[UCI]I804:24011-200000231712

2006년 2월

석사학위논문

모체 Thyroxine투여가 태아알코올효과를 가진 흰쥐 대뇌겉질 및 해마의 생후 발달에 따른 BDNF함유 신경세포와 BDNF 단백질 양에 미치는 영향

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

현 영 식

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY
100358002 2006-10-18

모체 Thyroxine 투여가 태아알코올효과를 가진 흰쥐 대뇌겉질 및 해마의 생후 발달에 따른 BDNF함유 신경세포와 BDNF 단백질 양에 미치는 영향

Effect of maternal thyroxine treatment on the postnatal development of brain-derived neurotrophic factor-containing neuron and protein amount in fetal alcohol effects in the rat cerebral cortex and hippocampus

2006년 2 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

현 영 식

모체 Thyroxine 투여가 태아알코올효과를 가진 흰쥐 대뇌겉질 및 해마의 생후 발달에 따른 BDNF함유 신경세포와 BDNF 단백질 양에 미치는 영향

지 도 교 수 정 윤 영

이 논문을 의학석사학위 신청 논문으로 제출함.

2005년 10월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

현 영 식

현영식의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 종 중

위 원 조선대학교 교수 문 정 석

위 원 조선대학교 부교수 정 윤 영

2005년 11월 28일

조 선 대 학 교 대 학 원

목 차

표 목 차

도 목 차

ABSTRACT

1. 서 론 ———— 1

2. 실험재료 및 방법 ———— 4

3. 결 과 ———— 8

4. 고 찰 ———— 13

5. 결 론 ———— 19

참고문헌 ———— 21

Explanation of Figures ———— 27

Figures ———— 29

표 목 차

Table 1. Blood ethanol and thyroxine levels ---------- 11

도 목 차

Fig. 1. BDNF protein was measured by ELISA assay in postnatal days 0, 7, 14, 21, 28 ---------- 12

Fig. 2. BDNF immunoreactivity in the cerebral cortex in alcohol-fed group, control pair-fed group and alcohol + T_4 group at P0, P7 and P14--------- 29

Fig. 3. BDNF immunoreactivity in the hippocampus in alcohol-fed group at P7, control pair-fed group at P0 and alcohol + T_4 group at P0 and 7 --------- 30

Fig. 4. BDNF immunoreactivity in the CA3 of hippocampus in alcohol-fed group, control pair-fed group and alcohol + T_4 group at P7---------- 30

Fig. 5. BDNF immunoreactivity in the CA3 of anterior level of hippocampus in alcohol-fed group(A), control pair-fed group(B) and alcohol + T_4 group(C) at P21 ---------- 30

Fig. 6. BDNF immunoreactivity in the hippocampus in alcohol-fed group, control pair-fed group and alcohol + T_4 group at P14 ---------- 31

Fig. 7. BDNF immunoreactivity in the CA2 of hippocampus in alcohol + T_4 groupat P7 and alcohol-fed group at P14 ---------- 31

Fig. 8. BDNF immunoreactivity in the CA1 and dentate gyrus of hippocampus in alcohol-fed group at P14, control pair-fed group at P28 and alcohol + T_4 group at P28 ---------- 31

ABSTRACT

Effect of maternal thyroxine treatment on the postnatal development of brain-derived neurotrophic factor-containing neuron and protein amount in fetal alcohol effects in the rat cerebral cortex and hippocampus

Hyun, Young-Sig
Advisor: Prof. Chung, Yoon-Young, M.D., Ph.D.
Department of Medicine,
Graduate School of 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 malnutrition. Especially, continuous maternal alcohol consumption during critical period of brain development may induce fetal alcohol effects . In this study, the author investigated not only the effects of maternal alcohol drinking on the postnatal changes of BDNF protein contents and patterns of BDNF-containing neuron but also the influence of maternal thyroxine treatment on the postnatal development of BDNF expression in 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 μg/kg/day) subcutaneously. After the pups were born, the pups of each were fostered by surrogate mother. The amount of BDNF was significantly higher in the alcohol + T_4 group as compared to the alcohol-fed group at P7, P14 and P21. Especially, alcohol + T_4-exposed pups showed a significant increase of BDNF amount at P7. In alcohol + T_4 group, the amount of BDNF was higher than control pair-fed group, in addition, the decrease of BDNF amount was found in alcohol-fed group compared to control pair-fed group at all ages. Alcohol + T_4 group showed mature pattern and numerical increase of BDNF-containing cell in cerebral cortex at P7. In hippocampus, the number and immunoreactivity of BDNF-containing cell in alcohol + T_4 group increased at P7, and began to decrease at P14. However, in alcohol + T_4 group, the BDNF immunoreactivity in hippocampus continued to show prominent configuration until P28. This study clearly showed the increase of the BDNF-containing neurons and BDNF amount in pups of thyroxine-supplemented alcohol-exposed dams compared to alcohol-exposed pups at P7. These results suggest that maternal thyroxine treatment may induced the early stimulatory effect of BDNF synthesis during the postnatal development of cerebral cortex and hippocampus in fetal alcohol effects.

서 론

만성적인 음주를 하는 여성에서 태어난 영아는 성장과 형태발생에 변화를 초래하는 태아알코올증후군(fetal alcohol syndrome)에 대한 감수성이 매우 높다(Jones와 Smith, 1973). 태아알코올증후군은 학습과 기억장애, 지능저하, 집중력장애, 정신발육지연(mental retardation), 심한 경우 작은머리증(microcephaly) 등과 같은 중추신경계통의 이상을 나타낼 뿐만 아니라 임부의 알코올 섭취가 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 대뇌에서 포도당과 산소 이용이 감소하여 대뇌 허혈 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).

Rosenbloom 등(1995)은 만성알코올 중독자를 부검하여 육안적 구조 변화가 있음을 관찰하였고 CT와 MRI를 통해서 이를 증명하였다. 특히 알코올 중독과 소뇌와는 밀접한 연관이 있어 자세의 균형과 운동작용의 조절 및 인지력 등에 지장을 받게 된다(Sullivan 등, 1995). 알코올에 의한 소뇌의 변성은 소뇌벌레의 앞상부에서 처음 관찰되었는데, 흥미로운 것은 정상적인 노화에 의한 변성은 소뇌 뒤소엽에서 주로 나타나고 소뇌벌레의 위축은 일어나지 않지만 알코올 남용에 의한 경우는 소뇌벌레 위축과 함께 앞과 위소엽에 변화가 나타나는 것으로 보고되어 있다(Victor 등, 1989; Raz 등, 1992; Karhunen 등, 1994). Nathaniel 등(1986a, b)은 임신 6일에서 분만할 때까지 알코올을 섭취한 흰쥐 어미에서 태어난 그 새끼들의 몸통과 뇌 및 소뇌 성장 감소와 소뇌 조롱박세포의 발달과 성숙 지연 및 연접이상 등을 보고하였고, Goodlett 등(1990)은 출생전 알코올에 노출된 흰쥐 새끼들의 조롱박세포 수가 현저히 감소하였다고 보고하였다.

