

<원 저>

## 6-Hydroxydopamine 유발 SH-SY5Y 세포주 손상에 대한 resveratrol의 신경보호 효과

장건천<sup>1</sup> · 김형춘<sup>2</sup> · 위명복<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 수의과대학 및 동물의학연구소, <sup>2</sup>강원대학교 약학대학

(접수: 2013년 8월 29일, 수정: 2013년 12월 3일, 게재승인: 2013년 12월 24일)

### Neuroprotective effects of resveratrol on 6-hydroxydopamine-induced damage of SH-SY5Y cell line

Geon-Cheon Chang<sup>1</sup>, Hyoung-Chun Kim<sup>2</sup>, Myung-Bok Wie<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, and <sup>2</sup>Neuropsychopharmacology and Toxicology Program, College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received: August 29, 2013; Revised: December 3, 2013; Accepted: December 24, 2013)

**Abstract :** Parkinson's disease is known to exhibit progressive degeneration of the dopaminergic neurons in the substantia nigra via inhibition of glutathione metabolism. It is well known that 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Parkinson's disease-like symptoms, while resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) has been shown to have anti-inflammatory and antioxidant effects. In the present study, we investigated the neuroprotective effects of resveratrol, a phytoalexin found in grapes and various plants, on 6-OHDA-induced cell damage to the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. Resveratrol (5 and 10  $\mu$ M) inhibited 6-OHDA (60  $\mu$ M)-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells and induced a reduction of the number of apoptotic nuclei caused by 6-OHDA treatment. Additionally, the total apoptotic rate of cells treated with both resveratrol (10  $\mu$ M) and 6-OHDA (60  $\mu$ M) was less than that of 6-OHDA treated cells. Resveratrol also dose-dependently (1, 5 and 10  $\mu$ M) scavenged reactive oxygen species (ROS) induced by 6-OHDA in SH-SY5Y cells and prevented depletion of glutathione in response to the 6-OHDA-induced cytotoxicity in the glutathione assay. Overall, these results indicate that resveratrol exerts a neuroprotective effect against 6-OHDA-induced cytotoxicity of SH-SY5Y cells by scavenging ROS and preserving glutathione.

**Keywords :** 6-hydroxydopamine, apoptosis, Parkinson's disease, resveratrol, SH-SY5Y cell line

## 서 론

파킨슨병은 중뇌의 흑색질(substantia nigra)에 분포하는 도파민성 뉴런의 선택적 퇴행변화를 일으키는 대표적 신경계 질환 가운데 하나로 강직(rigidity), 서동(bradykinesia), 안정시 진전(resting tremor) 및 자세 불안정(postural instability)을 특징으로 하며 아직 이 질환의 발병원인은 확실하게 밝혀지지 않았지만, 노화(aging), 미토콘드리아의 기능 이상, 체내 대표적 항산화 물질 가운데 하나인 글루타티온 양의 뇌내 감소 및 고갈과 더불어 산화적 스트레스 증가의 결과로 인한 apoptosis가 주로 병인과 관련이 있는 것으로 알려져

왔다 [12, 14].

최근 들어 환경오염의 증가로 인해 현대인에게 다양한 형태의 신경퇴행성 질환이 급증하는 추세와 더불어 식이보충 형태로 섭취하는 각종 항산화제가 예방의학적으로 매우 중요하게 인식되고 있다 [1]. 레스베라트롤(resveratrol, 3,5,4'-trihydroxystilbene)은 포도, 포도주, 땅콩 등에 주로 존재하는 phytoestrogen 혹은 phytoalexin의 일종으로 곰팡이 공격이나 손상에 반응해서 포도나무 같은 종자식물에 의해 합성되는 비플라보노이드 계열의 페놀화합물의 일종으로 인간건강에 유익한 것으로 알려져 왔으며, 레스베라트롤의 효능에 대하여는 항산화, 지질 및 지단백 대사 조절, 혈소판 응집억제,

