



Original Article / 원저

## RBL-2H3 비만세포에서 유백피 에탄올 추출물의 알레르기 반응 개선에 대한 효과

도현주<sup>1</sup>, 오태우<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>대구경북첨단의료산업진흥재단 신약개발지원센터

<sup>2</sup>한국한의학연구원 한의기술응용센터

## Effect of *Ulmus macrocarpa* Hance Ethanol extract (Ulmus) on Improvement of allergic responses in RBL-2H3 mast Cells

Hyun Ju Do<sup>1</sup>, Tae Woo Oh<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>New Drug Development Center, Daegu-Gyeongbuk Medical Innovation Foundation

<sup>2</sup>Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM)

### ABSTRACT

**Objectives** : In this study, we investigate the anti-allergic effects of *Ulmus macrocarpa* Hance (Ulmus) on RBL-2H3 mast cell (basophilic leukemia cell line), which are mediated by FcεR1s.

**Methods** : We evaluated the effect of the ethanol extract of Ulmus on the allergic inflammatory response in IgE-antigen-mediated RBL-2H3 cells. Cell toxicity was determined by MTT assay and the markers of degranulation such as beta-hexosaminidase, histamine, PGD<sub>2</sub>, TNF-α, IL-4, IL-6 production of inflammatory mediators and FcεR1-mediated protein expression by western blot.

**Results** : Ulmus inhibited degranulation and production of allergic mediators (e.g., TNF-α, IL-4, and IL-6) in them. Ulmus reduced histamine levels, expression of FcεR1 signaling-related genes such as Lyn, Syk, and Fyn, and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in mast cells. Also, Ulmus reduced PGD<sub>2</sub> release and cyclooxygenase-2 expression, and cytosolic phospholipase A2 phosphorylation in FcεR1-mediated RBL-2H3 mast cells.

**Conclusions** : These results indicate that Ulmus exhibits anti-allergic activity through inhibition of degranulation and inflammatory mediators and cytokine release. These findings suggest that Ulmus may have potential as a prophylactic and therapeutic agent for the treatment of various allergic diseases.

**Key words :** *Ulmus macrocarpa* Hance, RBL-2H3 mast cell, anti-allergic effect, inflammation mediators.

## I. 서론

비염은 크게 비알레르기성 비염과 알레르기성 비염으로 분류되는데, 비알레르기 비염의 경우 급격한 온도 및 기후변화, 담배연기 등의 비특이적인 외부 자극요인에 의해 발생하며, 대표적으로 혈관 운동성 비염을 들 수 있다<sup>1)</sup>. 반면, 알레르기성 비염의 경우 항원에 대하여 반복적인 노출에 의해 콧속의 점막이 과민반응을 일으켜 가려움증, 맑은 콧물, 코막힘을 비롯한 반복적인 재채기 등의 증상이 나타나는 질환으로, 최근 미세먼지와 같은 환경오염을 비롯한 공해의 증가 등 비특이적 자극으로 인하여 알레르기성 비염이 증가하고 있는 추세이다<sup>2)</sup>. 이처럼, 알레르기성 비염은 면역체계의 이상으로 발생하는 질환으로서, 보통 면역글로불린 E (IgE) 매개의 과민반응으로 과도한 염증반응 현상으로 이해할 수 있다. 즉, 알레르기 면역반응은 알레르기 주 요인이 되는 면역세포의 일종인 비만세포(mast cell)와 관련이 높으며, 비만세포의 표면에는 IgE 항체가 붙을 수 있는 표면 인자가 있으며 알레르겐이 인체 내로 들어와 IgE와 결합하게 되면, IgE와 결합하고 있는 비만세포가 활성화된다<sup>3)</sup>. 인체 내에서 고르게 분포되어 있는 비만세포는 골수에 존재하는 전구세포(progenitor cell)로부터 생성되며, 사람 당 약 천여개의 세포를 가지고 있으며, 비만세포 핵 내에는 많은 과립을 내포하고 있으며, 앞서 설명한 다양한 항원에 접촉이 된 부위에서 다량의 비만세포가 관찰된다. 사람에게서 비만세포는 폐포, 결막, 장관점막 및 비강 점막 등의 상피층과 결합하고 있으며, 이러한 비만세포로부터 여러 종류의 사이토카인이 유발되기에, 알레르기 염증반응의 작용 기전과 치료에 많은 연구로 이용 되어지고 있다<sup>4)</sup>. 특히 비만세포는 특이 IgE-FcεRI 반응에 의해 과립내의 화학매개체와 사이토카인 등을 분비하면서 알레르기 염증의 초기 반응과 후기반응을 일으키고 만성적인 염증을 일으키는데 중요한 역할을 하며, 활성화 된 비만세포는 신경전달물질인 히스타민을 외부로 분비하여 알레르기 반응을 유

발하게 된다<sup>5)</sup>. FcεRI의 발현은 염증성 사이토카인을 생성시키고 호염구의 탈과립 및 알레르기 질환에서 큰 상관관계를 갖는다. RBL-2H3 세포에서 FcεRI은 Tyrosine-protein kinase의 종류인 Lyn 및 Syk을 조절하여 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 및 5' AMPactivated protein kinase (AMPK)에 영향을 준다. Lyn 및 Syk의 인산화는 세포내 칼슘을 방출시키고, T helper 세포를 활성화시켜 호염구의 탈과립-염증을 유발한다<sup>6)</sup>.

알레르기 비염은 현대질환으로 인식되고 있지만, 옛날에도 이와 비슷한 질환이 있었다는 증거는 많이 있으며, 치료법 또한 많이 존재한다. 한의학에서는 비구, 분체, 비색으로 각종 문헌으로 표현을 하였으며, 이는 호흡기의 기능저하와 양기의 부족으로 폐의 기능저하를 그 원인으로 두고 있다<sup>7)</sup>. 즉, 알레르기 비염의 원인을 오장육부의 한열허실과 담음증으로 구분하며, 그 원인을 파악하여 침 치료 및 한약을 병행 투여하여 한열의 불균형에 대하여 증상치료와 면역력 증강을 동시에 치료하여 면역학적 항상성을 유지하는 치료를 하였다.

