Korean J Physiol Pharmacol
Vol 1: 699-705, December, 1997

L-Glutamate에 의한 PC12 세포의 고사성 사망

성기욱 · 정경희 · 김성윤 · 강정혜 · 이상복

가톨릭대학교 의과대학 약리학교실

Apoptotic Process is Involved in the L-Glutamate-Induced PC12 Cell Death. **Ki Wug Sung, Kyung Heui Jung, Seong Yun Kim, Jung Hyae Kang, and Sang Bok Lee** Department of Pharmacology, Catholic University Medical College, Seoul 137-701, Korea

Although it is known that neuronal cell death during development occurs by apoptosis, the mechanisms underlying excitatory amino acid-induced neuronal cell death remain poorly understood. In this study we have examined the mechanism by which L-glutamate, an excitatory amino acid neurotransmitter, induces cell death in PC12 cell lines.

To characterize cell death, we employed sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) method for cellular DNA fragmentation, DNA agarose gel electrophoresis and chromatin staining by acridine orange and ethidium bromide after treating the PC12 cells with L-glutamate. L-Glutamate caused dose-dependent cell death with a maximum at 24 hrs after the treatment. These cellular fragmentation was blocked by pretreatment of MK-801, a noncompetitive *N*-methyl-D-aspartic acid(NMDA) receptor antagonist, and nerve growth factor(NGF). Analysis of DNA integrity from L-glutamate-treated cells revealed cleavage of DNA into regular sized fragments, a biochemical hallmark of apoptosis. The PC12 cells that were induced to die by L-glutamate treatment exhibited classical chromatin condensation under the light microscopy after acridine orange and ethidium bromide staining. These results suggest that apoptosis is one of the key features that are involved in L-glutamate-induced excitotoxic cell death in PC12 cells, and these cell death are mediated by NMDA receptor and depend on NGF.

Key Words: Glutamate, Excitotoxicity, PC12 cell, Apoptosis, NMDA, NGF

서 론

L-Glutamate는 뇌신경조직에서 흥분성 신경전달을 매개하는 대표적인 아미노산계 신경전달물질이다. 그러나 신경세포가 외부적 혹은 내부적 요인에 의하여 대량의 L-glutamate에 노출되는 경우 세포 사망을 유발하는 것으로 알려져 있다. 병태생리적인 상태에서 L-glutamate에 의한 신경독성의 기전은 지금까지는 괴사(necrosis)과정을 통하는 것으로 알려져 있었다. 즉 많은 연구자들이 신경세포가 대량의 L-glutamate에 노출되면 수용체를 통한 양이온의 급격한 세포내 이동을 초래하고 이로 인하여 세포의 삼투압 조절능력이 상실된 세포는 용해되어 세포의 내용물이 유리되고 염증반응을 유발한다고 보고함으로써 괴사를 통하여 L-glutamate가 신경독성을 유발함을 시사하였다(Choi & Rothman, 1990). 그러나 최근에는 L-glutamate가 고사(apoptosis)를 통해서도 신경독성을 유발한다는 증거가 보고되고 있다. 즉 L-glutamate에 의한 신경독성은 시간경과와 이온의존성에 따라 급성과 지연성 세포 사망을 초래하며 급성기전에 의한 신경세포 사망은 주로 괴사에 의하지만 지연성 신경세포 사망은 세포내 Ca^{++}이온에 의존적으로 괴사 혹은 고사를 통하여 각각 세포 사망을 유발하는 것으로 보고되고 있다(Meldrum & Garthwaite, 1990; Choi, 1995).

