

청둥오리 췌장에서 bovine chromogranin, serotonin 및 bovine pancreatic polypeptide 면역반응세포의 분포에 관한 연구

이재현 · 구세광 · 이형식*

경북대학교 수의과대학
경산대학교 자연과학대학 생물학과*
(1998년 2월 14일 접수)

Immunohistochemical study on the Bovine chromogranin, Serotonin and Bovine pancreatic polypeptide immunoreactive cells in the pancreas of the duck(*Anas platyrhynchos platyrhynchos*, Linne)

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

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University
Department of Biology, College of Natural Science, Kyungsan University*
(Received Feb 14, 1998)

Abstract : The distributions and relative frequencies of bovine chromogranin(BCG)-, serotonin-, and bovine pancreatic polypeptide(BPP)-immunoreactive cells in the pancreas of the duck(*Anas platyrhynchos platyrhynchos*, Linne) were studied immunohistochemically on 23 days of incubation, at hatching, 1 week, 2 weeks, 3 weeks, 5 weeks, 6 weeks, 7 weeks, 9 weeks, 10 weeks, and 32 weeks after hatching.

In the exocrine portions, the relative frequencies of BCG- and serotonin-immunoreactive cells tend to decrease according to ages. BPP-immunoreactive cells first appeared 1 week after hatching, and thereafter decreased. These cells were mainly observed in the exocrine pancreas and marginal region of the pancreatic islets. In the endocrine portions, BCG-, serotonin- and BPP-immunoreactive cells disappeared 2 weeks, 9 weeks and 5 weeks after hatching, respectively.

Key words : duck, bovine chromogranin(BCG), serotonin, bovine pancreatic polypeptide(BPP), immunoreactive cells, age, pancreas.

서 론

췌장은 소화효소를 분비하는 외분비부와 호르몬을 분비하는 내분비부로 구성된 복합샘으로 알려져 있다^{1,4}. 지금까지 각종 동물의 췌장 내분비세포에 대한 면역조직화학적 연구는 매우 활발히 수행되어져 왔으며, 이들 세포들은 동물의 종에 따라 다양한 분포를 나타낸다고 보고되어져 왔다. 그러나 조류에 있어서는 닭^{5,6}, 오리⁷ 등 일부 가금류에서 보고되어 졌으며, 특히 연령에 따른 내분비세포의 변화에 대한 보고는 거의 찾아볼 수 없다.

따라서 본 연구에서는 면역조직화학적 방법으로 야생 조류인 청둥오리의 췌장에 있어서 chromogranin(CG), serotonin 및 pancreatic polypeptide(PP) 면역반응세포의 연령에 따른 분포 및 출현빈도를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

대구광역시 달성공원에서 분양받은 청둥오리(*Anas platyrhynchos platyrhynchos*, Linne)의 수정난을 부화기(KE 300, EUN JO Incubator company)로 습도 70%, 온도 35.8℃의 조건하에서 부화하였으며, 부화일수는 26~28일이었다. 청둥오리를 부란 23일과 부화직후, 부화후 1주, 2주, 3주, 5주, 6주, 7주, 9주, 10주 및 32주로 구분하여 각 5마리씩 실험에 사용하였다. 실험동물은 방혈후 췌장조직을 절

취하여 Bouin 액에 고정하였으며, 고정된 조직은 에탄올 계열에 탈수한 후 파라핀 포매를 실시하고 3~4μm의 연속절편을 제작하였다. 각 조직절편은 조직학적 구조를 확인하기 위하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다.

또한 각 절편은 PAP 법⁸으로 면역염색을 실시하였으며, 이때 사용된 항혈청 및 희석배율은 Table 1에 제시된 바와 같다. 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 normal goat serum을 처리하였으며, DAB 용액(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.01% H₂O₂ in HCl buffer(pH 7.6))으로 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 핵염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Table 1. Antisera used in this study

Antisera*	Code	Source	Dilution
Chromogranin(CG)	517210	Inctar	1 : 500-1,000
Serotonin	BO68082C	BioGenex	1 : 20
Pancreatic polypeptide(PP)	PUO660495	BiogGenex	1 : 26

* All antisera were raised in rabbits.

