

화학적 저산소증이 유도하는 뇌신경세포 손상에 있어서 미성숙 진굴 과피 발효 추출물의 보호 효과

고운철 · 이선령†
제주대학교 생물학과

Anti-apoptotic effect of fermented *Citrus sunki* peel extract on chemical hypoxia-induced neuronal injury

Ko, Woon Chul · Lee, Sun Ryung†

Department of Biology, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

ABSTRACT

Purpose: Neuronal apoptotic events induced by aging and hypoxic/ischemic conditions is an important risk factor in neurodegenerative diseases such as ischemia stroke and Alzheimer's disease. The peel of *Citrus sunki* Hort, ex Tanaka has long been used as a traditional medicine, based on multiple biological activities including anti-oxidant, anti-inflammation, and anti-obesity. In the current study, we examined the actions of fermented *C. sunki* peel extract against cobalt chloride (CoCl₂)-mediated hypoxic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Methods:** Cell viability was measured by trypan blue exclusion. Expression of apoptosis related proteins and release of cytochrome c were detected by western blot. Production of intracellular reactive oxygen species (ROS) and apoptotic morphology were examined using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) and 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. **Results:** Exposure to CoCl₂, a well-known mimetic agent of hypoxic/ischemic condition, resulted in neuronal cell death via caspase-3 dependent pathway. Extract of fermented *C. sunki* peel significantly rescued the CoCl₂-induced neuronal toxicity with the cell viability and appearance of apoptotic morphology. Cytoprotection with fermented *C. sunki* peel extract was associated with a decrease in activities of caspase-3 and cleavage of poly (ADP ribose) polymerase (PARP). In addition, increase in the intracellular ROS and release of cytochrome c from mitochondria to the cytosol were inhibited by treatment with extract of fermented *C. sunki* peel. **Conclusion:** Based on these data, fermented *C. sunki* peel extract might have a protective effect against CoCl₂-induced neuronal injury partly through generation of ROS and effectors involved in mitochondrial mediated apoptosis.

KEY WORDS: *Citrus sunki*, apoptosis, hypoxia, stroke, neuronal cells

서 론

의료과학기술의 발달로 인해 노인인구가 전체의 20% 이상을 차지하는 고령화 사회로 접어들면서 퇴행성 신경계 질환 (알츠하이머병, 파킨슨병)이나 혈관성 뇌질환 (뇌졸중)으로 고통 받는 사람이 증가하고 있다. 현재 우리나라에서 사망원인이 2위를 차지할 정도로 위험성이 높은 뇌졸중 (stroke)은 뇌에 혈액을 공급하는 혈관이 막히거나 터져서 생기는 뇌손상으로 여러 합병증의 결과물로서도 나타날 수 있다.^{1,2} 이는 뇌혈관의 막힘으로 오는 뇌경색

(ischemic stroke)과 뇌파열에 의한 뇌출혈 (hemorrhagic stroke)로 구분되며 뇌에 혈액 공급이 원활하지 않아 유발 되는 저산소 환경에 의해 특이적으로 손상받기 쉬운 해마나 대뇌피질의 신경세포가 사멸하게 되고 이로 인한 심각한 뇌신경 손상은 완전한 회복을 어렵게 한다.³ 뇌졸중 치료는 주로 tissue plasminogen activator (tPA)를 이용하는 혈전 용해 치료법 (thrombolytic therapy)이 효과적인 것으로 알려져 있으나 tPA의 사용은 3시간 이내에 이루어져야 되고 심각한 출혈 (intracerebral hemorrhage)이나 부종 (edema) 같은 부작용을 야기한다는 점에서 매우 제한적이

Received: August 6, 2015 / Revised: August 24, 2015 / Accepted: September 3, 2015

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-64-754-3522, e-mail: srlee@jejunu.ac.kr

© 2015 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

기 때문에⁴ 해마나 대뇌피질을 구성하는 신경세포의 손상을 보호하는 연구에 관심이 집중되고 있다.⁵⁻⁷ 최근에는 여러 신경성 뇌질환을 유발하는 모델에서 phytochemical들의 효능에 대한 많은 연구가 진행되고 있으며 이들은 신경세포 보호 효능⁸뿐 아니라 저해된 인지과 운동기능 향상⁹ 및 기억력을 회복¹⁰시키는 효능을 나타내는 것으로 보고되어 있다.