한편 각 조직의 발생과정 동안에 많은 세포가 사망하는 것으로 알려져 있다(Kerr & Harmon, 1991). 특히 뇌신경조직의 발생과정 중에는 다른 조직에 비하여 매우 많은 수의 신경세포가 사망하며 이러한 신경세포의 사망은

책임저자 : 이상복, ㉾ 137-701 서울 서초구 반포동 505, 가톨릭대학교 의과대학 약리학교실

뇌신경조직의 발생과 생리학적 기능유지를 위하여 필수적인 것으로 알려져있다(Oppenheim, 1991; Bursh et al, 1992; Naruse & Keino, 1995). 또한 뇌신경계의 발생시기에 있어 세포 사망은 특정 유전자의 발현에 의한 단백질 합성이 필요하고 이에 의하여 세포내 신호전달계를 활성화시켜 세포를 사망시키는 고사에 의한 것으로 알려져 있다(Henderson, 1996). 최근에는 뇌신경계의 발생과정에서 뿐만 아니라 뇌허혈, 전간(epilepsy)과 Huntington씨병 등의 퇴행성 뇌신경질환에 있어서도 고사에 의하여 신경세포의 사망이 유발되며, 이 때 L-glutamate에 의한 신경독성이 중요한 병태생리적 요인으로 보고되고 있다(Farooqui & Horrocks, 1991; Coyle & Puttfarcken, 1993; Meldrum 1993; Raff et al, 1993; Thompson, 1995; Charriaut-Marlangue et al, 1996; Portera-Cailliau et al, 1995).

따라서 본 연구에서는 신경세포의 연구에 많이 이용되는 PC12 세포에 L-glutamate를 처치한 후 DNA의 분절과 세포내 핵질의 형태변화를 관찰함으로써 *in vitro*에서 L-glutamate와 고사의 관련성을 확인하고 이에 대하여 L-glutamate성 *N*-methyl-D-aspartic acid(NMDA) 수용체 길항제의 효과 및 신경세포 성장인자인 nerve growth factor(NGF)의 효과를 알아보고자 하였다.

방 법

재 료

흰쥐 부신의 pheochromocytoma에서 분리하여 신경세포주로 확립된 PC12 세포주를 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하여 실험에 이용하였다. 세포배양에 사용된 RPMI 1640, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 마혈청(horse serum, HS), 항생제(penicillin과 streptomycin)는 GIBCO(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. Acridine orange, ethidium bromide, NGF, trypsin-EDTA, L-glutamate는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서, MK-801은 RBI(Natick, MA, USA)에서 구입하였다. FBS와 HS는 56°C에서 30분간 가열한 후 배양액에 첨가하였다.

세포배양 및 약물처치

PC12 세포는 5% FBS, 10% HS, penicillin(100 units/l), streptomycin(100 μg/l)이 첨가된 RPMI 1640 세포배양액으로 37°C, 10% CO_2가 유지되는 인공배양기에서 계대배양하였다. 약물 처치를 위하여 대조군, L-glutamate 처치군, MK-801 전처리 후 L-glutamate 처치군, NGF 전처리 후 L-glutamate 처치군으로 나누어 PC12 세포 1×10^6개를 60 mm 배양접시에 분주하고 1시간 후에 약물을 투여하였다. 대조군에는 약물 대신 phosphate buffered saline(PBS)을 처치하였고, L-glutamate(1 nM, 1 μM, 10 μM, 1 mM, 10 mM 및 1 M)는 세포배양액에 녹였으며 MK-801은 PBS에 녹여 L-glutamate 투여 5분전에 10 μM의 농도로 처치하였다. NGF(50 ng/ml)는 세포배양액에 5일간 첨가하였다.

ELISA에 의한 PC12 세포 DNA의 분절의 정량

PC12 세포의 DNA분절은 5-bromo-2'-deoxy-uridine(BrdU)과 DNA에 대한 항체를 이용한 sandwich enzyme-linked imminosorbant assay(ELISA) kit(Cellular DNA Fragmentation ELISA, Boehringer Manheim, Germany)로 정량하였다. PC12 세포를 10 μM의 BrdU가 첨가된 세포배양액에서 24시간 배양하여 DNA에 BrdU를 labeling한 후 원침(250 g, 10 min)하여 세포를 회수하고 세포배양용 96 well plate에 well 당 2×10^4개씩 분주한 후 1시간 후에 L-glutamate를 처치하였다. 원침(250 g, 10 min) 후 세포배양액을 제거하고 100 μl incubation buffer를 넣어 30분간 상온에 방치하여 얻은 세포질 용해액을 anti-DNA 항체가 있는 ELISA plate에 옮겼다. 남아있는 핵에 1% Triton® X-100을 100 μl 씩 넣어 30분간 상온에 방치하여 핵질 용해액을 얻어 ELISA plate에 옮겼다. 세포질 및 핵질 용해액을 anti-DNA와 상온에서 90분간 반응시킨 후 washing solution으로 3회 세척하고 전자레인지(500 W, 5 min)로 denaturation시켰다. anti-BrdU peroxidase가 포함된 conjugation solution을 100 μl 씩 각 well에 첨가하고 90분간 상온에 방치한 후 다시 3회 세척하고 기질용액 100 μl 를 첨가하여 발색시켰다. 30분 후 25 μl의 stop solution을 넣어 발색반응을 중단시키고 450 nm 파장에서 흡광도를 읽었다. DNA 분절은 세포질 및 핵질 용해액의 총 DNA량에 대한 세포질용해액의 DNA량의 비로써 정량하였다.

