International Journal of Oral Biology, Vol. 42, No. 1 March 31 2017, p. 9-15
Copyright ⓒ 2017, *The Korean Academy of Oral Biology*
http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2017.42.1.009
pISSN 1226-7155, eISSN 2287-6618

International Journal of Oral Biology

Apoptosis Induction Effect of *Zingiberis Rhizoma* Extract in Microglia BV-2 Cells

Jeongbin Seo[1], Myung Sook Oh[1], Young Pyo Jang[1] and Jeong Hee Kim[1,2,*]

[1]*Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, Graduate School*
[2]*Department of Oral Biochemistry and Molecular Biology and Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea*

(received January 09, 2017; revised February 20, 2017; accepted February 21, 2017)

Microglia have multiple functions in regulating homeostasis of the central nervous system. Microglia cells have been implicated as active contributors to neuron damage in neurodegenerative disorders. In this study, medicinal plant extracts (MPEs) were used to evaluate the cell-death induction effect in microglia BV-2 cells. Among 35 MPEs tested in this study, 4 MPEs showed less than a 30% cell survival after 24 hours of incubation. These were *Foeniculi Fructus*, *Forsythiae Fructus*, *Zingiberis Rhizoma* and *Hedera Rhombea*. The concentration showed that 50% cell death (IC_{50}) occurred with 33, 83, 67 Ed highlight: Please confirm wording, and 81 μ /ml, respectively. For further study, we chose *Zingiberis Rhizoma* (*ZR*) which showed a reasonably low IC_{50} value and an induction of cell death in a relatively narrow range. Western blot analysis showed that *ZR*-treated cells showed activation of caspase-3 and cleavage of PARP Ed highlight: When an acronym is first presented it needs to be spelled out in both dose- and time-dependent manners. However, the level of Bcl-2 and Bax were not changed by *ZR*-treatment in BV-2 cells. These results suggest that *ZR*-induced apoptosis in BV-2 cells occured through caspase-3 activation. The results also suggested that *ZR* may be useful in developing treatments for neurodegenerative diseases.

Key words: apoptosis, BV-2, medicinal plant extracts

*Correspondence to: Jeong Hee Kim, Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, Graduate School and Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea
Tel: +82-2-961-0915, Fax: +82-2-960-1467
E-mail: jhkimh@khu.ac.kr
ORCID : 0000-0002-3884-4503

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.

서 론

중추신경계의 항상성 조절에서 다양한 기능을 하는 microglia는 중추신경계의 resident immunological cell이며 내재 및 적응 면역 반응에 관여한다. Microglia cell은 알츠하이머병, 파킨슨병 및 다발성 경화증 같은 여러 신경 퇴행성 질환에서 신경 손상을 일으키는 데에 관여한다고 알려져 있다[1,2]. 최근, microglia-유도 신경독성과 apoptosis의 관련성에 관한 여러 연구들이 보고된 바 있다[3].

Type I programmed cell death라고도 불리는 apoptosis는 세포 증식과 세포사 간의 균형을 유지하는 중요한 기능을 하는 선택적인 생리학적 과정이다. 다양한 자극으로 인해 세포사멸로 이어지는 돌이킬 수 없는 과정이 촉발된다. 대부분의 세포독성 및 신경독성 물질들은 apoptosis를 통해 cell death를 일으킨다[4,5]. Apoptosis-유도 물질의 이점은 잠재적으로 유해한 세포를 염증반응 없이 제거하는 것이다.

오늘날 많은 종류의 신경퇴행성 질환 치료제들이 개발되었지만 그저 증상만 약화시켜줄 뿐이며[6], 그 약물

들의 부작용 또한 중요한 문제가 되고 있다[7]. 따라서 부작용이 적으며, 우수한 활성을 가지는 약재의 개발이 필요하다. 최근 천연약용식물에서부터 그러한 치료제를 개발하려는 노력이 활발하게 진행되고 있다[8-11].

또한 microglia가 다양한 신경성 질병에서 neuronal cell death와 관련되어 있다는 연구가 보고되고 있으며[1,12-15], microglia cell을 조절하여 microglia나 다른 신경 세포를 보호하는 저분자 물질 혹은 추출물을 찾으려는 노력이 진행되고 있다[14,16-18]. 따라서 microglia cell의 세포사멸 조절 물질을 찾게 된다면 microglia cell의 세포 사멸에 대한 이해가 증가하게 되고 이러한 결과는 향 후 많은 추가 시험 및 결과에 따라 신경성 질환의 치료제 개발에 일부 도움 및 방향 제시의 가능성이 있다고 생각된다. 본 연구에서는, 신경 보호 효과와 신경 독성에 대한 연구에서 광범위하게 쓰이는 대표적인 microglial cell인 BV-2 cell에서[5,16,19,20] 천연약재추출물의 cell death 유도 효과에 대하여 알아보았다.