또한 임신 중 알코올을 섭취한 어미는 혈액 내 thyroxine양이 현저히 감소되었는데 이는 자궁 내 상태를 갑상샘기능저하 상태로 유도하여 새끼들의 발달에 영향을 미쳐 중추신경계통의 이상을 유발한다고 하였으며(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 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 neurotrophin(NT)과 그 수용체의 발현을 조절하고 성숙 흰쥐에 thyroxine을 투여하였더니 뇌의 여러 부위에서 nerve growth factor(NGF)와 neurotrophin-3(NT-3) mRNA 발현이 증가하였다는 보고도 있다(Giordano 등, 1992).

신경세포발생기 동안의 알코올 노출은 정상적인 신경영양인자(neurotrophic factor) 간의 상호관계를 붕괴시킬 수도 있다. 신경영양인자는 발생 중인 중추신경계통에서 신경세포의 생존, 분화 및 증식을 조절하며 성장 중인 신경세포의 기능을 유지하는데 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 중추신경계통 전체에 걸쳐 광범위하게 발현되는데 특히 해마구성체(hippocampal formation), 대뇌겉질 및 편도복합체(amygdaloid complex) 등에서 많이 발현되며 콜린성 중격핵과 해마의 신경세포 축삭에서 역향성으로 수송되는 것으로 알려져 있다(Hofer 등, 1990; Phillips 등, 1990; Wetmore 등, 1990; Distefano 등, 1992). 또한 BDNF는 출생 후 최고 수준에 도달할 때까지는 발현이 증가되며 (Friedman 등, 1991; Schecterson과 Bothwell, 1992), 연령이 증가함에 따라 크게 감소되지 않아 BDNF가 성숙한 중추신경계통에서도 필수적인 역할을 할 것이라 여겨지고 있다(Lapchack 등, 1993;

Narisawa-Saito와 Nawa, 1996; Katoh-Semba 등, 1997).

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 야기 시킬 수 있는데 특히 태아의 뇌 발생에 예민한 결정적 기간 동안에 며칠씩 지속적으로 음주하는 경우 태아알코올효과를 나타내기 쉽다고 알려져 있다(Hankin, 1994).

따라서 본 연구는 임신 중 음주로 태아알코올효과가 유발된 후손과 지속적인 음주를 하고 있는 임신 흰쥐에 thyroxine을 투여하여 태어난 후손의 대뇌겉질 및 해마에서 BDNF 함유 신경세포의 생후 성장과 발달에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여 정상적으로 영양이 양호한 상태에서 태어난 흰쥐 대뇌겉질 및 해마와 위의 두 군에서 태어난 흰쥐 대뇌겉질 및 해마에서 BDNF 양과 면역조직화학적 방법을 이용한 BDNF 함유 신경세포의 분포 양상을 생후 0, 7, 14, 21, 28 일에서 각각 비교 분석하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물과 실험군

체중 200~250 gm의 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 35 칼로리 알코올을 매일 섭취하게 하고 thyroxine(T_4) 투여 효과를 위해 L-Thyroxine sodium salt (Sigma)를 NaOH 용액에 녹여 매일 5 μg/kg을 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 ℃의 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 통계처리 하였다(Table 1).

2. 조직처리 및 표본제작

한 cage에서 1 마리씩 즉 각 군에서 4 마리씩의 어린 쥐를 생후 0, 7, 14, 21, 28 일(P0, P7, P14, P21, P28)에 희생시켰다. 각 군에서 각 연령별로 2 마리씩은 BDNF 함량의 측정에 사용하기 위하여 마취 후 바로 뇌를 꺼내어 액체질소에 얼려 -70 ℃에 보관하였다. 생후 0 일과 7 일의 실험동물은 에테르로, 나머지 연령의 실험동물은 pentobarbital sodium(60 ㎎/kg, 중외제약)을 복막안에 주사하여 마취시킨 다음 가슴안을 열고 왼심실에 관류용 도관을 삽입한 후, heparin (250 unit/㎖, 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 ℃에서 12 시간 후고정하였다. Free-floating 방법으로 면역조직화학염색을 시행하기 위해 고정된 뇌조직은 후고정 다음에 30 % sucrose에 넣고 24시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 동결절편기를 이용해 35 ㎛ 두께의 연속관상 동결절편을 제작하여 glycerol과 ethylene glycol이 함유된 저장용액에 담아 4 ℃에 보관하였다.

3. Total protein isolation과 BDNF ELISA assay

-70 ℃에 저장된 각 군의 연령별 뇌 중 대뇌겉질 및 해마가 포함된 조직 100 ㎎에 lysis buffer (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 % NP40, 10 % glycerol, 1 mM PMSF, 10 ㎍/㎖ aprotinin, 1 ㎍/㎖ leupeptin, 0.5 mM sodium vanadate) 1 ml을 첨가하여 분쇄하였다. 30 초 동안 얼음에 놓아둔 후 4 ℃에서 15 분 동안 12,000 rpm으로 원심분리한 후 상청액을 분리하였다. 분리된 상청액은 BSA protein assay kit(Pierce, US)를 사용하여 total protein 양을 측정한 후 각 샘플에 동일한 양이 포함되도록 정량하였다. 정량한 total protein 300 ㎍을 본 실험에 사용하였다. BDNF 양은 현재 시판되

고 있는 BDNF E_{max}®ImmunoAssay System (Promega)을 사용하였는데 먼저 BDNF 항체를 carbonate coating buffer에 희석하여 ELISA 96-well plate에 200 ㎕/well을 분배하여 4 ℃에서 overnight 하였다. TBST Wash buffer (20 mM Tris-HCl(pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)로 수세한 다음 standard curve를 얻기 위해서 standard BDNF를 1 x sample buffer에 단계별로 희석하여 준비해 놓은 후 정량한 샘플(300 ㎍)과 함께 각각 200 ㎕/well을 분배하여 실온에서 흔들어주면서 1시간 배양하였다. 다시 수세한 후 2차 항체로는 anti-human BDNF pAb를 1:500으로 희석하여 100 ㎕/well을 분배하여 실온에서 2 시간 배양하고 수세한 후 anti-IgY HRP conjugate를 1:200으로 희석하여 200 ㎕/well을 분배하여 실온에서 1시간 배양하였다. 그 후 TBST Wash buffer로 수세하여 TMB one 용액을 100 ㎕/well 분배하여 10 분간 흔들어주며 반응시켰으며 1 N HCl 100 ㎕/well을 더하여 반응을 정지시킨 후 효소면역 측정기(EIA reader, Biorad, US)를 사용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정한 후 분석하였다. 모든 샘플은 두 번 이상 측정하여 그 평균값을 최종 농도로 정하였다.

4. BDNF 양의 통계처리

Kruskal-Wallis test로 세 군 간의 알코올 농도와 thyroxine 양을 비교하여 P 값을 구한 후 상호 의미 있는 두 군 끼리 비교해 보고자 분산분석(ANOVA) 후 사후검정(Post Hoc test)하였다.

