

청둥오리 췌장의 insulin, glucagon 및 somatostatin 면역반응세포에 관한 연구

이재현 · 구세광 · 이형식*

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

Immunohistochemical study on insulin, glucagon and somatostatin immunoreactive cells of 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 insulin-, glucagon-, and somatostatin-immunoreactive cells in the pancreas of the duck(*Anas platyrhynchos platyrhynchos*, Linne) were investigated 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 duck pancreas on 23 days of incubation and at hatching, mammalian type islets(mixed type) were only observed, thereafter three type's islets(mamalian, A and B type's islets) were identified. Insulin-immunoreactive cells were detected in central region of the islets, while glucagon- and somatostatin-immunoreactive cells were detected in marginal region of light(B type) or mammalian type islets, and in central region of dark islets(A type).

Insulin-, and somatostatin-immunoreactive cells were also detected in the exocrine regions. In this region the insulin-immunoreactive cells were detected from 23 days of incubation to 6 weeks, however not detected after 7 weeks. At hatching the relative numbers of somatostatin-immunoreactive cells were more frequent than those of other groups, and then decreased with ages.

Key words : insulin, glucagon, somatostatin, immunohistochemistry, duck, pancreas.

서 론

췌장은 소화효소를 분비하는 외분비부와 호르몬을 분비하는 내분비부로 구성된 복합샘이며¹⁻⁴, 특히 조류의 췌장은 해부학적으로 등쪽, 배쪽, 제3엽 및 비장엽의 총 4엽으로 이루어져 있다. 또한 췌장섬은 포유류와 달리 3가지 형태 즉, 다수의 A세포 및 소수의 D세포로 구성된 dark 췌장섬(A형), 다수의 B세포와 소수의 D세포로 구성되는 light 췌장섬(B형) 및 다수의 B세포와 소수의 A 및 D세포로 구성되는 포유류형(mammalian type, mixed 형)으로 구분된다⁴⁻⁷. 그러나 이런 형태학적 차이에도 불구하고 조류의 췌장에서 내분비세포에 관한 보고는 닭^{5,7} 및 집오리⁷ 등 일부 가금류를 제외하고는 매우 드물며, 특히 연령에 따른 내분비세포에 대한 보고는 거의 없는 바, 본 연구에서는 야생조류인 청둥오리의 췌장에 있어서 insulin, glucagon 및 somatostatin 항혈청을 이용한 면역조직화학적 방법으로 이들 세포의 연령에 따른 분포 및 출현빈도를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

대구광역시 달성공원에서 분양받은 청둥오리(*Anas platyrhynchos platyrhynchos*, Linne)의 수정란을 부화하여 사용하였다. 부화는 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 절취하여 Bouin 액에 고정하였으며, 고정한 조직은 에타놀 계열에 탈수한 후 파라핀포매를 실시하여 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 1에서 보는 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
Insulin	PUO290395	BioGenex	1 : 24
Glucagon	PUO391095	BioGenex	1 : 20
Somatostatin	PUO421295	BioGenex	1 : 26

* All antisera were raised in rabbits except for insulin which was raised in a guinea pigs.

결 과

청둥오리의 췌장에서 Insulin, glucagon 및 somatostatin 면역반응세포의 연령에 따른 분포 및 상대적 빈도는 Table 2에 나타내었다.

Insulin 면역반응세포는 실험 전 연령에 걸쳐 관찰되었으나 부화 7주령에서 32주령의 외분비세포사이에서는 관찰되지 않았다. 부화 23일령의 태아에서 부화시까지는 주로 포유류형 췌장섬이 관찰되었으며, 부화 1주 이후부터는 포유류형, B형 및 A형 등 3종의 췌장섬이 관찰되었다. 면역반응세포는 췌장섬의 중앙부분에서 주로 관찰되었고, 외분비샘포 사이에서도 소수 관찰되었다. 부화후 1주 이후부터는 포유류형, B형 췌장섬에서 주로 관찰되었으며, 소수의 A형 췌장섬에서도 관찰되었다. 췌장섬에서 이들 면역반응세포들은 췌장섬의 중앙부분에서 주로 관찰되었으며, 외분비세포 사이에서도 극소수의 면역반응세포들이 관찰되었다(Fig 1a-c).

