

한국 연근해산 두족류 (*Todarodes pacificus* and *Octopus minor*) 시엽내 Dopamine 및 Calbindin-D_{28K}의 분포에 관한 면역전자현미경적 연구

한 종 민, 장 남 섭*
목원대학교 자연과학대학 생명과학부

Immuno-Electron Microscopic Studies on the Distribution of Dopamine and Calbindin-D_{28K} in the Optic lobes of Cephalopods (*Todarodes pacificus* and *Octopus minor*) inhabiting the Korean waters

Jong-Min Han and Nam-Sub Chang*

Department of Life Science, College of Natural Science, Mokwon University, Taejon, 302-729, Korea
(Received May 6, 2002; Accepted May 24, 2002)

ABSTRACT

In this study, we carried out immunostaining and immunogold labeling with rabbit anti dopamine (TH) and rabbit anti calbindin D_{28k} to examine the characteristics and functions of the neurons that secrete neurotransmitters in optic lobes of *Todarodes pacificus* and *Octopus minor* inhabiting the Korean waters. The obtained results are as follow.

In the immunostaining with anti dopamine, only a few of the large amacrine cells in an the upper part of an outer granule cell layer and the cells forming the islands of medulla showed positive reaction in *Todarodes pacificus*, while 2~3 cells in the upper and middle parts of an outer granule cell layer and more than 5 cells in the islands of medulla reacted positively in *Octopus minor*.

For the case of anti calbindin case, 2~3 small amacrine cells in the upper portion of the outer granule cell layer and 1~2 cells which are located in the lower part of an inner granule cell layer showed positive reaction in *Todarodes pacificus*, while, in *Octopus minor*, 4 cells in the outer granule cell layer reacted positively, no immunoreactive cell being found in the inner granule cell layer.

As a result of performing the immunogold labeling, relative large number(17~26) of gold particles were labeled per 0.5 μm^2 of the cytoplasm of the cells which showed the immunoreactivity to the anti dopamine and anti calbindin in *Todarodes pacificus*, however, small number(10) of gold particles were labeled in *Octopus minor*, which reach only half of the number in the *Todarodes pacificus*.

Key words : Anti calbindin, Anti dopamine, Immunogold labeling, Immunostaining

* Correspondence should be addressed to Nam-Sub Chang, Department of Life Science, College of Natural Science, Mokwon University, Taejon, 302-729, Korea Ph.: 042-829-7582, FAX: 042-829-7580, E-mail: nschang@mokwon.ac.kr
Copyright © 2002 Korean Society of Electron Microscopy

서 론

두족류(cephalopod)의 시엽(optic lobe)에서 외측부위를 구성하는 피질부(cortex, cortical layer)는 척추동물의 망막(retina)내 속층(deeper layer)의 구조와 매우 유사하다(Young, 1974).

일반적으로 척추동물의 망막내 속층에는 이극세포(bipolar cell), 수평세포(horizontal cell), 무축삭세포(amacrine cell), 열기사이세포(interplexiform cell), 그리고 신경절세포(ganglion cell) 등 여러 종류의 신경원들로 이루어져 있다(Sterling, 1983).

Young (1974)과 Haghight et al. (1984)는 오징어 *Loligo pealei*의 외과립세포층을 구성하는 세포를 2종류로 세분하였는데, 이들은 수질부까지 축삭이 뻗어 있는 2차 시세포(2nd-order visual cell)와 무축삭세포(amacrine cell)들이었다. 무축삭세포의 종류에는 다극세포(multipolar cell)와 이극세포(bipolar cell)등으로 구분되었는데, 특히 다극세포는 척추동물의 수평세포와 유사한 것으로 알려져 있다(Young, 1974).

현재까지 면역조직화학적 실험을 통해 척추동물의 망막과 함께 두족류의 뇌신경계 및 시엽에서도 dopamine, noradrenaline, 5hydroxytryptamine (serotonin), octopamine, glutamate, GABA, somatostatin, 그리고 galanin 등의 많은 신경전달물질(neurotransmitter)들이 확인되었고, 이들의 분포상태도 연구되어왔다(Stefano et al., 1981; Uemura et al., 1987; Yamashita et al., 1990; Cornwell et al., 1993).

