약학회지 제40권 제6호 679~683(1996)
Yakhak Hoeji Vol. 40, No. 6

유제놀에 의한 즉시형 알레르기 반응의 억제

김상현* · 신태용* · 김형룡** · 이영미 · 이은희 · 신보경 · 김윤철 · 안년형 · 김형민#
원광대학교 약학대학, *우석대학교 약학대학, **원광대학교 치과대학
(Received June 3, 1996)

Inhibition of Immediate Allergic Reaction by Eugenol

Sang-Hyun Kim*, Tae-Yong Shin*, Hyung-Yong Kim**, Young-Mi Lee, Eun-Hee Lee, Bo-Kyoung Shin, Youn-Chul Kim, Nyeon-Hyoung An and Hyung-Min Kim#
College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
**College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea*
***College of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea*

Abstract—The current study evaluates the capacity of eugenol to regulate immediate allergic reaction by control of histamine release. Administrations of eugenol (1 M/kg, i.p.) at 60 min before and 5, 10 min after the compound 48/80 treatment (8 mg/kg, i.p.) were shown the mortality rates as 0, 44.4, and 77.8%, respectively. A 60 min before administered group revealed a significant inhibition of serum histamine release compared with those of 5 and 10 min after the compound 48/80 injection. Eugenol (6-48 mM) was also showed a dose-dependent activity on the compound 48/80-induced histamine release from the highly purified population of Alcian Blue-positive peritoneal mast cells. These results indicate that in vitro treatment with exogenous eugenol inhibited the active response of mast cell populations and modulated its characteristics.

Keywords ☐ Eugenol, Immediate allergic reaction, Histamine, Compound 48/80, Peritoneal mast cells.

I형 알레르기 반응인 즉시형 알레르기 반응은[1], IgE 항체 등에 의한 비반세포로부터 화학적 매개물질의 유리에 의한 모세혈관 투과성 항진, 평활근 수축 및 분비 항진 등으로 인해 다양한 임상증상을 일으킨다.[2,3] 비반세포는 즉시형 알레르기 반응 유발에 필수적인 세포로 알려져 있다.[4-7] 비반세포의 탈과립을 유도하는 비반세포의 활성화는 비반세포의 표면에 있는 IgE 수용체(FcεRI)에 항원, anti-IgE, lectin 등의 결합, anaphylatoxin 등에 의한 자극, compound 48/80, calcium ionophore, codeine 및 합성 부신피질 자극 호르몬과 같은 약리적 복합물에 의하여 일어난다.[8-11] Compound 48/80은 N-methyl-p-methoxy-phenylethylamine과 formaldehyde의 축합에 의해 합성된 중합체로서[12] 비반세포의 칼슘수준을 증가시켜 비반세포의 탈과립을 유도하는 아나필락시 유도에 가장 많이 쓰이는 약물이다.[13,14] 비반세포의 탈과립을 억제하는 물질은 cAMP를 변형하는 약물, 인지질 대사를 변화시키는 약물, 칼슘과 calmodulin 길항제, cromoglycate와 플라보노이드, 스테로이드 등이 있다.[15-19] 유제놀은 정향(Caryophilli Flos, Myrtaceae)의 주성분으로서 현재 치과영역에서 국소마취제로 이용되고 있으며, 자궁수축, 항진균, 항바이러스 효과와 랫트 간세포 미토콘드리아의 호흡을 억제한다는 보고가 있으나[20-22] 면역계 및 항알레르기 작용에 대한 연구 결과는 없다. 본 연구에서는 유제놀이 compound 48/80에 의해 유도된 알레르기 반응에 미치는 영향을 생체내·외 실험으로 분석하였다.

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0653-50-6805 (팩스) 0653-843-3421

실험방법

시약 및 기기

Eugenol, compound 48/80, metrizamide, disodium cromoglycate (DSCG)등은 Sigma 회사 제품을 사용하였고 기타 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. 기기로는 Spectrofluorometer (Kontron, Germany)를 사용하였다.

