JURNAL ILMU KEFARMASIAN INDONESIA, September 2010, hlm. 125-130 Vol. 8, No. 2
ISSN 1693-1831, AKREDITASI No. 167/DIKTI/KEP/2007

Pengaruh Kubebin, Senyawa Lignan *Piper cubeba* L.f. terhadap Pelepasan Histamin dari RPMCs

(The Effects of Cubebin, a Lignan from *Piper cubeba* L.f. on Histamine Release from RPMCs)

AGUNG ENDRO NUGROHO[1]*, WAHYONO[2], SUBAGUS WAHYUONO[2], KAZUTAKA MAEYAMA[3]

[1]Department of Pharmacology and Clinical Pharmacy, Gadjah Mada University, Jogjakarta, Indonesia.
[2]Department of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University, Jogjakarta, Indonesia.
[3]Department of Pharmacology, Informational Biomedicine, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsugawa , Toon-shi, Ehime 791-0295, Japan.

Diterima 5 Mei 2009, Disetujui 4 September 2010

Abstrak: Kubebin merupakan senyawa lignan yang diisolasi dari tanaman kemukus (*Piper cubeba* L.f.). Penelitian sebelumnya menunjukkan, kubebin menghambat secara poten kontraksi otot polos trakea marmut terisolasi yang diinduksi histamin dan metakolin. Pada penelitian ini, kubebin diuji aktivitasnya terhadap pelepasan histamin dari sel mast peritoneal tikus (RPMCs/sel mast jaringan ikat). Sebagai penginduksi histamin dari sel mast jaringan ikat digunakan *compound* 48/80 (pengaktivasi protein G), thapsigargin (pengaktivasi pompa SERCA), ionomisin (ionofor bagi ion kalsium), dan PMA (aktivator protein kinase C). Penetapan kadar histamin dilakukan dengan menggunakan HPLC-fluorometri. Pada penelitian ini, kubebin konsentrasi 30 dan 100 µM mampu menghambat pelepasan histamin yang diinduksi oleh thapsigargin masing-masing sebesar 12,86 ± 1,84% dan 40,38 ± 1,93%. Namun, kubebin tidak berhasil menghambat pelepasan histamin yang diinduksi *compound* 48/80, ionomisin, ataupun PMA. Hasil ini mengindikasikan bahwa kubebin menghambat pelepasan histamin dari sel mast jaringan ikat, dan kemungkinan melibatkan aktivasi pompa *sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase.*

Kata kunci: kubebin, histamin, sel mast jaringan ikat, RPMCs.

Abstract: Cubebin is a lignan isolated from Indonesian plant *Piper cubeba* L.f fruits. Cubebin has been found to strongly inhibit contraction of isolated-trachea of guinea pig induced by histamine or metacholine. In the present study, the effect of cubebin was investigated on histamine release from rat peritoneal mast cells (RPMCs), a connective tissue mast cell. Compound 48/80 (G Protein activator), thapsigargin (SERCA inhibitor), ionomycin (calcium ionophore), and PMA (PKC activator) were used as inducers for histamine release from connective tissue mast cell. Histamine released in the medium was measured by HPLC-fluorometry. The results showed that cubebin at the concentration of 30 and 100 µM inhibited the histamine release from RPMCs induced by thapsigargin by 12.86 ± 1.84 % and 40.38 ± 1.93 %, respectively. In addition, there was a partial inhibition seen in respond to ionomycin, with no effects towards compound 48/80 or PMA. These data indicate that cubebin inhibited the histamine release from connective mast cells, and might involve in the activation of sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase.

Keywords: cubebin, histamine, connective tissue mast cell, RPMCs.

