

Morphological characteristics of Neural Tissue and Corazonin Neurons of Central Nervous System in Larval Stage of Scuttle Fly

Hohyun Park^{†,*}

Department of Biomedical Laboratory Science, Mokpo Science University,
Mokpo-si, Jeollanam-do 58644, Korea

Through previous studies, the central nervous system (CNS) was collected by dividing the scuttle fly into larval, pupa, and adult stages by developmental stage, and the morphological characteristics were observed. *In situ* hybridization (ISH) using the collected central nervous system, it was possible to confirm the location and extent of expression of the neurotransmitter corazonin (Crz) at each stage of development. In this study, paraffin specimens were prepared using central nervous system tissues of 3rd instar larval stage of scuttle fly, which had completed *in situ* hybridization, and general histochemical staining (hematoxylin-eosin, H-E) and special histochemical staining (luxol fast blue-cresyl violet) was performed to observe the histological and cytological morphology characteristics of corazonin neurons. As a result, a variety of nerve cell body existed between many myelin sheath. The corazonin neurons compose cortex of central nervous system with other neurons congregating in this tissue and show larger cell body relatively in neurohistochemical analysis.

Key Words: Scuttle fly, Corazonin, Central nerve system, Larval stage, Hematoxylin-eosin, Luxol fast-cresyl violet

서 론

최근에 가장 연구가 많이 진행되고 있는 초파리 종의 하나로 *Drosophila melanogaster*는 scuttle fly와 유사한 구조 및 특징 등이 많이 관찰되었고, 말기 배에서부터 애벌레 3령 까지 24개의 세포를 가지고 있는 3개의 신경 그룹에서 corazonin 뉴런이 나타난다고 보고하였다(Shiga et al., 2003).

또한 복신경색(ventral nerve cord, VNC) 조직에서 1개의 신경 그룹, 대뇌(brain) 조직에서 2개의 신경 그룹이 관찰된다고 하였다(Choi et al., 2005; Lee et al., 2008; Choi, 2009). 대뇌 조직에서 등측면 안쪽으로 발현되어진 corazonin 뉴런은 유충호르몬(juvenile hormone)과 지질동원호르몬(adi-

pokinetic hormone)을 분비하는 후두 쪽에서 관찰되고, 오직 등측면 쪽의 신경원 1개의 그룹은 성충 시기까지 지속되어 발현된다고 하였다. Corazonin 뉴런은 복부 신경절에서 새로운 개재 뉴런 4개 그룹과, 시엽 외측 부위의 1개엽 당 6~8개 정도의 많은 신경세포가 집단으로 발현되고 있다고 보고되었다(Choi et al., 2005; Choi et al., 2006; Lee et al., 2008; Lee et al., 2011).

그래서 corazonin 뉴런이 생산되고 있는 공간적 분포 구역은 비교적 중추신경계 조직 안에 잘 보존되고 있고(Veenstra and Davis, 1993; Cantera et al., 1994; Hansen et al., 2001; Choi et al., 2005; Roller et al., 2003; Roller et al., 2006; Verleyen et al., 2006), 신경 조직을 구성하는 신경세포와 신경분비세포들의 작은 집합체로 발현되어 관찰되었다(Choi et al., 2005; Choi et al., 2008). 대뇌 조직에서 핵심 발

Received: November 14, 2022 / Revised: December 8, 2022 / Accepted: December 12, 2022

*Professor.

[†]Corresponding author: Hohyun Park. Department of Biomedical Laboratory Science, Mokpo Science University, Mokpo-si, Jeollanam-do 58644, Korea. Tel: +82-61-270-2745, Fax: +82-61-270-2745, e-mail: phh7082@hanmail.net

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

현 부위로는 외측 부분(pars lateralis) 쪽에 존재하고 있는 신경내분비세포 그룹 부분이고, 이러한 부위 뿐만 아니라 초파리 종(species)에 따라서도 종 특이적으로 발현된 부위가 발견되고 있었다. 특징적으로, 시엽 수질(optic lobe medulla) 쪽에서 수많은 corazonin 뉴런이 발현되어 관찰되고 있는 초파리 종으로는 *Drosophila melanogaster*로 많이 보고되었다(Choi et al., 2005; Lee et al., 2008).

이전 연구에서 scuttle fly의 애벌레 시기의 중추신경계에서 발현된 corazonin 뉴런은 2령 애벌레 시기에는 대뇌 조직의 전대뇌(procerebrum) 등쪽 측면(dorsolateral, DL) 가장자리 쪽에서 3 쌍의 corazonin 뉴런들이 진하게 발현되었고, 양쪽의 대뇌 조직에서 등중양(dorsomedial, DM) 쪽에 1쌍, 복신경색 조직상에서도 좌우로 8쌍이 뚜렷하게 관찰되었다. 3령 애벌레 시기에는 애벌레 2령 시기와 비슷한 패턴이지만 전대뇌의 등쪽 측면(DL) 부분 보다 전대뇌 등쪽 중양(DM) 부분이 뉴런의 발현이 약해져 있었고 3령 후기에는 뉴런이 하나의 쌍으로 관찰되지 않을 때도 있었다. 복신경색 조직도 좌우 대칭 8쌍의 corazonin 뉴런 중에서 맨 앞 2쌍의 corazonin 뉴런은 뚜렷하지만 3번째 corazonin 뉴런부터는 점점 약해지는 것을 볼 수가 있었다(Park, 2020).