실험동물

화학연구소(KRICT)에서 구입한 ICR계 생쥐 수컷을 원광대학교 약학대학 사육실에서 1주일 이상 순화시켜 체중 25~30 g 범위의 것을 사용하였다. 동물실내의 명암은 12시간으로 자동 조절시켰으며 물과 사료(신촌사료사)를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

사용약제

유제놀은 사용 직전에 생체내 실험에서는 생리식염수에 현탁시켜 사용하였고, 생체외 실험에서는 Tyrode buffer A (10 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.4 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5.6 mM glucose, 0.1% bovine serum albumin)를 사용하여 일정 농도로 조제하였다. Compound 48/80, DSCG는 생리식염수에 용해하여 사용하였다.

생체내 실험

Compound 48/80(8 mg/kg, 체중)을 생쥐의 복강내에 투여하기 60분 전, 5분 후 및 10분 후에 생리식염수로 조제한 유제놀을 각각 1 M/kg의 용량으로 복강내에 주사하였다. 치사율은 아나필락시를 유발시킨 후 60분 동안 관찰하였다. 치사율 관찰이 끝난 직후 생쥐의 심장에서 혈액을 취해 혈청을 분리하여 히스타민을 정량하였다.

시험관내 실험

생쥐 복강 비반세포의 분리 - Kanemoto등[14]의 방법에 준하여 생쥐 복강 비반세포를 분리하였다. 간단히 설명하면, 생쥐를 에테르로 마취시킨 후 실온에서 0.1% gelatin을 함유한 Tyrode buffer B (NaCl, $NaHCO_3$, KCl, NaH_2PO_4, glucose) 약 5 m*l*를 복강내에 주입하고 30초간 복벽을 가볍게 맛사지한 후 복벽 중앙선을 약간 절개하여 복강세척액을 스포이드로 채취하여 150 g로 10분간씩 3회 반복, 원침시킨 후 상층 부유액을 버리고 동일 Tyrode buffer B로 재부유시키고, 이 세포부유액중 비반세포는 22.5% w/v metrizamide를 이용하여 Yurt등[23]의 방법으로 분리 정제하였다.

Compound 48/80에 의한 히스타민 유리 - CO_2 배양기에서 미리 37°C, 10분간 배양시킨 생쥐 복강비반세포 부유액(2×10^5 cells/m*l*)에 Tyrode buffer A로 조제한 유제놀(6-48 mM)을 첨가하여 37°C에서 10분간 배양시킨 후 compound 48/80(5 μg/m*l*)을 가하여 다시 10분 동안 배양시킨 다음 400 g로 4°C에서 5분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 비반세포 부유액에 유제놀과 compound 48/80 대신 Tyrode buffer A를 첨가한 군을 blank로 하고, 유제놀 대신 Tyrode buffer A를 첨가하고 compound 48/80을 부가한 군을 대조군으로 하였다. 그리고 임상적으로 알레르기 질환에 사용하고 있는 DSCG를 비교군으로 실험하였다.

히스타민 분석 - 세포배양 상층액 및 혈청 중에 있는 히스타민은 Shore 등[24]의 방법을 약간 수정하여 정량하였다. 간략히 서술하면 에펜돌프 튜브에 시료 500 μ*l*를 넣고 0.1N-HCl 450 μ*l*와 60% 과염소산 용액 50 μ*l*를 넣고 혼합 후 원심 분리(1,500 rpm, 20 min)하고 그 상층액 800 μ*l*를 5N-NaOH 용액 500 μ*l*, 증류수 3 m*l*, *n*-Butanol 10 m*l* 및 NaCl 1.2 g을 혼합한 시험관에 넣고 진탕 후 원심분리(2,000 rpm, 10 min)한다. Butanol층 8 m*l*를 50 m*l* 시험관에 넣고 0.1N-HCl 용액 3 m*l*, *n*-Heptane 10 m*l*를 가하여 진탕 후 원심분리(2,000 rpm, 10 min)한다. 여기에서 얻어진 수층 2 m*l*에 1N-NaOH 용액 400 μ*l*와 1% *o*-Phthaldialdehyde 용액 100 μ*l*를 넣고 수욕상에서 37°C, 3분동안 반응시킨다음 3N-HCl 용액 200 μ*l*를 넣고 혼합 후 2분동안 방치하여 spectrofluorometer(Kontron)를 이용하여 λex=360 nm와 λem=440 nm에서 형광도를 측정하였다.

