

NMDA(N-methyl-D-asparate)의 투여에 의해 유발된 신경 과흥분상태에서의 쥐의 뇌조직 변화

송 재 찬

경북대학교 수의과대학
(1998년 4월 14일 접수)

Histological changes in brain tissue of rat induced neuronal excitotoxicity by NMDA(N-methyl-D-asparate)

Jae-chan Song

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University
(Received Apr 14, 1998)

Abstract : Histological changes was investigated in the 4 weeks old rat brain using NMDA (N-methyl-D-asparate) which is capable of mediating excitotoxic events. The changes were occurred when the injected NMDA solved in PBS was over 1.0 μ g/g(about 90nM). The necrosis of Purkinje cells in cerebellum and the increasement of coloidal plexus cell number were prevalent. The Purkinje cell number of necrosis were increased according to increasement of amount of injected NMDA. In spite of increasement of degenerated Purkinje cell number, differentiation of new Purkinje cell was not identified because total number of Purkinje cell was not changed. The change of cell number was observed in coloidal plexus cell rather than degeneration of cell. About 5 time increasement was occurred. This change may cause increasement of cerebrospinal fluid and the makes mophorogy of brain more round than nomal.

Key words : NMDA(N-methyl-D-asparate), Purkinje cell, coloidal plexus.

서 론

음성전하를 갖는 아미노산의 Glutamate와 Asparate는

중추신경계에서 다른 종류의 아미노산보다 높은 농도를 유지하면서 대사나 신경전달에 있어서 중요한 역할을 하고 있으나 정상농도 이상의 양에 의하여 신경 과흥분(exitotoxicity)을 유발한다¹. 신경 과흥분은 신경세포의 수

이 논문은 1996년 경북대학교 공모과제의 연구비로 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Jae-chan Song, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Republic of Korea.

지들기의 말단부에 있는 흥분성 수용체에 대한 과도한 자극으로 인하여 신경세포가 손상을 받는 것을 지칭하며^{2,4}, 이러한 작용을 하는 수용체로는 NMAD, Quis, KA 로 분류되는 3종류의 EAA(Excitotoxicity Amino Acid) 수용체가 있다. 그중 NMDA형 수용체는 높은 Ca^{2+} 이온의 투과성과 전위의존성 Mg^{2+} 이온의 투과를 저해하는 등 특성을 가지고 있어 다른 두종류의 수용체와 구별되며, 해마 CA1 영역에 있어서 신경활동 의존성의 synapse 가소성(activity dependent synaptic plasticity)에 중심적인 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다⁵. 과량의 NMDA(N-methyl-D-Asparate)는 신경세포의 NMDA 수용체에 작용하여 hypoxia-ischemia, seizures와 trauma 등을 동반하여 광범위한 신경손상을 일으키는 일차적인 원인으로 알려져 있으나⁶ 아직까지 과흥분에 의해서 야기되는 신경세포의 손상의 기전에 대하여는 거의 알려져 있지 않고 있다. 과량의 EAA에 의한 신경의 손상 특히 뇌조직의 손상에 대한 조직학적 연구는 과량의 Glu를 신생 흰쥐에 구강⁷ 또는 피하⁸로 투여하였을 경우에 시신경을 손상시키는 것이 확인되었다. 또한 신생 유인원을 사용한 실험에서도 같은 결과를 얻었으며, 손상부위가 뇌조직의 blood-brain-barrier가 없는 circumventricular organ에 나타나 과량의 Glu는 뇌조직 어느 부위에도 손상을 줄 수 있는 가능성이 제시되었다⁹. 본 연구에서는 EAA 수용체의 하나인 NMDA 수용체의 과흥분에 의하여 뇌조직이 손상을 받는 기전을 밝히기 위하여 실험용 쥐를 대상으로 하여 농도별로 NMDA로 투여한 뒤 뇌조직의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 실험동물은 Winstar 계통의 rat를 사용하였으며, 실험 전기간동안 고형사료(삼양사, 서울)와 수돗물을 자유롭게 공급하였다. 실험동물은 정상 대조군과 NMDA 투여군으로 구분하여 사육하였으며, 각 5마리씩 실험에 사용하였다. NMDA 투여군에는 N-Methyl-D-Asparate(A(Sigma, Cat No. M-3262 U.S.A)를 rat의 체중 g당 각각 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 μ g을 PBS에 녹여 복강내로 주사하였다. 또한 정상 대조군에는 NMDA 투여군과 동일한 양의 PBS를 동일한 방법으로 투여하였다. 실험동물은 NMDA와 PBS를 투여하고 24시간이 경과된 후 Ketamine hydrochloride(Ketarlar[®], 유한양행)로 마취후 뇌를 적

