pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 29, No. 4, pp. 356~362 (2014)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2014.29.4.356

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

좀보리사초의 IgE 매개성 알레르기 반응 억제 효과 및 기전

임한나 · 김영미*
덕성여자대학교 약학대학

Carex pumila Extract Supresses Mast Cell Activation and IgE-Mediated Allergic Response in Mice

Hannah Lim and Young Mi Kim*
College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea
(Received November 4, 2014/Revised November 8, 2014/Accepted November 10, 2014)

ABSTRACT - Allergic diseases have increased rapidly over the past decades, affecting an estimated 20~30% of the population in developed countries. In this study, we investigated whether or not a typical costal sand dune plant *Carex pumila* (CPE) suppresses the activation of mast cells and IgE-mediated allergic response *in vitro and in vivo*. As the results, the extract of *Carex pumila* inhibited antigen-stimulated degranulation in RBL-2H3 cells and Bone marrow-derived mast cells (BMMCs), and IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mice. CPE also suppressed the production of pro-inflammatory cytokines, TNF-α and IL-4, in antigen-stimulated mast cells. As its mechanism of action, CPE inhibited the activation of Syk in FcεRI-mediated signalling pathway, and that of LAT, a downstream adaptor molecule of Syk, in a dose-dependent manner. CPE also suppressed the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases, p38, ERK1/2, JNK, and Akt. Altogether, CPE inhibited mast cell activation and IgE-mediated allergic response by antigen through suppressing the activation of Syk. These results suggest that CPE may be useful for the treatment of allergic diseases.

Key words : *Carex pumila*, Allergy, Passive Cutaneous Anaphylaxis, IgE, Mast Cells, Syk Kinase

현대사회의 생활환경과 식생활의 선진국 형으로의 변화와 환경오염에 따른 오염물질의 증가 그리고 이에 따른 유전적 영향 등의 복합적인 원인으로 인해 알레르기 질환 발병률이 급격히 증가하고 있다[1,2]. 면역체계는 외부의 이물질로부터 인체를 보호하는 역할을 하지만, 알레르기 질환은 면역반응의 불필요한 과잉 활성화로 유발되는 질환이다.

알레르기의 원인이 되는 항원이 처음 침입하게 되면 우리 몸에서는 IgE가 생성이 되고, 생성된 IgE는 비만세포의 표면 수용체(high-affinity receptor for IgE, FcεRI)와 결합한다. 동일 항원이 반복적으로 침입하여 비만세포 표면에 위치한 IgE-고친화성 수용체에 항원이 결합하면 비만세포는 활성화 신호를 개시하게 되고 최종적으로 과립내 알레르기 유발물질인 히스타민, 아라키도닉 산 대사체, 프로테아제, 세로토닌과 헤파린 등의 분비를 유도하여 알레르기 반응을 일으키게 된다[3,4].

비만세포의 세포막에 존재하는 수용체인 FcεRI는 α와 β, 두개의 γ-subunit으로 구성된다. α chain은 세포 밖에서 IgE와 항원의 결합에 관여하고, β와 γ chain은 세포 내에서 신호전달을 매개한다. IgE가 결합한 FcεRI은 항원에 의해 활성화되면 처음으로 Lyn, Fyn, Fgr 등의 Src-family kinase가 수용체의 β, γ-subunit의 ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)에 있는 타이로신 잔기를 인산화시킨다[5]. 이는 알레르기 반응의 중요한 신호경로단백질인 Syk kinase 와 ITAM의 결합을 유도하여, 두개의 SH2 domain으로 구성된 Syk이 ITAM과 결합하여 구조가 변경되면서 알레르기 발생 신호경로가 활성화 된다. Syk이 활성화되면 하위 신호 분자들인 Linker for activation of T cells (LAT), SH2 domain containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa (SLP-76), Grb-associated binder 2 (Gab2), phospholipase(PL)Cγ, phospholipase(PL)D 등 이 차례대로 활성화되어, 비만세포가 활성화되면서 알레르기의 원인이 되는 히스타민, 싸이토카인, 아라키도닉 산 유도체 등이

*Correspondence to: Young Mi Kim, College of Pharmacy, Duksung Women's University 419 Ssangmun-Dong, Tobong-ku, Seoul 132-714, Korea
Tel: 82-2-901-8455
E-mail: kym123@duksung.ac.kr

분비된다[6-8]. 따라서 알레르기 반응과 관련된 세포내 신호 전달 억제물질을 찾아내는 것이 알레르기 반응 치료제 개발에 중요한 수단이 될 수 있다[9].