히스타민 유리 억제율(%)=(유제놀을 부가하지 않았을 때의 히스타민 양-유제놀을 부가하였을 때의 히스타민 양)×100/유제놀을 부가하지 않았을 때의 히스타민 양

통계학적 처리 - 실험 성적은 Student's *t*-test를 사용하여 처리하였다.

결과 및 고찰

유제놀이 compound 48/80에 의하여 유도된 아나필

Table I—Effect of eugenol on the anaphylaxis induced by compound 48/80 in mice

Treatment	Compound 48/80	Mortality (%)		
		1 hr before	5 min later	10 min later
Saline	+	100	100	100
Eugenol	+	0	44.4	77.8
Eugenol	-	0	0	0

Compound 48/80 (8 mg/kg) was intraperitoneally given to the groups of mice. Eugenol (1 M/kg) was given at 1 hr before of 5 min, 10 min later the compound 48/80 injection (n=9/group). Mortality(%) within 60 min following the compound 48/80 injection was represented as No. of dead mice×100/No. of total experimental mice.

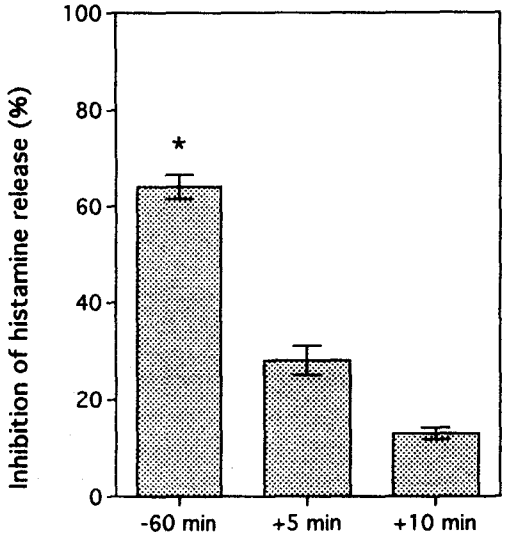

Fig. 1—Inhibitory effects of eugenol on the serum histamine release. Eugenol was given intraperitoneally with 1 M/kg at 60 min before or 5, 10 min later the compound 48/80(8 mg/kg) injection. Each bar shows the mean±S.E. of nine experiments. Significantly different from the control, *: $p<0.05$. Control : serum histamine content of saline treated(200 μl, i.p.)mice.

락시성 반응에 미치는 영향 - 생쥐에 생리식염수나 유제놀만을 투여한 군(n=9)에서는 100% 생존하였고, compound 48/80만을 투여한 군(n=9)에서는 100% 치사율을 나타냈다. Compound 48/80을 투여하기 60분 전에 유제놀(1 M/kg, 체중)을 복강내 투여한 군은 치사율 0% 이었으며 5분 후, 10분 후에 투여한 군에서는 치사율이 각각 44.4%, 77.8%이었다(Table I). Compound 48/80에 의한 아나필락시성 반응은 비반

