

## Research Article



### OPEN ACCESS

**Received:** Nov 15, 2021

**Revised:** Dec 10, 2021

**Accepted:** Dec 16, 2021

#### Correspondence to

**Jeong-sook Choe**

Functional Food & Nutrition Division,  
Department of Agrofood Resources,  
National Institute of Agricultural Science,  
Rural Development Administration, 166  
Nongsaeangmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju  
55365, Korea.


Tel: +82-63-238-3690

E-mail: swany@korea.kr


© 2021 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.


#### ORCID iDs

Hee Sun Yang 

<https://orcid.org/0000-0003-1916-1907>

Mi Jin Kim 

<https://orcid.org/0000-0002-2173-6426>

Mina Kim 

<https://orcid.org/0000-0002-7832-9880>

Jeong-sook Choe 

<https://orcid.org/0000-0002-2380-0591>

#### Funding

This work was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development (project No. PJ01511502)” Rural Development Administration, Republic of Korea.

<https://e-jnh.org>

# 고초균에 의한 생강 발효 추출물의 신경세포 보호 효과

양희선 , 김미진 , 김민아 , 최정숙 

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

## Neuroprotective effect of fermented ginger extracts by *Bacillus subtilis* in SH-SY5Y cells

Hee Sun Yang , Mi Jin Kim , Mina Kim , and Jeong-sook Choe 

Functional Food & Nutrition Division, Department of Agrofood Resources, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

### ABSTRACT

**Purpose:** The ginger rhizome (*Zingiber officinale*) is widely cultivated as a spice for its aromatic and pungent components. One of its constituents, 6-hydroxydopamine (6-OHDA) is usually thought to cross the cell membrane through dopamine uptake transporters, and induce inhibition of mitochondrial respiration and the generation of intracellular reactive oxygen species (ROS). This study examines the neuroprotective effect and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity of fermented ginger extracts (FGEs) on 6-OHDA induced toxicity in SH-SY5Y human neuroblastoma cells.

**Methods:** Ginger was fermented using 2 species of *Bacillus subtilis*, with or without enzyme pretreatment. Each sample was extracted with 70% ethanol. Neurotoxicity was assessed by applying the EZ-Cytox cell viability assay and by measuring lactic dehydrogenase (LDH) release. Morphological changes of apoptotic cell nuclei were observed by Hoechst staining. Cell growth and apoptosis of SH-SY5Y cells were determined by Western blotting and enzyme activity analysis of caspase-3, and AChE enzymatic activity was determined by the colorimetric assay.

**Results:** In terms of cell viability and LDH release, exposure to FGE showed neuroprotective activities against 6-OHDA stimulated stress in SH-SY5Y cells. Furthermore, FGE reduced the 6-OHDA-induced apoptosis, as determined by Hoechst staining. The occurrence of apoptosis in 6-OHDA treated cells was confirmed by determining the caspase-3 activity. Exposure to 6-OHDA resulted in increased caspase-3 activity of SH-SY5Y cells, as compared to the unexposed group. However, pre-treatment with FGE inhibited the activity of caspase-3. The neuroprotective effects of FGE were also found to be caspase-dependent, based on reduction of caspase-3 activity. Exposure to FGE also inhibited the activity of AChE induced by 6-OHDA, in a dose-dependent manner.

**Conclusion:** Taken together, our results show that FGE exhibits a neuroprotective effect in 6-OHDA treated SH-SY5Y cells, thereby making it a potential novel agent for the prevention or treatment of neurodegenerative disease.

**Keywords:** *Zingiber officinale*, neuroprotective effect, fermentation, 6-hydroxydopamine

**Conflict of Interest**

There are no financial or other issues that might lead to conflict of interest.

**서론**

최근 생활 수준의 향상과 의학의 발달로 개인의 평균 수명이 크게 증가되고 있다. 그러나 노령화 사회에 접어들면서 노화에 따른 각종 퇴행성 질환, 특히 치매, 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌신경 질환의 발생이 크게 증가함에 따라 전 세계적으로 메카니즘 규명과 치료제 개발에 많은 연구가 진행되고 있다 [1,2]. 파킨슨병은 중뇌의 흑색질 (substantia nigra)에 분포하는 도파민성 뉴런의 선택적 퇴행 변화를 일으키는 대표적인 신경계 질환 가운데 하나로 안정 시 진전 (resting tremor), 경직 (rigidity), 서동 (bradykinesia)과 같은 운동장애 및 변비, 우울, 수면장애, 기억 장애와 같은 비운동 장애를 동반한다 [3]. 파킨슨병의 주요 발병 원인은 확실하게 밝혀지지 않았지만, 노화, 미토콘드리아의 기능 이상, 산화적 스트레스 증가로 인한 세포자멸 (apoptosis)과 관련 있는 것으로 알려져 왔다 [4,5].

파킨슨병 실험 모델 유도에 광범위하게 사용되고 있는 6-hydroxydopamine (6-OHDA)은 카테콜아민성 신경독소이다. 6-OHDA 처리시 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 생성, 칼슘 항상성 교란 및 미토콘드리아 기능 억제를 통해 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 보고되었다 [6]. 또한 실험적으로 중뇌 흑색질 혹은 선조체에 6-OHDA를 투여하면 도파민성 뉴런의 손상을 야기할 수 있는데, 이는 초기 단계의 파킨슨병과 유사한 증상을 나타낸다 [7,8].

생강 (*Zingiber officinale*)은 생강과에 속하는 다년생 허브작물로 인도, 말레이시아 등 아열대 원산의 초본식물 중 하나이다. 근경은 특유의 맛과 향을 가지고 있어 식용, 약용 또는 화장품 용으로 널리 사용되고 있다 [9]. 생강의 주요 성분으로는 탄화수소류 (hydrocarbons), 케톤류 (ketones) 등의 증류 성분과 진저베렌 (zingiberene), 카디넨 (cadinene) 등의 향기 성분, 그리고 진지베롤 (zingiberol) 등의 정유 성분이 확인되었다 [10,11]. 특히 정유 성분 중 생강의 매운맛 성분인 진저롤 (gingerol), 진저론 (zingerone) 및 쇼가올 (shogaol) 등이 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다 [12-14]. 생강은 주로 식품의 부재료로 사용되고 있지만, 최적 저장 조건인 온도 10-15°C, 상대습도 80-90%에서도 장기간 생강을 저장·유통하는 것은 매우 어려운 실정이다 [15]. 또한 생강의 자극적인 향과 맛으로 인해 생강을 직접 섭취하거나 가공식품 소재로 사용하기에 제한적이거나 불편함이 있는 것이 사실이다. 이와 관련한 연구로는 유산균 균주를 사용하여 발효시킨 생강의 품질특성 [16]과 생리활성 [9,17], 고압과 효소처리 기술을 적용해 생강의 유용성분 파괴를 최소화하고 수용화하여 생강 추출물의 품질 개선 [18,19], 흑생강 제조 후 이를 이용한 음료 개발 [20]에 관한 보고 등이 있다. 그러나 아직 생강의 발효에 대한 연구는 미흡한 상태이며 특히, 효소처리와 발효를 동시에 진행한 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이다.

