

## 스트렙토조토신으로 유도된 신경세포사멸에서 비타민 C의 보호 기전 연구

이승희 · 한경훈 · 김현준 · 박광성 · 한성희\* · 김정희\*\* · †허재혁\*\*\*  
서울의료원 의학연구소 연구원, \* 고려대학교 안암병원 의생명연구센터 연구교수,  
\*\* 서울의료원 신경외과 과장, \*\*\* 서울의료원 신경과 과장

### Study on the Protective Mechanism of Vitamin C in the SH-SY5Y Cell Death Induced by the Streptozotocin

Seung-Hee Lee, Kyung-Hoon Han, Hyun-Jun Kim, Kwang-Sung Park,  
Sung-Hee Han\*, Jung-Hee Kim\*\* and †Jae-Hyeok Heo\*\*\*

Researcher, Research Institute, Seoul Medical Center, Seoul 02053, Korea

\*Research Exclusively Professor, Biomedical Research Center, Korea University Anam Hospital, Seoul 02841, Korea

\*\*Medical Doctor, Dept. of Neurosurgery, Seoul Medical Center, Seoul 02053, Korea

\*\*\*Medical Doctor, Dept. of Neurology Seoul Medical Center, Seoul 02053, Korea

#### Abstract

In this study, we analyzed the protective effects of the vitamin C in the streptozotocin (STZ)-induced apoptosis using the SH-SY5Y, a neuroblastoma cell line. The cells were pretreated with the vitamin C (100 µg) for 30 min, followed by the 24-hr treatment with the 2.5-mM STZ. The cell-viability assay using the Cell Counting Kit (CCK)-8 revealed the cell-survival rate increased by 15% following the vitamin-C pretreatment compared to the STZ-only treatment. Moreover, we conducted the western-blot analysis to determine the protective effect of the vitamin C regarding the apoptosis. Compared to those in the STZ-only-treatment group, the p-ERK and Bcl-2 expressions increased in the vitamin-C-pretreatment group, whereas the p-JNK and Bax expressions decreased. The vitamin-C pretreatment increased the expression of the SOD-1, an antioxidant enzyme, by more than 30%, indicating its protective role in the STZ-induced oxidative stress. Also, we found both the intrinsic- and extrinsic-pathway mechanisms of the STZ-induced apoptosis. The results of this study suggest vitamin C may help prevent the neurodegenerative diseases.

Key words: Alzheimer's disease, streptozotocin, reactiveoxygen species, vitamin C

#### 서 론

우리나라는 초고령 사회로 빠르게 진입하고 있으며, 만성 질환 및 노인성 질환의 유병률도 가파르게 증가될 것이라고 예상된다(Jeong 등 2017). 그 중 노년기에 발생하는 치매의 가장 흔한 형태인 알츠하이머병(Alzheimer's Disease: AD)은 기억상실과 인지 장애를 수반하는 신경퇴행성 질환이다(Masters

& Beyreuther 2006). 알츠하이머병은 시냅스 소실과 세포 외 beta-amyloid(Aβ)의 축적, 신경반(neuritic plaque) 그리고 세포 내 신경원섬유 다발(Neurofibrillary Tangle: NFT)에서 과인산화된 tau가 나타난다(Hutton 등 1998; Younkin 1998; Sisodia 1999). 그러나 알츠하이머병은 오랜 연구 기간에도 불구하고, 현재까지 병의 정확한 원인이나 병리학적 메커니즘이 밝혀지지 않았으며, 병의 주요 원인으로 에너지 대사 이상, 산화

† Corresponding author: Jae-Hyeok Heo, Dept. of Neurology Seoul Medical Center, Seoul 02053, Korea. Tel: +82-2-2276-7452, Fax: +82-2-2276-7435, E-mail: drjae93@gmail.com

적 스트레스, 그리고 미토콘드리아 장애가 기인한다고 알려져 왔다. 최근 들어 알츠하이머병은 노화와 관련한 대사질환(metabolic disease)과 밀접한 관련이 있으며, Hoyer S(1993)와 Cunnane 등(2011)이 발표한 결과에서는 대뇌 글루코스(glucose) 대사와 대뇌 에너지 생산의 불안정이 알츠하이머병의 중요한 발병 원인이라고 보고하였다.

