

수종의 알레르기 관련 약물이 흰쥐의 복강내 비만세포에서 Hyaluronidase 및 히스타민 유리에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생리학교실

유 신 애 · 김 구 자 · 하 종 식

(1988년 10월 15일 접수)

== Abstract ==

Effects of Allergy Related Drugs on Rat Peritoneal Mast Cells in Hyaluronidase Activity and Histamine Release

Shin Ae Yoo, Ku Ja Kim and Jong Sik Hah

Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University

Type I allergic reaction and its related clinical manifestations are known to occur by the effects of various chemical mediators. These chemical mediators are released from circulating basophils and tissue mast cells, which become "sensitized" through the binding of antigens and antibodies of the IgE type to their cell surface receptors.

Efforts to elucidate the mechanism of the release of these mediators, especially that of histamine, have been pursued for years. The mechanism is not yet clarified at the present time.

Recent reports of hyaluronidase, an enzyme known to be involved in the tissue inflammatory process, as possible participant in type I allergic reaction, initiated this study.

Relationships between the hyaluronidase activity and histamine release from the sensitized rat peritoneal mast cells were investigated. Also anti-allergic agents, tranilast and disodium cromoglycate, along with known histamine releasers, morphine and compound 48/80, were used to observe the inhibitory and stimulatory effects of these substances on the hyaluronidase activity as well as histamine release from the rat mast cells.

The results obtained are summarized as follows:

- 1) Hyaluronidase activity and histamine release from sensitized rat peritoneal mast cells started to increase on the 4th day of postsensitization. Hyaluronidase activity reached its peak value on the 7th day of postsensitization and that of histamine release on the 14th day of postsensitization.
- 2) Hyaluronidase activity and histamine release from sensitized rat peritoneal mast cells, pre-treated with tranilast revealed significant decrease in comparison with those of non-treated cells.
- 3) Hyaluronidase activity and histamine release from sensitized rat peritoneal mast cells, pre-treated with tranilast, followed by morphine injection, revealed significant increase in comparison with those of tranilast treated cells.
- 4) In vitro study of hyaluronidase activity and histamine release from un-sensitized rat peritoneal mast cells, using morphine and compound 48/80 as activators, revealed significant increase compared to those of non-activator used cells.
- 5) In vitro study of hyaluronidase activity and histamine release from un-sensitized rat peritoneal

mast cells, pre-treated with tranilast and disodium cromoglycate, using compound 48/80 and morphine as activators revealed significant decrease in comparison with those of tranilast and disodium cromoglycate treated cells.

From above results, participation of enzyme hyaluronidase in the process of histamine release from sensitized rat peritoneal mast cells, could be suggested. It was also quite evident that the clinically used anti-allergic agents, tranilast and disodium cromoglycate, have significant inhibitory function on the hyaluronidase activity and histamine release from sensitized rat peritoneal mast cells, while morphine significantly increased the hyaluronidase activity and histamine release from sensitized rat peritoneal mast cells.

Key Words: Allergy, Hyaluronidase, Histamine, Peritoneal cell

서 론

제 1 형 알레르기 질환에서는 항원-항체반응의 결과로 인하여 비만 세포로부터 여러 종류의 화학전달 물질이 유리되며, 이에 따라 알레르기 특유의 광범위한 임상 증상을 일으키게 된다(Gell & Coombs, 1963 ; Schleimer et al., 1985). 이 화학전달물질중 대표적인 것이 히스타민이고, 이 히스타민은 생물학적으로 활성화된 상태로 비만세포내에 막으로 둘러싸인 과립의 형태로 저장되어 있다(Aures et al., 1965; Strunk & Burger, 1980).

특정한 항원이 비만세포의 Fc 수용체에 붙어있는 IgE 항체와 가교를 형성하면 이것이 신호가 되어 일련의 생화학적 반응이 일어나게 되며(Ishizaka, 1976), 이는 세포막의 성질을 변화시키게 된다고 한다. 이때 세포막의 구조와 기능의 변화로 세포막을 통해 Ca^{2+} 이 세포내로 이동하게 되고, 이 Ca^{2+} 의 빠른 이동으로 인하여 세포내의 대사작용을 변화시켜 복잡한 생화학적 반응을 일으키게 된다. 그 결과 히스타민을 포함하고 있는 과립체들이 서로 접촉하면서 세포막쪽으로 이동하게 되며 세포막과도 접촉을 하게 되고, 마지막으로 과립이 열리면서 히스타민이 세포밖으로 유리되는 것으로 알려져 있다(Theoharides et al., 1980).

전술한 히스타민의 유리과정에서 직접 혹은 간접적으로 관여하는 다양한 생화학적 반응에는 여러 효소가 참여하는 것으로 알려져 있으며, 지금까지 알려진 효소들로는 세포막 효소인 methyltransferase (Hirata & Axelrod, 1980), adenylate cyclase,

guanylate cyclase (Lichtenstein & Margolis, 1968), phospholipase C, phospholipase A_2 (Ludowyke & Lagunoff, 1987), 및 serine esterase (Sampson, 1983), 와 세포내 효소인 lipooxygenase (Peters et al., 1981), cyclooxygenase (Lewis & Austen, 1981), endoperoxidase (Samuelsson, 1983), phosphodiesterase (Lichtenstein & Margolis, 1968) 등이 있다.

그러나 세포내에서 일어나는 생화학적 반응 과정 및 그 반응 순서는 아직까지 확실히 밝혀지지 않았고 또한 탈과립 현상을 직접 인지하는 효소에 관하여서도 해명되어 있지 않다.

Koda et al. (1976)이 쥐의 homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 반응을 연구하던중 그 반응국소에서 hyaluronidase의 활성이 상승되어 있음을 발견함으로써 제 1 형 알레르기 반응 결과 일어나는 히스타민의 유리과정에 있어서 hyaluronidase가 일련의 역할을 담당할 것이라는 가능성을 시사하였다.

Hyaluronidase는 고등동물의 각종 장기의 세포내 소립체(lysosome), 특히 고환과 피부에 많이 존재하며, 뱀독이나 벌독에서도 발견되고 연쇄상 구균과 포도상 구균등에서도 얻어지는 효소이다(Meyer et al., 1937).

Meyer등(1937)이 폐염쌍구균의 자가 소화액이 산성 뮤코다당(mucopolysaccharide)인 히아루로닉산(hyaluronic acid)에 작용하여 저분자의 단당류를 생성함을 관찰하고 이 자가 소화액을 hyaluronidase라 명명하였다. Border와 Raftery(1968)에 의해 소의 고환에서 유리한 hyaluronidase의 아미노산의 배열이 알려졌으나 현재까지 이 효소의 생리학적 의의

에 대하여서는 분명치 아니한 점이 많으며, 다만 이 효소가 모세혈관의 투과성에 관여하고, 염증부위에서 그 활성도가 높다는 점으로 미루어 보아 염증에 관여하는 기염 효소인 것으로 알려져 왔다.

Kakegawa et al. (1984) 이 in vitro로 임상에서 항알레르기제로 쓰이는 Disodium Cromoglycate (DS CG)와 N-(3', 4'-Dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (Tranilast) 가 비만 세포로부터 히스타민 유리를 억제하고 동시에 hyaluronidase의 활성도가 감소됨을 관찰하였으며, hyaluronidase와 히스타민이 서로 관계있는 효소이며 비만 세포내에 존재한다고 추측하였다.

