

쫚신나물 추출물의 알레르기 반응 억제 효과

김 영 미[†]

덕성여자대학교 약학대학 약학과

The Inhibitory Effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb Extract on Allergic Reaction

Young Mi Kim[†]

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea.

ABSTRACT : Complementary and alternative medicines are considered as a promising research field to develop new therapies for various allergic diseases. In this study, we investigated the anti-allergic effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb (AP) by using passive cutaneous anaphylaxis in mice and its mechanism of action in mast cells. The extract of AP reversibly inhibited degranulation in RBL-2H3 cells and bone marrow-derived mast cells (BMMCs). AP also suppressed the passive cutaneous anaphylaxis inducing by IgE and antigen (Ag) in a dose-dependent manner. In the study to find its mechanism of action, AP inhibited the phosphorylation of Syk kinase, a pivotal protein which is regulated by Src-family kinase for activation of mast cells. In addition, AP also suppressed activation of Akt and Erk1/2 that are critical for the production of cytokines in mast cells. The results strongly suggest that AP exerts anti-allergic activity *in vitro* and *in vivo* through the inhibition of activation of Syk in mast cells.

Key Words : *Agrimonia pilosa*, Anti-allergic Effect, Passive Cutaneous Anaphylaxis, IgE, Mast Cells, Syk Kinase

서 언

비만세포는 IgE-의존성 즉시형 과민반응과 다른 알레르기 반응에 있어 중요한 작동세포로 잘 알려져 있다 (Stone *et al.*, 2010; Bischoff, 2007). 이러한 반응은 비만세포 표면의 IgE 고친화성 수용체 (FcεRI)에 결합되어 있는 IgE에 다가성 항원이 결합할 때 세포내 신호전달경로의 활성화를 통해 유도된다. FcεRI 수용체는 IgE가 결합하는 α subunit, 세포신호전달을 증가시키는 β subunit 그리고 세포신호가 시작되는 두 개의 γ subunit으로 구성되어 있다 (Metzger, 2004). 다가성 항원에 의한 비만세포의 FcεRI 수용체를 통한 세포신호전달 경로의 활성화는 FcεRI의 β 및 γ subunit의 ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)의 Lyn 혹은 Fyn 등의 Src-family kinase에 의한 인산화를 통해 시작된다. Syk kinase는 Lyn 이나 Fyn에 의해서도 인산화가 유도되어 활성화될 수 있으며, 또한 FcεRI의 인산화된 ITAM 에 결합하여 구조적인 변화를 일으켜서 그 자신의 활성을 증가시킨다 (Mocsai *et al.*, 2010). 이러한 수용체 근접신호전달단백질의 활성화는 하위 신호전달단백질인 LAT (Saitoh *et al.*, 2000), SLP-76 (Pivniouk *et al.*, 1999), Gab2 (Gu *et al.*, 2001), 및

phospholipase (PL) Cγ (Bach and Brashler, 1973) 등의 신호 전달물질의 활성화를 유도하여 최종적으로 비만세포는 다양한 급만성 알레르기 반응의 원인이 되는 히스타민 및 각종 염증성 단백질 분해 효소, TNF-α, IL-4 등 알레르기성 사이토카인, 프로스타글란딘 D2 및 류코트리엔 C4 등의 분비를 유도한다 (Gilfillan and Rivera, 2009; Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

알레르기 질환을 치료하기 위해서 현재 다양한 시도가 이루어지고 있다. 적은 양의 항원을 오랜 기간 동안 환자에 투여하여 특정항원에 대해 탈감작을 유도하는 면역요법 (Noon, 1911; Passalacqua *et al.*, 2009), 비만세포의 활성화에 주요한 IgE 항체를 중화시키는 IgE 항체 투여법 (Holgate and Polosa, 2008), IL-4의 활성을 억제하는 IL-4 수용체의 투여법 (Milgrom, 2004) 등이 있으나 현재 광범위하게 실시하고 있는 치료법은 임상증상을 완화시키는 항히스타민제제의 투여가 일반적이며 약제내성 등으로 치료의 목적을 완전히 달성하기는 어려우므로 아직 더 많은 연구가 필요하다. 이러한 이유로 최근 많은 연구자들에 의해서 제 1형 알레르기 반응에서 중요한 역할을 하는 비만세포의 활성화에 중요한 tyrosine kinase 억제제의 개발을 통한 치료제 개발 연구가 여러 연구팀에 의해서 시도되고 있다 (Krauth *et al.*, 2009; Kim, 2008; Rossi *et al.*, 2006).

[†]Corresponding author: (Phone) +82-2-901-8455 (E-mail) kym123@duksung.ac.kr

Received 2010 August 11 / 1st Revised 2010 October 16 / 2nd Revised 2010 November 10 / Accepted 2010 November 19

한국, 일본 및 중국을 포함한 아시아 여러 나라에서는 전통적으로 식물추출물을 다양한 질병의 치료 및 예방에 적용해 왔다. 최근 국내 다른 연구팀에서도 이러한 것에 착안하여 천연물 유래의 알레르기 혹은 기타 질환 치료 효과를 가진 천연물 추출물에 대한 연구를 활발히 진행하고 있다 (Lee *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010).

