한국전자현미경학회지 제 27 권 제 4 호 1997
Korean J. Electron Microscopy 27(4), 347~355(1997)

성장기 흰쥐 시각피질의 신경연접에 대한 도은법 및 전자현미경적 연구

이 희 래
이화여자대학교 의과대학 해부학교실, 의과학연구소 신경과학부

Silver Impregnation and Electron Microscopic Studies on the Synapse in the Visual Cortex of Rat during Postnatal Development

Hee Lai Lee
Department of Anatomy, and Section of Neuroscience, Medical Research Center, College of Medicine, Ewha Womans University, 158-056 Seoul, Korea
(Received August 27, 1997)

ABSTRACT

These studies were performed to observe the morphological changes of synapses in the visual cortex of rat during early postnatal development. Specimens of the visual cortex were taken from rats (Sprague Dawley) at 1, 3, 7, 14 and 21 days of age, and prepared for silver impregnation and electron microscopy.

The number of synapse and the length of postsynaptic thickening were increased progressively with age, especially 14 and 21 days. The number of dendritic spine was increased conspicuously on postnatal days 14-21. And asymmetic, curved and axo-spinous synapses were increased markedly at the same ages.

The present findings suggest that spurt of synaptogenesis in the rat visual cortex occurs during early postnatal development, especially in second to 3rd week period and asymmetric and/or curved axo-spinous synapse is a matured form of synapse with advanced age.

Key words : Rat, Visual cortex, Synapse, Electron microscopy

서 론

포유류의 뇌에서 신경연접의 형성은 태생말기부터 시작되지만 출생후 초기 성장과정 기간에 왕성하게 형성되는 것으로 알려져 있다(Aghajanian & Bloom, 1967; Hinds & Hinds, 1976a, b; Blue & Parnavelas, 1983). 신경연접형성은 신경세포에서 성장한 돌기가 특정의 표적 신경세포에 접촉함으로서 시작되는 개개의 신경연접이 완성되는 동안에 접촉면이 증가하고(Jones, 1983), 신경연접막의 두께와 밀도가 증가하며(Vaughn, 1989), 연접소포의 양이 증가하게

* 본 연구는 1995년도 이화여자대학교 교내연구비 지원에 의해 이루어졌음

된다(Dyson & Jones, 1980; Jones, 1983).

그런데 완전하게 성숙한 신경연접도 활동상태에 따라서 그의 구조가 변경되는 것을 관찰하여 신경연접의 구조적 가변성에 대하여 관심을 갖게 되었다(Szekely, 1979; Ram, 1980). Dyson과 Jones (1980)은 실험동물을 이용한 연구에서 훈련받은 동물의 축삭종말은 훈련받지 않은 동물에 비하여 크고 또 Petit (1988), Tieman (1991), Greenough와 Anderson (1991)은 훈련받은 동물의 뇌에서는 신경연접의 수가 증가한다고 보고하였다. 또 Agnati 등(1992)은 노령의 흰쥐 뇌에서 신경연접의 수가 감소하고, Bertoni-Freddari 등(1992)은 노인성치매환자의 뇌에서 신경연접의 접촉면이 감소함을 관찰하였다.

위의 여러 사실들을 감안할 때 신경연접의 모양이나 크기, 그리고 수등은 뇌의 발달단계에 따라서 다양할 뿐 아니라 개체의 기능상태에 따라서도 다양한 양상을 나타낼 것으로 생각된다. 이 연구에서는 출생후 성장과정 대뇌의 시각피질에서 신경연접의 변동양상을 비교관찰하고자 계획하였다.

시각계통의 발생초기 신경연접 형성에 대해서는 Globus 등(1973), Cragg (1975a, b), Parnavelas (1978), Dyson과 Jones (1980), Turner와 Greenough (1985) 등이 다각도로 연구한 바 있다. 이 연구는 신생흰쥐의 시각피질에서 성장단계별로 신경연접의 구조적 특징을 형태계측하여 그 결과를 분석하여 신경연접의 변동양상을 밝히고자 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

정상조건으로 사육한 어미 흰쥐(Sprague Dawley rat)를 교배시키고 이들 어미에서 출생한 흰쥐를 출생후 1일, 3일, 7일, 14일 및 21일군으로 구분하며 각 실험군에 5마리씩 배정하였다.

