

# Kainic Acid 유발 흰쥐 발작 모델에서 (R)-N<sup>6</sup>-phenylisopropyladenosine의 전처치가 변연계의 신경세포 접착분자(Neural Cell Adhesion Molecule ; NCAM)의 면역반응 변화에 미치는 영향\*

Effect of (R)-N<sup>6</sup>-phenylisopropyladenosine (RPIA) Pretreatment  
on the Alteration of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Immunoreactivity  
in Limbic System of Kainic Acid (KA)-induced Rat Seizure Model

황선출<sup>1</sup> · 황세진<sup>2</sup> · 조원길<sup>2</sup> · 진창배<sup>3</sup> · 정호삼<sup>2</sup>

Seon-Chool Hwang, M.D.<sup>1</sup>, Se-Jin Hwang, M.D.<sup>2</sup>, Won-Gil Cho<sup>2</sup>,  
Chang Bae Jin, Ph.D.<sup>3</sup> and Ho-Sam Chung, Ph.D.<sup>2</sup>

## ABSTRACT

**Background :** Various neuronal and glial factors which participate in neural differentiation, including neural cell adhesion molecule (NCAM), are upregulated in pathogenesis of temporal lobe epilepsy (TLE). This study aimed to investigate the effect of (N<sup>6</sup>)-R-phenylisopropyladenosine (RPIA), an adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist, on the morphological alteration of NCAM immunoreactivity (IR) in limbic system of kainic acid (KA)-induced epileptic rats. **Methods :** Experimental animals were divided into control group, KA treatment only (10 mg/kg, i.p.) group, and RPIA pretreatment (100 µg/Kg, i.p., 10 min prior to injection of KA) group. Animals were sacrificed at 24 hours and 1 week after KA treatment. Luxol fast blue-cresyl violet stain for histopathological observation, and NCAM immunohistochemistry to study alteration of NCAM IR in limbic system were performed. **Results :** Neuronal loss in CA1 and CA3 areas of hippocampus, piriform cortex, basolateral amygdala nucleus and lateral dorsal thalamic nucleus were induced by KA injection, and those were reduced by RPIA pretreatment. Increase of NCAM-IR was observed in interneurons of all hippocampal areas, except CA2 area, piriform cortex and basolateral amygdala nucleus at 24 hours after KA injection, and increased NCAM-IR was observed in cell membrane and processes of neuroglia, dentate granule cells and pyramidal cells in CA1 area of hippocampus, and neurons in piriform cortex, amygdala and lateral dorsal thalamic nucleus 1 week after KA injection, but those changes were milder than those at 24 hours after KA injection. RPIA pretreatment significantly reduced KA-induced NCAM-IR in hippocampal CA3, CA1 area, piriform cortex, amygdala and lateral dorsal thalamic nucleus. **Conclusion :** We suggest that decrease of NCAM immunoreactivity is associated with neuroprotective effects of RPIA on limbic system against KA neurotoxicity. (J Korean Epilep Soc 3 : 22-32, 1999)

**KEY WORDS :** Kainic acid · R-N<sup>6</sup>-phenylisopropyladenosine · Limbic system · Neural cell adhesion molecule · Temporal lobe epilepsy.

\*본 과제는 과학기술처 및 한국과학기술연구원의 선도기술개발과제(1997~1998)에 의하여 지원되었음.

<sup>1</sup>부산메리놀병원 신경과

Department of Neurology, Merinol Hospital, Pusan, Korea

<sup>2</sup>한양대학교 의과대학 해부학교실

Department of Anatomy, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

<sup>3</sup>한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터

Bioanalysis and Biotransformation Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

교신저자 : 황세진, 133-791 서울 성동구 행당동

TEL : (02) 2290-8201 · FAX : (02) 2281-7841

E-mail : hwangsje@email.hanyang.ac.kr

## 서 론

홍분성 신경독성물질의 일종인 kainic acid(KA)<sup>1)</sup>를 실험동물에 전신적 혹은 편도핵등에 국소적으로 투여하면 복합-부분발작(complex-partial seizure)유형의 간질이 유발되며, 형태학적 변화로서 해마(hippocampus)의 신경세포의 괴사 및 2 차적인 신경교증(gliosis)에 의하여 특징적인 해마경화증(hippocampal sclerosis)의 소견이 나타나므로, 측두엽간질(temporal lobe epilepsy; TLE)의 기전 연구와 치료수단개발을 위한 실험동물모델로서 널리 사용되고 있다.<sup>2)</sup> 또한 KA를 전신적으로 투여하는 방법은 뇌내 국소투여법에 비하여 실험동물의 마취, 수술조작, 투여경로를 따른 부수적인 물리적 손상 혹은 감염이 없이 특정 구조물의 손상을 유발할 수 있다는 장점을 지니고 있다.<sup>3)</sup>

KA등을 이용한 간질모델에서 변연계의 병변형성과정(pathogenesis)에는 신경세포 손상의 인자 뿐만 아니라, 2차적인 축삭발아(axonal sprouting) 및 연결형성(synaptogenesis)에 따라 신경세포의 형성과정에 관여하는 많은 인자들의 발현에도 변화를 유발하며, 여기에는 신경세포의 분화에 관여하는 대표적인 인자인 신경세포접착분자(neural cell adhesion molecule: NCAM)의 변화가 포함된다. NCAM은 신경조직에서 최초로 알려진 세포접착분자(cell adhesion molecule)로서,<sup>4)</sup> 척추동물 배아의 발생과정 및 출생초기의 원시신경상피세포, 신경세포, 신경교세포 및 근육세포에서 고도로 발현되어, 신경연접 및 신경-근연접의 형성에 중요한 역할을 담당한다.<sup>5-7)</sup> 정상적인 성체에서 NCAM은 해마형성의 치상회(dentate gyrus)와 같이 신경형성이 지속되는 극히 제한된 지역에서만 발현되나,<sup>8)</sup> 신경손상에 따른 연결재형성은 NCAM의 재발현을 유발하며, 특히 측두엽간질의 특이적인 병리현상인 축삭발아(axonal sprouting) 및 연결재형성은 신경세포 및 신경교세포에서 NCAM의 발현을 수반한다고 알려져 있다.<sup>10,11)</sup>

KA의 신경독성기전은 glutamate성 연접의 연접전부에서 glutamate를 과다방출시키며, 또한 연접후부의 kainate 수용체를 직접적으로 자극함으로써 연접후신경세포의 지속적인 탈분극에 의한 세포체의 변성 및 괴사를 유발한다.<sup>12)</sup> 한편 adenosine은 신경계에서 매우 광범위하게 분포된 신경전달물질로서 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 및 A<sub>3</sub> 수용체의 매개로 효과를 나타내며<sup>13)</sup> 해마, 대뇌피질 및 소뇌피질의 신경세포에 고농

도로 분포하는 A<sub>1</sub> 수용체는<sup>14)</sup> glutamate, acetylcholine 등의 신경전달억제를 함으로서<sup>15)</sup> 자발적이거나 흥분성독성물질 혹은 외부 자극에 의한 전기적 흥분을 차단하는 기능을 지니고 있다.<sup>16-18)</sup>

이상과 같이 adenosine A<sub>1</sub> 수용체의 자극은 glutamate의 작용을 차단함으로써, 신경세포의 과도한 흥분을 차단하는 작용을 지닌다고 인식되고 있으나, 간질성 발작 혹은 흥분성 신경독성에 의한 해마의 변성에서 NCAM의 발현에 대한 adenosine의 효과는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구자는 KA를 사용한 측두엽간질모델에서 adenosine A<sub>1</sub> 수용체의 자극이 간질성 발작에 따른 NCAM 발현의 차단효과를 지니는지를 규명하기 위하여, KA에 의한 실험동물간질모델에서 안정적인 adenosine A<sub>1</sub> 수용체 효현제(agonist)인 RPIA를 전처치하여 변연계 신경세포의 형태학적 변화 및 NCAM의 면역반응변화를 연구하였다.