짚신나물은 우리나라의 야산이나 길가, 들판 등에 흔히 자라는 여러해살이 풀로써 선학초 및 용아초 등의 여러 이름으로 불리운다. 키는 15-60 cm 정도 자라고 전체에 흰털이 있으며 버들잎 모양 또는 긴 타원 꼴의 쪽잎이 어긋나게 나있으며, 6-7월에 꽃대위에 노란색의 작은 꽃이 모여서 핀다. 짚신나물은 지혈, 소염, 항균, 항암, 혈당강하, 조혈작용 등의 효능이 민간에서 보고 되고 있으나 실험적으로 증명이 되진 않았으며 최근 항산화 효과, 항바이러스 효과 및 iNOS 억제를 통한 항염증효과가 실험적으로 증명되어 보고되어 있다 (Jung *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2009). 하지만 짚신나물의 항알레르기 효과에 대한 보고는 현재까지 없다.

본 저자 등은 여러 종류의 천연 식물 추출물의 항알레르기 효과를 검색을 해왔으며, 본 논문에서는 짚신나물 (*Agrimonia pilosa* Ledeb.) 추출물이 *in vitro* 비만세포와 IgE 의존성 알레르기 동물모델에서 우수한 항 알레르기 효과가 있고 그 작용기전은 비만세포의 활성화 초기 신호전달물질인 Syk kinase의 활성화의 억제를 통해 약효가 나타남을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

DNP-BSA (antigen, Ag), DNP-specific IgE, Arabic gum, diphenylhydramine (DPH) 및 에만스블루는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. PP2 (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo[3,4-d]pyrimidine)는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였고 인산화된 혹은 인산화되지 않은 ERK1/2, Akt, JNK 및 Syk에 대한 항체는 Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. LAT 및 phosphotyrosine (4G10)에 대한 항체는 Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)에서 구입하였다. 비만세포의 배양을 위해 Minimum essential medium (MEM), RPMI (Roswell Park Memorial Institute) media, 글루타민과 다른 세포배양 시약은 GIBCO/Life Technologies Inc. (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 그 외 모든 시약은 시판되는 특급시약을 구입하여 사용하였다.

2. 짚신나물 추출물의 제조

짚신나물 추출물 (013-076)은 한국식물추출물은행 (Plant extract bank)으로부터 입수하여 사용하였다. 간단히 추출과정

을 기술하면 100 g의 건조된 짚신나물 전초를 50°C에서 메탄올 1000 ml에서 초음파 추출기를 이용 추출하였으며 추출액은 스피드백을 이용하여 40°C에서 24시간 동안 건조하였다. 건조후의 수득률은 약 15%였으며 추출과정에 따른 품질의 오차를 줄이기 위해 추출물은 비만세포의 항원 자극에 의한 탈과립 억제 효과를 확인한 후 실험에 사용 하였다.

3. 생쥐 골수유래 비만세포(BMMC) 및 RBL-2H3 비만세포의 분리 및 배양

생쥐 골수유래 비만세포 (bone marrow-derived mast cells, BMMC)는 이미 보고된 방법 (Jensen *et al.*, 2006)에 의해 4-5주령 웅성 Balb/c 생쥐에서 다음과 같은 과정을 거쳐 추출하였다. BMMC는 10 ng/ml IL-3를 함유한 RPMI배지 (RPMI 1640, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, antibiotics 및 10% fetal calf serum)에서 배양하였으며 3주후 약 98% 이상의 세포가 BMMC로 분화된 것을 FACS 분석을 통해 확인되었다. BMMCs 및 RBL-2H3 cells을 항원으로 자극하기위해 20 ng/ml DNP-specific IgE로 4시간 이상 감각시킨 후 BMMC는 Tyrode-BSA 완충액 (20 mM HEPES, pH 7.5, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM glucose, 0.05% BSA)로 교체후 20 ng/ml 항원 (DNP-BSA)으로 자극하여 짚신나물 추출물의 효능을 짚신나물 추출물을 처리하지 않은 대조군과 비만세포 활성을 비교하여 확인하였다. RBL-2H3 비만세포는 glutamine, antibiotics, 15% FBS를 포함한 MEM 배지에서 배양하였으며 항원자극은 PIPES 완충액 (25 mM PIPES, pH 7.2, 159 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, 0.1% BSA)에서 BMMC와 동일하게 IgE를 사용하여 감각시키고 항원자극을 시켰다.

