

산화적 스트레스에 의한 간세포의 DNA 손상 및 세포사멸 유도에 미치는 원지 에탄올 추출물의 보호 효과

김홍윤 · 박철¹ · 최영현² · 황원덕

동의대학교 한의과대학 내과학교실, ¹동의대학교 자연과학대학 분자생물학과, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실

The Protective Effect of Ethanol Extract of *Polygalae Radix* against Oxidative Stress-Induced DNA Damage and Apoptosis in Chang Liver Cells

Hong Yun Kim, Cheol Park¹, Yung Hyun Choi², Won-Deok Hwang

Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, ¹Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Dong-Eui University, ²Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

Received: April 9, 2019

Revised: May 11, 2019

Accepted: May 24, 2019

Correspondence to: Yung Hyun Choi
Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan 47227, Korea
Tel: +82-51-850-7413
Fax: +82-51-853-4036
E-mail: choiyh@deu.ac.kr

Correspondence to: Won-Deok Hwang
Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan 47227, Korea
Tel: +82-51-850-8625
Fax: +82-51-853-4036
E-mail: wdhwang@deu.ac.kr

Copyright © 2019 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: The purpose of the present study was to evaluate the preventive effects of ethanol extract of *Polygalae radix* (EEPR) against oxidative stress (hydrogen peroxide, H₂O₂)-induced DNA damage and apoptosis in Chang liver cells.

Methods: Chang liver cells were pretreated with various concentrations of EEPR and then challenged with 0.5 mM H₂O₂. The cell viability and apoptosis were assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay and flow cytometry analysis, respectively. The levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potentials (MMPs) and adenosine tri-phosphate (ATP) contents were measured. Expression levels of Bcl-2 and Bax were also determined using Western blot analysis.

Results: The results showed that the decreased survival rate induced by H₂O₂ could be attributed to the induction of DNA damage and apoptosis accompanied by the increased production of ROS, which was remarkably protected by EEPR. In addition, the loss of H₂O₂-induced MMPs and ATP contents was significantly attenuated in the presence of EEPR. The inhibitory effect of EEPR on H₂O₂-induced apoptosis was associated with up-regulation of Bcl-2 and down-regulation of Bax, thus reducing the Bax/Bcl-2 ratio.

Conclusions: Our data prove that EEPR protects Chang liver cells against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis by scavenging ROS and thus suppressing the mitochondrial-dependent apoptosis pathway.

Key Words: Polygalae radix, Oxidative stress, DNA damage, Apoptosis, Reactive oxygen species

서론

원지(遠志, *Polygalae radix*)는 원지과(遠志科: Polygalaceae)에 속하는 다년생 초본인 원지(*Polygala tenuifolia* Willd) 뿌리의 목심 부위를 제거하고 건조한 것으로 전통적으로 거담제, 기억력 증진제, 수면 보조제 등으로 사용되어 왔다¹⁾. 원지에 함유된 주요 성분으로는 다양한 saponins, xanthenes,

oligosaccharide esters 등이 보고되었으며, 이들로 인하여 흥분을 진정시키고 가래를 제거하며 기침을 멈추는 기능을 발휘하거나²⁻⁷⁾, 항치매, 퇴행성 뇌세포 보호, 신경 손상 보호, 항우울제 등의 효능을 나타내기도 한다⁸⁻¹¹⁾. 또한 원지는 진통제, 항비만, 항진균제, 항암제 등으로의 개발 가능성이 있음이 보고된 바 있다^{12,13)}. 특히 원지 열수 추출물은 6-hydroxydopamine에 의해 유발된 신경 독성에 대한 보호 효과

작용을 가지며, 이는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성의 억제에 따른 항산화 작용에 의한 신경세포의 세포 사멸(apoptosis) 억제와 관련이 있다¹⁴⁾. 아울러 원지 추출물은 N-methyl-D-aspartate 처리에 의한 중추 신경계 손상의 차단 효과가 보고된 바 있으며, 이 또한 ROS의 생성 차단과 연관성이 있다¹⁵⁾.

적정 수준의 ROS 생성은 세포의 성장과 증식에 필수적인 신호 분자 역할을 하지만 과도한 ROS 생성은 세포에 산화적 손상을 일으키게 된다^{16,17)}. 미토콘드리아(mitochondria)는 세포 내 소기관들 중에서 ROS의 생성을 담당하는 중요한 기관으로 산화적 스트레스에 의한 ROS 과잉 생산을 통한 미토콘드리아 기능 장애는 DNA 손상과 세포사멸을 유도하는 중요한 기전 중 하나로 인식되고 있다^{18,19)}. 또한, 세포 내 항산화 기능을 넘어서는 ROS의 축적은 전자 전달계(electron transport chain)의 항상성 지표인 미토콘드리아 막전위 잠재력(mitochondrial membrane potential, MMP)을 감소시켜 adenosine tri-phosphate (ATP) 생산 저하를 초래하며^{19,20)}, cytochrome *c*와 같은 세포사멸 유도 인자들이 MMP의 소실로 인하여 미토콘드리아 막내 공간(mitochondrial intermembrane space)에서 세포질로 방출됨으로써 caspases 신호전달경로 활성화에 의해 세포사멸을 유발하게 된다^{19,21)}.

한편 산화적 스트레스에 의해 생성되는 과도한 ROS는 간질환의 발병과 진행에 중요한 인자로 작용한다²²⁻²⁶⁾. 따라서 항산화제는 간세포에서 ROS 매개 DNA 손상에 대한 억제 효과뿐만 아니라 보호 효과를 가질 수 있다. 현재 산화적 스트레스에 대한 원지의 항산화 효능에 관한 연구는 보고된 바 없으며, 본 연구에서는 간세포에서 산화적 스트레스에 대한 원지 에탄올 추출물(ethanol extract of *Polygalae radix*, EEPR)의 억제 효과를 검증하였다. 본 연구결과에서 EEPR은 Chang 간세포(Chang liver cells)에서 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)에 의한 ROS 생산 억제를 통해 DNA 손상과 세포사멸을 효과적으로 감소시켜줌을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 원지 추출물(EEPR)의 준비

본 연구에 사용된 원지는 (주)대한생약제품(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 세척하고 건조시킨 후 잘게 분쇄하였다.