Calbindin (CB)-D_{28k}는 calretinin (CR)과 함께 포유류의 망막(Endo et al., 1985; Hamano et al., 1990; Pasteels et al., 1990; Pochet et al., 1991)을 비롯하여 거의 모든 신경계(Baimbridge et al., 1992; Andressen et al., 1993; Celio et al., 1996; Paxinos et al., 1999)에서 다양한 세포군집으로 관찰되었다. CB의 기능은 세포내 칼슘의 농도를 조절함으로써 세포의 손상을 방지하는 것으로 알려졌다(Miller, 1995; Lohmann & Friauf, 1996). 흰쥐 망막에서도 일부의 수평세포와 무축삭세포가 calbindin성 신경원으로 알려진 바 있다(Schreiner et al., 1985).

dopamine은 척추동물의 망막에서도 관찰되는 신경

전달물질로 주로 열기사이세포와 무축삭세포 등에서 합성되어지는 것으로 알려져 있다(Witkovsky & Deary, 1991; Witkovsky & Schütte, 1991). 그러나 dopamine과 calbindin에 대한 연구는 포유동물과 경골어류(Weruaga, 1991; Velasco, 1992; Manso et al., 1997; Alonso et al., 1998)를 제외하고 무척추동물에서는 그 보고가 매우 드문 실정이다.

본 연구실에서는 우리나라 연근해에서 서식하는 살오징어(*Todarodes pacificus*)와 서해낙지(*Octopus minor*)의 시엽을 대상으로 neuron의 특성과 기능을 확인키 위해 이미 dopamine, calbindin, serotonin, somatostatin 그리고 galanin 등에 대한 항체를 사용한 면역세포화학적 실험을 통해 각 부위별(외과립세포층, 내과립세포층 그리고 수질부) 반응세포들의 종류와 분포상태를 확인한 바 있다. 그러나 이들 시엽에 면역항체를 이용한 면역금지법(immunogold labeling)을 시행한 논문은 매우 드문 실정이다. 이에 두 종을 대상으로 면역금지법을 사용한 결과 유의할만한 차이가 인정되어 이를 보고코자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 재료는 우리나라 연근해에서 서식하고 있는 살오징어(*Todarodes pacificus*)와 서해낙지(*Octopus minor*)로서, 30% ethyl alcohol을 첨가하여 마취시킨 다음, 눈과 연결되어 있는 머리부위를 절개하여 뇌신경절과 시엽을 적출하였으며, 실험에 사용할 수 있도록 필요한 부위를 적당한 크기로 잘라내어 사용하였다.

2. 실험방법

1) 면역조직화학적 방법

4% paraformaldehyde로 24시간 정도 고정을 한 후, 0.1 MPBS로 수세한 다음 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하였다. 파라핀 포매조직은 5 μ m 두께로 박절하여 APES-coated slide에 부착시킨 다음 xylene으로 파라핀을 제거하였고, 함수시킨 후 실온에서 0.5M

Tris-HCl buffer (pH 7.2~7.6)에 5분간 처리하였다. 이 후 3% H₂O₂용액에 실온에서 5분간 처리하여 비특이성 반응을 억제시킨 후 항원(dopamine and calbindin-D_{28k})에 대한 일차 항체를 조직위에 떨어뜨리고 실온에서 1시간 30분간 반응시켰다. dopamine과 calbindin에 대한 일차 항체는 각각 polyclonal antibody인 rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH) (abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-calbindin-D_{28k} (chemicon, California, USA)을 사용하였다. 최적염색을 위한 희석배율을 정하기 위하여 정상대조군을 대상으로, 항원의 항체는 10, 50, 100, 200, 500배로 희석하여 각기 염색하였다. 면역조직화학 염색은 Histostain™-Plus Kit (Zymed laboratories Inc. USA)를 사용하여 ABC (Avidin-Biotin-Peroxidase Complex) 방법으로 염색하였다. Link antibody 용액을 첨가하여 실온에서 20분간 반응하였다. 각 단계와 단계 사이에는 0.5M Tris-HCl buffer (pH 7.2~7.6)로 2회씩 세척하여 각 단계에서 여분의 항체를 제거하였다. 마지막으로 DAB substrate-chromogen 용액을 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 증류수로 세척하였다. 또한 각 예마다 일차항체 대신 음성대조군 용액 (Zymed laboratories, USA)을 사용하여 염색을 병행하였으며 갈색으로 염색된 경우를 양성으로 판독하였다.

2) Immunogold labeling법

4% paraformaldehyde에 고정 후, 50%와 70% alcohol로 탈수시켰으며, 이어 친수성인 LR white에 침투시킨 다음 37°C에서 48시간 중합시켜 포매하였다. 이후 LKB-V ultramicrotome을 사용하여 1 µm 두께의 절편을 제작하고 이를 methylene blue로 단일염색 후 광학현미경하에서 정확한 부위를 확인한 다음, 초박절편을 만들어 formbar-coated nickel grid에 부착시켰다.

