

# 개체발생에 따른 황소개구리(*Rana catesbeiana*) 위장관에서 neurotensin, pancreatic polypeptide 및 gastrin/cholecystokinin 면역반응세포에 대한 면역조직화학적 연구

이형식 · 구세광\* · 이재현\*

경산대학교 자연과학대학 기초과학부  
경북대학교 수의과대학 조직학교실\*

(1998년 11월 30일 접수)

## Immunohistochemical study of neurotensin-, pancreatic polypeptide- and gastrin/cholecystokinin-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the bullfrog, *Rana catesbeiana* during developmental stages

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

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

(Received Nov 30, 1998)

**Abstract** : To investigate the regional distribution and relative frequency of the neurotensin-, pancreatic polypeptide(PP)- and gastrin/cholecystokinin(Gas/CCK)-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the bullfrog(*Rana catesbeiana*) with developmental stages, group of bullfrogs subdivided into the tadpole with hindlegs, metamorphosed bullfrog with tail, 2 weeks after metamorphosed bullfrog and adult bullfrog, were stained by immunohistochemical methods (PAP methods).

Neurotensin-immunoreactive cells were observed from the pylorus of the metamorphosed bullfrog with tail, but these cells were not detected after that periods. PP-immunoreactive cells were detected from the adult bullfrog in the pylorus, duodenum and ileum. These cells were most predominant in the pylorus. Gas/CCK-immunoreactive cells were observed from the adult bullfrog in the pylorus.

According to these results, most of immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the bullfrog were appeared after the complete metamorphosed periods, in which the complete differentiation of structure of gastrointestinal tract were occurred, and variable changes of the regional distribution and relative frequency with developmental stages were observed.

Key words : *Rana catesbeiana* , gastrointestinal tract, endocrine cells, immunohistochemistry.

## 서 론

동물의 소화관에 분포하는 내분비세포의 출현빈도와 분포는 동물의 종<sup>1</sup>에 따라 혹은 식성<sup>2,3</sup>에 따라 매우 다양한 차이를 나타내고 있으며 근래에 들어 조직화학적, 면역조직화학적 및 전자현미경적 방법을 통하여 포유류에서 무척추동물에 이르기까지 광범위하게 연구되어져 왔다. 특히 무미목(anura)에 속하는 양서류에서는 포유류의 신경내분비계(neuroendocrine system)에서 분비되는 regulatory peptide와 매우 유사한 생물학적 활성을 지닌 다양한 종류의 peptide들이 피부샘(skin gland)에서 발견되어짐에 따라 관심이 되어 왔으며<sup>4,5</sup> 양서류의 위장관 내분비세포에 대해서도 성체를 대상으로 매우 활발한 연구가 진행되어져 왔고<sup>6-13</sup> 특히 근래에 들어 특이항혈청을 이용한 면역조직화학적 방법을 통해 *Rana dybowskii*<sup>14</sup>, *Rana pipens*<sup>15</sup>, *Rana catesbeiana*<sup>15</sup>, *Xenopus laevis*<sup>15-17</sup>, *Rana esculenta*<sup>18</sup>, *Bufo regularis*<sup>19,20</sup> 및 8여종의 다양한 무미목 양서류<sup>21</sup>의 위장관에서 serotonin 등 17여종에 달하는 호르몬들이 분리 동정된 바 있으며 현재에도 계속해서 새로운 물질이 분리 동정되고 있으나 현재 우리나라에서 생태계 파괴를 초래하는 것으로 주목되고 있는 황소개구리의 위장관 내분비세포에 대해서는 Lechago et al<sup>15</sup>이 bombesin-like 세포를 동정하였고 이<sup>22</sup>가 도슨법을 이용하여 위장관 내분비세포를 동정한 것 이외에는 찾아볼 수 없다.

한편 Houillon<sup>23</sup>은 *Rana temporaria*의 발생단계를 4단계로 구분하였으며 Taylor와 Kollros<sup>24</sup>는 *Rana pipens*의 발생단계를 25단계로 구분하는 등 개구리의 발생단계 및 그에 따른 조직학적 보고는 다수 찾아볼 수 있으나 이들 발생단계에 따른 위장관 내분비세포의 변화에 대한 보고는 찾아볼 수 없으며 Bodegas et al<sup>25</sup>이 larva 단계의 *Rana temporaria*의 전장(anterior intestine) 부분에서 serotonin, somatostatin, bombesin 및 cholecystokinin 면역반응세포를 동정한 보고만이 있을 뿐이다. 또한 Lee와 Lee<sup>14</sup>는 산개구리의 위장관 내분비세포의 계절적 변이에 대

해 보고한 바 있다.