5. 면역조직화학염색

저장용액에 보관한 조직절편 중 대뇌겉질 및 해마가 포함된 절편을 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 % 말혈청 (normal horse serum)을 실온에서 1시간 반응시켰다. 1차 항체는 BDNF 항혈청(1:500, Chemicon)을 사용하였으며, 4 ℃에서 24~48 시간 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 1 시간 반응시킨 후, 0.1 M PB로 10분씩 3회 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 3회 수세하고 나서 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma)를 tris-buffered saline (TBS)에 녹여 기질용액으로 사용하였는데 반응 직전에 H_2O_2를 0.003 %가 되도록 첨가하였으며, 실온에서 5-10 분간 반응시킨 후 현미경하에서 발색 정도를 확인하였다. 또한 흑색을 띄는 nickel chloride를 DAB에 용해시켜 여과하고 0.003 % H_2O_2를 첨가하여 발색반응을 확인하였다. 그 후 TBS로 2~3 회 세척한 후 염색한 조직절편들을 젤라틴이 피막된 슬라이드에 부착하여 실온에서 12 시간 이상 건조한 다음, 통상의 조직처리 과정을 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 혈액샘플은 녹십자에 보내어 전혈(whole blood)에서 알코올 농도를, 혈청에서 thyroxine의 양을 측정하여 결과를 얻었다(Table 1). Kruskal-Wallis test로 세 군간의 알코올 농도와 thyroxine 양을 비교한 결과 P 값이 알코올은 0.014, thyroxine은 0.022로 통계학적으로 유의하였다. 이 중에서 상호 의미 있는 두 군 끼리 비교해 보고자 분산 분석후 사후검정하였더니 B 군에 비해 A 와 C 군의 알코올 농도가 각각 유의한 차이가 있었으며 C 군의 thyroxine 양이 A 군에 비해 유의하게 높았다.

2. BDNF ELISA assay 소견

BDNF 양은 생후 7, 14, 21 일에 C 군에서 A 군에 비해 현저하게 증가하였으며 특히 생후 7일에서 230 ± 26.87로 가장 높게 측정되었다. 생후 14 일을 제외하고 대부분의 생후 연령에서 A 군과 B 군 간에 유의한 차이는 관찰되지 않았다. B 군과 C 군 간의 차이를 관찰해 보니 생후 28 일에 B 군이 C 군보다 약간 높게 측정되었을 뿐 나머지 연령에서는 C 군이 B 군보다 항상 높았다. 생후 0 일을 제외한 모든 연령 중 생후 21 일의 A 군이 125 ± 2.12로 가장 낮았다. 따라서 BDNF 양은 모든 생후 연령에서 A 군에 비해 C 군에서 높게 측정되었으며 생후 28 일에는 B 군에서 다른 군들보다 약간 높게 측정되었을 뿐 B 군과 C 군 간에 큰 차이는 없었다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

3. BDNF 함유 신경세포의 분포

1) 대뇌겉질

생후 0 일에 B 군의 경우 II, III 층에서 미성숙하지만 돌기가 뚜렷한 소수의 BDNF 함유 신경세포가 관찰되었으며 A 군에서는 V, VI 층에서 약하게 염색된 돌기가 뚜렷하지 않은 세포들이 관찰되었고 C 군에서는 I 층부터 VI 층에 걸쳐 강하게 염색되며 돌기가 뚜렷한 세포들이 다수 관찰되었다(Fig. 2A, B, C).

생후 7 일에는 A 군과 C 군 모두 대뇌겉질아래판에서 염색이 두드러지게 나타났으나 C 군이 A 군에 비해 대뇌겉질 전층에 걸쳐 뚜렷하고 긴 돌기를 가진 큰 세포들이 다수 관찰되었다. B 군에서는 전층에 걸쳐 BDNF 함유 신경세포가 관찰되었는데 특히 V 층에서 뚜렷하였다(Fig. 2D, E, F).

생후 14 일에 B 군과 C 군에서는 이전 시기에 비해 세포 크기가 커졌으며 서로 비슷한 크기의 BDNF 함유 신경세포가 관찰되었으나 A 군에서는 이전의 연령과 큰 차이가 없는 분포양상을 나타냈다(Fig. 2G, H, I).

생후 21 일과 28 일에는 세 군 모두에서 이전의 연령과 비교해 약간의 세포 수 감소가 보였을 뿐 큰 변화 없이 유사하였다.

2) 해마

생후 0 일에는 BDNF 함유 신경세포가 A 군에서는 나타나지 않았으며 B 군과 C 군에서는 CA3(cornu ammonis 3)의 일부에서 출현하였는데 B 군에 비해 C 군이 약간 많았다(Fig. 3A, B).

생후 7 일에는 A 군에서도 양성반응 신경세포가 출현하였을 뿐만 아니라 B, C 군 모두 생후 0 일보다 양성반응 세포의 분포가 증가하였다. A 군의 CA1에서는 매우 약한 반응을 나타내는 소수의 세포만이 관찰되었고 CA3에서 가장 많이 분포하였으며

CA2와 치아이랑에서는 관찰되지 않았다. B 군과 C 군의 분포양상은 유사하였는데 CA1, CA2, CA3 및 치아이랑에서 양성반응 세포들이 관찰되었는데 그 중 CA3에 가장 다수가 분포하였으며 치아이랑에서는 소수만이 관찰되었다(Fig. 3C, D).

생후 7 일에 세 군 모두에서 CA3에서의 반응이 가장 뚜렷하여 세 군의 CA3에서 BDNF 함유 신경세포의 분포양상을 확대해 비교해보니 B 군의 CA3 피라밋층에서 세포의 모양과 돌기 및 염색강도 등이 가장 뚜렷하게 관찰되었으며 C 군은 B 군보다는 덜 뚜렷하였지만 크기는 유사하였으며 A 군에 비해서는 더 뚜렷한 양상을 나타냈다 (Fig. 4).

생후 14 일에 A 군에서는 CA1에 뚜렷한 양성반응 세포들이 나타났으며 CA2에도 양성반응을 나타냈으나 대부분의 중간 및 뒤 단면에서는 CA3와 치아이랑에서 BDNF 함유 신경세포가 전혀 관찰되지 않았다. 그러나 생후 21 일까지는 앞 단면의 CA3에서 일부 양성반응 세포들이 계속 출현하였다. 특히 CA2에서는 B 군과 C 군에서는 생후 7 일에 이미 양성반응을 나타냈으나 A 군에서는 이 보다 1 주 늦게 양성반응 세포가 출현하였다(Figs. 5A, 6A, 7A, 7B, 8A).

한편 생후 14 일에 B 군에서는 대부분에서 뚜렷한 반응을 나타냈는데 특히 CA3와 치아이랑에서 가장 뚜렷하였으며 C 군도 B 군과 분포양상은 유사하였으나 양성반응 세포 수는 B 군에서 매우 두드러지게 많았다. 생후 21 일의 앞쪽 단면의 CA3에서도 A 군에 비해 B, C 군이 뚜렷한 양성반응을 나타냈다(Figs. 5B, 5C, 6B, 6C).

