

한국재래산양 췌장 내분비세포의 면역전자현미경적  
연구 : bovine pancreatic polypeptide와  
chromogranin의 공존

이 재 현

**Immunoelectron Microscopic Study on the Endocrine  
Pancreas of the Native Korean Goat: Colocalization of  
Bovine Pancreatic Polypeptide and Chromogranin**

Lee, Jae-Hyun

(Received March, 1995)

**ABSTRACT**

Pancreatic endocrine cells of the native Korean goat were investigated immunocytochemically at electron microscopic level.

All glucagon-, insulin-, somatostatin- and pancreatic polypeptide(PP)-immunoreactive cells were showed chromogranin(CG) immunoreactivity in the secretory granules of each cells.

In addition, bovine pancreatic polypeptide immunoreactivity was found to be colocalized in the secretory granules of the glucagon and insulin cells.

These observations support that chromogranin is available as the marker of pancreatic endocrine cells on the native Korean goat and BPP colocalized in the secretory granules of glucagon and insulin cells.

**서 론**

일명 Langerhan's islet라 불리우는 췌도는 과립의 형태와 면역세포학적 특징을 근거로 glucagon(A), insulin(B), somatostatin(D) 및 pancreatic polypeptide(PP) 등 4종의 내분비세포로 구성되어 있다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다.

어류(Stefan & Falkmer, 1980; Agulleiro *et al.*,

1993)에서 사람(Larsson *et al.*, 1976; Buchan & Polak, 1980)에 이르기까지 많은 척추동물에 있어서 정상적인 췌도의 내분비세포에 대한 전자현미경학적 연구가 보고되어 있으나, 반추수 췌도의 내분비세포에 대한 전자현미경적 연구는 드물며(Galabova & Petkov, 1975; Larsson *et al.*, 1976; Hitaka *et al.*, 1979; Bonner-Weir & Like, 1980; Titlback *et al.*, 1985) 특히 한국재래산양의 췌도에 분포하는 내분비 세포에 대한 면역전자현미경적 및 세포내 peptide의 공존에 관한 보고는

경북대학교 수의과대학

Department of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

이 논문은 한국학술재단 '93년도 국비해의파견 연구 지원 계획에 의해 연구 되었음.

찾아볼 수 없다. Agulleiro 등(1993)과 Kaung(1985) 그리고 Wolfe-Coote와 Toit(1987)는 각각 sea bass와 rat 및 baboon 췌도의 glucagon 세포에서 glucagon과 PP가 공존한다고 하였으며, Nakajima 등(1988)은 소의 췌도에서 serotonin이 glucagon 세포와 BPP 세포에서 각각 면역반응을 보인다고 하였다.

본 실험에서는 한국재래산양의 췌도에 있어서 내분비 세포내 peptide의 colocalization 여부를 구명하고자 면역세포화학적으로 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 조직처리

한국재래산양(체중 약 13~14 kg)을 pentobarbital sodium으로 마취하여 경동맥으로부터 방혈하였다. 개복후 췌장의 우엽으로부터 조직을 절취하고, 2% paraformaldehyde와 2.5% glutaraldehyde 혼합액(pH 7.3)으로 4°C에서 4시간 고정하고, 0.1M sodium cacodylate buffer로 세척하였다. 고정된 조직은 ethanol 계열에서 탈수후 Lowicryl K<sub>4</sub>M resin (Chemische Werke Lowi, Germany)으로 포매하였다.

Lowicryl K<sub>4</sub>M resin의 중합은 -35°C에서 24시간 시행하였으며 그후 실온에서 Ultraviolet polymerizer (Dosaka EM Co Ltd., Kyoto, Japan)하에 3~4일간 중합하였다. 포매된 조직은 Ultramicrotome (Ultracuts, Reichert-Nissei)로 초박절편한 후 nickel grid에 부착시켜 37°C에서 건조시켰다.

### 2. 면역전자현미경법

Lowicryl K<sub>4</sub>M resin으로 포매된 초박절편은 Bendayan법(1982)에 의해 double labeling을 시행하였으며, 전 과정은 습윤 상자내에서 행하였다. 즉 grid에 부착시킨 절편을 phosphate buffered(pH 7.3) saline (PBS)에서 A면을 씻고, 1% bovine serum albumin (BSA)으로 실온에서 30분간 처리한후, 1차 항체로 4°C 냉장고내에서 over night시켰다.

