

알러지성 천식 모델 생쥐에서 프랑킨센스 에센셜 오일의 염증 억제 효과

이혜연¹ · 윤미영² · 강상모^{1,3*}

¹건국대학교 대학원 생물공학과, ²대전대학교 뷰티건강관리학과, ³건국대학교 미생물공학과

Anti-inflammatory Effect of *Boswellia sacra* (Frankincense) Essential Oil in a Mouse Model of Allergic Asthma. Lee, Hye-Youn¹, Mi-Young Yun², and Sang-Mo Kang^{1,3*}. ¹Department of Bioengineering Graduate School at Konkuk University Seoul 143-701, Korea, ²Department of Beauty Health Care, Daejeon University, Daejeon, 300-716, Korea, ³Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul, 143-701, Korea – Frankincense, the gum resin derived from *Boswellia* species, is complex mixtures composed of about 5~9% highly aromatic essential oil, 65~85% alcohol-soluble resins, and the remaining water-soluble gums. The anti-inflammatory properties of frankincense, alcohol-soluble resins, are well-recognized, but the question of whether aromatic essential oil also plays a role in the allergic asthma remains unanswered. This study was performed to evaluate anti-inflammatory effects of *Boswellia sacra* essential oil (BSEO) on ovalbumin (OVA)-induced asthma mouse model. BALB/c mice after intraperitoneal OVA sensitization were challenged with intratracheal OVA. One experimental group was inhaled with 0.3% BSEO for the later 8 weeks. BALB/c mice were sensitized and challenged with OVA and developed airway eosinophilia, mucus hypersecretion, and airway hyperresponsiveness. In contrast, the BSEO treated mice had reduced a number of eosinophils among BALF cells, goblet cell hyperplasia, and airway hyperresponsiveness. Cytokine analysis of BALF revealed that BSEO caused an increase in Th1 cytokine (interferon- γ (IFN- γ)) and a decrease in Th2 cytokines (interleukin-4 (IL-4), IL-5 and IL-13) levels. In addition, the OVA-specific serum IgE and eotaxin levels were also reduced. In mice inhaled BSEO, CD4⁺, CD3⁺/CCR3⁺, and B220⁺/CD23⁺ mediastinal lymph nodes cells were also decreased. These results suggest that inhaled BSEO as a immunomodulator in Th1/Th2 mediated asthma may have therapeutic potential for the treatment in allergic airway inflammation by a simple, cost-effective way.

Key words: *Boswellia sacra*, frankincense, essential oil, allergic asthma, airway inflammation

서 론

호흡기계 질환의 하나인 알러지성 천식은 기도내 염증에 의한 기도과민성과 점액 과분비를 동반한 가역적인 기도 폐쇄를 나타내는 질환으로, 염증반응은 T 세포, B 세포, 호중구, 비만세포 및 호산구 등의 염증 세포와 사이토카인, 케모카인과 같은 화학 매개체들에 의해 유발된다[10]. 특히 T세포 중 CD4⁺ Th2 세포들이 생성하는 사이토카인인 IL-4, IL-5 및 IL-13이 알러지성 천식의 기도 과민성과 호산성 염증반응에 중요한 매개역할을 수행하는[42, 57] 반면, Th1 세포들이 분비하는 IFN- γ 는 Th2 세포들의 분화를 억제하는 것으로 알려져 있다[2, 5].

최근 알러지성 질환과 천식은 전 세계적으로 빠르게 증가하는 추세이며[11], 이를 치료하기 위해 현재 시도되고 있는 약물들은 증상완화효과가 약하거나 국소적 또는 전신적 부

작용이 보고되고 있어[4, 55], 알러지성 천식 치료에 대해 새롭고 보완적인 접근으로 천연 식물 유래의 치료적 물질탐색이 활발히 진행 중이며[31, 37, 40] 대체의학 요법의 한 분야인 아로마 요법에 사용되는 많은 에센셜 오일의 항염증[22], 항암작용[15] 및 면역억제 작용[36, 58]에 대한 보고를 토대로 이를 응용하기 위한 연구도 시도되고 있다.

프랑킨센스는 감람나무과, *Boswellia* 속의 나무로부터 얻어지는 유향(oleo-gum resin)으로 고대로부터 전 세계적으로 의료적 목적과 향의 원료로 사용되어왔으며, 성분 구성은 5-9% 방향성 에센셜 오일, 에테르-용해성인 60-70% resin과 수용성인 25-30% gum으로 이루어져있으며[24, 54], 최근 resin 성분 중 boswellic acids에 대한 많은 연구가 진행되어 항염증작용[49], 면역조절작용[48], 항암작용[26], 항천식작용[21]이 보고되었다.

그러나 resin에 대한 활발한 연구에 비해 프랑킨센스 에센셜 오일에 대해서는 화장품, 미용산업 분야에서 향에 대한 관심 외에 알러지성 염증과 그 면역기전에 대한 연구는 보고된 바가 없어, 본 연구에서는 프랑킨센스 에센셜 오일의 알러지성 염증 억제능을 알아보고자 하였다. Ovalbumin

*Corresponding author

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

E-mail: kangsm@konkuk.ac.kr

(OVA)으로 천식을 유발시킨 천식 생쥐 모델에서 기도 과민성, 폐조직에서 호산구 침윤에 의한 조직손상, 혈청내 OVA-specific IgE 생산, 폐포 세척액과 비장세포 배양액내 림프구의 사이토카인 생산량 및 중격동 림프절에서의 면역세포 변화에 대한 프랑킨센스 에센셜 오일의 영향을 검토하고, 이를 통해 알러지성 염증 억제 기전에 대해서 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

알러지성 천식 생쥐 모델

알러지성 기관지 천식을 유도하기 위한 감작 및 유발 실험은 6주령 체중 20 ± 2 g의 BALB/c 마우스를 대상으로 Kung 등[32]의 방법을 수정하여 실행하였다. 500 μ g/mL의 난알부민(OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma)를 PBS로 용해한 후 혼합하여, 이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 G에서 5분 동안 원심분리하였다. 이 OVA/Alum 침전물을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100 μ g OVA를 0.2 mL로 조정하여 준비한 후 실험 시작 1일에 복강 내로 주사하여 전신감작을 시킨 후 실험 시작 14일에 10% chloral hydrate (Fluka, USA)로 생쥐를 마취한 후 난알부민(500 μ g/mL) 100 μ L를 기도투여하여 면역 유발시켰다. 실험 시작 21일부터 250x300x250 mm의 polycarbonate 재질 chamber (DJ-435, Daejong Inc., Republic of Korea)안에서 8주 동안, 1주일에 3일, 1일에 30분 Buxco Aerosol Delivery System (NE-CT10, Buxco Co., USA)를 이용하여 1~4주간은 2.5 mg/mL OVA/PBS 용액, 그리고 5~8주간은 5 mg/mL OVA/PBS 용액을 aerosol화하여 분무하여 흡입시키고 12주째 희생시켜 실험에 사용하였다.

프랑킨센스 에센셜 오일 흡입

본 실험에 사용한 아로마 오일은 프랑킨센스 에센셜 오일 (*B. sacra* essential oil; BSEO)로 Tisserand (Aromatherapy Products Ltd. Brighton, England)가 생산한 오일을 사용하였다. OVA/Alum로 전신 감작시킨 후 21일부터 8주간 0.3% BSEO를 1주일에 3회, 1회 30분씩 분무하여 흡입시켰다. 대조군에는 PBS를 동량 사용하였으며 12주째 희생시켜 실험에 사용하였다.

