

## 단삼추출물의 Src-family Kinase 억제에 의한 항알러지 효과

김영미<sup>#</sup>

덕성여자대학교 약학대학

(Received July 8, 2008; Revised August 14, 2008)

## Salviae Radix Suppresses Mast Cell-mediated Allergic Response: Inhibition of Src-family Kinase

Young Mi Kim<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

**Abstract** — In this study, the anti-allergic activity and mechanism of Salviae radix (SR) were investigated. The ethanol extract of SR showed significant inhibitory effect on degranulation from antigen-stimulated mast cells and it also inhibited the expression and secretion of TNF- $\alpha$  and IL-4 in antigen-stimulated RBL-2H3 cells. In the mast cell-mediated local animal allergy model, it suppressed the passive cutaneous anaphylaxis in a dose-dependent manner. As its mechanism of action, SR inhibited the activating phosphorylation of Syk, a downstream signaling molecule of Src-family kinase, for the activation of mast cells. The results of the study indicate that the anti-allergic activity of SR is mediated by the inhibition of Src-family kinase in mast cells.

**Keywords** □ Salviae radix, anti-allergic activity, mast cells, Src-family kinase, Syk kinase

비만세포로부터 항원의 자극에 의한 기 형성된 염증성 매개체의 분비는 계절성알레르기, 천식, 아토피성 피부염 등의 IgE 매개성 알레르기 질환의 원인이 된다.<sup>1,2)</sup> 항원에 의해 활성화된 비만세포에서 세포신호전달의 활성화는 IgE 고친화성 수용체(Fc $\epsilon$ RI)와 Lyn 혹은 Fyn 등의 Src-family kinase와의 상호반응에 의해 시작되며 그 하위신호전달 효소인 Syk kinase의 활성화를 유도한다.<sup>3,4)</sup> Syk kinase는 상위신호전달물질인 Lyn 이나 Fyn에 의해서도 인산화되어 활성화되며, 또한 Fc $\epsilon$ RI의 인산화된 ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)에 결합하여 구조적인 변화를 일으키서 그 자신의 활성을 증가시킨다.<sup>5)</sup> 이러한 활성화는 LAT, SLP-76, Gab2, phospholipase C $\gamma$  및 phospholipase D1 등의 하위 신호전달물질의 활성화를 유도한다. 이러한 신호를 통해 비만세포는 다양한 급만성 알레르기 반응의 원인이 되는 히스타민, 염증성 사이토카인, 아라키돈산 유도체 등을 분비한다.<sup>6,7)</sup>

알레르기 질환을 치료하기 위해 탈감작 면역요법, DNA 백신, IgE 항체, IL-4 수용체, 항히스타민제 등 다양한 시도가 이루어지고 있으나 약제내성 등으로 치료의 목적을 완전히 달성하기까지는 아직 많은 연구가 필요하다.<sup>8,9)</sup> 이러한 이유로 최근 여러 연구자들에 의해서 비만세포의 tyrosine kinase 억제제의 개발을 통한 치료제 개발이 시도되고 있다.<sup>10)</sup> 한편, 한국, 일본, 중국을 포함한 아시아 여러 나라에서는 전통적으로 식물추출물을 다양한 질병의 치료에 응용해왔다. 이에 착안 최근 천연물 유래의 항알레르기 효과를 가진 천연물 추출물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>11,12)</sup>

단삼(Salviae radix)은 Salvia miltiorrhiza Bunge(Labiatae)의 뿌리로서 중국에서 협심증, 관상동맥질환, 심근경색 및 고혈압 등의 심장질환에 민간요법으로 사용되어 왔다.<sup>13)</sup> 하지만 단삼의 항알레르기 효과에 대한 보고는 없었다. 본 저자는 수종의 천연 생약 추출물의 항알레르기 효과를 검색을 해왔으며, 본 논문에서는 단삼(Salviae radix)의 에탄올 추출물이 *in vitro*와 *in vivo* 알레르기 동물모델에서 우수한 항알레르기 효과가 있고 그 작용기전은 비만세포의 활성화 초기 신호전달물질인 Src-family kinase 활성의 억제를 통해 약효가 나타남을 보고하고자 한다.