2. 조직표본 제작

실험동물은 실험군별로 해당일에 마취후 동물고정대에 놓은 상태에서 흉곽을 열고 심장을 통하여 4% glutaraldehyde 고정액으로 관류고정하였다. 광학현미경 도은법표본을 위하여 고정된 뇌를 적출하여 대뇌의 시각피질 조직을 절취한 다음 silver nitrate로 처리하였고(Ito와 Kishida, 1974), 이를 탈수하여 paraffin에 포매하였으며 5 μm 두께의 절편을 만들었다. 전자현미경 표본을 위하여 시각피질조직을 epon에 포매한 다음 50 nm 정도 두께의 절편을 만들고 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하였다.

3. 표본관찰

광학현미경 표본에서는 시각피질의 부위를 확인하고 도은법에 의한 신경세포돌기의 상태, 특히 가지돌기의 상태와 가지돌기가시의 상태를 비교 관찰하였다. 투과전자현미경 표본에서는 주로 신경그물 부위를 관찰하되 일정부위 면적(90 um^2)을 사진 촬영한 다음 사진의 신경연접에서 연접이후 치밀질의 수, 길이 및 신경연접을 함유한 축삭종말의 수와 크기등 구조를 형태계측하였고 연접의 접촉상태와 접촉빈도를 비교분석하였다. 각 실험군의 형태계측치는 Wilcoxon-2-sample Test로 처리하여 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 도은염색 표본의 소견

도은염색표본을 관찰한 바 출생후 1일군의 시각피질에서 흑색으로 보이는 신경세포는 매우 드물게 나타났다. 신경세포의 돌기는 짧아서 윤곽을 확인할 정도였다. 출생후 3일군의 시각피질에서 흑색의 신경세포는 드물게 나타났으며 세포의 돌기는 짧고 가지돌기가시는 거의 볼 수 없었다. 출생후 7일군에서 흑색의 신경세포는 이전의 실험군에 비하여 자주 나타났다. 신경세포는 세포체와 가지돌기가 명확하게 구분되고 가지돌기는 비교적 길게 뻗어있고 가지돌기가시가 있으며 그 수는 단위길이(10 μm)내에 대략 3~5개 정도였다. 출생후 14일군에서 흑색의 신경세포는 7일군보다 윤곽이 명확하였다. 여러 개의 가지돌기는 길게 뻗어 있었고 가지돌기가시는 더욱 많아서 단위길이내에서 대략 18~22개를 볼 수 있었다. 출생후 21일군에서 신경세포는 여러 개의 긴 가지돌기를 갖고 있으며 특히 가지돌기의 먼쪽부분에 가지돌기가시가 발달되어 있으며 단위길이내에서 그 수는 25~30개 정도였다(그림 4, 5).

2. 전자현미경 표본의 소견

시각피질의 신경세포층에서 신경그물내의 신경연접은 주로 연접치밀질과 연접소포에 의하여 구분되었고 크기와 모양 및 상태 등은 실험군에 따라서 다양한 차이를 보였다.

1) 신경연접의 수 및 연접이후치밀질의 길이

출생후 1일군의 시각피질에서 신경그물의 구역은 비교적 좁으며 단위면적내에서 연접치밀질에 의하여 관찰된 신경연접의 수는 4.0이었고 연접이후치밀질의 길이는 1.1 μm이었다. 출생후 3일군의 신경그물 구역은 출생후 1일군에 비하여 넓으며 단위면적내의 신경연접 수는 4.0이었고 연접이후치밀질의 길이는 1.0 μm로 1일군과 비슷한 수준이었다. 출생후 7일군의 신경그물 구역은 출생후 3일군에 비하여 넓었으며 단위면적내의 신경연접 수는 5.2로 출생후 3일군에 비하여 유의하게 증가하였고 연접이후치밀질의 길이는 1.9 μm로 역시 출생후 3일군에 비하여 유의한 증가를 보였다. 출생후 14일군의 신경그물 구역은 출생후 7일군에 비하여 더욱 넓어서 신경세포들은 보다 격리되어 있었다. 단위면적내의 신경연접 수는 12.2이고 연접이후치밀질의 길이는 3.2 μm로 신경연접 수와 연접이후치밀질의 길이가 모두 출생후 7일군에 비하여 매우 유의하게 증가하였다. 출생후 21일군에서 신경연접의 수는 20.0, 연접이후치밀질의 길이는 5.8 μm로 모두 출생후 14일군에 비하여 매우 유의한 증가를 보였다 (Table 1).

