(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월20일
(11) 등록번호 10-1343801
(24) 등록일자 2013년12월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4045 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0061639
(22) 출원일자 2013년05월30일
심사청구일자 2013년05월30일
(56) 선행기술조사문헌
논문2008
RESEARCHPAPER2007
기사2012(BINEWS)
B. COSTA et al, Pharmacological Research, 2010, Vol. 61, pp. 537-546*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
유재명
대전광역시 서구 들말2길 40 (가장동)
김미리
대전광역시 유성구 가정로 65, 대림아파트 101동 201호 (신성동)
석대은
대전광역시 유성구 가정로 65, 101동 201호 (신성동)
(74) 대리인
김원준

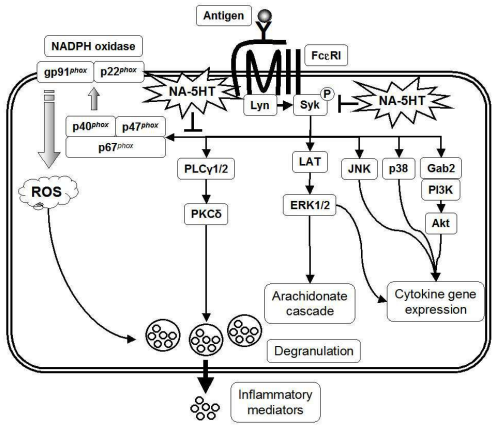
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 최영희

(54) 발명의 명칭 **N-아라키도노일 세로토닌을 유효성분으로 하는 항알레르기 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 항알레르기 및 항염증 효능이 우수하면서도, 세포 독성이 없어 안전하게 이용할 수 있는 *N*-아라키도노일 세로토닌(NA-5HT, *N*-arachidonoyl serotonin)을 유효성분으로 하는 항알레르기 및 항염증 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 약학 조성물 또는 화장료 조성물로 사용될 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0013606
부처명	미래창조과학부
연구사업명	일반연구자지원사업
연구과제명	산화적 손상관련 염증반응에 대한 함염증성 기능성 식품소재개발
기 여 율	1/1
주관기관	충남대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

N-아라키도노일 세로토닌(NA-5HT, *N*-arachidonoyl serotonin)을 유효성분으로 하는 비만세포에서의 탈과립 억제 효능을 갖는 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

N-아라키도노일 세로토닌(NA-5HT, *N*-arachidonoyl serotonin) 유효성분으로 하는 비만세포에서의 탈과립 억제 효능을 갖는 화장료 조성물.

청구항 4

N-아라키도노일 세로토닌(NA-5HT, *N*-arachidonoyl serotonin)을 유효성분으로 하는 비만세포에서의 탈과립 억제 효능을 갖는 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항알레르기 효능이 우수하면서도, 세포 독성이 없어 안전하게 이용할 수 있는 항알레르기 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 비만세포에서의 탈과립 억제 효능을 갖는 조성물에 관한 것이다

배 경 기 술

[0002] 알레르기는 생물체가 어떤 외래성 물질과 접하였을 때 항원항체반응에 의하여 생체 내에 유발되는 급격한 반응 능력의 변화를 칭한다. 생체는 이종물질에 대해서는 그 항원에 특이적으로 반응하는 항체와 림프구를 생산하고, 재차 항원과 접하면 여러 가지 면역반응을 일으킨다. 이 면역응답 또는 면역반응은 생체의 자기 보존을 위한 중요한 방어메커니즘의 하나인데, 보통 생체에 대해 보호적으로 작용하지만 때로는 이 매커니즘이 생체에 불리하게 작용하여 장애를 일으키는 경우가 있다.

[0003] 인체에 나타나는 알레르기는 면역 기전에 따라 Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ 및 Ⅳ형으로 분류되고, 이 중에서 즉시형 과민반응에 속하는 Ⅰ형 알레르기가 임상에 있어서 중요한 부분을 차지하고 있다. 아토피성 피부염, 알레르기성 비염, 기관지 천식, 고초열 및 화분증 등은 대표적인 Ⅰ형 알레르기에 속한다. Ⅰ형 알레르기는 비만세포(Mast cell)의 활성화에 의해 일어난다. 비만세포의 표면에는 IgE에 고친화적인 수용체 FcεRI가 있으며, 이 수용체에 IgE가 결합한 후 다시 알레르기를 유발하는 항원(앨러젠)이 결합하여 가교가 형성되면 탈과립반응이 유발되어 비만세포 내의 과립 내용물인 히스타민, 세로토닌(Serotonin), 브라드키닌(Bradykinin) 등과 같은 생합성 저장되어 있던 매개물질(Preformed mediator)과 프로테아제(Protease), 프로테오글리칸 (Proteoglycan) 등 다양한 알레르기를 유발시키는 물질을 세포 바깥으로 분비한다.

[0004] 현재 대부분의 알레르기 치료는 그 원인을 없애기보다는 증상을 완화하는 방향으로 연구가 진행되어지고 있다. 대표적으로 앨러젠에 의해 비만세포 등에서 분비된 히스타민 등의 수용체에 대한 길항제들이 주를 이루고 있다. 그러나 이러한 약물은 환자에게 투여 후 단기간 내에 내성을 보이기 때문에 환자들의 증상호전을 위한 경우가 대부분이다.

[0005] *N*-아라키도노일 세로토닌(NA-5HT, *N*-arachidonoyl serotonin)은 칸나비노이드(cannabinoid, CB) 수용체를 활성화시키는 엔도칸나비노이드(endocannabinoids)의 일종이다. 엔도칸나비노이드는 동물 체내에서 생성되는 내인성 칸나비노이드(endogenous cannabinoids)를 일컫는다. 칸나비노이드 수용체는 뇌, 심혈관 조직 및 혈관 내피세포에서 발현되는 CB1 수용체와 대부분 면역 및 혈관 조혈모 세포에서 발현되는 CB2 수용체로 나뉜다. 최근에는 CB1 및 CB2와 결합하는 물질들이 비만, 우울증, 파킨슨병, 암 등 수많은 질병의 치료에 이용될 수 있다는 연구결과들이 보고되고 있다.

