

흰쥐 1차배양 해마 신경세포 및 신경교 세포에 미치는 Ethanol의 효과

이화여자대학교 의과대학 약리학교실
이 경 은 · 배 영 숙

= Abstract =

Effect of Ethanol on the Neuronal Viability and Neurite Outgrowth in Primary Cultures of Rat Hippocampus

Kyung Eun Lee · Young Sook Pae
Department of Pharmacology, College of Medicine, Ewha Womans University.

Current information from studies in animal models indicates that perinatal exposure to alcohol produces a variety of damaging consequences in the central nervous system. These may result from direct neurotoxic effects of ethanol on the CNS, a system known to be particularly susceptible to environmental influences during development.

The present study was undertaken to investigate the effects of ethanol on the neuronal viability and neurite outgrowth, one of the critical steps in neuronal differentiation, in primary cultured neuronal and glial cells of rat hippocampus.

Cell cultures were prepared on embryonic day 17 (E17) for treatment with a series of ethanol concentrations (10, 100, 500, and 1000mM). Effect of ethanol was investigated at 0, 18, and 24 hour following ethanol treatment. To study the changes in proliferation of glial cells, protein content was measured at 7 day in vitro.

The results are as follows :

1) Ethanol did not altered neuronal survival or attachment to the substrate at any of the concentrations that were used.

2) 10 or 100mM ethanol was associated with significant increase in the total neurite length per cell.

3) 10 or 100mM ethanol markedly increased and 1000mM ethanol decreased protein contents on 7 day in vitro.

These findings suggested that ethanol may have distinct effects on neurite outgrowth and also indicated that high concentration of ethanol (500~1000mM) and long period of exposure (3~7days) were required to produce toxic effects on neurons and glial cells in this system.

서 론

중추신경계는 발생기(development) 동안에 환경적 요

인에 특히 민감한 장기로 알려져 있다¹⁾²⁾. Alcohol은 강력한
한 최기형(teratogenic) 작용을 나타내는 물질로 주산기
에 포유동물에 노출시키면 중추에 대한 직접 작용에 의하

어 정상적인 뇌발달의 기능적 및 형태학적 변동을 초래하며 소뇌중(microcephaly), 학습장애(learning deficit) 및 운동기능부전(motor dysfunction)과 같은 여러 가지 중추신경계 장애가 발생된다³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾.

중추 발달에 대한 ethanol의 장, 단기 효과를 밝히고자 많은 연구가 진행되어 왔으나 이러한 연구에는 많은 어려움이 있다. 주산기에 모체에 투여한 ethanol에 의하여 태아에 초래되는 여러 신경계 변화들이 태아에 대한 직접 작용인지 또는 모체의 영양결핍을 통하여 나타나는 결과인지 확실치 않다. 또한 ethanol은 생체에서 작용이 매우 다양하여 태아 신경세포에 대한 직접작용 이외에 태아의 소화기⁷⁾ 및 내분비계⁸⁾ 변동을 초래하여 이차적으로 신경계 이상을 나타낼 수 있다. 또한 뇌 세포는 여러 종류의 세포로 구성되어 있어 생체실험(*in vivo*)시 ethanol이 특히 어떠한 신경계 세포에 어떠한 영향을 나타내는 지를 측정하기가 쉽지 않다. 세포마다 약물에 대한 감수성이 다르며⁹⁾¹⁰⁾ 더우기 신경교 세포(glia)는 신경세포(neuron)에 비하여 수적으로 상당히 우세(9:1)하므로¹¹⁾ 비록 신경세포에 변화가 일어난다고 하여도 이를 관찰하기 어렵다.

세포배양은 각각의 생존 세포를 직접 관찰할 수 있도록 하며 또한 내인성 내분비계 또는 대사성 영향을 배제하고 특정 세포에 대한 약물의 직접효과를 검사할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 신경세포 배양을 이용하면 신경계 세포 발달에 미치는 ethanol 자체의 효과를 직접 검증할 수 있다.

