

불가사리 부타놀 분획의 항알러지 활성

양주혜 · 나민균 · 장현욱[#]

영남대학교 약학대학

(Received March 21, 2011; Revised May 4, 2011; Accepted May 6, 2011)

Anti-allergic Activity of Butanol Fraction of *Asterias amurensis*

Ju Hye Yang, Min Kyun Na and Hyeun Wook Chang[#]

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract — We investigated the effects of butanol fraction of *Asterias amurensis* (BFA) on the anti-allergic activity. BFA inhibited both cyclooxygenase-2 dependent prostaglandin D₂ and 5-lipoxygenase dependent leukotriene C₄ generation in a concentration-dependent manner with IC₅₀ values of 174.6 and 22.2 µg/ml, respectively. In addition, BFA also inhibited the degranulation in a dose dependent manner. Furthermore, oral administration of BFA inhibited IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis in mice. These results suggested that BFA may be useful in regulating mast cell-mediated allergic diseases.

Keywords □ *Asterias amurensis*, mouse bone marrow-derived mast cells, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase, anti-allergic effect

비만세포는 천식, 알러지성 비염, 아토피 피부염이나 식품 알러지 등에 관여하는 가장 중요한 세포로 알려져 있다.¹⁾ 비만세포가 알러지 특이적인 IgE가 비만세포 막에 있는 IgE receptor (FcεRI)와 교차결합(cross-linking)을 하게 되면 활성화되어 과립 속에 저장되어 있는 히스타민뿐만 아니라, 세포막에서 유리된 아라키돈산으로부터 eicosanoid인 prostaglandin D₂(PGD₂), leukotriene C₄(LTC₄) 및 platelet activating factor(PAF)와 같은 지질성 매개체 및 종양괴사인자(tumor necrosis factor-α, TNF-α), 인터루킨-1β(interleukin-1β, IL-1β), IL-6 등과 같은 염증성 사이토카인을 분비하여 각종 염증반응 및 알러지 반응에 관여하게 된다.²⁻⁴⁾

비만세포에서는 eicosanoid 생합성의 시작은 세포막인질에 phospholipase A₂(PLA₂)에 의해 유리되는 아라키돈산(arachidonic acid)에 cyclooxygenases(COXs)에 의한 arachidonic acid의 PGG₂로의 변환과, 동시에 PGG₂의 환원에 의한 PGH₂로의 peroxidase 반응,⁵⁾ hematopoietic PGD₂ synthase와 같은 마지막 단계의 효소에 의해서 이루어진다.⁶⁾ 지질성 매개체 중 prostaglandins(PGs)

생합성에 관여하는 COXs는 세포내 항상성 유지에 관여하는 COX-1과 달리 항체/항원나 cytokine 등의 자극으로 유도되는 COX-2가 발견되어 COX는 적어도 2종류의 동종효소(isozyme)이 존재함이 밝혀졌다. COX-1이 위, 신장을 비롯한 여러 조직에 발현되어 있는 반면, COX-2는 염증 자극으로 유도되는 발현 현상을 나타내어 2개의 효소가 서로 다른 역할을 함이 알려졌다.^{5,6)} 한편 비만세포에서 아라키돈산은 COX-2에 의해 PGD₂와 5-lipoxygenase(5-LOX)경로를 거쳐 LTC₄로 합성된다. Leukotrienes(LTs)는 알러지성 염증반응에 관여하는 지질성 매개체이다. 주로 granulocytes, monocytes/macrophages, mast cells과 같은 myeloid에서 생합성 된다.⁷⁻¹¹⁾

비만세포에 IL-3 존재 하에서 배양한 생쥐골수유래 비만세포(bone marrow-derived mast cells, BMMC)는 IL-10, IL-1β의 혼합조건에서 *c-kit* ligand(KL) 또는 FcεRI 교차에 의하여 활성화되면 COX-2의 발현과 함께 PGD₂의 생산, 내재성 사이토카인의 발현 등이 유도된다고 보고한바있다.^{8,9)} 특히, eicosanoid나 사이토카인의 장시간의 점진적인 생산, 우리는 기관지 천식이나, 아토피성 피부염과 같은 만성적인 알러지환자의 상태를 반영하는 것이기 때문에, 최근에는 비만세포 활성화시의 변화와 분자기전에 대한 관심이 높아지고 있다. BMMC는 *in vitro*에서 쉽게 배양될 수 있다는 사실과 동시에 여러 사이토카인에 대해 반응성을

