

## Ethanol이 흰쥐의 복강비만세포에서 Histamine 유리에 미치는 영향

김창종 · 이윤혜 · 이승준 · 서무현 · 장용운 · 심상수<sup>#</sup>

중앙대학교 약학대학

(Received August 10, 2001; Revised September 20, 2001)

### Effect of Ethanol on Histamine Release from Rat Peritoneal Mast Cells

Chang Jong Kim, Yun Hye Lee, Seung June Lee, Moo Hyun Seo,  
Yong Un Jang and Sang Soo Sim<sup>#</sup>

Division of Pathophysiology, College of Pharmacy, Chung Ang University

**Abstract** — To investigate action of ethanol on histamine release from rat peritoneal mast cells, we compared the inhibitory effect of ethanol with those of calcium antagonists in mechanism of between ATP and compound 48/80-induced histamine release. Ethanol dose-dependently inhibited 100  $\mu$ M ATP-induced histamine release, whereas did not inhibit 1  $\mu$ g/ml compound 48/80-induced histamine release. Verapamil, TMB-8 and EGTA dose-dependently inhibited ATP-induced histamine release, but did not inhibit compound 48/80-induced histamine release. Such an inhibitory effect of calcium antagonist was similar to that of ethanol. These results suggest that the inhibitory effect of ethanol on histamine release from rat peritoneal mast cells is mediated via disturbance of calcium mobilization.

**Keywords** □ Mast cells, histamine, ethanol, calcium antagonist

Ethanol이 세포의 신호전달계에 미치는 영향은 ethanol이 세포기능에 미치는 영향만큼 다양하게 보고되고 있다. 흰쥐의 뇌나 신경세포에서 ethanol은 cAMP를 증가시키며 cAMP-dependent protein kinase를 활성화시킨다는 것이 보고되었다.<sup>1-3)</sup> 또한 ethanol은 protein kinase C의 자극<sup>4)</sup> G-protein의 조절<sup>5,6)</sup> 및 phospholipase C와 phospholipase A<sub>2</sub>의 억제 등<sup>7-10)</sup> 수많은 신호전달계와 연관성을 갖고 있다. 이러한 ethanol의 다양한 작용은 신경세포와 근육세포에서 많은 연구가 진행되었다.

Ethanol은 protein kinase 및 신호전달계에 관여하는 효소뿐만 아니라 세포내 Ca<sup>2+</sup> 이동에도 영향을 준다는 보고가 있다. 특히 위장관에서 낮은 농도의 ethanol은 위장관의 위상성수축을 억제하는데 이러한

억제 기전은 세포외 Ca<sup>2+</sup>의 유입을 차단하는 것으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 비만세포에서 histamine의 유리도 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가와 밀접한 연관성이 있는데,<sup>11-13)</sup> 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가는 세포내 저장된 Ca<sup>2+</sup>의 유리와 세포외 Ca<sup>2+</sup>의 유입에 의해 일어난다.<sup>14,15)</sup> 이 사실들을 통해 ethanol이 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 조절을 통해 비만세포에서 histamine의 유리를 차단할 가능성이 있다는 것을 제시할수 있다. 지금까지 ethanol은 사람이 외상을 입었을 때 소독약으로 70% ethanol을 사용하여 왔다. 그러나 ethanol이 비만세포로부터 histamine 유리에 미치는 영향에 대한 보고는 없는 상태이다. 이 실험에서는 외상시 사용하는 ethanol이 단지 소독의 기능뿐만 아니라 histamine 유리를 차단하여 염증을 억제하는 작용이 있다는 설을 입증하기 위하여 비만세포로부터 histamine 유리에 미치는 ethanol의 영향을 관찰하였다.

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-820-5615 (팩스) 02-816-7338

### 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. ethanol은 Merck 사로부터 구입하였으며, 다른 모든 시약은 analytical grade를 사용하였다.

**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>16)</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 소분한 후 여러 가지 길항제를 5 분간 전처리한 후 100 μM ATP나 1 μg/ml compound 48/80을 처리하고 37°C에서 10분간 배양하며 histamine을 유

리시켰다. 배양이 끝난 후 원심분리를 통해 상층액과 세포를 분리하였고, 세포는 초음파분쇄기를 이용하여 균질화 시킨후 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>17)</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 ethanol과 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

**Ethanol이 histamine 유리에 미치는 영향** - 100 μM ATP는 복강비만세포로부터 전체 histamine의 30%를 유리시켰으며 1 μg/ml compound 48/80은 전체 histamine의 60%를 유리시켰다. 이러한 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리 과정에 ethanol이 미치는 영향을 관찰하였다. Ethanol은 ATP

