

Compound 48/80 유도 즉시형 과민반응에 대한 뱀차즈기의 억제효과

최용길 · 김상현¹ · 임종필 · 김대근 · 엄동욱 · 이경보 · 김상용² · 신태용*
우석대학교 약학대학, ¹조지아대학교 약리 및 독성학부, ²전북대학교 농과대학

Inhibitory Effect of *Salvia plebeia* on Compound 48/80-Induced Immediate Hypersensitivity Reaction

Yong-Gil Choi, Sang-Hyun Kim¹, Jong-Pil Lim, Dae-Keun Kim, Dong-Ok Eom,
Kyeong-Bo Lee, Sang-Yong Kim² and Tae-Yong Shin*

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

¹Department of Pharmacology and Toxicology, University of Georgia, Georgia 30602, USA,

²College of Agriculture, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

Abstract – We studied the inhibitory effect of the aqueous extract of *Salvia plebeia* (SPAЕ) on immediate hypersensitivity reactions. SPAЕ inhibited immediate hypersensitivity reaction induced by compound 48/80 in mice. When SPAЕ was employed in an immediate hypersensitivity reaction test, the plasma histamine levels were reduced in a dose-dependent manner. SPAЕ also inhibited the histamine release from rat peritoneal mast cells (RPMC) by compound 48/80. The level of cAMP in RPMC, when SPAЕ was added, significantly increased compared with that of a normal control. These results indicate that SPAЕ may be beneficial in the treatment of immediate hypersensitivity reactions.

Key words – *Salvia plebeia*, immediate hypersensitivity reaction, compound 48/80, mast cells, histamine, cAMP.

생체내에 널리 분포하고 있는 비만세포는 아나필락시와 알레르기 반응 중에 일어나는 다양한 생리적 변화에 중요한 역할을 하며, 세포내에 염기성과립을 가득 함유하고 있어 탈과립반응에 의해 과립내에 함유되어 있던 물질을 방출하는 것으로 알려져 있다.^{1,7)} 비만세포의 탈과립 반응에 의해 분비되는 가장 강력한 화학적 매개물질은 히스타민이며, 히스타민은 혈관에 대한 투과성 항진과 확장작용, 점막표면에 대한 선세포의 분비 항진 작용, 기관지 평활근에 대한 수축 작용 등을 일으켜 즉시형 과민반응을 주도한다.⁸⁾ 가장 강력한 히스타민 유리 촉진제인 compound 48/80은

N-methyl-*p*-methoxyphenylethylamine과 formaldehyde의 축합에 의해 생성되며, 비만세포내로 칼슘 유입을 증가시켜 세포내 칼슘 수준을 증가시키고, cAMP-phosphodiesterase를 활성화시켜 세포내 cAMP 수준을 감소시킴으로써 비만세포의 탈과립을 일으키는데 주로 사용되고 있다.^{9,10)} 고농도의 compound 48/80은 비만세포로부터 약 90%의 히스타민을 유리시키는 것으로 알려져 있으며, 적당량의 compound 48/80은 아나필락시 반응의 기전을 연구하기 위한 히스타민 유리 촉진제로서 가장 널리 사용되고 있다.^{11,12)} 뱀차즈기(*Salvia plebeia* R. Br)는 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 1년생 또는 2년생의 직립초본으로 우리나라 전지역의 황무지, 길가에서 자생한다. 뱀차즈기는 주로 강심제¹³⁾

*교신저자 : Fax : 063-290-1567

로 사용되며, 이 약의 밝혀진 약리작용으로는 IgE 매개 알레르기 반응의 억제 효과¹⁴⁾ 및 세포독성과 항균 작용 등이 있다.¹⁵⁾ 본 연구에서는 천연물에서 알레르기 치료 약물의 개발을 목적으로 IgE 매개 즉시형 알레르기 반응에 효과가 있는 뱀차즈기¹⁴⁾를 시료로 하여 compound 48/80 유도 즉시형 과민반응에 대한 효과를 실험하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 기기 - Compound 48/80, *o*-phthalaldehyde 및 metrizamide는 Sigma사 제품을 사용하였다. cAMP kit는 Amersham사에서 구입하여 사용하였으며 기타 시약은 시판 시약 특급을 사용하였다. 기기는 spectrofluorometer(Shimadzu RF-5301 PC)를 사용하였다.

