

## 비만세포에서 Histamine 유리에 관여하는 Phospholipase A<sub>2</sub>의 작용

이윤희 · 이승준 · 서무현 · 장용운 · 윤정이 · 김창종 · 심상수\*

중앙대학교 약학대학

(Received April 10 2001; Revised May 10, 2001)

### Action of Phospholipase A<sub>2</sub> in Histamine Release from Mast Cells

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

Division of Pathophysiology, College of Pharmacy, Chung Ang University

**Abstract** — To investigate whether phospholipase A<sub>2</sub> pathway is involved in histamine release of rat peritoneal mast cells, we measured histamine release in the presence of various enzyme inhibitors involved in eicosanoid pathway, such as phospholipase A<sub>2</sub>, cyclooxygenase and lipoxygenase. Phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors, manoalide and OPC, significantly inhibited histamine release induced by 100 μM ATP and 1 μg/ml compound 48/80. Cyclooxygenase inhibitors, ibuprofen and indomethacin, significantly inhibited ATP-induced histamine release and lipoxygenase inhibitors, baicalein and caffeic acid, also significantly inhibited. To investigate the involvement of protein kinase in ATP- and compound 48/80-induced histamine release, we observed effects of protein kinase inhibitors on histamine release. Bisindolmaleimide (protein kinase C antagonist) dose-dependently inhibited both ATP and compound 48/80-induced histamine release. Tyrosine kinase inhibitors (methyl 2,5-dihydroxy cinnamate and genistein) dose-dependently inhibited ATP and compound 48/80-induced histamine release. Protein kinase C and tyrosine kinase seem to be involved in histamine release induced by ATP and compound 48/80. These results suggest that phospholipase A<sub>2</sub> pathway as well as protein kinase C and tyrosine kinase are involved in histamine release of rat peritoneal mast cells by ATP and compound 48/80.

**Keywords** □ Phospholipase A<sub>2</sub>, protein kinase, mast cells, histamine release

비만세포는 외적인 자극에 염증 매개 물질을 분비하는 특이하게 분화된 분비 세포이다. 비만세포에서 염증매개 물질의 분비가 세포내 칼슘 농도의 증가와 매우 밀접한 관련성이 있다는 것은 수많은 보고된 바 있다.<sup>1-3)</sup> 복강비만세포에서 ATP에 의한 histamine 유리는 세포내 Ca<sup>2+</sup> 유리와 세포외 Ca<sup>2+</sup> 유입 모두 관여하고 있으며 이러한 세포외 Ca<sup>2+</sup>의 유입은 voltage-dependent calcium channel과 receptor-oper-

ated calcium channel 모두를 통해 일어나며, 한편 compound 48/80에 의한 histamine 유리에는 세포외 Ca<sup>2+</sup>의 유입과 연관성이 있으며 이는 voltage-dependent calcium channel이 아닌 receptor-operated calcium channel을 통해 이루어지고 있다는 보고가 있다.<sup>4)</sup> histamine을 유리하는 ATP와 compound 48/80은 비만세포에서 세포내 칼슘 증가 뿐만 아니라 여러 가지 이차전령물질을 생성하는 phospholipase를 통해서 작용한다는 보고도 있다. 비만세포에서 histamine의 탈과립 과정에는 protein kinase C의 활성화와,<sup>5,6)</sup> tyrosine kinase의 활성화가<sup>7-9)</sup> 관여한다는 보고가 있

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

으며, phospholipase C,<sup>10)</sup> phospholipase A<sub>2</sub>,<sup>11)</sup> 및 phospholipase D<sup>12)</sup>의 활성화도 관여하고 있다는 보고가 있다. 일반적으로 비만세포에서 histamine의 강력한 유리제인 compound 48/80은 주로 phospholipase C를 통해 작용하는 것으로 알려져 있다.<sup>13)</sup> 또한 ATP도 복강비만세포에서 농도 의존적으로 histamine과 prostaglandin D<sub>2</sub>를 유리시킨다는 보고로 미루어 볼 때<sup>14)</sup> ATP도 phospholipase A<sub>2</sub>를 통해 작용할 가능성을 제시하여 준다. 그러므로 이 연구에서는 비만세포에서 histamine 유리과정에 phospholipase A<sub>2</sub>와 protein kinase C 및 tyrosine kinase의 관여성을 규명하며, phospholipase A<sub>2</sub>에 의해 생성되는 arachidonic acid 대사산물들의 영향을 관찰하기 위하여 cyclooxygenase와 lipoxygenase 억제제들의 영향도 관찰하였다.