결 과

CG, serotonin, 및 PP 면역반응세포의 연령에 따른 출현빈도는 Table 2에 나타내었다. CG 면역반응세포는 주

Table 2. The relative frequencies of immunoreactive cells in the pancreas of the duck

	CG		Serotonin		PP	
	exocrine	endocrine	exocrine	endocrine	exocrine	endocrine
23 Days of incubation	+	+	++	+	-	-
Hatching	++	+	+++	+	-	-
1 Week	+	+	++	+	+++	+
2 Weeks	±	-	+	+	++	+
3 Weeks	±	-	+	+	++	+
5 Weeks	±	-	+	±	+	±
6 Weeks	±	-	±	±	-	-
7 Weeks	±	-	±	±	+	-
9 Weeks	±	-	±	-	+	-
10 Weeks	±	-	±	-	+	-
32 Weeks	±	-	±	-	+	-

* - : not detected, ± : rare, + : few, ++ : moderate, +++ : numerous.

로 원형 또는 방추형으로 전 연령군에서 관찰되었으며, 부화 23일 태아에서는 췌장의 외분비세포 사이와 췌장섬의 주변부분에서 소수 관찰되었고, 부화시에는 주로 외분비세포 사이에서 전 실험군중 가장 높은 빈도를 나타내었다. 부화후 1주령군에서는 외분비세포 사이와 췌장섬의 주변부분에서 소수 관찰되었으며, 부화후 2주에서 32주령군에서는 외분비세포 사이에서 극소수 관찰되었으나 췌장섬에서는 관찰되지 않았다(Fig 1a-d).

Serotonin 면역반응세포는 전 일령의 외분비샘에서 관찰되었고, 부화 23일경의 태아에서는 췌장의 외분비샘포 사이에서 집단을 형성하여 관찰되며, 췌장섬의 주변부분에서도 소수 관찰되었다. 부화시에는 부화 23일령의 분포와 유사하게 관찰되었으나 실험 전 일령군중 가장 다수 관찰되었다. 부화후 1주에서는 외분비샘포 사이와 췌장섬의 주변부분에서 각각 소수 관찰되었다. 부화 2주령부터 5주령에서는 외분비샘포 사이에서 소수 관찰되었으나 췌장섬에서는 주변부분에서 극소수 관찰되었으며, 부화 9주령 이상의 췌장섬에서는 관찰되지 않았다. 한편 세포의 형태는 원형 또는 짧은 세포질 돌기를 가지는 방추형을 나타내었으며, 1주령 이상에서는 다각형의 세포도 관찰되었다(Fig 2a-d).

PP 면역반응세포는 주로 방추형을 나타내었고 부화 1주령에서부터 관찰되기 시작하였으며, 췌장섬의 주변부분과 외분비샘포 사이에서 관찰되었다. 부화 2주, 3주령에서는 1주령에 비해 이들 세포가 감소되었으며, 특히 췌장섬에서는 극소수만이 관찰되었다. 부화 5주령 이후에서는 췌장섬내에서는 관찰되지 않았고 외분비세포 사이에서 주로 관찰되었다. 또한 이 세포는 췌관의 점막 기저부위에서도 소수 관찰되었다(Fig 3a-c).

고 찰

Chromogranin(CG)은 여러종류의 내분비세포에 존재하는 acidic protein으로서 A, B, secretogranin II 및 C 등 여러종류가 있으며, 신경조직에서와 같이 amine과 peptide 생산세포의 분비과립에 공존하며^{9,12}, 내분비세포의 marker 로써 유용하다¹³⁻¹⁵. 포유동물의 췌장에 있어서 CG 면역반응세포에 대한 보고는 rat와 소¹², 소^{14,18}, guinea pig⁹, 개¹⁶, 사람^{17,19}, 및 기타 여러동물^{18,20-23}에서 보고되어져 있으며, 그 분포는 동물에 따라 매우 다양하다. 한편 조류의 췌장에서 CG 면역반응세포의 출현에 대한 보고는 닭

²⁴을 제외하고는 거의 찾아볼 수 없다. 본 연구에서 CG 면역반응세포는 실험 전 연령에서 관찰되기 시작하여 연령이 증가할수록 감소하였으며, 특히 부화후 2주령 이후에서 부터는 췌장섬내에서는 관찰되지 않아 췌장의 내분비부에서만 CG 면역반응세포가 관찰었으나, 외분비부에서는 관찰되지 않는다고 한 Fischer-Colbrie *et al*¹²의 보고와 췌장의 내분비부와 외분비부에서 모두 관찰된다고 한 Buffa *et al*¹⁵, Grube와 Yoshie¹⁶의 보고와는 다소 상이한 결과를 나타내었다. 한편 Takayanagi와 Watanabe²⁴는 닭의 insulin 세포에서 chromogranin A(CG) 면역반응성이 관찰된다고 하였다. 그러나 Castaldo *et al*²⁵은 췌장에서 CGA 면역반응세포가 관찰되지 않는다고 하였고, Grube *et al*²³은 동물의 종에 따라 매우 다양한 CGA 면역반응세포의 분포를 보인다고 한 바 있다. 본 실험의 결과는 다른 동물과 다소 상이한 분포를 나타내었다.

