pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 30, No. 4, pp. 376~382 (2015)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2015.30.4.376

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

낙지다리 식물 추출물의 알레르기 억제효과

조소영 · 김영미*
덕성여자대학교 약학대학

Inhibitory Effect of *Penthorun chinense* Extract on Allergic Responses *in vitro* and *in vivo*

So young Jo and Young Mi Kim*
College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea
(Received November 26, 2015/Revised December 3, 2015/Accepted December 10, 2015)

ABSTRACT - Allergic diseases have rapidly increased in recent years. Mast cells play a critical role in IgE-mediated allergy responses and, therefore, closely associated with rhinitis, asthma, and atopic dermatitis. We studied anti-allergic effect of *Penthorum chinense extract* (PCE) *in vitro and in vivo*. PCE inhibited the degranulation of mast cells by antigen stimulation and its effect was dose-dependent and reversible in mast cells. PCE also suppressed the production of inflammatory cytokines such as TNF-α and IL-4 by antigen in mast cells. Mechanistically, PCE inhibited the activation of Syk/LAT pathway which is a key signaling pathway for the activation of mast cells by antigen. Notably, PCE suppressed IgE-mediated allergic responses by antigen in mice. These results strongly suggest that PCE is a potential candidate for anti-allergic treatment.

Key words : *Penthorum chinense* extract (PCE), mast cell, syk kinases, allergy, anti-allergic effect

현대 사회는 기후 변화에 따른 생태계 변화, 대기오염, 황사, 실내주거환경, 서구화된 식습관 등에 의하여 천식, 알레르기 비염, 아토피, 만성 폐쇄성폐질환 등 알레르기 질환이 증가 추세를 보이고 있다[1]. 특히, 알레르기 질환의 대상이 어린아이까지 확대되면서 사회적 이슈가 되고 있으며 다양한 알레르기 질환 치료제들이 개발되고 있는 상황이다.

외부 알레르겐(allergen)이 우리 몸속으로 침입하면, B 림프구는 침입한 알레르겐을 인식하고, 형질세포로 분화한다. 이때 분화된 형질세포는 항원을 특이적으로 인식하는 Immunoglobulin E (IgE)를 분비하게 된다. 이러한 조건에 의하여 항원 특이 IgE 항체가 비정상적으로 증가하게 되며 증가한 IgE는 비만세포 표면의 IgE 고 친화성 수용체(FcεRI, high-affinity receptor for IgE)에 결합하며 외부로부터 알레르겐(allergen)이 다시 들어오면 항원-항체 반응이 진행되면서 비만세포를 활성화시킨다[2].

비만세포는 세포 내에 과립들을 가지고 있는데, 비만세포가 활성화되면 세포 내의 과립에 저장되어 있던 히스타민, 헤파린 및 단백분해효소 등이 세포 밖으로 분비되고 류코트리엔, 프로스타글란딘 등의 화학매개체들을 만들어 낸다. 이러한 화학매개체들은 짧은 시간 내에 혈관을 확장시켜 투과성을 증가시키고 우리 몸의 평활근 수축 및 분비선의 기능을 증가시켜 알레르기 증상을 유도한다[3].

비만세포 표면에 존재하는 FcεRI는 α, β, γ-subunit으로 구성되어있다[4]. 이 중 β, γ-subunit는 세포 내 신호전달에 관여한다. 알레르겐이 IgE와 교차결합하면 β-subunit에 결합되어있던 Src-kinase에 의해 수용체가 인산화 되면서 세포 내 신호전달이 시작된다. 또한 β, γ-subunit은 수용체에 결합되어있던 Lyn kinase에 의해 ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation mitif)이 인산화 된다[5]. 인산화 된 ITAM은 세포 활성화에 중요한 역할을 하는 Syk kinase의 결합부위를 제공하여 Syk kinase를 활성화 시키고 그 후 아래의 하위 신호전달물질의 활성화를 유도한다[6].

항원에 의한 비만세포 활성화 과정 초기에 가장 중요한 신호전달단백질인 Syk가 활성화되면서 하위 신호전달 Linker for activation of T cells (LAT), phospholipase(PL)-Cγ, PKC (protein kinase C) 등 다양한 신호전달 물질이 활성화되고, 결과적으로 비만세포가 활성화되면서 히스타민, 프로스타글라딘, 루코트리엔 및 과민증인자 등을 분비하여 면역체계를 활성화시키고, 염증 및 알레르기를 발생

*Correspondence to: Young Mi Kim, College of Pharmacy, Duksung Women's University 33, Samyangro 144-Gil, Dobong-Gu, Seoul 01369, Korea
Tel: 82-2-901-8455, E-mail: kym123@duksung.ac.kr

시킨다[7]. 이와 같이 세포내 신호전달 기전에 대한 연구는 알레르기 질환 연구에서 중요한 부분을 차지한다. 본 논문에서도 FcεRI 매개한 신호전달에 중점을 두어 실험을 진행하였다.