조직절편을 포함하고 있는 nickel grid는 조직내 aldehyde기를 제거하기 위하여 0.5% NaBH₄가 첨가된 PBST-1% BSA (pH 7.2)에 10~20분간 띄워 놓았다. 이어 PBS로 수회 세척한 다음, PBST-1% BSA (pH 7.2)에 10분간 띄워놓았으며 1:50 (in PBST)으로 희석시킨 항체 (rabbit anti-TH and calbindin-D_{28k})에 띄운 후 40분간 반응시켰다. 비특이적인 반응을 없애

기 위해 PBST-1% BSA (pH 7.2)로 여러 번 씻어내고 protein A gold (10 nm) (1:20 in PBST-1% BSA)와 20분간 반응시켰다. 이어 PBST와 3차 증류수로 여러 번 씻어낸 다음 uranyl acetate로 단일염색 하여 Hitachi H-600 투과전자현미경 (75 KV)으로 관찰하였다. Kim & Lee (1998)의 방법을 이용하여 세포질 0.5 µm² 당 표지된 금입자의 수를 계산하여 면역항체에 따른 면역반응의 정도를 비교 검토하였다.

결 과

1. 면역조직화학적 결과

1) dopamine 면역반응

(1) 외과립세포층

항-dopamine에 대한 양성반응은 살오징어인 경우 외과립세포층의 바깥쪽에 위치한 1~2개 정도의 대형 무축삭세포 (직경 23×17 µm 정도)들만이 강한 양성반응을 보인 반면 (Fig. 1), 서해낙지에서는 외과립세포층의 바깥쪽과 중간부분에서 직경 9 µm 정도의 소형세포들과 직경 20×16 µm 정도의 대형세포 등 2~3개 정도에서 반응을 보였다 (Fig. 3A-B).

(2) 수질부

살오징어에서는 수질부의 섬을 이루는 세포들 중 1~2개 정도의 비교적 소량의 세포 (직경 20 µm 정도)만이 양성반응을 보인 반면 (Fig. 2), 서해낙지에서는 이보다 많은 5개 이상의 세포 (직경 17 µm 정도)에서 강한 양성반응을 보였다 (Fig. 4).

