

글루타메이트에 의해 산화적 스트레스를 받은 HT22 세포주에서 포공영의 신경세포 보호 활성

이현우¹ · 마충제^{1,2*}

¹강원대학교 의생명과학대학 생물소재공학과, ²강원대학교 의생명과학연구소

Neuroprotective Effect of *Taraxacum platycarpum* Extract Against Glutamate-induced Oxidative Stress in HT22 Cells

HyeonWoo Lee¹ and Choong Je Ma^{1,2*}

¹Department of Medical Biomaterials Engineering, College of Biomedical science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

²Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Abstract – Glutamate acts as an important neurotransmitter in brain. However, high concentration of glutamate showed an excitatory neurotoxicity and resulted to neuronal cell death. Neuronal cell death is known for one of the reason of Alzheimer's disease, a neurodegenerative disease. We tried to find neuroprotective medicinal plants by neuroprotection activity against glutamate injured HT22 cells as a model system. In the course of bioscreening of various medicinal plants, *Taraxacum platycarpum* extract showed significant neuroprotective activity. We tried to elucidate mechanisms of neuroprotective activity. *T. platycarpum* extract reduced ROS and intracellular Ca²⁺ concentration increased by glutamate induced neurotoxicity. In addition, mitochondrial membrane potential was restored to the control level. Also, glutathione level, glutathione reductase and glutathione peroxidase activity were increased by *T. platycarpum* extract treatment. These data suggested that *T. platycarpum* showed neuroprotective activity via antioxidative activity.

Keywords – *Taraxacum platycarpum*, Alzheimer's disease, ROS, Neuroprotection, Antioxidant

알츠하이머 병, 파킨슨 병, 헌팅턴 병 등과 같은 퇴행성 뇌신경계 질환은 뇌신경의 기능상실로 인하여 발생하여 기억력 및 인지기능 손상의 증상을 나타낸다.¹⁾ 이 중 알츠하이머 병은 가장 흔하게 나타나는 퇴행성 뇌신경계 질환으로 다양한 원인으로 인하여 발병할 수 있다. 산화 스트레스도 그 원인 중 하나로 중요하게 작용한다. 더욱이 인간 수명의 연장으로 고령화가 가속화되어 퇴행성 뇌신경계 질환의 환자의 수가 급증할 것으로 예상되며 이에 대한 치료제의 개발이 시급한 실정이다. 글루타메이트는 흥분성 신경전달물질로 신경세포에서 학습 및 기억에 중요한 역할을 하지만, 과량의 글루타메이트는 흥분성 신경독성을 일으켜 신경세포의 사멸을 유도하게 된다.²⁾ 과도하게 높은 농도의 글루타메이트는 활성산소종의 생산을 높이고, 세포 내 칼슘이온의 농도를 증가시키게 된다.³⁾ 미토콘드리아를 손상시켜

그 기능을 제대로 하지 못하게 할 뿐 아니라 세포 내 항산화 효소인 글루타치온 퍼옥시다아제, 글루타치온 리덕타제의 활성을 감소시키기도 하고 결과적으로 글루타치온의 생성을 억제하는 등 세포 내에서 산화 스트레스를 유도한다.⁴⁾ 마우스 헤마 유래 세포주인 HT22 세포는 산화 스트레스에 의해 유도되는 신경 독성의 메커니즘을 밝히기 위한 *in vitro* 모델로 널리 사용되어왔다.⁵⁾ HT22 세포는 이온성 글루타메이트 수용체가 결핍되어 글루타메이트 유발 세포 사멸의 원인으로 흥분 독성을 제외한다.⁶⁾ 포공영은 국화과의 민들레(*Taraxacum platycarpum* H. Dahlstedt) 또는 동속 식물의 전초를 말린 약재로 열독을 내려주고 종기를 없애주는 약으로 다양한 염증의 치료에 사용되어 왔다. 포공영의 주요 성분으로는 taraxasteryl acetate, ptiloepoxyl acetate, α -amyrin acetate, 3 β -acetoxy-11 α -hydroperoxy-12-ursene, neoilexonol acetate, β -amyrin acetate, 등 트리테르펜 계열과 sonchuside A, cichorioside C, deacetylmaticarin 8-*O*- β -D-glucopyranoside, 11 β -hydroxydeacetylmaticarin 8-*O*- β -D-

