약학회지 제40권 제 6 호 720~726(1996)
Yakhak Hoeji Vol. 40. No. 6

글루타메이트에 의한 신경독성에 미치는 징코라이드의 영향

김소라 · 전미희* · 김영중#
서울대학교 약학대학, *보건복지부 중앙약사심의위원회
(Received October 9, 1996)

Ginkgolides Attenuate Glutamate-Induced Neurotoxicity in Primary Cultures of Rat Cortical Cells

So Ra Kim, Mee Hee Jeon* and Young Choong Kim#
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
**The Central Pharmaceutical Affairs Council, Government Complex II, Kwachun-City, Kyungkido 427-760, Korea*

Abstract—The neurotoxicity induced by L-glutamate in primary cultures of rat cortical cells could be attenuated by diterpene constituents of *Ginkgo biloba* leaves, ginkgolides A, B and C. At the concentration of 100 nM, ginkgolides up-regulated the activity of glutathione reductase in primary cultures of rat cortical cells exposed to 100 μM glutamate. Furthermore, ginkgolides increased the content of reduced glutathione in glutamate-treated cortical cells. However, ginkgolides showed little effect in reducing superoxide dismutase activity. Ginkgolides did, however, markedly blocked the production of malondialdehyde, a byproduct of lipid peroxidation in glutamate-treated rat cortical cells.

Keywords □ glutamate, primary cultures of rat cortical cells, ginkgolides, glutathione reductase, superoxide dismutase, glutathione, malondialdehyde.

노인성 질환 중에서 최근 사회 문제로까지 대두되고 있는 치매는 알쯔하이머씨 병이 주원인인 것으로 알려졌다. 알쯔하이머씨 병 환자는 콜린성, 아드레날린성, GABA성 및 글루타메이트성 신경에 이상이 초래되며, 특히 콜린성 신경의 손실이 가장 심각하다고 보고되었다.[1] 이러한 다양한 신경 중에서도 최근에 알쯔하이머씨 병의 발병이나 진전에 글루타메이트성 신경이 깊이 연관되어 있다는 연구보고가 급증하면서 글루타메이트성 신경에 작용하는 물질을 이용하여 알쯔하이머씨 병을 예방하거나 치료하려는 시도에 관심이 고조시되고 있다.[2-4] 글루타메이트는 뇌조직 중에서 기억력과 학습력에 관여한다고 알려진 소뇌편도, 해마 등에 집중적으로 분포되어 있는 세 종류의 수용체, 즉 quisqualate, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 및 kainate 수용체에 작용하여 다양한 생리작용의 발현에 관여한다.[5] 하지만 이들 조직이 저산소나 저혈당 상태와 같이 비정상 상태에 이르게 되면 시냅스에서 유리되는 글루타메이트의 양이 증가된다. 그러나 신경세포 내로의 재흡수는 감소되어 결과적으로 세포 외의 글루타메이트 농도가 증가된다.[7-8] 이와 같이 세포 외의 글루타메이트의 농도가 증가되면 세포 내의 Ca^{2+}의 농도가 따라서 증가되고 이에 따라 자유 분자단의 생성이 증대되어 결국에는 세포막에 상해를 일으켜 신경세포의 괴사가 초래된다.[8-9] 따라서 이러한 글루타메이트의 작용을 차단시킬 수 있는 물질은 알쯔하이머씨 병의 증상을 개선시키거나 진행을 지연시킬 수 있다고 보고되었다.[10]

본 연구실에서는 생약 및 민간약을 중심으로 글루타메이트로 인한 신경독성 차단효과를 검색하던 중 은행잎 추출물이 글루타메이트로 인한 독성을 유의성 있게 차단시킴을 확인하였다. 은행잎 추출물은 1972년에 유럽에서 특허화되어 심혈관계 및 노인성 말초 순환장애,

