

모체 thyroxine 투여가 태아알코올효과를 가진 흰쥐 소뇌에서 BDNF 함유 조롱박세포의 생후 발달에 미치는 영향

정윤영, 강양수¹, 정상봉, 김영기², 김종중, 문정석,
박영란, 김 복, 박상수, 천관영, 류소연³, 배춘상²

조선대학교 의과대학 해부학교실, ¹메카성형외과,

²전남대학교 의과대학 해부학교실, ³조선대학교 의과대학 예방의학교실

간추림 : 임부의 알코올 남용은 태아 정신발육지연의 흔한 원인이다. 임부의 음주 양이 중간정도 수준이더라도 영양실조가 동반되면 행동과 학습장애 등을 나타내는 태아알코올효과를 야기시킬 수 있다. 특히 태아의 뇌 발생에 예민한 결정적 기간동안 지속적으로 음주하는 경우 태아알코올효과를 나타내기 쉽다. 본 실험에서는 임신 기간 중 지속적으로 알코올을 섭취하는 모체에 thyroxine을 투여하여 알코올의 유해한 영향으로 인한 태아알코올효과를 개선시킬 수 있는지를 알아보기 위하여 생후 연령에 따라 흰쥐 소뇌겉질에서 BDNF함유 신경세포의 발달과 성숙 양상을 관찰하였고 생후 14일의 소뇌겉질에 분포하는 BDNF함유 조롱박세포의 미세구조를 관찰하였다.

실험동물은 세 군으로 나누었는데 매일 35 칼로리 정도의 알코올을 섭취한 알코올 군, 알코올 대신 dextrin이 첨가된 유동액을 섭취한 정상 군, 그리고 알코올을 매일 섭취하고 thyroxine을 매일 5 µg/kg 이하 주사하여 알코올 + T₄ 군으로 하였다. 생후 0, 7, 14, 21, 28일에 희생시켜 면역조직화학염색을 시행하였으며 그 중 일부는 포매전 방법을 이용하여 면역전자현미경적 염색을 시행하였다. 본 연구 결과, 생후 14일부터 알코올 + T₄군과 정상 군이 유사한 성숙양상을 보였으나 알코올 군에서는 BDNF함유 조롱박세포들이 미성숙 양상을 나타냈으며 불완전한 단층 배열을 이루고 있었다. 생후 14일의 BDNF함유 조롱박세포의 미세구조를 세 군에서 비교한 결과, 알코올 군에서는 세포소기관의 형태가 뚜렷하지 않았으나 정상 군과 알코올 + T₄군에서는 과립세포질그물이 작은 단위로 관찰되었고 뚜렷한 골지장치들이 핵 주변에 분포해 있었으며 닛슬소체 형성도 뚜렷하게 나타나는 등 유사한 미세구조를 가지고 있었다.

이상의 결과에서 보이는 알코올 군과 알코올 + T₄군 사이의 생후 성숙 양상의 차이는 알코올에 노출된 모체에 투여하는 thyroxine이 그 후손의 소뇌겉질의 BDNF함유 조롱박세포의 생후 발달에 미치는 유해한 영향을 개선시킬 수 있음을 시사한다. 또한 모체 thyroxine 투여로 인해 그 후손의 생후 발달 초기에 BDNF와 같은 신경영양인자의 합성이 증가되어 임신 중 알코올 남용으로 인한 갑상샘호르몬 부족으로 발생하는 태아알코올효과에도 좋은 효과가 있을 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : 태아알코올효과, thyroxine, BDNF, 조롱박세포, 생후 발달

서 론

*이 논문은 2003년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음
교신저자: 정윤영(조선대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: yyjung@chosun.ac.kr

만성적으로 음주하는 여성에서 태어난 영아는 성장과 형태발생에 변화를 보이는 태아알코올증후군(fetal alcohol syndrome)에 대한 감수성이 매우 높다

(Jones와 Smith 1973). 태아알코올증후군은 학습과 기억장애, 지능저하, 집중력장애, 정신발육지연 (mental retardation)을 보이며, 심한 경우 작은머리증 (microcephaly) 등과 같은 중추신경계통의 이상을 나타낼 수 있다. 또한 임부의 알코올 섭취는 저출생체중, 얼굴기형, 비정상적인 활동항진, 근육긴장도 변화 및 면역계통의 이상 등을 직접적으로 유발시킬 수 있는 것으로 알려져 있다 (Abel과 Hannigan 1995). 특히 배아발생 (embryogenesis) 과정 중에 알코올에 노출되면 태아의 대뇌는 포도당과 산소 이용이 감소하여 대뇌 허혈 상태를 야기시켜 대뇌 대사 감소를 초래할 수 있으며 이러한 대사 변화는 중추신경계통의 구조와 기능의 붕괴 (disruption)에 따른 이상을 유발한다 (Richardson 등 1985, Abel 1996).

Rosenbloom 등 (1995)은 만성 알코올 중독자를 부검한 결과, 뇌에 육안적 구조 변화가 있음을 관찰하였고, 특히 알코올 중독은 소뇌와 밀접한 연관이 있어 자세의 균형과 운동작용의 조절 및 인지력 등에 지장을 받게 된다 (Sullivan 등 1995). 알코올 남용에 의한 소뇌의 변성은 소뇌벌레의 앞과 위소엽에서 관찰되었으며 소뇌벌레 위축도 함께 나타나는 것으로 보고되었다 (Victor 등 1989, Raz 등 1992, Karhunen 등 1994). Nathaniel 등 (1986a, b)은 임신 6일 부터 분만할 때까지 알코올을 섭취한 흰쥐 어미에서 태어난 새끼들의 몸통과 뇌 및 소뇌 성장 감소와 소뇌 조롱박세포의 발달과 성숙 지연 및 연결이상 등을 보고하였고, Goodlett 등 (1990)은 출생 전 알코올에 노출된 흰쥐 새끼들의 소뇌에서 조롱박세포 수가 현저히 감소하였다고 보고하였다.

또한 임신 중 알코올을 섭취한 어미는 혈액 내 thyroxine 양이 현저히 감소하여 자궁 내 상태를 갑상샘기능저하 상태로 유도하고 이는 새끼들의 중추신경계통에 이상을 유발하며 (Nathaniel 등 1986a) 임신 중 알코올에 노출되면 어미뿐만 아니라 태어난 새끼의 혈액 내 thyroxine 양이 모두 감소하는데 이는 갑상샘의 이상 발생에 기인한 것이라는 보고도 있다 (Hannigan과 Bellasario 1990). 갑상샘호르몬은 태아 발생 중 매우 중요한 역할을 하는데, 갑상샘호르몬 결핍은 신경세포의 증식과 이동 장애, 말이집 형성 장애 및 연결형성 지연 등과 같은 중추신경계

통의 형태학적 변화를 초래하는 것으로 알려져 있다 (Rami 등 1986, Rami와 Rabie 1990). 또한 갑상샘호르몬은 neurotrophin (NT)과 그 수용체의 발현을 조절하는데 성숙 흰쥐에 thyroxine을 투여하면 뇌의 여러 부위에서 nerve growth factor (NGF)와 neurotrophin-3 (NT-3) mRNA 발현이 증가한다는 보고가 있다 (Giordano 등 1992).

신경세포발생기 동안 알코올에 노출될 경우 정상적인 신경영양인자 (neurotrophic factor)간의 상호관계가 붕괴될 수 있다. 신경영양인자는 발생 중인 중추신경계통에서 신경세포의 생존, 분화 및 증식을 조절하며 성장 중인 신경세포 기능의 유지에 밀접하게 관여한다 (Chao 1992). 신경영양인자계통에 속하는 여러 인자를 일명 NT라고도 하는데 대표적으로 NGF, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), NT-3 및 neurotrophin-4/5 (NT-4/5) 등이 있다 (Ebendal 1992). 이 중 BDNF는 포유동물의 중추신경계통 전체에 걸쳐 광범위하게 발현되는데 특히 해마구성체 (hippocampal formation), 대뇌겉질 및 편도복합체 (amygdaloid complex) 등에서 많이 발현되며 콜린성 중격핵과 해마의 신경세포 축삭에서 역행성으로 수송되는 것으로 알려져 있다 (Hofer 등 1990, Phillips 등 1990, Wetmore 등 1990, Distefano 등 1992).

