

우방자 추출물의 compound 48/80 유도 비만세포 활성화와 혈관 투과성 억제효과

김은경, 이광소, 채옥희, 송창호

전북대학교 의과대학 해부학교실 및 전북대학교 부설 알레르기성 면역질환 연구센터

간추림 : 우방자 추출물이 compound 48/80에 의해 유도되는 비만세포 활성화를 억제하는 지 알아보고, 그 약리기전을 구명하기 위하여 이 연구를 실시하였다. 시험관내 실험에서 우방자 추출물이 비만세포의 형태변화와 히스타민 유리, 비만세포 내의 cAMP (cyclic adenosine-3',5' monophosphate) 수준에 미치는 영향을 관찰하였고, 생체 실험에서 혈관투과성에 미치는 영향을 관찰하였다. 1. Compound 48/80에 의한 흰쥐 복강 비만세포의 탈과립은 수분 이내에 관찰되었고, 이러한 비만세포의 탈과립은 우방자 전처리에 의하여 억제되었다. 2. Compound 48/80에 의한 비만세포로부터의 히스타민 유리는 우방자 전처리에 의하여 현저히 억제되었다. 3. 정상 복강 비만세포(2×10^5 cells/in 0.2mL)의 세포내 cAMP 수준은 2.0 ± 0.4 pmol이었고, compound 48/80을 처리한 경우 비만세포내 cAMP 수준은 1.1 ± 0.1 pmol이었다. 우방자 추출물의 최종농도를 0.1, 1, 10 mg/mL가 되도록 하여 처리한 경우 세포내 cAMP 수준은 1.8 ± 0.5 , 4.01 ± 0.5 , 33.4 ± 9.5 pmol로써 정상수준에 비하여 현저히 증가되었다. 우방자 추출물을 10 분간 전처리하고 compound 48/80용액을 첨가한 경우 세포내 cAMP 수준은 2.1 ± 0.4 , 4.3 ± 1.0 , 22.1 ± 4.4 pmol로써 우방자는 compound 48/80에 의한 세포내 cAMP 수준의 감소를 억제하였다. 4. 흰쥐의 피부에서 우방자 추출물을 투여하고 compound 48/80을 투여한 경우 compound 48/80만을 투여한 경우보다 현저하게 혈관투과성이 억제되었다. 이상의 결과로 미루어, 우방자는 compound 48/80에 의한 복강 비만세포의 세포내 cAMP 수준을 증가시킴으로써 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리를 억제한다고 생각된다. 이러한 약리기전을 통하여 compound 48/80에 의한 비만세포의 활성화와 피부의 혈관투과성을 억제하는 항 알레르기 물질을 함유하고 있을 것으로 사료된다.

찾아보기 낱말 : 비만세포, 우방자, compound 48/80, 히스타민, cAMP

서 론

결합조직에 널리 분포하고 있는 비만세포는 Ehrlich (1877)에 의하여 처음 관찰된 이래 그 유래, 형태 및 기능 등이 많은 학자들에 의하여 보고되어 왔다. 최근에 비만세포는 탈과립을 유발하는 인자들과 억제하는 인자들에 대한 연구를 통하여 모든 샘 세포들의 분비 기전을 규명하는 것뿐만 아니라 아

토피 (atopy), 기관지 천식, 알레르기성 비염 등 비만세포의 이상 분비로 인한 여러 가지 알레르기성 질환을 방지할 수 있는 적합한 약물을 개발하는 연구에 많은 학자들의 초점이 맞춰져 있다. 특히 비만세포는 흰쥐 복강내에서 분리하기가 쉽고 다른 세포와 달리 크고 굵은 이염색성의 과립을 함유하고 있으며, 과립내에는 히스타민 (Petersen 등 1996), 헤파린, 세로토닌 및 가수분해 효소 (Caufield 등 1980, Galli 등 1993, Nilsson 등 1999) 등이 함유되어 있다. 이들 비만세포의 활성화는 면역학적 자극들과 약리학적 복합물, C_{3a}, C_{5a}와 같은 아나필락시스독소 (anaphylatoxin)에 의하여 유도된다 (Roitt 등 2001).

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

비만세포 활성화 자극들에 의해 비만세포의 매개물질들이 세포 밖으로 방출되어, 이들 매개물질들에 의한 다양한 알레르기 증상이 나타나게 된다(Roitt 등 2001). 특히 비만세포 활성화를 유도하는 인자들 가운데 compound 48/80 (Tasaka 등 1991, Yoshii 등 1991)은 세포막에 작용하여 세포 밖의 칼슘을 세포 안으로 유입시켜 2차 신호전달자들인 cAMP (cyclic adenosine-3', 5' monophosphate)와 cGMP (cyclic guanosine-3', 5' monophosphate) 양에 변화를 일으켜 비만세포의 탈과립을 일으키고 히스타민을 유리시키는 강력한 물질로 알려졌다(강경진 등 1993). 반면에, 비만세포의 탈과립을 억제하는 물질들에 대한 연구도 많은데 이들은 세포막의 인지질 대사를 변화시키는 물질(채욱희 등 1996), cAMP의 수준변동과 Ca^{2+} 이동에 관계하는 물질(강경진 등 1993, 1994), cromoglycate와 flavonoids, protease 억제제(Theorides 등 1980), 세포 골격계에 작용하는 물질 및 스테로이드(Chang 등 1993) 등이 있다.

우방자(牛蒡子: burdock, *Arctium lappa* Linne)는 국화과(엉거시과)에 속하는 2년생 초본의 열매를 말하며, 우엉, 우자, 악실이라고도 불린다. 우리나라 각지에서 재배되고 있으며 8~9월에 과실이 성숙할 때 채취하여 껍질을 제거한 후 햇볕에 말려서 한약 재료로 사용된다. 한방과 민간에서 종자와 뿌리를 약재로 썼으며, 풍열, 유행성감기, 두드러기와 종기 등의 피부질환에 사용되고 있다(신민교 1979). Morita 등(1984)은 우방자가 돌연변이 유발요인에 의한 인위적 돌연변이 유발을 감소시키는 인자를 포함한다고 하였고, Lin 등(2000)은 아세트아미노펜(acetaminophen)에 의해 유발되는 간 손상에 있어서 우방자가 간을 보호하는 기능이 있다고 보고하였다. 그러나 우방자의 항알레르기 약리작용에 대한 연구보고는 없다.

