

Nerve Growth Factor로 분화된 PC12 세포에서 Glutamate성 독성에 대한 보호

계명대학교 의과대학 내과학교실*, 생리학교실

박혜원* · 안성훈* · 정종희 · 박원균 · 송대규 · 배재훈

Effect of Protective Agents on Excitotoxicity in Nerve Growth Factor-differentiated PC12 Cells

Hae Won Park, M.D.*, Seong Hun Ahn, M.D.*, Jong Hee Jung, B.S.,
Won Kyun Park, M.D., Dae Kyu Song, M.D., Jae Hoon Bae, M.D.

Department of Internal Medicine, and Department of Physiology,
Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea*

Abstract : Glutamate is a primary excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system, however excitotoxic when in excess. This study was designed to evaluate the mechanism of the glutamatergic excitotoxicity and the effect of several protective agents which are known to interrupt the intracellular apoptotic processes. The excitotoxicity was induced in nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells by adding 10 mM glutamate. In the cells treated with 10 mM glutamate, the cell number was decreased and the neurites were markedly shrunken. Cell viability was about a half determined by MTT test. Ionotropic glutamate receptor antagonists, AP5 (20 μ M), MK801 (10 μ M), and CNQX (20 μ M) in a single or combined treatments did not improve the viability of the excitotoxic PC12 cells. Antiapoptotic agents, cyclosporin A (0.5 μ M) and Z-VAD-fmk (100 μ M) did not improve the viability of the excitotoxic PC12 cells. However antioxidant, Cu/Zn superoxide dismutase (5~50 U) completely recovered the viability of the excitotoxic PC12 cells. Inhibitors of intracellular stored Ca^{2+} release, ryanodine (100 μ M) and U73122 (2 μ M), partially improved the cell viability only in the combined treatments with NMDA receptor antagonist, MK801. In conclusion, metabotropic glutamate receptors seems to participate in the increase of intracellular Ca^{2+} together with NMDA receptors in the excitotoxic process of NGF differentiated PC12 cells. Glutamatergic neuronal toxicity is mainly associated with the excess production of oxygen free radicals.

Key Words : Excitotoxicity, Nerve growth factor, PC12 cell

서 론

포유동물의 중추신경계에서 glutamate는 중요한 흥분성 신경전달물질이다[1,2]. Glutamate 수용체는 크게 향이온성 (ionotropic) 과 향대사성 (metabotropic) 수용체로 구분된다. 향이온성 수용체는 다시 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체와 non-NMDA 수용체인 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) 와 kainate 수용체로 나뉜다[3]. 일반적으로 AMPA 수용체는 glutamate 작용의 rapid component를 형성하며 세포막을 탈분극시켜 안정막전압에서는 Mg^{2+} 에 의해 억제되어 있던 NMDA 수용체를 활성화시킨다[4]. NMDA 수용체는 glutamate 작용의 slow component를 형성하며 Na^+ 뿐만 아니라 Ca^{2+} 이 유입되는 통로로 작용한다. 이때 과도한 흥분으로 다량의 Ca^{2+} 이 신경세포 내로 유입되면 오히려 세포독작용을 일으키는 신호전달 경로를 자극하게 되어 세포에 치명적인 손상을 야기할 수 있다[5]. 이러한 여러 종류의 수용체를 통하여 glutamate가 신경세포에 미치는 영향은 조직에 따라 혹은 신경세포에 따라 다양하게 나타나리라 짐작할 수 있고, glutamate는 신경세포에 대해 흥분작용과 함께 신경독작용을 유발하는 물질로 중추신경계의 만성퇴행성질환과도 관련이 있는 것[6,7]으로 알려져 있다. 따라서 흥분성 신경세포사를 연구하는데 있어 AMPA/kainate수용체나 NMDA수용체 및 향대사성 수용체의 역할이 관심의 대상이 되고 있다[8].

외부의 인자에 의한 것이든 세포에서 자연적으로 발생하는 것이든 간에 신경세포에 있어서 세포사를 일으키는 원인으로 산화스트레스(oxidative stress)와 에너지고갈(energy deprivation)이 중요한 인자로 생각되며, 이 과정에서 세포 내 Ca^{2+} 의 과도한 증가, 미토콘드리아의 기능 손상, 활성산소의 생성, 여러 가지 protease 특히 cystenyl aspartate-specific proteinases (caspases)의 활성화 기전이 복합적으로 작용한다[9].