따라서 본 실험에서는 생강을 효소처리하여 수용화율을 높인 후 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*, 고초균) 균주를 이용하여 발효시킨 생강발효물을 제조하고 70% 발효 주정을 가하여 추출하였다. 이를 사람의 신경모세포종인 SH-SY5Y에 6-OHDA와 함께 처리하여 세포 보호 효과를 평가하고 건강기능식품 소재로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

## 연구방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 생강은 전라북도 완주군에서 재배한 분말 상태의 봉동생강을 구입하여 사용하였다. 효소 (pectinex, termamyl)는 Novozymes (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)의 제품을 구입하여 사용하였다. 고초균 균주는 한국농업미생물자원센터 (Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양 받아 사용하였다.

### 균주선발

시료의 발효를 위해 사용된 고초균은 표준균주 2균주, 식물 및 한국 전통 발효식품에서 분리한 45균주를 스크리닝하여 선발하였다. 즉, 생강을 효소처리하여 여과한 후 동량의 증류수로 희석하고 10% 고초균 균현탁액을 접종 및 발효 (30°C, 48시간) 하였다. 발효 종료 후 배양액은 현탁하고 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생육이 가장 우수한 고초균 균주로 표준균주인 KACC 10854 (*B. subtilis* KACC 10854, BK)와 청국장 유래 균주인 CMIN-4 (*B. subtilis* CMIN-4, BC)를 선발하였다 (data not shown).

### 생강발효물 제조

본 실험에 사용된 생강 발효물 (fermented ginger extracts, FGEs)의 제조를 위해서 먼저 생강 분말에 pectinex 1% (w/w) 농도로 첨가하여 50°C, 2시간 교반 한 후 1% (w/w) 농도로 termamyl을 첨가하여 93°C, 1시간 교반하였다. 반응을 종료하고 100°C에서 5분동안 효소를 불활성화시킨 후 원심분리 (3,000 rpm, 15분)하여 상층액을 감압여과하였다 [18]. 여과액 (enzyme treatment filtrate, EF)에 동량의 증류수를 넣고 희석한 다음 1% (v/v) 고초균 2종 (BK, BC)을 각각 접종하여 30°C, 48시간 발효하였다. 각 시료는 멸균 후 동결건조하고 균일하게 분쇄하여 추출 시료로 사용하였다. 각 건조시료 1 g에 중량 대비 20배의 70% 발효주정을 가하여 30°C에서 30분씩 2회 초음파 추출하였다. 각 추출물은 여과하고 감압농축한 후 동결건조하여 -20°C에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

### 세포 배양

본 실험에 사용된 인체 신경모세포종인 SH-SY5Y 세포는 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank)으로부터 분양받아 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (Gibco, Waltham, MA, USA)와 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (HyClone, Loran, UT, USA) 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 37°C로 배양하였다. 세포 밀도가 80% 이상으로 포화되었을 때 trypsin-EDTA (Invitrogen)를 처리하여 계대배양하며 실험에 사용하였다.

### 세포 생존율

세포 생존율은 Ez-Cytox cell viability assay kit (DAEIL Lab, Seoul, Korea)를 사용하였으며, 제조사에서 권장하는 실험 방법에 따라 측정하였다. SH-SY5Y 세포를 96 well plate에 최종 농도 5 × 10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 분주한 뒤 24시간 배양하였다. FGE by BK (BKG), FGE by BK using EF (E/BKG), FGE by BC (BCG) 그리고 FGE by BC using EF (E/BCG)를 농도별 (0-400 µg/mL)로 처리하고 24시간 배양하여 세포생존율을 확인하였다. 자극원으로 사용된 6-OHDA

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 적정 농도를 확인하기 위해 농도별 (0–200  $\mu\text{M}$ )로 처리하고 24시간 배양하여 세포생존율을 확인하였다. 6-OHDA 자극에 대한 FGE의 신경세포 보호 활성을 평가하기 위해 BKG, E/BKG, BCG 그리고 E/BCG를 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하고 1시간 후 100  $\mu\text{M}$  6-OHDA를 첨가하여 24시간 배양하였다. 또한 pan-caspase 저해제인 z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone (z-VAD-fmk; Sigma-Aldrich)와의 활성을 비교하기 위해 20  $\mu\text{M}$  z-VAD-fmk를 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도의 E/BKG와 E/BCG와 동시에 처리하고 1시간 후 100  $\mu\text{M}$  6-OHDA를 첨가하여 24시간 배양하였다. 각 실험은 반응 종료 후 Ez-Cytox 시약 20  $\mu\text{L}$ 를 넣어 3시간 동안 반응시키고 microplate reader (Tecan)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 생존율로 나타내었다. 활성 비교를 위하여 양성대조군으로 도네페질 (Donepezil, Sigma-Aldrich)을 사용하였다.

### Lactic dehydrogenase (LDH) 농도 측정

LDH 농도 측정은 LDH activity assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 제조사에서 권장하는 실험 방법에 따라서 측정하였다. SH-SY5Y 세포를 96 well plate에 최종 농도  $5 \times 10^4$  cells/well가 되도록 분주한 뒤 24시간 배양하였다. BKG, E/BKG, BCG 그리고 E/BCG를 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하고 1시간 후 100  $\mu\text{M}$  6-OHDA를 첨가하여 24시간 배양하였다. 반응 종료 후 배양액 50  $\mu\text{L}$ 를 새로운 96 well plate에 옮기고, LDH reaction mixture를 제조하여 50  $\mu\text{L}$  혼합 후 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응종료액 50  $\mu\text{L}$ 를 첨가한 후 microplate reader (Tecan)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성 비교를 위하여 양성대조군으로 도네페질 (Sigma-Aldrich)을 처리한 세포를 사용하였다.

### Caspase-3 활성

Caspase-3 활성 평가는 caspase-3 active ELISA kit (Invitrogen)를 이용하였으며, 제조사에서 권장하는 실험 방법에 따라 측정하였다. SH-SY5Y 세포를 6 well plate에 최종 농도  $2 \times 10^6$  cells/well이 되도록 분주한 뒤 24시간 배양하였다. BKG, E/BKG, BCG 그리고 E/BCG를 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하고 1시간 후 100  $\mu\text{M}$  6-OHDA를 첨가하여 24시간 배양하였다. 반응 종료 후 세포를 수거하여 lysis buffer (BioVision, Milpitas, CA, USA)로 용해한 후 효소활성 평가를 위한 시료로 사용하였다. 단백질 정량 (Thermo Fisher Scientific) 후 96 well plate에 100  $\mu\text{L}$  시료를 넣어 실온에서 2시간 반응시킨 후 세척하였다. 100  $\mu\text{L}$  caspase-3 검출항체를 넣고 실온에서 1시간 반응시킨 후 세척하였다. 100  $\mu\text{L}$  anti-rabbit IgG HRP를 넣고 실온에서 30분 반응시킨 후 세척하였다. 100  $\mu\text{L}$  기질용액을 넣어 실온에서 30분 반응시킨 후 100  $\mu\text{L}$  반응종료액을 첨가하여 반응을 종료하고 microplate reader (Tecan)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Assay kit 내 caspase-3 표준용액으로 얻은 표준곡선을 이용하여 caspase-3 활성을 평가하였다. 활성 비교를 위하여 양성대조군으로 도네페질 (Sigma-Aldrich)을 처리한 세포를 사용하였다.