Glucagon 면역반응세포 역시 실험 전 연령에서 관찰되었다. 부화 23일령의 태아에서 부화시까지는 insulin 면역반응세포에 비하여 주로 췌장섬의 주변부위에서 소수 관찰되었으며, 외분비세포 사이에서도 소수 관찰되었다. 부화 1주령부터는 포유류형 췌장섬에서 중등도의 빈도로 주로 주변부위에서 면역반응세포들이 관찰되었으며, B형 췌장섬에서는 극소수의 면역반응세포들이 췌장섬의 주변부위에서 관찰되었다. 한편 A형 췌장섬에서는 췌장섬 전반에 걸쳐 다수의 면역반응세포들이 관찰되었다(Fig 2a-c).

Somatostatin 면역반응세포는 실험 전 연령에 걸쳐 관찰되었으며, 부화시에 다수의 면역반응세포들이 관찰되었다. 부화 23일부터 부화시까지 췌장섬 전반에 걸쳐 관찰되며, 외분비샘포에서도 다수 관찰되었다. 부화 1주령 이후부터는 췌장 전반에 흩어져서 관찰되며, B형 및 포

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

	Insulin		Glucagon		Somatostatin	
	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.

유류형 췌장섬에서는 주변부위에서 소수 관찰되나 A형 췌장섬에서는 중앙부분에서 다수 관찰되었다(Fig 3a-c).

고 찰

조류의 췌장섬은 포유류와 달리 A 및 B세포 분포의 비율이 다르며, 이에 따라 출현하는 췌장섬을 A형, B형 및 포유류형 등 3가지 형태로 구분한다⁴⁻⁷.

각종 동물의 췌장섬에서 insulin 면역반응세포의 출현에 대해서는 말⁹, 어류¹⁰, 양서류¹¹, 바늘두더쥐(Echidna)¹², 돼지¹³, 영원(Newt)¹⁴, 칠성장어¹⁵, mouse¹⁶, 닭^{5,17} 및 집오리⁶ 등에서 알려져 있고, insulin 면역반응세포의 출현시기에 대해서도 몇몇 보고¹⁶⁻¹⁸가 있다. 한편 본 연구에서 insulin 면역반응세포는 실험 전기간에 걸쳐 관찰되었으며, 부화후 1주령부터 3종류의 췌장섬 모두에서 관찰되기 시작하였다. 이들 세포들은 췌장섬의 중앙부분에서 주로 관찰되었으며, 외분비세포 사이에서도 단독으로 소수 관찰되었으나, 부화후 7주령 이후에서는 외분비세포 사이에서 관찰되지 않았다. 이와같은 결과는 다른 종류의 조류에서^{5,6,17}와 어류¹⁰에서 췌장섬의 중간부분에서 주로 관찰된다는 보고와 영원¹⁴에서 insulin 세포가 췌장섬의 중앙부분에서 덩어리 형태로 관찰된다는 보고와

유사하였으나, 말⁹의 췌장섬에는 주변부에 존재한다는 보고와는 다소 상이하였다. Insulin 면역반응세포의 출현 시기는 닭에서 부란 5일령의 태아에서 부터 출현한다는 Bagnell *et al*¹⁷의 보고와 mouse에서 임신 9.5일 이전에 출현한다는 Teitelman *et al*¹⁶의 보고 및 본 실험의 결과 부화 23일령의 태아에서 부터 다수의 insulin 면역반응세포가 관찰된 점으로 보아 발생초기에서 부터 출현할 것으로 생각된다.

