

연자육의 6-하이드록시도파민으로 유도된 도파민 세포 독성에 대한 보호효과

김효근¹, 오명숙^{1,2*}

1: 경희대학교 약학대학 한약학과 2: 경희대학교 약학대학 동서약학연구소

Protective Effects of *Nelumbinis* Semen Against Neurotoxicity Induced by 6-Hydroxydopamine in Dopaminergic Cells

Hyo Geun Kim¹, Myung Sook Oh^{1,2*}

1: Department of Oriental Pharmaceutical Science, college of Pharmacy, Kyung Hee University
2: East-West Pharmaceutical Research Institute, College of Pharmacy, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : This study was performed to evaluate the neuroprotective effect of water extracts from *Nelumbinis* semen (NSW) in dopaminergic cells.

Methods : We performed 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, 2,2-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) cation scavenging assay, and determination of total polyphenolic content to examine the antioxidant effects of NSW. We also evaluated the neuroprotective effects against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced toxicity using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide assay (MTT) assay, trypan blue cytotoxicity assay, and nitric oxide assay in SH-SY5Y cells and tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry in primary rat dopaminergic neurons.

Results : NSW showed IC₅₀ values of 184.80 and 92.90 µg/mL in DPPH and in ABTS assays, respectively. NSW showed 1.05% of total polyphenol contents. NSW showed protective effect against 6-OHDA-induced neurotoxicity whereas no influence on cell viability at the concentration of 1~50 µg/mL. NSW reduced NO generation while 6-OHDA produced it. Moreover, it protected rat dopaminergic neurons against 6-OHDA at a dose of 1 µg/mL.

Conclusions : These results indicated that NSW has neuroprotective effect against 6-OHDA-induced neurotoxicity through antioxidant activity in dopaminergic cell culture.

Key words : *Nelumbinis* Semen, dopaminergic neurons, 6-OHDA, neuroprotection.

서론

연자육(蓮子肉)은 수련과(Nymphaeaceae)에 속하는 다년생 水生本草인 연꽃(蓮)*Nelumbo nucifera*의 종자(種子)를 건조한 것이다¹⁾. 연자육은 補裨止瀉하고, 益腎固精시키며, 養心安神시키는 효능이 있어 久瀉를 치료한다. 또한 임상에서 不眠症, 憂鬱症 및 不安症의 치료에 사용되

고 있다²⁾. 연자육은 혈액 내 lipids 양을 줄이고, 혈전을 억제하는 효과가 있으며³⁾, LPS로 유도된 염증억제 효과와⁴⁾, 뇌허혈 모델에서 보호효과⁵⁾, 항 우울 효과^{6,7)}가 있는 것으로 보고되어 있다.

파킨슨병이나 알츠하이머병 같은 퇴행성 뇌질환은 원인이 명확하게 밝혀지지 않았으나, 뇌가 산화적 손상을 받기 쉬운 이유로 산화 스트레스가 주요한 원인으로 지

* 교신저자 : 오명숙, 서울시 동대문구 회기동1 경희대학교 약학대학 한약학과 본초학교실
· Tel : 02-961-9436 · E-mail : msohok@khu.ac.kr
· 접수 : 2009년 5월 22일 · 수정 : 2009년 6월 19일 · 채택 : 2009년 6월 22일

목되어 왔다⁸⁾. 특히 파킨슨병은 중뇌 흑질의 도파민 신경세포의 기능 상실 및 감소로 인해 운동장애 등이 나타나는 질환으로, 도파민 신경세포의 경우 자체 산화적 대사에 의해 산화 물질이 형성되기 때문에 산화 스트레스에 더 취약한 특징이 있다^{9,10)}.