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-901-8455 (팩스) 02-901-8386  
(E-mail) kym123@duksung.ac.kr

## 실험재료 및 방법

### 실험재료

Minimum essential medium(MEM)과 다른 세포배양 시약은 GIBCO/Life Technologies Inc.(Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, DNP-BSA(antigen, Ag), DNP-specific IgE, 포름알데히드, 아라비아검, diphenylhydramine(DPH)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. PP2는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였고 인산화된 혹은 인산화되지 않은 ERK1/2 및 Syk에 대한 항체는 Cell Signaling Technology Inc.(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. LAT 및 phosphotyrosine(4G10)에 대한 항체는 Upstate Biotechnology(Lake Placid, NY, USA)에서 구입하였다. 그 외 모든 시약은 특급시약을 구입하여 사용하였다.

### 실험동물

4주령의 웅성 ICR mice를 대한실험동물센터(음성, 한국)에서 구입하여 사육조건은 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  및 습도  $55 \pm 10\%$ 에 12시간 light-dark cycle을 유지하였다.

### 단삼의 에탄올 추출물 제조

단삼 추출물(CA01-028)은 한국식물추출물은행으로부터 구입하여 사용하였다. 100g의 단삼을  $50^\circ\text{C}$ 에서 에탄올 1000ml에서 초음파 추출기를 이용 추출하였으며 추출액은 스피드백을 이용하여  $40^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 건조하였다. 건조후의 수득물은 약 13.5% 였으며 추출물은 탈과립 억제 효과를 확인한 후 실험에 사용 하였다.

### 생쥐 골수유래(BMMC) 및 RBL-2H3 비만세포의 분리 및 배양

BMMC는 5주령 웅성 Balb/c 생쥐에서 분리하였다.<sup>14)</sup> BMMC는 10 ng/ml IL-3를 함유한 RPMI 배지(RPMI 1640, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, antibiotics 및 10% fetal calf serum)에서 배양하였다. 이 조건에서 배양 3주 후 약 98% 이상의 세포가 BMMC로 확인되었다. 세포 자극을 위해 20 ng/ml DNP-specific IgE로 4시간 이상 감각시킨 후 BMMC는 Tyrode-BSA 배지(20 mM HEPES, pH 7.5, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5.6 mM glucose, 0.05% BSA)로 교체후 20 ng/ml 항원(DNP-BSA)으로 자극하여 단삼추출물의 효능을 확인하였다. RBL-2H3 비만세포는 glutamine, antibiotics, 14% FBS를 포함한 MEM 배지에서 배양하였으며 항원자극은 PIPES 배지(25 mM PIPES, pH 7.2, 159 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5.6 mM glucose, 0.1% fatty acid-free fraction V from bovine serum)에서 BMMC와 동일하게 감각시키고 항원자극을 시켰다.

### 비만세포에서 탈과립 측정

BMMC와 RBL-2H3 비만세포를 24-well 배양플라스크( $2 \times 10^5$  cells/0.4 ml/well)에 분주하고 20 ng/ml DNP-specific IgE를 포함한 배지에서 4시간 이상 감각시켰다. 감각 시킨 세포를 PIPES (RBL-2H3 세포) 혹은 Tyrode(BMMC) 배지로 세척 후 well 당 0.2 ml의 같은 배지를 첨가하였다. 항원을 첨가하기 30분 전에 추출물을 넣고 20 ng/ml 항원을 첨가후 10분 동안 세포를 자극하였다. 탈과립은 과립속에 포함되어있다 세포밖으로 분비되는  $\beta$ -hexosaminidase의 활성으로 측정하였다.

