

마우스 모델을 이용한 사이프러스 오일의 알러지성 천식 억제 효과

승윤철*, 정규진**, 정광조***

대전대학교 보건스포츠 대학원 대체의학과*, 충남대학교 약학대학 약학과**, 대전대학교 뷰티건강관리학과***

Anti-asthmatic activities of Cypress oil in a mouse model of allergic asthma

Yun-Cheal Sueng*, Kyu-Jin Chung**, Kwang-jo Cheong***

Dept. of Alternative Medicine*

College of Pharmacy, Chungnam National University**

Dept. of Beauty Health Care, Daejeon University***

요약 본 연구는 천식 생쥐 모델을 이용하여 사이프러스 오일(CS)이 알러지성 천식에 미치는 영향을 평가하기 위하여 수행되었다. Ovalbumin으로 천식을 유발시킨 천식 생쥐 모델을 사용하여 실험군에 0.3% CS를 3주간, 1주 3회, 1회 30분간 분무기를 이용하여 흡입시켰다. 기도과민성, 백혈구 중 호산구 수, 폐 세포 내 면역세포와 Th2 사이토카인의 변화를 관찰한 결과 CS를 처리한 실험군에서 기도과민성, 호산구 수 및 폐 세포 내 IL-5, IL-13 수치, 혈청 내 IgE 분비량, 폐 세포 내 CCR3, CD3, CD4 세포의 수 등 모든 항목에서 현저한 감소효과를 보였다. 이러한 결과는 CS가 천식 반응의 주요인자인 Th2 사이토카인과 호산구에 긍정적인 영향력이 있음을 시사한다. 따라서 CS는 천식 치료제로서 가능성이 있을 것으로 사료된다.

주제어 : 사이프러스, 아로마테라피, 천식, 향천식, 항염증

Abstract This study was aimed to evaluate the effects of Cypress oil(CS) on anti-asthmatic activities in a mouse model of allergic asthma. Using an Ovalbumin-induced allergic asthma mouse model, 0.3% of CS was administered to experimental group using a nebulizer for 3 weeks on a basis of 3 times per week and 30min each time. The degree of airway hypersensitivity, the number of eosinophil in white blood cells, the number of immune cells and the change of cytokine in lung tissue were evaluated. The degree of airway hypersensitivity, the number of eosinophil, IL-5 and IL-13 levels in lung tissue, IgE in serum, the number of CCR3, CD3, CD4 cells were significantly decreased in experimental group treated with CS. These results suggested that CS may have a positive effects on Th2 cytokine and eosinophils which are major factors of asthma responses. Therefore CS might be of therapeutic value in treating asthma.

Key Words : Cypress oil, Aroma therapy, Asthma, Anti-asthma, Anti-inflammation

Received 7 October 2014, Revised 28 November 2014

Accepted 20 January 2015

Corresponding Author : Kwang-Jo Cheong
(Dept. of Beauty Care, Daejeon University)

Email: Cheong@dju.ac.kr

ISSN: 1738-1916

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

1. 서론

산업화가 빠른 속도로 진행됨에 따른 대기 오염의 가속화, 흡연 인구의 증가, 새로운 항원의 출현 등이 원인으로 작용하여 천식의 발생은 그 이전에 비해 두 배 이상 증가되는 양상을 띠고 있으며[1], 천식으로 인한 사망률 또한 증가하고 있다. 기관지 과민성과 기도 내 염증에 의한 가역적인 기도 폐쇄가 특징적인 호흡기계 질환인 천식은 기도 내로 흡입된 여러 가지 항원에 의하여 T 세포, B 세포, 호산구, 호중구 및 비만세포 등의 염증세포들에 의해 유발되는데 이 중 호산구가 가장 주요한 유발세포로 알려져 있다[2].

호산구는 활성화되면 과립단백이나 arachidonate 대사를 분비하여 점액분비세포 활성화, 기도 평활근 수축, 기도상피세포의 탈락에 관여한다. 이렇게 호산구가 활성화되는 과정에 Th2 세포가 발현하는 사이토카인들이 직접적인 영향을 미친다는 사실들이 보고[3-5]됨에 따라 최근 Th2 세포에서 발현하는 각종 사이토카인들의 작용기전에 변화를 초래함으로써 알러지 치료를 모색하는 실험적 연구들이 활발히 진행되고 있다.

천식의 치료제는 항염증 효과를 목표로 하는 스테로이드와 같은 증상 조절제와 기관지 확장제와 같이 속효성을 보이는 증상완화제가 있으며 현재까지 가장 효과적인 치료제는 스테로이드이다[6]. 그러나 장기적으로 사용될 경우, 부신기능억제, 골다공증, 골절, 성장지연, 혈압상승 등의 부작용들이 보고되고 있다. 따라서 장기적인 적용이 가능하면서 부작용이 없고, 근본적으로 천식을 치료할 수 있는 천연물 성분을 이용한 천식치료제의 개발이 요구되고 있다. 이와 관련하여 세계 각국에서는 식물추출물의 항염증 효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[7]. 이 경우, 각 식물 추출물은 대개 농축하여 제조한 에센셜 오일의 형태로 사용된다[8].

에센셜 오일은 전통적으로 민간에서 그 효능이 입증되어 오다가 근래 양약의 부작용에 대한 우려로 안전한 대체제나 보조제에 대한 관심이 높아지면서 항염증[9], 항균[10], 항바이러스[11], 항암작용[12] 및 면역조절 작용[13] 등 에센셜 오일의 다양한 효능들이 실험적으로 규명되고 있다. 천식과 관련하여 에센셜 오일의 영향을 평가한 실험적 연구로는 이[14]의 프랑킨센스 에센셜 오일 흡입이 OVA로 유도된 알러지성 천식 모델 생쥐에게 미

치는 영향, 현 등 [15]의 기도상피세포에서 식물 에센셜 오일의 인터루킨-8분비 억제효과, 전[16]의 페파민트오일의 흡입요법이 천식모델의 면역세포와 폐조직에 미치는 영향 등이 있는데, 이들은 에센셜 오일이 천식에 미치는 긍정적인 효과를 보고하였다.