실험군의 분류

본 실험에서는 실험 1일에 alum을 PBS에 용해한 후 복강주사하고, 14일에는 PBS만을 기관내 투여한 후 21일부터 8주간, 1주일에 3일, 1회 30분간 PBS만을 흡입시킨 정상 생쥐군을 음성 대조군(Nr)으로 지정하였고, OVA/alum으로 감작 유발시킨 생쥐군을 대조군(OVA-CT)으로, OVA/alum으로

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

기도의 과민반응 측정

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[23]의 방법에 따라 메타콜린에 의한 기도 협착을 유발시켜 기도의 과민반응(airway hyperresponsiveness; AHR)을 측정하였다. 메타콜린(Sigma, USA) 수용액을 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL의 농도로 준비하여 nebulizer로 생쥐에 흡입시킨 후, 각각의 농도에 대한 기도의 반응성을 10분 동안 연속적인 모니터링으로 측정하였다. Penh 값은 Biosystem XA software (Buxco Research System, Wilmington, USA)를 이용하여 분석하였고, Hamelmann 등[23]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).

혈청과 기관지 폐포 세척액 분리

실험 종료 후 생쥐는 10% chloral hydrate (Fluka, USA)를 복강 내에 투여한 후 혈액을 심장 채혈법으로 포집하고, 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 혈청을 얻었으며, -70°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

기관지 폐포 세척액(bronchoalveolar labage fluid; BALF)은 37°C 에서 주사기로 10% FBS DMEM 배양액을 기도에 반복하여 주의 깊게 넣고 흡입시켜서 얻었으며, 이 과정을 3회 반복하였다. 이 폐포 세척액의 세포를 cytospin centrifuge (Cellspin, Hanil, Korea)를 사용하여 1,000 rpm에서 슬라이드 글라스 위에 도말하고 Diff-Quik로 염색한 다음 호산구, 호중구, 림프구 등의 세포수를 광학현미경(Nicon, Japan) 하에서 400배로 관찰하여 조사하였다[30].

비장 및 MLN 세포 분리

비장을 적출하여 Eagle's minimum essential medium내에서 수술용 칼과 핀셋을 이용하여 단일세포 부유액을 만들었다. 이렇게 부유한 비장세포를 1 mg/mL OVA, 10% FBS, 5×10^5 M 2-mercaptoethanol, 100 μ g/mL streptomycin과 100 U/mL penicillin이 들어간 RPMI-1640 배양액 200 μ L를 첨가하여 5×10^5 cells/well의 농도로 2일 동안 배양한 후 원심분리하여 세포를 침전시키고 배양 상층액을 수거하였다.

종격동 림프절(Mediastinal lymph node; MLN)을 분리한 후 림프절 세포를 주사침으로 유리하고 적혈구를 제거한 후 PBS로 세척하고 5×10⁵ cells/well의 농도로 3일 동안 배양한 후 유세포 형광분석기(FACS, Becton Dickinson, U.S.A)를 이용하여 분석하였다.

형광 유세포 분석

MLN으로부터 분리한 세포로부터 여러 가지 세포 표면 분자들에 대한 항체를 이용한 염색을 하기 위해 5×10⁵ cells/well로 조정된 후 1회 인산완충 생리식염수로 1회 세척한 후 4에서 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 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 세포 표면 분자들의 발현을 FACS의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3⁺, CD19⁺, CCR⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3e⁺/CD69⁺, B220⁺/CD23⁺, CD3e⁺/CCR3⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수를 산출하였다.

ELISA 분석

천식 생쥐에서 분리한 BALF, 혈청 및 비장세포 배양 상층액에서 IL-4, IL-5, IL-13, eotaxin, IFN-γ 및 OVA-specific IgE를 측정하기 위하여 ELISA kit을 사용하여 생산량을 측정하였다[19]. 각 항체를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 BALF, 혈청(100배 희석) 및 비장세포 배양 상층액을 100 μL씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μL를 처리하고, 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μL씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μL의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

조직 병리 검사

폐를 떼어내어 10% 포르말린에 고정시킨 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음, epoxy에 포매한 후 microtome으로 절편을 만들어 hematoxylin/eosin (H&E), collagen deposition 염색인 Masson's trichrome (M-T), goblet cell 염색을 위한 Periodic acid-Shiff (PAS) 염색을 수행하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

기도 과민성에 대한 BSEO의 영향

알러지성 천식은 기도 내 염증반응에 의한 기도 과민반응을 나타내는 특징이 있으며[8, 43], 이러한 과민반응에 의한 기관지 수축은 천식의 지표로 이용되고 있다[38]. 본 실험에서 8주간 OVA aerosol과 BSEO를 1주일에 3회, 1일 30분간 분무 흡입시킨 후 기도 과민반응에 BSEO의 영향을 조사하기 위해서 마지막 분무를 실시하고 24시간 후에 전신 체적변동기록 장비를 이용하여 OVA-CT군과 OVA-BSEO군의 메타콜린에 대한 Penh 값을 비교하였다(Fig. 1). Fig. 1에서 나타난 바와 같이, 정상군에 비해 OVA-CT군의 Penh 값은 메타콜린 각 농도에서 모두 높게 나타났으며, OVA-BSEO군은 메타콜린 12.5 mg/mL 농도부터 OVA-CT군에 비해 유의하게 억제되었다(*p*<0.05). 50 mg/mL의 메타콜린에 대한 Penh 값은 정상군 1.81±0.23에 비해 OVA-CT군은 6.83±0.78로 현저한 증가를 나타내었으며 OVA-BSEO군은 4.90±0.34로 OVA-CT군에 비하여 약 28.3% 유의하게 억제되었다(*p*<0.05). 양성 대조군인 OVA-FT군은 formoterol 흡입군으로 Barnes 등[3]의 연구에 의하면 지속성 베타 2 항진제로 기도 평활근을 이완시키는 주 작용 외에 염증 세포 활성화의 안정화, 비만세포 활성화 억제가 보고되었으며, Scola 등[47]

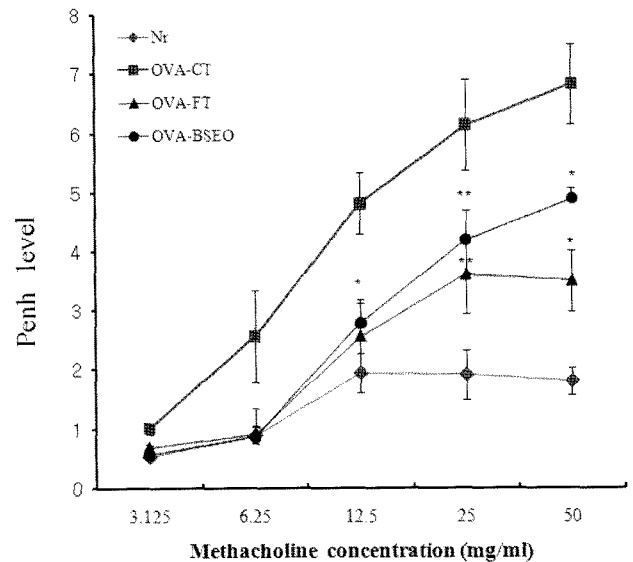


Fig. 1. BSEO inhibits AHR to aerosolized methacholine. Mice were sensitized and challenged as described in Materials and Methods. Enhanced pause (Penh) measurements 24 hours after the last challenge using Buxco system with mice exposed to increasing doses of methacholine. Abbreviations: *Nr*, saline-treated 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 0.3% BSEO. 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).

