

KU812와 RBL-2H3 비만세포에서 interleukin-8 (IL-8) 발현 및 histamine 유리에 대한 플라보노이드의 효과

구동환, 한상철, 강경진, 강희경, 유은숙

제주대학교 의학전문대학원 약리학교실

Abstract

Effects of Several Flavonoids on KU812 and RBL-2H3 mast cell line

Dong-Hwan Koo¹, Sang-Chul Han¹, Gyeong-Jin Kang¹, Hee-Kyoung Kang¹, and Eun-Sook Yoo¹

¹Department of Pharmacology, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

Allergic disease including atopic dermatitis (AD), bronchial asthma and rhinitis are inflammatory responses. AD is a chronic, recurrent inflammatory skin disease that have symptoms such as pruritus. Allergic responses associate with mast cells which play as the major effector cells in immediate hypersensitivity (type I response) through activation via the high-affinity IgE receptor, Fcε RI, although many other functions have recently been discovered for this cell type. Interleukin-8 (IL-8) is a cytokine that produced by various types of cells upon stimulated by antigen, inflammatory stimuli and exerts a variety of functions on mast cells and neutrophils. Release of histamine is a degranulation marker in stimulated mast cells. Flavonoids are chemical substance in plants have anti-bacterial, anti-viral and anti-inflammatory effects. We investigated the effects of flavonoids on the expression of IL-8 on KU812 cells using flow cytometry and the inhibition of histamine release on RBL-2H3 cells. Mast cells stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) plus calcium ionophore A23187 and treated with flavonoids suppressed IL-8 and histamine. We found that most of flavonoids inhibited the expression of IL-8 on KU812 cells and the histamine release on RBL-2H3 cells. Therefore, these results suggest that flavonoids have connection with expression of IL-8 and inhibition of histamine release in mast cells. (J Med Life Sci 2012;9:57-63)

Key Words : KU812, RBL-2H3, Flavonoid, Interleukin-8, Histamine

서론

아토피 피부염 (atopic dermatitis; AD), 기관지 천식, 알레르기 비염과 같은 알레르기 질환은 인체에 대한 면역체계의 방어 기능이 유해한 방향으로 작용하는 것으로, 항원에 반응한 특이적 면역글로불린 E (Immunoglobulin E; IgE)를 생성한 개체가 다시 동일한 항원에 재노출되어 일어나는 1형 과민반응을 말한다¹⁾. 이러한 1형 과민반응을 포함하는 알레르기 반응은 4가지 타입으로 나눌 수 있으며, 1형 과민반응은 IgE 의존형 또는 Anaphylaxis type, 2형은 조직독이형 또는 Cytolytic type, 3형은 면역복합체형 또는 Arthus type, 4형은 지연형 또는 Tuberculin type이라고 한다²⁾.

아토피 피부염은 만성, 재발성의 염증상태의 피부질환을 말하

며, 대표적인 증상으로는 가려움증 (pruritus)이 있다³⁾. 이러한 가려움증을 줄이기 위해서 염증 부위를 긁게 되면, 발진 (rash)이 심해지는 악순환을 겪게 된다. 아토피 피부염 증상의 개선을 위해서는 염증부위를 긁는 것을 제한하는 방법과 염증부위의 피부를 치료하는 방법, 그리고 염증반응의 원인을 감소시키는 방법이 있다⁴⁾. 아토피 피부염의 발생 원인은 명확하게 알려져 있지 않지만, 환경적 요소와 유전적 요소가 복합적으로 관련되어 있는 것으로 생각되고 있다. 또한, 다양한 종류의 세포와 인자도 아토피 피부염에 관여하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 아토피 피부염에 관련되는 세포에는 비만세포 (mast cell), 호산구세포 (eosinophils), 각질세포 (keratinocytes) 등 여러 종류가 있으며, Interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-8, IL-13과 같은 염증성 사이토카인 (cytokines)과 히스타민 (histamine), IgE와 같은 다양한 인자들로 인해서 염증성 반응이 생기게 된다^{6,7)}.

