

蕎麥의 비만세포 염증매개물질의 분비와 FcεRI 신호전달에 미치는 효과

강경화*

동의대학교 한의과대학 생리학교실

Fagopyrum esculentum Extract Suppresses the Release of Inflammatory Mediator and Proximal Signal Events in FcεRI-mediated RBL-2H3 Cell Activation

Kyung Hwa Kang*

Department of Oriental Physiology, College of Oriental Medicine, Dongeui University

Fagopyrum esculentum(FE) is an important food crop and medicinal plant that is used to improve diabetes, obesity, hypertension, hypercholesterolemia and constipation in Korea, but the underlying mechanisms involved in its anti-allergic activity are not fully understood. We investigated the effects on the release of inflammatory mediator and proximal signal events in FcεRI-mediated RBL-2H3 cell activation. FE reduced antigen (DNP - HSA)-induced release of histamine, prostaglandin D2 (PGD2) and cysteinyl Leukotriene (cysLT) in IgE-sensitized RBL-2H3 cells. In addition, it inhibited antigen-induced HDC2 and COX-2 and 5-LO mRNA expression in IgE-sensitized RBL-2H3 cells. FE also suppressed antigen-induced FcεRIβ and FcεRIγ subunit mRNA expression in these cells. To identify the mechanisms underpinning the inhibition of release of inflammatory mediators such as histamine and PGD2 and cysLT by FE, we examined the proximal signal events of intracellular FcεRI signaling molecules. FE suppressed antigen-induced phosphorylation of Lyn, Syk, LAT, PLCγ1, PI3K, Akt and cPLA2. Collectively, the anti-allergic effects of FE in vitro suggest its possible therapeutic application to inflammatory allergic diseases, in which its inhibition of inflammatory mediator and FcεRI-dependent signaling events in mast cells may be hugely beneficial.

Key words : *Fagopyrum esculentum* (FE), Histamine, PGD2, CysLT, FcεRI-mediated signaling, RBL-2H3

서 론

아토피 피부염, 알러지 천식, 알러지 비염 등의 알러지 염증 반응에서 비만세포의 활성화는 매우 중요한 역할을 한다. 비만세포나 호염기구 표면에서 IgE와 다가항원에 의한 FcεRI (high-affinity receptor for IgE)의 교차결합은 많은 화학적 매개물질을 세포 외로 분비를 유발한다. 일차적으로 histidine decarboxylase (HDC)에 의해 유도된 histamine이 비만세포 탈과립으로 분비되고 이차적으로 세포막의 인지질이 phospholipase A2(cPLA2)에 의해 arachidonic acid로 유리되고

cyclooxygenase-2 (COX-2)와 5-lipoxygenase (5-LO)에 의해 염증과 통증을 유도하는 prostaglandins과 leukotrienes과 같은 지질 대사물을 합성하여 분비한다. 이러한 매개물질에 의해 즉시형 알러지 반응이 유발된다¹⁾. 이러한 과정에 관여하는 신호전달은 항원이 FcεRI와 응집체를 형성하면 수용체의 β-subunit에 결합되어 있던 Src-family kinase에 의해 수용체가 인산화되면서 세포의 신호전달이 시작된다. FcεRI는 Lyn kinase에 의해 Syk kinase를 활성화시키며, 이후 LAT, PLCγ1, PI3K 와 Akt 등 많은 다른 신호전달분자와 adaptor 분자들이 수용체/Syk복합체로 유도되어 전체적인 신호전달계가 활성화된다²⁾.