NT 중 BDNF와 NT-4/5가 고도의 친화성을 가지고 결합하는 수용체는 TrkB인데 (Barbacid 1994), BDNF와 BDNF에 의해 유도되는 TrkB의 활성이 신경세포의 가변성 (plasticity)에 관여하는 것으로 알려지고 있다 (Thoenen 1995, Korte 등 1998, Bibel과 Barde 2000). BDNF는 소뇌에서도 높게 발현되는데 발생 중인 소뇌에서는 BDNF가 과립세포층의 신경돌기의 연장과 생존을 증가시키는 역할을 하며 BDNF mRNA는 조롱박세포가 성숙해짐에 따라 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Gao 등 1995, Yan 등 1997a, b, Ohira 등 1999). 이러한 일련의 보고들은 BDNF가 성숙한 소뇌의 신경세포 생존과 유지에 중요한 역할을 할 것이라고 생각하였다. 또한 BDNF는 GABA의 합성과 신경펩티드 및 glutamate 수용체 발현을 유도하여 신경교물형성 뿐만 아니라 신경전달물질의 조절 등에 관여한다는 보고가 있다

(Bessho 등 1993). 최근 정신분열증을 가진 뇌와 정상 뇌에서 BDNF 단백질 양을 비교했을 때 의미 있는 차이가 있다는 보고(Takahashi 등 2000)는 BDNF가 지적 기능 유지에 매우 중요할 뿐만 아니라 신경정신병의 병인과의 연관성이 있음을 보여준다.

현재 임부의 알코올 남용은 그 후손에게 정신발육 지연을 일으키는 가장 흔한 원인으로 여겨지고 있다. 임부의 심한 알코올 중독으로 인한 다양한 출생 결함을 나타내는 태아알코올증후군을 초래하지는 않더라도 임부의 음주 양이 중간정도 수준으로 지속적이며 영양실조가 동반되면 행동과 학습장애 등을 나타내는 태아알코올효과(fetal alcohol effects)를 야기시킬 수 있다. 특히 태아의 뇌 발생에 예민한 결정적 기간(critical period) 동안 며칠씩 지속적으로 음주하는 경우 태아알코올효과를 나타내기 쉬운 것으로 알려져 있다(Hankin 1994).

따라서 본 연구는 모체 thyroxine 투여가 태아알코올효과에 미치는 영향을 알아보고자 임신 중 알코올을 남용한 모체에서 태어난 후손과 지속적인 음주를 하고 있는 동일한 상태의 모체에 thyroxine을 투여하여 태어난 후손의 소뇌에서 BDNF 함유 조롱박세포의 생후 성장과 발달 양상을 영양상태가 양호한 정상적 상태에서 태어난 경우와 면역조직화학염색 및 면역전자현미경염색을 이용하여 비교 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물과 실험군

체중 200~250 gm의 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐 24마리를 숫컷과 교배시켜 임신 6일부터 4마리씩 세 군과 나머지 12마리를 한 군으로 분류하였다. A 군은 시중에서 판매되는 30% 알코올을 매일 35 칼로리 정도 섭취하게 하여 alcohol 군으로, B 군은 알코올 대신 dextrin이 첨가된 경장 영양제(Ensure[®] liquid, Japan)를 A 군과 같은 칼로리로 매일 섭취하게 하여 control pair-fed 군으로 하였다. 또한 C 군은 A 군과 같이 35칼로리 알코올을 매일 섭취하게

하고 thyroxine (T₄) 투여 효과를 위해 L-Thyroxine sodium salt (Sigma)를 생리식염수에 녹여 매일 5 µg/kg을 임신 어미의 목 뒷부분에 피하 주사하여 alcohol + T₄군으로 하였다. 이와 같은 식이와 처치는 임신 6일째부터 시작하여 모든 임신 어미들이 그 새끼들을 분만할 때까지 계속하였다. D 군은 모든 군의 총 임신 어미 수와 같은 모두 12마리로 흰쥐 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 네 군의 임신 흰쥐는 각각의 cage에서 따로 사육하고 21°C의 실내온도와 12시간씩 명암조절을 해주었다.

A, B, C 군에서 태어난 새끼들은 출생 6시간이 지난 후에 그 어미와 분리하여 D 군의 대리모에게 키우게 하였다. 한 어미에서 태어난 한 배의 새끼들은 다른 배의 새끼들과 섞이지 않도록 D 군의 한 대리모가 한 cage에서 키우도록 하였는데 이 때 대리모에게는 흰쥐 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. D 군에서 태어난 새끼들은 에테르를 사용하여 희생시켰다. 분만 후 새끼들과 분리된 A, B, C 군의 어미들은 마취하여 심장채혈을 한 후 녹십자로 보내어 혈액 내 알코올 농도와 thyroxine 양을 측정하여 통계처리 하였다(Table 1).

2. 조직처리 및 표본제작

한 cage에서 1마리씩 즉 각 군에서 4마리씩의 어린 쥐를 생후 0, 7, 14, 21, 28일(P0, P7, P14, P21, P28)에 희생시켰다. 생후 0일과 7일의 실험동물은 에테르로, 나머지 연령의 실험동물은 pentobarbital sodium (60 µg/kg, 중외제약)을 복막안에 주사하여 마취시킨 다음 가슴안을 열고 원심실에 관류용 도관을 삽입한 후, heparin (250 unit/mL, 녹십자)을 함유한 생리식염수로 관류세척하고 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4)에 녹인 4% paraformaldehyde 용액이나 Zamboni 고정액으로 관류 고정한 다음 뇌를 적출하여 동일한 고정액에 담가 4°C에서 12시간 후 고정하였다. Free-floating 방법으로 면역조직화학염색을 시행하기 위해 고정된 뇌 조직은 후고정 다음에 30% sucrose에 넣고 24시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 동결절편기를 이용해 35 µm 두께의 연속관상 동결절편을 제작하여 glycerol과 ethylene glycol

이 함유된 저장용액에 담아 4°C에 보관하였다.

3. 면역조직화학염색

저장용액에 보관한 조직절편을 매 5장마다 1장씩을 취하여 0.1 M PB로 옮겨서 수차례 수세한 후 과산화수소(H₂O₂)를 처리하여 내인성 과산화효소의 활성을 억제하였으며 다시 0.1 M PB로 세척한 후 면역조직화학반응을 실시하였다.

면역염색의 첫 단계로 비특이적 반응을 줄이기 위하여 3% 말혈청(normal horse serum)을 실온에서 1시간 반응시켰다. 1차 항체는 BDNF 항혈청(1:500, Chemicon)을 사용하였으며, 4°C에서 24~48시간 동안 진동시키면서 반응시켰다. 그 후 0.1 M PB로 10분씩 3회 수세 과정을 거쳤으며, 2차 항체는 biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector, 1:200)를 실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.1 M PB로 10분씩 3회 수세하였다. 그리고 peroxidase가 표지된 avidin-biotin complex (ABC, Vector)를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간정도 반응시킨 후, 0.1 M PB로 10분간 다시 3회 수세하고 나서 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma)를 tris-buffered saline (TBS)에 녹여 기질용액으로 사용하였는데 반응 직전에 H₂O₂를 0.003%가 되도록 첨가하였으며, 실온에서 5~10분간 반응시킨 후 현미경하에서 발색 정도를 확인하였다. 또한 흑색을 띄는 nickel chloride를 DAB에 용해시켜 여과하고 0.003% H₂O₂를 첨가하여 발색반응을 확인하였다. 그 후 TBS로 2~3회 세척한 후 염색한 조직절편들을 젤라틴이 피막된 슬라이드에 부착하여 실온에서 12시간 이상 건조한 다음, 통상의 조직처리 과정을 거쳐 polymount (Polyscience)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

4. 면역전자현미경염색

면역조직화학염색을 시행한 후 포매전 방법(pre-embedding method)을 이용하였다. 먼저 소뇌에서 관찰된 BDNF함유 조롱박세포를 광학현미경으로 확인한 후 뚜렷하게 염색된 세포가 포함되어 있는 절편만을 선택하여 0.1 M PB로 씻어내고 1% osmium

tetroxide에 1시간동안 고정하였다. 고정된 절편은 알코올로 순차적인 탈수과정을 거쳐 prophylyene oxide와 Epon을 1:1로 희석한 용액에 1시간 동안 실온에서 반응시키고 이 절편은 plastic embedding을 시행하여 62~65°C로 조정된 incubator에서 48시간 동안 놓아두었다. Plastic slide에서 BDNF양성반응 세포를 핀셋을 이용하여 떼어내어 미리 준비해 둔 epon으로 된 block에 100% epon을 이용하여 붙였다. BDNF양성반응 세포가 부착되어 있는 epon block을 동일한 incubator에 하루정도 더 넣어 경화시켰다. 완전히 굳은 후 조직의 바닥 면에서부터 1µm 내외의 광학현미경용 절편을 얻어 toluidine blue 염색을 하여 박편을 얻을 부위를 선정하고 LKB 초박절편기로 60 nm의 투과전자현미경용 박편을 만들었다. 전자현미경용 박편은 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 Hitachi (H-7600) 투과전자현미경으로 80 KV 가속전압하에서 관찰하였다.

