

한국재래산양 갑상샘에 있어서 Calcitonin면역 반응세포의 개체발생

이재현 · 구세광 · 이형식*

경북대학교 수의과대학 · 경상대학교 자연과학대학 생물학과*
(1996년 3월 8일 접수)

Ontogeny of calcitonin immunoreactive cells in the thyroid glands of Korean native goat

Jae-hyun Lee , Sae-kwang Ku, Hyeung-sik Lee*

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University
Dept. of Biology, College of Natural Science Kyungsan University*

(Received Mar 8, 1996)

Abstract : The development of calcitonin, serotonin(5-HT) and bovine chromogranin (BCG)-immunoreactive cells was investigated in the thyroid glands of Korean native goat from fetus to adult, using an immunohistochemical method. Moderate number of calcitonin-immunoreactive cells were present in the thyroid glands from 1 month to 6 months after birth, whereas a few in the adult. They were not present in the thyroid glands of fetus and 1 day after birth. A number of 5-HT- and BCG-immunoreactive cells were present in the thyroid glands of Korean native goat from fetus to adult. They were increased in number with age. BCG-immunoreactive cells were weakly reacted in fetus and 1 day after birth, while these cell were strongly stained from 1 month to adult.

These findings suggest that calcitonin-, 5-HT- and BCG-immunoreactive cells were present in the thyroid gland of Korean native goat.

Key words : calcitonin, 5-HT, BCG, immunoreactive cell, Korean native goat.

서 론

갑상샘 C 세포는 혈중 칼슘농도를 조절하는 polypeptide 호르몬인 calcitonin을 합성 분비하며¹, 하등척수동물에서는 ultimobranchial gland의 실질세포에서 calcitonin이 분

비되고 발생도중 신경능에서 분화한다². 포유류의 갑상샘 C세포에서는 calcitonin이외 동물종에 따라 somatostatin, serotonin(5-HT), CCK, chromogranin, calcitonin gene-related peptide(CGRP) 등의 peptide와 amine을 분비하며 일부 동물에서는 동일 세포에서 두 가지 특히 calcitonin과 CGRP, calcitonin과 somatostatin이 공존하고 있음이 알려

Address reprint request to Dr. Jae-hyun Lee, College of Veterinary medicine, Kyungpook National University, Tae-gu 702-701, Republic of Korea.

져 있다^{3,13}. 그러나 이들 protein과 peptide의 분포는 동물 종, 항체, 조직고정 및 과정에 따라 다르고¹⁴⁻¹⁶, 뿐만 아니라 동물종 및 연령, 갑상샘의 부위에 따라 C세포의 분포와 수가 심한 차이를 나타내고 있다^{8,16-25}. 갑상샘 C세포에 대한 계통발생학적 연구는 여러 동물에서 연구된 바 있으나^{8,16-17,19,24-25}, 한국재래산양에 있어서의 연구는 극히 드물다¹⁰. 본 연구에서는 한국재래산양 갑상샘 C세포에 있어서 calcitonin 면역반응과 bovine chromogranin(BCG) 및 serotonin(5-HT) 면역반응세포에 대한 출현시기 및 분포를 알아보기 위하여 면역조직화학적으로 관찰하였다.

재료 및 방법

한국재래산양을 Xylazine hydrochloride(Rompun®, Bayer)으로 마취한 후 방혈 도살하고, 임신말기의 태아와 생후 1일, 1개월, 6개월 및 성체에서 갑상샘을 절취하였다. 절취한 조직은 Bouin액에 고정하여 paraffin포매후 3-4 μ m로 연속절편하였고, 조직학적 구조를 확인하기 위해 H-E염색을 실시하였다.

또 각 절편은 PAP법(oxidase anti-oxidase methode)²⁶으로 면역염색을 실시하였으며 이때 사용된 항혈청 및 희석배율은 Table 1에서 보는 바와 같다. 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 normal goat serum을 처리하였고, DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.01% H₂O₂ in HCl buffer)로 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 핵 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Table 1. Antisera used in this study

Antisera*	Code	Source	Dilution
Calcitonin	PU0360694	BioGenex	1:40
Serotonin(5-HT)	8535028	Immunonuclear Corp.	1:10,000
Bovine Chromogranin(BCG)	8541011	Immunonuclear Corp.	1:500

* All antisera were raised in rabbit.

