

췌관을 결찰한 닭 췌장 내분비부의 형태학적 및 면역조직화학적 변화

구세광 · 이재현 · 이형식*

경북대학교 수의과대학
경산대학교 생물학과*
(1997년 1월 20일 접수)

The morphological and immunohistochemical changes of endocrine pancreas by pancreatic duct ligation in chicken

Sae-kwang Ku, Jae-hyun Lee, Hyeung-sik Lee*

*College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University
Department of Biology, Kyungsan University**

(Received Jan 20, 1997)

Abstract : To investigate morphological changes in the endocrine pancreas of chicken after pancreatic duct ligation, experimental animals were subdivided to control, 12 hours, 1 day, 2 days, 4 days, 7 days and 10 days groups and all of three pancreatic ducts of chicken were ligated by surgical procedure and then the morphological changes were observed.

In pancreatic islets, the vacuolation and invasion of connective tissue were occurred in all experimental groups and dissociation of pancreatic islets was detected in 4 days after pancreatic duct ligation and hold out to 10 days. The peak of the morphological changes in pancreatic islets was detected in 4 days after pancreatic duct ligation.

In the results of immunohistochemical methods against glucagon, insulin, somatostatin and bovine pancreatic polypeptide(BPP), the number of immunoreactive pancreatic islets were decreased but the size increased with time, so the number of immunoreactive cells in each pancreatic islets were increased. Glucagon-immunoreactive cells were not changed but insulin-immunoreactive cells were decreased with time($p<0.05$). BPP-immunoreactive cells were increased in 2 days after pancreatic duct ligation and then decreased with time($p<0.05$). Somatostatin-immunoreactive cells were increased with time($p<0.05$) in dark islets.

Key words : pancreatic duct ligation, chicken, immunohistochemical method, pancreatic islet.

서 론

지금까지 여러동물을 대상으로 췌관을 결찰하였을때 췌장섬에 미치는 영향에 대해서는 다수의 보고가 있으나 변화조건은 아직 논쟁의 여지가 있다¹⁻⁷.

조류의 췌장은 해부학적으로 등쪽(dorsal), 배쪽(ventral), 제 3(third) 및 비장엽(splenic lobe)으로 이루어져 있으며, 췌관은 등쪽(dorsal), 배쪽(ventral) 및 제 3관(third duct)으로 3개의 관이 존재한다.

한편 췌장섬은 포유류와는 달리 3가지 형태로 관찰되며, 이는 다수의 A세포 및 소수의 D세포로 구성되는 dark 췌장섬, 다수의 B세포와 소수의 D세포로 구성되는 light 췌장섬 및 다수의 B세포와 소수의 A 및 D세포로 구성되는 포유류형 췌장섬으로 구분된다⁸. 이와같이 포유류의 췌장과는 차이가 있음에도 불구하고 조류에서 췌관결찰후 외분비 및 췌장섬에 일어나는 형태변화에 관한 보고는 거의 찾아볼 수 없는 바, 본 연구에서는 닭 췌관을 외과적으로 결찰한 후 일령별로 췌장섬의 형태학적 및 면역조직화학적 변화를 광학현미경적으로 관찰하여 포유동물과 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 체중 약 1.5kg의 3개월령 전후의 닭 14마리를 대조군, 실험군으로 구분하여 실험기간동안 수도물과 사료(육계전기 2, 삼양사)를 자유롭게 공급하였으며, 실험군은 외과적 수술에 의해 췌관결찰을 실시한 후 12시간, 1, 2, 4, 7, 10일에 각각 2마리씩 구분하여 실험에 제공하였다.

외과적 절차 : 닭 췌장의 육안적 구조는 Iwanaga *et al*⁸과 Nickel *et al*⁹을 참고하였다. 실험동물은 McGrath *et al*¹⁰과 Hubbell *et al*¹¹에 따라 ketamine hydrochloride(유한케타민, 유한양행)를 체중당 0.02-0.05mg/g을 근육내 주사하여 마취하고, 췌장의 노출을 위하여 오른쪽 흉골을 따라 피부절개를 실시한 후 근육을 절개하여 십이지장 만곡부를 노출시켰다. 이후 십이지장 만곡부의 상부에서 3개 췌관의 위치를 확인한 후 췌관의 십이지장 근위부에서 담관과 분리하여 봉합사로 이중결찰을 실시하였고 이후 절개부위를 봉합하였다.

