

2004년 8월

석사학위논문

태아알코올효과를 가진 흰쥐
솔기핵에서 serotonin 함유
신경세포의 생후 발달에 미치는
thyroxine의 효과

 조선대학교



100284543 2004-10-15

조선대학교 대학원

의 학 과

김 주 수

태아알코올효과를 가진 흰쥐
솔기핵에서 serotonin 함유
신경세포의 생후 발달에 미치는
thyroxine의 효과

The effect of exogenous thyroxine on the postnatal
development of serotonin-containing neuron in the
rat raphe nuclei in fetal alcohol effects

2004년 8 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 주 수

태아알코올효과를 가진 흰쥐
솔기핵에서 serotonin 함유
신경세포의 생후 발달에 미치는
thyroxine의 효과

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 주 수

김주수의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선 대학교 교수 김 종중 

위 원 조선 대학교 교수 문 광석 

위 원 조선 대학교 교수 장 윤영 

2004년 5월 일

조선 대학교 대학원

목 차

도 목 차

ABSTRACT

서	론	1
실험	재료 및 방법	4
결	과	7
고	찰	10
결	론	14
참	고 문 헌	16
Explanation of	Figures	19
Figures		21

도 목 차

Table 1. Blood ethanol and thyroxine levels -----	9
Fig. 1. Photomicrographs of serotonin(5-HT)-containing neurons in the raphe nuclei in alcohol group, control pair-fed group and alcohol + T ₄ group at P0 -----	21
Fig. 2. Photomicrographs of serotonin(5-HT)-containing neurons in the raphe nuclei in alcohol group, control pair-fed group and alcohol + T ₄ group at P7 -----	21
Fig. 3. Photomicrographs of serotonin(5-HT)-containing neurons in the raphe nuclei in alcohol group, control pair-fed group and alcohol + T ₄ group at P14 -----	21
Fig. 4. Photomicrographs of serotonin(5-HT)-containing neurons in the raphe nuclei in alcohol group, control pair-fed group and alcohol + T ₄ group at P21 -----	22
Fig. 5. Photomicrographs of serotonin(5-HT)-containing neurons in the raphe nuclei in alcohol group, control pair-fed group and alcohol + T ₄ group at P28 -----	22

ABSTRACT

The effect of exogenous thyroxine on the postnatal development of serotonin-containing neuron in the rat raphe nuclei in fetal alcohol effects

Kim, Ju-Soo

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

Department of Medicine

Graduate School of 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 treatment with thyroxine(T_4) on the postnatal development of serotonin-containing neuron with fetal alcohol effects in the rat raphe were investigated via 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.

Heavily-labelled serotonin-immunoreactive neurons increased in number from P7 in control pair-fed group. In contrast, serotonin-immunoreactive neurons appeared weakly in alcohol-exposed pups compared to control pair-fed and alcohol + T₄-exposed pups. The expression of serotonin immunoreactivity decreased according to increasing postnatal ages in alcohol-exposed pups. However, in alcohol + T₄ group, the numbers and intensity of serotonin-immunoreactive neurons increased in contrast to the same ages of alcoholic group at all ages. Based on these results, it can be suggested that exogenous T₄ treatment during developmental ethanol exposure may be related to the increase of serotonin synthesis during postnatal development of raphe nuclei.

서 론

serotonin(5-hydroxytryptamine, 5-HT)은 포유동물의 중추신경계에서 중요한 신경전달물질(신경조절인자)이며(Graeff, 1997) 뇌에서 감정, 인지, 운동기능, 분위기뿐만 아니라 수면, 식욕, 생식활동을 포함한 신경내분비와 광주기 등을 조절한다(Coccaro 등, 1990). Serotonin 전달의 불균형은 우울증과 불안, 불면증과 식욕부진을 포함한 여러 가지 비기능성의 원인이 된다고 알려져 있다(Zhou 등, 2001). 대부분의 serotonin함유 신경세포체가 중간뇌 솔기핵에 위치하지만 뇌 전체에 넓게 존재하기도 한다. 특히 serotonin함유 신경세포체가 위치하는 가장 큰 집단은 꼬리쪽 중간뇌의 등쪽 솔기핵과 가운데 솔기핵인데 이 핵의 신경세포체들은 시상, 시상하부, 바닥핵, 바닥쪽 앞뇌 및 대뇌겉질 전체에 걸쳐 널리 투사한다(Jacobs와 Azmitia, 1992).

