

제 I 형 알레르기 반응이 유도된 생쥐에서 식물추출 복합물(PEM381)의 효과

김경범¹ · 박정수² · 정종문^{2*}

¹(주)벤스랩 중앙연구소

²수원대학교 생명과학과

Effects of Phyto-Extract Mixture (PEM381) in Type I Allergic Reaction-Induced Mice

Kyung-Bum Kim¹, Jeong-Su Park², and Jong-Moon Jeong^{2*}

¹Technology Research Center, Ben's Lab Co., Ltd., Hwasung 445-743, Korea

²Department of Life Science, The University of Suwon, Hwasung 445-743, Korea

Abstract

A previous study suggested that the phyto-extract mixture (PEM381) containing *Camellia sinensis* (leaf), *Psidium guajava* (leaf), and *Rosa hybrida* (flower) inhibited not only arachidonic acid cascade-related enzymes (5-lipoxygenase and cyclooxygenase) *in vitro* but also degranulation and histamine release from rat peritoneal mast cells. In this study, the same PEM381 was used to investigate its inhibitory effects on the syntheses of leukotrienes and prostaglandins as well as on serum concentration of histamine and eosinophils infiltration in type I allergic reaction-induced mice. The PEM381 could decrease concentrations of serum cysteinyl leukotrienes from mice activated by anti-DNP IgE and DNP-albumin. The concentration of serum histamine by oral administration of PEM381 (25, 50, and 100 mg/kg of body weight) in type I allergic reaction-induced mice was 395.93 ± 190.37 nM, 315.59 ± 164.23 nM, and 325.07 ± 112.02 nM, respectively, while that of positive control (promethazine hydrochloride 10 mg/kg of body weight) was 270.12 ± 24.02 nM. In addition, the PEM381 also showed inhibitory effect on the eosinophils infiltration in the nasal mucosa of mice which were sensitized with ovalbumin. However, the effect of PEM381 on the syntheses of prostaglandins seemed to be insignificant. Consequently, these results suggest that PEM381 may be useful for the prevention and treatment of type I allergy-related diseases.

Key words: PEM381, prostaglandins, leukotrienes, histamine, eosinophils

서 론

알레르기는 과학기술 발달로 가능해진 대량생산과 무분별한 자연개발로 인한 환경의 오염과 파괴에 따라 날이 갈수록 심해져 가고 있는 현대의 여러 문명병 중 하나이다. 우리나라에서는 전체 인구의 약 20% 정도가 알레르기 질환을 가지고 있으며 예전에 비해 꾸준히 증가하고 있는 실정이다. 알레르기 질환 중 알레르기성 비염, 아토피성 피부염 및 기관지 천식은 제 I 형 알레르기 반응(type I allergic reaction)에 속한다. 제 I 형 알레르기 반응은 피부, 호흡기, 림프관 주위, 혈관 주위, 위장관의 점막, 뇌 등 생체내 결합조직에 널리 분포되어 있는 비만세포(mast cell)가 병태생리학적으로 중요한 역할을 하며 크게 다음과 같은 3단계로 나뉘어 제 I 형 알레르기 반응이 일어난다(1-6). 제1단계는 면역글로블린 E(immunoglobulin E, IgE)의 생성과 감각의 단계이다. 항원이 인체를 자극하여 항체인 IgE를 생성, 분비시키고,

분비된 IgE는 비만세포 표면에 있는 IgE 수용체(FcεRI)에 결합하여 감각이 일어난다. 제2단계는 비만세포의 탈과립과 여러 알레르기 유발물질들의 분비단계이다. 항원이 인체에 재침투하여 비만세포 표면의 IgE에 결합하면서 비만세포가 활성화되는 것이다. 활성화된 비만세포는 탈과립이 유도되고 히스타민 같은 세포내 과립물질과 프로스타글란딘류(prostaglandins)와 류코트리엔류(leukotrienes) 같은 지질 매개물질 그리고 사이토카인류(cytokines) 등 여러 가지 화학적 매개물질이 생성되어 세포밖으로 분비된다. 제3단계에서는 이러한 여러 화학적 알레르기 매개물질로 인해 말초혈관의 투과성 항진과 확장작용, 점막표면에 대한 점액질 분비 항진작용, 기관지 평활근의 수축작용 등이 발생하여 제 I 형 알레르기 증상들이 나타난다(7-11).

비만세포 활성화로 분비되는 지질 매개물질 중 프로스타글란딘류와 류코트리엔류는 아라키돈산(arachidonic acid)으로부터 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase, COX)와 리

*Corresponding author. E-mail: jmjeong@suwon.ac.kr
Phone: 82-31-222-6514, Fax: 82-31-222-6552

폭시게나제(lipoxygenase, LO)에 의해서 각각 합성된다(12-18). 또한 호산구를 비롯한 염증세포의 조직 내 침윤은 제 I 형 알레르기 반응이 잠복기를 거친 후기 반응에 발생하는 현상으로 만성적인 코막힘이나 비특이적 점막과민성을 일으킨다(19). 따라서 프로스타글란딘류와 류코트리엔류의 합성, 히스타민 방출 그리고 호산구의 비강내 침윤에 대하여 억제 활성을 갖는 물질들은 제 I 형 알레르기 예방 및 치료제로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

PEM381은 녹차(*Camellia sinensis*)잎 추출물, 구아바(*Psidium guajava*)잎 추출물 그리고 장미(*Rosa hybrida*)꽃잎 추출물로 이루어진 식물추출 복합물이다. 최근 본 저자들은 PEM381에 대하여 제 I 형 알레르기 반응 억제 효능 및 생화학적 기전을 밝히기 위하여 시험관내 실험에서 COX와 LO 억제 활성 그리고 복강 비만세포로부터 compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립과 히스타민 방출에 미치는 영향을 측정하여 그 결과를 이미 보고한 바 있다(20).

