

한국재래산양 십이지장의 장관신경계통에 분포하는 Substance P, CGRP 및 칼슘결합단백질 반응세포에 대한 면역조직화학적 연구

이인세 · 이흥식 · 송승훈 · 윤성태 · 황인구 · 강태천* · 원무호* · 서제훈**

서울대학교 수의과대학 · 한림대학교 의과대학*
서울대학교 의과대학**
(1999년 3월 18일 접수)

Localizations of substance P, CGRP and calcium binding proteins in Korean native goat duodenum

In-se Lee, Heungshik S. Lee, Seung-hoon Song, Sung-tae Yoon, In-koo Hwang,
Tae-cheon Kang*, Moo-ho Won*, Je-hoon Seo**

*College of Veterinary Medicine, College of Medicine** , Seoul National University
College of Medicine, Hallym University**

(Received Mar 18, 1999)

Abstract : The localization of substance P(SP), calcitonin gene-related peptide(CGRP) and three calcium binding proteins, calbindin D-28k(CB), calretinin(CR) and parvalbumin(PA) was immunohistochemically examined in the myenteric and submucous plexuses of Korean native goat duodenum.

In the neurons of myenteric and submucous plexuses of duodenum, immunoreactivities of SP, CGRP and CB were confirmed in both nerve cell bodies and fibers. In contrast, CR immunoreactivity was found only in nerve fibers of myenteric plexuses, while PA immunoreactivity was found only in nerve cell bodies of submucous plexuses. In the inner circular muscle layer, dense SP-like immunoreactive fibers were prominent but only a few CGRP-like immunoreactivities were observed. Most of SP- and CGRP-like immunoreactive neurons of both plexuses colocalized with CB.

This result showed that SP and CGRP may have a important role for the movement of small intestine. The colocalizations of CB with SP or CGRP in myenteric and submucous plexuses suggest that CB may serve neuromodulatory role for SP- and CGRP-immunoreacted neurons on the movement of intestinal wall.

Key words : substance P, CGRP, calcium binding protein, duodenum, immunohistochemistry.

본 연구는 1998년도 한국과학재단 연구비지원(과제번호 ; KOSEF 981-0613-070-1)에 의하여 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. In-se Lee, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea.

서 론

소화관은 혼합 및 추진운동, 샘분비와 호르몬의 분비, 수분과 영양분의 흡수 등이 중추신경계로부터 비교적 독립적으로 이루어지는 장기로 이와같은 작용은 자체적으로 분비하는 호르몬과 신경계통에 의하여 조절되거나 지배된다^{1,2}.

호르몬에 의한 소화관의 운동 또는 분비의 조절은 주로 위점막이나 소장 및 대장의 상피에 있는 장내분비세포(enteroendocrine cell)가 담당한다. 소화관의 운동에 관여하는 신경은 소화관벽에 있는 내재성 신경(intrinsic neuron)과 자율신경계에 속하는 교감신경 및 부교감신경의 외인성 신경(extrinsic neuron)으로 이루어진다. 이외에 소화관벽의 내재성 신경세포는 외인성 신경과 유기적인 관계를 유지하며 소화관의 수축과 이완, 분비 및 흡수작용에 관여한다고 알려져 있다^{1,5}.

장벽에 있는 내재성 신경계통은 근육층신경절기(myenteric plexus)와 점막밑신경절기(submucous plexus) 및 이들 신경절기를 복잡하게 서로 연결하는 신경섬유로 구성된다^{1,6}. 근육층신경절기는 속돌림근과 바깥세로근 사이에서 신경세포체의 집단과 복잡하게 얽힌 신경섬유로 구성되어 있으며 점막밑신경절기는 점막밑조직에 위치한다. 대부분의 동물에서 하나의 신경절기를 구성하는 신경세포의 수는 근육층신경절기보다 적다고 알려져 있다^{1,6}. 이들 신경절기를 구성하는 신경세포는 세포체의 크기나 형태 및 신경돌기 등의 형태학적인 특성이 다양하며 전기생리학적 또는 면역조직화학적 특성 또한 다양한 것으로 보고되고 있다^{1,6-13}.

장관신경세포에는 고전적 신경전달물질 이외에도 endorphin, enkephalin, serotonin, γ -aminobutyric acid, calcitonin gene-related peptide(CGRP), substance P(SP), vasoactive intestinal polypeptide(VIP), galanin, bombesin, neuropeptide Y(NPY) 등의 다양한 신경전달물질이 존재하며 이들은 acetylcholine의 분비를 조절하거나 또는 단독으로 작용하여 장관의 운동, 분비 및 흡수기능을 조절하는 것으로 보고되었다^{1,4,14-25}.

이중 SP는 장과 뇌를 비롯하여 신체에 널리 분포되어 있는 펩타이드로 주로 흥분성 운동과 관련된 신경전달물질로 알려져 있을 뿐만 아니라 통증과 연관된 1차 감각신경세포의 주요 신경전달물질로 사용된다고 보고

되어 있다^{26,27}.

소화관에서 SP면역반응세포는 근육층신경절기의 속돌림근을 수축시켜 장관의 혼합 및 추진운동을 촉진시키며 점막밑신경절기에서는 소화관내의 기계적, 화학적 변화를 소화관 벽에 전달하는 1차 감각신경의 기능을 갖는 것으로 알려져 있다^{12,13,28-30}.

CGRP는 norepinephrine 분비를 증가시켜 간접적으로 장운동 및 분비를 감소시킬 뿐만 아니라 소장 및 담낭에서는 SP의 수축효과에 대한 길항제 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{31,32}. 그러나 반대로 SP와 공존하여 SP의 분비를 촉진시키는 한편 SP를 분해하는 효소인 SP endopeptidase의 활성을 저해하여 SP의 작용을 증가시키는 상반된 기능도 갖고 있는 것으로 보고되고 있다^{33,34}.

