

Compound 48/80에 의한 비만세포 활성화와 IgE에 의한 혈관투과성 증가에 대한 응답의 억제효과

연광해^{1,2}, 최윤희¹, 채옥희^{1,3}, 송창호^{1,3}

¹전북대학교 의학전문대학원 해부학교실

²중국 연변대학교 기초의학원 해부학교실

³전북대학교 의과학 연구소

간추림 : 비만세포는 알레르기 질환의 병태생리에 중요한 역할을 한다. 응답이 compound 48/80에 의한 비만세포의 활성화와 IgE에 의한 혈관투과성 증가를 억제하는지 알아보고, 그 약리기전을 구명하기 위하여 이 연구를 실시하였다. 시험관 내 실험에서 응답이 compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리, 비만세포 속으로의 칼슘유입, 비만세포 내의 cAMP 수준에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한 생체 실험에서 응답을 입안으로 투여한 다음 IgE에 의한 피부 혈관투과성 증가에 미치는 영향을 관찰하였다. 응답 전처리에 의하여 compound 48/80에 의한 흰쥐 복강 비만세포의 탈과립과 비만세포로부터의 히스타민 유리, 비만세포 내로의 칼슘유입이 억제되었다. 복강 비만세포 내 cAMP 수준도 응답에 의해 증가되었다. 또한 IgE에 의한 피부 혈관투과성 증가가 응답의 전처리로 억제되었다. 이상의 결과로 미루어, 응답은 compound 48/80에 의한 비만세포 활성화와 IgE에 의한 혈관투과성 증가를 억제하는 항알레르기성 물질을 함유하고 있다고 생각된다. 응답은 비만세포 활성화로 야기되는 알레르기 질환의 치료제로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

(2008년 12월 11일 접수, 2009년 1월 28일 게재승인)

찾아보기 낱말 : 비만세포, 응답, Compound 48/80, IgE, 히스타민 유리, 칼슘, cAMP

서 론

비만세포(mast cell)는 Ehrlich (1877)에 의하여 처음 관찰된 이래 그 유래와 형태, 기능 등이 많은 학자들에 의하여 보고되어 왔다. 비만세포는 흰쥐 복강 내에서 분리하기가 쉽고 다른 세포와 달리 크고 굵은 이염색성의 과립을 함유하고 있으며, 과립 내에는 히스타민 (Petersen 등 1996), 헤파린, 세로토닌 및 가수분해 효소(Caulfield 등 1980, Galli 등 1993, Nilsson 등 1999) 등이 함유되어 있다. 최근에 비만세포의 탈과립을 유발하는 인자들과 억제하는 인자들에 대한 연구를 통하여 샘세포들의 분비 기전을

구명할 뿐만 아니라, 아토피피부염과 천식, 알레르기성 비염 등 비만세포의 이상 분비로 인한 여러 가지 알레르기성 질환을 치료할 수 있는 약물을 개발하려는 연구들이 많이 진행되고 있다(Chai 등 1996, 1999, Kim 등 2004, Chai 등 2005, Li 등 2005a, b, Choi 등 2006a, b).

비만세포의 활성화는 면역학적 자극들(항원, anti-IgE, lectin 등)과 약리학적 복합물(ionophore A23187, compound 48/80 등), 보체(complement, C3_a와 C5_a)와 같은 아나필락톡신(anaphylatoxin)에 의하여 유도된다(Roitt 등 2001). 특히 비만세포 활성화를 유도하는 인자들 가운데 compound 48/80은 포름알데히드(formaldehyde)에 의하여 교차연결된 펜에칠아민(phenethylamine)의 혼합 다당체다(Tasaka 등

교신저자 : 송창호(전북대학교 의학전문대학원 해부학교실)
전자우편 : asch@chonbuk.ac.kr

1991, Yoshii 등 1991). 이 compound 48/80이 비만세포의 세포막에 작용하여 세포 밖에 있는 칼슘을 세포 안으로 유입시켜 세포 안 자유칼슘을 증가시키며, 2차 신호전달자체인 고리형아데노신1인산(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)과 고리형구아노신1인산(cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 양에 변화를 일으켜, 비만세포의 탈과립과 히스타민을 유리시키는 비만세포 활성화 물질이다(Kim 등 2004, Choi 등 2006a). 비만세포 활성화 자극들에 의해 비만세포가 활성화되면 많은 매개물질들이 세포 밖으로 방출되고, 이들 매개물질들에 의해 다양한 알레르기 증상들이 나타난다(Roitt 등 2001).

한편 곰의 간에서 분비되는 웅담(bear bile)의 주요성분은 담즙산으로 웅담특유의 우루소디옥시콜산(ursodeoxycholic acid, UDCA)과 체노디옥시콜산(chenodeoxycholic acid, CDCA)이며, 그 밖에 담색소와 아미노산, 미량원소 등이 포함되어있다(Jin 등 2005). 현재까지 웅담의 약리작용으로 해열과 진정, 이담, 항염증, 항산화, 항암, 간보호 작용 등이 있다고 알려져 있다(Jin 등 2005). 그러나 웅담의 항알레르기 약리작용에 대한 연구보고는 거의 없다. 다만 알레르기성 면역반응과 관련된 담즙(bile acid)의 약리효능에 대한 몇 개의 연구보고가 있다. Nakagami 등(1990)과 Kubo 등(1989)은 돼지의 담즙을 마우스의 입안으로 투여한 후 지연성과민반응이 억제된다고 보고하였으며, Gauthier 등(1974)은 담즙 추출물이 히스타민에 의한 아나필락시스 쇼크를 억제한다고 보고하였다. 반면에 Masini 등(1994)과 Quist 등(1991)은 담즙이 쥐의 비만세포로부터 히스타민 분비를 촉진시킨다고 보고하였다. 이러한 연구결과들은 알레르기성 면역반응에서 담즙의 약리 효능이 서로 다르게 나타날 수 있다는 것을 시사한다. 이에 저자들은 웅담의 항알레르기 효능과 그 약리 작용을 밝히기 위하여, 웅담이 compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리, 칼슘유입, cAMP 수준 변화와 IgE에 의한 피부 혈관투과성 변화에 미치는 효과를 알아보았다. 연구 결과 웅담에는 비만세포의 활성화와 피부 혈관투과성을 억제하는 약리효능이 있음을 알 수 있었다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 250~300 g의 건강하고 성숙한 Sprague-Dawley계 흰쥐(다물 사이언스, 대전, 대한민국) 수컷을 사용하였다. 이들 실험동물은 수돗물과 사료(제일사료주식회사, 대전, 대한민국)를 공급하고 가능한 스트레스를 받지 않도록 주의하여 조용한 분위기에서 사육하였다. 실험동물을 이용한 모든 실험은 전북대학교 실험동물 위원회(Chonbuk National University Animal Welfare)의 규정대로 실시하였다.