이에 저자들은 우방자의 항알레르기 약리기전을 구명하기 위하여, compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립, 히스타민 유리 및 혈관투과성의 증가에 우방자가 미치는 영향을 알아보고, 우방자가 복강 비만세포 내의 cAMP 수준에 어떠한 영향을 미치는지를 밝히기 위하여 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 250~300 g의 건강하고 성숙한 Sprague-Dawley계 흰쥐(다물사이언스, 대전)를 암수 구별 없이 사용하였다.

2. 약물

1) HEPES-Tyrode 완충용액

136 mM NaCl, 5 mM KCl, 11 mM $NaHCO_3$, 0.6 mM NaH_2PO_4 , 2.75 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 5.6 mM glucose, 2 mM $CaCl_2$, 1.0 mg/mL bovine serum albumin을 멸균된 3차 증류수에 녹여 만든 다음, pH 7.4로 적정하여 복강 비만세포의 분리와 탈과립, 히스타민 양, cAMP 수준을 측정하는 실험에 사용하였다.

2) 우방자 추출물

건조된 우방자(보현당, 전주) 1 kg을 3L의 증류수에 넣어 열탕 추출한 후 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator; EYELA, Tokyo Rikakikai Co. Ltd.)를 사용하여 수분을 일부 제거한 다음 냉동 건조하였다. 실험목적에 따라 우방자를 2차 증류수에 다양한 농도(1, 10 또는 100 mg/mL)로 희석하여 사용하였다.

3) Compound 48/80 용액

Compound 48/80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)을 2차 증류수에 용해시켜 5 μ g/mL의 농도로 희석하여 사용하였다.

3. 실험방법

1) 흰쥐 복강 비만세포의 수확

채욱희 등의 방법(1999)을 사용하여 다음과 같이 복강에서 비만세포를 얻었다. 흰쥐를 에테르로 마취시키고 뒤통수를 강타하여 치사시킨 후 약 10 mL의 HEPES-Tyrode 완충용액을 흰쥐의 복강 안에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 맞사지 하였다. 복벽 중

양선을 절개하고 복강 세척액을 스포이드로 채취하여 200×g로 10분간 원침시킨 후 상층 부유액을 버리고, 동일 HEPES-Tyrode 완충용액으로 비만세포 수가 1×10^6 cells/mL 되도록 만들었다. 비만세포의 형태 관찰은 이 비만세포 부유액을 사용하였다.

복강 비만세포 부유액으로 부터 비만세포의 순수분리는 Hachisuka 등(1988)의 방법을 이용하여 다음과 같이 분리하였다. 15 mL 원심분리용 시험관에 isotonic percoll 용액 (10×Hank's solution 1 mL + percoll 9 mL) 3.5 mL을 넣은 후 재부유된 비만세포 부유액 0.75 mL을 조심스럽게 올려놓고 HEPES-Tyrode 완충용액 0.5 mL을 상층에 채운 다음, 10분 정도 정치시킨 후 125×g로 15분간 원침시켰다. 원침 후 상층액 2 mL을 피펫으로 제거하고 4°C HEPES-Tyrode 완충용액으로 2번 세척하여 순수 비만세포 부유액을 만들었다. Trypan blue와 Kimura stain 용액을 이용하여 비만세포의 생존률과 순수도를 확인하였으며, 생존률과 순수도가 90% 이상인 경우에 만 실험에 사용하였다.

2) 비만세포의 형태변화 관찰

복강 비만세포 부유액 200 μL에 HEPES-Tyrode 완충용액 25 μL 또는 우방자 추출물 25 μL를 넣어 37°C 항온조에서 10분 동안 반응시켰다. 우방자가 compound 48/80에 의한 비만세포의 활성을 얼마나 억제하는가를 알기 위하여 비만세포를 우방자 추출물과 반응시킨 후에 compound 48/80용액 25 μL를 비만세포 부유액에 넣어 20분 동안 반응시켰다.

3) 비만세포의 탈과립 관찰 및 탈과립을 산출

광학현미경상으로 비만세포의 형태를 관찰하기 위하여 반응이 끝난 비만세포 부유액 200 μL를 도립현미경 재물대 위에 놓여진 슬라이드글라스(slide glass, 22×60 mm) 위에 떨어뜨려 비만세포들이 침전될 수 있도록 실온에서 10분간 정치시켰다. 1,000 배의 배율 하에서 비만세포를 도립현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 정상 비만세포의 형태는 대부분 원형 또는 난원형으로 세포윤곽이 뚜렷하고, 세포질 내에는 많은 과립들이 충만 되어 있었다. 비만세포의 직경은 대략 10~20 μm 정도로 복강 부유액의 다른 세포들(림프구 또는 호중성백혈구)에 비

해 2배 이상 컸다. 비만세포의 형태가 원형 또는 난원형으로 세포윤곽이 뚜렷하고, 세포질 내에 광굴절율이 높은 과립들로 충만된 상태를 정상형 비만세포로 구분하였다. 반면에 세포윤곽이 불분명하고 세포질 내 과립들이 세포표면으로 돌출 되거나 세포주위에 흩어져 있는 경우를 탈과립형으로 구분하여, 그 수를 실험군당 임의로 선택한 10시야에서 계수하고, 탈과립률을 계산하였다. 관찰오차를 줄이기 위하여 동일 실험군에 대하여 두 사람의 관찰결과를 합하여 산출하였다. 비만세포 탈과립율(%)=(탈과립된 비만세포 수/비만세포 총수)×100