칼슘결합단백질(calcium binding protein)은 세포내의 칼슘을 완충시키는 역할을 하며 호르몬이나 신경전달물질이 세포 표면을 자극하면 이에 반응하여 생산되는 칼슘의 농도를 조절한다고 알려져 있다^{12,35,36}. 그러나 신경계통에서의 생리적 기능은 아직 명확히 밝혀져 있지 않다.

이중 조류의 장에서 처음 발견된 calbindin D-28k(CB)는 vitamine D에 의해 생산이 조절되는 칼슘결합단백질의 하나로서 십이지장의 신경종말에서 신경전달물질의 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다. 특히 내재성 1차 감각신경세포(intrinsic primary afferent neuron)의 좋은 표지물질로 알려져 있어 내장감각전도로의 규명에 중요한 물질로 사용되고 있다³⁷⁻⁴².

다른 칼슘결합단백질인 calretinin(CR)은 망막에서 처음 보고되었으며 CB와 아주 유사한 단백질로 중추신경계에서는 서로 다른 세포무리에 존재하는 것으로 보고되고 있다. 근래에는 몇몇 동물의 위장관에서 CB반응세포의 존재가 확인되고 있으며 소장의 사이신경원과 secretomotor neuron 및 vasodilator neuron에서 CR세포가 분포하고 있음이 보고되고 있다^{13,35,43-45}.

Parvalbumin(PA)은 토끼의 근육조직에서 처음 발견된 칼슘결합 단백질로 중추신경계에서는 병리적 변화와 관련하여 알츠하이머병(Alzheimer disease)에 이환되었을 경우 해마의 피라미트 세포에서 급격히 감소하는 것으로 알려져 있다⁴⁶. 그러나 장신경계와 관련된 PA의 연구는 거의 이루어져 있지 않다.

본 연구는 한국재래산양의 십이지장에서 SP와 CGRP 및 칼슘결합단백질을 함유하는 세포를 확인하고 이들의 분포상태를 밝혀 이들 물질이 새끼동물에서 소장의

운동에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 조직처리 : 체중 15kg 가량의 한국재래산양 수컷 6마리를 사용하였다. 실험동물은 xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer Korea)와 ketamin hydrochloride (Ketamin, 유한양행)를 체중 kg당 각각 6mg와 0.06mg의 용량으로 섞어서 근육내 주사하여 마취시킨 다음 총목동맥을 통해 방혈시키고 1,000ml당 heparin 1,000IU를 함유한 4℃의 생리식염수를 주입하여 관류세척하였다.

관류세척이 끝난 동물은 곧 4℃의 4% paraformaldehyde를 함유한 0.1M phosphate buffer(PB, pH 7.4)로 관류고정하였다.

관류고정이 끝난 동물은 복강을 열어 십이지장을 떼어낸 다음 넓게 펴서 코르크판에 점막쪽이 바깥으로 향하도록 편으로 고정하여 4℃의 동일고정액에 12시간 후 고정시켰다. 후고정이 끝난 조직의 일부는 통상적인 방법으로 파라핀에 포매한 다음 8~12µm의 절편을 제작하였다.

나머지 조직은 30% sucrose를 함유한 0.1M PB(pH 7.4)에 12시간 내지 24시간동안 담가 놓았다. 그후 코르크판에서 십이지장 조직을 떼어내 조직이 용기의 바닥에 완전히 가라앉은 것을 확인한 후 embedding medium(Reichert-Jung, Germany)에 포매하였다. 조직은 동결박절기(Reichert-Jung, Germany)를 이용하여 12~14µm 두께의 냉동조직절편을 제작하여 gelatin을 입힌 slide에 붙인 다음 -20℃의 어두운 장소에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

면역조직화학반응 : 면역조직화학 염색에 앞서 냉동조직절편을 상온에서 30분간 건조시켰으며 파라핀 절편은 통상적인 방법에 따라 파라핀을 제거시킨 다음 합수시켰다. 이들 절편은 0.1% triton X-100이 함유된 0.01M PB용액(PBT, pH 7.4)에 10분간 완충시킨 후 다시 증류수로 10분간 세척하였다.

세척이 끝난 조직은 조직내의 내재성 peroxidase를 제거하기 위해서 0.5% 과산화수소가 함유된 methanol 용액에서 30분간 반응시켰다. 이후 증류수와 PBT로 각각 10분씩 세척한 후 비특이적 반응을 방지하기 위하여 조직을 normal goat serum에 30분간 반응시킨 후 streptavidin-biotin peroxidase 법을 이용한 면역조직화학반응을 실시

하였다.

1차 항체는 rabbit anti-CGRP와 rabbit anti-SP(이상 Peninsula, USA)를 1:10,000으로 희석하여 사용하였으며 rabbit anti-CB, rabbit anti-CR, rabbit anti-PA(이상 Chemicon, USA)는 각각 1:5,000, 1:1,000 및 1:5,000으로 희석하여 사용하였다.

면역조직화학반응에 이용된 모든 항체는 3% normal goat serum 및 0.1% triton X-100이 함유된 0.1M phosphate buffered saline(PBS, pH7.4)에 녹여서 사용하였다.

각 조직은 1차 항체에 4℃에서 18~24시간동안 반응시켰다. 이후 2차 항체인 biotinylated-goat anti-rabbit IgG (Zymed, USA)를 1:200으로 희석한 용액에 상온에서 2시간 반응시켰으며 이어서 1:200으로 희석한 peroxidase conjugated streptavidin(Zymed, USA)에 상온에서 1시간 반응시켰다. 이상 각 단계의 반응후에는 PBT용액으로 4~5차례 세척하였다.

항원항체반응이 끝난 조직은 0.003% 과산화수소와 0.05% DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrachloride; Sigma, USA)가 함유된 Tris buffer(pH 7.4)용액에서 1~5분간 발색시켰다. 이중면역조직화학 염색을 위한 조직은 DAB 대신 AEC kit(Vector Laboratories, USA)로 3~5분간 발색시켰다.

발색반응이 끝난 조직은 수세후 수용성 봉입제인 Crystal mount(Biomedica, USA)로 봉입한 후 Axioplan microscope(Carl Zeiss, Germany)로 관찰하여 사진촬영을 하였다.

