

Original Articles

라벤더, 레몬, 유칼립투스 혼합 에센셜오일이 아토피 피부염 동물 모델의 Th2 관련인자에 미치는 영향

김현아^a, 윤미영^{2a}, 송향희¹, 정광조¹, 유화승³대전대학교 뷰티건강관리학과, 벽성대학 건강복지학과², 대전대학교 한의학과³

Received : 10. 01. 21

Accepted : 10. 02. 08

Key Words:atopic dermatitis,
NC/Nga Mice,
Lavender, Lemon,
Ucalyptus, IgE, IgG1**Effects of Lavender, Lemon and Eucalyptus Essential Oil on Th2 related Factors of DNCB-induced Atopy dermatitis in NC/Nga Mice Model**Hyeon-Ah Kim^{1a}, Mi-Young Yun^{2a}, Hyang-Hee Song¹, Kwang-Jo Cheong¹, Hwa-Seung Yoo^{1a}
These authors equally contributed.Dept. of Health Welfare, Byuksung college¹Dept. of Beauty Health Care, Daejeon university²Dept. of Oriental Internal Medicine, Oriental Medical School of Daejeon university³**ABSTRACT****Purpose :** To investigate the effects of the lavender, lemon and eucalyptus oil mixture on the atopy dermatitis skin lesions induced on NC/Nga Mice by dinitrochlorobenzene (DNCB).**Material and Method :** For this purpose, we fabricated the oil mixture blending three essential oils (lavender, lemon, eucalyptus : ELL) with one carrier oil (jojoba) and apply it on the atopic dermatitis skin lesions of NC/Nga Mice. Atopic dermatitis in NC/Nga Mice was induced by DNCB treatment on the dorsal skin of mice for 8 weeks. The mixture of ratio of each essential oil drop was 1 (eucalyptus) : 2 (lemon) : 2 (lavender) and this mixture was blended with jojoba oil 50ml (0.025%). The ELL-ointment was supplied for 8 weeks. We evaluated the effects of ELL on cell viability of mouse lung fibroblast, clinical skin features and severity, the level of serum Immunoglobulin (Ig) E & Ig G1, Interleukin (IL)-4, IL-13 and Interferon (IFN)- γ .**Results :** ELL showed safety on the cell viability of mouse lung fibroblast compared with control group. The cell viability was measured by SRB method. The effects of ELL on clinical skin features and severity in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice was significant compared with control group. EEL also showed significant effects on clinical symptom score compared with control group. Serum IgE & IgG1 level and development of atopy dermatitis skin lesions were evaluated. Serum IgE & IgG1 production was significantly down-regulated in EEL group compared with control group. ELL also down-regulated the levels of IL-4 and IL-13, and up-regulated the level of IFN- γ compared with control group significantly.**Conclusion :** ELL was effective on atopy dermatitis by modulating Th2 related factors.**I. 서론**

최근 산업의 발달과 함께 약 80,000여개의 화학물질이 상업적으로 사용되고 있다. 각종 생물 및 생물화학적 물질들의 국제교류가 활발해지고 이로 인한 각종 유해가능물

질 (신중 마약류, 식품첨가물 및 산업환경화학물질) 등의 급격한 증가로 인한 면역계 이상으로 아토피성질환이나 알레르기성 질환이 증가되고 있다. 이러한 현상은 우리나라

*Corresponding author: Hwa-Seung Yoo, East-West Cancer Center, Dunsan Oriental Hospital of Daejeon University, 1136 Dunsan-dong, Seo-Gu, Daejeon, Rep. of Korea.

Tel:82-42-470-9132, Fax: 82-42-470-9006, E-mail: altyhs@dju.kr

Kwang-Jo Cheong, Department of Beauty & Health Care of Daejeon University, 1135 Dunsan-dong, Seo-Gu, Daejeon, Rep. of Korea

Tel :82-42-280-2390, Fax: 82-42-280-2389. E-mail: cheong@dju.kr

라에서도 꾸준히 증가하고 있고 그 결과 영유아의 경우 유병율이 10%이상으로 추정되어진다.

아토피 피부염은 그 원인이 T 림프구의 면역학적 이상이나 백혈구의 비면역학적 이상으로 추정되어지나 근본적인 원인은 밝혀지지 않고 있다⁹⁾. 다만 재발이 잦고 만성으로 경과하기 쉬운 문명병적 염증성 질환이며 습진의 일종으로 피부 소양증에 대한 역치가 낮아 심한 소양감을 유발하고 이로 인한 2차적인 습진이 형성되는 질환이라는 점에서는 이견이 없다⁹⁾.