결 과

본 실험에서 각 연령별 calcitonin, 5-HT 및 BCG 면역

반응세포의 출현빈도는 Table 2에서 보는 바와 같다. 한국재래산양 갑상샘에 있어서 calcitonin 면역반응세포는 태아와 1일령에서는 검출되지 않았으며, 1개월령과 6개월령에서 중등도의 출현을 보였고, 성체에서는 소수로 출현하였다(Fig 1a-c).

Table 2. The relative frequencies of endocrine cells in the thyroid gland of Korean native goat during development

	fetus	1day old	1month old	6months old	adult
Calcitonin	-	-	++	++	+
Serotonin(5-HT)	+	+	++	+++	+++
Bovine chromogranin(BCG)	+	++	+++	+++	+++

* - not detected, + few, ++ moderate, +++ numerous.

이들 세포들은 대체로 원형 또는 타원형을 나타내었고, 주로 소포 사이 또는 소포 주위에서 관찰되었다. 5-HT 면역반응세포는 태아에서 성체에 이르기까지 모든 갑상샘에서 관찰되었다(Fig 2a-d). 이 세포의 출현빈도는 태아와 1일령에서는 소수로 관찰되었으나 1개월령에서 중등도로, 6개월령과 성체에서는 다수 관찰되어 연령에 따라 증가하였다. 이들 면역반응세포들의 형태는 주로 원형 및 타원형을 나타내었으나 소수의 세포들은 세포질 돌기를 가진 것도 관찰되어 매우 다양한 형태를 보였으며, 소포 사이 또는 소포 주위에서 관찰되었다.

BCG 면역반응세포의 출현빈도는 5-HT 면역반응세포의 그것과 매우 유사하였으며, 세포수는 5-HT 면역반응세포에 비해 특히 1개월령부터 증가함을 볼 수 있었다(Fig 3a-e). 이들 세포들의 면역반응성은 태아 및 1일령 갑상샘에서는 약하게 반응하였으나(Fig 3a-b) 1개월령부터 성체에 이르기까지의 면역반응성은 매우 강하였다(Fig 3c-e). 세포의 형태는 태아와 1일령에서는 대체로 원형 및 타원형을 나타내었으나(Fig 3a-b), 그 이후의 연령에서는 다형태성의 세포가 다수 관찰되었으며(Fig 3c-e) 또 갑상샘 전반에 걸쳐 소포 사이 및 소포 주위에 출현하였다.

고 찰

Calcitonin은 갑상샘 소포 주위에 분포하는 paraneuron 형태의 내분비세포인 소포결세포(parafollicular cell 또는

C cell)에서 분비하는 호르몬으로써 부갑상샘 호르몬과 길항적으로 작용하여 골의 용해를 억제함으로써 혈중 칼슘 농도를 낮추는 기능을 한다.

본 실험에서는 한국재래산양의 갑상샘에 있어서 calcitonin 면역반응을 나타내는 C세포와 5-HT 및 BCG 면역반응세포의 연령별 분포를 확인하였던 바 calcitonin 면역반응세포는 태아와 생후 1일령에서는 관찰되지 않았으나 생후 1개월령 및 6개월령에서 중등도로 출현하였고 성체에서는 소수로 관찰되었다. 또 5-HT 및 BCG 면역반응세포는 태아에서 성체에 이르기까지 모두 관찰되었으며, 대체로 연령증가에 따라 이들 세포들의 증수를 볼 수 있었다. 또한 본 실험에서는 calcitonin 분비세포가 5-HT 및 BCG 면역반응세포 보다 수적으로 소수 분포하였다.