## 방 법

### 1. 실험동물 및 실험군

본 실험에 사용된 실험동물은 한양대학교 의과대학 무균동물실에서 사육된 체중 300~350 g의 Sprague-Dawley 계 SPF(specific pathogen free) 웅성 흰쥐를 사용하였으며, 실험기간중 식수와 사료(신촌사료 주식회사)는 무제한 공급하였다. 실험동물은 대조군, KA 단독투여군(KA 단독군; 변연계 발작모델) 및 RPIA 전처치군(RPIA-KA군)으로 분류하였으며 각각의 실험군에는 20마리의 흰쥐를 배당하였다.

### 2. KA를 이용한 측두엽간질모델 및 RPIA 전처치

KA 단독군(변연계 발작모델)은 KA 10 mg/kg을 주사용 증류수에 용해하여(10 mg/10 ml/kg) 복강내에 주사하고 자발적 경련유무를 확인하였다. RPIA-KA군의 흰쥐에는 KA 투여 10분전에 RPIA 100 µg/kg을 주사용 증류수 1 ml에 용해하여 복강내 투여로 전처치하였으며, 대조군의 실험동물에는 주사용 증류수만을 10 ml/kg의 용량으로 투여하였다. 모든 실험동물은 KA 및 RPIA 투여 후 임상증상을 관찰하였으며, 24시간 및 1주 경과시에 희생하였다.

### 3. 임상증상 관찰

모든 실험동물은 KA와 RPIA 투여 후 정상적으로 실험동물 사육장에서 사육하였으며, 투여직후 8시간동안은 매

시간 간격으로, 투여 1일 후부터 7일간, 1일 1회씩 임상증상을 관찰하였다. 임상증상관찰은 실험동물의 활동성의 변화, 자발적 경련유무 및 접촉자극에 대한 반응을 확인하였다. 또한 KA 단독투여 혹은 RPIA 전처치 및 KA 투여후 4시간 이내에 자발적 경련이 유발되지 않은 실험동물은 실험군에서 제외하였다.

#### 4. 조직형태학적 변화의 관찰

KA 투여 및 RPIA 전처치에 의한 변연계의 형태학적 변화를 확인하기 위하여 luxol fast blue-cresyl violet 이중염색을 시행하였다. 실험동물은 KA와 RPIA 투여 후 24시간 경과시에 pentobarbital 50 mg/kg을 복강내 주사하여 마취시킨 후 좌심실을 통하여 상행대동맥에 삽관술을 시행하고 생리식염수 50 ml와 neutral buffered formalin 300 ml를 혈관내에 주입하여 관류고정한 후 뇌를 적출하였으며, bregma에서 후방으로 4 mm 지점을 중심으로 전후 5 mm 두께로 관상절단(coronal section) 한 후 동일한 고정액에서 3~4일간 고정하고 수세, 탈수 및 포매과정을 거쳐 두께 8  $\mu$ m의 관상조직절편을 제작하고 luxol fast blue-cresyl violet 이중염색을 시행하였다. Luxol fast blue-cresyl violet 이중염색은 조직절편에서 paraffin을 제거한 후, 배양기내에서 36°C의 상태에서 0.1% luxol fast blue 수용액으로 10시간 동안 반응시키고, 0.01% lithium carbonate 용액으로 최적의 상태에 이를 때 까지 탈색시킨 후 cresyl violet 염색 및 탈수, 청명과정을 거쳐 permount로 봉입하였다.

조직형태학적 관찰은 해부학적으로 변연계 혹은 변연엽(limbic lobe)로 분류되는 구조물로서 해마형성(hippocampal formation), 편도핵(amygdala nucleus) 및 이상피질(piriform cortex)과 함께, 변연계와 밀접한 해부학적 연결을 지닌 배측외측시상핵(lateral dorsal thalamic nucleus)을 대상으로 하였으며, 광학현미경(Dioplan, Leica Co.)을 사용하여 해마형성에서 고유해마(hippocampus proper)의 CA1, CA2, CA3 영역의 추체세포(pyramidal cell), 치상회(dentate gyrus)의 과립세포(granule cell layer) 및 치상회문(hilum of dentate gyrus)의 추체세포의 변화를 관찰 하였고, 또한 이상피질의 피라미트세포 및 과립세포, 기저외측편도핵(basolateral amygdala nucleus) 및 배측외측시상핵의 신경세포를 관찰하였다. 신경세포의 형태학적 변화소견은 각각의 영역 혹은 신경핵에서 신경세포의 색소

용해(chromatolysis), 핵용축(pyknosis), 세포질위축(shrinkage of perikaryon)과 형태학적 변성 및 신경세포의 소실(neuronal loss) 유무를 관찰하였다.

#### 5. NCAM 면역조직반응 변화의 관찰

KA 투여 및 RPIA 전처치후 NCAM의 면역반응변화를 관찰하기 위한 면역염색을 시행하였다. 실험동물을 KA 투여후 24시간 및 1주 경과시에 pentobarbital 50 mg/kg을 복강투여하여 마취시킨 후 좌심실을 통하여 상행대동맥에 삽관술을 시행하고, 0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 50 ml 및 4% paraformaldehyde-0.5% glutaraldehyde(in PBS) 300 ml를 관류하여 고정시킨후 뇌를 적출 하였으며 bregma에서 후방으로 4 mm 지점을 중심으로 전후 5 mm두께로 관상절단하여 동일한 고정액에서 1 일간 후고정(postfixation)한 후 30% sucrose-PBS 용액에서 1일 이상 침적시켰고 냉동절편기를 이용하여 -14°C에서 두께 30  $\mu$ m의 관상조직절편을 제작하였으며 24 well tissue culture plate를 이용하여 PBS 내에서 자유부유법(free floating method)으로 면역조직화학염색을 시행하였다.

면역조직화학염색에 사용된 일차항체(primary antibody)는 배자형과 성체형의 NCAM에 모두 반응하는 rat anti-NCAM monoclonal antibody(Chemicon., Cat. No. : MAB310)으로서 0.2% triton X-100(Sigma), 3% bovine serum albumin(BSA, Sigma) 및 3% normal rabbit serum(Gibco)이 포함된 PBS에 1 : 500으로 희석하여 4°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 이후 PBS-0.2% triton X-100 용액 및 PBS-3% normal rabbit serum-triton X 100 용액으로 각각 10분간 수세하였으며 이차항체로서 biotinylated-rabbit anti rat(Vectorstain ABC kit, Vector, Cat. No. : PK-4004)를 PBS-3% NGS-0.2% triton X100 용액에 1 : 200으로 희석하여 30분간 반응시켰고, PBS-0.2% triton X-100 용액 및 PBS-3% NGS-triton X-100 용액으로 각각 10분간 수세하였으며, avidin biotin peroxidase complex(Vectastain ABC kit, Vector, Cat. No. : PK-4004)를 PBS-0.2% triton X-100 용액에 1 : 100으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후, PBS-0.2% triton X-100 용액으로 10분간 3회 수세하였으며, 발색을 위한 기질로 0.05% 3,3-diamino-benzidine tetrahydrochloride(DAB, Sigma Co.)이 포함된 PBS에 100  $\mu$ l의

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 5분 동안 반응시켰다. 발색이 완료된 조직절편은 gelatin으로 coating된 slide glass에 옮긴 후, 12시간 이상 자연 건조시키고 탈수 및 청명과정을 거친 다음 permount로 봉입하였다.