CA1에서의 BDNF 함유 신경세포는 B 군과 C 군에서는 생후 28 일까지도 계속 출현하였으나 A 군에서는 생후 14 일까지 출현하였을 뿐 그 이후 연령에서는 관찰되지 않았다. 생후 28 일에 C 군의 치아이랑에서는 생후 14 일의 분포양상과 유사하게 관찰되었다(Fig. 8).

Table 1. Blood ethanol and thyroxine levels

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 ± SD % for alcohol and x ± SD μg/dL for thyroxine. *, + indicate significance at the $p<0.05$ level determined by Post Hoc test after ANOVA.

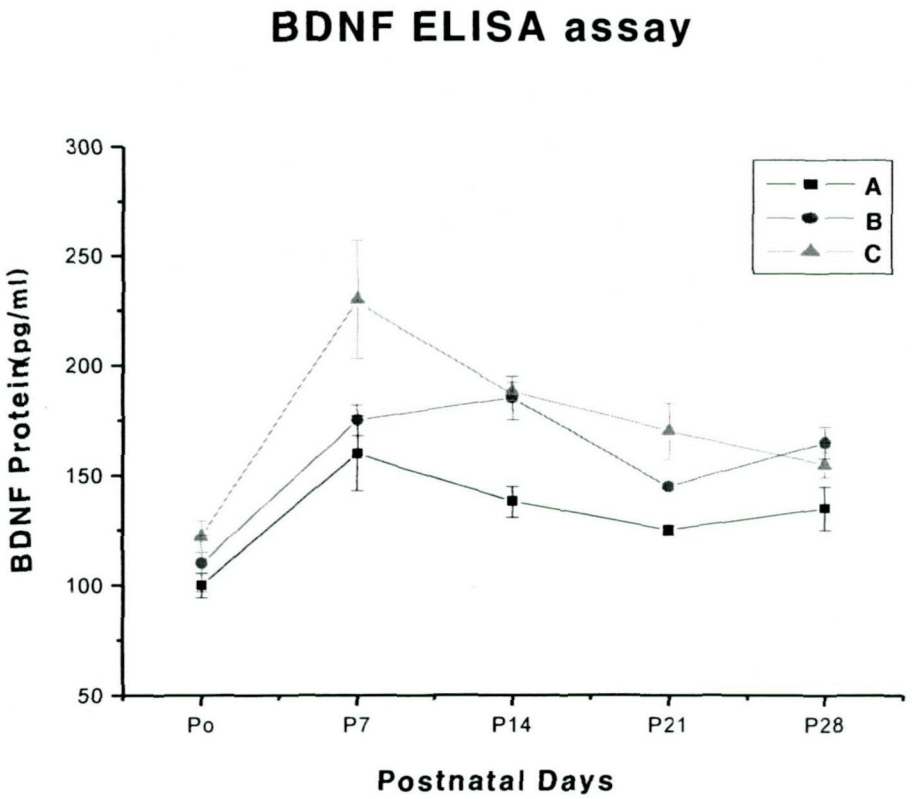


Figure 1. BDNF protein was measured by ELISA assay in postnatal days 0, 7, 14, 21, 28. BDNF protein was significantly increased at postnatal days 7, 14, 21 in the group C compared to the group A. In paticular, BDNF protein was highest in the group C at postnatal day 7. There were no significant differences between group A and group B almost all ages except postnatal day 14. This data revealed that BDNF protein was higher in the group C than in the group A at all ages. A: Alcohol-fed group, B: Control pair-fed group, C: Alcohol + T_4 group.

고 찰

알코올 남용이 인지력과 기억력에 영향을 미친다고 하여 알코올 남용이 선행적 및 역행성 건망증으로 잘 알려진 신경학적 질환인 Wernicke-Korsakoff 증후군과도 연관이 있다고 알려지게 되었다(Langlais, 1995). 물론 알코올과 신경학적 질환과의 관련성이 보고되기 이전부터 알코올 중독과 그로 인한 티아민(thiamine) 결핍이 여러 가지 건강 문제를 유발할 수 있다는데 관심을 갖고 있었으며 미국에서는 알코올과 연관하여 매년 십만 명이 사망하고 천억 정도의 예산을 소요하고 있다고 보고하였다(Rice, 1993). 최근 임부의 알코올 남용이 증가하고 있어 태아알코올증후군에 대한 관심이 높아지고 있으며 이미 태아알코올증후군에서 소뇌의 형성부전은 잘 알려져 있다(Clarren, 1981). 또한 갑상샘호르몬이 중추신경계의 발달에 중요한 역할을 할 것이라는 보고(Rami 등, 1986)가 있은 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 소뇌 조롱박세포의 성장과 분화가 정상 군에서 태어난 경우에 비해 지연되었다고 하였으며(Mohamed 등, 1987a, b) 알코올과 T_4를 동시에 투여한 어미에서 태어난 어린 쥐의 소뇌 조롱박세포를 전자현미경으로 관찰한 결과 리보소체, 닛슬소체로 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 쥐와 지속적인 음주를 하고 있는 임신 흰쥐에 thyroxine을 매일 투여하여 태어난 어린 쥐의 대뇌 겉질 및 해마에서 BDNF 양과 BDNF 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 할뿐만 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 주간(P7, P14, P21)이 사람 임신기간의 세 번째 삼분기(third trimester)에 해당하며 대부분의 신경세포들이 생후 21 일 경에 성숙수준에 도달한다는 보고 등(Mohamed 등, 1987 a, b)에 기인하여 출생한 날부터 1 주일 간격으로 생후 4 주까지 BDNF함유 신경세포의 성숙양상을 형태학적으로 관찰하고 그 단백질의 양의 변화를 조사하고자 함이었다.

Nathaniel 등(1999)은 알코올 군이 정상 군과 알코올 + T_4 군에 비해 소뇌 조롱박세포의 성숙 양상이 1 주정도 지연되어 성장한다고 하였다. 정상적으로 발달이 진행중인 뇌에서 BDNF에 관한 보고(Das 등, 2001)에서 대뇌겉질에 분포하는 BDNF mRNA는 생후 3 주 째에, BDNF 단백은 생후 2 주 째에 최고치에 도달한다고 하였는데 본 실험에서도 B 군에서는 BDNF 단백 양이 생후 14 일에 최고치에 도달함으로서 Das 등(2001)의 보고와 유사하였다. 본 연구에서 BDNF는 A 군에 비해 C 군에서 태어난 생후 7, 14, 21 일의 어린 쥐의 대뇌 및 해마에서 뚜렷한 증가를 나타냈으며 생후 7 일의 C 군에서 세 군의 모든 연령 중에서 가장 높게 측정되었을 뿐만 아니라 B 군보다 뚜렷하게 BDNF 단백 양이 증가하였다. 이는 생후 10 일 동안 thyroxine을 투여한 후 중격핵에서 BDNF mRNA는 생후 7 일에, BDNF는 생후 10 일에 현저하게 증가하였다는 Camboni 등(2003)의 보고와 유사하였지만 본 실험과의 차이점은 Camboni 등(2003)은 정상적으로 태어난 어린 쥐의 중격핵에서 BDNF 단백질 발현에 미치는 thyroxine의 투여 효과를 보기 위해 생후 10 일 동안 thyroxine을 투여하였고 본 실험에서는 생후에는 thyroxine을 투여하지 않고 음주 중인 모체 내에서 뇌 발생의 결정적 시기에 해당하는 출생 전에 thyroxine을 투여하였다는 점이다. 본 실험에서 생후 28

