

OVA로 유도된 천식생쥐 모델에서 레몬 오일의 항천식 및 항염증 효과

최국기*, 정규진**, 정광조***

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

Anti-asthma and anti-inflammation effects of lemon oil in OVA-induced allergic asthma mouse model

Gook-gi, Choi*, Kyu-Jin Chung**, Kwang-jo Cheong***

Dept. of Alternative Medicinet Graduate School of Health & Sports, Daejeon University*

College of Pharmacy, Chungnam National University**

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

요약 레몬 오일의 항장효과와 각성효과는 미용분야와 심리치료분야에서 폭넓게 증명되어 왔다. 그러나 레몬 오일의 항천식과 항염증에 대한 고유한 효과에 대해 입증된 바는 드물다. 이 논문은 OVA로 유도된 천식 생쥐 모델에서 항천식 및 항염증 효과에 대해 증명하고자 수행되었다. OVA로 유도된 천식 생쥐 모델을 정상군, 대조군, 양성대조군 그리고 실험군으로 구성된 4집단으로 분류하였다. 0.3%의 레몬오일을 실험군에 3주간, 1주에 3회, 1회 30분간 흡입시켰다. 최초 실험일로부터 6주 후 기도 과민성의 정도, 혈액학적 변화, 혈청 내 사이토카인의 변화, 기도조직의 변화를 평가하였다. 실험 결과 레몬 오일은 효과적으로 기도과민성 억제 및 호산구의 세포증식 억제, IgE의 생성 억제를 통하여 기도의 염증 반응 및 과민반응을 유의성 있게 억제하는 것으로 확인되었다.

주제어 : 레몬 오일, 아로마테라피, 항천식, 항염증, 호흡기계

Abstract The cosmetic and stimulating effects of lemon oil have been widely proven in the fields of beauty therapy and psychology therapy. But the lemon oil's proper effects on the anti asthma and the anti inflammation have not rarely been verified. This study was conducted to find out the lemon oil's effects on the anti asthma and anti inflammation in the OVA-induced allergic asthma mice model. OVA-induced allergic asthma mice were divided into 4 groups consisting of normal group, control group, positive control group and experimental group. 0.3% of lemon oil was nebulized to experimental group for 3 weeks on a basis of 3 times per week and 30 min each time. After 6 weeks from the initial experiment, the degree of hyper activeness of respiratory system, the hematological change, the amount of the cytokein in serum, the change of airway organization were evaluated. The results showed that lemon oil controled effectively the hyper activeness of respiratory system and restricted the multiplication of cells in acidophil in terms of statistical significance. It also turned out that lemon oil restricted effectively the infection of airway reaction and the hyper sensitiveness of respiratory system by controlling the creation of histamine(cytokein) and IgE.

Key Words : Lemon oil, aroma therapy, anti-asthma, anti-inflammation, respiratory system

Received 5 August 2014, Revised 22 September 2014

Accepted 20 October 2014

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

2000년 WHO의 보고에 따르면 전 세계적으로 1억~1억 5천만 명의 환자가 천식으로 고통 받고 있으며 1년에 18만 명 이상이 천식으로 목숨을 잃는 것으로 조사되었다. 2006년 통계청 자료에 따르면 호흡기질환에 의한 사망률이 인구 10만 명당 1996년 23.2%에서 2006년 29.3%로 증가하였으며 20세 이상의 천식 유병률은 1998년 1.1%에서 2005년 1.8%이며, 30세 이상의 천식 유병률은 1998년 1.3%에서 2005년 2.1%로 증가하였다고 보고된 바 있다. 최근에는 병태생리에 많은 연구들이 진행되어 기관지 천식을 기도 염증, 점액 과 분비 및 기도과민반응이 나타나는 호흡기 점막의 면역 질환으로, 백혈구 내 B세포, T세포, 비만세포, 호산구 침윤, 염증 세포들과 사이토카인, 케모카인과 같은 화학매개체에 의해 유발되며 기도과민성, 폐의 염증 및 혈청 내 IgE 분비 증가 등이 대표적인 특징으로 나타나는 만성염증성 질환으로 보고 있다. 이처럼 기관지 천식의 병태생리에 대한 이해가 깊어졌음에도 불구하고 현재 사용되는 항히스타민제, 스테로이드, 테오필린, 크로몰린제와 같은 약물들은 비 특이적으로 작용하며 장기간 사용할 경우 부작용이 문제가 되기 때문에 만성염증성 질환인 천식의 치료제로서 제한적이다. 따라서 기관지 천식에 특이적으로 작용하여 생리적 부작용을 최소화하는 새로운 항염증 약물의 필요성이 대두되고 있다[1].