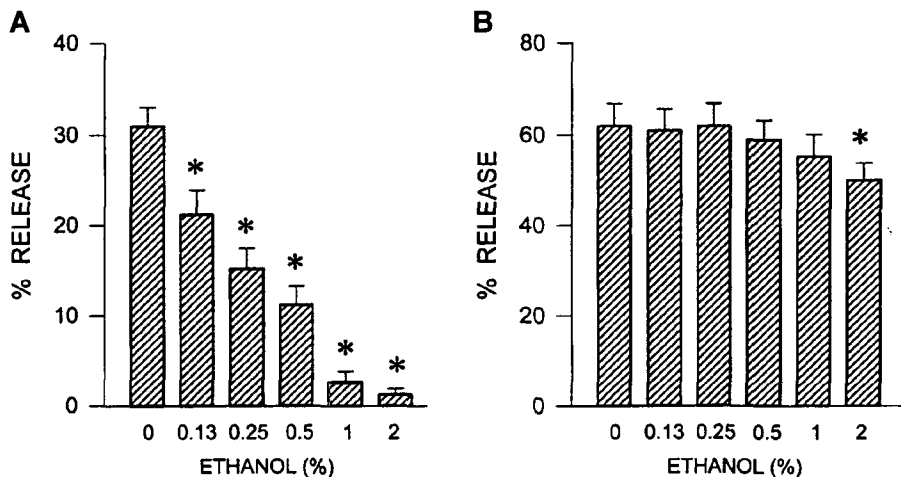


Fig. 1 - Effect of ethanol on histamine release induced by 100 μM ATP (A) and 1 μg/ml compound 48/80 (B). Results indicate means ± SE from 5 separate experiments.

\*P<0.05 vs. control.

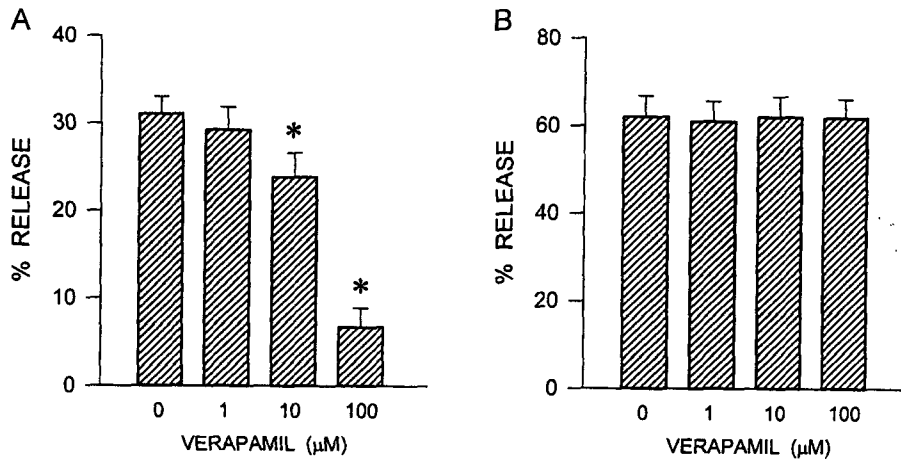


Fig. 2 – Effect of verapamil on histamine release induced by 100 μM ATP (A) and 1 μg/ml compound 48/80 (B). Results indicate means ± SE from 5 separate experiments.

\*P<0.05 vs. control.

에 의한 histamine의 유리를 0.13%의 낮은 농도에서 유의하게 억제하였으며, 농도 의존적으로 histamine의 유리를 차단하였다(Fig. 1A). 0.13% ethanol 농도는 우리가 술을 마신후 혈중 알콜농도에 도달하는 농도로서 생리적으로 유의성이 있는 결과라 할수 있다. 반면 ethanol은 compound 48/80에 의한 histamine 유리에 는 영향을 주지 못했다(Fig. 1B).

Ethanol의 효과가 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리에 있어 차이가 나타나는 것은 이들 작동제들이 histamine을 유리시키는 기전이 다른 것으로 설명할 수 있다. ATP는 P2X-purinoreceptor를 통해 ATP-gated ionic channels을 활성화시키며<sup>18)</sup> P2Y-purinoreceptor를 통해서는 phospholipase C를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>19)</sup> 반면 compound 48/80은 phospholipase C를 통해 작용하는 것으로 알려져 있다.<sup>11)</sup> 또한 compound 48/80에 의한 histamine 유리는 EGTA에 영향을 받지 않는다는 것이 보고된 바 있다.<sup>13,20)</sup> 이러한 결과들을 종합하여 볼 때 ethanol이 ATP에 의한 histamine 유리를 차단하는 효과는 세포외 Ca<sup>2+</sup>의 유입과 연관된 것으로 생각된다.