우리는 비만세포의 활성을 억제하는 기전을 지닌 천연물질 소재를 개발하고자 알레르기 억제 연구보고가 전무한 해안사구식물에 관심을 갖게 되었다. 해안사구(costal sand dune)는 바닷가의 모래가 바람에 날려 쌓이면서 형성된 것으로 독특한 지형에서 서식하는 해안사구식물에 대한 생리활성에 관한 연구는 매우 부족하다. 좀보리사초(*Carex pumila*)는 사초과의 다년생 초본식물로써 높이는 10~20 cm 이고, 굵은 뿌리줄기가 땅속으로 뻗어 확장된다. 잎은 폭 2~4 mm로 광택이 나며 질기고 때로는 말리기도 한다. 꽃자루 윗부분 이삭 2~3개는 수꽃, 아래로 약간 떨어져 붙어 있는 1~2개는 암꽃으로 모두 자갈색이다. 열매는 3 mm 정도로 팽팽하며, 밑 부분이 약간 굵고 끝이 3개로 갈라진다. 좀보리사초는 우리나라 해안사구에서 빈번하게 나타나는 대표적 해안사구식물이나, 알레르기 반응 조절에 대한 연구는 보고된 바 없다[10-12].

본 연구에서 우리는 좀보리사초 추출물은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 비만세포 활성 및 IgE 매개성 알레르기 반응 억제 기전을 규명하였다. 좀보리사초는 FcεRI 매개성 신호 경로 중 초기 신호 전달 분자인 Syk의 활성화 억제를 통해 하위 신호분자인 LAT 및 MAP kinase 등의 활성화를 순차적으로 억제함으로써 탈과립 및 알레르기 반응 억제 효능을 나타내었다. 이러한 연구결과를 통해 좀보리사초가 향후 알레르기질환 치료제의 소재로 활용될 수 있음을 제시하였다

실험재료 및 실험방법

실험재료

세포배양에 사용한 MEM (Minimal Essential Medium) 배양액과 R PMI-1640 배양액은 Gibco에서 구입하였다. DNP (dinitrophenol)-BSA (bovine serum albumin), DNP-specific mono clonal IgE, formamide, Arabic gum, PP2는 Calbiochem에서 구입하였다. Immunoblot에 사용한 Phospho-Syk specific polyclonal 항체, LAT specific polyclonal 항체와 phospho-Akt (polyclonal), Phospho-Erk1/2 (monoclonal), Phospho-JNK (polyclonal), Phospho-p38 (polyclonal)은 Cell Signalling Technology사에서, phospho-tyrosine specific monoclonal 항체, phospho-LAT specific polyclonal 항체는 Upstate사에서 구입하였다. Syk specific polyclonal 항체, actin specific monoclonal 항체, phospho-PLCγ는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하여 사용하였다. RT-PCR에 사용한 easy-blue™ Total RNA Extraction Kit는 iNtRON Bio technology로부터 구매하였다. PIPES, HEPES, Triton X-100, carbonate, p-nitrophenyl-N-acetyl-β-d-glucosaminide는 Sigma사에서 구입하였다. 이 외 모든 시약은 시중 제품 중 특급 시약을 사용하였다.

실험동물

실험동물은 (주)오리엔탈바이오 (성남, 한국)에서 생후 5주령 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 12시간으로 하였다. 모든 실험동물은 1 주일 동안 적응기간을 가진 후 실험에 사용하였다. 통계적 유의성을 위해 군당 마우스의 수는 5 마리로 하였다.

비만세포의 분리 및 배양

ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입한 RBL-2H3 (Rat Basophil Leukemia) cells을 200 mM L-glutamin, 10,000 units/ml penicillin streptomycin, 15% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 MEM을 배양액으로 하여 CO_2 incubator (5% CO_2, 37°C)에서 배양하였고 1~2 일 간격으로 계대 배양 하였다. Bone marrow-derived mast cells (BMMCs)는 5 주령의 수컷 Balb/c 마우스로부터 채취한 골수 세포를 10% FBS, 100 μg/ml streptomycin, 100 μM MEM non-essential amino acid solution, 5 mM sodium pyrubate를 포함한 RPMI 1640에 10 ng/ml의 murine recombinant IL-3를 첨가한 배양액을 사용하여 5주 정도 배양 후 98% 이상의 homogenous한 BMMCs를 얻어 실험에 사용하였다.

좀보리사초의 메탄올 추출물 구입

한국식물추출은행에서 구매한 사초과의 좀보리사초의 전초부위의 메탄올추출물을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시켜 100 mg/ml 농도로 stock시켜 실험 때마다 조건별로 희석해서 사용하였다.