아직까지 연자육은 실험적 내용을 통한 항산화 효과¹¹⁾와 뇌허혈 모델과 항 우울 모델에서 보호효과가 보고되었으나, 도파민 신경세포 보호를 통한 파킨슨병 모델에서의 효과에 관한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 연자육 물추출물(NSW)의 항산화 효과 및 총 폴리페놀 함량 측정을 하고, *in vitro* 및 *in vivo* 파킨슨병 연구에서 많이 사용하는 신경독성물질¹²⁾인 6-hydroxy dopamine (6-OHDA)으로 유도된 SH-SY5Y 세포에서 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, trypan blue cytotoxicity assay, nitric oxide(NO) assay 수행을 통해 도파민 세포 보호효과를 측정하고자 하였다. 또한 흰쥐 태아 중뇌 도파민 신경세포에서 6-OHDA 유발독성에 대한 보호효과를 측정하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 연자육은 정도약업사(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 잡질을 제거한 후 10배의 증류수에 담그어 2시간 동안 환류추출한 뒤 여과(Whatman No. 2) 하였다. 여과액을 -60°C 이하에서 얼려 동결건조 하였고(FDU-550R; Eyela Co, Japan), 수득률은 16.75%였다. -20°C 에 보관 후 매 실험 시 용매에 녹여 사용하였다.

2) 시약

세포배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum(FBS), minimal essential medium (MEM), penicillin-streptomycin(P/S)은 Gibco 사(Auckland, NZ)에서 구입하여 사용하였다. Folin-Ciocalteu's reagent, tannic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), greiss reagent, 2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), dimethyl sulfoxide (DMSO), para-formaldehyde (PFA), 3,3-diaminobenzidine (DAB), potassium persulfate, MTT, 6-OHDA, poly-L-lysine (PLL)은 Sigma-aldrich사(St Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. Rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH) affinity purified polyclonal antibody는 Chemicon사 (Temecula, USA), biotinylated anti-Rb antibody와 ABC standard kit은 Vector사(Burlingame, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) DPPH radical 소거 작용 측정

Blois의 방법¹³⁾을 응용하여 DPPH free radical에 대한 소거활성을 측정하였다. 0.2 mM DPPH 100 μL 와 NSW 100 μL 를 농도별로 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 spectrophotometer (Versamax microplate reader; Molecular Device, Sunnyvale, USA)로 흡광도를 측정하였다.

2) ABTS cation 소거 작용 측정

7.4 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24 시간 동안 반응하였다. ABTS+을 형성시킨 후 phosphate buffer saline(PBS pH7.4)로 희석하여 732 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 이 되게 하였다. 희석된 용액 950 μL 에 NSW 50 μL 를 가하여 상온에서 정확히 5분 동안 방치한 후 spectrophotometer로 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법¹⁴⁾을 응용하여 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. NSW를 증류수를 이용해 희석하여 2 N folin 200 μL 와 Na_2CO_3 2 mL를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 방치한 후 spectrophotometer를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 tannic acid를 이용하여 작성하였다.

4) 세포배양

본 실험에 사용된 세포주는 human neuroblastoma인 SH-SY5Y 세포이며, 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 10% (v/v) FBS, 1% P/S을 포함하는 high-glucose DMEM 배지를 사용하였으며 37°C , 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

5) Cell viability 측정

96 well plate에 2.0×10^4 /well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 48시간 후, NSW 1, 25, 50, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도별로 24 시간 동안 처리하였다. 1 mg/mL의 MTT를 처리하여 3 시간 배양 후, DMSO를 이용해 decrystallize시켜 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

6) 6-OHDA에 대한 뇌세포 보호 효과 측정

96 well plate는 2.0×10^4 /well, 24 well plate는 2.0×10^5 /well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 48시간 배양하였다. NSW를 6시간 처리 후 6-OHDA(200 μM)을 18 시간 더 처리 하였다. 반응 종료 후, 96 well plate는 1 mg/mL의 MTT를 처리하여 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 24 well plate는 trypsin-EDTA 처리 후, 세포를 모아 trypan blue로 염색 후

hemocytometer를 이용하여 생존 세포를 측정하였다. 세포 생존율을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

7) 6-OHDA에 의한 NO 생성에 관한 영향 측정

SH-SY5Y 세포에 다양한 농도의 NSW와 6-OHDA를 위의 조건으로 처리한 후 배양액을 회수하여 NO 생성량 측정에 사용하였다. 배양액에 Griess reagent를 동량으로 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 이용해 20~100 μM 의 표준곡선을 그려 NO 농도를 결정하였다.

