

메틸유제놀에 의한 즉시형 과민 반응의 억제

김창영 · 신태용* · 김형민[#]

원광대학교 약학대학, *우석대학교 약학대학

(Received February 17, 1997)

Suppression of Immediate Hypersensitivity by Methyleugenol

Chang-Young Kim, Tae-Yong Shin* and Hyung-Min Kim[#]

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

*College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

Abstract—We studied the action of methyleugenol on immediate hypersensitivity. Methyleugenol completely inhibited systemic anaphylaxis induced by compound 48/80 in mice. Methyleugenol also inhibited local anaphylaxis induced by anti-dinitrophenyl (DNP) IgE. Moreover, methyleugenol dose-dependently inhibited histamine release in peritoneal mast cells activated by compound 48/80 or anti-DNP IgE. These results suggest that the inhibitory effect of methyleugenol on anaphylaxis induced by compound 48/80 or anti-DNP IgE is due to, in part at least, the membrane stabilization of mast cells.

Keywords □ Methyleugenol, Anaphylaxis, Compound 48/80, Anti-dinitrophenyl (DNP) IgE, Histamine, Mast cells.

비만세포는 알레르기 반응 중에 일어나는 다양한 생리적 변화에 결정적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.¹⁻⁴⁾ 비만세포의 탈과립 반응에 의하여 분비되는 많은 화학적 매개 물질중에서 히스타민은 가장 강력한 물질로서 즉시형 알레르기 반응을 주도한다.⁵⁾ 비만세포로부터 탈과립을 유도하는 방법에는 비만세포 표면의 IgE 수용체 (FcεRI)에 IgE 항체와 다가 항원의 결합에 의한 면역학적 자극법과, compound 48/80, substance P, 렉틴 (lectin), anaphylatoxin 등에 의한 비면역학적 자극법이 있다. 또한 칼슘이온 운반체, 폴리믹신 B, 코데인, 몰핀 등의 약제도 비만세포를 직접 활성화 할 수 있다.⁶⁻¹⁰⁾ 이러한 비만세포의 탈과립을 유발하는 자극에 의하여 세포내 과립에 저장되어 있는 화학적 매개물질들이 유리되는데 이러한 물질중 히스타민은 가장 빠르게 유리되어 말초혈관에 대한 투과성 항진과 확장작용, 기관지

평활근에 대한 수축작용, 점막표면에 대한 선세포의 분비 항진 작용 등을 나타내어 즉시형 과민반응 및 만성 염증반응을 일으킨다. 가장 잘 알려진 강력한 히스타민 유리 촉진제로는 기본 아미노산 중합체인 compound 48/80과 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 합성을 촉진하여 염증유도하는 substance P가 있다.¹¹⁾ 메틸유제놀은 세신 (*Asarum heterotropoides mandshuricum*) 등 식물의 주성분으로 진통작용, 진정작용, 해열작용 및 항염증 작용이 알려져 있다.¹²⁾ 그러나 메틸유제놀의 과민반응에 대한 효과는 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 compound 48/80에 의한 전신성 아나필락시 반응과 anti-DNP IgE를 이용한 국소성 아나필락시 반응을 실험적으로 유발시켜 메틸유제놀이 즉시형 과민반응에 미치는 영향을 분석하였다.

실험방법

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0653-50-6805 (팩스) 0653-843-3421

시약 및 기기 - Anti-dinitrophenyl-IgE, DNP-

human serum albumin (HSA), metrizamide, methyleugenol은 Sigma 회사 (ST. Louis, MO)로부터 구입하였다. α -minimal essential medium (α -MEM)은 Flow Laboratories (Irvine, UK)에서, fetal calf serum (FCS)은 Gibco Laboratories (Grand Island, NY)에서 구입하였다. 기기는 Spectrofluorometer (Kontron, Germany)를 사용하였다.

실험동물 - ICR계 생쥐와 Wistar계 흰쥐는 삼육 실험동물센터 및 화학 연구소에서 구입하여 원광대학교 약학대학 동물 실험실에서 유지시켜 실험에 이용하였다.

