

## 닭 태자 샘위의 somatostatin 면역반응세포의 출현시기, 분포 및 상대적 빈도에 관한 연구

장재우 · 이형식 · 구세광\* · 이재현\*

경산대학교 자연과학부 생물학전공  
경북대학교 수의과대학 조직학교실\*  
(1999년 4월 16일 접수)

### Ontogeny, distributions and relative frequencies of the somatostatin-immunoreactive cells in the proventriculus of the chicken embryos with incubation periods

Jae-woo Chang, Hyeung-sik Lee, Sae-kwang Ku\* , Jae-hyun Lee\*

*Department of Biology, Faculty of Natural Science, Kyungsan University  
Laboratory of Histology, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University\**

(Received Apr 16, 1999)

**Abstract** : Ontogeny, distributions and relative frequencies of somatostatin-immunoreactive cells were investigated in the proventriculus of the chicken embryos with incubation periods. Samples were taken from 10 groups(10 days of incubation to hatching) and studied by immunohistochemical methods. The findings were as follows.

Somatostatin-immunoreactive cells were observed from 12 days of incubation in the proventricular glands and after that increased with incubation periods. The first observation time of these cells in the epithelium were at 15 days of incubation in the basal portion but in 16 and 17 days of incubation, no immunoreactive cells were observed in the epithelium but after that a few immunoreactive cells were observed in the basal portion and gastric gland regions. The shapes of these cells were spherical to spindle in the proventricular glands and spherical to round in the epithelium and gastric gland.

**Key words** : chicken embryo, ontogeny, somatostatin-immunoreactive cell, proventriculus.

## 서 론

조류의 위는 해부학적으로 샘위와 근육위의 2부분으로 구분되며, 샘위는 소화효소와 위산을 분비하고, 근육위는 기계적 작용에 의하여 음식물을 유미(chyme)의 상태로 변화시킨다<sup>1,2</sup>.

샘위에 존재하는 내분비세포는 조직학적<sup>3,4</sup> 및 전자현미경적<sup>2,5-7</sup>으로 그 존재가 보고되었다. 또한 근래에 들어 각종 peptide와 amine에 대한 항체를 이용한 면역조직화학적 방법에 의하여 벌새<sup>8</sup>, 메추리<sup>9</sup>, 닭<sup>10-12</sup>, 비둘기<sup>13</sup>, 오리<sup>14</sup> 및 다양한 조류<sup>4</sup>에서 substance P, neurotensin, serotonin, avian pancreatic polypeptide, glucagon, somatostatin, bombesin, met-enkephalin, gastrin releasing polypeptide 및 glicentin 등 10여종이 보고되어 있으며 현재에도 계속해서 새로운 물질이 검출되고 있다. 한편 샘위에서 이들 내분비세포의 연령에 따른 출현시기와 분포에 대한 보고로는 메추리<sup>9</sup>와 닭<sup>15,16</sup> 등 일부 조류에서 보고되어 있을 뿐 극히 소수에 불과하며 출현시기 역시 사용한 종과 실험방법에 따라 매우 다양하다<sup>9,14,15</sup>. 또한 Andrew와 Rawdon<sup>16</sup>은 발생단계중 매우 초기에 이들 내분비세포가 출현할 가능성을 시사한 바 있으나 그 자료는 매우 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 닭 수정란을 이용하여 부란 10일부터 부화직후까지의 각 일령에 따른 샘위에서 비교적 다수 관찰된다고 알려진 somatostatin 면역반응세포의 출현시기 및 일령별 분포와 상대적 빈도를 관찰하여 이전의 보고들과 비교하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물** : 본 실험에 사용된 동물은 닭 수정란(Harvard Co, USA)을 부화기(KE 300, EUN JO incubator Co, Korea)로 습도 70%, 온도 37.8℃의 조건하에서 부화시켜 사용하였으며 그 부화일수는 20~21일이었다. 닭 태자는 Hamburger와 Hamilton<sup>17</sup>의 방법에 따라 부란 10일(Stage 36), 11일(Stage 37), 12일(Stage 38), 13일(Stage 39), 14일(Stage 40), 15일(Stage 41), 16일(Stage 42), 17일(Stage 43), 18일(Stage 44) 및 부화직후(Stage 46)에서 각각 5마리씩 실험에 사용하였다.