유백피(*Ulmus macrocarpa* Hance, 榆白皮)는 느릅나무의 코르크층(줄기 껍질)을 벗긴 수피를 의미하며, 맛은 약간 달고 성질은 차가우면서 어느 한쪽으로 치우치지 않고 평하며(甘平), 이수통림(利水通淋)하고 체내외의 응종 창독을 삭히고 제거하는 소종(消腫)하는 효능이 있다고 알려져 있다. 느릅나무의 경우 우리나라에 널리 퍼져 있으며 부종, 부비동염, 위장관 염증 등의 염증성 질환의 치료에 전통적으로 사용되어 온 천연물이다<sup>8)</sup>. 이와 같은 임상적 사용을 뒷받침 하는 연구 결과로 유백피에 항산화 효과, 항염증 효과 및 면역 조절 능력 등이 있음이 보고된 바 있다<sup>9,10)</sup>. 동물 실험 모델에서 유백피 추출물에는 콜라겐 유도 관절염 증상을 완화하는 효과가 있었고 TNF-α와 같은 염증성 사이토카인의 발현을 감소시키면서 패혈증의 심각성을 낮추어 주는 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>11,12)</sup>. 사이토카인과 함께 염증시 증가하는 대표적인 물질 중 하나인 nitricoxide (NO) 역시 유백피 추출물에 의해 생성이

\*Corresponding author : Tae Woo Oh, CKorean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), 70, Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu, 41062, Republic of Korea  
Tel : +82-53-940-3833, Fax : +82-53-940-3899, E-mail : taewoo2080@kiom.re.kr  
•Received : October 15, 2021 / Revised : October 26, 2021 / Accepted : November 19, 2021



감소하는 것으로 알려져 있다<sup>10)</sup>. 뿐만 아니라 유백피에는 지질 산화를 방해하는 강력한 항산화 능력과 NO에 의해 유도되는 세포자멸사 (apoptosis)를 억제하는 기능 역시 존재한다<sup>8,13)</sup>.

본 연구에서는 알레르기 반응에 대하여 비만세포주인 RBL-2H3 cell에서 anti-DNP-IgE와 DNP-HSA으로 탈과립을 유도하여 유백피 에탄올 추출물(Ulmus)을 투여하여 유백피의 항알레르기 조절효과에 대하여 조사하였으며, 그에 대한 개선 효과에 대하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 유백피 에탄올 추출물 제조

본 실험에 사용한 유백피는 영천약업사(영천, 대한민국)에서 구매한 규격품으로 품질검사 필한 절단 생약으로 관능검사 후 에탄올 추출물로 제조하였다. 즉, 유백피(50g)을 진탕 배양기에서 40°C에서 24시간 동안 70% 에탄올을 사용하여 추출하였으며, 추출물을 150 μm 여과지(여과지(Whatman NO. 1) 사용하여 여과한 후 회전식 감압농축기(Buchi, Tokyo, Japan)로 농축하였다. 농축된 추출물을 동결건조 함으로써 유백피 에탄올 추출물(Ulmus)을 획득하였다(수율 18.5%). 추출물을 사용하기 전 -20°C에서 보관하였으며, 실험 직전 동결건조된 분말을 증류수에 재현탁하고 10,000xg에서 15분간 원심분리한 후 0.2 μm 멸균 필터로 여과하여 실험에 사용하였다.

#### 2) 비만세포배양

흰쥐의 basophilic leukemia cell line인 RBL-2H3 세포는 ATCC(CRL2256, Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였으며 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin-streptomycin이 함유된 Eagle's Minimum Essential Medium(MEM)를 배양액으로 하여 37°C 와 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다.

### 2. 방법

#### 1) 세포독성평가 (cell cytotoxicity assay) 및 탈과립 유도

약물에 의한 비만세포에서 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay 방법을 이용하였다. 배양한 RBL-2H3

cell을 96well plate에 2×10<sup>4</sup> cell/ml 농도로 200 μl씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양한 후 RBL-2H3 cell에 각각 100, 300, 500 μg/ml 농도의 Ulmus 시료를 처리하여 24시간동안 배양하였다. 반면, 비만세포에서의 탈과립(degranulation) 현상을 유도하기 위하여 동일한 방법으로 세포를 배양한 후, anti-DNP-IgE (0.1 μg/ml)처리하여 24시간 동안 배양한 다음, Ulmus 100, 300, 500 μg/ml 농도별로 1시간 동안 전처리한 후 DNP-HSA(10 μg/ml)을 처리하여 3시간 동안 배양함으로써 탈과립을 유도하였다. 그 이후 세포독성을 평가하기 위하여 배양된 세포에 5 mg/ml MTT 시약을 media에 5배 희석한 후 100 μl/well 씩 각 well에 분주하여 1시간 동안 incubator에서 반응시킨 후 상층액을 제거 후 formazon을 DMSO 100 μl씩 처리해 용해시켰다. 용해된 palat를 마이크로 판독기(SpectraMax i3, Molecular devices, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포에 대한 독성을 평가하였다.

#### 2) Beta-hexosaminidase 함량 측정

Beta-hexosaminidase의 분비는 Huang 등 (2008)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 24 well culture plate에 세포 (2×10<sup>5</sup> cells/ml)를 분주한 후 anti-DNP-IgE(0.5 μg/ml)를 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 12시간 배양하였다. 배양액을 제거한 후 Siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM PIPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, pH 7.2)를 이용해서 2회 세척한 다음 15% FBS와 MEM 배지에 적정 농도로 희석한 약물을 농도별 (100~500 μg/ml)로 처리하여 1시간 동안 배양한 후 DNP-HSA(2 μg/ml)를 처리하여 2시간 반응시킨 다음 ice bath에서 10분 동안 방치하여 반응을 종결시켰다. 세포배양액 40 μl를 96 well plate로 옮기고 여기에 substrate buffer(4-p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide 2 mM, sodium citrate, 0.05 M, pH 4.5)를 동량으로 넣은 다음 1시간 동안 배양하였다. 여기에 다시 stop solution 200 μl를 첨가함으로써 반응을 종결시킨 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Secretion of beta-hexosaminidase (%) = [대조군의 흡광도 - (약물처리군의 흡광도 / 대조군의 흡광도)] × 100

#### 3) 사이토카인 측정

비만세포에서 분비되는 tumor necrosis factor-α

(TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-6 및 IL-4 의 농도를 측정하기 위하여 세포를 6 well culture plate에 분주하고 DNP-IgE (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리하여 24시간 배양한 다음, Ulmus 약물을 농도별(100~500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 1시간 동안 전처리하여 배양한 후 DNP-HSA(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 처리하여 12시간 동안 배양함으로써 cytokine에 대하여 분비를 유도하였으며, 반응종결을 위해 ice bath에서 10분간 방치하였다. 배양이 끝난 상층액을 96 well ELISA plate에 옮기고 사이토카인 측정 키트(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 4) 히스타민 측정

비만세포에서 분비되는 히스타민의 농도를 측정하기 위하여 세포를 6 well culture plate에 분주하고 DNP-IgE (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리하여 하룻밤 배양하였다. 여기에 Ulmus 약물을 농도별(100~500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 처리하여 1시간 동안 배양한 후 DNP-HSA(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리하여 3시간 동안 배양함으로써 히스타민을 유리시켰다. 반응종결을 위해 ice bath에서 10분간 정지하였으며 배양이 끝난 상층액을 96 well ELISA plate에 100  $\mu\text{l}$ 씩 옮기고 히스타민 농도를 히스타민 측정 키트(histamine release assay kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 5) PGD2 측정

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate (Corning, USA)에  $2 \times 10^6$  cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 감작하고 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 배지 교환 후 약물을 농도별로 처리하여 1시간 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 DNP-HSA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리하여 30분 동안 자극시키고 ice bath에서 10분 동안 방치하여 반응을 종결시켰다. 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 PGE2 ELISA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) 를 사용하여 측정하였다. Microplate reader (SpectraMax i3, Molecular devices, CA, USA) 를 사용하여 405-420 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 PGD2의 양을 계산하였다.

