

유세포 형광 분석기를 통한 아로마 요법의 알러지 천식 억제 효과 탐색

김 규·윤미영·김동희*

The Search for Inhibitory Effect of Aroma Therapy on Allergic Asthma by Flow cytometer

The purpose of this study was to investigate the inhibitory effect of the aroma therapy of three kinds of aroma oil mixtures on asthma.

1. The percentage of granulocytes/lymphocytes population in mouse OVA-induced asthma lung cells was decreased significantly compared with those of control group.
2. The number of CCR3+ cells, CD4+ cells, CD8+ cells, CD23 and CD3e+/CD69+ in lungs of the mice group treated with M1 were decreased significantly compared with those of control group.
3. The number of IgE+/B220+ cells in the lungs of the mice group treated with M1 decreased significantly compared with those of control group. But the number of B220+ cells in the lungs of the mice group treated with M1 didn't show significant difference compared with those of control group.
4. The number of Gr-1+/CD11b+ cells in lungs of the mice group treated with M1 didn't show significant difference compared with those of control group. But the number of CD11b+ cells in lungs of the mice group treated with M1 decreased significantly compared with those of control group.

I. 서론

어떤 상황에서 면역반응은 손상을 발생하거나 때때로 치명적인 결과를 초래한다. 이러한 유해한 반응들 중의 하나를 과민반응 또는 알러지 반응이라고 한다. 1960년도 초에 Coombs과 Gell에 의해서 과민반응은 네가지 형태 (type I~IV)로 분류되었는데⁽⁷⁾, 이 중 Type I은 IgE-매개 반응들은 비만세포 (mast cell)와 호염기성구 (basophil)에서 발현되는 높은 친화력을 갖고 있는 Ig-E specific

Fc receptor (Fc RI)에 IgE의 결합에 의해서 자극된다.

Type I에 해당하는 천식은 비교적 흔한 질환으로 서구화된 대부분의 나라에서는 인구 중 3 - 6% 에서 천식이 있고 어린이에서 더 많이 발생한다⁽³⁾.

천식은 일반적인 국소적 anaphylaxis 형태로 공기 중 화분, 먼지, 바이러스 항원과 여러 가지 화학 물질들이 알러지성 천식을 유발할 수 있다. 또한 내인성 천식으로 알려진 노출과 관계없이 운동 또는 추운 기온에의 노출에 의해서도 유도될 수 있다⁽¹⁴⁾.

기도 염증은 이 질환의 질병 발생에 있어 가장

* 대전대학교 한의과대학 한방병리학교실

중요한 요소이므로 약물학적 중재 (치료)의 중요한 표적이 된다. Cytokine에 의해 유도된 많은 염증세포의 (특히, 호산성구, eosinophil) 모집은 심각한 조직 손상을 유발한다. 조직 손상은 산소 라디칼, NO, 그리고 cytokine을 포함한 이러한 염증성 세포에 의해 분비된 많은 독소에 의해서 매개된다. 이러한 현상은 점액과 단백질 분비의 증가, 부종 그리고 상피의 탈락으로 진전되어, 결국 기관지 내강의 폐색현상을 초래한다. 용집분자들은 초기반응에서 중요한 역할을 하며 뒤이어 염증성 세포를 모집한다⁽⁹⁾.

TH2 세포와 비만세포에 의해서 분비된 IL-4, IL-13, TNF-alpha 등과 같은 많은 cytokine들이 ICAM-1, E-selectin, 혈관세포 부착분자 (vascular cell adhesion molecule), 그리고 LFA-1을 포함하는 내피 부착 분자들의 발현을 upregulate 한다. 일단 upregulated 되면 호산성구-내피세포 부착현상은 폐 조직 내에서 내피세포막을 통한 이동과 생존연장에 대한 촉진기능을 증가시킨다⁽⁴⁾. 증상 완화제로는 테오필린, 베타 수용체를 사용하며 평활근 이완으로 증상 완화되지만, 효과는 미약하고 항염증제 DSCG도 역시 효과가 미약하게 나타낸다. 스테로이드제를 장기간 사용할 경우에 고혈압, 당뇨, 골다공증, 녹내장, 백내장, 지질대사 이상 등의 중증합병증이 발생한다. 이런 발생 문제 해결을 위해 흡입 제형으로 개발해 사용 중이지만, 장기간 사용시 부작용이나 중독성은 마찬가지로 발생한다⁽¹⁾.

이러한 이유로 인하여 현재 세계적인 추세는 각 나라에서 전해오는 고유한 방법으로서, 부작용이 없고 의사가 아니더라도 누구나 할 수 있으며, 어디서든 손쉽게 구할 수 있고, 항상 접할 수 있는 자연적인 요법인 대체의학을 선호하고 있는 실정이다. 대체의학 중의 한 분야로서 아로마 요법은 아로마 오일을 통한 향기요법으로 흡입을 통해 사람의 뇌를 자극하여 호르몬의 분비와 내분비계의 순환을 통해 면역력을 증가시켜 병의 치유력 향상을 통해 생체 기능을 조절하고, 병리 상태를 개선시켜 질병 치료에 도움을 주는 것으로 어떤 증상을 개선 완화시키는 치료법의 하나로, 이에 대한 효능은 많은 실험 및 임상을 통하여 검증되고 있

으며, 최근에는 고질적인 질환이나 난치성 질환에 이르기까지 이들에 대한 효능 연구가 다양하게 이루어지고 있다⁽²⁾.

