

박하의 항알레르기 활성

신태용*, 김대근

우석대학교 약학대학

Antiallergic Activity of Menthae Herba

Tae-Yong Shin* and Dae-Keun Kim

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

Abstract - Antiallergic activity of the aqueous extract of Menthae herba (MHAE) was investigated in mice and rats. MHAE inhibited systemic anaphylaxis induced by compound 48/80 in mice. Especially, MHAE inhibited compound 48/80 induced systemic anaphylaxis 100% with a dose of 500 mg/kg body weight. MHAE significantly inhibited serum histamine levels induced by compound 48/80. MHAE inhibited histamine release from the rat peritoneal mast cells activated by compound 48/80 or anti-DNP IgE. Our studies provide evidence that MHAE will be beneficial in the treatment of anaphylaxis.

Key words - Menthae herba; anaphylaxis; compound 48/80; histamine; mast cells.

인체에 나타나는 알레르기는 항원 항체 반응의 결과로 일어나는 생체의 병적 과정이며 면역기전에 따라 I-IV형으로 분류된다. 이 중 즉시형 과민반응에 속하는 I형 알레르기가 임상에서 중요한 부분을 차지하고 있으며 아토피성 피부염, 알레르기성 비염, 기관지 천식, 고초열 및 화분증 등¹⁾이 여기에 속한다. I형 알레르기 질환의 치료에는 항히스타민제, 기관지 확장제 및 진경제 등이 대증요법제로 사용되어 왔으며, disodium cromoglycate 개발 이후 비수한 작용기전을 가진 tranilast, oxatomide, ketotifen, azelastine 및 repinast 등이 임상에서 널리 사용되고 있다.²⁻⁷⁾ 이들 약물들은 화학적 전달물질의 유리 억제 작용이 있어 항알레르기 작용을 나타낸다. 비만세포는 아나필락시스와 알레르기 반응 중에 일어나는 다양한 생리변화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{8,9)} 비만세포의 탈과립을 유도하는 비만세포 활성화는 Fc 수용체에 항원, anti-IgE 등의 결

합, anaphylatoxine 등에 의한 자극, calcium inophore, compound 48/80, codeine 및 합성부신포질 자극 호르몬과 같은 약리학적 복합물에 의해 야기된다고 보고되어 있으며¹⁰⁾ 이 중 compound 48/80은 아나필락시스 반응의 기전을 연구하기 위하여 히스타민 유리 촉진제로서 가장 널리 사용되고 있는 약물이다.¹¹⁾ 본 연구에서는 생약에서 항알레르기 약물의 개발을 목적으로 20종의 생약에 대하여 compound 48/80에 의한 전신성 아나필락시스를 유발시켜 치사율을 측정함으로써 스크리닝 시험을 하였으며, 그 결과 항알레르기 효과가 우수한 것으로 기대되는 박하를 검체로 하여 compound 48/80 유발 아나필락시스 및 흰쥐 복강 비만세포로부터 히스타민 방출에 미치는 영향을 검토하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 기기 - Compound 48/80, metrizamide, α -minimum essential medium(α -MEM),

*교신저자 : Fax 0652-290-1567

anti-dinitrophenyl(DNP)-IgE, DNP-human serum albumine(HSA) 및 *o*-phthalaldehyde(OPA)는 Sigma사에서 구입하였으며 기타 시약은 시판 시약 특급을 사용하였다. 기기는 spectro-fluorometer(Shimadzu, RF-5300PC, Japan)를 사용하였다.

실험동물 - 대한 실험 동물 센터에서 구입한 Wistar계 수컷 흰쥐 및 ICR계 수컷 생쥐를 우석대학교 약학대학 동물 사육실에서 1주일 이상 순화시켜 흰쥐는 체중 230~250 g, 생쥐는 20~25 g 범위의 것을 사용하였다. 동물실의 명암은 12시간으로 자동 조절시켰으며 물과 사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

생약 및 시료의 조제 - 본 실험에 사용한 생약은 보화당 한의원(전주시)에서 구입하였으며 표본은 본 대학에 보관되어 있다. 세절한 시료 300 g을 증류수로 수욕상에서 5시간 2회 추출하여 감압, 농축한 다음 동결건조하여 -20℃에서 보관하였다. 이 추출물을 사용 직전에 생리식염수 및 Tyrode buffer A를 사용하여 일정농도로 조제하였다.