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-810-2811 (팩스) 053-810-4654
(E-mail) hwchang@yu.ac.kr

가지며, 결합조직형, 점막형 비만세포로의 분화 이전 미성숙 단계 세포라는 점 등에서 비만세포의 병태생리학적 측면을 연구하는데 좋은 재료가 될 수 있다. 본 연구팀은 IL-3 존재하에서 배양한 BMMC를 사용하여 COX-2/5-LOX 동시에 저해하는 화합물을 보고한바 있다.¹²⁻¹⁴⁾

우리나라에는 불가사리류 47종이 보고되어 있으며 남쪽에 비해 북방계의 종이 풍부하다. 특히 아무르 불가사리(*Asterias amurensis* Lütken), 일반적으로 북태평양 불가사리라고 불리며, 동북아시아, 중국, 일본 및 러시아유래로 우리나라의 전역에 퍼져 있어, 어민들에게는 가장 악명 높은 육식성 불가사리이다. 지금까지 불가사리에 관한 연구 중 특히 의약품에 대한 연구는 가장 활발한 분야로서 칼슘성분에 관한 것이었다. 본 연구자들은 최근 아무르불가사리로부터 새로운 saponin을 분리하여 보고했으며,¹⁵⁾ 또한 불가사리 추출물로부터 MMP-9 활성을 억제하는 기능을 보고하였다.¹⁶⁾ 본 연구팀은 지금까지 천연물에서 성분의 분리 및 구조결정에 관한 다년간의 경험을 바탕으로 최초로 아무르불가사리로부터 BMMC를 이용하여 새로운 항알러지 개발하는데 필요한 기초적인 자료를 제공하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

실험방법

시약

Albumin dinitrophenyl(DNP-HSA), anti-DNP IgE, Evans blue, HEPES buffer, sodium azide, Trizma base(Tris), p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide, sodium dodesylsulfate (SDS), bromophenol blue sodium salt, aspirin, ponceau solution, dexamethason, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), skim milk powder, 2-(12-hydroxy-dodeca-5,10-diynyl)-3,5,6-trimethyl-p-benzoquin-one는 Sigma-Aldrich사, Bradford protein assay reagent, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED), 40% acrylamide/bis solution, ammonium persulfate, coomassie brilliant blue는 BIO-RAD사, nitrocellulose는 Schleicher & Schuell BioScience GmbH사 (Dassel, Germany), enhanced chemiluminescence(ECL) western blot analysis system은 Amersham Pharmacia Biotech로부터 구입하였다. PGD₂, LTC₄ EIA Kit, COX-2 항체는 Cayman Chemical사로 부터 구입하였으며, RPMI-1640, modified Eagle Medium(MEM) non-essential amino acids solution, penicillin-streptomycin는 GIBCO-BRL사(Carlsbad, California, USA), fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone사(Logan, UT, USA), dimethylsulfoxide(DMSO)는 MERCK사, monoclonal anti-DNP (dinitrophenyl) mouse IgE는 Seikagaku-kougyo사에서 구입하여 사용하였다.

시료의 조제

아무르 불가사리는 포항시 양포항에서 채취하였으며, 아무르 불가사리(6.5 kg)을 가늘게 절개 한 후 실온에서 methanol 12L로 2회 추출하여 건조하였다. 건조한 methanol잔사에 물을 가한 후 연속적으로 n-hexane, ethylacetate 및 n-butanol을 가하여 추출하였다. 그 결과 n-hexane 16.6 g을, ethylacetate 및 n-butanol 분획은 각각 6.8 g, 및 34 g을 얻었다. 건조한 n-butanol 분획(BFA)은 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여서 모든 실험에 사용하였으며, DMSO의 최종농도는 0.1%(v/v)로 하였다.