Table 1. Number and length of postsynaptic thickening per 90 μm^2 in the visual cortex of rat during postnatal development.

Group of animal Age(day)	Number	Length (μm)
	Mean±SD	Mean±SD
1	4.0±1.0	1.1±0.23
3	4.0±0.70	1.0±0.16
7	5.2±1.30*	1.9±0.42*
14	12.2±1.79*	3.2±0.64*
21	20.0±1.40*	5.8±0.52*

*: Significant difference ($P<0.05$) compared to previous group

Table 2. Number and area of axon terminal per 90 μm^2 in the visual cortex of rat during postnatal development.

Group of animal Age(day)	Number	Area (μm^2)
	Mean±SD	Mean±SD
1	2.4±1.52	1.0±0.54
3	5.0±1.20*	2.1±0.47*
7	5.4±1.50	6.2±1.35*
14	18.2±3.19*	4.9±0.97
21	37.0±2.60*	13.0±0.79*

*: Significant difference ($P<0.05$) compared to previous group

2) 축삭종말의 수와 면적

축삭종말은 연접소포 함유에 의하여 식별하였는데 연접소포의 양은 축삭에 따라 다양하지만 대체로 후기 실험군의 축삭종말이 보다 많은 양의 연접소포를 갖는 경향을 보였다. 출생후 1일군에서 단위면적내에서 축삭종말의 수는 2.4이고 그의 면적은 1.0 μm^2이었다. 출생후 3일군에서 축삭종말의 수는 5.0, 그리고 면적은 2.1 μm^2로서 출생후 1일군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다. 출생후 7일군에서 축삭종말의 수는 5.4로 출생후 3일군과 비슷하였고 축삭종말의 면적은 6.2 μm^2로 출생후 3일군에 비하여 유의한 증가를 보였다. 출생후 14일군에서 축삭종말의 수는 18.2로서 출생후 7일군에 비하여 크게 증가하였으며 축삭종말의 면적은 4.9 μm^2로 출생후 7일군에 다소 낮은 수준을 나타내었다. 출생후 21일군에서 축삭종말의 수는 37.0이고 축삭종말의 면적은 13.0 μm^2로 모두 출생후 14일군에 비하여 매우 유의한 증가를 나타냈다 (Table 2).

3) 연접치밀질의 전자밀도

신경연접은 연접이후치밀질의 전자밀도 정도에 따라서 대칭연접과 비대칭연접으로 구분하였고 이들 연접의 출현율을 비교하였다.

출생후 1일군에서는 대칭연접과 비대칭연접의 출현율이 각각 50% 정도를 보였으며 출생후 3일군에서도 두 연접은 같은 비율을 나타냈다. 출생후 7일군에서 대칭연접은 17.9%, 그리고 비대칭연접은 82.1%로 이전실험군에 비하여 비대칭연접의 비율이 높았다. 출생후 14일군에서 대칭연접은 11.1%인데 비하여 비대칭연접은 88.9%였고 출생후 7일군에 비하여 비대칭연접

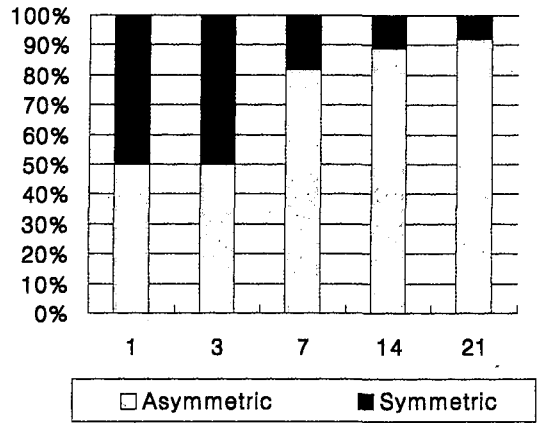


Fig. 1. Percentage of the symmetric and asymmetric synapses in the visual cortex of rat during postnatal development.

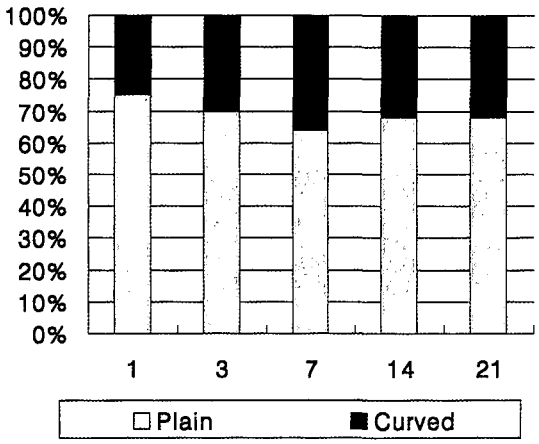


Fig. 2. Percentage of the plain and curverd synapses in the visual cortex of rat during postnatal development.

