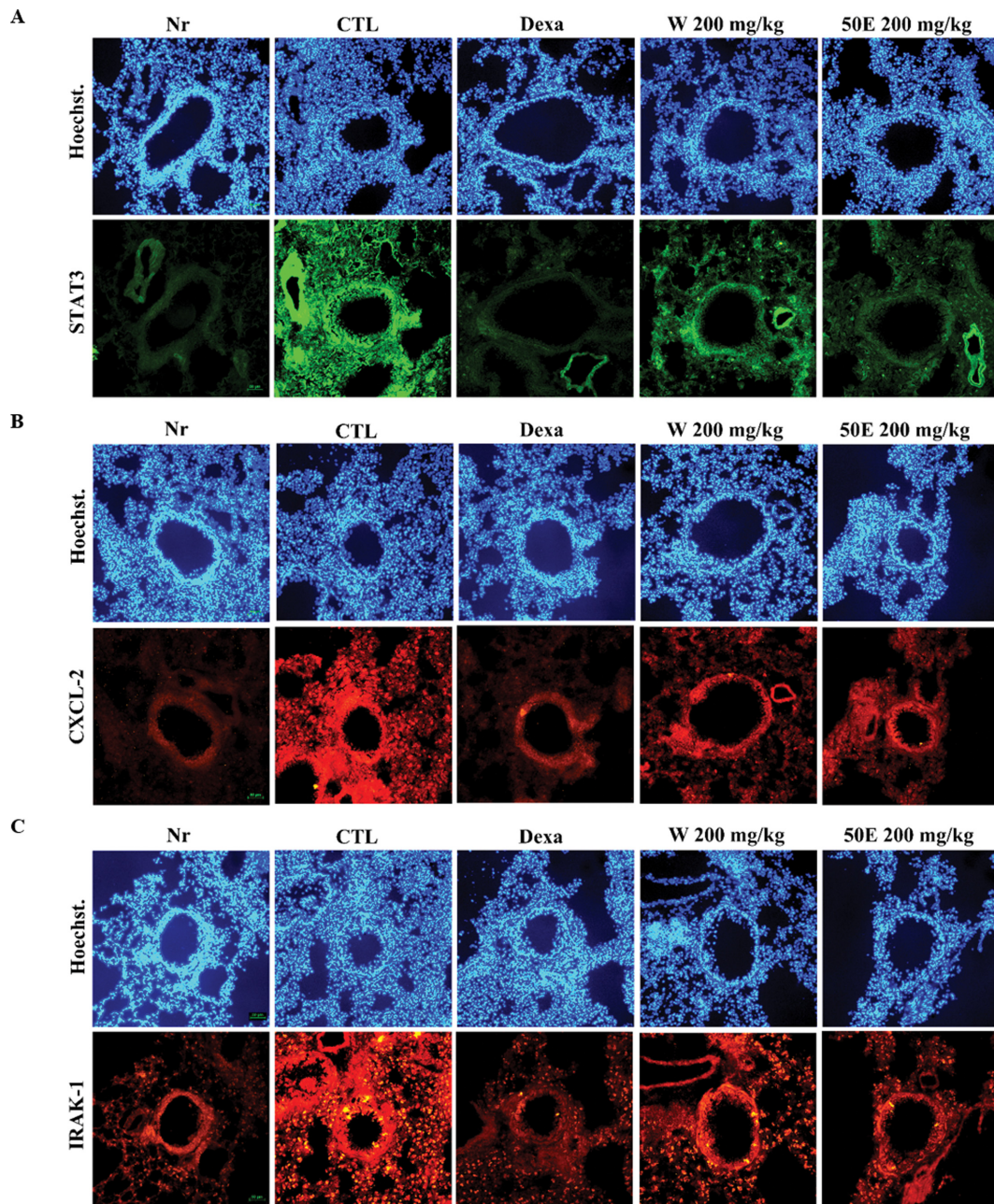
**폐조직에서 신호전달 IRAK1 단백질 발현 분석**

OVA 및 미세먼지로 유발된 호흡기 복합동물모델의 폐조직에서 신호전달 STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3)와 CXCL2, IRAK1 단백질을 발현을 면역



**Fig. 6.** Lung histology analysis in lung tissue of OVA+PM10-sensitized airway inflammation mice. H & E staining, M-T staining, and PAS staining. Nr: Normal, CTL: OVA+PM10-sensitized control group, Dexa: 3 mg/kg dexamethasone treated OVA+PM10-sensitized group, W100 and W200: OVA+PM10-sensitized group treated with 100 and 200 mg/kg OFI water extract, 50E100 and 50E200: OVA+PM10-sensitized group treated with 100 and 200 mg/kg OFI 50% ethanol extract.