이중면역조직화학반응 : 염색기질을 AEC로 하여 발색시킨 일부 조직절편에 대하여는 칼슘결합단백질과의 공존여부를 알아보기 위하여 acid permanganate법⁴⁷을 이용한 이중면역조직화학염색을 실시하였다.

먼저 CB 반응세포가 확인된 슬라이드에서 cover glass를 제거한 다음 0.15M KMnO₄ 및 0.01M H₂SO₄ 혼합용액으로 조직을 50~60초간 침지시켜 1차 항체를 용출시켰다. 1차 항체를 제거시킨 조직에 대하여 다시 같은 방법으로 SP와 CGRP에 대한 면역조직화학반응을 수행하여 0.003% 과산화수소와 0.05% DAB가 함유된 Tris buffer(pH 7.4) 용액으로 발색시킨 다음 갈색으로 반응된 세포를 이미 촬영한 CB 반응부위와 대조하여 동일한 부위를 찾아 촬영하였다.

세포계수 : 면역반응한 세포를 계수하기 위하여 각 실험동물에서 최소한 2개 이상의 표본을 골라서 SP, CGRP, CB, CR 및 PA에 면역염색된 절편을 무작위로 각각 5개씩을 선정하여 다음 임의로 선정하여 100배 시야에서 보이는

모든 신경얼기의 반응세포수를 세었다. 이때 사용된 면역반응절편의 인접절편은 cresyl violet으로 염색하여 각각의 신경얼기를 구성하는 전체 세포를 세어서 반응세포의 비율을 산출하였다.

결 과

SP와 CGRP의 면역반응성 : 한국재래산양 십이지장의 점막밑신경얼기와 근육층신경얼기를 구성하는 장관신경세포는 SP와 CGRP 항체에 대하여 신경세포체와 신경섬유 모두에서 면역반응을 보였다(Table 1, 2).

Table 1. Proportions of immunoreactive neurons for substance P, CGRP and calcium binding proteins in myenteric and submucous plexuses of Korean native goat duodenum (Mean±SE)

Immunoreactive cells	% of total cells	
	Myenteric plexus	Submucous plexus
Substance P	10±2.6	73±4.4
CGRP	13±1.9	39±7.7
Calbindin D-28k	18±3.2	58±8.4
Parvalbumin	0	26±5.1
Calretinin	0	0

* 95% confidence limits.

SP에 대한 면역반응은 근육층신경얼기를 구성하는 신경세포체와 신경섬유 모두에서 강하게 관찰되었다. 전체 신경세포 중 SP양성세포의 비율은 10% 였다(Fig 1a).

근육층(muscularis externa)의 속돌림근에서도 근육섬유 사이에서 강한 SP양성섬유가 관찰되었으며 이 섬유들은 근육섬유와 같은 방향으로 주행하였다. 그러나 바깥세로근에서는 SP양성섬유가 극히 드물게 관찰되었으며 반응성도 미약하였다(Fig 1b).

점막밑신경얼기에서는 신경세포체와 신경섬유 모두에서 강한 면역반응을 보였으며 전체 세포 중 SP양성세포의 비율은 73% 였다.

점막근육관(muscularis mucosae)에서는 드문드문 짧은 SP 양성신경섬유가 관찰되었으며 점막고유관(lamina propria)에서도 중등도의 면역반응을 보인 비교적 긴 SP 양성신경섬유가 관찰되었다. 십이지장샘 상피의 일부 세

포에서도 중등도의 SP 양성반응이 관찰되었다(Fig 1c).

근육층신경얼기에서 CGRP 양성반응을 보인 신경세포체는 13%의 비율로 관찰되었다. 신경세포체는 중등도의 CGRP 양성반응을 보였으며 신경섬유는 신경세포체 주위에서 강한 양성반응을 보였다(Fig 2a).

SP와는 달리 속돌림근에서는 CGRP양성신경섬유가 작은 점 모양으로 아주 드물게 관찰되었으며 바깥세로근에서는 거의 관찰되지 않았다(Fig 2a).

점막밑신경얼기에서는 CGRP에 대한 강한 면역반응성이 신경세포체와 신경섬유 모두에서 관찰되었다. 점막밑신경얼기 중 CGRP양성세포는 39% 였다.

점막근육관과 점막고유관에서도 CGRP에 면역반응을 보인 신경섬유가 관찰되었으며 일부 섬유는 점막밑신경얼기의 CGRP반응 신경세포체로부터 점막근육관을 거쳐 점막고유관까지 이어져 있는 것도 관찰되었다(Figs 2b, c).

칼슘결합단백질의 면역반응성 : 칼슘결합 단백질 중 CB는 점막밑신경얼기와 근육층신경얼기 모두에서 강한 면역반응을 나타내었다. 그러나 CR은 근육층신경얼기의 신경섬유에서만, PA는 점막밑신경얼기의 신경세포체에서만 반응이 관찰되었다(Table 2, 3).

CB는 근육층신경얼기의 신경세포체와 신경섬유 모두에서 면역반응이 관찰되었으며 CB양성세포체의 비율은 18% 였다. 신경세포체에서 CB양성반응은 중등도인 것에서부터 아주 강한 것까지 그 정도가 다양하게 관찰되었다. CB양성섬유는 근육층 신경얼기의 신경세포체 사이에서 강하게 관찰되었다.

근육층에서는 속돌림근과 바깥세로근에서 모두 CB양성섬유가 거의 관찰되지 않았다(Fig 3a).

점막밑신경얼기에서는 58%의 신경세포체가 CB에 강한 면역반응을 보였다. CB양성신경섬유는 중등도의 반응을 보였으며 세포 주위와 점막밑조직에서 관찰되었다.

점막근육관과 점막고유관에서도 중등도의 반응을 보인 CB섬유가 다수 관찰되었다. 점막밑 신경얼기의 CB양성세포에서부터 점막근육관을 지나 점막고유관까지 이어진 신경섬유도 관찰할 수 있었다(Fig 3b).

