

프랑킨센스 에센셜 오일 흡입이 OVA로 유도된 알러지성 천식 모델 생쥐에 미치는 영향

이혜연 · 김금란 · 강상모^{1*}

건국대학교 대학원 생물공학과, ¹건국대학교 미생물공학과

The Effect of Nebulized Frankincense Essential Oil in an OVA-Induced Allergic Asthma Mouse Model.
Lee, Hye-Youn, Kum-Ran Kim, and Sang-Mo Kang^{1*}. Department of Bioengineering Graduate School at Konkuk University Seoul 143-701, Korea, ¹Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul, 143-701, Korea – In this study, we investigated the effects of frankincense essential oil (BSEO) on the immune cell change in the lung, BALF and PBMC using a mouse model of asthma. BALB/c mice after intraperitoneal OVA sensitization (day 1) were challenged intratracheally with OVA on day 14. Then, the asthma was induced by repeated OVA inhalation challenged. The asthma induced mice group inhaled 0.3% BSEO for 30 minutes per trial, three times a week, for 8 weeks using the nebulizer. After 12 weeks from the experiment, the mice was killed and the lung, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were obtained. Next, the change of immune cells inside the separated tissues was observed to identify the effects of BSEO on the allergic asthma mice. In conclusion, the hypersensitive reaction of airway to the bronchoconstrictor in the allergic asthma induced mice was effectively suppressed in Frankincense group, in Bermagot, Eucalyptus, Chamomile, Marjoram and Frankincense groups, the natural aromatic essential oil groups. Furthermore, it was also confirmed that the weight of lung, total number of alveolus cells and the number of BALF, MNL and DLN increased after inducing allergic asthma were reduced. BSEO suppressed the percentage of CD3e⁺/CD19⁻, B220⁺/CD23⁺ and CD11b⁺/Gr-1⁺ cells in the lung tissue of allergic asthma mice. Moreover, BSEO also reduced the percentage of CD4⁺/CD8⁻, B220⁺/CD23⁺ and CD3⁺/CCR3⁺ cells in BALF. In addition, the percentage of CD3e⁺/CD19⁻, CD3⁺/CD69⁺ and B220⁺/CD23⁺ cells in PBMC was reduced. The results of this study indicate that BSEO would be effective to treat allergic asthma by the immune control suppressing the activity of immune cells in each tissue.

Key words: Frankincense essential oil, allergic asthma, airway inflammation, eosinophils

서 론

알러지성 천식(asthma)은 기도염증, 기도과민성, 기도협착 및 기관지 경련의 특징이 나타나는 기도의 만성 염증성 질환으로[10], 혈청 내 IgE 항체 생성이 증가하고 기관지폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluids; BALF)과 기도점액 내 interleukin(IL)-4와 IL-5 분비가 증가된 특징을 보인다[38]. 천식의 치료제로 사용되는 β 2-agonists와 glucocorticoids 등의 항 천식 약물의 흡입은 90~95% 환자에게 치료효과가 있는 것으로 알려져 있으나[4, 19], 이러한 치료에 반응하지 않는 5~10%의 환자에게는 새로운 전략이 필요하다.

알러지성 천식의 기도과민반응과 호산구성 염증반응은 CD4⁺ Th2 세포가 분비하는 interleukin(IL)-4, IL-5와 IL-13 등의 사이토카인의 작용에 의한 것으로[37], 이중 IL-4는 B

세포가 IgE를 생산하는 형질세포로의 전환을 유도하여 IgE 생산을 촉진시키고 Th2 염증매개 물질들을 분비시켜 기도 과민성과 기도폐쇄 등의 천식 관련 증상을 일으킨다. IL-5는 호산구의 성장, 분화, 및 활성화에 관여하여 기도 재구성에 중요한 역할을 수행하며, IL-13은 호산구성 염증반응, 점액 분비와 기도 과민반응 등에 주도적인 역할을 수행한다[23].

이러한 기전에 따라 최근에는 일반적으로 Th2에 의한 기도 염증 반응을 target으로 anti-IgE antibody (omalizumab), cytokine/chemokines antagonist 및 immuno-modulators 등의 새로운 화합물들이 Th2 반응을 억제시키거나 Th1 반응을 증가 시키는 방법으로 치료제로 연구되고 있다[35]. 그러나 *in vitro* 실험이 대부분으로 직접 천식을 유발시켜 천식의 증상에 효과적인 영향을 미치는 연구는 거의 없는 실정이다. 또한 현재 omalizumab이 병원치료가 요구되는 천식환자에게 가장 cost-effective 할 것으로 보고되었으나[11] 실제 천식환자의 치료에서 Th1/Th2 조절 여부는 보고되지 않아 치료의 한계를 나타내고 있다.

최근의 연구에서 프랑킨센스(감람나무 과 *Boswellia* 속)의

*Corresponding author

Tel: 82-450-3524, Fax: 82-2-3437-8360

E-mail: kangsm@konkuk.ac.kr

알코올 추출물에서 boswellic acids(BA)가 leukotrienes 합성을 억제하는 방법으로 항천식작용이 있음이 보고되었다[1]. 이에 전보[30]에서 프랑킨센스 방향성 에센셜 오일을 cost-effective한 방법으로 ovalbumin(OVA)으로 천식을 유발시킨 천식 생쥐 모델에 흡입시킨 후 기도 과민성, 폐조직에서 호산구 침윤에 의한 조직손상, 혈청 내 OVA-specific IgE 생산량과 비장세포 배양액 내 사이토카인 생산량 변화를 관찰하여 호흡기를 통하여 투여된 프랑킨센스 에센셜 오일의 알러지성 염증 억제능을 보고한 바 있다. 따라서 본 연구는 알러지성 천식이 유발된 천식 생쥐 모델을 이용하여 천식의 병리기전에 있어 결정적인 역할을 하는 것으로 알려진 BALF, 폐 및 PBMC 내 면역세포 변화를 살펴 알러지성 천식 억제에 프랑킨센스 에센셜 오일의 영향을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

알러지성 천식 생쥐 모델

6주령 체중 20 ± 2 g의 BALB/c 마우스를 대상으로 Kung 등[27]의 방법을 수정하여 실행하였다. 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 용해한 난알부민(OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV) 0.5 mg/mL을 동일 부피의 10% (w/v) aluminum potassium sulfate(Alum; Sigma)와 혼합하여, 난알부민 용액을 제조하였다. 이 혼합물을 10 N NaOH를 사용하여 pH 6.5로 조정하고 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 G에서 5분 동안 원심분리하였다. 이 OVA/Alum 침전물을 증류수를 가하여 용해한 후 OVA(0.5 mg/mL) 200 μ L를 실험 시작 1일에 복강 내로 주사하여 전신감작을 시켰다.

실험 시작 14일에 10% chloral hydrate(Fluka, USA)로 생쥐를 마취하고 OVA(0.5 mg/mL) 100 μ L를 기도 투여하여 면역 유발시켰다. 또한 실험 시작 21일부터 250×300×250 mm의 polycarbonate 재질 chamber(DJ-435, Daejon Inc., Republic of Korea)안에서 8주 동안, 1주일에 3회, 1회에 30분 Buxco Aerosol Delivery System(NE-CT10, Buxco Co., USA)을 이용하여 1~4주간은 2.5 mg/mL OVA/PBS 용액, 그리고 5~8주간은 5 mg/mL OVA/PBS 용액을 aerosol화하여 분무하여 흡입시키고 12주째 살처분하여 실험에 사용하였다.

아로마 에센셜 오일 흡입

본 실험에 사용한 아로마 오일은 프랑킨센스(*Boswellia sacra*), 캐모마일(*Matricaria chamomilla*), 마조람(*Thymus mastichina*), 버가못(*Citrus bergamia*), 유칼립투스(*Eucalyptus globulus*)로 Tisserand(Aromatherapy Products Ltd. Brighton, England)가 생산한 오일을 사용하여 beta-2 agonist 효능 실험을 수행하였고, 이 후 실험은 프랑킨센스 에센셜 오일(*Boswellia sacra* essential oil; BSEO)을 대상으로 실험하였다. OVA/Alum(0.5 mg/mL)으로 전신 감작시킨 후 21일부터 8주간 0.3% BSEO를 1주일에 3회, 1회 30분씩 분무하여 흡

입시켰다. 대조군에는 PBS를 동량 사용하였으며 12주째 살처분하여 실험에 사용하였다.

실험군 지정

본 실험에서는 실험 1일에 alum을 PBS(0.2 g/L KCl, 0.2 g/L KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 1.2 g/L Na_2HPO_4 , pH 7.4)에 용해한 후 200 μ L를 복강 주사하고, 14일에는 PBS만을 기관내 투여한 후 21일부터 8주간, 1주일에 3회, 1회 30분간 PBS만을 흡입시킨 정상 생쥐군을 음성대조군(Nr)으로 지정하였다.

