

WKY 랫드 요수부분 척수신경절 내에서 Calcitonin gene-related peptide와 Substance P 면역반응세포의 분포

신재원 · 윤여성 · 원무호* · 오양석**

강원대학교 수의학과 · 한림대학교 의과대학 해부학교실*
한림대학교 의과대학 실험동물부**
(1997년 9월 15일 접수)

Distribution of neuropeptide-immunoreactive cells of calcitonin gene-related peptide and substance P in the lumbar dorsal root ganglia of WKY rat

Jae-won Shin, Yeo-sung Yoon, Moo-ho Won* , Yang-seok Oh**

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University
*Department of Anatomy, College of Medicine, Hallym University**
*Experimental Animal Center, College of Medicine, Hallym University***
(Received Sep 15, 1997)

Abstract : Dorsal root ganglion (DRG) cells are primary sensory neurons which contain some biologically active neuropeptides which play a role as neurotransmitters or neuromodulators. This study was performed to observe normal distribution of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP) immunoreactive cells and colocalization of CGRP and SP in a single DRG cell of the lumbar DRGs(L₁~L₆) in the Wistar Kyoto (WKY) rat by immunohistochemistry.

About 55.8% of DRG cells contained CGRP-immunoreactivity, while about 12.7% of DRG cells showed SP-immunoreactivity. There was no significant difference in percentage of each neuropeptide-immunoreactive cells between each neuropeptide-immunoreactive cells between each levels of DRGs (L₁~L₆) ($p > 0.01$). In size distribution, CGRP-immunoreactive cells were identified below 1,500 μm^2 ; SP-immunoreactive cells below 600 μm^2 . In serial sections, about 86.7% of the SP immunoreactive cells contained CGRP immunoreactivity.

Key words : calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP), colocalization, immunohistochemistry, lumbar dorsal root ganglion(DRG).

본 논문은 한국과학기술처의 선도기술개발사업(G7) 연구비에 의하여 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Yeo-sung Yoon, Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Republic of Korea.

서 론

포유류의 뇌·척수신경절(craniospinal ganglia)내의 일차감각신경세포들은 여러가지 신경활성물질들(neuroactive substances)을 함유하고 있는데 이중 신경펩타이드(neuropeptides)를 일차감각신경펩타이드(primary afferent neuropeptide)라고 한다^{1,2}. 이들은 신경세포의 축삭을 따라 중추 및 말초신경으로 이동하며^{3,4}, 기능적으로 신경조절물질(neuromodulator) 또는 신경전달물질(neurotransmitter)로 작용한다고 연구되고 있다⁵.

척수신경절은 체성(somatic) 및 내장수용기(visceral receptor)에서 감지된 신호를 축삭을 통해 척수의 등쪽의 측면으로 들어가 중추신경계통에 정보를 전달하는 일차감각신경세포들의 신경절이다¹. 최근에 이르러 면역세포화학법의 발달로 인해 척수신경절에서 여러가지 신경활성물질중 calcitonin gene-related peptide⁷⁻¹⁰, substance P^{7,9,11,12}, somatostatin^{7,11}, galanin¹⁵, neuropeptide Y¹³⁻¹⁵, maso-active intestinal peptide^{7,16}, enkephalin¹⁶, dynorphin^{9,17}, bombesin/gastrin-releasing peptide^{8,18,19} 등의 신경펩타이드들과 calbindin²⁰, parvalbumin^{20,21}과 같은 칼슘결합단백질(calcium binding protein)이 존재하고 있음이 밝혀졌다.

Calcitonin gene-related peptide (CGRP)는 Rosenfeld *et al*²²이 calcitonin 유전자를 연구하다가 밝혀졌는데 이는 척수의 등쪽뿔(dorsal horn)에 높은 농도로 존재하며 일차구심성 신경세포와 관련이 있고 중추신경계통 내에서는 통증에 관여하는 신경펩타이드로 알려졌다. 염증반응시에는 혈관 내피세포를 자극시켜 혈관형성을 촉진하여 치유하는 역할을 하는 것으로 알려졌다²³.