이 다소 높은 비율을 보였다. 출생후 21일군에서 대칭연접은 8.0%이며 비대칭연접은 92.0%로서 비대칭연접이 보다 높은 비율을 나타냈다(그림 1).

4) 연접면의 형태

연접막의 형태에 따라서 곧은 평면연접과 굽은 곡면연접을 구분하여 실험군별로 출현율을 비교하였다. 출생후 1일군에서 평면연접과 곡면연접의 비율은 각각 75%와 25%였다. 출생후 3일군에서 평면연접이 70%, 곡면연접이 30%로서 곡면연접의 비율이 출생후 1일군에 비하여 높으며 출생후 7일군에서 평면연접이 64.3%, 곡면연접이 35.7%로 출생후 3일군에 비하여 곡면연접의 비율이 높았다. 출생후 14일군에서는 두 연접의 비율은 각각 67.9%, 32.1%로서 출생후 14일군의 비율과 비슷하였고 출생후 21일군에서 평면연접과 곡면연접의 비율은 각각 68.2%와 31.8%로 출생후 14일군의 비율과 비슷한 수준이었다(그림 2).

5) 연접의 접촉부위

신경연접에서 축삭종말이 접촉한 부위에 따라서 축삭가지돌기연접과 축삭가지돌기가시연접을 구분하여 실험군별로 비교하였다. 출생후 1일군에서 신경연접은 축삭가지돌기연접이 대부분이었고(95%) 축삭가지돌기가시연접은 소수(5%)였다. 출생후 3일군에서 축삭가지돌기연접은 95.2%, 그리고 축삭가지돌기가시연접은 4.8%로 출생후 1일군과 비슷하였다. 출생후 7일군에서 축삭가지돌기는 85.2%로 출생후 3일군에 비하여 현저하게 감소하였고 축삭가지돌기가시연접은 14.8%로 출생후 3일군에비하여 현저하게 증가하였다. 출생후 14일군에서 축삭가지돌기연접은 50.9%로 이전군에 비하여 현격하게 감소하였으며 축삭가지돌기가시연접은 49.1%로 이전군에 비하여 크게 증가하였다. 계속해서 출생후 21일군에서도 축삭가지돌기연접은 14.3%로 감소한 반면 축삭가지돌기가시연접은 85.7%로 연접의 대다수를 차지하였다(그림 3).

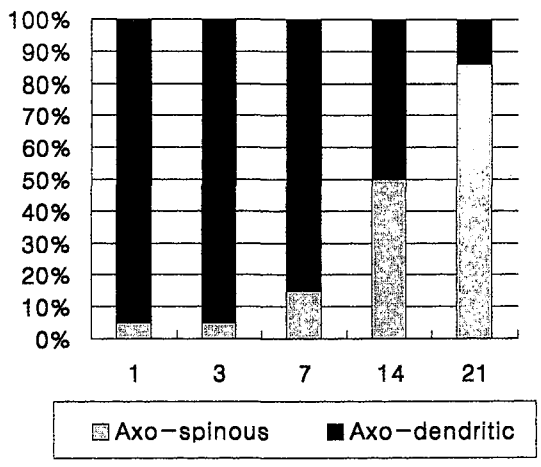


Fig. 3. Percentage of the axo-dendritic and axo-spinous synapses in the visual cortex of rat during postnatal development.

고 찰

이 연구에서 출생후 1일부터 21일까지의 흰쥐 시각피질을 도은표본과 전자현미경표본으로 관찰하여 비교분석한 결과를 종합하여 보면 도은표본에서는 출생후 7일부터 21일까지에 가지돌기의 성장과 더불어 가지돌기가시의 수가 급격히 증가하였고 전자현미경표본에서는 출생후 7일부터 21일까지의 성장기간에 전체 연접의 수가 증가하고 이에 따른 전체 연접치밀질의 길이도 증가하였으며 또 신경연접을 함유한 축삭종말 수의 급격한 증가와 더불어 축삭가지돌기가시연접이 급격히 증가하였고 비대칭 곡면연접의 출현율도 증가하였다.

