

Disodium Cromoglycate와 Ketotifen의 사람정장 유도 비만세포 활성화 억제작용

전북대학교 의과대학 해부학교실 및 알레르기성 면역질환 연구센터

채옥희

Inhibitory Effect of Disodium Cromoglycate and Ketotifen on Human Seminal Plasma-Induced Mast Cell Activation

Ok Hee Chai

Department of Anatomy and Research Center for Allergic Immune Disease, Chonbuk National University Medical School, Jeonju, Korea

ABSTRACT

Background: Human seminal plasma (HSP)-induced hypersensitivity is one of the serious complications with sexual intercourse. The clinical manifestations of HSP-induced hypersensitivity may be related to the release of vasoactive mediators from mast cell induced by HSP. It has recently been reported that HSP modulates immune systems and induces mast cell degranulation and histamine release from rat peritoneal mast cells (RPMC). Ketotifen and disodium cromoglycate (DSCG), anti-asthmatic and anti-allergic drugs, have a role of mast cell stabilization and inhibit mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion. But the inhibitory agents of HSP-induced mast cell activation are unknown. This study was performed to investigate the effects of DSCG and ketotifen on the HSP-induced mast cell activation. **Methods:** For this, influences of DSCG and ketotifen on the human seminal plasma-induced degranulation, histamine release and morphological changes of RPMC were observed. **Results:** The mast cell degranulation and histamine release of RPMC by HSP were induced in a dose-dependent fashion. The HSP-induced cytomorphological changes such as swelling, intracellular vacuoles, and interrupted cell boundary were significantly inhibited by pretreatment with DSCG or ketotifen. DSCG and Ketotifen inhibited the HSP-induced degranulation and histamine release from RPMC. **Conclusion:** From the above results, it is suggested that DSCG and ketotifen have a inhibitory effect of the HSP-induced mast cell activation. DSCG and ketotifen may be used for treatment of HSP-induced hypersensitivity. (*Immune Network* 2004;4(3):176-183)

Key Words: Disodium cromoglycate, ketotifen, human seminal plasma, mast cell, histamine

서 론

정장(seminal plasma)은 정액에서 정자를 제외한 부분이다. 사람정장이 여성에게 과민반응을 일으킨다는 증례 보고들(1,2)이 증가하고 있다. 그 증상들에는 두드러기,

부종, 천명, 심한 호흡곤란 및 골반통 등이 있는데 이러한 증상들은 성교 후 수 분내에 나타나 24시간까지 지속되고 심한 경우에는 수일간 지속되거나 사망하기도 한다(3). 정장에 의한 과민반응 질병 치료법으로 금욕, 콘돔의 사용, 탈감작 면역요법, 항히스타민제 및 비스테로이드 항염증제 등이 이용되고 있으나, 치료법의 불편함이나 치료효과가 증례에 따라 다른 것으로 알려져 있다(3,4).

사람정장이 여성에게 과민반응을 일으킨다는 여러 보고들로 미루어, 정장이 즉발성 과민반응에 중요한 역할을 담당하는 비만세포를 면역학적 또는 비면역학적으로

책임저자 : 채옥희, 전북대학교 의과대학 해부학교실

☎ 560-180, 전주시 금암동 산 2-20

Tel: 063-270-3132, Fax: 063-274-9880

E-mail: okchai@med.chonbuk.ac.kr

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: 02-PJ1-PG1-CH01-0006).

활성화시킴으로써 세포질 내 매개물질들이 유리되어 그 증상들이 나타날 것으로 생각된다. 최근 송창호 등은 시험관내 실험에서 사람정장에 의한 과민반응 증상들은 정장 내 함유된 열에 강한 물질이 직접 비만세포를 활성화시켜 과민반응을 유발시킨다고 보고하였으며(5), 송창호 등은 생체실험에서 사람정장이 흰쥐 피부비만세포의 탈과립과 혈관투과성을 증가시킨다고 보고하였다(6). 한편 disodium cromoglycate와 ketotifen은 비만세포 활성화를 억제하여 임상에서 알레르기 및 천식에 사용되어 왔으나(7), 이들 약제가 정장에 의한 비만세포 활성화를 억제하는지에 관하여는 잘 알려져 있지 않다. 이에 저자는 정장에 의한 비만세포 활성화가 disodium cromoglycate와 ketotifen에 의하여 직접 억제되는지를 규명하여 정장에 의한 과민반응의 치료에 응용하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물. 실험동물은 체중 250 gram 내외의 성숙한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 암수 구별없이 사용하였다. 이들 실험동물에 수돗물과 pellet 사료(제일사료주식회사, 대전)를 공급하고 가능한 한 스트레스를 받지 않도록 주의하면서 조용한 분위기에서 사육하였다.

시료.

HEPES-Tyrode 완충용액: 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0.6 mM NaH₂PO₄, 2.75 mM MgCl₂, 5.4 mM HEPES, 1.0 mg/ml bovine serum albumin, 1.0 mg/ml glucose를 3차 증류수에 녹인 후, pH 7.4로 적정한 후 복강비만세포의 분리, 탈과립 및 히스타민 유리량을 측정하는 실험에 사용하였다.