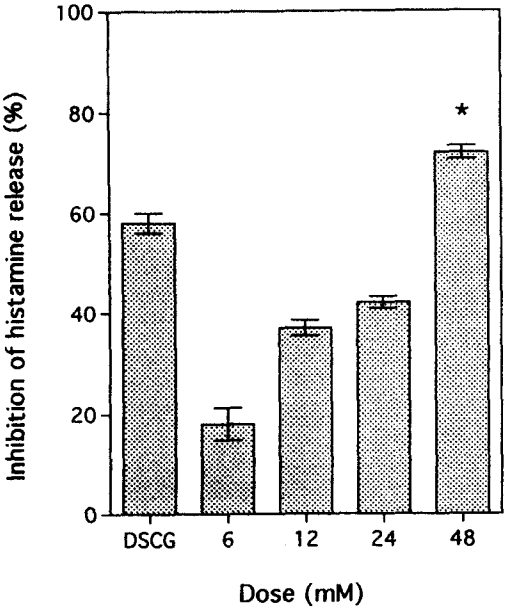

Fig. 2—The effect of eugenol on the inhibition of histamine release induced by compound 48/80 from mice peritoneal mast cells. Mast cell suspensions (2×10^5 cells/ml) were preincubated for 10 min at 37°C before the addition of drugs. The cells were preincubated with the drug, and then incubated (10 min) with the compound. Each bar indicates the mean±S. E. of four experiments. Significantly different from the control, *: $p<0.05$. Control : histamine content of Tyrode beffer A treated sample.

세포로부터 히스타민, 부라디키닌 및 세로토닌과 같은 혈관작용성 물질의 유리에 의한 것이다.[13] 이 결과는 유제놀이 비반세포에 작용하여 이와같은 물질의 유리를 억제함을 의미한다.

유제놀이 혈청중 히스타민 유리에 미치는 효과 - Compound 48/80을 투여하기 60분전, 5분 후, 10분 후에 각각 유제놀(1 M/kg, 체중)을 복강내에 투여하고 치사율을 관찰한 다음 생쥐의 심장에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 히스타민양을 측정하였다(Fig. 1). Compound 48/80투여 60분 전, 5분 후 및 10분 후 투여군의 혈청중 히스타민 유리 억제율은 각각 65.3±5.0%, 26.6±4.3%, 13.6±2.1%로 시간 의존적으로 나타나, compound 48/80에 의해 유도된 아나필락시반응에 대한 영향과 밀접한 관련성이 있었다. 즉, 유제놀이 compound 48/80의 투여에 의해 유도된 아나필락시 반응에 효과적인 것은 비반세포에서 히스타민 유리

의 억제때문인 것을 시사한다.

유제놀이 시험관내에서 compound 48/80에 의한 생쥐 복강비반세포의 히스타민 유리에 미치는 효과 – 비반세포에 compound 48/80을 처리하면 세포막이 파괴되면서 세포 내에 함유되어있는 각종 화학적 매개물질이 방출된다. 유제놀의 복강 비반세포에 미치는 영향을 분석하기 위해 compound 48/80 처리 전 10분에 유제놀을 처리하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 유제놀에 의해 용량 의존적으로 복강 비반세포로 부터 히스타민의 유리가 억제되었다.

결 론

유제놀은 compound 48/80에 의해 유도된 비반세포로부터 히스타민의 방출을 억제하였다. 이러한 유제놀의 작용때문에 비반세포가 주로 관여하는 즉시형 알레르기 반응인 아나필락시 쇽크도 유제놀이 억제시키는 것으로 사료된다. 유제놀은 비반세포에 대한 정확한 작용기작 규명에 의해 아나필락시 반응을 비롯한 각종 알레르기 질환의 예방 약물로써 유용할 것으로 기대된다.