Substance P(SP)는 말의 뇌와 장에서 일시적 혈압강하 및 장수축인자로서 처음 발견되고 생화학적 구조가 알려졌다¹². 그러나 SP는 계속된 연구에 의해 중추 및 말초신경계통에 광범위하게 분포되어 있음이 밝혀졌으나 아직까지 분포부위에 따른 정확한 기능이 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구는 신경증상에 관한 연구로 많이 이용되는 실험동물중 8개월령 이상의 WKY 랫드를 이용하여, 척수신경절중 골반과 후지에 감각신경 분포를 담당하는 요수부분 척수신경절 내에서 감각기전과 관련된 신경펩타이드 함유세포를 면역염색하여 분포, 크기 등을 연구하여 말초신경장애 시에 신경증상의 진단 및 치

료에 기초자료를 제공하고자 본 실험을 시행하게 되었다.

재료 및 방법

실험동물 및 조직처리 : 체중 300~450g의 8개월령 이상 Wistar Kyoto(WKY) 랫드 수컷 14마리를 사용하였다. 사육 및 실험기간의 사육실 환경은 23±2℃의 온도와 55±10%의 상대습도를 유지하였고, 24시간 인공조명하에서 사육하였다. 사료(신촌사료, 마우스용)와 음용식수는 자유로이 섭취하도록 하였다.

실험동물을 pentobarbital sodium(Entobar[®], 한림제약주식회사) 40mg/kg을 복강내 주사하여 전신마취시킨 뒤 흉강을 열고 cannula를 좌심실을 통하여 오른대동맥에 삽입하고 관류수세기(Master plex, USA)를 이용하여 생리식염수 500ml로 관류수세하였다. 이어서 4% paraformaldehyde 용액(0.1M phosphate buffer, pH 7.5; 이하 PB) 800ml로 30분간 관류고정시켰다. 골결자를 이용하여 요추골 척추사이구멍에 위치하고 있는 좌·우의 척수신경절(L₁~L₆)을 적출한 다음 0.1M PB에 희석한 30% sucrose 용액에 넣어 가라앉을 때까지 침적시킨 후 냉동절편기(IEC Co., USA)를 이용하여 6μm 두께의 연속 냉동절편을 작성하여 gelatin을 처리한 슬라이드에 조직절편을 부착시켰다.

면역조직화학적 관찰 및 분석 : 본 실험에서는 골반 내장과 후지의 구조가 대칭적이기는 하지만 요수부분 척수신경절(L₁~L₆)의 좌·우를 구분하여 신경펩타이드 면역반응세포의 분포도를 조사하였다.

신경펩타이드 CGRP 또는 SP를 함유하고 있는 세포체의 분포, 크기, 특징 등을 관찰하기 위하여 avidin-biotin complex 방법²⁴을 이용한 면역염색을 하였으며, 광학현미경(Axiophot, Zeiss)으로 신경펩타이드 면역반응세포를 관찰하였다.

척수신경절을 0.1M phosphate buffered saline(이하 PBS, pH 7.4)에 5분간 3회 수세한 뒤 10% normal goat serum(Vector Co., USA)에 실온에서 1시간 반응시켜 비특이염색반응을 최소화하였다. 각 신경펩타이드에 대한 1차 항체는 rabbit anti-CGRP(Peninsula Co., USA)와 rabbit anti-SP(INCSTAR Co., USA)를 1:1,000으로 희석한 용액을 사용하였다. 본 실험에서는 비특이성 항원에 대한 면역반응을 방지하기 위하여, 전처리용액(0.3% Triton X100, 1%

normal goat serum in PB)을 사용하였다. 항원항체 반응후 기질에 대하여 갈색을 띄게 하는 0.05% 3,3-diaminobenzidine 4HCl(Sigma Co.)에 30초~2분 내외로 발색시키고 0.1M PB에 수세하고 Entellan®(Merck Co.)으로 봉입하였다.