사람정장(humane seminal plasm): 2003년 2월부터 2004년 4월까지 전북대학교 병원에 내원한 정상인 20명으로부터 수음으로 정액을 얻었다. 정상인의 평균 나이와 각각의 정액의 양, 정자의 수, 운동성 및 형태를 분석한 결

과는 다음과 같다(Table I). 평균나이는 26.6세였으며, 일회의 수음으로 얻은 정액의 양은 2.7 ml였다. 정액에 포함된 정자의 수는 107×10⁶개였고, 정자의 운동성은 84.0%, 정자의 형태는 86.0%가 정상형 이었다. 각각의 정액은 사용시까지 영하 20°C에서 보관한 후 37°C에서 30분간 방치한 다음 2,000×g로 30분간 원침시켜 그 상층액을 얻어 정장으로 사용하였다.

DSCG 및 ketotifen 용액: DSCG와 ketotifen(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)을 HEPES-Tyrode 완충용액에 용해시켜 실험목적에 따라 여러 가지 농도로 희석하여 사용하였다.

실험방법.

복강비만세포의 분리 및 정제: Cochrane과 Douglas의 방법(8)을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 흰쥐를 에테르로 마취시켜 희생시킨 후 약 10 ml의 HEPES-Tyrode 완충용액을 흰쥐의 복강내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 마사지하였다. 복벽 중앙선을 절개하고 복강 세척액을 스포이드로 채취하여 200×g로 10분 간 원침시킨 후 상층 부유액을 버리고, HEPES-Tyrode 완충용액으로 비만세포 수가 1×10⁶ cells/ml되도록 재부유 시켜 실험에 사용하였다. 복강 비만세포 부유액으로부터 비만세포의 순수분리는 Hachisuka 등(9)의 방법을 이용하여 다음과 같이 분리하였다. Isotonic percoll 용액(10×Hank's solution 1ml+percoll 9 ml) 위에 세포 부유액을 올려놓고 HEPES-Tyrode 완충용액을 채운 다음 10분간 정치시킨 후 125×g로 15분간 원침시켜 상층액을 버리고 HEPES-Tyrode 완충용액으로 2번 세척하여 10⁶ 개/ml로 순수 비만세포 부유액을 만들었다.

비만세포의 탈과립 관찰: 재부유시킨 비만세포 부유액 200μl를 도립현미경 재물대 위에 놓여진 슬라이드(22×60 mm) 위에 떨어뜨려 비만세포들이 침전될 수 있도록 실온에서 10분간 정치시켰다. 사람정장의 농도에 따라 유도되는 비만세포 탈과립 현상을 관찰하기 위하여 비만세포 부유액에 25μl의 HEPES-Tyrode 완충용액을 첨가한 10분 후에 HEPES-Tyrode 완충용액을 첨가한 10분 후 100, 10, 1% 농도의 사람정장 25μl를 첨가하여 1,000배의 배율하에서 비만세포의 변화를 관찰하였다. 또한 DSCG가 비만세포의 탈과립 현상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DSCG 25μl를 첨가한 10분 후에 HEPES-Tyrode 완충용액 25μl를 비만세포 부유액에 첨가하여 관찰하였으며, DSCG가 사람정장에 의한 비만세포의 탈과립을 억제하는 지를 관찰하기 위하여 DSCG 25μl로 실온에서 10분간 전처리한 후 사람정장 25μl를 첨가하여 1,000배의 배율하에서 비만세포의 변화를 관찰하였다. 그리고 Ketotifen이 비만세포의 탈과립 현상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Ketotifen 25μl를 첨가한 10분 후에 HEPES-Tyrode 완충용액 25μl를 비만세

Table I. Standard variables of semen analysis in the normozoospermic man

Variables	Normozoospermic (n=20)
Age (year)	26.6±4.8 (19~33)
Volume (ml)	2.7±0.9 (1.5~4.5)
Total sperm count (spermatozoa×10 ⁶)	107.0±53.3 (60~200)
Motility (%)	84.0±6.9 (70~90)
Morphology (%)	86.0±5.1 (80~90)

Data are presented as mean±SD and range. Normal values of semen variables (World Health Organization, 1987): volume≥2 ml, total sperm count≥40×10⁶, spermatozoa per ejaculate motility≥25% with rapid progression, morphology≥30% normal forms.