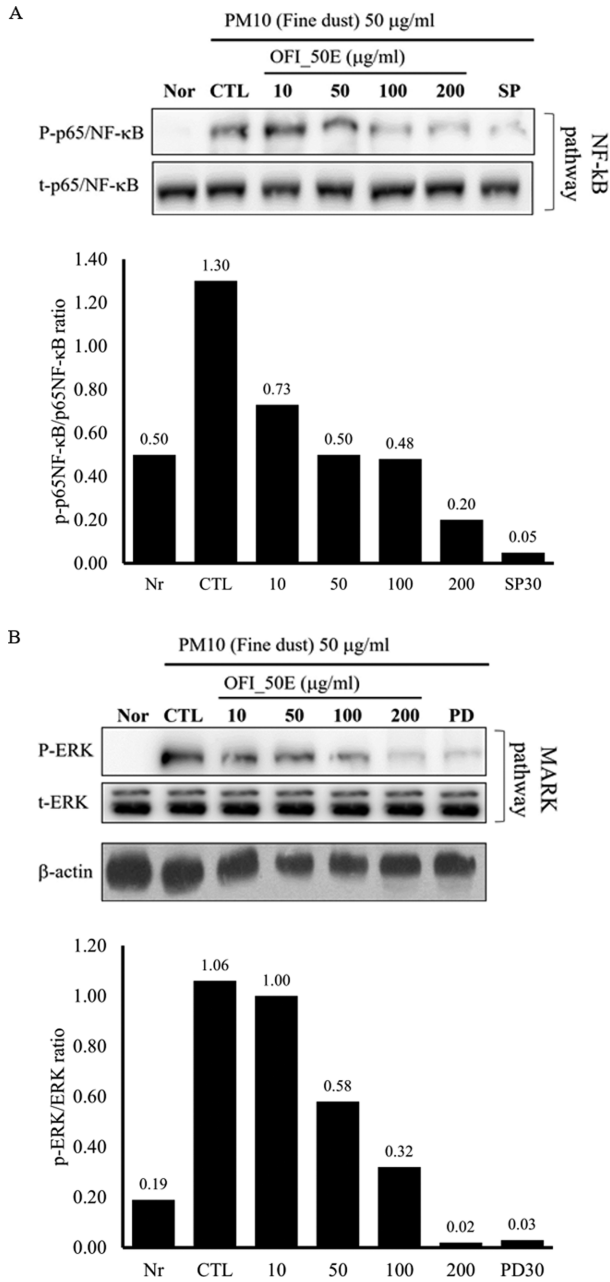
**Fig. 7.** Immunofluorescence staining for interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), TNF- $\alpha$  and STAT3 protein expression in the lungs of OVA+PM10-sensitized airway inflammation model. (A) Immunofluorescence staining for STAT3, (B) CXCL-2, and (C) IRAK1. Nr: Normal, CTL: OVA+PM10-sensitized control group, Dexa: 3 mg/kg dexamethasone-treated OVA+PM10-sensitized group, W 200 mg/kg: OVA+PM10-sensitized group treated with 200 mg/kg OFI water extract, 50E 200 mg/kg: OVA+PM10-sensitized group treated with 200 mg/kg OFI 50% ethanol extract.

형광조직염색(immune histology fluorescent, IHF)을 통해 분석하였다. 그 결과, 대조군에서 STAT3, IRAK1, CXCL-2 단백질 발현이 뚜렷하게 증가하였고, 양성대조군과 OFI-50E 200 mg/kg 투여군에서 크게 감소됨이 확인되었다(Fig. 7).

