

석사학위논문

산귤(*Citrus sunki* Hort. ex  
Tanaka) 과피 발효 추출물의  
신경세포 사멸 조절에 관한 연구

제주대학교 대학원

생명과학과

고운철

2010년 2월

산귤(*Citrus sunki* Hort. ex  
Tanaka) 과피 발효 추출물의  
신경세포 사멸 조절에 관한 연구

지도교수 이 선 령

고 운 철

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2010년 2월

신혜선의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_ ①

위 원 \_\_\_\_\_ ①

위 원 \_\_\_\_\_ ①

제주대학교 대학원

2010년 2월

Study on regulation of neuronal cell death by fermented  
extracts of *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka peel

Woon-Chul Ko

(Supervised by Professor Sun-Ryung Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of  
Master of Science

2010. 2.

This thesis has been examined and approved.

---

Thesis director, Se-Jae Kim, Prof. of Biology

---

---

(Name and signature)

---

Date

Department of Life Science  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## ABSTRACT

*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka has been used as a traditional medicine to treat patients suffered from different kinds of diseases. Although anti-inflammatory activity of *C. sunki* peel has suggested, little is known about other pharmacological and neurogeneration-related activities. Hypoxic/ischemic induced cell death is a major in the various clinical entities such as stroke and other neurodegenerative diseases (Parkinson's, Alzheimer's). This study was examined the effect of fermented *C. sunki* peel and its possible mechanisms on chemical hypoxia-induced neuronal cell death. To mimic the hypoxia condition in cell culture system,  $\text{CoCl}_2$  was used in the human neuroblastoma SH-SY5Y cells.  $\text{CoCl}_2$  induced caspase-dependent cell death via ROS production in a dose-dependent manner. Extract of fermented immature *C. sunki* peel significantly rescued the  $\text{CoCl}_2$ -induced neuronal toxicity compared to those of fermented mature *C. sunki* peel. Production of ROS and pro-apoptotic events including activation of caspase-3, -7, -9, hydrolysis of PARP and cellular fragmentation were blocked by treatment with extract of fermented immature *C. sunki* peel. Moreover, nobiletin or tangeretin showed the potent inhibitory effect on  $\text{CoCl}_2$ -induced cell death whereas synephrine has no effect. In conclusion, fermented immature *C. sunki* peel might have the protective effect against neuronal damage by chemical hypoxia ( $\text{CoCl}_2$ ), partly through generation of ROS and effectors involved in mitochondrial-mediated apoptosis.

# 목 차

A B S T R A C T	-----	i
목 차	-----	ii
LIST OF FIGURES	-----	iv
I. 서 론	-----	1
II. 재 료 및 방 법	-----	4
1. 시료 준비		
2. 세포 배양		
3. 세포 생존률 측정		
4. 세포내 ROS 생성물 측정		
5. DNA 단편 관찰		
6. 핵의 형태학적 변화 관찰		
7. Western blot		
8. 통계학적 분석		
III. 결 과	-----	7
1. 저산소 환경이 신경세포 사멸에 미치는 영향		
2. 신경세포 사멸에 있어서 산술 과피 발효 추출물의 효과		

- 1) 미성숙 산귤 과피 발효 추출물의 세포 사멸 보호 효과
- 2) 세포 사멸 관련 단백질의 발현 분석
- 3) 산귤 과피 발효 추출물의 ROS 생성 억제효과
- 4) 산귤 과피 발효 추출물의 단일 물질의 효과

IV. 고	찰	-----	25
V. 참	고 문	-----	28
VI. 요	약	-----	37



## LIST OF FIGURES

Figure 1. Neurotoxicity of CoCl <sub>2</sub> in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.	8
Figure 2. Effects of CoCl <sub>2</sub> on expression of apoptosis-related proteins.	9
Figure 3. Production of ROS by CoCl <sub>2</sub> in SH-SY5Y cell.	10
Figure 4. Protective effect of immature FES on CoCl <sub>2</sub> -induced apoptosis.	13
Figure 5. Effect of mature FES on CoCl <sub>2</sub> -induced apoptosis.	14
Figure 6. Morphological features of SH-SY5Y cells after treatment with CoCl <sub>2</sub> and FES.	15
Figure 7. Effect of FES on CoCl <sub>2</sub> -induced DNA fragmentation.	16
Figure 8. Expression of cell death-related proteins.	17
Figure 9. Expression of cell death-related proteins.	18
Figure 10. Effect of FES on CoCl <sub>2</sub> -induced ROS production.	20
Figure 11. Effect of synephrine on CoCl <sub>2</sub> -induced cell death.	21

Figure 12. Effect of polymethoxyl flavone(PMF) on  $\text{CoCl}_2$ -induced cell death. ----- 22

Figure 13. Effects of nobiletin and tangeretin on  $\text{CoCl}_2$ -induced cell death. ----- 23

Figure 14. Expression patterns of apoptosis-related protein. ----- 24



## I. 서론

수명에 대한 기대치가 증가하고 의료과학기술의 발달로 65세 이상의 노인인구가 전체의 20% 이상을 차지하는 고령화 사회로 접어들면서 퇴행성 신경계 질환(알츠하이머병, 파킨슨 병), 혈관성 뇌질환(뇌출혈, 뇌경색) 및 급성 손상성 신경 질환(뇌손상, 척수손상)과 같은 신경계 질환으로 고통 받는 사람이 증가하고 있다. 통계청 자료에 의하면 퇴행성 신경계 질환 중 뇌혈관 질환은 주요한 사망 원인 중의 하나로 이로 인한 사망은 우리나라 성인의 3분의 1 이상을 차지하고 있으며, 2020년에는 지금의 2배가 될 것으로 예상하고 있다.

대부분의 신경계 질환은 특정 부분 신경세포가 손실되거나 기능이 손상됨으로써 육체적, 정신적 행동 양식에 큰 변화를 가져오게 된다. 치매로 잘 알려진 알츠하이머병은 대뇌피질의 신경세포가 죽어서 대뇌의 전두엽과 측두엽의 뇌회기 위축되어 언어장애 및 심한 단기 기억상실을 유발하며, 파킨슨병은 흑색질의 신경세포의 파괴로 인해, 뇌줄중 역시 허혈에 특이적으로 손상받기 쉬운 해마체나 뇌피질의 신경세포가 영향을 받음으로써 유발된다(Huang *et al.*, 2009; Snider *et al.*, 1999; Miles *et al.*, 1998; Nakamura & Lipton, 2009; Andrabi *et al.*, 2008). 신경계 손상과 관련하여 저산소증에 의한 세포괴사, 칼슘과 흥분성 아미노산에 의해 매개되는 세포손상, 산소 유리기에 의한 손상, 염증세포에 의한 허혈 조직에서의 염증반응 등이 알려져 있지만 정확한 기전에 대해서는 많은 연구가 필요한 실정이다(Choi *et al.*, 1996; Giffard & Swanson, 2005; Lipton, 1999; Yuan & Yankner, 2000; Liu *et al.*, 2009).

세포사멸은 발생과정상 불필요한 세포나, 노화된 세포, 각종 상해를 받은 세포를 제거하기 위해 유전적으로 결정되는 세포내 자살 프로그램의 활성화를 통해 조절되는 능동적 세포 죽음 과정으로 정상적인 태아의 발달과 노화, 그리고 면역 기능과 조혈계의 유지에 중요한 역할을 한다. 세포사멸은 세포의 축소, 염색체 응축, 핵의 분해 및 사멸체(apoptotic body) 형성 등 뚜렷한 형태학적인 특징을 가지며(Love, 2003; Kim *et al.*, 2006), 크게 세 가지 과정, 즉 신호전달 단계, 조절 및 실행 단계, 구조적 변환 단계로 나뉘어진다. 신호전달 단계(signalization

phase)는 세포사멸을 야기하는 자극의 종류에 따라 달라지며, 주로 열 충격, 영양분 결핍, 산소 라디칼, 저산소증에 의해 발현되는 stress activated protein kinase (SAPK)의 활성화에 의해 조절된다(Hunter *et al.*, 2006). 조절 및 실행단계(control & execution phase)는 Bcl-2 family 및 protease의 역할을 하는 caspase들의 활성화를 통한 내재성 경로로 의해 조절된다. 자극에 의한 reactive oxygen species (ROS)의 생성량 증가는 Bcl-2 family 단백질을 활성화시킨다. 이는 미토콘드리아에서 cytochrome c의 방출을 야기하고(Yan *et al.*, 2009; Poyton *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009), 방출된 cytochrome c는 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor)과 caspase-9이 결합을 유도하여 apoptosome을 형성하게 된다(Adams & Cory, 1998; Matsumoto *et al.*, 2004). Apoptosome은 caspase-3의 활성화와 DNA 손상을 치료하는 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)의 분절화를 유도하여 세포 사멸을 조절하는 것으로 알려져 있다(Bredesen *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2008; Gartner *et al.*, 2008). 마지막으로 구조적 변화단계(structural alteration phase)에서는 세포의 응축 및 핵의 분해 그리고 사멸체의 형성 등 세포 사멸의 형태학적인 특징이 나타난다(Fulda, 2009).