Agarose 전기영동에 의한 DNA 확인

PC12 세포를 PBS로 세척하고 배양접시에 400 μl의 lysis buffer [10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)]를 넣어 세포용해액을 얻은 후 proteinase K(100 μg/ml)를 첨가하여 48°C에서 24시간 반응시켰다. 1.25 M NaCl을 첨가하고 원침(13,000 g, 20 min, 4°C)하여 상층액을 얻고 상층액과 같은 부피의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1, vol/vol)과 chloroform/isoamyl alcohol(24:1, vol/vol) 용액으로 DNA를 추출한 후 absolute ethanol로 DNA를 침전시켜 genomic DNA를 얻었다. 침전물을 TE buffer [10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA]에 녹이고

RNase A(100 μg/ml, 37°C, 1 시간)를 처리한 후 260 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA를 정량 하였다. 이렇게 얻은 DNA 20 μg을 1.3% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 자외선 투시기로 관찰하였다.

Acridine orange 와 ethidium bromide 염색에 의한 배양 PC12세포의 형태학적 관찰

약물 처치가 끝난 PC12 세포를 원침(250 g, 10 min)하여 회수하고 PBS로 세포현탁액을 만들어 25μl 세포현탁액에 acridine orange(100 μg/ml)와 ethidium bromide(100 μg/ml)가 혼합된 염색액을 1 μl 섞은 후 현탁액을 slide glass에 떨어뜨리고 cover glass를 덮은 후 형광형미경으로 관찰하였다.

통 계

모든 자료는 평균±표준오차로 표시하였다. DNA분절에 대한 약물효과의 결과분석은 일원배치에 의한 분산분석 및 Dunnett의 다중비교법에 의하여 통계적으로 검증하였다.

결 과

PBS를 처치한 대조군과 비교하였을 때 L-glutamate 처치에 의하여 세포내의 DNA 총량에 대한 분절 DNA 량이 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 1과 Fig. 2). L-Glutamate(1 mM) 처치 후 DNA 분절을 경시적으로 관찰하였을 때 9시간부터 분절이 증가되기 시작하였으나 24시간에만 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 증가를 보였다(130.0±7.8%, $P<0.05$, Fig. 1). L-Glutamate 처치 후 24시간에 관찰된 DNA 분절은 L-glutamate 농도 1 nM, 1 μM, 10 μM에서는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으나, 1 mM과 10 mM에서는 대조군에 비하여 유의하게 증가되었고(대조군에 비하여 124.2±3.0%, 120.5±0.9%, $P<0.05$), 1 M에서는 대조군에 비하여 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 2). L-Glutamate로 인한 DNA 분절은 NMDA 수용체 길항제인 MK-801과 신경세포 성장인자인 NGF에 의하여 차단되었다. 즉 L-glutamate(1 mM) 처치 시 대조군(99.9±1.9%)에 비하여 173.4±7.1%로 증가된 DNA의 분절이 L-glutamate 처치 5분전에 MK-801(10 μM)을 세포배양액에 전처리 하였을 때 98.1±1.5%로 차단되었다($P<0.05$,