OVA/alum으로 감작 유발시킨 생쥐군을 대조군(OVA-CT)으로 사용하였고, OVA/alum으로 감작 유발시킨 후 지속성 베타 2 항진제로 사용되는 formoterol(1 mg/kg)을 흡입시킨 생쥐군을 양성대조군(OVA-FT)으로 사용하였으며 OVA/alum으로 감작 유발시킨 후 0.3% BSEO를 흡입시킨 생쥐군을 실험군으로 지정하여 총 4군, 각 6마리로 나누어 실험하였다.

기도의 과민반응 측정

본 실험에서는 BSEO군의 폐기능 검사를 위하여 12주째 마지막 분무를 실시하고 24시간 후에 전신 체적변동기록(Whole body plethysmographs, Biosystem XA; Buxco research system, Wilmington, NC, USA) 장비를 사용하여 Hamelmann 등[21, 32]의 방법에 따라 메타콜린에 의한 기도 협착을 유발시켜 기도의 과민반응(airway hyperresponsiveness; AHR)을 측정하였다.

메타콜린(Sigma, USA) 분말을 PBS에 녹여 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL의 농도로 점차 증가시키면서 nebulizer로 생쥐에 흡입시킨 후, 각각의 농도에 대한 기도의 반응성을 10분간 연속적인 모니터링으로 측정하였다.

에센셜 오일들의 beta2-agonist 효능 스크리닝은 처음 1회만 각 에센셜 오일을 5분간 흡입시킨 다음 10분 후 기도저항수치(Penh)를 측정하였다. Penh 값은 Biosystem XA software(Buxco Research System, Wilmington, USA)를 이용하여 분석하였고, Hamelmann 등[21]의 다음의 공식에 의하여 측정하였다.

$$\text{Penh} = \text{Pause} \times \text{PIF} / \text{PEF}, \text{Pause} = (\text{Te} - \text{Tr}) / \text{Tr}$$

PIF, peak inspiratory flow; PEF, peak expiratory flow; Te, expiratory time; Tr, relaxation time.

혈액 및 기관지 폐포 세척액 분리

실험 종료 후 생쥐는 10% chloral hydrate(Fluka, USA)를 복강 내에 투여한 후 혈액을 심장 천자법으로 채혈하고, 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 혈청을 얻었으며 -70°C에 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다. 혈액성분과 효소들의 활성도 측정은 바이오톡스텍(주)(Biotoxtech Co., Ltd.

Cheongwon, Korea)에 의뢰하였다.

기관지 폐포 세척액(bronchoalveolar labage fluid; BALF)은 10% FBS가 함유된 DMEM 배양액(1회, 1 mL, 37°C)이 준비된 주사기로 기도에 반복하여 넣고 흡입시켜 얻었으며, 이 과정을 3회 반복하였다. 이 폐포 세척액의 세포를 1,000 rpm cytospin centrifuge(Cellspin, Hanil, Korea)로 처리하여 도말 표본을 만든 후 Diff-Quik으로 염색하였고 호산구, 호중구, 림프구 등의 세포수를 광학현미경(Nicon, Japan) 하에서 400배로 관찰하여 조사하였다[26].

폐 적출 및 폐세포 분리

폐포 세척액에서 세포를 분리하고, 폐를 적출하여 0.01 g 까지 chemical balance로 측정 한 후 폐조직을 잘게 절편하였다. 여기에 2% FBS이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 5 분간 1,800 rpm 배지에서 원심분리하고, 5 mL의 RPMI 1640 배양액에 50 µL의 collagenase IV(100 µg/mL)를 가한 후 37°C shaking 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 2분간 방치한 후 상층액을 분리하고 10% FBS이 포함된 RPMI 1640 배양액에 세포를 포집하였다. 이를 5회 이상 조직을 분해하여 폐세포를 분리하였다.

말초혈액 내 단핵구 분리

말초혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)를 분리하기 위해 heparin이 들어있는 주사기로 심장 천자법으로 채혈하여 원심분리기에 넣고 2,000 rpm에서 20 분 동안 원심분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C에 보관하고, 적혈구 위의 세포 층만 건어서 Ficoll-Hypaque(Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, U.S.A) 위에 섞이지 않도록 올려주고 2,000 rpm에서 30분간 원심분리를 하였다. 단핵구 층을 분리한 후 PBS로 희석하여 1500 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 PBS로 2회 수세하였다. 얻어진 단핵구 세포를 5×10^5 cells/well 로 조정 한 후 4°C에서 면역 형광염색(immuno fluorescence staining)을 실시하여 flow cytometer의 cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율(%)로 분석하였다.

형광 유세포 분석

폐, BALF 및 PBMC으로부터 분리한 각각의 세포를 24 well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하고 배양 후 각각의 세포를 염색완충용액(1% bovine serum albumin(BSA), 0.1% NaN₃ in PBS)으로 2회 수세한 후 4°C에서 면역 형광염색을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, PE-anti-CCR3, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD23, FITC-anti-CD69, PE-anti-B220, FITC-anti-IgE, PE-anti-Gr-1, FITC-anti-CD11b를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 인산완충용액으로 수세한 후 세포 표면 분자들의 발현을 FACScan Flow cytometer(Becton Dickinson)로 CD3e,

CD4, CD8, CD69, CCR3, B220, CD23 그리고 CD69의 발현을 분석하였다. 분석 프로그램은 CELLQUEST 프로그램(Becton Dickinson)으로 CD3e⁺/CD19⁺, B220⁺/CD23⁺, CD3e⁺/CCR3⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺의 비율(gated, %)을 산출하였다.

통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

기도과민성 측정

알러지성 천식은 기도 내 염증반응에 의한 기도과민반응을 나타내는 특징이 있으며, 이러한 과민반응으로 염증반응 세포들의 염증부위 침윤과 점액 세포들의 점액 과잉생산으로 인해 호흡곤란을 야기하여, 증상을 측정하는 방법으로 메타콜린에 대한 기도 과민반응을 이용하고 있다[3].

본 연구에서 Bergamot, Chamomile, Marjoram, Eukalyptus, Frankincense 아로마 에센셜 오일들을 대상으로 β₂-agonist 효능 스크리닝은 처음 1회만 각 아로마 에센셜 오일을 3분간 흡입시킨 다음 3분 후 기도저항수치(Penh)를 측정하여 비교하였다(Fig. 1). Fig. 1에서 나타난 바와 같이 정상군에 비해 OVA-CT군의 Penh값은 메타콜린 각 농도에서 높게 나타났으며, OVA-FT군은 OVA-CT군에 비해 메타콜린 각 농도에서 정상군 수준을 나타내었다. 아로마 에센셜 오일군 중 Bergamot군은 메타콜린 각 농도에서 대조군인 OVA-CT군보다 Penh값이 증가하였다. 메타콜린 25 mg/mL의 농도에서 OVA-CT군의 Penh값 3.084±0.25에 비해 Chamomile군은 3.879±0.163, Marjoram군은 3.734±0.23으로 기도저항이 증가하였으며, 50 mg/mL의 농도에서 OVA-CT군의 Penh값 4.498±0.39에 비해 Chamomile군은 4.112±0.32, Marjoram군은 3.398±0.13으로 감소하였다. Eukalyptus군은 메타콜린 각 농도에서 정상군에 비해 기도저항이 억제되었고, Frankincense군의 Penh값은 메타콜린 25 mg/mL의 농도에서 1.994±0.21, 50 mg/mL의 농도에서 2.82±0.16로 감소하였다(Fig. 1).

