

은행엽 추출물이 PC12 세포주에서 알코올에 의해 유도된 세포 독성에 미치는 영향

허은희* · 이종걸* · 한설희*†

충북대학교 의과대학 신경과학교실*,
충북대학교 의학연구소†

The effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on Ethanol-Induced Cytotoxicity in PC12 Cells

Enhee Huh, M.D.*, Jongkeol Lee, M.D.*, Seol-Heui Han, M.D.*†

Department of Neurology*, Chungbuk National University Hospital and Chungbuk National University Medical Research Center†, Cheongju, Korea

Background and Objectives: The processes underlying ethanol (EtOH)-induced neurotoxicity appear to be complex, with evidence for both apoptosis and necrosis *in vitro*. Oxidative stress has been implicated in the cytotoxic actions of EtOH. We investigated in rat pheochromocytoma (PC12) cells to see if EtOH-induced cytotoxicity is associated with oxidative stress and the standardized extract of Ginkgo biloba extract (EGb 761) is able to attenuate EtOH-induced neurotoxicity. **Methods:** We assessed oxidative stress induced by incubating PC12 cells with EtOH for 30 min by using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay quantitatively. To investigate the neuroprotection effect of EGb 761, cells were pretreated with this drug and the degree of oxidative stress or cell survival was assessed. **Results:** PC12 cell cultures exhibited a loss of cells and increase in intracellular reactive oxygen species when exposed to EtOH. Loss of cell numbers was EtOH concentration dependent. EtOH-induced neurotoxicity correlated with oxidative stress as reflected by DCFH-DA fluorescence. Addition of EGb 761 prior to EtOH treatment attenuates the EtOH-induced free radical production and neuronal death. **Conclusions:** The present investigation provides evidence that oxidative stress is involved in the pathogenesis of EtOH-induced neurotoxicity in PC12 cells. Further, the neuroprotective effect of EGb 761 on EtOH toxicity correlates with the suppression of intracellular oxidative stress. These results suggest that EGb 761 is beneficial for neuronal cell survival in response to oxidative stress, such as EtOH-induced neurotoxicity.

Key Words: Ethanol, Reactive oxygen species (ROS), EGb 761, PC12 cells

Address for correspondence

Seol-Heui Han, M.D.
Department of Neurology, Chungbuk National University Hospital, 62 Gaeshin-dong, Heungdeok-gu, Cheongju 361-763, Korea
Tel: +82-43-269-6372
Fax: +82-43-276-8929
E-mail: alzdoc@chungbuk.ac.kr

서 론

급속한 현대화와 더불어 점차 증가해가는 알코올 및 약물 중독장애는 전 세계적으로 큰 사회 문제가 되어가고 있다. 성인은 물론 청소년의 약물 오남용 및 무절제한 음주 습관이 심각한 사회문제로 되어가고 있다.

Ethanol은 중독성이 있는 신경활성 물질로서 이를 만성적으로 섭취할 경우 중추신경계 손상이 일어나며 이에 따라 가벼운 진전증이나 건망증으로부터 임상적으로 심각한 알코올성 치매(alcoholic dementia)에 이르기까지 다양한 신경계 이상증상이 나타날 수 있다. 또한 만성 알코올 남용(chronic alcohol abuse)이 뇌에 미치는 영향에 관심이 증가하면서 알코올 중독(alcoholism)이 Korsakoff 증후군에서 나타나는 기억 장애와는 다른 인

지 기능장애가 발현된다는 증거도 제시되고 있다[1].

뇌신경세포의 손상기전은 ethanol에 의한 신경세포의 직접적인 독성작용(direct neurotoxicity), 대사이상, 면역관련 손상, 외상, 혈관손상, thiamine 및 다른 영양소 결핍 등 여러 발생기전이 추정되고 있으나 이러한 기전이 단독 혹은 복합적으로 작용한 결과에 의한 것인지에 대해서는 아직 명확히 밝혀지지 않은 상태이다. 그러나 동물실험 결과에 의하면 영양결핍이 없는 상태에서 만성적으로 알코올을 투여하면 해마 원추세포 및 치상 과립 세포가 감소한다[2]. 더욱이 알코올 중독 환자들의 병리소견은 대뇌피질 신경세포 손실, 신경교세포 증식, 소뇌변성, 동맥경화성 변화(arteriosclerotic changes), 지질색전(lipid emboli) 등을 포함하고 있어 단순히 신경세포 손상에만 국한되지 않음을 시사한다[3, 4]. 또한 *in vitro* 연구에서도 알코올은 소뇌과립세포[5],