의 연구에서도 폐에서 활성화된 비만세포의 histamin release, prostaglandin E₂ 등의 기도수축 매개체들을 억제하는 것으로 보고되었고, 본 실험에서도 OVA-FT군의 Penh 값은 3.52 ± 0.52 로 OVA-CT군에 비해 기관지 과민반응이 48.5% 유의하게 억제되었다($p < 0.05$).

한편 Roy 등[46]에 의하면 프랑킨센스의 resin 성분 중 boswellic acids (BA)는 leukotriene 억제제로서, TNF- α 에 유도된 내피세포의 부착분자인 VCAM-1의 발현을 억제하는데 작용하여 귀의 염증 생쥐 모델에서 염증을 억제한다고 보고한 바 있다. 이 보고에 따르면 leukotriene은 기관지 평활근을 수축시키고 호산구성 염증반응에 작용하므로 BA의 항천식 작용이 추정되었으며, 본 결과에서도 항원 유발 후 염증반응에 의한 기관지 과민성[27, 39]의 억제가 BSEO 처치군에서 효과적으로 나타났으므로 프랑킨센스는 resin 뿐만 아니라 에센셜 오일에서도 항천식 작용이 있는 것으로 추정되었다. 또한 이러한 기도 과민성의 억제가 호산구성 염증반응[45]에 미치는 영향을 확인하기 위해 이후 폐조직 염색을 통해 호산구성 염증으로 인한 조직 손상 유무를 확인하였다.

폐의 조직학적 변화에 대한 BSEO의 효과

호산구, 림프구와 같은 염증 세포의 기도내 이동과 침윤은 알러지성 기도 염증의 발달에 주요 표지인자이다[20]. 본 실험에서는 OVA-BSEO군이 실질적인 염증 조직에 미치는 영향을 조사하기 위해 H&E 염색과 M-T 염색으로 조직검사를 수행하였다(Fig. 2). 본 결과에서 정상군(Fig. 2A)은 조직세포의 규칙적인 배열로 세기관지 및 폐포의 내강이 잘 보이며 호산구, 호중구, 단핵구 등의 염증세포의 침윤은 관찰되지 않은 반면, OVA-CT군에서는 세기관지 주변 및 혈관

주변에 염증세포의 심한 침윤과 세기관지 및 폐포의 이상 형태 및 협착이 관찰되었다(Fig. 2B). 이에 비하여 OVA-FT군(Fig. 2C)과 OVA-BSEO군(Fig. 2D)에서는 폐포 주위에 침윤된 염증세포들이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 폐포 조직 주위에 침착된 콜라겐을 자주색으로 염색하여 상피하부의 섬유화 정도를 관찰하는 M-T 염색 결과도 OVA-CT군(Fig. 2F)에 비하여 OVA-FT군(Fig. 2G)과 OVA-BSEO군(Fig. 2H)에서 감소되어 BSEO가 호산구의 폐포의 침윤을 억제하여 조직손상이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

한편 알러지성 천식에서 기관지의 염증으로 인한 기도 재구성이 일어나면 상피하부의 섬유화(Fig. 2F)와 함께 술잔세포(goblet cell)의 과 형성으로 인한 점액분비 증가 현상이 나타난다[7, 41].

본 연구에서 goblet cell의 과 형성 여부를 보기 위하여 각 그룹에서 6마리씩 폐조직을 PAS 염색을 하여(Fig. 3A), goblet cell을 x400 현미경에서 계수하였다(Fig. 3B). 그 결과 goblet cell 수는 정상군 0.5 ± 0.5 에 비해 OVA-CT군은 71.0 ± 6.0 으로 약 70배 이상 증가하였고, OVA-FT군은 55.5 ± 3.5 , OVA-BSEO군은 50 ± 4.0 로 OVA-CT군에 비하여 유의적으로 억제효과가 나타났다(Fig. 3B).

이와 같은 결과는 BSEO가 goblet cell의 과 형성으로 인한 점액분비 항진으로 일어난 기도 폐쇄를 억제하는 것을 보여주며 Fig. 2의 염증세포 침윤억제 결과와 함께 Fig. 1의 기도 과민성 감소에 영향을 주는 것으로 판단되었다.

OVA 특이 혈청 IgE와 BALF 내 염증세포 수의 변화

알러지성 천식은 혈청내 항원특이 IgE 항체가 증가[50]하고, BALF에서 IL-4, IL-5의 증가[29, 42]와 함께 호산구가 증가[34, 56]되는 특징이 있는 것으로 보고되었다. 본 연구

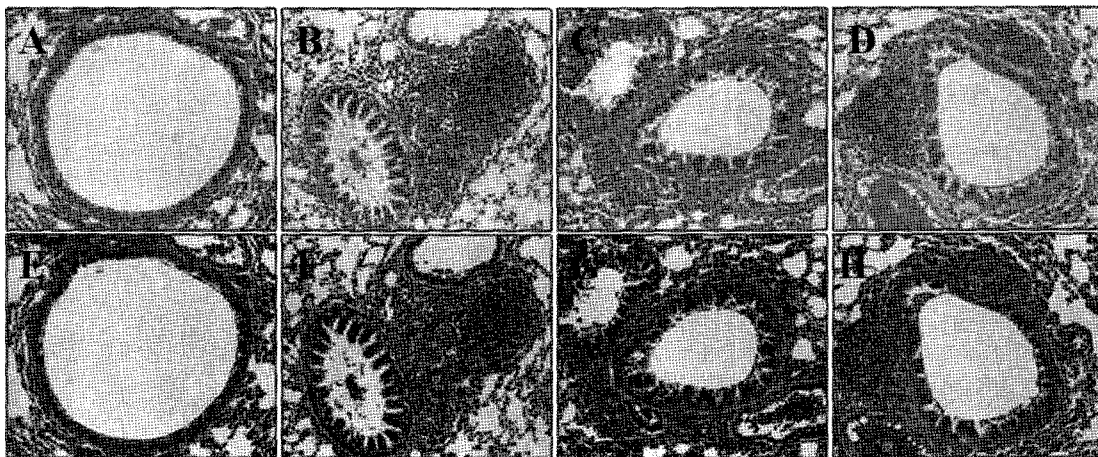


Fig. 2. Effect of BSEO on histology of lung tissue (H&E and Masson trichrome staining) in lung tissues of OVA-induced mouse model of asthma. Histological examination of lung tissue was obtained from sensitized mice 24 h after the last saline aerosol (A and E), OVA aerosol (B and F), OVA aerosol plus 1 mg/kg formoterol (C and G), or OVA aerosol plus 0.3% BSEO (D and H). Lung tissues were fixed, sectioned at 7 μ m thickness, and stained with H&E (A-D, magnification $\times 400$) or M-T (E-H, magnification $\times 400$), and examined by microscopy.