Mouse Bone Marrow Derived Mast Cells(BMMC)의 배양

Male BALB/c 쥐로부터 채취한 골수세포를 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 100 μM MEM Non-essential amino acid solution을 포함한 RPMI 1640 Medium에 IL-3공급원으로 20% PWM-SCM(pokeweed mitogen-stimulate spleen cell-conditioned medium)을 사용하여 배양하면 약 4주 후 98% 이상의 BMMC를 얻을 수 있었으며, 4주 후의 세포를 사용하였다.

세포독성시험(MTT assay)

1×10⁶ cells/ml의 BMMC에 일정농도의 BFA를 농도 별로 처리하여 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 전처리한 후 0.5 mg/ml 농도의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)를 처리하여 4시간 배양하여 0.04 N의 HCl/isopropanol을 가한 후 완전히 세포를 용해시킨 다음 ELISA를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 생존율을 계산하였다.

Cyclooxygenase-2(COX-2) 활성의 측정

BMMC내의 COX-1를 불 활성화시키기 위하여 BMMC를 미리 1×10⁷ cells/ml 농도로 하여 10 μg/ml aspirin으로 2시간 동안 배양한 후 COX-2 발현을 위하여 BMMC를 배양액으로 3회 세척한다. 이후 BMMC를 Tyrode-BSA buffer에 현탁시킨 후 500 ng/ml anti-DNP를 12시간 배양시킨후 세척하였다. 다음 감작된 BMMC에 BFA를 1시간 전 처리한 후 항원인 DNP-HSA와 혼합조건에서 37°C CO₂ incubator내에서 8시간 동안 배양하였다. 반응은 120×g, 4°C에서 5 분간 원심분리 하여 종결시키며, 원심분리 후 상등액을 PGD₂ 유리량은 PGD₂ EIA kit (Cayman 사)를 사용하여 ELISA법으로 측정하여 COX-2의 저해활성을 검토하였다. 이때 생성되는 PGD₂의 생성량은 약 1.8 ng/ml이었다.

5-lipoxygenase(5-LOX) 의존적인 LTC₄ 생성량 측정

상기 방법으로 BMMC(1×10⁶ cells/ml)에 BFA를 1시간 전 처

리한 후 DNP-HSA를 가한 후 처리하여 30분 후 배양 상등액 중의 LTC₄를 EIA kit(Cayman 사)를 사용하여 ELISA법으로 측정하여 5-LOX 활성으로 환산하였다. 이때 생성되는 LTC₄의 생성량은 약 2.7 ng/ml이었다.

β-hexosaminidase(β-hex) 유리반응

비만세포의 탈과립 지표 물질인 β-hexosaminidase(β-hex) 효소 활성 측정을 통하여 탈과립의 정도를 측정하였다. 1×10⁶ cells/ml의 BMMC에 BFA를 농도 별로 처리 하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 1시간 전 처리한 후 항원인 DNP-HSA로 자극하여 15분간 배양하고 120×g, 4°C에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 β-hex를 기질(100 mM citrate buffer(citric acid 0.955%, sodium citrate dihydrate 1.478%, pH 4.5), 1.3 mg/ml p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide)와 1:2 혼합시키고 37°C에서 1시간 동안 반응 시킨 후 0.2 M glycine(pH 10.7)으로 반응을 정지시켜 ELISA법으로 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 그 측정값을 유리 %로 환산하였으며, 항원-항체반응에 의해 β-hex는 약 36% 정도 유리되었다.