*교신저자(E-mail): cjma@kangwon.ac.kr
(Tel): +82-2-250-6565

glucopyranoside, 11 β -hydroxyleucodin, ixerin D과 dihydro-syringin 등 세스퀴테르펜 계열 화합물이 보고된 바가 있다.^{7,8)} 최근 연구결과에 따르면 포공영은 면역 기능을 강화시키고, 항산화 효과, 항 염증 효과, 항 알러지 효과 및 항암 작용이 있으며 담즙 분비를 촉진시켜 간장 보호 작용이 있는 것으로 보고되어 있다.⁹⁻¹³⁾ 하지만, 지금까지 신경세포 보호 활성에 대하여는 알려진 바는 거의 없다.

본 연구진은 다양한 천연물의 추출물을 대상으로 신경세포 보호 활성을 검색하던 중 포공영의 메탄올 추출물이 유의성 있는 뇌신경세포 보호 활성을 나타내어 농도에 따른 뇌신경 세포 보호 활성을 평가하고 세포 내에서의 작용기전을 규명하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료 - Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Fetal bovine serum(FBS)은 Gibco(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였고, Glutamic acid, MTT solution, Trolox, NADPH, DTNB, GSSG-R(Glutathione disulfide reductase), GSSG oxidase, GSH(L-glutathione reduced), 2,7-dichlorofluorecin diacetate(DCF-DA), Fura-2AM, Rhodamin 123, Triton X-100은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 대정화금^(株)에서 구입하여 사용하였다.

포공영 추출물의 제조 - 본 연구에서 사용한 포공영은 경동시장(서울, 대한민국)에서 구입하여 마충제교수가 검증하고 실험에 사용하였으며, 시료의 표본은 강원대학교 의생명과학대학 천연물연구실에 보관되어 있다. 포공영의 뿌리를 제외한 전초 6 kg을 80%의 메탄올 조건에서 90분씩 6회 초음파 추출하였다. 그 추출액을 45°C 수욕상에서 감압하여 농축하였다. 시료의 표본은 강원대학교 의생명과학대학 천연물연구실에 보관되어 있다.

HT22 세포 배양 - 글루타메이트에 의한 세포 사멸에 대한 연구를 하기 위해 쥐의 해마 유래 세포주인 HT22 cell을 이용하였다. 10%의 FBS과 1%의 penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM 배지에 HT22 cell을 배양하였다.

뇌신경세포 보호 활성 측정 - 이전에 기술하였듯이 MTT assay를 이용해 cell viability를 측정하였다.¹⁴⁾ 배양된 HT22 cell을 48 well plate에 1.7 $\times 10^5$ /well의 농도로 seeding 하고 37°C, 5%의 CO₂의 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 control, negative control well에는 배지를, positive control well에는 50 μ M trolox를, 나머지 well에는 각각의 농도가 다른 포공영 추출물 sample을 처리하여 주었다. 약한 시간 정도 배양 후 control을 제외한 모든 well에 glutamate(2 mM)를 투여하였다. 이 때 모든 처리량은 30 μ l/well로 하였다. 처리 후 24시간 incubation하고, 모든 well에

150 μ l/well의 MTT solution(1 mg/ml in PBS)을 가하였다. 3시간 incubation 후 각 well의 배지를 suction하여 모두 제거하고 DMSO solution을 300 μ l/well로 처리하고 빛을 차단한 상태에서 30분간 두어 formazan crystal을 충분히 녹여주었다. 다 녹인 solution을 96 well plate에 200 μ l/well로 옮기고 ELISA reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 같은 조건에서 3회 반복하여 결과값을 통계처리하였다.

