

산수유 추출물의 compound 48/80에 의한 비만세포 활성화와 혈관 투과성 억제효과

임정민, 이광소, 채옥희, 송창호

전북대학교 의과대학 해부학교실 및 전북대학교 부설 알레르기성 면역질환 연구센터

간추림 : 비만세포(mast cell)는 알레르기 질환의 병태생리에 중요한 역할을 한다. 비만세포의 활성화를 억제하는 물질들을 이용하여 알레르기 질환의 증상을 개선하고 예방하고자 노력하고 있다. 이 연구는 산수유 추출물이 비만세포의 활성화를 억제하는지와 그 억제작용의 약리기작을 밝히기 위하여 실시되었다. 흰쥐의 복강비만세포를 이용하여 compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립, 히스타민 유리, 세포내로의 칼슘유입, cAMP 양의 변화 및 혈관 투과성에 있어서 산수유 추출물이 미치는 영향을 관찰하였다. 산수유 추출물의 전처리에 의하여 compound 48/80에 의한 복강 비만세포의 탈과립과 비만세포로부터의 히스타민 유리, 비만세포내로의 칼슘유입이 억제되었다. 복강 비만세포내 cAMP 수준이 산수유 추출물에 의해 증가되었고, compound 48/80에 의한 세포내 cAMP 수준의 감소가 산수유 추출물의 전처리에 의해 억제되었다. 또한 compound 48/80으로 피부반응 유발 시 증가된 혈관 투과성이 산수유 추출물 전처리로 억제되었다. 이상의 결과로 산수유 추출물은 compound 48/80에 의한 비만세포 활성화와 혈관 투과성을 억제하는 성분을 함유하고 있다고 생각된다.

찾아보기 낱말 : 비만세포, 산수유, compound 48/80, 히스타민, 칼슘, cAMP

서론

산수유(*Corni fructus*)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 낙엽소교목인 산수유나무(*Cornus Officinalis*)의 붉은색 열매에서 씨를 제거한 것을 말한다. 옛날부터 중요한 한약재로 많이 사용되어 왔으며, 술의 원료로 많이 이용되어 왔다. 산수유는 면역계통에 있어 비특이성 면역기능을 증진시키는 작용이 있으며 항산화, 항균, 항암, 항염, 항바롬작용이 있고 간경·신경에 좋고 이뇨, 혈압강하, 단백질의 소화를 돕는 작용 등이 있다고 알려져 있다(김대식 등 1996, 서권일 등 1999, 서영배 등 2002). 산수유의 항알레르기 효능에 대한 연구로 산수유의 추출물이

기니아 피그에서 항히스타민 작용과 항아세틸콜린 작용이 있으며, 산수유 추출물이 마우스를 이용한 생체실험에서 수동피부 아나필락시스 반응을 억제하며 히스타민과 세레토닌, 키닌 등의 매개물질 생성을 억제시킨다고 보고되었다(서영배 등 2002). 최근 서영배 등(2002)이 산수유의 항알레르기 효과에 대한 연구에서 산수유 추출물을 처리하였을 경우 염증성 질환인 알레르기에 일정한 효과가 있음을 보고 하였다.

한편, 알레르기 병태생리에 관여하는 비만세포는 Ehrlich(1877)에 의해 처음 관찰, 명명된 이래 탈과립 유발 인자들과 억제인자들에 대한 연구를 통하여 아토피성 피부염, 기관지 천식 및 알레르기 비염 등 여러 알레르기 질환들을 예방하거나 치료할 수 있는 적합한 약물을 개발하는데 많이 이용되고 있다(Ludwyk 및 Lagunoff 1985, 채옥희 등 1996, Lee 등 1999, Sin 및 Kim 2000). 비만세포는 결합조직에

*본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: 02-PJ1-PG1-CH01-0006).
교신저자: 송창호(전북대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: asch@chonbuk.ac.kr

널리 분포하고 있으며 다른 세포와 달리 크고 굵은 이염색성의 과립을 함유하고 있고, 면역학적 또는 비면역학적 자극에 의하여 세포질 과립에 저장된 매개물질들(히스타민, 헤파린, 프로테아제, 가수분해 효소 등)과 많은 사이토카인들을 분비하여 여러 면역반응과 염증 반응 등에 관여한다(Galli 등 1993, Nilsson 등 1999). 또한 비만세포는 각 장기와 조직에서 그 수의 증감과 탈과립 과정을 통해 과민반응(hypersensitivity), 자가면역질환(autoimmune diseases), 종양(neoplasia) 등의 많은 질병의 병태생리에 관여한다(이영훈 등 2000). 비만세포의 활성화를 유도하는 인자들 가운데 강력한 분비촉진제 중 하나가 compound 48/80(Tasaka 등 1991, Yoshii 등 1991, Sin 등 2002)이다. Compound 48/80에 의한 비만세포 활성화 기전은 세포막에 작용하여 세포밖의 칼슘을 세포내로 유입시키고 세포내 자유칼슘을 증가시켜 2차 신호전달자들인 cAMP(cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate)와 cGMP(cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate)를 조절하여 비만세포의 탈과립과 히스타민을 유리시킨다(Lee 등 1999).

이 연구는 염증반응과 알레르기성 질환의 병태생리에 중요한 역할을 하는 비만세포의 활성화를 산수유 추출물이 억제하는 지와 그 억제기전을 밝히기 위하여 실시되었다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 체중 250~300g의 건강하고 성숙한 Sprague-Dawley계 흰쥐(다물사이언스, 대전)를 암수 구별 없이 사용하였다. 이들 실험동물은 수돗물과 사료(제일사료주식회사, 대전)를 공급하고 가능한 스트레스를 받지 않도록 주의하여 조용한 분위기에서 사육하였다.

2. 실험재료 및 측정방법

산수유 물추출물은 다음과 같이 제조하였다. 건조된 산수유(장수제약사, 장수) 200g에 증류수 1,500

mL을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 추출액(Corni Fructus)을 여과지(filter paper 2; Advantec, Tokyo, Japan)로 여과시켰다. 여과된 추출액을 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator; Eyela, Tokyo Rikakikai Co. Ltd.)를 사용하여 수분을 제거한 다음 동결건조하여 분말을 얻었다. 실험목적에 따라서 산수유 추출 분말을 2차 증류수 또는 생리식염수에 적당한 농도로 녹인 후 pH 7.4로 적정하여 사용하였다.

