

# 해마 세포주에서 인삼의 고평도당에 의한 세포사멸 차단효과

이정치\* · 장선일<sup>1</sup>

광주보건대학 임상병리과, 1: 전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부

## Ginsenosides Prevent High Glucose-induced Apoptosis in HT22 Cells

Jeong Chi Lee\*, Seon Il Jang<sup>1</sup>

Department of Clinical Pathology, Gwangju Health College University,  
1: School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University

Diabetic neuropathy is characterized by the decrease of cell viability in neuron, which is induced by the hyperglycemia. HT22 cell is the neuron cell line originated from hippocampus. Ginsenosides have been reported to retain anti-diabetic effect. However, the preventive effect of ginsenosides in the condition of diabetic neuropathy was not elucidated. Thus, this study was conducted to examine the protective effect of ginsenoside total saponin (GTS), panaxadiol (PD), and panaxatriol (PT) in the high glucose-induced cell death of HT22 cells, an in vitro cellular model for diabetic neuropathy. In present study, high glucose increased lactate dehydrogenase(LDH) activity, the lipid peroxide(LPO) formation and induced the decrease of cell viability. These effects were completely prevented by the treatment of GTS, but partially prevented by the treatment of PD and PT. High glucose also increased the expression of Bax and cleaved form of caspase-3 but decreased that of Bcl-2. These effects of high glucose on Bax, Bcl-2 and cleaved form of caspase-3 were completely prevented by the treatment of GTS, but partially prevented by the treatment of PD and PT in HT22 cells. In conclusion, ginsenosides prevented high glucose-induced cell death of hippocampal neuron through the inhibition of oxidative stress and apoptosis in HT 22 cells.

Key words : diabetic neuropathy, hippocampus, ginsenosides, high glucose, oxidative stress, apoptosis

### 서 론

당뇨병성 신경증은 주요한 당뇨병 합병증의 하나로 중추신경 및 말초신경에서 신경세포의 손상 및 신경세포에 혈액을 공급하는 미세혈관 변성으로 인해 순환 장애가 야기되어 유발되는 것으로 보고되고 있다<sup>1,2)</sup>. 당뇨병성 신경병증의 병인은 아직까지 확실히 알려져 있지 않지만 고혈당증에 의해 혈관성 손상이 야기되어 이로 인해 신경학적 변화가 일어나 당뇨병성 신경병증이 발생하는 것으로 알려져 있다<sup>3,4)</sup>. 당뇨병성 신경증 중 특히 기억 및 습득의 이상이 1형 당뇨 환자에게 관찰되는 것으로 보고되고 있다<sup>5)</sup>. 기억 및 습득은 뇌의 해마 부분에서 이루어지며, 당뇨 동물모델에서 이들의 기능 장애가 일어나는 것으로 보고되고 있다<sup>6)</sup>. 이에 대한 원인은 해마에서 고혈당에 의한 신경세포의 세포사멸과 관련되며<sup>7)</sup>, 이러한 당뇨병성 신경증은 다양한 신호전달

물질의 활성화에 의해서 발병하는 것으로 알려져 있다. 그 중 산화성 스트레스의 증가는 당뇨병에서 신경증을 포함한 여러 미세혈관계의 합병증을 유발하는데 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>8,9)</sup>.

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오래 전부터 우리나라를 중심으로 중국 및 일본에서 신체 기능을 강화시켜주는 강장제로서, 민속의약이나 한방 처방의 한 성분으로 널리 이용되어 왔다<sup>10)</sup>. 인삼 (ginseng total saponin: GTS)은 화학적 구조에 따라 크게 panaxadiol (PD) 및 panaxatriol (PT)로 나뉘어 진다<sup>11)</sup>. 이러한 인삼은 예로부터 당뇨병 등의 예방 효과가 있는 것으로 알려져 있으며<sup>12)</sup>, 인삼의 항당뇨 효과는 몇몇 연구자들에 의해서도 보고되고 있다<sup>13,14)</sup>. 그럼에도 불구하고 당뇨병성 신경병증 중 특히 기억 및 습득의 감소에 대한 효과는 거의 알려져 있지 않고 있으며 더욱이 이들에 대한 조절 기전 역시 알려져 있지 않고 있다. HT22 세포는 마우스 해마 기원 세포주로서 당뇨병성 신경증 중 기억 및 습득과 관련될 수 있는 세포 모델로 사용되고 있다<sup>15,16)</sup>.

