

|||||

総 説

|||||

サフランの薬理活性

正 山 征 洋

(長崎国際大学 薬学部 薬学科)

要 旨

サフランとその主活性成分であるクロシンの薬理作用を検討した。サフランエキスは、アルコールにより記憶学習を障害したマウスの記憶学習能を改善した。本活性本体はクロシンであり、クロセチンに結合するグルコースの数が少なくなるにつれて活性が低下した。PC-12細胞を用いてクロシンのアポトーシス抑制効果を検討した。アポトーシス惹起条件下においてもクロシンを培地へ添加することによりアポトーシスが抑制されることが明らかとなった。クロシンのアポトーシス抑制効果について各アポトーシス誘導ステップを検討した結果、クロシンはスフィンゴミエリネース活性を低下することによりセラミドレベルを低下させ、また、グルタチオンレベルを上昇させることにより細胞の安定化を促進し、PC-12細胞のアポトーシスを抑制することが明らかとなった。

キーワード

サフラン、*Crocus sativus* L.、クロシン、記憶学習、長期増強、アポトーシス

はじめに

サフランはアヤメ科に属し、学名を *Crocus sativus* L. と称する多年生草本で (Fig. 1) 主にスペインやギリシャで生産されるが、近年中国における生産が増加している。1花に3本あるめしべを集め乾燥したものがサフランである。9-10万個のサフラン花から5kgのめしべが収穫され、乾燥すると約1kgとなる。サフランは古来より医薬品として、香辛料として、また、染料としても使用されてきた。サフランは主成分として、赤色のカロテノイド色素、辛味成分であるピクロクロシン、香りの良いサフランナル等である。カロテノイド色素にはクロセチンに4分子のグルコースがついているクロシン、クロセチンにグルコースが3分子ついたもの、およびクロセチンにグルコースが2分子ついたものがある (Fig. 2)。我々は大部分県竹田市で屋内栽培されるサフランには乾燥重量で約15%のクロシンを含有し、他地域のサフランに比べ高含量であることを見出した。開花状態と

クロシン含量の相関を調査した結果、クロシンは満開期に近づくに従って含量が高まり満開期で最高となり、満開を過ぎて1週間後には2%近く減少する。クロシンは共役した2重結合を持つことから、光や酸素により酸化を受け、更に湿気があれば内在性の加水分解酵素によって加水分解を受けクロシンの含量は減少することを明らかにし、このような分解を防ぐには乾燥した状態下-20℃で保存する必要があることを明らかにした¹⁾。このように保存条件によりクロシン含量に大きな変動が生じるため、品質の評価が必要となった。このため簡便かつ迅速な分析法を開発する目的で、クロシンに対する単クローン抗体を作成し、それによる分析法を開発した²⁾。

サフランの抗腫瘍活性は各種の腫瘍細胞系、例えばサルコーマ180、エーリッヒ腹水癌、ダルトンリンパ腫等を用いた評価系により研究が行われている³⁾。サフランは化学的発ガンの阻害作用⁴⁾、また、クロセチンは皮膚がんやラウス



Fig. 1 Indoor cultivation of saffron in Ohita

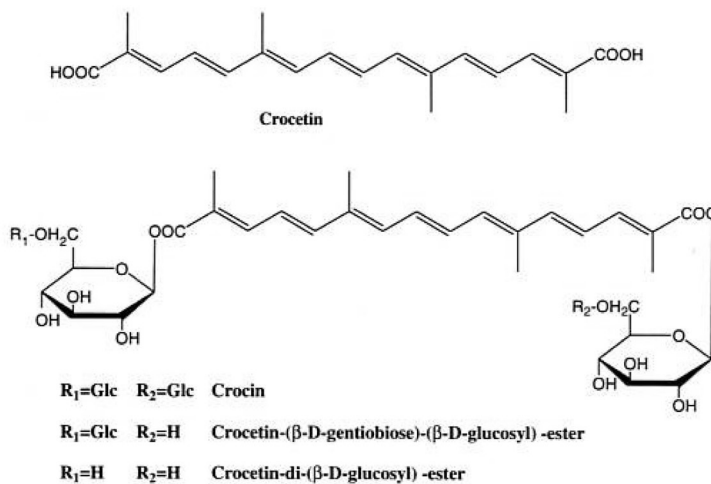


Fig. 2 Structure of crocetin and its glycosides

腫に有効であることが報告されている⁵⁾。Escribano 等はクロシンがヘラ細胞の増殖を止めることから、アポトーシス（細胞死）を引き起こすものと推察している⁶⁾。さらに、我々はサフランエキスやクロシンの内服によりマウスに対する2段階発ガンを抑制することを明らかにした⁷⁾。以上の実験結果はサフラン中のクロシンやクロセチンが抗腫瘍活性を持っていることを示すものである。さらに、クロセチン誘導

体は抹消血のビリルビンレベルを下げる働き⁸⁾や血清コレステロールや中性脂肪の低下作用が認められている⁹⁾。

記憶学習に作用する天然薬物の臨床応用に期待が寄せられている。脳の海馬は記憶学習を司る重要な部位であることは自明であるが、脳組織から誘導される長期増強作用（LTP）が記憶学習と密接な関連が有ることが明らかとなっている¹⁰⁾。我々は先にサフランやクロシンがマウ