1차 항체는 anti-glucagon serum(1:500, CRB Ltd.), anti-insulin serum(1:500, Incstar corp), anti-somatostatin serum(1:500, CRB Ltd.), anti-bovine pancreatic polypeptide(BPP)(1:500,

UCB bioproducts) 및 anti-porcine sp-1/chromogranin(CG)(1:200, INC)를 사용하였다. 이를 PBS로 씻고, 실온에서 1시간동안 colloidal gold(15 nm 또는 5 nm) labeled protein A complex(E-Y, Laboratories, INC, USA)로 반응시킨 후 PBS와 증류수로 세척하여 건조시켰다. 동일한 과정을 B면에서도 실시하였으며 B면에도 15 nm 또는 5 nm의 Colloidal gold를 반응시켰다. 이후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 실시한 후 전자현미경(JEOL 1210)으로 관찰하였다. 한편 대조로 1차 항체대신 non-immunized rabbit serum 또는 PBS로 반응시켰다.

## 결 과

한국재래산양의 췌도에서는 전자현미경적으로 그 과립의 형태적 특징에 따라 4가지 형태의 내분비세포가 관찰되며, 이들 각 세포에 대한 peptide의 공존에 대해 알아보기 위하여 이중 면역반응에 의해 전자현미경으로 관찰하였던 바 다음과 같은 각 세포의 면역반응성이 인정되었다.

Glucagon(A)세포는 다수의 전자밀도가 높은 분비과립이 세포질내에서 관찰되었으며, 이들 과립들은 둥글고, 약 200~440 nm의 크기를 가지고, 특히 과립내용물과 과립막 사이에는 비교적 좁은 halo를 보였다. 이 세포의 과립에서는 bovine pancreatic polypeptide(Fig. 1)와 bovine chromogranin(Fig. 2)이 공존하고 있었다. BPP labeling 금입자(15 nm)는 주로 과립물질의 core 부분에서 관찰되며 CG labeling 금입자(5 nm) 역시 주로 core 부분에서 인정되었다.

Insulin(B)세포는 다수의 원형 과립들이 세포질내에서 관찰되었으며, 이들 과립은 180~450 nm의 크기로서 과립막과 내용물 사이에 넓은 halo를 나타내고 내용물의 전자밀도는 A세포 보다 낮았다. 이 세포의 과립에는 BPP와 CG가 공존하였다. 특히 BPP labeling 금입자(15 nm)는 다수가 과립의 core 부분에 존재하나 소수는 halo 부분에도 출현하였으며(Fig. 3), CG labeling 금입자는 주로 dense core에서 관찰되었다(Fig. 4).

CG가 A세포와 B세포에 면역반응을 보이는 것은 CG 단독 염색에서도 확인할 수 있었다. 이들 CG labeling 금입자(5 nm)는 A세포와 B세포의 과립에서만 관찰되었다(Fig. 5).

Somatostatin(D) 세포는 전자밀도가 낮고 둥글며 비교적 A 및 B세포보다 작은(130~280 nm) 과립들이 세포질내에서 관찰되었다. 이들 과립에서는 CG labeling 금입자(5 nm)가 공존하나 비교적 반응이 약하여 금입자의 수가 다른 세포의 과립에서보다 소수로 나타나며 대다수의 금입자는 dense core에서 관찰되나 소수의 금입자는 halo 부분에서도 인정되었다(Fig. 6).

pancreatic polypeptide(PP) 세포는 췌도에서 매우 희소하게 출현하였으며, 전자밀도가 높고 다양한 형태의 과립들이 관찰되었다. 이들 과립은 길이 240~440 nm, 폭 150~200 nm의 크기로서 과립막과 내용물사이는 거의 밀착된 형태를 보였다. PP세포 역시 CG의 공존을 관찰할 수 있었다. 이중 염색에서 CG labeling 금입자(5 nm)는 대다수가 과립의 dense core에서 관찰되나 소수의 금입자는 halo 부분에서도 볼 수 있었다(Fig. 7).

## 고 찰

각종 동물의 췌도 내분비세포의 과립은 전자현미경적으로 그 크기에 있어서 동물종에 따라 상이하다. 본 실험에서 각 내분비세포의 과립의 크기는 소(Galabova & Solcia, 1972), 개(Munger *et al.*, 1965), guinea pig(Baskin *et al.*, 1984) 및 baboon(Wolfe-Coote & Toit, 1987)의 그것과 유사하였다. 그러나 특히 사람에게 있어서 D세포의 과립의 크기에 대해 Shibasaki와 Ito(1969)와 Beaten 등(1977)은 서로 다르게 보고하였으며 본 실험에서는 이들의 성적보다 작거나 크게 나타났다.

