

Compound 48/80과 anti-DNP IgE로 유도되는 비만세포 활성화에 대한 복분자의 억제효과

전북대학교 의과대학 해부학교실 및 알레르기성 면역질환 연구센터

이광소 · 채옥희 · 송창호

Inhibitory Effect of *Rubus Coreanus* on Compound 48/80- or Anti-DNP IgE-Induced Mast Cell Activation

Guang Zhao Li, Ok Hee Chai and Chang Ho Song

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

ABSTRACT

Background: The fruit of *Rubus coreanus* (RC), a perennial herb, has been cultivated for a long time as a popular vegetable. The anti-allergy mechanism of RC is unknown. The purpose of this study is to investigate the inhibitory effect of RC on compound 48/80- or anti-DNP IgE-induced mast cell activation. **Methods:** For this, influences of RC on the compound 48/80-induced degranulation, histamine release, calcium influx and the change of the intracellular cAMP (cyclic adenosine-3',5' monophosphate) levels of rat peritoneal mast cells (RPMC) and on the anti-DNP IgE-induced histamine release of RPMC were observed. **Results:** The pretreatment of RC inhibited compound 48/80-induced degranulation, histamine release and intracellular calcium uptake of RPMC. The anti-DNP IgE-induced histamine release of RPMC was significantly inhibited by pretreatment of RC. The RC increased the level of intracellular cAMP of RPMC, and the pretreatment of RC inhibited compound 48/80-induced decrement of intracellular cAMP of RPMC. **Conclusion:** These results suggest that RC contains some substances with an activity to inhibit the compound 48/80- or anti-DNP IgE-induced mast cell activation. The inhibitory effects of RC are likely due to the stabilization of mast cells by blocking the calcium uptake and enhancing the level of intracellular cAMP. (*Immune Network* 2004;4(2):100-107)

Key Words: *Rubus coreanus*, mast cell, histamine, calcium, cAMP

서 론

복분자(*Rubus coreanus*)는 장미과에 속하는 낙엽관목으로 국내의 건조지와 습지 모두에서 잘 자라며, 일명 검정딸기로 복분자열매는 식용과 약용으로 널리 이용되고 있다. 복분자열매는 예로부터 강장과 강정효과가 뛰어나며, 당뇨와 토혈 환자에 사용되어 왔다. 최근에 복분자열매는 항산화작용, 항암작용, 항균작용 등의 약리효능

도 우수한 것으로 보고되었다(1-3). 또한 복분자의 추출물이 마우스를 이용한 생체실험에서 compound 48/80에 의한 전신성과 국소성 아나필락시스 반응을 억제하는 항알레르기 작용이 있다고 보고되었다(4).

한편 비만세포는 흰쥐 복강에서 분리하기 쉽고, 다른 복강세포들보다 크며, 세포질 안에 굵은 이염색성의 과립들이 있고, 과립 안에는 히스타민과 헤파린, 세로토닌, 가수분해효소 등이 함유되어 있다(5-8). 이들 비만세포의 활성화는 면역학적 자극들(항원, anti-IgE, lectin 등)과 약리학적 복합물질(melitin, polyamine, codein, calcium ionophore A23187, compound 48/80 등), C3a, C5a와 같은 anaphylatoxin에 의하여 유도된다(9). 이러한 자극들로 비만세포 내로 칼슘유입이 증가되면, 비만세포 내에 이미

책임저자 : 송창호, 전북대학교 의과대학 해부학교실
☎ 561-756, 전주시 덕진구 금암동 산 2-20
Tel: 063-270-3101, Fax: 063-274-9880
E-mail: asch@chonbuk.ac.kr

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

만들어진 히스타민과 세로토닌, 가수분해 효소 등의 매개물질들이 비만세포 밖으로 분비된다(6). 또한 비만세포가 자극받으면 비만세포의 세포막에 있는 phospholipase A₂의 활성화가 유도되어 세포막에 존재하는 phosphatidyl choline이 arachidonic acid로 변환되는 과정이 활성화되고, arachidonic acid는 cyclooxygenase와 5-lipoxygenase pathway를 거쳐 새로 합성된 prostaglandin D₂, leukotrien C₄, leukotrien D₄, leukotrien E₄ 등의 매개물질들이 세포 밖으로 분비되어, 이들 매개물질들에 의한 알레르기 증상이 나타나게 된다(9). 특히, 비만세포 활성화를 유도하는 인자들 가운데 compound 48/80 (10,11)은 formaldehyde에 의하여 cross-linked된 phenethylamine의 혼합 다당체로서, 비만세포의 세포막에 작용하여 세포 외의 칼슘을 세포 내로 유입시킨다. 세포 내에서 자유칼슘이 증가하면 2차신호전달자들인 cyclic adenosine-3',5' monophosphate (cAMP)와 cyclic guanosine-3',5' monophosphate 양에 변화를 일으켜서 비만세포는 탈과립되고 히스타민이 유리된다(12).

반면에, 비만세포의 매개물질 분비를 차단하는 항알레르기 약물들의 작용기전은 비만세포 내로 칼슘유입을 억제하거나 비만세포 내 칼슘저장소로부터 세포질 내로의 칼슘유리를 억제하여, 세포 내 자유칼슘의 양을 감소시킴으로써 비만세포로부터 히스타민 유리를 억제한다고 알려졌다(13). 이러한 작용을 갖는 물질들로 세포막의 인지질 대사를 변화시켜 세포 내로 칼슘유입을 억제하는 물질, 세포막의 칼슘통로를 차단하여 세포 내로 칼슘유입을 억제하는 물질(16), cromoglycate와 protease 억제제(15), 그리고 세포골격계에 작용하는 물질(16) 등이 있다.

이러한 비만세포 탈과립 유발인자들과 억제인자들에 대한 연구를 통하여, 모든 분비세포들의 분비 기전을 밝힐 뿐 아니라 비만세포의 과다분비로 생기는 알레르기 질환들(아토피피부염과 기관지천식, 알레르기비염 등)을 예방하거나 치료할 수 있는 약물을 개발하는 데 많이 이용되고 있다(12,14,17,18).