EEPR을 얻기 위하여 원지 100 g 당 70% 에탄올 1 L를 첨가하여 60°C, 150 rpm으로 3일간 교반 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액을 여과지(Whatman No. 3 filter paper; Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과한 후 농축하였으며, 농축물은 동결건조하여 분말화하였으며 최종 수율은 27% 정도였다. 획득된 고형성분(EEPR)을 실험에 사용하기 위해서 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 100 mg/mL의 농도로 만든 다음 이를 적정 농도로 세포 배양 배지에 희석하여 처리하였다.

2. 세포 배양 및 생존율 측정

Chang 간세포(CCL-13; a human hepatoma cell line)는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), 100 U/mL의 penicillin 및 100 mg/mL의 streptomycin이 함유된 minimum essential medium (Gibco-BRL)을 이용하여 37°C 및 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. H₂O₂에 의한 세포독성에 미치는 EEPR의 영향을 조사하기 위하여 Chang 간세포에 적정 농도의 EEPR 또는 H₂O₂ (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 24시간 동안 단독으로 처리하거나, EEPR를 1시간 처리 후 H₂O₂를 24시간 처리하였다. 처리가 끝난 세포에 3시간 동안 0.5 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 처리하여 형성된 formazan을 DMSO에 용해시킨 후 96 well plate에 200 μL 씩 옮겨서 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 대조군으로는 N-acetyl cysteine (NAC; Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 사용하였으며, 각 실험군에 대한 세포 생존율은 아래와 같이 대조군 기준으로 백분율로 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{OD in EEPR and/or H}_2\text{O}_2\text{-treated cells}}{\text{Mean OD in untreated cells}} \times 100$$

3. 세포사멸 유도에 미치는 영향 평가를 위한 핵의 형태 변화 관찰

H₂O₂에 의한 세포사멸 유발에 미치는 EEPR의 영향을 조사하기 위하여 다양한 조건에서 배양된 Chang 간세포를

phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 수세 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)에 희석된 3.7% paraformaldehyde 용액(Sigma-Aldrich Chemical Co.)에 1시간 동안 고정시켰다. 고정된 세포를 수세한 후 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2)에 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석된 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 상온 암실에서 20분 동안 염색하였다. 이를 다시 PBS로 수세하여 건조시킨 후 형광현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 핵의 형태를 비교하였다.

4. 세포사멸 유도의 정량적 평가를 위한 flow cytometry 분석

H_2O_2 처리에 의한 세포사멸 유발 및 EEPR에 의한 억제 효과를 정량적으로 분석하기 위해 준비된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이들 세포를 PBS로 2~3회 정도 세척하고 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl 및 2.5 mM CaCl_2 가 포함된 annexin V binding buffer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 부유시킨 다음 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) 및 propidium iodide (PI)를 처리하여 암실에서 20분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 35 mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리하고 flow cytometer (Becton Dickinson)에 적용시켜 세포사멸이 유발된 세포를 형광반응에 따라 분석하였다.

5. ROS 생성량의 측정

H_2O_2 에 의한 ROS 생성과 EEPR에 의한 차단 효과를 확인하기 위하여 fluorescent probe인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA; Molecular Probes, Leiden, Netherlands)를 사용하였다. 이를 위하여 준비된 세포들을 10 μM 의 DCF-DA로 20분간 염색하고 non-specific staining을 제거하기 위하여 PBS로 수세한 후 flow cytometer를 이용하여 ROS 생성량을 정량적으로 비교하였다. 또한 동일한 조건에서 배양된 세포를 대상으로 형광 현미경 관찰에 의한 ROS 생산 정도를 조사하기 위하여 coverslip에 부착된 세포에 동일 조건으로 EEPR 및 H_2O_2 를 처리한 후, 이들 세포를 DCF-DA로 염색하고, 4% paraformaldehyde으로 20분간 고정시켜 형광 현미경으로 관찰하였다.

6. Comet 분석법에 의한 DNA 손상 분석

DNA 손상을 평가하기 위하여 Alkaline comet 분석법을 적용하였다. 이를 위하여 EEPR 및 H_2O_2 가 단독 또는 동시 처리된 조건에서 배양된 세포를 모은 후 0.5% low-melting-point agarose와 혼합하였다. 이 혼합물을 37°C에서 normal agarose (1% in PBS)로 미리 코팅한 슬라이드 위에 펼쳐 놓고 5분 동안 얼음 팩 위에서 냉각시켰다. Agarose가 고형화된 후, 세포를 lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na-ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], 10 mM Tris, 1% Triton $\times 100$ 및 10% DMSO [pH 10])을 이용하여 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 슬라이드를 300 mM sodium hydroxide 및 10 mM Na-EDTA (pH 13)를 함유하는 gel 전기영동 장치에서 30분간 DNA 풀림을 허용한 다음 30분 동안 전기영동으로 분리하였다. 전기영동 후 슬라이드를 중화용 완충액(neutralizing buffer, 0.4 M Tris, pH 7.5)으로 3회씩 최소 5분간 수세한 후, 4°C에서 absolute ethanol로 탈수시킨 다음 건조시켰다. 반응이 끝난 세포를 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 PI 용액으로 염색하고 이미지를 형광 현미경으로 관찰하였다.

7. 단백질의 분리와 Western blot 분석

EEPR의 산화적 스트레스 보호에 따른 관련 유전자들의 발현 변화를 관찰하기 위하여 준비된 세포에 적당량의 lysis buffer (25 mM Tris-Cl [pH 7.5], 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet-P40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM dithiothreitol)를 첨가하여 4°C에서 1시간 이상 반응시켰다. 상층액에 있는 단백질을 분리한 후 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다. Gel에 함유된 단백질을 polyvinylidene difluoride membrane (Schleicher & Schuell Bioscience Inc., Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. 그 후 1차 항체(Table 1)를 처리하여 상온에서 2시간 이상 반응시킨 후, PBS-T 용액(PBS with Tween 20)으로 세척하고 2차 항체를 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 enhanced chemiluminescence solution (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 해당 단백질의 발현 변화를 분석하였다. Immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse 및 anti-rabbit 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.에서 구입하였다.

Table 1. Antibodies Used in the Present Study

Antibody	Manufacturer	Item No.	Dilution
p- γ H2AX	Cell Signaling Technology, Inc.	9718	1:500
γ H2AX	Cell Signaling Technology, Inc.	7631	1:500
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-509	1:1,000
Bax	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-493	1:1,000
Actin	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-47778	1:1,000

8. MMP 변화의 측정

H₂O₂에 의한 미토콘드리아 기능 손상 여부와 EEPR에 의한 보호 효과를 확인하기 위하여 MMP의 변화 정도를 측정하였다. 이를 위하여 준비된 세포들에 10 μ M의 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1; Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 처리하여 암하, 상온에서 20분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 상층액을 제거하고 PBS를 첨가하여 세포를 부유시킨 다음 flow cytometer에 적용시켜 MMP의 변화를 정량적으로 측정하였다.

