

삼채 잎 추출물의 예쁜꼬마선충에 대한 수명연장 효과

기별희¹ · 이은별² · 김준형³ · 양재현⁴ · 김대근^{3*} · 김영수^{1*}

¹전북대학교 식품공학과, ²농촌진흥청 국립농업과학원 기능성식품과, ³우석대학교 약학대학,
⁴전북대학교 헬스케어기술개발사업단

Lifespan-extending Effects of *Allium hookeri* Leaves in *Caenorhabditis elegans*

Byeolhui Ki¹, Eun Byeol Lee², Jun Hyeong Kim³, Jae Heon Yang⁴, Dae Keun Kim^{3*} and Young-Soo Kim^{1*}

¹Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

²Functional Food & Nutrition Division, Department of Agro-food Resources, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

³College of Pharmacy, Woosuk University, Jeonju 55338, Korea

⁴Center for Healthcare Technology Development, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

Abstract – To evaluate the longevity property of *Allium hookeri* (Liliaceae) leaves, this study was performed. Ethanol extract of *A. hookeri* was successively partitioned as methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol and H₂O soluble fractions, and lifespan-extending effects of the fractions were checked using *Caenorhabditis elegans* model system. The most active ethyl acetate-soluble fraction elevated heat stress tolerance, and increased expression of stress resistance protein. Further studies were performed to investigate several aging-related factors such as reproduction, food intake, growth and movement of *C. elegans*. The results revealed that there were no significant changes in aging-related factors including reproduction and food intake, however, ethyl acetate-soluble fraction treatment led to up-regulation of locomotory ability and growth of aged worms, suggesting ethyl acetate-soluble fraction affected healthspan as well as lifespan of nematode.

Keywords – *Allium hookeri*, *Caenorhabditis elegans*, Longevity

노화는 산소를 이용하여 에너지를 생산하는 모든 생물이 겪어야 하는 자연현상이다. 유전적, 환경적 요인들의 복합적인 작용에 의해 생리적인 기능저하를 야기하고 결국에는 각종 질병을 일으켜 사망에 이르게 한다. 많은 논란이 거듭되고 있으나 노화의 주요원인은 Herman에 의해 제안된 free radical 이론이 아직은 상당한 설득력을 가지고 있다.¹⁾ Free radical 이론은 세포 내 대사과정 중에 생성되는 free radical이 세포 내의 DNA를 비롯한 탄수화물, 단백질, 지질 등과 반응하여 효소활성을 비롯한 산화적 손상 등에 영향을 주어 세포의 기능저하, 조직손상 등을 야기하여 결과적으로 질병과 노화를 촉진한다는 이론이다.^{2,3)} 이에 인체의 노화를 촉진하며 질병을 일으키는 것으로 알려진 free radical을 비롯한 활성 산소종(ROS)의 생성을 억제할 수 있는 천연자원

의 발굴이 요구되고 있으며, 실제로 각종 스트레스를 억제하고 노화를 지연시키며, 수명을 연장할 수 있을 가능성이 있는 quercetin, curcumin, resveratrol 등과 같은 천연물 유래 화합물들이 보고되고 있다.^{4,8)}

본 연구에서는 저자 등이 삼채 뿌리를 채취한 후에 폐기되는 삼채 잎 추출물의 항산화능을 보고하고,⁹⁾ 이어 삼채 잎의 수명연장과 관련된 작용을 알아보기 위해 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 모델로 실험을 실시하였다. 삼채 잎의 에탄올 추출물을 제조하고 이 추출물의 용매 분획물을 확보하여 각 분획물의 수명연장 효능을 확인하였다. 또한, 수명연장의 기전연구로 열 스트레스에 대한 저항성과 이와 관련된 스트레스 저항능을 확인하는 기전연구의 일환으로 형질 전환시킨 선충을 대상으로 열 스트레스 저항성 단백질 발현 여부를 측정하였다. 그 외에 노화 관련 인자로 생식능, 몸길이, 음식 섭취량 및 운동량 변화 등을 측정하여 삼채 잎 ethyl acetate 분획물이 선충의 수명연장에 미치