20종 생약의 전신성 아나필락시 억제효과 - Compound 48/80에 의한 전신성 아나필락시 반응은 Amir 등¹²⁾의 방법에 따라 실험하였다. 즉 비만세포의 탈과립제로 compound 48/80(8 mg/kg, 체중)을 생쥐 복강내에 투여하기 60분 전에 생리식염수로 조제한 각 생약을 100 mg/kg(체중)의 용량으로 복강내에 주사하였다. 치사율은 아나필락시를 유발시킨 후 60분 동안 관찰하여 결정하였다(n=10/group).

Compound 48/80에 의한 전신성 아나필락시 및 혈청의 분리 - Amir 등¹²⁾의 방법에 따라 실험하였으며 탈과립제로 compound 48/80(8 mg/kg, 체중)을 생쥐의 복강에 투여하기 60분 전에 생리식염수로 조제한 박하 물 추출물을 1.0~2000 mg/kg(체중)의 용량으로 복강내에 주사하였다. 한편 시간 의존 실험으로 박하 물 추출물을 compound 48/80 투여 5분후 및 10분 후에 각각 1000mg/kg(체중)의 용량으로 복강내에 주사하였다. 치사율은 아나필락시를 유발시킨 후 60분 동안 관찰하였다(n=10/group). 따로 compound 48/80 투여 60분 전, 5분 후 및 10분 후에 박하 물 추출물을 1000 mg/kg (체중) 농도로 복강내에 투여하고 compound 48/80을 주

사한 15분 후에 심장에서 채혈하여 4℃에서 방치한 다음 400×g에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다(n=7/group).

복강 비만세포의 분리 - Kanemoto 등¹¹⁾의 방법에 따라 흰쥐 복강 비만세포를 분리하였다. 즉 흰쥐를 에테르로 마취시킨 후 실온에서 Tyrode buffer B 약 20 ml를 복강내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 마사지한 후 복벽 중앙선을 약간 절개하고 복강내액을 채취하여 150×g로 10분간씩 3회 반복 원심시킨 후 상층 부유액을 제거하고 1 ml의 Tyrode buffer B에 재부유시켰다. 이 세포 부유액중 비만세포는 22.5%(W/V) metrizamide를 이용하여 Yurt 등¹³⁾의 방법으로 분리 정제하였다.

Compound 48/80에 의한 히스타민의 유리 - CO₂ 배양기에서 37℃로 10분간 배양시킨 흰쥐 복강 세포 부유액(2×10⁵ cells/ml)에 박하 물 추출물을 가하여 최종 농도를 0.001~1.0(mg/ml)로 하고 10분간 배양한 다음 compound 48/80(5 μg/ml)을 처리하고 다시 10분간 배양한 후 400×g로 4℃에서 5분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다.

Anti-DNP IgE와 DNP-HSA에 의한 히스타민의 유리 - 복강 비만세포 부유액에 anti-DNP IgE 항체를 가하여 37℃에서 16시간 동안 배양시킨 후 세척하여 IgE 수용체에 결합하지 않은 항체를 제거한 후 박하 물 추출물을 가하여 최종 농도를 0.001~1.0(mg/ml)로 하고 10분간 다시 배양시켰다. 여기에 DNP-HSA를 첨가하여 40분간 배양시킨 후 400×g로 4℃에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 분리하였다.

히스타민의 정량 - 세포배양 상층액 및 혈청 중에 있는 히스타민은 Shore 등¹⁴⁾의 방법에 따라 OPA로 히스타민을 형광유도체화 시킨후 λ_{ex} =353 nm, λ_{em} =438 nm에서 상대 형광강도를 측정하여 정량하였다.

히스타민 유리 억제율 - 히스타민 유리 억제율은 다음식에 의하여 구하였다.