[0006] NA-5HT는 FAAH(fatty acid amide hydrolase)의 약한 저해제이며(IC_{50}=5.6 μM), Ca^{2+} 채널의 하나인 TRPV(transient receptor potential vanilloid) 채널의 길항제(IC_{50}=37~40 nM)인 것으로 알려져 있다. NA-5HT는 위장관의 회장(ileum) 및 공장(jejunum)에 존재하며 GLP-1(glucagon-like peptide-1)의 분비를 조절하는 역할을 한다. 또한 급성 및 만성 말초 통증에 대해 강력한 진통 효과를 나타낸다. 그러나, 이의 생리학적 효과에 대해서는 아직 많은 연구가 이루어지지 않았다.

[0007] 본 발명자들은 세포 독성이 낮은 다수의 엔도칸나비노이드 계열의 화합물에 대해 항알레르기 효과를 검정한 결과, 그 중 NA-5HT의 항알레르기 효과가 현저함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 종래 기술의 문제점을 해소하기 위하여 비만세포로부터 알레르기 유발 물질의 분비를 원천적으로 차단하여 알레르기를 근원적으로 해소할 수 있으며 항알레르기 및 항염증 활성이 우수하고 독성이 없는 약학 및 화장료 조성물과 이를 함유하는 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 N-아라키도노일 세로토닌(NA-5HT, N-arachidonoyl serotonin)을 유효성분으로 하는 비만세포에서의 탈과립 억제 효능을 갖는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0010] NA-5HT는 세포 독성이 없고, I형 알레르기의 원인이 되는 FcεRI 수용체의 신호 전달 체계를 억제한다. 즉, FcεRI 수용체 신호 전달 체계에서 율속단계(rate-limiting step)의 신호전달 단백질 중 하나인 Syk의 활성을 농도 의존적으로 억제하는 것에 의해 탈과립화와 사이토카인 생성 및 아라키돈산 연쇄반응에서 생성되는 류코트리엔과 프로스타글란딘 생성을 억제한다. 따라서, NA-5HT는 염증성 매개인자인 사이토카인, 류코트리엔 및 프로스타글란딘의 생성을 효과적으로 억제하여 항염증 효과를 갖는다. 또한, 탈과립의 또 다른 원인이 되는 NADPH oxidase의 발현을 억제하는 작용이 있어 알레르기의 원인을 근원적으로 해소할 수 있다. 도 1은 알레르기와 관련된 기작에서 NA-5HT가 영향을 미치는 단계를 도식적으로 표현한 도면이다.

[0011] 본 발명의 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여, 그 자체 또는 약학적 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 현탁액, 시럽, 외용제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 물활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1kg 당 상기 조성물을 1~1000mg 의 양으로 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0012] 또한 본 발명은 NA_5HT를 유효성분으로 하는 비만세포에서의 탈과립 억제 효능을 갖는 화장료 조성물을 제공한다. 본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로는 스킨, 토너, 로션, 크림, 에센스, 비누, 샴푸, 클린징폼, 파우더 등의 제형을 예로 들 수 있다. 상기 화장료 조성물은 화장품에 통상적으로 사용되는 용해제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 차단제, 발포제, 계면활성제, 유화제 등 임의의 다른 성분을 함께 함유할 수 있다.

[0013] 본 발명은 또한 NA-5HT를 유효성분으로 하는 비만세포에서의 탈과립 억제 효능을 갖는 건강기능식품에 관한 것이다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 빵, 과자, 떡, 초코렛, 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 유제품, 각종 스프, 음료수 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한다. NA-5HT의 혼합양은 그의 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

발명의 효과

[0014] 이상과 같이 본 발명의 NA-5HT를 유효성분으로 하는 항알레르기 및 항염증 조성물은 비만세포에서 FcεRI 수용체의 신호전달 체계에 관여하는 단백질 및 NADPH oxidase 서브유닛 단백질의 발현을 저하시키는 것에 의해 알레르기 유발 물질의 분비를 원천적으로 차단하므로 알레르기를 근원적으로 예방 및 치료할 수 있을 뿐 아니라, 세포 독성이 없기 때문에 제약이나 화장품, 건강기능식품에 효과적으로 안전하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 NA-5HT의 항알레르기 활성의 기작을 보여주는 도면.

도 2는 NA-5HT에 의한 비만세포의 탈과립 억제 효과를 보여주는 그래프.

도 3은 NA-5HT에 의한 비만세포의 사이토카인 생성 억제 효과를 보여주는 그래프.

도 4는 NA-5HT에 의한 비만세포의 프로스타글란딘과 류코트리엔 생성 억제 효과를 보여주는 그래프.

도 5는 NA-5HT의 세포 독성에 대한 결과를 보여주는 그래프.

도 6은 NA-5HT의 FcεRI 수용체 신호 전달 체계에 대한 효과를 보여주는 그래프.

도 7은 NA-5HT의 아라키돈산 연쇄반응과 관련된 효소의 인산화 및 발현에 대한 억제 효과를 보여주는 그래프.

도 8은 NA-5HT의 NADPH oxidase 서브유닛의 발현에 대한 효과를 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0017] **실시예 1 : NA-5HT의 항알레르기 활성 측정**

[0018] **1) 비만세포에서의 알레르기 반응 유도**

[0019] NA-5HT의 항알레르기 활성을 측정하기 위하여 비만세포에서의 알레르기 반응을 유도하였다.

