

## RBL 2H3 비만세포에서 히스타민 유리와 칼슘과의 관계

박성훈 · 김수정 · 김정민 · 박주현 · 최방실 · 이지윤 · 최미영 · 심상수<sup>#</sup>

중앙대학교 약학대학

(Received January 30, 2007; Revised February 15, 2007)

## Relationship Between Histamine Release and $\text{Ca}^{2+}$ Mobilization in RBL 2H3 Mast Cells

Sung Hun Park, Soo Jeong Kim, Jung Min Kim, Ju Hyun Park, Bang Shil Choi, Ji Yun Lee,  
Mi Yeong Choi and Sang Soo Sim<sup>#</sup>

Department of Pathophysiology, College of Pharmacy, Chung Ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — To investigate the relation between extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and histamine release, we observed agonist-induced histamine release from RBL 2H3 mast cells in the presence or absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Histamine release induced by melittin and thapsigargin were greater in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  than in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Econazole-induced histamine release had nothing to do with extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , whereas arachidonic acid-induced histamine release increased in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Calmodulin antagonists did not affect melittin-induced histamine release but they may potentiate arachidonic acid-induced histamine release. These data suggest that arachidonic acid-induced histamine release may be mediated via  $\text{Ca}^{2+}$ -independent pathway and may be potentiated by the block of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pathway.

**Keywords** □ mast cells, histamine, calcium, calmodulin antagonist

일반적으로 비만세포로부터 histamine의 유리는 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도의 증가와 밀접한 연관성이 있는데,<sup>1-3)</sup> 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도의 증가는 세포내 저장된  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유리와 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입에 의해 일어난다.<sup>4,5)</sup> 비만세포로부터 histamine의 유리는 염증반응시 생성되는 염증 매개물질과 밀접한 연관성이 있다.<sup>6-8)</sup> 이러한 염증 매개물질에 의한 histamine의 유리는 세포외  $\text{Ca}^{2+}$  없는 상태에서는 반응이 감소하는 것으로 알려져 있다.<sup>9)</sup> 그러나 최근 본 실험실에서 arachidonic acid에 의한 histamine 유리는 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 이 없는 상태에서 더 많은 histamine이 유리되는 것을 관찰하였다.<sup>10)</sup> 이러한 결과는 평활근 수축과정에서와 마찬가지로 histamine 유리 과정도  $\text{Ca}^{2+}$  의존성 경로와  $\text{Ca}^{2+}$  비의존성 경로가 존재하는 것으로 사료된다. 또한 각 조직에 존재하는 비만세포의 histamine 유리 반응은 조직과 종에 따라 다르게 나타나고 있다.<sup>11)</sup> 이 논문에서는 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 과 calmodulin 길항제가 histamine을 유리시키는 작동체의 반응에 미치는 영향을 관찰하였다.

### 실험 방법

#### 재료

Melittin, arachidonic acid, thapsigargin, econazole, W-7, trifluoperazine, EGTA,  $\text{LaCl}_3$ ,  $\text{SrCl}_2$ , o-phthalaldehyde는 Sigma Chemical 회사로부터 구입하였다.

#### 비만세포 배양

RBL 2H3(rat basophilic leukemia) 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin(100 IU/50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 용액으로 37°C로 유지되는 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다.

#### Ca-free Krebs 용액

Histamine 유리를 측정하기 위해 phenol red가 없는 Krebs 용액을 사용하였다(mM : NaCl 137, KCl 2.7,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4,  $\text{MgCl}_2$  0.5, HEPES [pH 7.4] 10,  $\text{CaCl}_2$  1.8, glucose 5). 세포

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로

(전화) 02-820-5615 (팩스) 02-816-7338  
(E-mail) simss@cau.ac.kr

외  $\text{Ca}^{2+}$ 의 영향을 제거하기 위하여 Ca-free 용액은 Krebs 용액에서  $\text{CaCl}_2$ 를 제거한 후 대신 2 mM EGTA를 첨가하였다. 한편  $\text{LaCl}_3$ 와  $\text{SrCl}_2$ 를 사용할 때는 sodium dihydrogen phosphate를 제거하고 대신 6 mM tris-hydroxymethyl-aminomethane을 사용하였다.<sup>12)</sup>

