

공초점현미경을 이용한 암수 흰쥐 청색반점의 비교연구

박일권 · 송치원 · 이경열 · 권효정 · 김무강 · 이강이* · 정영길** · 이남섭** · 하권수***

충남대학교 수의과대학 조직학교실 · 대전대학교 한의과대학*
건양대학교 의과대학 해부학교실** · 기초과학지원연구소***
(2000년 8월 3일 게재승인)

Study for comparison with male & female rat locus coeruleus using confocal laser scanning microscopy

Il-kwon Park, Chi-won Song, Kyung-youl Lee, Hyo-jung Kwon, Moo-kang Kim,
Kang-lee Lee* , Young-gil Jeong** , Nam-seob Lee** , Kwon-soo Ha***

Department of Histology, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University
*College of Oriental Medicine, Taejon University**
*Department of Anatomy, College of Medicine Gonyang University***
*Korea Basic Science Institute****

(Accepted by Aug 3, 2000)

Abstract : The locus coeruleus(LC) is known to be observed a sexual dimorphism in rat CNS. LC is the largest collections of norepinephrine(NE)-containing neurons in the mammalian brain. Especially in rat, all LC neurons contained NE unlike other mammals, so that specific reactions were found in the tyrosine-hydroxylase(TH) immunoreactive neurons. Sexual dimorphism of rat LC has affected by genes before sex hormone appeared, thereafter affected by sex hormones. In these day, many scientists founded morphological differences between male and female LC morphology, but differences of entire structure was not founded. Thus we investigated sex differences of the LC neuron's morphology in rat by three-dimensional(3-D) reconstruction using Confocal laser scanning microscopy(CLSM).

We reported that neuron's shape was relatively-large multipolar neurons and neuron's processes in dorsal LC proceeded to ventral direction in the male and female rat. Male had a longer anterior-posterior length than female had in dorsal LC. In addition to middle-LC, male rat's LC had a more thicker posterior region but had not viewed in a previous study. In reverse, female rat's LC had a thicker anterior region like a previous study. This results using 3-D reconstruction by CLSM showed that the male's LC was more wide-ranging than female's relatively.

Key words : locus coeruleus, sexual dimorphism, confocal microscopy, norepinephrine, rat.

서 론

청색반점(locus coeruleus, A6)은 포유류의 뇌에서 norepinephrine(NE)을 합성, 분비하는 신경세포들의 가장 큰 집합체로서 많은 포유동물에서 그들의 형태학적인 연구가 이루어진 바 있으며¹, 본 실험에서 사용한 흰쥐에서도 면역염색을 통한 청색반점의 뇌내 위치와 신경원의 형태²⁻⁴ 및 분포⁵⁻⁹, 포함하고 있는 신경전달물질^{1,2,5,9,10}, 지배부위^{9,11-15} 등의 연구가 이루어져 왔으며 최근에는 청색반점에서부터 뇌의 여러 부위로 투사하는 신경의 형태가 암수에서 차이가 있다는 비교연구도 발표된 바 있다^{2,5}.

일반적으로 각 동물의 청색반점을 구성하고 있는 세포는 일반염색¹과 면역염색^{7,9,16}에 의해 형태를 분류할 수 있다. 흰쥐의 청색반점 신경원은 Golgi 염색방법에 의해 대형 못극신경원, 중형의 방추형 신경원 및 소형의 구형 신경원 등 3가지로 분류하여 관찰할 수 있지만¹⁷ 다른 포유동물과는 달리 멜라닌 색소가 포함되어 있지 않아서 청색을 띄지 않는 것으로 알려져 있다¹. 흰쥐의 청색반점에서 신경섬유가 투사하는 부위를 확인하기 위해 Horseradish peroxidase¹²나 Fast Blue⁹와 같은 역추적물질(retrograde transport material)을 이용하여 연구한 결과, 청색반점의 앞쪽 및 뒷쪽 부분에서는 해마체 및 대뇌부위로, 뒤쪽 및 배쪽에서는 소뇌 및 척수로 투사되어짐이 밝혀졌고, 투사되는 부위중에서도 감정을 지배하는 해마체 부위는 암수 성격형성에도 많은 영향을 미친다는 많은 연구결과가 나타나 있으며^{9,11,12,14,18} 청색반점 신경세포의 성장에서 성선자극호르몬(gonadotrophin)과 성호르몬(sex hormone)이 많은 영향을 준다는 것도 알려져 있어¹⁹ 성차에 따라 그 형태 등이 다르게 나타날 수 있음을 제시하여 밝힌다. 또한 흰쥐의 청색반점을 구성하는 각 신경원들의 표현형 발현(phenotypic expression)이 임신 12 일전에 나타남에도 불구하고, 신경원이 재구성되고 신경원들의 형태가 변하는 것은 그 후에 일어나므로 성적 차이는 유전자와 호르몬 양자의 차이에 의해 발생할 수 있다는 연구결과도 발표되어 있다²⁰⁻²². 이러한 암수차이들이 mRNA에 의한 유전적인 원인이든지 또는 성호르몬의 차이에 의한 것이든지 간에 암수성차에 따라 청색반점의 형태적인 차이가 있는 것만은 틀림없는 것으로 밝혀졌지만 그 차이가 어느 부위에서 어느 정도, 어떻게

존재하는지에 대해서는 아직까지 자세히 연구된 보고는 없다. 물론 청색반점에 관해서 각 동물^{1,2,7,11,23,24} 및 신경원의 형태^{1,11,17,19,22,25}, 투사부위^{9,12,14,18,22} 등에 관해서도 많은 연구를 한 바 있지만 흰쥐 암수성차에 따르는 청색반점의 형태적인 차이를 비교연구한 기본적인 연구가 많지 않으므로 전체적인 형태의 비교를 나타낼 수 있는 연구가 요구되고 있다.

