

Glutamate에 의한 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하는 제비꽃 추출물의 영향

이미라¹ · 한창석² · 한동열² · 박은주³ · 이승철¹ · 박해룡^{1,*}

¹경남대학교 식품생명학과, ²대한당한약방 한약연구실, ³경남대학교 식품영양학과

Protective Effect of Neuronal Cell on Glutamate-induced Oxidative Stress from *Viola mandshurica* Extracts

Mi-Ra Lee¹, Chang Suk Han², Dong Youl Han², Eunju Park³, Seung-Cheol Lee¹ and Hae-Ryong Park^{1,*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

²Laboratory of Herbal Medicine, Daehandang Herb Clinic, Sancheong 666-921, Korea

³Department of Food and Nutrition Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Received January 4, 2008; Accepted February 20, 2008

The present study describes glutamate which is known as excitatory neurotransmitter is related with oxidative damages and the *Viola mandshurica* extracts. Showed protective effects against glutamate-induced cytotoxicity. The protective effect of antioxidant on the glutamate treated N18-RE-105 cells was determined by a MTT reduction assay. The neuroprotective effect of methanol, ethanol, and acetone extracts from *V. mandshurica* against glutamate-induced cytotoxicity was assessed by the results of an MTT reduction assay. Among the three extracts, the acetone extract showed the highest protective effect by the results of an lactate dehydrogenase release assay. Therefore, these results suggest that *V. mandshurica* extracts could be a new potential candidate against glutamate-induced oxidative stress.

Key words: glutamate toxicity, N18-RE-105 cells, oxidative stress, *Viola mandshurica*

서 론

현대 사회의 눈부신 발달과 더불어 생체조직의 노화를 비롯 한 퇴행성 신경질환은 사회적인 문제로까지 크게 대두되고 있다. 특히 이러한 질환의 주된 원인이 활성산소(free radical, oxygen radical)에 기인한다는 것이 인정됨^{1,2}에 따라 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제의 개발과 연구에 더 많은 관심이 집중되고 있다.^{3,4} 이러한 활성산소들은 불안정하고 산화력이 높아 여러 생체물질과 쉽게 반응하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스를 유발하게 되며 이러한 산화적 스트레스는 지질과산화물을 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 세포의 노화와 변형을 유도함으로써 여러 가지 질병을 초래하게 된다.^{5,6}

활성산소를 제거하기 위해 세포내에서는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등 항산화 효소와 glutathione,⁷ uric acid⁸ 등의 여러 가지 비효소적 항산화

물질이 있어 활성산소에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호한다. 특히 glutathione peroxidase는 환원형 glutathione(GSH)을 산화형 glutathione(GSSG)으로 산화시키면서 H₂O₂를 제거하며 GSSG는 glutathione reductase에 의해 다시 GSH로 환원되어 인체 내에서 균형을 이루면서 존재하게 된다. 세포내에 독성 또는 산화적 손상이 일어난 경우에는 GSSG가 서서히 증가하게 되어 GSH/GSSG의 불균형을 초래하여 세포 사멸이 일어나게 된다. 이러한 GSH는 활성산소에 의한 세포 손상을 방지하고 세포 내 해독작용을 담당하는 중요한 물질로 여겨지고 있으며 glutamate, cysteine, glycine이라는 아미노산들로 구성되어 있다.⁹ GSH를 이루고 있는 아미노산 중에서 glutamate는 중추신경계에서 주요한 흥분성 신경전달물질로서 신경계에 필수적인 요소로 작용하지만 뇌 속의 과다한 축적은 뇌세포의 사멸과 변성을 초래하여 알츠하이머와 같은 퇴행성 뇌질환을 야기하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁻¹² 또한 glutamate의 농도 증가가 신경세포의 괴사를 초래하는 것으로 알려지면서 이와 관련된 연구가 활발히 이루어졌다. 특히 Ca²⁺ 농도의 상승¹³과 glutamate에 작용하는 N-methyl-D-aspartate(NMDA)와 non-NMDA 수용체를 차단^{14,15}시키려는 약물을 찾으려고 했으나 NMDA 수용체에 작용하는 어떤 약물들은 정신질환 증후를 나타내며 NMDA

*Corresponding author
Phone: +82-55-249-2689; Fax: +82-55-249-2995
E-mail: parkhy@kyungnam.ac.kr

수용체 복합체에 길항 작용하는 약물이 발작, strokes 이상 증상을 유발하고 있다. 이러한 내용으로 보아 glutamate에 의한 신경세포의 손상¹⁶⁾에 대한 정확한 기전은 알려지지 않고 있다.