십이지장 샘상피 중 다수의 세포에서 강한 CB양성반응을 보였으며 십이지장용모의 상피중에서도 CB양성세포가 관찰되었다. 이들 반응세포들은 점막근육관 근처에서 가장 많이 관찰되었으며 십이지장 내강쪽으로 갈수록 점차 줄어들었다(Fig 3c).

Table 2. Immunoreactivities for Substance P, CGRP and calcium binding proteins in Korean native goat duodenum

	Substance P	CGRP	Calbindin	Parvalbumin	Calretinin
Myenteric plexus					
cell bodies	++	++	+++	-	-
nerve fibers	+++	+++	+++	-	++
Circular muscle layer	+++	+	±	-	±
Longitudinal muscle layer	+	-	-	-	-
Submucous plexus					
cell bodies	+++	++	+++	+	-
nerve fibers	+++	+++	++	±	-
Muscularis mucosae	+	+	++	-	-
Lamina propria	++	+	++	-	-
Glandular epithelium	+	±	+++	-	-
Villial epithelium	++	-	+++	-	-

* +++ : strong, ++ : moderate, + : weak, ± : very weak, - : negative.

PA에 양성반응을 보인 세포는 점막밑신경절기에서만 관찰되었으며 근육층신경절기에서는 PA에 반응한 세포가 관찰되지 않았다.

PA 면역반응은 점막밑신경절기의 신경세포체에서만 매우 미약하게 나타났으며 그 비율은 전체세포 중 26%였다. 그러나 신경섬유는 신경세포체 주위에서 아주 약한 반응섬유가 흔적적으로만 관찰되었다(Fig 4).

점막근육판과 점막고유판 및 점막의 상피에서는 PA 양성반응이 관찰되지 않았다.

CR에 양성반응을 보인 세포는 근육층신경절기의 신경섬유에서만 관찰되었고 중등도의 면역반응을 보였으며 근육층신경절기의 신경세포체 주위에서 실타래 모양으로 관찰되었다. 속돌림근에서 매우 드물게 미약한 CR양성신경섬유들이 관찰되었으나 바깥세로근에서는 CR양성신경섬유가 관찰되지 않았다(Fig 5).

점막밑신경절기에서는 신경세포체와 신경섬유 모두 CR에 반응하지 않았다. 또한 점막근육판, 점막고유판, 십이지장샘 및 용모상피에서도 CR 반응은 관찰되지 않았다.

SP 및 CGRP와 CB와의 이중면역화학반응 : 본 실험에서 사용한 칼슘결합단백질인 CB, CR, PA 중에서 CB만이 점막밑신경절기와 근육층신경절기에서 모두 강한

면역반응을 보였다. 따라서 CB반응세포가 SP 및 CGRP도 함께 함유하고 있는지를 관찰한 결과 CB반응세포는 점막밑신경절기와 근육층신경절기 모두에서 이 두 물질과 공존하는 것이 확인되었다(Table 3).

Table 3. Proportions of calbindin immunoreactive neurons colocalized with SP and CGRP in Korean native goat duodenum (Mean ± SE)

	Neurons colocalized with calbindin	
	Myenteric plexus	Submucous plexus
Substance P	67 ± 37.7	92 ± 8.2
CGRP	75 ± 28.3	87 ± 13.9

* 95% confidence limits.

근육층신경절기에서 CB반응세포 중에서 SP에도 면역반응한 신경세포는 67%의 비율로 관찰되었다. CB와 SP에 함께 양성반응을 보인 근육층신경절기의 신경섬유는 실타래 모양으로 관찰되었다(Figs 6a, b).

점막밑신경절기에서 CB반응세포 중 SP에도 함께 반응한 세포의 비율은 92%였다. 점막밑신경절기의 신경세포체 주위와 점막밑조직, 점막근육층 및 점막고유층에서도 CB와 SP에 모두 면역반응을 보인 신경섬유가 관

찰되었다. 또한 십이지장 생상피와 장운동상피에서도 CB와 SP를 모두 함유하는 세포가 관찰되었다(Figs 6c, d).

근육충신경절기에서 CB반응세포 중 CGRP에도 양성 반응을 보인 신경세포체의 비율은 75%로 관찰되었다(Figs 7a, b).

점막밑신경절기의 CB반응세포에서 CGRP에 양성 반응을 보인 신경세포체의 비율은 87% 였으나 반응성은 미약하였다. 점막근육층과 점막고유층에서도 CGRP와 CB에 모두 면역반응을 보인 신경섬유가 관찰되었으나 그 수는 적었다(Figs 7c, d).

고 찰

십이지장을 포함한 소장에서는 분절, 시계추, 움모운 동 등의 혼합운동 및 연동운동과 같은 추진운동이 서로 유기적으로 이루어져 각종 소화액과 장내용물이 혼합되 도록 하여 소화관내 소화를 도울 뿐만 아니라 장내용물 이 소장의 점막과 많은 접촉이 이루어지게 한다².

이러한 장운동은 일차적으로 근육충신경절기를 경유 하여 조절되는데 이를 구성하는 신경세포는 크게 감각, 운동 및 사이신경세포로 이루어져 있으며 복잡하게 연 결된 신경섬유들이 근육층 뿐만 아니라 장운동에도 분 포한다고 보고되었다². 근육충신경절기에는 acetylcholine (ACh)과 norepinephrine 등의 고전적 신경전달물질 이외 에도 SP, CGRP, VIP, NPY, serotonin과 같은 신경전달물 질이 존재하며 이들 물질이 직접 근육섬유의 수용기에 작용하거나, 신경종말에서 ACh이 분비되는 것을 조절하 여 근육의 수축이나 이완이 일어나는 것으로 알려져 있 다.^{1,4,14-17,19-23,25}

점막밑신경절기는 주로 장운동의 운동과 혈관의 확장 을 통하여 상피의 흡수를 촉진시키고 십이지장생의 분 비를 조절하는 등, 운동조절의 기능을 할 뿐만 아니라 내재성 일차 감각신경세포로 존재하여 소장벽이 기계적 혹은 화학적 자극을 받을 경우 근육층에 감각정보를 보 내는 역할을 담당하기도 한다.^{2,12}

점막근육판은 점막과 점막밑조직 사이에 위치하는 얇 은 근육의 판상구조물로서 움모의 끝까지 뻗어 있는 근 육섬유와 연결되어 있어서 움모와 장내용물이 잘 접촉 하도록 움모의 운동을 돕는다².