본 연구에서는 흰쥐 암수 청색반점의 형태를 아직까지 시도된 적 없는 공초점현미경을 이용하여 뇌내에서의 3차원적 전체형태 및 청색반점 구성신경원들의 입체적인 위치관계 그리고 그들 상호간에 존재하는 신경세포들 등을 구축하였고 이를 바탕으로 청색반점에서의 부위별 구성세포들의 분포 및 구조를 규명하여 흰쥐에서의 암수성별에 따른 청색반점의 형태적인 차이를 밝히고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 실험동물로서는 한 배에서 태어난 8주령 Sprague-Dawley 흰쥐(SD 흰쥐)를 2회에 걸쳐 암수 각각 1마리씩 네 군으로 나누어 총 16마리를 사용하였으며, 광주기는 주야시간을 각각 12:12로, 온도는 22±1℃로 환경적용치에 부합되도록 관리하였다. 실험에 사용된 흰쥐의 평균체중은 수컷이 218g이었으며, 암컷은 193g이었다. 제1군은 뇌도보(atlas) 작성 및 청색반점의 위치 확인을 위해서, 제2군은 제1의 방법으로 미리 확인된 청색반점 부위를 신경원 형태와 청색반점 각 부분의 길이와 넓이를 관찰하기 위하여, 제3군은 청색반점의 신경원을 입체적으로 나타내기 위해 마지막 제4군은 암수에서 청색반점 전체형태를 비교 관찰하기 위해 제3군과 같이 청색반점 부위를 단지 두께만 더 두껍게 하여 3차원 구축에 사용하고자 한다.

조직처리 : 50mg/kg의 양으로 sodium pentobarbital을 복강내 주사하여 전신마취한 후 흉강을 열고 좌심실을 통하여 오른대동맥에 관류용 세관(cannula)를 삽입한 다음 이 세관으로 0.9% sodium nitrite와 0.005% heparin(녹십자)이 함유된 0.1M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)을 체온과 같은 37℃로 만들어 관류하였다. 그런 다음 가슴대동맥을 결찰하여 4% paraformaldehyde(in 0.1M PBS, pH 6.5)를 관류시켜 뇌를 1차 고정하였고, 다시 Borate buffer(pH 11.0)와 1:1로 혼합한 4% paraformaldehyde로 재

고정하였다. 그후 두개골과 뇌막을 제거하고 뇌를 적출하여 4% paraformaldehyde(in borate buffer)에 24시간동안 후고정한 후 동결손상을 최소화 하기 위하여 10% sucrose (in 0.1M PB), 20% sucrose(in 0.1M PB)에 각각 24시간씩 담근 후 30% sucrose(in 0.1M PB) 액에서 뇌가 완전히 가라앉을 때까지 침적시켰다. Vibratome을 이용시에는 sucrose에 침적하는 과정을 생략하였다. 그후 1, 2, 3군은 40 µm로 수평절단(horizontal section)하였으며, 제4군은 전체적인 완전히 침적한 후에는 오른쪽과 왼쪽을 구분하기 위해 주사기의 바늘이나 펀치할 수 있는 도구로 한쪽 뇌에 구멍을 뚫어 표시하였다.

광학현미경적 관찰 : 제1군은 cresyl violet 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였고, 제2군은 면역염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 면역염색을 위한 과정을 부유법(free floating methods)을 이용하였다. 절단된 조직에서 내인성 peroxidase 반응을 없애기 위해서 0.3% 과산화수소수(H₂O₂)를 첨가한 0.1% sodium nitrite와 0.005% heparin(녹십자)이 함유된 phosphate buffer solution(PBS)로 30분간 반응시킨 후 0.1M PBS로 5분씩 3회 수세하였다. 비특이적 반응을 줄이고 항체의 부착을 쉽게 하기 위한 전처리과정은 1% normal goat serum(NGS)과 1% bovine serum albumin(BSA) 그리고 0.3% Triton X-100을 첨가한 PBS 용액에 24시간 반응시켰으며 PBS 용액으로 5분씩 3회 수세하였다. 일차항체로서는 rabbit anti-TH(Che-micon)를 1% NGS, 1% BSA 및 Triton X-100을 첨가한 0.1 M PBS 용액에 1 : 2,000으로 희석하여 24~48시간동안 반응시켰으며 PBS 용액으로 5분씩 3회 수세하였다. 곧이어 1 : 200으로 희석된 이차항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector)를 12~24시간동안 반응시킨 후에 다시 5분씩 3회 수세한 다음, 1 : 200으로 희석된 ABC(Avidin-Biotin complex) 용액으로 30분간 반응시켰다. 발색을 위해서는 3,3'-diaminobenzidin(DAB, Sigma)을 PBS 용액에 용해하여(40mg/100ml) 2번 여과한 후, 과산화수소수가 PBS 용액에 0.0045% 되도록 첨가시켜 발색하였고, 탈수 과정을 거쳐 봉입한 후 광학현미경으로 오른쪽과 왼쪽 청색반점을 구분하여 관찰하였다. 또한 면역염색표본은 광학현미경(Axioport, Zeiss)의 적색, 녹색 및 황색필터를 모두 넣고 약 30~50초 동안 노출하여 Plus-X Pan 필름(Kodak, ASA 125)으로 촬영하였다. 촬영이 끝난 필름은 D-76(8 minutes, 1 : 25 dilution at 20℃)으로 현상하여 흑백 확대기(Omega사)를 이용해서 인화하였다.