스트렙토조토신(Streptozotocin: STZ)은 glucosamine-nitroso-urea 화합물로서 항생제로 사용되었으나, 췌장에서 인슐린을 분비하는 베타세포(beta cell)에 작용한다는 것을 알게 된 후, 당뇨병 실험동물 모델을 만드는데 많이 사용되어지고 있다(Junod 등 1967). 당뇨 유발 기전은 STZ 처리 시, ROS에 의한 베타세포의 손상이라고 알려져 있으며, 세포에 처리 시 free radical을 생성하여 DNA를 손상시킨 후, 세포 사멸을 유도하며, 지질 과산화물을 일으키는 것으로 보고되었다(Zheng 등 2015). 최근 연구에서는 스트렙토조토신을 투여한 당뇨병 실험동물 모델의 뇌에서 초기 신경퇴행성 질환의 병리학적 변화인 염증 및 산화적 스트레스, 그리고 생화학적 변화가 나타나는 것을 확인하였다(Wohaieb & Godin 1987). 이는 스트렙토조토신 처리로 인하여 알츠하이머병의 주된 요인인 활성산소(Reactiveoxygen Species: ROS)가 생성되어, 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유도하고, 이로 인하여 세포 및 조직들을 손상시키게 된다는 것을 의미한다. 특히 뇌조직은 항산화 효소가 다른 조직에 비해 적기 때문에 hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ), Superoxide anion( $O_2^-$ ), Hydroxyl radical(-OH), Peroxynitrites (ONOO<sup>-</sup>) 등과 같은 활성산소에 의한 산화적 손상을 쉽게 받을 수 있다(Reynolds 등 2007; Knott 등 2008). 그로 인하여 최근에는 신경세포 손상으로부터 신경세포를 보호할 수 있는 물질인 항산화제에 대해 관심이 집중되고 있다. 그 중 다양한 야채와 과일에 함유되어 있는 비타민 C는 여러 조직에 필요한 필수 대사물질이며, 우리나라의 비타민 C의 하루 필요 권장량이 다른 비타민과 비교해 높은 것은 생리학적, 생화학적 중요한 특성을 반영한다(Kim & Jang 2004). 항산화 효과를 가지고 있어서 알츠하이머병과 같은 노화 관련 질병에 효과가 있는 것으로 보고되었다(Heo & Lee 2005; Du 등 2012; Kwon 등 2014). 더욱이 비타민 C는 중추신경계에 많이 축적되어 있으며, 신경전달 물질의 합성과 조절에 관여하는 것으로 보고되었다(Sotiriou 등 2002).

따라서 본 연구에서는 STZ를 이용하여 SH-SY5Y 신경세포 손상을 유도한 후, 비타민 C에 의한 세포 보호효과와 세포 내 기전을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

본 실험에서 사용한 SH-SY5Y 신경세포는 American Type

Culture Collection(ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였다. 10% FBS(Gibco, USA)와 항생제(Gentamycin, Gibco, USA) 50  $\mu$ g/mL가 포함된 DMEM 배지에 접종하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(Thermo, USA)에서 배양하였다.

### 2. 세포 독성 평가

세포 생존률은 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Dojindo, Japan)으로 측정하였다. SH-SY5Y 신경세포를 96-well plate에  $1 \times 10^4$ /well로 접종한 후 24시간 동안 배양하였으며, 세포 독성을 알아보기 위해 STZ(Sigma, USA)과 비타민 C(L-Ascorbic acid, Sigma, USA)를 농도와 시간에 따라 각각 처리하였다. STZ으로 인한 세포독성에 대한 비타민 C의 보호효과는 비타민 C를 SH-SY5Y 세포에 30분 전처리한 후, STZ을 처리하였으며, WST-8[2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophnyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]을 10  $\mu$ L 첨가 후, 3시간 반응시킨 뒤 microplate reader(TECAN, Austria)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. 단백질 분석

Western blot을 통해 세포자멸 신호전달과 관련한 단백질의 인산화(phosphorylation)와 항산화 관련 단백질 발현을 측정하였다. 비타민 C를 30분 전처리한 후, 6시간과 24시간동안 각각 스트렙토조토신 처리하여 SH-SY5Y 세포에 protease inhibitor cocktail(Roche)과 phosphatase inhibitor cocktail(Roche)이 함유된 RIPA buffer(Sigma, USA)를 넣어 lysate를 추출하여 bicinchoninic acid(BCA, Pierce, USA)로 단백질 정량을 하였다. 20  $\mu$ g의 단백질을 4~12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel(Invitrogen, USA)에서 전기영동한 후, PVDF membrane(Millipore, Germany)에 이동시켰다. 5% skim milk로 1시간 blocking시킨 후 1차 항체로서 ERK(Cell signaling, USA), pERK(Cell signaling, USA), JNK(Cell signaling, USA), pJNK(Cell signaling, USA), Bcl-2(abcam, UK), Bax(abcam, UK), Sod-1(Santa Cruz, USA)을 4°C에서 12시간을 반응시킨 후, 2차 항체를 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 단백질의 발현은 enhanced chemiluminescence(ECL, Santa Cruz, USA)를 이용하여 반응시켰으며, Chemi smart 5000(Vilber, France)을 이용하여 측정하였다.