세포 내 ROS 측정 - 이전과 동일한 방법으로 HT22 cell에 glutamate와 trolox, sample을 처리하고 37°C에서, 5%의 CO₂의 조건으로 배양하였다.¹⁴⁾ 8시간 후 100 μ M의 DCF-DA를 40 μ l 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. 이 후 배지를 제거하고 1.0%의 triton X-100 300 μ l로 37°C에서 15분간 녹여 내었다. 형광도는 excitation wavelength - 490 nm / emission wavelength - 525 nm로 두 번 측정하여 비교하였다. 실험은 세 번 반복하여 결과 값을 통계처리 하였다.

세포 내 Ca²⁺ 농도 측정 - 이전에 실험한 방법과 같이 배양된 HT22 cell에 trolox와 sample을 처리하고 모든 well에 20 μ M의 Fura-2AM 10 μ l를 넣고 1시간 배양 후 glutamate를 처리하고 37°C에서 2시간 배양하였다.¹⁴⁾ 배양 후 배지를 제거하고 1.0%의 Triton X-100 150 μ l로 37°C에서 15분간 녹여낸다. 형광도는 calcium complex - 340 nm / calcium free - 510 nm로 두 번 측정하여 비교하였다. 실험 결과는 세 번 반복하여 측정된 값을 통계처리 하였다.

미토콘드리아 막전위 손상 억제 효과 측정¹⁴⁾ - 배양된 HT22 cell에 각각의 농도의 sample을 처리하고 1시간 후 2 mM의 glutamate를 처리해 세포 사멸을 유도하였다. 10 μ l의 rhodamine 123을 첨가하고 37°C에서 30분간 배양 후 PBS로 3회 세척하였다. 형광도는 excitation wavelength - 480 nm / emission wavelength - 525 nm에서 두 번 측정하여 비교하였다. 실험 결과는 세 번 반복 실험 후 측정된 값을 통계처리 하였다.

글루타치온 총 함량 및 항산화 효소 활성 측정¹⁴⁾ - HT22 cell을 6 well plate에 3.4 $\times 10^4$ cells/well 로 1 ml씩 seeding하고 24시간 동안 배양한 뒤, 각각 다른 농도의 포공영 추출물을 처리 1시간 후 2 mM의 glutamate를 첨가하였다. 24시간 배양 후 PBS로 2회 세척하고 10,000 g, 4°C 조건으로 30분간 원심분리를 하여 배지를 제거하고 170 μ l의 상층액을 수집하여 항산화 효소와 글루타치온의 양을 측정하였다. 글루타치온 총 함량은 312 nm에서 흡광도를 측정, 항산화 효소 활성 측정은 340 nm에서 각각 흡광도를 측정하였다. 실험 결과는 세 번 반복 실험 이후 측정된 값을 통계처리 하였다.

결과 및 고찰

MTT Assay를 통한 뇌신경세포 보호 활성 측정 - 글루

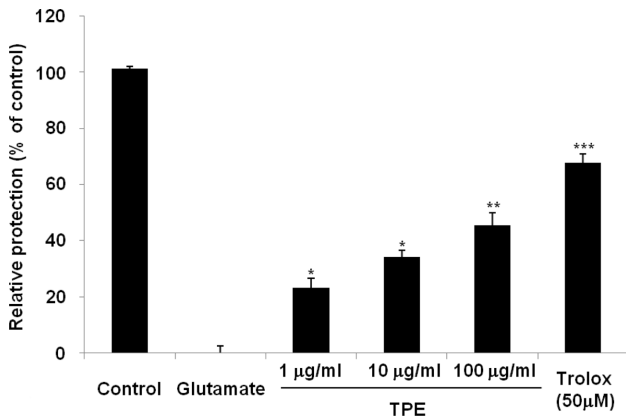


Fig. 1. Effect of *T. platycarpum* extract (1, 10 and 100 µg/ml) on glutamate-induced death of HT22 cells. Data are means ± S.D. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus the glutamate-treated group