Li와 Furness⁴⁸는 기니피크 소장의 근육충신경절기에서 SP는 ACh 합성효소인 choline acetyltransferase(ChAT) 면

역반응세포와 99%의 공존율을 보이며 따라서 SP가 ACh 의 분비에 영향을 미쳐 장벽에서 근육층의 운동을 조절 할 가능성이 있다고 보고하였다. Yau²⁶는 바깥세로근을 대상으로 atropine, tetrodotoxin 및 lioresal 등 ACh의 길항 제(antagonists)를 투여한 다음 SP의 효과를 관찰한 결과 길항제의 유무와 관계없이 바깥세로근의 수축강도에는 차이가 없었으며 따라서 SP가 직접 평활근에 작용하여 수축을 유도할 것이라고 보고하였다. 이러한 사실은 SP 가 다양한 기전을 통하여 장운동을 조절하는 것임을 보 여주는 것이다.

본 실험에서도 SP면역반응은 근육충신경절기의 신경 세포체와 신경섬유에서 모두 강하게 나타났으며 속돌립 근에서도 근육섬유 사이에서 다수의 강한 SP면역반응섬 유가 관찰되었다. 이는 근육충신경절기의 SP가 직접 속 돌립근에 작용해서 장운동을 일으킨다는 것을 시사해주는 결과라고 생각된다. 이와 관련하여 Lomax *et al*³⁶도 기니피크의 속돌립근에서 SP가 속돌립근의 운동을 직접 조절함으로써 SP가 장운동에 중요한 역할을 담당한다고 하였다.

한편 말의 근육충신경절기에서는 SP면역반응세포가 관찰되지 않고 신경섬유만이 다수 강하게 관찰된다고 보고되고 있다²⁹. 이는 근육충신경절기의 SP면역반응은 동물에 따라 차이가 많음을 의미하는 것으로, 말의 경우 근육충신경절기의 SP신경섬유는 중추신경계에서 유래 한 외인성 신경섬유이거나 또는 점막밑신경절기에서 유 래했을 것으로 생각된다. 그러나 한국재래산양의 근육 충신경절기에서는 10%의 신경세포체가 SP에 양성반응 을 보인 것으로 미루어 볼때 SP면역반응섬유의 대부분 은 해당 근육충신경절기나 이웃한 근육충신경절기의 SP면역반응세포에서 유래한 흥분성 운동신경섬유일 가 능성이 높은 것으로 사료된다.

Clerc *et al*¹³은 근육충신경절기의 SP면역반응세포를 투사부위에 따라 바깥세로근에 축삭을 내는 세포와 속 돌립근에 축삭을 내는 세포의 2종류로 분류하였다. 그러나 한국재래산양의 경우 바깥세로근에서는 SP반응섬유 가 아주 드문 반면 속돌립근에는 SP면역반응섬유가 훨씬 많은 것으로 볼때 근육충신경절기의 SP반응세포체는 대부분 속돌립근으로 축삭을 내는 것으로 생각된다. 또 한 SP면역반응섬유의 주행방향이 주로 속돌립근의 근육 섬유방향과 일치한 점은 효과적으로 소장벽의 추진운 동 을 하기 위하여는 속돌립근이 바깥세로근에 비하여 훨

션 유기적이며 협동적으로 기능을 수행하는 것으로 판단된다.

점막밀신경얼기에서 관찰되는 SP양성세포는 소화관 내의 기계적, 화학적 자극과 같은 정보를 근육층신경얼기로 전달해주는 역할을 하는 내재성 일차 감각신경세포로 알려져 있다¹³. 그러나 점막밀신경얼기에서 관찰되는 대부분의 SP면역반응섬유는 그 유래가 근육층신경얼기라고 보고되고 있다⁴⁹. 본 실험의 경우 SP에 면역반응된 신경세포체는 근육층신경얼기에서 10%로 랫드⁵⁰의 22% 보다 낮았다. 그러나 점막밀신경얼기에서는 73%로 랫드⁵⁰의 35%나 기니픽¹²의 12% 보다 훨씬 많았다. 이는 한국재산양의 경우 소화관내의 자극이 직접 근육층신경얼기로 전달되는 비율보다 점막밀신경얼기를 경유하여 근육층신경얼기로 전달되는 비율이 다른 동물보다 높음을 의미하는 것으로 생각된다. 이와같은 감각전도로를 취할 경우 점막밀신경얼기를 경유해서 여러개의 근육층신경얼기가 동시에 반응을 할 수 있기 때문에 빠른 반응을 요구하는 자극에 더욱 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

또한 점막밀신경얼기의 많은 수가 SP를 함유한 것은 이중 일부가 장운동의 운동에도 관여할 것으로 생각된다. 즉, 이들 SP반응세포는 점막근육판과 점막고유판에서 관찰된 강한 SP면역반응 신경섬유와 함께 십이지장운동의 운동을 촉진하는 중요한 역할을 담당하는 것으로 판단된다.

CGRP는 한국재산양의 경우 근육층 신경얼기에서 13%의 신경세포에서 양성반응이 관찰되어 SP와 거의 비슷한 정도의 분포양상을 보였으나 점막밀신경얼기에서는 39%로 SP에 비하여 낮은 양성반응을 보였다. CGRP가 장관신경계통에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여는 잘 알려져 있지 않다. 그러나 소뇌의 Purkinje cell에서 CGRP는 SP의 작용을 강화시켜준다는 보고에 비추어 볼 때 본 실험에서 관찰된 근육층신경얼기의 CGRP반응세포는 십이지장벽의 근육운동에 대한 SP의 기능을 촉진시켜줄 것으로 생각된다^{34,51}. 또한 속돌림근층에서 많은 SP반응섬유가 존재한 것과는 달리 CGRP반응섬유는 관찰되지 않은 점은 CGRP가 직접 속돌림근에 영향을 미치는 것이 아니라 속돌림근에 투사하는 근육층신경얼기의 SP면역반응세포의 기능을 조절하여 십이지장 수축작용을 증가시키는 기능을 담당하리라고 여겨진다.