### 4. 세포자멸사 관련 단백질 분석

세포자멸사와 관련한 단백질 발현은 Human Apoptosis Array Kit(R&D system, USA)를 사용하였다. 35개의 apoptosis와 관련한 항체가 붙어있는 nitrocellulose membrane을 1시간 동안 상온에 blocking시킨 후, 추출한 단백질 400  $\mu$ g을 4°C에서 12시간 반응시켰다. 반응 후, 1시간 동안 Detection Antibody Cocktail을 처리하였으며, Streptavidin HRP를 30분 반응시켜,

chemi reagent로 가시화 하였다.

## 5. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 실시하여 SPSS 20.K를 이용하여 one way ANOVA를 시행하였으며, 유의적인 차이를  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. STZ와 비타민 C의 독성평가

STZ와 비타민 C에 노출된 SH-SY5Y 신경세포의 세포생존을 변화를 알아보기 위해 각각 CCK-8 assay를 시행하였다. 다양한 농도의 비타민 C를 SH-SY5Y 세포에 24, 48, 72시간 처리하였으며, 대조군과 비교 시 세포 생존율에서 차이가 관찰되지 않았다. 이에 본 실험에서는 SH-SY5Y 세포에 비타민 C의 처리 농도는 100  $\mu$ M로 결정하였다(Fig. 1(A)). 반면에 STZ를 1, 2.5, 5, 10 mM 농도로 SH-SY5Y 세포에 24시간 처리했을 때, 대조군과 비교 시 농도의 증가에 따라서 생존율이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 이에 본 실험에서는 대조군과 비교하여 50% 이상의 세포생존율의 유의적 감소를 보인 2.5 mM을 SH-SY5Y 세포에 처리하기로 결정하였다(Fig. 1(B)).

### 2. 비타민 C의 세포보호 효과

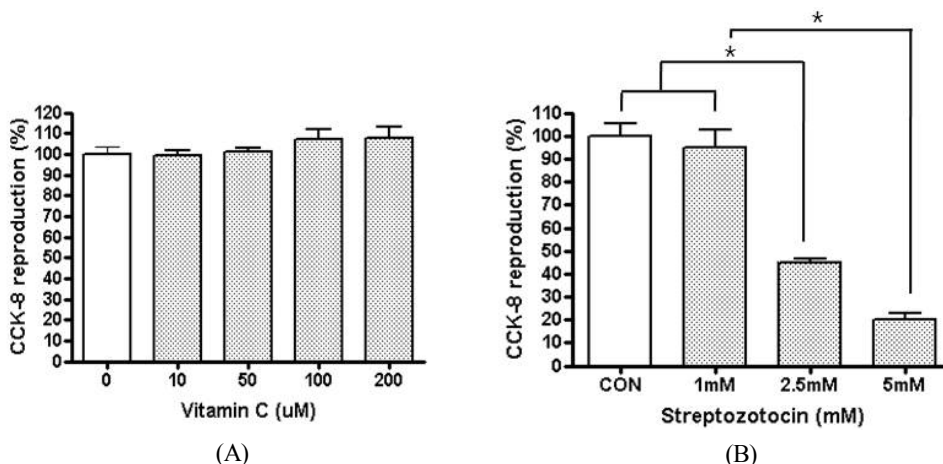
STZ 처리에 따른 SH-SY5Y 신경세포에서 비타민 C의 보호효과를 확인하기 위하여, SH-SY5Y 세포에 비타민 C 100  $\mu$ M을 30분 전처리 후, STZ 2.5 mM을 처리하였다. 24시간 세

포 배양 후 CCK-8 assay를 이용하여 SH-SY5Y 세포의 세포 생존율을 확인한 결과, STZ 처리군보다 비타민 C를 전처리한 군에서 SH-SY5Y 신경세포 생존율이 15% 정도 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2(A)). 또한, 위상차 현미경을 통하여 대조군과 STZ 처리군의 SH-SY5Y 신경세포의 형태를 비교 관찰한 결과, STZ 처리군의 세포들은 응축과 신경돌기 감소가 일어났으나, 비타민 C 전처리군에서는 STZ 처리군에 비해 세포의 응축과 신경돌기 감소가 줄어든 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2(B)).