9. ATP 함량의 측정

EEPR과 H₂O₂가 단독 또는 동시 처리된 세포에서 ATP 생성 수준의 변화를 관찰하기 위하여 luciferase/luciferin-based system을 적용하였다. 이를 위하여 준비된 세포에서 분리된 30 μ g의 미토콘드리아 pellet을 0.1% bovine serum albumin, 1 mM malate 및 1 mM glutamate를 함유한 buffer A (150 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, 2 mM potassium phosphate, 0.1 mM MgCl₂, pH 7.4)와 buffer B (0.8 mM luciferin and 20 mg/mL luciferase in 0.5 M Tris-acetate, pH 7.75)에 차례로 현탁시켰다. 여기에 0.1 mM adenosine diphosphate (ADP)를 첨가하여 반응을 개시하고 microplate reader를 사용하여 5분간 모니터링 하면서 ATP의 생성량을 조사하였다.

10. 통계적 분석

모든 측정값은 3회 반복하여 측정하였고 평균값(mean)과 표준오차(Standard deviation)로 나타냈으며, 각 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 통계적인 유의성은 P-value가 0.05 이하인 경우에 유의한 것으로 인정했다.

결과

1. Chang 간세포의 증식에 미치는 EEPR과 H₂O₂의 영향

Chang 간세포에서 EEPR의 산화적 스트레스 보호 효과를 조사하기 위하여 먼저 EEPR의 독성 여부를 조사하였다. 이를 위하여 다양한 농도의 EEPR을 단독 처리하여 24시간 배양한 후 MTT 분석을 실시하였다. 그 결과, EEPR의 처리 농도가 5 μ g/mL 이하에서는 유의적인 세포독성을 관찰할 수 없었으나, 7.5 μ g/mL 이상의 EEPR이 처리된 Chang 간세포에서는 의존적으로 세포 생존율이 감소되었다(Fig. 1A). 아울러 Chang 간세포에 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 H₂O₂를 사용하였으며, H₂O₂ 단독 처리에 따른 Chang 간세포의 생존율을 분석한 결과, 0.3 mM 이상의 처리군에서부터 유의적인 생존율 감소가 관찰되었다(IC₅₀=0.67 mM; Fig. 1B). 이 결과에 준하여 Chang 간세포에 산화적 스트레스를 유발하기 위한 H₂O₂의 농도는 약 60% 정도의 생존율 감소를 보인 0.5 mM로 선정하였으며, 이에 대한 EEPR의 보호 효과를 조사하기 위한 처리 농도는 세포독성이 나타나지 않았던 5 μ g/mL를 선정하여 추후 실험을 수행하였다.

2. H₂O₂에 의한 Chang 간세포의 증식 억제에 미치는 EEPR의 영향

세포독성 결과에서 선정된 농도를 대상으로 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스로부터 EEPR의 보호 효과를 조사하기 위하여 5 μ g/mL의 EEPR 또는 0.5 mM의 H₂O₂를 24시간 동안 단독으로 처리하거나, EEPR를 1시간 처리 후 H₂O₂를 24시간 처리된 조건에서 24시간 배양된 Chang 간세포를 대상으로 MTT 분석을 실시하였다. 그 결과, EEPR은 H₂O₂에 의한 Chang 간세포의 생존율 저하를 처리하지 않은 대조군에 비해 유의적으로 억제되었다(Fig. 2). 아울러 양성 대조군으로서 사용된 대표적인 항산화제인 NAC 처리군에서도 H₂O₂에 의한 세포독성이 유의적으로 억제되었다.

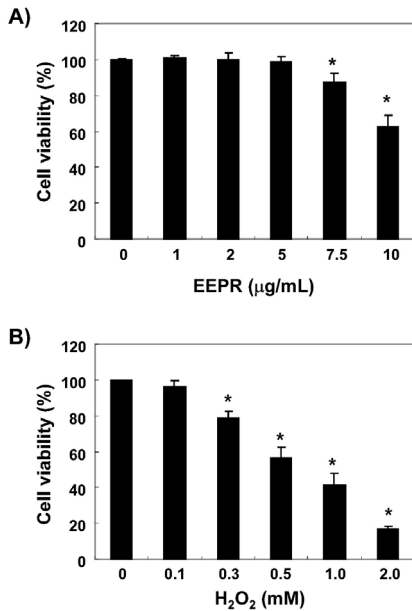


Fig. 1. Effects of EEPR and H₂O₂ on the growth of Chang liver cells. Cells were treated with the indicated concentrations of EEPR (A) and H₂O₂ (B) for 24 h. The cells were collected and an MTT assay was performed. The data were shown as mean±standard deviation obtained from three independent experiments (*P<0.05 compared with the control group). EEPR: ethanol extract of *Polygalae radix*, H₂O₂: hydrogen peroxide, MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

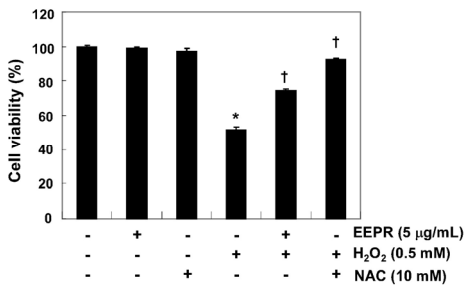


Fig. 2. Protective effects of EEPR against H₂O₂-induced cytotoxicity in Chang liver cells. Chang liver cells were treated with 0.5 mM H₂O₂ for 24 h after pre-treatment with or without 5 µg/mL EEPR or 10 mM NAC for 1 h. After treatment, cell viability was examined by the MTT assay. The data were shown as mean±standard deviation obtained from three independent experiments (*P<0.05 compared with the control group, †P<0.05 compared with the H₂O₂-treated group). EEPR: ethanol extract of *Polygalae radix*, H₂O₂: hydrogen peroxide, NAC: N-acetyl cysteine, MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

3. H₂O₂에 의한 Chang 간세포의 세포사멸 유도에 미치는 EEPR의 영향

다음은 Chang 간세포에서 H₂O₂에 의한 생존율 감소가 EEPR에 의해 억제되는 것이 EEPR의 세포사멸 유도 억제와 연관성이 있는지를 확인하였다. 이를 위하여 전형적인 세포사멸이 일어난 세포의 핵에서 특이적으로 관찰되는 염색질의