번데기(pupae) 시기는 중추신경계에서 corazonin 뉴런의 2개의 그룹이 사라지고 1개의 그룹에서만 발현하였다. 애벌레 시기에서의 corazonin 뉴런을 발현되었던 전대뇌 등중양(DM) 양쪽 1쌍, 복신경색 8쌍이 번데기로 번데기가 일어나면서 사라져 버리는 것을 관찰하였고, 시엽의 전대뇌 등측면(DL) 쪽에서 3쌍은 아직도 뚜렷하게 발현되고 있었다. 3쌍의 corazonin 뉴런은 번데기 시기 동안에 계속 발현되고 있었으며 시엽 발달로 인해 중양쪽으로 수렴되었고 번데기 말기에는 지속적으로 중양 부위에 위치하였다.

성충(adult fly) 시기에는 중추신경계에서 corazonin 뉴런은 3쌍의 등측면(DL) 쪽의 정중양에 좌우로 배치되었고, 대뇌 조직의 등쪽 측면(DL) 부분에서 발현된 3쌍의 corazonin 뉴런이 전대뇌 앞쪽의 중양쪽 뇌간 부분(pars intercerebralis)에서 집합되어 존재하는 것을 관찰할 수 있었다(Park, 2021).

위와 같이 이전 연구를 통하여 scuttle fly 애벌레, 번데기, 성충 시기 발생 단계별로 중추신경계에서의 corazonin 뉴런에 대한 발현 양상 및 형태학적 변화 등을 살펴보았다.

본 연구에서는 초파리 종 중에서 *Drosophila melanogaster*

가 중추신경계 조직에 대해 많은 연구가 되어 있지만 아직까지는 신경 조직학적 및 세포학적 구조의 형태에 대해서는 연구가 이루어지고 있지 않았다. 그래서 *Drosophila melanogaster*에 비해 연구가 많이 되어 있지 않은 희귀 초파리 종인 scuttle fly의 중추신경계 조직을 채취하여 이전 연구의 제자리혼성화법(ISH)을 이용해서 corazonin 뉴런을 발현시킨 애벌레 3령의 중추신경계 조직을 사용해서 파라핀 표본을 만들었고, 일반 및 특수조직학적 염색을 실시하여 신경의 조직 및 세포학적 구조와 형태적 특징, 발현된 corazonin 뉴런과 다른 신경세포들과의 신경세포학적 특징 등을 살펴보기로 하였다.

재료 및 방법

사육(feeding)

실험에 이용한 scuttle fly는 *Megaselia scalaris*라는 학명을 가진 fly이며, 초파리와 동일한 먹이를 이용하여 사육하였다. 사육을 위하여 증류수 250 mL에 dextrose 16 g, yeast flakes 6.5 g, cornmeal 20 g, agar 2.25 g을 교반기를 이용하여 혼합하고 전자렌지에서 10분 정도 끓여 넘치지 않을 정도로 가열하였다. 그리고 methylparaben 6.25 mL를 천천히 떨어뜨려서 혼합하고 배지 통에 부은 후 식힌 다음 성충을 이동시켜 사육을 하였다. 사육은 1주일 간격으로 다른 배지에 성충을 옮겨서 지속적으로 시행하였다. 제작된 사육 배지는 4°C 냉장고에 보관하였으며 사용 전 실온에 맞추기 위해 미리 꺼내 놓은 후 사용하였다.

중추신경계 조직의 채취 및 준비(collection and preparation of CNS tissue)

Scuttle fly의 애벌레(larvae) 3령 3~5일 시기의 5개 이상 개체를 사용하였다. 0.1% tween 20이 포함되어 있는 PBS(phosphate buffer solution, pH 7.0)가 채워져 있는 흡인 슬라이드에 개체를 담근 상태로 실체현미경(stereomicroscopy) 상에서 가늘고 정밀한 핀셋을 이용하여 번데기, 성충의 껍질 부분을 찢어가면서 채취하였고, 중추신경계 조직인 대뇌와 복신경색 조직을 적출하여 4% paraformaldehyde 용액에 넣은 후 4°C 냉장고에 1시간 이상 고정하여 보관하였다. 그리고 이전 연구를 통하여 Probe 제작하여 제자리혼성화법(in situ hybridization, ISH)을 이미 완료한 애벌레 3령 시기의 중추신경계 조직 검체를 그대로 이용하였다(Park, 2020) (Table 1).