### Hoechst 형광염색

SH-SY5Y 세포를 6 well plate에 최종 농도  $2 \times 10^6$  cells/well이 되도록 분주한 뒤 24시간 배양하였다. BKG, E/BKG, BCG 그리고 E/BCG를 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하고 1시간 후 100  $\mu\text{M}$  6-OHDA를 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 세척하고 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific) 용액을 처리하여 15분간 반응시켰다. 반응 종료 후 세척된 세포는 형광현미경 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 이용하여 형광도를 비교하였다.

### 단백질 분리 및 Western blot analysis

SH-SY5Y 세포를 6 well plate에 최종 농도  $2 \times 10^6$  cells/well이 되도록 분주한 뒤 24시간 배양하였다. BKG, E/BKG, BCG 그리고 E/BCG를 100 µg/mL의 농도로 처리하고 1시간 후 100 µM 6-OHDA 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 세척하고 protease inhibitor (Thermo Fisher Scientific)가 첨가된 RIPA lysis buffer (Thermo Fisher Scientific)를 첨가하여 얼음에서 15분 반응시켰으며, 15,000 rpm, 4°C, 15분 원심분리하여 상층액에 있는 단백질을 분리하였다. 단백질 정량시약 (Thermo Fisher Scientific)으로 단백질을 정량한 다음, sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)와 혼합하여 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel (Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 전기영동한 후, polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad Laboratories)으로 이동시켰다. 각각의 membrane을 5% skim milk를 실온에서 1시간 처리하여 비특이적인 단백질에 대해 차단시켰으며, 1차 항체는 anti-caspase-3 (1:500, sc56053; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 anti-actin (1:1,000, sc47778; Santa Cruz Biotechnology)을 사용하여 4°C에서 24시간 반응시켰다. 2차 항체 (1:5,000, sc516102; Santa Cruz Biotechnology)는 실온에서 1시간 반응시킨 후 각 membrane을 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Bio-Rad Laboratories)을 적용시킨 다음 이미지 장치 (Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 특정 단백질의 발현을 분석하였다. 각각의 밴드는 Image® software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 정량화 하였으며, actin은 internal control로 사용하였다. 단백질 발현 비교를 위하여 양성대조군으로 도네페질 (Sigma-Aldrich)처리한 세포의 단백질을 사용하였다.

### Acetylcholinesterase (AChE) 활성

AChE 활성평가는 AChE assay kit (Abcam Biotechnology, Cambridge, MA, USA)를 사용하였으며, 제조사에서 권장하는 실험 방법에 따라 측정하였다. SH-SY5Y 세포를 96 well plate에 최종 농도  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주한 뒤 24시간 배양하였다. BKG, E/BKG, BCG 그리고 E/BCG를 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하고 1시간 후 100 µM 6-OHDA를 첨가하여 24시간 배양하였다. 반응 종료 후 세포를 lysis buffer (BioVision)로 용해한 후 AChE 활성 평가를 위한 시료로 사용하였다. 단백질 정량 (Thermo Fisher Scientific) 후 96 well plate에 50 µL 시료와 AChE reaction mixture 50 µL를 혼합하고 실온에서 30분 반응시킨 후 microplate reader (Tecan)를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Assay kit 내 AChE 표준용액으로 얻은 표준곡선을 이용하여 AChE 활성을 평가하였다. 활성 비교를 위하여 양성대조군으로 도네페질 (Sigma-Aldrich)을 사용하였다.

### 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 SPSS 통계프로그램 (Statistical Package for the Social Science, ver. 12.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균 (mean) ± 표준편차 (SD)로 나타냈다. 각 실험군의 분석 항목별 통계적 유의성은 Student's t-test로  $p < 0.05$  수준에서 비교하였다.

## 결과

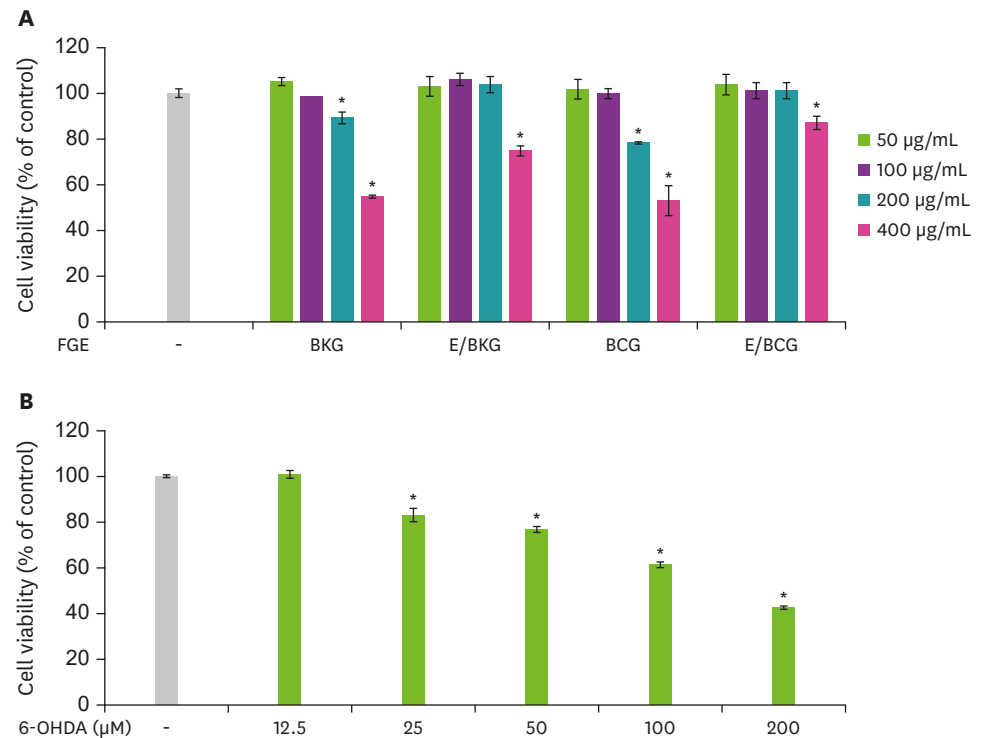
### 신경세포 생존율에 미치는 영향

생강발효물 (FGE)이 신경세포 생존에 영향을 미치는지 확인하기 위해 각 시료를 농도별로 (0-400 µg/mL) 처리하고 24시간 반응 후 세포 생존율을 대조군과 비교하였다. 효소 처리하지 않고 고초균 표준균주로 발효한 생강발효물 (BKG)과 청국장 유래 고초균 선발균주로 발효한