#### NF- $\kappa$ B 및 MAPK pathway 분석

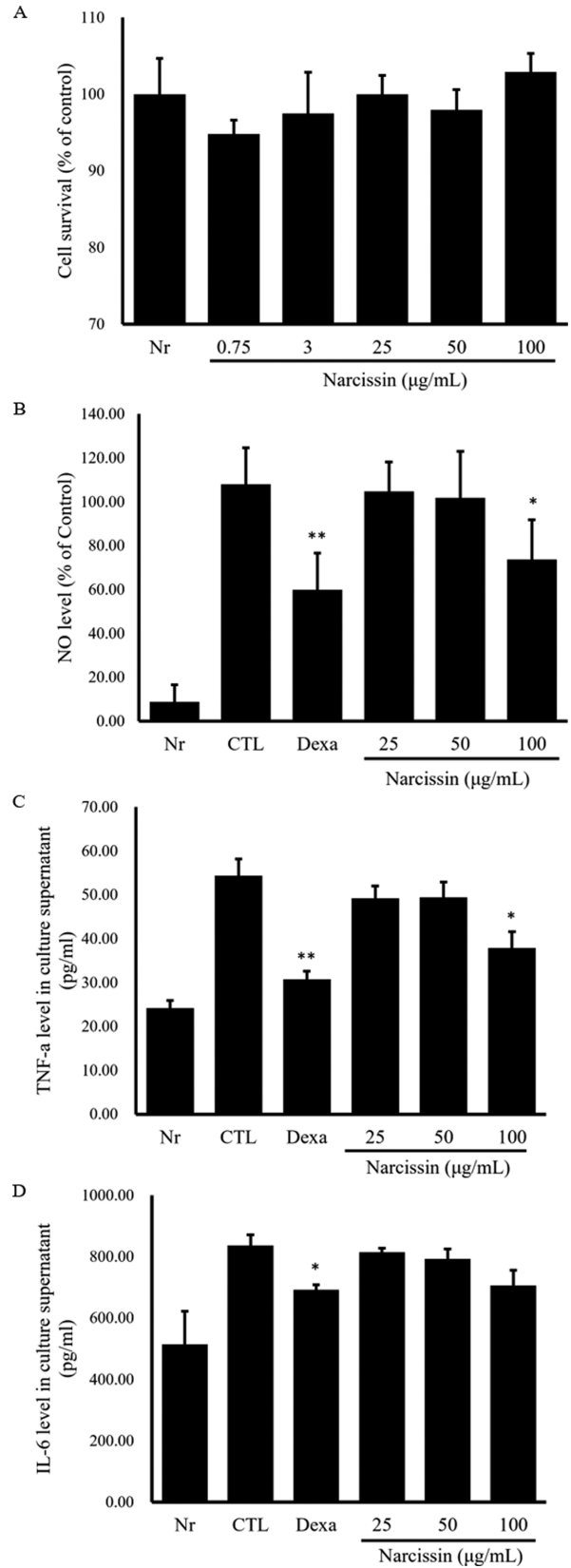
손바닥선인장 줄기 추출물(OFI-50E)이 염증 매개 인자의

발현에 관여하는 NF- $\kappa$ B pathway와 MAPK pathway에 미치는 영향을 western blot 분석을 통해 관찰한 결과, MH-S 세포에 미세먼지를 처리한 대조군에서는 NF- $\kappa$ B p65 subunit의 인산화가 정상군에 비해 증가한 반면에 OFI-50E를 처리한 시험군에서는 농도 의존적으로 p65의 인산화가 감소됨을 확인하였다. 또한, MAPK pathway에서 관여하는 ERK의 인산화를 분석한 결과에서도 OFI-50E 처리군에서



**Fig. 8.** Effects of OFI-50E on signal transduction through the NF-κB and MAPK pathways in MH-S cells via western blot analysis. (A) NF-κB expression, (B) MAPK expression. Nr: Normal, CTL: PM10 50 µg/mL, 10: PM10 50 µg/mL + OFI-50E 10 µg/mL, 50: PM10 50 µg/mL + OFI-50E 50 µg/mL, 100: PM10 50 µg/mL + OFI-50E 100 µg/mL, 200: PM10 50 µg/mL + OFI-50E 200 µg/mL, SP30: AP-1/NF-κB Dual inhibitor SP100030 30 µM, PD30: MARK inhibitor PD98059 30 µM.

농도 의존적으로 ERK 인산화가 감소됨을 확인하였다. 이 결과는 OFI-50E가 미세먼지(PM10)에 의해 활성화되는 NF-κB pathway와 MAPK pathway를 억제하여 미세먼지 유도에 의한 염증 매개인자의 발현을 억제할 수 있음을 시사한다(Fig. 8).