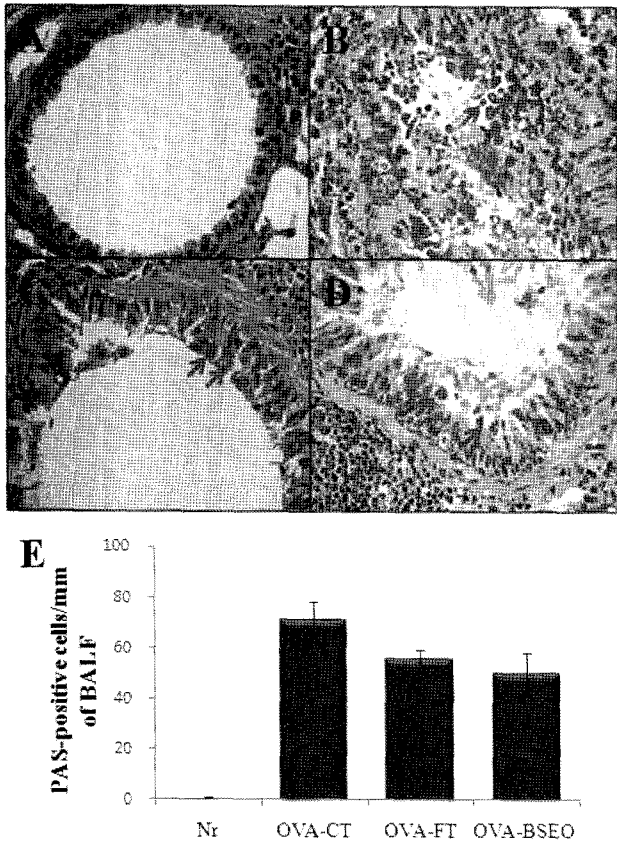


Fig. 3. Effect of BSEO on mucus production in OVA-induced mouse model of asthma. Histological examination of lung tissue was obtained from sensitized mice 24 h after the last saline aerosol **A**. OVA aerosol; **B**. OVA aerosol plus 1 mg/kg formoteol; **C**. or OVA aerosol plus 0.3% BSEO; **D**. PAS positive cells/mm in bronchiolar basement membrane; **E**. Lung tissues were fixed, sectioned at 7 μ m thickness, and stained with PAS for mucus production (**A-D**, magnification $\times 400$). Arrow indicates goblet cell. Means \pm SE of data and significance were the same as Fig. 1 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

에서 혈청내 anti-OVA specific IgE의 양을 측정된 결과 정상군 74.6 ± 15.3 에 비해 OVA-CT군은 400.5 ± 19.5 로 5.7배 이상 증가하였고, OVA-CT군 341.0 ± 2.0 에 비해 OVA-FT군은 341.0 ± 2.0 , OVA-BSEO군은 325.5 ± 9.5 로 유의적으로 억제효과가 나타났다($P < 0.05$)(Fig. 4A).

BALF 내 총 세포수는 OVA-CT군 4.20 ± 0.36 에 비해 OVA-FT군은 2.85 ± 0.26 , OVA-BSEO군은 2.97 ± 0.27 로 감소되어 유의적인 차이를 나타내었으나($p < 0.05$)(Fig. 4B), Diff-Quik으로 염색하여 호산구수를 측정된 결과 정상군은 4.00 ± 1 , OVA-CT군은 315 ± 37.0 , OVA-FT군은 193.5 ± 7.5 , OVA-BSEO군은 279.0 ± 5 로 나타나 OVA-CT 군에 비하여 OVA-BSEO군이 10% 이상 감소한 경향을 보였으나 유의적 차이는 없었다(Fig. 4C).

본 실험 결과의 BSEO 처치군(Fig. 4A)에서 특이적 항원

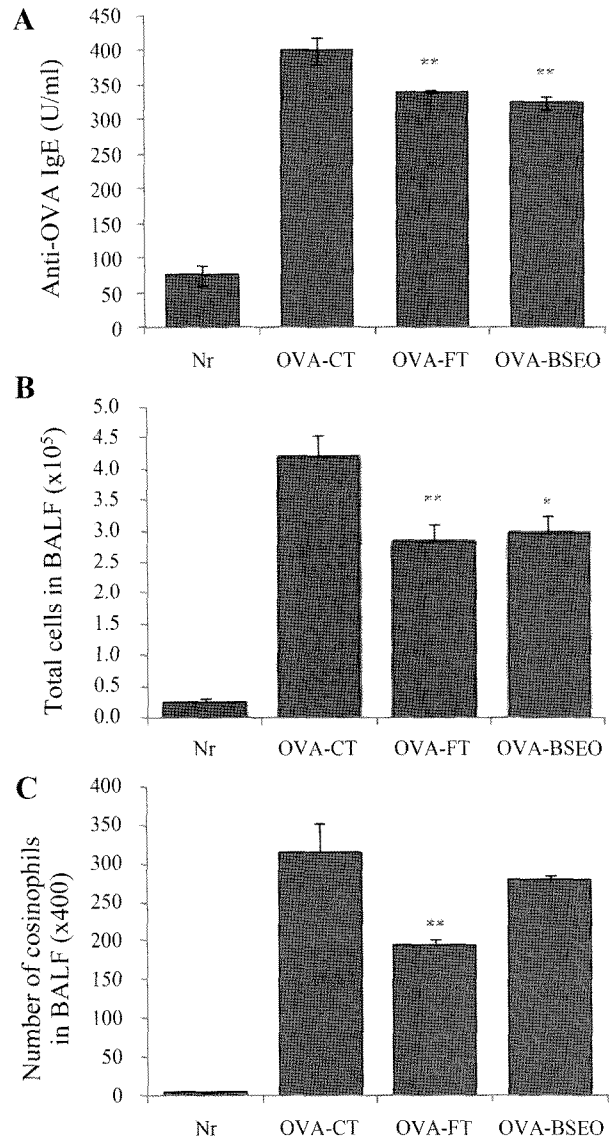


Fig. 4. Effects of BSEO on anti-OVA plasma IgE, total BALF cells, and eosinophils in BALF. **A**. Anti-OVA specific IgE was measured using ELISA; **B**. BALF was obtained from each group of mice and the number of total cells were counted; **C**. differential BALF cell counts were determined on Diff-Quik-stained cytospin slide. Abbreviations were the same as Fig. 1. Means \pm SE of data and significance were the same as Fig. 1 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

인 OVA에 대한 IgE 양의 감소는 IgE 항체를 생성하는 B세포를 자극하는 T helper 2(Th2) 세포의 활성 억제[52, 53]와 관련된 것으로 보고된 바 있으며, BALF내 호산구수의 감소도 Th2 세포 활성의 억제로 인한 것으로 앞서의 기도과민성 결과(Fig. 1)와 폐의 조직학적 변화 결과(Fig. 2)와 더불어 기존의 유의성 있는 연구 결과[16, 44]와도 부합됨으로써 BSEO가 Th2 세포 활성 억제로 알려지성 기관지 염증을 억제시키는 것으로 판단되었다.