따라서 이 연구는 ginsenoside 처리 시 고평도당에 의한 신

\* 교신저자 : 이정치, 광주시 광산구 신창동 683-3, 광주보건대학 임상병리과

· E-mail : jchlee@ghc.ac.kr, · Tel : 062-958-7623

· 접수 : 2009/08/11 · 수정 : 2009/08/25 · 채택 : 2009/09/23

경세포 중 해마 유래 세포주인 HT22 세포의 세포 사멸 차단효과 및 이와 관련된 신호전달계에 대해서 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

Dulbecco's Modified Eagle's Medium(D-MEM)/Ham's nutrient mixture F-12(D-MEM/F-12)와 Class IV collagenase는 Life Technologies (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. D-glucose, penicillin, streptomycin 및 reduced GSH는 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. GTS, PD 및 PT는 한국 인삼 연초 연구원(대전, 한국)에서 구입하였다. Bax, Bcl-2 및 caspase-3 항체는 Cell Signaling technology (Herts, UK)에서 구입하였다.

### 2. HT22 세포 배양

HT22세포는 ATCC에서 구입하였다. 이들 세포들은 5% FBS를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's 배지(Life Technologies, Grand Island, NY)에 배양하였다. 이들 세포들이 70% confluence 되었을 때 세포성장을 정지시키기 위해 무혈청 배지에서 이들을 배양하여 세포의 성장을 동기화시켜서 실험에 이용하였다.

### 3. MTT 측정

인삼의 신경세포 보호효과를 측정하기 위하여 MTT 환원 실험을 실시하였다. 세포주를 96-well plate에  $1 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 100  $\mu$ L씩 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 GTS, PD 및 PT를 처리하였다. 그리고 30분 후에 고포도당 (25 mM 포도당)을 처리하여 48시간 배양하였다. 반응 후 well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO 100  $\mu$ L 첨가하여 ELISA reader (Model 680, BioRad, Hercules, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 세포수를 100%로 하여 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

### 4. Lactate dehydrogenase (LDH) 측정

인삼의 신경세포 보호효과를 측정하기 위한 방법으로 LDH 방출측정 kit를 이용하여 실시하였다. HT22 세포주를  $1 \times 10^5$  cells/mL로 맞춘 후, 100  $\mu$ L씩 96 well plate에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, GTS, PD 및 PT를 처리하여 30분 배양하고, 고포도당을 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 새로운 96-well plate에 50  $\mu$ L 분주하고 LDH reagent를 50  $\mu$ L 첨가하여 반응시킨 후, 반응이 완료 되면 1 N HCl을 100  $\mu$ L 첨가하여 반응을 중지시킨다. 또한 살아남은 세포의 LDH 측정을 위해 남은 배양액을 제거하고, 0.5% Triton X-100용액을 50  $\mu$ L 첨가하여 40 rpm으로 10분 동안 shaking시키고 같은 방법으로 LDH reagent 첨가하여 반응시킨다. 반응이 끝나면 반응 정지액을 넣은 뒤, 각각을 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH에 의한 세포 독성의 백분율은 배양액과 살아있는 세포에서

유리된 총 LDH에 대한 배양액으로부터 유리된 LDH의 값으로 계산하여 무처리 대조군과 비교한 값을 나타내었다.