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

A: 박하 물 추출물을 부가하지 않았을 때의 히스타민의 양

B: 박하 물 추출물을 부가하였을 때의 히스타민의 양

통계학적 분석 - 실험 결과는 mean±S.E로 표시하였으며 Student's test에 의해 유의성을 검정하여 $p < 0.05$ 인 결과를 얻었을 때 유의성이 있는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

즉시형 과민반응에 대한 생약의 효과를 검토하기 위하여 compound 48/80(8 mg/kg)을 사용하여 전신성 아나필락시를 유도하고 치사율(n=10/group)를 측정하는 방법으로 20종 생약의 물 추출물에 대하여 항알레르기 활성을 검토한 결과 Table I에서와 같이 형개, 박하 및 자소엽을 투여한 군에서는 치사율이 10%로 강한 활성을 보였으며, 정향 및 길경을 투여한 군은 치사율이 40%로 활성을 나타내었다. 이 중 활성이 강한 박하의 즉시형 과민반응에 대한 효과를 검토하기 위하여 compound 48/80(8 mg/kg, 체중)을 생쥐에 주사하고 치사율(n=10/group)

Table I. Effects of crude drugs on compound 48/80 induced systemic anaphylaxis in mice

Samples		Mortality(%)
Arctii Semen	(우방자)	90
Xanthii Fructus	(창이자)	70
Corydallis Tuber	(혈호색)	50
Pogostemonis Herba	(곽 향)	60
Forsythiae Fructus	(연 교)	70
Platycodi Radix	(길 경)	40
Menthae Herba	(박 하)	10
Saussureae Radix	(복 향)	100
Perilliae Semen	(소 자)	80
Caryophylli Flos	(정 향)	40
Anemarrhenae Rhizoma	(지 모)	80
Eucommiae Cortex	(두 충)	80
Nepetae Spica	(형 개)	10
Zanthoxyli Fructus	(산 초)	70
Perilliae Herba	(자소엽)	10
Angelicae tenuissimae Radix	(고 분)	80
Elscholtziae Herba	(향 유)	80
Equiseti hyemalae Herba	(목 적)	80
Achyranthis Radix	(우 슬)	100
Angelicae dahuricae Radix	(백 지)	100

Groups of mice (n=10/group) were intraperitoneally pretreated with drugs (100 mg/kg, body weight). Mortality (%) within 60 min following compound 48/80 injection was represented as No. of dead mice/total No. of experimental mice × 100.

을 측정된 결과 Table II에서와 같이 생리식염수 200 μ l를 투여한 대조군은 100% 치사율을 나타내었다. 그러나 compound 48/80을 투여하기 1시간 전에 박하 물 추출물을 계열 희석하여 복강내에 투여하고 치사율을 관찰한 결과 1.0(mg/kg, 체중) 농도로 투여하였을 때는 치사율이 100%였으며 5.0~500(mg/kg, 체중) 농도로 투여하였을 때는 치사율이 농도의 존적으로 억제되었으나 1000(mg/kg, 체중)에서는 치사율이 증가하는 2중상의 결과를 얻었다. Amela 등¹⁵⁾은 kaempferol의 compound 48/80에 의한 히스타민 유리를 2중상으로 보고하였으며, 박하 물 추출물 중의 항알레르기 활성 물질은 kaempferol의 활성 양상과 유사한 것으로 생각되어진다. 한편 compound 48/80을 투여하고 5분 및 10분 후에 박하 물 추출물(1000 mg/kg, 체중)을 복강내에 투여한 결과 Table III에서와 같이 5분 후에 박하 물 추출물을 투여한 군은 치사율이 20%, 10분 후에 투여한 군에서는 치사율이 50%이었다. compound 48/80에 의한 아나필락시 반응은 비만세포로부터 히스타민, 부라디키닌 및 세로토닌과 같은 혈관작용성 물질의 유리에 의한 것으로 이 결과는 박하 물 추출물이 비만세포에 작용하여 이와 같은 물질의 유리

Table II. Effects of Menthae herba on compound 48/80 induced anaphylaxis in mice

Menthae Herba treatment (mg/kg, body weight)	Compound 48/80 (8 mg/kg, body weight)	Mortality (%)
None (Saline)	+	100
1.0	+	100
5.0	+	90
10	+	80
50	+	60
100	+	10
500	+	0
1000	+	20
2000	+	0
1000	-	0

Groups of mice (n=10/group) were intraperitoneally pretreated with 200 μ l saline or drugs. The drugs were given at various doses 60 min before the compound 48/80 injection. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to mice. Mortality (%) within 60 min following compound 48/80 injection was represented as No. of dead mice/total No. of experimental mice × 100.

