

승마 추출물의 항알레르기 효과

신태용[#] · 서형만 · 채병숙^{*}

우석대학교 약학대학, *우석대학교 자연과학대학

(Received May 7, 1998)

Antiallergic Effect of *Cimicifuga heracleifolia* Extract

Tae-Yong Shin[#], Hyung-Man Seo and Byeong-Suk Chae^{*}

College of Pharmacy, Woosuk University, Chonju, 565-701, Korea

^{*}College of Natural Science, Woosuk University, Chonju, 565-701, Korea

Abstract—Effects of the aqueous extract of *Cimicifuga heracleifolia* (CHAE) on the allergic reactions were investigated. CHAE inhibited systemic anaphylaxis induced by compound 48/80 in mice dose-dependently. Especially, CHAE inhibited compound 48/80-induced systemic anaphylaxis 100% with a dose of 0.5 mg/g body weight. CHAE significantly inhibited serum histamine levels induced by compound 48/80. CHAE inhibited histamine release from the rat peritoneal mast cells activated by compound 48/80 or anti-DNP IgE. Our studies provide evidence that CHAE will be beneficial in the treatment of anaphylaxis.

Keywords □ *Cimicifuga heracleifolia*, Anaphylaxis, Compound 48/80, Anti-dinitrophenyl IgE, Histamine, Mast cells.

승마는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 *Cimicifuga heracleifolia* Komarov 또는 그 밖의 동속 식물의 뿌리줄기를 건조한 것으로 해열작용, 진통작용 및 항염증작용,^{1,2)} 중추억제작용 및 진경작용³⁾ 등이 알려져 있으며 임상에서는 감염성 질환, 구내염, 파진 등에 사용되고 있는 생약⁴⁾이다. 알레르기는 항원 항체 반응의 결과로 나타나는 생체의 병적과정이며 일반적으로 반응을 일으키는데 필요한 시간 및 보체 관여의 유무로부터 I-IV형으로 분류되어진다.⁵⁾ 이 중 기관지 천식, 알레르기성 비염, 화분증 및 아토피성 피부염 등을 일으키는 즉시형과민반응인 제 I 형 알레르기가 임상에 있어서 중요한 부분을 차지하고 있다. 비만세포는 아나필락시와 알레르기 반응 중에 일어나는 다양한 생리변화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁶⁻¹¹⁾ 비만세포의 탈과립을 유도하는 비만세포 활성

화는 Fc수용체에 항원, anti-IgE, lectin 등의 결합에 의하거나, anaphylatoxin 등에 의한 자극, calcium ionophore, compound 48/80, codeine 및 합성부신 피질 자극 호르몬과 같은 약리적 복합물에 의하여 야기된다고 보고되어 있으며¹²⁻¹⁵⁾ compound 48/80은 아나필락시 반응의 기전을 연구하기 위하여 히스타민 유리촉진제로서 가장 널리 사용되고 있는 약물이다.¹⁶⁾ 한편 승마의 항알레르기에 대한 연구는 최 등^{17,18)}이 시험관내 스크리닝 시험으로 hyaluronidase의 활성과 생쥐 이각과 흰쥐 등 피부들 사용하여 PCA의 반응에 미치는 물 엑스의 영향을 검토하여 항알레르기 작용이 있음을 제시하였다. 그러나 승마의 천진성아나필락시와 항알레르기 성분에 대한 보고는 없으며 저자들은 승마의 항알레르기 성분의 분리 및 작용기전 연구의 일환으로 우선 승마의 물 추출물이 compound 48/80 유발 아나필락시 및 흰쥐의 복강 비만세포로부터 히스타민 방출에 미치는 영향을 검토하여 보고하는 바이다.

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0652-290-1572 (팩스) 0652-290-1567

실험방법

시약 및 기기

Compound 48/80, metrizamide, α -minimum essential medium(α -MEM), anti-dinitrophenyl (DNP) IgE, DNP-human serum albumin(HSA) 및 *o*-phthaldialdehyde(OPA)는 Sigma에서 구입하였으며 기타 시약은 시판 시약 특급을 사용하였다. 기기는 spectrofluorometer(Shimadzu, RF-5300PC, Japan)를 사용하였다.