재료 및 방법

실험 재료

세포 배양에는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Welgene, USA), fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA) 그리고 penicillin/streptomycin (Gibco, USA)이 사용되었다.

Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) (Duchefa, USA), dimethyl sulfoxide (DMSO) (Duchefa, USA), Nondet P-40 (NP40) (Sigma-Aldrich, USA) 그리고 Isopropanol (Merk Millipore, Germany)은 MTT assay에 사용되었다.

Western blot analysis에서 tween 20 (Sigma-Aldrich, USA, #P7949), NaF (Sigma-Aldrich, USA), Na_3VO_4 (Sigma-Aldrich, USA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich, USA), Protease Inhibitor (Roche diagnostics, USA), Protein assay dye reagent (Bradford assay reagent, Bio-Rad, USA) 및 polyvinylidene fluoride (PVDF)-membrane (Merk Millipore, Germany)이 사용되었다. Horseradish peroxidase (HRP)를 이용한 detection에는 West pico chemiluminescent substrate solution (Thermo scientific, USA)이 사용되었다. 본 실험에 사용된 항체는 다음과 같다. Rabbit polyclonal anti-caspase-3 (Cell signaling technology, USA), rabbit polyclonal anti-PARP (Cell signaling technology, USA), rabbit polyclonal anti-Bcl-2 (Cell signaling technology, USA), rabbit polyclonal anti-human anti-Bax (Cell signaling technology, USA), mouse polyclonal anti-α-tubulin (Santa cruz biotechnology, USA), rabbit polyclonal anti-vinculin (Santa cruz biotechnology, USA), Goat-anti-mouse HRP-conjugated secondary IgG antibody (Bethyl, USA) 그리고 Goat-anti-rabbit HRP-conjugated secondary IgG antibody (Bethyl, USA).

약재 및 추출법

본 실험에서 사용한 약재는 식품의약품안전처 승인 한약 규격품으로 정도약업사(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 약 50 g의 약재를 7배의 70% 에탄올을 가하여 24시간 동안 상온에서 침출하거나, 1시간 동안 초음파로 추출한 후 감압 여과하였다. 여과액을 감압 농축 한 후 -60℃ 이하에서 얼려 동결 건조하여 분말화하였다. 분말은 -20℃에 보관 후 실험 시 DMSO에 녹여 사용하였다. 건강피 [*Zingiberis Rhizoma* (*ZR*)]의 경우 상온 침출하였고, 수율은 2.16%였다.

세포 배양 및 형태적 변화 관찰

본 연구에서 사용된 세포는 microglia BV-2 cell이다. Microglia BV-2 cell은 5% FBS와 antibiotics (100 IU/ml penicillin 그리고 100 μg/ml streptomycin)가 포함된 DMEM에 37℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양하였다. BV-2 cell의 population doubling time은 본 실험의 조건에서 24시간 미만이었다.

BV-2 cell에 여러 농도의 *ZR*을 24시간 동안 처리 한 후 위상차 현미경 (Primo Vert, Zeiss, Germany)으로 형태적 변화를 관찰하였다.

세포 독성 분석

추출물의 세포 독성을 알아보기 위하여, MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다. 세포를 96-well plate에 3×10^4 cells/well로 seeding하여 여러 농도의 MPEs을 처리하였다. 20시간 배양 후, MTT를 20 μl (5 mg/ml) 처리하여 37℃에서 4시간 동안 반응시켰다. 상층액을 제거하고 dissolving solvent (4 mM HCl and 0.1% NP-40 in isopropanol)를 150 μl 넣어 충분히 섞어 주고, microplate reader (Wallac Victor 3-V, Perkinelmer, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot analysis

BV-2 cell에 여러 농도의 *ZR*을 여러 시간 동안 처리 하여 apoptosis 관련 단백질의 발현 변화를 관찰하였다. 세포를 lysis buffer (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% NP-40, 50 mM NaF, 2 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 and protease inhibitor, pH 7.5)로 lysis하여 Bradford assay로 단백질 농도를 측정하였다. 각 lysate에서 5 또는 10 μg의 단백질을

sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리 한 후 PVDF membrane에 electro-transfer하였다. Membrane은 5% non-fat milk로 상온에서 1 시간 동안 block되었고, 그 후 specific primary antibody를 1: 1,000으로 희석하여 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 그리고 HRP-conjugated secondary antibody를 1: 10,000으로 희석하여 상온에서 15분간 반응 시키고 chemiluminescent substrate solution을 이용하여 단백질 band를 관찰하였다.

