

한국재래산양 송과체와 앞쪽목신경절의 관계규명을 위한 면역조직화학적 연구

이흥식 · 이인세 · 송승훈 · 윤성태 · 황인구 · 이충현

서울대학교 수의과대학
(2000년 4월 13일 게재승인)

Immunohistochemical studies on the relationship between pineal body and superior cervical ganglia of the Korean native goat

Heungshik S. Lee, In-Se Lee, Seung-hoon Song, Sung-tae Yoon,
In-koo Hwang, Choong-hyun Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Accepted by Apr 13, 2000)

Abstract : The pineal body have been known to be affected by superior cervical ganglia, and most of its nerve fibers containing peptidergic neurotransmitters have been considered to be originated from this ganglia. To confirm this relationships, some peptidergic neurotransmitters were identified in both of pineal body and superior cervical ganglia of the Korean native goat, which were divided into two group ; breeding season and non-breeding season.

The localizations of two catecholamine-synthesizing enzymes ; tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine beta-hydroxylase (DBH), were investigated by immunohistochemistry in the superior cervical ganglia and the pineal body of adult Korean native goats. Substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), vasoactive intestinal polypeptide (VIP), neuropeptide Y (NPY) and galanin (GAL) were also identified in these organs by immunohistochemical and double immunofluorescent methods.

In superior cervical ganglia, immunoreactivities for TH and DBH were confirmed in the same ganglion cells. The immunoreactivities for SP, VIP(only in male), NPY and GAL were identified in both of ganglion cell bodies and nerve fibers in the ganglia. CGRP immunoreactivity, however, was observed only in nerve fibers. Most NPY- and VIP-immunoreactive(IR) ganglion cells also contained TH. SP and TH were colocalized in the cell bodies, but not in the nerve fibers. TH immunoreactivity was shown in almost all of ganglion cells in the superior cervical ganglia. The immunoreactivity for NPY had some seasonal variation and was stronger in breeding season

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비(과제번호 : 98-001-G00390)에 의하여 지원되었음

Address all correspondence requests for reprints to : Dr. Heungshik S. Lee, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea.

than in non-breeding season.

In pineal body, lots of TH-IR fibers were observed throughout the parenchyma including the pineal stalk and most of them also contained DBH. SP- and NPY-IR fibers were also immunostained with TH or DBH. But a few SP- and NPY-IR fibers were not colocalized with TH or DBH. Exceptionally, a bipolar neuron-like cell was observed to be immunostained with NPY in the pineal body. A few CGRP and GAL-IR fibers were observed, while VIP-IR fibers were not present.

It is concluded that most TH- and DBH-IR fibers as well as the peptidergic immunoreactive fibers of the pineal body might be originated from the superior cervical ganglia. Some peptidergic immunoreactive fibers, however, might be come from other regions of brain. We also suggest that NPY in pineal body plays a important role for pineal function. The seasonal variation of NPY immunoreactivity indicates that the synthesis and use of NPY may be different between in breeding and non-breeding seasons.

Key words : pineal body, superior cervical ganglia, neurotransmitter, Korean native goat, immunohistochemistry.

서 론

포유동물의 송과체(pineal body)는 간뇌에서 유래된 내분비샘으로 셋째뇌실(third ventricle)과는 송과체줄기(pineal stalk)에 의해 연결되어 있으며 세로토닌(serotonin)을 멜라토닌(melatonin)으로 전환시키는 신경내분비변환기(neuroendocrine transducer)로써 기능을 한다¹.

일주기 리듬을 조절하는 호르몬인 멜라토닌은 일조량에 따라 분비가 조절된다². 즉, 눈을 통해 들어온 빛정보가 망막시상하부로를 경유하여 시각교차위핵(suprachiasmatic nucleus)을 거쳐 앞쪽목신경절(superior cervical ganglia)로 전달된 다음, 이 신경절의 교감신경절이후신경섬유(adrenergic postganglionic nerve fibers)가 송과체에 분포하여 조절되는 것으로 알려져 있다^{1,3}. 그러나 이와 같은 신경로 이외에도 귀신경절(otic ganglia), 삼차신경절(trigeminal ganglia), 접형구개신경절(sphenopalatine ganglia), 뇌실연핵(paraventricular nucleus) 및 외측무릎체(lateral geniculate body) 등에서 유래하는 신경섬유가 송과체에 직접 분포한다는 사실도 몇몇 학자에 의해 주장되고 있지만 아직까지 논란이 많다⁴⁻⁶.

송과체에 분포하는 교감신경섬유는 tyrosine hydroxylase

(TH) 및 dopamine beta-hydroxylase(DBH)에 대하여는 면역반응을 보이는 반면 phenylethanolamine N-methyltransferase(PNMT)에 대한 면역반응은 보이지 않은 것으로 보아 노어에피네프린(norepinephrine)이 송과체의 주요 신경전달물질로 이용되는 것으로 알려져 있다⁶. 그러나 이러한 신경전달물질 이외에 펩타이드성 신경전달물질인 substance P(SP), calcitonin gene-related peptide(CGRP), neuropeptide Y(NPY) 및 vasoactive intestinal polypeptide(VIP) 등이 송과체에 분포하는 신경섬유에서 관찰된다는 사실에 비추어, 이들도 신경전달물질로써 이용되는 것으로 추정되고 있다^{4,7-11}. 하지만 이들 신경전달물질의 존재여부는 동물의 종류나 일조량의 변화에 따라 차이가 많다고 주장되고 있다^{1,8}. 그럼에도 불구하고 일조량에 큰 영향을 받는 계절번식동물인 한국재래산양의 송과체에 분포하는 이들 신경전달물질에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.