Duan 등[16]은 면역 세포 활성화에 중요한 외부 신호 조절 단백질인 ERK(extracellular signal-regulated kinase)를 억제하는 ERK kinase inhibitor를 천식군에 기도투여하여 기관지과민반응 억제, 호산구 감소, BALF 내 IL-4, IL-5, IL-13을 감소시켜 알러지성 기도 염증 억제 효과를 보고하였고, Ram 등[36]은 항염증, 항수축제로 사용되는 phospholipase A₂ inhibitor인 비스테로이드계 para-Bromophenacyl bromide (PBPB)를 천식생쥐군에 경구투여한 후 메타콜린에 대한 기관지 수축과 이완반응을 보고하였다. 이 보고에 의하면 PBPB는 BALF 내 IFN-γ 증가, IL-4와 IL-5 분비는 감소시키는

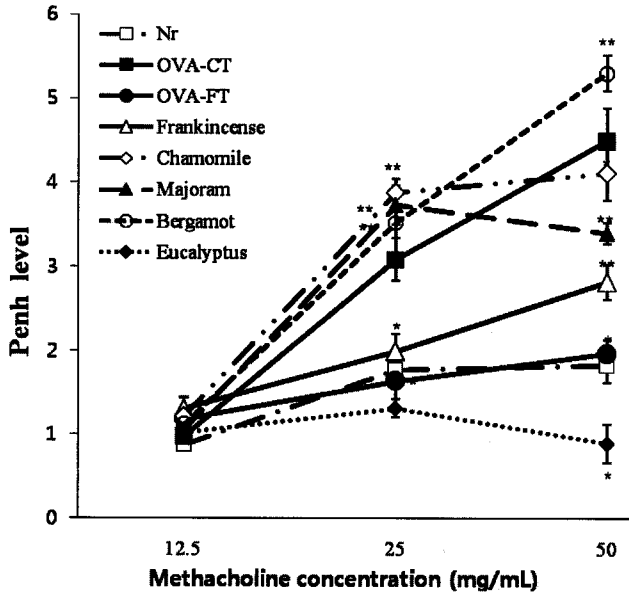


Fig. 1. Effect of aroma essential oils on AHR to methacholine. AHR was assessed in OVA mice inhaled to essential oils by analyzing Penh responses in a body plethysmograph. PBS or increasing concentrations of Mch (12.5-50 mg/mL) were nebulized for 3 min, and Penh measurements were taken and averaged for 3 min after each nebulization. Abbreviations: *Nr*, saline-treated mice; *OVA-CT*, OVA-sensitized/ challenged mice were treated with PBS; *OVA-FT*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with formoteol (1 mg/kg). The results represent the means±SE of 6 animals per group. Significance was determined using the Student's *t*-test versus the OVA-CT group (**p*<0.05, ***p*<0.01).

Th1/Th2 사이토카인 조절로 PLA2 활성을 억제시켜 기관지 과민반응을 억제하였다. 본 실험에서 아로마 에센셜 오일군 중 대조군에 비해 높은 기도과민반응을 나타내는 Bergamot 군과 정상군의 기도확장을 나타내는 Eucalyptus군을 실험군에서 제외하였다. 또한 메타콜린 50 mg/mL의 농도에서 Chamomile군, Marjoram군, Frankincense군의 Penh값은 OVA-CT군에 비해 각각 8.6%, 24%, 37% 감소하였는데 Frankincense 에센셜 오일(*Boswellia sacra* essential oil; BSEO) 흡입군이 항원 유발 후 염증반응에 의한 기관지 과민반응을 억제하는 항천식 작용이 있는 것으로 추정되어 이후 Frankincense 에센셜 오일을 대상으로 항염증 작용의 효과를 규명하고자 실험을 진행하였다.

말초혈액 내 세포분화비율에 미치는 영향

생쥐의 알러지성 천식 유발은 기관지 수축으로 인한 호흡량 변화와 폐의 염증유발에 의한 백혈구 수의 증가를 초래하며, 알러지성 천식 반응에 의한 폐 염증에서는 염증반응에 관여하는 백혈구들의 다수가 기도에 모이며, 특히 호산구과다증은 알러지성 천식 생쥐 모델에서 나타나는 두드러진 특징으로 알려져 있다[8]. 따라서 대조군과 BSEO 흡입

군의 염증반응을 비교하기 위하여 OVA 최종 노출 24시간 후 생쥐의 말초혈액을 수거하여 세포수를 측정하였다.

본 실험에서 백혈구(white blood cell; WBC)세포 백분율 비교 결과 정상군에서 neutrophils 빈도는 14.2±3%, lymphocytes 빈도는 82.9±3.5%, eosinophils 빈도는 0.5±0.1%, basophils 빈도는 0.15±0.07%, monocytes 빈도는 1.8±0.07%이었다(Fig. 2A, B). WBC내 neutrophils 빈도(%)는 정상군에 비해 OVA-CT군이 35.7±2.2%로 증가하였으며, OVA-FT군은 19.3±0.7%, OVA-BSEO군은18.7±3.7%로 각각 OVA-CT군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 2A). WBC내 lymphocytes 빈도는 정상군에 비하여 OVA-CT군은 57.6±1.6%로 감소하였으며, OVA-FT군은 76.0±1.6%, OVA-BSEO군은 72.6±2.6%로 모두 OVA-CT군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 2A). WBC내 eosinophils 빈도는 정상군에 비해 OVA-CT군에서 7.75±0.35%로 현저하게 증가한 결과를 얻었고, OVA-FT군은 3.5±1.35%, OVA BSEO군은 4.85±1.05%(%)로 각각 OVA-CT군에 비하여 유의성 있는 감소가 나타났다(*p*<0.01)(Fig. 2B).

그러나 basophils 빈도는 OVA-CT군 0.14±0.07%에 비하여 OVA-BSEO군이 0.1±0.01%으로 약간 감소를 나타냈지만 통계학적으로 유의성은 나타나지 않았고, Monocytes 빈도%는 OVA-CT군이 2.5±0.25%, OVA-FT군이 2.35±0.25%, OVA-BSEO군이 2.05±0.25%로 모든 군에서 큰 차이가 나타나지 않아 혈액에서 큰 변화를 보여주지 못했다(Fig. 2B).

Gilroy 등[20]은 백혈구 중 특히 neutrophils과 eosinophils 은 염증으로 인한 조직 손상 부위에 최초로 recruitment되는 세포들이며 염증 반응이 감소하면 apoptosis에 의해 제거되는 연구결과를 보고하였다. 또한 Basyigit 등[5]은 급성 중증 천식 환자의 기도 조직에서 neutrophil 수는 증가하며 이러한 증가는 IL-8과 관련이 있다는 연구결과를 보고하였다.

본 연구결과 Fig. 2A에서 정상군의 WBC내 neutrophils과 lymphocytes 비율은 천식유발에 의한 조직 손상으로 인하여 OVA-CT군에서 lymphocytes의 비율이 감소하고 BSEO군에서는 조직 손상으로 인한 염증이 감소함에 따라 OVA-CT군에 비하여 lymphocytes의 비율이 증가하는 것으로 판단되었다. 또한, Fig. 2B에서 말초혈액 내 호산구 비율이 정상군에 비해 OVA-CT군에서 현저히 증가하고 이에 비해 OVA-FT군과 OVA-BSEO군에서 감소된 결과는 전보[30]의 BSEO 흡입군에서 BALF 내 호산구 감소 결과와 일치하는 것으로 BSEO가 말초혈액과 BALF 내 호산구 억제에 영향을 주는 것으로 판단되었다.

폐 무게와 총폐포수 분석

폐의 무게와 총폐포수의 증가는 비만세포, 호산구, 림프구, 대식세포 등의 천식을 일으키는 면역세포들의 증식과 활성화로 기관지 및 폐에 침착, 침윤되고 이러한 염증 반응에 의한 콜라겐의 침착 등이 보고되었다[34].

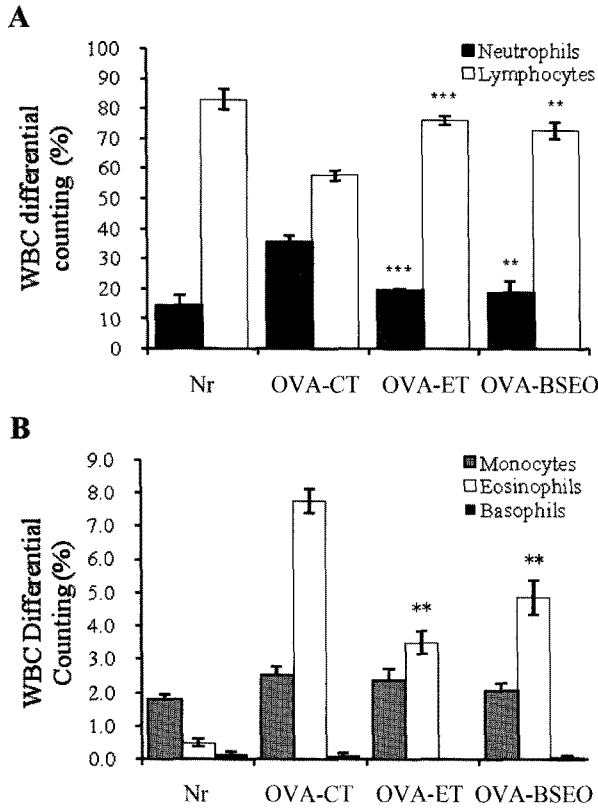


Fig. 2. Effect of BSEO on the differential leukocytes in peripheral blood of OVA-induced asthma mouse model. Peripheral blood was smeared on a slide and stained with Diff-Quick to determine differential cell counts (A). Changes on total WBC numbers and differential counts of lymphocytes in blood of OVA-induced asthma mouse model (B). Mice were sensitized and challenged as described in Materials and Methods. Abbreviations: *Nr*, saline-treated mice; *OVA-CT*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with PBS; *OVA-FT*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with formoterol (1 mg/kg); *OVA-BSEO*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with BSEO (3 mg/mL). The results represent the means±SE of 6 animals per group. The Student's *t*-test shows significant variance among groups. **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001 compared with OVA-CT group.