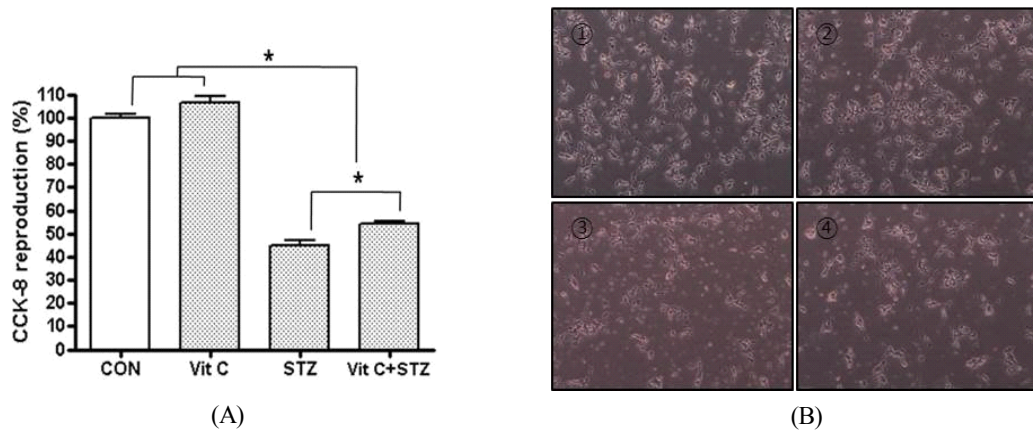
### 3. ERK와 JNK의 인산화

세포사에는 외부의 물리적 영향으로 일어나는 세포괴사(necrosis)와 세포들이 서로 신호를 주고받으며, 특정 유전자로부터 발현하는 단백질에 의해 능동적으로 죽음을 일으키는 세포자멸사(apoptosis)가 있다. 퇴행성 뇌질환 과정에서는 특정 부위의 신경세포들이 선택적으로 세포자멸사를 일으키게 되며(Mattson 등 1998), 산화적 스트레스의 경우, extracellular signal-regulated kinases(ERK), p38, c-Jun N-terminal kinase(JNK) 세 가지로 구성되어 있는 Mitogen activated protein kinase(MAPK)을 활성화 시켜 신경세포에서 외인성 세포자멸사를 유도한다고 알려져 있다(Stanciu 등 2000). 이에 본 연구에서는 STZ 처리에 따른 세포자멸에 관여하는 MAPK 기전을 살펴보았다.

세포증식과 관련한 p-ERK(Phospho-Extracellular signal-related kinase)와 염증 및 세포사멸에 관련한 p-JNK(Phospho-c-Jun N-terminal Kinase) 항체를 이용하여 인산화를 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. ERK의 인산화는 STZ 처리군에서는 대조군과



**Fig. 1. Cytotoxicity assays of Vitamin C and Streptozotocin on SH-SY5Y cells.** Cell viability was measured by CCK-8 assay. (A) Cells were incubated with vitamin C at indicated concentrations (0–200  $\mu$ M) for 24h. (B) Viability of SH-SY5Y cells were decreased with increasing streptozotocin concentration. Data present mean $\pm$ S.D. and are representative of three individual experiment ( $p < 0.05$ ).