교맥 (蕎麥, *Fagopyrum esculentum* FE)은 성질이 평하면서 차고 맛이 달며 독이 없고, 오장의 적체를 풀어주어 기력을 회복하게 하는 효능이 있어 한의학에서 여러 증기 및 화상의 치료에

* 교신저자 : 강경화, 부산시 진구 양정2동 산 45-1, 동의대학교 한의과대학

· E-mail : ghkang@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-7423

· 접수 : 2012/07/16 · 수정 : 2012/07/25 · 채택 : 2012/07/31

널리 사용되어 왔다^{3,4)}. 교맥에 대한 실험연구로는 항산화⁵⁾, 항염증⁶⁾, 항암⁷⁾, 고혈압⁸⁾, 당뇨⁹⁾ 등에 대한 보고가 있었으나, 항알러지 효능에 대한 교맥의 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구는 교맥이 FcεRI 매개 비만세포 활성화에 따른 histamine과 PGD2와 cysLT 같은 염증매개물질의 생산을 억제하고 세포내 신호전달을 억제하는지 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시약

본 실험에 사용된 anti-dinitrophenyl (DNP) immunoglobulin E (IgE) 및 DNP-HSA는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터, Dulbecco's modification Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin 및 trypsin-EDTA solution은 Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)로부터, tetrazolium bromide salt (MTT) 및 dimethylsulfoxide (DMSO)는 Amresco (OH, USA)로부터, Interleukin (IL)-4와 tumor necrosis factor alpha (TNF-α) kit는 BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA)으로부터, Prostaglandin D2 (PGD2)와 Cysteinyl Leukotriene (cysLT) kit는 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)로부터, RT-PCR kit (one-step RT-PCR PreMix kit)는 iNtRON Biotechnology, Inc. (Sungnam, Kyungki-Do, KOREA)로부터, anti-phospho-Lck/yes-related novel tyrosine kinase (p-Lyn), anti-Lyn, anti-phospho-phospholipase C (p-PLCγ)1, anti-PLCγ1, anti-phospho-phosphoinositide 3-kinase(p-PI3K), anti-PI3K, anti-phospho-Akt (p-Akt), anti-Akt, anti-phospho-cytosolic phospholipases A2 (p-cPLA2), anti-cPLA2 및 anti-β-actin primary antibody는 Cell Signaling Technology (Beuerly, MA, USA)으로부터, anti-phospho-spleen tyrosine kinase (p-Syk)와 anti-Syk는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터, Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody는 Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (KPL, Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 시료의 추출

본 실험에 사용된 교맥 (FE)는 옴니허브 (대구, 한국)에서 구입하여 사용하였다. FE 100 g을 증류수로 水洗하여 1 L의 75% ethanol을 가하여 incubator (iNtRON BIOTECHNOLOGY CO., Ltd., Korea)에서 60°C 90 rpm 조건 하에서 24시간 동안 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고, 0.2 mm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200 ml가 되도록 減壓濃縮한 후 냉동 건조하여 4.2 g의 抽出物을 얻었다. -20°C에 보관하였다가 실험직전 생리식염수나 배지에 희석하여 0.2 μm syringe filtering 후 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

RBL-2H3 (rat basophilic leukemia cell line)은 한국세포주은

행 (Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받아 배양하였다. 세포의 배양을 위하여 10% heat-inactivated FBS (Gibco BRL, USA)과 1% penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL, USA)을 포함한 DMEM (Gibco BRL, USA) 배양액에서 배양하였다. 세포는 37°C 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution (Gibco BRL, USA)을 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대 배양하였다.

4. Histamine assay

알레르기 즉시반응의 지표인 탈과립에 대한 억제효과를 살펴보기 위하여 histamine의 분비를 측정하였다. RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate(Corning, USA)에 5×10⁵cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE (30 ng/ml)로 감작하고 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer(119 mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM MgCl₂, 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH7.2)로 2번 세척한 다음 각 well 당 5.6mM glucose, 1mM CaCl₂와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하고 FE (0, 20 및 40 mg/ml)를 1시간 동안 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양 한 후 DNP-HSA (10 μg/ml)로 처리하여 10분 동안 반응시키고 ice bath에서 10분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 배양된 RBL-2H3 세포를 4°C에서 5분 동안 2000 rpm으로 원심 분리하여 그 상층액을 시료로 사용하였다. 1.5 ml tube에 시료 25 μl를 넣고 0.1N HCl 22.5 μl, 60% HClO₄ 2.5 μl를 넣고 혼합 후 원심분리하여 그 상층액 40 μl를 5N NaOH용액 25 μl, n-butanol 500 μl 및 NaCl 0.06 g을 혼합한 튜브에 넣고 진탕 후 원심분리(2000 rpm, 10 min)하였다. Butanol층 400 μl를 새 1.5 ml tube에 넣고 0.1N HCl용액 150 μl, n-heptane 0.5 ml를 가하여 진탕 후 원심분리하였다. 여기에서 얻어진 수층 100 μl에 1N NaOH 용액 200 μl와 0.1% o-phthalaldehyde 용액 5 μl를 넣고 혼합 후 37°C에서 3분 동안 반응시킨 후 3N HCl 용액 10 μl를 넣고 혼합하여 2분 동안 방치한 후 360 nm (excitation)과 450 nm (emission)에서 fluorometer (SPECTRAMAX M2, Molecular Devices Co. Ltd. USA)로 형광도를 측정하였다. 다음 식에 의해 inhibition(%)를 산출하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = (1 - T/C) \times 100$$

