

Thyroxine 투여가 태아알코올효과를 가진 흰쥐 솔기핵 serotonin 함유 신경세포의 생후 발달에 미치는 영향

정 윤 영, 김 주 수, 김 종 중

조선대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : serotonin은 포유동물의 중추신경계통에서 중요한 신경조절인자이며 다양한 신경정신질환의 병인과 관련이 있을 뿐만 아니라 감정, 인지, 내분비 기능, 운동 기능 및 통증 등을 조절한다. 본 연구에서는 발생과정 중 뇌발생의 결정적 시기에 알코올을 남용하는 모체에서 태아 알코올효과를 가지고 태어난 어린 쥐와 임신 중 알코올을 섭취했다더라도 적절한 양의 thyroxine (T_4)을 모체에서 투여받고 태어난 어린 쥐의 중간뇌 솔기핵에서 serotonin 함유 신경세포의 생후 발달에 미치는 영향에 대해 면역조직화학적 방법을 이용하여 관찰하였다.

실험동물은 세 군으로 나누었는데 매일 35칼로리 정도의 알코올을 섭취한 알코올 군, 알코올 대신 dextrin이 첨가된 유동액을 섭취한 정상 군, 그리고 알코올 군과 같은 양의 알코올을 매일 섭취하고 T_4 를 매일 5 μ g/kg 피하 주사하여 알코올+ T_4 군으로 하였다. 임신한 흰쥐 모체가 분만이 끝나면 각 군에서 태어난 새끼들은 그 어미와 분리하여 사료와 물을 자유롭게 섭취하는 대리모에게 키우게 하였다. 한 배의 새끼 1마리씩 총 4마리를 0, 7, 14, 21, 28일에 희생시켜 면역조직화학적 색을 시행하였다.

본 연구 결과, 알코올 군에서는 거의 모든 연령에서 정상 군과 알코올+ T_4 군에 비해 약하게 염색되었다. 생후 0일에 알코올+ T_4 군에서는 serotonin 면역반응이 정상 군에 비해 증가하였다. 알코올+ T_4 군의 serotonin 면역반응 양상은 생후 7일 부터는 정상 군과 유사하였으며, 모든 연령에서 알코올 군의 같은 연령과 비교해 면역반응이 뚜렷하게 증가함을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아, 임신 중 알코올 남용을 하는 모체에 지속적인 T_4 투여는 그 후손들의 뇌에 분포하는 serotonin 함유 신경세포의 발달을 정상 군과 유사하게 촉진시킬 수 있을 것으로 생각되며 모체 T_4 투여가 특히 출생 초기의 serotonin 합성에 영향을 미쳐 태아알코올효과를 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : 태아알코올효과, thyroxine, serotonin, 솔기핵, 생후 발달, 면역조직화학

서 론

serotonin (5-hydroxytryptamine)은 포유동물의 중추신경계통에서 중요한 신경전달물질이며, 뇌에서 감정, 인지, 운동기능, 분위기 뿐만 아니라 수면, 식욕, 생식활동을 포함한 신경내분비와 광주기 등을 조절한다 (Graeff 1997, Coccaro와 Murphy 1990). Sero-

tonin 전달의 불균형은 우울증과 불안, 불면증과 식욕부진을 포함한 여러 가지 기능부전의 원인이 된다고 알려져 있다 (Zhou 등 2001). 대부분의 serotonin 함유 신경세포는 중간뇌 솔기핵에 위치하지만 뇌 전체에 넓게 분포하기도 한다. 특히 serotonin 함유 신경세포가 가장 많이 분포하는 부위는 꼬리쪽 중간뇌의 뒤솔기핵과 정중솔기핵인데 이 핵들에 분포하는 신경세포들은 시상, 시상하부, 바닥핵, 바닥쪽 앞뇌 및 대뇌겉질 전체에 걸쳐 널리 투사한다 (Jacobs와 Azmitia 1992).

