

## 단감(*Diospyros Kaki L.*)껍질 추출물의 신경세포 보호 효과

이미라<sup>1</sup> · 문성희<sup>1</sup> · 최애란<sup>1</sup> · 이승철<sup>1</sup> · 안광환<sup>2</sup> · 박해룡<sup>†1</sup>

<sup>1</sup>경남대학교 식품생명학과, <sup>2</sup>경남농업기술원 단감연구소

### Neuroprotective Effects of Extracts from *Diospyros kaki L.* Peel

Mi-Ra Lee<sup>1</sup>, Seong-Hee Moon<sup>1</sup>, Ae-Ran Choi<sup>1</sup>, Seung-Cheol Lee<sup>1</sup>,  
Kwnag-Hwan Ahn<sup>2</sup> and Hae-Ryong Park<sup>†1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Changwon 631-701, Korea

<sup>2</sup>Sweet Persimmon Research Institute, Gyung-sangnam-do Agricultural Research & Extension Services, Gimhae 621-802, Korea

#### Abstract

This study was performed to assess the neuroprotective effects of methanolic extracts from sweet persimmon peel (PPE) against glutamate-induced cytotoxicity in hybridoma N18-RE-105 cells. The neuroprotective effects of PPE in N18-RE-105 cells were measured using the MTT reduction assay, LDH release assay, and phase-contrast microscopy. The results of the MTT reduction assay showed that treating cells with 500 µg/mL PPE resulted in cell viability of 66.9%. Additionally, the morphological changes and the results of the LDH release assay showed that glutamate-induced damage to nerve cells was strongly inhibited by PPE. GSH content of N18-RE-105 cells was 3.5 µM compared to that of the control, whereas pretreatment with 500 µg/mL PPE increased GSH content by 4.7 µM. PPE was fractionated with hexane, and that layer had the highest neuroprotective effects in glutamate-stressed N18-RE-105 cells. In conclusion, our data showed that glutamate potentiated the effects of N18-RE-105 cell death by a mechanism involving oxidative stress. Therefore, PPE may be a potential candidate for prevention and therapy of neurodegenerative diseases.

Key words : neuroprotective effect, sweet persimmon, glutamate, N18-RE-105 cells, glutathion

## 1. 서론

최근 생활수준이 향상되고 인간의 수명이 증가함에 따라 노화에 관련된 각종 퇴행성 신경질환과 심혈관계질환 등의 질병에 관심이 커지고 있으며, 특히 이러한 질환의 주된 원

인이 활성산소(free radical, oxygen radical)에 기인한다는 것이(Emerit J 등 2004, Sayre LM 등 2008) 인정됨에 따라 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제의 개발과 연구에 더 많은 관심이 집중되고 있다(Harman D 1981, Hwang SL과 Yen GC 2008, Yim MH 등 2006). 이러한 활성산소들은 불안정하고 산화력이 높아 여러 생체물질과 쉽게 반응하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스를 유발하게 되며 이러한 산화적 스트레스는 지질과산화물을 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 세포의 노화와 변형을 유도함으로써 여러 가지 질병을 초래하게 된다(Lovell MA와

†Corresponding author: Hae-Ryong Park, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Changwon, 631-701, Korea  
Tel : +82-55-249-2689  
Fax : +82-0505-999-2171  
E-mail : parkhy@kyungnam.ac.kr

Markesbery WR 2007, Markesbery WR과 Carney JM 1999, Negre-Salvayre A 등 2008, Singh D 등 2006).