결 과

1. 혈중 알코올과 thyroxine 농도

A, B, C 군의 어미가 새끼를 분만한 지 6시간 정도 지난 후 심장천자를 해서 얻은 혈액샘플은 녹십자에 보내어 전혈(whole blood)에서 알코올 농도를, 혈청에서 thyroxine의 양을 측정하여 결과를 얻었다(Table 1). Kruskal-Wallis test로 세 군 간의 알코올 농도와 thyroxine 양을 비교한 결과 B 군에 비해 A와 C 군의 알코올 농도가 각각 유의하게 높았으며, A 군의 thyroxine 양이 B 군에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

Table 1. Blood ethanol and thyroxine levels in maternal rats

Blood	Alcohol-fed group A (n=4)	Control pair-fed group B (n=4)	Alcohol + T ₄ group C (n=4)
Alcohol	0.015 ± 0.0057 *	0	0.0125 ± 0.005*
Thyroxine	2.2 ± 0.36*	3.025 ± 0.30	3.275 ± 0.56

Values are $x \pm SD\%$ for alcohol and $x \pm SD \mu\text{g/dL}$ for thyroxine. Asterisk indicates significant difference from the control pair-fed group ($p < 0.05$).

2. BDNF함유 신경세포의 분포

생후 0일에는 세 군 모두에서 양성반응을 나타내는 BDNF함유 신경세포는 관찰되지 않았으며 생후 7일에 세 군 모두에서 조롱박세포에 양성반응을 나타냈다. A 군은 소수의 매우 약한 반응을 나타내는 세포들이 출현하였으나 B 군과 C 군에서는 A 군에 비해 염색강도가 강할 뿐만 아니라 분자층으로 들어가는 신경돌기들을 확인할 수 있을 정도로 뚜렷하게 염색되는 양성반응 조롱박세포들이 다수 나타났으며 B 군에서는 거의 단층으로 배열되어 있는 조롱박세포들이 두드러지게 나타났다(Fig. 1A, B, C).

생후 14일에는 B 군에서 BDNF 면역반응이 조롱박세포의 세포체와 돌기들에서 가장 뚜렷하게 관찰되었으며 조롱박세포층에 조롱박세포들이 단층을 이루어 일렬로 배열되어 있고 성숙한 세포 양상을 띠어 전형적인 긴축삭신경세포의 형태로 나타났다. C 군에서는 B 군에 비해 양성반응 조롱박세포 수는 적게 분포하였으나 돌기의 형태나 단층 배열은 유사한 양상을 띠었다. A 군에서는 주로 뚜렷하게 염색되는 커다란 세포체들만이 관찰되었으며 B, C 군과는 다르게 조롱박세포의 돌기가 뚜렷하게 염색되지 않았으며 조롱박세포층과 과립층의 구별이 명확하지 않았을 뿐만 아니라 조롱박세포의 단층 배열도 관찰할 수 없었다(Fig. 1D, E, F).

생후 21일에는 B 군과 C 군의 BDNF함유 조롱박세포의 분포가 이전의 연령과 큰 차이 없이 유사하여 조롱박세포층에 단층 배열을 이루며 분포하였으며 돌기들이 분자층으로 들어가 더 복잡하고 긴 분지를 형성하는 것을 관찰할 수 있었다. A 군에서는 B, C 군에 비해 현저하게 작은 크기의 양성반응 세포들이 관찰되었으며 분자층으로 들어가는 돌기들은 약하게 염색되었으나 형태는 뚜렷하게 확인할 수 있었다. A 군에서는 생후 21일이 되어서야 BDNF함유 조롱박세포들이 단층 배열의 형태를 불완전하게 이루게 되어 조롱박세포층과 다른 층들과의 구별이 가능하였으나 B, C 군의 성숙 양상과 비교해 볼 때 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 1G, H, I).

생후 28일의 C 군에서는 여전히 뚜렷하게 염색되

는 세포체뿐만 아니라 복잡한 분지 형태를 갖춘 돌기들이 관찰되었으나 B 군에서는 C 군에 비해 돌기들의 분지형성이 덜 뚜렷하게 보였으며 A 군에서는 돌기의 염색반응은 거의 나타나지 않았으며 양성반응 세포 수 또한 현저히 감소하는 양상을 띠었으며 전체적으로 면역반응이 감소하였다(Fig. 1J, K, L).

3. 전자현미경 소견

BDNF 면역반응 강도, 성숙 양상 및 BDNF함유 조롱박세포의 크기가 이전의 연령에 비해 뚜렷하게 차이를 보이기 시작한 생후 14일의 미세구조를 세 군에서 비교하였다. 세 군 모두에서 핵은 중앙부위에 위치하였으며 난원형이나 구형을 하고 있었으며 불규칙한 모양을 띠기도 하였다.

A 군의 BDNF함유 조롱박세포에서는 핵의 크기가 다른 두 군에 비해 컸으며 세포질 전체에 산재되어 있는 자유리보소체가 많이 관찰되었다. 사립체도 관찰되었으나 다른 군에 비해 세포질이 작았으며 흔적적인 골지장치가 출현하는 등 세포소기관의 형태가 뚜렷하지 않았다(Fig. 2A).

B 군에서는 핵을 포함한 BDNF함유 조롱박세포들이 나란히 관찰되었다. 핵은 불규칙한 형태를 띠기도 하였지만 막 구조 및 모양은 뚜렷하였으며 대부분 구형의 뚜렷한 핵소체를 가지고 있었다. 세포소기관 중 흩어져 있는 자유리보소체들이 관찰되었으며 그 주위에 과립세포질그물이 작은 단위로 세포질 전체에 고루 퍼져 있었고 과립세포질그물들이 평행으로 배열되어 작은 닛슬소체를 형성하기도 하였다. 사립체도 매우 많았으며 여러 개의 골지장치들이 핵 주위에 매우 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 2B).

C 군에서도 뚜렷한 핵을 포함한 조롱박세포들이 나란히 배열되어 있는 모습으로 관찰되었으며 과립세포질그물이 작은 단위로 관찰되기도 하였지만 B 군에 비해 적게 분포해 있다는 것을 제외하고는 핵의 형태나 핵소체의 크기 및 세포소기관의 구조들이 B 군과 거의 유사하였다. 매우 크고 많은 사립체들이 관찰되었고 뚜렷한 골지장치들이 핵 주변에 분포해 있었을 뿐만 아니라 닛슬소체도 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 2C, D).

고 찰

미국에서는 알코올과 관련하여 매년 십만 명 이상이 사망하고 음주를 예방하는 차원에서 매년 천억 정도의 예산이 소요되고 있어 알코올 남용이 주요한 건강문제로 대두되고 있다(Rice 1993). 알코올 남용은 인지력과 기억력에 영향을 미쳐 Wernicke-Korsakoff 증후군으로 알려진 신경학적 질환과 연관이 있다는 보고가 있다(Langlais 1995). 알코올 남용과 신경학적 질환과의 관련성이 보고되기 이전부터 알코올 중독과 티아민(thiamine) 결핍이 여러 가지 건강 문제를 유발할 수 있다는 것은 잘 알려진 사실이다. 최근 임부의 알코올 남용이 증가하고 있어 태아알코올증후군에 대한 관심이 높아지고 있으며 이미 태아알코올증후군 환자에서 소녀의 형성부전은 일정하게 동반되는 기형으로 밝혀졌다(Clarren 1981). Heaton 등(2000)은 발달 중인 흰쥐 중추신경계통에서 출생 전 모체의 임신기간 중에 알코올을 투여 받은 경우와 출생 초기에 알코올을 흡입한 경우 신경영양인자들의 발현에 약간의 차이가 있음을 보고하였다. 또한 갑상샘호르몬이 중추신경계통 발달에 중요한 역할을 할 것이라는 보고(Rami 등 1986)가 있는 후 알코올로 인한 갑상샘 기능저하와 관련하여 발생하는 붕괴에 의한 이상에 대한 연구가 보고되었다(Rami와 Rabie 1990). 또한 알코올에 노출된 후 태어난 흰쥐 소녀 조롱박세포의 성장과 분화는 정상적으로 태어난 경우에 비해 지연되며(Mohamed 등 1987a, b), 알코올과 thyroxine을 동시에 투여한 어미에서 태어난 흰쥐 소녀 조롱박세포를 전자현미경으로 관찰한 결과 세포내소기관이 알코올 군에서 태어난 경우에 비해 더 발달하여 단백질 합성이 증가하는 보고(Nathaniel 등 1999) 등이 있었다.