아토피 피부염 환자에게 있어서 소양증은 환자로 하여금 병변을 반복적으로 긁게 하여 찰상과 태선화 등의 2차적인 병변을 유발시킨다. 따라서 신속하게 소양증을 경감시키는 것이 중요한 치료 목표가 되며 이를 위해 다양한 치료 방법들이 시도되고 있으나 치료에 잘 반응하지 않는 경우가 많다⁹⁾.

스테로이드 외용제는 보습제, 식이 조절, 항히스타민제, 항생제와 함께 아토피 피부염의 치료에 흔하게 사용되어진다. 그러나 이를 장기간 사용했을 때 피부의 위축이나 소아환자의 경우 성장 지연 가능성 등 각종 부작용이 문제되고 있어 새로운 치료에 대한 필요성이 증가되고 있다⁴⁾.

이러한 필요성에 부응하는 천연물질 대체약물중의 하나로 아로마 에센셜 오일(이하 에센셜 오일)이 이용되어져 왔으며 치료효능 역시 상당한 수준으로 알려져 있다. 인체에 사용가능한 에센셜 오일은 약 300종 이상에 달하고, 그 중 60여종의 에센셜 오일이 이용되고 있다. 에센셜 오일 사용에 있어서 중요한 것은 혼합을 통한 시너지 효과로서 정신기능과 피부상태를 가장 효과적으로 발현시킬 수 있다고 알려져 있는 몇 종류를 선택하여 시너지 효과를 극대화하는 것이다. 일반적으로 2~3가지 이상의 오일을 혼합해서 사용하는 것이 치료효과를 가장 극대화 시키는 것으로 알려져 있다⁵⁾.

라벤더(*Lavendula angustifolia*)는 지중해의 토착식물로 linalyl acetate 등의 에스테르와 linalool의 알코올이 주요 성분으로 에스테르는 신경계를 안정시키고 강화시키는 특성이 있어 항진균제, 진정제 효과가 있다⁶⁾. 레몬(*Citrus limon*)은 대부분 모노테르펜 탄화수소물인 limonene 성분으로 구성되어 있는데, 모노테르펜은 진통, 항바이러스, 충혈완화, 강장제, 흥분제과 호르몬 같은 성질을 갖고 있다⁷⁾. 유칼립투스(*Eucalyptus globulu*)는 에센셜 오일에 함유된 옥사이드 성분 중 대표적인 것은 eucalyptol (1.8-cineole)이다. 1.8-cineole은 호흡기계와 소화기계를 자극하며, 가래를 녹이거나 기관지에 발생

한 질병에 효과적인데 유칼립투스 외에 티트리, 로즈마리 등의 에센셜 오일에도 다량 존재한다⁸⁾.

이러한 기존 지식에 근거하여 본 연구에서는 라벤더, 레몬, 유칼립투스 등 3종류의 에센셜 오일을 혼합하여 아토피 피부염이 유발된 쥐를 대상으로 소양증 등 아토피 치료 가능성을 검증하기위해 이들 세 가지 에센셜 오일들을 캐리어 오일인 조조바 오일(Jojoba Oil)과 섞어 혼합 오일을 만든 다음 12주령의 발진된 NC/Nga 생쥐의 등 부위에 도포하여 임상적 변화, 혈청 중 IgE, clinical score, IgG1, 싸이토카인(IL-4, IL-13 및 IFN- γ) 발현 등을 분석하여 아토피 발진 억제에 미치는 영향을 살펴보았다.

II. 실험 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물로써 6주령의 수컷 NC/Nga mice는 Japan SLC사에서 공급 받아 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 15\%$, 12시간-12시간(light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약물

실험에 사용한 에센셜 오일들은 *Eucalyptus (Eucalyptus globulus)*, *Lemon (citrus limon)*, *Lavender (lavandula angustifolia)*이며 캐리어 오일(Carrier Oil)로 조조바 (Jojoba Oil)를 사용하였다. 오일 배합 비율은 통상 사람의 경우 (60kg 기준으로 사용시) 1.5%인 것을 감안하여 쥐의 무게를 환산하여(20g 기준으로, 0.025%) 배합한 후 실험에 사용하였다. 실험에 쓰인 오일은 Essenjoy (네이처-플러스, 한국)가 생산한 것들이다.