スの記憶学習を改善し、ラットの海馬スライスを用いた実験系で海馬歯状回における LTP の発生を報告している¹¹⁻¹³⁾。

近年の研究から脳内の酸素欠乏¹⁴⁾や脳の障害¹⁵⁾によりプログラムされた細胞死(アポトーシス)が惹起し、また、アルツハイマー患者の脳においてもアポトーシスが起ることが明らかとなっている¹⁶⁾。このような状況から天然薬物による脳神経細胞のアポトーシスの抑制は臨床面で大きな期待が寄せられている。

本総説では記憶学習や脳神経細胞のアポト

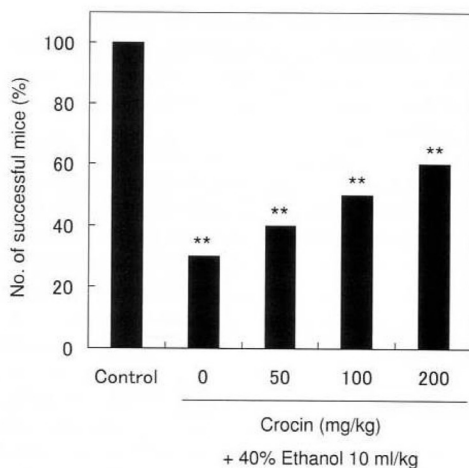


Fig. 3 Effect of crocin on memory and learning

シスに対するサフランとクロシンの作用について我々の研究結果を中心に述べる。

1. アルコール障害記憶学習に対するクロシンの改善作用

サフランエキスがアルコールでブロックされた記憶学習障害、特にマウスのステップスルー、ステップダウンテストにおいて改善作用が認められた¹²⁾ので、本テストを活性指標としてサフランエキスから活性成分を精製分離し、クロシンが活性成分であることを突き止めた。

ステップダウン試験での40%アルコールの経口投与による記憶学習障害は、クロシン 50mg/kg 経口の前投与により改善され、200mg/kg では60%まで改善された (Fig. 3)。

2. LTP に対するクロシンの効果

Fig. 4 に見られるように40%アルコール投与により LTP は著しく抑制される。このアルコールの経口投与による LTP 抑制は、アルコール投与 5 分前にクロシン 10.2nM 経口の前投与により用量依存的に増強されることが明らかとなった (Fig. 4)。クロシンの他に、Fig. 1 に示すクロセチンにグルコースが3個ついたもの、2個ついたものも同様に検討すると、何れ

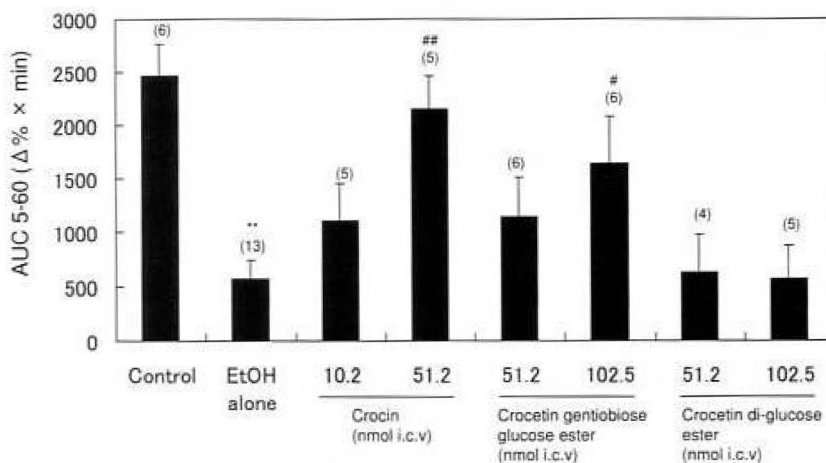


Fig. 4 Dose-dependent effects of crocin and its analogues on the LTP-blocking effect of ethanol

も用量依存的に増強するが、その強度には差があり、クロシンが最も強く、続いて3個、2個の順に活性は弱まることが明らかとなった¹⁷⁾。

3. PC-12 細胞死に対するクロシンの阻害作用

Fig. 5A-5D は培地から血清とグルコースを除去して誘導した PC-12 細胞の形態変化を示したものである。血清とグルコースを含む Dulbecco 修正 Eagle 培地 (DMEM) では PC-12 細胞は正常状態を保っている (A)。一方、血清とグルコースを同培地から除くと B に見られるように明らかにアポトーシスが起これり60%の細胞は死滅する (B)。これに反し血清とグルコースを同培地から除き、クロシン (0.1 μ M) を添加するとアポトーシスは抑制され (C)、さらにクロシン濃度を 10 μ M に上げると85%の細胞が生存した (D)^{8,19)}。アポトーシスに関し

て血清²⁰⁻²²⁾ や神経成長因子 (NGF)^{23,24)} を除去することにより PC-12 細胞の死滅を誘導することが知られている。Colombaioni 等は、血清除去培地は HN9.10e 細胞のセラミドレベルを上昇させ、その結果アポトーシスが引き起こされると報告している²⁵⁾。これらの結果から DMEM 培地から血清とグルコースを除去した培地において PC-12 細胞はセラミドレベルの上昇によってアポトーシスを惹起することが示唆される。

Fig. 6 に示す通り、PC-12 細胞を血清・グルコースフリー DMEM 培地で3時間培養を行うとセラミド濃度は添加培地に比べ、3.5倍に上昇した。ところがクロシンを添加することによりセラミド濃度は減少した。その減少の割合はクロシンを0.1, 1, 10 μ M 添加することにより用量依存的にセラミド含量が減少している。一方、セラミドの生合成を促進する

