

석류 추출물에 의한 인간호염구(KU812F 세포)의 탈과립 억제효과

박경태 · 심선엽¹ · 전순실^{2,*}

가야대학교 호텔조리영양학과, ¹부경대학교 해양생명과학연구소, ²순천대학교 식품영양학과

Inhibitory Effects of *Punica granatum* L. Extracts on Degranulation in Human Basophilic KU812F Cells

Kyong-Tae Park, Sun-Yup Shim¹, and Soon-Sil Chun^{2,*}

Department of Culinary Arts & Nutrition, Kaya University

¹Institute of Marine Life Science, Pukyong National University

²Department of Food and Nutrition, Suncheon National University

Abstract *Punica granatum* (PG) evidences a variety of physiological properties, including anti-diabetic, anti-cancer, anti-inflammatory, anti-microbial, and anti-oxidative activities. Using the human basophilic KU812F cells, the inhibitory effects of the methanolic extract of PG seed, shell, and juice on calcium ionophore, A23187-induced degranulation were assessed. All of the PG extracts inhibited A23187-induced intracellular Ca²⁺ levels, β-hexosaminidase, and histamine release in a dose-dependent manner. These results showed that all of the PG extracts are potent inhibitors of degranulation in allergic reactions, via the suppression of Ca²⁺ influx.

Key words: *Punica granatum* L., calcium influx, histamine, β-hexosaminidase, KU812F

서 론

석류(*Punica granatum* L.)는 Punicaceae과에 속한 낙엽소교목으로서 예로부터 열매와 줄기껍질과 뿌리의 껍질을 건조하여 설사, 이질, 구내염, 장출혈, 치통, 천식, 백일해, 무좀의 치료를 위한 한약재로 쓰여 왔으며, 이란을 중심으로 한 아시아 서남부 및 인도의 북서부가 자생지이다. 현재는 아열대 및 열대 각지에 널리 퍼져있는 식물로서, 생과일주스로 소비되거나, 주스, 잼, 시럽 및 주류로 가공되어 이용되기도 한다. 또한 석류 추출액 중에는 anthocyanin과 phenol성 화합물을 포함한 플라보노이드 성분이 풍부한 것으로 알려져 있으며, 이에 대한 항암, 항산화, 항염증, 항당뇨, 항산화, 항미생물 활성이 있는 것으로 보고되고 있다(1-7). 그러나 석류 추출물에 의한 비만세포 및 호염구 세포의 탈과립 억제 효과에 대한 연구 결과는 지금까지 보고된 바가 없다.

알레르기 질환은 면역계의 방어기능이 인체에 유해하게 작용하는 것으로, 무해한 항원에 응답하여, 특이적인 면역글로블린 E(IgE)를 생성한 개체가 다시 같은 항원에 노출되어 일어나는 일련의 반응을 말한다. 알레르기 반응은 크게 4가지 유형으로 나눌 수 있다. 이 중 통상 알레르기 질환으로 일컬어지는 유형은 제 I 형으로, 알레르기 관련 세포에서 분비되는 각종 화학매체들의 직·간접적인 약리작용과 이로 인해 야기되는 염증 반응에 의한

것으로서, 아토피성 피부염, 기관지 천식, 알레르기성 비염 및 식품 알레르기 등을 들 수 있다(8-10).

호염구 및 비만세포는 IgE를 매개로 하는 알레르기 반응에 있어 효과세포로서 중요한 역할을 담당하고 있다. 이들 세포 표면에 발현하고 있는, 고친화성 IgE 수용체인 FcεRI이 IgE 및 특이적 알레르겐과 결합함으로써, 세포질 내 칼슘농도가 상승하고, 탈과립이 일어나, 여러 가지 염증매개인자를 분비하게 된다. 이들 염증 매개인자는 혈관을 이완시키거나, 혈관투과도를 증가시키고, 기관지를 수축시키는 역할을 한다(11,12).