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7842 (팩스) 02-888-2933

뇌혈관 장애의 치료제로 널리 사용되고 있으며 이러한 효과는 주로 flavonoid계 성분에 의한 것으로 밝혀졌었다.[11] 그러나 최근 은행잎 중의 diterpene계 성분인 ginkgolides가 주 약효성분이며 강력한 platelet activating factor에 대한 길항작용이 있다고 보고된 이래 이에 대한 연구가 활발하다.[11-12] 특기할 만한 것은 은행잎 중의 diterpene계 성분인 ginkgolides와 sesquiterpene인 bilobalide가 일차배양한 흰쥐의 해마세포나 계배의 뇌신경세포에서 과량의 글루타메이트에 의한 신경세포 괴사를 유의성있게 차단시켰다는 보고가 있다.[12-13] 그러나 이에 대한 작용기전은 밝혀진 바 없다. 이에 본 연구에서는 ginkgolides 중에서 A, B 및 C가 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포에서 글루타메이트에 의해 유도되는 신경독성을 어떠한 기전으로 완화시키는지 알아보았다.

실험방법

실험동물 – Sprague-Dawley계 자성 흰쥐 (150~250 g)를 서울대학교 동물사육장에서 공급받아 서울대학교 약학대학 실험동물실에서 사육하였다. 사육장의 환경은 실내온도를 22±5°C로 유지하고 조명시간을 아침 7시에서 저녁 7시로 고정하였으며, 사료는 조단백 23.2%, 조지방 4.0%, 조섬유 6.0%, 조회분 10.0%, 조칼슘 0.6%, 조인 0.4%등이 함유된 고형사료 (서울, 삼양사)를 사용하였다. 자성 흰쥐를 교배시켜 임신을 유도하고 임신된지 17~19일된 태자를 실험에 사용하였다.

시약 및 재료 – 본 연구에 사용한 모든 시약은 Sigma사 (St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을, fetal bovine serum은 Hyclone사 (Logan, Utah, U.S.A.) 제품을 사용하였다. Ginkgolides A, B 및 C는 독일 Heidelberg 대학의 H. Schink 박사님으로부터 표품을 제공받아 사용하였다.

흰쥐의 대뇌피질세포의 분리 및 배양 – 대뇌피질세포의 분리 및 배양은 Choi의 방법[14]을 약간 수정하여 본 연구실에서 확립한 방법[15]에 따라 행하였다. 간단히 기술하면 흰쥐 태자의 대뇌를 적출한 후 해부현미경을 이용하여 피질 부분만을 분리한 다음 막을 제거한 후 0.25% trypsin으로 30분간 처리하여 조직을 연화시킨 다음 개개의 세포 상태로 분리하였다. 분리한 신경세포를 LDH와 MTT assay를 위하여 poly-L-lysine으로 도포한 배양용기 (Corning, 15×24 mm)에 1×10^5 cells/dish씩 이식하였다. 항산화 효소의 활성 검색을 위하여서는 collagen으로 도포한 배양용기 (Corning, 60 mm dishes)에 3×10^6 cells/dish씩 이식하였다. 배양액은 DMEM 90%, fetal bovine serum 10%, penicillin 100 IU/m*l*과 streptomycin 10 μg/m*l*으로 구성된 것을 사용하였다. 세포의 배양은 일정한 습도를 유지하는 37°C 배양기에서 공기 (95%)와 CO_2 (5%)의 혼합기체를 계속 공급시키면서 수행하였으며 세포배양 3일 후에 5×10^{-5} M의 5-fluorodeoxyuridine으로 처리하여 신경세포가 아닌 다른 세포들의 성장을 저지시켰다.

글루타메이트에 의한 신경독성 유발 – 분리한 흰쥐의 대뇌피질세포를 14일 동안 배양한 후 100 μM의 글루타메이트를 24시간 동안 배양세포에 작용시켜 신경독성을 유발시켰다.[14-15]

Ginkgolides의 투여 – Ginkgolides는 대뇌피질세포에 글루타메이트로 독성을 유발시키기 1시간 전에 미리 농도별로 투여하였다.