본 연구에서 사용된 사이프러스(*Cupressus sempervirens* L.)는 측백나무과에 속하는 식물로 지중해 연안, 프랑스 남부, 독일, 모로코 등이 원산지이며 수렴효과와 과잉수분 조절과 관련이 있다. 전통적으로 사이프러스 오일은 부종, 혈액순환장애, 호흡계의 만성기관지염과 천식에 사용되어 왔다.

측백나무과에 속하는 편백 정유에 관하여는 많은 연구가 이루어진 실정이며, 항산화 및 항근작용에 관한 연구[17,9]가 주를 이루고, 최근에는 미백활성[20] 뿐만 아니라 천식과 아토피 모델에 적용하여 항알러지 효과[21,22]를 입증하는 등 다각도에서 검증작업이 활발히 이루어지고 있다.

그러나 본 논문에서 사용한 사이프러스 오일(*Cupressus sempervirens*)에 관한 연구는 주로 해외에서 이루어졌으며 부위별 용매 추출물의 생리활성을 분석하거나 항균작용을 보고한 논문[23,5]이 대부분이다. 사이프러스 오일과 관련된 국내 논문으로는 주 등[26]의 클라리세이지, 유칼립투스, 사이프러스, 제라늄, 레몬그라스 에센셜 오일의 두피 미생물 생장 저해효과를 비교, 평가한 것과 신[27]의 화장품 산업에 이용되고 있는 천연에센셜 오일의 주요 구성물질 분석과 생리·항균효과에 관한 연구, 사이프러스 오일의 세포독성과 형태학적 변화 관찰을 통한 안전성을 검색한 윤 등[28]의 연구 등이 있다. 그러나 사이프러스 오일의 알러지성 염증과 그 면역기전에 대한 연구는 사이프러스, 로즈마리, 마조람 에센셜 오일을 혼합하여 알레르기성 천식 생쥐 모델에 미치는 효과를 조사한 이 등[29]의 연구 외에 사이프러스 오일을 단독으로 사용한 연구는 전무한 실정이다. 이에 본 연구에서는 Balb/c 생쥐에 ovalbumin으로 알레르기성 천식을 유발한 후, 사이프러스 오일을 단독으로 적용하여 기도 과민성, 혈액의 WBC 내 eosinophil의 세포 비율, 총 폐포수의 변화, CD3, CD4, CCR3의 세포수의 변화, 폐 조직 내 IL-5, IL-13 발현량의 변화, 혈청 내 IgE 분비량의 변화를 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료 및 시약

2.1.1 동물

암컷 8 주령의 SPF(specific pathogen-free) BALB/c 생쥐 (18 ~ 20 g)는 오리엔트바이오(Korea)사에서 공급받아 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 1-2 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2.1.2 약물 및 시약

본 실험에 사용한 오일은 Cypress(*Cupressus sempervirens*: concentration 100%)을 사용하였다. 실험에 쓰는 오일은 Primavera의 essential oil을 구입한 후 정선하여 사용하였다. 양성대조군으로는 항염증제인 Rolipram을 사용하였다. 본 실험에 사용된 시약 중 diethyl pyrocarbonate (DEPC), 2,7-dichlorodihydrofluore-scin diacetate (DCFH-DA), RPMI-1640, isopropano-1, 적혈구용혈액 (RBC lysis solution), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, lami-de, magnesium, chloride (MgCl₂)는 Sigma 사 (USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)는 Hyclone 사 (Logan, USA) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2.1.3 기기

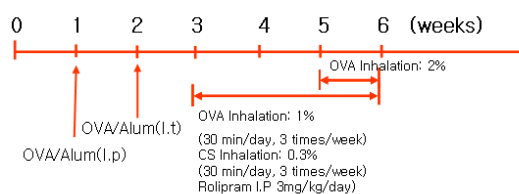
본 실험에 사용된 기기는 Clean bench, Autoclave, Water bath, Vorter mixer(vison scientific.co.,Korea), Micro-pipet(Gilson.co.,France), spectrophotometer(Shimadzu, co.,Japan), homogenizer (OMNI.co., USA)등을 사용하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 기관지 천식 생쥐 모델

500 µg/ml의 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma)를 PBS로 용해한 후 혼합하였다. 이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 xg에서 5분 동안 원심분리 하였다.

이 OVA/Alum 침전물 (pellet)을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100 µg OVA를 0.2 ml로 조정하여 복강 내(i.p)로 주사하여 전신감작을 시켰다. 이후 2주째에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500 ug/ml) 100 µl를 기도투여 (i.t)하였다. 3주째부터 분무기를 이용하여 1% 난알부민 용액을 하루에 30 분씩 일주일에 3 회씩 2주 동안 비강 및 기도내로 흡입시키고 최종 1주간은 2% 난알부민 용액을 하루에 30 분씩 일주일에 3 회씩 흡입시켰다. 이때 대조군에는 PBS 또는 Alum 만을 주사, OVA를 흡입시켰다[Fig. 1].



[Fig. 1] Experimental schedule

2.2.2 약물 투여

정상군은 천식 유발이 잘 되었는지를 비교하기 위한 군으로 아무런 처치를 하지 않았다. 대조군은 약물의 효능을 비교하기 위해 OVA/ALUM을 복강 내 주사하여 전신 감작시킨 후 OVA를 흡입시켰다. 실험군은 아로마 오일을 생리식염수에 cypress(CS) 0.3%로 희석한 후 nebulizer (Buxco. USA)를 이용하여 3주간, 1주 3회 100ml씩 30분간 흡입박스 (아크릴제작, 30 cm x 45 cm)에 분무하였다. 양성대조군으로는 Rolipram을 3 mg/kg으로 매일 I.P 하였다.