3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 중 dinitrochlorobenzene (DNCB), collagenase, trichloroacetic acid, trypsin-EDTA, SRB, acetic acid, tris-base, aceton, olive oil, ethanol, DNase-1, dNTPs, RNase inhibitor, tris-HCL, RPMI-1640 배양액, 적혈구 용혈액 (RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde는

Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (U.S.A.) 제품을, Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-13 (IL-13), Interferon- γ (IFN- γ)는 R & D system사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

기기는 Microwave oven (LG, Korea), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Co., Japan), micro-pipet (Gilson, Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific. Co., Korea), centrifuge (Sigma, Co., U.S.A.), homogenizer (OMNI, Co., U.S.A.), plate shaker (Lab-Line, Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices, Co., U.S.A.), Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Co., U.S.A.), contrast fluoroseince microscope (Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 조제

에센셜 오일은 Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), lemon (*Citrus limon*), lavender (*Lavandula angustifolia*) 오일을 1:2:2 비율로 배합하여 캐리어 오일인 조조바 오일 50ml에 희석하여 100 μ l (0.025%)를 사용하였다. 오일은 차광병에 넣어 상온에서 빛이 통하지 않게 보관하여 실험에 사용하였다.

2) 세포독성 측정

(1) Mouse Lung Fibroblast cells (mLFCs) 배양

BALB/c 생쥐의 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하였다. Tube에 다시 DMEM {containing collagenase A (5mg/ml, BM, indianapolis, IN, U.S.A.)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 10⁴U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml)}를 넣고 37 $^{\circ}$ C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하여 30분간 계속 배양하였

다. 배양 후 인산완충생리식염수로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에서 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC 세포를 분리한 후 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵cells/ml 농도로 96well plate에 분주하였다.

(2) SRB assay

세포 독성 측정 방법은 SRB assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFCs 세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 ELL을 D-PBS에 현탁하여 최종 농도 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10%를 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 μ l를 가하고 1시간 동안 4 $^{\circ}$ C에 방치하였다. 이를 다시 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 μ l/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 45회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100 μ l/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A.)에서 3.5speed로 5분간 shaking하고, ELISA reader (Molecular devices, U.S.A.) 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 피부염 유도 및 시료 처리

11주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 제모가 끝나면 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 그리고 1% Dinitrochlorobenzene (DNCB) 용액 (아세톤:올리브오일=3:1) 200 μ l를 등 부위에 도포하였고, 4일 후, 1주일에 2-3번씩 0.2% DNCB 용액 150 μ l를 등 부위에 도포하였다 (12주부터 20주).

이렇게 8주 처리한 다음 피부염이 충분히 유발되어 등 부위의 가피가 모두 벗겨지고, 이 부위에 새로운 피부염이 형성되면서 긁는 행동이 심화되면 DNCB 처리를 중단하고, 관능 평가를 실시하였다.

4) 관능평가

DNCB를 도포하여 피부염이 유발된 생쥐를 2개의 그룹으로 나누고, 대조군에는 생리식염수를, 실험군에는 ELL을 (0.025%/100 μ l/day)을 8주간 (12주에서 20주까지) 도포하였다. 도포한 후 일반적으로 사용되어지는 임상 육안적 방법으로 관능 평가를 4주 간격으로 실시하였다²⁵⁾.

육안 평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었다. 평가 항목은 홍반 (erythema), 가려움과 건조 피부 (Pruritus & Dry Skin), 부종과 혈종 (Edema & escoriation), 짓무름 (Erosion), 그리고 태선화 (Lichenification)로 나누었다. 이 각각의 항목은 없음 (0), 약함(1), 중증도(2), 심함(3)으로 채점하였다. 일반적으로 DNCB를 이용해 피부염을 유발할 경우, 약 12-13점이면 피부염이 최고조에 달했다고 판단한다.

5) 사이토카인 생성량 측정

(1) 비장 세포 배양액의 사이토카인 측정

Spleen cell ($2 \times 10^6/\text{mL}$)을 anti-CD28 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)과 anti-CD3 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)으로 24-well Costar 접시 (Corning Inc, Cambridge, Mass)에서 coating하여 48시간 동안 동시 배양 한 후, Interleukin-4(IL-4), Interleukin-13(IL-13), Interferon- γ (IFN- γ) 생성량을 ELISA kit로 측정하였다.