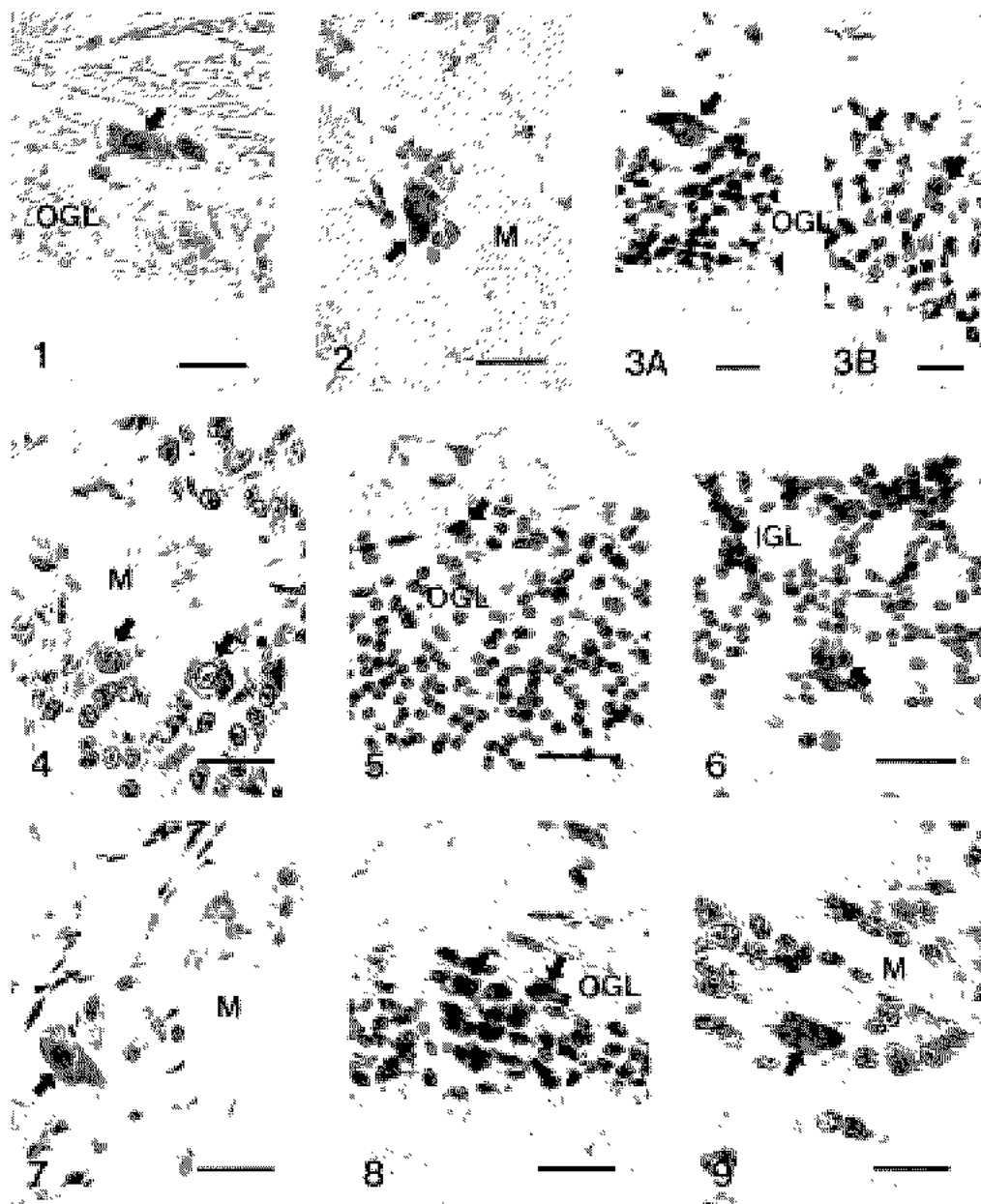
2) calbindin-D_{28k} 면역반응

(1) 외과립세포층

살오징어에서는 외과립세포층의 상단부위에서 2~3개 정도의 소형 무축삭세포 (직경 10×7 µm 정도)가 양성반응을 보인 반면 (Fig. 5), 서해낙지인 경우는 외과립세포층 전체부위에서 4개 정도의 세포들 (직경 12×10 µm)이 양성반응을 보였다 (Fig. 8).

(2) 내과립세포층

서해낙지에서는 반응을 볼 수 없었고, 살오징어에서만 내과립세포층의 하단에서 1~2개 정도의 세포 (직경 9 µm 정도)가 양성반응을 보였다 (Fig. 6).

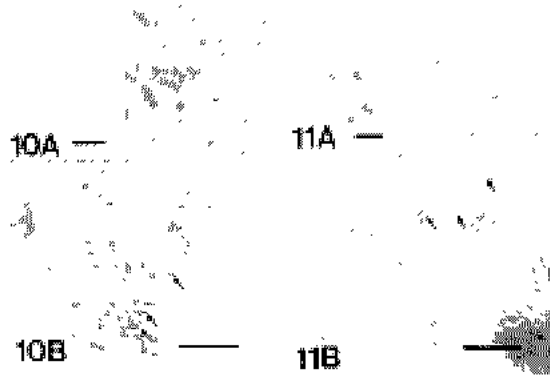


Figs. 1, 2. Light micrographs showing the positive reaction to the anti-dopamine serum in optic lobe of *Todarodes pacificus*. arrows, dopamine immunoreactive cells; M, medulla; OGL, outer granule cell layer. scale bars = 30 μ m.

Figs. 3A, B, 4. Light micrographs showing the positive reaction to the anti-dopamine serum in optic lobe of *Octopus minor*. arrows, dopamine immunoreactive cells; M, medulla; OGL, outer granule cell layer. scale bars = 20 μ m.

Figs. 5, 6, 7. Light micrographs showing the positive reaction to the anti-calbindin serum in optic lobe of *Todarodes pacificus*. arrows, calbindin immunoreactive cells; IGL, inner granule cell layer; M, medulla; OGL, outer granule cell layer. scale bars = 30 μ m.

Figs. 8, 9. Light micrographs showing the positive reaction to the anti-calbindin serum in optic lobe of *Octopus minor*. arrows, calbindin immunoreactive cells; M, medulla; OGL, outer granule cell layer. scale bars = 30 μ m.



Figs. 10A, B, 11A, B. Electron micrographs showing the dopamine-like nerve cells were appeared in the outer granule cell layer and medulla of optic lobe in *Todarodes pacificus*. arrows, gold particles. scale bars = 2.5 μ m, 0.2 μ m, 1.5 μ m, 0.25 μ m.

(3) 수질부

두 종의 수질부 심을 이루는 세포들 중 1~2개 정도의 대형 신경세포(직경 25 μ m 정도)에서 강한 양성 반응을 보였다(Figs. 7 & 8).

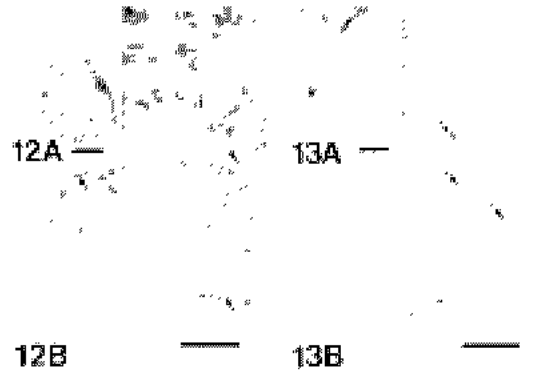
2. 면역전자현미경적 결과

1) dopamine 면역표지

살오징어인 경우 외과립세포층과 수질부의 세포들에서 비교적 많은 수의 금입자가 표지되었는데, 특히 외과립세포층의 대형 무축삭세포에서 세포질 0.5 μ m² 당 23 \pm 3개 정도의 금입자가 관찰되고(Fig. 10A-B), 수질부의 심을 이루는 세포들 중에서도 25 \pm 3개 정도가 표지되어 매우 강한 반응을 보인 반면(Fig. 11A-B), 서해낙지는 살오징어처럼 외과립세포층과 수질부를 구성하는 소수의 세포들만이 세포질 0.5 μ m² 당 5개 정도 이하의 금입자가 표지되어 비교적 약한 반응을 보였다(Figs. 12A-B, & 13A-B).