본 연구에서는 임신 중 음주로 태아알코올효과를 유발시킨 어린 쥐와 지속적인 음주를 하고 있는 임신 흰쥐에 thyroxine을 매일 투여하여 태어난 어린 쥐의 소녀에서 BDNF함유 조롱박세포의 생후 성장과 발달 양상을 영양상태가 양호한 정상 어미에서 태어난 경우와 비교하였다. 각 실험군은 분만한 후 대리모를 사용하여 그 새끼들을 키우게 하였다. 그

이유는 세 군 모두 모체 혈액을 검사해야 하고 알코올을 투여 받은 어미는 oxytocin 분비가 억제되어 유즙 분비가 감소하고 갑작스런 알코올 섭취 중단으로 인한 행동 변화를 초래할 가능성이 있을 뿐만 아니라(Nathaniel 등 1999), 세 군 모두 모체와 새끼 간의 밀접한 관계를 지속적으로 유지시키기 위함이었다. 또한 본 실험에서 생후 0, 7, 14, 21, 28일의 소뇌결질을 사용한 이유는 생후 처음 3주간(P7, P14, P21)이 사람 임신기간의 세 번째 삼분기(third trimester)에 해당하며 대부분의 신경세포들이 생후 21일경에 성숙 수준에 도달한다는 보고 등(Mohamed 등 1987 a, b)에 기인하여 출생한 날부터 1주일 간격으로 생후 4주까지 BDNF함유 조롱박세포의 성숙 양상을 형태학적으로 관찰하기 위함이었다.

본 실험에 사용한 T₄의 용량은 여러 연구자들의 보고에 근거하여 시행하였다. Nathaniel 등(1983, 1988)은 propylthiouracil에 의해 갑상샘기능저하 상태가 유도된 어린 쥐에 T₄를 2.5 µg/kg/day 피하주사한 결과 체중과 기분만 아니라 대뇌와 소녀의 성장을 증가시킬 수 있고, 성체 흰쥐에 15 µg/kg/day의 T₄를 투여한 경우 좌상 후 척수 뒤뿌리의 신경재생과 말미집 형성을 촉진시켰다는 보고가 있었다. 또한 어미와 발생 중인 태자의 갑상샘의 기능은 항진시키지 않고 알코올 노출에 의해 저하된 thyroxine 양을 충분히 보충하기에 적당한 양은 5 µg/kg/day 이라는 보고가 있었다(Nathaniel 등 1999). 혈액 내 thyroxine 농도에 관해 Nathaniel 등(1999)은 thyroxine 투여 군의 농도가 정상 군과 알코올 군의 평균치였으며 thyroxine 투여 군의 thyroxine 양은 알코올 군과는 유의한 차이가 있었으나 정상 군과는 유의한 차이는 없다고 보고하였다. 본 실험에서 모체 혈액 내 thyroxine 양은 알코올 +T₄군이 알코올 군에 비해 유의하게 높은 것은 유사하였으나 알코올 +T₄군이 알코올 군보다 약간 높게 나타나 같은 양의 thyroxine을 투여 받았더라도 개체마다 혈액 내 thyroxine 농도에 차이가 있을 것이라 생각되며 thyroxine 양과 투여시기를 서로 다르게 시행하여 비교해 보는 것도 필요할 것으로 생각된다.

발달이 정상적으로 진행 중인 뇌에 분포하는 BDNF에 관한 보고(Das 등 2001)에서 대뇌결질의

BDNF 단백질은 생후 2주에 최고치에 도달한다고 하였다. 본 실험에서 정상 군의 소뇌결질에서 BDNF 함유 조롱박세포는 생후 7일부터 나타나기 시작하여 생후 14일에 세포 크기의 증가와 함께 돌기 형태나 단층 배열 등의 성숙 양상이 보였다. 또한 본 연구에서 알코올 군에 비해 알코올 + T₄군에서 정상 군과 유사한 성숙 과정을 보였으며 알코올 군에서는 두 군과 다르게 조롱박세포의 돌기가 뚜렷하게 염색되지 않았으며 조롱박세포의 단층 배열도 관찰할 수 없었다. 이와 같은 실험 결과는 생후 10일 동안 thyroxine을 투여한 경우 뇌의 중격핵에서 BDNF mRNA는 생후 7일에, BDNF 단백질은 생후 10일에 현저하게 증가하였다는 Camboni 등 (2003)의 보고와 비교해 볼 때 연령의 차이는 약간 있지만 생후 2주경에 BDNF함유 조롱박세포가 성숙해진다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 thyroxine에 의한 mRNA나 단백질 양의 증가와 조롱박세포의 형태학적 성숙도 및 면역반응의 강도와 연관이 있음을 시사한다. 그러나 본 실험과 Camboni 등 (2003)의 차이점은 정상적으로 태어난 어린 쥐의 뇌에서 BDNF 단백질 발현에 미치는 thyroxine의 투여 효과를 보기 위해 생후 10일 동안 thyroxine을 투여한데 비해 본 실험의 경우 생후에는 thyroxine을 투여하지 않고 음주 중인 모체 내에서 뇌 발생의 결정적 시기에 해당하는 출생 전에 thyroxine을 투여하였다는 점이다. Heaton 등 (2000)은 뇌 성장 촉진기간 (brain growth spurt period)인 출생 후 4~10일 동안 알코올에 노출된 경우 생후 10일째에는 해마와 대뇌결질에서 정상 군에 비해 일시적인 BDNF 단백질 증가가 있었으나 생후 21일에 정상 수준으로 돌아왔다고 보고하였다. 또한 그들은 전체 임신기간에 걸쳐 알코올에 노출된 후 태어난 어린 쥐 뇌의 여러 부위에서 BDNF와 NT-3 단백질 양은 정상 군과 의미 있는 차이가 없었으나 NGF 단백질은 대뇌결질 및 줄무늬체에서 출생 첫 날 증가한 다음 생후 10일에 정상 수준으로 돌아왔다고 하였다. 따라서 Heaton 등 (2000)의 보고와 본 실험 결과로 미루어 볼 때, 알코올의 신경독성에 의한 신경영양인자의 발현이 뇌 부위에 따라 서로 차이가 있으며 알코올에 노출된 시기에 따라 BDNF를 포함한 여러 신경영양인자 발

현에도 서로 차이가 있을 수 있다는 것을 알 수 있었다.

본 실험에서 정상 군과 알코올 + T₄군의 BDNF 함유 조롱박세포의 발달은 생후 14일에 성숙 수준에 도달하여 서로 양상이 유사하였다. 그러나 알코올 군에서는 다른 두 군과 같은 조롱박세포의 완전한 단층배열이나 뚜렷한 돌기 모양 등 성숙 양상이 어느 연령에서도 두드러지게 나타나지 않았으며 생후 21일 이후 조롱박세포층은 불완전한 단층 배열을 보이다가 생후 28일에는 양성반응 세포 수가 오히려 다른 두 군에 비해 매우 감소되었다. 따라서 알코올 군이 정상 군에 비해 조롱박세포의 성숙 양상이 1 주정도 지연되어 성장한다고 보고한 Nathaniel 등 (1999)과는 약간의 차이가 있는 것 같다. 또한 본 실험에서 생후 14일의 BDNF함유 조롱박세포의 미세구조를 세 군에서 비교해 보았는데 알코올 군에서는 흔적적인 골지장치가 출현하는 등 세포소기관의 형태가 뚜렷하지 않았지만 정상 군과 알코올 + T₄군에서는 골지장치를 포함한 세포소기관이 뚜렷하였으며 닛슬소체 형성 또한 뚜렷하게 관찰됨으로서 알코올에 노출된 모체에 대한 thyroxine 처치가 BDNF와 같은 단백질 합성을 증가시켜 태자들의 뇌 발달에 좋은 효과를 나타낼 수 있을 것이라고 생각할 수 있다.