### 5. Lipid peroxide (LPO)형성

LPO 형성은 Ohkawa 등<sup>17)</sup>의 방법에 따라 malonaldehyde의 양으로 측정하였다. 세포들을 수확한 후 초음파로 세포를 분쇄한 후, 반응용액 [8% SDS 100  $\mu$ L, 0.8% 2-thiobarbituric acid (TBA) 200  $\mu$ L, 20% acetic acid 200  $\mu$ L]을 넣은 후 95°C에서 60분간 반응시켰다. 이후, 얼음으로 차게한 물에 식힌 후, 비특이적인 적색 색소를 제거하기 위하여 n-butanol-pyridine 혼합액(15:1, v/v)을 첨가한 후 4,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수확하였다. 이 샘플을 spectrofluorometry(emission 파장 553 nm, excitation 파장 515 nm)로 측정하여 nmol/mg protein으로 표시하였다. 단백질 정량은 Bradford<sup>18)</sup>의 방법을 이용하였다.

### 6. Western immunoblotting

배지를 제거한 HT22세포를 PBS로 2번씩 세척한 후, 각기 150  $\mu$ L의 lysis buffer (10 $\times$  PBS, 1% NP-40, 20% SDS, 0.5 M EDTA, 0.01 M PMSF, 10 mg/mL Leupeptin, 1 mg/mL pepstatin A)를 처리하여 균질화시켰다. 균질화된 세포를 tube에 옮긴 후, 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 새로운 tube에 저장하였다. Bradford 단백질 정량법을 이용하여 각각 60  $\mu$ g의 샘플들을 8% SDS-PAGE 전기영동시킨 후, polyvinylidene difluoride membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk에 1시간 동안 차단시켰고, 각각의 항체 (Bcl-2, Bax, caspase-3, beta actin)를 1% skim milk에 1,000배 희석하여 4°C에서 18시간 이상 배양하였다. 그 후, membrane을 0.1% Tween-20/1 $\times$  TBS에 10분 간격으로 3번 세척하였고, membrane을 1% skim milk에 5,000배 희석된 horseradish-peroxidase labeled 2차 항체에 1시간 동안 배양한 후, 3번 세척을 거쳐서 Enhanced Chemiluminescent (ECL) 시약을 1분간 처리한 다음 X-ray 필름에 30초간 노출시켜 현상하였다.

### 7. 통계처리

실험 결과의 통계적 처리는 Student's t test 및 Analysis of Variance (ANOVA)로 하였으며, P<0.05를 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과와 표현은 means  $\pm$  S.E로 하였다.

## 결 과

### 1. 고포도당의 신경세포 사멸 효과

신경세포사멸에 대한 고포도당의 효과를 알아보기 위하여, HT22 세포에 다양한 시간 (0~48 hr) 별로 고포도당 (25 mM glucose)을 처리한 후 MTT assay를 실시하였다. 실험결과 Fig. 1A에서와 같이 25 mM 포도당을 12시간 이상 처리 시 MTT assay는 감소하였으며, 48시간 이상에서 최고를 보였다. 이후 더 이상 증가 작용은 인정되지 않았다. 이러한 작용은 LDH assay를 측정된 결과에서도 같은 결과를 볼 수 있었다(Fig. 1B). 따라서

본 실험에서는 고혈당의 조건을 유지하기 위하여 25 mM 포도당을 48시간 처리하였다.