Histamine과 β-hexosaminidase는 비만세포가 항원 또는 면역학적인 자극에 의해 활성화되었을 때 분비되는 것으로, 일반적으로 *in vitro* 알레르기 반응에 관한 실험적인 연구의 탈과립 마커로 사용되고 있다(13). KU812F 세포는 백혈병 환자 유래 세포로서, 세포표면에 고친화성 IgE 수용체(FcεRI)를 발현하고 있고, 호염구 세포주로서 알려져 있으며, 본 세포주를 이용한 알레르기 반응 조절에 관한 많은 연구결과가 보고되고 있다(14,15). 따라서, 염증매개인자인 histamine 및 β-hexosaminidase 유리에 관한 연구에 있어, 그 효과가 아직 알려져 있지 않은 성분에 대한 연구를 위해 KU812F 세포는 좋은 수단이 될 것으로 생각된다. Calcium ionophores, neuropeptides 및 compound 48/80은 비만세포 탈과립을 자극하는 것으로 알려져 있다(16-17). 최근, 식품추출물 및 단일 성분에 관한 비만세포의 탈과립 억제에 관한 많은 연구가 보고되고 있지만(18-24), 석류에 의한 보고는 아직 이루어지지 않고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 인간 호염구 세포인, KU812F 세포의 calcium ionophore인 A23187자극에 의해 일어나는 세포 내 탈과립에 있어, 석류피, 석류씨, 및 석류즙의 메탄올 추출물에 의한 저해효과에 대해 알아보려고 하였다.

*Corresponding author: Soon-Sil Chun, Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Korea

Tel: 82-61-750-3654

Fax: 82-61-752-3657

E-mail: css@snu.ac.kr

Received September 30, 2008; revised October 30, 2008;

accepted October 30, 2008

재료 및 방법

재료 및 시약

석류는 전라남도 고흥군(2007년산), RPMI-1640배지, fetal bovine serum(FBS) 및 항생제와 antimycotics는 HyClone사(Logan, UT, USA), A23187, Fura 2-AM, kank's balanced salt solution (HBSS), histamine, *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide(NP-GlcNAc), *O*-phthalaldehyde(OPA), hydroxyethylpiperazinylethane-sulfonic acid(HEPES) 및 dimethylsulfoxide(DMSO)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA), Celltiter 96[®]AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay는 Promega사(Madison, WI, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

시료의 추출

석류씨와 석류피는 건조 후 분말화하여, 석류즙은 생석류를 짜서 즙을 낸 후, 여과하여 시료로 사용하였다. 시료에 10배의 메탄올을 첨가하여 4시간 동안 3회 반복 추출하여, 원심분리 한 후 여과하였다. 여과액을 회전식 진공농축기로 감압 농축한 후, 동결건조하여 -20°C에서 보관하면서, DMSO에 용해하여 본 실험에 사용하였다.

세포배양, 시료처리

본 실험에 사용한 호염기성 세포주 KU812F는 ATCC로부터 분양받아, 10% FBS, 10mM HEPES 및 항생제와 antimycotics가 첨가된 RPMI-1640 배지에, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였으며, 2-3일 간격으로 계대 배양하면서 사용하였다. 시료처리를 위해 KU812F 세포에 DMSO로 희석한 여러 가지 농도의 석류 추출물과 무혈청 배양 조건하에서 24시간 배양하였다.

세포독성 측정

석류 추출물에 의한 세포독성은 Celltiter 96[®]AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay를 사용하여 측정하였다. KU812F 세포를 2.5×10⁴ cells/plate의 농도로 분주하여, DMSO로 희석한 각 농도별 석류 추출물과 함께 무혈청 조건하에서 24시간 동안 배양하였다. 세포독성을 측정하기 위해, Celltiter 96[®]AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay 시약을 첨가하여, 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader(Molecular Devices, VersaMax, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여, 490 nm에서 측정하였다. 세포 생존율은 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 나타내었다.