NCAM 면역조직염색이 완료된 표본은 광학현미경(Diaplan, Leica)을 사용하여 해마의 치상회(dentate gyrus), CA1, CA2, CA3 영역, 기저외측편도핵, 이상피질 및 배측외측시상핵에서 각각의 층 혹은 신경세포 및 주위 기질의 NCAM 면역반응변화를 관찰하였으며, 각각의 해당영역에서 신경세포, 신경교세포 혹은 혈관주위조직의 면역반응의 강도를 측정하였다. 면역반응의 강도는 스캐너(3-CCD, Sony, Co) 및 컴퓨터를 사용하여 광학현미경상의 영상을 포착한 후 영상분석프로그램(Analysis Pro. 2.1, SIS Co, Germany)를 사용하여 green color로 색분해(color separation)하여 gray scale로 전환하고 각각의 해당지역에서 6군데 이상 pixel의 gray value를 측정하였다. 각 지역의 gray value의 평균에 따라 음성반응(- : gray value 256~200), 미약한 양성반응(± : gray value 199~150), 약한 양성반응(+ : gray value 149~120), 중등도 양성반응(++ : gray value 119~80) 및 강한 양성반응(+++ : gray value 80~0)의 5단계로 분류하였으며, 대조군, KA 단독투여군 및 RPIA 전처치후 KA 투여군에서 NCAM 면역반응의 차이점을 각각 비교하였다.

## 결 과

### 1. KA 및 RPIA 투여후의 임상증상관찰 소견

#### 1) KA 단독군

KA 단독군은 해당실험군의 20마리 흰쥐 중 16마리는 KA 투여 후 1시간 이내에 전신성 강직성 발작(generalized tonic clonic seizure)을 유발하였으며 이는 5~10분간 지속되었다. KA 단독군에서 4마리는 경련을 유발하지 않았으므로 실험군에서 배제하였다. 경련이 유발된 흰쥐 중 3마리는 KA 투여후 3~12시간 이내에 사망하였다. 경련이 유발되고 생존한 흰쥐는 8시간 경과시 까지 간헐적인 경련이 지속되었으며 24시간 경과시에는 대조군의 흰쥐에 비하여 활동성(activity)이 감소되어 있었고, 피검자의 접촉에 대하여 민감한 반응을 보였으며 간헐적인 경련을 유발하였으나, 경련의 지속시간은 투여당일에 비하여 단축되었다.

이러한 소견은 KA 투여후 1주 경과시까지 지속되었으며, 경련의 빈도는 1일 경과시에 비하여 감소되었다.

#### 2) RPIA-KA군

RPIA-KA군의 실험동물은 RPIA 투여 5~10분 경과시부터 활동성이 현저하게 감소되었으며 해당실험군의 20마리 흰쥐 중 13마리가 KA 투여후 1~2시간 이내에 경련을 유발하였으나, 이는 KA 단독군에 비하여 지속시간이 단축되었다. 경련이 유발된 흰쥐 중 3마리는 구강으로 혈성분비물을 배출하며 경련시작후 20분 이내에 사망하였다. 경련이 유발되고 생존한 흰쥐들은 투여후 24시간 경과시부터는 활동성이 다소 감소되어 있었으나 비교적 정상적인 행동을 나타내었으며 1주 경과시까지 경련유발이 관찰되지 않았다.

### 2. Lxol fast blue-cresyl violet염색소견

KA단독군 흰쥐 해마의 CA1, CA3 영역에서는 신경세포의 괴사가 관찰되었다. CA3 및 CA1 영역에서는 다수의 피라밋세포가 소실되었고 핵응축(pyknosis) 및 세포질위축이 관찰되었으며 치상회(dentate gyrus)의 과립세포 및 CA2 영역의 추체세포에서는 세포질위축 및 핵응축이 관찰

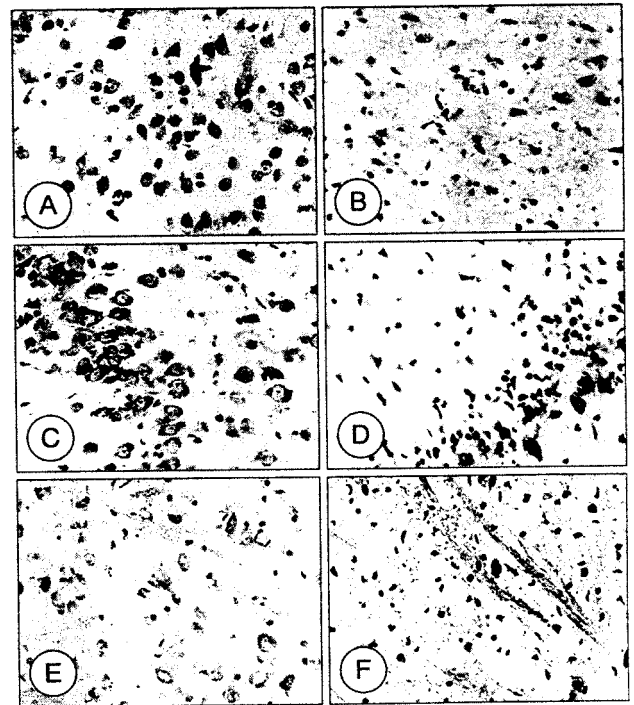


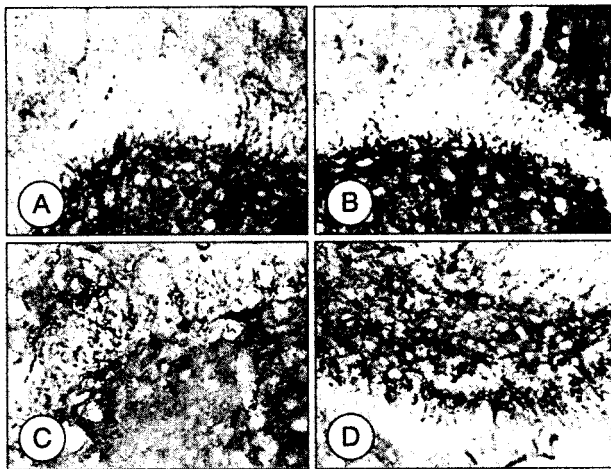
Fig. 1. Neuronal loss induced by KA treatment in limbic system. A : basolateral amygdala nucleus in the control rat, B : basolateral amygdala nucleus in the KA-treated rat, C : piriform cortex in control rat, D : piriform cortex in KA-treated rat. E : lateral dorsal thalamic nucleus in the control rat, F : lateral dorsal thalamic nucleus in the KA-treated rat. Luxol fast blue-cresyl violet stain, X200.