생강발효물 (BCG)은 200 µg/mL 이상의 농도에서, 효소 처리 후 고초균으로 발효한 생강발효물 (E/BKG, E/BCG)은 400 µg/mL 이상의 농도에서 대조군과 비교하여 유의적인 세포 독성을 나타냈다. 생강에 효소 처리를 하고 고초균을 이용하여 발효할 경우, 신경세포를 자극하는 독성이 완화되고 신경세포 생육에 유리한 조건이 형성되는 것으로 확인되었다 (Fig. 1A). 이에 신경세포 보호 효과 평가를 위한 FGE는 100 µg/mL 이하의 농도에서 진행하기로 하였다. 또한 신경세포 자극을 위한 6-OHDA 처리 농도를 결정하기 위해 6-OHDA를 농도별로 (0-200 µM) 처리하고 24시간 반응 후 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, 100 µM 농도에서 대조군과 비교하여 40% 이상 세포 생존율이 감소하였다 (Fig. 1B). 이에 본 연구에서는 100 µM 6-OHDA를 처리하여 신경세포를 자극하고 FGE의 세포 보호 효과를 확인하고자 하였다.

### 신경세포 보호 효과

6-OHDA에 의한 독성으로부터 FGE의 신경세포 보호 효과를 평가하였다. 6-OHDA 처리군은 대조군과 비교하여 세포 생존율이 59%로 감소하였고, 6-OHDA 자극 후 양성대조군으로 사용한 도네페질은 86% 이상으로 세포 생존율을 증가시켰다. 6-OHDA 자극된 신경세포에서 FGE를 처리한 모든 실험군에서 세포 생존율이 유의적으로 증가하였다. 시료 간의 활성 차이를 비교하였을 때, 100 µg/mL 농도에서 BKG와 BCG (73-74%)보다 E/BKG와 E/BCG의 세포 생



**Fig. 1.** Effect of FGE and 6-OHDA on viability of SH-SY5Y cells. (A) SH-SY5Y cells were treated with FGE at various concentrations for 24 hours. (B) SH-SY5Y cells were treated with 6-OHDA at various concentrations for 24 hours. Cell viability was tested using EZ-Cytox cell viability assay. Data are presented as the mean ± SD of 3 independent experiments. Statistical significance of the differences was evaluated by Student's t-test.

6-OHDA, 6-hydroxydopamine; KACC 10854, *B. subtilis* standard strain; CMIN-4, *B. subtilis* isolated from Cheonggukjang; BKG, fermented ginger extract by *B. subtilis* KACC 10854; E/BKG, fermented ginger extract by *B. subtilis* KACC 10854 after enzyme treatment filtrate; BCG, fermented ginger extract by *B. subtilis* CMIN-4; E/BCG, fermented ginger extract by *B. subtilis* CMIN-4 after enzyme treatment filtrate.

\*p < 0.05 compared with the control (none) group.

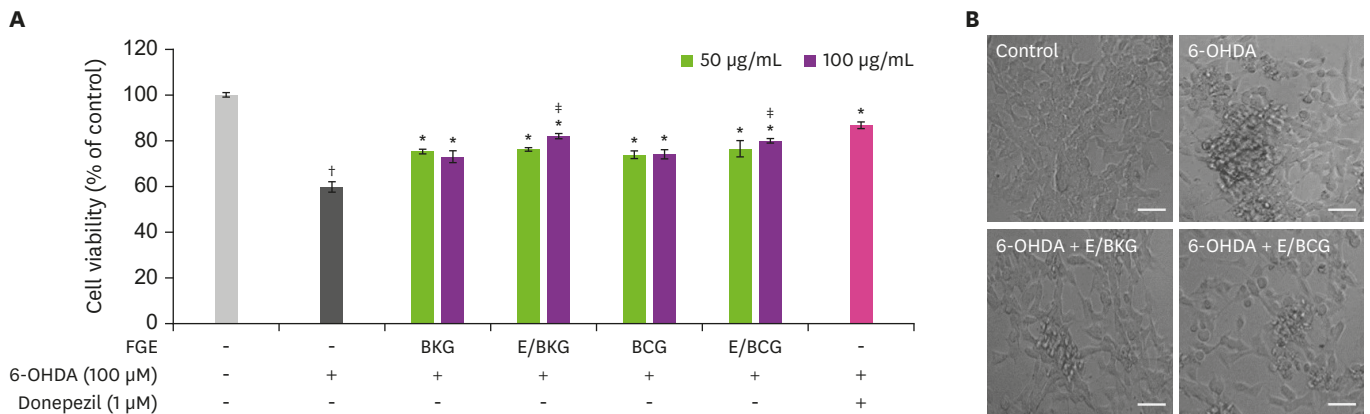
존율 (80–82%)이 유의적으로 크게 나타났다. 그러나 발효에 사용된 고초균 2종의 신경세포 보호 효과는 유사하였으며 처리군간 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2A). 형태학적인 관찰에서도 대조군과 비교하여 6-OHDA 처리군은 정상적인 성장이 이루어지지 않고 세포막이 손상되거나 한데 엉켜 뭉쳐 있었고 일부는 플레이트 바닥에서 떨어진 것을 확인할 수 있었다. 그러나 E/BKG, E/BCG를 100 µg/mL 농도로 처리하였을 때 세포 손상이 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2B).

**LDH 농도 측정**

LDH 농도를 측정함으로써 FGE가 6-OHDA 자극으로부터 신경세포의 세포막을 보호할 수 있는지 확인하였다. 6-OHDA 처리군은 대조군과 비교하여 LDH 농도가 186%로 증가하였고 6-OHDA 자극 후 양성대조군으로 사용한 도네페질은 131% 이하로 LDH 농도를 감소시켰다. 6-OHDA 자극된 신경세포에서 FGE를 처리한 모든 실험군에서 농도의존적으로 LDH 농도가 감소였다. 시료 간의 활성 차이를 비교하였을 때, 100 µg/mL 농도에서 BKG와 BCG (136–134%) 보다 E/BKG와 E/BCG의 LDH 농도 (122–116%)가 유의적으로 감소하였다. 그러나 발효에 사용된 고초균 2종의 신경세포 보호 효과는 유사하였으며 처리군간 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3).