[0020] RBL-2H3 세포를 24-웰 플레이트에 1×10^5 세포/웰의 농도로 분주하고, 100units/mL 페니실린, 100㎍/mL 스트렙토마이신(streptomycin)과 5%(v/v) 소태아혈청이 함유된 MEM 배지에서 37℃, 5% CO_2, 가습 조건에서 밤새 배양하였다. 다음날 세포를 1×PBS 완충액으로 세척하고, DNP-IgE 1㎍/mL(Sigma, Co., Ltd)와 함께 24시간 배양하여 세포를 감작시켰다. 감작된 세포에 NA-5HT(0~30μM, Cayman Chemical Co., Ltd.)을 넣고 1시간 추가로 배양한 후, 과민반응을 유도하기 위하여 DNP-HSA(dinitrophenol-human serum albumin) 25㎍/mL(Sigma, Co., Ltd.)를 가하여 다시 4시간동안 배양하였다. 배지를 4℃, 17,000g에서 10분간 원심분리하고 분석 시까지 -80℃에서 보관하며 사용하였다.

[0021] **2) NA-5HT의 비만세포에 대한 탈과립 억제 효과 검정**

[0022] 탈과립의 표식자인 β-hexosaminidase의 활성을 측정하는 것에 의해 비만세포로부터 알레르기 유발물질의 분비

억제 효과를 검정하였다.

[0023] 세포로부터 배지로 분비된 β-hexosaminidase의 양을 측정하기 위하여, 상기 1)의 상등액 25㎕와 0.1M sodium citrate 완충액(pH 4.5)으로 제조한 10 mM p-NAG(p-nitropheyl-*N*-acetyl-β-*D*-glucosaminide, Sigma-Aldrich) 50㎕를 96-웰 플레이트에 넣고, 37℃에서 1시간동안 반응하였다. 1시간 후 0.1M Na_2CO_3 완충액(pH 10.0)으로 반응을 종결시키고 405nm에서의 흡광도로 p-nitrophenol의 양을 측정하여 β-hexosaminidase의 활성을 결정하였다. 도 2의 (A) 및 (B)는 NA-5HT의 농도범위에 따른 별도의 실험의 결과로, 각 결과는 세 번의 실험의 평균값으로 나타내었다.

[0024] 도 2로부터 NA-5HT가 비만세포로부터의 β-hexosaminidase의 분비를 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있으며, IC_{50}값은 13.58 μM이었다.

[0025] **3) NA-5HT의 비만세포에 대한 사이토카인 생성 억제 효과 검정**

[0026] 알레르기에 관계된 비만세포에서 분비되는 사이토카인으로 잘 알려진 종양괴사인자-α(TNF-α) 생성에 대한 NA-5HT의 억제효과를 관측하였다.

[0027] 보다 구체적으로, 상기 1)의 상등액 중 TNF-α의 농도를 ELISA 키트(e-Bioscience, Inc.)를 사용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 측정하고 그 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3의 (A) 및 (B)는 NA-5HT의 농도범위에 따른 별도의 실험의 결과로, 각 결과는 세 번의 실험의 평균값으로 나타내었다. TNF-α 역시 탈과립 억제와 마찬가지로 농도 의존적 효과를 나타내었으며, IC_{50}값은 12.52 μM이었다.

[0028] **4) NA-5HT의 비만세포에 대한 프로스타글란딘과 류코트리엔 생성 억제 효과 검정**

[0029] 염증 및 알레르기 질환을 매개하는 핵심적인 매개물질로 알려진 염증성 지질매개체인 프로스타글란딘과 류코트리엔의 비만세포에서의 생성 억제효과를 관측하였다.

[0030] 상기 1)의 상등액 중 PGD_2, LTB_4 및 LTC_4의 농도를 EIA 키트(Cayman Chemical, Inc.)를 사용하여 각각 제조자의 매뉴얼에 따라 측정하고 그 결과를 도 4에 도시하였다. 도 4로부터 NA-5HT가 PGD_2, LTB_4 및 LTC_4의 생성을 유의적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다. PGD_2, LTB_4의 IC_{50}값은 각각 1.27 μM 및 1.20 μM이었다. LTC_4의 생성 억제 효과는 10 μM에서 유의성을 나타내었다.

[0031] **실시예 2 : NA-5HT의 세포독성 측정**

[0032] 세포 생존능의 지표로서 WST-1의 수용성 테트라졸륨 염으로의 미토콘드리아 의존성 환원으로 세포 호흡을 측정하였다.

[0033] 보다 상세하게는, RBL-2H3 세포를 96-웰 플레이트에 1×10^4 세포/웰의 농도로 분주하고, 5%(v/v) 소태아혈청이 함유된 MEM 배지, 37℃ 조건에서 밤새 배양하였다. 다음날 세포를 1×PBS 완충액으로 세척하고, DNP-IgE 1㎍/mL(Sigma, Co., Ltd.)와 함께 24시간 배양하여 세포를 감작시켰다. 감작된 세포에 NA-5HT(0~20㎍/mL)을 넣고 1시간 추가로 배양한 후, WST-1 시약(Daeil Lab Service. Co., Ltd.) 10㎕와 DNP-HSA(dinitrophenol-human serum albumin) 25ng/mL(Sigma, Co., Ltd.)를 동시에 가하여 다시 4시간동안 배양하였다. 세포 생존능을 확인하기 위하여 Micro-plate reader (Emax, Molecular Devices Inc. Sunnyvale, California, USA)를 사용하여 450nm에서의 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 5에 도시하였다. 그 결과, 측정된 농도범위에서 모든 실험군은 오차범위 내에서 동일한 생존능을 나타내어, NA-5HT가 세포독성이 없음을 확인할 수 있었다.

