

## 흰쥐의 복강비만세포에서 ATP와 Compound 48/80에 의한 Histamine 유리에 미치는 Econazole의 영향

장용운 · 이윤혜 · 이승준 · 서무현 · 윤정어 · 김창종 · 심상수\*

중앙대학교 약학대학

(Received April 30, 2001; Revised May 14, 2001)

### Effect of Econazole on ATP- and Compound 48/80-Induced Histamine Release in Rat Peritoneal Mast Cells

Yong Un Jang, Yun Hye Lee, Seung June Lee, Moo Hyun Seo, Jeong Yi Yoon, Chang Jong Kim and Sang Soo Sim\*

Division of Pathophysiology, College of Pharmacy, Chung Ang University

**Abstract** — To investigate the different mechanism between ATP and compound 48/80 ( $C_{48/80}$ )-induced histamine release, we observed effects of calcium antagonists in histamine release of rat peritoneal mast cells. Verapamil and diltiazem (voltage-dependent calcium channel blocker) and TMB-8 (a blocker of intracellular calcium release) significantly inhibited ATP-induced histamine release, but did not inhibit  $C_{48/80}$ -induced histamine release. Econazole (a blocker of receptor-operated calcium channel) dose-dependently inhibited both ATP and  $C_{48/80}$ -induced histamine release, but inhibitory effect of econazole in ATP-induced histamine release was more potent than that in  $C_{48/80}$ -induced histamine. EGTA dose-dependently inhibited ATP and  $C_{48/80}$ -induced histamine release, but  $C_{48/80}$ -induced histamine release was slightly inhibited by high concentrations (>2 mM) of EGTA. These results suggest that ATP-induced histamine release is related to both intracellular calcium release and extracellular calcium influx via voltage-dependent calcium channel and receptor-operated calcium channel.  $C_{48/80}$ -induced histamine release is related to extracellular calcium influx, especially by receptor-operated calcium channel rather than voltage-dependent calcium channel.

**Keywords** □ Mast cells, histamine, econazole.

조직 손상은 비만세포를 자극하여 histamine을 유리 시키므로써 염증반응을 악화시킨다. 비만세포를 자극하는 물질로서는 compound 48/80과 concanavaline A들이 잘 알려져 있다. 이들의 작용은 주로 phospholipase C를 활성화시키며, 이때 생성되는 second messenger에 의해 세포내  $Ca^{2+}$  농도가 증가하며 증가한 세포내  $Ca^{2+}$ 과 1,2-diacylglycerol(DAG)는 protein kinase C(PKC)를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 일반적으로 비만세포로부터의 histamine 유리는 세포내

$Ca^{2+}$  농도의 증가와 밀접한 연관성이 있는데,<sup>2,4)</sup> 세포내  $Ca^{2+}$  농도의 증가는 세포내 저장된  $Ca^{2+}$ 의 유리와 세포외  $Ca^{2+}$ 의 유입에 의해 일어난다.<sup>5,6)</sup> Compound 48/80은 *p*-methoxyphenethylmethylamine과 formaldehyde의 융합체로서 compound 48/80에 의한 histamine의 유리는 세포외  $Ca^{2+}$ 과는 무관한 것으로 알려져 있다.<sup>7)</sup>

한편 조직손상시 세포내에 저장된 약 5 mM 정도의 ATP가 유리되면서 이는 이웃된 여러 가지 세포에 자극제로 작용한다는 설이 제기되고 있다. ATP의 작용은 세포에 따라 매우 다양한데 주로 ATP는  $P_2$ -purinergic receptor를 통해 작용하는 것으로 알려져

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-820-5615 (팩스) 02-816-7338

있다. 이중에서 ATP는 P<sub>2X</sub>-purinoceptor를 통해 ATP-gated ionic channels을 활성화시키며<sup>8)</sup> P<sub>2Y</sub>-purinoceptor를 통해서 phospholipase C를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>9)</sup> ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리에 있어서 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가는 공통된 경로로서 이들 두 가지 작동제의 작용에 있어서 Ca<sup>2+</sup> 이동의 경로를 비교한 보고는 없는 상태이다. 그러므로 이 실험에서는 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리시 동원되는 Ca<sup>2+</sup>의 경로가 다른 지를 규명하였다.