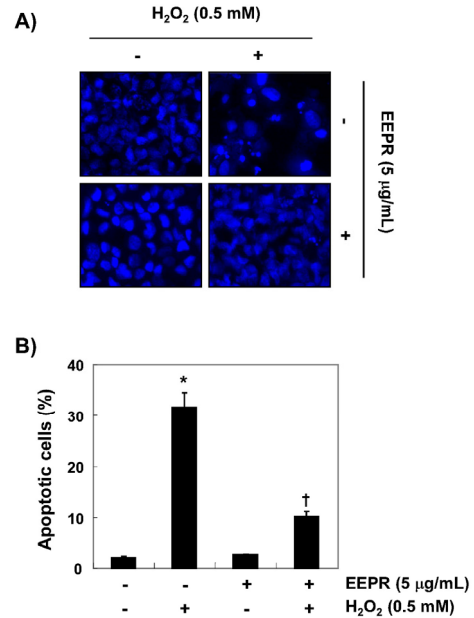


Fig. 3. Attenuation of H₂O₂-induced apoptosis by EEPR in Chang liver cells. Cells were treated with 5 µg/mL EEPR for 1 h, and then stimulated with or without 0.5 mM H₂O₂ for 24 h. (A) The DAPI-stained nuclei were pictured under a fluorescence microscope (original magnification, ×400). The representative photographs are shown. (B) The cells were stained with FITC-conjugated Annexin V and PI for flow cytometry analysis. The percentages of apoptotic cells were determined by counting the percentage of Annexin V-positive cells. Data were expressed as the mean±standard deviation of three independent experiments (*P<0.05 compared with the control group, †P<0.05 compared with the H₂O₂-treated group). H₂O₂: hydrogen peroxide, EEPR: ethanol extract of *Polygalae radix*, DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole, FITC: fluorescein isothiocyanate, PI: propidium iodide.

응축(chromatin condensation)에 따른 apoptotic body의 형성을 DAPI 염색을 통하여 조사하였다. Fig. 3A에서 알 수 있듯이, H₂O₂만이 단독으로 처리된 배지에서 배양된 Chang 간세포에서는 세포사멸이 유발되었음을 의미하는 염색질의 응축 및 apoptotic body 형성의 증가가 관찰되었으나, 이러한 형태적 변화가 5 µg/mL의 EEPR이 존재하는 조건에서 배양된 세포에서는 거의 관찰되지 않았다. 아울러 H₂O₂에 의해 유발된 세포사멸에 대한 EEPR의 효능을 정량적으로 평가하기 위하여 annexin V-FITC/PI 이중 염색을 통한 flow cytometry 분석을 실시한 결과, H₂O₂ 단독 처리군에서는 대조군에 비해 세포사멸 유발 세포의 빈도가 현저히 증가하였으나 EEPR의 전처리군에서는 H₂O₂ 단독 처리군에 비해 유의적으로 감소되었음을 알 수 있었다(Fig. 3B). 이러한 결과는 EEPR의 산화적 스트레스에 대한 세포독성 보호 효과가 세포사멸 억제와 직접 연관성이 있음을 의미하는 것이다.

4. H₂O₂에 의한 Chang 간세포의 ROS 생성에 미치는 EEPR의 영향

Chang 간세포에서 H₂O₂ 처리에 의해 유발된 세포독성 및 세포사멸 유도에 대한 EEPR의 보호 효과가 산화적 스트레스의 직접적인 차단 효과 때문인지를 조사하기 위하여 ROS 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 0.5 mM의 H₂O₂ 단독으로 1시간 동안 처리하거나, 5 µg/mL의 EEPR을 1시간 전처리 후 H₂O₂에 다시 1시간 노출한 Chang 간세포를 대상으로 DCF-DA로 염색한 후 flow cytometry 분석을 실시하였다. Fig. 4A, B에 나타난 흠광도 변화의 결과에서 알 수 있듯이, 0.5 mM의 H₂O₂ 단독 처리군에서는 대조군에 비하여 현저하게 ROS 생성이 증가하였다. 그리고 EEPR 단독 처리군에서는 대조군과 비교하여 큰 변화는 관찰되지 않았지만, EEPR은 H₂O₂에 의하여 유도된 ROS 생성을 효과적으로 차단하였으며, 이는 NAC 처리군에서도 유사하게 나타났다. 또한 Fig. 4C, D의 형광 현미경을 이용한 관찰에서도 ROS 생성을 의미하는 초록 형광의 강도가 H₂O₂ 단독 처리군에서는 매우 강하게 나타났으나 EEPR이 존재하는 조건에서 배양된 Chang 간세포에서는 현저히 감

소되었다. 이러한 결과는 H₂O₂에 의한 Chang 간세포의 생존을 저하 및 세포사멸 억제에 미치는 EEPR의 영향이 ROS 생성의 차단과 밀접한 연관성이 있음을 의미한다.

5. H₂O₂에 의한 Chang 간세포의 DNA 손상에 미치는 EEPR의 영향

이상에서 관찰된 EEPR의 산화적 스트레스에 의한 ROS 생성 및 세포사멸 억제 효과가 DNA 손상의 차단과 연관성이 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 Comet 분석법에 의한 DNA 손상 여부를 관찰한 결과, H₂O₂가 단독 처리된 Chang 간세포에서는 DNA 손상에 따른 comet tail의 현저한 증가가 관찰되었으며, 이러한 현상은 EEPR의 전처리 조건에서는 대조군 수준으로 완벽하게 차단되었다(Fig. 5A). 다음은 DNA 이중 나선 손상 지표로 널리 사용되는 γH2AX 단백질의 인산화(p-γH2AX, serine 139) 여부를 비교한 결과, H₂O₂가 처리된 Chang 간세포에서는 대조군에 비하여 γH2AX 단백질의 전체적인 발현에는 큰 변화 없이 인산화가 매우 증가하였으나, EEPR이 존재하는 조건에서는 이러한 현상이 관찰되지 않았다(Fig. 5B, C). 따라서 H₂O₂에