MLN 내 면역세포 수의 변화

MLN은 aeroallergen에 대한 알러지성 과민반응에서 강력한 항원 제시 세포인 기도의 수지상 세포들이 이동하여 naive T 세포를 자극하여 Th1 또는 Th2 면역반응을 개시하는 표적 장소로[14], 본 연구에서 MLN 내 총 면역 세포수와 절대 세포수(absolute number)를 산출하여 BSEO에 대한 면역 세포 변화를 관찰한 결과 MLN내 총 면역 세포수는 정상군에 비하여 OVA-CT군이 2배 이상 현저하게 증가한 결과를 얻었고, OVA-FT군과 OVA-BSEO군의 총세포수는 약 30% 이상 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타낸 결과

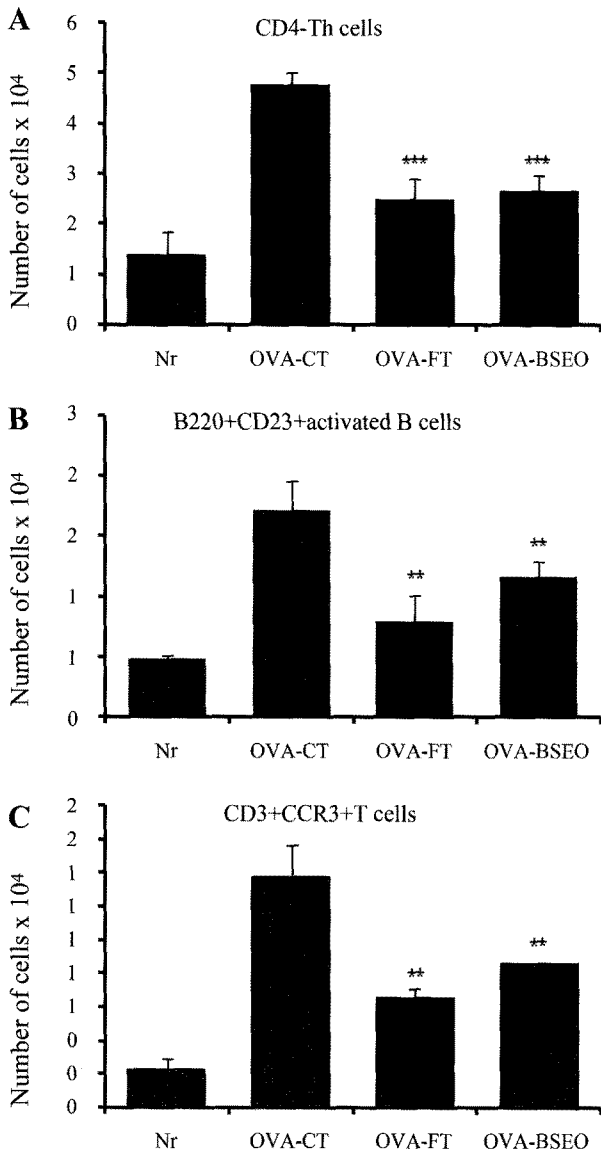


Fig. 5. Effects of BSEO on CD4+, CD3+/CCR3+, and B220+/CD23+ cells absolute number in mediastinal lymph nodes of OVA-induced mouse model of asthma. Abbreviations were the same as Fig. 1. Means ± SE of data and significance were the same as Fig. 1 (*p<0.05, **p<0.01).

(P<0.01), BSEO가 Th1 또는 Th2 면역세포 수를 억제하여 lung으로의 recruitment를 감소시키는 것으로 판단되었다 (results not shown).

MLN에서 Th 세포인 CD4+ 절대 세포수는 MLN의 총 면역 세포수에 FACS 결과를 적용한 것으로 MLN 내 CD4+ Th 총 세포수를 나타내며, 정상군은 1.40±0.44, OVA-CT군은 4.73±0.28로 약 3배 이상 증가되었고 이에 비해 OVA-FT군은 2.47±0.42, OVA-BSEO군은 2.66±0.32로 OVA-CT군에 비하여 약 50% 유의성 있는 감소(p<0.001)를 나타내어 BSEO가 MLN내 Th 세포를 효과적으로 감소시키는 것으로 확인되었다(Fig. 5A). CD3는 T 세포 결정 표지인자[9]이며, CCR3는 호산구, 호염기구 및 T 세포 표면에 존재하는 케모카인 수용체로[17] 본 실험 결과 CD3+/CCR3+의 절대 세포수는 정상군 0.22±0.08에 비해 OVA-CT군은 1.38±0.19로 약 6배 이상 증가되었고, 이에 비해 OVA-FT군은 0.65±0.06, OVA-BSEO군은 0.86±0.01로 OVA-CT군에 비하여 각각 52%, 37% 유의성 있는 감소를 나타내어 BSEO가 MLN내 화학주성 T 세포를 감소시키는 것으로 확인되었다(p<0.01) (Fig. 5B). 또한, B220+/CD23+ 활성화 B 세포의 절대 세포수는 정상군의 0.48±0.03에 비해 OVA-CT군은 1.72±0.24로 2배 이상 증가되었고, 이에 비해 OVA-FT군은 0.80±0.21, OVA-BSEO군은 1.16±0.13으로 OVA-CT군에 비하여 각각 54%, 32% 유의성 있는 감소를 나타내어 BSEO가 B 세포 활성화 억제에도 관여하는 것으로 확인되었다(p<0.01)(Fig. 5C).

Marco 등[35]은 항천식 치료제인 FTY720 흡입으로 MLN 내 CD4+, CD8+ T 림프구와 CD19+ B 림프구의 수가 효과적으로 억제된다고 보고하였으며, 본 실험의 MLN에서 BSEO가 비만세포, 호산구를 자극하는 T 세포와 OVA IgE 등을 생산하는 B 세포를 감소시킨 결과는 이러한 염증세포들의 lung으로의 recruitment를 차단하여 앞서의 폐 조직내 염증 세포수 감소(Fig. 2), anti-OVA specific IgE 감소, 폐포 세척액내 면역 세포수 및 호산구수의 감소(Fig. 4) 결과를 나타내는 것으로 판단되어 BSEO가 천식억제 효능을 나타낼 가능성이 있는 것으로 사료되었다.

BALF 및 비장림프구 배양액 내 Th1/Th2 사이토카인 변화에 미치는 영향

Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF 등의 사이토카인을 분비[12, 18]하며, 케모카인인 eotaxin은 IL-5와 상호작용하여 호산구의 조직 침윤을 도와[13, 59] 알러지성 염증반응에 관여한다. 또한 Lache 등[33]의 연구에 의하면 Th2 세포들이 알러지성 기도 염증 기작에 관여하는 것으로 보고되었고, 본 실험에서도 OVA-BSEO군(Fig. 2 D, H)에서 폐에 침윤된 호산구성 염증세포들의 감소와 조직손상 완화는 BSEO에 의한 Th2 cytokine의 억제에 의한 것으로 추정되었고, 또한 Kasakura 등[28]은 Th1 세포가 생산하는 사이토카인은

Th1 세포의 분화를 유도하는 반면 Th2 사이토카인의 증식과 분화를 억제하며, 반대로 Th2 세포가 생산하는 사이토카인은 Th2 세포의 증식과 분화를 유도하는 반면 Th1 세포의 분화를 억제하는 식으로 서로 길항작용을 함으로써 면역반응을 조절한다고 보고하였기에 본 실험에서는 BALF 및 비장 림프구 배양액에서 BSEO에 의한 Th1/Th2 사이토카인 생성량을 측정하여 비교하였다(Fig. 6, 7).

본 연구에서 BSEO의 Th2 사이토카인 생성량을 조사한 결과 Fig. 6과 같이 정상군의 IL-5는 10.0±2.78, IL-13은 20.1±1.85, eotaxin은 6.9±1.00에 비해 OVA-CT군의 IL-5는 80.3±8.32, IL-13은 103.1±9.00, eotaxin은 62.9±5.55로 사이토카인 양이 5~10배 크게 증가하였으며, OVA-FT군의 IL-5는 39.4±0.65, IL-13은 78.8±7.00, eotaxin은 42.7±4.05, OVA-BSEO군의 IL-5는 58.6±1.40, IL-13은 78.8±7.80, eotaxin은 43.2±2.90으로 모두 OVA-CT군에 대하여 유의적인 감소를 나타내었다(p<0.05)(Fig. 6).

