

## 설파살라진의 항알레르기 효과

김형민\* · 신태용#

\*원광대학교 약학대학, 우석대학교 약학대학  
(Received July 14, 1997)

### Antiallergic Effect of Sulfasalazine

Hyung-Min Kim\* and Tae-Yong Shin\*

\*College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea  
College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

**Abstract**—We studied the effects of sulfasalazine(SSZ) on anaphylaxis. SSZ was found to exhibit an inhibitory activity on the compound 48/80-induced anaphylaxis. SSZ also inhibited local anaphylaxis activated by anti-dinitrophenyl(DNP) IgE. Moreover, SSZ dose-dependently inhibited histamine release in rat peritoneal mast cells activated by compound 48/80 or anti DNP IgE. We investigated the effects of SSZ on cAMP of rat peritoneal mast cell. The level of cAMP in rat peritoneal mast cells, when SSZ was added, transiently and significantly increased approximately 16-fold compared with that of basal cells. These results suggest that the antianaphylactic action of SSZ may be associated with an increase in the intracellular cAMP content of the mast cells as the result of an inhibition of the cAMP phosphodiesterase.

**Keywords** □ Sulfasalazine, Anaphylaxis, Compound 48/80, Anti-dinitrophenyl(DNP) IgE, cAMP, Histamine, Mast cells.

생체내 결합조직에 널리 분포하고 있는 비만세포는 어떤 자극이 가해질 때 세포내 함유하고 있는 물질을 분비하는 기능을 가지고 있다. 이 세포는 Ehrlich<sup>1)</sup>에 의해 처음 관찰된 이래 그 유래, 형태 및 기능에 대하여 많은 연구가 진행되었다. 이러한 비만세포는 선세포의 stimulus-secretion coupling을 연구하기 위한 전형적인 모델로 사용되어 왔으나 최근에는 비만세포의 탈과립을 인위적으로 유발시켜 비만세포의 이상 분비로 인한 여러 가지 임상증상을 방지할 수 있는 의약품을 개발하는데 이용되고 있다.<sup>2)</sup>

비만세포의 탈과립을 유도하는 비만세포의 활성화는 IgE수용체에 항원, anti-IgE, lectin 등의 결합이나 anaphylatoxin 등에 의한 자극, calcium inophore, compound 48/80, codein 및 합성부신피질 자극 호르몬과 같은 약리적 복합물에 의하여 일어난다.<sup>3-6)</sup>

반면에 비만세포의 탈과립을 억제하는 물질에는 cAMP를 변형하는 약물, 인지질 대사를 변화시키는 약물, 칼슘과 calmodulin 길항제, cromoglycate, 플라보노이드, 스테로이드 등<sup>7-10)</sup>이 있다.

Sulfasalazine은 염증성 질환, 궤양성 장염 및 류머티스 관절염 등에 사용되는 약물<sup>11-12)</sup>이다. 또한 sulfasalazine은 생쥐 골수 유래 배양 비만세포와 흰쥐 복강 비만세포로부터 IgE 자극에 의한 히스타민 분비를 억제한다.<sup>13)</sup>

본 연구에서는 compound 48/80 유발 전신성 아나필락시, anti-DNP IgE를 이용한 국소성 아나필락시 및 흰쥐 복강 비만세포로부터 히스타민의 방출에 미치는 SSZ의 영향을 분석하였으며, 세포내 cAMP양을 측정하여 이들의 작용기전을 검토하였다.

#### 실험방법

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0652-290-1405 (팩스) 0652-290-1400

80. anti-dinitrophenyl(DNP) IgE, DNP-human serum albumin(HSA), o-phthaldialdehyde 및 metrizamide는 Sigma사 제품을 사용하였다.  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ -MEM)은 Flow Laboratories에서, fetal calf serum(FCS)는 Gibco Laboratories에서 구입하였다. cAMP kit는 Amersham사에서 구입하여 사용하였으며 기타 시약은 시판시약 특급을 사용하였다. 기기는 spectrofluorometer(Kontron Co.), spectrophotometer(Waters Co.)를 사용하였다.

**실험동물** - Wistar계 흰쥐 및 BALB/C 생쥐는 화학연구소에서 구입하여 실험에 사용할 때까지 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 10\%$ 로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 사육하였다.