Table 1. Base sequences of primers used for PCR amplification in scuttle fly of corazonin gene & structure of *Crz* gene in scuttle fly

Name of primers	Sequences (5' → 3')
Scut5' Crz_HindIII	5'-cgaagcttGAGTCGATTCCGATATTC
Scut3' Crz_XbaI	5'-ggctctagaCTTCAAATGCGAAACCACA



A; map for the *Crz* coding region
 B; sequences of the genomic *Crz* gene
 The coding sequences are shown in capital letters and 5'-UT, intron, 3'-UT sequences are shown in lower case.

조직표본 제작(tissue specimen production)

이전 연구를 통하여 제자리혼성화법(ISH)을 완료시킨 후 scuttle fly의 애벌레(larvae) 3령 시기의 중추신경계 조직을 바로 이용해서 완전히 증류수에 수세한 다음 탈수 과정을 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% alcohol에서 각각 10분간 시행하였고, 다음으로 투명 과정을 xylene을 이용하여 10분간 두 번에 걸쳐 시행하였다.

투명 과정이 끝난 후 60°C 열판 위에 금속 용기를 올려놓고 파라핀(Leica, Germany)을 녹인 후 투명 과정이 끝난 조직 들을 옮겨놓고 1~2시간 정도 침투 작업을 실시 하였다. 침투가 끝난 후 포매장치(Sandon, USA) 위에서 금속 포매 틀을 올려놓고 실체현미경을 이용하여 조직을 정밀하고 예리한 핀셋으로 정돈시킨 후 조직카세트를 올려놓고 녹아있는 파라핀을 끝까지 채운 후 -5°C의 냉각판에 위치시켜 포매 작업을 완료하여 파라핀 블록을 제작 하였다.

포매가 완료된 파라핀 블록을 회전형박절기에 장착하

여 4 μm의 두께의 절편을 만들고 45°C의 부유 온수조에 띄운 후 유리슬라이드에 조직절편을 붙여서 60°C 슬라이드 신전기(slide warmer)에 30분 정도 올려놓아 조직과 슬라이드를 열에 의해 부착시키면서 조직표본 제작 과정을 완료하였다.

헤마톡실린-에오진 염색(hematoxylin-eosin stain)

Scuttle fly에서 애벌레의 중추신경계 조직의 형태를 관찰하기 위하여 조직표본 제작 과정이 끝난 애벌레 3령 시기의 중추신경계 조직표본 슬라이드를 xylene이 들어있는 용기에 10분간 세 번에 걸쳐서 탈파라핀 단계를 시행하였고, 다음으로 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% alcohol을 이용하여 함수 과정을 통하여 증류수에 수세를 하였다.

헤리스 헤마톡실린(Harris hematoxylin)을 이용하여 핵 염색을 시행하였고, 약간의 수세를 한 후 분별액(1% HCl in 70% alcohol)을 이용하여 핵 이외의 염색액을 제거하였으며 증류수에 충분한 수세를 하여 중화 과정을 시행하였다(Bracegirdle et al., 2002; Gill, 2009; Carson and Hladik, 2009; Cardon, 2007; Titford, 2005).

다음으로 에오진(eosin) 염색액을 이용하여 세포질 및 결합 조직 등의 염색을 시행한 다음 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% alcohol을 이용하여 각각 1분간 탈수 과정을 시행하였다. 탈수 과정이 끝난 후 xylene으로 세 번에 걸쳐 1분간 투명 과정을 끝마치고 canada balsam에 투명제인 xylene을 소량 넣어서 녹인 후 봉입 작업을 시행하였고, H&E (hematoxylin&eosin) 염색 슬라이드 제작을 완성시켜 광학현미경을 이용하여 중추신경계 조직을 관찰하였다.

룩솔 패스트 블루-크레실 바이오렛 염색(Luxol fast blue-cresyl violet stain)

Scuttle fly 애벌레의 중추신경계 조직에서의 세포학적 특징을 관찰하기 위하여 이전에 연구되어진 제자리혼성화법(ISH)으로 corazonin 뉴런이 발현된 애벌레 3령 시기의 중추신경계 조직을 가지고 조직표본 제작 과정을 실시하여 파라핀 조직표본 슬라이드를 제작하여 신경세포와 수초 염색방법인 luxol fast blue-cresyl violet 염색을 시행하였다.

제작된 조직표본 슬라이드를 xylene이 들어있는 용기에 각각 10분간 세 번에 걸쳐서 파라핀을 제거하는 단계를 시행하였다. 100%, 95% alcohol을 이용하여 각각 3분간 xylene 제거를 하였다. Luxol fast blue (Sigma, USA) 제작 용액을 염색 용기에 미리 만들어 37°C 항온기에 넣어 온

도를 맞춘 후 탈파라핀이 완료된 조직표본 슬라이드를 넣어 16~24시간 동안 염색을 하였다. 염색이 끝난 후 95% alcohol을 이용하여 과량의 염색시약을 제거하고 0.05% lithium carbonate 용액에서 10초 정도 분별한 다음, 즉시 70% alcohol로 옮겨 수초 이외의 교원섬유 등에 염색된 청색을 제거한 후 증류수로 수세하였다(Bancroft and Gamble, 2008; Carson and Hladik, 2009).