재료의 채취 : 수술후 12시간, 1, 2, 4, 7 및 10일의 간

격으로 2마리씩 방혈후 췌장조직을 절취하여 Bouin액에 고정하였다. 췌장을 췌관이 존재하는 부위를 기준으로 십이지장 만곡부에서 상·중·하로 세절하여 ethanol 탈수후 xylene을 거쳐 paraffin 포매하고 3~4 μ m의 두께로 연속절편 표본을 제작하였다. 췌장의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 hematoxylin-eosin(H-E), periodic acid Schiff method(PAS), Masson's trichrom 및 Gomori's methods로 염색을 실시한 후 광학현미경하에서 관찰하였다.

면역조직화학적 방법 : 췌장 내분비세포의 분포와 수적 변동을 확인하기 위하여 PAP법¹²을 실시하였다. 면역조직화학적 염색으로서 먼저 파라핀을 제거한 조직절편은 100% methanol과 0.1% H₂O₂에 각각 30분간 침적하여 조직내의 내인성 peroxidase를 억제시킨 후 phosphate buffer saline(PBS; 0.01M, pH 7.4)으로 30분간 3회 세척하였다. 이어 비특이적인 면역 globulin 결합을 방지하기 위하여 normal goat serum(1:100)으로 상온에서 1시간 전 처치한 후 Table 1에서 보는 바와 같이 1차 항혈청들을

Table 1. Used antisera in this study

Antisera *	Code No.	Source	Dilution
Insulin	8622014	INC, Stillwater	1:1,500
Glucagon	8635013	INC, Stillwater	1:800
Somatostatin	CA 325	CRB, Billerica	1:1,000
Bovine pancreatic polypeptide(BPP)	i607	UCB, bioproducts	1:5,000

*All antisera were raised in the rabbit except for insulin which was raised in a guinea pig.

4℃ 냉장고에서 24시간 반응 시키고, PBS로 30분간 3회 세척하였다. 그후 2차 항혈청으로 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 30분간 3회 세척하였다. PAP complex (Sigma, 1:400)로 실온에서 1시간 방치시킨 후 PBS로 30분간 3회 세척하였다. 이어서 Tris-HCl buffer(0.05M, pH 7.6)에 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride 2mg 및 H₂O₂ 1 μ l가 혼합된 용액에 적용하여 각 항혈청에 대한 면역반응을 일으킨 내분비세포를 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 가볍게 핵 염색을 실시하였다. 췌장 내분비세포의 분포 및 수적 변동은 각 실험군별로 췌장섬 및 적정부위를 산정하여 췌장섬내 또는 한 시야에 출현하는 면역반응세포의 수를 평균 \pm 표준편차(Mean \pm S.D.)로 계산하였으며, Student's *t*-test로 유의성을 검정하였다.

결 과

췌장섬은 췌관결찰 1일에 췌장섬내 공포가 관찰되기 시작하여, 4일에서 최고에 달하나 10일까지 관찰되었다. 또한 췌장섬내 결합조직의 침윤은 역시 췌관결찰후 1일 이후부터 관찰되어 시간이 경과함에 따라 심하였으며, 췌장섬 자체의 붕괴가 췌관결찰 4일부터 관찰되었다 (Figs 1a-f). Insulin, glucagon, somatostatin 및 BPP 면역반응세포의 숫적 변화는 각각의 항혈청에 따라 다소 다른 경향을 나타내었다(Table 2, 3, Figs 2-4). 전체적으로 췌장섬의 수가 시간이 경과함에 따라 감소하나, 췌장섬을

Table 2. The number of pancreatic endocrine cells after pancreatic duct ligation in chicken(mean±S.D.)

	Glucagon	Insulin	Somatostatin	BPP
Control	39.92 ±4.73	31.75 ±4.37	13.83 ±2.89	8.50 ±2.14
12 hours	46.00 ±42.71	38.00 ±23.84	22.00 ±18.30	9.00 ±5.28
1 day	40.00 ±29.17	17.00 ±11.56	20.00 ±2.45	15.00 ±6.72*
2 days	29.00 ±26.33	26.00 ±2.85	15.00 ±12.09	26.00 ±13.47**
4 days	33.00 ±31.20	18.00 ±11.63	16.00 ±10.67	15.00 ±9.07*
7 days	38.00 ±27.25	20.00 ±12.02	18.00 ±13.35	10.00 ±3.44
10 days	41.00 ±23.18	22.00 ±11.70*	20.00 ±9.92	9.00 ±4.55

* p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control group.