Calcium 측정

세포 내 칼슘농도는 칼슘과 반응성있는 형광물질인 Fura 2-AM을 이용하여 측정하였다. KU812F 세포를 석류 추출물과 24시간 배양한 후, 2.0 μ M의 Fura 2-AM/Tyrode 완충용액(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.4 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 1.8 mM CaCl₂)과 37°C에서 30분간 배양하였다. HBSS로 세척한 세포를 5 μ M A23187/Tyrode 완충용액의 농도로 37°C에서 30분간 자극한 후, microplate fluorescence reader(BioTek, FLx800, Winooskin, VT, USA)를 이용하여 Ex 파장 360 nm 및 Em 파장 528 nm에서 측정하였다.

히스타민 측정

석류 추출물이 처리된 세포를 회수하여, phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후, 5 μ M A23187/Tyrode 완충용액으로 자

극하였다. 상층액에 1 N NaOH 및 0.2% OPA를 첨가하여 얼음 위에서 40분간 반응시켜, 3 N HCl의 첨가에 의해 반응을 정지시킨 후, 형광강도를 microplate fluorescence reader(BioTek)를 이용하여 Ex 파장 360 nm 및 Em 파장 460 nm에서 측정하였다. 세포 내 히스타민 농도는 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 나타내었다.

β -Hexosaminidase 측정

각각의 석류 추출물을 처리한 세포를 회수하여 PBS로 세척한 후, 5 mM A23187/Tyrode 완충용액으로 자극하여, 37°C에서 30분간 반응시켰다. 원심분리하여 상층액과 침전물을 분리하였고, 침전물은 0.1% Triton X-100이 첨가된 lysis 완충용액을 넣어, 얼음 위에서 30분간 반응시켰다. 상층액과 추출물에 0.4 M citrate와 0.2 M phosphate 완충용액, pH 4.5에 용해시킨 2 mM NP-GlcNAc를 첨가하여 37°C에서 40분간 반응시킨 후, 0.2 M glycine-NaOH, pH 10.7을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응액을 microplate reader(Molecular Devices)를 이용하여, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상층액 내의 β -hexosaminidase 활성은 다음과 같이 구하였다.

$$\beta\text{-Hexosaminidase 활성} = \frac{\text{A23187 자극 세포의 상층액 OD}}{\text{총 세포 추출물 OD}} \times 100$$

통계학적 분석

대조군과 PG 추출물 처리군의 실험결과에 대한 통계처리는 Student's t-test로 비교하였다. 통계처리 후 *p*값이 0.05 미만일 경우(*p*<0.05) 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

KU812F 세포에 대한 석류 추출물의 세포독성효과

KU812F 세포의 석류씨, 석류피 및 석류즙의 메탄올 추출물에 대한 세포독성을 측정하였다. KU812F 세포에 각각의 석류 추출물을 여러 가지 농도로 첨가하여, 24시간 처리한 후, 세포 생존율을 Celltiter 96[®]AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay를 이용하여 측정된 결과를 대조군에 대한 실험군의 세포 생존율을 백분율로 나타내었다. Fig. 1과 같이, 각각의 석류 추출물은 0-100 μ g/mL의 농도에서 어떠한 독성도 나타나지 않았으므로, 본 실험에 사용하였다.

세포 내 칼슘 유입 억제 효과

세포 내 칼슘 유입은 비만세포 및 호염구 탈과립에 있어 중요하다(12). 세포 내로의 칼슘 유입에 있어, 각각의 석류 추출물의 저해효과를 확인하기 위해, 24시간 동안 각각의 석류추출물을 0, 10, 50 및 100 μ g/mL 농도로 배양시킨 KU812F 세포를, Fura 2-AM과 반응시킨 후, A23187로 자극하여, 형광광도를 측정하였다. 그 결과, 각각의 석류 추출물이 처리된 세포를, 처리되지 않는 세포와 비교하였을 때, 세포 내 칼슘 농도가 농도 의존적으로 감소하는 결과를 나타내었으며, 석류피, 석류씨, 석류즙의 순으로 세포 내 칼슘 유입 저해효과가 크다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

