

# Roflumilast Attenuates MUC5AC and MUC5B Expression in Airway Epithelial Cells

Joon Kon Kim<sup>1</sup>, Yoon Seok Choi<sup>1</sup>, Chang-Hwi Park<sup>1</sup>, Young-Ha Lee<sup>1</sup>,  
Gui Ok Kim<sup>2</sup>, Si-Youn Song<sup>1</sup>, Chang Hoon Bae<sup>1</sup>, and Yong-Dae Kim<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu; and

<sup>2</sup>Graduate School of Health and Welfare CHA University, Pocheon; and

<sup>3</sup>Regional Center for Respiratory Diseases, Yeungnam University Medical Center, Daegu, Korea

## 호흡기 상피세포에서 Roflumilast에 의한 MUC5AC와 MUC5B 발현 억제

김준곤<sup>1</sup> · 최윤석<sup>1</sup> · 박창휘<sup>1</sup> · 이영하<sup>1</sup> · 김귀옥<sup>2</sup> · 송시연<sup>1</sup> · 배창훈<sup>1</sup> · 김용대<sup>1,3</sup>

영남대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실, <sup>1</sup> 차의과학대학교 보건복지대학원, <sup>2</sup> 영남대학교병원 권역 호흡기 전문질환센터<sup>3</sup>

**Background and Objectives** Roflumilast, a selective inhibitor of phosphodiesterase type 4, has an anti-inflammatory property. It has been used in the treatment of chronic inflammatory airway diseases such as chronic obstructive pulmonary disease and asthma. However, the effect of roflumilast on mucus secretion in inflammatory airway epithelial cells has not been reported. Therefore, this study was aimed at investigating the effects of roflumilast on the inflammatory mediator-induced MUC5AC and MUC5B expression in human airway epithelial cells.

**Materials and Method** In human mucin-producing NCI-H292 airway epithelial cells and primary cultures of nasal epithelial cells, the effects of roflumilast on lipopolysaccharide (LPS)- and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced MUC5AC and MUC5B expression were analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results** Roflumilast attenuated LPS-induced MUC5AC and MUC5B mRNA and glycoprotein expression in NCI-H292 cells. And roflumilast attenuated PMA-induced MUC5AC and MUC5B mRNA and glycoprotein expression in NCI-H292 cells. In addition, roflumilast attenuated LPS and PMA-induced MUC5AC and MUC5B mRNA expression in the primary cultures of nasal epithelial cells.

**Conclusion** These results suggest that roflumilast attenuates MUC5AC and MUC5B expressions in airway epithelial cells. Roflumilast may be a potentially ideal therapeutic agent for the control of mucus-hypersecretion in treating chronic inflammatory airway diseases.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2014;57(12):830-5

**Key Words** Airway epithelial cells · Anti-inflammatory property · MUC5AC · MUC5B · Roflumilast.

Received June 23, 2014

Revised July 23, 2014

Accepted July 24, 2014

Address for correspondence

Yong-Dae Kim, MD, PhD

Department of Otorhinolaryngology-

Head and Neck Surgery,

College of Medicine,

Yeungnam University,

170 Hyeonchung-ro, Nam-gu,

Daegu 705-802, Korea

Tel +82-53-620-3781

Fax +82-53-628-7884

E-mail ydkim@med.yu.ac.kr

## 서론

정상 사람 기도(airway) 표면은 점액으로 덮여 있고, 점액(mucus)은 외부로부터 유입되는 물질에 대한 일차 방어작용과 적절한 습도를 유지하며 윤활작용을 한다.<sup>1)</sup> 그러나 만성 폐쇄성 폐질환이나 천식과 같은 염증성 기도질환에서는 점액의 정상

이 변하고 과분비가 일어난다. 이런 점액의 과분비는 염증성 호흡기 질환의 경과를 악화시킬 수 있어, 점액 과분비의 조절은 임상적으로 매우 중요하다.<sup>1,2)</sup> 점액의 성상을 결정하는 것은 점액 내의 당단백인 점소(mucin)로 점액유전자에 의해 생성이 조절된다. 호흡기에서 발현되는 중요한 점액유전자는 MUC4, MUC5AC, MUC5B와 MUC8로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 이 중에서 분