4. 비만세포에서 탈과립 측정

BMMC와 RBL-2H3 비만세포를 24-well 배양플라스크 (2×10^5 cells/0.4 ml/well)에 분주하고 20 ng/ml DNP-specific IgE를 포함한 배지에서 4시간 이상 감각시킨 후 비만세포를 PIPES (RBL-2H3 세포) 혹은 Tyrode (BMMCs) 완충액으로 세척 후 well 당 0.2 ml의 같은 완충액을 첨가하였다. 항원으로 자극하기 30분 전에 짚신나물 추출물 혹은 대조군으로 DMSO 용액을 넣고 20 ng/ml 항원을 첨가 후 10분 동안 세포를 자극하였다. 탈과립은 비만세포내 과립 속에 포함되어있다가 세포밖으로 분비되는 β -hexosaminidase의 활성을 측정하여 전체 β -hexosaminidase의 활성에 대한 세포밖 배지로 분비된 그 효소의 활성 비율로 계산하였다.

5. Immunoblotting 분석

항체를 이용한 Immunoblotting 분석은 IgE로 감각된 비만

세포를 6 well 배양용기에서 20 ng/ml 항원으로 7분간 자극하고 얼음위에서 반응을 중지시켰다. 자극한 세포를 약 4°C의 PBS 완충액으로 3회 세척 후 0.25 ml lysis 완충액 (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Noidet p-40, 10% glycerol, 60 mM cotyl β-glucoside, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 2.5 mM nitrophenylphosphate, 0.7 μg/ml pepstatin, a prease-inhibitro cocktail tablet)에서 30분간 세포를 파쇄한 다음 15,000 g에서 15분 동안 냉장 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 단백질 정량후 시료로 사용하였다. 2x Laemmli buffer를 넣은 후 95°C에서 5분간 끓인 후 15 μl의 시료를 SDS-PAGE상에서 분리한 후 nitrocellulose 막에 이동시키고 5% skim milk를 포함한 TBS-T 완충액 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)으로 1시간 동안 처리하였다. 이후 측정하고자 하는 단백질에 대한 1차 항체를 1:1000배로 희석하여 약 4°C에서 하룻밤 처리하였다. 막을 TBS-T로 세척 후 HRP에 연결되어 있는 2차 항체를 1:2000배로 희석하여 1시간 동안 상온에서 처리, 세척 후 목적하는 단백질은 chemiluminescent 시약을 회사에서 원하는 실험절차에 따라 원하는 단백질을 검출 후 LAS3000(Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 nitrocellulose 막의 단백질을 확인하였다.

6. 제 1형 알레르기 동물모델 (passive cutaneous anaphylaxis) 실험

4주령의 음성 Balb/c 마우스를 대한실험동물센터 (음성, 한국)에서 구입하여 덕성여자대학교 약학대학 동물사육시설에서 사육하였다. 사육조건은 온도 22 ± 1°C 및 습도 55 ± 10%에 12시간 light-dark cycle을 유지하였으며 1주일간 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 1주일간 적응기간이 끝난 후 실험동물을 대조군과 실험군으로 투여군으로 그룹 당 10 마리를 사용하여 구분한 후 이전에 보고된 방법 (Kabu *et al.*, 2006)에 의해 실험을 실시하였다. DNP-BSA 특이 IgE 0.5 μg을 마우스의 오른쪽 귀에 피내주사하고 24시간 후 대조군으로 5% arabic gum을 혹은 5% arabic gum에 현탁된 실험군으로 추출물을 농도에 따라 경구로 투여한 다음, 1시간 후 4% 에 반스블루용액에 녹아있는 250 μg 항원 (DNP-BSA)을 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 항원주사 1시간 후 치사 하여 귀를 제거, 700 μl formamide 용액에 넣은 후 70°C에서 하룻밤 동안 추출한 후 추출된 에반스블루 색소의 양은 620 nm에서 미리 작성한 검량선과 비교하여 에반스블루 농도를 측정하였다.

7. 통계처리

실험결과는 최소 3번 이상 반복한 실험결과의 평균값 ± 분산으로 표시하고 one-way ANOVA 및 Dunnet's test를 이용 통계적 유의성을 검증하였다. 대조군과 실험군과의 유의성 검