*교신저자(E-mail): ykim@jbnu.ac.kr, ddkim@woosuk.ac.kr
(Tel): +82-63-270-2569, +82-63-290-1574

는 효능을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 삼채 잎은 2015년에 순창군에서 재배한 것을 김대근교수가 검증한 후에 60°C에서 건조하여 실험에 사용하였으며, 표준품은 우석대학교 약학과 표본실에 보관하고 있다(WSU-15-005).

추출 및 분획 - 건조하여 분쇄한 삼채 잎 1 kg을 에탄올 5 L로 50°C에서 5시간씩 2회 추출하였다. 추출액을 수욕상에서 감압농축하여 ethanol엑스 약 59 g을 얻었으며, ethanol엑스를 증류수로 현탁시킨 후 상법에 따라 동량의 methylene chloride(0.6 g), ethyl acetate(1.3 g) 및 *n*-butanol(6.9 g)의 순으로 용매 분획하여 분획물을 확보하였다.

***Caenorhabditis elegans*의 배양**¹⁰⁾ - 예쁜꼬마선충(*C. elegans*, wild type)과 *Escherichia coli* OP50은 차동석교수(우석대학교)로부터 제공받아 사용하였으며, Nematode Growth Medium(NGM) agar plate에서 배양하였다(20°C). 삼채 잎 분획물은 DMSO를 용매로 한 stock solution을 제조하고 멸균시켜 일정량씩 NGM plate(50°C)에 첨가하였으며, 최종 DMSO농도는 0.1%(v/v)를 유지하였다.

수명연장효능평가¹¹⁾ - 선충의 수명연장분석은 20°C에서 독립적으로 3회 실행하였으며, 성장단계를 일치시키기 위해 NGM plate로부터 알만을 따로 분리하여 삼채 잎 분획물을 첨가한 각각의 plate에 옮겨 배양하였고 매일 생존여부를 확인하였다. 생존여부의 확인은 선충을 platinum wire의 끝으로 자극했을 때 반응이 없는 경우를 사망상태로 간주하였고 독립적으로 3회 실행하였다.

온도 스트레스 저항성 평가¹²⁾ - 성장단계가 동일한 선충을 삼채 잎 ethyl acetate 분획물을 농도별(250, 500 µg/mL)로 처리한 NGM plate에서 배양하였다. 온도 스트레스에 의한 내성을 분석하기 위해 선충을 성체가 된 후 4일째에 신선한 배지로 옮기고 36°C에서 배양하여 시간 별로 생존율을 24시간 동안 측정하였다.

형광 발현강도 정량 및 분석 - 형질 전환된 선충 HSP-16.2::GFP를 포함한 CL2070를 삼채 잎 ethyl acetate 분획물을 농도별(250, 500 µg/mL)로 처리한 배지에서 배양하였다. 성체가 된 후 4일째에 사용하였으며, 현미경 관찰 전 CL2070는 2시간 동안 36°C에서 열 스트레스를 가하고 4시간 동안 20°C에서 회복시켰다. 선충을 sodium azide(2%)로 마취시킨 후 형광 실체 현미경(Olympus, Japan)으로 GFP 발현을 관찰하였으며, 현미경으로 촬영한 사진을 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 발현강도를 정량, 분석하였다.

노화 관련인자 분석 - 삼채 잎 ethyl acetate 분획물을 처리한 plate에서 성장 단계가 동일한 N2 선충을 배양하였다. 생식능 측정은 모체와 자손을 구별하기 위해 L4 유충을 개별적으로 매일 새로운 plate에 옮겼으며, 자손은 L2 또는 L3 단계에서 측정하였다. 선충의 식이량 측정은 4일과 8일된 성충을 새로운 NGM plate로 옮겨 1분 동안 인두의 움직임 관찰하였다. 선충의 몸길이는 4일째, 운동량은 성체 4일과 8일째에 측정하였다. 몸길이와 운동량은 Olympus software(Olympus, Japan)를 이용해 분석하였다(ethyl acetate분획 250, 500 µg/mL).