따라서 본 연구자는 해마의 신경 및 신경교 1차 배양세포에 농도별로 ethanol을 투여하여 나타나는 신경세포들 기 성장, 신경세포 생존율 및 신경교세포변화를 관찰하여 신경세포 및 신경교 세포에 미치는 ethanol의 영향에 대하여 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 실험군

동일 실험실 환경에서 사육한 몸무게 200~250g의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 암수 흰쥐의 교배는 18~20시에 암컷 3~4마리가 든 쥐장에 수컷 한마리를 넣고 다음날 9~11시에 수컷을 분리시킨 후 암컷의 질도말(vaginal smear) 표본을 만들어 현미경($\times 100$)으로 정자가 확인되면 임신으로 판정하고 임신 17일째 암컷 흰

쥐의 태아를 사용하였다.

실험군은 대조군 및 ethanol 투여군으로 나누었으며 ethanol 투여군은 다시 농도에 따라 10mM, 100mM, 500mM 및 1000mM 투여군으로 세분하였다.

2. 신경세포 배양

Mattson 및 Kater(1988)의 방법¹²⁾을 변형하여 태령 17일 흰쥐의 해마 신경세포를 일차 배양하였다. 임신 17일째 암컷 흰쥐의 경추를 탈구시켜 희생시키고, 가슴 이하 부위를 70%(v/v) 에탄올로 분무하여 소독한 후 복부를 정중 절개한 다음, 자궁을 자궁을 적출하였다. 자궁을 Ca^{++} 및 Mg^{++} 가 들어 있지 않는 Hank' balanced salt solution(HBSS)에 옮긴 후 무균상자 안에서 태아를 분리하였다. 쥐 한마리당 10~12 마리의 태아를 얻을 수 있었으며 10마리 이하의 태아가 들어 있는 경우 실험에서 배제하였다. 해부 현미경하에서 뇌막(meniges)을 벗기고 미세수술가위로 해마부위를 구하였다. 얻은 해마 조직을 HBSS 용액 내에서 잘게 자른 후 0.2% trypsin으로 15분간 처리하고 HBSS로 2회 세척한 다음 열처리된 소 태아혈청(heat-inactivated fetal bovine serum, FBS)에 15분간 반응시키고 pipet을 이용하여 기계적인 방법으로 세포를 완전히 분리시켰다. 분리된 세포를 1.5×10^4 cell/ml의 밀도로 poly-L-lysine (10 μ g/ml)이 도포된 35mm 배양접시(corning Glass Works, NY, USA)에 심고 5% CO_2 , 37 $^\circ C$ 및 포화습도 하의 항온기(Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA)에서 배양하였다. 배양액으로는 10% FBS와 열처리된 말 혈청(heat-inactivated horse serum, HS) 10%가 첨가된 Dulbecco' modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하였다. 6시간 배양 후 transferrin (10mg/ml), insulin(2.5mg/ml), selenite(15 μ M), progesterone(10 μ M) 및 putrescine(50mM)이 포함된 혈청배제 영양액(serum free medium)으로 교체하고 1주일 간 배양하였다. 영양액은 3~4일에 신선한 배양액으로 교환하였고 배양된 세포는 역상 위상차 현미경(inverted phase-contrast microscope: Leica DM IRB)으로 관찰하였다.

3. Ethanol 투여

배양 6시간 후, 즉 혈청 배제 영양액으로 교환하고 배양액에 ethanol을 0mM, 10mM, 100mM, 500mM 및 1000mM 농도로 투여하였다.

4. 신경돌기 성장(neurite outgrowth) 및 세포 생존율(viability) 측정

배양 6시간 후, 즉 혈청 배제 영양액으로 교환하고 ethanol을 투여한 시간을 0시간으로 하고 0시간, 18시간 및 24시간에 배양접시 당 3~4개의 시야를 무작위로 골라 200배 현미경 하에서 동일 부위를 촬영하고 negative film을 slide projector로 비추어 다른 세포와 연결되지 않고 세포돌기가 잘 발달된 신경세포를 선택하였다.

신경돌기 성장은 각 시간마다 하나의 신경세포가 가진 모든 신경돌기의 합을 μm 단위의 길이로 표시하였고 생존율은 신경돌기 성장측정과 동일한 방법으로 사진 촬영하고 세포체 길이(length) 이상 되는 신경돌기를 가진 세포의 수를 각 시간마다 산출하여 0시간에 대한 %로 표시하였다.