전체 신경연접의 수와 연접치밀질의 길이가 증가한 사실은 Eayers와 Goodhead (1959), Aghajanian과 Bloom (1967) 등이 흰쥐의 대뇌피질은 출생후 12~30일 사이에 신경연접의 수가 급진적으로 증가하였고 또 흰쥐 뇌의 후각망울(노숙영과 이희래, 1994), 새줄무늬체(이희래, 1995), 소뇌(한후재, 1997)에서 출생후 초기성장과정에서 신경연접이 급격히 증가한다는 보고와 같은 결과로서 출생후 초기성장기간에는 연접형성이 왕성함을 알 수 있다. 특히 전체 신경연접의 수 및 연접치밀질의 증가 추세는 7~21일군에서 더욱 뚜렷하였는데 흰쥐 뇌는 출생후 15일간이 급성장기라는 Diaz와 Samson (1980)의 견해와도 일치함을 알 수 있다. 특히 Cragg (1975a, b)는 시각피질에서 가지돌기가시는 출생전에 형성되기 시작하여 출생후 눈뜨기전에도 계속되지만 눈뜨는 시기에 대량으로 증가한다고 하였다. 흰쥐가 출생후 13일 경에 눈을 뜬다는 사실(한인규와 최윤재, 1989)에 비추어 14일 및 21일군에서 가지돌기가시가 증가하고 신경연접수가 증가한 점은 가지돌기가시의 증가는 곧 왕성한 신경연접 형성과 밀접한 관련이 있는 것으로 설명할 수 있다. 출생 후기로 갈수록 도은표본의 가지돌기가시가 증가한 점과 전자현미경표본의 축삭가지돌기가시연접의 급속한 증가현상이 일치하는 점은 이러한 설명을 뒷받침한다. 이러한 사실과 아울러 연접소포를 함유한 축삭종말도 증가한 사실은 Dyson과 Jones (1980), Blue와 Parnavelas (1983)가 신경연접에서 연접소포의 양적 증가는 신경연접 성숙 정도의 좋은 지침이라는 주장에 따라 흰쥐의 출생후 초기 상장과정에서 신경연접의 수적 증가와 더불어 성숙되는 과정의 형태학적 증거라고 생각할 수 있다.

또 실험군별로 관찰한 전체 신경연접중에서 연령이 증가할수록 비대칭연접이 증가하는 경향을 보인 사실은 비대칭연접은 발생후기에 증가한다는 보고(Johnson과 Amstrong-James, 1970; Hinds와 Hinds, 1976b)와 연접이후막은 연접이전막보다 늦게 성숙된다는 견해(Vaughn, 1989)에 따라서 신경연접이 형성될 때 초기에는 대칭연접으로 시작하여 연접치밀질이 증가되면서 비대칭연접으로 변형되는 것으로 생각된다.

그리고 출생후 성장과정의 경과에 따라서 평면연접에 비하여 곡면연접이 점진적으로 증가한 점은 Desmond와 Levy (1986a, b), Petit (1988) 등이 곡면연접은 기능적으로 활성이 높은 연접으로 생각한 견해에 따라서 곡면연접은 평면연접으로부터 전환된 구조로서 보다 기능적인 연접일 것으로 생각된다.

위의 여러 사실들을 종합하여 볼 때 흰쥐의 시각피질에서 신경연접은 출생후 초기부터 활발하게 형성되면서 성숙되지만 이러한 활동은 눈을 뜨는 시기에 급격하게 더욱 왕성해진다고 말할 수 있다.

결 론

흰쥐 뇌의 시각피질에서 출생후 초기 성장과정에 신경연접의 형태학적 변화를 파악하기 위하여 출생후 1, 3, 7, 14 및 21일군으로 구분한 후 도은법 및 전자현미경으로 관찰하였다.

신경연접의 수 및 연접이후치밀질의 길이는 출생후 성장기간 진행과 더불어 증가하였으며 특히 14일 및 21일군에서 뚜렷하게 증가하였다. 가지돌기가시의 수와 비대칭 곡면의 축삭가지돌기가시연접의 출현율은 출생후 14일 및 21일군에서 크게 증가하였다.

위와 같은 사실을 종합하여 볼 때 흰쥐의 시각피질에서 신경연접의 급속 형성은 출생후 2~3주기간에 일어나며 이 시기에 급증한 비대칭 곡면의 축삭가지돌기가시연접은 신경연접의 성숙형이라고 생각된다.

