

포도 품종별 메탄올 추출물로부터 면역활성 분석

허진철 · 이상욱 · 권미애 · 김보배 · 이숙희¹ · 이진만² · 최종욱 · 정신교 · 이상한[†]
경북대학교 식품생물산업연구소 및 식품공학과, ¹경북농업기술원, ²호서대학교

Analysis of Immunomodulating Activities in Methanol Extracts from Several Kinds of Grapes

Jin-Chul Heo, Sang-Uk Woo¹, Mi-Ae Kweon, Bo-Bae Kim, Sook-Hee Lee¹,
Jin-Man Lee², Jong-Uck Choi, Shin-Kyo Chung and Sang-Han Lee[†]

Food & Bio-Industry Institute, and Department of Food Science & Technology,
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹GyeongSangBukDo Agricultural Research & Extension Services, Daegu 702-708, Korea

²Department of Food & Biotechnology, Hoseo University Asan 336-795, Korea

Abstract

Fruits and vegetable extracts are well-known as healthy foods. Such foods have been used as herbal medicines or traditional therapies for centuries. To assess biological activities in grapes, we examined the immunomodulating activities of water extracts from four kinds of grapes (cultivars Kyoho, Delaware, Campbell, and Niagara). We explored possible antioxidant and anticancer activities using antioxidant assays such as the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) reduction assay, the ferric iron reducing ability of plasma (FRAP) assay, a cell proliferation assay, an NO inhibition assay, a wound healing assay, and an IL-4/IL-13 elicitation assay. Methanol extracts of grapes were tested. The results showed that each grape extract had potent antioxidant activities. The grape extracts increased cell proliferation and NO production activities in tumor cell lines. IL-4 and IL-13 cytokine levels were decreased in mouse primary spleen cells by treatment with any extract. These results suggest that grape extracts can be used as biomaterials with immunomodulating activities.

Key words : grape extracts, immuno-modulating activities, antioxidant, anticancer, nitric oxide

서 론

산화물은 인체에서 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있는데, 특히 자가 면역질환(autoimmune diseases)의 일종인 아토피(atopic dermatitis), 천식(asthma), 비염(rhinitis) 등 질환의 원인이 되기도 한다(1,2). 또한 산화물에 의한 질병은 생물의 체내에서 산화스트레스(oxidative stress)로 작용을 하게 되는데, 각종 호르몬, 사이토카인 등의 활성을 변화시켜 질병을 유발 하는 것으로 알려져 있다(3,4).

생물의 체내에서는 활성산소(reactive oxygen species)에 의한 세포와 조직의 손상이 매우 심각하게 작용하는데, 이

에 따라 체내 방어기작은 SOD (superoxide dismutase, EC: 1.15.1.1)라는 활성산소를 제거시키는 효소의 작용으로 이를 제거한다(5,6). 그러나 과잉의 활성산소는 각 세포에서 제거하지 못하면 세포나 조직이 손상을 입고, 여러 가지 질병에 노출되게 되는데, 이를 보완하기 위해 항산화물질은 외부에서 보충해 줄 수 있는 식품 또는 식품소재에 대한 개발이 점차 증가 추세에 있다(7-9).

천식은 개인에 대한 차이가 매우 크게 나타나는 질병으로 각종 알러젠(allergen)에 노출될 경우 기도와 폐에 면역과민반응이 발생하여 근육의 수축과 함께 점액물질이 분비되어 호흡곤란과 함께 지속될 경우 목숨을 앗아갈 수도 있다(10,11). 천식의 치료에 대한 처방은 주로 스테로이드(steroid)계통의 약물을 이용하여 경직된 근육을 이완시켜 주는 데, 많은 부작용이 있는 것으로 알려져 있다. 이에

[†]Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

따라 많은 천식 관련 약물의 개발에 관련된 분자 표적으로 IL-4, IL-13, IL-25 등의 사이토카인(cytokine)의 억제 등을 이용한 면역 억제의 방향으로 시도를 하고 있다. 또한 부작용을 억제하려는 의도에서 천연물을 이용하여 약물 또는 활성성분을 개발하려고 하며, 가능한 안전성이 확보된 소재에서 후보물질을 찾고자 한다.