포 부유액에 첨가하여 관찰하였으며, Ketotifen이 사람 정장에 의한 비만세포의 탈과립을 억제하는 지를 관찰하기 위하여 Ketotifen 25 μ l로 실온에서 10분간 전처리한 후 사람정장 25 μ l를 첨가하여 1,000배의 배율하에서 비만세포의 변화를 관찰하였다. 탈과립의 측정은 10군데의 시야에서 정상 및 탈과립된 비만세포의 수를 센 다음 각각을 평균하여 탈과립률을 계산하였다. 탈과립률 및 탈과립 억제율은 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{비만세포 탈과립률(\%)} = \frac{\text{탈과립된 비만세포의 수}}{\text{비만세포의 총수}} \times 100.$$

$$\text{탈과립 억제율(\%)} = [1 - \frac{\text{(DSCG 또는 Ketotifen+사람정장)에 의한 비만세포의 탈과립률}}{\text{사람정장에 의한 비만세포의 탈과립률}}] \times 100$$

유리된 히스타민의 측정: 위에서 기술한 방법으로 흰쥐 복강 비만세포를 분리한 다음 부유액 내 세포의 수가 10⁶ cells/ml가 되도록 조절한 후 그 중 200 μ l씩 취하였다. 사람정장의 농도에 따라 비만세포에서 유리되는 히스타민을 측정하기 위하여 비만세포 부유액에 25 μ l의 HEPES-Tyrode 완충용액을 투여한 10분 후 100, 10, 1% 농도의 사람정장 25 μ l를 첨가하여 반응시켰다. 정상 비만세포에서 유리되는 히스타민을 측정하기 위하여 비만세포 부유액에 HEPES-Tyrode 완충용액만을, 사람정장에 의한 히스타민 유리작용을 보기 위하여 25 μ l의 HEPES-Tyrode 완충용액을 투여한 10분 후 사람정장 25 μ l를 첨가하였고, DSCG 및 Ketotifen이 단독으로 비만세포의 히스타민을 유리시키는지 알아보기 위하여 25 μ l의 DSCG 및 Ketotifen를 각각 비만세포 부유액에 첨가하였다. 또한 여러 농도의 DSCG가 사람정장에 의한 히스타민 유리를 억제하는지 알아보기 위하여 100, 10, 1 μ M의 DSCG 25 μ l를 전처리하고 10분 후 역시 25 μ l의 사람정장을 첨가하여, 37°C에서 10분간 반응시켰다. 여러 농도의 Ketotifen이 사람정장에 의한 히스타민 유리를 억제

하는지를 알아보기 위하여 100, 10, 1 μ M의 Ketotifen 25 μ l를 전처리하고 10분 후 역시 25 μ l의 사람정장을 첨가하여, 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4°C에서 400 \times g로 원침하여 얻은 상층액내의 히스타민양의 분석은 Harvima 등(10)의 방법을 수정, 보완하여 다음과 같이 실시하였다. 원침 후 상층액 10 μ l와 1.5 μ l S-adenosyl (methyl-¹⁴C) methionine (2 μ Ci/ml), 40 μ l 300 mM Tris-glycin buffer (pH 8.3), 5 μ l histamine N-methyl transferase를 37°C 항온조에서 90분간 반응시킨 후 3N perchloric acid 20 μ l를 첨가하여 반응을 중지시켰다. Perchloric acid를 중화시키기 위하여 10N NaOH 20 μ l를 첨가하고, 1ml toluene-isoamyl alcohol로 추출한 후 상층액 700 μ l를 얻어 3 ml Cocktail 용액으로 scintillation 시킨 다음 β -counter (Liquid scintillation Analyzer, A canberra company, Australia)를 사용하여 cpm(count per minute) 값을 측정한 후 히스타민 표준곡선에 준하여 히스타민 양을 산출하였다. 히스타민 양은 히스타민 총량에 대한 백분율로 표시하였으며, 총 히스타민 양은 비만세포 수가 2 \times 10⁵ cell인 부유액 200 μ l를 100°C로 10분간 가열한 다음 원침 시킨 후 상층액으로부터 측정된 히스타민 양을 100으로 정하였다. 히스타민 유리율 산출공식은 다음과 같다.

$$\text{히스타민 유리율(\%)} = \frac{\text{실험군 히스타민 유리량}}{\text{총 히스타민 유리량}} \times 100$$

$$\text{히스타민 유리 억제율(\%)} = [1 - \frac{\text{(DSCG 또는 Ketotifen + 사람정장)에 의한 히스타민 유리율}}{\text{사람정장에 의한 히스타민 유리율}}] \times 100$$

결 과

사람정장에 의한 복강 비만세포 탈과립에 대한 DSCG 및 Ketotifen의 억제현상.

HEPES-Tyrode 완충용액에 부유된 비만세포의 소견: 도립현미경 상에서 HEPES-Tyrode 완충용액에 부유된 비만세포는 부유액 내의 림프구나 다른 복강 세포들보다 두 배 정도 커서 쉽게 구별할 수 있으며, 그 형태는 구형 또는 난원형이었다. 세포의 윤곽은 뚜렷하고 비만세포의 세포질 내에는 광굴절율이 강한 과립들로 채워져 있어 핵은 분명하게 관찰되지 않았다(Fig. 1). HEPES-Tyrode 완충용액에 부유된 지 30분 이상이 경과되어도 별다른 이상의 소견을 관찰할 수 없었다.

사람정장 처리 후 비만세포의 소견: HEPES-Tyrode 완충용액에 부유된 비만세포 부유액(Fig. 1)에 원액의 사람정장을 처리한 결과, 수 초 이내에 세포가 팽대되어 그 크기가 증가되었으며, 세포의 변연부가 불규칙하게 됨과 동시에 광굴절률이 약화된 몇 개의 과립들이 세포 표면으로 돌출되기 시작했다(Fig. 2). 시간이 경과됨에 따라 세포 표면 전체를 한 두층의 과립들이 둘러싸는 양상



Figure 1. Normal rat peritoneal mast cells in HEPES-Tyrode buffered solution show regular, smooth outline and contain many refractive granules in cytoplasm. Bar=10 μ m.