**Compound 48/80에 의한 전신성 아나필락시스** - Amir<sup>14</sup> 등의 방법에 따라 실험하였다. 즉 비만세포의 탈과립제로 compound 48/80( $8 \mu\text{g/g}$ , 체중)를 흰쥐의 복강내에 주사하였으며, SSZ는 생리식염수에 녹인 다음 compound 48/80을 생쥐의 복강내에 투여하기 60분전에 0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 100.0( $\mu\text{g/g}$ , 체중)의 용량으로 복강내에 주사하였다. 또 compound 48/80을 투여하고 5분 및 10분 후에 SSZ( $100 \mu\text{g/g}$ , 체중)을 복강내에 주사하였다. 치사율 실험은 아나필락시스 속을 유발시킨 후 1시간 동안 관찰하였으며 관찰 후 생쥐의 심장에서 채혈하고 혈청을 분리하여 히스타민을 정량하였다.

**48시간 동종 수동 피부 아나필락시스(PCA)** - Kawabata<sup>15</sup> 등의 방법에 따라 실험하였다. 즉 한 마리의 흰쥐를 사용하여 등의 털을 제거한 후 4곳의 부위에 각각 anti-DNP IgE  $100 \mu\text{g}$ 씩을 피하주사하여 감작시킨 다음 48시간 후에 흰쥐의 꼬리 정맥에 DNP-HSA 1mg과 Evans blue 16mg을 포함한 생리식염수를 주사하여 항원 항체 반응을 야기시켰다. anti-DNP IgE로 감작시킨 비만세포를 DNP-HSA로 탈감작시키기 1시간 전에 생리식염수로 조제한 SSZ를 0.01, 0.1, 1.0, 10.0( $\mu\text{g/g}$ , 체중)를 경구투여 하였고 30분 후에 흰쥐를 치사시켰다. Evans blue로 염색된 피부 부위를 잘라 1.0M-KOH 1ml를 가하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 하룻밤 동안 방치하여 피부 조직을 용해시킨 다음 acetone과 0.6M- $\text{H}_3\text{PO}_4$ (5:13)의 혼액 9ml를 가하여 진탕 추출한 후 Katayama<sup>16</sup> 등의 방법에 따라 620nm에서 색소량을 비색정량하였다.

**히스타민의 정량** - 혈청 중에 있는 히스타민은

Shore<sup>17</sup> 등의 방법에 따라 o-phthaldialdehyde로 히스타민을 형광유도체화 시킨 후  $\lambda_{\text{ex}} = 353 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 438 \text{ nm}$ 에서 상대형광강도를 측정하여 정량하였다.

**흰쥐 복강 비만세포의 분리** - Kanemoto<sup>18</sup> 등의 방법에 따라 실험하였다. 즉 흰쥐를 에테르로 마취시킨 후 실온에서 Tyrode buffer B( $137 \text{ mM NaCl}$ ,  $12 \text{ mM NaHCO}_3$ ,  $2.7 \text{ mM KCl}$ ,  $0.3 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $1.0 \text{ mM MgCl}_2$ ,  $1.0 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $5.6 \text{ mM dextrose}$ , 0.1% bovine serum albumin) 약 20ml를 복강내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 마사지하였다. 복벽 중앙선을 주의 깊게 절개하고 pasteur pipette로 복강 세척액을 채취하여  $150 \times \text{g}$ 에서 10분동안 원심분리하여 상정액을 분리 제거한 후 비만세포 부유액을 Tyrode buffer B에 재부유 시켰다. 세포 부유액 중 비만세포는 22.5%(W/V) metrizamide를 이용하여 Yurt<sup>19</sup> 등의 방법으로 분리 정제하였다.

**히스타민 유리** - 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 미리  $37^\circ\text{C}$ 에서 10분간 배양시킨 복강 비만세포 부유액( $1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ )에 SSZ를 가하여 10분간 배양시킨후 compound 48/80을 가해 다시 10분 동안 배양 시켰다. 또, anti-DNP IgE로 감작시킨 비만세포 부유액( $1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ )은 DNP-HSA( $1 \mu\text{g/ml}$ )로 탈감작시키기 10분 전에 SPP를 첨가하였다.