그리고 glutamate의 농도 증가는 cysteine 흡수를 차단하여 세포내 GSH 수준을 두드러지게 감소시켜 산화적 스트레스를 유발하여 신경세포의 괴사를 초래하는 것으로 알려져 있으나 산화적 손상이 세포 내에서 대사적 경로를 통하여 세포사멸을 일으키는지는 명확하지 않다.¹⁷⁻²⁰⁾ 다만 어떠한 자극에 의한 세포내 활성산소의 생성과 GSH 함유량의 감소, 그리고 세포손상 기전들이 단독 또는 복합적인 기전으로 작용함으로써 세포사멸을 초래한다고 보여 진다. 이러한 이유로 glutamate 농도 증가로 인한 신경세포 사멸은 산화적 스트레스와 관련성이 있는 것으로 추측하고 있다.

본 연구팀에서는 국내외에서 자생하고 있는 435가지의 약용식물 추출물을 대상으로 뇌신경세포계 hybridoma N18-RE-105 세포주를 이용하여 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호효과를 갖는 천연추출물의 탐색을 시도하였다. 그 결과 제비꽃(*Viola mandshurica*)추출물로부터 강력한 신경세포 보호효과를 확인할 수 있었다. 제비꽃은 다년생 초본으로 줄기가 없고 잎은 뿌리로부터 총생하며 엽병이 길고 날개가 있다. 꽃은 보통 4-5월에 농자색으로 핀다. 과실은 원추형으로 성숙하면 3열로 갈라지며 다갈색의 종자가 튀겨서나간다. 주요성분은 지상부에 flavone 배당체²¹⁾로 orientin, isorientin 등이 함유되어 있으며, 약리작용으로는 적리균, 황색포도상구균, 폐렴구균, 피부진균, 결핵균의 성장을 억제, 소염효과 등이 알려져 있다. 하지만 제비꽃에 관한 생리약리학적 연구는 아직 초보적인 단계에 불과하며, 특히 신경세포 보호효과와 관련된 연구는 수행된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하는 생리활성물질을 탐색하기 위한 목적으로 제비꽃의 추출물을 이용하여 glutamate에 의해 손상된 N18-RE-105 신경 세포주에 대한 보호효과를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 실험재료. 본 실험에서 사용된 제비꽃은 경상남도 산청군 지리산 근처에서 채집하여 음건, 추출하여 실험에 사용하였다. 신경세포 보호효과 실험에 사용된 시약으로 L-glutamic acid(monosodium salt hydrate), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), ascorbic acid, dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)제품을 구입하였으며, lactate dehydrogenase(LDH) release assay kit는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)로부터 구입하였다. 세포주 배양을 위해 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), horse serum(HS) 및 HAT supplement 등은 Gibco-BRL(Grand Island, NT, USA)에서 구입하였으며, 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

추출물 제조. 제비꽃 5 g에 methanol, ethanol, acetone 용매를 각각 100 ml씩 가하여 상온에서 3일 동안 정치시켜 추출한 후, 여과지(5C. 110 mm, Advantec, Tokyo Roshi Kaish, Ltd.,

Tokyo, Japan)로 여과하였다. 여과된 추출액은 회전감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C에서 감압 농축하여 각 용매 추출물을 얻었다. 각 추출물은 10 mg/ml로 DMSO에 녹여 적당한 농도로 희석하였고, 최종농도 1% DMSO가 되도록 처리하였다.

세포주 및 배양. 본 실험에 사용된 세포주는 hybridoma N18-RE-105 cell로써 한국생명공학연구원에서 분양 받아 사용하였다. 사용된 배지는 DMEM medium에 10% FBS, 5% HS 및 1×HAT supplement를 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO₂ incubator(MCO-18AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

산화적 스트레스 유도. 신경세포에서의 산화적 스트레스를 유도하기 위하여 glutamate를 시간별로 처리하였다. 96-well plate에 5×10⁴ cells/ml 농도로 세포를 분주한 후, 24시간 동안 배양하고 10, 20 mM의 최종농도로 glutamate를 24, 36시간 노출시킨 뒤 산화적 스트레스를 받아 50% 이하의 세포사멸을 유도하는 적절한 농도와 시간을 결정하였다.