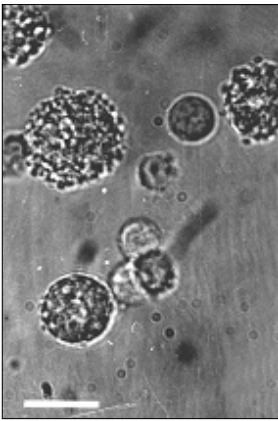


Figure 2. Mast cells observed within 1 minutes after the addition of human seminal plasma (HSP) show swelling, vacuoles in cytoplasm, and irregular outline. Bar=10 μ m.

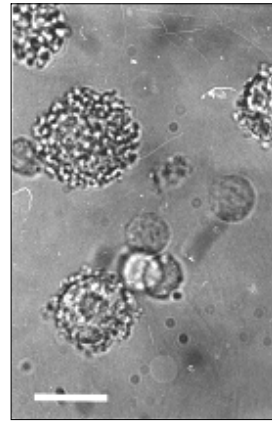


Figure 3. Mast cells observed within 10 minutes after the addition of HSP show protruded granules, which are interpreted as degranulation of mast cells. Bar=10 μ m.

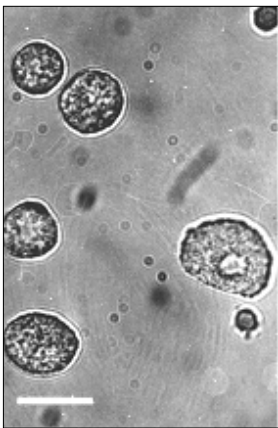


Figure 4. Normal rat peritoneal mast cells in HEPES-Tyrode buffered solution show similar finding as seen as in Figure 1. Bar=10 μ m.

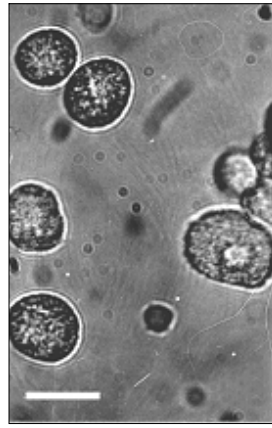


Figure 5. Mast cells observed within 10 minutes after addition of DSCG show swelling. Bar=10 μ m.

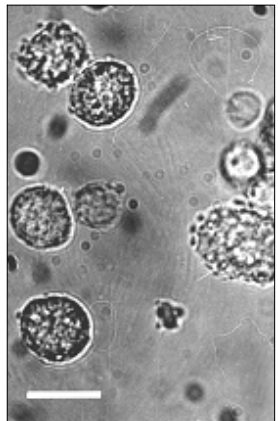


Figure 6. Mast cells pretreated with DSCG observed within 10 minutes after the addition of HSP show vacuoles in cytoplasm, irregular boundary and protrude few granules out of cell membrane. Bar=10 μ m.



Figure 7. Normal rat peritoneal mast cells in HEPES-Tyrode buffered solution show similar finding as seen as in Figure 1. Bar=10 μ m.

을 보였고, 시간이 지날수록 세포 표면으로 돌출된 과립들이 많아져서 세포의 전체적인 크기는 증가되어, 전형적인 비만세포 탈과립 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). **DSCG 전처리 후 사람정장 처리시 비만세포 소견:** HEPES-Tyrode 완충용액에 부유된 비만세포 부유액(Fig. 4)에 100 μ m의 DSCG를 첨가하였을 때 비만세포의 크기는 약간 증가되었으나, 형태 및 표면 윤곽 등은 정상 비만세포와 유사하였으며, 10분 이상이 경과되어도 이상

소견을 관찰할 수 없었다(Fig. 5). DSCG로 전처리한 10분 후 사람정장을 첨가하면 수 분 이내에 세포질 내 과립들의 광굴절률이 약해지기 시작하고 세포의 변연부가 불규칙해짐에 따라 소수의 과립들이 세포 표면 밖으로 돌출되는 현상이 관찰되었으나, 많은 시간이 경과되어도 더 이상의 비만세포 탈과립 현상은 진행되지 않았다(Fig. 6). DSCG로 전처리된 경우에는 사람정장에 의해 유도되는 경우와 비교하여 볼 때 복강 비만세포의 탈과

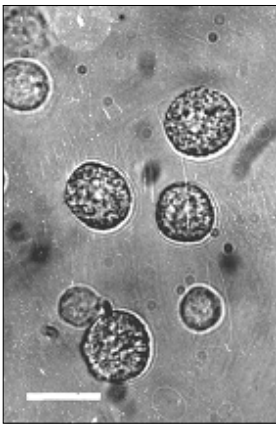


Figure 8. Mast cells observed within 10 minutes after the addition of Ketotifen show swelling. Bar=10µm.