본 연구에서는 이전에 보고된 연구 결과들을 바탕으로 실험동물상에서 PEM381이 제 I 형 알레르기 반응에 미치는 영향을 알아보고자 제 I 형 알레르기 반응을 유발시킨 생쥐를 모델로 류코트리엔류, 프로스타글란딘류 그리고 히스타민 방출 및 호산구의 비강내 침윤에 미치는 영향을 측정하였기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 기기

Compound 48/80, anti-dinitrophenyl(DNP) IgE, DNP-albumin, DNP-ovalbumin, Congo red, hematoxylin, ovalbumin, aluminum hydroxide gel, pertussis toxin 그리고 promethazine hydrochloride는 Sigma사(USA)에서 구입하였다. Prostaglandins screening EIA kit(catalog No. 514012), histamine EIA kit(catalog No. A05890)는 Cayman사(USA)에서, cysteinyl leukotrienes EIA kit(catalog No. 900-070)는 Assay Designs사(USA)에서 구입하였다. 구아바잎, 녹차잎 그리고 장미꽃잎은 (주)진용내추럴(수원시 팔달구)에서 구입하였다. ELISA autoreader는 VERSA Max(Molecular Devices사, USA) 모델, 광학현미경은 BH2(Olympus사, Japan) 모델, 마이크로톰(microtome)은 94004(Pikaseiko사, Japan) 모델을 사용하였다. 그 이외의 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다.

실험동물과 관리

ICR계 생쥐(수컷, 7주령)는 (주)오리엔트 바이오(경기도 가평)에서 구입하여 본 실험실의 사육실에서 1주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 사육실 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $55 \pm 5\%$ 및 명암은 12시간 주기로 자동 조절하였다.

식물재료 추출 및 PEM381 제조

본 실험에 사용된 식물재료 및 PEM381은 이미 연구 보고

된 PEM381과 동일한 원료이며 추출 및 제조 방법은 다음과 같다(20). 구아바잎(중국산), 녹차잎(중국산) 그리고 장미꽃잎(파키스탄산) 각각의 소재를 세척하고 마쇄하여 건조한 뒤 각각 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 먼저 구아바잎 추출분말은 건조 중량 1,000 g에 약 10배에 달하는 50% 에탄올을 첨가하여 60°C 에서 2시간 동안 추출하여 감압농축한 뒤 동결 건조시켜 160 g의 추출분말을 얻어 약 16%의 회수율을 나타내었다. 녹차잎 추출분말은 건조 중량 1,000 g에 약 10배에 달하는 물을 첨가한 다음 80°C 에서 4시간 동안 열수 추출하여 식힌 후 4°C 에서 $200 \times g$ 로 10분 동안 원심 분리하여 상등액을 감압농축한 뒤 동결 건조시켜 310 g을 얻어 약 31%의 회수율을 나타내었다. 장미꽃잎 추출분말은 건조 중량 1,000 g에 약 10배에 달하는 물을 첨가한 다음 100°C 에서 2시간 동안 열수 추출하여 식힌 후 4°C 에서 $200 \times g$ 로 10분간 원심 분리하여 상등액을 감압농축한 뒤 동결 건조시켜 410 g을 얻어 약 41%의 회수율을 나타내었다. 위의 방법으로 얻어진 구아바잎 추출분말, 녹차잎 추출분말 그리고 장미꽃잎 추출분말 각각을 혼합하여 식물추출 복합물(PEM381)을 제조하였다.

혈청내 류코트리엔류와 프로스타글란딘류 농도 측정

혈청내 류코트리엔류와 프로스타글란딘류의 농도 측정은 다음과 같은 방법으로 실험하였다. 생쥐 양쪽 귀에 anti-DNP IgE($1.2 \mu\text{g}/\text{mL}$) $10 \mu\text{L}$ 씩 주사하고 47시간 경과 후, 샘플(PEM381 5, 15 그리고 $50 \text{ mg}/\text{kg}$ of body weight)을 경구 투여하였다. 한 시간 뒤(즉, anti-DNP IgE 주사 48시간 경과 후) DNP-albumin(0.2 mg)을 꼬리정맥에 주사하여 제 I 형 알레르기 반응을 유발시켰다. 30분 후 혈액을 심장에서 채혈하여 실온에서 20분간 방치한 후 $4,000 \text{ rpm}$ 에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청에서 단백질을 제거하기 위하여 4배 부피의 에탄올을 첨가하고 4°C 에서 5분 동안 방치 후 $6,000 \text{ rpm}$ 에서 10분 동안 원심 분리하여 상등액을 진공회전 농축기를 이용하여 건조시켰다. 건조된 혈청 샘플에서 cysteinyl leukotriene EIA kit와 prostaglandins screening EIA kit를 이용하여 각각 류코트리엔류와 프로스타글란딘류의 농도를 측정하였다. 이때 사용한 방법은 이들 kit의 제조사가 제공한 실험방법에 따라 실시하였다. 또한 양성대조군으로 프로메타진 하이드로클로라이드(promethazine hydrochloride, Phenergan[®]: H1 histamine receptor antagonist, $10 \text{ mg}/\text{kg}$ of body weight)를 경구 투여하였다.