2) calbindin-D_{28k} 면역표지

살오징어에서는 외과립세포층과 내과립세포층(Fig. 15A-B) 그리고 수질부 등에서 다수의 세포들이 양성반응을 보인 반면, 서해낙지에서는 외과립층과 수질부에서만 양성반응을 보였다. 특히 살오징어의



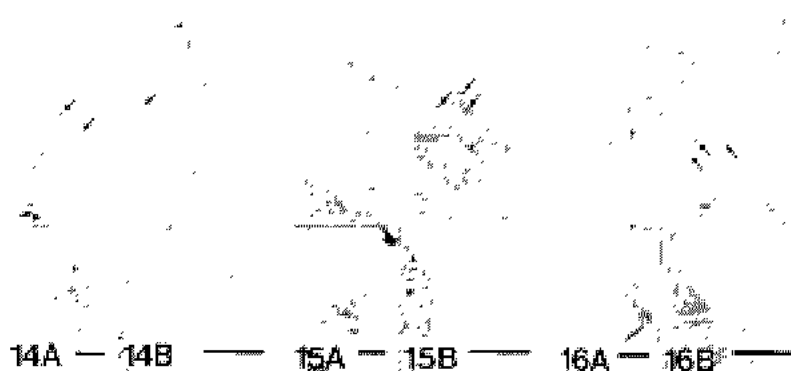
Figs. 12A, B, 13A, B. Electron micrographs showing the dopamine-like nerve cells were appeared in the outer granule cell layer and medulla of optic lobe in *Octopus minor*. arrows, gold particles. scale bars = 1.5 μ m, 0.25 μ m, 2.5 μ m, 0.2 μ m.

외과립세포층(Fig. 14A-B)과 수질부(Fig. 16A-B) 등에서는 반응을 보인 세포가 세포질 0.5 μ m² 당 각각 17 \pm 2, 26 \pm 3개 정도로 비교적 많은 금입자가 표지된 반면, 서해낙지의 외과립세포층과 수질부에서는 반응 세포내 10개 미만의 금입자가 표지되어 두 종간 반응의 차이가 뚜렷해 보였다(Figs. 17A-B & 18A-B).

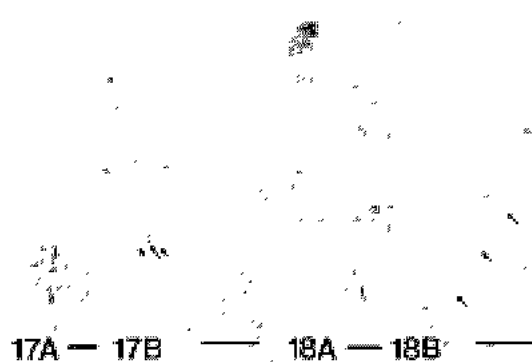
고 찰

Dopamine은 대표적인 catecholamine계 신경전달물질로 척추동물의 망막내에 널리 분포하고 있으며, 망막에서 명, 암 조절에 잘 적응할 수 있도록 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Witkovsky & Deary, 1991). 이들은 tyrosine이 tyrosine hydroxylase (TH)와 dopamine β -hydroxylase (DBH) 등의 대표적인 촉매제에 의해 최종산물인 epinephrine으로 변화되어가는 과정 중에 형성되는 중간대사산물이다(Kamp, 1985). 따라서 catecholamine 합성과정의 첫 번째 효소인 TH에 대한 항체를 면역형광항체법과 면역염색을 사용하여 반응된 세포가 dopamine성 신경세포임을 밝히는 연구가 계속 되어왔다(Hokfelt et al., 1976; Versaux-Botteri & Nguyen-Legros, 1986).

특히 Oh et al. (1999)은 포유류 guinea pig의 망막에



Figs. 14A, B, 15A, B, 16A, B. Electron micrographs showing the calbindin-like nerve cells were appeared in the outer and inner granule cell layer and medulla of optic lobe in *Todarodes pacificus*. arrows, gold particles. scale bars = 1.5 μm , 0.25 μm , 1.5 μm , 0.2 μm , 1 μm , 0.25 μm .



Figs. 17A, B, 18A, B. Electron micrographs showing the calbindin-like nerve cells were appeared in the outer granule cell layer and medulla of optic lobe in *Octopus minor*. arrows, gold particles. scale bars = 1.5 μm , 0.2 μm , 2.5 μm , 0.25 μm .