알코올 남용은 일반적으로 태아시기와 청소년시기동안에 뇌 발달을 방해하여 뇌의 여러 부분에서 신경세포 손실을 유발하고 발달하는 흰쥐 뇌에서는 고사성(apoptotic) 신경퇴행을 유도한다고 보고되었다(Jang, 2002). 특히 태아 알코올중후군은 학습과 기억장애, 지능저하, 집중력 장애, 정신발육지연과 같은 중추신경계통의 이상을 나타낼 뿐만 아니라 임부의 알코올 섭취가 얼굴기형, 비정상적인 활동항진, 근육긴장도 변화, 및 면역계통의 이상 등을 유발시킬 수 있는 것으로 보고되었다(Abel, 1995). 또한 배아발생과정 중에 알코올에 노출되면 태아의 대뇌에서 포도당과 산소 이용이 감소하여 대뇌 허혈 상태를 일으켜 대뇌 대사 감소를 초래하여 중추신경계통의 구조와 기능의 붕괴에 의한 이상을 유발한다고 보고하였다(Abel, 1996). 또한 알코올의 지속적인 남용은 흰쥐 뇌 솔기핵에서 serotonin함유 신경세포의 활성화에 영향을 준다는 보고가 있으며(Abel, 1996), 알코올이 태아발생시기 8-15일에 신경관형성에 결함을 발생시켜 등쪽솔기핵에서 serotonin함유 신경세포들이 뚜렷하게 감소한다는 보고가 있었다(Zhou 등, 2001). 그리고 어린 쥐에 알코올을 투여했을 때 serotonin뿐만 아니라 serotonin 합성의 속도제한효소인 tryptophan

hydroxylase(TPH)의 합성을 방해하고(Morzoati 등, 2001; Berggren 등, 2001) 술기핵의 신경아교세포의 발달을 억제하는데 특히 별아교세포의 발달을 억제한다는 보고도 있었다(Nuzhath 등, 2003).

또한 임신 중 알코올을 섭취한 어머니는 혈액 내 thyroxine(T₄) 양이 현저히 감소되었는데 이는 자궁 내 상태를 갑상샘 기능저하 상태로 유도하여 새끼들의 발달에 영향을 미쳐 중추신경계통의 이상을 유발한다고 하였으며 임신 중 알코올에 노출된 어머니뿐만 아니라 태어난 새끼의 혈액 내 T₄양이 모두 감소하였는데 이는 갑상샘의 이상 발생에 기인하는 것으로 생각하고 있다. 갑상샘호르몬은 중추신경계통의 발달과 분화를 촉진시키는데 매우 중요한 역할을 하는데 갑상샘호르몬 결핍에 의해 신경세포의 증식과 이동장애, 말기집 형성장애 및 연접형성 지연 등과 같은 중추신경계통의 형태학적 변화를 초래하기도 한다. 또한 갑상샘호르몬의 투여는 신경영양인자(neurotrophin)와 그 수용체의 발현을 조절하고 성숙 흰쥐에 T₄를 투여한 결과 신경성장인자(Nerve growth factor)와 신경영양인자(neurotrophin-3)의 발현이 증가하고(Nuzhath 등, 2003), 흰쥐의 해마에서 serotonin 수용체를 포함한 전달자(transmitter) 결합수용체를 증가시킨다고 보고되었다(Thomas 등, 2002). 그리고 알코올과 T₄를 동시에 투여한 어머니에서 태어난 어린 쥐의 소뇌 조롱박세포를 전자현미경으로 관찰한 결과 리보소체, 닛슬소체로 구성된 형질내세망 및 골지장치기 알코올 군에서 태어난 어린 쥐들에 비해 증가하였다는 보고(Nathaniel 등, 1999) 등이 있었다.