알코올 남용은 일반적으로 태아시기와 청소년시

*이 논문은 2005년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음

교신저자 : 정윤영 (조선대학교 의과대학 해부학교실)

전자우편 : yyjung@chosun.ac.kr

기 동안에 뇌 발달을 방해하여 뇌의 여러 부분에서 신경세포 소실을 유발하고, 발달하는 흰쥐 뇌에서는 세포자멸사성 신경퇴행을 유도한다고 보고되었다 (Jang과 Shin 2002). 임부의 알코올 섭취는 얼굴기형, 비정상적인 활동항진, 근육긴장도 변화 및 면역계통의 이상 등을 유발시킬 수 있으며, 특히 태아알코올증후군은 학습과 기억장애, 지능저하, 집중력 장애, 정신발육지연과 같은 중추신경계통의 이상을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Abel과 Hannigan 1995). 또한 배아발생과정 중에 알코올에 노출되면 태아의 대뇌에서 포도당과 산소 이용이 감소하여 대뇌 허혈 상태를 일으켜 대뇌의 대사 감소를 초래하여 중추신경계통의 구조와 기능의 붕괴에 의한 이상을 유발한다 (Abel 1996). 알코올의 지속적인 남용은 흰쥐 뇌 솔기핵에서 serotonin함유 신경세포의 활성화에도 영향을 주며 (Abel 1996), 배자발생시기 8~15일에 신경관 형성에 결함을 발생시켜 뒤솔기핵에서 serotonin함유 신경세포들을 뚜렷하게 감소시킨다는 보고 (Zhou 등 2001)도 있었다. 어린 쥐에 알코올을 투여했을 때 serotonin 뿐만 아니라 serotonin 합성의 속도제한효소인 tryptophan hydroxylase (TPH)의 합성이 방해되고, 솔기핵에서 신경아교세포의 발달이 억제되는데 특히 별아교세포의 발달이 억제된다는 보고도 있었다 (Morzoati와 Johnson 1999, Berggren 등 2001, Nuzhath 등 2003).

또한 임신 중 알코올을 섭취한 어머니는 혈액 내 thyroxine (T_4) 양이 현저히 감소되었는데 이는 자궁내 상태를 감상샘 기능저하 상태로 유도하여 새끼들의 발달에 영향을 미쳐 중추신경계통의 이상을 유발하는 것이며 (Nathaniel 등 1986), 임신 중 알코올에 노출된 어머니 뿐만 아니라 태어난 새끼의 혈액 내 T_4 양이 모두 감소하는데 이는 감상샘의 이상 발생에 기인한 것으로 알려져 있다 (Hannigan과 Bellasario 1990). 감상샘호르몬은 중추신경계통의 발달과 분화를 촉진시키는데 매우 중요한 역할을 하는데 감상샘호르몬 결핍에 의해 신경세포의 증식과 이동장애, 말이집 형성 장애 및 연접형성 지연 등과 같은 중추신경계통의 형태학적 변화를 초래하기도 한다 (Rami 등 1986, Rami와 Rabie 1990). 또한 감상샘호르몬의 투여는 신경영양인자 (neurotrophin)와 그

수용체의 발현을 조절하고 성숙 흰쥐에 T_4 를 투여하면 신경성장인자 (nerve growth factor)와 신경영양인자 중 neurotrophin-3의 발현이 증가되고 (Nuzhath 등 2003), 흰쥐 해마에서 serotonin 수용체를 포함한 여러 신경전달물질과 결합하는 수용체를 증가시킨다 (Thomas 등 2002)는 보고 등이 있었다. 그리고 알코올과 T_4 를 동시에 투여한 어미에서 태어난 어린 쥐의 소뇌 조롱박세포를 전자현미경으로 관찰한 결과 리보솜체, 닛슬소체로 구성된 세포질골 및 골지장치에 알코올 군에서 태어난 어린 쥐들에 비해 증가하였다는 보고 (Nathaniel 등 1999)가 있었다.

따라서 본 연구는 태아알코올효과에 미치는 T_4 의 영향을 알아보고자 발생과정 중 뇌 발생의 결정적 시기에 알코올을 남용한 모체에서 태아알코올효과를 가지고 태어난 어린 쥐의 솔기핵과, 같은 시기에 알코올을 섭취했다라도 적절한 양의 T_4 를 모체에서 투여 받고 태어난 어린 쥐의 솔기핵에서 serotonin함유 신경세포의 생후 발달 양상을 면역조직화학적 방법을 이용하여 생후 0, 7, 14, 21, 28일에서 각각 비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물과 실험군

체중 200~250 g의 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐 24마리를 숫컷과 교배시켜 임신 6일부터 4마리씩 세 군과 나머지 12마리를 한 군으로 분류하였다. A군은 시중에서 판매되는 30% 알코올을 매일 35칼로리 (18 mL/day) 정도를 섭취하게 하여 알코올 군으로, B군은 알코올 대신 dextrin이 첨가된 경장 영양제 (Ensure[®] liquid, Japan)를 A군과 같은 칼로리로 매일 섭취하게 하여 정상 군으로 하였다. 또한 C군은 A군과 동일한 방법으로 알코올을 매일 섭취하게 하고 T_4 투여 효과를 위해 L-thyroxine sodium salt (Sigma)를 0.9% NaCl 용액에 녹여 매일 5 μ g/kg을 임신 어미의 목 뒷부분에 피하 주사하여 알코올+ T_4 군으로 하였다. 이와 같은 식이와 처치는 임신 6일째부터 시작하여 모든 임신 어미들이 그 새끼들을 분만할 때까지 계속하였다. D군은 모든 군의 총