이에 저자는 hyaluronidase와 히스타민이 생체내에서 이들간에 서로가 어떠한 연관성을 가지고 제 1형 알레르기 반응에 관여하는가를 규명하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험 동물 : 실험동물은 체중 150~250 gm의 Wistar계 웅성 흰쥐를 복강 비만세포 채취용으로 사용하였으며, 시판의 혼합 사료와 충분한 물을 주어 사육하면서 실험에 사용하였다.

2) 실험에 사용된 시약 : 본 실험에 사용된 난백

알부민, 하이아루로니다제, Hyaluronic acid, N-acetylglucosamine, potassium tetraborate, P-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB), tetrabromophenolphthalein ethyl ester, compound 48/80등은 Sigma Chem. Co.의 재재를 사용하였다. 1, 2-dichloroethane은 Shinro Pure Chemical Co.의 재재를 사용하였으며, CuCl₂ · 2H₂O는 Shimakyu's Pure Chem. Co. 제품을 사용하였고, 염산-모르핀은 대원 제약 제품을 사용하였다. 그밖의 모든 시약들은 분석용 특급 시약을 사용하였다. Tranilast는 삼영신약 주식회사의 제품을 사용하였으며 DSCG는 Fisons 제품을 사용하였다.

본 실험에서 사용한 감작용 Bordetella Pertussis vaccin은 주식회사 녹십자의 제품이다.

3) 실험 동물군 : 실험은 다음의 2군으로 나누어 시행하였다(표 1).

가. 제 1형 알레르기 반응 유발군

생리 식염수만을 투여한 대조군과 1.0% 난백 알부민을 0.1 ml 근육 주사하고 백일해 백신(Bordetella Pertussis vaccin) 1.0 ml을 복강내 주사한 감작군으로 나누었다. 각 군을 감작후 4일, 7일, 14일에 도살하여 복강내 비만세포를 분리하고 이 세포에서의 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량을 측정하였다. 또한 감작군은 다음의 3군으로 나누어 시행하였다.

Table 1. Characteristics of experimental groups

Group	Drug	Dose
* Type I Allergic Reaction Group (sensitized rats)	Tranilast Morphine HCl Tranilast + Morphine HCl	5 mg/kg/day × 5 days, P.O. 2 mg/kg, I.P. 5 mg/kg/day × 5 days, P.O. + 2 mg/kg, I.P.
* Unsensitized Rat Group	Compound 48/80 Morphine HCl DSCG + Compound 48/80 DSCG + Morphine HCl Tranilast + Compound 48/80 Tranilast + Morphine HCl	0.1, 0.3 1.0 mg/ml 0.4, 0.8, 1.6 mg/ml 0.1-0.4 mM + 0.1 mg/ml 0.1-0.4 mM + 0.4 mg/ml 0.2-1.0 mM + 0.1 mg/ml 0.2-0.8 mM + 0.4 mg/ml
* Control Group	Saline	0.1 ml I.M. and I.P.

* Six rats are used for each experiment.

① Tranilast 투여군

감작후 제10일부터 제14일까지 5일간 Tranilast(5 mg/kg/day)를 경구 투여한 후 흰쥐의 복강내 비만세포의 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량을 측정하여 각각의 억제율을 산출하였다.

② 염산-모르핀 투여군

감작후 제14일에 염산-모르핀(2 mg/kg)을 복강내 주사후 흰쥐의 복강내 비만세포의 hyaluronidase 활성도와 히스타민의 유리량을 측정하여 각각의 억제율을 산출하였다.

③ Tranilast와 염산-모르핀 투여군

감작후 제10일부터 제14일까지 5일간 Tranilast(5 mg/kg/day)를 경구 투여하고 감작후 제14일에 Tranilast를 투여한지 40분에 염산-모르핀(2 mg/kg)을 복강내 주사한후 30분뒤에 복강내 비만세포에서의 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량을 측정하여 각각의 억제율을 산출하였다.

나. 유리 복강 비만세포 실험군

생리 식염수만을 투여한 정상 흰쥐로부터 분리한 복강 비만세포를 다음의 6가지 군으로 나누어 시행하였다.

① Compound 48/80 실험군

복강내 비만세포에 히스타민 유리제인 Compound 48/80를 각각 0.1, 0.3, 1.0 mg/ml 작용시킨 후 hyaluronidase 활성도 및 히스타민 유리량을 측정하고 이로부터 유리율을 산출하였다.

② 염산-모르핀 실험군

복강내 비만세포에 염산-모르핀을 각각 0.4, 0.8, 1.6 mg/ml로 처치한후 hyaluronidase 활성도 및 히스타민 유리량을 측정하고 이로부터 유리율을 산출하였다.

③ DSCG와 염산-모르핀 실험군

복강내 비만세포에 DSCG를 각각 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mM로 전처치한 후 염산-모르핀을 투여하여 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량을 측정하고, 이에 의한 억제율을 산출하였다.

④ DSCG와 Compound 48/80 실험군

복강내 비만세포에 DSCG를 각각 0.1, 0.2, 0.4 mM로 전처치한 후 Compound 48/80를 0.1 mg/ml 투여하여 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량을 측정하고 이에 의한 억제율을 산출하였다.

⑤ Tranilast와 compound 48/80 실험군

복강내 비만세포에 Tranilast를 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mM로 전 처치한 후 Compound 48/80를 0.1 mg/ml 투여하여 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량을 측정하고 이에 의한 억제율을 산출하였다.

⑥ Tranilast와 염산-모르핀 실험군

복강내 비만세포를 Tranilast로 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mM등으로 전처치하고 염산-모르핀 0.4 mg를 투여했을때 hyaluronidase 활성도 및 히스타민 유리량을 측정하여 각각의 억제율을 산출하였다.

2. 실험 방법

1) 감작(Sensitization) : 감작시키는 방법은 Motta(1964)의 방법에 의해 감작시켰다.

흰쥐의 대퇴 근육내에 1.0%의 난백 알부민 생리 식염수 용액 0.1 ml를 주사하였고, 다시 백일해 백신(Bordetella Pertussis vaccin: 2×10^{10} heat killed Bordetella Pertussis/ml) 1.0 ml를 복강내로 주사하였다.

대조군에는 대퇴 근육내에 생리식염수 0.1 ml를 그리고 복강내에는 생리식염수 1.0 ml를 주사하였다.

2) 복강 비만세포(peritoneal mast cell)의 분리방법 : 체중 150~250 gm의 Wistar계 웅성 흰쥐를 사용하였고, ethylether로 마취시킨 후 피를 흘려 희생시켰다.

150 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 2.1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.7 mM NaHCO_3 , 5.4 mM Glucose, 1.2 mM MgSO_4 그리고 pH 7.2의 0.1 M 인산 완충액(2.0% V/V)으로 조성된 Locke액 10.0 ml를 복강내로 주사하여 약 2분간 맞사지 한 후 개봉하여 복강액을 취했다. 다시 같은 Locke액 5.0 ml로 복강내를 세정하여 채취하고 이액을 앞에서 채취한 복강액과 혼합하여 4°C에서 $50 \times g$ 로 8분간 원심분리 하였다(DAMON/IEC Model K Centrifuge). 이때 상등액은 버리고 비만세포가 들어 있는 침전을 냉각 Locke액으로 2회 씻어준 후 Bray 및 Van Arsdel (1961)의 방법에 준하여 비만세포가 약 1×10^5 cells/ml이 되도록 제조하였다.