**면역조직화학적 염색** : 부란중인 달걀을 깨어 개체를

채취한 후 샘위를 구분하였으며 부화직후에서는 방혈후 샘위를 채취하여 사용하였다. 채취한 샘위는 Bouin 액에 24시간 이상 고정하였다. 고정한 조직은 에타놀계열에 탈수한 후 Paraffin에 포매하였으며 3~4 $\mu$ m의 연속절편을 제작하였다. 각 조직절편은 hematoxylin-eosin(H-E) 염색을 실시하여 조직학적 구조를 확인하였다.

일령에 따른 somatostatin 세포를 관찰하기 위하여 peroxidase anti-peroxidase(PAP) 법<sup>18</sup>을 이용하여 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 면역조직화학적 염색을 위하여 먼저 파라핀을 제거한 조직절편을 100% methanol과 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 각각 30분간 침적하여 조직내의 내인성 peroxidase를 억제시킨 후 phosphate buffered saline(PBS; 0.01M, pH 7.4)으로 30분간 3회 세척하였다. 이어 비특이적인 면역 globulin의 결합을 방지하기 위하여 normal goat serum으로 실온에서 1시간 전처리한 후 somatostatin 항혈청(BioGenex, Cat No. PUO421295)을 1:26으로 희석하여 4℃ 냉장고하에서 24시간 이상 반응시키고 PBS로 30분간 3회 세척하였다. 이후 2차 항혈청인 Anti-Rabbit IgG goat serum으로 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 30분간 3회 세척하였다. Peroxidase anti-peroxidase complex (Sigma, USA)로 실온에서 1시간 방치한 후 역시 PBS로 30분간 3회 세척하였다. DAB 용액(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris-HCl buffer (0.05M, pH 7.6)으로 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 가볍게 핵 염색을 실시하여 광학현미경 하에서 관찰하였다.

## 결 과

닭 태자 샘위에서 일령에 따른 somatostatin 면역반응세포의 분포 및 상대적 빈도는 Table 1에 나타내었다. 즉, somatostatin 면역반응세포는 부란 12일의 proventricular gland에서 최초로 관찰되기 시작하였으며 일령에 따라 점차 증가되어 부란 15일에는 상피에서도 극소수의 면역반응세포가 관찰되었으나 부란 16일과 17일에서는 관찰되지 않았고 부란 18일부터는 다시 관찰되기 시작하였다.

한편 somatostatin 면역반응세포는 상피의 경우, 기저부에서 타원형 또는 방추형으로 관찰되었으며 gastric gland 부위에서는 원형 또는 타원형으로 관찰되었다. Proventricular gland 부위에서는 주로 타원형 또는 방추형

**Table 1.** Distributions and relative frequencies of the somatostatin-immunoreactive cells in the proventriculus of the chicken embryos with age

	Epithelium	Proventricular gland
10 days of incubation	-	-
11 days of incubation	-	-
12 days of incubation	-	±
13 day of incubation	-	±
14 days of incubation	-	+
15 days of incubation	±	+
16 days of incubation	-	++
17 days of incubation	-	+++
18 days of incubation	±	+++
Hatching	+	+++

- : not detected, ± : rare, + : a few, ++ : moderate, +++ : numerous.

으로 관찰되었다(Figs 1~10).

## 고 찰

조류의 샘위는 간 주위에 식도와 근육위 사이에 존재하는 긴 방추형의 기관으로 성숙한 조류에서는 길이 45 mm, 직경 20mm를 나타낸다고 알려져 있다<sup>19</sup>. 또한 근육위와 샘위 사이에는 선명한 constriction 부위가 존재하여 양자가 확실히 구별된다고 한다<sup>1</sup>.