실험동물

Wistar계 수컷 흰쥐 및 ICR계 수컷 생쥐는 대한 실험 동물 센터에서 구입하여 실험에 사용하였다.

사용약제

승마(CHAE)는 시중 한의원에서 구입하여 증류수로 수욕상에서 5시간 2회 추출하여 농축한 다음 동결건조하여 -20°C 에서 보관하였다. 이 추출물을 사용직전에 생체내 실험에서는 생리식염수를 사용하고 생체의 실험에서는 Tyrode buffer A를 사용하여 일정농도로 조제하였다.

생체내 실험

Amir 등¹⁹⁾의 방법에 따라 실험하였다. 즉 비만세포의 탈과립제로 compound 48/80(8 $\mu\text{g/g}$, 체중)을 생쥐 복강내에 투여하기 60분 전에 생리식염수로 조제한 CHAE를 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 및 1.0(mg/g, 체중)의 용량으로 복강내에 주사하였다. 치사율은 아니필락시를 유발시킨 후 60분 동안 관찰하였다. 치사율의 관찰이 끝난 직후 생쥐의 심장에서 채혈하고 혈청을 분리하여 히스타민을 정량하였다. 시간 의존 실험으로 CHAE(1 mg/g, 체중)를 compound 48/80 투여 1시간 전, 5분과 10분 후에 각각 복강내에 주사하고 치사율을 관찰하였다.

시험관내 실험

흰쥐 복강 비만세포의 분리 - Kanemoto 등¹⁶⁾의 방법에 따라 흰쥐 복강 비만세포를 분리하였다. 이를 간단히 기술하면 흰쥐를 에테르로 마취시킨 후 실온에서 Tyrode buffer B 약 20 ml를 복강내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 마사지한 후 복벽 중앙선을 약간 절개

하고 복강내액을 채취하여 150 \times g로 10분간씩 3회 반복 원심시킨 후 상층 부유액을 제거하고 1ml의 Tyrode buffer B에 재부유시켰다. 이 세포 부유액중 비만세포는 22.5%(W/V) metrizamide를 이용하여 Yurt 등²⁰⁾의 방법으로 분리 정제하였다.

Compound 48/80에 의한 히스타민 유리 - CO_2 incubator에서 미리 37°C 에서 10분간 배양시킨 흰쥐복강비만세포 부유액(2×10^5 cells/ml)에 CHAE의 농도를 각각 0.001, 0.01, 0.1, 및 1.0 mg/ml의 농도로 첨가하여 37°C 에서 10분간 배양시킨 후 compound 48/80을 가하여 다시 10분간 배양시킨 다음 400 \times g로 4°C 에서 5분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다.

Anti-DNP IgE와 DNP-HSA에 의한 히스타민 유리 - 흰쥐 복강 비만세포 부유액(2×10^5 cells/ml)에 anti-DNP IgE antibody를 첨가하여 37°C 에서 16시간 동안 배양시킨 후 3회 세척하여 비만세포의 IgE 수용체와 결합하지 않은 antibody를 제거한 후 CHAE를 첨가하고 10분간 다시 배양시켰다. 여기에 DNP-HSA를 첨가하고 40분간 배양시킨 후 400 \times g로 4°C 에서 5분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다.

히스타민의 정량

세포배양 상층액 및 혈청 중에 있는 히스타민은 Shore 등²¹⁾의 방법에 따라 OPA로 히스타민을 형광유도체화 시킨 후 $\lambda_{\text{ex}}=353$ nm, $\lambda_{\text{em}}=438$ nm에서 상대형광강도를 측정하여 정량하였다.