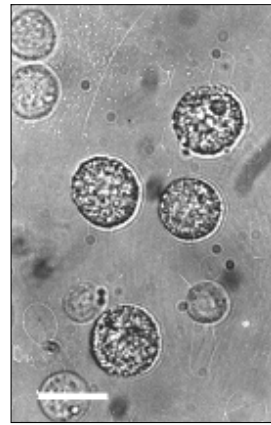


Figure 9. Mast cells pretreated with Ketotifen observed within 10 minutes after the addition of HSP show vacuoles in cytoplasm, irregular boundary. But mast cells didnot degranulate. Bar=10µm.

Table II. Dose-dependent fashions of human seminal plasma (HSP)-induced degranulation rate and histamine release from rat peritoneal mast cells

Final concentrations of HSP (% _{v/v})	Degranulation rate	Histamine (ng/ml)
0.0	6.5±1.2	610±90
0.1	38.2±7.5	1,250±180
1.0	52.9±9.2	3,200±450
10.0	89.3±7.8	9,833±333

HSP (1, 10, and 100%) was diluted with HEPES-Tyrode buffered solution. Degranulation rate was calculated by the following formula: Degranulation rate (%) = (Number of degranulated mast cells÷Number of total mast cells)×100. Histamine was calculated by the interpolation from the standard curve.

립 현상이 억제되었다.

Ketotifen 전처리 후 사람정장 처리시 비만세포 소견: HEPES-Tyrode 완충용액에 부유된 비만세포 부유액(Fig. 7)에 100µM의 Ketotifen을 첨가하였을 때 비만세포의 크기는 약간 증가되었으나, 형태 및 표면 윤곽 등은 정상 비만세포와 유사하였으며, 10분 이상이 경과되어도 이상소견을 관찰할 수 없었다(Fig. 8). Ketotifen으로 전처리한 10분 후 사람정장을 첨가하면 비만세포의 크기가 증가하고, 비만세포의 세포질 내에 존재하는 과립들의 광굴절율이 약해지며 공포상의 구조를 관찰할 수 있었으나, 비만세포 탈과립 현상은 관찰되지 않았다(Fig. 9). Ketotifen 전처리에 의하여 사람정장에 의해 유도되는 복강 비만세포의 탈과립 현상은 현저하게 억제되었으며, Ketotifen의 비만세포 탈과립 억제력이 DSCG의 억제력보다 훨씬 더 강력하였다.

사람정장에 의한 복강 비만세포의 탈과립률에 대한 DSCG 및 Ketotifen의 억제효과. 독립현미경상에서 비만세포의 탈과립률을 측정된 결과는 다음과 같다.

사람정장의 농도에 따른 비만세포의 탈과립률을 보기

Table III. Protective effects of DSCG and Ketotifen to the degranulation rate of rat peritoneal mast cells (RPMCs) induced by human seminal plasma (HSP)

Agent	HSP	Degranulation rate	% Inhibition
HEPES-Tyrode	-	6.5±1.2	-
DSCG	-	13.8±3.5	-
Ketotifen	-	11.9±2.9	-
HEPES-Tyrode	+	89.3±7.8	-
DSCG	+	57.5±5.7	47.2±6.9
Ketotifen	+	39.4±8.2	66.8±9.9

RPMCs suspension was treated with HEPES-Tyrode buffered solution, DSCG (100µM) or Ketotifen (100µM) or/and HSP (100%) at 37°C for 10 minutes. Degranulation rate (%) was calculated by the following formula: (Number of degranulated mast cells÷Number of total mast cells)×100. % Inhibition of degranulation rate was calculated by the following formula: [1-((DSCG+HSP)-induced degranulation rate÷HSP-induced degranulation rate)]×100, or [1-((Ketotifen+HSP)-induced degranulation rate÷HSP-induced degranulation rate)]×100.

위한 실험에서 비만세포 부유액에 사람정장의 농도가 0.1, 1 및 10%가 되도록 첨가하여 37°C에서 10분 동안 반응시킨 다음 측정된 비만세포의 탈과립률은 각각 38.2±7.5, 52.9±9.2 및 89.3±7.8%로써 사람정장의 농도가 증가할수록 비만세포 탈과립률도 증가되었음을 관찰하였다(Table II). HEPES-Tyrode 완충용액과 반응시킨 대조군에서의 비만세포 탈과립률은 6.5±1.2%이고, DSCG 및 Ketotifen으로 처리한 경우 탈과립률은 각각 13.8±3.5%와 11.9±2.9%였다. 반면에 사람정장으로 반응시킨 경우 비만세포 탈과립률은 89.3±7.8%로 대조군에 비하여 현저하게 증가하였다. 또한 DSCG로 전처리한 후 사람정장을 반응시킨 경우 비만세포의 탈과립률은 57.5±5.7%였으며, Ketotifen으로 전처리한 다음 사람정장으로 반응시킨 경우의 탈과립률은 39.4±8.2%였다. 이때 DSCG에 의한 비만세포 탈과립 억제율은 47.2±6.9%이

Table IV. Inhibitory effects of DSCG on the histamine release from rat peritoneal mast cells (RPMCs) induced by human seminal plasma (HSP)

Final concentrations of DSCG	HSP	% Histamine release	% Inhibition
0	+	89.0±3.1	-
0.1	+	145.7±27.6	-51.7±31.0
1	+	46.7±0.7	59.8±0.7
10	+	41.9±1.2	68.4±1.6

RPMCs suspension was treated with DSCG (1, 10, 100 μ M) and HSP (100%) at 37°C for 10 minutes. % Histamine release was calculated by the following formula: [Histamine release of experimental groups÷Total histamine release]×100. % Inhibition of histamine release was calculated by the following formula: [1-((DSCG+HSP)-induced histamine release÷HSP-induced histamine release)]×100.