5. 단백질 정량

세포배양 7일째에 영양액을 제거하고 phosphate buffered solution(PBS)으로 세척한 후 cell scraper (Nunc A/S, Roskilde, Denmark)로 배양접시 바닥에 붙은 세포들을 긁어 eppendorf tube에 모았다. 800 μl 의 PBS를 넣고 분쇄하여 Bradford(1976)의 방법¹³⁾으로 단백질량을 분석하고 Bovine serum albumin(BSA)으로 함량을 표준화(standardization)하였다.

6. 자료분석

실험자료는 평균 \pm 표준오차로 표현하였으며 실험군간의 비교를 위하여 분산분석(analysis of variance)을 이용하였고, 각 군간의 차이는 Dunnett 법으로 비교하였다.

7. 시 약

Hank's balanced salt solution, Dulbecco's modified Eagle's medium, penicillin/streptomycin, fetal bovine serum, horse serum 등은 Gibco(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)의 제품을 이용하였고 poly-

Table 1. Effects of ethanol treatment on the viability in cultured hippocampal neuron of rat

Group	18 Hour	24 Hour
Control (8)	48.6 \pm 4.9	46.2 \pm 4.7
E 10 (8)	60.0 \pm 6.2	55.0 \pm 5.1
E 100 (8)	50.3 \pm 4.3	45.9 \pm 8.4
E 1000 (8)	53.0 \pm 6.7	49.4 \pm 8.6

Numbers in parentheses denote the number of dishes. Values are mean \pm S.E. expressed as percentage to 0 hour. E 10 : administration of 10mM ethanol, E 100 : 100mM ethanol, E1000 : 1000mM ethanol.

L-lysine hydrobromide(Mol Wt 70,000~150,000), pyruvate, Sodium bicarbonate, Glutamine, transferrin, insulin, selenite, progesterone, putrescine, ethanol 등은 Sigma(Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) 제품을 이용하였으며 이들 모든 시약은 세포배양용 또는 특급시약을 사용하였다.

결 과

1. 신경세포 '생존율(neuronal viability)' (Table 1, Fig. 1)

신경돌기의 길이가 세포체 길이 이상인 세포를 기준으로 생존율을 측정할 때 대조군에서 18시간에 48.6 \pm 4.9%였고 24시간에는 46.2 \pm 4.7%로 시간의 경과에 따라 초기 신경세포 생존율은 별다른 변동을 나타내지 않았다. 10mM ethanol 투여시 18시간째 신경세포 생존율은 60.0 \pm 6.2%, 24시간째 55.0 \pm 5.1% 였고 100mM 군에서는 18시간 과 24시간에 각각 50.3 \pm 4.3%, 45.9 \pm 8.4% 였으며 1000mM 투여군은 각각 53.0 \pm 6.7% 및 49.4 \pm 8.6% 를 나타내어 10mM ethanol 투여후 18시간째 신경세포 생존율은 대조군에 비하여 약간 증가되는 소견을 보였으나 통계학적인 의의는 없었다.

2. 신경돌기 성장(neurite outgrowth)(Table 2, Fig. 2, Fig. 3)

대조군의 신경세포 돌기의 총 길이의 합을 구하였을 때, 0시간, 18시간 및 24시간에 각각 24.4 \pm 1.7 μm , 232.8 \pm 11.7 μm 및 268.0 \pm 16.5 μm 로 18시간째 약 9.8 \pm 0.6배, 그리고 24시간째 11.2 \pm 0.8배의 성장을 나타내었다. Ethanol 10mM 투여군에서는 0시간, 18시간 및 24시간

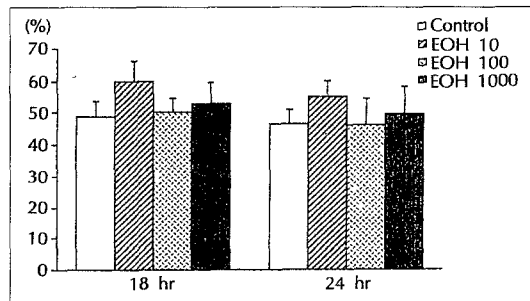


Fig. 1. Neuronal viability of rat hippocampal neurons after exposure to ethanol. The number of neurite-bearing cells was counted and was expressed as percent to 0 hour. EOH : ethanol(mM).

Table 2. Effects of ethanol treatment on total neurite length in cultured hippocampal neuron of rat.