C: Cell (+), DNP-HSA (+), test sample (-)

T: Cell (+), DNP-HSA (+), test sample (+)

5. PGD2 and cysLT assay

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate (Corning, USA)에 2×10⁶ cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE (30 ng/ml)로 감작하고 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배지교환 후 FE (0, 20 및 40 mg/ml)를 처리하여 1시간 동안 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 DNP-HSA (10 μg/ml)를 처리하여 30

분 동안 자극시키고 ice bath에서 10분 동안 방치하여 반응을 종결시켰다. 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 PGE2와 cysLT ELISA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) 를 사용하여 측정하였다. Microplate reader (Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용하여 405-420 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 PGD2와 cysLT의 양을 계산하였다.

6. RT-PCR

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 6 well plate (Corning, USA)에 1×10⁶ cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti DNP-IgE (0.5 µg/ml)로 감작하고 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 새로운 배지로 교환한 후 FE (0, 20 및 40 mg/ml)를 세포에 처리하여 1시간 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척한 다음 DNP-HSA (10 µg/ml)을 4시간 동안 처리하여 면역반응을 유도하였다. 상층액을 제거한 후 1 ml의 TRizol을 넣고 2분간 방치한 후 chloroform을 넣고 10초간 vortexing하고 5,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합하여 흔들여 주었다. 13,000 rpm에서 25분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-DW 20 µl에 녹여 -20°C에 보관하였다가 실험에 사용하였다. RT-PCR은 one-step RT-PCR PreMix kit (iNtRON Biotechnology, Inc., Korea)를 사용하여 45°C에서 30분, 94°C에서 5분간 반응시킨 후 94°C에서 30초간 denaturation시키고, 55°C에서 30초간 annealing시킨 다음, 72°C에서 1분간 extension시키는 cycle을 32회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72°C에서 5분간 PCR machine (GeneAmp, PCR system 9700, USA)에서 수행하였다. 각 PCR products는 2% agarose gel에 loading하여 100 V 조건에서 30분간 전기영동을 통하여 분석하였다. 각각의 primer의 염기서열은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Primers for RT-PCR analysis

Target gene		5' to 3' direction	size
COX-2	F	ACTTGCTCACTTTGTTGAGTCATTC	583
	R	TTTGATTAGTACTGTAGGGTTAATG	
5-LOX	F	AAAGAACTGAAACACGCAGAAA	515
	R	AACTAGCCCCTGTACACACCATT	
HDC2	F	ATGCTGGGGCTCCCGGACTTC	779
	R	AGCCATGTCTGTACCGTGTCT	
GAPDH	F	CCACAGTCCATGCCATCAC	568
	R	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	

F: forward, R: reverse

7. Western blot

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 100 mm cell culture dishes (Corning, USA)에 5×10⁵ cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti DNP-IgE(0.5 µg/ml)로 감작하고 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 새로운 배지로 교환한 후 FE (0, 20 및 40 mg/ml)로 세포에 처리하여 1시간 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척한 다음 DNP-HSA