Western blot analysis

96-well plate에 2×10⁵ cells/200 μl의 세포에 lysis buffer (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 5 mM Na₂EDTA, 10% glycerol, 1% Tritonx-100, 1 mM EGTA, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄)를 넣고 얼음에서 30분 둔 후(5분마다 vortex 함) 원심분리 하여 상등액을 취하였다. 2×10⁵ cells/200 μl의 농도로 얻은 total 세포의 단백질을 SDS-PAGE로 전기영동을 하고 20% methanol, 25 mM Tris(pH 7.4), 192 mM glycine이 포함된 완충액을 사용하여 nitrocellulose paper로 electrotransfer하였다. 단백질을 이동된 membrane은 Ponceaus용액으로 이동유무를 확인한 후, 5% skim milk용액으로 30분간 실온에서 blocking하였다. 그리고 TTBS(25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20) 완충액으로 희석한 1차 항체와 membrane을 12시간 이상 반응하였다. 반응이 끝난 후 TTBS로 3회 세척했다. 다시 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체와 2시간 반응시키고 TTBS로 3회 세척했다. 세척이 끝나면 증류수로 세척하고 ECL 용액으로 2분간 반응한 후 필름에 감광하여 나타난 band의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 및 그 차이를 확인하였다.

수동 피부아나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)

ICR mouse(25~30 g, Hyochang Science, 대구)를 실험 전 적어도 1주일 동안 cage에서 키웠으며, 1 group 당 6마리를 나누어서 1:1000으로 희석된 anti-DNP IgE(Sigma Aldrich) 20 μl를 쥐의 양쪽 귀 피내(i.d)에 주사하였다. 24시간 뒤 BFA(25~

100 mg/kg)와 히스타민 H1 수용체 길항제인 fexofenadine HCl (Fexo, 50 mg/kg, 한국파마에서 제공)¹⁷⁾를 경구 투여하였다. 1시간 후에 꼬리 정맥으로 항원(DNP-HSA, 300 μg)을 200 μl(0.8% Evans blue 용액 함유) 투여하여 알러지반응을 유도하였다. 그 다음 Evans blue가 퍼져있는 양쪽 귀를 잘라 낸 다음 400 μl foramide 용액에 넣어서 63°C에 12시간 반응시킨 후 12,000 rpm 5분 동안 원심분리 하여 Evans blue가 포함된 층을 추출하여 630 nm에서 흡광도를 측정하여 혈관 투과성 정도를 관한다.

통계처리

모든 자료는 mean±S.E로 나타내었으며, 통계학적 분석은 Student's t-test로 행하였다. 유의성검증은 대조군과 비교하여 P값이 0.05보다 작을 경우 유의성이 있다고 판단하였다.

실험결과 및 고찰

BFA의 세포독성

1×10⁶ cells/ml의 BMMC에 BFA를 농도 별로 처리하여 4시간 동안 preincubation한 후, 5 mg/ml 농도의 MTT를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 4시간 더 배양하여 0.04 N-HCl/isopropanol을 가하여 완전히 세포를 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. BFA는 최종 농도 200 μg/ml에서 세포독성이 없음을 확인되어 그 이하의 농도에서 실험을 하였다(Fig. 1).

BFA가 COX-2 의존적인 PGD₂ 생성 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

BMMC내의 COX-1를 불활성화시키기 위하여 BMMC를 미리 10 μg/ml aspirin을 2시간 처리하여 COX-1을 불활성 시킨 후 실험을 하였다. 상기 방법에 따라 감작된 BMMC에 BFA를 1시간 전 처리한 후 항원인 DNP-HSA와 혼합조건에서 37°C CO₂ incubator내에서 8시간 동안 배양 시킨 후 생성되는 PGD₂에 대

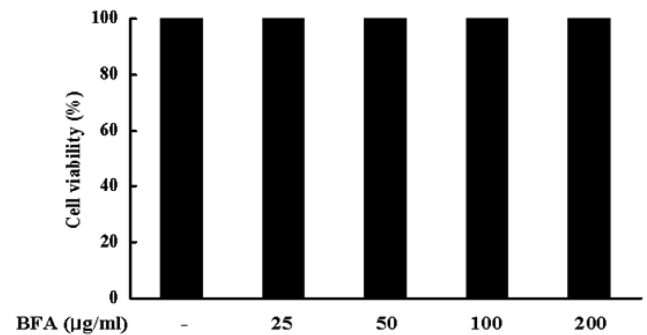


Fig. 1 – Effect of BFA on the cell viability. Cells were incubated in the presence of 25~200 of μg/ml BFA. The cell viability was assayed by MTT assay. Data represent the mean±S.E. with three different samples.