또한 CGRP와 SP가 동일한 신경세포에 공존하고 있는 양상을 관찰하기 위하여 뒤절편은 SP 항체를 이용하여 위와같은 방법으로 시행하여 관찰하였다, 면역염색후 척수신경절 조직절편을 광학현미경(Zeiss Co., Germany) 하에서 척수신경절의 연속절편을 10회 반복측정하여 표지신경세포 분포를 나타내었고, 이를 99% student *t*-test로 검정하였다. 요수부분 각각의 면역반응세포의 크기는 반응을 보인 신경세포중에서 뚜렷한 핵이 보이는 세포체를 컴퓨터 화상분석기(VM32, Rise Co., Japan)로 면적을 측정하였다. 또한 각각의 척수신경절에서 신경펩타이드 면역반응세포의 형태학적 특징을 조사하였다.

결 과

CGRP 면역반응세포 : CGRP 면역반응세포들은 염색성이 일반적으로 세포질 내에 균질하게 분포하거나 과립상의 구조로 관찰되었다(Fig 5).

첫째에서부터 여섯째 오른쪽 요수부분 척수신경절에서 CGRP 세포들의 분포율은 $51.9 \pm 8.4\%$, $61.9 \pm 9.1\%$,

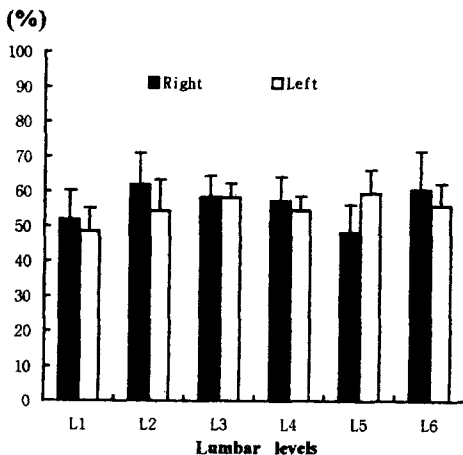


Fig 1. Distribution of CGRP immunoreactive cells in DRG L₁~L₆ of WKY rat. There is no significant difference between levels for CGRP immunoreactive cells($p > 0.01$).

$58.4 \pm 6.1\%$, $57.2 \pm 7.0\%$, $48.2 \pm 8.0\%$, $60.5 \pm 11.8\%$ 로 나타났고, 왼쪽에서는 $48.6 \pm 6.7\%$, $54.4 \pm 8.9\%$, $58.2 \pm 4.0\%$, $54.5 \pm 4.2\%$, $59.4 \pm 6.9\%$, $55.8 \pm 6.4\%$ 로 나타났으며 각각의 척수신경절 위치에 따른 CGRP 세포 분포율은 유의차가 없었다($p > 0.01$), (Fig 1).

CGRP 크기에 따른 분포는 $1,500\mu\text{m}^2$ 이하에서 면역반응을 보였는데 $200\sim 400\mu\text{m}^2$ 사이에서 전체 CGRP 면역반응세포중 52.1%의 높은 분포율을 나타내었다(Fig 2).

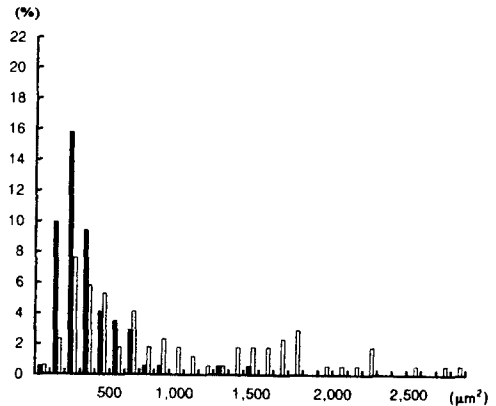


Fig 2. Size distribution of CGRP (black bar) immunoreactive cells in the total(open bar) DRG cells of WKY rat.

SP 면역반응세포 : SP 면역반응세포들은 신경절내에서 전반적으로 산재해 분포하고 있었으며 면역반응세포들의 염색성은 대부분 세포질 전반에 약하게 염색되었으나 진하게 염색된 것들도 관찰되었다(Fig 6).