비만세포의 탈과립 측정

비만세포를 24 well plate (1.8×10^5 cells/well)에 분주하여, 20 ng/ml의 DNP 특이적인 IgE가 포함된 MEM 배지에서 12 시간 동안 배양 감작하였다. 탈과립 측정은 PIPES 완충용액(159 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM Glucose, 0.4 mM $MgCl_2$, 25 mM PIPES, 4 mM $CaCl_2$, 0.1% fatty acid and protease-free fraction V from bovine serum, pH 7.2)을 사용하여 진행하였다. 실험은 완충용액으로 세포를 2회 세척 후, 다시 완충용액을 넣고 CO_2 incubator에서 5분간 반응시킨 후, CPE를 각 농도별로 완충용액에 희석시켜 각 well에 30 분 처리하였다. 다음으로, 25 ng/ml의 항원(DNP-BSA)를 각 well에 첨가하여 10 분 동안 자극시킨 후, 5 분간 얼음 위에 두어 자극을 정지시켰다. 탈과립에 의해 세포 밖으로 분비된 β-hexosaminidase을 측정하

기 위해 상층액을 새 tube에 옮기고, plate에 남아있는 세포는 0.1% triton X-100으로 용해시켰다. 상층액과 파쇄된 시료는 96 well plate에 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-d-glucosaminide와 각각 30 μl씩 섞은 다음 incubator에서 1시간 동안 반응시킨 후, 0.1 M carbonate 완충용액을 넣어 반응을 종결시킨 후 405 nm 파장에서 micro plate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 다음의 계산식을 이용하여 β-hexosaminidase의 양을 백분율로 나타내었다.

$$\beta\text{-hexosaminidase (\%)} = \frac{\text{흡광도(배양액)}}{\text{흡광도(배양액)} + \text{흡광도(세포분쇄액)}} \times 100\%$$

RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

6well plate에서 자극된 RBL-2H3 cells에 trizol reagent를 분주한다. 피펫으로 cell lysate를 모은 다음, 클로로포름을 200 μl 넣어 준다. 15,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리 후 얻은 상층액과 클로로포름을 1:1로 섞은 후 상온에서 5분 동안 반응시킨 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 에탄올로 씻어준다. RNA pellet을 DEPC-water 50 μl에 녹여서 얻은 total RNA를 reverse transcriptase와 dNPT, oligo primer, superase, 5× 반응완충액, $MgCl_2$를 이용하여 제조회사가 제공하는 완충용액과 방법에 따라 25°C, 5분, 42°C, 60분, 72°C, 5분, 4°C로 유지시켜 cDNA를 제조한다. PCR (polymerase chain reaction)은 94°C, 30초, 58°C, 30초, 72°C, 40초를 30회 반복하였다. Primer인 Rat TNF-α forward는 5'-CACCACGCTCTTCTGT CTACTGAAC-3', reverse는 5'-CCGGACTCCGTGATGTCTAAGTACT-3', IL-4 forward는 5'-CCGATATGGTGTAATTTCCTATGCTG-3', reverse는 5'-TTGTGAGCGTGGACTCATTC-3'이었고, Rat GAPDH forward는 5'-GTGGAGTCTACTGGCGTCTTC-3', reverse는 5'-CCAAGGCTGTGG GCAAGGTCA-3'을 사용하였다.

Immunoblot analysis

비만세포를 6 well plates에 well당 8.0×10^5 씩 분주한 후, 20 ng/ml의 DNP 특이적인 IgE가 포함된 MEM 배지에서 12 시간 동안 배양하며 감작시켰다. PIPES 완충용액 2 ml로 3번 씻어준 후 다시 PIPES 완충용액 1 ml를 넣어준다. 이 후 CO_2 incubator (5% CO_2, 37°C)에서 5분간 반응시킨 후, 추출물을 각 농도별로 PIPES 완충용액에 희석시켜 각 well에 30분 정도 전처리를 하였다. 250 ng/ml의 DNP-BSA를 각 well에 첨가하여 10분간 자극시키고, 5분 동안 얼음 위에서 자극을 정지시켰다. 세포는 차가운 PBS로 두 번 씻어주고, 차가운 lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet p-40, 10% glycerol, 60 mM octyl b-glucoside, 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 2.5 mM nitrophenyl phosphate, 0.7 mg/ml pepstatin, protease-inhibitor cocktail tablet)를 첨가하여 세포를 용해시킨 후, 세포 파쇄물은 30분 동안 얼음위에 두고, 13,000 rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리하여 세포파쇄 찌꺼기를 제거한 상층액에 3× sample buffer를 섞어 100°C에서 5분간 단백질을 변성시켰다. 변성된 단백질시료를 10%의 poly acryl amide gel (poly acrylamide: bisacrylamide = 29: 1)을 사용하여 80 볼트에서 30분, 120 볼트에서 1시간 동안 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 진행한 후 PVDF membrane (Schleicher & Schuell, BA85)로 transfer 시켰다. TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)로 5% BSA을 만들어 1 시간 동안 blocking 시킨 다음, 각각의 특이적인 항체와 4°C에서 overnight시켰다 (1차 항체 반응). 그리고 horseradish peroxidase (HRP)가 붙은 단일클론 항체 또는 다클론 항체로 한 시간 동안 반응시킨 다음 (2차 항체 반응), 비 특이적으로 남아있는 항체를 TBS-T로 10분 간격으로 5~6회 씻어준 후, ECL detection kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 단백질 밴드를 검출하였다.