한편 계절번식동물(seasonal breeder)의 경우 낮의 길이가 짧아짐에 따라 멜라토닌의 양이 증가되어 생식샘 기능이 억제되는 것으로 알려져 있다¹². 이러한 효과는 송과체에서 분비된 멜라토닌이 생식샘에 직접 작용한다기 보다는 뇌척수액을 통하여 셋째뇌실 주변의 시상하부(hypothalamus)에 작용하여 생식샘자극호르몬분비호르몬

(GnRH)의 분비를 조절하는 간접적인 방법에 의한 것으로 주장되고 있다.^{1,13-15}

한편 송과체에 신경섬유를 내는 앞쪽목신경절 내에도 송과체에 분포하는 신경전달물질과 동일한 종류의 신경전달물질들을 함유하고 있지만 송과체와 마찬가지로 동물에 따라 그 분포양상이 매우 다양한 것으로 알려져 있다.¹⁶⁻¹⁹ 그러나 이에 대한 연구도 한국재래산양에서는 전혀 수행된 바 없다.

따라서 이 연구에서는 한국재래산양 송과체와 앞쪽목신경절의 형태학적 특성을 밝힘과 동시에, 송과체와 앞쪽목신경절에서 TH, DBH, SP, CGRP, NPY, VIP 및 galanin (GAL) 등의 분포를 면역조직화학적 방법으로 확인하고, 신경섬유의 기능적 특성을 밝힘으로써 송과체와 앞쪽목신경절과의 연관성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 조직처리 : 체중 15kg 내외의 성숙한 한국재래산양을 번식기(1~3월)와 비번식기(7~8월)로 나누어 암수 각각 2마리씩, 모두 8마리를 실험에 사용하였다. 모든 실험동물은 일조량에 따른 멜라토닌 분비의 영향을 최소화하기 위하여 하루 중 같은 시간에 희생시켰다. 실험동물은 Rompun(Bayer Korea, Korea)과 Ketamine(Yuhan, Korea)의 혼합액(체중 kg당 각각 6mg와 0.06 mg의 용량으로 섞어서 근육내주사)으로 마취시켜 왼쪽총목동맥(left common carotid artery)을 통하여 방혈시키고, 1000ml당 heparin 1000IU를 함유한 4℃의 생리식염수를 주입하여 관류세척하였다. 세척이 끝난 직후 4% paraformaldehyde를 함유한 0.1M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 관류고정한 다음 송과체와 앞쪽목신경절을 신속히 적출하여 동일한 고정액에 8시간 후고정하였다. 고정이 끝난 조직은 30% sucrose를 함유한 0.1M PBS(pH7.4) 용액으로 옮긴 후 시료가 바닥에 완전히 가라앉아 탈수가 된 것을 확인한 다음 OCT compound(Reichert-Jung, Germany)로 봉입하고 곧 -70℃의 냉동고에 보관한 후 필요에 따라 사용하였다.

일반조직학적 관찰 : 냉동고에 보관한 조직을 cryocut (Reichert-Jung, Germany)로 10~15µm 두께의 연속절편을 만들어 gelatin-coated slide에 얹어 통상적인 방법에 따라 1% cresyl violet으로 염색하고 송과체와 앞쪽목신경절의 일반적인 형태를 관찰하였다.

면역조직화학반응 : 조직절편은 조직내의 내인성 peroxidase를 제거하기 위해서 0.5% 과산화수소가 함유된 methanol 용액에서 20분간 반응시켰으며 이어 비특이적 반응을 방지하기 위하여 10% normal goat serum에서 30분간 반응시킨 후 streptavidin-biotin peroxidase 법을 이용한 면역조직화학반응을 실시하였다. 면역조직화학반응에 이용된 모든 항체는 3% normal goat serum 및 0.1% Triton X-100(Sigma, USA)이 함유된 0.1M PBS에 희석하여 사용하였다.

1차항체는 rabbit anti-SP antibody, rabbit anti-CGRP antibody, rabbit anti-NPY antibody(Peninsula laboratory Inc., USA), rabbit anti-VIP antibody, rabbit anti-GAL antibody (Zymed, USA)와 mouse anti-TH antibody, rabbit anti-DBH antibody(Boehringer Mannheim Biochemica, Germany)를 각각 희석하여 사용하였다. 조직은 1차항체로 실온에서 24시간 반응시킨 후 2차항체인 biotinylated-goat anti-rabbit IgG와 biotinylated-goat anti-mouse IgG(Sigma, USA)를 1:200으로 희석한 용액에서 2시간동안 반응시켰다. 이어서 1:200으로 희석한 peroxidase conjugated streptavidin (Sigma, USA)에 1시간동안 반응시켰다. 이상 각 단계의 반응 후에는 0.1M PBS로 4~5차례 세척하였다.

항원항체반응이 모두 끝난 조직은 0.003% 과산화수소와 0.3% 4Cl-naphthol 또는 0.05% DAB(Sigma, USA)가 함유된 Tris buffer 용액에서 5~10분간 발색시켰다. 발색반응이 나타난 조직절편은 Crystal mount(Biomed, USA)로 봉입한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

이중면역조직화학반응 : TH 및 DBH가 NPY, SP 및 VIP 등의 펩타이드성 신경전달물질과 공존하는지의 여부를 알아보기 위하여 이중면역형광염색을 실시하였다. 조직은 면역조직화학염색에서와 같은 방법으로 TH 또는 DBH 그리고 NPY, SP, VIP에 대한 일차반응을 실시한 후, 4~5차례 세척한 다음 FITC-conjugated anti-rabbit IgG(Jackson ImmunoResearch, USA) 용액에서 2시간 반응시켰다. 이후의 모든 과정은 빛을 차광한 상태에서 실시하였다. 반응이 끝난 조직은 0.1M PBS로 세척한 다음, TH에 대한 1차항체에 48시간, 4℃에서 반응시킨 다음 1:1,000으로 희석한 Cy3-conjugated anti-mouse IgG(Jackson ImmunoResearch, USA)으로 2시간 반응시켰다. 이상의 면역조직화학반응이 끝난 조직은 Crystal mount로 봉입한 후 HBO fluorescence illumination 장치가 부착된 광학현미경(Axioplan, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하고 필

요에 따라 사진촬영을 하였다.