따라서 본 연구는 발생과정 중 뇌 발생의 결정적 시기에 알코올을 남용하는 모체에서 태아 알코올효과를 가지고 태어난 어린 쥐의 뇌와 같은 시기에 알코올을 섭취했다라도 적절한 양의 T₄를 모체에서 투여 받고 태어난 후손의 뇌에서 serotonin함유 신경세포의 생후 성장과 발달에 미치는 영향에 대해 관찰하였다. 본 연구의 목적은 정상적으로 영양이 양호한 상태에서 태어난 흰쥐 뇌와 위의 두 군에서 태어난 흰쥐 뇌에서 면역조직화학적 방법을 이용하여 serotonin함유 신경세포의 분포 양상을 생후 0. 7. 14. 21. 28일에서 각각

비교 분석하여 알코올에 의한 serotonin 함유 신경세포의 감소와 태아알코올 효과에 미치는 T₄의 영향을 관찰하고자 하는데 있다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물과 실험군

체중 200~250 g의 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐 24 마리를 숫컷과 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 35칼로리 알코올을 매일 섭취하게 하고 T₄ 투여 효과를 위해 L-Thyroxine sodium salt (Sigma)를 0.9 % NaCl 용액에 녹여 매일 5 µg/kg을 임신 어미의 목 뒷부분에 피하 주사하여 alcohol + T₄ 군으로 하였다. 이와 같은 식이와 처치는 임신 6 일째부터 시작하여 모든 임신 어미들이 그 새끼들을 분만할 때까지 계속 하였다. 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 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 통계 처리하였다(Table 1).

2. 조직처리

각각의 군과 각각의 한 어미로부터 태어난 어린 쥐를 생후 0, 7, 14, 21, 28

일(P0, P7, P14, P21, P28) 에 희생시켰다. 각 군에서 각 연령별로 2 마리씩을 pentobarbital sodium(60 mg/kg)을 복막안에 주사하고, 어린 쥐는 에테르로 마취시킨 후 가슴안을 열고 원심실에 관류용 도관을 삽입한 후, heparin(250 unit/ml)을 함유한 생리식염수로 관류세척하고 0.1 M phosphate buffer(PB, pH 7.4)에 녹인 4 % paraformaldehyde 용액이나 Zamboni 고정액으로 관류고정한 다음 뇌를 적출하여 동일한 고정액에 담가 4 °C에서 12 시간 후고정하였다. Free-floating 방법으로 면역조직화학염색을 시행하기 위해 고정된 뇌 조직은 후고정한 다음에 30 % sucrose용액에 넣고 24 시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 동결절편기를 이용해 35 μ m 두께의 연속가로 동결절편을 제작하여 저장용액에 담아 4 °C에 보관하였다.

3. 면역조직화학염색

저장액에 보관한 조직절편을 매 5 장마다 1 장씩을 취하여 0.1 M PB로 옮겨서 수차례 수세한 후 과산화수소(H_2O_2)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 1 시간 반응시켰다. 1차 항체는 rabbit anti-serotonin(1:1000, Biogenesis)을 사용하였으며, 4 °C에서 24~48 시간 동안 진동시키면서 반응시켰다. 그 후 0.1 M PB로 10 분씩 3 회 수세 과정을 거쳤으며, 2 차 항체는 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector, 1:200)를 실온에서 1 시간 반응시킨 후, 0.1 M PB로 10 분씩 3 회 수세하였다. 그리고 peroxidase가 표지된 avidin-biotin complex(ABC, Vector)를 1:100으로 희석하여 실온에서 1 시간 가량 반응시킨 후, 0.1 M PB로 10 분간 다시 3 회 수세하고 나서 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, Sigma)를 tris-buffered saline(TBS)에 녹여 기질용액으로 사용하였는데 반응 직전에 H_2O_2 를 0.003 %가 되도록 첨가하였으며, 실온에서 5~10 분간 반응시킨 후

