

Distribution Pattern of Inhibitory and Excitatory Nerve Terminals in the Rat Genioglossus Motoneurons

Yong-Suk Moon*

Department of Anatomy, College of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-718, Korea

Received November 8, 2010 / Accepted November 9, 2010

The genioglossus muscle plays an important role in maintaining upper airway patency during inspiration; if this muscle does not contract normally, breathing disorders occur due to closing of the upper airway. These occur because of disorders of synaptic input to the genioglossus motoneurons, however, little is known about it. In this study, the distribution of GABA-, glycine-, and glutamate-like immunoreactivity in axon terminals on dendrites of the rat genioglossus motoneurons, stained intracellularly with horseradish peroxidase (HRP), was examined by using postembedding immunogold histochemistry in serial ultrathin sections. The motoneurons were divided into four compartments: the soma, and primary (Pd), intermediate (Id), and distal dendrites (Dd). Quantitative analysis of 157, 188, 181, and 96 boutons synapsing on 3 soma, 14 Pd, 35 Id, and 28 Dd, respectively, was performed. 71.9% of the total number of studied boutons had immunoreactivity for at least one of the three amino acids. 32.8% of the total number of studied boutons were immunopositive for GABA and/or glycine and 39.1% for glutamate. Among the former, 14.2% showed glycine immunoreactivity only and 13.3% were immunoreactive to both glycine and GABA. The remainder (5.3%) showed immunoreactivity for GABA only. Most boutons immunoreactive to inhibitory amino acids contained a mixture of flattened, oval, and round synaptic vesicles. Most boutons immunoreactive to excitatory amino acids contained clear and spherical synaptic vesicles with a few dense-cored vesicles. When comparisons of the inhibitory and excitatory boutons were made between the soma and three dendritic segments, the proportion of the inhibitory to the excitatory boutons was high in the Dd (23.9% vs. 43.8%) but somewhat low in the soma (35.7% vs. 38.2%), Pd (34.6% vs. 37.8%) and Id (33.1% vs. 38.7%). The percentage of synaptic covering of the inhibitory synaptic boutons decreased in the order of soma, Pd, Id, and Dd, but this trend was not applicable to the excitatory boutons. The present study provides possible evidence that the spatial distribution patterns of inhibitory and excitatory synapses are different in the soma and dendritic tree of the rat genioglossus motoneurons.

Key words : Genioglossus muscle, immunogold, GABA, glycine, glutamate

서 론

혀는 음식물에 대한 맛을 감지하는 특별한 기능이 있을 뿐만 아니라 정확한 움직임으로 삼키기, 핥기, 저작기, 발성 및 씹기 작용에 중요한 역할을 담당하며, 또한 기도를 확장시켜 호흡을 용이하게 해준다. 혀의 운동을 담당하는 근육으로는 주로 혀의 모양을 변화시키는 자체근육(intrinsic muscle)과 혀의 위치를 변화시키는 바깥근육(extrinsic muscle)으로 구성되어 이들 모두 혀밑신경(hypoglossal nerve)의 지배를 받는다. 삼차신경에 의한 아래턱운동과 함께 음식물을 삼켜주는 혀의 바깥근육들은 혀의 내뺌(protrusion)과 들임(retrusion) 작용을 운동적으로 수행하게 되는데 이러한 작용들은 말초수용기로 부터 감각정보가 입력되는 감각입력계, 감각정보를 처리하는 중추처리계 및 운동출력계 등이 종합적으

로 작용하여 나타나게 되는 복잡한 과정이다[2]. 혀의 바깥근육은 혀의 내뺌에 관여하는 턱끝혀근(genioglossus muscle)과 혀의 들임에 작용하는 목뿔혀근(hyoglossus muscle) 및 붓혀근(styloglossus muscle)으로 구성되며 이들을 지배하는 신경원은 혀밑신경핵(hypoglossal nucleus) 내에 존재한다. 혀밑신경은 크게 두 개의 가지(branch)를 가지는데 안쪽가지(medial branch)는 들임근들에 그리고 가쪽가지(lateral branch)는 내뺌근과 연결되어 있다[16,25].

입안 바닥과 입인두의 입구에 위치한 혀는 호흡을 위한 기도유지에 중요한 역할을 담당한다. 특히 혀의 내뺌에 관여하는 턱끝혀근은 공기의 흡입(inspiration)시에는 활성을 나타내지만 음식물을 삼킬때(swallowing)에는 활성을 나타내지 않는다는 것이 최근 다양한 전기생리학적 연구방법들을 통해 알려졌다[2,20,21]. 또한 역행성추적자(retrograde tracer)를 이용하여 혀밑신경핵의 운동신경원들에 투사되는 전운동신경원들(premotor neurons)의 위치와 기능들이 해부학적 연구들에 의해 보고되었으며[7,21], 이들 전운동신경원들은 같은쪽