본 연구에서는 Houillon<sup>23</sup>의 방법에 따라 뒷다리가 있는 올챙이(Tadpole with hindleg, stage II), 꼬리를 가지는 변태중인 개구리(Metamorphosed bullfrog with tail, stage III), 변태후 2주(2 weeks after metamorphosed bullfrog, stage IV) 및 성체(Adult bullfrog)로 구분하고 위장관내에 존재하는 bovine chromogranin(BCG), bombesin, glucagon, 및 insulin 면역반응세포의 개체발생에 따른 변화를 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

실험동물은 경산 부근에서 Houillon<sup>23</sup>의 구분과 동일한 형태를 나타내는 뒷다리가 있는 올챙이, 꼬리를 가지는 변태중인 황소개구리, 변태후 2주 및 성체로 구분하여 각각 5마리씩 채집하였다. 채집된 실험동물은 ether로 마취하고 개복한 후 위저부, 유문부, 십이지장, 회장 및 직장의 각 부위에서 소편의 조직을 절취하여(Fig 1), Bouin 액에 12시간이상 고정하고 파라핀 포매한 후 3~5 $\mu$ m의 절편을 제작하였다. 이후 위장관의 정확한 부위를 확인하기 위하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다.

또한 위장관 각 부위의 내분비세포를 관찰하기 위하여 peroxidase antiperoxidase(PAP)법<sup>26</sup>에 의한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 면역조직화학적 염색을 위하여 먼저 파라핀을 제거한 조직절편을 100% methanol과 0.1% 과산화수소(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 Table 1에서와 같이 1차 항혈청을 희석하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고 내에서 24시간 이상 반응시키고 PBS로 30분간 3회 세척하였다. 이후 2차 항혈청인 anti-rabbit IgG goat serum으로 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 30분간 3회 세척하였다. 이어 peroxidase antiperoxidase complex(Sigma, USA)로 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 30분간 3회 세척

Table 1. Antisera used in this study

Antisera*	Code	Source	Dilution
Neurotensin	BO67122A	BioGenex Lab.	1 : 20
Bovine pancreatic polypeptide(BPP)	PUO660495	BioGenex Lab.	1 : 20
Gastrin/Cholecystokinin(Gas/CCK)	i600/004	Union Chimique Belge, bioproducts	1 : 100

\*All antisera were raised in rabbits.

하였다. 그후 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 광학현미경하에서 관찰하였다.

## 결 과

개체발생에 따른 황소개구리 위장관에서 neurotensin, PP 및 Gas/CCK 면역반응세포의 출현빈도 및 분포는 위장관 각 부위와 발생단계에 따라 다양하게 관찰되었다 (Table 2).

뒷다리를 가지는 올챙이 : 위장관 전 부위에 걸쳐 neurotensin, PP 및 Gas/CCK 면역반응세포는 관찰되지 않았다.

꼬리를 가지는 변태중인 개구리 : 위장관 전 부위에 걸쳐 PP 및 Gas/CCK 면역반응세포는 관찰되지 않았으나 유문부에서 극소수의 neurotensin 면역반응세포가 유문샘 부위에서 방추형의 형태로 관찰되었다(Fig 1).

변태후 2주 : 위장관 전 부위에 걸쳐 neurotensin, PP 및 Gas/CCK 면역반응세포는 관찰되지 않았다.

성체 (Table 2) : Neurotensin 면역반응세포는 위장관 전 부위에서 관찰되지 않았으나 PP 면역반응세포는 유문부, 십이지장 및 회장부위에서 관찰되었고(Fig 2a-d)

Gas/CCK 면역반응세포는 유문부에 국한되어 관찰되었다(Fig 3). PP 면역반응세포는 유문부에서는 유문샘(pyloric gland)부분에 국한되어 타원형 또는 방추형의 형태로 관찰되었고(Fig 2a,b) 십이지장에서는 점막상피의 바닥부분에서 방추형의 세포들이 극소수 관찰되었다(Fig 2c). 회장에서도 십이지장과 유사하게 점막상피의 바닥부분에서 방추형의 세포들이 소수 관찰되었다(Fig 2d). 또한 유문부에서는 타원형 또는 방추형의 Gas/CCK 면역반응세포들이 점막상피의 바닥부분과 유문샘부분에서 중등도로 관찰되었다(Fig 3).