3. 실험방법

1) 복강비만세포의 수확

채옥희 등(1999a)의 방법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 흰쥐를 에테르로 마취시켜 희생시킨 후 약 10 mL의 HEPES-Tyrode 완충액(136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0.6 mM NaH₂PO₄, 2.75 mM MgCl₂, 5.4 mM HEPES, 1.0 mg/mL bovine serum albumin, 1.0 mg/mL glucose, pH 7.4)을 흰쥐의 복강내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 마사지하였다. 복벽 중앙선을 절개하고 복강 세척액을 스포이드로 채취하여 200×g로 10분 간 원심시킨 후 상층 부유액을 버리고, HEPES-Tyrode 완충용액으로 비만세포 수가 1×10⁶ cells/mL 되도록 재부유시켜 실험에 사용하였다. 복강 비만세포 부유액으로부터 비만세포의 순수분리는 Hachisuka 등(1988)의 방법을 이용하여 분리하였다.

2) 세포독성 실험

산수유 추출물의 세포독성을 알아보기 위해 복강비만세포(2×10⁵ cells in 0.2 mL)를 수확한 후 HEPES-Tyrode (25 μL)만을 처리하거나 산수유 추출물(25 mg/mL, 25 μL)을 처리한 후 37°C에서 배양하면서 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간에 세포 생존 여부를 Trypan blue(Gibco, USA)를 이용한 Temkin과 Levi-Schaffer(2001)의 방법을 이용하여 측정하였다. 복강 비만세포를 수확했을 때의 생존을 100으로 놓고 생존율을 계산하였다.

3) 비만세포의 약물반응 실험

산수유 추출물 자체가 비만세포의 활성화에 미치

는 영향을 보기 위해서, 복강 비만세포(1×10^6 cells/mL) 부유액을 200 μ L에 다양한 농도의 산수유 추출물(0.2, 1.0, 5.0 또는 25 mg/mL) 25 μ L를 넣어 37°C 항온조에서 10분 동안 반응시키고 다시 HEPES-Tyrode 완충용액 25 μ L를 첨가 후 37°C 항온조에서 20분 동안 반응시켰다. 산수유 추출물이 compound 48/80 (Sigma, U.S.A.)에 의한 비만세포 활성화를 억제하는 것을 확인하기 위하여, HEPES-Tyrode 완충용액 25 μ L 또는 다양한 농도의 산수유 추출물을 25 μ L를 넣어 37°C 항온조에서 10분 동안 반응시키고 다시 compound 48/80 용액 25 μ L를 첨가하여 20분 동안 반응시켰다. 이렇게 반응시킨 다음 비만세포로부터 히스타민 유리량과 비만세포내로의 칼슘유입, 비만세포내 cAMP 수준변화를 측정하였다.

4) 비만세포 탈과립 관찰과 탈과립을 산출

비만세포의 형태와 탈과립 유무를 관찰하기 위하여 반응이 끝난 비만세포가 들어 있는 복강 부유액 20 μ L를 슬라이드글라스(slide glass)위에 올려 놓은 후 비만세포가 침전될 수 있도록 실온에서 10분간 정지시켰다. 도립 광학현미경 (American Optical, USA)으로 1,000배의 배율 하에서 비만세포를 다음과 같이 관찰하여 정상형과 탈과립형으로 구분하였다. 대부분 복강 비만세포들은 원형 또는 난원형으로 세포질 안에 많은 과립들로 충만되어 있고, 세포 윤곽이 뚜렷하였다. 세포의 모양이 원형이나 타원형으로 세포윤곽이 분명하고, 세포질 내에 광굴절율이 높은 과립들로 충만된 상태를 정상형 비만세포로 구분하였다. 반면에 세포윤곽이 불분명하고 세포질 내 과립들이 세포표면으로 돌출되어 있거나 세포주위에 흩어져 있는 경우를 탈과립형으로 구분하였다. 실험군 당 임의로 선택한 10시야에서 관찰된 비만세포의 수를 세어, 다음과 같은 식에 의하여 탈과립율을 계산하였다. 탈과립율(%)=(탈과립된 비만세포수/비만세포 총수)×100

5) 복강 비만세포로부터 히스타민 유리량의 측정

히스타민 측정은 채옥희 등(1999a)과 Harvima 등(1988)의 방법을 이용하였다. 히스타민 양은 히스타민 표준곡선을 이용하여 산출하였고 히스타민 총량

에 대한 백분율로 표시하였다. 총 히스타민 양은 비만세포 수가 1×10^6 cells/mL인 250 μ L를 100°C로 10분간 가열한 다음 원침시켜 얻은 상층액에서 측정된 히스타민 양을 100으로 정하였다. 히스타민 유리율 산출공식은 다음과 같다. 히스타민 유리율(%)=(실험군 히스타민 유리량/총 히스타민 유리량)×100

6) 비만세포내로의 칼슘 유입량 측정

칼슘유입량은 강경진 등(1993)의 방법을 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 위에서 기술한 방법대로 순수 복강 비만세포를 분리한 후 1 μ Ci $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /mL (PerkinElmer Life Science, Inc., U.S.A.)을 포함하는 Ca^{2+} , Mg^{2+} free HEPES-Tyrode 완충액(HEPES-Tyrode 완충액에서 2 mM CaCl_2 와 2.75 mM MgCl_2 을 제외)에 재부유시켰다. 이 비만세포 재부유액을 이용하여 compound 48/80에 의한 탈과립 유도 반응 실험과 동일하게 반응을 시켰다. 원침 후 상층액을 버리고 1 mM 염화란타륨(LaCl_3)과 10% Triton×100을 넣어 비만세포를 파괴시킨 후 β -counter를 사용하여 칼슘양을 측정하였다.

7) 복강 비만세포내 cAMP 측정

순수 분리된 비만세포를 이용하여 위에서 기술한 대로 반응을 마친 다음, 복강 비만세포를 100°C에서 10분간 끓여 원침한 후, 상층액에서 cAMP 정량 측정하였다. cAMP 정량은 Holmgarrd (1982)의 방법에 기본적 원리를 둔 cAMP [^{125}I] radioimmunoassay kit (Du Pont Company, Wilmington, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

8) Compound 48/80에 의한 피부반응 유발 실험

피부반응 유발 실험은 전병득 등(1992)의 방법을 수정, 보완하여 다음과 같이 실시하였다. 수컷 흰쥐의 등쪽 피부의 털을 제거한 다음 등쪽 피부의 진피내로 생리식염수 또는 산수유 추출물(0.2, 1, 10 또는 100 mg/mL)을 각각 50 μ L를 주입하고 10분 후 compound 48/80 용액(5 μ L/mL)을 같은 자리에 50 μ L 주사하였다. 음성 대조군은 compound 48/80 용액 대신에 50 μ L의 생리식염수 또는 다양한 농도의 산수유 추출물을 주사하였다. Compound 48/80

용액 주사 후 20분이 경과한 뒤 0.5% Evans blue 용액 (Sigma, U.S.A.) 400 μ L를 흰쥐의 음경 등쪽정맥에 주입하였다. 피부반응 유발 여부와 양성반응 판정은 Evans blue 용액을 주입하고 30분 경과 후 등쪽 피부를 절개하여 진피 쪽에서 파란색 반점이 나타나는 지의 여부를 관찰하고 사진을 촬영하였다. 그리고 파란색 반점이 나타난 부위의 피부를 절취하여 그 무게를 측정하고, 세절하여 2 mL의 formamide용액 (Junsei, Japan)에 넣고 60°C 건조기에서 3시간 동안 Evans blue를 유출시켰다. 유출된 Evans blue 농도를 spectrophotometer (Spetra MAX plus, Molecular Devices, U.S.A.)로 620 nm에서 측정한 후 Evans blue 표준곡선에 준하여 Evans blue 농도를 산출하였다.