이 중, 비만세포는 급성 및 만성 염증과 알레르기 반응 중 1형 과민반응에 관여하는 세포로 알려져 있다. 비만세포의 표면에서 발현되는 고친화성 IgE 수용체인 FcεRI이 IgE 또는 특이적 항원과 결합하면 세포질 내부의 칼슘 농도가 상승하게 되고, 비만세

Address for correspondence : Eun-Sook Yoo, PhD,
Department of Pharmacology, Jeju National University School of
Medicine, 102 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea
E-mail : eunsyoo@jejunu.ac.kr

포의 탈과립이 일어나 히스타민이나 염증성 사이토카인이 분비된다. 이렇게 분비된 염증성 인자들은 아토피 피부염과 같은 알레르기 질환의 원인으로 작용한다⁶⁾.

실험에서 다른 염증성 인자는 비만세포에서 분비되는 물질 중 하나인 히스타민과 만성 아토피 피부염 환자에게서 높은 농도로 나타나는 사이토카인 중 하나인 IL-8이다. 히스타민은 비만세포가 항원이나 염증관련 자극에 의해 활성화되었을 때 분비되는 물질로 실험이나 연구에서 비만세포 탈과립의 지표로 사용되며¹⁰⁾, IL-8은 염증 반응에 있어서 비만세포나 호중구 세포(neutrophils)가 자극을 받았을 때 분비되는 염증성 사이토카인이다^{9,11)}. 염증 반응으로 인해 분비된 IL-8은 호염기구세포(basophils)에서 분비되는 히스타민을 억제하는 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다^{12,13)}.

플라보노이드(Flavonoids)는 식물에서 얻을 수 있는 비질소성의 생물 색소로 과일이나 야채, 커피나 차와 같은 음료에도 일부 성분이 포함되어 있다. 플라보노이드에는 여러 가지 종류가 있으며, 각기 다른 식물이나 음료에 따라 포함되어 있는 성분의 종류와 양 또한 모두 다르다. 이러한 플라보노이드는 여러 연구를 통해서 항균성, 항바이러스성, 항염증성과 관련된 다양한 생물학적 효과를 보이는 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. Hesperidin, Hesperetin, Neohesperidin, Naringin, Naringenin은 귤류(*Citrus*)에 많이 함유된 Flavanone glycoside이며¹⁷⁾, Nobiletin과 Tangeretin 역시 귤류에서 볼 수 있는 Polymethoxyflavonoids이다¹⁸⁾.

실험은 다양한 플라보노이드가 인간 비만세포인 KU812 세포와 rat 유래 비만세포인 RBL-2H3에서 염증과 관련된 인자인 IL-8과 비만세포가 탈과립 될 때 분비되는 히스타민을 억제할 수 있는지에 대해서 수행되었다.

재료 및 실험방법

1. 재료 및 시약

RPMI 1640배지와 Fetal bovine serum (FBS), Antibiotic-antimycotic은 GIBCO (Grand Island, NY), Dulbecco's modified eagle's medium; DMEM은 Hyclone (Logan, UT)으로부터 구입했으며, 자극제로 사용된 Phorbol myristate acetate (PMA)와 Calcium ionophore A23187은 Sigma-aldrich chemical Co. (St. Louis, MO)로부터 구입해 사용했다.

세포생존능 평가(WST assay)에 사용된 시약인 Ez-Cytox는 Daeil (Korea)의 시약을 사용했으며, 시료로 처리한 플라보노이드 중 Hesperidin, Hesperetin, Neohesperidin, Naringenin, Quercitrin은 Sigma-aldrich chemical Co.에서, Naringin은 Fluka (St. Louis, MO)에서 구입해 사용했다. Nobiletin, Tangeretin은 Wako (Japan), Quercetin은 Cayman chemical company (Ann Arbor, MI)에서, Quercetagenin은 Extrasynthese genay france (France)에서 구입했다.

유세포 분석(Flow cytometry)에 사용된 Golgi Plug™ (Protein transport inhibitor)는 BD (San Jose, CA),

Paraformaldehyde (PFA), Anti-human IL-8 항체는 각각 Sigma-aldrich chemical Co.와 BioLegend (San Diego, CA)에서 구입했으며, 히스타민 유리(Histamine release) 억제 평가에 사용된 Tyrode buffer는 Biosesang (Korea), O-phthalaldehyde(OPA)는 Sigma-aldrich chemical Co.에서 구입해 사용했다.

2. 세포배양 및 시료처리

실험에 사용한 세포인 KU812는 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic을 첨가한 Hydroxyethylpiperazinylethanesulfonic acid (HEPES)가 포함되어 있는 RPMI 1640 배지에서 배양되었으며, RBL-2H3은 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM에서 배양되었다. 배양은 37°C의 온도에 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 배양했다.