포도는 와인과 주스 등 건강식품으로 널리 이용되고 있는 과일이다. 많은 연구결과에 의하면 포도의 항암 효과는 대부분이 polyphenol로서 그 중에 대표적인 것이 resveratrol 인데, 이들 물질은 French paradox에서 알 수 있듯이 심혈관 질환이나 항암활성이 우수하여 체내에 생체항상성을 유지시켜 준다고 알려져 있다(12-14). 또한 활성산소(reactive oxygen species)나 활성질소(reactive nitrogen species) 등에 의한 외부적인 damage에 의한 DNA, 단백질 등의 생물학적 방어기작에 대해서도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 쉽게 구할 수 있는 포도 4종을 이용하여 이의 항산화활성, 항암활성을 기본으로 하여 면역활성에 관여하는 몇 가지의 활성 assay 방법을 사용하여 포도의 추출물로부터 면역활성을 탐색하고 이의 분석을 수행하였다.

재료 및 방법

재 료

재료는 2005년에 수확한 거봉, 델라웨어, 캠벨, 청포도를 김천농협에서 구입하여 10°C의 저장고에 보관하면서 사용하였다. 재료는 실험실 내에서 homogenizer를 이용하여 완전히 분쇄한 다음, 동량의 50% methanol을 이용하여 추출과정을 거쳤으며, 이후 filter paper를 이용하여 찌꺼기를 제외한 용액을 동결건조를 통하여 분말로 만들어서 실험에 사용하였다.

추출물의 전자공유능 측정

각 추출물의 시료에 0.2 mM DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 1/20의 비율로 실온에서 30분간 incubation 한 후 517 nm (Victor3, PerkinElmer, 생산국)에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성 비율 (% inhibition)은 아래와 같이 계산 하였다(15).

$$\text{Inhibition}(\%) = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

(A : Absorbance at OD 517 nm)

추출물의 환원력 측정

Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay(16)를 이용하여 환원력을 알아보았다. 실험을 위한 반응액으로는

acetate buffer (pH 3.6, 300 mM) : 10 mM의 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) : 20 mM의 FeCl₃·6H₂O를 10 : 1 : 1의 비율로 혼합하여 실험직전에 만들어 사용하였다. 반응액과 추출물을 각각의 비율로 혼합 한 후 10분간 상온에서 보관 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

산화스트레스에 의한 세포사멸 억제효과

뇌종양세포주인 SH-SY5Y 세포주는 American Type Culture Collect (ATCC)로부터 구입하였으며, SH-SY5Y 세포는 10%의 fetal bovine serum, L-glutamine, sodium bicarbonate를 함유한 RPMI 1640 medium (JBI)을 사용하여 37°C, 5 %의 CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포 배양 후 200 μM의 H₂O₂를 처리한 후 포도추출물을 농도별로 처리하였다(17). 세포 생존을 확인은 CCK-8 kit (DOJINDO, Kumamoto, Japan)를 사용하여 실험하였다. 이 kit는 수용성의 tetrazolium salt를 포함하고 있으며 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)는 살아 있는 세포의 미토콘드리아의 탈수소 효소에 의해서 노란색의 산물(formazan)로 환원되는데 살아있는 세포의 수와 직접적으로 비례하는 탈수소효소에 의해서 생성되는 formazan의 양을 450 nm에서 측정함으로써 세포의 생존율을 관찰 할 수 있다. CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양 한 후 CCK-8 용액을 10 μl 넣은 다음, 그 후 1시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율 (%)은 다음의 계산식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{세포 생존율}(\%) = \text{AS/AC} \times 100$$