*Corresponding author

Tel : +82-53-650-4458, Fax : +82-53-652-2690
E-mail : ysmoon@cu.ac.kr

(ipsilateral) 또는 반대쪽(contralateral)의 허밀신경핵 운동신경원들에 투사되어 혀의 반사적 운동을 조절한다[13]. 그러므로 입안의 다양한 기능에 대한 혀내뱀반사 또는 혀들뱀반사를 수행하기 위해서는 전운동신경원들과 턱끝혀근 운동신경원 사이의 억제성 또는 흥분성 신호입력의 양상을 이해하는 것이 매우 중요하다. 지금까지의 많은 전기생리학적인 연구에 의하면 억제성 입력신호는 주로 세포체에서 많이 입력되며, 흥분성 입력신호는 주로 신경세포 가지돌기의 원위부에서 입력됨으로써 운동신경원이 부적절하게 흥분되는 것이 방지된다고 생각되어 왔다. 또한, 운동신경원에 대한 억제성 또는 흥분성 신경종말의 미세구조를 분석함으로써 억제성 및 흥분성 신호 입력 양상을 척수[17,18,19,24]와 삼차신경계[1,23]에서 보고하였지만 혀밀신경핵 내의 턱끝혀근 운동신경원에 대한 억제성 및 흥분성 신호입력의 양상은 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 horseradish peroxidase에 의한 세포내 염색법을 이용하여 턱끝혀근의 운동신경원을 표식한 후 턱끝혀근 운동신경원의 세포체와 가지돌기의 각 부위에서 억제성 신경전달물질인 GABA와 glycine, 흥분성 신경전달물질인 glutamate에 대한 면역양성 신경종말의 발현빈도, 미세구조 및 연결양상 등을 정량적으로 분석함으로써 턱끝혀근의 억제성 및 흥분성 신호입력의 의의를 밝혀 혀의 운동에 관여하는 신경회로망의 특성을 이해하고자 한다.

재료 및 방법

Horseradish peroxidase (HRP) 주입 및 조직처리

체중이 300-350 g인 Sprague-Dawley 계통의 수컷 흰쥐 3마리를 sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.)로 마취하고 턱끝혀근을 노출시킨 후 glass microelectrode에 30% HRP (Sigma, USA) 용액을 넣어 오른쪽 턱끝혀근에 0.7 μ l의 HRP를 주입하였다. 약 10시간 생존시킨 후 흰쥐를 sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.)로 마취시킨 뒤 심장을 통해 헤파린을 함유한 식염수와 2.5% glutaraldehyde, 0.5% paraformaldehyde 및 0.1% picric acid를 함유한 고정액[in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4]으로 관류고정 하였다. 뇌줄기를 적출하여 4°C의 동일 고정액에서 2시간 정도 후고정 한 후 진동절편기를 이용하여 80 μ m 두께로 횡단 연속절편을 만들었다. Tungstate/tetramethylbenzidine (TMB) 방법을 이용하여 HRP를 가지화하였고, diaminobenzidine (0.25 mg/ml in PB, pH 6.0)을 이용하여 절편을 안정화하였다. 광학현미경으로 관찰하여 HRP에 진하게 표식된 운동신경원을 포함한 절편을 골라서 1% OsO₄ (osmium tetroxide in 0.1 M PB, pH 6.0)로 1시간 후고정 하였다. 에탄올로 탈수하고 Durcupan (Fluka, Switzerland)으로 포매 한 후 58°C에서 48시간 동안 경화하였다.

Postembedding immunogold histochemistry

포매된 조직에서 HRP에 표식된 운동신경원들을 세포체

(Soma)와 가지돌기의 근위부(primary dendrite, Pd), 중간부(intermediate dendrite, Id) 및 원위부(distal dendrite, Dd)로 구분하였다(Fig. 1). 원위부는 HRP에 표식된 가지돌기 중 적어도 100 μ m 이상의 길이를 가진 가지돌기만 선별하여 구분하였다. 각 부위가 포함되어 있는 절편부위를 면도날로 세절한 뒤 연속 초박절편을 형성하여 formvar film으로 지지막을 형성한 one hole-nickel grid 위에 얹은 후 다음과 같이 postembedding immunogold histochemistry를 시행하였다. 1% periodic acid 용액으로 7분 동안 resin을 etching한 후, 9% sodium-m-periodate 용액으로 osmium을 제거한 다음 1% sodium borohydride로 10분간 반응시켜 aldehyde group을 환원시켰다. 2% human serum albumin (HSA)으로 10분간 반응시킨 뒤 rabbit anti-GABA항체(1:350, Sigma A2052, USA), rabbit anti-glycine항체(1:100, Abcam ab9442, UK) 및 rabbit anti-glutamate항체(1:400, Sigma G6642, USA)로 실온에서 4시간 반응하였다. 그 후 1:20으로 희석한 15 nm의 금입자가 결합된 goat anti-rabbit IgG (Bio Cell Co., London, UK)에 2시간 반응하였다. Uranyl acetate 포화용액과 0.3% lead citrate 용액으로 염색한 후 Hitachi H-7500 투과전자현미경으로 25,000배에서 촬영하였다.

금입자 염색절편의 전자현미경적 분석

HRP에 표식된 운동신경원에서 각 부위로 구분한 연속절편의 면역염색반응에 대한 전자현미경 사진들을 다음과 같이 분석하였다. 모든 정량적인 분석은 전자현미경 사진상에서 컴퓨터에 연결된 Wacom digitizing tablet과 NIH image software (version 1.62; NIH, USA)를 사용하여 다음 각 항목을 측정하였다. 표식 운동신경원의 1) 둘레 및 길이, 2) 이와 인접

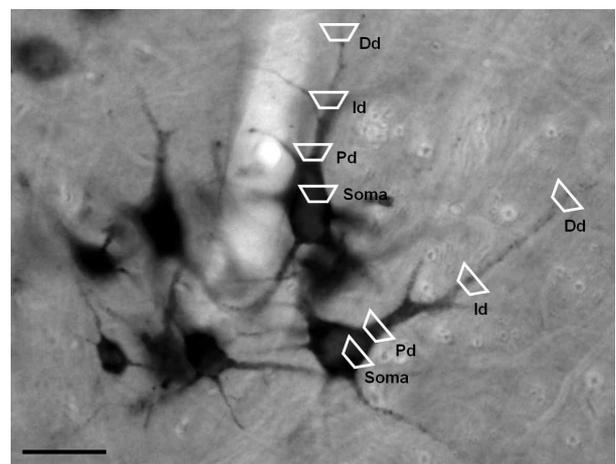


Fig. 1. Light micrograph showing labeled genioglossus motoneurons. Dendrites within the boxes and the soma were examined at the electron microscopic level. Pd, Id, and Dd indicate primary, intermediate, and distal segments, respectively. Scale bar=50 μ m.