이에 본 연구에서는 고질적인 질환으로 인식되고 있는 천식에 대한 아로마 요법의 효능을 검증하고자 in vitro, in vivo에서 유세포 형광분석기 (FACS, Becton Dickinson, USA)로 생쥐 폐세포에서 CD3e, CD4, CD8, CD69, CCR3, B220, CD23 (Fce) 그리고 CD69의 발현을 분석하였다.

II. 實驗方法

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 18~25g의 C57BL/6 (한국화학연구소) 쥐로, 실험 당일까지 고형 사료 (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상 (삼양사 배합 사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃, 상대 습도 50±10%, 조명 시간 12시간 (07:00~19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 아로마 오일

본 실험에 사용한 아로마 오일은 문헌에 나와 있는 것을 바탕으로 Eucalytus (Eucalytus globulus), Lemon(Citrus-limon), Lavender (Lavandulaan gustifolia)를 가지고 브랜딩(mix)하여 M1 실험군으로 사용하였으며 사람을 기준 (1.5%)으로 무게에 비례하게 환산하여 실험군 0.025%, 0.0025%, 0.00025%로 사용하였다.

실험에 쓰는 오일은 Essenjoy (네이처-플러스, 한국)의 essential oil을 구입한 후 정성하여 사용한다 (별첨을 기준으로 브랜딩을 하였다).

2. 시약 및 기기

1) 시약

시 약 명	제조사	제조국
Chicken egg albumin (ovalbumin : OVA; grade)	Sigma	U.S.A
Aluminum potassium sulfate (alum)		
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)		
Isopropanol		
RBC lysis solution		
ethidium bromide (EtBr)		
Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)		
D-phosphate buffer saline		
chloroform		
RPMI-1640 medium		
Collagenase		
RNAzolB	Tel-Test	U.S.A
Taq polymerase	TaKaRa	Japan
Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)		
Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase		
M-MLV RT RNase		
Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT RNase inhibitor		
Fetal bovine serum, FBS	Logan	U.S.A
Agarose	FMC	U.S.A
Antibody-CD3-PE (phycoerythrin)	Pharmingen	U.S.A
Antibody-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate)		
Antibody-CD8-FITC (fluorescein isothiocyanate)		
Antibody-CD25-PE (phycoerythrin)		
Antibody-CD28-PE (phycoerythrin)		
Antibody-B220-PE (phycoerythrin)		
Antibody-CD69-FITC (fluorescein isothiocyanate)		
IL-5 ELISA KIT	Biosource Biosource R&D Systems Shibayagi	U.S.A Japan
IL-4 ELISA KIT		
IL-13 ELISA KIT		
IgE ELISA KIT		

2) 기기

기 기 명	제조사	제조국
Rotary evaporator	Eyela	Japan
Spectrophotometer	Shimazu	Japan
Centrifuge	Sigma	U.S.A
Primus 96 thermocycler system	MWG Biotech	Germany
Ice-maker	Vision	Korea
Homogenizer	OMNi	U.S.A
Plate shaker	Lab-Line	U.S.A
Flow cytometer	Becton Dickinson	U.S.A
Digital thickness gauge	Mitutoyo Corp	Japan
Cytological Centrifuge	Hanil	Korea
Research microscope	Nikon	Japan
FACS Calibur	Becton Dickinson	U.S.A
Bio-freezer	Sanyo	Japan
Elisa Reader	molecular devices	U.S.A
Air compressor	Tamiya	Japan
Electric chemical balance	MC1	Germany
Crusher	Rong tsong	Taiwan

3. In vitro 방법

1) 천식 모델 생쥐의 폐에서 호산구세포 분리
 500 µg/ml의 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma)를 0.2 ml (100 µg)을 복강내로 주사하여 전신감작을 시킨후 2주째에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500ug/ml) 100 µl를 기도투여 (i.t)한다. 3주째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 6주 동안 비강 및 기도 내로 흡입 시킨다. 천식이 유발된 생쥐의 폐를 적출하여 폐 조직을 잘게 절편 한 후 2% 우태아 혈청 (fetal bovine serum; FBS)이 포함된 RPMI 1640 배지에 1mg/ml의 collagenase IV를 가한 용액 15 ml로 37°C, shaking 배양기에서 30분 동안 5회 이상 조직을 분해 (digestion) 하여 폐세포를 분리한다. 분리된 폐세포는 배지로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포이외의 분해되지 않은 조직이나 불

순물을 제거한다. 이들 세포들로부터 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정한다.

2) 폐세포 배양

24 well plate에 폐세포 (2x10⁶cells)를 배양하고 M1을 0.025%, 0.0025%, 0.00025%를 각각 처리하고 1시간 후, rIL-3 (30U/ml)나 rIL-5 (10 µg/ml)로 호산구 활성화 유발을 위하여 각각의 well에 첨가하여 48 시간 배양하였다.