히스타민 유리 억제율

히스타민 유리 억제율은 다음식에 의하여 구하였다.

$$\text{히스타민 유리 억제율}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: CHAE를 부가하지 않았을 때의 히스타민의 양

B: CHAE를 부가하였을 때의 히스타민의 양

통계학적 분석

실험 결과는 $\text{mean} \pm \text{S.E}$ 로 표시하였으며 Student's test에 의해 유의성을 검정하여 $p < 0.05$ 인 결과를 얻었을 때 유의성이 있는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

Compound 48/80에 의해 유도된 아니필락시 반응에

Table I— Effects of CHAE on compound 48/80-induced anaphylaxis

CHAE treatment (mg/g, body weight) ^{a, b)}	Compound 48/80 (8 µg/g, body weight) ^{c)}	Mortality (%) ^{d)}
None (Saline)	+	100
0.01	+	100
0.05	+	71.4
0.10	+	42.9
0.50	+	0
1.00	+	0
1.00	-	0

^{a)} Groups of mice (n=7/group) were intraperitoneally pretreated with 200 µl saline or drugs.

^{b)} The drugs were given at various doses 1hr before the compound 48/80 injection.

^{c)} The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to mice.

^{d)} Mortality (%) within 1hr following compound 48/80 injection was represented as number of dead mice × 100/total number of experimental mice.

미치는 CHAE의 효과 - 즉시형 과민반응에 대한 CHAE의 효과를 검토하기 위해 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시를 유도하였다. 치사율은 compound 48/80(8 µg/g, 체중)을 생쥐에 주사한 후 1시간 동안 관찰하여 결정하였다(n=7/group). Table I에서와 같이 생리식염수 200 µl를 투여한 대조군은 100% 치사율을 나타내었다. 그러나 compound 48/80을 투여하기 1시간 전에 CHAE를 계열 회색하여 복강내에 투여한 후 치사율을 관찰한 결과 0.01(mg/g, 체중) 농도로 투여하였을 때는 치사율이 100%이었으나 0.05, 0.10 (m/g, 체중) 농도로 투여하였을 때는 치사율이 각각 71.4%, 42.9%였으며 0.50 및 1.0(mg/g, 체중)에서는

Table II— Time dependent effects of CHAE on compound 48/80-induced anaphylaxis

CHAE treatment (mg/g, body weight) ^{a, b)}	Compound 48/80 (8 µg/g, body weight) ^{c)}	Mortality (%) ^{d)}	
		5 min later	10 min later
None (Saline)	+	100	100
1.0	+	14.3	14.3
1.0	-	0	0

^{a)} Groups of mice (n=7/group) were intraperitoneally pretreated with 200 µl of saline or drugs.

^{b)} The drugs were given 5 min or 10 min after the compound 48/80 injection.

^{c)} The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to mice.

^{d)} Mortality (%) within 1hr following compound 48/80 injection was represented as number of dead mice × 100/total number of experimental mice.

치사율이 0%이었다. 한편 compound 48/80을 투여하고 5분 및 10분 후에 CHAE(1 mg/g, 체중)을 복강내에 투여한 결과 Table II에서와 같이 5분 및 10분 후 모두 치사율이 14.3%이었다.

혈청중 히스타민 유리에 미치는 CHAE의 효과 - 치사율 실험이 끝난 직후 생쥐의 심장에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 히스타민 양을 측정된 결과(n=7/group). Fig. 1에서와 같이 혈청 중 히스타민의 유리는 CHAE 농도 의존적으로 억제되었다. 이와같은 결과는 CHAE가 compound 48/80 투여에 의해 유도된 전신성 아나필락시 반응을 억제하여 히스타민 등 화학적 매개물질의 유리를 억제한 결과로 사료된다.

Compound 48/80에 의한 흰쥐 복강비만세포의 히스타민 유리에 미치는 CHAE의 효과 - 비만세포에 compound 48/80을 처리하면 세포막이 파괴되면서 세포내에 함유되어 있는 각종 화학적 매개물질이 방출된다. 그러나 비만세포를 CHAE로 전처리하고 compound 48/80을 처리하면 히스타민 유리가 일어나지 않는다. CHAE가 복강비만세포에 미치는 영향을 검토하기 위하여 compound 48/80 처리 10분 전에 CHAE를 처리한 결과 Fig. 2에서와 같이 CHAE는 compound 48/80에