AS: toxicant(H₂O₂) 무첨가구의 흡광도

AC: 시료 첨가구의 흡광도

추출물의 nitric oxide 활성 측정

RAW 264.7 세포주(mouse의 macrophage성 cell line)를 이용하여 포도추출물에 대한 NO 활성 및 억제능을 알아보았다. Raw 264.7 세포를 2 × 10⁴/well (96 wells)에 배양을 한 다음 LPS를 200 ng/well의 농도로 처리한 군과 처리하지 않은 군에 포도 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양 후, NO 생성량을 측정하였다. NO의 정량은 Greiss reagent (0.1% naphthylendiamine -dihydrochloride in water, 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, w/v)와 NaNO₂를 이용하였으며, 실험은 동량의 배지와 혼합한 후 약 10분간 상온에서 반응을 시킨 후, 560 nm에서 흡광도를 확인하였다(18).

상처치유 실험

상처 치유(wound healing) 실험은 세포의 운동성을 확인

하는 것으로 attach cell인 B16F1 세포를 플레이트에 분주한 다음 CO₂ 배양기에서 세포가 완전히 플레이트에 잘 때까지 배양한다. 이후 피펫맨 팁을 이용하여 약 1 mm의 상처를 만든 다음 배양액을 교체한 후 시료를 농도별로 처리하였다. 37°C의 5 %농도의 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, 상처의 치유정도를 현미경을 통하여 관찰 하였다. Wound healing 비율은 현미경을 통하여 남아있는 상처가 회복되는 정도 즉 상처의 폭을 잴 다음 무처리군과 비교를 통하여 억제활성 정도를 비교하였다.

사이토카인 발현에 대한 추출물의 활성 분석

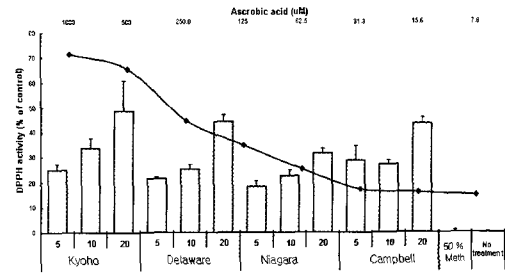
Balb/C (수컷, 10 주령, 효창사이언스) 마우스의 비장세포를 분리하여 이를 일차 배양하면서 IL-4, IL-13의 양을 측정하였다. 비장세포의 일차 배양은 다음과 같이 수행하였다. 먼저 마우스를 해부하여 왼쪽 옆구리 부분에 적갈색으로 비장을 절취하여 클린벤치로 옮긴 다음, 비장을 완전히 분쇄하였으며, 덩어리로부터 지방 등 다른 성분을 제거하였으며, 이후 적혈구(RBC)를 제거한 후 RPMI 1640 배지를 이용하여 3회 수세하였다. Concanavalin A(Con A)를 3 ug/mL 농도로 처리하여 세포를 48시간 배양하면서 세포를 활성화시킨 뒤, 각 포도 추출액을 농도별로 처리하였고, 24시간 더 배양한 후, ELISA (Mouse용 Quantikine ELISA Kit, R&D ELISA system)를 이용하여 IL-4와 IL-13의 양을 배지로부터 측정하였다(19).