낙지다리(*Penthorum chinense* Pursh)는 돌나물과(Crassulaceae)의 다년생 초본으로 근경이나 종자로 번식한다. 전국적으로 분포하며 강가나 풀밭의 습기가 많은 곳에 분포한다. 낙지다리 추출물은 간과 신경세포의 보호 효과가 있는 것으로 보고되어 있다[8]. 하지만 알레르기 질환에 대한 낙지다리의 효능에 대한 보고는 존재하지 않는다. 본 연구에서는 낙지다리 추출물의 비만세포 억제 효과 및 알레르기 유발 동물모델에서 알레르기 억제 효과 등을 규명하기 위해 수행하였다.

Materials and Methods

재료

Dinitrophenol(DNP)-specific IgE와 항원(DNP-bovine serum albumin, DNP-BSA)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 또한 PP2는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였다. RPMI-1640 및 Minimal Essential Medium (MEM), 배양액에 첨가되는 Glutamine과 그 외 세포배양 시약은 GIBCO Technologies Inc. (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. Western blot에 사용되는 Phospho-Syk 및 Phospho-LAT 항체는 Cell signalling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며 그 외에 actin을 검출하기 위한 항체는 Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. 기타 모든 시약은 시중 제품 중 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

실험동물

실험에 사용한 동물은, (주)오리엔탈바이오(성남)에서 생후 5 주령 수컷 Balb/c 마우스를 구입하여 사용하였다. 물과 사료는 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육환경은 온도 22 ± 1°C, 습도 55 ± 10%로 유지하였고, 낮과 밤의 주기는 각각 12 시간으로 하였다. 모든 실험동물은 1 주일동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물실험은 덕성여자대학교 동물실험윤리 회의 승인을 받아, 동 규정에 따라 실험을 진행하였다.

낙지다리의 메탄올 추출물(PCE) 제조

낙지다리 추출물(분양번호, 007-019)은 한국식물추출물은행으로부터 분양받아 실험을 진행하였다. 낙지다리 추출과정은 건조된 낙지다리 전초 100 g을 50°C 메탄올 1000 ml에서 초음파 추출기를 이용하여 하였으며 스피드백을 이용하여 40°C에서 24시간 건조과정을 거쳤다. 이러한 과정으로 추출한 최종 회수율은 약 15% 였다. 비만세포 억제 실험에 사용하기 위해서 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 용해시켜 100 mg/ml 농도로 제조 한 후, 최종 처리 농도로 희석하여 실험에 적용하였다.

비만세포(BMMC, RBL-2H3)의 분리 및 배양

RBL-2H3 (Rat Basophil Leukemia) cell은 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받아 15% FBS가 포함된 MEM (penicillin /streptomycin 및 L-glutamine 포함)을 배양액으로 하여 5% CO_2 incubator에서, 2-3일 간격으로 계대 배양 하였다.

생쥐의 골수에서 유래한 비만세포(BMMCs, Bone marrow-derived mast cells)는 5주령의 수컷 Balb/c 마우스의 골수로부터 채취하였다. 마우스로부터 분리한 골수의 세포는 RPMI배지(RPMI 1640, 10% FBS, 0.1 mM non-essesntial amino acid 및 2 mM L-glutamine)에 IL-3(10 ng/ml)이 포함된 배양액을 사용하여 4주 이상 배양 후 BMMC로의 분화가 98%이상 되었음을 FACS분석을 통해 확인한 후 실험에 사용하였다.