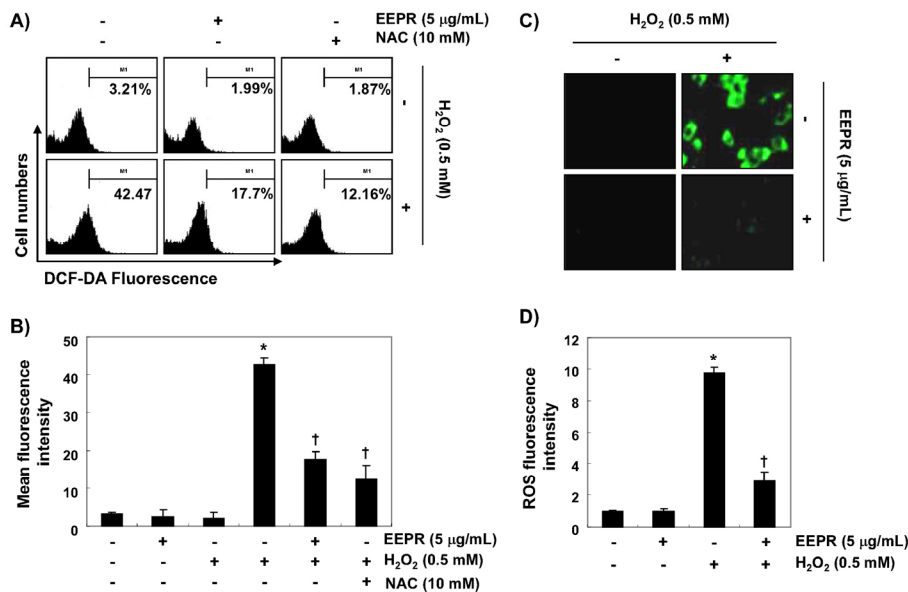


Fig. 4. Prevention of H₂O₂-induced ROS accumulation by EEPR in Chang liver cells. Cells were pretreated with 5 µg/mL EEPR for 1 h, and then stimulated with or without 0.5 mM H₂O₂ for 1 h. (A) After staining with DCF-DA fluorescent dye, DCF fluorescence was monitored by a flow cytometer. (B) The data were shown as mean±standard deviation obtained from three independent experiments (*P<0.05 compared with the control group, †P<0.05 compared with the H₂O₂-treated group). (C) The fluorescent images were obtained by a fluorescence microscope (original magnification, ×200). These images are representative of at least three independent experiments. (D) The relative intensities of ROS were quantified and the results were expressed as mean±standard deviation (*P<0.05 compared with the control group, †P<0.05 compared with the H₂O₂-treated group). H₂O₂: hydrogen peroxide, ROS: reactive oxygen species, EEPR: ethanol extract of *Polygalae radix*, DCF-DA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, NAC: N-acetyl cysteine.

대한 EEPR의 세포사멸 유발 억제효과는 ROS 생성 차단과 연관된 DNA 손상의 억제와도 직접적인 연관성이 있음을 알 수 있었다.

6. H₂O₂에 의한 Chang 간세포의 미토콘드리아 기능 손상에 미치는 EEPR의 영향

다음은 Chang 간세포에서의 산화적 스트레스 억제제 미토콘드리아 기능 손상의 회복과 연계되어 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 미토콘드리아 기능 손상을 의미하는 MMP 소실에 미치는 영향을 조사한 결과, H₂O₂ 단독 처리된 배지에서 배양된 Chang 간세포에서는 미토콘드리아

기능 손상을 의미하는 MMP 소실이 매우 증가되었으나, EEPR에 의해 이러한 현상이 유의적으로 차단되었다(Fig. 6A). 미토콘드리아의 기능 상실은 전자 수송 체인의 손상을 초래하여 ATP 생산이 감소될 수 있기 때문에 ATP 생성에 미치는 EEPR의 영향을 조사한 결과, H₂O₂에 노출된 세포에서 MMP의 소실과 함께 세포 내 ATP 농도는 정상 배지에서 배양된 세포와 비교하여 유의하게 감소하였다. 그러나 EEPR이 존재할 경우에는 H₂O₂에 의한 ATP의 감소가 유의적으로 회복되었다. 이러한 결과를 고려할 때 H₂O₂에 의한 미토콘드리아의 기능 손상이 Chang 간세포에서 EEPR에 의하여 차단되었으며, 이는 ROS 생산의 억제와 밀접한 관련이 있음을 의미한다.

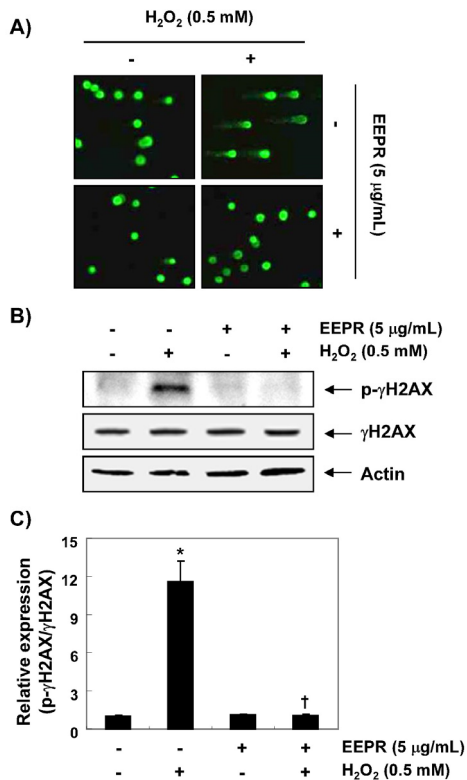


Fig. 5. Protection of H₂O₂-induced DNA damage by EEPR in Chang liver cells. Cells were pretreated with 5 μg/mL EEPR for 1 h, and then stimulated with or without 0.5 mM H₂O₂ for 24 h. (A) To detect cellular DNA damage, the comet assay was performed, and representative images of comet assay were taken by a fluorescence microscope (original magnification, ×200). (B) The cellular proteins were prepared, and p-γH2AX and γH2AX protein levels were assayed by Western blot analysis using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (C) Bands of p-γH2AX were quantified using ImageJ, normalized to γH2AX and ratios were determined. The measurements were made in triplicate and values are expressed as the mean±standard deviation (*P<0.05 compared with the control group, †P<0.05 compared with the H₂O₂-treated group). H₂O₂: hydrogen peroxide, EEPR: ethanol extract of *Polygalae radix*, ECL: enhanced chemiluminescence.