출하였다.

적출한 뇌조직은 대뇌, 중뇌, 소뇌 및 연수부위가 동시에 관찰되도록 가로(longitudinal)로 절단하여 Bouin액(picric acid : formalin : acetic acid, 15 : 5 : 1의 혼합액)에 36시간 고정하였다. 고정한 조직은 에탄올 계열에서 탈수과정 후에, xylene을 거쳐 일반적인 방법으로 paraffin 포매를 실시하였고, microtome(ANGLIA scientific, England)를 사용하여 3~4 μ m의 연속절편을 제작하였다. 이후 뇌조직의 조직학적 변화를 관찰하기 위해, hematoxylin-eosin(H-E) 염색을 실시한 후 광학현미경하에서 관찰하였다.

결 과

NMDA(N-methyl-D-Asparate)가 흰쥐의 뇌에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 NMDA의 농도를 각각 0.1 μ g/g(S1), 0.25 μ g/g(S2), 0.5 μ g/g(S3), 1 μ g/g(S4), 2.5 μ g/g(S5), 5 μ g/g(S6)의 군으로 구분하여 조직학적 변화를 관찰하였던 바 뇌를 적출한 후에 관찰된 외형적인 형태에서는 PBS를 투여한 대조군과 정상 뇌조직에서는 육안상으로 관찰되는 변화는 없었으나 NMDA 투여군에서는 외형이 정상군에 비해 가로축이 짧고, 세로축이 확장되어 전체적으로 팽창되어 있는 것이 관찰되었다. 광학현미경하에서 관찰된 조직학적 소견은 소뇌의 조롱박 신경세포(Purkinje cell)의 변성과 뇌실의 맥락열기 세포(Choroid plexus cell)의 수적 증가가 관찰되었다.

적출한 뇌의 전체적인 조직학적 변화를 동일한 시야에서 관찰하기 위하여 뇌를 가로축으로 4 μ m씩 연속 절편하여 10개의 분획당 1분획에 대하여 H-E 염색을 하였다. 조직의 검사결과 소뇌에서는 대조군과는 다른 조직학적 변화가 관찰되었으나 그 이외의 실질조직의 변성은 관찰되지 않았다. 소뇌에서는 피질분자층, 조롱박 신경세포층과 과립층으로 구분되는 구조중에 피질분자층 및 과립층에서는 조직학적 변성이 인정되는 부분이 관찰되지 않았으나 조롱박 신경세포층에서는 NMDA의 농도가 0.25 μ g/g 이상에서 세포의 변성이 관찰되었다(Fig 1,2). 대조군에서 관찰된 조롱박 신경세포들은 과립층의 세포보다 월등히 큰 둥근형태로 핵과 세포질이 확연히 구별되어 관찰되고, 세포가 일정한 간격을 이루며 한층의 세포로 배열되어 있는 것이 관찰되었다. 그러나 NMDA를 투여한 군에서는 부분적으로 대조군에서와 동

Table 1. The number of total and degenerative Purkinje cell(mean±S.D), and their ratio(%) in the cerebellum

	Number of total cells	Number of degenerative cells	D/T(%)**
Normal	23.20±3.82	2.10±1.45	8.30
S1(0.1µg/g)	23.80±5.73	2.50±1.90	12.82
S2(0.25µg/g)	22.50±4.38	10.50±2.70*	31.82
S3(0.5µg/g)	22.70±4.88	15.30±3.80*	40.26
S4(1.0µg/g)	22.90±4.07	15.20±5.03*	40.16
S5(2.5µg/g)	23.30±5.12	14.90±5.24*	39.01
S6(5.0µg/g)	23.90±4.51	18.80±2.20*	45.08

* p < 0.01 compared with normal group.