본 실험에서 OVA/Alum으로 유발한 알러지성 천식생쥐모델에서 폐 무게를 측정된 결과 정상군은 0.15±0.02 g으로 나타난 반면 OVA-CT군은 0.31±0.02 g으로 정상군에 비하여 유의성 있게 (*p*<0.05) 증가하였다. OVA-FT군은 0.18±0.03 g, OVA-BSEO 투여군은 0.25±0.01 g으로 나타나 OVA-CT군에 비하여 20% 감소하여 유의한 차이를 보였다(Fig. 3A). 총폐 포수를 측정된 결과는 정상군은 0.95±0.05(×10⁷)개, OVA-CT군은 2.00±0.10(×10⁷)개, OVA-FT군은 1.305±0.10(×10⁷)개, OVA-BSEO군은 1.65±0.25(×10⁷)개로 나타나 OVA-FT군과 OVA-BSEO군이 OVA-CT군에 비하여 유의하게 감소하였다(*p*<0.01)(Fig. 3B).

이와 같은 결과는 항염증, 항천식 효과로 보고된 *Radix adenophorae* extract의 투여가 천식군에서 폐의 무게와 총폐

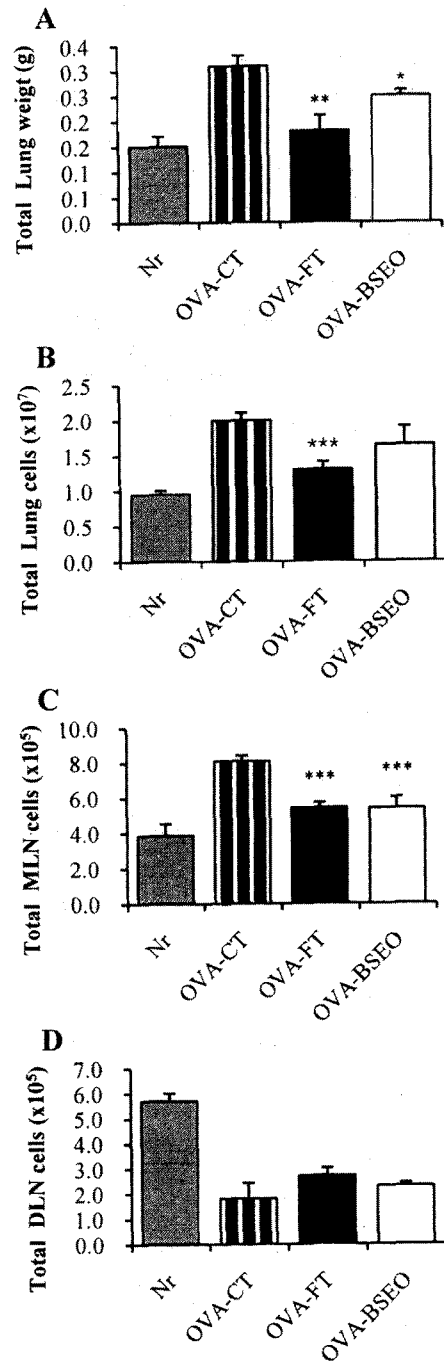


Fig. 3. Inhibitory effect of BSEO on OVA-induced decrease of the number of inflammatory cells. Total lung weight, (B) total lung cells, (C) total MLN cells and (D) total DLN cells counts were determined in the BALB/c mice. Mice were sensitized and challenged as described in Materials and Methods. Abbreviations: *Nr*, saline-treated mice; *OVA-CT*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with PBS; *OVA-FT*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with formoterol (1 mg/kg); *OVA-BSEO*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with BSEO (3 mg/mL). The results represent the means±SE of 6 animals per group. The Student's *t*-test shows significant variance among groups. **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001 compared with OVA-CT group.

포수가 현저하게 감소한다는 Roh 등[40]의 연구결과와 일치하는 것으로, 본 실험에서 천식유발로 인한 폐염증으로 OVA-CT군에서 폐무게와 총폐세포수의 증가가 나타났고 BSEO 흡입군에서 폐무게와 총폐세포수가 감소하였다. 이와 같은 결과는 BSEO가 폐의 염증을 억제하는 것을 보여주며 Fig. 2의 호산구 억제 결과와 함께 Fig. 1의 기도 과민성 억제에 영향을 주는 것으로 판단되었다. 또한 폐의 무게, 총폐포수 변화가 면역 반응에 관련되는 세포 수와 관련이 있는지 조사하기 위하여 천식유발 생쥐로부터 BALF, DLN 및 MLN을 분리하여 세포수를 비교하는 다음 실험을 진행하였다.

조직 내 세포 수 변화 비교

MLN은 aeroallergen에 대한 알리지성 과민반응에서 강력한 항원 제시 세포인 기도의 수지상 세포(DCs)들이 이동하여 naive T 세포를 자극하여 Th1 또는 Th2 면역반응을 개시하는 표적 장소이며[12], 만성천식 동물모델에서 폐의 염증과 감염 등은 superantigen 등이 수지상 세포를 자극하면 활성화된 DCs가 다시 배수 림프절(drainng lymph nodes,

DLN)로 이동하여 DLN에 있는 naive T 세포를 자극하고 활성화된 T 세포는 폐부종 부위로 이동하여 염증반응을 일으킨다[24].

본 연구에서 MLN내 총 면역 세포수를 조사한 결과 정상군 $3.85 \pm 0.65 (\times 10^5 \text{ cells})$ 에 비하여 OVA-CT군이 $8.10 \pm 0.3 (\times 10^5 \text{ cells})$ 으로 2배 이상 현저하게 총 세포수가 증가하였고, OVA-FT군은 $5.40 \pm 0.3 (\times 10^5 \text{ cells})$, OVA-BSEO군은 $5.40 \pm 0.6 (\times 10^5 \text{ cells})$ 으로 각각 약 30%이상 OVA-CT군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다($P < 0.01$)(Fig. 3C). 또한, 총 DLN 세포수를 측정된 결과 정상군 $5.70 \pm 0.3 (\times 10^5 \text{ cells})$ 에 비하여 OVA-CT군이 $1.80 \pm 0.6 (\times 10^5 \text{ cells})$ 으로 3.4배 이상 현저하게 총 세포수가 감소하였고, OVA-FT군은 $2.70 \pm 0.3 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로 OVA-CT군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 OVA-BSEO군은 $2.30 \pm 0.1 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로 OVA-CT군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 3D).

이와 같은 결과는 천식유발로 인한 염증반응으로 MLN내 면역세포수가 증가하였고 BSEO 흡입으로 Th1 또는 Th2 면역세포 수가 억제되는 것으로 판단되었다. 또한, Hammad