FITC에 면역반응을 보인 신경절세포와 신경섬유의 관찰과 사진촬영을 위해서는 blue filter(exciter filter 450~490nm; beam splitter 510nm; barrier filter 520nm)를 사용하였다. Cy3에 표지된 신경절세포와 신경섬유의 관찰과 사진촬영을 위해서는 green filter(exciter filter 513~565nm; beam splitter 580nm; barrier filter 590nm)를 사용하였다. 이때 blue filter와 green filter를 번갈아 사용하여 FITC와 Cy3 면역형광염색에 양성반응을 보인 부위를 찾아서 사진촬영을 하였다.

결 과

앞쪽목신경절 : 한국재산양 앞쪽목신경절은 미주교감신경줄기로부터 교감신경이 분리되는 부위 약 1cm 정도 앞쪽에 위치하고 있었으며 크기는 장축 10mm 내외, 단축 5mm 내외의 타원형을 하고 있었다(Fig 1a). 신경절을 구성하는 신경절세포는 타원형으로 크기는 25~50 μ m였으며, 위성세포는 4~7 μ m 크기의 방추형으로 관찰되었다(Fig 1c).

면역조직화학염색 결과 이 신경절에서는 TH, DBH, SP, CGRP, VIP, NPY 및 GAL에 대한 면역반응이 관찰되었다(Table 1). 이들중 TH, DBH, SP, VIP, GAL 및 NPY에 대한 면역반응은 신경절세포와 신경섬유 모두에서 관찰되었으나 CGRP에 대한 면역반응은 소수의 신경섬유에서만 관찰되었다(Figs 2; 4a,b; 5a,b; 6a,b; 7).

TH와 DBH 면역반응세포는 대부분의 신경절세포에서 모두 관찰되었으며 각각에 반응한 신경절세포에서 상호 공존하는 것을 관찰할 수 있었다(Figs 4a, b).

SP 면역반응은 신경절세포와 신경섬유에서 모두 관찰

되었다. 면역반응을 보인 염주모양의 신경섬유는 밀집되어 관찰되었으며, 신경절세포의 면역반응은 암수에서 모두 미약하게 관찰되었다(Fig 2a). 한편 SP 양성반응을 보인 신경절세포는 TH 및 DBH와 공존함을 확인할 수 있었으나 신경섬유에서는 공존하지 않았다(Figs 6a, c).

CGRP 면역반응은 일부 신경섬유에서 염주모양으로 관찰되었으나 신경절 세포에서는 면역반응을 확인할 수 없었는데 이와같은 소견은 암수 또는 번식기와 비번식기에도 차이가 없었다(Figs 2b).

VIP 면역반응은 번식계절에 따른 차이를 관찰할 수 없었으나 암수간에는 면역반응이 다르게 관찰되었다. 즉, 수컷에서는 VIP에 면역반응을 보인 신경절세포가 다수 관찰되었으며 일부 신경섬유에서도 면역반응을 관찰할 수 있었다(Fig 2c). VIP 양성반응을 보인 신경절세포는 TH 및 DBH와도 공존하였다(Figs 7). 그러나 암컷에서는 신경절세포와 신경섬유 모두에서 VIP 면역반응이 전혀 관찰되지 않았다.

NPY 면역반응은 암수 모두에서 번식기에서는 중등도의 면역반응을 보였으나 비번식기에는 약한 면역반응을 보여 계절에 따라 신경절세포에서의 면역반응에 차이를 보였다. 그러나 신경섬유에서는 계절에 관계없이 미약하게 반응하였다. NPY 면역반응은 크기가 큰 세포가 작은 세포보다 더 강하게 나타났으며 이들 면역반응은 주로 핵 주위에서 관찰되었다(Figs 2e, f). 한편 이들 NPY에 양성반응을 보인 신경절세포도 TH 및 DBH와 공존함을 확인할 수 있었다(Figs 5a, b).

GAL 면역반응은 성별이나 계절에 관계없이 비슷한 경향을 나타내었지만 대체로 소수의 신경절세포와 신경섬유에서만 미약한 면역반응이 관찰되었다(Fig 2d).

송과체 : 한국재산양 송과체는 셋째뇌실 뒷개의 뒤

Table 1. Immunoreactivities for TH, DBH, SP, CGRP, VIP, NPY and GAL in superior cervical ganglia of the Korean native goat (ganglion cell bodies/nerve fibers)

		TH	DBH	SP	CGRP	VIP	NPY	GAL
Breeding Season	Male	+++/+	++/+	±/++	-/++	++/+	++/+	+/+
	Female	++/+	++/+	±/++	-/++	-/-	++/+	+/+
Non-breeding Season	Male	+++/+	++/+	±/++	-/++	++/+	+/+	+/+
	Female	++/+	++/+	±/++	-/++	-/-	+/+	+/+

Note : +++, strong, ++, moderate, +, weak, ±, very weak, -, negative, TH; tyrosine hydroxylase, DBH; dopamine beta-hydroxylase, SP; substance P, CGRP; calcitonin gene-related peptide, VIP; vasoactive intestinal peptide, NPY; neuropeptide Y, GAL; galanin.

Table 2. Immunoreactivities of nerve fibers for TH, DBH, SP, CGRP, VIP, NPY and GAL in pineal body of the Korean native goat

		TH	DBH	SP	CGRP	VIP	NPY	GAL
Breeding Season	Male	+++	+++	+	+	-	++	+
	Female	+++	+++	+	+	-	++	+
Non-breeding Season	Male	+++	+++	+	+	-	++	+
	Female	+++	+++	+	+	-	++	+

Note: +++; strong, ++; moderate, +; weak, ±; very weak, -; negative, TH; tyrosine hydroxylase, DBH; dopaminic beta-hydroxylase, SP; substance P, CGRP; calcitonin gene-related peptide, VIP; vasoactive intestinal peptide, NPY; neuropeptide Y, GAL; galanin.