#### 6) Western blot

RBL-2H3 cell로부터 Fc $\epsilon$ RI 매개 신호전달 관련 기

전을 확인하기 위하여 단백질의 발현을 Western blot으로 측정하였다. 먼저, RBL-2H3 cells를 100 mm cell culture dish에  $5 \times 10^5$  cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였고, 그 후 anti DNP-IgE(0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 감작하고 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 이후 새로운 배지로 교환한 후 Ulmus (100, 300 및 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 세포에 처리하여 1시간 동안 배양한 후 DNP-HSA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 1시간 동안 처리하여 면역반응을 유도하였다. 세포를 1 $\times$  PBS로 3회 세척 후 lysis buffer(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin) 0.1 ml로 lysis시켰으며, 이를 12,000 rpm에서 20분 원심분리함으로써 단백질을 분리하였다. 분리된 각 단백질의 농도를 protein assay solution으로 정량한 다음, 30  $\mu\text{g}$  단백질을 5 $\times$ sample buffer와 섞어 8-15% SDS-PAGE를 통해 분리하였다. 분리된 gel상의 단백질을 NC membrane으로 transfer시키고 각 membrane은 5% BSA로 실온에서 1시간 blocking 하였다. Membrane에 FC $\epsilon$ RI 매개 신호전달 관련 일차항체 COX-2, p-cPLA2, p-Lyn, p-Syk, p-Fyn, p-PLC $\gamma$ 1, p-Akt, p-ERK와  $\alpha$ -tubulin 일차항체 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 넣어 4°C에서 overnight 반응시킨 후 0.05% Tween이 들어간 TBS로 3회 세척하였다. Membrane에 다시 anti-IgG conjugated HRP 항체를 넣은 후 1시간 동안 실온에서 반응시키고 0.05% Tween이 포함된 TBS(1 $\times$ TTBS)로 3회 세척하여 ECL용액을 이용하여 ChemiDocTM touch imaging system (BioRad, California, USA)를 이용하여 분석하였다.

#### 7) 통계처리

모든 실험 결과는 GraphPadprism 5.0 통계 프로그램(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean $\pm$ SD)로 계산하였으며 각 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA로 분석하였으며, 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였으며, p<0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 평가하였다.

### III. 결과

#### 1. 세포 독성 평가

유백피 에탄올 추출물(Ulmus)의 RBL-2H3 세포에서의 독성 정도를 평가하기 위해서 MTT assay 를 수행

하였다. 그 결과, 그림 1A에서와 같이 세포만 배양한 대조군(control) 경우 세포 생존도는  $100 \pm 2.89\%$ 였으며, 약물 대조군인 Dexamethasone을 처리한 그룹은  $98.34 \pm 3.56\%$ 의 생존율을 보였으며, Ulmus를 100, 300, 500, 1000  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 약물 처리군에서는 각각  $102.29 \pm 5.23\%$ ,  $99.64 \pm 6.4\%$ ,  $93.35 \pm 7.26\%$ ,  $91.60 \pm 7.14\%$ ,  $82.65 \pm 10.65\%$ 로 측정되었다. 유백피 에탄올 추출물은 RBL-2H3 세포에서 1000  $\mu\text{g/ml}$  농도까지 독성이 거의 없는 것으로 판단되어 이후 실험에서

는 최대 500  $\mu\text{g/ml}$ 까지 사용하여 실험을 진행하였다. 반면, 탈과립을 유도한 상태에서의 약물의 독성을 평가하였을 때는, 세포만 배양한 그룹에서는  $100 \pm 1.96\%$ 였으며, 탈과립을 유도한 DNP-HSA 그룹에서는  $94.97 \pm 16.56\%$ 으로 세포 생존율을 보였으며, 약물 대조군인 Dexamethasone을 처리한 그룹은  $90.27 \pm 2.14\%$ 의 생존율을 보였다. 한편 Ulmus를 농도별로 처리한 그룹에서는 각각  $92.27 \pm 0.52\%$ ,  $83.25 \pm 4.02\%$ ,  $84.06 \pm 11.01\%$ 의 세포 생존율을 보였다(Fig. 1.B).

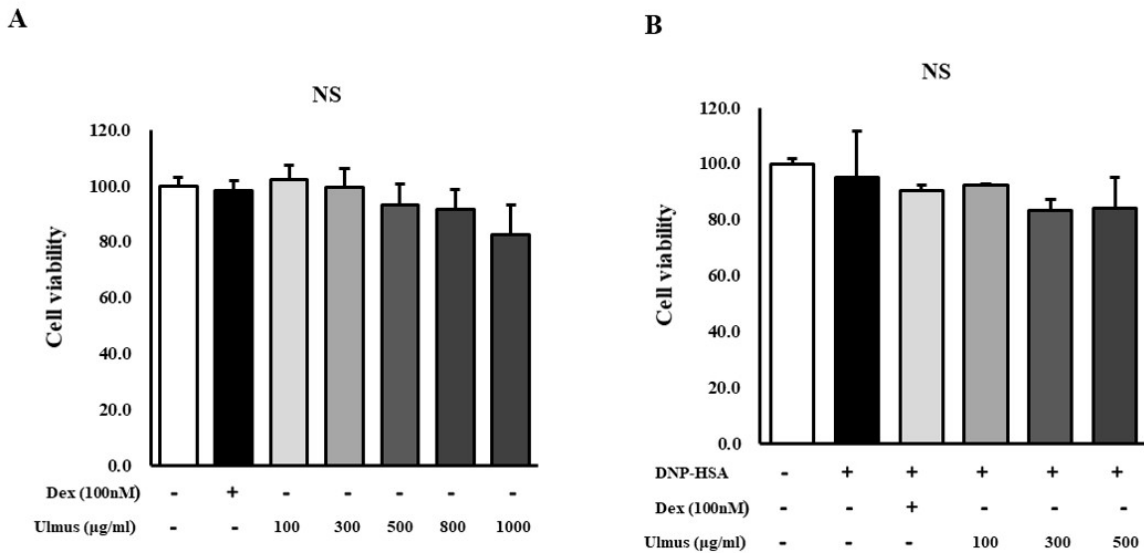


Fig. 1. Effect of Ulmus on cytotoxicity in RBL-2H3 cells. Cells were incubated with different concentrations of Ulmus for 24 h(A) and DNP-IgE (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) for overnight, treated with Ulmus and stimulated with DNP-HSA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) for 3h(B) and then cell viability was measured by MTT assay.