2. 실험재료

웅담(bear bile)은 인위적으로 추출한 웅담분말을(중국 연길시 연남 곰 사육장, 연변대학교 기초의학원 이광소 교수 기증) 멸균증류수에 녹인 다음 0.2 μm 필터에 여과하여 사용하였다. 실험목적에 따라 웅담 1,000 mg을 멸균증류수 10 mL에 녹여서 pH 7.4로 적정한 후 여러 농도로 희석하여 사용하였다.

3. 실험방법

1) 복강 비만세포의 수확

Chai 등의 방법(1999)을 이용하여 다음과 같이 복강에서 비만세포를 얻었다. 흰쥐의 복강 내에 약 10 mL의 타이로드 완충용액(HEPES-Tyrode buffered solution)을 주입하고 90초간 쥐의 배벽을 가볍게 마사지 하였다. 배벽 중앙선을 절개하고 복강 세척액을 스포이트로 채취하여 200 \times g로 10분간 원심시킨 후 상층 부유액을 버리고, 동일 타이로드 완충용액으로 비만세포 수가 1×10^6 cells/mL 되도록 재부유 시켰다. 비만세포의 형태 관찰은 이 비만세포 부유액을 사용하였다.

복강 비만세포 부유액으로부터 비만세포의 순수분리는 Hachisuka 등(1988)의 방법을 이용하여 다음과 같이 분리하였다. 15 mL 원심분리용 시험관에 등장페르콜용액(isotonic percoll solution; 10 \times Hank's solution 1 mL+percoll 9 mL) 3.5 mL을 넣은 후 재부유된

비만세포 부유액 0.75 mL을 조심스럽게 올려놓고 타이로드 완충용액 0.5 mL을 위층에 채운 다음, 10 분 정도 정지시킨 후 125×g로 15분간 원침시켰다. 원침후 상층액 2 mL을 피펫으로 제거하고 4°C 타이로드 완충용액으로 2번 세척하여 순수 비만세포 부유액을 만들었다.

2) 세포독성 실험

응답의 세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT)를 이용하여 다음과 같이 평가하였다(Choi 등 2006). 복강 비만세포를 수확하여 응답을 다양한 농도로 처리한 후 37°C 항온조에서 2시간 동안 배양시켰다. 다음 MTT를 첨가하고 37°C 항온조에서 1시간 동안 배양한 후 형성된 보라색 MTT 결정을 분광광도계 (SPECTRA MAX plus, Molecular Devices, USA)에서 570 nm로 흡광도를 측정하여 생존율을 계산하였다.

3) 비만세포의 형태변화 관찰

복강 비만세포 부유액 200 μL에 타이로드 완충용액 25 μL, 응답 25 μL를 각각 넣고 37°C 항온조에서 10분 동안 반응시켰다. 응답이 compound 48/80에 의한 비만세포의 활성을 억제하는가를 알아보기 위하여, 비만세포 부유액 200 μL를 응답 25 μL와 반응시킨 후에 compound 48/80 용액 25 μL를 넣어 20분 동안 반응시켰다.

4) 비만세포의 탈과립현상 관찰 및 탈과립물 산출

광학현미경에서 비만세포의 형태를 관찰하기 위하여 반응이 끝난 비만세포 부유액 200 μL를 1,000 배의 배율로 도립현미경으로 관찰하였다(Chai 등 2005). 정상 비만세포의 형태는 대부분 원형 또는 난원형으로 세포윤곽이 뚜렷하고 세포질 내에는 많은 과립들이 충만되어 있었다. 비만세포의 직경은 대략 10~20 μm 정도로 복강 부유액의 다른 세포들(림프구 또는 호중성백혈구)에 비해 2배 이상 컸다. 비만세포의 형태가 원형 또는 난원형으로 세포윤곽이 뚜렷하고 세포질 내에 광굴절률이 높은 과립들로 충만된 상태를 정상형 비만세포로 구분하였다. 반면에 세포윤곽이 불분명하고 세포질 내 과립들이 세포표면으로 돌출되거나 세포주위에 흩어져 있는

경우를 탈과립형으로 구분하여, 그 수를 실험군당 임의로 선택한 10 시야에서 계수하고, 탈과립률을 계산하였다. 관찰오차를 줄이기 위하여 동일 실험군에 대하여 두 사람의 관찰결과를 합하여 산출하였다. 비만세포 탈과립률(%)=(탈과립된 비만세포 수 ÷ 비만세포 총수)×100

5) 비만세포로부터 유리된 히스타민 양의 측정

위에서 기술한 방법으로 흰쥐 복강 비만세포를 분리한 다음 부유액 내 세포의 수가 10⁶ cells/mL가 되도록 조절한 후 그 중 200 μL씩 취하였다. 정상 비만세포에서 유리되는 히스타민 양을 측정하기 위하여 비만세포 부유액 200 μL에 타이로드 완충용액 만을 처리하였고, compound 48/80 용액에 의한 히스타민 유리를 측정하기 위하여 타이로드 완충용액 25 μL를 첨가한 10분 후 compound 48/80 용액(최종농도: 0.5 μg/mL) 25 μL를 첨가하여 반응시켰다. 응답이 단독으로 비만세포의 히스타민을 유리시키는 지 알아보기 위하여 응답(최종농도: 25, 50 또는 100 μg/mL) 25 μL를 비만세포 부유액에 투여한 10분 후에 타이로드 완충용액 25 μL를 첨가하였다. 또한 응답의 compound 48/80 용액에 의한 히스타민 유리 억제작용을 알아보기 위하여 비만세포 부유액에 상기 농도의 응답용액 25 μL를 전처리하고 10분 후 역시 compound 48/80 용액(최종농도: 0.5 μg/mL) 25 μL를 첨가하였다. 반응이 끝난 후 4°C에서 400×g로 원침하여 얻은 상층액 내의 히스타민 양을 측정하였다. 히스타민 양은 Harvima 등(1988)의 방법을 이용한 방사성동위원소(¹⁴C)-효소법으로 정량하였다. 히스타민 양은 히스타민 총량에 대한 백분율로 표시하였으며, 총 히스타민 양은 비만세포 수가 2×10⁵ 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

6) 비만세포 내로의 칼슘유입량 측정

칼슘유입량은 Li 등(2005)의 방법을 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 순수 분리한 비만세포를 칼

습과 마그네슘이 들어있지 않은 타이로드 완충액에 $1 \mu\text{Ci}^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{mL}$ (PerkinElmer Life science, Inc., USA) 농도로 재부유시켰다. 이 비만세포 재부유액을 이용하여 compound 48/80에 의한 탈과립 유도 반응실험과 동일하게 반응시켰다. 원침 후 상층액을 버리고 1 mM 염화탄타늄 (LaCl_3)과 10% Triton $\times 100$ 을 넣어 비만세포를 파괴시킨 후 β -counter (Liquid scintillation Analyzer, A canberra company, Australia)를 사용하여 칼슘양을 측정하였다.