통계 분석 - 통계 자료의 값은 평균값±표준오차(mean ± S.E.M.)로 표시하였으며, 그룹 간의 통계적 유의성 검정은 Student's t-test를 통해서 분석하였고, 선충의 연속적인 생존

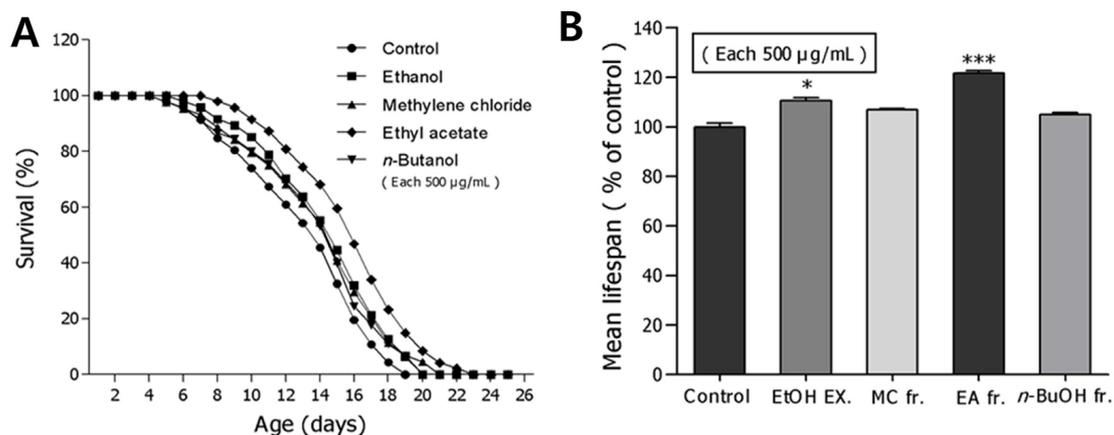


Fig. 1. Effects of fractions from *A. hookeri* leaves on the lifespan of wild-type N2 nematodes. Worms were grown in the NGM agar plate at 20°C in the absence or presence of fractions. The number of worms used per each lifespan assay experiment was 44-50 and three independent experiments were repeated (N=3). (A) The mortality of each group was determined by daily counting of surviving and dead animals. (B) The mean lifespan of the N2 worms was calculated from the survival curves. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test. Error bars represent the standard error of mean (S.E.M.). Differences compared to the control were considered significant at **p*<0.05 and ****p*<0.001 by one-way ANOVA.

도는 Log-rank test 분석 방법을 이용하였다. p 값은 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

C. elegans 수명 연장효능 - 야생형 N2 선충을 이용하여 삼채 잎 ethyl acetate 분획물의 수명에 미치는 영향을 관찰하였으며, Fig. 1에서 보는 바와 같이 삼채 잎 ethyl acetate 분획물은 *C. elegans*의 수명을 농도의존적으로 증가시켰다. 대조군의 평균 수명 시간은 13.1 ± 0.5 일이었고, ethyl acetate 분획물에서 선충의 평균 수명을 15.8 ± 0.5 일이었다(23.2%, $***p<0.001$, Fig. 1, Table I).

열 스트레스 저항력 증가 효능 - 삼채 잎 ethyl acetate 분획물의 선충에 대한 열 스트레스 저항능에 미치는 영향은 고온 스트레스 조건 하에서 선충을 배양하여 생존율을 확인하였다. 선충에게는 고온 조건인 36°C 에서 생존율을 관찰한 결과 대조군은 7시간 만에 죽기 시작하여 16시간에 모두 사멸한 반면, 삼채 잎 ethyl acetate 분획물 처리군은 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 20시간, 22시간으로 생존율이 향상되었다. 대조군의 평균 생존시간이 16.0 ± 0.5 시간이었으나, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처리군은 17.3 ± 0.5 시간($***p<0.001$)으로 29.9% 평균 생존 시간을 향상시켰다(Fig. 2, Table II).