**Table 1.** Alteration of NCAM immunoreactivity of limbic regions in rat brain of control group, KA treatment (10 mg/kg i.p.) only group (KA), and RPIA pretreatment (100 µg/kg, i.p.) before KA administration (RPIA+KA) group

Group	Region	DG		CA1	CA2	CA3	Amyg.	Pyri.	Thal.
		Gr.	Hilus						
Control		+	+	-	-	-	-	±	±
KA	24 h	++	+++*	+++*	+	++*	++*	+++*	+
	1 week	+, ++	++	+, ++	±	±	++	++	++
RPIA+KA	24 hr	++	+	±	±	±	+	+	±
	1 week	+, ++	+	±	-	-	+	+	±

Notes : DG : Dentate gyrus, Gr. : granular layer, Amyg. : basolateral amygdala nucleus, Ento. : piriform cortex, Thal. : lateral dorsal thalamic nucleus, - : negative reaction, ± : trace reaction, + : weak positive reaction, ++ : moderate positive reaction, +++ : strong positive reaction

\*back ground reaction

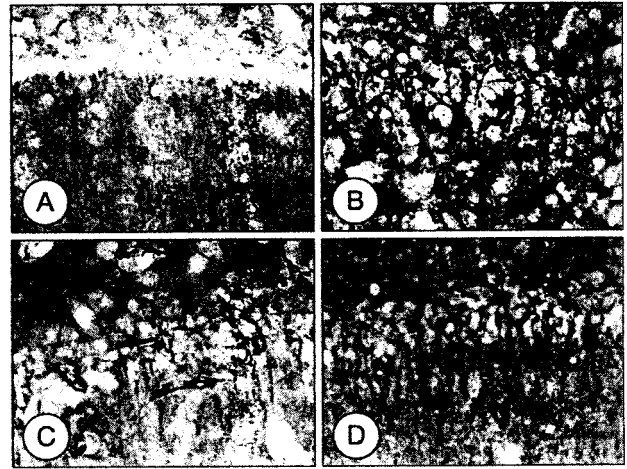


**Fig. 2.** NCAM immunoreactivity (IR) in dentate gyrus of hippocampus. A : control rat, B : KA-treated rat, 24 hours after injection, C : RPIA-KA treated rat, 24 hours after injection, D : KA-treated rat, 1 week after injection. NCAM IR in dentate gyrus is increased at 24 hours after injection. NCAM IR in molecular and polymorphic layers of dentate gyrus is decreased, but NCAM-immunoreactive neurons or glial cells are increased in granule cell layer at 24 hours after RPIA-KA treatment, and in 1 week after KA treatment. PAP method, ×200.

되었으나 신경세포소실은 관찰되지 않았다. 또한 이상피질 (piriform cortex)의 추체세포와 기저외측편도핵(basolateral amygdala nucleus), 배측외측시상핵(lateral dorsal thalamic nucleus)에서도 신경세포의 소실 및 핵응축이 관찰되었다(Fig. 1).

RPIA-KA군 흰쥐 해마의 치상회 및 CA1-CA3 영역에서는 과립세포 및 추체세포의 위축과 핵응축이 관찰되었으나 CA3, CA1 영역에서도 세포의 피사소견이 관찰되지 않았다.

또한, 이상피질과 기저외측편도핵 및 배측외측시상핵에서도 신경세포의 위축 및 핵응축이 관찰되었으나 신경세포의 소실은 관찰되지 않았다.



**Fig. 3.** NCAM-IR in CA1 area of the hippocampus. A : control rat ; B : KA-treated rat, 24 hours after injection, C : RPIA-pretreated rat, 24 hours after injection, D : KA-treated rat, 1 week after injection. Strong NCAM IR is observed in interneurons and glial-like cells at 24 hours after KA injection NCAM-immunoreactive neuronal processes are observed at 1 week after KA injection. Those changes were significantly reduced in RPIA-KA group. PAP method, ×200

### 3. NCAM 면역염색소견

#### 1) 대조군

대조군 흰쥐에서 NCAM의 면역반응은 해마의 CA1-CA3 영역에서는 미약한 양성반응(±) 혹은 음성반응(-)을 나타내었으나 치상회문(hilum of dentate gyrus)에서는 약한 양성반응(+)을 나타내었고 치상회문에 인접한 일부 과립세포의 세포막에서는 약한 혹은 중등도의 양성반응(+~++)을 나타내었다. 기저외측편도핵, 이상피질의 신경세포에서는 모두 음성반응(-)을 나타내었으며 배측외측시상핵에서는 소수 신경세포의 세포막에서 약한 양성반응(+)을 나타내었다(Figs. 2A, 3A and 4A, C, E, Table 1).

#### 2) KA 단독군

KA 단독투여후 24시간 경과군의 해마에서 NCAM의 면

역반응은 대조군에 비하여 현저히 증가된 소견을 나타내었다. 치상회의 분자층(molecular layer)에서는 약한 양성반응(+), 치상회문에서는 중등도의 양성반응(++), 치상회문에 인접한 과립세포층에서는 강한 양성반응(+++)을 각각 나타내었다(Fig. 2B, Table 1). 또한 CA1 영역에서는 분자층, 추체세포층 및 다형층에서 모두 강한 양성반응(+++)을 나타내었으며 특히 추체세포층에서 중간신경세포(interneuron) 혹은 신경교세포로 예상되는 작은 세포의 세포막과 돌기에서 강한 양성반응을 나타내었고 일부세포는 세포질에서도 면역반응이 관찰되었다(Fig. 3B, Table 1). CA3 영역에서는 전체적으로 CA1 영역과 유사한 소견을 나타내었으나 추체세포층에서 점상의 강한 면역반응이 관찰되었다. 또한 CA2 영역의 면역반응은 대조군에 비하여 증가되었으나 CA1 및 CA3 영역에 비하여 낮은 면역반응을 나타내었다. 이상피질 및 기저외측 편도핵에서는 중등도의 양성반응(++)을 나타내는 신경세포가 관찰되었으며 일부 세포에서는 세포질내에서도 면역반응이 관찰되었다. 또한 배측외측시상핵에서는 세포막 및 세포돌기에서 강한 양성반응(+++)을 나타내는 신경세포가 관찰되었다(Fig. 4, Table 1).

KA 단독투여후 1주 경과군에서 NCAM의 면역반응은 치상회의 다형층에서는 약한 양성반응(+)을 나타내었고 다형층에 인접한 과립세포층에서는 세포막과 세포돌기에서 중등도의 양성반응을 나타내는 신경세포가 관찰되었다(Fig. 2D, Table 1). CA1 영역에서는 면역반응이 1일 경과군에 비하여 감소되어 미약한 양성반응(±)을 나타내었으나 세포막 및 수상돌기에서 약한 혹은 중등도 양성반응(+~++)을 나타내는 추체세포가 관찰 되었으며 크기가 작은 중간신경세포에서도 유사한 형태의 면역반응이 관찰되었다(Fig. 3D, Table 1).

3) RPIA 전처리 및 KA 투여군

RPIA-KA투여후 24 시간 경과군의 해마에서 NCAM의 면역반응은 KA 단독투여군에 비하여 현저하게 감소된 소견을 나타내었다. 치상회의 다형층은 심층에서는 약한 양성반응(+)을 나타내었으나 과립세포층과 인접한 부위에서는 부분적으로 중등도 혹은 강한 양성반응(++~+++)을 나타내었으며 과립세포층에서는 세포막과 돌기에서 약한 양성반응(+)을 나타내는 세포들이 관찰되었고(Fig. 2C, Table 1). CA1 - CA3 영역에서는 대조군과 유사한 미약한