7. H₂O₂에 의한 Chang 간세포의 Bcl-2 family 단백질 발현 변화에 미치는 EEPR의 영향

한편 미토콘드리아의 기능 손상과 연관된 세포사멸 유도에 핵심적인 조절자로 작용하는 인자가 Bcl-2 family 단백질들이다. 따라서 이상에서 관찰된 EEPR의 미토콘드리아

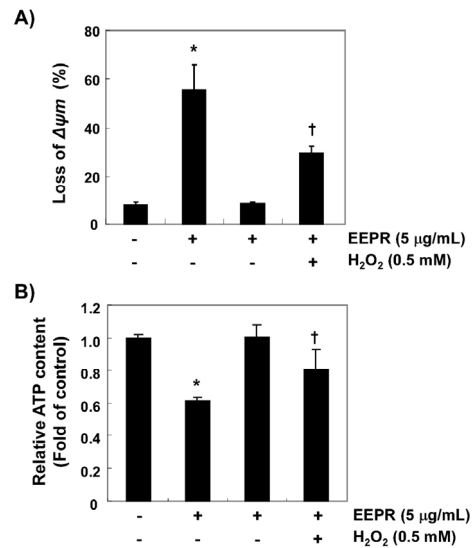


Fig. 6. Attenuation of H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction by EEPR in Chang liver cells. Cells were pretreated with 5 μg/mL EEPR for 1 h, and then stimulated with or without 0.5 μM H₂O₂ for 24 h. (A) The cells were incubated with 10 μM JC-1 and the values of MMP were evaluated by a flow cytometer. (B) To monitor the ATP production using a luminometer, a commercially available kit was used. The results are the mean±standard deviation obtained from three independent experiments (*P<0.05 compared with the control group, †P<0.05 compared with the H₂O₂-treated group). H₂O₂: hydrogen peroxide, EEPR: ethanol extract of *Polygalae radix*, JC-1: 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide, MMP: mitochondrial membrane potential, ATP: adenosine tri-phosphate.

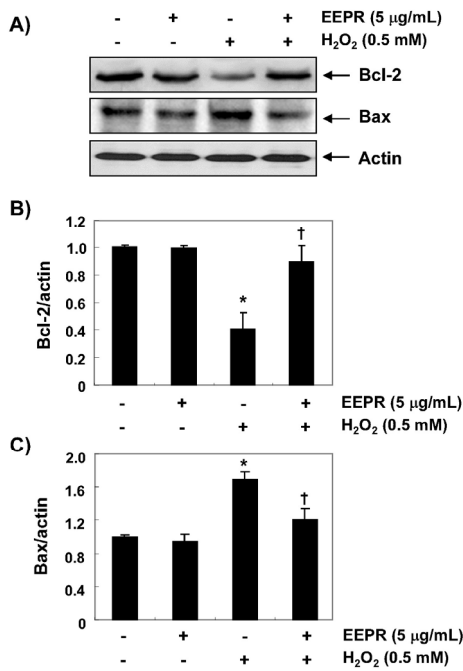


Fig. 7. Effect of EEPR on the expression of Bcl-2 and Bax in H₂O₂-treated Chang liver cells. (A) After treatment with 5 µg/mL EEPR in the presence or absence of 0.5 µM H₂O₂ for 24 h, the cellular proteins were prepared, and the protein levels were assayed by Western blot analysis using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B and C) Bands were quantified using ImageJ, normalized to actin and the ratios were determined. Data are presented as the means±standard deviation of three independent experiments (*P<0.05 compared with the control group, †P<0.05 compared with the H₂O₂-treated group). EEPR: ethanol extract of *Polygalae radix*, H₂O₂: hydrogen peroxide, ECL: enhanced chemiluminescence.

아 손상 차단과 연관된 세포사멸 유도 억제가 이들 단백질들의 발현 변화와 연관되어 있는지를 조사하였다. Fig. 7에 나타난 결과에서 알 수 있듯이 H₂O₂가 처리된 배지에서 배양된 Chang 간세포에서 대표적인 pro-apoptotic 단백질에 속하는 Bax의 발현이 증가된 반면, anti-apoptotic 단백질군에 속하는 Bcl-2의 발현은 감소되었다. 그러나 EEPR의 전처리에 의해서는 두 Bcl-2 family 단백질들의 발현이 대조군 수준으로 유지되었다. 이러한 결과들은 EEPR가 H₂O₂에 의한 Bcl-2 family 인자들의 발현 변화를 억제함으로써 미토콘드리아 기능 손상을 차단시켜 세포사멸 유도를 억제하였음을 보여주는 것이다.

고찰

많은 선행연구들에서 나타났듯이, 간세포에서 비정상적인 ROS 축적은 핵산, 단백질, 지질과 같은 세포의 중요한

성분을 산화시켜 궁극적으로 DNA 손상을 동반한 세포사멸을 유도하는 원인이 된다²²⁻²⁴. 이러한 간세포의 세포사멸은 간 기능 저하에 결정적인 역할을 하며 다양한 간 질환의 발병과 진행을 촉진시킨다^{22,24}. 최근 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스는 다양한 유형의 간세포 세포사멸에서 미토콘드리아의 기능 손상이 동반되는 것으로 나타났다²⁵⁻²⁷. 비록 원치 추출물이 신경세포의 손상에 대한 효과에서 항산화 효능의 중요성이 일부 확인된 바 있으나^{14,15} 산화적 스트레스에 대한 직접적인 방어 효능에 관한 연구는 매우 미비한 편이다. 본 연구의 결과에서 H₂O₂가 Chang 간세포에서 ROS의 생산을 유도함으로써 DNA 손상을 활성화시키고 세포사멸을 유도한다는 것을 보여 주었다. 그러나 원지 에탄올 추출물(EEPR)은 ROS의 축적 감소를 통해 DNA 손상을 억제함으로써 H₂O₂ 유도 세포독성 및 세포사멸을 유의적으로 억제하였다. 본 연구를 위해 H₂O₂의 농도를 0.5 mM로 선정한 이유는 50% 이하의 생존율을 나타내는 조건에서는 유의적인 보호 효과를 검출하기 어렵기 때문이었다.