전신성 아나필락시 시험 - 메틸유제놀은 Compound 48/80 (8 mg/Kg, 체중) 투여하기 60 분전, 5 분후 및 10 분후에 복강내에 주사하였다. 치사율은 아나필락시를 유발시킨후 60 분동안 관찰하여 결정하였다. 치사율의 관찰이 끝난 직후 생쥐의 심장에서 혈액을 취해 혈청을 분리하여 히스타민을 정량하였다.

수동 피부 아나필락시 시험 - IgE 의존적 피부반응인 수동 피부 아나필락시 시험은 피부에 anti-DNP IgE (100 μ g)를 피내 주사한 48 시간 후에 흰쥐의 꼬리 정맥에 DNP-HSA (1 mg)와 4% Evans blue (1:4)를 주사하여 일으켰다.⁴⁾ 약 30 분후에 흰쥐를 마취시킨후 피내 주사한 피부를 절개하여 염색된 부위의 Evans blue의 양을 측정하였다.¹³⁾

복강 비만세포 분리 - Kanemoto 등¹⁴⁾의 방법에 준하여 흰쥐 복강 비만세포를 분리하였다. 간단히 설명하면 생쥐를 에테르로 마취시킨 후 0.1% gelatin을 함유한 Tyrode buffer B (NaCl, NaHCO₃, KCl, NaH₂PO₄, glucose) 약 20 ml를 복강내에 주입하고 30 초간 복벽을 가볍게 맞사지한 후 복벽 중앙선을 조심스럽게 절개하여 복강세포를 함유한 세척액을 파스퇴르 피펫으로 채취하였다. 복강세포를 150×g로 10 분간씩 3회 반복하여 원침시킨 후 상층 부유액을 버리고 동일 Tyrode buffer B로 재부유시켰다. 이 세포부유액중 비만세포는 22.5% w/v metrizamide를 이용하여 Yurt 등¹⁵⁾의 방법으로 분리 정제하였다.

히스타민 정량 - 세포배양 상층액 및 혈청 중에 있는 히스타민의 정량은 Shore 등¹⁶⁾의 방법으로 하였다. 간단히 설명하면 에펜돌프 튜브에 시료 500 μ l를 넣고 0.1 N-HCl 450 60% 과염소산 용액 50 μ l를 넣고 혼합 후 원심분리 (1,500 rpm, 20 min)하여 그 상층액 800 μ l를 5 N-NaOH 용액 500 μ l, 증류수 3 ml, *n*-Butanol 10 ml 및 NaCl 1.2 g을 혼합한 시험관에 넣고 진

탕 후 원심분리 (2,000 rpm, 10 min)하였다. Butanol층 8 ml를 50 ml 시험관에 넣고 0.1 N-HCl 용액 3 ml, *n*-Heptane 10 ml를 가하여 진탕 후 원심분리 (2,000 rpm, 10 min)하였다. 여기에서 얻어진 수층 2 ml에 1 N-NaOH 용액 400 μ l와 1% *o*-Phthalaldehyde 용액 100 μ l를 넣고 수욕상 (37°C)에서 3 분동안 반응시킨다음, 3 N-HCl 용액 200 μ l를 넣고 혼합 후 2 분 동안 방치하여 spectrofluorometer (λ ex = 360 nm, λ em = 440 nm)로 형광도를 측정하였다.

히스타민 유리 억제율(%)은 다음과 같이 계산하였다. 억제율 (%) = (약물을 부가하지 않았을 때의 히스타민양 - 약물을 부가하였을 때의 히스타민양) × 100 / 약물을 부가하지 않았을 때의 히스타민 양

통계학적 분석 - 실험 결과는 mean \pm S.E.로 표시하였으며, student's t-test를 실시하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