지금까지 신경독성에 대하여 위에서 언급한 기전에 의거한 여러 종류의 보호제를 사용하여 신경세포의 생존을 높이려는 시도가 이루어졌다. Ca^{2+} 유입에

의한 신경독작용을 억제하는 방안으로 Ca^{2+} 유입의 주된 통로가 되는 NMDA수용체를 억제하는 방법과 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로를 차단하는 방법이 연구되었다[10]. 산화스트레스를 억제하는 방법으로 lazaroid계 약물을 이용하는 방법이 보고되었고[11], 그 외에도 superoxide dismutase나 nitric oxide synthase 억제제 등을 이용한 보고[12]가 있다. 세포자멸사의 유발을 억제하기 위하여 caspase 억제제를 이용[13]하거나 anti-apoptotic protein인 Bcl-2를 과발현 시킨 보고[14]도 있다. 이 외에도 cyclosporin A 및 FK-506을 이용하기도 하였다[15]. 한편, 이상의 보호제들은 신경독작용에 대하여 신경세포의 생존을 높이는 방법으로 이용되었으나 거의 대부분이 단일제의 효과를 관찰한 것이었다.

PC12 세포는 pheochromocytoma세포의 불멸 세포주로 시냅스에서 분비되는 신경전달물질은 glutamate, GABA, dopamine, norepinephrine, acetylcholine 등 다양하다. PC12 세포를 신경세포로 분화시키기 위하여 이용하는 nerve growth factor(NGF)는 신경전달물질의 분비와 수용체의 활성화에 영향을 미친다. NGF는 신경계에 소량으로 존재하면서 신경세포의 생존과 분화에 영향을 미치며, 신경세포의 구조 및 기능적 변화에 관여한다[16,17]. NGF는 trkA 및 p75^{nmr} 등 세포내의 수용체[16] 뿐만 아니라 세포막에 존재하는 여러 가지 이온통로에도 작용하므로 NGF로 분화된 PC12 세포는 다양한 약제의 작용을 관찰하는데 많이 이용되고 있다[18,19].

이 연구에서는 NGF로 분화시킨 PC12 세포에서 glutamate성 신경독성의 기전을 살펴보고, 각기 다양한 기전을 통하여 세포사의 과정에 작용할 것으로 생각되는 여러 가지 보호제를 적절하게 조합하여 사용하면 신경세포의 생존에 상승적인 효과를 나타낼 수 있는 약물의 조합이 가능하리라는 가정 하에서 칼슘통로 억제제, 활성산소 억제제, caspase 억제제 중 일부를 단독 혹은 복합적으로 사용하였을 때 신경세포독성에 대한 보호효과 여부를 비교해 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험은 말초신경계의 교감신경성 세포인 PC12 세포를 이용하였다. PC12 세포의 배양은 96 well plate에 well당 1×10^5 개의 세포를 뿌려 안치시킨 후 배양 초기부터 50 ng/mL NGF를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기(Sanyo사, 일본)에서 배양하였고, 3일 간격으로 배양액을 1/2 씩 교체하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum을 포함한 RPMI1640(Gibco-BRL사, 미국)에 100 µg/mL penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였다.

NGF의 영향 하에서 5~7일간 배양한 PC12 세포를 대상으로 배양액에 각 농도별 glutamate를 첨가하여 24시간 후의 독성 효과를 관찰하였다.

Glutamate에 의한 신경독성작용에 미치는 각 glutamate 수용체들의 역할을 비교해 보고자 배양액에 NMDA 수용체 길항제인 D-2-amino-5-phosphoquinopentanoic acid(AP5)와 MK801, 그리고 non-NMDA 수용체 길항제인 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione(CNQX), 또한 이들 길항제를 병합하여 glutamate와 동시에 첨가한 다음 PC12 세포의 생존 정도를 관찰하였다.

PC12 세포의 신경독성에 대하여 세포자멸사의 과정을 차단하여 그 효과를 관찰하였다. Caspase cascade의 작용을 차단하기 위하여 Z-VAO-fmk를 처리한 다음 glutamate성 독성에 대한 PC12 세포의 생존 정도를 관찰하였다. 한편 cyclosporin A를 glutamate와 동시에 처리한 다음 PC12 세포의 생존 정도를 관찰하였다.

PC12 세포의 glutamate성 신경독성에 대하여 활성산소의 억제 효과를 관찰하기 위하여 Cu/Zn superoxide dismutase(SOD)를 처리하고 PC12 세포의 생존 정도를 관찰하였다.

Glutamate성 신경독성에 대하여 세포내 Ca²⁺ 억제제의 효과를 관찰하기 위하여 위에서 언급한 NMDA 수용체 차단제 이외에 세포내 Ca²⁺ 유리 억제제인 ryanodine과 U73122를 처리한 다음 PC12 세포의 생존 정도를 관찰하였다.

배양액에 glutamate와 각 종의 보호제를 단독 혹은 병합 처리한 후 배양한 PC12 세포의 생존 정도를

관찰하기 위하여 24시간째에 PC12 세포를 도립현미경하에서 100배 및 200배의 비율로 세포의 형태, 신경접합의 정도 등을 형태학적으로 평가하였고, 각 군에서 신경세포의 생존율을 평가하기 위한 미토콘드리아 기능의 평가는 MTT test kit(Sigma사, 미국)를 이용하여 측정하였다.