7) cAMP 측정방법

실험방법은 Kim 등 (2006)의 방법을 사용하여 측정하였다. 순수 분리된 비만세포에 응답을 처리한 후 산성 알코올 (0.9 mL 86% ethanol : 1 M HCl = $99 : 1$)로 반응을 중지한 다음, 액체질소를 이용하여 비만세포를 파괴하여 건조된 시료를 얻었다. cAMP 정량은 Holmegarrd (1982)의 방법에 기본적 원리를 둔 cAMP [^{125}I] radioimmunoassay kit (Du Pont Company, Wilmington, USA)을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 위에서 얻은 상층액 $100 \mu\text{L}$ 에 working tracer solution (cAMP [^{125}I]-Tracer : cAMP Carrier serum = $1 : 1$ (v/v)) $100 \mu\text{L}$ 를 첨가하였다. 그리고 4°C 에서 18 시간 동안 반응시킨 다음, cAMP precipitator 0.5 mL 를 첨가하였다. 첨가 후 $1,200 \times \text{g}$ 에서 15 분 동안 원침한 다음, 상층액을 버리고 γ -counter (COBRAII, A canberra company, Australia)로 cAMP를 측정하였다.

8) 응답 전처리 후 IgE에 의한 피부 혈관투과성 변화 측정

피부 혈관투과성 유발 실험은 Choi 등 (2006)의 방법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 수컷 흰 쥐 등의 털을 제거한 다음 anti-dinitrophenyl (DNP) immunoglobulin (IgE)에 의한 피부반응을 유발하기 위하여 에테르 마취하에서 등 피부의 진피 내로 200 ng anti-DNP IgE가 들어있는 $20 \mu\text{L}$ 인산화완충 용액 (phosphate-buffered saline, PBS)을 주사하였다. 24 시간 후 0.1 mg/mL DNP human serum albumin (HSA)가 들어있는 2% 에반스청 (Evans blue) 용액 $200 \mu\text{L}$ 를 음경등정맥으로 주입하였다. 에반스청을

주사하기 24 시간과 12 시간, 1 시간 전에, 응답 (50 , 100 또는 200 mg/kg)을 입안(oral)으로 세 차례 투여하였다. 에반스청을 주입한 후 20 분이 경과한 등 피부를 절개하여 진피에서 파란색 반점이 나타나는 여부를 관찰하였다. 그리고 파란색 반점이 나타난 부위의 피부를 절취하여 그 무게를 측정하고, 가로 세로 약 $3 \sim 4 \text{ mm}$ 정도의 작은 조각으로 세절하여, 2 mL 의 폼아미드 (formamide)용액에 넣고, 80°C 에서 3 시간 동안 에반스청을 유출시켰다. 유출시킨 에반스청의 양을 분광광도계 (SPECTRA MAX plus, Molecular Devices, USA)로 620 nm 에서 측정한 후 에반스청 표준곡선에 준하여 농도를 산출하였다.

결 과

1. 응답의 세포독성

응답이 비만세포에 대한 세포독성 실험은 MTT 실험방법을 이용하였다. 응답 농도 $25 \sim 500 \mu\text{g/mL}$

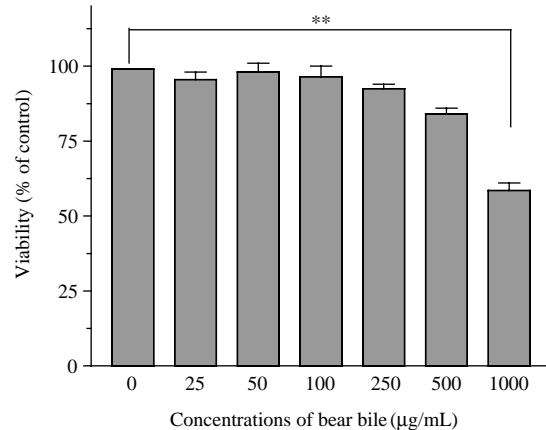


Fig. 1. Effect of bear bile on the rat peritoneal mast cell (RPMC) viability. RPMCs were treated with various concentrations of bear bile for 2 h. RPMC viability was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay, and the percentage of the viability was calculated as a ratio of A_{570} of control cells (treated with HEPES-Tyrod buffered solution). Each data value is the mean \pm S.E.M. of five independent experiments. **: $p < 0.01$.

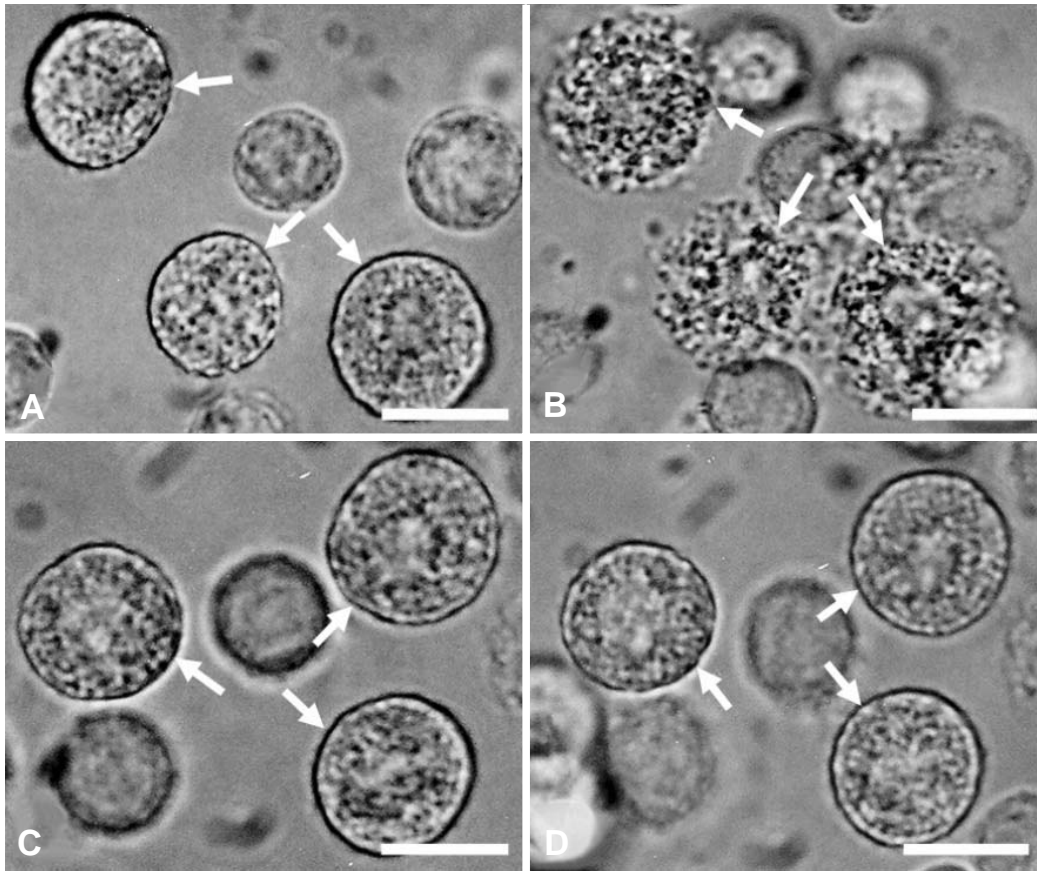


Fig. 2. Inverted light micrographs of rat peritoneal mast cells (RPMCs) in HEPES-Tyrode buffered solution. A : The normal RPMCs (arrows) in HEPES-Tyrode buffered solution. B : The degranulated RPMCs (arrows) after the addition of compound 48/80. C : The RPMCs (arrows) observed within 10 minutes after the addition of bear bile solution (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) show similar findings as seen in figure A. D : The RPMCs (arrows) pretreated with bear bile solution (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) observed within 10 minutes after the addition of compound 48/80, show similar findings as seen in figure C. Bars=10 μm .