Glucagon은 췌장의 A세포에서 산생되며, 혈당 상승작용, 당원분해 등의 당대사에 관여하는 호르몬으로 알려져 있으나, 소화관에서는 위수축운동이나 위산분비를 억제하는 작용을 가지고 있다^{1-4,19}. 췌장에서 glucagon 면역반응세포에 대한 보고는 말⁹, 어류¹⁰, 양서류¹¹, 바늘두더쥐¹², rat²⁰, 멍크²¹ 및 조류^{6,16} 등 각종동물에서 알려져 있으며, mouse와 돼지²², 닭¹⁵ 등에서는 glucagon 면역반응세포의 출현시기에 대해 보고된 바 있다. 본 실험에서는 glucagon 면역반응세포가 실험 전기간에 걸쳐 관찰되었으며 태아와 부화시에는 주로 췌장섬의 주변부위에서 관찰되었고, 부화후 1주령에서 부터 B형 및 포유류형 췌장섬의 주변부분에서 역시 관찰되나 A형 췌장섬에서는 전반에 걸쳐 다수 관찰되었다. 이와같은 결과는 조류에서의 Iwanaga *et al*⁵, 및 Lucini *et al*⁶의 보고와 대체로 일

치하나 포유류의 소견^{9,12,20,21}과는 다소 차이를 나타내었다. 한편 glucagon 면역반응세포의 출현시기에 대해 mouse²⁰는 태생 9일령 부터, 돼지는 태생 18일령 부터 소화관에서 관찰되며, 췌장에서는 더욱 초기에 출현한다고 보고하였다. 또한 닭은 부란 5일령 이전부터 insulin 세포와 함께 출현한다고 하였다¹⁶. 본 연구도 부화 23일령부터 출현하여 이들 소견과 대체로 일치하였다.

Somatostatin은 양의 시상하부에서 최초로 분리된 14개의 아미노산으로 구성된 peptide계의 호르몬으로서 위장관 내분비세포나 신경세포, 중추신경계에서 확인되며, 위장관중에는 위전정부 점막의 내분비세포와 췌장섬의 D세포에 주로 분포하는 것으로 알려져 있으며²², 주된 작용은 각종 호르몬에 대한 억제기능을 나타낸다고 한다²³. 췌장에서 somatostatin 세포의 분포에 대해서는 닭⁷, 오리⁶ 및 각종 척추동물에서 보고^{20,21,25-28}된 바 있다. 대부분의 척추동물에서는 췌장섬의 주변부위에 분포하며 외분비부와 도관상피에도 소수 출현한다고 하였다^{20,21,25-28}. 본 실험에서 somatostatin 면역반응세포는 실험 전기간에 걸쳐 관찰되었다. 특히 부화시에 가장 다수의 면역반응세포가 관찰되며, 부화후 1주령 이후부터는 췌장엽 전반에 흩어져서 관찰되고, 외분비부에서도 다수 관찰되었다. B형 및 포유류형의 췌장섬에서는 주변부에서 소수로, A형 췌장섬에서는 중앙부에서 다수로 관찰되었다. 이러한 소견은 포유류에서의 연구^{20,21,25-27}들과는 다소 차이를 나타내었으나 닭⁷과 오리⁶에서의 보고와는 거의 일치하였으며, 이들 연구는 성체에 국한되어 있으므로 부화후 1주령 이전에 대해서는 알 수 없었다. 또한 본 실험에서 부화시 췌장 외분비부에서 다수 관찰되었다가 연령이 증가함에 따라 감소되는 소견으로 보아 외분비부에 존재하던 세포들의 일부가 췌장섬의 기능분화와 함께 췌장섬내로 밀집되는 것으로 생각되나 췌장의 크기 자체가 연령에 따라 증가되므로 세포의 빈도가 감소될 수 있는 점 역시 배제할 수 없으므로 금후 이 방면의 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다. 한편 췌장내의 somatostatin 면역반응세포의 출현시기에 대해서는 Ito *et al*²²은 이 세포가 다른 세포보다 비교적 늦게 출현하며, 특히 Alumets *et al*²⁵은 rat의 췌장에서 태생 15~17일째 출현한다고 하였다. 본 실험에서는 부란 23일

부터 실험에 사용하였으므로 정확한 출현시기는 알 수 없으나 비교적 발생초기에 출현함을 알 수 있었다.