	Control (10)	E 10 (8)	E 100 (8)
Neurite length(μm)			
0 Hour	24.4 \pm 1.7	23.7 \pm 1.6	20.0 \pm 0.5
18 Hour	232.8 \pm 11.7	294.9 \pm 20.4*	238.7 \pm 11.3
24 Hour	268.0 \pm 16.5	399.4 \pm 33.1*	291.7 \pm 11.7*
Change(ratio)			
18 Hour	9.8 \pm 0.6	13.2 \pm 1.5*	11.9 \pm 0.5
24 Hour	11.2 \pm 0.8	17.4 \pm 1.6*	14.6 \pm 0.7*

*p < 0.05 compared to control(Dunnet method for multiple contrast was used). Other legends are the same as table 1.

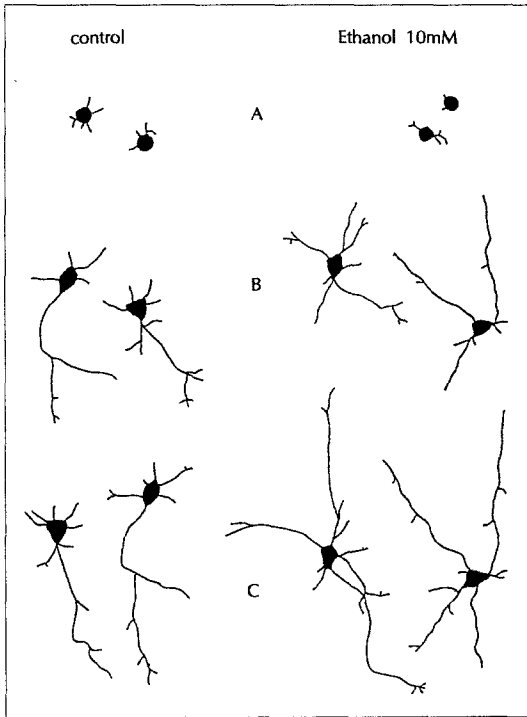


Fig. 2. Representative drawing of hippocampal neurons showing ethanol-induced neurite outgrowth and morphological development after 0h(A), 18h(B) and 24h(C). Note the increased neurite elongation and neurite branching after 10mM treatment compared to control.

에 각각 23.7 \pm 1.6 μm , 294.9 \pm 20.4 μm 및 399.4 \pm 33.1 μm 로서 18시간에 13.2 \pm 1.5, 24시간에 17.4 \pm 1.6배의 성장을 나타내어 대조군에 비하여 유의있는 신경돌기 길이성장을 나타내었다. Ethanol 100mM 투여는 20.0 \pm 0.5 μm , 238.7 \pm 11.3 μm 및 291.7 \pm 11.7 μm 로서 18시간에 11.9 \pm 0.5, 24시간에 14.6 \pm 0.7배의 성장을 나타내어 특히 24시간째에 대조군에 비하여 유의있는 길이성장을 나

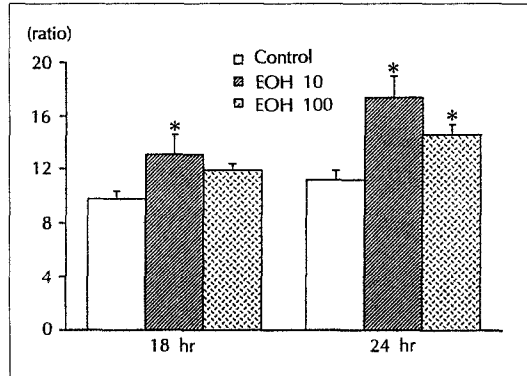


Fig. 3. Changes of neurite outgrowth of rat hippocampal neurons after exposure to ethanol. Values are expressed as ratio to 0 hour. *p < 0.05 compared to control(Dunnet method for multiple contrast was used). Other legends are the same as Fig. 1.

Table 3. Effects of ethanol treatment on protein amount of cultured hippocampal neuron and glia of rat.

Group	protein content
Control (34)	122.9 \pm 6.3
E 10 (28)	155.9 \pm 8.6*
E 100 (26)	146.6 \pm 7.5*
E 500 (5)	96.2 \pm 7.0
E 1000 (7)	51.9 \pm 3.4*

*p < 0.05 compared to control(Dunnet method for multiple contrast was used)

Values are mean \pm S.E. expressed as $\mu\text{g}/\text{dish}$.