실험동물 - Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(200-250 g) 및 ICR계 수컷 생쥐(20-25 g)는 대한실험동물센터에서 구입하여 실험에 사용할 때까지 온도 22±2°C, 상대습도 55±5%로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 사육하였다.

약물(SPAE)의 제조 - 본 실험에 사용한 뱀차즈기는 1999년 7월 전북 완주군에서 채집하여 감정을 거친 후 증류수로 수육상에서 5시간씩 2회 추출한 후 여과 농축하고 동결건조하여 실험에 사용하였다. 생체내 실험에서는 생리식염수에, 생체의 실험에서는 Tyrode buffer A(10 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 5.6 mM glucose, 0.1% bovine serum albumin)를 사용하여 실험 직전에 일정 농도로 조제하였다.

Compound 48/80에 의한 전신성 아나필락시 및 혈청의 분리 - Amir 등¹⁶⁾의 방법에 따라 실험하였다. 즉 비만세포의 탈과립제로 compound 48/80(0.008 g/kg, 체중)을 생쥐의 복강내에 주사하였으며, SPAE는 생리식염수에 녹인 다음 compound 48/80을 생쥐의 복강내에 투여하기 1시간 전에 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 및 1.0(g/kg, 체중)의 용량으로 복강내에 주사하였다. 또 시간 의존 실험으로 compound 48/80을 투여하고 5분 및 10분 후에 SPAE(1.0 g/kg, 체중)을 복강내에 주사하였다. 치사율 실험은 아나필락시를 유발시킨 후 1시간 동안 관찰하였으며 관찰 후 생쥐의 심장에서 채혈하고 혈청을 분리하여 히스타민을 정량하였다(n=10/

group).

흰쥐 복강 비만세포의 분리 - Kanemoto 등¹⁷⁾의 방법에 따라 실험하였다. 즉 흰쥐를 에테르로 마취시킨 후 실온에서 Tyrode buffer B(137 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 2.7 mM KCl, 0.3 mM NaH₂PO₄, 1.0 mM MgCl₂, 1.0 mM CaCl₂, 5.6 mM dextrose, 0.1% bovine serum albumin) 약 20 ml를 복강내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 마사지하였다. 복벽 중앙선을 주의 깊게 절개하고 Pasteur pipette로 복강 세척액을 채취하여 150×g에서 10분 동안 원심분리하여 상정액을 분리 제거한 후 비만세포 부유액을 Tyrode buffer B에 재부유 시켰다. 세포 부유액 중 비만세포는 22.5 w/v% metrizamide를 이용하여 Yurt¹⁸⁾ 등의 방법으로 분리 정제하였다.

Compound 48/80에 의한 히스타민의 유리 - CO₂ incubator에서 미리 37°C로 10분간 배양시킨 복강 비만세포 부유액(2×10⁵ cells/ml)에 SPAE를 0.001, 0.01, 0.1 및 1.0 mg/ml의 농도로 첨가하여 37°C에서 10분간 배양시킨 후 compound 48/80을 가하여 다시 10분 동안 배양시킨 다음 400×g로 4°C에서 5분간 원심분리하여 상정액을 분리하였다.

히스타민의 정량 - 혈청 및 세포배양 상정액 중에 있는 히스타민은 Shore¹⁹⁾ 등의 방법을 약간 수정하여 *o*-phthalaldehyde로 히스타민을 형광유도체화 시킨 후 λ_{ex}=353 nm, λ_{em}=438 nm에서 상대형광강도를 측정하여 정량하였다.

세포내 cAMP 측정 - Peachell 등²⁰⁾의 방법에 따라 실험하였다. 즉, Tyrode buffer A에 부유시킨 흰쥐 복강 비만세포(2×10⁵ cells/ml)에 Tyrode buffer A로 조제한 SPAE(1.0 mg/ml)를 넣어 5% CO₂ incubator로 37°C에서 배양하였다. 배양시간은 5, 10, 30, 60, 120, 180, 360초이며 산성화 에탄올(86% ethanol 0.9 ml : 1 M HCl = 99 : 1)을 넣어 혼합하고 반응을 정지시킨 후 액체질소에서 동결시켰다. 이 시료를 녹여서 혼합한 후 400×g로 4°C에서 5분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후 상정액 0.9 ml를 취해 감압 건조시켰다. 이 건조 시료 중의 cAMP 함량은 assay buffer 200 μl에 용해시킨 후 cAMP 정량 kit를 사용하여 측정하였다.