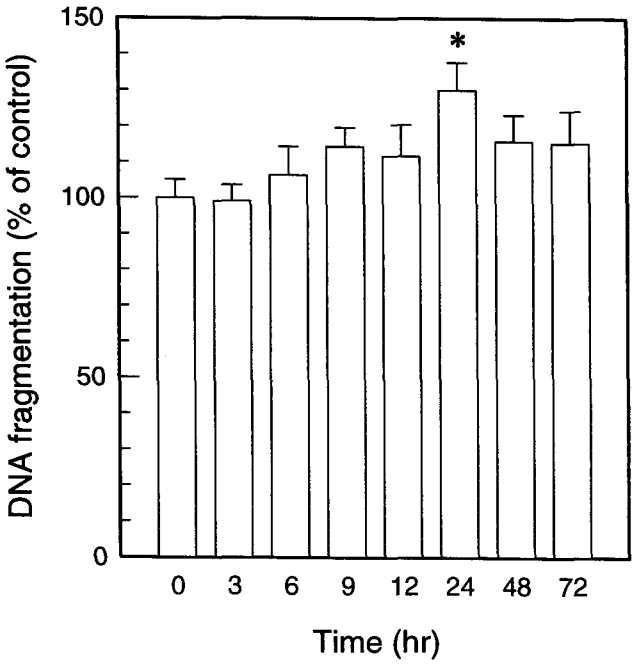

Fig. 1. DNA fragmentation induced by L-glutamate in PC12 cells. DNA fragmentation was examined by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) at various time points after L-glutamate(1 mM) treatment. Cellular DNA fragmentation was maximal at 24 hrs after L-glutamate treatment.
Values are mean±S.E.M. of three triplicate experiments. *$P<0.05$ from control.

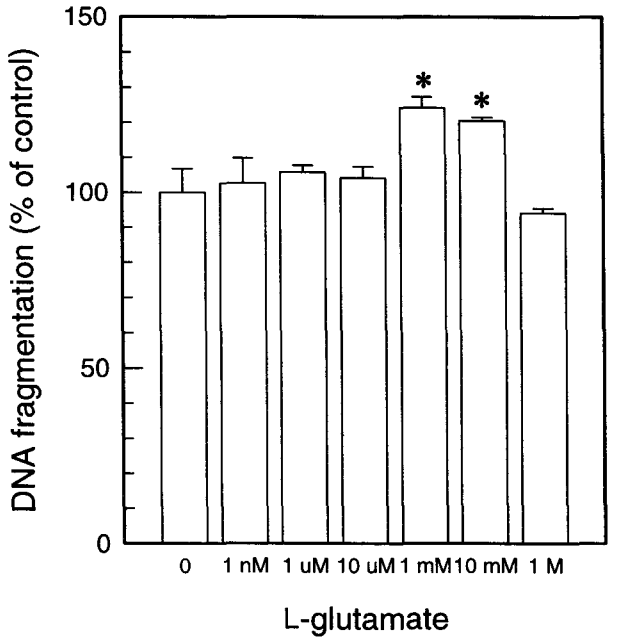

Fig. 2. Dose dependent DNA fragmentation induced by L-glutamte in PC12 cells. DNA fragmentation was studied by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) in PC12 cells at 24 hrs after various concentrations of L-glutamate treatment.
Values are mean±S.E.M. of three triplicate experiments. *$P<0.05$ from control.