SP 세포들은 첫째에서부터 여섯째 오른쪽 요수부분 척수신경절에서 전체 세포들중 분포율은 $7.2 \pm 2.5\%$, $12.6 \pm 4.4\%$, $18.0 \pm 4.5\%$, $9.6 \pm 3.7\%$, $9.2 \pm 3.3\%$, $12.9 \pm 4.9\%$ 로 나타났고, 왼쪽에서는 $10.7 \pm 3.4\%$, $18.9 \pm 5.5\%$, $9.1 \pm 2.8\%$, $7.6 \pm 3.6\%$, $19.5 \pm 5.0\%$, $17.1 \pm 3.6\%$ 로 관찰되었으며, 각각의 척수신경절에서의 분포율은 유의차가 없었다($p > 0.01$), (Fig 3).

SP 면역반응 세포의 크기에 따른 분포는 $600\mu\text{m}^2$ 이하의 작은 세포에서 주로 관찰되었으며 특히 $100\sim 200\mu\text{m}^2$ 사이에서 60.9%로 높은 분포율을 나타내었다(Fig 4).

CGRP와 SP 면역반응세포의 공존 : SP 항체에 면역반응을 보인 세포들중 약 86.7%에 해당하는 세포들이 동일 세포내에 CGRP를 공유하고 있었는데 이들 세포는

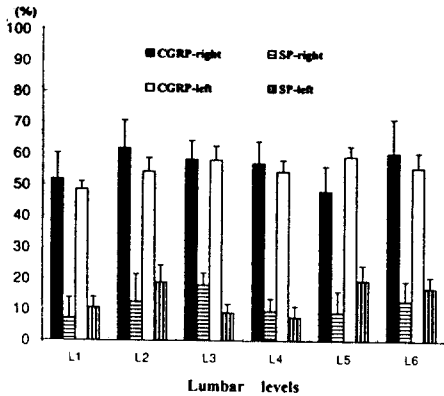


Fig 3. Distribution of CGRP and SP immunoreactive cells in DRG L₁-L₆ of WKY rat. There is no significant difference between levels for CGRP and SP immunoreactive cells ($p > 0.01$).

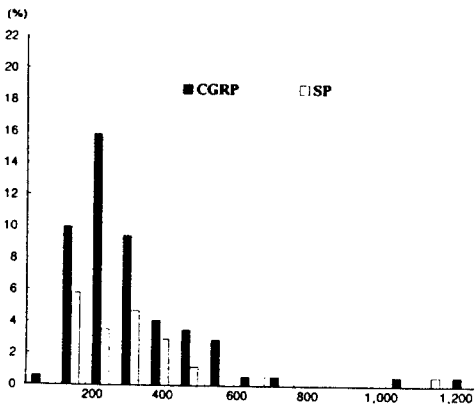


Fig 4. Size distribution of CGRP (black bar) and SP (white bar) immunoreactive cells in the total DRG cells of WKY rat.

전반적으로 600 μm^2 이하의 작은 세포들이었다. 요수부분 척수신경절의 위치에 따른 CGRP/SP 공존세포의 분포율은 유의차가 없었다(Fig 7).

고찰

본 연구인 WKY 랫드 요수부분 척수신경절에서 CGRP 면역반응세포의 분포율은 약 56%이었다. 다른 실험의 요수부분 척수신경절에서의 CGRP 세포의 분포를 살펴보면 Sprague-Dawley(SD) 랫드 L₄-L₅ 부위에서는 44%²⁵,

Wistar 랫드 L₄ 부위에서는 47%²⁶였다고 보고하였다. 또한 McCarthy와 Lawson²⁶은 Wistar 랫드에서 7주~8개월 연령에 따라 L₄ 부위에서 CGRP 세포의 출현을 변화를 관찰하였던 바 연령에 따른 차이는 없는 것으로 보고하기도 하였다. 본 연구에서는 L₄ 및 L₄-L₅ 부위의 평균 출현율이 각각 55.9%, 54.8%로서 위의 결과들과 비교하면 다소 많이 관찰되었으나 랫드의 혈통간에 요수부분 척수신경절에서 CGRP 세포의 분포율은 큰 차이가 없었다.