고, Ketotifen에 의한 비만세포 탈과립 억제율은 66.8±9.9%로써 사람정장에 의한 비만세포 탈과립이 DSCG 및 Ketotifen에 의하여 억제되었음을 관찰할 수 있었으며, 비만세포 탈과립 억제력은 DSCG에 비해 Ketotifen이 좋았음을 알 수 있었다(Table III).

사람정장에 의한 복강 비만세포로부터 히스타민 유리에 대한 DSCG 및 Ketotifen의 억제효과. 사람정장의 농도에 따른 비만세포로부터 유리되는 히스타민 양을 알아보기 위한 실험에서 비만세포 부유액에 사람정장의 농도가 0.1, 1 및 10%가 되도록 첨가하여 37°C에서 10분 동안 반응시킨 다음 측정할 결과 다음과 같다. 상기의 농도에서 비만세포로부터 유리된 히스타민 양은 각각 1,250±180, 3,200±450 및 9,833±333 ng으로써 사람정장의 농도가 증가할수록 비만세포로부터 유리되는 히스타민 양도 증가하였다(Table II).

사람정장에 의한 비만세포의 히스타민 유리량에 대한 DSCG 농도에 따른 억제율을 보기 위한 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다. 비만세포 부유액에 사람정장을 처리한 대조군에서 히스타민 유리율은 89.0±3.1%였으나, 비만세포 부유액에 1, 10 및 100 μ M의 DSCG (최종농도; 0.1, 1, 10 μ M)를 전처리한 후 사람정장을 첨가한 경우에는 각각 145.7±27.6, 46.7±0.7 및 41.9±1.2%로 그 억제율은 상기의 농도에서 각각 -51.7±31.0, 59.8±0.7 및 68.4±1.6%였다(Table IV). 저농도인 1 μ M의 DSCG를 처리한 경우에는 사람정장을 처리한 대조군보다 더욱 많은 히스타민을 유리시켰으나 대조군과의 유의한 차이는 없었으며(P value=0.1754), 그 이상의 농도에서는 히스타민 유리율을 현저하게 억제하였다.

사람정장에 의한 비만세포의 히스타민 유리량에 대한 Ketotifen 농도에 따른 억제율을 알아본 실험결과, 비만세포 부유액에 1, 10 및 100 μ M의 Ketotifen (최종농도;

Table V. Inhibitory effects of Ketotifen on the histamine release from rat peritoneal mast cells (RPMCs) induced by human seminal plasma (HSP)

Final concentrations of Ketotifen	HSP	% Histamine release	% Inhibition
0	+	89.0±3.1	-
0.1	+	87.7±11.0	15.8±12.4
1	+	43.8±1.6	65.4±1.8
10	+	39.4±1.4	69.2±1.3

RPMCs suspension was pretreated with Ketotifen (1, 10, 100 μ M) and HSP (100%) at 37°C for 10 minutes. % Histamine release was calculated by the following formula: [Histamine release of experimental groups÷Total histamine release]×100. % Inhibition of histamine release was calculated by the following formula: % Inhibition of histamine release = [1-((Ketotifen+HSP)-induced histamine release÷HSP-induced histamine release)]×100.

0.1, 1, 10 μ M)을 전처리한 후 사람정장을 첨가한 경우에는 각각 87.7±11.0, 43.8±1.6 및 39.4±1.4%로, 그 억제율은 각각 15.8±12.4, 65.4±1.8 및 69.2±1.3%였다(Table V). 비만세포의 히스타민 유리 억제율은 Ketotifen의 농도에 의존적으로 증가하였다.