### Immunoblotting 분석

비만세포는 6 well 배양기에서 20 ng/ml 항원으로 7분간 자극하고 얼음위에서 반응을 중지시켰다. 자극한 세포를 약  $4^\circ\text{C}$ 의 PBS 완충액으로 세척후 0.25 ml lysis 완충액(20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Noidet p-40, 10% glycerol, 60 mM cotyl  $\beta$ -glucoside, 10 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSE, 2.5 mM nitrophenylphosphate, 0.7  $\mu\text{g/ml}$  pepstatin, a prease-inhibitro cocktail tablet)에서 30분간 세포를 파쇄한 다음 15,000g에서 15분 동안 냉장 원심분리 하였다. 원심분리후 상등액을 시료로 사용하여  $2 \times$  Laemml buffer<sup>15)</sup>를 넣은 후  $95^\circ\text{C}$ 에서 5분간 가열하였다. 단백질은 SDS-PAGE상에서 분리된 후 nitrocellulose 막에 이동시키고 5% skim milk를 포함한 TBS-T 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)으로 1시간 동안 처리하였다. 이후 측정하고자 하는 단백질에 대한 1차 항체를 1:1000배로 희석하여 약  $4^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 처리하였다. 막을 TBS-T로 세척 후 HRP-연결되어있는 2차 항체를 1:2000배로 희석하여 1시간 동안 상온에서 처리, 세척 후 목적하는 단백질은 chemoluminescent 시약을 이용 검출 하였다.

### Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

감작된 RBL-2H3 비만세포( $1 \times 10^6$  cells/3 ml/well)를 PIPES 완충액으로 세척 후 20 ng/ml 항원으로 15분 동안 자극 후 차가운 PBS로 세척하였다. Total RNA는 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 추출후 Superscript first-strand sythesis system(Invitrogen)을 이용 역전사 시켰다. PCR은  $94^\circ\text{C}$ 에서 45초,  $55^\circ\text{C}$ 에서 45초 그리고  $72^\circ\text{C}$ 에서 60초를 30번 반복하며 다음과 같은 primer를 사용 실시하였다. rat TNF- $\alpha$  primer는 forward 5'-CACCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC-3' 및 reverse 5'-CCGGACTCCGTGATGTCTAAGTACT-3', rat IL-4 primer는 forward 5'-ACCTTGCTGTACCCTGTTC-3' 및 reverse 5'-TTGTGAGCGGGACTCATTC-3', rat GAPDH primer는 forward 5'-GTGGAGTTACTGGCGTCTTC-3' 및 reverse 5'-CCAAGG-

CTGTGGGCAAGGTCA-3'을 각각 사용하였다.

### Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

감작된 RBL-2H3 세포를 20 ng/ml 항원으로 4시간 동안 자극 후 세포 밖 배지로 분비된 TNF- $\alpha$ 나 IL-4를 ELISA kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

### Passive cutaneous anaphylaxis

항원특이 IgE 0.5  $\mu$ g을 마우스의 오른쪽 귀에 피내주사 24시간 후 단삼 추출물을 농도에 따라 경구로 투여한 다음, 한 시간 후 4% 에반스블루용액에 녹아있는 250  $\mu$ g 항원을 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 항원주사 1시간 후 치사 하여 귀를 제거, 700  $\mu$ l formamide 용액에 넣은 후 70°C에서 하룻밤 동안 추출한 후 추출된 에반스블루 색소의 양은 620 nm에서 표준선과 비교하여 농도를 측정하였다.<sup>16)</sup>

### 통계처리

결과의 표시는 최소 3번 반복한 실험결과를 이용 mean  $\pm$  SEM로 표시하고 one-way ANOVA 및 Dunnet's test를 이용 통계적 유의성을 검정하였다.