현미경하에서 발색 정도를 확인하였다. 그 후 TBS로 2~3회 세척한 후 염색한 조직절편들을 젤라틴이 피막된 슬라이드에 부착하여 실온에서 12 시간 이상 건조한 다음, 통상의 조직처리 과정을 거쳐 polymount(Polyscience)로 봉입하여 광학현미경으로 비교 관찰하였다.

결 과

1. 혈중 알코올과 thyroxine 농도

A, B, C 군의 어미가 새끼를 분만한지 6 시간 정도 지난 후 심장천자를 해서 얻은 혈액샘플은 녹십자에 보내어 전혈(whole blood)에서 알코올 농도를, 혈청에서 thyroxine의 양을 측정하여 결과를 얻었다. 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 군을 비교해 보고자 분산 분석 후 사후검정하였더니 B 군에 비해 A와 C 군의 알코올 농도가 각각 유의한 차이가 있었으며 C 군의 thyroxine 양이 A 군에 비해 유의하게 높았다(Table 1).

2. serotonin-함유 신경세포의 분포

1) control pair-fed 군 (정상군)

Serotonin함유 신경세포는 중간뇌의 등쪽 솔기핵과 가운데 솔기핵 안에서 집중적으로 관찰할 수 있었으며 가쪽 솔기핵에서는 적은수의 양성세포들을 확인할 수 있었다. Serotonin함유 신경세포는 P0, 7, 14, 21, 28 일 모두에서 관찰할 수 있었고 P7에 가장 많은 수의 양성 세포들이 분포하였으며 성숙한 수준의 양상을 띠었다(Fig. 2B). P14 부터 연령이 증가함에 따라 양성세포들의 수와 분포는 크게 변화가 없었다(Fig. 1~5B). P7의 경우 P0에 비해 serotonin함유 신경세포의 염색강도 및 양성반응 세포 수가 현저히 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 1B, 2B).

2) Alcohol 군

Alcohol 군에서 serotonin함유 세포의 염색강도는 모든 연령에서 정상 군에

비해 미약하게 염색되었으며 특히 등쪽 솔기핵에서 비교한 결과 염색 강도 및 염색된 세포체의 수가 현저히 감소하는 양상을 관찰하였다. 그리고 세포체 형태도 뚜렷하지 않고 작았으며 등쪽 솔기핵 전체에 드물고 성긴 모양으로 분포하였다(Fig. 1~5A). 또한 alcohol 군은 연령이 증가함에 따라 양성반응 세포의 수나 염색 강도가 증가하는 양상을 나타내지 않았으며 성숙형태의 분포 양상을 보이지 않았다.

3) alcohol + T₄군

Alcohol + T₄ 군에서 serotonin함유 신경세포를 등쪽 솔기핵에서 관찰한 결과, 정상 군과 비교했을 때 serotonin함유 신경세포들이 비슷한 형태로 발달됨을 관찰할 수 있었으며 P0에서는 정상 군에 비해 훨씬 많은 숫자의 serotonin함유 신경세포들이 나타났다(Fig. 1C). 정상 군과 마찬가지로 P7의 경우 P0에 비해 serotonin함유 신경세포의 염색강도가 두드러지게 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 2C). P7 이후 성장 동안에는 뚜렷한 증가 양상은 보이지 않았으나 P14 이후부터는 비슷한 분포로 나타나 P7과 유사한 성숙한 형태를 띠었다. Alcohol + T₄ 군에서 P7과 P14의 serotonin함유 신경세포체들은 정상 군보다 훨씬 뚜렷하고 더 큰 크기를 가지고 있었고 alcohol 군과 비교해 보면 모든 연령에서 serotonin함유 신경세포의 염색강도 뿐 아니라 세포체의 수가 현저히 증가하였다(Fig. 1~5C).