다음으로 cresyl violet (Sigma, USA) 제작 용액을 염색 용기에 미리 37°C 항온기에 넣어 온도를 올린 후 luxol fast blue 염색이 끝난 슬라이드를 20분 동안 염색을 하였다. 염색이 끝난 후 증류수를 이용하여 수세하고 일정시간 70% alcohol에 담가두고 1~2초 동안 분별액(95% alcohol 90 mL, chloroform 10 mL, glacial acetic acid 3 drops)에 넣어서 바로 95% alcohol을 이용하여 분별액을 제거하였다(Klüver and Barrera, 1953; Luna, 1992).

95%, 100%, 100% alcohol을 이용하여 탈수 과정을 시행한 후 xylene으로 세 번에 걸쳐 3분간 투명 과정을 끝마치고 canada balsam에 투명제인 xylene을 소량 넣어 녹인 후 봉입 작업을 시행하여 염색 슬라이드 제작을 완성시켜 광학현미경을 이용하여 corazonin 발현 부위와 주위의 다른 신경세포 등의 특징을 관찰하였다.

결 과

신경조직학적 특징

Scuttle fly에서 애벌레 3령 시기의 중추신경계 조직을 파라핀 표본을 제작하여 일반 염색(H&E stain)을 통하여 조직학적 구조를 살펴 보았다.

대뇌(brain) 조직의 경우는 사람의 대뇌와 같이 겉질(cortex) 쪽에 신경세포체(nerve cell body)들이 구성되어 있었고, 속질(medulla) 쪽은 신경섬유와 결합 조직으로 이루어져 있었다. 신경세포체가 밀집한 피질 부위에는 여러 종류의 신경세포가 관찰되고 있었고, 주로 피라미드 세포(pyramidal cell)와 별 세포(stellate cell) 등이 가장 많이 존재하고 있었다. 아울러 신경세포의 말미집(myelin sheath)과 신경섬유가 주변에 많이 관찰이 되지만 뚜렷하지는 않았다. 안쪽의 속질 부위에는 거의 핵을 가지고 있는 신경세포가 존재하지 않았고 신경섬유와 결합 조직 등으로만 채워져 있는 구조로 관찰이 되었다(Fig. 1).

복신경색(ventral nerve cord, VNC) 조직의 경우는 사람의 척수와 달리 대뇌 조직과 마찬가지로 바깥쪽에 신경세포체가 밀집되고, 안쪽에 섬유조직으로 나누어져 있었

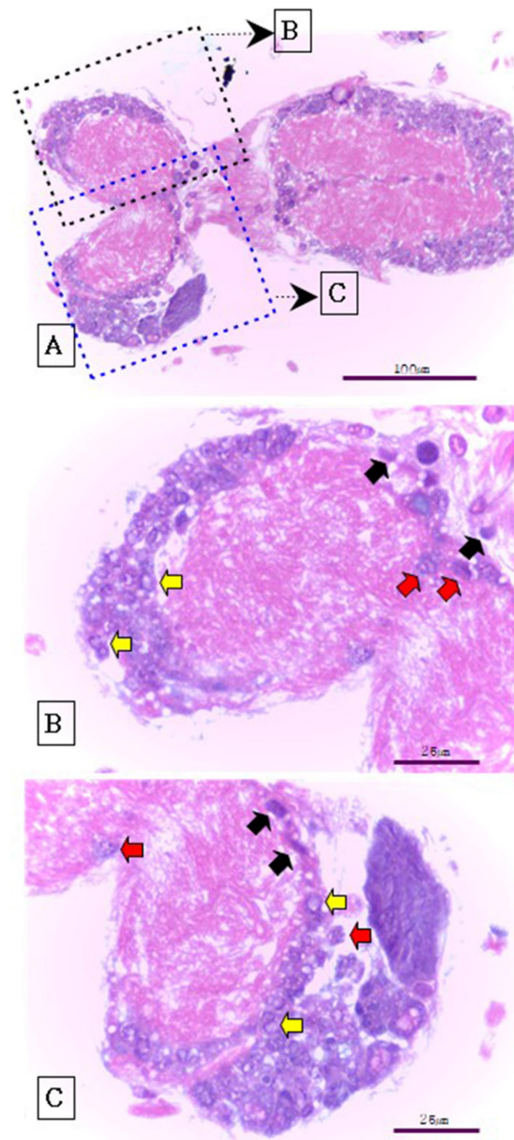


Fig. 1. Histochemical staining of brain of central nerve system (CNS) in the scuttle fly larval period by hematoxylin-eosin (H-E) stain. A; whole sample ($\times 100$). B, C; partial enlargement of brain ($\times 400$). Black arrows, pyramidal cell; red arrows, stellate cell; yellow arrows, myelin sheath.