본 연구에서 생후 14일 이후에 알코올 + T₄군의 BDNF함유 조롱박세포 발달이 두드러진다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과와 함께 생후 일시적인 감상샘기능항진이 BDNF와 같은 NGF계 NT나 그 수용체의 mRNA 발현을 생후 10~12일에 증가시킨다는 보고 (Lüesse 등 1998, Roskoden 등 1999)로 미루어 보아 출생 전 모체 thyroxine 투여가 출생 후 그 후손의 BDNF함유 신경세포의 성장에 미치는 영향이 생후 일시적인 thyroxine 투여 효과와 유사하다는 것을 알 수 있었으며 뇌 발달 과정 중 매우 중요한 시기인 생후 10일경의 BDNF나 그 수용체의 mRNA 및 단백질 발현에 thyroxine이 중요한 영향을 미칠 것으로 생각된다. 또한 정상적인 원숭이에서 연령이 증가할수록 대부분의 해마 신경세포의 세포체 및 돌기의 BDNF면역반응이 감소하였다는 보고 (Hayashi 등 2001)가 있었는데 본 실험에서도 BDNF

함유 신경 돌기의 면역반응은 감소하였으나 생후 28일까지도 뚜렷한 양성반응 세포가 관찰되었다. 한편 Camboni 등(2003)의 보고에서 출생 초기 thyroxine 투여 후 4개월 된 성체에서는 생후 10일에 비해 BDNF면역반응 세포 수가 유의하게 감소하였으나 정상 군에서는 생후 10일과 성체 사이에 큰 차이가 없었다고 하였으므로 생후 28일 이후의 연령과 성체 및 노화한 경우 등 다양한 연령에서의 변화 양상을 비교해 볼 필요가 있을 것이며 중이나 뇌의 부위에 따라 BDNF면역반응에 차이가 있을 것으로 생각된다.

신생아의 감상샘기능저하는 발생 중인 췌기핵(cuneate nucleus) 및 척수의 앞뿔(anterior horn) 등에 혈액공급을 감소시켜 모체의 알코올 남용 후 감상샘 기능의 이상으로 인한 중추신경계통의 결함은 저산소증과도 연관이 있다(David와 Nathaniel 1981, Thomas와 Nathaniel 1992). Propylthiouracil로 유도된 신생 쥐의 감상샘기능저하에 thyroxine을 투여한 경우 뇌와 소뇌 무게 증가가 있었는데 생후 21일에 투여한 경우보다 생후 14일에 투여한 경우에 더 두드러진 효과가 있었다고 하였다(Nathaniel 등 1988). Nathaniel 등(1999)은 조롱박세포의 성장 지연은 알코올과 그 대사산물의 유해한 영향과 혈액 내 thyroxine 저하와도 연관이 있다고 하였다. 본 실험에서도 알코올에 노출되어 혈액 내 thyroxine 농도가 낮은 어미에서 태어난 어린 쥐의 소뇌결질의 BDNF함유 조롱박세포의 생후 발달은 정상 군이나 thyroxine 처치를 받은 군에 비해 성숙도에 차이가 있었을 뿐만 아니라 생후 28일에는 세포 소실이 뚜렷하였다.

본 실험 결과 알코올에 노출되었더라도 모체 내에서 thyroxine을 지속적으로 투여 받은 경우 BDNF함유 조롱박세포의 분포 양상이 생후 14일에 정상 군과 유사하게 이루어진 것으로 보아 모체 thyroxine 투여가 출생 초기의 BDNF합성과 연관이 있어 출생 후 thyroxine을 투여 받은 것과 같은 효과를 나타낼 수 있으며 임신한 모체의 음주로 인해 감상샘호르몬 감소로 발생하는 소뇌 조롱박세포 발달 이상을 thyroxine 투여로 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다.

MacLennan 등(1995)이 만성적인 알코올 남용으로

로 인해 흰쥐 해마에서 BDNF mRNA가 감소하며 BDNF 유전자 전사의 이상으로 인해 신경세포 변성 및 신경영양인자의 기능 이상을 초래할 수 있으며, 만성적인 알코올 남용이 신경영양인자의 수용체의 기능에도 변화를 일으킬 수 있을 것이라고 보고하였다. 이후 Back 등(1996)은 어릴 때부터 10주 동안 성숙해 질 때까지 만성적으로 알코올을 남용했을 때 신경영양인자 분비 감소를 보상하기 위해 BDNF 수용체인 TrkB 단백 발현이 증가되었다는 것을 Western blot으로 분석하여 보고하였다. BDNF와 그 수용체 TrkB는 기억의 생성 및 유지와 학습과정 등 고도의 지적 기능 유지에 중요하며 정신분열증과 같은 신경정신병 등에서는 신경연접의 감소가 연접의 기능적인 자극 전도에도 영향을 미쳐 결국 학습 장애와 같은 지적 기능 이상이 유발된다는 보고가 있었다(Linnarsson 등 1997, Minichiello 등 1999, Iritani 등 2003). 본 실험에서도 복잡한 BDNF면역반응 신경돌기들이 알코올 군에서는 매우 감소되어 있음으로서 태아알코올효과는 해마의 신경세포뿐만 아니라 소뇌결질 조롱박세포 연접의 감소 등이 야기되어 신경전달 기전의 변화를 유발할 것이라고 추측할 수 있었다. 또한 모체 thyroxine 투여가 알코올에 의한 조롱박세포 변성을 억제하여 조롱박세포 성장의 형태학적 성숙을 유지할 뿐만 아니라 생후 연접의 발달을 유도하는 등 가변성에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합해 보면 알코올에 노출된 모체에 투여하는 thyroxine은 그 후손의 소뇌결질의 BDNF함유 조롱박세포의 생후 발달을 정상 군과 유사하게 유지시킴으로서 모체 thyroxine투여가 임신 중 알코올 남용으로 인한 감상샘호르몬 부족으로 발생하는 태아알코올효과에 좋은 효과가 있을 것으로 판단된다.

참고 문헌

- Abel EL : Alcohol-induced changes in blood gases, glucose, and lactate in pregnant and nonpregnant rats. Alcohol 13 : 281-285, 1996.
- Abel EL, Hannigan JH : Maternal risk factors in fetal alcohol

