

고양이 흉수에서 Substance P 면역반응 신경원의 분포와 연결연구

가톨릭대학교 의과대학 마취과학교실

이 승 균 · 박 수 석

= Abstract =

Distribution of substance P Immunoreactive Neurons and Their Synaptic Organization in the Cat Thoracic Cord

Seung Kyun Lee, M.D. and Soo Seog Park, M.D.

Department of Anesthesiology, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Background: Though a number of studies have described the distribution of substance P (SP)-like immunoreactivity in the spinal cord, they have been focused on lamina I and II of the dorsal horn and there are little morphological studies on the topographic distribution and ultrastructure of the SP immunoreactive neurons especially in the ventral horn of the spinal cord. This study was conducted to identify distribution pattern of SP immunoreactive neurons and to define the synaptic organization of their processes in ventral horn of the thoracic cord of the cat by preembedding immunocytochemical method using SP antiserum.

Methods: Five adults cats of either sex were used and deeply anesthetized by intramuscular injection of ketamine. After removal of the spinal cord, samples of thoracic cord were taken and placed in fresh fixative at 4°C for 2 hours. Transverse sections 50 μm thick were processed using the preembedding immunocytochemical method and incubated consecutively in the specific primary antibody and the 10% normal goat serum, the rabbit anti-substance P antiserum, the biotin-labelled goat anti-rabbit IgG and finally the avidin-biotin-peroxidase complex. The processed tissue sections were thoroughly washed and stained in the black with 1% uranyl acetate. Section were examined on a electron microscope.

Results:

- 1) SP immunoreactive neurons were observed in the gray matter around central canal.
- 2) In lamina I and II SP immunoreactivity was observed in both myelinated and unmyelinated nerve fibers, but in ventral horn only in the unmyelinated nerve fibers.
- 3) SP immunoreactive axon terminals with small round and large dense core vesicles made chemical synapses onto the dendrites of motor neurons in the ventral horn.

Conclusion: SP immunoreactive neurons might play an important role in modulation of motor neurons in the ventral horn of the thoracic cord of the cat.

Key Words: Immunocytochemical method. Substance P. Thoracic spinal cord.

*본 논문은 가톨릭중앙의료원 학술연구보조비로 이루어진 것임.

*박사학위 논문임.

서 론

Substance P는 1970년 Chang과 Leeman¹⁾에 의해 조류 시상하부에서 분리된 undecapeptide의 하나로서 척수에 있어서는 후근신경절세포(dorsal root ganglion cell)와 아교질(substantia gelatinosa)에 중지하는 일차수입신경섬유(primary afferent fiber)에 분포되어 있음이 밝혀졌고²⁾, 등쪽뿔(dorsal horn)의 신경세포에 강한 흥분성 작용을 하며³⁻⁵⁾, 말초신경에 손상을 주거나 유해한 자극을 가할 시 등쪽뿔에서 substance P 농도가 감소한다는 생화학적 연구 보고⁶⁻⁸⁾ 등에 기초하여 척수의 동통 전도도에 관여하는 물질로 인정되고 있다.

현재까지 정상 포유동물 척수의 substance P성 신경세포의 본태를 밝히기 위한 형태학적 연구는 주로 흰쥐를 대상으로 이루어 졌을 뿐⁹⁻¹⁴⁾, 다른 동물에 대한 연구는 미미한 실정이다.

흰쥐 척수에서 substance P 항체를 이용한 면역세포화학법으로 알려진 사실은 등쪽뿔 중 표층과 아교질 부위에 국한하여 substance P 면역반응 섬유와 그 종말이 분포하고 있어 이 부위에서 substance P는 신경전달물질의 역할을 하는 것으로 보고되었다¹⁵⁻²⁰⁾.

그러나 척수속에서의 substance P성 신경원의 출현과 돌기의 분포양상, 그리고 연결기구(synaptic organization)에 대하여는 아직까지 명확하게 밝혀져 있지 않다.