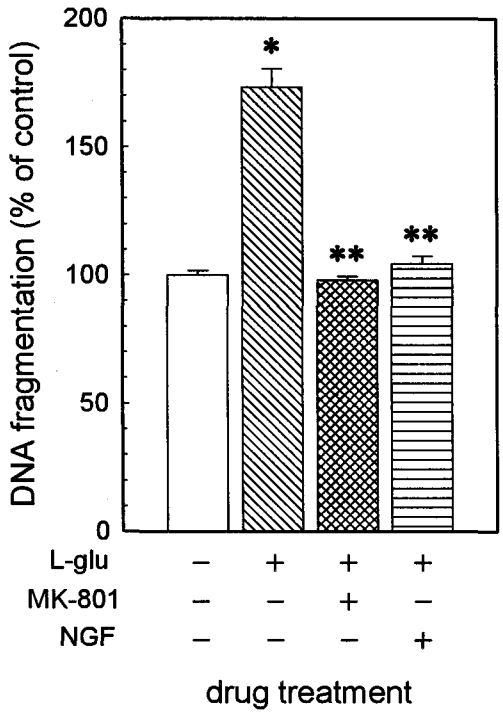

Fig. 3. Effects of *N*-methyl-D-aspartic acid(NMDA) receptor antagonist, MK-801, and nerve growth factor(NGF) on cellular DNA fragmentation induced by L-glutamate. MK-801(10 μM) was treated at 5 min before L-glutamate(1 mM) treatment and NGF(50 ng/ml) was treated for 5 days before L-glutamate(1 mM) treatment.
Values are mean±S.E.M. of three triplicate experiments.
*$P<0.05$ from control.
**$P<0.05$ from L-glutamate treated only.

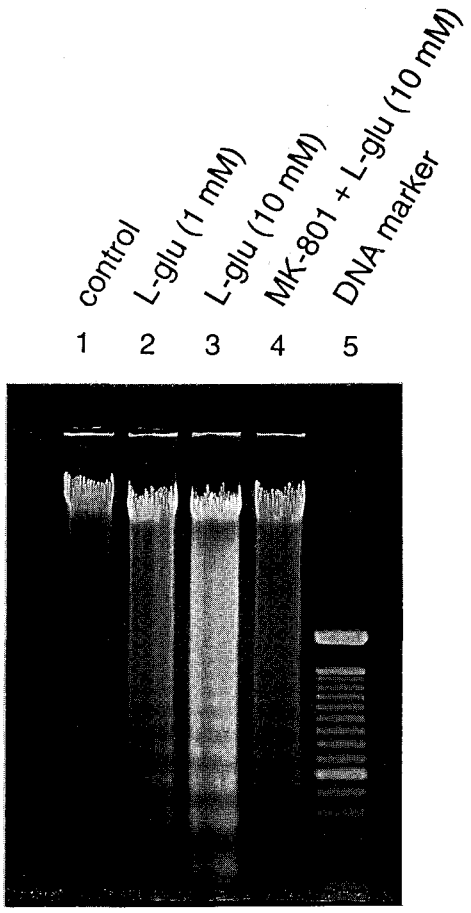

Fig. 4. Patterns of DNA migration in L-glutamate-treated PC12 cells. DNA was extracted from PC12 cell at 24 hrs after L-glutamte(L-glu, 1 mM, 10 mM) and from MK-801 pretreated PC12 cells. After DNA was migrated on 1.3 % agrose gel electrophoresis, gel was stained with ethidium bromide and photographed under UV trasillumination.

Fig. 3). 또한 NGF(50 ng/ml)를 5일간 처치한 경우 L-glutamate(1 mM)에 의한 DNA 분절은 NGF 비전처리 군에 비하여 유의하게 감소되었다(104.4±3.0%, $P<0.05$, Fig. 3).

PC12 세포에 L-glutamate를 처치하고 genomic DNA를 추출하여 1.3% agarose 젤에 전기영동 후 DNA의 이동을 관찰하였을 때 고사를 시사하는 DNA ladder 현상이 관찰되었다(Fig. 4). 이러한 DNA ladder는 PBS를 처치한 대조군(lane 1)에서는 나타나지 않았고 1 mM 처치군(lane 2)에 비하여 10 mM(lane 3) 처치군에서 더욱 뚜렷이 나타났으며 MK-801 전처리에 의하여 감소되었다(lane 4). 또한 100 base pair(bp) ladder marker(lane 5)와 비교하였을 때 대략 internucleosome 단위로 분절이 일어남을 알 수 있었다.

L-Glutamate에 의한 PC12 세포사망을 형태학적으로 관찰하기 위하여 L-glutamate 1 mM을 처치한 후에 acridine orange와 ethidium bromide로 chromatin을 염색하였을 때 정상 PC12 세포는 녹색의 핵이 균질한 상태로 동그란 모양을 유지하고 있었으나 사망 세포는 염색상이 균질하지 못하고 핵내에 진한 녹색의 덩어리가 관찰되어 L-glutamate에 의한 PC12 세포사망이 고사에 의함을 시사하였다(Fig. 5).