요수부분 척수신경절에서 SP 면역반응세포의 분포에 대하여 SD 랫드의 L₂ 및 L₄-L₅ 부위에서는 각각 21.2%¹¹ 및 18%²⁵였고, Wistar 랫드 L₄ 부위에서는 18~20%²⁷였다고 보고되었다. 본 연구에서는 L₂, L₄ 및 L₄-L₅ 부위의 평균 출현율이 각각 15.8%, 8.6%, 11.5%로서 위 연구결과들과 비교하면 다소 적게 관찰되었으나 랫드의 혈통간에 요수부분 척수신경절에서 SP 세포의 분포율은 큰 차이가 없었다. 신경활성물질의 축삭이동을 차단하는 colchicine을 투여한 SD 랫드의 경우 L₃ 부위에서 50% 정도⁷, SP는 30% 정도⁷가 관찰되어 colchicine을 투여하면 보다 많은 수의 CGRP와 SP 세포가 관찰되는 것으로 여겨진다²⁸.

한편 다른 종의 경우 고양이에서는 28% 정도⁸, 개에서는 21.3%²⁷, 닭과 기니픽에서는 각각 40%와 20%³⁰가 관찰된다고 보고된 바 있으며, SP 세포는 고양이에서는 18.1%³¹, 개에서는 5.4%²⁹로 관찰된다고 보고된 바 있어, 종간에 따른 분포의 차이를 보이는데 대해서는 더 연구가 필요하다.

척수신경절 내에서 크기에 따른 CGRP 면역반응세포의 분포는 작은 세포에서 큰 세포에 이르기까지 다양하게 관찰된다고 하였다^{7,30}. 즉, Scott³⁰는 Wistar 랫드에서 CGRP 세포는 150~1,800 μm^2 사이에서 관찰되는데 대다수가 200~900 μm^2 사이에 위치한다고 하였다. 본 WKY 랫드 실험에서도 위와 같이 비슷한 양상을 보였으며 특히 가장 많은 수가 200~300 μm^2 사이에서 관찰되었다. 따라서 척수신경절 내의 CGRP 세포는 그 크기가 다양하다고 여겨진다. 연령에 따른 크기 변화를 Wistar 랫드에서 7주, 10~12주 및 32~34주령에서 관찰하였던 바 약간의 증가추세를 보이나 유의차는 없다는 보고도 있다²⁶. 한편 고양이의 척수신경절 내에서 많은 수의 CGRP 세포가 400~600 μm^2 의 크기에 속해 있다고 보고되었는데¹⁰, 본 실험에서는 많은 수가 200~400 μm^2 사이에서 관찰되

어 위의 연구와 비교해볼 때 랫드의 CGRP 세포는 고양이
의 경우에 비해 작은 세포에 해당하는 것 같다.

SP 면역반응세포 크기에 따른 분포에 대하여 본 실험
에서는 100~600 μm^2 사이에서 관찰되었다. Scott³⁰는 Wis-
tar 랫드에서 주로 SP 세포중 많은 수가 400 μm^2 크기를
중심으로 밀집되었다고 하였는데, 본 실험의 경우 많은
수의 SP 세포가 200 μm^2 를 전후해 분포하고 있었다. 이와
같이 Wistar 랫드와 차이가 있는 것은 혈통간의 차이인
지 아니면 측정방법에서 온 차이인지에 대해서도 더 연
구해야할 필요가 있다.