하고 있는 신경종말의 수, 3) 각 신경종말 인접부의 평균 길이 (mean apposed length), 그리고 4) 신경종말에 의하여 운동신경원이 덮여진 비율(synaptic covering %) 등을 측정하였다. 표식 운동신경원과 연결하는 신경종말을 면역반응의 결과에 따라 GABA 항체에만 면역양성인 신경종말(GABA only), glycine 항체에만 면역양성인 신경종말(glycine only), GABA 및 glycine 항체에 동시에 면역양성인 신경종말(GABA and glycine), glutamate 항체에만 면역양성인 신경종말(glutamate only), 그리고 모든 항체에 면역음성인 신경종말(none) 등 5군으로 분류하여 각각의 측정치를 구하였다. 면역양성 여부는 연결 후 세포질의 금입자 밀도(gold particle density)에 비해 5배 이상의 밀도를 보이는 경우 양성으로 간주하였다. 금입자 밀도는 사립체를 제외한 세포질 부위의 면적을 측정하고 여기에 존재하는 금입자의 수를 헤아려 입자수/ μm^2 으로 표시하였다.

결 과

일반적인 소견

HRP의 역행성 이동으로 표식된 턱끝혀근 운동신경원은 혀 밑신경핵의 배쪽(ventral)에 주로 분포하였다(Fig. 2). 턱끝혀근 운동신경원 세포체의 평균 지름은 16-38 μm 의 분포를 보였고, 24-30 μm 크기에서 최빈치를 가지는 분포를 나타내었다. 본 연구에서 분석한 턱끝혀근 운동신경원은 평균지름이 30 μm 이상이고, 하나 이상의 C형 신경종말이 인접하며 복잡한 가지돌기의 형태를 가지는 알파 운동신경원(alpha motoneuron)으로 판단되었다. 전자현미경적인 관찰에서 TMB와 HRP의 반응 산물은 여러 가지 크기의 전자밀도가 치밀한 결정(crystalline)

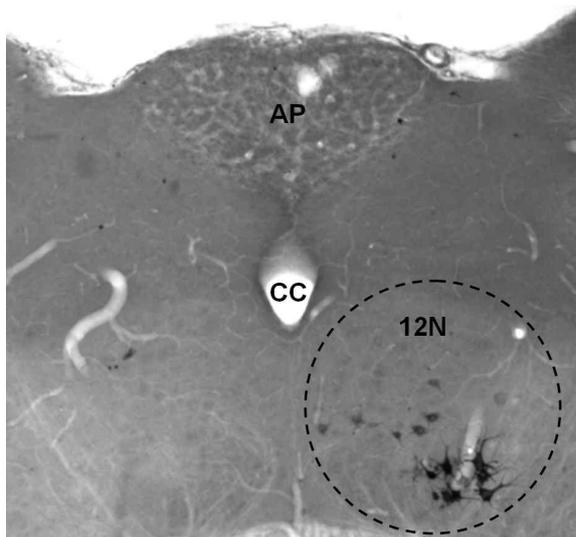


Fig. 2. Light micrograph showing genioglossus motoneurons labeled with horseradish peroxidase and apposing boutons in the ventral subdivision of the hypoglossal nucleus (12N). AP; area postrema, CC; central canal, $\times 4$.

혹은 막대(rod) 형태로 나타났는데 이는 주로 표식된 운동신경원의 핵을 제외한 세포체 및 가지돌기에 분포하였다(Fig. 3).

다음의 미세구조적인 분석은 3개의 턱끝혀근 운동신경원에 연결한 622개의 신경종말을 기초로 하였다. 622개의 신경종말 중 157개는 세포체에서 관찰하였으며, 465개는 가지돌기의 근위부, 중간부 및 원위부에서 각각 188개, 181개 및 96개를 관찰하였다. 먼저 연결소포의 형태에 따라 신경종말들을 두 군으로 나눌 수 있었는데, 한 군은 F 혹은 P형 신경종말로서 납작하거나 타원형 혹은 둥근 형태의 연결소포 및 약간의 치밀연접소포를 함유하고 있는 것이고, 또 다른 군은 S, C 및 M형 신경종말로서 밝고 구형의 소포를 함유하며 때때로 큰 치밀연접소포를 함유하고 있었다. 연결구조가 명확히 관찰되는 경우 대부분의 F 혹은 P형 신경종말은 대칭연접형태를 보였고, S, C 및 M형 신경종말은 비대칭 연접형태를 보였다(Fig. 4D). 함유하고 있는 연결소포의 형태나 연접부합체의 형태 등 인접한 신경종말의 일반적인 미세구조적 조건은 턱끝혀근 운동신경원의 세포체, 가지돌기의 근위부, 중간부 및 원위부에서 별다른 차이를 보이지 않았다.