결과 및 고찰

항산화 활성

포도의 항산화 활성을 알아보기 위하여 전자공유능을 측정 할 수 있는 DPPH를 이용한 항산화 실험과 환원력을 알 수 있는 FRAP 활성 실험을 실시하였다. DPPH를 이용한 항산화 실험 결과 4종의 포도 추출물을 농도별로 처리할 경우 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 활성 정도는 거봉에서 가장 높은 활성을 보였으며, 델라웨어, 청포도, 캠벨 순으로 나타났다. 대조군으로 처리한 ascorbic acid와 비교하여 볼 때 약 31.3-250 μM의 농도의 활성을 보였다. FRAP 활성 측정의 경우 농도에 따른 활성은 캠벨이 가장 높게 나타났으며, 다른 3종은 비슷한 활성을 나타내었다. 대조군으로 사용된 ascorbic acid와 비교하여 볼 때 약 62.5-125 μM의 농도에서 활성이 나타났다(Fig. 1). 항산화 실험의 경우 방법과 실험의 종류가 매우 다양하며, 빠른 시간에 할 수 있어 스크리닝 시에 가장 많이 쓰이는 방법 중의 하나이다(20-22). 본 실험에서는 포도 추출물 4종에 있어 항산화 효과를 나타내는 것으로 나타났으며, 농도에 따라 그 활성이 증가하는 것으로 나타났다.

A.



B.

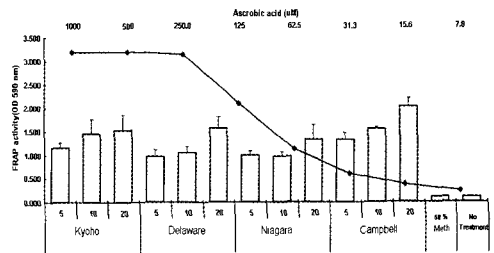


Fig. 1. Effect of grape extracts on antioxidant activity.

Radical scavenging assay using DPPH (A) and FRAP (B). Ascorbic acid was used as a positive control.

산화스트레스에 의한 세포사멸 억제

과산화수소는 세포내에서 산화스트레스를 일으켜 세포사멸을 유도하는데 이를 이용하여 포도 추출물의 산화스트레스 억제효과를 알아보았다. 효소 수준에서의 항산화 실험을 통하여 항산화 활성을 확인 후 세포 수준에서의 활성을 알아보기 위하여 neuronal 세포주인 SH-SY5Y 세포주에 H₂O₂를 처리한 후 포도 추출물을 처리하여 세포생존율을 측정하였다. 실험 결과 과산화수소를 처리한 시료에서 약 60 % 정도의 사멸율을 보였다. 반면에 포도추출물을 처리한 경우 과산화수소에 의한 세포사멸이 다소 줄어든 것을 알 수 있었는데, 포도 추출물을 처리한 경우 약 50 % 내외의 사멸율을 나타내었다. 포도의 종에 따라서는 캠벨과 거봉 추출물에서 활성이 다른 종에 비해 다소 높게 나타났다. 실험 결과로 보아 포도 추출물은 과산화수소에 의한 산화스

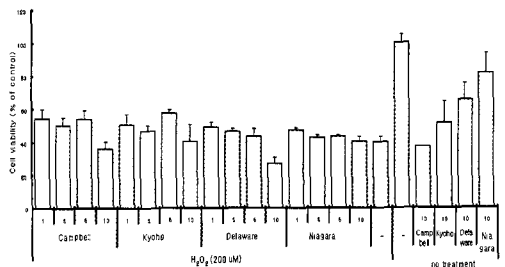


Fig. 2. The cell viability of grape extracts inhibited oxidative stress induced by hydrogen peroxide.

Grapes extract increased cell proliferation activity in oxidative stress by hydrogen peroxide in SH-SY5Y cells.

트레스를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 항산화 실험에서 포도의 종류에 따른 항산화 활성이 비슷한 패턴으로 나타나는 것을 알 수 있었다. 이는 포도 자체가 가지는 활성에 기인하는 것으로 보이며, 영양성분 또한 큰 차이를 보이지 않은 것은 종간 형태적 특징은 보이고 있지만 기본적인 차이는 크지 않은 것으로 사료된다.