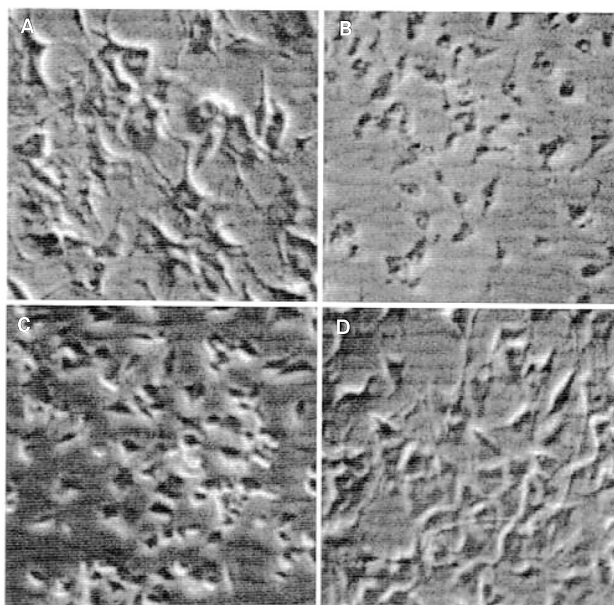


Fig. 5 Effect of crocin on morphological changes and PC-12 cell death induced by serum/glucose deprivation. A : Control cells in serum/glucose-containing DMEM [DMEM (+)] B : cells in DMEM alone [DMEM (-)] C : cells in DMEM (-) plus 0.1 μ M crocin, D : cells in DMEM (-) plus 10 μ M crocin

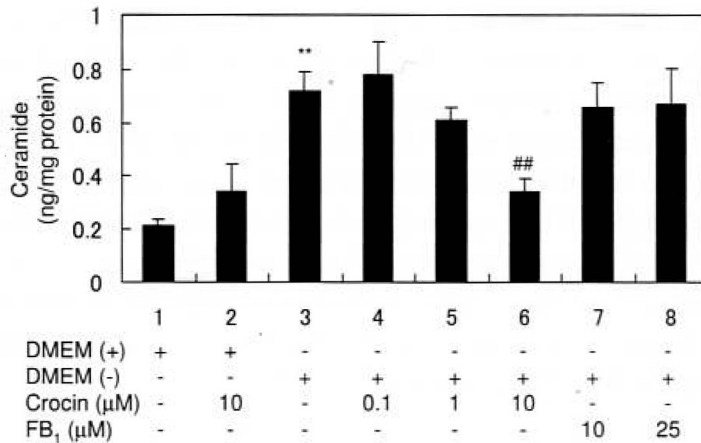


Fig. 6 Effect of crocin or FB₁ ceramide accumulation in serum/ glucose – deprived PC – 12 cells

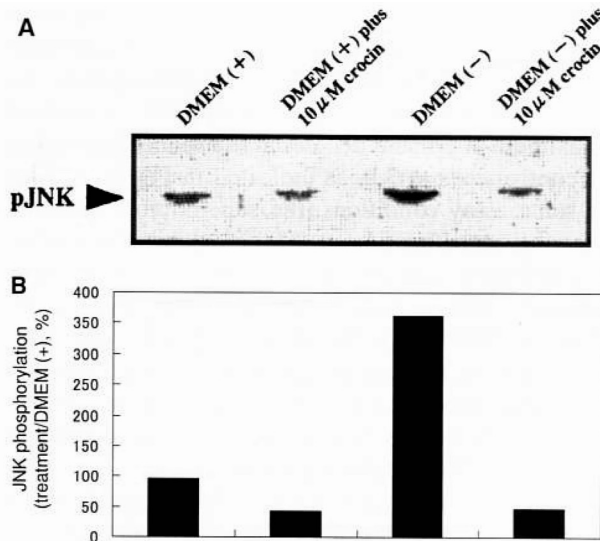


Fig. 7 Effect of crocin on phosphorylation of JNK in serum/ glucose – deprived PC – 12 cells

FB₁^{26,27} の添加は全く影響しなかったことから、クロシンはセラミドの生合成レベルを活性化するのはではなく、別のステップに作用していることが示唆される。

次に血清・グルコースフリー DMEM 培地においては、セラミドによって活性化されアポトーシスを引き起こす c-jun kinase (JNK)²⁸ の磷酸化が起こっていることが判る (Fig. 7A)。しかし 10μM のクロシンを添加することによ

り JNK の磷酸化が阻害されることが明らかとなった (Fig. 7B)。なお、セラミドは低酸素下において PC-12 細胞死が起こるときに活性化されるスフィンゴミエリナーゼによるスフィンゴミエリンの加水分解産物であることが報告されている^{29,30}。以上からクロシンは JNK の磷酸化を阻害し、従ってアポトーシスを抑制する作用を持つことになる。

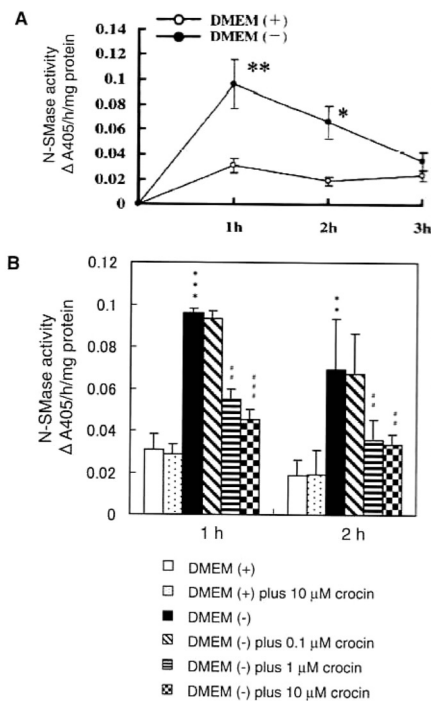


Fig. 8 Effect of crocin on the activity of magnesium-dependent N-SMase enhancement in serum/glucose-deprived PC-12 cells
 A: time-dependent N-SMase activity of PC-12 cells cultured in DMEM (-), B: dose-dependent effect of crocin in N-SMase activity in PC-12 cells cultured in DMEM (-)