Serotonin은 평활근 수축작용을 포함한 각종의 기능을 담당하며, 소화관 내분비계에서는 장크롬친화성 세포에서 분비된다²⁶. 한편 췌장에서 serotonin 면역반응세포는 닭²⁷, 파충류²⁸, 나무늘보²⁹, 고양이³⁰, guinea pig³¹, 오리 및 다양한 동물³²에서 보고된 바 있으나 연령에 따른 변화에 관한 보고는 거의 없다. 본 실험에서 serotonin 면역반응세포는 실험 전 연령에서 관찰되었으며, 태아에서부터 부화후 7주령까지는 외분비샘포 사이와 췌장섬의 주변부분에서 관찰되었으나 부화후 9주령 이상에서부터는 췌장섬 부분에서는 관찰되지 않았다. 이와같은 소견은 serotonin 면역반응세포들이 주로 닭 췌장의 외분비부에서 관찰된다고 한 Ding *et al*³²의 결과와는 대체로 일치하나, 닭의 췌장에서 A 세포와 serotonin 면역반응세포가 공존한다는 보고²⁷와는 다소 상이하였다. 또한 오리에서 3종류의 췌장섬 즉, light, dark 및 포유류형 췌장섬내에서 모두 serotonin 면역반응세포가 관찰된다는 Lucini *et al*⁷의 보고와도 상이하였다. 이같은 차이는 동물의 종에 따라 매우 다양한 분포를 나타낸다는 Ding *et al*³²의 보고로 미루어 보아 청둥오리의 종 특이적 소견으로 생각된다. 또한 본 연구의 결과 부화후 9주령까지는 췌장섬에서도 반응세포가 관찰되었으나 Lucini *et al*⁷의 보고와 달리 이 연령 이후에서는 관찰되지 않은 것은 이들 연구에서는 집오리의 성체를 사용한 반면 본 실험에서는 야생오리인 청둥오리를 사용한 결과로 생각되어진다.

PP는 36개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, 현재까지 정확한 기능은 알려져 있지 않으나 조류에서 위산

분비와 간에서의 당원분해를 자극한다고 하며³³, 췌장에서 PP 세포는 출생후부터 관찰되며 출생후 급증한다고 알려져 있다^{34,35}. 본 연구에서도 이들 보고와 유사하게 부화 1주령에서부터 관찰되기 시작하였으며, 부화후 3주령 이후에서는 일정한 빈도로 출현하였다.

한편 본 연구의 결과 부하기 또는 부화직후 일정기간 동안 소수의 CG, serotonin 및 PP 세포가 췌장섬의 주변 부분에서 관찰되었으나 CG 면역반응세포는 부화후 2주, serotonin 면역반응세포는 부화후 9주령 및 PP 면역반응세포는 부화후 5주령에서부터 췌장섬내에서 관찰되지 않았다. 이는 닭의 췌장에서 insulin, aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine beta-hydroxylase S-100 protein 및 CGA가 공존하며²⁴, glucagon, serotonin, 및 aromatic L-amino acid decarboxylase가 닭의 A 세포에 공존하고²⁷, 소에서 serotonin 면역반응세포는 glucagon 또는 BPP 세포에 공존한다는 보고³⁶ 및 본 연구에서 부하기 또는 부화직후에서는 췌장섬 주변에서 관찰된 것으로 미루어 보아 오리에서도 이들 세포들이 공존하고 있을 것으로 생각되며, 특히 이들 CG, serotonin 및 PP 면역반응세포들은 연령이 증가함에 따라 기능분화가 이루어지면서 췌장섬내에서 관찰되지 않은 것으로 추정되나 정확한 기전을 알기 위해서는 금후 면역전자현미경적 방

법 등의 더 세밀한 연구가 수행되어져야 할 것으로 생각된다.