**Ca<sup>2+</sup> 길항제가 histamine 유리에 미치는 영향** – Ethanol의 효과가 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리에 있어 차이가 나타나는 것이 세포외 Ca<sup>2+</sup> 유입과 연관성이 있는 지를 관찰하였다. ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리에서 여러 가지 Ca<sup>2+</sup> 길항제의 효과를 관찰하여 ethanol의 억제효

과와 비교 분석하였다.

첫 번째 compound 48/80과 ATP에 의한 histamine 유리에 막전압 의존성 Ca<sup>2+</sup> 차단제인 verapamil이 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하였다. ATP에 의한 histamine 유리는 농도 의존적으로 억제하였으나 compound 48/80에 의한 histamine 유리에는 어떠한 영향도 미치지 않았다(Fig. 2). 이 결과로 보아 ATP에 의한 histamine 유리에 있어 세포외 Ca<sup>2+</sup>의 유입은 막전압 의존성 Ca<sup>2+</sup> 통로를 통해 이루어지며, compound 48/80에 의한 histamine 유리에는 관여하지 않는 것으로 생각된다. 또한 compound 48/80과 ATP에 의한 histamine 유리에서 verapamil의 억제효과는 ethanol의 억제 효과와 유사한 양상을 보이는 것으로 보아 ethanol의 억제효과는 verapamil과 같은 기전으로 억제효과를 나타내는 것으로 사료된다.

Econazole은 receptor-operated calcium channel blocker로서 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리과정에 관여하는 지를 관찰하였다. Econazole은 ATP에 의한 histamine 유리를 0.1 μM의 매우 낮은 농도에서 유의하게 억제하였으며 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 3A). compound 48/80에 의한 histamine 유리도 농도 의존적으로 억제하는 경향을 보였으나 ATP에 대한 억제효과 보다는 매우 약하게 억제하였다(Fig. 3B). 그러나 econazole을 1 mM과 같은 고농도로 사용시 흰쥐의 비만세포에서 histamine을 유리시킨다는 보고도 있다.<sup>21)</sup> 이 실험에서 사용한 econazole의

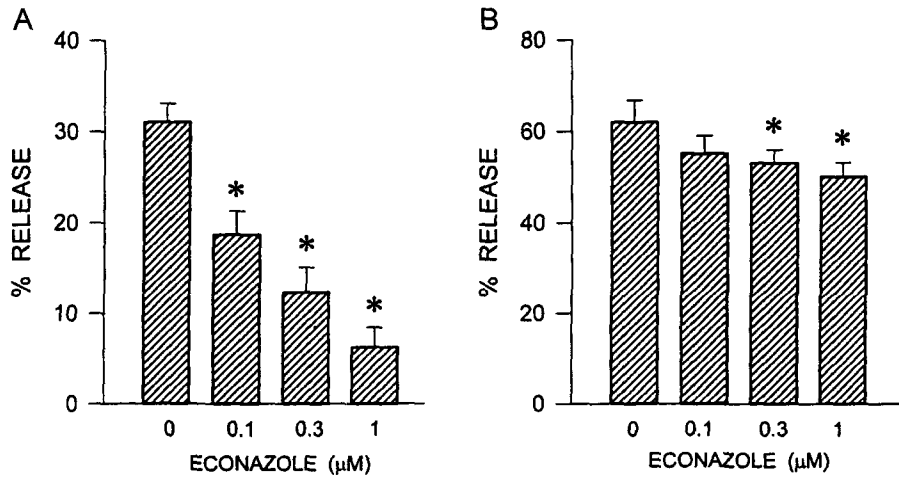


Fig. 3 - Effect of econazole on histamine release induced by 100 μM ATP (A) and 1 μg/ml compound 48/80 (B). Results indicate means ± SE from 5 separate experiments. \*P<0.05 vs. control.