또한 과립의 형태에 있어서도 동물에 따라 다르게 보고되고 있다. 즉 B세포의 과립은 사람(Shibasaki & Ito, 1969), 돼지(Capella & Solcia, 1972), 개(Munger *et al.*, 1970), 어류(Kobayashi & Takahashi, 1970) 등에서 crystalloid 구조를 보이나, guinea pig(Baskin *et al.*, 1984), golden hamster(Petkov *et al.*, 1970), 토끼 및 Opossum(Munger *et al.*, 1965)의 B세포 과립에서는 crystalloid 구조를 볼 수 없다. 본 실험에서도 B세포의 과립에서 crystalloid 구조는 관찰되지 않았다.

한편 몇몇 동물의 췌도에 있어서 내분비세포의 면역반응이 동물종에 따라 다르며 동일 세포의 분비과립에 두 가지 peptide가 공존하고 있다는 사실이 알려져 있다.

즉 어류인 sea bass(Agulleiro *et al.*, 1993)와 rat(Kaung, 1985)의 췌도에 있어서 glucagon 세포의 과립에는 glucagon과 PP가 공존하며, Chacma baboon(Wolfe-Coote & Toit, 1987)의 췌도에서 소수의 세포는 glucagon과 PP가 공존한다. Nakajima 등(1988)은 소의 췌도에서 glucagon 세포와 PP세포가 serotonin에 각각 면역반응을 나타낸다고 하였다.

본 실험에서는 A, B, D 및 PP세포에서 각각 chromogranin에 면역반응을 나타내었으며, A와 B세포에서는 BPP가 면역반응을 나타내어 이들 peptide가 동일과립내에 공존하고 있음을 확인하였다.

Chromogranin은 부신수질의 분비과립에서 분리된 산성용해성 단백질이며(Blaschko *et al.*, 1967), A, B 및 C(secretogranin II) 등 세가지 속이 있고(Fische-Colbrie & Schober, 1987; Eiden *et al.*, 1989), 부신수질의 내분비기관과 세포에 널리 분포되어 모든 신경내분비세포의 marker로 알려져 있다(Fujita *et al.*, 1988). 또 chromogranin은 내분비세포 과립에서 각종 amine 또는 peptide와 공존하여(Ehrhart *et al.*, 1986; Bassetti *et al.*, 1990) 분비과립 기질의 구성에 관여한다고 한다(Konecki *et al.*, 1987).

한편 Ehrhart 등(1986)은 소의 췌도 내분비세포에서 CGA-like 면역반응이 분비소포내에 국한하여 나타나며, hormone은 중심부에 주로 출현하나 CGA는 주변부에 출현하는 것으로 미루어 CGA-like 단백질이 분비세포 기질의 주요성분임을 시사하였다. 또 Cetin과 Grube(1991)는 guinea pig의 췌장에서 CGA와 CGB의 면역반응이 과립에 따라 다르다고 하였으며, Grube와 Yoshie(1989)는 CG의 세포내 국재가 동물종에 따라 상이하다고 하였으나, Cetin(1992)은 동물종 및 내분비세포에 따라서도 CG의 반응이 상이하다 하였다.

본 실험에서는 CG가 A 및 B세포에서는 주로 과립의 dense core에서 관찰되었으나 D 및 PP세포에서는 소수의 금입자가 halo 부분에서도 관찰되어 세포의 종류에 따라 다르게 나타났다. 또한 모든 내분비세포에서 CG의 반응이 관찰된 것은 Fujita 등(1988)의 주장과 같이 재산양에서도 내분비세포의 marker로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

한편 몇몇 동물의 췌장 내분비세포중 일부 세포의 과립에서 BPP의 공존이 보고되어 있다. Wolf-Coote와 Toit(1989)는 baboon에서, Kaung(1985)은 rat에서, Agulleiro 등(1993)은 sea bass에서 췌도의 A 및 B세

포에서 BPP가 공존함을 보고하였다. 본 실험에서도 A 및 B세포의 과립에서 BPP가 공존함을 관찰하였다.

그러나 Hashimoto 등(1988)의 보고와 같은 glucagon과 insulin의 공존, 그리고 somatostatin과 insulin의 공존(Saulnier-Michel *et al.*, 1992)은 관찰되지 않았다. Hashimoto 등(1988)은 rat의 췌도의 progenitor cell이 태생 20.5일에서 glucagon과 insulin을 동시에 합성하며 이후 췌도가 성숙함에 따라 A 및 B세포로 각각 분화해 나가나 그 기전은 알 수 없다고 하였다. 또 Saulnier-Michel 등(1992)은 췌장 내분비세포의 RIN cell line인 RW세포에서 somatostatin 세포가 두가지형 즉 somatostatin만을 함유하는 세포형과 insulin과 somatostatin을 함께 함유하는 세포형을 관찰하고 이 같은 동일세포내 두가지 hormone의 공존은 두세포의 gene 발현 조절 및 분화과정에 매우 밀접한 관계가 있을 것으로 추정하고 있다. 본 실험에서는 태생초기의 췌도에 대해서 관찰하지 않았으므로 이상과 같은 사실을 알 수 없으며, 발생학적으로 초기단계의 췌도에 대한 peptide의 공존에 대해 금후 더 구명해야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