결 과

Screening of MPEs for cytotoxicity

Microglia BV-2 cell의 cell death를 유도하는 MPEs를 찾기 위해, 세포에 MPEs (Table 1)를 100 μg/ml 농도에서 24시간 처리하여 MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 1). 그 중 40% 이하의 생존율을 나타내는 MPEs를 선택하여 그들의 농도 의존적인 세포 독성을 관찰하였다(Fig. 2). 선택된 4가지 MPEs인 E4, E5, E19 그리고 E26은 각각 *Foeniculi fructus*, *Forsythiae fructus*, *Zingiberis rhizoma* 그리고 *Hedera rhombea*이며, 그들의 IC_{50} 값은 각각 33, 83, 67 그리고 81 μg/ml이었다. 그 중 IC_{50} 값이 낮고 상대적으로 좁은 범위에서 cell death 유도 반응이 관찰되는 *Zingiberis rhizoma (ZR)*으로 세포사멸의 메커니즘을 살펴보았다.

ZR induced of BV−2 cell death.

BV-2 cell에 *ZR*을 여러 농도로 24시간 동안 처리 한 후 위상차 현미경으로 세포 형태의 변화를 관찰하였다(Fig. 3). 그 결과 살아 있는 세포 수의 감소와 형태적 변화가 농도 의존적으로 관찰되었다. Apoptotic cell의 뚜렷한 형태적 특징인 세포의 원형화가 관찰됨과 동시에 세포가 부

Table 1. Medicinal plant extracts (MPEs) used in this study

No.	추출물	과명
E1	*Rubi Fructus* (복분자)	Rosaceae
E2	*Salviae Miltiorrhizae Radix* (단삼)	Lamiaceae
E3	*Cassiae Semen* (결명자)	Fabaceae
E4	*Foeniculi Fructus* (회향)	Apiaceae
E5	*Forsythiae Fructus* (연교)	Oleaceae
E6	*Artemisiae Scopariae Herba* (인진)	Asteraceae
E7	*Rhei Rhizoma* (대황)	Polygonaceae
E8	*Mori Folium* (상엽)	Moraceae
E9	*Angelicae Gigantis Radix* (당귀)	Umbelliferae
E10	*Lycii Fructus* (구기자)	Solanaceae
E11	*Rhei Undulati Rhizoma* (종대황)	Polygonaceae
E12	*Peucedani Radix* (식방풍)	Umbelliferae
E13	*Glehniae Radix cum Rhizoma* (해방풍)	Umbelliferae
E14	*Mori Fructus* (상심)	Moraceae
E15	*Cyperi Rhizoma* (향부자)	Cyperaceae
E16	*Houttuyniae Herba* (어성초)	Saururaceae
E17	*Ampelopsis Radix* (백렴)	Vitaceae
E18	*Biotae Folium* (측백)	Cupressaceae
E19	*Zingiberis Rhizoma* (건강피)	Zingiberaceae
E20	*Moutan Cortex Radicis* (목단피)	Paeoniaceae
E21	*Ginseng Radix Alba* (인삼)	Araliaceae
E22	*Coriandri Herba cum Radix* (고수)	Umbelliferae
E23	*Sanguisorbae Radix* (지유)	Rosaceae
E24	*Scutellariae Radix* (황금)	Labiatae
E25	*Paeoniae Radix* (작약)	Paeoniaceae
E26	*Hedera rhombea* (송악)	Araliaceae
E27	*Citrii Unshiu Immaturi Pericarpium* (청피)	Rutaceae
E28	*Magnoliae Cortex* (후박)	Magnoliaceae
E29	*Acori Gramineri Rhizoma* (석창포)	Araceae
E30	*Perilla Herba* (소엽)	Labiatae
E31	*Angelicae Dahuricae Radix* (백지)	Umbelliferae
E32	*Chrysanthemi Flos* (감국)	Compositae
E33	*Houttuyniae Herba* (어성초)	Saururaceae
E34	*Cirsii Herba* (대계)	Compositae
E35	*Prunellae Spica* (하고초)	Labiatae