저자들은 고양이의 흉수에서 substance P항체를 이용한 면역세포화학법으로 substance P면역반응성 신경세포의 분포상태를 확인하고, 특히 substance P가 운동신경세포(motor neuron)를 탈분극 시킨다는 보고²¹⁾에 착안하여 배쪽뿔(ventral horn)에서의 substance P성 신경섬유의 연결상을 형태학적으로 규명하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

본 실험에 사용한 동물은 성숙한 고양이 5마리였으며 ketamine(50 mg/kg body weight) 마취하에 4% paraformaldehyde액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 심장을 통하여 전신을 관류 고정한

후, 추궁관을 제거하고 일정한 부위의 흉수를 절취하여 같은 고정액에 넣어 2시간 동안 재고정하였다.

일차 고정된 조직편은 세척액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 씻은 다음 vibratome (Dosaka EM CO, Japan)으로 50 μm 두께의 횡단 절편을 작성하였다.

척수에서 substance P의 면역반응성을 광학 및 전자현미경으로 관찰하기 위하여 포매전 염색법(pre-embedding method)을 이용하여 avidin-biotin-peroxidase complex(ABC)²²⁾법에 따라 면역염색을 시행하였다. 조직내 항원량의 투과를 증진시키기 위하여 30% sucrose(0.1 phosphate buffer, pH7.4)에 4시간 동안 담근 후 액체 질소에서 급속냉동시키고, 실온에서 서서히 녹게하였다. 면역염색은 조직내 비특이면역반응을 제거하기 위해 정상 혈청(10% normal goat serum, Vector Laboratories, U.S.A.)을 적용시킨 후 실시하였으며, 이때 사용한 1차 항체는 rabbit antisubstance P 항혈청(Eugene Tech, U.S.A.)으로서 1:1,000으로 희석하여 사용하였다.

2차 항체로는 biotin-labelled goat anti-rabbit IgG(1:50, Vector Laboratories, U.S.A.), 3차 항체로는 avidin-biotin-peroxidase complex(1:100, Vector Laboratories, U.S.A.)를 사용하였으며, 0.05% 3,3-diaminobenzidine-tetrahydrochloride-0.05% H₂O₂ 혼합액으로 정색하였다.

광학현미경 관찰을 위해서는 염색된 조직편을 세척액과 증류수로 씻은 다음 0.5% gelatine을 입힌 slide glass에 부착시켰다.

전자현미경으로 척수의 희색질에 있는 substance P 면역반응세포와 연결기구를 관찰하기 위하여는 염색된 조직편을 세척액으로 씻은 다음 1% uranyl acetate로 전자염색을 시행하였다. 이와같이 전자염색된 조직편에서 광학현미경 관찰 결과를 토대로 substance P 면역반응성 세포와 그 돌기가 주로 분포하는 중심희색질, 배쪽뿔 및 등쪽뿔 부위를 수술 현미경 하에서 절취하여 Epon에 포매(embedding)하였다.

Ultramicrotome(Reichert Jung, Germany)으로 70~90 nm의 초박 절편을 만든 후 이를 lead citrate 액으로 염색한 다음 투과전자현미경(Jeol