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. 염증 사이토카인 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard를 G3PDH를 사용하였으며, primer의 최종 농도가 200nM이 되게 반응시켰다.

Pre-denaturation은 2min at 50°C, 10min 94°C, 그리고 40 cycles을 0.15min at 95°C, 1min at 60°C에서 수행하였다. ELL 투여군과 대조군은 internal standard로는 G3PDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정하였다.

$$y = x(1+e)^n$$

(x = starting quantity, y = yield, n = number of cycles, e = efficiency)

6) 면역글로불린 측정

시료 투여 시점인 8주와 12주, 16주, 그리고 20주에 생쥐의 눈에서 capillary tube를 이용하여 약 100 μL 의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500rpm에서 20분간 원심분리한 후 30 μL 의 혈청을 분리하였다(IgG1은 IgE 상승을 확인한 것으로 20주차에 단회만 측정함). 혈청은 취하여 실험에 이용할 때 까지 -70°C에 냉동 보관하였다. 혈청내 IgE, IgG 측정은 Enzyme-linked immuno-sorbent

assay (ELISA, Endogen, USA)와 ELISA kit (R&D system)를 사용하였다. 각 항체를 coating 완충 용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight 하였다. 각 well을 3회 washing 완충 용액으로 세척한 후 폐포 세척액과 혈청(100배 희석)을 100 μL 씩 분주하였다. 이를 1시간 동안 실온에서 방치한 후 washing 완충 용액으로 2회 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μL 를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μL 씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μL 의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

III. 실험 결과

1. 세포독성에 미치는 영향

본 실험에서 ELL의 아로마 오일이 정상세포에 미치는 영향을 SRB 법으로 측정하여 안정성 여부를 관찰하였다. mLFCs을 96well plate에 5×10^4 세포로 분주하여 sub-culture 한 후 Eucalyptus, lemon, lavender와 이것을 혼합한 ELL을 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10%의 농도로 48시간 동시 배양한 후 SRB 법으로 세포독성을 분석한 결과, 시료를 처리하지 않은 상태인 대조군의 세포생존율은 $100.0 \pm 5.2(\%)$ 로 나타났다. 한편 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10%의 농도로 처리한 실험군은 각각 대조군에 비하여 처리한 0.5%이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1).

2. Nc/Nga 생쥐에 유발된 아토피 피부염 억제 효과

본 실험에서 ELL의 아토피 피부염 억제 작용을 조사하기 위하여 Nc/Nga 생쥐를 이용하여 조사하였다. DNCB를 제모한 피부에 도포하여 피부염을 유발하였으며, 대조군에는 생리식염수를, 실험군에는 ELL 0.025%의 농도로 매일 도포하여 피부염 지수를 측정하였다. Fig.2에서 보

는 바와 같이 DNCB를 NC/Nga mouse에 8주간 도포하고 최종 등피부에 나타난 소양행동을 동반한 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 단계를 0(none), 1(mild), 2(moderate), 3(severe)로 개체마다 평가 기록하여 피부 발진 점수로 평가한 결과 대조군의 skin clinical score는 DNCB를 도포하지 않은 정상군 (NC/Nga-Nr)에 비하여 10배 이상 skin clinical score 값이 증가하였고 ELL 도포군은 대조군에 비해 3배 이상 유의성 있게($p < 0.001$) 감소하였다(Fig. 2).

3. 혈청 면역글로블린 수치에 미치는 영향

본 실험에서 ELL이 Th2 cell에 관여하는 IgE와 IgG1의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NC/Nga 생쥐의 눈에서 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하여 생성량을 측정된 결과, IgE와 IgG1 생성량은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타내었다(Fig. 3).