타메이트는 중추신경계에서 세포 내 ROS 생성의 증가로 인한 산화 스트레스에 의한 신경 독성을 유발한다.¹⁵⁾ 포공영 추출물의 세포 보호 활성을 평가하기 위하여 글루타메이트로 유도하여 HT22 세포 사멸을 유발시킨 후 24시간 후의 세포 생존율을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다(Fig. 1). 추출물의 처리 농도를 1 µg/ml부터 10배로 증가시켜 10 µg/ml, 100 µg/ml까지 처리를 한 결과, 1 µg/ml의 농도를 처리하였을 때부터 미약한 보호효과를 나타냈으며, 농도의존적으로 보호 효과가 증가하였다. 즉 낮은 농도에서도 Glutamate로 유도된 HT22 세포에 대한 포공영 추출물의 세포 보호 효과가 있다는 것을 증명 하였으며, 처리 농도가 증가함에 따라 세포 보호 활성도 유의하게 증가함을 확인하였다. Glutamate로 유도된 HT22 세포에 대한 포공영의 보호 활성이 어떤 기전을 통해 이루어 졌는지 확인 하기 위해서 세포 내 ROS, Ca²⁺ 농도, 미토콘드리아 막전위의 손상 억제 및 글루타치온 총 함량과 항산화 효소를 측정하는 실험을 진행하였다.

세포 내 ROS 측정 - 많은 연구로부터 Glutamate 매개 신경세포 사멸이 과도한 ROS 생성을 포함한 산화 스트레스와 밀접하게 연관되어 있다는 것이 보고되어 있다.¹⁶⁾ 포공영 추출물이 ROS 소거를 통한 Glutamate로 유도된 HT22 세포 사멸에 대한 보호 활성 평가를 확인하기 위해 DCF-DA를 첨가하고 1시간 후에 Trilon-X 100으로 녹여 내었다. 이후 형광 측정을 진행하였다(Fig. 2). 1 µg/ml의 포공영 추출물을 처리한 실험군에서 음성대조군과 비슷한 수준의 ROS 소거 결과값을 갖지만, 포공영 추출물의 농도가 증가함에 따라 ROS 생산량이 줄어들었음을 확인 하였으며 100 µg/ml 농도에서 양성대조군인 Trolox와 동등한 수준을 보였다. 이 결과를 통해 포공영 추출물은 투여 농도에 비례하는 강력한 ROS 소거능을 가지며 ROS로 인한 세포 사멸을 막아

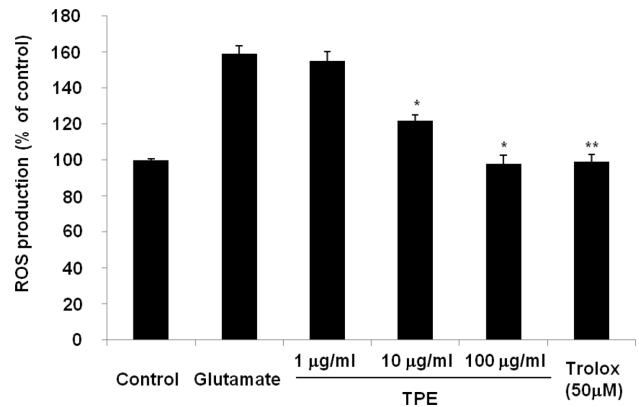


Fig. 2. Effect of *T. platycarpum* extract (1, 10 and 100 µg/ml) on reactive oxygen species production in glutamate injured HT22 cells. Data are means ± S.D. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus the glutamate-treated group