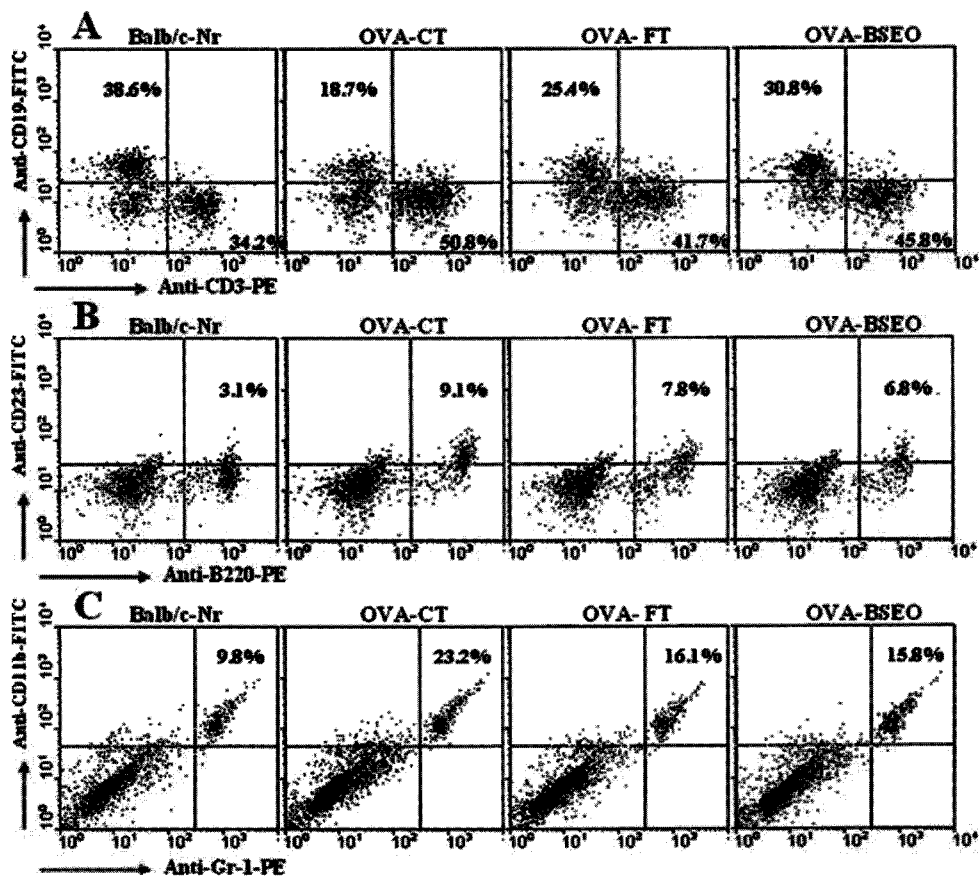


Fig. 4. Effect of BSEO on the percentage of CD19/CD3, CD23/B220, and CD11b/GR-1-gated cells in lung of OVA-induced asthma mouse model. Mice were sensitized and challenged as described in Materials and Methods. Abbreviations: *Nr*, saline-treated mice; *OVA-CT*, OVA-sensitized/ challenged mice were treated with PBS; *OVA-FT*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with formoteol (1 mg/kg); *OVA-BSEO*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with BSEO (3 mg/mL). The results represent the means±SE percentage cells for CD19⁺ CD3⁺ (A) or CD23⁺/B220⁺ (B) or CD11b⁺/Gr-1⁺ (C) cells. Each dot polt represents of 6 animals per group.

등[22]의 만성천식질환 동물의 경우 DLN의 면역세포가 천식 폐질환 부위로 migration이 일어나 DLN 내 면역세포의 현저한 감소가 나타나는 연구결과와 일치하는 것으로 만성 천식 생쥐동물에서 DLN의 naive한 T 세포가 활성화되어 천식 폐염증 부위로 이동하여 앞서의 Fig. 3A, B의 폐의 무게와 폐 세포수가 증가한 것으로 판단되었다.

앞서의 BSEO 군의 DLN과 MLN 내 염증세포 수 감소와 전보[30]의 BALF 내 염증세포 수 감소는 Th1 또는 Th2 세포 활성 억제에 의한 결과이며, Fig. 2B의 혈액 내 호산구 감소와 전보[30]의 BALF 내 호산구 감소 결과와 종합하면 BSEO가 Th2 세포 활성 억제로 알러지성 기관지 염증을 억제하는 것으로 판단되었다.

폐조직 내 면역세포 변화에 미치는 영향

최근의 연구에서 알러지성 천식 생쥐의 경우 폐부위에 Th2 세포, 호산구세포, 단핵구, 비만세포 등 면역염증세포가 증가하게 되고, 기도 재구성과 goblet 세포가 증가하며, 항원을 인식한 림프구는 림프절에서 활성화하여 염증 조직으로 이동하는 것이 보고되었다[6].

전보[30]에서 BSEO는 호산구성 염증반응과 기도의 과민 반응을 억제하였으므로 본 실험에서 이에 관여하는 면역세포의 종류와 분포를 확인하기 위하여 폐조직 내 면역세포의 종류와 분포를 FACScan 실험을 수행하여 세포수를 백분율(%)로 분석하였다(Fig. 4). 본 연구결과 T세포의 활성 표지인 CD3e⁺/CD19⁻ 세포 비율은 정상군 34.2%에 비하여 OVA-CT군은 50.8%로 증가되었고, OVA-CT군에 비하여 OVA-FT군은 41.7%, OVA-BSEO군은 45.8%로 각각 유의하게 감소되었다(Fig. 4A).

이에 비해 B세포인 CD19⁺ 세포 비율은 정상군은 38.6%이며 정상군에 비해 OVA-CT군은 18.7%로 감소되었고, OVA-FT군은 25.4%, OVA-BSEO군은 30.8%로 OVA-CT군에 비하여 각각 유의하게 증가되었다(Fig. 4A). 위와 같은 결과로 OVA-BSEO군에서 T세포 수가 감소됨을 확인할 수 있었고, B세포인 CD19⁺ 비율의 증가는 BSEO에 의해 감소된 T 세포에 의존적으로 변화되는 것을 확인하였다. 한편 B세포의 표면에서 발현되는 분자인 B220 (CD45)은 사람에게는 존재하지 않지만 마우스의 B 세포 표면에 존재하는 B세포 마커이며, CD23은 비만세포, 호중구, 호산구 등의 표면 분자이다[15]. 본 연구에서 B220⁺/CD23⁺ 세포 비율은 정상군은 3.1%이며 OVA-CT군은 정상군에 비해 9.1%로 증가되었고 OVA-FT군은 7.8%, OVA-BSEO군은 6.8%로 OVA-CT군에 비하여 각각 유의하게 감소하였고(Fig. 4B), 전보[30]의 BSEO군에서 특이적 항원인 OVA에 대한 IgE 양의 감소 결과와 더불어 BSEO가 알러지성 염증에 의한 B 세포의 분화를 효과적으로 억제하는 것으로 판단되었다.

CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포 비율은 정상군은 9.8%이며 OVA-CT군은 정상군에 비하여 23.2%로 증가되었고 OVA-FT군은

16.1%, OVA-BSEO군은 15.8%로 나타나 OVA-CT군에 비하여 각각 감소하였다(Fig. 4C). 세포유착분자는 세포 간, 세포-기질 간 상호작용을 중개하는 세포표면 수용체로서 염증 반응 및 면역학적 반응, 상처치유, 응고, 세포성장 및 분화에 관여하는데 Gr-1은 과립구의 표지자이고 CD11b는 순환 호산구의 표면에 발현하여 내피에 발현되어 있는 ICAM-1(intercellular adhesion molecule 1)과 유착하고 이후 PAF, LTB4, eotaxin, RANTES 등의 화학 주성인자 등에 의해 경내피 이동이 일어나 결체조직 즉 표적장기로 유입된다[18, 25, 31]. 따라서 본 실험결과 폐 세포에서 CD11b⁺/Gr-1⁺ 절대 세포수를 조사한 결과 OVA-BSEO군이 OVA-CT군에 비하여 약 53% 유의하게 억제된 결과는 BSEO흡입이 호산구의 내피세포유착을 통한 경내피 이동을 억제하여 천식을 감소시키는 효능을 가질 수 있는 근거로 사료되었다(Fig. 4C).

BALF 내 면역세포 변화에 미치는 영향

OVA로 유도된 천식 생쥐의 BALF에서 Th2 세포인 CD4⁺/CD8⁻, 초기 활성화된 T 세포인 CD3⁺/CD69⁺, Gr-1⁺/CD11b⁺ 및 IgE⁺/B220⁺ 절대세포수의 증가가 보고되었고[40], 항천식제 및 항염증제 투여 시 증가된 염증매개 면역세포들의 현저한 감소가 보고되었다[39].

본 연구에서 BALF 내 면역세포의 종류와 분포를 FACScan 실험을 수행하여 세포수를 백분율(%)로 분석하였다(Fig. 5). T 세포 활성 지표인 CD3⁺ 세포 비율은 정상군은 15.6%이며 OVA-CT군은 정상군에 비하여 83.2%로 증가되었고, OVA-CT군에 비하여 OVA-FT군은 69.3%, OVA-BSEO군은 71.0%로 OVA-CT군에 비하여 각각 유의하게 감소되었다(Fig. 5A). CCR3 수용체는 호산구, 호염기구 및 T 세포 등의 세포 표면에 존재하는 chemokine receptor로 특히 C-C chemokine eotaxin에 의해 활성화되는 것으로[17], 본 연구 결과 CCR3⁺ 세포 비율은 정상군은 1.3%이며 OVA-CT군은 정상군에 비하여 8.1%로 증가되었고 OVA-FT군은 13.7%, OVA-BSEO군은 5.2%로 OVA-CT군에 비하여 각각 유의하게 감소되어(Fig. 5A), BALF 내 BSEO가 호산구 수를 유의하게 억제하는 것으로 확인되었다.