Table 1. Blood ethanol and thyroxine levels in maternal rats

Blood	Alcohol-fed group	Control pair-fed group	Alcohol+T ₄ group
	A (n=4)	B (n=4)	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 mean ± SD % for alcohol and mean ± SD µg/dL for thyroxine. Asterisk indicates significant difference from the control pair-fed group ($p < 0.05$)

임신 어미 수와 같은 모두 12마리로 흰쥐 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 네 군의 임신 흰쥐는 각각의 cage에서 따로 사육하고 21°C의 실내 온도와 12시간씩 명암조절을 해주었다.

A, B, C군에서 태어난 새끼들은 출생 6시간이 지난 후에 그 어미와 분리하여 D군의 대리모에게 키우게 하였다. 한 어미에서 태어난 한 배의 새끼들은 다른 배의 새끼들과 섞이지 않도록 D군의 한 대리모가 한 cage에서 키우도록 하였는데 이 때 대리모에게는 흰쥐 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. D군에서 태어난 새끼들은 에테르를 사용하여 희생시켰다. 분만 후 새끼들과 분리된 A, B, C군의 어미들은 마취하여 심장체혈을 한 후 녹십자로 보내어 혈액 내 알코올 농도와 T₄ 양을 측정하여 통계 처리하였다 (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. 실험동물은 pentobarbital sodium (60 mg/kg)을 복막안에 주사하고, 어린 쥐는 에테르로 마취시킨 후 가슴안을 열고 원심실에 관류용도관을 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 후고정한 다음에 30% sucrose용액에 넣고 24시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 동결절편기를 이용해 35 µm 두께의

연속가로 동결절편을 제작하여 glycerol과 ethylene glycol이 함유된 저장용액에 담가 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% 염소혈청 (normal goat serum)을 실온에서 1시간 반응시켰다. 1차 항체는 rabbit anti-serotonin (1 : 1000, Biogenesis)을 사용하였으며, 4°C에서 24~48시간 동안 진동시키면서 반응시켰다. 그 후 0.1 M PB로 10분씩 3회 수세 과정을 거쳤으며, 2차 항체는 biotinylated goat anti-rabbit 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 1시간가량 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. 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.

결 과

1. 혈중 알코올과 thyroxine 농도

Kruskal-Wallis test로 세 군 간의 알코올 농도와 T₄ 양을 비교한 결과 B군에 비해 A와 C군의 알코올 농도가 각각 유의하게 높았으며, A군의 T₄ 양이

B군에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.05$, Table 1).

2. Serotonin함유 신경세포의 분포

1) 알코올 군 (alcohol-fed group)

알코올 군에서 serotonin함유 신경세포의 면역반응 염색강도는 모든 연령에서 정상 군에 비해 미약하게 염색되었으며 특히 뒤술기핵에서 비교한 결과 염색 강도 및 염색된 세포체의 수가 현저히 감소하는 양상을 관찰하였다. 그리고 세포체 형태도 뚜렷하지 않고 작았으며 뒤술기핵 전체에 드물고 성긴 모양으로 분포하였다. 또한 알코올 군은 연령이 증가함에 따라 양성반응 세포의 수나 염색 강도가 증가하는 양상을 나타내지 않았으며 성숙된 형태의 분포 양상을 보이지 않았다(Figs. 1A-5A).

2) 정상 군 (control pair-fed group)

Serotonin함유 신경세포는 뒤술기핵과 정중술기핵에서 집중적으로 관찰할 수 있었으며 가쪽술기핵에서는 소수의 양성세포들을 확인할 수 있었다. Serotonin함유 신경세포는 P0, 7, 14, 21, 28일 모두에서 관찰할 수 있었다. P7의 경우 P0에 비해 serotonin함유 신경세포의 염색강도 및 양성반응 세포 수가 현저히 증가하였을 뿐만 아니라 성숙한 형태의 분포 양상을 띠었다(Figs. 1B, 2B). P14부터 연령이 증가함에 따라 양성세포들의 수와 분포양상은 크게 변화 없었다(Figs. 3B-5B).

