

Compound 48/80으로 자극된 마우스에서 어유의 항소양 효과

한 상철¹, 강경진¹, 강희경¹, 문상욱², 유은숙¹

¹제주대학교 의과대학 약리학교실, ²주) 퍼멘텍

Abstract

Antipruritic Effect of Fish Oil on Compound 48/80 Stimulated Mice

Sang-Chul Han¹, Gyeong-Jin Kang¹, Hee-Kyoung Kang¹, Sang-Wook Moon², Eun-Sook Yoo¹

¹Department of Pharmacology, School of Medicine, Jeju National University, Jeju

²Fermentec Inc, 207, 66, Dae hak Ro, Jeju City, Jeju

Itch, a skin sensation that provokes the desire to scratch, accompanies various skin diseases such as atopic dermatitis. In present study, we investigated the anti-pruritic effect of fish oil on scratching behavior mouse models induced by compound 48/80, a mast cell degranulator. Fish oil or diphenhydramine, histamine H1 receptor antagonist, was orally administrated 1 h before subcutaneous injection of compound 48/80. The number of scratching was counted for a period of 20 min after the injection of compound 48/80 and fish oil inhibited the scratching number in a dose-dependent manner, but with potency less than that of diphenhydramine. Also, fish oil suppressed the serum immunoglobulin E (IgE) and histamine induced by compound 48/80. Especially, the inhibitory effect of fish oil on histamine release was actually stronger than that of diphenhydramine. Therefore, these results suggest that fish oil may be an effective source for improving allergic symptom of atopic dermatitis. (J Med Life Sci 2011;8:35-38)

Key Words : Fish oil, Scratching behavior, Compound 48/80, Histamine, Immunoglobulin E

서론

알레르기 질환은 4종류의 type으로 구분되고 IgE에 의해 활성화된 비만세포는 type I 알레르기 반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 비만세포는 IgE를 통한 항원-항체반응 뿐만 아니라, 약리학적 복합물질 (melitin, polyamine, codein, calcium ionophore A23187, compound 48/80)에 의해서도 활성화된다. 특히, 비만세포를 자극하는 물질로 알려진 compound 48/80은 N-methyl-pmethoxyphenyl ethylamine과 formaldehyde를 혼합한 아미노산 중합체이다. Compound 48/80은 비만세포의 세포막을 자극하여 세포 내로 칼슘의 유입을 증가시키고 이로 인해 증가된 자유칼슘은 cyclic adenosine-3',5' monophosphate (cAMP)를 감소시켜 비만세포를 탈과립 시키게 된다. 이와 같은 자극은 비만세포 내에 과립으로 존재하는 히스타민, 트립테이스 및 가수분해효소 등의 매개물질 뿐만 아니라 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin-1 β (IL-1 β) 등의 생성 또한 증가시켜 염증반응을 유도한다. 히스타민은 비만세포 내에서 가장 많은 양으로 존재하고 세포 활성화 시 가장 빠르게 유리되는 물질로 혈관 확장, 부종 및 소양증을

유발시킨다. 현재, 히스타민에 의한 소양증을 억제하는 의약품이 개발되어 치료에 사용되고 있으며 대표적인 치료제로는 비만세포 안정제 (cromoglyn, ketotifen, doxantrazole)와 항히스타민제 (azelastine, astemizole, diphenhydramine)가 있다. 이 중 ketotifen, azelastine, astemizole, diphenhydramine 등은 비만세포 안정제/ 항히스타민제의 복합 효능 제재로도 알려져 있다.

연어, 오징어, 고등어 등에서 얻어지는 fish oil (어유)에는 PUFAs (polyunsaturated fatty acids)가 함유되어 있고 이 물질은 급성 및 만성 아토피 피부염에 있어서 히스타민과 prostaglandin E2 발현을 억제하며 n-6 (omega-6 fatty acid)와 n-3 (omega-3 fatty acid)가 대표적인 물질로 알려져 있다. 이 중 n-3 PUFA에는 아토피 환자의 혈청에서 감소하는 물질인 eicosapentaenoic acid (EPA)와 docosahexaenoic acid (DHA)가 대표적인 물질로 알려져 있고 이러한 물질들은 면역세포 기능 저해 및 T/B 림프구 증식을 억제한다.

따라서 본 연구에서는 가려움 유발 동물모델에서 fish oil (FO)의 소양증 억제효과를 알아보고자 하였고 compound 48/80을 주사하여 가려움을 유발하였다. 이후 각 실험군의 굵는 행동, 혈청 내 IgE와 histamine 변화를 확인하였다.