공초점현미경적 관찰 : 제3군과 제4군은 면역형광염색하여 공초점 현미경으로 관찰하였다. 염색은 면역염색과 같은 방법으로 조직을 1차항체까지 처리하여으나 2차항체는 형광염색을 위한 FITC(fluorescein isothiocyanate conjugated anti-rabbit IgG)를 1 : 300으로 희석하여 8시간 동안 반응시켰다. 형광염색이 끝난 후 PBS로 수세한 다음 봉입하지 않고 공초점현미경으로 입체적인 형태를 직접 검경, 관찰하였다. 60µm로 자른 조직은 공초점현미경 관찰시 원래의 색깔인 녹색으로 표시하였으며, 100 µm로 자른 조직은 평면상태에서 입체적으로 나타내기 위해서 깊이(depth)에 따라 다르게 나타나는 색상표(look-up table)를 이용해서 나타내었다. 관찰은 신경원을 500배, 청색반점은 100배로 확대하였고 완성된 상은 조합한 후 Exp-Foc 상으로 나타내어 Mitsubish(CP700D)사의 인쇄기를 이용하여 출력하였다.

삼차원적 화상분석 : 청색반점의 입체적인 형태를 비교하기 위해서는 형광염색된 일련의 조직표본들을 가지고 공초점 현미경으로 관찰하여 3차원 구축을 실시하였다. 청색반점의 등쪽부터 배쪽까지 수평절단한 조직표본들을 공초점현미경으로 재물대 위에 올려놓고 제4뇌실과 펀치된 구멍을 기준으로 하여 각각의 축과 위치를 맞춘 후 64장으로 세분하여 주사(scanning)하면서 시각적인 절단작업을 실시하였다. 이 과정중 불필요한 반응을 제거하여 상을 뚜렷하게 하기 위한 축적(accumulation)작업을 4번씩 실시하였다. 3차원 상은 주사단위(scanner unit)를 통해 광원이 투과할 수 있는 시료에서 얻어진 연속적 절단들을 "3-D projection"으로 작업해서 만들었고, 공초점현미경의 입체상 "Stereo Images"와 "Depth coding"이라는 soft ware를 이용해 좀더 선명한 3차원 상을 얻었으며 절단된 상은 개별적으로 한 장씩 저장하는 TCS export file로 저장하였다. 저장된 64장의 상은 3차원 구축 명령어인 Voxblast version 1.3(Win-U사)을 이용하여 각각을 연결하는 정렬(alignment)을 한 후 3차원 상으로 재조합하였다. 재조합된 청색반점의 3차원 상은 각도를 설정(rendering)하여 X, Y 또는 Z축을 중심으로 회전시켜 관찰하였다.

결 과

면역조직화학염색 관찰소견 : TH 면역염색후 광학현미경으로 관찰한 흰쥐의 청색반점은 제4뇌실을 따라 분

Fig 1. Area of right LC in male and female.

X: a number of slide, dorsal to ventral portion, Y: LC area (pixel).

포하고 있었으며 TH 면역반응세포의 분포는 좌우에서 각각 다른 형태를 나타내었다. 청색반점의 등쪽부분은 수평절단시 오른쪽이 왼쪽보다 수평절단시 더 앞쪽에 위치하였고 넓이도 더 크게 나타났으며, 이 부분의 신경원은 앞쪽으로 신경의 돌기를 내고 있었다(Fig 2, 3). 청색반점 등쪽부분의 앞쪽에서는 청색아핵(subceruleus nucleus)이 관찰되었으며, 청색아핵의 세포돌기들 역시 앞쪽으로 뻗고 있었고 신경원수는 절단조직에서 보통 2~5개가 관찰되었다. 청색반점의 등쪽부분 평면절단상의 면적은 수컷이 암컷에 비해 넓었으며, 가장 길게 전후로 신장된 청색반점의 전후길이를 비교한 결과도 수컷이 더 긴 결과를 나타냈다. 청색반점의 면적을 등쪽부터 배쪽끝까지 영상분석기(Image analyzer)로 측정하여 도표화한 결과, 청색반점의 면적은 수컷이 암컷보다 더 큰 면적을 나타내었고, 전체적인 형태로는 암수 모두 청색반점의 중간부분이 한 번 증가하였다가 감소하는 양상을 보였으며 청색반점의 등쪽부분의 전후로 길게 뻗어있긴 하지만 가운데가 끊어진 형태를 나타내었다. 조직절단의 숫자에 있어서도 수컷이 암컷보다 2~3장 더 많이 관찰되어 수컷의 상하길이 역시 동일연령 한 배새끼 암컷에 대해 더 두터운 것으로 관찰되었다(Fig 1). 청색반점의 중간부분은 중간크기의 방추신경원 및 구형모양의 작은 신경원들로 구성되어 있었으며, 제4뇌실벽의 양쪽에서는 청색반점과 청색아핵이 서로 연결하면서 앞쪽으로 진행하고 있음이 관찰되었다(Fig 2, 3). 청색반점의 등쪽부분은 암수 모두 대형의 뭉극신경원처럼 보이는 신경세포들이 관찰되었다(Fig 4). 면역염색상으로는 뚜렷한 암수원래 청색반점 신경세포의 형태적인 차이를 나타내지 않았다.