* Penulis korespondensi, HP. 085643929723
e-mail: agungendronugroho@yahoo.com

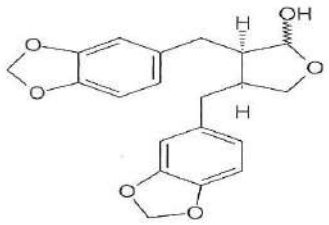
PENDAHULUAN

PENGOBATAN trasidional (*traditional medicine*) merupakan praktik kesehatan, pendekatan, pengetahuan dan kepercayaan mengenai obat-obatan dari tanaman, hewan dan mineral, terapi spiritual yang dapat diterapkan secara tunggal atau dengan kombinasi dengan perawatan, diagnosis dan pencegahan penyakit atau pemeliharaan kesehatan. Di negara berkembang terutama Afrika, 80% populasi masyarakat masih menggunakan pengobatan tradisional dalam perawatan kesehatan utama. Di Cina, produk tanaman tradisional mencapai 30–50% dari total penggunaan obat. Pasar dunia menunjukkan bahwa perdagangan obat tradisional dari tahun ke tahun menunjukkan peningkatan[1]. Seiring fakta tersebut, penelitian ekplorasi tanaman tradisional obat semakin meningkat guna mendapatkan suatu obat tradisional yang poten dan efektif. Penelitian obat-obat anti-asma juga banyak dilakukan, dari upaya isolasi senyawa berkhasiat anti-alergi, khususnya anti-asma, hingga mempelajari target molekul aksi obat tradisional tersebut.

Piper cubeba L.f. atau dikenal dengan nama kemukus dilaporkan mempunyai aktivitas farmakologi sebagai anti-asma dan anti-inflamasi[2,3]. Ekstrak n-heksan dan ekstrak etanol tanaman tersebut dapat menurunkan kontraksi otot polos trakea yang diinduksi histamin atau metakolin[4].

Dari ekstrak n-heksana *Piper cubeba* L.f. diisolasi senyawa aktif yang merupakan senyawa golongan lignan, yaitu kubebin (Gambar 1) dan dihidrokubebin. Kedua senyawa lignan tersebut dapat menghambat reaksi inflamasi, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, serta menunjukkan aktivitas trakeospasmolitik pada percobaan organ terisolasi. Kubebin menurunkan kontraksi otot polos trakea hingga 80%, sementara aktivitas dihidrokubebin lebih rendah dibandingkan kubebin[5]. Temuan tersebut memberikan harapan yang cerah bagi pengembangan obat anti-asma. Hasil penelitian tersebut didukung penelitian yang dilakukan terhadap genus Piper yang lain. Ekstrak *Piper longum* menunjukkan efek penghambatan pada anak-anak penderita asma bronkial[6]. *Piper fitokadsura* mengandung tiga senyawa neolignan yang menghambat aktivitas ikatan platelet terhadap sisi reseptornya pada membran platelet plasma terisolasi dari kelinci[2].

Pada penelitian ini, kubebin yang pada penelitian sebelumnya dilaporkan poten, diuji aktivitasnya terhadap pelepasan histamin dari sel mast peritoneal tikus (*rat peritoneal mast cells*), suatu sel mast jaringan ikat. Senyawa yang digunakan untuk menginduksi pelesapan histamin dari sel mast adalah *compound* 48/80, ionomisin, thapsigargin dan *phorbol myristate acetate* (PMA).



Gambar 1. Struktur kimia dari kubebin.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan uji utama adalah kubebin yang diisolasi dari *Piper cubeba* L.f. yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu, Jawa Tengah, Indonesia. Isolasi kubebin dilakukan terhadap ekstrak n-heksana dengan metoda *bioassay-guided isolation*[5]. Sebagai senyawa pengaktivasi sel mast digunakan *compound* 48/80 (pengaktivasi protein G), thapsigargin (*SERCA inhibitor*), ionomisin (ionofor ion kalsium), dan *phorbol myristate acetate* (PMA) yang diperoleh dari Sigma Chemical, USA. *Monoclonal Imunoglobulin E* diperoleh dari Department of Pharmacology, School of Medicine, Ehime University. Bahan lainnya adalah *medium MEM* dan antibiotika (kombinasi natrium penisilin G dan streptomisin sulfat) (Grand Island, NY), *fetal calf serum* (JRH Biosciences), PIPES (Dosindo, Kumamoto Japan).

Subjek uji yang digunakan adalah tikus jantan Wistar dengan berat 250–300 g dan usia 3-4 bulan. Hewan uji dikarantina dan diaklimatisasikan selama satu minggu di laboratorium. Tikus dipelihara dalam kamar hewan pada suhu ruangan (±28°C) dan diberi sirkulasi udara yang cukup melalui ventilasi udara. Hewan uji ditempatkan dalam kandang hewan, diberi makanan yang sesuai dan air minum matang secukupnya dalam botol minuman (sumber air PAM) secara *ad libitum*. Pengelompokan hewan uji dilakukan secara acak satu hari sebelum perlakuan dimulai guna menjamin homogenitas kelompok dalam hal berat badan. Masing–masing hewan uji diberi kode, dan masing -masing sangkar ditempel etiket yang menunjukkan nomor kelompok, jalur pemberian, peringkat dosis, jenis kelamin, dan nomor hewan.

