

스피루리나 플라텐시스에 의한 즉시형 과민반응의 억제 효과

김형민* · 송호준** · 신민교** · 신태용*

*원광대학교 약학대학, **원광대학교 한의과대학, 우석대학교 약학대학

(Received July 14, 1997)

Inhibitory Effect of Immediate Hypersensitivity by *Spirulina platensis*

Hyung-Min Kim*, Ho-Joon Song**, Min-Kyo Shin** and Tae-Yong Shin*

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

**College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

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

Abstract—We studied the effects of the powders of *Spirulina platensis* (SPP) on anaphylactic reactions. SPP inhibited systemic anaphylaxis induced by compound 48/80 in rats. SPP also inhibited local anaphylaxis activated by anti-dinitrophenyl(DNP) IgE. Moreover, SPP dose-dependently inhibited histamine release in rat peritoneal mast cells activated by compound 48/80 or anti DNP-IgE. These results suggest that SPP may contain compounds with actions that inhibit mast cell degranulation in the rat.

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

비만세포는 아나필락시스와 알레르기 반응 중에 일어나는 다양한 생리적 변화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁷⁾ 비만세포의 탈과립 반응에 의해 분비되는 가장 강력한 화학적 매개물질인 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 촉진제는 N-methyl-p-methoxyphenylethylamine과 formaldehyde의 축합에 의해 생성된 compound 48/80⁹⁾이다. 고농도의 compound 48/80은 비만세포로부터 약 90%의 히스타민을 유리시키는 것으로 알려져 있으며 적당량의 compound 48/80은 아나필락시스 반응의 기전을 연구하기 위해 히스타민 유리 촉진제로서 가장 널리 사용되고 있다.^{10,11)} 비만세포의 탈과립을 유도하는 비만세포의 활성화는 비만세포의 표면에 있

는 IgE 수용체에 항원의 결합에 의해서도 일어나며¹²⁾ 이 때 항 IgE항체가 I형 과민반응의 대표적인 실험 모델인 수동 피부 아나필락시스(Passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 반응을¹³⁻¹⁵⁾ 유도한다.

스피루리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*)는 중국, 대만과 캘리포니아 등 햇볕이 풍부한 지역의 맑은 호수에서 자생하는 조류의 일종으로 지구상에서 약 3억년 이상 생존하고 있는 것으로 알려져 있으며 다양한 영양 성분과 생리활성 물질을 함유하고 있어 화학요법시 보조제, 수술 후 백혈구 감소 및 면역반응의 조절 등에 사용되고 있다.¹⁶⁾ 본 연구에서는 compound 48/80에 의해 유도된 전신성 아나필락시스와 항IgE 항체에 의한 피부 아나필락시스 반응에 미치는 스피루리나 플라텐시스의 효과를 검토하였다.

실험방법

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0652-290-1405 (팩스) 0652-290-1400

시약 및 기기 - *Spirulina platensis*(SPP) 분말은

Spirin Pharmaceutical Factory(Yunnan, China)에서, compound 48/80, anti-dinitrophenyl(DNP) IgE, DNP-human serum albumin(HSA), *o*-phthaldialdehyde 및 metrizamide는 Sigma에서 구입하였다. α -minimal essential medium(α -MEM)은 Flow Laboratories에서, fetal calf serum(FCS)는 Gibco Laboratories에서 구입하였다. 기기는 spectrofluorometer(Kontron Co.), spectrophotometer(Waters Co.)를 사용하였다.

실험동물 - Wistar계 흰쥐는 화학연구소에서 구입하여 실험에 사용할 때까지 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$ 로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 사육하였다.

Compound 48/80에 의한 아나필락시스 - 비만세포의 탈과립제로 compound 48/80($8 \mu\text{g/g}$, 체중)을 흰쥐의 복강내에 주사하였으며, SPP는 생리식염수에 부유시킨 다음 compound 48/80을 주사하기 1시간 전에 흰쥐의 체중 g당 0.005 mg 에서 1.0 mg 까지 변화시키면서 복강내에 주사하였다. 치사율은 아나필락시스 속을 유발시킨 후 1시간 동안 관찰하였으며 관찰 후 흰쥐의 심장에서 채혈하였다.