2.2.3 기도과민성 측정

생쥐의 생명유지기능(vital function)을 담당하는 호흡기계에서 기도저항수치(Penh)에 미치는 영향을 검토하고 신체기능에 대한 안전성 평가를 목적으로 하는 Plethysmograph (BUXCO Biosystem XA, USA)는 기도저항수치 측정시험을 무마취의 시험동물을 whole body chamber에 넣어 놓은 상태에서 기도과민성의 측정은 whole body plethysmographs인 Biosystem XA (Buxco research system, Wilmington, NC, USA) 장비를 사용하여 실시하였다. 6주간 2.5% OVA inhalation 24시간 후

에, 농도별 Methachololo (Sigma)수용액을 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 mg/ml의 농도로 분무하고, 각각의 농도에 대한 기도의 반응성은 10분 동안 연속적으로 모니터링으로 체크하였다.

2.2.4 혈액검사

실험 종료 후 생쥐는 10% Chloral Hydrate (Fluka, USA)을 복강 내에 투여한 후 혈액을 심장 채혈법으로 포집하고, 원심분리 3,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻었으며, -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 혈액성분과 효소들의 활성도 측정은 바이오톡스텍 (주) (Republic of Korea)에 의뢰하였다.

2.2.5 폐 적출 및 폐 세포 분리

폐 적출 후, 무게를 재고, 폐 조직을 잘게 절편 한 후 2% 우 태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1640 배지에 1 mg/ml의 collagenase IV를 가한 용액 3 ml로 37℃, shaking 배양기에서 30분 동안 5회 이상 조직을 분해 (digestion) 하여 폐 세포를 분리하였다.

2.2.6 유 세포 분석(flow cytometry analysis)

폐를 분리한 세포를 2-5x10⁵ 세포로 조정하여 염색 완충용액(1% 우 태아 혈청, 0.01% NaN₃가 포함된 인산염 완충용액, pH7.4)으로 1회 세척하였다. 이를 PE(phycoerythrin) 형광물질이 결합된 CD3, CD4, CCR3의 항체를 시료에 가하여 4℃에서 40분간 반응시키고 염색 완충용액으로 2회 세척한 후 세포 표면 분자들의 발현을 유세포 분석기(FACScan, BD Biosciences)로 분석하였다.

2.2.7 ELISA Analysis

천식 생쥐에서 분리한 혈청에서 각 사이토카인량을 측정하기 위해 OVA-IgE (Shibayagi, japan), enzyme-linked immuno-sorbent assay (Biosource, USA)와 ELISA kit (R&D system)로 생산량을 측정하였다.

2.3 통계처리

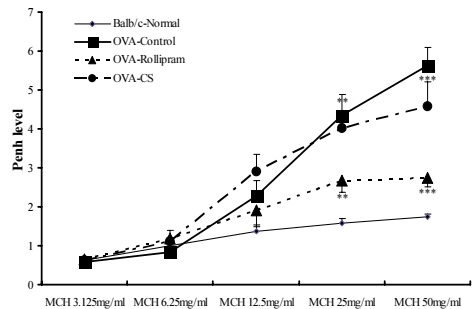
다양한 실험으로부터 얻은 결과는 Mean±Standard Error로 기록하였고, 유의성 검증은 Independent T-test 분석방법을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 기도과민성에 미치는 효과

알러지성 과민반응에 의해 나타나는 기관지 수축에 미치는 CS오일의 효과를 확인하기 위하여 정상군, 대조군, 양성대조군, 실험군에 Methacholine(MCH) 농도를 점차 증가시켜 그에 대한 기도저항값(Penh)을 측정한 결과, 대조군에서는 MCH의 농도 증가에 따라 Penh값이 증가하는 소견을 보이며, 이에 반해 양성대조군인 Rolipram은 2.736 ± 0.219, 실험군인 CS은 4.573 ± 0.32로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다[Fig. 2]. 항원 유발 후 염증반응에 의한 기도과민성이 CS에 의해 억제된 것으로 사료된다.

천식 의심환자에게 시행한 유도 객담 검사에서 호산구가 많을수록 기류폐쇄와 AHR이 심하였다는 보고[30]는 천식이 심할수록 호산구성 기도염증이 심하다는 선행연구들[31,32]과 일치하는 결과이다. 이러한 보고는 본 연구의 [Fig. 3]에서 실험군에서의 호산구 감소와 일치하였다. CS의 흡입이 기도의 평활근 증식을 억제하여 기도 두께를 감소했을 가능성이 있고, 또한 호산구나 염증성 세포의 기관지로의 유입, 침윤을 막음으로서 기도과민성을 줄일 수 있었을 것으로 사료된다.



[Fig. 2] Effect of CS on airway responsiveness to inhaled methacholine.

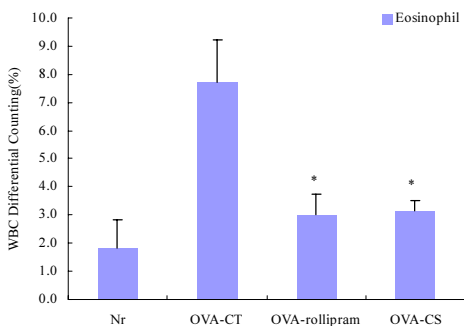
Penh was measured in a Buxco box, as previously described. Data are presented as means ± SE from 6 individual mice in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3.2 혈액 내 세포분화비율에 미치는 영향

호산구성 기도 염증은 천식의 가장 특징적인 병태생리적 현상이며, 이에 따라 천식 환자의 객담과 폐 조직에

서 호산구가 증가되어 있음이 보고[33]된 바 있다. 현재 까지 연구결과에 의하면 호산구는 천식에서 기도염증을 일으키는데 가장 중요한 역할을 담당하는 세포이며, Th2 세포에 의해 매개되는 염증 및 IL-13을 활성화시켜 천식 발생에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [5,6,7]. 이외에도 백혈구 중 특히 호산구와 호중구는 염증으로 인한 조직 손상 부위에 최초로 recruitment되는 세포들이며 염증 반응이 감소하면 apoptosis에 의해 제거 [34] 되는 염증세포로서, 호산구의 부적절한 축적과 호산구에서 분비되는 염증 전구 매개체는 천식 및 다른 알러지 질환의 발병에 중요한 역할을 한다는 결과가 보고[35] 됨으로써 호산구가 기도염증에 미치는 결정적인 영향이 입증되고 있다.