3) 비만세포 제조 방법 : Bray 및 Van Arsdel

(1961)의 방법을 이용하였다.

즉, 비만세포 부유액과 0.1% dimethyltoluothionine chloride (toluidine blue)를 19:1의 비율로 심하게 섞은 다음 혈구계산기(hemocytometer)를 이용하여 metachromatically 염색된 비만세포를 광학 현미경(Bausch & Lomb)으로 세었다. 이때 세포수는 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{세포수} = n \times 4,000 \times d$$

n : 혈구 계산기에서 센 세포수

d : 희석배수

4) Hyaluronidase 활성도 측정법 : Aronson 및 Davidson(1967)의 방법을 이용하여 hyaluronidase의 활성도를 측정하였다.

효소 완충용액(340 NF units/ml) 0.3 ml과 시료 0.2 ml을 섞은 후 37°C에서 20분간 incubation시킨 다음 hyaluronic acid(1.2 mg/ml) 0.5 ml을 첨가하고 37°C에서 40분간 방치한 뒤 0.4 N NaOH 0.2 ml을 첨가하였다. 이때 유리된 N-acetylglucosamine을 정량하여 hyaluronidase의 활성도를 나타내었다.

N-acetylglucosamine을 정량하는 방법은 시료 0.5 ml과 potassium tetraborate (pH 9.1) 0.1 ml을 혼합하여 3분간 끓인후 흐르는 물에서 냉각시킨 다음 P-dimethylaminobenzaldehyde 3.1 ml을 넣고 혼합한 뒤 37°C에서 20분간 방치하고 다시 흐르는 물에서 냉각한다. 이 시료를 585 nm에서 분광광도계(Perkin-Elmer 554 UV/VIS Spectrophotometer)로 흡광도를 측정하여 N-acetylglucosamine 표준 검량곡선에 의해 효소의 활성도를 계산하였다.

이때에 사용한 P-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB)는 DMAB 10.0 gm을 glacialacetic acid: 10 N HCl=87.5 : 12.5 (V/V) 100 ml에 녹였으며 실험에 사용하기 직전에 초산으로 9배 희석액을 만들어 사용했다.

5) 히스타민 정량법 : Sakai 및 Ohno(1984)의 방법으로 히스타민 양을 측정하였다. 시료는 약 5 µg/ml의 히스타민을 포함하도록 희석하여 사용했다.

시료 3.0 ml에 5×10⁻³ M의 CuCl₂ 용액 1.0 ml, 0.3 M KH₂PO₄ 용액과 0.1 M Na₂B₄O₇ 용액으로 된 borate-phosphate 완충액(pH 9.5) 15.0 ml을 첨가하여 5분동안 세워둔 후 4×10⁻³ M의 tetrabromophenolphthalein ethyl ester 용액 2.0 ml을 넣은 다음

29.0 ml의 증류수를 넣고 이 시료를 분액 깔때기에 옮겨 다시 1, 2-dichloroethane 10.0 ml을 첨가하고 10분간 빨간색이 발색될 때까지 흔들여 주었다. 그 후 10분 동안 세워둔 후 유기층을 분리하여 515 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하여 히스타민 표준 검량곡선에 의하여 히스타민양을 계산하였다.

비만세포로부터 히스타민을 유리시키는 방법은 비만세포에 Locke액을 첨가하고 이를 30분간 끓여 비만세포로부터 히스타민을 용출시켰다.

6) 히스타민 유리제에 의한 복강 비만세포로부터의 hyaluronidase의 활성도 및 히스타민 유리량 측정법 :

복강 비만세포 부유액 0.6 ml에 Locke액 0.2 ml을 첨가하고 37°C에서 5분간 방치한 뒤 각 농도로 조제한 히스타민 유리제 1.0 ml을 넣고 다시 37°C에서 10분간 반응시켰으며 얼음으로 반응을 정지시키고 이 시료를 4°C에서 20분간 원심분리하여 상등액(Ps)과 침전부분(Pr)에서의 히스타민 양을 각각 측정하였다. 히스타민 유리를 위한 활성제로는 Compound 48/80와 염산-모르핀을 사용하였으며, 이때 대조로는 이들 활성제 대신에 생리식염수를 넣었다. 히스타민 유리율을 다음의 계산식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Histamine release(\%)} = \frac{Ps}{Ps + Pr} \times 100$$

Hyaluronidase 활성도는 얼음으로 반응을 정지시킨 후 Morgan-Elson 법으로 측정하였다.

7) 항 알레르기제(Tranilast와 DSCG)가 복강 비만세포에서의 hyaluronidase 활성도 및 히스타민 유리량에 미치는 억제 효과의 측정법 :

복강 비만세포 부유액 0.6 ml을 각 농도로 조제한 항 알레르기제 1.0 ml을 넣고 여기에다 Locke액 0.2 ml을 첨가한 뒤 37°C에서 5분간 방치시킨 다음 활성제 0.2 ml을 넣고 다시 37°C에서 10분간 방치시켰다. 이때 사용된 활성제인 Compound 48/80의 농도는 5×10⁻⁷ g/ml, 염산-모르핀은 2×10⁻³ g/ml로 하였다. 얼음으로 반응을 정지시킨 후 4°C에서 20분간 원심분리한 뒤 상등액과 침전부분의 히스타민의 양을 측정하였다.

대조로서는 항 알레르기제 대신 Locke액을, 그리고 활성제 대신으로는 생리 식염수를 넣었다.

억제율은 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{\text{O.D compare} - \text{O.D sample}}{\text{O.D compare}} \times 100$$

(O.D; Optical Density)

실 험 결 과

1. 대조군의 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량

정상 흰쥐에 생리 식염수를 대퇴근육 및 복강내로 각각 0.1 ml, 1.0 ml을 주사한 후 복강 비만세포에서의 세포당 hyaluronidase 활성도 및 히스타민 유리량을 측정하였다.

정상 복강 비만세포의 hyaluronidase의 활성도는 2.51 ± 0.04 pmol/cell이고 히스타민의 유리량은 15.1 ± 0.90 pg/cell이었다.

2. 감작(sensitization)후의 hyaluronidase의 활성도 및 히스타민 유리량의 변화

흰쥐의 대퇴 근육내에 난백 알부민 0.1 ml을 주사하고 다시 복강내에 백일해 백신(Bordetella Pertussis vaccin) 1.0 ml을 주사한 후 시간 경과에 따른 hyaluronidase의 활성도 및 히스타민 유리량의 변화는 Fig. 1-1, 1-2에 나타난 것과 같이 hyaluronidase 활성도는 감작후 4일에는 3.33 ± 0.04 , 7일에는 3.75 ± 0.06 , 14일에는 3.03 ± 0.03 pmol/cell로써 4일부터 증가하여 7일에 최대활성도를 나타냈으며 14일에는 7일의 최대 활성도에 비해 약 19.2% 정도 감소하였음을 볼 수 있다 ($p < 0.01$).

히스타민의 유리량은 Fig. 2-1, 2-2에서 보는것처럼 감작 후 4일에는 17.02 ± 0.08 , 7일에는 21.6 ± 0.17 , 14일에는 26.45 ± 0.75 pg/cell로써 4일부터 증가하기 시작하여 7일에서부터는 의의있게 증가하였다 ($p < 0.01$).