**히스타민 유리 억제율** - 히스타민 유리 억제율은 다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{히스타민유리억제율}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A : SSZ를 부가하지 않았을 때의 히스타민양

B : SSZ를 부가하였을 때의 히스타민의 양

**세포내 cAMP 측정** - Peachell<sup>20</sup> 등의 방법에 따라 실험하였다. 즉 Tyrode buffer A( $10 \text{ mM HEPES}$ ,  $130 \text{ mM NaCl}$ ,  $5.0 \text{ mM KCl}$ ,  $1.4 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $1.0 \text{ mM MgCl}_2$ ,  $5.6 \text{ mM glucose}$ ,  $0.1 \text{ mM bovine serum albumin}$ )에 부유시킨 흰쥐 복강 비만세포( $5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ )에 Tyrode buffer A로 조제한 SSZ( $500 \mu\text{g/ml}$ )를 넣어 5%  $\text{CO}_2$  incubator로  $37^\circ\text{C}$ 에서 배양하였다. 배양시간은 0, 5, 10, 30, 60, 180, 300초이며 산성화 에탄올(86% ethanol 0.9ml : 1M HCl = 99:1)을 넣어 세차게 혼합하여 반응을 정지시킨 후 액체질소에서 동결시켰다. 이 시료를 녹여서 혼합한 후  $400 \times \text{g}$ 으로  $4^\circ\text{C}$ 에서 5분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후 상정

액 0.9 ml를 취해 감압 건조시켰다. 이 건조 시료 중의 cAMP 함량은 assay buffer 200  $\mu$ l에 용해시킨 후 cAMP정량 kit를 사용하여 측정 하였다.

**통계학적 분석** - 실험 결과는 mean  $\pm$  S.E로 표시하였으며 Student's test에 의해 유의성을 검정하여  $p < 0.05$ 인 결과를 얻었을 때 유의성이 있는 것으로 하였다.

### 실험결과 및 고찰

**Compound 48/80에 의해 유도된 아나필락시 반응에 미치는 SSZ의 효과** - 즉시형 과민반응에 대한 SSZ의 효과를 검토하기 위해 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시를 유도하였다. 치사율은 compound 48/80(8  $\mu$ g/g, 체중)을 생쥐에 주사한 후 1시간 동안 관찰하여 결정하였다. Table I에서와 같이 생리 식염수 200  $\mu$ l를 투여한 대조군( $n=10$ )은 100%치사율을 나타내었다. 그러나 compound 48/80을 투여하기 1시간 전에 SSZ를 계열 희석하여 복강내에 투여한 후 치사율을 관찰한 결과 0.01( $\mu$ g/g, 체중)농도로 투여하였을 때는 모두 사망하였으나, 0.1( $\mu$ g/g, 체중)일 때는 80%, 10( $\mu$ g/g, 체중)일 때는 40%만 사망하였고, 100( $\mu$ g/g, 체중)에서는 전혀 사망하지 않았다. compound 48/80을 투여하고 5분 및 10분 후에 SSZ(100  $\mu$ g/g, 체중)을 복강내에 투여한 결과 Table II에서와 같이 5분 후에 SSZ를 투여한 군은 전혀 사망하지 않았으나 10분 후에 투여한 군에서는 치사율이 50%이었다.

**Table I**—Effects of SSZ on compound 48/80-induced systemic anaphylaxis

SSZ treatment ( $\mu$ g/g, body weight)	Compound 48/80 (8 $\mu$ g/g, body weight)	Mortality(%)
None(saline)	+	100
0.01	+	100
0.1	+	80
1.0	+	60
10.0	+	40
100.0	+	0
100.0	-	0

Groups of mice were intraperitoneally pretreated with saline (200  $\mu$ l) or SSZ was given at various doses 1 hr before ( $n=10$ /group) compound 48/80 injection.

Compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of mice.

Mortality (%) within 1 hr following compound 48/80 injection was represented as the No. of dead mice  $\times$  100/total No. of experimental mice.