고찰

사람정장(human seminal plasma)은 남성의 생식기인 부고환, 정낭, 전립샘 및 요도망울샘 등에서 분비되는 혼합물로서, 여기에 포함된 다양한 성분들은 정자와 난자의 수정을 촉진시킨다고 알려졌다(11). 예를 들면, 과당은 정자운동에 필요한 에너지 공급원으로, 아연성분들은 정자의 핵단백질을 안정화시키며, phospholipase는 수정과 capacitation 동안 일어나는 세포막 변화에 중요한 역할로 작용한다(11). 최근 시험관내 실험을 통한 여러 보고들 (9,12)에 의하면 사람정장은 면역에 관계하는 T 림프구, B 림프구, NK 세포, 큰포식세포들의 면역학적 기능을 직접 또는 간접적으로 억제시켜 활성화된 세포들의 항원에 대한 결합력, 분화력, 증식력, 탐식작용 또는 표적세포의 용해 등을 감소시키며, 생체실험(13)의 일환으로 생쥐의 질내로 사람정장을 주입하면 사람정자, 양적혈구와 같은 여러 가지 항원들에 대한 면역반응이 억제된다고 한다. 이러한 사람정장의 면역억제 효과는 사람정장을 가열하거나 단백질 분해효소인 트립신으로 처리된 후에도 남아 있으며, 여러 포유동물에서 종족 비특이성(species-nonspecific)으로 일어난다고 알려졌다(11,13). 한편 여성에서 정장에 대한 과민반응이 유발된다는 보고를 1958년 Specken (14)이 처음 발표한 이래 사람정장이 성교 후에 일어나는 과민반응에 관련된다는 보고가 발표되었으며, 이들 대부분 환자들은 사람정장에 대한 알레르기성 반응으로 성교 후에 즉시 두드러기

(urticaria), 부종(edema), 천식음(wheezing), 심한 호흡곤란(severe dyspnea) 및 골반통(pelvic pain) 등의 증상들이 나타났다가 24시간 후에 서서히 소멸된다고 한다(3,15-17). Shah and Panjabi (3)는 이런 사람정자에 대한 여성의 과민반응을 “사람정장 내에 들어 있는 단백질성분들이 전신성 또는 국소성의 과민반응에 관여함으로 야기되는 임상적 장애”라고 정의하였으며, 심한 경우는 IgE로 매개되는 전신성 아나필락틱 반응으로 나타나기도 한다고 보고하였다. 또한 IgE와 무관한 세포생기전으로 증상들이 나타날 경우에는 피하 또는 국소적인 반응을 보인다고 보고되어 사람정장이 여성 체내의 면역계에 심각한 영향을 미칠 경우가 있음을 시사하고 있으나, 면역계에서 중요한 역할을 담당하는 비만세포가 정장에 의하여 영향을 받는다는 보고는 없다.

본 실험은 흰쥐 복강 비만세포를 이용한 시험관내 실험으로 사람정장이 비만세포의 형태변화 및 히스타민 유리에 미치는 영향을 관찰하였다. 사람정장에 의한 흰쥐 복강 비만세포의 형태변화는 정장을 처리한 수 초 이내에 관찰되었는데, 시간이 경과함에 따라서 비만세포의 변연부가 불규칙해지고 세포의 크기가 점차 팽대되면서 과립들이 세포표면으로 돌출되는 탈과립 현상이 유도되었다. 또한 사람정장에 의해 비만세포로부터 히스타민이 유리됨을 관찰하였으며, 이런 현상은 비만세포 탈과립률과 더불어 정장 농도의존성 양상으로 증가되었다. 이는 정장이 면역계의 T 림프구, B 림프구, NK 세포, 큰포식세포들의 면역학적 기능을 직접 또는 간접적으로 억제시킨다는 타 연구자들의 보고들(12,13,18,19)과는 달리 시험관내에서 정장이 직접적으로 비만세포를 활성화시키고 생체에서 피부비만세포를 탈과립시켜 비만세포 과립에 존재하는 히스타민 등을 유리시켜 혈관 투과성을 증가시킴으로써 귀부종과 피하반응을 유발시킨다는 송창호 등(5,6)의 보고와 일치하였다. 이는 사람정장에 의한 과민반응들이 어떤 유발기전에 의하든, 그 과민반응의 증상들이 결국에는 생체내 결합조직에 널리 분포된 비만세포 내 매개물질들이 유리되어 나타날 것이라는 가설을 규명할 수 있는 근거자료로 생각된다.

임상에서 천식 및 알레르기 치료제로 사용되는 disodium cromoglycate(DSCG)와 Ketotifen은 비만세포 탈과립에 의하여 유도되는 P-selectin과 CD18에 의존적인 백혈구의 rolling과 adhesion을 억제하는 등의 비만세포 안정화 작용이 있다고 알려졌다(20). 이에 DSCG와 Ketotifen을 이용하여 사람정장에 의한 비만세포 탈과립 및 히스타민 유리에 대한 억제효과를 알아보았다. 본 연구가 시험관 실험이므로 생체 내의 상황을 그대로 반영하기는 다소 어려움이 있겠지만, 본 연구에서 사용된 DSCG 및 Ketotifen의 농도는 실제 임상에서 사용되는 상용량과 혈중흡수량을 계산하여 본 실험에서 적용하였다. 그 결

과 사람정장에 의하여 수 초 이내에 유도되었던 비만세포의 탈과립현상은 DSCG와 Ketotifen에 의해 현저하게 억제됨을 관찰할 수 있었다. 또한 정장의 농도의존성 양상으로 증가되었던 비만세포의 탈과립률과 비만세포로부터의 히스타민 유리도 DSCG와 Ketotifen 전처리에 의하여 억제되었으며, 비만세포의 히스타민 유리 억제율도 DSCG 및 Ketotifen의 농도에 의존적으로 증가하였다.