(10 µg/ml)을 1시간 동안 처리하여 면역반응을 유도하였다. 반응 후 cells는 cold PBS로 2회 세척한 다음, 0°C에서 low salt buffer를 첨가하여 부드럽게 pipetting하고 15분 동안 ice위에 방치한 후 10% Igepal CA-630을 첨가하여 강하게 vortexing하였다. 그 후 4°C 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 새 e-tube에 상층액을 옮긴 후 다시 4°C 13,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 cytosol 분획을 분리하였다. protein content는 Bradford법으로 정량하였으며, 30~50 µg의 단백질을 10% SDS-PAGE 로 분리하고, Hypond-PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech)으로 transfer하였다. Transfer된 membrane은 Tris-buffered saline Tween-20 (TBST) (20 mM Tris, pH 7.6, 136 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 용해된 5% skim milk에 1시간 동안 실온에서 blocking한 후 anti-phospho-Lyn (p-Lyn)와 anti-Lyn, anti-phospho-Syk (p-Syk)와 anti-Syk, anti-phospho-PLCγ1 (p-PLCγ1)와 anti-PLCγ1, anti-phospho-Pi3K (p-Pi3K)와 anti-Pi3K, anti-phospho-Akt (p-Akt)와 anti-Akt, anti-phospho-cPLA2 (p-cPLA2)와 anti-cPLA2와 β-actin primary antibody (1 : 1000 dilution)로 4°C에서 overnight 반응한 후 TBST로 3회 세척하고, HRP-conjugated secondary antibody (1 : 1000 dilution)로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후 ECL system (Amersham)을 이용하여 발색시켰다.

8. 통계처리

成績은 SPSS 17.0K for Windows 통계 프로그램 패키지를 사용하여 평균치±표준편차로 나타내었고 유의수준은 p<0.05로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 one way-ANOVA와 Dunnett test 검정을 실시하였다.

결 과

1. Histamine 분비와 HDC2 발현

Histamine 분비에 미치는 FE의 효과를 살펴본 결과 FE 20 mg/ml 농도에서 31.62±14.12%의 억제효과를 나타내었고, FE 40 mg/ml 농도에서 41.44±2.21%의 억제효과를 나타내 모든 농도에서 유의한 (p<0.05) 억제효과를 나타내었다(Fig. 1A). RBL-2H3 cells에서 HDC2 enzyme 유전자의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 HDC2 mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, FE (20 and 40 mg/ml)를 처리한 세포에서 mRNA의 발현이 농도의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1B).

2. PGD2와 cysLT 분비와 COX-2와 5-LO 발현

RBL-2H3 cells에서 분비된 PGE2의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 0.04±0.02 pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 0.11±0.01 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 증가를 나타내었다. 반면 FE (20 and 40 mg/ml)를 처리한 세포에서 각각 0.05±0.01 pg/ml과 0.03±0.01 pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 감소를

보였다. 또한 RBL-2H3 cells에서 분비된 cysLT의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 0.04 ± 0.02 pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 0.20 ± 0.09 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 FE (20 and 40 mg/ml)를 처리한 세포에서 각각 0.04 ± 0.02 pg/ml과 0.05 ± 0.02 pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 2A). RBL-2H3 cells에서 prostaglandin과 leukotriene 등의 지질대사물의 생산을 촉매하는 염증성 enzyme 유전자의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 COX-2와 5-LO mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, FE (20 and 40 mg/ml)를 처리한 세포에서 mRNA의 발현이 농도의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2B).

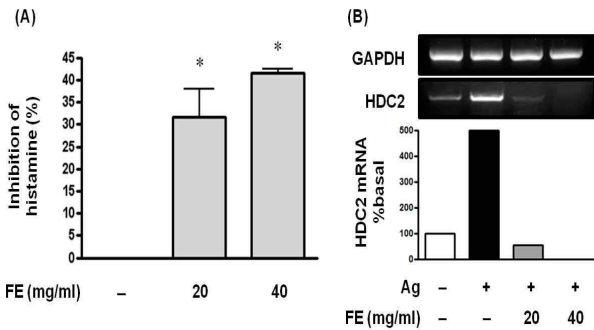


Fig. 1. Effect of FE on the release of histamine (A) and expression of HDC2 mRNA (B) in RBL-2H3 cells. (A) IgE sensitized cells was pretreated with FE (20 and 40 mg/ml) for 1 hr prior to Ag exposure for 10 min. The fluorescence intensity was measured with excitation at 360 nm and emission at 450 nm with a fluorometer. Results represent as the mean±SD of the inhibition of histamine release. * $p < 0.05$ vs stimulated group. (B) IgE sensitized cells was pretreated with FE (20 and 40 mg/ml) for 1 hr prior to Ag exposure for 4 hr. Detection of mRNA expression was examined by RT-PCR analysis. GAPDH was used as internal control genes.