E 500 : administration of 500mM ethanol.

Other legends are the same as table 1.

타내었다.

3. 단백질 정량(Table 3, Fig. 4, Fig. 5)

세포배양 7일째 시행한 단백질 정량에서 대조군의 단백질량은 배양접시당 122.9 \pm 6.3 μg 이었다. Ethanol 10mM

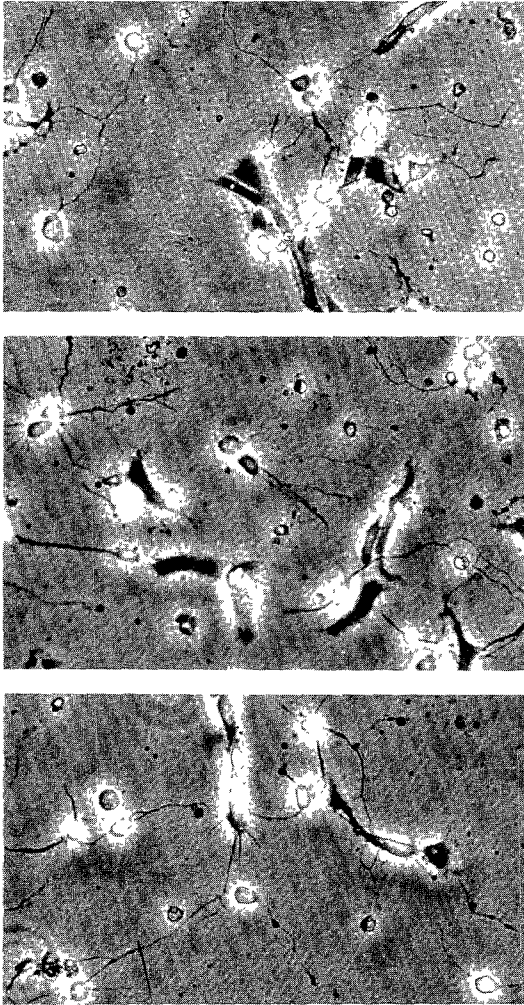


Fig. 4. Phase contrast micrograph showing the change of number of neurons and glial cells in culture exposed different concentrations of ethanol for 1 week. 10mM(B) increase and 1000mM(C) decrease the number of cells in culture compared to control (A).

투여군은 $155.9 \pm 8.6\mu\text{g}$, 100mM 투여군은 $146.6 \pm 7.5\mu\text{g}$ 으로 대조군에 비하여 단백질이 크게 증가되었다. 500mM ethanol 투여군의 단백질량은 $96.2 \pm 7.0\mu\text{g}$ 으로, 1000mM ethanol 투여군의 단백질량은 $51.9 \pm 3.4\mu\text{g}$ 으로 대조군에 비하여 유의있는 감소를 나타내었다.

고 찰

신경세포의 성장 또는 분화 정도를 결정하는 여러 가지

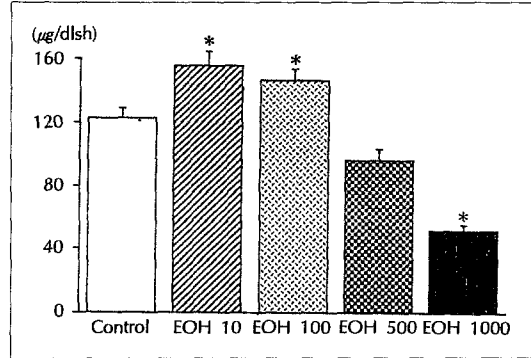


Fig. 5. Effect of ethanol treatment on the total protein content of the culture after 7 days in vitro. Values are expressed as $\mu\text{g}/\text{dish}$. EOH : ethanol(mM)
* $p < 0.05$ compared to control(Dunnet method for multiple contrast was used).