3) 알코올+T₄군 (alcohol+T₄ group)

알코올+T₄군에서 serotonin함유 신경세포를 뒤술기핵에서 관찰한 결과, 정상 군과 비교해 보면 두 군이 비슷한 양상으로 발달됨을 관찰할 수 있었다. P0에서는 정상 군에 비해 serotonin함유 신경세포의 면역반응이 강하게 나타났다(Fig. 1C). 정상 군과 마찬가지로 P7의 경우 P0에 비해 serotonin함유 신경세포의 염색강도가 두드러지게 증가하는 경향을 나타냈으며 세포체 모양 또한 뚜렷하였고 성숙 양상을 보였다(Fig. 2C). P7 이후 연령에서는 뚜렷한 증가 양상은 보이지 않았으나 P14 이후부터는 비슷한 분포로 나타나 P7과 유사한 성숙한 형태를 띠었다. 알코올+T₄군에서 P7부터는 모든 연령에서 serotonin 면역반응 양상이 정상 군과 매우 유사하였으

며, 모든 연령에서 알코올 군에 비해 serotonin함유 신경세포의 염색강도 뿐 아니라 세포체의 수가 현저히 증가하였다(Figs. 1C-5C).

고 찰

현재 임부의 알코올 남용이 그 후손에 정신발육 지연을 일으키는 가장 흔한 원인으로 여겨지고 있다. 임부의 음주 양이 지나치게 많아 심한 알코올 중독으로 인한 태아의 형태발생과 성장의 변경으로 여러 가지 출생결함을 나타내는 태아알코올증후군을 초래하지 않더라도 임부의 음주 양이 중간정도 수준으로 지속적이며 영양실조가 동반되면 행동과 학습장애 등을 나타내는 태아알코올효과(fetal alcohol effects)를 야기시킬 수 있는데 특히 태아의 뇌 발생에 예민한 결정적 기간 동안에 며칠씩 지속적으로 음주하는 경우 태아알코올효과를 나타내기 쉽다고 알려져 있다(Hankin 1994).

알코올과 배아발생과 관련한 보고 중 알코올에 노출된 배아발생 15일의 뇌에서 정중술기핵이 여전히 열려있는 불완전한 신경관 형성이 유도되어 이 부위에서 serotonin함유 신경세포의 생성이 저해되고 serotonin함유 신경세포유도 정상 군에 비해서 두드러지게 낮게 나타났다고 하는 보고가 있었다(Zhou 등 2001, Nuzhath 등 2003). 또한 알코올은 in vivo에서 발생 중인 흰쥐 뇌에서 고사에 의한 세포사를 유도하여 serotonin 신경세포체계의 기능 이상을 일으킨다고 하였다(Tajuddin과 Druse 1999, Ikonomidou 등 2000). Serotonin는 배아발생 11~13일에 처음으로 나타나고 뇌 전체에 광범위하게 분포하기도 하지만 주로 중간뇌의 술기핵에 분포하는 것으로 알려져 있다(Jacobs와 Azmitia 1992). 본 실험에서는 생후 첫 한 달 동안의 변화를 한 주 간격으로 술기핵에서 관찰하였는데 알코올을 지속적으로 섭취한 모체에서 태어난 어린 쥐의 술기핵에 분포하는 serotonin함유 신경세포가 모든 연령에서 정상 군에 비해 감소함을 확인하였고 알코올 군에서 나타난 serotonin의 낮은 발현은 알코올로 인해 serotonin의 활성이 방해받는 것으로 생각할 수 있었다.

한편 갑상샘호르몬이 중추신경계통의 발달에 중요한 역할을 할 것이라는 보고(Rami 등 1986)가 있는 후 알코올로 인한 갑상샘 기능저하와 관련하여 발생하는 붕괴에 의한 이상에 대하여 관심을 갖는 연구가 보고되었다(Rami와 Rabie 1990). 소뇌에서 알코올 및 T₄와 관련한 보고를 보면 알코올에 노출된 후 태어난 어린 쥐에서 소뇌조롱박세포의 성장과 분화가 정상 군에서 태어난 경우에 비해 지연되었다고 하였다(Mohamed 등 1987a, b). 갑상샘호르몬은 발생 중에 매우 중요한 역할을 하는데 갑상샘호르몬 결핍에 의해 신경세포의 증식과 이동 장애, 말이집 형성 장애 및 연결형성 지연 등과 같은 중추신경계통의 형태학적 변화를 초래하기도 한다(Rami 등 1986, Rami와 Rabie 1990). 또한 갑상샘호르몬은 신경영양인자와 그 수용체의 발현을 조절할 뿐 아니라 성숙 흰쥐에 T₄를 투여하였더니 뇌의 여러 부위에서 신경영양인자의 발현이 증가하였다는 보고도 있었다(Giordano 등 1992). 또한 갑상샘호르몬은 serotonin 수용체인 serotonin^{1A}를 증가시키고 치아이랑, 해마의 CA3, CA1에서 serotonin의 신경세포 수를 증가시키며(Thomas 등 2002), Serotonin^{1A} 길항제를 모체에 투여하면 새끼 쥐에서 발달하는 serotonin과 신경아교세포 영양인자인 S100β가 증가되어 모체 알코올 섭취에 의한 뇌손상을 예방할 수 있다는 보고가 있었다(Nuzhath 등 2003).

