

2004년 8월

석사학위논문

모체 Thyroxine 투여가 태아알코올효과
를 가진 흰쥐 대뇌겉질 및 해마에서 NPY
함유 신경세포의 생후 발달에 미치는 영향

조선대학교 대학원

의학과

김복



100284536 2004-10-15

모체 Thyroxine 투여가 태아알코올효과를 가진 흰쥐 대뇌겉질 및 해마에서 NPY 함 유 신경세포의 생후 발달에 미치는 영향

Effect of maternal thyroxine treatment on the postnatal development of Neuropeptide-Y-containing neuron in fetal alcohol effects in the rat cerebral cortex and hippocampus

2004년 8 월 일

조선대학교대학원

의학과

김복

모체 Thyroxine 투여가 태아알코올효과를
가진 흰쥐 대뇌겉질 및 해마에서 NPY 함
유 신경세포의 생후 발달에 미치는 영향

지 도 교 수 정 윤 영

이 논문을 의학석사학위 신청 논문으로 제출함.

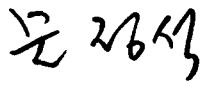
2004년 4월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

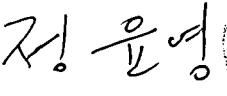
의 학 과

김 복

김 복 의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선 대학교 교수  

위 원 조선 대학교 교수  

위 원 조선 대학교 교수  

2004년 5월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

목 차

도 목 차

ABSTRACT

서 론	1
실험재료 및 방법	4
결 과	7
고 찰	10
결 론	14
참 고 문 헌	16
Explanation of Figures	25
Figures	27

도 목 차

- Fig. 1. Photomicrographs of NPY-immunoreactive neurons in the cerebral cortex in alcohol group, control pair-fed group and alcohol + T4 group at P0 ----- 27
- Fig. 2. Photomicrographs of NPY-immunoreactive neurons in the cerebral cortex in the cerebral cortex in alcohol group, control pair-fed group and alcohol + T4 group at P7 ----- 27
- Fig. 3. Photomicrographs of NPY-immunoreactive neurons in the cerebral cortex in alcohol group, control pair-fed group and alcohol + T4 group at P14 ----- 28
- Fig. 4. Photomicrographs of NPY-immunoreactive neurons in the cerebral cortex in alcohol group, control pair-fed group and alcohol + T4 group at P21 ----- 28
- Fig. 5. Photomicrographs of NPY-immunoreactive neurons in the cerebral cortex in alcohol group, control pair-fed group and alcohol + T4 group at P28 ----- 28
- Fig. 6. Photomicrographs of NPY-immunoreactive neurons in the hippocampus in alcohol group, control pair-fed group and alcohol + T4 group at P7 ---- 29
- Fig. 7. Photomicrographs of NPY-immunoreactive neurons in the hippocampus in alcohol group, control pair-fed group and alcohol + T4 group at P14 --- 29

ABSTRACT

Effect of maternal thyroxine treatment on the postnatal development of Neuropeptide-Y-containing neuron in fetal alcohol effects in the rat cerebral cortex and hippocampus

Jin, Fu

Advisor: Prof. Chung, Yoon-Young, M.D., Ph.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

Maternal alcohol abuse is considered to be one of the most prominent cause of neurobiological malformations in the postnatal and adult life of the offspring. In this study, the author investigated the effects of maternal alcohol drinking on the postnatal development of Neuropeptide-Y(NPY)-containing neuron, and, the influence of thyroxine treatment on the cerebral cortex and hippocampus of pups of alcohol abused mother.

Time-pregnant rats were divided into three groups. Alcohol-fed group A($n = 4$) received 35 calories of liquid alcohol diet daily from gestation day 6; control pair-fed group B($n = 4$) was fed a liquid diet in dextrin replaced alcohol isocalorically; alcohol + T_4 group C($n = 4$) received 35 calories liquid alcohol diet and exogenous thyroxine ($5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) subcutaneously. After the pups were born, the pups of each were fostered by surrogate mother.

Alcohol + T_4 group showed prominent NPY immunoreactivity in the cerebral

cortex compared to alcohol and control pair-fed group at P7. In alcohol + T₄ group, NPY-containing neurons were found widely distribution in the all layers of cerebral cortex after P14. Also, numerical decrease of NPY-containing neuron was not found according to increasing age in alcohol + T₄ group. However, the decrease of NPY-containing neuron was clearly observed in alcohol group compared to alcohol + T₄ group after P14. In hippocampus, control pair-fed and alcohol + T₄ group were appeared similar patterns after P7. However, in alcohol + T₄, the intensity of NPY immunoreactivity was stronger in alcohol + T₄ group as compared to the control pair-fed group. In addition, in alcohol + T₄ group, NPY immunoreactivity was prominent appeared in CA2 and CA3 at P14 as compared to the control pair-fed group.

The present results showing the increase of intensity and number of NPY-containing neurons in cerebral cortex and hippocampus of pups of exogenous T₄ supplemented alcohol-exposed dams as compared to control pair-fed and alcohol-exposed pups at P7, presumably suggest that NPY-containing neurons might be regulated by the early postnatal growth stimulatory effect of the exogenously supplemented T₄. Therefore, the increase of NPY synthesis 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.

서 론

임신 중 알코올의 남용은 그 후손들의 생후 신경생물학적 변형을 일으키는 중요한 원인의 하나이다(Spoehr 등, 1993; Thompson 등, 1988). 임부의 음주 양이 지나치게 많아 태아알코올증후군(fetal alcohol syndrome)을 초래하지 않더라도 임부의 음주 양이 중간정도 수준으로 지속적이며 영양실조가 동반되면 행동과 학습장애 등을 나타내는 태아알코올효과(fetal alcohol effects)를 야기시킬 수 있다(Hankin, 1994). 특히 배아발생(embryogenesis) 과정 중에 알코올에 노출되면 태아의 대뇌에서 포도당과 산소 이용이 감소하여 대뇌 혈액 상태를 일으켜 대뇌 대사 감소를 초래할 수 있으며 이러한 대사의 변화는 중추신경계통의 구조와 기능의 붕괴(disruption)에 의한 이상을 유발할 것이라고 하였다(Richardson 등, 1985; Abel, 1996). Nathaniel 등(1986a, b)은 임신 6일에서 분만할 때까지 알코올을 섭취한 흰쥐 어미에서 태어난 그 새끼들의 몸통과 뇌 및 소뇌 성장이 감소하였고 소뇌 조롱박세포의 발달과 성숙 지연 및 연접이상 등을 보고하였고, Goodlett 등(1990)은 출생 전 알코올에 노출된 흰쥐 새끼들의 조롱박세포 수가 현저히 감소하였다고 보고 하였으며 Francesco 등(1999)은 출생 전 알코올 섭취는 숫 생쥐의 속후각겉질(entorhinal cortex)에서 신경세포의 성장과 분화(differentiation)에 변화를 일으킨다고 하였다.