[0034] **실시예 4 : NA-5HT의 FcεRI 수용체 신호 전달 체계에 대한 효과 측정**

[0035] 실시예 2의 1)로부터 유래된 세포를 용해하여 총단백질을 추출한 후에 FcεRI 수용체 신호전달 체계의 단백질을 웨스턴블럿에 의해 정량하였다. 웨스턴블럿에 사용한 항체는 Cell signaling Technology, Inc. 또는 Cayman Chemical, Inc.에서 구입하여 사용하였다. 도 6 및 도 7은 상기 웨스턴블럿 결과의 전기영동 사진 및 ImageJ

software(NIH, USA)를 사용하여 정량한 그래프이다. 로딩 대조군으로는 β-actin 또는 비인산화 단백질을 사용하였다.

[0036] 도 6에서 NA-5HT은 FcεRI 수용체 신호 전달 체계의 율속단계의 신호전달 단백질의 하나인 Syk의 활성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 Lyn에 대해서는 약간의 억제 효과를 나타내기는 하였으나, 그 효과가 크지는 않았으며 농도 의존적이지도 않았다. NA-5H는 Syk의 활성화 억제에 의해 하위 신호전달체계인 탈과립화 관련 기전(PLCγ1, PLCγ2 - PKCδ 경로)을 억제하였으며, 특히 PLCγ1, PLCγ2에 대한 효과가 현저하였다. 하위 신호전달체계인 사이토카인(TNF-α) 생성 관련 기전에 대해서 역시 Gab2 - PI3K - Akt 경로 및 LAT / ERK1/2 또는 JNK 경로를 억제함을 나타내었다. ERK1/2에 대해서는 ERK1/2의 발현과 인산화를 모두 억제하였으며, 이러한 효과에 의하여 사이토카인의 생성을 억제하는 것으로 판단된다. 도 6의 결과로부터 NA-5HT의 항알레르기 활성은 IgE에 의해 활성화된 비만세포에서 FcεRI 수용체 신호전달 체계의 초기 단계에 관여하는 단백질의 발현이나 활성을 저하하는 것에 의한 것임을 알 수 있다.

[0037] 도 7은 Sky의 하위 신호전달체계인 아라키돈산 연쇄반응(arachdonate cascade)의 관련 효소인 $cPLA_2$와 5-LO(5-Lipoxygenase)의 인산화 및 COX-2의 발현에 대한 NA-5H의 영향을 보여주는 그래프이다. $cPLA_2$는 아라키돈산 연쇄반응의 율속단계에 관여하는 효소이며, 5-LO는 류코트리엔 생성의 율속단계에 관여하는 효소이고, COX-2는 프로스타글란딘 생성의 율속단계에 관여하는 효소이다. 도 7에 의하면, NA-5HT는 $cPLA_2$와 5-LO의 인산화 및 COX-2의 발현을 농도 의존적으로 억제함을 보여준다. 그러나 PGD_2, LTB_4 생성 억제에 대한 도 4의 결과를 해석할 수 있을만큼 현저한 효과를 나타내지는 않는 것으로 보아 NA-5HT가 $cPLA_2$와 5-LO의 인산화 및 COX-2의 발현 저해를 포함하여 PGD_2나 LTB_4의 생성에 관여하는 효소를 직접적으로 저해하는 효과가 있을 것으로 판단된다.

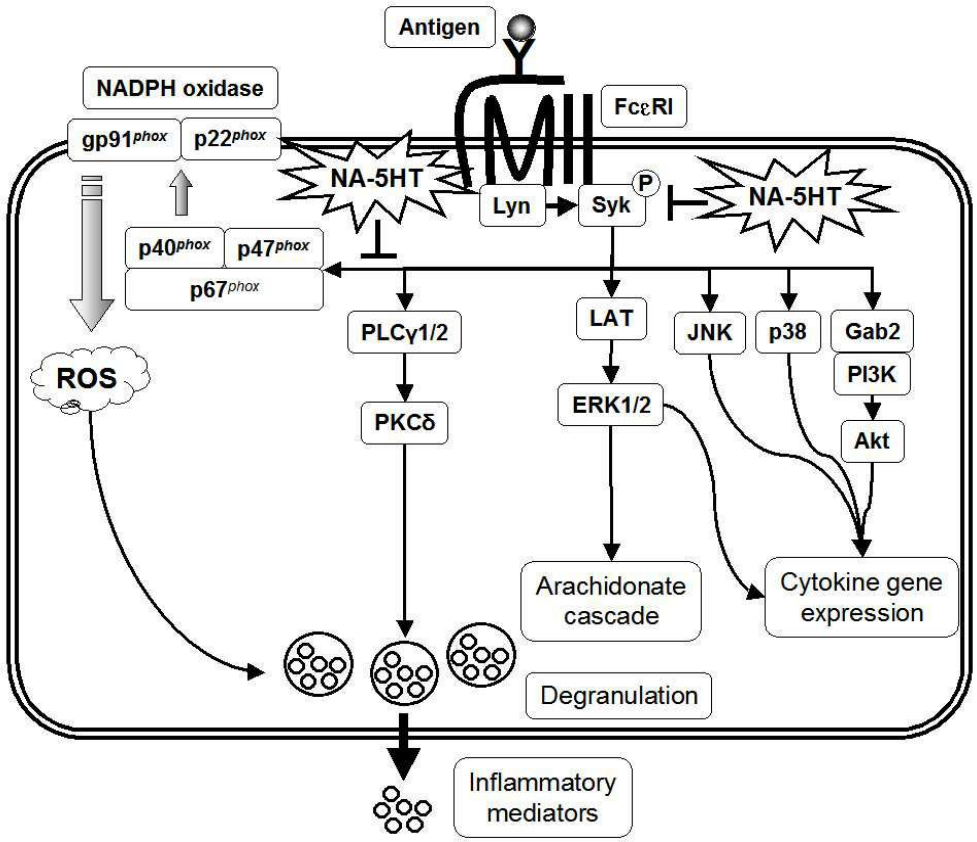
[0038] **실시예 5 : NA-5HT의 NADPH oxidase 서브유닛의 발현에 대한 효과 측정**