**Table II**—Inhibitory effects after an intraperitoneal injection of SSZ on compound 48/80-induced anaphylaxis

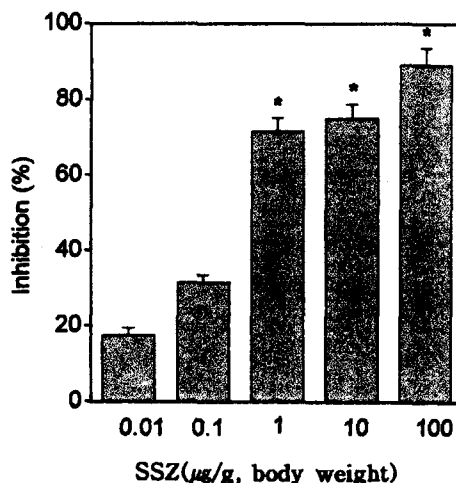
SSZ treatment ( $\mu$ g/g, body weight)	Compound 48/80 (8 $\mu$ g/g, body weight)	Mortality(%)	
		5 min after	10 min after
None(Saline)	+	100	100
SSZ	+	0	50
SSZ	-	0	0

Groups of mice( $n=10$ /group) were intraperitoneally pretreated with saline(200  $\mu$ l) or SSZ was given 100  $\mu$ g/g body weight at 5 min or 10 min after compound 48/80 injection.

Compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of mice.

Mortality(%) within 1 hr following compound 48/80 injection was represented as No. of dead mice  $\times$  100/total No. of experimental mice.

**혈청 중 히스타민 유리에 미치는 SSZ의 효과** - SSZ(100  $\mu$ g/g, 체중)투여에 의해 전신성 아나필락시가 완전히 억제되므로 혈청 중 히스타민을 측정하여 SSZ의 효과를 검토하였다. compound 48/80을 투여하기 1시간 전에 SSZ를 복강내에 투여하였다( $n=7$ ). compound 48/80을 투여하고 15분 후에 심장에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 히스타민 양을 측정한 결과 Fig. 1에서와 같이 혈청중 히스타민의 유리는 SSZ에



**Fig. 1**—Effects of SSZ on compound 48/80-induced serum histamine release. Groups of mice were intraperitoneally pretreated with 200  $\mu$ l saline or SSZ. Each drug was given with various doses at 1 hr before compound 48/80 injection. Compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of mice( $n=7$ /group). \* $p < 0.05$ ; significantly different from the saline value.

**Table III**—Effects of SSZ on the 48 hrs passive cutaneous anaphylaxis in rats

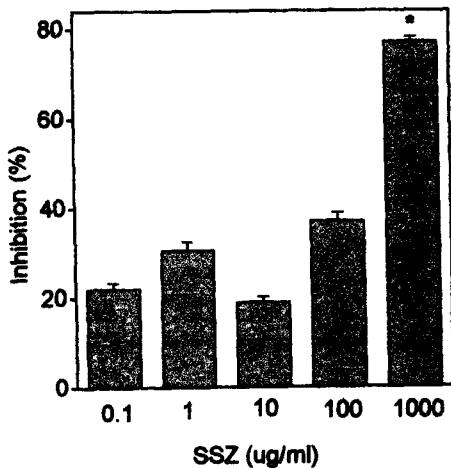
SSZ treatment (mg/g. body weight)	Amount of dye ( $\mu\text{g}/\text{site}$ )	Inhibition(%)
None (saline)	25.77 $\pm$ 1.83	-
0.01	25.01 $\pm$ 0.26	3.0
0.1	20.57 $\pm$ 2.84	20.2
1.0	12.03 $\pm$ 0.77*	53.3
10.0	2.74 $\pm$ 0.39*	89.4

Drug was administered intraperitoneally 1 hr prior to challenge with antigen. Each amount of dye represents the mean $\pm$ S.E. of 4 experiments(animal number=1).

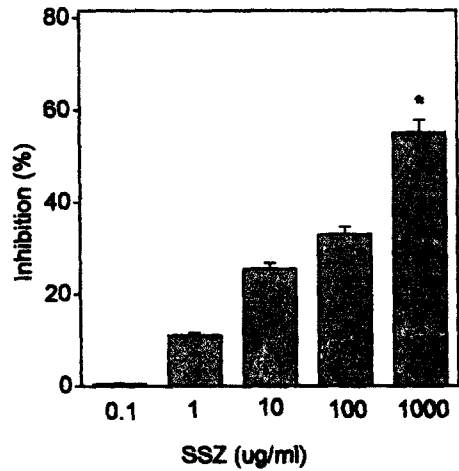
\*p<0.05: significantly different from the saline value.