### Histamine 정량

RBL 2H3 세포에서 유리된 histamine의 양을 1% o-phthaldialdehyde를 이용하여 fluorospectrometer로 측정하였다. Eppendorf tube에 RBL 2H3 세포를  $10^6$  cells/well로 분주한 후 여러 가지 agonist를 처리한 후 30분간 배양하였다. 원심분리하여 상층액과 cell pellet으로 나누고 각각의 tube에 중류수를 가하여 2 mL로 조절한 후 1 N NaOH 0.4 mL를 가하여 잘 혼합하였다. 1% OPT(o-phthaldialdehyde, 10 mg/mL in absolute methanol) 0.1 mL를 가하여 잘 혼합한 후 실온에서 4분 이상 배양하고 3 N HCl 0.2 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 96 well microplate에 200  $\mu\text{l}$ 씩 소분하여 형광측정(Ex. 355 nm/Em. 455 nm)하였다.<sup>13)</sup> Histamine 유리는 % release[A  $\times$  100/(A+B); A: histamine amount in supernatant; B: histamine amount in pellet]로 표기하였다.

### 자료분석 및 통계처리

모든 실험 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표기하였으며 실험 군 간의 통계적 유의성은 two-tailed Student's t-test로 하였으며  $P < 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

## 실험결과 및 고찰

### Thapsigargin/econazole에 의한 histamine 유리에 미치는 $\text{Ca}^{2+}$ 의 영향

Thapsigargin은 세포질내  $\text{Ca}^{2+}$ 을 형질내세망으로 수송하는  $\text{Ca}^{2+}$ -pump 억제제로서 세포질내  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 증가시키는 물질이다.<sup>14)</sup> Thapsigargin은 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 의 존재 유무에 따라 현저한 차이를 보이고 있다. 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 이 존재할 때 농도 의존적으로 비만세포에서 histamine을 유리하였다. 반면 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 을 제거한 Ca-free 용액에서는 농도 의존적인 histamine 유리를 보이고 있지만 histamine 유리 정도는 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 이 존재하는 경우에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 thapsigargin에 의한 histamine 유리시 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 이 밀접하게 연관되어 있다는 것을 시사하여 준다.

Econazole은 receptor-operated calcium channel 차단제로서 평활근 수축을 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한 흰쥐의 복강 비만세포에서 ATP에 의한 histamine 유리를 낮은 농도에서는 농도 의존적으로 억제하지만,<sup>15)</sup> 1 mM 이상의 고농도에서는

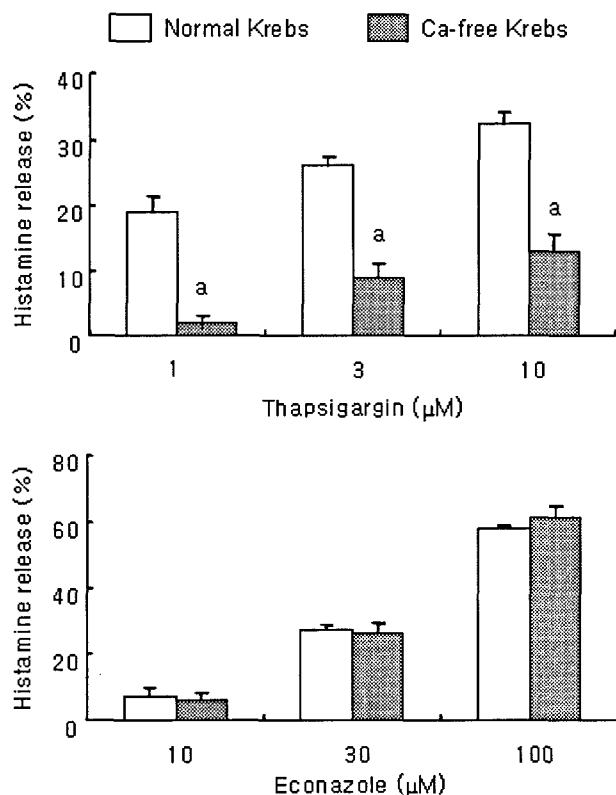


Fig. 1 – Effects of thapsigargin and econazole on histamine release in the presence or absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Results indicate means  $\pm$  SD from 5 separate experiments. a: significantly different from histamine release in normal Krebs solution ( $P < 0.05$ ).

econazole 자체가 흰쥐 복강비만세포로부터 histamine을 유리한다는 보고가 있었다.<sup>16)</sup> Econazole은 RBL 2H3 비만세포에서 농도 의존적으로 histamine을 유리하였으며 이러한 histamine 유리는 세포외  $\text{Ca}^{2+}$  존재 유무에 상관없이 나타났다(Fig. 1). 이러한 결과는 econazole의 histamine이 유리되는 과정 중  $\text{Ca}^{2+}$ 이 관여하는 이후 단계에서 econazole의 작용하는 것으로 사료된다.