Somatostatin은 면양의 시상하부에서 최초로 분리되었으며<sup>20</sup> 14개의 아미노산으로 구성된 peptide로서 선형(straight form)과 고리형(cyclic form)이 존재하며 합성이 가능하고 위장관 내분비세포나 신경세포, 중추신경계에서도 확인되어지며 위장관중에서는 위전정부 점막의 내분비세포와 췌장섬의 D세포에서 주로 분포하는 것으로 알려져 있다. 이들은 포유류의 위저부에서 보고된 것과 같이 전형적인 paracrine 세포로서 mechano-receptor로서 작용한다고 하며<sup>21-23</sup> 내분비뿐만 아니라 외분비의 분비역시 억제한다고 알려져 있다<sup>24</sup>. 조류에 있어서 somatostatin의 분포는 소화관 뿐만 아니라 뇌하수체<sup>25</sup>와 retina<sup>26</sup>에서도 보고되어 있다. 또한 샘위에 있어서 somatostatin 면역반응세포의 분포에 관해서는 닭<sup>2,11,27</sup>, 벌새<sup>8</sup>, 메추리<sup>9</sup>, 비둘기<sup>13</sup> 및 다양한 조류<sup>2</sup> 등에서 보고되어 있

으며 이들 보고에서 somatostatin 면역반응세포들은 상피부분에서 소수 또는 극소수로 존재하며 proventricular gland에서는 다수 존재한다고 보고되었다.

본 연구에서도 부란 후기부터 상피에 소수, proventricular gland에 다수 관찰되어 이 시기에서부터 성체와 같은 분포양상(distribution pattern)을 나타내는 것으로 보여지나 다른 조류에서 이와 유사한 보고를 찾아볼 수 없는 바 조류의 종에 따른 차이는 서로 비교하기 곤란하다.

한편 부란시기에 따른 본 실험의 결과에서 somatostatin 면역반응세포는 부란 12일의 proventricular gland에서 극소수로 최초 관찰되었으나 상피부위에서는 부란 15일에 최초로 관찰된 후 부란 16일과 17일에서는 관찰되지 않았고 부란 18일부터 다시 관찰되기 시작하였다. 이 같은 결과는 메추리에서 이들 세포들이 상피와 proventricular gland 두 곳 모두에서 부란 12일부터 관찰된다는 Yamaguchi *et al*<sup>9</sup>과 닭에서 부란 16일에 주로 상피에서 관찰되기 시작한 후 proventricular gland에서 수적 증가를 나타낸다는 Martinez *et al*<sup>16</sup>의 보고와는 다소 상이하였다. 그러나 샘위에서 이들 내분비세포가 부란 3.25일 이전부터 존재할 가능성을 보고한 Andrew와 Rawdon<sup>16</sup>의 보고와 같은 맥락으로 이들 세포들이 더 이른 시기에 관찰된 것으로 생각되며 또한 사용한 항혈청의 분자량 또는 중간 차이를 나타낸다고 알려져 있으므로<sup>28,29,31</sup> 이 같은 차이를 나타낸 것으로 생각되며 정확한 이유를 알기 위해서는 금후 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

이상에서 somatostatin 면역반응세포는 부란 12일에 proventricular gland에서 최초로 관찰된 후 일령에 따라 증가되었고 상피에서는 부란 15일에 극소수로 관찰된 후 부란 16 및 17일에는 관찰되지 않았다가 부란 18일부터 다시 관찰되는 등 이전의 보고들<sup>9,16</sup>과 차이를 나타낸 바 somatostatin 뿐만 아니라 다른 내분비세포들의 출현시기 역시 더 많은 연구를 수행해야 할 것으로 생각되며 *in situ hybridization* 등 새로운 방법으로도 이와같은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

닭 태자의 샘위에서 일령에 따른 somatostatin 면역반응세포의 출현시기, 분포 및 상대적 빈도를 관찰하기 위하여 부란 10일부터 부화직후에 걸쳐 10개군으로 구별