비만세포의 탈과립(β-hexosaminidase) 측정

BMMCs(3.3×10^5/well) 혹은 RBL-2H3 cells(1.8×10^5/well) 두 종류의 비만세포를 24-flask에 분주하고 20 ng/ml DNP-특이 IgE를 포함한 배지에서 12시간이상 감작하여 비만세포 FcεRI에 IgE가 결합하도록 하였다. β-hexosaminidase 분비 측정은 Tyrode (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 5.6 mM glucose, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 0.5% fatty acid-free fraction V from bovine serum, pH 7.4) 완충용액과 PIPES (25 mM PIPES, 159 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$. 5.6 mM glucose, 0.5% fatty acid-free fraction V from bovine serum, pH 7.4) 완충용액을 이용하여 실험을 진행하였다. 우선 37°C 완충용액으로 각각의 세포를 2번 세척 후 well당 각 농도별로 완충용액에 희석된 추출물을 첨가하고 30분 전처리를 하였다. 그 후 20 ng/ml의 항원을 각 well에 첨가하여 10분 동안 세포자극을 진행하였다. 10분 incubation 후 약 7분간 얼음 위에서 자극을 정지시켰다. 탈과립에 의해 세포 밖으로 분비된 β-hexosaminidase을 측정하기 위해 위의 과정을 거친 각 well의 상층액과 Triton X-100으로 세포를 파쇄하여 얻은 파쇄액을 각각의 96 well plate에 30 ul씩 분주하고 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-d-gluco saminide를 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 250 ul의 0.1 M carbonate buffer를 넣어 반응을 종료한 뒤 405 nm에서 흡광도 측정하여 정량하였다.

Cell viability

96well plate에 well 당 2.2×10^4개의 세포를 분주하고 5% CO_2 incubator에서 12시간 배양하였다. 그 후 PCE를

10 ug/ml, 30 ug/ml, 100 ug/ml 농도별로 처리한 후 CO_2 incubator에서 1시간동안 반응시켰다. 1시간 후 각 well에 CCK-8 (cell counting kit-8)을 첨가한 후 1시간 동안incubation을 시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Immunoblotting 분석

IgE로 감작된 BMMCs, RBL-2H3 cells에 PIPES (or Tyrod buffer)로 희석한 PCE를 각각 농도별로 첨가한 다음, 20 ng/ml의 항원을 넣어 10분 동안 자극하고 얼음위에서 반응을 정지시켰다. 항원에 의해 자극된 세포는 약 4ºC PBS 완충용액으로 2번 세척한 후 세포파쇄용액 (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% nonidet P-40, 60 mM octyl β-glucoside, 10% glycerol, 10 mM NaF, 1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM Na3VO4, 2.5 mM nitrophenyl-phosphate, 0.7 mg/ml pepstatin, and a protease-inhibior cocktail tablet)으로 10분간 세포를 파쇄 후 15,000rpm, 10분간 4ºC에서 원심분리기한 다음 상등액을 얻었다. 이 상등액을 이용하여 단백질 정량 후 100ºC에서 3x Laenmmli buffer로 약 5분간 끓였다. 정량된 단백질은 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리 후 nitrocellulose membrane으로 옮겨 5% BSA를 포함한 TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) 완충액으로 1시간 동안 blocking을 시켰다. 이후 분석하고자 하는 단백질에 대한 1차 항체를 1000배로 희석하여 4ºC에서 overnight로 반응시킨 후 TBS-T로 세척한 뒤 2000배로 희석한 HRP-conjugation된 2차 항체로 1시간 상온에서 반응시켰다. 이후 10분씩 5번 TBS-T 완충액으로 세척하고 chemiluminescence analyzer로 단백질 밴드를 확인하였다.

국소적 수동 피부 알레르기 마우스 동물 모델

DNP (dinitrophenol)-specific IgE에 의한 국소 알레르기 피부 반응(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)을 유도하기 위해 마우스(BALB/c, 5주령 수컷) 의 오른쪽 귀에 DNP-specific IgE를 피내로 0.5 μg를 주사하였다. 다음 날 5% 아라비아검 용액에 녹인 낙지다리추출물을 40 mg/kg, 200 mg/kg, 1000 mg/kg 경구 투여 하였다. 1 시간 후 항원(DNP-BSA, 1 mg/ml)을 에반스 블루 용액을 이용하여 5 mg/ml 농도로 제조하여 250 μl를 꼬리로 정맥 투여하였다. 1 시간 후 마우스를 안락사 시키고 귀를 적출하여 700 μl의 포름아마이드로 63ºC에서 12 시간 동안 에반스블루를 추출 후 상등액을 620 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 에반스 블루의 정량은 표준 정량곡선을 이용하여 측정하였다.

통계처리

모든 실험결과는 mean ± S.E.로 나타내었으며, 각 군 간의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)에 이은 Student's t-test 분석을 실시하였다. 대조군과 비교하여 p 값이 0.05 미만일 경우에 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다. 모든 실험은 3회 반복으로 실시하였다.