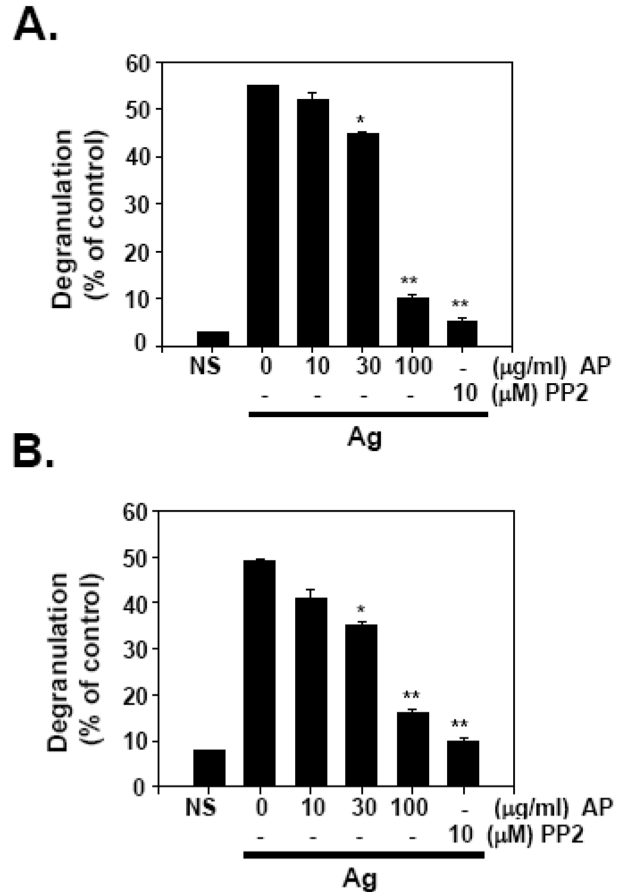


Fig. 1. Effect of AP on antigen-induced degranulation in RBL-2H3 mast cells and BMMCs. RBL-2H3 cells (A) and BMMC (B) were incubated overnight in 24 well cluster plates, with 20 ng/ml DNP-specific IgE, in a complete growth medium. The medium was replaced with a Tyrode (for BMMCs) or PIPES (for RBL-2H3 cells) buffer that contained the indicated concentration of AP, before stimulating with 20 ng/ml DNP-BSA (Ag), to measure the release of β-hexosaminidase. The values are expressed as mean ± SEM from the three independent experiments. PP2 (10 μM) is a general Src-family kinase inhibitor as a reference reagent. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and the Dunnett's test. Significant differences are indicated follows: *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001.

정은 SigmaStat 프로그램 (Systat Software Inc., Point Richmond, CA)을 이용하여 시행하였다.

결과 및 고찰

1. 비만세포의 항원자극에 의한 탈과립에 대한 실험군 추출물의 억제효과

비만세포는 다양한 알레르기 유발 매개체들을 함유한 과립을 세포내에 포함하고 있다가 항원에 의해 활성화되면 과립이

세포막과 융합되면서 그 속에 가지고 있는 히스타민, β -hexosaminidase, tryptase 등을 세포밖으로 분비하여 여러 가지 제1형 알레르기 반응의 주요한 원인이 된다 (Stone *et al.*, 2010). 본 연구에서는 이러한 항원에 의한 탈과립 현상을 측정하기 위해 RBL-2H3 세포 및 골수유래의 비만세포 (BMCC)에서 항원 자극에 의해 세포밖으로 분비되는 β -hexosaminidase의 깊신나물 추출물에 의한 억제 효과를 측정하였다. 농도선정 예비실험을 통해 처리 농도는 세포독성이 없는 0-100 $\mu\text{g/ml}$ 을 선정하여 실험하였다. 깊신나물 추출물은 항원자극에 의한 비만세포에서의 탈과립을 농도 의존적으로 억제하였으며 IC_{50} 값은 각각 세포에서 약 50.1 $\mu\text{g/ml}$ (RBL-2H3 cells) 및 52.4 $\mu\text{g/ml}$ (BMCCs)였다 (Fig. 1A 및 1B). 비만세포에서 탈과립은 히스타민 등의 알레르기 증상을 유도하는 물질의 분비를 의미하므로 깊신나물 추출물의 탈과립 억제는 제1형 알레르기 반응을 *in vivo* 동물모델이나 사람에서도 알레르기 반응을 억제할 수 있음을 시사하였다.

2. 깊신나물 추출물의 비만세포 탈과립 억제 효과의 가역성 시험

특정 화합물이나 천연 추출물 소재를 의약품으로 개발하기 위하여 그 효과의 가역성은 개발하고자 하는 소재의 부작용 감소 측면에서 많은 의미를 가진다. 왜냐하면 약물의 비가역적인 작용은 인체에 투여 되었을 때 치명적인 부작용을 유발할 가능성이 있기 때문이다. 이에 본 연구자들은 깊신나물 추출물의 비만세포에서의 탈과립 억제 효과의 가역성 시험을 실시하였다. IgE로 감작한 비만세포를 1시간 동안 깊신나물 추출물로 처리한 다음 두 그룹으로 나누어 한 그룹은 추출물을 PIPES 완충액으로 제거하고 다른 그룹은 제거하지 않은 상태에서 항원으로 자극하여 탈과립 활성의 가역성을 비교 측정하였다. 그림 2에서 보여지는 바와 같이 깊신나물 추출물의 탈과립 억제 효과는 완충액으로 세척 시 그 억제효과가 대부분 소멸 됨을 알 수 있었다. 이러한 실험결과는 깊신나물 추출물의 비만세포에 대한 탈과립억제 효과는 가역적임을 보여 주었다 (Fig. 2).