본 연구에서 WBC수중 호산구의 비율을 분석한 결과, Nr 1.8 ± 1.0 , OVA-CT 7.72 ± 1.52 , OVA-Rolipram 3.03 ± 0.73 , OVA-CS 는 3.15 ± 0.37 로 나타나 OVA-CT군에서는 정상군에 비해 호산구의 비율이 현저히 증가하고, 이에 반해 OVA-CS군에서는 호산구의 비율이 유의성 있게 감소됨을 확인하였다[Fig. 3]. 알러지성 천식에 호산구의 증가가 영향을 주는 것으로 확인되는 것인데, 천식에서 주요한 역할을 하는 호산구의 비율이 CS투여군에서 유의성 있게 감소된 것은 CS오일이 기도 염증의 주요인자인 호산구의 증식의 억제를 통하여 천식에 유의한 효과를 가지는 것으로 해석된다.



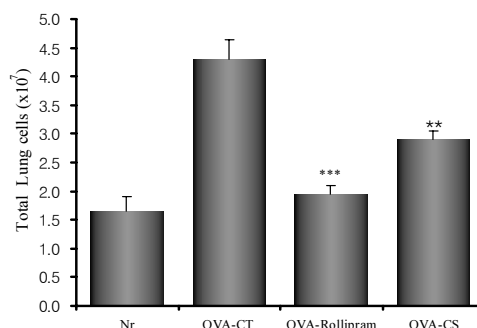
[Fig. 3] Effect of CS on eosinophil in White blood cell. Data are presented as means \pm SE from 6 individual mice in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

3.3 폐 세포 수에 미치는 영향

알러르기성 기관지 천식 유발은 폐의 염증유도에 의

한 백혈구, 림프구 등 염증성세포 수의 증가를 초래하는 것으로 알려져 있다[36].

총 폐 세포수($\times 10^7$)를 측정한 결과 Nr 0.95 ± 0.05 , OVA-CT 2.00 ± 0.10 , OVA-Rolipram 1.305 ± 0.10 , OVA-CS 1.65 ± 0.25 으로 나타나 OVA-CT 군에 비하여 OVA-CS군이 유의성(P <0.01) 있게 감소되었다[Fig 4]. 천식 유발군에서 각종 면역 관련세포를 포함하는 총 폐 세포수가 증가되었고, CS 오일 처리군에서 total 폐 세포수가 유의성 있게 감소된 이 결과는 차[37]의 마우스 모델을 이용한 비파열의 알러르기성 천식 억제 효과의 결과와도 부합되는 소견으로 CS오일이 기도내 염증세포의 증가를 억제하여 염증성 면역세포의 이주 및 침윤을 억제하는 것으로 추정된다. 이는 CS오일이 백혈구 내 호산구 수를 감소시킨[Fig. 3]의 결과와도 일치하며, 이를 근거로 CS오일이 이들 세포에 의한 염증 반응을 억제하는 작용이 있을 것으로 판단하였다.



[Fig. 4] Effect of CS on total lung cells number. Data are presented as means \pm S.E from 6 individual mice in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

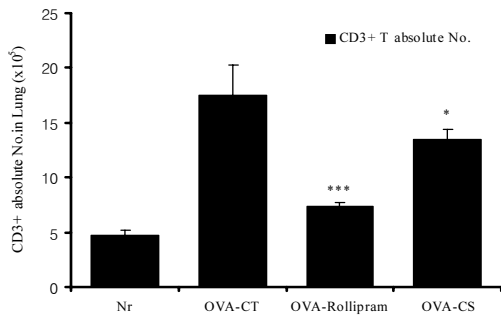
3.4 폐 조직 내 면역세포 변화에 미치는 영향

CD3는 T세포 모두에 존재하는 표면분자이며, CCR3 receptor는 주로 호중구, 호산구, 비만세포 및 Th2 세포에서 발현된다[38]. 따라서 CD3+는 전체 T세포수로 분석할 수 있다. CCR3는 호산구, 비만세포, Th2 림프구의 세포 표면 표식인자로[39]CCR3가 결핍된 생쥐의 폐에서 호산구가 98%감소함에 따라 점액 세포 과분비와 콜라겐 침착을 저하시켜 CCR비율의 감소가 천식에 미치는 긍정적인 영향이 보고[40] 된 바 있다. 따라서 CCR3의 발현을 조절함으로써 천식을 치료하고자 하는 방법이 모색되

고 있다[41]. 또한 CD4 T세포는 IL-4, IL-13 등의 Th2 사이토카인의 주된 공급자로서 기도염증, 점액분비와 기도과민 반응 등의 병태생리학적 특징을 나타낸다고 보고된 바[42]있으며, 천식 유발 생쥐의 폐와 DLN에서 CD4+ T세포와 CD8+ T세포의 증가가 보고[43]되는 등 천식을 유발하고 유지시키는 대표적인 세포로 알려져 있다[44].