활성산소를 제거하기 위해 세포내에서는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 등 항산화 효소와 glutathione (GSH), uric acid 등의 여러 가지 비효소적 항산화 물질이 있어 활성산소에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호 한다(Ames BN 등 1981, Park HM 등 1997). 특히 GSH는 활성산소에 의한 세포 손상을 방지하고 세포내 해독작용을 담당하는 중요한 물질로 여겨지고 있다(Kato S 등 1993). GSH를 이루고 있는 아미노산 중에서 glutamate는 중추신경계에서 주요한 흥분성 신경전달물질로서 신경계에 필수적인 요소로 작용하지만, glutamate의 농도 증가는 cysteine 흡수를 차단하여 세포내 GSH 수준을 두드러지게 감소시켜 산화적 스트레스를 유발하여 신경세포의 괴사를 초래하는 것으로 알려져 있다(Coyle JT와 Puttfarcken P 1993, Lee IK 등 2003, Penugonda S 등 2005). 그러나 산화적 손상이 세포내에서 대사적 경로를 통하여 세포사멸을 일으키는지는 명확하지 않으며 다만, 어떠한 자극에 의한 세포내 활성산소의 생성과 GSH 함유량의 감소, 그리고 세포손상 기전들이 단독 또는 복합적인 기전으로 작용함으로써 세포사멸을 초래한다고 보여진다(Choi DW 1988, Murphy TH 등 1989, Tan S 등 1998). 이러한 이유로 glutamate 농도 증가에 따른 신경세포 사멸은 산화적 스트레스와 관련성이 있는 것으로 추측하고 있다. 현재 이러한 퇴행성 신경질환을 치료하기 위해서 항산화물 처리, 세포 이식, 외과적 수술 등 다양한 치료법이 제시되고 있지만, 대부분이 위험요소와 부작용을 나타내고 있다. 또한, 뇌 조직의 경우 일단 손상이 되면 기능 회복이 어려우므로 인체에 무해하면서도 효과적인 물질을 천연자원으로부터 탐색하고자 하는 연구가 다각도로 진행되고 있는 실정이다(Choi EJ 등 2007, Gouaze V 등 2004, Kim JH 등 2007).

본 연구팀에서는 N18-RE-105 신경계 세포주를 이용하여 신경세포 보호 효과를 갖는 단감(*Diospyros kaki* L., sweet persimmon) 추출물의 탐색을 시도하였다. 본 연구에서 사용된 단감은 우리나라, 일본 및 중국 등지에서 주로 생산되는 동양 특유의 과실로서 감미가 강하며 알칼리성 식품으로 체내 장의 수축과 장 분비액의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 비타민과 무기질이 풍부하며 특히 비타민A와 C의

함유량이 다른 과실에 비해 높으며, 동의보감과 본초강목에 의하면 감은 고혈압, 동맥경화 등의 순환기계 질환에 효능이 있으며 당뇨병 등의 만성질환과 암 예방 효과를 가진다고 하였다(Celik A와 Ercisli S 2008, Kawase M 등 2003, Kim SY 등 2006, Kim IS 등 2008). 현재 단감은 가공 및 저장에 관한 연구가 대부분이며, 생리활성에 관한 연구는 미비한 실정이다(Kim MS 등 1999, Son KM 등 2002, An GH 등 2004). 특히 부산물인 단감의 껍질에 관한 생리, 약리학적 연구는 아직 초보적인 단계이다.

따라서 본 연구에서는 퇴행성 신경질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 생리활성물질을 탐색하기 위한 목적으로 단감껍질 추출물의 신경세포 보호 효과를 밝히고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 실험재료

시약으로 L-glutamic acid (monosodium salt hydrate), MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), ascorbic acid는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였으며, LDH (lactate dehydrogenase) release assay kit는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)로부터 구입하였다. 세포주 배양을 위해 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), horse serum (HS) 및 HAT supplement 등은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

### 2. 단감 추출물 및 분획물 제조

본 연구에 사용한 단감은 경남농업기술원 단감연구소(경남 진영)에서 제공 받아 사용하였으며, 단감을 꼭지(calyx), 껍질(peel), 과육(flesh) 부분으로 나누어 동결 건조하였다. 시료 5 g에 methanol 용매를 100 mL씩 가하여 상온에서 3 일 동안 정치시켜 추출한 다음, 여과지(Advantec, Tokyo, Japan)로 여과하였다. 여과된 추출액은 회전감압농축기

(EYELA N-1000, Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C에서 감압 농축하여 추출물을 얻었다. 단감꼭지 추출물을 PCE, 단감껍질 추출물을 PPE, 단감과육 추출물을 PFE라고 명명하였다. PPE에서 다음 단계의 분획물을 얻기 위하여 용매의 극성을 달리하여 순차적으로 용매분획물을 얻었다. 즉, hexane과 물을 같은 비율로 분획 추출하여 hexane 층을 분리하였고, 동일한 방법으로 diethyl ether, ethyl acetate 및 물 층으로 분획하여 얻어진 각각의 용매 분획물을 감압 농축시켜 분획물을 얻었다. 각 추출물 및 분획물은 10 mg/mL로 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