Table 1. Blood ethanol and thyroxine levels

	Alcohol-fed group	Control pair-fed group	Alcohol + T ₄ group
Blood	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 $x \pm SD$ % for alcohol and $x \pm SD$ $\mu\text{g/dL}$ for thyroxine. *, + indicate significance at the $p < 0.05$ level determined by Post Hoc test after ANOVA.

고찰

현재 임부의 알코올 남용이 그 후손에 정신발육지연을 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).

알코올에 노출된 배아발생 15 일의 뇌에서 가운데 솔기핵이 여전히 열려있는 불완전한 신경관 형성이 유도되어(Zhou 등, 2001) 이 부위에서 serotonin 함유 신경세포의 생성이 저해되고 serotonin 신경섬유도 정상 군에 비해서 두드러지게 낮게 나타났다고 보고하였다(Nuzhath 등, 2003). 또한 여러 연구에서 알코올은 in vivo에서 발생 중인 흰쥐 뇌에서 고사에 의한 세포사(cell death)를 유도하여(Ikonomidou 등, 2000) serotonin 신경세포체계의 이상기능을 일으킨다고 보고하였다(Tajuddin, 1999). Serotonin는 배아발생 11~13 일에 처음으로 나타나고 생성된 serotonin는 중간뇌의 솔기핵에 주로 분포되어 있고 뇌 전체에 널리 퍼져 있다는 보고가 있지만(Jacobs와 Azmitia, 1992) 본 실험에서는 배아시기에는 관찰하지 않았으며 생후 첫 한 달 동안의 변화를 주별로 솔기핵에서 관찰하였다. 본 연구에서는 알코올을 지속적으로 섭취한 모체에서 태어난 어린 쥐들의 뇌에 분포하는 serotonin함유 신경세포가 정상 군에 비해 감소함을 확인하였으며 정상 군보다 alcohol 군에서 나타난 serotonin의 낮은 발현은 알코올로 인해 serotonin의 활성이 방해받는다는 것을 알 수 있었다. 이러한 알코올 노출에 의한 serotonin의 활성 저하는 중추 신경계통의 serotonin 신경체계의 이상을 유발하여 우울증, 감정이상과 연관

된 질병을 유발할 수 있을 것이다.

한편 갑상샘호르몬이 중추신경계의 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(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 하였다(Mohamed 등, 1987a, b). 갑상샘호르몬은 발생 중에 매우 중요한 역할을 하는데 갑상샘호르몬 결핍에 의해 신경세포의 증식과 이동 장애, 말이집 형성 장애 및 연접형성 지연 등과 같은 중추신경계통의 형태학적 변화를 초래하기도 한다(Rami 등, 1986; Rami와 Rabie, 1990). 또한 갑상샘호르몬은 신경영양인자(neurotrophin, NT)와 그 수용체의 발현을 조절할 뿐 아니라 성숙 흰쥐에 thyroxine을 투여하였더니 뇌의 여러 부위에서 신경영양인자의 발현이 증가하였다는 보고도 있다(Giordano 등, 1992). 그리고 갑상샘호르몬은 serotonin 수용체인 serotonin^{1A}를 증가시키고 치아이랑, 해마의 CA3, CA1 에서 serotonin의 신경세포 수를 증가시킨다는 보고(Thomas 등, 2002)가 있었지만 중간뇌 슬기핵에서 serotonin과의 직접적인 연관성에 관한 보고는 드문 실정이다. Serotonin^{1A} 길항제를 모체에 투여하면 새끼 쥐에서 발달하는 serotonin과 신경아교세포 영양인자인 S100 β 가 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 thyroxine을 매일 투여하여 태어난 어린 쥐의 뇌에서 serotonin 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 알코올

에 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 해당하며 대부분의 신경세포들이 생후 21 일경에 성숙수준에 도달한다는 보고 등(Mohmed 등, 1987 a, b)에 기인하여 출생한 날부터 1 주일 간격으로 생후 4 주까지 serotonin 함유 신경세포의 성숙양상을 형태학적으로 관찰하였다.