앞에 언급한 바와 같이 복분자 추출물의 항알레르기 약리효능은 보고되었지만(4) 항알레르기 약리기전은 명확히 알려져 있지 않다. 이 연구는 복분자 추출물의 항알레르기 약리기전의 일부를 밝히고자, 염증반응과 알레르기질환의 병태생리에 중요한 역할을 하는 비만세포의 활성화를 복분자 추출물이 억제하는지와 그 억제기전을 밝히기 위하여 실시되었다.

재료 및 방법

실험동물. 실험동물은 체중 250~300 g 내외의 건강하고 성숙한 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷(다물사이언스, 대전)을 사용하였다.

복분자 추출물. 건조된 복분자열매(보현당, 전주) 1 kg 을 3 L의 증류수에 넣어 열탕 추출한 후 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator; EYELA, Tokyo Rikakikai Co. Ltd.)를 사용하여 수분을 제거한 다음 동결건조하여 분말을 얻었다. 실험방법에 따라 복분자열매 추출물 분말을 2차 증류수에 다양한 농도로 희석하여 사용하였다(이하 복분자로 명기함).

복분자의 시험관내 실험방법.

복강 비만세포의 수확: 채옥희 등(19)의 방법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 흰쥐를 에테르로 마취시키고 머리의 뒷통수를 강타하여 치사시킨 후 약 10 ml의 HEPES-Tyrode (136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 11 mM NaHCO₃, 0.6 mM NaH₂PO₄, 2.75 mM MgCl₂, 5.4 mM HEPES, 1.0 mg/ml bovine serum albumin, 1.0 mg/ml glucose, pH 7.4) 완충용액을 흰쥐의 복강 내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 마사지하였다. 복벽 중앙선을 절개하고 복강 세척액을 스포이드로 채취하여 100×g에서 10분간 원심시킨 후 상층액을 버리고, 동일 HEPES-Tyrode 완충용액으로 비만세포 수가 1×10⁶ cells/ml 되도록 복강 부유액을 만들어 실험에 이용하였다.

복강 비만세포의 순수분리는 Hachisuka 등(20)의 방법을 이용하여 다음과 같이 분리하였다. 15 ml 원심분리용 시험관에 isotonic percoll 용액(10×Hank's solution 1 ml + percoll 9 ml) 3.5 ml를 넣은 후 재부유된 비만세포 부유액 0.75 ml를 isotonic percoll 용액 위에 조심스럽게 올려놓고 HEPES-Tyrode 완충용액 0.5 ml로 상층을 채운다. 10분 정도 정치시킨 후 100×g으로 15분간 원심시켰다. 원침 후 상층액 2 ml를 피펫으로 제거하고 4°C HEPES-Tyrode 완충용액으로 2번 세척하여 순수 비만세포 부유액을 만들었다. Trypan blue와 Kimura stain 용액을 이용하여 비만세포의 생존율과 순수도를 확인하였으며, 생존율과 순수도가 90% 이상인 경우에만 실험에 사용하였다.

비만세포의 형태변화 관찰: 재부유시킨 비만세포 부유액 200μl에 HEPES-Tyrode 완충용액 25μl 또는 복분자 25μl를 각각 넣어 37°C 배양기에서 10분 동안 반응시켰다. 반응 후 compound 48/80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) 용액 25μl를 첨가하여 20분 동안 반응시켰다.

광학현미경상으로 비만세포의 형태를 관찰하기 위하여 반응이 끝난 비만세포 부유액 200μl를 도립현미경 재물대 위에 놓여진 슬라이드글라스(slide glass, 22×60 mm) 위에 떨어뜨려 비만세포들이 침전될 수 있도록 실온에서 10분간 정치시켰다. 1,000배의 배율하에서 비만세포를 도립현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 정상 비만세포의 형태는 대부분 원형 또는 난원형으로 세포윤곽이 뚜렷하고, 세포질 내에는 많은 과립들이 충전되어 있었다. 비만세포의 직경은 대략 10~20μm 정도로 복강 부유액의 다른 세포들(림프구 또는 호중성백혈

구)에 비해 2배 이상 컸다. 비만세포의 형태가 원형 또는 난원형으로 세포윤곽이 뚜렷하고, 세포질 내에 광굴절율이 높은 과립들로 충만된 상태를 정상형 비만세포로 구분하였다(19). 반면에 세포윤곽이 불분명하고 세포질 내 과립들이 세포표면으로 돌출되거나 세포주위에 흩어져 있는 경우를 탈과립형으로 구분하여, 그 수를 실험군 당 임의로 선택한 10시야씩 2번 세어 평균하였다. 개인적인 오차를 줄이기 위하여 동일 표본에 대하여 두 사람의 관찰소견을 종합하여 평균을 산출하였다. 탈과립률은 다음 공식에 의하여 산출되었다. 비만세포 탈과립률(%)=(탈과립된 비만세포 수/비만세포 총수)×100

Compound 48/80 또는 anti-DNP IgE에 의한 비만세포의 히스타민 유리량 측정: 위에서 기술한 방법대로 재부유시킨 복강 부유액에 비만세포의 수가 1×10^6 cells/ml가 되도록 세포 수를 조절한 후 그 중 200 μ l씩 취하였다. 정상 비만세포에서 유리되는 히스타민 양을 측정하기 위하여 비만세포 부유액에 HEPES-Tyrode 완충용액만 처리하였고, compound 48/80에 의한 히스타민 유리를 측정하기 위하여 HEPES-Tyrode 완충용액 25 μ l를 첨가한 10분 후 compound 48/80용액(5 μ g/ml) 25 μ l를 첨가하였다. 복분자 그 자체가 히스타민을 유리하는지를 알아보기 위하여 0.1, 1, 10 mg/ml의 농도로 25 μ l를 각각 비만세포 부유액(200 μ l)에 첨가하고, 10분 후에 HEPES-Tyrode 완충용액 25 μ l를 첨가하였다. 또한 이들이 compound 48/80에 의한 히스타민 유리를 억제하는지를 알아보기 위하여 200 μ l 비만세포 부유액에 상기 농도를 각각 25 μ l씩 전처리하고 10분 후 compound 48/80 용액(5 μ g/ml) 25 μ l를 첨가하였다.