Results

비만세포(RBL-2H3 세포)의 탈과립(β-hexosaminidase) 억제효과

IgE 감작된 비만세포는 항원으로부터 자극을 받으면 비만세포 과립 안에 있던 histamine, β-hexosaminidase, 다양한 proteases 등을 세포 밖으로 방출하여 알레르기 반응을 유도한다. 본 실험에서는 탈과립의 지표로 사용되는 β-hexosaminidase를 측정하여 낙지다리 추출물의 억제효과를 확인하였다[9]. 항원자극에 의한 비만세포에서의 β-hexosaminidase 분비가 농도 의존적으로 억제되었으며, 처리농도 100 μg/ml에서 비만세포의 탈과립 현상이 약 80% 정도가 억제되는 우수한 효능이 관찰되었다(Fig. 1). 이러한 억제효과는 대조약물로 사용된 PP2의 억제효과와 유사하게 나타났다.

PCE의 비만세포 탈과립 억제 효과의 가역성 실험

RBL-2H3 세포에 한 그룹은 PCE를 100 μg/ml으로 30분 동안 전처리를 진행 하였고 다른 한 그룹은 PCE를 동일한 농도로 30분 전 처리 한 후 PIPES 완충용액으로 5회 세척하여 탈과립의 현상이 회복되는 것을 관찰하였다. PCE 100 μg/ml 농도로 전처리한 군에서 β-hexosaminidase 분비는 대조군과 비교하여 70% 이상 억제 되었으나 PIPES 완

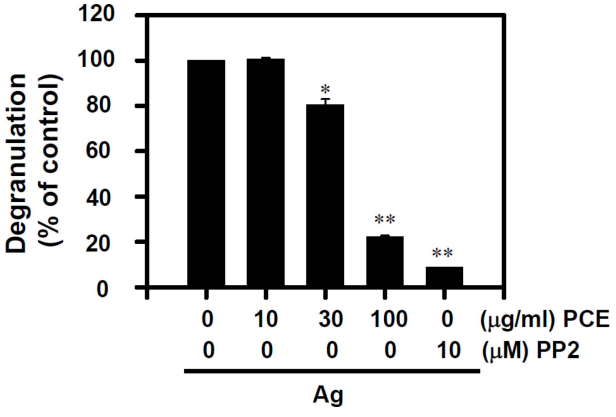

Fig. 1. Effect of *Penthorum chinense* extract (PCE) on antigen (Ag)-stimulated degranulation in RBL-2H3 mast cells. After incubating RBL-2H3 cells with 50 ng/ml DNP-specific IgE, the cells were stimulated with 25 ng/ml antigen for 10 min. The degranulation was determined by measurement of the activity of β-hexosaminidase in culture media. The values indicate mean ± S.E.M. from three independent experiments. *$p < 0.05$ and **$p < 0.01$, significant differences with the Ag-stimulated control without PCE. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

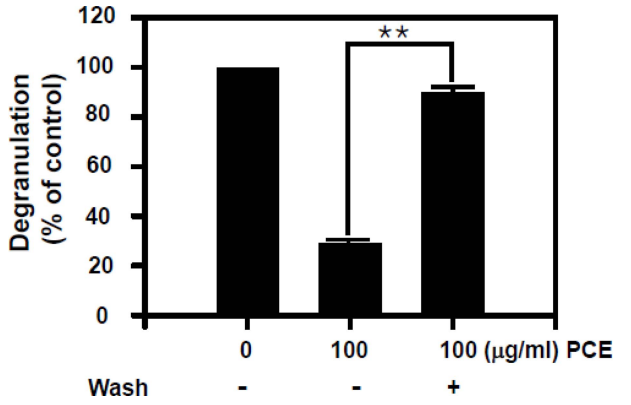

Fig. 2. Reversibility of *Penthorum chinense* extract (PCE) on antigen (Ag)-stimulated degranulation in RBL-2H3 mast cells. The RBL-2H3 cells were washed out five times with PIPES buffer after pre-treating with 100 μg/ml PCE for 1 h and then stimulated for 10 min with antigen. The values indicate mean ± S.E. from three independent experiments. **p < 0.01, significant differences with control.