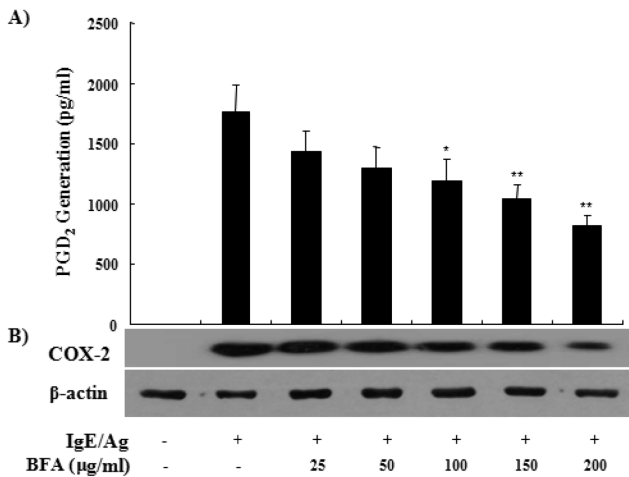


Fig. 2 – Effect of BFA on COX-2 dependent PGD₂ generation (A) and COX-2 protein expression (B). IgE sensitized BMMC were pretreated with BFA for 1 h at 37°C, and then stimulated with DNP-HSA for 10 min. PGD₂ released into the supernatant was quantified by EIA kit. Samples were processed by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose filter. The immunoblot was then probed with anti-COX-2 at a dilution 1:3,000. The values are mean±S.E. from 3 independent experiments: *P<0.05, **P<0.01 versus without BFA.

한 저해효과를 측정한 결과 BFA는 PGD₂ 생성을 용량의존적으로 저해하였으며, IC₅₀ 값은 174.6 µg/ml이었다(Fig. 2A). 다음 BFA에 의한 PGD₂ 생성 억제에 COX-2 단백질 발현의 저해로 기인한 것인지 조사하기 위해 COX-2 단백질 발현을 Western blot을 수행하였다. Fig. 2B에서 보듯이, BFA는 용량 의존적으로 COX-2 단백질 발현을 저해하였다.

BFA가 5-LOX 의존적인 LTC₄ 생성에 미치는 영향

활성화된 비만세포에서 LTC₄는 아라키돈산에 5-LOX/LTC₄ synthase에 의해 합성되는데, LTC₄는 염증이나 천식과 같은 알러지 반응에 관여함이 알려져 있다.^{18,19} IL-3 존재 하에서 4주 이상 배양한 BMMC를 상기방법에 따라 활성화시킨 후 비만세포에 존재하는 5-LO의 활성화에 미치는 BFA의 영향을 알아보기 위해 5-LOX의 대사산물인 LTC₄ 생성 억제를 검토한 결과 BFA는 결과 농도 의존적으로 LTC₄의 생성을 억제하였으며, IC₅₀값이 22.2 µg/ml로 비교적 강한 저해 활성을 나타내었다(Fig. 3).

BFA가 비만세포 탈과립에 미치는 영향

비만세포는 IgE가 IgE 수용체에 결합하면 과립속에 존재하는 히스타민 등이 방출되는 탈과립반응이 일어나게 된다.¹⁻³ 따라서 본 연구에서도 BMMC에 BFA를 전 처리하여 탈과립 반응에 미치는 영향을 검토하였다. 이때 탈과립 지표는 비만세포 과립속에 존재하는 β-hexosaminidase(β-hex)를 지표로 하여 β-hex효소