4) 비만세포로부터 유리된 히스타민 양의 측정

위에서 기술한 방법으로 흰쥐 복강 비만세포를 분리한 다음 부유액내 세포의 수가 10^6 cells/mL가 되도록 조절한 후 그 중 200 μL씩 취하였다. 정상 비만세포에서 유리되는 히스타민 양을 측정하기 위하여 비만세포 부유액 200 μL에 HEPES-Tyrode 완충용액 만을 처리하였고, compound 48/80용액에 의한 히스타민 유리를 측정하기 위하여 HEPES-Tyrode 완충용액 25 μL을 첨가한 10분 후 compound 48/80 용액 (5 μg/mL) 25 μL을 첨가하여 반응시켰다. 우방자가 단독으로 비만세포의 히스타민을 유리시키는 지 알아보기 위하여 우방자 추출물(1, 10 또는 100 mg/mL) 25 μL을 비만세포 부유액에 투여한 10분 후에 HEPES-Tyrode 완충용액 25 μL을 첨가하였다. 또한 우방자의 compound 48/80용액에 의한 히스타민 유리 억제작용을 알아보기 위하여 비만세포 부유액에 상기 농도의 우방자용액 25 μL을 전처리하고 10분 후 역시 compound 48/80용액(5 μg/mL) 25 μL을 첨가하였다. 반응이 끝난 후 4°C에서 400×g로 원침하여 얻은 상층액내의 히스타민양의 분석은 Harvima 등(1988)의 방법을 이용하였다. 히스타민 양은 히스타민 총량에 대한 백분율로 표시하였으며, 총 히스타민 양은 비만세포 수가 2×10^5 cells인 부유액 200 μL를 100°C로 10분간 가열한 다음 원침시킨 후 상층액으로부터 측정된 히스타민 양을 100으로 정하였다. 히스타민 유리율 산출공식은 다음과 같다. 히스타민 유리율(%)=(실험군 히스타민 유리량/총 히스타민 유리량)×100

5) cAMP 측정방법

상기에 기술한 방법으로 복강 비만세포를 순수분리한 다음 부유액내 비만세포가 10^6 cells/mL가 되도록 세포 수를 조절한 후 그 중 200 μ L를 얻었다. 정상 비만세포의 cAMP 수준을 측정하기 위하여 HEPES-Tyrode 완충용액 25 μ L를, compound 48/80 용액의 세포내 cAMP 수준에 대한 작용을 알아보기 위하여 25 μ L의 HEPES-Tyrode 완충용액을 첨가한 10분 후에 25 μ L의 compound 48/80용액 (5 μ g/mL)을 첨가하였으며, 우방자 용액이 비만세포내 cAMP 수준에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 25 μ L의 우방자 용액을 비만세포 부유액에 첨가한 10분 후에 25 μ L의 HEPES-Tyrode 완충용액을 첨가하였다. 또한 compound 48/80용액이 비만세포내 cAMP 수준에 미치는 작용에 대한 우방자의 작용을 보기 위하여 25 μ L의 우방자 용액을 전처리하고, 10분 후 25 μ L의 compound 48/80용액 (5 μ g/mL)을 첨가하여 37°C 항온조에서 20분 동안 반응시켰다. 모든 반응의 증지는 원침 후 상층액을 버리고 50 mM acetate buffer (pH 6.2) 0.25 mL를 첨가한 후 세포를 액체 질소를 이용하여 신속하게 동결시킨 다음 100°C 물에 10분 끓여 원침한 후, cAMP 정량을 위하여 상층액 100 μ L를 얻었다. cAMP 정량은 Holmegard (1982)의 방법에 기본적 원리를 둔 cAMP [125 I] radio-immunoassay kit (Du Pont Company, Wilmington, DE)을 이용하여 측정하였다.

6) 우방자 전처리 후 compound 48/80에 의한 피부반응 억제효과

피부반응 유발 실험은 전병득 등(1992)의 방법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 수컷 흰쥐의 등쪽의 털을 제거 한 다음 compound 48/80에 의한 피부반응을 유발하기 위하여 에테르 마취하에서 등쪽 피부의 진피내로 0.9% 생리식염수, 또는 우방자 추출물 (1, 10 또는 100 mg/mL)을 각각 50 μ L씩 주입한 10분 후 compound 48/80용액 (5 μ g/mL)을 같은 자리에 50 μ L씩 주사하였다. 음성 대조군은 compound 48/80용액 대신 50 μ L의 0.9% 생리식염수와 우방자 만을 주사하였다. Compound 48/80용액 주사 후 20분이 경과한 뒤 0.5% Evan's blue 용액 400 μ L

를 흰쥐의 음경 등쪽정맥내로 주입하였다. 피부반응 유발 여부와 양성 반응 판정은 Evan's blue 용액을 주입하고 30분이 경과한 뒤 등쪽 피부를 절개하여 진피 쪽에서 파란색 반점이 나타나는지의 여부를 관찰하였다. 그리고 파란색 반점이 나타난 부위의 피부를 절취하여 그 무게를 측정하고, 가로 세로 약 3~4 mm 정도의 작은 조각으로 세절 하여 2 mL의 formamide 용액에 넣고 80°C에서 3시간 동안 Evan's blue를 유출시켰다. 유출시킨 Evan's blue density를 spectrophotometer (spcetra MAX plus, Molecular Devices, USA)로 620 nm에서 측정한 후 Evan's blue 표준곡선에 준하여 피부 조직의 무게 (그램) 당 Evan's blue 농도를 산출하였다.

결 과

1. 비만세포의 형태와 탈과립 관찰

1) HEPES-Tyrode 완충용액에 부유된 정상 비만세포 비만세포의 크기는 복강 부유액내 림프구의 두배 정도였으며, 구형 또는 난원형이었다. 세포막이 뚜렷하고 세포질에는 광굴절율이 강한 과립들로 채워져 있어 핵이 분명하게 관찰되지 않는 정상 비만세포 소견을 보여 주었다 (Fig. 1A). 광학현미경 유침하에서 비만세포를 정상형과 탈과립형으로 구분하여 임의로 10시야를 선택하여 산출한 결과, 정상형의 비만세포는 96.0% 이었으며 탈과립된 비만세포는 4.0%로 대부분의 비만세포가 정상형이었다 (Fig. 2).