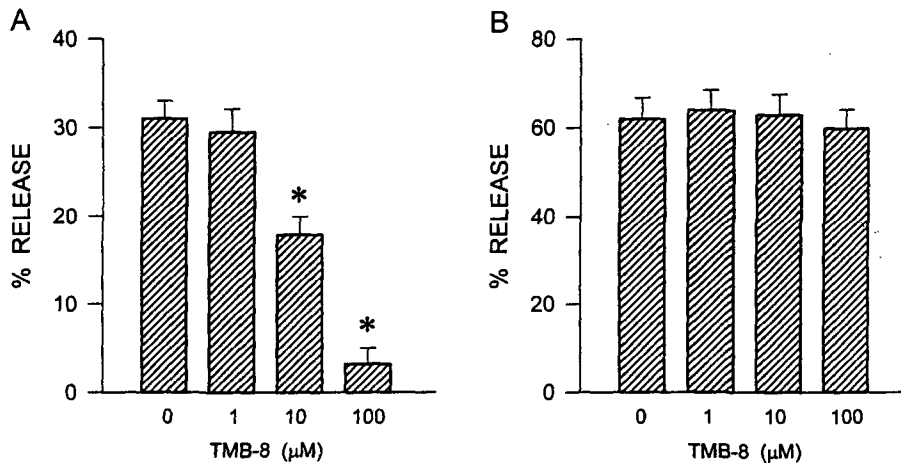


Fig. 4 - Effect of TMB-8 on histamine release induced by 100 μM ATP (A) and 1 μg/ml compound 48/80 (B). Results indicate means ± SE from 5 separate experiments. \*P<0.05 vs. control.

농도는 histamine을 유리시키는 농도보다는 1000배나 낮은 농도를 사용하였기 때문에 econazole이 histamine을 유리시키는 작용제보다는 histamine 유리를 차단하는 억제제로서의 작용이 있다고 주장할 수 있다.

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

복강 비만세포에서 compound 48/80에 의한 histamine 유리가 TMB-8에 의해 영향을 받지 않았다는 보고와 잘 일치하고 있다.<sup>22,23)</sup> 이는 ATP에 의한 histamine 유리에 있어 세포의  $Ca^{2+}$ 의 유입 뿐만 아니라 세포내  $Ca^{2+}$  유리도 관여하고 있음을 알 수 있으며, compound 48/80에 의한 histamine 유리에서 세포내  $Ca^{2+}$  유리는 관여하지 않는 것으로 생각된다. Verapamil 효과와 마찬가지로 TMB-8의 억제효과는 ethanol의 억제 효과와 유사한 양상을 보이는 것으로 보아 ethanol의 억제 효과는 TMB-8과 같은 기전으로 억제효과를 나타내

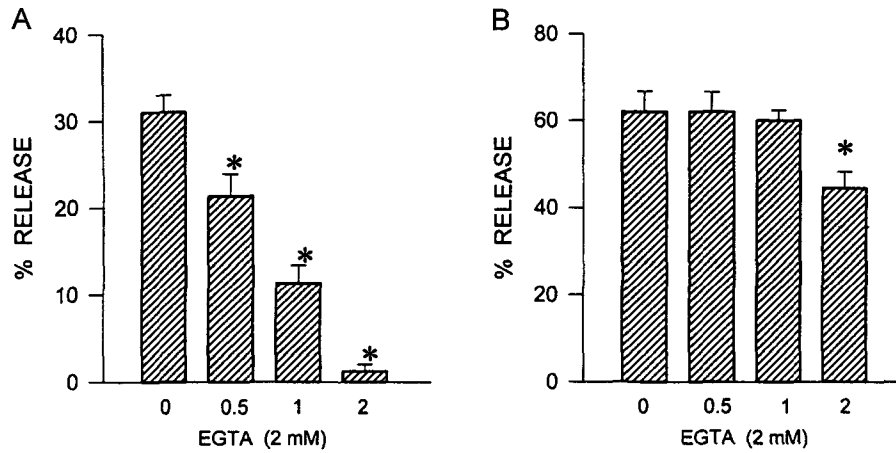


Fig. 5 - Effect of EGTA on histamine release induced by 100  $\mu$ M ATP (A) and 1  $\mu$ g/ml compound 48/80 (B). Results indicate means  $\pm$  SE from 5 separate experiments.

\*  $P < 0.05$  vs. control.

는 것으로 사료된다.

ATP에 의한 histamine의 유리는 세포의  $Ca^{2+}$ 을 제거하는 EGTA 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 5A). 이러한 결과는 ATP에 의한 histamine 유리는 세포의  $Ca^{2+}$  농도에 의존적인 것을 보여준다. 그러나 compound 48/80에 의한 histamine 유리에 있어서 EGTA는 1 mM까지는 영향을 주지 않았지만 2 mM에서 30% 정도의 유의한 억제를 나타내었다(Fig. 5B). 이미 compound 48/80에 의한 histamine 유리는 EGTA에 영향을 받지 않는다는 것이 보고된 바 있다.<sup>13,20</sup> 이러한 결과는 compound 48/80에 의한 histamine은 세포의  $Ca^{2+}$  농도에는 비 의존적인 것으로 사료되나, 세포의  $Ca^{2+}$  농도가 완전히 제거되는 상태에서는 억제되는 것으로 사료된다. EGTA의 억제효과도 ethanol의 억제 효과와 유사한 양상을 보였다.