8) Rat mesencephalic culture에서 6-OHDA에 대한 세포 보호 효과 측정

Sprague-Dawley rat 14일 태아는 Orient Bio(Osan, Korea)에서 구입하였다. 흰쥐 태아 중뇌 조직을 얼음 위에서 박리하여 10% FBS를 포함한 MEM에 모은 후, 파이펫을 이용하여 기계적으로 dissociation하였다. PLL로 미리 코팅한 coverslip에 1.0×10^5 로 seeding 한 후 37°C에서 6일 동안 증식시켰다. 0.2, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 NSW 처리 6시간 후 6-OHDA를 10 μM 을 처리하여 18시간을 더 배양하였고, 고정 후 primary antibody (rabbit-anti-TH; 1:2,000)를 반응시켰다. Biotinylated anti rabbit IgG(H+L)을 이용하여 secondary antibody를 반응시킨 후, ABC solution 반응을 거쳐 DAB로 발색하였다. 각 과정 사이에 PBS 3회 세척을 행하였다. Gelatin coated slide에 coverslip을 mounting 용액을 이용해 덮어 보관하였다. 현미경(Axioskop 2; Carl Zeiss Inc, Göttingen, Germany)을 사용하여 NSW의 세포에 대한 영향을 관찰하였다.

3. 통계처리

모든 측정값은 mean \pm SEM으로 표시하였다. 본 연구의 통계처리는 SPSS 12.0K for Windows 프로그램을 사용하였으며, one-way ANOVA를 이용하여 평균값의 유의성을 5% 미만의 한계로 조사하였다.

결 과

1. NSW의 DPPH radical과 ABTS cation 소거 활성

DPPH radical과 ABTS cation 소거능력은 시료의 흡광도가 감소되는 정도에 따라 나타내는 것으로 NSW의 농도별 DPPH free radical과 ABTS cation 소거활성을 Fig. 1에 나타내었다. NSW 1, 10, 100, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 DPPH radical 소거활성은 22.09 \pm 2.33~85.75 \pm 2.67%로 나타났으며, ABTS cation 소거활성은 11.50 \pm 0.28~91.20 \pm 0.10%로 나타났다. NSW 농도와 free radical 및 cation 소거활성에 따른 분석결과 50%의 radical

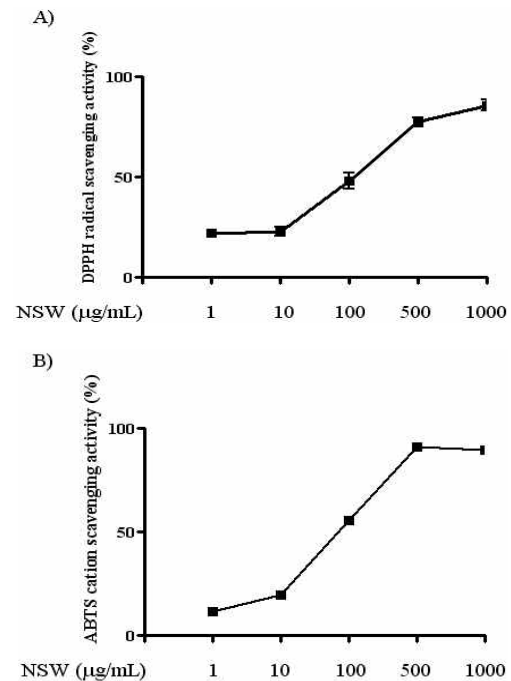


Fig. 1. Antioxidant effects of NSW in DPPH radical scavenging activity A) and ABTS cation scavenging activity B)

Values indicate the mean \pm SEM of three replications.

Table 1. IC₅₀ Numeric Values in DPPH and ABTS Assays, and Determination of Total Polyphenol Contents

	$\mu\text{g}/\text{mL}$
DPPH IC ₅₀	184.80 \pm 1.56
ABTS IC ₅₀	92.90 \pm 0.69
Total polyphenol contents	105.08 \pm 0.06

소거활성에 필요한 농도는 184.80 \pm 1.56 및 92.90 \pm 0.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 보였다(Table 1).