CD4⁺ T 세포는 Th 세포로 분화하며 분화된 Th 세포들이 IL-4를 생성하여 B 세포가 IgE를 생성하도록 유도하며, CD8⁺ 세포는 Tc 세포로 분화하여 CTL 세포를 형성하여 altered self-cell을 제거하는 역할을 한다[29]. 본 연구 결과 CD4⁺ 세포 비율은 정상군은 26.0%이며 OVA-CT군은 정상군에 비하여 63.4%로 증가되었고 OVA-FT군은 50.1%, OVA-BSEO군은 52.7%로 OVA-CT군에 비하여 각각 유의하게 감소되었다(Fig. 5B). CD8⁺ 세포 비율은 정상군은 10.0%이며 OVA-CT군은 6.3%로 증가되었고 OVA-FT군은 6.6%, OVA-BSEO군은 11.3%로 OVA-CT군에 비하여 각각 유의하게 감소되었다(Fig. 5B).

B220⁺/CD23⁺ 세포 비율은 정상군은 4.17%이며 OVA-CT

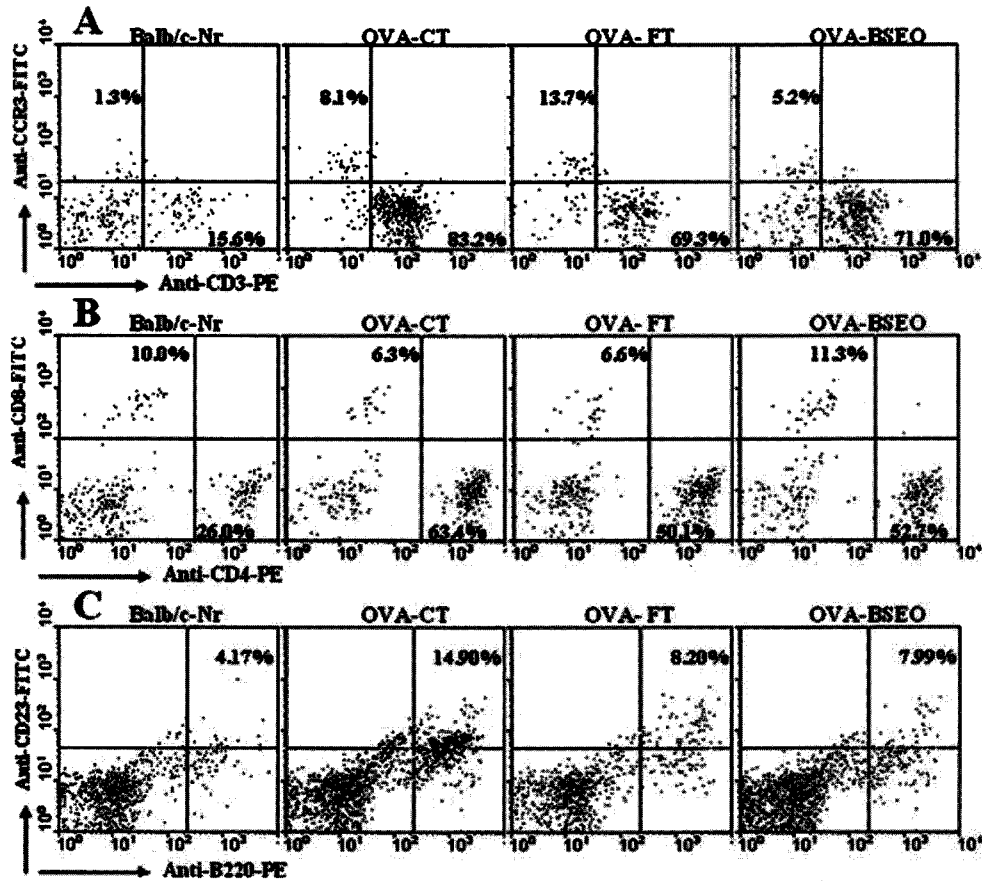


Fig. 5. Effect of BSEO on the percentage of CD19/CD3, CD23/B220, and CD11b/GR-1-gated cells in BALF of OVA-induced asthma mouse model. Mice were sensitized and challenged as described in Materials and Methods. Abbreviations: *Nr*, saline-treated mice; *OVA-CT*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with PBS; *OVA-FT*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with formoterol (1 mg/kg); *OVA-BSEO*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with BSEO (3 mg/mL). The results represent the means±SE percentage cells for CCR3⁺/CD3⁺ (A) or CD8⁺/CD4⁺ (B) or CD23⁺/B220⁺ (C) cells. Each dotplot represents of 6 animals per group.

군은 정상군에 비하여 14.90%로 증가하였고 OVA-FT군은 8.20%, OVA-BSEO군은 7.99%로 나타나 OVA-CT군에 비하여 각각 유의하게 감소하였다(Fig. 5C).

Bratke 등[9]의 연구에 의하면 만성 천식은 T세포 매개 기도 염증과 관련되어 있으며 폐포 내 granzyme B(grB)발현이 증가하고 BALF 내 CD3⁺, CD8⁺ 및 CD16/56⁺의 증가하는 반면 말초혈액 내에서는 CD3⁺, CD8⁺ 및 CD16/56⁺ 세포들의 비율이 감소한다는 결과를 보고하였다.

본 연구의 BALF 내 OVA-BSEO군에서 CD3⁺/CCR3⁺, CD4⁺/CD8⁺, B220⁺/CD23⁺ 세포비율 감소는 앞서의 폐조직 내 면역세포 변화결과(Fig. 4)와 일치하는 것으로 폐와 BALF 내 면역세포 수 감소로 알러지성 염증과 기도과민반응이 억제되는 것으로 판단되었다.

PBMC 내 면역세포 변화에 미치는 영향

최근의 연구에서 천식군과 정상군에 대해 peripheral blood mononuclear cell(PBMC)에서 잘 알려진 염증 매개물질인

IL-9[13], IL-4와 IL-5[33], IL-13[14], IL-10[40] 및 IFN-γ[28]의 변화들이 보고되었으며, 또한 알러지성 천식에서 항원에 의해 자극된 PBMCs의 증가와 이들 세포들이 생성하는 Th1 및 Th2 사이토카인 또는 케모카인의 생산량의 증가가 보고되었다[41].

본 연구에서 PBMC 내 면역세포의 종류와 분포를 FACSscan 실험을 수행하여 세포수를 백분율(%)로 분석하였다(Fig. 6). 본 연구결과 T 세포인 CD3e⁺/CD19⁻ 세포비율은 정상군은 60.2±0.20%이며 OVA-CT군은 정상군에 비하여 80.9±2.35%로 증가되었고, OVA-FT군은 58.7±10.60%, OVA-BSEO군은 57.8±5.40%로 OVA-CT군에 비하여 각각 유의하게 감소되었다(Fig. 6). 이에 비해 B세포인 CD19⁺ 세포 비율은 정상군은 21.9±0.50%이며 정상군에 비해 OVA-CT군은 14.1±4.00%로 감소되었고 OVA-FT군은 18.6±2.50%, OVA-BSEO군은 24.8±3.45%로 OVA-CT군에 비하여 각각 유의하게 증가되어 T 세포의 수에 의존하여 변화되는 것을 확인하였다(Fig. 6A).