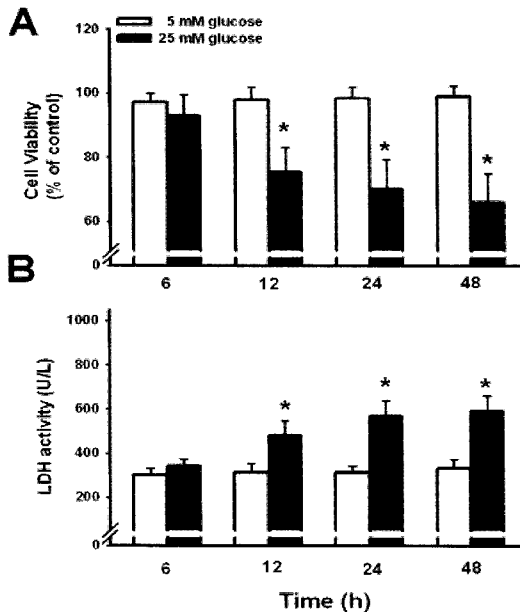


Fig. 1. Time dependent effect of 25 mM glucose on cell viability (A) and LDH activity (B). HT22 cells were incubated with 5 mM or 25 mM glucose at different time intervals (0 to 48 hr). Values are means  $\pm$  S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \* p < 0.05 vs. control.

2. Total ginsenoside, PD 및 PT에 의한 고포도당의 HT22 세포 사멸에 대한 억제 효과 작용

Ginsenoside에 의해 고포도당의 신경세포 사멸 작용이 차단되는지를 알아보기 위하여 고포도당 처리 30분전에 GTS를 농도별로 (0~10  $\mu$ g/mL) 처리하였다. 실험결과 GTS는 1  $\mu$ g/mL 이상에서 고포도당에 의한 신경세포 사멸 작용을 차단시켰다(Fig. 2).

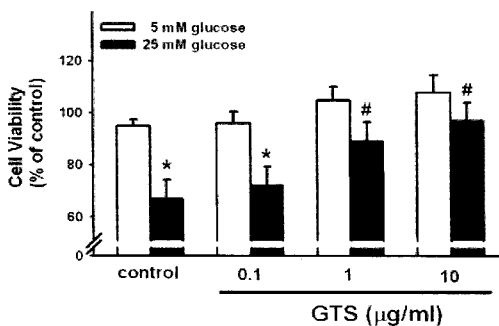


Fig. 2. Dose dependent effect of GTS against high glucose-induced cell viability. HT22 cells were incubated with different dosage of GTS (0 to 10  $\mu$ g/ml) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Values are means  $\pm$  S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \* p < 0.05 vs. control. # p < 0.05 vs. 25 mM glucose alone.

향후 실험에서는 10  $\mu$ g/mL을 사용하였다. 이러한 total ginsenoside에 의한 신경세포 사멸 작용이 직접적으로 ginsenoside 의 어떠한 분획에서 이루어지는지를 알아보기 위하여 GTS, PD 및 PT를 전처리하여 고포도당 처리 후 신경세포 사

멸 효과를 살펴보았다. 실험결과 GTS는 고포도당의 MTT assay 억제 작용 및 LDH 증가 작용을 완전히 차단하는 것으로 나타났다(Fig. 3A, B). 한편, PD 및 PT 역시 GTS 정도는 아니지만, 고포도당에 의한 세포사멸 작용을 부분적으로 유의성 있게 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3A, B).

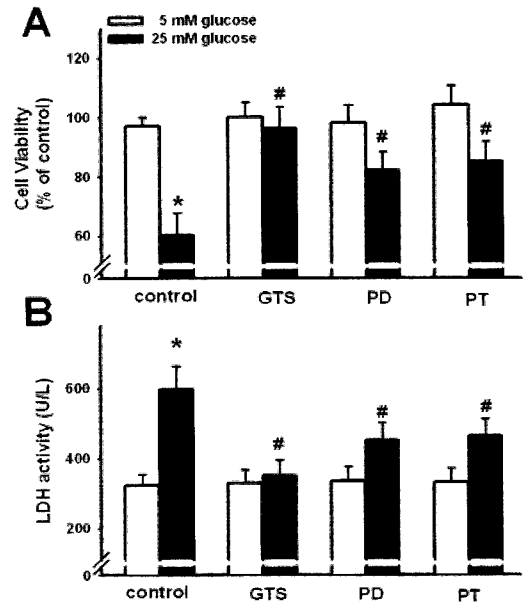


Fig. 3. Effect of GTS, PD, and PT against high glucose-induced cell viability (A) and LDH activity (B). HT22 cells were incubated with GTS, PD, and PT (10  $\mu$ g/ml, respectively) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Values are means  $\pm$  S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \* p < 0.05 vs. control. # p < 0.05 vs. 25 mM glucose alone.