통계학적 분석 - 실험 결과는 mean±SEM으로 표시하였으며 Student's *t*-test에 의해 유의성을 검정하여 p<0.05인 결과를 얻었을 때 유의성이 있는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

Compound 48/80 유도 즉시형 과민반응에 대한 SPAE의 효과 - 즉시형 과민반응에 대한 SPAE의 효과를 검토하기 위해 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시를 유도하였다. 치사율은 compound 48/80(0.008 g/kg, 체중)을 생쥐에 주사한 후 1시간 동안 관찰하여 결정하였다(n=10/group). Table I에서와 같이 생리 식염수 200 μ l를 투여한 대조군은 100% 치사율을 나타내었다. 그러나 compound 48/80을 투여하기 1시간 전에 SPAE를 계열 희석하여 복강내에 투여한 후 치사율을 관찰한 결과 SPAE 농도 의존적으로 치사율이 감소하였으며, 1.0(g/kg, 체중)에서는

Table I. Effect of SPAE on compound 48/80-induced systemic anaphylactic reaction

SPAE treatment (g/kg, body weight)	Compound 48/80 (0.008 g/kg)	Mortality (%)
None(saline)	+	100
0.01	+	100
0.05	+	70
0.1	+	60
0.5	+	30
1.0	+	0
1.0	-	0

Groups of mice (n=10/group) were intraperitoneally pretreated with 200 μ l saline or SPAE. SPAE was given at various doses 1 hr before the compound 48/80 injection. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of mice. Mortality (%) within 1 hr following compound 48/80 injection was represented as number of dead mice \times 100/total number of experimental mice.

Table II. Time-dependent effect of SPAE on compound 48/80-induced systemic anaphylactic reaction

SPAE treatment (g/kg, body weight)	Compound 48/80 (0.008 g/kg)	Mortality (%)	
		5 min after	10 min after
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 saline or SPAE. SPAE was given at 5 min or 10 min after the compound 48/80 injection. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of mice. Mortality (%) within 1 hr following compound 48/80 injection was represented as number of dead mice \times 100/total number of experimental mice.

치사율이 0%이었다. 시간 의존 실험으로 compound 48/80을 투여하고 5분 및 10분 후에 SPAE(1.0 g/kg, 체중)을 복강내에 투여한 결과 Table II에서와 같이 5분 후에 SPAE를 투여한 군은 치사율이 20%, 10분 후에 투여한 군은 치사율이 40%로 시간 의존적으로 치사율이 증가하였다.

혈청 중 히스타민 유리에 미치는 SPAE의 효과 - SPAE(0.05-1.0 g/kg) 투여에 의해 전신성 아나필락시가 농도 의존적으로 억제되므로 혈청중 히스타민을 측정하여 SPAE의 효과를 검토하였다. 심장에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 히스타민 양을 측정한 결과 Table III에서와 같이 혈청중 히스타민의 유리는 SPAE에 의해 농도 의존적으로 억제되었으며, 0.1(g/kg, 체중) 이상의 농도에서 유의성 있는 억제 효과가 있었다. 또 시간 의존 실험으로 compound 48/80을

Table III. Effect of SPAE on compound 48/80-induced plasma histamine release

SPAE treatment (g/kg, body weight)	Compound 48/80 (0.008 g/kg)	Histamine release (μ g/ml)
None (saline)	+	14.7 \pm 1.5
0.01	+	13.3 \pm 1.1
0.05	+	11.9 \pm 0.9
0.1	+	6.7 \pm 0.5*
0.5	+	5.1 \pm 0.5*
1.0	+	4.1 \pm 0.3*

Groups of mice (n=10/group) were intraperitoneally pretreated with 200 μ l saline or SPAE. SPAE was given with various doses 1 hr before the compound 48/80 injection. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of mice. Each datum represents the mean \pm SEM of three independent experiments. *p<0.05: significantly different from the saline value.