### 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, bisindolmaleimide, genistein, methyl 2,5-dihydroxycinnamate, manoalide, oleyloxyethyl phosphorylcholine, caffeic acid, baicalin, ibuprofen, indomethacin은 Sigma Chemical 회사로부터 구입하였다.

**비만세포의 분리** - 흰쥐를 ether 마취하여 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>15)</sup> 분리한 비만세포는 Krebs 용액을 이용하여 10<sup>5</sup> cells/ml로 분산시켜 histamine 유리 실험에 사용하였다.

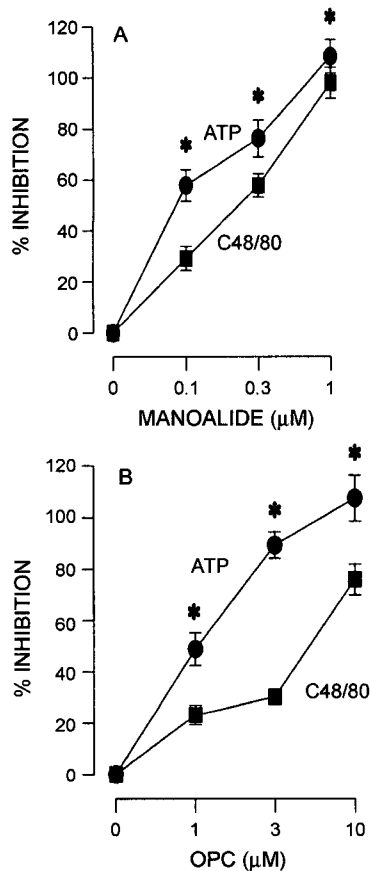
**Histamine 정량** - 분리한 비만세포를 각 tube에 1 ml 씩 소분하고 여러 가지 길항제와 억제제를 5 분간 전처리한 후 100 μM ATP나 1 μg/ml compound 48/80을 처리하고 37°C에서 10분간 배양하며 histamine을 유리시켰다. 배양이 끝난후 원심분리를 통해

상층액과 세포를 분리하였고, 세포는 초음파분쇄기를 이용하여 균질화시킨후 1% OPT(o-phthaldialdehyde) 시약을 이용하여 histamine을 형광분석하였다. 형광 측정은 fluorospectrophotometer(FL600, Microplate Fluorescence Reader, Bio-Tek)를 이용하였으며 excitation은 355 nm에서 emission은 455 nm에서 측정하였다.<sup>16)</sup> ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리는 % release  $[A/(A+B) \times 100$ ; A: histamine amount in supernatant; B: histamine amount in pellet]로 표기하였으며 여러 가지 길항제나 억제제의 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

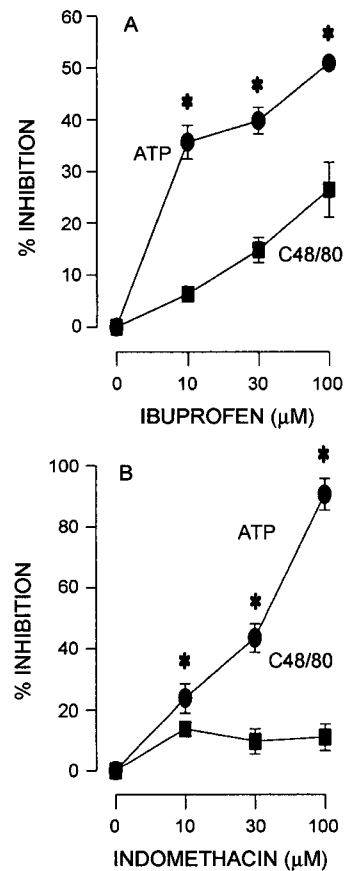
**Phospholipase A<sub>2</sub> 억제제가 histamine 유리에 미치는 영향** - compound 48/80(1 μg/ml)과 ATP(100 μM)는 복강 비만세포에서 각각 65%와 31%로 유의하게 histamine 유리를 일으켰다. 이러한 compound 48/80과 ATP에 의한 histamine 유리 과정에 phospholipase A<sub>2</sub>가 관여하는 지를 알아보기 위하여 phospholipase A<sub>2</sub> 억제제인 manoalide, oleyloxyethyl phosphorylcholine(OPC)을 전처리하였다. Manoalide와 OPC는 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine의 유리를 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 1). manoalide는 1 μM에서 ATP에 의한 histamine 유리를 108.4% 억제하였으며 compound 48/80에 의한 유리는 98.1% 억제하였다. 10 μM OPC는 ATP는 107.4%, compound 48/80은 76.1% 각각 억제하였다. phospholipase A<sub>2</sub> 억제제가 비만세포에서 anti-IgE에 의한 histamine 유리를 억제한다는 보고된 바 있다.<sup>17)</sup> 이러한 결과로 미루어 볼 때 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리과정에는 phospholipase A<sub>2</sub>가 깊이 관여하고 있음을 제시하여 준다. 그러나 이 실험에서 ATP와 compound 48/80이 직접적으로 phospholipase A<sub>2</sub>를 활성화시킨다고 결론을 내릴 수는 없는 상태이다. 왜냐하면 phospholipase C를 통한 protein kinase C가 이차적으로 phospholipase A<sub>2</sub>나