**D/T(%) : Degenerative cells / Total cells.

Table 2. The numbers of choroid plexus cells(mean±SD) in 4th ventricle

	Normal	S1(0.1µg/g)	S2(0.25µg/g)	S3(0.5µg/g)	S4(1.0µg/g)	S5(2.5µg/g)	S6(5.0µg/g)
Numbers of cells	128.70±8.87	300.40±15.66*	434.40±38.13*	446.20±41.79*	509.90±22.09*	579.50±22.09*	673.50±39.04*

*p < 0.01 compared with normal group.

일한 형태의 정상세포가 관찰되고 있으나 대부분의 세포들이 형태가 위축되어 부정형으로 관찰되었다(Fig 2, 3). 이러한 세포들은 H-E 염색의 결과, 핵막과 세포질의 구분이 없이 세포전체가 균일하게 염색되며, 호산성이 증가하여 대조군의 세포보다 강하게 염색되어 나타나, 세포가 괴사된 모습으로 관찰된다. 이러한 변화는 투여한 NMDA의 농도에 따라 차이가 나타난다. 즉, 투여한 NMDA의 농도가 높을수록 개개의 세포에 있어서 변성의 정도가 심하게 나타나 전체 세포중에서 변성된 세포가 차지하는 비율도 증가하여 나타난다(Table 1). Table 1에서 보는 바와 같이 NMDA 투여군에서는 정상군에 비하여 1mm²에서 관찰되는 조롱박 신경세포의 총수는 별다른 변화를 보이지 않는 반면, 변성된 세포의 수는 S1(0.1µg/g)군에서는 3.05±1.90으로 정상군의 2.10±1.45에 비하여 별다른 유의성이 관찰되지 않았으나 S2(0.25µg/g)군에서 S6(5µg/g)군에 걸쳐서는 유의성(p < 0.01) 있는 증가가 관찰되었다. 특히 정상군에 비해 S2군에서는 큰 폭의 증가가 관찰되었다. 한편 맥락열기를 구성하고 있는 맥락열기 세포정상군에 비해 NMDA 투여군에서는 세포의 형태에는 변화가 없으나 0.1µg/g의 NMDA의 농도에서부터 수의 증가를 나타내고 있으며(Fig 4, 5) 또한

농도에 비례하여 유의성(p < 0.01)이 인정되는 증가를 나타내었다(Table 2). 또한 이들 세포의 수적증가와 함께 뇌실의 확장이 관찰되었다. 두종류의 세포변화에 있어서 각각의 세포가 변화를 일으키는 NMDA의 농도가 다르게 나타났다. 맥락열기 세포는 0.1µg/g의 NMDA 농도에서부터 유의성이 있는 변화를 나타내고 있는데 반해, 조롱박 신경세포는 0.25µg/g의 농도에서부터 변화를 나타내는 것이 관찰되었다.

고 찰

본 연구에서는 NMDA가 유발하는 신경 과흥분에 의해 뇌조직이 받는 손상을 광학현미경하에서 조직의 관찰을 통하여 고찰하였다.

소뇌에서의 조직손상은 NMDA를 투여하였을 때 소뇌를 구성하고 있는 분자층(molecular layer)과 과립층(granular layer)에서는 손상이 확인되지 않았으나 조롱박 신경세포에는 H-E 염색의 결과 세포의 괴사가 인정되었다. 그러나 동일한 양의 PBS를 투여한 정상 대조군에서는 변화를 나타내지 않으며 투여한 NMDA의 농도가 증가함에 따라 관찰된 조롱박 신경세포중에서 손상된 세포의

수의 비율이 증가되어 나타나고 있다. 조롱박 신경세포가 손상을 받는 현상은 EAA를 과량투여하거나 traumatic brain injury^{10,11} 등의 연구에서 이미 보고된 바가 있어 이러한 결과는 투여한 NMDA에 의하여 유발된 것으로 사료된다.