Table IV. Time-dependent effect of SPAE on compound 48/80-induced plasma histamine release

SPAE treatment (g/kg, body weight)	Compound 48/80 (0.008 g/kg)	Histamine release (μ g/ml)	
		5 min after	10 min after
None (saline)	+	9.1 \pm 1.5	9.1 \pm 1.5
1.0	+	5.1 \pm 0.6*	7.1 \pm 0.8

Groups of mice (n=10/group) were intraperitoneally pretreated with 200 μ l saline or SPAE. SPAE was given at 5 min or 10 min after the compound 48/80 injection. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the groups of mice. Each datum represents the mean \pm SEM of three independent experiments. *p<0.05: significantly different from the saline value.

Table V. Effect of SPAE on compound 48/80-induced histamine release from RPMC

SPAE treatment (mg/ml)	Compound 48/80 (5 µg/ml)	Histamine release (µg/ml)
None(saline)	+	24.0±2.2
0.001	+	23.7±2.5
0.01	+	20.1±2.1
0.1	+	16.6±1.8*
1.0	+	8.0±0.7*

RPMC (2×10^5 cells/ml) were preincubated with SPAE at 37°C for 10 min prior to incubation with compound 48/80 for 10 min. Each datum represents the mean ± SEM of three independent experiments. *p<0.05: significantly different from the saline value.

Table VI. Effect of SPAE on compound 48/80-induced cAMP content in RPMC

SPAE treatment (mg/ml)	Compound 48/80 (5 µg/ml)	cAMP (p mol)
None (saline)	-	0.48±0.03
None (saline)	+	0.25±0.04
1.0	-	1.45±0.17*
1.0	+	0.82±0.03*

RPMC (2×10^5 cells/ml) were pretreated with saline or SPAE at 37°C (60 sec). Each datum represents the mean ± SEM of three independent experiments. *p<0.05: significantly different from the saline value.

투여하고 5분 및 10분 후에 SPAE(1.0 g/kg, 체중)을 복강내에 주사한 후 채혈하여 혈청 중 히스타민 양을 측정된 결과 Table IV에서와 같이 compound 48/80 투여 5분 후에 SPAE를 투여하였을 때 유의성 있는 억제 효과가 있었다.

비만세포로부터 히스타민 유리에 미치는 SPAE의 효과 - 흰쥐의 복강 비만세포에 미치는 SPAE의 효과를 검토하기 위하여 compound 48/80을 투여하기 10분전에 SPAE를 처리하였다. Table V에서와 같이 SPAE는 compound 48/80에 의한 히스타민의 유리를 농도 의존적으로 억제하였으며, 0.1 mg/ml 이상의 농도에서 유의성 있는 억제 효과가 있었다. SPAE 1.0 mg/ml를 처리한 세포에 대한 Trypan blue 흡수 실험 결과 97% 이상의 세포가 생육성(viability)이 있었다.

비만세포의 cAMP 함량에 미치는 SPAE의 효과 - 흰쥐 복강 비만세포에 SPAE(1.0 mg/g)을 가하고 배양하였을 때 cAMP의 증가는 60초 후에 최고치에 도달하였으며, Table VI에서와 같이 SPAE를 가하였을 때 cAMP의 양이 SPAE를 가하지 않았을 때보다

3배 정도 증가하였다. 이 사실은 cAMP가 히스타민의 유리 조절인자로서 작용하고 있음을 시사하고 있다.

결론

Compound 48/80 유도 즉시형 과민반응에 대한 SPAE의 효과 실험의 결과 SPAE는 compound 48/80에 의해 유도된 전신성 아나필락시를 억제하였으며, 혈청 중 히스타민의 유리를 농도 의존적으로 억제하였다. SPAE는 compound 48/80에 의한 흰쥐의 복강 비만세포로부터 히스타민의 유리를 농도 의존적으로 억제하였으며, 비만세포의 cAMP의 양을 3배까지 증가시켰다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 compound 48/80 유도 즉시형 과민반응에 대한 SPAE의 억제 효과는 세포내 cAMP 함량의 증가에 의한 것으로 사료된다.²¹⁾ 즉시형 과민반응의 억제 효과를 나타내는 SPAE의 활성 성분에 대한 연구는 현재 진행 중에 있다.