2) 우방자 처리 후 비만세포의 변화

우방자 추출물 (1, 10 또는 100 mg/mL)을 정상 비만세포 부유액에 첨가하였을 때 비만세포의 형태, 크기, 표면윤곽 등이 정상 비만세포와 별 다른 소견을 보이지 않았으며, 첨가 후 30분 동안 탈과립 현상은 되지 않았다 (Fig. 1B, 1C, 1D). 이때 비만세포 탈과립율은 각각 3.0, 4.0, 13.0% 이었다 (Fig. 2).

3) Compound 48/80용액 처리 후 비만세포의 형태변화

비만세포 부유액에 compound 48/80용액 (최종농

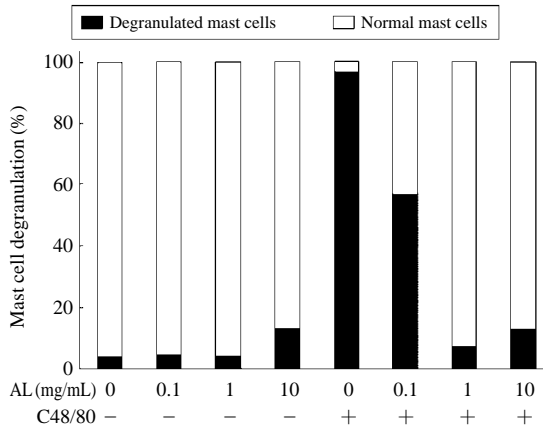


Fig. 2. Inhibitory effects of *Arctium lappa* Linne (AL) on compound 48/80 (C48/80)-induced mast cells degranulation. Rat peritoneal mast cells (RPMC, 2×10^5 cells/0.2 mL) were treated with 0.025 mL of HEPES-Tyrode, AL (final concentration; 0.1, 1 or 10 mg/mL), C48/80 (final concentration; 0.5 μ g/mL)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

도: 0.5 μ g/mL)을 첨가한 후 수분 이내에 비만세포 세포질내 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 돌출 되는 탈과립현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 1E). 비만세포의 탈과립율을 산출한 결과 96.5%로, 탈과립된 비만세포는 현저하게 증가하였다(Fig. 2).

4) 우방자 전처리 후 compound 48/80용액 첨가시 비만세포의 변화

정상 비만세포 부유액에 우방자 추출물(최종농도: 10 또는 1 mg/mL)을 10분간 전처리한 후 compound 48/80용액(최종농도: 0.5 μ g/mL)을 첨가하였을 때도 형태, 크기, 표면윤곽 등에서 정상 세포와 다른 소견을 관찰할 수 없었다. 그러나 20분이 경과한 후 비

만세포의 일부 세포막의 가장자리가 불규칙해졌으며 약간의 굴절율 감소를 보였고, 몇몇의 과립들이 돌출 되어 보였지만 compound 48/80용액에 의한 비만세포의 현저한 탈과립 현상은 관찰되지 않았다(Fig. 1F, 1G). 그러나 저농도의 우방자 추출물(최종농도: 0.1 mg/mL)을 처리한 경우 Fig. 1E와 같이 탈과립 되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1H).

이상의 형태학적인 결과로 탈과립율을 계산해 본 결과 우방자 추출물을 전처리 한 뒤 compound 48/80을 처리한 비만세포의 탈과립율은 우방자 추출물의 최종농도가 10 mg/mL일 때 $12.5 \pm 2.5\%$, 1 mg/mL일 때 $7.0 \pm 4.0\%$, 0.1 mg/mL일 때 $56.5 \pm 1.5\%$ 이었다(Fig. 2). 우방자 추출물의 전처리에 의하여 compound 48/80에 의한 비만세포 탈과립이 현저히 억제됨을 알 수 있었다.

2. 비만세포로부터 유리된 히스타민 양의 측정결과

Compound 48/80용액에 의한 흰쥐 복강 비만세포로부터의 히스타민 유리는 우방자 추출물 전처리에 의하여 현저히 억제되었다. 흰쥐 복강 비만세포로부터 유리된 히스타민 양 측정결과는 다음과 같다. HEPES-Tyrode 완충용액에 부유된 정상비만세포로부터 유리된 히스타민 양은 $1.34 \pm 0.1\%$ 이며, 복강 비만세포 부유액에 우방자 추출물의 최종농도를 0.1, 1, 10 mg/mL가 되도록 첨가했을 때의 히스타민 유리는 각각 3.0 ± 0.5 , 12.8 ± 3.6 , $14.7 \pm 1.3\%$ 이었다. 복강 비만세포 부유액에 compound 48/80(최종농도: 0.5 μ g/mL)용액을 처리하였을 때 비만세포로부터 유리된 히스타민 양은 $57.4 \pm 3.2\%$ 이었으나, 상기 농도의 우방자 추출물을 전처리 한 후 compound 48/80을 첨가하였을 때 비만세포로부터 유리된 히스타민 양은 각각 36.0 ± 2.2 , 16.3 ± 2.1 , $12.1 \pm 3.5\%$ 이었다(Fig. 3). Compound 48/80용액에 의한 비만세포로부터의 히스타민 유리가 우방자 추출물에 의하여 현저하게 억제되었음을 관찰할 수 있었다.

3. 비만세포의 cAMP 수준 측정 결과

우방자 추출물에 의한 비만세포의 히스타민 유리

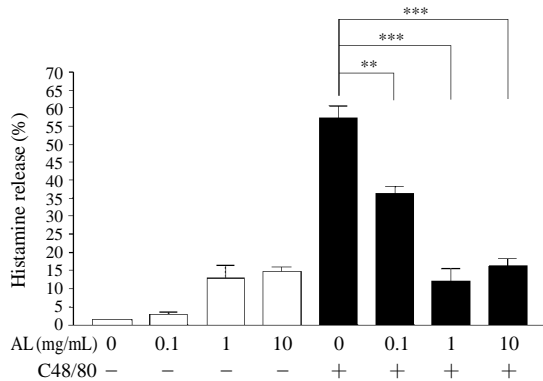


Fig. 3. Inhibitory effects of *Arctium lappa* Linne (AL) on compound 48/80 (C48/80)-induced histamine release from rat peritoneal mast cells (RPMC). RPMC (2×10^5 cells/0.2 mL) were treated with 0.025 mL of HEPES-Tyrode, AL (final concentration; 0.1, 1 or 10 mg/mL), C48/80 (final concentration; 0.5 μ g/mL) or AL+C48/80 at 37°C for 30 minutes. Histamine release (%) was calculated by the following formula: (experimental histamine release/total histamine release) \times 100. Data are represented as the mean \pm SEM (n = 6). ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