본 연구에서는 임신 중 음주로 태아알코올효과를 유발시킨 어린 쥐의 뇌와 지속적으로 음주를 하고 있는 임신 흰쥐에 T₄를 매일 투여하여 태어난 어린 쥐의 뇌에서 serotonin함유 신경세포의 생후 성장과 발달 양상을 정상적으로 영양상태가 양호한 어미에서 태어난 경우와 비교하였다. 본 연구에 사용한 실험 군들에서는 모체가 분만한 후 대리모를 이용하여 그 새끼들을 키우게 하였는데 그 이유는 우선 세 군의 모든 모체 혈액을 검사하여야 할 뿐만 아니라 Nathaniel 등(1999)이 보고한 바와 같이 알코올 군과 알코올+T₄군의 어미는 알코올에 노출되어 oxytocin 분비가 억제되어 유즙 분비가 감소하며, 어미의 갑작스런 알코올 섭취 중단으로 인해 행동 변화를 초래할 가능성이 있고 세 군 모두에서 모체와 새끼간의 밀접한 관계를 유지시키기 위해서였다. 또

한 본 실험에서 생후 0, 7, 14, 21, 28일의 뇌를 사용한 이유는 생후 처음 3주간이 사람 임신기간의 세 번째 삼분기(third trimester)에 해당하며 대부분의 신경세포들이 생후 21일경에 성숙수준에 도달한다는 보고 등(Mohamed 등 1987a, b)에 기인하여 출생한 날부터 1주일 간격으로 생후 4주까지 serotonin함유 신경세포의 성숙양상을 형태학적으로 관찰하였다.

본 실험에 사용한 T₄의 용량은 여러 연구자들의 보고에 근거하여 시행하였는데 propylthiouracil에 의해 갑상샘 기능 저하 상태가 유도된 어린 쥐에 T₄를 2.5 μg/kg/day 피하주사한 경우 체중과 키 뿐만 아니라 뇌와 소뇌의 성장을 촉진시켰으며, 성체 흰쥐에 15 μg/kg/day의 T₄를 투여한 경우 좌상 후 척수 뒤 뿌리의 신경재생과 말이집 형성을 촉진시켰다고 하였다(Nathaniel 등 1983, 1988). 따라서 Nathaniel 등(1999)은 어미와 발생 중인 태자의 갑상샘의 기능을 향진시키지 않고 알코올 노출에 의해 저하된 thyroxine 양을 충분히 보충하기에 적당한 양이 5 μg/kg/day라고 하였으며 혈액 내 T₄ 농도는 T₄ 투여 군의 농도가 정상 군과 알코올 군 사이의 평균치였고 T₄ 양이 알코올 군과 유의한 차이가 있었으나 정상 군과는 그렇지 않았다고 하였다. 그러나 본 실험에서 모체의 혈액 내 T₄ 양은 알코올+T₄군이 정상 군보다 높게 측정되어 개체마다 같은 양을 투여했다 라도 T₄ 양에 차이가 있을 것이라 생각되며 thyroxine양과 투여시기를 서로 다르게 해서 비교해 보는 것도 필요할 것이라 생각된다.

본 연구에서는 태아발생기에 중요한 기능을 하는 T₄ 투여가 술기핵에서 알코올로 인한 serotonin 발현의 감소에 효과가 있을지 확인하였는데 실제로 알코올과 T₄를 같이 투여한 군의 serotonin함유 신경세포 분포를 보면 P0에는 정상 군보다도 더 많은 세포들이 관찰되었는데 이는 어린 쥐에 T₄를 투여했을 때 신경영양물질이나 신경전달물질의 활성이 증가된다는 Daniele 등(2003)의 보고와 유사하였다. 알코올+T₄군에서 P7 이후 serotonin함유 신경세포의 분포 양상이 정상 군과 매우 유사하였으며 알코올 군과 비교해 보면 모든 연령에서 serotonin함유 신경세포의 염색 강도 뿐만 아니라 세포의 수도 현

저히 증가하는 양상을 보였다. 이는 모체의 알코올 남용으로 인한 갑상샘호르몬 부족으로 태자에 미치는 유해한 영향을 T₄의 치료로 인해 완화시킬 수 있을 것으로 생각할 수 있었다.