MTT 분석을 통한 세포 생존율 측정. 제비꽃 추출물과 ascorbic acid의 신경세포 보호효과를 측정하기 위하여 MTT reduction assay를 실시하였다. 세포주를 5×10⁴ cells/ml로 맞추고 96-well plate에 각각 100 μl씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 제비꽃 추출물을 각 용매별 10, 50, 100 μg/ml와 ascorbic acid 50, 100 μM의 최종농도로 처리하였다. 30분 동안 배양한 후 20 mM glutamate를 처리하여 24시간 배양하고 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT(5 mg/ml) 용액을 10 μl씩 첨가하여 1시간 동안 다시 배양하였다. 반응 후 well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO 100 μl 첨가하여 녹이고 ELISA reader(Model 680, BioRad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구 세포수를 100%로 하였을 때 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

LDH 측정에 의한 세포독성 확인. 제비꽃 추출물의 신경세포 보호효과를 측정하기 위한 방법으로 LDH release assay를 실시하였다. N18-RE-105 세포주를 5×10⁴ cells/ml로 맞춘 후, 100 μl씩 96-well plate에 분주하여 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 뒤 10, 50, 100 μg/ml의 최종농도로 제비꽃 acetone 추출물을 세포주에 처리하였다. 30분 후 20 mM glutamate를 처리하여 24시간 배양한 다음, 배양액을 새로운 96-well plate에 50 μl 분주하고, 이 배양액에 LDH reagent를 50 μl씩 첨가하여 상온에서 정치시킨 후, 20분간 반응하였다. 반응이 완료되면 stop solution인 1 N HCl을 100 μl씩 첨가하여 반응을 중지시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 살아남은 세포의 LDH 측정을 위해 배양액을 제거한 후, 0.5% Triton X-100용액을 50 μl 첨가하여 40 rpm으로 10분 동안 shaking시켜 세포벽을 깨트린 다음, 같은 방법으로 LDH reagent 50 μl를 첨가하여 반응 시키고, 반응이 끝나면 반응 정지액을 넣은 뒤, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH에 의한 세포독성의 백분율은 배양액과 살아있는 세포에서 유리된 총 LDH에 대한 배양액으로부터 유리된 LDH의 값으로 계산하여 glutamate 실험군과 비교한 값을 나타내었다.

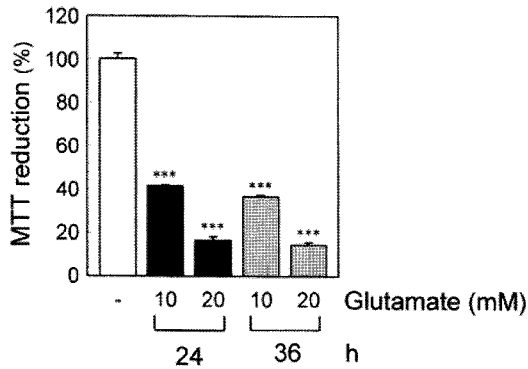


Fig. 1. Concentration- and time-dependent effect of glutamate toxicity on N18-RE-105 cell viability. Cells were treated with various concentrations (10, 20 mM) of glutamate and cell count after (24 h, 36 h) incubation. After MTT assay, the MTT reduction rate (mean±S.D. of triplicate determination) were calculated by setting each of control survivals in the absence of glutamate. ***significant vs. control glutamate-treated cells $p<0.001$.

신경세포의 형태학적 변화 관찰. 제비꽃 acetone 추출물에 대한 N18-RE-105 세포주의 형태학적인 관찰을 위해 6-well plate에 1×10^5 cells/well로 24시간 동안 배양하였다. 제비꽃 acetone 추출물을 농도별(50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리한 후 20 mM의 glutamate를 24시간 노출시켜 phase-contrast microscope(TS 100-F, Nikon, Tokyo, Japan)로 각 well의 세포형태를 관찰하고 100배로 사진 촬영하였다.

