

## 흰쥐 시각교차위핵(suprachiasmatic nucleus)의 출생직후 GABA 성 신경종말의 분포양상

이 성 준

경북대학교 수의과대학  
(2000년 11월 1일 게재승인)

### The postnatal distribution pattern of GABAergic terminals of the suprachiasmatic nucleus in rat

Seong-joon Yi

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University  
(Accepted by November 1, 2000)

**Abstracts :** The present study was carried out to reveal the role of  $\gamma$ -aminobutylic acid(GABA) during postnatal period in rat. The suprachiasmatic nucleus(SCN) of hypothalamus has been known as the regulation center of circadian rhythm in the mammals. In this study, we could find many GABAergic terminals in the SCN from day 1 to day 7 after birth. On the basis of these results, it can be said there are some kinds of inhibitory effects by GABA to the light stimulation of newborn rat.

**Key words :** GABA, suprachiasmatic nucleus, circadian rhythm, rat

## 서 론

일주기를 조절하는 중추(pacemaker of circadian rhythm)로 알려진 시각교차위핵(suprachiasmatic nucleus)은 시상하부(hypothalamus)의 신경핵(nucleus)로서 최근에 중요한 연구과제 중 하나이다<sup>1,2</sup>. 시상하부의 뇌실주위구역(periventricular zone)중 앞구역(anterior region)에 위치하며 시각교차(optic chiasm)위에 있는 시각교차위핵은 매우 작고 밀집한 신경세포로 구성되어 있으며 시각교차에 의해 앞배쪽으로 경계지어 있고, 시각위교차(supraoptic commissure)에 의해 뒤배쪽으로 경계되어 진다. 흰쥐에서 시각교차위핵은 전두면으로 절단된 뇌조직절편에서 일반적으로 Nissl 염색 또는 조직화학염색방법에 의해 세포구축학적으로 등쪽내측부(dorsomedial portion)와 배쪽외측부(ventrolateral portion)로 명확히 나뉘어 지는데 등쪽내측부는 배쪽외측부보다 상대적으로 더 작은 신경세포들로 구성되어 있다<sup>3</sup>.

포유동물의 일주기성 행동 리듬이 시각교차위핵에 의해 조절되는데, 이는 일주기에 맞추어 행동으로 발현된

다<sup>4</sup>. 외과적으로 시각교차위핵이 제거된 동물에서 일주기의 소실 또는 심한 손상이 보고되었으며<sup>5</sup>, 또한 손상을 유발시킨 동물에게 시각교차위핵을 이식했을 경우에는 공여동물의 일주기가 회복되었다는 연구도 보고된 바 있다<sup>6</sup>. 시각교차위핵은 일주기의 조절이외에도 환경조절의 변화에 민감하게 반응하는데, 특히 빛 자극에 의한 내인성 시간조절에 관여한다. 이러한 활동은 시각교차위핵의 배쪽외측부가 망막시상하부로(retinohypothalamic tract, RHT)와 무릎시상하부로(geniculohypothalamic tract, GHT)를 각기 수용하기 때문에 가능한 것으로 알려져 있다<sup>7</sup>.

일주기와 관련되어 GABA는 중추신경계통에 널리 퍼져 있는 대표적인 억제성 신경전달물질로서 특히 stress나 노인성 치매 등에 의해 일주기의 조절에 혼란이 오면 임상적으로 불면증을 일으키게 되는데, 이때 치료에 이용되는 benzodiazepine 등과 같은 약물은 GABA 작용을 촉진시키는 역할을 하여 일주기를 정상적으로 유지하도록 하는 것으로 보고되고 있어, 일주기 조절에서 GABA는 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>8</sup>.

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단 학술연구조성비에 의하여 지원되었습.

Address reprint request to Dr. Seong-joon Yi, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea.

특히 랫드를 비롯한 포유류는 대부분 출생 후 일주기 동안 눈을 뜨지 못하는데, 이와 같은 현상은 망막 신경절세포와 시각교차위핵을 비롯한 뇌의 여러부위에서 강한 빛을 수용할 준비가 되어 있지 않기 때문으로 사료되나 이에 대한 개체발생학적 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구는 일주기 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 시각교차위핵에 있어 출생 후 일주일 간 GABA 성 신경종말의 분포를 동정하여 태자에 있어 빛 수용과 억제성 신경전달물질간의 상호관계를 추론해 보고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물의 처리