3) 형광유세포 분석

양성대조군으로 rmIL-10 (50 ng/ml)을 사용하였다. 배양 후 폐세포를 인산완충생리식염수 (3% 우태아혈청, 0.1% NaN₃)로 2회 수세하였고, 4°C에서 면역형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 phycoerythrin(PE)-anti-mouse CD69, anti-mouse IgE, anti-CD3e-FITC, anti-CCR3-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, anti-B220-PE 그리고 fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse CD23등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기 (FACS, Becton Dickinson, USA)로 생쥐 폐세포에서 CD3e, CD4, CD8, CD69, CCR3, B220, CD23 (Fcε) 그리고 CD69의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 CD69/CD3e, CD3e/CCR3, CD23/B220, 그리고 CD4/CD8의 비율 (gated, %)을 산출하였다.

4. In vivo 방법

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 혼합한다. 이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 x g 에서 5분 동안 원심분리 한다. 이 OVA/Alum 침전물 (pellet)을 증류수를 가하여 원

래의 양으로 용해한 후 100 µg OVA를 0.2 ml로 조정하여 복강내로 주사하여 전신감작을 시킨다. 이후 2주째에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500ug/ml) 100µl를 기도투여 (i.t)한다. 3주째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 6주 동안 비강 및 기도내로 흡입시킨다. 이때 대조군으로써 PBS 또는 Alum 만을 주사, 흡입시킨다.

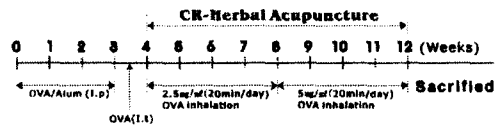


Fig. 1. Asthma OVA-induced mouse model

2) 약물 투여

OVA/Alum로 전신감작 시킨 후 3주째부터 아로마 오일을 (0.025%)를 일주일에 3회 흡입시킨다. 대조군에는 증류수를 동량으로 흡입시킨다.

3) 폐와 기관지 폐포세척액 (Bronchoalveolar lavage fluid: BAL fluid)의 분리

6주후 기관지천식 생쥐의 눈에서 혈액을 분리한 후 목부분을 해부하여 폐포 세척액으로부터 세포를 분리하기 위해 10% FBS/DMEM 배양액 1ml을 넣은 주사기를 기관지 (trachea)에 주입시키고 끈으로 묶어 고정된 후 3회 순환 시켜 분리한 후 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정한다.

4) 유세포 분석

폐와 폐포 세척액으로부터 분리한 세포로부터 여러 가지 세포표면 분자들에 대한 항체를 이용하여 면역염색하기 위하여 2-5x10⁵ 세포로 조정하여 염색 완충용액 (1% 우태아혈청, 0.01% NaN₃가 포함된 인산염 완충용액, pH 7.4)으로 1회 세척하였다. 이를 FITC (fluoresceinated isothiocyanate) 또는 PE (phycoerythrin) 형광물질이 결합된 CD3, CD4, CD8, CD69, CCR3, B220,

CD11b, Gr-1등의 항체를 시료에 가하여 4℃에서 40분간 반응시키고 염색 완충용액으로 2회 세척한 후 세포표면 분자들의 발현을 유세포분석기 (FACScan, BD Biosciences)로 분석한다.

III. 實驗結果

1) Granulocytes/Lymphocytes에 미치는 영향

(1) In vitro

폐세포중 granulocytes의 비율이 정상군에서는 24.0%, 대조군에서는 31.2%이었고, 양성 대조군에서는 26.9%, M1 (0.025%) 투여군에서는 28.2%, M1 (0.0025%) 투여군에서는 28.9%, M1 (0.00025%) 투여군에서는 31.3%로, 대조군에 비하여 granulocytes 비율이 효과적인 감소를 나타내었다(Fig. 2).

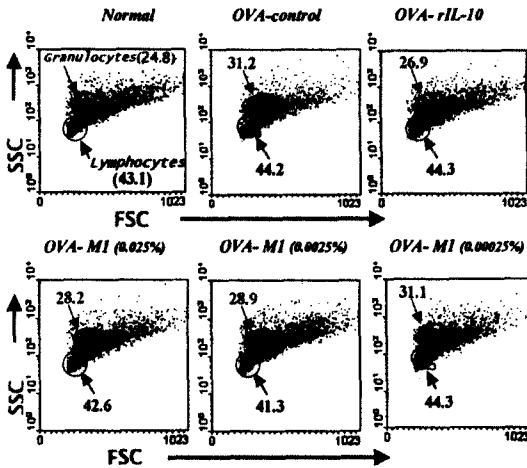


Fig. 2. Effect of M1 treated on the percentage of granulocytes/lymphocytes population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells. C57BL/6 mice were injected OVA for 6 weeks (I.p: 3 times, I.t: 9 times). The mice lungs were taken out, chopped and disposed with collagenase. Eosinophil were activated by rIL-3/rIL-5. The lung cells were treated with M1, incubated for 48hr at 37℃, and analyzed by flow cytometer.

Normal, normal C57BL/6 mice; OVA-contro, OVA-induced asthma lung cells; OVA-rIL-10, positive control; OVA-M1, OVA inhalation and 0.025, 0.0025, 0.00025% M1 treatment repectively.