4. 血清・グルコースフリー DMEM 培地により活性化されるスフィンゴミエリネースのクロシンによる阻害活性

スフィンゴミエリネースはマグネシウム依存性の酵素である。そこで PC-12 細胞のホモジネートのスフィンゴミエリネース活性を測定した結果、Fig. 8A に示す通り 1 時間で最高となり、3 時間でコントロールレベルまで低下した。次にクロシン添加の影響を Fig. 8B に示す。血清・グルコースフリー条件下ではスフィンゴミエリネース活性が顕著に上昇するが、クロシンを添加することにより活性は用量依存的に低下した。

次にクロシンが直接スフィンゴミエリネース活性を阻害するか否かを検討したのが Fig. 9 である。1mM および 10mM のクロシン添加は何らスフィンゴミエリネース活性を変化させない。一方、グルタチオン (GSH) の添加は用量依存的にスフィンゴミエリネース活性を低下させている。従来から GSH は細胞膜に存在するマグネシウム依存性のスフィンゴミエリネースの阻害活性を持つことが知られている^{29,31,32}。これらの結果から、我々はクロシンが酵素を直接阻害するのではなく、血清・グルコースフリー条件下において、PC-12 細胞中に

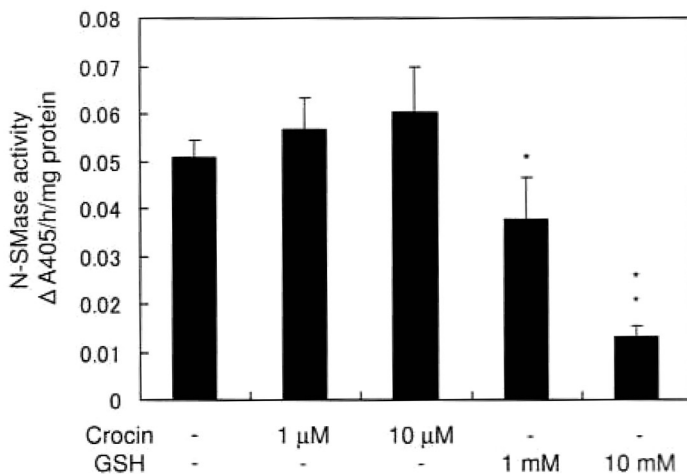


Fig. 9 Direct effects of crocin and GSH on the activity on magnesium-dependent N-SMase

おけるスフィンゴミエリナーゼ活性を GSH 依存的に阻害するという仮説をたてるに至った。

4. クロシンにより活性化される glutathione reductase (GR) - glutamylcysteinyl synthase (γ-GCS) による細胞内 GSH レベル

上記仮説を明確にするために、まず最初に、血清・グルコースフリー条件下における PC-12 細胞内 GSH 濃度を測定した。Fig. 10 はクロシン添加、無添加条件で GSH レベルを測定した結果である。PC-12細胞を血清・グルコースフリー条件下3時間処理すると GSH はコントロールに比べ半分の濃度となった。一方、クロシンを添加することにより GSH レベルは用量依存的に上昇し3時間後においてもコントロールに比べ高いレベルを保った。

次にクロシンがどのようなメカニズムで GSH レベルを上昇させるかを明らかにするため、GR 活性と glutathione peroxidase (GPx) 活性について時間を追って検討したのが Fig.

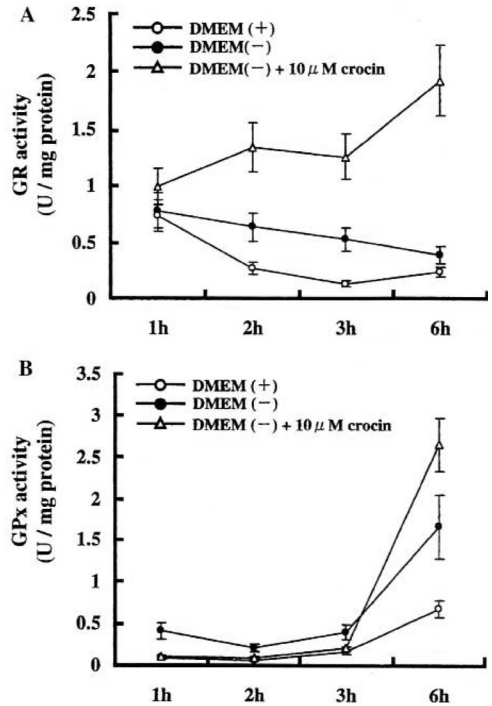


Fig. 11 Effect of crocin on activity of GR and GPx in serum/glucose-deprived PC-12 cells