### 3. 세포주의 배양

본 실험에 사용된 세포주는 hybridoma N18-RE-105 cells로 한국생명공학연구원에서 분양 받아 사용하였다. 사용된 배지는 DMEM medium에 10% FBS, 5% HS 및 1 × HAT supplement를 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (MCO-18AIC, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

### 4. MTT reduction assay

PCE, PPE 및 PFE의 신경세포 보호 효과를 측정하기 위하여 MTT reduction assay를 실시하였다. 세포주를 5 × 10<sup>4</sup> cells/mL로 맞추고 96-well plate에 각각 100 μL씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 추출물과 분획물을 처리하였다. 그리고 30분 동안 배양한 후 glutamate를 20 mM 되도록 처리하여 24시간 배양하고 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT (5 mg/mL) 용액을 10 μL씩 첨가하여 1시간 동안 다시 배양하였다. 반응 후 well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO 100 μL를 첨가하여 녹이고 ELISA reader (Model 680, BioRad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아무것도 처리하지 않은 세포수를 100%로 하였을 때 상대적인 세포 성장 억제율을 구하였다.

### 5. LDH release assay

PPE의 신경세포 보호 효과를 측정하기 위한 방법으로

LDH release assay를 실시하였다. N18-RE-105 세포주를 5 × 10<sup>4</sup> cells/mL로 맞추고 후, 100 μL씩 96-well plate에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양한 뒤 PPE를 세포주에 처리하였다. 그리고 30분 후 glutamate 20 mM을 처리하여 24시간 배양한 다음, 배양액을 새로운 96-well plate에 50 μL 분주하고, 이 배양액에 LDH reagent를 50 μL씩 첨가하여 상온에서 정치시킨 후, 20분간 반응하였다. 반응이 완료되면 stop solution인 1 N HCl을 100 μL씩 첨가하여 반응을 중지시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH에 의한 세포독성의 백분율은 배양액과 살아 있는 세포에서 유리된 총 LDH에 대한 배양액으로부터 유리된 LDH의 값으로 계산하여 glutamate가 처리된 실험군과 비교한 값을 나타내었다.

### 6. 세포내의 glutathione (GSH) 측정

N18-RE-105 세포주의 GSH양을 측정하기 위하여 1 × 10<sup>5</sup> cells/mL의 세포 배양액에 5% meta-phosphoric acid를 넣어 4°C에서 1분간 초음파 분쇄 후, 3000 × g, 4°C에서 10분간 원심 분리하였다. 상등액의 GSH양을 측정하기 위해 GSH assay kit (Bioxytech GSH-400, OR, USA)를 사용하여 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포내 GSH의 양은 단백질 백분율당 μM로 나타내었다.

### 7. 세포주의 형태학적 변화 관찰

N18-RE-105 세포주의 형태학적인 관찰을 위해 6-well plate에 1 × 10<sup>5</sup> cells/well로 24시간 동안 배양한 후, PPE를 농도별로 처리하였다. 그리고 30분 후 glutamate 20 mM을 24시간 노출시켜 phase contrast microscope (TS 100-F, Nikon, Tokyo, Japan)로 각 well의 세포형태를 관찰하고 100 배로 사진 촬영하였다.

### 8. 통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치 ± 표준편차 (SD)를 구하였다. 단감 추출물의 신경세포 보호 효과의 정도를 비교하기 위하여 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고 Scheffe's test를 이용하여 대조군과 각 구간