(2) In vivo

천식 병태 모델을 이용한 in vivo 실험에서는 granulocytes의 비율이 정상군에서는 6.7%, 대조군에서는 17.8%, M1 (0.025%) 투여군에서는 9.9%로 대조군에 비하여 효과적인 감소를 나타냈다 (Fig. 3).

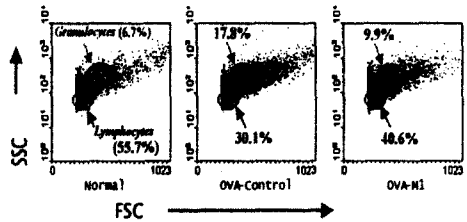


Fig. 3. Effect of M1 extract drug on granulocytes/lymphocytes population (%) in murine OVA-induced asthma lung cells. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (once a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of M1 extract for the later 8 weeks (3 times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer.

2) CD3e/CCR3에 미치는 영향

(1) In vitro

CD3e/CCR3의 비율은 정상군이 14.9%, 대조군이 26.9%, 양성 대조군이 16.9%, M1 (0.025%) 투여군이 16.6%, M1 (0.0025%) 투여군이 17.6%, M1 (0.00025%) 투여군이 25.1%로 나타났다(Fig. 4).

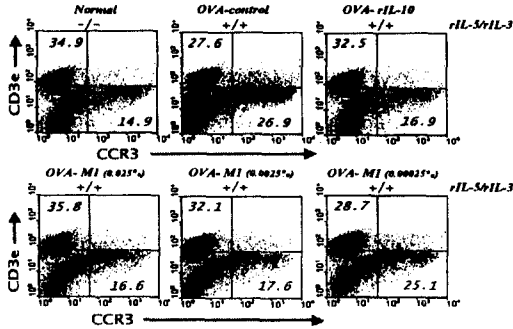


Fig. 4. Effect of M1 treated on the percentage of CD3e/CCR3 population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells. C57BL/6 mice were injected OVA for 6 weeks (I.p: 3 times, I.t: 9 times). The mice lungs were taken out, chopped and disposed with collagenase. Eosinophil were activated by rIL-3/rIL-5. The lung cells were treated with M1, incubated for 48hr at 37°C, and analyzed by flow cytometer. Normal, normal C57BL/6 mice; OVA-control, OVA-induced asthma lung cells; OVA-rIL-10, positive control; OVA-M1, OVA inhalation and 0.025, 0.0025, 0.00025% M1 treatment respectively.

(2) In vivo

천식 병태 모델을 이용한 in vivo 실험에서는 CCR3의 비율이 정상군에서는 19.9%, 대조군에서는 34.8%, M1(0.025%) 투여군에서는 22.6%로 대조군에 비하여 효과적인 감소를 나타냈다(Fig. 5).

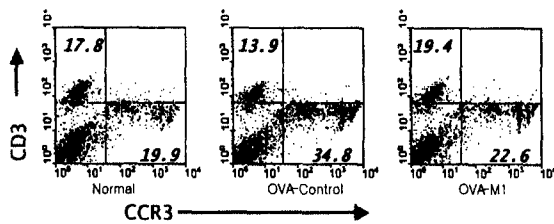


Fig. 5. Effect of M1 extract drug on CD3e/CCR3 (%) in murine OVA-induced

asthma lung cells. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (once a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of M1 extract for the later 8 weeks (3 times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer. Normal, normal C57BL/6 mice; OVA- control, OVA-inhalation; OVA-M1, OVA inhalation and 0.025 M1 treatment.

3) CD4/CD8에 미치는 영향

(1) In vitro

CD4/CD8의 비율은 정상군에서 37.6%, 대조군에서 46.4%, 양성 대조군에서 41.2%, M1 (0.025%) 투여군에서 39.9%, M1 (0.0025%) 투여군에서 42.8%, M1 (0.00025%) 투여군에서 45.0%로 나타났다(Fig. 6).

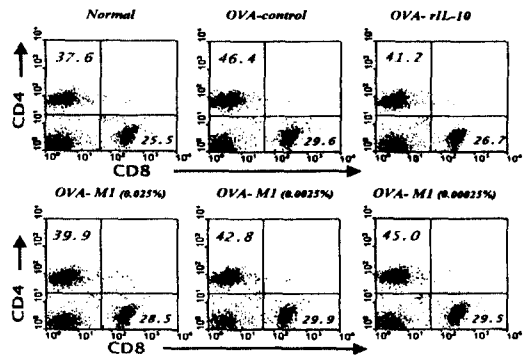


Fig. 6. Effect of M1 treated on the percentage of CD4/CD8 population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells. C57BL/6 mice were injected OVA for 6 weeks (I.p: 3 times, I.t: 9 times). The mice lungs were taken out, chopped and disposed with collagenase. Eosinophil were activated by rIL-3/rIL-5. The lung cells were treated with M1, incubated for 48hr at 37°C, and analyzed by flow cytometer. Normal, normal C57BL/6 mice; OVA-control, OVA-induced asthma lung cells; OVA-rIL-10, positive control; OVA-M1, OVA inhalation and

0.025, 0.0025, 0.00025% M1 treatment respectively.