산귤(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka)은 쌍떡잎식물 쥐손이풀목 운향과(Rutaceas)에 속하는 제주도 재래종으로 현재 분류학상으로는 일본으로부터 도입된 일반 온주밀감과 함께 Citrus 속에 해당된다. Citrus속 식물의 과피는 오랫동안 생약으로 사용되어 왔으며, 특히 재래감귤인 산귤의 과피인 진피는 한약재의 구성성분에서 매우 중요한 약제성분으로 인정되어 왔으나 약리학적 측면에서의 활성화는 거의 알려져 있지 않다(강 등, 2005). 최근에 들어서 Citrus 속의 성분 및 생리활성 분석을 통한 과피의 기능성에 대해 관심을 가지게 되었고, 활발한 연구가 진행되고 있다. Choi 등 (Choi *et al.*, 2007a)의 연구에서는 감귤 flavonoid의 nobiletin 성분이 NO의 양을 감소시켜 항염 효과가 있음을 밝혔고, Chang 등 (Chang *et al.*, 2008)은 유방암세포인 MDA-MB-231 세포와 MCF-7 세포 등 총 6개의 암세포주를 이용하여 플라보노이드의 항암효과를 보고하였다. 또한, 감귤 과피에 포함된 flavonoid는 심장순환기계 질환 및 항산화, 항바이러스 작용, 항 알러지, 모세혈관 강화작용 등에 대한 개선 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Slambrouck *et al.*, 2005; Akao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008;

Nichenametla *et al.*, 2006). 감귤로부터 약 60여종의 플라보노이드가 분리되었으며, 이들 플라보노이드들은 대부분 감귤류의 과피에 포함되어 있는 반면 과육에는 소량만이 포함되어 있는 것으로 보고되어져 있다(백 등, 2001). 감귤류에는 일반적인 플라보노이드인 rutin, deosmine 등과 감귤류 특유의 플라보노이드인 hesperidin, naringin 등, 그리고 채소나 다른 과일에서 보고되지 않은 감귤류 고유의 tangeretin, nobiletin과 같은 플라보노이드가 함유되어 있다. 그 외 essential oils은 hydrocarbones (terpenes), oxygen (alcohols, aldehydes, ketones, carboxylic acids, esthers, lactones), 그리고 sulfur (sulfides, disulfides, trisulfides) 등의 유기물을 포함하고 있다(Akakabe *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2007b).

Choi 등(Choi *et al.*, 2007b)의 연구에서 Citrus 속 20종의 과피에서 생리활성 물질을 추출하여 분석한 결과 산귤에서 polymethoxyl flavone 인 nobiletin과 tangeretin이 다른 종에 비하여 많은 양이 함유되어 있음을 보고하였다. 그리고 강 등(강 등, 2005)은 산귤 과피 추출물이 대식세포인 Raw 264.7 세포에서 산화 질소의 생성 및 NOS와 COX-2와 같은 염증유발 단백질을 억제하고, 상피세포 유래 세포주인 CHO-IR 세포 및 사람의 간암세포주인 HepG2 세포의 생존능을 감소시켰으며, 이러한 효과는 과피를 발효하여 사용하였을 경우 발효하기 전보다 효과가 높다고 보고하였다. 따라서 본 연구는 제주 재래종 감귤인 산귤 과피를 발효시켜 얻은 추출물이 뇌질환 유발시 발생하는 신경세포 사멸에 어떠한 영향을 끼치는지 파악하고 그 기전을 규명하여 제주도의 자원 활용화 및 신경 세포 사멸에 의해 유발될 수 있는 뇌관련 질환치료제로서의 가능성을 모색하는데 목적을 두고 수행되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료준비

실험에 사용된 산굴 과피 발효 추출물은 이엠라이프의 도움을 받아 사용하였다. 추출과정은 건조된 상태의 과피를 발효하여 사용하였다. 발효과정은 다음과 같다. 인삼, 다시마, 쌀겨를 중량 비율 1 : 2 : 20으로 섞은 혼합물과 물 1L에 짓산균과 효모를 접종하여 1주 이상 수분함량이 35% 미만으로 떨어질 때까지 교반 발효시켜 고형상의 발효물을 만들고, 다시 이 발효물에 소금포화용액 1 : 55의 중량 비율로 섞어 살균 추출 후 여과시켰다. 세절한 진피에 물을 1 kg/0.1L로 가하고, 발효액을 1% 미만으로 첨가하여 2주 이상 교반하여 추출하였다. 산굴 과피 발효물을 80% 에탄올에 넣고 48시간동안 추출하여 산굴 과피 발효 에탄올 추출물을 얻었다.

### 2. 세포 배양

실험에 사용된 Human neuroblastoma SH-SY5Y 세포는 한국 세포주은행(KCLB)으로부터 구입하였다. 세포는 100 units/mL의 penicillin과 100 µg/mL의 streptomycin, 10% fetal bovine serum (FBS), 그리고 20 mM HEPES가 포함된 MEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

실험을 위한 조건은 세포를 1 X 10<sup>6</sup> cell/mL의 농도로 심어 48시간 배양한 후 FBS가 포함되지 않은 배지로 교환하였다. 20시간 동안 안정화시킨 후 CoCl<sub>2</sub> 또는 산굴 과피 발효 추출물을 농도별로 처리하였다.

### 3. 세포 생존률 측정

세포의 생존률은 trypan-blue 염색시약을 이용하여 측정하였다. 24 well plate에 준비된 세포에 각각의 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 세포를 모두 수거하여 0.4% trypan blue와 섞어 hemocytometer를 이용하여 살아 있는 세포와 죽은 세포를 계수하였다. 아래의 식을 이용하여 추출물 처리에 따른 세포의 생존률을 산출하였다.

세포 생존률(%) = 살아있는 세포 수 / (살아있는 세포 수 + 죽은 세포 수) X 100

#### 4. 세포내 ROS 측정

세포내 reactive oxygen species (ROS) 생성은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하여 fluorescence spectrometer에서 측정하였다. 96well plate에 CoCl<sub>2</sub> 또는 추출물이 농도별로 처리된 세포(1 X 10<sup>6</sup> cell/mL)를 준비하여 DCF-DA(10 µg/mL)를 1시간 동안 처리한 후 FLUOstar (excitation : 485nm, emission : 520nm)에서 형광을 측정하였다.

#### 5. DNA fragmentation 관찰

CoCl<sub>2</sub> 또는 추출물을 처리하여 24시간동안 배양된 세포를 수거하여 phosphate buffer saline (PBS)로 세척한 후, Promega Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega)로 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동한 후 RedSafe Nucleic acid Staining Solution (iNtRON)으로 염색하여 UV transilluminator (GELMANAGER<sup>™</sup>)하에서 DNA fragmentation 현상을 관찰하였다.

#### 6. 핵의 형태학적 변화 관찰

-20℃에 보관된 90% 메탄올을 이용하여 5분 동안 세포를 고정한 후 PBS로 수세하였다. DNA에 특이적으로 결합하는 형광색소인 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 용액 (3 µg/mL)으로 상온에서 30분간 염색하여 공초점 레이저 스캐닝 현미경(FV500, Olympus)하에서 관찰하였다(excitation : 358nm, emission : 461nm, X10 objective, zoom 6 times).

#### 7. Western blot

PBS 수세 후 수확한 세포에 protease inhibitor cocktail (Amresco)이 포함된 lysis buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100)를 넣어 단백질을 추출하였다. 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 얻은 후 Bradford 방법으로 Protein Assay Kit (Bio-Rad)를 사용

하여 단백질을 정량하였다. 30  $\mu$ g의 단백질을 10~12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 변성 분리하고, 이를 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane의 blocking은 3% skin milk가 함유된 TBS-T (Tris buffer saline + 0.1% Tween 20)용액에서 상온에서 1시간 동안 실시하였다. 단백질 발현 분석을 위해 anti-mouse PARP (Santa Cruz Biotech), anti-rabbit cleaved caspase-3 (Cell signaling), anti-rabbit cleaved caspase-7 (Cell signaling), anti-rabbit cleaved caspase-9 (Cell signaling), anti-mouse Bcl-2 (Santa Cruz Biotech), anti-mouse Bax (Santa Cruz Biotech), anti-mouse beta-actin (Sigma)를 TBS-T 용액에 희석하여 4°C에서 overnight 한 후, TBS-T로 3회 세척하였다. 2차 항체인 Horse Raddish Peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotech)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 뒤에 enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham Biosciences)으로 각 band의 영상을 얻었다.

#### 8. 통계학적 분석

제시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험 결과이며, 이들의 평균과 표준오차를 산출하여 student's *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였다.

### III. 결과

#### 1. 저산소환경이 신경세포 사멸에 미치는 영향

저산소환경을 유발하기 위해 사용된  $\text{CoCl}_2$ 가 신경세포 사멸에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 인간 신경세포인 SH-SY5Y 세포를 이용하여 생존률의 변화를 조사하였다.  $\text{CoCl}_2$ 를 100  $\mu\text{M}$  농도로 처리하였을 경우 대조군과 비교하여 세포의 사멸 효과가 나타나지 않았고, 200  $\mu\text{M}$  ( $62.76 \pm 12.0\%$ )처리군 부터 유의적으로 세포 생존율이 감소하기 시작하여 400  $\mu\text{M}$  농도에서는  $27.10 \pm 4.9\%$ 로 매우 낮은 생존율을 보였다(Figure 1).