3. 감작시킨 흰쥐의 복강내 비만세포에서의 hyaluronidase 활성도 및 히스타민 유리에 미치는 효과

감작시킨 후 제10일부터 14일까지 5일동안 항알레르기 약물로 알려진 Tranilast(5 mg/kg/day)를 경구 투여한 후 희생시켜 분리한 복강 비만세포의

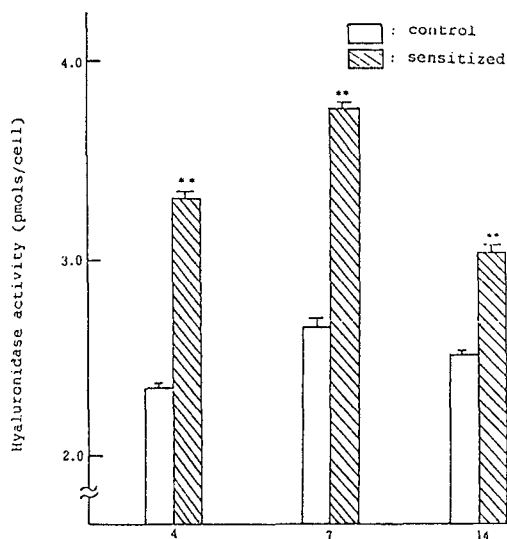


Fig. 1-1. Hyaluronidase activity of rat peritoneal mast cell after one intramuscular injection of antigen, egg white albumin (0.1 ml), plus one intraperitoneal injection of Bordetella Pertussis vaccin (1.0 ml). Control group received saline injections, 0.1 ml intramuscular and 1.0 ml intraperitoneal. Each value is the mean (\pm SE) of 2 duplicate observations from 6 rats.

** $P < 0.01$

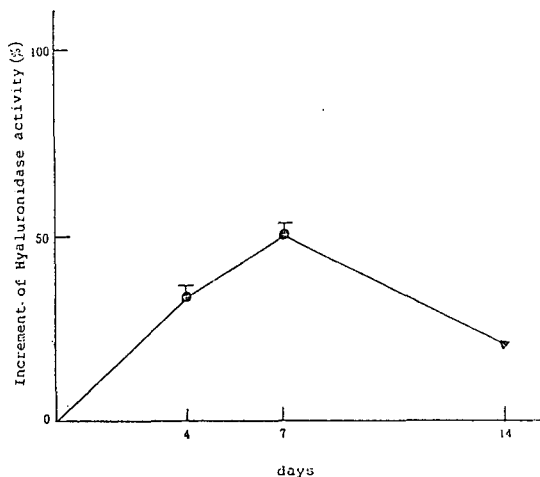


Fig. 1-2. Increment of hyaluronidase activity of rat peritoneal mast cell after sensitization with egg white albumin and Bordetella Pertussis vaccin. 0% represents the mean control value of unsensitized mast cell (2.51 ± 0.04 pmols/cell).

hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량을 측정하였다. 표 2.에서 보는 바와 같이 각각 2.68 ± 0.02 pmol/cell, 21.09 ± 0.23 pg/cell이었다. 감작 후 제14일의 복강 비만세포의 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량을 대조치로 하였을 때 Tranilast를 투여

한 군의 hyaluronidase 활성도는 11.55 ± 0.66 , 히스타민 유리량은 $20.19 \pm 0.80\%$ 감소하였다. 그러나 감작시킨후 제14일에 염산-모르핀(2 mg/kg)을 복강내 주사한 후 30분 뒤에 희생시켜 분리한 복강 비만세포의 hyaluronidase 활성도 및 히스타민 유리량을 측정한 결과 대조치에 비해서 각각 17.82 ± 0.99 , $30.78 \pm 0.07\%$ 증가되었음을 보여준다.

또한 감작시킨 후 제10일부터 5일간 Tranilast(5 mg/kg/day)를 경구 투여하고 마지막 14일에 Tranilast를 경구 투여한 40분 후에 염산모르핀(2 mg/kg)을 복강내 주사한 뒤 30분후에 희생시켜 비

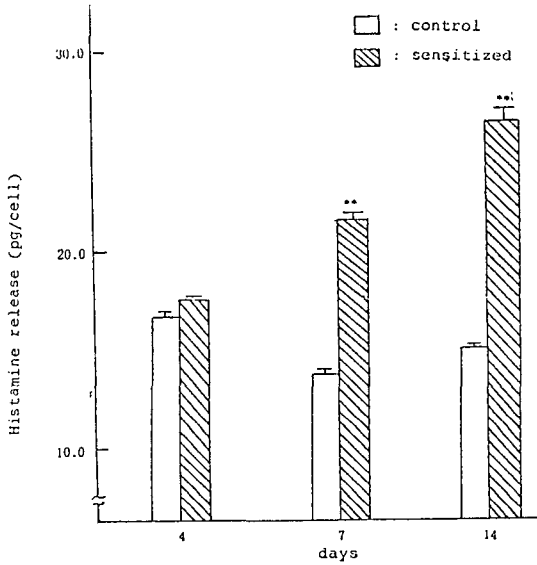


Fig. 2-1. Histamine release of rat peritoneal mast cell after one intramuscular injection of antigen, egg white albumin (0.1 ml), plus one intraperitoneal injection of Bordetella Pertussis vaccin (1.0 ml). Control group received saline injections, 0.1 ml intramuscular and 1.0 ml intraperitoneal. Each value is the mean (\pm SE) of 2 duplicate observations from 6 rats.

**P<0.01

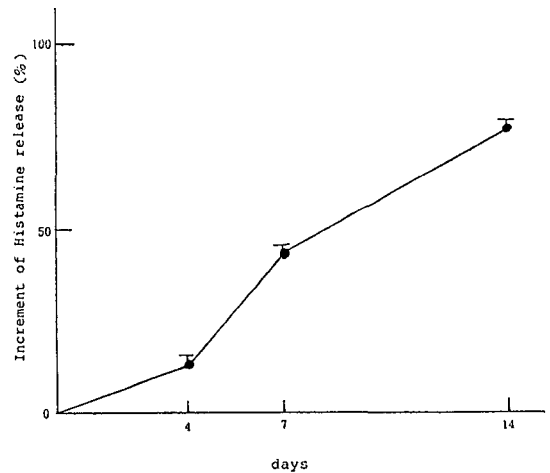


Fig. 2-2. Increment of histamine release of rat peritoneal mast cell after sensitization with egg white albumin and Bordetella Pertussis vaccin. 0% represents the mean control value of unsensitized mast cell (15.1 ± 0.90 Pg/cell).

Table 2. The effects of Tranilast and morphine-HCl in sensitized rat mast cells.

Durg	Dose	Amounts		Inhibition (%)	
		Hyaluronidase (Pmol/cell)	Histamine (Pg/cell)	Hyaluronidase	Histamine
Control		3.03 ± 0.03	26.45 ± 0.75		
Tranilast	5 mg/kg/D \times 5 days P.O.	* 2.68 ± 0.02	** 21.09 ± 0.23	11.55 ± 0.66	20.19 ± 0.80
morphine-HCl	2 mg/kg I.P.	** 3.75 ± 0.03	** 34.59 ± 0.02	-17.82 ± 0.99	-30.78 ± 0.07

Each value represents mean \pm S.E. of 6 rats.

* p<0.05

**p<0.01

Table 3. The effects of Tranilast and Tranilast plus morphine-HCl in sensitized rat peritoneal mast cell.

