

선택에 의한 즉시형 알레르기 반응의 억제

신태용* · 김성화 · 김형민*

우석대학교 약학대학, *원광대학교 약학대학

(Received April 30, 1998)

Inhibition of Immediate Allergic Reaction by *Cryptotympana atrata*

Tae-Yong Shin*, Seong-Hwa Kim and Hyung-Min Kim

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

*College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea

Abstract—Effects of the aqueous extract of *Cryptotympana atrata* Fabricius (CAF) on the allergic reactions were investigated. In the present study, we examined the effect of CAF on compound 48/80-induced anaphylaxis in vivo and histamine release from rat peritoneal mast cells in vitro. CAF dose-dependently inhibited systemic anaphylaxis induced by compound 48/80 in mice. CAF significantly inhibited serum histamine levels induced by compound 48/80. CAF also inhibited histamine release from the rat peritoneal mast cells activated by compound 48/80. These results suggest that CAF may be useful for the prevention and treatment of allergy related disease.

Keywords □ *Cryptotympana atrata*, Anaphylaxis, Compound 48/80, Histamine, Mast cells.

선택(*Cryptotympana atrata* Fabr.)는 매미과(Cicadidae)에 속하는 매미의 유충이 성충으로 변화할 때 탈피한 껍질로서 진정작용, 진정작용, 해열작용이 있으며 임상에서는 소아의 감기에 의한 발열, 과상풍, 각막혼탁 및 담마진 등의 알레르기성 피부질환에 이용되고 있는 생약이다.¹⁾ 이에 관한 약리학적 연구로는 Hsieh등²⁾이 흰쥐를 이용한 실험에서 진정작용, 진정작용 등을 보고하였으며 Ma등³⁾은 이종 수동 피부 아나필락시를 이용한 실험으로 항알레르기 작용을 보고하였다. 알레르기는 일반적으로 내가자 형으로 분류되어 지고 있으며⁴⁾ 그 중 제I형 알레르기가 임상에서 주요부분을 차지하고 있다. 비만세포는 아나필락시와 알레르기 반응 중에 일어나는 다양한 생리적 변화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며⁵⁻¹⁰⁾ Ish-

izaka등¹¹⁾은 비만세포로부터 히스타민의 유리가 제I형 알레르기의 병리학적 진행과정에 있어서의 필수적인 단계임을 밝혔다. 한편 compound 48/80은 N-methyl-p-methoxyphenylethylamine과 formaldehyde의 축합에 의해 합성된 고분자물질의 복합체로서 비만세포 탈과립물질로 알려져 있다.¹²⁾ 고농도의 compound 48/80은 비만세포로부터 약 90%의 히스타민을 유리시키는 것으로 알려져 있으며 적당량의 compound 48/80은 아나필락시 반응의 기전을 연구하기 위해 히스타민 유리촉진제로서 가장 널리 사용되고 있다.¹⁴⁾

저자들은 선택이 담마진 등의 알레르기 피부질환의 치료에 이용되고 있는 점에 주목하여 그 약리작용의 특성을 규명하기 위해 대표적인 즉시형 알레르기 반응 시험법을 이용하여 그 억제작용을 검토하였다. 즉 선택의 물 추출물을 검체로 하여 compound 48/80 유발 아나필락시 및 흰쥐 복강 비만세포로부터 히스타민 방출에

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0652-290-1572 (팩스) 0652-290-1567

미치는 영향을 검토하였다.

실험방법

시약 및 기기

Compound 48/80, metrizamide, α -minimum essential medium(α -MEM) 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

선택(CAF)는 시중 한의원에서 구입하여 물 추출물을 실험에 사용하였다. 즉 선택을 증류수로 수욕상에서 5시간 2회 추출하여 감압하에서 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^등¹³⁾의 방법에 따라 실험하였다. 즉 비만세포의 탈과립제로 compound 48/80(8 $\mu\text{g/g}$, 체중)을 생쥐 복강내에 투여하기 60분전에 생리식염수로 조제한 CAF를 0.025, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 및 1.0(mg/g, 체중)의 용량으로 복강내에 주사하였다.