3. 깊신나물 추출물의 비만세포 억제 작용기전

다음으로 본 연구자들은 깊신나물 추출물의 비만세포에서 탈과립 억제를 유도하는 기전을 알아보았다. 깊신나물 추출물의 비만세포 활성화의 억제기전을 연구하기위해 다양한 초기 신호전달물질의 활성화에 대한 깊신나물 추출물의 억제 효과를 측정하였다. IgE/항원자극에 의해 비만세포는 Fc ϵ RI 수용체의 β -subunit에 결합되어 있던 Lyn이 β 및 γ -subunit의 ITAM을 인산화 시켜 세포질에 존재하는 Syk kinase를 수용체와 결합을 유도하여 하위 세포신호전달 물질을 활성화 시킨다 (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). 하위 신호전달 물질중 Syk

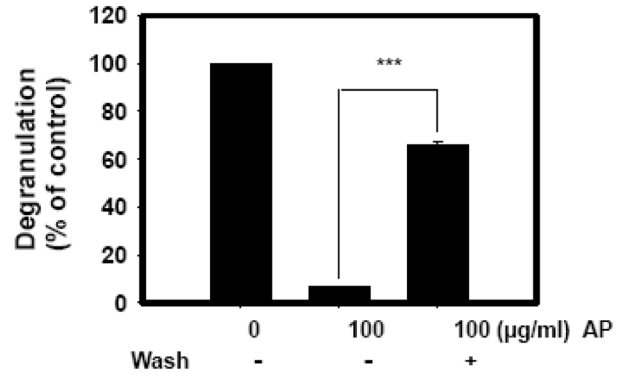


Fig. 2. Effect and reversibility of AP on antigen-stimulated degranulation in mast cells. RBL-2H3 cells were pre-incubated for 1 h with DMSO or 100 $\mu\text{g/ml}$ AP. Then, the cells were washed five times with PIPES buffer before the treatment of DNP-BSA (Ag) to measure the release of β -hexosaminidase. The values are expressed as the mean \pm SEM from three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and the Dunnett's test. Significant differences are indicated follows: *** $P < 0.001$.

kinase는 가장 핵심이되는 신호전달 단백질이며 LAT은 Syk kinase의 직접적인 기질 단백질로서 하위 신호전달물질이 활성화되는데 있어 접착단백질 (adaptor protein)로서 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다 (Saitoh *et al.*, 2000).

본 연구에서는 우선 깊신나물 추출물의 Syk kinase의 인산화에 대한 억제 효과를 확인하였다. 그 결과 깊신나물 추출물은 비만세포의 신호전달에 중요한 Syk kinase의 항원에 의한 타이로신 잔기 인산화를 농도 의존적으로 억제하였다 (Fig. 3A). 그 억제는 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 현저하였으며 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 인산화가 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 3A). 특히 Syk kinase의 317번 위치의 아미노산인 tyrosine은 Lyn 등 Src-family kinase의 직접적인 기질로서 잘 보고되어져 있다 (Chu *et al.*, 1998; Law *et al.*, 1996; Mócsai *et al.*, 2010). 이러한 것은 깊신나물 추출물이 Src-family kinase의 활성의 억제를 통해 Syk kinase의 인산화를 억제하는 것을 의미한다. 다음으로 Syk kinase의 직접적인 기질 단백질이며 비만세포 활성화에 주요한 역할을 하는 adaptor 단백질인 LAT (linker for activation of T cells)의 인산화도 Syk kinase의 인산화 억제와 비슷한 정도로 억제되는 결과를 얻었다 (Fig 3A). 이러한 결과는 깊신나물 추출물의 비만세포 억제 효과는 Fc ϵ RI 수용체와 근접한 초기 신호전달과정에서의 중요한 역할을 하는 Syk kinase의 활성의 억제를 통해 그 억제효과를 나타나는 것으로 보여진다.

최근 Lyn/Syk kinase 신호전달경로 이외에도 비만세포를 활성화시키는 다른 신호전달 경로인 Fyn/Gab2/PI3K 신호전달경로가 존재함이 보고 되었다 (Parravicini *et al.*, 2003). 따라서

