

생체실험에서 복분자의 compound 48/80에 의한 아나필락틱 속과 혈관 투과성 증가의 억제효과

이 광 소, 채 옥 희, 송 창 호

전북대학교 의과대학 해부학교실 · 알레르기성 면역질환 연구센터

간추림 : 알레르기 질환은 비만세포 활성화에 따른 매개물질들의 과다분비로 유발된다. 이에 비만세포의 활성화를 억제하는 물질들을 이용하여 알레르기 질환의 증상을 개선하고 예방하고자 많은 연구들이 진행되고 있다. 본 연구는 복분자에 항알레르기성 성분이 있는지를 확인하기 위하여 생체에서 복분자 추출물이 compound 48/80에 의한 아나필락틱 속과 피부의 혈관 투과성 증가를 억제하는지를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 복분자 추출물의 전처리로 compound 48/80에 의한 마우스의 사망률이 감소되었고, 사망시까지 소요되는 시간이 지연되었다.
2. 복분자 추출물의 전처리로 compound 48/80에 의한 마우스 장간막 비만세포의 탈과립이 현저하게 억제되었다.
3. 흰쥐 피부에서 복분자 추출물의 전처리로 compound 48/80 또는 anti-DNP IgE에 의한 혈관 투과성이 억제되었다. 이상의 실험결과로 미루어 복분자 추출물에는 compound 48/80에 의한 아나필락틱 속과 compound 48/80 또는 anti-DNP IgE에 의한 혈관투과성의 증가를 억제하는 항알레르기성 성분이 함유되어 있을 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : 아나필락틱 속, 복분자, 비만세포, 혈관투과성

서 론

복분자(*Rubus coreanus*)는 장미과에 속하는 낙엽 관목이며 건조지와 습지 모두에서 잘 자라는 검정 딸기로 예로부터 식용과 약용으로 널리 사용되어 왔다. 한의학에서는 강장, 강정효과가 뛰어나며 당뇨, 토혈, 지혈 등에 쓰인다. 최근에 발표된 연구결과를 보면 복분자는 항산화, 항암, 항균 등 약리효능도 우수한 것으로 보고(Heinonen 등 1998, De Ancos 등 2000, 차환수 등 2001)되어 있으며 항알레르기 작용(Shin 등 2002)도 있다고 보고되었다.

한편, 비만세포는 흰쥐 복강내에서 분리하기가 쉽

고 다른 세포와 달리 크고 붉은 이염색성의 과립을 가지고 있으며 과립내에는 히스타민(Petersen 등 1996)과 헤파린, 세로토닌, 가수분해효소(Caufield 등 1980, Galli 1993, Nilsson 등 1999) 등이 함유되어 있다. 이들 비만세포의 활성화는 면역학적 자극들(항원, anti-IgE, lectin 등)과 약리학적 복합물질들(melitin, polyamine, codein, calcium ionophore A23187, compound 48/80 등), C3a, C5a와 같은 anaphylatoxin에 의하여 유도된다(Roitt 등 2001). 이러한 자극들로 비만세포 내로 칼슘유입이 증가되면, 비만세포 내에 이미 만들어진 히스타민과 세로토닌, 가수분해 효소 등의 매개물질들이 비만세포 밖으로 분비된다(Caufield 등 1980). 또한 비만세포가 자극 받으면 비만세포의 세포막에 있는 phospholipase A₂의 활성화가 유도되어 세포막에 존재하는 phosphatidyl choline이 arachidonic acid로 변환되는 과정이 활성화되고, arachid-

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

onic acid는 cyclooxygenase와 5-lipoxygenase 경로를 거쳐 새로 합성된 PGD₂, LTC₄, LTD₄, LTE₄ 등의 매개물질들이 세포 밖으로 방출되어, 이들 매개물질들에 의한 알레르기 증상이 나타나게 된다(Roitt 등 2001). 특히 비만세포 활성화를 유도하는 인자들 가운데 compound 48/80 (Tasaka 등 1991, Yoshii 등 1991)은 formaldehyde에 의하여 교차결합된 phenethylamine의 혼합 다당체로써, 비만세포의 세포막에 작용하여 세포 외의 칼슘을 세포 내로 유입시킨다. 세포내에서 자유칼슘이 증가하면 2차신호전달자인 cAMP와 cGMP 양에 변화를 일으켜서 비만세포는 탈과립되고 히스타민이 유리된다(Lee 등 1999).