본 연구는 이러한 실정에서 천식을 효율적으로 중재할 수 있는 대안으로 보완대체요법 가운데 아로마테라피를 택하여 레몬 오일의 항염증 효과 및 항 천식효과에 미치는 효과를 규명하기 위해 시도되었다. 레몬오일을 이용한 대부분의 연구들은 시너지 블렌딩을 이용한 향기요법과 마사지 요법 등의 미용학적 연구들로서 레몬오일을 단독으로 사용한 항 천식 및 항염증 효능에 대한 논문은 보고된 바 없다. 따라서 레몬 오일(*Citrus Medica Limonum*; CML)이 기도과민성과 더불어 혈액학적 변화와 혈청 내 세포분화 비율에 미치는 영향, 혈청 내 사이토카인의 변화, 폐 조직을 관찰하여 알레르기성 천식 생쥐 모델에 미치는 영향을 조사함으로써 천식 치료제로서의 가능성을 제시하고자 한다.

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 고품사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2°C, 습도 55±15%, 1-2 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2.1.2 약물

본 실험에 사용한 오일은 lemon(*Citrus Medica Limonum*: concentration 100%)을 사용하였다. 실험에 쓰는 오일은 Primavera의 essential oil을 구입한 후 정선하여 사용하였다. 양성대조군으로는 항염증제인 Rolipram을 사용하였다.

2.1.3 시약

본 실험에 사용된 시약 중 diethyl pyrocarbonate (DEPC), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), RPMI-1640, isopropanol, 적혈구용혈액 (RBC lysis solution), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, lamide, 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.

2.1.4 기기

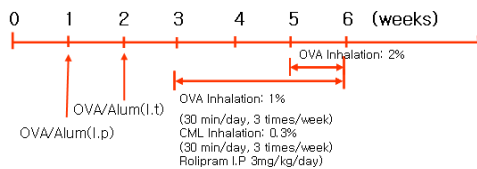
본 실험에 사용된 기기는 Clean bench, Autoclave, Water bath, Vorter mixer(vison scientific.co.,Korea), Micro-pipet(Gilson.co.,France), spectrophotometer(Shim-azue, co.,Japan), homogenizer (OMNI.co., USA)등을 사용하였다.

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 혼합

물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750xg에서 5분 동안 원심분리 하였다. 이 OVA/Alum 침전물 (pellet)을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100 µg OVA를 0.2ml로 조정하여 복강 내(i.p)로 주사하여 전신감작을 시킨다. 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 천식유발이 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 CML0.3%로 희석한 후 nebulizer (Buxco, USA)를 이용하여 3주간 3회 100ml씩 30분간 흡입박스 (아크릴제작, 30cm x 45cm)에 분무하였다. 양성 대조군으로는 Rolipram을 3mg/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. 즉 Penh값은 Pause-PIF/PEF와 같으며,

여기서 $Pause = (Te - TR) / Tr$ 로서 PIF는 peak inspiratory flow, PEF는 peak expiratory flow, Te는 expiratory time, Tr은 relaxation time으로 Biosystem XA software (Buxco Research System, Wilmington, USA)를 이용하여 분석하였다. 6주간 2.5% OVA inhalation 24시간 후에, 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 °C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 혈액성분과 효소들의 활성도 측정은 바이오톡스텍 (주) (Republic of Korea)에 의뢰하였다.