Anti-dinitrophenyl (DNP) IgE (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)에 의한 히스타민 유리를 측정하기 위하여 비만세포 부유액에 anti-DNP IgE (10 μ g/ml) 25 μ l를 첨가한 15분 후 DNP-Human serum albumin (HSA, 20 μ g/ml) 25 μ l를 첨가하였다. 또한 복분자가 anti-DNP IgE와 DNP-HSA에 의한 히스타민 유리를 억제하는지를 알아보기 위하여 anti-DNP IgE로 감작된 200 μ l 비만세포 부유액에 복분자 0.1, 1, 10 mg/ml의 농도로 25 μ l씩 10분간 전처리한 다음 25 μ l의 DNP-HSA를 첨가하여 10분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4°C에서 400 \times g으로 원침하여 얻은 상층액 내의 히스타민 양의 분석은 Harvima 등(21)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, 1 ml toluene-isoamyl alcohol로 추출한 후 상층액 700 μ l를 얻어 3 ml Cocktail 용액으

로 scintillation시킨 다음 β -counter (Liquid scintillation Analyzer, A canberra company, Australia)를 사용하여 CPM (count per minute)값을 측정된 후 히스타민 표준곡선에 준하여 히스타민 양을 산출하였다. 히스타민 양은 히스타민 총량에 대한 백분율로 표시하였으며, 히스타민 총량은 비만세포수가 10^6 cells/ml인 250 μ l를 100°C로 10분간 가열한 다음 원침시킨 후 상층액으로부터 측정된 히스타민 양을 100으로 정하였다. 히스타민 유리율 산출공식은 다음과 같다. 히스타민 유리율(%)=(실험군 히스타민 유리량/총 히스타민 유리량)×100

비만세포 내로의 칼슘유입량 측정: Kang 등(13)의 방법을 수정, 보완하여 사용하였다. 순수한 비만세포를 위에서 기술한 방법으로 분리한 다음 부유액 내 1×10^6 cells/ml가 되도록 세포 수를 조절한 후 다시 원침하여 상층액을 버리고 2 μ ci ⁴⁵Ca/ml를 포함하는 HEPES-Tyrode 완충용액에 재부유시켰다. 정상 비만세포에서의 칼슘유입을 측정하기 위하여 비만세포 부유액에 칼슘이 없는 HEPES-Tyrode 완충용액 25 μ l를, compound 48/80에 의한 비만세포 내로의 칼슘유입을 알아보기 위하여는 비만세포 부유액 200 μ l에 칼슘이 없는 HEPES-Tyrode 완충용액 25 μ l를 첨가한 10분 후 compound 48/80 용액(5 μ g/ml) 25 μ l를 첨가하였다. 복분자 그 자체가 비만세포의 칼슘유입에 미치는 영향을 알아보기 위하여 이들의 수용액 25 μ l와 칼슘이 없는 HEPES-Tyrode 완충용액 25 μ l를 비만세포 부유액에 첨가하였다. 또한 compound 48/80에 의한 칼슘유입에 대한 복분자의 작용을 보기 위하여, 비만세포 부유액에 이들의 0.1, 1, 10 mg/ml의 농도를 25 μ l씩 10분간 전처리한 다음 compound 48/80 용액(5 μ g/ml) 25 μ l를 첨가하였다. 반응 후 100 \times g으로 10분간 원침 후 상층액을 버리고 칼슘이 없는 HEPES-Tyrode 완충용액 3 ml로 세척하고 1 mM 염화란탄륨(LaCl₃) 3 ml로 3번 세척한 다음 세포에 10% Triton×100을 800 μ l 넣어 비만세포를 파괴시킨 후 3 ml Cocktail 용액으로 scintillation시킨 다음 β -counter (Liquid scintillation Analyzer, A canberra company, Australia)를 사용하여 CPM (count per minute)값을 측정된 후 칼슘 표준곡선에 준하여 칼슘 양을 산출하였다.

비만세포 내의 cAMP 측정: 상기에 기술한 순수한 비만세포 분리방법과 같은 방법으로 분리한 다음 부유액 내 비만세포가 1×10^6 cells/ml가 되도록 세포 수를 조절한 후 그중 200 μ l를 얻었다. 정상 비만세포의 cAMP 수준을 측정하기 위하여 HEPES-Tyrode 완충용액 25 μ l를, compound 48/80 용액이 세포 내 cAMP 수준에 대한 작용을 알아보기 위하여 25 μ l의 HEPES-Tyrode 완충용액을 첨가한 10분 후 25 μ l의 compound 48/80 용액(5 μ g/ml)을 첨가하였다. 복분자 그 자체가 비만세포 내 cAMP 수준에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 이들의 수용액 25 μ l를 비만세포 부유액에 첨가하였다. 또한 compound

48/80 용액이 비만세포 내 cAMP 수준에 미치는 작용에 대한 복분자의 작용을 보기 위하여, 비만세포 부유액에 1, 10 mg/ml의 농도를 25 μ 씩 10분간 전처리한 다음 compound 48/80 용액(5 μ g/ml) 25 μ 를 첨가하여 20분 동안 반응시켰다. 모든 반응의 증지는 원침 후 상층액을 버리고 50 mM acetate buffer (pH 6.2) 0.25 ml를 첨가한 후 세포를 액체 질소를 이용하여 신속하게 동결시킨 다음 100°C 물에 10분간 끓여 원침한 후, cAMP 정량을 위하여 상층액 100 μ 를 얻었다. cAMP 정량은 Holmegaard의 방법에 기본적인 원리를 둔 cAMP [¹²⁵I]radioi mMunoassay kit (Du Pont Company, Wilmington, DE)를 이용하였다 (22). 위에서 얻은 상층액 100 μ 에 working tracer solution (cAMP [¹²⁵I]-Tracer : cAMP Carrier serum=1 : 1(v/v))100 μ (blank tube는 제외)를 넣어 잘 섞은 후, 4°C에서 18시간 동안 반응시킨 다음 cAMP precipitator 0.5 ml를 넣어 혼합한 후 1,200 \times g에서 15분 동안 원침한 다음 상층액을 버리고 γ -counter (COBRA II, Auto GA mMa, A can-

berra company, Australia)로 측정하였다.

통계처리: 모든 실험은 3회 이상 반복실험을 하였으며, 통계처리는 Students *t*-test를 이용하였고, $P < 0.05$ 시 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

비만세포의 탈과립 관찰.