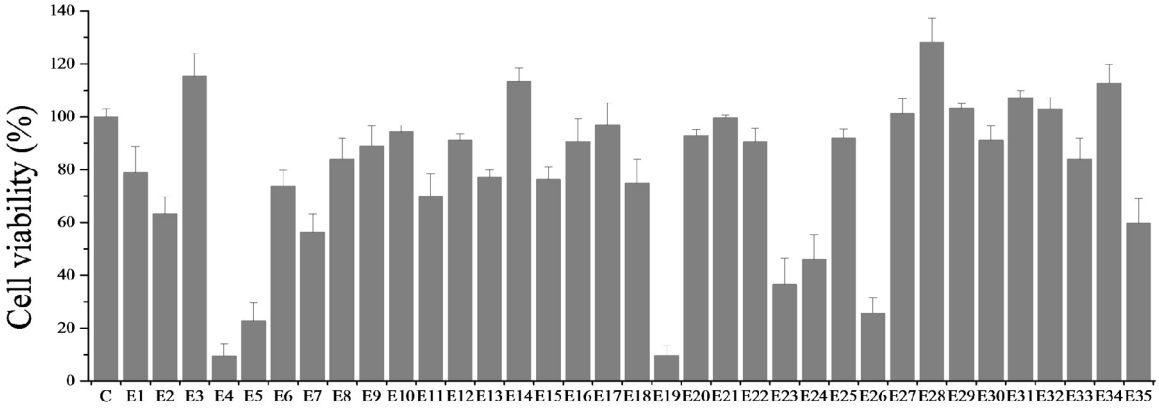

Fig. 1. Screening of MPEs for cytotoxicity in BV-2 cells. Cells were treated with 100 μg/ml of each MPE for 24 hrs and cell survival was measured by the MTT assay.