탈과립에 있어 저해효과

세포 내 칼슘 농도 상승은 비만 세포 및 호염구 내 히스타민과 β -hexosaminidase를 유리시킨다(8). 호염구 탈과립에 있어, 석류 추출물에 의한 억제효과를 검토하기 위해, KU812F 세포를 석

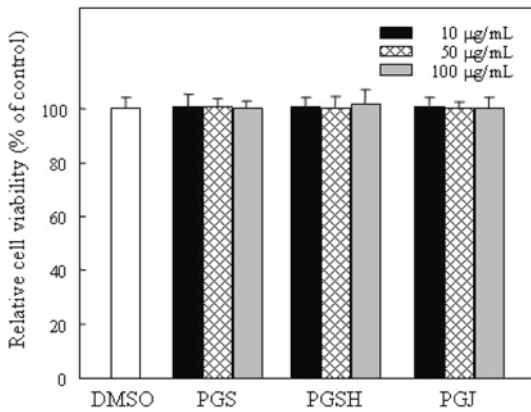


Fig. 1. Cytotoxic effects of PG extracts on KU812F cells. KU812F cells were cultured in the presence of different concentrations of PG extracts for 24 hr, and the cell viabilities were determined by MTS assay. Each determination was made in triplicate and data shown are mean±SD. DMSO, dimethylsulfoxide; PGS, punica granatum seed; PGSH, punica granatum shell; PGS, punica granatum juice.

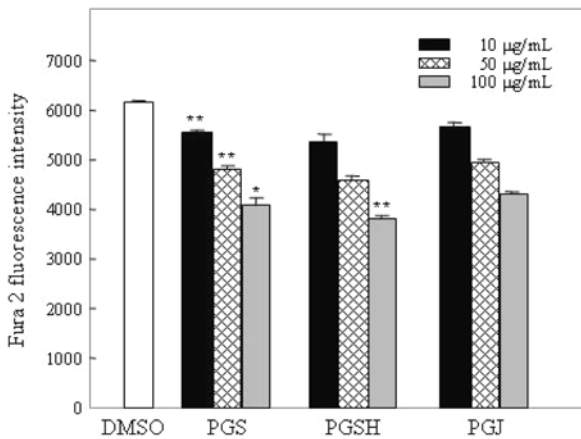


Fig. 2. Effects of PG extracts on intracellular Ca²⁺ concentration. KU812F cells were treated in the presence of different concentrations of PG extracts (0, 10, 50, and 100 mg/mL) for 24 hr. The cells were incubated with Fura 2-AM, and stimulated with A23187. Intracellular Ca²⁺ concentration was spectrofluorometrically determined. Each value represents mean±SD of three different experiments. *Values are significantly different from control (**p*<0.05, ***p*<0.01).

류 추출물을 처리하여, A23187로 자극한 후, 유리되는 히스타민과 β-hexosaminidase 활성을 측정하였다. 10, 50, 100 µg/mL 농도의 석류 추출물이 처리된 세포에서 유리되는 히스타민함량은 석류씨는 89, 79, 60%, 석류피는 86, 76, 63%, 석류즙은 91, 82, 74%를 각각 나타내었고, 농도 의존적으로 감소하였으며, 석류피, 석류씨, 석류즙의 순으로 저해효과가 크다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3). 또한 석류 추출물이 처리되지 않는 세포의 β-hexosaminidase 함량은 24.6%를 나타내었고, 10, 50, 100 µg/mL 농도의 석류 추출물이 처리된 세포에서는, 석류씨 23, 20, 18%, 석류피 21, 18, 16%, 석류즙 23, 21, 20%를 각각 나타내었으며, 농도 의존적으로 감소하였고, 석류피, 석류씨, 석류즙의 순으로 저해효과가 크게 나타났다(Fig. 4). 이는 세포 내 칼슘농도의 억제 효과가 같은 경향을 나타내는 것으로, 각각의 석류추출물이 알레르기 반응에 있어, 세포 내 칼슘농도를 억제함으로써, 히스타민과 β-hexosaminidase의 유리를 억제시킨다는 것을 알 수 있었다.