Table 3. The number of immunoreactive cells in dark type pancreatic islet(mean±S.D.)

	Glucagon	Insulin	Somatostatin
Control	125.20 ±26.57	9.20 ±2.74	18.70 ±5.08
12 hours	127.00 ±56.67	11.00 ±2.71	22.00 ±19.49
1 day	130.00 ±13.25	6.00 ±1.21	25.00 ±15.06
2 days	96.00 ±36.96	8.00 ±4.18	29.00 ±17.21
4 days	74.00 ±20.25*	4.00 ±2.71	31.00 ±15.83*
7 days	122.00 ±55.77	7.00 ±5.59	73.00 ±25.45*
10 days	135.00 ±69.93	7.00 ±4.97*	73.00 ±36.31*

* p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control group.

구성하고 있는 세포의 수는 증가하는 경향을 나타내었다. Glucagon 면역반응세포의 경우 dark 췌장섬에서 약간의 변화가 관찰될 뿐 거의 정상적인 수치를 보인 반면, insulin 면역반응세포는 췌관결찰후 시간이 경과함에 따라 대조군에서 31.75 ± 4.73 이 10일에서는 22 ± 11.70 로 유의성 있게(p<0.05) 감소하였고(Table 2, Fig 2), light 췌장섬에서는 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았다. Somatostatin의 경우 전체적으로 췌관결찰후 별다른 유의성을 보이지 않았으나 dark 췌장섬에서 somatostatin 면역반응세포는 대조군에서 18.7 ± 5.08 을 나타내었으나 10일후 73 ± 36.31 로 유의성 있게(p<0.01) 현저히 증가되는 경향을 나타내었다(Table 3, Figs 3a-f). BPP 면역반응세포는 췌관결찰후 2일을 기점으로 증감을 보였다. 즉, 대조군에서 8.5 ± 2.14 이던 것이 췌관결찰후 2일에 26 ± 13.47 로 유의성 있는(p<0.01) 증가가 인정되나, 다시 10일에는 9 ± 4.55 로 대조군에서와 유사한 수치를 나타내었다(Table 2, Figs 4a-f).

고 찰

췌관폐쇄는 특히 포유류의 췌장에서 다양한 병증을 일으킨다고 알려져 있다^{2,13-15}. 조류에서의 병증에 대한 보고는 찾아보기 힘들다. 이러한 췌관의 폐쇄는 췌관을 인위적으로 결찰하여 쉽게 유발할 수 있으며, 인위적인 췌관결찰을 통한 췌장의 형태학적 변화에 대한 연구는 마우스^{1,16}, 랫드¹⁷⁻¹⁹, 사람^{13,20}, 토끼^{5,6,21}, 돼지⁴, 햄스터²², 주머니쥐^{15,23}, 개^{23,18} 등 다수의 포유류에서 보고된 바 있다.

닭의 췌장섬은 포유동물과 달리 A 및 B세포 분포의 비율이 다르며 이에 따라 출현하는 췌장섬을 몇가지 형태로 나눌 수 있다. 즉, 다수의 A세포(72%) 및 소수의 D세포(28%)로 구성되는 dark 췌장섬, 다수의 B세포(86%)와 소수의 D세포(14%)로 구성되는 light 췌장섬 및 다수의 B세포와 소수의 A 및 D세포로 구성되는 포유류형 췌장섬으로 구분된다⁸. 췌관을 결찰한 동물에서 췌장섬의 변화를 관찰한 보고들²⁻⁷을 보면 그 결과가 서로 약간씩 다르다. 즉, 마우스에서 실험 전기간에 걸쳐 췌장섬이 육안적으로 관찰되며 거의 변화를 보이지 않는다고 하였고², 돼지에서 PP의 분비에 변화를 보이지 않는다고 하였으며⁴, 랫드에서 somatostatin 분포의 변화가 거의 없다고 하였다⁷.