**세포자멸 억제 활성**

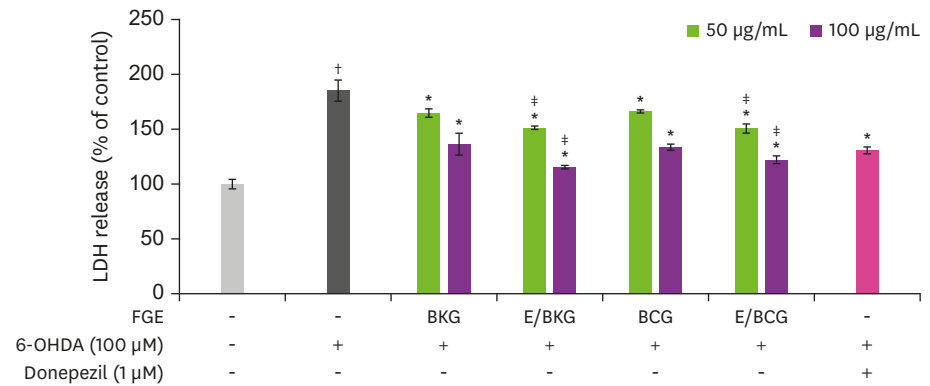
FGE의 신경세포 보호 효과가 6-OHDA 처리로 유발된 세포자멸 (apoptosis) 억제와 관련성이 있는지 확인하였다. 먼저 전형적인 세포자멸이 발생한 세포의 핵에서 특이적으로 관찰되는 자멸체 (apoptotic body) 형성 여부를 hoechst 염색을 통하여 확인하였다. 대조군의 경우에는 핵의 모양이 일정하고 둥글게 염색되어 관찰되는 반면, 6-OHDA 처리군에서는 핵의 수축 및 자멸체의 증가가 관찰되었다. 그러나 E/BKG와 E/BCG를 100 µg/mL 농도로 처리하였을



**Fig. 2.** Protective effect of FGE against 6-OHDA-stimulated cytotoxicity in SH-SY5Y cells. (A) SH-SY5Y cells were treated with 100 µM 6-OHDA for 24 hours after pre-treatment with or without FGE for 1 hour. Cell viability was tested using EZ-Cytox cell viability assay. Data are presented as the mean ± SD of 3 independent experiments. Statistical significance of the differences was evaluated by Student’s t-test. (B) SH-SY5Y cells were treated with 100 µM 6-OHDA for 24 hours after pre-treatment with or without 100 µg/mL E/BKG and E/BCG for 1 hour. The morphological images were obtained by a phase-contrast microscope (magnification 200×, scale bar 50 µm). These images are representative of at least 3 independent experiments. Donepezil used as a positive control at a concentration of 1 µM. Samples are the same as Fig. 1.

6-OHDA, 6-hydroxydopamine; FGE, fermented ginger extract; KACC 10854, *B. subtilis* standard strain; CMIN-4, *B. subtilis* isolated from Cheonggukjang; BKG, fermented ginger extract by *B. subtilis* KACC 10854; E/BKG, fermented ginger extract by *B. subtilis* KACC 10854 after enzyme treatment filtrate; BCG, fermented ginger extract by *B. subtilis* CMIN-4; E/BCG, fermented ginger extract by *B. subtilis* CMIN-4 after enzyme treatment filtrate.

\*p < 0.05 compared with the 6-OHDA treated group; †p < 0.01 compared with the control (none) group; ‡p < 0.05 compared with the enzyme treated group at the same concentration.



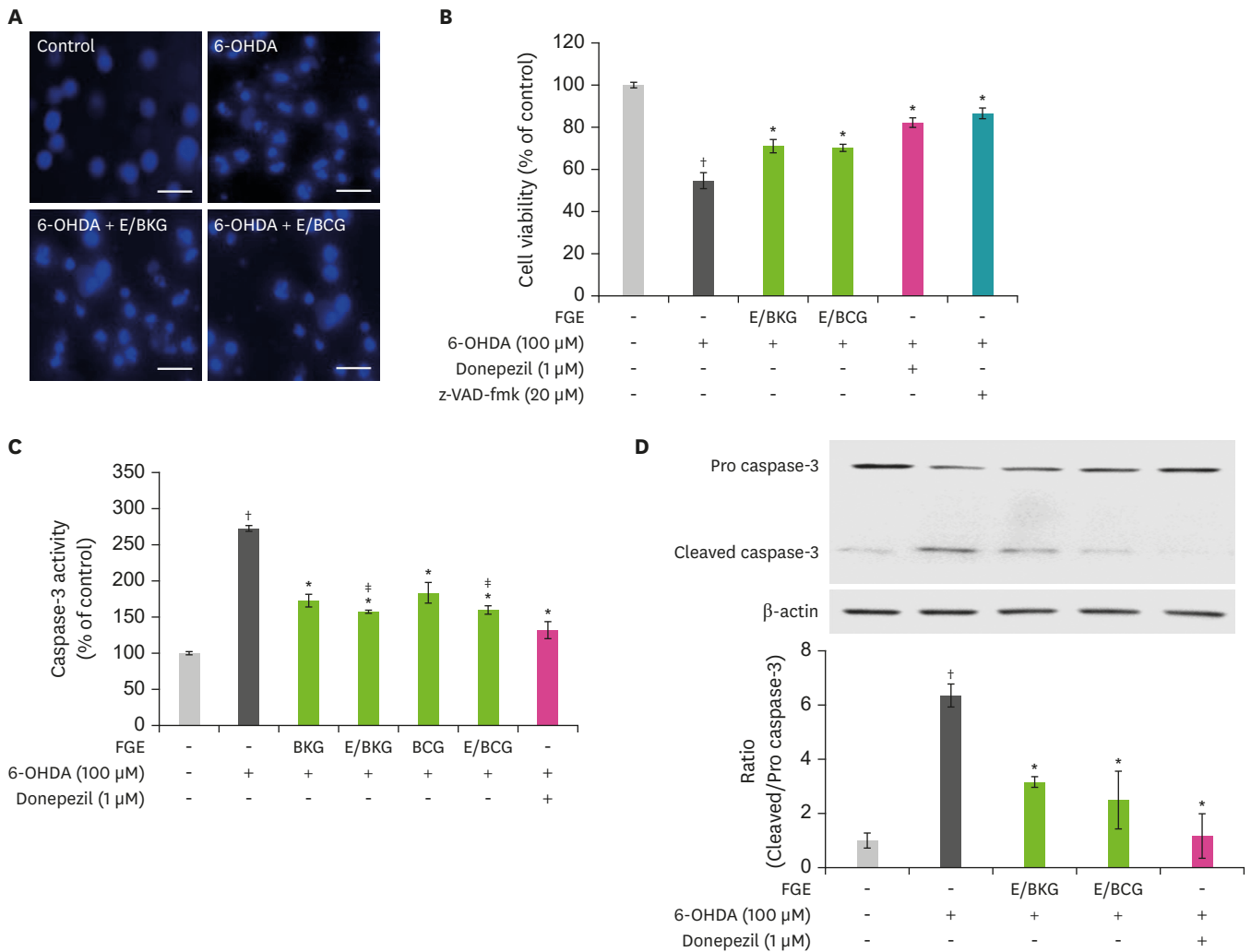
**Fig. 3.** Protective effect of FGE against 6-OHDA-stimulated LDH release in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were treated with 100 µM 6-OHDA for 24 hours after pre-treatment with or without FGE for 1 hour. LDH concentration was assessed by LDH cytotoxicity assay kit. Data are presented as the mean ± SD of 3 independent experiments. Statistical significance of the differences was evaluated by Student's t-test. Donepezil used as a positive control at a concentration of 1 µM. Samples are the same as Fig. 1. 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; FGE, fermented ginger extract; LDH, lactic dehydrogenase; KACC 10854, *B. subtilis* standard strain; CMIN-4, *B. subtilis* isolated from Cheonggukjang; BKG, fermented ginger extract by *B. subtilis* KACC 10854; E/BKG, fermented ginger extract by *B. subtilis* KACC 10854 after enzyme treatment filtrate; BCG, fermented ginger extract by *B. subtilis* CMIN-4; E/BCG, fermented ginger extract by *B. subtilis* CMIN-4 after enzyme treatment filtrate. \*p < 0.05 compared with the 6-OHDA treated group; †p < 0.01 compared with the control (none) group; ‡p < 0.05 compared with the enzyme treated group at the same concentration.