2.2.5 ELISA Analysis

천식생쥐에서 분리한 혈청에서 각 사이토카인량을 측정하기 위해 OVA-IgE (Shibayagi, japan), Histamine, enzyme-linked immuno-sorbent assay (Biosource, USA)으로 생산량을 측정하였다. 각 항체를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 폐포 세척액과 혈청 (100배 희석)을 100 µl씩 분주하였다. 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 µl를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100µl씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 µl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA kit (R&D system)을 이용하여 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.6 조직병리검사

폐를 떼어내어 즉시 10% formaldehyde 용액에 고정 한 후 세절하여 흐르는 물에 8 시간 수세한 다음, epoxy 에 포매하고, 이것을 microtome으로 절편을 만들어 표준 방법에 의하여 Hematoxylin & Eosin과 collagen deposition염색인 Masson-Trichrome 염색을 수행하였

다. 그리고 배상세포를 관찰하기 위하여 PAS 염색을 하여 400x의 광학현미경에서 관찰하였다.

2.3 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 Mean±Standard Error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

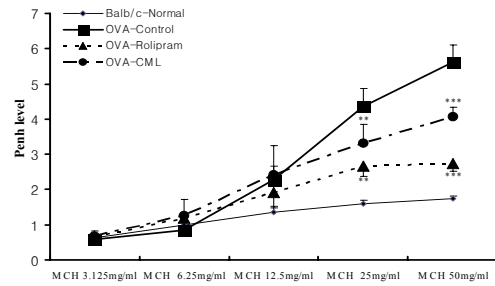
3. 결과 및 고찰

본 연구는 4집단 즉, 정상군(Normal Group), 대조군(Control Group), 양성대조군(Rolipram Group), 실험군(CML Group)에 대한 6주 동안의 실험 전, 후 기도과민성에 미치는 효과, 혈액학적 변화에 미치는 효과, 혈청 내 사이토카인의 변화, 조직의 변화는 다음과 같은 결과를 나타내었다.

3.1 기도과민성에 미치는 효과

천식의 진단으로 Methacholine(MCH)을 이용한 기관지 유발 검사를 하여 MCH 농도를 점차 증가시키면서 기도 저항성 측정을 통해 기관지 과민성 정도를 확인하였다. [Fig. 2]에서 볼 수 있는 바와 같이, 정상군에 비해 OVA-CT군의 최대 Penh 값은 MCH 각 농도에서 높게 나타났으며, OVA-CML군은 MCH 12.5mg/ml 농도부터 OVA-CT군에 비해 유의한 억제효과가 나타났다(p<0.001).

이 결과에서 항원 유발 후 염증반응에 의한 기도저항이 억제됨은 CML이 기도 평활근 증식을 억제하여 기도의 두께를 감소했을 가능성이 있고, 호산구나 비만세포와 같은 염증세포가 기관지로 유입되거나 침윤되는 작용을 억제했을 것으로 사료되므로 CML이 천식의 특징적 양상인 기도과민성 발생을 억제하였음을 알 수 있다. 특히 천식 환자에서의 기도과민성은 호산구성 기도염증과 밀접한 관계가 있다는 보고[2]가 본 연구의 [Fig. 4]에서의 호산구 감소와도 일치하는 바 CML 흡입으로 기도과민성이 억제된다면, 염증세포 수 역시 유의하게 저하될 것이며 이러한 변화는 CML 흡입이 기관지 과민반응을 억제하여 항 천식 작용이 있는 것으로 추정된다.



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

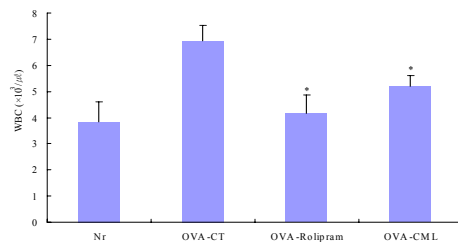
Penh was measured in a Buxco box, as previously described. Data are presented as means ± SE from 6 individual mice in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

3.2 혈액학적 변화와 혈액 내 세포분화비율에 미치는 영향

백혈구는 주로 식세포 작용과 면역작용에 관여하는 세포로 천식질환과 혈액 내 백혈구 수의 상관관계로 인한 증가와 감소에 대한 임상조건이 많지 않으나 Herb(1994)는 BALF내 염증성 백혈구의 증가는 기도질환을 유도하는 매개체로 보고하였다[3].

본 연구에서 CML을 흡입시킨 BALB/C Mice의 백혈구 수치를 알아본 결과 [Fig. 3]에서 볼 수 있는 바와 같이 실험군인 OVA-CML은 5.2 ± 0.4 , 대조군은 6.93 ± 0.6 으로 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소가 나타났다(p<0.05).