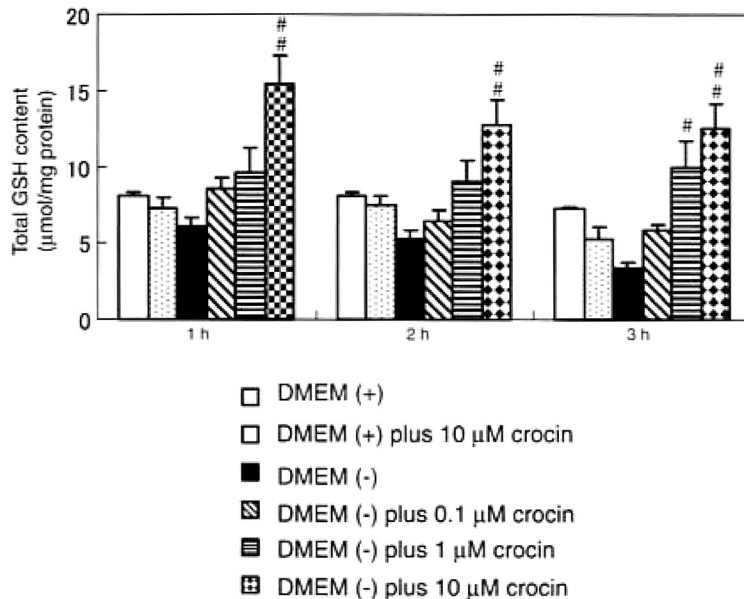


Fig. 10 Effect of crocin on the intracellular GSH in serum/glucose-deprived PC-12 cells

11 である。クロシン無添加培地では GR 活性は時間と共に低下している。一方、クロシンを添加することにより活性は経時的に上昇し、6 時間後には約 4 倍の活性を示した (A)。Fig. 11B は GRx 活性を調査したもので、血清・グルコースフリー条件下においても活性は上昇しており、クロシン添加との優位差は認められず、GRx に対するクロシンの関与は否定された。

GHS 生合成は γ -GCS により制御され、本酵素は種々のメカニズムにより制御されるものと考えられている。マウスの内皮細胞において、

γ -GCS 活性上昇に伴い誘導される TNF α や IL-1 は mRNA 発現上昇と関連していることが報告されている³³。IL-6 も同様に γ -GCSmRNA 発現を刺激し、酵素活性が高まり、その結果 GSH レベルを上昇することが明らかにされている³⁴。その一方で、Pan、Perez-Polo 等は NGF が γ -GCS 活性を転写レベルで

上昇させるとの報告を行っている³⁵。

Fig. 12 は γ -GCSmRNA 発現と血清・グルコース添加およびフリー条件下における γ -GCS 活性に対するクロシンの作用を示している。コントロール細胞に対してはクロシンの添加効果は認められないが、血清・グルコースフリー条件下では 10 μ M のクロシンを添加することにより γ -GCSmRNA 発現は顕著に増加している (A、B)。さらにクロシンによる γ -GCS の活性化を Fig. 12C に示す。クロシンによる γ -GCS の活性化は γ -GCSmRNA 発現を良く反映していることから、クロシンは GR と γ -GCS の両酵素を活性化することにより細胞内 GSH レベルを上昇させるものと推察される。そこで GSH 合成を阻害する buthionine sulfoximine (BSO) を添加したところ γ -GCS 活性を低下させ細胞内 GSH レベルの低下を誘導した³⁴。

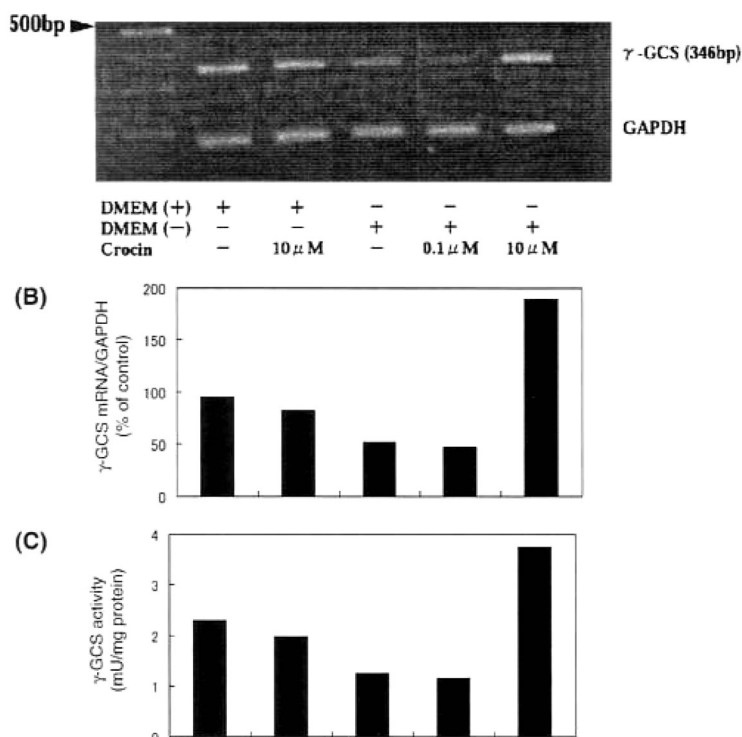


Fig. 12 Effect of crocin on mRNA expression and activity of γ -GCS in serum/glucose deprived PC-12 cells