쪽끝과 앞쪽둔덕 바로 앞의 셋째뇌실 등쪽에 위치하였으며, 장축 약 5mm, 단축 약 3mm 내외의 크기로 다소 불규칙한 모양으로 관찰되었다. 송과체는 짧고 넓은 송과체 줄기에 의해 간뇌와 연결되어 있었으며 셋째뇌실이 송과체오목으로 확장된 형태를 보였고, 송과체 표면에는 혈관이 잘 발달되어 있었다(Fig 1b). 송과체 실질 내에서는 직경 약 5µm 내외의 원형 내지 타원형으로 관찰되는 송과체세포(pinealocyte)와 아교세포(glial cell)가 주로 관찰되었다(Fig 1d).

면역조직화학염색 결과 한국재래산양 송과체에서는 신경섬유에서 TH, DBH, SP, CGRP, NPY 및 GAL에 대한 면역반응이 관찰되었다(Figs 3; 4c,d; 5c,d; 6c,d; 8). 이와 같은 소견은 번식제절이나 성별에 관계없이 동일하였다. 그러나 VIP의 경우에는 면역반응을 관찰할 수 없었다(Table 2).

TH와 DBH는 송과체 전체에 걸쳐 대부분의 신경섬유에서 중등도 이상의 강한 면역반응을 보였으며 서로 공존하고 있음도 확인할 수 있었다(Figs 4c, d).

NPY에 면역반응을 보이는 다수의 신경섬유가 번식제절이나 암수에 관계없이 중등도의 면역반응을 보였고 송과체실질 내에 고르게 분포하였다. 특이하게도 송과체실질 내에서는 NPY에 양성반응을 보이는 두극신경원(bipolar neuron)과 유사한 형태의 세포를 관찰할 수 있었다(Fig 9). 한편 NPY 면역반응 신경섬유의 대부분은 TH 및 DBH와 각각 공존하였지만 일부 신경섬유는 TH에 면역반응을 보이지 않았다(Figs 5c, d). 한편 송과체줄기에서도 NPY가 TH와 공존하는 신경섬유를 관찰할 수 있었다.

SP 면역반응은 일부 신경섬유에서 염주모양으로 관찰되었으며 송과체줄기와 송과체실질에서 TH 또는 DBH와 공존하는 신경섬유를 관찰할 수 있었다(Fig 3a, 6c,d;

8a,b).

CGRP와 GAL에 대한 면역반응을 보인 신경섬유는 소수 관찰되었지만 면역반응은 중등도였다(Figs 3b, c).

고 찰

한국재래산양의 앞쪽목신경절은 미주교감신경줄기가 교감신경에서 분리되는 부위로부터 약 1cm 정도 떨어져 위치하였으며 장축 10mm 내외, 단축 5mm 내외의 타원형으로 산양 및 면양에서 보고된 앞쪽목신경절의 위치와 유사하였다^{20,21}. 이 신경절을 구성하는 신경절세포들은 타원형으로 크기가 25-50µm 였는데 이는 면양의 앞쪽목신경절 세포가 50µm 크기의 A형 세포와 25µm 크기의 B형 세포로 구성되었다는 보고와 유사하였다²².

한편 한국재래산양의 송과체는 장축 약 5mm, 단축 약 3mm 내외의 크기로 관찰되었으며, 셋째뇌실 뒷개의 뒤쪽끝과 앞쪽둔덕 바로 앞의 뇌실 등쪽에 위치하고 있어 면양, 고양이 및 사람 등에서의 위치와 유사하였다^{1,23}.

Vollrath²⁴는 송과체가 셋째뇌실과 얼마나 인접해 있는가에 따라 셋째뇌실에 아주 가까이 위치하는 송과체를 A형, 멀리 떨어져 소뇌에 인접한 것을 C형 및 C형보다는 가깝고 A형보다는 멀리 떨어진 것을 AB형 등으로 분류하였다. 한국재래산양의 송과체는 짧고 넓은 송과체줄기에 의해 간뇌에 연결되어 있었으며, 셋째뇌실이 송과체오목으로 확장되어 Vollrath²⁴의 분류중 A형과 유사하였다. 이와같은 형태학적 특징에 대하여 Møller *et al*²³은 고양이와 면양 및 사람에서 송과체는 송과체 줄기를 통하여 신경섬유가 뇌와 연결되어 있다고 주장하였는데 한국재래산양의 경우도 이 부분을 통해 송과체에 분포하는 신경섬유가 유래할 수도 있는 가능성이 있

을 것으로 사료된다.

실제로 이 연구에서 SP와 NPY의 경우 송과체줄기에서 면역반응을 보인 신경섬유를 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 송과체에 분포하는 SP와 NPY 면역반응 신경섬유의 일부는 그 유래가 앞쪽목신경절이 아닌 고배핵, 외측무릎체 및 삼차신경절, 접형구개신경절, 귀신경절 등이라고 한 주장^{4,5,9,25,26}에 비추어 한국재래산양에서도 SP 면역반응 신경섬유나 NPY 면역반응 신경섬유 중 일부는 앞쪽목신경절이 아닌 다른 부위에서 유래하였을 가능성을 배제할 수 없을 것으로 생각된다.