### Melittin/arachidonic acid에 의한 histamine 유리에 미치는 $\text{Ca}^{2+}$ 의 영향

비만세포에서 histamine 유리는 염증과 밀접한 연관성이 있으며 염증 과정시 일어나는 phospholipase A<sub>2</sub>의 활성과 이로 인해 생성되는 arachidonic acid는 비만세포에서 histamine 유리를 일으키는 중요한 인자로 알려져 있다. Melittin은 내인성 phospholipase A<sub>2</sub> 활성제로서 비만세포에서 농도 의존적으로 histamine을 유리하며 arachidonic acid도 histamine을 농도 의존적으로 유리시키는 것으로 알려져 있다.<sup>10)</sup> Melittin은 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 이 없을 때보다 존재할 때 더 많은 histamine을 유의하게 유리시켰다. 반면 arachidonic acid는 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 이 없을 때 더 많은 histamine이 유리되었다(Fig. 2).

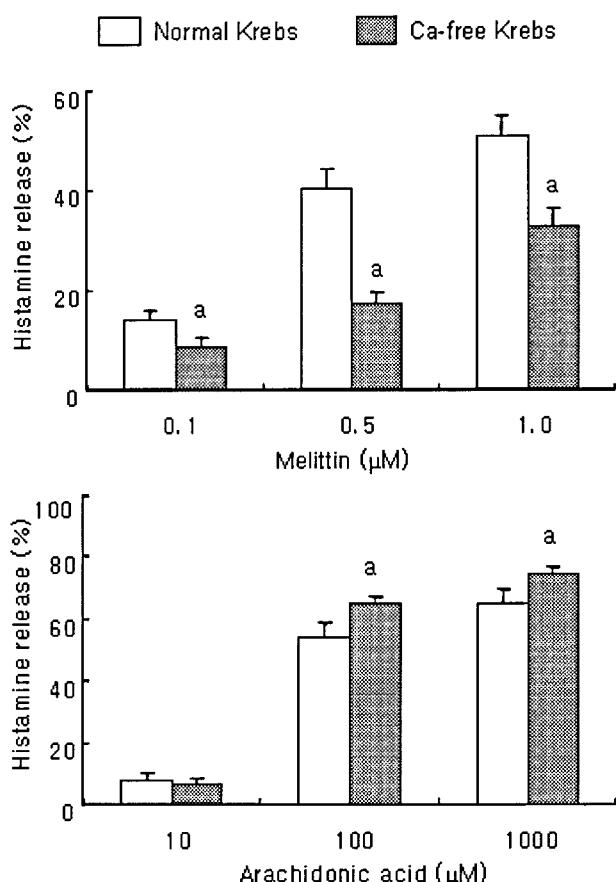


Fig. 2 – Effects of melittin and arachidonic acid on histamine release in the presence or absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Results indicate means $\pm$ SD from 5 separate experiments. a: significantly different from histamine release in normal Krebs solution ( $P<0.05$ ).

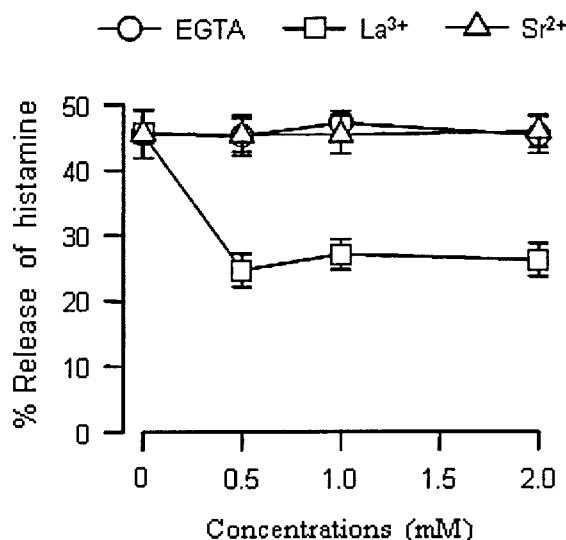


Fig. 4 – Effects of calcium chelator and calcium competitor on histamine release induced by arachidonic acid (100  $\mu\text{M}$ ). Results indicate means $\pm$ SD from 5 separate experiments.