5. クロシンの抗酸化作用による脳神経細胞死の予防効果

我々は血清・グルコースフリー条件下における PC-12 細胞に対するクロシンの影響について α -トコフェロールとの比較検討を行なった。血清・グルコースフリー条件は PC-12 細胞の形態と膜の脂質酸化に影響を与え、さらに細胞内 superoxide dismutase (SOD) 活性を減少させることを明らかにした³⁶⁾。Fig. 13 はコントロール PC-12 細胞 (A) と血清・グルコースフリー条件下における PC-12 細胞を Annexin V で染色した像である (B-D)。Phosphatidylserine (PS) は通常は細胞の内皮に存在しているが、酸化ストレスによって細胞の外部の膜上に移動する。PS の外部への移動はアポトーシス誘導の早期のシグナルと考えられている。FITC 結合 Annexin V はマイナスにチャージした PS に結合し、リング状の蛍光を示す。血

清・グルコースフリー条件下における PC-12 細胞 (B) は A に比べ明らかにリング状の蛍光が認められる。クロシン 10 μ M を添加した培地における細胞 (C) では、リング状の蛍光は認められない。 α -トコフェロールを 10 μ M 添加した細胞 (D) では、数は少ないもののリングを検出している。クロシン添加と比較するとクロシン添加培地の細胞がより正常状態を保っていることが明らかとなった。血清・グルコースフリー培地における PC-12 細胞の酸化脂質量はコントロール培地のそれに対して1.8倍で、SOD 活性はコントロールに比べ14%に減少した。一方、クロシンは α -トコフェロールに比べて顕著な酸化脂質量低下を示し、SOD 活性の上昇を誘導した。

6. PC-12 細胞内のクロシンの分布

クロシンの細胞内分布を検討するため、抗

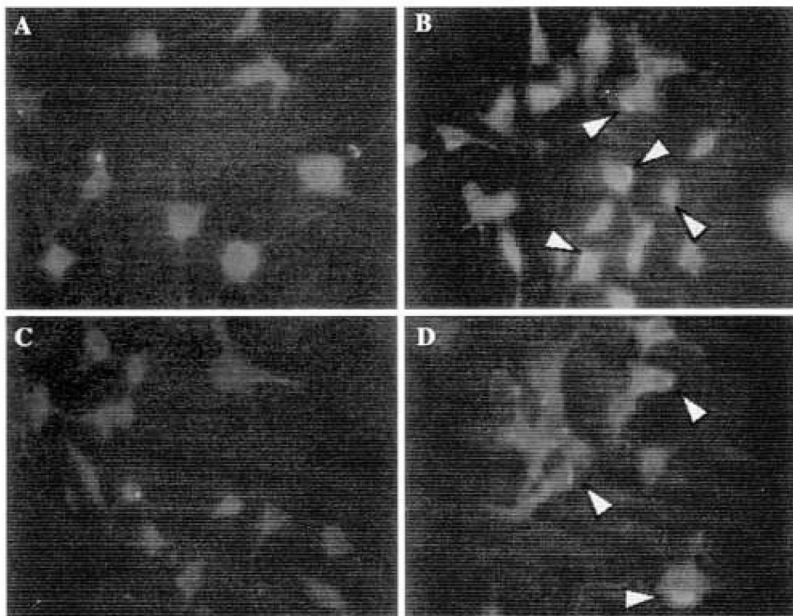


Fig. 13 Annexin V staining of PC-12 cells exposed for 3 hr in serum/glucose - deprived DMEM

A : control cells in DMEM (+) B : cells in DMEM (-) alone, C : Cells in DMEM (-) plus 10 μ M crocin, D: cells in DMEM (-) plus 10 μ M α -tocopherol. Arrows indicate ring - shape stains

クロシンモノクローナル抗体²⁾による染色を行った。Fig. 14は10 μ Mのクロシンを添加しPC-12細胞の経時変動を抗体染色で追跡したものである。Aはクロシン添加直後に染色したもので、Bは30分後の像である。両者の比較からクロシンは α -トコフェロール等と同様に最初は細胞膜に存在するが時間の経過と共に細胞内へ取り込まれることが明らかとなった。ただし、細胞内におけるクロシンの役割については不明であり、今後の検討課題である。

おわりに

サフランはマウスに5g/kg投与しても毒性が出ない極めて安全な天然薬物である³⁷⁾。我々はクロシンがアルコールにより誘発される記憶学習阻害およびLTP抑制を改善する作用を明らかにした。また、クロシンが海馬のニューロンにおけるN-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターを介したエタノールの阻害作用を改善することも明らかにした³⁸⁾。クロシンの記憶学習改善作用はこの作用に基づくことが推測される。このためクロシンは中枢神経系の障害改善薬として有用な天然薬物と目されている。

一方、クロシンのアポトーシス抑制効果をFig. 15にまとめた。クロシンはGSHの生合

成を活性化し、セラミドの生成を抑制することによりアポトーシスを抑制することが明らかとなった。

酸化ストレスは多くの脳障害を引き起こすことが知られており、中枢神経系の疾患としてはアルツハイマー病、パーキンソン病、ハッチンソン病等に深く関与している³⁹⁾。クロシンの抗酸化作用は α -トコフェロールよりも強くかつ安全性が高く、難治性神経障害に応用可能と考えられるので、さらなる動物実験引いては臨床実験が望まれる。

Fig. 16はクロシンが2006年より中国において狭心症の医薬品として上市されたものである。また、クロシンは眼の微細血管の血流量を改善するため眼科領域においても眼疾患治療薬の創出に期待が持たれている。

謝辞

本総説は日本学術振興会によるアジアコアプログラムの活動の一環として著されたものである。

引用文献

- 1) Morimoto S, Umezaki Y, Shoyama Y, Saito H, Nishi K, Irino N (1994) Post-harvest degradation of carotenoid glucose esters in saffron. *Planta Med*, 60 : pp. 438-440.