한편 임신 중 알코올을 섭취한 어미는 혈액 내 thyroxine 양이 현저히 감소되었는데 이는 자궁 내 상태를 갑상샘기능저하 상태로 유도하여 새끼들의 발달에 영향을 미쳐 중추신경계통의 이상을 유발하며(Nathaniel 등, 1986a), 임신 중 알코올에 노출된 어미뿐만 아니라 태어난 새끼의 혈액 내 thyroxine 양이 모두 감소하였는데 이는 갑상샘의 이상 발생에 기인한 것일 수 있다고 하였다(Hannigan과 Bellasario, 1990). 갑상샘호르몬은 발생 중에 매우 중요한 역할을 하는데 갑상샘호

르몬 결핍에 의해 신경세포의 증식과 이동 장애, 말이집 형성장애 및 연접형성 자연 등과 같은 중추신경계통의 형태학적 변화를 초래하기도 한다(Rami 등, 1986; Rami와 Rabe, 1990). 또한 갑상샘호르몬은 neurotrophin과 그 수용체의 발현을 조절하고 성숙 흰쥐에 thyroxine을 투여하였더니 뇌의 여러 부위에서 NGF와 NT-3 mRNA 발현이 증가하였다는 보고도 있었다(Giordano 등, 1992).

Neuropeptide Y(NPY)는 36개의 아미노산으로 구성된 신경전달물질이며 최근에는 사람뿐만 아니라 여러 포유동물의 뇌에서 NPY는 다른 신경전달물질에 비해 많이 분포하고 있으며 catecholamine, somatostatin, FMRF-amide 등과 함께 대뇌겉질을 포함한 뇌조직의 여러 부위에 광범위하게 분포하고 있는 것으로 알려지고 있다(Allen 등, 1984; Davies 등, 1990; Quidt와 Emson, 1986). 또한 NPY는 자율신경조절에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 심혈관계 기능, 생식, 성생활, 일간리듬의 조절에 관여할 뿐만 아니라(Gray와 Morley, 1986), 음식섭취의 조절(Clark 등, 1984; Levine와 Morley, 1984), 대뇌겉질의 흥분(Woldbye 등, 1997; Woldbye 등, 1996), 및 감정적 행동의 조절(Heilig 등, 1993; Heilig와 Widerlov, 1995) 등에도 관여하는 신경계통의 대표적인 신경전달물질이다(Colmer와 Wahlestedt, 1993; Dumont 등, 1992).

현재 임부의 알코올 남용이 그 후손의 정신발육지연을 일으키는 가장 큰 원인으로 여겨지고 있는데 특히 태자의 뇌 발생에 결정적인 기간동안에 지속적으로 음주하는 경우 태아알코올효과를 나타내기 쉽다고 하였다(Hankin, 1994).

따라서 본 연구는 임신 중 음주로 태아알코올효과가 유발된 후손과 지속적인 음주를 하고 있는 임신 흰쥐에 thyroxine을 투여하여 태어난 후손의 대뇌겉질과 해마에서 NPY 함유 신경세포의 생후 성장과 발달에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여 정상적으로 영양이 양호한 상태에서 태어난 흰쥐 뇌와 위의 두 군에서 태어난 흰쥐 뇌에서 면역조직화학적 방법을 이용한 NPY 함유 신경세포의 분포 양상을

생후 0, 7, 14, 21, 28 일에서 각각 비교 분석하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물과 실험군

체중이 200~250 mg의 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐 24 마리를 솟컷과 교배시켜 임신 6 일부터 4 마리씩 세 군과 나머지 12 마리를 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 35 칼로리 알코올을 매일 섭취하게 하고 thyroxine(T_4) 투여 효과를 위해 L-Thyroxine sodium salt (Sigma)를 NaOH 용액에 녹여 매일 5 μ g/kg 을 임신 어미의 목 뒷부분에 피하 주사하여 alcohol + T_4 군으로 하였다. 이와 같은 식이와 처치는 임신 6 일째부터 시작하여 모든 임신 어미들이 그 새끼들을 분만할 때까지 계속하였다. D 군은 모든 군의 총 임신 어미 수와 같은 모두 12 마리로 흰쥐 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 네 군의 임신 흰쥐는 각각의 cage에서 따로 사육하고 21 °C의 실내온도와 12 시간씩 명암조절을 해주었다.

A, B, C 군에서 태어난 새끼들은 출생 6 시간이 지난 후에 그 어미와 분리하여 D 의 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 회생시켰다. 분만 후 새끼들과 분리 된 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 1 마리씩 즉 각 군에서 4 마리씩의 어린 쥐를 생후 0, 7, 14, 21, 28일 (P0, P7, P14, P21, P28)에 희생시켰다. 생후 0 일과 7 일의 실험동물은 에테르로, 나머지 연령의 실험동물은 pentobarbital sodium(60 mg/kg, 중외제약)을 복막안에 주사하여 마취시킨 다음 가슴안을 열고 원심설에 관류용 도관을 삽입 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 12 시간 후고정하였다. Free-floating 방법으로 면역조직화학염색을 시행하기 위해 고정된 뇌조직은 후고정 다음에 30 % sucrose에 넣고 24시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 동결절편기를 이용해 35 μm두께로 연속관상 동결절편을 제작하여 glycerol과 ethylene glycol이 함유된 저장용액에 담아 4 °C에 보관하였다.