Address for correspondence : Eun-Sook Yoo
Department of Internal Medicine, Jeju National University School of Medicine, 102 Jejudaeakno, 690-756, Jeju, Korea
E-mail : eunsyoo@jejunu.ac.kr

실험 및 방법

1. 시약 및 시료. 본 연구에 사용한 어유는 fermentec Inc. (Jeju,

Korea)에서 제공받았다. Compound 48/80 (c 48/80), diphenhydramine (DPH)은 sigma-aldrich chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, mouse IgE enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) MAX deluxe sets는 biolegend (San Diego, USA)에서, histamine research elisa kit는 labor diagnostika nord (Nordhorn, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 6주령 BALB/c 마우스 (20~25 g)는 orient bio (Korea)에서 구입하여 제주대학교 의과대학 동물 사육실에서 사육하였다.

2. 실험동물 및 실험군. 6주령 BALB/c 암컷 마우스는 1주일간의 순화기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 사육 및 실험 전 기간에 걸쳐 온도 23±1 °C, 상대습도 60±10%, 조명시간 07 : 00~19 : 00 조건 하에서 사육되었으며 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 식염수만 투여한 정상 대조군, compound 48/80으로 자극한 유발 대조군, DPH 투여 후 compound 48/80으로 자극한 양성 대조군, 2가지 농도의 어유 투여 후 compound 48/80으로 자극한 시료 투여군으로 총 5군으로 나누었으며 군당 5 마리씩 실험에 사용되었다. 모든 실험은 제주대학교 동물실험 윤리위원회의 규정에 따라 수행되었다.

3. 가려움 유도 및 증상관찰. Compound 48/80을 이용한 본 실험은 Shinmei Y 등의 방법을 수정하여 실시하였다²⁴⁾. 각 마우스들을 실험 실시 전 10분 동안 관찰박스 (9×11×15 cm)에 적응시킨 후 DPH (3 mg/kg)와 어유 (20, 100 mg/kg)를 경구투여 하였다. 투여 1시간 후 compound 48/80 (5 mg/kg)을 목 뒷 부위에 피하 주사하여 자극하였고 마우스들의 긁는 행동을 관찰 박스에서 20분 동안 디지털 카메라 (NEX-3; Sony, Japan)로 기록하였다.

4. 혈청 내 IgE 및 histamine 양 측정. 6주령 BALB/c 마우스에 DPH (3 mg/kg)와 어유 (20, 100 mg/kg)를 경구투여하고 1시간 후에 compound 48/80 (5 mg/kg)을 목 뒷 부위에 피하 주사하여 자극하였다. 20분 후 마우스를 희생시켰고 주사기로 심장채혈 후 13,000 rpm, 4 °C에서 5분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 실험에 사용 전까지 -70 °C에서 보관하였다. 분리된 혈청에서의 IgE 농도는 ELISA kit를 이용하여 정량하였다. 간단히 설명하면, 무 혈청 배지로 100배 희석된 혈청을 IgE 항체가 코팅된 96 well plates에 분주하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 마우스 IgE 항체와 avidin-HRP를 결합시켰다. 이 후 발색시약 A/B를 이용하여 20분간 발색 반응시킨 후 반응정지 용액을 이용하여 반응을 정지시켰다. 흡광도 측정은 ELISA reader(450 nm)를 이용하였다.

분리된 혈청에서의 histamine 농도는 ELISA kit를 이용하여 정량하였다. 간단히 설명하면, 혈청은 희석용액으로 21배 희석되었다. 반응 plate에 희석된 혈청 25 µL, acylation buffer 25 µL, acylation reagent 25 µL를 분주하여 상온에서 1 시간 반응 후 각 96 well plates에 20 µL씩 분주하였고 100 µL histamine

항혈청과 혼합하여 4 °C에서 18 시간 반응시켰다. 이후, 효소결합 용액과 발색시약 A/B를 분주하여 빛을 차단한 상태에서 25 분 후 반응정지 용액을 이용하여 반응을 정지시켰다. 흡광도 측정은 ELISA reader (450 nm)를 이용하였다.

5. 통계처리. 각 실험군의 유의성 검증은 Student's t-test 분석을 이용하여 검증하였고 유의수준은 $P < 0.05$ 로 설정하였다.