그리고 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 키뿐만 아니라 뇌와 소뇌의 성장을 촉진시켰으며, 성체 흰쥐에 15 µg/kg/day의 T₄를 투여한 경우 좌상 후 척수 뒤뿌리의 신경재생과 말이집 형성을 촉진시켰다고 하였다(Nathaniel 등, 1983; 1988). 따라서 어미와 발생 중인 태자의 갑상샘의 기능을 향진시키지 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 B 군보다 높게 측정되어 개체마다 같은 양을 투여했다더라도 thyroxine 양에 차이가 있을 것이라 생각되며 thyroxine 양과 투여시기를 서로 다르게 해서 비교해 보는 것도 필요할 것이라 생각된다.

따라서 본 연구에서는 태아발생기에 중요한 기능을 하는 T₄를 이용하여 serotonin함유 신경세포의 감소를 막을 수 있을지 확인하고자 하였는데 실제로 T₄와 알코올을 같이 투여한 군의 serotonin함유 신경세포 분포를 보면 P0에는 정상 군보다도 더 많은 세포체들이 관찰되었는데 이는 어린 쥐에 T₄를

투여했을 때 신경인자 등을 증가시킨다는 Daniele 등(2003)의 보고와 유사하였다. Alcohol + T₄ 군에서 P7과 P14의 serotonin함유 신경세포들은 정상 군보다 훨씬 뚜렷하고 더 큰 크기를 가지고 있었고 alcohol 군과 비교해 보면 모든 연령에서 serotonin함유 신경세포의 염색강도 뿐 아니라 세포체의 수가 현저히 증가하였다. 이는 모체의 알코올 섭취로 인한 갑상샘호르몬 부족때문에 태자에 미치는 유해한 영향을 T₄의 처리로 인해 완화시킬 수 있을 것으로 생각할 수 있다.

한편 알코올에 노출된 새끼의 솔기핵에서 별아교세포와 S100β함유 신경아교세포가 확연하게 감소하는데 이는 serotonin이 감소하는 유사한 위치에서 감소한다는 보고가 있었는데 serotonin함유 신경세포의 감소는 GFAP함유 별아교세포와 S100β함유 신경아교세포의 감소와 병행하며 이는 다른 중추신경계통 신경세포의 발달에도 영향을 줄 것이라고 하였다(Eriksen 등, 2000; Zhou 등, 2001). 따라서 알코올에 의한 GFAP와 S100β의 감소에 의해 serotonin함유 신경세포의 감소가 나타나는 것으로 생각하고 있다. 본 실험에서는 GFAP와 S100β의 감소를 확인하지 못했지만 중간뇌 솔기핵의 신경세포들에서 알코올로 인해 serotonin의 발현이 현저히 감소함을 확인하였다. 또한 모체의 알코올 섭취에 의해 태어나는 후손의 뇌에서 serotonin 신경세포체계가 비정상적으로 발달되는데 이는 T₄에 의해 알코올의 독성이 억제되어 거의 정상적인 생후 발달이 유도된다는 것을 추측할 수 있었다.

따라서 이 결과는 흰쥐 솔기핵에서 T₄가 알코올에 의한 비정상적인 serotonin 신경세포체계의 발달에 영향을 주어 serotonin 함유 신경세포의 감소를 방지한다는 것을 시사하였다. 또한 임신한 모체의 음주로 인해 갑상샘호르몬이 감소하여 발생하는 중추신경계통의 이상을 T₄ 투여로 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

Serotonin은 포유동물의 중추신경계에서 중요한 신경조절인자이며 다양한 신경정신학적 질환의 병인과 관련이 있으며 감정, 인지, 내분비 기능, 운동 기능 및 통증 등을 조절한다.

