

Effect of Anthocyanidin on MUC5AC and MUC5B Expression in Airway Epithelial Cells

Jun Hyeok Lee¹, Gui Ok Kim¹, Hyung Gyun Na¹, Na Kyung Park¹,
Hoon-sung Kim¹, Joon Kon Kim¹, Ji Hoon Ahn¹, Yo Han Choi¹,
Si-Youn Song¹, Chang Hoon Bae¹ and Yong-Dae Kim^{1,2}

¹Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu; and

²Center for Respiratory Disease, Yeungnam University Medical Center, Daegu, Korea

호흡기 상피세포에서 MUC5AC와 MUC5B 발현에 대한 Anthocyanidin의 효과

이준혁¹ · 김귀옥¹ · 나형균¹ · 박나경¹ · 김훈성¹ · 김준곤¹ · 안지훈¹ · 최요한¹ · 송시연¹ · 배창훈¹ · 김용대^{1,2}

영남대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실, ¹ 영남대학교병원 호흡기전문질환센터²

Received March 11, 2013

Revised April 18, 2013

Accepted April 21, 2013

Address for correspondence

Yong-Dae Kim, MD, PhD

Department of Otorhinolaryngology-

Head and Neck Surgery,

College of Medicine,

Yeungnam University,

170 Hyeonchung-ro, Nam-gu,

Daegu 705-703, Korea

Tel +82-53-620-3781

Fax +82-53-628-7884

E-mail ydkim@med.yu.ac.kr

Background and Objectives Naringenin and delphinidin are types of anthocyanidin, which are flavonoids and thus have anti-inflammatory property. Moderate consumption of natural dietary naringenin and delphinidin is believed to do anti-inflammatory action, but the action mechanism is unclear. Therefore, this study aimed to investigate the effects of naringenin and delphinidin on interleukin-1 β (IL-1 β)- and lipopolysaccharide (LPS)-induced MUC5AC and MUC5B expressions in airway epithelial cells.

Materials and Method In NCI-H292 cells and cultured nasal polyp epithelial cells, the effects of naringenin and delphinidin on IL-1 β - and LPS-induced MUC5AC and MUC5B expressions were analyzed by real-time polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay.

Results Delphinidin attenuated IL-1 β - and LPS-induced MUC5AC and MUC5B mRNA and glycoprotein expression in a dose-dependent pattern in NCI-H292 cells and in cultured nasal polyp epithelial cells. Naringenin partially attenuated IL-1 β - and LPS-induced MUC5AC and MUC5B mRNA and glycoprotein expression at a high dose.

Conclusion These results suggest that delphinidin attenuates MUC5AC and MUC5B expressions in the airway epithelial cells. Between anthocyanidin and delphinidin, delphinidin exhibits greater potential as an ideal therapeutic agent for the control of mucus-hypersecretion in the treatment of airway inflammatory diseases.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2013;56:291-6

Key Words Airway epithelial cells · Delphinidin · MUC5AC · MUC5B · Naringenin.

서론

점액(mucus)은 호흡기 상피 표면을 덮고 있는 물질로서 적절한 습도를 유지해주고 윤활역할을 하며, 외부로부터 유입되는 물질에 대한 방어 작용을 한다. 그러나 만성 염증성 호흡기질환에서는 점액의 분비가 과도하게 일어나거나 그 성상이 변화하여 병의 경과를 악화시킬 수 있어, 점액의 과다 분비를 조절하는 것이 매우 중요하다.¹⁾ 점액의 성상을 결정하는 것은

점액 내의 당단백인 점소(mucin)로 점액유전자에 의해 생성이 조절된다. 호흡기에서 발현되는 중요한 점액유전자는 MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B와 MUC8로 알려져 있다.²⁾ 이 중에서 분비형 점소(secretory mucin)인 MUC5AC 및 MUC5B의 유전자 발현에 대해 이비인후과 영역에서 중요성이 부각되고 있다.