한편 알코올에 노출된 새끼의 솔기핵에서 별아교세포와 S100β 함유 신경아교세포의 현저한 감소는 serotonin이 감소하는 위치와 유사하다는 보고가 있었는데 serotonin 함유 신경세포의 감소는 GFAP 함유 별아교세포와 S100β 함유 신경아교세포의 감소와 병행하며 이는 다른 중추신경계통의 신경세포의 발생에도 영향을 줄 것이라고 생각되어지고 있으며, 알코올에 의한 GFAP와 S100β의 감소로 인해 serotonin 함유 신경세포의 감소가 나타나는 것으로 추측되고 있다(Eriksen 등 2000, Zhou 등 2001). 본 연구에서는 중간뇌 솔기핵에서 알코올로 인해 serotonin의 발현이 현저히 감소함을 확인하였으므로 앞으로 출생 후 뿐만 아니라 출생 전 배아발생시기동안 알코올로 인한 serotonin의 발현 저하와 관련하여 GFAP와 S100β의 감소를 동시에 확인해 볼 수 있는 비교 연구가 추구되어야 할 것이다. 또한 모체의 알코올 남용으로 인해 태어나는 그 후손의 뇌에서 serotonin 함유 신경세포의 비정상적인 발달은 T₄에 의해 알코올의 독성이 억제되어 거의 정상적인 생후 발달이 유도될 수 있을 것으로 생각할 수 있었다.

따라서 이상의 결과를 종합해 보면 임신한 모체의 음주로 인해 갑상샘호르몬이 감소하여 발생하는 중추신경계통의 이상 등을 유발하는 태아알코올효과에 T₄ 투여가 좋은 효과가 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

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.

Berggren U, Eriksson M, Fahlke C, Balldin J : Relationship between central serotonergic neurotransmission and reduction in alcohol intake by citalopram. *Drug Alcohol Depend*

63: 263-267, 2001.

Coccaro EF, Murphy DL : Serotonin in major psychiatric disorders. American Psych Press Washington DC, 1990.

Daniele C, Thomas R, Herbert S : 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 Lett* 350: 141-144, 2003.

Eriksen JL, Gillespie RA, Druse MJ : Effects of in utero ethanol exposure and maternal treatment with a 5-HT_{1A} agonist on S100β-containing glial cells. *Brain Res Dev Brain Res* 121: 133-143, 2000.

Giordano T, Pan JB, Casuto D, Watanabe S, Arneric SP : Thyroid hormone regulation of NGF, NT-3 and BDNF mRNA in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 16: 239-245, 1992.

Graeff FG : Serotonergic systems. *Psychiatr Clin North Am* 20: 723-739, 1997.

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.

Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Strfovaska V, Horster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW : Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287: 1056-1060, 2000.

Jacobs BL, Azmitia EC : Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72: 165-229 1992.

Jang MH, Shin MC : Alcohol and nicotine administration inhibits serotonin synthesis and tryptophan hydroxylase expression in dorsal and median raphe of young rats. *Neurosci Lett* 329: 141-144, 2002.

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.

Morzoati SL, Johnson TB : Serotonergic neuronal activity in the dorsal raphe nucleus of selectively bred alcohol-prefering and alcohol-nonpreferring rats and unselected Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res* 23: 1362-1367, 1999.

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 Pathology* 67: 175-191, 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, 1986.
- 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.
- Nuzhath FT, Luisa AO, Jason LE, Mary JD : Effects of ethanol and ipsapirone on the development of midline raphe glial cells and astrocytes. *Alcohol* 29: 157-164, 2003.
- Rami A, Patel AJ, Rabie A : Thyroid hormone and development of rat hippocampus: morphological alterations in granule and pyramidal cells. *Neuroscience* 19: 1217-1226, 1986.
- Rami A, Rabie A : Delayed synaptogenesis in the dentate gyrus of the thyroid-deficient developing rat. *Dev Neurosci* 12: 398-405, 1990.
- Tajuddin NF, Druse MJ : In utero ethanol exposure decreased the density of serotonin neurons. Maternal ipsapirone treatment exerted a protective effect. *Dev Brain Res* 117: 91-97, 1999.
- Thomas R, Karl ZA, Herbert S : Transient postnatal thyroxine treatment leads to variation in transmitter binding site densities in the hippocampus of rats. *Neurosci Lett* 333: 21-24, 2002.
- Zhou FC, Sari Y, Zhang JK, Goodlett CR, Li TK : Prenatal alcohol exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice. *Brain Res Dev* 126: 147-155, 2001.