일을 제외하고 대부분의 생후 연령에서 C 군에서 BDNF 단백 양이 정상 군보다 증가하였으며 모든 생후 연령에서 A 군에 비해 C 군에서 높게 측정되었고 생후 7 일에 정상 군과 C 군에서 태어난 어린 쥐의 뇌 사이에 BDNF 단백 양의 차이가 있었고 나머지 연령에서는 두 군 사이에 큰 차이는 없었다. 또한 생후 14 일을 제외하고는 B 군과 C 군 사이에도 큰 차이는 없었으나 A 군이 B 군에 비해 모든 연령에서 BDNF 단백 양이 적게 측정되었다. Heaton 등(2000)은 출생 전에 알코올에 노출된 경우 생후 1 일에 뇌의 대부분에서 BDNF는 정상 군과 큰 차이가 없이 유사하였으며, 출생 후 뇌 성장 최고기간(brain growth spurt period)인 출생 후 4-10일에 알코올에 노출된 경우는 생후 10 일에 해마에서만 정상 군에 비해 일시적인 BDNF 단백질 증가가 있었고 생후 21일에 정상과 유사하거나 낮게 측정되었다고 보고하였다. 본 실험에서는 A 군의 생후 0 일의 BDNF 단백질은 B 군과 큰 차이가 없었으나 생후 7 일에 같은 군의 다른 연령보다 가장 높게 측정되었으나 A 군이 B 군보다 증가하지는 않았으며 해마에서 생후 7 일의 BDNF 함유 신경세포의 분포양상도 마찬가지였고 생후 21 일 이후의 소견은 Heaton 등(2000)과 유사하였다. 그러나 BDNF 양을 뇌 부위별로 구별하여 측정한 후 비교해 볼 필요가 있을 것이라 생각되며 출생 전과 후의 알코올 노출에 따라 BDNF 단백질 발현에 차이가 있을 수 있다는 것도 배제할 수 없을 것이다.

본 연구에서 면역조직화학적 염색 결과, C 군의 대뇌겉질에서는 I 층부터 VI 층까지 전층에 걸쳐 돌기가 뚜렷하고 강하게 염색된 BDNF 함유 신경세포가 생후 0 일부터 다른 군에 비해 다수 관찰되었으며 생후 7 일에 가장 두드러졌으며 A 군의 염색 양상은 매우 약하였고 세포 크기도 C 군에 비해 작았다. 해마의 CA1의 경우 B 군과 C 군에서는 생후 7 일에 양성반응이 나타났으며 생후 28 일까지 지속적으로 양성 세포들이 관찰되었으나 A 군에서는 생후 7 일에 매우 약한 반응으로 나타나 생후 14 일까지 양성반응을 보였다. CA2에서는 B 군과 C 군에서는 생후 7 일에 뚜렷한 양성반응을 나타냈으나 A 군은 생후 14 일에 가장 뚜렷하게 나타난 후 이후 연령에서는 관

찰되지 않았다. CA3에서는 B 군과 C 군에서는 생후 0 일부터 양성반응을 나타냈고 생후 7 일에 가장 뚜렷한 분포를 보였으며 점차 감소하였으나 A 군에서는 생후 7 일에 양성반응이 나타났고 연령이 증가할수록 앞 단면에서 소수 나타났다. 치아이랑에서는 생후 14 일의 B 군에서 가장 뚜렷한 반응을 보였으며 C 군에서는 생후 28 일까지도 양성반응 세포들이 나타났다. 따라서 본 실험의 결과 해마에서는 C 군에서 대부분 생후 7 일과 14 일에 BDNF함유 신경세포가 증가하였다는 것을 알 수 있었는데 이는 생후 일시적인 갑상샘기능항진이 중격 및 해마에서 BDNF와 같은 NGF계 NT나 그 수용체의 mRNA 발현을 생후 10-12일에 증가시킨다는 보고 등(Lüesse 등, 1998; Roskoden 등, 1999)과 유사하여 출생 전 모체에 thyroxine 투여로 출생 후 그 후손의 BDNF 함유 신경세포의 성장에 미치는 영향이 생후 일시적인 thyroxine 투여 효과와 유사하다는 것을 알 수 있었으며 해마의 분화 과정 중 가장 중요한 시기인 생후 10 일경의 BDNF mRNA 및 단백질 발현에 thyroxine이 중요한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

또한 정상적인 원숭이에서 연령이 증가할수록 해마의 CA2를 제외한 대부분의 해마 신경세포의 세포체 및 돌기의 BDNF 면역반응이 감소하였다는 보고(Hayashi 등, 2001)가 있었는데 본 실험의 정상 군의 해마에서도 BDNF 함유 신경세포가 생후 14 일 이후 연령이 증가할수록 그 수는 감소하였으나 생후 28 일까지도 뚜렷한 양성반응을 나타냈다.

신생아의 갑상샘기능저하는 발생 중인 쐐기핵(cuneate nucleus) 및 척수의 앞뿔(anterior horn) 등에 혈액공급을 감소시켜 모체의 알코올 남용 후 갑상샘 기능의 이상으로 인한 중추신경계통의 결함은 저산소증과도 연관이 있을 것이라 생각하게 되었다(David와 Nathaniel, 1981; Thomas와 Nathaniel, 1992). Propylthiouracil로 유도된 신생쥐의 갑상샘기능저하에 thyroxine을 투여한 경우 뇌와 소뇌 무게 증가가 있었는데 생후 21 일에 투여한 경우보다 생후 14 일에 투여한 경우에 더 두드러진 효과가 있었다

고 하였다(Nathaniel 등, 1988). Nathaniel 등(1999)은 조롱박세포의 성장 지연은 알코올과 그 대사산물의 유해한 영향과 혈액 내 thyroxine 저하와도 연관이 있다고 하였는데 본 실험에서도 알코올에 노출되어 혈액 내 thyroxine 농도가 낮은 어미에서 태어난 어린 쥐에서는 생후 14 일 이후로 세포 소실이 뚜렷하였으며 이는 출생 전 갑상샘기능저하 상태에서 성장할 경우 BDNF 함유 신경세포의 생후 성장에도 영향을 미칠 것으로 생각된다.