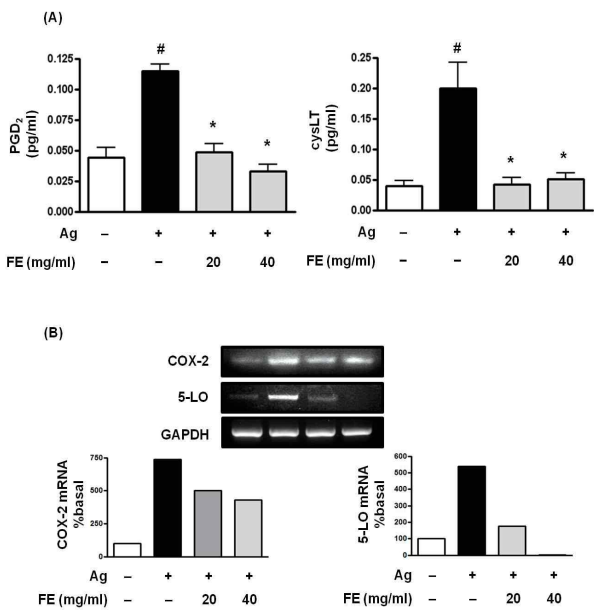


Fig. 2. Effects of FE on the production of PGD₂ and cysLT (A) and expression of COX-2 and 5-LO mRNA (B) in RBL-2H3 cells. (A) IgE

sensitized cells was pretreated with FE (20 and 40 mg/ml) for 1 hr prior to Ag exposure for 30 min. PGE₂ and cysLT concentration was measured from cell supernatant using ELISA method. The absorbance was measured at 405 nm with a microplate reader. Results represent as the mean±SD. # $p < 0.05$ vs vehicle group, * $p < 0.05$ vs stimulated group. (B) IgE sensitized cells was pretreated with FE (20 and 40 mg/ml) for 1 hr prior to Ag exposure for 4 hr. Detection of mRNA expression was examined by RT-PCR analysis. GAPDH was used as internal control genes.

3. FcεRIβ와 FcεRIγ subunit의 발현

RBL-2H3 cells의 FcεRIβ와 FcεRIγ subunit mRNA의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 FcεRIβ와 FcεRIγ mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, FE (20 and 40 mg/ml)를 처리한 세포에서 mRNA의 발현이 농도의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

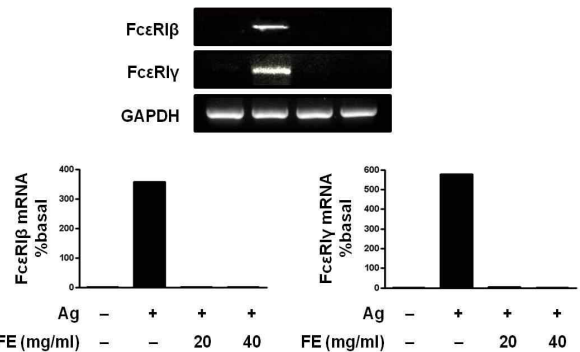


Fig. 3. Effects of FE on the expression of FcεRIβ and FcεRIγ mRNA in RBL-2H3 cells. IgE sensitized cells was pretreated with FE (20 and 40 mg/ml) for 1 hr prior to Ag exposure for 4 hr. Detection of mRNA expression was examined by RT-PCR analysis. GAPDH was used as internal control genes.