본 실험에서는 출생 후 1일부터 일주일 동안 Wister 계 신생 랫드를 암수구별 없이 일령별로 사용하였다. 먼저 실험동물은 ketamin hydrochloride(케타라, 유한양행)와 xylazine(롬폰, 한국 바이엘)을 각각 체중 100 gm 당 0.15 ml 및 0.05 ml 씩 혼합하여 복강 내에 주사하여 마취시킨 뒤 심장을 통하여 관류고정을 실시하였다. 관류고정은 실험동물의 흉강을 열고 심장을 확인한 뒤 왼쪽 심실을 통해 오름대동맥으로 canula를 삽입하고, 오른쪽 심장귀를 절단한 다음 peristaltic pump를 이용하여 0.1M sodium phosphate buffer(이하 PB라 함)에 heparin을 혼합한 용액을 관류시켜 혈액을 제거하였다. 이 때 관류속도 및 시간은 실험동물의 상태와 관류되는 완충액의 색깔을 관찰하면서 실험동물에 따라 최적의 조건으로 조절하였다. 혈액을 제거한 다음에는 4% paraformaldehyde-llysine-periodate를 고정액으로 이용하여 관류시켰다. 관류고정이 끝난 후 두개골을 열고 뇌를 적출하여 동일고정액에 담가 냉장고에서 4시간 동안 후고정한 다음 20% phosphate buffered sucrose에 12시간 내지 24시간 동안 담가 동결보호하였다.

동결보호가 끝난 조직은 동결절편기(cryostat)를 이용하여 약 15  $\mu$ m 두께의 관상연속절편을 제작하여 gelatin이 coating 된 slide glass에 얹어 건조시킨 다음 GABA에 대한 antibody를 사용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다.

### 면역조직화학 염색

염색은 1:500으로 rabbit anti-GABA(Sigma)를 1차 항체로 사용하여 조직절편위에 점적하여 4°C에서 12내지 24시간 동안 반응시켰다. 이 때 항체의 희석액은 PB에 1% normal goat serum(ABC kit, Vectastain)과 0.3% Triton X-100(Sigma) 혼합액을 사용하였다. 그 후 조직절편은 실온에서 15분간 2회 PB로 세척하고 1:200으로

희석된 biotinylated anti-rabbit IgG(ABC kit, Vectrastain)을 2차 항체로 사용하여 실온에서 2시간 가량 반응시켰다. 다시 실온에서 PB로 2회 세척한 다음, peroxidase가 표지된 ABC 용액에 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 PB로 15분간 2회 수세한 후, 30 mg의 3,3'-diaminobezidine을 150 ml의 PB에 녹인 용액에서 갈색의 발색반응을 시행하였다. 이 때 반응시간은 발색의 정도를 관찰하면서 절편에 따라 조절하였다. 반응이 끝난 조직들은 cresyl violet으로 대조 염색을 실시한 다음 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명화 과정을 거쳐 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

흰쥐 태자를 대상으로 출생 1일부터 시각교차위핵에서 GABA 성 신경종말의 분포를 관찰한 결과, 시각교차위핵의 형성은 다소 불완전한 형태를 보였으며, 출생 1일령부터 양성반응을 보인 신경종말이 다수 관찰되었으며 이는 7일령까지 비슷한 양상을 보여 일령에 따른 큰 차이점은 보이지 않았다(Fig 1-7). 다만 신경핵의 형성이 7일령에서는 불완전하게 형성되기 시작하는 것이 관찰되었다(Fig 7)

## 고 찰

시각교차위핵은 일주기를 조절하는 중추로서 알려져 있고, 또한 시각 및 시각반사의 경로로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>2</sup>. 또한 일주기 조절 이외에 시각교차위핵은 환경변화에 민감하게 반응하여 특히 빛 자극에 의한 내인성 시간조절에 관여하는 것으로도 알려져 있는데, 이와 같은 기능은 시각교차위핵으로 유입되는 수입신경섬유들의 협력작용으로 가능한 것으로 보고되어 있다<sup>8</sup>. 이미 시각교차위핵의 vasoactive intestinal polypeptide(VIP) 함유 신경세포가 망막시상하부로(geniculohypothalamic tract)와 무릎시상하부로(geniculohypothalamic tract)를 통해 망막으로부터 신경전도를 받는 것으로 보아 VIP는 일주기 조절 신호를 전달하는 주된 세포일 가능성이 있다. 이외에도 vasopressin(VP), neuropeptide Y(NPY), GABA, L-glutamate 등 30여종의 신경전달물질 또는 신경펩티드가 분비조절 작용을 통해 그 활성을 유지하고 있는 것으로 알려져 있어 이에 대한 연구를 통해 아직 명확하게 밝혀져 있지 않은 밤과 낮의 행동리듬에 있어서의 신호전달의 기전이 점차 밝혀지고 있다<sup>9-12</sup>.