혈청내 히스타민 농도 측정

PEM381이 히스타민 방출에 미치는 영향을 측정하기 위하여 Kobayashi 등의 방법을 이용하여 실험하였다(21). 먼저, 생쥐에 샘플(PEM381 25, 50 그리고 $100 \text{ mg}/\text{kg}$ of body weight)을 경구투여하고 1시간 후 compound 48/80($1.2 \text{ mg}/\text{kg}$ of body weight)을 복강 주사하여 비만세포내 과립

물질이 분비되도록 유발시켰다. 30분 후 혈액을 심장에서 채혈하여 실온에서 20분간 방치한 후 4,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청 샘플에서 hitamine EIA kit를 이용하여 히스타민 농도를 측정하였다. 히스타민 방출 억제율(%)은 $[1 - (\text{제 I 형 알레르기 반응이 유발된 실험군의 히스타민 농도} - \text{정상군의 히스타민 농도}) / (\text{제 I 형 알레르기 반응이 유발된 대조군의 히스타민 농도} - \text{정상군의 히스타민 농도})] \times 100$ 식으로부터 구하였다. 또한 양성대조군으로는 프로메타진 하이드로클로라이드(10 mg/kg of body weight)를 경구 투여하였다.

호산구수 측정

PEM381이 호산구의 비강내 침윤에 미치는 영향을 측정하기 위해 Kayasuga 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 실험하였다(22). 먼저, 수컷 생쥐 코에 anti-DNP IgE(1.2 µg/mL) 10 µL 주사하고 47시간 경과 후, 샘플(PEM381 5, 15 그리고 100 mg/kg of body weight)을 경구 투여하였다. 한 시간 뒤(즉, anti-DNP IgE 주사 48시간 경과 후) DNP-ovalbumin(0.2 mg)을 꼬리정맥에 주사하였다. 5일 후(본 동물실험개시 7일째) ovalbumin(100 µg), aluminum hydroxide gel(1 mg) 그리고 pertussis toxin(300 ng)을 복강 주사하였다. 14일 후(본 동물실험개시 21일째) 7일 동안 매일 샘플(PEM381 5, 15 그리고 100 mg/kg of body weight)을 경구 투여하고 생쥐의 양쪽 비공 안으로 각각 ovalbumin 50 µg을 용해한 생리식염수 10 µL를 떨어뜨렸다. 연구일 28일째에 생쥐를 경추 탈골시켜 비강이 있는 부위(즉, 코끝부터 눈 바로 밑까지)를 자른 후 다음과 같은 방법으로 포매과정을 거쳐 호산구의 수를 측정하였다. 먼저 포매과정에 방해가 되지 않도록 면도하여 털을 제거하고 10% 포르말린 용액에 24시간 동안 고정시켰다. 고정액을 증류수로 완전히 세척하고 10% 질산액으로 15시간 동안 탈회시킨 뒤 증류수로 12시간 세척하여 조직 내 탈회액을 제거하고 파라핀으로 조직을 포매한 후 마이크로톰을 이용하여 7 µm 두께로 박절하였다. 박절된 조직에서 크실렌(xylene)으로 파라핀을 제거한 후 수화(hydration)과정을 거쳐 0.5% 콩고 레드(Congo red, in 50% 에탄올)와 Gill's hematoxylin 염색법을 이용하여 염색하였다. 호산구의 수는 비중격(nasal septum)을 제외한 비강 좌우 측면의 상피층에 침윤되어 있는 모든 호산구의 수를 광학현미경($\times 400$)으로 관찰하여 박절된 조직의 개수로 나눈 평균값으로 나타내었다.

통계분석

모든 데이터는 SPSS (10 version) 프로그램을 이용하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 그룹간의 유의적인 통계차를 분석하기 위하여 $p < 0.05$ 의 유의수준으로 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)을 이용하여 사후검증을 하였다.

결과 및 고찰

혈청내 류코트리엔류 농도에 미치는 영향

류코트리엔류는 아라키돈산으로부터 5-LO에 의해 합성되는 3개의 공액이중 결합을 지닌 지방산 유도체들이다. 5-LO는 아라키돈산을 중간체인 5-hydroperoxyicosatetraenoic acid(5-HPETE)를 거쳐 류코트리엔A₄(LTA₄)로 전환시킨다. LTA₄는 LTA₄ hydrolase에 의해서 LTB₄로 또는 LTC₄ synthase에 의해서 LTC₄로 전환된다. 전환된 LTC₄는 γ -glutamyl transferase에 의해서 LTD₄로, LTD₄는 peptidase에 의해서 최종적으로 LTE₄로 전환된다(Fig. 1). LTC₄, LTD₄ 그리고 LTE₄는 측쇄(side chain)에 공통적으로 시스테인을 가지고 있기 때문에 시스테인 류코트리엔(cysteinyl leukotriene)이라고 불린다. 이들 시스테인 류코트리엔은 점액분비의 증가, 혈관투과성 증가, 비강내 점액의 혈류 증가 등 제 I 형 알레르기 반응에 강력한 매개체로서 작용한다(23,24). 따라서 실험동물을 대상으로 PEM381이 5-LO 억제 작용으로 인하여 혈청내 시스테인 류코트리엔 농도에 미치는 영향을 측정한 결과 제 I 형 알레르기 반응이 유발되지 않은 정상군과 제 I 형 알레르기 반응이 유발된 대조군의 혈청내 시스테인 류코트리엔 농도가 각각 3.18 ± 0.21 ng/mL과 8.14 ± 1.60 ng/mL로 나타나 대조군이 정상군보다 약 2.6배 높은 혈청내 시스테인 류코트리엔 농도를 나타내었다($p < 0.05$). 실험동물과 사람 그리고 혈청과 뇨간에 시스테인 류코트리엔 농도의 차이는 있지만 Guzik 등에 의하면 알레르기를 지니고 있는 사람의 뇨는 건강한 사람의 뇨보다 약 1.9배 높은 뇨내 시스테인 류코트리엔 농도를 나타내어 본 실험 결과와 비슷한 양상을 나타냈다(25). PEM381(5, 15 그리고 50 mg/kg of body weight)을 미리 경구투여하고 제 I 형 알레르기 반응이 유발된 샘플군의 경우 혈청내 시스테인 류코트리엔 농도가 각각 6.92 ± 1.15 ng/mL, 5.03 ± 0.96 ng/mL 그리고 4.69 ± 1.04 ng/mL로 나타나 PEM381이 혈청내 시스테인 류코트리엔 농도를 감소시키는 것으로 나타났다. 반면에 PEM381 15 mg/kg(체중)과 PEM381 50 mg/kg(체중)간의 실험군에서는 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그런데 양성대조군으로 사용된 프로메타진 하이드로클로라이드 10 mg/kg(체중) 경구투여시 혈청내 시스테인 류코트리엔 농도는 4.65 ± 0.87 ng/mL로 나타나 PEM381 15 mg/kg(체중)과 PEM381 50 mg/kg(체중) 경구투여한 군과 비슷한 혈청내 시스테인 류코트리엔 농도를 나타내었다(Fig. 2). 따라서 실험동물상에서 PEM381이 5-LO 활성억제 작용으로 인하여 시스테인 류코트리엔 생합성을 효율적으로 억제하는 것으로 나타났다.