Cara kerja. Preparasi sel mast peritoneal tikus (RPMCs). Percobaan ini dilakukan isolasi sel mast tipe jaringan ikat pada daerah peritoneal tikus. Tikus dikurbankan dengan cara dekapitasi, kemudian sel mast peritoneal diisolasi melalui rongga peritoneal dengan menggunakan larutan *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,4 yang mengandung 5 IU/mL heparin dan 0,1% BSA. Larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 1.000 rpm selama 5 menit, kemudian endapan yang

terbentuk diresuspensi dengan PBS yang mengandung 0,1%BSA, diikuti dengan penambahan secara hati-hati 38% BSA. Setelah disentrifugasi (2.000 rpm selama 20 menit), endapan pelet diresuspensikan dengan dapar PIPES. Pada pengecatan dengan *toluidine blue*, kemurnian sel mast dengan proses ekstraksi di atas adalah sebesar 95 %.

Uji aktivitas terhadap pelepasan histamin. Sebanyak 120 µL suspensi RPMCs (2 x 10^4 sel/mL) diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, dengan penambahan dapar PIPES baik tanpa (kontrol negatif) atau dengan kubebin (1–100 µM). Setelah inkubasi, sebanyak 20 µL larutan stimulan sel mast (*compound* 48/80 100 µg/mL, thapsigargin 5 µM, ionomycin 1 µM, atau kombinasi PMA 100 nM dan ionomisin konsentrasi sub-optimum 0,1 µM) ditambahkan pada tiap sumuran (*well*), kemudian plate diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah inkubasi 30 menit, plate disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3.000 rpm, dan supernatan sebanyak 50 µL dipindah ke tube 1,5 mL. Pada supernatan ditambahkan asam perklorat 3% sebanyak 250 µL, dan di-*mixer*. Setelah itu, ditambahkan pula larutan KOH 2M/ KH_2PO_4 1 M sebanyak 30 µL, dicampur, kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan siap ditetapkan kadar histaminnya. Untuk penetapan histamin total, terhadap 6 sumuran dilakukan sonifikasi untuk kemudian homogenat sel siap dilakukan penetapan kadar histamin.

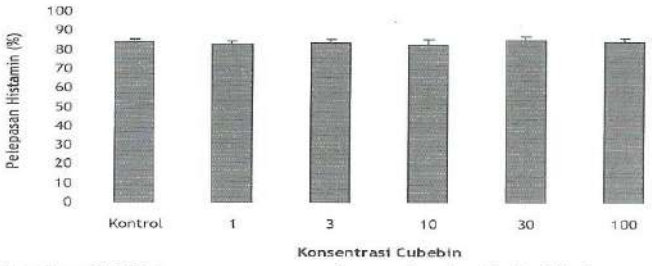
Penetapan kadar histamin. Pelepasan histamin dari sel mast ditetapkan dengan HPLC-fluorometri[7]. Sebanyak 50 µL supernatan dan homogenat sel dinjeksikan pada kolom TSKgel SP-2SW *Cation Exchanger* (Tosoh, Tokyo). Fase gerak HPLC yang digunakan adalah larutan dapar kalium fosfat 0,25 M dan larutan o-*phthalaldehyde* dalam kondisi alkali. Deteksi fluorometri dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 360 nm dan emisi 450 nm.