수동 피부 감작 알레르기 동물모델

IgE 및 비만세포 매개성 수동 피부 감작 알레르기 반응 (Passive cutaneous anaphylaxis, PCA)을 유도하기 위해 마우스의 한쪽 귀에 IgE 를 0.5 μg를 주입하였다. 약 12 시간 후 5% Arabic gum 용액에 녹인 CPE와 표준약물(cetirizine, 20 mg/kg)을 농도별로 경구투여 하였다. 1시간 후 DNP-BSA를 5 mg/ml 에반스 블루 염색액에 1 mg/ml의 농도로 희석하여 250 μl를 꼬리정맥에 투여하였다. 한 시간 후 마우스를 안락사하고 IgE를 주입한 귀를 잘라서 700 μl의 포름아마이드에 넣고 63°C에서 12시간 이상 염색약을 추출 후 원심분리하여 상등액을 얻은 후, 620 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

통계학적 분석

결과의 표시는 최소 3 번 반복한 실험결과를 이용 mean ± S.E.M.로 표시하고 one-way ANOVA 및 Dunnet's test를 이용 통계적 유의성을 검정하였다.

결 과

좀보리사초 추출물의 RBL-2H3 세포와 BMMC의 탈과립에 대한 억제 효과 및 가역적 효과

β-hexosaminidase는 탈과립이 유발될 때 다양한 과립물들과 함께 분비되는 과립단백질이다. 따라서 항원 자극에 의한 비만세포의 활성화로 유도되는 탈과립을 측정하는 지표 단백질로써 β-hexosaminidase을 측정하였다. 비만세

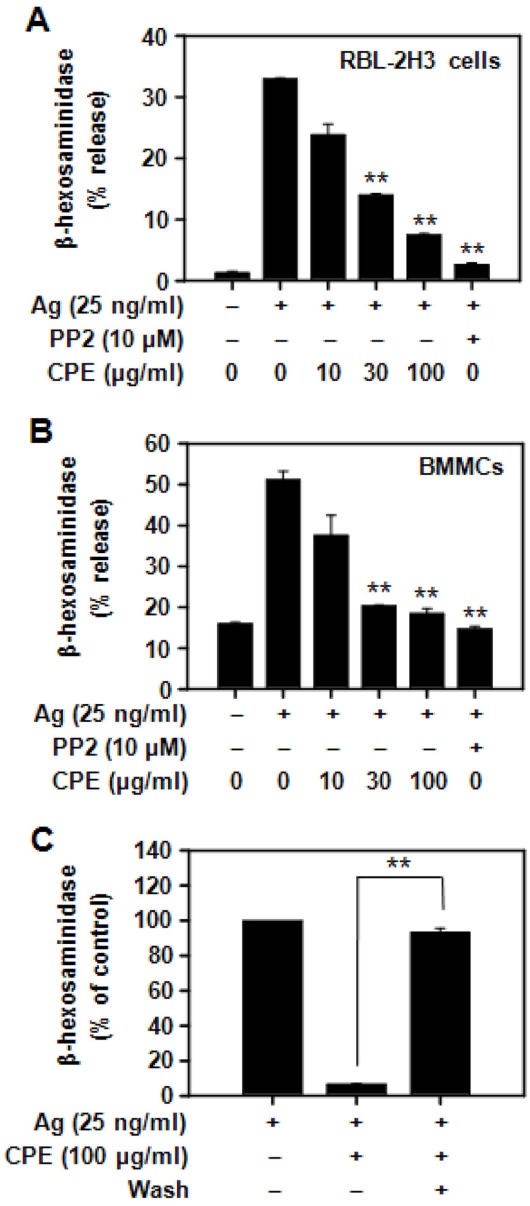

Fig. 1. CPE has a reversible inhibitory effect on degranulation in mast cells. (A-B) Mast cells (1.8×10^5 cells/well) were sensitized by DNP-specific IgE (20 ng/ml) and treated with or without CPE as shown. After stimulating mast cells with antigen (25 ng/ml), the level of β-hexosaminidase release was measured. (C) To observe the reversibility of the effect of CPE, CPE-treated RBL-2H3 cells were washed five times by PIPES buffer and stimulated by antigen. The degranulation of mast cells was measured as described in the "Materials and Methods". The values are expressed as mean ± S.E.M. from three or more independent experiments. $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$. PP2, a typical src-family kinase inhibitor.

포의 탈과립 시 CPE 처리로 인한 억제효과를 측정하기 위해 CPE를 10, 30, 100 μg/ml의 농도로 처리하였다. 실험 결과 CPE는 농도 의존적으로 RBL-2H3 cells과 BMMCs의 탈과립을 억제하였다(Fig. 1A 및 1B).