다. 바깥쪽 피질 부분에는 피라미드 세포, 별 세포, 신경절 세포(ganglion cell) 등이 많이 관찰이 되었고, 주위에 신경섬유, 말미집으로 채워져 있는 구조를 하고 있었지만 뚜렷하게 관찰이 되지는 않았다. 안쪽의 속질 부분은 신경섬유와 결합 조직으로 구성된 구조를 하고 있었으며 대뇌 조직과 다른 점은 중앙 부분에 T자 형태로 핵을 가지고 있는 신경세포들이 존재하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

신경세포학적 특징

Scuttle fly에서 애벌레 3령 시기의 중추신경계 조직을 제자리혼성화법(ISH)을 이용해서 corazonin 뉴런을 염색한 다음 이것을 다시 파라핀 표본을 만들어서, 염색된 corazonin 뉴런을 비롯하여 주위의 신경세포 및 니슬소체(Nissle body) 또는 말리집을 뚜렷하게 보기 위해 말리집-니슬소체 염색(luxol fast blue-cresyl violet stain)을 시행하여 신경세포학적인 특징을 관찰하였다.

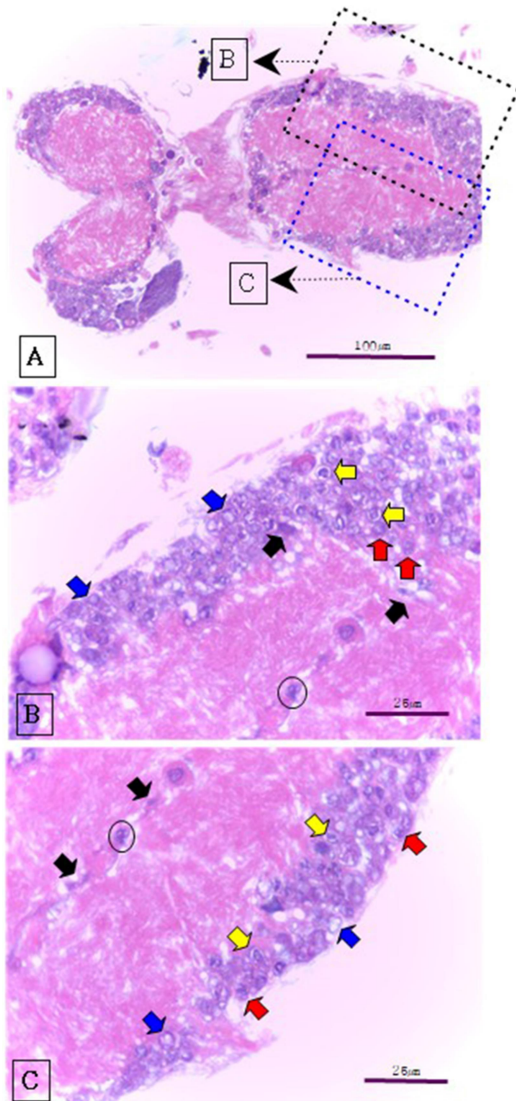


Fig. 2. Histochemical staining of ventral nerve cord (VNC) of central nerve system (CNS) in the scuttle fly larval period by hematoxylin-eosin (H-E) stain. A; whole sample ($\times 100$). B, C; partial enlargement of VNC ($\times 400$). Black arrows, pyramidal cell; red arrows, stellate cell; yellow arrows, ganglion cell; blue arrows, myelin sheath; ring, 'T' shaped nucleus.

애벌레 3령 시기의 중추신경계 대뇌 조직에서 세포들을 살펴보면 제일 눈에 띄는 것은 말리집이 많이 존재하고 있는 것을 관찰하였다. 말리집은 축삭(axon)을 감싸고 있는 부분으로 축삭은 거의 대부분 지방으로 되어 있어서 염색이 되지 않고, 말리집만 짙은 파란색으로 염색이 되어 관찰되었다. 많은 말리집 사이에 다양한 신경세포의 신경세포체가 존재하고 있었으며 신경세포체 안에 핵은 크고 둥그런 모습으로 하얗게 보였다. 신경세포의 세포체