MTT assay – 배양 중인 대뇌피질세포의 배양액에 MTT (5 mg/m*l*)를 배양액의 10%가 되도록 가하고 계속하여 3시간 더 배양한 후 생성된 formazan을 DMSO로 녹여낸 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.[16]

Lactate dehydrogenase (LDH)의 정량 – 흰쥐의 대뇌피질세포의 배양액을 취하여 배양액 중으로 유리된 LDH를 정량 Kit을 이용하여 정량하였다.[17]

Superoxide dismutase 활성 측정 – 일차배양한 대뇌피질세포 내의 superoxide dismutase의 활성은 McCord와 Fridovich 등의 방법[18]을 약간 수정하여 측정하였다.

Glutathione reductase 활성 측정 – 일차배양한 대뇌피질세포 내의 GSSG-R의 활성은 Carlberg와 Mannerviik의 방법[19]으로 측정하였다.

Glutathione의 정량 – 일차배양한 대뇌피질세포 내의 총 glutathione양과 GSSG양은 Griffith의 방법[20]으로 측정하였다.

과산화 지질의 정량 – 지질의 과산화 정도는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 표준물질로 하여 Asakawa와 Matsushita의 방법[21]을 응용하여 측정하였다.

단백질 정량 – 단백질 양은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry 방법[22]으로 505 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

Table I—Effects of ginkgolides A, B and C on glutamate-induced neurotoxicity in rat cortical cells

Concentration	Relative ratio of MTT(%)	Relative ratio of LDH (%)
Control	100.0	100.0
Reference	0.0	0.0
Ginkgolide A		
10 nM	28.1	18.9
100 nM	48.2**	45.7**
1 μM	45.8*	39.1*
10 μM	6.7	6.0
Ginkgolide B		
10 nM	26.9	26.5
100 nM	51.6**	50.4**
1 μM	53.8**	49.8**
10 μM	10.4	5.5
Ginkgolide C		
10 nM	31.0*	34.0*
100 nM	47.0**	45.2*
1 μM	35.3*	27.8
10 μM	0.5	0.0

Control is the value for primary cultured rat cortical cells. Control values for MTT and LDH were 1.23±0.08 optical density and 197.6±1.06 Unit/m*l*, respectively.
Reference is the value for primary cultured rat cortical cells exposed to glutamate. Reference values for MTT and LDH were 0.58±0.02 optical density and 110.9±0.31 Unit/m*l*, respectively.
Differs significantly from the control: $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $n=3$.

통계처리 – 통계적 유의성 검토는 대조치로부터의 변동을 "one-way ANOVA" test로 하였으며 p값이 5% 미만일 때는 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

뇌신경계 질환을 치료하거나 예방할 수 있는 새로운 의약품을 개발하려는 노력이 부단히 경주되고 있으나 이러한 의약품으로 개발될 수 있는 생리활성물질을 신속하고 정확하게 검색할 수 있는 방법은 아직까지도 명쾌하게 제시되어 있지 않다. 이에 본 연구에서는 생체를 대신하여 신경세포의 연구에 널리 이용되고 있는 일차 배양한 흰쥐의 대뇌피질세포를 이용하여 글루타메이트에 의한 신경독성을 차단하는 물질을 검색하던 중 은행잎 추출물이 글루타메이트에 의한 대뇌피질세포의 사멸을 완화시킴을 알았다. 이에 은행잎 추출물로부터 유효물질의 분리를 시도하기 전에 은행잎의 성분으로 이미 platelet activating factor에 대한 강력한 길항작용을 갖는 것으로 알려진 ginkgolides가 혹시 이러한 활성을 나타내는지 그 여부를 검색하여 보았다. 검색결과 ginkgolides도 유의성 있게 글루타메이트에 의한 신경독성을 완화시킴을 알고 그 작용기전을 밝히고자 하였다. 흰쥐의 대뇌피질세포를 글루타메이트성 수용체가 충분히 발달되도록 14일간 배양한 후 100 μM의 글루타메이트를 작용시키면 신경축색돌기의 굵기가 가늘어지며 분절되고 신경세포 자체도 팽윤되어 결국에는 사멸되는 것을 현미경으로 관찰할 수 있었다. Ginkgolides A, B 및 C를 14일 동안 배양한 흰쥐의 대뇌피질세포에 10 nM에서 10 μM까지 농도별로 작용시키고 1시간 후에 글루타메이트를 처리하여 독성을 유발시키면서 계속하여 24시간동안 더 배양한 후 현미경 관찰, MTT assay를 이용한 생존율 측정 및 배양액 중으로 유리되는 LDH양을 측정하였다 (Table I). Ginkgolides A, B 및 C는 모두 글루타메이트로 인한 신경독성을 유의성 있게 완화시켰으며 각각 100 nM에서 최고의 효과를 나타내어 정상상태 때의 48%, 52% 및 47% 수준까지 대뇌피질세포를 생존시켰다.