한국재래산양의 췌도에 있어서 내분비세포의 과립내 몇가지 peptide의 공존에 대해 면역전자현미경적으로 관찰하였다. 모든 glucagon, insulin, somatostatin 및 pancreatic polypeptide (PP) 세포의 과립에서 chromogranin의 면역반응을 관찰하였다. 또 bovine pancreatic polypeptide 면역반응이 glucagon과 insulin 세포의 과립에서 관찰되었다. 이상의 소결으로 chromogranin은 한국재래산양 췌장내분비세포의 marker가 될 수 있으며, BPP가 A 및 B세포에 공존함을 알 수 있었으나 그 기능은 알 수 없다.

## 참 고 문 헌

- Agulleiro, B., M.T. Lozano, M.E. Abad and M.P. Gracia Hernandez. 1993. Electron microscopic immunocytochemical study of the endocrine pancreas of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Cell Tissue Res.* 274 : 303-314.
- Baskin, D.G., K.C. Gorray and W.Y. Fujimoto. 1984. Immunocytochemical identification of cells containing insulin, glucagon, somatostatin and pancreatic polypeptide in the islets of Langerhans of the guinea pig pancreas with light and electron microscopy. *Anat. Rec.* 208 : 567-578.
- Bassetti, M., W.B. Huttner, A. Zanini and P. Rosa. 1990. Co-localization of secretogranins chromogranins with thyrotropin and luteinizing hormone in secretory granules of cow anterior pituitary. *J. Histochem. Cytochem.* 38 : 1353-1363.
- Beatens, D., J. De Mey and W. Gepts. 1977. Immunohistochemical and ultrastructural identification of the pancreatic polypeptide-producing cell (PP-cell) in the human pancreas. *Cell Tissue Res.* 186 : 239-246.
- Bendayan, M. 1982. Double immunocytochemical labeling applying the protein A-gold technique. *J. Histochem. Cytochem.* 30 : 81-85.
- Blaschko, H., R.S. Comline, F.S. Schneider, M. Silver and A.D. Smith. 1967. Secretion of chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature.* 215 : 58-59.
- Bonner-Weit, S. and A.A. Like. 1980. Dual population of islets of Langerhans in bovine pancreas. *Cell Tissue Res.* 206 : 157-170.
- Buchan, A.M. and J.M. Polak. 1980. The classification of the human gastroenteropancreatic endocrine cells. *Invest. Cell Pathol.* 3 : 51-71.
- Cetin, Y. 1992. Chromogranin A immunoreactivity and Grimelius' argyrophilia. *Anat. Embryol.* 185 : 207-215.
- Cetin, Y. and D. Grube. 1991. Topology of chromogranins in secretory granules of endocrine cells. *Histochem.* 96 : 301-310.
- Capella, C. and E. Solica. 1972. The endocrine cells of the pig gastrointestinal mucosa and pancreas. *Arch. Histol. Jap.* 35 : 1-29.
- Ehrhart, M., D. Grube, M.F. Bader, D. Aunis and M. Gratzl. 1986. Chromogranin A in the pancreatic islet: Cellular and subcellular distribution. *J. Histochem. Cytochem.* 34 : 1973-1983.