반면에, 비만세포의 매개물질 유리를 차단하는 항알레르기 약물질의 작용기전은 비만세포내로의 칼슘유입을 억제하거나 또는 비만세포내 칼슘저장소로부터 세포질내의 칼슘유리를 억제하여, 세포내 자유칼슘의 양을 감소시킴으로써 비만세포로부터 히스타민 유리를 억제하는 것이라고 알려졌다(강경진 등 1993). 이러한 작용을 갖는 물질들에는 세포막의 인지질 대사를 변화시켜 세포내로의 칼슘유입을 억제하는 물질, 비만세포막의 칼슘통로를 차단하여 세포내로의 칼슘유입을 억제하는 물질(채옥희 등 1996), cromoglycate과 protease 억제제(Sieghart 등, 1981), 그리고 세포골격계에 작용하는 물질(Chang 등 1993) 등이 있다.

이와 같이 비만세포 활성화 억제물질들에 대한 연구를 통하여 아토피성 피부염, 기관지 천식 및 알레르기성 비염 등 비만세포의 이상 분비로 인한 여러 가지 알레르기성 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 적합한 약물을 개발하는데 비만세포가 많이 이용되고 있다(Ludwyk와 Lagunoff 1985, 채옥희 등 1996, Lee 등 1999, Shin과 Kim 2000).

앞에 언급한바와 같이 복분자 의항알레르기성 효능에 대한 몇몇 연구자들의 보고(Shin 등 2002)는 있었지만 그 항알레르기성 기전에 관한 연구보고는 없다. 이에 본 연구는 복분자에 항알레르기성 성분이 있는지를 확인하기 위하여 생체에서 복분자가 compound 48/80에 의한 아나필락틱 속과 피부의 혈관 투과성 증가를 억제하는지를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 체중 20~30 그램의 ICR계 마우스와 체중 250~300 그램 내외의 건강하고 성숙한 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷(다물사이언스, 대전)을 사용하였다.

2. 복분자 추출물

건조된 복분자(보현당, 전주) 1kg을 3L의 증류수에 넣어 열탕 추출한 후 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator; EYELA, Tokyo Rikakikai Co. Ltd.)를 사용하여 수분을 제거한 다음 동결건조하여 분말을 얻었다. 실험목적에 따라 복분자를 2차 증류수에 다양한 농도로 희석하여 사용하였다.

3. Compound 48/80에 의한 아나필락틱 속 유발 및 복분자 전처리 방법

Compound 48/80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)에 의한 아나필락틱 속 유발 방법은 전병득 등(1992)의 방법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 체중 20~30 그램 정도의 건강한 ICR계 마우스를 각 실험군당 10마리씩 선별한 다음 생리식염수로 희석한 compound 48/80을 체중 그램당 5, 10, 15 µg 되도록 복강내 1회 투여하였다. 대조군은 compound 48/80 대신에 생리식염수를 주사하였다. ICR계 마우스에 복분자(1, 10 mg/mL)의 전처리는 여러 농도의 compound 48/80을 투여하기 24, 12, 1시간 전에 각각 3차례에 걸쳐 300 µL씩 복강내 투여하였다. 이들의 전처리가 compound 48/80에 의한 아나필락틱 속 유발을 억제하는지를 알아보기 위하여 아나필락틱 속 유발여부, 사망률, 장간막 비만세포의 탈과립 현상을 관찰하였다.

- 1) 복분자의 compound 48/80에 의한 아나필락틱 속 유발여부와 사망률에 미치는 영향에 대한 관찰방법
복분자 300 µL를 각각 3차례에 걸쳐 복강에 투여

한 후 compound 48/80을 ICR계 마우스 복강에 투여하거나, 복분자 대신 2차 증류수 300 μL를 복강에 투여한 후 compound 48/80을 투여한 다음 각각 3일 동안을 관찰하였다. 복분자의 compound 48/80에 의한 ICR계 마우스의 사망률은 아나필락틱 속으로 죽은 마우스를 실험에 이용된 총 마리수로 나누어 산출하였다. 또한, 사망률과 더불어 compound 48/80을 주입한 후 아나필락틱 속으로 죽을 때까지의 평균 시간(분)을 측정하였다.