위의 결과는 OVA-CML이 백혈구 수치 감소에 효과가 있음을 나타낸 것으로 추정되며 백혈구의 감소는 항염증 작용에 효과가 있을 것으로 사료된다[Fig. 3].



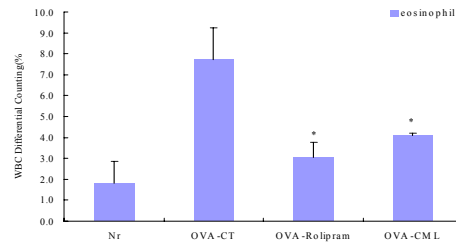
[Fig. 3] Effect of CML on white blood cell in blood.

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).

3.2.1 호산구(Eosinophil)

호산구는 천식환자의 혈액, 기관지 폐포액, 기도상피, 객담에 많이 존재하며 자체 내에서 여러 가지 사이토카인들을 분비하여 다른 세포들을 활성화시켜 천식의 병태생리에 중요하게 작용해[4] 만성적인 천식증상의 발현에 직접적인 역할을 수행한다는 Heusser 등(1997)의 보고[5]가 있고 또 다른 보고로는 호산구가 외인성기관지 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염등과 기타 IgE에 의해 매개되는 여러 가지 알레르기성 염증 질환에 있어 주축을 담당하는 전 염증 세포로서 과민성과 연관된 후기 반응에 중요한 역할을 한다는 연구가 있다[6]. 또한 말초 혈액 호산구 수는 천식에서 기도 저항에 상관관계가 있다고 이준혁(2007)은 보고[7]하였고 Justice(2003)는 항원에 감작된 쥐에서 호산구를 선택적으로 제거했을 시 비강 내 상피와 배상세포이형성, 점액 분비 등이 감소되었고 기도의 과민반응이 나타나지 않음[8]을 밝혀 호산구가 항원으로 유발된 폐 병리에 직접적인 인과관계가 있음을 입증하였다.

천식환자에게 기도과민성 정도와 기관지 호산구수의 상관관계는 이미 알려진 사실로 보고되고 있는 바[9] 본 연구에서 CML을 흡입시킨 BALB/C Mice의 호산구의 빈도를 측정해보았다. 그 결과 [Fig. 4]에서 볼 수 있는 바와 같이 대조군은 7.72 ± 1.52 , 실험군인 OVA-CML은 4.08 ± 0.14 로 대조군에 비하여 실험군인 OVA-CML군에서 호산구가 유의성 있게 감소했음을 보였다($p < 0.05$). 이 결과는 CML이 천식의 알레르기 반응에 억제하는 작용이 있음을 알 수 있고, 또한 정상군에 비해 OVA-CT군에서 호산구의 비율이 현저히 증가하고 이에 반해 OVA-CML군에서 감소한 결과는 알레르기성 천식에 호산구의 증가가 영향을 주는 것으로 확인되는 것인데 이것은 이해연(2009)의 프랑킨센스 에센셜오일 흡입이 OVA로 유도된 알레르기성 천식모델 생쥐에 미치는 영향[10]의 결과와도 부합되는 소견으로 CML이 알레르기성 기관지 염증의 중요한 요인인 호산구 세포의 침윤을 억제하여 천식 치료에 유효할 것으로 판단된다[Fig. 4].



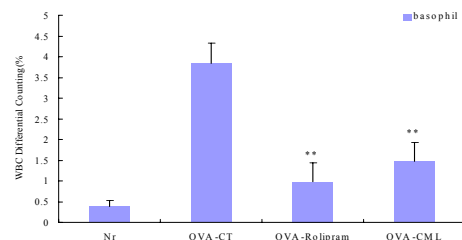
[Fig. 4] Effect of CML on eosinophil in blood.

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 (* $p < 0.05$).

3.2.2 호염기구(Basophil)

호염기구는 호산구나 단핵구와 같이 알레르기 염증 반응이 일어나는 병소에 선택적으로 침윤한다는 사실과 호염기구가 다른 면역세포들의 생물학적 기능을 조절하며 알레르기 염증 과정에서 매우 중요한 역할을 한다는 사실이 보고되고 있다[11].