본 실험에 사용한 T_4의 용량은 여러 연구자들의 보고에 근거하여 시행하였는데 Propylthiouracil에 의해 갑상샘기능저하 상태가 유도된 어린 쥐에 T_4를 2.5 μg/kg/day 피하주사한 경우 체중과 키뿐만 아니라 뇌와 소뇌의 성장을 촉진시켰으며, 성체 흰쥐에 15 μg/kg/day의 T_4를 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 군과는 유의한 차이가 있었으나 정상 군과는 그렇지 않았다고 하였는데 본 실험에서 모체의 혈액 내 thyroxine 양은 C 군이 A 군에 비해 유의하게 높은 것은 유사하였으나 C 군이 B 군보다 높게 측정되어 개체마다 같은 양을 투여했더라도 thyroxine 양에 차이가 있을 것이라 생각되며 thyroxine 양과 투여시기를 서로 다르게 해서 비교해 보는 것도 필요할 것이라 사료된다.

본 실험 결과 알코올에 노출되었더라도 모체 내에서 thyroxine을 지속적으로 투여받은 경우 출생 후 뇌 BDNF 양이 생후 7 일에 가장 증가하였을 뿐만 아니라 대뇌겉질 시상하부, 해마 등 대부분의 뇌 부위에서 BDNF 함유 신경세포의 분포가 생후 7 일에 가장 두드러지게 나타난 것으로 보아 출생 전 thyroxine 투여가 출생 후 초기에

BDNF 합성을 증가시켜 출생 후 thyroxine을 투여 받은 것과 같은 효과가 있으며 임신한 모체의 음주로 인해 갑상샘호르몬이 감소하여 발생되는 중추신경계통의 이상을 thyroxine 투여로 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 Camboni 등(2003)의 보고에서 출생 초기에 thyroxine 투여 후 4 개월 된 성체에서는 생후 10 일에 비해 BDNF 면역반응 세포 수가 유의하게 감소하였으나 정상 군에서는 생후 10 일과 성체 사이에 큰 차이가 없었다고 하였으므로 생후 28 일 이후의 연령과 성체 및 노화한 경우 등 다양한 연령에서의 변화 양상을 비교해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면 모체의 알코올 섭취로 인한 갑상샘호르몬 부족이 태자에 미치는 유해한 영향은 음주 중인 모체에 thyroxine을 투여함으로서 태어난 후손들의 출생 초기의 대뇌 겉질 및 해마의 BDNF 합성을 촉진시켜 BDNF 함유 신경세포의 생후 발달을 정상과 유사하게 유지시키거나 촉진시킬 수 있을 것으로 보인다.

결 론

임부의 알코올 남용이 태아 정신발육지연의 흔한 원인이며 임부의 음주 양이 중간 정도 수준이더라도 영양실조가 동반되면 행동과 학습장애 등을 나타내는 태아알코올효과를 야기시킬 수 있으며 특히 태아의 뇌 발생에 예민한 결정적 기간(critical period) 동안에 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 태어난 흰쥐 대뇌 겉질 및 해마의 생후 연령에 따라 BDNF 함유 신경세포의 발달과 성숙 양상을 관찰하였고 BDNF 단백질 함량을 측정하였다.

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 알코올을 매일 섭취하고 thyroxine을 매일 5 $\mu g/kg$ 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 4 마리를 0, 7, 14, 21, 28 일에 희생시켜 면역조직화학염색을 시행하였으며 각 군에서 각 연령별로 2 마리씩은 BDNF 단백질 측정에 사용하였다.

본 연구 결과 BDNF 양은 알코올 + T_4 군에서 알코올 군에 비해 생후 7, 14, 21 일에 뚜렷한 증가를 나타냈으며 그 중 생후 7 일의 알코올 + T_4 군에서 가장 높게 측정되었을 뿐만 아니라 정상 군보다도 뚜렷하게 증가하였다. 알코올 군은 모든 연령에서 정상 군에 비해 감소하였다. 알코올 + T_4 군의 대뇌겉질에서는 알코올 군에 비해 돌기가 뚜렷하고 강하게 염색된 BDNF함유 신경세포가 생후 7 일에 가장 두드러졌다. 알코올 + T_4 군의 해마에서는 대부분 생후 7 일과 14 일에 BDNF 함유 신경세포가 증가하였으며 정상 군과 같이 연령이 증가할수록 BDNF 함유 신경세포 수는 감소하였

으나 생후 28 일까지도 뚜렷한 양성반응을 나타냈다.

이상의 결과로 보아 임신 중 알코올 남용을 하는 모체에 thyroxine을 투여함으로서 출생한 후손의 대뇌겉질 및 해마에 분포하는 BDNF 함유 신경세포의 생후 발달을 정상 군과 유사하거나 더 빠르게 촉진시킬 수 있을 것으로 생각된다. 또한 모체에 투여하는 지속적인 thyroxine 처치가 출생 후 초기에 BDNF 합성을 증가시켜 모체의 알코올 남용으로 야기되는 태아알코올효과와 같은 출생결함을 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다.

References

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.*

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 displat 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.*

Friedman WJ, Olson L, Persson H : Cells that express brain-derived neurotrophic factor mRNA in the developnig postnatal rat brain, *Eur J Neurosci 3 : 688-697, 1991.*

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.*

Jones KL, Smith DW : Recognition of fetal alcohol syndromein 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.*

Katoh-Semba R, Takeguchi IK, Semba R, Kato K : Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with developmemt in the brain, *J Neurochem 69 : 34-42, 1997.*

Langlais PJ : Alcohol related thiamine deficiency : Impact on cognitive and memory functioning, *Alcohol Health Res World 19 : 113-121, 1995.*

Lapchack PA, Araujo DM, Beck KD, Finch CE, Johnson SA, Hefti F : BDNF and TrkB expression in the hippocampal formation of aging rats, *Neurobiol Aging 14 : 121-126, 1993.*

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.*

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.*

Narisawa-Saito M, Nawa H : Differential regulation of hippocampal neurotrophins during aging in rats, *J Neurochem 67 : 1124-1131, 1996.*

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.*

Phillips HS, Hains JM, Laramee 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 : 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.*

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 117 : 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.*

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 p75 and trk receptor expression, *Exp Brain Res 127 : 307-313, 1999.*

Schecterson LC, Bothwell M : Novel roles for neurotrophins are suggested by BDNF and NT-3 mRNA expression in developing neurons, *Neuron 9 : 449-463, 1992.*

Thomas AP, Nathaniel EJH : Comparisons of capillary maturation in control and hypothyroih rat spinal cord : An ultrastructural study, *Exp Neurol 116 : 96-103, 1992.*

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.*

Rosenbloom MJ, Pfefferbaum A, Sullivan EV : Structural brain alterations associated with alcoholism, *Alcohol Health Res World 19 : 266-272, 1995.*

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.*

Victor M, Adams RD, Cillins GH : The Wernicke-Korsakoff syndrome and related neurologic disorders due to alcoholism and malnutrition, *2nd ed. Davis, Philadelphia, 1989.*

Explanation of Figures

Fig. 2. BDNF immunoreactivity in the cerebral cortex in alcohol-fed group(A, D, G), control pair-fed group(B, E, H) and alcohol + T_4 group(C, F, I) at P0 (A, B, C), P7(D, E, F) and P14(G, H, I). The intensity of BDNF immunoreactivity was most prominent in alcohol + T_4 group at P7(F). In addition, the number of BDNF immunoreactive neuron increased in alcohol + T_4 group at P7(F) compared to the other two groups in all ages. I - VI = cellular layers; sp = subcortical plate. Scale bars = 50 ㎛