4. 사이토카인 발현에 미치는 영향

본 실험에서 ELL의 사이토카인 생성 조절 작용을 보면, Th2 사이토카인에 대하여는 비장 세포 배양액 중의 IL-4와 IL-13 생성이 억제 된 것을 확인할 수 있었다. Th1 사이토카인에 대하여는 비장 세포 배양액 중의 IFN- γ 생성이 유의성 있는 증가를 확인할 수 있었다

IV. 고찰

현재 전 세계적으로 수많은 사람들이 아토피성 피부질환으로 고통 받고 있으며, 아토피 피부질환은 주로 유아와 소아에 발생하는 만성적 또는 재발성 염증 피부질환으로^{9,10}, 아직까지 정확한 원인을 규명하지 못하고 있다. 아토피피부염은 유전적인 가족력과 음식섭취 등으로 인한 생활·환경의 영향과 파괴된 피부층을 통해 유입된 항원 물질에 대한 면역반응으로 혈중 IgE 항체의 수준이 증가함으로써 나타나는 복합적 질환으로 알려져 있으며¹¹⁻¹², 만성 재발성 습진 질환으로 유전학적 요소, 환경 요소, 피부장벽의 이상과 면역반응의 이상이 함께 작용하여 피부의 습진성 변화, 심한 소양증과 함께 이차적인 태선화를

일으킨다. 아토피피부염의 병인은 정확히 밝혀지지 않았으나 피부의 면역 반응의 이상이 주요한 기전으로 생각되고 있으며 과민 반응을 보이는 T 세포, 높은 친화력을 가진 IgE 수용체를 발현하는 수지세포(dendritic cell), Th1과 Th2의 불균형과 선천성 면역의 이상 등이 주요한 원인으로 여겨지고 있다. 원인을 규명하고자 하는 학술적 노력보다도 더 현실적인 것은 중등도 이상의 아토피피부염은 사회적, 경제적, 정신적인 측면에서 환자의 삶의 질을 현저하게 떨어뜨린다는 사실이다. 아토피피부염의 증가로 자연친화적인 생활양식에 대한 관심과 요구가 높아지면서 최근에는 자연치유요법에 대한 관심과 이를 실제 임상에 적용하려는 여러 종류의 대체요법들이 새롭게 부각되고 있다. 그러한 방법들 중의 하나로서 아로마테라피는 그 효능성과 접근성 및 편리성에서 가장 대중적인 대체요법으로 자리 잡고 있다. 이러한 관점에서 본 연구에서도 아로마를 이용한 아토피 질환 억제효과를 규명하고자 하였다. 구체적으로 아토피질환환자의 피부발진과 유사하게 항원에 의하여 피부질환을 유도하는 동물실험 모델을 사용하여 ELL을 도포하여 효능을 알아보았다 피부질환환자와 같은 발진유발을 위하여 DNCB를 알러젠으로 반복 도포하여 NC/Nga 생쥐를 아토피피부발진동물모델로 사용하여 ELL의 피부발진억제 효과를 관찰하였다. 우선 아로마 오일의 독성검사를 실시하였다. 독성이 있는 물질은 세포의 증식·분화·기능을 저해하고, 세포분열을 할 때 염색체 복제 이전 단계에서 염색체의 활성을 억제한다고 알려져 있다³. SRB assay는 세포 단백질 염색을 이용하여 세포증식이나 독성을 측정하는 방법으로¹⁴ 아로마 오일인 유칼립투스, 레몬, 라벤더와 이것을 혼합한 ELL오일에서는 독성이 없음을 나타내었고, 임상 피부평가 수치 (skin dryness, erythema, edema, erosion)에서는 효과적으로 피부염 수치를 감소 시켰다.

Mouse 면역 시스템에 관련이 있는 세포 중에 두 종류의 helper T cell (Th)이다. 그리고 이들 세포들이 생산하는 cytokine의 종류에 의해 다시 Th1과 Th2 등의 subtype으로 분류되어 진다¹⁵. 이중 아토피는 Th2의 활성화에 기초를 둔 면역 시스템 이상반응으로 특징지어진다. 즉, 미분화된 Th cell이 Th2로의 분화가 과다 촉진되면서 발생되기 시작한다고 알려져 있고, 이때 Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-13, IL-9과 IL-10 등과 같은 cytokine을 생산하게 되고¹⁶, 이중 IL-4와 IL-13은 mouse에서 IgE와 IgG1의 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다⁷. 아토피는 Naive T cell에서 Th2 cell로 분

