HT22 신경세포에서 금은화 추출물에 의한 글루타메이트 유도 산화적 스트레스 및 세포사멸 억제 효과

전창환^{id} · 송춘호^{id}

동의대학교 한의과대학 경락경혈학교실

Inhibitory Effect of *Lonicera japonica* Thunb. Flower Buds against Glutamate-Induced Cytotoxicity in HT22 Hippocampal Neurons

Chang-Hwan Jun, Choon-Ho Song

Department of Meridian & Acupoint, College of Korean Medicine, Dong-eui University

Objectives : In this study, we investigated the neuroprotective effects of ethanol extract of *Lonicera japonica* flower buds (EELJ) on glutamate-induced neurotoxicity in mouse hippocampus-derived neuronal HT22 cells. **Methods :** After analyzing the cytoprotective effect of EELJ on glutamate in HT22 cells, the inhibitory effect of apoptosis was studied using flow cytometry. In order to analyze the antioxidant efficacy of EELJ, the levels of reactive oxygen species (ROS) and glutathione (GSH) were investigated, and the effects on the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were also analyzed. Furthermore, the effect of EELJ on the expression of apoptosis regulators such as Bax and Bcl-2 in glutamate-treated HT22 cells was investigated. **Results :** According to the current results, pretreatment with EELJ significantly reduced glutamate-induced loss of cell viability and release of lactate dehydrogenase. EELJ also markedly attenuated glutamate-induced generation of intracellular ROS, which was associated with increased levels of GSH, and activity of SOD and CAT in glutamate-stimulated HT22 cells. In addition, EELJ was strikingly inhibited glutamate-induced apoptosis in HT22 cells. Furthermore, the expression of pro-apoptotic Bax was increased and the expression of anti-apoptotic Bcl-2 was decreased in glutamate-treated HT22 cells, while in the presence of EELJ, their expressions were maintained at the control levels. **Conclusions :** These findings indicate that EELJ protects glutamate-induced cytotoxicity in HT22 hippocampal neurons through antioxidant activity. Therefore, although identification of biologically active substances of EELJ and re-evaluation through animal experiments is necessary, this natural substance is a promising candidate for further research in preventing and treating oxidative stress-mediated neurodegenerative diseases.

Key words : *Lonicera japonica* Thunb., glutamate-induced cytotoxicity, HT22 hippocampal neurons

서론

뇌와 연관된 신경 퇴행성 질환(neurodegenerative diseases)의 발병에는 다양한 원인들이 관여하지만, 산화적 스트레스(oxidative stress)가 주요 원인 중의 하나로 인식되고 있다¹⁾. 산화적 스트레스

는 산화 환원 항상성(redox homeostasis)의 불균형으로 설명되는 데, 이는 세포 내 자유 라디칼(free radicals)의 제거 능력 저하에 따른 것이다²⁾. 신경계를 포함한 대부분의 조직에서 과잉의 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 핵산, 단백질 및 지질의 산화적 변형을 포함한 세포 내 거대 분자들의 손상을 유발하여 궁

Received February 8, 2021, Revised March 5, 2021, Accepted March 17, 2021

Corresponding author: **Choon-Ho Song**

Department of Meridian & Acupoint, College of Korean Medicine, Dong-eui University, 52-57 Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan 47227, Korea
Tel: +82-51-890-3320, Fax: +82-0505-182-6883, E-mail: chsong@deu.ac.kr

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

극적으로 세포사멸(apoptosis)을 초래한다³⁾. 신경계 중에서, 특히 산소 소비에 크게 의존적인 중추신경계(central nervous system, CNS)는 산화적 손상에 매우 민감하다⁴⁾.

뇌의 주요 흥분성 신경전달물질(excitatory neurotransmitter)인 글루타메이트는 다양한 CNS 장애 및 신경 퇴행성 질환에서 신경세포의 사멸을 유도하는 중요한 조절인자로 알려져 있다^{5,6)}. 즉 글루타메이트의 과도한 축적은 ROS 생성 및 산화성 신경독성(흥분독성, excitotoxicity)을 활성화시켜 신경세포의 죽음을 유도할 뿐만 아니라 허혈성 뇌졸중, 간질, Parkinson 병 등을 포함한 급성 및 만성 신경 퇴행성 질환 유발과도 밀접한 관련이 있다^{2,3,7,8)}. 따라서, 글루타메이트에 의한 산화적 스트레스 연관 신경세포의 사멸 억제는 신경 퇴행성 질환의 예방과 치료를 위한 접근법으로 적용될 수 있다.

신경 퇴행성 질환에 대한 중요한 치료 전략 중의 하나로서 해마의 기능 유지 및 손상의 차단에 초점을 맞추고 있다. 특히 해마의 기능 유지는 기억 장애 치료에 중요하며, 해마 유래 HT22 신경세포는 쥐 해마로부터 유래된 세포주(immortalized mouse hippocampal HT22 cells)로서 글루타메이트에 의해 유발된 뉴런 독성의 연구와 기억 장애를 포함한 뇌 손상 모델로서 광범위하게 사용되고 있다^{9,10)}.

인동과(忍冬科, Caprifoliaceae family)에 속하는 다년생 덩굴성 식물인 인동(忍冬, *Lonicera japonica* Thunb.)은 한국, 중국, 일본을 포함한 동아시아에 서식하는 약초의 일종이다. 금은화(金銀花)는 인동의 꽃 봉오리를 지칭하는 것으로 전통 의학에서 열병 및 염증성 질환의 치료 목적으로 사용되어 왔다¹¹⁾. 특히 최근 Yang 등¹²⁾은 금은화 추출물이 노화를 지연시키고 노화 관련 질병을 치료하는 데 유의한 효과가 있다고 보고한 바 있으며, 다양한 연구들에서 CNS 장애 및 신경 퇴행성 질환의 치료를 위한 긍정적인 효과가 있음이 입증되고 있다¹³⁻¹⁶⁾.