1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 함유한 정상적인 Krebs 용액에서 melittin에 의한 histamine 유리는 EGTA와  $\text{LaCl}_3$ 에 의해 농도 의존적으로 억제되었으나  $\text{SrCl}_2$ 는 영향을 주지 않았다(Fig. 3). 그러나 arachidonic acid에 의한 histamine 유리에 있어서  $\text{LaCl}_3$ 는 0.5 mM에서 유의하게 억제하였으나 EGTA와  $\text{SrCl}_2$ 는 별 다른 영향을 주지 않았다(Fig. 4).  $\text{LaCl}_3$ 는 세포와  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입을 차단하는 것으로 알려져 있으며,  $\text{SrCl}_2$ 는 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유리를 차단하는 것으로 알려져 있다.<sup>12)</sup> Melittin에 의한 histamine 유리는 세포와  $\text{Ca}^{2+}$ 에 의존적이지만, 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유리와는 무관한 것으로 사료된다. 한편 arachidonic acid에 의한 histamine 유리는  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs 용액에서도 영향을 받지 않았지만  $\text{LaCl}_3$ 에 의해 유의하게 억제되는 것으로 보아  $\text{LaCl}_3$ 의 작용이 세포와  $\text{Ca}^{2+}$  유입을 차단하는 것 이외의 작용에 의해 histamine 유리를 차단하는 것으로 사료된다.

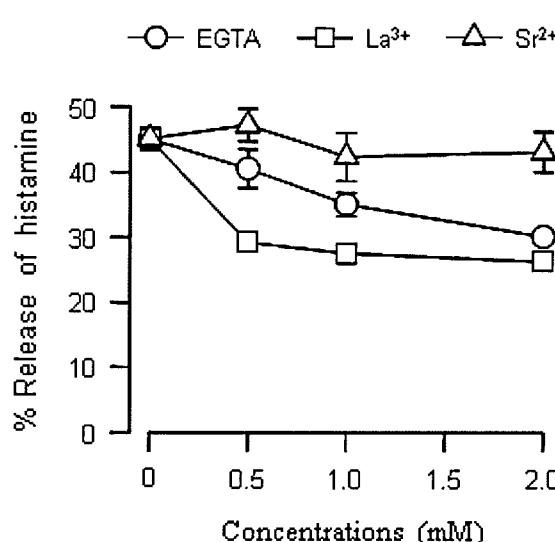


Fig. 3 – Effects of calcium chelator and calcium competitor on histamine release induced by melittin (0.5  $\mu\text{M}$ ). Results indicate means $\pm$ SD from 5 separate experiments.

#### Calmmodulin 길항제가 melittin과 arachidonic acid에 의한 histamine 유리에 미치는 영향

Calmmodulin 길항제로서 많이 사용되는 W-7과 trifluoperazine은 농도 의존적으로 RBL 2H3 세포에서 histamine을 유리시켰다(Fig. 5). 이러한 작용은 복강내 비만세포에서도 같은 결과가 보고되었다.<sup>17)</sup> Calmodulin 길항제가 histamine 유리하는 기전은 아직 잘 밝혀지지 않았지만 세포내에서 calmodulin과 유사한 작용을 하여 histamine을 유리시키는 것으로 제시되고 있다.<sup>17)</sup> Melittin과 calmodulin 길항제를 같이 처리한 경우 각각을 단독 투여한 histamine 유리의 합보다는 적었으며, melittin에 의한 histamine 유리 값과 비슷한 결과를 나타내었다(Fig. 5). 그러나 arachidonic acid와 같이 투여한 경우에 있어서 각각을 단독 투