**Fig. 1** – Effect of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor on histamine release induced by ATP (100 μM) and compound 48/80 (C<sub>48/80</sub>, 1 μg/ml). Manoilide (A) and OPC (B) inhibited ATP- and C<sub>48/80</sub>-induced histamine release in a dose dependent manner. Results indicate means ± SE from 5 separate experiments. \*significantly different from C<sub>48/80</sub>-induced histamine release (P<0.05).

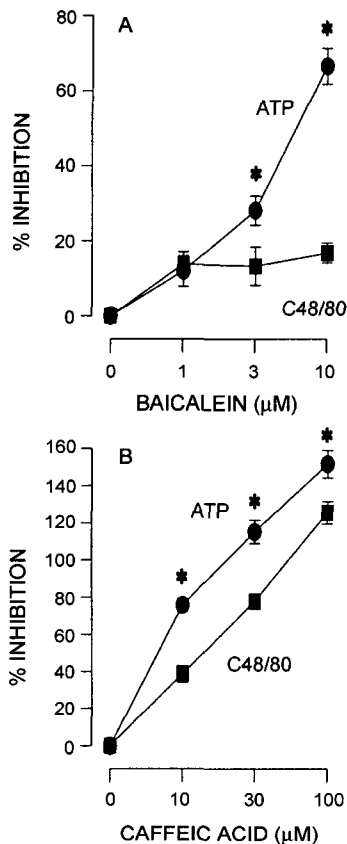
D를 활성화시킨다는 보고가 있기 때문이다.<sup>18)</sup> 이러한 보고로 미루어 볼 때 compound 48/80은 phospholipase C를 활성화시키는 것으로 알려져 있는데 compound 48/80에 의한 histamine 유리가 phospholipase A<sub>2</sub> 억제제에 의해 차단되는 것은 위에서 언급한 기전을 통해 이루어진 것으로 사료된다. 이에 대한 연구는 앞으로 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

**Cyclooxygenase와 lipoxygenase 억제제가 histamine 유리에 미치는 영향** – phospholipase A<sub>2</sub>에 의해 생성되는 arachidonic acid는 세포내에서 cyclooxygenase(COX)와 lipoxygenase(LOX)에 의해 강력한 생물학적 활성을 갖는 eicosanoid 복합체를 형성한다.



**Fig. 2** – Effect of cyclooxygenase inhibitor on histamine release induced by ATP (100 μM) and compound 48/80 (C<sub>48/80</sub>, 1 μg/ml). Ibuprofen (A) and indomethacin (B) dose-dependently inhibited ATP-induced histamine release, whereas indomethacin did not affect C<sub>48/80</sub>-induced histamine release. Results indicate means ± SE from 5 separate experiments. \*significantly different from C<sub>48/80</sub>-induced histamine release (P<0.05).

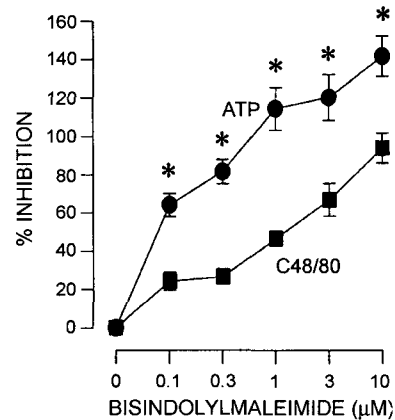
이들 eicosanoid들이 비만세포에서 histamine의 유리에 관여하는 지를 관찰하기 위하여 COX와 LOX 억제제를 처리하였다. COX 억제제인 ibuprofen과 indomethacin은 ATP에 의한 histamine의 유리는 농도 의존적으로 억제하였으나, compound 48/80에 의한 histamine 유리에 있어서 ibuprofen은 유의하게 억제하였으나 indomethacin은 별 다른 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2). LOX 억제제인 baicalein과 caffeic acid도 ATP에 의한 histamine 유리는 농도 의존적으로 억제하였으나 compound 48/80에 의한



**Fig. 3** – Effect of lipoxygenase inhibitor on histamine release induced by ATP (100 μM) and compound 48/80 (C<sub>48/80</sub>, 1 μg/ml). Baicalein (A) and caffeic acid (B) dose-dependently inhibited ATP-induced histamine release, whereas baicalein did not affect C<sub>48/80</sub>-induced histamine release. Results indicate means ± SE from 5 separate experiments. \*significantly different from C<sub>48/80</sub>-induced histamine release (P<0.05).