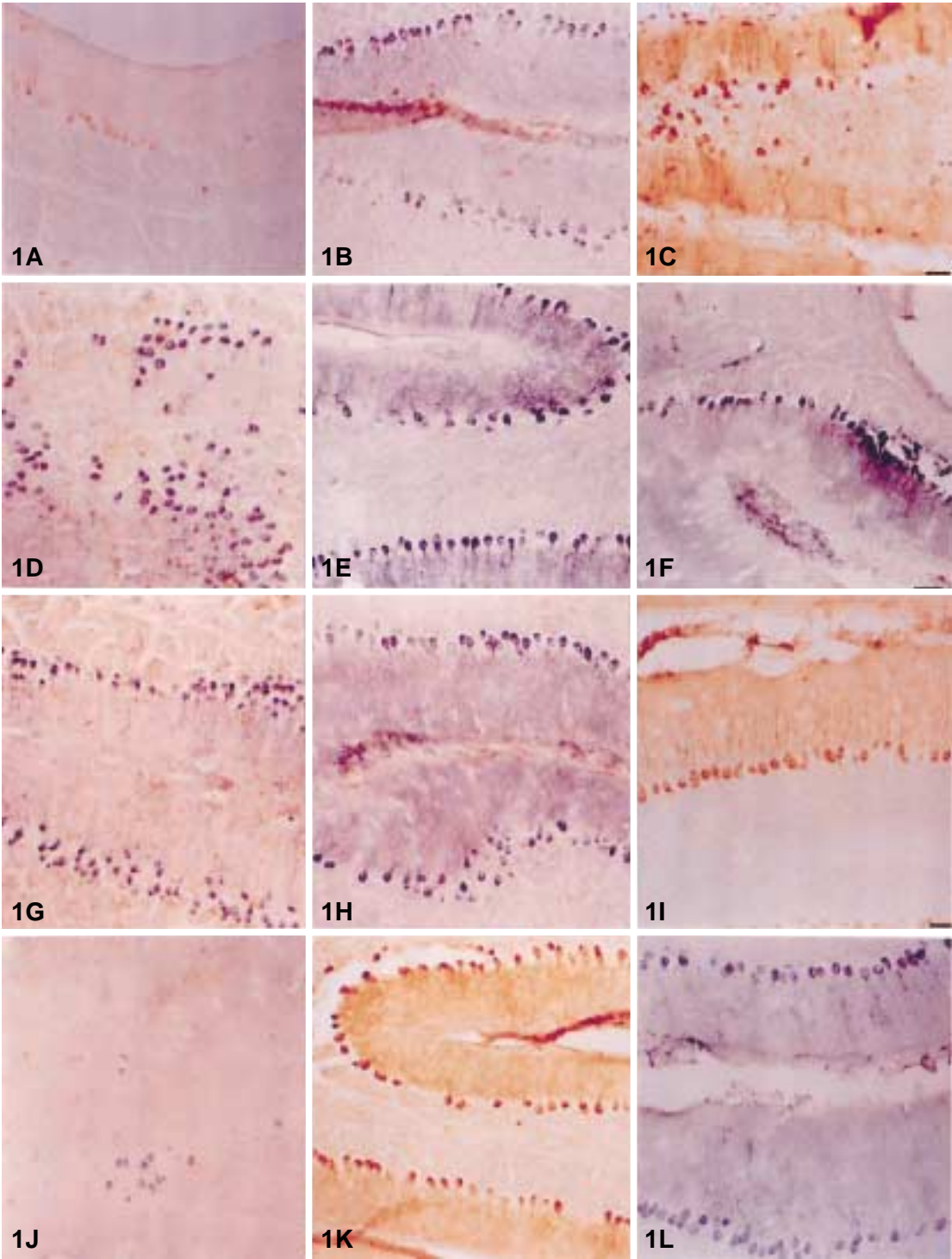
- syndrome: provocative and permissive influences. *Neurotoxicol Teratol* 17 : 445-462, 1995.
- Baek JK, Heaton MB, Walker DW : Up-regulation of high-affinity neurotrophin receptor, *trkB*-like protein on Western blots of rat cortex after chronic ethanol treatment. *Mol Brain Res* 40 : 161-164, 1996.
- Barbacid M : The *Trk* family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25 : 1386-1403, 1994.
- Bessho Y, Nakanishi S, Nawa H : Glutamate receptor agonists enhance the expression of BDNF mRNA in cultured cerebellar granule cells. *Brain Res Mol Brain Res* 18 : 201-208, 1993.
- Bibel M, Barde YA : Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14 : 2919-2937, 2000.
- Camboni D, Roskoden T, Schwegler H : Effect of early thyroxine treatment on brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and protein amount in the rat medial septum/diagonal band of Broca. *Neurosci Letters* 350 : 141-144, 2003.
- Chao MV : Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron* 9 : 583-593, 1992.
- Clarren SK : Recognition of fetal alcohol syndrome. *J Am Med Assoc* 245 : 2436-2439, 1981.
- Das KP, Chao SL, White LD, Haines WT, Harry GJ, Tilson HA, Barron S : Differential patterns of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA and protein levels in developing regions of rat brain. *Neuroscience* 103 : 739-761, 2001.
- Distefano PS, Friedman B, Dadziejewski C, Alexander C, Boland P, Schick CM, Lindsay RM, Wiegand SJ : The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* 8 : 983-993, 1992.
- David S, Nathaniel EJH : Development of brain capillaries in euthyroid and hypothyroid rats. *Exp Neurol* 73 : 243-253, 1981.
- Ebendal T : Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J Neurosci Res* 32 : 461-470, 1992.
- Gao WQ, Zheng JL, Karihaloo M : Neurotrophin4/5 and brain-derived neurotrophic factor act at later stages of cerebellar granule cell differentiation. *J Neurosci* 15 : 2656-2667, 1995.
- Giordano T, Pan JB, Casuto D, Watanabe S, Arneric SP : Thyroid hormone regulation of NGF, NT-3 and BDNF RNA in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 16 : 239-245, 1992.
- Goodlett CR, Marcussen BL, West JR : A single day of alcohol exposure during the brain growth spurt induces brain weight restriction and cerebellar Purkinje cell loss. *Alcol* 7 : 107-114, 1990.
- Hankin JR : FAS prevention strategies. *Alcohol Health Res World* 18 : 62-69, 1994.
- Hannigan JH, Bellasario RE : Lower serum thyroxine levels in rats following prenatal exposure to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 14 : 456-460, 1990.
- Hayashi M, Mistunaga F, Ohira K, Shimizu K : Changes in BDNF-immunoreactive structures in the hippocampal formation of the aged macaque monkey. *Brain Res* 918 : 191-196, 2001.
- Heaton MB, Mitchell JJ, Paiva M, Walker DW : Ethanol-induced alterations in the expression of neurotrophic factors in the developing rat central nervous system. *Dev Brain Res* 121 : 97-107, 2000.
- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA : Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J* 9 : 2459-2464, 1990.
- Iritani S, Niizato K, Nawa H, Ikeda K, Emson PC : Immunohistochemical study of brain-derived neurotrophic factor and its receptor, *TrkB*, in the hippocampal formation of schizophrenic brains. *Prog Neuro-psychopharm Bio Psychiatry* 27 : 801-807, 2003.
- Jones KL, Smith DW : Recognition of fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 2 : 999-1001, 1973.
- Karhunen SG, Erkinjuntti T, Laippala P : Moderate alcohol consumption and loss of cerebellar purkinje cells. *Br Med J* 308 : 1663-1667, 1994.
- Korte M, Kang H, Bonhoeffer T, Schuman E : A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology* 37 : 553-559, 1998.
- Langlais PJ : Alcohol related thiamine deficiency : Impact on cognitive and memory functioning. *Alcohol Health Res World* 19 : 113-121, 1995.
- Lindholm D, Hamner S, Zirrgiebel U : Neurotrophins and cerebellar development. *Perspect Dev Neurobiol* 5 : 83-94, 1997.
- Linnarsson S, bjorklund A, Emfors P : Learning deficit in