Drug	Dose	Amounts		Inhibition (%)	
		Hyaluronidase (pmol/cell)	Histamine (pg/cell)	Hyaluronidase	Histamine
Tranilast	5 mg/kg/D×5 days P.O.	2.68±0.02	21.09±0.23		
Tranilast + morphine-HCl	5 mg/kg/D×5 day + 2 mg/kg I.P.	**3.30±0.03	**24.32±0.32	-23.13±1.12	-15.32±1.51

The inhibition% of Tranilast+morphine HCl is calculated on the base of hyaluronidase activity and histamine release from Tranilast treated rat mast cell as control.

Each value represents mean±S.E. of 6 rats.

* p<0.05

**p<0.05

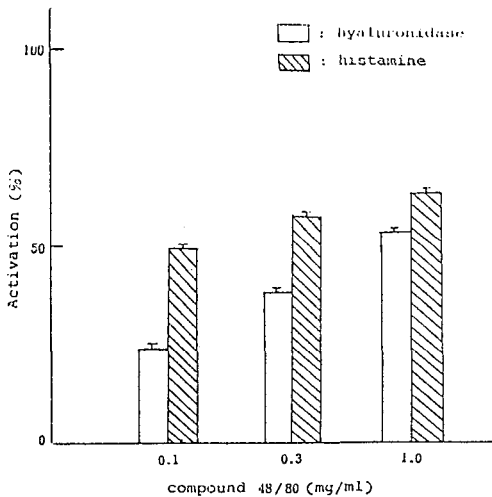


Fig. 3-1. The effects of compound 48/80 on hyaluronidase activity and histamine release on *in vitro* test from rat peritoneal mast cell, with drug concentration mean control value of unsensitized mast cell (hyaluronidase: 2.51±0.04 pmols/cell, histamine: 15.1±0.90 Pg/cell). Each value is the mean (±SE) of 2 duplicate observations from 6 rats.

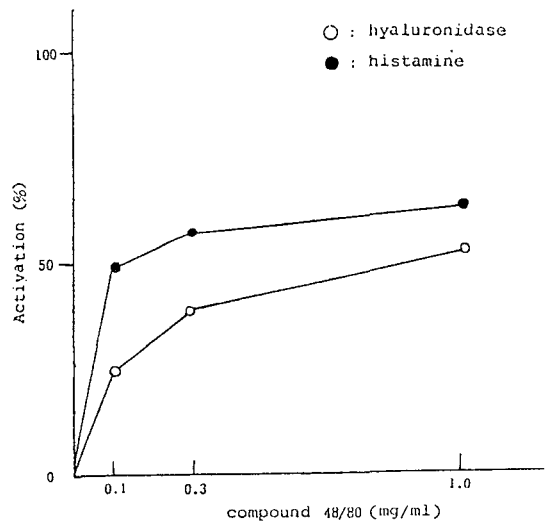


Fig. 3-2. The effects of compound 48/80 on hyaluronidase activity and histamine release on *in vitro* test from rat peritoneal mast cell with drug concentrations of 0.1, 0.3 and 1.0 mg/ml. 0% represents the mean control value of unsensitized mast cell (hyaluronidase: 2.51±0.04 pmols/cell, histamine: 15.1±0.90 Pg/cell). Each value is the mean (±SE) of 2 duplicate observations from 6 rats.

만세포를 분리하여 hyaluronidase 활성도 및 히스타민의 유리량을 측정하였더니 각각 23.13±1.12, 15.32±1.51% 증가되었음을 보여준다(표 3).

또한 DSCG를 사용하여 (2 mg/kg/I.P.) hyaluronidase 활성도 및 히스타민 유리의 억제를 관찰하기 위해 DSCG를 복강내로 투여하였으나 실험중 흰 쥐들이 복강내 출혈을 일으켜 죽사하였으므로 본 실험에서 제외되었다.

4. Hyaluronidase 활성화 및 히스타민 유리에 미치는 Compound 48/80의 효과

Fig. 3-1, 3-2에서 보여주는 바와 같이 Compound

48/80는 농도의존성 (concentration-dependency)을 가지고 hyaluronidase를 활성화시키며 히스타민 유리량도 마찬가지로 농도 의존성을 지니고 있음을 Fig. 3-1, 3-2에서 시사해 주고 있다($P < 0.01$, $P < 0.01$).

5. Hyaluronidase 활성화 및 히스타민 유리에 미치는 염산-모르핀의 효과

염산-모르핀도 hyaluronidase를 활성화 시켰고, 히스타민의 유리량도 농도에 의존적으로 증가시킴을 Fig. 4-1, 4-2에서 보여주고 있다($P < 0.05$, $P < 0.01$).

6. Hyaluronidase 활성화 및 히스타민 유리에 미치는 DSCG의 효과

Hyaluronidase 활성화에 미치는 DSCG의 억제 효과는 Fig. 5에서 보여주고 있다. DSCG는 농도에 의존적으로 억제효과를 나타내며 활성물질인 염산-모르

핀에 의하여 유도된 경우보다는 Compound 48/80에 의하여 유도된 경우에 더욱 강하게 억제되었다 ($P < 0.01$). 이는 염산-모르핀이 Compound 48/80보다 훨씬 강한 활성화제(activator)임을 보여준다.

히스타민 유리의 억제효과도 농도-의존성을 보여주며 Compound 48/80에 의해 유도된 경우 더욱 강하게 억제되고 있음이 Fig. 5에서 보여주고 있다 ($P < 0.01$).

7. Hyaluronidase 활성화 및 히스타민 유리에 미치는 Tranilast의 효과

Fig. 6에서 보는 바와 같이 Tranilast는 활성화제로 Compound 48/80와 염산-모르핀을 사용했을때 hyaluronidase의 활성화 억제 효과는 각각 농도에 의존적임을 보여주고 있으며, 유의있게 억제되었다 ($P < 0.05$, $P < 0.05$).

히스타민 유리에 미치는 Tranilast의 억제효과는

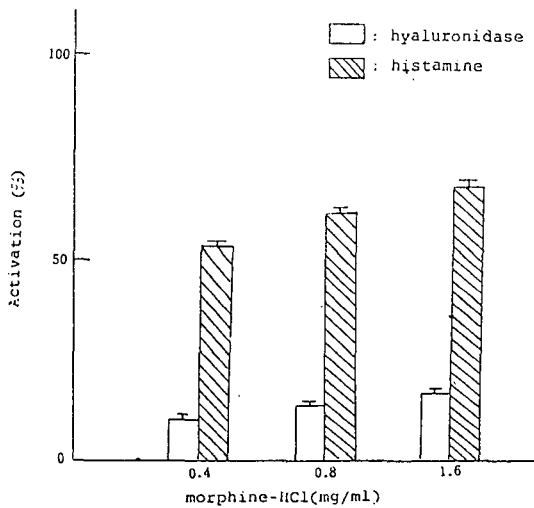


Fig. 4-1. The effects of morphine-HCl on hyaluronidase activity and histamine release on in vitro test from rat peritoneal mast cell, with drug concentrations of 0.4, 0.8 and 1.6 mg/ml. 0% represents the mean control value of unsensitized mast cell (hyaluronidase: 2.51 ± 0.04 pmols/cell, histamine: 15.1 ± 0.90 pg/cell). Each value is the mean (\pm SE) of 2 duplicate observations from 6 rats.