2. NSW의 총 폴리페놀 함량

NSW의 총 폴리페놀 함량을 tannic acid의 검량선 $y = 0.010x + 0.034$, $R^2 = 0.995$ 를 이용하여 구한 결과 10 mg/mL의 NSW에 105.08 \pm 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 tannic acid가 포함되어 있었다(Table 1).

3. SH-SY5Y 세포에서 NSW의 6-OHDA에 대한 보호효과

NSW가 SH-SY5Y 세포에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. NSW의 1~75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 범위에 대하여 측정하였으며, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도를 제외한 나머지 농도에서 92.47 \pm 2.68~97.30 \pm 1.26%로 NSW는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2A).

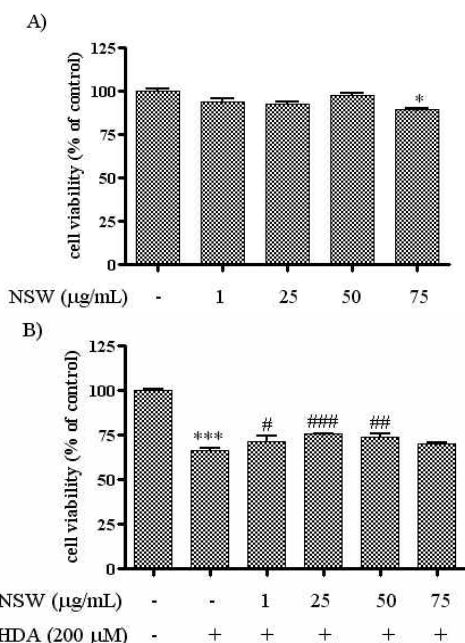


Fig. 2. Neuroprotective effects of NSW in SH-SY5Y cells using MTT assay. A) Cell viability of NSW only. B) Cell viability of NSW pre-treatment against 6-OHDA

Values are indicated as the mean±SEM. *** : $p < 0.001$ and * : $p < 0.05$ compared with the control group, ### : $p < 0.001$, # : $p < 0.01$, and # : $p < 0.05$ compared with the 6-OHDA-only treated group.

NSW의 6-OHDA 독성에 대한 보호효과를 측정된 결과, 6-OHDA에 의하여 66.22±1.45%로 세포 생존율이 감소한 것이 NSW의 전처리에 의하여 1-50 µg/mL의 농도에서 71.56±3.03~75.36±0.43%의 생존율을 보여 세포보호효과를 나타내었으나, 75 µg/mL의 농도에서는 통계적으로 유의한 효과를 보이지 않았다(Fig. 2B).

NSW의 6-OHDA에 대한 세포보호효과를 검증하기 위하여 trypan blue를 이용한 세포 수 측정을 한 결과, 6-OHDA에 대하여 46.00±2.00%로 감소한 세포 생존율이 1-75 µg/mL 농도에서 60.00±3.46~84.00±3.46%로 보호효과를 나타내었다(Fig. 3).

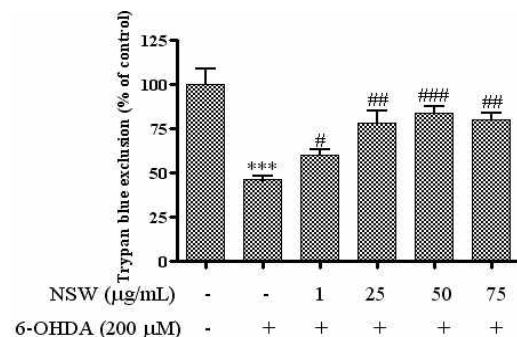


Fig. 3. Neuroprotective effects of NSW in SH-SY5Y cells using trypan blue cytotoxicity assay

Values are indicated as the mean±SEM. *** : $p < 0.001$ compared with the control group. ### : $p < 0.001$, # : $p < 0.01$, and # : $p < 0.05$ compared with the 6-OHDA-only treated group.