문 헌

1) Coombs, R. R. A. and Gell, P. G. H. : Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *Clinical Aspects of Immunology* 3rd ed., Blackwell Sci. Pub., Oxford, p.761 (1975).
2) Ishizaka, T., Soto, C. S. and Ishizaka, K. : Mechanism of passive sensitization. 3. Number of IgE molecules and their receptor sites on human basophil granulocytes. *J. Immunol.* **111**, 500 (1973).
3) Segal, D. M., Taurog, J. D. and Metzger, H. : Dimeric IgE serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 2993 (1977).
4) Gomos, J. C., Distasi, L. C., Sgarbosa, F. and Barata, L. E. S. : Pharmacological evaluation of the inhibitory effect of extracts from *Anchietia salutaris* in the histamine release induced in the rat and the guinea pig. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **103**, 188 (1994).
5) Dombrowicz, D., Flamand, V., Brigman, K. K., Koller, B. H. and Kinet, J. P. : Abolitin of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor α chain gene. *Cell* **75**, 969 (1993).
6) Martin, T. R., Ando, A., Takeishi, T., Katona, I. M., Drazen, J. and Galli, S. J. : Mast cells contribute to the changes in heart rate, but not hypotension or death, associated with active anaphylaxis in mice. *J. Immunol.* **151**, 367 (1993).
7) Ando, A., Martin, T. R. and Galli, S. J. : Effects of chronic treatment with the c-kit ligand, stem cell factor, on IgE dependent anaphylaxis in mice. *J. Clin. Invest.* **92**, 1639 (1993).
8) Tasaka, K., Mitsunobu, M. I. O. and Masahiro, O. : Intracellular calcium release induced by histamine release and its inhibition by some antiallergic drugs. *Ann. Allergy.* **56**, 464 (1986).
9) Chand, N., Pillar, J., Diamantis, J., Perhach, J. R. and Duane Sofia, R. : Inhibition of calcium ionophore (A23187) stimulated histamine release from rat peritoneal mast cells by azelastine : Implications its mode. *Eur. J. Pharmacol.* **96**, 227 (1983).
10) Takei, M., Umeyama, A., Shoji, N., Arihara, S. and Endo, K. : Mechanism of inhibition of IgE dependent histamine release from rat mast cells by penasterol and penasterone. *J. Pharm. Sci.* **84**, 223 (1995).
11) Ohmori, Y., Mo, M., Kishi, M., Mizutani, M., Katada, T. and Konishi, H. : Antiallergic constituents from Oolong Tea Stem. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 683 (1995).
12) Baltzly, R., Buck, J. S., De Beer, E. J. and Webb, F. S. : A family of long acting depressors. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 1301 (1949).
13) Amir, S. and Englis, A. M. : An inhibitor of nitric oxide production, N^G-nitro-L-arginine-methyl ester, improves survival in anaphylactic shock. *Eur. J. Pharmacol.* **203**, 125 (1991).
14) Kanemoto, T., Kasugai, T., Yamatodani, A., Ushio, H., Mochizuki, T. K., Kimura, M., Nishimura, M. and Kitamura, Y. : Supernormal histamine release and normal cytotoxic activity of beige rat mast cells with giant granules. *Int.*

Arch. Allergy Immunol. **100**, 99 (1993).

15) Makino, H., Saijo, T., Ashida, Y., Kuriki, H. and Maki, Y. : Mechanism of action an antiallergic agent, amlexanox (AA-673), inhibiting histamine release from mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **82**, 66 (1987).

16) Reanmmongkol, W., Tohda, M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Sakai, S. I. and Watanabe, H. : Inhibitory effect of alkaloids extracted from the stem bark of *Hunteria zeylanica* on 5-lipoxygenase activity *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 910 (1995).

17) Ashida, Y., Saijo, T., Kuriki, H. and Maki, Y. : Interaction of the antiallergic agent AA-344 with biogenic amines and prostaglandins in production of cAMP in rat mast cells. *Int. Arch. Allergic appl. Immunol.* **62**, 415 (1980).

18) Graziani, Y. and Chayoth, R. : Elevation of cAMP level in Ehrlich Ascites tumor cells by quercetin. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 1259 (1977).

19) Lee, Y. M. and Kim, H. R. : Inhibitory effect of anaphylaxis by WK101 and mechanism of action. *Yakhak Hoeji* **39**, 616 (1995).

20) Yamahara, J., Kobayashi, M., Saiki, Y., Sawada, T. and Fujimura, H. : Biologically active principles of crude drugs. Pharmacological evaluation of cholagogue substance in clove and its properties. *J. Pharm. Dyn.* **6**, 281 (1983).

21) Boonchird, C. and Flegel T. W. : *In vitro* antifungal activity of eugenol and vanillin against Candida albicans and Cryptococcus neoformans. *Can. J. Microbiol.* **28**, 1235 (1981).

22) Cotmore, J. M., Burke A., Lee N. H. and Shapiro I. M. : Respiratory inhibition of isolated rat liver mitochondria by eugenol. *Arch. Oral Biol.* **24**, 565 (1979).

23) Yurt, R. W., Leid, R .W. and Austen, K. F. : Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.* **252**, 518 (1977).

24) Shore, P. A., Burkhalter, A. and Cohn, V. H. : A method for fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127**, 182 (1959).