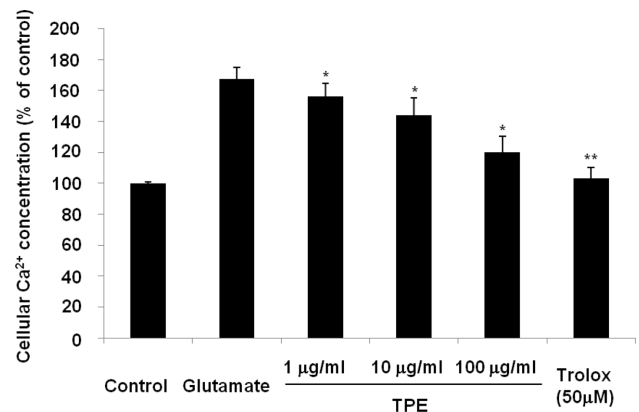


Fig. 3. Effect of *T. platycarpum* extract (1, 10 and 100 µg/ml) on calcium ion influx in glutamate injured HT22 cells. Data are means ± S.D. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus the glutamate-treated group

준다는 것을 알 수 있다.

세포 내 Ca²⁺ 농도 측정 - Glutamate에 의한 신경 독성은 glutamate 수용체가 과흥분 되어 세포 내로 과량의 Ca²⁺이 유입되며, 이러한 현상은 세포 내 다양한 효소들의 활성에 장애를 주어 필수 단백질과 DNA에 손상을 주어 세포 독성을 유발하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ Fura-2AM을 사용하여 세포 내 유입된 Ca²⁺의 양을 측정하였다(Fig. 3). 포공영 추출물을 처리한 실험군에서 처리 농도가 높아짐에 따라 현저히 낮은 양의 Ca²⁺ 방출됨을 확인하였고, 100 µg/ml를 처리한 실험군에서는 양성대조군인 Trolox와 동등한 수준을 보였다. 포공영 추출물을 처리 했을 때 세포 내에 Ca²⁺의 과 유입을 차단해줌으로써 세포 독성이 유발됨을 일차적으로 막아주었고 이 현상으로 인해 세포 사멸을 직접적으로 막아주었다고 판단된다.

미토콘드리아 막전위 손상 억제 효과 측정 - 미토콘드리

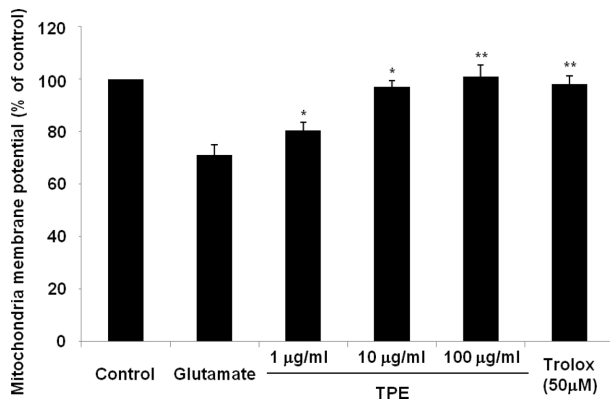


Fig. 4. Effect of *T. platycarpum* extract (1, 10 and 100 µg/ml) on glutamate-induced disruption of mitochondrial membrane potential in HT22 cells. Data are means ± S.D. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus the glutamate-treated group

이는 세포의 에너지원인 ATP를 만들고 그 과정을 거치면서 ROS가 발생하며 막전압이 상승한다. 막전압이 상승함으로써 Ca²⁺의 이동통로가 열리게 되며 Ca²⁺의 세포 내 과 유입이 발생한다. 이러한 독성상태가 계속 유지되면 미토콘드리아의 막전압 조절 기능이 상실된다.¹⁸⁾ 형광 염료인 Rhodamine 123을 처리한 후 형광값을 측정된 결과, 포공영 추출물을 처리한 실험군은 Glutamate에 대한 독성을 완화시켜 정상 세포와 비슷한 수준의 막전압을 유지시켰다(Fig. 4). 즉 포공영 추출물은 ROS의 발생을 차단하여 미토콘드리아 막 전압이 상승하는 현상을 막고 그로 인해 Ca²⁺ 이온의 과 유입을 막아주어 결과적으로 세포 사멸에 대해 보호 활성이 있다는 것으로 확인된다.