화되고, Th1은 Th2가 생산하는 IL-4등의 cytokine의 자극으로 Th에서 Th1으로 전환되어야한다. 그러나 전환되지 못하고, 이 과정에서 Th2에서 생산된 IL-4, IL-5, IL-9 및 IL-13등의 cytokine에 의해 B cell에서 IgE 생산을 촉진하고 비만세포 (mast cell)를 탈 과립화시키고, 호산구(eosinophil)등을 활성화 시켜 혈액 내 IgE의 함량이 증가와 histamine과 같은 cytotoxic 물질들의 농도가 증가하면서 각종 염증 반응들이 진행되는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. Th2 cell의 경우 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 cytokine만을 특이적으로 발현하며, 이러한 Th2 cell의 경우 eocinophil의 증식시켜 mast cell과 basophil을 자극하여 세포내에 수용성 물질의 방출을 유도한다. 그리고, B cell이 isotype switching을 유도하여 IgE나 IgG1과 같은 면역글로블린의 분비를 촉진시킨다¹⁹⁾. ELL은 이러한 면역글로블린의 분비를 대조군보다 현저하게 감소시켰다.

최근 연구에서도 Th1세포와 Th2 세포는 각기 특징적인 싸이토카인의 발현을 통해 서로 상반되는 면역기능을 담당한다. Th2 cell 경우 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 cytokine만을 특이적으로 발현하며, 이러한 Th2 cell의 경우 eocinophil의 증식시키며 mast cell과 basophil로 하여금 세포내에 수용성 물질의 방출을 유도하는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾.

또한, Th1 세포의 경우 특이적으로 IFN- γ , TNF- α , IL-2와 같은 싸이토카인을 발현하며 pro-inflammatory 혹은 cell-mediated immune response를 담당하고 있다²⁰⁾, 이러한 Th1 세포는 면역계에서 CD8 T+ 세포를 활성화 시키고, macrophage의 활성화 및 DTh에 중요 기능을 담당하고 있다. 또한 B 세포를 자극하여 IgM, IgG2a, IgG2b와 같은 항체를 특이적으로 생산하도록 유도한다고 알려져 있고²¹⁾, ELL의 Th1세포와 Th2 세포는 각기 특징적인 싸이토카인의 발현을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 미루어 ELL은 인체에서도 Th1세포와 Th2 세포의 조절 및 IgE 생성량 억제를 통하여 항아토피 효능을 발휘할 수 있을 것으로 추측되며 이를 위한 임상연구가 활발히 이루어져야 할 것으로 생각된다. 또 이를 위하여 에센셜 오일들 간의 최적 배합에 대한 보다 심도 있는 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

아토피질환 환자의 피부발진을 DNCB의 항원을 반복 도포하여 동물실험모델을 만들어 ELL의 효능검사를 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. ELL의 아로마 오일은 0.5%이하의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다.
2. ELL이 아토피 피부염 억제 작용에서 임상스코어 상 피부염을 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
3. ELL이 혈청 면역글로블린 IgE와 IgG1 생성량을 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
4. ELL이 Th2 사이토카인인 IL-4와 IL-13 생성량을 유의성 있게 억제시켰고 Th1 사이토카인인 IFN- γ 생성량을 유의성 있게 증가시켰다.

이상의 결과에서 라벤더, 레몬, 유칼립투스 혼합 에센셜오일은 Th2 관련인자의 조절을 통해 아토피 피부염 유발 동물모형에 대해 효과가 있을 것으로 추정된다.

VI. 참고문헌

1. 공남미, 지선영. 아토피 피부염의 양·한방적 고찰 대한외관과학회지, 1999; 12(1);241-53.
2. 김덕곤 외, 동의소아과학, 서울, 정담, 2002.
3. 이희정, 박창욱, 이주희, 이광훈, 아토피 피부염 환자에서 독세핀 크림 국소도포요법의 소양증 경감 효과에 대한 연구, 대한피부과학회지, 2006;44(3):309-14
4. Guin JD. Complications of topical hydrocortisone J Am Acad Dermatol 1981;4:4(4)17-22.
5. Sugano, H Psychology and Biology of Fragrance I Chapman and Hall 1990
6. 김선미, 한현정, 김현숙. 프로페셔널 아로마테라피 서울:현문사 2004.
7. Battaglia, S. The Complete Guide to AromaTherapy(2ed) Brisbane Australia : The International Centre of Holistic AromaTherapy 2003.