치사율은 아니필락시를 유발시킨 후 60분 동안 관찰하였다. 한편 compound 48/80 투여 60분전, 5분후 및 10분 후에 CAF(1 mg/g, 체중)를 복강내에 투여하고 compound 48/80을 복강내에 주사한 15분후에 심장에서 채혈하고 혈청을 분리하여 히스타민을 정량하였다.

시험관내 실험

흰쥐 복강 비만세포의 분리 - Kanemoto^등¹⁴⁾의 방법에 따라 흰쥐 복강 비만세포를 분리하였다. 이를 간략히 기술하면 흰쥐를 에테르로 마취시킨 후 실온에서 Tyrode buffer B 약 20 ml를 복강내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 마사지한 후 복벽 중앙선을 약간 절개

하여 복강내액을 pasteur pipette로 채취하여 150 \times g로 10분간씩 3회 반복 원심시킨 후 상층 부유액을 제거하고 1 ml의 Tyrode buffer B에 재부유시켰다. 이 세포 부유액중 비만세포는 22.5%(W/V) metrizamide를 이용하여 Yurt^등¹⁵⁾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 Tyrode buffer A로 조제한 CAF를 첨가하여 최종 농도를 각각 0.05, 0.1, 0.5 및 1.0 mg/ml로 하고 37°C 에서 10분간 배양시킨 후 compound 48/80(5 $\mu\text{g/ml}$)을 가하여 다시 10분동안 배양시킨 다음 400 \times g로 4°C 에서 5분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다.

히스타민의 정량

세포배양 상층액 및 혈청 중에 있는 히스타민은 Shore ^등¹⁶⁾의 방법에 따라 OPA로 히스타민을 형광유도체화시킨 후 $\lambda_{\text{ex}}=353$ nm, $\lambda_{\text{em}}=438$ nm에서 상대형광광도를 측정하여 정량하였다. 이를 간략히 기술하면 에펜돌프 튜브에 시료 500 μl 를 취하고 0.1 M-HCl 450 μl 와 60% 과염소산 용액 50 μl 를 혼합 후 원심 분리(400 \times g, 20 min)하고 그 상층액 800 μl 를 취해 5 M-NaOH 용액 500 μl , 증류수 3 ml, *n*-butanol 10 ml 및 NaCl 1.2 g을 혼합한 시험관에 넣고 진탕 후 원심분리(500 \times g, 10 min)하였다. butanol층 8 ml를 취하고 0.1 M-HCl 3 ml와 *n*-heptane 10 ml를 가하여 진탕 후 원심분리(500 \times g, 10 min)하였다. 여기에서 얻어진 수층 2 ml에 1 M-NaOH 용액 400 μl 와 1% OPA 용액 100 μl 를 가하고 37°C 수욕상에서 3분 동안 반응시킨 다음 3 M-HCl 용액 200 μl 를 가하여 혼합하고 2분 동안 방치한 후 $\lambda_{\text{ex}}=353$ nm, $\lambda_{\text{em}}=438$ nm에서 형광광도를 측정하였다.

히스타민 유리 억제율

히스타민 유리 억제율은 다음식에 의하여 구하였다.

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

A : CAF를 부가하지 않았을 때의 히스타민의 양

B : CAF를 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 아나필락시 반응에 미치는 CAF의 효과 - 즉시형 과민반응에 대한 CAF의 효과를 검토하기 위해 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시를 유도하였다. 치사율은 compound 48/80(8 μ g/g, 체중)을 생쥐에 주사한 후 1시간 동안 관찰하여 결정하였다($n=10$ /group). Table I에서와 같이 생리식염수 200 μ l를 투여한 대조군은 100%치사율을 나타내었다. 그러나 compound 48/80을 투여하기 1시간 전에 CAF를 제열 희석하여 복강내에 투여한 후 치

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

CAF treatment (mg/g, body weight)	Compound 48/80 (8 μ g/g, body weight)	Mortality (%)
None(Saline)	+	100
0.025	+	100
0.05	+	80
0.10	+	60
0.25	+	40
0.50	+	0
1.00	+	0
1.00	-	0