글루타치온 총 함량 및 항산화 효소 활성 측정 - 글루타치온은 중추신경계에서 중요한 항산화제이고 글루타치온 리덕타제는 글루타치온의 생성을 위한 중요한 효소이기 때문에 글루타미이트의 농도가 높으면 글루타치온의 세포 고갈을 억제하거나 글루타치온 퍼옥시다제와 같은 항산화효소가 신경세포 사멸을 초래한다.¹⁹⁾ 세포 내 글루타치온의 상실은 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환에서 감소된 신경통 글루타치온 수치를 발견할 수 있기 때문에 뇌 노화 및 신경퇴행에 대해 기여하는 것으로 생각된다. 포공영 추출물이 글루타치온 함량 및 효소 보호에 대해 활성이 있는지를 확인하였다. 글루타치온 총 함량은 포공영 추출물의 투여 농도가 100 µg/ml에서 최대 대조군의 64%의 함량 정도를 보였다(Fig. 5). 포공영 추출물은 글루타치온 리덕타제와 글루타치온 퍼옥시다제에 대해 100 µg/ml 농도에서 각각 대조군의 83%, 78%의 보호 활성을 보였다(Fig. 6A, 6B). 이 결과를 통해 포공영 추출물은 Glutamate로 독성이 유도된 HT22 세포의 글루타치온 총 함량을 음성대조군의 수치의 약 두배 정도로 유지시키며 글루타치온이 상실됨을

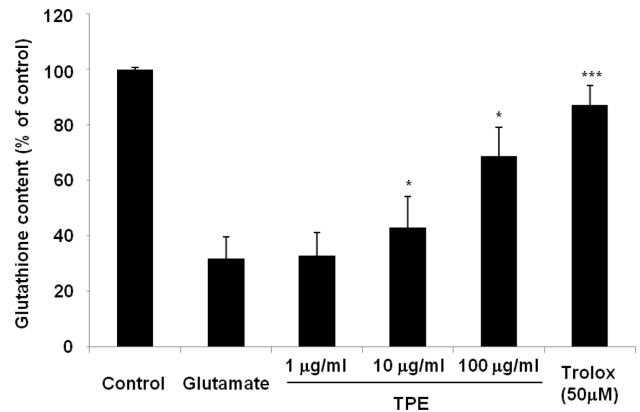


Fig. 5. Effect of *Taraxacum platycarpum* extract (1, 10 and 100 µg/ml) on glutathione level in glutamate injured HT22 cells. Data are means ± S.D. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus the glutamate-treated group