그럼에도 불구하고 금은화 추출물에 의한 HT22 신경세포의 보호 효과에 관한 연구는 현재까지 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 산화적 스트레스에 대한 금은화 추출물의 HT22 신경세포 보호 기능을 확인하고 이와 관련된 질환의 예방과 치료에 적용이 가능한지를 알아보기 위하여 HT22 신경세포를 이용하여 금은화 에탄올 추출물(ethanol extract of *Lonicera japonica* flower buds, EELJ)의 신경보호 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 금은화 에탄올 추출물의 준비

금은화(The flower buds of *L. japonica* THUNB.)는 (주)대한생약제품(Busan, Republic of Korea)에서 구입하였으며, 에탄올 추출물을 분리하기 위하여 분쇄한 금은화 분말 100 g을 70% 에탄올 1 L를 첨가하여 60°C에서 150 rpm으로 3일간 교반시켰다. 그 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 분리한 후, 상층액을 여과지(Whatman No. 3 filter paper, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과한 후 40°C water bath에 rotary evaporator를 사용하여 농축하였다. 농축물은 동결 건조하여 분말화하였으며 최종 수율은 29.7%였다. 획득된 고형성분인 금은화 에탄올 추출물(이하 금은화 추출물, EELJ)은 실험에 사용하기 전, -20°C에 보관하였다.

2. 세포배양 및 금은화 추출물 처리

해마 유래 HT22 신경세포(mouse hippocampus-derived neuronal cells)는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Welgene Inc., Gyeongsan, Republic of Korea), 100 U/ml의 penicillin 및 100 mg/ml의 streptomycin (Welgene Inc.)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgene Inc.)을 이용하여 37°C에서 5%의 CO₂가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 글루타메이트에 의한 세포독성에 미치는 금은화 추출물의 영향을 조사하기 위하여 HT22 신경세포에 적정 농도의 금은화 추출물 또는 글루타메이트(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 24시간 동안 단독으로 처리하거나, 금은화 추출물을 12시간 처리 후 글루타메이트를 24시간 처리하였다. 금은화 추출물을 세포에 처리하기 위해서는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 100 mg/ml의 농도(stock solution)로 만든 다음 이를 DMEM에 적정 농도로 희석하여 처리하였다.

3. 세포 생존율 측정

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석법을 통하여 다양한 조건에서 배양된 HT22 신경세포의 생존율을 측정하였다. 이를 위하여 적정 농도의 금은화 추출물(0~20 µg/ml) 및 글루타메이트(0~20 mM)의 처리가 완료된 후 배지를 제거하고 0.5 mg/ml의 MTT (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 37°C, 암하에서 처리하여 각 well에 형성된

formazan을 DMSO에 용해시켰다. 3시간 후, 96 well plate에 반응액을 200 μ l씩 옮겨서 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 각 실험군에 대한 세포 생존율은 아래와 같이 대조군 기준으로 백분율로 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Mean OD in EELJ and/or glutamate-treated cells}}{\text{Mean OD in untreated cells}} \times 100$$

4. Lactate dehydrogenase (LDH) 유리의 정량적 분석

세포독성에 의해 손상된 세포에서 세포 외로 분비되는 LDH의 양은 세포독성의 평가하는 대표적인 방법 중의 하나이며¹⁷⁾, LDH assay kit (CytoTox96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity assay, Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 분석하였다. 이를 위하여 적정 시간 동안 금은화 추출물(0-20 μ g/ml)과 글루타메이트(5 mM)를 단독 또는 복합으로 처리된 배지에서 배양된 HT22 신경세포를 kit에서 제공된 lysis 용액을 이용하여 50분 정도 용해시켰다. 그 용해 산물을 96 well plate로 옮겨 각 샘플에 LDH 기질 용액(substrate solution)을 첨가하였다. 30분 동안 실온의 암하에서 반응한 후 반응정지액을 넣어 반응을 종결시킨 후 plate를 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험값은 LDH 분비량의 퍼센트로 표시하였다.

5. ROS 생성량의 측정

글루타메이트 처리에 의한 HT22 신경세포에서 ROS 생성과 이에 대한 금은화 추출물의 차단 효과를 확인하기 위하여 fluorescent probe인 2',7'-di-chlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA, Molecular Probes, Leiden, Netherlands)를 사용하였다. 이를 위하여 처리(10 μ g/ml)의 금은화 추출물 및 5 mM의 글루타메이트가 끝난 세포들을 10 μ M의 DCF-DA를 이용하여 37°C에서 1시간 염색하고 비특정의 착색(non-specific staining)을 제거하기 위하여 생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 수세한 후 유세포분석기(flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 각 샘플 당 10,000개 이상의 세포를 대상으로 ROS의 생성량을 정량적으로 분석하였다.

6. Superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT)의 활성 및 glutathione (GSH)의 정량적 평가

글루타메이트 처리에 대한 금은화 추출물의 항산화 활성 회복능을 조사하기 위하여 SOD와 CAT의 효소적 활성화와 GSH의 양적

변화는 Biovision, Inc. (San Francisco CA, USA)에서 구입한 kit를 사용하여 조사하였다. 이를 위하여 HT22 신경세포에 금은화 추출물(10 μ g/ml)을 12시간 동안 전처리한 후 글루타메이트(5 mM)가 함유된 배지에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 배지를 제거하고 세포들을 모은 후 PBS로 수세하고 5분간 700 $\times$ g로 원심분리하였다. 모아진 세포 pellet에 각 kit에서 제공된 ice-cold assay buffer를 500 μ l씩 첨가하여 재현탁시켰다. 세포들을 vortex mixing을 통하여 용해시킨 후 상층액을 각 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정은 SOD 활성을 위해서는 450 nm를, GSH 함량 측정을 위해서는 405 nm를, 그리고 CAT 활성의 측정을 위해서는 570 nm를 사용하였다. 실험값은 대조군에 대해 각각의 퍼센트로 표시하였다.

7. 세포사멸 유도 평가를 위한 핵의 형태 변화 관찰

글루타메이트 처리에 의한 세포사멸의 유발 확인과 금은화 추출물의 억제 효과를 조사하기 위하여 다양한 조건에서 배양된 HT22 신경세포를 PBS로 2회 수세 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)에 희석된 3.7% paraformaldehyde 용액(Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 이용하여 1시간 동안 실온에서 고정시켰다. 고정된 세포들을 PBS로 다시 수세한 후 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2)에 2.5 μ g/ml의 농도로 희석된 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 상온 어두운 곳에서 20분 동안 염색하였다. 이를 다시 PBS로 세척하고 건조시킨 후 형광현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 핵의 형태를 비교하였다.

8. 유세포 분석기를 이용한 세포사멸 유도의 정량적 비교

다양한 조건에서 배양된 세포들에서 세포사멸의 빈도를 정량적으로 평가하기 위하여 유세포 분석기를 사용하였다. 이를 위하여 금은화 추출물(10 μ g/ml) 및 글루타메이트(5 mM)가 단독 또는 복합 처리된 세포를 5분간 700 $\times$ g로 원심분리하여 수집하였다. 수집된 세포들을 PBS로 수세 후, 75% ethanol을 이용하여 12시간 동안 고정하였다. 고정된 세포들을 50 μ g/ml의 propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 암하에서 10분간 염색시킨 후, 35 mm mesh를 이용하여 단일 세포로 분리하고 유세포 분석기에 적용시켜 세포사멸이 유발된 세포를 형광 반응에 따라 분석하였다. 세포사멸이 유도된 세포들에 해당하는 세포주기 분포도 중에서 sub-G1기에 해당하는 빈도를 산출하여 세포사멸 빈도로 제시하였다.

9. Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling (TUNEL) 분석

세포사멸 유도에 대한 정량적 평가를 재확인하기 위하여 유세포 분석기를 이용한 TUNEL 분석을 실시하였다. 이는 terminal deoxynucleotidyl transferase를 사용하여 절단된 DNA를 검출하여 세포사멸을 평가하는 방법으로¹⁸⁾, 이를 위하여 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)에서 구입한 *In Situ* Cell Death Detection kit를 사용하였으며, 실험 과정은 제조사가 제공하는 설명서에 따랐다. 즉, 다양한 조건(10 μ g/ml의 금은화 추출물 및 5 mM의 글루타메이트)에서 배양된 세포(2×10^6 개)를 모아서 PBS로 수세후 PBS (200 μ l)에 다시 현탁시켰다. 그 후 동량의 2% formaldehyde PBS 용액을 첨가하고, 세포를 교반시키면서 실온에서 30분 동안 고정시켰다. 그리고 PBS로 세척한 후, 0.1% sodium citrate와 0.1% Triton X-100 용액에 5분간 4°C에서 반응시켰다. 이어서, 세포들을 PBS로 다시 세척하고 PI 용액에서 재현탁시키기 전에 37°C에서 90분 동안 enzyme/FITC 표지 용액에 반응시킨 후 유세포 분석기를 사용하여 세포사멸의 정도를 분석하였다.

10. 단백질의 분리와 Western blot 분석

금은화 추출물의 산화적 스트레스 보호에 따른 관련 유전자들의 발현 변화를 관찰하기 위하여 준비된 세포들을 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1% Nonidet-P40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 및 5 mM dithiothreitol]를 첨가하여 4°C에서 1시간 이상 반응시켰다. 상층액에 있는 단백질을 분리하고 정량한 후 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용한 전기영동으로 분리하였고, gel에 함유된 단백질을 polyvinylidene difluoride membrane (Schleicher & Schuell Bioscience Inc., Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. Membrane은 PBST (PBS with Tween 20)로 만든 5% skim milk를 사용하여 1시간 동안 반응시킨 후 검출하고자 하는 단백질에 해당하는 항체들로 상온에서 2시간 이상 반응시킨 후, PBS-T 용액으로 세척하고 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse 및 anti-rabbit 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)로 상온에서 1시간 정도 다시 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 해당 단백질의 발현 변화를 분석하였다. 본 연구에 사용된

1차 항체 중, Bax (sc-7480), Bcl-2 (sc-7382) 및 actin (sc-7210)은 Santa Cruz Biotechnology Inc.에서 구입하였다. 검출된 각 단백질들의 발현 변화(densitometric analysis)는 ImageJ[®] software (v1.48, NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 분석하였다.