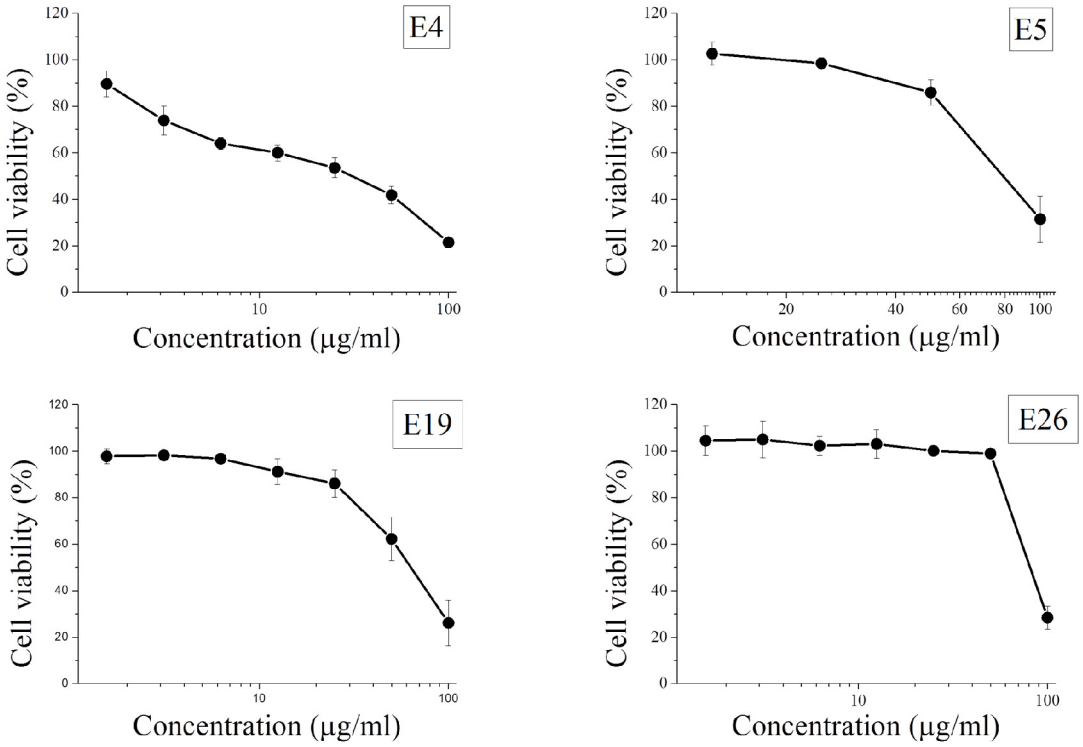

Fig. 2. Dose-dependent cytotoxicity of selected MPEs. BV-2 cells were treated with 0~100 μg/ml of E4, E5, E19 and E26 (*Foeniculi fructus*, *Forsythiae fructus*, *Zingiberis rhizoma* and *Hedera rhombea* respectively.) MPEs for 24 hrs and cell survival was measured by the MTT assay. IC_{50} values of 4 MPEs were measured.

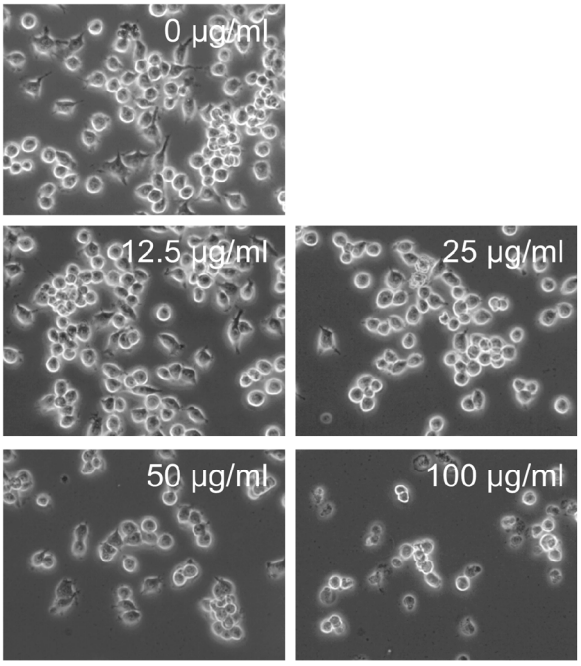

Fig. 3. Antiproliferative effect of *ZR* in BV-2 cells. Morphological changes in BV-2 cells in response to *ZR* treatment. Cells were incubated with indicated concentrations of *ZR* for 24 hrs. Cell morphology was observed under a phase-contrast microscope (200X magnification) after *ZR* treatment.

착되지 않고 떠있었으며, 수축되는 양상이 관찰되었다.

Effect of *ZR* treatment on caspase−3 activation

*ZR*의 apoptosis 유도 메커니즘을 알아보기 위해, apoptosis-관련 단백질들의 발현 변화를 관찰해보았다. Western blot analysis를 통해 *ZR*이 처리된 BV-2 cell의 Bcl-2, Bax, caspase-3, 그리고 PARP [poly(ADP-ribosyl)polymerase] 발현 변화를 관찰하였다. Fig. 4에 나타난 것처럼, *ZR*을 여러 농도로 24시간 처리 했을 때, apoptotic signaling pathways의 중요한 조절인자인 Bcl-2[21] 발현은 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다. 하지만 pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현은 50 μg/ml 및 100 μg/ml로 처리시에 경미한 증가 양상을 보였다. 또한 *ZR*은 caspase-3의 proteolytic processing을 농도 의존적으로 유도하여 processed active caspase-3가 나타나는 것이 관찰되었다. Caspase-3의 활성은 여러 단백질의 cleavage를 일으키는데, PARP도 그 중의 하나이다. PARP가 cell death 과정에서 필수적인 단백질은 아니지만, PARP의 cleavage는 apoptosis의 전형적인 특징 중 하나다. *ZR*은 PARP의 cleavage 또한 농도 의존적으로 유도하였다. 마찬가지로, *ZR* 100 μg/ml을 여러 시간 동안 처리 했을 때 시간 의존적으로 caspase-3와 PARP의 cleavage가 일어났다(Fig. 5).