사사

이 논문은 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Wasserman, S. I. and Marquardt, D. L. (1988) Anaphylaxis in Allergy: Principles and Practice. 3rd ed. 1365. C.V. Mosby Co.
2. Kim, H. M., Hirota, S., Chung, H. T., Ohno, S., Osada, S., Ko, K. I., Kim, J. B., Kitamura, Y. and Nomura, S. (1994) 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: 258-263.
3. Dombrowicz, D., Flamand, V., Brigman, K. K., Koller, B. H. and Kinet, J. P. (1993) Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor α chain gene. *Cell* 75: 969-976.
4. Martin, T. R., Ando, A., Takeishi, T., Katona, I. M., Drazen, J. and Galli, S. J. (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.
5. Lee, Y. M., Kim, D. K., Kim, S. H., Shin, T. Y. and Kim, H. M. (1996) Antianaphylactic activity of *Poncirus trifoliata* fruit extract. *J. Ethnopharmacol.* 54: 77-84.

6. Ando, A., Martin, T. R. and Galli, S. J. (1993) Effects of chronic treatment with the c-kit ligand, stem cell factor, on IgE dependent anaphylaxis in mice. *J. Clin. Invest.* 92: 1639-1649.
7. Gomes, J. C., Distasi, L. C., Sgarbosa, F. and Barata, L. E. S. (1994) 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: 188-193.
8. Petersen, L. J., Mosbech, H. and Skov, P. (1996) Allergen-induced histamine release in intact human skin *in vivo* assessed by skin microdialysis technique: Characterization of factors influencing histamine releasability. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97: 672-679.
9. Sullivan, T. J., Parker, K. L., Stenson, W. and Parker, C. W. (1975) Modulation of cyclic AMP in purified rat mast cells. I. Responses to pharmacologic, metabolic and physical stimuli. *J. Immunol.* 114: 1473-1479.
10. Sullivan, T. J., Parker, K. L., Eisen, S. A. and Parker, C. W. (1975) Modulation of cyclic AMP in purified rat mast cells. II. Studies on the relationship between intracellular cyclic AMP concentrations and histamine release. *J. Immunol.* 114: 1480-1485.
11. Shin, T. Y., Kim Y. K. and Kim, H. M. (2001) Inhibition of immediate-type allergic reactions by *Prunella vulgaris* in a murine model. *J. Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 23: 423-435.
12. Shin, T. Y., Won, J. H., Kim, H. M. and Kim, S. H. (2001) Effect of *Alpinia oxyphylla* fruit extract on compound 48/80-induced anaphylactic reactions. *Am. J. Chinese Med.* 29: 293-302.
13. 문관심 (1994) 약초의 성분과 이용, 520. 일월서각, 서울.
14. Shin, T. Y., Kim, D. K., Choi, Y. K., Kim, Y. J., Choi, D. S., Kim, S. H. and An, N. H. (2000) Effect of *Salvia plebeia* on IgE antibody mediated allergic reaction in rats. *Int. J. Oriental Med.* 1: 29-35.
15. 신민교, 김석근, 이상건, 강영성, 김성수, 양은영, 이현옥, 백승화 (2001) 배암차즈기 추출물의 세포독성과 항균효과. *생약학회지*, 32: 55-60.
16. Amir, S. and English, A. M. (1991) An inhibitor of nitric oxide production, ¹⁴C-nitro-L-arginine methyl ester, improves survival in anaphylactic shock. *Eur. J. Pharmacol.* 203: 125-127.
17. Kanemoto, T., Kasugai, T., Yamatodani, A., Ushio, H., Mochizuki, T. K., Kimura, M., Nishimura, M. and Kitamura, Y. (1993) Supernormal histamine release and normal cytotoxic activity of beige rat mast cells with giant granules. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 100: 99-106.
18. Yurt, R. W., Leid, R. W. and Austen, K. F. (1977) Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.* 252: 518-521.
19. Shore, P. A., Burkhalter, A. and Cohn, V. H. (1959) A method for fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 127: 182-186.
20. Peachell, P. T., MacGlashan, D. W., Lichtenstein, L. M. and Schleimer, R. P. (1988) Regulation of human basophil and lung mast cell function by cyclic adenosine monophosphate. *J. Immunol.* 140: 571-579.
21. Makino, H., Saijo, T., Ashida, Y., Kuriki, H. and Maki, Y. (1987) Mechanism of action of an antiallergic agent, Amlexanox(AA-673), in inhibiting histamine release from mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 82: 66-71.

(2001년 9월 17일 접수)