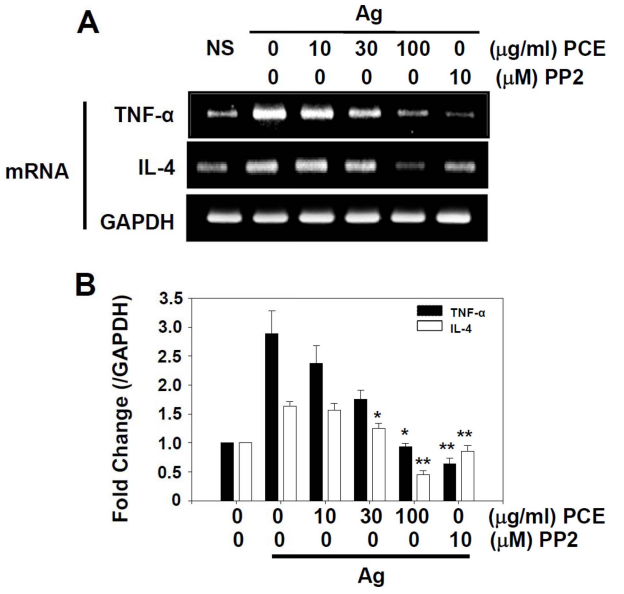

Fig. 3. Effect of *Penthorum chinense* extract (PCE) on the expression of tumor necrosis factor (TNF)-α and interleukin (IL)-4 in RBL-2H3 mast cells. RBL-2H3 cells were incubated with IgE and then stimulated with 25 ng/ml Ag. Total RNA was isolated and then reversely transcribed. Polymerase chain reaction using IL-4- or TNF-α specific primers was performed as described in the section for "Materials and Methods". (A) The representative images and (B) band density from three independent experiments are shown. *p < 0.05 and **p < 0.01, significant differences with Ag-stimulated controls. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

충용액으로 5회 세척해 준 군은 대조군의 약 90%까지 회복되었다(Fig. 2). 이러한 결과로부터, PCE의 비만세포 탈과립 억제효과는 가역성을 가짐을 알 수 있었다.

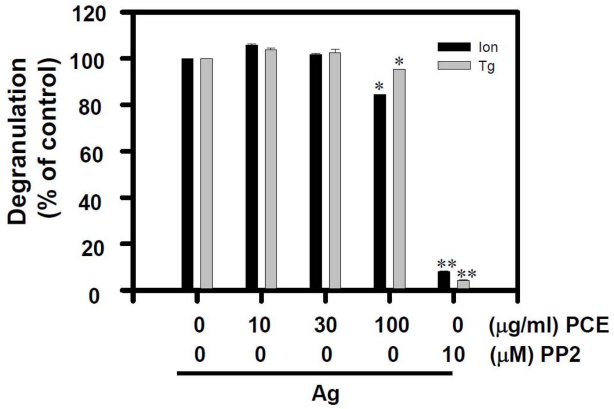

Fig. 4. Effect of *Penthorum chinense* extract (PCE) on ionomycin or thasigargin-stimulated degranulation in mast cells. The RBL-2H3 cells were stimulated with 1 μM ionomycin (Ion) or 300 nM thapsigargin (Tg), and degranulation was measured by assessing the activity of β-hexosaminidase in culture media. The values indicate mean ± SEM from three independent experiments. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor. *p < 0.05 and **p < 0.01, significant differences with Ag-stimulated controls.

PCE의 비만세포에서 염증성 사이토카인 분비 억제 효과

본 연구에서는 PCE 전처리에 의한 비만세포에서의 사이토카인 생산 억제 효과를 RT-PCR 기법으로 측정하였다. PCE는 농도 의존적으로 TNF-α 와 IL-4의 mRNA 발현을 현저히 억제하였다(Fig. 3A). IL-4의 mRNA 발현은 PCE 30 μg/ml 농도에서부터 대조군과 비교하여 유의적으로 억제되었으며($p < 0.05$), TNF-α의 mRNA 발현은 PCE 100 μg/ml 농도에서 대조군과 비교하여 유의적으로 억제되었다($p < 0.05$), PCE 100 μg/ml에서는 대조약물로 사용된 PP2와 유사한 정도의 억제 효과가 관찰되었다(Fig. 3B).

PCE의 세포내 칼슘 농도 증가에 따른 탈과립의 억제 효과

본 연구에서 PCE의 비만세포 탈과립 억제효과의 기전을 연구하기 위해 우선 이 억제효과가 칼슘이온 증가의 상위 신호전달물질인지 하위 신호경로를 억제하는 것인지를 알아보기 위해 본 실험을 진행하였다. 비만세포를 이오노마이신 과 탭시가긴을 처리 시 비만세포에서 탈과립이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 이러한 물질을 처리하기 전 PCE을 전처리하였을 때 PP2 와는 달리 PCE의 전처리에 의해서 탈과립의 억제 효과는 보이지 않았다(Fig. 4). 이러한 결과는 PCE에 의한 비만세포에서의 탈과립 억제효과는 칼슘에 의한 신호전달경로 상위에서 일어나는 것으로 추정된다.