수동 피부 아나필락시스 - IgE의존성 피부 반응은 한 마리의 흰쥐를 사용하여 등의 털을 제거한 후 anti-DNP IgE $100 \mu\text{g}$ 씩을 4곳의 부위에 각각 피하주사하여 감각시킨 다음 48시간 후에 흰쥐의 꼬리 정맥에 PBS로 조제한 DNP-HSA(1 mg)과 4% Evans blue(1:4)를 주사하여 항원 항체 반응을 야기시켰다. 주사 부위는 유성의 붉은색 잉크로 표시하였다. anti-DNP IgE로 감각시킨 비만세포를 DNP-HSA로 탈감작시키기 1시간 전에 SPP(0.1 mg/g , 0.5 mg/g , 체중)를 경구투여 하였고 30분 후에 흰쥐를 치사시켰다. Evans blue로 염색된 피부 부위를 잘라서 1.0M-KOH 1 ml 를 가하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 하룻밤 동안 방치하여 피부 조직을 용해시킨 다음 acetone과 $0.6\text{M-H}_3\text{PO}_4$ (5:13)의 혼합액 9 ml 를 가하여 진탕 추출한 후 Katayama¹⁷⁾ 등의 방법에 따라 620 nm 에서 색소량을 측정하였으며 Evans blue의 검량선을 작성하였다.

히스타민의 정량 - 혈청 중에 있는 히스타민은 Shore¹⁸⁾ 등의 방법에 따라 *o*-phthaldialdehyde로 히스타민을 형광유도체화시킨 후 $\lambda_{\text{ex}}=353 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=438 \text{ nm}$ 에서 상대형광강도를 측정하여 정량하였다. 이

를 간략히 서술하면 에펜들프 튜브에 시료 $500 \mu\text{l}$ 를 취하고 0.1M-HCl $450 \mu\text{l}$ 와 60% 과염소산 용액 $50 \mu\text{l}$ 를 혼합 후 원심 분리($400 \times \text{g}$, 20 min)하고 그 상정액 $800 \mu\text{l}$ 를 취해 5M-NaOH 용액 $500 \mu\text{l}$, 증류수 3 ml , *n*-butanol 10 ml 및 NaCl 1.2 g 을 혼합한 시험관에 넣고 진탕 후 원심분리($500 \times \text{g}$, 10 min)하였다. *n*-butanol층 8 ml 를 취하고 0.1M-HCl 3 ml , *n*-heptane 10 ml 를 가하여 진탕 후 원심분리($500 \times \text{g}$, 10 min)하였다. 여기에서 얻어진 수층 2 ml 에 1M-NaOH 용액 $400 \mu\text{l}$ 와 1% *o*-phthaldialdehyde 용액 $100 \mu\text{l}$ 를 가하고 37°C 수욕상에서 3분동안 반응시킨다음 3M-HCl 용액 $200 \mu\text{l}$ 를 가하여 혼합하고 2분 동안 방치한 후 $\lambda_{\text{ex}}=353 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=438 \text{ nm}$ 에서 형광광도를 측정하였다.

흰쥐 복강 비만세포의 분리 - Kanemoto¹¹⁾ 등의 방법에 따라 흰쥐 복강 비만세포를 분리하였다. 이를 간기하면 흰쥐를 에테르로 마취시킨 후 실온에서 Tyrode buffer B(137 mM NaCl , 2.7 mM KCl , 12 mM NaHCO_3 , $0.3 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 1.0 mM MgCl_2 , 1.0 mM CaCl_2 , 5.6 mM dextrose , 0.1% bovine serum albumin) 약 20 ml 를 복강내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 마사지하였다. 복벽 중앙선을 주의 깊게 절개하고 pasteur pipette로 복강 세척액을 채취하여 $150 \times \text{g}$ 에서 10분 동안 원심분리하여 상정액을 분리 제거한 후 비만세포 부유액을 Tyrode buffer B에 재부유 시켰다. 세포 부유액 중 비만세포는 22.5%(W/V) metrizamide를 이용하여 Yurt¹⁹⁾ 등의 방법으로 분리 정제하였다. 이를 간기하면 Tyrode buffer B 1 ml 에 재부유시킨 비만세포 부유액을 22.5%(W/V) metrizamide 2 ml 에 가하여 $400 \times \text{g}$ 에서 15분간 원심분리하였다. buffer-metrizamide 표면에 남아있는 세포를 여과 제거한 후 세척하여 Tyrode buffer A 1 ml 에 재부유 시켰다. Toluidine blue 염색 양성 비만세포는 약 95%이었다.

히스타민 유리의 억제 - 5% CO_2 incubator에서 미리 37°C 에서 10분간 배양시킨 복강 비만세포 부유액($1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$)에 SPP를 가하여 10분간 배양시킨 후 compound 48/80을 가해 다시 10분 동안 배양시켰다. anti-DNP IgE로 감각시킨 비만세포 부유액($1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$)은 DNP-HSA($1 \mu\text{g/ml}$)로 탈감작시키기 10분 전에 SPP를 첨가하였다.