결론

청둥오리의 췌장에 출현하는 CG, serotonin 및 PP 면역반응세포의 연령에 따른 분포 및 출현빈도를 부란 23일, 부화 직후, 부화후 1주, 2주, 3주, 5주, 6주, 7주, 9주, 10주 및 32주로 구분하여 면역조직화학적으로 관찰하였던바, CG 및 serotonin 면역반응세포들은 부화 이전에서부터 실험 전 연령에 걸쳐 외분비샘포 사이와 췌장섬의 주변부분에서 관찰되었으며, 부화후 연령이 증가함에 따라 감소하였고, 특히 CG 면역반응세포는 부화후 2주, serotonin 면역반응세포는 부화후 9주령 이후에서부터 췌장섬내에서 관찰되지 않았다. 한편 PP 면역반응세포들은 부화후 1주령에서부터 관찰되기 시작하여 일령이 증가함에 따라 감소되었으나 부화후 32주령 이후에서는 일정한 빈도로 출현하였고, 부화후 5주령에서부터는 췌장섬내에서는 관찰되지 않았다. 이들 세포들은 주로 외분비부분에서 관찰되었으며, 췌장섬의 주변부분에서도 일정기간 관찰되었다.

Legends for figures

Fig 1. BCG-immunoreactive cells in the pancreas of the duck.

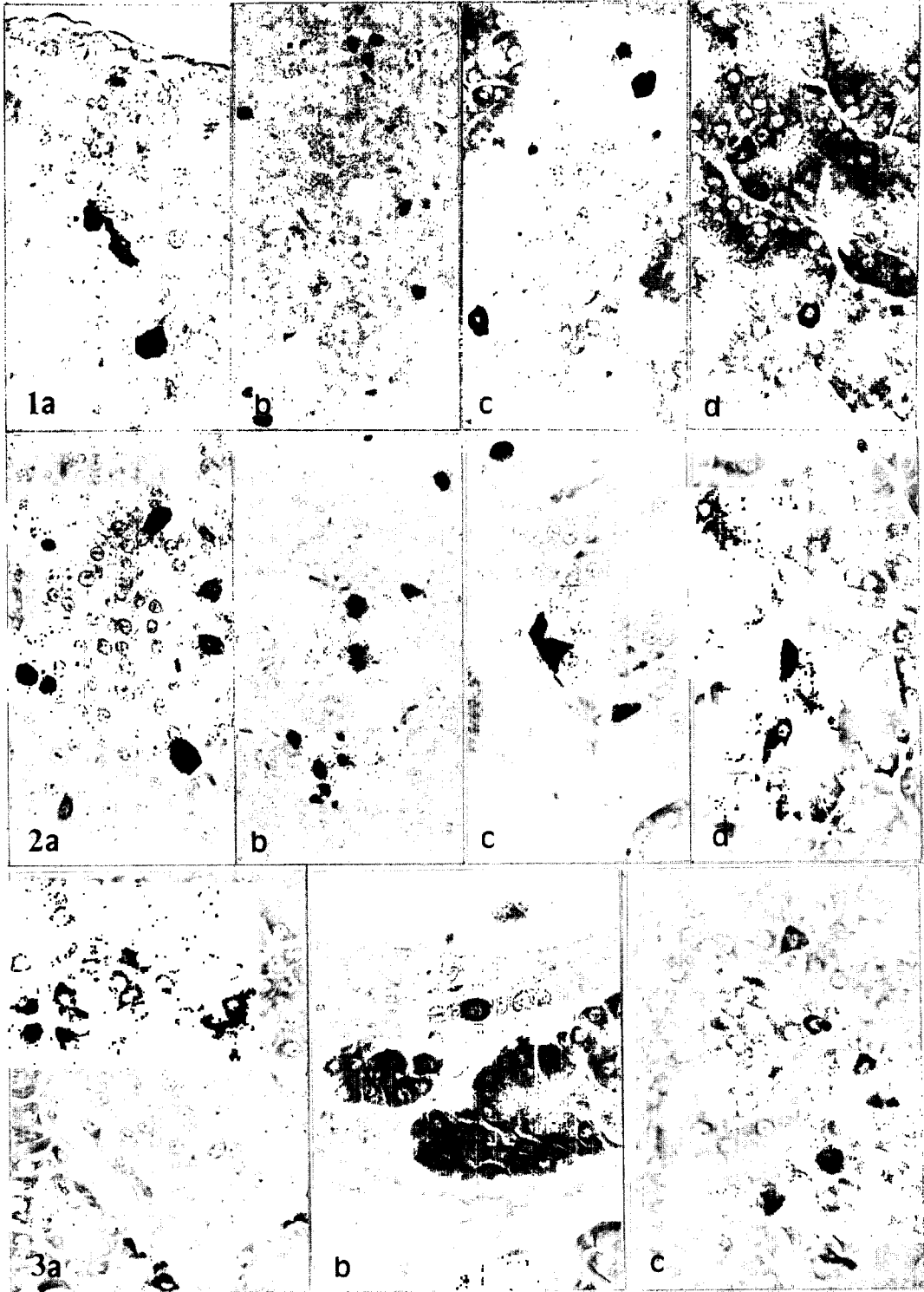
- a. 23 days of incubation, b. at hatching,
 - c. 1 week after hatching, d. 6 weeks after hatching.
- a, c, d : × 480, b : × 240, PAP method.