2) Compound 48/80에 의한 아나필락틱 속 유발시

복분자의 전처리가 장간막 비만세포의 탈과립 현상에 미치는 영향에 관한 실험방법

Compound 48/80 만을 복강내로 주입하거나, 복분자를 각각 3차례에 걸쳐 전처리한 다음 compound 48/80을 투여한 15분후에 경추 탈구법으로 마우스를 희생시켰다. 그리고 복벽 중앙선을 소절개하여 메탄올을 직접 복강내로 주입하여 20분 동안 고정 한 후 고정된 장간막을 얻어 슬라이드 위에 올려 놓고 수세한 다음 0.1% toluidine blue (pH 4.0)로 1분간 염색하고 수세한 다음 탈수하여 봉입하는 방법으로 각 개체마다 2개의 슬라이드를 만들었다. 400배의 광학 현미경하에서 비만세포의 탈과립 현상을 관찰하고 탈과립 지수를 산출하였다. 장간막 비만세포 중, 탈과립되지 않은 비만세포를 정상형 비만세포(Fig. 1A), 약간의 과립들이 비만세포 주위에 있는 정도를 경도 탈과립형(Fig. 1B), 많은 과립들이 비만세포 주위에 산재된 것을 강도 탈과립형(Fig. 1C)으로 구분하여 1개의 절편당 비만세포의 수를 임의로 10시야씩 2번을 세어 평균하였다. 탈과립 지수는 다음 공식에 의하여 산출하였다. 탈과립 지수(%) = [(정상형의 수 × 0) + (경도 탈과립형의 수 × 50) + (강도 탈과립형의 수 × 100)] / 100

4. Compound 48/80 또는 anti-DNP IgE에 의한 혈관투과성의 증가 및 복분자 처리 방법

피부 반응 유발실험은 전병득 등(1992)의 방법을 수정, 보완하여 다음과 같이 실시하였다. Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷을 실험군당 10마리씩 선별한 다음 등쪽의 털을 제거하고 진피 내로 0.9% 생리식

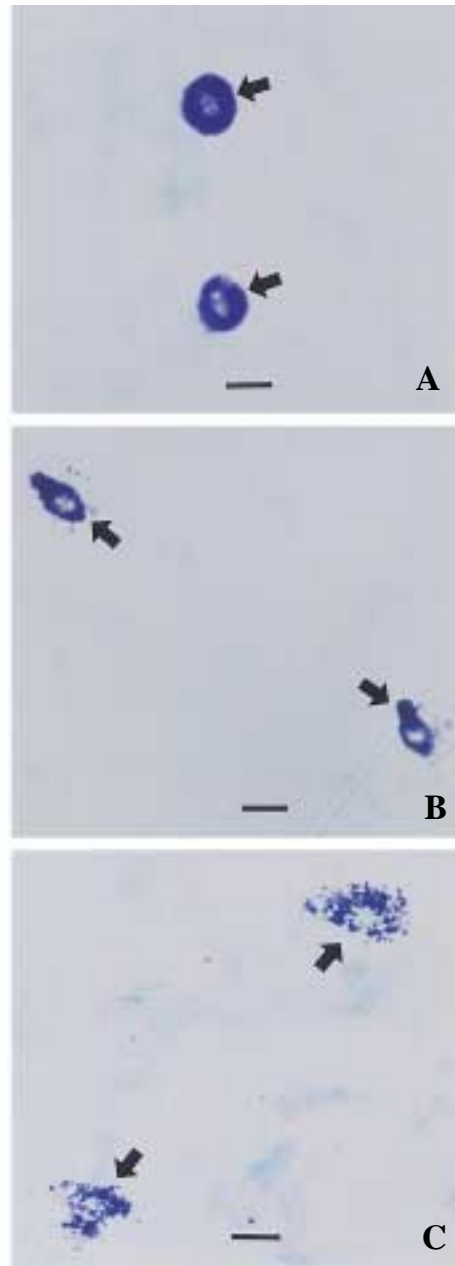


Fig. 1. Light microphotographs of compound 48/80-induced mesenteric mast cell degranulation. No degranulated mesenteric mast cells (arrows in A) showed round shape with fine granules and regular surface. Moderate (B) and severe degranulated mesenteric mast cells (C) became irregular surface and had extruded granules. Toluidine blue stain, bar = 10 μm