결과 및 고찰

1. 가려움에 의한 행동 양상의 변화. 소양증과 관련된 반복적인 긁는 행동은 피부 병변에 원인이 될 뿐만 아니라 아토피 피부염과 같은 질환을 악화시킨다¹⁾. 따라서 본 연구에서는 compound 48/80을 이용하여 마우스의 가려움을 유발하였고, 긁는 행동의 횟수를 자극 후 20분간 관찰하였다. Compound 48/80으로 자극한 유발 대조군은 긁는 행동이 평균 206.0회로 정상 대조군에 비하여 크게 증가하였고, DPH를 투여한 양성 대조군의 경우 긁는 행동이 평균 90.6회로 유발 대조군과 비교하여 유의성 있게 감소하였다. 또한 어유를 투여한 결과 고용량 (100 mg/kg) 시료 투여군에서 긁는 행동이 평균 137.6회로 DPH 투여군 보다 억제 효과는 미흡하나 유발 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였다 (Fig. 1). 결과적으로 어유는 compound 48/80에 의한 가려움을 개선시키는 것으로 생각되어진다.

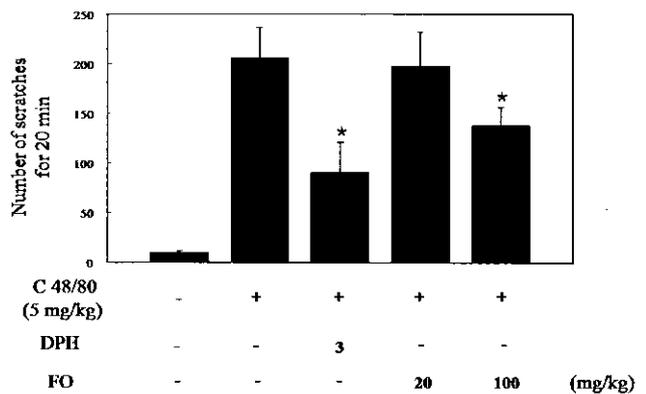


Figure 1. Effect of fish oil on the scratching behavior induced by compound 48/80 in mouse. DPH (3 mg/kg) and FO (fish oil, 20 and 100 mg/kg) were orally administered 1h before the subcutaneous injection of c 48/80 (compound 48/80, 5 mg/kg). The number of scratches was counted for a period of 20 min after the injection of c 48/80. n = 5 mice/group. *, $P < 0.05$

2. 혈청 내 IgE 양 변화. IgE는 비만세포 세포표면의 Fcε 수용체와 결합하여 비만세포 탈과립을 유도하며, 혈청내 IgE 양의 증가는 피부염에 있어서 알레르기 반응의 정도를 나타내는 지표로 알려져 있다²⁾. 따라서 본 연구에서 혈청 IgE 양을 측정한 결과는 다음과 같다. BALB/c 마우스에서 compound 48/80에 의한 IgE 양은 3.41±0.49 ng/mL이었으며 DPH를 투여한 양성 대조군의

IgE 양은 2.03 ± 0.87 ng/mL로 유발 대조군과 비교하여 유의성 있게 감소하였고 또한 고용량의 어유 (100 mg/kg) 투여 시 2.11 ± 0.82 ng/mL로 유의적으로 감소하였다 (Fig. 2). 따라서 어유로 인한 IgE 감소는 IgE와 Fcε 수용체 결합에 의한 비만세포 활성화 억제효과에 기인한 것으로 생각되어진다.

3. 혈청 내 히스타민 양 변화. Compound 48/80은 비만세포 외의 칼슘을 세포내로 유입시켜 자유칼슘의 증가로 인해 비만세포의 탈과립을 일으킨다³⁾. 특히 혈관확장과 알레르기의 원인으로 작용하는 히스타민은 비만세포 내에 과립형태로 존재하고 있으며 항원 및 다양한 자극으로 인해 세포 밖으로 분비되고 이러한 히스타민은 소양증의 주요한 원인과 비만세포 탈과립의 지표로 이용된다⁶⁻⁷⁾. 본 연구에서 혈청 히스타민 양을 측정한 결과, 유발 대조군 즉, compound 48/80 투여 후 히스타민 양은 0.96 ± 0.02 ng/mL이었으며, 고용량 (100 mg/kg)의 어유 투여군에서 히스타민 양은 0.46 ± 0.07 ng/mL로 유발 대조군과 비교하여 유의적인 감소를 나타내었다. DPH 투여 후 히스타민 양은 0.58 ± 0.11 ng/mL로서, 히스타민 양 변화에 있어서 어유의 효과가 더 강력함을 확인 할 수 있다 (Fig. 3). 따라서 어유가 히스타민 양을 억제하는 것으로 보아 비만세포 안정화에 영향을 미치는 것으로 생각되어진다.