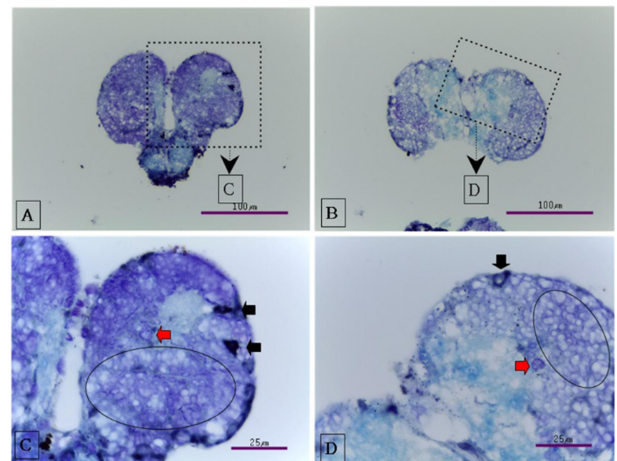


Fig. 3. Cytological staining of brain of central nerve system (CNS) in the scuttle fly larval period by luxol fast blue-cresyl violet stain. A, B; whole sample ($\times 100$). C, D; partial enlargement of brain ($\times 400$). Black arrows, corazonin-expressing neuron; red arrows, Nissl body; elliptical rings, myelin sheath.

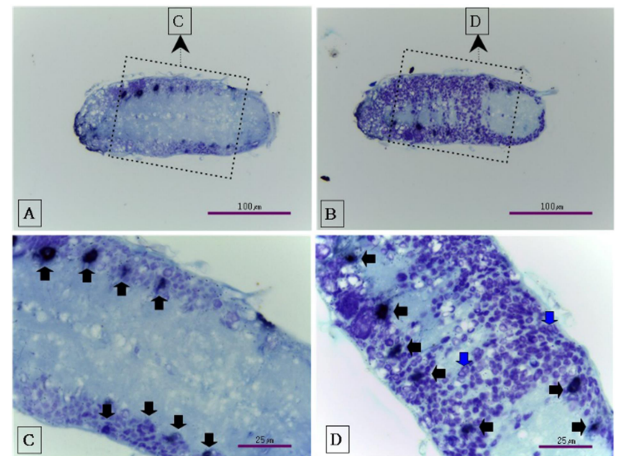


Fig. 4. Cytological staining of ventral nerve cord (VNC) of central nerve system (CNS) in the scuttle fly larval period by luxol fast blue-cresyl violet stain. A, B; whole sample ($\times 100$). C, D; partial enlargement of VNC ($\times 400$). Black arrows, corazonin-expressing neuron; blue arrows, myelin sheath.

안에는 니슬소체를 볼 수 있었고 과립이 풍부해서 진하게 염색이 되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 말이집과 신경세포체들 사이에서 발현된 corazonin 뉴런이 위치해 있는 것을 관찰 하였고, corazonin 뉴런이 다른 신경세포에 비해 상당히 큰 세포라는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

중추신경계 복신경색 조직에서도 마찬가지로 대뇌 조직에 비해서는 말이집이 많이 존재하지는 않았고 다양한 신경세포가 많이 존재하고 있었다. 대뇌 조직과 마찬가지로 corazonin을 발현하는 세포는 주위의 다양한 신경세포에 비해 크기가 매우 큰 것을 볼 수 있었다. 물론 제자리 혼성화법 염색이 진하게 염색이 되어서 corazonin 뉴런을 정확히 확인을 할 수는 없었지만 1개의 분비관을 이루는 뉴런처럼 관찰 되는 특징이 있었다(Fig. 4).

고 찰

동물에서의 신경전달물질을 분비하는 세포는 신경계의 구조에 포함되어 동물이 행동하는데 가장 영향을 주고 있다. 그래서 곤충의 행동에 직접적으로 영향을 미치고 있는 corazonin 뉴런에 관심을 가졌다. Corazonin 뉴런은 다양한 스트레스에 따른 곤충의 군집 행동 등을 조절할 수 있으며(Tawfik et al., 1999), 피부 조직의 색소 등에 관여 (Veenstra, 1991; Tawfik et al., 1999; Tanaka, 2001; Tanaka et al., 2002a; Porras et al., 2003), 생식 능력 조절(Taylor et al., 2012), 음식 섭취에 대한 섭식 행동(Veenstra, 2009), 심장박동 유지(Veenstra, 1989; Tawfik et al., 1999; Tanaka, 2001; Yerushalmi et al., 2002) 등을 생리적으로 조절하는 것으로 연구되었다. 그래서 이전에 연구되어진 제자리혼성화법을 이용한 검체를 이용하여 corazonin 뉴런에 대해 신경 조직 및 세포학적 구조적인 형태를 알기 위해 연구를 하게 되었다.

Scuttle fly에서 애벌레 3령 시기의 중추신경계 조직을 채집하여 제자리혼성화법을 완료한 후, 파라핀 표본을 만들어서 H&E (hematoxylin & eosin) 염색을 시행하여 중추신경계의 전체적인 조직학적인 구조를 살펴보았다. 애벌레 중추신경계 조직에서 대뇌 조직은 사람의 대뇌와 같이 겉질(cortex) 쪽은 회색질(gray matter), 속질(medulla) 쪽은 백색질(white matter)의 비슷한 구조로 되어 있었다.