HEPES-Tyrode 완충용액에 부유된 정상 비만세포: 비만세포의 크기는 복강부유액 내 림프구의 두 배 정도였으며, 구형 또는 난원형이었고, 세포 표면은 윤곽이 평활하고 뚜렷하였다. 비만세포의 세포질에는 일반적으로 크고 광굴절률이 강한 과립들로 충만되어 있어서 핵은 분명하게 관찰되지 않았지만 세포의 중앙에 위치하고 있었다(Fig. 1A). 광학현미경으로 비만세포를 정상형, 탈과립형으로 구분하여 임의로 10시야를 선택하여 산출한 결과 정상형의 비만세포는 95.3%였으며 탈과립된 비만세포는 4.7%로 대부분의 비만세포가 정상형이었다

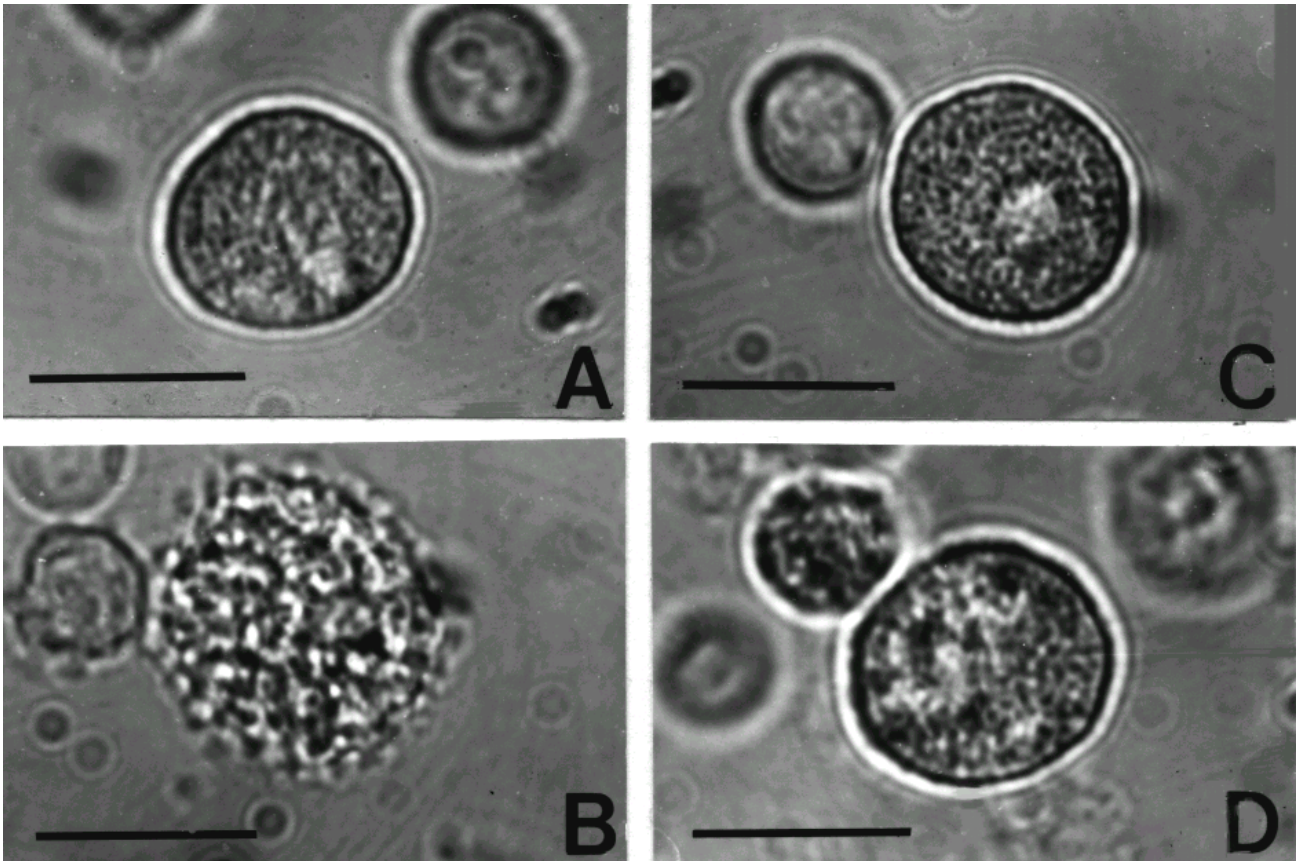


Figure 1. Light microphotographs using inverted microscopy of rat peritoneal mast cells (arrows, RPMC) in HEPES-Tyrode buffer (A), after stimulation with 5 μ g/ml compound 48/80 (B) and 1 mg/ml *Rubus coreanus* water extract (RCWE) (C), after being pretreated with 1 mg/ml RCWE prior to the stimulation with 5 μ g/ml compound 48/80 (D). Normal RPMC is generally characterized by round shape with fine granules and regular surface. Degranulated mast cells have become swollen and have many vacuoles, an irregular surface and extruded granules. Deformed RPMC became polymorphic and had stubby or broad cytoplasmic mass. However RCWE significantly inhibited compound 48/80-induced mast cell degranulation. Bar=10 μ m.

(Table I).

Compound 48/80 처리 후 비만세포의 탈과립: 비만세포 부유액에 compound 48/80 용액(5µg/ml)을 첨가한 결과 수분 이내에 세포질 내 과립들의 광굴절률이 약해지기 시작했으며, 세포의 가장자리가 불규칙하게 되면서 일부 과립들이 세포표면으로 돌출되어 나와 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 또한 시간이 경과되면서 세포가 점차 커지고 동시에 세포질 내 공포상의 구조가 보였으며, 광굴절률이 약화된 과립들이 세포표면으로 돌출되는 탈과립현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 이와 같은 비만세포 형태를 광학현미경으로 관찰하고 그 수를 세어 비만세포 탈과립률을 산출한 결과, 탈과립된 비만세포는 95.5%로 대부분 비만세포들은 탈과립되었다(Table I).