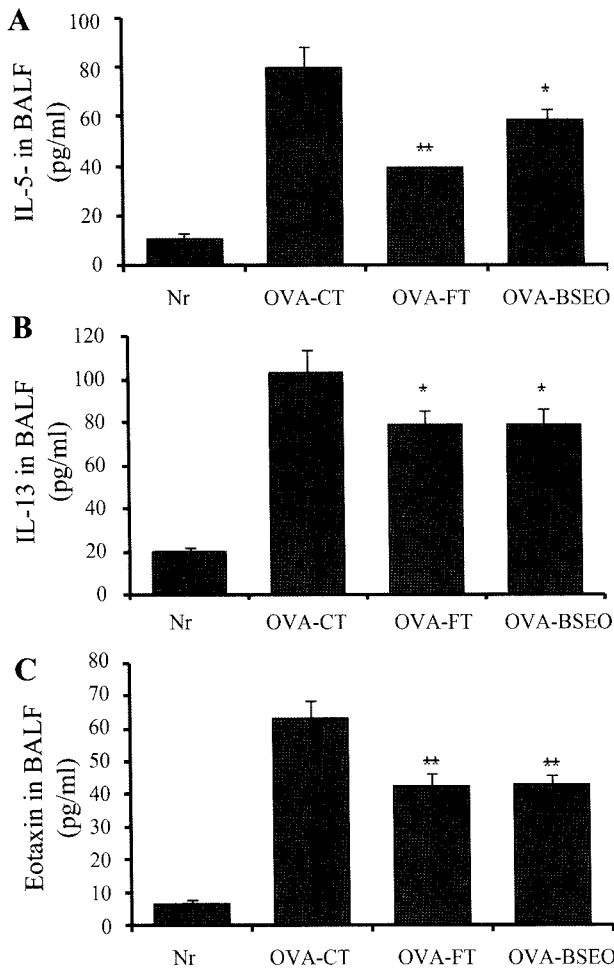


Fig. 6. Effect of BSEO on cytokine and chemokine levels in BALF of OVA-induced mouse model of asthma. Levels of IL-5 (A), IL-13 (B), eotaxin (C), were analyzed by ELISA. Abbreviations were the same as Fig. 1. Means ± SE of data and significance were the same as Fig. 1 (*p<0.05, **p<0.01).

한편, Th1 세포에서 분비되는 IFN- γ 는 Th1과 Th2 분화의 주요 조절 인자로 B 세포의 분화와 증식을 억제하여 IL-4와 IgE 생성을 감소시킴으로써 Th2쪽으로 치우친 결과로 유발된 알러지 반응을 억제 조절하는 역할을 한다[6, 60]. 본 실험에서 비장 림프구 배양액 내의 사이토카인의 생성량을 측정한 결과 Th2 사이토카인인 IL-4는 OVA-CT군 127.0±15.5에 비해 OVA-FT군은 76.3±8.45, OVA-BSEO군은 77.5±9.75로 두 군 모두 유의하게 감소된 반면, Th1 세포에서 생산되어 Th2 세포가 분비하는 IL-4에 길항하는 IFN- γ 는 OVA-CT군 41.8±7.30에 비해 OVA-FT군은 46.1±11.40으로 유의한 차이가 없었으나 OVA-BSEO군은 94.9±8.20으로 유의적인 증가를 나타내었다(p<0.01)(Fig. 6B).

Takayuki 등[51]은 알러지성 기도염증을 억제하는 Kampho 약제인 SST 처치군에서 BALF내 사이토카인 양을 측정한 결과 대조군에 비하여 IL-5의 양은 감소하고 IFN- γ 양은 증가한다고 보고하였으며, 본 실험 결과도 BSEO군이 Th2 사이토카인인 IL-4(Fig. 7A), IL-5(Fig. 6A) 및 IL-13(Fig. 6B) 생산량을 감소시키고 Th1 사이토카인인 IFN- γ 생산량을 증가시켰다(Fig. 7B). 이상의 결과와 본 연구결과로 판단하자면 알러지성 염증 유발에는 Th2 사이토카인이

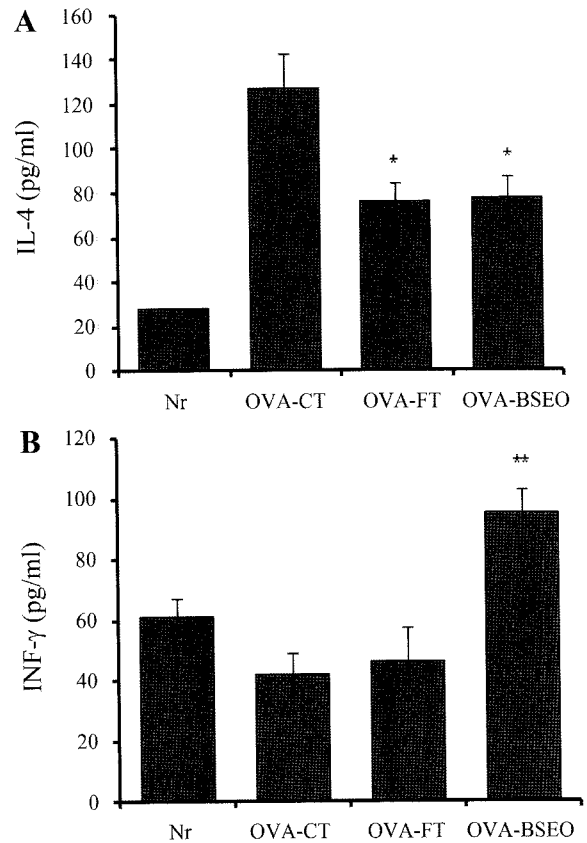


Fig. 7. Effect of BSEO on cytokine levels in splenocyte culture supernatant of OVA-sensitized mice. Levels of IL-4 (A) and IFN- γ (B) were analyzed by ELISA. Means ± SE of data and significance were the same as Fig. 1 (*p<0.05, **p<0.01).

작용하며 BSEO군은 Th1 사이토카인 양을 증가시킴으로 Th1/Th2 길항작용을 통한 면역 조절 작용으로 알러지성 염증을 억제하는 것으로 확인되었다.

이상의 결과로부터 BSEO는 알러지성 천식 모델 생쥐의 폐, 폐포세척액, 비장세포 및 종격동 림프절을 조사한 결과 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13과 케모카인인 eotaxin 등의 생성 억제, Th1 사이토카인인 IFN- γ 생성 증가 및 IgE 생성 억제작용으로 효과적으로 기도염증반응을 억제하였다. 항염증작용을 가진 다른 방향성 오일인 티트리 오일은 Hart 등[25]에 의한 *in vivo*에서 tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-1 β , IL-8, IL-10와 prostaglandin E₂의 생성 억제로 염증작용이 억제된다는 보고와 이와 상반된 Abe 등[1]의 TNF- α 에 자극된 중성구의 염증반응은 억제되지 않는다는 보고가 있었다. 그러나 두 실험 모두 흡입이 아닌 피부에 바르는 국소적용에 대한 항염증 보고였으며 프랑킨센스 resin에 대한 항천식 연구[21]도 흡입이 아닌 치료적 성분을 이용한 경구복용이 보고되었다. 이에 비해 본 실험에서 알러지성 천식의 BSEO 실험은 방향성 에센셜 오일을 간단히 흡입하는 방법으로 사용이 간편하여 병원이나 피부미용실에서 알러지성 염증 치료와 예방 및 방향의 소재로 큰 효과를 기대할 수 있으리라 사료된다.