Nitric oxide 활성

NOS는 NOS 1 (nNOS), NOS 2 (iNOS), NOS 3 (eNOS) 등으로 크게 3가지로 나누어지는데 이는 발현되는 조직의 부위 따라 나누어진다. NOS에 의해 생성된 NO는 면역과 염증반응에 관련이 있으며, 혈관 내에서는 동맥경화와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 조직내에서 손상이 일어났을 때 NO는 cytoprotective 및 cytotoxic 활성을 가지며, 이는 세포내 미세환경과 세포의 종류에 의해 다양하게 발현됨으로서 세포 및 조직의 안정성을 유지하는 것으로 알려져 있다(18). 본 실험은 포도추출물이 NO (nitric oxide)의 활성과의 관련성을 알아보기 위하여 실시하였다. 본 실험에서는 Raw 264.7 세포주를 이용하여 포도 추출물에 의한 NO 활성을 알아보았다. LPS로 NO를 유도한 cell과 그렇지 않은 세포의 NO 활성을 측정해 본 결과 LPS로 NO를 유도한 세포에서는 포도 추출물에 의한 NO의 감소가 일어나지 않았다. 반면 LPS로 유도되지 않은 Raw 264.7 세포에서는 NO 증가를 알 수 있었다. 거봉, 캠벨, 델라웨어 추출물을 처리한 군에서 3~4배 정도 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

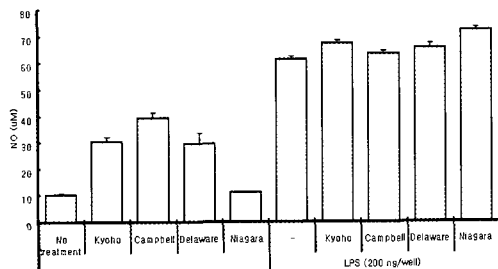


Fig. 3. Grape extracts increased nitric oxide activity in Raw 264.7 cells.

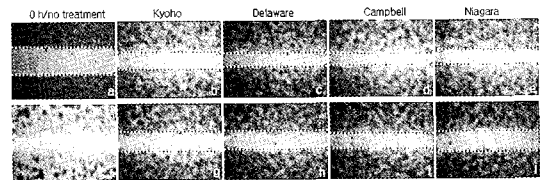
Grapes extract were treated with or without LPS in Raw 264.7 cells. Grapes extract do not decrease NO amount with LPS, but increase NO amount without LPS induced cells.

상처치유 실험

포도추출물의 항암활성을 알아보기 위하여 상처치유 활성 실험을 실시하였다. B16 (mouse melanoma cell line) 세포주를 이용하여 상처를 형성시킨 다음, 포도추출물에 의한 전이정도를 실험한 결과 포도 추출물의 농도에 따른 세포의 전이가 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이는 포도추출물에 의한 세포의 운동성을 저하시켜 암세포의 전이를 억제하는 것으로 판단된다. Wound healing 실험에서의 암세포주

의 운동성 저하는 거봉, 델라웨어, 캠벨, 청포도의 순으로 나타났다(Fig. 4). 세포의 운동성을 결정하는 요인은 많은 경우 세포막에 위치한 단백질의 발현과 관계가 있으며, 특히 CD44, uterine plasminogen activator receptor (uPAR), intracellular cell adhesion molecule (ICAM), vascular cell adhesion molecule (VCAM) 등의 단백질이 관여하는 것으로 알려져 있다(23). 본 실험에서 포도 추출물에 의한 세포의 운동성 감소를 확인 할 수 있었으며, 또한 농도에 따른 감소의 증가를 알 수 있었다. 이는 포도 추출물이 세포내의 운동성 관련단백질의 발현에 직접 또는 간접적인 영향을 가지고 있는 것으로 사료되며, 향후 이와 관련한 실험 등이 추가되어야 할 것으로 판단된다.

A.



B.

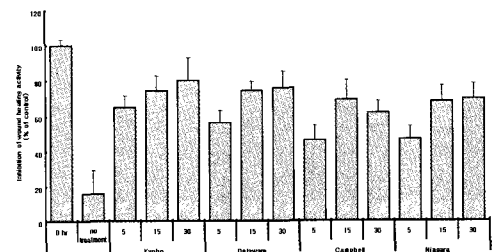


Fig. 4. Wound healing activity by grape extracts.