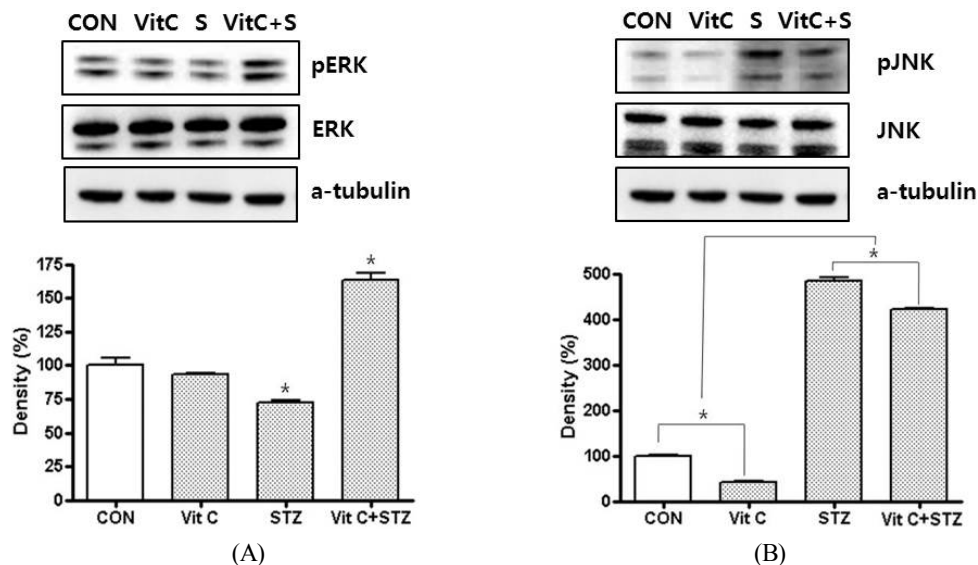
**Fig. 2. Protective effect of vitamin C against STZ-induced cell death in SH-SY5Y cells.** SH-SY5Y cells were pretreated with vitamin C for 30 min and then exposed to STZ for 24 h. (A) Cell viability was measured by CCK-8 assay. Data present mean±S.D. and are representative of three individual experiment ( $p<0.05$ ). (B) The morphology of SH-SY5Y cells with STZ and vitamin C treatment (magnification,  $\times 100$ ); CON(control): medium alone, Vit C (vitamin C): 100  $\mu$ M, STZ (streptozotocin): 2.5 mM, Vit C+ STZ (vitamin C 100  $\mu$ M + streptozotocin 2.5 mM).

비교 시 유의적으로 감소하였으나, 비타민 C 전처리군에서는 대조군과 비교 시 단백질 발현이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었으며(Fig. 3(A)), JNK의 인산화의 경우, 비타민 C 전처리군에서 단백질의 발현이 유의적으로 감소하였다(Fig. 3(B)).

#### 4. Bcl-2와 Bax의 발현 분석

세포자멸사는 크게 두 가지 경로로 진행이 되는데 외인

성 세포자멸사(extrinsic apoptosis)인 사멸수용체 경로(death receptor)와 내인성 세포자멸사(intrinsic apoptosis)인 미토콘드리아 경로가 있다(Wang & Youle 2009; Sayers TJ 2011). 외인성 경로는 외부에서 내부로 세포사멸 신호를 전달하는 경로이며, Tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  등이 사멸 수용체와 결합하여 caspase-3를 활성화 시켜 진행되고, 내인성 경로는 미토콘드리아에서 Bcl-2의 조절로 Bax가 외막에 구멍을 내어 cytochrome C가 방출되면서 caspase-9를 활성화시키고, 이차



**Fig. 3. Protective effect of vitamin C on MAPK signaling pathways.** Cells were untreated (control) or treated with 2.5  $\mu$ M STZ in the absence or presence of 100  $\mu$ M vitamin C for 6 hr. Western blot analysis was performed with pERK, ERK, pJNK and JNK antibodies. Expression of  $\alpha$ -tubulin was used as an internal control ( $p<0.05$ ); CON (control): medium alone, Vit C (vitamin C): 100  $\mu$ M, STZ (streptozotocin): 2.5 mM, Vit C+ STZ (vitamin C 100  $\mu$ M + streptozotocin 2.5 mM).

적으로 caspase-3를 활성화 시키면서 진행이 된다(Gross 등 1999; Degenhardt 등 2006). 이에 본 연구에서는 STZ으로 유도된 세포사멸에서 미토콘드리아 경로를 통한 세포사멸의 대표적 인자인 Bcl-2와 Bax의 단백질 발현이 비타민 C에 의해서 조절되는지 살펴보았다. 세포사멸을 촉진하는 Bax 단백질의 경우, STZ 처리군에서 대조군과 비교 시, 단백질 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 비타민 C 전처리에 의해 Bax 단백질의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4(A)). 또한, Bax의 작용을 억제시켜 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 발현은 비타민 C 처리군과 비타민 C 전처리군에서 각각 STZ군보다 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4(B)).

5. 산화스트레스 억제 효과

세포 내 활성산소를 과산화수소로 전환시켜 세포를 보호하는 대표적인 항산화 효소인 Sod-1(superoxide dismutase-1)의 발현을 살펴 보았다. 비타민 C를 단독 처리하였을 때 Sod-1의 발현이 대조군에 비하여 감소하는 것으로 나타났으며, STZ 처리군에서는 Sod-1의 발현이 변화되지 않았다. 하지만 비타민 C 전처리군에서는 대조군에 비하여 SOD-1 단백질의 발현이 30% 이상 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 비타민 C가 SOD-1의 발현을 증가시켜 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 것으로 사료된다(Fig. 5).