를 억제함을 의미한다. compound 48/80을 투여하기 60분 전, 5분 후 및 10분 후에 각각 박하 물 추출물(1000 mg/kg, 체중)을 복강내에 투여하고 생쥐의 심장에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 히스타민 양을 측정 한 결과(n=7/group) Fig. 1에서와 같이 compound 48/80 투여 60분전 투여군의 혈청중 히스타민 유리 억제율은 69.7±5.8%, 5분후 투여군은 50.5±3.5%, 10분후 투여군은 42.3±3.9%

로 60분 전 투여군이 가장 효과적이었다. 이러한 결과들은 박하 물 추출물이 compound 48/80 투여에 의해 유도된 아나필락시의 예방에 효과적임을 시사하고 있다. 흰쥐의 복강 비만세포에 미치는 박하 물 추출물의 영향을 검토하기 위하여 compound 48/80 처리 10분 전에 박하 물 추출물을 0.001~1.0 (mg/ml)의 농도로 처리한 결과 Fig. 2에서와 같이 각각 13.1±2.1%, 28.4±4.1%, 69.7±5.7% 및 67.5±5.1%로 히스타민 유리를 억제시켰으며 또 비

Table III. Effects of time administered *Menthae herba* on compound 48/80 induced anaphylaxis in mice

Menthae Herba treatment (mg/kg, body weight)	Compound 48/80 (8 mg/kg, body weight)	Mortality (%)	
		5 min later	10 min later
None (Saline)	+	100	100
1000	+	20	50
1000	-	0	0

Groups of mice (n=10/group) were intraperitoneally pretreated with 200 µl of saline or drugs. The drugs were given 5 min or 10 min after the compound 48/80 injection. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to mice. Mortality (%) within 60 min following compound 48/80 injection was represented as No. of dead mice/total No. of experimental mice ×100.

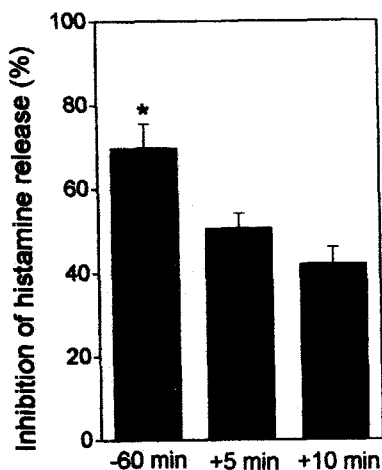


Fig. 1. Effects of *Menthae herba* on compound 48/80-induced serum histamine release in mice. Groups of mice were intraperitoneally pretreated with 200 µl saline or *Menthae Herba* (1000 mg/kg, body weight). Compound 48/80 solution was given intraperitoneally to the group of mice (n=7/group). Significantly different from the saline value: *p<0.05.

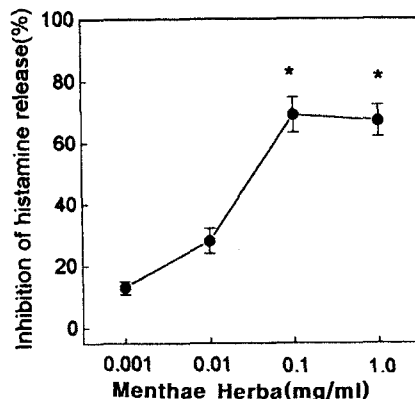


Fig. 2. Effects of *Menthae herba* on compound 48/80-induced histamine release from rat peritoneal mast cells. Rat peritoneal mast cells (2×10^5 cells/ml) were preincubated with the drug at 37°C for 10 min prior to incubation with compound 48/80. Significantly different from the saline value: *p<0.05.

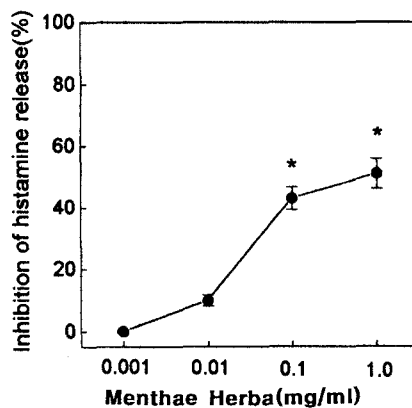


Fig. 3. Effects of *Menthae herba* on anti-DNP IgE-induced histamine release from rat peritoneal mast cells. Rat peritoneal mast cells (2×10^5 cells/ml) were preincubated with the drug at 37°C for 10 min prior to the challenge with DNP-HSA. Significantly different from the saline value: *p<0.05.