## 2. Beta-hexosaminidase release에 대한 효과

Beta-hexosaminidase는 호염구나 비만세포의 히스타민이 저장된 과립 안에 존재하며, 외부자극에 의해서 세포 밖으로 분비됨으로써 알레르기 반응을 유발시키게 된다. 따라서 비만세포의 탈과립은 알레르기 반응 지표로 널리 이용되고 있어 본 연구에서도 beta-hexosaminidase에 대하여 측정을 하였다. 그 결과, DNP-HSA에 의해 활성화된 RBL-2H3 세포로부터 beta-hexosaminidase의 양이 탈과립을 유도하지 않은 정상 그룹에 비하여 유의

하게 증가하였으며, 유백피 에탄올 추출물(Ulmus)을 100, 300, 500  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하였을 때 DNP-HSA 그룹에서 측정된 값을 기준으로 하였을 때, 각각  $0.73 \pm 0.002\%$ ,  $0.38 \pm 0.004\%$ ,  $0.30 \pm 0.003\%$ 로 농도 의존적으로 감소 되었다. 반면 약물 대조군인 Dexamethasone의 경우  $0.96 \pm 0.028\%$ 로 탈과립을 유도한 그룹과는 유의성은 없었지만, 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2.)

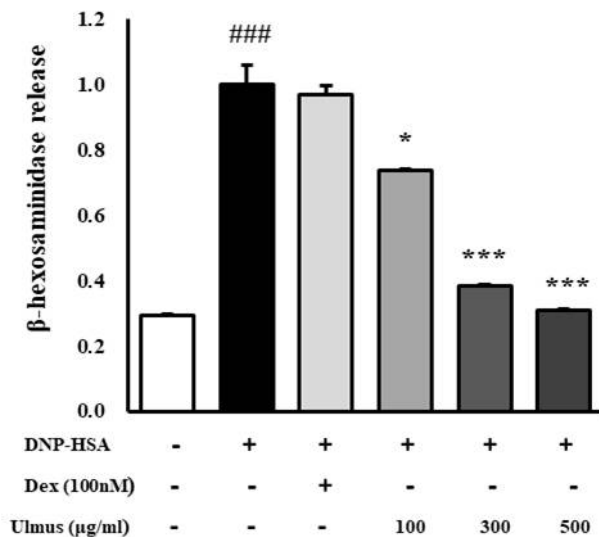


Fig. 2. Effect of Ulmus on degranulation of  $\beta$ -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells. Cells were incubated with anti-DNP-IgE (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for overnight, treated with Ulmus for 1 h, and then stimulated with DNP-HSA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 3 h.  $\beta$ -hexosaminidase secretion into the supernatant was measured by beta-hexosaminidase release assay kit. Results represent as the mean  $\pm$  SD of three different preparations with quadruplicate experiments. ###  $p < 0.001$  vs. CTL ; \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. DNP-HSA group.

### 3. 사이토카인 분비에 대한 효과

활성화된 비만세포로부터 분비되는 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-4, IL-6에 대한 유백피 에탄올 추출물(Ulmus)의 효과를 확인하기 위해 세포배양액으로부터 각각의 사이토카인 농도를 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과, 정상세포에서는 TNF- $\alpha$  농도가  $5.25 \pm 1.63$  pg/ml로 낮게 측정된 반면, DNP-HSA를 처리한 그룹에서는 TNF- $\alpha$ 의 농도가  $35.95 \pm 1.72$  pg/ml로 증가하였으며, 약물 대조군인 dexamethasone 그룹의 경우  $22.94 \pm 7.52$  pg/ml로 나타났다. 또한 유백피 에탄올 추출물(Ulmus)을 100, 300, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리하였을 때 각각  $37.14 \pm 1.91$  pg/ml,  $16.05 \pm 1.15$  pg/ml,  $5.77 \pm 1.07$  pg/ml로 TNF- $\alpha$ 의 분비가 농도 의존적으로 감소함으로써 유백피 에탄올 추출물이 활성화된 비만세포에서 TNF- $\alpha$  분비를 감소시킴으로써 염증반응을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3A). 또 다른 염증성 사이토카인의 일종인 IL-4의 양은 아무런 처리를 하지

않은 정상 그룹에서  $7.14 \pm 0.72$  pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 그룹에서  $33.3 \pm 6.27$  pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 정상 그룹에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. 반면 Ulmus를 농도별로 처리한 그룹에서는 각각  $26.49 \pm 2.48$  pg/ml,  $26.88 \pm 3.03$  pg/ml과  $12.39 \pm 0.71$  pg/ml로 항원으로 자극한 그룹에 비해 유의한 감소를 보였다(Fig. 3B). 또한 RBL-2H3 cells에서 분비된 IL-6의 양은 아무런 처리를 하지 않은 정상 그룹에서는  $1.22 \pm 0.16$  pg/ml이었으며 항원으로 자극한 그룹에서는  $16.79 \pm 0.51$  pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 그룹에 비하여 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 반면 약물 대조군인 dexamethasone 그룹의 경우  $17.17 \pm 1.02$  pg/ml로 DNP-HSA 그룹과 비교하였을 때, 감소하는 경향은 나타나지 않았으나, 유백피 에탄올 추출물(Ulmus)을 농도별로 처리한 그룹에서는 각각  $2.89 \pm 0.41$  pg/ml과  $1.62 \pm 0.31$  pg/ml,  $1.54 \pm 0.45$  pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 감소를 보였다(Fig. 3C).