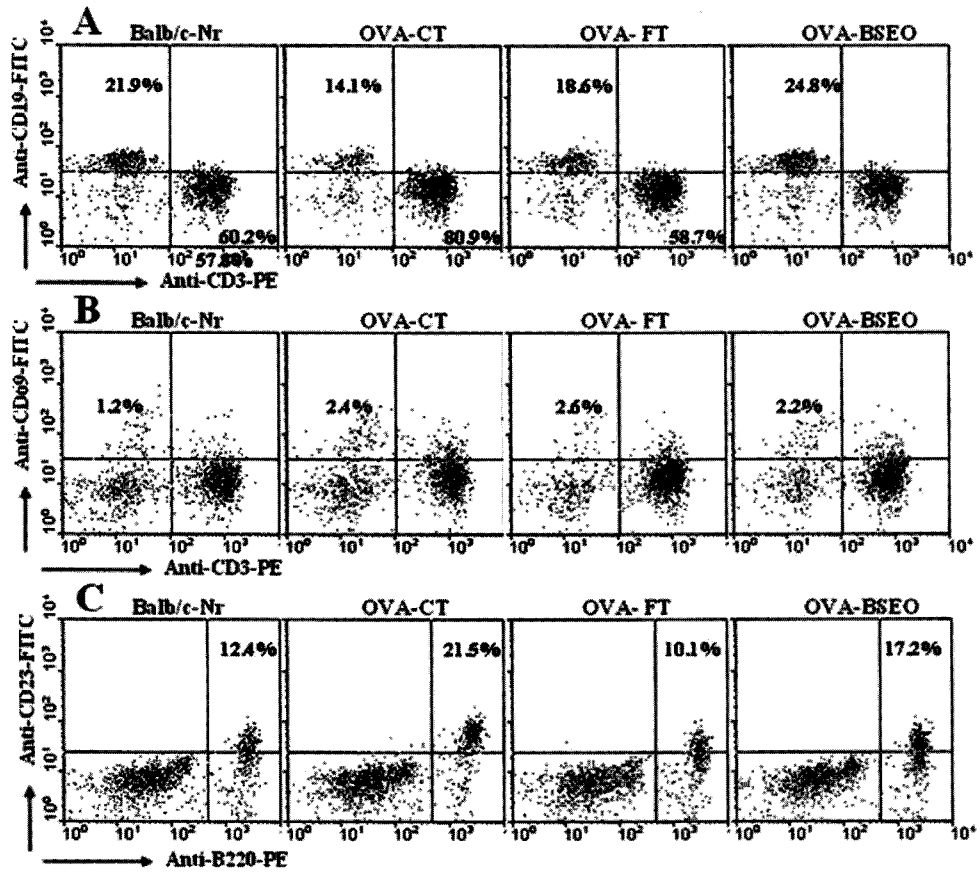


Fig. 6. Effect of BSEO on the percentage of CD19/CD3, CD69/CD3, and CD23/B220-gated cells in PBMC of OVA-induced asthma mouse model. Mice were sensitized and challenged as described in Materials and Methods. Abbreviations: *Nr*, saline-treated mice; *OVA-CT*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with PBS; *OVA-FT*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with formoterol (1 mg/kg); *OVA-BSEO*, OVA-sensitized/challenged mice were treated with BSEO (3 mg/mL). The results represent the means±SE percentage cells for CD19⁺CD3⁺ (A) or CD69⁺CD3⁺ (B) or CD23⁺B220⁺ (C) cells. Each dot plot represents of 6 animals per group.

CD69는 T cell과 B cell, 대식세포, NK 세포 등에서 발현되며, 세포의 활성화 marker로[42], CD3⁺/CD69⁺ 세포수의 평가는 천식모델에서 호산구 침윤의 표지로 사용되며, 본 연구 결과 CD3⁺/CD69⁺ 세포 비율은 정상군은 1.2±0.36%이며 정상군에 비해 OVA-CT군은 2.4±0.11%, OVA-FT군은 2.6±0.25%로 증가하였고 OVA-BSEO군은 2.2±0.36%로 나타나 OVA-CT군과 OVA-FT군에 비하여 감소되었다(Fig. 6B). 이러한 결과로 BSEO가 PBMC 내 호산구 수의 증가를 억제하는 것으로 확인 되었다.

B220⁺/CD23⁺ 세포 비율은 정상군은 12.4±0.20%이며 정상군은 OVA-CT군에 비해 21.5±2.75%로 증가되었고 OVA-FT군은 10.1±0.65%, OVA-BSEO군은 17.2±0.70%로 나타나 OVA-CT군에 비하여 각각 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

Arnold 등[2]은 알러지성 천식 환자의 말초혈액 내 CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ 및 CD56⁺ 세포의 증가를 보고하였고, Borgonovo 등[7]은 항원 노출 후 수 시간 내 CD4⁺ T 세포들이 target기관으로 이동하여 알러지성 염증을 유발하며 이

과정은 특히 항원-특이 T 세포들이 말초혈액에서 기관지폐포세척액으로 recruitment됨을 보고하였다. 또한 Zhou 등[43]의 보고에 의하면 알러지성 비염 생쥐 모델의 코점막 내 *eotaxin* 유전자와 골수 내 CCR3의 발현 연구에서 골수와 말초혈액 내 백혈구수를 검사한 결과, 백혈구 내 호산구의 비율이 정상군에 비하여 현저하게 증가하였고 코점막 내 *eotaxin* mRNA의 발현과 *eotaxin* 양성 세포들도 정상군에 비하여 크게 증가하였고 이 세포들이 호산구수에 크게 좌우되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 백혈구 내 CCR 양성 세포 비율이 정상군에 비해 증가하였고 골수 내 백혈구 내 호산구의 비율에 크게 좌우되는 결과를 보고하였다.

위의 보고와 본 연구에서 PBMC내 T 세포비율은 대조군에 비하여 BSEO군에서 감소되었고, B세포 비율은 T세포에 의존하여 변화하였다. 또한 대조군에 비해 BSEO군에서 호산구 침윤의 표지인 CD3⁺/CD69⁺, B세포의 표지인 B220⁺/CD23⁺ 세포 비율의 감소를 확인하였다. 이는 BSEO 흡입이 말초혈액 내 면역세포 비율을 조절하는 결과로 호산구성 염증세포 침윤으로 인한 기도 내 염증억제(Fig. 2)와 기도 과

민반응(Fig. 1) 결과를 나타내는 것으로 판단되어 BSEO가 알러지성 염증 억제에 관여하는 것으로 판단되었다.

이상의 결과를 종합해보면 BSEO는 알러지성 천식 모델 생쥐의 폐 조직 내의 CD3e⁺/CD19⁻, B220⁺/CD23⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포 비율을 억제하였으며 BALF 내의 CD4⁺/CD8⁻, B220⁺/CD23⁺, CD3⁺/CCR3⁺ 세포비율을 억제하였다. 또한 PBMC내 CD3e⁺/CD19⁻, CD3⁺/CD69⁺, B220⁺/CD23⁺ 세포비율을 억제하였다. 이상의 결과들은 BSEO가 BALF, 폐 및 PBMC 내의 T세포 수를 유의적으로 감소시켜 알러지성 염증 발생에 관련된 T 세포의 항원 인식과 세포내로의 활성화 신호를 억제하여 알러지성 염증을 억제하는 것으로 판단되며 또한, B 세포 수를 유의적으로 감소시켜 체액성 면역 반응에 관여하는 항체 생산 분비를 억제함으로써 알러지성 염증 유발을 지연시키는 것으로 판단되었다.

요 약

프랑킨센스 에센셜 오일(BSEO)이 알러지성 천식 생쥐 모델의 폐, BALF 및 PBMC 내 면역세포 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구는 Balb/c 생쥐를 이용하여 실험 1일에 100 µg ovalbumin (OVA)을 복강 내 투여하고, 실험 14일에 50 µg OVA를 기도 내 투여하여 감작시킨 후 OVA를 반복 흡입시켜 천식을 유발하였다. 천식 유발 생쥐군에 0.3% BSEO를 8주간, 1주에 3회, 1회에 30분간 nebulizer로 흡입시켰고, 실험일로부터 총 12주 후에 살처분시켜 폐, 기관지 폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid; BALF), 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)를 분리하여 조직 내의 면역세포 변화를 관찰하였다.

본 연구 결과 알러지성 천식 유발 생쥐에서 기관지 수축제에 대한 기도 과민성반응이 천연 아로마 에센셜 오일군인 Bergamot군, Eucalyptus군, Chamomile군, Marjoram군, 및 Frankincense군 중 Frankincense군에서 효과적으로 억제됨을 확인하였다. 또한 알러지성 천식유발로 증가한 폐무게, 총폐포수, BALF수, MNL, DLN수가 억제됨을 확인하였다. BSEO는 알러지성 천식 모델 생쥐의 폐 조직 내의 CD3e⁺/CD19⁻, B220⁺/CD23⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포 비율을 억제하였으며 BALF 내의 CD4⁺/CD8⁻, B220⁺/CD23⁺, CD3⁺/CCR3⁺ 세포비율을 억제하였다. 또한 PBMC내 CD3e⁺/CD19⁻, CD3⁺/CD69⁺, B220⁺/CD23⁺ 세포비율을 억제하였다. 이러한 결과는 BSEO가 각 조직내의 면역세포의 활성화 억제를 통한 면역 조절작용으로 알러지성 천식의 치료에 효과적일 것으로 사료되었다.