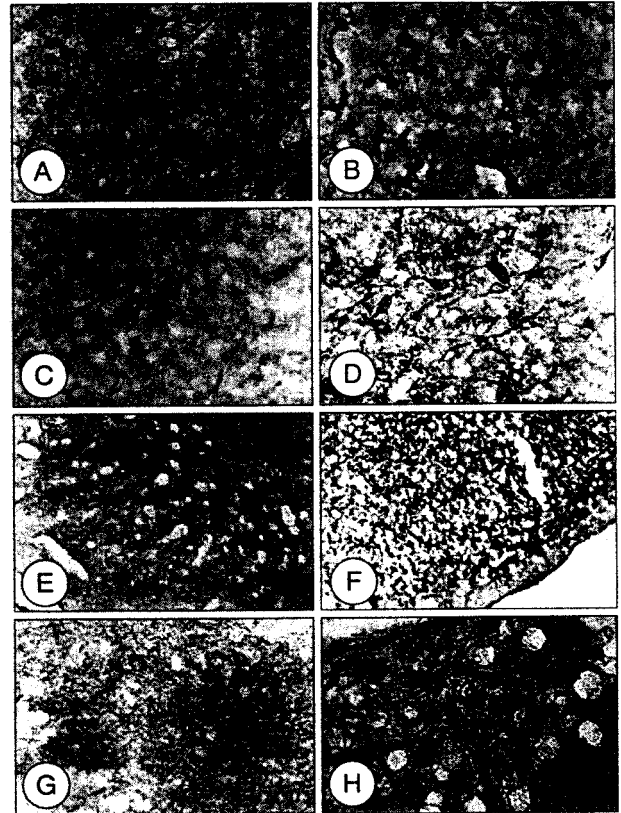


Fig. 4. NCAM-IR in limbic system. A : basolateral amygdala nucleus in control rat, B : basolateral amygdala nucleus of KA-treated rat, 24 hours after injection, C : lateral dorsal thalamic nucleus of control rat, D : lateral dorsal thalamic nucleus of KA-treated rat, 1 week after injection, E : piriform cortex of control rat, F : piriform cortex of KA-treated rat, 24 hours after injection, G : basolateral amygdala nucleus of RPIA-Ka group. 24 hours after injection, H : basolateral amygdala nucleus of KA-treated rat, 1 week after injection. NCAM-IR neuronal perikaryons and processes in amygdalar nucleus (B), and immunoreactive small neurons or glial cells in the piriform cortex (F) are increased. Neurons with NCAM-IR cell membrane and processes at lateral dorsal thalamic nucleus (D), and immunoreactive neuronal processes around the blood vessel at the amygdala (H) are increased. NCAM immunoreactive neurons in basolateral amygdala nucleus (G) are decreased by RPIA pretreatment. PAP method, A, B, C, D, G and H : X200, E and F : X63.

양성반응(±)을 나타내었다(Fig. 3C, Table 1). 기저외측 편도핵 및 배측외측시상핵과 이상피질에서는 혈관벽을 제외한 모든 지역에서 약한 양성반응(+) 혹은 미약한 양성반응(±)이 관찰되었다(Fig. 4, Table 1).

RPIA-KA 투여후 1주 경과군에서 NCAM의 면역반응은 24시간 경과군과 유사한 소견을 나타내었다. 치상회에서 과립세포층의 심층(deep layer) 및 치상회문에서는 중등도의 양성반응(++)이 신경세포의 세포막 및 돌기에서 관찰되었으나 CA1 - CA3 영역의 분자층, 피라미트세포층 및 다형층에서 음성반응(-) 혹은 미약한 양성반응(±)을 나타내었고, 편도핵 및 시상핵에서도 혈관주위의 신경세포 및 신

경교세포의 돌기를 제외한 모든 영역에서 약한 혹은 미약한 양성반응(+~±)이 관찰되었다(Table 1).

## 고 찰

KA는 강력한 흥분성 신경독성물질로서 신경과학분야에서는 실험동물을 이용한 간질모델 및 특정 신경핵의 파괴를 통한 뇌기능 연구에 널리 이용되고 있다. 본 연구에서는 이러한 간질모델을 사용하여 adenosine A<sub>1</sub> 수용체 표현제인 RPIA가 KA에 의한 신경세포의 손상, 및 신경분화와 관련된 인자인 NCAM의 변화에 미치는 영향을 관찰하였다.

KA의 투여 후 해마의 CA1, CA3 영역, 이상피질 및 편도핵등에서는 심한 세포손상이 유발되었으며, 이러한 부분들은 glutamate의 수용체가 많이 분포하는 지역이라는 공통점을 지니고 있다. Glutamate의 수용체는 NMDA수용체, 비 NMDA수용체 및 metabotropic glutamate 수용체의 3종류로 대별되며 이중 비 NMDA 수용체는 AMPA 수용체 및 kainate 수용체로 세분된다.<sup>19)</sup> 뇌에서 NMDA 수용체는 해마의 CA1 영역에 많이 분포하며, kainate 수용체는 CA3 영역의 투명층(stratum lucidum), 대뇌피질의 심층(deep layer), 선조체(corpus striatum), 시상망상핵(reticular nucleus of thalamus), 편도핵 및 소뇌의 과립세포층에 고밀도로 분포한다고 알려져 있다.<sup>20,21)</sup> 또한 KA의 흥분성 신경독성에서 중요한 기전인 glutamate의 유리증가는 간질 경련뿐 아니라 뇌의 허혈손상<sup>22,23)</sup> 및 외상성 뇌손상<sup>24)</sup>에서도 중요한 독성기전으로 인정되고 있다.

본 연구에서 RPIA의 전처치는 KA에 의한 형태학적 손상을 억제하였다. 뇌허혈, 간질 및 신경독성물질에 의한 뇌손상의 억제와 관련하여 뇌내의 억제성 신경전달물질을 이용한 흥분성 독성물질의 차단은 유용한 수단으로 고려되고 있으며, 본 연구에서는 adenosine A<sub>1</sub> 수용체 표현제인 RPIA를 사용하여 KA에 의한 손상의 차단 효과를 관찰하였다. 포유류의 뇌에 광범위하게 분포된 adenosine은 억제성 신경전달물질 및 신경조절물질(neuromodulator)로서<sup>25)</sup> 뇌 흥분의 조절에 관여하므로 흥분성 신경독성의 차단에도 효과를 지닐 것으로 예상되고 있다. 중추 및 말초신경계통에서 adenosine의 수용체는 기본적으로 adenosine과 결합 후 adenylylase를 억제함에 따라 cAMP의 감소를 유발시키는 A<sub>1</sub> 수용체와 adenylylase를 자극하는 A<sub>2</sub> 수용체로 구분되며<sup>26)</sup> adenosine에 의한 억제작용은 주

로 A<sub>1</sub> 수용체에 의하여 매개된다고 알려져 있다.<sup>27)</sup> Adenosine A<sub>1</sub> 수용체는 흰쥐의 뇌에서 해마, 대뇌피질 및 소뇌에 많이 분포하며,<sup>14)</sup> 해마에서 adenosine A<sub>1</sub> 수용체는 CA3 영역에서는 연접전부인 피라밋세포의 축삭말단에, CA1 영역에서는 연접후부인 피라밋세포의 수상돌기에 존재한다.<sup>28)</sup> Arvin등<sup>17)</sup>은 adenosine A<sub>1</sub> 수용체 표현제인 2-chloroadenosine이 KA에 의한 선조체 신경세포의 손상을 억제할 수 있다고 하였으며, Barrie 및 Nicholls<sup>29)</sup>은 내재성 adenosine이 A<sub>1</sub> 수용체 및 protein kinase C의 매개를 통하여 4-aminopyridine에 의하여 유발된 glutamate의 유리를 억제한다고 주장하였다. 본 연구에 사용된 RPIA는 adenosine A<sub>1</sub> 수용체 표현제로서, Fastbom 및 Fredholm<sup>30)</sup>은 RPIA의 이성체인 L-phenylisopropyladenosine이 해마 절편에서 glutamate의 유리를 감소시킨다고 하였으며, MacGregor 및 Stone<sup>18)</sup>과 MacGregor등<sup>31)</sup>은 KA에 의한 신경교증이 RPIA에 의하여 억제되며 이는 주로 중추신경계의 adenosine A<sub>1</sub> 수용체에 의하여 매개된다고 주장한 바 있다. 본 연구에서는 RPIA를 전처치한 결과 해마, 기저의 측편도핵, 이상피질, 배측외측시상핵등에서 신경세포의 핵 응축 및 세포위축 소견이 관찰되었으나 명확한 추체세포의 소실은 나타나지 않았으므로 kainic acid에 의한 신경세포의 손상이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