전신성 아나필락시 시험 - 즉시형 과민반응에 대한 메틸유제놀의 효과를 평가하기 위하여 맨 먼저 전신성 아나필락시 모델을 사용하였다. 전신성 아나필락시 유도제는 비면역학적 자극 물질인 compound 48/80을 사용하였다. 치사율은 compound 48/80 (8 μ g/g, 체중)을 주사한 후 1 시간동안 관찰하여 결정하였다. Table I에 보인 바와 같이 생리식염수나 메틸유제놀 (0.1 μ l/g, 체중)만을 투여한 군(n=9)에서는 생존율 100% 이었고, compound 48/80만을 투여한 군 (n=9)에서는 치사율이 100% 이었다. Compound 48/80을 투여하기 1 시간

Table I—Effect of methyleugenol on systemic anaphylaxis after a single administration of compound 48/80

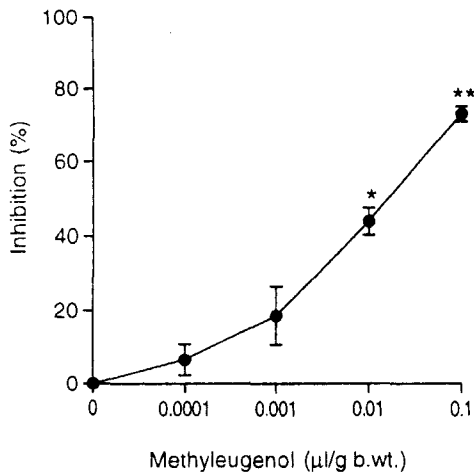
Treatment	Compound 48/80	Mortality (%)		
		1 hr before	5 min later	10 min later
None	+	100	100	100
Methyleugenol	+	0	0	75
Methyleugenol	-	0	0	0

Saline (200 μ l) or methyleugenol (0.1 μ l/g, b.wt) was given at 60 min before or 5 min, 10 min after (n=3/group) compound 48/80 injection. Compound 48/80 solution (8 μ g/g) were intraperitoneally given to the group of mice. Mortality (%) within 60 min following compound 48/80 injection was represented as No. of dead mice \times 100 / No. of total experimental mice.

Table II—Dose-dependent effect of methyleugenol on compound 48/80-induced systemic anaphylaxis

Methyleugenol addition ($\mu\text{l/g}$)	Mortality (%)
None	100
0.1	0
0.01	0
0.001	75
0.0001	100

Group of mice intraperitoneally pretreated with saline (200 μl) or methyleugenol was given at 60 min before ($n=3/\text{group}$) compound 48/80 injection. Compound 48/80 solution (8 $\mu\text{g/g}$) were intraperitoneally given to the group of mice. Mortality (%) within 60 min following compound 48/80 injection was represented as No. of dead mice \times 100/No. of total experimental mice.

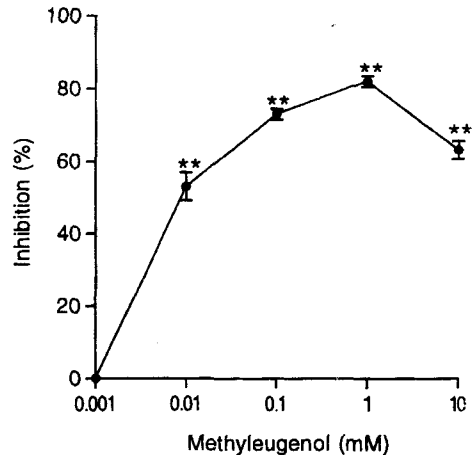
**Fig. 1**—Effect of methyleugenol on serum histamine release after compound 48/80 injection. Methyleugenol was given with 0.1 $\mu\text{l/g b.wt.}$ at 60 min before compound 48/80 injection. Groups of mice were intraperitoneally administered with 200 μl of saline or methyleugenol. Compound 48/80 solution (8 $\mu\text{g/g b.wt.}$) was intraperitoneally given to the group of mice. Each value indicates mean \pm S.E. ($n=3$). * $p<0.005$. ** $p<0.001$.