혈청내 프로스타글란딘류 농도에 미치는 영향

COX는 세포의 인지질에 포스포라이페아제(phospholipase) A₂가 작용하여 생성된 아라키돈산으로부터 프로스타

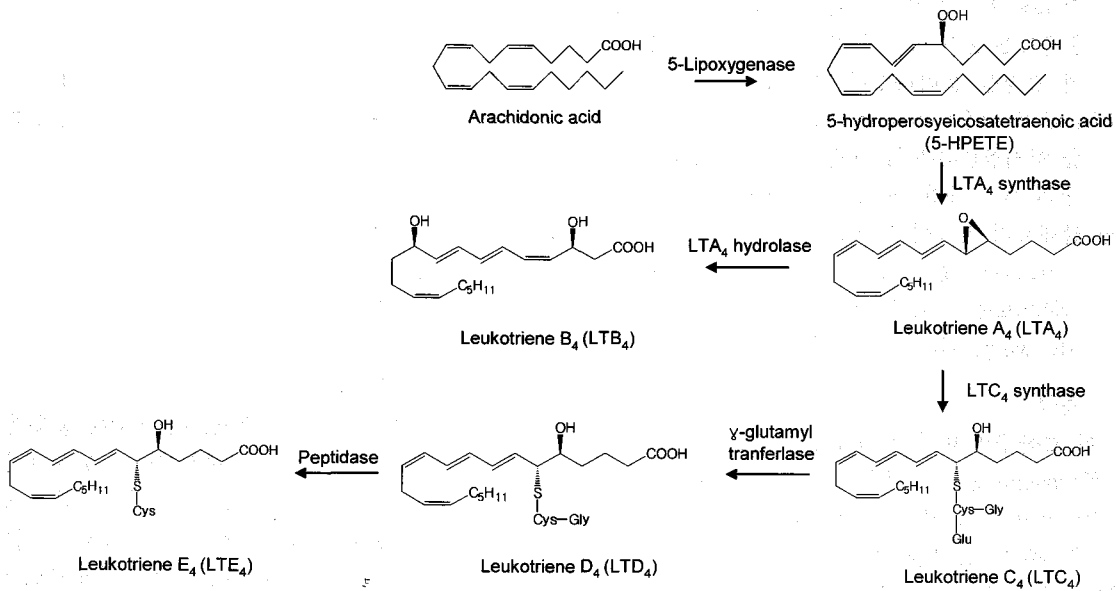


Fig. 1. The formation of leukotrienes by the 5-lipoxygenase pathway.

Lipoxygenase type 5 converts arachidonic acid into leukotriene (LT)A₄ with 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE) as an intermediate. The unstable intermediate LTA₄ is further converted into LTB₄ by LTA₄ hydrolase or into LTC₄ by LTC₄ synthase. LTC₄ is then metabolized to LTD₄ and LTE₄. LTC₄, LTD₄ and LTE₄ are collectively designated cysteinyl leukotrienes (cys LTs) due to common presence of cysteine in the side-chain (23).

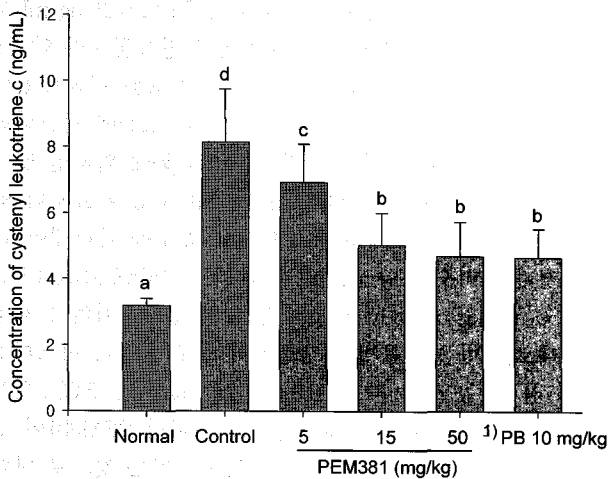


Fig. 2. Inhibitory effect of PEM381 on the concentration of serum cysteinyl leukotrienes in type I allergic reaction-induced mice.