## 고 찰

개체발생에 따른 황소개구리의 위장관에서 neurotensin, PP 및 Gas/CCK 면역반응세포의 부위별 분포 및 출현빈도를 관찰하였던 바 발생단계에 따라 매우 다양한 변화가 관찰되었으며 대부분의 면역반응세포는 위장관의 조직학적 구조가 완전히 확립되는 성체부터 관찰되기 시작하였으나 다른 무미목 양서류에서 개체발생에 따른 보고를 찾아볼 수 없는 바 그 결과를 비교하기 곤란하므로 금후 다른 종에서도 본 연구와 유사한 실험이 수행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 황소개구리의 위장관에서도 본 실험에 사용한 항혈청 이외의 다른 내분

Table 2. The regional distribution and relative frequencies of immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the adult bullfrog

	Fundus	Pylorus	Duodenum	Ileum	Rectum
Neurotensin	-	-	-	-	-
Pancreatic polypeptide(PP)	-	+++	±	+	-
Gastrin/cholecystokinin(Gas/CCK)	-	++	-	-	-

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

비세포에 대한 개체발생에 따른 연구 역시 더 수행되어야 할 것으로 생각된다.

Neurotensin은 tridecapeptide로서 중추신경계에서 관찰되는 신경전달물질이며 그 명확한 기능은 아직 밝혀지지 않았다<sup>27</sup>. 포유류의 위장관에서는 주로 소장 특히 원위 공장과 회장에서 관찰되어지며<sup>28</sup> 드물게 대장에서도 확인된다<sup>29</sup>. 한편 무미목 양서류의 위장관에서 neurotensin 면역반응세포의 분포에 대해 El-Salhy et al<sup>19,20</sup>은 *Bufo regularis*의 회장부위에서만 극소수의 세포가 관찰된다고 하였으며 Lee와 Lee<sup>16</sup>는 *Xenopus laevis*에서 십이지장과 회장에서만 소수의 면역반응세포가 관찰된 점으로 보아 같은 무미목 양서류에서도 그 분포가 종에 따라 다소 차이를 나타내고 있다. 본 실험에서는 꼬리를 가지는 변태중인 황소개구리의 유문부에서만 극소수의 세포들이 관찰되어 이전의 보고와 다소 차이를 나타내었으나 발생단계에 따른 변화에 대한 보고는 찾아볼 수 없는 바 비교하기 곤란하다.

PP는 병아리 insulin을 순수 분리할 때 섞이는 오염물로부터 분리되었으며 36개의 아미노산으로 이루어진 polypeptide이다. 현재까지 명확한 기능은 알려져 있지 않으나 췌장의 중탄산이온과 소화액의 분비를 억제시키며 담낭을 이완시키고 간의 담즙분비를 저하시킨다고 알려져 있다<sup>27</sup>. 무미목 양서류의 위장관에서는 주로 위와 소장에 분포한다고 보고되어 있으며<sup>20,30</sup> 본 실험의 결과 황소개구리의 위장관에서도 성체의 유문부, 십이지장 및 회장에서부터 관찰되기 시작하였으며 이중 유문부에서 가장 높은 출현빈도를 나타내어 이전의 보고들<sup>20,30</sup>과 유사하게 관찰되었다. 그러나 발생단계에 따른 변화에 대한 이전의 보고는 찾아볼 수 없는 바 비교하기 곤란하나 Lee와 Lee<sup>14</sup>는 *Rana dybowskii*의 위장관에서 활동기와 동면기에 따라 이들 면역반응세포의 부위별 분포 및 출현빈도가 매우 다양하게 변화된다고 보고 하였으나 본 실험에서는 활동기에서만 관찰하였으므로 금후 활동기와 동면기에 따른 차이 역시 관찰해야 할 것으로 생각된다.