글루타메이트 수용체는 직접적으로든 간접적으로든 이온 channel들과 연결되어 있어 과량의 NMDA 수용체의 효능제를 배양세포에 투여하면 단시간 내에 세포 내의 Ca^{2+}, Na^+ 등의 농도가 증가되며, 이러한 양이온의 유입에 이어서 세포 내의 전압 조절을 위하여 음이온이 역시 세포내로 유입되고, 높아진 삼투압을 조절하기 위하여 물이 세포내로 유입되어 결국은 세포가 팽윤되고 터져서 괴사하게 되는데 이러한 현상은 배양세포의 경우 30분 이내에 급속하게 나타난다.[8] 또한, 배양세포에 NMDA 수용체의 효능제를 고농도로 투여한 다음 30분 이내에 즉시 효능제를 제거하여도 24시간 후에는 배양세포에 심한 독성이 나타난다.[9] 이는 세포내로 유입된 Ca^{2+}에 의해 여러 calcium-dependent 효소가 활성화되고 cystine uptake도 억제되어 세포 내에서 자유 분자단의 생성이 증대되어 독성이 유발되는 것으로 받아들여지고 있으며 다양한 항산화제들이 글루타메이트로 인한 독성을 유의성 있게 차단시킨다는 보고가 이를 뒷받침한다.[1] 세포 내의 자유 분자단은 정상환경에서도 생성되나 세포 내에 존재하는 항산화제인 glutathione에 의해 직접 포합되거나 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase 등 일련의 효소들과 반응하여 인체에 무해한 물질로 변화되어 배설된다.[18-20] 그

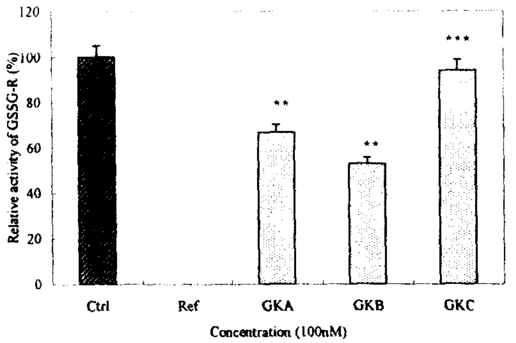

Fig. 1—Effects of ginkgolides on the activity of glutathione reductase in primary cultured rat cortical cells exposed to glutamate.
Control is the value for primary cultured rat cortical cells. Control value for GSSG-R was 67.5 ±3.9 nmol NADPH oxidized/mg protein/min.
Reference is the value for primary cultured rat cortical cells exposed to glutamate. Reference value for GSSG-R was 34.6±2.2 nmol NADPH oxidized/mg protein/min.
Differs significantly from the control: $p<0.01^{**}$, $p<0.01^{***}$(n=3).

러나 비정상적으로 세포내에서 자유 분자단이 과다하게 생성되면 항산화 작용이 지속적으로 원활하게 진행되지 못하고 세포막의 지질이 과산화되어 세포의 괴사가 유도된다.[21]

세포내의 자유 분자단의 생성이 증가되면 환원형 glutathione (GSH)보다는 산화형 glutathione (GSSG)양이 증가하게 되며, 증가된 GSSG는 glutathione reductase (GSSG-R)에 의해 다시 GSH로 환원되어 항산화작용이 지속적으로 유지된다. 그러나 신경세포가 글루타메이트에 의해 독성을 입게 되면 GSSG-R의 활성이 저하되어 세포내에서의 GSSG양은 정상상태 때보다 증가되고 이에 따라 항산화작용도 원활히 유지되지 못한다. 이에 ginkgolides가 글루타메이트로 인해 감소된 대뇌피질세포 내의 GSSG-R의 활성에 어떻게 영향을 미치는 지 알아보았다 (Fig. 1). Ginkgolides A와 B는 각각 100 nM에서 글루타메이트로 인해 감소된 GSSG-R의 활성을 각각 정상상태 때의 67%와 53% 수준까지 증대시켰으며 특히, ginkgolide C를 100 nM 작용시켰을 때는 정상상태 때의 활성수준까지 증대시켜 ginkgolides는 항산화작용의 항상성 유지에 관여하는 것으로 생각된다.