4. SH-SY5Y 세포에서 NSW이 6-OHDA에 의한 NO 생성에 미치는 영향

SH-SY5Y 세포에 NSW를 1-75 µg/mL의 농도별로 처리하고, 6시간 후 6-OHDA 200 µM을 18시간 처리하여 6-OHDA에 대하여 유도되는 NO의 영향을 검증하였다. 6-OHDA에 의하여 255.88±5.80%로 증가한 NO의 양이 NSW의 전처리에 의하여 212.86±5.42~220.61±

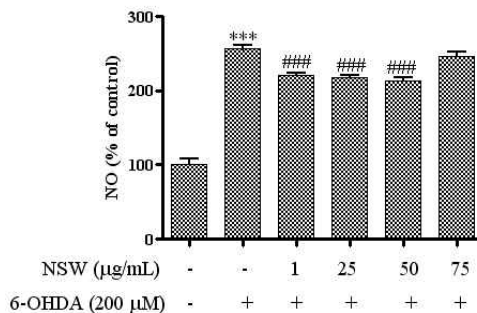


Fig. 4. Antioxidant effects of NSW in 6-OHDA-induced accumulation of NO in SH-SY5Y cells using Griess reagent

Values are indicated as the mean±SEM. *** : $p < 0.001$ compared with the control group, ### : $p < 0.001$ compared with the 6-OHDA-only treated group.

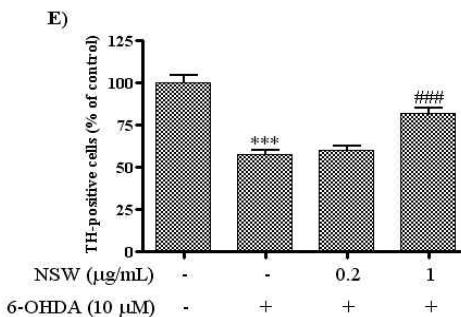
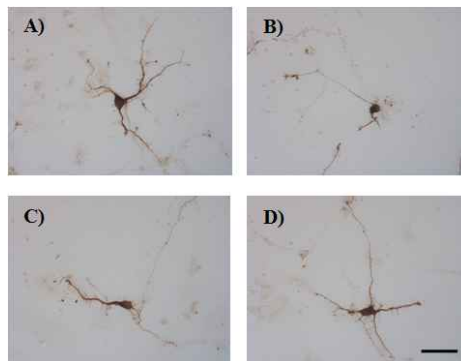


Fig. 5. Protective effect of NSW against 6-OHDA toxicity in dopaminergic neurons. Representative images of experiments were shown (A-D) and the numbers of TH-positive neurons were counted (E)

A) Control group; B) 6-OHDA group; C) NSW 0.2 µg/mL+6-OHDA group; D) NSW 1 µg/mL+6-OHDA group. Scale bar = 50 µm. Values are indicated as the mean±SEM. *** : $p < 0.001$ compared with the control group, ### : $p < 0.001$ compared with the 6-OHDA-only treated group.

3.28%로 1, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 통계적으로 유의하게 감소되었으며, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 유의한 효과를 나타내지 않았다(Fig. 4).

5. Rat mesencephalic culture에서 NSW의 6-OHDA에 대한 보호 효과

흰쥐 태아 중뇌 도파민 신경세포에서 NSW의 6-OHDA 독성에 대한 보호효과를 anti-TH염색을 이용하여 측정하였다. 6-OHDA 10 μM 에 의하여 57.32 \pm 2.56%로 감소한 TH-positive 세포가 NSW 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 전처리에 의하여 81.67 \pm 3.24%로 도파민 세포의 생존율이 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났다(Fig. 5).

고 찰

본 연구에서는 연자육 물추출물의 항산화 효과 및 이에 따른 SH-SY5Y 세포와 흰쥐 태아 중뇌 세포에서 6-OHDA 독성에 대한 보호효과에 관해 알아보았다.