Gastrin은 주로 위저부 점막과 위저생에 집중 분포하나 소장에도 소수분포하고 있으며 위산분비 자극, 위장관운동 촉진, 위점막의 벽세포 증식자극 등의 작용을 가지고 특히 CCK와 아미노산 배열, 생물활성 및 활성부위

등이 유사한 물질로 알려져 있다. 또 CCK는 십이지장이나 공장에 분포하며 음식물중의 지방이나 아미노산에 의해 방출되고 특히 담낭 수축작용이 강하고 gastrin에 대해 억제작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>27</sup>. 무미목 양서류의 위장관에서는 종에 따라 다소 차이가 인정되나 대부분의 종에서 유문부와 십이지장에 국한되어 존재한다<sup>17,21</sup>. 또한 Lee와 Lee<sup>14</sup>는 *Rana dybowskii*의 위장관에서 동면기에는 유문부, 십이지장 및 회장에서 다수의 면역반응세포가 관찰되나 활동기에는 십이지장과 회장에서만 극소수의 면역반응세포가 관찰되어 계절에 따라 매우 심한 차이를 나타낸다고 하였다. 그러나 발생단계에 따른 이들 면역반응세포의 변화에 대한 보고는 찾아볼 수 없는 바 비교하기 곤란하나 본 실험의 결과 황소개구리에서는 성체의 유문부에 국한되어 관찰되기 시작하였다. 이러한 성체에서의 결과는 이전의 보고들<sup>17,21</sup>과 유사하였다.

## 결론

개체발생에 따른 황소개구리(*Rana catesneiana*)의 위장관에서 neurotensin, pancreatic polypeptide(PP) 및 gastrin/cholecystokinin(Gas/CCK) 면역반응세포의 분포 및 출현빈도를 관찰하기 위하여 뒷다리가 있는 올챙이(Tadpole with hindleg), 꼬리를 가지는 변태중인 개구리(Metamorphosed bullfrog with tail), 변태후 2주(2 weeks after metamorphosed bullfrog) 및 성체(Adult bullfrog)로 구분하고 면역조직화학적 방법(PAP 법)으로 관찰하였던 바 neurotensin 면역반응세포는 꼬리를 가지는 변태중인 개구리의 유문부에서 극소수 관찰되었으나 다른 발생단계에서는 관찰되지 않았다. PP 면역반응세포는 성체의 유문부, 십이지장 및 회장에서부터 관찰되기 시작하였으며 이중 유문부에서 가장 높은 출현빈도를 나타내었다. Gas/CCK 면역반응세포 역시 성체의 유문부에 국한되어 관찰되기 시작하였다.

이상의 결과에서 황소개구리의 위장관에 존재하는 대부분의 면역반응세포는 변태완료후 위장관의 구조가 완전히 분화되고 난 이후에 출현하는 것으로 관찰되었으며 그 부위별 분포 및 출현빈도는 발생단계에 따라 매우 다양하게 변화되는 것으로 관찰되었다.

## Legends for figures

**Fig 1.** Neurotensin-immunoreactive cells in the pylorus of the metamorphosed bullfrog with tail. × 480, PAP method.

**Fig 2.** PP-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the adult bullfrog.

a, b. Pylorus, c. Duodenum, d. Ileum.

a-d; × 240, PAP method.