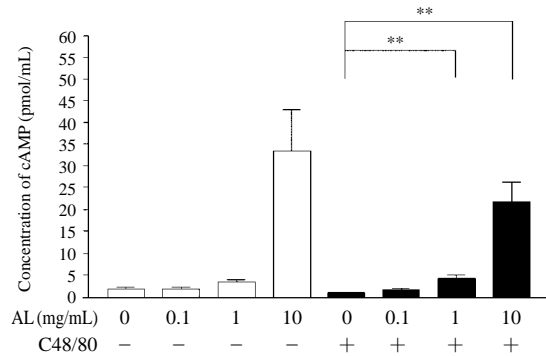


Fig. 4. Effects of *Arctium lappa* Linne (AL) on the compound 48/80 (C48/80)-induced decrease of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cAMP) levels in the rat peritoneal mast cells (RPMC). RPMC (2×10^5 cells/0.2 mL) were treated with 0.025 mL of HEPES-Tyrode, AL (final concentration; 0.1, 1 or 10 mg/mL), C48/80 (final concentration; 0.5 μ g/mL) or AL+C48/80 at 37°C for 30 minutes. The concentration of cAMP (pmole) was measured as described in Materials and Methods. Data are represented as the mean \pm SEM (n = 6). ** : $P < 0.01$

억제작용이 세포내의 cAMP 수준과 관련이 있는 지를 알아보기 위한 실험결과는 다음과 같다. 정상 복강 비만세포 (2×10^5 cells/200 μ L)의 세포내 cAMP 수준은 2.0 ± 0.4 pmol이었다. 우방자 자체가 복강 비만세포내의 cAMP 수준에 어떠한 영향을 미치는 가를 알아보기 위하여 실시한 실험에서 우방자 추출물의 최종농도를 0.1, 1, 10 mg/mL가 되도록 하여 처리한 경우 세포내 cAMP 수준은 1.8 ± 0.5 , 4.01 ± 0.5 , 33.4 ± 9.5 pmol로써 정상수준에 비하여 현저히 증가되었다. Compound 48/80용액의 세포내 cAMP 수준에 미치는 영향을 알아보기 위하여 복강 비만세포 부유액에 compound 48/80 (최종농도: 0.5 μ g/mL)을 처리한 경우 비만세포내 cAMP 수준은 1.1 ± 0.1 pmol로 정상수준의 절반 정도로 감소하였다. Compound 48/80용액에 의한 비만세포내 cAMP 수준의 감소에 있어 우방자의 역할을 알아보기 위하여, 우방자 추출물을 10분간 전처리하고 compound 48/80을 첨가한 경우 세포내 cAMP 수준은 2.1 ± 0.4 , 4.3 ± 1.0 , 22.1 ± 4.4 pmol로써 compound 48/80에 의한 세포내 cAMP 수준의 감소를 억제하였다

(Fig. 4).

4. 우방자 전처리 후 compound 48/80에 의한 피부반응 억제효과

Compound 48/80에 의한 피부반응 유발실험에 대한 우방자의 억제효과를 구명하기 위하여 피부반응 (파란색 반점)을 관찰하고 Evan's blue의 농도를 측정 한 결과는 다음과 같다. 생리식염수를 투여한 피부에서는 파란색 반점이 나타나지 않았고, compound 48/80 (5 μ g/mL)을 투여한 부위에서는 파란색 반점이 나타났다. 우방자를 1, 10 또는 100 mg/mL의 농도로 처리한 경우에는 그 자체에 의하여 파란색 반점이 거의 나타나지 않았으나, 우방자 농도 100 mg/mL에서는 우방자 자체의 색깔로 인해 희미한 갈색으로 관찰되었다. 우방자 전처리 후 compound 48/80을 주입한 경우에는 같은 농도의 compound 48/80 만을 투여한 경우와 다르게 현저한 피부반응의 감소를 보였다. Compound 48/80 만을 투여한 경우에 산출되는 Evan's blue의 농도는 31.3 ± 1.2 μ g/g 이었으나, 상기 농도의 우방자 추출물을 투여한 후

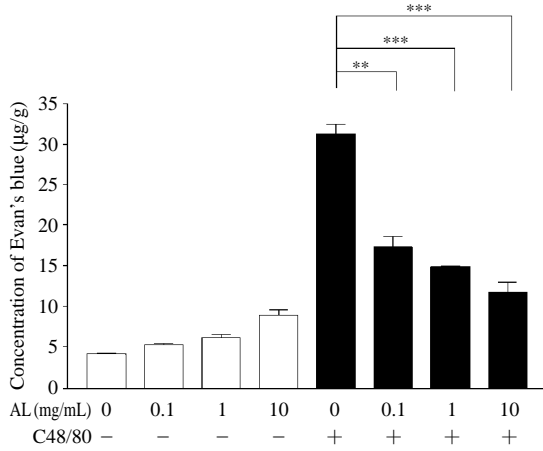


Fig. 5. Inhibitory effect of *Arctium lappa* Linne (AL) on the compound 48/80 (C48/80)-induced cutaneous reaction. The skin of Sprague-Dawley rats was injected intradermally with 50 µL of phosphate buffered saline (PBS), AL (0.1, 1 or 10 mg/mL), C48/80 (5 µg/mL) or AL+C48/80. Twenty minutes after intradermal injection, 0.5% Evans blue solution was injected via tail vein. The concentration of Evan's blue (µg/g) was measured as described in Materials and Methods. Data are represented as the mean ± SEM (n=6). ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

compound 48/80용액을 투여한 경우 산출되는 Evan's blue의 농도는 각각 17.3 ± 1.3 , 14.8 ± 0.1 , 11.7 ± 1.3 µg/g으로 우방자 추출물을 투여한 후 compound 48/80을 투여한 경우 compound 48/80 만을 투여한 경우 보다 현저하게 혈관투과성이 억제되었다(Fig. 5).