서 dopamine성 신경세포를 찾기 위해 TH와 DBH에 대한 항체를 사용한 면역염색을 수행한 결과, DBH 항체에 비해 TH 항체를 사용할 시 더 많은 수의 dopamine성 신경세포를 찾을 수 있었다고 보고되었다. TH 항체에 반응한 dopamine성 신경세포는 2가지 형태 (type 1, type 2)의 무축삭세포로 관찰되었는데 (Nguyen-Legros et al., 1994), type 1 세포는 망막의 내핵층(inner nuclear layer)에서 그 수가 $56 \pm 11.5/\text{mm}^2$ 정도 관찰된 대형 무축삭세포(직경 $12.0 \pm 1.7 \mu\text{m}$ 정

도)였고, type 2 세포는 그 수가 $166.6 \pm 30.5/\text{mm}^2$ 정도로 내망상층(inner plexiform layer)에서 관찰된 소형 무축삭세포(직경 $6.4 \pm 1.2 \mu\text{m}$ 정도)였다. 본 연구에서도 두 종류의 살오징어와 서해낙지의 시엽에서 dopamine성 신경세포를 찾기 위해 rabbit anti-TH를 사용하여 면역염색을 각각 시도한 결과 두 종의 외과립세포층과 수질부에서 다양한 반응을 보인 세포들을 확인할 수 있었는데, 특히 살오징어의 외과립세포층에서는 대형 무축삭세포들(직경 $23 \mu\text{m}$ 정도)이 강한 반응을 보였다. 그러나 본 실험에서 관찰된 무축삭세포들은 포유류의 망막에서 관찰된 dopamine성 신경세포에 비해 세포의 크기가 훨씬 크고, 반응세포의 수도 현저히 적게 나타나, Oh et al. (1999)의 연구결과와는 상당한 차이를 보였다. 이는 척추동물에 비해 무척추동물의 망막에서 dopamine성 신경세포의 분화가 매우 미흡한 것인지 또는 종의 차이에서 오는 현상인지는 확인되지 않았다.

dopamine을 사용한 면역금지법은 두 종에서 반응 정도에 약간의 차이를 확인할 수 있었는데, 서해낙지에서 반응세포의 세포질 $0.5 \mu\text{m}^2$ 당 금입자의 수가 평균 5개 정도가 관찰된 데 비해 살오징어에서는 24 ± 3 개 정도가 관찰되어 금입자의 친화성이 살오징어에서 4배 정도 더 강하게 나타나는 것을 알 수 있었다.

Rogers (1987)는 여러 종의 척추동물에서 칼슘결합 단백질인 calretinin-D_{29K}와 calbindin-D_{28K}들의 아미

노산 서열이 50~60% 정도가 일치한다고 밝힌 바 있고, 이어 조류(Ellis et al., 1991), 포유류(Massey & Mills, 1996), 사람(Yan, 1997; Nag & Wadhwa, 1999) 그리고 어류(Vecino et al., 1993; Dalil-Thiney et al., 1994; Weruaga et al., 2000) 등의 망막에서도 calbindin-D_{28k}의 분포에 대한 많은 연구가 있었다. 특히 Vecino(1998)와 Doldan et al.(1999)은 송어와 가자미 등 어류의 발생 단계에 따라 망막을 재료로 calbindin-D_{28k}의 면역염색을 실시한 결과, 신경절세포, 이극세포 그리고 무축삭세포에서 반응을 보인다고 하였으며, 특히 무축삭세포에서는 calbindin-D_{28k}가 더 빨리 발현된다고 하여 칼슘결합 단백질의 출현시기와 분포상태를 이용해 특정 신경세포의 분화를 밝히는데 좋은 계기가 되고 있다. 살오징어와 서해낙지를 재료로 한 본 연구에서도 시엽에 rabbit anti-calbindin-D_{28k}를 투여하여 면역염색을 실행한 결과, 외과립세포층, 내과립세포층 그리고 수질부에서 소수의 무축삭세포들이 반응을 나타내 calbindin성 신경세포가 존재함을 확인할 수 있었다. 즉 살오징어의 외과립세포층 상단에서는 2~3개의 소형 무축삭세포가 반응을 보였으며, 내과립세포층의 하단에서는 1~2개의 세포에서 반응을 보였다. 반면 서해낙지에서는 전체 외과립세포층에서 4개 정도의 세포가 반응을 보였지만, 내과립세포층에서는 거의 반응이 없었다. 면역금지법의 결과는 살오징어인 경우 서해낙지에 비해 calbindin-D_{28k}에 대한 금입자의 친화성이 2배 이상 높게 나타났는데, 이와 같은 결과는 척추동물에서 처럼 무척추동물인 두족류에서도 어느 정도 dopamine과 calbindin-D_{28k}의 활성이 높다는 것을 보여주는 사례라 사료된다. 그러나 아직 두 종간 시엽내에 존재하는 신경전달물질의 종류와 이를 생성하는 신경세포에 대한 연구는 지금까지 매우 미흡한 초기단계이므로 보다 지속적인 많은 연구가 뒷받침해야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

Alonso JR, Garcia Ojeda E, Weruaga E, Briñón JG, Arévalo R, Celio MR, Aijón J: McAB 300 antibody against calbindin D 28k is a glial marker in the teleost brain. Arch

Ital Biol 136: 77-81, 1998.