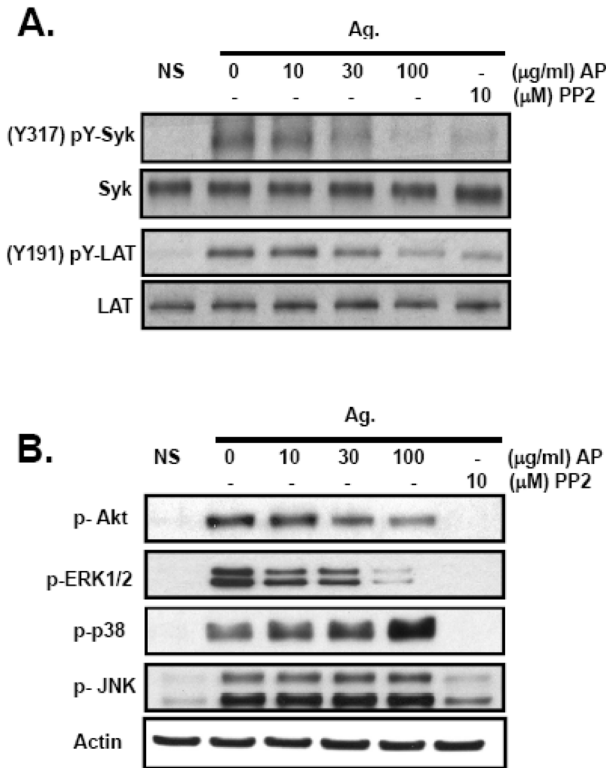


Fig. 3. Effect of AP on activation of Syk kinase, Akt, and MAP kinases. (A) The RBL-2H3 cells were incubated overnight in 6 well plates with 25 ng/ml DNP-specific IgE. The cells were stimulated with 25 ng/ml antigen (Ag), with or without AP, for 7 min. The whole cell lysates were subjected to immunoblot analysis to detect phosphorylated or non-phosphorylated forms of target proteins. Representative blots are shown from three independent experiments. PP2(10 μM) is a general Src-family kinase inhibitor.

우리는 이 보조적인 신호전달과정에대한 쥘신나물 추출물의 억제효과를 측정하였다. 그 결과, PI3K의 활성화를 표시하는 Akt의 인산화도 역시 쥘신나물추출물에 의해 억제되는 것을 볼 때 이 신호전달경로 역시 본 추출물에 의해 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 3B). 이러한 것은 Lyn과 Fyn은 같은 Src-family kinase로서 쥘신나물추출물에 의해 모두 억제되는 것으로 생각되었다.

한편, Erk1/2, p38 및 JNK MAP kinase는 비만세포에서 항원 자극에 의한 TNF-α 및 IL-4 등의 사이토카인의 생성 및 분비에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히, 최근 보고에 의하면 Erk1/2는 비만세포에서 TNF-α 분비에 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (McPherson *et al.*, 2009). 쥘신나물추출물은 흥미롭게도 p38 및 JNK의 활성화에는 영향이 없었으며 Erk1/2를 특이적으로 억제하는 효과를 보였다 (Fig. 3B). 이러한 결과로 볼때 쥘신나물 추출물의 Erk1/2 활성화 억제는 비만세포에서 TNF-α 생성을 억제할 가능성이 높은 것으로 생각됐다.

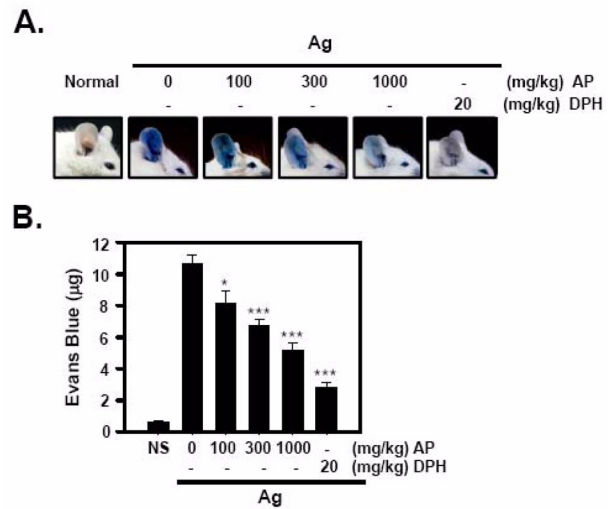


Fig. 4. Effect of AP on passive cutaneous anaphylaxis in mice. An DNP-specific IgE (0.5 μg) was intradermally injected into a mouse right ear. An injection of antigen, 250 μg antigen (Ag, 1 μg/ml in a PBS containing 4% Evans blue), was administered 24 hr later into the mouse tail vein. The AP was administered 1 hr before the treatment of antigen (Ag). The mouse was euthanized 1 hr after the challenge of Ag, and the right ear was removed for the measurement of the amount of dye extravasated. (A) Representative images of ears are shown from three independent experiments. (B) Values for the extravasated amount of Evans blue are expressed as mean±SEM from the three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and the Dunnett's test. Significant differences are indicated follows: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001 (n = 10 per group). DPH (20 mg/kg), a typical anti-histamine drug, was used as a reference.

위의 실험 결과에서 쥘신나물추출물을 전 처리했을 때 p38 및 JNK MAP kinase의 활성화는 변함이 없거나 오히려 증가하는 것으로 봐서 항원이 비만세포의 수용체 결합하는 것을 원천적으로 차단하는 기전은 아닌 것으로 생각되며 그 추출물의 유효성분이 비만세포의 세포막을 통과하여 초기신호전달물질 중 Src-family kinase 억제를 통한 Syk kinase의 활성억제 효과에서 비롯된다는 것을 알 수 있었다.