현재까지 각종 동물의 갑상샘 C 세포의 출현에 대해서는 많은 연구가 수행되어 졌다. 즉, rat^{14,17,19,22,24-25,27}, 면양^{16,23}, 돼지¹⁸, 개^{6,8-9,12,30}, guinea pig¹¹, 토끼⁵, 사람²⁸과 여러 동물^{7,10,14,21}에서 C세포를 동정하였다. 그러나 C세포의 연령별 수적 차이에 대해서 사람에서는 나이와 함께 감소하나²⁸ Stux et al²⁹은 rat에서 일생중 수적변동이 없다고 하였고 Petko et al²⁷은 생후 15일에 가장 다수 출현한다고 한, 반면 Blä hser¹⁴, Alumer et al¹⁷, Martin-Lacave et al²⁴, Conde et al²⁵은 rat에서 그리고 Okada et al²³은 면양에서 각각 연령 증가에 따라 C세포의 수적 증가를 보고하고 있어 상이한 소견을 보이고 있다. 특히 Alumer¹⁷은 rat의 태생기에 C세포는 거의 없고 신생기에 약간 증가하여 출생 후 부터 성체에 이르기까지 증가한다고 하였다. 본 실험에서는 C세포가 태생기와 생후 1일령에서는 관찰되지 않았고, 생후 1개월령과 6개월령에서 중등도로 출현하나 성체에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이와같은 소견은 C세포의 형태와 분포 패턴이 동물종간 및 절편에 따라 다르다는 Okada et al¹⁶, Kameda⁸의 주장과 일치한다고 할 수 있으며, 이와 함께 사용한 혈청의 종류와도 관계가 있을 것으로 생각된다. 그러나 Zabel과 Sch ä fer⁵가 토끼에서 C세포는 calcitonin을 저장하는 세포와 somatostatin을 저장하는 두 가지 형태의 세포가 존재한다고한 점을 미루어 볼 때 한국재래산양의 갑상샘에는 성체에서 소수의 C세포가 출현하므로 calcitonin에 반응을 보이지 않는 somatostatin 저장세포가 존재할 가능성도 부정할 수 없고 이는 Thomas et al¹³이 갑상샘의 C세포는 발생도중 즉, 두 가지 calcitonin과 somatostatin 합성세포로 분화한다는 주장을 확인할 필요가 있다.

한편 포유류 갑상샘 C세포에 있어서 5-HT 면역반응성에 대한 보고는 드물다. Falck & Owman³¹, Gershon & Nunez³²는 FIF법을 이용하여 양, 염소 및 박쥐에서 5-HT 면역반응세포가 출현함을 보았고, Zabel & Sch ä fer²⁰ 및 Zabel⁴은 5-HT 면역반응세포가 5-hydroxy-*t*-tryptophan을 처리한 rat과 토끼 갑상샘의 모든 C세포에서 관찰되었다고 하였다. 또 최근 정 등¹⁰은 토끼, 개, 소, 염소, 사슴, 돼지의 갑상샘에서 5-HT 면역반응세포를 관찰하고 이들 동물중 염소와 사슴에서 다수, 그 외의 동물에서는 소수가 검출되었다고 하였으며, 성숙한 guinea pig의 갑상샘에서도 5-HT 면역반응세포를 동정하였다¹¹. 그러나 이상의 보고에서는 연령별 검색이 이루어져 있지 않고 있다. 본 실험에서는 태아기에서 성체에 이르기까지 전 연령에서 5-HT 면역반응세포가 관찰되었으며, 이 세포는 연령에 따라 수적으로 증가하였다. 이같은 사실은 정 등¹⁰이 주장한 바와 같이 일부 포유류의 갑상샘 C세포에는 calcitonin 이외에 5-HT세포도 존재함을 알 수 있다.