사람의 코 점막 상피세포에서 점액의 분비를 증가시키고 점액 유전자 발현을 증가시키는 여러 가지 물질이 존재한다. 그

중 interleukin-1 β (IL-1 β)는 대식세포와 내피세포에서 생산되는 모노카인으로 T세포와 B세포, 섬유아세포의 증식, 프로스타글란딘 E2의 생산, 류마티스관 관절염과 같은 여러 가지 반응에 관계한다.³⁾ Lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성 세균의 외막 성분으로 인체 내에서 대식세포를 자극시켜 사이토카인을 유도하여 여러 염증 반응을 일으킨다.³⁾

Anthocyanidin은 꽃이나 과일, 곡류의 적색, 청색, 자색을 나타내는 flavonoid계의 수용성 색소로 그 종류가 다양하며 생체 내에서의 역할도 광범위하다.⁴⁾ 그 중 delphinidin과 naringenin은 일상생활에서 흔히 볼 수 있는 꽃이나 과일, 채소에 다량으로 존재하고, 세포 내에서 항염증, 항산화, 세포자살 및 면역시스템 조절 등의 작용에 관계하는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁹⁾ 그러나 염증반응에 의한 기도점액 과분비 과정에서 anthocyanidin이 점액유전자 발현에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구는 아직까지 국내에 보고된 바가 없다.

따라서 호흡기 상피세포인 비용상피세포와 NCI-H292 세포에서 naringenin과 delphinidin이 MUC5AC 및 MUC5B 유전자의 발현과 점액 단백질 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

재 료

LPS와 naringenin 및 delphinidin은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서, IL-1 β 는 R&D system(Wiesbaden-Nordenstadt, Germany)에서, RPMI 1640 medium은 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA), fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone Laboratories(Logan, UT, USA)에서 구입하였다. MUC5AC(MS-145-P1) 일차항체는 Neomarker(Fermont, CA, USA)에서 구입하였으며, MUC5B(SC-23024) 일차항체, anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase(HRP)-conjugated 일차항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

세포 배양 및 처리

비용조직은 만성 비·부비동염 및 비염을 가진 10명의 환자에서 내시경적 부비동 수술 과정에서 채취하였다. 천식과 알레르기성 비염을 동반하지 않으며 최근 4주 동안 비·부비동염의 급성 악화나 약물 투여를 하지 않은 경우를 대상으로 하였다. 채취한 비용조직을 즉시 penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 μ g/mL를 포함한 phosphate buffered saline(PBS)에 담아 4℃에서 30분간 넣어두었다. PBS로 세척 후 결체조직을 제거하고, 비용상피가 위로 오도록 하여 조직배양 접시에 넣은 후 비용상피가 침수될 정도로 dispase(GIBCO,

Grand Island, NY, USA)를 10 mL 정도 첨가한 후 95%의 산소와 5%의 이산화탄소가 혼합된 환경의 배양기에서 37℃의 온도로 1시간 30분 동안 배양하였다. 이후 15번 수술용 칼로 비용의 상피 표면을 깨끗하게 긁어내어 PBS에 담은 후 200 mesh에 걸러 내고 튜브에 담아 3000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상층부의 PBS를 제거하고 Human Keratinocyte Growth Supplement(HKGS, Cascade Biologics, Portland, OR, USA, 5/500 mL of medium)가 첨가된 EpiLife Medium(Cascade Biologics, Portland, OR, USA) 6 mL를 넣은 후 24-well plate에 1 mL씩 접종하였다. 현미경으로 세포의 양을 확인한 후 2일마다 HKGS를 첨가한 EpiLife Medium으로 배지를 교체하면서 세포가 70~80% 정도로 증식되면 실험에 사용하였다.

사람 폐의 점액상피암 세포주(human pulmonary mucocoeptidermoid carcinoma cell line)인 NCI-H292 세포(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 6-well plate에 1×10^6 cells/well의 농도로 접종한 후 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin과 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 이용하여 95%의 산소와 5%의 이산화탄소가 혼합된 배양기에서 37℃의 온도로 배양하였다.

Anthocyanidin의 효과를 알아보기 위해서 배양된 비용상피세포에는 100 μ M 농도의 naringenin 및 delphinidin을, NCI-H292 세포에는 50 μ M, 100 μ M 농도의 naringenin 및 delphinidin을 전처리 한 후 1시간 뒤에 10 ng/mL의 IL-1 β , 100 ng/mL의 LPS를 각각 투여하였다. 대조군은 동일한 시간 동안 배지에서 비용상피세포와 NCI-H292 세포를 각각 단독으로 배양하였다.