복분자의 compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립 억제효과: 비만세포 부유액에 농도가 0.1, 1, 10 mg/ml인 복분자를 각각 첨가하여 10분이 경과하여도 비만세포의 크기, 형태, 표면윤곽 등이 정상 비만세포와 다른 이상의 소견을 보이지 않았으며, 20분 이상이 경과하여도 세포가 약간 팽대하였을 뿐 다른 형태변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 1C). 비만세포 부유액에 복분자의 최종농도가 0.01 mg/ml 되도록 전처리한 경우에는 compound 48/80에 의한 비만세포 탈과립 현상을 억제하지 못하였다. 그러나 복분자(최종농도: 0.1, 1 mg/ml)를 각각 10분간 처리한 후 compound 48/80 용액을 첨가하였을 때 형태, 크기, 표

면윤곽 등에서 완충용액에 부유된 비만세포와 다른 이상의 소견을 관찰할 수 없었으나, 20분이 경과된 후 비만세포의 일부 세포막의 불연속성과 약간의 굴절률 감소를 보였으며, 몇몇의 과립들이 돌출되어 보였지만 compound 48/80에 의한 비만세포의 현저한 탈과립 현상은 관찰되지 않았다(Fig. 1D).

이상의 형태학적인 결과로 탈과립률을 계산해 본 결과는 다음과 같다. 복분자를 전처리하고 난 뒤 compound 48/80을 처리한 비만세포의 탈과립률은 복분자의 최종농도가 0.01 mg/ml일 때 82.1±2.9%, 0.1 mg/ml일 때 8.5±3.3%, 1 mg/ml일 때 8.0±1.9%이었으며, 비만세포의 탈과립 억제율은 각각 15, 96, 98%이었다. 복분자의 전처리에 의하여 compound 48/80에 의한 비만세포 탈과립이 농도 의존적으로 현저하게 억제되었다(Table I).

비만세포로부터 유리된 히스타민 양의 측정결과.

Compound 48/80에 의한 비만세포의 히스타민 유리량 측정결과: 순수한 비만세포 부유액에 HEPES-Tyrode 완충용액을 첨가했을 때 비만세포로부터 유리된 히스타민 양은 2.7±0.3%이며, 복분자의 최종농도가 0.01, 0.1, 1 mg/ml가 되도록 첨가했을 때 유리되는 히스타민 양은 정상 비만세포에서 유리되는 양과 비슷하였다. 복강 비만세포 부유액에 compound 48/80을 처리하였을 때 비만세포로부터 유리된 히스타민 양은 56.8±3.8%이었으나 상기 농도의 복분자를 전처리한 후에 compound 48/80 용액을 처리했을 때 유리된 히스타민 양은 각각 44.3±3.1, 3.4±0.7, 2.7±0.2%이었으며, 억제율은 각각 23, 99,

Table I. Inhibitory effects of *Rubus coreanus* water extract on compound 48/80-induced mast cell degranulation

Treatment		Type of mast cells (%)			Inhibition of degranulation (%)
RCWE (mg/ml)	C48/80 (0.5µg/ml)	Normal	Degranulated		
-	-	95.5±2.0	4.5±1.7		
-	+	4.9±1.8	95.1±1.3		
0.01	-	95.2±2.1	4.8±2.3		
0.01	+	17.9±3.2	82.1±2.9	15	
0.1	-	94.8±2.7	5.2±1.2		
0.1	+	91.5±2.5	8.5±3.3	96	
1	-	93.9±3.0	6.1±1.6		
1	+	92.0±2.2	8.0±1.9	98	

Rubus coreanus water extract (RCWE) dose-dependently inhibited the compound 48/80 (C48/80)-induced mast cell degranulation. Rat peritoneal mast cells (1×10⁶ cells/ml in HEPES-Tyrode buffer, 200µl) were preincubated with RCWE (25µl) or HEPES-Tyrode buffer (25µl) at 37°C for 10 minutes prior to the incubation with C48/80 (5µg/ml, 25µl) or HEPES-Tyrode buffer (25µl). Data are presented as the mean±SEM (n=4). Inhibition of degranulation (%) = [1-(degranulation of (RCWE + C48/80)-degranulation of RCWE)/(degranulation of C48/80-degranulation of HEPES-Tyrode buffer)]×100.

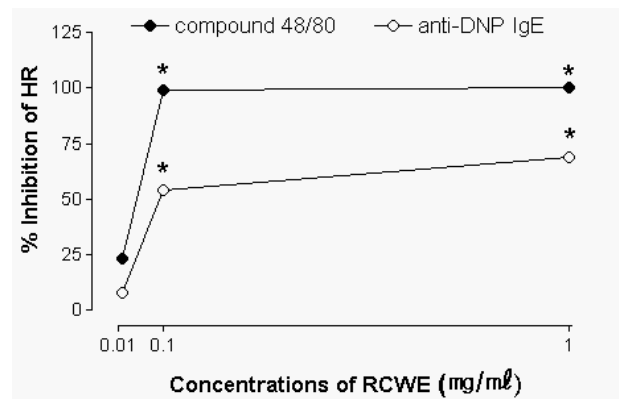


Figure 2. Inhibitory effects of *Rubus coreanus* water extract (RCWE) on compound 48/80 (C48/80)- or anti-DNP IgE-mediated histamine release (HR) from rat peritoneal mast cells (RPMC). RPMC were preincubated with the drug at 37°C for 10 minutes prior to the incubation with C48/80 or to the challenge with antigen. RCWE dose-dependently inhibited the C48/80- or anti-DNP IgE-mediated histamine release. Percent inhibition of HR was calculated by the following formula: [1-(HR of (RCWE + C48/80 or anti-DNP IgE)-HR of RCWE)/(HR of C48/80 or anti-DNP IgE-HR of HEPES-Tyrode)]×100. *P<0.01; significantly different from the saline value.

100%로 compound 48/80에 의한 비만세포로부터의 히스타민 유리가 복분자 전처리에 의해 농도 의존적으로 현저하게 억제되었다(Fig. 2).

Anti-DNP IgE에 의한 비만세포의 히스타민 유리량 측정결과: 순수한 비만세포 부유액에 HEPES-Tyrodé 완충 용액과 복분자를 각각 최종농도가 0.01, 0.1, 1 mg/ml이 되도록 첨가했을 때 유리되는 히스타민 양은 정상 비만세포에서 유리되는 양과 비슷하였다. Anti-DNP IgE와 DNP-HSA에 의한 비만세포의 히스타민 유리량은 45.9±4.7%이었으나 상기 농도의 복분자를 전처리하였을 때 anti-DNP IgE와 DNP-HSA에 의한 비만세포의 히스타민 유리량은 각각 39.2±3.5, 24.2±2.5, 18.8±3.0%이었다. 복분자가 anti-DNP IgE와 DNP-HSA에 의한 비만세포로부터의 히스타민 유리 억제율은 각각 10, 54, 69%로 anti-DNP IgE와 DNP-HSA에 의한 비만세포로부터의 히스타민 유리가 복분자 전처리에 의해 유의있게 억제되었다(Fig. 2).