요 약

프랑킨센스는 감람나무 종에서 얻어지는 gum resin으로, 성분은 5-9% 방향성 에센셜 오일, 알코올-용해성인 65-85% resin과 수용성인 gum 잔여물로 구성된 복합물이다. 프랑킨센스의 알코올 용해성인 resin 성분들의 항염증 작용은 잘 알려져 있으나, 방향성 에센셜 오일 성분이 알러지성 천식에 작용을 하는지의 여부는 보고되지 않았다. 실험은 프랑킨센스 에센셜 오일(BSEO)이 ovalbumin(OVA)으로 유발된 알러지성 천식 생쥐 모델에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행하였다. BALB/c 생쥐는 OVA로 복강감작 후 OVA 기도투여로 면역반응을 유발시켰다. 실험그룹은 0.3% BSEO를 8주간 흡입시켰다. OVA로 감작, 유발시킨 BALB/c 생쥐에서 기도내 호산구 침윤증가, 점액분비 증가와 기도과민성이 나타났다. 이에 비하여, BSEO 처치군에서 BALF내 호산구수, 술잔세포의 과증식, 기도과민성이 감소되었다. BALF내 사이토카인 분석 결과, BSEO는 Th1 사이토카인인 IFN- γ 를 증가시켰으며 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5와 IL-13을 감소시켰다. 또한, OVA-specific IgE와 eotaxin의 분비를 억제시켰다. BSEO 흡입군에서 종격동 림프절의 CD4⁺, CD3⁺/CCR3⁺, 및 B220⁺/CD23⁺ 세포들 또한 감소되었다. 이상의 결과에서 BSEO는 Th1/Th2 관여 면역조절인자로 판단되며, BSEO 흡입으로 간단하고 경제적인 방법으로 알러지성 기도염증 치료가 가능할 것으로 사료되었다.

REFERENCES

1. Abe, S., N. Maruyama, K. Hayama, H. Ishibashi, S. Inoue, H. Oshima, and H. Yamaguchi. 2003. Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils. *Med. Inflamm.* **12**: 323-328.
2. Aronica, M. A., S. McCarthy, S. Swaidani, D. Mitchell, M. Goral, J. R. Sheller, and M. Boothby. 2004. Recall helper T cell response: T helper 1 cell-resistant allergic susceptibility without biasing uncommitted CD4 T cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**: 587-595.
3. Barnes, P. J. 1999. Effect of bbb₂-agonist on inflammatory cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**: 10-17.
4. Barnes, P. J. 1999. Therapeutic strategy for allergic disease. *Nature.* **402**: B31-38 (Suppl.).
5. Barnes, P. J. 2000. Endogenous inhibitory mechanisms in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**: S176-181.
6. Borish, L. 2003. Allergic rhinitis: Systemic inflammation and implications for management. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**: 1021-1031.
7. Bousquet, J., P. Chanez, J. Y. Lacoste, R. White, P. Vic, P. Godard, and F. B. Michel. 1992. Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy.* **47**: 3-11.
8. Bousquet, J., P. K. Jeffery, W. W. Busse, M. Johnson, and A. M. Vignola. 2000. Asthma, From bronchoconstriction to airway inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**: 1720-1745.
9. Bromberg, J. S. 1993. The biology of CD2: adhesion, transmembrane signal, and regulatory receptor of immunity. *J. Surg. Res.* **54**: 258-267.
10. Busse, W. W., and R. F. Jr. Lemanske. 2001. Asthma. *N. Engl. J. Med.* **344**: 350-362.
11. Cookson, W. 1999. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature.* **402**: B5-11 (Suppl.).
12. Coyle, A. J., C. Bertrand, S. Tsuyuki, H. Pircher, S. Walti, G. Le Gros, and F. Erard. 1996. IL-4 differentiates naive CD8+ T cells to a "Th2-like" phenotype: a link between viral infections and bronchial asthma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **796**: 97-103.
13. Daugherty, B. L., S. J. Siciliano, J. A. DeMartino, L. Malkowitz, and A. Sirotna. 1996. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J. Exp. Med.* **183**: 2349-2354.
14. de Heer, H. J., H. Hamida, S. Thomas, J. Danielle, V. Nanda, A. M. W. Monique, C. H. Henk, and N. L. Bart. 2004. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.* **5**: 89-98.
15. de Sousa, A. C., D. S. Alviano, A. F. Blank, P. B. Alves, C. S. Alviano, and C. R. Gattass. 2004. Melissa officinalis L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**: 677-681.
16. Duan, W., J. H. Chan, C. H. Wong, B. P. Leung, and W. S. Wong. 2004. Anti-inflammatory effects of mitogen-activated

- protein kinase kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model. *J. Immunol.* **172**: 7053-7059.
17. Erin, E. M., T. J. Williams, P. J. Barnes, and T. T. Hansel. 2002. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* **1**: 201-214.
 18. Foster, P. S., S. P. Hogan, A. J. Ramsay, K. I. Mattaei, and I. G. Young. 1996. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* **183**: 195-201.
 19. Garside, P., M. Steel, E. A. Worthey, A. Satoskar, J. Alexander, H. Bluethmann, F. Y. Liew, and A. M. Mowat. 1995. T helper 2 cells are subject to high dose oral tolerance and are not essential for its induction. *J. Immunol.* **154**: 5649-5655.
 20. Gleich, G. J. 2000. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**: 651-663.
 21. Gupta, I., V. Gupta, A. Parihar, S. Gupta, R. Lüdtkke, H. Safayhi and H. P. Ammon. 1998. Effect of *Boswellia serrata* gum resin in patients with bronchial asthma: results of a double blind, placebo-control, 6-week clinical study. *Eur. J. Med. Res.* **3**: 511-514.
 22. Hajhashemi, V., A. Ghannadi, and B. Sharif. 2003. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J. Ethnopharmacol.* **89**: 67-71.
 23. Hamelmann, E., J. Schwarze, K. Takeda, A. Oshiba, G. L. Larsen, C. G. Irvin, and E. W. Gelfand. 1997. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **156**: 766-775.
 24. Hamm, S., J. Bleton, J. Connan, and A. Tchaplal. 2005. A chemical investigation by headspace SPME and GC-MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples. *Phytochemistry.* **66**: 1499-1514.
 25. Hart, P. H., C. Brand, C. F. Carson, T. V. Riley, R. H. Prager, and J. J. Finaly-Jones. 2000. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm. Res.* **49**: 619-626.
 26. Huang, M. T., V. Badmaev, Y. Ding, Y. Liu, J. G. Xie, and C. T. Ho. 2000. Anti-tumor and anti-carcinogenic activity of triterpenoid, beta boswellic acid. *Biofactors.* **13**: 225-230.
 27. Jain, V. V., K. Kitaqaki, T. Businqa, I. Hussain, C. Geroge, P. O'shauqhnessy, and J. N. Kline. 2002. CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**: 867-872.
 28. Kasakura, S. 1998. A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the pathogenesis of various human disease. *Rinsho. Byori.* **46**: 915-921.
 29. Kay, A. B., S. Ying, and S. R. Durham. 1995. Phenotype of cells positive for interleukin-4 and interleukin-5 mRNA in allergic tissue reaction. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**: 208-210.
 30. Kibe, A., H. Inoue, S. Fukuyama, K. Machida, K. Matsumoto, H. Koto, T. Ikegami, H. Aizawa, and N. Hara. 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.
 31. Kim, J., H. Lee, Y. Lee, B. G. Oh, C. Cho, Y. Kim, M. Shin, M. Hong, S. K. Jung and H. Bae. 2007. Inhibition effects of Moutan Cortex Radicis on secretion of eotaxin in A549 humna epithelial cells and eosinophil migration. *J. Ethnopharmacol.* **114**: 186-193.
 32. Kung, T. T., D. Stelts, J. A. Zurcher, A. S. Watnick, H. Jones, P. J. Mauser, X. Fernandez, S. Umland, and W. Kreutne. 1994. Mechanisms of allergic pulmonary eosinophilia in the mouse. *J. Allergy Clin. Immunol.* **94**: 1217-1224.
 33. Larché, M., D. S. Robinson, and A. B. Kay. 2002. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**: 450-463.
 34. Makino, S., and T. Fukuda. 1995. Eosinophils and allergy in asthma. *Allergy Proc.* **16**: 13-21.
 35. Marco, I., H. Hamida, M. van Nimwegen, K. Mirjam, V. Nanda, C. H. Henk, and N. L. Bart. 2006. Inhaled iloprost suppresses the cardinal features of asthma via inhibition of airway dendritic cell function. *J. Clin. Invest.* **116**: 2935-2944.
 36. Maruyama, N., Y. Sekimoto, H. Ishibashi, S. Inouye, H. Oshima, H. Yamauchi, and S. Abe. 2005. Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *J. Inflamm. (Lond).* **2**: 1-11.
 37. Marx, J., E. Pretorius, and M. J. Bester. 2006. Effects of *Urginea sanguinea*, a traditional asthma remedy, on embryo neuronal development. *J. Ethnopharmacol.* **104**: 315-321.
 38. Palmerio, E. M., R. J. Hopp, R. E. Biven, A. K. Bewtra, N. N. Nair, and R. G. Townley. 1992. Probability of asthma based on methacholine challenge. *Chest.* **101**: 630-633.
 39. Paul, J. B., G. Raif, and C. O. Hans. 2003. Desloratadine inhibits allergen-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness and alters T-cell responses in murine models of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**: 149-159.
 40. Ram, A., U. Mabalirajan, M. Das, I. Bhattacharya, A. K. Dinda, S. V. Ganqal and B. Ghosh. 2006. Glycyrrhizin alleviates experimental allergic asthma in mice. *Int. Immunopharmacol.* **6**: 1468-1477.
 41. Redington, A. E., and P. H. Howarth. Airway wall remodeling in asthma. *Thorax.* **52**: 310-312.
 42. Robinson, D. S., Q. Hamid, S. Ying, A. Tsicopoulos, J. Barkans, A. M. Bentley, C. Corrigan, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1992. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.* **326**: 298-304.
 43. Roche, W. R., R. Beasley, J. H. Williams, and S. T. Holgate. 1989. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet.* **1**: 520-524.
 44. Roh, G. S., S. W. Seo, S. Yeo, J. M. Lee, J. W. Choi, E. Kim, Y. Shin, C. Cho, H. Bae, S. K. Jung, and K. Kwack. 2005.