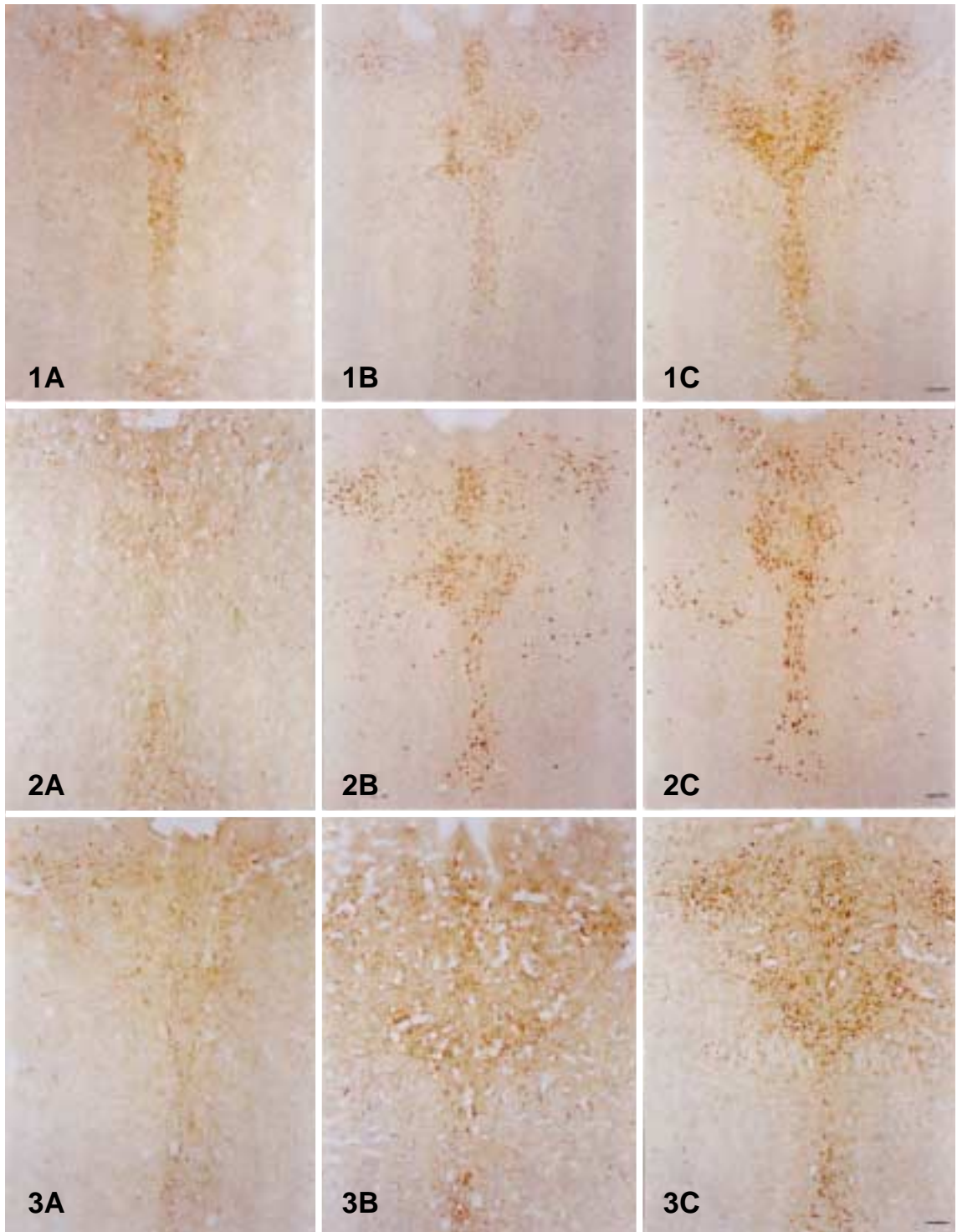
K C I

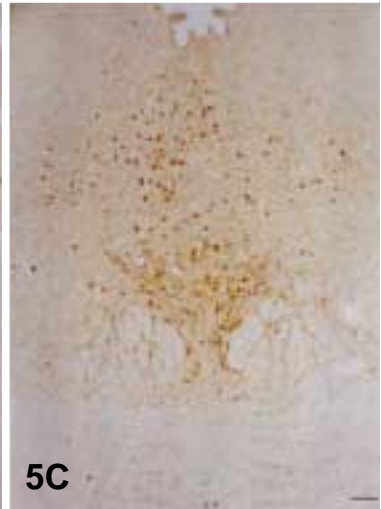
Legends for Figures

- Fig. 1.** Photomicrographs of serotonin-containing neurons in the dorsal raphe nuclei in alcohol-fed group (A), control pair-fed group (B) and alcohol+T₄ group (C) at P0. The serotonin-containing neurons were observed in the dorsal raphe nuclei of all groups. The intensity of serotonin immunoreactivity was most prominent in alcohol+T₄ group compared to alcohol-fed and control pair-fed group. Scale bar=100 μm.
- Fig. 2.** Photomicrographs of serotonin-containing neurons in the dorsal raphe nuclei in alcohol-fed group (A), control pair-fed group (B) and alcohol+T₄ group (C) at P7. Mature patterns of serotonin-containing neurons were observed in control pair-fed and alcohol+T₄ group. Intensity of serotonin immunoreactivity were also similar in control pair-fed and alcohol+T₄ group. Scale bar=100 μm.
- Fig. 3.** Photomicrographs of serotonin-containing neurons in the dorsal raphe nuclei in alcohol-fed group (A), control pair-fed group (B) and alcohol+T₄ group (C) at P14. The intensity of serotonin immunoreactivity was most prominent in alcohol+T₄ group. Serotonin-containing neuron in alcohol-fed group exhibited relatively slower maturation compared to control pair-fed and alcohol+T₄ group. Scale bar=100 μm.
- Fig. 4.** Photomicrographs of serotonin-containing neurons in the dorsal raphe nuclei in alcohol-fed group (A), control pair-fed group (B) and alcohol+T₄ group (C) at P21. The intensity of serotonin immunoreactivity was less prominent in alcohol-fed group. Scale bar=100 μm.
- Fig. 5.** Photomicrographs of serotonin-containing neurons in the dorsal raphe nuclei in alcohol-fed group (A), control pair-fed group (B) and alcohol+T₄ group (C) at P28. The distribution of serotonin-containing neurons were similar in control pair-fed and alcohol+T₄ group. However, in alcohol-fed group, morphological changes of serotonin-containing neurons were not observed during postnatal development. Scale bar=100 μm.