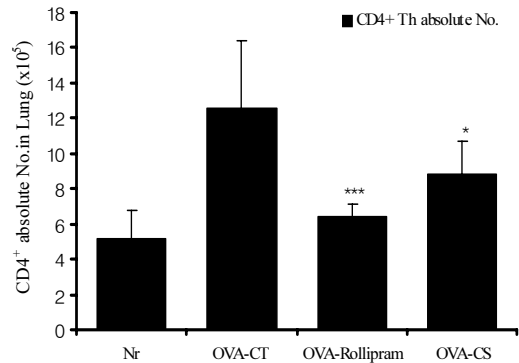
FACS로 폐에 침윤된 세포들을 분석한 결과, CD3+세포는 Nr 4.70 ± 0.48 , OVA-CT 17.5 ± 2.72 , OVA-Rolipram 7.4 ± 0.28 , OVA-CS 13.5 ± 0.86 로 나타나 OVA-CT 군에 비하여 OVA-CS 군이 유의성($P < 0.05$)있게 감소하였다[Fig. 5]. CD4+세포는 Nr 5.2 ± 1.59 , OVA-CT 12.6 ± 3.83 , OVA-Rolipram 6.4 ± 0.71 , OVA-CS 8.8 ± 1.92 로 나타나 OVA-CT 군에 비하여 OVA-CS 군이 유의성($P < 0.05$)있게 감소하였다[Fig. 6]. CCR3+세포는 Nr 0.64 ± 0.17 , OVA-CT 3.56 ± 0.45 , OVA-Rolipram 1.78 ± 0.09 , OVA-CS 2.03 ± 0.31 로 나타나 OVA-CT 군에 비하여 OVA-CS 군이 유의성($P < 0.05$)있게 감소하였다[Fig. 7].

이러한 결과를 종합할 때[Fig. 5-7] 폐 세포와 OVA-CT 군에서 T세포와 호산구의 증가를 확인할 수 있었으며, 이는 증가된 T세포에 의한 싸이토카인 분비로 B 세포 활성화와 IgE 분비가 증가하여 비만세포와 호산구의 영향으로 염증반응이 일어난 것으로 보인다. OVA-CS 군에서 이들 세포의 현저한 감소가 이루어진 것은 CS가 T세포의 활성화를 억제하고 호산구의 기도 내 침윤을 억제할 가능성이 있음을 시사한다.



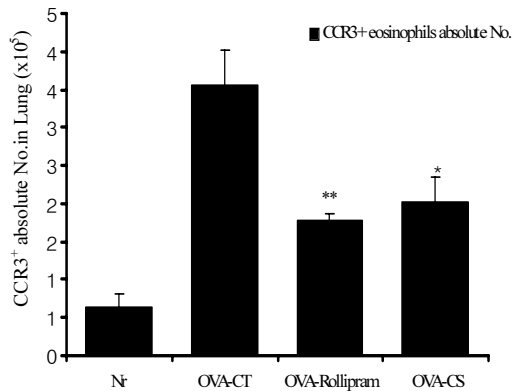
[Fig. 5] Effect of CS on surface expression of adhesion molecules in lung.

Cells were labeled with FITC-conjugated antibodies to CD3+ cells. Data are presented as means ± S.E from 6 individual mice in each group. Data are presented as means ± SE (n = 6 in each mice group). Statistically significant value compared with control group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



[Fig. 6] Effect of CS on surface expression of adhesion molecules in lung.

Cells were labeled with FITC-conjugated antibodies to CD4+ cells. Data are presented as means ± S.E from 6 individual mice in each group. Data are presented as means ± SE (n = 6 in each mice group). Statistically significant value compared with control group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



[Fig. 7] Effect of CS on surface expression of adhesion molecules in lung.

Cells were labeled with FITC-conjugated antibodies to CCR3+ cells. Data are presented as means ± S.E from 6 individual mice in each group. Data are presented as means ± SE (n = 6 in each mice group). Statistically significant value compared with control group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.5 싸이토카인의 변화

싸이토카인은 생체의 면역 조절 및 방어에 중요한 역할을 담당하는 생리 활성물질로, Th2 세포의 분화, IgE 생산 또는 호산구의 증식 등의 알러지성 염증에 관여하고 있다.

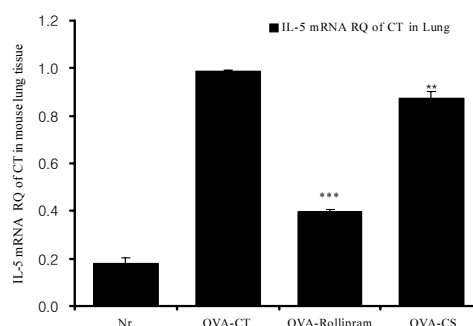
IL-5는 B세포의 증식과 분화를 자극하는 기능을 가진

사이토카인으로 활성화된 CD4 T세포와 비만세포가 분비하고, IL-2 또는 IL-4의 B세포 분화성장에 작용하여 IgE 생산을 촉진하는 것으로 보고[45]되어 있다. 뿐만 아니라 IL-5는 골수에서 호산구 형성의 촉진과 활성화에 관여한다고 알려져 있는데, 호산구성 기관지염 환자들의 객담 내에서 정상인에 비해 통계학적으로 유의하게 증가되어 있는 IL-5 수치를 증명한 보고[46]가 있어 IL-5와 천식 기도 염증에 가장 중요한 호산구의 활성화의 밀접한 관계를 확인할 수 있다. IL-13 또한 Th2 세포의 생성 및 IgE의 생산을 촉진하며 기도에서의 점액 분비를 유도하며 기도저항의 증가에 있어서 매우 중요한 역할을 한다고 보고되었다[47]. 따라서 IL-13은 천식 치료에 중요한 치료 타겟이 될 수 있으며, 급성 allergen-induced asthmatic 반응에서 매우 중요한 증거들이 발표되고 있다.

IgE는 IgE의 Fc 수용체를 가진 비만세포를 자극하여 다양한 생리 활성 물질의 분비를 유도함으로써 알러지 반응을 일으키므로 혈청 내 IgE 농도는 알러지 증상을 나타내는 중요한 지표가 된다.