(2) In vivo

천식 병태 모델을 이용한 in vivo 실험에서는 CD4의 비율이 정상군에서는 19.9%, 대조군에서는 29.6%, M1 (0.025%) 투여군에서는 21.8%로 대조군에 비하여 효과적인 감소를 나타냈다 (Fig. 7).

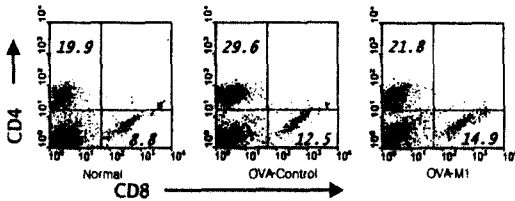


Fig. 7. Effect of M1 extract drug on CD4/CD8(%) in murine OVA-induced asthma lung cells. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (once a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of M1 extract for the later 8 weeks (3 times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer. Normal, normal C57BL/6 mice; OVA-control, OVA-inhalation; OVA-M1, OVA inhalation and 0.025% M1 treatment.

4) CD69/CD3e에 미치는 영향

(1) In vitro

CD69/CD3e의 비율이 정상군에서는 9.9%, 대조군에서는 16.9%, 양성 대조군에서는 60.2%, M1 (0.025%) 투여군에서는 9.1%, M1 (0.0025%) 투여군에서는 9.9, M1 (0.00025%) 투여군에서는 14.6%로 나타났다(Fig. 8),

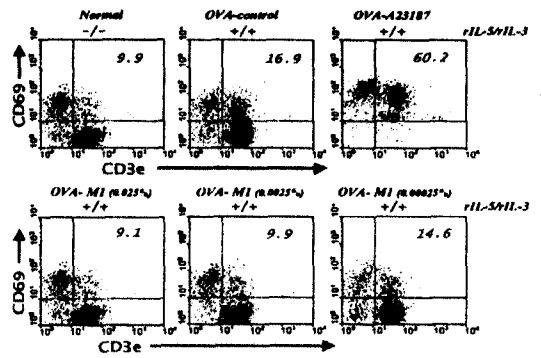


Fig. 8. Effect of M1 treated on the percentage of CD69/CD3e population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells. C57BL/6 mice were injected OVA for 6 weeks (I.p: 3times, I.t: 9 times). The mice lungs were taken out, chopped and disposed with collagenase. Eosinophil were activated by rIL-3/rIL-5. The lung cells were treated with M1, incubated for 48hr at 37°C, and analyzed by flow cytometer.

Normal, normal C57BL/6 mice; OVA-control, OVA-induced asthma lung cells; OVA-rIL-10, positive control; OVA-M1, OVA inhalation and 0.025, 0.0025, 0.00025% M1 treatment respectively.

(2) In vivo

천식 병태 모델을 이용한 in vivo 실험에서는 CD69의 비율이 정상군에서는 4.4%, 대조군에서는 16.3%, M1 (0.025%) 투여군에서는 8.7%로 나타났다(Fig. 9).

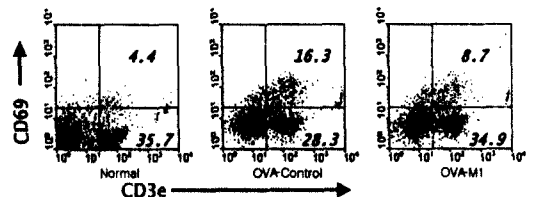


Fig. 9. Effect of M1 extract drug on CD69/CD3e (%) in murine OVA-induced asthma

lung cells. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (once a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of M1 extract for the later 8 weeks (3 times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer.

Normal, normal C57BL/6 mice; OVA-control, OVA-inhalation; OVA-M1, OVA inhalation and 0.025% M1 treatment.

5) CD23/B220에 미치는 영향

In vitro에서 CD23/B220의 비율은 정상군에서 2.63%, 대조군에서 5.36%, 양성 대조군에서 2.82%, M1 (0.025%) 투여군에서 1.92%, M1 (0.0025%) 투여군에서 3.12%, M1 (0.00025%) 투여군에서 5.04%로 나타났다(Fig. 10),

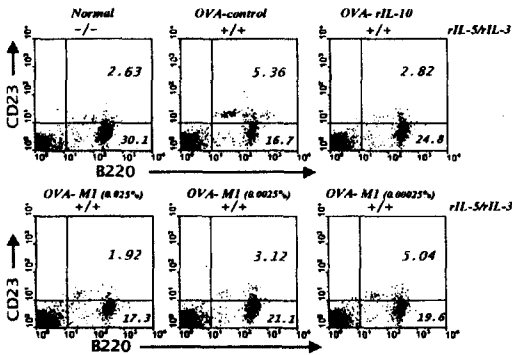


Fig. 10. Effect of M1 treated on the percentage of CD23/B220 population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells. C57BL/6 mice were injected OVA for 6 weeks (I.p: 3 times, I.t: 9 times). The mice lungs were taken out, chopped and disposed with collagenase. Eosinophil were activated by rIL-3/rIL-5. The lung cells were treated with M1, incubated for 48hr at 37°C, and analyzed by flow cytometer. Normal, normal C57BL/6 mice; OVA-control, OVA-induced asthma lung cells; OVA-rIL-10, positive control; OVA-M1, OVA

inhalation and 0.025, 0.0025, 0.00025% M1 treatment respectively.