PCE의 비만세포에서의 Syk 및 LAT의 인산화 억제 효과

Fig. 5에서, PCE는 농도 의존적으로 Syk kinase의 인산화를 억제하여 활성을 감소시키는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 Syk kinsae의 인산화 활성이 억제됨으로 LAT 인

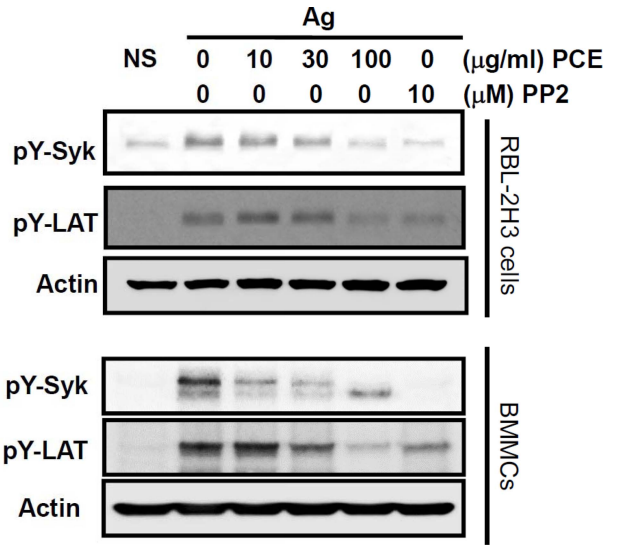

Fig. 5. Effect of *Penthorum chinense* extract (PCE) on the activating phosphorylation of Syk and LAT in Ag-stimulated mast cells. The IgE-primed RBL-2H3 cells and BMMCs were stimulated with 25 ng/ml Ag (DNP-BSA), with or without PCE at the indicated doses, for 7 min. The whole cell lysates were subjected to immunoblot analysis to detect the phosphorylated forms of Syk and LAT. Representative immunoblot images are shown from three independent experiments. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

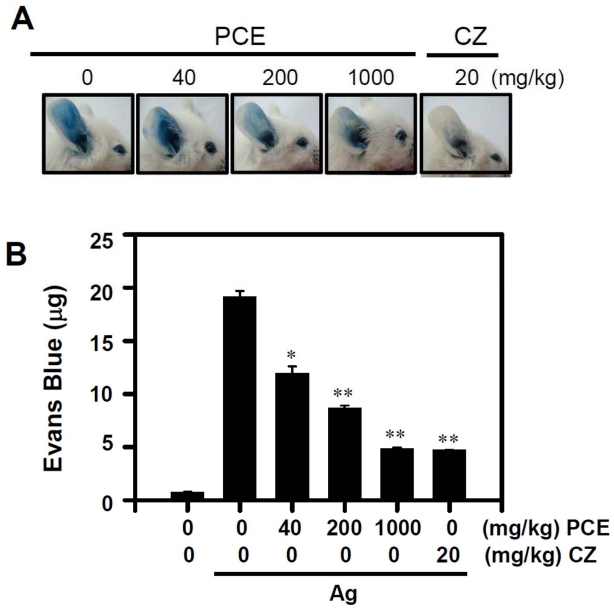

Fig. 6. Effect of *Penthorum chinense* extract (PCE) on IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis (PCA). (A) The anti-allergic effect was assessed using PCA mouse model. Balb/c mice were intravenously injected with a 250-mg antigen (DNP-BSA) containing 4% Evans blue 24 h after intradermal administration of a dinitrophenol (DNP)-specific IgE antibody (0.5 mg) into a mouse ear. PCE (0-1000 mg/kg) was orally administrated at 1 h before treatment of antigen. (A) The representative photographs of ears are shown. B) The dye extravasated by antigen was extracted from the ear and the amount was measured by absorbance from three independent experiments, each with 5 mice. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$, significant differences with Ag-stimulated controls. Cetrizine (CZ, 50 mg/kg) was used as a typical anti-histamine reference drug.

산화 활성역시 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 낙지다리추출물은 Syk kinase의 인산화를 억제하므로서 항원에 의해 유도되는 비만세포의 탈과립을 억제할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 5). 이러한 결과는 RBL-2H3 cell 뿐만 아니라 골수유래의 세포에서 분화시킨 비만세포(BMMC)에서도 항원자극에의한 Syk/LAT 신호전달경로가 유사한 정도로 억제된다는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5).

PCE의 국소피부자극 알레르기 반응의 억제 효과

알레르기 동물모델에서 PCE의 알레르기 반응 억제효과를 측정한 결과, 항원 자극에 의한 알레르기 반응은 잘 유도 되었으며 PCE 처리에 의해 억제되었다(Fig. 6A). 이러한 억제 결과는 PCE 0-1000 mg/kg 농도 범위 내에서 농도 의존적으로 억제되었으며 최고농도인 1000 mg/kg 투여군에서는 대조약물로 사용된 세트리진과 동일한 효과를 보였다.