Fig. 3. BDNF immunoreactivity in the hippocampus in alcohol-fed group at P7(C), control pair-fed group at P0(A) and alcohol + T_4 group at P0 and P7(B, D). BDNF immunoreactive cells(arrows) appeared in control pair-fed group and alcohol + T_4 group at P0(A, B). The intensity of BDNF immunoreactivity was stronger in alcohol + T_4 group as compared to the alcohol-fed group at P7(C, D). CA1 = cornu ammonis 1; CA2 = cornu ammonis 2; CA3 = cornu ammonis 3; DG = dentate gyrus. Scale bars =100 ㎛

Fig. 4. BDNF immunoreactivity in the CA3 of hippocampus in alcohol-fed group(A), control pair-fed group(B) and alcohol + T_4 group(C) at P7. BDNF immunoreactive cell appeared in control pair-fed group and alcohol + T_4 group at P0(A, B). The number and intensity of BDNF immunoreactivity was most prominent in control pair-fed group(B) compared to the other two groups. Mature pattern was apparent in alcohol + T_4 group(C) as compared to alcohol-fed

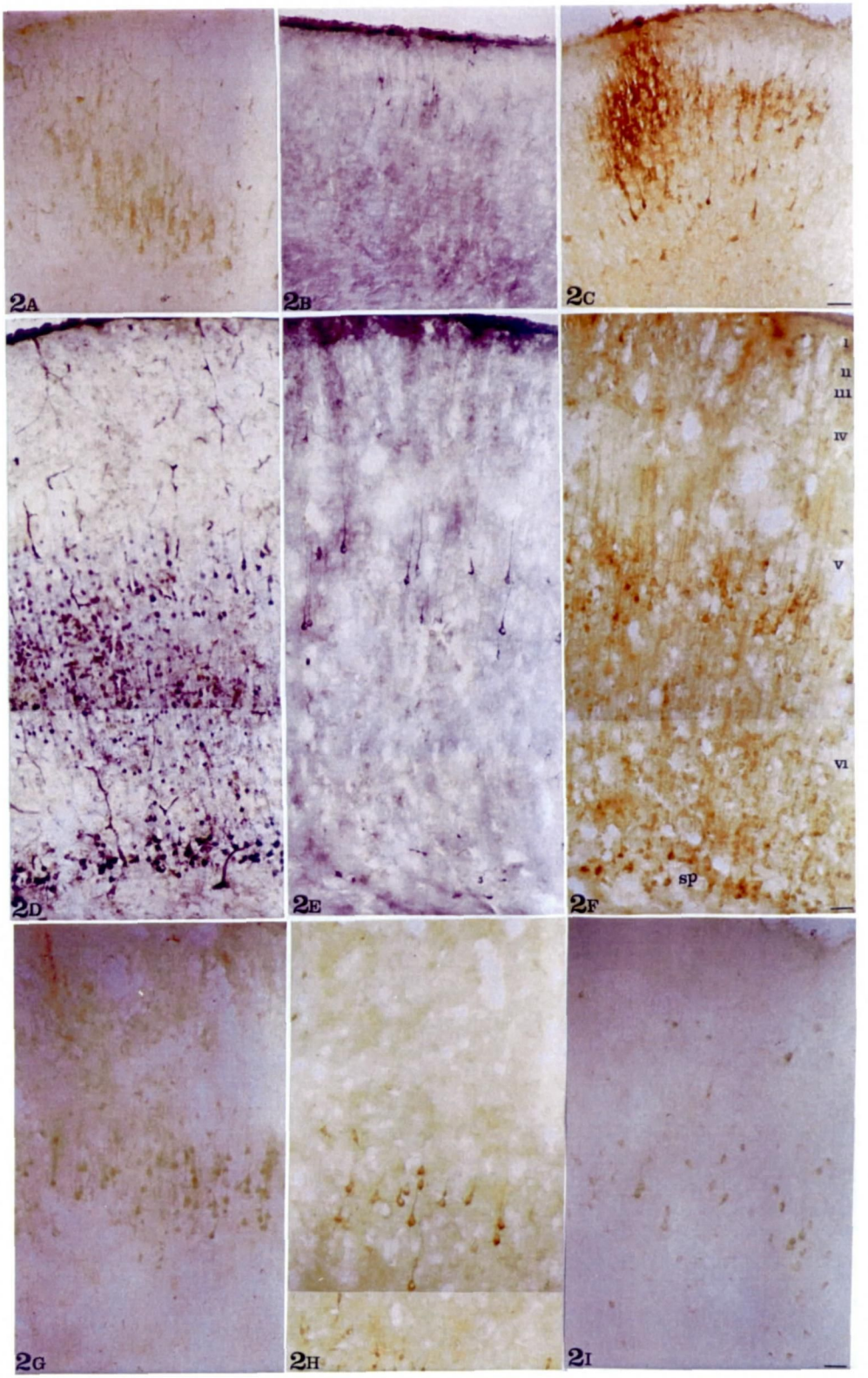
group(A). Scale bars = 50 ㎛

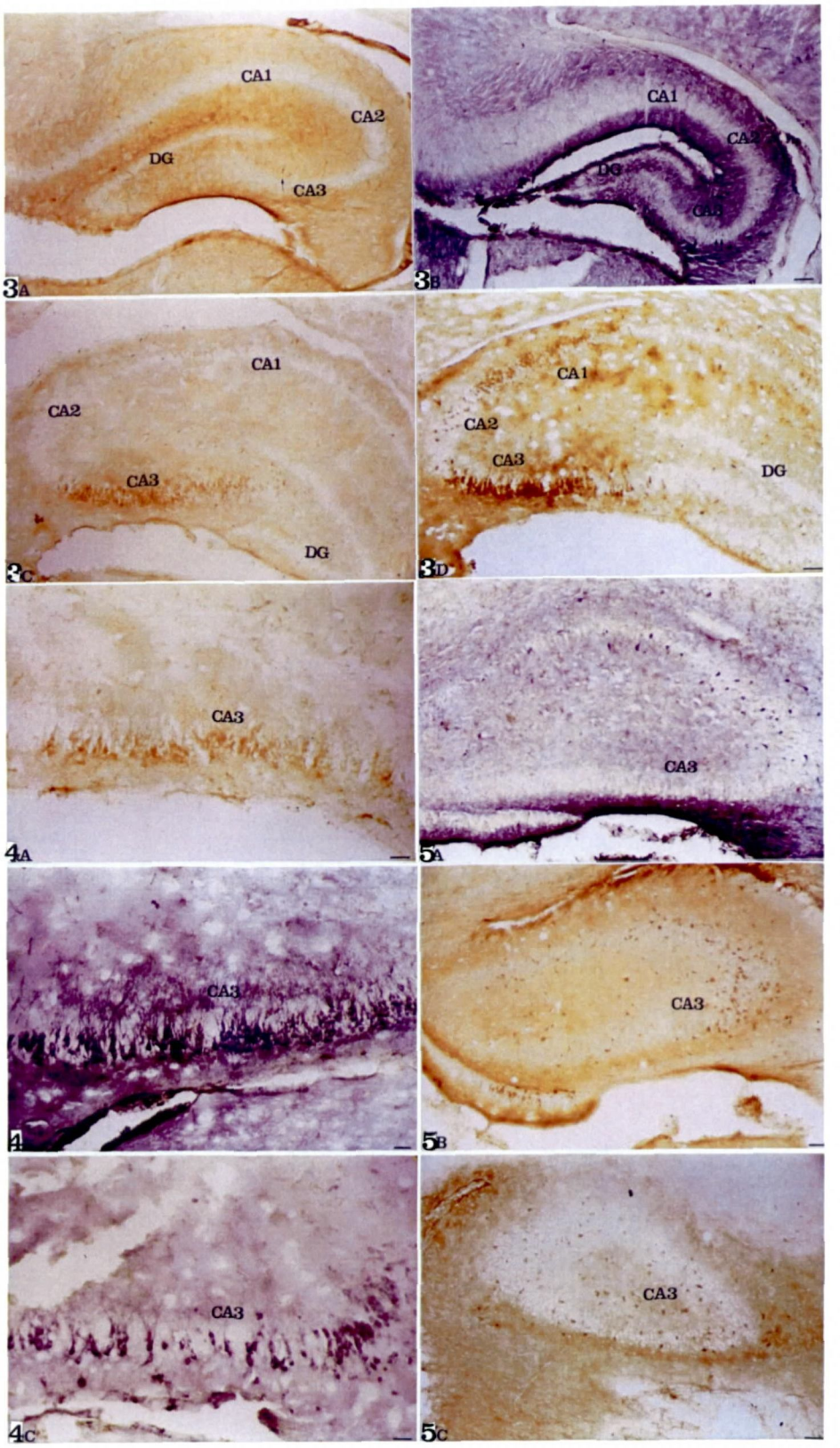
Fig. 5. BDNF immunoreactivity in the CA3 of anterior level of hippocampus in alcohol-fed group(A), control pair-fed group(B) and alcohol + T_4 group(C) at P21. BDNF immunoreactive cell decreased in alcohol-fed group(A) compared to the other two groups. Scale bars = 100 ㎛