대부분의 알레르기 질환은 비만세포와 밀접한 관련이 있다. 특이적 항원, 세포 내 자유칼슘의 증가 및 cAMP 감소에 의해 비만세포가 활성화된 부위에는 다양한 염증세포들이 침윤되거나 혈관확장, 평활근 수축, 부종, 소양증 등이 발생한다^{6-8, 25)}. 이에 본 연구에서는 compound 48/80으로 자극한 가려움 동물모델에 어유를 투여하였을 때 항소양 효과에 대하여 연구하였다. 마우스에 가려움을 유발하였을 때 정상 대조군과 유발 대조군에서 확인한 긁는 행동의 차이를 확인하였으며, 어유를 투여한 군에서

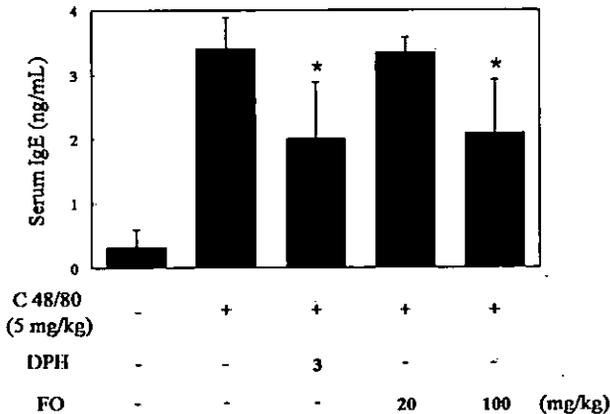


Figure 2. Effect of fish oil on serum immunoglobulin E production in the compound 48/80 stimulated mouse. DPH (3 mg/kg) and FO (fish oil, 20, 100 mg/kg) were orally administered 1h before the subcutaneous injection of c 48/80 (compound 48/80, 5 mg/kg). After the injection of c 48/80, the amount of IgE release in BALB/c mice serum was measured by ELISA. n = 5 mice/group. *, P < 0.05

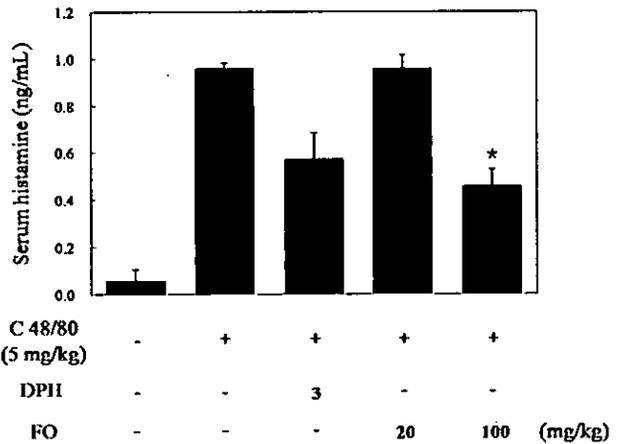


Figure 3. Effect of fish oil on serum histamine production in the compound 48/80 stimulated mouse. DPH (3 mg/kg) and FO (fish oil, 20, 100 mg/kg) were orally administered 1h before the subcutaneous injection of c 48/80 (compound 48/80, 5 mg/kg). After the injection of c 48/80, the amount of histamine release in BALB/c mice serum was measured by ELISA. n = 5 mice/group. *, P < 0.05

DPH를 투여한 양성 대조군과 비교하여 억제효과는 미흡하나 유의적으로 긁는 행동이 감소되는 결과를 확인하였고 어유가 비만세포의 탈과립을 유도하는 compound 48/80에 의한 가려움을 개선시키는 것을 알 수 있었다. 알레르기 반응의 지표로 이용되며 비만세포의 탈과립을 유도하는 IgE 양을 혈청에서 측정된 결과 어유 투여 후 IgE 양이 유의적으로 억제되었으며 어유에 의한 IgE 양의 감소는 IgE와 Fcε 수용체 결합에 의한 비만세포 활성화와 억제효과에 기인한 것으로 사료되어진다. 비만세포의 탈과립 지표로 이용되며 소양증의 원인으로 작용하는 히스타민 양을 혈청에서 측정한 결과, 어유 투여 시 유발 대조군과 비교하여 유의적인 감소를 나타내었고 양성 대조군 보다 히스타민 양을 강력히 감소시켰다. 앞선 실험결과와 비교하였을 때 DPH 투여는 긁는 횟수의 감소효과가 어유 투여보다 강력하였고 (Fig. 1.) 히스타민 양의 억제효과는 어유가 더 강력하였다 (Fig. 3.). 이러한 결과, 어유는 히스타민 길항효과 보다는 비만세포 안정화 효과가 더 우수한 것으로 생각되어진다. 이에 본 실험에서 사용한 어유는 소양증의 원인이 되는 비만세포의 탈과립을 억제하는 물질로 활용 가능 할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 (주) 퍼멘텍과 공동연구로 수행된 지역산업기술개발 사업 (2010.4 ~ 2011.3)의 결과로서 사업비 지원에 감사드립니다.