3. 면역조직화학염색

저장용액에 보관한 조직절편을 매 5 장마다 1 장씩 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 % normal goat serum(Vector)을 실온에서 1시간 반응시켰다. 1차 항체는 rabbit anti-NPY(1:1000, Incstar)를 사용하였으며, 4 °C에서 24 ~ 48 시간 동안 진동시키면서 반응시켰다. 그 후 0.1 M PB로 10분씩 3회 수세 과정을 거쳤으며, 2차 항체는 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector)를 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 10분씩 3회 수세하였다. 그리고 peroxidase가 표지된 avidin-biotin complex (ABC, Vector)를 1:100

으로 희석하여 실온에서 1시간 가량 반응시킨 후, 0.1 M PB로 10분 3회 수세하고 나서 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, Sigma)를 0.1M PB에 녹여 기질용액으로 사용하였는데 반응 직전에 H₂O₂를 0.003 %가 되도록 첨가하였으며, 실온에서 5-10 분간 반응시킨 후 현미경하에서 발색 정도를 확인하였다. 그 후 0.1M PB로 2~3회 세척한 후 염색한 조직절편들을 젤라틴이 피막된 슬라이드에 부착하여 실온에서 12시간 이상 건조한 다음, 통상의 조직탈수과정을 거쳐 polymount (Polyscience)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 혈중 알코올과 thyroxine 농도

A, B, C 군의 어미가 새끼를 분만한 지 6 시간 정도 지난 후 심장천자를 해서 얻은 혈액은 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 P 값이 알코올은 0.014, thyroxine은 0.022로 통계학적으로 유의하였다. 이 중에서 상호 의미있는 두 군끼리 비교해 보고자 분산분석(ANOVA) 후 사후검정(Post Hoc test)하였더니 B 군에 비해 A 와 C 군의 알코올 농도가 각각 유의한 차이가 있었으며 C 군의 thyroxine 양이 A 군에 비해 유의하게 높았다.

2. NPY 함유 신경세포의 분포

1) 대뇌겉질

생후 0 일에 B 군의 경우 주로 IV, V, VI 층에서 돌기가 뚜렷한 NPY 함유 신경세포들이 관찰되었으며 A 군에서는 V, VI 층에서 돌기가 뚜렷하지 않은 소수의 신경세포가 관찰되었고 C 군에서도 주로 V, VI 층에서 A 군과 유사한 형태의 세포들이 나타났으나 A 군보다는 세포 수가 더 많이 관찰되었다(Fig. 1).

생후 7 일에는 A 군과 B 군에 비해 C 군에서 뚜렷하고 긴 돌기를 가진 크기가 큰 NPY 함유 신경세포들이 관찰되었는데 IV, V 층에서 뚜렷하였다(Fig. 2).

생후 14 일에 C 군에서 A 군과 B 군에 비해 전 층에 걸쳐 많은 수의 NPY 함유

신경세포들이 관찰되었으며 A군은 B 군에 비해 NPY 함유 신경세포 수가 현저히 감소하였다(Fig. 3).

생후 21 일에 C 군의 NPY 함유 신경세포 분포 양상이 가장 두드러지게 관찰되었으며 A군은 이전 연령과 큰 차이가 없었으나 B 군에서는 이전 연령에 비해 양성 세포 수가 약간 감소하는 양상을 나타냈다(Fig. 4).

생후 28 일에 A 군은 이전 연령이나 다른 군에 비해 NPY 함유 신경세포가 현저히 감소하였으며 B 군과 C 군은 이전 연령과 유사하였고 C 군이 가장 두드러진 양성 반응을 보였다(Fig. 5).

2) 해마구성체

생후 0 일에는 NPY 함유 신경세포가 세 군 모두에서 나타나지 않았다.

생후 7 일에는 A 군에서는 NPY 함유 신경세포가 치아이랑에서 소수 출현하였고 C 군은 B 군과 유사하게 해마의 CA1~3 및 치아이랑에서 NPY 함유 신경세포들이 관찰되었는데 C 군이 B 군에 비해 더 뚜렷한 양상을 보였으며 치아이랑에서 가장 두드러진 양성 소견을 나타냈다(Fig. 6).

생후 14 일에는 A 군에서는 이전 연령과 마찬가지로 치아이랑에서 소수의 양성 반응 세포가 관찰되었으며, B, C 군도 이전의 연령과 분포 양상은 비슷하였으나 C 군에서 CA1 뿐만 아니라 CA2, 3에서도 NPY 함유 신경세포의 분포가 뚜렷하였다 (Fig. 7).

생후 21 일과 28 일은 생후 14일과 분포 상의 큰 차이는 없었으나 A 군과 B 군에서는 이전의 연령과 비교해 NPY 함유 신경세포 수가 약간 감소하는 양상을 나타냈으나 C 군에서는 이전의 연령과 비교해 세포 수와 크기에 큰 변화가 없었다.

Table 1. Blood ethanol and thyroxine levels

Blood	Alcohol-fed group A(n = 4)	Control pair-fed group B(n = 4)	Alcohol + T 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 $\bar{x} \pm SD$ % for alcohol and $X \pm SD$ $\mu g/dL$ for thyroxine. * † indicate significance at the $p<0.05$ level determined by Post Hoc test after ANOVA.

고 찰

임신 중 알코올의 남용은 작은머리증(microencephaly), 성장부진(growth deficits), 얼굴기형, 정신지체(mental retardation) 등을 나타내는 태아알코올증후군(fetal alcohol syndrome)을 일으킬 뿐 만 아니라(Streissguth 등, 1980; Wisniewski 등, 1983) 활동항진, 주의력 결핍, 억제적 행동결핍, 정신사회적 기능 결핍 등을 포함하는 행동장애도 나타낸다(Aronson 등, 1997; Olson 등, 1997; Olson 등, 1998; Roebuck 등, 1999).

최근 임부의 알코올남용이 증가하고 있어 태아알코올증후군에 대한 관심이 높아지고 있다. 사람과 동물에서의 신경화학(Clarren 등, 1990; Druse 등, 1990; Tran와 Kelly, 1999), 전기생리학(Loffe와 Chernick, 1990; Tan 등, 1990), 신경해부학적(Goodlett와 Lundahl, 1996; Mattson 등, 1996) 연구는 알코올 노출이 중추신경계통의 발달에 해로운 영향을 준다는 증거를 제공하였고 해마 CA1의 피라밋세포(Miller, 1995; Wigal와 Amsel, 1990), 소뇌 조롱박세포(Phillips와 Cragg, 1982; Volk, 1984), 대뇌겉질의 신경세포(Miller, 1986, Miller, 1988) 등은 출생 전 신경발생시기에 알코올에 노출되면 이들 세포의 감소를 유발한다고 하였다.

