

말 서골코기관에서 protein kinase C 및 nitric oxide synthase의 면역조직학적 관찰

이광협 · 안미정 · 이용덕 · 하태영 · 김희석 · 신태균

제주대학교 농과대학 수의학과
(2001년 8월 17일 게재승인)

Immunohistochemical localization of protein kinase C and nitric oxide synthase in the vomeronasal organ of the horse

Kwanghyup Lee, Meejung Ahn, Yongduk Lee, Taeyoung Ha,
Heeseok Kim, Taekyun Shin

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

(Accepted by August 17, 2001)

Abstract : The expression of protein kinase C (PKC) isoforms and nitric oxide synthase (NOS) isoforms was studied in the equine vomeronasal organ (VNO), a pheromone receptor organ, using immunohistochemistry. All PKC isoforms including PKC α , β I, δ , and θ were detected in the supporting cells, sensory receptor cells, and basal sensory epithelial cells, while constitutive PKC α and β I were stained more intensely than novel PKC δ and θ . There was also a varying degree of immunostaining for PKCs in the glandular acini and VNO nerve. Constitutive neuronal and endothelial NOSs, and inducible NOS were detected in the VNO sensory epithelia. There was intense immunoreactivity for endothelial NOS in the VNO sensory epithelia but weak reactivity for neuronal NOS, while inducible NOS showed little immunoreactivity in the adjacent section. These findings suggest that both PKCs and NOSs may be involved in the process of pheromone reception in the horse. Constitutive isoforms of these enzymes may play a more important role in signal transduction in the VNO of the horse.

Key words : vomeronasal organ, protein kinase C, nitric oxide synthase, horse

서 론

서골코기관은 비중격의 저부 좌우측에 위치하는 관상 기관으로서 내강은 감각상피 및 호흡상피로 구성되어 있고 기관외부와외의 교통은 종에 따라 구강 또는 비강으로 다양하게 나타나고 있다^{1,3}. 서골코기관은 포유류에서 페로몬을 인지하는 역할을 하는 기관으로⁴ 성적행동을 유발하는데 중요한 역할을 한다. 또한 일부 동물에서 보이는 프레멘(Flehmen) 행동은 이 기관 속으로 페로몬을 받아들이기 위해 입술을 위로 올리는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 현상은 페로몬을 감지한 신경상피세포가 다양한 경로를 통해 뇌조직에 정보를 전달하여야만

동물이 행동을 보일 수 있는데 그 과정 중 감각상피세포에서는 다양한 형태의 신호전달이 일어나게 된다.

감각상피세포는 세포 바깥으로부터 다양한 정보를 받아 들여 뇌로 정보를 전달하는데 그 첫 과정으로 복잡한 신호전달 효소들이 관여되는 것으로 알려져 있으며 signal-transducing receptor proteins G α ⁵, adenylyl cyclase II⁶, 2차 신호전달 효소로서 inositol triphosphosphate, protein kinase C⁸ 및 nitric oxide synthase⁹ 등이 알려져 있으며 후각상피에 대하여는 일부 확인된 바 있다.

Protein kinase C (PKC)는 transmembrane signal transduction에 중요한 역할을 담당하는 효소¹⁰로써 뇌, 신장, 폐, 심장, 비장, 난소 및 고환 등 거의 모든 조직

이 연구는 제주대학교(동물과학연구소)의 발전기금 지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

Address reprints requests to Dr. Taekyun Shin, Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea (E-mail: shint@cheju.cheju.ac.kr)