$\text{CoCl}_2$ 의 처리는 핵내에 존재하는 PARP의 분절화(116 kDa  $\rightarrow$  85 kDa)를 촉진시켰고, 불활성화 상태인 procaspase형태(34 kDa)에서 있다가 cleavage 되면서 활성형(17, 19 kDa)으로 전화하게 되는 caspase-3의 경우, 분절화된 형태의 caspase-3 발현양을 농도 의존적으로 증가시켰다(Figure 2).

$\text{CoCl}_2$ 에 의한 caspase 매개성 세포사멸이 ROS의 조절을 통해 이루어지는지를 확인하기 위해 세포에 DCF-DA를 처리하여 세포내에서 생성되는 ROS의 양을 측정하였다. 그 결과, 현저하게 증가된 높은 양의 ROS 생성을 측정할 수 있었다. 300 $\mu\text{M}$  농도에서 가장 높은 양의 ROS를 관찰할 수 있었다(Figure 3).

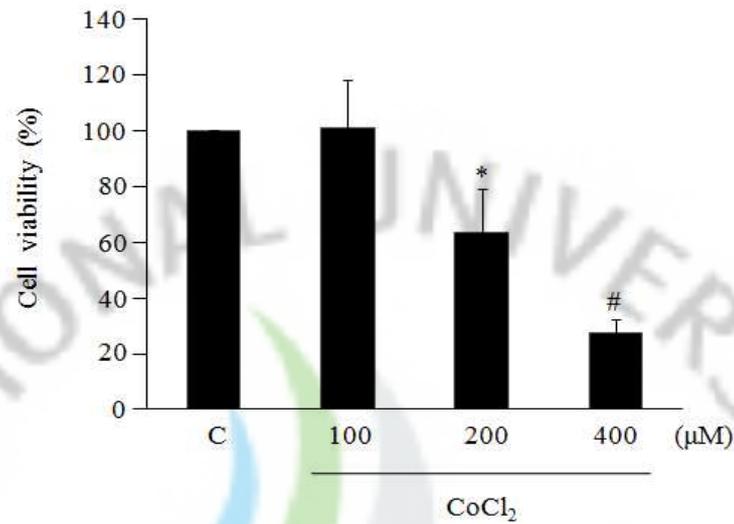
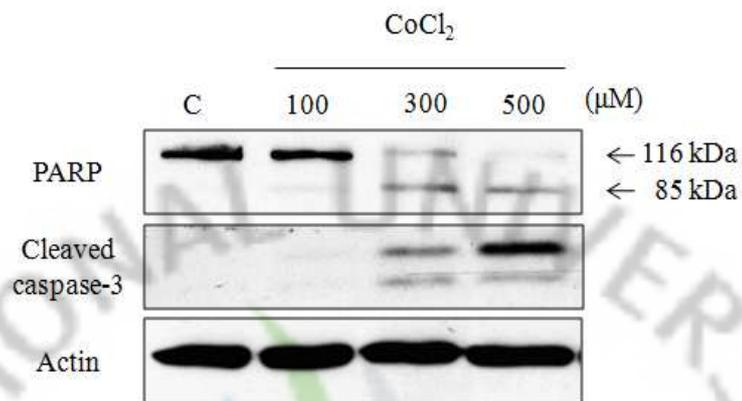
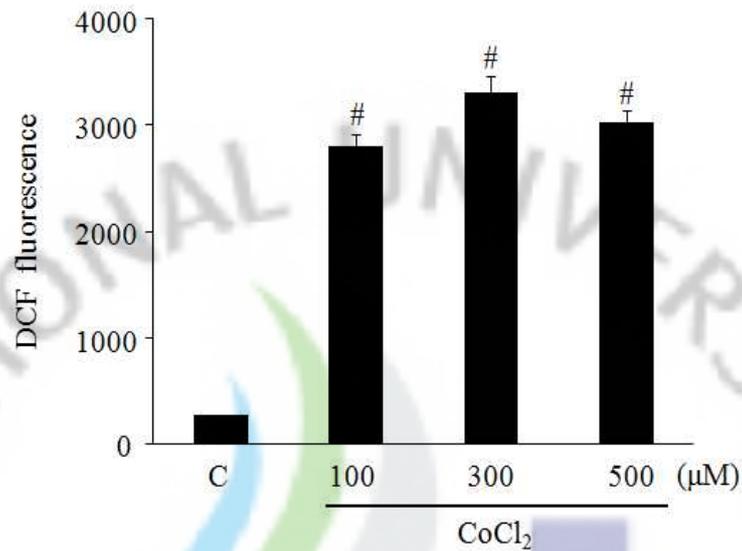


Figure 1. Neurotoxicity of CoCl<sub>2</sub> in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Cell viability was estimated by trypan-blue dye-exclusion at 36 hrs. Data are represented as mean±SD of 3 separate expts. \**p*<0.05, #*p*<0.001 vs control.



**Figure 2. Effects of  $\text{CoCl}_2$  on expression of apoptosis-related proteins.** Cells were incubated with  $\text{CoCl}_2$  for 24 hrs. The expression of PARP, cleaved caspase-3 and actin level were detected using western blot analysis.



**Figure 3. Production of ROS by CoCl<sub>2</sub> in SH-SY5Y cells.**

The DCF loaded cells were incubated with CoCl<sub>2</sub> for 1 hr at the indicated concentration. The intracellular levels of ROS were detected by measuring the DCF fluorescence. Data are represented as mean±SD of 3 separate expts.

#*p*<0.001 vs control.

## 2. 신경세포 사멸에 있어서 산굴 과피 발효 추출물의 효과

### 1) 미성숙 산굴 과피 발효 추출물의 세포 사멸 보호 효과

산굴 과피 발효 추출물이  $\text{CoCl}_2$ 에 의한 세포 사멸에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 trypan-blue 염색법을 이용하여 세포 생존률을 측정하였다. 그 결과 46.5%의 생존율을 보인  $\text{CoCl}_2$ 에 비해 미성숙 산굴 과피 발효 추출물이 100  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리되었을 경우 69.5% 정도의 생존률을 나타내었다(Figure 4). 반면 성숙 산굴 과피 발효 추출물에서는 세포 생존률의 변화를 관찰할 수 없었다(Figure 5). 따라서 성숙 산굴 과피 발효 추출물보다 미성숙 산굴 과피 발효 추출물이 신경세포 손상을 보호하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

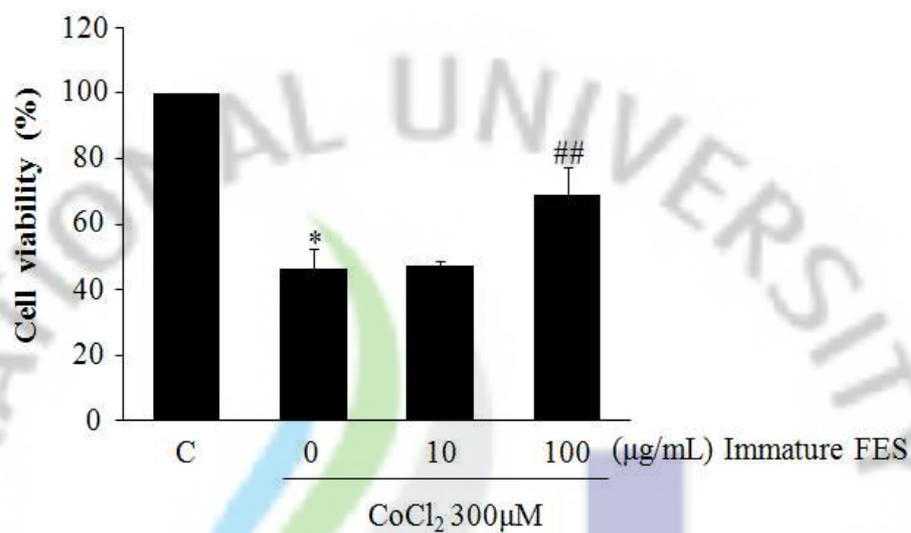
미성숙 산굴 과피 발효 추출물의 신경세포 사멸 보호 효과를 검증하기 위하여 세포 사멸의 대표적인 형태학적 특징인 핵의 응축 및 분절화 현상을 관찰하였다. 먼저 세포의 핵을 DAPI 염색하여 핵의 형태학적인 변화를 관찰한 결과  $\text{CoCl}_2$ 가 처리된 대조군에 비해 산굴 과피 발효 추출물 처리군에서 핵의 응축 및 사멸체 형성이 감소하였고(Figure 6), Figure 7에서 보는 바와 같이 DNA 분절화 현상 또한 현저하게 감소시킴을 관찰할 수 있었다.