이상에서 청둥오리의 췌장에서는 insulin, glucagon 및 somatostatin 면역반응세포가 부란 23일경부터 전 연령에 걸쳐 관찰되었고, 이들 세포들은 부화후 1주일 이전에는 주로 포유류형 췌장섬에서 관찰되었으며, 소수의 세포들이 외분비부에서 단독으로 관찰되기도 하였다. 부화후 1주일령부터는 3종류의 췌장섬에서 모두 관찰되기 시작하였다. Insulin 면역반응세포는 주로 췌장섬의 중앙부에서 관찰되었으며, glucagon 및 somatostatin 면역반응세포들은 B형 및 포유류형 췌장섬에서는 주변부에서 관찰되었고, A형에서는 췌장섬 전반에 걸쳐 관찰되었다. 한편 somatostatin 면역반응세포는 췌장섬 뿐만 아니라 외분비부에서도 관찰되었으며, 이 부위에서는 부화시 가장 다수 관찰되어 연령이 증가됨에 따라 감소하였다.

결 론

청둥오리의 췌장에 출현하는 insulin, glucagon 및 somatostatin 면역반응세포의 연령에 따른 분포 및 출현빈도를 관찰하기 위하여, 부란 23일, 부화 직후, 부화후 1주, 2주, 3주, 5주, 6주, 7주, 9주, 10주 및 32주에서 면역조직화학적 방법으로 관찰하였던 바, insulin, glucagon 및 somatostatin 면역반응세포들은 실험 전기간에 걸쳐 관찰되었고, 이들 세포들은 부화후 1주일 이전에는 주로 포유류형 췌장섬의 형태로 관찰되었으며, insulin 면역반응세포는 단독으로 외분비부에서 관찰되기도 하였다. 부화후 1주일령부터는 3종류의 췌장섬에서 모두 관찰되기 시작하였다. Insulin 면역반응세포는 주로 췌장섬의 중앙부에서 관찰되었으며, glucagon 및 somatostatin 면역반응세포들은 B형과 포유류형 췌장섬에서는 주로 주변부에서 관찰되었고, A형 췌장섬에서는 췌장섬 전반에 걸쳐 관찰되었다. 또한 somatostatin 면역반응세포는 췌장섬 뿐만 아니라 외분비부에서도 관찰되었으며 이 부위에서는 부화시 가장 다수 관찰되었다가 연령이 증가에 따라 감소되었다.

Legends for figures

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

- a. 23 days of incubation, b. 1 week after hatching,
c. 32 weeks after hatching.
a-c : × 240, PAP method.