고찰

결합조직에 널리 분포되어 있는 비만세포는 그 세포질 내에 히스타민(Petersen 등 1996), 헤파린, 세로토닌 및 가수분해효소(Caufield 등 1980, Galli 등 1993, Nilsson 등 1999) 등이 포함된 비교적 큰 분비 과립을 함유하고 있으며, 형태 및 기능학적으로 stimulus - secretion coupling의 전형적인 모델로 이용되어 왔으며 최근에는 비만세포내 과립들의 이상 분비로 인하여 발생하는 다양한 알레르기성 질환을

예방하거나 치료할 수 있는 약물을 개발하는데 연구의 초점이 되고 있다.

이러한 비만세포의 탈과립 현상을 활성화시키는 중요한 요인으로는 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 액틴미세섬유와 중간미세섬유, 미세소관 등을 변형시키는 경우(채옥희 등 1999) 등이 있다. 이러한 비만세포 탈과립을 일으키는 여러 인자들의 대부분은 세포밖으로부터 세포 안으로 Ca²⁺ 유입을 증가시킴으로써 비만세포내의 자유 Ca²⁺의 양을 증가시키며, 증가된 자유 Ca²⁺이 세포내 Ca²⁺ binding protein인 calmodulin과 결합하여 Ca²⁺ - calmodulin 복합체를 형성하게 되고 이것이 세포내 myosin light chain kinase를 활성화시킨다. 그 결과 세포내 골격 및 세포내 이동에 관여하는 미세소관과 미세섬유가 활성화되어 비만세포의 과립을 세포막 가까이로 이동시켜 결과적으로 세포막 융합을 일으키게 됨으로써 비만세포 탈과립 및 히스타민 유리현상이 일어나게 된다고 알려졌다(William 1989). 이러한 탈과립 인자 가운데 세포내 cyclic nucleotide 수준의 변동에 의한 분비기전에 작용하는 것으로 cAMP와 cGMP가 있다. cAMP는 비만세포 표면 수용체에 β-adrenergic agonist, PGE₂, 히스타민들이 결합하여 adenylylate cyclase를 활성화시키거나 세포내 cAMP-dependent phosphodiesterase의 작용을 억제함으로써 세포내 cAMP 양을 증가시켜 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리를 억제한다(강경진 등 1993). cGMP는 비만세포 표면 수용체에 cholinergic agonist들이 결합하여 guanylate cyclase를 활성화시켜 세포내 cGMP 양을 증가시킴으로써 비만세포 탈과립 및 히스타민 유리를 일으킨다(Lee 등 1999).

본 연구에서는 상기의 여러 가지 비만세포의 탈

과립을 유도하는 인자들 중 compound 48/80을 사용하였는데, compound 48/80은 포름알데히드(formaldehyde)에 의하여 cross linked된 phenethylamine의 mixed polymer로써 비만세포막 수용체에 작용하여 세포외의 칼슘을 세포내로 유입시킴으로써 세포내 자유칼슘의 양을 증가시켜 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리를 강력하게 일으키며, 세포내 cAMP-phosphodiesterase의 파괴를 억제하여 세포내 cAMP 양을 감소시킨다고 알려졌다(강경진 등 1993, 1994). 본 연구에서 compound 48/80은 세포내로의 칼슘유입을 증가시켜, 흰쥐 복강 비만세포를 탈과립 시키고, 히스타민을 유리시켰으며, 세포내 cAMP 양을 감소시켰다. 또한 진피내로 투여된 compound 48/80은 현저한 피부반응을 일으켰다. 이는 투여된 compound 48/80이 결합조직내의 비만세포를 탈과립 시켜 히스타민을 비롯한 많은 활성인자들을 세포 밖으로 유리시킴으로서 이들이 주위 모세혈관의 혈관 투과성을 증가시켜 혈관내로 투여된 Evan's blue 용액이 혈관 밖으로 스며 나와 진피내 파란색 반점을 일으킨 것으로 생각된다.

반면, 비만세포의 매개물질 유리를 차단하는 약물들의 작용기전은 비만세포내로의 칼슘유입을 억제하거나 또는 비만세포내 칼슘저장소로부터 세포질내의 칼슘유리를 억제하여, 세포내 자유칼슘의 양을 감소시킴으로써 비만세포로부터 히스타민 유리를 억제하는 것이라고 알려졌다(강경진 등 1993, 1994). 이러한 작용을 갖는 물질들에는 세포막의 인지질 대사를 변화시켜 세포내로의 칼슘유입을 억제하는 물질(강경진 등 1993, 채옥희 등 1999), 비만세포막의 칼슘통로를 차단하여 세포내로의 칼슘유입을 억제하는 물질(강경진 등 1993, 채옥희 등 1999), cromoglycate과 protease 억제제(Sieghart 등 1981, 강경진 등 1993), 그리고 세포골격계에 작용하는 물질(박주은 등 1987) 등이 있다.

한편 본 실험에 사용한 우방자는 한방에서 오랫동안 체내의 풍열을 몰아내고 해열과 해독작용을 가지고 있어 유행성감기로 인한 발열, 기침과 가래가 끓을 때, 두드러기와 중기 등의 피부질환에 효과가 있는 한약재로 알려져 있다. Morita 등(1984)은 우방자가 돌연변이 유발요인에 의한 인위적 돌연변

이 유발을 감소시키는 인자를 포함한다고 하였고, Lin 등(2000)은 acetaminophen(진통해열제)에 의해 유발되는 간 손상에 있어서 우방자가 간을 보호하는 기능이 있음을 보여주었다. 그러나 항알레르기 약리작용에 대한 보고는 없다.

본 실험 결과, 도립 현미경에서 compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립 현상은 세포막의 불규칙성, 과립의 돌출 및 세포 밖으로의 탈출 등의 소견이 있었으나, 우방자 추출물을 전처리 함으로써 compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립은 현저히 억제되었다. 또한 복강 비만세포의 히스타민 유리를 측정된 결과, compound 48/80에 의한 히스타민 유리가 우방자 추출물에 의해서 현저히 억제되었음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 compound 48/80이 다당체 성분으로, 세포막의 수용체에 작용한다는 보고로 미루어 우방자 추출물이 비만세포막의 compound 48/80이 작용하는 수용체에 경쟁적억제(competitive inhibition)작용을 할 것으로 생각되나, 이는 이들 수용체에 대한 정밀한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 생각된다.