본 연구에서 CML을 흡입시킨 BALB/C Mice의 호염기구 빈도를 알아본 결과 [Fig. 5]에서 볼 수 있는 바와 같이 대조군은 3.8 ± 0.5 , 실험군인 OVA-CML은 1.48 ± 0.45 로 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소함을 보여주었는데($p < 0.01$) 이 결과를 천식의 악화가 순환계 내의 호염기구, 호산구의 수적 증가와 연관이 있고 호염기구의 수적 증가가 알레르기 천식개체의 혈액 내에서 확인된 바 있음을 보고한 김현희(2002)의 연구보고[12]와 관련지어 볼 때 CML을 흡입한 실험군에서 호염기구와 호산구의 빈도 감소는 천식의 알레르기 반응을 억제하는 결과로 천식의 호전에 도움이 될 것으로 판단된다.



[Fig. 5] Effect of CML on basophil in blood.

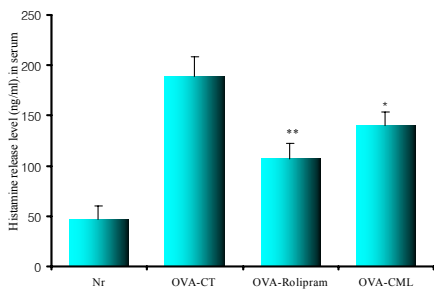
Data are presented as means \pm SE from 6 individual mice in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (** $p < 0.01$).

3.3 혈청 내 사이토카인의 변화

3.3.1 히스타민(Histamin)

알레르기 반응이나 염증에 관여하는 주요한 화학 물질로 알려져 있는 히스타민은 혈청 내 사이토카인으로 다양한 평활근에 직접 작용하여 수축효과를 보이는 것으로 보고된 바 있다[13]. 사이토카인은 호산구를 폐와 기도 조직 내로 유입해 만성 기도 염증을 유발하고 기도 염증이 발생하면 평활근 세포의 수축과 상피세포의 활성화도를 증가시켜 기도 개형이 따른다[14]는 보고와 기도의 염증과 기도 과민성, 점액 생산과 기도폐쇄에 관여하는 IgE 생산과 분비를 증가시키고 호산구와 점액의 활성화에도 작용을 한다는 보고가 있다[15]. 특히 히스타민은 비만세포의 과립에 저장되었다가 유리되는 가장 주된 염증매개물질로서 기도에 조기 반응하여 알레르기증상을 일으키는 주요 화학매체이며[16] 기관지 악화 시에 혈청 히스타민이 증가한다는 보고는[17] 히스타민의 이러한 작용에 의해 1형 과민반응인 천식을 초래하게 되는 것으로 볼 수 있다.

본 연구에서 CML을 흡입시킨 BALB/C Mice의 히스타민 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과 [Fig. 6]에서 볼 수 있는 바와 같이 대조군은 188.8 ± 19.8 에 비하여 실험군인 OVA-CML은 140.4 ± 12.8 로 대조군에 비하여 유의성 있게 생성량이 감소하였음을 보여주었다($p < 0.05$). 이 결과는 CML이 알레르기 반응에 주된 인자로 알려진 히스타민의 활성화 억제에 유의한 작용이 있음을 보여주는 것이다.



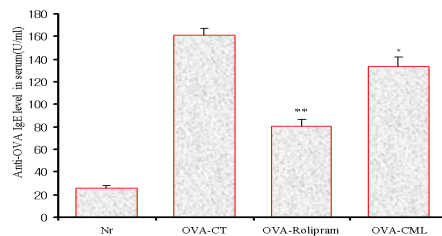
[Fig. 6] Effect of CML on histamin levels in serum.

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 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.3.2 Anti-OVA IgE

IgE는 천식이나 알레르기비염과 관련된다는 연구보고가 있으며[18] 예전부터 천식의 호전과 악화에 있어 IgE의 생성은 매우 중요한 치료적 목표로 여겨져 왔다. IgE는 알레르기 반응에 있어 중요한 항체로서 혈청 내에 존재하고 제 1형 과민반응의 경우의 항체는 주로 IgE로서 비만세포와 친화성이 있으며 항원과 결합하면 히스타민 등이 분비되어 기관지 천식을 일으키게 된다.