히스타민 유리 억제제 - 히스타민 유리 억제제는

다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{히스타민 유리 억제율 (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A : SPP를 부가하지 않았을 때의 히스타민양

B : SPP를 부가하였을 때의 히스타민의 양

통계학적 분석 - 실험결과는 mean±S.E로 표시하였으며 Student's test에 의해 유의성을 검정하여 p<0.01인 결과를 얻었을 때 유의성이 있는 것으로 하였다.

실험결과 및 고찰

Compound 48/80에 의해 유도된 아나필락시스 반응에 미치는 SPP의 효과 - 즉시형 과민반응에 대한 SPP의 효과를 검토하기 위해 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시스를 유도하였다. compound 48/80은 비만세포의 탈과립을 유도할 때 가장 많이 사용되는 약물이며 비만세포의 세포질내 칼슘농도를 증가시켜 히스타민을 유리하는 물질이다. 치사율은 compound 48/80(8 µg/g, 체중)을 흰쥐에 주사한 후 1시간 동안 관찰하여 결정하였다. Table I에서와 같이 생리식염수 200 µl를 투여한 대조군(n=10)은 100%치사율을 나타내었다. 그러나 compound 48/80을 투여하기 1시간 전에 SPP를 0.005 mg/g(체중)에서 1.0 mg/g(체중)까지 변화시키면서 복강내 투여한 군에서는 치사율이 농도 의존적으로 감소하였으며 0.5 mg/g(체중)

Table I— Effects of SPP on compound 48/80-induced systemic anaphylaxis

SPP treatment (mg/g, body weight)	Compound 48/80 (8 µg/g, body weight)	Mortality(%)
None(Saline)	+	100
0.005	+	100
0.01	+	80
0.05	+	60
0.1	+	30
0.5	+	0
1.0	+	0
1.0	-	0

Rats intraperitoneally pretreated with saline (200 µl) or SPP was given at various doses 1 hr before (n=10/group) the compound 48/80 injection. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of rats. Mortality (%) within 1 hr following the compound 48/80 injection is expressed as the No. of dead rats×100/total No. of experimental rats.

이상을 투여한 군에서는 치사율이 0%였다. 따라서 SPP는 농도 의존적으로 전신성 아나필락시스를 억제함을 알 수 있었다.

혈청중 히스타민 유리에 미치는 SPP의 효과 - SPP(1.0 mg/g, 체중) 투여에 의해 전신성 아나필락시가 완전히 억제되므로 혈청 중 히스타민을 측정하여 SPP의 효과를 검토하였다. compound 48/80을 투여하기 1시간 전에 SPP를 복강내에 투여하였다(n=7). compound 48/80을 투여하고 15분 후에 심장에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 히스타민 양을 측정한 결과 Table II에서와 같이 SPP(1.0 mg/g, 체중) 투여에 의해 히스타민의 유리가 현저히 억제되었다(p<0.01). 이러한 결과는 SPP가 compound 48/80 투여에 의해 유도된 전신성 아나필락시스 반응을 억제하여 히스타민 등 화학적 매개물질의 유리를 억제하는 것으로 사료된다.

수동 피부 아나필락시세에 미치는 SPP의 효과 - 흰쥐의 등에 anti-DNP IgE를 피하 주사하고 48시간 후에 DNP-HSA와 Evans blue 혼합액을 꼬리 정맥에 주사하면 IgE 수용체(FcεRI)를 경유한 비만세포의 활성화가 일어난다. 이 때 비만세포에서 유리된 히스타민 등에 의해 모세혈관 투과성 항진과 확장작용으로 anti-DNP IgE 주사 부위에 Evans blue에 의한 청색반점이 나타난다. 이러한 PCA에 미치는 SPP의 영향을 검토하기 위하여 DNP-HSA와 Evans blue의 혼합액을 투여하기 1시간 전에 흰쥐에 SPP(0.1, 0.5 mg/g, 체중)를 경구투여 한 결과 Table III에서와 같이 수동 피부 아나필락시스 반응의 억제율이 각각 40.8% 및 68.7%였다(p<0.01). 이는 SPP가 비만세포에 의해 매개되는 수동 피부 아나필락시스 반응도 억제하는 것을 의미한다.

히스타민 유리에 미치는 SPP의 효과 - 흰쥐의 복강 비만세포에 미치는 SPP의 효과를 검토하기 위하여

Table II— Effects of SPP on compound 48/80-induced serum histamine release

SPP treatment (mg/g, body weight)	Compound 48/80 (8 µg/g, body weight)	Inhibition(%)
None(Saline)	+	0
1.0	+	62.7*

Group of rats were intraperitoneally pretreated with saline (200 µl) or SPP. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of rats. The drug was given 1 hr before (n=7/group) the compound 48/80 injection. *p<0.01:significantly different from the saline values.