비형 점소(secretory mucin)인 MUC5AC와 MUC5B의 유전자 발현에 대해 호흡기 영역에서 매우 중요하다.<sup>3)</sup>

사람의 호흡기 상피세포에서 점액 유전자 발현을 증가시켜 점액의 분비를 증가시키는 여러 가지 염증성 매개물질 중 protein kinase C를 활성화하여 염증반응을 유도하는 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)와 그람 음성 세균의 외막 성분으로 인체 내에서 대식세포를 자극시켜 사이토카인을 생성하여 염증반응을 유도하는 lipopolysaccharide(LPS)가 대표적이다.<sup>4,5)</sup>

Phosphodiesterase type 4(PDE4) 억제제인 roflumilast는 세포 내 PDE4 효소와 결합하여 선택적으로 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)의 수준을 유지하여 염증 매개물질 발현을 억제하고 항염증반응을 유도하여 천식과 만성 폐쇄성 폐질환과 같은 만성 염증성 호흡기 질환의 치료제로 사용된다.<sup>6)</sup> 그러나 염증반응에 의한 기도점액 과분비 과정에서 roflumilast가 점액유전자 발현과 점액 단백 생성에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구는 아직까지 국내에 보고된 바가 없다.

따라서 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포와 코점막 상피세포에서 roflumilast가 MUC5AC와 MUC5B 유전자의 발현과 점액 단백 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

Roflumilast는 Selleckchem(Houston, TX, USA)에서 구입하였고, LPS와 PMA는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. MUC5AC(MS-145-P1) 일차항체는 Neomarker (Fermont, CA, USA)에서 구입하였고, MUC5AC의 anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase(HRP)-conjugated 이차항체, MUC5B(SC-23024) 일차항체와 HRP-conjugated 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. EpiLife medium과 keratinocyte growth supplement는 Cascade Biologics(Portland, OR, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone Laboratories(Logan, UT, USA)에서 구입하였다.

### 세포 배양 및 처리

사람 폐의 점액상피양 암 세포주(human pulmonary mucoid carcinoma cell line)인 NCI-H292 세포(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 6-well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well의 농도로 접종한 후 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin과 10%

FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 이용하여 95%의 산소와 5%의 이산화탄소가 혼합된 배양기에서 37°C의 온도로 배양하였다.

Roflumilast의 효과를 알아보기 위해서 NCI-H292 세포에 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 nM 농도의 roflumilast를 전처리한 후 1시간 뒤에 100 ng/mL 농도의 LPS와 10 nM 농도의 PMA를 각각 투여하였다. 대조군은 동일한 시간 동안 배지에서 NCI-H292 세포를 단독으로 배양하였다.

사람 코점막 상피세포를 얻기 위해서 알레르기에 대한 기저 질환과 가족력이 없고, 피부단자시험(skin prick test)과 multiple simultaneous allergen test에서 음성반응이 나온 10명을 대상으로 하여 용비술 시행 중에 발생하는 비강 내 적출물 중 정상 하비갑개 조직을 얻었다. 일차배양을 하기 위해 하비갑개 점막조직을 phosphate-buffered saline(PBS)으로 세척한 후, 90분 동안 dispase(Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany)에 침전시켰다. 외과용 수술칼을 사용하여 하비갑개 점막의 표면을 벗겨내어, 1% PBS를 추가한 후 mesh를 통해 여과하였다. 이런 과정을 통해 얻은 하비갑개 점막의 상피세포들을 24-well( $2.5 \times 10^5$  cells/well) plate에 접종한 후, EpiLife medium과 keratinocyte growth supplement(5/500 mL of medium)에서 배양하였다. 일차배양한 코점막 상피세포에서 roflumilast의 효과를 알아보기 위해 0.4 nM 농도의 roflumilast를 전처리한 후 1시간 뒤에 100 ng/mL 농도의 LPS와 10 nM 농도의 PMA를 각각 투여하였다. 대조군은 동일한 시간 동안 배지에서 코점막 상피세포를 단독으로 배양하였다.

### Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

Gene Amp RNA PCR core kit와 PTC-200(MF Research Inc., Watertown, MA, USA) PCR 기계를 사용하여 제조사의 방법대로 시행하였다. PCR에 사용된 oligonucleotide primer는 밝혀진 염기서열에 의해 제작하였으며, 각 반응의 내부 양성 대조군(internal positive control)은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 사용하였다.