세포와 세포간의 선택적인 접착은 신경조직을 비롯한 다세포구조의 형성에 있어 가장 필수적인 과정이며 원형질막의 화학적 성상은 이러한 세포간의 적절한 응집 및 접착에 있어 중요한 요인으로 작용한다. 신경조직에서 세포간의 접착을 매개하는 세포접착분자(cell adhesion molecule, CAM)는 다양한 조직에 분포하며 신경계의 발생과정 중 많은 지역에서, 모든 시기에 발견되는 일반세포부착분자(general CAM)과 한정적인 시기에 제한적인 지역에서 발견되는 한정세포접착분자(restricted CAM)으로 구분된다. 일반세포부착분자에는 Ca<sup>++</sup>의존적으로 세포접착을 매개하여 접착결합(adherence junction)의 형성에 관여하는 N-cadherin과 calcium 비의존적인 NCAM의 두 가지 종류가 알려져 있으며 대표적인 한정세포접착분자에는 축삭에 분포하여 신경섬유속(fascicle)의 형성에 기여하는 축삭관련세포접착분자(axon-associated CAM(Ax-CAM))과, 세포간 접착의 작용기전에서 당구조(complex saccharide structure)의 인식과정을 요하는 당세포접착분자[saccharide-CAM(Sac-CAM)]이 알려져 있다.<sup>32)</sup> NCAM은 최초로 알

려진 신경세포접착분자로서 이의 존재와 기능은 1976년에 처음으로 알려졌고<sup>33)</sup> 이후에 화학적 성상이 규명되었고 homophilic ligand로 정의되었다.<sup>34)</sup> 당단백(glycoprotein)의 일종인 NCAM은 구성 단백질 및 탄수화물의 구조에 많은 다양성을 지닌 single chain polypeptide로 이루어져 있다. NCAM의 화학적 구성에서 중요한 특징은 다량의 sialic acid를 함유하는 것으로 이러한 sialic acid의 함량에 따라 분자량의 30% 정도가 sialic acid로 구성된 H-type과 10% 이하인 L-type으로 구분되며 성체의 신경계에 존재하는 NCAM은 대부분이 L-type으로 이루어진다. 많은 양의 sialic acid를 함유한 H-type은 신경계의 발생과정에서 주로 발현되므로 통상적으로 polysialylated NCAM(PSA-NCAM) 혹은 태자형 NCAM으로 명명된다. 신경계의 발생과정에서 NCAM의 역할은 첫째로 radial glia의 end feet와 관련된 축삭의 인도 및 성장, 둘째로 운동신경세포의 축삭에 의한 골격근의 지배과정, 셋째로 발생초기의 세포간의 junctional communication의 형성, 넷째로 NCAM-H 및 NCAM-L의 조절을 통하여 발생과정에서 필수적인 세포간 접촉 및 세포이동의 조절 등에 직접적으로 관여한다.<sup>7,35)</sup> 이러한 신경계의 발생과정에서 NCAM은 지역에 따라 접착성이 약한 H-type 및 접착성이 강한 L-type이 모두 발현되거나 개체의 성숙이후에는 대부분의 지역에서 L-type이 발현되며 이러한 H-type에서 L-type으로의 NCAM의 전환은 신경조직의 성숙에 따른 연결형성 및 신경돌기성장의 안정화를 반영한다고 할 수 있다. 또한 성체에서 NCAM은 연결의 가소성(plasticity)과 안정화 두 가지를 모두 조절하는 기능을 지니고 있으며 NCAM이 연결을 가변화 시키는 기전은 접착력의 변화보다는 일반적인 신호전달계의 작용을 지니는 것으로 알려져 있다.<sup>35)</sup>

이와 같이 NCAM은 발생과정의 뇌에서 광범위한 지역에서 발현되거나 성체의 경우 극히 제한된 지역에서만 발현되며 성체에서 NCAM의 발현은 해당지역의 신경세포의 지속적인 분열, 연결의 가소성 및 세포손상과 연관된다고 할 수 있다. 대부분의 동물에서 출생 후에는 신경세포의 분열이 일어나지 않으나 흰쥐, mouse, 토끼, 고양이 및 guinea pig 등은 생후에도 치상회의 과립세포는 계속 분열되며, 특히 흰쥐의 치상회는 생후 11개월까지 지속적인 세포분열이 일어난다고 알려져 있다.<sup>36)</sup> Aaron 등<sup>37)</sup>은 흰쥐 성체에서 치상회분열에 인접한 과립세포는 PSA-NCAM의 면역반응을 나타내며, 노화됨에 따라 세포분열이 감소되고 NCAM의 면

역반응도 현저히 감소한다고 하였다. 또한, 흰쥐의 뇌에서 PSA-NCAM의 면역반응은 흑질(substantia nigra) 및 선조체에서는 각각 생후 2개월 및 생후 25일 정도까지 나타난다고 알려져 있다.<sup>38)</sup> 성체 흰쥐의 뇌에서 NCAM의 면역반응은 시상하부 및 시상의 일부핵, 척수의 후각의 표층, 치상회의 배측부위, 외측슬상체(lateral geniculate body), 고삐핵(habenular nucleus), parabrachial nucleus, bed nucleus of stria terminalis, 중뇌의 중심회색질(mesencephalic central gray) 및 후구(olfactory bulb)에서는 세포사이에서 점상의 면역반응(punctuate immuno-labelling)이 관찰되며 이상피질, 치상회의 배측부위(dorsal portion) 및 척수의 lamina X에서는 신경세포의 세포체 및 돌기에서 면역반응이 관찰되고, 측뇌실(lateral ventricle) 및 중심관의 뇌실막세포층(ependymal layer) 및 척수의 백질에서는 신경교세포에서 관찰된다.<sup>6)</sup> 본 실험에서 대조군의 흰쥐는 치상회 및 시상의 일부 핵에서 세포막 주위 및 돌기에서 면역반응이 관찰되었으며 시상하부에서는 매우 강한 면역반응이 세포사이에서 관찰되었고 이상피질등에서는 신경세포로 추측되는 세포의 세포질에서 미약한 양성반응이 관찰되었다.

신경계의 손상과 NCAM의 발현에 관련된 연구에서 Junker 등<sup>39)</sup>은 일시적 전뇌허혈(transient global ischemia) 후 신경세포의 손상이 유발되는 CA1 영역에서 NCAM의 mRNA 발현이 2~4일간 일시적으로 증가하며 NCAM 180-specific probe는 해마의 신경세포에서, NCAM 120/140 mRNA는 신경교세포에서 발현이 증가된다고 하였다. 또한 장내피질(entorhinal cortex)의 손상에 의하여 치상회의 입력이 차단된 경우<sup>40)</sup> 및 KA에 의한 반응성 성상교세포에서도 NCAM의 면역반응이 증가되는 것으로 알려져 있다.<sup>41)</sup> 본 연구에서 KA의 전신적 투여는 24 시간경과시에 해마의 각 영역, 기저외측편도핵, 이상피질 등 형태학적 손상이 유발된 지역에서 현저한 NCAM 면역반응의 증가를 유발하였으며 특히 형태학적 손상이 심한 해마의 CA1 및 CA3 영역 및 치상회분, 이상피질등에서는 세포사이의 주변 기질(back ground)에서도 강한 면역반응이 관찰되었다. 치상회의 과립세포층, 배측외측시상핵에서의 면역반응은 신경세포의 세포막 및 돌기에서 증가되었으나 해마의 CA1, CA3 영역, 이상피질에서는 피라밋세포의 배측에 위치한 중간신경세포(interneuron) 혹은 신경교세포로 추측되는 세포의 세포막 및 돌기에서 면역반응이 현저하게 증가되었고