의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 단감 추출물의 신경세포 보호 효과

본 연구에서는 단감의 부위별 추출물을 50, 100, 500  $\mu$ g/mL의 농도로 N18-RE-105 세포주에 처리하여 고농도의 glutamate에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서 신경세포 보호 효과를 확인하였다(Fig. 1). Glutamate가 20 mM 단독 처리된 세포주에서는 세포생존율이 30% 정도였으나, PPE와 PCE 500  $\mu$ g/mL에서는 세포생존율이 50% 이상인 66.9, 66.2%의 생존율을 나타냄으로써 세포를 보호하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 반면, PFE는 44.8%의 약한 활성을 보였다. 다음으로, glutamate로 유도된 세포독성 상태에서 활성이 가장 좋은 PPE를 가지고 N18-RE-105 세포주의 형태학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 광학현미경하에서 관찰하였다(Fig. 2). 그 결과, 정상군에서는 건강하게 뽀은 돌기를 관찰할 수 있었지만 glutamate 처리군의 신경세포는 산화적 스트레스로 인하여 전체적인 세포의 수가 적을 뿐 아니라 돌기가 거의 소멸된 양상을 보여 세포가 형태학적으로 큰 변화가 유도된 것을 확인할 수 있으나, PPE를 100, 500  $\mu$ g/mL로 처리한 세포주에서는 농도의존적인 세포의 생존을 확인할 수 있었다(Cheng HY 등 2008). 이러한 신경세포의 형태학적인 변화를 통하여 PPE는 glutamate 독성에 의한 신경세포 손상을 억제하거나 보호하는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 동일한 조건하에서 구체적인 세포의 손상 정도를 확인하기 위하여 세포 배양액 중에 들어 있는 LDH의 방출량을 측정된 결과는 Table 1과 같다. Glutamate가 처리된 N18-RE-105 세포주에 PPE 50, 100, 500  $\mu$ g/mL을 처리하여 glutamate 처리군과 비교한 결과, LDH 방출량이 각각 59.8, 61.0, 49.6%로 감소하여 대조군의 수준으로 회복되었다는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 세포배양에서 방출된 LDH의 활성 정도를 알아봄으로써 세포손상 정도와 비례관계를 가진다는 것을 알 수 있었다. Glutamate가 세포에 손상을 끼침에 따라 세포막파괴로 인해 LDH 방출량이 높은 것과 대조적으로 PPE 처리군에서는 농도 의존적으로

glutamate가 유도하는 산화적 스트레스로 인한 세포손상으로부터 신경세포를 보호함에 따라 효과적으로 LDH 방출량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 PPE가 glutamate의 산화적 스트레스로부터 유도되는 세포사를 억제한다는 것을 시사하고 있다.

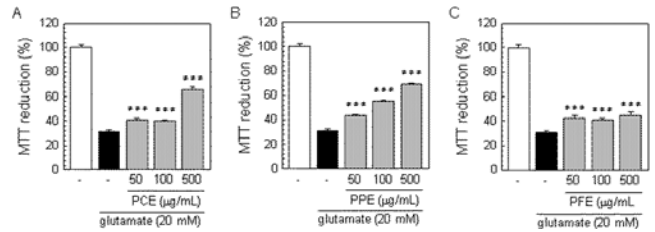


Fig. 1. The neuroprotective effects of extracts of the sweet persimmon on glutamate-induced cytotoxicity in N18-RE-105 cells.

The cells were pretreated for 30 min with PCE (A), PPE (B), and PFE (C) and then treated with 20 mM of glutamate for 24 hr. After a MTT assay, the survival rate was calculated by setting each of control survival rate. \*\*\*significantly different from glutamate-treated control group ( $p < 0.001$ )

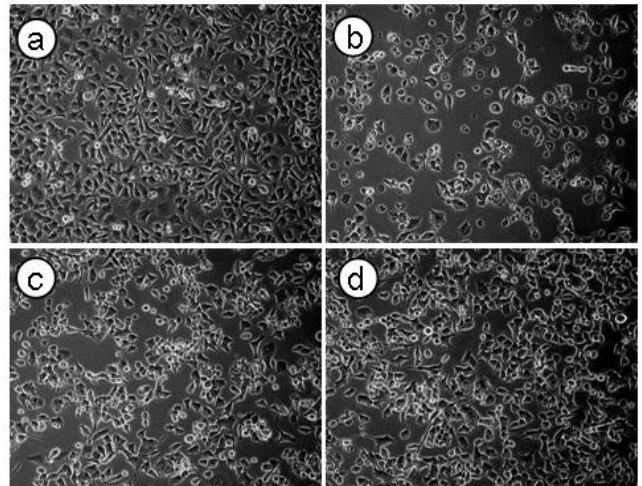


Fig. 2. The neuroprotective effects of PPE glutamate-induced cytotoxicity in N18-RE-105 cells.