실험에 사용된 primer의 염기배열은 MUC5B의 경우 sense는 5'-CAC ATC CAC CCT TCC AAC-3', antisense는 5'-GGC TCA TTG TCG TCT CTG-3'이고, MUC5AC의 경우 sense는 5'-TCA ACG GAG ACT GCG AGT ACA C-3', antisense는 5'-CTT GAT GGC CTT GGA GCA-3'이다. GAPDH의 경우 sense는 5'-CCT CCA AGG AGT AAG ACC CC-3', antisense는 5'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG-3'을 사용하였다.

실험에 사용되어 증폭된 mRNA 산물의 크기는 MUC5B는

245 bp, MUC5AC 130 bp, GAPDH는 145 bp였다. 이 과정을 간략히 설명하면, 배양된 세포를 2% bovine serum albumin을 함유한 PBS로 3회 세척한 후 Trizol<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)을 이용하여 총 mRNA를 추출하였다. MUC5AC mRNA에 대한 PCR은 95°C에서 60초간 변성과정과 60°C에서 60초간 결합반응, 72°C에서 60초간 연장반응을 33회 반복한 후 72°C에서 20분간 최종 연장반응을 시행하였고, MUC5B mRNA에 대한 PCR은 95°C에서 60초간 변성과정과 72°C에서 60초간 결합반응, 72°C에서 60초간 연장반응을 33회 반복한 후 72°C에서 20분간 최종 연장반응을 시행하였다. 증폭된 증합효소연쇄반응의 산물은 SYBR green이 함유된 1% agarose gel을 통한 전기영동을 이용하여 분리 관찰하였다. 확인된 띠(band)의 세기는 Scion Image software(Scion Corporation, Frederick, MD, USA)를 이용하여 반정량적으로 분석하였고, 대조군의 density를 100으로 하였을 때 실험군의 density값을 비율로 나타내어 relative density로 나타내었다.

#### 면역분석법(Immunoassay)

MUC5AC와 MUC5B의 점액 단백질의 함량을 측정하기 위해서 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법을 이용하였다. 시료를 처리한 배양된 세포에서 lysis buffer[50 mM Tris·Cl(pH 7.5), 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 1% Triton X-100, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride]로 단백질을 추출하여 정량화하였다. 추출한 단백질 100 µg을 96-well plate에 담고 40°C에서 건조될 때까지 방치한 후 plate를 PBS로 3회 세척하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위해 2% bovine serum albumin으로 실온에서 1시간 동안 차단한 후 PBS로 3회 세척한 다음 0.05% Tween 20을 함유한 PBS에 1:200으로 희석된 MUC5AC와 MUC5B 일차항체로 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척한 후 HRP-conjugated 이차항체를 0.05% Tween 20을 함유한 PBS에 1:5000으로 희석하여 각 well에 첨가하였고, 1시간 후에 각 well을 PBS로 3회 세척하였다. 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine 용액으로 발색한 후, 2N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 중단시켰다. ELISA reader(EL800<sup>®</sup>, BIO-TEK Instruments, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선을 이용하여 단백질의 양을 정량화하였다.

#### 통 계

통계 처리는 Windows용 SPSS version 10.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 모든 실험은 *p*값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 정하여 Student's *t*-test를 이용하였다.

## 결 과

#### NCI-H292 세포에서 roflumilast가 LPS에 의한 MUC5AC와 MUC5B 발현에 미치는 영향

NCI-H292 세포에서 LPS로 유도된 MUC5AC의 mRNA 발현과 점액단백의 생성은 roflumilast 0.1 nM 투여한 군에서부터 통계학적으로 의미 있게 감소하였다(Fig. 1A and B). LPS로 유도된 MUC5B의 mRNA 발현과 점액단백의 생성은 roflumilast를 투여한 모든 군에서는 통계학적으로 의미 있게 감소하였다(Fig. 1C and D).

#### NCI-H292 세포에서 roflumilast가 PMA에 의한 MUC5AC와 MUC5B 발현에 미치는 영향

NCI-H292 세포에서 PMA로 유도된 MUC5AC와 MUC5B의 mRNA 발현과 점액단백의 생성은 roflumilast를 투여한 모든 군에서 통계학적으로 의미 있게 감소하였다(Fig. 2).