8. 김해남, 김봉남. 에센셜 오일의 항균효과 관한 연구. 한국미용학회지, 2003;9(2):40-51.
9. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004;113(2):651-7.
10. Heinzmann A, Daser A. Mouse models for The genetic dissection of atopy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127(3):170-80.
11. Rousset F, Rorbert J, Andary M, Bonnin JP, Souillet G, Chretien I, Briere F, Pene J, de Vries JE. Shift in interleukin-4 and interferon-gamma priduction by T cells of patients wiTh elevated serum IgE levels and The modulatory effects of These lymphokines on spontaneous IgE synThesis. *J Allergy Clin Immunol.* 1991 ;87(1 Pt 1):58-69.
12. Van der Kleij HP, Kraneveld AD, van Houwelingen AH, Kool M, Weitenberg AC, Redegeld FA, Nijkamp FP. Murine model for non- IgE-mediated asThma. *Inflammation.* 2004;28(3):115-25.
13. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(13):1107-12.
14. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger Th, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growTh and drug sensitivity in culture using human and oTher tumor cell lines *Cancer Res* 1988;48(17):4827-33.
15. Mosmann T, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T-cell clones Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57.
16. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H: Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating paThogens by gamma delta T cells in vivo *Nature.* 1995 ;373(6511):255-7.
17. Aversa G, Punnonen J, Cocks BG, de Waal Malefyt R, Vega F Jr, Zurawski SM, Zurawski G, de Vries JE: An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits boTh IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synThesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors *J Exp Med.* 1993;178(6):2213-8.
18. Romagnani S: immunologic influences on allergy and The Th1/Th2 balance *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(3):395-400.
19. H Matsuoka, N Maki, S Yoshida, M Arai, J Wang, Y Oikawa, T Ikeda, N Hirota, H Nakagawa, A Ishii. A mouse model of The atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinae.* *Allergy.* 2003;58(2):139-45.
20. Gor, DO, Rose NR, and Greenspan NS Th1-Th2: a Procrustean paradigm. *Nat Immunol.* 2003;4(6):503-05.
21. Feldmann, M, FM Brennan, and RN Maini, Role of cytokines in rheumatoid arThritis. *Annual Review of Immunology.* 1996;14(1):397-440.

Table 1. Primer sequences used for real-time reverse transcription polymerase chain reaction

mouse IL-13	sense primer	5' atgcccaacaagcagagac 3'
	antisense primer	5' tgagagaaccaggagctgt 3'
mouse IL-4	sense primer	5' acaggagaaggagcgcct 3'
	anti- sense	5' gaagccctacagacgagctca 3'
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)	sense primer	5' tgcgctctagaaaaacctgcca 3'
	antisense primer	5' gccccaggctcaaagtg 3'
mouse interferon- γ	sense primer	5' tcaagtggcatagatgtggaagaa 3'
	antisense primer	5' tggtctctgaggatttcatg 3'

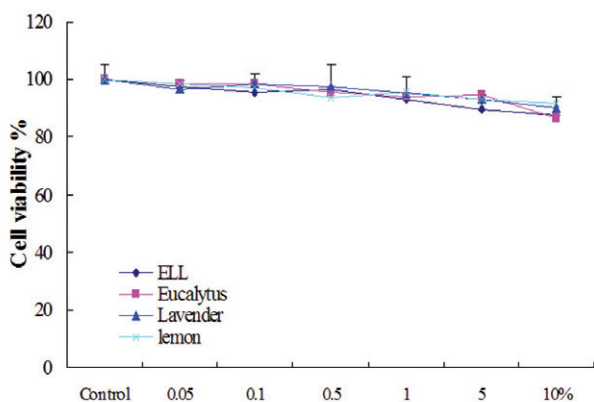


Fig. 1. Effects of ELL on the cell viability of mouse lung fibroblast

Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were cultured with various concentration of eucalyptus, lemon and lavender, ELL for 48 hr and the cell viability was measured by SRB method. The results were presented by the mean \pm S.E.

ELL = Lavender, Lemon, Eucalyptus and Carrier Oil

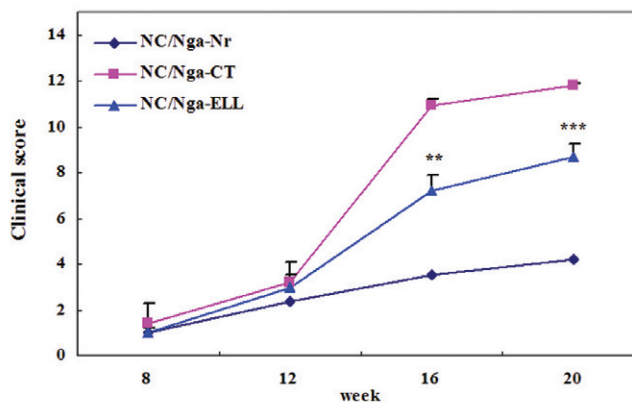


Fig. 2. Effects of ELL on clinical skin features and severity in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice.