실험결과는 통계처리하여 평균과 표준편차로 표시하였다. 각 군에서의 비교는 Student's t-test로 유의성을 검증하였으며 p<0.05를 유의한 수준으로 평가하였다.

성 적

배양 5-7 일째 대조군과 각 농도의 glutamate를 처리한 군에서 PC12 세포의 생존율은 대조군을 100%로 두었을 때 5, 10 mM의 glutamate를 처리한 세포에서 각각 76.7 ± 4.88 , $49.2 \pm 7.54\%$ 였으며, 20, 30, 40, 50 mM의 glutamate를 처리한 세포에서는 거의 0%의 생존율을 보였다(Fig. 1). 대조군과 비교할 때 10 mM glutamate 첨가군에서 다수의 세포가 탈락하였으며, 세포의 돌기는 현저하게 위축되어 있었다.

Glutamate성 신경독성에 대한 glutamate 수용체들의 영향을 평가하고자 glutamate와 함께 20 µM AP5, 10 µM MK801, 20 µM CNQX를 처리한 세포에서 생존율을 비교하면, AP5, MK801 및 CNQX는 대조군에 대하여 각각 26.7 ± 15.4 , 50.8 ± 3.82 , $28.0 \pm 15.12\%$ 로 glutamate만 투여한 세포의 $33.6 \pm 17.4\%$ 와 비교하여 유의한 회복은 보이지 않았다. 또한 CNQX와 AP5를 병합 처리하여도 세포의 생존율은 회복되지 않았다(Fig. 2).

신경세포 독성에 대하여 세포자멸사에 관여하는 기전을 억제하고자 100 µM Z-VAD-fmk와 0.5 µM cyclosporin A를 단독 혹은 병합하여 투여한 결과 10 mM glutamate 투여 시의 $44.9 \pm 17.6\%$ 에 비하여 각각 39.0 ± 22.72 , $45.5 \pm 18.27\%$ 로 유의한 회복을 보이지 않았다. 또한 Z-VAD-fmk와 cyclosporin A를 병합하여 처리 시 세포의 생존율은 더욱 감소되었다(Fig. 3).