Table III—Effects of SPP on the 48-hrs passive cutaneous anaphylaxis in rats

SPP treatment (mg/g. body weight)	Amount of dye ($\mu\text{g}/\text{site}$)	Inhibition(%)
None (Saline)	14.128 \pm 0.165	—
0.1	8.369 \pm 0.074*	40.8
0.5	4.425 \pm 0.046*	68.7

The drug was administered orally 1 hr prior to the challenge with antigen. Each amount of dye is presented as the mean \pm S.E. of four independent experiments (animal number=1).

*p<0.01: significantly different from the saline values.

compound 48/80을 투여하기 10분전에 SPP를 처리하였다. 또 비만세포를 anti-DNP IgE로 감작하고 DNP-HSA를 처리하기 전 SPP를 처리하였다. Fig. 1에서와 같이 SPP는 농도 의존적으로 compound 48/80에 의한 히스타민의 유리를 억제시켰으며 DNP-HSA를 처리하기 전 SPP를 처리하였을 때도 비만세포로부터 히스타민 방출이 현저히 억제되었다. 이는 SPP가 생체내의 비만세포막을 안정화시켜 히스타민의 방출을 억제함으로써 compound 48/80 또는 anti-

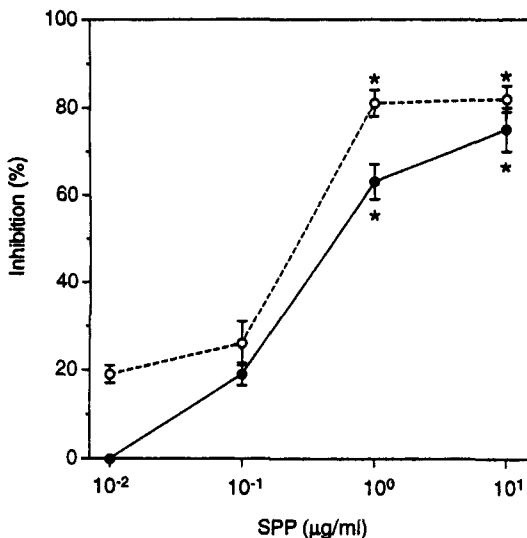


Fig. 1—Effects of SPP on compound 48/80-induced or IgE-mediated histamine release from RPMC. RPMC(1×10^5 cells/ml) were preincubated with the drug at 37°C for 10 min prior to incubation with compound 48/80(○) or prior to the challenge with DNP-HSA(●). Each data is presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments (animal number=1) *p<0.01: significantly different from the saline value.

DNP IgE에 의해 유도된 아나필락시를 억제하는 것으로 사료된다.

결 론

SPP는 compound 48/80에 의해 유도된 전신 아나필락시 및 anti-DNP IgE로 유도된 국소 아나필락시를 억제하였다. 이는 SPP가 생체내에 존재하는 비만세포막을 안정화시켜 히스타민의 방출을 억제함으로써 compound 48/80 및 anti-DNP IgE에 의해 유도된 아나필락시를 억제하는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 학술진흥재단 학제간 연구지원사업 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Wasserman, S. I. and Marquardt, D. L. : *Anaphylaxis in Allergy* : Principles and Practice. 3rd ed., C.V. Mosby Co. 1365 (1988).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) Ando, A., Martin, T. R. and Galli, S. J. : Effects

- of chronic treatment with the c-kit ligand, stem cell factor, on IgE dependent anaphylaxis in mice. *J. Clin. Invest.* **92**, 1639 (1993).
- 7) Gomes, J. C., Distasi, L. C., Sgarbosa, F. and Barata, L. E. S. : 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 (1994).
 - 8) 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).
 - 9) 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).
 - 10) Amir, S. and Englis, A. M. : An inhibitor of nitric oxide production, N^g-nitro-L-arginine-methyl ester, improves survival in anaphylactic shock. *Eur. J. Pharmacol.* **203**, 125(1991).
 - 11) 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).
 - 12) 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).
 - 13) Ovary, Z. : Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. *J. Immunol.* **81**, 355 (1958).
 - 14) Ovary, Z. : Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. *Prog. Allergy* **5**, 459 (1958).
 - 15) Watanabe, N. and Ovary, Z. : Antigen and antibody detection by in vivo methods. A revaluation of passive cutaneous anaphylatic reactions. *J. Immunol. Methods* **14**, 381 (1977).
 - 16) Tyler, V. E., Brady, L. R. and Robbers, J. E. : *Pharmacognosy*, 9th ed., Lea and Febiger 489 (1988).
 - 17) 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).
 - 18) 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).
 - 19) Yurt, R. W., Leid, R. W. and Austen, K. F. : Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.* **252**, 518 (1977).