6. 스트렙토조토신에 의한 세포사멸

SH-SY5Y 신경세포에서 STZ에 의해 영향을 받는 세포사

멸 관련분자들을 알아보기 위하여 human apoptosis antibody array kit를 이용하여 35가지의 세포사멸 관련 단백질을 살펴보았다. 연구 결과, STZ 처리에 따라서 Cytochrome C, SMAC/Diablo(second mitochondria-driven activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI), TRAIL

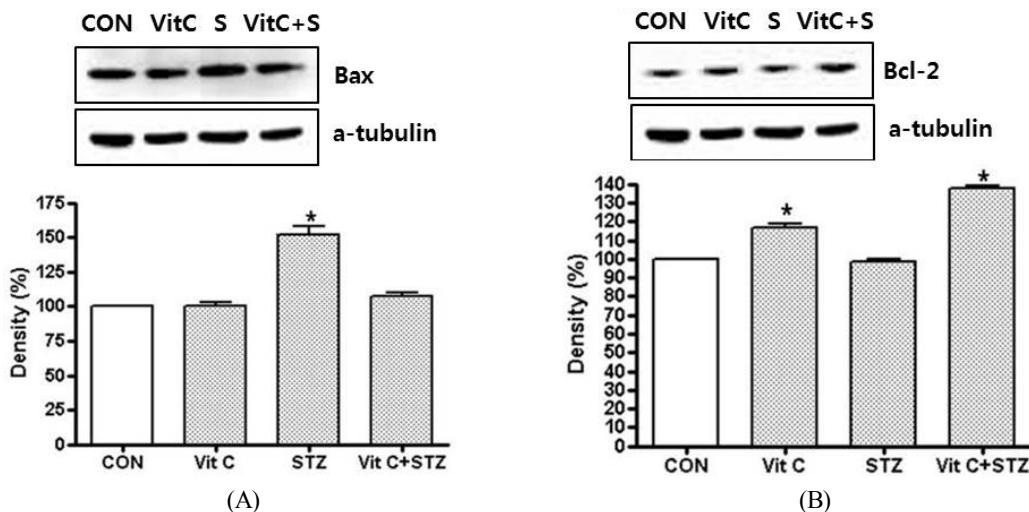


Fig. 4. Effect of vitamin C on STZ-induced alteration of Bcl-2 and Bax in SH-SY5Y cells. Cells were untreated (control) or treated with 2.5 μM STZ in the absence or presence of 100 μM vitamin C for 24 hr. Western blot analysis was performed with Bax and Bcl-2 antibodies. Expression of α-tubulin was used as an internal control (p<0.05); CON (control): medium alone, Vit C (vitamin C): 100 μM, STZ (streptozotocin): 2.5 mM, Vit C+ STZ (vitamin C + streptozotocin).

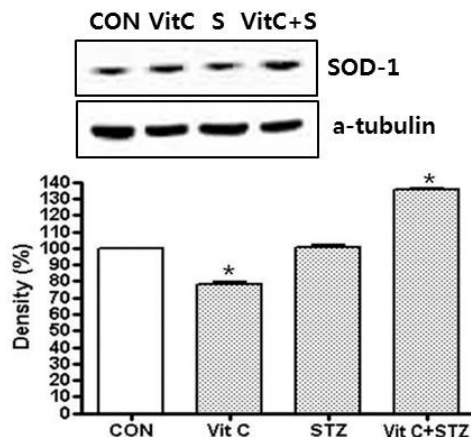


Fig. 5. Effect of vitamin C on Sod-1 protein expression by STZ-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells. Cells were untreated (control) or treated with 2.5 μM STZ in the absence or presence of 100 μM vitamin C for 24 hr. Western blot analysis was performed with Sod-1 antibody. Expression of α-tubulin was used as an internal control (p<0.05); CON (control): medium alone, Vit C (vitamin C): 100 μM, STZ (streptozotocin): 2.5 mM, Vit C+ STZ(vitamin C + streptozotocin).

R2/DR5(Tumor necrosis factor-related apoptosis-including ligand receptor 2, Death Receptor 5), HIF-1a(hypoxia inducible factor-1a), HSP-27(heat shock protein-27)의 증가가 나타나는 것으로 확인되었으며, 그 중 HSP-27과 SMAC/Diablo의 발현이 높은 경향을 보였다(Fig. 6).