3. GTS, PD 및 PT에 의한 고포도당의 세포 사멸 작용 차단작용에 대한 산화성 스트레스 및 세포 사멸 단백질 관련성

산화성 스트레스와의 관련성을 알아보기 위하여 lipid peroxide (LPO) 형성을 측정하였다. 실험결과 고포도당은 산화성 스트레스를 증가시켰으며, 이러한 작용은 GTS에 의해서 완벽하게 차단되는 것으로 나타났으며, PD 및 PT 역시 유의성 있게 차단하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

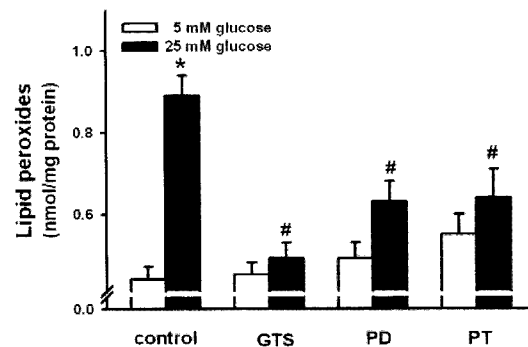


Fig. 4. Effect of GTS, PD, and PT against high glucose-induced stimulation of lipid peroxide formation. HT22 cells were incubated with GTS, PD, and PT (10  $\mu$ g/ml, respectively) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Values are means  $\pm$  S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \* p < 0.05 vs. control. # p < 0.05 vs. 25 mM glucose alone.

고포도당 처리 시 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax의 발현이 증가하였으며, 세포 사멸 억제 단백질인 Bcl-2의 발현은 감소하였다. 이러한 반응은 GTS에 의해서 완전히 차단되는 것으로 나타났다. 또한 이러한 변화는 caspase-3의 활성에서도 같은 양상을 볼 수 있었다. PD 및 PT 역시 GTS 정도는 아니지만, 고포도당에 의한 세포사멸 단백질인 Bax 및 caspase-3의 활성을 부분적으로 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

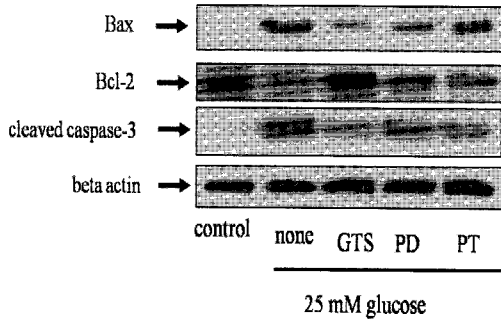


Fig. 5. Effect of GTS, PD, and PT against high glucose-induced expression of Bax, Bcl-2, and cleaved form caspase-3. HT22 cells were incubated with GTS, PD, and PT (10  $\mu$ g/ml, respectively) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Then, western immunoblotting analysis was conducted as described in Material and Method.

## 고찰

Ginseng의 항당뇨 효과는 여러 연구자들에 의해서 보고되고 있다<sup>10,14</sup>) 이 연구에서 고포도당 처리 시 HT22 신경세포 사멸은 증가하였는데, 이는 Sharifi 등<sup>19</sup>)이 이 연구에서 사용했던 것과 같은 세포에 고포도당 (15 mM)을 처리하였을 때 신경 세포 사멸이 증가하였다는 보고와 일치하였다.