Fig. 6. BDNF immunoreactivity in the hippocampus in alcohol-fed group(A), control pair-fed group(B) and alcohol + T_4 group(C) at P14. BDNF immunoreactive cell increased in dentate gyrus of control pair-fed group(B). In CA3 and dentate gyrus, no BDNF immunoreactive cell was found in alcohol-fed group(A). Scale bars = 100 ㎛

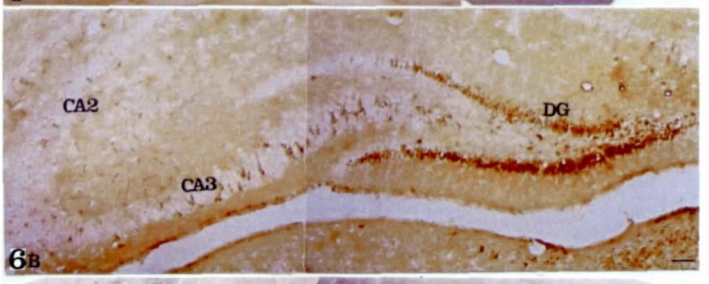
Fig. 7. BDNF immunoreactivity in the CA2 of hippocampus in alcohol + T_4 group at P7(A) and alcohol-fed group at P14(B). BDNF immunoreactive cell in alcohol-fed group appeared later than in alcohol + T_4 group. Scale bars = 50 ㎛

Fig. 8. BDNF immunoreactivity in the CA1 and dentate gyrus of hippocampus in alcohol-fed group at P14(A), control pair-fed group at P28(B) and alcohol + T_4 group at P28(C). In alcohol-fed group, BDNF immunoreactive cell appeared at P14(A), and no appearance was found at P28. BDNF immunoreactive cell of control pair-fed and alcohol + T_4 group at P28 was evident as before. Scale bars = 50 ㎛

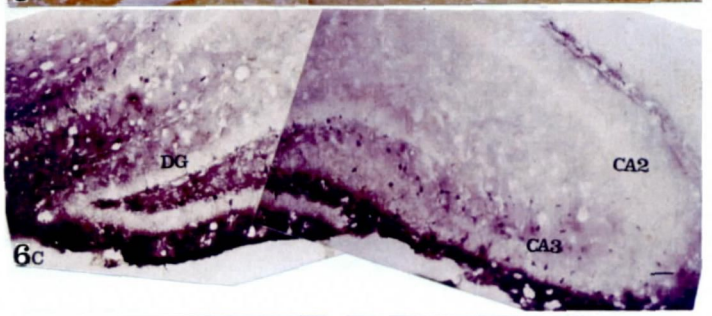

2A
2B
2C
2D
2E
2F
I
II
III
IV
V
VI
sp
2G
2H
2I


CA1
CA2
DG
CA3
3A
CA1
CA2
DG
CA3
3B
CA1
CA2
CA3
DG
3C
CA1
CA2
CA3
DG
3D
CA3
4A
CA3
5A
CA3
4
CA3
5B
CA3
4C
CA3
5C

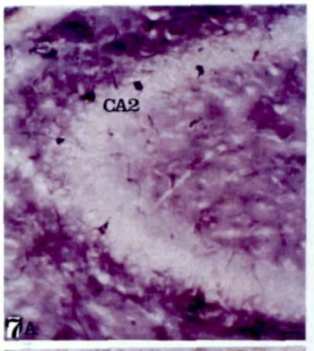
6A



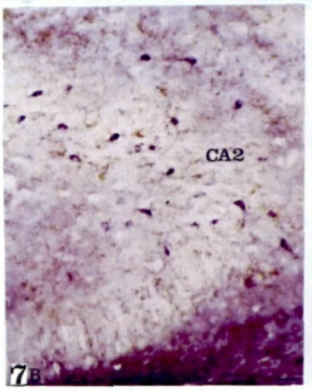
6B



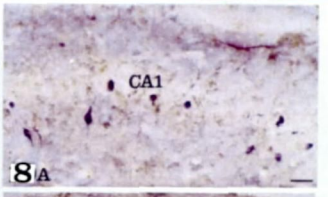
6C



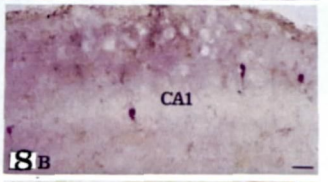
7A



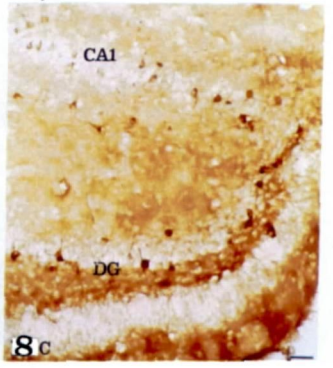
7B



8A



8B



8C