그러나 췌관을 결찰한 개²에서 insulin의 혈중 level이

일시적인 증가를 보인 후 계속해서 감소한다고 하였으며, 토끼에서는 췌장섬의 괴사가 일어나고 췌장섬내 다수의 공포화와 섬유질의 침윤이 관찰된다고 하였다³. 본 연구에서는 췌관결찰 1일 이후부터 췌장섬내 공포화와 결합조직의 침윤이 관찰되었으며, 췌장섬 자체의 붕괴가 췌관결찰 4일부터 관찰되었다. 이러한 공포화 및 결합조직의 침윤은 4일경에 최고에 달하며, 이후 시간이 경과할 수록 그 정도가 현저하였다. 이러한 결과는 Klapator *et al*⁴, Lee *et al*⁷ 및 Watanabe *et al*¹의 보고와는 약간 차이가 있으나 Ambromovage *et al*², Catala *et al*⁶ 및 Idenzaki *et al*³의 보고와는 거의 유사하다. 또한 면역조직화학적 염색의 결과 insulin 면역반응세포가 전체적으로 췌관결찰후 22±11.70으로 유의성 있게($p<0.05$) 감소되었으나, 이 정도의 변화로 당뇨병 등의 병증이 유발될지는 확실히 알 수 없다. 한편 개에서 췌관결찰후 만성 췌장염이 유발되고, 이어서 췌장성 당뇨병(pancreatic diabetes)이 유발된다고 하였으나², 본 연구에서는 연구기간이 짧았으며 생화학적 방법으로 혈중 glucose 및 insulin level을 측정하지 않았으므로 당뇨병의 유발 가능성에 대해서는 정확히 지적할 수 없다. 그러나 monosodium aspartate로 당뇨병을 유발시킨 들쥐(vole)²⁴에서 중등도의 당뇨병시 췌장의 glucagon 세포가 증가하며, 췌장섬내 공포화와 insulin 면역반응세포의 수가 약간 줄어든다고 한 점으로 보아 닭에서도 췌관결찰시 당뇨병이 유발될 가능성이 있다고 생각되어 진다. 또한 본 연구에서 somatostatin 면역반응세포는 전체적으로 췌관결찰후 2일을 기점으로 약간의 변화가 관찰될 뿐이나 dark 췌장섬의 경우, somatostatin 면역반응세포가 대조군에서 18.7±5.08을 나타내었던 것이 10일에는 73±36.31로 유의성 있게($p<0.01$) 현저히 증가하였다. 이와같은 결과는 랫트에서 뚜렷한 변화를 나타내지 않는다는 연구결과⁷와는 다소 다른 소견을 나타내었으나 토끼에서 췌관결찰후 장에서 somatostatin 면역반응세포가 증가한다⁵는 것과는 비슷한 결과를 나타내었다. 본 연구에서 BPP 면역반응세포는 췌관결찰후 2일을 기준으로 변화를 나타내었으나 결국에는 정상과 같은 수준으로 나타났다. 이와같은 결과는 PP의 분비가 돼지에서 별다른 변

화를 보이지 않았다는 보고⁴와는 다소 다른 소견이었다. 그러나 이상의 내분비세포의 수적 변화는 조류가 포유류와 달리 A 및 B세포의 분포가 췌장섬의 종류에 따라 다르며, 실시한 실험방법이 서로 다르고 또한 췌장섬내의 내분비세포의 직접적인 수적변동에 대한 면역조직화학적 보고를 거의 찾아볼 수 없는 바, 동물계통간의 변화와 차이를 나타낸 것으로 생각되어 진다.

이상에서 췌관결찰이 조류의 내분비 췌장에 미치는 영향은 형태적 구조가 포유류와 다르므로 그 결과가 포유류와 다른 소견을 나타낸 것으로 생각되어지나 실험동물이 닭에 한정되어 있고, 초미세구조상을 관찰하지 않았으므로 이러한 변화들이 조류에서의 공통적인 변화인지 아니면 닭에 한정된 변화인지는 좀더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

췌관결찰이 닭의 내분비 췌장에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 3개의 췌관을 외과적 방법으로 결찰한 후 대조군, 12시간, 1, 2, 4, 7 및 10일에 각각 췌장을 절취하여 광학현미경적 및 면역조직화학적으로 관찰하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

췌장섬에서는 췌관결찰 1일 이후부터 췌장섬내 공포화가 관찰되었으며, 섬유성분의 침윤이 관찰되었다. 또 췌관결찰 4일경부터는 췌장섬 자체의 붕괴가 관찰되었다. 이러한 췌장섬의 변화는 4일경에 최고에 달한 후 10일까지 지속되었다.