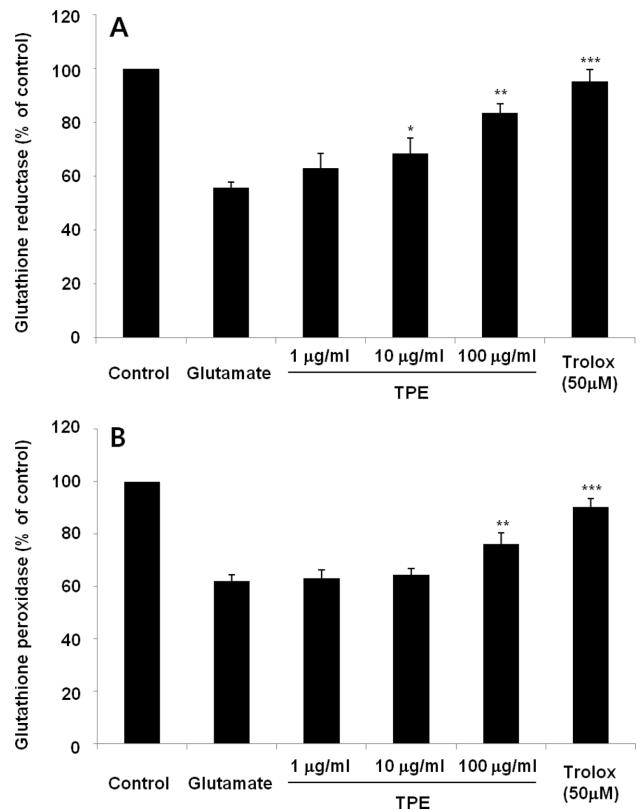


Fig. 6. Effect of *Taraxacum platycarpum* extract (1, 10 and 100 µg/ml) on glutathione reductase (A) and glutathione peroxidase (B) in glutamate injured HT22 cells. Data are means ± S.D. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus the glutamate-treated group

유의하게 막아주었으며 관련 효소인 글루타치온 리덕타제, 퍼옥시다제 측정 실험에서도 같은 패턴 양상을 보였다. 이를 통하여 포공영 추출물은 글루타메이트에 의한 HT22 세

포주의 신경세포 독성에 대하여 항산화활성을 나타냄에 의하여 신경세포 보호 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

결 론

본 실험을 통해 포공영 메탄을 추출물은 Glutamate로 유도된 뇌신경 세포 독성에 대한 유의적인 보호 효과를 확인하였다. ROS 수준의 증가는 모든 세포에 스트레스를 주는 명백한 원인이고 Ca^{2+} 의 과한 유입은 세포 사멸을 초래한다. 미토콘드리아 막전압이 상승함에 따라 세포 내 Ca^{2+} 의 이동통로는 활성화되며 이는 Ca^{2+} 의 과유입을 초래한다. 신경 퇴행성 질환에서 감소된 신경 세포의 글루타치온 수준이 뇌 노화와 신경 퇴행성 장애에 기여한다고 여겨진다. 즉 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 신경 퇴행성 질환은 ROS의 생성 정도, Ca^{2+} 의 과부하, 미토콘드리아의 장애 및 여러 글루타치온 총 함량 및 항산화효소의 감소를 포함한 여러 요인으로 인해 유발된다. 포공영 추출물 1 µg/ml, 10 µg/ml, 그리고 100 µg/ml로 농도를 점차 증가시키기에 따라 세포 내 ROS와 Ca^{2+} 의 수준을 유의적으로 감소시켰으며 이는 대조군과 거의 비슷한 수준이었다. 그리고 미토콘드리아 막전압의 손상 정도를 보통 수준으로 유지시키며 보호 효과를 입증하였다. 또한 포공영 추출물이 농도 의존적으로 증가함에 따라 글루타치온의 함량을 정상 세포 수준으로 유지시켰으며 항산화 효소의 보호 활성 또한 뛰어났다. 따라서 이러한 포공영 추출물은 Glutamate로 유도된 신경 세포 사멸에 강력한 보호 효과를 가지고 있다고 판단된다. 현재 포공영에 존재하는 화합물인 β-amyrin acetate가 강한 항산화능이 있는 것으로 보고되어 있으며 ROS 소거 활성을 비롯한 여러 기전을 통해 세포 보호에 기여한 것으로 사료된다.²⁰⁾ 하지만 포공영의 다른 어떤 화합물이 세포 사멸에 대한 보호 효과를 나타내는지 더욱 연구가 진행되어야 할 필요가 있으며, 포공영 추출물은 알츠하이머병과 같은 퇴행성 신경 질환 치료 약물에 대한 개발가능성이 있다고 여겨진다.

사 사

이 논문은 2017년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비로 연구하였음(관리번호-520170404). 이 논문은 2016년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2016R1A2B1011384).