본 연구에서 CML을 흡입시킨 BALB/C Mice의 anti-OVA IgE의 변화를 살펴본 결과 [Fig. 7]에서 볼 수 있는 바와 같이 혈청 내 Anti-OVA IgE는 대조군은 $161.0 \pm 6.2\%$, 실험군인 OVA-CML은 $133.8 \pm 8.4\%$ 로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$). 이 결과는 천식 유발에 의해 상승된 IgE 값을 CML이 유의하게 감소시켰음을 의미하며 이러한 결과는 [Fig. 7]에서 볼 수 있는 바와 같이 항 IgE 항체를 처치한 천식 군에서 기관지 폐포 세척액내 총 염증 세포수중 특히 호산구 수가 감소하였고 항 IgE항체가 비만세포 활성화와 억제와 호산구 구성 기관지 염증반응을 억제하여 항염증효과 및 기도과민반응성 호전효과가 있음을 제시한 홍태용(2009)의 연구결과와 부합된다. 이 결과로 볼 때 천식의 증상 완화에 IgE 수치 감소와 관련이 있고 CML이 천식 증상의 완화에 유의한 효과가 있음이 추정된다.



[Fig. 7] Effect of CML on anti-OVA IgE levels in serum.

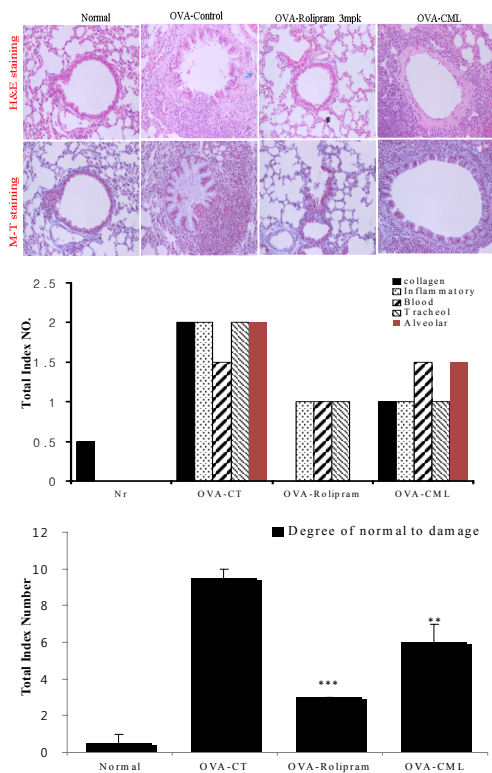
Data are presented as means \pm SE from 6 individual mice in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.4 조직의 변화

3.4.1 H&E염색과 M&T 염색

H&E(Hemotoxylin&Eosin) 염색과 M&T (Masson's Trichrome) 염색을 위해 BALB/c의 폐조직을 떼어내어,

정상군에 비교한 손상정도를 0~2의 Index 값을 준 다음 조직 부분의 세기관지와 폐포, 그리고 세포부분의 감염과 혈액세포의 침윤정도를 알아보는 H&E염색과 그리고 M&T 염색에 의한 콜라겐 침착정도를 분석하였다. 그 결과 H&E 염색에서 정상군은, 조직세포의 규칙적인 배열로 기관지 및 폐포의 내강이 잘 보이고 대조군에서는 기관지 주변 염증세포의 침윤과 세기관지와, 폐포의 이상 형태 및 협착이 관찰되었다. 이에 비하여 실험군에서는 폐포 주위에 침윤된 염증세포들의 감소가 확인되었다. M&T염색에서는 대조군에 비하여 양성대조군과 실험군에서 조직손상의 감소가 확인되었다. 양성대조군의 기도 저항 수치는 대조군에 비하여 현저하게 억제되었으며, 대조군에 비하여 실험군에서 기도저항 수치의 감소가 확인되었다 [Fig 8].

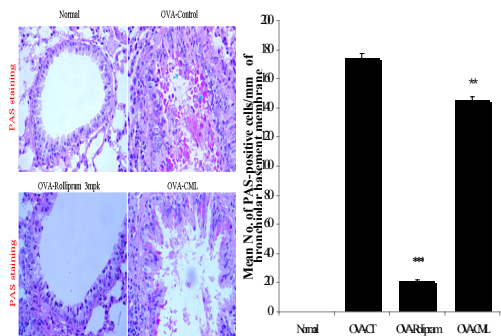


[Fig. 8] Effect of CML on allergic airway inflammation in experimental asthma. Data are presented as means ± SE (n = 6 in each mice group). Statistically significant value compared with control group data by T test (**p<0.01,***p<0.001).