형질 전환 선충 HSP-16.2의 발현 증가 - 삼채 잎 ethyl acetate 분획물의 선충에 대한 열 스트레스 조건 하에서 내성 스트레스 반응 유전자의 증가 여부를 알아보기 위해, HSP-16.2를 포함한 형질 전환 선충 CL2070을 사용하였다. CL2070 유전자를 포함한 선충을 2시간 동안 36°C 에서 열

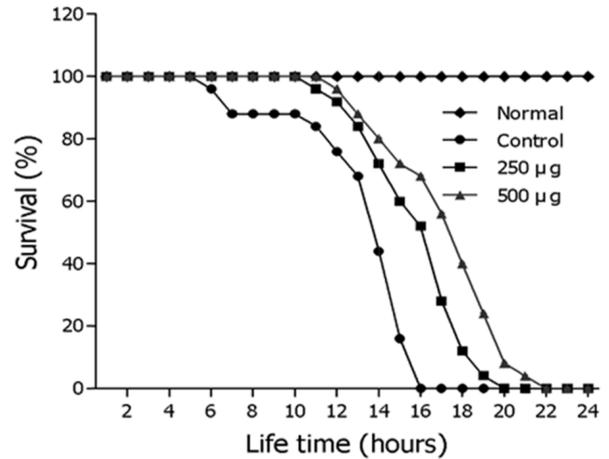


Fig. 2. Effects of ethyl acetate-soluble fraction from *A. hookeri* leaves on the thermal stress tolerance of wild-type N2 nematodes. To assess thermal tolerance, worms were incubated at 36°C and then their viability was scored. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test. All experiments were done in triplicates.

처리를 하고 2시간 동안 20°C 에서 회복시킨 후 HSP-16.2::GFP 형광 강도를 측정한 결과, ethyl acetate 분획물 250 $\mu\text{g/mL}$ 투여군은 대조군에 비해 약 12.6%($***p<0.001$), 500 $\mu\text{g/mL}$ 투여군은 24.2%($***p<0.001$)의 증가율을 나타냈다(Fig. 3A, 3B).

노화 관련인자의 변화 - 삼채 잎 ethyl acetate 분획물 처리가 선충의 수명 메커니즘에 미치는 영향을 확인하기 위해 생식, 섭식, 몸길이 및 운동량을 측정하였다. 500 $\mu\text{g/mL}$ 분획물 처리군은 대조군에 비하여 선충의 생식능력과, 4일

Table I. Effects of fractions from *A. hookeri* leaves on the lifespan of *C. elegans*

Fraction	Mean Lifespan (day)	Maximum lifespan (day)	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
Control	13.1 ± 0.5	19	-	-
Ethanol	14.4 ± 0.5	20	9.1	$*p<0.05$
Methylene chloride	14.0 ± 0.7	21	6.7	-
Ethyl acetate	15.8 ± 0.5	23	20.4	$***p<0.001$
<i>n</i> -Butanol	13.9 ± 0.9	20	5.7	-

Mean lifespan presented as mean \pm S.E.M data. Change in mean lifespan compared with control group (%). Statistical significance of the difference between survival curves was determined by log-rank test using the Kaplan-Meier survival analysis. Differences compared to the control were considered significant at $*p<0.05$ and $***p<0.001$.

Table II. Effects of ethyl acetate-soluble fraction from *A. hookeri* leaves on the stress tolerance of wild-type N2

Stress condition	Fraction	Mean lifespan (h)	Maximum lifespan (h)	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
36°C thermal tolerance	Control	13.3 ± 0.4	16	-	-
	250 $\mu\text{g/mL}$	16.0 ± 0.5	20	19.7	$**p<0.01$
	500 $\mu\text{g/mL}$	17.3 ± 0.5	22	29.9	$***p<0.001$

Mean lifespan presented as mean \pm S.E.M data. Change in mean lifespan compared with control group (%). Statistical significance of the difference between survival curves was determined by log-rank test using the Kaplan-Meier survival analysis. Differences compared to the control were considered significant at $**p<0.01$ and $***p<0.001$.