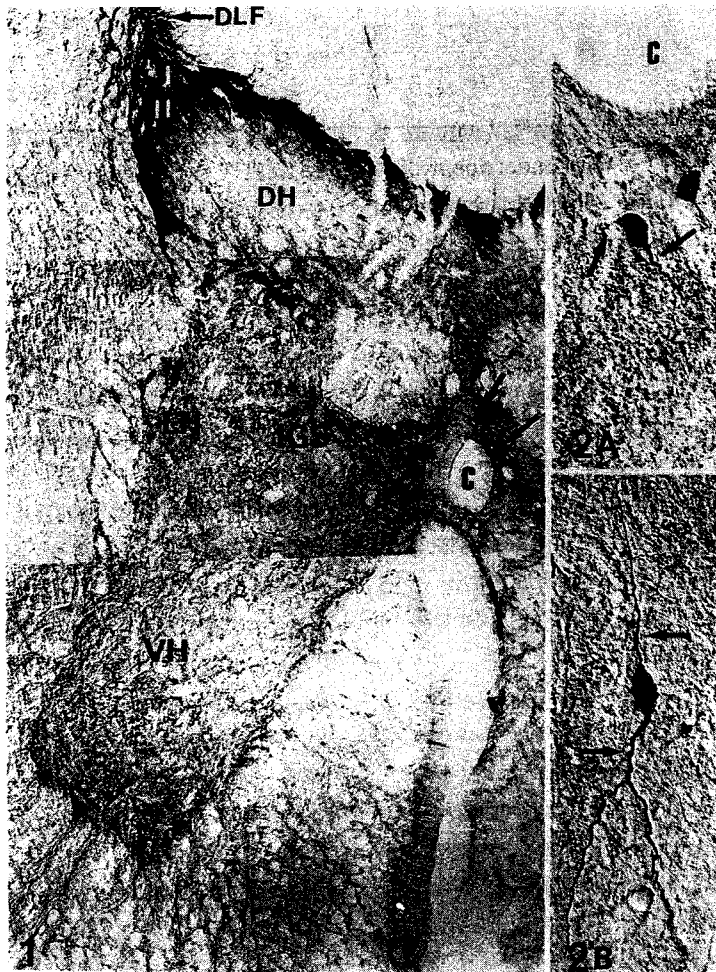


Fig. 1. Low power microphotograph of a transverse section of the cat thoracic cord processed for substance P (SP) immunoreactivity.

Strong SP immunoreactive fibers are heavily distributed in the dorsolateral fasciculus(DLF), and lamina I and II of the dorsal horn (DH), and more or less evenly distributed in the rest of the gray matter.

C, central canal ; arrows, SP immunoreactive neurons ; IGS, intermediate gray substance ; VH, Ventral horn. $\times 200$

Figs. 2A & B. Strong SP immunoreactive neurons in the gray matter around central canal(C). SP immunoreactive neurons are oval or spindle in shape, and two primary processes(arrows) are seen to emerge from the cell body. $\times 400$.

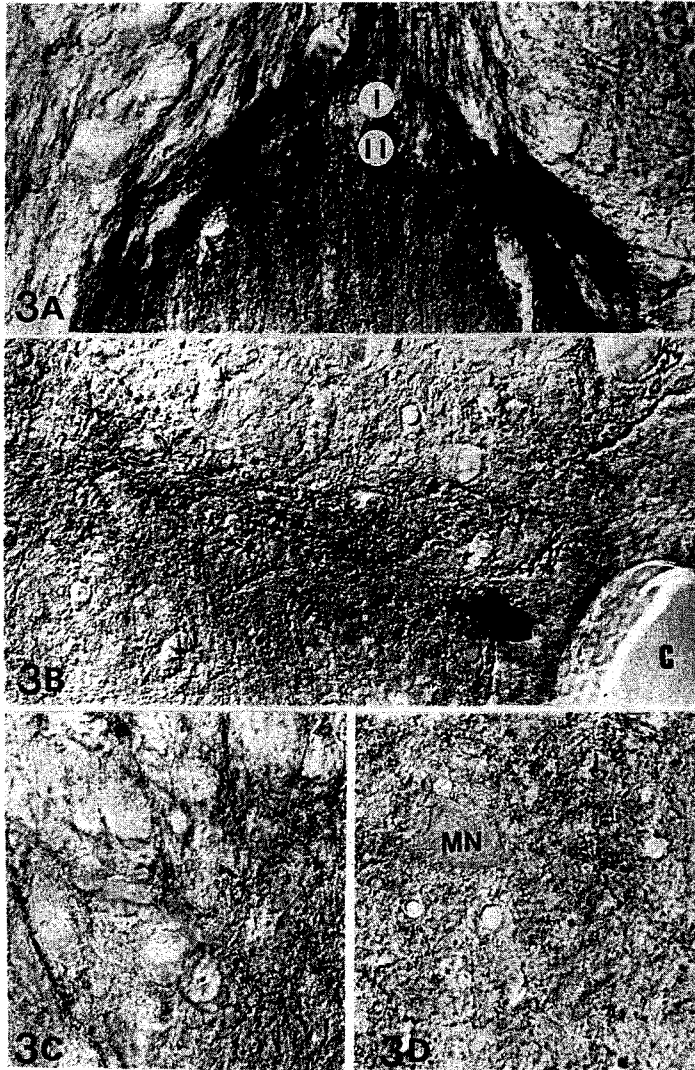
1200EX, Japan)으로 관찰하였다.