하지만 애벌레의 복신경색 조직은 사람의 척수가 바깥 쪽은 백색질, 안쪽은 회색질인 반면에 겉질과 속질 쪽이 각각 그대로 애벌레 대뇌 조직과 동일한 구조를 하고 있는 차이점을 확인하였다. 애벌레의 대뇌와 복신경색 조직

겉질 부분에는 많은 여러 종류의 신경세포가 밀집되어 관찰이 되었고, 속질 부분에는 신경세포가 존재하지 않고 신경섬유와 결합 조직으로만 채워져 있는 구조를 하고 있었다. 그리고 복신경색 조직의 한가운데에는 "T" 자형의 줄을 지어 신경세포들이 존재하고 있는 조직학적 구조의 특징 등을 알 수 있었다(William et al., 2013).

중추신경계 조직에서 H&E 염색을 통해서 신경 조직학적 전체 구조는 확인할 수 있었지만 corazonin 발현 뉴런과 기타 신경세포의 구조는 정확히 확인을 할 수가 없었다. 그래서 scuttle fly 애벌레 3령 시기의 중추신경계 조직을 제자리혼성화법을 시행하여 corazonin 뉴런을 발현시킨 후 파라핀 표본을 만들어서 발현된 corazonin 뉴런과 다른 신경세포 등을 뚜렷하게 관찰하기 위하여 말이집-니슬소체 염색(luxol fast blue-cresyl violet stain)을 시행하여 신경세포학적인 특징을 관찰하였다.

애벌레의 중추신경계 조직에 존재하는 세포들을 살펴 보았을 때 대뇌와 복신경색 조직에서 다양하고 많은 신경세포를 비롯하여 말이집, 니슬소체 등을 확인할 수 있었다. 많은 말이집과 신경세포들 사이에서 corazonin 뉴런이 발현되어 있었지만 corazonin 뉴런이 제자리혼성화법(ISH)에 의해 염색이 진하여 정확한 구조는 확인할 수 없었다. 하지만 일반적인 신경세포의 세포체와 비교했을 때 피질 부분의 많은 신경세포 사이에 존재하고 있는 corazonin 뉴런은 상당히 큰 신경내분비세포라는 것을 확인하였다(William et al., 2013).

위의 결과를 통하여 scuttle fly의 중추신경계에서 제자리혼성화법(ISH)을 의해 발현되는 corazonin 뉴런이 다양한 신경세포 사이에서 비교적 큰 신경세포로 자리잡고 있는 것을 형태적으로 관찰할 수 있었다. 앞으로의 연구는 scuttle fly의 중추신경계에서 다양한 신경세포 사이에 비교적 큰 신경세포로 위치해 있는 corazonin 발현 뉴런에 대해 발생 단계별로 corazonin 유전자의 발현 양상을 보기 위해서 RNA를 추출하여 전기영동 상에서 확인할 예정이다.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by reserch fund Mokpo Science University, 2022.

CONFLICT OF INTEREST

The authors affirm that they have no academic, financial or rights interests.