소뇌에서 관찰된 조롱박 신경세포의 총수는 대조군과 실험군에서 변화가 없었으나 실험군에서는 투여한 NMDA의 농도가 증가할수록 조롱박 신경세포중에서 손상된 세포의 수와 비율이 유의성 있는 증가를 보이고 있다. 이러한 결과는 Furuyama *et al*¹²⁻¹⁵에 의해 조롱박 신경세포의 분화가 유도될 수 있는 가능성이 시사된 바 있어, 새로운 조롱박 신경세포의 분화를 예측할 수 있으나 본 연구에서는 조롱박 신경세포 전체의 수가 투여한 NMDA의 농도와는 무관하게 나타나는 것으로 미루어 NMDA에 의하여 조롱박 신경세포가 손상을 받아도 새로운 조롱박 신경세포의 증식은 유발되지 않는 것으로 판단된다. 본 연구의 경우 조롱박 신경세포의 증식에 있어 NMDA를 투여한 시간이 짧아(24시간) 분화가 유도되기에는 충분한 시간적인 여유가 없었을 가능성이 있으나¹⁶ 이러한 가능성을 확인하기 위해서는 NMDA를 투여한 장기간에 걸쳐 지속적인 관찰이 필요할 것으로 판단된다.

신경 과흥분에 의한 조직의 손상에 대한 기전은 과흥분의 수용체를 가진 세포에서 자극을 수용한 뒤, 이 세포로부터 신경흥분의 전달을 받는 세포에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 보고는 본 연구의 결과로 나타난 조롱박 신경세포의 손상이 NMDA가 조롱박 신경세포에 직접 작용하지 않고, NMDA 수용체를 발현하면서, 조롱박 신경세포에 흥분성 신경전달을 하는 세포로부터 자극을 수용한 결과로 예측된다. 소뇌에서 NMDA에 대한 수용체의 분포는 시간적으로 또한 공간적으로 매우 다양한 분포를 나타내고 있다⁵. NMDA 수용체를 구성하고 있는 5종류의 subtype $\epsilon 1$, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, $\zeta 1$ 에 대한 각 subtype의 발현양상은 subtype $\epsilon 2$ 는 출생 직후부터 1주까지는 발현하고 있으나 그 이후에는 발현하지 않으며, subtype $\zeta 1$ 은 뇌조직의 전체에서, subtype $\epsilon 1$ 은 주로 대뇌와 소뇌의 과립세포층에서 발현되고 있다. Subtype $\epsilon 4$ 는 출생후 7일까지 대뇌와 소뇌의 과립세포층에서 발현하고 있으나 그 이후에는 거의 발현하지 않는다. 반면 subtype $\epsilon 3$ 는 출생 1주 이후부터 지속적으로 소뇌의 과립세포에서 특이적으로 발현하고 있다. 또

한 subtype $\epsilon 3$ 의 기능이 조롱박 신경세포와 과립세포간의 synapse에 있어서 흥분성 synapse의 전달에 관여하고 있는 점¹⁷, 신경 과흥분에 의한 조직의 손상이 주로 흥분 전달 신경계에서 신경전달을 수용한 세포와 연결된 세포에서 일어난다는 지금까지의 보고가 소뇌의 조롱박 신경세포가 손상을 받는 본 연구의 결과와 일치하여, NMDA의 투여에 의한 조롱박 신경세포의 손상은 과립세포에서 발현하고 있는 NMDA 수용체의 subtype $\epsilon 3$ 에 의하여 수용된 과흥분이 조롱박 신경세포에 전달되어 일어난 결과로 추정된다. 이러한 가능성은 subtype $\epsilon 3$ 의 유전자 결손 실험동물¹⁸을 제작하여 확인하는 추가연구가 필요하다.