KU812, RBL-2H3 세포에 처리한 플라보노이드 시료는 DMSO에 희석해서 각 농도 별(μ M)로 처리했으며, 시료처리하는 배지에 FBS를 첨가하지 않은 무혈청 조건에서 이루어졌다.

3. 세포생존능 평가(WST assay)

시료에 대한 세포의 생존능력을 알아보기 위해 WST assay를 수행했다. 96-well plate에 KU812 세포를 2.0X10⁶cells/mL만큼 접종한 후, 각 농도 별(50, 25, 12.5 μ M)로 희석한 시료를 24시간 동안 전처리했다. RBL-2H3 세포는 KU812 세포와 같은 세포 수(2.0X10⁶cells/mL)만큼 접종한 후 전배양한 뒤, 농도 별(50, 25, 12.5 μ M)로 희석한 시료를 24시간 동안 전처리했다. WST 시약을 각 well당 5 μ L씩 분주한 후, 37°C, 5% CO₂가 공급되는 조건에서 3시간 동안 배양하고, 마이크로 플레이트 리더(Microplate reader)를 이용해 450nm의 파장을 측정했다.

4. 유세포 분석(Flow cytometry)

자극으로 인해 유도되는 IL-8의 발현을 측정하기 위해서 유세포 분석을 수행했다. 6-well plate에 KU812 세포를 2.0X10⁶cells/mL만큼 접종한 후, 단백질 수송 억제제(Protein transport inhibitor)인 Golgi Plug™를 1 μ L/mL로 첨가한 뒤, 10 μ M의 농도로 희석한 시료를 24시간 동안 전처리했다. 자극제인 PMA(20 nM)와 A23187(6 μ M)로 세포를 12시간 동안 자극한 뒤, 세포염색을 수행했다.

세포를 배양튜브로 옮긴 뒤, 원심분리(1500 rpm, 300초, 4°C)를 통해 상층액을 제거하고, Phosphate buffered saline (PBS)를 이용해서 2회 세척했다. 세척한 상층액을 제거한 세포에 PBS에 녹인 1.5%의 PFA를 각 튜브당 500 μ L씩 넣고 고르게 섞은 뒤 실온에서 20분간 고정했다. PBS를 이용해서 2회 세척하고 상층액을 제거한 후, 100% MeOH를 각 튜브당 500 μ L씩 넣고 상온에서 10분간 반응시켰다. 다시 PBS로 2회 세척하고 상층액을 제거한 뒤, 배양완충액(Incubation buffer B)인 PBS에 희석한 1% Bovine serum albumin (BSA)을 각 튜브당 100 μ L씩 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다. 배양완충액이 있는 상태에서 1차 항체

인 IL-8을 1:100의 비율로 첨가해 실온의 암조건에서 1시간 동안 반응시킨 뒤, PBS로 2회 세척한 세포에 1% PFA를 500 μ L씩 넣고 고르게 섞어 고정시킨다. 고정된 세포는 빛을 차단한 상태로 4°C에서 보관했다. 유세포 분석은 고정된 세포를 이용해서 측정했으며, FACScalibur™ (BD)를 이용해 KU812 세포에서의 IL-8 발현량의 차이를 측정했다.

5. 히스타민 유리 억제 평가 (Histamine release)

탈과립으로 인한 히스타민의 유리가 억제되는지 알아보기 위해 히스타민 유리 억제 평가를 수행했다. 96-well plate에 RBL-2H3 세포를 2.0x10⁵ cells/mL만큼 접종한 후, 각 농도 별 (10, 5, 2.5 μ M)로 희석한 시료를 1시간 동안 전처리했다. 자극제인 PMA (40 nM)와 A23187 (6 μ M)를 이용해 세포를 30분간 자극한 뒤, 얼음 위에서 10분간 반응을 정지시켰다. 원심분리 (1800 rpm, 300초, 4°C)를 통해 세포를 가라앉힌 후 상층액 50 μ L를 걸러내어 동량의 1N NaOH (50 μ L)와 동량의 1% OPA (50 μ L)를 처리해 실온의 암조건에서 40분간 반응시켰다. 반응의 정지를 위해 3N HCl을 각 well당 50 μ L씩 분주했으며, 유리된 히스타민의 측정은 360-465nm의 파장을 측정해서 얻었다.