A. Pretreatment with grapes extract prevents wound healing activity. B16 cells were incubated for 24 hr at 37 °C with 0, 5, 50 µl/ml grape extract in (a) wound of 0 hr, (f) after 24 hr, (b, g) Kyoho, (c, h) Delaware, (d, i) Campbell and (e, j) Niagara extract in 5 µg/ml (b - e) and 50 µg/ml (g - j).

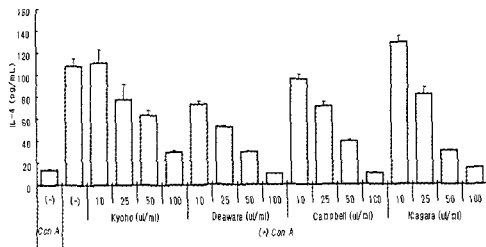
B. The inhibition of wound healing activity were marked as length by a microscope. For each test, five randomly chosen parts were measured and denoted as average values.

IL-4 및 IL-13 활성 억제

Cytokine의 일종인 IL-4 (interleukin-4)와 IL-13 (interleukin-13)은 자가면역반응의 일종인 천식, 아토피, 비염등과 밀접한 관계를 가지는데, 이들의 생성 및 분비의 증가는 자가면역반응으로 인한 질병과의 연관성이 최근 많은 연구결과로 보고되고 있다. 본 실험에서는 포도 추출물이 IL-4와 IL-13의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 mouse spleen primary 세포를 이용하여 알아보려 하였다. 비장은 면역과 관련하여 중요한 신체기관으로 체내 각종 면역세포의 경유지 및 성장과 관련하여 중요한 역할을 하며, 여기에서는 여러 종류의 면역관련 세포를 분리해 낼 수 있다. 실험은 마우스의 비장에서 면역세포를 분리하여 Concanavalin A (Con A)를 처리하여 세포를 활성화를 유도한 군과 그렇지

않은 군에 포도추출물을 처리하여 IL-4와 IL-13의 변화를 ELISA assay를 통하여 알아보았다. IL-4의 경우 Con A를 처리하지 않은 군에서 IL-4의 생성을 증가시키는 것은 나타나지 않았다. 반면 거봉과 델라웨어 추출물을 처리한 경우 IL-4의 생성이 다소 감소하는 것으로 나타났다. Con A를 처리한 경우 무처리군에서 IL-4의 발현이 약 5배 이상 증가하는 것을 알 수 있었으며, 여기에 포도추출물을 처리한 경우 추출물의 농도에 따라 IL-4의 발현이 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). IL-13의 경우 또한 IL-4와 비슷한 결과를 확인할 수 있었는데, Con A를 처리하지 않은 실험 군에서는 포도추출물 처리 4종에서 IL-13의 발현이 약 50% 정도 감소하는 것으로 나타났다. 무처리군의 경우 Con A를 처리하였을 때 Con A를 처리하지 않은 군에 비해 약 2.7배 정도 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 반면 포도 추출물을 처리한 경우 모든 경우에 IL-13의 발현이 추출물의 처리 농도에 따라 감소하는 것으로 나타났다.

A.



B.

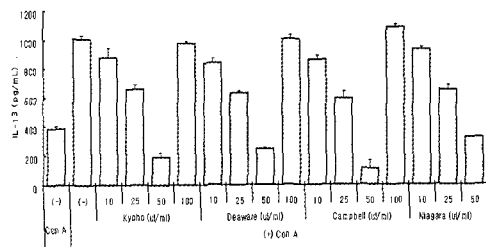


Fig. 5. Quantitative ELISA analysis of IL-4 (A) and IL-13 (B) expression in activated mouse spleen cells by grape extracts.

The grapes extract decreased cytokine IL-4 and IL-13 expression in a dose-dependent manner.