Discussion

질병관리본부가 실시한 「천식 및 알레르기질환 조사」 결과에 따르면, 최근 15년간('95년 ~'10년) 알레르기 비염은 어린이 1.3배, 청소년은 1.4배 증가했고, 알레르기결막염은 어린이 1.9배, 청소년 1.9배 증가했다고 발표했다. 이와 같이 알레르기 발병률은 어린아이로부터 성인까지 계속해서 증가하는 추세이다[10]. 현재 알레르기 치료제로는 알레르기를 일으키는 알레르겐(allergen)으로부터 보호하는 물리적 방법, 항히스타민제, 류코트리엔 수용체 길항제 등이 있는데, 이 중 가장 널리 쓰이는 항히스타민제는 알레르기 반응 시, 체내에 과다하게 분비되는 히스타민을 억제함으로 알레르기 반응을 감소시키는 효과를 가지고 있지만, 과량으로 사용할 경우 중추신경계 억제 및 녹내장, 전립선 비대 등 다양한 부작용을 동반하고 있다[11]. 이와 같이 현재 시판 되고 있는 약물 중 알레르기를 근본적으로 치료할 수 있는 치료법은 미비한 상태이다. 따라서 알레르기 질환을 치료할 근본적인 연구가 필요하다.

알레르기 질환에서 증상 발현에 중요한 역할을 하는 비만세포(mast cell)의 활성의 조절은 알레르기 질환 치료제 개발에서 많은 연구의 대상이 되고 있다. 호염기구와 비만세포에는 알레르기반응을 유도하는 화학매개체들이 포함된 과립들이 세포질 내에 존재한다. 알레르겐이 외부로부터 항원에 의해 자극되어지면 알레르기 반응을 일으키는 물질을 생산, 분비한다[12]. 이러한 화학매개체들은 과립 안에 이미 생성되어 저장되어있던 물질(preformed mediators)

과, 자극 후 새로 생성되는 물질(newly synthesized mediators)로 구성된다. 비만세포 활성화시 분비되는 물질로는 히스타민과 세로토닌이 있으며, 그 외에도 IL-4, IL-13, TNF-α 등의 사이토카인을 분비하여 알레르기성 염증 및 림프구의 증식과 이동을 유도한다[13].

이러한 과정은 알레르겐 과 비만세포 표면의 고친화성 IgE 수용체(FcεRI)가 결합한 후 신호전달체계가 활성화 되는 Fyn-Gab2-PI3K 경로와 Lyn-Syk-LAT 경로에 따라 진행된다[14]. 알레르겐 과 FcεRI 간의 집합이 이루어지면 수용체의 β, γ-subunit의 ITAM이 Src-kinase에 의해 인산화되고 Syk kinase와 인산화 된 ITAM이 결합하여 Syk의 구조가 변형되면서 신호가 활성화된다. 그 후 하위 신호전달분자 및 어댑터 단백질이 순차적으로 활성되어 비만세포에서 알레르기 유도물질을 분비하고 알레르기 반응을 유도하게 된다[15]. PCE은 세포독성이 없는 0-100 μg/ml에서 비만세포 초기 활성신호전달경로인 Syk/LAT의 신호전달경로 활성을 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 5). 이러한 신호전달을 바탕으로 활성화된 비만세포는 세포질 내 칼슘 농도가 증가되는데 이러한 증가는 비만세포 내의 과립의 탈 과립을 유도한다. PCE가 비만세포 탈 과립 억제의 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 1)

새로운 의약품이 개발될 때 그 물질의 체내 가역성은 매우 중요하다. 일반적으로 비가역적인 물질은 체내 투여 시 체내 단백질에 결합하여 그 단백질이 제거 될 때 까지 약효를 진속하게 되어 부작용 가능성을 증가 시킨다[16]. 이러한 비가역성에 의한 부작용 가능성을 관찰하기 위해 우리는 낙지다리 추출물의 가역성 실험을 진행하였다. 실험결과 낙지다리 추출물은 비만세포 활성 억제효과가 가역적임을 관찰하였다(Fig. 2). 이러한 가역성은 낙지다리 추추물의 부작용 가능성을 다소 낮추어 준 것으로 평가되었다.