의해 억제되었다. 이러한 결과는 SSZ가 compound 48/80의 투여에 의해 유도된 아나필락시 예방에 효과적임을 시사하고 있다.

**수동 피부 아나필락시(PCA)에 미치는 SSZ효과** - PCA에 미치는 SSZ의 영향을 검토하기 위하여 DNP-HSA와 Evans blue의 혼합액을 투여하기 1시간 전에 흰쥐에 SSZ를 0.01, 0.1 1.0, 10./0( $\mu\text{g}/\text{g}$ , 체중)을 경구투여 한 결과 Table III에서와 같이 수동 피부 아나필락시 반응의 억제율이 각각 3.0%, 20.2% 53.3%(p<0.05) 및 89.4%였다(p<0.05). 이는 SSZ가 비만세포에 의해 매개되는 수동 피부 아나필락시 반응도 억제하는 것을 의미한다.

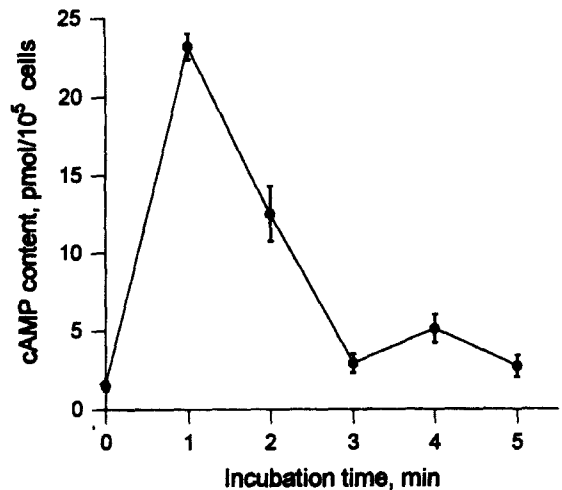


**Fig. 2**—Effect of SSZ on compound 48/80-induced histamine release from RPMC. RPMC( $2 \times 10^5$  cells/ml) were preincubated with drug at 37°C for 10 min prior to incubation with each stimulator for 10 min. \*p<0.05: significantly different from the saline value.



**Fig. 3**—Effect of SSZ on IgE-mediated histamine release from RPMC. RPMC( $2 \times 10^5$  cells/ml) were preincubated with drug at 37°C for 10 min prior to incubation with each stimulator for 10min. \*p<0.05: significantly different from the saline value.

**비만세포로부터 히스타민 유리에 미치는 SSZ의 효과** - 흰쥐의 복강 비만세포에 미치는 SSZ의 효과를 검토하기 위하여 compound 48/80을 투여하기 10분전에 SSZ를 처리하였다. 또 비만세포를 anti-DNP IgE로 감작하고 DNP-HSA를 처리하기 전 SSZ를 처리한 결과 Fig. 2 및 Fig 3에서와 같이 SSZ는 compound 48/80에



**Fig. 4**—Time course of increase in the cAMP level of rat peritoneal mast cells caused by SSZ. Rat peritoneal mast cells( $5 \times 10^5$  cells/ml) were pre-treated with saline or SSZ(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) at 37°C. Each point represents the mean of triplicate values.

의한 히스타민의 유리를 억제 시켰으며 DNP-HSA를 처리하기 전 SSZ를 처리하였을 때도 비만세포로부터 히스타민 방출이 현저히 억제되었다. SSZ 1000 µg/ml를 처리한 세포에 대한 Trypan blue 흡수 실험 결과 97% 이상의 세포가 생육성(viability)이 있었다.