인용문헌

1. Swerdlow, R. H. (2007) Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clin. Interv. Aging*. **2**: 347.
2. Hynd, M. R., Scott, H. L. and Dodd, P. R. (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **45**: 583-595.
3. Choi, D. W. (1985) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.* **58**: 293-297.
4. Tan, S., Wood, M. and Maher, P. (1998) Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *J. Neurochem.* **71**: 95-105.
5. Liu, J., Li, L. and Suo, W. Z. (2009) HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci.* **84**: 267-271.
6. Fukui, M., Song, J. H., Choi, J., Choi, H. J. and Zhu, B. T. (2009) Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Euro. J. Pharm.* **617**: 1-11.
7. Yun, S. I., Cho, H. R. and Choi, H. S. (2002) Anticoagulant from *Taraxacum platycarpum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **66**: 1859-1864.
8. Warashina, T., Umehara, K. and Miyase, T. (2012) Constituents from the roots of *Taraxacum platycarpum* and their effect on proliferation of human skin fibroblasts. *Chem. Pharm. Bull.* **60**: 205-212.
9. Jeong, J. Y., Chung, Y. B., Lee, C. C., Park, S. W. and Lee, C. K. (1991) Studies on immunopotentiating activities of antitumor polysaccharide from aerial parts of *Taraxacum platycarpum*. *Arch. Pharm. Res.* **14**: 68-72.
10. Chang, M. S., M. J. Park, M. C. Jeong, D. M. Kim, and G. H. Kim. (2011) Antioxidative and antibrowning effects of *Taraxacum platycarpum* and *Chrysanthemum indicum* Extracts as natural antibrowning agents. *Korean. J. Food Preserv.* **18**: 584-589.
11. Ho, C., Choi, E. J., Yoo, G. S., Kim, K. M. and Ryu, S. Y. (1998) Desacetylmaticarin, an anti-allergic component from *Taraxacum platycarpum*. *Planta Med.* **64**: 577-578.
12. Takasaki, M., Konoshima, T., Tokuda, H., Masuda, K., Arai, Y., Shiojima, K. and Ageta, H. (1999) Anti-carcinogenic activity of *Taraxacum* plant. I. *Biolog. Pharmaceut. Bull.* **22**: 602-605.
13. Han, S. H., Hwang, J. K., Park, S. N., Lee, K. H., Ko, K. I., Kim, K. S. and Kim, K. H. (2005) Potential effect of solvent fractions of *Taraxacum mongolicum* H. on protection of gastric mucosa. *Korean. J. Food Sci. Tech.* **37**: 84-89.
14. Jung, Y. S., Weon, J. B., Yang, W. S., Ryu, G., & Ma, C. J. (2018) Neuroprotective effects of Magnoliae Flos extract in mouse hippocampal neuronal cells. *Sci. rep.* **8**: 1-6.
15. Ankarcrone, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A., Nicotera, P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* **15**: 961-973.
16. Albrecht, P., Lewerenz, J., Dittmer, S., Noack, R., Maher, P. and Methner, A. (2010) Mechanisms of oxidative glutamate toxicity: the glutamate/cystine antiporter system xc as a neuroprotective drug target. *CNS. Neurolog. Disorders Drug Tar-*

- gets.* **9**: 373-382.
17. Randall, R. D. and Thayer, S. A. (1992) Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **12**: 1882-1895.
 18. Ly, J. D., Grubb, D. R. and Lawen, A. (2003) The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ m) in apoptosis; an update. *Apoptosis.* **8**: 115-128.
 19. Koga, M., Serritella, A. V., Messmer, M. M., Hayashi-Takagi, A., Hester, L. D., Snyder, S. H., Sawa, A. and Sedlak, T. W. (2011) Glutathione is a physiologic reservoir of neuronal glutamate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **409**: 596-602.
 20. Fabiyi, O. A., Atolani, O., Adeyemi, O. S., Olatunji, G. A. (2012) Antioxidant and Cytotoxicity of β -Amyrin acetate fraction from *Bridelia ferruginea* Leaves. *Asian. Pacif. Jour. Tropic. Biomed.* **2**: 981-984.
- (2019. 5. 30 접수; 2019. 6. 12 심사; 2019. 6. 19 게재확정)