면역형광염색 관찰조건 : 면역형광염색후 공초점현미

경으로 암수 청색반점의 수평절단면을 등쪽에서 배쪽으로 관찰해보면 배쪽으로 내려갈수록 청색반점의 폭이 넓어졌다가 다시 감소하는 양상을 보였다. 청색반점의 중간부분의 앞쪽에서 신경원이 앞쪽에 몰려있는 반면에 수컷에서는 뒤쪽에 더 밀집되어 있는 것으로 관찰되었다(Fig 5, 6). 청색반점 배쪽부분은 암수의 청색반점 모두 폭이 좁아졌으며 전체적인 청색반점의 형태가 제4뇌실을 감싸며 안쪽으로 휘는 것이 관찰되었다. 그리고 전체적인 형태에서 수컷이 방추형으로 이루어진데 반해 암컷은 흑모양으로 제4뇌실을 따라 앞쪽으로 이동하고 있음이 관찰되었다(Fig 8, 9). 청색반점 각 부분에서의 신경원 숫자와 모양은 등쪽부분의 수평절단면에서는 암수 모두에서 신경원의 수가 적었고, 신경원의 직경은 약 20~25 μm 정도 되었으며 형태가 뭉극신경원으로 나타났다(Fig 7). 중간부분에서는 타원형의 신경원과 작은 구형의 신경원으로 존재하였으나 이 부위에서는 암수의 차이가 뚜렷하게 관찰되지 않았다. 청색반점의 가장 배쪽부분의 신경원은 비교적 대형의 뭉극신경원이 관찰되었고 신경원들은 암컷에 비해 수컷에서 산재되어 나타났으며 청색반점의 전체적인 형태에서 수컷이 암컷보다 흑색질 방향으로의 신경원 이동을 먼저 나타내었다(Fig 10). 공초점현미경으로 관찰한 암수 청색반점의 전체적인 형태를 보면 암수 모두 청색반점의 등쪽부분은 제4뇌실을 따라 앞뒤로 뻗어 나가는 형태를 나타내었고, 아래쪽으로 내려갈수록 청색반점의 면적은 점점 작아졌으며, 배쪽 부분의 형태는 둥글게 뭉쳐있는 형태였다(Fig 8, 9). 면역형광염색후 공초점현미경으로 관찰한 조건에서도 면역염색후 광학현미경으로 관찰했던 것과 마찬가지로 수컷이 암컷보다 좀더 많은 조직절단수를 관찰할 수 있었으므로 수컷 청색반점의 상하길이가 암컷보다 더 큰 것을 관찰할 수 있었다.

화상분석 관찰조건 : 공초점현미경으로 주사하여 얻은 청색반점 각 절단면의 상을 가지고 3차원 구축을 실시한 후 동화상으로 관찰한 결과 암수 모두 청색반점의 등쪽부위의 신경원들은 등쪽으로 신경돌기를 내고 있는 것이 관찰되었으며, 형광염색시 구형으로 보였던 등쪽의 신경세포체는 완전한 구형이 아니고 넓적한 타원형의 모양으로 관찰되었다. 그리고 그들의 신경돌기들은 등쪽으로 가지를 내고 있었다. 이렇게 얻어진 신경세포들을 3차원 구성프로그램으로 회전시켜 보니 "ㅂ"자 모양을 나타내었고 이들의 신경원들은 뭉극신경원과 비슷

한 뭇극신경원으로 구성되어있음을 관찰할 수 있었다. 또한 양쪽만 남고 가운데는 끊어진 형태로 나타났던 청색반점 등쪽의 신장된 부위는 일반현미경으로는 관찰하기 어려웠던 부위로 90° 회전한 상을 관찰한 결과 "S"자 형태를 나타내었으며 특히 이 부위의 뒤쪽에 있는 신경원은 암컷보다 수컷에서 더 많이 분포하여 두껍게 관찰되었다(Fig 11). 반대로 암컷은 이 부분에서 앞쪽에 신경원이 더 많이 분포하여 수컷보다 두꺼운 형태를 나타냈다. 청색반점의 배쪽부분에서 신경원들은 너무 근접하게 분포하고 있어 신경원 하나하나의 모양이나 신경돌기들의 방향을 알아내기 곤란하였다. 전체적인 청색반점의 형태는 배쪽부분으로 내려갈수록 암컷보다 수컷이 먼저 앞쪽으로 굽어지는 형상을 나타내는 점을 제외하고는 암수에 있어서의 형태는 크게 입체적인 차이를 보이지 않았다. 청색반점에 대한 측면의 전체적인 형태는 배쪽이 앞쪽으로 꺾인 "J"자 모양으로 관찰되었으나 서로 다른 두 장의 슬라이드를 연결할 때 앞쪽 슬라이드의 뒤쪽 면과 뒤쪽 슬라이드의 앞쪽 면이 완벽하게 주사되지 않

Fig 11. 3-D reconstruction.

아서 완전히 결합하지 않았다(Fig 12).