한편 한국재래산양에서는 송과체는 물론 앞쪽목신경절에서도 CGRP 면역반응을 보이는 신경섬유가 관찰되었다. 그러나 앞쪽목신경절의 신경절세포에서는 CGRP 면역반응을 관찰할 수 없었다. 이는 송과체의 CGRP 면역반응 신경섬유가 앞쪽목신경절에서 유래한 것이 아님을 보여주는 결과로 생각된다. 이러한 결과는 저빌의 송과체에서 관찰된 CGRP 면역반응 신경섬유가 삼차신경절에서 유래되었다고 한 보고⁴에 비추어 한국재래산양에서도 송과체에 분포하는 CGRP 면역반응 신경섬유는 앞쪽목신경절이 아닌 다른 신경절에서 유래했을 가능성을 제시하는 것으로 판단된다. 그러나 이를 확인하기 위해서는 역행성신경로추적법이나 *in situ* hybridization에 의한 mRNA의 입증 등 후속 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

한국재래산양 송과체에서는 GAL에 면역반응된 신경섬유를 관찰할 수 있었다. 한편 앞쪽목신경절의 신경섬유와 신경절세포에서도 미약하나마 GAL 면역반응을 관찰할 수 있었다. 이들의 결과를 종합해볼 때 송과체에 분포하는 GAL 면역반응 신경섬유 중 일부는 앞쪽목신경절에서 유래할 가능성이 있다고 판단되지만 나머지 많은 신경섬유는 다른 곳에서 유래되었을 가능성도 있다고 생각된다. 그러나 이들도 CGRP와 마찬가지로 역행성신경로추적법이나 *in situ* hybridization에 의한 mRNA 검출이 형태학적으로 증명되어야 할 것으로 보인다.

한편 앞쪽목신경절에서는 머리부위에 분포하는 신경절이후교감신경을 내는데 이들을 구성하는 신경절세포와 신경섬유에는 TH, DBH 이외에 serotonin, NPY, VIP, SP, CGRP, GABA 및 GAL 등에 대한 면역반응이 나타나는 것으로 널리 알려져 있다¹⁶⁻¹⁹.

한국재래산양을 대상으로 한 이 연구에서도 앞쪽목신경절 신경절세포와 신경섬유에서 TH와 DBH에 대한 면

역반응세포와 신경섬유가 관찰되었으며 NPY, VIP, SP, CGRP 및 GAL 등에 대한 면역반응도 관찰되었다.

송과체에 분포하는 신경섬유에서도 앞쪽목신경절에서 관찰되는 TH, DBH와 함께 여러 펩타이드성 신경전달물질들이 관찰된다고 주장되고 있다^{4,7-11}. 이 연구에서도 송과체에서 TH와 DBH 면역반응 신경섬유를 관찰할 수 있었으며 또한 SP, CGRP, NPY 및 GAL 면역반응 신경섬유도 관찰할 수 있었다. 그러나 멜라토닌 생산에 주요 기능을 한다고 알려진 VIP에 대한 면역반응 신경섬유는 관찰되지 않아 대부분의 연구자들이 보고한^{27,28} 연구결과와는 차이를 보였다. 이와 같은 결과는 아마도 한국재래산양은 멜라토닌 생산에 VIP를 이용하지 않거나 또는 VIP가 번식기와 비번식기 사이에만 생산되어 이용되는 것이 아닌가 추정되기도 하지만 현재로서는 그 원인을 단정하기는 어려울 것으로 생각된다.

한편 앞쪽목신경절에서는 계절에 관계없이 VIP 면역반응 신경절세포와 신경섬유가 수컷에서는 면역반응을 보였지만 암컷에서는 VIP 면역반응 신경절세포와 신경섬유가 계절에 관계없이 전혀 관찰되지 않았다. 이러한 VIP 분포의 암수간 차이에 대해서는 다른 동물에서 보고된 바가 없어서 그 기능적인 차이를 가늠하기는 어렵다. 따라서 한국재래산양에서는 아직 밝혀지지 않은 어떤 이유에 의해서 교감신경계의 VIP의 기능이 성별에 따라 다를 것으로 생각된다. 그리고 송과체에서도 앞쪽목신경절에서와 같이 번식계절에 따라 VIP의 합성과 이용에 차이가 있을 것으로 사료되지만 이 사실도 현재로서는 그 원인을 단언할 수는 없을 것 같다.

SP는 신경절세포에 대한 일차적인 흥분작용을 일으키는 신경전달물질^{10,29-32}이지만 송과체에서는 혈류를 조절하고 송과체세포막에 대한 전기활성을 조절하여 멜라토닌의 분비를 조절하는 것으로 주장되고 있다³³. 이 연구에서 SP 면역반응 신경섬유가 송과체에서 다수 관찰된 점으로 보아 한국재래산양에서도 SP는 멜라토닌 생산과 분비에 영향을 줄 것으로 사료된다.

송과체에서 NPY 면역반응 신경섬유가 관찰된다는 사실은 여러 연구자들에 의하여 보고되었다^{8,9,23,34,35}. 그러나 송과체 내에서 NPY 면역반응 신경섬유의 분포상태는 연구자에 따라 차이가 있어서 면양³⁴은 NPY 면역반응 신경섬유가 송과체실질의 중심부에서 관찰되는데 비하여, 밍크²⁵는 송과체줄기 근처의 앞쪽부분에서 주로 관찰되고 햄스터, 랫드 및 저빌³⁶은 송과체 주변부에서

주로 관찰된다고 보고되고 있다. 한국재래산양 송과체에서도 NPY에 면역반응된 신경섬유가 관찰되었는데 이들 신경섬유는 송과체실질 전체에 균등하게 분포되어 이들과 다른 소견을 보였다.

송과체에 분포하는 NPY 면역반응 신경섬유는 일반적으로 앞쪽목신경절에서 유래된다고 주장되고 있지만 학자에 따라서는 앞쪽목신경절이 아닌 다른 부위에서도 기원하는 것으로 주장되고 있다^{25,37-39}.