참 고 문 헌

노숙영, 이희래, 1994. 성장기 흰쥐의 후각망울에서 신경연접의 구조적 변동. 한국전자현미경학회지 24, 32-40

이희래, 1995. 출생후 성장과정의 흰쥐 새줄무늬체에서 신경연접의 구조적 변동. 한국전자현미경학회지 25, 1-8

한인규, 최윤재, 1989. 실험동물사육학, 서울대학교 출판부, 서울 p.3

한후재, 1997. 흰쥐 소뇌피질 분자층에서 생후 발육에 따른 신경연접 형태변화에 관한 연구. 대한해부학회지 30, 183-190

Aghajanian CK, Bloom FE, 1967. The formation of synaptic junction in developing rat brain; A Quantitative electron microscopic study. Brain Res. 6, 716-727

Agnati LF, Benfenati F, Solfrini V, Biagini G, Fuxe K, Guidolin D, Carani C, Gini I, 1992. Brain aging and neuronal plasticity. Ann. New York Acad. Sci. 673, 180-186

Bertoni-Freddari C, Fattoretti D, Casoli T, Gambini M, Meier-Ruge W, Ulrich J, 1992. Structural dynamics of synaptic junctional areas in aging and Alzheimer's disease. Ann. New York Acad. Sci. 673, 285-292

Blue ME, Parnavelas JG, 1983. The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. J. Neurocytol. 12, 697-712

Cragg BG, 1975a. The development of synapses in Kitten visual cortex during visual deprivation. Exp. Neurol. 46, 445-451

Cragg BG, 1975b. The development of synapses in the visual system of the cat. J. Comp. Neurol. 160, 147-166

Desmond NL, Levy WB, 1986a. Changes in numerical density of synaptic contact with long term potentiation in the hippocampal dentate gyrus. J. Comp. Neurol. 253, 466-475

Desmond NL, Levy WB, 1986b. Changes in the postsynaptic density with long term potentiation in the dentate gyrus. J. Comp. Neurol. 253, 476-482

Diaz J, Samson HH, 1980. Impaired brain growth in neonatal rats exposed to ethanol. Science 208, 751-753

Dyson SE, Jones DG, 1980. Quantitation of terminal parameters and their interrelationship in maturing central synapses. A perspective for experimental studies. Brain Res. 183, 43-59

Eayrs JT, Goodhead B, 1959. Postnatal development of the cerebral cortex in the rat. J. Anat. 93, 385-402

Globus A, Rosenzweig MR, Bennett EL, Diamond MC, 1973. Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. J. Comp. Psychol. 82, 175-181

Greenough WT, Anderson BJ, 1991. Cerebellar synaptic plasticity. Relation to learning versus neural activity. Ann. New York Acad. Sci. 627, 231-247

Hinds JW, Hinds PL, 1976a. Synapse formation in the mouse olfactory bulb. I. Quantitative studies. J. Comp. Neurol. 169, 15-40

Hinds JW, Hinds PL, 1976b. Synapse formation in the mouse olfactory bulb. II. Morphogenesis. J. Comp. Neurol. 169, 41-62

Ito H, Kishida R, 1974. A Golgi-type impregnation method for electron microscopy. J. Hirnforschung 15, 409-417

Johnson R, Armstrong-James M, 1970. Morphology of superficial postnatal cerebral cortex with special reference to synapses. Z. Zellforsch Mikrosk. Anat. 110, 540-558

Jones DG, 1983. Development, maturation and aging of synapses. In Advances in cellular neurobiology. vol. 4. ed. S. Federoff and L. Hertz, Academic Press. New York. pp.163-222

Parnavelas JG, 1978. Influence of stimulation on cortical development. Prog. Brain Res. 48, 247-259

Petit TL, 1988. Synaptic plasticity and the structural basis of learning and memory, pp. 201-234. In Neural plasticity. A Lifespan approach Ed. Petit T.L. and G.O. Ivy. Alan R. Lass,

New York

Ram J, 1980. Nervous system plasticity in development and regeneration. TINS Aug. 4-10

Szekely G, 1979. Order and plasticity in the nervous system. TINS Oct. 245-248

Tieman SB, 1991. Morphological changes in the geniculocortical pathway associated with monocular deprivation. Ann New York Acad. Sci. 627, 212-230

Turner AM, Greenough WT, 1985. Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. Brain Res. 329, 195-203

Vaughn JE, 1989. Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. Synapse 3, 255-285

FIGURE LEGENDS

Fig. 4. Light micrograph of visual cortex at 14th day after birth. Dendritic spines (arrows) are seen on dendrite of a neuron. Siver impregnation.