결 과

흉수의 조직학적 구조는 신경세포가 주로 본포하고 있는 H자 모양의 회색질과 주로 신경섬유로 이루어져

있는 백색질로 구분되며, 회색질은 다시 등쪽으로 돌출한 등쪽뿔과 배쪽으로 돌출한 배쪽뿔 및 이들 사이에 위치한 중간 회색질(intermediate gray substance)과 이곳에서 외측으로 돌출한 외측뿔(lateral horn)이 뚜렷이 구분되었다.

척수의 횡단 절편에 substance P 면역염색을 시행



Figs. 3A, B, C & D. Microphotographs of the dorsolateral fasciculus and lamina I and II(3A), the area adjacent to the central canal (C, 3B), lateral horn(3C) and anterior horn (3D) showing SP immunoreactivity. $\times 800$.

3A; Strong SP immunoreactive nerve fibers are observed in the dorsolateral fasciculus(DLF) and lamina I and II of the dorsal horn.

3B; SP labelled processes extending to the lateral and ventral horns. C, central canal.

3C & D; SP immunoreactive profiles are evenly distributed. MN. motor neuron.

한 후 광학 현미경 소견은 substance P 면역 반응 신경세포체의 위치와 섬유 분포 양상이 뚜렷이 구분되었으며(Fig. 1), 포매전염색법을 이용한 전자현미경 소견은 substance P 면역 반응 세포의 미세구조와 연결기구를 명확히 알 수 있었다(Fig. 4~7).

Substance P 면역 반응성 신경원의 세포체는 주로 중심관(central canal) 주위 회색질 즉 lamina x⁽²³⁾의 외측에서 소수 관찰되었을 뿐 다른 부위에서는 전혀 관찰되지 않았다.