11. 통계 처리

실험 결과 측정값은 SigmaPlot statistical program version 11.2 프로그램(Systat Software, San Jose, CA, USA)을 사용하여 분석하였다. 각 실험 결과는 평균값(mean)과 표준오차(Standard deviation, SD)로 나타냈으며, 실험군 간의 통계분석은 Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하였고 one-way analysis of variance test 혹은 Student t-test를 통해 시행했다. 실험 결과의 통계적 유의성 판정을 위한 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. HT22 신경세포의 증식에 미치는 금은화 추출물 및 글루타메이트의 영향

Fig. 1A의 결과에서 알 수 있듯이, 금은화 추출물이 존재하는 배지에서 증식된 HT22 신경세포는 금은화 추출물의 처리 농도가 7.5 μ g/ml까지 증가할수록 HT22 신경세포의 증식이 유의적으로 증가하였으며, 최고 농도인 20 μ g/ml 처리군에서는 대조군과 유사한 경향을 보여주었다. 그러나 글루타메이트가 처리된 HT22 신경세포에서는 글루타메이트의 처리 농도가 증가할수록 세포의 생존율이 유의적으로 감소되어, 5 mM 처리군의 경우 58%의 생존율을 보였으며, 10 mM 처리군에서는 32% 이하의 생존율을 나타내었다(Fig. 1B). 따라서 HT22 신경세포에 세포독성을 유발시키기 위한 글루타메이트의 농도는 5 mM로, 이에 대한 금은화 추출물의 보호 효과를 조사하기 위한 금은화 추출물의 농도는 10 μ g/ml을 최고 농도로 설정하였다.

2. HT22 신경세포에서 글루타메이트에 의한 세포독성에 미치는 금은화 추출물의 영향

Fig. 2A에 나타난 MTT 분석 결과에서 알 수 있듯이, 금은화 추출물의 전처리 농도가 증가할수록 글루타메이트에 의한 세포생존율의 감소가 유의적으로 회복되었으며, 대조군 대비 7.5 μ g/ml 및 10 μ g/ml 처리군에서는 각각 75% 및 86%의 생존율을 보였다.

Fig. 1. Effects of EELJ and glutamate on the cell viability in hippocampal HT22 cells.

Cells were treated with various concentrations of EELJ (ethanol extract of *Lonicera japonica* flower buds, A) and glutamate (GLU, B) for 24 h. The cell viability was determined by an MTT reduction assay. The results were expressed as the mean±SD obtained from three independent experiments (* p <0.05 compared with the control group).

이러한 글루타메이트에 대한 금은화 추출물의 세포독성 억제 효과를 재확인하기 위하여 LDH 분석을 수행한 결과, Fig. 2B에서 보는 바와 같이 대조군에서의 LDH의 유리는 5% 정도였으나, 글루타메이트 처리군에서 LDH의 유리가 대조군 대비 14배 증가된 69%로 나타났다. 그러나 7.5 μg/ml 및 10 μg/ml 농도의 금은화 추출물 전처리하는 LDH의 양을 각각 32% 및 19%로 유의성 있게 감소시켰다. 이상의 결과는 금은화 추출물이 HT22 신경세포에서 글루타메이트에 의한 세포독성에 대해 보호 효과를 가질 수 있음을 보여주는 것이다.

3. HT22 신경세포에서 글루타메이트에 의한 ROS 생성의 증가에 미치는 금은화 추출물의 영향

이상에서 관찰된 HT22 신경세포에서 글루타메이트에 대한 금은화 추출물의 세포독성 억제 효과가 산화적 스트레스의 억제와 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 먼저 글루타메이트에 의한 ROS의 생성에 미치는 금은화 추출물의 영향을 분석하였다. 이를 위하여 글루타메이트 단독 처리군, 금은화 추출물 단독 처리군 및

Fig. 2. Protective effect of EELJ on glutamate-induced cytotoxicity in hippocampal HT22 cells.

Cells were pre-treated with or without the indicated concentrations of EELJ for 12 h and then cultured in the presence or absence of 5 mM glutamate for 24 h. (A) Cell viability was determined by an MTT reduction assay. (B) LDH release into the extracellular medium was measured to determine cytotoxicity. The results are expressed as the mean±SD obtained from three independent experiments (* p <0.05 compared with the control group; # p <0.05 compared with the glutamate-treated group).

금은화 추출물이 존재한 조건에서 글루타메이트가 처리된 세포를 대상으로 DCF-DA 염색을 실시 후, 유세포 분석기에 적용시켰다. Fig. 3A의 결과에서 알 수 있듯이, HT22 신경세포에서 글루타메이트 단독 처리는 대조군과 비교하여 5배 이상 ROS 생성이 증가되었으며, 금은화 추출물 단독 처리군에서는 대조군과 유사하였다. 그러나 금은화 추출물이 전처리된 세포에서는 글루타메이트에 의한 ROS의 형성을 현저하게 감소시켜 금은화 추출물의 HT22 신경세포 보호 효과가 ROS 형성의 저해와 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다.

4. HT22 신경세포에서 글루타메이트에 의한 GSH 함량 감소와 SOD 및 CAT의 활성 억제에 미치는 금은화 추출물의 영향

이상에서 관찰된 금은화 추출물의 ROS 생성억제가 항산화 시스템의 기능 회복과 연관성이 있을 것으로 기대되어 세포 내 주요 항산화 효소인 SOD 및 CAT의 활성과 GSH의 수준에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 SOD 활성의 경우, 글루타메이트가 단독으로

Fig. 3. Effects of EELJ on the levels of intracellular ROS production, and activities of SOD and CAT, and levels of GSH in glutamate-treated hippocampal HT22 cells.

Cells were pre-treated with or without 10 μ g/ml EELJ for 12 h and then exposed to 5 mM glutamate for 1 h (A) or 24 h (B~D). (A) The medium was removed, and the cells were incubated for 20 min with medium containing 10 μ M DCF-DA for 30 min. The intracellular ROS level was quantitated using a flow cytometer. (B~D) The activity of SOD and CAT, and levels of GSH were determined by the commercially available assays and expressed as percentages of the corresponding values for the control group. (A~D) Each bar represents the mean $\pm$ SD from three independent experiments per group (* p <0.05 compared with the control group; # p <0.05 compared with the glutamate-treated group).