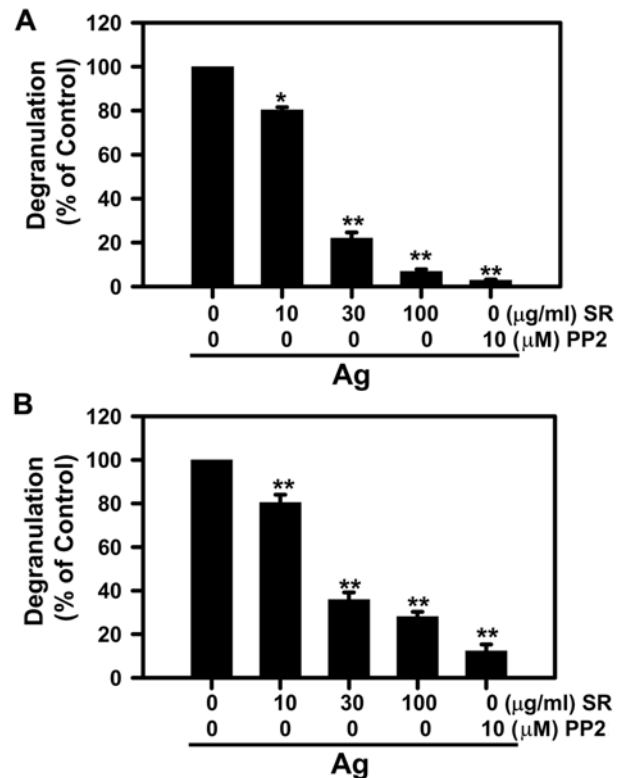
## 실험 결과 및 고찰

### 단삼추출물의 비만세포에서 탈과립에 대한 효과

비만세포가 함유하고있는 과립에는 히스타민 및 tryptase 등 다양한 알레르기 증상을 유발하는 매개체들이 함유되어 있어<sup>3)</sup> 항원에 의한 이들 분비를 확인하는 것은 매우 중요하다. 본 연구에서는 *in vitro* 항알레르기 효과를 측정하기 위해 RBL-2H3 세포 및 골수유래의 비만세포(BMMC)에서 항원 자극에 의해 유도되는 탈과립에 대한 단삼추출물의 억제효과를 측정하였다. 단삼추출물은 항원자극에 의한 비만세포에서의 탈과립을 농도 의존적으로 억제하였으며 IC<sub>50</sub> 값은 약 15  $\mu$ g/ml였다(Fig. 1A 및 1B). 이러한 억제효과는 최근 보고된 다른 식물추출물의 효과에 비해 억제효과가 우수했다.<sup>12)</sup>

### 단삼추출물의 TNF- $\alpha$ 및 IL-4 분비 억제 효과

비만세포에서는 Interleukins 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 및 TNF- $\alpha$  등 다양한 종류의 사이토카인 및 케모카인을 분비한다.<sup>3)</sup> 이 중 특히, TNF- $\alpha$ 와 IL-4 등의 사이토카인은 비만세포에 의해 매개되어지는 알레르기 염증에 있어 중요하다.<sup>17)</sup> 따라서 단삼추출물이 항원에 의한 사이토카인의 생산과 분비에 억제 효과가 있는지를 확인하였다. TNF- $\alpha$  및 IL-4는 단삼추출물에 의해 농도 의존적으로 발현이 억제되었으며(Fig. 2A), 세포외 분비도 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 2B 및 2C). 이러한 결과는 단삼추출