비만세포내로의 칼슘유입량 측정결과. 복분자의 비만세포의 탈과립, 히스타민 유리를 억제하는 작용이 비만세포 내로의 칼슘유입에 관한 기전에 의하여 일어나는지 알아보기 위한 실험결과는 다음과 같다. 순수한 비만세포 부유액에 compound 48/80 용액을 처리하였을 때 비만세포 내로 유입된 칼슘 양은 58.3±5.2 nM이었으나, 복분자(최종농도: 0.1, 1 mg/ml)를 전처리한 후에 compound

48/80 용액을 첨가하였을 때 비만세포 내로 유입된 칼슘 양은 각각 43.8±1.4, 33.6±1.5 nM이었다. 이때 복분자의 compound 48/80에 의한 비만세포 내로의 칼슘유입 억제율은 49, 83%로 compound 48/80에 의한 비만세포 내로의 칼슘유입이 복분자 전처리에 의해 농도 의존적으로 억제되었다(Table II).

비만세포내의 cAMP 측정결과. 복분자의 복강 비만세포로부터의 히스타민 유리 억제작용이 cAMP 수준에 관계하는 기전에 의하여 일어나는지를 알아보기 위한 실험결과는 다음과 같다. 정상 복강 비만세포의 세포 내 cAMP 수준은 2.5±1.4 pmol (100%)이었다. 복분자 자체가 비만세포 내의 cAMP 수준에 어떠한 영향을 주는지를 알아보기 위하여 실시한 실험에서 복분자(최종농도: 0.1, 1 mg/ml)를 처리한 경우 세포 내 cAMP 수준은 6.8±0.4 pmol (272%), 20.1±0.8 pmol (804%)로 정상 수준에 비하여 농도 의존적으로 현저히 증가되었다. Compound 48/80 용액의 세포내 cAMP 수준에 대한 작용을 알아보기 위하여 복강 비만세포 부유액에 compound 48/80 (최종농도: 0.5µg/ml)을 처리한 경우 비만세포 내 cAMP 수준은 1.0±0.9 pmol (40%)로 정상 수준의 절반 이하로 감소되었다. Compound 48/80에 의한 비만세포내 cAMP 수준의 감소에 복분자의 역할을 알아보기 위하여, 상기농도의 복분자를 전처리하고 compound 48/80 용액을 첨가한 경우 비만세포 내 cAMP 수준은 6.0±0.7 pmol (240%), 17.9±1.8 pmol (716%)로 compound 48/80 용액에 의한 비만세포 내 cAMP 수준의 감소를 현저히 억제하였다(Table III).

Table II. Inhibitory effects of *Rubus coreanus* water extract on the compound 48/80-induced ⁴⁵Ca uptake into rat peritoneal mast cells

RCWE (mg/ml)	C48/80 (0.5µg/ml)	Calcium (nM)	Inhibition (%)
-	-	29.5±2.5	-
-	+	58.3±5.2	-
0.1	-	28.5±1.3	-
0.1	+	43.8±1.4*	49
1	-	29.0±1.2	-
1	+	33.6±1.5*	83

Rubus coreanus water extract (RCWE) dose-dependently inhibited the compound 48/80 (C48/80)-induced calcium uptake. The purified rat peritoneal mast cells (1×10⁶ cells/ml in HEPES-Tyrodé buffer, 200µl) were preincubated with RCWE (25µl) or HEPES-Tyrodé buffer (25µl) at 37°C for 10 minutes prior to the incubation with C48/80 (5µg/ml, 25µl) or HEPES-Tyrodé buffer (25µl). Data are presented as the mean±SEM (n=4). Inhibition (%) of calcium uptake was calculated by the following formula: [1-(calcium uptake of (RCWE+C48/80)-calcium uptake of RCWE)/(calcium uptake of C48/80-calcium uptake of HEPES-Tyrodé buffer)]×100. *P<0.01; significantly different from HEPES-Tyrodé buffer plus C48/80 value.

Table III. Inhibitory effect of *Rubus coreanus* water extract on compound 48/80-induced reduction of cyclic adenosine-3', 5' monophosphate (cAMP) level of rat peritoneal mast cells

RCWE (mg/ml)	C48/80 (0.5µg/ml)	cAMP (pmol)	% Control
-	-	2.5±1.4	100
-	+	1.0±0.9	40
0.1	-	6.8±0.4	272
0.1	+	6.0±0.7*	240
1	-	20.1±0.8	804
1	+	17.9±1.8*	716

Rubus coreanus water extract (RCWE) dose-dependently inhibited the compound 48/80 (C48/80)-induced reduction of cAMP. The purified rat peritoneal mast cells (1×10⁶ cells/ml in HEPES-Tyrodé buffer, 200µl) were preincubated with RCWE (25µl) or HEPES-Tyrodé buffer (25µl) at 37°C for 10 minutes prior to the incubation with C48/80 (5µg/ml, 25µl) or HEPES-Tyrodé buffer (25µl). Data are presented as the mean±SEM (n=3). * P<0.01; significantly different from the HEPES-Tyrodé buffer plus C48/80 value.

고 찰

결합조직에 널리 분포되어 있는 비만세포는 비만세포 내 과립들의 이상분비로 인하여 발생하는 다양한 알레르기질환들을 예방하거나 치료할 수 있는 약물을 개발하는 데 연구의 초점이 되고 있다(12,14,17).