4. 쥘신나물 추출물의 IgE 매개성 알레르기 반응 억제효과

쥘신나물추출물은 *in vitro* 비만세포를 이용한 실험에서 우수한 알레르기유발 물질 분비 억제 효과를 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 쥘신나물추출물의 IgE/비만세포 의존성 알레르기 동물모델에서 제 1형 알레르기 반응 억제효과를 실험하였다. 본 논문에서는 알레르기 동물모델 중 가장 일반적으로 사용되어지는 IgE 및 비만세포 매개성 국소적 알레르기 동물모델인 passive cutaneous anaphylaxis (PCA)를 사용하였다 (Kabu *et al.*, 2006). 이 동물 모델은 생쥐의 귀에 IgE를 피

내주사하여 국소 비만세포를 감작시키고 항원을 꼬리 정맥주사 후 귀에 존재하는 비만세포 활성화에 의한 에반스 블루 색소의 혈관으로부터의 귀 조직으로의 유출정도를 측정하는 실험이다. 항원에 의한 에반스 블루의 혈관으로부터의 유출은 항원자극에 의해 현저히 증가함을 관찰할 수 있었으며 (Fig. 4A), 항원자극에 의한 귀 조직으로의 에반스 블루의 유출은 짚신나물추출물에 의해 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다 (Fig. 4B). 이러한 억제는 1000 mg/kg 투여군에서 기존 항알레르기 효과를 가진 비교약물인 DPH (대조군대비 약 78% 억제)에 비해 다소 떨어지지만 유의한 효과 (대조군대비 약 52% 억제)를 보여주었다.

따라서 짚신나물추출물의 항알레르기 효과는 IgE/비만세포 매개성 알레르기 동물모델에서도 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 현재 아이들에게 빈발하고 있는 아토피성 피부염에도 치료효과가 예상 되는 바 추후 연구가 더 필요할 것으로 생각되었다. 특히 추출물 자체로 바로 인체에 투여하기에는 다소 투여량이 큰 것을 생각할 때 짚신나물 추출물중 유효성분의 규명 혹은 경구투여이외의 외피용제 등의 개발을 통해 인체에 적용할 수 있는 방법을 연구하면 우수한 의약품 혹은 기능성 식품으로의 개발이 가능하리라 생각되었다.

본 연구를 요약하면 짚신나물추출물의 *in vitro* 비만세포 및 제 1형 알레르기동물모델에서 항알레르기 효과와 그 작용기전을 연구하였다. 짚신나물추출물은 RBL-2H3 및 골수유래의 비만세포 (BMBC)에서 항원자극에 대해 농도의존적인 항알레르기 효과 (IC_{50} = 약 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$)를 보였다. 이러한 항알레르기 효과는 가역적이었으며, 이에 더해 짚신나물추출물은 항원에 의해 유도된 IgE 및 비만세포 의존성 알레르기 동물모델에서 농도 의존적으로 알레르기 반응을 억제하였다. 작용기전으로 짚신나물추출물은 비만세포 초기 신호전달 활성화에 중요한 Syk kinase의 활성을 억제하는 것으로 밝혀졌으며 이는 Src-family kinase의 기질인 Syk kinase의 317번 아미노산 잔기인 tyrosine의 인산화를 억제하는 것을 볼 때 Lyn이나 Fyn 등 Src-family kinase의 억제를 통해 항 알레르기 효과를 획득하는 것으로 생각되었다. 현재 연구로는 짚신나물추출물의 어떤 성분이 항알레르기 효과를 나타내는 것에 대한 연구는 진행되어 있지 않으므로 추후 성분에 대한 연구 및 추출물의 독성에 대한 연구가 심층적으로 이루어지면 짚신나물추출물의 기능성식품이나 의약품으로의 개발이 가능하리라 생각된다.

감사의 글

이 연구는 2008년도 덕성여자대학교에서 지원을 받아 수행된 연구로 이에 감사를 표합니다.