Analisis data. Data penelitian yang disajikan dalam bentuk persentase pelepasan histamin. Nilai tersebut merupakan kadar histamin yang dilepaskan oleh sel mast dalam medium dibagi dengan kadar histamin dalam sel mast (*total histamine content*), kemudian dikalikan seratus persen. Semua data disajikan dalam bentuk *mean* ± SEM. Analisis statistika menggunakan *one-way analysis of variance* (ANOVA), dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* (LSD). Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

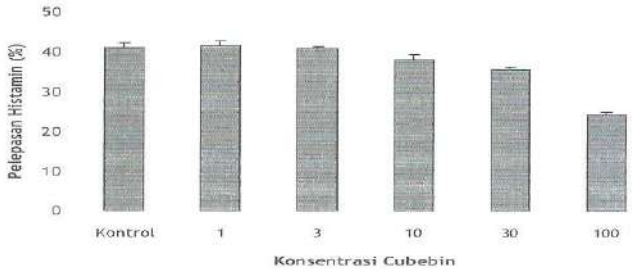
Pada percobaan ini, dilakukan uji aktivitas kubebin, senyawa lignan dari *Piper cubeba*, terhadap pelepasan histamin dari sel mast peritoneal tikus (RPMCs). Sebagai stimulan histamin digunakan *compound* 48/80 (100 µg/mL), thapsigargin (5 µM), ionomisin (1 µM) dan PMA (100 nM, dikombinasi dengan ionomisin konsentrasi sub optimum 0,1 µM). Pada Gambar 2-5, disajikan hasil pengaruh kubebin terhadap kadar pelepasan histamin dari RPMCs. Kadar pelepasan histamin merepresentasikan sebagai persentase pelepasan histamin dibandingkan dengan kadar histamin total dari RPMCs. Pada penelitian ini, konsentrasi kubebin yang digunakan adalah 1, 3, 10, 30, dan 100 µM.

Pada RPMCs, *compound* 48/80 (pengaktivasi protein G pada sel mast) konsentrasi 100 µg/mL mampu menstimulasi pelepasan histamin sebesar 84,19±1,48%. Perlakuan kubebin dengan seri konsentrasi 1–100 µM tidak mempengaruhi pelepasan histamin dari RPMCs secara bermakna ($P>0,05$) (Gambar 2). Thapsigargin (*SERCA inhibitor*) konsentrasi 5 µM merangsang pelepasan histamin dari RMPCs sebesar 41,17 ± 1,31%. Pada RPMCs, perlakuan kubebin mampu menghambat pelepasan histamin (Gambar 3). Pada dosis rendah (1–10 µM), kubebin belum mampu menghambat pelepasan histamin yang diinduksi thapsigargin. Namun, konsentrasi kubebin 30 dan 100 µM secara bermakna ($P<0,05$) mampu menghambat pelepasan histamin masing-masing sebesar 12,86 ± 1,84% dan 40,38 ± 1,93% (Tabel 1).



Gambar 2. Histogram pengaruh pemberian kubebin konsentrasi 1-100 µM terhadap pelepasan histamin dari RMPCs dengan induksi *compound* 48/80. Nilai % pelepasan histamin adalah kadar histamin yang dilepaskan oleh sel mast dalam medium dibagi dengan kadar histamin dalam sel mast (*total histamine content*), kemudian dikalikan seratus persen.

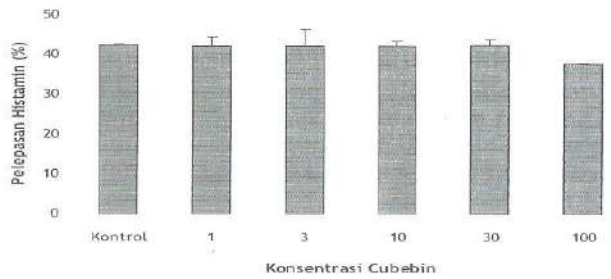
Ionomisin, senyawa ionofor yang dapat meningkatkan influk ion kalsium pada sel mast, pada konsentrasi 1 µM dapat menstimulasi pelepasan histamin dari RMPCs sebesar 42,42 ± 0,40%. Pada Gambar 4 tampak bahwa perlakuan kubebin tidak mempengaruhi pelepasan histamin yang diinduksi ionomisin, meski pada konsentrasi tertinggi (100 µM) mampu sedikit menghambat pelepasan histamin (10,81 ± 0,83%) (Tabel 1).



Gambar 3. Histogram pengaruh pemberian kubebin konsentrasi 1-100 μM terhadap pelepasan histamin dari RMPCs dengan induksi thapsigargin. * Berbeda bermakna dibandingkan kontrol (P<0,05). Nilai % pelepasan histamin adalah kadar histamin yang dilepaskan oleh sel mast dalam medium dibagi dengan kadar histamin dalam sel mast (*total histamine content*), kemudian dikalikan seratus persen.