Chromogranin(CG)은 anionic protein계에 속하며, CGA, CGB, CGC 등 여러 종류가 있고 신경조직에와 같이 대부분의 amine, peptide 생산내분비세포의 분비과립에 공존하고^{33,34}, 내분비세포의 marker로 유용하다³⁵. 그러나 이들 protein과 peptide의 분포는 동물종, 항혈청, 조직과정 및 여러 과정에 따라 다르다¹⁵. Solcia et al³⁶은 갑상샘 C세포의 분비과립내에는 neuroendocrine peptide이외에 CGA와 CGC를 저장하는 특징을 가진다고 하였고, Nolan et al³⁷도 C세포에서 BCG 면역반응을 관찰하였다. 본 실험에서는 태아와 성체에 이르기까지 BCG 면역반응세포를 관찰할 수 있었으며, 면역반응성은 태아기와 생후 1일령에서는 비교적 약한 반응성을 보였으나, 생후 1개월령부터 성체에 이르기까지는 강한 면역반응을 나타내었다. 또 연령에 따라 수적으로 면역반응세포가 증가함을 볼 수 있었다. CG의 면역반응은 동물의 종에 따라 다르다. 즉, Zabel et al²¹은 여러 동물중, guinea pig와 돼지에서는 CG 면역반응세포가 관찰되나 rat, 햄스타, mongolian gerbil, mice, 토끼 등에서는 검출할 수 없었다고 하였고, Okada¹⁶는 소와 rat에서 C세포가 BCG에 면역반응 양성을 나타내나, 면양의 성체와 태아의 C세포에서는 CGA 면역반응이 차이를 나타내어 태아가 보다 성체에서 반응이 약하였다고 하였다. 그러나 이같은 차이에 대한 의의는 알 수 없으며, CGA의 양적 차이 또는 고정방법의 차이로 생각된다고 하였다. 본 실험에서는 태아기와 생후 1일령 보

다 생후 1개월령 이후에서 강한 면역반응을 나타낸 것은 Okada¹⁶의 보고와 상이하며 이같은 차이에 대한 의의는 알 수 없다.

이상의 결과로 볼 때 한국재래산양의 갑상샘에는 calcitonin 면역반응세포 이외에 5-HT 및 BCG 면역반응세포가 더 존재함을 알 수 있으며, C세포내에 somatostatin이 공존하는지 여부에 대해서는 금후 더 구명해야할 것으로 생각된다.

결 론

한국재래산양 갑상샘의 calcitonin 면역반응세포의 출현 시기 및 분포를 알아보기 위하여 분만말기 태아에서 성체

에 이르기까지 갑상샘에 대해 면역조직화학적으로 관찰하였다.

Calcitonin 면역반응세포는 생후 1개월과 6개월에서 중등도로 출현하였고 성체에서는 소수 관찰되었으나, 태아와 생후 1일령에서는 관찰되지 않았다.

5-HT 및 BCG 면역반응세포는 태아에서 성체에 이르기까지 모든 갑상샘에서 관찰되었으며 일령에 따라 수적으로 증가하였다. 특히 BCG 면역반응세포는 태아와 생후 1일령에서 약한 면역반응을 나타내었으나 1개월령 이후부터는 강한 면역반응을 나타내었다.

이상의 결과로 한국재래산양의 갑상샘에는 calcitonin이 외에 5-HT 및 BCG 면역반응세포가 분포함을 알 수 있었다.

Legends for figures

Fig 1. Calcitonin immunoreactive cells in the thyroid gland of Korean native goat.