일부 세포의 세포질에서도 면역반응이 관찰되었다. 그러나 KA 투여 후 1주 경과시에는 모든 지역에서 면역반응이 24시간경과시에 비하여 현저히 감소하였으며 24시간경과시에 관찰된 주변기질의 면역반응은 거의 나타나지 않았고 치상회의 과립세포층, 치상회문(hilum of dentate gyrus) 및 CA1 영역에서는 세포막 및 돌기에서 면역반응을 지닌 과립세포, 피라밋세포 및 신경교세포가 대조군에 비하여 현저히 증가되었다. 배측외측시상핵에서는 신경세포의 세포막 및 돌기에서 강한 면역반응이 관찰되었고 기저외측편도핵 및 이상피질에서는 혈관주위의 신경세포 및 신경교세포에서 면역반응이 나타났으나 24시간경과군에 비하여 현저히 감소된 소견을 나타내었다. 따라서 KA에 의한 NCAM 면역반응의 증가는 급성적인 경련에 의한 변화인 것으로 추측할 수 있었다. 또한 RPIA 전처치후 KA 투여군의 해마에서 NCAM의 면역반응은 KA 단독투여군에 비하여 현저히 감소되었으며 치상회 과립세포층의 심층부의 과립세포 및 이상피질과 편도핵에서는 소수의 신경세포를 제외한 대부분의 지역에서는 NCAM의 면역반응이 관찰되지 않았다.

임상적인 TLE와 NCAM의 관련성에 대하여 Mikkonen<sup>40)</sup>은 TLE 환자의 치상회의 내과립층(inner molecular layer), 외과립층(outer molecular layer), CA1 영역 및 이상피질의 II 층에서 PSA-NCAM의 면역반응이 증가하였으며, 면역반응의 증가는 간질발작기간, 해마의 신경세포소실 및 이끼섬유발아(mossy fiber sprouting)의 정도에 비례한다고 보고한 바 있다. 본 연구과 같은 KA유발 발작모델에서 NCAM의 면역반응변화는 초기의 급성적인 흥분독성과 발작에 의한 2차적인 손상에 기인할 수 있으며, 따라서 각각의 손상에 의한 변화를 명확히 구분하기 어렵다는 문제점을 지니고 있다. 본 연구에서 24시간 경과시에는 NCAM 면역반응이 해마를 포함한 변연계 전체에서 증가하였으며 여기에는 흥분독성으로 인하여 임상적인 TLE와는 양상이 다른 비특이적 반응이 포함되는 것으로 생각되고, 7일 경과시의 변화는 흥분독성과 발작에 의한 복합적인 손상의 2차적인 반응인 것으로 판단된다. 본 연구에 사용된 NCAM의 항체는 Chemicon사에 자문결과, 성체형과 태자형의 NCAM에 모두 반응성을 지닌 항체인 것으로 확인되었으나, 대조군에서는 치상회 및 시상하부등의 제한된 지역에서만 면역반응을 나타내는 점을 감안할 때 KA 투여 후 면역반응의 증가는 대부분이 PSA-NCAM의 발현에 의한 것으로 예상된다. 본 실험에서 KA 투여후 24시간 경과시의

NCAM 면역반응은 해마, 편도핵 및 이상피질의 경우 주변기질에서 현저히 증가되었고 해마에서는 추체세포나 과립세포보다는 크기가 작은 중간신경세포나 신경교세포에서 주로 증가됨을 알 수 있었다. 또한 NCAM 면역반응의 지역적인 증가가 성상교세포의 변화와 부합되는 것으로 미루어 보아 손상초기의 NCAM의 발현은 흥분독성에 의해 손상된 추체세포 보다는 손상에 민감하지 않은 중간신경세포와 반응성 성상교세포등을 유발하는 신경교세포에서 주로 유발되므로, 면역반응이 주변기질에서 관찰되는 것으로 생각되며, RPIA의 전처치에 의하여 추체세포의 과사가 억제되므로 중간세포 및 신경교세포의 면역반응도 증가되지 않은 것으로 판단된다. 또한 대조군의 경우에 NCAM의 면역반응이 주로 신경세포의 세포막 및 돌기에서 관찰되었으나 KA 단독투여후 24 시간경과군에서는 세포질내부에서도 현저하게 증가된 것은 연결형성보다는 손상 초기에 세포내 NCAM 합성의 급격한 증가에 기인한 것으로 생각된다. 한편, KA 투여후 1주 경과시에 NCAM의 면역반응은 손상초기와는 달리 주변기질의 반응은 대조군과 유사한 소견을 나타낸 반면 해마의 추체세포등에서 세포막과 돌기에서 현저한 증가를 나타냄을 알 수 있었고 이는 손상에 따른 2차적인 신경섬유의 성장 및 연결의 재형성과 관련되는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합할 때 KA에 의한 변연계의 손상에서 초기에는 흥분독성에 따라 심하게 손상되는 지역의 중간신경세포 및 신경교세포에서 NCAM이 발현되고, 시간이 경과되면 피라밋세포와 같은 주요한 신경세포 및 성상교세포에서 발현되며 이러한 변화는 흥분독성 및 발작에 의한 2차적인 손상 및 축삭발아과정과 관련되는 것으로 판단된다. 또한 RPIA의 전처치는 KA에 의한 신경세포의 초기손상과 발작을 억제함으로써 신경돌기의 재형성과정에 의한 NCAM의 반응증가 또한 억제하는 것으로 생각된다.

## 결 론

본 연구에서는 KA를 사용한 흰쥐의 측두엽간질모델에서 adenosine A<sub>1</sub> 수용체의 자극이 흥분성 신경독성에 따른 신경세포접착분자(NCAM)의 발현을 차단하는 효과를 지니는지를 규명하기 위하여, 실험동물 흰쥐를 대조군, KA(10 mg/kg, i.p.) 단독처치군 및 RPIA(100 µg/kg, i.p.) 전처치후 KA 투여군으로 분류하여, 각각 RPIA 전처치 및

KA 투여를 시행한 후, 해마, 이상피질, 편도핵 및 배측외측 시상핵에서 luxol fast blue-cresyl violet 염색 및 NCAM 면역조직화학법을 사용하여 조직형태학적 변화 및 NCAM 면역반응의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) KA 단독투여군에서는 해마의 CA1, CA3 영역, 이상피질, 배측외측시상핵 및 기저외측편도핵에서 신경세포의 피사가 유발되었으며, RPIA 전처치군에서는 신경세포의 피사가 감소되었다.

2) KA 단독투여후 24시간 경과시에 치상회의 과립세포, CA1, CA3 영역, 이상피질, 배측외측시상핵 및 기저외측편도핵에서 중간신경세포(interneuron) 및 신경교세포의 세포질, 세포막 및 돌기에서 NCAM의 면역반응이 증가되었다.

3) KA 단독투여후 1주 경과시에는 치상회의 과립세포 및 CA1 영역의 피라미트세포의 세포막 및 돌기에서 NCAM의 면역반응이 증가되었으며 이상피질, 배측외측 시상핵 및 기

저외측편도핵에서는 신경세포의 세포막 혹은 신경세포 및 신경교세포의 돌기에서 NCAM의 면역반응이 증가되었으나 이는 24시간 경과시에 비하여 경미하였다.

4) RPIA 전처치군에서 NCAM의 면역반응은 치상회의 과립세포, 기저외측편도핵에서 신경세포 혹은 신경교세포의 돌기 및 세포막의 NCAM의 면역반응이 대조군에 비하여 증가되었으나 KA 단독투여군에 비하여 현저하게 감소되었다.