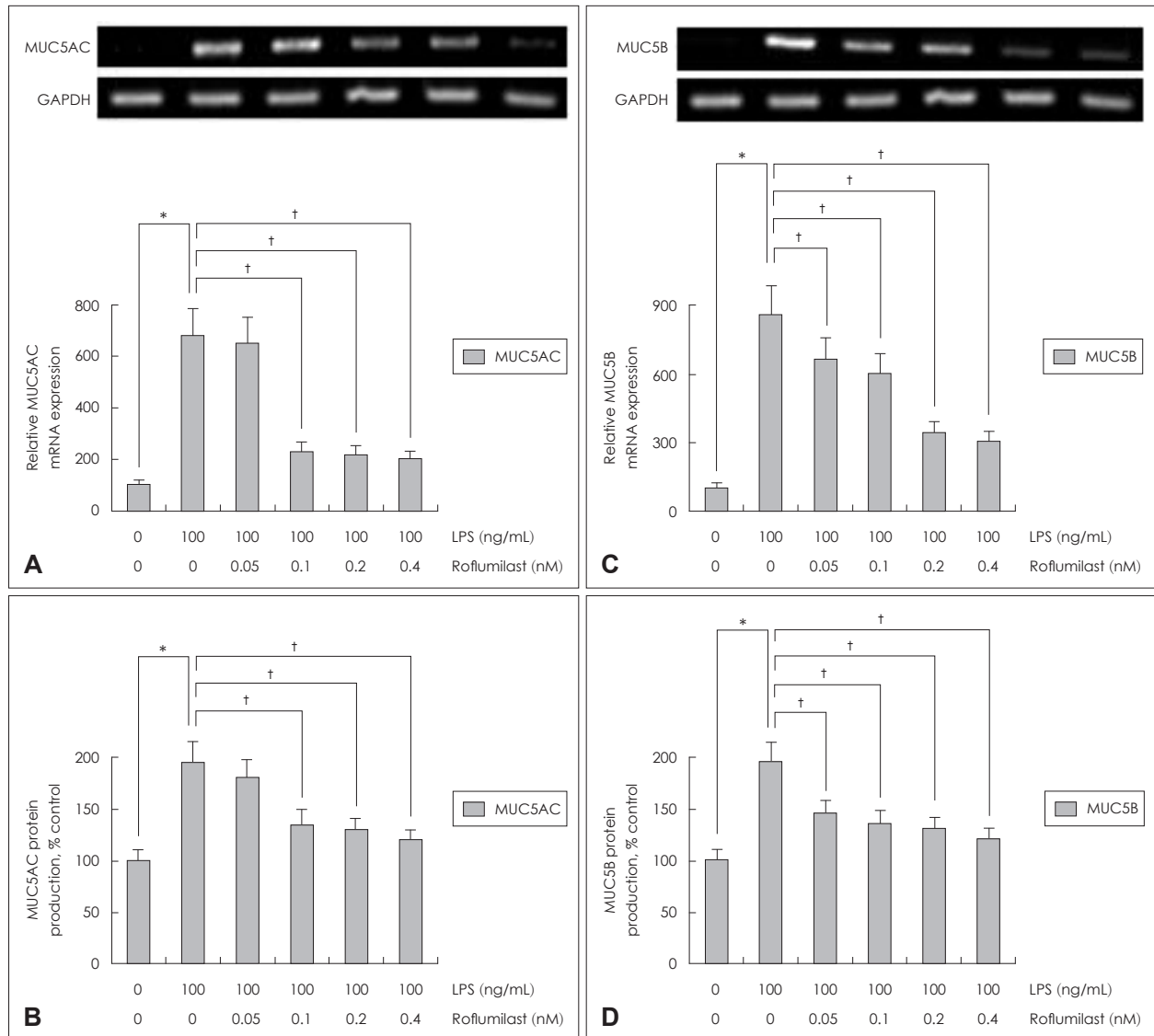
#### 사람 코점막 상피세포에서 roflumilast가 LPS와 PMA에 의한 MUC5AC 및 MUC5B 발현에 미치는 영향

사람 코점막 상피세포에서 roflumilast(0.4 nM)가 LPS와 PMA로 유도된 MUC5AC와 MUC5B의 mRNA 발현을 통계학적으로 의미 있게 감소시켰다(Fig. 3).