[0039] NADPH oxidase에 의해 생성된 활성산소종(ROS)은 비만세포의 탈과립을 유도하는 것으로 알려져 있다. NA-5HT가 IgE 감작된 RBL-2H3 세포에서 NADPH oxidase의 발현에 영향을 미치는지 확인하였다. 실시예 2의 1)로부터 유래된 세포를 용해하여 총단백질을 추출한 후에 NADPH oxidase 서브유닛으로 알려진 $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ and $p67^{phox}$ 단백질을 웨스턴블럿에 의해 정량하였다. 비교를 위하여, 대조군으로 항체의 처리전에 NA-5HT 대신 NADPH oxidase 저해제로 알려진 DPI(diphenyleneiodonium, Sigma-Aldrich, Inc.) 또는 DPI와 NA-5HT를 함께 처리하고 동일한 방법에 의해 서브유닛 단백질을 정량하였다. 웨스턴블럿에 사용한 항체는 Sanra Cruz biotechnology, Inc.에서 구입하여 사용하였다. 로딩 대조군으로는 β-actin을 사용하였다. 도 8은 상기 웨스턴블럿 결과의 전기영동 사진 및 ImageJ software를 사용하여 정량한 그래프이다.

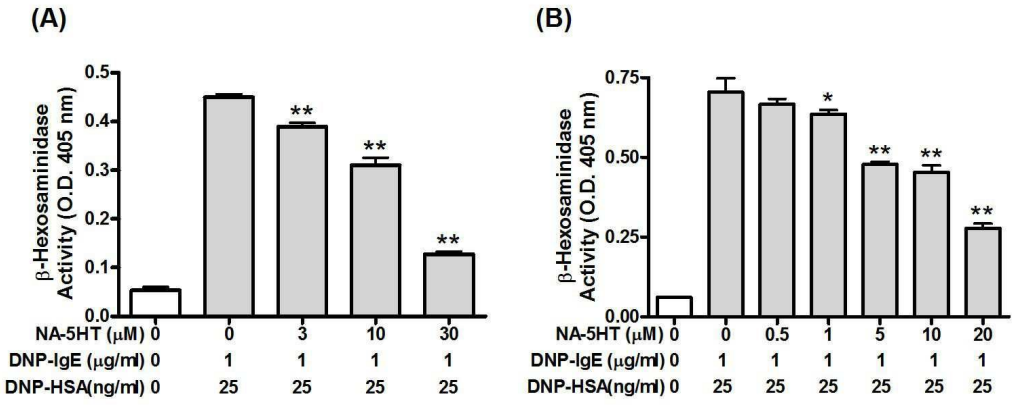
[0040] 도 8은 $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ and $p67^{phox}$ 단백질 모두가 NA-5HT 또는 DPI의 단독 또는 병용 처리에 의해 감소하는 것을 보여준다. 특히, $p40^{phox}$의 경우에는 항체의 처리 전에 비하여 현저히 감소되었다.

도면

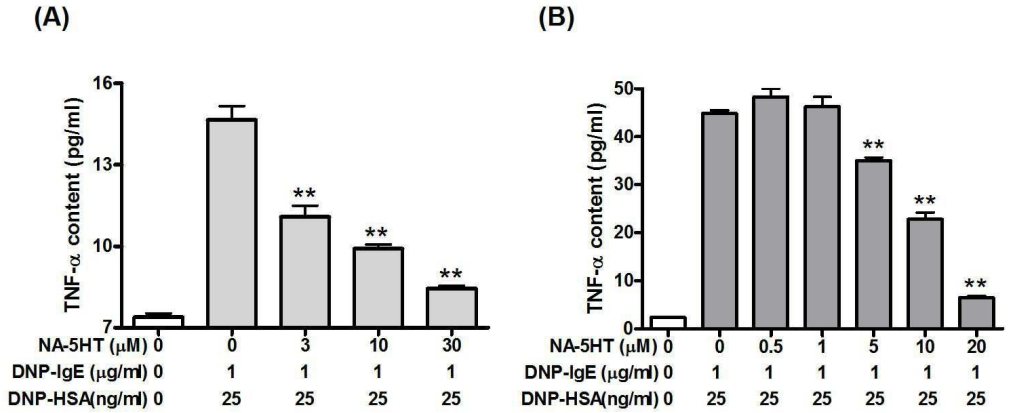
도면1


Antigen
NADPH oxidase
FcεRI
gp91phox
p22phox
NA-5HT
Lyn
Syk
P
NA-5HT
p40phox
p47phox
p67phox
PLCγ1/2
LAT
JNK
p38
Gab2
PI3K
Akt
ROS
PKCδ
ERK1/2
Arachidonate cascade
Cytokine gene expression
Degranulation
Inflammatory mediators