이상의 결과에 따라 KA-유발 간질원쥐모델에서 RPIA의 전처치에 의한 NCAM 면역반응의 감소는 KA의 흥분성 신경독성에 대한 RPIA의 신경보호효과를 반영하는 것으로 생각된다.

**중심 단어 :** Kainic acid · RPIA · NCAM.

- 논문접수일 : 1999년 3월 30일
- 심사완료일 : 1999년 7월 9일

**REFERENCES**

- 1) Shinozaki H, Konishi S. Action of several antihelminths and insecticides on rat cortical neuron. *Brain Res* 1970;24:368-71.
- 2) Bradford HF, Glutamate, GABA and Epilepsy. *Prog Neurobiol* 1995;47:477-511.
- 3) McCandless DW, Finesmith RB. Chemically induced models of seizures. In: Bouton AA, Baker GB, Butterworth RF ed. *Neuromethod, Vol 22, Animal models of neurological disease*, Humana Press, 1992:144.
- 4) Thiery JP, Brackenbury R, Rutishauser U, et al. Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. *J Biol Chem* 1977;100:442-56.
- 5) Silver J, Rutishauser U. Guidance of optic axons in vivo by a performed adhesive pathway on neuroepithelial endfeet. *Dev Biol* 1984;106:485-99.
- 6) Noble M, Albrechtsen M, Moller C, et al. Purified astrocytes express NCAM/D2-CAM-like molecules in vitro. *Nature* 1985;316:725-8.
- 7) Grumet M, Rutishauser U, Edelman GM. N-CAM mediates adhesion between embryonic nerve and muscle in vitro. *Nature* 1982;295:693-5.
- 8) Bonfanti L, Olive S, Poulain DA, et al. Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 1992;49:419-36.
- 9) Larner AJ. Axonal sprouting and synaptogenesis in temporal lobe epilepsy: possible pathogenetic and therapeutic roles of neurite growth inhibitory factors. *Seizure* 1995;4:249-58.
- 10) Woldbye DP, Bolwig TG, Kragh J, et al. Synaptic regeneration and remodelling after fast kindling of the olfactory bulb. *Neurochem Res* 1996;21:585-93.
- 11) Mikkonen M, Soininen H, Kalvianen R, et al. Remodeling of neuronal circuitries in human temporal lobe epilepsy: increased expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the hippocampus and the entorhinal cortex. *Ann Neurol* 1998;44:923-34.
- 12) Ferkany JW, Zaczek R, Coyle JT. Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature* 1982;298:757-9.
- 13) Londos C, Cooper DMF, Wolff J. Subclass of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:2551-4.
- 14) Mahan LC, McVittie LD, Smykrdall EM, et al. Cloning and expression of an A<sub>1</sub> adenosine receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 1991;40:1-7.
- 15) Fredholm BB, Hedqvist P. Modulation of neurotransmission by purine nucleotides and nucleosides. *Biochem Pharmacol* 1980;29:1635-43.
- 16) Schubert R, Mitzdorf U. Analysis and quantitative evaluation of the depressive effect of adenosine on evoked potentials in hippocampal slices. *Brain Res* 1979;172:186-90.
- 17) Arvin B, Neville LF, Pan J, et al. 2-Chloroadenosine attenuated kainic acid-induced toxicity within the rat striatum: relationship to release of glutamate and Ca<sup>2+</sup> influx. *Br J Pharmacol* 1989;98:225-35.
- 18) MacGregor DG, Stone TW. Inhibition by the adenosine analogue, (R)-N<sup>6</sup>-phenylisopropyladenosine, of kainic acid neurotoxicity in rat hippocampus after systemic administration. *Br J Pharmacol* 1993;109:316-21.
- 19) Watkins JC, Krogsgaard-Larsen P, Honore T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11:25.
- 20) Monaghan DT, Cotman CW. Distribution of N-methyl-D-aspartate sensitive L-[<sup>3</sup>H] glutamate binding sites in cat brain. *J Neurosci* 1985;5:2909-19.
- 21) Monaghan DT, Cotman CW. Distribution of <sup>3</sup>H-kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res* 1982;252:91-100.
- 22) Choi DW, Rothman SM. The roll of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci* 1990;13:171-82.
- 23) Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, et al. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984;43:1369-74.
- 24) Bullock R, Fujisawa H. The role of glutamate antagonists for the treatment of CNS

- injury. *J Neurotrauma* 1992;9(Suppl 2):1-25.
- 25) Philis JW, Wu PH. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 1981;16:187-239.
- 26) Van Calker D, Muller M, Hamprecht B. Adenosine regulators, via two different types of receptors, the accumulation of cAMP in cultured cells. *J Neurochem* 1979;33:999-1005.
- 27) Alzheimer C, Kargl L, Bruggencate GT. Adenosinergic inhibition in hippocampus is mediated by adenosine A<sub>1</sub> receptors very similar to those of peripheral tissues. *Eur J Pharmacol* 1991;196:313-7.
- 28) Deckert J, Jorgensen MB. Evidence for pre- and postsynaptic localization of adenosine A<sub>1</sub> receptor in the CA1 region of rat hippocampus: A quantitative autoradiographic study. *Brain Res* 1988;446:161-4.
- 29) Barrie AP, Nicholls DG. Adenosine A<sub>1</sub> receptor inhibition of glutamate exocytosis and protein kinase C-mediated decoupling. *J Neurochem* 1993;60:1081-6.
- 30) Fastbom J, Fredholm BB. Inhibition of [<sup>3</sup>H] glutamate release from rat hippocampal slices by L-phenylisopropyladenosine. *Acta Physiol Scand* 1985;125:121-3.
- 31) MacGregor DG, Miller WJ, Stone TW. Mediation of the neuroprotective action of R-phenylisopropyladenosin through a centrally located adenosine A<sub>1</sub> receptor. *Br J Pharmacol* 1993;110:470-6.
- 32) Rutishauser U, Jessel TM. Cell adhesion molecule in vertebrate neuronal development. *Physiol Rev* 1988;68:819-57.
- 33) Rutishauser U, Thiery JP, Brackenbury R, et al. Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:577-81.
- 34) Hoffman S, Sorkin BC, White PC, et al. Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule (N-CAM) purified from embryonic brain membranes. *J Biol Chem* 1982;257:7720-9.
- 35) Balak K, Jacobson M, Sunshine J, et al. Neural cell adhesion molecule expression in Xenopus embryos. *Dev Biol* 1987;119:540-50.
- 36) Kaplan M, Bell DH. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 1984;4:345-58.
- 37) Aaron LI, Chesselet MF. Heterogeneous distribution of polysialylated neuronal-cell adhesion molecule during post-natal development and in the adult: An immunohistochemical study in the rat brain. *Neuroscience* 1989;28:701-10.
- 38) Szele FG, Alexander C, Chesselet MF. Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. *J Neurosci* 1995;15:4429-48.
- 39) Jucker M, Mondadori C, Mohajeri H, et al. Transient upregulation of NCAM mRNA in astrocytes in response to entorhinal cortex lesions and ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 1995;28:149-56.
- 40) Miller PD, Styren SD, Lagenaur CF, et al. Embryonic neuronal cell adhesion molecule (N-CAM) is elevated in the denervated rat dentate gyrus. *J Neurosci* 1994;14:4217-25.
- 41) Le Gal La Salle G, Rougon G, Valin A. The embryonic form of neural cell surface molecule (E-NCAM) in the rat hippocampus and its reexpression on glial cells following kainic acid-induced status epilepticus. *J Neurosci* 1992;12:872-82.
- 42) Mikkonen M, Soininen H, Kalvianen R, et al. Remodelling of neuronal circuitries in human temporal lobe epilepsy: increased expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the hippocampus and the entorhinal cortex. *Ann Neurol* 1998;44:923-34.