염수, 또는 1, 10 mg/mL의 복분자를 각각 50 µL씩 주사한 다음 10분 후 compound 48/80 용액(5 µg/mL)을 같은 자리에 50 µL씩 주사하였다. 음성 대조군은 compound 48/80 용액 대신 50 µL의 생리식염수를 복분자를 주사한 자리에 각각 주사하였다. 20분 후 0.5% Evans blue 용액 400 µL를 흰쥐의 음경등정맥 내로 주입하였다. 또한 anti-DNP IgE [Dinitrophenyl (DNP)-Human serum albumin (HSA)와 anti-DNP IgE 용액 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)]에 의한 피부반응에 있어 복분자의 작용을 관찰하기 위하여 진피 내로 anti-DNP IgE (10 µg/mL) 50 µL씩 주사한 24시간 후에 1, 10 mg/mL의 복분자를 각각 50 µL씩 같은 자리에 주사하였다. 주사한 20분 후에 1% Evans blue 200 µL과 DNP-HSA (20 µg/mL) 200 µL의 혼합액을 흰쥐의 음경등정맥내로 주입하였다. 피부반응 유발여부와 양성반응의 판정은 Evans blue 용액을 주입하고 30분이 경과한 뒤 등쪽 피부를 절개하여 주사한 부위의 진피에서 파란색반점이 나타나는지의 여부를 관찰하였다. 그리고 주사 부위의 피부를 절취하여 그 무게를 측정하고, 가로와 세로가 약 3~4 mm 정도의 작은 조각으로 세절하여 2 mL의 Formamide 용액에 넣고 80°C에서 3시간동안 반응시켰다. 반응 후 모든 피부조직에서 파란색반점들이 관찰되지 않고 Formamide 용액이 파랗게 변하였다. 이 Evans blue 추출액을 spectrophotometer (Spectra MAX plus, Molecular Devices, USA)로 620 nm에서 밀도를 측정한 후 Evans blue 표준곡선에 준하여 Evans blue 농도를 산출하였다. 통계처리는 Students unpaired *t*-test를 이용하였고, $P < 0.05$ 시 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

실 험 결 과

1. Compound 48/80에 의해 유도된 아나필락틱 속예에 대한 복분자의 억제효과

ICR계 마우스에서 아나필락틱 속예 일으킬 수 있는 compound 48/80의 최소 농도는 체중 그램당 10 µg이었고, 그 농도에서의 평균 사망시간은 21.9분이었다. Compound 48/80에 의한 아나필락틱 속예

Table 1. Inhibitory effects of *Rubus coreanus* water extract (RCWE) on compound 48/80-induced systemic anaphylaxis

RCWE (mg/mL)	Compound 48/80 (µg/g BW)	Mortality (%)	Death time (minute)
—	—	0	—
—	5	0	—
—	10	80	21.9
—	15	100	17.8
1	10	10	64.3
1	15	80	39.8
10	10	0	—
10	15	30	53.4

Groups of mice (n = 10/group) were intraperitoneally pretreated with 300 µL saline or RCWE was given at various doses 24, 12 and 1 hr before the injection of various doses of compound 48/80. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of mice. Mortality (%) within 72 hrs following the compound 48/80 injections was presented as the No. of dead mice × 100/ total No. of experimental mice.

유발시킨 결과 사망률과 사망까지의 소요시간은 체중 그램당 10 µg 투여 군에서는 80% 및 21.9분, 체중 그램당 15 µg 투여 군에서는 100% 및 17.8분이었으며 compound 48/80 대신에 생리식염수만을 투여한 음성 대조군에서는 10마리 모두 생존하였다. 한편 1 mg/mL 복분자를 전처리한 후 10, 15 µg의 compound 48/80을 투여한 군에서는 90%, 20% 생존하였고 평균 사망시간은 64.3분, 39.8분이었으며, 10 mg/mL 복분자를 전처리한 후 10, 15 µg의 compound 48/80을 투여한 군에서는 100%, 70% 생존하고 평균 사망시간은 53.4분으로 복분자의 전처리는 compound 48/80에 의한 아나필락틱 속예 농도 의존적으로 억제하였다 (Table 1).

2. Compound 48/80에 의한 아나필락틱 속예 유발시 장관막 비만세포의 탈과립에 대한 복분자의 억제효과

Compound 48/80을 마우스 체중 그램(gm)당 5, 10, 15 µg을 복강내 투여한 경우와 복분자를 전처리한 후 compound 48/80을 투여한 경우에서의 장관막 비만세포의 탈과립 정도를 관찰한 결과는 다음과 같다. 생리식염수만을 투여한 음성 대조군의 비만세포 탈과립 지수는 6.3%였고 compound 48/80을 마우

Table 2. Inhibitory effect of *Rubus coreanus* water extract (RCWE) on compound 48/80 (C48/80)-induced mesenteric mast cell degranulation.