지표들이 있다. 특히 axon 및 dendrite와 같은 신경돌기 성장(outgrowth)은 신경의 구조 및 기능적 특성을 나타내는 과정이므로 신경분화(differentiation)의 중요한 지표로 인정되고 있다¹⁴. 생체 실험에서 ethanol은 대뇌피질(cortex)^{15,16} 해마(hippocampus)^{16,17,18,19} 및 소뇌피질(cerebellar cortex)^{16,18,20}의 발생중인 또는 성숙한 신경세포의 신경돌기에 변화를 일으킨다고 한다. 생체의(in vivo)로 배양된 닭의 척수신경세포에 ethanol을 투여하면 신경세포의 생존율에는 변동을 일으키지 않으면서 신경돌기 형성이 억제된다²¹고 하였으며 흰쥐의 크롬 친화성 세포종(pheochromocytoma, PC12 cell line) 세포배양실험에서는 오히려 신경돌기성장이 촉진되었다고 하는 보고^{22,23}도 있다. 이처럼 ethanol이 신경세포돌기 성장에 미치는 효과는 세포의 종류에 따라 상당한 차이를 나타낸다. 본 연구에서 신경돌기 길이성장을 측정하였을 때 10mM ethanol 투여는 18시간 및 24시간에 대조군에 비하여 유의있는 신경돌기 길이성장을 나타내었고 100mM ethanol은 특히 24시간째 유의있는 길이성장을 나타내었으나 10mM ethanol 투여군에 비하여 그 정도가 미약하였다. 이러한 저농도 ethanol의 신경세포돌기 성장(분화) 촉진기전에 대하여는 본 실험 결과만으로는 알 수 없다. Wooten 및 Ewald(1991)²³는 여러 종류의 alcohol(methanol, ethanol, propanol 및 butanol)을 0.4% (87mM)의 농도로 배양 PC12 세포에 투여하였을 때 신경돌기 성장이 촉진되었으며 이러한 현상은 모든 alcohol에서 동일하게 나타나고 그 정도는 각 alcohol의 측쇄(side-chain)길이의 연관이 있다고 하였다. 따라서

alcohol에 의한 신경세포 분화촉진은 alcohol과 세포막의 상호작용을 통하여 일어난다고 해석하였다. 신경돌기 성장의 세포내 조절을 담당하는 것은 cAMP²⁶⁾, inositol phospholipid²⁵⁾ 및 calcium²⁶⁾²⁷⁾등의 이차전령물질(second messenger)들이 관여한다고 한다. 저농도의 칼슘통로 봉쇄제(calcium channel blocker) 투여에 의하여 세포내로의 calcium유입이 봉쇄되며 신경돌기 길이성장이 촉진된다고 한다¹²⁾. 또 ethanol은 세포배양에서 전압의존성 칼슘통로(voltage-dependent calcium channel)를 차단한다고 하므로²⁸⁾²⁹⁾ 본 실험에서 나타난 10~100mM ethanol투여에 의한 신경돌기성장 촉진은 세포내 calcium농도 감소와 관련이 있을 것이라 생각된다.

본 실험에서 세포체 길이보다 긴 신경돌기를 가진 세포를 생존한 세포로 판단하고 전체 세포수에 대한 생존세포수의 비율을 측정하여 신경세포 생존율을 구하였을 때 10-1000mM ethanol 투여는 18시간 및 24시간에 측정된 신경세포 생존율에 별다른 영향을 미치지 않았다. 소뇌 과립세포(cerebellar granular cell) 배양실험에서¹⁴⁾ fluorescein diacetate-propidium iodide 및 trypan blue 염색법을 이용하여 세포 생존율을 검사하였을 때 50~200mM ethanol 투여는 배양후 24시간까지 대조군에 비하여 별다른 차이를 나타내지 않았다고 하였으며 PC12 배양세포에서는 비교적 측쇄길이가 긴 propanol 및 butanol은 세포독성을 많이 나타내지만 비교적 측쇄가 짧은 methanol 및 ethanol은 세포독성이 적게 나타낸다고 하였다²³⁾.