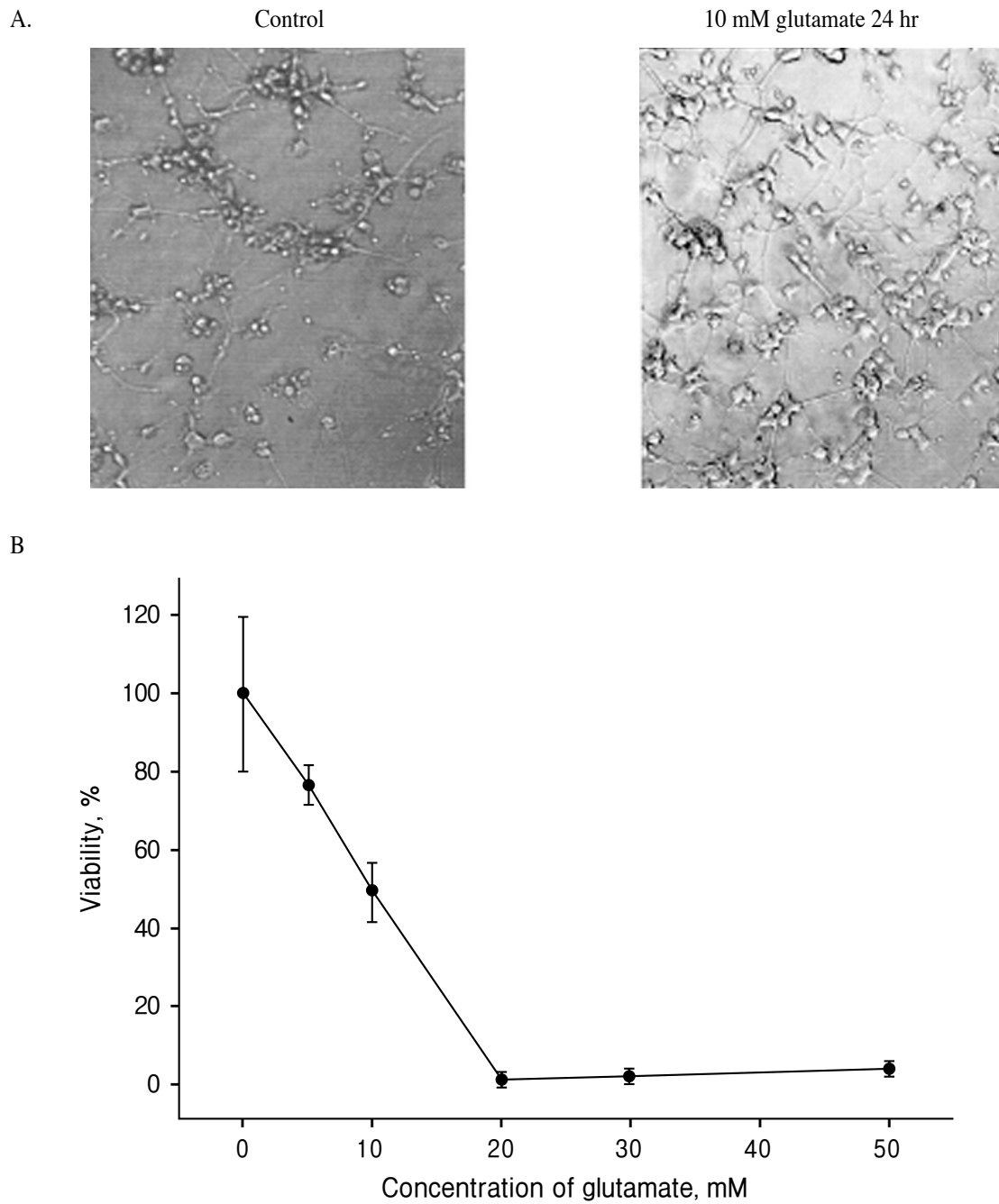


Fig. 1. Neuronal toxicity of glutamate in NGF-differentiated PC12 cells. A: Microscopic features in control and 10 mM glutamate treatment. B: Cell viability according to the concentration of glutamate. Data are acquired as percentile change to the averaged value of 0 mM glutamate and presents mean and SD.

신경세포 독성에 대하여 산화스트레스의 발생을 억제하고자 여러 가지 농도의 Cu/Zn SOD를 투여한 결과 10 mM glutamate 투여 시의 $21.9 \pm 6.31\%$ 에

비하여 50, 25, 10, 5 U/mL의 Cu/Zn SOD와 함께 투여 시 생존율은 각각 99.8 ± 1.99 , 102.6 ± 3.27 , 101.7 ± 3.24 , $102.8 \pm 4.16\%$ 로 대조군의

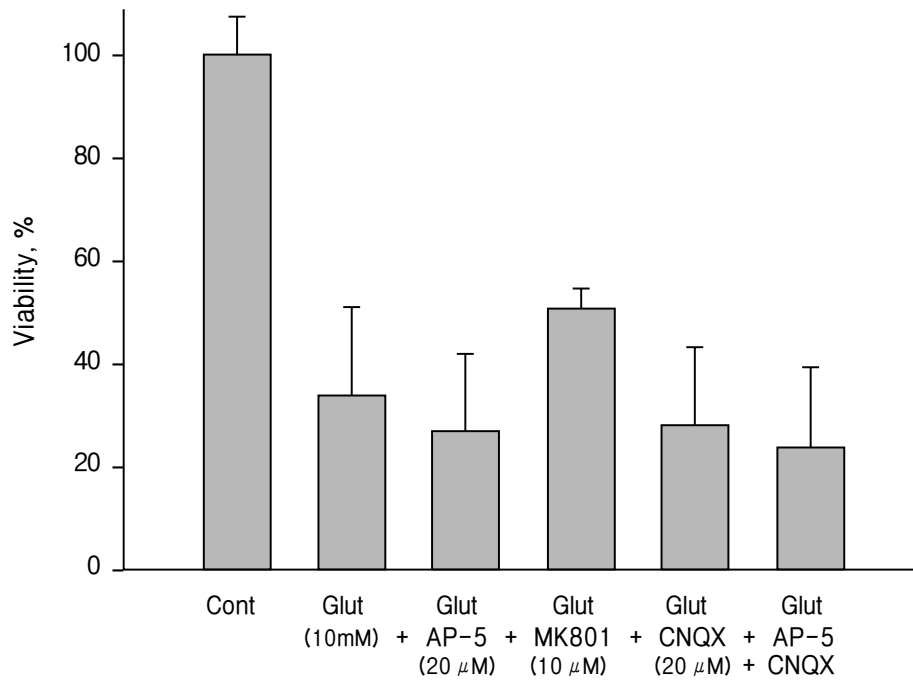


Fig. 2. The protective effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists on glutamate toxicity in NGF-differentiated PC12 cells. Cont: control; glutamate. * $p < 0.01$ vs. control.