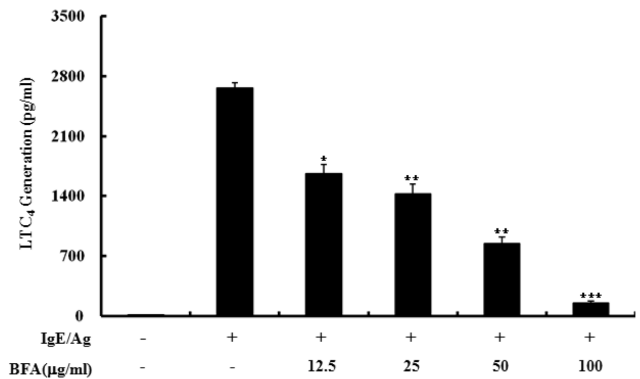


Fig. 3 – Effect of BFA on 5-LOX dependent LTC₄ generation. BMMC were pre-incubated for 1 h with the indicated concentrations of BFA and then stimulated with 100 ng/ml of DNP-HSA for 10 min. LTC₄ released into the supernatant was quantified by EIA kit. All data was the arithmetic mean of triplicate determinations. The values are mean±S.E. from 3 independent experiments: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 versus without BFA.

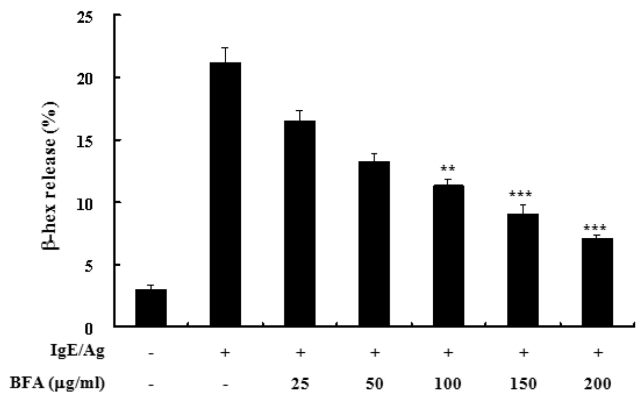


Fig. 4 – Effect of BFA on the release of β-hexosaminidase (β-hex). BMMC were preincubated for 1 h with the indicated concentrations of BFA and then stimulated with 100 ng/ml of DNP-HSA for 10 min. β-hex released into the supernatant and cell lysate were measured. All data was the arithmetic mean of triplicate determinations. The values are mean±S.E. from 3 independent experiments: **P<0.01, ***P<0.001 versus without BFA.

활성을 측정하여 탈과립의 정도를 비교하였다. 활성화되지 않은 세포에서 배양상층액에 β-hex가 약 6% 유리되었으며, 자극제를 처리한 세포에서는 β-hex가 약 36% 정도 유리되었다. BFA를 25~200 µg/ml의 농도로 처리했을 때 농도 의존적인 탈과립을 저해하였으며, IC₅₀ 값은 115.5 µg/ml이었다(Fig. 4).

BFA가 수동 피부아나필락시스 반응에 미치는 영향

BFA가 시험관에서 알러지 유발 물질인 PGD₂, LTC₄ 및 탈과립반응을 용량 의존적으로 억제하였기 때문에 과연 동물 모델에서 그 항알러지 효능을 나타내는지 확인하기 위하여 제1형 알러

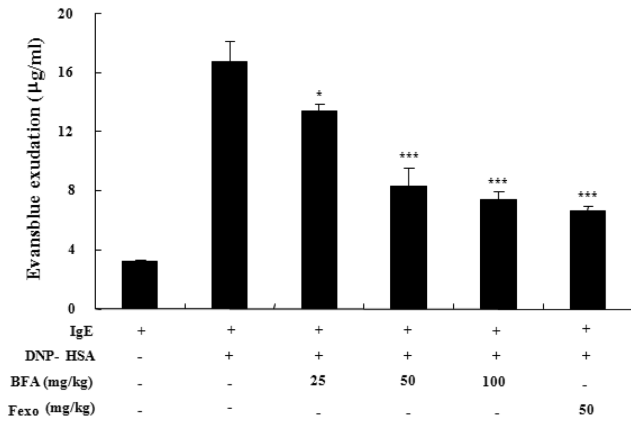


Fig. 5 – Dose-dependent inhibition of IgE induced PCA reaction by BFA. The effect of BFA (25~100 mg/kg) or fexofenadine HCl (50 mg/kg) on IgE-mediated PCA reaction were examined. Dye extravasation in ears were quantified (n= 6, ***P<0.05 and *P<0.001 versus without BFA). Fexofenadine-HCl (Fexo) was used as an atypical antihistamine control drug.