이 연구결과 한국재래산양 앞쪽목신경절의 신경절세포와 송과체에 분포하는 신경섬유들이 TH와 DBH에 동시에 면역반응을 나타내었으며 또한 TH나 DBH와 NPY가 공존하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 일부의 NPY 면역반응을 보인 신경섬유는 TH 및 DBH 면역반응을 보이지 않는 것이 관찰되는 경우도 있었다. 이러한 사실은 송과체의 NPY 면역반응 신경섬유는 대부분 앞쪽목신경절에서 유래되지만 앞쪽목신경절이 아닌 부위로부터도 송과체에 투사되어 송과체에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

한편 송과체에서 enkephalin을 함유하는 내재성 신경세포가 관찰된다는 보고와 함께, NPY를 함유하는 신경세포 유사세포(neuron-like cell)가 관찰된다는 보고도 있는데 이들 세포가 신경세포인지 여부에 대해서는 아직 논란의 여지가 많다^{40,41}. 이 연구에서도 NPY에 면역반응을 보이는 두극신경원(bipolar neuron)과 유사한 세포가 관찰되었으나 이들이 신경세포인지 여부에 대해서는 neuron-specific enolase를 marker로 하여 신경세포 여부를 밝히는 면역조직화학적 기법⁴²에 의한 확인이 필요할 것으로 사료된다.

NPY 면역반응 신경섬유는 송과체세포와 직접 연결되어 송과체에서 멜라토닌의 분비를 억제⁴³할 뿐 아니라 실질 내의 혈관주위에 분포하여 혈관수축에 관여^{44,45}함으로써 일주기 리듬을 조절⁴⁶하는 것으로 알려져 있다. 따라서 한국재래산양 송과체에서 NPY 면역반응 신경섬유가 관찰된 것은 NPY가 한국재래산양에서도 송과체세포의 멜라토닌 분비를 조절함으로써 계절번식과 관련된 중요한 생리적 기능을 수행할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해볼 때 한국재래산양 송과체에 분포하는 신경섬유는 TH나 DBH 이외에도 SP, NPY 및 GAL을 함유한 신경섬유를 앞쪽목신경절로부터 받아서 송과체의 멜라토닌 분비를 조절할 것으로 사료된다. 그러나 CGRP 신경섬유의 경우는 앞쪽목신경절이 아닌 다

른 곳으로부터도 유래할 것으로 추측된다. 아울러 VIP 면역반응 신경섬유가 송과체에서는 관찰되지 않은 점으로 보아 한국재래산양에서 송과체에 대한 신경조절은 다른 동물과 다소 차이가 있을 것으로 사료된다. 한편 앞쪽목신경절의 경우 수컷에서만 VIP 면역반응 신경절세포가 관찰된 것으로 보아 교감신경계에서 성별에 따른 기능적 차이가 있을 것으로 사료된다. 한편 NPY가 번식계절에 따라 면역반응 정도에 차이를 보인 점에 비추어 이 물질이 계절번식동물에서 번식생리학적 차이를 야기할 것으로 사료된다.

결론

한국재래산양 앞쪽목신경절과 송과체의 육안해부학적 관찰과 함께 TH, DBH 및 SP, CGRP, VIP, NPY 및 GAL 등의 펩타이드성 신경전달물질의 분포를 면역조직화학적 방법으로 관찰하여 이들의 상호관계를 확인한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 육안해부학적 관찰 결과, 앞쪽목신경절의 크기는 장축 10mm, 단축 5mm 내외였으며, 신경절세포는 크기가 25-50 μ m의 타원형이었다. 송과체는 장축 5mm, 단축 3mm 크기 내외였으며, 실질내의 송과체세포들은 직경 5 μ m 내외의 원형 내지 타원형이었다.

2. 앞쪽목신경절에서 tyrosine hydroxylase(TH)와 dopamine β -hydroxylase(DBH)는 모든 신경절세포에서 관찰되었으며 이들은 공존하였다. Substance P(SP)와 galanin(GAL)은 신경절세포에서 미약하게 관찰되었으며, vasoactive intestinal polypeptide(VIP) 면역반응세포는 수컷에서만 관찰되었다. Neuropeptide Y(NPY)에 면역반응을 보인 신경절세포는 성별에 따른 차이는 관찰되지 않았으나 비번식기보다 번식기에서 상대적으로 강한 면역반응이 관찰되었다. SP, VIP 및 NPY는 각각 TH 및 DBH와 공존하였다.

3. 송과체에서 TH와 DBH는 대부분의 신경섬유에서 관찰되었으며 NPY 면역반응은 송과체 실질내의 많은 신경섬유에서 골고루 관찰되었다. 대부분의 NPY 면역반응 신경섬유는 TH 및 DBH와 공존하였으나 일부 NPY 면역반응 신경섬유에서는 TH 및 DBH에 대한 면역반응이 관찰되지 않았다. 한편 두극신경원과 유사한 세포에서 NPY에 대한 면역반응이 관찰되었다. SP, calcitonin gene-related peptide (CGRP) 및 GAL에 면역반응을 보인

신경섬유는 소수 관찰되었으나 VIP 면역반응신경섬유는 관찰되지 않았다.

이와같은 결과로 미루어 볼 때 한국재래산양 앞쪽목 신경절과 송과체는 육안해부학적으로 다른 동물과 유사하게 관찰되었으며 TH, DBH 및 펩타이드성 신경전달물질의 분포도 다른 포유동물과 대체로 비슷하였다. 그러나 앞쪽목신경절에서 VIP 면역반응 신경절세포와 신경섬유 모두 수컷에서만 관찰되어 성별에 따른 차이가 관찰되었고, 송과체에서는 VIP 면역반응 신경섬유가 전혀 관찰되지 않아 다른 포유동물과는 차이를 보였다. 번식

계절에 따라 면역반응에 차이를 보인 앞쪽목신경절의 NPY 면역반응 신경절세포는 송과체에서 멜라토닌 분비에 영향을 주어 계절번식동물의 번식생리에 중요한 영향을 미칠 것으로 사료된다. 송과체의 SP와 NPY 면역반응 신경섬유중 일부는 TH 및 DBH와 공존하지 않았는데 이 결과는 SP와 NPY가 앞쪽목신경절 이외의 다른 부위로부터도 유래할 것으로 생각된다. 따라서 한국재래산양 송과체는 앞쪽목신경절 이외의 다른 부위에서도 신경섬유를 받아 멜라토닌 분비를 조절하여 계절번식에 중요한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