맥락얼기 세포(choroidal plexus cell)는 유입되는 혈액의 일부를 뇌척수액으로 분비되는 역할을 담당하고 있으며, 정상적으로 이 세포들은 한 층의 세포로 구성되어 있다^{19,20}. 본 연구에서는 NMDA의 과량투여에 의하여 이들 세포가 증식하여 복층의 세포를 형성하는 것이 관찰되었다. 아직 신경세포의 과흥분에 의하여 맥락얼기 세포가 증식되는 것이 관찰된 보고가 없어, 이러한 결과에 대한 원인을 추론할 수 없으나, 본 연구에서 NMDA의 투여후에 나타나는 외형적인 변화 즉, 뇌를 적출하였을 때 정상 뇌조직보다 팽창되어 있으며 또한 거미막밑 공간이 실질조직과 넓은 간격을 이루고 있는 것이 맥락얼기 세포가 뇌척수액을 생산하는 기능과 밀접한 관계가 있는 것으로 추정된다. 즉, 맥락얼기 세포의 수적인 증식은 유입되는 혈액으로부터 뇌척수액으로의 분비를 증가시키고, 이러한 뇌척수액의 증가는 뇌의 외부부를 싸고 있는 뇌막에 의하여 제한된 공간에 정상보다 많은 양의 뇌척수액이 수용되어야 하기 때문에 외형이 팽창되어 나타나며 또한 거미막밑 공간도 증가된 뇌척수액의 양의 증가함에 따라 정상보다 많은 양의 뇌척수액이 유입되기 때문에 실질조직으로부터 격리되는 것으로 추정된다.

NMDA에 의하여 조롱박 세포가 괴사되는 반면 맥락얼기 세포가 괴사되지 않고 증식하는 점과 변화를 나타내기 시작하는 NMDA의 농도가 다르다는 것은 두세포의 기능이 다르다는 점에서 본 연구에서 나타난 결과를 예측할 수 있으나 아직까지 뇌를 구성하는 각 세포에 대한 EAA의 감수성에 대한 연구는 전혀 진행되어 있지 않아 이러한 변화의 차이를 설명할 수 없다. 이러한 차이점은 각 세포가 어떠한 종류의 신경전달 수용체를 가지

는가에 대한 별도의 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

NMDA를 비롯한 그외의 EAA에 의하여 일어나는 세포에 손상에 대한 기전은 현상만 관찰되었을 뿐 그 기전에 대하여는 아직 불분명한 점이 많다. 이러한 이유는 신경세포로 분화된 세포는 배양하기가 어려워 다량의 균일한 실험재료를 얻을 수 없기 때문이다. 일부 미분화 신경세포를 인위적으로 특정 신경세포로 분화시켜 신경세포의 분화 및 기능에 대하여 연구하고 있으나^{21,22} 제한된 종류의 신경세포에 국한되고 있다. 그러나 최근 *in situ hybridization*을 사용한 신경세포의 연구²³는 분자생물학적 기법과 병행하여 신경세포의 기능에 관한 연구에 좋은 방법을 제시하고 있다. 본 연구에서 관찰된 조롱박 신경세포의 손상이나 맥락얼기 세포의 증식은 EAA가 신경세포의 과흥분에 의하여 손상을 받는 기전의 연구를 위하여 좋은 재료로서의 가치가 있다. 이러한 연구는 소뇌에서 정상적으로 발현되는 유전자와 NMDA에 의하여 과흥분이 유도된 소뇌에서의 유전자 변화를 SAGE(Serial Analysis of Gene Expression²⁴, DDPCR^{25,26} 또는 PCR subtraction²⁷ 등의 방법을 이용하여 세포내에서 일어나는 변화에 관련된 유전자를 분리하고 분리한 유전자를 probe로 하여 *in situ hybridization*을 실행하여 유전자의 구조를 밝히고 각 조직에서의 발현여부를 연구함으로써 NMDA에 의하여 유발된 조직의 변화에 대하여 손상을 받는 기전과 또는 손상을 억제하는 기전에 관

한 세포내에서 일어나는 변화에 대한 명확한 해석이 기대된다.