지 동물 모델인 PCA 반응으로 실험하였다. 상기 방법으로 ICR mouse의 양쪽 귀에 anti-DNP IgE를 피내주사 한 후 24시간 뒤 BFA 25, 50, 100 mg/kg 및 와 대조시약인 H1 수용체 길항제인 fexofedadine 50 mg/kg을 항원 투여 1시간 전에 경구투여 하였다. 그 다음 1시간 후 0.8% Evans blue, 1 ml 항원(DNP-HSA)를 꼬리 정맥으로 주사(i.v.)한 후 1시간 뒤 양쪽귀에 유출된 색소를 추출하여 흡광도를 측정하여 혈관 투과성 정도를 관찰한 결과 BFA는 용량 의존적으로 알러지 반응 억제하는 결과를 얻었다.

결 론

본 연구에서는 전 세계적으로 바다의 해적으로 알려진 불가사리를 의약품적으로 이용할 가능성을 확인하기 위하여 유기 용매로 분획한 후 얻어진 부타놀 분획을 검체로 사용하여 시험관 및 동물실험을 수행하였다. 항원-항체반응에 의해 활성화된 비만세포로부터 COX-2 의존적인 PGD₂의 생성을 용량 의존적으로 억제하였으며, 이 억제반응은 COX-2 단백질의 발현 억제에 의함이 밝혀졌다. 또한 세포막에서 유리되는 아라키돈산은 비만세포에서 5-LOX에 의해 알러지 및 천식유발에 관여함이 알려진 LTC₄ 생성을 용량 의존적으로 억제하였으며, 동시에 항원-항체 반응에 의해 일어나는 탈과립 반응도 용량 의존적으로 억제하는 활성을 동시에 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 세포수준에서 BFA가 PGD₂, LTC₄ 및 탈과립을 억제하였기 때문에 동물 모델에서 BFA의 효능을 검토하였다. 그 결과 항원-항체로 반응에 의해 활성화된 비만세포에 의해 유발되는 아나필락시스 반응을 용량 의존적으로 억제함을 확인하였다. 이상과 같이 본 연구팀은 최초로 불가사리 부타놀 분획이 비만세포 유래의 지질성 매개성 생성억제

및 비만세포의존적인 아나필락시스를 억제하는 활성을 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 금후 불가사리 부타놀 추출물에서 항알러지 활성을 나타내는 화합물의 분리 및 구조를 결정할 필요가 있다고 생각한다.

감사의 말씀

본 연구는 농림수산식품부 수산특정연구개발사업의 연구비지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- 1) Moon, T. C., St Laurent, C. D., Morris, K. E., Marcet, C., Yoshimura, T., Sekar, Y. and Befus, A. D. : Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal. Immunol.* **3**, 111 (2010).
- 2) Yamaguchi, M., Sayama, K., Yano, K., Lantz, C. S., Noben-Trauth, N., Ra, C., Costa, J. J. and Galli, S. J. : IgE enhances Fc receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc epsilon receptor I expression and mediator release. *J. Immunol.* **162**, 5455 (1999).
- 3) Stevens, R. L. and Austen, K. F. : Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol. Today* **10**, 381 (1989).
- 4) Murakami, M. and Kudo, I. : Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A2s. *Adv. Immunol.* **77**, 163 (2001).
- 5) DeWitt, D. and Smith, W. L. : Yes, but do they still headaches. *Cell* **83**, 345 (1995).
- 6) Urade, Y., Ujihara, M., Horiguchi, Y., Ikai, K. and Hayaishi, O. : The major source of endogenous prostaglandin D₂ production is likely antigen-presenting cells-localization of glutathione-requiring prostaglandin-D synthase in histiocytes, dendritic and kupffer cells in various rat-tissues. *J. Immunol.* **143**, 2982 (1989).
- 7) Murakami, M., Bingham, C. O., Matsumoto, R., Austen, K. F. and Arm, J. P. : IgE- dependent activation of cytokine-primed mouse cultured mast cells induces a delayed phase of prostaglandin D₂ generation via prostaglandin endoperoxidase synthase-2. *J. Immunol.* **155**, 4445 (1995).
- 8) Ashraf, M., Murakami, M. and Kudo, I. : Cross-linking of the high-affinity IgE receptor induces the expression of cyclooxygenase 2 and attendant prostaglandin generation requiring interleukin 10 and interleukin 1 beta in mouse cultured mast cells. *Biochem. J.* **320**, 965 (1996).
- 9) Moon, T. C., Murakami, M., Ashraf, M., Kudo, I. and Chang,