Legends for figures

- Fig 1. Sagittal sections of the superior cervical ganglia(a) and the pineal body(b) of the Korean native goat. (bar = 1mm). High magnification of the superior cervical ganglia(c) and the pineal body(d). Hb; habenular nucleus, Pc; posterior commissure, Pi; pineal body, Pr; pineal recess. Cresyl violet stain. $\times 400$.
- Fig 2. Micrographs of the superior cervical ganglia immunostained with SP(a), CGRP(b), VIP(c), GAL(d) and NPY(e, f). The immunoreactivities of CGRP are confirmed only in the nerve fibers. In contrast, immunoreactivities of VIP, GAL and NPY are observed in both ganglion cell bodies and nerve fibers, but predominant in the ganglion cell bodies. The NPY immunoreactivities are stronger in breeding season(e) compared to those in non-breeding season(f). $\times 200$.
- Fig 3. Micrographs of the pineal body immunostained with SP(a), CGRP(b) and GAL(c). SP-, CGRP- and GAL-immunoreactive(IR) fibers show varicose-like structures. $\times 400$.
- Fig 4~9. Double immunofluorescent micrographs of the superior cervical ganglia(a, b) and the pineal body(c, d).
- Fig 4. TH(a, c; arrows) and DBH(b, d; arrows) are colocalized in both of the superior cervical ganglia and the pineal body. a, b: $\times 200$; c, d: $\times 400$.
- Fig 5. Most of NPY-IR ganglion cell bodies(b, d; arrows) contained TH(a, c; arrows) in both of the superior cervical ganglia and the pineal body. a, b: $\times 200$; c, d: $\times 400$.
- Fig 6. In the nerve fibers of superior cervical ganglia, SP(a) is not colocalized with TH(b). Most SP-IR fibers(c; arrow) are immunoreacted with TH(d; arrow) in pineal body. a, b: $\times 200$; c, d: $\times 400$.
- Fig 7. Some TH-IR ganglion cell bodies(a) in the superior cervical ganglia are immunoreacted with VIP(b). $\times 200$.
- Fig 8. TH(a) and SP(b) are colocalized in the nerve fibers of the pineal stalk(arrows). $\times 400$.
- Fig 9. Bipolar neuron-like cell(arrow) is immunoreacted with NPY. Its processes is shown going upward and downward in the pineal body. $\times 400$.

참 고 문 헌

1. Arendt J. *Melatonin and the mammalian pineal gland*. Chapman & Hall, London, pp28-65, 1995.
2. Wurtman RJ, Axelrod J, Fscher JE. Melatonin synthesis in the pineal gland : effect of light mediated by the sympathetic nervous system. *Science*, 143:1328-1330, 1994.
3. Reiter RJ. Pineal melatonin : Cell biology of its synthesis and of its physiological interaction. *Endocr Rev*, 12:151-180, 1991.
4. Shiotani Y, Yamano M, Shiosaka S, *et al*. Distribution and origins of substance P (SP)-, calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-, and neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. *Neurosci Lett*, 70: 187-192, 1986.
5. Mikkelsen JD, Cozzi B, Møller M. Efferent projections from the lateral geniculate nucleus to the pineal complex of the Mongolian gerbil(*Meriones unguiculatus*). *Cell Tissue Res*, 264:95-102, 1991.
6. Kaleczyc J, Przybylska B, Majewski M, *et al*. Immunohistochemical studies on the coexistence of catecholamine-synthesizing enzymes and neuropeptide Y in nerve fibers of the porcine pineal gland. *J Pineal Res*, 17:20-24, 1994.
7. Mikkelsen JD, Møller M, Larsen PJ, *et al*. The presence of nerve fibers immunoreactive for vasoactive intestinal peptide(VIP), peptide histidine isoleucine(PHI), and preproVIP(111-122) in the mouse pineal gland. *J Pineal Res*, 16:50-56, 1994.
8. Møller M, Ravault JP, Cozzi B. The chemical neuroanatomy of the mammalian pineal gland : neuropeptides. *Neurochem Int*, 28:23-33, 1996.
9. Phansuwan-Pujito P, Pramaulkijja S, Govitrapong P, *et al*. An immunohistochemical study of neuropeptide Y in the bovine pineal gland. *J Pineal Res*, 15:53-58, 1993.
10. Ronnekleiv OK. Distribution in the Macaque pineal of nerve fibers containing immunoreactive substance P, vasopressin, oxytocin, and neurophysins. *J Pineal Res*, 5:259-271, 1988.
11. Schröder H, Vollrath L. Neuropeptide Y(NPY)-like immunoreactivity in the guinea pig pineal organ. *Neurosci Lett*, 63:285-289, 1986.
12. Tamarkin L, Baird CJ, Almeida OFX. Melatonin : A coordinating signal for mammalian reproduction?. *Science*, 227:714-720, 1985.
13. Vanecek J, Klein DC. Melatonin inhibition of GnRH-induced LH release from neonatal rat gonadotroph : involvement of Ca^{2+} not cAMP. *Am J Physiol*, 269:85-90, 1995.
14. Zemkova H, Vanecek J. Inhibitory effect of melatonin on gonadotrophin-releasing hormone-induced Ca^{2+} oscillations in pituitary cells of newborn rats. *Neuroendocrinology*, 65:276-283, 1997.
15. Vanecek J, Vollrath L. Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res*, 505:157-159, 1989.
16. Grimes PA, McGlenn AM, Koeberlein B, *et al*. Galanin immunoreactivity in autonomic innervation of the cat eye, *J Comp Neurol*, 348:234-243, 1994.
17. Grunditz T, Ekman R, H kanson R, *et al*. Neuronal pathways to the rat thyroid revealed by retrograde tracing and immunocytochemistry. *Neuroscience*, 24:321-335, 1988.
18. Ichigawa H, Helke CJ. Distribution, origin and plasticity galanin-immunoreactivity in the rat carotid body. *Neuroscience*, 52:757-767, 1993.
19. Domeij S, Dahlqvist, Forsgren S. Studies on localization of neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide, catecholamine-synthesizing enzymes and acetylcholinesterase in the larynx of the rat. *Cell Tissue Res*, 263: 495-505, 1991.
20. May NDS. *The anatomy of the sheep*, 3rd ed, University of Queensland press, Brisbane, pp.191, 251, 1970.
21. Getty R. *The anatomy of the domestic animals, Vol 1, 4th ed, Saunders, Philadelphia, 1122-1123, 1975.*
22. Gabella G, Trigg P, Mcphail H. Quantitative cytology of ganglion neurons and satellite glial cells in the superior cervical ganglion of the sheep. Relationship with