에서 비만세포의 생존율이 85% 이상이었고, 농도 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 생존율이 57% 이었다 (Fig. 1). 복강 비만세포를 이용한 비만세포의 탈과립과 히스타민유리, 칼슘 유입, cAMP 변화 등의 실험에서 응답의 최종농도를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도로 실시하였다.

2. 비만세포의 형태와 탈과립 관찰

1) 타이로드 완충용액에 부유된 정상 비만세포
비만세포의 크기는 복강 부유액 내 림프구의 두

배 정도였으며, 구형 또는 난원형이었다. 세포막이 뚜렷하고 세포질에는 광굴절률이 강한 과립들로 채워져 있어 핵이 분명하게 관찰되지 않는 정상 비만세포 소견을 보였다 (Fig. 2A).

2) Compound 48/80 용액 처리 후 비만세포의 형태변화

비만세포 부유액에 compound 48/80 용액 (최종농도: 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 첨가한 후 수 분 이내에 비만세포 세포질 내 과립들의 광굴절률이 약해지기 시작했으며, 비만세포의 가장자리가 불규칙하게 되면서 일부

과립들이 세포표면으로 돌출되어 나와 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 또한 시간이 경과되면서 세포가 점차 커지고 동시에 세포질 내 공포상의 구조가 보였으며, 광굴절률이 약화된 과립들이 세포표면으로 돌출되는 탈과립현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B).

3) 응답 처리 후 비만세포의 변화

응답 100 µg/mL을 정상 비만세포 부유액에 첨가하였을 때 비만세포의 형태, 크기, 표면윤곽 등이 정상 비만세포와 별다른 소견을 보이지 않았으며, 첨가후 30분 동안 탈과립현상은 나타나지 않았다(Fig. 2C).

4) 응답 전처리 후 compound 48/80 용액 첨가시

비만세포의 변화

정상 비만세포 부유액에 응답(최종농도: 100 µg/mL)을 10분간 전처리한 다음 compound 48/80 용액(최종농도: 0.5 µg/mL)을 첨가하였을 때도 형태, 크기, 표면윤곽 등에서 정상 세포와 다른 소견을 관찰할 수 없었다. 그러나 20분이 경과한 후 비만세포의 일부 세포막의 가장자리가 불규칙해졌으며 약간의 굴절률 감소를 보였고, 몇몇의 과립들이 돌출되어 보였지만 compound 48/80 용액에 의한 비만세포의 현저한 탈과립현상은 관찰되지 않았다(Fig. 2D).

이상의 형태학적인 결과로 탈과립률을 계산해 본 결과 응답을 전처리한 뒤 compound 48/80을 처리한 비만세포의 탈과립률은 응답의 최종농도가 25 µg/mL일 때 82.5±5.6%, 50 µg/mL일 때 54.8±1.0%, 100 µg/mL일 때 19.8±3.5%이었으며, 응답의 전처리에 의하여 compound 48/80에 의한 비만세포 탈과립률이 현저히 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 3).

3. 비만세포로부터 유리된 히스타민 양의 측정결과

Compound 48/80 용액에 의한 복강 비만세포로부터의 히스타민 유리는 응답 전처리에 의하여 현저히 억제되었다. 복강 비만세포로부터 유리된 히스타민 양 측정결과는 다음과 같다. 타이로드 완충용액에 부유된 정상 비만세포로부터 유리된 히스타민

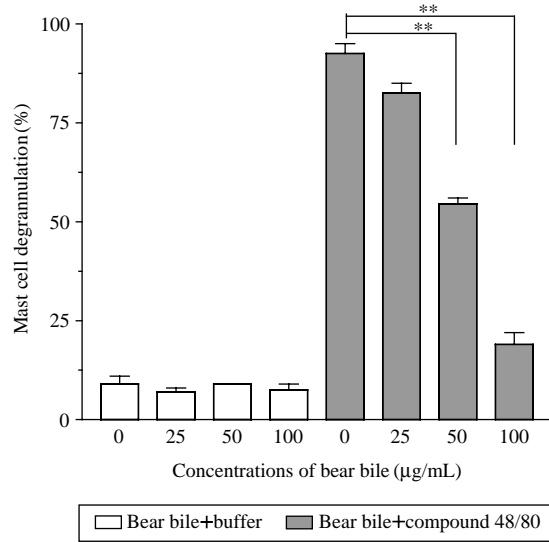


Fig. 3. Inhibitory effect of bear bile on compound 48/80 (C48/80)-induced degranulation in rat peritoneal mast cells (RPMCs). RPMCs (1×10^6 cells/mL) were treated with 25 µL of HEPES-Tyrode, bear bile (final concentration: 25, 50 or 100 µg/mL) or bear bile+C48/80 (final concentration: 0.5 µg/mL) at 37°C for 30 min. The number of RPMCs was counted by inverted microscopy ($\times 1,000$) in 10 fields. Mast cell degranulation (%) was calculated by the following formula: (number of degranulated RPMCs / total number of RPMCs) $\times 100$. Data are represented as the mean \pm S.E.M. of five independent experiments. ** : $p < 0.01$.

양은 7.3±0.85%이며, 복강 비만세포 부유액에 응답 최종농도를 25, 50, 100 µg/mL가 되도록 첨가했을 때의 히스타민 유리는 각각 6.8±10.4, 6.8±1.2, 5.8±0.45%이었다. 복강 비만세포 부유액에 compound 48/80(최종농도: 0.5 µg/mL) 용액을 처리하였을 때 비만세포로부터 유리된 히스타민 양은 64.9±2.5%이었으나, 상기 농도의 응답을 전처리한 후 compound 48/80 용액을 첨가하였을 때 비만세포로부터 유리된 히스타민 양은 각각 57.5±1.4, 36.2±1.1, 9.3±2.1%이었다. Compound 48/80 용액에 의한 비만세포로부터의 히스타민 유리가 응답에 의하여 현저하게 억제되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