때 세포의 핵 손상이 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4A). 또한 6-OHDA 처리로 유발된 세포자멸에 대하여 FGE의 신경세포 보호 효과가 caspase 활성화와 관련하는지 확인하기 위해 pan-caspase 저해제인 z-VAD-fmk와의 활성을 비교하였다. 6-OHDA 처리군은 대조군과 비교하여 세포 생존율이 54%로 감소하였고 z-VAD-fmk처리군은 86%, 양성대조군으로 사용한 donepezil은 82% 이상으로 세포 생존율을 증가시켰다. E/BKG와 E/BCG 처리군은 각각 71%, 70% 이상으로 세포 생존율을 증가시켰다 (Fig. 4B). Caspase 중 세포의 생존을 결정하는 caspase-3 활성을 평가 한 결과, 6-OHDA 처리군은 대조군과 비교하여 caspase-3 활성이 272%로 증가하였고 6-OHDA 자극 후 양성대조군으로 사용한 donepezil은 134% 이하로 caspase-3 활성을 감소시켰다. 6-OHDA 자극된 신경세포에서 FGE를 처리한 모든 실험군에서 caspase-3 활성이 감소하였다. 100 µg/mL 농도에서 BKG와 BCG (173-183%)보다 E/BKG와 E/BCG의 caspase-3 활성 (157-160%)이 유의적으로 감소하였다. 그러나 발효에 사용된 고초균 2종의 caspase-3 활성은 유사하였으며 처리군 간 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4C). 6-OHDA 자극 후 caspase-3 억제활성이 우수한 시료인 E/BKG와 E/BCG를 100 µg/mL의 농도로 처리하여 caspase-3 단백질 변화를 확인하였다. 대조군과 비교하여 6-OHDA 처리로 증가한 cleaved/total caspase-3 ratio가 E/BKG와 E/BCG를 처리한 실험군에서 감소하였다 (Fig. 4D).

**AChE 활성**

6-OHDA 자극에 대하여 FGE가 AChE의 활성을 억제할 수 있는지 확인하였다. 6-OHDA 처리군은 대조군과 비교하여 6-OHDA의 활성이 370% 이상 증가하였고, 6-OHDA 자극 후 양성대조군으로 사용한 도네페질은 161%로 AChE 활성을 감소시켰다. 6-OHDA로 자극된 신경세포에서 FGE를 처리한 모든 실험군은 AChE의 활성을 유의적으로 감소시켰다 (261-323%). 시료 간의 활성 차이를 비교하였을 때 BKG와 BCG (293-323%)보다 E/BKG와 E/BCG의 AChE 저해활성 (261-296%)이 유의적으로 크게 나타났다. 그러나 발효에 사용된 고초균 2종의 AChE 저해활성에는 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 5).

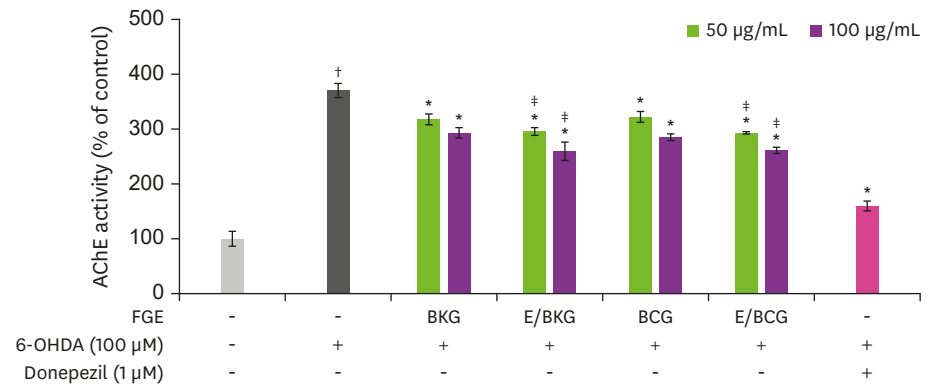




**Fig. 4.** Inhibitory effects of FGE against 6-OHDA-stimulated apoptosis in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were treated with 100  $\mu$ M 6-OHDA for 24 hours after pre-treatment with or without 100  $\mu$ g/mL FGE for 1 hour. (A) The morphological images were obtained by a fluorescence microscope after hoechst staining (magnification 400 $\times$ , scale bar 50  $\mu$ m). These images are representative of at least 3 independent experiments. (B) Activation of FGE was confirmed using z-VAD-fmk. SH-SY5Y cells were treated with 100  $\mu$ M 6-OHDA for 24 hours after pre-treatment with FGE or 20  $\mu$ M z-VAD-fmk for 1 hour. Cell viability was tested using EZ-Cytox cell viability assay. (C) Caspase-3 activation was tested using caspase-3 activity assay kit. (D) Western blot analysis of the caspase-3 activation protein expression.  $\beta$ -actin was used as a control. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments. Statistical significance of the differences was evaluated by Student's t-test. Donepezil used as a positive control at a concentration of 1  $\mu$ M. Samples are the same as Fig. 1. 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; FGE, fermented ginger extract; KACC 10854, *B. subtilis* standard strain; CMIN-4, *B. subtilis* isolated from Cheonggukjang; BKG, fermented ginger extract by *B. subtilis* KACC 10854; E/BKG, fermented ginger extract by *B. subtilis* KACC 10854 after enzyme treatment filtrate; BCG, fermented ginger extract by *B. subtilis* CMIN-4; E/BCG, fermented ginger extract by *B. subtilis* CMIN-4 after enzyme treatment filtrate. \* $p < 0.05$  compared with the 6-OHDA treated group; <sup>†</sup> $p < 0.01$  compared with the control (none) group; <sup>\*</sup> $p < 0.05$  compared with the enzyme treated group at the same concentration.