처리된 HT22 신경세포에서 대조군 대비 45%가 감소되었다(Fig. 3B). 그러나 글루타메이트에 의한 SOD의 활성 감소는 금은화 추출물이 존재하는 조건에서는 대조군 대비 90% 이상 회복되었다. 이와 유사하게 글루타메이트에 의하여 감소된 GSH의 수준과 CAT의 활성 또한 금은화 추출물에 의하여 유의적으로 모두 회복되었다(Fig. 3C, D). 이상의 결과는 HT22 신경세포에서 글루타메이트에 의한 금은화 추출물의 ROS 생성 억제 효능이 세포 내 주요 항산화 효소의 활성 유지와 연관성이 있음을 의미한다.

5. HT22 신경세포에서 글루타메이트에 의한 세포사멸의 유도에 미치는 금은화 추출물의 영향

이상에서 관찰된 글루타메이트가 처리된 HT22 신경세포에서 금은화 추출물의 항산화 활성과 연관된 세포독성의 차단이 세포사멸 유도의 억제와 연관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 세포사멸이 일어난 세포의 핵에서 특이적으로 관찰되는 염색질의 응축(chromatin condensation)에 따른 세포사멸 사체

(apoptotic body)의 형성을 DAPI 염색을 통하여 조사하였다. Fig. 4A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, 글루타메이트가 단독 처리된 HT22 신경세포에서는 세포사멸이 유발되었음을 의미하는 세포사멸 사체 및 염색질 응축의 증가가 관찰되었으나, 금은화 추출물이 존재하는 조건에서 배양된 세포에서는 이러한 형태적 변화가 거의 관찰되지 않았다.

따라서 이러한 금은화 추출물의 세포사멸 억제 효과를 정량적으로 평가하기 위하여 PI 염색을 통한 유세포 분석을 수행하였으며, 세포사멸이 일어난 세포의 집단에 해당되는 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도가 글루타메이트 단독 처리군에서 대조군에 비하여 9배 이상 증가되어 글루타메이트 처리에 따른 HT22 신경세포의 증식억제가 세포사멸 유도에 의한 것임을 다시 확인할 수 있었다(Fig. 4B, C). 그러나 금은화 추출물이 전처리된 조건에서는 글루타메이트에 의한 세포사멸의 빈도가 현저하게 감소되었다. 아울러 핵 내 DNA의 단변화를 검출하는 TUNEL 분석법에 의한 결과에서도, 글루타메이트가 처리된 세포에서는 TUNEL에 양성 반응을 보

Fig. 4. Inhibitory effect of EELJ on glutamate-induced nuclear morphological changes and increase of sub-G1 cells in hippocampal HT22 cells.

Cells were pre-treated with or without 10 μg/ml EELJ for 12 h before treatment with 5 mM glutamate for 24 h. (A) The cells were stained with DAPI solution and stained nuclei were observed using a fluorescence microscope (original magnification, ×200). Each image is representative of at least three independent experiments. Scale bar=200 μM. (B and C) The cells were stained with PI solution for flow cytometry analysis. (B) PI fluorescence intensity was detected to measure the frequency of cells in each phase of the cell cycle using a flow cytometer. (C) Sub-G1% was calculated as the percentage of the number of cells in the sub-G1 population relative to the number of total cells. The results are expressed as the mean±SD obtained from three independent experiments (* p <0.05 compared with the control group; # p <0.05 compared with the glutamate-treated group).

이는 세포의 빈도가 대조군에 비하여 19배 증가되었으나, 금은화 추출물이 존재하는 조건에서는 유의적인 감소를 보였다(Fig. 5). 이러한 결과는 HT22 신경세포에서 글루타메이트의 산화적 스트레스에 대한 금은화 추출물의 세포독성 보호 효과가 세포사멸 억제와 직접 연관성이 있음을 의미하는 것이다.

6. HT22 신경세포에서 글루타메이트에 의한 Bcl-2 family 단백질 발현 변화에 미치는 금은화 추출물의 영향

글루타메이트에 의한 산화적 스트레스와 연관된 세포사멸 유도 및 금은화 추출물에 의한 억제 과정에서 세포사멸 조절에 핵심적으로 관여하는 유전자들의 발현 변화를 조사하기 위하여 Bcl-2 family 단백질에 속하는 Bax 및 Bcl-2의 발현을 조사하였다. 이를

Fig. 5. Suppressive effect of EELJ on glutamate-induced apoptosis in hippocampal HT22 cells.

Cells were pre-treated with or without 10 μg/ml EELJ for 12 h before treatment with 5 mM glutamate for 24 h. (A) The efficacy of inducing HT22 cell apoptosis was measured by the TUNEL assay on a flow cytometer. (B) The percentages of TUNEL-positive cells were expressed as the mean±SD of three independent experiments (* p <0.05 compared with the control group; # p <0.05 compared with the glutamate-treated group).