**Fig. 9.** Effects of narcissin on MH-S cell line. (A) Cytotoxicity of narcissin on proliferation, (B) production of NO (C) production of TNF-α, (D) production of IL-6 of MH-S cell line. Nr: Normal, CTL: PM10 50 µg/mL, Dexa: dexamethasone 10 µg/mL.

### Narcissin의 세포 독성

MH-S murine alveolar macrophage 세포주에 대한 narcissin의 세포독성 측정 결과, narcissin 처리 농도(0.75, 3, 25, 50, 100 µg/mL)에 따른 세포 독성이 발견되지 않았다(Fig. 9A).

### NO 생성량, IL-6 및 TNF-α 생성량

미세먼지에 의해 유도되는 NO 생성 저감 효능을 확인한 결과, 대조군에 비하여 100 µg/mL의 narcissin 처리군에서 유의적으로 NO 생성량의 감소를 확인하였으며(Fig. 9B), TNF-α 생성량 또한 100 µg/mL의 narcissin 처리군에서 유의적으로 감소하였다(Fig. 9C). IL-6의 경우, 유의적인 차이가 발견되지 않았다(Fig. 9D).

## 요 약

본 연구에서는 기관지 천식 등 호흡기 치료에 민간 약재로 활용되어 온 손바닥선인장 줄기를 활용하여 OVA와 미세먼지로 유발된 동물 모델을 대상으로 호흡기 염증 보호 효과를 연구하였고, *in vitro* 시험을 통해 그 작용기전을 구명하였다. 동물 모델에서 OFI-50E 투여군의 혈중 OVA-specific IgE 수준이 감소되는 결과로서 OVA에 의해 유도되는 과민 반응 및 알레르기 반응을 감소시키는 것을 확인하였고, MCH에 의한 기도저항성 분석 결과, OFI 50% ethanol extract 투여군에서 유의적으로 낮은 저항값이 분석되었다. 특히 OFI-50E 200 mg/kg 투여군은 dexamethasone을 투여한 양성대조군보다도 낮은 저항값을 보여 천식 유발 모델의 기도 과민 반응 개선 효능을 확인하였다. 기관지 폐포세척액, 폐 조직에서의 림프구 및 호중구를 포함한 면역 세포 분석 결과, Th cell 결과에서 실험군 간 유의적인 차이는 없었으나, 활성화된 T helper cell (CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>)이 특히 OFI-50E 200 mg/kg 투여군에서 눈에 띄는 감소를 보였고, BAL에서의 염증성 cytokine CXCL-1, MIP2, IL-17, TNF-α가 OFI 50% ethanol extract 투여군에서 유독 유의적인 감소를 보였다. 또한 비장 세포에서의 염증성 cytokine IL-4, IL-5, IL-13 분석 결과, 마찬가지로 OFI-50E 투여군에서 크게 감소하였다. 이러한 결과로 보아 OFI-50E가 미세먼지에 의해 증가되는 염증 작용을 완화시키는 것으로 판단된다. 손바닥선인장 줄기 추출물의 폐 염증 완화 효능 작용기전으로 폐 조직에서 IRAK-1 활성화 세포가 억제되었으며, CXCL-2 및 STAT3 등의 발현이 강력하게 억제됨을 확인하였다. 또한, MH-S 세포주에서 미세먼지에 의해 유도되는 MAPK 인산화와 NF-κB 인산화가 억제됨을 확인하였다. 따라서, 미세먼지에 의한 염증 반응에 대한 손바닥선인장 줄기 추출물의 폐 염증 완화 효능 작용 기전은 IRAK-1 활성화 억제를 통해 NF-κB 및 MAPK 경로 등을 억제함으로써 염증성 cytokine의 생성을 저해하는 것으로