결 과

1. 산수유의 세포독성

산수유 추출물은 세포독성이 없었고, 오히려 생존율을 증가시켰다. HEPES-Tyrode 완충액으로 처리

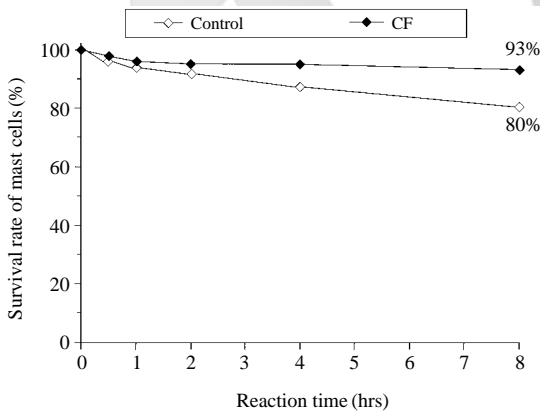


Fig. 1. The cytotoxicity of *Corni fructus* (CF) in rat peritoneal mast cells (RPMC) by using trypan blue test. RPMC (2×10^5 cells/0.2 mL) were treated with 0.025 mL of HEPES-Tyrode (control) or CF (final concentration; 2.5 mg/mL) at 37°C for 8 hrs. The survival rate of mast cells (%) was calculated by the following formula: (experimental survival rate/survival rate of control at 0 hr) \times 100. Data are represented as the mean (n = 6/point).

한 복강비만세포의 생존율은 30분에서 96%, 1시간에서 94%, 2시간에서 92%, 4시간에서 87%, 8시간에서 80%이었으며, 산수유 (25 mg/mL, 25 μ L)를 처리하였을 경우에는 생존율이 30분에서 98%, 1시간에서 96.2%, 2시간에서 95%, 4시간에서 95%, 8시간에서 93%이었다 (Fig. 1).

2. 비만세포의 형태와 탈과립 관찰

1) 복강부유액의 정상 비만세포

HEPES-Tyrode 완충용액에 부유된 비만세포의 대부분은 정상형이었다. 즉, 비만세포의 크기는 복강부유액내 림프구의 두배 정도였으며, 구형 또는 난원형이었고 세포 표면의 윤곽은 뚜렷하였다. 비만세포의 세포질에는 일반적으로 크고 광굴절율이 강한 과립들로 충만되어 있어 핵은 분명하게 관찰되지 않았지만 세포의 중앙에 위치하고 있었다. 도립광학 현미경으로 임의로 10시야를 선택하여 비만세포를

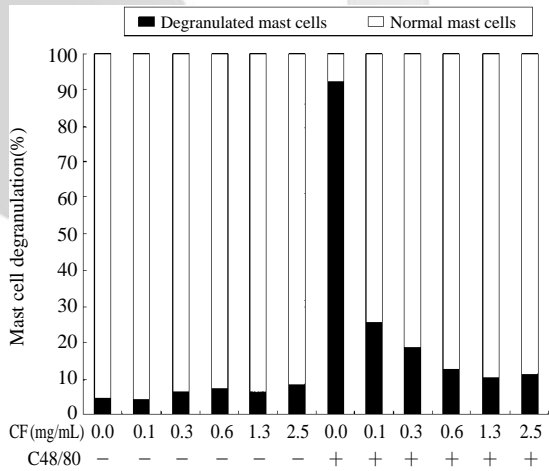


Fig. 2. Inhibitory effects of *Corni fructus* (CF) on compound 48/80 (C48/80)-induced mast cell degranulation. Rat peritoneal mast cells (RPMC, 2×10^5 cells/0.2 mL) were treated with 0.025 mL of HEPES-Tyrode, CF (final concentration; 0.1, 0.3, 0.6, 1.3 or 2.5 mg/mL), C48/80 (final concentration; 0.5 μ g/mL) or CF+C48/80 at 37°C for 30 minutes. The number of RPMC was counted by inverted microscopy (\times 1,000) in 10 fields. Mast cell degranulation (%) was calculated by the following formula: (number of degranulated mast cells/total number of mast cells) \times 100. Data are represented as the mean (n = 6).

정상형과 탈과립형으로 구분하여 관찰하였다. 정상형의 비만세포는 95.6%이었으며, 탈과립된 비만세포는 4.4%로 대부분의 비만세포가 정상형이었다 (Fig. 2).

2) Compound 48/80 용액 처리 후 비만세포의 형태변화

비만세포 부유액에 compound 48/80(최종농도: 0.5 µg/mL)을 첨가한 후 수분 이내에 비만세포 세포질 내 과립들의 광굴절율이 약해지기 시작했으며, 비만세포의 가장자리가 불규칙하게 되면서 일부 과립들이 세포표면으로 돌출 되어 나와 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 또한 시간이 경과되면서 세포가 점차 커지고 동시에 세포질내 공포상의 구조가 보였으며, 광굴절율이 약화된 과립들이 세포표면으로 돌출되는 탈과립 현상이 관찰되었다. 이와 같은 비만세포 변화를 광학현미경으로 관찰하여 산출한 결과 비만세포 탈과립율은 92.1%이었다(Fig. 2).

3) 산수유 추출물 처리 후 비만세포의 형태변화

비만세포 부유액에 산수유 추출물을 첨가하였을 때 비만세포의 형태, 크기, 표면윤곽 등은 정상 비만세포와 유사하였으며 첨가 후 30분이 경과되어도 탈과립 현상은 관찰되지 않았다. 산수유 추출물(최종농도; 0.1, 0.3, 0.6, 1.25 또는 2.5 mg/mL)을 단독 처리 후 비만세포의 탈과립율은 각각 4, 6, 7, 6, 8%였다(Fig. 2).