Clinical severity score of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0(non-e), 1(mild), 2(moderate) and 3(severe) for each of five signs and symptoms (itch, erythema/hemorrhage, edema, excoriation/erosion and scaling/dryness): Symptoms were evaluated by skin dryness, eruption and wound on the three parts of the body: ear, face and head, and back. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT mice group by t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Nr=Normal, CT=Control, ELL=Lavender, Lemon, Eucalyptus and Carrier Oil

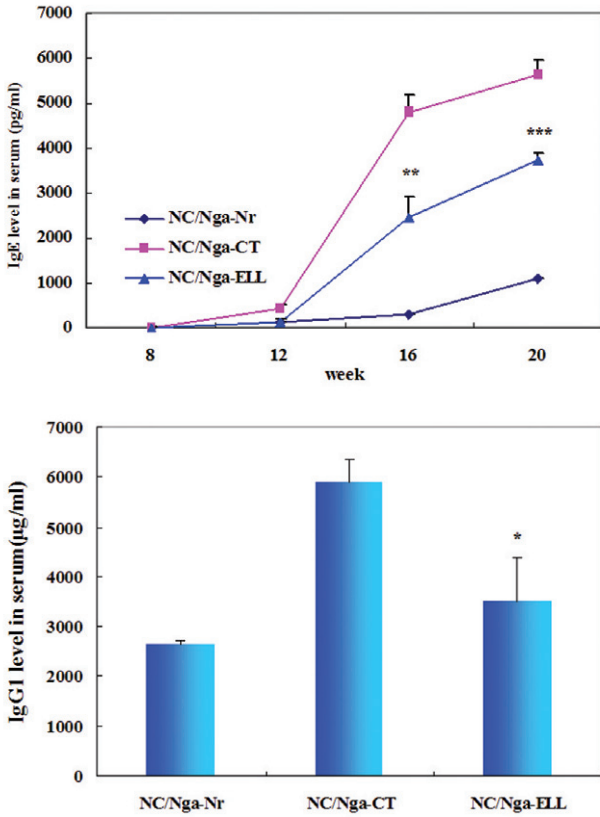


Fig. 3. Serum IgE & IgG1 elevation and development of atopy dermatitis skin lesions-induced in NC/Nga mice by DNCB. Atopic dermatitis NC/Nga mice was induced by DNCB treatment in the dorsal skin, before The treatment of DNCB (NC/Nga-Nr), DNCB treatment for 8 weeks (NC/Nga-CT), DNCB treatment for 8 weeks with ELL-ointment (NC/Nga-ELL). Statistically significant value compared with DNCB-CT group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Nr=Normal, CT=Control, ELL=Lavender, Lemon, Eucalyptus and Carrier Oil

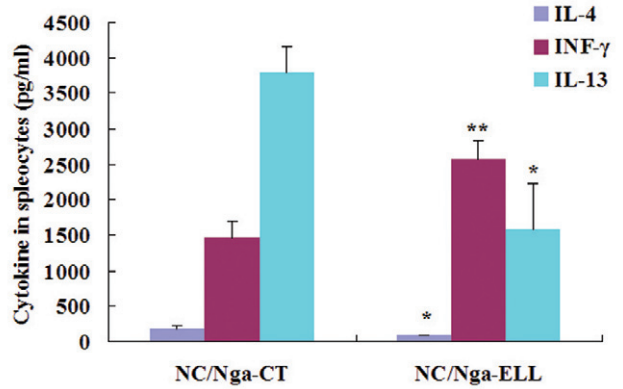


Fig. 4. Effects of ELL on the production of cytokines in spleocytes of DNCB-induced dermatitis model of mice. The levels of IL-4, IL-13 and INF-γ in the culture supernatant were measured using IL-4, IL-13 and INF-γ ELISA kit, respectively. The values represent the mean S.E of four mice. Statistically significant value compared with NC/Nga mice group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).