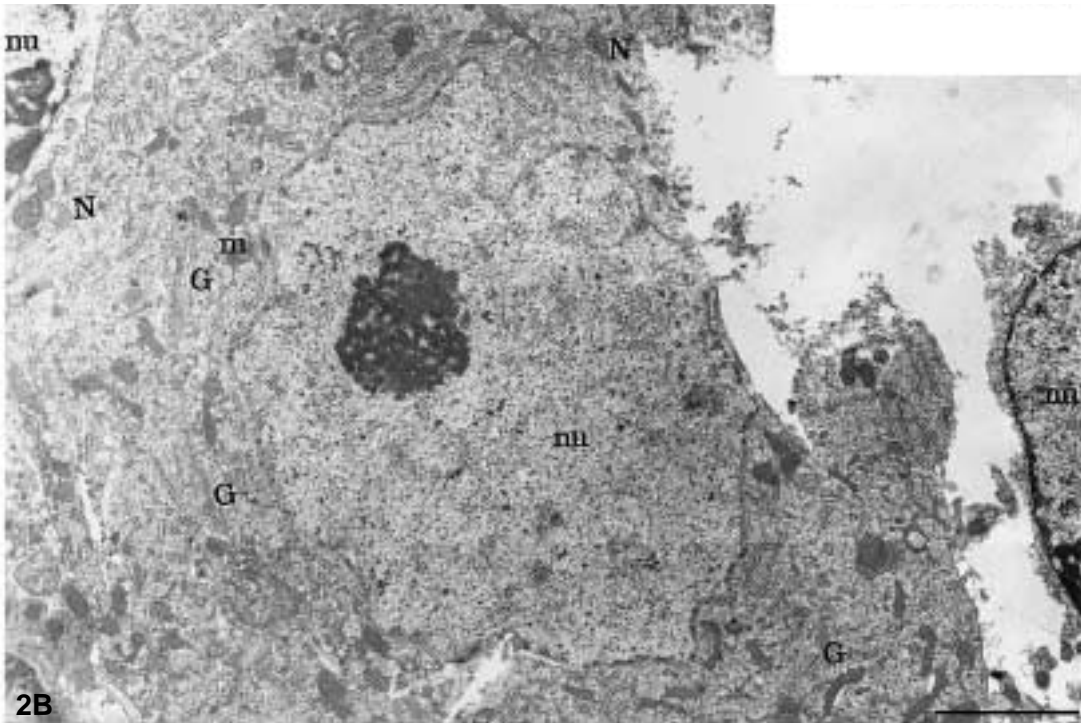
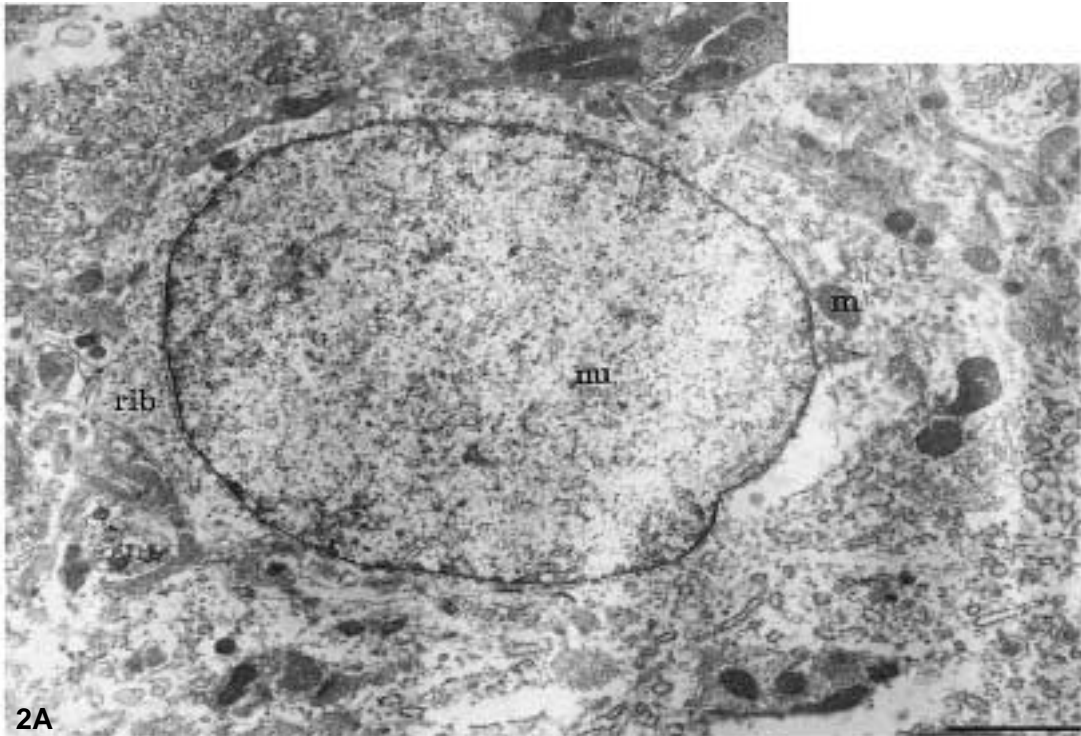
- BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci* 9 : 2581-2587, 1997.
- Lüesse HG, Roskoden T, Linke R, Otten U, Heese K, Schwegler H : Modulation of mRNA expression of the neurotrophins of the nerve growth factor family and their receptors in the septum and hippocampus of rats after transient postnatal thyroxine treatment. I. Expression of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 mRNA. *Exp Brain Res* 119 : 1-8, 1998.
- MacLennan AJ, Lee N, Walker DW : Chronic ethanol administration decreases brain-derived neurotrophic factor gene expression in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 197 : 105-108, 1995.
- Minichiello L, Korte M, Wolfer D, Kuhn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Amaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R : Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24 : 401-414, 1999.
- Mohamed SA, Nathaniel EJH, Nathaniel DR, Snell L : Altered Purkinje cell maturation in rats exposed prenatally to ethanol-I. cytology. *Exp Neurol* 97 : 35-52, 1987a.
- Mohamed SA, Nathaniel EJH, Nathaniel DR, Snell L : Altered Purkinje cell maturation in rats exposed prenatally to ethanol-II. synaptology. *Exp Neurol* 97 : 53-69, 1987b.
- Nathaniel EJH, Hassard T, Burton L, Novak C : Effect of exogenous thyroxine on the development of the Purkinje cell in fetal alcohol effects in the rat. *Exp Mol Pathol* 93 : 601-609, 1999.
- Nathaniel EJH, Nathaniel DR, Mohamed SA, Nahnybida L, Nathaniel L : Growth patterns of rat body, brain and cerebellum in fetal alcohol syndrome. *Exp Neurol* 93 : 610-620, 1986a.
- Nathaniel EJH, Nathaniel DR, Nathaniel VE : Cytological effects of triiodothyronine on dorsal root regeneration in adult rat. *Exp Neurol* 80 : 672-681, 1983.
- Nathaniel EJH, Nathaniel DR, Nathaniel LM, Burt S, Panfilli F : Effect of thyroxine replacement therapy on the growth patterns of body, brain and cerebellum in the neonatal hypothyroid rat. *Exp Neurol* 101 : 1-16, 1988.
- Nathaniel EJH, Nathaniel DR, Nathaniel L, Kowalzik C, Nahnybida L : Prenatal ethanol exposure and cerebellar development in rats. *Exp Neurol* 93 : 601-609, 1986b.
- Ohira K, Shimizu K, Hayashi M : Change of expression of full-length and TrkB_S in the developing monkey central nervous system. *Dev Brain Res* 112 : 21-29, 1999.
- Phillips HS, Hains JM, Laramée GR, Rosenthal A, Winslow JW : Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* 250 : 290-294, 1990.
- Rami A, Patel AJ, Rabie A : Thyroid hormone and development of rat hippocampus: morphological alterations in granule and pyramidal cells. *Neuroscience* 19 : 17-1226, 1986.
- Rami A, Rabie A : Delayed synaptogenesis in the dentate gyrus of the thyroid-deficient developing rat. *Dev Neurosci* 12 : 398-405, 1990.
- Raz N, Torres IJ, Spencer WD, White K, Acker JD : Age-related regional differences in cerebellar vermis observed in vivo. *Arch Neurol* 49 : 412-416, 1992.
- Rice DP : The economic cost of alcohol abuse and dependence. *Alcohol Health Res World* 17 : 10-11, 1993.
- Richardson B, Patrick J, Bousquet J, Homan J, Brien J : Cerebral metabolism in fetal lamb after maternal infusion of ethanol. *Am J Physiol* 249 : 505-509, 1985.
- Rosenbloom MJ, Pfefferbaum A, Sullivan EV : Structural brain alterations associated with alcoholism. *Alcohol Health Res World* 19 : 266-272, 1995.
- Roskoden T, Heese K, Otten U, Schwegler H : Modulation of mRNA expression of the neurotrophins of the nerve growth factor family and their receptors in the septum and hippocampus of rats after transient postnatal thyroxine treatment. II. Effects on p. 75 and trk receptor expression. *Exp Brain Res* 127 : 307-313, 1999.
- Sullivan EV, Rosenbloom MJ, Deshmokh A, Desmond JE, Pfefferbaum A : Alcohol and the cerebellum-Effects on balance, motor coordination, and cognition. *Alcohol Health Res World* 19 : 138-141, 1995.
- Takahashi M, Shirakawa O, Toyooka K, Kitamura N, Hashimoto T, Maeda K, Koizumi S, Wakabayashi K, Takahashi H, Someya T, Nawa H : Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 5 : 293-300, 2000.
- Thoenen H : Neurotrophins and neural plasticity. *Science* 270 : 593-598, 1995.
- Thomas AP, Nathaniel EJH : Comparisons of capillary maturation in control and hypothyroid rat spinal cord: An ultrastructural study. *Exp Neurol* 116 : 96-103, 1992.
- Victor M, Adams RD, Cillins GH : The Wernicke-Korsakoff