4. FcεRI 매개 신호전달 기전

RBL-2H3 cells에서 FcεRI 매개 신호전달 기전을 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 Lyn, Syk, LAT, PLCγ1, PI3K, Akt와 cPLA2의 인산화가 증가하였다. 반면 FE (20 and 40 mg/ml)를 처리한 세포에서 Lyn, Syk, LAT, PLCγ1, PI3K, Akt와 cPLA2의 인산화가 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

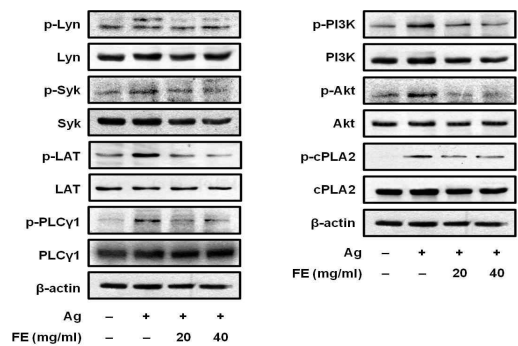


Fig. 4. Effect of FE on FcεRI-mediated signaling events in RBL-2H3 cells. IgE sensitized cells was pretreated with FE (20 and 40 mg/ml) for 1 hr prior to Ag exposure for 15 min. The phosphorylation of Lyn, Syk, LAT, PLCγ1, PI3K, Akt, and cPLA2 and Lyn, Syk, LAT, PLCγ1, PI3K, Akt, cPLA2 and β-actin were assayed by western blot analysis as described in Materials and Methods.

고찰

교맥은 한의학에서 고혈압⁸⁾, 당뇨병 같은 만성질환뿐만 아니라 습진, 종기, 화상 등의 염증성 피부질환^{3,4)}에 자주 응용되어 왔다. 최근에는 교맥의 피부미백¹⁰⁾ 효과에 대한 연구가 보고되었다. 본 연구는 교맥이 항원자극에 의한 유도된 FcεRI 매개 RBL-2H3에서 비만세포의 활성화와 신호전달에 미치는 영향을 조사하였다.

Histamine은 basophil과 mast cell의 활성화되는 동안 합성되는 일차매개물질로서, histidine 아미노산이 HDC 효소에 의해 합성되어 세포내 과립에 저장되었다가 이들 세포들이 활성화되면 즉시 분비되어 다양한 세포의 histamine 수용체에 결합하여 그 작용을 나타낸다¹¹⁾. 본 연구에서 FE는 histamine 분비와 HDC2의 발현을 억제하였다. 이는 FE가 비만세포 활성화에 의한 과립내 HDC2의 발현을 억제하여 일차매개물질인 histamine의 합성과 분비를 감소시켰으며, 탈과립을 억제하는 효과가 있음을 시사하는 결과이다.

PGD2와 cysLT (LTC4, LTD4 와 LTE4)의 생합성은 FcεRI의 교차결합에 의해 비만세포가 활성화되면 과립의 분해가 일어나고 핵 세포막에 있는 인지질이 cPLA2에 의해 아라키돈산으로 전환되고 COX-2와 5-LO 효소의 작용에 의해 생성되는 이차 지용성 매개물질이다^{12,13)}. PGD2는 기관지 수축작용을 하고, cysLT는 기관지 수축, 혈관투과성 증가, 점액생산 촉진 등의 작용을 한다^{14,15)}. 본 연구에서 FE는 COX-2의 발현을 감소시켜 PGD2의 분비를 억제하였고, 5-LO의 발현을 감소시켜 cysLT의 분비를 억제하였다. 이는 FE가 COX-2와 5-LO의 발현기전을 조절하여 이차 지용성 매개물질인 PGD2와 cysLT의 합성과 분비를 감소시킨 결과로 해석된다.

FcεRI은 탈과립을 일으키는 비만세포와 호염기성 세포의 표면에 독점적으로 발현된다. FcεRI은 마우스에서 하나의 α chain, 하나의 β chain, 두개의 이황화 결합된 γ chain으로 구성된 4분자체로 존재한다^{16,17)}. IgE 결합과 FcεRI 분자의 신호전달은 서로 다른 subunit에 의해 수행된다^{16,18)}. FcεRIα subunit은 대부분 세포 외에 존재하여 일련의 세포 반응을 개시하기 위해 IgE 결합부위와 고친화성을 가진다¹⁹⁾. FcεRIβ subunit은 신호강도를 증폭시키고²⁰⁾, FcεRIγ subunit은 FcεRIα subunit이 세포표면에 안정적으로 발현할 수 있게 하고 탈과립을 유도하는 신호를 전달한다^{17,21)}. 따라서 본 연구에서 FcεRIβ와 FcεRIγ subunit의 발현 감소는 FE가 세포내 신호전달과 탈과립을 억제하는 것으로 볼 수 있다.