한편 갑상샘호르몬이 중추신경계의 발달에 중요한 역할을 할 것이라는 보고(Rami 등, 1986)가 있은 후 알코올로 인한 갑상샘 기능저하와 관련하여 발생하는 봉괴에 의한 이상에 대하여 관심을 갖는 연구가 보고되었다(Rami 등, 1990). 소뇌에서 알코올 및 thyroxine과 관련한 보고를 보면 알코올에 노출된 후 태어난 어린 쥐에서 소뇌조롱박세포의 성장과 분화가 정상 군에서 태어난 경우에 비해 지연되었다고 하였으며(Mohmed 등, 1987a, b) 알코올과 T₄를 동시에 투여한 어미에서 태어난 어린 쥐의 소뇌 조롱박세포를 전자현미경으로 관찰한 결과 리보소체, 낫슬소체로 구성된 형질내세망 및 골지장치가 알코올 군에서 태어난 어린 쥐들에 비해

증가하였다는 보고(Nathaniel 등, 1999) 등이 있었다.

본 연구에서는 임신 중 음주로 태아알코올효과를 유발시킨 어린 쥐의 뇌와 지속적으로 음주를 하고 있는 임신 흰쥐에 thyroxine을 매일 투여하여 태어난 어린 쥐의 뇌에서 NPY 함유 신경세포의 생후 성장과 발달 양상을 정상적으로 영양상태가 양호한 어미에서 태어난 경우와 비교하였다. 본 실험에서는 각 실험군의 모체가 분만한 후 대리모를 사용하여 그 새끼들을 키우게 하였는데 그 이유는 우선 세 군의 모든 모체 혈액을 검사하여야 할 뿐만 아니라 Nathaniel 등(1999)이 보고한 바와 같이 A 군과 C 군의 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. 또한 본 실험에서 생후 0, 7, 14, 21, 28 일의 뇌를 사용한 이유는 생후 처음 3 주간이 사람 임신기간의 세 번째 삼분기(third trimester)에 해당하여 대부분의 신경세포들이 생후 21 일 경에 성숙수준에 도달한다는 보고 등(Mohmed 등, 1987 a, b)에 기인하여 출생한 날부터 1 주일 간격으로 생후 4 주까지 NPY함유 신경세포의 성숙양상을 형태학적으로 관찰하였다.

본 실험에 사용한 T₄의 용량은 여러 연구자들의 보고에 근거하여 시행하였는데 Propylthiouracil에 의해 갑상샘 기능저하 상태가 유도된 어린 쥐에 T₄를 2.5 µg/kg /day 피하주사한 경우 체중과 키뿐만 아니라 뇌와 소뇌의 성장을 촉진시켰으며, 성체 흰쥐에 15 µg/kg/day의 T₄를 투여한 경우 좌상 후 척수 뒤뿌리의 신경재생과 말이집형성을 촉진시켰다고 하였다(Nathaniel 등, 1983; 1988). 따라서 어미와 발생 중인 태자의 갑상샘의 기능을 항진시키지 않고 알코올 노출에 의해 저하된 thyroxine 양을 충분히 보충하기에 적당한 양이 5 µg/kg/day라고 하였다(Nathaniel 등, 1999). 혈액 내 thyroxine 농도에 관한 Nathaniel 등(1999)의 보고에서 thyroxine 투여 군의 농도가 정상 군과 알코올 군 사이의 평균치였으며 thyroxine

양이 알코올 군과 유의한 차이가 있었으나 정상 군과는 그렇지 않았다고 하였는데 본 실험에서 모체의 혈액 내 thyroxine 양은 C 군이 B군보다 높게 측정되어 개체마다 같은 양을 투여했더라도 thyroxine 양에 차이가 있을 것이라 생각되며 thyroxine 양과 투여시기를 서로 다르게 해서 비교해 보는 것도 필요할 것이라 생각된다.

신생아의 갑상샘기능저하는 발생 중인 째기핵 및 척수의 앞뿔 등에 혈액공급을 감소시키며 모체의 알코올 남용 후 갑상샘 기능 이상으로 인한 중추신경계통역 결함은 저산소증과도 연관이 있을 것이라 생각하고 있다(David와 Nathaniel, 1981; Thomas와 Nathaniel, 1992).

본 실험 결과, 알코올에 노출되었더라도 모체 내에서 thyroxine을 지속적으로 투여 받은 경우 출생 후 대뇌겉질에서는 생후 7일에 뚜렷하고 긴 돌기를 가진 크기가 큰 NPY 함유 신경세포들이 관찰되어 알코올 군 보다 더 뚜렷한 양성반응을 나타내기 시작한다는 것을 알 수 있었다. 또한 생후 14 일 이후부터는 모체 내에서 thyroxine을 지속적으로 투여 받은 어린 쥐의 대뇌겉질의 전 층에 걸쳐 광범위하게 NPY 함유 신경세포들이 관찰되었으며 연령 증가에 따른 세포의 감소가 나타나지 않았으나 알코올 군은 NPY 함유 신경세포가 생후 14 일 이후 연령이 증가함에 따라 감소하는 양상을 나타냈다. 해마에서는 생후 7 일부터 모체 내에서 thyroxine을 지속적으로 투여 받은 경우 정상 군과 유사한 분포양상을 나타냈으며 알코올 군과는 뚜렷한 차이를 보였다. 알코올 군은 치아이랑에서만 소수의 양성 반응을 나타냈으나, thyroxine을 투여 받은 출생 후 어린 쥐는 치아이랑 뿐 아니라 CA1, 2, 3에서도 NPY 함유 신경세포의 분포가 뚜렷하였다. 또한 연령이 증가할수록 알코올 군과 정상 군은 NPY 함유 신경세포가 약간 감소하는 양상을 나타냈으나 thyroxine을 투여 받은 군에서는 세포 수와 크기에 큰 변화가 없었다. 따라서 본 결과는 출생 전 알코올 섭취가 출생 후 속후각질에서의 NPY 함유 신경세포의

감소를 일으킨다고 한 Francesco 등(1999)의 보고와 유사하였을 뿐만 아니라 속후 각걸질, 해마 및 치아이랑을 포함한 변연계의 신경세포 발달 이상 뿐만 아니라 대뇌걸질의 NPY 함유 신경세포의 발달에도 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 임신 중 알코올 남용을 하는 모체에 thyroxine을 투여함으로서 출생한 후손들의 대뇌걸질 및 해마에 분포하는 NPY 함유 신경세포의 생후 발달을 정상 군과 유사하게 유지시키거나 더 빠르게 촉진시킬 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

본 실험에서는 임신 기간 중 지속적으로 알코올을 섭취하는 모체에 thyroxine을 투여하여 알코올의 유해한 영향으로 인한 태아알코올효과를 개선시킬 수 있는지를 태어난 흰쥐 생후 연령에 따라 대뇌겉질 및 해마에서 NPY 함유 신경세포의 발달과 성숙 양상을 관찰하였다.