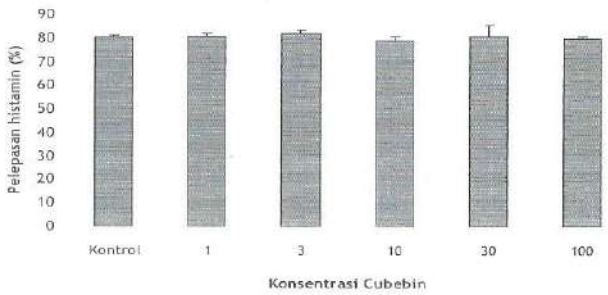
Tabel 1. Harga efek penghambatan kubebin terhadap pelepasan histamin dari RPMCs.

No.	Konsentrasi marmin (μM)	Induktor histamin	Penghambatan histamin (%)
1.	10	Thapsigargin	12,86±1,84
2.	100	Thapsigargin	40,38±1,93
3.	100	Ionomisin	10,81±0,83



Gambar 4. Histogram pengaruh pemberian kubebin konsentrasi 1-100 μM terhadap pelepasan histamin dari RMPCs dengan induksi ionomisin. * Berbeda bermakna dibandingkan kontrol (P<0,05). Nilai % pelepasan histamin adalah kadar histamin yang dilepaskan oleh sel mast dalam medium dibagi dengan kadar histamin dalam sel mast (*total histamine content*), kemudian dikalikan seratus persen.

Pada percobaan berikutnya, pemberian PMA konsentrasi 100 nM tunggal pada sel mast peritoneal tikus (RPMCs) hanya mampu merangsang pelepasan histamin sebesar 15%. Oleh karena itu, pemberian PMA 100 nM dikombinasikan dengan ionomisin subdosis optimal (0,1 μM). Kombinasi tersebut mampu merangsang pelepasan histamin sebesar 80,17 ± 1,06% (Gambar 5). Pada percobaan ini, kubebin dengan seri konsentrasi 1–100 μM tidak mempengaruhi pelepasan



Gambar 5. Histogram pengaruh pemberian kubebin konsentrasi 1-100 μM terhadap pelepasan histamin dari RMPCs dengan induksi kombinasi PMA dan ionomisin (dosis sub optimum). Nilai % pelepasan histamin adalah kadar histamin yang dilepaskan oleh sel mast dalam medium dibagi dengan kadar histamin dalam sel mast (*total histamine content*), kemudian dikalikan seratus persen.

histamin dari RPMCs secara bermakna (P>0,05).

Pada tikus, sel mast terdapat pada 2 jaringan utama, yaitu jaringan ikat (*connective tissue mast cells*) dan mukosa (*mucosa mast cells*). Sel mast peritoneal tikus (*rat peritoneal mast cells*) merupakan contoh sel mast jaringan ikat, sementara *rat basophilic leukemia* merupakan contoh dari sel mast mukosa. Kedua sel mast tersebut berbeda dalam hal ontogenik, ultrastruktural, sitokimia maupun proses biokimia dalam bagian intraselulernya. Sel mast mukosa mempunyai granul yang jumlahnya lebih sedikit (kira-kira 10 kali) dibandingkan sel mast jaringan ikat. Berdasarkan pewarnaan terhadap proteoglikan, sel mast mukosa lebih dominan mempunyai kondroitin, sementara sel mast jaringan ikat dominan mempunyai heparin. Respons stimulasi pada sel mast jaringan akan menghasilkan prostaglandin D2 (PGD2), sementara sel mast mukosa menghasilkan PGD2, leukotrin C4 dan B4[8]. Dalam kontraksi otot polos trakea tikus, sel mast jaringan ikat lebih penting dibanding sel mast mukosa[9,10]. Mempertimbangkan hal di atas, maka pada penelitian ini digunakan sel mast peritoneal tikus (RMPCs) sebagai model sel mast jaringan ikat.