### 2) 세포사멸 관련 단백질의 발현 분석

산굴 과피 발효 추출물의 세포 손상 억제 기전을 알아보기 위해 세포사멸 관련 단백질들의 발현양상을 분석하였다. 먼저 세포 사멸을 유도하는 대표적인 신호전달 물질인 caspase의 활성화에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 western blot을 수행한 결과 활성화된 형태의 분절화된 caspase-3, -7, -9의 발현양이 산굴 과피 발효 추출물을 전처리하였을 경우 현저하게 감소되는 것을 확인하였고, PARP의 발현량 역시 유사한 결과를 나타내었다(Figure 8). 또 다른 세포사멸 조절 인자인 Bcl-2 family의 경우 pro-apoptotic protein (Bcl-2) 과 anti-apoptotic protein (Bax)이 상호작용을 통해 세포 사멸을 조절하는데, 이들의 관련성을 확인하기 위해 Bcl-2와 Bax의 발현양을 분석하였다. 그 결과  $\text{CoCl}_2$  처리군에서 대조군에 비하여 감소된 양상을 보인 Bcl-2의 발현양은 산굴 과피 발효 추출물 처리군에서 증가하는 것을 확인하였으나, Bax의 경우 발현양의 차이를 관찰할 수

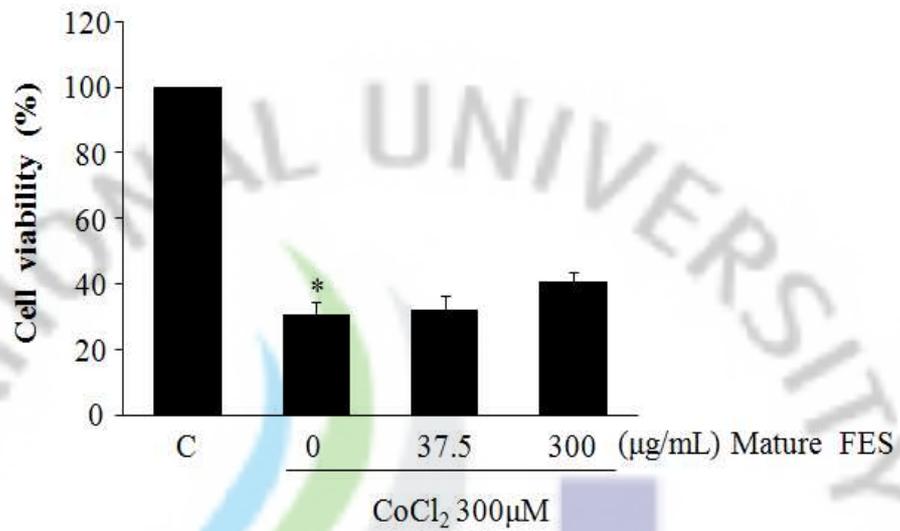
없었다.(Figure 9).





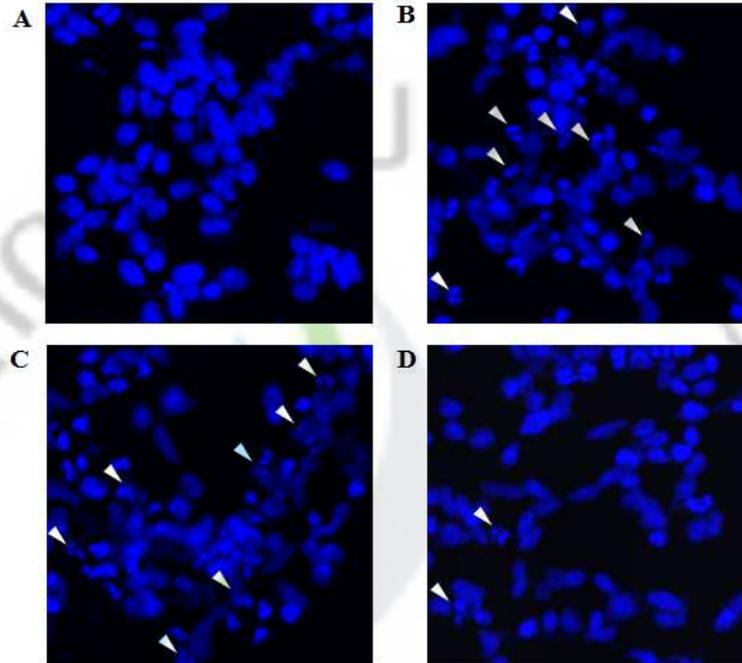
**Figure 4. Protective effect of immature FES on  $\text{CoCl}_2$ -induced apoptosis.**

Cell viability was measured by trypan-blue dye-exclusion after 36 hrs exposure to  $\text{CoCl}_2$  with or without immature-FES. Data are represented as mean $\pm$ SD of 4 separated expts. \* $p$ <0.01 vs control, # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 vs  $\text{CoCl}_2$  treated cells.



**Figure 5. Effect of mature FES on  $\text{CoCl}_2$ -induced apoptosis.**

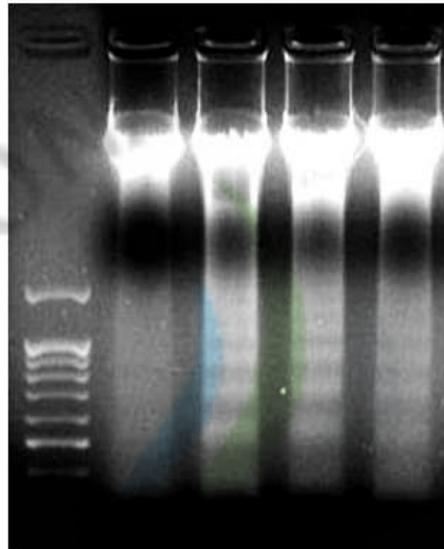
Cell viability was measured by trypan-blue dye-exclusion after 36 hrs exposure to  $\text{CoCl}_2$  with or without mature-FES. Data are represented as mean $\pm$ SD of 4 separated expts. \* $p < 0.01$  vs control.



**Figure 6. Morphological features of SH-SY5Y cells after treatment with  $\text{CoCl}_2$  and FES.**

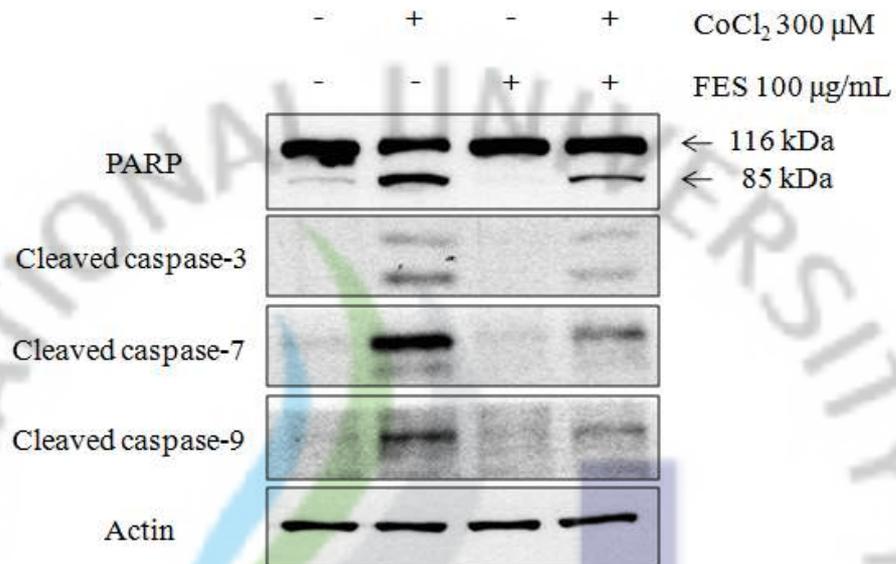
Cells were treated with FES or  $\text{CoCl}_2$  for 24 hrs and stained with DAPI solution. Nuclei were observed using an FV500 confocal laser scanning microscope (X10 objective, 6 times). (A) Control, (B)  $\text{CoCl}_2$  300  $\mu\text{M}$ , (C)  $\text{CoCl}_2$  300  $\mu\text{M}$  + FES 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (D)  $\text{CoCl}_2$  300  $\mu\text{M}$  + FES 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The arrow indicates the apoptotic body in SH-SY5Y cells.

M	-	+	+	+	CoCl <sub>2</sub> 300μM
	-	-	10	100	FES(μg/mL)



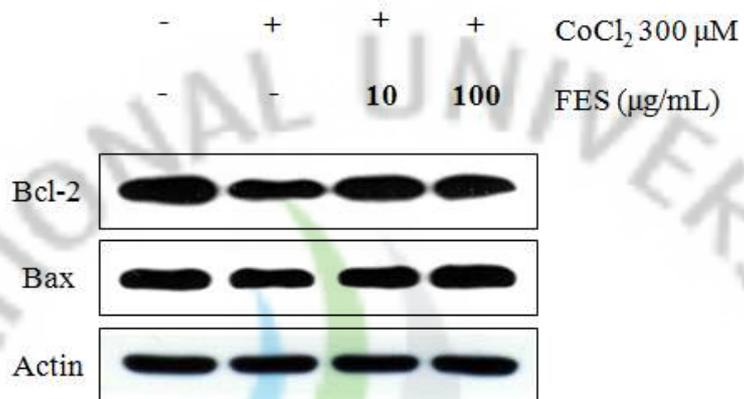
**Figure 7. Effects of FES on CoCl<sub>2</sub>-induced DNA fragmentation.**

Cells were exposed to indicated concentration of FES for 30 min and the incubated with CoCl<sub>2</sub> for 24 hrs and DNA laddering was analyzed by DNA electrophoresis.



**Figure 8. Expression of cell death-related proteins.**

Cells were exposed to indicated concentration of FES for 30 min and the incubated with CoCl<sub>2</sub> for 24 hrs. The expression of PARP, cleaved caspase-3,-7,-9 and actin level were detected using western blot analysis.