또한 우방자의 비만세포 탈과립 및 히스타민 유리 억제작용이 위에서 기술한 바 있는 억제 기전 중에 cAMP 기전에 관여하는 지 알아보기 위한 실험에서 compound 48/80은 비만세포 안정화에 관여하는 세포내 cAMP 양을 감소시켰다. 그러나 우방자 추출물을 전처리하고 compound 48/80을 처리한 경우에는 세포내 cAMP 양이 증가되었다. 또한 우방자 추출물을 비만세포에 단독으로 처리했을 때도 우방자는 비만세포내 cAMP 양을 현저히 증가시켰다. Compound 48/80에 의한 cAMP 수준의 감소가 우방자 전처리에 의하여 현저하게 억제되는 것으로 미루어 보아 우방자 자체가 세포내 secondary messenger인 cAMP 수준을 조절하여 비만세포 활성화를 억제하는 것으로 생각된다.

또한 생체내의 실험에서 우방자는 compound 48/80에 의한 피부반응을 현저히 억제하였는데, 이는 우방자 추출물이 복강 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리를 억제한 결과로 미루어 진피내로 투여된 우방자가 비만세포를 안정화시켜 뒤에 투여된 compound 48/80에 의한 혈관 투과성을 억제하여

Evan's blue의 혈관 밖으로의 유출을 방지함으로써 진피내의 파란색 반점의 출현을 억제한 것으로 생각된다. 그러나 아직까지 진피내로 투여된 compound 48/80과 우방자가 비만세포를 제외한 결합조직내의 여러 가지 세포들에 어떠한 영향을 주는 지에 대한 연구도 미비한 실정이어서 정확한 억제기전을 밝히기 위해서는 이 부분에 대한 연구도 보강되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 실험결과들은 우방자가 세포내 cAMP양을 증가시키는 비만세포 안정화 기전을 통하여 비만세포 탈과립 및 히스타민 유리를 억제함으로써 생체 내에서도 compound 48/80에 의한 피부반응을 억제한다고 사료된다. 또한 비만세포 안정화 작용에 대한 우방자의 정확한 작용기전을 알아내기 위하여 우방자에 대한 생화학적 성분분석과 정제에 대한 연구가 병행되어야 하며, 우방자의 억제 기전이 세포막의 수용체 및 phospholipid system에 작용하는지, 세포막 또는 세포질내의 효소계에 작용하는지, 칼슘통로 및 세포골격계에 작용하는 지에 대한 보다 세부적이고 정밀한 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

참고 문헌

- 강경진, 전병득, 채옥희, 이무삼 : 상백피가 흰쥐 복강 비만세포의 히스타민 유리와 Calcium uptake에 미치는 영향. 대한면역학회지 15 : 91-99, 1933.
- 강경진, 채옥희, 최명희, 신인호, 이무삼, 전병득 : Compound 48/80에 의한 흰쥐 복강 비만세포의 히스타민 유리 및 cAMP에 미치는 상백피의 억제효과. 한국 BRM 학회지 4 : 111-122, 1994.
- 박주은, 송창호, 이무삼 : 상백피로 전처리된 비만세포에 미치는 Colchicine의 영향. 대한해부학회지 20 : 358-364, 1987.
- 신민교 : 원색 본초유신, 경원문화사, pp. 125, 1979.
- 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 유리 및 cAMP, cGMP 수준변동에 미치는 상백피의 효과. 대한면역학회지 18 : 353-365, 1996.
- 채옥희, 이종인, 이무삼 : 상백피의 colchicine 유도 비만세포 활성화 억제효과. 대한해부학회지 32 : 735-747, 1999.
- Caufield JP, Lewis RA, Hein R, Austen KF : Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge. J Cell Biol 85 : 29-37, 1980.
- 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 : Beitrage zur kenntnis der Anilinfarbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. Arch Mikrosk Anat 13 : 263-277, 1877.
- Galli SJ : New concepts about the mast cell. N Engl J Med 28 : 257-265, 1993.
- 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, Axelrod 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 TG, Chai OH, Kang KJ, Lee LY : Inhibitory Effect of Polysaccharide Fraction from Cortex Mori on Compound 48/80-induced Mast cell Activation. Korean J Immuno 21 : 35-45, 1999.
- Lin SC, Chung TC, Lin CC, Ueng TH, Lin YH, Lin SY, Wang LY : Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* on carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced liver damage. Am J Chinese Med 28 : 163, 2000.
- Morita K, Kada T, Namiki M : A desmutagenic factor isolated from burdock (*Arctium lappa* Linne). Mutat Res 129 : 25-31, 1984.
- Nilsson G, Costa JJ, Metcalfe DD : Mast cell 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 histamine releasability. *J Allergy Clin Immunol* 97 : 672–683, 1996.
- Richard AG, Thomas JK, Barbara : *Kuby Immunology* 4th ed. Freeman. pp. 401–404, 1999.
- Roitt I, Brostoff J, Male D : *Immunology*, Gower medical publishing. 6th ed. Mosby, pp. 323–343, 2001.
- 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 : 2737–2742, 1981.
- 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.
- 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. 30–31, 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.

Legends for Figures

Fig. 1. Inverted light micrographs of rat peritoneal mast cells (RPMC) in HEPES–Tyrode buffered solution.