4) 산수유 추출물 전처리 후 compound 48/80을 처리한 비만세포의 형태변화

비만세포 부유액에 산수유 추출물을 10분간 처리한 후 compound 48/80 용액을 첨가한 1분 후에 형태, 크기, 표면윤곽 등에서 완충용액에 부유된 정상 비만세포와 유사하였다. 20분이 경과된 후 소수의 비만세포들에서 세포막의 불연속성과 약간의 광굴절율 감소, 과립들의 돌출 현상들이 관찰되었다. 그러나 대부분의 비만세포들에서는 compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립 현상이 관찰되지 않았다. 산수유 추출물(최종농도: 0.1, 0.3, 0.6, 1.25 또는 2.5 mg/mL)을 전처리하고 compound 48/80(최종농도: 0.5 µg/mL)을 처리한 경우 비만세포 탈과립율은

각각 25.3, 18.2, 12, 10, 11%였다. 이때 비만세포 탈과립은 산수유 추출물 농도의존적으로 억제되었다 (Fig. 2).

3. 비만세포로부터 유리된 히스타민 양의 측정 결과

Compound 48/80용액에 의한 흰쥐 복강 비만세포로부터 히스타민 유리는 산수유 추출물을 전처리함으로써 억제되었다. 흰쥐 복강 비만세포로부터 유리된 히스타민 양의 측정결과는 다음과 같다. 정상비만세포에서 히스타민 유리율은 5.2±0.7%였으며, 복강 비만세포 부유액에 산수유 추출물(최종농도; 0.02, 0.1, 0.5 또는 2.5 mg/mL)을 처리하였을 경우에 히스타민 유리율은 각각 6.3±0.1, 3.5±0.3, 3.3±0.3, 5.9±1.5%로 정상비만세포의 유리율과 비슷하였다. 복강 비만세포 부유액에 compound 48/80(최종농도: 0.5 µg/mL)을 처리하였을 때 히스타민 유리율은

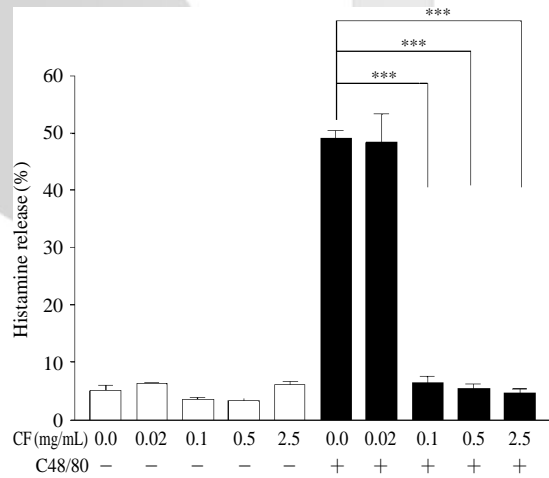


Fig. 3. Inhibitory effects of *Corni fructus* (CF) on compound 48/80 (C48/80)-induced histamine release from rat peritoneal mast cells (RPMC). RPMC (2×10^5 cells/0.2 mL) were treated with 0.025 mL of HEPES-Tyrode, CF (final concentration; 0.02, 0.1, 0.5, or 2.5 mg/mL), C48/80 (final concentration; 0.5 µg/mL) or CF+C48/80 at 37°C for 30 minutes. Histamine release (%) was calculated by the following formula: (experimental histamine/total histamine release) × 100. Data are represented as the mean ± SEM (n = 6). ***: $P < 0.001$

48.9±1.5%였으나, 산수유 추출물을 0.1 mg/mL 농도 이상으로 전처리하였을 경우에 농도 의존적으로 히스타민 유리가 감소되었다. 산수유 추출물(최종농도: 0.1, 0.5 또는 2.5 mg/mL)로 전처리한 후 compound 48/80을 처리할 때 히스타민 유리량은 각각 6.2±1.1, 5.3±0.8, 4.5±0.7%이었다(Fig. 3).

4. 비만세포내로의 칼슘 유입 측정 결과

Compound 48/80에 의한 복강 비만세포의 칼슘유입이 산수유 추출물을 전처리함으로 감소되었다. 복강 비만세포의 칼슘유입 측정 결과는 다음과 같다. 정상 비만세포의 칼슘 유입은 53.2±1.9 nM (in 1 × 10⁶ cells/mL)이었고, 산수유 추출물(최종농도: 0.02, 0.1 또는 0.5 mg/mL) 만을 처리하였을 경우 칼슘유입은 각각 55.8±3.0, 55.3±1.5, 41.1±0.5 nM로 정상 비만세포와 비슷하였다. 최종농도 2.5 mg/mL의 산수유 추출물에서는 비만세포의 칼슘유입은 22.8±0.5 nM로 정상 비만세포 보다 약간 감소되었다.

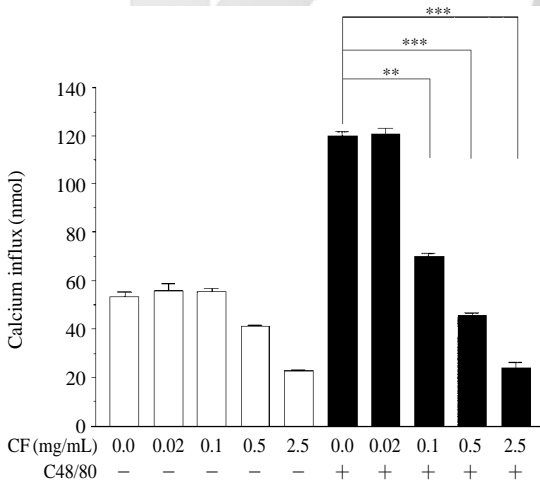


Fig. 4. Inhibitory effects of *Corni fructus* (CF) on compound 48/80 (C48/80)-induced calcium influx into the rat peritoneal mast cells (RPMC). RPMC (2 × 10⁵ cells/0.2 mL) were treated with 0.025 mL of HEPES-Tyrode, CF (final concentration; 0.02, 0.1, 0.5, or 2.5 mg/mL), C48/80 (final concentration; 0.5 µg/mL) or CF+C48/80 at 37°C for 30 minutes. Calcium influx are represented as the mean ± SEM (nmol/2 × 10⁵ mast cells, n = 6). **: P < 0.01, ***: P < 0.001

복강 비만세포 부유액에 compound 48/80을 처리하였을 때 유입된 칼슘의 양이 119.8±2.0 nM로 급격히 증가하였다. 반면에 산수유 추출물(최종농도: 0.1, 0.5 또는 2.5 mg/mL)로 전처리하고 compound 48/80을 처리하였을 때 칼슘 유입량은 각각 70.1±1.0, 45.6±1.0, 24.3±2.0 nM로, compound 48/80에 의해 증가된 칼슘유입이 산수유 추출물의 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 4).