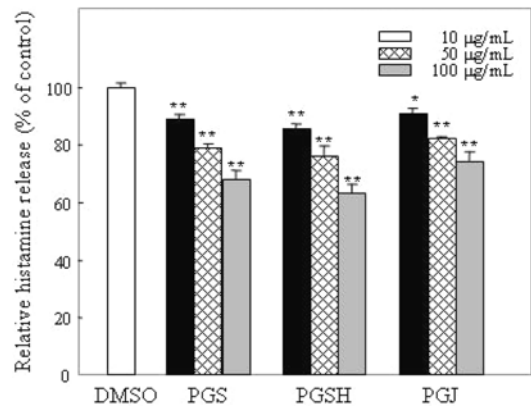


Fig. 3. Effects of PG extracts on histamine release. KU812F cells were treated in the presence of different concentrations of PG extracts (0, 10, 50, and 100 mg/mL) for 24 hr and stimulated with A23187. Histamine content was spectrofluorometrically determined. Each value represents the mean±SD of three different experiments. *Values are significantly different from control (**p*<0.05, ***p*<0.01).

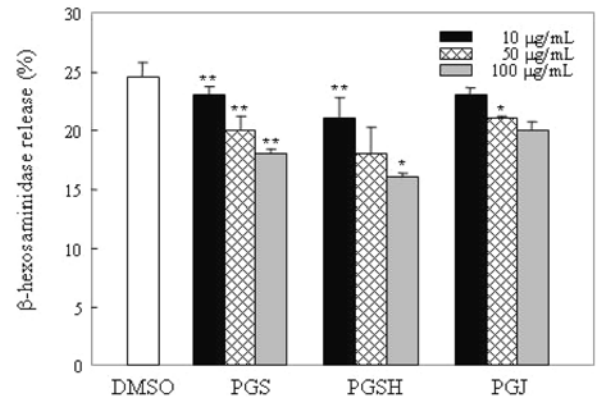


Fig. 4. Effects of PG extracts on β-hexosaminidase release. KU812F cells were treated in the presence of different concentrations of PG extracts (0, 10, 50, and 100 mg/mL) for 24 hr, stimulated with A23187, and β-hexosaminidase content was determined. Each value represents the mean±SD of three different experiments. *Values are significantly different from control (**p*<0.05, ***p*<0.01).

예로부터, 석류는 설사, 이질, 구내염, 치통, 천식, 백일해, 무좀 및 장출혈의 치료를 위한 한약재로 사용되어 왔다(1). 석류는 강한 항산화, 항염증 및 항암효과를 나타내는 폴리페놀성 화합물, 특히 punicalagins(ellagitannins)을 함유하고 있다(25-27). 또한, 다양한 약리 효과가 갖는 성분이 각 부위별로 함유되어 있으며, 함량은 나무 품종에 따라서도 그 차이가 있는 것으로 보고 되고 있다(28-30). 항 알레르기 활성을 갖는 물질 탐색의 일환으로, 석류를 각 부위별로 나누어, 메탄올로 추출하여, 알레르기 반응 조절 연구에 많이 이용되는 인간 호염구인 KU812F 세포에 있어, 석류 추출물이 KU812F 세포의 탈과립을 저해한다는 것을 알 수 있었다.