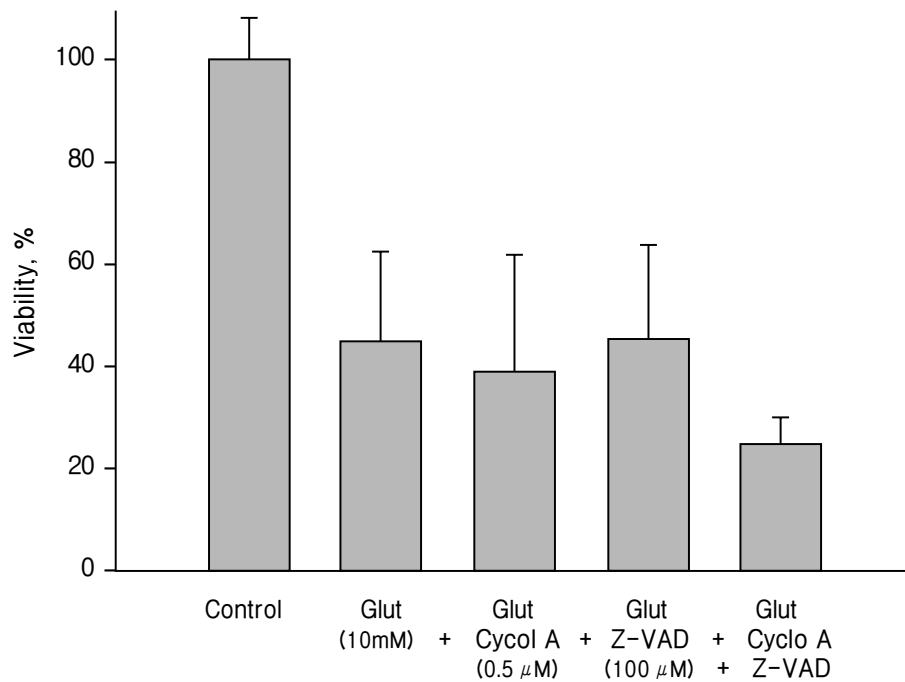


Fig. 3. The protective effects of cyclosporin-A and glutamate caspase inhibitor (Z-VAD) on glutamate (Glut) toxicity in NGF-differentiated PC12 cells. Cyclo A: cyclosporin-A; Z-VAD: Z-VAD-fmk.

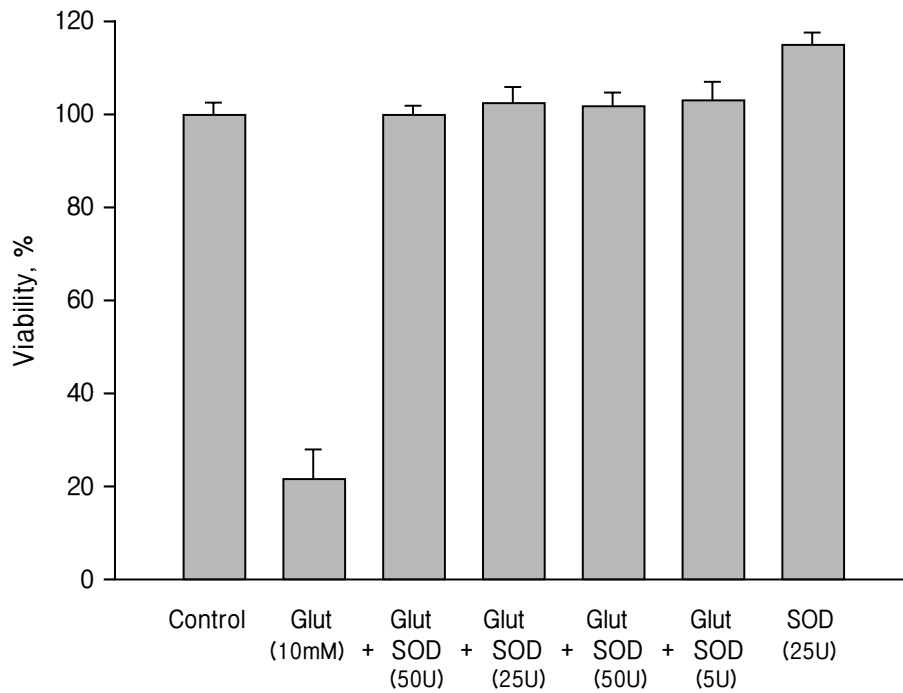


Fig. 4. The protective effects of Cu/Zn superoxido dismutase (SOD) glutamate (Glut) toxicity in NGF-differentiated PC12 cells.

Table 1. Effect of intracellular Ca^{2+} channel inhibition on glutamate toxicity in NGF-differentiated PC12 cells

Condition	N	Mean \pm SD	P value
Glutamate 10 mM	29	100 \pm 16.73	
Glutamate + ryanodine 100 μ M	11	104.1 \pm 23.09	0.530
Glutamate + U73122 2 μ M	11	112.3 \pm 36.56	0.145
Glutamate + ryanodine + U73122	3	167.9 \pm 12.49	< 0.01
Glutamate + MK801 10 μ M + ryanodine	3	170.1 \pm 16.68	< 0.01
Glutamate + MK801 10 μ M + U73122	3	163.7 \pm 15.13	< 0.01

NGF: nerve growth factor.

수준으로 완전 회복되었다(Fig. 4).