**흰쥐 복강 비만세포의 cAMP함량에 미치는 SSZ의 효과** - 흰쥐 복강 비만세포에 SSZ(500 µg/g, 체중)을 넣어 배양하였을 때 Fig. 4에서와 같이 cAMP의 증가는 순간적이었으며 최고치가 SSZ를 가하였을 때는 SSZ를 가하지 않았을 때보다 16배 증가하였다. SSZ를 첨가한 후 1분 후에 정점에 이르다가 3분 후에는 12.5%로 급격히 감소하였다. 이 사실은 cAMP가 히스타민 유리 조절인자로서 작용하며, 이러한 SSZ에 의한 cAMP함량의 증가는 주로 cAMP의 생성의 증가에 의한 것으로 사료된다.<sup>7)</sup>

## 결 론

SSZ의 항알레르기 효과 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SSZ는 compound 48/80에 의해 유도된 전신 아나필락시 및 anti-DNP IgE로 유도된 국소 아나필락시를 억제하였다.
2. SSZ는 compound 48/80 및 anti-DNP IgE에 의한 흰쥐의 복강 비만세포로부터 히스타민의 유리를 억제하였다.
3. SSZ는 비만세포의 cAMP의 양을 최고 16배까지 증가시켰다.

이러한 결과로 미루어 볼 때, SSZ의 항알레르기 효과는 세포내 cAMP 함량의 증가에 의한 것으로 사료된다.

## 문 헌

- 1) Elrich, P. : Beitrage zur Kenntniss der Anilinfarbung und ihrer Verwendung in der Mikroskopischen Technik. *Arch. Mikrosk. Anat.* **13**, 263 (1877).
- 2) Ludwyke, R. and Lagunoff, D. : Drug inhibition of mast cell secretion. *Drug* **29**, 277 (1985).
- 3) Taska, 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).
- 4) Chand, N., Pillar, J., Diamantis, W., Perhach, J. L. and Sophia, R. D. : Inhibition of calcium ionophore (A23187) stimulated histamine release from rat peritoneal mast cells by azelastine: Implications for its mode of action. *Eur. J. Pharmacol.* **96**, 227 (1983).
- 5) 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**, 228 (1995).
- 6) Ohmori, Y., Ito, M., Kishi, M., Mizutani, H., Katada, T. and Konishi, H. : Antiallergic constituents from oolong tea stem. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 683 (1995).
- 7) Makino, H., Saijo, T., Ashida, Y., Kuriki, H. and Maki, Y. : Mechanism of action of an antiallergic agent, Amlexanox(AA-673), in inhibiting histamine release from mast cells. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* **82**, 66 (1987).
- 8) Reanmongkol, 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).
- 9) Ashida, Y., Saijo, T., Kuriki, H. and Maki, Y. : Interaction of the antiallergic agent AA-344 with biogenic amines and prostaglandins in production of cyclic AMP in rat mast cells. *Int. Arch Allergy Appl. Immunol.* **62**, 415 (1980).
- 10) Graziani, Y. and Chayoth, R. : Elevation of cyclic AMP level in Ehrlich ascites tumor cells by quercetin. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 1259(1977).
- 11) Pullar, T. and Capell, H. A. : Sulfasalazine: a new antirheumatic drug. *Br. J. Rheumatol.* **23**, 26 (1984).
- 12) Sircar, J. C., Schwender, C.F. and Caruthers, M. E. : Inhibition of soybean lipoxygenase by sulfasalazine and s-aminosalicylic acid: a possible mode of action if ulcerative colitis. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 170 (1983).
- 13) Barrett, K. E., Tashof, T. L. and Metcalfe, D. D. : Inhibition of IgE mediated mast cell degranula-

- tion by sulfasalazine. *Eur. J. Pharmacol.* **107**, 279 (1985).
- 14) Amir, S. and English, A. M. : An inhibitor of nitric oxide production, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester, improves survival in anaphylactic shock. *Eur. J. Pharmacol.* **203**, 125 (1991).
- 15) Kawabata, T. T. and Babcock, L. S. : Measurement of murine ovalbumin-specific IgE by a rat basophil leukemia cell serotonin release assay. *J. Immunol. Method* **162**, 9 (1993).
- 16) Katayama, S., Shionoya, H. and Ohtake, S. : A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.* **22**, 89 (1978).
- 17) 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).
- 18) 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).
- 19) Yurt, R. W., Leid, R. W. and Austen, K. F. : Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.* **252**, 518 (1977).
- 20) Peachell, P. T., Macglashan, D. W., Lichtenstein, L. M. and Schleimer, R. P. : Regulation of human basophil and lung mast cell function by cyclic adenosine monophosphate. *J. Immunol.* **140**, 571 (1988).