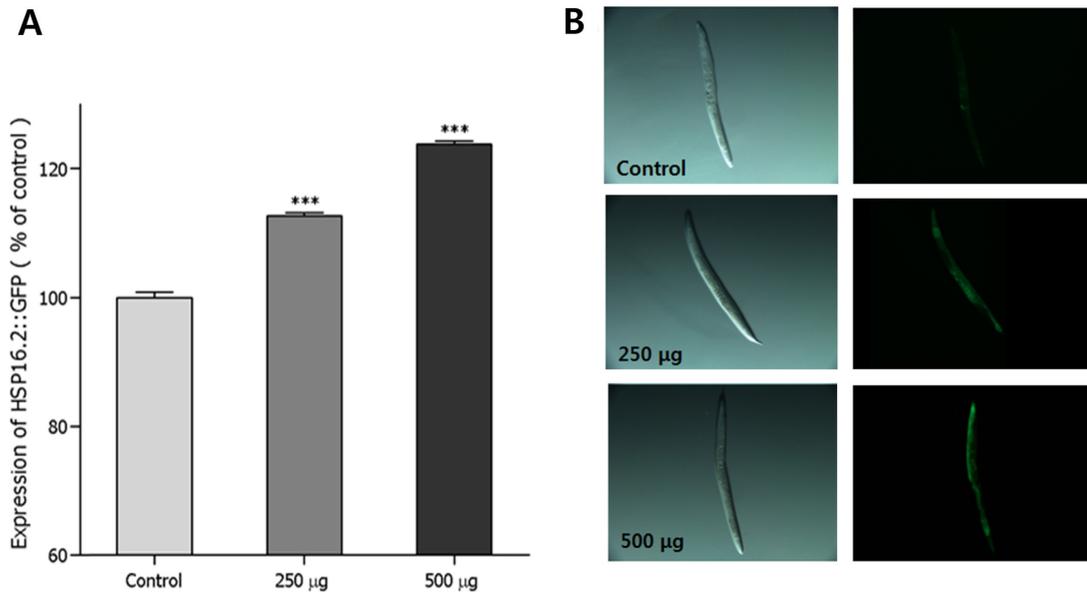


Fig. 3. Effects of ethyl acetate-soluble fraction from *A. hookeri* leaves on the expression of HSP-16.2 in *C. elegans*. (A) Mean GFP intensity of CL2070 mutant was represented as mean \pm S.E.M. of values from 19 to 25 worms per each experiment. (B) Images of 16.2::GFP expressions of CL2070 worms in the presence or absence of ethyl acetate-soluble fraction. Data are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent experiments (N=3). Differences compared to the control were considered significant at *** p <0.01 by one-way ANOVA.