실험동물은 세 군으로 나누었는데 매일 35 칼로리 정도의 알코올을 섭취한 A 군을 알코올 군, 알코올 대신 dextrin이 첨가된 유동액을 섭취한 B 군을 정상 군, 그리고 C 군은 A 군과 같은 양의 알코올을 매일 섭취하고 thyroxine을 매일 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 피하 주사하여 알코올 + T₄ 군으로 하였다. 임신한 흰쥐 모체가 분만이 끝나면 각 군에서 태어난 새끼들은 그 어미와 분리하여 사료와 물을 자유롭게 섭취하는 대리 모에게 키우게 하였다. 한 배의 새끼 1 마리씩 총 4 마리를 0, 7, 14, 21, 28 일에 희생시켜 면역조직화학염색을 시행하였다.

본 연구 결과 알코올에 노출되었더라도 모체 내에서 thyroxine을 지속적으로 투여 받은 경우, 대뇌겉질에서는 생후 7 일에 NPY 함유 신경세포들이 알코올 군과 정상 군보다 더 뚜렷한 양성반응을 나타내기 시작하였으며, 생후 14 일 이후부터는 대뇌겉질의 전 층에 걸쳐 광범위하게 NPY 함유 신경세포들이 관찰되었고 연령 증가에 따른 세포의 감소가 나타나지 않았으나 알코올 군은 NPY 함유 신경세포가 생후 14 일 이후 연령이 증가함에 따라 감소하는 양상을 나타냈다. 해마에서는 생후 7 일부터 모체 내에서 thyroxine을 지속적으로 투여 받은 경우 정상 군과 유사한 분포양상을 나타냈으며 알코올 군과는 뚜렷한 차이를 보였으며 연령이 증가할 수록 알코올 군과 정상 군은 NPY 함유 신경세포가 약간 감소하는 양상을 나타냈으나 thyroxine을 투여 받은 군에서는 큰 변화가 없었다.

이상의 결과로 보아 임신 중 알코올 남용을 하는 모체에 지속적인 thyroxine 치료가 출생한 후손들의 뇌에 분포하는 NPY 함유 신경세포의 발달을 정상 군과 유사하거나 더 빠르게 촉진시킬 수 있을 것으로 생각되며 모체 thyroxine 투여가 특히 출생 초기의 NPY 합성에 영향을 미쳐 태아알코올효과를 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Abel E.L : Alcohol-induced changes in blood gases, glucose and lactate in pregnant and nonpregnant rats. *Alcohol 13: 281-285, 1996.*
2. Allen JM, McGregor GP, Woodhams PL, Polak JM, Bloom SR : Ontogeny of a novel peptide neuropeptide Y in rat brain. *Bran Res 303: 197-200, 1984.*
3. Aronson M, Hagberg B, Gillberf C : Attention deficits and autistic spectrum problems in children exposed alcohol during gestation: a follow-up study, *Dev. Med. Child Neurol 39: 583-587, 1997.*
4. Clark JJ, Karla PS, Crowle WR, Karla SP. Neuropeptice Y and Human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology 115:427-429, 1984.*
5. Clarren SK, Asstley SJ, Bowden DM, Lai H, Milam AH, Rudeen PK, Shoemaker WJ : Neuroanatomic and neurochemical abnormalities in nonhuman primate infants exposed to weekly doses of ethanol during gestation, *Alcohol Clin. Exp. Res 14:674-683, 1990.*
6. Colmer WF, Wahlestedt C : The biology of neuropeptide Y and related peptides. *Totowa, NJ: Humana Press; 1993.*

7. David S, Nathaniel EJH : Development of brain capillaries in euthyroid and hypothyroid rats. *Exp Neurol*, 73: 243-253, 1981.
8. Davies CA, Morroll DR, Prinja D, Mann DMA, Gibbs A : A quantitative assessment of somatostatin-like and neuropeptide Y-like immunostained cells in the frontal and temporal cortex of patients with alzheimer's disease. *J Neurosci* 96: 59-73, 1990.
9. Druse M.J, Tajuddin N, Kuo A, Connerty M : Effects of in utero ethanol exposure on the developing dopaminergic system in rats, *J. Neurosci. Res.* 27:233-240, 1990.
10. Dumont Y, Martel JC, Fournier A, St pierre S, Quirion R : Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. *Prog Neurobiol* 38: 125-167, 1992.
11. Francesco Angelucci, Marco Fiore, Costantino Cozzari, Luigialoe : Prenatal ethanol effects on NGF level, NPY and ChAT immunoreactivity in Mouse entorhinal cortex: A preliminary study. *Neurotoxicology and Tertiology*, 4: 415-425, 1999.
12. Giordano T, Pan JB, Casuto O, Watanabe S. Arneric SP : Thyroid hormone regulation of AGF, NT-3 and BDNF RNA in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 16: 239-245, 1992.

13. 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.
14. Goodlett CR, Lundahl K.R : Temporal determinants of neonatal alcohol-induced cerebellar damage and motor performance deficits, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55: 531-540, 1996.
15. Gray St, Morley JE : Neuropeptide Y. Anatomical distribution and possible function of the mammalian nervous system. *Life science* 38: 389-401, 1986.
16. Hankin JR : FAS prevention strategies. *Alcohol Health Res World*, 18: 62-69, 1994.
17. Hannigan JH, Bellasario RE : Lower serum thyroxine levels in rats following prenatal exposure to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 14: 456-460, 1990.
18. Heilig M, Mcleod S, Brot M, Heinrichs SC, Mensaghi F, Koob GF : Anxiolytic-like action of neuropeptide Y : mediation by Y1 receptors in amygdala, and dissociation from food intake effects. *psychopharmacology* 8: 357-363, 1993.