**Figure 9. Expression of cell death-related proteins.**

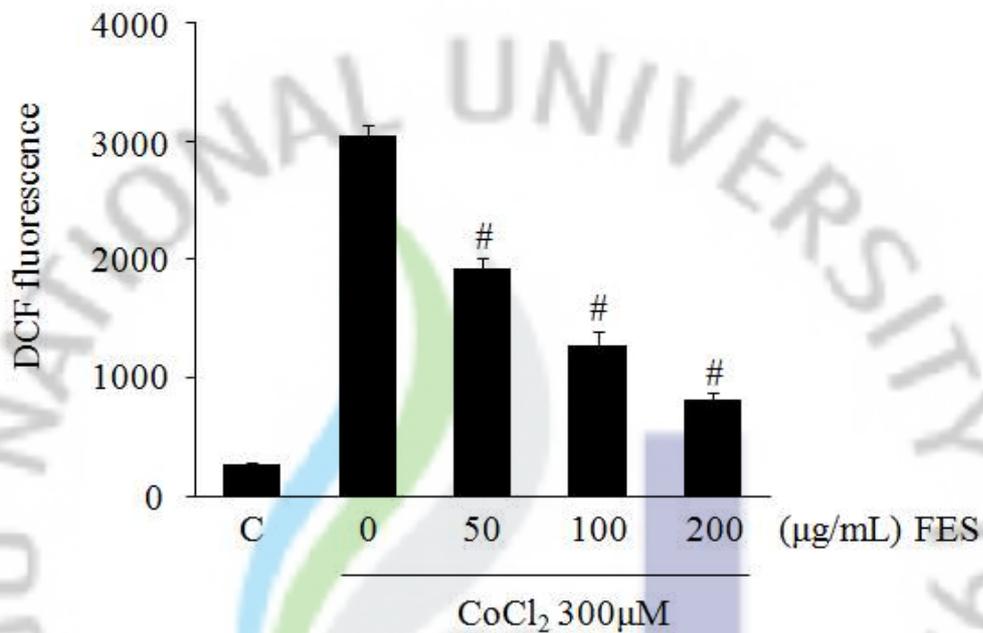
Cells were exposed to indicated concentration of FES for 30 min and the incubated with CoCl<sub>2</sub> for 24 hrs. Levels of Bcl-2 or Bax were determined using western blot analysis.

### 3) 산귤 과피 발효 추출물의 ROS 생성 억제 효과

산귤 과피 발효 추출물의 보호 작용이 활성산소종의 억제를 통해 조절되는지 확인하기 위하여 DCF-DA를 이용하여 세포내 생성되는 활성산소종의 양을 측정 한 결과 농도 의존적으로 처리된 산귤 과피 발효 추출물에 의해 현저하게 감소 하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 10).

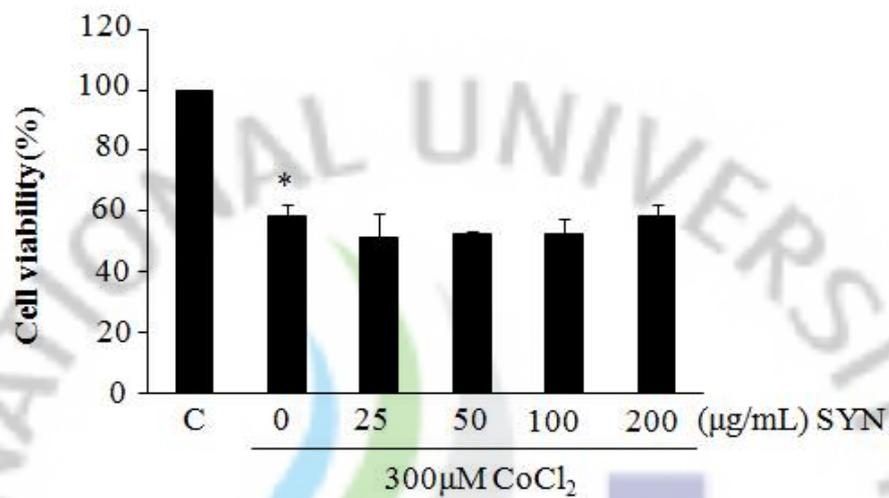
### 4) 산귤 과피 발효 추출물의 단일 물질의 효과

추출물의 세포 손상 보호 효과가 추출물이 함유한 성분 중 어떠한 성분의 영향을 받아 이루어지는지 알아보하고자 추출물이 포함하고 있는 단일 물질들을 각각 처리하여 생존능에 미치는 효과를 분석하였다. 산귤 과피 발효 추출물의 성분을 분석한 이전 결과에 따르면 synephrine을 포함하는 alkaroid 계열과 rutin, hesperidin, sinensetin, nobiletin, tangeretin을 포함하는 플라보노이드 계열이 동정이 되었다. 따라서 분석된 산귤 과피 발효 추출물의 성분 중 alkaroid 계열과 polymethoxyl flavone (PMF) 계열을 처리하여 세포 생존률을 측정한 결과 alkaroid 계열인 synephrine에서는 보호 효과가 없었으나(Figure 11), PMF 계열에서는 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 71.3% 정도의 생존률을 나타내었다(Figure 12). 또한 PMF 계열 중 함유량이 많은 nobiletin과 tangeretin을 이용하여 세포사멸에 미치는 영향을 확인한 결과 nobiletin과 tangeretin 모두에서 높은 생존율을 나타내었다(Figure 13). 이들 단일물질 처리군을 이용하여 caspase-3와 PARP의 활성도를 확인한 결과, nobiletin과 tangeretin 처리군에서는 분절화된 caspase-3와 PARP의 발현 정도가  $\text{CoCl}_2$  처리군에 비해 감소되었고, synephrine에서는 발현 양의 변화를 관찰할 수 없었다. 단일 물질의 세포 손상에 대한 보호효과는 western blot을 수행한 caspase 활성 변화와 동일한 효과를 나타내었다.



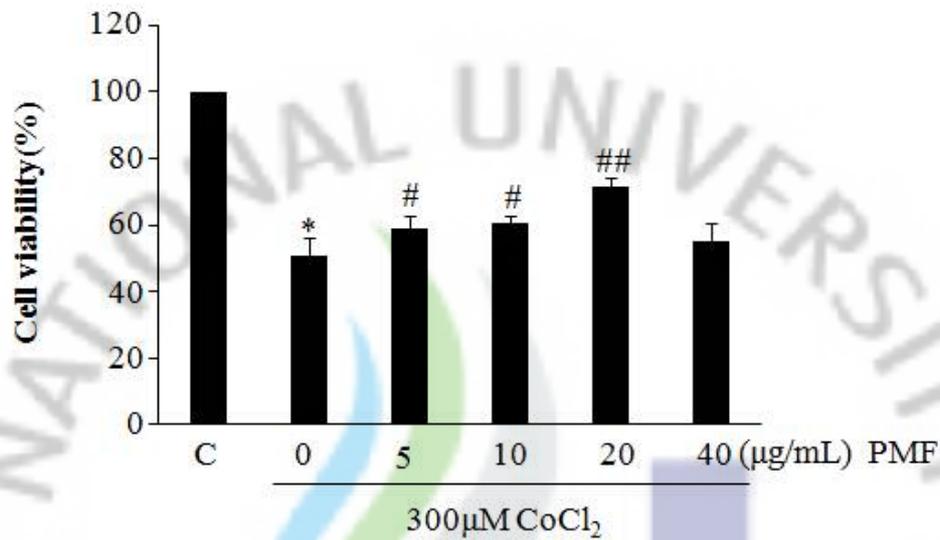
**Figure 10. Effects of FES on CoCl<sub>2</sub>-induced ROS production.**

Cells were incubated with 300 µM CoCl<sub>2</sub> alone or incubated with FES for 30min prior to the CoCl<sub>2</sub> treatment. Data are represented as mean±SD of 4 separate expts. <sup>#</sup>*p*<0.0001, vs CoCl<sub>2</sub> treated cells.



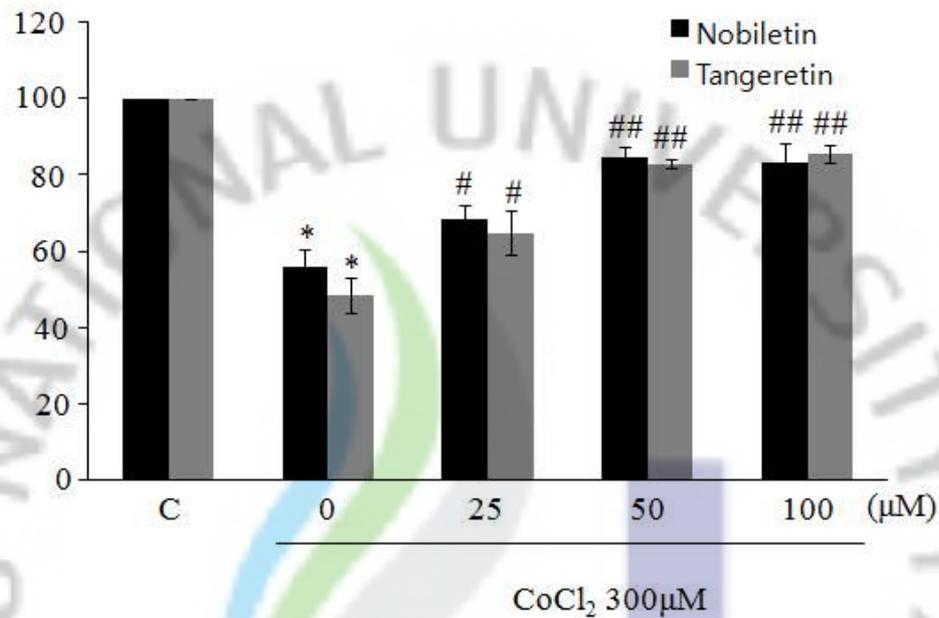
**Figure 11. Effect of synephrine on  $\text{CoCl}_2$ -induced cell death.**

Cell viability was measured by trypan-blue dye-exclusion after 36 hrs exposure to  $\text{CoCl}_2$  with or without synephrine (SYN). Data are represented as mean $\pm$ SD of 5 separated expts. \* $p$ <0.01 vs control.