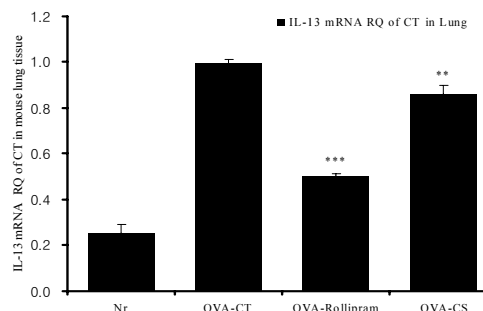
폐 조직 내의 IL-5 mRNA 유전자 발현을 살펴보면, Nr 0.181 ± 0.02 , OVA-CT 0.989 ± 0.00 , OVA-Rolipram 0.395 ± 0.01 , OVA-CS 0.873 ± 0.03 로 나타나 OVA-CT 군에 비하여 OVA-CS군이 유의성($P < 0.01$)있게 감소하였다[Fig. 8]. 폐 조직 내의 IL-13 mRNA 유전자 발현을 살펴보면, Nr 0.252 ± 0.04 , OVA-CT 1.00 ± 0.01 , OVA-Rolipram 0.504 ± 0.01 , OVA-CS 0.9 ± 0.04 로 나타나 OVA-CT 군에 비하여 OVA-CS군이 유의성($P < 0.01$)있게 감소하였다[Fig. 9].

혈청 내 anti-OVA IgE는 Nr 26.2 ± 1.95 , OVA-CT 161.0 ± 6.0 , OVA-Rolipram 80.4 ± 6.1 , OVA-CS은 141.5 ± 5.75 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($P < 0.05$)감소하였다[Fig.10]. 이상의 결과는 IL-4, IL-5, IL-13의 발현량 감소를 통해 알러지원에 의한 천식성 기도염증과 기도과민성을 완화시켰다고 보고한 선행연구[48]의 결과와도 일치하는 것으로서 CS가 Th2 경로의 항진에 관여하는 사이토카인인 IL-5, IL-13의 발현량 감소를 통해 IgE 생성을 억제하여 천식의 주요병리기전인 염증반응을 억제하는 것으로 생각된다.



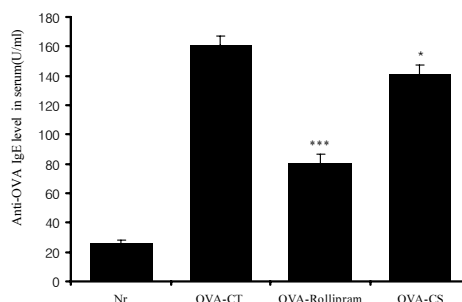
[Fig. 8] Effect of CS on IL-5 mRNA levels in lung tissue.

Data are presented as means ± S.E from 6 individual mice in each group. Data are presented as means ± SE (n = 6 in each mice group). Statistically significant value compared with control group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



[Fig. 9] Effect of CS on IL-13 mRNA levels in lung tissue.

Data are presented as means ± SE (n = 6 in each mice group). Statistically significant value compared with control group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



[Fig.10] Effect of CS on anti-OVA IgE levels in serum.

Data are presented as means ± SE from 6 individual mice in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4. 결론

CS 오일이 OVA로 유도된 천식 생쥐 모델에 미치는 약리적 효능을 알아보기 위해, Balb/c 생쥐에 OVA로 알레르기성 천식을 유발한 후, 기관지 과민성 검사, WBC 내 호산구 세포분화 비율의 변화, 폐세포 수 변화, 폐 세포의 CD3, CD4, CCR3 세포수 변화, 폐 조직 및 혈청 내의 IL-5, IL-13 및 IgE 분비량의 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CS 투여군의 기도 과민성은 OVA 유발 천식 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다.
2. CS 투여군에서 폐 세포수, 호산구 수가 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다.
3. CS 투여군에서 대조군에 비해 CD3+ T세포, CD4+ T세포, CCR3+의 유의성 있게 감소를 보였다.
4. CS 투여군에서 폐 조직 내의 IL-5, IL-13과 혈청 내의 IgE가 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다.

이상의 결과, CS는 OVA로 감작하여 천식을 유발시킨 천식 모델 생쥐의 기관지 과민반응 감소, 호산구 증식 억제, T 세포 감소, IgE 생성량 감소, IL-5, IL-13의 발현량 감소로 천식 유발관련 인자의 억제능이 있음을 확인하였다. 이를 근거로 CS는 천식억제에 유효한 것으로 사료되며, 알러지성 천식의 치료보조제로 가능성이 있을 것으로 판단된다. 향후 사이프러스 오일의 성분별 약리효능 및 농도별 약물 독성 평가 등 성분분석 및 안정성에 관한 좀 더 세심한 연구가 필요하리라 사료된다.

REFERENCES

[1] Hartert.T.V., Peebles.R.S., Epidemiology of asthma: the year of review. *Curr. Opin. Pulm. Med*, Vol. 6, pp. 4-9, 2000.

[2] Busse, WW., Lemanske Jr., RF., Asthma. *N Engl J Med*, Vol. 344, No.5, pp. 350-362, 2001.

[3] James J.,Lee, Dawn Dimina, MiMi P.Macias, Sergei I.Ochkur, Michael P.MacGarry, Katie R.O 'Neill, Cheryl Protheroe, Ralph Pero, Thanh Nguyen, Stephania A.Cormier, Elizabeth Lenkiewicz, Dana

Colbert, Lisa Rinaldi, Steven J.Ackerman, Charles G.Irvin, Nancy A.Lee., Defining a Link with Asthma in Mice Congenitally Deficient in Eosinophils. *SCIENCE*, Vol. 305, pp. 1773-1776, 2004.

[4] Alison A. Humbles, Clare M.Lloyd, Sarah J. McMillan, Daniel S.Friend, Georgina Xanthou, Erin.E.McKenna, Sorina Chiran, Norma P.Gerard, ChanningYu, Stuart H.Orkin, CraigGerard, A Critical Role for Eosinophils in Allergic Airways Remodeling. *SCIENCE*, Vol. 305, pp. 1776-1779, 2004.

[5] Zhou Zhu, Tao Zheng, Robert J.Homer, Yoon-Keun Kim, Ning Yuan Chen, Lauren Cohn, Qutayba Hamid, Jack A.Elias., Acidic Mammalian Chitinase in Asthmatic Th2 Inflammation and IL-13 Pathway Activation. *SCIENCE*, Vol. 304, pp. 1678-1682, 2004.