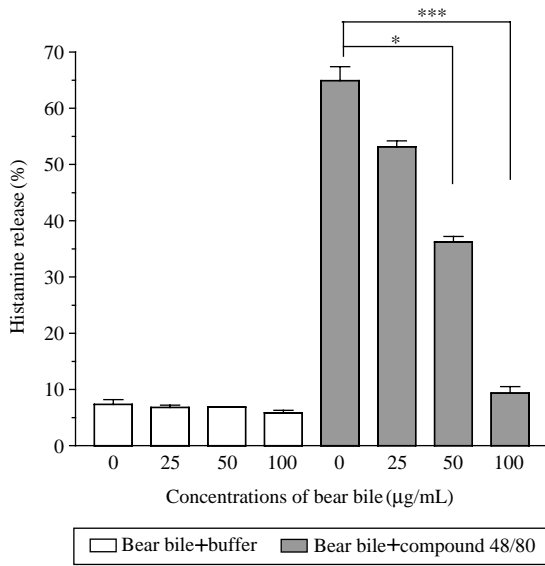


Fig. 4. Inhibitory effect of bear bile on compound 48/80 (C48/80)-induced histamine release from rat peritoneal mast cells (RPMCs). RPMCs (1×10^6 cells/mL) were treated with 25 μ L of HEPES-Tyrode, bear bile (final concentration : 25, 50 or 100 μ g/mL) or bear bile+C48/80 (final concentration : 0.5 μ g/mL) at 37°C for 20 min. Histamine release (%) was calculated by the following formula : (experimental histamine/total histamine release) \times 100. Data are represented as the mean \pm S.E.M. of five independent experiments. * : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$.

4. 비만세포 내로의 칼슘유입 측정 결과

Compound 48/80에 의한 복강 비만세포 내로의 칼슘유입이 응답 전처리로 감소되었다. 복강 비만세포의 칼슘유입 측정 결과는 다음과 같다. 정상 비만세포의 칼슘 유입은 82.2 ± 1.1 nM (in 1×10^6 cells/mL)이었고, 응답(최종농도: 25, 50, 100 μ g/mL)만을 처리하였을 경우 칼슘유입은 각각 77.1 ± 3.0 , 74.0 ± 3.6 , 71.3 ± 2.1 nM로 정상세포와 비슷하였다. 복강비만세포 부유액에 compound 48/80을 처리하였을 때 유입된 칼슘의 양이 156.0 ± 6.0 nM로 급격히 증가하였다. 반면에 응답(최종농도: 25, 50, 100 μ g/mL)을 전처리하고 compound 48/80을 처리하였을 때 칼슘유입량은 116.2 ± 3.8 , 101.2 ± 5.8 , 84.8 ± 1.6 nM로, compound 48/80에 의해 증가된 칼슘유입이 응답농

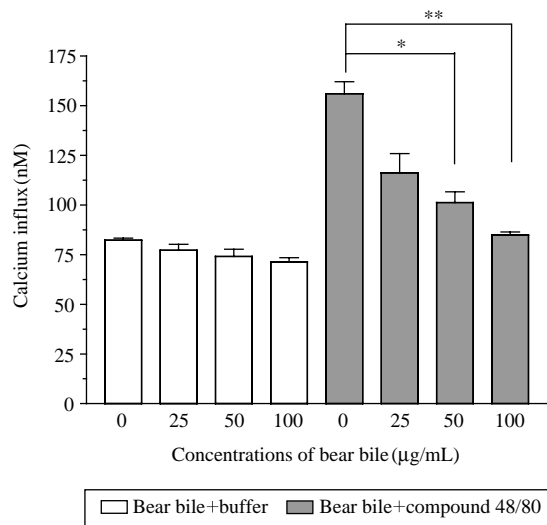


Fig. 5. Inhibitory effect of bear bile on compound 48/80 (C48/80)-induced calcium influx into rat peritoneal mast cells (RPMCs). RPMCs (1×10^6 cells/mL) were treated with 25 μ L of HEPES-Tyrode, bear bile (final concentration : 25, 50 or 100 μ g/mL) or bear bile+C48/80 (final concentration : 0.5 μ g/mL) at 37°C for 30 min. The amounts of calcium influx are represented as the mean \pm S.E.M. of five independent experiments. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$.

도에 의해 농도의존적으로 감소되었다 (Fig. 5).

5. 비만세포 내 cAMP 수준 측정 결과

응답의 복강 비만세포로부터의 히스타민 유리 억제작용이 cAMP 수준에 관계하는 기전에 의하여 일어나는 지를 알아보기 위한 실험결과는 다음과 같다. 정상 복강 비만세포(1×10^6 cells/mL)의 세포 내 cAMP 수준은 0.48 ± 0.3 pM이었으며 이를 100%로 기준을 삼았다. 응답이 흰쥐 복강 비만세포 내의 cAMP 수준에 어떠한 영향을 주는가를 알아보기 위하여 실시한 실험에서 응답의 최종농도를 100 μ g/mL가 되도록 하여 시간대 별로 37°C 항온조에서 1, 2, 3, 4, 5분간 반응 처리한 경우 세포 내 cAMP 수준은 각각 756, 278, 256, 230, 200%로서 정상수준에 비하여 현저히 증가되었다. cAMP 수준은 1분에서 가장 많이 올라갔고 5분에서 떨어지기 시작했다 (Fig. 6).

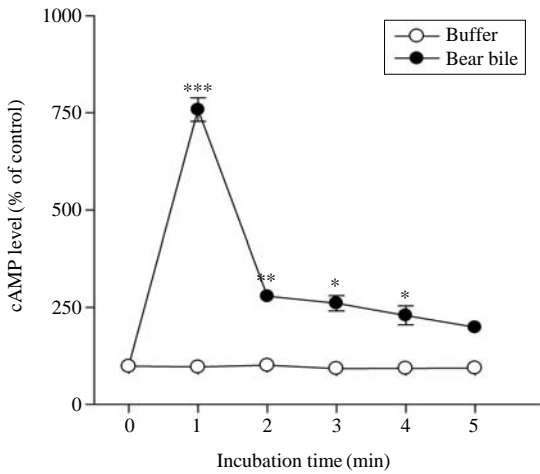


Fig. 6. Effect of bear bile on cAMP in rat peritoneal mast cells (RPMCs). RPMCs were treated with bear bile (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for indicated time at 37°C. The analysis of intracellular cAMP was described in Materials and Methods. Each data value represents the mean \pm S.E.M. of two independent experiments. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$.

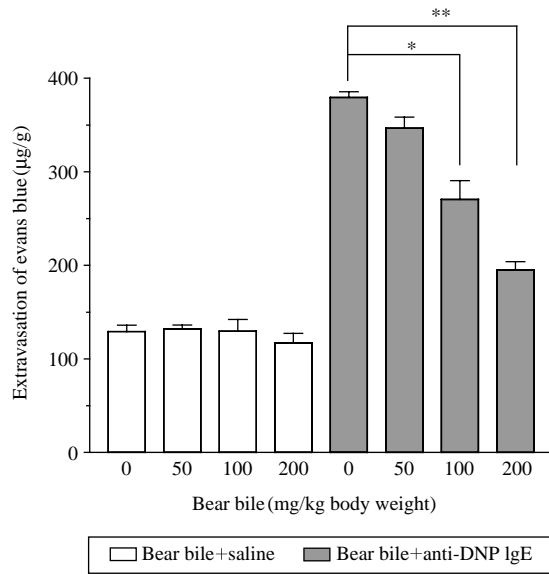


Fig. 7. Inhibitory effect of bear bile on the anti-dinitro phenyl (DNP) immunoglobulin E-mediated passive cutaneous anaphylaxis in mice. Bear bile was orally administered 24, 12 and 1 hr prior to the challenge with antigen (DNP-human serum albumin). Extravasation of Evans blue ($\mu\text{g}/\text{g}$) was measured as described in Materials and Methods. Data are represented as the mean \pm S.E.M. of five independent experiments. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$.