또한, 세포내에 총 glutathione양이 적거나 GSSG양이 과다하게 존재할 때에는 글루타메이트로 인한 세

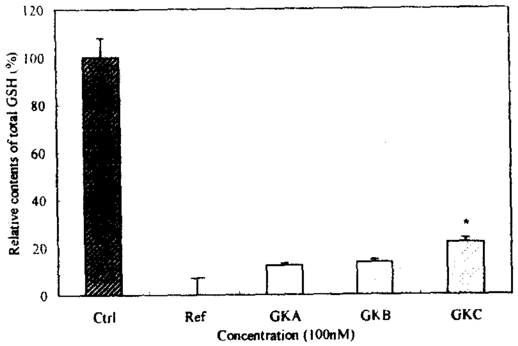

Fig. 2—Effects of ginkgolides on the content of total glutathione in primary cultured rat cortical cells exposed to glutamate.
The nomenclature is precisely as described under the legend to Fig. 1.
Control value for total glutathione content was 89.3±7.9 nmol/mg protein. Reference value for total glutathione content was 21.8±3.1 nmol/mg protein.
Differs significantly from the control: $p<0.05^{*}$ (n=3).

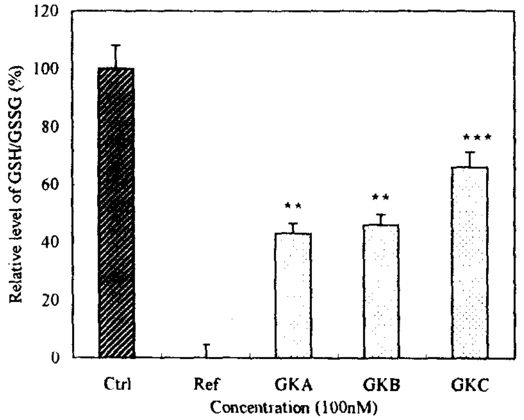

Fig. 3—Effects of ginkgolides on the level of GSH/GSSG in primary cultured rat cortical cells exposed to glutamate.
The nomenclature and levels of significance are precisely as described under the legend to Fig. 1 (n=3).
Control level for GSH/GSSG was 11.4±0.9. Reference level for GSH/GSSG was 3.5±0.2.

포 괴사를 더욱 촉진시킨다는 보고[8]가 있어 ginkgolides가 글루타메이트에 의해 감소된 glutathione 양에 어떻게 영향을 미치는 지 배양세포를 수집하여 세포내에 존재하는 총 glutathione양과 환원형 및 산화형 GSSG양을 측정함으로써 알아보았다 (Figs. 2 and 3). Ginkgolides는 글루타메이트로 인하여 감소

된 세포내의 총 glutathione양은 유의성있게 증가시키지 못하였다 (Fig. 2). 그러나 ginkgolides A, B 및 C는 글루타메이트로 인하여 감소된 GSH 양은 유의성있게 증대시키고, 글루타메이트로 인하여 증가된 GSSG 양은 감소시켜 GSH/GSSG의 값을 정상상태 때의 66% 수준까지 유지시켰다 (Fig. 3). 이러한 결과는 ginkgolides에 의해 GSSG-R의 활성이 증대됨으로써 GSSG를 GSH로 원활히 환원시킴으로써 GSH의 양을