1개의 턱끝혀근 운동신경원의 세포체에는 평균적으로 52.3개의 신경종말이 관찰되었고, 가지돌기의 근위부, 중간부 및 원위부에서는 각각 13.4개, 5.2개 및 3.4개의 신경종말이 관찰되었다. 각 부위에서 관찰한 신경종말의 평균 길이는 1.0-1.2 μm 로 비슷하였다. Synaptic covering (%)은 세포체와 가지돌기의 근위부에서 각각 65.8%와 64.0%로 비슷하였으나 가지돌기의 중간부와 원위부에서는 각각 53.6%와 48.5%로 관찰되어, 세포체에서 가지돌기의 원위부 쪽으로 감소되는 경향을 보였

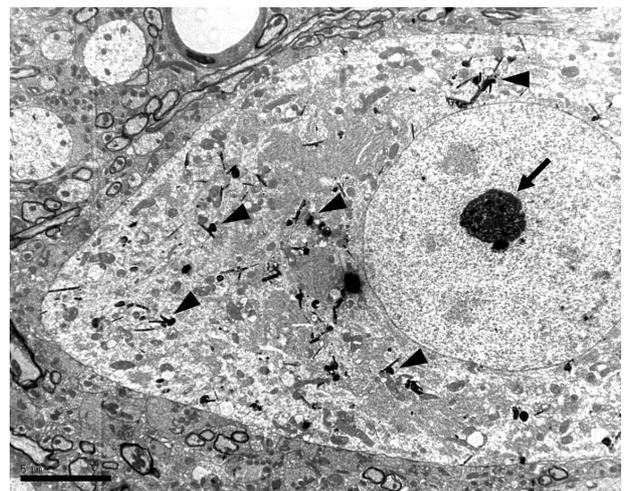


Fig. 3. Electron micrograph showing labeled genioglossus motoneuron. Somata of labeled genioglossus motoneuron shows electron dense crystalline or rod like tungstate/tetramethylbenzidine reaction products of horseradish peroxidase (arrow heads). Note the vacuolated nucleolus (arrow) which is one of the morphological features of alpha motoneuron. Scale bar=5 μm .

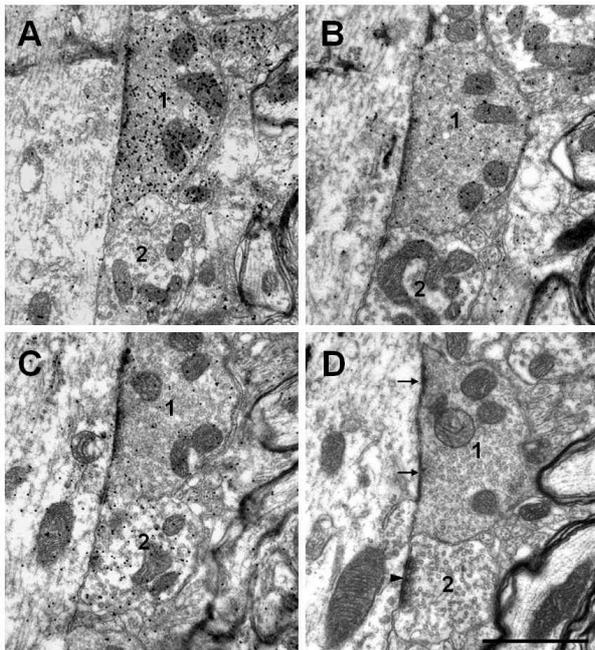


Fig. 4. Electron micrographs of adjacent ultrathin sections of the primary dendrite incubated with GABA (A), glycine (B), glutamate (C) antisera and positive control (D). A, B: The bouton 1 is immunopositive for both GABA and glycine. C: The bouton 2 is immunopositive for glutamate only. D: The bouton 1 contains mixture of flattened, oval and round synaptic vesicles, i.e. pleomorphic vesicles and makes symmetrical synaptic contact (arrows) with the dendrite. The bouton 2 contains mixture of clear and spherical synaptic vesicles and makes asymmetrical synaptic contact (arrowhead) with the dendrite. Scale bar=1 μ m.

다(Table 1). GABA, glycine 및 glutamate 면역양성반응을 나타내는 금입자들은 주로 사립체 및 연결소포위에 균일하게 분포하였다. 또한, 연결소포가 밀집된 부위에는 금입자의 밀도도 높았으며, 혈관의 내강과 같이 조직이 없는 resin부위에는 존재하지 않았다. GABA 및 glycine에 면역양성반응을 보이는 신경종말의 금입자 밀도는 연결이후 세포질의 금입자 밀도에 비하여 각각 9~11 및 6~7배 높았으며, glutamate에 양

성인 신경종말의 금입자 밀도는 약 7~8배 높았다.

GABA에 면역양성인 신경종말

턱끝혀근 운동신경원에서 관찰한 신경종말 중 5.3%인 33개에서 GABA에만 양성반응을 보였다. 33개의 GABA 면역양성 신경종말 중 세포체에는 9개, 가지돌기의 근위부, 중간부 및 원위부에는 각각 12개, 7개 및 5개가 관찰되었다. Synaptic covering (%)은 세포체와 가지돌기의 근위부에서 각각 3.8%와 4.1%로 비슷하였으나 가지돌기의 중간부와 원위부에서는 각각 2.2%와 2.8%로 관찰되어, GABA 면역양성 신경종말은 세포체에서 가지돌기의 원위부 쪽으로 감소되는 경향을 보였다(Table 2). GABA 면역양성 신경종말에는 타원형 또는 둥근 형태의 연결소포 및 약간의 치밀연접소포가 관찰되었고, 연결의 형태는 대칭성 연결을 이루고 있어 F 혹은 P형으로 분류할 수 있었다(Fig. 4D).

Glycine에 면역양성인 신경종말

턱끝혀근 운동신경원에서 관찰한 신경종말 중 14.2%인 88개에서 glycine에만 양성반응을 보였다. 88개의 glycine 면역양성 신경종말 중 세포체에는 24개, 가지돌기의 근위부, 중간부 및 원위부에는 각각 29개, 27개 및 8개가 관찰되었다. Synaptic covering (%)은 세포체와 가지돌기의 근위부에서 각각 9.8%와 9.3%로 비슷하였으나 가지돌기의 중간부에서는 7.7%로 감소되었고 원위부에서는 4.0%로 현저히 감소되는 경향을 보였다(Table 2). Glycine 면역양성 신경종말에는 타원형 또는 둥근 형태의 연결소포 및 약간의 치밀연접소포가 관찰되었고, 연결의 형태는 대칭성 연결을 이루고 있어 F 혹은 P형으로 분류할 수 있었다(Fig. 4D).