본 실험에서 신경교세포수의 변동(세포분열)을 보기 위하여 7일째에 실시한 단백질량실험에서 10~100mM ethanol 투여군에서는 단백질양이 대조군에 비하여 유의 있게 증가하였고, 500-1000mM ethanol 투여군에서는 크게 감소하였다. 소뇌 과립세포 배양실험에서 100mM이하의 ethanol은 배양 4~7일에 신경 및 신경교세포 수의 변화를 일으키지 않으며 150~200mM ethanol은 현저한 세포수 감소를 나타낸다고 하였다¹⁴⁾. 한편 Pantazis등³⁰⁾은 비교적 저농도(100~200mg/ml, 21.7~43.4mM)의 ethanol투여로도 PC12 세포 및 소뇌과립세포에 독성을 나타내었다고 하였다. 신경세포의 분화정도가 미숙할수록 대사 및 세포내 calcium농도 증가에 영향을 덜 받기 때문에 이러한 상반된 결과를 보이는 것은 ethanol에 노출될 당시 신경세포의 성숙정도가 중요한 원인 중의 하나일 것으로 시사하였다¹⁴⁾.

이상의 결과로 볼 때 ethanol은 그 자체로 중추신경계에 직접 영향을 미칠 수 있으며 특히 저농도(10~100mM) ethanol은 초기 신경세포 분화 및 후기 신경교 세포 성장을 촉진시키며 신경교 세포의 성장을 억제하기 위하여는 고농도(500~1000mM)의 ethanol 투여가 필요함을 알 수 있었다.

결 론

Ethanol은 강력한 최기형(teratogenic) 작용을 나타내는 물질로 주산기에 포유동물에 노출시키면 ethanol 자체의 세포에 대한 직접 작용에 의하여 주로 중추신경계에 부작용을 일으킨다. 본 연구자는 신경세포 및 신경교 세포에 미치는 ethanol의 영향을 알아보려고 태령 17일째 Sprague-Dawley계 흰쥐 태아의 해마 신경 및 신경교 세포를 1차 배양하여 농도별로 ethanol을 투여하였을 때 나타나는 신경세포 돌기 성장, 신경세포 생존율 및 단백질량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 배양후 18~24시간동안 신경세포 생존율은 대조군과 10mM, 100mM, 500mM 및 1000mM ethanol 투여군간에 별다른 차이를 나타내지 않았다.

2) 10mM ethanol 투여로 18시간 및 24시간 째, 100mM methanol 투여는 24째 신경세포 돌기길이의 유의 있는 길이성장을 나타내었다.

3) 배양 7일째 측정된 단백질량은 10mM 및 100mM methanol투여로 크게 증가되었으며 1000mM 투여군에서는 오히려 유의 있는 감소를 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때 ethanol은 그 자체로 중추신경계에 직접 영향을 미칠 수 있으며 특히 저농도(10~100mM) ethanol은 초기 신경세포 분화 및 후기 신경교 세포 성장을 촉진시키며 신경교 세포의 성장을 억제하기 위하여는 고농도(500~1000mM)의 ethanol 투여가 필요함을 알 수 있었다.

References

- 1) Morganes PJ, Miller MW, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz E, Resnick O : *The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in rat. Neurosci Biobehav Rev* 1978 ; 2 : 137-230