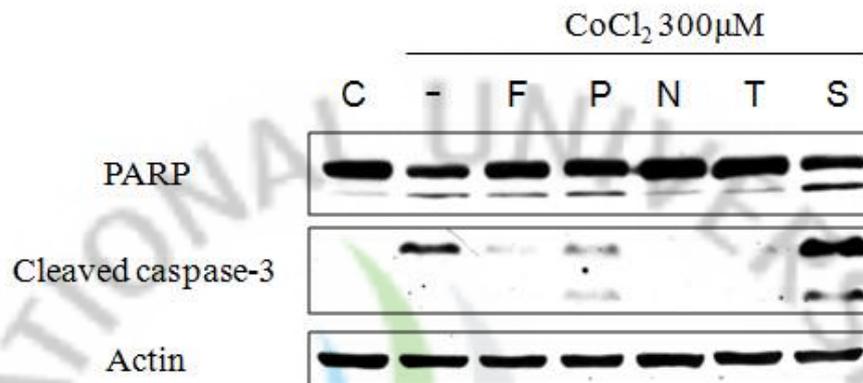
**Figure 12. Effect of polymethoxyl flavone (PMF) on CoCl<sub>2</sub>-induced cell death.**

Cell viability was measured by trypan-blue dye-exclusion after 36 hrs exposure to CoCl<sub>2</sub> with or without polymethoxyl flavone (PMF). Data are represented as mean±SD of 5 separated expts. \**p*<0.01 vs control, #*p*<0.05, ##*p*<0.01 vs CoCl<sub>2</sub> treated cells.



**Figure 13. Effects of nobiletin and tangeretin on CoCl<sub>2</sub>-induced cell death.**

Cell viability was measured by trypan-blue dye-exclusion after 36 hrs exposure to CoCl<sub>2</sub> with or without the indicated each compound. Data are represented as mean±SD of 5 separated expts. \**p*<0.01 vs control, #*p*<0.05, ##*p*<0.01 vs CoCl<sub>2</sub>-treated cells.



**Figure 14. Expression patterns of apoptosis-related proteins.**

Cells were incubated with each compound for 30 min prior to the  $\text{CoCl}_2$  treatment. F: FES 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , P: PMF 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , N: Nobiletin 50  $\mu\text{M}$ , T: Tangeretin 100  $\mu\text{M}$ , S: Synephrine 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## IV. 고찰

뇌혈관성질환의 하나인 뇌경색은 뇌에 혈액 공급이 원활하지 않아 유발되는 저산소환경에 의해 특이적으로 손상받기 쉬운 해마나 대뇌피질의 신경세포가 사멸함으로써 나타나는 질환이다. 뇌경색을 포함한 뇌졸중은 현재 우리나라에서 노인성 질환 중 사망 발병률이 2위를 차지할 정도로 위험성이 높으며, 신경손상으로 인해 완전한 회복이 어려워 이를 치유하기 위한 많은 연구들이 진행되고 있다. 본 연구에서는 저산소환경에 의한 신경손상을 극복하기 위한 방안을 찾아보고자 수행하였다.

뇌경색은 산소의 전달을 감소시키고 글루코오스에 의한 에너지를 과소시키며 이온화의 변화도를 방해하여 뉴런에 손상을 입힌다. 이러한 원인으로  $Ca^{2+}$  의존성 채널의 활성을 통하여 글루탐산과 아스파르트산과 같은 흥분성 아미노산과  $K^+$  등의 방출을 유도한다. 글루탐산은  $Ca^{2+}$ 의 과다 공급으로 인한 흥분독성을 활성화시키고, 많은 효소 시스템(proteases, lipase 그리고 endonuclease)의 과활성화를 유도하여, 자유라디칼을 발생시킨다. 추가적으로  $Ca^{2+}$ 은 단백질 분해 효소의 활성을 조절하고 세포 골격 단백질 및 세포외기질 단백질을 분해함으로써 세포를 죽음을 이르게 한다. 이렇게 뇌경색은 세포 내에서 여러 신경전달물질을 통해 복합 단계적으로 발생되며, 그 결과 뇌 기능의 손실과 심한 신경 퇴화가 일어난다 (Aley *et al.*, 2005; Curin *et al.*, 2006). 뇌경색 모델을 *in vitro* system에 적용하기 위해 세포내에서 저산소환경을 유발하는 2가지 방법, 즉, hypoxia chamber를 이용하여 물리적으로 산소를 차단하는 방법(Liu *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2006)과  $CoCl_2$ 를 이용한 화학적인 방법이 사용된다(Ji *et al.*, 2006; Ardyanto *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2006).

감귤의 과피에는 PMF를 비롯한 많은 플라보노이드가 존재하며 현재까지 약 60여종이 분리·동정되었다. 플라보노이드의 함량은 수확시기에 따라 다른 것으로 알려져 있다. 미성숙과피인 경우 성숙 과피에 비하여, 과육에 비해 과피에서 함량이 훨씬 높은 것으로 보고되어 있으며, 이러한 플라보노이드의 생리활성에

대한 연구 또한 다양하게 진행되고 있다. 미성숙 추출물에 의해서 높은 보호효과를 보였으며, 이는 미성숙 산굴 과피 발효 추출물이 성숙 산굴 과피 발효 추출물에 비하여 플라보노이드의 양이 많이 함유되어 있기 때문인 것으로 사료된다.

내재적 신호전달에 의해 수행되는 caspase-3 활성화, PARP와 DNA의 분절화 현상은 세포 사멸을 일으키는 주된 신호전달 경로로 알려져 있으며 (Kotake-Nara & Saida, 2007; Zou *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000), caspase의 활성화는 미토콘드리아에서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species)에 의해 조절될 수 있다. 활성산소종은 체내에서 산화스트레스로 작용하여 각종 질병의 근원이 되며 세포를 구성하는 단백질, 지방, DNA 등을 산화시키고 다량의 활성산소종이 오랫동안 존재하면 세포의 퇴화나 사멸을 유도할 수도 있다(Yoon *et al.*, 2002). 특히 활성산소종에 의한 DNA의 돌연변이는 세포의 노화 및 암 조절 기전에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Wiseman & Halliwell, 1996; Rhee, 1999).

내재성 세포사멸 신호전달계에서 caspase는 caspase-9이 Apaf-1, ATP, 그리고 cytochrome c와 결합을 하면서 apoptosome을 형성하고(Delivoria-Papadopoulos 등 2007), 이 형성된 apoptosome은 세포사멸에 직접적으로 관여하는 caspase-3와 caspase-7을 활성화시킨다(Morizane *et al.*, 2005; Rami *et al.*, 2008; Gurb *et al.*, 2003). 그리고 세포 사멸을 조절하는 단백질 군으로 알려져 있는 Bcl-2 family는 산화스트레스로 작용하는 활성산소종에 의해 활성화가 되면서 세포의 축소, 핵의 응집, 사멸체 형성 및 DNA 분절현상을 통해 세포 사멸을 유도하게 된다. 산굴 과피 발효 추출물이  $\text{CoCl}_2$ 에 의해서 증가되는 ROS의 생성량과 caspase-3, -7, -9의 활성화뿐 아니라 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현량을 억제하였고 pro-apoptotic 단백질인 Bax는 아무런 변화가 없는 것을 확인하였다.

산굴 과피 발효 추출물의 성분을 분석한 보고서에 따르면 Alkarioid 계열의 synephrine과 플라보노이드 계열의 배당체 플라보노이드 2종(rutin, hesperidin)과 폴리메톡실플라본 3종(sinensetin, nobiletin, tangeretin)을 함유하고 있는 것으로 보고되었다. Synephrine은 지금까지 항산화, 항염증효과 그리고 항우울증 효과가 있다고 밝혀져 있다(Ko *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2001). 그리고 감귤 과피의 성분

중 플라보노이드는 심장순환기계 질환 및 항암, 항산화, 항염증, 항바이러스작용, 모세혈관 강화작용 등에 대한 개선 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Mertens-Talcoott *et al.*, 2007; Morley *et al.*, 2007; Sergeev *et al.*, 2007; Miyata *et al.*, 2008).

본 연구에서 확인한 산굴 과피 발효 추출물의 신경 손상 보호효과 역시 기존 연구 결과에 제시된 것과 유사하게 PMF에 의한 현저한 보호효과가 확인되었고 이들 효능은 tangeretin과 nobiletin에 의해 조절됨을 확인 할 수 있었다. 그러나 처리된 단일물질을 플라보노이드 중 가장 많은 양을 함유하고 있는 2종에 대해 실시한 결과이므로 좀 더 명확한 결과를 밝히기 위해서는 소량을 함유한 물질이 미나 나머지 3종에 대한 확인과 단일물질간의 조합을 통해 세포 사멸의 억제 효과에 어떠한 상관관계를 유지하며 작용하는지에 대한 분석이 필요한 것으로 사료된다.