### 실험방법

**실험동물** - 수컷 흰쥐(체중 250-300 g)를 온도와 습도가 자동 조절되는 동물실험실에서 1주일간 물과 음식을 자유로이 섭취하며 안정화시킨 후 실험을 수행하였다. ATP, compound 48/80, verapamil, diltiazem, econazole, TMB-8과 EGTA는 Sigma Chemical 회사로부터 구입하였다.

**비만세포의 분리** - 흰쥐를 ether 마취하에 가능한 한 출혈을 일으키지 않게 주의해서 복강을 절개하였다. 차가운 Krebs buffer 용액(mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4, MgCl<sub>2</sub> 0.5, HEPES [pH 7.4] 10, CaCl<sub>2</sub> 1.8, glucose 5)을 10 ml 씩 2회 복강내에 주입한 후 1-2 분간 부드럽게 마사지하고 삽입한 Krebs 용액을 채취하였다. 분리한 복강액을 1000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 pellet을 얻고 이를 다시 Percoll density 원심분리를 이용하여 비만세포를 분리하였다.<sup>10)</sup> 분리한 비만세포는 Krebs 용액을 이용하여 10<sup>5</sup> cells/ml로 분산시켜 histamine 유리 실험에 사용하였다.

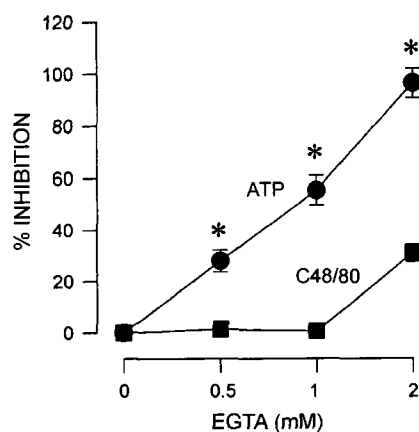
**Histamine 정량** - 분리한 비만세포를 각 tube에 1 ml 씩 소분하고 여러 가지 길항제를 5 분간 전처리한 후 100 μM ATP나 1 μg/ml compound 48/80을 처리하고 37°C에서 10분간 배양하며 histamine을 유리시켰다. 배양이 끝난후 원심분리를 통해 상층액과 세포를 분리하였고, 세포는 초음파분쇄기를 이용하여 균질화시킨후 1% OPT(*o*-phthalaldehyde) 시약을 이용하여 histamine을 형광분석하였다. 형광 측정은 fluorospectrophotometer(FL600, Microplate Fluorescence Reader, Bio-Tek)를 이용하였으며 excitation은 355 nm에서 emission은 455 nm에서 측정하였다.<sup>11)</sup> ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리는 % release

[A/(A+B)×100; A: histamine amount in supernatant; B: histamine amount in pellet]로 표기하였으며 Ca<sup>2+</sup> 길항제의 효과는 길항제를 투여하지 않은 대조군에 대한 % inhibition으로 표기하였다.

**자료분석 및 통계처리** - 모든 실험 결과는 평균±표준오차로 표기하였으며 실험 군간의 통계적 유의성은 two-tailed Student's t-test로 하였으며 P 값이 0.05 미만일 때 유의하다고 판단하였다.

### 실험결과 및 고찰

**세포의 Ca<sup>2+</sup>이 histamine 유리에 미치는 영향** - compound 48/80(1 μg/ml)은 복강 비만세포에서 전체 histamine의 60% 이상을 유리시키는 강력한 histamine 유리제인 반면 ATP는 100 μM에서 약 30% histamine을 유리시켰다. 이러한 compound 48/80과 ATP에 의한 histamine 유리 과정에 세포의 Ca<sup>2+</sup>이 어떠한 작용을 하는 지를 알아보기 위하여 세포의 Ca<sup>2+</sup>을 chelation하는 EGTA를 여러 농도로 투여하였다. ATP에 의한 histamine의 유리는 EGTA 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 1). 이러한 결과는 ATP에 의한 histamine 유리는 세포의 Ca<sup>2+</sup> 농도



**Fig. 1** - Effect of calcium chelator on histamine release induced by ATP (100 μM) and compound 48/80 (C<sub>48/80</sub>, 1 μg/ml). EGTA inhibited ATP-induced histamine release in a dose dependent manner, whereas did not inhibit C<sub>48/80</sub>-induced histamine release at concentration of less than 1 mM. Results indicate means ± SE from 5 separate experiments.