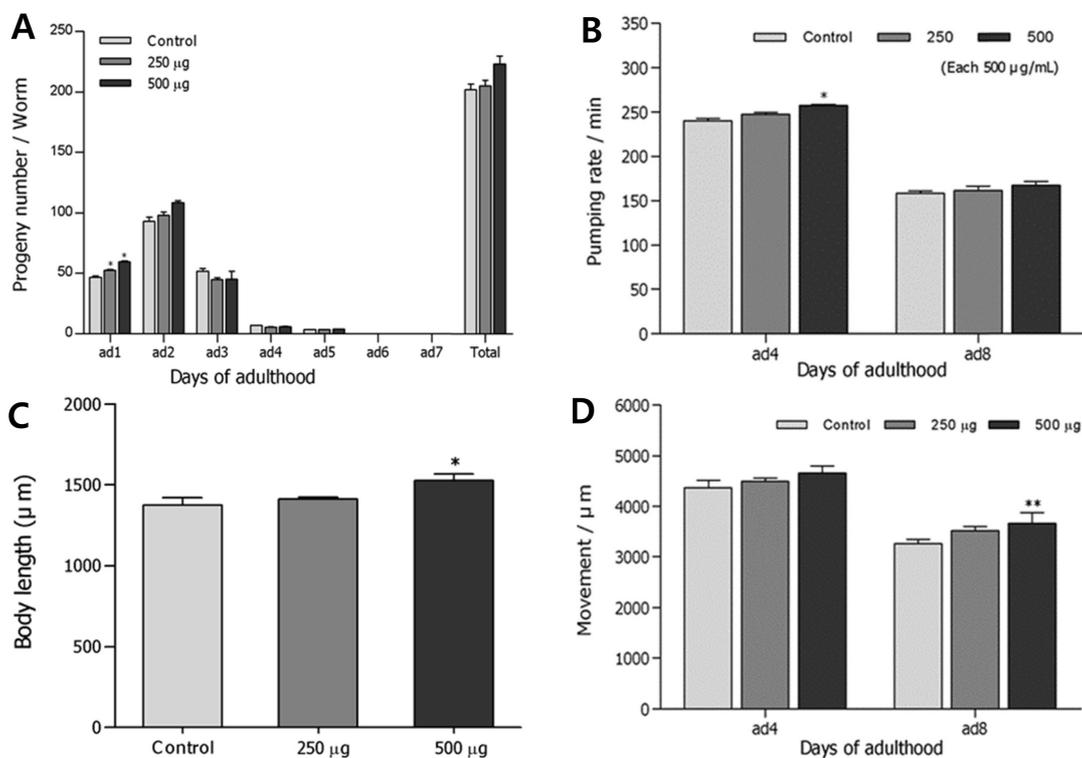


Fig. 4. Effects of ethyl acetate-soluble fraction from *A. hookeri* leaves on the various aging-related factors of wild-type N2 nematodes. (A) Daily and total reproductive outputs were counted. The progeny was counted at the L2 or L3 stage. (B) On the 4th and 8th days of adulthood, the pharyngeal pumping rates were measured. (C) For the grown alteration assay, photographs were taken on 4th day of worms and the body length of each animal was analyzed. (D) The body movements were counted on 4th and 8th days of adulthood worms under a dissecting microscope for 10 seconds. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (N=3). Differences compared to the control were considered significant at * p <0.05 and ** p <0.01 by one-way ANOVA.

과 8일째의 먹이 섭취량의 변화는 미세한 증가는 있었으나 유의성이 없었다(Fig. 4A, 4B). 그러나 4일과 8일째 선충의 몸길기와 움직임 측정 결과 4일째에는 모두 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화가 없었으나, 8일째에는 대조군에 비해 몸길이(* $p < 0.05$)와 운동량(* $p < 0.01$)이 유의성있게 증가하는 것이 확인되었다(Fig. 4C, 4D).