**Fig 3.** Gas/CCK-immunoreactive cells in the pylorus of the adult bullfrog. × 240, PAP method.

## 참 고 문 헌

1. Solcia E, Capella C, Vassallo G, *et al.* Endocrine cells of the gastric mucosa. *Int Rev Cytol*, 42:223-286, 1975.
2. Yamada J, Iwanaga T, Okamoto T, *et al.* Ultrastructure of avian gastrin cell granules. *Arch Histol Jap*, 43:57-63, 1980.
3. Yamada J, Iwanaga T, Yamashita T, *et al.* Distribution and frequency of occurrence of endocrine cells in the proventriculus of birds. *Jap J Zootech Sci*, 50:653-659, 1979.
4. Esparmer V. Half a century of comparative research on biogenic amines and active peptides in amphibian skin and molluscan tissues. *Comp Biochem Physiol*, 79:1-7, 1984.
5. Polak JM, Bloom SR. Localization of regulatory peptides in the gut. *Br Med Bull*, 38:303-307, 1982.
6. Lee HS, Lee JH, Lee CE. Histological study of the gastrointestinal endocrine cell of the frog, *Rana rugosa* (Amphibia, Anura). *Nature & Life*, 23:121-125, 1993.
7. Chung IC. The endocrine cells in the gastrointestinal tract. *Korean J Anatomy*, 1:1-34, 1976.
8. Kim CW, Chung YW. A study on the enterochromaffin cells in the gastrointestinal mucosa of *Rana amurensis* during prehibernating, hibernating, posthibernating and active period. *Korean J Zool*, 2:109-118, 1973.
9. Chung JW, Kwun HS. Fine structure of the endocrine cells in the duodenum of the frog, *Bombina orientalis*. *Korean J Anatomy*, 14:77-88, 1981.
10. Chung JW, Kwun HS. Ultrastructure of endocrine cells in the gastric mucosa of the frog, *Bombina orientalis*. *Korean J Anatomy*, 16:81-92, 1983.
11. Geuze JJ. Light and electron microscope observations on the gastric mucosa of the frog (*Rana esculenta*). II. Structural alternations during hibernation. *Z Zellforsch*, 117:103-117, 1971.
12. Lee HS, Lee JH. The ultrastructure of the gastroendocrine cells in the gastric mucosa of the frog, *Rana rugosa*. *Korean J Zool*, 33:22-27, 1990.
13. Lee JH, Lee HS. An electron microscopic study on the gastro-entero-endocrine cells of the frog (*Rana dybowskii*). *Korean J Vet Res*, 30:129-143, 1990.
14. Lee HS, Lee JH. Seasonal variations of the gastro-entero-pancreatic endocrine cells of the frog, *Rana dybowskii*. *Korean J Vet Res*, 36:11-21, 1996.
15. Lechago J, Holmquist AL, Rosenquist GL, *et al.* Localization of bombesin-like peptides in the frog gastric mucosa. *Gen Com Endocrinol*, 36:553-558, 1978.
16. Lee HS, Lee JH. Immunohistochemical study of the en-

- ocrine cells of the gastrointestinal mucosa of the african clawed toad, *Xenopus laevis*. *Korean J Vet Res*, 37:9-13, 1997.
17. Lee HS, Lee JH. An immunohistochemical study of the endocrine cells on the gastro-entero-pancreatic system of the african clawed toad, *Xenopus laevis*. *Korean J Vet Res*, 32:523-529, 1992.
  18. Trandaburu T, Nürnberger F. Somatostatin-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the frog, *Rana esculenta*. *Cell Tissue Res*, 279:437-440, 1995.
  19. El-Salhy M, Grimelius L, Lundberg JM, et al. Immunocytochemical evidence for occurrence of PYY, a newly isolated gut polypeptide in endocrine cells in the gut of amphibians and reptiles. *Biomed Res*, 3: 303-306, 1982.
  20. El-Salhy M, Grimelius L, Wilander E, et al. Histological and immunohistochemical studies of the endocrine cells of the gastrointestinal mucosa of the toad (*Bufo regularis*). *Histochemistry*, 71:53-65, 1981.
  21. Buchan AMJ. An immunocytochemical study of regulatory peptides in the amphibian gastrointestinal tract. *Can J Zool*, 64:1-7, 1986.
  22. 이형식. 황소개구리 소화관의 내분비세포에 관하여. 경산대학교 논문집, 11:1-8, 1993.
  23. Houillon C. *Embriologia*. Omega, Barceloma, 1973.
  24. Tylor AC, Kolloros JJ. Stages in the normal development of *Rana pipens larvae*. *Anat Rec*, 94:7-23, 1946.
  25. Bodegas ME, Villaro AC, Burrell MA, et al. An immunohistochemical and ultrastructural study of the larval anterior intestine of the frog *Rana temporaria*, with special reference to endocrine cells. *Tissue & Cell*, 29:549-559, 1997.
  26. Sternberger LA. *Immunocytochemistry*. 2nd ed, New York, John Wiley & Sons, 104-149, 1979.
  27. Norris DO. *Vertebrate endocrinology*. 3rd ed, New York, Academic press, 471-540, 1996.
  28. Frigerio B, Ravazzola M, Ito S, et al. Histochemical and ultrastructural identification of neurotensin cells in the dog ileum. *Histochemistry*, 54:123-131, 1977.
  29. Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, et al. Synaptophysin. A marker protein for neuroendocrine cells and neoplasm. *Proc Natn Acad Sci USA*, 83:3500-3504, 1986.
  30. Falkmer S, Stefan Y. Pancreatic polypeptide(PP): Phylogenetic aspects in gastrointestinal mucosa and endocrine pancreas. *Scan J Gastroenterol*, 13:49-59, 1978.