통계처리. 모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준편차(SD)를 구하고 각 추출물의 세포독성 정도를 비교하기 위해 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고 Scheffe's test를 이용하여 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

Glutamate의 세포독성과 ascorbic acid의 항산화작용. 뇌신경세포계 hybridoma N18-RE-105 세포주에 대한 glutamate의 세포독성을 농도와 시간별로 알아보기 위해 glutamate를 처리한 결과는 Fig. 1과 같다. Glutamate의 세포독성은 농도와 시간에 의존적으로 나타났으며 최종농도 20 mM glutamate를 처리하고 24시간이 경과하자 정상세포의 16.8% 수준으로 세포 생존율이 감소하였다. 다음으로 glutamate 세포독성과 세포내 산화-환원계의 연관성을 조사하기 위하여 천연 항산화제인 ascorbic acid를 30분 전 처리한 후, 20 mM glutamate를 처리하여 세포 생존율을 조사하였다. 신경세포가 외부환경으로부터 자극을 받으면 신경상해를 입는 것과 동시에 세포사가 유도되어 세포의 형태학적인 변화가 나타나므로²²⁾ glutamate로 유도된 세포독성의 상태에서 ascorbic acid가 세포의 형태학적 변화에 미치는지를 알아보기 위해 광학 현미경 하에서 관찰하였다(Fig. 2A). 정상군에 비해 glutamate 처리군은 세포독성으로 인하여 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보여 신경세포가 형태학적으로 큰 변화가 유도된 것을 확인할 수 있었으나, ascorbic acid를 처

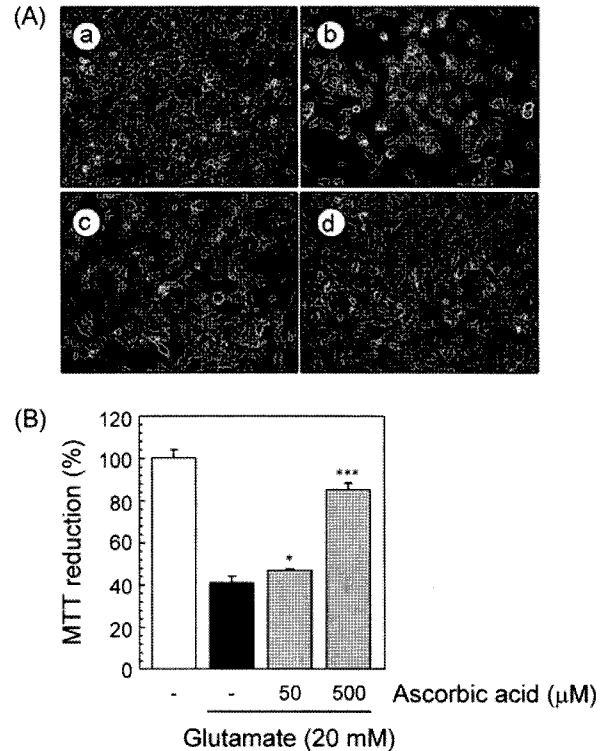


Fig. 2. Protective effect of ascorbic acid on the glutamate-induced cytotoxicity cell death in N18-RE-105 cells. (A) The cells were exposed to various concentrations of ascorbic acid and morphological changes were monitored for 24 h (a: control, b: 20 mM glutamate, c: 20 mM glutamate+ascorbic acid 50 μM , d: 20 mM glutamate+ascorbic acid 500 μM). (B) Photographs were taken with a phase-contrast microscope at 100 \times magnification. Cell survival effects of ascorbic acid was determined using MTT reduction assay (means±S.D. of triplicate determination) were calculated by setting each of control survivals in the absence of glutamate and ascorbic acid. *: $p<0.05$; ***: $p<0.001$.

중농도 50 μM , 500 μM 전처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 신경세포의 생존을 확인할 수 있었다. 그리고 동일한 조건에서 MTT reduction assay 방법을 이용하여 정상군과 glutamate 처리군 그리고 glutamate와 ascorbic acid를 농도별로 처리한 실험군과 비교하였다. Fig. 2B의 결과와 같이 glutamate 처리군의 세포 생존율은 40.8% 수준으로 떨어졌으나 ascorbic acid를 50 μM , 500 μM 로 처리했을 때의 생존율은 47%, 85.3%로 세포가 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 고농도의 glutamate는 세포내의 산화-환원 system 이상을 초래하여 세포사를 일으키며 산화적 스트레스를 유도하고 있음을 확인할 수 있었다.