만세포를 anti-DNP IgE로 감작하고 DNP-HSA를 처리하기 10분 전에 박하의 물 추출물을 0.001~1.0 (mg/ml)의 농도로 처리하였을 때도 Fig. 3에서와 같이 각각 0%, $10.2 \pm 1.7\%$, $43.8 \pm 3.7\%$ 및 $51.3 \pm 4.8\%$ 로 히스타민 유리를 농도 의존적으로 억제시켰다. 이러한 결과들은 생체내에 있는 비만세포막이 박하 물 추출물에 의해 안정화 되어 히스타민의 방출을 억제하여 compound 48/80 또는 anti-DNP IgE로 유도된 아나필락시를 억제하는 것으로 사료된다.

결 론

총 20종 생약의 물 추출물에 대하여 치사율을 측정하여 항알레르기 활성을 검토한 결과 형개, 박하 및 자소엽이 강한 활성을 나타내었다. 이 중 박하를 선정하여 항알레르기 활성을 검토한 결과 박하 물 추출물은 compound 48/80 및 anti-DNP IgE에 의해 유도된 비만세포로부터 히스타민의 방출을 억제하였으며, 이러한 박하 물 추출물의 작용 때문에 비만세포가 주로 관여하는 즉시형 알레르기 반응인 전신성 아나필락시를 억제시키는 것으로 사료된다. 박하는 비만세포에 대한 정확한 작용기전의 규명에 의해 아나필락시를 비롯한 각종 알레르기 질환의 예방약물로서 유용할 것으로 기대되며, 그 작용기전은 계속 연구 중에 있다.

사 사

이 논문은 1998년도 우석대학교 학술연구 조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. Tizard, I. R. (1995) *Immunology an introduction*. 4th ed. 432-453. Saunders college publishing.
2. Koda, A., Nagai, H., Watanabe, S., Yanagihara, Y. and Sakamoto, K. (1976) Inhibition of hypersensitivity reactions by new drug, N(3'4'-dimethoxy cinnamoyl) anthranilic acid(N-5'). *J. Allergy Clin. Immunol.* 57: 396-407.
3. Awouters, F. and Niemegeers, C. J. E. (1977) Oxatomide, a new orally active drug which inhibits both the release and the effects of allergic mediators. *Experientia* 33: 1567-1569.
4. Martin, U. and Baggioini, M. (1981) Dissociation between the antianaphylactic and antihistaminic actions of ketotifen. *Arch. Pharmacol.* 316: 186-189.
5. Katayama, S., Akimoto, N., Shinoya, H., Morimoto, T. and Katoh, Y. (1981) Antiallergic effect of azelastine hydrochloride on immediate hypersensitivity reactions *in vivo* and *in vitro*. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 31: 1197-1203.
6. Morinaka, Y., Takahashi, K. and Hata, S. (1981) Antiallergic agents-I. Pyranoquinolone derivatives(repirinast). *Eur. J. Med. Chem.* 16: 251-256.
7. Saijo, T., Kuriki, H., Ashida, H. and Maki, Y. (1985) Mechanism of the action of amlexanox (AA-673), an orally active antiallergic agent. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 78: 43-50.
8. 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.
9. 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 cells derived from normal and mast cell deficient mice and mast cell lines. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105: 258-263.
10. Tasaka, K., Mitsunobu, M. I. O. and Masahiro, O. (1986) Intercellular calcium release induced by histamine releasers and its inhibition by some antiallergic drugs. *Ann. Allergy* 56: 464-469.
11. 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.
12. Amir, S. and English, A. M. (1991) An inhibitor of nitric oxide production, N^G-nitro-L-arginine-methylester, improves survival in anaphylactic shock. *Eur. J. Pharmacol.* 203: 125-127.
13. Yurt, R. W., Leid, R. W. and Austen, K. F.

- (1977) Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.* 252: 518-521.
14. 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.
15. Amella, M., Bronner, C., Briancon, F., Haag, M., Anton, R. and Landry, Y. (1985) Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and biflavonoids. *Planta Med.* 45: 16-20.

(1998년 7월 30일 접수)