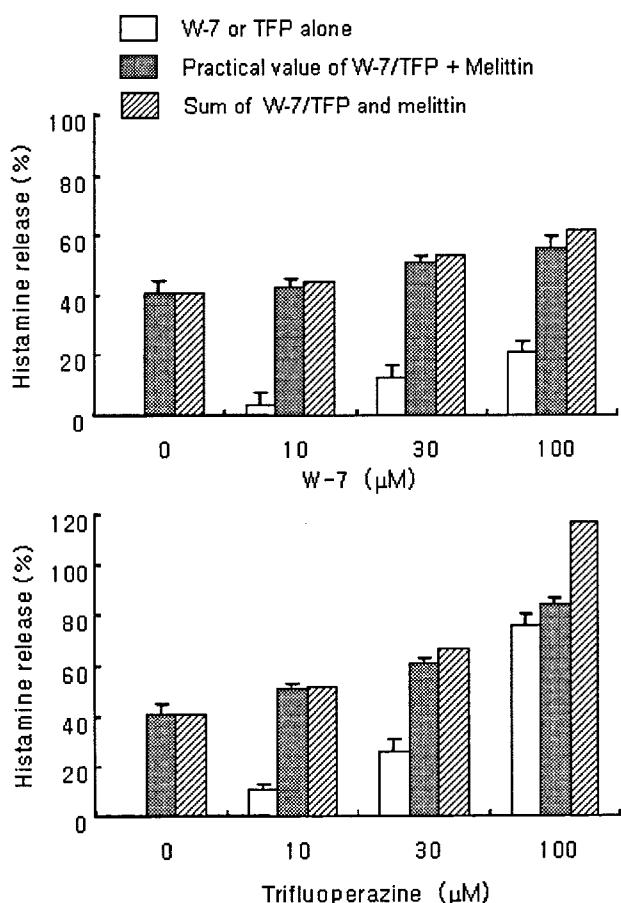


Fig. 5 – Effects of calmodulin antagonists on histamine release induced by melittin (0.5 μM). Results indicate means±SD from 5 separate experiments.

여한 경우보다 histamine 유리가 더 증가하였다(Fig. 6). 이러한 결과로 미루어 볼 때 arachidonic acid에 의한 histamine 유리는 calcium 비의존성 경로를 통해 histamine을 유리시키며 calcium 의존성 경로를 차단 시 arachidonic acid의 반응을 더 강화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

RBL 2H3 비만세포에서 melittin과 thapsigargin에 의한 histamine 유리는 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 이 없을 때보다 존재할 때 histamine의 유리가 잘 일어났다. Econazole은 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 의 존재 유무에 상관없이 histamine이 유리되었고 arachidonic acid의 경우 세포외  $\text{Ca}^{2+}$  없는 경우에 histamine 유리가 더 크게 일어났다. 이러한 결과는 histamine을 유리시키는 작동제에 따라 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 의 영향이 다르게 나타나는 것을 보여주고 있다. 한편 melittin에 의한 histamine 유리는 calmodulin 길항제에 별다른 영향을 받지 않지만 arachidonic acid에 의한 histamine 유리를

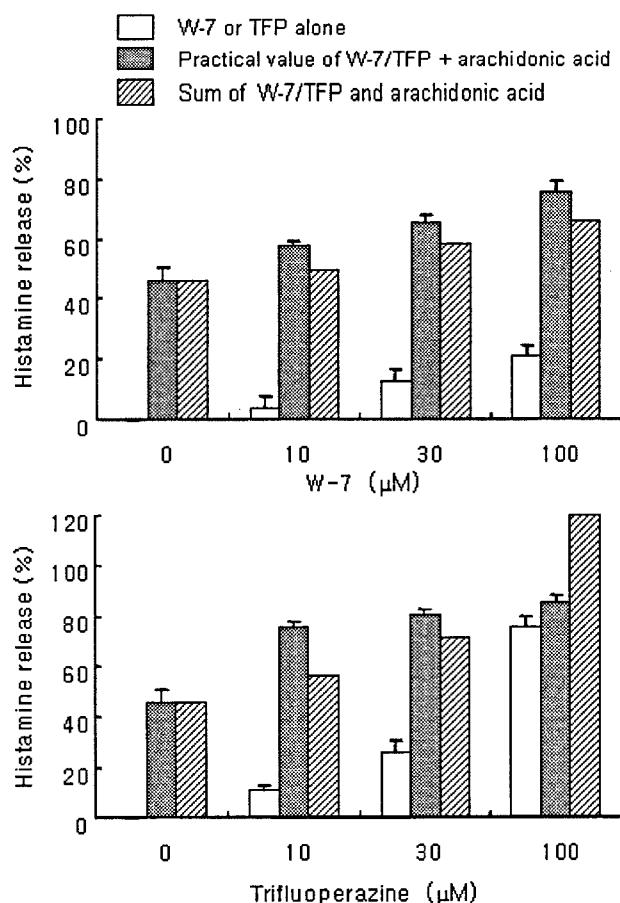


Fig. 6 – Effects of calmodulin antagonists on histamine release induced by arachidonic acid (100 μM). Results indicate means±SD from 5 separate experiments.