Andressen C, Blümcke I, Celio MR: Calcium binding proteins: selective markers of nerve cells. Cell Tissue Res 271: 181-208, 1993.

Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH: Calcium binding proteins in the nervous system. Trends Neurosci 15: 303-308, 1992.

Celio MR, Pauls TL, Schwaller B: Guidebook to the Calcium Binding Proteins. Oxford University Press, Oxford, 1996.

Cornwell CJ, Messenger JB, Williamson R: Distribution of GABA like immunoreactivity in the octopus brain. Brain Res 621: 353-357, 1993.

Dalil Thiney N, Pochet R, Versaux Botteri C, Vesselkin N, Repérant J, Nguyen Legros J: Immunohistochemical localization of calbindin D 28K and calretinin in the lamprey retina. J Comp Neurol 340: 140-147, 1994.

Doldan MJ, Frego B, De Miguel Villegas E: Immunohistochemical localization of calretinin in the retina of the Turbot (*Psetta maxima*) during development. J comp Neuro 406: 425-432, 1999.

Ellis JH, Richards DE, Rogers JH: Calretinin and calbindin in the retina of the developing chick. Cell Tiss Res 264: 197-208, 1991.

Endo T, Kobayashi S, Onaya T: Parvalbumin in rat cerebrum, cerebellum and retina during postnatal development. Neurosci Lett 60: 279-282, 1985.

Haghighat N, Cohen RS, Pappas GD: Fine structure of squid (*Loligo pealei*) optic lobe synapses. Neuroscience 13: 527-546, 1984.

Hamano K, Kiyama H, Emson PC, Manabe R, Nakauchi M, Tohyama M: Localization of two calcium binding proteins, calbindin (28 KD) and parvalbumin (12 KD), in the vertebrate retina. J comp Neurol 302: 417-424, 1990.

Hokfelt T, Johansson O, Fuxe K, Goldstein M, Park D: Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron, systems in the rat brain: Three catecholamine synthesizing enzymes in the rhinencephalon. In De Ajuriaguerra HJ, Tissot R (eds): Rhinencephale Neurotransmetteurs et Psychoses. Geneva: Georg 79-113, 1976.

Kamp C: The dopaminergic system in retina. In: Morgan WW (ed) Retinal transmitters and modulators: models for the brain. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-32, 1985.