에 분포하며 세포의 분화와 증식에 관여하고 있다¹¹. PKC는 domain 구성에 따라 conventional PKC(cPKC) α , β I, β II, γ 와 novel PKC (nPKC) δ , ϵ , ζ , η , θ 의 2가지 그룹으로 나누어진다¹². cPKC(α , β I, β II, γ)는 3개의 domain을 함유하여 칼슘, 인지질, DAG/phorbol ester 칼슘, 인지질, DAG에 의해 활성화 된다¹³⁻¹⁴. 반면 nPKC(δ , ϵ , ζ , η)는 칼슘 결합과 C2 domain이 없으므로 Ca^{2+} 에 관계없이 활성화 될 수 있다¹⁴⁻¹⁵. 이상과 같이 PKC subtypes에 따라 서로 다른 경로를 통해 활성화된 PKC는 세포 고유의 기능을 담당할 수 있게 된다¹⁴. 비록 PKC는 활성화 시킬 수 있는 인자에 의해 두가지로 분류되나 아형에 따라 장기 및 조직 내에서의 발현은 상당한 차이를 나타낸다¹⁶⁻¹⁷. 또한 유전자 수준에서 구조적으로 유사한 아형이라 하더라도 분포하고 있는 세포는 다른 것으로 알려지고 있다¹⁸.

Nitric oxide synthase(NOS)는 크게 Ca^{2+} 에 의존적인 상존형과 Ca^{2+} 비의존적이고 면역학적 자극에 의해 유도되는 유도형으로 나뉘고 있다¹⁹. 상존형으로는 신경 세포유래의 Neuronal NOS, 혈관내피세포 유래의 endothelial NOS가 있으며 이들은 주로 신호전달물질로 작용하거나 혈관의 확장에 관여하는 신호전달효소로 알려지고 있다²⁰. 유도형으로는 주로 큰 포식세포에서 발현되어 면역기능을 담당하는 유도형 NOS가 있다²¹. 이들은 처음 확인될 당시에는 각각 신경세포 또는 혈관 내피세포에서 주된 역할을 하는 것으로 알려져 왔으나 최근의 조사에서는 침샘²² 뿐만 아니라 백혈구, 간세포, 비장, 부신의 분비샘, 혈관 근육²³ 등 여러 형태의 세포에서도 발현이 증명되고 있다.

PKC와 NOS는 어느 세포에서든지 위와 같은 여러 신호전달 효소의 흐름 중간에 위치할 수 있는 것으로서 서골코기관과 비슷한 세포구조를 가진 후각상피에서 PKC의 발현²⁴이 증명된 바 있으나 실제로 프레멘을 분명하게 보이는 말의 서골코기관에서의 PKC와 NOS의 발현에 대한 보고는 거의 없다.

본 연구에서는 말의 서골코기관 점막에서 어떤 형태의 신호전달효소가 관여하는지를 조사하기 위하여 먼저 PKC와 NOS의 여러 아형을 면역조직화학적으로 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 이용한 말은 Thoroughbred 종 (수컷 2두, 암컷 1두, 한국마사회)이며 연령은 18-24개월령이었다.

사용한 항체

사용한 1차 항체는 rabbit anti-PKC α , rabbit anti-

PKC β I, rabbit anti-PKC δ , rabbit anti-PKC θ (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, U.S.A), mouse anti-neuronal NOS, mouse anti-endothelial NOS 및 mouse anti-inducible NOS (Transduction Laboratory, Lexington, KY)를 사용하였으며, 면역조직화학은 avidin-biotin peroxidase complex Histo-plus[®] kit(Zymed, South San Francisco, U.S.A.)를 사용하였다.

면역조직화학 염색

조직을 10% buffered formalin 용액에서 고정시킨 후 ethanol과 xylene으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 paraffin에 포매한 후 5 μ m 두께로 절편을 만들었다. 파라핀을 제거한 후 조직을 항체에 반응시키기 전에 내재성 peroxidase를 제거하기 위하여 30% H_2O_2 를 3차 증류수에 희석한 용액에 반응시켰으며 비특이적 면역반응을 방지하기 위해 normal blocking serum을 반응시켰다. 1차 항체 rabbit anti-PKC α (1:100), rabbit anti-PKC β I(1:100), rabbit anti-PKC δ (1:100), rabbit anti-PKC θ (1:100), mouse anti-neuronal NOS(1:200), mouse anti-endothelial NOS(1:200) 및 mouse anti-inducible NOS(1:200)를 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 biotinylated anti-rabbit IgG 또는 biotinylated anti-mouse IgG를 실온에서 25분 동안 반응시켰다. 이어서 avidin-biotin peroxidase conjugate로 25분간 실온에서 반응시켰으며 각 단계별로 PBS로 5분간 3회씩 충분히 세척하였다. 면역반응이 끝난 조직은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 용액에 H_2O_2 가 0.009% 되게 희석된 용액에서 발색시켰다. 양성반응을 나타낸 조직을 hematoxylin 용액으로 대조염색을 하고, ethanol, xylene의 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