결론

과량의 NMDA가 뇌조직에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 알아보기 위하여 0.1 μ g/g~5 μ g/g의 NMDA를 복강으로 주사하여 뇌조직을 절편하여 광학현미경하에서 대조군과 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 투여한 NMDA의 농도가 0.1 μ g/g 이상에서 맥락얼기 세포의 증식이 인정되었으며, 0.25 μ g/g 이상의 농도에서 소뇌의 조롱박 신경세포의 피사가 인정되었다.

2. 육안으로 관찰된 형태의 변화는 뇌척수액의 증가로 인하여 팽창되어 있었다.

3. 소뇌에서는 조롱박 신경세포에서만 변성이 인정되었고, 그외 뇌조직의 실질부분에서는 변성은 인정되지 않았다. 조롱박 신경세포의 총수의 변화는 대조군과 실험군에서 변화가 없어 NMDA의 투여에 의해서는 조롱박 신경세포의 새로운 분화가 유도되지 않는 것으로 나타났다.

4. NMDA를 투여한 실험군에서는 맥락얼기 세포의 수가 대조군보다 투여한 NMDA의 농도에 따라 약 5배의 증가를 보이고 있으며 이러한 맥락얼기 세포수의 증가는 뇌척수액의 증가를 유발하여 외형을 팽창시키는 것으로 나타났다.

Legend for figures

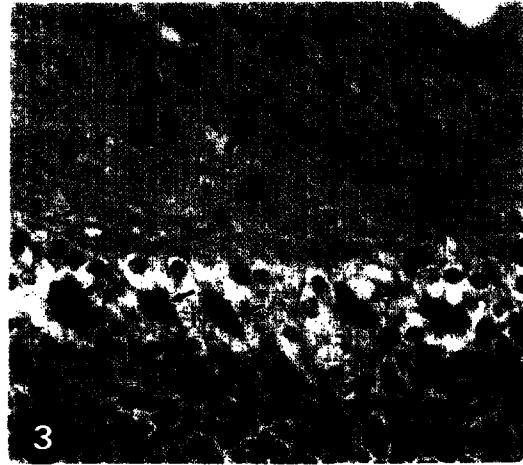
Fig 1. Light micrograph of Purkinje cell in cerebellum. 0.25 μ g/g of NMDA was injected. H-E stain \times 300.

Fig 2. Light micrograph of Purkinje cell in cerebellum. 1.0 μ g/g of NMDA was injected. H-E stain \times 300.

Fig 3. Light micrograph of Purkinje cell in cerebellum. 5.0 μ g/g of NMDA was injected. H-E stain \times 300.

Fig 4. Light micrograph of choloid plexus cell in 4th ventricle. 1.0 μ g/g of NMDA was injected. H-E stain \times 300.

Fig 5. Light micrograph of choloid plexus cell in 4th ventricle. 5.0 μ g/g of NMDA was injected. H-E stain \times 300.



참 고 문 헌

1. Olney JW, Labruyere J, Wang G, *et al.* NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science*, 254:1515-1518, 1991.
2. Olney JW. Toxic effects of glutamate and relate amino acids on the developing central nerve system In Nyhan WN, ed. Heritable disorders of amino acid metabolism. New York: John Wiley & Sons, 501-512, 1974.
3. Olney JW, Ho OL, Rhee V. Cytotoxic effects of acidic and sulphur-containing amino acids of the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res*, 14:61-76, 1971.
4. Olney JW, Misar CH, deGubareff T. Cystein-S-syulfate: brain damaging metabolite in sulfite oxidase deficiency. *J Neuropathol Exp Neurol*, 34:167-176, 1975.
5. Watanabe M. Involvement of the NMDA receptor channel in synaptic plasticity and development(Japanese). *The Cell*, 28:7-12, 1997.