— Thyroxine이 태아알코올효과를 가진 술기핵에 미치는 영향 —





Abstract

Effect of Exogenous Thyroxine on the Postnatal Development of Serotonin-containing Neuron in Fetal Alcohol Effects in the Rat Raphe Nuclei

Yoon-Young Chung, Ju-Soo Kim, Jong-Joong Kim

Department of Anatomy, College of Medicine, Chosun University

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) has been concerned in the pathophysiology of various neuropsychiatric disorders. It is known to modulate emotion, cognition, endocrine activity, motor function, and pain. In the present study, the effects of exogenous thyroxine (T_4) on the postnatal development of serotonin-containing neuron in the rat raphe nuclei with fetal alcohol effects were investigated using immunohistochemistry.

These experimental animals were divided into three groups : the alcohol-fed group received 35 calories liquid ethanol diet ; the control pair-fed group was fed a liquid diet in dextrin replaced alcohol isocalorically ; alcohol+ T_4 group received alcohol diet and exogenous thyroxine subcutaneously. After the pups were born, the pups of each were fostered by surrogate mother. An average of four pups, one from each litter, were killed at days 0, 7, 14, 21, and 28 for each of the above three groups.

As a result, in alcohol group, serotonin-immunoreactivity was weakly stained at all postnatal ages compared to control pair-fed and alcohol+ T_4 group. The intensity of serotonin immunoreactivity was more prominent in alcohol+ T_4 group than in control pair-fed group at P0. Mature patterns of serotonin-containing neurons were observed in control pair-fed and alcohol+ T_4 group at P7. A similar developmental pattern of serotonin-containing neuron was observed on and after P7 in control pair-fed and alcohol+ T_4 group.

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

Key words : Fetal alcohol effects (FAE), Thyroxine (T_4), Serotonin, Raphe nucleus, Postnatal development, Immunohistochemistry