이들 세포체의 모습은 구형 또는 난원형이었으며,

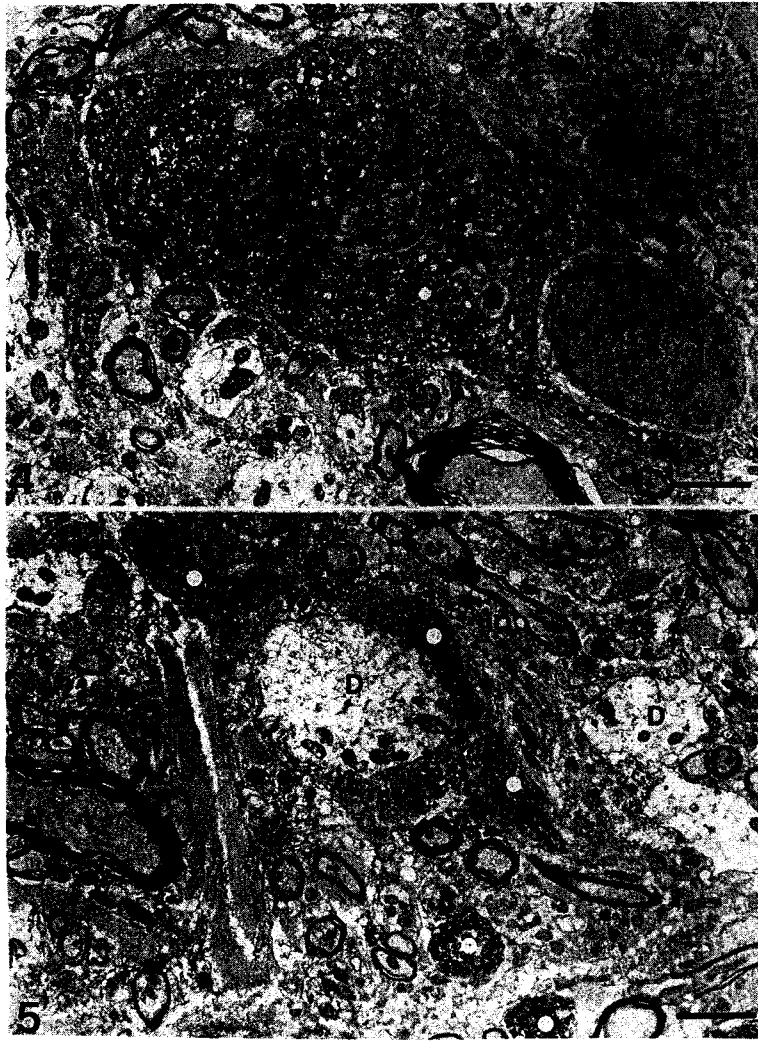


Fig. 4. A part of SP immunoreactive neuron with well developed cellular organelles such as mitochondria, endoplasmic reticulum and ribosome. OG, oligodendroglia ; scale bar, 2 μ m.

Fig. 5. Note that naked axons(White circle) show strong SP immunoreactivity. D, dendrite; scale bar, 2 μ m.

직경은 5~6 μ m였고, 세포체에서 2~3개의 일차돌기가 분지하고 있는 다극성 신경세포였으며, 이들 세포에서 유래하는 신경섬유는 대체로 외측뿔(lateral horn)과 배쪽뿔쪽으로 향하였다(Fig. 2A 및 B).

이 신경세포의 미세구조를 관찰한 결과 세포질에는 사립체, 형질내세망, 리보솨체 및 골지체와 같은 세포소기관들이 잘 발달되어 있었으며, substance P 면역반응산물은 사립체막, 형질내세망 뿐만 아니라 무형기질에 두루 분포하였다(Fig. 4).

Substance P 면역반응 세포돌기의 분포를 보면, 중심관 주위의 회색질 부위와 중간 회색질 및 배쪽뿔에서 염주상 또는 작은 점상의 면역반응신경섬유들이 고르게 분포하되, 가장자리에서는 다소 밀집되어 분포하였다(Fig. 1). 배쪽뿔 부위에 있는 substance P 면역반응성 섬유는 전자현미경상 모두 무수초섬유였으며(Fig. 5), 또한 비면역반응성 수상돌기와 연결을 이루고 있는 substance P성 축삭종말도 흔히 관찰되었고(Fig. 6C), 특히 면역반응축삭종말과 연결을 이루는



Figs. 6A, B & C. Electron microphotographs show that strongly labelled axon terminals(stars) make chemical synapses(arrows) onto large(6A) and small(6B & 6C) unlabelled dendrites in the ventral horn.

Note non-labelled axon terminal (open star) making synapses onto the dendrite (open arrow). white arrowheads, dense core vesicles ; scale bar, 1 μ m.

수상돌기는 그 크기와 미세구조상 운동신경원의 것으로 판단되었다. Substance P성 축삭종말에는 강한 면역반응을 나타내는 직경이 4~6 nm인 작고 둥근 소포(small round vesicle)와 소수의 직경이 13~15 nm인 치밀중심소포(dense core vesicle)들이 혼

재하여 있었다.