Glucagon, insulin, somatostatin 및 BPP antiserum을 사용하여 PAP법에 의한 면역조직화학적 처리를 실시한 결과 면역반응을 나타내는 췌장섬의 수는 시간이 갈수록 감소하였으나, 면역반응세포의 수는 증가되었다. Glucagon 면역반응세포는 전체적으로 뚜렷한 수적 변화를 나타내지 않았으나 insulin 면역반응세포의 수는 감소하였다. BPP 면역반응세포는 2일을 기점으로 변화를 보였으며 somatostatin 면역반응세포는 dark 췌장섬에서 시간이 경과함에 따라 큰 폭으로 증가하였다.

Legend for figures

Fig 1. Morphological changes of pancreatic islets in 12 hours to 10 days after duct ligation.

a. 12 hours, b. 1 day, c. 2 days, Arrows indicated invasive fibrotic cells. d. 4 days Arrows indicated invasive fibrotic cells. e. 7 days, f. 10 days.

a-f; Gomori's stain, a-c; $\times 480$, d-f; $\times 240$.

Fig 2. Insulin-immunoreactive cells in pancreatic islets in 12 hours to 10 days after duct ligation

a. 12 hours, b. 1 days, c. 2 days, d. 4 days, e. 7 days, f. 10 days.

a; $\times 240$, b-f; $\times 480$.

Fig 3. Somatostatin-immunoreactive cells in pancreatic islets in 12 hours to 10 days after duct ligation.

a. 12 hours, b. 1 day, c. 2 days, d. 4days, e. 7 days, f. 10 days.

a-d; $\times 480$, e-f; $\times 240$.

Fig 4. BPP-immunoreactive cells in pancreatic islets in 12 hours to 10 days after duct ligation.