한편 점막밀신경얼기에서 CGRP반응세포체로부터 신

경섬유가 점막근육판을 거쳐 점막고유판까지 이어진 것이 관찰되었는데 이는 SP와는 독립적으로 장운동의 운동에 있어서는 CGRP가 직접 관여할 수 있다는 추정을 가능케 하는 것으로 이에 대하여는 SP 길항제의 투여 등을 통한 추가적 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

CB는 세포내에서 신경전달물질의 생성 및 분비에 필수적인 기능을 하는 칼슘이온을 조절하는 물질이다. 따라서 세포의 기능적 활성을 나타내는 중요한 지표로 사용되고 있다^{29-40,42}.

장관의 근육층신경얼기에서 CB는 내재성 감각세포의 표지물질로 이용되고 있으나 근래에는 CB가 축삭종말에도 함유하고 있음이 확인되어 이 물질이 신경전달물질의 역할을 갖고 있을 것으로 여겨지고 있다^{37,38,52,53}.

본 실험에서 CB는 근육층신경얼기와 점막밀신경얼기에서 각각 18%와 58%의 세포에서 관찰되었는데 이는 CB가 이들 신경얼기의 세포기능에 큰 역할을 담당하고 있음을 시사해주는 결과라고 생각된다. 더욱이 CB반응세포중 근육층신경얼기에서는 각각 67%와 75%가, 점막밀신경얼기에서는 각각 92%와 87%가 SP 및 CGRP와 공존하고 있는 점은 Resibois *et al*^{52,53}이 주장한 대로 CB가 단순히 칼슘이온의 조절 뿐 아니라 신경전달물질로 작용하거나 또는 신경조절물질로 작용하여 SP나 CGRP의 장운동을 조절할 것으로 추정된다.

한편 PA는 점막밀신경얼기에만 아주 미약한 반응을 보였는데 이는 PA가 십이지장 근육층의 운동이나 장운동의 운동에 거의 관여하지 않음을 의미하는 결과로 생각된다.

CB 반응세포는 CR 반응세포와 마찬가지로 동물에 따라 분포상태가 크게 다른 것으로 보고되고 있다. 즉, Clerc *et al*¹³은 기니픽 십이지장에서 CB와 CR이 근육층신경얼기에서 각각 17%와 30%의 세포에서 나타났다고 하여 특히 CR 반응세포의 경우 신경섬유에서만 반응이 나타난 본 실험과는 큰 차이를 보였다. Walters *et al*³⁵도 사람의 십이지장에서 CB반응세포가 근육층신경얼기에서 38%로 점막밀신경얼기의 13% 보다 많았다고 하여 본 실험에서 각각 18%와 58%로 관찰된 결과와 달랐다. CR반응세포도 근육층신경얼기와 점막밀신경얼기의 세포중 각각 21%와 23%를 차지하였다고 하였으나 본 실험에서는 근육층신경얼기의 신경섬유에서만 나타났을 뿐 점막밀신경얼기에서는 확인할 수 없었다.

Clerc *et al*¹³은 CB와 CR반응세포는 모두 ChAT에도

반응하였다고 하며 이들 세포가 cholinergic neuron의 기능을 긴밀하게 조절하고 있음을 밝혔다. 그러나 본 실험에서 CR반응이 근육층신경절기의 신경섬유에만 적게 분포할 뿐 아니라 CB반응세포의 분포상태에도 차이가 많은 점은 장운동에 관여하는 cholinergic neuron의 기능 조절에 CB와 CR 이외에도 다른 신경전달물질이 관여할 것이라는 추측을 가능케 한다.

따라서 한국재래산양 십이지장의 점막밑신경절기와 근육층신경절기를 구성하는 신경원들은 이들 동물과는 다소 다른 기전에 의하여 소장의 운동에 관여하는 것으로 여겨진다. 그러나 이에 대한 보다 분명한 기전은 VIP, NPY, ChAT 등 기타 관련물질의 연구가 더 이루어져야 가능할 것으로 생각된다.

결 론

한국재래산양 십이지장에 분포하는 장관신경세포에서 SP와 CGRP 및 칼슘결합단백질의 분포상태를 면역조직화학적 방법으로 규명한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 십이지장의 점막밑신경절기와 근육층신경절기를 구성하는 장관신경세포는 SP, CGRP, CB 항체에 대하여

신경세포체와 신경섬유 모두에서 면역반응이 나타났다. 그러나 CR은 근육층신경절기의 신경섬유에서만, PA는 점막밑신경절기의 신경세포체에서만 반응을 나타내었다.

2. 속돌립근에서도 SP에 강하게 면역반응한 신경섬유가 관찰되었으며 이들 섬유는 근섬유와 같은 방향으로 주행하였다.

3. SP, CGRP 및 CB 면역반응은 점막근육판과 점막고유판의 신경섬유에서도 관찰되었으며 일부 CGRP반응 섬유는 점막밑신경절기의 신경세포체로부터 일어나 점막근육층을 거쳐 점막고유판 속으로 주행하는 것도 관찰되었다.

4. 근육층신경절기의 CB면역반응세포는 각각 67%와 75%가 SP 및 CGRP와 공존하였으며 점막밑신경절기에서는 각각 92%와 87%가 공존하였다.

이와같은 결과로 미루어 볼때 한국재래산양 십이지장의 장관신경계에는 SP, CGRP, CB가 다량 분포하며 이 세포들은 소장의 운동에 긴밀히 관여할 것으로 추정된다. 또한 이들 반응세포의 분포상태는 다른 동물에 비하여 다소의 차이가 있으며 이는 소장의 운동기능에도 다른 영향을 미칠 것으로 생각된다.