예로부터 한방이나 민간요법의 약재로 사용하고 있는 진피는 제주 재래 감귤종의 하나인 진귤 (*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka)의 과피이다. 진귤을 포함한 감귤은 citrus 속의 성분 및 활성 분석을 통해 과육보다는 과피의 중요성이 강조되었고 수확시기^{11,12}와 발효유무¹³에 따라 생리활성 성분의 함유량과 효능에 있어서 차이를 보이고 있다. 미성숙 진귤 과피는 항염,¹¹ 항비만 및 지방간 개선 작용^{14,15}에 효과적인 것으로 알려져 있으나 신경계 뇌혈관질환과의 연관성에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구는 진귤 과피가 뇌경색과 같은 혈관성 뇌질환에 미치는 효능을 알아보고자 수행되었으며 뇌경색과 가장 유사한 환경을 이루는 화학적 저산소환경의 세포 모델을 이용하여 뇌신경세포 손상에 따른 미성숙 진귤 과피 발효 추출물의 보호 효과를 확인하였다.

연구방법

시료

본 실험에 사용된 미성숙 진귤 과피 발효 추출물은 Cui 등¹⁵의 논문에서 제시된 바와 같이 추출되었다. 간단히 기술하면, 미성숙 진귤 과피를 건조하여 분쇄한 분말을 80% 에탄올로 실온에서 추출한 후 회전농축기로 에탄올을 제거하고 남은 수층 시료를 동결건조 하였다. 5% 설탕이 첨가된 동량의 물을 첨가하여 멸균한 후 5% *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014와 5% *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0203으로 접종하여 38°C에서 7일간 혐기배양하였고 급속냉동 후 동결건조하여 사용하였다.

세포배양

Human neuroblastoma SH-SY5Y 세포는 한국 세포주은행에서 분양 받아 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS), 100 unit/mL penicillin/streptomycin, 20 mM HEPES가 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 실험을 위해 세포는 48시간 배양하고 FBS가 포함되지 않은 배지로 교환하여 20시간 안정화시킨 후 CoCl₂ 또는 추출물을 처

리하였다.

세포 생존율 측정

24 well plate (1 × 10⁶ cell/mL)에 분주된 세포에 CoCl₂ 또는 추출물을 처리하여 24시간 배양한 후 세포를 모두 수거하여 0.4% trypan blue와 섞어 hemocytometer를 이용하여 살아있는 세포와 죽은 세포를 계수하였다. 생존율은 아래의 식을 이용하여 산출하였다.

세포 생존율(%)

$$= \frac{\text{살아있는 세포수}}{\text{살아있는 세포수} + \text{죽은세포 수}} \times 100$$

세포내 ROS 측정

96 well plate에 CoCl₂ 또는 추출물이 농도별로 처리된 세포 (1 × 10⁶ cell/mL)를 준비하여 10 µg/mL의 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 1시간 동안 처리한 후 fluorescence spectrometer (excitation : 485 nm, emission : 520 nm)에서 생성되는 형광으로 세포내 reactive oxygen species (ROS)를 측정하였다.

핵의 형태학적 변화 관찰

CoCl₂ 또는 농도별 추출물이 24시간 처리된 세포 (1 × 10⁶ cell/mL)에 아세톤과 메탄올을 1:1로 혼합한 용액으로 5분 동안 처리하여 고정시킨 후 Phosphate buffered saline (PBS)로 수세하였다. DNA에 특이적으로 결합하는 형광색소인 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, USA) 용액 (3 µg/mL)을 가하여 상온에서 30분간 반응한 후 형광현미경 (IX-71, Olympus, Japan)하에서 관찰한 후 apoptotic body를 가지는 세포를 계수화 하였다.