\*significantly different from C<sub>48/80</sub>-induced histamine release (P<0.05).

에 의존적인 것을 보여준다. 그러나 compound 48/80에 의한 histamine 유리에 있어서 EGTA는 1 mM까지는 영향을 주지 않았지만 2 mM에서 30% 정도의 유의한 억제력을 나타내었다(Fig. 1). 이미 compound 48/80에 의한 histamine 유리는 EGTA에 영향을 받지 않는다는 것이 보고된 바 있다.<sup>4,12,13</sup> 이러한 결과는 compound 48/80에 의한 histamine은 세포의  $Ca^{2+}$  농도에는 비의존적인 것으로 사료되나, 세포의  $Ca^{2+}$  농도가 완전히 제거되는 상태에서는 억제되는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 compound 48/80이 세포의  $Ca^{2+}$  농도에 비의존적이며 phospholipase C를

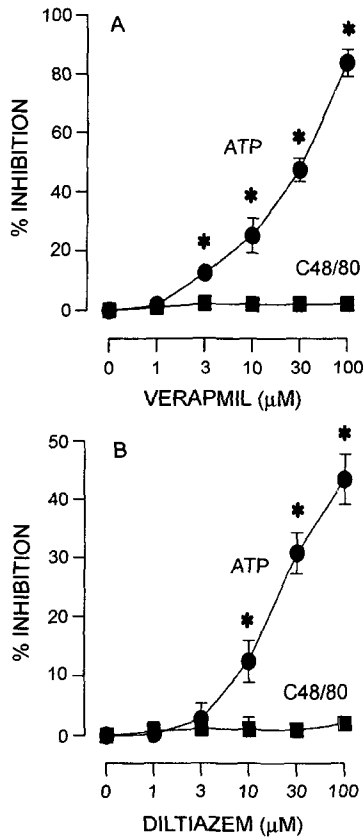


Fig. 2 - Effects of voltage-dependent calcium channel antagonists on histamine release induced by ATP (100 μM) and compound 48/80 ( $C_{48/80}$ , 1 μg/ml). Verapamil (A) and diltiazem (B) inhibited ATP-induced histamine release in a dose dependent manner, whereas did not inhibit  $C_{48/80}$ -induced histamine release. Results indicate means  $\pm$  SE from 5 separate experiments. \*significantly different from  $C_{48/80}$ -induced histamine release ( $P < 0.05$ ).

활성화시켜 histamine을 유리시킨다는 보고와 잘 일치하고 있다.<sup>2,14</sup>

**막전압 의존성  $Ca^{2+}$  통로 차단제의 영향** - 상기의 결과로 미루어 볼 때 compound 48/80과 ATP 모두 세포의  $Ca^{2+}$  농도에 민감한 정도의 차이는 있으나 세포의  $Ca^{2+}$ 에 영향을 받고 있음을 알 수 있다. compound 48/80과 ATP에 의한 histamine 유리에 막전압 의존성  $Ca^{2+}$  차단제인 verapamil과 diltiazem이 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하였다. verapamil과 diltiazem은 ATP에 의한 histamine 유리는 농도 의존적으로 억제하였으나 compound 48/80에 의한 histamine 유리에는 어떠한 영향도 미치지 않았다(Fig. 2). 이 결과는 ATP에 의한 histamine 유리에 있어 세포의  $Ca^{2+}$ 의 유입이 막전압 의존성  $Ca^{2+}$  통로를 통해 이루어지며, compound 48/80에 의한 histamine 유리에는 관여하지 않는 것으로 생각된다.