6. 통계학적 분석

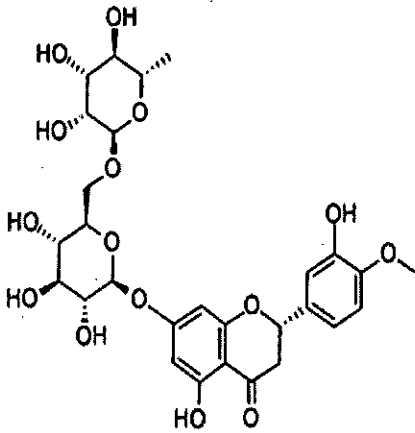
대조군과 플라보노이드를 처리한 실험군 간의 결과에 대한 통계학적인 분석은 Student's t-test를 이용해 비교했다. 통계 처리한 P 값이 0.05 미만일 경우 (P<0.05)에 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정했다.

결과 및 고찰

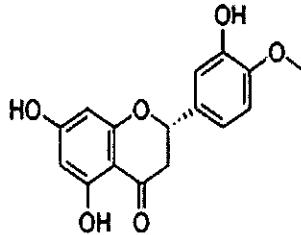
플라보노이드의 구조.

실험에 사용된 플라보노이드 중 Hesperidin, Hesperetin, Neohesperidin, Naringin, Naringenin은 꿀에 많이 함유된 Flavanone glycoside이며¹⁷⁾, Nobiletin과 Tangeretin 또한 꿀에서 볼 수 있는 Polymethoxyflavonoids이다¹⁸⁾. Quercetin과 Quercetagenin, Quercitrin은 양파류 (*Allium*)에 함유되어 있는 플라보노이드로 알려져 있으며^{19,20)}, Figure 1에 플라보노이드의 화학적 구조를 나타냈다.