신경능선세포(neural crest cell)[6], PC12 세포주[5]에서 농도 의존성으로 세포 손상을 유발한다. 이러한 알코올 관련 세포 사멸의 기전은 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 발생 및 지질과산화(lipid peroxidation)가 관여하는 산화성 스트레스(oxidative stress)[7], caspase-3 활성화에 따른 apoptosis[8, 9] 등이 주로 관여할 것으로 추정된다.

은행엽은 유럽에서 가장 널리 사용되고 있는 약용식물 중 하나이다. EGb 761로 명명된 *Ginkgo biloba* extract는 수 백년 동안 임상에서 다양한 치료약제로 사용되어 왔다. EGb 761은 뇌혈류 장애, 노화 및 그에 연관된 인지기능 저하, 퇴행성 치매, 수면장애, 스트레스 등에 효과 있음은 많은 임상 연구에 의해 확인되었다[10-12].

은행엽에서 추출된 복합 화합물인 EGb 761은 그 화학적 조성이 잘 알려져 있는데 flavonoid glycosides (24%), terpene lactone (6%)이 주요 구성 성분이다. Flavonoid 분획은 quercetin, kaempferol 및 isorhamnetin 등 3가지 flavonoid를 포함하고 있고 당(sugar)과 연결되어 있으며 terpenoid 분획은 ginkgolides와 bilobalides로 이루어져 있다[10]. EGb 761의 유용한 신경 보호 효과는 superoxide anion, hydroxyl radical 등 활성 산소 제거효과를 포함한 항 산화작용에 의한 것으로 추정된다[13, 14].

동물 실험 및 알코올 중독환자의 관찰을 통하여 알코올 투여 후 발생하는 신경세포 손상 및 독성에 대한 많은 연구가 이루어져 왔으나 세포학적 분자생물학적 기전에 대해서는 아직 잘 밝혀져 있지 않은 상태이다. 따라서 알코올에 의해 유발된 신경세포 사멸 기전과 산화성 손상, 신경염증 또는 apoptosis의 관련성을 밝혀 내는 것은 알코올성 신경질환의 발병기전을 이해하는데 매우 중요하며, 이들 기전을 EGb 761이 억제할 수 있는가를 규명하는 것은 임상적으로 중요한 의미를 가진다.

본 연구의 목적은 EGb 761이 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 신경세포 사멸을 억제하고 활성산소를 제거한다는 보고[15]에 기초하여 PC12 세포를 대상으로 EGb 761이 알코올에 의해 유도된 세포 사멸에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

PC12 세포는 충북대학교 생화학 교실에서 유지중인 세포주를 분양 받아 사용하였다. 세포주를 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin-streptomycin 이 함유된 RPMI 1640 배지(GIBCO)로 배양하면서 실험에 이용하였다. 세포가 충분히 증식되면 96 well black culture plate (Greiner)에 동일한 수로 분주한 다음 24시간 배양하고 FBS가 포함되지 않은 RPMI 1640 배지로 다시 12시간 동안 배양하여 starvation 시켰다. 배양조건은 37°C, 5% CO₂/95% air로 하였다.

2. 세포독성을 유발하기 위한 EtOH 투여

PC12 세포주에 대한 적절한 세포 손상을 유발할 수 있는 EtOH의 농도를 결정하기 위해 PC12 세포주에 다양한 농도(각각 0, 50, 100, 200, 400 mM)의 EtOH을 1% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 이와 동시에 같은 조건으로 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있는 과산화수소(H₂O₂) 50 mM를 양성 대조군으로 이용하였다.

3. EGb 761의 PC12 세포 보호 효과 검증

분말 EGb 761 (Schwabe, Germany)를 멸균한 증류수에 녹여 사용하였다. 6-well plate에서 PC12 세포를 각 well에 5.0×10⁵개씩 넣어 24시간 배양기에서 배양하여 실험에 이용하였다. 200 mM 농도의 EtOH이 투여된 PC12 세포주와 투여되지 않은 세포주에 EGb 761을 각각 0 ng/mL, 50 ng/mL, 500 ng/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL 농도로 희석하여 24시간 동안 배양기에서 배양하였다.