결 과

말 서골코기관의 구조

말의 서골코기관은 끝이 막힌 관모양 구조로 비강 중격의 좌우측 기저부에 위치하고 있으며 연골에 의해 싸여 있고 입구는 구강 앞쪽 천장에 있는 절치관과 연결되어 있다. 가로 단면에서 보면 입구쪽은 원형에 가까우나 중앙부 쪽에서는 긴 타원형의 내강을 갖는다. 또한 외측벽은 감각 상피로 덮여 있으나 내측벽은 호흡 상피로 덮여 있다(Fig 1). 감각 상피가 있는 점막쪽에는 점막 밑 샘이 발달되어 있고 이들은 내강 쪽으로 도관에 의해 연결되어 있다. 호흡 상피는 거뭇 중층 원주 섬모 상피로 구성되어 있고 점막 밑에는 샘조직이 발달되어 있다.

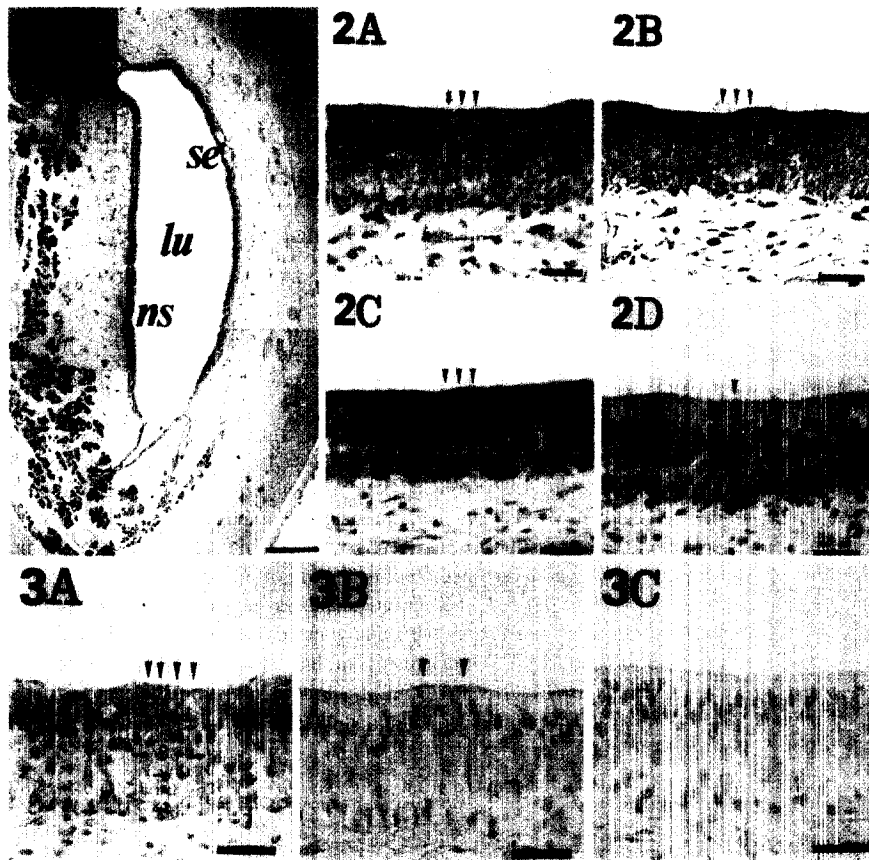


Fig 1. Histological structure of vomeronasal organ of horse. The nonsensory epithelium(ns) includes ciliated and nonciliated cells, whereas the sensory epithelium(se) contains neurosensory and sustentacular epithelial cells. g: vomeronasal gland, lu: lumen of the vomeronasal organ. Hematoxylin-eosin staining. scale bar = 200 μ m.