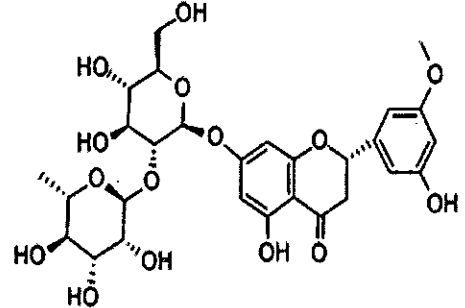
A. Hesperidin



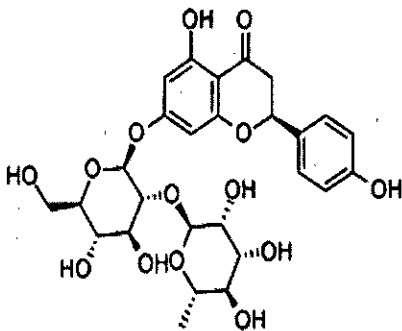
B. Hesperetin



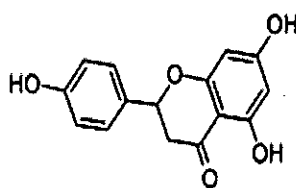
C. Neohesperidin



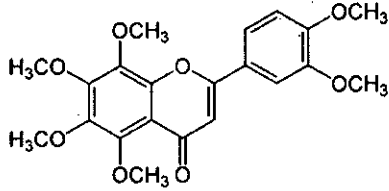
D. Naringin



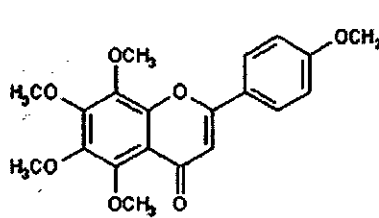
E. Naringenin



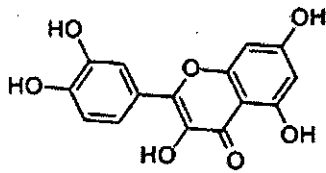
F. Nobiletin



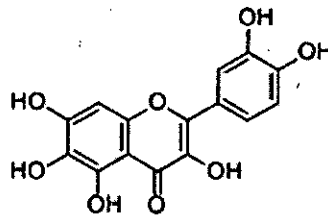
G. Tangeretin



H. Quercetin



I. Quercetagenin



J. Quercitrin

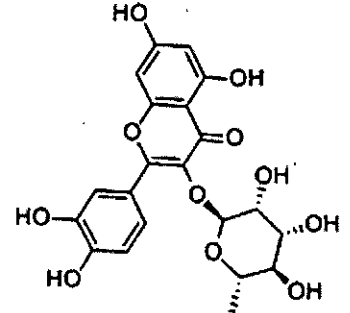
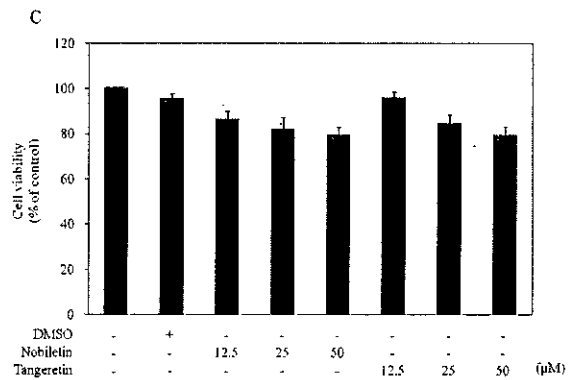
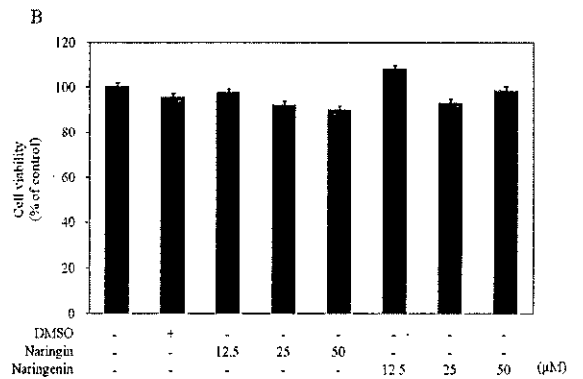
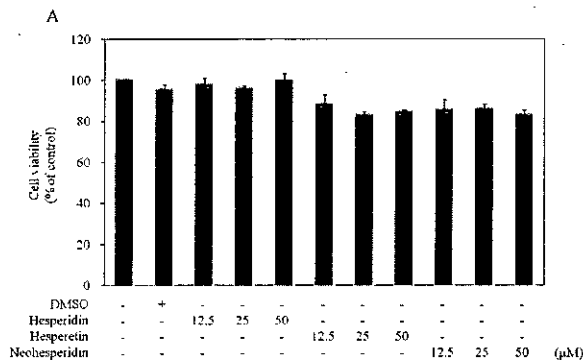


Figure 1. Chemical structure of flavonoids. The chemical structure of ten kinds of flavonoid including A. Hesperidin, B. Hesperetin, C. Neohesperidin, D. Naringin, E. Naringenin, F. Nobiletin, G. Tangeretin, H. Quercetin, I. Quercetagenin, J. Quercitrin.

KU812, RBL-2H3에 대한 플라보노이드의 세포생존능 평가.

KU812 세포에 플라보노이드를 각각의 농도 별 (50, 25, 12.5 μ M)로 처리하고 24시간 동안 배양한 후 세포의 생존능 여부를 WST assay를 통해 평가했다. 음성 대조군은 자극을 하지 않은 상태의 세포를 이용했으며, 양성 대조군으로는 시료를 희석한 DMSO로 자극된 세포를 이용했다. 플라보노이드의 종류에 따라서 세포의 생존능에 영향을 주는 경우도 있었으며, 처리한 농도에 관계없이 생존능에 영향을 주지 않는 시료도 있었다 (Fig. 2).



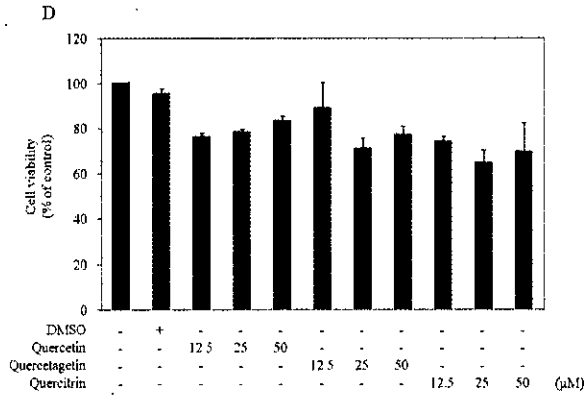


Figure 2. Effects of Flavonoids on the cell viability in KU812 human mast cells. Cells were pre-incubated for 18 hrs, and cell viability was determined from the cells at indicated dose of flavonoids (50, 25, 12.5 μM) for 24 hrs. The cell viability was confirmed by WST assay. A. Hesperidin, hesperetin and neohesperidin, B. Naringenin and naringenin, C. Nobiletin and tangeretin, D. Quercetin, quercetagenin and quercitrin.