6. 응답 전처리 후 IgE에 의한 피부 혈관투과성 변화

지금까지의 시험관 실험에서, 응답이 compound 48/80에 의한 비만세포의 활성화(탈과립, 히스타민 유리, 칼슘유입)를 억제한다는 것을 알 수 있었다. 이에 생체실험에서도 비만세포의 IgE 수용체를 경유한 피부 혈관투과성 증가를 응답이 억제하는지 알아보았다. Anti-DNP IgE에 의한 피부 혈관투과성 증가에 대한 응답의 억제효과를 구명하기 위하여 피부반응(파란색 반점)을 관찰하였고, 에반스청의 농도(Evans blue density)를 측정된 결과는 다음과 같다. 생리식염수를 투여한 정상대조군은 피부에 파란색 반점이 나타나지 않았고, anti-DNP IgE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 주사한 부위에서는 파란색 반점이 나타났다. 응답을 50, 100 또는 200 mg/kg의 농도로 입 안으로 세 번 투여한 경우에는, 같은 농도의 anti-DNP IgE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)만을 주사한 경우와 비교할 때, 현저한 피부반응의 감소가 관찰되었다. Anti-DNP IgE 용액만을 주사한 경우에 산출되는 에반스청의 농도는

387 \pm 17.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ 이었으나, 상기 농도의 응답을 세 번 구강 투여한 다음 anti-DNP IgE 용액을 주사한 경우 산출되는 에반스청의 농도는 각각 362.3 \pm 16.1, 277.2 \pm 19.4, 198.2 \pm 17.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ 으로 anti-DNP IgE 용액만을 주사한 경우보다 혈관투과성이 억제되었다 (Fig. 7).

고찰

비만세포는 히스타민(Petersen 등 1996)과 헤파린, 세로토닌, 가수분해효소(Caulfield 등 1980, Galli 등 1993, Nilsson 등 1999) 등이 포함된 비교적 큰 분비과립을 갖고 있어, 비만세포 과립들의 이상분비로 인하여 발생하는 다양한 알레르기성 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 약물을 개발하는 연구에 이용

되고 있다. 이러한 비만세포를 활성화시키는 요인들은 다양하다. 첫째, 항원과 IgE 항체, IgE 수용체에 대한 항체, 콘카나발린에이 (concanavalin A), 폴리아민 (polyamine), compound 48/80, 폴리믹신비 (polymyxin B), 폴리라이신 폴리펩타이드 (polylysine polypeptides), 알파-키모트립신 (alpha-chymotrypsin), 이자포스포리파제 A₂ (pancreatic phospholipase A₂) 등의 효소들의 자극이 있다 (Ischizaka 등 1980). 둘째, 칼슘과 연계된 자극분비 (Ca²⁺ coupled stimulation secretion)이다 (Ischizaka 등 1980, Kang 등 1993). 셋째, 고리형 뉴클레오티드 (cyclic nucleotide) 수준 변화에 의한 분비다. 넷째, 단백질 키나아제 (protein kinase)의 활성화에 따른 인산화 (phosphorylation) 증가이다 (Richard 등 1999). 다섯째, 비만세포의 세포골격인 액틴미세섬유와 중간 미세섬유, 미세소관 등을 변형시키는 것이다 (Chai 등 1999).

이러한 비만세포의 활성화는 대부분 세포 밖으로부터 세포 안으로 칼슘 (Ca²⁺) 유입을 증가시켜 세포 안의 자유 칼슘 양이 증가된다. 증가된 자유 칼슘이 비만세포의 칼슘결합단백 (Ca²⁺ binding protein)인 칼모듈린 (calmodulin)과 결합하여 칼슘-칼모듈린 복합체를 형성하게 되어, 이것이 세포 내 미오신키나아제 (myosin light chain kinase)를 활성화시킨다 (Ganong 2005). 그 결과 세포 내 골격과 물질이동에 관여하는 미세소관과 미세섬유가 활성화되어 비만세포의 과립을 세포막 가까이로 이동시켜 결과적으로 세포막 융합을 일으키게 됨으로써 비만세포 탈과립과 히스타민 유리현상이 일어나게 된다 (Ganong 2005). 한편 탈과립 인자들 중 세포 내 고리형 뉴클레오티드 (cyclic nucleotide) 수준의 변동에 의한 분비기전에 작용하는 것으로 cAMP와 cGMP가 있다. 비만세포 표면수용체에 베타-아드레날린 작용물질 (β-adrenergic agonist), 프로스타글란딘 E₂, 히스타민들이 결합하여 아데닐산분리효소 (adenylate cyclase)를 활성화시키거나, 세포 내 cAMP-의존적 인산디에스테르 가수분해효소 (phosphodiesterase)의 작용을 억제함으로써 세포 내 cAMP 양을 증가시켜 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리를 억제한다고 알려져 있다 (Kang 등 1993). 반면 cGMP의 경우 비

만세포 표면수용체에 콜린성 작용물질 (cholinergic agonist)들이 결합하여 구아닐산분리효소 (guanylate cyclase)를 활성화시켜 세포 내 cGMP 양을 증가시킴으로써 비만세포 탈과립과 히스타민 유리를 일으킨다고 알려졌다 (Lee 등 1999).

이 연구에서는 상기의 여러 가지 비만세포의 탈과립을 유도하는 인자들 중 compound 48/80을 사용하였다. Compound 48/80은 포름알데히드에 의하여 교차연결된 펜에칠아민의 혼합 다당체다 (Tasaka 등 1991, Yoshii 등 1991). 이 compound 48/80이 비만세포의 세포막에 작용하여 세포 밖에 있는 칼슘을 세포 안으로 유입시켜 세포 안 자유칼슘을 증가시키며, 2차 신호전달자들인 cAMP와 cGMP의 양에 변화를 일으켜, 비만세포의 탈과립과 히스타민을 유리시키는 비만세포 활성화 물질이다 (Kim 등 2004, Choi 등 2006a). 특히 compound 48/80이 비만세포의 cAMP-인산디에스테르 가수분해효소의 파괴를 억제하여 세포 내 cAMP 양을 감소시킨다고 알려졌다 (Kang 등 1993, Li 등 2005). 이 연구에서 compound 48/80은 비만세포 안으로 칼슘유입을 증가시켜, 비만세포를 탈과립시키고, 히스타민을 유리시켰으며, 세포 내 cAMP 양을 감소시켰다. 또한 피부의 진피 내로 투여된 anti-DNP IgE는 DNP-HSA와 결합하여 피부반응을 일으켰다. 이는 anti-DNP IgE를 매개로 하는 피부반응이 결합조직 내의 비만세포를 탈과립시켜 히스타민을 비롯한 많은 활성인자들을 세포 밖으로 유리시킴으로써 이들이 주위 모세혈관의 혈관 투과성을 증가시켜 혈관 내로 투여된 에반스청용액이 혈관 밖으로 스며 나와 진피 내 파란색 반점을 일으킨 것으로 생각된다.