REFERENCES

- Ammon, H. P. 2006. Boswellic acids in chronic inflammatory diseases. *Planta Med.* 72: 1100-1116.
- Arnold, V., Balkow, S., Staats, R., Matthys, H., Luttmann, W., and Virchow, J. C., Jr. 2000. Increase in perforin-positive peripheral blood lymphocytes in extrinsic and intrinsic asthma. *Pneumologie.* 54: 468-473.
- Baraldo, S., Lokar Oliani, K., Turato, G., Zuin, R., and Saetta, M. 2007. The Role of Lymphocytes in the Pathogenesis of Asthma and COPD. *Curr. Med. Chem.* 14: 2250-2256.
- Barnes, P. J., Jonsson, B., and Klim, J. B. 1996. The costs of asthma. *Eur. Respir. J.* 9: 636-642.
- Basyigit, I., Yildiz, F., Ozkara, S. K., Boyaci, H., and Ilgazli, A. 2004. Inhaled corticosteroid effects both eosinophilic and non-eosinophilic inflammation in asthmatic patients. *Mediators Inflamm.* 13: 285-291.
- Beasley, R., Roche, W. R., Roberts, J. A., and Holgate, S. T. 1989. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139: 806-817.
- Borgonovo, B., Casorati, G., Frittoli, E., Gaffi, D., Crimi, E., and Burastero, S. E. 1997. Recruitment of circulating allergen-specific T lymphocytes to the lung on allergen challenge in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: 669-678.
- Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J. Y., Barneon, G., Ghavanian, N., Enander, I., Venge, P., Ahlstedt, S., Simony-Lafontaine, J., Godard, P., and et al. 1990. Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* 323: 1033-1039.
- Bratke, K., Bottcher, B., Leeder, K., Schmidt, S., Kupper, M., Virchow, J. C., Jr., and Luttmann, W. 2004. Increase in granzyme B⁺ lymphocytes and soluble granzyme B in bronchoalveolar lavage of allergen challenged patients with atopic asthma. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 542-548.
- Busse, W. W., and Lemanske, R. F., Jr. 2001. Asthma. *N. Engl. J. Med.* 344: 350-362.
- D'Amato, G., Bucchioni, E., Oldani, V., and Canonica, W. 2006. Treating Moderate-to-Severe Allergic Asthma with a Recombinant Humanized Anti-IgE Monoclonal Antibody (Omalizumab). *Treat. Respir. Med.* 5: 393-398.
- de Heer, H. J., Hammad, H., Soullie, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M. A., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. 2004. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.* 200: 89-98.
- Devos, S., Cormont, F., Vrtala, S., Hooghe-Peters, E., Pirson, F., and Snick, J. 2006. Allergen-induced interleukin-9 production in vitro: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. *Clin. Exp. Allergy.* 36: 174-182.
- Dolecek, C., Steinberger, P., Susani, M., Kraft, D., Valenta, R., and Boltz-Nitulescu, G. 1995. Effects of IL-4 and IL-13 on total and allergen specific IgE production by cultured PBMC from allergic patients determined with recombinant pollen allergens. *Clin. Exp. Allergy.* 25: 879-889.
- Dorshkind, K., Narayanan, R., and Landreth, K. S. 1992. Regulatory cells and cytokines involved in primary B lymphocyte production. *Adv. Exp. Med. Biol.* 323: 119-123.
- Duan, W., Chan, J. H., Wong, C. H., Leung, B. P., and

- Wong, W. S. 2004. Anti-inflammatory effects of mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model. *J. Immunol.* **172**: 7053-7059.
17. Erin, E. M., Williams, T. J., Barnes, P. J., and Hansel, T. T. 2002. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* **1**: 201-214.
 18. Furusho, S., Myou, S., Fujimura, M., Kita, T., Yasui, M., Kasahara, K., Nakao, S., Takehara, K., and Sato, S. 2006. Role of intercellular adhesion molecule-1 in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *Clin. Exp. Allergy.* **36**: 1294-1302.
 19. Gaga, M., Zervas, E., Grivas, S., Castro, M., and Chanez, P. 2007. Evaluation and management of severe asthma. *Curr. Med. Chem.* **14**: 1049-1059.
 20. Gilroy, D. W., Lawrence, T., Perretti, M., and Rossi, A. G. 2004. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**: 401-416.
 21. Hamelmann, E., Schwarze, J., Takeda, K., Oshiba, A., Larsen, G. L., Irvin, C. G., and Gelfand, E. W. 1997. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**: 766-775.
 22. Hammad, H., Kool, M., Soullie, T., Narumiya, S., Trottein, F., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. 2007. Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung dendritic cell function and induction of regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **204**: 357-367.
 23. Herrick, C. A., and Bottomly, K. 2003. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 405-412.
 24. Idzko, M., Hammad, H., van Nimwegen, M., Kool, M., Muller, T., Soullie, T., Willart, M. A., Hijdra, D., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. 2006. Local application of FTY720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function. *J. Clin. Invest.* **116**: 2935-2944.
 25. Keramidaris, E., Merson, T. D., Steeber, D. A., Tedder, T. F., and Tang, M. L. 2001. L-selectin and intercellular adhesion molecule 1 mediate lymphocyte migration to the inflamed airway/lung during an allergic inflammatory response in an animal model of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**: 734-738.
 26. Kibe, A., Inoue, H., Fukuyama, S., Machida, K., Matsumoto, K., Koto, H., Ikegami, T., Aizawa, H., and Hara, N. 2003. Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13-induced eosinophilia, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**: 50-56.
 27. Kung, T. T., Stelts, D., Zurcher, J. A., Watnick, A. S., Jones, H., Mauser, P. J., Fernandez, X., Umland, S., Kreutner, W., Chapman, R. W., and et al. 1994. Mechanisms of allergic pulmonary eosinophilia in the mouse. *J. Allergy Clin. Immunol.* **94**: 1217-1224.
 28. Lagging, E., van Hage-Hamsten, M., Gronneberg, R., Elfman, L., and Harfast, B. 1998. Cytokine production in PBMC from allergics and non-allergics following in vitro allergen stimulation. *Immunol. Lett.* **60**: 45-49.
 29. Laky, K., Fleischacker, C., and Fowlkes, B. J. 2006. TCR and Notch signaling in CD4 and CD8 T-cell development. *Immunol. Rev.* **209**: 274-283.
 30. Lee, H.-Y., Yun, M.-Y., and Kang, S.-M. 2008. Anti-inflammatory effect of *Boswellia sacra* (Frankincense) essential oil in a mouse model of allergic asthma. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 343-352.
 31. Li, Y. F., Tsao, Y. H., Gauderman, W. J., Conti, D. V., Avol, E., Dubeau, L., and Gilliland, F. D. 2005. Intercellular adhesion molecule-1 and childhood asthma. *Hum. Genet.* **117**: 476-484.
 32. Mitzner, W., and Tankersley, C. 1998. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**: 340-341.
 33. Moverare, R., Rak, S., and Elfman, L. 1998. Allergen-specific increase in interleukin (IL)-4 and IL-5 secretion from peripheral blood mononuclear cells during birch-pollen immunotherapy. *Allergy.* **53**: 275-281.
 34. Nomura, A., Uchida, Y., Sakamoto, T., Ishii, Y., Masuyama, K., Morishima, Y., Hirano, K., and Sekizawa, K. 2002. Increases in collagen type I synthesis in asthma: the role of eosinophils and transforming growth factor-beta. *Clin. Exp. Allergy.* **32**: 860-865.
 35. O'Garra, A., and Murphy, K. 1994. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 458-466.
 36. Ram, A., Das, M., Gangal, S. V., and Ghosh, B. 2004. Para-Bromophenacyl bromide alleviates airway hyperresponsiveness and modulates cytokines, IgE and eosinophil levels in ovalbumin-sensitized and -challenged mice. *Int. Immunopharmacol.* **4**: 1697-1707.
 37. Renauld, J. C. 2001. New insights into the role of cytokines in asthma. *J. Clin. Pathol.* **54**: 577-589.
 38. Robinson, D., Hamid, Q., Bentley, A., Ying, S., Kay, A. B., and Durham, S. R. 1993. Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**: 313-324.
 39. Roh, G. S., Seo, S. W., Yeo, S., Lee, J. M., Choi, J. W., Kim, E., Shin, Y., Cho, C., Bae, H., Jung, S. K., and Kwack, K. 2005. Efficacy of a traditional Korean medicine, Chung-Sang-Bo-Ha-Tang, in a murine model of chronic asthma. *Int. Immunopharmacol.* **5**: 427-436.
 40. Roh, S. S., Kim, S. H., Lee, Y. C., and Seo, Y. B. 2008. Effects of radix adenophorae and cyclosporine A on an OVA-induced murine model of asthma by suppressing to T cells activity, eosinophilia, and bronchial hyperresponsiveness. *Mediators Inflamm.* **2008**: 781425.
 41. Samson, K. T., Minoguchi, K., Tanaka, A., Oda, N., Yokoe, T., Yamamoto, Y., Yamamoto, M., Ohta, S., and Adachi, M.

2006. Inhibitory effects of fluvastatin on cytokine and chemokine production by peripheral blood mononuclear cells in patients with allergic asthma. *Clin. Exp. Allergy*. **36**: 475-482.
42. Sancho, D., Gomez, M., and Sanchez-Madrid, F. 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* **26**: 136-140.
43. Zhou, M., Dong, M., Wu, Y., Wang, L., and Yue, B. 2006. The expression and significance of eotaxin gene in nasal mucosa and CCR3 in bone marrow in model of allergic rhinitis. *Lin. Chuang. Er. Bi. Yan. Hou. Ke. Za. Zhi.* **20**: 227-230.

(Received Jan. 15, 2010/Accepted March 3, 2010)