신경펩타이드 항체에 면역반응하는 세포중 과립상의
염색성은 골지복합체의 모습에 의한 것으로 주로 핵 주
위에서 염색되어진다고 하며^{7,32} 균질하게 염색되나 그
차이는 닛슬소체와 신경세사(neurofilament)에 함유된 물
질의 분포정도에 의한 것이라는 보고²⁸가 있다. CGRP 면
역반응세포의 염색성에 대하여 작은 세포에서는 치밀한
형태를 보이며, 큰 세포에서는 과립상의 구조를 갖고 있
다는 보고가 있는데^{7,33}, 본 연구에서도 CGRP 세포의 염
색성이 위 결과들과 유사하게 관찰되었다. SP 면역반응
세포의 염색성에 대해서는 대부분 세포의 세포질 내
에서 약하게 반응하였으나 소수의 경우 진하게 반응한 것
들도 있었다. 이에 대하여 Ju *et al*⁷은 SP 세포의 염색성
은 세포질내에서 약하게 관찰된다고 하여, 본 연구와는
약간의 차이를 나타내었다.

한편 근래에 이르러 어떤 감각신경세포들에서는 2가
지 이상의 신경펩타이드가 함께 공존한다는 연구가 이

루어지고 있다. 이에 대하여 먼저 CGRP 세포는 주로
SP를 공유하는데 랫드에서는 50%³⁰, 기니픽에서는 95%
¹⁵, 고양이에서는 36%¹⁰에 이른다고 하였다. 이것은 본
연구인 WKY 랫드에서 86.7%로 나타나 종전에 알려진
것보다 다소 많은 분포로 관찰되고 있다. SP 세포는 랫
드의 경우 100% CGRP를 공유하며^{7,30,32}, 기니픽과 고양
이에서는 80% 이상^{10,16}이라 하였고, 그 외에 랫드에서
소수의 세포가 somatostatin을 공유한다³⁰는 보고도 있다.
위에 언급한 것들 외에도 그 수는 적지만 somatostatin 세
포는 SP와, galanin 세포는 SP와 공존한다는 보고도 있다
^{23,34}. 이상과 같이 랫드에서는 본 연구에서 관찰한 것처
럼 주로 2 혹은 3 종류의 신경펩타이드가 공존하는 것으
로 정리되지만 기니픽^{16,30}과 고양이^{23,35}에서는 하나의 신
경세포에서 CGRP, SP, somatostatin, galanin 등이 공존한
다고 하여 랫드보다는 더 많은 종류가 공존하는 것 같
다. 아울러 WKY 랫드에 대해서도 이와같은 연구가 필
요하다고 본다.

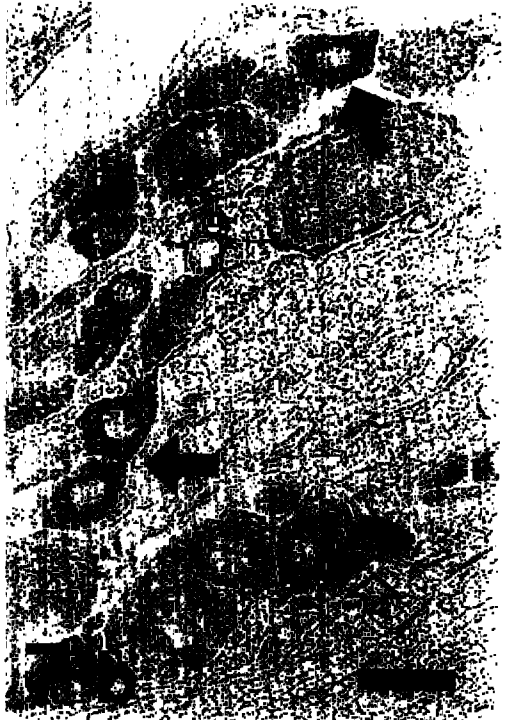
이상의 결과를 비교 정리해보면 척수신경절 내에 분
포하는 신경펩타이드 면역반응세포는 신경펩타이드 종
류에 따라 그 세포의 염색성, 분포율, 크기 등의 차이가
있음이 분명하다. 이는 척수신경절세포가 담당하는 체
성 및 내장성 일차감각이 조건에 따라 그 기능에 차이가
있기 때문인 것으로 사료된다. 또한 같은 신경펩타이드
라도 동물의 종 또는 계통에 따라 척수신경절에서 분포
의 비교 관찰이 필요하며, 아울러 그 기능도 함께 병행
하는 연구가 필요하다고 본다.