음성 대조군에 대한 시료 처리군의 생존율을 백분율로 나타냈다. 가장 낮은 농도 (12.5 μM)로 처리한 시료에서 세포 생존능에 영향을 주는 것으로 생각되는 시료가 있었기 때문에, 실험에서는 세포생존능 평가에 이용된 농도보다 낮은 농도 (10, 5, 2.5 μM)로 시료를 희석해 처리했다.

RBL-2H3 세포에 대한 플라보노이드의 독성을 확인하기 위해서 각 농도 별 (50, 25, 12.5 μM)로 시료를 처리하고 24시간 동안 배양한 후 세포생존능을 평가했다. 음성 대조군과 양성 대조군은 KU812 세포의 평가와 같은 조건으로 처리했으며, 플라보노이드의 농도에 따라서 세포의 생존에 영향을 주는 시료가 있었다. 그렇기 때문에 실험에는 KU812 세포와 처리한 것과 같이 좀 더 낮은 농도로 희석된 시료를 이용해 실험을 진행했다. 히스타민 유리 억제 평가에 사용한 시료농도는 10 μM로 사용했다.

세포표면에서의 IL-8 발현량 변화

자극으로 인해 유도되는 염증성 사이토카인인 IL-8¹¹⁾의 발현량을 유세포 분석으로 알아보았다. 비만세포에 있어서 IL-8은 비만세포의 표면에서 발현되는 FcεRI이 IgE 또는 특이적인 항원과 결합했을 때 세포질 내부의 칼슘 농도가 올라가게 되는데, 이러한 칼슘 농도의 증가로 인해 생성되는 염증성 사이토카인 중에 하나이다⁹⁾. 그렇기 때문에 PMA와 Calcium ionophore인 A23187로 자극을 하게 되면, 그로 인해서 IL-8의 발현이 증가한다. IL-8은 자극제를 4시간 이상 처리하면 처리하지 않았을 때보다 발현량이 증가하는 양상을 보이며, 12시간 동안 자극하게 되면 4시간을 자극했을 때보다 2배 정도 높은 발현량을 보인다⁹⁾. 음성 대조군에서 발현된 IL-8 수치와 자극제만 처리한 양성 대조군의 수치 차이를 통해서, 비만세포가 자극을 받았을 때, 그로 인해 IL-8이 유도되는 것을 확인할 수 있다. Hesperidin, Naringin,

Quercetagenin, Quercitrin의 경우에는 양성 대조군에 비해서 IL-8의 발현량이 감소하는 경향을 보였고, Hesperetin, Neohesperidin, Naringenin, Nobiletin, Tangeretin, Quercetin의 경우에는 양성 대조군에 비교했을 때 증가한 IL-8 발현량을 확인할 수 있다 (Fig. 3A-B). 그림에 표시된 백분율 수치의 변화가 대조군과 비교했을 때 자극으로 인해 유도되는 IL-8의 형광발색의 비율을 나타낸다.