알레르기 반응은 비만세포 및 호염기구 표면에 발현하고 있는 고친화성 IgE 수용체인 FcεRI과 알레르겐 및 특이적 항체와의 결합에 의해 일어나며, 항원응집은 protein tyrosine kinases, Syk와 Lyn의 인산화를 초래하여, protein kinase C(PKC)의 translocation 및 calcium influx를 일으켜, 세포 내 탈과립을 야기시킴으로써 염증매개인자인, 히스타민과 β-hexosaminidase를 분비하게 된다(8,31-

35). 따라서, 석류에 의한 보다 구체적인 연구를 위해, 석류로부터 항알레르기 활성을 갖는 단일 성분을 분리하여, 이에 대한 세포 내 신호 전달 제어 기전에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

석류는 항당뇨, 항암, 항산화, 항미생물 및 항염증 효과와 같은 다양한 생리적 특성을 가지고 있다. 석류의 씨, 껍질 및 즙의 배탄을 추출물의 항알레르기 활성을 조사하기 위해, 인간 호염구인 KU812F 세포에 있어, A23187로 유도된 탈과립에 있어 저해 효과를 검토하였다. 세포를 각각의 추출물로 처리하여, A23187로 자극한 후, 세포 내 칼슘농도, β -hexosaminidase 및 히스타민 함량을 조사하였다. 각각의 석류 추출물은 A23187에 의해 유도된 세포 내 칼슘 농도, 히스타민 및 β -hexosaminidase 유리를 농도 의존적으로 감소시켰다. 이러한 결과는 석류 추출물은 알레르기 반응에 있어 칼슘 유입의 억제제를 통한 탈과립의 강력한 저해제로서의 가능성을 제시하고 있다.