제비꽃 추출물의 신경세포 보호효과. 본 연구팀에서는 고농도의 glutamate가 유도하는 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하는 물질을 찾기 위하여 천연물을 대상으로 탐색을 시도하였다. 그 결과, 제비꽃(*Viola mandshurica*)추출물로부터 강력한 신경세포 보호효과를 확인할 수 있었다. 먼저, 제비꽃을 용매별로 추출하여 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종농도로 N18-RE-105 세포주에 처리하여 glutamate에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에 대한 신경세포 보호효과를 확인하였다(Fig. 3). Methanol과 acetone 추출물 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 39.3%, 49.4%로 약한 활성

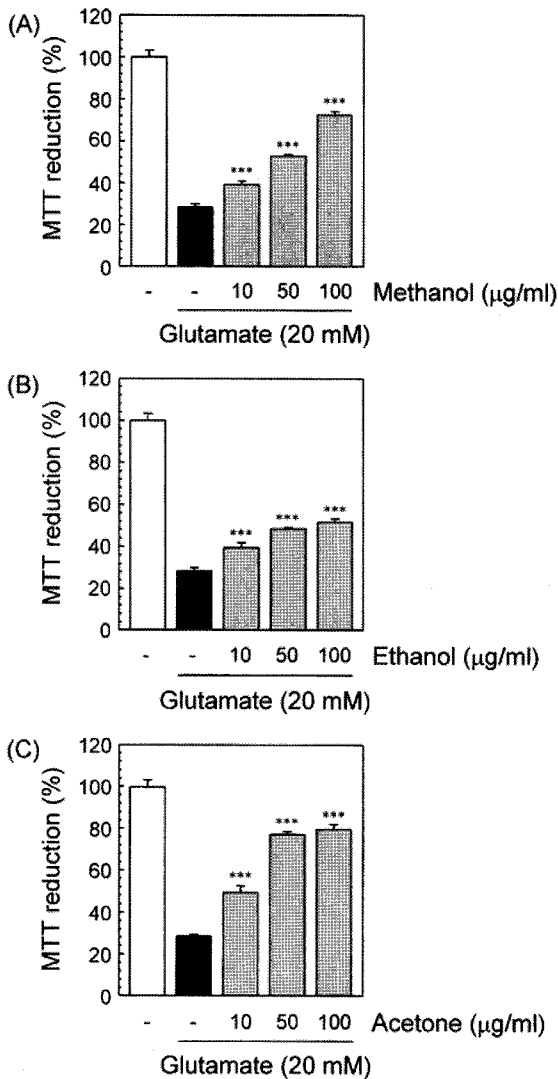


Fig. 3. *Viola mandshurica* extracts protected N18-RE-105 cells from glutamate-induced cytotoxicity in a dose-dependent manner. The cells were treated with various concentrations (10, 50, 100 µg/ml) of each extracts of *V. mandshurica* (A: methanol extract, B: ethanol extract, C: acetone extract). After MTT assay, the MTT reduction rate (means±S.D. of triplicate determination) were calculated by setting each of control survivals in the absence of glutamate and *V. mandshurica* extracts. ***significant vs. control glutamate-treated cells ($p < 0.001$).

을 보이지만, 100 µg/ml로 처리했을 때에는 각각 72.1%, 79.4%로 급격히 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 특히 acetone 추출물의 경우 50 µg/ml에서도 76.8%의 생존율을 보이면서 강력하게 세포를 보호하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 다음으로 glutamate로 유도된 세포독성 상태에서 활성이 가장 좋은 acetone 추출물을 가지고 N18-RE-105 세포주의 형태학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 광학 현미경 하에서 관찰하였다(Fig. 4A). 그 결과, 정상군에 비해 glutamate 처리군은 신경세포의 형태학적을 큰 변화가 유도된 것을 확인할 수 있으나, 제비꽃의 acetone 추출물을 50 µg/ml, 100 µg/ml을 최종 농도로 처리하였을 때 신경세포의 생존을 확인할 수 있었다. 이러한 신경세포의 형태학적인 변화를 통하여 제비꽃 acetone 추출물은 glutamate 독성에 의한 신경세포 손상을 억제하거나 보호