## 고 찰

사람의 코점막 상피에서 점액 유전자 발현을 증가시켜서 점액의 분비를 증가시키는 염증 매개물질로는 LPS, PMA, interleukin(IL)-1와 IL-4 등이 있다.<sup>1-5)</sup> 이 중 LPS는 그람 음성 세균의 외막 성분으로 체내에서 LPS 결합단백인 cluster of differentiation 14와 결합하고 toll-like receptor 4에서 감지하여 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호전달 경로를 통해 대식세포나 단핵구를 자극시켜 사이토카인 생성 등을 유도하여 염증 반응을 일으켜서 MUC5A와 MUC5B 발현을 증가시킨다.<sup>1,7,8)</sup> PMA는 protein kinase C를 활성화시키는 주요 염증 반응물질로, MAPK 경로를 통해 matrix metalloproteinases(MMP)-9를 증가시켜 호흡기 상피에서 MUC5B 발현을 일으킨다.<sup>1,4)</sup>

PDE는 현재까지 21개의 유전자형이 발견되었고 11개의 아형이 존재하며 cyclic guanosine mono-phosphate(cGMP)와 cAMP 조절에 관여하여 세포의 면역기능과 염증반응을 일으킨다.<sup>8)</sup> PDE의 아형 중 4번, 7번, 8번은 cAMP에 선택적이며, 5번, 6번, 9번은 cGMP에 선택적이고, 나머지 아형은 cAMP와 cGMP 모두에 선택적이다.<sup>8,9)</sup> 이 중 PDE4는 A, B, C, D형이 존



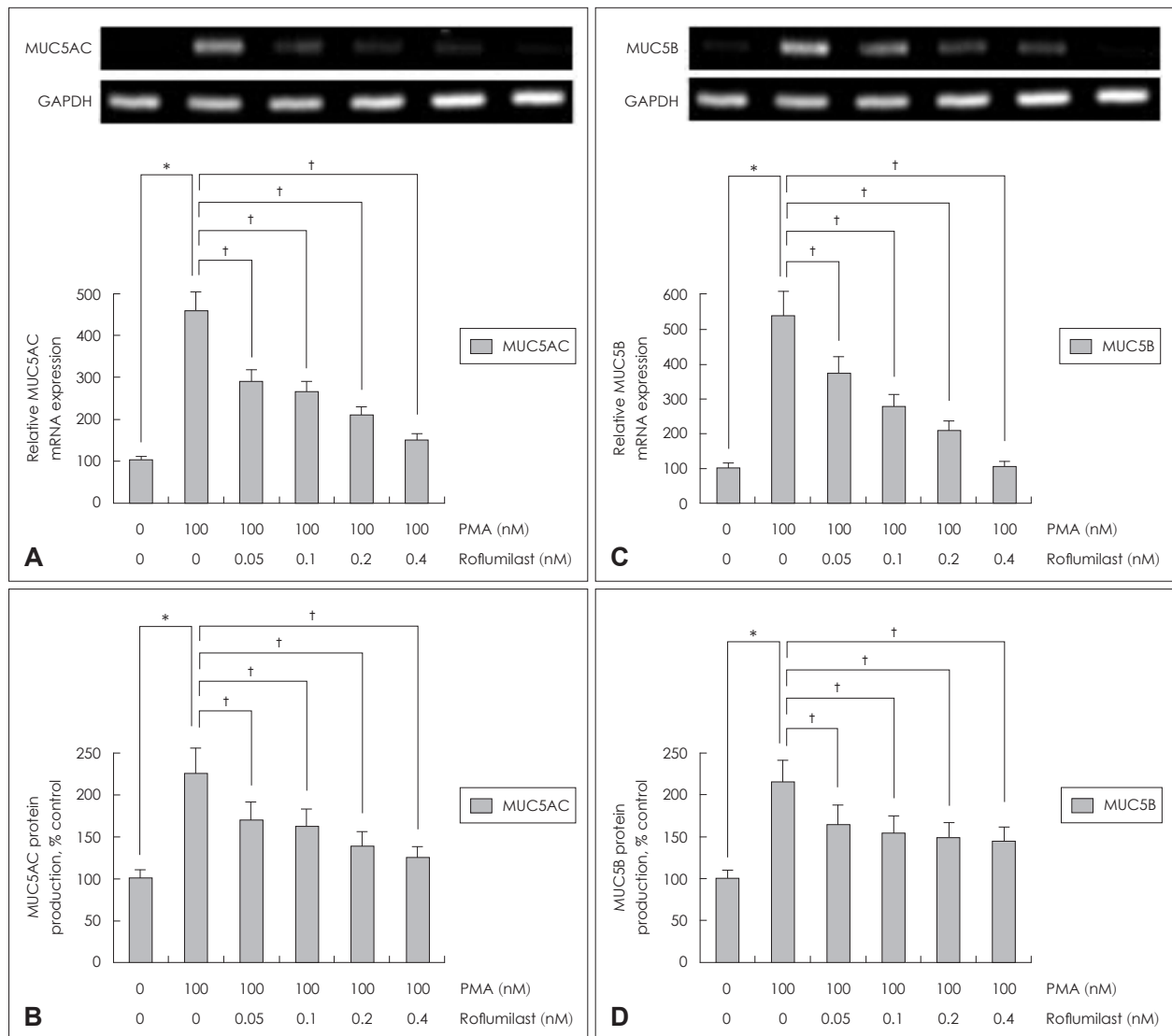
**Fig. 1.** The effects of roflumilast on LPS-induced MUC5AC and MUC5B expression in human NCI-H292 cells. RT-PCR and ELISA showed that roflumilast significantly attenuated LPS-induced MUC5AC mRNA expression and glycoprotein level (A and B). And roflumilast significantly attenuated LPS-induced MUC5B mRNA expression and glycoprotein level (C and D). Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicate. \* $p$ <0.05 compared with zero value, † $p$ <0.05 compared with LPS only. LPS: lipopolysaccharide, RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