전 및 5 분 후에 메틸유제놀 (0.1 $\mu\text{l/g}$, 체중)을 복강내 투여한 군은 치사율 0% 이었으며, 10 분 후에 투여한 군에서는 치사율이 75% 이었다. 메틸유제놀은 농도 의존적으로 전신성 아나필락시를 억제하였다 (Table II). Compound 48/80은 비만세포막에 작용하여 탈과립을 유도하는 물질로 생체내에 투여할 때 비만세포로부터 histamine 등을 유리시켜 아나필락시를 일으킨다. 전신

Table III—Effect of methyleugenol on the 48-hrs Passive cutaneous anaphylaxis in mice

Methyleugenol addition ($\mu\text{l/g}$)	Amount of dye ($\mu\text{g/site}$)	Inhibition (%)
None	15.630 \pm 0.02509	-
0.2	6.966 \pm 0.01152	55.4
0.1	2.869 \pm 0.00474*	81.6
0.01	2.399 \pm 0.00397*	84.6

Drug was administered orally 1 hr prior to challenge with antigen. Each amount of dye represents the mean \pm S.E. of 4 experiments. * $p<0.001$.

**Fig. 2**—Effect of methyleugenol on compound 48/80-induced histamin release from rat peritoneal mast cells. Rat peritoneal mast cells (2×10^5 cells/ml) were pretreated with saline or methyleugenol for 10 min. Compound 48/80 solution (5 $\mu\text{g/ml}$) were added to the rat peritoneal mast cell suspension pretreatment with the above agents. Each value indicates mean \pm S.E. ($n=3$). ** $p<0.001$.

성 아나필락시에 대한 메틸유제놀의 효과가 분명하기 때문에 그 작용기작을 규명할 필요가 있다.

혈청중 히스타민 유리억제 시험— 메틸유제놀 (0.1 $\mu\text{l/g}$, 체중) 투여에 의하여 전신성 아나필락시를 완벽하게 억제하기 때문에 혈청중 히스타민양의 변화를 측정하여 메틸유제놀의 효과를 평가하였다. Compound 48/80을 투여하기 1 시간 전에 메틸유제놀을 복강내에 투여하고 15 분 후에 즉시 채혈하여 히스타민양을 측정하였다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 혈청중 히스타민 유리는 메틸유제놀 농도 의존적으로 억제되었다. 이러한 결과는 메틸유제놀에 의한 compound 48/80에 의해 유도된 전신성 아나필락시반응의 억제는 메틸유제놀이 히스타민 등 화학적 매개물질의 유리를 억제한 결과로 사료된다.

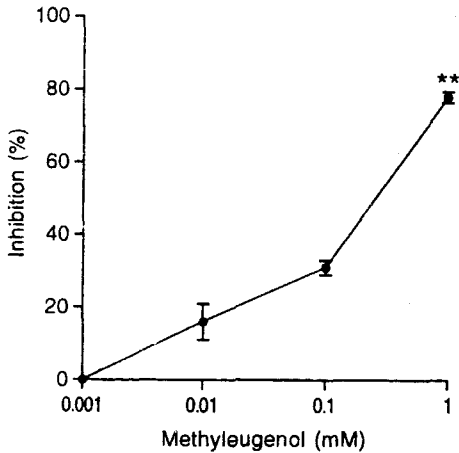


Fig. 3 — Effect of methyleugenol on histamin release from RPMC passively sensitized with anti-DNP-IgE antibody. Methyleugenol was added 24 hr before the challenge. Each value indicates mean±S.E. (n=6) **p<0.001.

수동 피부 아나필락시 시험 - Table III에 나타낸 바와 같이 메틸유제놀의 경구투여에 의해 수동 피부 아나필락시 반응이 농도의존적으로 억제되었다. 수동 피부 아나필락시는 I형 즉시형 알레르기 반응의 대표적인 실험 모델이다. 메틸유제놀은 비만세포에 의하여 매개되는 수동 피부 아나필락시 반응도 억제하는 것을 의미한다.