세포질과 미토콘드리아의 분획

세포질과 미토콘드리아 분획의 단백질을 분리하기 위해서 mitochondrial isolation kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하였다. CoCl₂ 또는 추출물이 24시간 처리된 세포를 protease inhibitor가 포함된 Sol A (cytoplasmic isolation buffer)로 파쇄하여 750 × g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 10,000 × g에서 15분간 재원심분리한 후 상층액을 세포질 분획으로 사용하였다. 남겨진 침전물에 protease inhibitor가 포함된 Sol B (mitochondrial isolation buffer)를 첨가하여 현탁시킨 후 미토콘드리아 분획 단백질을 분리하였고 Bradford protein assay를 통해 정량하였다.

Western blot

PBS 수세 후 수확한 세포에 protease inhibitor가 포함된

lysis buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100)를 넣어 30분간 반응한 후 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 단백질을 추출하였다. 단백질 정량을 통해 얻어진 30 μ g의 단백질은 10% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 전이시킨 후 단백질 발현 분석을 위해 anti-mouse PARP, anti-mouse cytochrome c (Santa Cruz Biotech, Dallas, TA, USA), anti-rabbit cleaved caspase-3, -7, -9 (Cell signaling, Danvers, MA, USA), anti-mouse beta-actin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 항체를 이용하여 반응하였고 enhanced chemiluminescence kit (ECL) 방법으로 확인하였다.

통계 처리

본 실험의 결과는 3회 반복하여 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 통계처리는 student's *t*-test에 의해 수행되었으며 $p < 0.05$ 인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

화학적 저산소증에 의한 신경세포 사멸 효과

저산소증이 유도하는 신경세포 사멸은 뇌경색과 같은 혈관성 뇌손상을 야기하는데 있어서 매우 중요한 요인이다. 본 연구에서 사용된 CoCl_2 는 산화적 스트레스에 의해 저산소 환경을 일으킴으로써 뇌경색과 유사한 환경을 만드는 모델로 알려져 있다.¹⁶ 다양한 농도로 처리된 CoCl_2 가 신경세포인 SH-SY5Y 세포 사멸에 미치는 효과는 Fig. 1에 제시하였다. 먼저, trypan blue exclusion으로 CoCl_2 에 의한 세포 생존율을 확인한 결과, 100 μM 농도에서는 세포사멸 효과가 거의 나타나지 않았고 $55 \pm 12\%$ 의 생존율을 보인 300 μM 처리군에서 유의적으로 세포 생존율이 감소하기 시작하여 500 μM 의 농도에서는 $22 \pm 5\%$ 의 낮은 생존율을 나타내었다 (Fig. 1A).

세포의 사멸은 활성화된 caspase-3와 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 분절화가 유도되고 세포의 응축이나 핵의 분해 등 구조적인 변화단계를 거쳐 조절된다.¹⁷ CoCl_2 에 의한 생존을 저해가 세포 사멸 조절 단백질에 미치는 영향을 확인하기 위해 caspase-3 및 PARP 발현양상을 분석하였다. 대조군에 비해 300 μM 과 500 μM 의 CoCl_2 처리군에서 핵 내에 존재하는 PARP의 분절현상이 관찰되었고 세포사멸이 진행될수록 분절화된 형태의 활성화형 caspase-3의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B). 이러한 결과는 CoCl_2 가 유도하는 세포 사멸은 caspase-3 의존성 경로를 통해 조절되고 있음을 보여주는