Fig. 5. Light micrograph of visual cortex at 21st day. Many dendritic spines (arrows) are very noticeable. Silver impregnation.

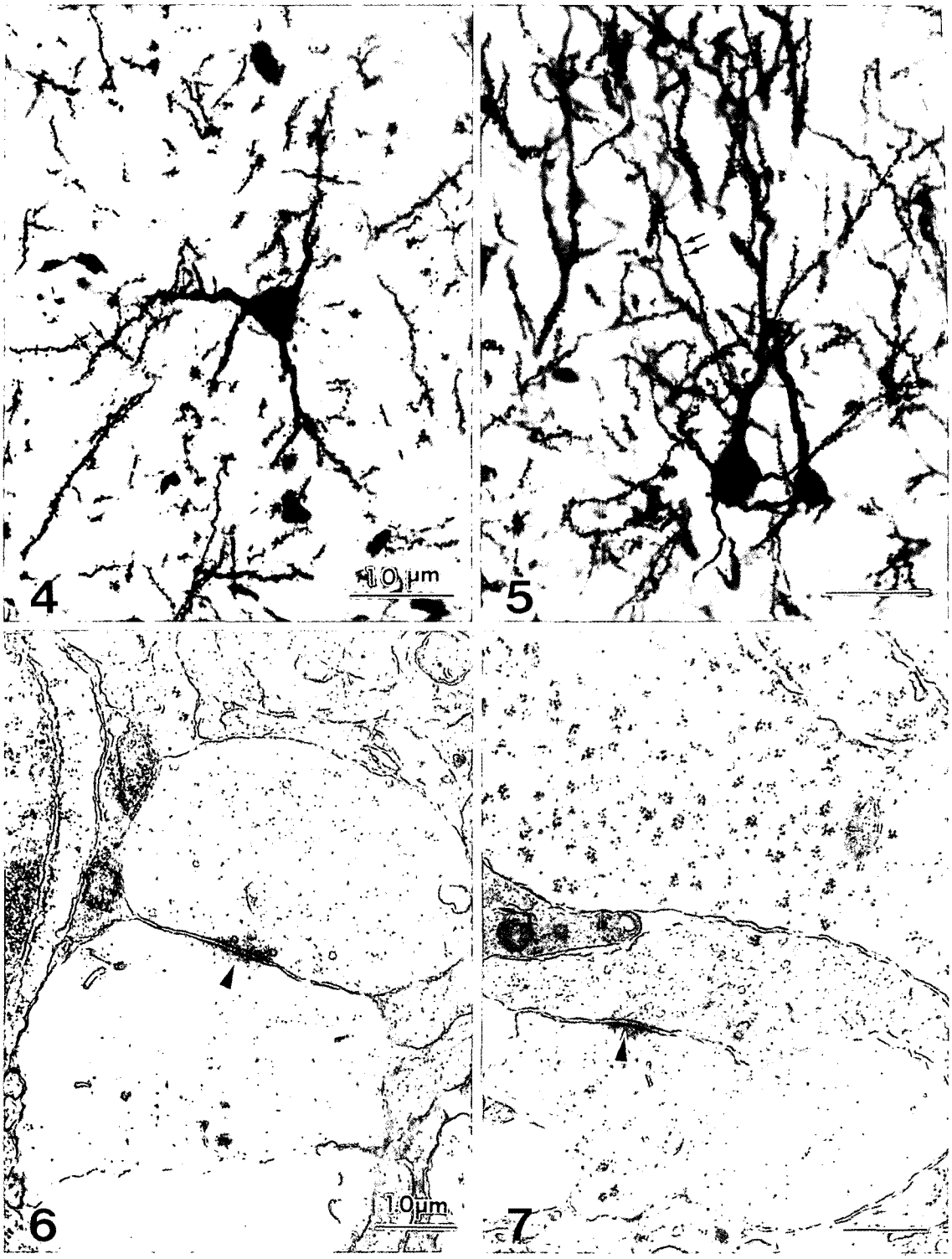
Fig. 6. Electron micrograph of visual cortex at 1st day. An axon terminal with pale cytoplasm makes a symmetric plain synapse (arrowhead)