5) IgE/B220에 미치는 영향

천식 병태 모델을 이용한 in vivo 실험에서는, IgE/B220이 정상군에서는 1.2, 36.4%, 대조군에서는 15.7, 16.9%, M1 (0.025%) 투여군에서는 8.3, 32.7%로 나타났다(Fig. 11)

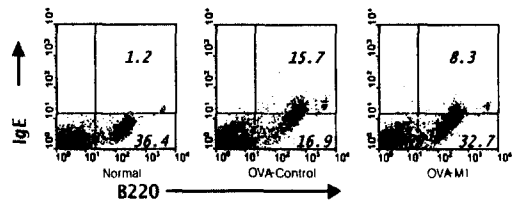


Fig. 11. Effect of M1 extract drug on IgE/B220 (%) in murine OVA-induced asthma lung cells. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (once a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of M1 extract for the later 8 weeks (3 times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer. Normal, normal C57BL/6 mice; OVA-control, OVA-inhalation; OVA-M1, OVA inhalation and 0.025% M1 treatment.

6) CD11b/Gr-1에 미치는 영향

천식 병태 모델을 이용한 in vivo 실험에서는 Gr-1의 비율이 정상군에서는 2.6%, 대조군에서는 9.9%, M1 (0.025%) 투여군에서는 5.2%로 감소 효과를 나타내었다(Fig. 12).

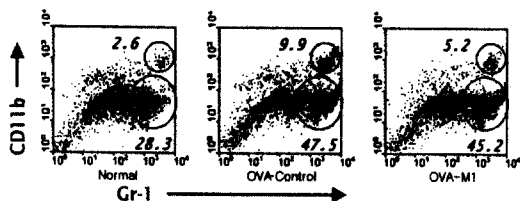


Fig. 12. Effect of M1 extract drug on CD11b/Gr-1(%) in murine OVA-induced asthma lung cells. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (once a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of M1 extract for the later 8 weeks (3 times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer. Normal, normal C57BL/6 mice; OVA-control, OVA-inhalation; OVA-M1, OVA inhalation and 0.025% M1 treatment.

IV. 고찰

천식의 주요 기전으로는 mast cell 표면에 부착되어 있는 IgE 항체에 알러젠이 결합하고 이로부터 분비되는 히스타민을 비롯한 화학매체들에 의해 기도수축이 일어나는 것을 연구되어 왔다. 그러나 천식 치료에 탁월한 효과를 지닌 스테로이드 제제가 mast cell로부터 화학매체 유리능이 없고⁽¹³⁾, 항히스타민제가 천식 치료 효과가 없다는 점과 mast cell 유리능이 높아져 있는 아토피 환자들의 일부에서만 천식이 발생하는 점들을 고려해 볼 때, 천식의 발생이 단순한 "Leaky mast cell theory"만이 아닐 가능성은 제시되어 왔다.

1970년대 말부터 시행된 천식 환자에서의 기관지 점막 생검은 경증의 천식 환자에서도 기도 염증 반응이 존재한다는 것을 밝혀냈으며, 이는 일반 염증과 달리 eosinophil과 림프구의 침윤이 뚜렷이 증가되어 있다. 천식의 중증도에 따라서 기

도 염증 반응이 심해지며 기도 상피세포의 탈락, 상피세포 기저막하 콜라겐 침착, 기도 평활근 및 점액선의 증식 등의 소견을 보고한 바 있다⁽⁶⁾. 따라서 현재 천식은 기존의 가역적인 기도폐쇄와 기관지 과민성 이외에 만성 eosinophil성 기도 염증 질환으로 정의된다.

알레르기성 염증 반응에서 중요한 세포는 T-림프구와 eosinophil로서 T-림프구는 알레르기성 염증반응의 양상을 결정하는 조정자의 역할을 담당하는데, 이는 주로 T-림프구에서 생성되는 cytokine을 통해 이루어진다. 그리고 활성화된 eosinophil에서는 여러 가지 화학매체를 분비하여 천식으로 인한 기관지의 손상을 유도한다. 일반적으로 Th1 세포는 자연성 과민반응에 관계하며, Th2 세포는 IgE 항체의 생성을 증가시키며, 알레르기성 염증반응에 관계한다⁽¹⁰⁾.

Th2 세포는 MIP-1a와 MCP-3와 같은 β -chemokine 7 등을 생성하여, eosinophil를 기도내로 유인하며, IL-5, IL-3 및 GM-CSF를 분비하여 eosinophil의 분화, 성숙, 활성화 및 생존을 증가에 관계한다. 기도에 침윤된 eosinophil에서는 MBP, ECP, eosinophil-derived neurotoxin 등이 분비되어 기도 손상을 유발한다⁽¹²⁾.