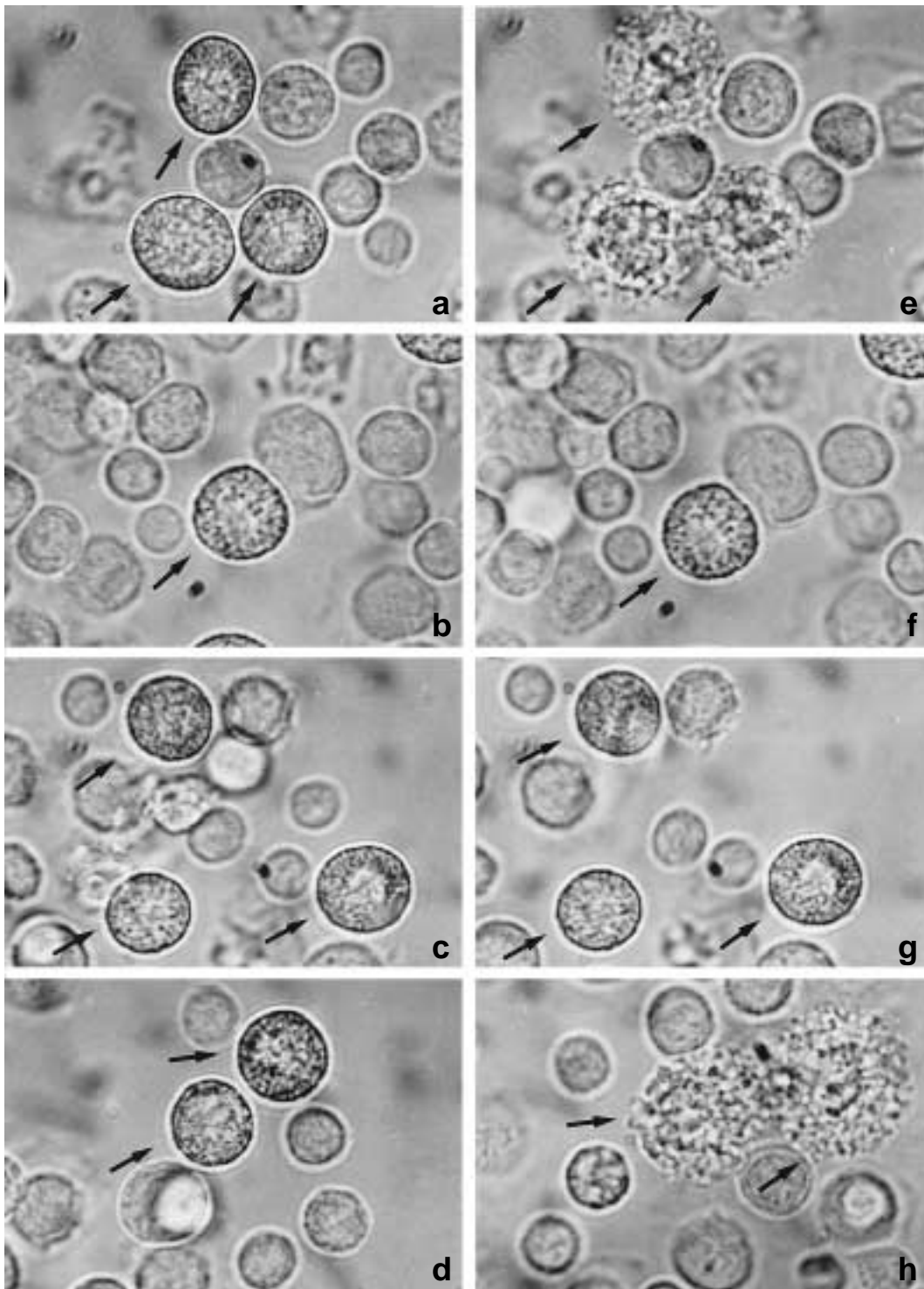
A : The normal RPMC (arrows) in HEPES–Tyrode buffered solution show clear, smooth outline, spheroidal shape and central located nucleus, and contain many refractive granules in their cytoplasm. $\times 1,000$.

B, C, D : The RPMC (arrows) observed within 10 minutes after the addition of *Arctium lappa* Linne solution (B; 100 mg/mL, C; 10 mg/mL, D; 1 mg/mL) show similar findings as seen in figure A. $\times 1,000$.

E : The RPMC (arrows) observed within 5 minutes after the additon of compound 48/80 show swelling, severe irregular and disrupted boundary and beside the granules, vacuoles are present, which are interpreted as degranulation of mast cell. $\times 1,000$.

F, G : The RPMC (arrows) pretreated with *Arctium lappa* Linne solution (F; 100 mg/mL, G ; 10 mg/mL) observed within 10 minutes after the addition of compound 48/80, show similar findings as seen in figure B and C. $\times 1,000$.

H : The RPMC (arrows) pretreated with *Arctium lappa* Linne solution (H; 1 mg/mL) observed within 10 minutes after the addition of compound 48/80, show similar findings as seen in figure E. $\times 1,000$.



Abstract

Inhibitory Effect of *Arctium lappa* Linne on Compound 48/80-induced Mast Cell Activation and Vascular Permeability

Eun-Kyoung Kim, Guang-Zhao Li, Ok-Hee Chai, Chang-Ho Song

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

Arctium lappa Linne (AL) has been widely cultivated for a long time as a popular vegetable. The fruit of AL has been used as an antiphlogistic and expectorant in herbal medicine, the crude drug is known as “burdock” in Korea. In pharmaceutical field, a few papers recently reported the antiinflammatory, antiviral, and anticancer effects of this extract. However, the antiallergic effect of AL is unknown. The purpose of this study is to investigate the inhibitory effect of AL on compound 48/80-induced mast cell activation. For this, the effects of AL on the degranulation, the histamine release, and the change of the intracellular cAMP (cyclic adenosine-3', 5' monophosphate) levels of rat peritoneal mast cells (RPMC) and the influences of AL on the compound 48/80-induced cutaneous reaction were studied. The results were as follows; 1) the compound 48/80-induced mast cell degranulation and histamine release of RPMC was significantly inhibited by pretreatment with AL, 2) the compound 48/80 decreased the cAMP levels of RPMC, but the compound 48/80-induced cAMP levels of RPMC were significantly increased by pretreatment with AL, 4) AL significantly inhibited compound 48/80-induced vascular permeability of cutaneous tissue. From the above results, it is suggested that AL contains some substances which inhibit the compound 48/80-induced vascular permeability and mast cell activation.

Key words : Mast cell, *Arctium lappa* Linne, Compound 48/80, Histamine release, cAMP, Vascular permeability