19. Heilig M, Widerlov E : Neurobiology and clinical aspects of neuropeptide Y. *Crit Rev Neurobiol* 9: 115-136, 1995.
20. Levine AS, Morley JE : Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides* 5: 1025-1029, 1984.
21. Loffe S, Chernick V : Prediction of subsequent motor and mental retardation in newborn infants exposed to alcohol in utero by computerized EEG analysis, *Neuropediatrics* 21: 11-17, 1990.
22. Mattson SN, Riley EP, Sowell ER, Jernigan TL, Sobel DF, Jones KL : A decrease in the size of the basal ganglia in children with fetal alcohol syndrome, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 20: 1088-1093, 1996.
23. Miller M.W : Generation of neurons in the rat dentate gyrus and hippocampus: effects of prenatal and postnatal treatment with ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 19: 1500-1509, 1995.
24. Miller M.W : Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons, *Science* 233: 1308-1311, 1986.
25. Miller M.W : Effects of prenatal exposure to ethanol on the development of cerebral cortex: I . Neuronal generation, *Alcohol Clin. Ecp. Res.* 12:440-449, 1988.

26. 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.
27. 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.
28. 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
29. 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
30. Nathaniel EJH, Nathaniel DR, Nathaniel L, Kowalzik C, Nahnybida L : Prenatal ethanol exposure and cerebellar development in rats. *Exp Neurol*, 93: 601-609, 1986b.
31. Nathaniel EJH, Nathaniel DR, Nathaniel VE : Cytological effects of triiodothyronine on dorsal root regeneration in adult rat. *Exp Neurol*, 80: 672-681, 1983.

32. Nathaniel EJH, Nathaniel DR, Nathaniel LM, Vurt 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.
33. Olson H.C, Feldman J.J, Steissguth A.P, Sampson P.D, Bookstein F.L : Neuropsychological deficits in adolescents with fetal alcohol syndrome: clinical findings, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22: 1998-2012, 1998.
34. Olson H.C, Steissguth A.P, Sampson P.D, Barr H.M, Bookstein F.L, Thiede K : Association of prenatal alcohol exposure with behavioral and learning problems in early adolescence, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 36: 1187-1194, 1997.
35. Phillips SC, Cragg BG : A change in susceptibility of rat cerebellar Purkinje cells to damage by alcohol during fetal, neonatal and adult life, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 8: 441-454, 1982.
36. Quidt ME, Emson PC : Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system-II. Immunohistochemical analysis. *Neurosci.* 18: 545-618, 1986.
37. 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.

38. Rami A, Rabie A : Delayed synaptogenesis in the dentate gyrus of the thyroid-deficient developing rat. *Dev Neurosci*, 12: 398-405, 1990.
39. 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.
40. Roebuck T.M, Mattson S.N, Riley E.P : Behavioral and psychosocial profiles of alcohol-exposed children, *Alcohol Clin Exp Res*. 23: 1070-1076, 1999.
41. Spohr HL, Williams J, Steinhausen HC : Prenatal alcohol exposure and long-term developmental consequences. *Lancet* 341: 907-910, 1993.
42. Streissguth A.P, Barr H.M, Martin D.C, Herman C.S : Effects of maternal alcohol, nicotine, and caffeine use during pregnancy on infant mental and motor development at eight months, *Alcohol Clin Exp Res*. 4: 152-164, 1980.
43. Tan SE, Berman RF, Abel EL, Zajac CS : Prenatal alcohol exposure alters hippocampal slice electrophysiology, *Alcohol* 7: 507-511, 1990.
44. Thomas AP, Nathaniel EJH : Comparisons of capillary maturation in control and hypothyroid rat spinal cord : An ultrastructural study. *Exp Neurol*, 116: 96-103, 1992.

45. Thompson AD, Pratt OE, Jeyasingham M, Shagw GK : Alcohol and brain damage . *Hum. Toxicol.* 7: 455-463, 1988.
46. Tran TD, Kelly SJ : Alterations in hippocampal and hypothalamic monoaminergic neurotransmitter systems after alcohol exposure during all three trimester equivalents in adult rats, *J. Neural Transm.* 106: 773-786, 1999.
47. Volk B : Cerebellar histogenesis and synaptic maturation following pre-and postnatal alcohol administration. An electron-microscopic investigation of the rat cerebellar cortex, *Acta Neuropathol.* 63: 57-65, 1984.
48. Wisniewski K, Damska M, Sher J.H, Qazi Q : A clinical neuro-pathological study of the fetal alcohol syndrome, *Neuropediatrics* 14: 197-201, 1983.
49. Wigal T, Amsel A : Behavioral and neuroanatomical effects of prenatal, postnatal, or combined exposure to ethanol in weanling rats. *Behav. Neurosci.* 104: 116-126, 1990.
50. Woldbye DP, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Klemp K, Madsen TM, Bolwig TG : Powerful inhibition of kainic acid seizures by neuropeptide Y via Y5-like receptors. *Nat Med* 3: 761-764, 1997.
51. Woldbye DP, Madsen TM, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Bolwig TG :

Neuropeptide Y inhibits hippocampal seizures and wet dog shakes. *Brain Res*
737: 162-168, 1996.

Explanation of Figures

Fig. 1. Photomicrographs of NPY-immunoreactive(IR) neurons in the cerebral cortex in alcohol group(a), control pair-fed group(b) and alcohol + T4 group(c) at P0. The intensity of NPY immunreactivity was most prominent in control pair-fed group. $\times 200$.

Fig. 2. Photomicrographs of NPY-IR neurons in the cerebral cortex in the cerebral cortex in alcohol group(a), control pair-fed group(b) and alcohol + T4 group(c) at P7. In alcohol + T4 group, more differentiated NPY-IR neurons exhibited larger and intensely stained cytoplasm. In addition, their processes had increased in length, thickness and complexity. $\times 200$.