**수용체를 통한  $Ca^{2+}$  통로 차단제의 영향** - Econazole은 receptor-operated calcium channel blocker로서 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리과정에 관여하는 지를 관찰하였다. econazole은 ATP 뿐만 아니라 compound 48/80에 의한 histamine 유리를

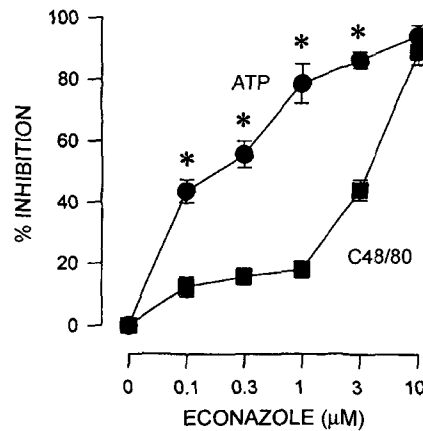
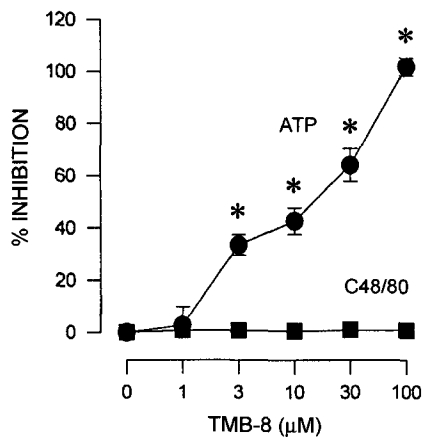


Fig. 3 - Effect of receptor-operated calcium channel blocker on histamine release induced by ATP (100 μM) and compound 48/80 ( $C_{48/80}$ , 1 μg/ml). Econazole inhibited ATP- and  $C_{48/80}$ -induced histamine release in a dose dependent manner. However, the inhibitory effect of econazole in ATP-induced histamine release was more potent than that in  $C_{48/80}$ -induced histamine release. Results indicate means  $\pm$  SE from 5 separate experiments. \*significantly different from  $C_{48/80}$ -induced histamine release ( $P < 0.05$ ).

농도 의존적으로 억제하였으며 10  $\mu\text{M}$ 에서 각각 94.1%와 88.9% 억제하였다. 그러나 econazole을 1 mM과 같은 고농도로 사용시 흰쥐의 비만세포에서 histamine을 유리시킨다는 보고도 있다.<sup>15)</sup> 이 실험에서 사용한 econazole의 농도는 histamine을 유리시키는 농도보다는 낮은 농도를 사용하였다. Fig. 3에서 보듯이 낮은 농도의 econazole에서 억제효과를 비교하여 보면 ATP에 의한 histamine 유리를 더 강력하게 억제하였다. 이 결과로 미루어 볼 때 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리과정에서 세포의  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입은 receptor-operated calcium 통로를 통해 유입된다는 것을 알 수 있다. 한편 고농도의 EGTA는 compound 48/80에 의한 histamine의 유리를 억제하였는데 아마도 compound 48/80에 의한 세포의  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입은 receptor-operated calcium channel을 통해 이루어지는 것으로 생각된다.

**세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유리 차단제의 영향** - TMB-8은 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유리 차단제로서 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리과정에 관여하는 지를 관찰하였다. TMB-8은 ATP에 의한 histamine 유리를 농도 의존적으로 억제하였으나 compound 48/80에 의한 histamine 유리에는 어떠한 영향도 미치지 않았다(Fig. 4).



**Fig. 4** - Effects of intracellular calcium release blocker on histamine release induced by ATP (100  $\mu\text{M}$ ) and compound 48/80 ( $\text{C}_{48/80}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ ). TMB-8 inhibited ATP-induced histamine release in a dose dependent manner, whereas did not inhibit  $\text{C}_{48/80}$ -induced histamine release. Results indicate means  $\pm$  SE from 5 separate experiments. \*significantly different from  $\text{C}_{48/80}$ -induced histamine release ( $P < 0.05$ ).

이러한 결과는 흰쥐의 복강 비만세포에서 compound 48/80에 의한 histamine 유리가 TMB-8에 의해 영향을 받지 않았다는 보고와 잘 일치하고 있다.<sup>16,17)</sup> 이러한 결과로 미루어 볼 때 ATP에 의한 histamine 유리에 있어 세포의  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입 뿐만 아니라 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유리도 관여하고 있음을 알 수 있으며, compound 48/80에 의한 histamine 유리에서 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유리는 관여하지 않는 것으로 생각된다. 한편  $\text{Ca}^{2+}$  길항제들의 영향이 ATP에 의한 histamine 유리에는 잘 나타나지만 compound 48/80에 의한 histamine 유리에는 econazole을 제외한 길항제들의 영향은 잘 나타나지 않고 있다. 이는 compound 48/80에 의한 histamine 유리과정이 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도의 증가보다는  $\text{Ca}^{2+}$  이외의 다른 기전을 통해 histamine 유리를 일으키는 것으로 생각되며 이에 대한 연구는 앞으로 더 진행되어야 할 것이다.