4. 세포 생존율 분석(cell viability assay)

(1) PC12 세포주를 60 mm 배양접시에 배양하면서 EtOH을 0-400 mM의 농도로 처리하고, 투여 24시간 후에 각각 trypsin을 처리하여 수확하였으며, trypan blue exclusion assay 방법을 사용하여 각 군에서의 세포 생존율을 조사하였다. 동일한 방법을 5회 반복하여 얻은 평균치는 아무것도 투여하지 않은 세포군에서 24시간 배양 후의 생존 세포 수에 대한 %로 나타내었다.

(2) EGb 761을 농도별로 투여하고 200 mM EtOH을 첨가한 PC12 세포주와 첨가하지 않은 PC12 세포주를 6-well 배양접시에 배양 한 24시간 후에 각각 trypsin을 처리하여 수확하였으며, trypan blue exclusion assay 방법을 사용하여 각 군에서의 세포 생존율을 조사하였다. 동일한 방법을 3회 반복하여 얻은 평균치를 EtOH와 EGb 761을 투여하지 않은 세포군에서 24시간 배양 후의 생존 세포 수에 대한 %로 나타내었다.

5. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 형광법을 이용한 활성산소의 측정

1) 알코올에 의해 유도된 활성산소의 측정

PC12 세포를 96 well microplate (Nunk, Denmark)에 8×10³/well개 분주하여 배양한 후 Krebs-Ringer buffer (118 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 1.5 mM CaCl₂, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 11.5 mM glucose, 0.8 mM EDT로 2번 세척한 후 25 mg/mL 농도의 DCFH-DA가 함유된 Krebs-Ringer buffer를 세포에 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 이때 96 well microplate는 parafilm으로 밀봉하여

산소에 의한 산화를 막아주었으며, 빛을 차단 해주기 위하여 암실에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 EtOH를 각각 150, 200, 250, 300, 350, 400 mM 농도로 처리하고 microplate 형광판독기(microplate fluorescence reader, Genious, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm의 파장에서 매 10분 간격으로 30분 동안 측정하였다.

2) EGb 761투여 후 활성산소의 측정

PC12 세포주를 96 well microplate (Nunk, Denmark)에서 배양한 후 Krebs-Ringer buffer로 2번 세척한 후 200 mM 농도의 알코올과 EGb 761을 농도별로 처리하여 2시간 동안 배양하고 Krebs-Ringer buffer로 다시 2회 세척하였다. 세척 후 25 μ g/mL 농도의 DCFH-DA가 함유된 Krebs-Ringer buffer를 세포에 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 이때 96 well microplate는 parafilm으로 밀봉하여 산소에 의한 산화를 막아주었으며, 빛을 차단해주기 위하여 암실에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 microplate 형광 판독기를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm의 파장에서 매 10분 간격으로 30분 동안 측정하였다.

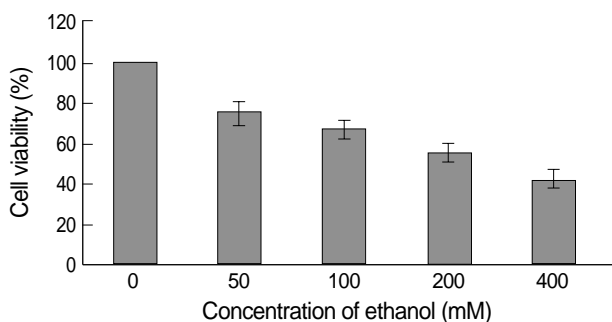


Fig. 1. Survival rate of PC12 cells after exposure to ethanol for 24 hours. Each bar represents percent of cells survived compared to cells without any treatment. Cell survival was measured by trypan blue exclusion assay. The error bars represent the standard deviation.

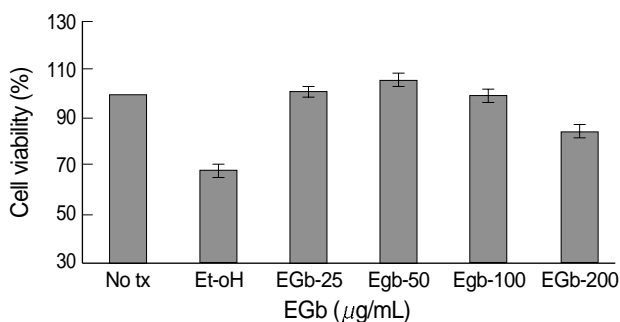


Fig. 2. Survival rate of PC12 cells after exposure to EGb 761 for 24 hours. Ethanol (200 μ M) was used as a positive control. The blanked circles are for those of 24 hours exposure. The error bar represents the standard deviation.