\*Corresponding author

Tel: +82-33-250-8676, Fax: +82-33-259-5625

E-mail: mbwie@kangwon.ac.kr

혈관 이완, 항암효과 등이 보고되고 있는데, 특히 암 예방에 유용할 뿐만 아니라 백혈병세포, 지방암세포 등 다양하게 암 세포의 성장을 억제함이 보고되었다 [2, 3, 7, 9]. 또한, 레스베라트롤은 중국과 일본에서 오랫동안 심장병 및 뇌졸중을 치유하는 효능이 알려진 전통 천연약물 Itadori tea의 구성성분으로도 사용돼 왔으며 [3], 최근 심혈관계질환과 암뿐만 아니라 헌팅턴병, 파킨슨병, 알츠하이머 치매 같은 퇴행성 신경질환의 치료와 예방에도 레스베라트롤 같은 stilbenoid 화합물이 도움을 줄 수 있다는 사실이 점차 알려지고 있다 [15]. 그동안 파킨슨병 실험모델과 관련한 레스베라트롤의 세포보호 차원의 약리학적 작용기전에 관한 연구로는 인간 신경암세포종(human neuroblastoma)인 SH-SY5Y 세포에서 과량의 도파민 유발 신경 독성으로 인한 apoptosis 신호 단백질인 caspase-3 억제 및 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현 증가 [10]와 실험적 파킨슨병 유발물질로 알려진 6-hydroxydopamine(6-OHDA)을 rat 선조체 투여하여 흑질부위에서 염증과 관련한 cyclooxygenase-2(COX-2) 및 TNF- $\alpha$  mRNA의 변화 감소 관찰 [8]이 있었고, 또 다른 실험적 파킨슨병 유발물질로 알려진 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) 투여로 인한 마우스 흑질 신경세포 손상에 대해 레스베라트롤이 항산화 작용을 통해 보호작용을 나타냄을 알 수 있다 [11].

실험적으로 중저 흑색질 혹은 선조체에 6-OHDA를 투여하면 도파민성 뉴런의 손상을 볼 수 있는데, 이는 초기 단계의 파킨슨병과 유사한 증상을 나타낸다 [6, 10]. 따라서 본 실험에서는 레스베라트롤이 갖는 신경세포 보호효능을 세포 수준에서 알아보기 위해 파킨슨병 모델 유발 독성물질로 알려진 6-OHDA를 이용하여, 인간 신경암 세포종인 SH-SY5Y 신경세포에서 6-OHDA 처리 시 신경세포의 apoptosis 및 reactive oxygen species(ROS) 증가 및 글루타민 감소에 대해 레스베라트롤이 방어 효과를 나타내는지 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양

Human neuroblastoma인 SH-SY5Y 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)과 100 U/mL penicillin/100  $\mu$ g/mL streptomycin을 첨가하여 배양하였다. 세포는 37°C 조건에서 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator에서 배양 유지되었으며, 배지는 최종 실험 전까지 2일 간격으로 갈아주었다.

### 6-OHDA에 의한 세포 손상

6-OHDA(CAS no. 28094-15-7; Sigma, USA)은 dimethylsulfoxide(DMSO)로 30 mM stock solution으로 만들어 준비하였으며, 각각의 실험 시 DMSO에 희석하여 사용하였다. 배지 당 DMSO의 농도는 0.1%를 초과하지 않았다. 세포는 레스베라트롤을 2시간 전처리한 다음 6-OHDA를 24시간 동

안 처리하였다. 세포 손상은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay, lactate dehydrogenase(LDH) assay로 측정하였으며, 세포의 형태학적 변화는 위상차현미경 혹은 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색을 하여 형광현미경(Carl Zeiss, Germany)으로 확인하였다.

### 레스베라트롤 처리

레스베라트롤(CAS no. 501-36-0; Sigma)은 DMSO에 용해하여 제조하였으며, DMEM 배지로 희석 사용하였다. 세포 배양에서 DMSO는 0.1%를 초과하지 않도록 하였다.