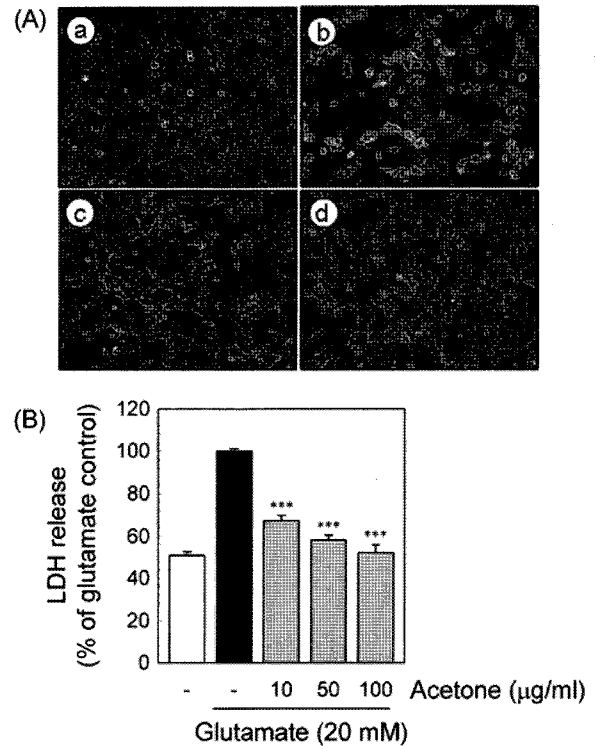


Fig. 4. Protective effect of acetone extracts from *V. mandshurica* on the glutamate-induced oxidative stress cell death in N18-RE-105 cells. (A) The cells were exposed to various concentrations of *V. mandshurica* acetone extracts and morphological changes were monitored for 24 h (a: control, b: 20 mM glutamate, c: 20 mM glutamate+*V. mandshurica* acetone extracts 50 µg/ml, d: 20 mM glutamate+*V. mandshurica* acetone extracts 100 µg/ml). Photographs were taken with a phase-contrast microscope at 100× magnification. (B) The cells were treated with various concentrations 10, 50, 100 µg/ml of *V. mandshurica* acetone extracts. Data were normalized to the activity of LDH release from vehicle-treated cells (100%) and expressed as percentage of the control glutamate-treated cells (obtained separate plating). ***significant vs. control glutamate-treated cells ($p < 0.001$).

하는 효과가 있다는 것을 확신할 수 있었다. 또한 동일한 조건 하에서 세포의 손상 정도를 확인하기 위하여 세포 배양액 중에 들어있는 LDH의 방출 양을 측정된 결과는 Fig. 4B와 같다. Glutamate가 처리된 N18-RE-105 세포주에 제비꽃의 acetone 추출물을 10, 50, 100 µg/ml을 최종농도로 처리하여 glutamate 처리군과 비교한 결과, LDH 방출량이 67.5, 57.8, 52.1%로 감소하여 정상군의 수준으로 회복되었다는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 제비꽃의 acetone 추출물이 glutamate에 의해 유도된 산화적 스트레스로부터 신경세포 손상을 강력하게 억제한다는 것을 시사한다. 이상의 결과로부터, glutamate에 의한 세포독성에 산화적 손상이 관여하고 있고, 이에 제비꽃 추출물이 항산화 작용을 함으로써 glutamate의 세포독성을 방어하고 있는 것으로 생각된다.

초 록

본 연구에서는 신경독소일 뿐만 아니라 흥분성 신경전달물질로 잘 알려져 있는 glutamate의 세포독성이 산화적 손상과 관

련하고 있고, 여기에 방어효과를 보이는 제비꽃 추출물에 관하여 연구하였다. MTT reduction assay를 통하여 glutamate의 세포독성을 확인하였고 ascorbic acid와 같은 대표적인 항산화제를 처리한 후 광학 현미경을 이용한 형태학적 변화를 관찰하였다. N18-RE-105 세포주에 최종 농도 20 mM의 glutamate를 처리 하면 40.8%의 생존율을 보이는데 반하여 ascorbic acid 500 μ M 최종농도로 처리하였을 때 85.3%의 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 그리고 신경세포 보호효과를 가지는 제비꽃을 methanol, ethanol, acetone 추출한 뒤 MTT reduction assay를 이용하여 활성을 확인하였으며 그 중 acetone 추출물을 최종농도 50, 100 μ g/ml를 처리 시 76.8%, 79.4%로 가장 높은 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 이 결과는 N18-RE-105 세포주의 형태학적 변화와 LDH release assay에서도 일치하는 결과를 확인하였다.