Substance P성 축삭종말은 크고 작은 비면역반응성 신경원의 수상돌기와 화학연접(chemical synapse)을 이루었을 뿐 세포체나 가지돌기와 연접을 이루고 있는 종말은 전혀 관찰되지 않았으며, 따라서 이들 신



Fig. 7A. Low power electron microphotograph of lamina I of the dorsal horn, comprising a number of unmyelinated and myelinated nerve fibers.

MG, microglia; OG, oligodendroglia; scale bar, 2 μ m.

7B. High power electron microphotograph of lamina I. SP immunoreactivity is observed in both naked and myelinated nerve fibers. Scale bar, 1 μ m.

경종말은 연접분류상 비대칭성 축삭-수상돌기연접 (asymmetrical axo-dendritic synapse)이었다(사진 6A, B 및 C).

한편, 백색질에서는 등쪽뿔로 들어가는 섬유다발인 등의측쪽속(dorsolateral fasciculus of Lissauer) 과 등쪽뿔에서의 lamina I과 II에 존재하는 대다수의 신경섬유가 substance P 면역반응성을 나타내었고

(Fig. 3A), 이들 섬유는 염주(varicosity)상이며 등 쪽에서 배쪽으로 주행하고 있었다.

이 부위를 전자현미경으로 관찰한 결과 배쪽뿔의 것 과는 달리 많은 무수초신경섬유 뿐만 아니라 소수의 수초신경섬유도 강한 면역 반응을 나타내었다(Fig. 7A 및 B).

고 찰

사람을 비롯한 각종 포유동물 척수내에는 substance P를 비롯한 각종 펩티드, gamma aminobutyric acid, glycine 및 glutamate 등의 아미노산 및 acetylcholine 등 여러 종류의 활성물질(bioactive substance)이 존재하며²⁴⁾, 이들 물질의 작용기전이 전기생리학적, 생리학적 및 면역세포화학적 연구에 의하여 점차 밝혀져 가고 있다.

본 실험에서 substance P 항체를 이용한 면역세포 화학법으로 흉수에 있는 substance P성 신경세포를 동정하고, 그 섬유 분포양상을 관찰한 결과 중심관 주위의 회색질에 위치하는 소수의 세포만이 substance P성이었고, substance P성 신경섬유는 백색질에서는 등외측쪽속에서, 회색질에서는 등쪽뿔중의 lamina I과 II에서 밀접하여 분포하였고, 등쪽뿔의 나머지 부위와 배쪽뿔에서는 비교적 고르게 산재하였다.

특히 배쪽뿔에 분포하는 substance P성 신경섬유는 등쪽뿔의 것과는 달리 모두 무수초섬유였으며, 또한 배쪽회색질내 substance P성 섬유의 연결기구를 보면 소구형 및 대치밀중심소포에 섞여 포함되어 있는 시냅스전말단(presynaptic terminal)이 비교적 큰 수상돌기와 비대칭성 화학연접을 이루고 있음이 본 연구에서 처음 밝혀졌다. 등외측쪽속과 배쪽뿔중 lamina I과 II에 substance P성 신경섬유가 밀접하여 분포하는 사실은 원숭이²⁵⁾와 흰쥐²⁶⁾ 척수에서의 분포와 상응하는 사실이며, 척수 회백질에서의 substance P성 신경원의 분포에 대한 연구에서 보면 흰쥐의 경우 등쪽뿔의 lamina I과 II에 위치하는 세포중 소수가, 닭에서는 중심관 배쪽회색질의 세포중 일부가²⁷⁾ substance P성이라는 사실만이 밝혀졌고 substance P가 척수의 운동신경원을 탈분극시킨다는 보고가 있을 뿐이다. 이들의 연구보고와 본 실험의 결과를 종합하여 볼 때 substance P성 신경세포는 동물에 따라 분포양상이 다르고, 따라서 자기 독특한 섬유연결을 이루고 있을 것으로 생각되며, 이들 섬유는 substance P를 신경전달물질로 하여 배쪽회색질에 있는 운동신경원의 수상돌기에 흥분성 연접을 이룰 것으로 추측되지만, 척수신경절에서 기시하여 등외측쪽