### MTT assay

MTT assay는 cell viability를 측정하기 위해 사용하였다. 96-well 플레이트에 well 당  $2.0 \times 10^4$  농도로 SH-SY5Y cells를 seeding하였다. 세포에 6-OHDA를 60  $\mu$ M 농도로 첨가하기 2시간 전에 레스베라트롤을 각각 5, 10  $\mu$ M로 전처리하였다. 6-OHDA (60  $\mu$ M) 처리 후 24시간째 20  $\mu$ L MTT (5 mg/mL in PBS)에 4시간 동안 처리한 다음 상등액을 제거한 후 200  $\mu$ L DMSO를 첨가하여 가볍게 흔들고 570 nm 흡광도에서 microplate spectrophotometer를 통해 reading하였다.

### LDH assay

세포 손상 정도를 알아보기 위한 또 다른 방법으로 LDH 분비 정도를 측정하였다. 세포는 24-well plate에  $1.0 \times 10^5$ /well 농도로 seeding하였다. 레스베라트롤을 2시간 전처리한 후 배양세포를 6-OHDA에 24시간 동안 노출했다. 노출 종료 후 각각의 well로부터 25  $\mu$ L씩 배양액을 96-well에 옮겨 담은 다음 NADH buffer(NADH 3 mg/0.1 M PBS 10 mL)와 pyruvate buffer를 각각 100  $\mu$ L, 25  $\mu$ L씩 넣어 340 nm 흡광도에서 microplate spectrophotometer(Molecular Device, USA)로 kinetic program을 이용하여 측정하였다.

### DAPI 염색

DAPI 염색을 위해 poly-D-lysine과 laminin으로 코팅된 coverglass-bottom dish에  $2 \times 10^5$  농도로 seeding하여 키운 세포를 PBS로 씻은 후 70% ethanol로 30분 고정하였다. PBS로 씻은 다음 1:1,000 비율로 DAPI(final 1  $\mu$ g/mL) 염색을 10분간 시행하고 다시 PBS로 씻은 후 fluorescence inverted microscope(Carl Zeiss, Germany)로 DNA 변화 여부를 관찰하였다.

### Annexin V and Dead Cell assay

배양한 세포에 각각의 약물을 처리한 다음 24시간 후 1% trypsin EDTA를 처리하여 세포를 배양하고 15 mL conical tube에 모은 다음 600  $\times$  g에서 5분간 원심 분리하였다. 상등액을 버린 다음 1% FBS를 함유한 DMEM으로 pipet을 이용하여 세포를 단일세포로 만들고 이것을  $2 \times 10^5$ /mL 농도가 되게 하였다. 100  $\mu$ L를 microtube에 옮기고 Annexin V &

Dead Cell Kit(EMD Millipore, USA)를 이용하여 동량의 Annexin V & Dead Cell reagent를 첨가해 20분 동안 암실은 조건에 방치한 후 세포분석기(Muse Cell Analyzer; Millipore, USA)를 이용하여 분석하였다.

#### Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay

24-well의 세포를 2% SDS를 사용하여 용해시킨 다음 cell scraper를 이용하여 배양하고 microtube에 세포를 모은 후 ice-cold 상태에서 30초간 초음파로 분쇄하여 100  $\mu$ L씩 sample을 채취하였다. TBARS assay kit(ZeptoMetrix, USA)를 이용하여 각각 100  $\mu$ L의 SDS 용액을 넣어 섞은 다음 2.5 mL TBA/Buffer reagent를 첨가하여 95°C에서 60분간 가열 후 ice bath에서 식히고 1,400  $\times$  g에서 30분간 원심 분리한 후 상등액을 채취하여 532 nm에서 흡광도를 측정 비교하였다. 또한, 동시에 malondialdehyde(MDA) standard(0~100 nmol/mL) 용액을 이용하여 MDA 농도별로 표준검량선을 만들어 값을 구하였다.