Groups of mice ($n=10$ /group) were intraperitoneally pretreated with 200 μ l saline or drugs. The drugs were given at various doses 60 min before the compound 48/80 injection. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to mice. Mortality (%) within 60 min following compound 48/80 injection was represented as No. of dead mice/total No. of experimental mice \times 100

Table II—Effect of time administered the CAF on compound 48/80 induced anaphylaxis

CAF treatment (mg/g, body weight)	Compound 48/80 (8 μ g/g, body weight)	Mortality(%)	
		5 min later	10 min later
None(Saline)	+	100	100
1.0	+	20	40
1.0	-	0	0

Groups of mice ($n=10$ /group) were intraperitoneally pretreated with 200 μ l of saline or drugs. The drugs were given 5 min or 10 min after the compound 48/80 injection. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to mice. Mortality(%) within 60 min following compound 48/80 injection was represented as No. of dead mice/total No. of experimental mice \times 100

사율을 관찰한 결과 0.025(mg/g, 체중) 농도로 투여하였을 때는 치사율이 100%이었으나 0.05, 0.10 및 0.25(mg/g, 체중) 농도로 투여하였을 때는 치사율이 각각 80%, 60% 및 40%였으며 0.50 및 1.0(mg/g, 체중)에서는 치사율이 0%이었다. 한편 compound 48/80을 투여하고 5분 및 10분 후에 CAF(1 mg/g, 체중)을 복강내에 투여한 결과 Table II에서와 같이 5분 후에 CAF를 투여한 군은 치사율이 20%, 10분후에 CAF를 투여한 군에서는 치사율이 40%이었다.

Compound 48/80에 의한 아나필락시 반응은 비만 세포로부터 히스타민, 부라디키닌 및 세로토닌과 같은 혈관작용성 물질의 유리에 의한 것이다.¹⁷⁾ 이 결과는 CAF가 비만세포에 작용하여 이와같은 물질의 유리를 억제함을 의미한다.

혈청중 히스타민 유리에 미치는 CAF의 효과 -

Compound 48/80을 투여하기 60분 전, 5분후 및 10분 후에 각각 CAF(1 mg/g, 체중)을 복강내에 투여하고 생쥐의 심장에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 히스타민 양을 측정하였다($n=7$ /group). Fig. 1에서와 같이 compound 48/80 투여 60분 전 투여군의 혈청중 히스타민 유리 억제율은 $67.7 \pm 7.2\%$, 5분 후 투여군은 62.6

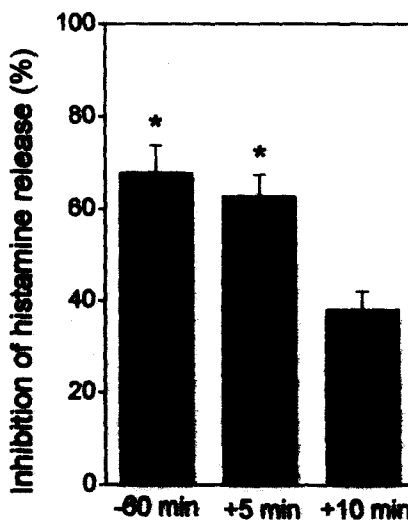


Fig. 1—Inhibitory effect of CAF on serum histamine release 15 min after compound 48/80 injection. Mice ($n=7$ /group) were intraperitoneally administered with 200 μ l of saline or CAF. Compound 48/80 solution (8 μ g/g, body weight) were intraperitoneally given to mice. Each bar shows the mean \pm S.E. Significantly different from the control (* $p < 0.05$).