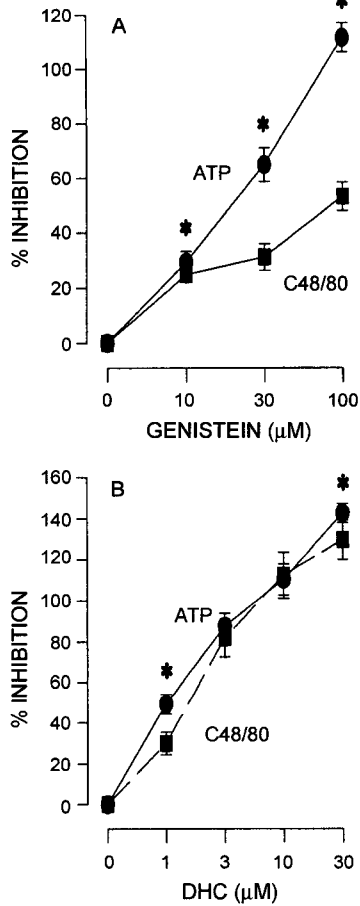
histamine 유리에 있어서는 baicalein의 억제효과는 나타나지 않았다(Fig. 3). 지금까지 보고된 바에 따르면 COX 억제제로 알려진 non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAID)가 histamine 유리에 미치는 영향에 대해서는 논란의 여지가 많이 있다. 이들 NSAID들은 복강비만세포나 사람의 중성구 세포에서 histamine의 유리를 억제한다는 보고도 있으나,<sup>19-21)</sup> 반대로 효과를 나타내지 않는다는 보고도 있다.<sup>22)</sup> 그러나 이 실험 결과로 미루어 볼 때 복강비만세포에서 ATP에 의한 histamine의 유리과정에서는 COX와 LOX에 의한 eicosanoid 모두가 깊이 관여하고 있음을 알 수 있다.

#### Protein kinase 억제제가 histamine 유리에 미치



**Fig. 4** – Effect of protein kinase C inhibitor on histamine release induced by ATP (100 μM) and compound 48/80 (C<sub>48/80</sub>, 1 μg/ml). Bisindolmaleimide inhibited ATP- and C<sub>48/80</sub>-induced histamine release in a dose dependent manner. Results indicate means ± SE from 5 separate experiments. \*significantly different from C<sub>48/80</sub>-induced histamine release (P<0.05).

는 영향 – histamine 유리에 관여하는 protein kinase의 종류를 알기 위하여 여러 가지 protein kinase 억제제를 처리하여 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리의 변화를 관찰하였다. protein kinase C 억제제인 bisindolmaleimide는 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리를 농도의존적으로 억제하였다. 이러한 bisindolmaleimide의 억제효과는 10 μM에서 ATP에서는 141.9%, compound 48/80에서는 93.9%로 ATP에 의한 histamine 유리를 더 강력하게 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4). Tyrosine kinase 억제제로 알려진 genistein과 DHC도 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리를 농도의존적으로 억제하였다. genistein(100 μM)은 ATP에 의한 histamine 유리를 111.7%, compound 48/80에 의한 유리는 53.3% 각각 억제하였다. 또한 DHC도 각각 142.7%와 129.7%로 ATP에 의한 histamine 유리에 더 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이미 protein kinase C와 tyrosine kinase가 물질분비 뿐만 아니라 평활근 수축과정에 깊이 관여하고 있다고 알려져 있다.<sup>5-9)</sup> ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리 과정에서도 protein kinase C와 tyrosine kinase가 깊이 관여하고 있음을 알 수 있다.



**Fig. 5** – Effect of tyrosine kinase inhibitor on histamine release induced by ATP (100 μM) and compound 48/80 (C<sub>48/80</sub>, 1 μg/ml). Genistein (A) and DHC (B) inhibited ATP- and C<sub>48/80</sub>-induced histamine release in a dose dependent manner. Results indicate means ± SE from 5 separate experiments. \*significantly different from C<sub>48/80</sub>-induced histamine release (P<0.05).