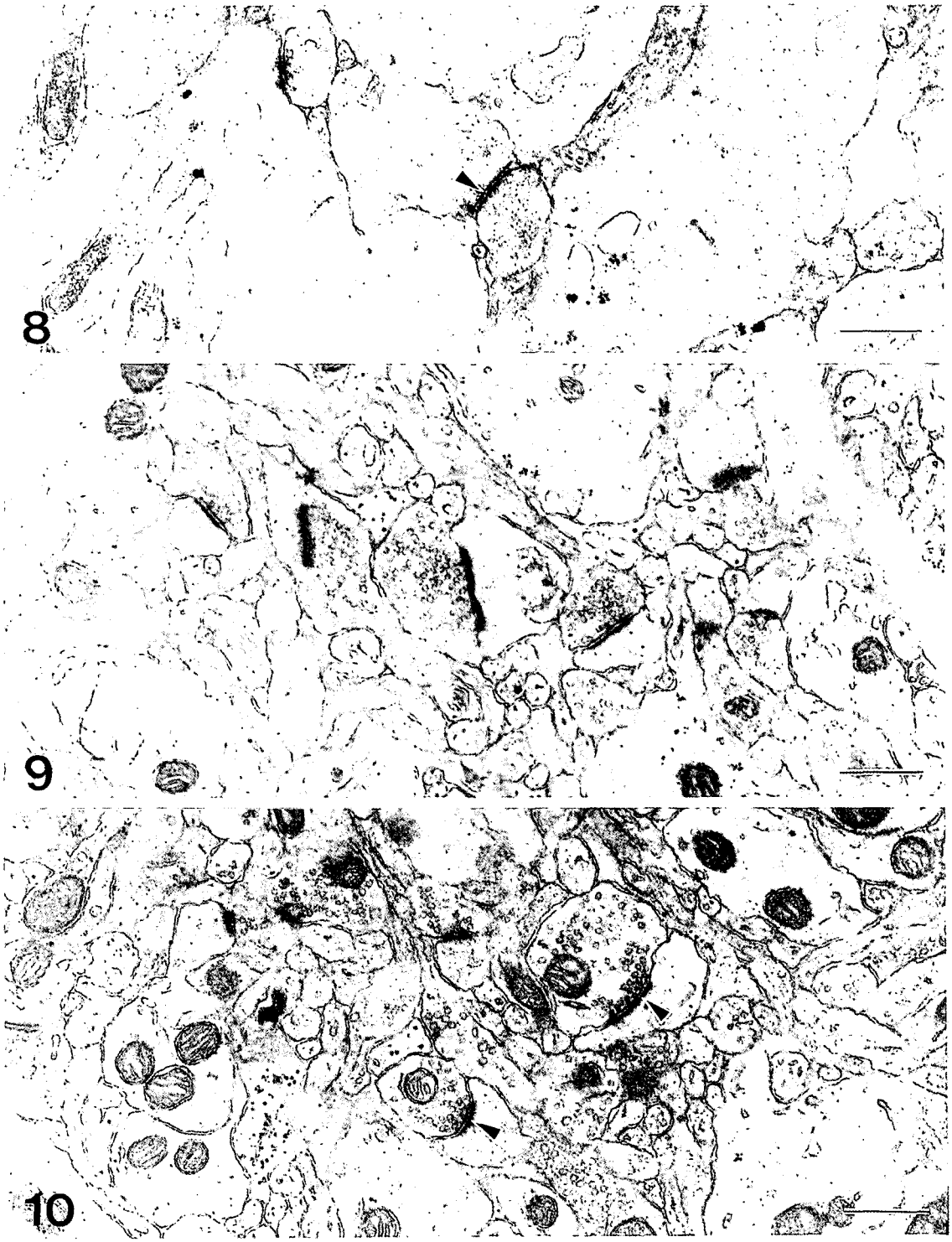
Fig. 7. Electron micrograph of visual cortex at 3rd day. An axon terminal with dense cytoplasm makes an asymmetric synapse.

Fig. 8. Electron micrograph of visual cortex at 7th day. An asymmetric synapse (arrowhead) is noticed.

Fig. 9. Electron micrograph of visual cortex at 14th day. Several asymmetric axo-spinous synapses are seen.

Fig. 10. Electron micrograph of visual cortex at 21st day. Two curved asymmetric axo-spinous synapes (arrowheads) are seen.


4
1.0μm
5
6
1.0μm
7


8
9
10