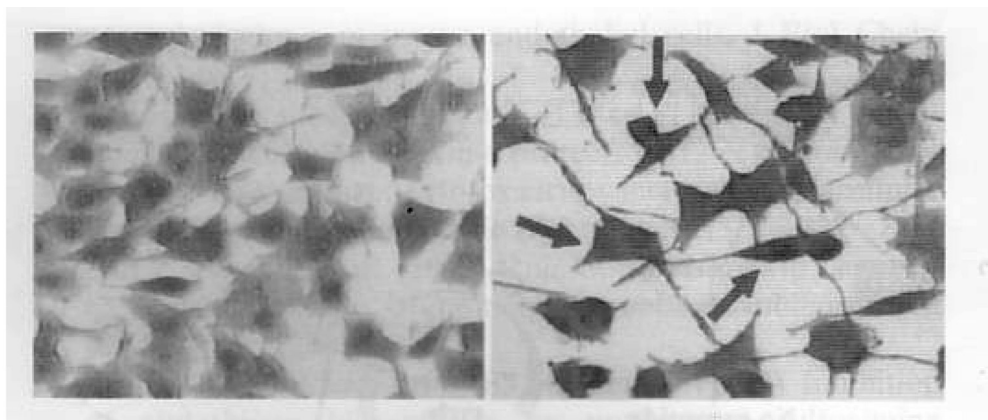


Fig. 14 PC-12 cells treated with 10 μ M crocin (left, 0 min) and immunostaining with anti-crocin MAb (right, 30 min)
Arrows indicate cells stained strongly by anti-crocin MAb.