Pada penelitian ini digunakan beberapa induktor sel mast untuk melepaskan histamin, yaitu *compound* 48/80, thapsigargin ionomisin dan PMA. *Compound* 48/80 merupakan senyawa penginduksi sel mast dengan meningkatkan kecepatan interaksi GTP-S terhadap protein G[11,12]. Aktivasi terhadap protein G pada membran sel mast memicu serangkaian peristiwa biokimiawi dalam intraseluler sel mast, misalnya aktivasi fosfolipase C, protein kinase C dan ion kalsium intraseluler, yang akhirnya menghasilkan pelepasan histamin dari sel mast[13]. Thapsigargin merupakan senyawa lakton sesquiterpen yang dapat menghambat pompa *sarco/endoplasmic reticulum*

Ca2+ ATPase (SERCA) pada sitoplasma sel mast sehingga dapat mencegah pengisian ion kalsium kembali pada retikulum endoplasma. Hal tersebut mengakibatkan kenaikan ion kalsium intraseluler, yang kemudian mengakibatkan pembukaan kanal ion kalsium pada membran sel mast. Hasilnya, terjadi influk ion kalsium menuju ke intraseluler pada sel mast[13,14,15]. Ionomisin merupakan antibiotik polieter yang bisa beraksi sebagai ionofor terhadap ion kalsium, baik pada membran sel maupun intraseluler. Oleh karena itu, ionomisin dapat meningkatkan ion kalsium intraseluler melalui influks ion kalsium maupun dari simpanan intraseluler di retikulum endoplasma. Kenaikan ion kalsium intraseluler dalam sel mast akan memacu pelepasan histamin[16,17]. *Phorbol myristate acetate* (PMA) merupakan senyawa yang mengaktivasi protein kinase C, namun untuk dapat menstimulasi pelepasan histamin diperlukan influks ion kalsium, karena untuk proses translokasi PKC menuju membran sel diperlukan kadar ion kalsium yang memadahi[18,19,20,21].

Beberapa tanaman genus *Piper* dilaporkan mempunyai aktivitas anti-alergi[22]. Ekstrak *Piper longum* menunjukkan efek penghambatan pada anak-anak penderita asma bronkial[6]. *Piper futokadsura* mengandung tiga senyawa neolignan yang dapat menghambat aktivitas ikatan platelet terhadap sisi reseptornya pada membran platelet plasma terisolasi dari kelinci[2].

Pada penelitian sebelumnya, ekstrak n-heksana dan ekstrak etanol *Piper cubeba* dapat menurunkan kontraksi otot polos trakea marmut yang diinduksi baik histamin atau metakolin. Lebih lanjut, diperoleh senyawa aktif yang merupakan senyawa golongan lignan, yaitu kubebin dan dihidrokubebin dari ekstrak yang potensial dari *Piper cubeba*. Kedua senyawa lignan tersebut dapat menghambat reaksi inflamasi baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, serta menunjukkan aktivitas trakeospasmolitik pada percobaan organ terisolasi. Kubebin menurunkan kontraksi otot polos trakea hingga 80%, sementara aktivitas dihidrokubebin lebih rendah dibandingkan kubebin[5]. Pada penelitian, kubebin hanya dapat menghambat secara nyata pelepasan histamin dari sel mast peritoneal tikus yang diinduksi thapsigargin. Namun, kubebin tidak mampu menghambat pelepasan histamin yang diinduksi oleh *compound* 48/80 atau PMA. Pada percobaan dengan ionomisin, kubebin pada dosis tinggi menghambat pelepasan histamin, namun potensi penghambatannya sangat rendah sekali. Hasil ini mengindikasikan bahwa kubebin menghambat pelepasan histamin dari sel mast jaringan ikat, dan kemungkinan melibatkan aktivasi pompa *sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase*.