Mice were sensitized with intradermal injection of anti-DNP IgE (1.2 µg/mL) 10 µL into the ear. After 48 hr, the mice were challenged with intravenous injection of DNP-albumin (0.2 mg) into the tail vein. Samples were orally administered 1 hr before the challenge. Thirty min after the challenge, the mice were anesthetized and the blood was harvested via cardiac puncture. The serum was isolated by centrifugation (at 4,000 rpm for 10 min). The concentration of serum cysteinyl leukotrienes was measured by cysteinyl leukotrienes EIA kit. Results are represented as mean ± SD of three independent experiments (n=10 for each group). Bars with different letters are significantly different at (p<0.05) by Duncan's multiple range test. ¹PB: promethazine hydrochloride (Phenergan®, H1 histamine receptor antagonist).

글란딘류와 트롬복산류(thromboxanes)를 형성하는 과정을 촉매한다(26). COX는 COX-1과 COX-2 두 가지 형태의 이

성체로 존재하는데 COX-1은 위, 신장을 비롯한 여러 조직에서 발현되며 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장 기능의 유지 등 정상적 생체기능에 작용하고, COX-2는 염증성 자극에 의해 단기간에 유도, 발현되는 현상을 나타낸다(27-31). 실험동물을 대상으로 PEM381에 의한 혈청내 프로스타글란딘류 농도에 미치는 영향을 1회 측정된 결과 6 그룹 사이에 통계학적으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3). 이후 정상군과 대조군 그리고 양성대조군 사이에 혈청내 프로스타글란딘류 농도를 2회 더 측정된 결과 역시 통계학적으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 프로스타글란딘류와 류코트리엔류는 초기 알레르기 반응(항원에 노출된지 수분~30분 이내 발생하는 반응)에 중요한 지질 매개체로서 관여한다. 그러나 류코트리엔류는 초기 알레르기 반응이 끝나고 잠복기를 거친 후기 알레르기 반응(항원에 노출된지 2~4시간 뒤에 일어나는 반응)에서도 여전히 지질 매개체로 관여하지만 프로스타글란딘류는 관여하지 않는 것으로 알려져 있다(32). 본 실험에서는 항체(anti-DNP IgE)를 주사하고 48시간 경과 후 항원(DNP-albumine)을 투여하여 알레르기 반응을 유발시켰다. 그리고 30분 뒤 심장에서 혈액을 채혈하였다. 이 과정에서 아마도 실험동물은 항원(DNP-albumine) 투여 후 수분 내에 초기 반응이 끝나고 잠복기에 들어간 시점으로 의심된다. 그 결과 혈청내 프로스타글란딘류의 농도가 정상쥐와 대조군 사이에 유의적인 차이를 나타내지 않은 것으로 여겨진다. 따라서, 과연 프로스타글란딘류가 본 알레르기 반응 초기에 생성되고 이것의 합성이 PEM381에 의해 효율적으로 억제되는지를 보려면 항원 투여 후 30분 이내에서 시간간격을 달리하여 혈청내 프로스

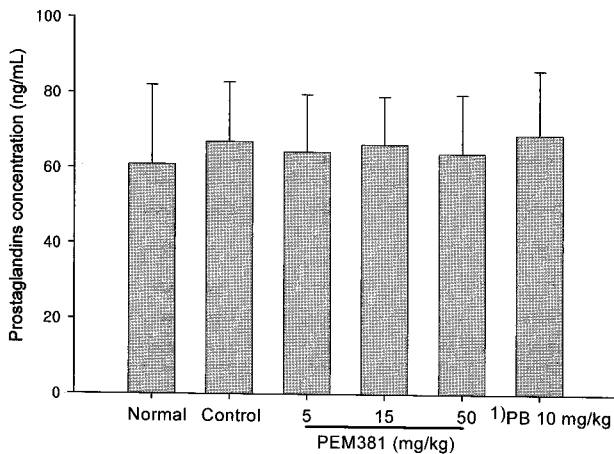


Fig. 3. Effect of PEM381 on the concentration of serum prostaglandins in type I allergic reaction-induced mice. The concentration of serum prostaglandins was measured by prostaglandins screening EIA kit. Results were represented as mean \pm SD (n=10 for each group). ¹PB: promethazine hydrochloride (Phenergan[®], H1 histamine receptor antagonist). There is no significant difference among the 6 groups by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

타글란딘류 농도를 측정해야 될 것이다.

혈청내 히스타민 농도에 미치는 영향

이미 보고된 실험결과에 의하면 PEM381(최종농도: 0.01, 0.1 그리고 1 mg/kg)을 비만세포 배양액에 전처리하고 compound 48/80(0.25 μ g)을 투입할 경우 비만세포로부터 히스타민의 방출율이 각각 24.8 ± 2.2 , 20.8 ± 1.8 그리고 $12.1 \pm 5.2\%$ 로 나타나 PEM381의 세포 배양액내 농도가 높을수록 히스타민 방출을 억제하는 것으로 나타났다(20). 이 결과를 토대로 실험동물을 대상으로 실험한 결과 compound 48/80을 처리하지 않은 정상쥐의 경우 혈청내 히스타민 농도는 138.70 ± 1.04 nM, compound 48/80 처리로 인하여 비만세포가 탈과립된 대조군의 혈청내 히스타민 농도는 438.93 ± 96.37 nM로 나타나 대조군이 정상군보다 약 3배 높은 혈청내 히스타민 농도를 나타냈다. 실험방법으로 인용한 Kobayashi 등의 문헌에 의하면 대조군이 정상군보다 약 21배 높은 혈청내 히스타민 농도를 나타내어 본 실험결과와는 많은 차이를 나타냈으나 Park과 Choi의 문헌에서는 대조군이 정상군보다 약 2.0 배~2.5배 높은 혈청내 히스타민 농도를 나타내어 본 실험결과와 비슷한 차이를 나타냈다(21,33). PEM381(25, 50 그리고 100 mg/kg)을 미리 경구투여하고 compound 48/80 처리된 샘플군의 혈청내 히스타민의 농도는 각각 395.93 ± 190.37 nM, 315.58 ± 164.23 nM, 그리고 325.07 ± 112.02 nM로 나타났다. 그중 PEM381(50 mg/kg과 100 mg/kg)을 경구투여한 샘플군은 심한 표준편차로 인하여 대조군과 비교시 통계학적으로 유의적인 차이를 보이지 않았으나 혈청내 히스타민 방출을 억제하는 경향을 나타내었다(Table 1). Compound 48/80은 n-methyl- ρ -methoxyphenyl-ethylamine과 formaldehyde의 축합반응에 의해 합성된 고분자물질의 복