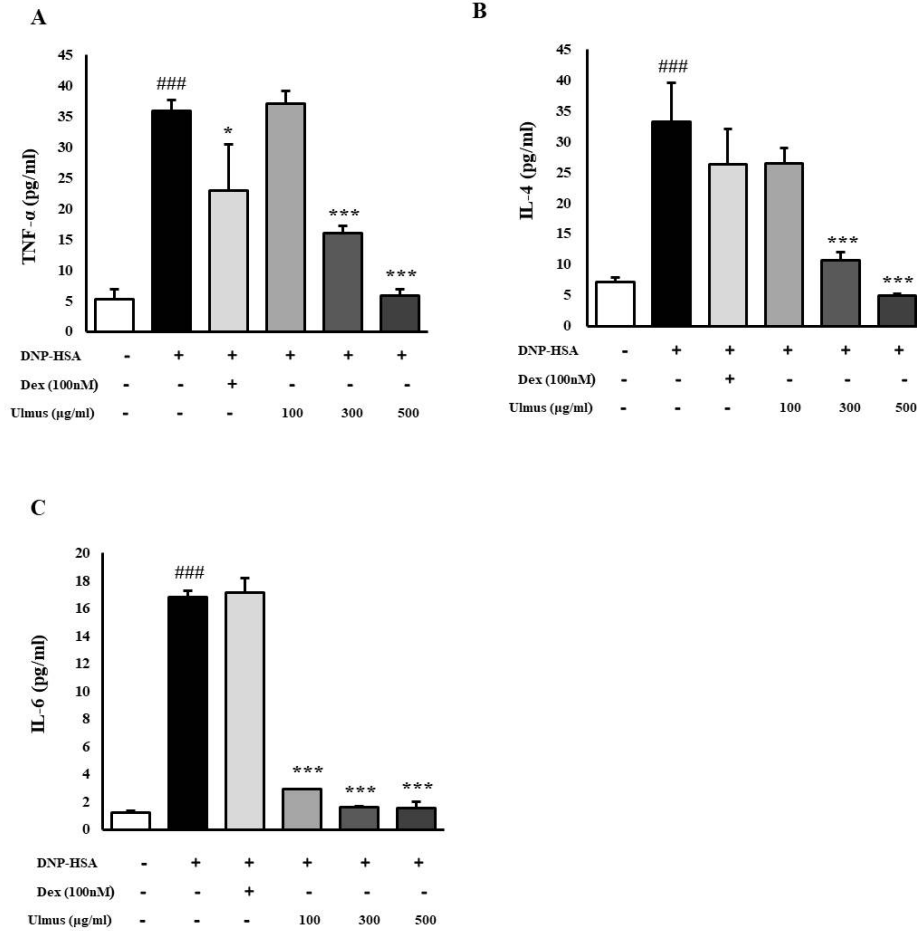


Fig. 3. Effect of Ulmus on the production of TNF- $\alpha$  (A), IL-4(B) and IL-6(C) of in RBL-2H3 cells. The cells were sensitized with anti-DNP-IgE (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), stimulated by DNP-HSA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and treated various concentrations of Ulmus. The levels of cytokine in culture supernatant media were measured using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit. The results represent as the mean  $\pm$  SD of three different preparations with quadruplicate experiments. ###  $p < 0.001$  vs. CTL ; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. DNP-HSA group.

#### 4. Histamine 분비 및 PGD2 발현 변화에 대한 효과

활성화된 비만세포로부터 탈과립에 의해 분비되는 히스타민에 대한 유백피 에탄올 추출물(Ulmus)의 효과를 확인하기 위해 세포배양액으로부터 히스타민의 농도를 효소면역반응법(ELISA)으로 측정하였다. 그 결과, 아무런 처리를 하지 않은 정상 그룹에서는 히스타민의 농도가  $80.15 \pm 5.12 \text{ ng}/\text{ml}$ 로 측정된 반면, IgE-antigen complex에 의해 자극을 받은 그룹에서는  $138.13 \pm 4.22 \text{ ng}/\text{ml}$ 로 현저히 증가 되었으나, 약물 대조군인 dexamethasone을 처리한 그룹의 경우  $130.28 \pm 3.28 \text{ ng}/\text{ml}$ 로 그다지 감소

하는 경향은 보이지 않았다. 하지만, 약물 투여군인 Ulmus를 100, 300, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리하였을 때 히스타민의 농도가 각각  $110.23 \pm 2.70 \text{ ng}/\text{ml}$ ,  $108.26 \pm 0.99 \text{ ng}/\text{ml}$ ,  $89.41 \pm 3.80 \text{ ng}/\text{ml}$  로 측정되어 유백피 에탄올 추출물은 비만세포로부터 히스타민의 분비를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 또한 RBL-2H3 cells에서 분비된 PGD2의 양은 아무런 처리를 하지 않은 그룹에서  $49.36 \pm 2.07 \text{ pg}/\text{ml}$ 이었으며, 항원으로 자극한 그룹에서는  $568.06 \pm 48.22 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 아무런 처리를 하지 않은 그룹에 비해 유의한 증가를 나타내었으며, 약물 대조군인

dexamethasone을 처리한 그룹의 경우  $479.63 \pm 12.57$  pg/ml로 약간의 감소하는 경향을 보였다. 반면 Ulmus를 농도별로 처리한 그룹에서는 각각  $246.99 \pm 39.64$  pg/ml과

$105.02 \pm 11.64$  pg/ml 및  $97.09 \pm 4.69$  pg/ml 로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 감소를 보였다(Fig. 4B).

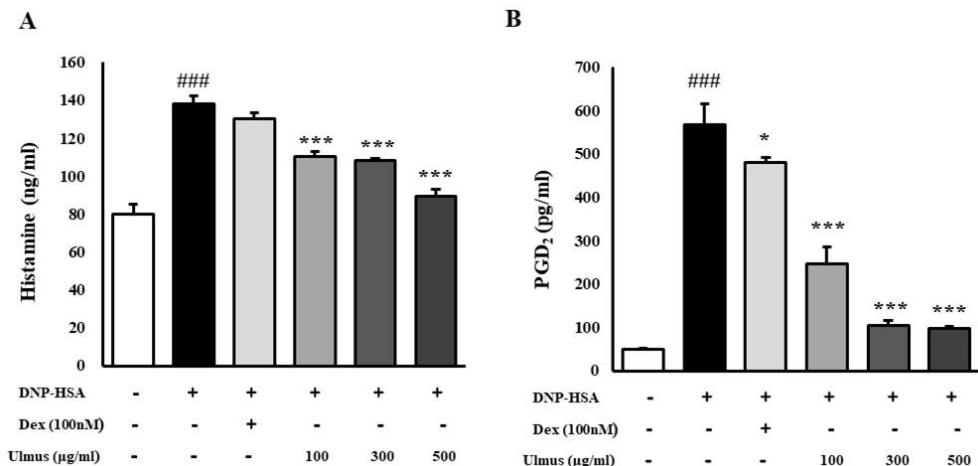


Fig. 4. Effect of Ulmus on the production of Histamine (A) and PGE<sub>2</sub> (B) in RBL-2H3 cells. The cells were sensitized with anti-DNP-IgE (0.1 µg/ml) for overnight, stimulated by DNP-HSA (10 µg/ml) and treated various concentrations of Ulmus. The levels of histamine and PGE<sub>2</sub> conditioned media were measured by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit. The results represent as the mean±SD of three different preparations with quadruplicate experiments. ###p<0.001 vs. CTL ; \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 vs. DNP-HSA group.

### 5. FcεRI 매개 신호전달 경로에 대한 단백질 발현 변화에 대한 효과

FcεRI은 탈과립을 일으키는 비만세포의 표면에 독점적으로 발현되며, 이에 대하여 초기 신호전달 과정에 대하여 RBL-2H3 cells에서 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 그룹에 비해 항원으로 자극한 그룹에서 cPLA2의 인산화와 더불어 COX-2의 발현이 증가하였으며, 초기 신호전달 기전에 관여하는 Lyn, Syk, Fyn,

PLCγ1, Akt와 ERK의 인산화가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 Ulmus (100, 300 and 500 µg/ml)를 처리한 그룹에서는 COX-2의 발현이 농도의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 저농도(100-300 µg/ml)에서 cPLA2의 인산화가 감소하는 경향을 보였다. 또한 ERK와 Fyn을 제외한 Lyn, Syk, PLCγ1, 및 Akt의 인산화가 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4).