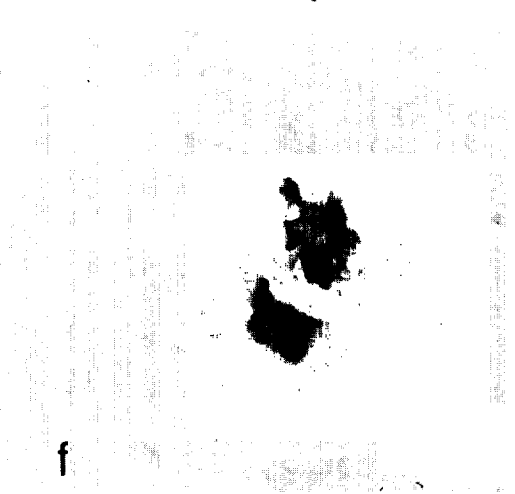
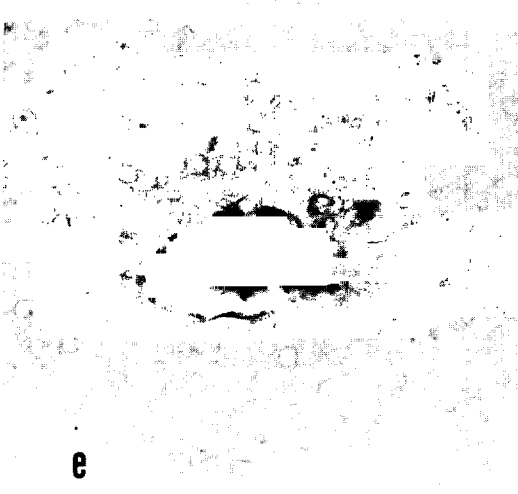
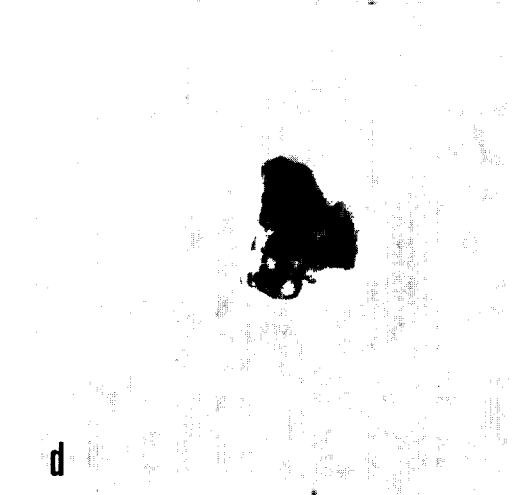
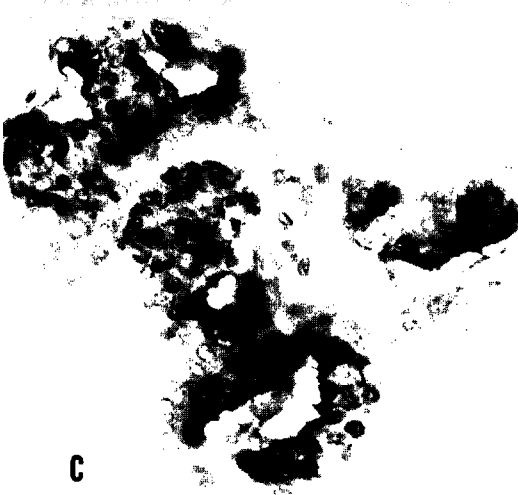
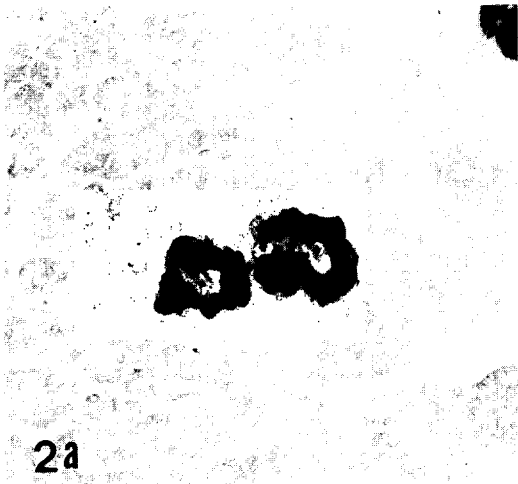
a. 12 hours, b. 1 day, c. 2 days, d. 4 days e. 7 days, f. 10 days.

a-f; $\times 240$.

참 고 문 헌

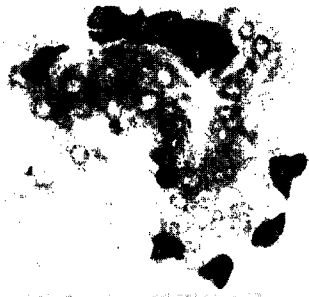
1. Watanabe S, Abe K, Anbo Y, *et al.* Changes in the mouse exocrine pancreas after pancreatic duct ligation; A qualitative and quantitative histological study. *Arch Histol Cytol*, 58:365-374, 1995.
2. Ambromovage AM, Pairent FW, Howard JM. Pancreatic exocrine insufficiency; V. the effect of long-term pancreatic duct ligation on serum insulin level and glucose metabolism in dog. *Am Surg*, 177:338-343, 1973.
3. Idenzuki Y, Goetz FC, Lillehei RC. Late effect of pancreatic duct ligation on beta cell function. *Am J Surg*, 117: 33-39, 1969.
4. Klaptor R, Schorn EP, Knipper A, *et al.* Pancreatic duct ligation and pancreatic polypeptide(PP) secretion. *Klin Wochenschr*, 60:211-212, 1982.
5. Guijarro LG, Arilla E. Somatostatin level and binding in duodenal mucosa of rabbits with ligation of the pancreatic duct. *J Endocrinol*, 118: 227-232, 1988.
6. Catala J, Bonnatous R, Dutrillaux MC, *et al.* Dissociation of langerhan's islets in rabbit after pancreatic duct ligation, Immunocytochemical and ultrastructural studies. *Virchows Arch[cell pathol]*, 52: 539-551, 1987.
7. Lee W, Wakasugi H, Ibayashi H. Comparison of somatostatin distribution in pancreatic duct ligated rats and streptozocin diabetic rats. *Gasteroenterologica Japonica*, 18:453-458, 1983.
8. Iwanaga T, Yui R, Fujita T. The pancreatic islets of the chicken. *Avian Endocrinol, Enviromental and ecological perspectives* pp 81-94, 1983.