고 찰

본 연구에서는 신경세포에 대한 아미노산계 흥분성 신경전달물질인 L-glutamate의 신경독성작용을 알아보고자 PC12 세포에 L-glutamate를 처치한 후 DNA 분절을 ELISA법으로 정량하고 이에 대한 NMDA 수용체 길항제

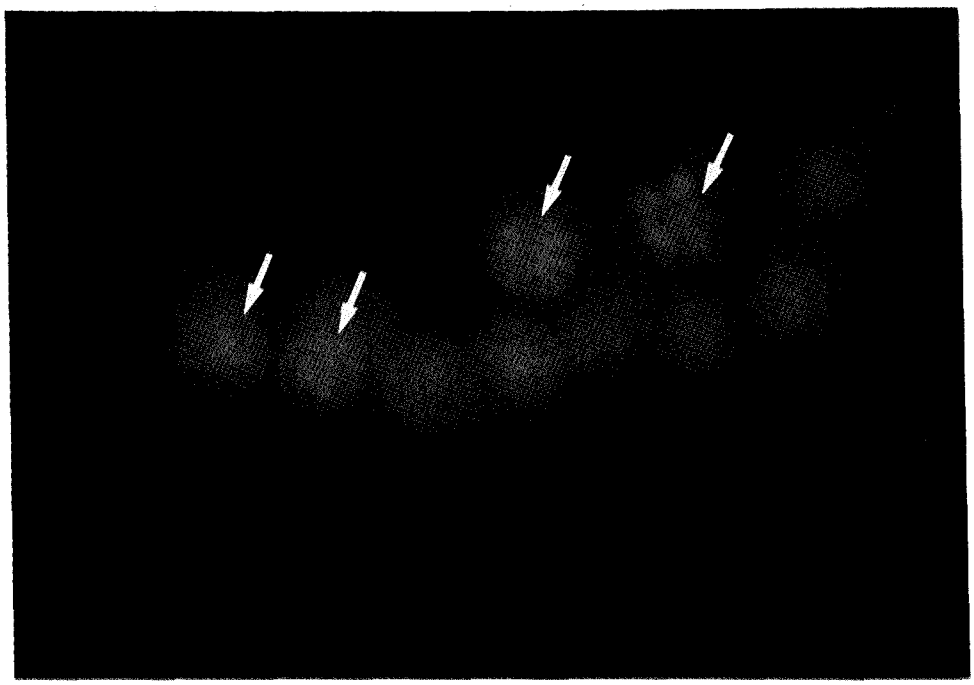

Fig. 5. Nuclear morphologic changes in PC12 cells treated with L-glutamate(1 mM). Picture representes cells observed under the fluorescent microscope after chromatin staining by acridine orange and ethidium bromide. Arrows indicate apoptotic nuclear change; condensed chromatin and chromatin clumping(×1000).

와 신경세포 성장인자의 효과를 관찰하였다. 또한 고사에 의한 PC12 세포사망을 알아보기 위하여 DNA를 분리하여 agarose 젤 전기영동으로 DNA분절의 양상을 관찰하였으며 chromatin 염색 후 형광현미경으로 세포핵 내 chromatin의 분포와 모양을 관찰하였다.