고 찰

흰쥐의 뇌에서 청색반점은 NE를 분비하는 가장 큰 구조물로 제4뇌실 주위에 분포하고 있으며 이들의 신경원은 NE와 함께 galanin, neuropeptide Y, vasopressin을 포함하고 소수의 신경원은 GABA를 보유하고 있는 것으로 알려져 있다^{7,9}. 신경전달물질인 NE는 중추신경에 존재하는 아미노산의 유도체인 카테콜라민성 물질중의 하나로 뇌, 교감신경, 교감신경절 및 크롬친화성 세포에서 전구체 화합물인 tyrosine으로부터 효소촉매작용에 의해서 형성된다는 사실이 밝혀진 이래, 여러 동물에서 카테콜라민 생합성효소인 TH나 DBH의 항체를 이용한 면역염색에서 뇌의 NE 신경원에 대한 형태 및 분포 등을 관찰할 수 있었다. Vogt⁷는 NE가 뇌의 다른 부위보다 중뇌와 시상하부의 신경섬유에 높은 농도로 존재하는 것을 흰쥐에서 밝힌 바 있으며, Simerly *et al*²⁶은 흰쥐에서 청색반점으로부터 기시한 NE 면역반응세포가 뇌줄기의 외측피개지역에 산재하는 다른 NE 면역반응세포(A4~A10)와는 달리 중추신경계에 광범위하게 투사되어 분포하며, 그 중에서도 중뇌에 특히 많이 분포하고 있음을 밝힌 바 있다. 그리고 Holets *et al*⁹은 흰쥐의 청색반점에서 시상하부로 투사하는 신경돌기가 척수쪽으로 투사하는 신경돌기보다 NE와 같은 peptide를 더 많이 함유하고 있음을 보고한 바 있다. 청색반점은 시상하부와는 달리 암수 성차와는 직접적인 연관이 없다고 그동안 알려져 왔으나 최근 들어 청색반점이 성호르몬에 영향을 받는 해마체와 연관되어 있으므로 청색반점에서 해마체에 투사하는 신경원의 구성과 그 세포질에 포함되어 있는 신경전달물질들의 합성 등이 성별에 따라 차이가 있다는 것은 Loy *et al*¹⁵이 흰쥐에서 밝힌 바 있다.

이러한 흰쥐 청색반점의 성차가 나타나는 원인에 대해서 Balan *et al*¹⁸은 에스크로젠과는 관계가 없다고 하였지만 Reister *et al*²²은 수컷 청색반점의 NE 세포는 안드로겐의 영향을 받아 분화가 잘 되고, 암컷의 청색반점은 성호르몬과 관계없이 독립적이라고 보고하였다. 이처럼 성호르몬에 의한 영향을 알기 위해 Clark *et al*²¹은 거세한 흰쥐 수컷에 androgen을 처리하여 실험해본 결과 시상하부에서의 TH 수치가 정상 수컷의 수치보다 낮은 반면 testosterone propionate를 처리한 암컷에서는 TH

Fig 12. Aligned two images.

의 면역염색정도가 수컷에 비해 더욱 향상되었다고 발표했으며, *Srivastava et al*¹⁹은 테스토스테론에 영향을 받은 해마체가 감각신경원과 관계되어 암수행동의 차이에 영향을 미쳤다고 보고하였다. 1993년 *Robinson et al*²⁶은 청색반점의 세포를 배양할 때 해마체의 세포를 첨가하면 청색반점 신경원의 TH 활동이 증가되어 신경원의 수명과 신경돌기의 배열이 변화되었다고 하였으며 비특선택적이기는 하나 청색반점의 신경원수도 증가되어 수컷의 지배적인 성행동(예를 들어 수컷은 일반적으로 암컷에 비해 성호르몬인 안드로겐이 중추신경계에 더 강하게 작용함)으로 나타난다는 보고²⁷은 암수의 청색반점 형태가 다르게 나타날 수도 있음을 제시하였다. 이러한 암수성차에 의한 청색반점의 형태학적인 차이를 자세히 규명하기 위해 1992년 *Luque et al*¹¹이 흰쥐 뇌를 dopamine- β -hydroxylase로 면역염색한 결과 흰쥐 청색반점 중간부분 앞쪽의 부피와 평균 체세포면적이 암컷이 수컷보다 더 큰 수치를 나타낸다고 발표한 바 있으나 1997년 *Babstock et al*²은 TH 면역염색을 실시하여 암수 흰쥐를 비교한 결과 수컷의 청색반점 등쪽부분의 전후 길이와 부피가 암컷보다 컸으나 청색반점 전체의 상하 길이는 암컷이 수컷보다 컸으므로 암수 청색반점의 전체적인 부피는 차이를 나타내지 않았다는 결과를 보고한 바 있다.

본 연구에서는 공초점현미경을 이용한 3차원 구축에 비중을 두고 항체에 FITC를 부착시켜 실험해본 결과 수컷의 청색반점 등쪽부위가 암컷보다 더 큰 면적을 나타내었으며, TH 면역염색을 한 청색반점을 공초점현미경을 이용하여 입체적으로 관찰한 결과 역시 이전 *Babstock*²이 TH 항체를 이용한 연구와 같이 수컷이 암컷보다 더 큰 것으로 나타났다. 그러나 청색반점 등쪽부분에서 나타나는 암수의 차이가 흰쥐를 제외한 다른 동물에서도 본 연구와 같은 결과를 나타낼 지에 대해서는 면역염색, 공초점현미경, 전자현미경 등의 다른 방법으로 더 연구해볼 필요가 있다. 그리고 면역염색시 청색반점 중간부분은 가운데가 끊어진 형태로 관찰되었는데 이것을 공초점현미경의 3차원상으로 구축해본 결과 가운데가 "S"자 형태로 되어있기 때문임을 처음으로 확인할 수 있어 앞으로 이러한 구조물의 연구에 공초점현미경이 응용될 수 있음을 시사하였다. *Luque et al*¹¹이 발표한 청색반점 중간부분의 앞쪽에서 암컷의 체세포면적이 수컷보다 크다고 한 보고는 본 연구의 결과에서 암컷의 청색반

점 중간부분의 앞쪽에 신경세포체가 많이 집중되어 나타났음을 3차원구축 회전상을 통해 확인할 수 있어 그 결과가 일치하는 양상을 나타내었으며, 이와 반대로 수컷에서는 3차원구축후의 회전상에서 청색반점 중간부분의 뒤쪽이 두껍게 뒤쪽으로 뻗어있는 것이 처음으로 관찰되었다. 이처럼 암수에서 두꺼운 부위가 부위별로 다르게 나타나는 것은 청색반점의 신경섬유가 투사되는 정도와 TH 분비량에도 부위별로 차이가 있어 암수의 성행동에도 차이가 있을 것으로 사료된다.