Treatment		Type of mast cells degranulation (%)			Degranulation index (DI, %)	Inhibition of degranulation
RCWE (mg/mL)	C48/80 (μg/g BW)	Non	Moderate	Severe		
—	—	88.9±1.6	9.6±2.6	1.5±1.2	6.3	—
—	5	66.8±5.2	19.4±4.5	13.8±3.7	23.5	—
—	10	8.8±1.9	16.3±3.3	73.9±2.9	82.1	—
—	15	2.4±0.8	9.9±1.4	87.7±4.8	92.7	—
1	5	81.2±2.7	13.8±2.2	5.0±1.6	11.9	49
1	10	63.4±5.3	24.8±4.0	11.8±3.6	24.2	71
1	15	9.3±4.6	20.3±4.2	70.4±3.2	80.6	13
10	5	83.9±1.8	12.1±1.8	4.0±1.3	10.1	57
10	10	80.6±3.5	14.7±2.5	4.7±2.3	12.1	85
10	15	36.4±3.3	36.1±3.7	27.5±2.9	45.6	51

Groups of mice (n=10/group) were intraperitoneally injected three times with 300 μL of saline or RCWE (1 or 10 mg/mL) at various doses 24, 12 and 1 hr before the injection of various doses of compound 48/80 (5, 10, or 15 μg/g BW). The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of mice. Degranulation index (DI, %)=[(No. of normal mast cell×0)+(No. of moderate degranulated mast cell×50)+(No. of severe degranulated mast cell×100)]/100. Inhibition of degranulation (%)=[1-(DI. of compound 48/80-induced degranulated mast cell pretreated with RCWE/DI of compound 48/80-induced degranulated mast cell)]×100.

스 체중 그램 당 5 μg을 투여한 군에서는 23.5%, 10 μg을 투여한 군에서는 82.1%, 15 μg을 투여한 군에서는 92.7%였다. 그러나 1 mg/mL의 복분자를 전처리한 후에 compound 48/80을 처리한 경우 상기의 농도에서 탈과립 지수는 각각 11.9, 24.2, 80.6%였고 탈과립 억제율은 각각 49, 71, 13%였으며, 10 mg/mL의 복분자를 전처리한 후에 compound 48/80을 처리한 경우 상기의 농도에서 탈과립 지수는 각각 10.1, 12.1, 45.6%이었고 탈과립 억제율은 각각 57, 85, 51%로 복분자의 전처리가 compound 48/80에 의한 장관막 비만세포의 탈과립을 억제하였다(Table 2).

3. Compound 48/80 또는 anti-DNP IgE에 의해 유도된 혈관투과성에 대한 복분자의 억제효과

Compound 48/80 또는 anti-DNP IgE에 의한 흰쥐 피부의 혈관투과성에 대한 복분자의 억제효과를 구명하기 위하여 Evans blue를 이용한 피부반응을 관찰하였다. 생리식염수를 투여한 정상대조군은 피부에 파란색 반점이 나타나지 않았고, compound 48/80 또는 anti-DNP IgE을 투여한 부위에는 파란색 반점이 나타났다. 1, 10 mg/mL의 복분자 만을 처리한 경우에 피부에 파란색 반점이 나타나지 않았다. 복분

자를 전처리한 후 compound 48/80을 주입한 경우에 같은 농도의 compound 48/80 만을 투여한 경우와 다

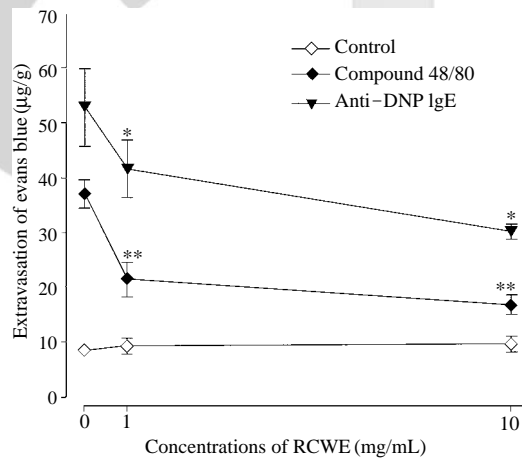


Fig. 2. Inhibitory effect of *Rubus coreanus* water extract (RCWE) on the compound 48/80 (C48/80) or IgE-induced cutaneous reaction. The skin of Sprague-Dawley rats was injected intradermally with 50 μL of phosphate buffered saline (PBS), RCWE (1 or 10 mg/mL), C48/80 (5 μg/mL) or RCWE+C48/80. Twenty minutes after intradermal injection, 0.5% Evans blue solution was injected via tail vein. The concentration of Evans blue (μg/g) was measured as described in Materials and Methods. Data represent as mean ± SEM (n=6). * : P < 0.05, ** : P < 0.01