본 연구에서는 발생과정 중 뇌 발생의 결정적 시기에 알코올을 남용하는 모체에서 태아 알코올효과를 가지고 태어난 어린 쥐의 중간뇌 슬기핵과 같은 시기에 알코올을 섭취했다라도 적절한 양의 T_4 를 모체에 투여하여 태어난 후 손의 중간뇌 슬기핵에서 serotonin함유 신경세포의 생후 성장과 발달에 미치는 영향에 대해 면역조직화학적 방법을 이용하여 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 + 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 1 마리씩 총 4 마리를 0, 7, 14, 21, 28 일에 희생시켜 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

본 연구 결과, 정상 군에서는 생후 7 일부터 serotonin함유 신경세포의 수와 염색강도가 증가하였으나 알코올 군에서는 정상 군과 알코올+ T_4 군에 비해 약하게 염색되었다. 알코올 군에서 serotonin면역반응은 생후 연령이 증가함에 따라 감소하였으나 알코올+ T_4 군에서는 serotonin함유 신경세포의 수와 염색 강도가 모든 연령에서 알코올 군의 같은 연령과 비교한 결과 증가함을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 임신 중 알코올 남용을 하는 모체에 지속적인 thyroxine 처치가 알코올에 의한 비정상적인 serotonin 신경세포체계의 발달

에 영향을 주어 serotonin함유 신경세포의 감소를 방지한다는 것을 알 수 있었다. 또한 모체 thyroxine 투여에 의해 알코올에 노출된 후손의 슬기핵에서 serotonin함유 신경세포가 거의 정상적인 생후 발달이 유도되며 임신한 모체의 음주로 인해 갑상샘호르몬이 감소하여 발생하는 중추신경계통의 이상을 T₄ 투여로 개선시킬 수 있을 것임을 시사하였다.

참 고 문 헌

- Abel E.L.. "Alcohol-induced changes in blood gases, glucose, and lactate in pregnant and nonpregnant rats." *Alcohol* **13**:281-285, 1996.
- Abel E.L., Hannigan J.H.. "Maternal risk factors in fetal alcohol syndrome: provocative and permissive influences." *Neurotoxicol Teratol* **17**:445-462, 1995
- Barbara L., Silke D., Heidrun F.. "Acute effect of ethanol on anxiety and 5-HT in the prefrontal cortex of rats." *Alcohol* **27**:135-141, 2002.
- Berggren U., Eriksson M., et al.. "Relationship between central serotonergic neurotransmission and reduction in alcohol intake by citalopram." *Drug Alcohol Depend.*, **63**:263-267, 2001.
- Coccaro E.F., Murphy D.L.. "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 neurotrophoc factor mRNA expression and protein amount in the rat medial septum/diagonal band of Brocal." *Neuroscience Letters* **350**:141-144, 2003.
- Giordano T., Pan J.B., Casuto D., Watanabe S., Arneric S.P.. "Thyroid hormone regulation of NGF, NT-3 and BDNF RNA in the adult rat ain." *Brain Res. Mol. Brain Res.* **16**:239-245, 1992.
- Graeff F.G.. "Serotonergic systems." *Psychiatr. Clin. North Am.* **20**:723-739, 1997.
- Hankin J.R.. "FAS prevention strategies." *Alcohol Health Res World* **18**:62-69, 1994.
- Hannigan J.H., Bellasario R.E.. "Lower serum thyroxine levels in rats following prenatal exposure to ethanol." *Alcohol Clin. Exp. Res.*