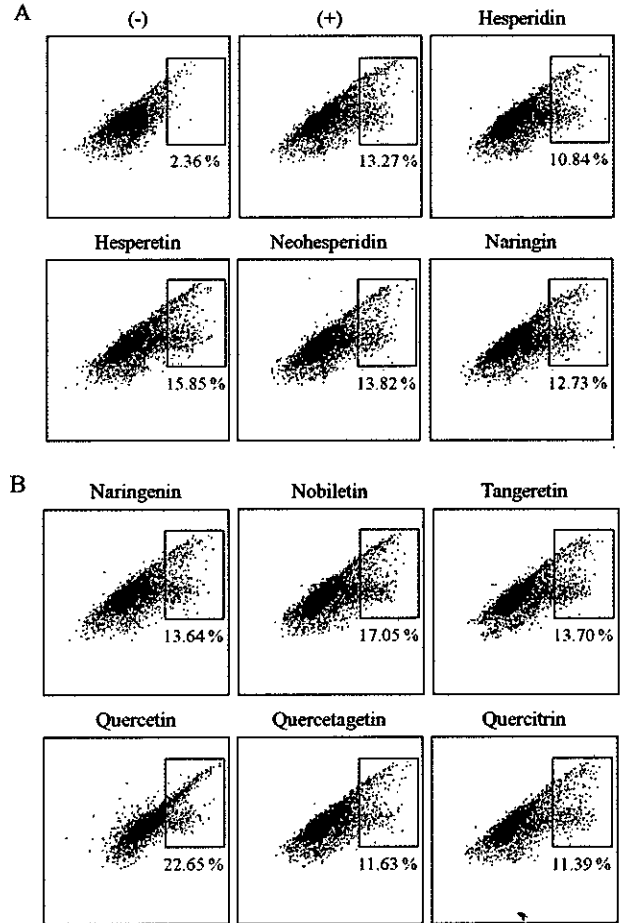


Figure 3. Effects of several flavonoids on the expression of interleukin-8(IL-8) in KU812 human mast cells. Cells were pre-incubated with flavonoids (10 μM) for 24 hrs, and stimulated by phorbol myristate acetate (PMA : 20 nM) plus calcium ionophore A23187 (6 μM) for 12 hrs. Interleukin-8 (IL-8) expression was assessed by flow cytometry. The numbers in graphs show IL-8 expression levels on KU812 human mast cells. A. Hesperidin, hesperetin, neohesperidin and naringin B. Naringenin, nobiletin, tangeretin, quercetin, quercetagenin and quercitrin.

플라보노이드의 히스타민 유리 억제.

자극제로 사용된 PMA와 A23187은 비만세포의 자극에 이용된다. 알레르기 반응의 원인 인자 중 하나로 작용하는 히스타민은

비만세포 내부에 존재하며 자극을 받게 되면 세포 외부로 탈과립

참 고 문 헌

Table 1. Inhibitory effects of several flavonoids on the histamine release in RBL-2H3 rat mast cells. Cells were pre-incubated and pre-treated with flavonoids (10 μM) for 1 hr, and stimulated by phorbol myristate acetate (PMA : 40 nM) plus calcium ionophore A23187(6 μM) for 30 mins. After the stimulation, histamine release in RBL-2H3 cell line was measured with O-phtaldehyde(OPA).

Sample	TC50 (μM)	Histamine release (% of control)	P-value
Unstimulated	-	33.5 ± 1.15	-
Stimulated	-	100	-
Hesperidin	461.2	65.1 ± 3.54	0.052
Hesperetin	398.9	72.0 ± 1.86	0.023
Neohesperidin	464.3	69.9 ± 10.24	0.156
Naringin	615.7	54.6 ± 1.96	0.026
Naringenin	582.8	69.2 ± 4.75	0.076
Nobiletin	93.7	98.9 ± 10.40	0.900
Tangeretin	362.9	67.0 ± 2.98	0.047
Quercetin	44.3	69.3 ± 4.55	0.060
Quercetagenin	195	70.9 ± 0.36	0.001
Quercitrin	89.1	74.8 ± 2.95	0.046

된다¹⁰⁾. 실험에서는 자극제 처리를 한 양성 대조군의 히스타민 유리 정도를 기준으로 놓고 플라보노이드를 처리했을 때 히스타민의 유리가 억제되는지를 알아보았다. 세포에 처리한 플라보노이드에 있어서 대부분의 시료가 히스타민 유리를 억제하는 경향을 보였다 (Table. 1). 억제 정도를 양성 대조군 대비 백분율로 나타내었을 때, Nobiletin의 경우를 제외한 9가지의 시료에서 히스타민의 유리가 억제되는 경향을 보였으며 Hesperetin, Naringin, Tangeretin, Quercetagenin, Quercitrin은 양성 대조군에 비해서 유의성 있는 억제 경향을 나타냈다.