비만세포로부터 히스타민 유리 억제 시험 - 메틸유제놀에 흰쥐의 복강 비만세포에 미치는 영향을 분석하기 위하여 compound 48/80 처리 10 분 전에 메틸유제놀을 처리하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 메틸유제놀은 용량 의존적으로 복강 비만세포로부터 히스타민의 유리를 억제시켰다. 또한 비만세포를 anti-DNP IgE로 감작하고, DNP-HSA를 처리하여 야기하면 비만세포내에 있는 화학적 매개물질이 방출되었다. 메틸유제놀을 DNP-HSA로 야기하기전에 처리하였을때 비만세포로부터 히스타민 방출이 현저하게 억제되었다 (Fig. 3). 이러한 결과들은 메틸유제놀이 생체내에 있는 비만세포막을 안정화시켜 히스타민의 방출을 억제하므로써 compound 48/80 혹은 anti-DNP IgE로 유도된 아나필락시를 억제하는 것을 의미한다.

감사의 말씀

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비 (유전공학)에 의하여 연구되었음

문헌

- 1) Kim, H. M., Hirota, S., Chung, H. T., Ohno, S., Osada, S., Ko, K. I., Kim, J. B., Kitamura, Y. and Nomura, S. : 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 (1994).
- 2) Dombrowicz, D., Flamand, V., Brigman, K. K., Koller, B. H. and Kinet, J. P. : Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor α chain gene. *Cell* **75**, 969 (1993).
- 3) Martin, T. R., Ando, A., Takeishi, T., Katona, I. M., Drazen, J. and Galli, S. J. : Mast cells contribute to the changes in heart rate, but not hypotension or death, associated with active anaphylaxis in mice. *J. Immunol.* **151**, 367 (1993).
- 4) Lee, Y. M., Kim, D. K., Kim, S. H., Shin, T. Y. and Kim, H. M. : Antianaphylactic activity of Poncirus trifoliata fruit extract. *J. Ethnopharmacol.* **54**, 77 (1996).
- 5) Petersen, L. J., Mosbech, H. and Skov, P. : 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 (1996).
- 6) Tasaka, K., Mio, M. and Okamoto, M. : Intracellular calcium release induced by histamine release and its inhibition by some antiallergic drugs. *Ann. Allergy.* **56**, 464 (1986).
- 7) Chand, N., Pillar, J., Diamantis, J., Perhach, J. R. and Duane Sofia, R. : Inhibition of calcium ionophore (A23187) stimulated histamine release from rat peritoneal mast cells by azelastine : Implications its mode. *Eur. J. Pharmacol.* **96**, 227 (1983).
- 8) Takei, M., Umeyama, A., Shoji, N., Arihara, S. and Endo, K. : Mechanism of inhibition of IgE dependent histamine release from rat mast cells by penasterol and penasterone. *J. Pharm. Sci.* **84**, 223 (1995).
- 9) Ohmori, Y., Mo, M., Kishi, M., Mizutani, M.,

- Katada, T. and Konishi, H. : Antiallergic constituents from Oolong Tea Stem. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 683 (1995).
- 10) Baltzly, R., Buck, J. S., De Beer, E. J. and Webb, F. S. : A family of long acting depressors. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 1301 (1949).
- 11) Ansel, J. C., Brown, J. R., Payan, D. G. and Brown, M. A. : Substance P selectively activates TNF- α gene expression in murine mast cell. *J. Immunol.* **150**, 4478 (1993).
- 12) Huang, K. C. : *The Pharmacology of Chinese Herbs*, 1st ed., CRC Press, Inc., Florida, p. 145 (1993).
- 13) Katayama, S., Shionoya, H. and Ohtake, S. : A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.* **22**, 89 (1978).
- 14) Kanemoto, T., Kasugai, T., Yamatodani, A., Ushio, H., Mochizuki, T. K., Kimura, M., Nishimura, M. and Kitamura, Y. : Supernormal histamine release and normal cytotoxic activity of beige rat mast cells with giant granules. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **100**, 99 (1993).
- 15) Yurt, R. W., Leid, R. W. and Austen, K. F. : Native heparin from rat peritoneal mast cell. *J. Biol. Chem.* **252**, 518 (1977).
- 16) Shore, P. A., Burkhalter, A. and Cohn, V. H. : A method for fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127**, 182 (1959).