3.4.2 PAS 염색

만성 기관지염은 기관지의 염증으로 인하여 기관지 점막의 부종과 섬유성 염증 반응이 일어나 기도가 좁아지게 되며 배상세포와 점액분비 항진으로 기도 폐쇄가 발생하여 환기-관류 장애가 심해지는 증상으로 혈중 이산화탄소의 분압이 증가하여 폐 성심에 빠지게 되는 질병이며 만성 폐쇄성 기관지염은 소 기도에 비가역성 협착을 초래하면서 발전하는데, 이 경우 직경 2mm 이하의 세기관지가 점액에 의한 막힘, 배상세포 이형성, 염증, 평활근의 증가 그리고 섬유화로 인하여 소기도의 단면적이 감소하게 되는 증상이다.

본 연구에서 CML을 흡입시킨 BALB/C Mice를 배상세포 과 형성 여부를 알아보기 위해 폐조직을 PAS(Periodic acid-Schiff) 염색한 결과 정상군에 비해서 대조군은 174.5 ± 2.5, CML군은 156.7 ± 2.3로 OVA-CT군에서 배상세포가 과 형성 되었고 OVA-CML군에서 배상세포가 감소되었다(p<0.01). 이러한 결과는 [Fig. 9]에서 보이는 바와 같이 CML이 배상세포의 과 형성을 억제하여 점액분비를 감소시키는 것으로 만성기관지염과 만성 폐쇄성 기관지염으로의 전진을 억제시키는 것으로 추정된다. [Fig. 9].



[Fig. 9] Effect of CML on mucus hyperproduction. 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<0.01, ***p<0.001).

4. 결론

CML이 OVA/Alum으로 전신 감작된 마우스의 알레르기성 기관지 천식에 미치는 효과를 알아보기 위하여

BALB/c에 OVA/Alum으로 감작시켜 CML을 투여한 후 MCH로 기도 과민성에 미치는 효과를 측정하였고 폐 조직에 H&E/M&T, PAS로 염색하여 조직의 변화를 관찰하고 혈액과 혈청 내의 백혈구 수치의 변화, 백혈구 내 호산구, 호염기구의 각 빈도와 사이토카인의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CML이 기도 과민성에 미치는 효과에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소효과를 나타냈다.
 2. CML이 혈액학적 변화에 미치는 효과에서 백혈구의 수치는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소했다.
 3. CML이 혈액내 세포분화비율에 미치는 영향에서 호산구의 빈도는 대조군에 비하여 유의성있게 감소했다.
 4. CML이 혈액 내 세포분화비율에 미치는 영향에서 호염기구의 빈도는 대조군에 비하여 유의성있게 감소했다.
 5. CML의 혈청 내 사이토카인의 변화에서 히스타민은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소했다.
 6. CML의 혈청 내 사이토카인의 변화에서 Anti-OVA IgE는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소했다.
 7. 폐 조직의 변화를 H&E/M&T 염색으로 조직을 확인한 결과, 폐포의 손상도와 염증세포의 감소를 확인했다.
 8. 점액을 분비시키는 배상세포를 PAS로 염색하여 조직을 관찰한 결과 유의성 있는 감소를 보였다.
- 이상의 결과를 종합해 볼 때 알레르기성 염증으로 유발된 기관지 과민성이 대조군에 비해 CML 흡입군에서 효과적으로 억제되었고 혈액학적 검사 결과와 혈청 내 히스타민과 IgE 생성량에서 또한 유의한 수준의 감소가 있었다. 조직검사 결과 염증세포의 심한 침윤과 점액분비과다가 감소하였고 조직 손상 또한 감소됨을 확인할 수 있었다.