과도한 ROS 축적에 의한 세포사멸 유도에서 ROS 과부하는 미토콘드리아 막의 탈분극을 유발하여 MMP의 소실을 가져 오며 이는 내인성(intrinsic) 세포 사멸 경로의 시작으로 간주된다^{19,21}. 동시에 미토콘드리아 기능 장애는 미토콘드리아 호흡 연쇄의 전자 전달 경로의 이상을 촉진하여 궁극적으로 세포 내 ATP 생산을 방해한다^{28,29}. 또한 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상은 돌연변이를 유발할 뿐만 아니라 세포사멸을 유도할 수 있으며, DNA 손상 정도를 평가하기 위하여 광범위하게 사용되는 Comet 분석법은 DNA 이중 나선의 절단 정도를 평가하는 방법이다^{30,31}. 또한 γH2AX 단백질은 DNA 이중 나선이 산화적 스트레스에 의해 절단되었을 경우 인산화형의 발현이 증가하기 때문에 DNA 손상 마커로 활용된다^{32,33}. 본 연구 결과에 의하면, EEPR 처리에 의해 H₂O₂에 의한 MMP의 소실과 APT 함량 저하가 현저하게 억제되었다. 이러한 결과는 에너지 항상성 유지 관점에서 산화적 스트레스에 의한 간세포의 세포사멸 보호 효과가 미토콘드리아 기능 보존에 의한 ATP 생산 유지와 관련이 있음을 보여주는 이전의 연구 결과들과 일치하였다³⁴⁻³⁶. 아울러 H₂O₂에 의한 DNA 손상은 EEPR의 전처리 조건에서는 유의적으로 억제되었다. 따라서 미토콘드리아 막 기능의 유지로 인한 ATP 생산 보존은 산화적 스트레스로부터 세포 생존 경로를 보존하기 위

한 EEPR의 가능한 메커니즘 중 하나로 추정되며, 이는 원지 추출물이 산화적 스트레스에 의한 신경세포 손상 차단에서 나타난 Choi 등¹⁴⁾과 Lee 등¹⁵⁾의 결과를 뒷받침한다고 생각한다.

세포사멸 개시에 대한 신호 전달은 자극의 종류에 따라 다르지만, caspase cascade의 활성화에 기반한 death receptor (DR) 매개 외인성(extrinsic) 경로와 미토콘드리아가 매개하는 내인성 경로로 크게 나눈다. 외인성 경로에서 death ligand와 상응하는 DR 사이의 상호 작용은 궁극적으로 caspase-8을 활성화시킨다^{37,38)}. 반면에, 내인성 경로의 개시는 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome c를 포함한 세포사멸 유도 인자들의 방출에 의한 caspase-9의 활성을 필요로 한다^{37,38)}. Caspase-9 및 -8과 같은 개시 caspase의 활성화는 caspase-3 및 -7을 포함하는 하류의 효과가 caspase를 궁극적으로 활성화시켜 결국 세포사멸을 유도한다^{37,39)}. 세포사멸 유도를 위한 caspase cascade의 활성화는 pro-apoptotic 단백질 및 anti-apoptotic 단백질로 이루어진 Bcl-2 family 구성원을 비롯한 다양한 단백질에 의해 조절된다. Bcl-2 family 계열 구성원 중 Bcl-2와 같은 anti-apoptotic 단백질은 세포사멸 유도 인자의 방출을 막기 위해 외부 미토콘드리아 막에 위치하고 있다^{39,40)}. 반면에, Bax를 포함한 pro-apoptotic 단백질은 anti-apoptotic 단백질에 길항하거나 미토콘드리아 막으로 이동하여 미토콘드리아 막에 구멍(mitochondrial pore)의 형성을 유도하여 MMP의 소실로 이끄는 막 일체형 호모 올리고머(membrane-integrated homo oligomer)를 형성한다^{30,41)}. 따라서 anti-apoptotic Bcl-2 family 단백질에 대한 pro-apoptotic Bax family 단백질의 균형은 내재적 세포사멸 경로를 활성화하거나 억제하는 결정 요인으로 작용한다. 이전의 많은 연구들은 간세포에서 H₂O₂에 의한 세포사멸 유도가 Bcl-2/Bax 비율의 감소에 따른 caspases의 활성화와 관련이 있음을 보여 주었다⁴²⁻⁴⁴⁾. 이전 연구 결과들과 일치되게 본 연구의 결과에서도 H₂O₂가 처리된 Chang 간세포에서 Bcl-2의 발현 감소 및 Bax 발현 증가가 EEPR의 존재 하에서 유의적으로 차단되었다. 이러한 관점에서 EEPR은 Bax/Bcl-2 발현율의 증가를 감소시킴으로써 H₂O₂에 의해 유발된 세포사멸을 억제하였음을 의미한다. 그러나 EEPR에 의한 세포사멸의 억제 효과가 caspase 신호전달 경로에 영향을 미치는지 외인성 및 내인성 경로 차단에 대한 추가적인 기전 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서 EEPR은 Chang 간세포에서 항산화 작용을 통해 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스, 미토콘드리아 기능 장애, DNA 손상 및 세포사멸을 효과적으로 막아 줄 수 있음을 확인하였다. 또한, EEPR은 Bcl-2/Bax의 발현 비율 감소를 정상 수준으로 회복시킬 수 있었으며 이는 ROS 생성 억제에 따른 미토콘드리아의 항상성 유지에 기여하였음을 추론할 수 있었다. 따라서 EEPR이 Chang 간세포에서 산화적 손상으로부터 보호할 수 있음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단(2018R1A2B2005705)의 지원을 받아 수행된 연구이다.

References

1. May BH, Lu C, Lu Y, Zhang AL, Xue CC. Chinese herbs for memory disorders: a review and systematic analysis of classical herbal literature. *J Acupunct Meridian Stud.* 2013 ; 6(1) : 2-11.
2. Cao Q, Jiang Y, Cui SY, Tu PF, Chen YM, Ma XL, et al. Tenuifolin, a saponin derived from *Radix Polygalae*, exhibits sleep-enhancing effects in mice. *Phytomedicine.* 2016 ; 23(14) : 1797-805.
3. Kim KS, Lee DS, Bae GS, Park SJ, Kang DG, Lee HS, et al. The inhibition of JNK MAPK and NF- κ B signaling by tenuifoliside A isolated from *Polygala tenuifolia* in lipopolysaccharide-induced macrophages is associated with its anti-inflammatory effect. *Eur J Pharmacol.* 2013 ; 721(1-3) : 267-76.
4. Sun XL, Ito H, Masuoka T, Kamei C, Hatano T. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on scopolamine-induced impairment of rat spatial cognition in an eight-arm radial maze task. *Biol Pharm Bull.* 2007 ; 30(9) : 1727-31.
5. Kawashima K, Miyako D, Ishino Y, Makino T, Saito K, Kano Y. Anti-stress effects of 3,4,5-trimethoxycinnamic acid, an active constituent of roots of *Polygala tenuifolia* (Onji) *Biol Pharm Bull.* 2004 ; 27(8) : 1317-9.
6. Chung IW, Moore NA, Oh WK, O'Neill MF, Ahn JS,