는 calmodulin 길항제와 병행 투여시 상승 작용을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 arachidonic acid에 의한 histamine 유리는 calcium 비의존성 경로를 통해 histamine을 유리시키며 calcium 의존성 경로를 차단 시 arachidonic acid의 반응을 더 강화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2006년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Botana, L. M., Alfonso, A., Botana, M. A., Vieytes, M. R., Louzao, M. C. and Cabado, A. G. : Influence of protein kinase C, cAMP and phosphatase activity on histamine release produced by compound 48/80 and sodium fluoride on rat mast cells. *Agents and Actions* **37**, 1 (1992).

- 2) Ishizuka, Y. and Nozawa, Y. : Concerned stimulation of PI-turnover,  $\text{Ca}^{2+}$ -influx and histamine release in antigen-activated rat mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 710 (1983).
- 3) Takei, M. and Endo, K. : Histamine release and calcium concentrations in rat mast cells are dependent on intracellular ATP: effects of prostaglandin D2. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **50**(6), 357 (1994).
- 4) Ali, H., Collado-Escobar, D. and Beaven, M. A. : The rise in concentration of free  $\text{Ca}^{2+}$  and of pH provides sequential, synergistic signals for secretion in antigen-stimulated rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *J. Immunol.* **143**, 2626 (1989).
- 5) Pearce, F. L., Ennis, M., Truneh, A. and White, J. R. : Role of intra- and extracellular calcium in histamine release from rat peritoneal mast cells. *Agents and Actions* **43**, 144 (1994).
- 6) Campos, B. G., Ferreira, R. R. and Gomes, J. C. : The potentiation of the histamine release induced by adenosine in mast cells from guinea pig lung and heart: sharp dependence on the time of preincubation. *Pharmacol. Res.* **41**(3), 291 (2000).
- 7) Dexter, E. J., Butchers, P. R., Reeves, J. J., Sheehan, M. J. and Pearce, F. L. : The effect of adenosine and its analogues on histamine release from mast cells. *Inflamm. Res.* **48**, 7 (1999).
- 8) Lau, H. Y. and Roche, C. M. : Effects of secretory phospholipase A<sub>2</sub> enzymes on mast cells of rat, guinea pig and human. *Inflamm. Res.* **46**, 19 (1997).
- 9) Praetorius, H. A., Friis, U. G., Praetorius, J. and Johansen, T. : Evidence for a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange mechanism in rat peritoneal mast cells. *Pflugers. Arch.* **437**(1), 86 (1998).
- 10) Lee, J. H., Lee, J. Y., Kang, H. S., Jeong, C. H., Moon, H., Whang, W. K., Kim, C. J. and Sim, S. S. : The effect of acteoside on histamine release and arachidonic acid release in RBL-2H3 mast cells. *Arch. Pharm. Res.* **29**(6), 508 (2006).
- 11) Varsani, M. and Pearce, F. L. : Role of phospholipase A<sub>2</sub> in mast cell activation. *Inflamm. Res.* **46**, 9 (1997).
- 12) Biancani, P., Hillemeier, C., Bitar, K. N. and Makhlof, G. M. : Contraction mediated by  $\text{Ca}^{2+}$  influx in esophageal muscle and by  $\text{Ca}^{2+}$  release in the LES. *Am. J. Physiol.* **253**, 760 (1987).
- 13) Radvanyi, F., Jordan, L., Russo-Marie, F. and Bon, C. : A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase A<sub>2</sub> using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin. *Anal. Biochem.* **177**, 103 (1989).
- 14) Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. and Dawson, A. P. : Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**(7), 2466 (1990).
- 15) Jang, Y. U., Lee, Y. H., Lee, S. J., Seo, M. H., Yoon, J. Y., Kim, C. J. and Sim, S. S. : Effect of econazole on ATP- and compound 48/80-induced histamine release in rat peritoneal mast cells. *Yakhak Hoeji* **45**, 282 (2001).
- 16) Hanada, S. and Oga, S. : Histamine release from rat mast cells induced by econazole. *Gen. Pharmac.* **22**, 511 (1991).
- 17) Ohishi, K., Suzuki, T. and Uchida, M. K. : Relation between inhibition of calmodulin and mediator release from rat mast cells. *Gen Pharmacol.* **16**(4), 335 (1985).