Reference

- 1) Matsuo N, Yamada K, Shoji K, Mori M, Sugano M. Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship. *Allergy* 1997 Jan;52(1):58-64.
- 2) Matsuo N, Yamada K, Yamashita K, Shoji K, Mori M, Sugano M. Inhibitory effect of tea polyphenols on histamine and leukotriene B4 release from rat peritoneal exudate cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1996 Jun;32(6):340-344.
- 3) Foreman JC. Substance P and calcitonin gene-related peptide: effects on mast cells and in human skin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;82(3-4):366-371.
- 4) Baltzly R, Buck JS. A family of long-acting depressors. *J Am Chem Soc* 1949 Apr;71(4):1301-1305.
- 5) 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* 1999;21:35-45.
- 6) Bennett JP, Cockcroft S, Gomperts BD. Ionomycin stimulates mast cell histamine secretion by forming a lipid-soluble calcium complex. *Nature* 1979 Dec 20-27;282(5741):851-853.
- 7) Yurt RW, Leid RW, Jr, Spragg J, Austen KF. Immunologic release of heparin from purified rat peritoneal mast cells. *J Immunol* 1977 Apr;118(4):1201-1207.
- 8) Caulfield JP, Lewis RA, Hein A, Austen KF. Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge. *J Cell Biol* 1980 May;85(2):299-312.
- 9) Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2004 Oct;4(10):787-799.
- 10) Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev* 2000 Feb;173:131-140.
- 11) Petersen LJ, Mosbech H, Skov PS. 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* 1996 Feb;97(2):672-679.
- 12) Lagunoff D, Martin TW, Read G. Agents that release histamine from mast cells. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983;23:331-351.
- 13) Gui X, Carraway RE. Involvement of mast cells in basal and neurotensin-induced intestinal absorption of taurocholate in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004 Aug;287(2):G408-16.
- 14) Chand N, Pillar J, Diamantis W, Sofia RD. Inhibition of allergic histamine release by azelastine and selected anti-allergic drugs from rabbit leukocytes. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985;77(4):451-455.
- 15) Chand N, Pillar J, Diamantis W, Sofia RD. Inhibition of IgE-mediated allergic histamine release from rat peritoneal mast cells by azelastine and selected anti-allergic drugs. *Agents Actions* 1985 Jul;16(5):318-322.
- 16) Sugimoto Y, Umakoshi K, Nojiri N, Kamei C. Effects of histamine H1 receptor antagonists on compound 48/80-induced scratching behavior in mice. *Eur J Pharmacol* 1998 Jun 12;351(1):1-5.
- 17) Gueck T, Seidel A, Baumann D, Meister A, Fuhrmann H. Alterations of mast cell mediator production and release by gamma-linolenic and docosahexaenoic acid. *Vet Dermatol* 2004 Oct;15(5):309-314.
- 18) Nakamura MT, Cho HP, Xu J, Tang Z, Clarke SD. Metabolism and functions of highly unsaturated fatty acids: an update. *Lipids* 2001 Sep;36(9):961-964.
- 19) Yu G, Bjorksten B. Polyunsaturated fatty acids in school children in relation to allergy and serum IgE levels. *Pediatr Allergy Immunol* 1998 Aug;9(3):133-138.
- 20) Yu G, Kjellman NI, Bjorksten B. Phospholipid fatty acids in cord blood: family history and development of allergy. *Acta Paediatr* 1996 Jun;85(6):679-683.
- 21) Gurr MI. The role of lipids in the regulation of the immune system. *Prog Lipid Res* 1983;22(4):257-287.
- 22) Calder PC, Bond JA, Newsholme EA. Fatty acid inhibition of concanavalin A-stimulated lymphocyte proliferation. *Biochem Soc Trans* 1989 Dec;17(6):1042-1043.
- 23) Calder PC, Bond JA, Newsholme EA. Fatty acid inhibition of lipopolysaccharide-stimulated B lymphocyte proliferation. *Biochem Soc Trans* 1990 Oct;18(5):904-905.
- 24) Shinmei Y, Hossen MA, Okihara K, Sugimoto H, Yamada H, Kamei C. Effect of Brazilian propolis on scratching behavior induced by compound 48/80 and histamine in mice. *Int Immunopharmacol* 2004 Oct;4(10-11):1431-1436.
- 25) Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Curr Opin Pulm Med* 2005 Jan;11(1):35-42.