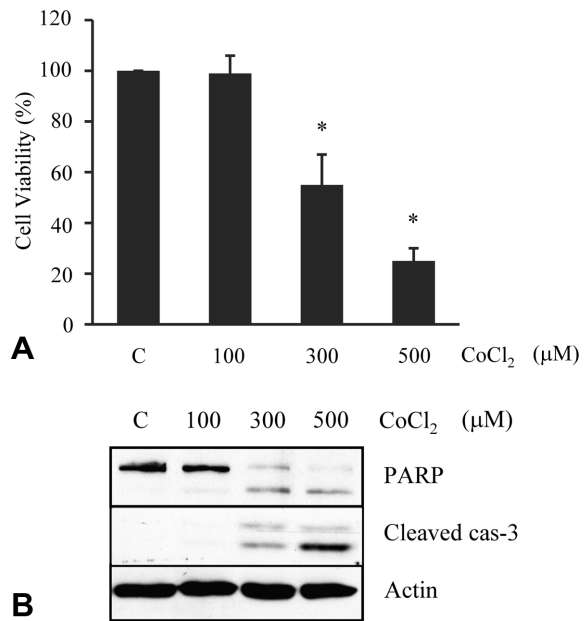


Fig. 1. Induction of caspase-3 mediated cell death. Effects of CoCl_2 on the cell viability by trypan blue exclusion (A) and expression of apoptosis-related proteins by western blot analysis (B). Data are represented as mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs control. C: control

것이다.

진굴 과피 발효 추출물의 신경세포 사멸 보호 효과

진굴 과피는 다른 식물에서는 발견되지 않는 감귤 특유의 플라보노이드로 인해 다양한 생리 활성을 가진다. 진굴 과피에는 tangeretin, nobiletin, hesperidin, rutin, sinensetin 순으로 많은 플라보노이드 성분을 가지고 있으며 성숙되는 정도에 따라 함유량이 크게 변하여 성숙과에 비하여 미숙과에서 hesperidin을 제외한 모든 플라본 성분이 3~5배 정도 높은 함유량을 가짐으로써 미성숙 과피가 항염 활성을 가지는 것으로 보고되었다.¹¹ 감귤과피에서 추출한 각각의 플라보노이드 성분의 미미한 항신경염증의 효능은 이들이 동시에 작용하였을 경우 시너지 효과를 발휘하여 신경염증을 저해하는 효과를 나타내었다.¹⁸ 특히, 미성숙 진굴 과피에서 함유량이 높은 것으로 알려진 nobiletin의 경우 뇌경색 동물모델에서 뇌손상을 억제⁸하고 파킨슨 및 알츠하이머 유발 모델에서 인지력과 기억력을 향상^{9,10}시키는 것으로 보고되었다. 따라서 플라보노이드의 보고인 진굴 과피가 뇌손상에 관련된 질환 제어 물질로서 기능을 수행하는지 알아보하고자 미성숙 진굴 과피 발효 추출물을 이용하여 뇌신경보호 효과를 확인하였다. CoCl_2 가 처리된 저산소환경 세포사멸 모델에서 진굴 과피 발효 추출물을 30분 전처리하여 세포 생존율을 조사한 결과, 진굴 과피 발