위하여 글루타메이트와 금은화 추출물의 단독 또는 복합 처리된 조건에서 배양된 HT22 신경세포의 단백질을 추출하여 Bax 및 Bcl-2의 항체를 이용하여 immunoblotting를 실시하였으며 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 제시된 결과에서 알 수 있듯이, 글루타메이트가 단독 처리된 배지에서 배양된 HT22 신경세포에서 대표적인 세포사멸 유도(pro-apoptotic) 단백질에 속하는 Bax의 발현이 증가된 반면, 세포사멸 억제(anti-apoptotic) 단백질군에 속하는 Bcl-2의 발현은 감소되었다. 그러나 금은화 추출물의 전처리에 의해서는 두 Bcl-2 family 단백질들의 발현은 대조군 수준으로 유지되었다. 따라서 금은화 추출물에 의한 글루타메이트 유도 세포사멸의 억제에는 Bcl-2 family 인자들의 발현 변화를 억제함으로써 세포사멸 유도를 차단하여 HT22 신경세포에 대한 보호 작용을 나타냄을 알 수 있었다.

Fig. 6. Effects of EELJ on the expression of Bax and Bcl-2 in glutamate-treated hippocampal HT22 cells.

Cells were pre-treated with or without 10 µg/ml EELJ for 12 h, and then treated with or without 5 mM glutamate for 24 h. (A) The equal amounts of proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and subjected to Western blot analysis. Actin was used as an internal control, and the proteins were visualized using an ECL detection system. (B) The expression of each protein was indicated as a fold change relative to the control. Quantitative analysis of mean pixel density was performed using the ImageJ[®] software. The results are expressed as the mean±SD obtained from three independent experiments (* $p < 0.05$ compared with the control group; # $p < 0.05$ compared with the glutamate-treated group).

고 찰

신경 퇴행성 질환의 치료 목적으로 현재 임상적으로 광범위하게 사용되고 있는 합성 약물은 장기적으로 사용할 경우 심각한 부작용을 경험할 가능성이 높다¹⁹⁾. 그러나 신경 퇴행성 질환에 대한 새로운 치료 목표와 전략으로 전통적으로 사용되어 온 약재 유래 화합물들은 환자들이 쉽게 이용할 수 있고 우수한 효과와 최소한의 부작용으로 잠재적 대안이 될 수 있다²⁰⁾. 본 연구에서는 다양한 치료의 목적으로 오랫동안 사용되어 온 전통 의약자원으로부터 신경 퇴행성 질환의 예방과 치료에 유의적인 후보물질을 도출하기 위하여 금은화 추출물의 효능을 평가하였다. 이를 위하여 HT22 신경세포를 대상으로 글루타메이트에 의한 세포독성 억제에 대한 금은화 에탄올 추출물이 미치는 영향 및 관련 기전 연구를 수행하였다.

신경 변성에서 신경세포의 사멸을 유도하는 가장 중요한 병리학적 요인 중 하나는 산화적 스트레스이며, ROS의 과도한 생성에 의한 세포사멸 신호 전달 경로의 활성화는 신경세포의 사멸을 유발

하는 데 가장 중요한 기전으로 입증되었다^{2,21)}. 포유동물의 CNS에서 글루타메이트는 주요 내인성 신경 전달물질로서 다양한 기능을 수행한다. 하지만, 장기간의 노출 또는 고농도에서는 신경독성을 유발하여 산화적 스트레스에 의한 신경세포의 죽음을 초래하여 다양한 신경 퇴행성 질환의 발병에 기여한다^{6,22)}. 특히 해마세포에서 글루타메이트에 의한 과도한 ROS의 생성이 세포사멸의 진행에 주요 요인이 밝혀졌다³⁾.

따라서, 본 연구에서는 HT22 신경세포를 대상으로 글루타메이트에 대한 세포독성 반응에 따른 세포사멸에 미치는 금은화 추출물의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 HT22 신경세포에 신경독성을 유발시키기 위해서는 5 mM의 글루타메이트를 처리하였다. 금은화 추출물의 경우, 비록 7.5 µg/ml 처리군에서 HT22 세포의 증식이 유의적으로 증가되었지만 10 µg/ml 처리군에서는 HT22 세포의 증식에 영향을 미치지 않았기에 10 µg/ml 이하로 선정하였다(Fig. 1). 본 연구에서 수행된 MTT 분석 및 LDH 유리의 측정 결과에 의하면, 금은화 추출물이 전처리된 조건에서 글루타메이트에 의한 세포독성은 금은화 추출물 처리 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 2). 이러한 금은화 추출물의 글루타메이트에 대한 HT22 신경세포 보호 작용에는 ROS 생성의 억제 작용이 동반되었다(Fig. 3A). 따라서 금은화 추출물의 항산화력이 세포독성의 차단과 밀접한 연관이 있음을 유추할 수 있었으며, 이러한 HT22 신경세포에서의 ROS 차단 효과는 한약재 유래 다양한 생리활성 물질들에 의한 연구 결과²³⁾와 잘 일치된다.

한편, ROS의 제거를 통한 산화적 스트레스로부터 세포 손상을 방지하기 위해 세포에는 SOD와 CAT을 포함한 다양한 항산화 방어 시스템이 존재한다. SOD는 과산화물 음이온(superoxide anion)을 과산화수소(H_2O_2)로 변환시키는데 관여하며, 이 생성물들은 CAT에 의해 제거된다²⁴⁾. 즉 SOD와 CAT은 뇌 조직을 포함한 광범위한 인체 조직에 존재하는 항산화 효소(antioxidant enzyme)로서 ROS의 해독에 중요한 역할을 한다²⁵⁾. 그리고, GSH는 세포 내 가장 풍부한 내인성 항산화제로서 SOD 및 CAT의 활성뿐만 아니라 증가된 GSH 수준은 산화적 스트레스에 대한 방어 작용에 핵심적인 역할을 한다²⁶⁾. 특히 HT22 신경세포에서, 글루타메이트는 N-acetyl-cysteine의 흡수를 억제하여 강력한 항산화제 역할을 하는 GSH의 세포 내 농도를 감소시켜 궁극적으로 산화적 스트레스와 세포사멸을 일으킨다^{3,21)}. 금은화 추출물은 HT22 신경세포에서 글루타메이트 처리에 의한 ROS 생성 억제와 함께 SOD 및 CAT의 효소 활성 억제를 유의적으로 차단시켰다. 아울러 GSH의 감소 또한 금은화 추출물에 의해 효과적으로 차단하여(Fig. 3B~D), 글루타메이트에 대한 HT22 신경세포 보호 효과가 금은화 추출

물의 항산화력과 연관되어 있음을 시사한다. 그러나 금은화 추출물에 의한 GSH 감소의 차단 효과에 글루타메이트-시스테인 연결 효소가 관여할 가능성에 대한 추가 연구가 요구된다.