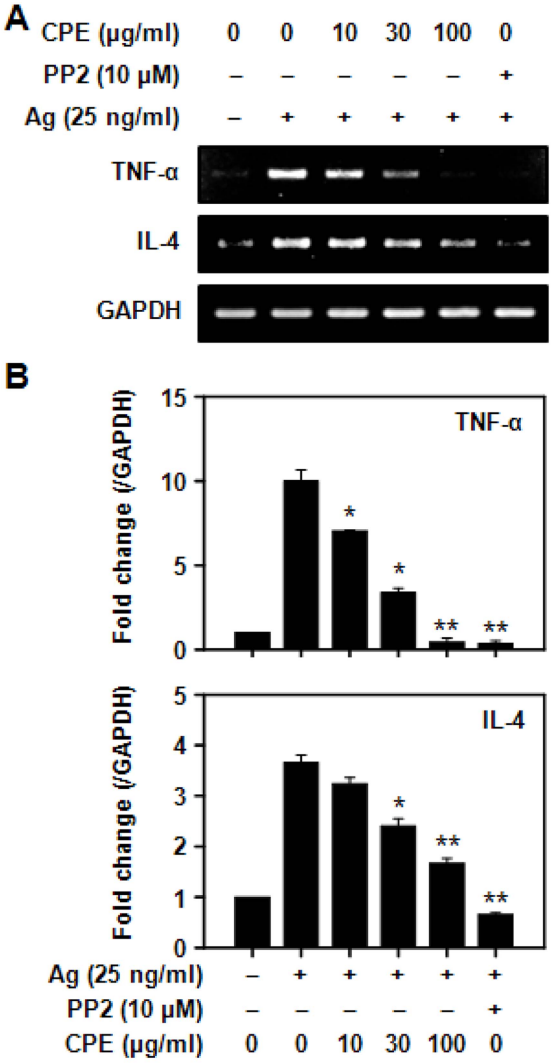

Fig. 2. CPE inhibits the release of inflammatory cytokines by antigen in mast cells. (A) IgE-primed RBL-2H3 cells (1×10^6 cells/well) were stimulated with antigen (25 ng/ml) for 15 mins, with or without CPE. Total RNA was subjected to RT-PCR as described in the "Materials and Methods". (A) Representative images were shown. (B) The band density was measured by using Multi gauge V3.1 software (FUJIFILM, Inc., Japan). $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$.

CPE 처리 후 비만세포 탈과립 억제 효과의 가역성을 확인하기 위해 CPE 처리 1시간 후 PIPES 완충용액으로 세포를 5번 씻어준 뒤 항원으로 자극하여 RBL-2H3에서 탈과립을 측정하였다. 그 결과 RBL-2H3 세포에 CPE처리 후 세척하면 탈과립 현상이 다시 회복되었다(Fig. 1C). 이러한 결과를 통해 CPE의 비만세포 탈과립 억제효과는 가역적임을 알 수 있었다.

좀보리사초 추출물의 항원에 의해 유도된 TNK-α 및 IL-4 생성에 대한 억제 효과

TNF-α와 IL-4는 항원자극에 의해 비만세포에서 분비되

는 대표적인 염증성 사이토카인이다. CPE의 비만세포에서 생성되는 염증성 싸이토카인의 생성을 저해하는 효과를 확인하기 위해, 비만세포에 IgE를 감작 한 후 항원을 처리하여 TNF-α 및 IL-4 의 발현에 대한 CPE의 억제 효과를 RT-PCR을 통하여 확인하였다. Fig. 2A에서 보이는 것처럼 항원에 의한 RBL-2H3 cells에서의 TNF-α 및 IL-4의 발현의 증가를 CPE가 농도 의존적으로 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

좀보리사초 추출물의비만세포에서 Syk 및 하위 신호전달 단백질 활성화 억제 효과

다음으로 비만세포에서 항원에 의한 탈과립 과 사이토카인 생산을 억제하는 기전을 실험하였다. CPE는 RBL-2H3 cells에서 항원 자극에 의한 Syk과 LAT의 활성화를 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 3). 또한, CPE는 비만세포에서 사이토카인의 생산에 중요한 신호전달단백질인 MAP kinase인 ERK1/2, p-38 및 JNK의 활성화를 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 3). 또한, BMMC에서도 초기 신호분자를 억제하는지를 immunoblot을 통해 분석한 결과 RBL-2H3 cells과 동일한 억제 효과를 나타냈다(Fig. 3). 이로써 CPE의 알레르기 반응 억제 효과는 비만세포에서 초기 신호 분자인 Syk과 LAT의 활성화 및 그 하위 신호전달단백질인 MAP kinase를 억제하는데 기인함을 알수 있었다.