6. Hume RI, Digledine R, Heinemann SF. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science*, 253:1028-1031, 1991.
7. Olney JW, Ho OL. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature*, 227:609-610, 1970.
8. Olney JW. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus: an electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 30:75-90, 1971.
9. Olney JW, Sharp LG, Feigin RD. Glutamate-induced brain damage in infant rimates. *J Neuropathol*, Exp Neurol, 31:464-488, 1972.
10. Fukuda K, Aihara N, Sagar SM. *et al*. Purkinje cell vulnerability to mild traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 13:255-266, 1996.
11. Banno T, Kohono K. Conformational changes of smooth endoplasmic reticulum induced by brief anoxia in rat purkinje cell. *J Comp Neurol*, 369:462-471, 1996.
12. Larkfors L, Lindsay RM, Alderson RF. Characterization of the response of Perkinje cells to neurotrophin treatment. *J Neurichem*, 66:1362-1373, 1996.
13. Furuya S, Hashikawa T, Hirabayahi Y. Restrict occurrence of an unusual ganglioside GD1 alpha in rat brain and its possible involvement in dendritic growth of cerebellar purkinje neurons. *J Neuro Res*, 44:73-83, 1996.
14. Sohma O, Mizuguchi M, Takashima S, *et al*. High expression of Bcl-x protein in the developing human cerebellar cortex. *J Neurosci Res*, 43:175-182, 1996.
15. Napieralski JA, Eisenman LM. Further evidence for a unique development compartment in the cerebellum of the meander tail mutant mouse as revealed by the quantitative analysis of Purkinje cells. *J Comp Neurol*, 364:718-728, 1996.
16. Chen WJ, McAlhany RE Jr, Marier SE, *et al*. Cocaine exposure during the brain growth spurt failed to produce cerebellar Purkinje cell loss in rat pups. *Teratology*, 53:145-151, 1996
17. Yuzaki M, Forrest D, Verselis LM, *et al*. Functional NMDA receptors are transiently active and support the survival of Purkinje cells in culture. *J Neurosci*, 16:4651-4661, 1996.
18. Soloviev MM, Brierley MJ, Sao Z, *et al*. Functional expression of a recombinant unitary glutamate receptor from *Xenopus*, which contains N-methyl-D-aspartate(NMDA) and Non-NMDA receptor subunit. *J Biol Chem*, 271:32572-32579, 1996.
19. Webb DJ, Wen J, Lysiak JJ, *et al*. Urine alpha-macroglobulins demonstrate divergent activities as neutralizers of transforming growth factor-beta and as inducers of nitric oxide synthesis. A possible mechanism for the endotoxin insensitivity of the alpha 2-macroglobulin gene knock-out mouse. *J Biol Chem*, 271: 24982-24988, 1996.
20. 김진경 등. 조직학 도보(Finn Geneser F. Color atlas of histology), 고려의학, 65, 1992.
21. 배춘상 등. 신경해부학(Capenter MB. Core text of neuroanatomy) 교문사, 9-10, 1993.
22. Munir M, Lu L, Wang YH, *et al*. Pharmacological and immunological characterizaton of N-methyl-D-aspartate receptors in human NT2-N neurons. *J Parmacol Exp Ther*. 276:819-828, 1996.
23. Nakki R, Sharp FR, Sagar SM. Fos expression in the brainstem and cerebellum following phencylidine and MK801. *J Neuro Res*, 43:203-212, 1996.
24. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, *et al*. Serial analysis of gene expression. *Science*, 270:484-487, 1995.
25. Chapman MS, Qu N, Pascoe S, Chen WX, *et al*. Isolation of differentially expressed sequence tags from steroid-responsive cells using mRNA differential display. *Mol Cell Endocrinol*, 27:108:R1-R7, 1995.
26. Brandt B, Vogt U, Harms F, *et al*. Double-differential PCR for gene dosage estimation of erb B oncogenes in benign and cancer tissues and comparison to cellular DNA content. *Gene*, 29-34, 1995.
27. McCaustland KA, Bi S, Purdy MA, *et al*. Application of two RNA extraction methods prior to amplification of hepatitis E virus nucleic acid by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 35:331-342, 1991.