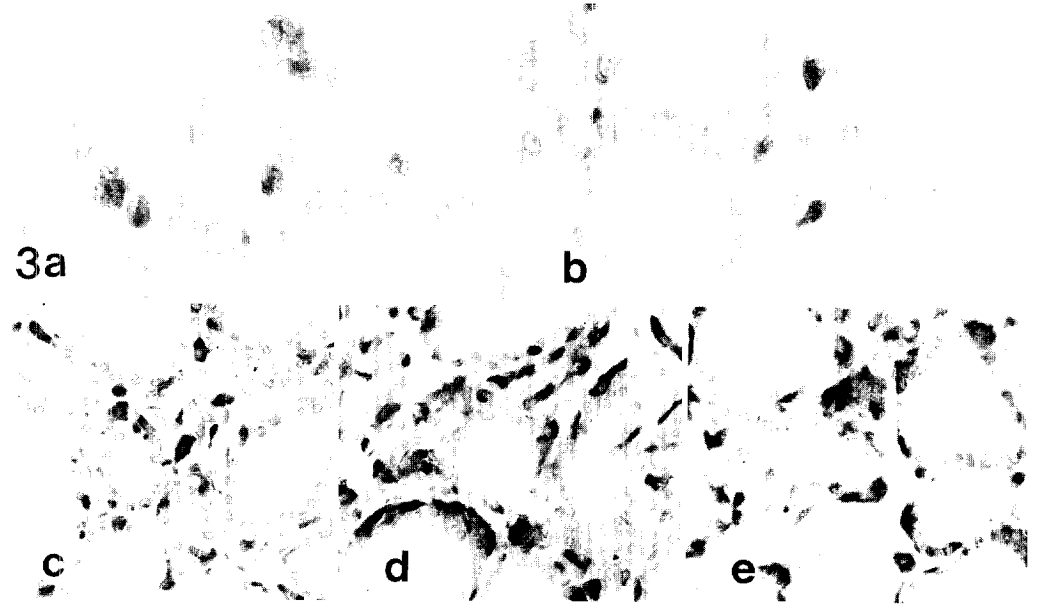
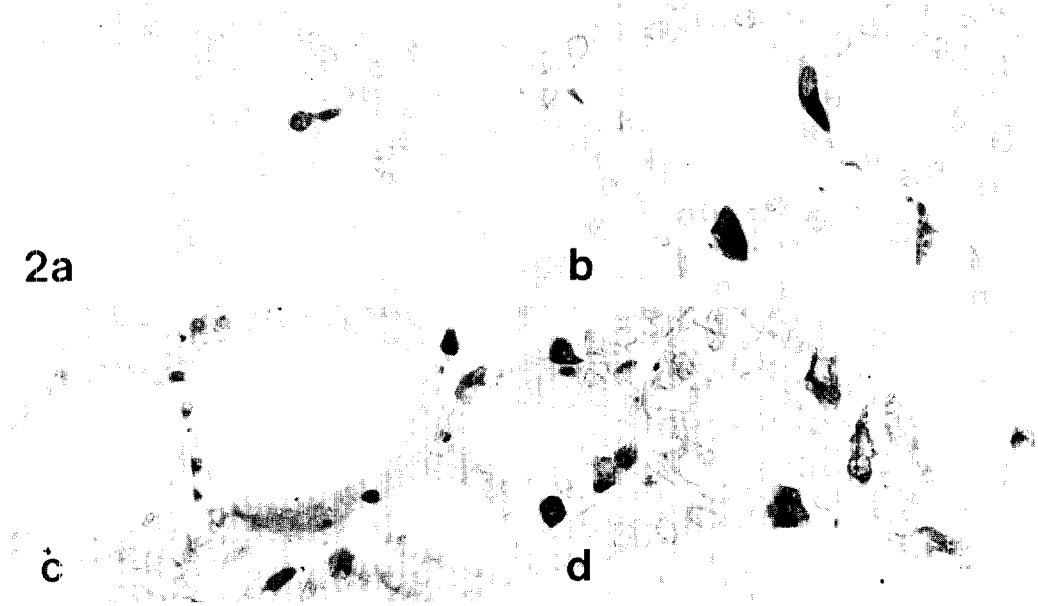
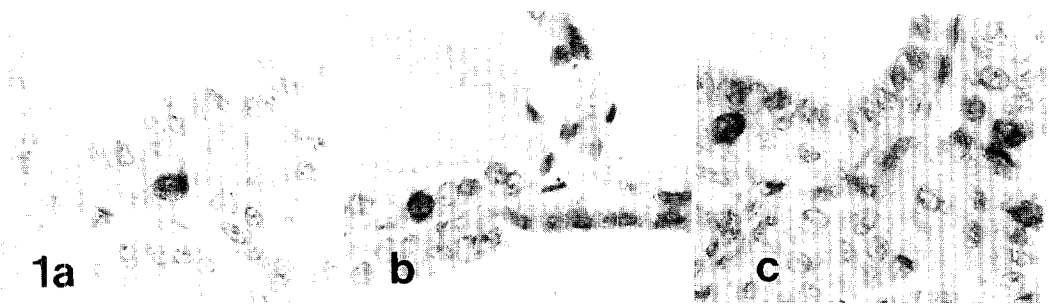
a. 1 month old, b. 6 month old, c. adult, a-c ; $\times 480$.