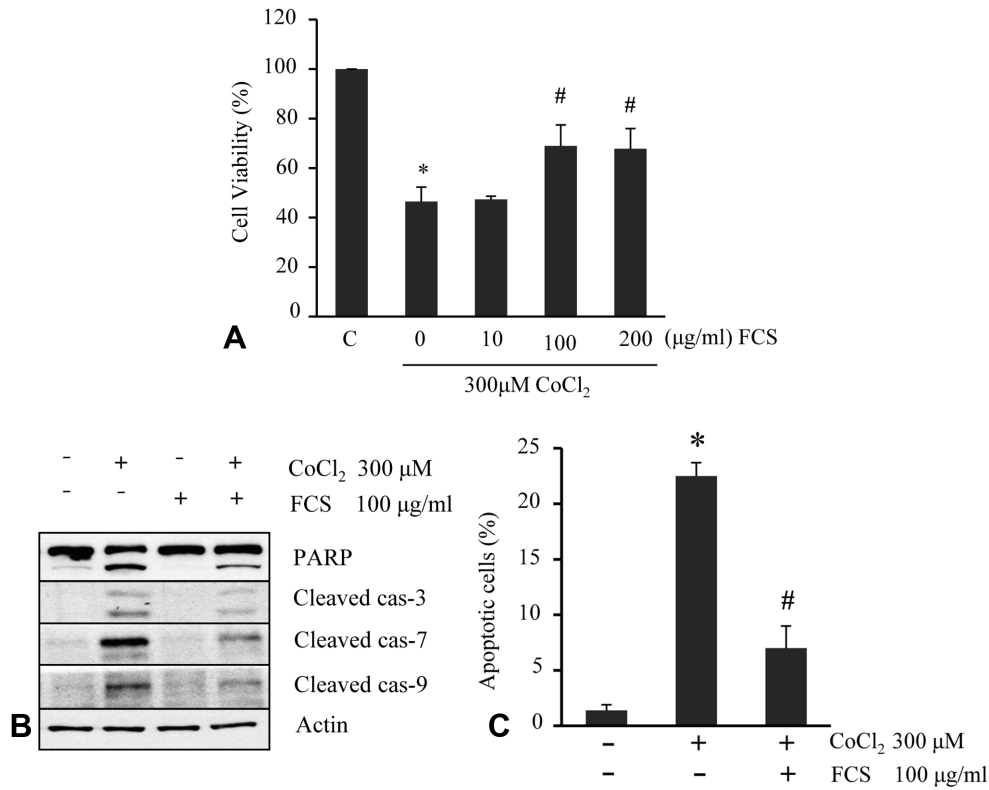


Fig. 2. Protective Effect of fermented *C. sunki* peel extract on the neurotoxicity (A), activities of caspases and PARP (B), formation of apoptotic body (C) in CoCl₂-treated SH-SY5Y cells. Data are presented as mean ± SD of three independent experiments. *p < 0.05 vs control. #p < 0.05 vs CoCl₂-treated cells. FCS: Fermented *C. sunki* peel extract

효 추출물이 100~200 µg/mL 농도로 처리된 세포의 생존율은 약 69 ± 11%로 나타났으며 이는 약 46 ± 8%의 생존율을 보인 300 µM CoCl₂ 단독 처리군과 비교하였을 경우 유의성 있는 결과를 보여주었다 (Fig. 2A). 이러한 신경세포 사멸 보호 효과는 세포 사멸 관련 단백질들의 발현 양상을 확인한 결과에서도 동일하게 나타났다. 생존율이 저해된 CoCl₂ 단독 처리군에 비해 진균 과피 발효 추출물 처리군에서 PARP의 분절화와 활성화된 cleaved casase-3, -7, -9의 발현이 현저히 감소하는 양상을 보였다 (Fig. 2B). 진균 과피 발효 추출물의 신경세포 사멸 보호 효과를 검증하기 위해 DAPI staining을 이용해 세포 사멸 진행에 따른 염색체의 응축이나 apoptotic body를 관찰하였다. Fig. 2C에 제시한 바와 같이 apoptotic body를 가지는 세포의 비율이 23 ± 1.2%인 CoCl₂ 단독 처리군에 비해 진균 과피 발효 추출물 처리군에서는 7 ± 2.0%로 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 진균 과피 발효 추출물이 CoCl₂가 유도하는 caspase-3 의존성 신경세포 사멸에 대해 보호 효과가 있음을 보여주는 것으로 epigallocatechin gallate (EGCG),¹⁹ 에스트라디올,²⁰ 허브 추출물²¹에 의해 나타나는 다양한 신경 세포 손상 보호 효과들과 비교해 볼 때 일정 수준 이상의 보호

효능을 발휘하는 것으로 생각된다.

세포의 사멸 기전은 미토콘드리아 매개성 경로와 사멸 수용체 매개성 경로에 의해 조절될 수 있다. 미토콘드리아에 의해 중재되는 세포사멸은 mitochondrial transmembrane potential (MMP, ΔΨ_m)를 변화시키거나 미토콘드리아의 시토크롬 c가 세포질로의 전이에 영향을 미치는 일련의 미토콘드리아의 dysfunction을 일으킴으로써 caspase-9/-3의 활성화와 같은 caspase cascade를 통해 조절된다.¹⁷ CoCl₂에 의해 유도되는 저산소환경은 HIF-1α 유도에 의해 ROS 형성을 야기하기도 하고²² 활성화된 p38 MAPK signaling를 통한 ROS의 생성 억제는 저산소 환경에서의 염증을 보호하기도 하며¹⁶ anti-apoptotic protein인 Bcl-2 family와 proapoptotic protein인 Bax/Bid의 상호조절을 통해 신경세포의 사멸을 조절한다.¹⁹ 따라서 진균 과피 발효 추출물의 세포 사멸 보호 효과가 산화적 스트레스에 의한 ROS 생성 기전 및 미토콘드리아 매개성 경로에 의해 조절되는지 확인하기 위해 세포내 생성되는 ROS의 양과 Cytochrome c의 전이 양상을 확인하였다. 먼저, DCF-DA를 이용해 생성되는 ROS의 양을 측정된 결과, 대조군에 비해 CoCl₂에 의한 저산소환경은 세포내 생성되는 ROS의 양을 현저히 증