GABA와 glycine 모두에 면역양성인 신경종말

턱끝혀근 운동신경원에서 관찰한 신경종말 중 13.3%인 83개에서 GABA와 glycine 모두에서 양성반응을 보였다. GABA와 glycine 모두에서 양성반응을 보인 83개의 신경종말 중 세포체에는 23개, 가지돌기의 근위부, 중간부 및 원위부에는 각각 24개, 26개 및 10개가 관찰되었다(Fig. 4A, B). 각 부위

Table 1. Quantitative data on boutons covering genioglossus alpha motoneurons

Parameters	Soma	Dendrites*			All
		Pd	Id	Dd	
Number of somata and dendrites	3	14	35	28	77
Total membrane length (μ m)	288.4	346.6	378.3	203.7	
Number of boutons	157	188	181	96	465
Total length of boutons (μ m)	189.9	221.8	202.7	98.9	
Mean length of boutons (μ m)	1.2	1.2	1.1	1.0	
Percentage of synaptic covering	65.8	64.0	53.6	48.5	

*Dendrites of genioglossus alpha motoneurons are divided into three segments: primary (Pd), intermediate (Id), and distal (Dd)

Table 2. Quantitative data on boutons immunoreactive for GABA and/or glycine or glutamate or immunonegative for amino acids apposing the soma or dendrites of genioglossus alpha motoneurons

Parameters	Soma	Dendrites			All
		Pd	Id	Dd	
GABA only					
Number of boutons	9	12	7	5	24
% Boutons	5.7	6.4	3.9	5.2	5.2
Mean bouton length (μm)	1.2	1.2	1.2	1.1	
% Synaptic covering	3.8	4.1	2.2	2.8	
Glycine only					
Number of boutons	24	29	27	8	64
% Boutons	15.3	15.4	14.9	8.3	12.8
Mean bouton length (μm)	1.2	1.1	1.1	1.0	
% Synaptic covering	9.8	9.3	7.7	4.0	
GABA and glycine					
Number of boutons	23	24	26	10	60
% Boutons	14.7	12.8	14.3	10.4	12.5
Mean bouton length (μm)	1.1	1.2	1.1	1.1	
% Synaptic covering	9.1	8.2	7.4	5.4	
GABA and/or glycine					
Number of boutons	56	65	60	23	148
% Boutons	35.7	34.6	33.1	23.9	30.5
Mean bouton length (μm)	1.2	1.2	1.2	1.0	
% Synaptic covering	24.1	22.5	18.7	11.5	
Glutamate alone					
Number of boutons	60	71	70	42	183
% Boutons	38.2	37.8	38.7	43.8	40.1
Mean bouton length (μm)	1.3	1.2	1.2	1.0	
% Synaptic covering	27.7	25.4	22.6	23.3	
Immunonegative					
Number of boutons	41	52	51	31	134
% Boutons	26.1	27.6	28.2	32.3	29.4
Mean bouton length (μm)	1.2	1.1	1.1	0.9	
% Synaptic covering	16.6	16.5	14.6	14.3	

에서 관찰한 면역양성 신경종말의 평균 길이는 1.1-1.2 μm로 비슷하였다. Synaptic covering (%)은 세포체, 가지돌기 근위부, 중간부 및 원위부에서 각각 9.1%, 8.2%, 7.4% 및 5.4%로 관찰되어 세포체에서 가지돌기의 원위부 쪽으로 가면서 감소되는 경향을 보였다(Table 2). GABA나 glycine에 양성인 대부분의 신경종말은 F 혹은 P형으로 분류할 수 있었고 연결구조가 명확히 관찰되는 경우 대칭성 연결을 이루고 있었다(Fig. 4D).

Glutamate에 면역양성인 신경종말

턱끝허근 운동신경원에서 관찰한 신경종말 중 39.1%인 243개에서 glutamate에만 양성반응을 보였다. 243개의 glutamate 면역양성 신경종말 중 세포체에는 60개, 가지돌기의 근위부, 중간부 및 원위부에는 각각 71개, 70개 및 42개가 관찰되었다(Fig. 4C). Synaptic covering (%)은 세포체, 가지돌기 근위부, 중간부 및 원위부에서 각각 27.7%, 25.4%, 22.6% 및 23.3%로

관찰되어 세포체나 가지돌기의 각 부분 모두에서 비슷한 경향성을 나타내었다(Table 2). Glutamate 면역양성 신경종말에는 구형의 소포와 때때로 큰치밀연접소포가 관찰되었고, 연결의 형태는 비대칭성 연결을 이루고 있어 S, C 및 M형으로 분류할 수 있었다(Fig. 4D). 특히 S형이 가장 많았으며 C형은 소수 관찰되었고 M형은 매우 드물었다.

GABA, glycine 및 glutamate 모두에 면역음성인 신경종말

턱끝허근 운동신경원에서 관찰한 신경종말 중 28.1%인 175개에서는 3가지 아미노산에 대하여 음성반응을 보였다. Synaptic covering (%)은 세포체나 가지돌기의 각 부분 모두에서 비슷한 경향성을 나타내었다(Table 2). 각 면역음성 신경종말들의 함유 연결소포의 미세구조적 형태나, 연결의 형태, 신경종말의 형태 등에 있어서 뚜렷한 차이는 관찰할 수 없었다.