하고 면역조직화학적 관찰을 실시하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

면역조직화학적으로 somatostatin 면역반응세포는 부란 12일의 proventricular gland에서 극소수로 최초 관찰된 후 일령에 따라 증가하였고 부란 17일부터 다수로 샘 전체에 걸쳐 산재되어 주로 타원형 또는 방추형으로 관찰

되었다. 한편 상피에서는 상피의 기저부에서 부란 15일에 최초로 관찰된 후 부란 16일과 17일에는 관찰되지 않았다가 부란 18일부터 다시 관찰되기 시작하였다. 이들 면역반응세포들은 표면상피에서는 주로 방추형, gastric gland에서는 원형 또는 타원형으로 관찰되었다.

## Legends for figures

- Fig 1. Somatostatin-immunoreactive cells in the proventricular glands of the chicken embryos at 12 days of incubation.  $\times 480$ .
- Fig 2. Somatostatin-immunoreactive cells in the proventricular glands of the chicken embryos at 13 days of incubation.  $\times 480$ .
- Fig 3. Somatostatin-immunoreactive cells in the proventricular glands of the chicken embryos at 14 days of incubation.  $\times 480$ .
- Fig 4. Somatostatin-immunoreactive cells in the proventricular glands of the chicken embryos at 15 days of incubation.  $\times 480$ .
- Fig 5. Somatostatin-immunoreactive cells in the epithelium of the proventriculus of the chicken embryos at 15 days of incubation.  $\times 480$ .
- Fig 6. Somatostatin-immunoreactive cells in the proventricular glands of the chicken embryos at 16 days of incubation.  
a, b;  $\times 480$ .
- Fig 7. Somatostatin-immunoreactive cells in the proventricular glands of the chicken embryos at 17 days of incubation.  $\times 480$ .
- Fig 8. Somatostatin-immunoreactive cells in the epithelium of the proventriculus of the chicken embryos at 18 days of incubation.  
a, b;  $\times 480$ .
- Fig 9. Somatostatin-immunoreactive cells in the proventricular glands of the chicken embryos at 18 days of incubation.  
a;  $\times 120$ , b, c;  $\times 480$ .
- Fig 10. Somatostatin-immunoreactive cells in the epithelium(b) and proventricular glands(c, d) of the proventriculus of the chicken embryos at hatching.  
a;  $\times 120$ , b~d;  $\times 480$ .