The cell viability was measured using a morphological analysis. The cells were exposed to PPE and morphological changes were monitored for 24 hr (a: control, b: 20 mM glutamate, c: 20 mM glutamate/100  $\mu$ g/mL PPE, d: 20 mM glutamate/500  $\mu$ g/mL PPE). Photographs were taken with a phase contrast microscope at 100  $\times$  magnification

Table 1. Neuroprotective effects of PPE on LDH leakage in N18-RE-105 cells

Treatment	LDH release (%)
Control	40.9 ± 0.57
Glutamate	72.5 ± 0.65
PPE (50 µg/mL) + glutamate	59.8 ± 2.44***
PPE (100 µg/mL) + glutamate	61.0 ± 0.49***
PPE (500 µg/mL) + glutamate	49.6 ± 2.14***

The cells were incubated with 20 mM glutamate for 24 hr. Data were normalized to the activity of LDH release from vehicle-treated cells and expressed as percentage of the glutamate-treated control group. \*\*\*significantly different from glutamate-treated control group (p<0.001)

## 2. 세포내 glutathione (GSH) 합성에 대한 단감껍질 추출물 (PPE)의 영향

고농도의 glutamate를 처리하여 N18-RE-105 세포주 내의 GSH 합성량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 아무것도 처리하지 않은 대조군의 GSH 합성량은 7.3 µM로 높게 나타나는 반면, glutamate 처리군의 GSH 합성 수준은 3.4 µM로서 대조군에 비해서 절반에도 미치지 못하는 수준으로 나타났다. 그리고 glutamate가 처리된 N18-RE-105 세포주에 PPE 100, 500 µg/mL을 처리하여 glutamate 처리군과 비교한 결과, GSH 합성량이 3.7, 4.6 µM의 수준으로 증가하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 세포내의 GSH는 세포 내재적 방어 물질의 하나로 정상적인 세포에서 발생하는 활성산소기와 결합하여 고유의 순환 대사경로를 통해 활성산소기를 세포 밖으로 배출함으로써 세포독성에 대한 방어 역할을 한다 (Bhandari U와 Ansari MN 2008). GSH의 합성 감소는 활성산소기를 증가시키며 이러한 활성 산소기가 지질 과산화 연쇄반응을 일으켜 DNA 손상 등 산화적 스트레스를 유발한다 (Ansari MA 등 2009).

이상의 결과로부터 단감껍질은 glutamate에 의해 유도되는 GSH의 합성 감소를 억제하여 신경세포를 보호하고 있다는 것을 알 수 있었다(Miyamoto M 등 1989).

Table 2. Effect of PPE on the levels of intracellular GSH in the presence of glutamate

Treatment	GSH levels (µM)
Control	7.3 ± 0.71
Glutamate	3.4 ± 0.13
PPE (100 µg/mL) + glutamate	3.7 ± 0.14
PPE (500 µg/mL) + glutamate	4.6 ± 0.73*

The cells were seeded and grown for 24 hr, and then they were treated with 20 mM glutamate. After 24 hr, cells were removed and analyzed for GSH levels. \*significantly different from glutamate-treated control group (p<0.05)

## 3. 단감껍질 추출물(PPE) 분획물의 신경세포 보호 효과

단감 추출물 중에서 가장 강력한 신경세포 보호 효과를 가지는 단감껍질 추출물(PPE)에서 활성이 있는 물질의 특성을 확인하기 위하여 PPE를 극성도에 따라 hexane, diethyl ether, ethyl acetate 및 물 층 순서로 용매 분획하여, 그 분획물을 얻었다 (Hwang HS 등 2006). 단감껍질 분획물의 신경세포 보호 효과에 대한 결과는 Fig. 3과 같다. N18-RE-105 세포주에 각 분획물을 10, 50 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, hexane 층에서 신경세포 보호 효과가 가장 높았다. 즉, hexane 분획물 50 µg/mL을 처리했을 때 79.6%의 신경세포 생존율을 보였으며 diethyl ether 분획물에서도 50 µg/mL 농도 처리 시 61.4%로 활성이 증가하였으나 hexane 분획물과 비교하였을 때 상대적으로 효과가 낮음을 알 수 있었다. Ethyl acetate 분획물에서는 다른 분획물과 비교하였을 때 미약한 활성이 보였으며 물 층에서는 거의 활성이 보이지 않았다. 이 결과를 바탕으로 극성도가 높은 ethyl acetate, 물 층보다 비극성도가 높은 hexane 층에서 활성이 확인됨에 따라 단감껍질 추출물에서 신경세포 보호 효과를 가지는 물질이 비극성 성질을 가지는 것을 알 수 있었다.