LITERATURE CITED

- Bach MK and Brashler JR.** (1973). On the nature of the presumed receptor for IgE on mast cells. I. The effect of sialidase and phospholipase C treatment on the capacity of rat peritoneal cells to participate in IgE-mediated, antigen-induced histamine release in vitro. *Journal of Immunology.* 110:1599-1608.
- Bischoff SC.** (2007). Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature Review of Immunology.* 7:93-104.
- Chu DH, Morita CT and Weiss A.** (1998). The syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunological Reviews.* 165:167-180.
- Gilfillan AM and Rivera J.** (2009). The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunology Review.* 228:149-169.
- Gilfillan AM and Tkaczyk C.** (2006). Integrated signalling pathways for mast cell activation. *Nature Reviews Immunology.* 6:218-230.
- Gu H, Saito K, Klamann LD, Shen J, Fleming T, Wang Y, Pratt JC, Lin G, Lim B, Kinet JP and Neel BG.** (2001). Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature.* 412:186-190.
- Holgate ST and Polosa R.** (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Review Immunology.* 8:218-230.
- Jensen BM, Swindle EJ, Iwaki S and Gilfillan AM.** (2006). Generation, isolation, and maintenance of rodent mast cells and mast cell lines. *Current Protocols in Immunology.* 3:3.23.
- Jung CH, Kim JH, Park S, Kweon DH, Kim SH and Ko SG.** (2010). Inhibitory effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb on inflammation by suppression of iNOS and ROS production. *Immunological Investigations.* 39:159-170.
- Kabu K, Yamasaki S, Kamimura D, Ito Y, Hasegawa Y, Sato E, Kitamura H, Nishida K and Hirano T.** (2006). Zinc is required for FcεRI-mediated mast cell activation. *Journal of Immunology.* 177:1296-1305.
- Kim JM, Kim DJ, Kim TH, Baek JM, Kim HS and Choe M.** (2010). Effects of water extract of *Glycyrrhiza uralensis* on β-hexosaminidase release and expression of the cytokines of RBL-2H3 mast cells. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 18:231-237.
- Kim YM.** (2008). *Crassirhizomae rhizoma* exhibits anti-allergic activity through inhibition of Syk kinase in mast cells. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 16:27-32.
- Krauth MT, Mirkina I, Herrmann H, Baumgartner C, Kneidinger M and Valent P.** (2009). Midostaurin (PKC412) inhibits immunoglobulin E-dependent activation and mediator release in human blood basophils and mast cells. *Clinical Experimental Allergy.* 39:1711-1720.
- Law CL, Chandran KA, Sidorenko SP and Clark EA.** (1996). Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Molecular and Cellular Biology.* 16:1305-1315.
- Lee JH, Kim JW, Ko NY, Mun SH, Kim DK, Kim JD, Kim HS, Lee KR, Kim YK, Radinger M, Her E and Choi WS.** (2008). *Camellia japonica* suppresses immunoglobulin E-mediated allergic response by the inhibition of Syk kinase

- activation in mast cells. *Clinical and Experimental Allergy*. 38:794-804.
- McPherson VA, Sharma N, Everingham S, Smith J, Zhu HH, Feng GS and Craig AW.** (2009). SH2 domain-containing phosphatase-2 protein-tyrosine phosphatase promotes Fc (epsilon) RI-induced activation of Fyn and Erk pathways leading to TNF (alpha) release from bone marrow-derived mast cells. *Journal of Immunology*. 183:4940-4947.
- Metzger H.** (2004). The high affinity receptor for IgE, Fcepsilon RI. *Novartis Found Symposium*. 257:51-59.
- Milgrom H.** (2004). Anti-IgE therapy in allergic disease. *Current Opinion Pediatrics*. 16:642-647.
- Noon L.** (1911). Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet*. I:1572-1573.
- Mócsai A, Ruland J and Tybulewicz VL.** (2010). The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nature Reviews Immunology*. 10:387-402.
- Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LE, O'Shea JJ and Rivera J.** (2003). Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nature Immunology*. 3:741-748.
- Passalacqua G, Compalati E and Canonica GW.** (2009). Advances in allergen-specific immunotherapy. *Current Drug Targets*. 10:1255-1262.
- Pivniouk VI, Martin TR, Lu-Kuo JM, Katz HR, Oettgen HC and Geha RS.** (1999). SLP-76 deficiency impairs signaling via the high-affinity IgE receptor in mast cells. *Journal of Clinical Investigation*. 103:1737-1743.
- Rossi AB, Herlaar E, Braselmann S, Huynh S, Taylor V, Frances R, Issakani SD, Argade A, Singh R, Payan DG and Masuda ES.** (2006). Identification of the Syk kinase inhibitor R112 by a human mast cell screen. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 118:749-755.
- Saitoh S, Arudchandran R, Manetz TS, Zhang W, Sommers CL, Love PE, Rivera J and Samelson LE.** (2000). LAT is essential for Fc (epsilon)RI-mediated mast cell activation. *Immunity*. 12:525-535.
- Shin WJ, Lee KH, Park MH and Seong BL.** (2010). Broad-spectrum antiviral effect of *Agrimonia pilosa* extract on influenza viruses. *Microbiology and Immunology*. 54:11-19.
- Stone KD, Prussin C and Metcalfe DD.** (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125:S73-S80.
- Xu ML, Hu JH, Wang L, Kim HS, Jin CW and Cho DH.** (2010). Antioxidant and anti-diabetes activity of extracts from *Machilus thunbergii* S. et Z. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:34-39.
- Zhu L, Tan J, Wang B, He R, Liu Y and Zheng C.** (2009). Antioxidant activities of aqueous extract from *Agrimonia pilosa* Ledeb and its fractions. *Chemistry and Biodiversity*. 6:1716-1726.