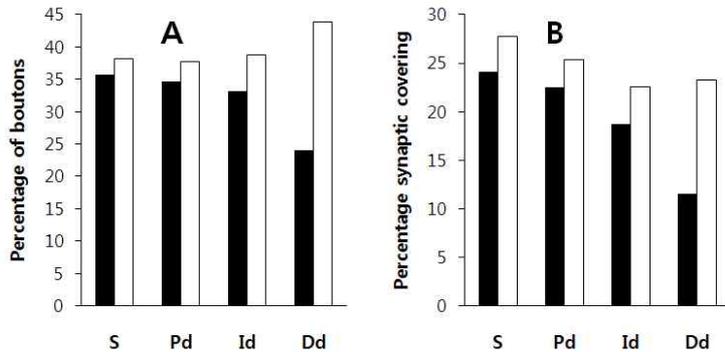


Fig. 5. Histograms showing the proportion (A) and the percentage of synaptic covering (B) of putative inhibitory synaptic boutons immunoreactive for GABA and/or glycine (closed columns) and putative excitatory boutons immunoreactive for glutamate (open columns) on the soma (S), primary dendrite (Pd), intermediate dendrite (Id), and distal dendrite (Dd) in genioglossus alpha motoneurons.

억제성 및 흥분성 신경종말의 비교

턱끝혀근 운동신경원에서 관찰한 신경종말 중 71.9%인 447개에서 GABA, glycine 또는 glutamate에 대한 양성반응을 보였다. 본 연구에서 관찰한 622개의 신경종말 중 204개(32.8%)는 GABA 또는 glycine에 양성반응을, 243개(39.1%)는 glutamate에 양성반응을 나타내었다. 이상의 결과들을 종합하였을 때 억제성 신경전달물질인 GABA 또는 glycine을 가지는 신경종말은 세포체에서 가지돌기로 갈수록 감소되어짐을 관찰할 수 있었고, 특히 가지돌기의 원위부에서 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 반면, 흥분성 신경전달물질인 glutamate를 가지는 신경종말은 세포체와 가지돌기 모두에서 큰 변화를 나타내지 않았다(Fig. 5).

고 찰

본 연구에서 GABA와 glycine은 혀밑신경핵의 운동신경원에 대해 연결후 억제제를 통하여 혀운동에 대한 조절기능을 가짐을 확인할 수 있었다. 혀밑신경핵 운동신경원으로의 억제성 입력은 세포체에서 가지돌기의 원위부로 갈수록 신경종말의 수나 밀도에서 약하게 나타났다. 또한 glutamate는 턱끝혀근의 수축을 위한 흥분성 신경전달물질로 작용함을 확인할 수 있었으며, 흥분성 입력은 세포체와 가지돌기 모두에서 유의한 차이 없이 일정하게 분포함을 알 수 있었다.

본 연구에서 HRP에 의하여 표식된 턱끝혀근 운동신경원은 24-30 μm 의 크기에서 최빈치를 가지는 분포를 나타내었는데, 실험적으로 분석한 운동신경원은 30 μm 이상의 크기에 하나 이상의 C형 신경종말과 복잡한 가지돌기를 가지는 알파 운동신경원을 대상으로 하였다. 이전 연구에서 알파 운동신경원의 특징은 척수, 얼굴신경핵 그리고 삼차신경핵 등에서 보고된 바 있으며[6,8,9,15], 특히 척수의 운동신경핵에서 관찰되는 대부분의 알파 운동신경원은 세포막의 40% 이상이 신경종말에 의하여 덮여져 있다고 보고되어 있다[9,19]. 이상의 결과들과 이전의 연구들을 종합해 볼 때 본 연구에서 분석한 운동신경원은 턱끝혀근의 수축을 주도적으로 담당하는 알파 운동신경원이라 추측된다.

신경종말의 기능이 연결세포의 모양과 관련을 가진다는 Uchizono [26]와 Bodian [3]의 보고 이후 척수[9,14,19]와 삼차신경계[1,22]에서 전자현미경을 이용한 면역조직화학기법을 통하여 구형의 연결세포를 함유한 S형 신경종말은 흥분성 신경전달물질인 glutamate에 면역반응을 나타내고, 납작한 연결세포를 함유한 F형 및 다형의 세포를 함유한 P형 신경종말은 억제성 신경전달물질인 GABA나 glycine, 혹은 둘 모두에 면역반응을 나타낸다고 보고되었다. 본 연구에서도 대부분의 GABA나 glycine에 면역양성인 신경종말은 F형 또는 P형이었으며, 연결의 형태가 잘 관찰되는 경우 대칭연접형태를 보였다. 또한 glutamate에 면역양성인 신경종말은 구형의 연결세포를 함유하고 있으며 비대칭연접의 형태를 가지는 S형이 대부분이었으며 소수의 C형과 M형도 관찰되었다.

일부 전기생리학적 연구를 보면 혀신경[12]이나 근육 중심신경[10] 혹은 그물구성체[5]를 자극하였을 때 운동신경세포에 나타나는 억제성 연결후전위(IPSP)는 glycine의 길항제인 strychnine에 의해서는 차단되지만 GABA의 길항제인 bicuculline이나 picrotoxin에 의해서는 영향을 받지 않는다고 한다. 이러한 결과들은 운동신경원의 억제에 GABA 보다는 glycine이 주로 사용된다는 것을 의미한다. 본 실험 결과에서도 GABA 양성 신경종말에 비하여 훨씬 더 많은 glycine 양성 신경종말이 혀밑신경핵 운동신경원과 연결을 이루고 있음을 확인할 수 있었다. 즉 턱끝혀근 운동신경원의 경우 glycine 양성 종말이 27.5%이며 GABA 양성 종말이 18.6%이었다. 이러한 결과는 이전의 척수[9,19] 및 삼차신경운동핵[1,28]에서의 결과와 일치한다. 이와 같이 glycine성 신경종말이 GABA성 신경종말에 비하여 더 많이 분포하는 것은 연결 후 운동신경종말의 억제에 있어서 GABA에 비하여 glycine이 주된 역할을 한다는 전기생리학적 결과와 일치한다[4,11].