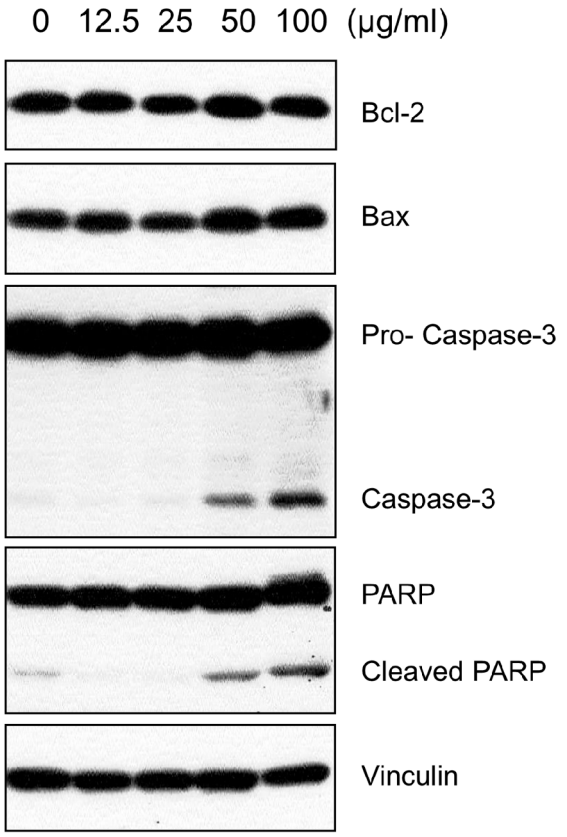

Fig. 4. Dose-dependent changes in the expression of apoptosis-related proteins in response to *ZR* treatment. BV-2 cells were treated with various concentrations of *ZR* for 24 hrs. Cell extracts were subjected to western blotting to determine immunoreactivity levels of Bcl-2, Bax, caspase-3, and PARP. Representative western blots are shown.

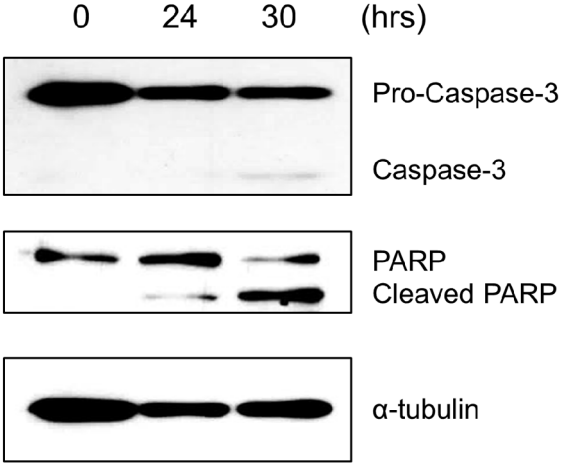

Fig. 5. Time-dependent changes in the expression of apoptosis-related proteins in response to *ZR* treatment. BV-2 cells were treated with 100 μg/ml of *ZR* for various time points. Cell extracts were subjected to western blotting to determine immunoreactivity levels of caspase-3, and PARP. Representative western blots are shown.

고 찰

신약개발에서의 천연물의 중요성은 꾸준히 두드러졌고[22,23], 다양한 질병의 신약개발에서 천연물은 좋은 원천이었다[24]. 천연물과 그 구성 분자들은 의약화학에서 약물 디자인에 유용하게 쓰여져 왔다[25].

Zingiberis rhizome (건강피, *ZR*)는 *Zingiber officinale* Rocs (Zingiberaceae, 생강과)의 뿌리를 말린 것이다. ZR은 전통적으로 암, 당뇨, 거담 약제로 사용되었다[26]. *ZR*의 hexane fraction이 blood-brain barrier를 통과하는 것으로 알려져 있으며, microglia로 인한 염증반응을 억제함으로써 neuronal damage를 완화시킨다고 보고된 바 있다[27]. 본 연구에서는 천연물들의 microglial BV-2 cell에서의 cell death-유도 효과에 대해서 조사하였다. 여러 MPEs 중에서 선택된 *ZR*은 cell death를 유도 하였고 IC_{50} 값은 67 μg/ml 이었다. *ZR*의 BV-2이외의 다른 세포에 유해한 것인지를 알아보기 위해 PC-12 cell (ATCC CRL-1721)과 U-2 OS cell (ATCC HTB-96)에도 *ZR*을 100 μg/ml의 농도로 처리하여 본 결과 각각 107.7±10.1% 및 95.2±15.4%의 생존율을 보여 *ZR*이 BV-2 cell에서 유의하게 세포사멸을 유도하는 것으로 보인다. *ZR*이 유도하는 cell death의 경로를 탐색하기 위해 necrosis 및 autophagy 등 cell death와 관련 있는 경로를 조사하였으나, *ZR*이 BV-2 cell에서 이러한 경로에 대한 관여는 미미하였다 (data not known).