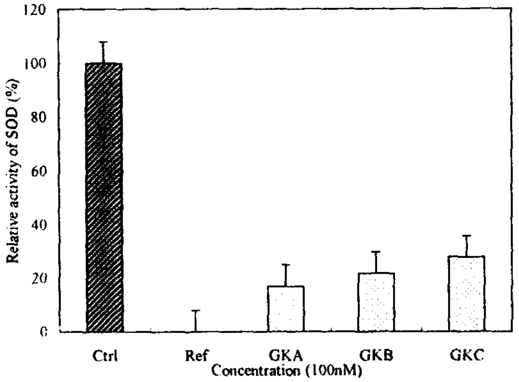

Fig. 4—Effects of ginkgolides on the activity of superoxide dismutase in primary cultured rat cortical cells exposed to glutamate.
The nomenclature is precisely as described under the legend to Fig. 1(n=3).
Control value for SOD was 53.5±4.4 mU/ml.
Reference value for SOD was 27.5±2.7 mU/ml.

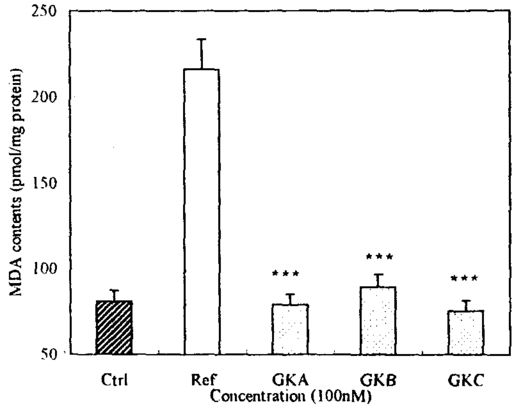

Fig. 5—Effects of ginkgolides on the production of malondialdehyde in primary cultured rat cortical cells exposed to glutamate.
The nomenclature is precisely as described under the legend to Fig. 1.
Differs significantly from the control: p<0.01***, (n=3).

증대시킨 결과로 추측된다.

Ginkgolides가 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포에서 글루타메이트로 인한 신경독성으로 저하된 SOD의 활성에는 어떻게 작용하는 지 알아보았다. 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포에 ginkgolides A, B 및 C를 각각 100 nM의 농도로 작용시킨 후 글루타메이트로 독성을 유발시키고, 24시간 후에 배양세포를 수집하여 SOD 활성을 측정하였을 때, ginkgolides A, B 및 C는 SOD의 활성에 별다른 영향을 미치지 않았다 (Fig. 4). 이러한 결과는 은행잎 추출물 제제인 Egb 761은 자유 분자단을 직접 포합하여 항산화 효과를 나타내는데 이러한 작용은 은행잎 추출물의 성분 중 flavonoid 계열의 성분에 의한 것이며, terpene 계열의 성분들은 직접 자유 분자단을 포함하지 않는다는 보고와 일치한다고 하겠다.[23-24]

Ginkgolides A, B 및 C는 각각 100 nM에서 글루타메이트로 인한 신경독성으로 증가된 지질의 과산화 산물인 malondialdehyde의 생성량을 정상상태 때의 수준까지 감소시켜 세포막 지질의 과산화를 거의 완벽하게 차단시킴을 알 수 있었다 (Fig. 5). 그러나 ginkgolides가 세포막 지질의 과산화를 정상상태 때의 수준까지 차단시킴에도 불구하고 글루타메이트로 인한 독성을 완전히 차단시키지 못하는 것은 독성유발 초기에 일어나는 세포내로의 Ca^{2+} 유입을 차단시키지 못함으로써 이에 따른 급성독성을 막지 못하여 일어나는 결과로 일단은 추측할 수 있으나 이를 뒷받침 할 연구가 뒤따라야 할 것이다.

결 론

1. Ginkgolides A, B 및 C는 모두 100 nM에서 글루타메이트로 인한 세포괴사를 유의성있게 완화시켜 각각 정상상태 때의 48%, 52% 및 47% 수준까지 대뇌피질세포를 유지시켰다.

2. Ginkgolides A, B 및 C는 글루타메이트로 인해 저하된 glutathione reductase의 활성을 정상상태 때의 수준까지 증대시켰다.

3. Ginkgolides A, B 및 C는 환원형 glutathione양도 유의성있게 증가시켜 정상상태 때의 세포내의 산화환원 반응의 항상성을 유지시키는 것으로 생각된다.

4. Ginkgolides A, B 및 C는 글루타메이트로 인한 지질 과산화로 증가된 malondialdehyde의 생성량을

정상상태 때의 수준까지 감소시켰다.