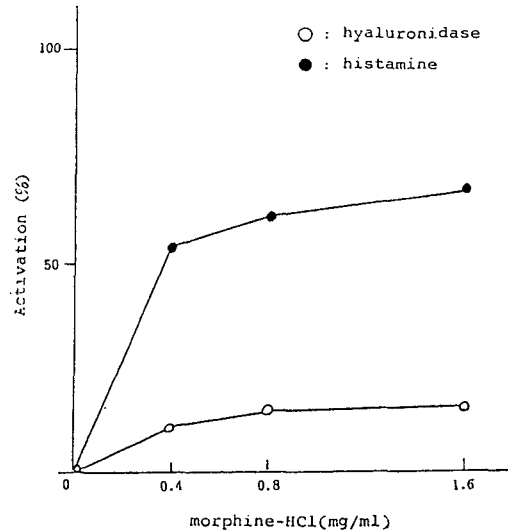


Fig. 4-2. The effects of morphine-HCl on hyaluronidase activity and histamine release on in vitro test from rat peritoneal mast cell, with drug concentrations of 0.4, 0.8 and 1.6 mg/ml. 0% represents the mean control value of unsensitized mast cell (hyaluronidase: 2.51 ± 0.04 pmols/cell, histamine: 15.1 ± 0.90 pg/cell). Each value is the mean (\pm SE) of 2 duplicate observations from 6 rats.

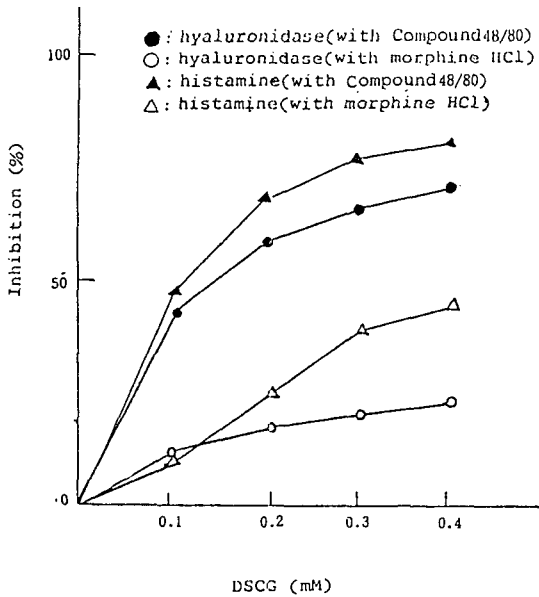


Fig. 5. The effects of DSCG on hyaluronidase activity and histamine release on in vitro study with activators, Compound 48/80 and morphine HCl. The inhibitory effects of DSCG on hyaluronidase activity and histamine release are observed with drug concentrations of 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 mM. 0% represents the mean control values of unsensitized mast cell (hyaluronidase: 2.51 ± 0.04 pmols/cell, histamine: 15.1 ± 0.90 pg/cell). Each value is the mean (\pm SE) of 2 duplicate observations from 6 rats.

Fig. 6에서 나타났으며 hyaluronidase 활성도에서의 억제효과와 마찬가지로 농도 의존성을 갖고 있으며 높은 통계적 유의성이 있었다($P < 0.01$, $P < 0.01$).

고 찰

19세기말 Paul Ehlich가 비만세포에 대해 관심을 가지기 시작한 이래 많은 조직학적, 혈액학적 연구가 계속 되어져 왔지만(Berman, 1983) 비만세포의 기능을 조절할 수 있는 방법에 대한 연구는 Ishizaka 등(1966)이 IgE라는 면역글로블린에 의해 제 1형 알레르기 반응이 중재된다고 발표한 이후 급속도로 진전되기 시작하였다. 그후 과거 십수년간 IgE의 기

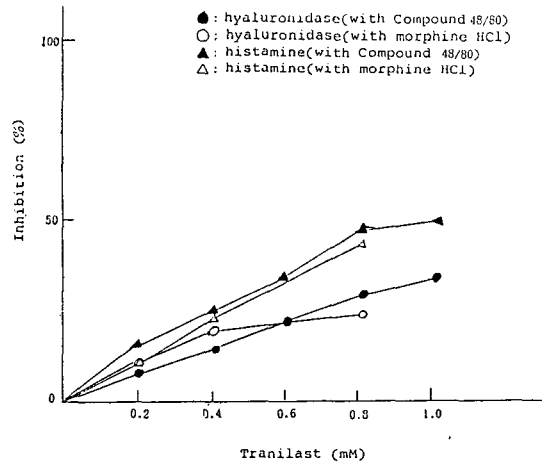
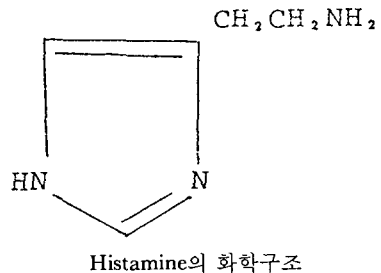


Fig. 6. The effects of Tranilast on hyaluronidase activity and histamine release on in vitro study with activators, Compound 48/80 and morphine HCl. The inhibitory effects of Tranilast on hyaluronidase activity and histamine release are observed with drug concentrations of 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 mM. 0% represents the mean control value of unsensitized mast cell (hyaluronidase: 2.51 ± 0.04 pmols/cell, histamine: 15.1 ± 0.90 pg/cell). Each value is the mean (\pm SE) of 2 duplicate observations from 6 rats.

능과 비만세포에서 유리되는 화학전달물질, 특히 히스타민 유리의 기전을 알아내기 위한 연구와 이에 관련된 생화학적 반응 및 관련효소에 대한 연구들이 활발하게 진행되어 왔다.

히스타민은 histidine decarboxylase라는 효소의 작용에 의하여 아미노산인 L-histidine으로부터 생성되는 저분자량을 가진 화합물질이다(Aures et al., 1965).



감작되지 않은 상태에 있는 동물체내에서 히스타민은 호염기성 세포나 비만세포의 과립속에 생물학적으로 활성화된 형태로 저장 되어있다가(Strunk & Burger, 1980) 항원-항체 반응에 의해 비만세포에 자극이 주어지면 다량의 히스타민이 조직내로 유리된다(Ishizake, 1976). 이 히스타민이 exocytosis를 하는 기전은 많이 알려져 있으나 세포막내의 효소 계열의 작동과 함께 세포막의 형태와 그 기능에 변화가 오고 이에 따른 Ca^{2+} 의 세포내 유입 및 복합적인 세포내의 생화학적 반응에 기인한다고 설명하는 설이 유력하다(Foreman & Garland, 1976).

최근에는 비만세포의 소립체에 존재하는 효소로써 히스타민의 유리를 위한 생화학적 반응에 일익을 담당할 것이라고 추측되는 원래 기염효소로 알려져 있는 hyaluronidase가 대두되었다(Koda et al., 1976).

본 실험은 흰쥐의 복강 비만세포에서의 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량을 측정하여 hyaluronidase와 히스타민과의 관계를 관찰하고자 시도하였다.

Hyaluronidase는 생체내의 여러 조직중에서 불활성 상태로 존재하는 효소이다. 그러나 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 등의 생체내 금속이온 및 spermine, spermidine 등의 생체내 유기 염기가 본 효소를 활성화 한다고 알려져 있다(Kakegawa et al., 1985).