본 연구에서 *ZR*의 apoptosis 유도효과를 알아보기 위해 apoptosis-관련 단백질의 발현 변화를 알아보았다. 그 결과, anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 변화는 관찰되지 않았지만 pro-apoptotic protein인 Bax의 발현은 경미한 농도의존적인 증가가 관찰되었다. 결과적으로 apoptosis 유도에서 중요한 Bcl-2/Bax의 비율이[28] 감소하게 되어 apoptosis가 유도된 것으로 생각된다. BV-2 cell에 *ZR*을 처리 했을 때 농도 및 시간 의존적으로 caspase-3가 활성화 되는 것으로 나타났다. 그에 따라 downstream 단백질인 PARP의 cleavage도 관찰되었으며 이는 약물 처리로 유도된 caspase 활성에 의한 PARP cleavage가 관찰된 연구들과 유사한 결과를 보였다[29,30]. 이러한 결과들은 Neuron등에 대한 안전성 실험 등 다 각도의 추가 실험을 통한다면 *ZR*이 신경퇴행성 질환의 신약 개발에 있어 도움이 될 가능성이 있음을 시사한다.

감사의 글

This study was supported by a grant from BIO & Medical Technology Development Program of National Research

Foundation of Korea grant (MEST, 2012M3A9C6049936).

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

1. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. Nat Rev Neurosci. 2007;8:57-69. doi:10.1038/nrn2038.
2. Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. Nat Rev Immunol. 2011;11:775-787. doi: 10.1038/nri3086.
3. Chen CM, Wu CT, Yang TH, Chang YA, Sheu ML, Liu SH. Green Tea Catechin Prevents Hypoxia/Reperfusion-Evoked Oxidative Stress-Regulated Autophagy-Activated Apoptosis and Cell Death in Microglial Cells. J Agric Food Chem. 2016;64:4078-4085. doi:10.1021/acs.jafc.6b01513.
4. Foo JB, Saiful Yazan L, Tor YS, Wibowo A, Ismail N, How CW, Armania N, Loh SP, Ismail IS, Cheah YK, Abdullah R. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by betulinic acid-rich fraction from Dillenia suffruticosa root in MCF-7 cells involved p53/p21 and mitochondrial signalling pathway. J Ethnopharmacol. 2015;166:270-278. doi:10.1016/j.jep.2015.03.039.
5. Liu Z, Song G, Zou C, Liu G, Wu W, Yuan T, Liu X. Acrylamide induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in BV-2 microglial cells. Free Radic Biol Med. 2015;84:42-53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.013.
6. Chen X, Pan W. The Treatment Strategies for Neurodegenerative Diseases by Integrative Medicine. Integr Med Int. 2014;1: 223-225. doi:10.1159/000381546.
7. Mizuno Y. Recent Research Progress in and Future Perspective on Treatment of Parkinson's Disease. Integr Med Int. 2014;1:67-79. doi:10.1159/000365571.
8. Dey A, Bhattacharya R, Mukherjee A, Pandey DK. Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. Biotechnol Adv. 2016; 16:30160-30164. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.12.005.
9. Ablat N, Lv D, Ren R, Xiaokaiti Y, Ma X, Zhao X, Sun Y, Lei H, Xu J, Ma Y, Qi X, Ye M, Xu F, Han H, Pu X. Neuroprotective Effects of a Standardized Flavonoid Extract from Safflower against a Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson's Disease. Molecules. 2016;9:21. doi:10.3390/molecules21091107.
10. Choi DK, Koppula S, Suk K. Inhibitors of microglial neurotoxicity: focus on natural products. Molecules. 2011; 16:1021-1043. doi:10.3390/molecules16021021.
11. Park SY. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. Arch Pharm Res. 2010;33: 1589-1609. doi:10.1007/s12272-010-1010-y.
12. Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. Trends. Immunol. 2008;29:357-365. doi:10.1016/j.it.2008.05.002.
13. Loane DJ, Stoica BA, Pajoohesh-Ganji A, Byrnes KR, Faden AI. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 modulates microglial reactivity and neurotoxicity by inhibiting NADPH oxidase. J Biol Chem. 2009;284: 15629-15639. doi:10.1074/jbc.M806139200.
14. Lee DS, Jeong GS. Arylbenzofuran isolated from Dalbergia odorifera suppresses lipopolysaccharide-induced mouse BV2 microglial cell activation, which protects mouse hippocampal HT22 cells death from neuroinflammation-mediated toxicity. Eur J Pharmacol. 2014;728:1-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.12.041.
15. Stoica BA, Loane DJ, Zhao Z, Kabadi SV, Hanscom M, Byrnes KR, Faden AI. PARP-1 inhibition attenuates neuronal loss, microglia activation and neurological deficits after traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2014;31:758-772. doi: 10.1089/neu.2013.3194.
16. Li Z, Hu H, Lin R, Mao J, Zhu X, Hong Z, Tao J, Zhang Y, Chen L. Neuroprotective effects of Gua Lou Gui Zhi decoction against glutamate-induced apoptosis in BV-2 cells. Int J Mol Med. 2014;33:597-604. doi:10.3892/ijmm.2013.1612.
17. Wang C, Xie N, Zhang H, Li Y, Wang Y. Puerarin protects against β-amyloid-induced microglia apoptosis via a PI3K-dependent signaling pathway. Neurochem Res. 2014;39: 2189-2196. doi:10.1007/s11064-014-1420-1.
18. Liu J, Huang D, Xu J, Tong J, Wang Z, Huang L, Yang Y, Bai X, Wang P, Suo H, Ma Y, Yu M, Fei J, Huang F. Tiagabine Protects Dopaminergic Neurons against Neurotoxins by Inhibiting Microglial Activation. Sci Rep. 2015;5:15720. doi:10.1038/srep15720.
19. Kwon OW, Moon E, Chari MA, Kim TW, Kim AJ, Lee P, Ahn KH, Kim SY. A substituted 3,4-dihydropyrimidinone derivative (compound D22) prevents inflammation mediated neurotoxicity; role in microglial activation in BV-2 cells. Bioorg. Med Chem Lett. 2012;22:5199-5203. doi:10.1016/j.bmcl.2012.06.082.
20. Hao F, Zhang NN, Zhang DM, Bai HY, Piao H, Yuan B, Zhu HY, Yu H, Xiao CS, Li AP. Chemokine fractalkine attenuates overactivation and apoptosis of BV-2 microglial cells induced by extracellular ATP. Neurochem Res. 2013;38: 1002-1012. doi:10.1007/s11064-013-1010-7.
21. Reed JC. Bcl-2 family proteins. Oncogene. 1998;17: 3225-3226. doi: 10.1038/sj.onc.1202591.
22. Hong J. Natural product diversity and its role in chemical biology and drug discovery. Curr Opin Chem Biol. 2011; 15:350-354. doi:10.1016/j.cbpa.2011.03.004.
23. Rosén J, Gottfries J, Muresan S, Backlund A, Oprea T. Novel chemical space exploration via natural products. J Med Chem. 2009;52:1953-1962. doi:10.1021/jm801514w.
24. Butler MS. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. Nat Prod Rep. 2008; 25:475-516. doi:10.1039/b514294f.