FcεRIβ와 FcεRIγ subunit은 세포질 영역의 C말단 부위에 immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)라는 시그널 전달 motif를 가진다. FcεRI의 초기 신호전달 과정은 FcεRI의 응집에 의해 시작되는데 Lyn이 ITAM내의 두 tyrosine 잔기를 인산화하고 인산화된 ITAM은 Syk를 위한 docking site로서 작용한다. 이 부분에 Syk가 결합하여 효소활성을 증가시키는 형태로 변화하고 활성화된 Syk는 자기인산화를 통해 tyrosine 대부분을 인산화시킨다²²⁾. 인산화된 Syk는 신호기작을 하위단계로

전달하여 세포막 단백질인 LAT를 인산화시킨다. 인산화된 LAT는 Gads, Grb2, SLP-76, Shc 같은 세포질 adaptor, Sos와 Vav1 같은 구아노신 3 인산 (GTP) 교환체와 PLC γ1와 PLCγ2로 구성된 다분자집합의 scaffold로서 기능한다. 이러한 경로를 통해 PLCγ가 활성화되고 PI3K가 세포막에서 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)를 가수분해하여 이차전달물질인 diacylglycerol (DAG)와 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)를 생산하여 각각 protein kinase C (PKC)를 활성화하고 세포내 calcium [Ca²⁺]을 증가시킨다²³⁾. Akt는 PI3K 신호기작의 하위단계로 PI3K활성의 지표로서 Akt 인산화는 비만세포 증식과 사이토카인 생산에 관여한다²⁴⁾. 본 연구에서 FE는 Lyn/Syk/LAT/PLCγ/PI3K/Akt로 전달되는 초기 신호전달 과정을 효과적으로 억제하였고 아라키돈산 대사를 유도하는 cPLA2의 인산화도 억제하였다.

종합적으로 살펴볼 때 FE는 비만세포 활성화에 의한 알러지성 염증반응을 유도하는 효소의 발현을 억제하여 과립속에 합성, 저장되어 있던 일차매개물질과 이차로 합성된 지용성 매개물질의 분비를 억제하는 효과가 있다. 첫째, HDC2 효소의 발현과 histamine 분비를 억제하고, 둘째, cPLA2/COX-2/5-LO 효소의 발현을 억제함으로써 아라키돈산 대사에 의한 PGD2와 cysLT의 생산을 억제하였다. 이는 FE가 항원으로 유도된 IgE와 FcεRI의 응집에 의한 FcεRIβ와 FcεRIγ의 매개로 시작된 초기 신호전달 과정을 효과적으로 억제한 결과로 볼 수 있다. 따라서 FE가 비만세포의 활성화에 따른 알러지 반응을 억제하는 효능이 있으므로, 습진, 종기, 화상 등의 염증성 피부질환뿐만 아니라, 알러지 염증반응의 초기에 임상적으로 활용이 가능하다고 사료된다.

참고문헌

1. Metcalfe, D.D., Baram, D., Mekori, Y.A. Mast cells. *Physiol Rev* 77(4):1033-1079, 1997.
2. Gilfillan, A.M., Rivera, J. The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev* 228(1):149-169, 2009.
3. 허 준. (신대역) 동의보감. 서울, 범인문화사, p 1808, 2007.
4. 중앙대사전 편찬위원회. 중앙대사전. 서울, 정담, pp 392-393, 2006.
5. Hur, S.J., Park, S.J., Jeong, C.H. Effect of buckwheat extract on the antioxidant activity of lipid in mouse brain and its structural change during in vitro human digestion. *J. Agric. Food Chem.* 59(19):10699-10704, 2011.
6. van den Berg, A.J.J., van den Worm, E., van Ufford, H.C.Q., Halkes, S.B.A., Hoekstra, M.J., Beukelman, C.J. An in vitro examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey. *J Wound Care* 17(4):172-174, 176-178, 2008.
7. Ishii, S., Katsumura, T., Shiozuka, C., Ooyauchi, K., Kawasaki, K., Takigawa, S., Fukushima, T., et al.