### 고찰

신경세포는 다양한 원인에 의해 사멸이 일어나는데, 산화적 스트레스, 신경영양인자의 불균형, 신경독소 등의 원인과 이 외에 다양한 원인에 의한 것으로 알려져 있다 [21]. 과도한 신경 세포 사멸은 신경조직의 손상으로 이어져 결과적으로 인간에게 알츠하이머, 파킨슨병 등과 같은 퇴행성 뇌신경질환의 원인이 된다 [22]. 이러한 이유로 신경세포 보호 활성 물질의 개발은 퇴행성 뇌신경계 질환 치료제 개발의 주요한 타겟이 될 수 있을 것이다. 따라서 본 연구



**Fig. 5.** AChE inhibitory effects of FGE. SH-SY5Y cells were treated with 100 μM 6-OHDA for 24 hours after pre-treatment with or without FGE for 1 hour. AChE activity was tested using AChE assay kit. Data are presented as the mean ± SD of 3 independent experiments. Statistical significance of the differences was evaluated by Student's t-test. Donepezil used as a positive control at a concentration of 1 μM. Samples are the same as Fig. 1. 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; FGE, fermented ginger extract; AChE, acetylcholinesterase; KACC 10854, *B. subtilis* standard strain; CMIN-4, *B. subtilis* isolated from Cheonggukjang; E/BKG, fermented ginger extract by *B. subtilis* KACC 10854 after enzyme treatment filtrate; E/BCG, fermented ginger extract by *B. subtilis* CMIN-4 after enzyme treatment filtrate. \*p < 0.05 compared with the 6-OHDA treated group; †p < 0.01 compared with the control (none) group; ‡p < 0.05 compared with the enzyme treated group at the same concentration.

에서는 생강을 효소처리하여 수용화율을 높인 후 고초균을 이용하여 발효시킨 생강발효물 (FGE)을 제조하고, 신경세포 보호 효과를 평가하였다.

신경세포 내 6-OHDA 처리 시 ROS 생성, 칼슘 항상성 교란 및 미토콘드리아 기능 억제를 통해 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 보고되었다 [6]. 신경세포 내 스트레스의 효과적인 유도를 위한 6-OHDA의 농도를 결정하기 위해 6-OHDA를 농도별로 처리하였을 때 100 μM 농도에서 대조군과 비교하여 세포 생존율이 40% 감소하였다. Guo 등 [23]의 연구에서 SH-SY5Y 세포에 100 μM 6-OHDA를 24시간동안 반응시킨 후 세포 생존율은 본 연구와 유사하게 대조군 대비 30%로 감소하였고, 100 μM 6-OHDA 처리한 세포 내 ROS도 대조군 대비 2배가량 증가하였다. 또한 Ikeda 등 [24]의 연구에서도 100 μM 6-OHDA 처리한 SH-SY5Y 세포의 apoptosis가 증가하였으며 시료의 신경세포 보호 활성 평가를 위한 적절한 스트레스를 제공하는 것으로 보고되었다.

신경세포 내 6-OHDA 자극 후 FGE를 처리하고 세포 생존율과 LDH 농도를 평가했을 때, BKG와 BCG보다 E/BKG와 E/BCG 시료의 세포 생존율이 유의적으로 크게 나타났다. Nam 등 [18]의 연구에서 생강을 효소처리하였을 때 수용화율 및 유용성분의 용출이 증가한다고 보고하였다. Nagendra chari 등 [25]의 연구에서도 생강을 효소로 전처리하여 용매 추출하였을 때 진저롤 및 총 폴리페놀 함량이 증가하였고 항산화 활성이 증대되었다고 하였다. 본 실험에서 효소 전처리 후 발효한 시료의 신경세포 보호 활성이 크게 나타난 이유도 효소처리로 인한 생강의 유용성분의 용출 증가와 관련한 것으로 판단된다.

Apoptosis형 세포 사멸, 즉 프로그램된 세포 사멸은 여러가지 다양한 자극에 의해 유도된다. 이러한 자극에는 세포 표면에 부착된 수용체인 FAS나 스트레스에 대한 사립체 사립체의 반응, ER 스트레스 등이 포함된다. 특히, caspase는 세포 사멸에서 중요한 역할을 하는 시스테인 프로테아제 family로서 상위 caspase는 하위 caspase를 자르고 활성화시켜 세포 생존에 필요한 단백

질의 작용을 억제하여 세포 사멸을 유도하는 역할을 한다. 즉, 최종적으로 caspase-3와 같은 실행자 caspase가 활성화되어 표적 기질 단백질들의 분해를 통해 세포자멸사가 일어난다 [26,27]. 본 연구에 사용된 6-OHDA는 세포 내에서 급속히 산화하여 과산화수소, 수산화라디칼, 초과산화물라디칼 등의 다양한 산화 물질을 생성한다. 생성된 산화 물질은 단백질과 지질 산화, DNA 손상, 세포 사멸을 일으킨다. 또한 6-OHDA는 caspase 활성화에 이르는 경로를 통해 세포자멸사를 일으킨다고 알려져 있다 [24,28]. 본 연구에서는 6-OHDA 처리로 유발된 세포자멸사에 대하여 FGE의 신경세포 보호 효과가 caspase 활성화와 관련하는지 확인하기 위해 caspase-3 활성을 평가한 결과, 6-OHDA 자극된 신경세포에서 FGE를 처리한 모든 실험군에서 caspase-3 활성이 유의적으로 감소하였다. 이는 신경세포 보호 효과 및 LDH 농도 저해 활성화와 유사한 결과로 FGE가 6-OHDA 처리로 유발된 신경세포의 세포자멸사를 감소시킬 뿐만 아니라 caspase-3 활성을 효과적으로 저해함으로써 신경세포 보호 활성이 이루어짐을 유추할 수 있다. 이를 뒷받침할 수 있는 유전자 및 단백질 수준에서의 실험이 추가적으로 이루어져야 할 것이다.

조절할 수 있는 뇌신경전달 물질인 아세틸콜린 (acetylcholine, ACh)은 시냅스에 존재하는 콜린성 수용체 (cholinergic receptor)에 결합하여 신호 전달을 함으로써 뇌 인지기능에 있어 중요한 역할을 하지만 다양한 자극에 의해 대뇌 피질과 해마 부위에서 급격하게 감소하는 특징이 있다. 또한 ACh는 뇌신경 말단에서 AChE에 의해 분해되며 AChE의 활성이 지나치게 증가하게 되면 인지기능의 감소가 나타난다고 알려져 있다 [29-31]. 현재 치매 치료를 위해 사용되고 있는 가장 보편적인 약물인 AChE 억제제는 치매 환자의 시냅스에서 ACh의 양을 일시적으로 상승시켜 증상적 치료 (symptomatic treatment)를 위해 사용되고 있다 [32]. 본 연구에서 FGE가 6-OHDA 처리로 증가된 AChE의 활성을 유의적으로 억제하였으며, 이는 FGE를 활용하여 AChE의 활성을 저해하는 억제제 개발 및 뇌신경 질환 개선에 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면 FGE는 6-OHDA로 처리된 SH-SY5Y 세포에서 세포 생존율을 증가시키고, LDH 농도를 감소시켰다. Caspase-3 활성 및 단백질 발현 그리고 핵의 형태학적인 변화를 통하여 FGE가 6-OHDA로 유발된 세포자멸사를 억제할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 FGE는 AChE 활성을 저해함으로써 ACh성 신경세포의 기능을 강화시켜 인지기능을 개선할 수 있을 것으로 판단된다.