다음은 금은화 추출물의 글루타메이트에 대한 항산화 활성과 연관된 세포증식력 회복이 세포사멸 억제와 연관되어 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 핵의 형태적 변화와 sub-G1기 세포의 빈도 및 TUNEL 양성 반응의 빈도를 유세포 분석기를 통하여 정량적으로 분석하였다. 금은화 추출물에 의하여 글루타메이트 유도 HT22 신경세포의 생존력 저하 차단 효과에서 예측이 가능하듯이, 금은화 추출물이 존재하는 조건에서 글루타메이트에 의한 세포사멸이 거의 대조군 수준으로 억제되었다(Fig. 4, 5). 세포사멸의 촉진과 억제를 조절하는 단백질로 구성된 Bcl-2 family 단백질들(Bcl-2 family proteins)은 세포사멸의 진행을 결정짓는데 핵심적인 역할을 한다. 그중에서 대표적인 세포사멸의 촉진자인 Bax는 미토콘드리아 외막에 위치하며 미토콘드리아 투과성 전이를 촉진하거나 미토콘드리아 외막의 장벽 기능을 약화시켜 세포사멸 촉진 인자의 방출을 유도한다. 반대로, Bcl-2와 같은 세포사멸 억제 단백질들은 세포사멸 촉진 인자의 방출을 억제하기 위해 미토콘드리아 투과성 및 막 장벽 안정화를 유지하는데 필수적이다²⁷⁾. 그러므로, Bax 계열 단백질과 Bcl-2 계열 단백질 사이의 발현 균형은 세포사멸 유도 및 억제의 중요한 결정 인자로서 작용한다. 따라서 본 연구에서는 글루타메이트에 의한 Bax 및 Bcl-2 단백질의 발현 변화에 미치는 금은화 추출물의 영향을 조사하였다. 본 연구의 결과에서 의하면 글루타메이트가 처리된 HT22 신경세포에서 세포사멸의 촉진자인 Bax의 발현은 증가된 반면, Bcl-2의 발현은 매우 감소되었으며(Fig. 6), 이는 Chu 등²⁸⁾의 연구에서 나타난 결과와 잘 일치되었다. 그러나 금은화 추출물이 존재하는 조건에서 글루타메이트가 처리된 HT22 신경세포의 Bax와 Bcl-2의 발현은 대조군 수준으로 유지되었다(Fig. 6). 따라서 HT22 신경세포에서 금은화 추출물은 ROS 생성의 억제와 함께 Bax 및 Bcl-2의 발현 변화를 감소시켜 세포사멸 개시를 차단하였을 것으로 추정된다.

이상의 결과에서 금은화 추출물은 산화적 스트레스를 억제함으로써 글루타메이트에 의한 HT22 신경세포의 독성을 억제할 수 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 HT22 신경세포의 보호를 위한 금은화 추출물의 활용 가능성을 제시할 수 있으나, 동물 실험을 통한 재확인과 금은화 추출물에 함유된 유효 성분들에 대한 추가적인 실험도 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

결론

본 연구의 결과에 의하면 금은화 추출물은 글루타메이트에 의해 유도된 HT22 신경세포의 증식억제를 유의적으로 차단하였으며, 이는 ROS 생성의 억제와 연관성이 있었다. 또한 글루타메이트에 의해 감소된 SOD와 CAT 활성 및 GSH 수준이 금은화 추출물 처리에 의하여 회복되었으며, 이는 금은화 추출물의 항산화력을 재확인하여 주는 결과이다. HT22 신경세포에서 글루타메이트에 의한 세포독성은 세포사멸 유도와 밀접한 연관이 있었으며, 금은화 추출물을 이를 유의적으로 차단하였다. 글루타메이트에 의한 HT22 신경세포의 세포사멸 유도에는 Bax의 발현 증가와 Bcl-2 발현의 억제가 관여하고 있었으며, 금은화 추출물이 존재하는 조건에서 이들 단백질은 대조군 수준으로 유지되었다. 따라서 HT22 신경세포에서 글루타메이트에 의한 세포사멸은 ROS 생성에 따른 미토콘드리아 기능 손상과 이상이 있을 것으로 기대되며, 금은화 추출물은 이러한 손상을 억제시켰을 것으로 추정된다. 따라서 금은화 추출물은 HT22 신경세포의 퇴행성을 예방할 수 있는 잠재력을 가지고 있음을 의미한다.

Acknowledgement

None.

Funding

None.

Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

References

1. Raichle ME, Gusnard DA. Appraising the brain's energy budget. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 ; 99(16) : 10237-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.172399499>
2. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2007 ; 9(1) : 49-89. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.9.49>
3. Liu Z, Zhou T, Ziegler AC, Dimitrion P, Zuo L. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative Med Cell Longev*. 2017 ; 2017 : 2525967. <https://doi.org/10.1155/2017/2525967>
4. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp Neurobiol*. 2015 ; 24(4) : 325-40. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>
5. Sosa MA, De Gasperi R, Paulino AJ, Pricop PE, Shaughness MC, Maudlin-Jeronimo E, et al. Blast overpressure induces shear-related injuries in the brain of rats exposed to a mild traumatic brain injury. *Acta Neuropathol Commun*. 2013 ; 1 : 51. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-51>
6. Lewerenz J, Maher P. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-what is the evidence? *Front Neurosci*. 2015 ; 9 : 469. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00469>
7. Wang JF, Li Y, Song JN, Pang HG. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury. *Neurochem Int*. 2014a ; 64 : 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.11.002>
8. Ha JS, Park SS. Glutamate-induced oxidative stress, but not cell death, is largely dependent upon extracellular calcium in mouse neuronal HT22 cells. *Neurosci Lett*. 2006 ; 393 : 165-9. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.09.056>
9. Behl C. Effects of glucocorticoids on oxidative stress-induced hippocampal cell death: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 1998 ; 33(7-8) : 689-96. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(98\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(98)00019-9)
10. Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA, Vavilis TD. Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study. *Front Cell Neurosci*. 2015 ; 9 : 91. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00091>
11. Li Y, Li W, Fu C, Song Y, Fu Q. *Lonicerae japonicae* flos and *Lonicerae* flos: A systematic review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology. *Phytochem Rev*. 2019 ; 22 : 1-61. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09655-7>
12. Yang ZZ, Yu YT, Lin HR, Liao DC, Cui XH, Wang HB. *Lonicera japonica* extends lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med*. 2018 ; 129 : 310-22. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.035>
13. Wang P, Liao W, Fang J, Liu Q, Yao J, Hu M, et al. A glucan isolated from flowers of *Lonicera japonica* Thunb. inhibits aggregation and neurotoxicity of A β 42. *Carbohydr Polym*. 2014 ; 110 : 142-7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.060>
14. Kwon SH, Hong SI, Jung YH, Kim MJ, Kim SY, Kim HC, et al. *Lonicera japonica* THUNB. protects 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity by inhibiting activation of MAPKs, PI3K/Akt, and NF- κ B in SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol*. 2012 ; 50(3-4) : 797-807. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.026>
15. Kwon SH, Hong SI, Kim JA, Jung YH, Kim SY, Kim HC, et al. The neuroprotective effects of *Lonicera japonica* THUNB. against hydrogen peroxide-induced apoptosis via phosphorylation of MAPKs and PI3K/Akt in SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol*. 2011 ; 49(4) : 1011-9. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.01.008>
16. Weon JB, Yang HJ, Lee B, Yun BR, Ahn JH, Lee HY, et al. Neuroprotective activity of the methanolic extract of *Lonicera japonica* in glutamate-injured primary rat cortical cells. *Pharmacogn Mag*. 2011 ; 7(28) : 284-8. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.90404>
17. Loo DT, Rillema JR. Measurement of cell death. *Methods Cell Biol*. 1998 ; 57 : 251-64. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61583-6](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61583-6)
18. Majtnerová P, Roušar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep*. 2018 ; 45(5) : 1469-78. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9>
19. Xie J, Liang R, Wang Y, Huang J, Cao X, Niu B. Progress in target drug molecules for Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem*. 2020 ; 20(1) : 4-36. <https://doi.org/10.2174/1568026619666191203113745>
20. Moradi SZ, Momtaz S, Bayrami Z, Farzaei MH, Abdollahi M. Nanoformulations of herbal extracts in treatment of neurodegenerative disorders. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 ; 8 : 238. <https://doi.org/10.1155/2014/979730>
21. Wang Y, Qin ZH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*. 2010 ; 15(11) : 1382-402. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0481-0>

22. Fukui M, Song JH, Choi J, Choi HJ, Zhu BT. Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Eur J Pharmacol.* 2009 ; 617(1-3) : 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.059>
23. Song JH, Kim S, Yu JS, Park DH, Kim SY, Kang KS, et al. Procyanidin B2 3"-O-gallate isolated from *Reynoutria elliptica* prevents glutamate-induced HT22 cell death by blocking the accumulation of intracellular reactive oxygen species. *Biomolecules.* 2019 ; 9(9) : 412. <https://doi.org/10.3390/biom9090412>
24. An H, Ling C, Xu M, Hu M, Wang H, Liu J, et al. Oxidative damage induced by nano-titanium dioxide in rats and mice: A systematic review and meta-analysis. *Biol Trace Elem Res.* 2020 ; 194(1) : 184-202. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01761-z>
25. Qi W, Boliang W, Xiaoxi T, Guoqiang F, Jianbo X, Gang W. Cardamonin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by restraining oxidative stress and inflammation associated with Nrf2 signaling. *Biomed Pharmacother.* 2020 ; 122 : 109547. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109547>
26. Lee H, Ko W, Chowdhury A, Li B, Kim SC, Oh H, et al. Brassicaphenanthrene A from *Brassica rapa* protects HT22 neuronal cells through the regulation of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression. *Mol Med Rep.* 2020 ; 21(1) : 493-500. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10824>
27. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 ; 21(2) : 85-100. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>
28. Chu Q, Zhu Y, Cao T, Zhang Y, Chang Z, Liu Y, et al. Studies on the neuroprotection of osthole on glutamate-induced apoptotic cells and an Alzheimer's disease mouse model *via* modulation oxidative stress. *Appl Biochem Biotechnol.* 2020 ; 190(2) : 634-44. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03101-2>