5. 비만세포내 cAMP 수준 측정 결과

Compound 48/80에 의한 복강 비만세포내 cAMP 수준이 정상 비만세포 보다 감소되었으나 산수유 추출물로 전처리하였을 때에는 cAMP 수준이 정상 비만세포 보다 증가되었다. 복강 비만세포내 cAMP 수준 측정 결과는 다음과 같다. 정상 비만세포내 cAMP는 0.989±0.01 pmol (in 1 × 10⁶ cells/mL)였으

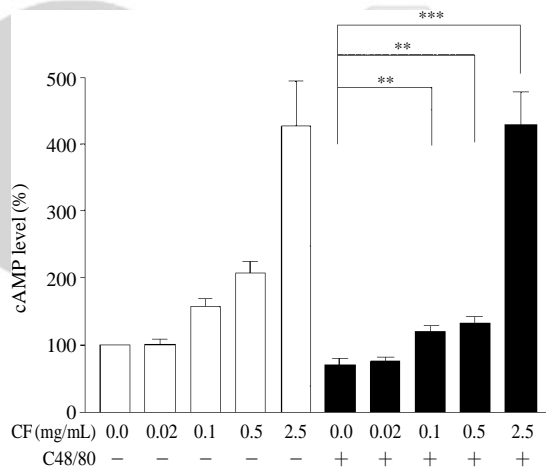


Fig. 5. Effects of *Corni fructus* (CF) on the compound 48/80 (C48/80)-induced decrease of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cAMP) levels in the rat peritoneal mast cells (RPMC). RPMC (2 × 10⁵ cells/0.2 mL) were treated with 0.025 mL of HEPES-Tyrode, CF (final concentration; 0.02, 0.1, 0.5, or 2.5 mg/mL), C48/80 (final concentration; 0.5 µg/mL) or CF+C48/80 at 37°C for 30 minutes. The levels of cAMP were measured as described in the Materials and Methods. cAMP level (%) was calculated by the following formula: (experimental cAMP level/cAMP level of HEPES-Tyrode treated control) × 100. Data are represented as the mean ± SEM (n = 6). **: P < 0.01, ***: P < 0.001

며 이를 100%로 기준을 삼았다. 최종농도 0.02, 0.1, 0.5 또는 2.5 mg/mL 산수유 추출물 만을 처리하였을 때 cAMP 수준은 각각 131, 178, 181, 526%로 정상 비만세포 보다 증가되었다. 복강 비만세포 부유액에 compound 48/80을 처리하였을 때 비만세포내 cAMP 수준은 0.642 ± 0.2 pmol (in 1×10^6 cells/mL)로 정상 비만세포 보다 감소되었다. 그러나 compound 48/80처리 시 감소되었던 cAMP 수준이 산수유 추출물(최종농도: 0.1, 0.5 또는 2.5 mg/mL)로 전처리한 후에 각각 122, 138, 438%로 증가되었다 (Fig. 5).

6. Compound 48/80에 의한 피부반응 유발실험 결과

Compound 48/80에 의한 흰쥐의 피부에서 혈관투과성이 산수유 추출물의 주입으로 감소되었다. 흰쥐의 등쪽 피부에서의 피부반응 결과는 다음과 같다. Compound 48/80 용액 (5 μ L/mL)을 주입한 경우 피부에서 파란색 반점이 관찰되었으나, 산수유 추출물 (1, 10 또는 100 mg/mL)을 주입한 다음 compound

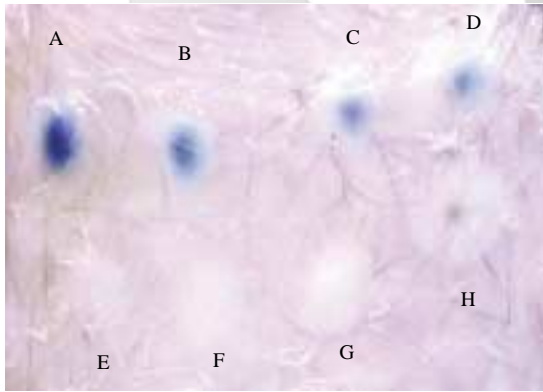


Fig. 6. Inhibitory effect of *Corni fructus* (CF) on the compound 48/80 (C48/80)-induced cutaneous reaction. The skin of Sprague-Dawley rats was injected intradermally with 50 μ L of normal saline, CF (1, 10 or 100 mg/mL), C48/80 (5 μ g/mL) or CF+C48/80. Twenty minutes after intradermal injection, 0.5% Evans blue solution injected via tail vein. The photograph of the internal surface in rat skin. A: C48/80, B: 1 mg/mL CF+C48/80, C: 10 mg/mL CF+C48/80, D: 100 mg/mL CF+C48/80, E: normal saline, F: 1 mg/mL CF, G: 10 mg/mL CF, H: 100 mg/mL CF

48/80 용액을 주입한 경우에는 파란색 반점의 크기가 감소되었다. 생리식염수 또는 산수유 추출물(1, 10 또는 100 mg/mL) 만을 주입한 경우에는 파란색 반점이 관찰되지 않았다 (Fig. 6). 이를 정량 측정된 결과는 다음과 같다. 생리식염수를 주입한 정상대조군에서 피부 조직내로 유출된 Evans blue의 양은 피부 조직무게 (그램) 당 8.4 ± 0.5 μ g이었다. 0.2, 1 또는 10 mg/mL의 산수유 추출물 만을 주입하였을 때에는 정상대조군과 비슷하게 각각 8.7 ± 0.2 , 8.3 ± 0.2 , 10.2 ± 1.3 μ g였으나 100 mg/mL의 농도에서는 15.5 ± 0.6 μ g으로 약간 증가하였다. Compound 48/80을 주입한 부위에서 조직내로 유출된 Evans blue의 양은 조직무게 (그램) 당 53.2 ± 3.9 μ g이었다. 그러나 산수유 추출물(1, 10 또는 100 mg/mL)을 주입한 후 compound 48/80을 주입한 부위에서는 피부 조직내로의 Evans blue 유출이 조직무게 (그램) 당 각각 39.1 ± 2.7 , 34.1 ± 1.9 , 33.5 ± 2.09 μ g으로, compound

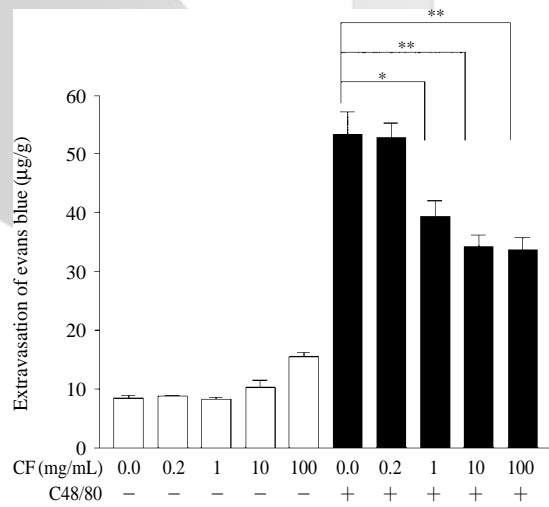


Fig. 7. Inhibitory effect of *Corni fructus* (CF) on the compound 48/80 (C48/80)-induced cutaneous reaction. The skin of Sprague-Dawley rats was injected intradermally with 50 μ L of normal saline, CF (0.2, 1, 10 or 100 mg/mL), C48/80 (5 μ g/mL) or CF+C48/80. Twenty minutes after intradermal injection, 0.5% Evans blue solution injected via tail vein. Extravasation of Evans blue (μ g/g) was measured as described in Materials and Methods. Data are represented as the mean \pm SEM (n = 6). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

48/80에 의해 증가된 혈관투과성이 산수유 추출물 전처리로 감소되었다 (Fig. 7).