Real-time polymerase chain reaction(PCR) 분석

합성된 cDNA 1 μ L를 대상으로 LC Fast Start DNA Master SYBR Green kit(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 사용하여 real-time PCR을 이용한 점액 유전자 발현 반응을 시행하였다. Real-time PCR은 최종량이 10 μ L가 되게 2.5 mM의 MgCl₂와 최종 농도가 0.5 μ M이 되게 primer를 투여하였으며, 25 ng의 RNA 1 μ L를 이용하여 실험을 수행하였다. 정량적인 PCR은 Light-Cycler(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 사용하여 95℃에서 10초간 변성(denaturation)과정을 거치고 60℃에서 5초간 결합(annealing)반응을 시킨 후, 72℃에서 10초간 연장(extension)반응하였고, 이러한 과정을 45회 반복하였다. 각 실험에서 증폭된 cDNA의 유무를 확인하기 위하여 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase를 대조 유전자(internal control)로 사용하였으며, 사용한 primer들의 염기서열은 Table 1과 같다. 증폭의 정확도

Table 1. Primers used for polymerase chain reaction amplification

Gene	Primer sequence
MUC5AC	Forward: ATC ACC GAA GGC TGC TTC TGT C Reverse: GTT GAT GCT GCA CAC TGT CCA A
MUC5B	Forward: CAC ATC CAC CCT TCC AAC Reverse: GGC TCA TTG TCG CTG
GAPDH	Forward: CCT CCA AGG AGT AAG ACC CC Reverse: AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

는 변성곡선(melting curve, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)을 사용하여 평가하였다.

면역분석법(Immunoassay)

MUC5AC 및 MUC5B의 점액 단백질의 함량을 측정하기 위해서 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법을 이용하였다. 시료를 처리한 배양된 세포에서 lysis buffer[50 mM Tris·Cl(pH 7.5), 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 1% Triton X-100, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride]로 단백질을 추출하여 정량하였다. 추출한 단백질 100 µg을 96-well plate에 담고 40°C에서 건조될 때까지 방치한 후 plate를 PBS로 3회 세척하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위해 2% bovine serum albumin으로 실온에서 1시간 동안 차단한 후 PBS로 3회 세척한 다음 0.05% Tween 20을 함유한 PBS에 1 : 200으로 희석된 MUC5AC과 MUC5B 일차항체를 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척한 후 HRP-conjugated 이차항체를 0.05% Tween 20을 함유한 PBS에 1 : 5000으로 희석하여 각 well에 첨가하였고, 1시간 후에 각 well을 PBS로 3회 세척하였다. 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine 용액으로 발색한 후, 2N-H₂SO₄를 이용하여 중단시켰다. ELISA reader(EL800®, BIO-TEK Instruments, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선을 이용하여 단백질의 양을 정량하였다.

통 계

통계 처리는 Windows용 SPSS version 10.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 모든 실험은 *p*값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 정하여 Student's *t*-test를 이용하였다.

결 과

NCI-H292 세포와 비용상피세포에서 naringenin과 delphinidin이 IL-1β에 의한 MUC5AC 발현에 미치는 영향

NCI-H292 세포에서 IL-1β로 유도된 MUC5AC의 mRNA 발현과 점액단백의 생성량은 delphinidin을 투여한 군에서는 통계학적으로 의미 있게 감소하였다. Naringenin의 경우에