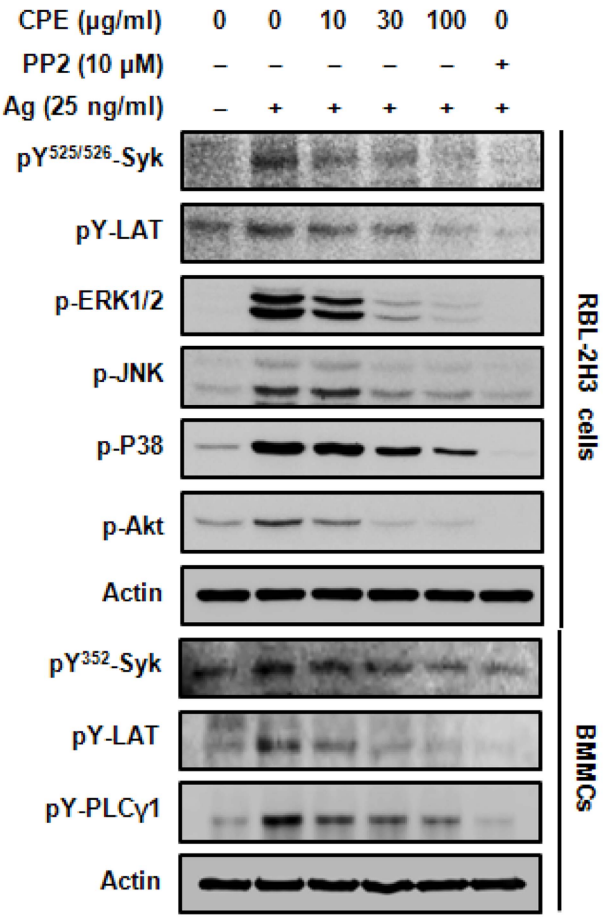

Fig. 3. CPE inhibits activation of Syk and Syk-dependent signaling pathway. IgE-primed Mast cells (1×10^6 cells/well) were stimulated by antigen (25 ng/ml) with or without CPE for 10 min. The whole cell lysates for Syk, LAT, Akt, and three MAP kinases were then measured by Western blot analysis using specific antibodies for phosphorylated tyrosine residues. Representative images from three independent experiments are shown. Ag, antigen; PP2, a Src-family kinase inhibitor.

동물모델에서 좀보리사초 추출물의 알레르기 억제 효과

다음으로 BALB/c 마우스를 이용하여 국소적 알레르기 질환 동물 모델(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)에서 CPE의 알레르기 억제 효과 및 피부의 병리학적 분석을 수행하였다. PCA는 IgE를 마우스의 귀에 피내주사 후 꼬리 정맥으로 IgE에 특이적인 antigen이 포함된 에반스블루 용액을 주입하여, 항원이 IgE에 감작된 귀의 비만세포를 자극하여 탈과립을 유도하여 과립 내 물질들이 혈관 투과성을 높임으로써 혈관 내 에반스 블루가 귀에 삼출하게 되는 알레르기 동물모델이다. IgE 매개형 PCA에 대해 억제작용을 가진 물질을 투여할 경우 위의 반응을 억제하여 귀에 삼출되는 에반스블루의 양을 감소시키기 때문에 이 원리를 이용하여 *in vivo*에서 알레르기 반응 억제실험을 수행하였다. 실험 결과로 CPE는 마우스에서 항원에 의해 유도된 PCA 반응을 농도 의존적으로 억제 하였다(Fig. 4A). 더우기 귀 조직의 병리학적 관찰에서도 CPE는 귀 조직내 비만세포의 탈과립을 억제 하였다(Fig. 4B). 이러한 실험을 통해 CPE가 항원 자극에 의한 IgE 매개성 알레르기 반응을 in vivo에서도 효과적으로 차단함을 알 수 있었다.

고 찰

알레르기는 전 세계 인구의 20~30%가 겪고 있는 흔한 질환 중의 하나이다. 알레르기성 비염이나 천식 및 아토피성 피부염 등 제1형 알레르기가 가장 빈번히 발생하며, 면역체계의 조절에 이상이 생긴 소아와 청소년들이 많이 걸린다. 최근 우리나라 보건복지부 통계에 의하면 해마다 청소년들의 알레르기로 인한 결석자 및 치료 의뢰 건수가 늘어나고 있다. 현재 알레르기 치료제로는 면역세포를 직접 억제하는 약물, 항히스타민제, 스테로이드제 등이 빈번하게 사용되고 있으나 높은 치료비용과 치료에 소요되는 긴 시간 등의 불편함이 있으며, 이들은 근본적으로 알레르기를 치유하지는 못한다. 이러한 이유로 알레르기에 대한 근본적인 연구가 필요하다[13].