#### Glutathione assay

각각 약물 처리한 배양세포를 trypsin으로 처리한 후 4°C에서 300  $\times$  g로 10분간 원심 분리하고 cold PBS(pH 7.4)로 한 번 세척하고 suspension 하였다. 이후 세포를 다시 동일 방법으로 원심 분리 및 세척해서 상등액을 버린 다음 5%(w/v) metaphosphoric acid를 넣어 현탁액을 만들고 초음파로 분쇄한 다음 5분간 얼음 위에 방치하였다가 4°C에서 12,000  $\times$  g로 5분간 원심 분리하여 상등액을 분리하고 글루타티온 검출 kit(Enzo Life Science, USA)의 검출 방법에 따라 총 글루타티온과 산화 글루타티온을 405 nm에서 각각 측정하여 GSH/GSSG(pmol) 비율로 표시하였다.

#### 통계분석

모든 실험 결과는 mean values  $\pm$  standard deviation(SD)

으로 나타내었다. Statistical analysis는 Dunnett test를 따르는 one-way ANOVA를 사용하였으며 통계적 유의성은  $p < 0.05$ 일 경우 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

#### 6-OHDA 용량-독성반응

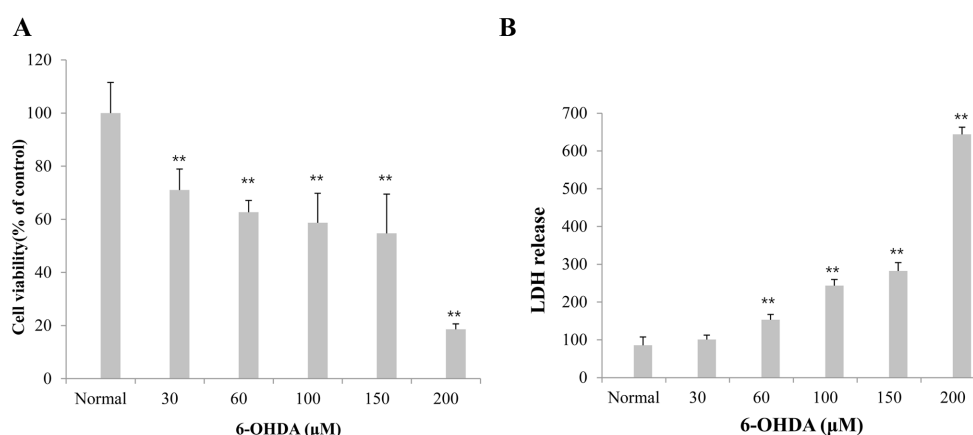
MTT 분석방법을 이용하여 6-OHDA를 SH-SY5Y세포에 처리한 세포독성검사에서는 normal과 비교하면 30, 60, 100, 150, 200  $\mu$ M의 6-OHDA를 투여한 군에서 각각 69%, 62%, 58%, 53%, 18%의 세포 생존율을 나타내어 처리용량이 증가함에 따라 cell viability가 감소함을 나타내었다(Fig. 1A). 세포 독성평가의 또 다른 방법의 하나로 LDH 분비를 이용한 평가에서는 6-OHDA(30, 60, 100, 150, 200  $\mu$ M)을 투여한 군에서도 6-OHDA 처리에 따른 세포 손상 증가에 따라 LDH 분비 증가가 관찰되었다(Fig. 1B). 따라서 6-OHDA의 신경세포 독성에 대한 레스베라트롤의 보호 효과를 관찰하기 위해서 MTT 및 LDH 분석에서 나타난 세포 손상 정도를 동시에 고려하여 60  $\mu$ M로 설정하였다.