Fig 2. Serotonin-immunoreactive cells in the pancreas of the duck.

- a. 23 days of incubation, b. at hatching,
 - c. 1 week after hatching, d. 6 weeks after hatching.
- a, c, d : × 480, b : × 240, PAP method.

Fig 3. BPP-immunoreactive cells in the pancreas of the duck.

- a. 1 week after hatching, b. 6 weeks after hatching,
 - c. 9 weeks after birth.
- a-c : × 480, PAP method.



참 고 문 헌

1. Banks WJ. Applied veterinary histology. 2nd ed, Williams & Wilkins, 484-485, 1986.
2. Ross MH, Romrell LJ, Gordon IK. Histology A text and atlas. 3rd ed, Williams & Wilkins, 517-519, 1995.
3. McDonald LE, Pineda MH. Veterinary endocrinology and reproduction. 4th ed, Lea & Febiger, 186-201, 1989.
4. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Anatomy of the domestic birds. Verlag Paul Parey, Berlin · Hamburg, 60, 1977.
5. Iwanaga T, Yui R, Fujita T. The pancreatic islets of the chicken. Avian Endocrinol, Enviromental and ecological perspectives, 81-94, 1983.
6. Takayanagi M, Okada Y, Kita K, *et al.* Somatostatin-14, and somatostatin-28 in chicken pancreatic islet D-cells. *Tissue Cell*, 28:495-500, 1996.
7. Lucini C, Castaldo L, Lai O. An immunohistochemical study of the endocrine pancreas of duck. *Eur J Histochem*, 40:45-52, 1996.
8. Sternberger LA. Immunocytochemistry 2nd ed, New York, John Wiley & Sons, 104-149, 1979.
9. Cetin Y, Grube D. Immunoreactives for chromogranin A and B, and secretogranin II in the guinea pig endocrine pancreas. *Histochemistry*, 94:479-484, 1990.
10. Benedum UM, Baeuerle PA, Konecki DS, *et al.* The primary structure of bovine chromogranin A: a representative of a class of acidic secretory proteins common to avariety of peptidergic cells. *EMBO J*, 5:1495-1502, 1986.
11. Buffa R, Gini A, Pelagi M, *et al.* Immunoreactivity of hormonally characterized human endocrine cells against three novel anti-human chromogranin B(B11 and B13) and chromogranin A(A11) monoclonal antibodies. *Arch Histol Cytol*, 52:99-105, 1989.
12. Fischer-Colbrie R, Lassmann H, Hogn C, *et al.* Immunological studies on the distribution of chromogranin A and B in the endocrine and nervous tissues. *Neuroscience*, 16:547-555, 1985.
13. Lloyd RV, Cano M, Rosa P, *et al.* Distribution of chromogranin A and secretogranin I (chromogranin B) in neuroendocrine cells and tumors. *Am J Pathol*, 130:296-304, 1988.
14. Wakinson A, Tonsson AC, Davison M, *et al.* Heterogeneity of chromogranin A-derived peptides in bovine gut, pancreas and adrenal medulla. *Biochem J*, 1: 471-479, 1991.
15. Lundquist M, Arnberg H, Candell J, *et al.* Silver stains for identification of neuroendocrine cells. A study of the chemical background. *Histochem J*, 22: 615-623, 1990.
16. Grube D, Yoshie S. Immunohistochemistry of chromogranin A and B, and secretogranin II, in the canine endocrine pancreas, *Arch Histol Cytol*, 52:287-298, 1989.
17. Schmid KW, Weiler R, Xu RW, *et al.* An immunological study on chromogranin A and B in human endocrine and nervous tissues. *Histochem J*, 21: 365-373, 1989.
18. Yoshie S, Hagn C, Ehrhart M, *et al.* Immunological characterization of chromogranin A and B and secretogranin II in the bovine pancreatic islet. *Histochemistry*, 87:99-106, 1987.
19. Hugn C, Schmid KW, Fischer-Colbrie R, *et al.* Chromogranin A, B and C in human adrenal medulla and endocrine tissues. *Lab Invest*, 55:405-411, 1986.
20. Kawkins KL, Lloyd RV, Toy KA. Immunohistochemical localization of chromogranin A in normal tissues from laboratory animals. *Vet Pathol*, 26:488-498, 1989.
21. Grube D, Bargsten G, Cetin Y, *et al.* Chromogranins in mammalian GEP endocrine cells: their distribution and interrelations with co-stored amines and peptides. *Arch Histol Cytol*, 52:91-98, 1989.
22. Cetin Y. Chromogranin A immunoreactivity and Grime-lius's argylophilia. A correlative study in mammalian endocrine cells. *Anat Embryol Berl*, 185:207-215, 1992.
23. Grube D, Aunis D, Bader F, *et al.* Chromogranin A (CGA) in the gastro-entero-pancreatic(GEP) endocrine