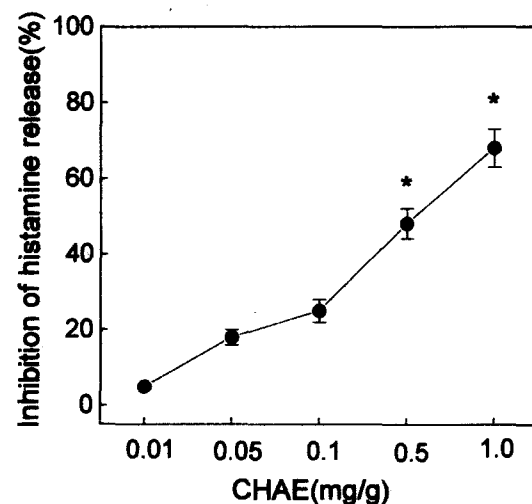


Fig. 1— Effects of CHAE on compound 48/80-induced serum histamine release. Groups of mice were intraperitoneally pretreated with 200 µl saline or CHAE. Each drug was given with various doses at 1 hr before compound 48/80 injection. Compound 48/80 solution was given intraperitoneally to the group of mice (n=7/group).

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

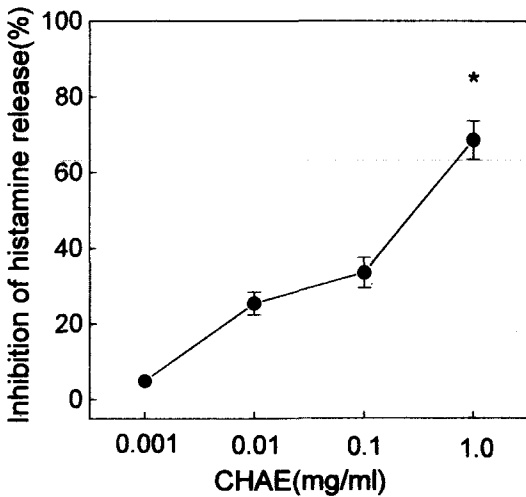


Fig. 2— Effects of CHAE on compound 48/80-induced histamine release from RPMC. RPMC (2×10^5 cells/ml) were preincubated with the drug at 37°C for 10 min prior to incubation with compound 48/80. Each data is presented as the mean \pm S.E of three independent experiments. * $p < 0.05$: significantly different from the saline value.

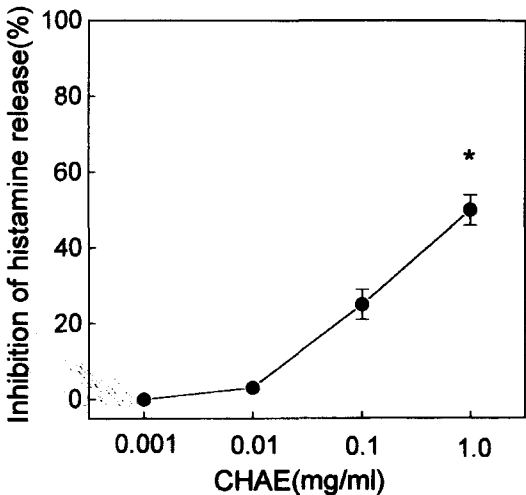


Fig. 3— Effects of CHAE on anti-DNP IgE-induced histamine release from RPMC. RPMC (2×10^5 cells/ml) were preincubated with the drug at 37°C for 10 min prior to the challenge with DNP-HSA. Each data is presented as the mean \pm S.E of three independent experiments. * $p < 0.05$: significantly different from the saline value.

의한 히스타민의 유리를 억제시켰다.

Anti-DNP IgE와 DNP-HSA에 의한 흰쥐 복강비만 세포의 히스타민 유리에 미치는 CHAE의 효과 - 비만

세포를 anti-DNP IgE로 감작하고 DNP-HSA를 처리하기 전 CHAE를 처리하였을 때 Fig. 3에서와 같이 비만세포로부터 히스타민의 유리가 억제되었다. 이는 CHAE가 세포막을 안정화시켜 히스타민의 방출을 억제함으로써 compound 48/80 또는 anti-DNP IgE에 의해 유도된 아나필락시를 억제하는 것으로 사료된다.