반면에, 비만세포의 매개물질 유리를 차단하는 약물질의 작용기전은 비만세포 내로의 칼슘유입을 억제하거나 또는 비만세포 내 칼슘저장소로부터 세포질 내의 칼슘유리를 억제하여, 세포 내 자유칼슘의 양을 감소시킴으로써 비만세포로부터 히스타민 유리를 억제하는 것이라고 알려졌다 (Lim 등 2004). 이러한 작용을 갖는 물질들에는 세포막의 인지질 대사를 변화시켜 세포 내로의 칼슘유입을 억제하는 물질 (Kang 등 1993, Chai 등 1999)과 비만세포막의

칼슘통로를 차단하여 세포 내로의 칼슘유입을 억제하는 물질(Kang 등 1993, Chai 등 1999), 크로모글리케이트(cromoglycate)와 플라보노이드, 프로테아제 억제제(Sieghart 등 1981, Kang 등 1993), 세포골격계에 작용하는 물질(Park 등 1987), 스테로이드(Chang 등 1993)들이 있다.

이 연구에서 사용된 응답이 알레르기성 질환에 미치는 영향은 보고되지 않았으나, Nakagami 등(1990)과 Kubo 등(1989)은 돼지에서 추출한 담즙이 면역조절을 통해 지연성 과민반응을 억제한다고 보고하였다. 또한 Gauthier 등(1974)은 담즙 추출물이 히스타민에 의한 아나필락시스 쇼크를 억제한다고 보고하였다. 소의 담즙에서도 항알레르기 활성을 나타낼 것으로 추측되는 몇 가지 물질들이 정제되었다(Pelletier와 Laflamme 1977). 이러한 보고들로 미루어 응답도 알레르기성 질환의 치료에 효능이 있을 것으로 생각된다.

이 연구 결과에서, compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립 현상들, 즉 세포막의 불규칙성과 과립의 돌출, 세포 밖으로의 탈출 등의 소견들이 관찰되었으나, 응답을 전처리하여 compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립 현상은 현저히 억제되었다. 또한 비만세포의 히스타민 유리를 측정 한 결과, compound 48/80에 의한 히스타민 유리율이 응답의 전처리로 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 compound 48/80이 다당체 성분으로, 세포막의 수용체에 작용한다는 보고로 미루어 응답이 비만세포막의 compound 48/80이 작용하는 수용체에 경쟁적 억제 작용을 할 것으로 생각되나, 앞으로 이들 수용체에 대한 정밀한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 생각된다. 그리고 응답의 비만세포 탈과립과 히스타민 유리, 칼슘유입에 대한 억제작용이 위에서 기술한 비만세포 활성화 억제 기전들 중 cAMP 기전에 관여하는지를 알아보기 위한 실험에서 응답은 비만세포 내 cAMP 양을 현저히 증가시켰다. 이 결과로 응답에는 세포 내 이차신호전달자인 cAMP 수준을 높여 비만세포 활성화를 억제하는 물질이 함유되어 있을 것으로 생각된다.

또한 응답을 입안으로 투여한 다음 실시한 피부

반응 실험에서 응답은 anti-DNP IgE에 의한 피부반응을 억제하였다. 응답이 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리, 칼슘의 유입을 직접 억제한 본 연구의 결과로 미루어, 응답이 여러 가지 티로신키나제(tyrosine kinase)를 억제하여 비만세포를 안정화시킴으로써 anti-DNP IgE에 의한 혈관투과성, 즉 에반스칭이 혈관 밖으로 유출되어 진피에 파란색 반점이 출현하는 피부반응이 억제되었을 것으로 생각된다. 그러나 아직까지 응답이 비만세포를 제외한 결합조직 내의 여러 가지 세포들에 어떠한 영향을 주는가에 대한 연구도 미비한 실정이라서 정확한 억제기전을 밝히기 위해서는 이 부분에 대한 연구도 보강되어야 할 것으로 생각된다.

한편, 이 연구 결과에서 응답에 의한 혈관 투과성 억제와 비만세포 활성화 억제는 응답의 주요성분인 UDCA와 CDCA에 의한 것으로 추측되나, 이러한 가정은 다양한 구조의 담즙산들이 오히려 비만세포로부터 히스타민 분비를 촉진시킨다는 Masini 등(1994)과 Quist 등(1991)의 보고와는 서로 다르다. 그러나 이러한 결과 차이는 연구에 사용한 담즙의 농도에 따른 것으로 생각된다. 이 연구에서는 세포독성이 없는 응답 25~100 µg/mL 농도를 이용하였으나, Masini 등(1994)과 Quist 등(1991)은 세포독성을 보이는 0.3~10 mmol/L 농도를 사용하였다. 응답 그 자체는 비만세포를 활성화시키지 않을 뿐 아니라, 분비자극물질에 의한 비만세포의 활성화도 억제한다. 따라서 비만세포 안정화 작용에 대한 응답의 정확한 작용기전을 알아내기 위하여 응답의 생화학적 성분분석과 정제에 대한 상세한 연구가 병행되어야 하며, 그 결과로 밝혀진 구성성분의 효과와 이들 사이의 상호작용에 대한 정확한 이해가 뒤따라야 할 것이다. 아울러, 응답의 억제 기전이 세포막의 수용체에 작용하는지, 세포막 또는 세포질 내의 효소계에 작용하는지, 칼슘통로와 세포 골격계에 작용하는지에 대한 연구들이 수행되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 실험결과들은 응답이 세포 내 cAMP양을 증가시키는 비만세포 안정화기전을 통하여 비만세포 탈과립과 히스타민 유리, 세포 내 칼슘유입을 억