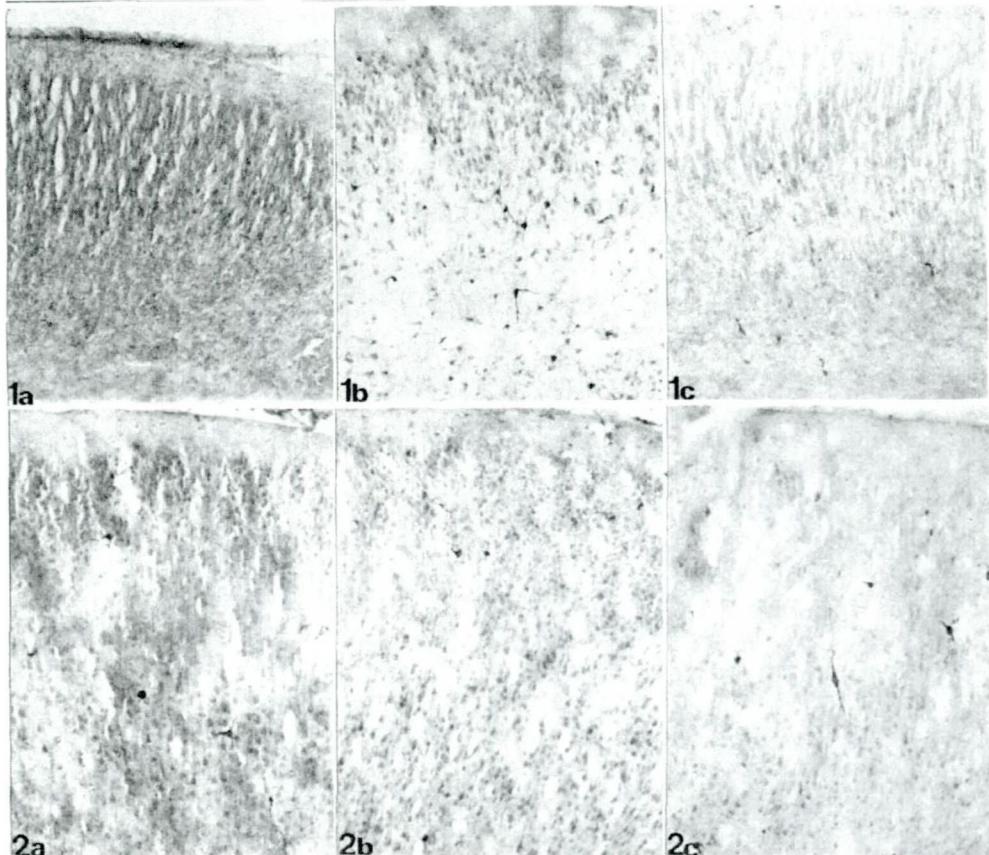
Fig. 3. Photomicrographs of NPY-IR neurons in the cerebral cortex in alcohol group(a), control pair-fed group(b) and alcohol + T4 group(c) at P14. The number of NPY-IR neuron increased in alcohol + T4 group compared to the other two groups. $\times 100$.

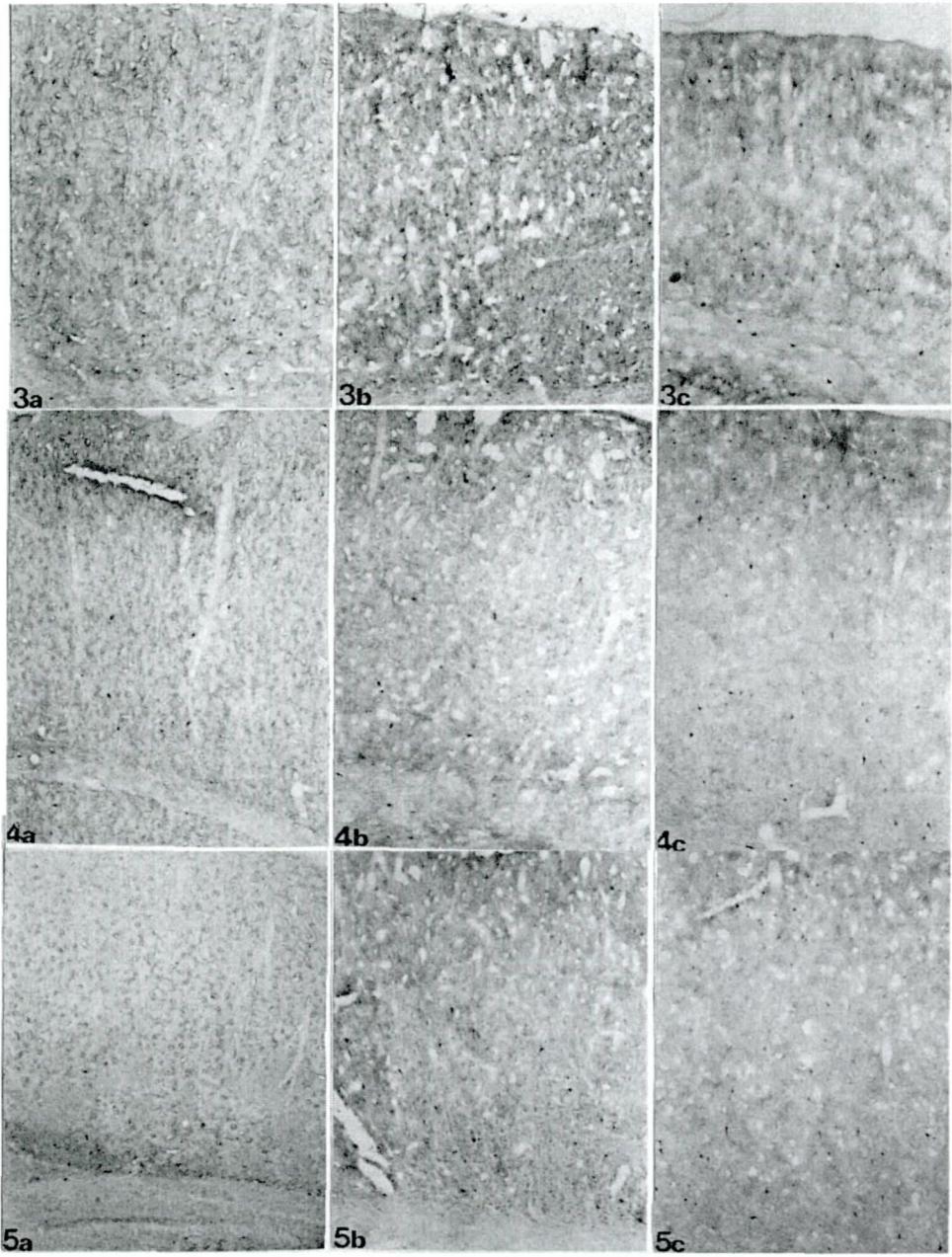
Fig. 4. Photomicrographs of NPY-IR neurons in the cerebral cortex in alcohol group(a), control pair-fed group(b) and alcohol + T4 group(c) at P21. At this age, the intensity and number of NPY-IR neuron similar to P14 in alcohol + T4 group. However, the number of NPY-IR neuron decreased in the other two groups. $\times 100$.