결론

CHAE의 항알레르기 효과 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CHAE는 compound 48/80에 의해 유도된 전신성 아나필락시를 억제하였다.
2. CHAE는 compound 48/80 및 anti-DNP IgE에 의한 흰쥐의 복강 비만세포로부터 히스타민 유리를 억제하였다.
3. CHAE는 compound 48/80에 의해 유도된 전신성 아나필락시에서 혈청 중 히스타민의 유리를 억제하였다. 승마의 항알레르기 활성 성분의 분리 및 작용기전은 차후 연구할 계획이다.

감사의 말씀

이 논문은 1998년도 우석대학교 학술연구 조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Shibata, M., Yamatake, Y., Amagaya, Y and Fukushima, M. : Pharmacological studies on the chinese crude drug "Shoma". I. Acute toxicity and anti-inflammatory action of *Cimicifuga rhizoma*, *Cimicifuga dahurica maxim*. *Yakugaku Zasshi*, **95**, 539 (1975).
- 2) Shibata, M., Sakurai, N. and Onoda, M. : Pharmacological studies on the chinese crude drug "Shoma". II. Anti-inflammatory action of *Cimicifuga rhizoma*, *Cimicifuga Simplex* Wormsk. *Yakugaku Zasshi*, **97**, 911 (1979).
- 3) Shibata, M., Ikoma, M., Onoda, M., Sato, F. and Sakurai, N. : Pharmacological studies on the chinese crude drug "Shoma". III. Central depressant and antispasmodic actions of *Cimicifuga rhi-*

- zama, Cimicifuga Simplex* Wormsk. *Yakugaku Zasshi*, **100**, 1143 (1980).
- 4) Chang, H. M. and But, P. P. H. : *Pharmacology and applications of chinese materia medica*. World scientific. 235 (1987).
 - 5) 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., 761 (1975).
 - 6) Shin, H. Y., Lee, E. H., Shin, T. Y. and Kim, H. M. : Effect of cytochalasin D on systemic and local anaphylaxis in murine model. *Pharmacol. Res.* **36**, 141 (1997).
 - 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) Lee, Y. M., Kim, D. K., Kim, S. H., Shin, T. Y. and Kim, H. M. : Antianaphylactic activity of *Poncirus trifoliata* fruit extract. *J. Ethnopharmacol.* **54**, 77 (1996).
 - 9) Martin, T. R., Ando, A., Takeishi, T., Katona, I. M., Drazen, J. M. 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).
 - 10) Dombrowicz, D., Flamand, V., Brigman, K. K., Koller, B. H. and Kinet, J. P. : Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor α chain gene. *Cell* **75**, 969 (1993).
 - 11) Kim, H. M., Hirota, S., Chung, H. T., Ohno, S., Osada, S., Ko, K. I., Kim, J. B., Kitamura, Y. and Nomura, S. : Differential expression of protein kinase C genes in cultured mast cell derived from normal and mast cell deficient mice and mast cell lines. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **105**, 258 (1994).
 - 12) Tasaka, K., Mitsunobu, M. I. O. and Masahiro, O. : Intracellular calcium release induced by histamine releasers and its inhibition by some antiallergic drugs. *Ann. Allergy* **56**, 464 (1986).
 - 13) Chand, M., Pillar, J., Diamantis, J., Perhach, J. R. and Duane S. 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).
 - 14) 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).
 - 15) Ohmori, Y., Ito, M., Kishi, M., Mizutani, H., Kameda, T. and Konishi, H. : Antiallergic constituents from oolong tea stem. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 683 (1995).
 - 16) 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).
 - 17) Choi, S. H., Kim, Y. R., Lim, D. G. and Bai, E. O. : Anti-allergic action of some medicinal plant. *Yakhak Hoeji*, **36**, 140 (1992).
 - 18) Choi, S. H., Bae, E. O., Lim, D. K. and Kim, Y. R. : Effects of some medicinal plants on 48-hour homologous passive cutaneous anaphylaxis and chemical mediators. *Yakhak Hoeji*, **36**, 357 (1992).
 - 19) 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).
 - 20) Yurt, R. W., Leid, R. W. and Austen, K. F. : Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.* **252**, 518 (1977).
 - 21) 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).