## 결 론

복강비만세포에서 ATP에 의한 histamine 유리는 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유리와 세포의  $\text{Ca}^{2+}$  유입 모두 관여하고 있으며 이러한 세포의  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입은 voltage-dependent calcium channel과 receptor-operated calcium channel 모두를 통해 이루어지고 있음을 보여 준다. 한편 compound 48/80에 의한 histamine 유리는 세포의  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입과 연관성이 있으며 이는 voltage-dependent calcium channel이 아닌 receptor-operated calcium channel을 통해 이루어지고 있음을 제시할 수 있다.

## 문 헌

- 1) Goth, A. : On the general problem of the release of histamine. In : Rochae Silva M, ed. Histamine II and anti-histamine. Berlin, Heidelberg, New York : Springer-Verlag, 57 (1978).
- 2) 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 Actions* 37, 1 (1992).
- 3) Ishizuka, Y. and Nozawa, Y. : Concerned stimulation

- of PI-turnover,  $Ca^{2+}$ -influx and histamine release in antigen-activated rat mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 710 (1983).
- 4) Takei, M. and Endo, K. : Histamine release and calcium concentrations in rat mast cells are dependent on intracellular ATP: effects of prostaglandin  $D_2$ . *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **50**(6), 357 (1994).
  - 5) Ali, H., Collado-Escobar, D. and Beaven, M. A. : The rise in concentration of free  $Ca^{2+}$  and of pH provides sequential, synergistic signals for secretion in antigen-stimulated rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *J. Immunol.* **143**, 2626 (1989).
  - 6) Fasolato, C., Hoth, M., Matthews, G. and Penner, R. :  $Ca^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  influx through receptor-mediated activation of nonspecific cation channels in mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 3068 (1993).
  - 7) Uvnas, B. and Thon, I-L. : Evidence for enzymatic histamine release from isolated rat mast cells. *Exp. Cell. Res.* **23**, 45 (1973).
  - 8) Conigrave, A. D. and Jiang, L. : Review:  $Ca^{2+}$ -mobilizing receptors for ATP and UTP. *Cell Calcium* **17**(2), 111 (1995).
  - 9) North, R. A. and Barnard, E. A. : Nucleotide receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 346 (1997).
  - 10) Knudsen, T. and Johansen, T. :  $Na^+$ - $K^+$  pump activity in rat peritoneal mast cells inhibition by extracellular calcium. *Br. J. Pharmacol.* **96**, 773 (1989).
  - 11) Radvanyi, F., Jordan, L., Russo-Marie, F. and Bon, C. : A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase  $A_2$  using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin. *Anal. Biochem.* **177**, 103 (1989).
  - 12) Pearce, F. L., Ennis, M., Truneh, A., White, J. R. : Role of intra- and extracellular calcium in histamine release from rat peritoneal mast cells. *Agents Actions* **43**, 144 (1994).
  - 13) Kawabe, H., Hayashi, H. and Hayaishi, O. : Differential calcium effects on prostaglandin  $D_2$  generation and histamine release from isolated rat peritoneal mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **143**(2), 467 (1987).
  - 14) Wu, C. Y., Chen, C. F., Chiang, C. F. : Stimulation of inositol phosphate production and GTP-ase activity by compound 48/80 in rat peritoneal mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 204 (1993).
  - 15) Hanada, S. and Oga, S. : Histamine release from rat mast cells induced by econazole. *Gen. Pharmac.* **22**, 511 (1991).
  - 16) Dahlquist, R. and Diamant, B. : Interaction of ATP and calcium on the rat mast cell : Effect on histamine release. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* **34**, 368 (1974).
  - 17) Chakravarty, N. : Effect of TMB-8 on calcium transport in mast cells in relation to histamine secretion. *Agents Actions* **23**, 191 (1988).