본 실험은 인체의 폐와 기관지 주위에 존재하는 비만세포와 유사한 면역학적 생리작용을 가지며(Lau & Pearce, 1986) 또 비교적 분리가 용이한 흰쥐의 복강내 비만세포를 사용하였다.

그리고 Mota가 비만세포 활성화 항체(mast cell activating antibody) 유도를 위해 실험에 사용한 난백 알부민과 백일해 백신을 이용하여 항원-항체 반응을 일으켜서 쥐를 감작시켰다(Mota, 1964). 백일해 백신은 항원으로서의 역할뿐만 아니라 히스타민 감작요인을 함유하는 특성을 보유하므로 동물 감작에 흔히 쓰이는 물질로 알려져 있다(Mota, 1958; Preston, 1959).

감작된 쥐의 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량을 측정한 결과 hyaluronidase의 활성도는 감작 4일부터 증가하기 시작하여 7일에 최대 활성도를 보였고, 7일 이후부터는 점차 활성도는 감소하기 시작

하여 히스타민의 유리량이 가장 상승되어 있는 시기에 계속 감소하는 추세를 보였다(Fig. 1-1, 1-2, 2-1, 2-2).

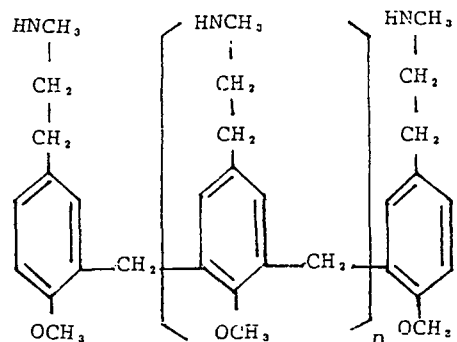
비만세포로부터 유리되는 히스타민 “all-or-none manner”로 반응하지 않고 자극이 있을때 20~60%의 히스타민 양을 점진적으로 방출한다고 보고되어 있다(Berman, 1983). 즉 어느 정도 비만세포내에서 그 유리율이 조절되어 조금씩 유리된다고 해석할 수 있다. 본 실험의 결과는 hyaluronidase가 감작 일경에 최대 활성도를 나타내어 일단 세포내의 히스타민 유리의 autonomicity를 작동시켜 히스타민의 유리량을 증가시키는 반면에 hyaluronidase 자체의 활성도는 감소시키지 않았나 생각된다. 히스타민의 유리량이 최고치에 도달하는 시기는 감작후 14일에서 인데 이는 Mota의 보고와 일치한다(Mota, 1964).

감작한 흰쥐에 Tranilast를 경구 투여한 후 시행한 실험군에서 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량이 억제됨을 관찰하였다. 이 결과는 Kakegawa (1985)의 실험보고와 일치한다.

Compound 48/80은 polyamine으로써 항원-항체 반응이 존재하지 않는 상태에서 비만세포로부터 히스타민을 유리시키는 화합물이다.

Compound 48/80를 사용하여 정상 흰쥐 복강에서 유리한 비만세포에서의 히스타민 유리는 농도의 존성을 보여주었고, 또한 hyaluronidase의 활성화도 농도에 의존적인 상승을 나타내었다(Fig. 3-1, 3-2).

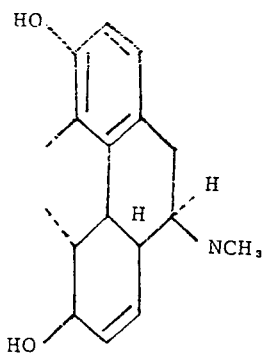
이 실험을 통하여 항원-항체 반응이 없어도 히스



Compound 48/80의 화학구조

타민은 유리될 수 있으며, hyaluronidase의 활성도가 증가하는 점으로 보아 hyaluronidase는 면역 반응에 의존하지 않고도 비만세포내에서 독립적으로 히스타민 유리에 관여한다고 추측할 수 있다.

중추 신경계의 수용체(receptor)에 작용하여 의식 손실없이 진통 작용을 일으켜 임상에서 중요한 역할을 담당하는 모르핀의 다양하고도 광범위한 약리 작용중 히스타민의 유리를 상승시키는 약리작용은 잘 알려져 있지 않다. 본 실험에서 감각되지 않은 비만세포에서도 모르핀에 의해 농도 의존적으로 히스타민 유리량의 상승과 hyaluronidase의 활성도의 상승을 관찰하였다(Fig. 4-1, 4-2). 즉 hyaluronidase의 활성과 히스타민의 유리는 면역학적 반응이 존재하지 않는 조건하에서도 서로 관련되어 있음이 확인되었다. 위의 실험 결과는 임상에서 심한 천식환자가 호흡곤란에 빠진 경우에 사용되는 모르핀은 히스타민의 유리를 유발시켜 더욱 심한 기관지의 협착을 초래하여 심각한 호흡마비에 빠뜨릴 수 있음을 시사해 준다.

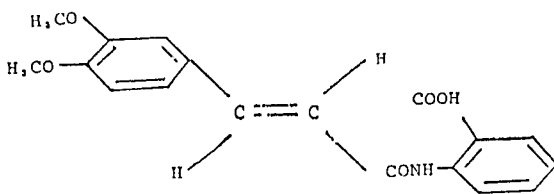


Morphine의 화학구조

Tranilast는 무취, 미색의 결정체인 분말로써 물에 잘 녹지 않고 알칼리성 액체에 용해되는 물질이다(Azuma et al., 1976). Tranilast는 항알레르기 작용을 하는 약제로써 강력한 homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA)를 억제하고 기니아 피그의 폐를 사용한 생체의 실험에서 강력한 anaphylactic mediator의 유리를 억제한다고 보고되어 있다(Koda, 1976).

DSCG는 천식 환자를 치료하기 위한 항 알레르기 제로 개발되었으며 비만세포의 세포막을 안정시켜

탈과립 현상을 막는다고 하여 이는 Ca^{2+} 이온과 복합체를 형성함으로써 Ca^{2+} 이온의 세포내 유입을 억제하여 히스타민 유리를 방지한다는 설(Holford, 1984)과 세포내 cAMP의 농도를 증가시켜 히스타민 유리를 억제한다는 설(Lavin et al., 1976) 등이 있다. Tranilast와 DSCG는 임상적으로 제 1형 알레르기 반응에 의한 만성 천식 환자의 장기적 예방목적으로 사용되고 있는 산성 항알레르기 약제이다.



Tranilast의 화학구조

Tranilast와 DSCG로 전처치한 흰쥐의 비만세포를 이용한 생체의 실험에서 Compound 48/80와 모르핀을 첨가하였을 때 hyaluronidase 활성도 및 히스타민의 유리량은 농도 의존적으로 감소됨을 관찰하였다. 즉 Tranilast와 DSCG는 히스타민 유리를 억제할뿐만 아니라 hyaluronidase의 활성도도 감소시키는 효과를 보였다(Fig. 5, 6).

이상의 실험을 통하여 관찰된 흰쥐의 비만세포의 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량은 서로 의미있는 관계가 있는 것으로 나타났다.

Hyaluronidase가 어떤 기전에 의하여 히스타민 유리과정에 참가하고 있는지 지금까지의 실험 단계에서는 확실한 추정이 불가능하나 아마도 불활성 상태의 hyaluronidase는 항원-항체 반응에 의해 자극된 비만세포내로 유입되는 Ca^{2+} 에 의해 활성화되어 어떤 생화학적 반응을 거쳐 과립을 열어서 히스타민의 유리과정에 한 부분을 담당할 것이라 가정해 볼 수 있겠다.