- ganglion neuron size. *J Neurocytol*, 17:753-769, 1988.
23. Møller M, Phansuwan-Pujito P, Pramankijja S, *et al*. Innervation of the cat pineal gland by neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers: an experimental immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 276:545-550, 1994.
 24. Vollrath L. The Pineal organ. In: Oksche A, Vollrath L (eds) *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Vol. VI(7). Springer-Verlag, Heidelberg, 1981.
 25. Møller M, Mikkelsen JD, Martinet L. Innervation of the mink pineal gland with neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers. *Cell Tissue Res*, 261:477-483, 1990.
 26. Mikkelsen JD, Møller M. A direct neural connection from the intergeniculate leaflet of the lateral geniculate nucleus to the deep pineal gland of the rat demonstrated with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin(PHA-L). *Brain Res*, 520:342-346, 1990.
 27. Bessen J, Sarrieau A, Vial M, *et al*. Characterization and autoradiographic distribution of vasoactive intestinal peptide binding sites in the rat central nervous system. *Brain Res*, 398:329-336, 1986.
 28. Martin JL, Dietl MM, Hof PR, *et al*. Autoradiographic mapping of mono ¹²⁵I-iodo-[Tyr]¹⁰, [Met]¹⁷ vasoactive intestinal peptide binding sites in the rat brain. *Neuroscience*, 23:539-565, 1987.
 29. Mayer ML, MacLeod NK. The excitatory action of substance P and stimulation of the stria terminalis bed nucleus on preoptic neurons. *Brain Res*, 166:206-210, 1978.
 30. Sastry BP. Effects of substance P, acetylcholine and stimulation of habenula on rat interpeduncular neuronal activity. *Brain Res*, 14:404-410, 1978.
 31. Ogata N. Effects of substance P on neurons of various brain regions *in vitro*. *Brain Res*, 176:395-400, 1979.
 32. Katayama Y, North RA. Does substance P mediate slow synaptic excitation within the myenteric plexus?. *Nature*, 274:387-388, 1978.
 33. Dun NJ, Karczmar AG. Actions of substance P on sympathetic neurons. *Neuropharmacology*, 18:215-218, 1979.
 34. Williams LM, Morgan PJ, Pelletier G, *et al*. Neuro-peptide Y(NPY) innervation of the ovine pineal gland. *J Pineal Res*, 7:345-353, 1989.
 35. Schon F, Allen JM, Yeats JC, *et al*. Neuropeptide Y innervation of the rodent pineal gland and cerebral blood vessels. *Neurosci Lett*, 57:65-71, 1985.
 36. Shiotani Y, Jin KL, Kawai Y, *et al*. An electron microscopic immunohistochemical study on the tyrosine hydroxylase-positive, dopamine beta-hydroxylase-negative cells in the pineal gland of golden hamster. *J Neuroendocrinol*, 1:423-426, 1989.
 37. Lingappa JR, Zigmond RE. A histochemical study of the adrenergic innervation of the rat pineal gland: Evidence for overlap of the innervation from the two superior cervical ganglia and for sprouting following unilateral denervation. *Neuroscience*, 21:893-902, 1987.
 38. Zhang E, Mikkelsen JD, Møller M. Tyrosine hydroxylase- and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in the pineal complex of untreated rats and rats following removal of the superior cervical ganglia. *Cell Tissue Res*, 265:63-71, 1991.
 39. Cozzi B, Mikkelsen JD, Ravault JP, *et al*. Neuropeptide Y (NPY) and C-flanking peptide of NPY in the pineal gland of normal and ganglionectomized sheep. *J Comp Neurol*, 316:238-250, 1992.
 40. Schröder H. Neuropeptide Y(NPY)-like immunoreactivity in peripheral and central nerve fibres of the golden hamster(*Mesocricetus auratus*) with special respect to pineal gland innervation. *Histochemistry*, 85:321-325, 1986.
 41. Moore RY, Sibony P. Enkephalin-like immunoreactivity in neurons in the human pineal gland. *Brain Res*, 457:395-398, 1988.
 42. Ogata M, Tsuganezawa O. Neuron-specific enolase as an effective immunohistochemical marker for injured axons after fatal brain injury. *Int J Legal Med*, 113:19-25, 1999.
 43. Reuss S, Schröder H. Neuropeptide Y effects on pineal melatonin synthesis in the rat. *Neurosci Lett*, 74:158-162, 1987.
 44. Dahlof C, Dahlof P, Lundberg JM. Neuropeptide Y (NPY): enhancement of blood pressure increase upon

- alpha-adrenoceptor activation and direct pressor effects in pithed rats. *Eur J Pharmacol*, 109:289-292, 1985.
45. Edvinsson L, Emson P, McCulloch J, *et al*. Neuropeptide Y: Immunocytochemical localization to and effect upon feline pial arteries and veins *in vitro* and *in situ*. *Acta Physiol Scand*, 122:155-163, 1984.
46. Albers HE, Ferris CF. Neuropeptide Y: role in the light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. *Neurosci Lett*, 50:163-168, 1984.