- Efficacy of a traditional Korean medicine, Chung-Sang-Bo-Ha-Tang, in a murine model of chronic asthma. *Int. Immunopharmacol.* **5**: 427-436.
45. Roitt, I. M., J. Brostoff, and D. Male. 1989. Immunology. pp. 11-20. 2nd ed. Gower medical Publishing, London.
 46. Roy, S., S. Khanna, H. Shah, C. Rink, C. Phillips, H. Preuss, G. V. Subbaraju, G. Trimurtulu, A. V. Krishnaraju, M. Baqchi, D. Baqchi, and C. K. Sen. 2005. Human genome screen to identify the genetic basis of the anti-inflammatory effects of *Boswellia* in microvascular endothelial cells. *DNA Cell Biol.* **24**: 244-255.
 47. Scola, A. M., L. K. Chong, S. K. Suvarna, R. Chess-Williams, and P. T. Peachell. 2004. Desensitisation of mast cell beta2-adrenoreceptor-mediated responses by salmeterol and formoterol. *Br. J. Pharmacol.* **141**: 163-171.
 48. Sharma, M. L., A. Kaul, A., Khajuria, S. Singh, and G. B. Singh. 1996. Immunomodulatory activity of boswellic acids (pentacyclic triterpene acids) from *Boswellia serrata*. *Phytother. Res.* **10**: 107-112.
 49. Singh, G. B., S. Singh, and S. Bani. 1996. Anti-inflammatory actions of boswellic acids. *Phytomedicine* **3**: 81-85.
 50. Takami, M., Y. Takata, K. Matsumoto, S. Ono, and W. Tsukada. 1991. Effects of DP-1904, a new thromboxane A2 synthetase inhibitor, on guinea pig experimental asthma. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* **629**: 407-409.
 51. Takayuki, N., A. Yumiko, E. Michiko, N. Shin-yu, Y. Takeshi, and Y. Haruki. 2004. Anti-allergic activity of a Kampho (Japanese herbal) medicine "Sho-seiryu-to (Xiao-Qing-Long-Tang)" on airway inflammation in a mouse model. *Int. Immunopharmacol.* **4**: 1353-1365.
 52. Taube, C., C. Duez, Z. H. Cui, K. Takeda, Y. H. Rha, J. W. Park, A. Balhorn, D. D. Donaldson, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2002. The role of IL-13 in established allergic airway disease. *J. Immunol.* **169**: 6482-6489.
 53. To, Y., M. Dohi, R. Tanaka, A. Sato, K. Nakaqome, and K. Yamamoto. 2001. Early interleukin 4-dependent response can induce airway hyperreactivity before development of airway inflammation in a mouse model of asthma. *Lab. Invest.* **81**: 1385-1396.
 54. Tucker, A. O., 1986. Frankincense and myrrh. *Econ. Bot.* **40**: 425-433.
 55. van Schayck, C. P., I. D. Bijl-Hofland, S. G. Cloosterman, H. T. Folgering, F. J. van der Elshout, and C. Van Weel. 2002. Potential masking effect on dyspnoea perception by short- and long-acting beta2-agonists in asthma. *Eur. Respir. J.* **19**: 240-245.
 56. Vignola, A. M., P. Chanez, A. M. Campbell, F. Souques, B. Lebel, I. Enander, and J. Bousquet. 1998. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**: 403-409.
 57. Walker, C., E. Bode, L. Boer, T. T. Hansel, K. Blaser, J. C. Jr. Virchow. 1992. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**: 109-115.
 58. Won, J., Y. G. Hur, E. M. Hur, S. H. Park, M. A. Kang, Y. Choi, C. Park, K. H. Lee, and Y. Yun. 2003. Rosmarinic acid inhibits TCR-induced T cell activation and proliferation in an Lck-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* **33**: 870-879.
 59. Yang, M., S. P. Hogan, S. Mahalingam, S. M. Pope, N. Zimmermann, P. Fulkerson, L. A. Dent, I. G. Young, K. I. Mattaei, M. E. Rothenberg, and P. S. Foster. 2003. Eotaxin-2 and IL-5 cooperate in the lung to regulate IL-13 production and airway eosinophilia and hyperreactivity. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **112**: 935-943.
 60. Yang, S. H., C. Y. Hong, and C. L. Yu. 2001. Decreased serum IgE level, decreased IFN- γ and IL-5 but increased IL-10 production, and suppressed cyclooxygenase 2 mRNA expression in patients with perennial allergic rhinitis after treatment with a new mixed formula of Chinese herbs. *Int. Immunopharmacol.* **1**: 1173-1182.

(Received Sep. 23, 2008/Accepted Oct. 19, 2008)