## V. 참고 문헌

강신해, 이영재, 이창홍, 김세재, 이대호, 이영기, 박덕배, 2005. 제주자생 진귤 (Citrus sunki Hort. Tanaka) 과피의 생리활성. 한국식품과학회지, 37:983-988.

백순옥, 복진영, 천현자, 정승일, 한완수, 김일광, 2001. 감귤류와 한국산 청피에 함유된 Methoxylated Flavonoids의 분석과 정량적 분호. Analytical Science & Technology, 14:331-339.

제주 재래종 진귤 과피를 이용한 식의약품 개발(생약제재 개발을 위한 품질기준 및 지방간 치료 효력시험), 2008. 제주 하이테크 산업 진흥원

Adamas, J. M. and S. Cory, 1998. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. Science, 281:1322-1326.

Akakabe, Y., M. Sakamoto, Y. Ikeda, and M. Tanaka, 2008. Identification and Characterization of Volatile Components of the Japanese Sour Citrus Fruit Citrus Nagato-yuzukichi Tanaka. Biosci. Biotechnol. Biochem., 72:1965-1968.

Akao, Y., T. Itoh, K. Ohguchi, M. Inuma, and Y. Nozawa, 2008. Interactive effects of polymethoxy flavones from citrus on cell growth inhibition in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16:2803-2810.

Aley, P.K., C.C Bauer, M.L. Dallas, J.P. Boyle, K.E. Porter, and C. Peers, 2005. Hypoxic modulation of Ca<sup>2+</sup> signaling in human venous and arterial endothelial cells. The journal of biological chemistry, 280:13349-13354

Andrabi, S.A., T.M. Dawson, and V.L. Dawson, 2008. Mitochondrial and Nuclear Cross Talk in Cell Death. *Annals New York Academy of Sciences*, 1147:233-241.

Ardyanto, T.D., M. Osaki, Y. Nagahama, K. Yamaga, N. Maeta, T. Tamura, and H. Ito, 2007. Down-regulation of cobalt-induced HIF-1 $\alpha$  expression correlates with cell proliferation and apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Oncology reports*, 19:339-343.

Bredesen, D.E., R.V. Rao, and P. Mehlen, 2006. Cell death in the nervous system. *Nature*, 443:796-802.

Chang, H., M. Mi, W. Ling, J. Zhu, Q. Zhang, N. Wei, Y. Zhou, Y. Tang, and J. Yuan, 2008. Structurally Related Cytotoxic Effects of Flavonoids on Human Cancer cells in Vitro. *Arch. Pharm. Res.*, 31:1137-1144.

Choi, D.W., 1996. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Current Opinion in Pharmacology*, 6:667-672.

Choi, S.Y., J.H. Hwang, H.C. Ko, J.G. Park, and S.J. Kim, 2007a. Nobiletin from citrus fruit peel inhibits the DNA-binding activity of NF- $\kappa$ B and ROS production in LPS-activated Raw 264.7 cells. *Journal of Ethno-Pharmacology*, 113:149-155.

Choi, S.Y., H.C Ko, S.Y. Ko, J.H. Hwang, J.G. Park, S.H. Kang, S.H. Han, S.H. Yun, and S.J Kim, 2007b. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 30:772-778.

Chu, P.H., S.M. Jung, C.H. Yeh, H.H. Wu, T.F. Shiu, H.C. She, and N.M. Tseng, 2008. Expression of caspase-3-dependent apoptosis in mural thrombi leukocytes. *APMIS*, 116:995-999.

Cui, Z.G., B.Y. Kim, S.H. Kang, Y.J. Lee, D.H. Lee, Y.K. Lee, and D.B. Park, 2007. Fermented Peel of Citrus sunki Hort. Ex Tanaka Promotes Ethanol Metabolism and Suppresses Body Fat Accumulation. *Food Science and Biotechnology*, 16:311-314.

Curin, Y., M.F. Ritz, and R. Andriansitohaina, 2006. Cellular mechanisms of the protective effect of polyphenols on the neurovascular unit in strokes. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry*, 4:277-288.

Delivoria-Papadopoulos, M., M. Gorn, Q.M. Ashraf, and O.P. Mishra, 2007. ATP and cytochrome c-dependent activation of caspase-9 during hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets. *Neuroscience Letters*, 429:115-119.

Fulda, S., 2009. Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of cancer*, 124:511-515.

Gartner, A., P.R. Boag, and T.K. Blackwell, 2008. Germline survival and apoptosis. *WormBook*, 4:1-20.

Giffard, R.G., R.A. Swanson, 2005. Ischemia-Induced Programmed Cell Death in Astrocytes. *GLIA*, 50:299-306.

Gurp, M.V., N. Festjens, G.V. Loo, X. Saelens, and P. Vandenabeele, 2003. Mitochondrial intermembrane protein in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 304:487-497.

Huang, C.Y., C.M. Liang, C.L. Chu, and S.M. Liang, 2009. Albumin fibrillization induces apoptosis via integrin/FAK/Akt pathway. *BMC Biotechnology*, 9:02.

Hunter, A., A. Hendrikse, M. Renan, and R. Abratt, 2006. Does the tumor microenvironment influence radiation-induced apoptosis?. *Apoptosis*, 11:1727-1735.

Ji, Z., G. Yang, S. Shahzidi, K. Tkacz-Stachowska, Z. Suo, J.M. Nesland, and Q. Peng, 2006. Induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha overexpression by cobalt chloride enhances cellular resistance to photodynamic therapy. *Cancer letters*, 244:182-189.

Jung, J.Y., K.H. Roh, Y.J. Jeong, S.H. Kim, E.J. Lee, M.S. Kim, W.M. Oh, H.K. Oh, and W.J. Kim, 2008. Estradiol protects PC12 cells against CoCl<sub>2</sub>-induced apoptosis. *Brain Research Bulletin*, 76:579-585.

Kim, K.S., V. Rajagopal, C. Gonsalves, C. Johnson, and V.K. Kalra, 2006. A Novel Role of Hypoxia-Inducible Factor in Cobalt Chloride- and Hypoxia-Mediated Expression of IL-8 Chemokine in Human Endothelial. *The Journal of Immunology*, 177:7211-7224.

Kim, K.W., H.D. Kim, J.S. Jung, R.S. Woo, H.S. Kim, H.W. Suh, Y.H. Kim, and D.K. Song, 2001. Characterization of antidepressant-like effects of *p*-synephrine stereoisomers. *Naunyn-schmiedeberg's arch pharmacol*, 364:21-26.

Kim, R., M. Emi, K. Tanabe, S. Murakami, Y. Uchida, and K. Arihiro, 2006. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *Journal of*

Pathology, 208:319-326.

Ko, H.C., Y.H. Wang, K.T. Liou, C.M. Chen, C.H. Chen, W.Y. Wang, S. Chang, Y.C. Hou, K.T. Chen, C.F. Chen, and Y.C. Shen, 2007. Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cells. *European journal of pharmacology*, 555:211-217.

Kotake-Nara, E., and K. Saida, 2007. Characterization of CoCl<sub>2</sub>-induced reactive oxygen species(ROS):Inductions of neurite outgrowth and endothelin-2/vasoactive intestinal. *Neuroscience Letters*, 422:223-227.

Lee, T.Y., F.Y. Chen, H.H. Chang, and H.C. Lin, 2009. The effect of capillarisin on glycochenodeoxycholic acid-induced apoptosis and heme oxygenase-1 in rat primary hepatocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 325:53-59.

Lipton, P., 1999. Ischemia Cell Death in Brain Neurons. *Physiological Reviews*, 79:1432-1516.

Liu, J., Z. Yu, S. Guo, S.R. Lee, C. Xing, C. Zhang, Y. Gao, D.G. Nicholls, and E.H. Lo, 2009. Effect of neuroglobin over-expression on mitochondrial function and oxidative stress following hypoxia/reoxygenation in cultured neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 87:164-170.

Liu, X.H., A. Kirschbaum, K. Yu, S. Yao, and A.C. Levine, 2005. Cyclooxygenase-2 Suppresses Hypoxia-induced Apoptosis via a Combination of Direct and Indirect Inhibition of p53 Activity in a Human. *The Journal of Biological Chemistry*, 280:3817-3823.

Love, S., 2003. Apoptosis and brain ischaemia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 27:267-282.

Luo, F.M., X.J. Liu, N.H. Yan, S.Q. Li, G.Q. Cao, Q.Y. Cheng, Q.J. Xia, and H.J. Wang, 2006. Hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha promotes hypoxia-induced A549 apoptosis via a mechanism that involves the glycolysis. *BMC Cancer*, 6:26.

Matsumoto, K., Y. Akao, H. Yi, K. Ohguchi, T. Ito, T. Tanaka, E. Kobayashi, M. Inuma, and Y. Nozawa, 2004. Preferential target is mitochondria in alpha-mangostin-induced apoptosis in human leukemia HL60 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12:5799-5806.

Mertens-Talcott, S.U., W.V. De Castro, J.A. Manthey, H. Derendorf, and V. Butterweck, 2007. Polymethoxylated Flavones and Other Phenolic Derivates from Citrus in Their Inhibitory effects on P-Glycoprotein-Mediated Transport of Talinolol in Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:256-2568.

Miles, A.N., and N.W. Knuckey, 1998. Apoptotic neuronal death following cerebral ischaemia. *Journal of Clinical Neuroscience*, 5:125-145.