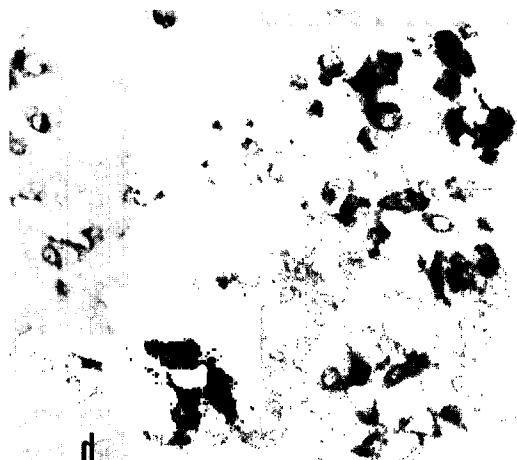
3a



b



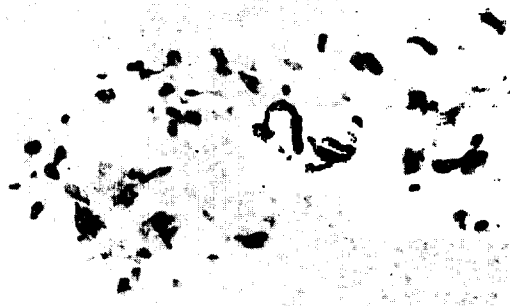
c



d



e



f



9. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. The anatomy of the domestic fowls, Vol 5, Verlag Paul parey · Springer Verlag, 1977.
10. McGrath CJ, Lee JC, Campbell VL. Dose-response anesthetic effects of ketamine in chicken. *Am J Vet Res*, 45:531-534, 1984.
11. Hubbell H, Sakada. Handbook of veterinary anesthesia, Mosby, table 23-1, 2.
12. Sternberger LA. Immunocytochemistry, 2nd ed., John Wiley Sons, New York, 1979.
13. Lowes JR, Rode J, Lees WR, *et al.* Obstructive pancreatitis unusual cause of chronic pancreatitis. *Brit J Surg*, 75:1129-1133, 1988.
14. Johnes TC. Veterinary pathology, 15th ed., Lea & Febiger, pp 1437-1442, 1983.
15. Samuel I, Wilcockson DP, Regon JP, *et al.* Ligation-induced acute pancreatitis in opossum; Acinar cell necrosis in the absence of colocalization. *J Surg Res*, 58:69-74, 1995.
16. Abe K, Watanabe S. Apoptosis of mouse pancreatic acinar cells after duct ligation. *Arch Histol Cytol*, 58: 221-229, 1995.
17. Samuel I, Toriumi Y, Wilcockson DP, *et al.* Bile and pancreatic juice replacement ameliorates early ligated-induced acute pancreatitis in rats. *Am J Surg*, 16:391-399, 1995.
18. Andrew Churg AB, Richter WR. Early changes in the exocrine pancreas of dog and rat after ligation of the pancreatic duct. *Am J Pathol*, 63:521-534, 1971.
19. Walker NI. Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation I. the role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am J Pathol*, 126:439-451, 1987.
20. Huston DG, Levi JU, Livingston A, *et al.* Pancreatic duct ligation in the therapy of chronic pancreatitis. *Am Surg*, 45:449-452, 1979.
21. Arvanitakis C, Folscroft J. Effect of pancreatic duct ligation on exocrine pancreatic function and structure in rabbit. *Experientia*, 34:77-79, 1978.
22. Balas D, Senegas-Balas F, Bertrand C, *et al.* Ribert: Effects of pancreatic duct ligation on the hamster intestinal mucosa, Histological finding. *Digestion*, 20: 157-167, 1980.
23. Samuel I, Toriumi Y, Yokoo H, *et al.* Ligated-induced acute pancreatitis in rats and opossums; a comparative morphological study of the early phase. *J Surg Res*, 57:299-311, 1994.
24. Sasaki M, Arai T, Oki Y. Immunohistochemical, ultrastructural and hormonal studies on the endocrine pancreas of vols(*Microtus arvalis*) with monosodium aspartate-induced diabetes. *Vet Pathol*, 28:497-505, 1991.