#### Resveratrol에 의한 신경보호 효과 및 형태학적인 증거

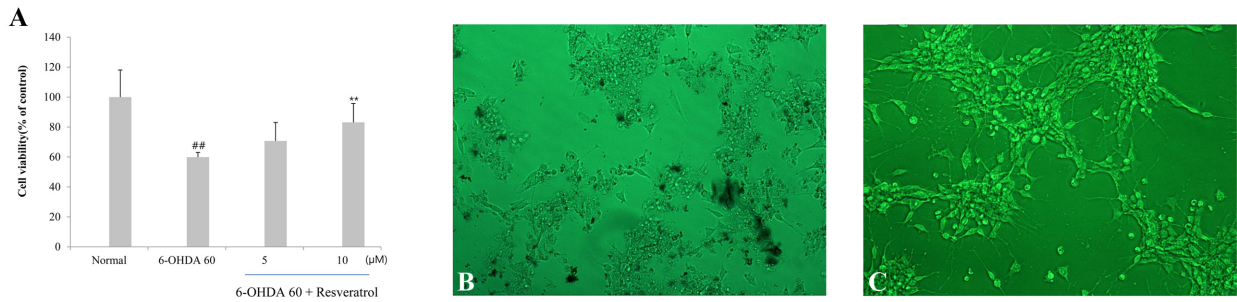
MTT 분석결과 6-OHDA(60  $\mu$ M)를 투여한 군의 cell viability는 normal군보다 40% 가량 감소하였다. 하지만 레스베라트롤 5  $\mu$ M 및 10  $\mu$ M을 전처리한 군에서는 normal군보다 각각 31%, 17% 감소하여 cell viability가 6-OHDA 단독 투여 군보다 증가함을 보여주었다(Fig. 2A). 위상차현미경을 이용한 형태학적인 세포 관찰에서 6-OHDA 투여 시 많은 세포의 손상과 소실이 관찰되었으며(Fig. 2B) 레스베라트롤을 전처리한 군에서는 세포 손상이 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 2C).

#### DAPI 염색을 이용한 resveratrol의 DNA 보호 효과

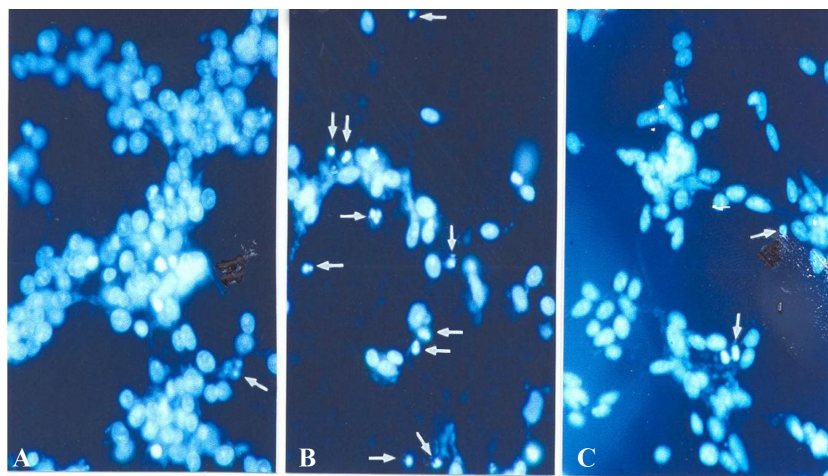
DNA 손상에 대한 형태학적인 관찰에서는 normal군(Fig.



**Fig. 1.** Dose-toxicity of 6-OHDA in SH-SY5Y cells. Cytotoxicity of SH-SY5Y cells was quantified by MTT assay (A) and LDH release measurement. Cultures were exposed with 30-200  $\mu$ M concentrations of 6-OHDA for 20-24 h. Values are presented as mean  $\pm$  SD. (n = 8, \*\*  $p < 0.01$  vs. normal).



**Fig. 2.** Protective effects of resveratrol on 6-OHDA-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Cultures were preincubated with 5 or 10  $\mu\text{M}$  resveratrol 2 h prior to the exposure to 6-OHDA for 20-24 h (A). Morphological evidence of protection by resveratrol on 6-OHDA-induced neurotoxicity (B and C). Phase contrast photomicrographs of cultured SH-SY5Y cells with 6-OHDA alone (B) or in the presence of both 10  $\mu\text{M}$  resveratrol and 6-OHDA (C).



**Fig. 3.** Detection of apoptosis in SH-SY5Y cells by DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) stain. Arrow indicates fragmented DNA nuclei. (A) Vehicle. (B) 60  $\mu\text{M}$  6-OHDA. (C) 60  $\mu\text{M}$  6-OHDA + 10  $\mu\text{M}$  resveratrol.