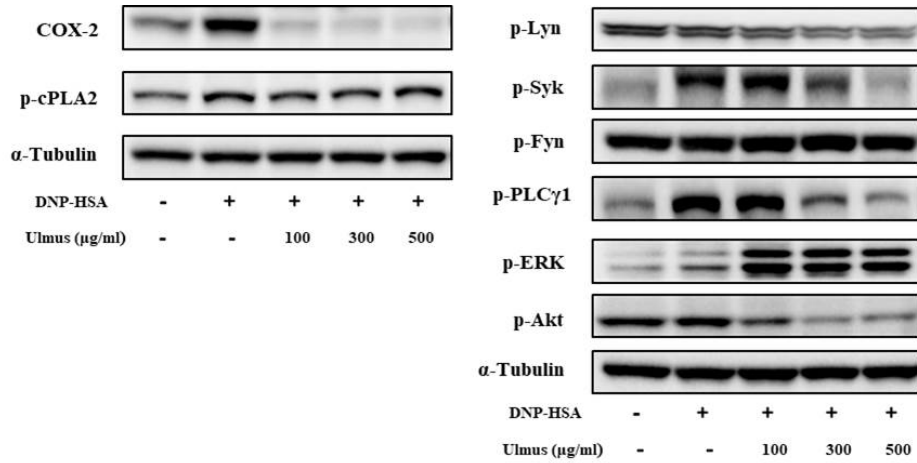


Fig. 5. Effect of Ulmus on IgE-antigen complex-induced production of protein phosphorylation in RBL-2H3 cell. The cells were sensitized with anti-DNP-IgE (0.1 μg/ml), stimulated by DNP-HSA (10 μg/ml) and treated various concentrations of Ulmus. The COX-2 and p-cPLA2(A) and phosphorylation of Lyn, Syk, Fyn, PLCγ1, ERK, Akt and α-Tubulin were assayed by western blot analysis.

#### IV. 고찰

알레르기 반응(과민성 반응)은 면역체계가 정상적이면서 외부로부터의 자극에 의하여 면역체계가 부적절하게 반응하는 것을 의미한다. 일반적으로 알레르기가 나타나면 재채기를 비롯한 눈물, 콧물, 피부 가려움 및 발진 등이 나타나며 심하면 아나필락시스 반응과 같은 생명을 위협하기도 한다. 일반적으로 항체, 백혈구, 비만세포, 보체 단백질 및 기타 물질 등을 포함하는 면역체계가 인체를 외부 물질(항원)로부터 보호하는데, 이에 취약한 사람의 경우 대부분의 사람들에게는 무해한 음식, 약물 또는 환경 속의 특정 물질(알레르기 항원)에 노출되면 면역 체계가 과민하게 반응하게 되며 그로 인해 알레르기 반응이 나타나게 된다. 어떤 사람들은 하나의 물질에만 알레르기 반응을 보이고, 일부는 다수의 물질에 알레르기 반응이 나타나기도 하며, 한국의 경우 알레르기 비염 환자가 해마다 증가해 14년 새 2배로 증가하였다<sup>14</sup>. 특히, 인하대병원 환경보건센터에 따르면, 전체 알레르기 질환의 2018년 인구 1만 명당 진료실인원은 1865명이며, 연령별로는 소아와 청소년 비율이 높은 것으로 나타났다. 12세 이하 소아가 전체의 41.5%, 13세 이상 18세 이하의 청소년이 전체의 33.6%를 차지했다. 성별로는 여성이 53.6%로 남성(46.4%)보다 많았다<sup>15</sup>. 현재 알레르기에 대한 치료는 근본적인 원인

을 없애기보다는 증상을 완화시키는 치료가 주된 치료법으로 이루어지고 있으며, 이에 대한 부작용도 발생하고 있는 실정이다. 그러므로 안전하고 효과적인 치료제 개발이 필요하며, 이에 대하여 약리적인 효능이 뛰어나고, 안정성이 검증된 천연물로부터 많은 연구가 활발히 이루어지고 있다.

한의학에서는 알레르기 질환에 대하여 비구(鼻飮), 비분(鼻噴), 비양(鼻痒), 비체(鼻嚏), 비류청체(鼻流涕) 등의 범주로 보았으며, 『영추(靈樞·본신편(本神篇))』에 기사혼(氣舍魂), 폐장기(肺藏氣), 폐기허즉비색불리소기(肺氣虛則鼻塞不利少氣)이라 하여 비(鼻)가 정상적인 통기(通氣)와 후각(嗅覺)의 기능을 발휘하려면 폐기(肺氣)가 조화(調和)되고 호흡이 원활해야 한다고 하였다<sup>16</sup>. 위기(衛氣)는 현대의학의 면역체계에 해당하는 것으로, 위기(衛氣)의 허약이 면역반응에 대한 기능이 저하되고 과민반응의 원인이라고 할 수 있으며, 알레르기 질환은 폐(肺), 비(脾), 신(腎)의 허약으로 인해 외사를 방어하는 인체의 능력이 저하되어 나타나게 되는 것으로 볼 수 있다.

유백피(*Ulmus macrocarpa* Hance, 榆白皮)는 우리나라에 널리 퍼져 있으며 부비동염을 비롯한 부종 및 위장관 염증과 같은 염증성 질환의 치료에 전통적으로 사용되어 온 한약재이다<sup>8</sup>. 이에 저자는 세포 탈과립과 염증매개물질 분비 억제에 대한 유백피 에탄올 추출물의

활용 가능성을 알아보고, 그 응용범위를 넓히기 위하여 RBL-2H3세포 생존 및 증식에 미치는 영향, degranulation에 미치는 영향 및 사이토카인, 염증매개 물질에 미치는 영향을 살펴보았다.

먼저 항알레르기에 대한 효능을 알아보기 전에 유백피 에탄올 추출물에 대하여 세포 독성을 검증하기 추출물을 농도별로 처리하였다. 일반적으로 단일성분의 세포 처리 농도 범위인 100 ~ 1000  $\mu\text{g/ml}$  범위로 처리한 후 세포생존율을 분석한 결과 RBL-2H3 세포에서 독성을 나타내지 않는다는 것을 확인하였으며(Fig. 1A), 알레르기 반응에 대한 조절 효과를 살피기 전 RBL-2H3 세포에 IgE 자극과 함께 반응시켰을 때의 독성을 확인해본 결과 아무런 처리를 하지 않은 control군과 비교하였을 때 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포의 모양 및 증식을 유도하지 않았으며, 독성 또한 나타나지 않아(Fig. 1B) 약물의 효능평가를 위하여 500  $\mu\text{g/ml}$ 을 최대 용량으로 하여 실험을 진행하였다.

RBL-2H3 세포는 흰쥐의 basophilic leukemia cell로서 표면에 IgE 특이 수용체인  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 가 존재하여 IgE 자극에 의해 화학매개 물질을 분비하는 것으로 알려져 있다. 이러한 화학매개 물질은 프로테오글리칸(proteoglycan), 히스타민(histamine), 세린 프로테아제(serine proteases) 등으로 외부에서 자극을 받기 이전부터 비만세포 내 과립에 이미 생성되어 외부자극 후 빠르게 유리된다<sup>17,18</sup>. 특히  $\beta$ -hexosaminidase은 비만세포의 과립에 저장되어 있는 histamine이 알레르기 반응에 의해 활성화되어 세포 밖으로 유리될 때 함께 분비되어지므로  $\beta$ -hexosaminidase의 활성화는 비만세포 탈과립의 지표인자로서 사용된다<sup>19</sup>. 비만세포의 탈과립 현상에 대하여 유백피 에탄올 추출물(Ulmus)의 효과를 알아보기 위하여 측정된  $\beta$ -hexosaminidase의 분비량은 유백피 에탄올 추출물의 처리농도가 증가함에 따라  $\beta$ -hexosaminidase의 분비를 유의적으로 억제하였으며, 특히 아무것도 처리하지 않은 control그룹과 비교했을 때 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 탈과립 억제효과가 비슷하게 나온 것으로 나타났다 (Fig. 2). 이것은 유백피 에탄올 추출물이 초기 알레르기 반응을 매우 효과적으로 제어할 수 있음을 시사한다.