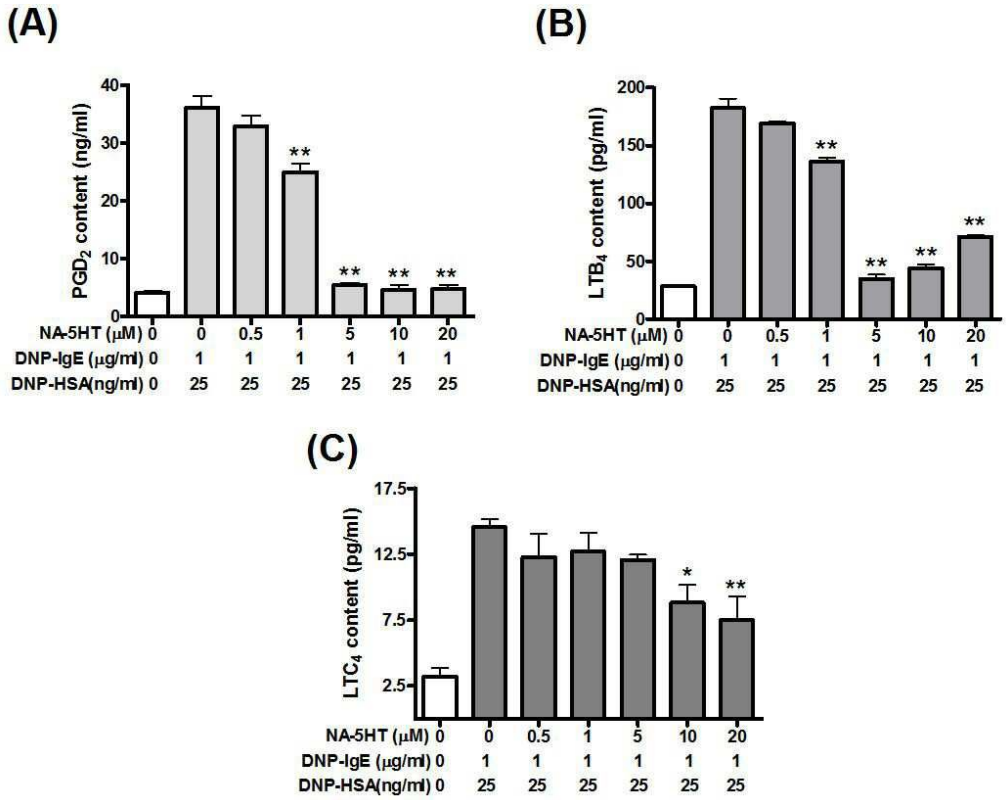
도면2


(A)
β-Hexosaminidase Activity (O.D. 405 nm)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
**
**
NA-5HT (μM) 0 0 3 10 30
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 25 25 25 25
(B)
β-Hexosaminidase Activity (O.D. 405 nm)
0.75
0.50
0.25
0.00
*
**
**
**
NA-5HT (μM) 0 0 0.5 1 5 10 20
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 25 25 25 25 25 25

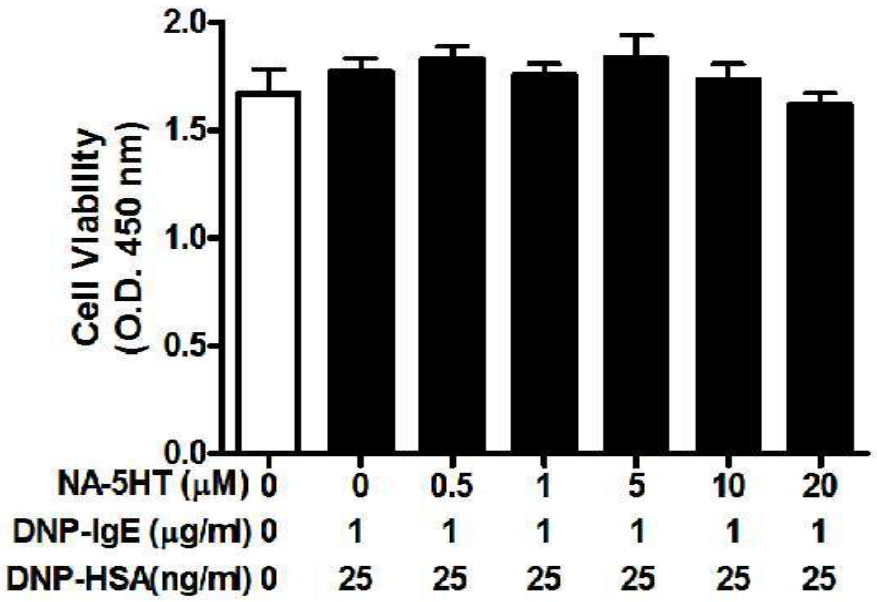
도면3


(A)
TNF-α content (pg/ml)
16
13
10
7
**
**
**
NA-5HT (μM) 0 0 3 10 30
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 25 25 25 25
(B)
TNF-α content (pg/ml)
50
40
30
20
10
0
**
**
**
NA-5HT (μM) 0 0 0.5 1 5 10 20
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 25 25 25 25 25 25