- Kim SJ, Lee JH: A study on the activity of antibodies immunoreaction to the antigen of *Paragonimus westermani*. Korean J Electron Microscopy 28 : 527-538, 1998. (Korean)
- Lohmann C, Friauf E: Distribution of the calcium binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. J Comp Neurol 367 : 90-109, 1996.
- Manso JM, Becerra M, Anadón R: Expression of a low molecular weight (10 kDa) calcium binding protein in glial cells of the brain of the trout (Teleostei). Anat Embryol 196 : 403-416, 1997.
- Massey SC, Mills SL: A calbindin immunoreactive cone bipolar cell type in the rabbit retina. J Comp Neurol 366 : 15-33, 1996.
- Miller RJ: Regulation of calcium homeostasis in neurons: the role of calcium binding proteins. Biochem Soc Trans 23 : 629-632, 1995.
- Nag TC, Wadhwa S: Developmental expression of calretinin immunoreactivity in the human retina and a comparison with two other EF hand calcium binding proteins. Neuroscience 91 : 41-50, 1999.
- Nguyen Legros J, Versaux Botteri C, Savy C: Dopaminergic and GABAergic retinal cell populations in mammals. Microsc Res Tech 36 : 26-42, 1994.
- Oh SJ, Kim IB, Lee EJ, Kim KY, Kim HI, Chun MH: Immunocytochemical localization of dopamine in the guinea pig retina. Cell Tissue Res 298 : 561-565, 1999.
- Pasteels B, Rogers J, Blachier F, Pochet R: Calbindin and calretinin localization in retina from different species. vis Neurosci 5 : 1-16, 1990.
- Paxinos G, Carrive P, Wang H, Wang PY: Chemoarchitectonic atlas of the rat brainstem. Academic press, Sydney, 1999.
- Pochet R, Pasteels B, Seto Ohshima A, Bastianelli E, Kitajima S, Van Eldik LJ: Calmodulin and calbindin localization in retina from six vertebrate species. J comp Neurol 314 : 750-762, 1991.
- Rogers JH: Two CaBPs mark many chick sensory neurons. Neuroscience 31 : 697-709, 1987.
- Schreiner DS, Jande SS, Lawson DEM: Target cells of vitamin D in the vertebrate retina. Acta Anat 121 : 153-162, 1985.
- Stefano GB, Hall B, Makman MH, Dvorkin B: Opioid inhibition of dopamine release from nervous tissue of *Mytilus edulis* and *Octopus vulgaris*. Science 213 : 928-930, 1981.
- Sterling P: Microcircuitry of the cat retina. Ann Rev Neurosci 149-185, 1983.
- Uemura T, Yamashita T, Haga T, Miyazaki N, Kondo H, Matsushita M: Localization of serotonin immunoreactivity in the central nervous system of *Octopus vulgaris* by immunohistochemistry. Brain research 406 : 73-86, 1987.
- Vecino E, García Briñón J, Velasco A, Caminos E, Lara J: Calbindin D 28k distribution in the retina of the developing trout (*Salmo fario* L.) Neurosci Lett 152 : 91-95, 1993.
- Vecino E: Spatiotemporal development of the fish retina: Distribution of calbindin D 28K, Cell & Developmental biology 9 : 271-277, 1998.
- Velasco A: Glía en el sistema nervioso central de teleosteos. Aportaciones morfológicas e inmunocitoquímicas. Minor Thesis, Universidad de Salamanca, Salamanca. 1992.
- Versaux Botteri C, Nguyen Legros J: An improved method for tyrosine hydroxylase immunolabeling of catecholamine cells in whole mounted rat retina. J Histochem Cytochem 34 : 743-748, 1986.
- Weruaga E: Localización de proteínas ligantes de calcio en la retina de teleosteos de agua dulce: estudio inmunocitoquímico. Minor thesis, Universidad de Salamanca, Salamanca, 1991.
- Weruaga E, Velasco A, Briñón JG, Arévalo R, Aijón J, Alonso JR: Distribution of the calcium binding proteins parvalbumin, calbindin D 28k and calretinin in the retina of two teleosts. J Chem Neuro 19 : 1-15, 2000.
- Witkovsky P, Deary A: Functional roles of dopamine in the vertebrate retina. Prog Ret Res 11 : 248-292, 1991.
- Witkovsky P, Schütte M: The organization of dopaminergic neurons in vertebrate retinas. Vis Neurosci 7 : 113-124, 1991.
- Yamashita T, Haga C, Hirai K, Uemura T, Kondo H, Kosaka K: Localization of serotonin immunoreactivity in cephalopod visual system. Brain Research 521 : 81-88, 1990.
- Yan XX: Prenatal development of calbindin D 28k and parvalbumin immunoreactivities in the human retina. J Comp Neurol 377 : 565-576, 1997.
- Young, JZ: The central nervous system of *Loligo*. I. The optic lobe. Philos Trans R Soc Lond Biol 267 : 263~302, 1974.

<국문초록>

한국 연근해산 살오징어와 서해낙지의 시엽에서 신경전달물질을 분비하는 neuron의 특성 및 기능을 확인하기 위해 rabbit anti-dopamine (TH)과 rabbit anti-calbindin-D_{28k} 등의 항체를 이용한 면역염색과 면역금지법을 시행한 결과는 다음과 같았다.

항-dopamine을 사용한 면역염색 결과 살오징어에서는 외과립세포층 상단에 위치한 대형 무축삭세포와 수질부의 섬을 이루는 세포들 중 2~3개의 비교적 소량의 세포만이 양성반응을 보인 반면, 서해낙지에서는 외과립세포층 상단 및 중간 부위의 2~3개의 세포와 수질부섬을 이루는 5개 이상의 세포에서 강

한 양성반응을 보였다. 항-calbindin-D_{28k}인 경우는 살오징어의 외과립세포층 상단에 위치한 2~3개의 소형 무축삭세포와 내과립세포층 하단에 위치한 1~2개의 세포에서 양성반응을 보인 반면, 서해낙지인 경우는 외과립세포층에서 4개 정도의 세포에서 양성반응을 보였으나, 내과립세포층에서는 반응을 확인할 수 없었다.

면역금지법을 시행한 결과 살오징어에서는 항-dopamine과 항-calbindin에 면역반응을 보인 세포들의 세포질 0.5 μm^2 당 17~26개 정도의 비교적 많은 수의 금입자가 표지된 반면, 서해낙지에서는 세포질 0.5 μm^2 당 평균 10개 정도인 소량의 금입자만이 표지되어, 살오징어가 서해낙지에 비해 표지된 금입자가 거의 2배 정도 많았다.