고 찰

최근 생활환경의 변화로 알레르기 질환은 점차 증가되고 있다. 알레르기 질환으로는 알레르기성 비염과 천식, 알레르기성 결막염, 아토피성 피부염, 곤충알레르기, 식품알레르기, 구강알레르기, 정액알레르기, 알레르기성 접촉 피부염, 물리적 두드러기, 약물 알레르기 등이 있다(신태용 2001). 알레르기(allergy)는 과민반응(hypersensitivity reaction)이라는 면역반응들의 분류 중 하나로 제1형 과민반응과 동일시된다(김대식 등 2001). 제1형 과민반응은 IgE 항체와 비만세포(mast cell)에 의해 일어난다. 과민반응의 발생기전은 다음과 같다(Richard 등 1999). 항원 즉 알레르겐(allergen)에 노출되면 항원 특이 IgE가 생성되고, 생성된 IgE는 비만세포 표면에 있는 IgE에 대한 고도의 친화력을 갖는 수용체(FcεR I)에 부착한다. 다시 동일한 알레르겐이 인체내에 들어오면 비만세포의 수용체에 부착된 IgE의 교차결합이 형성된다. 이렇게 교차결합이 형성되면 비만세포 세포막에 phosphatidylcholine(PC)이 축적되어 세포막 유동성이 증가되어 세포막의 칼슘이 유입된다. 이 칼슘유입은 phospholipase A₂를 활성화시켜 PC가 arachidonic acid로 전환되도록 한다. arachidonic acid는 다시 강력한 매개물질로 전환되어 알레르기 반응을 유발한다. 마지막으로 교차결합은 세포막에 존재하는 adenylate cyclase를 활성화시켜 cAMP를 증가시킨다. 증가된 cAMP는 비활성 protein kinase를 활성화시키면서 감소되어진다. cAMP에 의해 활성화된 protein kinase는 과립의 물과 칼슘의 삼투압을 변화시켜 과립을 팽대시키고 세포막 융합을 유도한다. 이렇게 세포막에 존재하는 효소계가 활성화되어 짧은 시간내에 탈과립이 이뤄져 화학적 매개물질의 유리가 일어난다(Richard 등 1999). 유리되는 중요한 물질은 미리 만들어져 있다가 유리되는 히스타민(histamine), 헤파린(heparin)등과 세포막에 유래하는 arachidonic acid가 대사되어 slow reacting sub-

stance of anaphylaxis (SRS-A)나 프로스타글란딘(prostaglandine)이 생성 유리된다. 또한 여러 사이토카인들도 생성 방출된다(김대식 등 2001, 신태용 2001). 이 때 비만세포의 탈과립에 의해 분비되는 가장 특징적이고 강력한 혈관작용성 물질 가운데 하나가 히스타민(Petersen 등 1996)이다. 이렇게 비만세포에서 유리된 화학적 매개물질에 의해 모세혈관의 투과성이 항진되고 평활근이 수축되며, 점막에서 점액의 분비가 증가된다(신태용 2001, 김대식 등 2001). 최근에는 제1형 과민반응에 중요하게 관여하는 세포들을 활성화시키는 인자들과 억제하는 인자들에 대한 연구와 이 세포들로부터 분비되는 화학매개물질들의 역할에 대한 연구, 실험동물에서 알레르기성 질환을 일으키는 다양한 실험모델을 만들어 내는 연구들을 통하여 알레르기성 질환의 발병 기전을 밝히고 이를 방지할 수 있는 적합한 새로운 약물을 개발하는 것이 많은 학자들의 관심대상이 되고 있다(하대유 등 1987, 전병득 등 1992). 비만세포를 활성화시키는 중요한 인자로는 항원, IgE 항체, IgE 수용체에 대한 항체, IgE dimer, Con A, polyamine, compound 48/80, topical antibiotics polymyxin B, polylysine polypeptides, alpha-chymotrypsin, porcine pancreatic phospholipase A₂ 등의 효소들의 자극 및 Ca²⁺ coupled stimulation secretion 기전에 의하여 분비되는 경우(Ischizaka 등 1980, 강경진 등 1993), cyclic nucleotide level에 의한 분비, protein kinase의 활성화에 따른 phosphorylation 증가(Richard 등 1999), 비만세포의 세포골격인 액틴미세섬유(actin filament)와 중간미세섬유(intermediate filament), 미세소관(microtubules) 등을 변형시키는 경우(채옥희 등 1999b) 등이 있다. 이러한 비만세포 탈과립을 일으키는 여러 인자들의 대부분은 세포밖으로부터 세포내로의 칼슘유입을 증가시킴으로써 비만세포내의 자유 칼슘의 양을 증가시키며, 증가된 자유 칼슘이 세포내 Ca²⁺ 결합단백질인 calmodulin과 결합하여 Ca²⁺-calmodulin complex를 형성하게 되고 이것이 세포내 myosin light chain kinase를 활성화시킨다. 그 결과 세포내 골격 및 세포내 이동에 관여하는 미세소관과 미세섬유(microfilaments)가 활성화되어 비만세포의 과립을 세포막 가까이로 이동시켜 결과적

으로 세포막 융합을 일으키게 됨으로써 비만세포 탈과립 및 히스타민 유리현상이 일어나게 된다고 알려졌다(William 1989).

반면 비만세포의 탈과립을 억제하는 물질들에 대한 연구도 많은데 이들은 세포막의 인지질 대사를 변화시키는 물질(채욱희 등 1996)과 cAMP의 수준의 변동과 칼슘이동에 관계하는 물질(강경진 등 1993, 1994), cromoglycate와 flavonoids, protease 억제제(Theoharides 등 1980, Sieghart 등 1981), 세포 골격계에 작용하는 물질 및 스테로이드(Chang 등 1993) 등이 있다. 이렇듯 알레르기 병태생리에 중요한 비만세포의 활성화를 억제시켜 매개물질 유리를 차단하는 약물의 작용기전을 보면 비만세포내로의 칼슘유입을 억제하거나 또는 비만세포내 칼슘저장소로부터 세포질내의 칼슘유리를 억제하여, 세포내의 자유칼슘의 양을 감소시킴으로써 비만세포로부터 히스타민의 유리를 억제하는 것이라고 알려져 있다. 또한 칼슘에 대한 세포막의 투과성은 세포내 cAMP 수준이 상승하면 저하되기 때문에, cAMP 합성을 자극하든지 그 분해를 방해하는 약물은 히스타민 방출을 감소시킨다고 알려져 있다(임동윤 등 1993).