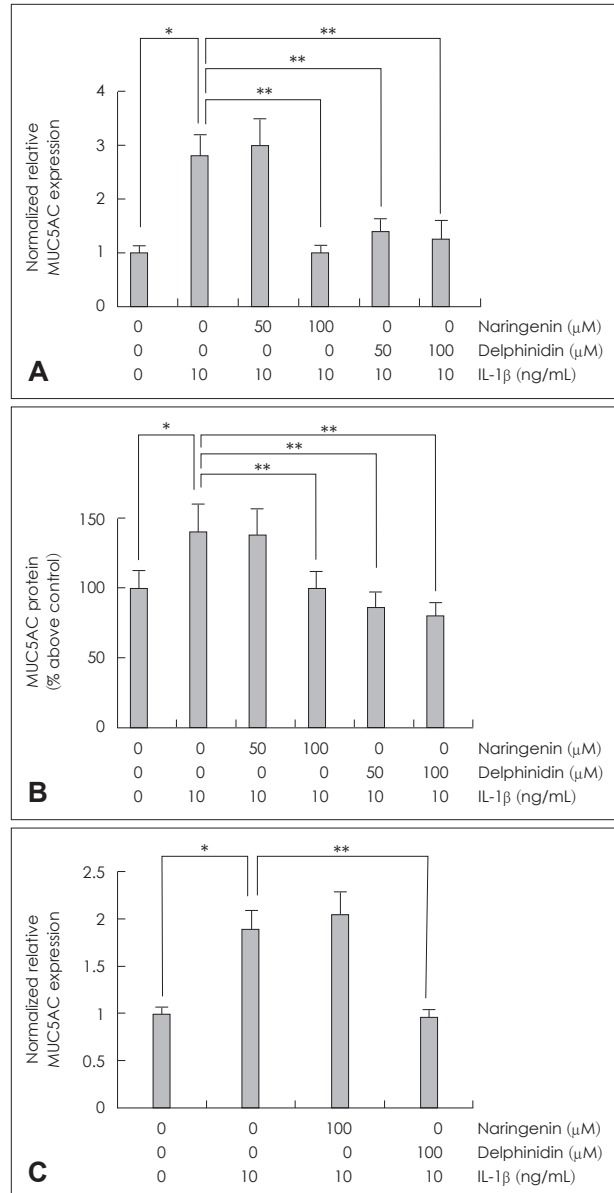


Fig. 1. The effects of naringenin and delphinidin on IL-1β-induced MUC5AC expression. In NCI-H292 cells, real-time PCR showed attenuation of IL-1β-induced MUC5AC mRNA expression by pretreatment with naringenin (100 µM) and delphinidin (50 µM and 100 µM)(A). ELISA showed that naringenin (100 µM) and delphinidin (50 µM and 100 µM) decreased IL-1β-induced MUC5AC glycoprotein level (B). In cultured nasal polyp epithelial cells, real-time PCR showed attenuation of IL-1β-induced MUC5AC mRNA expression only by pretreatment with delphinidin (100 µM)(C). Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean ± SD of three independent experiments performed in triplicate. **p*<0.05 compared with zero value, ***p*<0.05 compared with IL-1β only. IL-1β: interleukin-1β, PCR: polymerase chain reaction, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

는 고용량(100 µM)을 투여한 군에서는 감소하였으나, 저용량(50 µM)을 투여한 군에서는 변화가 없었다(Fig. 1A and B). 비용상피세포에서 IL-1β로 유도된 MUC5AC의 mRNA 발

현은 delphinidin을 투여한 군에서 통계학적으로 의미 있게 감소하였으나, naringenin을 투여한 군에서는 변화가 없었다 (Fig. 1C).

NCI-H292 세포와 비용상피세포에서 naringenin과 delphinidin이 IL-1 β 에 의한 MUC5B 발현에 미치는 영향

NCI-H292 세포에서 IL-1 β 로 유도된 MUC5B의 mRNA 발현은 naringenin과 delphinidin을 투여한 군에서 통계학적으로 의미 있게 모두 감소하였으며 delphinidin을 투여한 군에서 보다 효과적으로 감소된 소견을 보였다(Fig. 2A). NCI-H292 세포에서 IL-1 β 로 유도된 MUC5B 점액 단백질의 생성량은 naringenin과 delphinidin을 투여한 군에서 통계학적으로 의미 있게 모두 감소하였다(Fig. 2B). 비용상피세포에서 IL-1 β 로 유도된 MUC5B의 mRNA 발현은 naringenin과 delphinidin을 투여한 군에서 통계학적으로 의미 있게 모두 감소하였으며 delphinidin을 투여한 군에서 보다 효과적으로 감소된 소견을 보였다(Fig. 2C).

NCI-H292 세포와 비용상피세포에서 naringenin과 delphinidin이 LPS에 의한 MUC5AC 발현에 미치는 영향

NCI-H292 세포에서 LPS로 유도된 MUC5AC의 mRNA 발현과 점액 단백질의 생성량은 naringenin과 delphinidin을 투여한 군에서는 통계학적으로 의미 있게 모두 감소하였다(Fig. 3A and B). 비용상피세포에서 LPS로 유도된 MUC5AC의 mRNA 발현은 naringenin과 delphinidin을 투여한 군에서 모두 감소하였다(Fig. 3C).