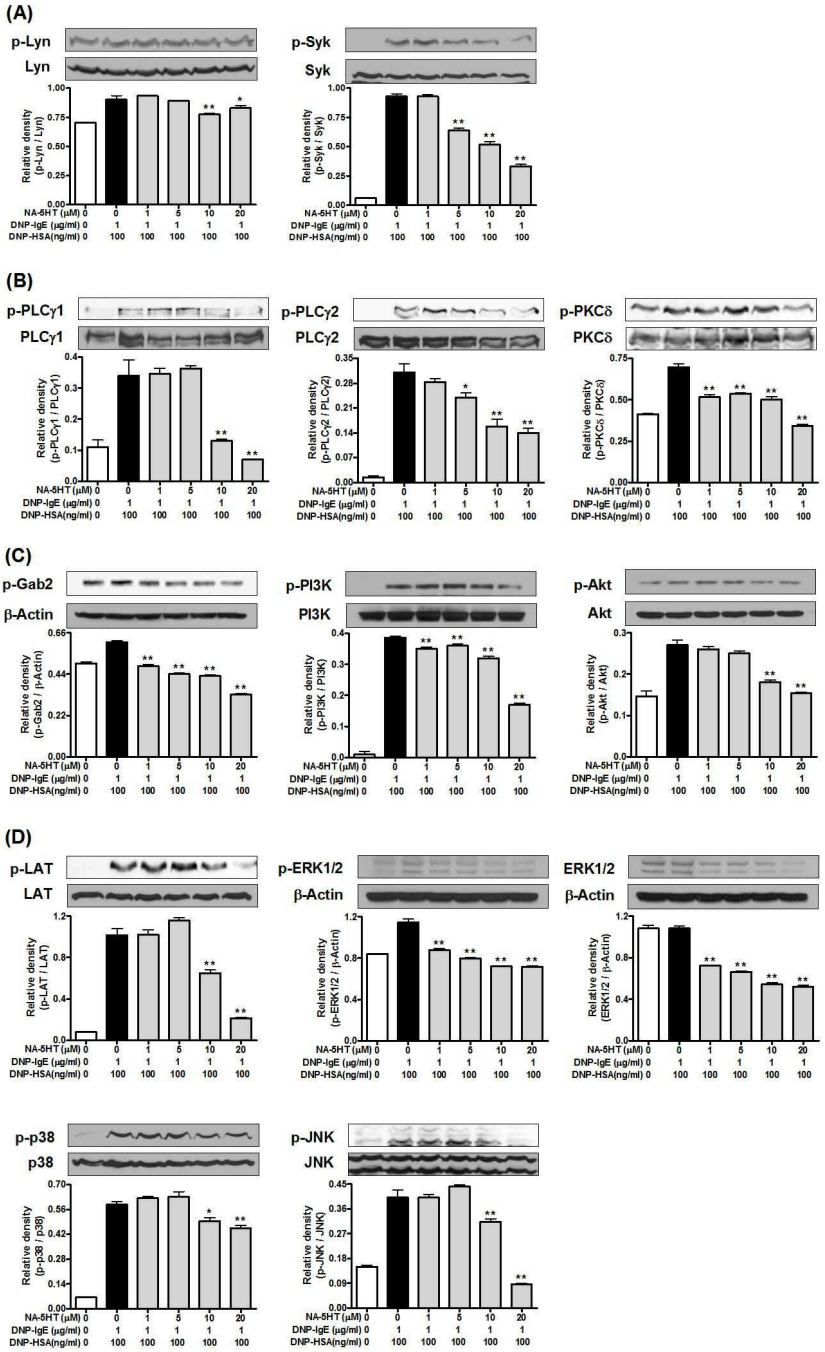
도면4


(A)
PGD2 content (ng/ml)
40
30
20
10
0
**
**
**
**
NA-5HT (μM) 0 0 0.5 1 5 10 20
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 25 25 25 25 25 25
(B)
LTB4 content (pg/ml)
200
150
100
50
0
**
**
**
**
NA-5HT (μM) 0 0 0.5 1 5 10 20
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 25 25 25 25 25 25
(C)
LTC4 content (pg/ml)
17.5
12.5
7.5
2.5
*
**
NA-5HT (μM) 0 0 0.5 1 5 10 20
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 25 25 25 25 25 25

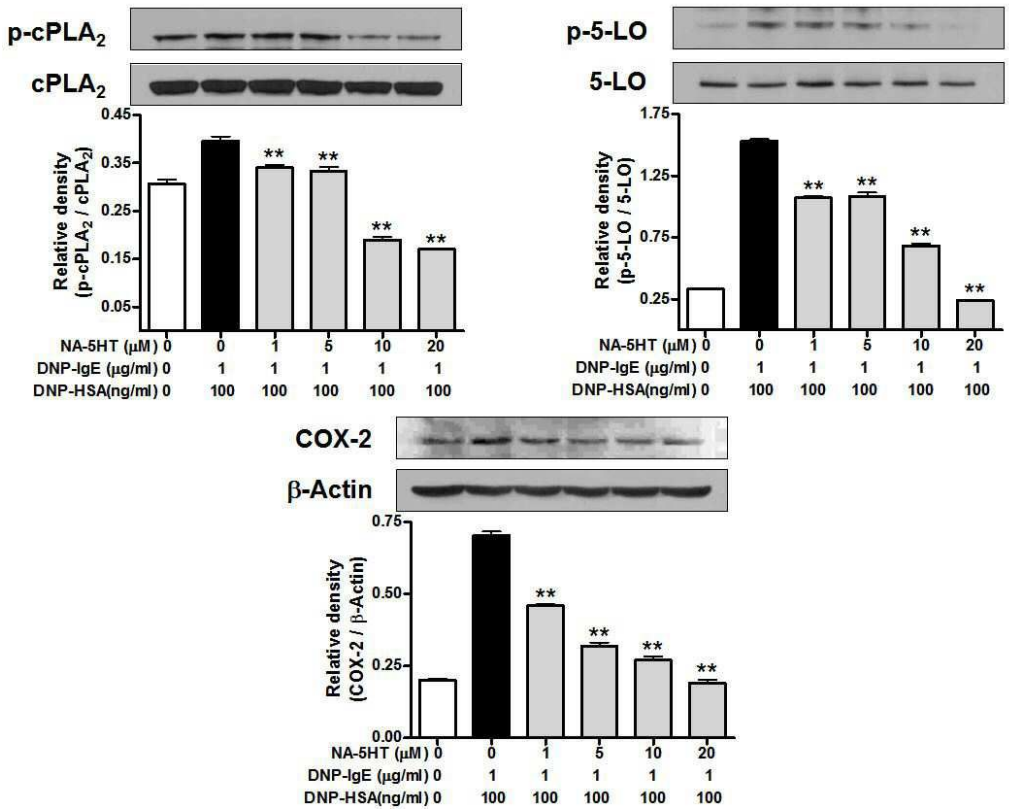
도면5


Cell Viability
(O.D. 450 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NA-5HT (μM) 0 0 0.5 1 5 10 20
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 25 25 25 25 25 25