르게 피부반응이 현저하게 감소하였다. 즉 compound 48/80 만을 투여한 경우에 피부조직 그림당 Evans blue의 농도는 $36.7 \pm 2.7 \mu\text{g/g}$ 이었다. 상기 농도의 복분자 용액을 전처리한 후 compound 48/80을 투여한 경우에 Evans blue의 농도는 각각 20.2 ± 3.5 , $15.3 \pm 1.8 \mu\text{g/g}$ 으로, 억제율은 각각 54, 75%였다 (Fig. 2). 또한 복분자를 전처리한 경우에 같은 농도의 anti-DNP IgE 만을 투여한 경우에 비하여 피부반응의 현저한 감소를 보였다. 즉 anti-DNP IgE 만을 투여한 경우에 피부조직 그림당 Evans blue의 농도는 $53.5 \pm 7.5 \mu\text{g/g}$ 이었다. 복분자 용액 1, 10 mg/mL 을 전처리하고, anti-DNP IgE를 투여한 경우에 Evans blue의 농도는 각각 41.6 ± 5.6 , $29.5 \pm 1.5 \mu\text{g/g}$ 으로, 억제율은 각각 33, 56%였다. 복분자는 compound 48/80 또는 anti-DNP IgE에 의한 혈관투과성의 증가를 현저하게 억제하였다 (Fig. 2).

고 찰

아나필락시스는 제1형 과민반응인 즉시형 과민반응으로서 그 발생기전은 항원이 체내로 들어오면 항원 전달세포에 의하여 협조 T세포에 전달되고 도움 T세포의 도움에 의하여 B세포가 자극되어 항원 특이성 IgE가 생산되고 이 항원 특이성 IgE는 즉시형 과민반응에서 중요한 역할을 하는 비만세포 막 표면에 있는 Fc 수용체에 부착된다. 이와 같이 항원에 감작된 비만세포가 동일한 항원의 공격을 받으면 항원과 비만세포 표면에 부착된 IgE 사이에 교차결합이 일어나고 비만세포는 탈과립되어 많은 매개물질들의 분비가 일어나 제1형 과민반응에 관련된 증상이 나타난다. 즉, 다양한 세포들이 비만세포가 활성화된 부위에 침착되고 혈관확장 및 부종이 야기되며 혈소판 활성화인자에 의한 조직손상을 야기시키기도 한다. 또한 평활근의 수축, 호흡곤란, 혈압저하 등의 증상을 일으키고 때로는 사망하기도 한다 (Roitt 등 2001). 최근에는 즉시형 과민반응에 중요하게 관여하는 세포들을 활성화시키는 인자들과 억제하는 인자들에 대한 연구, 이 세포들로부터 분비되는 화학 매개물질들의 역할에 대한 연구 및 실험동물에서 알레르기성 질환을 일으키는 다양한 실험모델을 만들어내는 연구들을 통하여 알레르기성 질환의 발병 기전을 밝히고 이를 방지할 수 있는 적합한 새로운 약물을 개발하는 것이 많은 학자들의 관심의 대상이 되고 있다(하대유 등 1987, 전병득 등 1992).