결 과

1. 알코올 또는 EGb 761 투여에 의한 PC12 세포주의 생존을 조사

배양된 PC12 세포주를 대상으로 농도별로 알코올 또는 EGb 761을 투여하고 24시간이 경과된 후의 세포 생존율을 trypan blue exclusion assay 방법으로 조사하였다. 세포주에 50, 100, 200, 400 mM 농도의 알코올로 처리하고, 투여 24시간 후의 세포 생존율은 알코올을 전혀 투여하지 않은 세포군에 비해서 각각 75.2, 67.1, 55.4, 41.2%를 나타냈다(Fig. 1). 세포주에 25, 50, 100, 200 mg/mL 농도의 EGb 761로 처리하고, 투여 24시간 후의 세포 생존율은 EGb 761을 투여하지 않은 세포군에 비해서 각각 108.4, 105.3, 101.2, 89.7%를 나타냈다(Fig. 2).

2. 알코올에 의해 유도된 PC12 세포 사멸에 대한 EGb 761의 효과

1% FBS를 포함한 RPMI 1640 배양액에서 EGb 761을 각각 0.05, 0.5, 50, 100 μ g/mL 농도로 전처리한 PC12 세포주에 200 mM EtOH를 첨가하여 24시간 배양기에서 배양한 후 세포 생존율을 조사하였다. 세포의 생존율은 EGb 761의 농도 의존성으로 증가하였는데 EtOH 단독 투여한 세포주에 비해 약 8-30%의 세포 생존율 증가를 나타냈다(Fig. 3).

3. 알코올에 의해 유도된 활성산소의 변화

PC12 세포를 96-well에 배양한 후 Krebs-Ringer buffer로 세척하였다. 세척 후 DCFH-DA를 첨가하여 30분 후에 다양한 농도의 EtOH와 양성 대조군으로 H₂O₂ 50 mM를 처리하여 DCFH-DA 형광 강도를 측정하였는데 EtOH의 농도가 증가함에

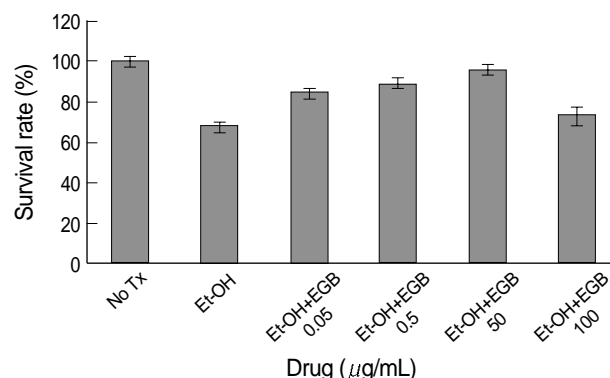


Fig. 3. Effect of increasing concentrations of EGb 761 on PC12 neuronal cell viability determined in the presence of ethanol. PC12 cell were treated for 24 hours with the indicated concentrations of EGb 761 in the presence of 200 mM ethanol. The error bar represents the standard deviation.

따라 형광 강도, 즉 ROS 발생량이 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

4. EGb 761에 의한 활성산소의 감소

EGb 761와 EtOH이 투여된 배양액에서 PC12 세포를 2시간 배양하고 DCFH-DA 방법으로 ROS 발생 정도를 측정하였다. ROS의 발생은 1-10 mg/mL 농도의 EGb 761에서는 감소하였지만 50-200 mg/mL 농도에서는 오히려 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 5).