최근에 비만세포억제를 통한 알레르기 반응 억제 효능이 있는 식물 추출물에 대한 보고가 다양하게 진행 되어지고 있다. 그 중에서 갈매나무 잎 추출물은 항원 자극에 의한 비만세포의 Fyn kinase 활성화 억제를 통해 알레르기 반응을 억제하는 것으로 보고되었다[17]. 꾸지뽕나무 추출물은 항원에 의한 비만세포의 Lyn/Syk 경로의 활성화 억제를 통해 알레르기 반응억제 효능을 가지는 것으로 보고되어 갈매나무 추출물의 억제 기전과는 다소 차이가 있었다[18]. 이러한 식물 추출물의 마우스에서의 알레르기 반응 억제 ED_{50}는 대부분 200-500 mg/kg 이며 본 연구의 낙지다리 추출물의 경우에도 유사한 ED_{50}를 보였다. 또한, 낙지다리 추출물은 비만세포의 신호전달과정 중 Syk kinase의 활성화 억제를 통해 알레르기 반응을 억제하였다. 하지만 이러한 억제가 어떤 상위 kinase의 활성 조절에 의한 것인지는 추후 보완 연구가 더 필요하다.

종합적으로 우리나라에서 자생하는 낙지다리 식물 추출물은 항원 자극에 의한 비만세포의 탈과립, 사이토카인 분비 및 동물모델에서 알레르기 반응을 세포내 Syk/LAT 신호전달경로를 억제하여 나타남을 확인할수 있었다. 이러한 억제 현상은 가역성을 가져 추후 사람에게의 적용 가능성이 높아 환자에 적용하기 위해 독성 및 성분연구에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 생각된다.

Acknowledgments

본 연구는 2014년도 덕성여자대학교 연구지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Holgate, S.T. and Polosa, R.: Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 218-230 (2008).
2. Siraganian RP, Zhang J, Suzuki K and Sada K: Protein tyrosine kinase Syk in mast cell signaling. *Mol Immunol*, **38**, 1229-1233 (2002).
3. Beaven MA: Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur J Immunol*, **39**, 11-25 (2009).
4. Kang Mo Ahn: Role of Mast Cells in Allergic Inflammation and Innate Immunity. *Korean Journal of Pediatrics*, **47**, 1137-1141 (2004).
5. Xiao W, Nishimoto H, Hong H, Kitaura J, Nunomura S, Maeda-Yamamoto M, Kawakami Y, Lowell CA, Ra C and Kawakami T : Positive and Negative Regulation of Mast Cell Activation by Lyn via the FcεRI. *J Immunol,* **175**, 6885-6892 (2005).
6. Roth K, Chen WM and Lin TJ: Positive and negative regulatory mechanisms in high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation. *Arch, Immunol Ther Exp*, **56**, 385-399 (2008).
7. D G Raible, E S Schulman, J DiMuzio, R Cardillo and T J Post: Mast cell mediators prostaglandin-D2 and histamine activate human eosinophils., *J Immunol*, **148**, 3536-3542 (1992).
8. Wang A, Lin L and Wang Y: Traditional Chinese Herbal Medicine Penthorum chinense Pursh: A Phytochemical and Pharmacological Review. *Am J Chin Med*, **43**, 601-620 (2015).
9. Schwartz LB and Austen KF: Enzymes of the Mast cell Granule. *J Inv Der*, **74**, 349-353 (1980).
10. Korea Centers for Disease Control and Prevention: Trend increase in allergic diseases in children youth. **13**, 1-13 (2010).
11. Kyu Eon Kim: Allergic rhinitis diagnosis and treatment guidelines in Korea. *AARD*, **19**, 807-885 (1999).
12. Gilllan AM and Rivera J: The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev*, **228**, 149-169 (2009).
13. Sang Yup Lee and Gwang Ho In: Immunopathogenesis of Asthma. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, **60**, 1-12 (2006).
14. Gifillan AM and Tkaczyk C: Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol*, **6**, 218-228 (2006).
15. Giorgio Bertona, Attila Mócsaib and Clifford A. Lowellc: Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell acti-

vation. *cell press*, **26**, 208-214 (2005).
16. Eun Lee, Byung Wook Park, Kum Jeong Huh and Heung Go: A Study on The Side Effects and Toxicity of Herbal Medicine. *Journal of Korean Oriental Internal Medicine*, **23**, 222-227 (2002).
17. Kim JH, Kim AR, Kim HS, Kim HW, Park YH, You JS, Park YM, Her E, Kim HS, Kim YM and Choi WS: Rhamnus davurica leaf extract inhibits Fyn activation by antigen in mast cells for anti-allergic activity. *BMC Complement Altern Med* (2015).
18. Kim JD, Kim do K, Kim HS, Kim AR, Kim B, Her E, Park KH, Kim HS, Kim YM and Choi WS: Morus bombycis extract suppresses mast cell activation and IgE-mediated allergic reaction in mice. *J Ethnopharmacol*, **146**, 287-93 (2013).