L-Glutamate에 의한 PC12 세포의 DNA분절은 지연성이며(Fig. 1), 용량의존적임을(Fig. 2) 알 수 있었다. 즉 고사를 시사하는 중요한 지표 중의 하나인 DNA 분절이 약물처치 후 24시간에 증가되는 것으로 보아 과량의 L-glutamate에 의한 신경독성은 지연성 세포사망을 유발하며 이는 주로 고사에 의한 것으로 사료된다. Kure등(1991)은 흰쥐 태자의 대뇌피질에서 분리하여 일차 배양한 신경세포에 L-glutamate를 처치하였을 때 DNA의 분절이 유발되고 이러한 DNA분절은 endonuclease 억제제인 aurintricarboxylic acid, mRNA 합성 억제제인 actinomycin D에 의하여 차단되는 것으로 보고한 바, L-glutamate에 의한 신경세포의 사망이 고사에 의할 수 있음을 시사하였다. 또한 본 실험의 결과는 흰쥐 뇌로부터 일차 배양한 신경세포에 L-glutamate 재흡수를 억제하는 L-α-amino adipate를 처치하여 세포배양액의 내인성 L-glutamate의 농도를 지속적으로 높여 주었을 때 신경세포의 사망이 유발되며 이는 48시간에 최고에 도달한다는 Didier등(1996)의 보고와 흥분성 아미노산계 신경전달물질인 kainate를 흰쥐의 편도핵에 주사하였을 때 48~72시간 후에 해마에서 DNA의 분절이 관찰되어 흥분성 신경세포 독성이 지연성임을 시사한 Pollard등(1994)의 보고와도 유사하다. 본 실험에서는 위의 보고에 비하여 시간적으로 조기에 신경세포의 사망이 유발되었는데 이는 실험에 사용된 세포 혹은 동물, 사용약물에 의한 차이에 기인한 것으로 사료된다. 한편 L-glutamate 투여 후 PC12 세포에서 추출한 DNA를 agarose 젤 전기영동하였을 때, 분절에 의한 DNA ladder가 관찰되었고 이러한 DNA ladder는 DNA 표지자와 비교하였을 때 internucleosome 단위로서(Fig. 4) 고사에 의한 세포사망시 특징적으로 관찰되는 internucleosomal DNA 분절(Naruse & Keino, 1995)과 같아 위에서 언급한 결과를 뒷받침하고 있다. Acridine orange와 ethidium bromide로 PC12 세포의 chromatin을 염색하였을 때 정상 PC12 세포는 핵의 chromatin이 균질하게 염색이 되는데 비하여 L-glutamate 처치 시에 고사의 형태적 특징인 chromatin의 농축 및 농축된 chromatin의 덩어리(Majno & Joris, 1995)가 관찰되어(Fig. 5) 고사가 진행됨을 시사하였다.

L-Glutamate에 의한 DNA 분절은 NMDA 수용체 길항제인 MK-801 전처리에 의하여 차단되는 것으로 보아 (Fig. 3) L-glutamate에 의한 고사성 세포사망은 NMDA 수용체를 매개하여 유발됨을 알 수 있었다. 한편 L-glutamate성 NMDA 수용체는 세포외액의 Na^+, K^+, Ca^{++}등 양이온에 대한 선택적인 투과성을 가지며(Monaghan et al, 1989) 특히 Ca^{++}이온에 대한 투과성이 신경세포에 있어 중요한 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다(Murphy & Miller, 1988; Holopainen et al, 1990). 따라서 이러한 결과는 L-glutamate에 의하여 PC12 세포의 NMDA 수용체가 활성화되고 이를 통하여 유입된 Ca^{++}이온에 의하여 세포 사망과 관련된 효소가 Ca^{++}이온 의존적으로 활성화되어 DNA 분절등 고사의 특징적 현상을 유발될 수 있음을 시사한다. 이는 갓 태어난 흰쥐의 뇌에 NMDA와 kainate를 투여하였을 때 internucleosomal DNA 분절이 동반된 고사성 세포 사망을 유발하며 특히 NMDA에 의한 사망은 MK-801에 의하여 차단된다는 보고(Campagne et al, 1995)와 유사하다. 또한 본 실험에서 L-glutamate에 의한 DNA 분절은 신경세포 성장인자인 NGF에 의하여 차단됨을 관찰하였다(Fig. 3). 이는 신경세포에 cycloheximide, actinomycin D, colchicine등의 약물을 투여하면 고사가 일어나고 이러한 신경세포 사망은 NGF, basic fibroblast growth factor등의 성장인자에 의하여 차단된다는 보고(Lindenboim et al, 1995)와 일치한다. 그러나 L-glutamate의 NMDA수용체를 통한 신경세포 사망기전은 mitochondria의 기능, 즉, 세포의 energy 조달 상태에 따라 괴사 또는 고사를 모두 유발할 수 있다고 보고된 바 있다(Ankarcrona, et al, 1995). 이는 L-glutamate에 의한 신경독성은 NMDA 수용체 이외에 여러 인자에 대하여 의존적임을 시사한다. 따라서 이에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 Schubert등(1992)은 NGF와 fibroblast growth factor를 PC12 세포에 처리한 경우 신경세포로의 분화가 촉진됨으로써 세포막에 발현되는 NMDA 수용체의 수적 증가에 의하여 오히려 L-glutamate에 의한 신경독성이 증가되는 반면, epidermal growth factor는 L-glutamate에 의한 신경독성을 감소시킨다고 보고된 바 있으므로 세포성장인자의 신경세포 사망에 대한 효과에 대해서도 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과는 L-glutamate가 고사를 통하여 뇌신경조직의 사망을 유발할 수 있음을 시사한다. 뇌허혈, 전간과 Huntington씨병, Parkinson씨병, Alzheimer씨병등의 퇴행성 뇌신경질환에 있어서도 L-glutamate 유발성 고사에 의한 신경세포 사망에 대한 연구가 더 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1995~1997년도 과학기술처 특정연구 생명공학기술개발사업과 1996년도 교육부 지원 기초의학 학술조성비 및 가톨릭 중앙의료원 성의장학회(1994~1996)의 지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