고 찰

EtOH에 의해 유도되는 중추신경계의 손상 기전에는 NMDA 수용체의 과잉자극(overstimulation)[16], 산화성 스트레스(oxidative stress), 카스파제 활성화(activation of caspases)와 미토콘드리아 기능장애(DNA damage and mitochondrial dys-

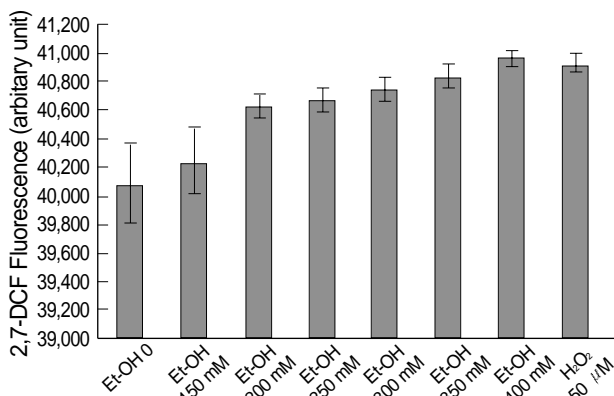


Fig. 4. Effects of EtOH on the amount of reactive oxygen species (ROS). PC12 cell were treated with increasing concentrations of ethanol and the amount of ROS was measured by DCFH-DA intensity. The error bars represent the standard deviation.

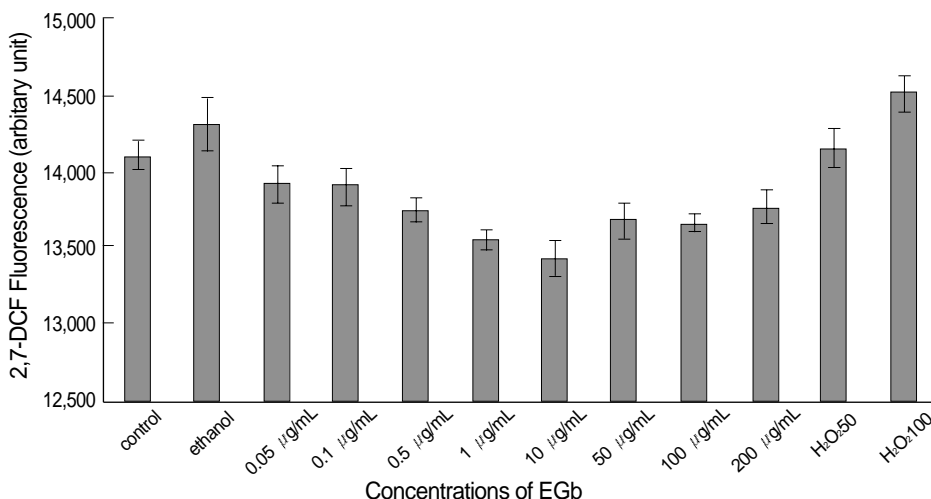


Fig. 5. Effect of increasing concentrations of EGb 761 on cell free radical production in PC12 cells in the presence of ethanol. PC12 cells were treated for 2 hours with the indicated concentrations of EGb 761 in the presence of ethanol. Treatment with EtOH (200 μM) was used as positive controls. Controls refer to no treatment. The error bar represents the standard deviation.

function)[17] 등 다양한 생화학적 cascade가 관여하는데 특히 산화성 스트레스가 중요한 역할을 하는 여러 경로가 관련되어 있다. 뇌 조직을 포함한 중추신경계는 EtOH에 폭로되면 ROS 발생이 촉진되며 다른 한편으로 항산화 방어(antioxidative defense) 기전의 약화를 초래하여 산화성 스트레스 환경에 취약성을 나타낸다. 산소는 호흡에서 최종 전자 수용체로써 모든 호기성 생물체의 성장에 필수적 인자인 동시에, 반응성이 강한 여러 가지 ROS들을 발생시켜 세포에 치명적인 손상을 일으키는 원인이 된다[18]. ROS는 단백질, 지질, 핵산 등 중요한 생체 고분자에 손상을 입히며, Alzheimer's disease, 관절염, 백내장, 암 등을 포함한 다양한 질병과 ischemia-reperfusion에 의한 세포 손상 및 노화 등 다양한 임상적 상황을 야기한다. 산화성 스트레스는 정상적인 호흡과정에서 부산물로 발생하는 ROS에 의해 내부적으로 발생할 수 있으며, 외부적으로도 높은 분압의 산소, gamma-ray 조사, 자외선 방사, 과산화수소, 산화-환원 회전성 물질(redox-cycling agent), 전이금속 등에 노출되었을 때 유발될 수 있는데, 여기에는 여러 종류의 free radical이 관여한다고 알려져 있다. 알코올은 항산화 방어 계통을 손상할 수 있으며 분해 대사를 환원하여 축적물을 증가시킬 수 있다[19]. EtOH은 추정되는 두가지 기전 즉 세포사멸과 세포번식 억제 두 기전이 동시에 작용하여 PC12 세포의 손실을 일으킨다[20]. 따라서 EtOH 관련 세포 사멸의 기전에는 ROS 발생 및 지질과산화가 관여하는 산화성 스트레스[7]가 중요하며 이외에 caspase-3 활성화에 따른 아포토시스 기전(apoptotic mechanism)도 관여하는 것으로 알려져 있다[8, 9].