REFERENCES

- Bancroft JD, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. 6th ed. Oxford: Churchill Livingstone Elsevier. 2008. 378.
- Bracegirdle B. The history of staining. Chapter 2 in: Horobin RW, Kiernan JA (eds.). Conn's Biological Stains. 10th ed. Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd. 2002. 15-22.
- Cantera R, Veenstra JA, Nassel DR. Post-embryonic development of Corazonin-containing neurons and neurosecretory cells in the Blowfly, *Phormia terraenovae*. J Comp Neurol. 1994. 350: 559-572.
- Cardon D. Natural Dyes: Sources, Tradition, Technology and Science. Archetype Publications, London. 2007. pp 263-274.
- Carson FL, Hladik C. Histotechnology: A Self-Instructional Text. 3rd ed. Chicago, Ill.: American Society of Clinical Pathologists. 2009. 214-215.
- Choi SH. "The Regulation of Neuropeptide Corazonin and Its Functional Analyses in *Drosophila melanogaster*." PhD diss., University of Tennessee. 2009.
- Choi SH, Lee G, Monahan P, Park JH. Spatial regulation of Corazonin neuropeptide expression requires multiple cis-acting elements in *Drosophila melanogaster*. J Comp Neurol. 2008. 507: 1184-1195.
- Choi YJ, Lee G, Park JH. Programmed cell death mechanisms of identifiable peptidergic neurons in *Drosophila melanogaster*. Development. 2006. 133: 2223-2232.
- Choi YJ, Lee G, Hall JC, Park JH. Comparative analysis of Corazonin-encoding genes (Crz's) in *Drosophila* species and functional insights into Crz-expressing neurons. J Comp Neurol. 2005. 482: 372-385.
- Gill GW. Gill hematoxylin—first person account. Biotechnic & Histochemistry. 2009. 84: 1-12.
- Hansen IA, Sehnal F, Meyer SR, Scheller K. Corazonin gene expression in the waxmoth *Galleria mellonella*. Insect Mol Biol. 2001. 10: 341-346.
- Klüver H, Barrera E. "A Method for the Combined Staining of Cells and Fibers in the Nervous System." Journal of Neuro-pathology and Experimental Neurology. 1953. 12: 400-403.
- Lee G, Kim KM, Kikuno K, Wang Z, Choi YJ, Park JH. Developmental regulation and functions of the expression of the neuropeptide corazonin in *Drosophila melanogaster*. Cell Tissue Res. 2008. 331: 659-673.
- Lee G, Wang Z, Sehgal R, Chen CH, Kikuno K, Hay B, Park JH. *Drosophila* caspases involved in developmentally regulated programmed cell death of peptidergic neurons during early metamorphosis. J Comp Neurol. 2011. 519: 34-48.
- Luna LG. Histopathologic Methods and Color Atlas of Special Stains and Tissue Artifacts. Gaithersburg, MD: American Histolabs. 1992. 494-495.
- Park HH. The Expression of Corazonin Neurons in Larvae Stage of Scuttle Fly. Biomedical Laboratory Sciences. 2020. 26: 1-9.
- Park HH. The Expression of Corazonin Neurons in Pupa and Adult Stage of Scuttle Fly. Biomedical Laboratory Sciences. 2021. 27: 239-247.
- Porras MG, De Loof A, Breuer M, Arechiga H. Corazonin promotes tegumentary pigment migration in the crayfish *Procambarus clarkii*. Peptides. 2003. 24: 1581-1589.
- Roller L, Tanaka S, Kimura K, Satake H, Tanaka Y. Molecular cloning of [Thr⁴, His⁷]-corazonin (Apime-corazonin) and its distribution in the central nervous system of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera; Apidae). Appl Entomol Zool. 2006. 41: 331-338.
- Roller L, Tanaka Y, Tanaka S. Corazonin and corazonin-like substances in the central nervous system of the Pterygote and Apterygote insects. Cell Tissue Res. 2003. 312: 393-406.
- Shiga S, Davis NT, Hildebrand JG. Role of neurosecretory cells in the photoperiodic induction of pupal diapause of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. J Comp Neurol. 2003. 462: 275-285.
- Tanaka S. Endocrine mechanism of controlling body-color polymorphism in locusts. Arch Insect Biochem Physiol. 2001. 47: 139-149.
- Tanaka S, Zhu DH, Hoste B, Breuer M. The dark-color inducing neuropeptide, His⁷-corazonin, causes a shift in morphometric characteristics towards the gregarious phase in isolated-reared (solitary) *Locusta migratoria*. J Insect Physiol. 2002a. 48: 1065-1074.
- Tawfik AI, Tanaka S, De Loof A, Schoofs L, Baggerman G, Waelkens E, Derua R, Milner Y, Yerushalmi Y, Pener MP. Identification of the gregarization - associated dark - pigmentotropin in locusts through an albino mutant. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999. 96: 7083-7087.
- Taylor TD, Pacheco DA, Hergarden AC, Murthy M, Anderson DJ. A neuropeptide circuit that coordinates sperm transfer and copulation duration in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012. 109: 20697-20702.

Titford M. The long history of hematoxylin. *Biotech Histochem.* 2005. 80: 73-78.

Veenstra JA. Isolation and structure of corazonin, a cardio-active peptide from the America cockroach. *FEBS Lett.* 1989. 250: 231-234.

Veenstra JA. Presence of corazonin in three insect species, and isolation and identification of [His7] corazonin from *Schistocerca americana*. *Peptides.* 1991. 12: 1285-1289.

Veenstra JA. Does Corazonin signal nutritional stress in insects? *Insect Biochem Mol Biol.* 2009. 39: 755-762.

Veenstra JA, Davis NT. Localization of corazonin in the nervous system of the cockroach *Periplaneta americana*. *Cell Tissue Res.* 1993. 274: 57-64.

Verleyen P, Baggerman G, Mertens I, Vandersmissen T, Huybrechts J, Van Lommel A, De Loof A, Schoofs L. Cloning and char-

acterization of a third isoform of corazonin in the honey bee *Apis mellifera*. *Peptides.* 2006. 27: 493-499.

William K, Ovalle, Patrick C, Nahirney. *Netter's Essential Histology.* Elsevier Health Sciences. 2013.

Yerushalmi YK, Bhargava C, Gilon, Pener MP. Structure-activity relations of the dark-colour-inducing neurohormone of locusts. *Insect Biochem Mol Biol.* 2002. 32: 909-917.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2022.28.4.290>

Cite this article as: Park H. Morphological characteristics of Neural Tissue and Corazonin Neurons of Central Nervous System in Larval Stage of Scuttle Fly. *Biomedical Science Letters.* 2022. 28: 290-297.