산수유는 옛날부터 중요한 한약재로 많이 사용되어 왔으며 그 약리효능은 다음과 같다. 산수유 물추출물은 기니아피그의 적출회장 실험에서 항히스타민 작용이 있고, 산수유 추출물이 생쥐의 피부반응(passive cutaneous anaphylaxis)을 억제하였고, 또한 히스타민, 세레토닌, 키닌 등의 화학매체의 생성이 억제된다고 보고되었다(서영배 등 2002). 그리고 서권일 등(1999)은 산수유 추출물의 항균 및 항산화성에 대한 연구에서 용매에 따른 산수유 추출물의 항균활성은 물추출물이 가장 강하였고, 시험균주 중 *Escherichia Coli* O-157에 대해 가장 강한 항균활성을 나타내었다고 보고하였다. 또한 산수유 물추출물이 강한 수소공여능을 나타냄을 보고하였다. 최근 서영배 등(2002)은 산수유의 항알레르기 효과에 대한 연구보고에서 산수유 추출물이 B세포의 증식을 억제하고, IgE 생성을 유도하는 주요인자인 IL-4 생성량을 감소시켰으며, IgE 저친화성 수용체이며 IgE 생성과 조절에 관여하는 CD23의 발현을 감소시켰

다고 하였다. 또한 산수유 추출물이 B세포에서 IgE의 발현과 생성을 억제함을 보고하였다. 그리고 rHRF에 의해 활성화된 비만세포주인 IC-2세포의 히스타민 유리를 억제시켰다고 보고하였다. 이와 같은 보고들은 산수유가 항알레르기 작용이 있음 제시한다.

본 실험에서는 비만세포의 탈과립을 유도하는 인자들 중 compound 48/80을 사용하여 비만세포를 활성화시키고, 산수유 추출물의 전처리에 의한 비만세포 활성화 억제효과를 밝히고자 하였다. Compound 48/80은 formaldehyde에 의하여 교차연계된 phenethylamine의 mixed polymer로써 비만세포막 수용체에 작용하여 세포막의 칼슘을 세포내로 유입시킴으로써 세포내 자유칼슘의 양을 증가시켜 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리를 강력하게 일으키며, 세포내 cAMP-phosphodiesterase의 파괴를 억제하여 세포내 cAMP 양을 감소시킨다고 알려져 있다(George 등 1982). 본 실험에서 compound 48/80은 흰쥐 복강 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리를 일으켰으며, 칼슘의 유입을 증가시켰고 세포내 cAMP 수준을 감소 시켰다. 또한 조직내로의 혈관투과성을 증가시켰다. 반면 산수유 추출물을 전처리한 뒤 compound 48/80에 의한 비만세포 탈과립과 히스타민 유리, 칼슘유입, cAMP 수준의 감소가 억제되었다. 비만세포의 탈과립에 의해 분비되는 가장 특징적이고 강력한 혈관작용성 물질 가운데 하나인 히스타민(Petersen 등 1996)의 유리는 산수유 추출물의 전처리로 억제되었다. 산수유 추출물을 0.1 mg/mL 농도 이상으로 전처리하였을 경우에 농도 의존적으로 히스타민 유리가 감소되었다. 또한 산수유 추출물이 compound 48/80에 의한 복강 비만세포내로의 칼슘 유입을 억제하였다. 복강 비만세포 부유액에 compound 48/80을 처리하였을 때 증가된 칼슘의 양이 산수유 추출물을 전처리하였을 때 농도 의존적으로 감소되었다. 그리고 산수유 추출물을 단독으로 처리하였을 때에 비만세포내 cAMP 수준이 증가되었고, 2.5 mg/mL의 농도에서는 526%의 현격한 증가를 보였다. 복강 비만세포 부유액에 compound 48/80을 처리하였을 때 cAMP는 감소되었으나, 산수유 추출물(0.1, 0.5 또는 2.5 mg/mL)을 전처리한 후에

각각 122, 138, 438%로 증가되었다. 이로 산수유 추출물이 compound 48/80에 의한 비만세포내 cAMP 수준감소를 억제한다는 것을 알 수 있었다. 산수유 추출물이 생체내에서 혈관투과성에 미치는 영향을 알아보려고 피부반응 실험을 실시하였다. 그 결과 compound 48/80에 의해 조직내로의 Evans blue 유출이 증가되었으나, 산수유 추출물을 1, 10 또는 100 mg/mL의 농도로 전처리한 후 감소되었다. 이러한 결과로 미루어, 산수유 추출물이 비만세포내로의 칼슘유입을 억제하고 비만세포내 cAMP 수준을 증가 시킴으로써 비만세포를 안정화시켜 탈과립과 히스타민 유리를 억제할 것으로 생각된다. 또한 피부에서 산수유 추출물의 전처리로 비만세포로부터 히스타민의 유리가 억제되어 compound 48/80에 의한 혈관투과성이 억제되었을 것으로 생각된다. 앞으로 산수유의 추출물의 칼슘 유입의 억제 기전과 cAMP 수준 증가에 대한 기전에 대한 연구와 산수유로부터 이러한 활성기전을 갖는 순수물질의 정제 및 성분분석에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