세포 내에서 활성산소를 측정하는 경우 8-OH-dG의 농도를 측정하여 DNA 손상 정도를 파악하거나, 세포 내에 존재하는 지질과산화 정도를 측정하는 방법 등[21-23]이 주로 이용되는데 이러한 방법들은 활성산소에 의해 나타나는 2차적인 세포 내 변화로서 활성산소의 변화량을 추정해야만 하므로 정확성이나 특이성 등에서 많은 제한점을 가질 수밖에 없다. 더구나 활성산소의 경우는 그 반감기가 매우 짧고 세포 내에 존재하는 다양한 환

성산소 scavenger에 의해 빠른 시간 내에 복구가 일어나므로 가능한 빠른 시간 내에 생성된 활성산소를 측정하는 것이 정확성을 높이는 중요한 관건이 될 것이다[24]. Keston 등은 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 세포 배양액에 첨가하게 되면 세포 내의 활성산소에 의한 산화과정을 통해서 2', 7'-dichlorofluorescein로 변화되는 이것이 형광을 발생하므로 특정 과정에서 형광의 정도로서 활성산소의 양을 직접 정량할 수 있는 방법을 보고하였는데[25]. 본 연구는 이들의 방법을 변형하여 활성산소 발생 정도를 측정하였다.

본 연구의 목적은 PC12 세포주에서 은행엽 추출물이 알코올에 의해 유발되는 ROS 발생 및 세포사멸에 미치는 효과를 규명하는 것이었다. 본 연구에서 항산화 물질로 사용한 Ginkgo biloba 잎의 표준 추출물인 EGb 761은 신경세포 보호 효과와 항산화 효과를 동시에 나타내는데[26], 실제로 superoxide anion, hydroxyl and peroxy radicals, nitric oxide 등과 같은 자유 라디칼(free radical)을 제거하는 기능이 우수하다[27].

본 연구 결과 EtOH는 PC12 세포주에서 농도 의존성으로 세포 생존율을 감소시켰고 DCFH-DA 형광 강도는 증가시켰다. 이러한 결과는 Li 등[28]이 PC12 세포주를 대상으로 한 연구의 결과와 일치하는 것으로서 EtOH가 세포내 ROS의 생성을 유도하였음을 의미한다. EtOH에 의한 신경세포 사멸 기전은 단순히 지 않은데 기존의 연구 결과에 의하면 아포토시스와 세포괴사 기전 모두가 관여되는 것 같다[29, 30]. 그러나 이번 연구에서는 caspase-3 활성도의 측정이나 Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling (TUNEL) 염색을 시행하지 않아 EtOH에 의해 유도된 세포사멸 기전에 아포토시스의 관련 여부는 알 수 없었으나 EtOH의 세포 독성이 산화 스트레스에 의한 것임을 확인할 수 있었다. EtOH에 의한 세포 생존율 감소는 EGb 761 투여로 회복이 되었는데 농도 경사에 따른 반응은 일관성 있게 나타나지는 않았다. 즉, EtOH 200 mM 농도를 투여한 PC12 세포주에 EGb 761을 첨가한 후 DCFH-DA 형광 강도 측정결과 저 농도인 EGb 761 1-10 μ g/mL에서 형광 강도가 유의하게 감소 되었다. 이는 EGb 761이 ROS 제거에 효과 있음을 시사하며 이는 Oyama 등[27]의 연구와 유사하게 EGb 761의 구성 성분 중 flavonoid 요소가 나타낸 자유 라디칼 제거 및 항산화 작용에 의한 것으로 생각된다. 그러나 EGb 761의 높은 농도에서는 DCFH-DA 형광 강도가 오히려 증가하는 경향을 나타내었는데 이는 EGb 761 정제 과정에서 완전하게 분리되지 않은 유해 성분인 ginkgolic acid의 농도도 함께 높아져 있었기 때문일 것으로 추정된다. Ginkgolic acids는 알러지를 유발하며, 세포독성 및 유전자독성(genotoxicity)을 나타내기도 한다[31]. 이러한 부작용 때문에 Ginkgo biloba 추출물을 이용한 약물의 제조 허가 과정에서 ginkgolic acids의 최대 허용 농도를 5 ppm 이하로 제거할 것을 규정하고 있다. 5 ppm 이하의 ginkgolic acids 농도는 인체에 유해하지 않을 것으로 생각하나 지용성인 이 물질이 장기간에 걸쳐 지속적으로 섭취된다