청색반점 소구역의 형태에 대해서는 전뇌로 투사하는 청색반점의 등쪽부분 뿐만 아니라 척수로 투사하는 배쪽부분에서도 암컷보다 수컷에서 더 크게 나타났으나 이는 한 배 새끼일지라도 암수간에 체중차이가 있음으로 청색반점의 크기를 몸무게에 대한 비율로 산정해보면 체중 및 체구크기에 대한 단위면적당은 암컷이 수컷보다 커서 단지 암수의 장기 크기만을 비교하는 것에 대해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 청색반점을 수평절단해서 면역형광염색을 실시하여 공초점현미경으로 관찰해보면 다른 부분보다는 배쪽의 형태에서 암수차이가 발견되며 수컷이 제4뇌실에서 벗어나 방추형으로 나타나는 데 반해, 암컷은 제4뇌실과 나란히 뻗어나가면서 앞부분이 뒷부분보다 비후된 흑모양으로 다른 형태를 나타내었다.

청색반점을 이루는 신경원 각각의 형태차이를 공초점현미경으로 관찰한 결과 암수간에 뚜렷한 차이를 보이지는 않았다. 그리고 면역염색을 실시한 인간의 청색반점 형태를 3차원적으로 구축한 상^{1,25}과 공초점현미경을 이용한 흰쥐 청색반점의 3차원적인 상을 비교해 보면 인간의 청색반점은 등쪽과 배쪽의 구분이 없이 넓적한 모습을 보이는데 비해, 흰쥐에서는 등쪽부분이 앞뒤로 길게 신장되고 배쪽 부분에서는 좁아지는 형태를 나타내는 차이를 보였다. 청색반점의 암수 형태차이는 더 나아가서 다른 뇌부위에 투사되는데도 영향을 끼치게 될 뿐만 아니라 많은 질환들 즉, *Parkinson's disease*, *Alzheimer's disease*, *Down's syndrome*, *Pick's disease* 그리고 *lobar atrophy* 와 같은 질병에서도 그 발병빈도가 남녀간에 있고, 이들은 신경전달물질의 전도부위와 전도물질의 양과 연관되어 차이가 있을 것으로 사료되어 현재에도 많은 연구가 진행중에 있다^{1-3,20}. 즉, NE가 청색반점에서 흑색질로 전달되지 않기 때문에 발생하는 *Parkinson* 병은 신경전달물질인 dopamine 대사과정 이상과 전연접신경섬유(pre-

synaptic fiber)의 전달이상이 생겨 나타나게 되며²⁰, Alzheimer 병의 경우는 소뇌보다는 대뇌피질의 영역에 더 많은 병변이 관찰되어 청색반점의 부위중 앞쪽과 등쪽 부분에 이상이 생긴다는 연구보고²⁴가 있어 이러한 뇌질 환들과 관련해서 청색반점에 대한 연구가 현재까지 많이 진행되고 있다². 기존 공초점현미경에는 기본적으로 3차원 구축 명령어군이 마련되어 있어 이를 동영상으로 구축할 수도 있으나^{29,30} 이러한 구축은 속도가 느리며 여러 조직절단을 조합하는 기능이 없어 세포이상의 구조물을 관찰하기는 어려웠지만 본 연구에서 사용한 공초점현미경은 주사한 일련의 상을 다시 3차원 명령어군을 이용해서 재조합할 수 있어 청색반점 조직전체를 관찰할 수가 있었다. 물론 조직전체의 3차원적 구조를 회전하며 관찰하기에는 아직까지 기술적인 어려움이 있으며 또한 공초점현미경은 깊이에 따라서 주사할 수 있다고는 하지만 전체조직을 주사할 수 없어서 조직절단을 재조합해야 하는게 현재로서는 각 장 사이에 공간이 생기므로 이들 사이를 빈틈없이 재조합하는 연구가 요구된다.

이상의 연구에서 지금까지 평면적인 조직관찰로만 비교연구해왔던 청색반점의 암수형태 변화 및 차이에 관한 것을 공초점현미경을 이용해서 3차원으로 전체구조로 재조합해서 암수의 청색반점을 비교한 본 연구는 이 분야의 연구에 기초적인 자료를 확립하는데 크게 기여할 수 있으리라 본다.