결 론

제 1형 알레르기 반응을 유발시킨 흰쥐의 복강 비만세포와 정상 흰쥐의 복강 비만세포를 분리하여 이 두 복강 비만세포를 사용하여 hyaluronidase의 활성도와 히스타민의 유리량과의 관계를 관찰하고자 임

상 영역에서 쓰이는 항알레르기 물질인 Tranilast와 DSCG, 그리고 히스타민 유발 물질인 compound 48/80와 모르핀을 사용하여 복강 비만세포로부터의 hyaluronidase 활성도와 히스타민 유리량과의 상호 관계를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 제 1형 알레르기 반응을 유발시킨 흰쥐의 복강 비만세포의 hyaluronidase 활성도는 감각후 제 7일에 3.75 ± 0.06 pmol/cell로 최고치에 도달하였고 그 이후 점차적으로 감소되었으나 히스타민의 유리량은 감각 제 14일에 26.45 ± 0.75 pg/cell로 최고치에 도달하였다.

2) 제 1형 알레르기 반응 유발 흰쥐의 복강 비만세포에서 Tranilast는 hyaluronidase의 활성도를 $11.56 \pm 0.66\%$ 감소 시켰고 히스타민의 유리량은 $20.19 \pm 0.80\%$ 억제시켰다.

3) 제 1형 알레르기 반응을 유발시킨 후 Tranilast를 5일간 경구 투여하고 제 14일에 염산-모르핀을 복강내 주사하고 30분 후에 희생시켜 유리한 복강 비만세포에서의 hyaluronidase의 활성도는 3.30 ± 0.03 pmol/cell이고 히스타민 유리량은 24.32 ± 0.32 pg/cell로 Tranilast 만을 단독 경구투여한 군에 비해 의의있게 증가되었다.

4) 정상 흰쥐의 복수를 채취하여 유리한 비만세포에 히스타민 활성제로 알려진 Compound 48/80와 염산-모르핀을 작용시켰더니 hyaluronidase의 활성도와 히스타민의 유리량이 농도에 의존적으로 현저하게 증가되었다.

5) 정상 복강 비만세포에 Tranilast와 DSCG로 전치치후 Compound 48/80 및 염산-모르핀을 작용시켰더니 hyaluronidase의 활성도와 히스타민의 유리량이 활성제만 투여한 군에 비하여 현저하게 감소되었다.

REFERENCES

- Aronson NN & Davidson EA (1967). Lysosomal hyaluronidase from rat liver. *J Biol Chem* 242, 437-440
- Aures D, Winzvist G & Hansson E (1965). Histamine formation in the blood and bone marrow of the guinea pig *Am J Physiol* 208, 186-189
- Azuma H, Banno K & Yoshimura T (1976). Pharmacological properties of N-(3', 4'-Dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5), a new anti-atopic agent. *Br J Pharmacol* 58, 483-488
- Berman MA (1983). Cromolyn: Past, Present, and Future. *The pediatric Clin North Am* 30, 915-922
- Borders CL Jr & Raftery MA (1968). Purification and partial characterization of testicular hyaluronidase. *J Biol Chem* 243, 3756-3762
- Bray RE & VanArsdel PP Jr (1961). In vitro histamine release from rat mast cells by chemical and physical agents. *Proc Soc Exp Biol Med* 106, 255-259
- Foreman JC & Garland LG (1976). Mechanism of action of antiallergic drugs. *Br Med J* 9, 640
- Gell PGH & Coombs RRA (1963). Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *Clinical Aspects of Immunology*. F A Davis Co, p 37-62
- Hirata F & Axelrod J (1980). Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science* 209, 1082-1090
- Holford-Strevens V (1984). Desensitization of rat mast cells: Studies of some effects of antiallergic drugs. *Agents and Actions* 14, 643-648
- Ishizaka K, Ishizaka T & Hornbrook M (1966). Physicochemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 97, 75
- Ishizaka K (1976). Cellular events in the IgE antibody response. *Adv Immunol* 23, 1
- Kakegawa H, Matsumoto H, Endo K, Satoh T, Nonaka G & Nishioka I (1985). Inhibitory effects of tannin on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesentery mast cells. *Chem Pharm Bull* 33, 5079-5082
- Koda A, Nagai H, Watanabe S, Yanagihara Y & Sakamoto K (1976). Inhibition of hypersensitivity reactions by a new drug, N (3', 4'-Dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5'). *J Allergy Clin Immunol* 57, 396-407
- Lau HYA & Pearce FL (1986). Effects of antihistamines on isolated mast cells from the rat, guinea pig and man. *Agents and Actions* 18, 107-109
- Lavin N, Rachelefsky GS & Kaplan SA (1976). An action of disodium cromoglycate: Inhibition of cyclic 3', 5'-AMP phosphodiesterase. *J Allergy Clin Immunol* 57, 80-88

- Lewis RA & Austen KF (1981). Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell-dependent compounds. *Nature* 293, 103-108
- Lichtenstein LM & Margolis S (1968). Histamine release in vitro: inhibition by catecholamines and methylxanthines. *Science* 161, 902
- Ludowyke R & Lagunoff D (1987). Drug inhibition of mast cell secretion. *Progress in Drug Research* 276-301
- Meyer K, Dubos R & Smyth EM (1937). The hydrolysis of the polysaccharide acids of vitreous humor, of umbilical cord, and of streptococcus by the autolytic enzyme of pneumococcus. *J Biol Chem* 118, 71-78
- Mota I (1958). Mast cell and histamine in rat anaphylaxis: The effect of *Haemophilus pertussis*. *Nature* 182, 1021-1022
- Mota (1964). The mechanism of anaphylaxis I. Production and biological properties of "mast cell sensitizing" antibody. *Immunology* 7, 681-699
- Peters SP, Siegel MI, Kagey-Sobotka A & Lichtenstein LM (1981). Lipoxygenase products modulate histamine release in human basophils. *Nature* 292, 455-477
- Preston NW (1959). Factors influencing the assay of the histamine-sensitizing factor of *Haemophilus pertussis*. *J Path Bact* 78, 217-224
- Sakai T & Ohno N (1984). Spectrophotometric determination of histamine in mast cells, muscle and urine by solvent extraction with Copper (II) and tetrabromophenolphthalein ethyl ester. *Analyst* 109, 1569-1572
- Sampson HA (1983). Prospects for control of the IgE antibody response symposium on pediatric allergy. *The pediatric Clin North Am* 30, 5
- Samuelsson B (1983). Leukotriens: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220, 568-575
- Schleimer EP, Fox CC, Naclerio RM, Plaut M, Creticos PS, Togias AG, Warner JA, Kagey-Sobotka A & Lichtenstein LM (1985). Role of human basophils and mast cells in the pathogenesis of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 76, 369-374
- Strunk RC & Burger WE (1980). Chemical mediators of inflammation, Allergic Disease of Infancy, Children and Adolescence. Mosby Co., St Louis P 150-159
- Theoharides TC, Sieghart W, Greengard P & Douglas W (1980). Antiallergic drug cromolyn may inhibit histamine secretion by regulating phosphorylation of a mast cell protein. *Science* 207, 80-82