## 요약

본 연구에서는 생강을 효소처리하여 수용화율을 높인 후 고초균을 이용하여 발효시킨 생강발효물 (FGEs)을 제조하고, 이를 SH-SY5Y에 6-OHDA와 함께 처리하여 세포 보호 효과 및 AChE 저해 활성을 평가하였다. 그 결과, 6-OHDA로 자극된 신경세포에서 FGE를 처리한 모든 실험군에서 세포 생존율이 증가하고 LDH 농도가 감소하였다. 6-OHDA로 유발된 세포자멸사를 억제할 수 있는지 확인하기 위해 핵의 형태학적인 변화 및 caspase-3 활성을 확인하였다. FGE를 처리한 모든 실험군에서 핵의 손상 및 apoptotic body의 감소와 caspase-3 억제 활성을 확인할 수 있었다. 또한 FGE는 AChE의 활성을 유의적으로 감소시켰다. 시료 간의 활성 차이를 비교하였을 때, 생강에 효소 처리 후 고초균으로 발효한 추출물군 (E/BKG와 E/BCG)의 신경세포 보호 활성이 효소 처리하지 않은 발효생강군 (BKG와 BCG) 보다 유의적으로 크게 나타났다. 그러나 발효에 사용된 고초균 2종 간의 활성은 유사하였으며 처리군 간 유의적인

차이를 보이지 않았다. 본 연구 결과로부터 효소처리하여 수용화율을 높여 고초균으로 발효한 FGE는 신경세포 보호 및 AChE 저해 효과를 나타내어 향후 신경질환 연구를 위한 기초자료 제공 및 고부가가치 식품소재 개발에 이용 가능할 것으로 판단된다.

## REFERENCES

1. Lee SI, Choi CH, Kim JS, Lim SS, Jung HW. The antioxidant activities and neuroprotective effects of hot water extracts from torreyae semen. *Korean J Herbol* 2017; 32(6): 41-48.  
[CROSSREF](#)
2. Park EK, Han KH, Lee SH, Kim NK, Bae MH, Seo YH, et al. Neuroprotective effects of Schisandra chinensis and Ribes fasciculatum extract on hydrogen peroxide-mediated oxidative stress in neuroblastic SH-SY5Y cell line. *Korean J Food Nutr* 2018; 31(6): 865-872.
3. Cho H, Kang K. Effects of taro extract on brain resilience in in vitro Parkinson's disease model induced by 6-hydroxydopamine. *J Korean Biol Nurs Sci* 2020; 22(4): 223-231.  
[CROSSREF](#)
4. Martin HL, Teismann P. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J* 2009; 23(10): 3263-3272.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
5. Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2002; 68(5): 325-340.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
6. Glinka YY, Youdim MB. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol* 1995; 292(3-4): 329-332.  
[PUBMED](#)
7. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 2002; 175(2): 303-317.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
8. Lee MK, Kang SJ, Poncz M, Song KJ, Park KS. Resveratrol protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis induced by dopamine. *Exp Mol Med* 2007; 39(3): 376-384.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
9. Seo YH. Antioxidant and antimicrobial activities of ginger with aging and fermentation. *Korean J Food Preserv* 2007; 24(8): 1180-1187.  
[CROSSREF](#)
10. Kim JS, Kor MS, Kim YH, Kim MK, Hong JS. Volatile flavor components of Korean ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Korean J Food Sci Technol* 1991; 23(2): 141-149.
11. Munda S, Dutta S, Haldar S, Lal M. Chemical analysis and therapeutic uses of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) essential oil: a review. *J Essent Oil Bear Pl* 2018; 21(4): 994-1002.  
[CROSSREF](#)
12. Ho SC, Chang KS, Lin CC. Anti-neuroinflammatory capacity of fresh ginger is attributed mainly to 10-gingerol. *Food Chem* 2013; 141(3): 3183-3191.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
13. Mashhadi NS, Ghiasvand R, Askari G, Hariri M, Darvishi L, Mofid MR. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of ginger in health and physical activity: review of current evidence. *Int J Prev Med* 2013; 4(Suppl 1): S36-S42.  
[PUBMED](#)
14. Ryu HS, Kim HS. Effect of *Zingiber officinale* Roscoe extracts on mice immune cell activation. *Korean J Nutr* 2004; 37(1): 23-30.
15. Kim HS, Choi JH, Lee HJ, Jeong MC, Kim BS, Kim D. Quality characteristics of treated with mild heat and minced ginger during storage. *Korean J Food Preserv* 2010; 17(6): 784-792.  
[CROSSREF](#)
16. Chun YG, Chung HY. Quality properties of fermented gingers. *Korean J Food Sci Technol* 2011; 43(3): 249-254.  
[CROSSREF](#)
17. Chung HY, Park SY. Effects of fermented ginger extracts on the production of NO and PGE2 in RAW 264.7 macrophages. *Food Eng Prog* 2013; 17(1): 55-61.

18. Nam DG, Kim M, Im P, Kim SB, Choe JS, Choi AJ. Solubilization of polysaccharide and functional components by high-pressure enzyme treatment from ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Food Eng Prog* 2018; 22(2): 173-185.  
[CROSSREF](#)
19. Nam DG, Kim M, Im P, Kim SB, Choe JS, Choi AJ. Solubilization of polysaccharide and functional components of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) using ethanol and enzyme. *Korean J Food Preserv* 2019; 26(5): 545-554.  
[CROSSREF](#)
20. Ban YJ, Baik MY, Hahm YY, Kim HK, Kim BY. Optimization of processing conditions for making a black ginger and design mixture for black ginger drinks. *Food Eng Prog* 2011; 14(2): 112-117.
21. Steckley D, Karajgikar M, Dale LB, Fuerth B, Swan P, Drummond-Main C, et al. Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2007; 27(47): 12989-12999.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
22. Kirkinezos IG, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12(6): 449-457.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
23. Guo S, Bezar E, Zhao B. Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS-NO pathway. *Free Radic Biol Med* 2005; 39(5): 682-695.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
24. Ikeda Y, Tsuji S, Satoh A, Ishikura M, Shirasawa T, Shimizu T. Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 2008; 107(6): 1730-1740.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
25. Nagendra chari KL, Manasa D, Srinivas P, Sowbhagya HB. Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Food Chem* 2013; 139(1-4): 509-514.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
26. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
27. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012; 45(6): 487-498.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
28. Ochu EE, Rothwell NJ, Waters CM. Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *J Neurochem* 1998; 70(6): 2637-2640.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
29. Schulz V. Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trials and guidelines fail to consider. *Phytomedicine* 2003; 10 Suppl 4: 74-79.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
30. Chung YK, Heo HJ, Kim EK, Kim HK, Huh TL, Lim Y, et al. Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L on the acetylcholinesterase. *Mol Cells* 2001; 11(2): 137-143.  
[PUBMED](#)
31. Oh HK, Kim SH. Effect of soy isoflavone intake on water maze performance and brain acetylcholinesterase activity in rats. *Korean J Nutr* 2006; 39(3): 219-224.
32. Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, Morgan LC, Moore CG, Jonas DE. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging* 2008; 3(2): 211-225.  
[PUBMED](#)