25. Rodrigues T, Reker D, Schneider P, Schneider G. Counting on natural products for drug design. Nat Chem. 2016;8:531-541. doi:10.1038/nchem.2479.
26. Ali BH, Gerald B, Tanira MO, Nemmar A. Some phytochemical and toxicological properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe): a review of recent research. Food Chem Toxicol. 2008;46:409-420. doi:10.1016/j.fct.2007.09.085.
27. Jung HW, Yoon CH, Park KM, Han HS, Park YK. Hexane fraction of Zingiberis Rhizoma Crudus extract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglial cells via the NF-kappaB pathway. Food Chem Toxicol. 2009;47:1190-1197. doi: 10.1016/j.fct.2009.02.012
28. Oltvai, ZN, Korsmeyer, SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. Cell 1994;79:189-192.
29. Li Y, He K, Huang Y, Zheng D, Gao C, Cui L, Jin YH. Betulin induces mitochondrial cytochrome c release associated apoptosis in human cancer cells. Mol Carcinog. 2010;49:630-640. doi:10.1002/mc.20638.
30. Khan I, Guru SK, Rath SK, Chinthakindi PK, Singh B, Koul S, Bhushan S, Sangwan PL. A novel triazole derivative of betulinic acid induces extrinsic and intrinsic apoptosis in human leukemia HL-60 cells. Eur J Med Chem. 2016;108:104-116. doi:10.1016/j.ejmech.2015.11.018.