- Park JB, et al. Behavioural pharmacology of polygalasaponins indicates potential antipsychotic efficacy. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002 ; 71(1-2) : 191-5.
7. Shin JY, Shin JW, Ha SK, Kim Y, Swanberg KM, Lee S, et al. Radix Polygalae extract attenuates PTSD-like symptoms in a mouse model of single prolonged stress and conditioned fear possibly by reversing BAG1. *Exp Neurobiol.* 2018 ; 27(3) : 200-9.
 8. Naito R, Tohda C. Characterization of anti-neurodegenerative effects of *Polygala tenuifolia* in Abeta(25-35)-treated cortical neurons. *Biol Pharm Bull.* 2006 ; 29(9) : 1892-6.
 9. Ikeya Y, Takeda S, Tunakawa M, Karakida H, Toda K, Yamaguchi T, et al. Cognitive improving and cerebral protective effects of acylated oligosaccharides in *Polygala tenuifolia*. *Biol Pharm Bull.* 2004 ; 27(7) : 1081-5.
 10. Liu P, Hu Y, Guo DH, Wang DX, Tu HH, Ma L, et al. Potential antidepressant properties of Radix Polygalae (Yuan Zhi). *Phytomedicine.* 2010 ; 17(10) : 794-9.
 11. Hu Y, Liao HB, Dai-Hong G, Liu P, Wang YY, Rahman K. Antidepressant-like effects of 3,6'-disinapoyl sucrose on hippocampal neuronal plasticity and neurotrophic signal pathway in chronically mild stressed rats. *Neurochem Int.* 2010 ; 56(3) : 461-5.
 12. de Campos RO, Santos AR, Vaz ZR, Pinheiro TR, Pizzolatti MG, Cechinel Filho V, et al. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). *Life Sci.* 1997 ; 61(16) : 1619-30.
 13. Hwang JY, Wu YX, Hwang DI, Bae SJ, Kim T. Anti-obesity effect of *Polygala tenuifolia*. *Korean J Food Preserv.* 2014 ; 21(1) : 97-106.
 14. Choi JG, Kim HG, Kim MC, Yang WM, Huh Y, Kim SY, et al. Polygalae radix inhibits toxin-induced neuronal death in the Parkinson's disease models. *J Ethnopharmacol.* 2011 ; 134(2) : 414-21.
 15. Lee HJ, Ban JY, Koh SB, Seong NS, Song KS, Bae KW, et al. Polygalae radix extract protects cultured rat granule cells against damage induced by NMDA. *Am J Chin Med.* 2004 ; 32(4) : 599-610.
 16. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2018 ; 80(1) : 50-64.
 17. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017 ; 2017 : 8416763.
 18. Zimmermann M, Reichert AS. How to get rid of mitochondria: crosstalk and regulation of multiple mitophagy pathways. *Biol Chem.* 2017 ; 399(1) : 29-45.
 19. Rigoulet M, Yoboue ED, Devin A. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H2O2 signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2011 ; 14(3) : 459-68.
 20. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev.* 2013 ; 12(1) : 376-90.
 21. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000 ; 408(6809) : 239-47.
 22. García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial oxidative stress and antioxidants balance in fatty liver disease. *Hepatology Commun.* 2018 ; 2(12) : 1425-39.
 23. Engin A. Non-alcoholic fatty liver disease. *Adv Exp Med Biol.* 2017 ; 960 : 443-67.
 24. Richter K, Kietzmann T. Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison. *Cell Tissue Res.* 2016 ; 365(3) : 591-605.
 25. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst).* 2006 ; 5(2) : 145-52.
 26. Paracha UZ, Fatima K, Alqahtani M, Chaudhary A, Abuzenadah A, Damanhoury G, et al. Oxidative stress and hepatitis C virus. *Virology.* 2013 ; 10 : 251.
 27. Meynard D, Babitt JL, Lin HY. The liver: conductor of systemic iron balance. *Blood.* 2014 ; 123(2) : 168-76.
 28. Tian X, He W, Yang R, Liu Y. DI-3-n-butylphthalide protects the heart against ischemic injury and H9c2 cardiomyoblasts against oxidative stress: involvement of mitochondrial function and biogenesis. *J Biomed Sci.* 2017 ; 24(1) : 38.
 29. Valero T. Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. *Curr Pharm Des.* 2014 ; 20(35) : 5507-9.
 30. Kulikov AV, Shilov ES, Mufazalov IA, Gogvadze V, Nedospasov SA, Zhivotovsky B. Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 2012 ; 69(11) : 1787-97.
 31. Afanasieva K, Sivolob A. Physical principles and new applications of comet assay. *Biophys Chem.* 2018 ;

- 238(1) : 1-7.
32. Siddiqui MS, François M, Fenech MF, Leifert WR. Persistent γ H2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015 ; 766(1) : 1-19.
 33. Turinetto V, Giachino C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res*. 2015 ; 43(5) : 2489-98.
 34. Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*. 2012 ; 44(1) : 88-106.
 35. Pessayre D, Mansouri A, Berson A, Fromenty B. Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol*. 2010 ; 196 : 311-65.
 36. Grattagliano I, Bonfrate L, Diogo CV, Wang HH, Wang DQ, Portincasa P. Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: certainties and doubts. *World J Gastroenterol*. 2009 ; 15(39) : 4865-76.
 37. Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev*. 2017 ; 277(1) : 76-89.
 38. Schultz DR, Harrington WJ Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*. 2003 ; 32(6) : 345-69.
 39. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol*. 2016 ; 37(7) : 8471-86.
 40. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 ; 292(1) : C45-51.
 41. Imahashi K, Schneider MD, Steenbergen C, Murphy E. Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*. 2004 ; 95(7) : 734-41.
 42. Basu C, Sur R. S-allyl cysteine alleviates hydrogen peroxide induced oxidative injury and apoptosis through upregulation of Akt/Nrf-2/HO-1 signaling pathway in HepG2 cells. *Biomed Res Int*. 2018 ; 2018 : 3169431.
 43. Qi G, Liu Z, Fan R, Yin Z, Mi Y, Ren B, et al. Athyrium multidentatum (Doll.) Ching extract induce apoptosis *via* mitochondrial dysfunction and oxidative stress in HepG2 cells. *Sci Rep*. 2017 ; 7(1) : 2275.
 44. Zhao H, Meng W, Li Y, Liu W, Fu B, Yang Y, et al. The protective effects of CHIR99021 against oxidative injury in LO2 cells. *Pharmazie*. 2016 ; 71(11) : 629-35.