Key words: glutamate toxicity, N18-RE-105 cells, oxidative stress, *Viola mandshurica*

참고문헌

1. Yoon, M. Y., Kim, J. Y., Hwang, J. H., Cha, M. R., Lee, M. R., Jo, K. J. and Park, H. R. (2007) Protective effect of methanolic extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. on H₂O₂-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem* **50**, 63-67
2. Sagara, Y., Dargusch, R., Chambers, D., Davis, J., Schubert, D. and Mater, P. (1998) Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 1375-1389
3. Lee, Y. S. (2007) Antioxidative and physiological activity of extracts of *Angelica dahurica* leaves. *Korean J. Food Preserv.* **14**, 78-86
4. Kim, D. J., Seong, K. S., Kim, D. W., Ko, S. R. and Chang, C. C. (2004) Antioxidative effects of red ginseng saponins on paraquat-induced oxidative stress. *J. Ginseng Res.* **28**, 5-10
5. Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 7915-7922
6. Halliwell, B. and Aruoma, O. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Lett.* **281**, 9-19
7. Kim, S. H., Park, H. M., Seo, J. H. and Hur, M. (1997) The change of blood reduced glutathione according to postmenopausal HRT: GSH as a maker of antioxidant effect of the sex steroids. *JKSM.* **3**, 116-125
8. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E. and Hochstein P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 6858-6862
9. Kato, S., Ishita, S., Sugawara, K. and Mawatari, K. (1993) Cystine/glutamate antiporter expression in retinal Muller glial cells: implications for DL-alpha-aminoacidipate toxicity. *Neuroscience.* **57**, 473-482
10. Choi, W. H., Oh, Y. S., Ahn, J. Y., Kim, S. R. and Ha, T. Y. (2005) Antioxidative and protective effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* extracts on glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 479-483
11. Jeon, H. J., Park, S. W. and Mun, B. S. (2004) Effects of *Gwibitang* on glutamate-induced death in rat neonatal astrocytes. *J Korean Oriental Med.* **25**, 184-193
12. Lee, J., Kim, M. S., Lee, C., Kim, H. Y., Choi, D. H., Kim, T. Y., Son, Y. and Park, R. (2003) Role of morphine in the glutamate-induced oxidative damage of C6 glial cells. *Korean J Anesthesiol.* **45**, 271-277
13. Hwang, I. Y., Cheol, S. I., Song, Y. S., Seoung, M. J., Park, H. J., Lee, Y. M., Park, C. B., Lee, M. K., Oh, K. W., Sim, Y. Y. and Hong, J. T. (2002) Intracellular calcium concentration in the glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cell. *J. Toxicol. Pub. Health.* **18**, 355-362
14. Park, M. J., Kim, S. R., Moon, A. and Kim, S. H. (1995) Primary cultured brain cells as screening methods for natural products acting on glutamatergic neurons. *Yakhak Hoeji.* **39**, 444-449
15. Malouf, A. T., Coyle, J. T. and Schnaar, R. L. (1984) Agonists and cations regulate the glutamic acid receptors on intact neuroblastoma hybrid cells. *J Biol Chem.* **259**, 12763-12768
16. Park, M. J. and Kim, Y. C. (1992) Effects of betaine on the glutamate-induced neurotoxicity in primary cultured chicken brain cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **23**, 259-263
17. Kim, S. R., Jeon, M. H. and Kim, Y. C. (1996) Glinkgolides attenuate glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells. *Yakhak Hoeji.* **40**, 720-726
18. Kim, S. R., Jang, Y. P., Sung, S. H., Lee, H. S., Moon, A. and Kim Y. C. (1997) Bilobalide attenuates glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells. *Yakhak Hoeji.* **41**, 111-116
19. Murphy, T. H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R. L. and Coyle, J. T. (1989) Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron.* **2**, 1547-1558
20. Tan, S., Schubert, D. and Maher, P. (2001) Oxytosis: A novel form of programmed cell death. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**, 497-506
21. Yook, C. S., Lee, W. T. and Moon, C. K. (1989) Studies on flavonoid glycoside of the leaves of *Viola diamantica*. *Yakhak Hoeji.* **33**, 124-128
22. Yoon, M. Y., Lee, B. B., Kim, J. Y., Kim, Y. S., Park, E. J., Lee, S. C. and Park, H. R. (2007) Antioxidant activity and neuroprotective effect of *Psoralea corylifolia* Linne extracts. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**, 84-89