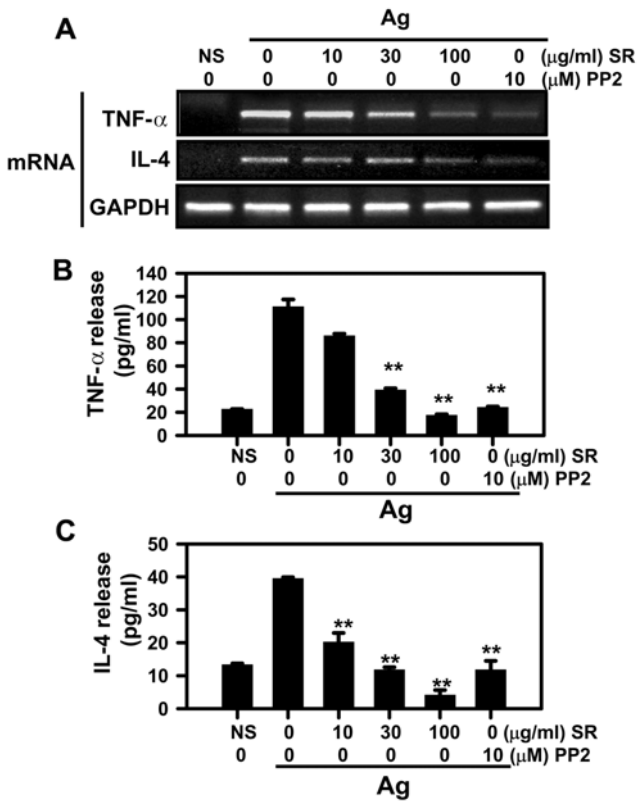


**Fig. 1** – Effect of SR on antigen-induced degranulation in RBL-2H3 mast cells and BMMC. RBL-2H3 cells (A) and BMMC (B) were incubated overnight in 24 well cluster plates, with 50 ng/ml DNP-specific IgE, in a complete growth medium. The medium was replaced with a Tyrode or PIPES buffer that contained the indicated concentration of SR, before stimulation with 20 ng/ml antigen (Ag), to measure the release of  $\beta$ -hexosaminidase. The values are expressed as mean  $\pm$  SEM from the three or more independent experiments. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

물이 비만세포에 의한 급성 알레르기 반응 뿐 아니라 사이토카인에 의한 만성 알레르기 질환에도 효과가 있음을 의미한다.

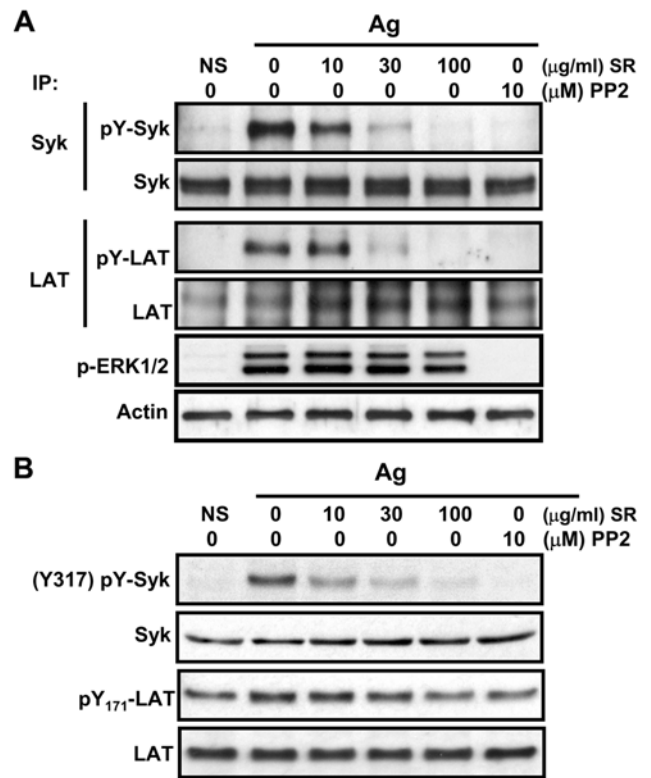
### 단삼추출물의 비만세포 억제 기전

단삼추출물의 비만세포 억제기전을 연구하기 위해 다양한 초기 신호전달물질의 활성화에 대한 단삼추출물의 억제 효과를 측정하였다. 비만세포는 항원에 의해 자극이되면 Fc $\epsilon$ R1 수용체의  $\beta$ -subunit에 결합되어 있던 Lyn이  $\beta$  및  $\gamma$ -subunit의 ITAM을 인산화 시켜 세포질에 존재하는 Syk kinase를 수용체와 결합을 유도해 초기 세포신호전달계를 활성화 시킨다.<sup>3)</sup> 본 연구에서는 초기 신호전달에 대한 단삼추출물의 Syk kinase의 인산화에 대한 억제 효과를 확인하였다. 그 결과 단삼추출물은 비만세포의 초기 신호전달에 중요한 Syk kinase의 항원에 의한 인산화를 농도 의존적으로 억제하였다. 그 억제는 10  $\mu$ g/ml 농도에서 현저하였으며 100  $\mu$ g/ml에서는 인산화가 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 3A).