SIMPULAN

Pada percobaan ini, kubebin yang diisolasi dari tanaman *Piper cubeba* L.f. mampu menghambat pelepasan histamin dari sel mast peritoneal tikus (RPMCs) yang diinduksi oleh thapsigargin. Namun, kubebin tidak dapat dalam menghambat pelepasan histamin yang diinduksi *compound* 48/80, ionomisin, atau PMA.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. 2010; [Artikel dalam internet]. Traditional Medicine. diambil dari: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/. diakses 4 September 209. Traditional medicine. diambil dari : http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/. diakses 30 Agustus 2009.
2. Chang MN, Han GQ, Arison BH, Springer JP, Hwang SB, and Shen TY. Neolignan from Piper futokadsura. Phytochemistry.1985. 24: 2079-82.
3. Souza GH, da Silva Filho AA, de Souza VA, Pereira AC, Royo V A, de Silva ML, da Silva R, Donate PM, Carvalho JC, Bastos JK. Analgesic and anti-inflammatory activities evaluation of (-)-O-acetyl, (-)-O-methyl, (-)-O-dimethylethylamine cubebin and their preparation from (-)-cubebin. Farmaco. 2004. 59(1): 55-61.
4. Wahyuono S, Mulyono, Wahyono, and Mursyidi A. Tracheospasmolytic Activity of Piper cubeba fructus. Ind J Pharm. 1999. 10:48-56.
5. Wahyono. Isolation and Structure Elucidation of Tracheospasmolytic Compounds from Piper cubeba Fruits [Dissertation]. Jogjakarta : Gadjah Mada University, Jogjakarta: 2005. 34-45.
6. Dahanukar SA, Karandikar SM, and Desai M. Efficacy of Piper longum in childhood asthma. Indian Drugs.1984. 21: 384-8.
7. Yamatodani A, Fukuda H, Wada H, Iwaeda T, Watanabe T. High-performance liquid chromatographic determination of plasma and brain histamine without previous purification of biological samples : cation-exchange chromatography coupled with post-column derivatization fluorometry. J Chromatogr.1985. 344:115-123.
8. Dale MM, Foreman JC, and Fan TD. Textbook of Immunopharmacology. 3rd Eds. Oxford : Blackwell Scientific Publication; 1994. 21-34.
9. Ikawati Z, Hayashi M, Nose M, Maeyama K. The lack of compound 48/80-induced contraction in isolated trachea of mast cell-deficient Ws/Ws rats in vitro: the role of connective tissue mast cells. Eur J Pharmacol. 2000. 402(3): 297-306.
10. Ikawati Z, Nose M, Maeyama K. Do mucosal mast cells contribute to the immediate asthma response?. Jpn J Pharmacol. 2001. 86(1): 38-46.
11. Mousli M, Bronner C, Landry Y, Bockaert J, Rouot B. Direct activation of GTP-binding regulatory proteins

(G-proteins) by substance P and compound 48/80. FEBS Lett. 1990. 259(2):260-2.

12. Palomaki VA, Laitinen JT. The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase D-lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT1A receptors in rat brain sections. Br J Pharmacol. 2006. 147(6): 596-606.
13. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. Physiol Rev.1997. 77(4):1033-64.
14. Patkar SA, Rasmussen U, Diamant B. On the mechanism of histamine release induced by thapsigargin from Thapsia garganica L. Agents Actions. 1979. 9(1):53-7.
15. Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca2+ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A.1990. 87(7): 2466-70.
16. Liu WC, Slusarchyk DS, Astle G, Trejo WH, Brown WE, Meyers E. Ionomycin, a new polyether antibiotic. J Antibiot (Tokyo). 1978, 31(9): 815-9.
17. Huang Y, Putney JW Jr. Relationship between intracellular calcium store depletion and calcium release-activated calcium current in a mast cell line (RBL-1). J Biol Chem. 1998. 273(31):1954-9.
18. Chakravarty N. The role of protein kinase C in the histamine secretion from mast cell. Acta Physiol Scand. 1990. 139: 319-33.
19. Katakami Y, Kaibuchi K, Sawamura M, Takai Y, Nishizuka Y. Synergistic action of protein kinase C and calcium for histamine release from rat peritoneal mast cells. Biochem Biophys Res Commun.1984. 121:573-8.
20. Okano Y, Yamada K, Takagi H, Nozawa Y. Biphasic effect of phorbol myristate acetate on histamine secretion induced by compound 48/80 in rat peritoneal mast cells Biochem Biophys Res Commun. 1986. 137(3):1112-8.
21. Okano Y, Takagi H, Nakashima S, Tohmatsu T, Nozawa Y. Inhibitory action of phorbol myristate acetate on histamine secretion and polyphosphoinositide turnover induced by compound 48/80 in mast cells. Biochem Biophys Res Commun. 1985.132(1):110-7.
22. Nayampali SS, Satoskar RS. Evaluation of anti-allergenic activity of Piper longum using rat-lung perfusion technique, in Proc. 13th Annual Conf. Indian Pharmacol Soc., Regional Res., September 30th – October 2nd, Lab. Jammu-Tawi India : 1980.