활성산소는 생체 내에서 지질, 단백질 및 DNA를 공격하여 파괴하고 질병 및 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 신경계는 다른 조직에 비해 산소 소비량이 많고, 지질이 풍부해 산화스트레스에 특히 취약한 조직으로, 항산화 능력이 감소되면 뇌허혈증, 알츠하이머병, 파킨슨병 같은 퇴행성 뇌질환의 병리기전이 된다¹⁶⁾. 따라서 NSW의 항산화 효과를 측정하기 위하여 DPPH radical scavenging assay, ABTS cation scavenging assay, 총 폴리페놀함량 측정 등의 방법을 이용하였다. DPPH assay는 안정화된 hydroxyl radical(OH \cdot)을 형성한 후, 이들이 전자나 수소를 받아 자색시료의 흡광도가 감소하는 것을 이용한 방법으로, NSW의 IC₅₀은 184.80 \pm 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 지용성 물질과 수용성 물질 모두 반응할 수 있는¹⁷⁾ ABTS assay는 ABTS $^+$ 을 형성한 후 청색시료의 흡광도가 감소하는 것을 이용한 방법으로, NSW의 IC₅₀은 92.90 \pm 0.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 DPPH IC₅₀보다 높은 항산화 능력을 보였으며, 이는 지용성 물질을 함유하고 있는 종자류의 특성 때문으로 생각된다. 폴리페놀화합물은 식물에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 대표적 항산화 물질로 퇴행성 뇌질환 예방과 관련이 있는 것으로 알려져 왔다¹⁸⁾. 따라서 NSW의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과 10 mg/mL당 10.58 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 tannic acid를 포함하는 것으로 나타났다. 이는 항산화 효과가 뛰어난 것으로 알려진 차전자의 총 폴리페놀 함량 11.26 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 와 비슷하며, 임 등¹²⁾의 연구 결과에서 보여준 11.82 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 결과와 유사하다.

NSW의 6-OHDA에 대한 도파민 세포 보호효과를 알아보기 위하여 human neuroblastoma 세포인 SH-SY5Y 세포에서 MTT assay와 trypan blue cytotoxicity assay

를 수행하였다. 6-OHDA는 도파민 세포 내에서 자가 산화 작용을 촉진하여 산화적 스트레스 생성을 유발하고, 미토콘드리아에 직접 작용하여 세포 자가사멸을 유도하게 된다. 이러한 작용은 선조체에 많이 존재하는 도파민 세포와 관련이 있어, 파킨슨병 유발 모델에 이용된다¹⁹⁾. 본 실험에서는 세포생존율이 6-OHDA에 의해 66.22 \pm 1.45%와 46.00 \pm 2.00%로 통계적으로 유의하게 감소하였으며, NSW의 전처리에 의하여 유의한 세포보호효과를 검증할 수 있었다. 이 결과로 NSW이 6-OHDA의 뇌세포 독성에 대한 보호 효과를 갖고 있음을 알 수 있었다.

NO는 ONOO $^-$ 로 변화되어 신경세포 내 중요한 기능을 매개함과 동시에 과 발현시 신경세포 사멸의 원인으로 알려져 있는 물질로 산화적 스트레스 상태에서 증가하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 본 실험에서 6-OHDA으로 유도된 세포의 NO 생성률이 증가하였지만, NSW에 의하여 1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 농도 의존적으로 NO의 생성이 억제된 것을 확인하였다.

흰쥐 태아 중뇌 도파민 신경세포에서 TH-positive 세포를 측정하여 NSW의 도파민 세포 보호효과를 확인하였다. 도파민 신경세포는 신경학적, 정신병학적 질환에 관여하는 도파민을 생성하는 세포로 주로 중뇌에 존재한다. 진전, 근긴장, 동작완만 등 운동장애의 증상을 보이는 파킨슨병은 도파민 세포 및 도파민의 생성 감소에 의해 나타나는 질환으로 정확한 원인과 치료방법은 밝혀진 바 없으나, 항산화제를 통한 도파민 세포 보호에 대한 연구가 진행되어 왔다^{9,16)}. 본 실험 결과 6-OHDA에 대한 세포 독성에 대하여 NSW 전처리가 보호효과를 나타내었음을 확인하였다.