한편, 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, poly lysine 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 actin filament, intermediate filament 및 미세소관 등을 변형시키는 경우 (채옥희 등 1999) 등이 있다. 이러한 비만세포 탈과립을 일으키는 여러 인자들의 대부분은 세포밖으로부터 세포내로의 Ca²⁺ 유입을 증가시킴으로써 비만세포내의 자유 Ca²⁺의 양을 증가시키며, 증가된 자유 Ca²⁺이 세포내 Ca²⁺ binding protein인 Calmodulin과 결합하여 Ca²⁺ - Calmodulin complex를 형성하게 되고 이것이 세포내 myosin light chain kinase를 활성화시킨다. 그 결과 세포내 골격 및 세포내 이동에 관여하는 미세소관 (microtubules)과 미세섬유 (microfilaments)가 활성화되어 비만세포의 과립을 세포막 가까이로 이동시켜 결과적으로 세포막 융합을 일으키게 됨으로써 비만세포 탈과립 및 히스타민 유리현상이 일어나게 된다고 알려졌다 (William 1989). 이러한탈과립인자 가운데 세포내 cyclic nucleotide level의 변동에 의한 분비기전에 작용하는 것으로 cAMP가 있는데, cAMP는 비만세포 표면 수용체에 β-adrenergic agonist, PGE₂, histamine들이 결합하여 adenylate cyclase를 활성화시키거나 세포내 cAMP-dependent phosphodiesterase의 작용을 억제함으로써 세포내 cAMP 양을 증가시켜 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리를 억제한다 (강경진 등 1994)고 알려졌다.

본 실험에서는 상기의 여러 가지 비만세포의 탈

과립을 유도하는 인자들 중 compound 48/80, anti-DNP IgE를 사용하였는데, compound 48/80은 formaldehyde에 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-phosphodiesterase를 활성화시켜 세포내 cAMP 양을 감소시킨다고 알려졌다(George 등 1982, 강경진 등 1994). Anti-DNP IgE는 비만세포막의 Fc 수용체에 결합하여 비만세포를 감작시키고 DNP-HSA를 처리하여 항원 항체반응을 일으키고, IgE의 교차결합을 유도함으로써 비만세포내로의 칼슘유입을 증가시키고 세포내 자유칼슘을 증가시켜 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리를 일으킨다고 알려져 왔다(William 1989). 본 연구에서 진피내로 투여된 compound 48/80과 anti-DNP IgE은 현저한 피부반응을 일으켰다. 이는 투여된 compound 48/80 혹은 anti-DNP IgE가 결합조직내의 비만세포를 탈과립 시켜 히스타민을 비롯한 많은 활성인자들을 세포 밖으로 유리시킴으로서 이들이 주위 모세혈관의 혈관 투과성을 증가시켜 혈관내로 투여된 Evans blue 용액이 혈관 밖으로 스며 나와 진피내 파란색 반점을 일으킨 것으로 생각된다.

반면, 비만세포의 탈과립을 억제하는 물질들에 대한 연구도 많은데 이들은 세포막의 인지질 대사를 변화시키는 물질(채옥희 등 1996), cAMP의 수준변동과 Ca^{2+} 이동에 관계하는 물질(강경진 등 1993, 1994), cromoglycate와 flavonoids, protease 억제제(Theorides 등 1980, Sieghart 등 1981), 세포 골격계에 작용하는 물질 및 스테로이드(Chang 등 1993) 등이 있다. 비만세포를 포함한 모든 살아있는 세포들은 미세섬유와 미세소관이 어우러져 형성된 세포 골격계를 가지고 있는데 이 세포 골격계는 세포의 형태유지, 세포내부의 뼈대형성, 세포의 운동, 세포질 내 소기관의 이동, 유사분열시의 방추사 형성 등의 역할에 관여한다(Chang 등 1993)고 알려졌다.

본 실험에서 compound 48/80에 의하여 아나필락틱 속을 일으킨 ICR계 마우스에서 마우스의 사망률, 장간막 비만세포의 탈과립 지수는 용량 의존성으

로 증가되었다. 장간막 비만세포의 심한 탈과립과 더불어 마우스 사망률의 증가는 여러가지 사망원인 중 항원으로 감작하거나 야기주사하여 IgE 항체에 의하여 증대되는 전통적인 아나필락시스와 유사한 활성 매개물질들이 마우스의 비만세포로부터 분비되기 때문에 야기된다고 생각된다. 복분자를 전처리한 다음 compound 48/80에 의한 아나필락틱 속을 유발한 실험군에서 마우스의 사망률, 장간막 비만세포의 탈과립 지수는 현저히 감소하였다. 이러한 실험 결과는 복분자가 compound 48/80에 의한 장간막 비만세포의 활성화를 억제하여 일어나는 현상으로 생각된다.

이상의 실험결과로 볼때 복분자는 compound 48/80에 의하여 유도된 아나필락틱 속을 현저히 억제하였으며 compound 48/80과 anti-DNP IgE에 의한 피부반응도 억제하였다. 아마도 복분자가 비만세포를 포함한 알레르기에 관여하는 여러 종류의 세포로부터 아나필락시스 증개물질의 유리를 억제하여 아나필락시스에 의한 다양한 생리적 반응들이 일어나지 못하게 함으로써 아나필락틱 속과 피부반응을 억제하는 항 알레르기성 작용을 가지는 것으로 사료된다.