Table 1. Effect of PEM381 on the compound 48/80-induced histamine release in mice

Group (n=10/group)	Dose (mg/kg of body weight)	Histamine concentration ¹⁾ (nM)
Normal	-	138.70 ± 31.04^a
Control	-	438.93 ± 96.37^b
PEM381	25	395.93 ± 190.37^b
	50	315.58 ± 164.23^{ab}
	100	325.07 ± 112.02^{ab}
Promethazine hydrochloride ²⁾	10	270.12 ± 24.02^{ab}

Mice were orally administered of samples 60 min before intraperitoneal injection of compound 48/80 (1.2 mg/kg of body weight). After 30 min, the mice were anesthetized and then blood was harvested via cardiac puncture. The blood was centrifuged for 10 min at 4,000 rpm to get serum. The concentration of serum histamine was measured by histamine EIA kit. ¹Each histamine concentration is represented as mean \pm SD (n=10 for each group) of three independent experiments. ²PB: promethazine hydrochloride (Phenergan[®], H1 histamine receptor antagonist). Means with different superscript in the same column are significantly different at ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

합체로서 비만세포 내의 칼슘 농도를 증가시켜 세포막의 투과성을 증가시킨다. 그 결과 비만세포가 탈과립되면서 비만세포내에 저장되어 있던 히스타민이 방출된다(34,35). 방출된 히스타민은 혈관확장과 평활근 수축작용을 일으켜 제 I 형 알레르기 반응이 일어난다. 따라서 PEM381이 compound 48/80에 의한 비만세포 탈과립을 억제하는 구체적인 생화학적 기전에 대해서는 좀 더 연구가 필요할 것으로 사료된다. Li 등의 문헌에 의하면 PEM381의 식물재료 중 녹차의 대표적인 활성물질인 EGCG(epigallocatechin gallate)가 compound 48/80에 의한 비만세포의 칼슘유입을 감소시켜 비만세포 탈과립을 억제하는 것으로 나타나 PEM381도 유사한 생화학적 기전으로 비만세포 탈과립을 억제시킬 것으로 보이나 자세한 실험적 확인이 필요하다고 본다(36).

호산구수에 미치는 영향

호산구를 비롯한 염증세포의 조직 내 침윤은 제 I 형 알레르기 반응이 4~11시간의 잠복기를 거친 후기 반응에 발생되는 현상으로 만성적인 코막힘이나 비특이적 점막과민성을 일으킨다. 콩고 레드와 Gill's hematoxylin 염색법으로 염색된 호산구를 광학현미경으로 관찰한 결과 Fig. 4의 화살표로 나타난 것처럼 2엽성핵(bilobed nucleus)은 헤마토실린에 의해 파란색으로 염색되고 세포질 내에 있는 아미로이드는 콩고 레드에 의해 빨간색으로 염색되었다. 제 I 형 알레르기 반응이 유발된 대조군의 호산구수는 28.9 ± 6.2 개, PEM381(5, 15 그리고 100 mg/kg) 경구 투여와 동시에 제 I 형 알레르기 반응을 일으킨 샘플군의 호산구수는 각각 22.8 ± 9.4 , 20.0 ± 9.4 그리고 16.4 ± 2.8 개로 관찰되어 PEM381의 농도가 높을수록 호산구의 비강내 침윤을 효율적으로 감소시키는

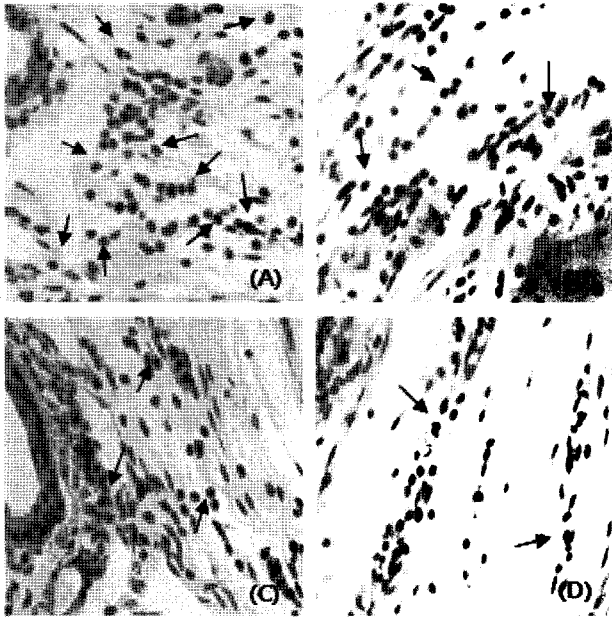


Fig. 4. Light microphotographs of eosinophils infiltration in the nasal mucosa of mice which were sensitized with ovalbumin ($\times 400$).