면 유해성 발현의 가능성을 배제할 수 없다.

은행엽 추출물 EGb 761은 동물 신경보호 효과가 있음이 이미 알려져 있고[10] 또한 Alzheimer's disease (AD) 환자의 인지 기능을 보호하고 개선한다는 보고도 있다[32]. EGb 761은 임상에서 이미 기억력 감퇴, 집중력 장애, 우울감, 어지러움(현훈), 이명, 두통 등의 다양한 증상을 수반하는 기질성 뇌기능 장애 치료제로 많이 이용되고 있는데 이들에서 나타나는 치료 효과는 EGb 761의 항산화 작용, 신경세포 성장 촉진 효과와 관련 있을 것으로 추정된다. 특히 본 연구에서 밝혀진 바와 같이 EGb 761의 항산화 효과가 신경세포 독성의 방어 기전에 매우 중요한 역할을 할 것임을 시사해준다. 또한 아밀로이드 베타단백(amyloid beta protein, A β)의 신경세포 독성에 관한 최근 연구에서 비타민 E, terpenoids, ginkgolides와 같은 항산화제는 A β 가 유도한 활성산소 생성과 지질과산화를 억제할 수 있지만 A β 에 의해 유도된 apoptosis 기전에 의한 세포 사멸은 보호할 수 없었는데[33, 34] 이는 퇴행성 신경질환 치료제로서의 항산화제의 제한점이 있음을 시사해준다.

본 연구에서의 한계점은 항산화 및 항염증 효과가 있는 것으로 알려진 다른 물질들 예를 들면 melatonin, vitamin E (Troxilax), spin trapper alpha-phenyl-N-ter-butyl nitron (PBN) 등을 positive control로 사용하여 기존의 연구들과 직접 비교연구를 하지 못한 것이다. 향후 이들 물질과 동일한 조건 하에서 EGb 761의 항산화 및 항염증 효과의 정량화가 포함된 추시 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다.

결론

본 연구를 통해 알코올은 PC12 세포에서 활성산소를 생성하여 농도 의존성 세포 독성을 나타내는 것을 확인하였으며 EGb 761 투여로 활성산소의 생성이 억제되었고 세포 사멸의 정도가 완화되었다.

참고문헌

- Victor M. *Alcoholic dementia*. *Can J Neurol Sci* 1994; 21: 88-99.
- Cadete-Leite A, Tavares MA, Paula-Barbosa MM. *Alcohol withdrawal does not impede hippocampal granule cell progressive loss in chronic alcohol-fed rats*. *Neurosci Lett* 1988; 86: 45-50.
- Agarwal KC. *Therapeutic actions of garlic constituents*. *Med Res Rev* 1996; 16: 111-24.
- Ibanez J, Herrero MT, Insausti R, Belzunegui T, Tunon T, Garcia-Bragado F, et al. *Chronic alcoholism decreases neuronal nuclear size in the human entorhinal cortex*. *Neurosci Lett* 1995; 183: 71-4.
- Pantazis NJ, Dohrman DP, Goodlett CR, Cook RT, West JR. *Vulner-*