최근 당뇨병 1형 생체 모델인 streptozotocin (STZ)에 의해 유도된 당뇨 랫드의 좌골신경에서 세포 사멸이 확인되어<sup>20</sup>), 이 연구결과가 생체에서도 증명될 수 있음을 시사해 주고 있다. 이 연구에서 사용한 HT22 세포는 해마 기원 세포주이기 때문에 이 연구결과는 1형 당뇨 동물 및 환자 모델에서 기억 손상이 유도된다는 보고에 대한 *in vitro*적 증거를 제시하고 있다<sup>7,21,22</sup>). 더욱이 이 연구에서 ginsenoside 처리 시 고포도당에 의한 기억 및 습득을 담당하는 신경세포 손상이 현저하게 차단되었다. 이러한 결과는 고혈당증시에 기억을 담당하는 세포들의 세포 사멸이 GTS에 의해서 차단될 수 있음을 시사해주고 있다. 그리고 이 연구결과는 기억 및 습득에 대한 실험은 실시하지 않았지만, Jang 등<sup>23</sup>)이 인삼 투여 시 STZ에 의해 유도된 1형 당뇨 랫드 뇌의 해마에서 당뇨병성 신경증을 유발시키는 c-Fos의 발현이 호전되었다는 생체 실험 보고와도 일치한다고 할 수 있다.

이 연구에서 고 포도당에 의한 GTS의 신경 해마 세포 방어 효과 작용은 PD 및 PT의 성분에 기인한 것으로 판단이 된다. 특히 이는 PD 및 PT 자체 성분들이 상이한 작용을 해서 신경세포 사멸을 억제하여 항당뇨 신경증 효과를 나타낼 것으로 추측되고 있다. 이에 대한 연구는 PD 및 PT 성분을 다시 분획화하여 효과를 알아보는 연구가 향후 필요할 것으로 사료된다.

이 연구에서 고포도당 처리 시 산화성 스트레스를 의미하는 LPO 형성은 증가하였다. 이는 1형 당뇨병에서 산화성 스트레스에 의해 기억 손상이 야기된다는 생체 실험결과와 일치한다고 할 수 있다<sup>24</sup>). 이 연구결과와 비슷하게 Saravia 등<sup>25</sup>)은 estrogen 처리시 당뇨에 의해 감소되었던 해마의 신경세포의 사멸이 차단되는 것을 관찰하였다. 최근에 인삼은 아니지만 curcumin 또는 lycopene과 같은 물질들이 산화성 스트레스 유발을 억제하여 기억 및 인지 능력을 회복시킨다고 하였다<sup>26,27</sup>). 이 연구 결과는 비록 *in vitro*적 실험이지만 인삼도 당뇨병성 신경증으로 인한 기억 및 인지 감퇴를 억제시킬 수 있는 새로운 물질로 가능성이 있다고 하겠다.

세포 손상에는 Bax, Bcl-2, Bad 등의 다양한 미토콘드리아와 관련이 있는 세포 사멸 인자들이 관여한다<sup>28</sup>). 특히 Bax/Bcl-2 비율은 미토콘드리아 경로에 의한 세포 사멸의 주요한 표지 인자로 인식되고 있다<sup>19</sup>). 이 연구 결과 고포도당 처리 시 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax의 발현은 증가하였으나, 세포 사멸 억제 단백질인 Bcl-2의 발현은 억제되었는데, 이는 Bax/Bcl-2의 비율이 증가한다는 것을 지시해주고 있다. 또한 이 연구에서 세포 사멸을 직접적으로 담당하는 활성화 형태인 절편된 caspase-3의 발현이 증가하여 이 연구결과를 뒷받침해주고 있다.