NCI-H292 세포와 비용상피세포에서 naringenin과 delphinidin이 LPS에 의한 MUC5B 발현에 미치는 영향

NCI-H292 세포에서 LPS로 유도된 MUC5B의 mRNA 발현과 점액단백의 생성량은 delphinidin을 투여한 군에서는 통계학적으로 의미 있게 감소하였다. Naringenin의 경우에는 고용량(100 μ M)을 투여한 군에서는 감소하였으나, 저용량(50 μ M)을 투여한 군에서는 변화가 없었다(Fig. 4A and B). 비용상피세포에서 LPS로 유도된 MUC5B의 mRNA 발현은 naringenin과 delphinidin을 투여한 군에서 통계학적으로 의미 있게 모두 감소하였으며 delphinidin을 투여한 군에서 보다 효과적으로 감소된 소견을 보였다(Fig. 4C).

고 찰

주요 anthocyanidin인 delphinidin은 분자식은 $C_{15}H_{11}O_7$ 이고, 배당체(glycoside)로서 히야신스(*Hyacinthus orientalis*)

의 청색 꽃과 사프란(*Crocus sativus*)의 꽃, 가지(*Solanum melongena*)의 껍질, 석류, 여러 가지 종류의 베리(berries) 및 포도

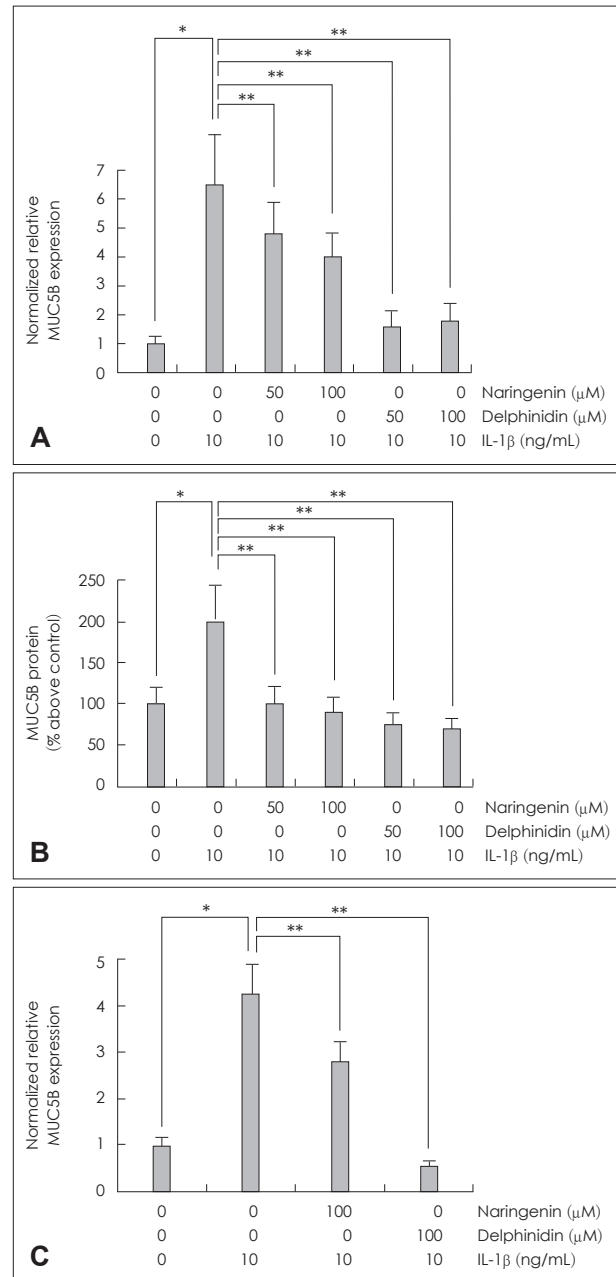


Fig. 2. The effects of naringenin and delphinidin on IL-1 β -induced MUC5B expression. In NCI-H292 cells, real-time PCR showed attenuation of IL-1 β -induced MUC5B mRNA expression by pretreatment with naringenin and delphinidin in all concentrations (A). ELISA showed that naringenin and delphinidin significantly decreased IL-1 β -induced MUC5B glycoprotein level in all concentrations (B). In cultured nasal polyp epithelial cells, real-time PCR showed attenuation of IL-1 β -induced MUC5B mRNA expression by pretreatment with naringenin (100 μ M) and delphinidin (100 μ M)(C). Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. * p <0.05 compared with zero value, ** p <0.05 compared with IL-1 β only. IL-1 β : interleukin-1 β , PCR: polymerase chain reaction, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