이러한 DSCG 및 Ketotifen의 정확한 억제기전을 밝히기 위해서는 사람정장에 의한 비만세포 활성화기전이 먼저 밝혀져야 하겠지만, 이미 밝혀진 비만세포 탈과립 및 히스타민 유리작용이 세포 내의 칼슘농도를 증가시키거나, 세포막을 통하여 세포밖의 칼슘을 세포 내로 이동시킴으로써 일어난다고 보고(21)된 것으로 보아 DSCG 및 Ketotifen이 세포막의 칼슘통로 및 펌프를 인산화시킴으로써 칼슘통로를 차단하거나 세포 내 칼슘저장소에 작용하여 세포 내 칼슘농도가 증가되는 것을 차단함으로써 억제하는 것으로 생각된다.

이상과 같이 사람정장의 흰쥐복강 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리에 대한 DSCG 및 Ketotifen의 정확한 억제기전을 밝히기 위해서는 보다 더 세부적이고 정밀한 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Bangard C, Rosener I, Merk HF, Baron JM: Type I sensitization to seminal fluid. Urticaria and angioedema. *Hautaeztz* 55;79-81, 2004
- Tomitaka A, Suzuki K, Akamatsu H, Matsunaga K: Anaphylaxis to human seminal plasma. *Allergy* 57;1081-1082, 2002
- Shah A, Panjabi C: Human seminal plasma allergy: a review of a rare phenomenon. *Clin Exp Allergy* 34;827-838, 2004
- Dijkstra AT, Bruijnzeel-Koomen CA: Allergy to human semen. *Ned Tijdschr Geneesk* 141;690-692, 1997
- 송창호, 한의혁, 조의식, 이창현, 최종림, 이정용, 이무삼: 시험관내 실험에서 사람정장에 의한 흰쥐 복강비만세포 탈과립 및 히스타민 유리. *대한면역학회지* 17;81-88, 1995
- 송창호, 전성은, 한의혁: 정장이 비만세포 활성화에 미치는 시험관 및 생체실험 I: 정장이 피하반응과 피부 비만세포 탈과립에 미치는 영향. *대한체질인류학회지* 10;283-291, 1997
- Daniele RP: Asthma In: Wyngaarden JB, Smith LH eds.: Cecil textbook of medicine. p403-410, WB Sanders Company, 1989
- Cochrane DE, Douglas WW: Calcium-induced extrusion of secretory granule (exocytosis) in the mast cells exposed to 48-80 or the ionophores A-23187 and X-537A. *Proc Natl Acad Sci USA* 71;408-412, 1974
- Hachisuka H, Kusahara M, Okubo HK, Sasai Y: Purification of rat peritoneal mast cells with percoll density centrifugation. *Arch Dermatol Res* 280;358-362, 1988
- Harvima RJ, Harvima IT, Fraki JE: Optimization of histamine radioenzyme assay with purified histamine-N-methyltransferase. *Clinica Chimica Acta* 171;247-256, 1988
- James K, Hargreave TB: Immunosuppression by seminal plasma and its possible clinical significance. *Immunol Today* 5; 357-363, 1984
- Tarter TH, Cunningham-Rundles S, Koids SS: Suppression

- of natural killer cell activity by human seminal plasma in vitro: identification of 19-OH-PGE as the suppressor factor. *J Immunol* 136;2862-2867, 1986
13. Lee HK, Ha TY: Human seminal plasma suppresses delayed-type hypersensitivity responses to intravaginally deposited sheep red blood cells and sperm: separation of immunosuppressive factors. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 88;412-419, 1989
 14. Specken JLH: Een Merkwardig geval van allergie in de gynaecologie. *Ned Tijdschr verlosd gynaecol* 58;314-318, 1958
 15. Poskitt BL, Wojnarowska FT, Shaw S: Semen contact urticaria. *J R Soc Med* 88;108-109, 1995
 16. Knit B, Degreef H, Dooms-Goossens A: Combined allergy to human seminal plasma and latex: case report and review of the literature. *Contact Dermatitis* 30;7-11, 1994
 17. Bernstein JA, Jerd ZA, Berstein DI, Korbee L, Berstein IL: Evaluation and treatment of localized vaginal immunoglobulin E-mediated hypersensitivity to human seminal plasma. *Obstet Gynecol* 82;667-673, 1993
 18. Lee HK, Lee HH, Park YH, Lee JH, Ha TY: Regulation of human B cell proliferation and differentiation by seminal plasma. *Clin Exp Immunol* 85;174-179, 1991
 19. Veselsky L, Dostal J, Kraus M, Peknicova J, Holan V, Zajicova A, Jonakova V, Zelezna B: Reverse effect of indomethacin on the immunosuppressive activity of boar seminal immunosuppressive fraction. *Anim Reprod Sci* 15;111-23, 2002
 20. Gaboury JP, Johnston B, Niu XF, Kubes P: Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion in vivo. *J Immunol* 154;804-813, 1995
 21. Platts-Mills T: Hypersensitivity. In: Roitt I, Brostoff J, Male D eds.: *Immunology*, p330-333, Mosby, 2001
-