불필요한 운동신경원의 흥분을 방지하기 위하여 흥분성 연결후전위를 차단하는 데는 먼쪽 가지돌기 보다는 세포체나 몸쪽 가지돌기의 억제성 입력이 훨씬 강력하고 효과적이다. 본 연구에서도 GABA나 glycine에 양성인 신경종말이 턱끝혀근 운동신경원에 인접하고 있는 비율은 가지돌기의 원위부에 비하여 높게 나타났다. 즉, GABA나 glycine에 양성인 신경종

말은 세포체(35.7%)에 비하여 가지돌기의 원위부(23.9%)에서 급격히 감소되었다. 이러한 결과는 척수 운동신경원[17,19]과 삼차신경핵 운동신경원[1,23]에서의 보고와 동일한데, 이는 운동신경원에 있어서 억제성 신호입력의 위치가 중요하다는 것을 말해 준다.

본 연구를 통하여 턱끝혀근 지배 운동신경원은 세포체와 가지돌기의 부위에 따라 GABA, glycine 및 glutamate를 함유하는 전운동신경원들에 의해 서로 다른 양식의 제어를 받고 있다는 것을 알 수 있었으며, 운동신경원의 부위에 따른 이러한 억제성 및 흥분성 연결입력 양식의 차이는 유연한 혀운동의 제어기전과 밀접한 관련이 있을 것으로 추정된다.

감사의 글

이 연구는 2006년도 대구가톨릭대학교 의과학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

References

- Bae, Y. C., T. Nakamura, H. J. Ihn, M. H. Choi, A. Yoshida, M. Moritani, S. Honma, and Y. Shigenaga. 1999. The distribution pattern of inhibitory and excitatory synapses in the dendritic tree of single masseter α -motoneuron in the cat. *J. Comp. Neurol.* **414**, 454-468.
- Bailey, E. F. and R. F. Fregosi. 2004. Coordination of intrinsic and extrinsic tongue muscles during spontaneous breathing in the rat. *J. Appl. Physiol.* **96**, 440-449.
- Bodian, D. 1966. Synaptic types on spinal motoneurons: an electron microscopic study. *Johns Hopkins Med J.* **119**, 16-45.
- Chandler, S. H., S. A. Nielsen, and L. J. Goldberg. 1985. The effects of a glycine antagonist strychnine on cortically induced rhythmical jaw movements in the anaesthetized guinea pig. *Brain Res.* **325**, 181-186.
- Chirwa, S. S., I. Stafford-Segert, P. J. Soja, and M. H. Chase. 1991. Strychnine antagonizes jaw-closer motoneuron IPSPs induced by reticular stimulation during active sleep. *Brain Res.* **547**, 323-326.
- Conradi, S. 1969. Ultrastructure and distribution of neuronal and glialelements on the motoneuron surface of the spinal cord of the adult cat. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **332**, 5-48.
- Cunningham Jr, E. T. and P. E. Sawchenko. 2000. Dorsal medullary pathways subserving oromotor reflexes in the rat: implications for the central neural control of swallowing. *J. Comp. Neurol.* **417**, 448-466.
- Davidoff, M. S. and A. P. Irinchev. 1986. Acetylcholinesterase activity and type C synapses in the hypoglossal, facial and spinal-cord motor nuclei of rats. An electron-microscope study. *Histochem.* **84**, 515-524.
- Destombes, J., G. Horcholle-Bossavit, and D. Thiesson. 1992. Distribution of glycinergic terminals on lumbar motoneurons of the adult cat: an ultrastructural study. *Brain Res.* **599**, 353-360.
- Eldridge, F. L., D. E. Millhorn, and T. Waldrop. 1987. Spinal inhibition of phrenic motoneurons by stimulation of afferent from leg muscle in the cat: blockade by strychnine. *J. Physiol.* **389**, 137-146.
- Enamoto, S., N. Katakura, T. Sunada, T. Takayama, Y. Hirose, Y. Ishiwata, and Y. Nakamura. 1987. Cortically induced masticatory rhythm in masseter motoneurons after blocking inhibition by strychnine and tetanus toxin. *Neurosci. Res.* **4**, 396-412.
- Felpe, L. P. 1977. Effects of strychnine, bicuculline and picrotoxin on inhibition of hypoglossal motoneurons. *J. Neurosci. Res.* **3**, 289-294.
- Gestreau, C., M. Dutschmann, S. Obled, and A. L. Bianchi. 2005. Activation of XII motoneurons and premotor neurons during various oropharyngeal behaviors. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **147**, 159-176.
- Holstege, J. C. 1991. Ultrastructural evidence for GABAergic brain stem projections to spinal motoneurons in the rat. *J. Neurosci.* **11**, 159-167.
- Kellerth, J. O., C. H. Berthhold, and S. Conradi. 1979. Electron microscopic studies of serially sectioned cat spinal α -motoneurons III. Motoneurons innervating fast-twitch (type FR) units of the gastrocnemius muscle. *J. Comp. Neurol.* **184**, 755-768.
- Krammer, E. V., T. Rath, and M. F. Lischka. 1979. Somatotopic organization of the hypoglossal nucleus: a HRP study in the rat. *Brain Res.* **170**, 533-537.
- Örnung, G., O. P. Ottersen, S. Cullheim, and B. Ulfhake. 1998. Distribution of glutamate-, glycine- and GABA-immunoreactive nerve terminals on dendrites in the cat spinal motor nucleus. *Exp. Brain Res.* **118**, 517-532.
- Örnung, G., B. Ragnarson, G. Grant, O. P. Ottersen, J. Storm-Mathisen, and B. Ulfhake. 1995. Ia boutons to CCN neurones and motoneurones are enriched with glutamate-like immunoreactivity. *NeuroReport* **6**, 1975-1980.
- Örnung, G., O. Shupliakov, H. Linda, O. P. Ottersen, J. Storm-Mathisen, B. Ulfhake, and S. Cullheim. 1996. Qualitative and quantitative analysis of glycine- and GABA-immunoreactive nerve terminals on motoneuron cell bodies in the cat spinal cord: a postembedding electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* **365**, 413-426.
- Peever, J. H., L. Shen, and J. Duffin. 2002. Respiratory pre-motor control of hypoglossal motoneurons in the rat. *Neuroscience* **110**, 711-722.
- Roda, F., C. Gestreau, and A. L. Bianchi. 2002. Discharge patterns of hypoglossal motoneurons during fictive breathing, coughing, and swallowing. *J. Neurophysiol.* **87**, 1703-1711.
- Saha, S., K. Appenteng, and T. F. C. Batten. 1991. Quantitative analysis and postsynaptic targets of GABA-immunoreactive boutons within the rat trigeminal motor nucleus. *Brain Res.* **561**, 128-138.
- Shigenaga, Y., M. Moritani, S. J. Oh, K. P. Park, S. K. Paik, H. N. Kim, S. K. Ma, C. W. Park, A. Yoshida, O. P. Ottersen, and Y. C. Bae. 2005. The distribution of inhibitory and excitatory synapses on single, reconstructed jaw-opening mo-