- H. W. : Regulation of cyclooxygenase-2 and endogenous cytokine expression by bacterial lipopolysaccharide that acts in synergy with c-kit ligand and Fce receptor I crosslinking in cultured mast cells. *Cell. Immunol.* **185**, 146 (1998).
- 10) Murakami, M., Austen, K. F., Bingham, C. O. 3rd, Friend, D. S., Penrose, J. F. and Arm, J. P. : Interleukin-3 regulates development of the 5-lipoxygenase/leukotriene C4 synthase pathway in mouse mast cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 22653 (1995).
- 11) Murakami, M., Austen, A. F. and Arm, J. P. : The immediate phase of c-kit ligand stimulation of mouse bone marrow-derived mast cells elicits rapid leukotriene C4 generation through posttranslational activation of cytosolic phospholipase A2 and 5-lipoxygenase. *J. Exp. Med.* **182**, 197 (1995).
- 12) Son, J. K., Son, M. J., Lee, E., Moon, T. C., Son, K. H., Kim, C. H., Kim, H. P., Kang, S. S. and Chang, H. W. : Ginkgetin, a Biflavone from Ginkgo biloba leaves, inhibits cyclooxygenases-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 2181 (2005).
- 13) Jahng, Y. D., Zhao, L. X., Moon, T. S., Basnet, A., Kim, E. K., Chang, H. W., Ju, H. K., Jeong, T. C. and Lee, E. S. : Simple aromatic compounds containing propenone moiety show considerable dual and COX/5-LOX inhibitory activities. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **14**, 2559 (2004).
- 14) Moon, T. C., Seo, C. S., Haa, K., Kim, J. C., Hwang, N. K., Hong, T. G., Yang, J. H., Kim, J. H., Son, J. K. and Chang, H. W. : *meso*-dihydroguaiarectic acid isolated from *Saururus chinensis* inhibits cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells. *Arch. Pharm. Res.* **31**, 606 (2008).
- 15) Hwang, I. H., Kim, D. W., Kim, S. J., Min, B. S., Lee, S. H., Son, J. K., Kim, C. H., Chang, H. W. and Na, M. K. : Asterosaponins Isolated from the Starfish *Asterias amurensis*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **59**, 78 (2011).
- 16) Suh, S. J., Ko, H. K., Song, K. H., Kim, J. R., Kwon, K. M., Chang, Y. C., Lee, Y. C., Kim, D. S., Park, S. J., Yang, J. H., Son, J. K., Na, M. K., Chang, H. W. and Kim, C. H. : Ethylacetate fraction from Korean seaside starfish, *Asterias amurensis*, has an inhibitory effect on MMP-9 activity and expression and on migration behavior of TNF- α induced human aortic smooth muscle cells. *Toxicol. In Vitro* 2011 (in press).
- 17) Ciprandi, G., Tosca, M. A., Cosentino, C., Riccio, A. M., Passalacqua, G. and Canonica, G. W. : Effects of fexofenadine and other antihistamines on components of the allergic response: adhesion molecules. *J. Allergy Clin. Immunol.* **12**, S78 (2003).
- 18) Wenzel, S. E. : The role of leukotrienes in asthma. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **69**, 145 (2003).
- 19) Christmas, P. and Soberman, R. J. : The organization and consequences of eicosanoid signaling. *J. Clin. Invest.* **111**, 1107 (2003).