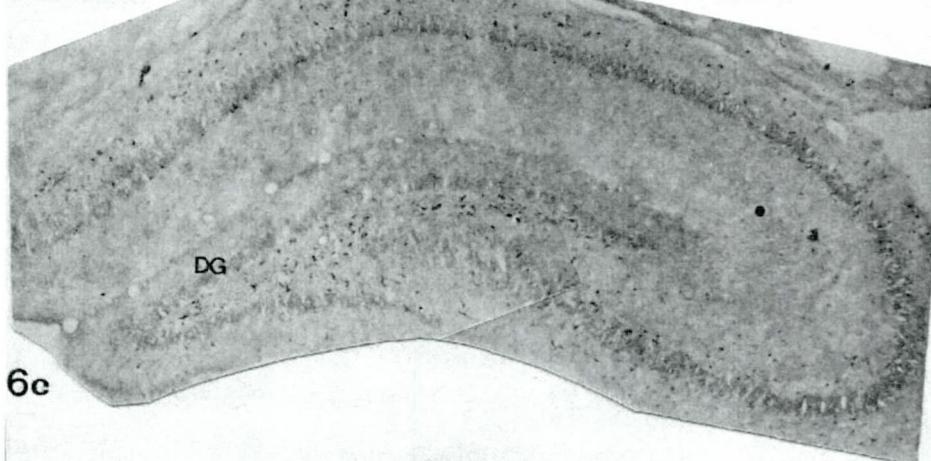
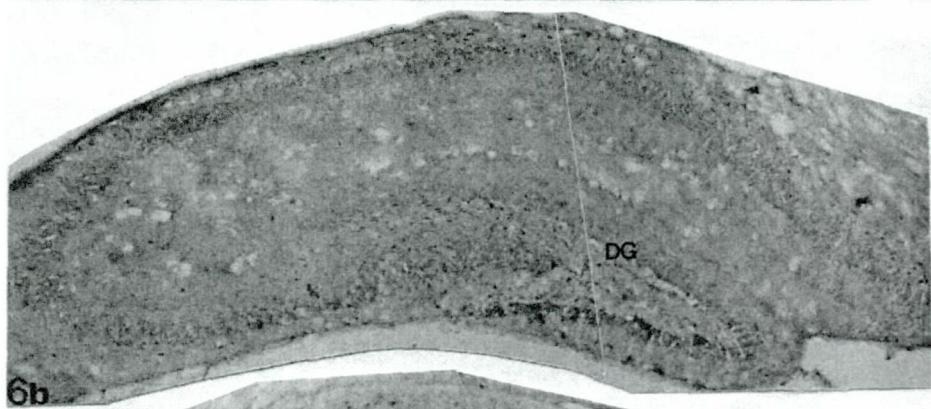
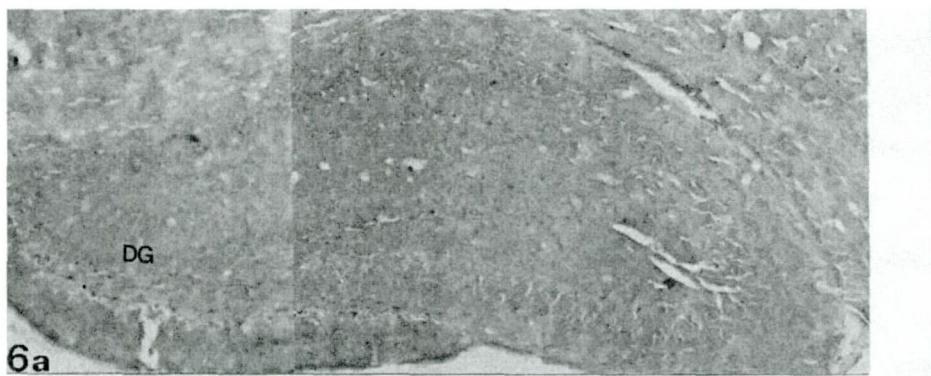
Fig. 5. Photomicrographs of NPY-IR neurons in the cerebral cortex in alcohol group(a), control pair-fed group(b) and alcohol + T4 group(c) at P28. The decrease of the number of NPY-IR neurons was not found in alcohol + T4 group. However, the intensity and number of NPY immunoreactivity was clearly decreased in alcohol group. $\times 100$.

Fig. 6. Photomicrographs of NPY-IR neurons in the hippocampus in alcohol group(a), control pair-fed group(b) and alcohol + T4 group(c) at P7. NPY immunoreactivity was remarkable in dentate gyrus in all groups. The intensity of NPY immunoreactivity was stronger in alcohol + T4 group as compared to the control pair-fed group. $\times 100$.

Fig. 7. Photomicrographs of NPY-IR neurons in the hippocampus in alcohol group(a), control pair-fed group(b) and alcohol + T4 group(c) at P14. The distribution of NPY-IR neurons was similar to its previous age pattern in all groups. However, in alcohol + T4 group, NPY immunoreactivity was prominent appeared in CA2 and CA3 as compared to the control pair-fed group. $\times 100$.





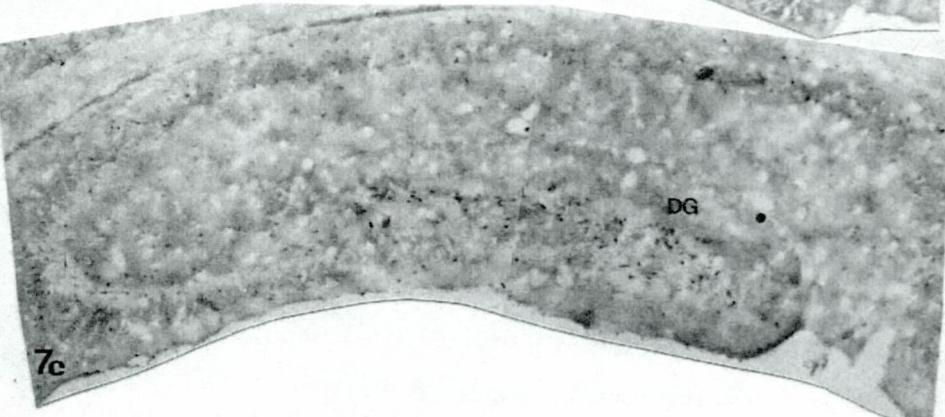




7a



7b



7c