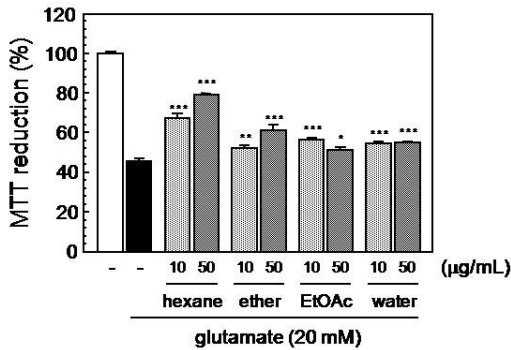


Fig. 3. The neuroprotective effects of each fraction of the PPE on glutamate-induced cytotoxicity in N18-RE-105 cells.

The cells were treated with fractions of PPE and then treated with 20 mM of glutamate for 24 hr. After MTT reduction assay, the survival rate was calculated by setting each of control survivals rate. Significant vs. glutamate-treated control group (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ )

#### IV. 결론

본 연구는 glutamate가 유도하는 세포독성으로부터 신경세포를 보호하는 단감 추출물에 대한 연구로서, 단감 시료는 껍질, 껍질, 과육 부분으로 나누어 추출물을 제조하여 사용하였다. N18-RE-105 신경계 세포주에 20 mM의 glutamate와 각각의 추출물을 처리하여 확인한 결과, 단감껍질 추출물 500 µg/mL에서 66.9%의 높은 세포생존율을 확인할 수 있었다. 또한, 단감껍질 추출물은 신경세포의 형태학적인 변화와 LDH 방출을 억제하는 효과를 확인함으로써 glutamate에 의해 유도된 신경세포 손상을 억제한다는 것을 알 수 있었다. 세포내의 GSH 합성량을 측정한 결과, glutamate 처리군에 비해 단감껍질 추출물을 처리한 세포주에서는 세포내의 GSH 합성량이 농도 의존적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 다음으로 단감껍질 추출물을 이용하여 극성도에 따라 용매 분획하여 신경세포 보호 효과를 확인한 결과, hexane 분획물에서 가장 높은 활성을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 단감껍질 추출물은 단감의 다른 부위 추출물보다 glutamate에 의한 세포독성으로부터 신경세포를

보호하는 효과가 있다는 것을 확인함으로써 퇴행성 신경질환에 대한 예방 및 치료의 새로운 소재로서의 가능성이 있다는 것을 알 수 있었다.

#### 감사의 글

이 논문은 2010년 단감수출연구사업단 지원으로 이루어졌습니다.

#### 참고문헌

Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(11):6858-6862

Ansari MA, Abdul HM, Joshi G, Opii WO, Butterfield DA. 2009. Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 20(4):269-75

Bhandari U and Ansari MN. 2008. Protective effect of aqueous extract of *Embelia ribes* Burm fruits in middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats. *Indian J Pharmacol* 40(5):215-20

Celik A and Ercisli S. 2008. Persimmon cv. Hachiya (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit: some physical, chemical and nutritional properties. *Int J Food Sci Nutr* 59(7-8):599-606

Cheng HY, Hsieh MT, Wu CR, Tsai FH, Lu TC, Hsieh CC, Li WC, Lin YT, Peng WH. 2008. Schizandrin protects primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity. *J Pharmacol Sci* 107(1):21-31

Choi DW. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1(8):623-634

Choi EJ, Lee YS, Kim GH. 2007. Antioxidative characteristics of extracts from aromatic herb *Elsholtzia splendens*. *Food Sci Biotechnol* 16(3):489-492

Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262(5134):689-695

- Emerit J, Edeas M, Bicaire F. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Biomed Pharmacother* 58(1):39-46
- Gouaze V, Yu JY, Bleicher RJ, Han TY, Liu YY, Wang H, Gottesman MM, Bitterman A, Giuliano AE, Cabot MC. 2004. Overexpression of glucosylceramide synthase and  $\beta$ -glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy. *Mol. Cancer Ther* 3(5):633-639
- Hamman D. 1981. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(11):7124-7128
- Hwang HS, Lee YK, Lee KG. 2006. Fractionation of banaba leaves extract (*Lagerstromia speciosa* L. Pers) and its antioxidant activity. *Food Engineering Progress* 10(2):120-124
- Hwang SL, Yen GC. 2008. Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in PC12 cells. *J. Agric Food Chem* 56(3):859-864
- Kato S, Ishita S, Sugawara K, Mawatar K. 1993. Cystine/glutamate antiporter expression in retinal Muller glial cells: implications for DL-alpha-aminoadipate toxicity. *Neuroscience* 57(2):473-482
- Kawase M, Motohashi N, Satoh K, Sahagami H, Nakashima H, Tani S, Shirataki Y, Kurihara T, Spengler G, Wolfard K, Molnar J. 2003. Biological activity of persimmon (*Diospyros kaki*) peel extracts. *Phytother Res* 17(5):495-500
- KimerAnimTechnol I):133-14
- Kim JH, Ha HC, Lee MS, Kang JI, Kim HS, Lee SY, Pyun KH, Shim I. 2007. Effect of Tremella fuciformis on the neurite outgrowth of PC12 cells and the improvement of memory in rats. *Biol Pharm Bull* 30(4):708-714
- Kim MS, Oh SD, Son DS. 1999. Effect of seedlessness on the incidence of flesh browning during MA storage in non-astringent persimmons (*Diospyros kaki* L.). *J. Kor Soc Hort Sci*, 40:79-82
- Kim SY, Jeong SM, Kim SJ, Jeon KI, Park E, Park HR, Lee SC. 2006. Effect of heat treatment on the antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from persimmon (*Diospyros kaki* L.) peel. *Biosci Biotechnol Biochem* 70(4):999-1002
- Lee IK, Yun BS, Kim JP, Ryoo IJ, Kim YH, Yoo ID. 2003. Neuroprotective activity of  $p$ -terpenyl leucomentins from the mushroom *Paxillus panuoides*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67(8):1813-1816
- Lovell MA, Markesbery WR. 2007. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res* 35(22):7497-7504
- Markesbery WR, Carney JM. 1999. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 9(1):133-146
- Miyamoto M, Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT. 1989. Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Pharmacol Exp Ther*. 250(3):1132-1140
- Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. 1989. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2(6):1547-1558
- Park HM, Kim SH, Seo JH, Hur M. 1997. The change of blood reduced glutathione according to postmenopausal HRT : GSH as a maker of antioxidant effect of the sex steroids. *JKSM* 3(2):116-125
- Park YS, Kim SR. 2002. Effects of prestorage conditioning and hot water dip on fruit quality of non-astringent 'Fuyu' persimmons during cold storage. *J. Kor Soc Hort Sci*. 43:58-63
- Penugonda S, Mare S, Goldstein G, Branks WA, Ercal N. 2005. Effects of n-acetylcysteine amide (NACA), a novel thiol antioxidant against glutamate-induced cytotoxicity in neuronal cell line PC12. *Brain Res* 1056(2):132-138
- Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. 2008. Advanced lipid peroxidation and products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* 153(1):6-20
- Sayre LM, Perry G, Smith MA. 2008. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 21(1):172-188
- Singh D, Kaur R, Chander V, Chopra K. 2006. Antioxidants in the prevention of renal disease. *J Med Food* 9(4):443-450
- Son GM, Kim KH, Sung TS, Kim JH, Shin DJ, Jeong JY, Bae YI. 2002. Physicochemical characteristics of sweet persimmon by heating treatments. *Korean J Food & Nutr*. 15:144-150
- Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D. 1998. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 141(6):1423-1432
- Yim MH, Hong TG, Lee JH. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of fermentation and ethanol extracts of Pine Needles (*Pinus densiflora*). *Food Sci Biotechnol* 15(4):582-588