Miyata, Y., T. Sato, K. Imada, A. Dobashi, M. Yano, and A. Ito, 2008. A citrus polymethoxyflavonoid, nobiletin, is a novel MEK inhibitor that exhibits antitumor metastasis in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 366:168-173.

Morizane, Y., R. Honda, K. Fukami, and H. Yasuda, 2005. X-Lionked Inhibitor

of Apoptosis Functions as Ubiquitin Ligase toward Mature Caspase-9 and Cytosolic Smac/DIABLO. *Journal of Biochemistry*, 137:125-132.

Morley, K.L., P.J. Ferguson, and J. Koropatnick, 2007. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer letters*, 251:168-178.

Nakamura, T., and S.A. Lipton, 2009. Cell death : protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis*, 14:455-468

Nichenametla, S.N., T.G. Taruscio, D.L. Barney, and J.H. Exon, 2006. A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:161-183.

Poyton, R.O., P.R. Castello, K.A. Ball, D.K. Woo, and N. Pan, 2009. Mitochondria and hypoxic signaling. *New York Academy of Sciences*, 1177:48-56

Rami, A., I. Bechmann, and J. H. Stehle, 2008. Exploiting endogenous anti-apoptotic proteins for novel therapeutic strategies in cerebral ischemia. *Progress in Neurobiology*, 85:273-296.

Rhee, S.G., 1999. Redox signaling:hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental and molecular medicine*, 31:53-59.

Sergeev, I.N., C.T. Ho, S. Li, J. Colby, and S. Dushenkov, 2007. Apoptosis-inducing activity of hydroxylated polymethoxyflavones and polymethoxyflavones from orange peel in human breast cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51:1478-1484.

Slambrouck, S.V., V.S. Parmar, S.K. Sharma, B. De Bondt, F. Fore, P. Coopman, B.W. Vanhoecke, T. Boterberga, H.T. Depypered, G. Leclercq, and M.E. Brackea, 2005. Tangeretin inhibits extracellular-signal-regulated kinase(ERK) phosphorylation. *FEBS Letters*, 579:1665-1669.

Snider, B.J., F.J. Gottron, And D.W. Choi, 1999. Apoptosis and Necrosis in *Cerebrovascular Disease*. 893:243-253

Wang, G., T.K. Hazra, S. Mitra, H.M. Lee, and E.W. Englander, 2000. Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl<sub>2</sub> in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic acids Research*, 28:2135-2140.

Wang, Z., S. Li, S. Ferguson, R. Goodnow, and C.T. Ho, 2008. Validated reversed phase LC method for quantitative analysis of polymethoxyflavones in citrus peel extracts. *Journal of separation science*, 31:30-37.

Wiseman, H. and B. Halliwell, 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species:role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, 313:17-29.

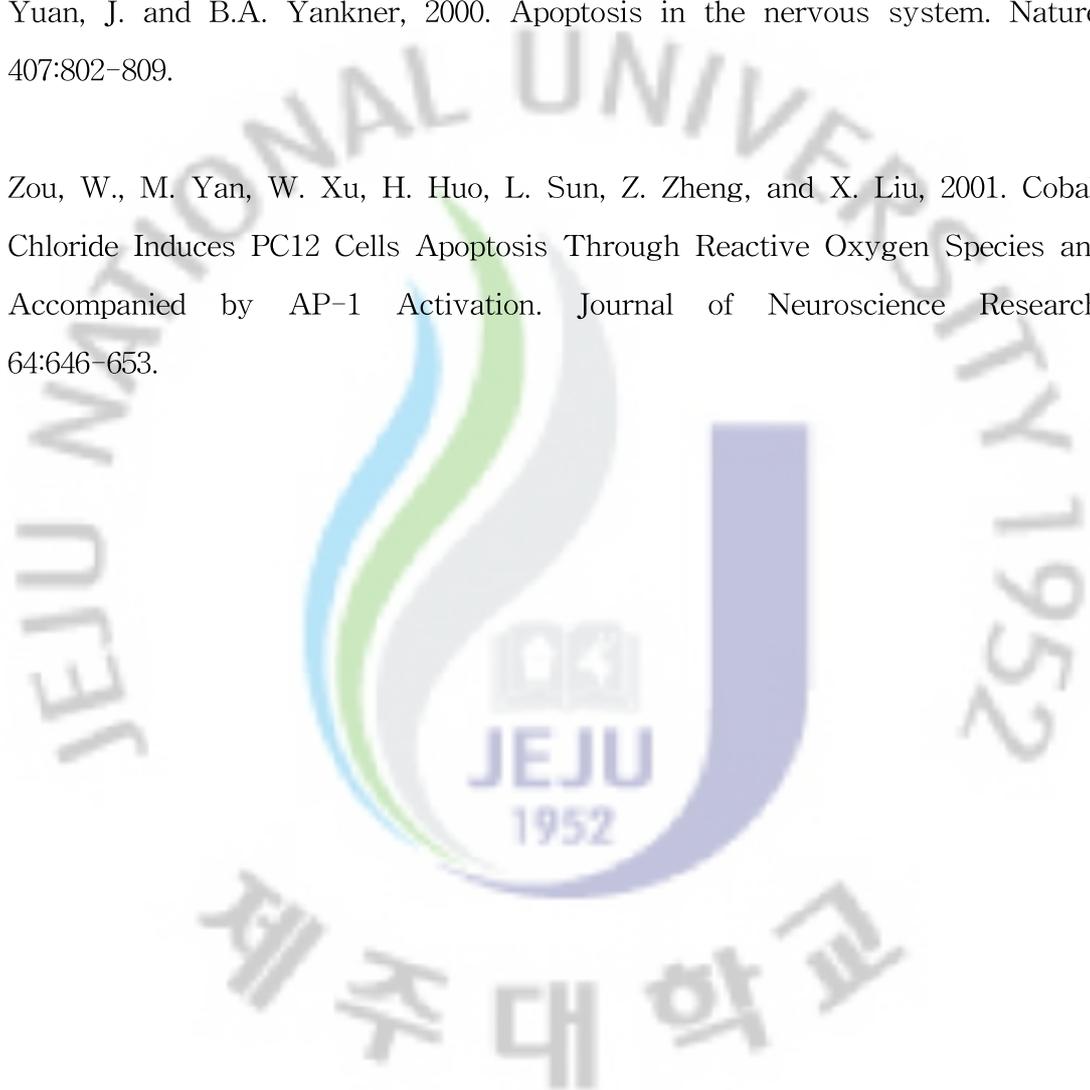
Xu, G. H., J. C. Chen, D. H. Liu, Y. H. Zhang, P. Jiang, and X. Q. Ye, 2008. Mineral, phenolic compounds, and antioxidant capacity of Citrus Peel extract by Hot water. *Journal of Food Science*, 73:C11-C18.

Yan, F., L. Gou, J. Yang, C. Huang, L. Chen, A. Tong, M. Tang, Z. Yuan, S. Yao, P. Zhang, and Y. Wei, 2009. A novel pro-apoptosis gene PNAS4 that induces apoptosis in A549 human lung adenocarcinoma cells and inhibits tumor growth in mice. *Biochimie*, 91:502-507.

Yoon, S.O., C.H. Yun, and A.S. Chung, 2002. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *mechanisms of ageing and development*. 123:1597-1604.

Yuan, J. and B.A. Yankner, 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407:802-809.

Zou, W., M. Yan, W. Xu, H. Huo, L. Sun, Z. Zheng, and X. Liu, 2001. Cobalt Chloride Induces PC12 Cells Apoptosis Through Reactive Oxygen Species and Accompanied by AP-1 Activation. *Journal of Neuroscience Research*, 64:646-653.



## VI. 요약

산귤(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka)은 다양한 질병을 앓고 있는 환자에 민간 요법으로 사용되어 왔다. 산귤은 항염증 활성이 있다고 보고되어 있지만, 다른 퇴행성 신경 질환과 다른 약리학적 활성에는 잘 알려져 있지 않다. 저산소/허혈에 의한 세포 사멸은 뇌졸중과 다른 퇴행성 신경질환(알츠하이머병, 파킨슨병)등과 같은 질환의 주요 원인이다. 본 연구에서는 화학적 저산소증에 의한 세포 사멸에 산귤 과피 발효 추출물의 효과와 기작을 조사하기 위하여 수행하였다. human neuroblastoma SH-SY5Y세포에  $\text{CoCl}_2$ 를 사용하여 저산소증 환경을 세포 배양에 적용하였다.  $\text{CoCl}_2$ 의 농도 의존적으로 ROS의 생성물을 통해 caspase 의존적 세포 사멸이 유도되었다. 산귤 과피 발효 에탄올추출물이 성숙 산귤 과피 발효 추출물에 비하여  $\text{CoCl}_2$ 에 의한 신경세포 사멸 보호 효과가 있었다. 산귤 과피 발효 추출물이 ROS 생성물과 pro-apoptotic 단백질 활성을 포함하여 caspase-3, -7, -9의 활성, PARP의 가수분해, 그리고 세포 분절화를 억제하였다. 또한, nobiletin과 tangeretin은 synephrine은 아무런 효과가 없는 것에 비하여 높은 보호 효과를 나타내었다. 요약하면, 산귤 과피 발효 추출물은 화학적 저산소증에 의한 ROS 생성과 미토콘드리아 매개성 세포사멸의 작용을 통한 신경 손상에 보호효과가 있다고 할 수 있다.