재하고, 포유류의 세포와 조직에 널리 분포하며 염증작용과 면역조절작용, 우울과 정신분열에 대한 작용 등의 다양한 생물학적 기능을 가진다.<sup>8)</sup> 호흡기에서는 PDE4가 활성화되면 cAMP를 분해하여 세포 내의 cAMP가 감소하게 되어 염증세포와 면역적격세포(immunocompetent cell)들의 활성화가 일어나서 급성 폐 손상과 염증성 호흡기 질환에 영향을 미친다.<sup>10-12)</sup>

Roflumilast는 PDE4 억제제로 임상적으로 만성 폐쇄성 호흡기 질환과 천식의 치료제로 사용되고 있다.<sup>13)</sup> 이는 roflumilast가 PDE4 효소와 결합하여 cAMP의 분해작용을 억제하여 세포 내의 cAMP의 농도가 유지되고 nuclear factor-kap-

paB, p38 MAPK와 c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase 신호전달 체계를 통해 호염기구, 림프구, 대식세포, 단핵구, 호산구와 호중구 등의 염증세포에 작용하여 neutrophil elastase, myeloperoxidase, MMP-9, nitrogen oxide와 tumor necrosis factor- $\alpha$  등의 분비를 감소시키는 항염증작용을 하기 때문이다.<sup>10,14)</sup> 그러나 아직까지 roflumilast가 만성 폐쇄성 호흡기 질환과 천식에서 점액의 분비 조절과 염증성 호흡기 상피세포에서 점액 유전자의 발현과 점액 단백 생성에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 roflumilast가 LPS와 PMA에 의해 염증성 반응을 유도한 호흡기 상피세포에서 MUC5AC와 MUC5B