판단된다. 상기의 결과들에 따르면 손바닥선인장 줄기 추출물의 개선 효능은 일반적으로 염증 완화를 위하여 처방되는 dexamethasone을 양성대조군으로 투여한 그룹과 비슷한 수준으로 개선되는 것을 알 수 있고, 이는 손바닥선인장 줄기 추출물이 천식과 같은 폐 기능 저하 질환 등에 관여하는 다양한 cytokine과 염증 세포에서의 조절을 통해 호흡기 염증을 개선하는 효능이 있음을 시사한다. 손바닥선인장 줄기 50% ethanol extract (OFI-50E)의 주요 화합물로 narcissin이 확인되었으며, 이를 지표 물질로 설정하였다. MH-S cell line에 대한 narcissin의 세포 독성이 발견되지 않았고, NO 생성량 및 TNF-α 생성량이 narcissin 100 µg/mL 처리군에서 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. Isorhamnetin 배당체인 isorhamnetin-3-O-glucosyl-rhamnosyl-rhamnoside, isorhamnetin-3-O-glucosyl-rhamnoside 등은 IL-6, TNF-α 생성을 저감하는 효능이 보고되어 있다(Antunes-Ricardo et al., 2015). Narcissin은 isorhamnetin 배당체의 한 종류로서 본 연구의 결과에서 narcissin이 NO, TNF-α 생성 억제를 통해 항염증 효능을 가짐을 확인하였으며 이는 지표물질로 설정한 narcissin이 잠재적으로 유효성분일 수 있음을 암시한다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 “기술사업화지원사업”의 지원을 받아 수행되었다(과제번호 821003022SB010).

## References

- Antunes-Ricardo M, Gutierrez-Urbe JA, Lopez-Pacheco F, Alvarez MM, Serna-Saldivar SO. 2015. *In vivo* anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill cladodes. *Ind. Crops. Prod.* 76: 803-808.
- Barnes PJ. 1994. Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 42-49.
- Bohadana AB, Massin N, Wild P, Toamain JP, Engel S, Goutet P. 2000. Symptoms, airway responsiveness, and exposure to dust in beech and oak wood workers. *J. Occup. Environ. Med.* 57: 268-273.
- Choi J, Lee CK, Lee YC, Moon YI, Park HJ, Han YN. 2002. Biological activities of the extracts from fruit and stem of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* var. saboten) II.-Effects on dietary induced hyperlipidemia. *Kor. J. Pharmacogn.* 33: 230-237.
- Doeing DC, Solway J. 2013. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J. Appl. Physiol.* 114: 834-843.
- Ghio AJ, Smith CB, Madden MC. 2012. Diesel exhaust particles and airway inflammation. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 18: 144-150.
- Hwang JH, Yi MR, Kim JW, Bu HJ, Kang CH, Lim SB. 2015. Quality characteristics and antioxidant activity of prickly pear

- cactus cladodes. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 44: 356-362.
- Lanzi E. 2016. The economic consequences of outdoor air pollution. Organization for Economic Cooperation and Development. Available from: <https://www.oecd.org/environment/indicators-modelling-outlooks/Policy-Highlights-Economic-consequences-of-outdoor-air-pollution-web.pdf>.
- Lee YS, Yang WK, Park YR, Park YC, Park IJ, Lee GJ, Kang HS, Kim BK, Kim SH. 2022. *Opuntia ficus-indica* Alleviates Particulate Matter 10 Plus Diesel Exhaust Particles (PM10D)-Induce Airway inflammation by Suppressing the Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines. Plants. 11: 520.
- Mangia C, Cervino M, Gianicolo EAL. 2015. Secondary particulate matter originating from an industrial source and its impact on population health. Int. J. Environ. Res. Public Health. 12: 7667-7681.
- Manners S, Alam R, Schwartz DA, Gorska MM. 2014. A mouse model links asthma susceptibility to prenatal exposure to diesel exhaust. J. Allergy Clin. Immunol. 134: 63-72.
- Nials AT, Uddin S. 2008. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. Dis. Model. Mech. 1: 213-220.
- Peebles RS Jr, Sheller JR, Johnson JE, Mitchell DB, Graham B.S. 1999. Respiratory syncytial virus infection prolongs methacholine-induced airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized mice. J. Med. Virol. 57: 186-192.
- Shin DC. 2007. Health effects of ambient particulate matter. J. Korean Med. Assoc. 50: 175-182.
- Shin J, Han MJ, Lee YC, Moon YI, Kim DH. 2002. Antidiabetic activity of *Opuntia ficus-indica* var. sabotan on db/db Mice. Kor. J. Pharmacogn. 33: 332-336.

### Author Information

**김현정:** 주식회사 휴림 기능성소재연구소 주임연구원

**장민철:** 주식회사 휴림 기능성소재연구소 선임연구원

**김봉균:** 주식회사 휴림 기능성소재연구소 상무이사

**김승형:** 대전대학교 동서생명과학연구원 책임연구원

**박인재:** 주식회사 휴림 기능성소재연구소 책임연구원