와 같은 과일, 토마토, 당근, 적자색의 고구마, 적상추와 적양파와 같은 채소의 색소로 존재한다.⁵⁻⁷⁾ Delphinidin의 생물학적 기능은 항산화작용, 항염증작용과 혈관생성억제 등으로 다양하게 보고되고 있으며,⁵⁻¹³⁾ 최근 연구에서는 인간혈관 내

피세포주에 delphinidin을 투여하여 tumor necrosis factor- α 에 의해 유도된 intracellular adhesion molecule-1과 vascular adhesion molecule-1의 발현을 억제시켜 항염증작용으로 동

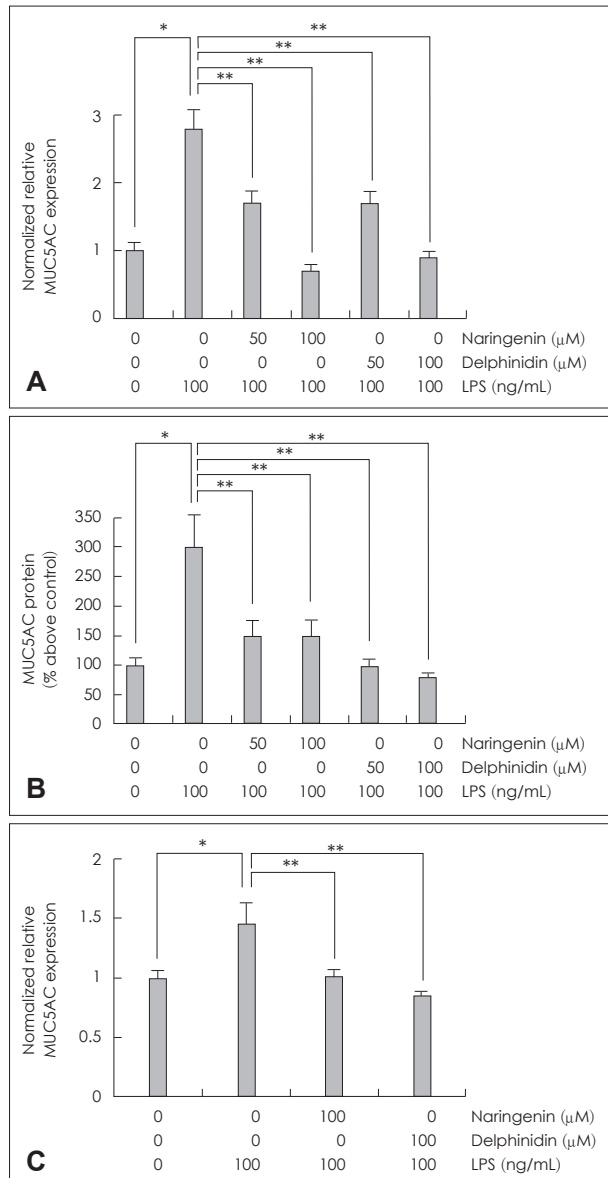


Fig. 3. The effects of naringenin and delphinidin on LPS-induced MUC5AC expression. In NCI-H292 cells, real-time PCR showed attenuation of LPS-induced MUC5AC mRNA expression by pretreatment with naringenin and delphinidin in all concentrations (A). ELISA showed that naringenin and delphinidin significantly decreased LPS-induced MUC5AC glycoprotein level in all concentrations (B). In cultured nasal polyp epithelial cells, real-time PCR showed attenuation of LPS-induced MUC5AC mRNA expression by pretreatment with naringenin (100 μ M) and delphinidin (100 μ M)(C). Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. * p <0.05 compared with zero value, ** p <0.05 compared with LPS only. LPS: lipopolysaccharide, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, PCR: polymerase chain reaction.