Fig 2. 5-HT-immunoreactive cells in the thyroid gland of Korean native goat.

a. Fetus, b. 1 month old, c. 6 month old, d. adult, a-b, d ; $\times 480$, c ; $\times 240$

Fig 3. BCG-immunoreactive cells in the thyroid gland of Korean native goat.

a. Fetus, b. 1 day old, c. 1 month old, d. 6 month old, e. adult a-b ; $\times 480$, c-e ; $\times 240$



참 고 문 헌

1. Bussolati G, Pearse AGE. Immunofluorescent localization of calcitonin in "C" cells of pig and dog thyroid. *J Endocrinol*, 37 : 205-209, 1967.
2. Pearse AGE, Polak JM. Cytochemical evidence for the neural crest origin of mammalian ultimobranchial C cells. *Histochemie*, 27 : 96-102, 1967.
3. Kameda Y, Oyama H, Endoh M, et al. Somatostatin immunoreactive C cells in thyroid glands from various mammalian species. *Anat Rec*, 204 : 161-170, 1982.
4. Zabel M. Studies on in vitro effect of serotonin on calcitonin secretion by rat thyroid C cells. *Histochemistry*, 83 : 71-75, 1985.
5. Zabel M, Schäfer H. Ultrastructural localization of calcitonin and somatostatin in C cells of rabbit thyroid. *Cell Tissue Res*, 245 : 667-672, 1986.
6. Kameda Y, Oyama H, Horino M. Ontogeny of immunoreactive somatostatin in thyroid C cells from dogs and guinea pigs. *Anat Rec*, 208 : 89-101, 1984.
7. Kameda Y. Localization of immunoreactive calcitonin gene-related peptide in thyroid C cells from various mammalian species. *Anat Rec*, 219 : 204-212, 1987.
8. Kameda Y. Ontogeny of immunoreactive calcitonin gene-related peptide in thyroid C cells from dogs, rabbits, and guinea pigs. *Anat Rec*, 220 : 76-86, 1988.
9. 정진웅, 박인선. 개 갑상선의 소포방세포내 calcitonin 및 somatostatin의 공존. 대한해부학회지, 19 : 353-361, 1986.
10. 정진웅, 박인선, 김진 등. 각종 포유동물의 갑상선 소포방세포에 대한 면역세포화학적 연구. 대한해부학회지, 21 : 98-110, 1988.
11. 정진웅, 박인선, 천명훈 등. 기니픽 갑상샘 소포결세포에서의 칼시토닌 및 소마토스타틴의 존재에 대한 면역세포화학적 연구. 대한해부학회지, 23 : 151-163, 1990.
12. Leblance B, Paulus G, Andreu M, et al. Immunocytochemistry of thyroid C-cell complexes in dogs. *Vet Pathol*, 27 : 445-452, 1990.
13. Thomas GA, Neonakis E, Davies HG, et al. Synthesis and storage in rat thyroid C-cells. *J Histochem Cytochem*, 42 : 1055-1060, 1994.
14. Bláhser S. Immunocytochemical demonstration of calcitonin-containing C-cells in the thyroid glands of different mammals. *Cell Tissue Res*, 186 : 551-558, 1978.
15. Grube D, Aunis D, Bader F, et al. Chromogranin A (CGA) in the gastroentero-pancreatic(GEP) endocrine system I. CGA in the mammalian endocrine pancreas. *Histochemistry*, 85 : 441-452, 1986.
16. Okada HM. Immunohistochemical demonstration of calcitonin gene-related peptide and chromogranin A in C cells of sheep thyroid. *J Vet Med Sci*, 53 : 149-151, 1991.
17. Alumets J, Hakanson R, Lundqvist G, et al. Ontogeny and ultrastructure of somatostatin and calcitonin cells in the thyroid gland of the rat. *Cell Tissue Res*, 206 : 193-201, 1980.
18. Tsuchiya T, Schiomura Y, Suzuki K, et al. Immunocytochemical study on the C cells in pig thyroid glands. *Acta Anat*, 120 : 138-141, 1984.
19. Larsson L-I. Differential changes in calcitonin, somatostatin and gastrin/cholecystokinin-like parafollicular cells during ontogeny. *Histochemistry*, 82: 121-130, 1985.
20. Zabel M, Sch fer H. Ultrastructural immunocytochemical localization of hormones in thyroid parafollicular cells. *Acta Anat*, 120 : 81, 1984.
21. Zabel M, Schäfer H, Sturdyk J, et al. Immunocytochemical studies on parafollicular cells of various mammals. *Acta anat*, 131 : 222-226, 1988.
22. Arias J, Scopsi L, Fischer JA, et al. Light and electron-microscopical localization of calcitonin, calcitonin gene-related peptide, somatostatin and C-terminal gastrin/cholecystokinin immunoreactivities in rat thyroid. *Histochemistry*, 91 : 265-272, 1989.
23. Okada HM, Matsukawa K, Ohgiya N, et al. Im-