14:456-460, 1990

- Ikonomidou C., Bittigau P., Ishimaru M.J., Wozniak D.F., Koch C.. "Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome." *Science* 287:1056-1060, 2000.
- Jacobs B.L. and Azmitia E.C.. "Structure and function of the brain serotonin system." *Physiol Rev.* 72:165-229 1992.
- Jang M.H., Shin M.C.. *et al.* "Alcohol and nicotine administration inhibits serotonin synthesis and tryptophan hydroxylase expression in dorsal and median raphe of young rats." *Neuroscience Letters* 329:141-144, 2002.
- Mohamed S.A., Nathaniel E.J.H., Nathaniel D.R., Snell L.. "Altered purkinje cell maturation in rats exposed prenatally to ethanol-I. cytology." *Exp Neurol* 97:35-52, 1987a.
- Mohamed S.A., Nathaniel E.J.H., Nathaniel D.R., Snell L.. "Altered purkinje cell maturation in rats exposed prenatally to ethanol-II. synaptology." *Exp Neurol.* 97:53-69, 1987b.
- Morzoati S. L., Johnson T.B. *et al.* "Serotonergic neuronal activity in the dorsal raphe nucleus of selectively bred alcohol preferring and alcohol nonpreferring rats and unselected Wister rats." *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23:1362-1367, 1999.
- Nathaniel E.J.H., Nathaniel D.R., Mohamed S.A., Nahnybida L., Nathaniel L.. "Growth patterns of rat body, brain and cerebellum in fetal alcohol syndrome." *Exp. Neurol.* 93:610-620, 1986.
- Nathaniel E.J.H., Hassard T., Burton L., Novak C.. "Effect of exogenous thytoxine on the development of the purkinge cell in fetal alcohol effects in the rat". *Exp. Mol. Pathology* 67:175-191, 1999.
- Nuzhath F.T., Luisa A.O. Jason L.E., Mary J.D.. "Effects of ethanol and

- ipsapirone on the development of midline raphe glial cells and astrocytes." *Alcohol* **29**: 157-164, 2003.
- Rami A., Patel A.J., 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.
- 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.
- Tajuddin N.F. and Druse M.J.. "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 Z.A., Herbert S.. "Transient postnatal thytoxine treatment leads to variation in transmitter binding site densities in the hippocampus of rats." *Neuroscience Letters* **333**:21-21, 2002.
- Tork I.. "Anatomy of the serotonergic system." *Ann. NY. Acad. Sci.* **600**:9-35, 1990.
- Zhou F.C., Sari Y., Zhang J.K., Goodlett C.R., Li T.-K.. "Prenatal alcohol exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice." *Brain Res. Del.* **126**:147-155, 2001.

Explanation of Figures

Fig. 1. Photomicrographs of serotonin-containing neurons in the dorsal raphe nuclei in alcohol group(A), control pair-fed group(B) and alcohol + T₄ group(C) at P0. The serotonin-containing neurons were present in the dorsal raphe nuclei of pups of all groups. The intensity of serotonin immunoreactivity was most prominent in alcohol + T₄ group compared to the other two groups. ×100.

Fig. 2. Photomicrographs of serotonin-containing neurons in the dorsal raphe nuclei in alcohol group(A), control pair-fed group(B) and alcohol + T₄ group(C) at P7. Mature patterns and increased intensities of serotonin-containing neurons appeared in control pair-fed and alcohol + T₄ group. ×100.

Fig. 3. Photomicrographs of serotonin-containing neurons in the dorsal raphe nuclei in alcohol 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. The expression of serotonin immunoreactivity decreased during the postnatal development of the raphe nuclei in pups with fetal alcohol effects compared to the other two groups. ×100.

Fig. 4. Photomicrographs of serotonin-containing neurons in the dorsal raphe nuclei in alcohol group(A), control pair-fed group(B) and alcohol + T₄ group(C) at P21. The intensity of serotonin immunoreactivity was less prominent in alcohol group. ×100.

Fig. 5. Photomicrographs of serotonin-containing neurons in the dorsal raphe nuclei in alcohol group(A), control pair-fed group(B) and alcohol + T₄ group(C) at P28. The patterns of distribution of serotonin-containing neurons were similar between control pair-fed and alcohol + T₄ group. However, the expression of serotonin immunoreactivity was the least prominent in alcohol group among the three groups. ×100.