Eosinophils (arrows) infiltrated to the nasal mucosa of mice were stained with 0.5% Congo red in 50% ethyl alcohol and Gill's hematoxylin. Slide (A) indicates the eosinophils from the ovalbumin-sensitized mice, whereas the other slides [(B): PEM381 5 mg/kg of body weight, (C): PEM381 15 mg/kg of body weight, (D): PEM381 100 mg/kg of body weight] show the decreased number of infiltrated eosinophils.

것으로 나타났다(Fig. 5).

결론적으로 본 연구에서는 이전에 보고된 연구 결과들을 바탕으로 실험동물상에서 PEM381이 제 I 형 알레르기 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 제 I 형 알레르기 반응을 유발시킨 생쥐를 모델로 류코트리엔류, 프로스타글란딘류 그리고 히스타민 방출 및 호산구의 비강내 침윤에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 PEM381은 류코트리엔류의 생합성을 억제할 뿐만 아니라 호산구의 비강내 침윤도 억제하는 것으로 나타났다. 그리고 비록 통계학적으로 유의적인 차이는 없었으나 PEM381은 히스타민 방출을 억제하는 것으로 나타났다. 그러나 PEM381에 의한 프로스타글란딘류의 생합성에 미치는 영향은 신뢰할만한 결과를 얻어내지 못했다.

알레르기 질환의 치료방법으로 약물요법, 회피요법 그리고 면역요법 등이 이루어지고 있으나 알레르기 유발물질의 다양성, 여러 가지 부작용, 치료의 효율성 그리고 고가의 치료비 등으로 인하여 치료가 제한되어 있다. 이에 효율적이고 부작용이 없는 천연식물자원에 대한 개발이 요구되고 있는 실정으로 볼 때 PEM381이 건강기능성 식품으로서 유용하리라 생각된다. 이를 위해 제 I 형 알레르기 질환을 지니고 있는 환자를 대상으로 PEM381의 임상학적인 효능 연구가 진행되어야 한다고 본다.

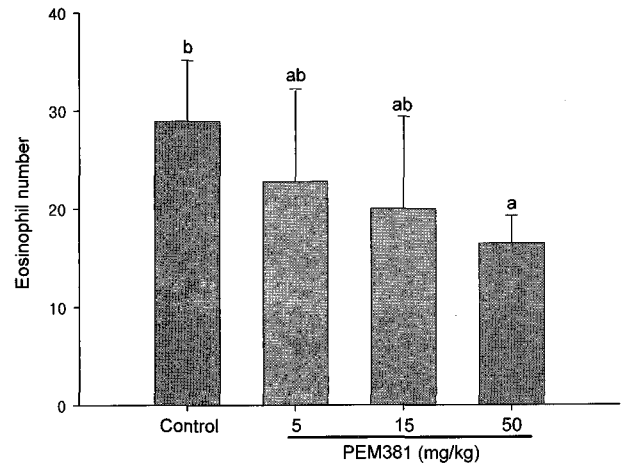


Fig. 5. Inhibitory effect of PEM381 on eosinophils infiltration in the nasal mucosa of mice which were sensitized with ovalbumin.

Mice were intradermally injected with anti-DNP IgE (1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 10 μL into the nose. After 47 hr, samples were orally administered to the mice. After another 1 hr, DNP-ovalbumin (0.2 mg) was injected into the tail vein of mice. After 5 days, the mice were given an intraperitoneal injection of ovalbumin (100 μg), aluminum hydroxide gel (1 mg), and pertussis toxin (300 ng). During next 14 days, the oral administration of samples were daily performed and then the ovalbumin (50 μg in 10 μL) was daily dropped into bilateral nasal cavities for 1 week. After another 7 days, the mice were sacrificed, then their heads were removed. They were fixed using 10% formalin solution and embedded in paraffin. The paraffin-embedded nasal cavity was sectioned using a microtome to get 7 μm thick-specimens. The paraffin was removed from the specimens and then stained with 0.5% Congo red and Gill's hematoxylin for specific identification of eosinophils. All eosinophils that had been infiltrated to the nasal mucosa of mice were counted under a light microscope and divided by specimen number. Results are represented as mean \pm SD of three independent experiments ($n=10$ for each group). Bars with different letters are significantly different at ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

요 약

본 연구에서는 녹차(*Camellia sinensis*) 잎 추출물, 구아바(*Psidium guajava*) 잎 추출물 그리고 장미(*Rosa hybrida*) 꽃 잎 추출물로 이루어진 식물추출 복합물(PEM381)이 실험동물상에서 제 I 형 알레르기 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 제 I 형 알레르기 반응을 유발시킨 생쥐를 모델로 류코트리엔류, 프로스타글란딘류 그리고 히스타민 농도 및 호산구의 비강내 침윤 정도를 측정하였다. 그 결과 PEM381은 류코트리엔류의 생합성을 억제할 뿐만 아니라 호산구의 비강내 침윤도 억제하는 것으로 나타났다. 그리고 비록 통계학적으로 유의적인 차이는 없었으나 PEM381은 히스타민 방출을 억제하는 것으로 나타났다. 그러나 PEM381에 의한 프로스타글란딘류의 생합성에 미치는 영향은 신뢰할만한 결과를 얻어내지 못했다. 이상의 결과로 미루어 PEM381은 알레르기성 비염, 아토피 피부염 및 기관지 천식 같은 제 I 형 알레르기 질환에 대하여 예방 및 개선에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업(A06-00042 717)지원으로 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