본 연구결과로부터 STZ는 미토콘드리아 내부의 Cytochrome C와 pro-apoptotic protein인 SMAC/Diablo를 유출시키고, 외부의 Death receptor인 TRAIL R2/DR5를 통해 caspase의 활성을 증가시켜 세포사멸이 유도되며, 이는 외인성 및 내인성 양쪽 경로를 통하여 세포사멸이 이루어지는 것으로 사료된다. 또한, STZ 자극에 의해 활성산소가 증가되어 저산소적응 반응 단백질인 HIF-1a와 항스트레스 반응 인자인 HSP-27이 나타나는 것으로 확인됐으며, 이들은 스트레스 환경에 노출될 경우, 방어기전에 있어 중요한 역할을 하며, Hela 세포에 TNF- $\alpha$ 나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 적용으로 HSP-27이 증가하여 세포를 보호하는 역할을 한다는 연구 결과와 일치하는 것으로 나타났다(Park 등 2003).

## 요약 및 결론

알츠하이머병의 발병원인과 기전에 대하여 많은 연구가 진행되었으나, 아직까지 완전히 밝혀지지 않고 있다. 이에 본 연구에서는 STZ로 유도된 세포독성으로부터 노인성 질병의 예방과 항산화 효과로 잘 알려진 비타민 C를 이용하여 SH-SY5Y 신경세포 내 보호 기전을 살펴보고자 하였다.

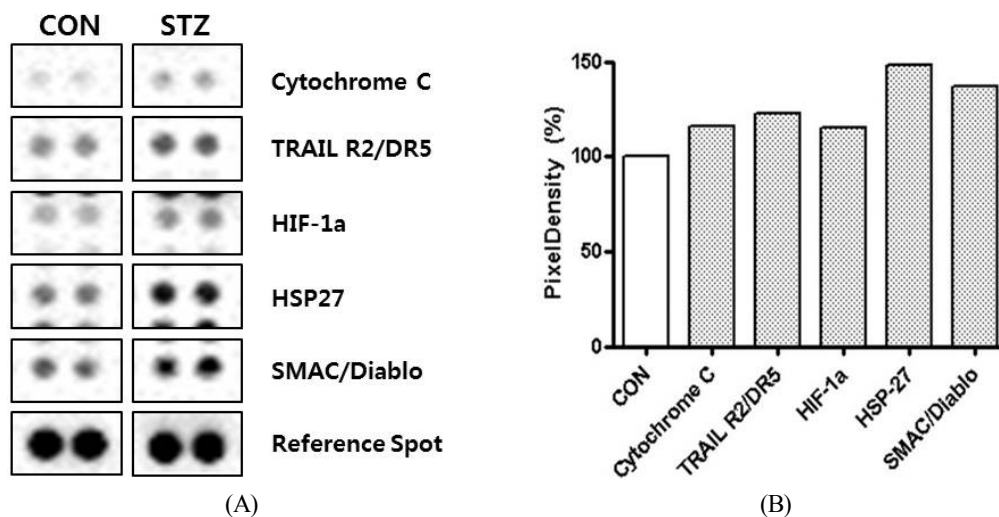
본 연구 결과에 의하면, STZ를 SH-SY5Y 신경세포에 처리하였을 때, 세포사멸이 유도되는 것을 확인하였으며, 비타민

C를 전처리함으로써 세포생존도가 증가하는 것을 확인하였다. 비타민 C가 신경세포를 보호하는 기전을 알아보기 위하여 세포자멸사 과정에서 신호전달을 통해 다양한 유전자를 발현시키는 MAPKs의 인산화를 살펴보았다. 비타민 C 처리 시 ERK의 인산화가 증가하며, 세포증식을 유도하는 것으로 확인하였으며, ERK와는 반대로 염증, 세포사멸과 관련된 JNK의 인산화는 비타민 C에 의해 인산화가 억제되는 것으로 확인되었다. 또한 STZ는 Bax 단백질의 발현 증가와 Bcl-2 단백질의 발현을 감소시켰으며, apoptosis antibody array로 확인한 결과, Cytochrome C가 유도됨을 확인하였다. 이뿐만 아니라, 비타민 C 처리에 의해 Bcl-2가 증가하여 세포사멸이 억제되는 것을 확인하였으며, 항산화 효소인 Sod-1의 발현을 증가하는 것 또한 확인하였다. 이는 비타민 C가 항산화 방어 체계를 강화시켜 STZ에 의한 세포손상을 보호하는 것으로 사료된다.