**Fig. 2** – Effects of SR on secretion and expression of TNF- $\alpha$  and IL-4 in RBL-2H3 cells. (A) SR was added to the IgE-primed RBL-2H3 cells 30 min before the addition of 20 ng/ml antigen (Ag), or cells were left unstimulated (NS). The cells were stimulated for 15 min before assaying TNF- $\alpha$  or IL-4 mRNA by RT-PCR. The results are representative gel pictures from three independent experiments. (B and C) The secretion of TNF- $\alpha$  and IL-4 were measured by ELISA 4 hr after stimulating RBL-2H3 cells with 20 ng/ml antigen. The values are expressed as mean  $\pm$  SEM for the three independent experiments. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

다음으로 Syk kinase의 직접적인 세포신호전달의 하위 기질인 LAT의 인산화도 같은 정도 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig 3A). 따라서 단삼추출물은 Syk의 상위 신호전달물질을 억제함을 추측할 수 있었다. 비만세포의 활성화 과정에서 초기 신호전달물질은 Src-family kinase 임이 잘 보고 되어왔다.<sup>3)</sup> 항원에 의해 비만세포가 자극되면 아주 초기에 Src-family kinase의 한 종류인 Lyn은 하위 신호전달물질인 Syk kinase의 317번 Tyrosine 잔기를 인산화시킨다.<sup>18,19)</sup> 우리는 과연 항원에 의한 Syk kinase의 317번 Tyrosine 잔기의 인산화가 단삼추출물에 의해 억제되는지를 확인하고자 인산화된 Syk kinase의 317번 Tyrosine 잔기에 특이적인 항체를 사용하여 그 효과를 확인하였다. 그림에서 보여지듯이 항원 자극에 의해 증가되는 Syk kinase 317번 tyrosine 잔기의 인산화는 단삼추출물에 의해 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 3B). 이러한 결과를 볼 때 단삼추출물의 비만



**Fig. 3** – Effect of SR on activation of Syk kinase. (A) The RBL-2H3 cells were incubated overnight in 6 well plates with 50 ng/ml DNP-specific IgE. The cells were stimulated with 20 ng/ml antigen (Ag), with or without SR, for 7 min. Syk and LAT were immunoprecipitated with the specific antibodies, respectively, and the immunoprecipitated proteins were subjected to immunoblot analysis to detect phosphorylated or total proteins. (B) The BMMCs were incubated with 50 ng/ml DNP-specific IgE overnight. The cells were stimulated with 20 ng/ml antigen, with or without SR, for 7 min. The proteins derived from cell lysates were subjected to immunoblot analysis to detect the phosphorylated forms (Y317) of Syk. Representative blots are shown. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

세포 억제효과는 초기신호전달물질 중 Src-family kinase 억제에 의한 효과에서 비롯된다는 것을 알 수 있었다. 최근 단삼의 유효 성분 중의 하나인 5, 16-dihydrotanshinone-I은 비만세포의 항원 자극에 의한 신호전달경로 중 Syk를 억제하지 않았으며 PLC $\gamma$ 2와 ERK1/2를 억제 시킴으로 강한 항 알러지 효과를 나타냄이 보고 되었다.<sup>20)</sup> 하지만 본 연구의 추출물은 Syk의 활성화를 억제하였고 ERK1/2의 활성화에는 영향이 없었다(Fig. 3A). 이러한 결과의 차이는 본 연구의 단삼추출물의 유효 성분은 tanshinone 성분이 아님을 의미하였다. 본 추출물은 비만세포의 항원 자극에 의한 신호전달에서 5, 16-dihydrotanshinone-I의 작용점보다 상위 초기신호전달과정을 억제시킴으로서 좀 더 특이적인 비만세포 억제제로 활용이 가능 하나 추출물의 정확한 유효성분에 대한 추가적인 실험이 필요하다고 생각한다.