Legends for figures

Figs 1-5. Photomicrographs taken from longitudinal sections(except 1b: transverse section) of myenteric and submucous plexuses in Korean native goat duodenum. The sections were stained with one of anti-substance P(SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), calbindin(CB), calretinin(CR), and parvalbumin(PA), and visualized by DAB(Figs 1, 2, 4, 5) and AEC(Fig 3). (× 200)

Fig 1. SP immunoreactive neurons and nerve fibers are located in myenteric plexus between inner circular and outer longitudinal muscle layers(a). SP immunoreactive fibers are observed to run parallel with inner circular muscle fibers in transverse section(b). Strong SP immunoreactive neurons and nerve fibers are prominent in submucous plexus(c). SP immunoreactivities are also seen in nerve fibers of lamina propria and muscularis mucosa.

Fig 2. CGRP immunoreactivities in myenteric(a) and submucous(b, c) plexuses. The distribution pattern of CGRP immunoreactive neurons and fibers in myenteric plexus is similar to that of SP, but only a few CGRP immunoreactive fibers are observed in inner circular muscle layer(a). Some CGRP immunoreactive fibers arised from cell body in submucous plexus run to both of lamina propria and muscularis mucosa(c).

Fig 3. Many CB immunoreactive neurons and fibers are seen in myenteric(a) and submucous(b) plexuses. A lot of cells are also immunoreacted in glandular and villial epithelia(c).

Fig 4. PA immunoreactivities are observed only in submucous plexus and the immunoreactivity is very weak. The number of immunoreactive neurons is fewer than those of SP and CGRP.

Fig 5. CR immunoreactivities are observed only in nerve fibers of myenteric plexus, but not in submucous plexus.

Figs 6~7. Photomicrographs taken from sections of myenteric and submucous plexuses of Korean native goat duodenum. In plates a and c, the sections were stained with anti-CB, and visualized by AEC. In plates b and d, the same sections of plates a and c were stained with anti-SP(Fig 6), and CGRP(Fig 7) after removal of CB antiserum and their color substrates. These sections were visualized by DAB. (× 200)

Fig 6. Strong SP immunoreactivities(b, d) are observed in CB immunoreactive neurons(a, c) in both of myenteric(a, b) and submucous(c, d) plexuses.

Fig 7. Many CB immunoreactive neurons(a) of myenteric and submucous(c) plexuses are colocalized with CGRP(b, d). But in submucous plexus, CB immunoreactive neurons(c) show very weak reaction with CGRP(d).

참 고 문 헌

1. Furness JB, Costa M. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience*, 5:1-20, 1980.
2. Swenson MJ, Reece WO. *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 11th ed, Comstock Cornell Univ Press, New York, 325-348, 1993.
3. 송영식, 허경발, 정인혁 등. 미주신경 절단후 위장관 근층간신경총의 조직계측학적 연구. 연세의대 논문집, 17:415-427, 1984.
4. Kirchgessner AL, Gershon MD. Identification of vagal efferent fibers and putative target neurons in the enteric nervous system of the rat. *J Comp Neurol*, 285: 38-53, 1989.
5. Messenger JP, Furness JB. Distribution of enteric nerve cells that project to the coeliac ganglion of the guinea-pig. *Cell Tiss Res*, 269:119-132, 1992.
6. Kandel ER, Schwartz JH, Jellell TM. *Principles of neural science*. 3rd ed., Appleton & Lange, Connecticut, 766-768, 1991.
7. 이혜연, 박승화, 정인혁. 흰쥐 근층간신경총과 점막 하신경총의 신경세포 분포에 대한 형태정량적 연구. 대한해부학회지, 20:165-173, 1987.
8. Gunn M. Cell types in the myenteric plexus of the cat. *J Comp Neurol*, 111:89-93, 1959.
9. Leaming DB, Cauna N. A qualitative and quantitative study of the myenteric plexus of the small intestine of the cat. *J Anat*, 95:160-169, 1961.
10. Baumgarten HG, Holstein AF, Owman CH. Auerbach's plexus of mammals and man: Electron microscopic identification of three different types of neuronal processes in myenteric ganglia of the large intestine from rhesus monkeys, guinea-pigs and man. *Z Zellforsch*, 106:376-397, 1970.
11. Gabella G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J Anat*, 109:81-95, 1971.
12. Clerc N, Furness JB, Bornstein JC, et al. Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of myenteric neurons of the duodenum in the guinea-pig. *Neuroscience*, 82:899-914, 1998a.
13. Clerc N, Furness JB, Bornstein JC, et al. Morphological and immunohistochemical identification of neurons and their targets in the guinea-pig duodenum. *Neuroscience*, 86:679-694, 1998b.
14. Larsson LI, Fahrenkrug J, Muckadell OS, et al. Localization of vasoactive intestinal polypeptide(VIP) to central and peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:3197-3200, 1976.
15. Schultzberg M, Dreyfus CF, Gershon MD, et al. VIP-, enkephalin-, substance P- and somatostatin-like immunoreactivity in neurons intrinsic to the intestine: immunohistochemical evidence from organotypic tissue cultures. *Brain Res*, 155:239-248, 1978.
16. Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide: Meas-