3A)보다 6-OHDA(60  $\mu\text{M}$ ) 투여 군에서 cell loss가 많이 생겨 염색된 핵이 감소한 것을 볼 수 있고, 분절된 핵과 핵 염색질 응축을 관찰할 수 있다(Fig. 3B). 이에 비해 레스베라트롤(10  $\mu\text{M}$ )을 전처리한 군에서는 세포의 분절화 및 핵 응축의 감소를 나타내었다(Fig. 3C).

#### Annexin V/PI staining

normal군은 apoptotic cell rate가 5.6%(Fig. 4A)인데 반해 6-OHDA(60  $\mu\text{M}$ ) 단독 투여 군에서는 29.6% 증가세를 보였다(Fig. 4B). 레스베라트롤(10  $\mu\text{M}$ )을 투여한 군에서는 15.5%로 6-OHDA(60  $\mu\text{M}$ ) 단독 투여 군에 비해 뚜렷한 apoptosis 감소를 나타내었다(Fig. 4C).

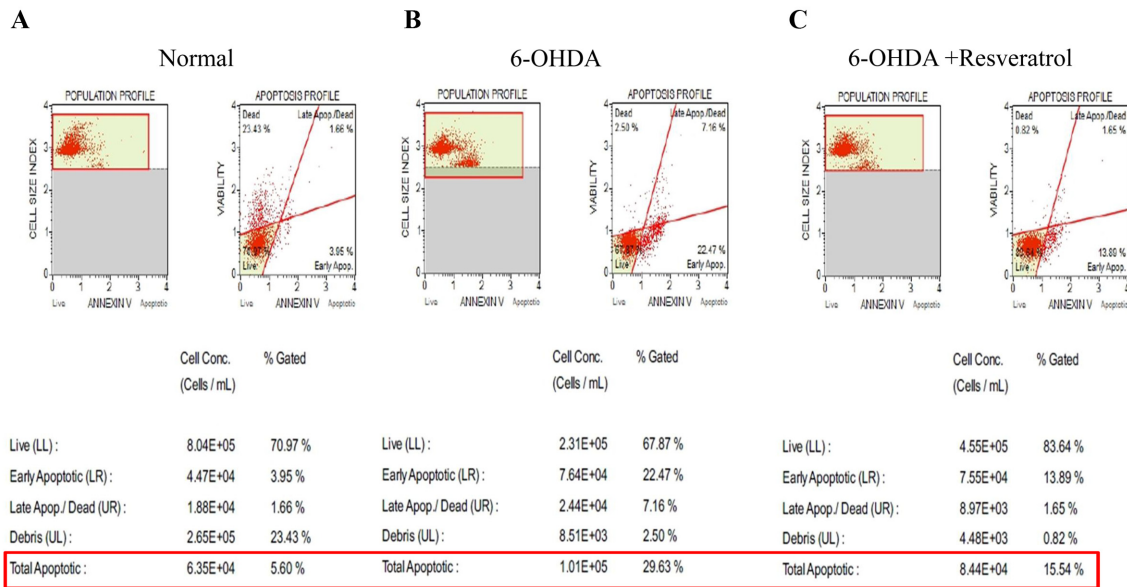
#### TBARS and glutathione assay

지질과산화 정도를 나타내는 TBARS level이 6-OHDA(60  $\mu\text{M}$ ) 단독 처리 군에서 normal군보다 5배 가량 증가하였으며, 레스베라트롤(1, 5, 10  $\mu\text{M}$ )을 전처리한 군에서는 농도에 비례해서 TBARS level의 유의한 감소를 나타내었고( $p < 0.01$ ), 10  $\mu\text{M}$  투여 군에서는 normal군에 가까운 수치를 보