이는 CML의 흡입이 각 염증 세포의 활성화를 저하시켰음을 보여주는 결과이며 이를 근거로 CML은 기관지 천식에 유의한 효과가 있을 것으로 판단된다. 본 연구자의 연구를 바탕으로 부작용이 적은 천연식물 오일의 약리학적 효과와 연구, 그리고 CML의 기관지 천식 억제 효과에 대한 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- [1] Tai-yong Hong, The effect of anti-IgE antibody on airway inflammation in a mouse model of chronic asthma. M.S dissertation, Catholic University. 2009.
- [2] Kirby, J. G. Hargreave, F. E. Gleich, G. J. O'Byrne, P. M., Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis*, Vol. 136, pp. 379-83. 1987.
- [3] Herd, C. M. Donigi-Gale, D. Shoupe, T. S. Kilfeather S. A. Okiji, S. A. Page, C. P., Effect of PF 10040 on PAF-induced airway responses in neonatally immunized rabbits. *Br J.Pharmacol*, Vol. 111, No. 1, pp. 7-12. 1994.
- [4] Yang-keun Rhee, Eosinophil in Asthma. *J.Tuberculosis and respiratory diseases*, Vol. 46, No 1, pp. 5-6, 1999.
- [5] Heusser, C. Jardieu, P., Therapeutic potential of anti-IgE antibodies. *Curr Opin in Immunology* Vol. 9, p. 805. 1997.
- [6] Terada, N. Konno, A. Togawak., Biochemical properties of eosinophils and their preferential accumulation mechanism in nasal allergy. *J Allergy Clin Immunol*, Vol. 94, pp. 629-42. 1994.
- [7] Jun-hyuk Lee, Association between CCR3 gene polymorphisms and eosinophilia in Korean with asthma. Ph.D. dissertation, Soonchunhyang University. 2007.
- [8] Justice, J. P, Borchers, M. T. Crosby, R. Hines, E. M. Shen, H. H. Ochkur, S. I. McGarry, M.P. Lee, N. A. Lee, J., J. Ablation of eosinophils leads to a reduction of allergen-induced pulmonary pathology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, Vol. 284, No. 1, pp. 169-78. 2003.
- [9] Liu, Y. J., Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*, Vol, 106, pp. 259-62. 2001.
- [10] Hye-Youn Lee, The effect of nebulized Frankincense essential oil in an OVA-induced allergic asthma mouse model. Ph.D.dissertation, Konkuk University.

y. 2009.

- [11] Hyun-hee Kim, Human Basophil. *J. Pediatr Allergy Respir Dis(Korea)*, Vol. 12, No.12, pp. 71-81, 2002.
- [12] Hyun-hee Kim, The role of human basophils in allergic inflammation. *J. Allergy Asthma Respir Dis(Korea)*, Vol. 22, No. 3, pp.507-513, 2002.
- [13] Hill, S., Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharm Rev*, Vol. 42, pp. 45-82, 1990.
- [14] Thomas, P. S. Yates, D. H. Barnes, P. J., TNT-increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, Vol. 152, pp. 76-80, 1995.
- [15] Bachereau, J. Steinman, R. M., Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, Vol.392, pp.245-52, 1998.
- [16] Dong-ju Kim, The comparative study on the efficacy of Leukotriene receptor antagonist and antihistamine in combination and nasal decongestant and antihistamine in combination in allergic rhinitis, M.S dissertation, Gyeongsang National University, 2004.
- [17] Skoner, D. P. Page, R. Asman, B. Cillen, B. Fireman, P., Plasma elevation of histamine and al prostaglandin metabolite in acute asthma. *Am Rev respir Dis*, Vol. 137, pp. 1009-14, 1988.
- [18] Ishizaka, K. Ishizaka T. Hombrook, M. M., Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J Immunol*, Vol. 97, pp. 840-53, 1996.

최 국 기(Choi, Gook-gi)



- 2007년 2월 : 대전대학교 뷰티건강관리학과(보건학사)
- 2010년 2월 : 대전대학교 보건스포츠 대학원 대체의학과(보건학석사)
- 2010년 7월 ~ 현재 : 대전대 웰니스 아카데미아 웰니스 과학연구소 비상임연구원

· 관심분야 : 대체의학, 미용
 · E-Mail : cgg611018@naver.com

정 광 조(Cheong, Kwang-jo)



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

· E-Mail : Cheong@dju.ac.kr

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 : doccap@naver.com