결 론

청색반점(Locus coeruleus)은 뇌의 부위중 norepinephrine (NE)을 분비하는 가장 큰 구조물로써 제4뇌실 주변에 위치하고 있으며 다른 동물과는 달리 흰쥐에서는 청색반점의 신경원이 멜라닌 색소를 함유하고 있지 않으나 NE는 모든 신경원이 포함하고 있는 것으로 알려져 있다. 암수 흰쥐 청색반점에서의 형태적인 차이는 성호르몬이 발현되기 이전에는 유전자에 의해서 형태적인 차이가 발생하며 그 이후에는 성호르몬의 영향에 의해 암수차이를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 이러한 차이를 구별하기 위하여 본 연구에서는 면역염색 및 면역형광염색 그리고 면역형광염색한 조직을 공초점현미경으로 3차원 구축하는 방법을 이용하여 TH 면역반응세포의 형태와 크기, 분포부위, 암수간의 구조적 및 외형적 차이를 나타내고자 하였다. 실험동물로는 한 배에서 태어난 8주

령 흰쥐 암수를 각각 8마리씩 사용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 청색반점의 전체적인 형태는 전체 조직절단 숫자가 암컷보다 수컷이 많아 수컷의 상하길이가 더 긴 것을 알 수 있었으며, 일련의 표본들에서 청색반점의 면적이 암컷보다 수컷이 모두 약간씩 큰 결과를 나타내었지만 전반적인 형태는 암수에서 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 3차원으로 구축한 전체적인 모양을 측면에서 관찰해보면 암수 모두 청색반점의 배쪽부분이 아래쪽으로 쏠려 있는 "T"자 형태로 관찰되었다.

2. 면역염색을 실시한 청색반점에서 암수 모두 청색반점 등쪽부분에서 가운데가 끊어진 형태로 나타났으며 이 부분을 3차원으로 구축한 후 회전하여 측면에서 관찰한 결과 가운데가 "S"자 형태로 움푹 패인 공간이 있음을 확인할 수 있었다. 청색반점 중간부분에서는 크기를 제외하고 암수의 형태에서 다른 점이 없었으나 청색반점의 배쪽에서 수컷은 제4뇌실에서 평면절단상이 방추형으로 위치하며 제4뇌실을 감싸며 안쪽으로 휘어지는 양상을 보이는 반면, 암컷에서는 앞부분이 뒷부분보다 더 부푼 형태인 흑모양을 나타내면서 제4뇌실과 나란히 위치하고 있었다.

3. 청색반점에서 가장 등쪽의 신경세포체는 면역형광염색시 구형으로 보였지만 3차원 구축결과 완전한 구형이 아닌 넓적한 모양을 나타내었다. 청색반점 등쪽부분의 신경원들은 암수 모두 등쪽으로 신경돌기를 내어 "ㄴ" 형태를 나타내고 있는 것이 관찰되었다. 청색반점 중간의 앞쪽에 위치한 신경원들은 앞쪽에 위치한 흑색질쪽으로 신경돌기를 뺏고 있는 것이 관찰되었다. 청색반점의 배쪽부분에서는 뭇극신경원들이 관찰되었으며, 등쪽과 앞쪽으로 신경돌기를 내고 있었다.

4. 청색반점에서의 신경원 분포에 관한 암수차이는 면역형광염색한 조직절편들을 모아 3차원적으로 구축한 상을 90도로 회전하면서 관찰한 결과 다른 부분에서는 차이가 관찰되지 않았으나 청색반점 등쪽부분에서 수컷은 뒤쪽에서, 암컷은 반대로 앞쪽에서 신경원이 많이 몰려 두꺼운 세포층으로 나타냄으로 암수차이를 나타내었다.

5. 몇 장의 슬라이드를 합쳐서 청색반점을 재구축하였을 때 암수 흰쥐 청색반점의 부분적인 구조를 비교할 수 있으나 이 분야에 대해서는 더 많은 연구가 앞으로 필요하다.

Legend for figures

- Fig 2. Intermediate LC(ILC) in male. Neurons extended to anterior-posterior direction around 4V. Empty space in central LC was a artery. LC shape displayed so spindle-shape that different from female's. $\times 100$. 4V : the fourth ventricle. immunohistochemistry. horizontal section.
- Fig 3. ILC in female. ILC started to extend to posterior direction. Many neurons are observed in posterior ILC. ILC appeared oval-shape. 4V : the fourth ventricle. immunohistochemistry. horizontal section. $\times 100$.
- Fig 4. Dorsal LC(DLC)'s Neuron in male. Immunohistochemistry. horizontal section. $\times 400$.
- Fig 5. ILC in male. LC locates along 4V. $\times 100$. 4V : the fourth ventricle. fluorescence. horizontal section. $\times 100$.
- Fig 6. ILC in female. LC composed of a large multipolar neurons. 4V : the fourth ventricle. fluorescence. horizontal section. $\times 100$.
- Fig 7. Male's DLC in 3-D reconstruction. DLC consisted of a large multipolar neurons, its dendrite processed ventral portion. 4V : the fourth ventricle. fluorescence. horizontal section. $\times 100$.
- Fig 8. Ventral LC(VLC) in male. Its shape is similar to horny-cave shape 90 degree view. many neurons locate posterior portion. fluorescence. $\times 100$.
- Fig 9. VLC in female. Its shape is similar to spindle shape. Many neurons locate anterior portion. fluorescence. $\times 100$.
- Fig 10. VLC in male. fluorescence. Male's LC was so spatial localization that different from female's. LC consisted of a large multipolar neurons, its dendrite processed ventral portion. fluorescence. $\times 500$.