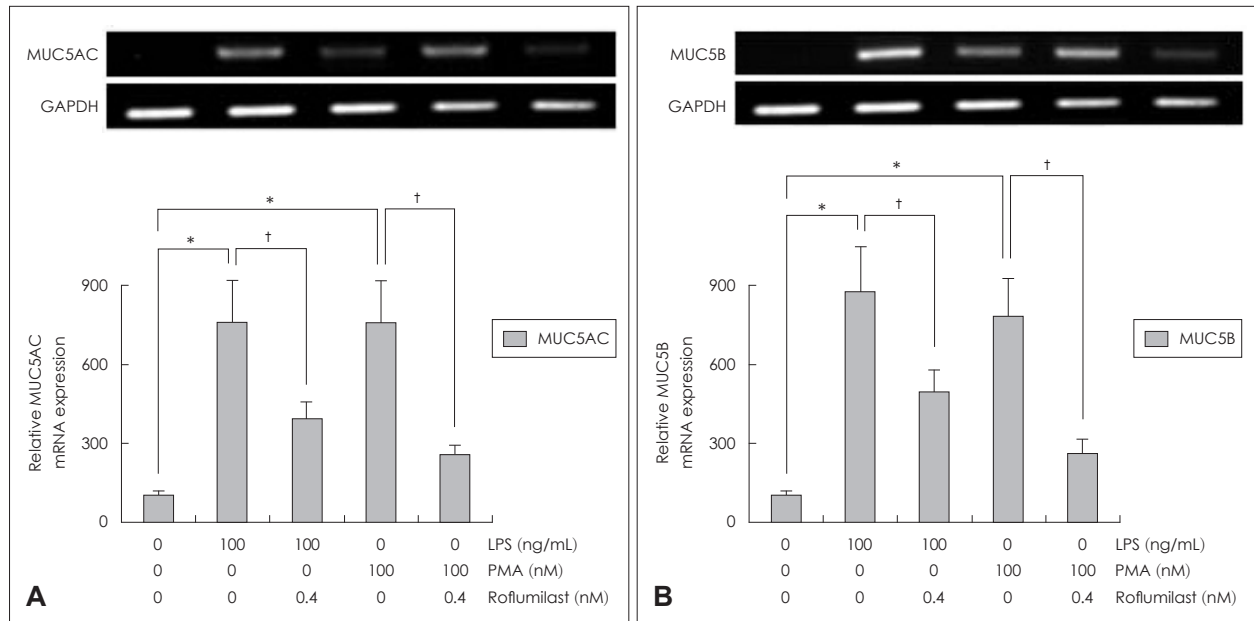


**Fig. 2.** The effects of roflumilast on PMA-induced MUC5AC and MUC5B expression in human NCI-H292 cells. RT-PCR and ELISA showed that roflumilast significantly attenuated PMA-induced MUC5AC mRNA expression and glycoprotein level (A and B). And roflumilast significantly attenuated PMA-induced MUC5B mRNA expression and glycoprotein level (C and D). Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicate. \* $p$ <0.05 compared with zero value, † $p$ <0.05 compared with PMA only. PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate, RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

발현이 감소되는 결과를 보였으며, 이는 호흡기 상피세포에서 MUC5AC와 MUC5B 발현에 주로 관여하는 것으로 알려진 extracellular signal-regulated kinase MAPK나 p38 MAPK 신호전달 체계를 통하여 roflumilast가 호흡기 상피세포에서 점액분비에 관여한다는 것을 추정할 수 있다.<sup>15-17)</sup> 하지만 roflumilast의 명확한 점액분비 억제 효과를 확인하기 위해서는 호흡기 상피세포에서 MUC5AC와 MUC5B 점액유전자 뿐만 아니라 다른 종류의 점액유전자에 대한 연구가 추가적으로 필요하다.

본 연구에서 확인된 roflumilast의 점액 과분비 억제 효과는 0.4 nM의 농도에서 충분히 확인할 수 있었다. 만성 폐쇄성

폐질환 환자의 roflumilast의 하루 경구 투여 용량이 500  $\mu$ g이며, 체내에 최고 혈중농도가 16 nM 정도임을 생각해 볼 때 실제 치료용량보다 훨씬 낮은 농도에서부터 점액 과분비 억제 효과가 있음을 알 수 있었다.<sup>18)</sup> Roflumilast 12.5  $\mu$ g을 인체에 경구 투여시 혈중 농도가 본 연구에 사용한 농도인 0.4 nM로, 인체에서 이 농도로는 roflumilast 치료시 발생할 수 있는 설사, 오심, 복통과 두통 등의 부작용이 거의 발생하지 않을 것으로 생각된다. 그러나, 본 연구는 roflumilast를 호흡기 상피세포에 직접 처리한 경우이므로 보다 자세한 roflumilast의 혈중농도에 따른 점액의 과분비 억제효과를 확인하기 위해서는 다양한 종류의 세포나 동물을 이용한 연구가 뒤따라야 할 것으로



**Fig. 3.** The effects of roflumilast on LPS and PMA induced MUC5AC and MUC5B expression in human nasal epithelial cells. RT-PCR showed that roflumilast significantly attenuated LPS- and PMA-induced MUC5AC (A) and MUC5B (B) mRNA expression. Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicate. \* $p$ <0.05 compared with zero value, † $p$ <0.05 compared with LPS or PMA only. LPS: lipopolysaccharide, PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate, RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

생각된다.