가시켰고 이는 CoCl₂ 처리가 산화적 스트레스로 작용하여 ROS 증가에 의해 세포 사멸에 이르게 된다는 기존의 연구와 일치하였다.^{19,20} 반면, 100 µg/mL의 진굴 과피 발효 추출물 처리에 의한 ROS 생성량은 저산소환경에 의한 생성량에 비해 약 51.8%로 감소되어 유의성 있는 효과를 보였으며 이는 ROS scavenger인 N-acetyl-cystein (NAC)를 처리하였을 경우 나타나는 효과와 유사하였다 (Fig. 3A). Caspase cascade를 통해 세포사멸을 억제하는 진굴 과피 발효 추출물이 미토콘드리아 의존성 경로를 통해 조절되는지 검증하기 위해 미토콘드리아 및 세포질로 분획을 나누어 cytochrome c가 전이되는 양상을 비교분석하였다. 세포 사멸이 유도된 CoCl₂ 처리군은 높은 발현량의 cytochrome c가 세포질 분획에서 관찰된 반면, 진굴 과피 발효 추출물의 처리는 미토콘드리아 분획에서 cytochrome c의 발현량이 높게 나타나는 것으로 보아 진굴 과피 발효 추출물은 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome c의 방출을 억제하였다 (Fig. 3B). 이상의 결과는 진굴 과피 발효 추출물이 CoCl₂에 의한 ROS 생성을 저해하여 cytochrome c의 방출을 억제함으로써 caspase-3 불활성화를 유도하여 세포 사멸의 보호 효과를 발휘하고 있음을 보여주는 것으로 이전 연구에서 보고한 저산소환경이 유도하는 신경세포 세포 모델에서 플라보노이드 성분에 의해 조절되는 작용 기전과 유사한 결과를 보여 주었다. 녹차에 다량 포함되어 있는

EGCG는 MMP와 cytochrome c의 변화 및 Bcl-2/Bax의 발현조절을 통해 caspase-3 의존성 세포 사멸을 억제하였고¹⁹ 또다른 플라보노이드의 하나인 scutellarin의 경우, ROS 저해 및 p38 MAP kinase의 인산화 억제를 통해 caspase-3 활성을 조절함으로써 세포 사멸을 조절하였다.²³ 본 연구 결과 역시 진굴 과피 발효 추출물이 ROS 저해 및 cytochrome c의 변화에 의한 caspase cascade 경로에 의해 조절되는 것으로 보아 식물이 가지는 플라보노이드 성분의 작용 기전과 마찬가지로 미성숙 과피에 포함된 다량의 플라보노이드 성분이 미토콘드리아 의존성 경로를 통해 저산소환경에 대한 세포 사멸을 억제하는 데 중요한 역할을 수행했을 것으로 추측된다. 본 연구에 사용된 미성숙 진굴 과피에는 플라보노이드 중 tangeretin과 nobiletin의 성분이 높은 것으로 알려져 있고¹¹ 최근 보고된 뇌경색 동물모델에서 nobiletin의 뇌신경 손상 보호 효능이 뛰어난 것으로 보아⁸ 미성숙 진굴 과피가 함유하고 있는 보다 많은 플라보노이드 성분의 시너지 효과로 인해 저산소성 세포 사멸을 보호하는데 있어서 유의적인 결과가 도출 되었을 것으로 사료된다. 그러나 본 연구는 미토콘드리아가 매개하는 사멸 기전에 관련된 일부분만을 살펴본 것으로 Bcl-2 family와 같은 또다른 신호전달경로와의 상호 조절 및 사멸 수용체를 통한 조절 기전은 추후 계속 연구되어야 할 부분이다.