연자육은 SH-SY5Y 세포 및 흰쥐 태아 도파민 신경 세포에서 6-OHDA에 의한 뇌신경 세포 독성에 대하여 보호 효과를 나타내었다. 이는 폴리페놀 함유 및 DPPH radical 소거, ABTS cation 소거와 NO 생성 억제 능력의 항산화 작용에 의한 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 NSW의 항산화 효과와 6-OHDA 신경 세포 독성을 이용한 도파민 세포 보호효과에 대하여 연구를 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH radical scavenging assay와 ABTS cation scavenging assay에서 IC₅₀은 각각 184.80 \pm 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 92.90 \pm 0.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났으며, 총 폴리페놀 함량은 10.51 \pm 0.06 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이었다.
2. SH-SY5Y 세포에 대한 NSW의 세포 생존율 효과 실험결과 1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 생존율에 영향을 미치지 않았으며, NO 생성 억제의 효과를 통하여, 6-OHDA에 의한 산화스트레스에 대한 보호 효과를 나타내었다.

3. NSW는 6-OHDA에 의한 태아 중뇌 도파민 신경세포 손상에서 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 보호효과를 나타내었다.

이상의 결과에서 NSW는 항산화 효과 및 뇌세포 보호 효과가 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 Seoul RNBD program (10524) 지원사업에 의해 수행되었음

참고문헌

- 서부일, 최호영. 임상 한방본초학. 영림사. 2004 ; 936-7.
- 전국한외과대학 본초학교실. 본초학. 영림사. 1991 ; 623-4.
- la Cour B, Molgaard P, Yi Z. Traditional Chinese medicine in treatment of hyperlipidaemia. *J Ethnopharmacol.* 1995 ; 46 : 125-9.
- 김태현. 연자육이 LPS 로 유도된 BV2 Microglia cell 에서의 nitric oxide 생성에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2006.
- Kim JH, Kang MK, Cho CW, Chung HS, Kang CW, Parvez S, Bae H. Effects of Nelumbinis Semen on contractile dysfunction in ischemic and reperfused rat heart. *Arch Pharm Res.* 2006 ; 29 : 777-85.
- Jang CG, Kang MK, Cho JH, Lee SB, Kim HT, Park SK, Lee JW, Park SK, Hong MC, Shin MK, Shim IS, Bae HS. Nelumbinis Semen reverses a decrease in 5-HT_{1A} receptor binding Induced by chronic mild stress, a depression-like symptom. *Arch Pharm Res.* 2004 ; 27 : 1065-72.
- Kang MK, Shin DW, Oh JW, Cho CW, Lee HJ, Yoon DW, Lee SM, Yun JH, Choi H, Park SK, Shin MK, Hong MC, Bae HS. The Anti-depressant effect of Nelumbinis Semen on rats under chronic mild stress induced depression-like symptoms. *Am J Chin Med.* 2005 ; 33 : 205-13.
- Sayre ML, Perry G, Smith AM. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 2008 ; 21 : 172-88.
- Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol.* 1992 ; 32 : 804-12.
- Jenner P. Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 1991 ; 136 : 6-15.
- Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. *Kor J Medicinal Crop Sci.* 2004 ; 12 : 191-202.
- Cohen G, Heikkila ER. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem.* 1974 ; 249 : 2447-52.
- Blosis MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958 ; 181 : 1190-200.
- George P, Dimltriou B. Antioxidant Effect of Natural Phenols on Olive Oil. *J Am Oil Chem Soc.* 1991 ; 68 : 669-71.
- Kuramoto T. Development and application of food materials from plant extracts such as SOD. *Up to date Food Processing.* 1992 ; 27 : 22-3.
- Reynolds A, Lauriea C, Mosleya LR, Gendelmana EH. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. *Int Rev Neurobiol.* 2007 ; 82 : 297-325.
- Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* 1996 ; 384 : 240-2.
- Galli RL, Shukitt-Hale B, Youdim, KA, Joseph JA. Fruit polyphenolics and brain aging : nutritional interventions targeting age-related neuronal and behavioral deficits. *Ann NY Acad Sci.* 2002 ; 95 : 128-2.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP : contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001 ; 65 : 135-2.