- Eiden, L.E., W.B. Huttner, J. Mallet, D.T. O'Connor, H. Winkler and A. Zanini. 1987. A nomenclature proposal for the chromogranin/secretogranin proteins. *Neuroscience*. 21 : 1019-1021.
- Fischer-Colbrie, R. and M. Schober. 1987. Isolation and characterization of chromogranin A, B and C from bovine chromaffin granules and a rat pheochromocytoma. *J. Neurochem.* 48 : 262-270.
- Fujita, T., T. Kanno and S. Kobayashi. 1988. *The paraneuron*. Springer, Tokyo-Berlin-Heidelberg-New York.
- Galabova, R. and P. Petkov. 1975. Electron microscopy of the endocrine pancreas of cattle (*Bos taurus L.*) *Acta anat.* 92 : 560-569.
- Grube, D. and S. Yoshie. 1989. Immunohistochemistry of chromogranin A and B and secretogranin II in the canine endocrine pancreas. *Arch. Histol. Cytol.* 52 : 287-298.
- Hashimoto, T., H. Kawano, S. Daikoku, K. Shima, H. Taniguchi and S. Baba. 1988. Transient coappearance of glucagon and insulin in the progenitor cells of the rat pancreatic islets. *Anat. Embryol.* 178 : 489-497.
- Hitaka, S., H. Tamate and K. Hikosaka. 1979. The fine structure of endocrine cells in the sheep pancreas. *Tohoku J. Agri. Res.* 30 : 66-75.
- Kaung, H.C. 1985. Electron microscopic immunocytochemical localization of glucagon and pancreatic polypeptide in rat pancreas: Characterization of a population of islet cells containing both peptides. *Anat. Rec.* 212 : 292-300.
- Kobayashi, K. and Y. Takahashi, 1970. Light and electron microscopic observations of the islets of Langerhans in *Carassius carassius longsdorffii*. *Arch. histol. Jap.* 31 : 433-454.
- Konecki, D.S., U.M. Benedum, H.H. Gerdes and W. B. Huttner. 1987. The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin. *J. Biol. Chem.* 262 : 17026-17030.
- Larsson, L. -I., F. Sundler and R. Hakanson. 1975. Immunohistochemical localization of human pancreatic polypeptide (HPP) to a population of islet cells. *Cell Tissue Res.* 156 : 167-171.
- Larsson, L. -I., F. Sundler and R. Hakanson. 1976. Pancreatic polypeptide-A postulated new hormone: identification of its cellular storage site by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Diabetologia.* 12 : 211-226.
- Munger, B.L., F. Caramia and P.E. Lacy. 1965. The ultrastructural basis for the identification of cell types in the pancreatic islets. II. rabbit, dog and opossum. *Z. Zellforsch.* 67 : 776-798.
- Nakajima, S., N. Kitamura, J. Yamada, T. Yamashita and T. Watanabe. 1988. Immunohistochemical study on the endocrine pancreas of cattle with special reference to coexistence of serotonin and glucagon or bovine pancreatic polypeptide. *Acta anat.* 131 : 235-240.
- Petkov, P., R. Galabova and St. Manolov. 1970. Electron microscopic investigation on the Langerhans islets of the golden hamster. *Arch. Histol. Jap.* 32 : 229-239.
- Saulnier-Michel, C., M. Fromont-Racine and R. Pictet. 1992. Co-expression of insulin and somatostatin genes in pancreatic endocrine cells selected for their high level of insulin gene transcription. *J. Cell Sci.* 101 : 795-799.
- Sibasaki, S. and T. Ito. 1969. Electron microscopic study on the human pancreatic islets. *Arch. Histol. Jap.* 31 : 119-154.
- Stefan, Y. and S. Falkmer. 1980. Identification of four endocrine cell type in the pancreas of *Cottus scorpius* (Teleosti) by immunofluorescence and electron microscopy. *Gen. Comp. Endocrinol.* 42 : 171-178.
- Titlbach, M.K. Flat and S. Falker, 1985. Postnatal maturation of the islets of Langerhans in sheep. Light microscopic, immunohistochemical, morphometric and ultrastructural investigations with particular reference to the transient appearance of argyrophil insulin immunoreactive cells. *Diabetes Res.* 2 : 5-15.
- Wolfe-Coote, S.A. and D.F. Toit. 1987. Morphology and endocrine production of cells in the islets of

Langerhans of the chacma baboon. *Anat. Rec.* 218 : 56-65.

### FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** A-cell immunostained for glucagon (small gold particles) and bovine pancreatic polypeptide (large gold particles).  $\times 75,000$
- Fig. 2.** Glucagon (large gold particles) and chromogranin (small gold particles) immunoreactivities are seen in the secretory granules.  $\times 75,000$
- Fig. 3.** Insulin (small gold particles) and bovine pancreatic polypeptide (large gold particles) immunoreactivities are seen in the secretory granules.  $\times 75,000$
- Fig. 4.** Insulin (large gold particles) and chromogranin (small gold particles) immunoreactivities are seen in the secretory granules.  $\times 75,000$
- Fig. 5.** Chromogranin immunoreactivity is seen in the secretory granules of A and B cell.  $\times 15,000$
- Fig. 6.** Somatostatin (large gold particles) and chromogranin (small gold particles) immunoreactivities are seen in the secretory granules.  $\times 75,000$
- Fig. 7.** Bovine pancreatic polypeptide (large gold particles) and chromogranin (small gold particles) immunoreactivities are seen in the secretory granules.  $\times 75,000$