### 결 론

복강비만세포에서 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리과정에 protein kinase C와 tyrosine kinase가 관여하고 있으며, 이들 두 작동제에 의한 histamine 유리과정에는 phospholipase A<sub>2</sub> 경로가 깊이 관여하고 있는 것을 보여 주고 있다.

### 문 헌

1) Botana, L. M., Alfonso, A., Botana, M. A., Vиейtes,

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).

2) Ishizuka, Y. and Nozawa, Y. : Concerned stimulation of PI-turnover, Ca<sup>2+</sup>-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 D<sub>2</sub>. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **50**(6), 357 (1994).

4) 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. *Yakhakhoeji*, **45**, 282 (2001).

5) Ozawa, K., Szallasi, Z., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Mischak, H., Mushinski, J. F. and Beaven, M. A. : Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent isozymes of protein kinase C mediate exocytosis in antigen-stimulated rat basophilic RBL 2H3 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 1749 (1993).

6) Kawakami, Y., Yao, L., Tashiro, M., Gibson, S., Mills, G. B. and Kawakami, T. : Activation and interaction with protein kinase C of a cytoplasmic tyrosine kinase, Itk/Tsk/Emt, on FcεRI cross-linking on mast cells. *J. Immunol.* **155**, 3556 (1995).

7) Deanin, G. G., Martinez, A. M., Pfeiffer, J. R., Gardner, M. E. and Oliver, J. M. : Tyrosine kinase-dependent phosphatidylinositol turnover and functional responses in the FcεRI signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 551 (1991).

8) Paolini, R., Jouvin, M-H. and Kinet, J-P. : Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature*, **353**, 855 (1991).

9) Adamczewski, M., Paolini, R. and Kinet, J. P. : Evidence for two distinct phosphorylation pathways activated by high affinity immunoglobulin E receptors. *J. Biol. Chem.* **267**, 18126 (1992).

10) Atkinson, T. P., Kaliner, M. A. and Hohman, R.

- J. : Phospholipase C-gamma 1 is translocated to the membrane of rat basophilic leukemia cells in response to aggregation of IgE receptors. *J. Immunol.* **148**, 2194 (1992).
- 11) Nakamura, T. and Ui, M. : Simultaneous inhibitions of inositol phospholipid breakdown, arachidonic acid release, and histamine secretion in mast cells by islet-activating protein, pertussis toxin. *J. Biol. Chem.* **260**, 3584 (1985).
  - 12) Garcia-Gil, M. and Siraganian, R. P. : Phospholipase A<sub>2</sub> stimulation during cell secretion in rat basophilic leukemia cells. *J. Immunol.* **13**, 259 (1986).
  - 13) 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).
  - 14) Jaffar, Z. H. and Pearce, F. L. : Histamine secretion from mast cells stimulated with ATP. *Agents Actions* **30**(1-2), 64 (1990).
  - 15) Knudsen, T. and Johansen, T. : Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump activity in rat peritoneal mast cells inhibition by extracellular calcium. *Br. J. Pharmacol.* **96**, 773 (1989).
  - 16) 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).
  - 17) Varsani, M. and Pearce, F. L. : Role of phospholipase A<sub>2</sub> in mast cell activation. *Inflamm. Res.* **46 Suppl 1**, S9 (1997).
  - 18) Balsinde, J., Balboa, M. A., Insel, P. A. and Dennis, E. A. : Differential regulation of phospholipase D and phospholipase A<sub>2</sub> by protein kinase C in P388D1 macrophages. *Biochem. J.* **321**(Pt 3), 805 (1997).
  - 19) Champion, G. D., Day, R. O. and Wade D. N. : The effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on adenosine triphosphate content and histamine release from rat peritoneal cell suspensions rich in mast cells. *Br. J. Pharmacol.* **59**, 29 (1977).
  - 20) Conroy, M. C. and DeWeck, A. L. : Effects of aspirin and indomethacin on histamine release from leukocytes of patients with suspected intolerance to aspirin. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **66**, 152 (1981).
  - 21) Lewis, G. P. and Whittle, B. J. R. : The inhibition of histamine release from rat peritoneal mast cells by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its reversal by calcium. *Br. J. Pharmacol.* **61**, 229 (1977).
  - 22) Ranadive, N. S. and Lewis, R. : Effects of antioxidants and indomethacin on compound 48/80 induced histamine release and Ca<sup>2+</sup>-uptake in mast cells. *Fed. Proc.* **40**, 1115 (1981).