고 찰

삼채 잎 에탄올 추출물을 methylene chloride, ethyl acetate 및 butanol을 이용하여 용매분획을 실시하고 각 분획에 대하여 예쁜꼬마선충을 모델로 사용하여 수명에 미치는 영향을 확인하였다. 예쁜꼬마선충은 토양 속에서 미생물과 박테리아를 먹이로 하며, 약 1 mm 정도 크기로 20°C에서 20일 정도의 짧은 수명을 가지고 있다.^{13,14)} 단순한 생물임에도 불구하고 선충의 발생단계나 세포사멸기전, 외부환경에 대한 반응 및 인간의 수명과 연관되는 노화 등 유전학적인 면에서 인간과 많은 부분이 유사하여 최근 연구에 많이 이용되고 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 삼채 분획물의 수명연장 실험을 위해서 일반적인 배양환경에서의 야생형 N2 선충을 이용하였으며, 시간에 따른 선충의 생존율을 확인하였다. 선충의 생존율을 측정된 결과 삼채 잎 ethyl acetate 분획물이 가장 높은 생존율을 나타냈다. 선충의 생존과 수명은 스트레스와 밀접한 관련이 있으므로 열 스트레스 조건하에서 선충의 저항성을 측정 하였다.¹¹⁾ 열 스트레스 조건에서 삼채 잎 ethyl acetate 분획물을 처리한 선충군이 대조군에 비해 높은 생존율을 보였으며, 이는 이미 보고한 juglone으로 유발시킨 산화적 스트레스 조건에서도 같은 결과를 보였다.¹²⁾ 이 결과는 삼채 잎의 ethyl acetate 분획물의 선충에 대한 수명연장 효능이 열과 산화적 스트레스 저항능과 상당한 관련이 있음을 시사한다. 한편, green fluorescent protein(GFP)은 자외선을 비추면 녹색의 형광 빛을 띠는 단백질로 추적하고자 하는 유전자에 GFP를 결합시켜 유전자의 발현 위치에서 형광빛을 띄어 선충의 체내에서 어떻게 작용하는지 관찰할 수 있다.^{19,20)} 열 스트레스 조건하에서 heat shock protein-16.2(HSP-16.2)을 발현시키는 선충의 mutant를 이용하여 삼채 잎 ethyl acetate 분획물이 단백질 발현에 미치는 영향을 살펴 본 실험에서는 열 스트레스에 저항성을 나타내는 HSP-16.2 단백질 발현이 대조군과 비교하여 상당히 증가되는 것이 관찰되었다. 이는, GFP-fused transgenic strain CL2070을 이용하여 산화적 스트레스 저항성 확인실험에서도 삼채 잎 ethyl acetate 분획물 처리군이 산화적 스트레스에도 저항성이 있음이 보고된⁹⁾ 내용과 더불어 열과 산화적 스트레스에 저항할 수 있는 능력이 노화방지 및 수명연장과 상당한 관련이 있음을 추측할 수 있다. 또한, 삼채 잎 ethyl acetate 분획물의 선충 내 항산화 효소인 SOD, catalase의 활성 증가와 선충 내의

ROS 축적억제 효과 등은¹²⁾ 선충의 수명을 연장시키는데 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

삼채 잎 ethyl acetate 분획물을 노화와 관련된 선충의 구조적, 기능적인 면에 미치는 영향을 확인하기 위해 선충의 생식, 먹이 섭취에 따른 인두의 움직임, 몸길기와 운동량 등을 측정된 실험에서 생식능과 섭식량의 변화는 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 다만, 몸길기와 운동량은 농도 의존적으로 유의성 있는 변화를 나타내 신체성장 촉진능력과 운동량의 향상이 선충의 건강한 수명연장에 영향을 줄 수 있음을 시사한다.

결 론

삼채 잎의 ethyl acetate 분획물은 예쁜꼬마선충을 실험 모델로 사용한 수명연장실험에서 대조군보다 유의성 있는 강한 수명연장 효과를 보여 주었다. 열에 의한 스트레스 저항성 평가에서 삼채 잎 ethyl acetate 분획물 처리군이 열 스트레스 조건하에서 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 생존율이 증가하는 것이 확인되었다. 이와 관련하여 HSP-16.2를 발현시키는 선충의 mutant를 이용한 삼채 잎 ethyl acetate 분획물의 영향을 확인한 결과, 이 분획물이 열 스트레스에 저항성을 나타내는 HSP-16.2 단백질 발현이 대조군과 비해 상당히 증가됨을 확인하였다. 또한, 수명에 미치는 노화 관련 인자를 측정된 결과 삼채 잎 ethyl acetate 분획물 처리가 선충의 생식능력과 음식 섭취량에는 유의성 있는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으나, 몸길기와 운동량을 유의성 있게 증가시키는 것이 확인되어 선충의 수명연장에 어느 정도 영향이 있음을 확인하였다.