- ability of cerebellar granule cells to alcohol-induced cell death diminishes with time in culture. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 1014-21.
6. Chen SY, Sulik KK. Free radicals and ethanol-induced cytotoxicity in neural crest cells. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 1071-6.
 7. Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcoholism* 1994; 29: 513-22.
 8. Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Muglia LJ, Jermakowicz WJ, D'Sa C, et al. Ethanol-induced caspase-3 activation in the in vivo developing mouse brain. *Neurobiol Dis* 2002; 9: 205-19.
 9. Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Qin YQ, Labruyere J, Ikonomidou C. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2002; 133: 115-26.
 10. DeFeudis FV. *Ginkgo biloba extract (EGb761): from Chemistry to the Clinic*. Pages 401. Ullstein Medical, Wiesbaden 1998.
 11. Chrsten Y, Costendin J, Lacour M. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb) on the central nervous system. *Adv. Ginkgo Biloba Res*. Elsevier, Paris, 1992: 172.
 12. Lemay M, Kergoat M-J, Lupien S. Ginkgo biloba: What good is it?, *Nat Medicine Canada* 1999; 2: 34-7.
 13. Pincemail J, Dupuis M, Nasr C, Hans P, Haag-Berrurier M, Anton R, et al. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. *Experientia* 1989; 45: 708-12.
 14. Pincemail J, Deby C. Antiradical properties of Ginkgo biloba extract. *Presse Med* 1986; 15: 1475-9.
 15. Yao Z, Drieu K, Papadopoulos V. The Ginkgo biloba extract EGb 761 rescues the PC12 neuronal cells from beta-amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of beta-amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands. *Brain Res* 2001; 889: 181-90.
 16. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, De'milia DM, Rayudu PV, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5923-8.
 17. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 2000; 20: 6920-6.
 18. Koo MS, Lee JH, Rah SY, Yeo WS, Lee JW, Lee KL, et al. A reducing system of the superoxide sensor SoxR in Escherichia coli. *EMBO J* 2003; 22: 2614-22.
 19. Bailey SM, Cunningham CC. Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1998; 28: 1318-26.
 20. Luo J, West JR, Cook RT, Pantazis NJ. Ethanol induces cell death and cell cycle delay in cultures of pheochromocytoma PC12 cells. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 644-56.
 21. Honda M, Yamada Y, Tomonaga M, Ichinose H, Kamihira S. Correlation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), a biomarker of oxidative DNA damage, and clinical features of hematological disorders: a pilot study. *Leuk Res* 2000; 24: 461-8.
 22. Lloyd DR, Phillips DH. Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and nickel (II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat Res* 1999; 424: 23-36.
 23. Kamat JP, Devasagayam TP, Priyadarsini KI, Mohan H. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. *Toxicology* 2000; 155: 55-61.
 24. Wang D, Kreutzer DA, Essigmann JM. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat Res* 1998; 400: 99-115.
 25. Keston AS, Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 1965; 11: 1-5.
 26. Oyama Y, Fuchs PA, Katayama N, Noda K. Myricetin and quercetin, the flavonoid constituents of Ginkgo biloba extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and Ca(2+)-loaded brain neurons. *Brain Res* 1994; 635: 125-9.
 27. Du G, Willet K, Mouithys-Mickalad A, Sluse-Goffart CM, Droy-Lefaix MT, Sluse FE. EGB 761 protects liver mitochondria against injury induced by in vitro anoxia/reoxygenation. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 596-604.
 28. Li Y, Walker DW, King MA. Peroxide mediates ethanol-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 389-92.
 29. Bhavé SV, Hoffman PL. Ethanol promotes apoptosis in cerebellar granule cells by inhibiting the trophic effect of NMDA. *J Neurochem* 1997; 68: 578-86.
 30. Liesi P. Ethanol-exposed central neurons fail to migrate and undergo apoptosis. *J Neurosci Res* 1997; 48: 439-48.
 31. Hecker H, Johannisson R, Koch E, Siegers CP. In vitro evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from Ginkgo biloba L. *Toxicology* 2002; 177: 167-77.
 32. Oken BS, Storzbach DM, Kaye JA. The efficacy of Ginkgo biloba on cognitive function in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998; 55: 1409-15.
 33. Yao ZX, Drieu K, Szweda LI, Papadopoulos V. Free radicals and lipid peroxidation do not mediate beta-amyloid-induced neuronal cell death. *Brain Res* 1999; 847: 203-10.
 34. Pike CJ, Ramezan-Arab N, Cotman CW. Beta-amyloid neurotoxicity in vitro: evidence of oxidative stress but not protection by antioxidants. *J Neurochem* 1997; 69: 1601-11.