본 연구를 통하여 STZ로 유도된 SH-SY5Y 신경세포 손상에서 비타민 C가 여러 기전을 통하여 세포자멸사를 억제하여 세포를 보호하는 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 연구는 일부 기전들만을 확인한 것으로 추후 연구에서는 다양한 비타민 C의 농도 및 처리시간에 따른 기전의 차이를 분석하고, 실험동물을 통한 검증 및 스트렙토조토신에 의한 아밀로이드베타와 타우의 관련성을 확인하고자 한다.

## 감사의 글

이 연구는 2015년도 서울시 재원으로 보조금 지원을 받아 수행된 “SH-SY5Y 신경세포주를 이용한 노인성 치매에 관한



**Fig. 6. Expression of apoptosis-related proteins.** Cells were treated with or without 2.5 mM STZ for 24 h and analyzed by apoptosis antibody array.

연구”의 결과로, 이에 감사드립니다.

## References

- Cunnane S, Nugent S, Roy M, Courchesne-Loyer A, Croteau E, Tremblay S, Castellano A, Pifferi F, Bocti C, Paquet N, Begdouri H, Bentourkia M, Turcotte E, Allard M, Barberger-Gateau P, Fulop T, Rapoport SI. 2011. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition* 27:3-20
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10:51-64
- Du J, Cullen JJ, Buettner GR. 2012. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta* 1826:443-457
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. 1999. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13:1899-1911
- Heo HJ, Lee CY. 2005. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J Agric Food Chem* 53:1984-1989
- Hoyer S. 1993. Abnormalities in brain glucose utilization and its impact on cellular and molecular mechanisms in sporadic dementia of Alzheimer type. *Ann N Y Acad Sci* 695:77-80
- Hutton M, Pérez-Tur J, Hardy J. 1998. Genetics of Alzheimer's disease. *Essays Biochem* 33:117-131
- Jeong YS, Hwang BS, Cho SM, Hwang KA, Hwang IG. 2017. Antioxidant and anti-diabetic, anti-Alzheimer activities of stem from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* cultivated in Jeju at harvest time. *Korean J Food Nutr* 30:1332-1340
- Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. 1967. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 126:201-205
- Kim MO, Jang SM. 2004. Effects of various proteins on the autoxidation of L-ascorbic acid. *Korean J Food Nutr* 17:294-301
- Knott AB, Perkins G, Schwarzendacher R, Bossy-Wetzell E. 2008. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9:505-518
- Kwon KH, Lim HY, Chung MJ. 2014. Neuroprotective effects of bread containing *Cirsium setidens* or *Aster scaber*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43:829-835
- Masters CL, Beyreuther K. 2006. Alzheimer's centennial legacy: Prospects for rational therapeutic intervention targeting the A $\beta$  amyloid pathway. *Brain* 129:2823-2839
- Mattson MP, Partin J, Begley JG. 1998. Amyloid  $\beta$ -peptide induces apoptosis-related events in synapses and dendrites. *Brain Res* 807:167-176
- Park KJ, Gaynor RB, Kwak YT. 2003. Heat shock protein 27 association with the I $\kappa$ B kinase complex regulates tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 278:35272-35278
- Reynolds A, Lauriea C, Mosleya RL, Gendelmana HE. 2007. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol* 82:297-325
- Sayers TJ. 2011. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 60:1173-1180
- Sisodia SS. 1999. Alzheimer's disease: Perspectives for the new millennium. *J Clin Invest* 104:1169-1170
- Sotiriou S, Gispert S, Cheng J, Wang Y, Chen A, Hoogstraten-Miller S, Miller GF, Kwon O, Levine M, Guttentag SH, Nussbaum RL. 2002. Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nat Med* 8:514-517
- Stanciu M, Wang Y, Kentor R, Burke N, Watkins S, Kress G, Reynolds I, Klann E, Angiolieri MR, Johnson JW, DeFranco DB. 2000. Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J Biol Chem* 275:12200-12206
- Wang C, Youle RJ. 2009. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet* 43:95-118
- Wohaieb SA, Godin DV. 1987. Starvation-related alterations in free radical tissue defense mechanisms in rats. *Diabetes* 36:169-173
- Younkin SG. 1998. The role of A $\beta$ 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris* 92:289-292
- Zheng S, Zhao M, Ren Y, Wu Y, Yang J. 2015. Sesamin suppresses STZ induced INS-1 cell apoptosis through inhibition of NF- $\kappa$ B activation and regulation of Bcl-2 family protein expression. *Eur J Pharmacol* 750:52-58

Received 24 March, 2018

Revised 14 June, 2018

Accepted 09 July, 2018