- munohistochemical demonstration of parafollicular (C) cells in sheep thyroid and parathyroid gland. *Jpn J Vet Sci*, 52 : 879-882, 1990.
24. Martin-Lacave I, Conde E, Montero C, et al. Quantitative changes in the frequency and distribution of the C-cell population in the rat thyroid gland with age. *Cell Tissue Res*, 270 : 73-77, 1992.
 25. Conde E, Martin-Lacave I, Utrilla JC, et al. Post-natal variation in the number and size of C-cells in the rat thyroid gland. *Cell Tissue Res*, 280 : 659-663, 1995.
 26. Sternberger LA. Immunocytochemistry. 2nd Ed, New York, *John Wiley & Sons*, 104-149, 1979.
 27. Petkó M, Rigo G, Varga Z. Quantitative changes of the C-cell population in the rat thyroid during post-natal ontogenesis. *Cell Tissue Res*, 166 : 541-552, 1976.
 28. Wolfe HJ, DeLellis RA, Voelkel EF, et al. Distribution of calcitonin-containing cells in the normal neonatal human thyroid gland: a correlation of morphology with peptide content. *J Clin Endocrinol Metab*, 41 : 1076-1081, 1975.
 29. Stux MB, Thompson B, Isler H, et al. The "light cells" of the thyroid gland in the rat. *Endocrinol*, 68 : 292-308, 1961.
 30. Kameda Y. Co-expression of vimentin and 19S-thyroglobulin in follicular cells located in the C cell complex of dog thyroid gland. *J Histochem Cytochem*, 43 : 1097-1106, 1995.
 31. Falck B, Owman C. 5-hydroxytryptamine and related amines in endocrine cell system. In: Advances in pharmacology, ed. Garattini S & Shore PA, Academic press, New York, Vol 6A, pp: 211-231, 1968.
 32. Gershon MD, Nunez ZA. Histochemical and radioautographic studies of serotonin and parafollicular cells in the thyroid gland of the prehibernating bat. *Endocrinol*, 86 : 160-166, 1970.
 33. Benedum UM, Baeuerle PA, Konecki DS, et al. The primary structure of bovine chromogranin A: a representative of a class of acidic secretory proteins common to a variety of peptidergic cells. *EMBO J*, 5 : 1495-1502, 1986.
 34. Buffa R, Gini A, Pelagi M, et al. Immunoreactivity of hormonally-characterized human endocrine cells against three novel anti-human chromogranin B(B11 and B13) and chromogranin A(A11) monoclonal antibodies. *Arch Histol Cytol*, 52 : 99-105, 1989.
 35. Lloyd RV, Cano M, Rosa P, et al. Distribution of chromogranin A and secretogranin I (Chromogranin B) in neuroendocrine cells and tumors. *Amer J Pathol*, 130 : 296-304, 1988.
 36. Solcia E, Usellini L, Buffa R, et al. Endocrine cells producing regulatory peptides: ed. Polak JM, Regulatory peptides, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, pp : 220-228, 1989.
 37. Nolan JA, Trojanowski JQ, Hogue-Angeletti R. Neurons and neuroendocrine cells contain chromogranin. *J Histochem Cytochem*, 33 : 791-798, 1985.