Ankarcrina M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961–973, 1995

Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 13: 245–251, 1992

Campagne MVL, Lucassen PJ, Vermeulen JP, Balazs R. NMDA and kainate induce internucleosomal DNA cleavage associated with both apoptotic and necrotic cell death in the neonatal rat brain. *Eur J Neurosci* 7: 1627–1640, 1995

Charriaut-Marlangue C, Aggoun-Zouaoui D, Represa A, Ben-Ari Y. Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gap 120 toxicity. *Trends Neurosci* 19: 109–114, 1996

Choi DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal cell death. *Trends Neurosci* 18: 58–60, 1995

Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13: 171–182, 1990

Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689–695, 1993

Didier M, Bursztajn S, Adamec E, Passani L, Nixon RA, Coyle JT, Wei JY, Berman SA. DNA strand breaks induced by sustained glutamate excitotoxicity in primary neuronal culture. *J Neurosci* 16: 2238–2250, 1996

Farooqui AA, Horrocks LA. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disease. *Brain Res Rev* 16: 171–191, 1991

Henderson CE. Programmed cell death in the developing nervous system. *Neuron* 17: 579–585, 1996

Holopainen I, Louve M, Enkvist MOK, Akerman KEO. Coupling of glutamatergic receptors to changes in intracellular Ca^{2+} in rat cerebellar granule cells in primary culture. *J Neurosci Res* 25: 187–193, 1990

Kerr JFR, Harmon BV. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In: Tomei LD, Cope FO ed,

Apoptosis: the Molecular Basis of Cell Death. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 5−29, 1991

Kure S, Tominaga T, Yoshimoto T, Tada K, Narisawa K. Glutamate triggers internucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 39−45, 1991

Lindenboim L, Haviv R, Stein R. Inhibition of drug-induced apoptosis by survival factors in PC12 cells. *J Neurochem* 64: 1054−1063, 1995

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3−15, 1995

Meldrum B. Amino acid as dietary excitotoxins: a contribution to understanding neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 18: 293−314, 1993

Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Teands Pharmacol Sci* 11: 379−387, 1990

Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29: 365−402, 1989

Murphy SN, Miller RJ. A glutamate receptor regulates Ca^{2+} mobilization in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85: 8737−8741, 1988

Naruse I, Keino H. Apoptosis in the developing CNS. *Prog Neurobiol* 47: 135−155, 1995

Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14: 453−501, 1991

Pollard H, Charriaut-Marlangue C, Cantagrel S, Represa A, Robain O, Moreau J, Ben-Ari Y. Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience* 63: 7−18, 1994

Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Proce DL, Koliatsos VE. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* 15: 3775−3787, 1995

Raff MC, Barres BA, Burne J, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from nervous system. *Science* 262: 695−700, 1993

Schubert D, Kimura H, Maher P. Growth and vitamin E modify neuronal glutamate toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8264−8267, 1992

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456−1462, 1995