속을 통하여 돌아오는 substance P성 신경말단의 연결이후 구조인 신경원의 종류를 감별동정하는 일이 앞으로의 일차과제이며, 이를 밝히므로써 신경해부학적 및 기능적 섬유연결을 명확히 할 수 있을 것으로 판단된다.

한편, 등외측쪽속을 이루는 신경섬유는 척수신경절에서 유래하며, 그 중의 상당수가 lamina I과 II에 종지하고²⁸⁾, 이들 섬유가 유해(nociceptive)자극의 전달경로로서²⁹⁻³¹⁾, 또한 substance P를 신경전달물질로 하여 동통전달에 일차적으로 관여하는 것으로 알려져 있으며 이는 lamina I과 II의 substance P를 포함하는 신경말단의 연결구조를 밝힘으로써 형태학적으로 뒷받침되었다.

그러므로 저자들은 척수 회백질에서의 substance P성 신경원의 확인과 연결기구를 밝히는데 주목적을 두었으므로 본 실험에서 이 부위에 대한 관찰은 다만 lamina I과 II에서의 substance P성 섬유를 확인하는데 그쳤다. 그 결과 척수신경절에서 기원하는 섬유의 일부가 substance P성이며, 이들은 무수초 및 수초섬유로서 비면역반응섬유와 같은 방향으로 주행하고 있음을 관찰하였는 바 흰쥐의 경우 무수초섬유만이 substance P성이라는 Priestley들의 보고와 상이하여 동물에 따라 substance P가 동통자극 전달외에 다른 자극을 전달하는데 관여하는 물질인지 혹은 수초신경섬유도 동통자극을 전달하는지 장차 규명되어야 할 과제이다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 substance P는 중심관 주위에 소수 존재하며 척수내에서 위치하는 곳에 따라 서로 다른 기능, 즉 등쪽뿔에서는 주로 동통전달에 관여하는 신경전달물질의 역할을 하며, 배쪽뿔에서는 운동조절과정에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Chang MM, Leeman SE. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J Biol Chem* 1970; 245: 4784-90.
- 2) Hökefelt T, Kellerth JO, Nissson G, Pernow B. Substance P. Localization in the central nervous system and in some primary sensory