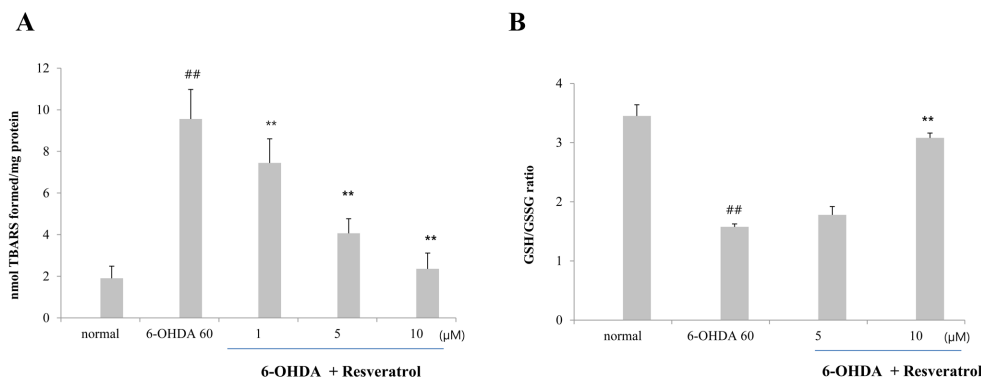
여주었다(Fig. 5A). 글루타티온 양의 변화를 나타내는 GSH/GSSG 비율의 변화에서는 normal군보다 6-OHDA(60  $\mu\text{M}$ ) 단독 투여 군에서 GSH/GSSG 비율이 감소하였으며, 레스베라트롤(5, 10  $\mu\text{M}$ ) 전처리군에서 농도에 비례하여 GSH/GSSG 비율의 감소가 유의하게 억제되었다(Fig. 5B).

## 고 찰

대표적 신경 퇴행성 질환의 하나인 파킨슨병의 원인은 아직 정확히 알려진 바는 없으나 그동안 주로 free radical에 의해 생기는 산화적 스트레스와 mitochondria의 기능 이상, 염증 및 apoptosis 등이 관여하는 것으로 잘 알려져 왔다 [14]. 현재까지 알려진 치료방법으로는 L-dopa가 사용되나 증상을 일시적으로 개선해 주거나 이 질환의 진행을 지연시켜 주는 정도이다. 특히 신경계 질환은 한번 발병하면 진행 경과에 따라 부분적으로 진행속도를 늦출 수는 있으나 본래 상태로의 완전한 회복이 어려운 치료적 한계성을 지니고 있어 점차 예방적 차원에서 신경계 질환의 발생을 낮추는 노력이 필요한 실정이다 [5]. 그동안 레스베라트롤의 신경보호 효능



**Fig. 4.** Resveratrol inhibits the apoptosis of SH-SY5Y cells induced by 6-OHDA by cell analyzer. The SH-SY5Y cells pretreated with for 2 h were exposed to 60 μM 6-OHDA for 20-24 h. The SH-SY5Y cells were labeled with Annexin V/PI staining and quantified by cell analyzer. (A) Vehicle. (B) 60 μM 6-OHDA. (C) 60 μM 6-OHDA + 10 μM resveratrol.



**Fig. 5.** Effect of resveratrol on TBARS formation (A) and GSH/GSSG ratio in SH-SY5Y cells obtained from neurotoxicity induced by 6-OHDA (60 μM) exposure for 20~24 h. Values are expressed in mean ± SD. \*\**p* < 0.01 vs. 6-OHDA-treated cells, ##*p* < 0.01 vs. normal.

에 관한 몇몇 연구에서도 알 수 있듯이 여러 연구자는 효과적으로 ROS를 제거하는 항산화 물질 혹은 파킨슨병의 특징으로 나타나는 도파민 신경세포의 글루타티온 고갈 및 이에 따른 apoptosis를 억제할 수 있는 화합물의 발굴에 그 초점이 맞추어져 왔다 [12]. 이번 실험을 통해 레스베라트롤은 비교적 낮은 농도(5~10 μM)에서 인간 신경암 세포종인 SH-SY5Y 세포에서 6-OHDA에 의한 신경 독성에 대해 보호 효과를 나타내었다. 이는 본 실험에서 사용한 세포주와 같은 인간 신경암 세포주를 이용한 다른 실험에서도 고농도의 도파민으로 유발된 신경 독성에 대해 레스베라트롤이 5 μM에서 유의한 보호 효과를 얻은 결과와 본 실험에 사용한 농도보다 낮은 농도의 6-OHDA(25 μM)를 처리 시 레스베라트롤이 1 μM 혹은 10 μM 농도에서 유의성 있는 신경보호 효과를 나타낸 점과 비교해 볼 때 동일한 *in vitro* 신경계에서