이 연구 결과는 ginsenosides의 항 당뇨 신경증효과에 대한 세포 사멸 관련 단백질 발현 억제 관련성을 최초로 보고하였다. 그리고 향후 인삼을 이용한 당뇨병 생체 모델을 대상으로 연구가 필요할 것으로 판단이 된다. 또한 이러한 ginsenoside에 의한 고포도당의 산화성 스트레스 억제 및 세포 사멸 억제 효과는 ginsenoside를 당뇨병성 신경증 중 기억 및 습득 저해를 억제하는 치료제로 사용될 수 있다는 것을 시사해주고 있다. 결론적으로 ginsenoside는 고포도당에 의한 산화성 스트레스 및 세포 사멸을 억제시켜 신경세포의 세포 사멸 효과를 억제함으로써 당뇨병성 신경증의 특징 중 하나인 기억 및 습득 감퇴를 억제할 수 있을 것으로 추측되며, 이 연구 결과는 향후 당뇨병성 신경증의 기억 및 인식 감퇴의 치료제 개발에 기초 자료를 제공할 것으로 사료된다.

## 결론

당뇨병성 신경증은 고혈당증에 의해 신경세포의 사멸과 관련되어 일어나는 당뇨병의 합병증이다. HT22 세포들은 기억 및 습득을 담당하는 해마에서 기원하는 신경세포주이다. 인삼의 항 당뇨 효과는 보고되고 있으나 당뇨병성 신경증에 대한 예방 효과는 보고되고 있지 않고 있다. 따라서 이 연구에서는 고포도당에 의한 HT22 세포의 세포 사멸에 대한 인삼(total saponin: GTS) 및 인삼 분획인 panoxadiol (PD) 및 panoxatriol (PT)의 차단효과를 알아보고자 실시하였다. 고포도당은 HT22 산화성 스트레스 증가, lactate dehydrogenase (LDH) 활성 증가 및 세포 사멸을 유도하였으며, 이러한 반응은 GTS 처리 시 완벽하게 차단되었고 PD 및 PT에 의해서는 부분적으로 차단되었다. 또한 western blotting을 이용하여 실험한 결과 역시 고포도당은 세포

사멸 촉진 단백질인 Bax 및 caspase-3의 발현을 증가시켰으며, 세포 사멸 억제 단백질인 Bcl-2의 발현은 감소시켰다. 이러한 고포도당에 의한 단백질 발현은 GTS에 의해서는 완벽하게 그리고 PD 및 PT에 의해서는 부분적으로 차단되었다. 결론적으로 인삼은 해마 유래주 세포인 HT22세포에서 산화성 스트레스 억제 및 세포 사멸 억제를 통하여 고포도당의 작용을 차단하는 것으로 나타났다.