문헌

- Gomes JC, Di Stasi LC, Sgarbosa F, Barata LE. 1994. Pharmacological evaluation of the inhibitory effect of extracts from *Anchieta salutaris* on the histamine release induced in the rat and the guinea pig. *Int Arch Allergy Immunol* 103: 188-193.
- Ando A, Martin TR, Galli SJ. 1993. Effects of chronic treatment with the c-kit ligand, stem cell factor, on immunoglobulin E-dependent anaphylaxis in mice. Genetically mast cell-deficient Sl/Sld mice acquire anaphylactic responsiveness, but the congenic normal mice do not exhibit augmented responses. *J Clin Invest* 92: 1639-1649.
- Lee YM, Kim DK, Kim SH, Shin TY, Kim HM. 1996. Antianaphylactic activity of *Poncirus trifoliata* fruit extract. *J Ethnopharmacol* 54: 77-84.
- Martin TR, Ando A, Takeishi T, Katona IM, Drazen JM, Galli SJ. 1993. Mast cells contribute to the changes in heart rate, but not hypotension or death, associated with active anaphylaxis in mice. *J Immunol* 151: 367-376.
- Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet JP. 1993. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell* 75: 969-976.
- Kim HM, Hirota S, Chung HT, Ohno S, Osada S, Shin T, Ko KI, Kim JB, Kitamura Y, Nomura S. 1994. Differential expression of protein kinase C genes in cultured mast cells derived from normal and mast cell-deficient mice and mast cell lines. *Int Arch Allergy Immunol* 105: 258-263.
- Ennis M, Pearce FL, Weston PM. 1980. Some studies on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine. *Br J Pharmacol* 70: 329-334.
- Metcalfe DD, Kaliner M, Donlon MA. 1981. The mast cell. *Crit Rev Immunol* 3: 23-74.
- Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. 1997. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest* 99: 901-914.
- Church MK, Levi-Schaffer F. 1997. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol* 99: 155-160.
- Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. 1993. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 268: 9049-9054.
- Otto JC, Smith WL. 1994. The orientation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 269: 19868-19875.
- Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL. 1995. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 270: 10902-10908.
- Yokoyama C, Takai T, Tanabe T. 1988. Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett* 231: 347-351.
- Kemal C, Louis-Flamberg P, Krupinski-Olsen R, Shorter AL. 1987. Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: a possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity. *Biochemistry* 26: 7064-7072.
- Nakatsuka M, Osawa Y. 1983. Selective inhibition of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism by L-arginine or sodium nitroprusside in intact human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1630-1640.
- Neichi T, Koshihara Y, Murota S. 1983. Inhibitory effect of esculetin on 5-lipoxygenase and leukotriene biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 753: 130-132.
- Sekiya K, Okuda H, Arichi S. 1982. Selective inhibition of platelet lipoxygenase by esculetin. *Biochim Biophys Acta* 713: 68-72.
- Naclerio RM. 1988. The pathophysiology of allergic rhinitis: impact of therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 82: 927-934.
- Kim KB, Lee EG, Chai OH, Song CH, Jeong JM. 2007. Inhibitory effects of phyto-extract mixture (PEM381) on type I allergic reaction. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 155-162.
- Kobayashi T, Ohta Y, Yoshino J. 2001. Preventive effect of ebselen on acute gastric mucosal lesion development in rats treated with compound 48/80. *Eur J Pharmacol* 2: 271-279.
- Kayasuga R, Iba Y, Hossen MA, Watanabe T, Kamei C. 2003. The role of chemical mediators in eosinophil infiltration in allergic rhinitis in mice. *Int Immunopharmacol* 3: 469-473.
- Funk CD. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875.
- Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237: 1171-1176.
- Guzik TJ, Czerniawska-Mysik G, Korpanty G, Mastalerz L, Radwan J, Szczeklik A. 2002. Urinary leukotriene levels are increased during exacerbation of atopic eczema/dermatitis syndrome. Relation to clinical status. *Allergy* 57: 732-736.
- Peters SP, MacGlashan DW, Schulman ES, Schleimer RP, Hayes EC, Rokach J, Adkinson NF, Lichtenstein LM. 1984. Arachidonic acid metabolism in purified human lung mast cells. *J Immunol* 132: 1972-1979.
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. 1991. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci* 88: 2692-2696.
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. 1991. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266: 12866-12872.
- Smith WL, DeWitt DL. 1995. Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Semin Nephrol* 15: 179-194.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci* 91: 12013-12017.
- Szczeklik A, Stevenson DD. 1999. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis and management. *J Allergy Clin*

- Immunol* 104: 5-13.
32. Raoul LW. 2004. *Essential Pediatric Allergy, Asthma, and Immunology*. 1st ed. McGraw-Hill, New York. p 22-25.
 33. Park MH, Choi C. 2000. Effect of polyphenol compounds from persimmon leaves (*Diospyros kaki folium*) on antiallergy. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 111-115.
 34. Lau HY, Wan SP. 2000. Inhibition of compound 48/80 induced histamine release from mast cells by chloride channel blockers is affected by methods of drug preincubation. *Inflamm Res* 49: S21-22.
 35. Levi-Schaffer F, Slovik D, Armetti L, Pickholtz D, Touitou E. 2000. Activation and inhibition of mast cells degranulation affect their morphometric parameters. *Life Sci* 66: PL283-290.
 36. Li GZ, Chai OH, Song CH. 2005. Inhibitory effects of epigallocatechin gallate on compound 48/80-induced mast cell activation and passive cutaneous anaphylaxis. *Exp Mol Med* 37: 290-296.

(2007년 8월 27일 접수; 2007년 10월 23일 채택)