최근 천식과 관련된 보고 중에 산화물이 천식유발의 원인이라는 보고가 있기 때문에 항산화 활성을 보인 포도 추출물이 실제 자가면역질환의 분자 마커중 하나인 IL-4와 IL-13의 발현에 미치는 영향을 마우스 일차 배양세포를 이용하여 알아보았다. 그 결과 4종의 포도 메탄올 추출물 모두에서 비슷한 결과를 보여 주었다. 포도의 효능은 이를 이용하여 만들어지는 포도주에 대한 연구가 상대적으로 매우 많다. 생과의 저장성이 좋지 못하다는 점, 포도의 항산화 및 항암 활성이 높은 점, 포도의 polyphenol 성분이 항아토

피 활성을 가진다는 점으로 판단하여 포도의 기능성 또는 생리활성의 연구는 포도의 고부가가치화에 많은 기여를 하리라고 기대한다.

감사의 글

본 연구결과는 농림부·농림기술관리센터 지정 포도연구사업단의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

요 약

하우스 포도 중 대표적인 것으로는 거봉, 델라웨어, 캠벨, 청포도를 열거할 수 있는데, 이에 대한 생물학적 활성 효과 중 항산화와 항암 활성에 대한 보고는 많으나 면역활성에 대한 활성의 연구는 미흡한 실정이다. 이에 우리는 4종의 포도의 메탄올 추출물로 항산화, 항암, 그리고 면역활성을 분석하였다. 전자공유능을 측정하기 위한 DPPH를 이용한 실험 결과 포도 4종에서 모두 항산화 활성을 나타내었으며, 환원력을 알아보기 위한 FRAP 실험 또한 활성을 나타내었다. 산화스트레스에 의한 세포사멸 억제 효과는 약간 있는 것으로 나타났다. 반면에 포도 추출물에 의한 cell proliferation 활성은 증가하는 것으로 나타났다. Nitric oxide (NO) 생성 억제 실험에서는 LPS에 의해 유도된 NO의 활성을 감소시키지는 않으나 포도 추출물 자체가 Raw 264.7 세포에서 NO의 활성을 유도하는 것으로 나타났다. Wound healing assay를 이용하여 항암효과를 알아본 결과 포도추출물 4종에서 세포의 운동성을 억제하는 효과를 가지는 것으로 나타났다. Mouse primary spleen cell 에서의 cytokine IL-4, IL-13의 활성을 알아본 결과 Con A로 유도된 IL-4와 IL-13의 발현 양을 현저히 줄이는 것으로 나타났다. 이로 미루어 보아, 포도 4종에 대한 생물학적 활성 결과 항산화, 항암 활성은 물론 항천식 활성이 있는 것으로 확인되어 면역 조절 활성이 포도의 기능성에 중요한 역할을 할 것으로 판단된다.

참고문헌

- MacNee, W. (2001) Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.*, 429, 195-207
- Matsuyama, T., Ihaku, D., Tanimukai, T., Uyama, O. and Kitada, O. (1993) Superoxide dismutase suppressed asthmatic response with inhibition of manganese superoxide induction in rat lung. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*, 31, 139-145