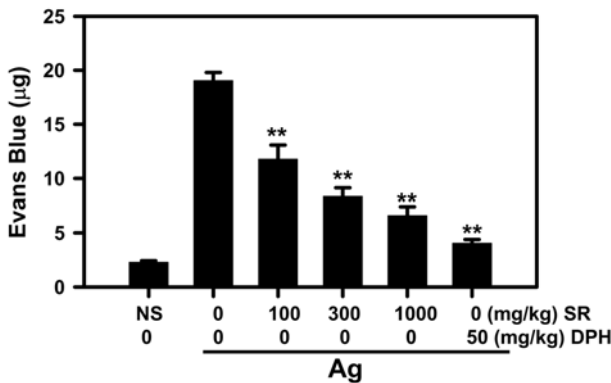


Fig. 4 – Effect of SR on passive cutaneous anaphylaxis in mice. An DNP-specific IgE (0.5 µg) was intradermally injected into a mouse right ear. An injection of antigen, 250 µg antigen (Ag, 1 µg/ml in a PBS containing 4% Evans blue), was administered 24 hr later into the mouse tail vein. The SR was administered 1 hr before the treatment of antigen. The mouse was euthanized 1 hr after the challenge of antigen, and the right ear was removed for the measurement of the amount of dye extravasated. The values are expressed as mean ± SEM from the three independent experiments. DPH (50 mg/kg), a typical anti-histamine drug, was used as a reference.

#### 단삼 추출물의 비만세포 매개성 국소적 알레르기 반응 억제효과

단삼 추출물은 *in vitro*에서 항 알레르기효과를 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 단삼추출물의 *in vivo* 알레르기 동물모델에서 알레르기 억제효과를 측정하였다. 본 연구에서는 가장 보편적으로 사용되어지는 비만세포 매개성 국소적 알레르기 동물모델인 passive cutaneous anaphylaxis 를 사용하였다. 이 동물 모델은 생쥐의 귀에 IgE를 피내주사하여 국소 비만세포를 감작시키고 항원을 정맥주사 후 비만세포 활성화에 의한 에반스 블루 색소의 혈관으로부터의 유출정도를 측정하였다. 항원에 의한 에반스 블루의 혈관으로부터의 유출은 항원자극에 의해 현저히 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 항원자극에 의한 에반스 블루의 유출은 단삼추출물에 의해 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다(Fig. 4). 이러한 실험을 통해 단삼추출물의 항알레르기 효과를 알레르기 동물모델에서도 확인할 수 있었다. 이러한 연구결과 단삼추출물은 *in vivo* 비만세포 매개성 알레르기 반응에도 효과가 있는 것으로 드러났으며 이러한 결과는 현재 아이들에게 빈발하고 있는 아토피성 피부염에도 치료효과가 예상 되는 바 추후 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

#### 결 론

본 연구에서는 단삼 추출물의 *in vitro* 및 *in vivo* 동물모델에서 항알레르기 효과와 그 작용기전을 측정하였다. 단삼 추출물은 RBL-2H3 및 골수유래의 비만세포(BMMC)에서 항원자극에

대해 농도의존적인 항알레르기 효과(IC<sub>50</sub>≈약 15 µg/ml)를 보였다. 또한, 알레르기성 염증에 중요한 TNF-α 및 IL-4 사이토카인의 생산 및 분비를 억제하였다. 더 나아가 단삼추출물은 항원에 의해 유도된 비만세포 매개성 알레르기 동물모델에서 농도 의존적으로 알레르기 반응을 억제하였다. 작용기전으로서 단삼추출물은 비만세포 초기 신호전달물질인 Src-family kinase의 억제를 통해 항 알레르기 효과를 획득하는 것으로 밝혀졌다. 현재 연구로는 단삼의 어떤 성분이 약효를 나타내는 지에 대한 연구는 진행되어 있지 않았으므로 추후 성분에 대한 연구가 심층적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