[6] Sung-Hwahn Hahn, The Effect of Essential Oils from Citron, Pine Tree, *Chamaecyparis pisifera* and *Chamaecyparis obtusa* on IL-8 Transcription and Secretion. M.S. dissertation, Dankook University. p. 27, 2011.

[7] Niazi, J., Singh, P., Bansal, Y., and Goel, R., Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of aqueous extract of fresh leaves of *Coccinia indica*.*Inflammopharmacol*, Vol. 17, No. 4, pp. 239-244, 2009.

[8] Sung-Hwahn Hahn, The Effect of Essential Oils from Citron, Pine Tree, *Chamaecyparis pisifera* and *Chamaecyparis obtusa* on IL-8 Transcription and Secretion. M.S. dissertation, Dankook University. p. 2, 2011.

[9] Sousa OV, Silverio MS, Del-Vechio-Vieira G, Matheus FC, Yamamoto CH and Alves MS., Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. *J Pharm Pharmacol*, Vol. 60, No. 6, pp. 771-777, 2008.

[10] Chorianopoulos N, Evergetis E, Mallouchos A, Kalpoutzakis E, Nychas GJ, Haroutounian SA.,

- Characterization of the essential oil volatiles of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica*: influence of harvesting time and antimicrobial activity. *J Agric Food Chem*, Vol. 54, No. 8, pp. 3139-3145, 2006.
- [11] Burke BE, Baillie JE, Olson RD., Essential oil of Australian lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) in the treatment of molluscum contagiosum in children. *Biomed Pharmacother*, Vol. 58, No. 4, pp. 245-247, 2004.
- [12] Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, *et al.* Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz J Med Biol Res*, Vol. 40, No. 6, pp. 839-847, 2007.
- [13] Kawashima H, Tateishi N, Shiraiishi A, Teraoka N, Tanaka T, Tanaka A, *et al.* Oral administration of dihomogamma-linolenic acid prevents development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Lipids*, Vol. 43, No. 1, pp. 37-43, 2009.
- [14] Hye-youn Lee, The Effect of Nebulized Frankincense Essential Oil in an OVA-Induced Allergic Asthma Mouse Model. Ph.D. dissertation, Konkuk University. 2009.
- [15] Kyung-Hee Hyun, Youn-Seup Kim, Jeung-Keun Suh, Sung-Hwahn Hahn, Do-Hyung Kim, Jae-Suk Park and Young-Koo Jee, The Suppressive Effect of Essential Oils from Plants on Interleukin-8 from Airway Epithelial Cell. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol.*, Vol. 31, pp. 272-280, 2011.
- [16] Young-Kyung Jeon, Inhibitory Effect of the Induced Allergic Asthma Murine by Peppermint Inhalation Therapy. M.S. dissertation, Daejeon University. 2010.
- [17] Kyung-ah Seo, The Antibacterial Effect of *Chamaecyparis obtusa* on *Malassezia furfur* and Its Effect on Dandruff Scalp. M.S. dissertation, Konkuk University. 2013.
- [18] Ji-Young Jung, Antibacterial Effect with essential oil from Hinoki cypress on skin microbiota. M.S. dissertation, Kwangju Women's University. 2011.
- [19] Ye-hyun Lee, Antimicrobial effect of *Chamaecyparis obtusa* and *Thuja orientalis* essential oils on *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine skin and ears. M.S. dissertation, Seoul National University, 2014.
- [20] Seon-Hong Kim, Whitening effect and antioxidant activity of essential oils from *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa*. M.S. dissertation, Seoul National University. 2011.
- [21] Seong-Kyeom Kim, Modulatory Effect of *Chamaecyparis obtusa* Leaf Essential Oils on Airway Hyperresponsiveness and Inflammation in a Murine Model of Allergic Asthma. M.S. dissertation, Chungbuk National University. 2014.
- [22] So-Eun Cho, Anti-oxidative, Anti-inflammatory and Immunomodulatory effects of *Chamaecyparis obtusa* Leaves Extracts for Atopic Dermatitis. Ph.D. dissertation, Konkuk University. 2012.
- [23] Imededdine Arbi Nehdi, *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* seed oil: Chemical composition, physicochemical characteristics, and utilizations. *Industrial Crops and Products*, Vol. 41 pp. 381 -385, 2013.
- [24] Samy A Selim, Mohammed E Adam, Sherif M Hassan and Abdulrhman R Albalawi, Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 14. p. 179, 2014.
- [25] Sedigheh Asgary, Gholam Ali Naderi, Mohammad Reza Shams Ardekani, Amirhossein Sahebkar, Atousa Airin, Sanaz Aslani, Taghi Kasher, and Seyed Ahmad Emami, Chemical analysis and biological activities of *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* essential oils. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 51, No. 2, pp. 137 - 144, 2013.
- [26] Myung-Won Joo, Ju-Youn Kim, The Hindrance Effect of Essential Oil on the Growth of Scalp Microorganisms -Focused on Clary Sage, Eucalyptus, Cypress Geranium, Lemon Grass. *Journal of The Korean Society of cosmetology*, Vol.18 No.2, 2012.
- [27] Yu-Hyeon Shin, A Study on Compound Analysis