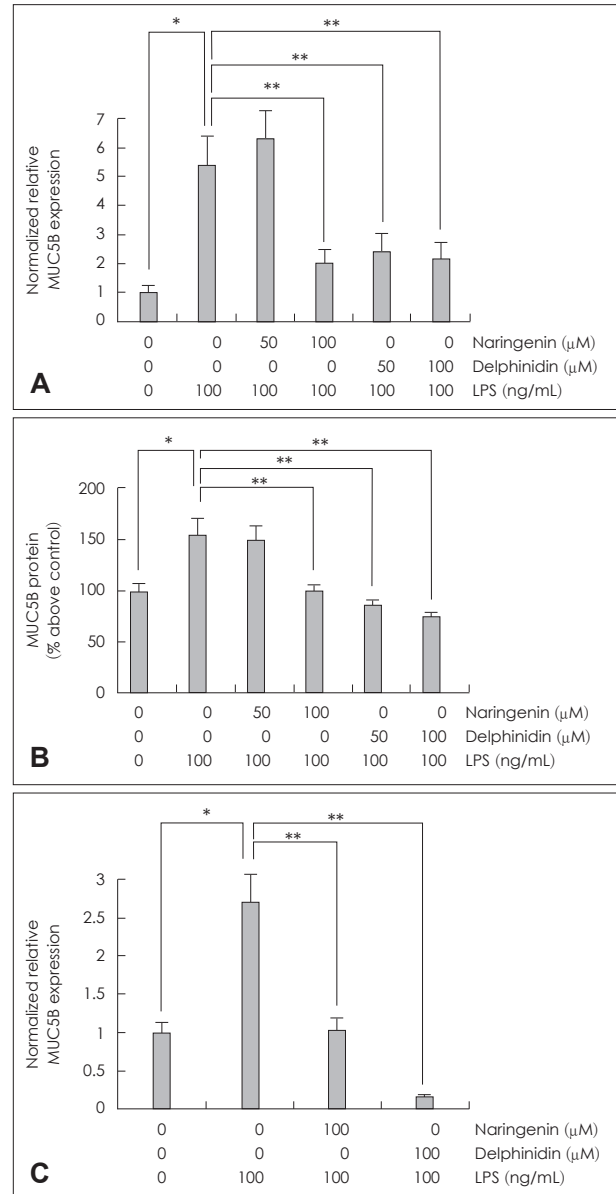


Fig. 4. The effects of naringenin and delphinidin on LPS-induced MUC5B expression. In NCI-H292 cells, real-time PCR showed significant attenuation of LPS-induced MUC5B mRNA expression by pretreatment with naringenin (100 μ M) and delphinidin (50 μ M and 100 μ M)(A). ELISA showed that naringenin (100 μ M) and delphinidin (50 μ M and 100 μ M) decreased LPS-induced MUC5B glycoprotein level (B). In cultured nasal polyp epithelial cells, real-time PCR showed attenuation of LPS-induced MUC5B mRNA expression by pretreatment with naringenin (100 μ M) and delphinidin (100 μ M)(C). Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. * p <0.05 compared with zero value, ** p <0.05 compared with LPS only. LPS: lipopolysaccharide, PCR: polymerase chain reaction, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

맥의 경화작용을 저지시킬 수 있다고 보고되었다.¹⁴⁾ 또한 delphinidin이 세포자살의 기전에 관여하여 전립선암이나 대장암에서 항암효과도 있다고 보고되었다.¹⁰⁾

Naringenin은 delphinidin과 함께 주요 anthocyanidin으로 분자식은 $C_{15}H_{12}O_5$ 이고, 플라보노이드의 일종인 플라바논(flavonone) 무배당체로서 포도와 오렌지, 유자 등의 감귤류에 많이 들어 있으며 항산화 효과가 매우 크고, 항염증, 지방감소, 탄수화물 대사 증진, 면역시스템 조절 등에 효과가 있다.^{9,11-13)} 최근 보고된 연구에서는 naringenin이 대식세포에서의 nuclear factor-kappa B에 대한 억제작용을 통해 알레르기성 질환의 치료제로 가능성이 알려져 있다.⁹⁾ 하지만 naringenin과 delphinidin이 호흡기 상피세포의 점액분비에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 아직까지 국내에 보고된 바가 없었다.