감사의 글

본 연구에 소요된 경비는 교육부 지원 한국학술진흥재단의 94년도 자유공모과제 (과제번호 01 F 0119) 학술연구조성비로 충당된 것으로 이 연구비 지원에 감사드리며 ginkgolides A, B 및 C를 기증해 주신 독일 Heidelberg 대학의 H. Schink 박사님께도 감사드립니다.

문 헌

1) Smith, C. M. : Alzheimer's Disease. In *Neurotransmitters, Drugs and Disease* (eds Webster, R. A. and Jordan, C. C.), Blackwell Scientific Publ. Co., London, p. 428 (1989).
2) Choi, D. W., Maulucci-Gedde M. A. and Kriegstein, A. R. : Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* **7**, 357 (1989).
3) Rothman, S. M. : Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J. Neurosci.* **4**, 1884 (1984).
4) Zaczek, R. and Coyle, J. T. : Excitatory amino acid analogues: Neurotoxicity and seizure. *Neuropharmac.* **21**, 15 (1982).
5) Monaghan, D. T., Bridges, R. J. and Cotman, C. W. : The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmac. Toxic.* **29**, 365 (1989).
6) Kauppisen, R. A., McMahon, H. T. and Nicholls, D. G. : Ca^{2+}-dependent and Ca^{2+}-independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca^{2+} concentration in isolated nerve terminals following metabolic inhibition: Possible relevance to hypoglycemia and anoxia. *Neurosci.* **27**, 175 (1988).
7) Weiloch, T. : Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonists. *Science* **230**, 681 (1985).
8) Kariman, K : Mechanism of cell damage in ischemia: A hypothesis. *Life Sci.* **37**, 71 (1985).
9) Albers, G. W., Goldberf, M. P. and Choi, D. W. : N-methyl-D- aspartate antagonists: Ready for clinical trial in brain ischemia. *Annal. Neurol.* **25**, 398 (1989).
10) Thiels, E., Weisz, D. J. and Berger, T. W. : *In vivo* modulation of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation by glycine modulatory site. *Neurosci.* **11**, 3430 (1992).
11) Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, R. and Moritier, F. : Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Med.* **61**, 126 (1995).
12) Prehn, J. H. M. and Krieglstein, J. : Platelet-activating antagonists reduce excitoxic damage in cultured neurons from embryonic chick telencephalon and protect the rat hippocampus and neocortex from ischemic injury in vivo. *J. Neurosci. Res.* **34**, 179 (1993).
13) Krieglstein, J., Ausmeier, F. El-abhar, H., Lippert, K., Welsch, M., Rupalla, K. and Henrich-Noack, P. : Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* constituents. *Eur. J. Pharmaceu. Sci.* **3**, 39 (1995).
14) Choi, D. W. : Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.* **58**, 293 (1985).
15) Park, M. J., Kim, S. R., Moon, A., Kim, S. H. and Kim Y. C. : Primary culture brain cells as screening methods for natural products acting on glutamatergic neurons. *Yakhak Hoeji* **39**, 444 (1995).
16) Mosmann, T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immuno. Methods* **65**, 55 (1983).
17) Choi, D. W. and Koh J. Y. : Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Methods* **20**, 83 (1987).
18) McCord, J. M. and Frivich, J. : Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969).
19) Carlberg, I. and Mannervik, B. : Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*

250, 5475 (1975).

20) Griffith, O. W. : Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl pyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207 (1980).

21) Asakawa, T. and Matsushita, S. : Thiobarbituric acids test for detecting lipid peroxides. *Lipids* **14**, 401 (1980).

22) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

23) Maitra, I., Marcocci, L., Droy-Lefaix, M. T. and Packer, L. : Peroxyl radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* extract Egb 761. *Biochem. Pharm.* **49**, 1649 (1995).

24) Marcocci, L., Magguire, J. J., Droy-Lefaix, M. T. and Packer, L. : The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract Egb 761. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **201**, 748 (1994).