## 참고문헌

- Boulton, A.J. Diabetic neuropathy: classification, measurement and treatment. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 14: 141-145, 2007.
- Bibbo, C., Patel, D.V. Diabetic neuropathy. *Foot Ankle Clin.* 11: 753-774, 2006.
- Kles, K.A., Vinik, A.I. Pathophysiology and treatment of diabetic peripheral neuropathy: the case for diabetic neurovascular function as an essential component. *Curr Diabetes Rev.* 2: 131-145, 2006.
- Misawa, S., Kuwabara, S., Ogawara, K., Kitano, Y., Yagui, K., Hattori, T. Hyperglycemia alters refractory periods in human diabetic neuropathy. *Clin Neurophysiol.* 115: 2525-2529, 2004.
- Gold, A.E., Deary, L.J., Jones, R.W., O'Hare, J.P., Reckless, J.P., Frier, B.M. Severe deteriorations in cognitive function and personality in patients with long-standing diabetes: A complication of diabetes or a consequence of treatment? *Diabetes Med.* 11: 499-505, 1994.
- Jackson-Guilford, J., Leander, J.D., Nisenbaum, L.K. The effect of streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus. *Neurosci Lett.* 293: 91-94, 2000.
- Li, Z.G., Zhang, W., Grunberger, G., Sima, A.A. Hippocampal neuronal apoptosis in type I diabetes. *Brain Res.* 946(2):221-231, 2002.
- Camera, A., Hopps, E., Caimi, G. Diabetic microangiopathy: physiopathological, clinical and therapeutic aspects. *Minerva Endocrinol.* 32: 209-229, 2007.
- Pop-Busui, R., Sima, A., Stevens, M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev.* 22: 257-273, 2006.
- Kiefer, D., Pantuso, T. Panax ginseng. *Am Fam Physician* 68: 1539-1542, 2003.
- Yip, T.T., Lau, C.N., Kong, Y.C., Yung, K.H., Kim, J.H., Woo, W.S. Ginsenoside compositions of Panax ginseng C.A. Meyer tissue culture and juice. *Am J Chin Med.* 13: 89-92, 1985.
- Waki, I., Kyo, H., Yasuda, M., Kimura, M. Effects of a hypoglycemic component of ginseng radix on insulin biosynthesis in normal and diabetic animals. *J Pharmacobiodyn.* 5: 547-554, 1982.
- Xie, J.T., Mehendale, S.R., Wang, A., Han, A.H., Wu, J.A., Osinski, J., Yuan, C.S. American ginseng leaf: ginsenoside analysis and hypoglycemic activity. *Pharmacol Res.* 49: 113-117, 2004.
- Cho, W.C., Chung, W.S., Lee, S.K., Leung, A.W., Cheng, C.H., Yue, K.K. Ginsenoside Re of Panax ginseng possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 21: 173-179, 2006.
- Schmidt, P., Holsboer, F., Spengler, D. Beta(2)-adrenergic receptors potentiate glucocorticoid receptor transactivation via G protein beta gamma-subunits and the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Mol Endocrinol.* 15(4):553-564, 2001.
- Post, A., Muller, M.B., Engelmann, M., Keck, M.E. Repetitive transcranial magnetic stimulation in rats: evidence for a neuroprotective effect in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci.* 11(9):3247-3254, 1999.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95: 351-358, 1979.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- Sharifi, A.M., Mousavi, S.H., Farhadi, M., Larijani, B. Study of high glucose-induced apoptosis in PC12 cells: role of bax protein. *J Pharmacol Sci.* 104: 258-262, 2007.
- Kumar, A., Kaundal, R.K., Iyer, S., Sharma, S.S. Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Sci.* 80: 1236-1244, 2007.
- Beauquis, J., Roig, P., Homo-Delarche, F., De Nicola, A., Saravia, F. Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *Eur J Neurosci.* 23(6):1539-1546, 2006.
- Beauquis, J., Saravia, F., Coulaud, J., Roig, P., Dardenne, M., Homo-Delarche, F., De Nicola, A. Prominently decreased hippocampal neurogenesis in a spontaneous model of type 1 diabetes, the nonobese diabetic mouse. *Exp Neurol.* 210(2):359-367, 2008.
- Jang, M.H., Chang, H.K., Shin, M.C., Lee, T.H., Kim, Y.P., Kim, E.H., Kim, C.J. Effect of ginseng radix on c-Fos expression in the hippocampus of streptozotocin-induced

- diabetic rats. *J Pharmacol Sci.* 91: 149-152, 2003.
24. Alvarez, E.O., Beauquis, J., Revsin, Y., Banzan, A.M., Roig, P., De Nicola, A.F., Saravia, F. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. *Behav Brain Res.* 198(1):224-230, 2009.
25. Saravia, F.E., Beauquis, J., Revsin, Y., Homo-Delarche, F., de Kloet, E.R., De Nicola, A.F. Hippocampal neuropathology of diabetes mellitus is relieved by estrogen treatment. *Cell Mol Neurobiol.* 26(4-6):943-957, 2006.
26. Kuhad, A., Chopra, K. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences. *Eur J Pharmacol.* 576(1-3):34-42, 2007.
27. Kuhad, A., Sethi, R., Chopra, K. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Life Sci.* 83(3-4):128-134, 2008.
28. Wong, W.W., Puthalakath, H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life.* 60(6):390-397, 2008.