천식 환자에서 CD25, HLA-DR, VLA-1 양성인 활성화 T-림프구의 기도 내 침윤 증가가 보고되었으며⁽⁸⁾, 이들은 폐기능 이상 및 천식 증상 정도와 비례하는 것이 밝혀졌고, 스테로이드 치료로 호전됨이 알려졌다. 활성화 T-림프구와 활성화 eosinophil가 서로 비례한다고 보고하였고⁽⁵⁾, BALF eosinophil 수와 CD4+/CD25+ 림프구가 비례함을 확인함으로써 T-림프구의 조절 기능을 재확인하였다. 천식 환자의 기도 점막에서 비정형 림프구가 증가하며, 이들은 면역화학 염색을 통해 CD25 양성 세포임이 확인되었다⁽¹¹⁾. 이러한 T-림프구의 침윤 양상은 외인성 천식 뿐 아니라 내인성 천식 및 직업성 천식에서도 동일한 양상을 보이고 있다. 이들 연구 결과들은 활성화 T-림프구에서 생성된 물질들에 의해 기도로 eosinophil 유인이 일어나고 천식의 중증도가 결정된다는 것을 시사하였다.

Till 등⁽¹⁵⁾은 천식 환자의 BAL 세포에서 형성한

CD8+ T-림프구 클론이 IL-5를 생성하는 것을 확인했으며, IL-4와 IL-5를 동시에 생성하는 CD8+ 세포가 천식 환자의 기도에 존재함을 보고하였다⁽¹⁶⁾.

Lymphocytes는 7-20 μ m 직경의 단핵백혈구로 림프 조직에 산출되어 체액성 및 세포 매개성 면역에 관여하고 있으며, granulocytes는 과립성 백혈구, 과립구로, 건조후의 염색성에 따라서 호산성, 호중성, 호염기성으로 나뉘어진다. 호중구는 백혈구 중 식균작용이 강력하여 식세포(식세포)라고도 하며, 호산구는 기생충의 감염이나 알레르기성 질환일 경우에 증가하고, 호염기구는 혈액내에서 혈액이 응고하는 것을 막아준다.

따라서 Granulocytes /Lymphocytes 비율의 감소는 폐 세포내의 과립구의 감소로 천식에 의한 염증이나 알러지 반응의 감소를 의미하는데, 본 실험에서는 in vitro에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하였으며, in vivo에서는 대조군에 비하여 40% 이상 감소하였다(Fig. 2, 3).

CD3는 T-cell의 결정 표식 인자로, T-림프구의 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포안으로 전달하는 역할을 하고, CCR3는 호산구의 활성화와 탈과립화에 관여하는 인자로 CCR3의 활성화가 되면 eosinophile, basophile, Th-2 cell, mast cell의 활성화로 조직에 damage를 주고, 이중 Th-2 cell은 IL-5, IL-3을 분비로 eosinophile을 활성화시킨다.

본 실험에서는 in vitro, in vivo 모두에서 대조군에 비하여 CD3e/CCR3 비율이 감소되었으며, in vivo에서는 대조군에 비하여 35% 이상 감소하였다(Fig. 4, 5). 이 같은 CD3e/CCR3 비율의 감소는 호산구의 감소로 천식에 의한 염증과 알러지 반응의 감소를 의미한다.

CD4는 보조 세포과 단구일부, 피질 가슴샘 세포 일부에 발현하는 것으로, TCR과 함께 MHC class-II를 인지하는 기능을 하고, Th-2 cell을 인식하여 IL-4, IL-5, IL-13을 발현하고, CD8는 세포독성, 억제 T-cell, NK cell 일부, 피질 가슴샘 세포의 일부에 발현하는 세포로 TCR과 함께 MHC class-I를 인지하는 기능을 한다. 본 실험에서는 CD4/CD8 비율이 in vitro에서 대조군에

비하여 농도 의존적으로 감소하였으며, in vivo에서는 대조군에 비하여 26% 이상 감소함으로써 본 아로마 요법이 천식에 의한 염증과 알러지 반응에 중요한 역할을 담당하는 T-cell의 감소에 영향을 미침을 알 수 있었다(Fig. 6, 7).

CD69는 활성화된 B-cell, T-cell, mast cell에 분포하는 것으로, 림프구의 신호 전달에 관여하고, CD3는 T-cell에 분포하여, Th-2 cell의 신호 전달 역할을 한다. 따라서 CD69/CD3e의 비율의 감소는 Th-2 cell의 감소로 천식에 의한 염증과 알러지 반응의 감소를 의미하는데, 본 실험에서 CD69/CD3e의 비율은 in vitro에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하였으며, in vivo에서는 대조군에 비하여 46% 이상 감소하였다(Fig. 8, 9).

CD23은 B-cell 일부, 단핵구, 수상돌기세포, 호산구, 혈소판에 발현하는 단백질로써, 대식세포와 호산구에 의한 세포독성을 매개하고, 활성화시에는 IgE를 분비하여 eosinophile을 자극한다. B220은 쥐의 B-cell 표면에 있는 표식자로, B-cell의 면역 증가를 의미한다. 따라서 CD23/B220의 비율의 감소는 염증과 알러지 반응에 관여하는 B-cell의 감소로 천식에 의한 염증과 알러지 반응의 감소를 의미하는데, 본 실험에서 CD23/B220의 비율은 in vitro에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 10)

B220은 쥐의 B-cell 표면에 있는 표식자로, B220 세포수의 증가는 전반적인 체액성 면역의 증가를 나타낸다. IgE는 항원이 기도내에 들어오면 생성되어 mast cell나 호염기구 등의 수용체에 달라붙어서 과민면역반응(알러지 반응)에 중요하게 관여하는 면역글로불린이다. 본 실험에서는 대조군에 비하여 IgE의 비율이 효과적으로 감소한 결과를 나타내었고, 상대적으로 B220+세포의 수는 증가하였다(Fig. 11). 이 같은 결과는 알러지 반응을 일으키는 IgE의 감소와 B-cell의 증가로 천식에 의한 알러지 반응의 감소를 의미한다.