#### 감사의 말씀

이 논문은 2007년도 덕성여자대학교 연구비의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

#### 문 헌

- 1) Beaven, M. A. and Hundley, T. R. : Mast cell related diseases: genetics, signaling pathways, and novel therapies, p. 307-355. In T. H. Finkel and J. S. Gutkind (eds.), Signal transduction and human disease. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J. (2003).
- 2) Wedemeyer, J., Tsai, M. and Galli, S. J. : Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 624 (2000).
- 3) Gilfillan, A. M. and Tkaczyk, C. : Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 218 (2006).
- 4) Parravinci, V., Gadina, M., Kovarova, M., Odom, S., Gonzalez-Espinosa, C., Furumoto, Y., Saitoh, S., Samelson, L. E., O'Shea, J. J. and Rivera, J. : Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat. Immunol.* **3**, 741 (2002).
- 5) Siraganian, R. P., Zhang, J., Suzuki, K. and Sada, K. : Protein tyrosine kinase Syk in mast cell signaling. *Mol. Immunol.* **38**, 1229 (2002).
- 6) Church, M. K. and Levi-Schaffer, F. : The human mast cell. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**, 155 (1997).
- 7) Metcalfe, D. D., Kaliner, M. and Donlon, M. A. : The mast cell. *Crit. Rev. Immunol.* **3**, 2374 (1981).
- 8) Kay, A. B. : Allergy and allergic diseases. *New. Engl. J. Med.* **344**, 30 (2001).
- 9) Kay, A. B. : Allergy and allergic diseases. *New. Engl. J. Med.* **344**, 109 (2001).
- 10) Luskova, P. and Fraber, P. : Modulation of the FcεRI signaling by tyrosine kinase inhibitors: Search for therapeutic targets of inflammatory and allergy diseases. *Curr. Pharmaceut. Des.* **10**,

- 1727 (2004).
- 11) Lee, J. H., Kim, J. W., Ko, N. Y., Mun, S. H., Her, E., Kim, B. K., Han, J. W., Lee, H. Y., Beaven, M. A., Kim, Y. M. and Choi, W. S. : Curcumin, a constituent of curry, suppresses IgE-mediated allergic response and mast cell activation at the level of Syk. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 1225 (2008).
  - 12) Lee, J. H., Kim, J. W., Ko, N. Y., Mun, S. H., Kim, D. K., Kim, J. D., Kim, H. S., Lee, K. R., Kim, Y. K., Radinger, M., Her, E. and Choi, W. S. : Camellia japonica suppresses immunoglobulin E-mediated allergic response by the inhibition of Syk kinase activation in mast cells. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 794 (2008).
  - 13) Lin, H. C., Ding, H. Y. and Chang, W. L. : Two New Fatty diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza*. *J. Nat. Prod.* **64**, 648 (2001).
  - 14) Saitoh, S., Arudchandran, R., Manetz, T. S., Zhang, W., Sommers, C. L., Love, P. E., Rivera, J. and Samelson, L. E. : LAT is essential for FcεRI-mediated mast cell activation. *Immunity* **12**, 525 (2000).
  - 15) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages t4. *Nature* **227**, 680 (1970).
  - 16) Kabu, K., Yamasaki, S., Kamimura, D., Ito, Y., Hasegawa, Y., Sato, E., Kitamura, H., Nishida, K. and Hirano, T. : Zinc is required for FcεRI-mediated mast cell activation. *J. Immunol.* **177**, 1296 (2006).
  - 17) Theoharidies, T. C. and Kalogeromitros, D. : The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1088**, 78 (2006).
  - 18) Chu, D. H., Morita, C. T. and Weiss, A. : The syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* **165**, 167 (1998).
  - 19) Law, C. L., Chandran, K. A., Sidorenko, S. P. and Clark, E. A. : Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1305 (1996).
  - 20) Choi, H. S. and Kim, K. M. : Tanshinones inhibit mast cell degranulation by interfering with IgE receptor-mediated tyrosine phosphorylation of PLCgamma2 and MAPK. *Planta Med.* **70**, 178 (2004).