- urement, Distribution and putative neurotransmitter function. *Digestion*, 19:149-169, 1979.
17. Malmfors G, Leander S, Brodin E, *et al.* Peptide-containing neurons intrinsic to the gut wall. *Cell Tiss Res*, 214:225-238, 1981.
 18. Hills JM, Jessen KR, Mirsky R. An immunohistochemical study of the distribution of enteric GABA-containing neurons in the rat and guinea-pig intestine. *Neuroscience*, 22:301-312, 1987.
 19. 김재역, 이해연, 정인혁 등. 원쥐 소장벽 신장총의 vasoactive intestinal polypeptide 함유 신경원의 분포에 대한 면역조직화학적 연구. 연세의대 논문집, 20:71-86, 1987.
 20. Wolter HJ. Adrenocorticotropin and β -endorphin are colocalized in the nervous system of rat duodenum. *Biochem Biophys Res Commun*, 117:568-573, 1983.
 21. Wolter HJ. Co-existence of the enkephalergic system and the melanotropinergic system in the rat duodenum shown by immunohistochemistry. *Life Sci*, 41:717-721, 1985.
 22. Wolter HJ. Colocalization of dynorphin-A(1-17) and dynorphin-A(1-8) within some perikarya of rat duodenum: Immunohistochemical evidence for the presence of two separate dynorphinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun*, 130:774-780, 1987.
 23. Lees GM, Mackenzie GM, Pearson GT. Complex correlations between the morphology, electrophysiology and peptide immunohistochemistry of guinea-pig enteric neurones. *Eur J Morphol*, 30:123-136, 1992.
 24. Bagnol D, Henry M, Cupo A *et al.* Distribution of enkephalin-like immunoreactivity in the cat digestive tract. *J Auton Nerv Syst*, 64:1-11, 1997.
 25. Fujimiya M, Okumiya K, Yamane T *et al.* Distribution of serotonin-immunoreactive nerve cells and fibers in the rat gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol*, 107:105-114, 1997.
 26. Yau WM. Effect of substance P on intestinal muscle. *Gastroenterology*, 74:228-231, 1978.
 27. Kruk ZL, Pycock CJ. *Neurotransmitters and Drugs*. Edmundsbury Press, Suffolk, 189-190, 1991.
 28. Schmidt P, Poulsen SS, Rasmussen TN *et al.* Substance P and neurokinin A are codistributed and colocalized in the porcine gastrointestinal tract. *Peptides*, 12:963-973, 1991.
 29. Pearson GT. Structural organization and neuropeptide distributions in the equine enteric nervous system: an immunohistochemical study using whole-mount preparations from the small intestine. *Cell Tiss Res*, 276:523-534, 1994.
 30. Schemann M, Schaaf C, Mader M. Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach. *J Comp Neurol*, 353:161-178, 1995.
 31. Lenz HJ, Silverman TA, Messmer AG *et al.* Increased sympathetic outflow to the gut by cerebral CGRP inhibits duodenal, pancreatic, small intestinal and biliary functions. *Ann N Y Acad Sci*, 657:522-4, 1992.
 32. Hashimoto T, Poston GJ, Greeley GH Jr *et al.* Calcitonin gene-related peptide inhibits gallbladder contractility. *Surgery*, 104(2):419-23, 1988.
 33. Raybould HE. Inhibitory effects of calcitonin gene-related peptide on gastrointestinal motility. *Ann N Y Acad Sci*, 657:248-57, 1992.
 34. 이인세, 이홍식, 서제훈 등. Mongolian gerbil 소뇌에서의 CGRP 분포에 관한 면역조직화학적 연구. 서울대학교 수의대논문집, 23:1-9, 1998.
 35. Walters JRF, Bishop AE, Facer P *et al.* Calcitonin and calbindin-D28k immunoreactivity in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 104:1381-1389, 1993.
 36. Lomax AEG, Bertrand PP, Furness JB. Identification of the populations of enteric neurons that have NK1 tachykinin receptors in the guinea-pig small intestine. *Cell Tiss Res*, 294:27-33, 1998.
 37. Jande SS, Maler L, Lawson DEM. Immunohistochemical mapping of vitamin D-dependent calcium-binding protein in brain. *Nature*, 294:765-770, 1981.
 38. Jande SS, Tolnai S, Lawson DE. Immunohistochemical localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein in duodenum, kidney, uterus and cerebellum of chickens. *Histochemistry*, 71(1):99-116, 1981.
 39. Norman AW. Intestinal calcium absorption: a vitamin D-hormone-mediated adaptive response. *Am J Clin Nutr*, 51:290-300, 1990.

40. Lee YS, Taylor AN, Reimers TJ, *et al.* Calbindin-D in peripheral nerve cells is vitamin D and calcium dependent. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:7344-7348, 1987.
41. Wasserman RH, Taylor AN, Kallfelz FA. Vitamin D and transfer of plasma calcium to intestinal lumen in chicks and rats. *Am J Physiol*. 211:419-23, 1966.
42. Shamley DR, Opperman LA, Buffenstein R *et al.* Ontogeny of calbindin-D28k and calbindin-D9k in the mouse kidney, duodenum, cerebellum and placenta. *Development*, 116:491-496, 1992.
43. Rogers JH. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol*, 105:1343-1353, 1987.
44. Rogers JH. Two calcium-binding proteins mark many chick sensory neurons. *Neuroscience*, 31:697-709, 1989.
45. Brookes SJH, Song ZM, Steele PA *et al.* Identification of motor neurons to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum. *Gastroenterology*, 103:961-973, 1992.
46. Brady DR, Mufson EJ. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of Alzheimer's diseased brain. *Neuroscience*, 80:1113-25, 1997.
47. Tramu G, Pillez A, Leonardelli J. An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 26:322-324, 1978.
48. Li ZS, Furness JB. Immunohistochemical localisation of cholinergic markers in putative intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell Tiss Res*, 294:35-43, 1998.
49. Costa M, Furness JB, Llewellyn-Smith IJ, *et al.* Projections of substance P-containing neurons within the guinea-pig small intestine. *Neuroscience*, 6:411-424, 1981.
50. 이해연, 장재천, 박경아. 방사선 조사가 발생중 흰쥐 장신경계의 substance P 함유 신경세포에 미치는 영향. *대한해부학회지*, 23:324-338, 1990.
51. Kang TC, Seo J, Lee IS *et al.* The existence of substance P in Purkinje cells in cerebellum of the gerbil. *Brain Res*, 778:397-400, 1997.
52. Resibois A, Vienne G, Pochet R. Calbindin-D28k and the peptidergic neuroendocrine system in rat gut: an immunohistochemical study. *Biol Cell*, 63:67-75, 1988.
53. Resibois A, Rypens F, Pochet R. Epithelial and neuronal calbindin in avian intestine. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 251:611-620, 1988.