참 고 문 헌

1. German DC, Walker BS, Manaye K, Smith WK, Woodward DJ, North AJ. The human locus coeruleus: Computer reconstruction of cellular distribution. *J Neurosci*, 8:1776-1778, 1988.
2. Doris Babstock, Malsbury CW, Harley CW. The dorsal locus coeruleus in larger in male than in female Sprague-Dawley rats. *Neurosci Lett*, 224:157-160, 1997.
3. Chan-Palay V, Asan E. Alterations catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J Comp Neurol*, 287: 373-392, 1989.
4. Benno RH, Tucker LW, Joh TH, Reis DJ. Quantitative immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase in rat brain. II. Variations in the amount of tyrosine hydroxylase among individual neurons of the locus coeruleus in relationship to neuronal morphology and topography. *Brain Res*, 246:237-247, 1982.
5. Berridge CW, Stanford TL, Foote SL, Kelly AE. Distribution of dopamine beta-hydroxylase-like immunoreactive fibers within the shell subregion of the nucleus accumbens. *Synapse*, 27:230-241, 1997.
6. Luque JM, de Bla MR, Segovia S, Guillamon A. Sexual dimorphism of the dopamine- β -immunoreactive neurons in the rat locus coeruleus. *Dev Brain Res*, 67: 211-215, 1992.
7. Geong YG, Lee NS, Min SK. Distribution of noradrenergic neurons in the Locus coeruleus and subceruleus region of the *Apodemus agrarius*, *Korean J Lab Anim Sci*, 14:49-53, 1998.
8. Simerly RB, Swanson LW, Handa RJ, Gorski RA. Influence of perinatal androgen on the sexually dimorphic distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *Neuroendo*, 40:501-510, 1985.
9. Holets VR, Hufelt T, Ruæus A, Terenius L, Goldstein M. Locus coeruleus neurons in the rat containing neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase or galanin and their projections to the spinal cord, cerebral cortex and hypothalamus. *Neurosci*, 24:893-906, 1988.
10. Olpe HR, Steinmann MW. Age-related decline in the activity of noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus. *Brain Res*, 251:174-176, 1982.
11. Yang SP, Pau KYF, Spies HG. Gonadectomy alters tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter mRNA levels in the locus coeruleus in rabbit. *J Neuroendo*, 9:35-62, 1993.
12. Mason ST, Fibiger HC. Regional topography within noradrenergic locus coeruleus as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*, 187:703-724, 1979.
13. Asanuma C. Noradrenergic innervation of the thalamic reticular nucleus: a light and electron microscopic immunohistochemical study in rats. *J Comp Neurol*, 319: 299-311, 1992.
14. Fritschy JM, Grzanna R. Demonstration of two separate descending noradrenergic pathways to the rat spinal cord: Evidence for an intragriseal trajectory of locus coeruleus axon in the superficial layers of the dorsal horn. *J Comp Neurol*, 291:552-582, 1991.
15. Loy R, Koziell DA, Lindsey JD, Moore RY. Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*, 189:699-710, 1980.
16. Moons L, Els D'hondt, Pijcke K, Vandesande F. Noradrenergic system in the chicken brain: Immunocytochemical study with antibodies to noradrenaline and dopamine- β -hydroxylase. *J Comp Neurol*, 360:331-348, 1995.
17. Baker KG, Tuk I, Hornung JP, Halasz P. The human locus coeruleus complex: an immunohistochemical and three dimensional reconstruction study. *Exp Brain Res*, 77:257-270, 1989.
18. Balan IS, Ugrumov MV, Borisova NA, Calas A, Pilgrima C, Reisert I, Thibault J. Birthdates of the tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the hypothalamus of male and female rats. *Neuroendo*, 64: 405-411, 1996.
19. Srivastava N, Granholm AC, Gerhardt GA. Collateral

- of central noradrenergic neurons aging : histochemical and neurochemical studies in intraocular triple transplants. *Experi Neurol* , 156:524-535, 1997.
20. Manaye KF, McIntire DD, Mann DMA, German DC. Locus coeruleus cell loss in the aging human brain : A non-random process. *J Comp Neurol* , 358:79-87, 1995.
 21. Clark FM, Proudfit HK. Anatomical evidence for genetic differences in the innervation of the rat spinal cord by noradrenergic locus coeruleus neurons. *Brain Res* , 591:44-53, 1992.
 22. Reister L, Engle J, Philgrim C. Early sexual differentiation of diencephalic dopaminergic neurons of the rat *in vitro* . *Cell & Tissue Res* , 253:411-417, 1989.
 23. James RU, Molly ML. Differential effects of the intraventricular administration of 6-hydroxy dopamine on the induction of type II β -tubulin and tyrosine hydroxylase mRNA in the locus coeruleus of the aging Fisher 344 Rat. *J Comp Neurol* , 364:363-381, 1996.
 24. Agmo A. Male rat sexual behavior. *Brain Res Proto* , 1:203-209, 1997.
 25. Loughlin SE, Foote SL, Bloom FE. Efferent projections of nucleus locus coeruleus : Topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. *Neurosci* , 18:291-306, 1986.
 26. Simerly RB, Swanson LW, Gorski RA. The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involve in the control of gonadotropin release : immuno-histochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism. *Brain Res* , 330:55-64, 1985.
 27. Beyer C, Eusterschulte B, Pilgrim C, Reisert I. Sex steroids do not alter sex differences in tyrosine hydroxylase activity of dopaminergic neurons *in vitro* . *Cell & Tissue Res* , 270:547-552, 1992.
 28. 하권수. Confocal Laser Scanning Microscope의 원리와 응용. 기초과학지원연구소, 1997.
 29. Sheldon E, Knecht DA. Reconstruction and display of curvilinear objects section data using 3-D curve fitting algorithms. *J Microsc* , 191:97-107, 1998.