제하여 생체 내에서도 anti-DNP IgE에 의한 피부 혈관투과성 증가를 억제할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 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.
- Chai OH, Lee JI, Lee MS : Inhibitory effect of *Cortex mori* on the colchicine-induced mast cell activation. *Korean J Anat* 32: 735-747, 1999. (in Korean)
- Chai OH, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH : Inhibitory effects of *Morus alba* on compound 48/80-induced anaphylactic reactions and anti-chicken gamma globulin IgE-mediated mast cell activation. *Biol Pharm Bull* 28: 1852-1858, 2005.
- Chai OH, Yang MS, Lee MS : Effect of *Cortex mori* on spermine-induced histamine release, changes of cAMP and cGMP levels of rat peritoneal mast cells. *Korean J Immunol* 18: 353-365, 1996. (in Korean)
- Chang L, Kious T, Yogancioglu M, Keller D, Pfeiffer J : Cytoskeleton of living, unstained cells imaged by scanning force microscopy. *Biophys J* 64: 1282-1286, 1993.
- Choi YH, Yan GH, Chai OH, Lim JM, Sung SY, Zhang X, Kim JH, Choi SH, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH : Inhibition of anaphylaxis-like reaction and mast cell activation by water extract from the fruiting body of *Phellinus linteus*. *Biol Pharm Bull* 29: 1360-1365, 2006a.
- Choi YH, Yan GH, Chai OH, Zhang X, Lim JM, Kim JH, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH : Inhibitory effects of *Agaricus blazei* on mast cell-mediated anaphylaxis-like reactions. *Biol Pharm Bull* 29: 1366-1371, 2006b.
- Ehrlich P : Beitrage zur kenntnis der Anilinfarbung 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.
- Ganong WF : Review of Medical Physiology, 22nd ed., Philadelphia. The McGraw-Hill Companies, pp 39-41, 2005.
- Gauthier P, Delagrave J, Laflamme G, Pelletier G : Protection against histamine bronchospasm and Herxheimer anaphylactic microshock using a bile extract. *Union Med Can* 103: 426-431, 1974.
- Hachisuka H, Kusuhara M, Higuchi M, Okubo K, Sasai 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 radioenzymatic 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.
- Jin Y, Moon YS, Jeong HS, Choi IJ : The effects of bear bile on the expression of the p53 protein in cancer cell lines. *Korean J Anat* 38: 49-54, 2005.
- Kang KJ, Jun BD, Chai OH, Lee MS : Inhibitory effect of *Mori cortex* on compound 48/80-induced histamine release and calcium uptake of rat peritoneal mast cells. *Korean J Immunol* 15: 91-99, 1993. (in Korean)
- Kim EK, Li GZ, Chai OH, Song CH : Inhibitory effect of *Arctium lappa* on compound 48/80-induced mast cell activation and vascular permeability. *Korean J Phys Anthropol* 17: 55-66, 2004. (in Korean)
- Kim SH, Kim SH, Kim SH, Moon JY, Park WH, Kim CH, Shin TY : Action of *Dracocephalum argunense* on mast cell-mediated allergy model. *Biol Pharm Bull* 29: 494-498, 2006.
- Kubo M, Nakagami T, Yamasaki N, Ito M, Nogami M, Taji S : Studies on medicinal resources from livestock. I. Anti-allergic effects of pig bile (1). *Chem Pharm Bull* 37: 3409-3411, 1989.
- 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 Immunol* 21: 35-45, 1999. (in Korean)
- Li GZ, Chai OH, Song CH : Inhibitory effects of epigallocatechin gallate on compound 48/80-induced mast cell activation and passive cutaneous anaphylaxis. *Exp Mol Med* 37: 290-296, 2005a.
- Li GZ, Chai OH, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH : Inhibitory effects of *Houttuynia cordata* water extracts on anaphylactic reaction and mast cell activation. *Biol Pharm Bull* 28: 1864-1868, 2005b.
- Lim JM, Li GZ, Chai OH, Song CH : Inhibitory effect of *Corni fructus* on compound 48/80-induced mast cell activation and vascular permeability. *Korean J Phys Anthropol*

- 17: 19-30, 2004. (in Korean)
- Masini E, Bechi P, Dei R, Di Bello MG, Sacchi TB : Helicobacter pylori potentiates histamine release from rat serosal mast cells induced by bile acids. *Dig Dis Sci* 39: 1493-1500, 1994.
- Morita K, Kada T, Namiki M : A desmutagenic factor isolated from burdock (*Arctium lappa* Linne). *Mutat Res* 129: 25-31, 1984.
- Nakagami T, Yamasaki N, Taji S : Studies on medicinal resources from livestock. II. Anti-allergic effects of pig bile (2). *Chem Pharm Bull* 38: 706-708, 1990.
- Nillsson G, Costa JJ, Metcalfe DD : Mast cell and basophil. In Gallin JI, Snyderman R (eds.) : *Inflammation : Basic principles and clinical correlates*, 3rd ed., Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, pp 97-117, 1999.
- Park JE, Song CH, Lee MS : Effect of colchicine on rat peritoneal mast cells pretreated *Cortex mori*. *Korean J Anat* 20: 358-364, 1987. (in Korean)
- Pelletier G, Laflamme G : Natural antiallergenic factors in bile. *Ann Immunol* 128: 261-263, 1977.
- 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.
- Quist RG, Ton-Nu HT, Lillienau J, Hofmann AF, Barrett KE : Activation of mast cells by bile acids. *Gastroenterology* 101: 446-456, 1991.
- Richard AG, Thomas JK, Barbara AO : *Kuby Immunology*, 4th ed., New York. W.H. Freeman and Company, pp 401-404, 1999.
- Roitt I, Brostoff J, Male D : *Immunology*, 6th ed., Philadelphia. Gower Medical Publishing Ltd, pp 323-343, 2001.
- Sieghart W, Theoharides TC, Douglas WW, Greengard P : Phosphorylation of a single mast cell protein in response to drugs that inhibit secretion. *Biochem Pharmacol* 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.
- Yoshii N, Mio M, Akagi M, Tasaka K : Role of endoplasmic reticulum, an intracellular Ca^{2+} store, in histamine release from rat peritoneal mast cell. *Immunopharmacol* 21: 13-21, 1991.

Korean J Phys Anthropol
22(1): 71 ~ 83, 2009

Abstract

Inhibitory Effect of Bear Bile on Compound 48/80-induced Mast Cell Activation and IgE-mediated Vascular Permeability

Guang-Hai Yan^{1,2}, Yun-Ho Choi¹, Ok-Hee Chai^{1,3}, Chang-Ho Song^{1,3}

¹Department of Anatomy, Chonbuk National University Medical School, Jeonju, Korea,

²Department of Anatomy, Yanbian University College of Medicine, Yanji, China,

³Institute for Medical Sciences, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

The bear bile has been used as a traditional drug medicine and has been known to have anti-tumor, anti-inflammatory and anti-oxidant effects. The purpose of this study is to investigate the inhibitory effect of bear bile on compound 48/80-induced mast cell activation *in vitro* and anti-dinitrophenyl (DNP) IgE-mediated vascular permeability *in vivo*. For this, the effects of bear bile on the degranulation, histamine release, calcium influx and the change of the intracellular cAMP levels of rat peritoneal mast cells (RPMCs) and the influences of the oral treatment of bear bile on IgE-mediated cutaneous vascular permeability were studied. The results were as follows; the compound 48/80-induced degranulation, histamine release and calcium influx of RPMCs were inhibited by pretreatment with bear bile, the cAMP levels of RPMCs were increased by pretreatment with bear bile, and bear bile inhibited anti-DNP IgE-mediated cutaneous vascular permeability. From the above results, it is suggested that bear bile contains some substances which inhibit anti-DNP IgE-mediated vascular permeability and mast cell activation. Bear bile potentially may serve as an effective therapeutic agent for allergic diseases.

Key words : Mast cell, Bear bile, Compound 48/80, IgE, Histamine release, Calcium, cAMP