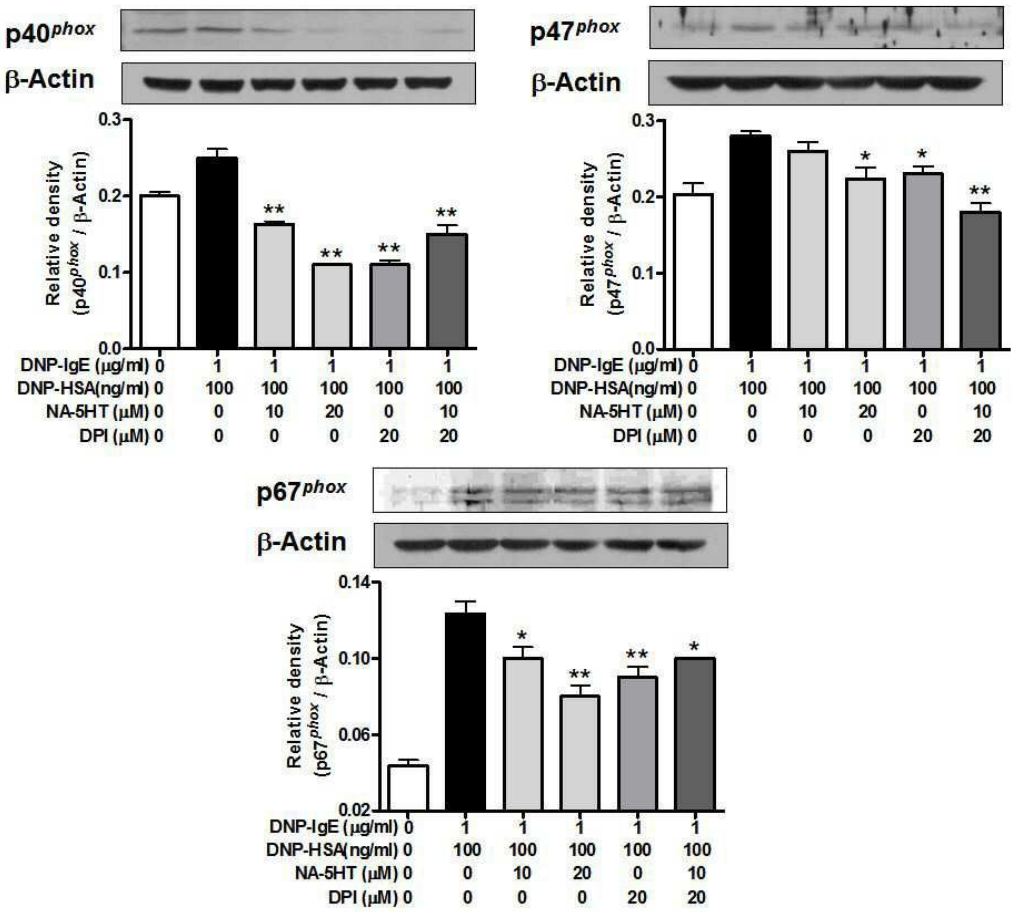
도면6


(A)
p-Lyn
Lyn
p-Syk
Syk
Relative density (p-Lyn / Lyn)
Relative density (p-Syk / Syk)
(B)
p-PLCγ1
PLCγ1
p-PLCγ2
PLCγ2
p-PKCδ
PKCδ
Relative density (p-PLCγ1 / PLCγ1)
Relative density (p-PLCγ2 / PLCγ2)
Relative density (p-PKCδ / PKCδ)
(C)
p-Gab2
β-Actin
p-PI3K
PI3K
p-Akt
Akt
Relative density (p-Gab2 / β-Actin)
Relative density (p-PI3K / PI3K)
Relative density (p-Akt / Akt)
(D)
p-LAT
LAT
p-ERK1/2
β-Actin
ERK1/2
β-Actin
Relative density (p-LAT / LAT)
Relative density (p-ERK1/2 / β-Actin)
Relative density (ERK1/2 / β-Actin)
p-p38
p38
p-JNK
JNK
Relative density (p-p38 / p38)
Relative density (p-JNK / JNK)
NA-5HT (μM) 0 0 1 5 10 20
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 100 100 100 100 100

도면7


p-cPLA2
cPLA2
Relative density (p-cPLA2 / cPLA2)
0.45
0.35
0.25
0.15
0.05
**
NA-5HT (μM) 0 0 1 5 10 20
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 100 100 100 100 100
p-5-LO
5-LO
Relative density (p-5-LO / 5-LO)
1.75
1.25
0.75
0.25
COX-2
β-Actin
Relative density (COX-2 / β-Actin)
0.75
0.50
0.25
0.00

도면8


p40phox
β-Actin
Relative density (p40phox / β-Actin)
0.3
0.2
0.1
0.0
**
**
**
**
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 100 100 100 100 100
NA-5HT (μM) 0 0 10 20 0 10
DPI (μM) 0 0 0 0 20 20
p47phox
β-Actin
Relative density (p47phox / β-Actin)
0.3
0.2
0.1
0.0
*
*
**
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 100 100 100 100 100
NA-5HT (μM) 0 0 10 20 0 10
DPI (μM) 0 0 0 0 20 20
p67phox
β-Actin
Relative density (p67phox / β-Actin)
0.14
0.10
0.06
0.02
*
**
**
*
DNP-IgE (μg/ml) 0 1 1 1 1 1
DNP-HSA(ng/ml) 0 100 100 100 100 100
NA-5HT (μM) 0 0 10 20 0 10
DPI (μM) 0 0 0 0 20 20