앞으로 비만세포의 활성화 작용에 대한 복분자의 정확한 억제기전을 밝히기 위해서는 먼저 복분자로부터 이러한 활성을 갖는 순수물질의 정제 및 성분 분석에 대한 연구가 절실하다. 또한 비만세포표면 수용체, 세포내 신호 전달계에 대한 영향, 세포내의 칼슘수준의 변화에 대한 영향 및 세포 골격계에 대한 전반적이고도 세밀한 연구가 필요하다. 그리고 이세포들 사이의 정보전달에 관여하는 다양한 사이토카인(cytokine)들과 염증세포 이동 및 침윤에 대한 연구도 동시에 수행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- 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. 한국BRM학회지 4 : 111-122, 1994.

- 전병득, 강경진, 채옥희, 송창호, 이무삼, 신세원 : Compound 48/80으로 유도되는 아나필락틱 속과 피부반응을 일으키기 위한 간단한 실험모형. 대한BRM학회지 2 : 169-181, 1992.
- 차환수, 박민선, 박기문 : 복분자 딸기의 생리활성. 한국식품과학회지 33 : 409-415, 2001.
- 채옥희, 양문식, 이무삼 : Spermine에 의한 흰쥐 복강 비만세포의 히스타민 유리와 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.
- 하대유, 박영민, 한장연 : Cyclosporin A, carbenicillin, epinephrine 및 steroid hormone이 마우스의 능동성 전신성 anaphylaxis에 미치는 영향. 대한면역학회지 9 : 169-175, 1987.
- Caufield JP, Lowis RA, Hein A, 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, Kiouss T, Yogancioğlu M, Keller D, Pfeiffer J : Cytoskeleton of living, unstained cells imaged by scanning force microscopy. Biophys J 64 : 1282-1293, 1993.
- De Ancos B, Gonzalez EM, Cano MP : Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. J Agr Food Chem 48 : 4565-4570, 2000.
- 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 48/80-induced histamine release by Benzalkonium chloride and its analogs and the polyamine receptor in mast cells. J Pharma Experi The 222 : 652-661, 1982.
- Heinonen LM, Meyer AS, Frankel EN : Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. J Agr Food Chem 46 : 4107-4112, 1998.
- Ischizaka T, Hirata F, Ishizaka K, Axelrod J : Stimulation of phospholipid methylation, Ca^{2+} 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 *Cotex 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 cell and basophil, 3th ed. Lippincott Williams & Willkins 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.
- Shin TY, Kim DK : Inhibitory effect of mast cell-dependent anaphylaxis by *Gleditsia sinensis*. Arch Pharm Res 23 : 401-406, 2000.
- Shin TY, Kim SH, Lee ES, Eom DO, Kim HM : Action of *Rubus coreanus* Extract on Systemic and Local Anaphylaxis. Phytoter Res 16 : 508-513, 2002.
- 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.
- 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.
- Theorides 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. Appleton & Lange, 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.

Korean J Phys Anthrop
17(2): 99 ~ 107, 2004

Abstract

Inhibitory Effect of *Rubus coreanus* on Compound 48/80-induced Anaphylactic Shock and Vascular Permeability *in Vivo*

Guang-Zhao Li, Ok-Hee Chai, Chang-Ho Song

Department of Anatomy and Research Center for Allergic Immunologic Disease, Chonbuk National University Medical School, Jeonju, Korea

As an attempt to search for antiallergic and antiinflammatory activities, we examined the potency of *Rubus coreanus* water extract (RCWE). The effect of RCWE on systemic anaphylactic shock and vascular permeability was investigated. Results are 1) compound 48/40-induced mortality rate in mice were significantly inhibited by pretreatment of RCWE and compound 48/40-induced mean death time in mice were delayed by pretreatment of RCWE, 2) compound 48/40-induced mesenteric mast cell degranulation in mice were significantly inhibited by pretreatment of RCWE, 3) the increase of vascular permeability induced by compound 48/80 or anti-DNP IgE in rat was significantly inhibited by pretreatment of RCWE. These results suggest that RCWE contains substances with an activity to inhibit the systemic anaphylaxis and vascular permeability.

Key words : Anaphylactic shock, Mast cell, *Rubus coreanus*, Vascular permeability