혈액흐름의 감소로 인해 일어나는 뇌경색은 결국 뇌손상으로 이어지게 되고 이러한 손상은 산화적인 스트레스나 염증, glutamate neurotoxicity 및 부종에 의해 일어나는 복합적인 현상이다. 뇌손상의 저해는 뇌졸중을 포함한 뇌질환의 좋은 예후를 기대할 수 있고 뇌졸중 환자들의 삶을 회복시킬 수 있다는 점에서 매우 중요한 일이다. 본 연구결과에서 보여준 진굴 과피 발효 추출물의 보호 효과는 뇌졸중 유발원인 저산소증에 의한 뇌신경 손상을 억제할 수 있는 phytochemical로서 향후 뇌질환의 예방 및 치료를 위해 활용이 가능한 잠재적 후보로서의 가능성을 제시하였다. 그러나 보다 더 정확한 효능 검증을 위해 동물모델에서의 적용 및 뇌질환 증상을 완화시키는 약물과의 비교 분석을 통한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

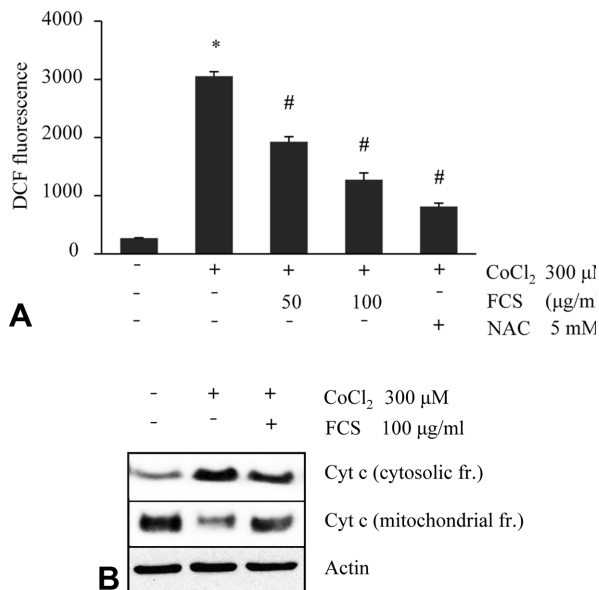


Fig. 3. Effect of fermented *C. sunki* peel extract on the CoCl₂-induced ROS generation (A) and release of mitochondrial cytochrome c to cytosol (B). Data are represented as mean ± SD of three independent experiments. *p < 0.05 vs control. #p < 0.05 vs CoCl₂-treated cells. FCS: Fermented *C. sunki* peel extract, NAC: N-acetyl-cystein, Cyt c: Cytochrome c

References

1. World Health Organization (CH). The top 10 causes of death [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2013 [updated 2014 May; cited 2015 Mar 11]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
2. Statistics Korea. 2013 Cause of death statistics [Internet]. Daejeon: Statistics Korea; 2014 [cited 2014 Sep 23]. Available from: http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/2/6/2/index.board.

3. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 2009; 40(5): e331-e339.
4. Fan X, Jiang Y, Yu Z, Yuan J, Sun X, Xiang S, Lo EH, Wang X. Combination approaches to attenuate hemorrhagic transformation after tPA thrombolytic therapy in patients with poststroke hyperglycemia/diabetes. *Adv Pharmacol* 2014; 71: 391-410.
5. Ghosh N, Ghosh R, Bhat ZA, Mandal V, Bachar SC, Nima ND, Sunday OO, Mandal SC. Advances in herbal medicine for treatment of ischemic brain injury. *Nat Prod Commun* 2014; 9(7): 1045-1055.
6. Lopez MS, Dempsey RJ, Vemuganti R. Resveratrol neuroprotection in stroke and traumatic CNS injury. *Neurochem Int*. Forthcoming 2015.
7. Mikami Y, Yamazawa T. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sci*. Forthcoming 2015.
8. Yasuda N, Ishii T, Oyama D, Fukuta T, Agato Y, Sato A, Shimizu K, Asai T, Asakawa T, Kan T, Yamada S, Ohizumi Y, Oku N. Neuroprotective effect of nobiletin on cerebral ischemia-reperfusion injury in transient middle cerebral artery-occluded rats. *Brain Res* 2014; 1559: 46-54.
9. Yabuki Y, Ohizumi Y, Yokosuka A, Mimaki Y, Fukunaga K. Nobiletin treatment improves motor and cognitive deficits seen in MPTP-induced Parkinson model mice. *Neuroscience* 2014; 259: 126-141.
10. Onozuka H, Nakajima A, Matsuzaki K, Shin RW, Ogino K, Saigusa D, Tetsu N, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and A β pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 326(3): 739-744.
11. Shin HS, Kang SI, Ko HC, Kim HM, Hong YS, Yoon SA, Kim SJ. Anti-inflammatory effect of the immature peel extract of Jinkyool (*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka). *Food Sci Biotechnol* 2011; 20(5): 1235-1241.
12. Kim YD, Senevirathne M, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. Reactive oxygen species scavenging activity of Jeju native citrus peel during maturation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2009; 38(4): 462-469.
13. Moon SW, Kang SH, Jin YJ, Park JG, Lee YD, Lee YK, Park DB, Kim SJ. Fermentation of *Citrus unshiu* Marc. and functional characteristics of the fermented products. *Korean J Food Sci Technol* 2004; 36(4): 669-676.
14. Kang SI, Shin HS, Kim HM, Hong YS, Yoon SA, Kang SW, Kim JH, Kim MH, Ko HC, Kim SJ. Immature *Citrus sunki* peel extract exhibits antiobesity effects by beta-oxidation and lipolysis in high-fat diet-induced obese mice. *Biol Pharm Bull* 2012; 35(2): 223-230.
15. Cui ZG, Kim BY, Kang SH, Lee YJ, Lee DH, Lee YK, Park DB. Fermented peel of *Citrus sunki* Hort ex Tanaka promotes ethanol metabolism and suppresses body fat accumulation. *Food Sci Biotechnol* 2007; 16(2): 311-314.
16. Lan A, Xu W, Zhang H, Hua X, Zheng D, Guo R, Shen N, Hu F, Feng J, Liu D. Inhibition of ROS-activated p38MAPK pathway is involved in the protective effect of H₂S against chemical hypoxia-induced inflammation in PC12 cells. *Neurochem Res* 2013; 38(7): 1454-1466.
17. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol* 2013; 87(7): 1157-1180.
18. Ho SC, Kuo CT. Hesperidin, nobiletin, and tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (*Citri reticulatae* pericarpium). *Food Chem Toxicol* 2014; 71: 176-182.
19. Jung JY, Mo HC, Yang KH, Jeong YJ, Yoo HG, Choi NK, Oh WM, Oh HK, Kim SH, Lee JH, Kim HJ, Kim WJ. Inhibition by epigallocatechin gallate of CoCl₂-induced apoptosis in rat PC12 cells. *Life Sci* 2007; 80(15): 1355-1363.
20. Jung JY, Roh KH, Jeong YJ, Kim SH, Lee EJ, Kim MS, Oh WM, Oh HK, Kim WJ. Estradiol protects PC12 cells against CoCl₂-induced apoptosis. *Brain Res Bull* 2008; 76(6): 579-585.
21. Zeng KW, Wang XM, Ko H, Yang HO. Neuroprotective effect of modified Wu-Zi-Yan-Zong granule, a traditional Chinese herbal medicine, on CoCl₂-induced PC12 cells. *J Ethnopharmacol* 2010; 130(1): 13-18.
22. Cervellati F, Cervellati C, Romani A, Cremonini E, Sticozzi C, Belmonte G, Pessina F, Valacchi G. Hypoxia induces cell damage via oxidative stress in retinal epithelial cells. *Free Radic Res* 2014; 48(3): 303-312.
23. Wang LX, Zeng JP, Wei XB, Wang FW, Liu ZP, Zhang XM. Effects of scutellarin on apoptosis induced by cobalt chloride in PC12 cells. *Chin J Physiol* 2007; 50(6): 301-307.