본 실험결과와 비슷한 효과를 보인 것으로 보이며 [4, 10], 또 다른 도파민 신경독소로 알려진 1-methyl-4-phenylpyridinium(MPP+) 처리 시 나타나는 ROS 축적 및 글루타티온 고갈을 레스베라트롤이 예방하는 효과를 보여준 점은 본 실험결과와 잘 일치하는 결과로 생각된다 [13]. 이러한 레스베라트롤의 신경보호작용은 이미 예견하였듯이 이 결과에서 나타난 강력한 지질 과산화 현상의 억제를 통해 나타나며, 6-OHDA에 의해 일어나는 ROS 축적 증가와 동시에 GSH/GSSG 비율의 감소를 레스베라트롤이 잘 억제할 수 있다는 것을 보여준다.

마지막으로 DAPI 염색 및 Annexin V/PI 염색을 이용한 세포분석 검사에서도 apoptosis를 잘 억제함을 알 수 있었다. 최근 들어서는 레스베라트롤보다 신경보호 효능이 더 우수한 다양한 레스베라트롤 유도체들에 대한 개발연구도 병행

되고 있으므로 앞으로 더 자세한 기전 연구를 통해 파킨슨 병의 효과적 치료 및 예방 가능성을 추구하고 볼 필요가 있을 것으로 생각한다.

## References

1. Almeida IMC, Barreira JCM, Oliveira MBPP, Ferreira ICFR. Dietary antioxidant supplements: benefits of their combined use. *Food Chem Toxicol* 2011, **49**, 3232-3237.
2. Blanchet J, Longpré F, Bureau G, Morissette M, DiPaolo T, Bronchti G, Martinoli MG. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008, **32**, 1243-1250.
3. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean MEJ, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem* 2002, **50**, 3337-3340.
4. Chao J, Li H, Cheng KW, Yu MS, Chang RCC, Wang M. Protective effects of pinostilbene, a resveratrol methylated derivative, against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *J Nutr Biochem* 2010, **21**, 482-489.
5. Chao J, Yu MS, Ho YS, Wang M, Chang RCC. Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2008, **45**, 1019-1026.
6. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 2002, **175**, 303-317.
7. Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000, **66**, 663-673.
8. Jin F, Wu Q, Lu YF, Gong QH, Shi JS. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol* 2008, **600**, 78-82.
9. Johnson WD, Morrissey RL, Osborne AL, Kapetanovic I, Crowell JA, Muzzio M, McCormick DL. Subchronic oral toxicity and cardiovascular safety pharmacology studies of resveratrol, a naturally occurring polyphenol with cancer preventive activity. *Food Chem Toxicol* 2011, **49**, 3319-3327.
10. Lee MK, Kang SJ, Poncz M, Song KJ, Park KS. Resveratrol protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis induced by dopamine. *Exp Mol Med* 2007, **39**, 376-384.
11. Lu KT, Ko MC, Chen BY, Huang JC, Hsieh CW, Lee MC, Chiou RYY, Wung BS, Peng CH, Yang YL. Neuroprotective effects of resveratrol on MPTP-induced neuron loss mediated by free radical scavenging. *J Agric Food Chem* 2008, **56**, 6910-6913.
12. Martin HL, Teismann P. Glutathione-a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J* 2009, **23**, 3263-3272.
13. Okawara M, Katsuki H, Kurimoto E, Shibata H, Kume T, Akaike A. Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. *Biochem Pharmacol* 2007, **73**, 550-560.
14. Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2002, **68**, 325-340.
15. Richard T, Pawlus AD, Iglésias ML, Pedrot E, Waffo-Teguo P, Mérillon JM, Monti JP. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Ann N Y Acad Sci* 2011, **1215**, 103-108.