- and Effect of Biological activity and Antimicrobial for Natural Essential oil in Cosmetics Industry. M.S. dissertation, Daegu Haany University. 2013.
- [28] Young-Han Yun, Kyong-Soon Kim, Hye-Young Oh, Byong-Soo Yu, Ki-Young Kim, A Screening of 5 Species Essential Oil's Safety by the Observation of Cytotoxicity and Morphological Change on Cells. J. Kor. Soc. Cosm. Vol. 14, No. 3, 2008.
- [29] Hye-Youn Lee, Kum-Lan Kim, Mi-young Yun, Sang-Mo Kang, The effect of essential oil mixture in a mouse model of allergic asthma. The Korean Society for Aesthetics and Cosmetology, Vol.7 No.1, 2009.
- [30] Sim Myoung Ki, Change of inflammatory markers in induced sputum in suspected asthmatics by anti-asthma treatment. Ph.D. dissertation, Chonnam National University. 2012.
- [31] Woodruff PG, Khashayar R, Lazarus SC, Janson S, Avila P, Boushey HA, Segal M, Fahy JV., Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma. J Allergy Clin Immunol., Vol. 108, pp. 753-8, 2001.
- [32] Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanović R., The relationship between airways inflammation and asthma severity. Am J Respir Crit Care Med, Vol. 161, pp. 9-16, 2000.
- [33] Ulińska D, Szmidi M. Usefulness of the eosinophil count in induced sputum of asthmatic patients. Pneumonol Alergol Pol., Vol. 69, No. 9-10, pp. 581-589, 2001.
- [34] Maneechotesuwan K, Essilfie-Quaye S., Kharitonov SA, Adcock IM and Barnes PJ., Loss of control of asthma following inhaled corticosteroid withdrawal is associated with increased sputum interleukin-8 and neutrophils. Chest, Vol. 132, No. 1, pp.98-105, 2007.
- [35] Seung-Yeon Jeong, Effects of *Salviae miltiorrhizae* on inflammatory cells associated with asthma via splenocyte, BMDC, eosinophil. Ph. D. dissertation, Kyung Hee University. 2009.
- [36] Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P., Eosinophilic inflammation in asthma. N Engl J Med, Vol. 323, No. 15, pp. 1033-1039, 1990.
- [37] Jong-Tae Cha, Anti-asthmatic activities of leaves of *Eriobotrya japonica* Lindley in a mouse model of allergic asthma. Ph.D. dissertation, Sangji University. 2012.
- [38] Homer A. Boushey, MD., New and Exploratory Therapies for Asthma. CHEST, Vol. 123, pp. 439-445, 2003.
- [39] Lee JH, McCre JH, Park SW, Jang As, Uh ST, Kim YH, Park CS, Park BL and Shin HD, Genetic interactions model among Eotaxin gene polymorphisms in asthma. J. Hum. Genet, Vol. 53, No. 10, pp. 867-875, 2008.
- [40] Fulkerson PC, Fischetti CA and Rothenberg ME, Eosinophils and CCR3 regulate interleukin-13 transgene-induced pulmonary remodeling. Am. J. Pathol., Vol. 169, No. 6, pp. 2117-2126, 2006.
- [41] Erin EM, Williams TJ, Barnes PJ, Hansel TT., Eotaxin receptor(CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, Vol. 1, pp. 201-214, 2002.
- [42] Lee SY, Kwon SS, Kim YK, Kim KH, Moon HS, Song JS. and Park SH, Distribution and cytokine production of CD4 and CD8 T-lymphocyte subsets in patients with acute asthma attacks, Ann. Allergy Asthma Immunol., Vol. 86, No. 6, pp. 659-664, 2001.
- [43] Matsumoto K, Inoue H, Nakano T, Tsuda M, Yoshiura Y, Fukuyama S, Tsushima F, Hoshino T, Aizawa H, Akiba H, Pardoll D, Hara N, Yagita H, Azuma M and Nakanishi Y, B7-DC regulates asthmatic response by an IFN-gamma-dependent mechanism, J. Immunol., Vol. 172, No. 4, pp. 2530-2541, 2004.
- [44] Lauren Cohn, Jack A. Elias, and Geoffrey L. Chup. ASTHMA: Mechanisms of Disease Persistence and Progression. Annu. Rev. Immunol, Vol. 22, pp. 789-81, 2004.

- [45] Hanmelmann E, Gelfand EW : IL-5-induced airway eosinophilia—the key to asthma? Immunol Rev, Vol. 179, pp. 182–191, 2001.
- [46] Young-Su An, Eotaxin and IL-5 in the sputum of the patients with stable bronchial asthma and with eosinophilic bronchitis. M.S. dissertation, Soon Chun Hyang University. 2000.
- [47] Lee BR, Hong KE, Jang SG : The experimental study on the immuno-regulatory effect of notopterygii rhizoma herbal-acupuncture at Pyeus(BL13) on OVA-induced asthma in mice, The Korean Journal of Meridian & Acupoint, Vol. 22, pp. 107–125, 2005.
- [48] Heung Bin Lim and Seung Hyung Kim, Antiasthmatic Effects on Scutellaria baicalensis Georgi Extracts Against Airway Inflammation and Hyperresponsiveness Induced by Diesel Exhaust Particles with Ovalbumin Sensitization. Korean J. Medicinal Crop Sci., Vol. 20, No. 2, pp. 129–135, 2012.

정 광 조(Cheong, Kwang Jo)



- 1978년 2월 : 공주 사범대
- 1985년 2월 : 서울대학교 행정대학원 (행정학석사)
- 2009년 2월 : 중국허룽강성 중의약대학(의학박사)
- 1989년 9월 ~ 현재 : 대전대학교 뷰티 건강관리학과 교수

· 관심분야 : 대체의학(아로마테라피)
· E-Mail : Cheong@dju.ac.kr

승 윤 철(Sueng, Yun Cheal)



- 1989년 2월 : 한밭대학교 화학공학과 (학사)
- 2011년 2월 : 대전대학교 보건의료대학원 대체의학과 (보건학 석사)
- 2014년 2월 : 대전대학교 일반대학원 뷰티건강관리학과 (보건학 박사)
- 2008년 3월 ~ 현재 : 중부대학교 한방 건강관리학과 조교수

· 관심분야 : 대체의학, 화학
· E-Mail : syc8197@hanmail.net

정 규 진(Chung, Kyu Jin)



- 2007년 2월 : 대전대학교 뷰티건강관리학과(보건학사)
- 2010년 2월 : 숙명여자대학교 향장학과 (향장학 석사)
- 2012년 8월 : 충남대학교 약학과 박사수료
- 2011년 3월 ~ 2014년 3월 : 벽성대학 건강재활복지과 교수

· 관심분야 : 대체의학, 미용
· E-Mail : doocap@naver.com