문 헌

- Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agr. Food Chem.* 54: 980-985 (2006)
- Ahn DG. Illustrated book of korean medicinal herbs. Kyohak Publishing Co., Seoul. p 742 (2000)
- Jung KH, Kim MJ, Ha E, Uhm YK, Kim HK, Chung JH, Yim SV. Suppressive effect of Punica granatum on the production of tumor necrosis factor (TNF) in BV2 microglial cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1258-1261 (2006)
- Lansky EP, Newman RA. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. Ethnopharmacol.* 109: 177-206 (2007)
- Li Y, Qi Y, Huang TH, Yamahara J, Roufogalis BD. Pomegranate flower: A unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR- α - γ activator properties. *Diabetes Obes. Metab.* 10: 10-17 (2008)
- Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J. Agr. Food Chem.* 54: 8956-8961 (2006)
- Koh JH, Hwang MO, Moon JS, Hwang SY, Son JY. Antioxidative and antimicrobial activities of pomegranate seed extract. *Korean J. Food Cookery Sci.* 21: 171-179 (2005)
- Blank U, Rivera J. The ins and outs of IgE-dependent mast cell exocytosis. *Trends Immunol.* 25: 266-273 (2004)
- Kinet JP, 1999. The high affinity IgE receptor (Fc ϵ RI): From physiology to pathology. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 931-972 (1999)
- Kinet JP, Blank U, Brini A, Jouvin MA, Kuster H, Mejan O, Ra C. The high affinity receptor for immunoglobulin E: A target for therapy of allergic diseases. *Int. Arch. Aller. A. Imm.* 94: 51-55 (1991)
- Schroeder JT, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. The role of the basophil in allergic inflammation. *Allergy* 50: 463-472 (1995)
- 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.* 259: 7129-7136 (1984)
- Matsuda H, Morikawa T, Ueda K, Managi H, Yoshikawa M. Structural requirement of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF- α and IL-4 production from RBL-2H3 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 3123-3128 (2002)
- Yanagihara Y, Kajiwara K, Basaki Y, Ikiwawa K, Akiyama K, Saito H. Induction of human IgE synthesis in B cells by a basophilic cell line, KU812. *Clin. Exp. Immunol.* 108: 295-301 (1997)
- Kishi K. A new leukemia cell line with Philadelphia chromosome characterized as basophile precursors. *Leuk. Res.* 9: 381-390 (1985)
- Chai OH, Lee YH, Han EH, Kim HT, Lee MS, Song CH. Atrial natriuretic peptide induces rat peritoneal mast cell activation by cGMP-independent and calcium uptake-dependent mechanism. *Exp. Mol. Med.* 32: 179-186 (2000)
- Chai OH, Kim KH, Lee YH, Kim JG, Baik BJ, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH. Histamine release induced by dendroaspis natriuretic peptide from rat mast cells. *Peptides* 22: 1421-1426 (2001)
- Kim SH, Choi CH, Kim SY, Eun JS, Shin TY. Anti-allergic effects of *Artemisia iwayomogi* on mast cell-mediated allergy model. *Exp. Biol. Med.* 230: 82-88 (2005)
- Kimata M, Shichijo M, Miura T, Serizawa I, Inagaki N, Nagai H. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin. Exp. Allergy* 30: 501-508 (2000)
- Segawa S, Yasui K, Takata Y, Kurihara T, Kaneda H, Watari J. Flavonoid glycosides extracted from hop (*Humulus lupulus* L.) as inhibitor of chemical mediator release from human basophilic KU812 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 60384-60388 (2006)
- Sugiura Y, Takeuchi Y, Kakinuma M, Amano H. Inhibitory effects of seaweeds on histamine release from rat basophile leukemia cells (RBL-2H3). *Fisheries Sci.* 72: 1286-1291 (2006)
- Tachibana H, Sunada Y, Miyase T, Sano M, Maeda-Yamamoto M, Yamada K. Identification of a methylated tea catechin as an inhibitor of degranulation in human basophilic KU812 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 452-454 (2000)
- Tokura T, Nakano N, Tomonobu I, Matsuda H, Nagasako-Akazome Y, Kanda T, Ikeda M, Okumura K, Ogawa H, Nishiyama C. Inhibitory effects of polyphenol-enriched apple extracts on mast cell degranulation in vitro targeting the binding between IgE and Fc ϵ RI. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1974-1977 (2005)
- Yamada P, Isoda H, Han JK, Talorete TP, Yamaguchi T, Abe Y. Inhibitory effect of fulvic acid extracted from Canadian sphagnum peat on chemical mediator release by RBL-2H3 and KU812 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 1294-1305 (2007)
- Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. Anthocyanin- and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- κ B pathway and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int. J. Cancer* 24: 927-936 (2003)
- Kawaii S, Lansky EP. Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *J. Med. Food* 7: 13-18 (2004)
- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. *In vitro* antiproliferative, apoptotic, and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem.* 16: 360-367 (2005)
- Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J. Chromatogr. A* 27: 87-93 (2000)
- Choi OK, Chung KS, Cho GS, Hwang MO, Yoo YS. Proximate compositions and selected phytoestrogens or Iranian black pomegranate extract and its products. *Korean J. Food Chem.* 15: 119-125 (2002)
- Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *Altern. Med. Rev.* 13:128-144 (2008)
- Siraganian RP, Zhang J, Suzuki K, Sada K. Protein tyrosine kinase Syk in mast cell signaling. *Mol. Immunol.* 38: 1229-1233 (2002)
- Amoui M, Drrova L, Tolar P, Draber P. Direct interaction of Syk and Lyn protein tyrosine kinases in rat basophilic leukemia cells activated via type Fc ϵ receptors. *Eur. J. Immunol.* 27: 321-328 (1997)
- Eiseman E, Bolen JB. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature* 355: 78-

- 80 (1992)
34. Hata D, Kawakami Y, Inagaki N, Lantz CS, Kitamura T, Khan WN, Maeda-Yamamoto M, Miura T, Han W, Hartman SE. Involvement of Bruton's tyrosine kinase in FcεRI-dependent mast cell degranulation and cytokine production. *J. Exp. Med.* 187: 1235-1247 (1998)
35. Nadler M, Matthews J, Turner SA, Kinet JP. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor FcεRI coupling form to function. *Adv. Immunol.* 76: 325-355 (2000)