- neurons. *Science* 1975; 190: 889-90.
- 3) Henry JL. Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Res* 1976; 114: 439-52.
 - 4) Salt TE, Crozier CS, Hill RG. The effects of capsaicin pre-treatment on the responses of single neurons to sensory stimuli in the trigeminal nucleus caudalis of the rat: Evidence against a role for substance P as the neurotransmitter serving thermal nociception. *Neuroscience* 1982; 7: 1141-8.
 - 5) Murase K, Carpenter SE. Action of substance P on rat spinal dorsal horn neurones. *J Physiol* 1984; 346: 203-17.
 - 6) Jessell T, Tsumoo A, Kanazawa K, Otsuka M. Substance P depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of peripheral processes of primary sensory neurones. *Brain Res* 1979; 168: 247-59.
 - 7) Yaksh TL, Jessell TM, Gamse R, Mudge AW, Leeman SE. Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. *Nature* 1980; 286: 155-7.
 - 8) Kuraishi Y, Hirota N, Sato Y, Hino Y, Satoh M, Takagi H. Evidence that substance P and somatostatin transmit separate information related to pain in the spinal dorsal horn. *Brain Res* 1985; 325: 294-8.
 - 9) Nilsson K, H kfelt T, Pernow B. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Med Biol* 1974; 52: 424-7.
 - 10) Cuello AC, Kanazawa I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1978; 178: 129-56.
 - 11) Ljungdahl A, H kfelt T, Nilsson G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* 1978; 3: 861-943. II) Light microscopic localization in relation to catecholamine-containing neurons. *Neuroscience* 1978; 3: 945-76.
 - 12) Cuello AC, Priestly JV, Milstein C. Immunocytochemistry with internally labelled monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 665-9.
 - 13) Inagaki S, Sakanaka M, Shiosaka S, Senba E, Takatsuki K. Ontogeny of substance P-containing neuron system of the rat: Immunohistochemical analysis and upper brain stem. *Neuroscience* 1982; 7: 251-77.
 - 14) Sakanaka M, Inagaki S, Shiosaka S, Senba E, Takagi H, Tohyama M. Ontogeny of substance P-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis. II. Lower brain stem. *Neuroscience* 1982; 7: 1097-126.
 - 15) Chan-Palay VC, Palay SL. Ultrastructural identification of substance P cells and their processes in rat sensory ganglia and their terminals in the spinal cord by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 4050-4.
 - 16) Cuello AC, Jessell TM, Kanazawa L, Iversen, LL. Substance P. Localization in synaptic vesicles in rat central nervous system. *J Neurochem* 1977; 29: 747-51.
 - 17) Pelletier G, Leclerc R, Dupont A. Electron microscope immunohistochemical localization of substance P in the central nervous system of the rat. *J Histochem cytochem* 1977; 25: 1373-80.
 - 18) Pickel VM, Reis DJ, Leeman SE. Ultrastructural localization of substance P in neurons of rat spinal cord. *Brain Res* 1977; 122: 534-40.
 - 19) Barber RP, Vaughn JE, Slemmon JR, Salvaterra PM, Roberts E, Leeman SE. The origin, distribution and synaptic relationships of substance P axons in rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1979; 184: 331-52.
 - 20) Priestley J, Somogyi P, Cuello C. Immunocytochemical localization of substance P in the spinal trigeminal nucleus of the rat: A light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 1982; 211: 31-49.
 - 21) Otsuka M, Konisih S, Takahashi, T. The presence of a motoneuron depolarizing peptide in bovine dorsal roots of spinal nerves. *Proc Jap Acad* 1972; 48: 342-6.
 - 22) Hus SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase technique: A comparison between ABC and unlabelled antibody(PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-80.
 - 23) Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 1952; 96: 415-95.
 - 24) Hunt SP. Cytochemistry of the spinal cord. In

- Chemical Neuroanatomy*. 1st ed. New York, Raven Press. 1984, pp 53-84.
- 25) DiFiglia M, Aronin N, Leeman S. *Light microscopic and ultrastructural localization of immunoreactive substance P in the dorsal horn of the monkey spinal cord*. *Neuroscience* 1982; 7: 1127-39.
- 26) Vacca L, Abrahams S, Naftchi N. *A modified peroxidase antiperoxidase procedure for amplified localization of tissue antigens: localization of substance P in the rat spinal cord*. *J Histochem Cytochem* 1980; 28: 297-307.
- 27) Du F, Dubois P. *Distribution of substance P and vasoactive intestinal polypeptide neurons in the chicken spinal cord, with notes on their postnatal development*. *J Comp Neurol* 1988; 278: 253-64.
- 28) Ralston HJ. III, Ralston DD. *The distribution of dorsal root axons in laminae I, II and III of the macaque spinal cord: A quantitative electron microscope study*. *J Comp Neurol* 1979; 184: 643-84.
- 29) Bessou P, Perl ER. *Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli*. *J Neurophysiol* 1979; 32: 1025-43.
- 30) Light AR, Perl ER. *Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers*. *J Comp Neurol* 1979; 186: 133-50.
- 31) Lynn B, Carpenter SE. *Primary afferent units from the hairy skin of the rat hind limb*. *Brain Res* 1981; 238: 13-28.