- Anti-Inflammatory Effect of Buckwheat Sprouts in Lipopolysaccharide-Activated Human Colon Cancer Cells and Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72(12):3148-3157, 2008.
8. Li, S.Q., Zhang, Q.H. Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Crit Rev Food Sci Nutr* 41(6):451-464, 2001.
 9. Lee, C.C., Hsu, W.H., Shen, S.R., Cheng, Y.H., Wu, S.C. Fagopyrum tataricum (Buckwheat) Improved High-Glucose-Induced Insulin Resistance in Mouse Hepatocytes and Diabetes in Fructose-Rich Diet-Induced Mice. *Exp Diabetes Res* 2012: 2012.
 10. No, S.T., Kim, D.S., Lee, S.J., Park, D.J., Lee, J.C., Lim, K.S., Woo, W.H., M, Y.J. Study of Skin Depigmenting Mechanism of the Ethanol Extract of Fagopyrum esculentum. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 21(5):1243-1249, 2007.
 11. Fukui, H. Progress in Allergy Signal Research on Mast Cells: Up-Regulation of Histamine Signal-Related Gene Expression in Allergy Model Rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 106(3):325-331, 2008.
 12. Murphy, R.C., Gijón, M.A. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochemical Journal* 405(3):379, 2007.
 13. Boyce, J.A. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunological Reviews* 217(1):168-185, 2007.
 14. Tanaka, K., Ogawa, K., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S., Nagata, K. Cutting Edge: Differential Production of Prostaglandin D2 by Human Helper T Cell Subsets. *J Immunol* 164(5):2277-2280, 2000.
 15. Westcott, J.Y., Wenzel, S.E., Dreskin, S.C. Arachidonate-induced eicosanoid synthesis in RBL-2H3 cells: stimulation with antigen or A23187 induces prolonged activation of 5-lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1303(1):74-81, 1996.
 16. Blank, U., Ra, C., Miller, L., White, K., Metzger, H., Kinet, J.P. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 337(6203):187-189, 1989.
 17. Ra, C., Jouvin, M.H., Kinet, J.P. Complete structure of the mouse mast cell receptor for IgE (Fc epsilon RI) and surface expression of chimeric receptors (rat-mouse-human) on transfected cells. *J. Biol. Chem.* 264(26):15323-15327, 1989.
 18. Ravetch, J.V., Kinet, J.P. Fc Receptors. *Annual Review of Immunology* 9(1):457-492, 1991.
 19. Blank, U., Ra, C.S., Kinet, J.P. Characterization of truncated alpha chain products from human, rat, and mouse high affinity receptor for immunoglobulin E. *J. Biol. Chem.* 266(4):2639-2646, 1991.
 20. Lin, S., Cicala, C., Scharenberg, A.M., Kinet, J.P. The FcεRIβ Subunit Functions as an Amplifier of FcεRIγ-Mediated Cell Activation Signals. *Cell* 85(7):985-995, 1996.
 21. Kinet, J.P. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 931-972, 1999.
 22. Zhang, J., Billingsley, M.L., Kincaid, R.L., Siraganian, R.P. Phosphorylation of Syk Activation Loop Tyrosines Is Essential for Syk Function AN IN VIVO STUDY USING A SPECIFIC ANTI-Syk ACTIVATION LOOP PHOSPHOTYROSINE ANTIBODY. *J. Biol. Chem.* 275(45):35442-35447, 2000.
 23. Kalesnikoff, J. Galli, S.J. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 9(11):1215-1223, 2008.
 24. Fukao, T., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Koyasu, S. Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in mast cells: new insights from knockout mouse studies. *J. Mol. Med.* 81(9):524-535, 2003.