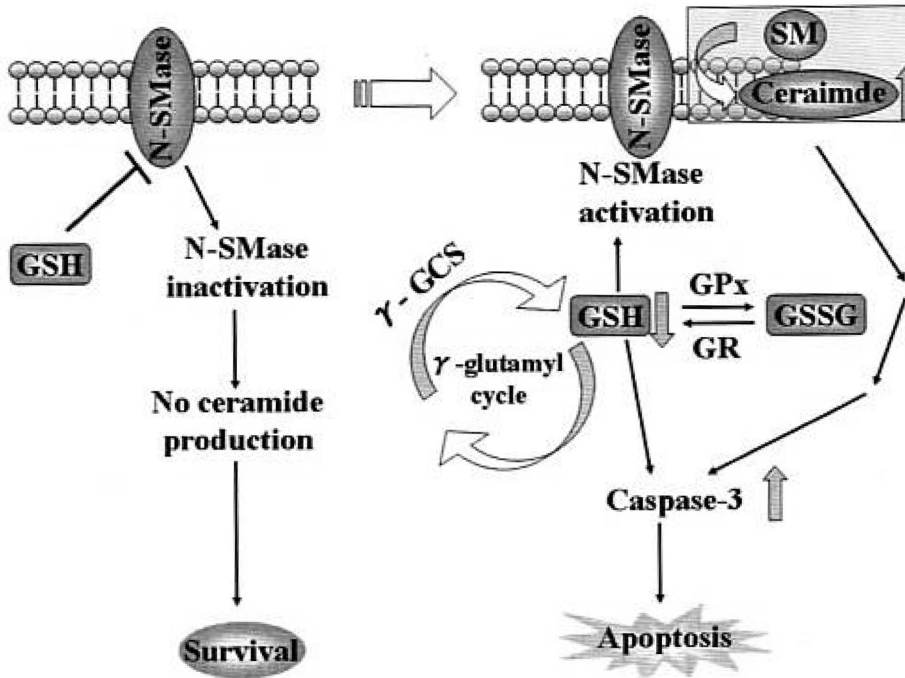


Fig. 15 Prevention mechanism of apoptosis by crocin



Fig. 16 Crocin was approved by SFDA for the clinical trial in 2006

- 2) Lijiang X, Tanaka H, Yaming X, Shoyama Y (1999) Preparation of monoclonal antibody against crocin and its characterization. *Cytotechnology* 29, pp. 65-70.
- 3) Nair SC, Pannikar B, Panikar KR (1991) *Cancer Lett* 57, pp. 109-114.
- 4) Salomi MJ, Nair SC, Panikar KR (1991) *Nut Cancer* 16, pp. 67-72.
- 5) Gainer JL, Wallis DA, Jones JR (1976) *Oncology* 33, pp. 222-224.
- 6) Escrubabi H, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandes JA (1996) *Cancer Lett.* 100, pp. 23-30.
- 7) Konoshima T, Takasaki M, Tokuda H, Morimoto S, Tanaka H, Xuan LJ, Saito H, Sugiura M, Molnar J, Shoyama Y (1998) Crocin and crocetin derivatives inhibit skin tumor promotion in mice. *Phytotherapy Res* 12, pp. 400-404.
- 8) Miwa T (1954) Study on Gardenia florida L. (Fuructus Gardeniae) as a remedy for icterus. Report IV, On the effect of the active principle and extract of Fuructus Gardeniae on the bile secretion of rabbits, blood bilirubin and peripheral lymph bilirubin of common bile-duct ligated rabbits. *Jap J Pharmacol* 4, pp. 69-81.
- 9) Gainer J, Jones JR (1975) The use of crocetin in experimental atherosclerosis. *Experimentia* 31, pp. 548-549.
- 10) Ishiyama J, Saito H, Abe K (1991) Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor promote the generation of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats. *Neurosci Lett* 12, pp. 403-411.
- 11) Abe K, Xie F, Saito H (1991) Epidermal growth factor enhances short-time potentiation and facilitates induction of long-term potentiation of evoked potential in rat hippocampal slices. *Brain Res* 547, pp. 171-174.
- 12) Zhang XY, Shoyama Y, Sugiura M, Saito H (1994) Acute effects of *Crocus sativus* L. on passive avoidance performance in mice. *Biol Pharm Bull* 17, pp. 217-221.
- 13) Sugiura M, Shoyama Y, Saito H, Abe K (1995) Ethanol extract of *Crocus sativus* L. antagonizes the inhibitory action of ethanol on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Phytotherapy Res* 9, pp. 100-104.
- 14) Crowe MJ, Bresnahan JC, Shumann SL, Masters JN, Beattie MS (1997) Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature Medicine* 3, pp. 73-76.
- 15) Hill IE, MacManus JP, Rasquinha I, Tuor UI (1995) DNA fragmentation indicative of apoptosis following unilateral cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Res* 676, pp. 398-403.
- 16) Pettmann B, Henderson CE (1998) Neuronal cell death. *Neuron* 20, pp. 633-647.
- 17) Sugiura M, Shoyama Y, Saito H, Abe K (1994) Crocin (crocetin di-gentiobiose ester) prevents the inhibitory effect of ethanol on long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 271, pp. 703-707.
- 18) Ochiai T, Soeda S, Ohno S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H (2004) Crocin prevents the death of PC-12 cells through sphingomyelinase-ceramide signaling by increasing glutathione synthesis. *Neurochem Int* 44, pp. 321-330.
- 19) Soeda S, Ochiai T, Paopong L, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H (2001) Crocin suppresses tumor necrosis factor- α -induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. *Life Sci* 69, pp. 2887-2898.
- 20) Oppenheim R W (1991) Cell death during development of the nervous system. *Ann Rev Neurosci* 14, pp. 453-501.
- 21) Batistatou A, Green LA (1991) Aurintricarboxylic acid rescues PC-12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *J. Cell. Biol.* 115, pp. 461-471.
- 22) Rukenstein A, Rydel RE, Green LA (1991) Multiple agents rescue PC-12 cells from serum-free cell death by translation- and transcription-independent mechanisms. *J. Neurosci.* 11, pp. 2552-2563.
- 23) Mesner PW, Winters TR, Green SH (1992) Nerve growth factor withdrawal-induced cell

- death in neuronal PC-12 cells resembles that in sympathetic neurons. *J. Cell. Biol.* 119, pp. 1669-1680.
- 24) Pittman RN, Wang S, DiBenedetto AJ, Mills JC (1993) A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *J. Neurosci* 13, pp. 3669-3680.
- 25) Colombaioni L, Frago LM, Varela-Nieto I, Pesi R, Garcia-Gil M (2002) Serum deprivation increases ceramide levels and induces apoptosis in undifferentiated HN9.10e cells. *Neurochem Int* 40, pp. 327-336.
- 26) Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH Jr (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium moniforme*. *J Biol Chem* 266, pp. 14486-14490.
- 27) Merrill AH Jr, van Echten G, Wang E, Sandhoff K (1993) Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *J Biol Chem* 268, pp. 27299-27306.
- 28) Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380, pp. 75-79.
- 29) Yoshimura S, Banno Y, Nakashima S, Hayashi K, Yamakawa H, Sawada M, Sakai N, Nozawa Y (1999) Inhibition of neutral sphingomyelinase activation and ceramide formation by glutathione in hypoxic PC-12 cell death. *J Neurochem* 73, pp. 675-683.
- 30) Yoshimura S, Banno Y, Nakashima S, Takenaka K, Sakai H, Nishimura Y, Sakai N, Shimizu S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Nozawa Y (1998) Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxic PC-12 cell death. *J Biol Chem* 273, pp. 6921-6927.
- 31) Liu B, Hannun YA (1997) Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J Biol Chem* 272, pp. 16381-16287.
- 32) Liu B, Andrieu-Abadie N, Levade T, Zhang P, Obeid LM, Hannun YA (1998) Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor- α -induced cell death. *J Biol Chem* 273, pp. 11313-11320.
- 33) Urata Y, Yamamoto H, Goto S, Tsushima H, Akazawa S, Yamashita S, Nagataki S, Kondo T (1996) Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of γ -glutamylcysteine synthase by interleukin-1 and tumor necrosis factor- α in mouse endothelial cells. *J Biol Chem*, 271, pp. 15146-15152.
- 34) Nakajima A, Yamada K, Zou L.-B, Yan Y, Mizuno M, Nabeshima T (2002) Interleukin-6 protects PC12 cells from 4-hydroxynonenal-induced cytotoxicity by increasing intracellular glutathione levels. *Free Radic Biol Med*, 32, pp. 1324-1332.
- 35) Pan Z, Perez-Polo R (1993) Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism. *J Neurochem* 61, pp. 1713-1721.
- 36) Ochiai T, Ohno S, Soeda S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H (2004) Crocin prevents the death of rat pheochromocytoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of α -tocopherol. *Neurosci Lett* 362, pp. 61-64.
- 37) Abdullaev FI (2002) Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med* 227, pp. 20-25.
- 38) Abe K, Sugiura M, Shoyama Y, Saito H (1998) Crocin antagonizes ethanol inhibition of NMDA receptor-mediated responses in rat hippocampal neurons. *Brain Res* 787, pp. 132-138.
- 39) Behl C, Moosmann B (2002) Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med* 33, pp. 182-191.