알레르기 질환에서 중요한 역할을 하는 비만세포는 조혈전구세포에서 분화되어 피부나 위장관, 기도의 점막과

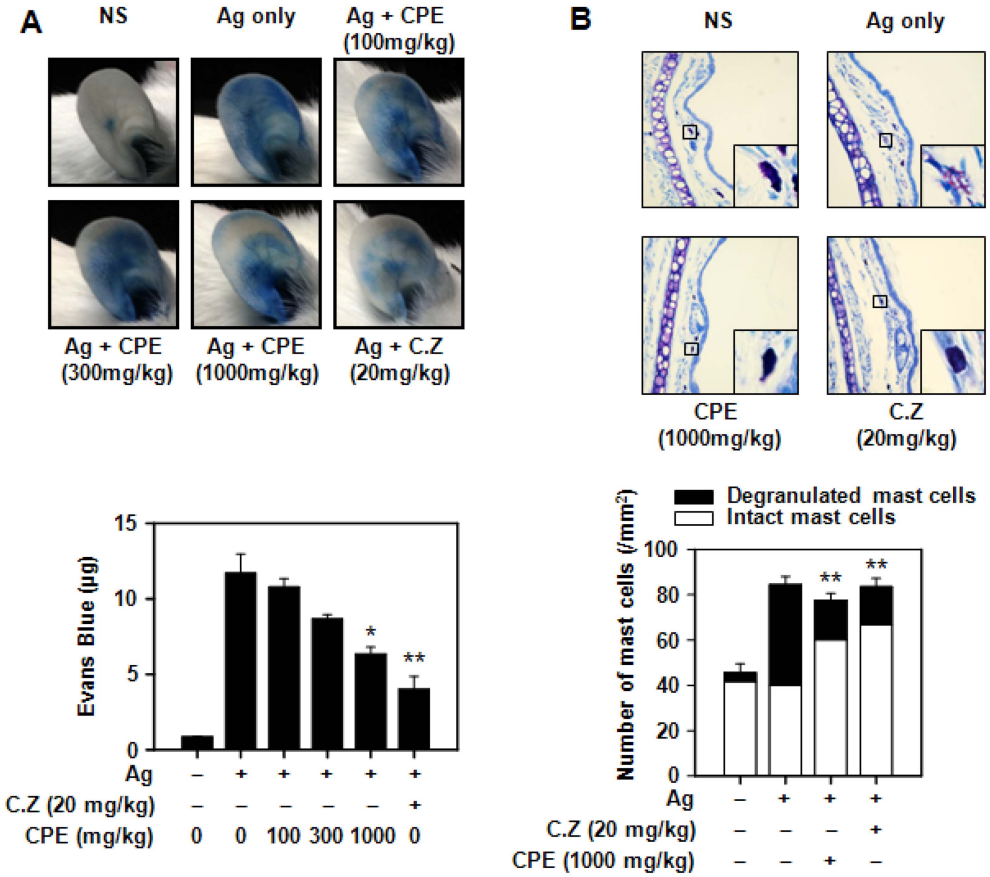

Fig. 4. CPE inhibits PCA reaction in mice. (A) Balb/c mice were intravenously injected with a 250 μg antigen containing 4% Evans blue 24 h after intradermal administration of IgE (0.5 μg) into a mouse ear. CPE was orally administrated 1 h before an administration of antigen. The dye extravasated by antigen was extracted from the ear and the amount was measured by absorbance at 620 nm. The representative images of ears (upper panel) and the mean ± S.E.M. of values for amount of dye (lower panel) from three independent experiments (n = 5) are shown. (B) The ear skins were prepared for histological examination as described in "Materials and Methods". Representative histological images are shown (upper panel). The histograms show the percentage of degranulated mast cells in the given number of mast cells in ear skin sections (lower panel). Values for degranulated mast cells are expressed as percent of total number of mast cells and are the means ± the S.E.M. of values from three independent experiments. *$p < 0.05$ and **$p < 0.01$. Cetrizine (CZ, 20 mg/kg) was used as a typical anti-histamine reference drug.

심근을 둘러싼 조직으로 퍼져 성숙해진다. 항원의 침입에 의해 생성되어 비만세포 표면의 고친화성 IgE 수용체(FcεRI)와 결합되어 있는 IgE가 항원과 결합하면 비만세포가 활성화되어 다양한 알레르기 유발 물질 (히스타민, 헤파린, 류코트리엔, 프로스타글란딘, 아라키도닉산 및 사이토카인)의 분비를 유도하여 염증, 소양, 통증, 혈관확장, 기도 수축, 등 알레르기 반응을 일으키게 된다[14,15].

한국을 비롯한 많은 아시아 국가들은 질병치료를 위해 자생하는 약초를 우려낸 추출물을 사용해 왔으며, 이들의 치료기전을 밝혀내기 위한 연구가 국내외적으로 활발히 진행 중이다. 우리나라의 해안사구식물들 중 순비기나무, 갯방풍, 갯기름나물 등도 민간약재로 사용되어 왔고, 그 외 사구식물들에도 항염증 효과를 보이는 플라보노이드가 다량 존재한다는 연구결과도 있다[11]. 우리는 해안사구식물 추출물의 항알레르기 효능 여부를 검색하는 중 좀보리사초 추출물에서 유의적인 알레르기 억제 효과가 확인하여 그 기전을 규명하였다.