Legends for figures

Fig 5. Calcitonin gene-related peptide immunoreactive cells in the lumbar dorsal root ganglion of the WKY rat. Various sized cells which are distributed throughout the ganglion show strong immunoreactivity in the cytoplasm or granular immunoreactivity. Scale bar=50 μm

Fig 6. Substance P immunoreactive ganglion cells in the lumbar dorsal root ganglion of the WKY rat. High power of Substance P immunoreactive cells are small and medium size, Scale bar=50 μm

Fig 7. Colocalization of calcitonine gene-related peptide and substance P in dorsal root ganglion cells (arrow). (a) : Some cells (arrowheads) does not show the substance P immunoreactivity. (b) : A cell(open arrow) does not show the calcitonin gene-related peptide immunoreactivity. Scale bar=50 μm



참 고 문 헌

1. Carpenter MM. *Core Text of Neuroanatomy*, Williams & Wilkins, Baltimore, 57-82, 1991.
2. Sann H, Rossler W, Hammer K, *et al.* Substance P and calcitonin-gene related peptide in the ureter of chicken and guinea-pig: Distribution binding sites and possible functions. *Neuroscience*, 49:699-713, 1992.
3. Cuello AC, Del Flacco M, Paxinos G, *et al.* The central and peripheral ends of the substance P-containing sensory neurons in the rat trigeminal system. *Brain Res*, 152:499-509, 1978.
4. Brimijoin S, Lundberg JM, Brodin E, *et al.* Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig. *Brian Res*, 191:443-457, 1980.
5. Hökfelt T, Johansson O, Ljunhdahl A, *et al.* Peptidergic neurons. *Nature*, 284:515-521, 1980.
6. Villar MJ, Cortes R, Theodorsson E, *et al.* Neuropeptide expression in rat dorsal root ganglion cells and spinal cord after peripheral nerve injury with special reference to galanin. *Neuroscience*, 33:587-604, 1989.
7. Ju G, Hökfelt T, Brodin E, *et al.* Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P, somatostatin, galanin, vasoactive intestinal polypeptide and cholecystokinin immunoreactive ganglion cells. *Cell Tissue Res*, 247:417-431, 1987.
8. Cameron AA, Leah JD, Snow PJ, *et al.* The coexistence of neuropeptides in feline sensory neurons. *Neuroscience*, 27:969-979, 1988.
9. Gibbins LL, Furness JB, Costa M. Pathway-specific patterns of the coexistence of substance P, calcitonin gene-related peptide, cholecystokinin and dynorphin in neurons of the dorsal root ganglion of the guinea-pig. *Cell Tissue Res*, 248:417-437, 1987.
10. Lunam CA, Furness JB. Subpopulations of chick dorsal root ganglion neurons based on calcium binding protein-, neuropeptide Y-enkephalin-and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity (LI), *Neurosci Lett Suppl.* 30:S94, 1988.
11. Tuschcherer MM, Seybold VS. Immunohistochemical studies of substance P, cholecystokinin-octapeptide and somatostatin in dorsal root ganglia of the rat. *Neuroscience*, 14:593-605, 1985.
12. Noguchi K, Dubner R, De Leon M, *et al.* Axotomy induces preprotachykinin gene expression in a subpopulation of dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Res*, 37:596-603, 1994.
13. Zhang X, Meister B, Elde R, *et al.* Large calibre primary afferent neurons projecting to the gracile nucleus express neuropeptide Y after sciatic nerve lesions: an immunohistochemical and *in situ* hybridization study in rats. *Eur J Neurosci*, 5:1510-1519, 1993.
14. Kashida H, Senba E, Ueda Y, *et al.* Co-localized but target-unrelated expression of vasoactive intestinal polypeptide and galanin in rat dorsal root ganglion neurons after peripheral nerve crush injury. *Brian Res*, 582: 47-57, 1992.
15. Zhang X, Xu ZQ, Bao L, *et al.* Complementary distribution of receptors for neurotensin and NPY in small neurons in rat lumbar DRGs and regulation of the receptors and peptides after peripheral axotomy. *J Neurosci*, 15:2733-2747, 1995.
16. Eiden LE, Siegel RE, Girand P, *et al.* Ontogeny of enkephalin- and VIP-containing neurons in dissociated cultures of embryonic mouse spinal cord and dorsal root ganglia. *Dev Brain Res*, 44:141-150, 1988.
17. Weihe E, Hartschuh W, Weber E. Prodynorphin opioid peptides in small somatosensory primary afferents of guinea pig. *Neurosci Lett*, 58:347-352.
18. Ichkawa H, Deguchi T, Nakago T, *et al.* Parvalbumin, calretinin and carbonic anhydrase in the trigeminal and spinal primary neurons of the rat. *Brain Res*, 655: 241-245, 1994.
19. Panula P, Hadjiconstantinou M, Yand HYT, *et al.* Immunohistochemical localization of bombesin/gastrin-releasing peptide and substance P in primary sensory neurons. *J Neurosci*, 3:2021-2029, 1983.
20. Honda CN. Differential distribution of calbindin-D28k