- 2) Patel AJ : *Undernutrition and brain development. Trends Neurosci* 1983 : 6 : 151-154
- 3) Abel EL : *Prenatal effects of alcohol on adult learning in rats. Pharmacol Biochem Behav* 1979 : 10 : 239-243
- 4) Cogan DC, Cohen LE, Sparman G : *Effects of gestational alcohol on the development of neonatal reflexes in the rat. Neurobehav Toxicol Teratol* 1983 : 5 : 517-522
- 5) Diaz J, Samson HH : *Impaired brain growth in neonatal rats exposed to ethanol. Science* 1980 : 208 : 751-753
- 6) Fernandez K, Caul WP, Haenlein M, Vorhees CV : *Effects of prenatal alcohol on homong behavior, maternal responding and openfield activity in rats. Neurobehav Toxicol Teratol* 1983 : 5 : 351-356
- 7) Mezey E : *Effect of ethanol on intestinal morphology, metabolism and function in alcohol related disease in gastroenterology, Springer-Verlag, NewYork, 1985 : pp342-360*
- 8) Cicero TJ : *Sex differences in the effects of alcohol and other psychoactive drugs on endocrine function : Clinical and experimental evidence. Res Adv Alcohol Drug Problem, 1980 : 5 : 545-593*
- 9) Klemm WR, Mallari CG, Dreyfus LR, Fiske JC, Forney E, Mikeska JA : *Ethanol-induced regional and dose-response differences in multiple-unit activity in rabbits. Psychopharmacology* 1976 : 49 : 235-244
- 10) Gonzales RA, Ganz N, Crews FT : *Variations in membrane sensitivity of brain region synaptosomes to the effects of ethanol in vitro and chronic in vivo treatment. J Neurochem* 1987 : 49 : 158-162
- 11) Kandel ER, Schwartz JM : *Principles of neuronal sciences. Elsevier/North Holland, NewYork, 1981 : pp 14-23*
- 12) Mattson MP, Kater SB : *Isolated hippocampal neurons in cryopreserved long-term cultures : Development of neuroarchitecture and sensitivity to NMDA. Int J Dev Neurosci* 1988 : 6 : 439-452
- 13) Bradford M : *A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem* 1976 : 72 : 248-254
- 14) Zou ZY, Richard AR, Roberta JP : *Ethanol enhances neurite outgrowth in primary cultures of rat cerebellar macroneurons. Develop Brain Res* 1993 : 72 : 75-84
- 15) Hama T, Huang KP, Guroff G : *Protein kinase C as a component of a nerve growth factor-sensitive phosphorylation system in PC12 cells. Proc Acad Sci USA* 1986 : 83 : 2353-2357
- 16) Pentney RJ, Miller MW : *Effects of ethanol on neuronal morphogenesis. Development of the central nervous system : Effects of alcohol and opiates, Wiley-Liss Press, 1991 : pp71-107*
- 17) Davies DL, Vernadakis A : *Effects of ethanol on cultured glial cells : proliferation and glutamine synthetase activity. Brain Res* 1984 : 16 : 27-35
- 18) Smith DE, Davies DL : *Effect of perinatal administration of ethanol on the CA1 pyramidal cell of the hippocampus and Purkinje cell of the cerebellum : An ultrastructural survey. J Neurocytol* 1990 : 19 : 708-717
- 19) Walker DW, Hunter BE, Abraham WC : *Neuroanatomical and functional deficits subsequent to chronic ethanol administration in animals. Alcohol Clin Exp Res* 1981 : 5 : 267-282
- 20) Smith DE, Founda A, Canale J : *Effects of perinatally administered ethanol on the development of the cerebellar granule cells. Exp Neurol* 1986 : 92 : 491-501
- 21) Dow KE, Riopelle RJ : *Specific effects of ethanol on neurite-promoting proteoglycans of neuronal origin. Brain Res* 1990 : 508 : 40-45
- 22) Messing RO, Henteleff M, Park JJ : *Ethanol enhances growth factor-induced neurite formation in PC12 cells. Brain Res* 1991 : 565 : 301-311
- 23) Wooten MW, Eward SJ : *Alcohols synergize with NGF to induce early differentiation of PC12 cells. Brain Res* 1991 : 550 : 333-339
- 24) Nirenberg M, Wilson S, Higashida H, Rotter A, Krueger K, Busis N, Ray R, Kenimer JG, Adler M : *Modulation of synapse formation by cyclic adenosine monophosphate. Science* 1983 : 222 : 794-799
- 25) Hammer Jr RP : *Alcohol effects on developing neuronal sturcture. Alcohol and brain development, Oxford University Press, NewYork, 1986 : pp184-203*
- 26) Connor JA : *Digital imaging of free calcium changes and of spatial gradients in growing processes in single mammalian central nervous system cells. Prog Natl Acad Sci USA* 1986 : 83 : 6179-6183
- 27) Kater SB, Mills LR : *Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. J Neurosci* 1991 : 7 : 4034-4043
- 28) Dildi-Mayfield JE, Marchu T, Leslie SW : *Ethanol and voltage- or receptor-mediated increases in cy-*

- tosolic Ca⁺⁺ in brain cells. Alcohol 1991 : 9 : 63-69*
- 29) Oakes SG, Pozos RS : *Electrophysiological effects of acute ethanol exposure II. Alterations in the calcium component of action potentials from sensory neurons in dissociated culture. Dev Brain Res 1981 : 5 : 251-255*
- 30) Pantazis NJ, Dohrman DP, Luo J, Goodlett CR West JR : *Alcohol reduces the number of pheochromocytoma(PC12) cells in culture. Alcohol 1992 : 9 : 171-180*