이러한 비만세포의 탈과립 현상을 활성화시키는 중요한 요인으로는 항원, IgE 항체, IgE 수용체에 대한 항체, IgE dimer, Con A, polyamine, compound 48/80, topical antibiotics polymyxin B, polylysine polypeptides, alpha-chymotrypsin, porcine pancreatic phospholipase A₂ 등의 효소들의 자극 및 Ca²⁺-coupled stimulation secretion 기전에 의하여 분비되는 경우(13,23), cyclic nucleotide level에 의한 분비, protein kinase의 활성화에 따른 phosphorylation 증가(24), 비만세포의 세포골격인 actin filament, intermediate filament 및 미세소관 등을 변형시키는 경우 등이 있다(19). 이러한 비만세포 탈과립을 일으키는 여러 인자들의 대부분은 세포 밖으로부터 세포 내로의 Ca²⁺ 유입을 증가시킴으로써 비만세포 내의 자유 Ca²⁺의 양을 증가시키며, 증가된 자유 Ca²⁺이 세포 내 Ca²⁺ binding protein인 Calmodulin과 결합하여 Ca²⁺-Calmodulin complex를 형성하게 되고 이것이 세포 내 myosin light chain kinase를 활성화시킨다. 그 결과 세포 내 골격 및 세포 내 이동에 관여하는 미세소관(microtubules)과 미세섬유(microfilaments)가 활성화되어 비만세포의 과립을 세포막 가까이로 이동시켜 결과적으로 세포막 융합을 일으킴으로써 비만세포 탈과립 및 히스타민 유리현상이 일어난다고 알려졌다(25).

본 연구에서 상기의 여러 가지 비만세포의 탈과립을 유도하는 인자들 중 compound 48/80과 anti-DNP IgE를 사용하였는데, compound 48/80은 formaldehyde에 의하여 cross-linked된 phenethylamine의 mixed polymer로 비만세포의 막수용체에 작용하여 세포 외의 칼슘을 세포 내로 유입시킴으로써 세포 내 자유칼슘의 양을 증가시켜 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리를 강력하게 일으키며, 세포 내 cAMP-phosphodiesterase를 활성화시켜 세포 내 cAMP 양을 감소시킨다고 알려졌다(26,27). 본 연구에서도 compound 48/80은 비만세포 내로 칼슘유입을 증가시키고 세포 내 cAMP 양을 감소시켜, 비만세포 탈과립을 유발시켰고, 비만세포로부터 히스타민을 유리시켰다. 또한 Anti-DNP IgE는 비만세포막의 Fc 수용체에 결합하여 비만세포를 감작시키고 DNP-HSA를 처리하여 항원 항체반응을 일으키고, IgE의 교차결합을 유도함으로써 비만세포 내로의 칼슘유입을 증가시키고 세포 내 자유칼슘을 증가시켜 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리를 일으킨다고 알려져 왔다(25). 본 연구에서도 anti-DNP IgE는 비만세포로부터 많은 양의 히스타민을 유리

시켰다.

한편 비만세포의 탈과립을 억제하는 물질들에 대한 연구도 많은데 이들은 세포막의 인지질 대사를 변화시키는 물질(14), cAMP의 수준변동과 Ca²⁺이동에 관계하는 물질(13,26), cromoglycate와 flavonoids, protease 억제제(15,28), 세포 골격계에 작용하는 물질 및 스테로이드 등이 있다(16). 본 실험 결과, 도립 현미경에서 compound 48/80처리로 비만세포막의 불규칙성과 과립의 돌출 및 세포 밖으로의 탈출 등의 탈과립현상이 관찰되었으나, 복분자 전처리로 compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립현상이 현저하게 억제되었다. 또한 복강 비만세포의 히스타민 유리를 측정된 결과, compound 48/80 혹은 anti-DNP IgE에 의한 히스타민 유리가 복분자 전처리로 현저하게 억제되었다. 복분자열매에는 gallic acid, 2,3-(S)-HHDP-D-glucopyranose, sanguin, 항산화물질들(quer-
cetin 등)이 함유되어 있다고 보고되었다(29-31). 이 중 quercetin 같은 항산화물질들은 비만세포로부터 히스타민유리를 억제한다고 알려져 있어(32), 본 연구에서 복분자 추출물이 비만세포 활성화를 억제하는 것은 복분자열매에 함유된 항산화물질들의 작용으로 생각된다.

또한 복분자 전처리로 compound 48/80과 anti-DNP IgE에 의한 히스타민 유리 억제 정도는 차이가 있었다. 즉, compound 48/80에 의한 비만세포의 히스타민유리는 복분자 추출물의 농도에 따라 100%까지 억제되지만 anti-DNP IgE에 의한 히스타민 유리는 최고 69%까지 억제되었다. 이러한 억제율의 차이는 복분자열매의 추출물에 포함된 여러 성분들에 기인할 것으로 생각된다. 특히 복분자열매에는 포도당, 과당, 서당, 탄닌 등의 탄수화물들이 함유되어 있고(29,33), compound 48/80도 다당체 성분(27)으로, 복분자 추출물에 함유된 다당체가 compound 48/80이 작용하는 비만세포막의 수용체에 경쟁적으로 작용함으로써 anti-DNP IgE보다 compound 48/80에 의해 유도되는 히스타민 유리를 현저하게 억제하였을 것으로 생각되나, 이들 수용체에 대한 정밀한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 생각된다.

한편 비만세포 탈과립 유발인자들 중 세포 내 cyclic nucleotide level의 변동에 의한 분비기전에 작용하는 것으로 cAMP가 있는데, cAMP는 비만세포 표면 수용체에 β -adrenergic agonist, PGE₂, histamine들이 결합하여 adenylate cyclase를 활성화시키거나 세포 내 cAMP-dependent phosphodiesterase의 작용을 억제함으로써 세포 내 cAMP 양을 증가시켜 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리를 억제한다고 알려졌다(26). Compound 48/80은 비만세포의 막수용체에 작용하여 세포 내 cAMP-phosphodiesterase를 활성화시켜 세포 내 cAMP 양을 감소시킨다고 알려졌다(27). 본 연구에서도 compound 48/80의 처리로 비만세포 내 cAMP 양이 감소되었다. 복분자 단

독 처리로 비만세포 내 cAMP 양이 현저하게 증가되었을 뿐 아니라, 복분자 전처리로 compound 48/80에 의한 cAMP 양 감소도 현저하게 억제되었다. 이러한 결과로 미루어 복분자 추출물에는 비만세포 내의 cAMP 수준을 증가시키는 물질(들)이 함유되어 있을 것으로 생각된다. 그러나 이러한 작용이 cAMP 대사 중 어떤 부위에 영향을 미치는지에 대한 정확한 기전은 복분자의 활성성분 정제와 함께 더 연구되어야 할 것이다.