- and parvalbumin in somatic and visceral sensory neurons. *Neuroscience*, 68:883-892, 1995.
21. Fuxe K, Agnati LF, McDonald T, *et al.* Immunohistochemical indications of gastrin releasing peptide-bombesin-like immunoreactivity in the nervous system of the rat. Codistribution with substance P-like immunoreactivity in dorsal root ganglion cell bodies. *Neurosci Lett*, 37:17-22, 1983.
 22. Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, *et al.* Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*, 304:129-135, 1983.
 23. Haegerstraned A, Dalsgaard CJ, Jonzon B, *et al.* Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. *Pro Natl Acad Sci USA*, 87: 3299-3303, 1990.
 24. Hsu SM, Raine L, Fanger H, *et al.* A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol*, 75:734-738, 1981.
 25. Verge VM, Richardson PM, Benoit R, *et al.* Histochemical characterization of sensory neurons with high-affinity receptors for nerve growth factor. *J Neurocytol*, 18:583-591, 1989.
 26. McCarthy PW, Lawson SN. Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with calcitonin gene-related peptide like immunoreactivity. *Neuroscience*. 34:623-632. 1990.
 27. McCarthy PW, Lawson SN. Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with substance P-like immunoreactivity. *Neuroscience*, 28:745-753. 1989.
 28. Lee Y, Kawai Y, Shiosaka S, *et al.* Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: immunocytochemical analysis. *Brain Research*, 330: 194-196, 1985.
 29. Bonfanti L, Bellardi S, Ghidella S, *et al.* Distribution of five peptide, three general neuroendocrine markers and two synaptic-vesicle-associated proteins in the spinal cord and dorsal root ganglia of the adult and newborn dog: an immunocytochemical study. *Am J Anat*, 191:154-166, 1991.
 30. Scott SA. *Sensory Neurons: Diversity, Development and Plasticity*, Oxford Univ. Press. New York:27-59, 1992.
 31. Hanesch U, Heppelmann B, Schmidt RF, *et al.* Somatostatin-like immunoreactivity in primary afferents of the medial articular nerve and colocalization with substance P in the cat. *J Comp Neurol*, 354:345-352. 1995.
 32. Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T, Lundberg JM, *et al.* Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioural responses of the rat. *Neurosci Lett*, 52:199-204, 1984.
 33. Zhang X, Aman K, Hökfelt T, *et al.* Secretory pathways of neuropeptides in rat lumbar dorsal root ganglion neurons and effects of peripheral axotomy. *J Comp Neurol*, 352:481-500, 1995.
 34. Kar S, Bretherton WD, Gibson SJ, *et al.* Novel peptide pancreastatin: its occurrence and codistribution with chromogranin A in the central nervous system of the pig. *J Comp Neurol*, 288:627-639, 1989.
 35. Leah JD, Cameron AA, Kelly WL, *et al.* Coexistence of peptide immunoreactivity in sensory neurons of the cat. *Neuroscience*, 16:683-690. 1985.