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

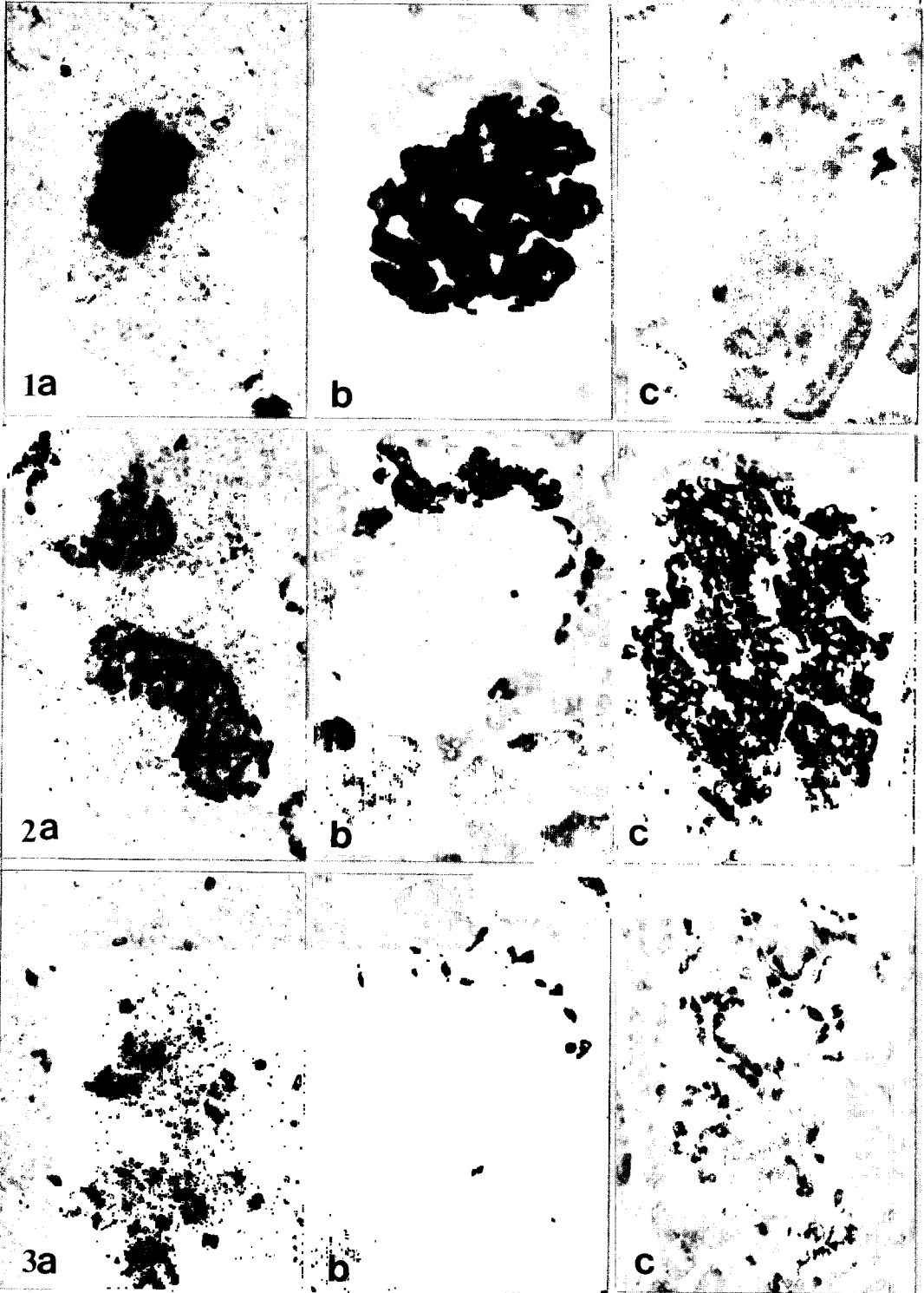
- a. 23 days of incubation, b. 1 week after hatching,
c. 32 weeks after hatching.
a-c : × 240, PAP method.