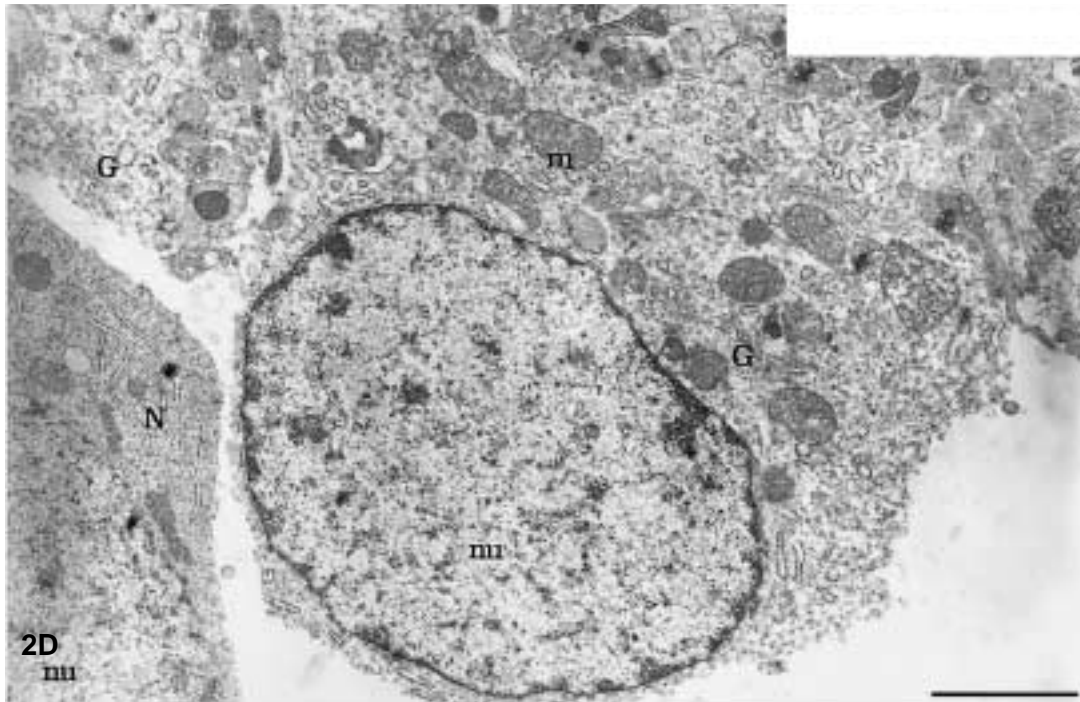
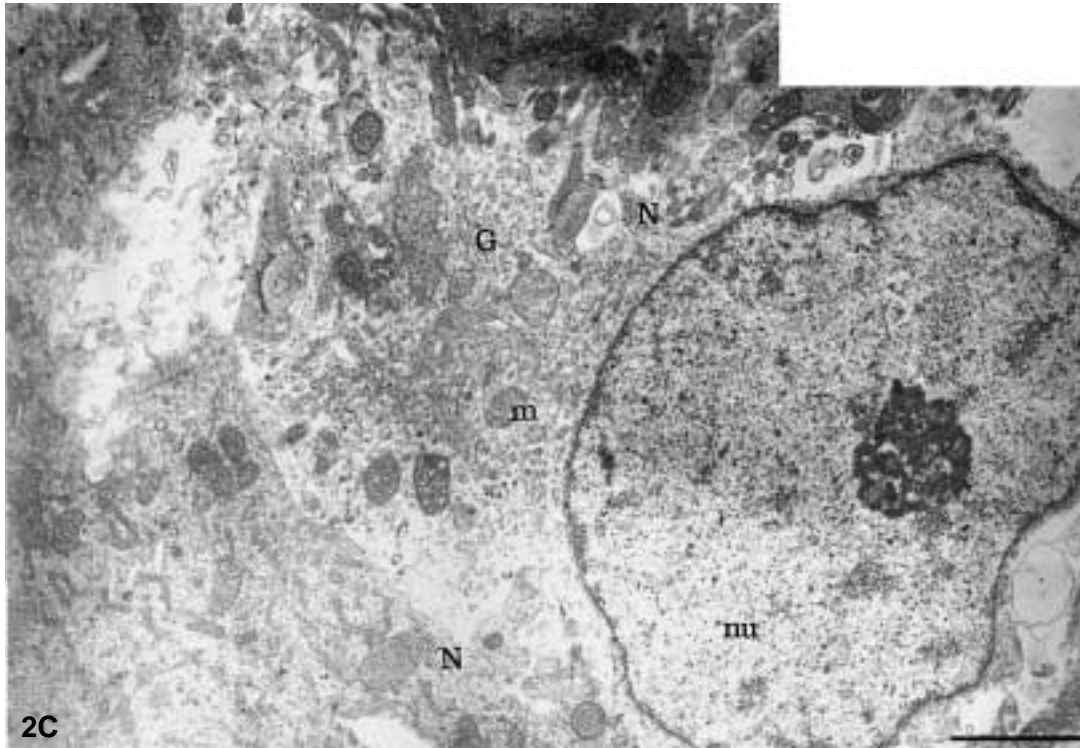
- syndrome and related neurologic disorders due to alcoholism and malnutrition, 2nd ed. Davis, Philadelphia, 1989.
- Wetmore C, Ernfors P, Persson H, Olson L : Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization. *Exp Neurol* 109 : 141-152, 1995.
- Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein SC : Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* 378 : 135-157, 1997a.
- Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennet L, Welcher AA : Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat. *Neuroscience* 78 : 431-448, 1997b.

Legends for Figures

- Fig. 1.** BDNF immunoreactivity in the Purkinje cells of cerebellar cortex in alcohol-fed group (A, D, G, J), control pair-fed group (B, E, H, K) and alcohol+T₄ group (C, F, I, L) at P 7 (A, B, C), P 14 (D, E, F), P 21 (G, H, I) and P 28 (J, K, L). Mature patterns and monolayer arrangement were reached at P14 in alcohol+T₄ group, whereas these morphological features were found at P 7 in control pair-fed group. In alcohol-fed group, the monocellular arrangement of BDNF-immunoreactive Purkinje cell was not completely achieved at all postnatal ages, in addition, the number of BDNF-immunoreactive Purkinje cell was decreased at P 28 as compared to control pair-fed and alcohol+T₄ group. Scale bars = 50 μm
- Fig. 2.** Electron micrographs of BDNF-immunoreactive Purkinje cell in the cerebellar cortex in alcohol-fed group (A), control pair-fed group (B) and alcohol+T₄ group (C, D) at P14. The BDNF-immunoreactive Purkinje cell of alcohol-fed group exhibited large nucleus, small cytoplasm, small amount of ribosomal collection and rudimentary cytoplasmic organelles. The morphology of BDNF-immunoreactive Purkinje cell of the control pair-fed group was characterized by centrally located nucleus with a prominent nucleolus and a cytoplasm exhibiting segments of rough endoplasmic reticulum in a matrix of free ribosomes. In addition, numerous short segments of rough endoplasmic reticulum showed a tendency of parallel alignment and many Golgi complexes were appeared in the perinuclear position. The cytology of BDNF-immunoreactive Purkinje cell in the alcohol+T₄ group was similar to that in control pair-fed group. Golgi complexes were found within the cytoplasm in a circumnuclear location. Parallel arrays of rough endoplasmic reticulum formed Nissl bodies. G, Golgi complex; m, mitochondria; N, Nissl body; nu, nucleus; rib, ribosome. Scale bars = 1.7 μm







Abstract

Effect of Maternal Thyroxine Treatment on the Postnatal Development of Brain-derived Neurotrophic Factor-containing Purkinje Cell in Fetal Alcohol Effects in the Rat Cerebellum

Yoon-Young Chung, Yang-Soo Kang¹, Sang-Bong Jeong, Young-Ki Kim²,
Jong-Joong Kim, Jeong-Seok Moon, Young-Lan Park, Jin Fu, Sang-Soo Park,
Kwan-Young Cheon, So-Yeon Ryu³, Choon-Sang Bae²

Department of Anatomy, College of Medicine, Chosun University ¹*Mecca Aesthetic Clinic*

²*Department of Anatomy, College of Medicine, Chonnam National University*

³*Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Chosun University*

Maternal alcohol abuse is thought to be the common cause of mental retardation. Even moderate maternal alcohol consumption may produce fetal alcohol effects with behavioral and learning difficulties, if the drinking is associated with malnutrition. Especially, continuous alcohol consumption during critical period of brain development is very likely to produce fetal alcohol effects. The aims of this study are to investigate whether exogenous thyroxine treatment to alcohol-fed dams may ameliorate the detrimental effects of alcohol on the postnatal development of BDNF-containing Purkinje cell of the cerebellar cortex of the offspring.

The morphological features of the growth and maturation were observed at 0, 7, 14, 21, 28 postnatal days via immunohistochemistry. In addition, electron microscopic finding of BDNF-containing Purkinje cell at P14 was also examined. Time-pregnant rats were divided into three groups. Alcohol-fed group received 35 calories of liquid alcohol diet daily from gestation day 6; control pair-fed group was fed a liquid diet in which dextrin replaced alcohol isocalorically; alcohol +T₄ group received 35 calories liquid alcohol diet and exogenous thyroxine subcutaneously.

As a result, a similar developmental pattern of BDNF-immunoreactive Purkinje cells was observed in control pair-fed and alcohol +T₄ group on and after P14. These cells of alcohol-fed group showed immature features. Single-layer arrangement of these cells in alcohol-fed group was not completely achieved throughout postnatal life. Electron microscopic observations of BDNF-immunoreactive Purkinje cells at P14 revealed large nucleus, small cytoplasm, small amount of ribosomal collection and rudimentary cytoplasmic organelles in alcohol-fed group. The morphology of BDNF-immunoreactive Purkinje cell in alcohol +T₄ group was similar to that in control pair-fed group. It was characterized by numerous short segments of rough endoplasmic reticulum, many of which showed a tendency of parallel alignment that suggested an attempt at Nissl body configuration. The cytology of Golgi complexes was also found within the cytoplasm in perinuclear location. Those observed differences of postnatal maturation patterns between alcohol-fed and alcohol +T₄ group may indicate the beneficial effects on the postnatal development of BDNF-containing Purkinje cells in cerebellar cortex in the pups of thyroxine-treated alcohol-exposed dams.

These results suggest that the increase of BDNF synthesis during early postnatal life caused by maternal administration of exogenous thyroxine may ameliorate fetal alcohol effects as a result of the dysthyroid state following maternal alcohol abuse.

Key words : Fetal alcohol effects, Thyroxine, Brain-derived neurotrophic factor, Purkinje cell, Postnatal development