한편, 비만세포가 알레르겐과 결합하면, 탈과립이 일어나 histamine이나 염증성 사이토카인, 즉  $\text{TNF-}\alpha$ , interleukin3(IL-3), IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 및 IL-16 등과 같은 여러 사이토카인을 분비하

게 되고, 분비된 이러한 염증 매개인자들은 염증반응을 더욱 촉진시키는 동시에 신체적으로 피부 가려움증 또는 혈관을 이완시키거나 혈관 투과도를 증가시키며, 기관지를 수축시키게 된다<sup>20-22</sup>.

$\text{TNF-}\alpha$ 는 대표적인 염증성 사이토카인과 함께 더불어 전구 염증인자로서 대식세포와 함께 다양한 염증반응을 유발하며 국소 알레르기 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다. 비만세포에서 생성되어 분비되는  $\text{TNF-}\alpha$ 는 혈관내피세포의 adhesion molecules의 발현을 증가시키게 되고, 호산구 및 T림프구의 표적기관으로의 유입을 촉진시킨다. 또한, 비만세포에서 생산되는 또 다른 사이토카인의 일종인, IL-4, IL-13, IL-6 등은 Th2 세포의 반응을 활성화시키고, 결국 IgE의 발현을 높임으로써 만성적인 알레르기 반응에 관여하게 된다<sup>23</sup>.

본 연구에서 유백피 에탄올 추출물(Ulmus)이 RBL-2H3 세포에서 IgE-매개  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-4 및 IL-6의 생산에 미치는 영향에 대하여 살펴 본 바, RBL-2H3 cells에서 분비된  $\text{TNF-}\alpha$  및 IL-4의 양은 300 및 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도의존적으로 유의한 감소를 보였으며(Fig. 3A, B), IL-6의 경우 유백피 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 세포에서 모든 농도에서 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 감소를 보였다(Fig. 3C). 이처럼 유백피 에탄올 추출물은 사이토카인의 분비를 유의적으로 억제함으로써 알레르기 염증반응에 대하여 억제 효과도 있는 것으로 나타났다.

Histamine은 비만세포의 탈과립으로부터 가장 빠르게 분비되는 일차 매개 물질 중 하나로, 호염기구(basophils), 호산구(eosinophil)와 결합조직에 있는 비만세포에 의해 생성된다. 이는 뇌를 포함하여 여러 조직에서 발견되며 신경전달물질로 작용하며, 두 개의 효소 DAO(diamine oxidase)와 HNMT(histamine N-methyltransferase)를 통해서 분해된다<sup>24</sup>. DAO는 소화기계와 세포질 내에서 oxidative deamination을 통해서 히스타민을 분해하고, HNMT는 세포질 내에서 methylation을 통해서 히스타민을 분해한다. 반면, 비만세포가 비특이적 외부자극으로부터 자극을 받으면, 새로운 분비물질을 생성하여 발현하게 되는데, 이때 가장 중요한 물질은 arachidonic acid(AA)로부터 유래된 대사산물이며, cyclooxygenase(COX) 경로와 lipoxygenase의 2가지 경로가 있다. Cyclooxygenase 경로의 대표적인 대사산물이 prostaglandin D2(PGD2)이며, 이는 prostaglandin의 대표적 염증매개물질 중 하나로, 이러한 프로스타글란딘 (prostaglandins, PGs)이



막지질로부터 유리된 arachidonic acid가 COX의 대사 작용을 거쳐 생성되는 것으로 체내의 항상성 유지에 기여하거나 세포의 사멸 및 보호작용을 조절하는 것으로 알려져 있다<sup>25,26</sup>. 본 연구에서도 유백피 에탄올 추출물이 Histamine과 PGD2의 생산에 미치는 영향을 RBL-2H3 cells에서 확인 해 본 결과, 분비된 Histamine의 양이 약물 농도별로 처리한 그룹에서 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 감소를 보였다(Fig. 4A). 또한 RBL-2H3 cells에서 분비된 PGD2의 양은 유백피 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 그룹에서 IgE-매개 PGD2의 분비를 농도의존적으로 억제하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4B).

항원에 의해 활성화된 비만세포의 신호전달 경로는 FcεRI와 근접한 초기 신호전달계에 해당하는 Lyn-Syk-LAT으로 이어지는 경로와 Fyn-Gab2-PI3K로 이어지는 두 가지 경로가 있는데 이러한 과정은 FcεRI 응집으로부터 IgE에 붙는 α-chain, β-chain, γ-chain homodimer로 이루어진 tetrameric receptor로서 연속적이고 복잡한 신호전달 과정이 시작된다<sup>27</sup>. 수용체 근처의 신호전달에 대한 기전은 아직 완전히 밝혀지진 않았지만, 초기 신호전달 과정에서는 응집된 수용체와 SRC-family kinase 활성화, lipid raft의 융합 및 수용체의 tyrosine phosphorylation이 차례대로 일어나는 것으로 알려져있다. 또한 SRC-family kinase는 Lyn으로서 주로 lipid raft에 존재하며, Lyn이 lipid raft에 결합하는 것만으로 FcεRI의 비인산화 상태에서 인산화로 전환되어 비만세포의 탈과립이 시작된다<sup>28</sup>. FcεRI β-chain과 γ-chain에서 Lyn이 immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)내의 tyrosine 잔기를 인산화하고 ITAM가 인산화되면 Syk의 촉매영역이 trans-혹은 autophosphorylation(자기인산화)되거나 Lyn에 의해 인산화가 되어 활성이 증가하게 되어 인산화된 Syk가 대부분의 tyrosine을 인산화 시키게 되어 Syk 또는 Lyn에 의해 막 횡단 어댑터인 linker for activation of T cells(LAT)의 인산화가 일어남으로써 다양한 염증성 매개체들의 방출에 필요한 신호전달 경로를 이끌어낸다<sup>29</sup>. 하위 신호전달 기전 중 PLCγ은 LAT와 직간접적으로 상호작용을 하면서 비만세포의 탈과립을 조절하는데 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져있다. 외부 항원에 의한 비만세포의 탈과립 과정에서 FcεRI 신호전달 기전 중 하위 신호전달 체계 중 하나에 해당되는 MAP kinase와 Akt는 PI3K 활성화의 지표로서, 사이토카

인 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>30</sup>. 본 연구에서 항원에 의해 비만세포의 탈과립을 유도하고, 유백피 에탄올 추출물(Ulmus)의 신호전달 체계에 대하여 그 효능을 살펴 본 바, 유백피 에탄올 추출물은 arachidonic acid의 대사에 관여하는 COX-2와 cPLA2의 인산화를 억제하였으며(Fig. 5A), 초기 신호전달에 관여하는 Lyn, Syk, PLCγ의 단백질 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 Akt 및 ERK에 대한 인산화 억제 효과를 살펴본 바, 유백피 에탄올 추출물은 Akt의 인산화를 억제하였지만, ERK의 인산화는 억제하지 못한 것으로 나타났다(Fig. 5B).