인용문헌

- Herman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 298-300.
- Beckman, K. B. and Ames, B. N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**: 547-581.
- Si, H. and Liu, D. (2014) Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. *J. Nutr. Biochem.* **25**: 581-591.
- Liao, V. H. C., Yu, C. W., Chu, Y. J., Li, W. H., Hsieh, Y. C. and Wang, T. T. (2011) Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* **132**: 480-487.
- Bass, T. M., Weinkove, D., Houthoofd, K., Gems, D. and Partridge, L. (2007) Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* **128**: 546-552.
- Grünz, G., Haas, K., Soukup, S., Klingenspor, M., Kulling, S. E., Daniel, H. and Spanier, B. (2012) Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for

- lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mech. Ageing Dev.* **133**: 1-10.
7. Pandey, R., Gupta, S., Shukla, V., Tandon, S. and Shukla, V. (2013) Antiaging, antistress and ROS scavenging activity of crude extract of *Ocimum sanctum* (L.) in *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900). *Indian J. Exp. Biol.* **51**: 515-521.
 8. Tiwari, S., Singh, S., Pandey, P., Saikia, S. K., Negi, A. S., Gupta, S. K., Pandey, R. and Banerjee, S. (2014) Isolation, structure determination, and antiaging effects of 2,3-pentanediol from endophytic fungus of *Curcuma amada* and docking studies. *Protoplasma* **251**: 1089-1098.
 9. Ki, B., Lee, E. B., Kim, J. H., Yang, J. H., Kim, D. K. and Kim, Y.-S. (2017) Anti-oxidative effects of *Allium hookeri* leaves in *Caenorhabditis elegans*. *Kor. J. Pharmacogn.* **48**: 141-147.
 10. Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
 11. Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S. and Johnson, T. E. (1995) Thermo tolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 7540-7544.
 12. Lee, E.Y., Shim, Y. H., Chitwood, D. J., Hwang, S. B., Lee, J. and Paik, Y. K. (2005) Cholesterol-producing transgenic *Caenorhabditis elegans* lives longer due to newly acquired enhanced stress resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**: 929-936.
 13. Guha, S., Natarajan, O., Murbach, C. G., Dinh, J., Wilson, E. C., Cao, M., Zou, S. and Dong, Y. (2014) Supplement timing of cranberry extract plays a key role in promoting *Caenorhabditis elegans* healthspan. *Nutrients* **21**: 911-921.
 14. Hope, I. A. (1999) Background on *Caenorhabditis elegans*. In *C. elegans: A Practical Approach*, 1-15. Oxford University Press, NY.
 15. Kaletta, T. and Henartner, M. O. (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**: 387-399.
 16. Kobet, R. A., Pan, X., Zhang, B., Pak, S. C., Asch, A. S. and Lee, M. H. (2014) *Caenorhabditis elegans*: A model system for anti-cancer drug discovery and therapeutic target identification. *Biomol. Ther.* **22**: 371-383.
 17. van der Blik, A. M., Sedensky, M. M. and Morgan, P. G. (2017) Cell biology of the mitochondrion. *Genetics* **207**: 843-871.
 18. Rieckher, M. and Tavernarakis, N. (2017) *Caenorhabditis elegans* microinjection. *Bio. Protoc.* **7**: e2565.
 19. Salim, C. and Rajini, P. S. (2016) Glucose-rich diet aggravates monocrotophos-induced dopaminergic neuronal dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *J. Appl. Toxicol.* **37**: 772-780.
 20. Hostettler, L., Grundy, L., Käser-Pébernard, S., Wicky, C., Schaffer, W. R. and Glauser, D. A. (2017) The bright fluorescent protein mNeonGreen facilitates protein expression analysis *in vivo*. *G3 (Bethesda)* **7**: 607-615.
- (2017. 11. 6 접수; 2017. 12. 1 심사; 2017. 12. 6 게재확정)