- toneurons in the cat. *Neuroscience* **133**, 507-518.
24. Taal, W. and J. C. Holstege. 1994. GABA and glycine frequently colocalize in terminals on cat spinal motoneurons. *NeuroReport* **5**, 2225-2228.
25. Travers, J. B. and L. Rinaman. 2002. Identification of lingual motor control circuits using two stains of pseudorabies virus. *Neuroscience* **115**, 1139-1151.
26. Uchizono, K. 1965. Characteristics of excitatory and inhibitory synapses of the central nervous system of the cat. *Nature* **207**, 642-643.
27. Weinberg, R. J. and S. L. Van Eyck. 1991. A tetramethylbenzidine/tungstate reaction for horseradish peroxidase histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 1143-1148.
28. Yang, H. W., K. Appenteng, and T. F. C. Batten. 1997. Glycine-immunoreactive terminals in the rat trigeminal motor nucleus: light-and electronmicroscopic analysis of their relationship with motoneurons and with GABA-immunoreactive terminals. *Brain Res.* **749**, 301-319.

초록 : 흰쥐의 턱끝혀근 지배 운동신경원에 대한 억제성 및 흥분성 신경종말의 분포 양식

문용석*

(대구가톨릭대학교 의과대학 해부학교실)

턱끝혀근은 호흡을 위해 상부기도를 확보하는 중요한 근육이지만 정상적으로 수축하지 못하면 상부기도를 폐쇄함으로써 호흡장애가 생길 수 있다. 이것은 턱끝혀근을 지배하는 운동신경원의 연접입력 이상으로 생각하고 있으나 이러한 연접입력에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 흰쥐의 턱끝혀근을 지배하는 운동신경원과 연접하는 억제성 및 흥분성 신경종말의 분포 양식에 대해 분석하고자 하였으며, 이를 위해 신경추적자인 HRP를 주입하여 턱끝혀근 지배 운동신경원을 표식하고, 운동신경원을 세포체와 가지돌기의 근위부, 중간부 및 원위부로 구분한 후, 전자현미경용 연속절편을 제작하여 GABA, glycine 및 glutamate 항체를 사용한 postembedding immunogold histochemistry를 시행하였다. 정량적 분석은 3개의 턱끝혀근 운동신경원에 연접한 622개의 신경종말 중 157개는 세포체에서, 188개는 14개의 가지돌기 근위부에서, 181개는 35개의 가지돌기 중간부에서, 96개는 28개의 가지돌기 원위부에서 각각 연접 양상을 분석하였다. 관찰한 신경종말의 71.9%에서 사용된 3종류의 아미노산에 대한 면역양성반응이 나타났는데 이 중 32.8%는 GABA 또는 glycine에 대한 면역양성반응을 보였고, 39.1%는 glutamate에 대한 면역양성반응을 보였다. GABA 또는 glycine에 대한 면역양성 신경종말 중 14.2%는 glycine에만 면역양성반응을 보였고, 13.3%는 glycine과 GABA에 동시에 면역양성반응을 보였으며, 5.3%만이 GABA에만 면역양성반응을 보였다. 억제성 아미노산에 면역양성반응을 보인 신경종말에는 납작하거나, 타원형 또는 둥근 형태의 연접소포가 함유된 반면, 흥분성 아미노산에 면역양성반응을 보인 신경종말에는 구형의 소포와 약간의 큰 치밀연접소포가 함유되어 있었다. 억제성 신경종말과 흥분성 신경종말의 분포 비율은 가지돌기 원위부에서 각각 23.9% 대 43.8%로 가장 높았지만, 세포체(35.7% 대 38.2%), 가지돌기의 근위부(34.6% 대 37.8%), 및 중간부(33.1% 대 38.7%)에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 억제성 신경종말의 synaptic covering (%)은 세포체에서 가지돌기 원위부로 갈수록 감소되었지만, 흥분성 신경종말의 synaptic covering (%)은 각 부위에서 큰 차이를 나타내지 않았다. 본 연구를 통하여 턱끝혀근 지배 운동신경원은 세포체와 가지돌기의 부위에 따라 GABA, glycine 및 glutamate를 함유하는 전운동신경원들에 의해 서로 다른 양식의 제어를 받고 있다는 것을 알 수 있었으며, 운동신경원의 부위에 따른 이러한 억제성 및 흥분성 연접입력 양식의 차이는 유연한 혀운동의 제어기전과 밀접한 관련이 있을 것으로 추정된다.