3. Nadeem, A., Chhabra, S.K., Masood, A. and Raj, H.G. (2003) Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111, 72-78
4. Varshavskii, B.I., Trubnikov, G.V., Galaktimpva, L.P., Koreniak, N.A., Koledzina, I.L. and Oberemok, A.N. (2003) Oxidant-antioxidant status of patients with bronchial asthma during inhalation and systemic glucocorticoid therapy. *Ter. Arkh.*, 75, 21-24
5. Liu, M.L. and Hong, S.T. (2005) Early phase of amyloid β_{42} -induced cytotoxicity in neuronal cells is associated with vacuole formation and enhancement of exocytosis. *Exp. Mol. Med.*, 37, 559-566
6. Tinahones, F.J., Gomez-Zumaquero, J.M., Monzon, A., Rojo-Martinez, G., Pareja, A., Morcillo, S., Cardona, F., Oliveira, G. and Soriguer, F. (2004) Dietary palmitic acid influences LDL-mediated lymphocyte proliferation differently to other mono- and polyunsaturated fatty acids in rats. *Diabetes Nutr. Metab.*, 17, 250-258
7. Ajaikumar, K.B., Asheef, M., Babu, B.H. and Padikkala, J. (2005) The inhibition of gastric mucosal injury by *Punicagranatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *J. Ethnopharmacol.*, 96, 171-176
8. Ling, W.H., Wang, L.L. and Ma, J. (2002) Supplementation of the black rice outer layer fraction to rabbits decreases atherosclerotic plaque formation and increases antioxidant status. *J. Nutr.*, 132, 20-26
9. Scandalios, J.G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38, 995-1014
10. Kim, J., McKinley, L., Natarajan, S., Bolgos, G.L., Siddiqui, J., Copeland, S. and Remick, D.G. (2006) Anti-tumor necrosis factor-alpha antibody treatment reduces pulmonary inflammation and methacholine hyper-responsiveness in a murine asthma model induced by house dust. *Clin. Exp. Allergy*, 36, 122-132
11. Lundy, S.K., Berlin, A.A., Martens, T.F. and Lukacs, N.W. (2005) Deficiency of regulatory B cells increases allergic airway inflammation. *Inflamm. Res.*, 54, 514-521
12. Jason, M.G., Patricia, T. and Lyndon, L.L. (2007) Anticancer effects of four varieties of muscadine grape. *J. Med. Food*, 10, 54-59
13. Alkhalaf, M. (2007) Resveratrol-induced apoptosis is associated with activation of p53 and inhibition of protein translation in T47D human breast cancer cells. *Pharmacol.*, 80, 134-143
14. Scarlatti, F., Sala, G., Somenzi, G., Signorelli, P., Sacchi, N. and Ghidoni, R. (2003) Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling. *FASEB J.*, 17, 2339-2341
15. Mellors, A. and Tappel, A.L. (1966) The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J. Biol. Chem.*, 241, 4353 - 4356
16. Benzie, I.F. and Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239, 70-76
17. Sanvicens, N., Gomez-Vicente, V., Messeguer, A. and Cotter, T.G. (2006) The radical scavenger CR-6 protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress-induced apoptosis: effect on survival pathways. *J. Neurochem.*, 98, 735-747
18. Du, C., Guan, Q., Diao, H., Yin, Z. and Jevnikar, A.M. (2005) Nitric oxide induces apoptosis in renal tubular epithelial cells through activation of caspase-8. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 290, 1044-1054
19. Zurawski, S.M., Chomarat, P., Djossou, O., Bidaud, C., McKenzie, A.N., Miossec, P., Banchereau, J. and Zurawski, G. (1995) The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor. *J. Biol. Chem.*, 270, 13869-13878
20. Tsaknis, J. and Lalas, S. (2005) Extraction and identification of natural antioxidant from *Sideritis cuboia* (mountain tea). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6375-6381
21. Hosseinzadeh, H. and Sadeghnia, H.R. (2005) Safranal, a constituent of *Crocus sativus* (saffron), attenuated cerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 8, 394-399
22. Yu, H., Liu, X., Xing, R., Liu, S., Li, C. and Li, P. (2005) Radical scavenging activity of protein from tentacles of jellyfish *Rhopilema esculentum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 2659-2664
23. Heo, J.C., Park, J.Y., Lee, J.M., Kwon, T.K., Kim, S.U., Chung, S.K. and Lee, S.H. (2005) *Wisteria floribunda* gall extract inhibits cell migration in mouse B16F1 melanoma cells by regulating CD44 expression and GTP-RhoA activity. *J. Ethnopharmacol.*, 102, 10-14