신경독성에 대한 세포내 Ca^{2+} 유리차단의 효과를 알아보기 위해 100 μM ryanodine과 2 μM U73122를 처리하였을 때 10 mM glutamate 투여에 대한 억제효과를 관찰할 수 없었다. 그러나 100 μM ryanodine과 2 μM U73122를 병합하거나 MK801과 함께 처리하였을 때 부분적으로 glutamate에 의한 신경독성을 억제하는 경향을 보였다(Table 1).

고 찰

PC12 세포는 pheochromocytoma세포의 일종이지만 신경세포와 유사한 다양한 이온통로가 존재하고 동시에 여러 가지 신경전달물질을 분비한다. PC12 세포에 존재하는 이온 통로는 막전압의존성 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 통로가 발현[20,21]될 뿐만 아니라 막전압에 의존적이면서 양이온에 비특이성을 가진 이온통로도 8~27%에서 관찰된다[22]. 동시에 glutamate와 GABA 이외에 acetylcholine과 monoamine들을 분비한다. NGF가 PC12 세포의 분화에 미치는 영향은 신경돌기의 형성을 촉진하면서 [23] Na^+ , Ca^{2+} 통로 및 NMDA수용체의 수적 증가를 유발하여 이를 활성화시킨다[20,24].

NMDA수용체는 시냅스의 가소성(plasticity)과 장기강화(long-term potentiation)의 기전에 관여하지만 [25] 과도할 때는 흥분독성을 유발하기도 한다[25]. PC12 세포에서 NMDA수용체의 특성은 포유동물 신경계에서의 NMDA수용체와 유사한 것으로 알려져 있다[26]. PC12 세포에 존재하는 NMDA수용체의 발현은 NGF의 투여와 관계없지만 NGF는 NMDA수용체의 양적인 증가를 통하여 이를 활성화시킨다[25,26].

이 실험에서 20 μM 의 AP5 투여 시 glutamate에 의한 세포독성을 억제하는 현상은 나타나지 않아 PC12 세포에서 glutamate성 신경독성에 NMDA수용체를 통한 작용은 상대적으로 미약한 것으로 생각된다. 동시에 non-NMDA 수용체를 차단하더라도 신경독성은 억제되지 않아 PC12 세포에서 향이온성 glutamate수용체는 신경독성을 유발하는 유일한 경

로 작용하지 않으며, 향대사성 glutamate 수용체가 상당한 비중으로 관여할 것으로 생각된다. 향대사성 glutamate수용체의 작용 기전에 대하여 아직 상세하게 밝혀진 바는 없지만 G-단백과 결합하여 PLC를 활성화하고 inositol triphosphate 및 diacylglycerol를 생성하여 결국 세포내 저장 Ca^{2+} 을 유리하여 세포 신호전달기전을 활성화할 것[27]으로 생각된다. 이 실험에서 PLC의 활성화를 억제하는 U73122는 이 과정을 차단함으로써 세포내 저장 Ca^{2+} 의 유리를 억제할 뿐만 아니라 향대사성 glutamate수용체를 통한 작용도 동시에 차단하는 효과를 기대하였다. 그러나 U73122 만으로는 glutamate에 의한 신경독성을 유의하게 억제하는 작용을 관찰할 수 없었으며, NMDA수용체 길항제인 MK801과 병합하여 사용 시 어느 정도의 신경독성을 차단하는 효과가 관찰된다는 점은 PC12 세포에서 glutamate성 신경독성기전으로 NMDA수용체 및 향대사성 수용체가 모두 관여할 것으로 생각된다. 따라서 glutamate가 세포독성을 유발하는 조건이 세포내 Ca^{2+} 농도의 과도한 증가로 생각할 때 과량의 glutamate가 존재하는 조건하에서 NMDA수용체나 향대사성 glutamate수용체 중 어느 한 경로를 통하더라도 신경독성은 유발될 것이다.

Caspase는 신경세포 뿐만 아니라 다른 세포에서도 세포사를 유발하는 중요한 기전의 하나로 생각하고 있으며 활성산소, 성장인자의 부족, 허혈, 저혈당 및 기계적 손상 등 여러 가지 원인에 의해 활성화된다[9]. Caspase cascade가 활성화되는 기전에는 크게 두 가지 경로가 있다. 그 중 하나는 미토콘드리아의 손상에 의해 일어나며 caspase 9를 활성화시키는 경로이고, 다른 하나는 세포막의 death receptor를 통하여 caspase 8을 활성화시키는 경로이다. 그러나 어떠한 경로를 통하든지 결과적으로 마지막 단계의 caspase 활성화는 caspase 3, 6, 7이 관여하여 세포사를 유발하는 것으로 알려져 있다. 동시에 cyclosporin A는 immunophilin ligand이면서 calcineurin 생성을 억제하는 것으로 알려져 있으며 이러한 작용을 통하여 미토콘드리아막의 보호 효과 및 calcineurin에 의한 세포사를 방지하는 것으로 보고되고 있다[15]. 이 실험에서 Pan-caspase