이상의 연구 결과로 보아 호흡기 상피세포에서 roflumilast가 점액의 과분비 조절에 관여할 것으로 생각되며, 이와 관련된 작용기전에 대한 연구와 *in vivo* 연구를 추가적으로 진행한다면 점액의 과분비를 억제할 수 있는 새로운 약제 개발에 도움이 될 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Ali MS, Pearson JP. Upper airway mucin gene expression: a review. *Laryngoscope* 2007;117(5):932-8.
- 2) Woo HJ, Min MK, Bae CH, Song SY, Kim YD. Roxithromycin suppresses MUC5B/8 mucin genes and mucin production in airway epithelial cells. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2008; 51(7):617-22.
- 3) Lee JG, Moon HJ, Kim SS, Kim CW, Yoon JH. Expression and regulation of MUC8 & MUC5AC by various cytokines in normal human nasal epithelial cells. *Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2001;44(6):600-5.
- 4) Bae CH, Chen SM, Lee HM, Song SY, Kim YD. The Effect of Doxycycline on PMA-Induced MUC5B Expression via MMP-9 and p38 in NCI-H292 Cells. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2011;4(4):177-83.
- 5) Shim JJ. Signal transduction of MUC5AC expression in airway mucus hypersecretory disease. *Tuberc Respir Dis* 2003;55(1):21-30.
- 6) Price D, Chisholm A, Ryan D, Crockett A, Jones R. The use of roflumilast in COPD: a primary care perspective. *Prim Care Respir J* 2010;19(4): 342-51.
- 7) Ishinaga H, Takeuchi K, Kishioka C, Yagawa M, Majima Y. Effects of dexamethasone on mucin gene expression in cultured human nasal epithelial cells. *Laryngoscope* 2002;112(8 Pt 1):1436-40.
- 8) Jin SL, Ding SL, Lin SC. Phosphodiesterase 4 and its inhibitors in inflammatory diseases. *Chang Gung Med J* 2012;35(3):197-210.
- 9) Page CP, Spina D. Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2012;12(3):275-86.
- 10) Souness JE, Aldous D, Sargent C. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. *Immunopharmacology* 2000;47(2-3):127-62.
- 11) Lipworth BJ. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2005;365(9454):167-75.
- 12) Spina D. PDE4 inhibitors: current status. *Br J Pharmacol* 2008;155(3): 308-15.
- 13) Reid DJ, Pham NT. Roflumilast: a novel treatment for chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Pharmacother* 2012;46(4):521-9.
- 14) Kwak HJ, Song JS, Heo JY, Yang SD, Nam JY, Cheon HG. Roflumilast inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators via suppression of nuclear factor-kappaB, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315(3):1188-95.
- 15) Yuan-Chen Wu D, Wu R, Reddy SP, Lee YC, Chang MM. Distinctive epidermal growth factor receptor/extracellular regulated kinase-independent and -dependent signaling pathways in the induction of airway mucin 5B and mucin 5AC expression by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Am J Pathol* 2007;170(1):20-32.
- 16) Bae CH, Kwak DS, Ye SB, Song SY, Kim YD. Diallyl disulfide induces MUC5B expression via ERK2 in human airway epithelial cells. *Phytother Res* 2012;26(2):197-203.
- 17) Woo HJ, Yoo WJ, Bae CH, Song SY, Kim YW, Park SY, et al. Leptin up-regulates MUC5B expression in human airway epithelial cells via mitogen-activated protein kinase pathway. *Exp Lung Res* 2010; 36(5):262-9.
- 18) Lahu G, Nassr N, Hünemeyer A. Pharmacokinetic evaluation of roflumilast. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;7(12):1577-91.