참고 문헌

- 강경진, 전병득, 채옥희, 이무삼 : 상백피가 흰쥐 복강 비만세포의 히스타민 유리와 Calcium uptake에 미치는 영향. 대한면역학회지 15 : 91-99, 1993.
- 강경진, 채옥희, 최명희, 신인호, 이무삼, 전병득 : Compound 48/80에 의한 흰쥐 복강 비만세포의 히스타민 유리와 cAMP에 미치는 상백피의 억제 효과. 한국 BRM 학회지 4 : 111-122, 1994.
- 김대근, 곽종환, 류정희, 권학철, 송기원, 강삼식, 이성행, 이은아, 권년수, 이강노, 지옥표 : 산수유의 반응성 산소종 생성 증진 성분. 생약학회지 27 : 101-104, 1996.
- 김대식, 김소연, 김춘추, 민창기, 박수정, 서영훈, 엄현석, 정낙균, 정대철, 정태준, 진종률, 한치화 : 면역생물학, 제5판. 라이프사이언스, pp. 493-501, 2001.
- 서권일, 이상원, 양기호 : 산수유 추출물의 항균 및 항산화성. Korean J Postharvest. Sci Technol 6 : 99-103, 1999.
- 서영배, 길기정, 이용구, 이영철 : 산수유 항알러지 효과에 관한 연구. 대한본초학회지 17 : 1-12, 2002.
- 신태용 : 알레르기과 한약. 신일상사, pp. 44, 175, 2001.
- 이영훈, 한의혁, 송창호 : 비만세포의 두얼굴. 천식 및 알레르기. 20 : 684-692, 2000.
- 임동훈, 이인화 : 한눈에 알 수 있는 약리학. 약물요법의 기초지식, 제2판. 신일상사, pp. 28-29, 1993.
- 전병득, 강경진, 채옥희, 송창호, 이무삼, 신세원 : Compound 48/80으로 유도되는 아나필락틱 속과 피부반응을 일으키기 위한 간단한 실험모형. 대한BRM학회지 2 : 169-181, 1992.
- 채옥희, 양문식, 이무삼 : Spermine에 의한 흰쥐 복강 비만세포의 히스타민 유리와 cAMP, cGMP 수준변동에 미치는 상백피의 효과. 대한면역학회지 18 : 353-365, 1996.
- 채옥희, 배형운, 이무삼, 이종인, 송창호 : 상백피가 사람정장에 의한 흰쥐 복강 비만세포의 활성화에 미치는 영향. 천식 및 알레르기 19 : 666-676, 1999a.
- 채옥희, 이종인, 이무삼 : 상백피의 colchicine 유도 비만세포 활성화 억제효과. 대한해부학회지 32 : 735-747, 1999b.
- 하대유, 박영민, 한장연 : Cyclosporin A, carbenicillin, epinephrine 및 steroid hormone이 마우스의 능동성 전신성 anaphylaxis에 미치는 영향. 대한면역학회지 9 : 169-175, 1987.
- Chang L, Kious T, Yogancioglu M, Keller D, Pfeiffer J : Cytoskeleton of living, unstained cells imaged by scanning force microscopy. Biophys J 64 : 1282-1293, 1993.
- Ehrlich P : Beiträge zur kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. Arch Mikrosk Anst 13 : 263-277, 1877.
- Galli SJ : New concepts about the mast cell. N Engl J Med 28 : 257-265, 1993.
- George WD, Steven MH, Edgar FK : Competitive inhibition of compound 48/80-induced histamine release by Benzaikonium chloride and its analogs and the polyamine receptor in mast cells. J Pharma Experi Ther 222 : 652-661, 1982.
- Hachisuka H, Kusuhara M, Higuchi M, Okubo K, Sasaie Y : Purification of rat cutaneous mast cells with percoll density centrifugation. Arch Dermatol Res 280 : 358-362, 1988.
- Harvima RJ, Harvima IT, Fraki JE : Optimization of histamine radiolenzymatic assay with purified histamine N-methyltransferase. Clinica Chimica Acta 171 : 247-256, 1988.
- Holmegaard SN : Measurement of cAMP in clinical investigations. Acta Endocrinologica 101 : 1-46, 1982.
- Ischizaka T, Hirata F, Ishizaka K, Axelrode J : Stimulation of phospholipid methylation, Ca²⁺ influx and histamine release by bridging of IgE receptors on rat mast cells. Proc

- Natl Acad Sci USA 77 : 1903-1996, 1980.
- Lee MS, Ryu YG, Chai OK, Kang KJ, Lee JY : Inhibitory effect of polysaccharide fraction from *Cortex Mori* on compound 48/80-induced mast cell activation. *Korean J Immunol* 21 : 35-45, 1999.
- Ludwyk R, Lagunoff D : Drug inhibition of mast cell secretion. *Drug* 29 : 277-289, 1985.
- Nilsson G, Costa JJ, Metcalfe DD : Mast cells and basophil, 3th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 97-117, 1999.
- Petersen LJ, Mosbech H, Skov P : Allergen-induced histamine release in intact human skin in vivo assessed by skin microdialysis technique: characterization of factors influencing histamin releasability. *J Allergy Clin Immunol* 97 : 672-679, 1996.
- Richard AG, Thomas JK, Barbara : *Kuby Immunology*, 4th ed. Freeman. pp. 401-404, 1999.
- Sieghart W, Theorides TC, Greengard P, Douglas WW : Phosphorylation of a single mast cell protein in response to drug that inhibit secretion. *Biochem Pharmac* 30 : 2737-2745, 1981.
- Sin TY, Kim DK : Inhibitory effect of mast cell-dependent anaphylaxis by *Gleditsia sinensis*. *Arch Pharm Res* 23 : 401-406, 2000.
- Sin TY, Kim SH, Lee ES, Eom DO, Kim HM : Action of *Rubus coreanus* extract on systemic and local anaphylaxis. *Phytother Res* 16 : 508-513, 2002.
- Tasaka K, Mio M, Izushi K, Aoki I : Role of the cytoskeletons on Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} store of rat peritoneal mast cell. *Skin Pharmacol* 4 : 43-52, 1991.
- Temkin V, Levi-Schaffer F : Mechanism of tumour necrosis factor alpha mediated eosinophil survival. *Cytokine* 15 : 20-26, 2001.
- Theoharides TC, Sieghart W, Greengard P, Douglas WW : Antiallergic drug cromolyn may inhibit histamine secretion by regulating phosphorylation of a mast cell protein. *Science* 207 : 80-82, 1980.
- William FG : *Review of medical physiology*, 14th ed. pp. 30, 1989.
- Yoshii N, Mio M, Akagi M, Tassaka K : Role of endoplasmic reticulum, an intracellular Ca^{2+} store, in histamine release from rat peritoneal mast cell. *Immunopharmacol* 21 : 13-24, 1991.

Abstract

Inhibitory Effect of *Corni fructus* on Compound 48/80-induced Mast Cell Activation and Vascular Permeability

Jong-Min Lim, Guang-Zhao Li, Ok-Hee Chai, Chang-Ho Song

*Department of Anatomy and Research Center for Allergic Immune disease,
Chonbuk National University Medical School*

The fruit of *Corni fructus* (CF), a perennial herb, is believed to have anti-allergy effects, but its mechanism is unknown. The purpose of this study is to investigate the inhibitory effect of CF on compound 48/80-induced mast cell activation. For this, the effects of CF on the degranulation, the histamine release, the calcium influx and the change of the intracellular cAMP levels of rat peritoneal mast cells (RPMC) and influences of CF on the compound 48/80-induced cutaneous reaction were studied. The results were as follows; the compound 48/80-induced degranulation, intracellular calcium influx and histamine release of RPMC was significantly inhibited by pretreatment with CF, the compound 48/80-induced cAMP level of RPMC were significantly increased by pretreatment with CF, CF significantly inhibited compound 48/80-induced vascular permeability of rat cutaneous tissue. From the above results, it is suggested that CF contains some substances which inhibit the compound 48/80-induced vascular permeability and mast cell activation.

Key words : Mast cell, *Corni fructus*, Compound 48/80, Histamine, Calcium, cAMP