inhibitor 이기 때문에 caspase의 활성화를 억제하여 glutamate성 신경독성에 의한 세포사를 방지할 것으로 기대하였으나 실험 결과는 glutamate성 독성을 차단하지 못하였고, 또한 cyclosporin A의 투여도 glutamate에 의한 독성을 억제하지 못하였다. 반면에 Cu/Zn SOD는 PC12 세포에서 10 mM glutamate에 의한 신경독성을 완전하게 차단하는 효과가 관찰되어 glutamate성 신경독성의 주된 세포내 기전은 산화스트레스에 의해 일어난다고 할 수 있다. 세포사를 유발하는 산화스트레스의 기전은 superoxide, hydrogen peroxide, peroxynitrite 및 hydroxyl radical을 생성하여 단백질이나 지질에 손상을 야기한다[15]. 이 과정에서 SOD는 catalase와 glutathione peroxydase와 함께 superoxide와 hydrogen peroxide를 분해함으로써 활성산소의 생성을 억제한다[15].

신경세포에 대한 흥분성 작용뿐만 아니라 독작용에서도 세포내 Ca^{2+} 농도는 직접적인 연관성이 있다[31]. 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가할 수 있는 경로는 세포막에 존재하는 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로, Na^+/Ca^{2+} exchanger, NMDA수용체뿐만 아니라 세포내 미토콘드리아 등에 저장되어 있는 Ca^{2+} 을 유리하는 ryanodine 수용체 등으로 다양하다[32]. 이 실험에서 세포내 저장되어 있는 Ca^{2+} 을 유리하는 경로를 차단하였을 때 glutamate성 신경독성에 대한 유의한 보호효과는 관찰되지 않았으나 또 다른 Ca^{2+} 유입 경로인 NMDA수용체와 동시에 차단하면 glutamate성 독성에 대하여 부분적으로 보호효과를 관찰할 수 있었다. 그러나 실험적으로 세포외액의 Ca^{2+} 을 제거했을 때[33]와 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로를 차단했을 때[29] 신경독작용에 따른 반응이 유발되지 않거나 억제됨으로써 신경세포의 독작용에는 세포로 유입되는 Ca^{2+} 경로가 상대적으로 중요하다. 그러나 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 차단제를 처리한 경우 정상 세포에서도 성장이 거의 억제되므로 glutamate에 의한 신경독성 효과를 관찰하기 어려울 것으로 판단하여 이 실험에서는 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 차단제를 사용하지 않았다.

이상의 결과에서 NGF로 분화시킨 PC12 세포에서 glutamate가 신경독성을 유발하는 경로로

NMDA수용체와 항대사성 수용체의 역할이 중요하며, glutamate에 의해 세포사를 유발하는 주된 기전은 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하면 과도한 활성산소의 형성에 의해 야기될 것으로 생각된다.

요 약

NGF로 분화시킨 PC12 세포에서 glutamate성 신경독성의 기전을 살펴보고, 각기 다양한 기전을 통하여 세포사의 과정에 작용할 것으로 생각되는 여러 가지 보호제를 적절하게 조합하여 신경세포의 생존에 상승적인 효과를 나타낼 수 있는 약물의 조합을 관찰하고자 배양 5~7 일째 PC12 세포에 10 mM glutamate를 처리하여 신경독성을 유발하였다. 항이온성 glutamate수용체 억제제인 AP5, MK801 및 CNQX는 glutamate성 신경독성을 차단하지 못하였다. 세포사멸사에 관여하는 기전을 억제하는 cyclosporin A와 Z-VAD-fmk를 단독 혹은 병합하여 투여한 결과 glutamate성 독성 작용을 차단하지 못하였다. 그러나 활성산소를 억제하는 Cu/Zn superoxide dismutase를 투여하였을 때 glutamate에 의한 독성은 완전히 차단되었다. 세포내 Ca^{2+} 유리를 억제하는 ryanodine과 U73122를 단독으로 처리하였을 때에는 glutamate에 대한 유의한 보호효과는 없었으나 NMDA수용체 억제제와 병합하여 처리하면 부분적인 보호효과가 있었다. NGF로 분화시킨 PC12 세포에서 glutamate성 독성에 NMDA수용체와 항대사성수용체가 중요한 역할을 담당하며, 주된 기전은 과도한 활성산소의 형성인 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 1990;9:3545-50.
2. Castilho PE, Malenka RC, Nicoll RA. Kainate

- receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 1997;**388**:182-6.
3. Metsis M, Timmusk T, Arenas E, Persson H. Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:8802-6.
 4. Asztely F, Gustafsson B. Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 1996;**12**:1-11.
 5. Froissard P, Duval D. Cytotoxic effects of glutamic acid on PC12 cells. *Neurochem Int* 1994;**24**:485-93.
 6. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;**36**:83-106.
 7. Ying W. A new hypothesis of neurodegenerative diseases: the deleterious network hypothesis. *Med Hypotheses* 1996;**47**:307-13.
 8. Camins A, Gabriel C, Aguirre L, Sureda FX, Pubill D, Pallas M, *et al.* U-83836E prevents kainic acid-induced neuronal damage. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998;**357**:413-8.
 9. Castilho RF, Hansson O, Brundin P. FK506 and cyclosporin A enhance the survival of cultured and grafted rat embryonic dopamine neurons. *Exp Neurol* 2000;**164**:94-101.
 10. Schierle GS, Brundin P. Excitotoxicity plays a role in the death of tyrosine hydroxylase-immunopositive nigral neurons cultured in serum-free medium. *Exp Neurol* 1999;**157**:338-48.
 11. Bjorklund A, Spenger C, Stromberg I. Tirilazad mesylate increases dopaminergic neuronal survival in the oculo grafting model. *Exp Neurol* 1997;**148**:324-33.
 12. Nakao N, Frodl EM, Duan WM, Widner H, Brundin P. Lazaroids improve the survival of grafted rat embryonic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:12408-12.
 13. Schierle GS, Hansson O, Leist M, Nicotera P, Widner H, Brundin P. Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat Med* 1999;**5**:97-100.
 14. Schierle GS, Leist M, Martinou JC, Widner H, Nicotera P, Brundin P. Differential effects of bcl-2 overexpression on fiber outgrowth and survival of embryonic dopaminergic neurons in intracerebral transplants. *Eur J Neurosci* 1999;**11**:3073-81.
 15. Castilho RF, Hansson O, Brundin P. Improving the survival of grafted embryonic dopamine neurons in rodent models of Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 2000;**127**:203-31.
 16. Blochl A, Sirrenberg C. Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75L_{NTR} receptors. *J Biol Chem* 1996;**271**:21100-7.
 17. Bartrup JT, Moorman JM, Newberry NR. BDNF enhances neuronal growth and synaptic activity in hippocampal cell cultures. *Neuroreport* 1997;**8**:3791-4.
 18. Said SI, Dickman K, Dey RD, Bandyopadhyay A, De Stefanis P, Raza S, *et al.* Glutamate toxicity in the lung and neuronal cells: prevention or attenuation by VIP and PACAP. *Ann NY Acad Sci* 1998;**865**:226-37.
 19. Shi L, Wang CA. Inhibitory effect of the kinase inhibitor chelerythrine on acetylcholine-induced current in PC12 cells. *Arch Biochem Biophys* 1999;**368**:40-4.
 20. Bouron A, Becker C, Porzig H. Functional expression of voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels during neuronal differentiation of PC12 cells with nerve growth factor or forskolin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999;**359**:370-7.
 21. Hahn SJ, Choi JS, Rhie DJ, Oh CS, Jo YH, Kim MS. Inhibition by fluoxetine of voltage-activated ion channels in rat PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 1999;**367**:113-8.
 22. Dopico AM, Treisman SN. A novel large conductance, nonselective cation channel in

- pheochromocytoma (PC12) cells. *J Membr Biol* 1997;**160**:151-60.
23. Sherwood NT, Lesser SS, Lo DC. Neurotrophin regulation of ionic currents and cell size depends on cell context. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:5917-22.
 24. Pereira C, Santos MS, Oliveira C. Metabolic inhibition increases glutamate susceptibility on a PC12 cell line. *J Neurosci Res* 1998;**51**:360-70.
 25. Bai G, Kusiak JW. Nerve growth factor up-regulates the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter in PC12 cells. *J Biol Chem* 1997;**272**:5936-42.
 26. Casado M, Lopez-Guajardo A, Mellstrom B, Naranjo JR, Lerma J. Functional N-methyl-D-aspartate receptors in clonal rat pheochromocytoma cells. *J Physiol (Lond)* 1996;**490**:391-404.
 27. Conley EC. *The Ion Channel Fast Book I: Extracellular Ligand-gated Channels*. London: Academic Press;1996,p.75-233.
 28. Lerma J, Paternain AV, Naranjo JR, Mellstrom B. Functional kainate-selective glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Pro Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:11688-92.
 29. 홍영수, 배재훈, 송대규, 임정근, 박원균. Kainate 수용체를 통한 신경독작용에서 BDNF mRNA 발현과 Ca²⁺ 유입 경로. *항공우주의학* 1999;**9**:198-206.
 30. Wetmore C, Olson L, Bean A. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression and release from hippocampal neurons is mediated by non-NMDA type glutamate receptors. *J Neurosci* 1994;**14**:1688-700.
 31. Mattson M, Lovell M, Furukawa K, Markesbery W. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1995;**65**:1740-51.
 32. Conley EC. *The Ion Channel Fast Book II: Intracellular Ligand-gated Channels*. London: Academic Press;1996,p.21-277.
 33. Yu O, Chuang DM. Neurotrophin protection against toxicity induced by low potassium and nitroprusside in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 1997;**68**:68-77.