Gr-1는 과립구에서 발현하는 분자이고, CD11b는 과립구, 단구, NK-cell, mast cell, granulocytes에 발현하는 분자로, Mac-1의 복합체의 일부로서, 백혈구에 부착하는 기능을 함으로써 Gr-1 세포수의 감소는 알러지 반응을 나타내는 과립구의 감소

를 의미한다. 본 실험에서는 CD11b/Gr-1의 비율이 *in vivo*에서 대조군에 비하여 47% 이상 감소함으로써 매우 유의적인 결과를 나타내었다(Fig. 12).

이상의 결과로 보아 아로마 요법이 알레르기성 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 T-림프구와 eosinophil에 효과적으로 작용함으로써 항알러지 천식효과가 인정되었다.

IV. 결론

천식에 대한 아로마 요법의 효능을 검증하고자 *in vitro*, *in vivo*에서 유세포 형광분석기로 생쥐 폐세포에서 granulocytes, CD3e/CCR3, CD4/CD8, CD69/CD3e, CD23/B220, IgE/B220 및 CD11b/Gr-1의 비율을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Granulocytes의 비율은 *in vitro*에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하였으며, *in vivo*에서는 대조군에 비하여 40% 이상 감소하였다.
2. CD3e/CCR3의 비율은 *in vitro*에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하였으며, *in vivo*에서는 대조군에 비하여 35% 이상 감소하였다.
3. CD4/CD8의 비율은 *in vitro*에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하였으며, *in vivo*에서는 대조군에 비하여 26% 이상 감소하였다.
4. CD69/CD3e의 비율은 *in vitro*에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하였으며, *in vivo*에서는 대조군에 비하여 46% 이상 감소하였다.
5. CD23/B220의 비율은 *in vitro*에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하였다.
6. IgE/B220의 비율은 *in vivo*에서 대조군에 비하여 47% 이상 감소하였다.
7. CD11b/Gr-1의 비율은 *in vivo*에서 대조군에 비하여 47% 이상 감소하였다.

참 고 문 헌

1. 최인선 (1997). 동물천식모형 : 알레르기제 17

권 제1호 p7-17.

2. 하병조 (2000). 아로마테라피: 교문사 p. 8-9.
3. Bevan MA, Metzger H (1993). Signal transduction by FC receptors: the FcεRI case. *Immunol Today* 14:222.
4. Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani AM, Schwartz LB, Durham SR, Jeffery PK, Kay AB (1991). Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 88:661-74.
5. Cho SH, Seo JY, Choi DC, Yoon HJ, Cho YJ, Min KU, Lee GK, Seo JW, Kim YY (1996). Pathologic changes according to the severity of asthma. *Clin Exp Allergy*; 26:1210-9.
6. Coombs RRA, Gell PGH (1963). The classification of allergic reaction underlying disease. In Gell PGH, Coombs RRA (eds): *Clinical Aspects of Immunology*. Oxford, UK: Blackwell.
7. Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB (1988). T-lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet* 1129-32.
8. Gail SJ, Lantz CS(1998): Allergy. In Paul, WE (ed): *Fundamental Immunology*, 4th ed. New York: Lippincott-Raven.
9. Ishizaka K (1998). IgE binding factors and regulation of the IgE antibody response. *Annu Rev Immunol* 6:513.
10. Jeffery PK, Warllaw AAJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB (1985). Bronchial biopsies in asthma: an ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 140: 1745-53.

11. Kay AB, Frew AJ, Corrigan CJ, Robinson DS (1997). The T-cell hypothesis of chronic asthma. In kay AB ed. Allergy and allergic diseases. Blackwell Science.
12. Schleimer RP, Schulman ES, MacGlashan DW Jr, Peters SP, Hayes EC, Adams GK 3d, Lichtenstein LM, Adkinson NF Jr (1983). Effects of dexamethasone on mediator release from human lung fragments, and purified human lung mast cells. *J Clin Invest* 71:1830-5.
13. Terr AI (1994). Anaphylaxis and urticaria. In Stites DP, Terr AI, Parslow TG (edu). Basic and Clinical Immunology, 8th ed. E Norwaik, CT: Appleton & Lange.
14. Till S, Li B, Durham (1995). Secretion of eosinophil-active cytokines interleukin-5, granulocyte/macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 by bronchoalveolar lavage CD4+ and CD8+ T cell lines in atopic asthmatics, and atopic and non-atopic controls. *Eur J Immunol* 25:2727-31
15. Ying S, Durham SR, Humbert M, Barkans J (1997). Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T-cells, eosinophils and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and non-atopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol* (in press).