결론적으로 복분자 추출물에는 세포 내의 cAMP 수준을 증가시키고 세포 외 칼슘유입을 억제함으로써 비만세포의 활성화(탈과립과 히스타민 유리)를 억제하는 성분들이 함유되어 있으며, 이러한 성분들이 알레르기 반응을 억제할 것으로 생각된다. 앞으로 복분자 추출물에서 이러한 활성을 갖는 순수물질의 정제와 성분분석에 대한 연구를 통하여 알레르기 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 약물개발이 가능할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- De Ancos B, Gonzalez EM, Cano MP: Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J Agr Food Chem* 48;4565-4570, 2000
- Heinonen LM, Meyer AS, Frankel EN: Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J Agr Food Chem* 46;4107-4112, 1998
- Cha HS, Park MS, Paek JM: Physiological activities of *Rubus coreanus* miquel. *Korean J Food Sci Technol* 33;409-415, 2001
- Shin TY, Kim SH, Lee ES, Eom DO, Kim HM: Action of *Rubus coreanus* extract on systemic and local anaphylaxis. *Phytother Res* 16;508-513, 2002
- Petersen LJ, Mosbech H, 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;672-683, 1996
- Caufield JP, Lowis RA, Hein A, Austen KF: Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge. *J Cell Biol* 85;29-37, 1980
- Nillsson G, Costa JJ, Metcalfe DD: Mast cell and basophil. In: Gallin JI, Snyderman R (ed.): *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, 3th edition, p97-117, Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 1999
- Galli SJ: New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 28;257-265, 1993
- Platts-Mills T: Hypersensitivity-Type I. In: Roitt I, Brostoff J, Male D: *Immunology*, 6th edition, p323-343, Gower medical publishing, 2001
- Tasaka K, Mio M, Izushi K, Aoki I: Role of the cytoskeletons on Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} store of rat peritoneal mast cell. *Skin Pharmacol* 4;43-52, 1991
- Yoshii N, Mio M, Akagi M, Tassaka K: Role of endoplasmic reticulum, an intracellular Ca^{2+} store in histamine release from rat peritoneal mast cell. *Immunopharmacol* 21;13-24, 1991
- Lee MS, Ryu YG, Chai OK, Kang KJ, Lee JY: Inhibitory effect of polysaccharide fraction from *Cortex mori* on compound 48/80-induced mast cell activation. *Korean J Immunol* 21;35-45, 1999
- Kang KJ, Jun BD, Chai OH, Lee MS: Inhibitory effects of *Mori cortex* on compound 48/80-induced histamine release and calcium uptake of rat peritoneal mast cells. *Korean J Immunol* 15;91-99, 1993
- Chai OH, Yang MS, Lee MS: Effects of *Cortex mori* on spermine-induced histamine release, changes of cAMP and cGMP levels of rat peritoneal mast cells. *Korean J Immunol* 18;353-365, 1996
- Sieghart W, Theorides TC, Greengard P, Douglas WW: Phosphorylation of a single mast cell protein in response to drug that inhibit secretion. *Biochem Pharmacol* 30;2737-2745, 1981
- Chang L, Kious T, Yoganicoglu M, Keller D, Pfeiffer J: Cytoskeleton of living, unstained cells imaged by scanning force microscopy. *Biophys J* 64;1282-1293, 1993
- Shin TY, Kim DK: Inhibitory effect of mast cell-dependent anaphylaxis by *Gleditsia sinensis*. *Arch Pharm Res* 23;401-406, 2000
- Ludwyk R, Lagunoff D: Drug inhibition of mast cell secretion. *Drug* 29;277-289, 1985
- Chai OH, Lee JI, Lee MS: Inhibitory effect of *Cortex mori* on colchicine-induced mast cell activation. *Korean J Anat* 32;735-747, 1999
- Hachisuka H, Kusuhara M, Higuchi M, Okubo K, Sasaie Y: Purification of rat cutaneous mast cells with percoll density centrifugation. *Arch Dermatol Res* 280;358-362, 1988
- Harvima RJ, Harvima JJ, Fraki JE: Optimization of histamine radioenzymatic assay with purified histamine N-methyltransferase. *Clinica Chimica Acta* 171;247-256, 1988
- Holmegaard SN: Measurement of cAMP in clinical investigations. *Acta Endocrinologica* 101;1-46, 1982
- Ischizaka T, Hirata F, Ishizaka K, Axelrod J: Stimulation of phospholipid methylation, Ca^{2+} influx and histamine release by bridging of IgE receptors on rat mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77;1903-1996, 1980
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborn BA: *Hypersensitive reactions*. In: *Kuby Immunology* 4th ed, p401-404, WH Freeman and company, New York, 1999
- Ganong WF: *Review of medical physiology*, 14th ed, p30-31, McGraw-hill, 1989
- Kang KJ, Chai OH, Choi MH, Shin IH, Lee MS, Jun BD: Inhibitory effect of *Cortex mori* on compound 48/80-induced histamine release and cAMP level of rat peritoneal mast cells. *Korea J BRM* 4;111-122, 1994
- George WD, Steven MH, Edgar FK: Competitive inhibition of 48/80-induced histamine release by Benzalkonium chloride and its analogs and the polyamine receptor in mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 222;652-661, 1982
- Theorides TC, Sieghart W, Greengard P, Douglas WW: Antiallergic drug cromolyn may inhibit histamine secretion by regulating phosphorylation of a mast cell protein. *Science* 207;80-82, 1980
- Pang KC, Kim MS, Lee MW: Hydrolyzable tannins from the furits of *Rubus coreanus*. *Kor J Pharmacogn* 27;366-370, 1996
- Yoon I, Cho JY, Kuk JH, Wee JH, Jang MY, Ahn TH, Park KH: Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanus* fruit. *Korean J Food Sci Technol* 34;898-904, 2002
- Yoon I, Wee JH, Moon JH, Ahn TH, Park KH: Isolation and identification of quercetin with antioxidative activity from fruits of *Rubus coreanus* miquel. *Korean J Food Sci Technol* 35;499-502, 2003
- Scheller S, Dworniczak S, Pogorzelska T, Rajca M, Shani J: Effect of quercetin, caffeic acid and caffeic acid phenylethyl ester, solubilized in non-ionic surfactants, on histamine release in vivo and in vitro. *Arzneimittelforschung* 50;72-76, 2000
- Ohtani K, Miyajima C, Takahashi T, Kasai R, Tanaka D, Hahn DR, Naruhashi N: A Dimeric triterpene-glycoside from *Rubus coreanus*. *Phytochemistry* 29;3275-3280, 1990