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

- a. 23 days of incubation, b. 1 week after hatching,
c. 32 weeks after hatching.
a-c : × 240, 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, Environmental and ecological perspectives, 81-94, 1983.
6. Lucini C, Castaldo L, Lai O. An immunohistochemical study of the endocrine pancreas of duck. *Eur J Histochem*, 40:45-52, 1996.
7. 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.
8. Sternberger LA. Immunocytochemistry 2nd ed, New York, John Wiley & Sons, 104-149, 1979.
9. Helmataedter V, Feurle GE, Forssmann WG. Insulin-, glucagon-, and somatostatin-immunoreactive endocrine cells in equine pancreas. *Cell Tiss Res*, 172:447-454, 1976.
10. Scheuermann DW, Adriaenson D, Timmermans JP, *et al.* Immunohistochemical localization of polypeptide hormones in pancreatic endocrine cells of a diplopan fish, *Protopterus aethiopicus*. *Acta Histochem*, 91:185-192, 1991.
11. Cowan BJ, Foty RA, Liversage RA. Insulin, glucagon and somatostatin localization in the pancreas of metamorphosed *Xenopus laevis*. *Tissue Cell*, 23:777-787, 1991.
12. Yamada J, Krause WJ, Edwin N, *et al.* A survey of endocrine cells in the pancreas of the echidna (*Tachyglossus aculeatus*) with special reference to pancreatic motilin cells. *J Anat*, 171:223-231, 1990.
13. Machetti P, Giamarelli R, di Carlo A, *et al.* Mor-



- phometrical and immunocytochemical characterization of the porcine endocrine pancreas. *Transplant Proc*, 22:727-728, 1990.
14. Foty RA, Lai-Fook JE, Liversage RA. Localization of insulin, glucagon and somatostatin in the pancreas of adult Newt, *Notophthalmus viridescens*. *Tissue Cell*, 21:1-10, 1989.
 15. Youson JH, Elliott WM, Beamish RJ, *et al*. A comparison of endocrine pancreatic tissue in adults of four species of lampreys in British Columbia: a morphological and immunohistochemical study. *Gen Com Endocrinol*, 70:247-261, 1988.
 16. Teitelman G, Alpert S, Polack JM, *et al*. Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon, and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide. *Development*, 118:1031-1039, 1993.
 17. Bagnell CA, Baker NK, McMurty JP. Immunohistochemical localization of insulin in the chick embryo during development. *Gen Com Endocrinol*, 73:293-298, 1989.
 18. Miettinen PJ, Heikinheimo K. Transforming growth factor-alpha(TGF-alpha) and insulin gene expression in human fetal pancreas. *Development*, 114:833-840, 1992.
 19. Ito Z, Fujita T, Kobayashi S, *et al*. 消化管ホルモン. 第1版, 構談社, 東京, 211-249, 1980.
 20. Ito S, Yamada Y, Hayashi M, *et al*. Somatostatin-containing cells in the rat and horse pancreatic islets. *Tohoku J Exp Med*, 124:57-64, 1978.
 21. Kawano H, Yamashita T, Yamada J, *et al*. A light microscopic study of the gastro-entero-pancreatic endocrine cells of the mink(*Mustela vison*). *Arch Histol Jap*, 46:559-573, 1983.
 22. Ito H, Hashimoto Y, Kitagawa H, *et al*. Ontogeny of gastroenteropancreatic(GEP) endocrine cells in mouse and porcine embryos. *Jpn J Vet Sci*, 50:99-110, 1988.
 23. Brazeau P, Vale WR, Burgus N, *et al*. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 179:77-79, 1973.
 24. Kitamura N, Yamada J, Calingsan NY, *et al*. Immunocytochemical distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the horse. *Equine Vet J*, 16:103-107, 1984.
 25. Alummet J, Sundler F, Häkanson R. Distribution, ontogeny and ultrastructure of somatostatin immunoreactive cells in the pancreas and gut. *Cell Tiss Res*, 185:465-479, 1977.
 26. Calingsan NY, Kitamura N, Yamada J, *et al*. Immunocytochemical study of the gastro-enteropancreatic endocrine cells of the sheep. *Acta Anat*, 118:171-180, 1984.
 27. Dubois MP. Immunoreactive somatostatin is present in discrete cells of endocrine pancreas. *Pro Nat Acad Sci*, 72:1340-1343, 1975.
 28. Rombout JHWH, Vander-Grinten CPM, Peeze-Binkorst FM, *et al*. Immunocytochemical identification and of peptide hormones in the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system of the mouse and a stomachless fish, *Barbus conchonus*. *Histochemistry*, 84:471-483, 1986.