이러한 신경전달물질 중 GABA는 대표적인 억제성 신경전달물질로서 이미 널리 알려져 있고, 시각교차위

- Fig 1.** Immunoreactive GABAergic terminals(arrows) in SCN at postnatal day 1, respectively. Note the terminals surrounding the soma. X100.
- Fig 2.** Immunoreactive GABAergic terminals(arrow) in SCN at postnatal day 2, X100.
- Fig 3.** Immunoreactive GABAergic terminals(arrow) in SCN at postnatal day 3, X100.
- Fig 4.** Immunoreactive GABAergic terminals(arrow) in SCN at postnatal day 4, X100.
- Fig 5.** Immunoreactive GABAergic terminals(arrow) in SCN at postnatal day 5, X100.
- Fig 6.** Immunoreactive GABAergic terminals(arrow) in SCN at postnatal day 6, X100.
- Fig 7.** Immunoreactive GABAergic terminals(arrow) in SCN at postnatal day 7, X100.

핵내에서 일주기 변화에 따른 각종 생리현상에 있어 억제성을 작용하여 생리주기의 변화 등에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다<sup>13</sup>.

본 실험에서는 생후 1일에서 7일 사이의 태자에 있어서 눈을 뜨지 못하는 여러 가지 요인 중에 빛자극에 따른 일주기 조절에 영향을 미치는 시각교차위핵 내에서

GABA의 역할에 대해 연구한 바 다수의 신경종말이 시각교차위핵내에서 관찰되었다. 이와 같은 결과는 GABA에 의해 생후에 바로 눈을 뜨지 못하는 것인지 아니면 다른 요인에 대한 부수적인 작용으로 GABA 성 신경종말의 분포가 많은 것인지 정확하지는 않지만, GABA가 태자의 일주기에도 작용한다는 사실을 말해주는 것으로 사료된다. 하지만 본 연구에서는 태자의 안구에 신경로 추적자를 주입하여 시각경로의 각 단계에서 GABA의 역할을 규명하고자 하였으나, 태자에 주입했을 경우, 그 주입의 결과에 대한 신빙성에 의문이 가고 또한 누출 등이 문제가 되어 이번 연구에서는 배제하였기 때문에 정확한 신경핵의 형성여부에 대한 지견은 제시하지 못하였지만, 앞으로 좀더 효과적이고 정확한 주입방법을 고안하여 시각교차위핵을 중심으로 한 전체 시각전달 경로에 위치하는 모든 신경핵의 형태학적 동정과 병행하여 GABA의 분포를 관찰한다면 태아가 눈을 뜨는 시기와 GABA의 역할에 대해 보다 명확한 자료를 얻으리라 기대된다.

## 결 론

생후 1일에서 7일째까지의 흰쥐 태자의 시상하부에 위치한 시각교차위핵에서 GABA 성 신경종말의 분포를 관찰한 결과 다수의 신경종말이 전 실험군에서 관찰되어 태자의 있어 빛자극에 대한 반응에 GABA가 억제성 역할을 수행하고 있는 것을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. 김진상, 흰쥐의 일주기조절중추내 바이러스 감염에 대한 매개변수 분석. *대한물리치료학회지*, 10(2):113-125, 1998.
2. 김진상, 이성준. Colchicine 투여 후 흰쥐와 모래쥐 시각교차위핵내 bombesin에 대한 면역조직화학반응. *대한물리치료학회지*, 11(2):115-122, 1999.
3. van den Pol AN. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat intrinsic anatomy. *J Comp Neurol*, 191:661-702, 1980.
4. 김재봉, 박환태, 임미경 등. 흰쥐 시각교차위핵에서 c-AMP responsive element modulator의 발현 및 조절에 관한 연구. *대한해부학회지*, 29(4):349-356, 1996.
5. Rusak B, Zucker I. Neuronal regulation of circadian rhythm. *Physiol Rev*, 59:449-526, 1979.
6. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, et al. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247:975-978, 1990.
7. Johnson RF, Morin LP, Moore RY. Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythm in the hamster. *Brain Res Bull*, 22:411-422, 1989.
8. Johnson RF, Morin LP, Moore RY. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res*, 462:301-312, 1988.
9. Chen G, van den Pol AN. Coexpression of multiple metabotropic glutamate receptors in axon terminals of single suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurophysiol*, 80(4):1932-1938, 1998.
10. Biggs KR, Prosser RA. GABA-B receptor stimulation phase-shifts the mammalian circadian clock in vitro. *Brain Res*, 807(1-2):250-254, 1998.
11. Ingram CD, Ciobanu R, Coculescu IL, et al. Vasopressin neurotransmission and the control of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res*, 119:351-364, 1998.
12. Gribkoff VK, Pieschl RL, Wisialowski TA, et al. Phase shifting of circadian rhythm and depression of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus by neuropeptide Y: mediation by different receptor subtypes. *J Neurosci*, 18(8):3014-3022, 1998.
13. Jarry H, Wise PM, Leonhardt S, et al. Effects of age on GABA turnover rates in specific hypothalamic areas in female rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 107(1):59-62, 1999.