IL-8은 세포가 염증성 자극을 받게 되면 유도되는 사이토카인으로 히스타민을 억제하는데 영향을 주는 것으로 알려진 인자이다^{12,13)}. 플라보노이드를 처리했을 때 자극으로 인해 유도되는 IL-8 수치가 증가하는 시료와 감소하는 시료가 있었으며, IL-8 수치를 감소시키는 시료는 Hesperidin, Naringin, Quercetagenin, Quercitrin이었다. 또한, 플라보노이드를 처리했을 때 자극으로 인해 세포에서 탈과립되는 히스타민의 유리가 억제되는 것을 볼 수 있는데, 이는 Nobiletin을 제외한 모든 시료에서 억제효과를 나타냈다. 그 중에서도 Hesperetin, Naringin, Tangeretin, Quercetagenin, Quercitrin은 유의성 있는 억제를 보였다. 이러한 결과를 종합해 보았을 때, 실험에서 사용된 플라보노이드 중 Hesperidin, Naringin, Quercetagenin, Quercitrin의 경우에 IL-8의 발현과 히스타민의 생성을 동시에 억제하는 효과를 보임으로써 알레르기 질환과 관련된 염증 억제 효과를 기대해 볼 수 있다.

- 1) Blank U, Rivera J. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. Trends Immunol 2004 May;25(5): 266-273.
- 2) 서울대학교 의과대학. 면역학 서울: 서울대학교출판부; 1994. p. 1-3, 135-142, 165-169, 229-241.
- 3) Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. Lancet 2003 Jan 11;361(9352):151-160.
- 4) Correale CE, Walker C, Murphy L, Craig TJ. Atopic dermatitis: a review of diagnosis and treatment. Am Fam Physician 1999 Sep 15;60(4):1191-8, 1209-10.
- 5) Sandstrom MH, Faergemann J. Prognosis and prognostic factors in adult patients with atopic dermatitis: a long-term follow-up questionnaire study. Br J Dermatol 2004 Jan;150(1):103-110.
- 6) Schroeder JT, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. The role of the basophil in allergic inflammation. Allergy 1995;50:463-472.
- 7) Beaven MA, Rogers J, Moore JP, Hesketh TR, Smith GA, Metcalfe JC. The mechanism of the calcium signal and correlation with histamine release in 2H3 cells. J Biol Chem 1984;259:7129-7136.
- 8) Kawakami T, Ando T, Kimura M, Wilson BS, Kawakami Y. Mast cells in atopic dermatitis. Curr Opin Immunol 2009 Dec; 21(6):666-678.
- 9) Yu Y, De Waele C, Chadee K. Calcium-dependent interleukin-8 gene expression in T84 human colonic epithelial cells. Inflamm Res 2001 50(4):220-226.
- 10) Kim HK, Lim YM, Kim DK, Nho YC. Effect of natural extracts mixture from Houttuynia cordata and Ulmus davidiana var. japonica in mast cell-induced allergic inflammatory response. Lab Anim Res 2008;24:1-7.
- 11) Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. J Leukoc Biol 1994 Nov;56(5):559-564.
- 12) Kuna P, Reddigari SR, Kornfeld D, Kaplan AP. IL-8 inhibits histamine release from human basophils induced by histamine-releasing factors, connective tissue activating peptide III, and IL-3. J Immunol 1991 Sep 15;147(6):1920-1924.
- 13) Alam R, Forsythe PA, Lett-Brown MA, Grant JA. Interleukin-8 and RANTES inhibit basophil histamine release induced with monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant peptide-1 and histamine releasing factor. Am J Respir Cell Mol Biol 1992 Oct;7(4):427-433.

- 14) Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygen scavenging and oxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol Med* 1994;16:845-850.
- 15) Hope WC, Welton AF, Fielder-Nagy C, Batula-Bernardo C, Coffey JW. In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substances of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity of quercetin. *Biochem Pharmacol* 1983;32:367-371.
- 16) Duarte J, Perez Vizcaino F, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol* 1993 Jul;24(4):857-862.
- 17) Tong L, Zhou D, Gao J, Zhu Y, Sun H, Bi K. Simultaneous determination of naringin, hesperidin, neohesperidin, naringenin and hesperetin of *Fractus aurantii* extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2012 Jan 25;58:58-64.
- 18) Onda K, Horike N, Suzuki TI, Hirano T. Polymethoxyflavonoids Tangeretin and Nobiletin Increase Glucose Uptake in Murine Adipocytes. *Phytother Res* 2012 May 14.
- 19) Augusti KT. therapeutic values onions(*Allium cepa* L.) and garlic(*Allium sativum* L.). *Indian J Exp Biol* 1996;34:634-640.
- 20) Park YK. Source and processing technology of vegetable juice and the trend of study. *Bulletin of Food Technology* 1995;8:59-68.