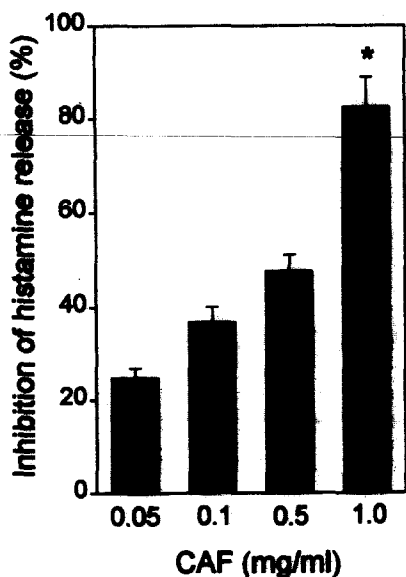


Fig. 2—Inhibitory effect of CAF on compound 48/80 induced histamine release from rat peritoneal mast cells. Rat peritoneal mast cells (2×10^5 cells/ml) were pretreated with saline or CAF for 10 min. Each bar shows the mean \pm S.E. (n = 3). Significantly different from the control (*p < 0.05).

$\pm 5.8\%$, 10분 후 투여군은 $37.8 \pm 4.1\%$ 로 억제율을 나타내었으며 그 중 60분 전 투여군이 가장 효과적이었다. 이러한 결과들은 CAF가 compound 48/80 투여에 의해 유도된 아나필락시 예방에 효과적임을 시사하고 있다.

시험관 내에서 compound 48/80에 의한 흰쥐 복강비만세포의 히스타민 유리에 미치는 CAF의 효과 - 비만세포에 compound 48/80을 처리하면 세포막이 파괴되면서 세포내에 함유되어 있는 각종 화학적 매개물질이 방출된다. 그러나 비만세포를 CAF로 전처리하고 compound 48/80을 처리하면 히스타민 유리가 일어나지 않는다. CAF가 복강비만세포에 미치는 영향을 검토하기 위하여 compound 48/80 처리 10분 전에 CAF를 처리한 결과 Fig. 2에서와 같이 CAF의 농도가 0.05 mg/ml일 때는 $24.7 \pm 3.9\%$, 0.1 mg/ml일 때는 $36.7 \pm 4.1\%$, 0.5 mg/ml일 때는 $47.4 \pm 5.4\%$, 1.0 mg/ml일 때는 $82.3 \pm 7.6\%$ 로 히스타민 유리를 억제시켰다.

결 론

CAF의 즉시형 알레르기 반응의 억제 효과 실험을 통

하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CAF는 compound 48/80에 의해 유도된 전신 아나필락시를 억제하였다.
2. CAF는 compound 48/80에 의한 흰쥐의 복강비만세포의 히스타민 유리를 억제하였다.
3. CAF는 compound 48/80에 의해 유도된 전신 아나필락시에서 혈청 중 히스타민의 유리를 억제하였다.

감사의 말씀

이 논문은 1998년도 우석대학교 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

문 헌

- 1) Chang, H. M. and But, P. P. H. : *Pharmacology and applications of chinese materia medica*. World scientific. 1229 (1987).
- 2) Hsieh, M. T., Peng, W. H., Yeh, F. T., Tsai, H. Y. and Chang, Y. S. : Studies on the anticonvulsive, sedative and hypothermic effects of *Periostracum cicadae* extracts. *J. Ethnopharmacol.* **35(1)**, 83 (1991).
- 3) Ma, S. P., Qu, R. and Hand, B. Q. : Immunologic inhibition and anti-allergic action of *Cryptotympana atrata* Fabricius. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chin*, **14(8)**, 490 (1989).
- 4) Tizard, I. R. : *Immunology an introduction*, 4th ed., Saunders college publishing 454 (1995).
- 5) Gomes, 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).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) Ishizaka, T., Chang, T. H., Taggart, M. and Ishizaka, K. : Histamine release from rat mast cells by antibodies against rat basophilic leukemia membrane. *J. Immunol.* **119**, 1589 (1977).
- 12) Aridor, M., Traub, L. M. and Saqi, E. R. : Exocytosis in mast cells by basic secretagogues : Evidence for direct activation of GIP-binding proteins. *J. Cell. Biol.* **111**, 909 (1990).
- 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) Yurt, R. W., Leid, R. W. and Austen, K. F. : Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.* **252**, 518 (1977).
- 16) 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).
- 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. Allergy Appl. Immunol.* **62**, 415 (1980).