일반적으로 비만세포의 분비를 억제하는 방법으로 첫 번째, FcεRI에 결합된 IgE에 항원이 이들의 응집을 막는 것과, 두 번째, 응집체 형성 이 후 개시되는 FcεRI 매개 신호전달단백질을 막는 방법이 있는데, 본 연구는 두 번째 방법에 초점을 맞춰 실험을 진행하였다. 항원이 FcεRI와 결합 후 신호전달체계가 활성화 되는 경로로 Lyn-Syk-LAT 경로와 Fyn-Gab2-PI3-K경로 두 가지가 존재한다. 이는 다가성 항원이 FcεRI와 응집 후 Lyn, Fyn 등의 Src-family kinase가 수용체의 β, γ-subunit의 ITAM을 인산화하여 Syk kinase와 ITAM이 결합하여 두개의 SH2 domain으로 구성된 Syk의 구조가 변경되면서 알레르기 발생 신호경로가 활성화된다. Syk의 활성화로 하위 신호들인 LAT, SLP-76, Gab2, phospholipase(PL)Cγ, PLD 등의 신호전달분자 및 어

댑터가 차례대로 활성화되어, 전체 알레르기 반응을 유도하는 신호체계가 활성화된다[15,16]. CPE는 Lyn-Syk-LAT경로에서 초기신호전달단백질인 Syk의 활성화를 농도 의존적으로 억제 하였고, 그 다음 하위신호분자인 LAT도 동일한 경향으로 억제하였다(Fig. 3). 이러한 결과를 바탕으로 CPE는 비만세포 활성화에 중요한 Lyn-Syk-LAT 신호전달과정을 억제하여 비만세포의 활성화를 억제하는 것으로 생각된다[17,18].

MAP Kinase (ERK1/2, JNK, p38)는 비만세포에서 사이토카인의 발현 및 분비에 필수적인 사이토카인이다[14]. CPE는 항원에 의해 생성되는 TNF-α 나 IL-4의 생산도 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 2). 이러한 결과와 일치하게 CPE는 세 종류의 MAP kinase를 모두 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 CPE가 비만세포에서 항원에 의한 사이토카인 생성 억제효과는 MAP kinase 활성억제 효과에 기인한다는 것을 알 수 있었다.

종합하면, 해안사구식물인 CPE는 항원자극에 의한 비만세포의 세포내 과립 및 사이토카인 등의 알레르기 유발인자의 분비를 억제하였다. 동물알레르기 실험에서도 CPE는 알레르기 반응을 억제하였다. 그 작용 기전으로 CPE는 항원자극에 의한 Syk kinase의 활성화를 억제하여 알레르기 반응 억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 추가적인 실험을 통해 CPE를 알레르기 치료제로서의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 2013년도 덕성여자대학교 연구지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Ebo D.G. and Stevens W.J. IgE-mediated food allergy-extensive review of the literature. *Acta Clin Belg* **56**, 234-247 (2001).
2. Alma J.N., Ferdi E., Leon M.K., Johan G., Frans P.N. and Frank A.R. Mechanisms of allergy and asthma. *Eur J Pharmacol* **585**, 354-360 (2008).
3. Toshio T. Efficacy of Flavonoids for Patients with Japanese Cedar Pollinosis. *Current Insights in Pollen. Allergens* 103-122 (2012).
4. Galli, S. J. New concepts about the mast cells. New Eng. *J. Med.* **328**, 257-270 (1993).
5. Paolini R., Jouvin M.H. and Kinet J.P. Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engantigenement and disengantigenement. *Nature* **353**, 855-858 (1991).
6. Wong B.R., Grossbard E.B., Payan D.G., and Masuda E.S. Targeting Syk as a treatment for allergic and autoimmune disorders. *Expert Opin Invest Drugs* **13**, 743-762 (2004).
7. Rivera J and Gilfillan A.M. Molecular regulation of mast cell. activation. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 1214-1225 (2006).
8. Gilfillan A.M. and Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* **6**, 218-230 (2006).
9. 김경만, 알레르기 반응의 신호전달체계 및 조절기능에 관한 연구, *보건복지부 보건의료개발사업 보고서*, 2004.
10. 환경부, *자연방파제 해안사구*, 2011.
11. 민병미, *한국의 해안 사구식물*, 2006.
12. 강영희, *생명과학대사전*, 2008.
13. Beaven, M. A. Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur. J. Immunol.* **39**, 11-25 (2009).
14. Voehringer, D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat. Rev. Immunol*. **13**, 362-375 (2013).
15. Wedemeyer J., Tsai M. and Galli S. J. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr. Opin, Immunol*. **12**, 624-631 (2000).
16. Sada, K., Takano, T., Yanatigeni, S. and Yamamura, H Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J. Biochem*. **130**, 177-186, (2001).
17. Chu, D. H., Morita, C.T. and Weiss, A. The syk family of protein tyrosin kinase in T-cell activation and development. *Immunol. Rev,* **165**, 167-180 (1998).
18. Theohardies, T.C. and Kalogeromitros, D. The dritical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. **1088**, 78-99 (2006).