이상의 결과들로 종합적으로 살펴볼 때 유백피 에탄올 추출물은 DNP-HSA로 자극한 RBL-2H3 세포에서 화학적 매개물질을 비롯한 염증성 사이토카인의 생성을 농도의존적으로 유의하게 억제함으로써 염증성 알레르기 억제에 대한 효능을 가지고 있음을 보여준다.

## V. 결론

본 연구에서는 종합적으로 살펴볼 때 유백피 에탄올 추출물은 RBL-2H3 비만세포에서 anti-DNP-IgE-antigen complex에 의한 알레르기 염증반응에 대한 조절효과를 조사해본 결과 활성화된 비만세포로부터 분비되는 beta-hexosaminidase을 비롯한 histamine을 유의적으로 감소시켰으며, FcεRI의 응집을 매개로 한 초기 신호 전달과정에 해당되는 Lyn-Syk-PLCγ 및 cPLA2의 발현양을 억제하였으며, 이는 아라키돈산 대사에 의한 COX-2 및 PGD2의 분비를 억제하는 것으로 나타났으며, 또한 FcεRI의 하위 신호전달 기전에 해당하는 Akt의 인산화를 억제함으로써, 유백피 에탄올 추출물은 탈과립된 비만세포로부터 분비되는 cytokine의 일종인 TNF-α, IL-4 및 IL-6의 분비를 유의적으로 감소시켰다. 이러한 결과를 바탕으로 유백피 에탄올 추출물은 비만세포의 활성화에 따른 알레르기 염증 반응을 억제하는 효능이 있으므로, 항알레르기 후보소재로서 개발의 가치가 있는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2021년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구로(No. 2021R1C1C1012018), 이에 감사드립니다.

## References

1. Dykewicz MS, Fineman S, Nicklas R, Lee R, Blessing-Moore J, Li JT. Executive summary of joint task force practice parameters on diagnosis and management of rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998;81:463-468.
2. Korean Journal of Asthma, Allergy and Clinical Immunology. *Asthma and Allergy disease.* Seoul : koonja publisher. 2002;66:431-433.
3. Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med.* 1993; 328(4): 257-265.
4. KM Ahn. Role of mast cell in allergic inflammation and innate immunity. *Korean Journal of Pediatrics.* 2004;47:11-15.
5. Poole JA, Rosenwasser LJ. The role of immunoglobulin E and immune inflammation : implications in allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005;5(3):252-258.
6. Lin K, Huang D, Huang D, Tzeng S and Lin W. Inhibition of ampk through lyn-syk-akt enhances fc  $\epsilon$  ri signal pathways for allergic response. *J Mol Med.* 2016;94:183-194.
7. Ahn DK, Nac HS. Oriental medicine and immunology. Paju : openbooks. 1994:15-48.
8. Jun CD, Pae HO, Kim YC, Jeong SJ, Yoo JC, Lee EJ, Choi BM, Chae SW, Park RK, Chung HT. Inhibition of nitric oxide synthesis by butanol fraction of the methanol extract of *Ulmus davidiana* in murine macrophages. *J Ethnopharmacol.* 1998;62:129-135.
9. Choi SY, Lee S, Choi WH, Lee Y, Jo YO, Ha TY. Isolation and anti-inflammatory activity of Bakuchiol from *Ulmus davidiana* var. japonica. *J Med Food.* 2010;13:1019-1023.
10. Lee SJ, Lim KT. Glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* Nakai regulates expression of iNOS and COX-2 in vivo and in vitro. *Food Chem Toxicol.* 2007;45:990-1000.
11. Kim KS, Lee SD, Kim KH, Kil SY, Chung KH, Kim CH. Suppressive effects of a water extract of *Ulmus davidiana* Planch (*Ulmaceae*) on collagen-induced arthritis in mice. *J Ethnopharmacol.* 2005;97:65-71.
12. Zheng MS, Li G, Li Y, Seo CS, Lee YK, Jung JS, Song DK, Bae HB, Kwak SH, Chang HW, Kim JR, Son JK. Protective constituents against sepsis in mice from the root barks of *Ulmus davidiana* var. japonica. *Arch Pharm Res.* 2011; 34:1443-1450.
13. Kim JP, Kim WG, Koshino H, Jung J, Yoo ID. Sesquiterpene O-naphthoquinones from the root bark of *Ulmus davidiana*. *Phytochemistry.* 1996;43: 425-430.
14. Busse WWW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J. Med.* 2001;44(5):350-62.
15. Moon SH, Jang HJ, Park YS, Lee WY, Lim DH, Kim JH. Fractional exhaled nitric oxide in Korean children with allergic rhinitis. *Allergy Asthma Respir Dis.* 2015;3(6):439-445.
16. Woo HS, Kim CH. The Review of Oriental Medical Therapy on Allergic Rhinitis. *J Korean Oriental Med.* 2006;27(1):155-64.
17. Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344(1): 30-37.
18. Gurish MF, Austen KF. The diverse roles of mast cells. *J Exp Med* 2001; 194(1): F1-5.
19. Lee E, Chol EJ, Cheong H, Kim YR, Ryu SY, Kim KM. Anti-allergic actions of the leaves of *castanea crenata* and isolation of an active component responsible for the inhibition of mast cell degranulation. *Archives of Pharmacal Research.* 1999;22:320-323.
20. 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.
21. Salamon P, Shoham NG, Gavrieli R, Wolach B, Mekori YA. Human mast cells release interleukin-8 and induce neutrophil chemotaxis on contact with activated T cells. *Allergy.* 2005;60:1316-1319.
22. Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev.* 2000;173: 131-140.



23. Toru H, Pawankar R, Ra C, Yata J, Nakahata T. Human mast cells produce IL-13 by high-affinity IgE receptor cross-linking: enhanced IL-13 production by IL-4-primed human mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102:491-502.
24. Fukui, H. Progress in Allergy Signal Research on Mast Cells: Up-Regulation of Histamine Signal-Related Gene Expression in Allergy Model Rats. *J Pharmacol Sci.* 2008;106(3):325-331.
25. Boyce, J.A. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev.* 2007;217(1):168-185.
26. Murphy, R.C., Gijon, M.A. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J.* 2007; 405(3):379-395.
27. Ra C, Jouvin MH, Kinet JP. 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.* 1989;264(26):15323-15327.
28. Paolini R, Jouvin MH, Kinet JP. Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature.* 1991;353:855-858.
29. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6:218-230.
30. Theoharides TC, Kalogeromitros D. The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006;1088:78-99.