## 참 고 문 헌

1. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Anatomy of the domestic birds. Springer-Verlage, New York, Heidelberg, Berlin, 46-50, 1977.
2. Yamada J, Kitamura N, Yashita T. The relative frequency and topographical distribution of somatostatin-, GRP-, APP-, glucagon-, 5-HT-, and neurotensin-immunoreactive cells in the proventriculus of seven species of birds. *Arch Histo Jap*, 48:305-314, 1985.
3. Okamoto T, Sugimura M, Kudo N. Distribution of endocrine cells in the duck digestive tracts. *Fas Fish Anim Husb Hiroshima Univ*, 15:127-134, 1976.
4. Iwagana T, Yamada J. Endocrine-like cells of peculiar shape in the proventriculus of the chicken-possible mechanoreceptors? *Biomed Res*, 1:28-32, 1980.
5. Kataoka K. An electron microscope study on neuro-endocrine complex in the proventricular mucosa of the finch, *Uroloncha striate var domestica*. *Arch Histo Jap*, 36:391-400, 1974.
6. Andrew A. Endocrine cells of the stomach of chickens around the time of hatching, *Cell Tiss Res*, 172:553-561, 1976.
7. Okamoto T, Yamada J. Light and electron microscopic studies on the endocrine cells in the duck proventriculus. *Jap J Vet Sci*, 43:863-870, 1981.
8. Richardson KC, Yamada J, Wooller C. An immunohistochemical study of the gastrointestinal endocrine cells of the new Holland honeyeater, *Phylidonyris novaehollandiae*. *Aust J Zool*, 36:483-496, 1988.
9. Yamaguchi S, Yamada J, Kitamura N, *et al*. Ontogeny of the endocrine cells in the quail proventriculus. *Z Mikrosk Anat Forsch*, 100:981-989, 1986.
10. Yamanaka Y, Yamada J, Kitamura N, *et al*. An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the chicken gastrointestinal tract. *Z Mikrosk Anat Forsch*, 103:437-446, 1989.
11. Mart nez A, Lopez J, Barrenechea MA, *et al*. Immunocytochemical and ultrastructural characterization of endocrine cells in the chicken proventriculus. *Cell Tiss Res*, 263:541-548, 1991.
12. Atoji Y, Hirasawa Y, Yamamoto Y, *et al*. Distribution of neurotensin-immunoreactive neurons in the digestive tract of the chicken. *J Auton Nerv Syst*, 53:185-194, 1995.
13. Saito T, Yamada J, Kitamura N, *et al*. An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of domestic pigeon(*Columba livia var domestica*). *Z Mikrosk Anat Forsch*, 103:237-246, 1989.
14. Lucini C, Castaldo L, Cocca T, *et al*. Distribution of substance P-like immunoreactive nervous structures in the duck gut during development. *Eur J Histochem*, 37:173-182, 1993.
15. Alison BC. The ontogeny and distribution of glucagon and pancreatic polypeptide- immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the chicken. *Anat Embryol Berl*, 82:605-610, 1990.
16. Martínez A, López J, Sesma P. Development of the diffuse endocrine system in the chicken proventriculus. *Cell Tiss Res*, 271:107-113, 1993.
17. Andrew A, Rawdon BB. Can a non-gut mesenchyme support differentiation of gut endocrine cells? *Anat Embryol Berl*, 185:509-516, 1992.
18. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in development of chick embryo. *J Morphol*, 88:49-92, 1951.
19. Sternberger LA. Immunocytochemistry. 2nd ed., Johe Wiley & Sons, 104-149, 1979.
20. Hodges RD. The histology of the fowl. Academic Press, London, 47-54, 1974.
21. Brazeau P, Vale W, Burgus R, *et al*. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 179:77-79, 1993.
22. Alumets J, Ekelund M, Munshid HA, *et al*. Topography of somatostatin cells in the stomach of the rat : possible functional significance. *Cell Tiss Res*, 202:177-188, 1979.
23. Kusumoto Y, Iwanaga T, Ito S, *et al*. Juxta-position of somatostatin cell and parietal cell in the dog stomach. *Arch Histo Jap*, 42:459-465, 1979.

24. Larsson LI, Goltermann N, De Magistris L, *et al.* Somatostatin cell processes as pathways for paracrine secretion. *Science*, 205:1393-1395, 1979.
  25. Patel YC, Zingg HH, Fitz-Patrick D, *et al.* Somatostatin: some aspects of its physiology and pathophysiology. In: ed, Bloom SR and Polak JM, Gut hormones, 2nd ed, Churchill Living Stone, Edinburgh, 339-349, 1981.
  26. Mikami S, Yamada S. Immunohistochemistry of the hypothalamic neuropeptides and anterior pituitary cells in the Japanese quail. *J Exp Zool*, 232:405-417, 1984.
  27. Ishimoto I, Fukuda M, Kuwayama Y, *et al.* Phylogenetical development of somatostatin-containing cells in the retina from teleosts to mammals: immunohistochemical analysis. *J Hirnforsch*, 23:127-132, 1982.
  28. Usellini L, Tenti P, Fiocca R, *et al.* The endocrine cells of the chicken proventriculus. *Basic Appl Histochem*, 27:87-102, 1983.
  29. Solcia E, Capella C, Vassallo G, *et al.* Endocrine cells of the gastric mucosa. *Int Rev Cytol*, 42:233-286, 1975.
  30. Dockray GJ. Molecular evolution of gut hormones. Application of comparative studies on the regulation of digestion. *Gastroenterol*, 72:344-358, 1977.
  31. Helander HF. The cell of gastric mucosa. *Int Rev Cytol*, 70:217-289, 1981.
-