## 결 론

복강비만세포에서 ATP와 compound 48/80에 의한 histamine 유리에 미치는 ethanol의 효과를 여러 가지  $Ca^{2+}$  길항제의 효과와 비교 분석하였다. Ethanol은 ATP에 의한 histamine 유리를 농도 의존적으로 억제 하였으나 compound 48/80에 의한 histamine 유리에 는 이렇다할 영향을 주지 못했다. 이러한 ethanol의 억제효과가 verapamil, TMB-8 및 EGTA의 억제효과

와 유사한 양상을 나타내는 것으로 보아 ethanol이 비만세포에서  $Ca^{2+}$  이동을 방해하므로써 histamine의 유리를 억제하는 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 중앙대학교 연구기자재 구입 지원프로그램의 도움을 받아 수행한 결과로 이에 감사 드립니다.

## 문 헌

- 1) Shen, J., Chan, K. W., Chen, B. T., Phillippe, J., Sehba, F., Duttaroy, A., Carroll, J. and Yoburn, B. C. : The effect of in vivo ethanol consumption on cyclic AMP and delta-opioid receptors in mouse striatum. *Brain Res.* **770**, 65 (1997).
- 2) Karl, P. L., Divald, A., Diehl, A. M. and Fisher, S. E. : Altered cyclic AMP human chorionic gonadotrophin production in cultured human placental trophoblasts exposed to ethanol. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 45 (1998).
- 3) Moore, M. S., DeZazzo, J., Luk, A. Y., Tully, T., Singh, C. M. and Heberlein, U. : Ethanol intoxication in drosophilla: genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signalling pathway. *Cell* **93**, 997 (1998).
- 4) Werber, A. H., Morgan, R. A., Zhou, P. and Yang, C.

- : Intracellular mechanism of constriction of rat aorta by ethanol. *Alcohol* **14**, 351 (1997).
- 5) Singh, S. P., Handa, R. K., Depala, V., Gao, Y., McIlroy, P. J. and Ranvindra, R. : The effect of ethanol on muscarinic receptor-G protein coupling in the rat cortex. *Pharmacol. Toxicol.* **81**, 294 (1997).
  - 6) Ikida, T. and Kuriyama, K. : An anaesthetic dose of ethanol inhibits cyclic AMP formation by altering the function of Gs protein. *Alcohol* **32**, 153 (1997).
  - 7) Allan, A. M., Weeber, E. J., Savage, D. D. and Caldwell, K. K. : Effects of prenatal ethanol exposure on phospholipase C-beta1 and phospholipase A2 in hippocampus and medial frontal cortex of adult rat offspring. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21**, 1534 (1997).
  - 8) Zhang, B. H. and Farrell, G. C. : Ethanol perturbs receptor-operated cytosolic free calcium concentration signals in cultured rat hepatocytes. *Gastroenterology* **113**, 641 (1997).
  - 9) Larsson, C., Thomas, A. P. and Hoek, J. B. : Carbachol-stimulated  $Ca^{2+}$  increase in single neuroblastoma SH-SY5Y cells: effects of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **22**, 637 (1998).
  - 10) Stair, S. M., May, L. G., Puhl, H. L., Phelps, S. H., Williams, C. L. and Aronstam, R. S. : Ethanol disrupts carbamylcholine-stimulated release of arachidonic acid from chinese hamster ovary cells expressing different subtypes of human muscarinic receptor. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **22**, 409 (1998).
  - 11) 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).
  - 12) 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).
  - 13) 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).
  - 14) 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).
  - 15) 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).
  - 16) Knudsen, T. and Johansen, T. :  $Na^+-K^+$  pump activity in rat peritoneal mast cells inhibition by extracellular calcium. *Br. J. Pharmacol.* **96**, 773 (1989).
  - 17) 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).
  - 18) Conigrave, A. D. and Jiang, L. : Review:  $Ca^{2+}$ -mobilizing receptors for ATP and UTP. *Cell Calcium* **17**(2), 111 (1995).
  - 19) North, R. A. and Barnard, E. A. : Nucleotide receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 346 (1997).
  - 20) 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).
  - 21) Hanada, S. and Oga, S. : Histamine release from rat mast cells induced by econazole. *Gen. Pharmac.* **22**, 511 (1991).
  - 22) 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).
  - 23) Chakravarty, N. : Effect of TMB-8 on calcium transport in mast cells in relation to histamine secretion. *Agents Actions* **23**, 191 (1988).