- system I. CGA in the mammalian endocrine pancreas. *Histochemistry*, 85:441-452, 1986.
24. Takayanagi M, Watanabe T. Immunocytochemical colocalizations of insulin, aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine-beta-hydroxylase, S-100 protein and chromogranin A in B-cells of the chicken endocrine pancreas. *Tissue Cell*, 28:17-24, 1996.
 25. Castaldo L, Anderozzi G, Anyonucci R, *et al.* Immunohistochemical localization of some endocrine cells in the gastroenteropancreatic system of *Erinaceus europaeus*. *Basic Appl Histochem*, 32:511-521, 1988.
 26. Solcia E, Creutzfeldt W, Falkmer S, *et al.* Human gastropancreatic endocrine, paracrine cells : Santa Monica 1980 Classification, Ed, Grossman MI, Brazier MAB and Lechago J. *Academic Press*, 159-165, 1981.
 27. Watanabe T, Morakami T, Nagatsu I. Immunohistochemical colocalization of glucagon, serotonin and aromatic L-acid decarboxylase in islet A cells of chicken pancreas. *Cell Tiss Res*, 259:67-72, 1990.
 28. Petez TR, Ballestar J, Pastor LM, *et al.* Comparative immunohistochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine system of three reptiles. *Gen Com Endocrinol*, 76:171-191, 1989.
 29. da Mota DL, Yamada J, Gerge LL, *et al.* An immunohistochemical study on the pancreatic endocrine cells of the three-toed sloth, *Bradypus variegatus*. *Arch Histol Cytol*, 55:203-209, 1992.
 30. Furuzawa Y, Ohmori Y, Watanabe T. Immunohistochemical colocalization of serotonin, aromatic L amino acid decarboxylase and polypeptide hormones in islet A and PP cells of the cat pancreas. *J Vet Med Sci*, 56:911-916, 1994.
 31. Kirchgessner AL, Liu MT, Tamir H, *et al.* Identification and localization of 5-HT1P receptors in the guinea pig pancreas. *Am J Physiol*, 262:G553-566, 1992.
 32. Ding WG, Fujimura M, Tooyama I, *et al.* Phylogenetic study of serotonin-immunoreactive structures in the pancreas of various vertebrates. *Cell Tiss Res*, 263:237-243, 1991.
 33. Yamada J, Kitamura N, Yamashita T. Avian endocrinology : Avian gastrointestinal endocrine cells, ed, Mikami S, Japan Sci Soc Press, Tokyo, 67-79, 1983.
 34. Larsson LI. Ontogeny of peptide-producing nerves and endocrine cells of the gastro-duodeno-pancreatic region. *Histochemistry*, 54:133-142, 1977.
 35. Sundler F, Håkanson R, Hammer RA, *et al.* Immunohistochemical localization of neurotensin in endocrine cells of the gut. *Cell Tiss Res*, 178:313-321, 1977.
 36. Nakajima S, Kitamura N, Yamada J, *et al.* Immunohistochemical study on the endocrine pancreas of cattle with special reference to coexistence of serotonin and glucagon or bovine pancreatic polypeptide. *Acta Anat Basel*, 131:235-240, 1988.