이 연구에서는 최근까지 보고된 연구에서 가장 많이 사용된 50 μ M 또는 100 μ M 농도의 naringenin과 delphinidin을 투여하여,^{5,6,9,14)} NCI-H292 세포에서는 IL-1 β 와 LPS로 유도된 MUC5AC와 MUC5B의 유전자 발현 및 단백질생성이 delphinidin에 의해 억제되었고, 배양된 비용상피세포에서도 유사한 양상으로 delphinidin에 의해 IL-1 β 와 LPS로 유도된 MUC5AC와 MUC5B의 유전자 발현이 억제되었다. 특히 delphinidin은 IL-1 β 와 LPS로 유도된 MUC5AC보다 MUC5B의 유전자 발현 및 단백질생성에 대하여 더욱 강한 억제효과를 보였다. 따라서 delphinidin은 호흡기 상피세포에서 염증반응으로 유도된 MUC5AC와 MUC5B의 유전자의 발현 증가에 대한 억제효과가 있다고 생각된다. 하지만 naringenin의 경우에는 IL-1 β 와 LPS로 유도된 MUC5AC와 MUC5B의 유전자 발현 및 단백질생성이 naringenin의 농도에 따라 억제되지 않는 양상이 관찰되었다. 따라서 anthocyanidin 중 delphinidin이 naringenin보다 항염증작용이 더 강하여 IL-1 β 와 LPS에 의한 점액 유전자 발현 및 점액 단백질 생성 억제에 더 효과적인 것으로 생각된다. 또한 이 연구를 토대로 생체 내 호흡기 상피세포에서 점액 분비 조절에 관여하는 anthocyanidin의 작용기전에 대한 연구와 함께 anthocyanidin의 상용 복용량에 의한 혈중농도로 호흡기 상피세포에서 점액 분비 억제가 일어나는지에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과로 보아 호흡기 상피세포에서 anthocyanidin이 점액의 과분비를 억제하는 작용이 있으므로, 이와 관련

된 작용기전에 대한 연구와 *in vivo* 연구를 진행한다면 점액의 과분비를 억제할 수 있는 새로운 약제의 개발에 도움이 될 것이다.

REFERENCES

- 1) Woo HJ, Min MK, Bae CH, Song SY, Kim YD. Roxithromycin suppresses MUC5B/8 mucin genes and mucin production in airway epithelial cells. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2008; 51(7):617-22.
- 2) Ali MS, Pearson JP. Upper airway mucin gene expression: a review. Laryngoscope 2007;117(5):932-8.
- 3) Lee JG, Moon HJ, Kim SS, Kim CW, Yoon JH. Expression and regulation of MUC8 & MUC5AC by various cytokines in normal human nasal epithelial cells. Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg 2001;44(6):600-5.
- 4) Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. Nutr Cancer 1993;20(1):21-9.
- 5) Chen CY, Yi L, Jin X, Mi MT, Zhang T, Ling WH, et al. Delphinidin attenuates stress injury induced by oxidized low-density lipoprotein in human umbilical vein endothelial cells. Chem Biol Interact 2010; 183(1):105-12.
- 6) Fritz J, Roth M, Holbach P, Esselen M, Marko D. Impact of delphinidin on the maintenance of DNA integrity in human colon carcinoma cells. J Agric Food Chem 2008;56(19):8891-6.
- 7) Koponen JM, Happonen AM, Mattila PH, Törrönen AR. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. J Agric Food Chem 2007;55(4):1612-9.
- 8) Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet 1993;342(8878):1007-11.
- 9) Shi Y, Dai J, Liu H, Li RR, Sun PL, Du Q, et al. Naringenin inhibits allergen-induced airway inflammation and airway responsiveness and inhibits NF-kappaB activity in a murine model of asthma. Can J Physiol Pharmacol 2009;87(9):729-35.
- 10) Yun JM, Afaq F, Khan N, Mukhtar H. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells. Mol Carcinog 2009;48(3):260-70.
- 11) Boniface R, Robert AM. [Effect of anthocyanins on human connective tissue metabolism in the human]. Klin Monbl Augenheilkd 1996; 209(6):368-72.
- 12) Aviram M, Fuhrman B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. Ann N Y Acad Sci 2002;957:146-61.
- 13) Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang YC, Booren AM, Gray JI, et al. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. J Nat Prod 1999;62(2): 294-6.
- 14) Koh EG, Chae SC, Seo ES, Na MS, Lee JB. Delphinidin chloride effects on the expression of TNF- α induced cell adhesion molecules. Korean J Environ Biol 2009;27(1):88-94.