Fig 2. Immunohistochemical staining of protein kinase C α (A), β I(B), δ (C) and θ (D) in the vomeronasal sensory epithelia of a horse. Counterstained with hematoxylin. scale bar = 30 μ m.

Fig 3. Immunohistochemical staining of neuronal nitric oxide synthase(NOS; A), endothelial NOS(B) and inducible NOS(C) in the vomeronasal sensory epithelia of a horse. Counterstained with hematoxylin. scale bar = 30 μ m.

Table 1. Expression of PKS isoenzymes in the vomeronasal organ of horse

	PKC			
	α	β	δ	θ
supporting cells	++	++	++	+
receptor cells	+	+	+	+
basal cells	++	++	+	+
acini	+	+	+	+
nerve bundle	++	++	+	

Relative intensity of immunoreactivity was scored from +: weak, ++: intense, -: negative.

Table 2. Expression of NOS isotypes in the vomeronasal organ of horse

	eNOS	nNOS	iNOS
supporting cells	++	+	-
receptor cells	++	+	-
basal cells	++	+	-
acini	+	+	-
nerve bundle	++	+	-

Relative intensity of immunoreactivity was scored from +: weak, ++: intense, -: negative.

말 서골코기관 감각상피세포에서 PKCs의 발현

말의 서골코기관 감각 상피(vomeranosal sensory epithelium, VSE)의 지지세포에서 PKC α , PKC β I과 PKC δ 가 강하게 발현되었고, PKC θ 는 약하게 발현되었다(Fig 2). 수용체 세포에서는 PKC α , PKC β I, PKC δ 와 PKC θ 가 모두 약하게 발현되었다. 그리고 기저세포에서는 PKC α , PKC β I은 강하게 발현되었으나 PKC δ 와 PKC θ 는 약하게 발현되었다(Table 1). 서골코기관의 샘 세포인 경우 PKC α 만 강하게 발현되었고 PKC β I, PKC δ 와 PKC θ 는 약하게 발현되었으며 신경다발에서는 PKC α 는 강하게 발현되고, PKC β I, PKC δ 는 약하게 발현되었으며 PKC θ 는 발현되지 않았다(Table 1).

말 서골코기관 감각상피세포에서 NOSs의 발현

말의 서골코기관에서 상존형인 NOS 중에서 신경형 NOS는 감각 상피의 수용체 세포에서 발현하였고 혈관 내피세포형의 NOS는 감각신경세포, 지지세포 및 기저 세포에서 발현되었다. 그 중 혈관내피세포형의 NOS가 매우 강하고 광범위하게 인정되었다(Fig 3). 그러나 면역기능에 관여되는 것으로 알려진 유도형 NOS는 거의 나타나지 않았다(Table 2). 이와 같은 발현 양상은 다른 샘세포에서도 같은 경향으로 나타났다.

고 찰

본 실험에서는 말의 서골코기관에서 PKC와 NOS의 여러 아형이 신경 감각 상피 세포에서 어떻게 발현하는지를 조사하였다. 그 결과 상존성 PKC 인 PKC α , PKC β I 그리고 novel PKC 인 PKC δ 와 PKC θ 인 4종의 PKC와 3종의 NOS가 말의 서골코기관에서 발현함을 처음 확인하였다. 말의 vomeronasal sensory epithelium과 nerve bundle에서 PKC α , PKC β I, PKC δ 와 PKC θ 가 발현되는 것으로 보아 성행동을 유발하는 페로몬을 인지하는데 있어 감각 상피에서 받아들여진 페로몬을 신경 다발로 전달하는데 PKC가 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 이와 같은 현상은 세포 구조가 비슷한 후각 상피의 점막에서도 확인된 바 있으나 말의 서골코기관에서는 주로 감각상피세포층에서 발현되는 것에 비해 후각상피의 점막층에서의 PKC 중 PKC α , PKC β , PKC ξ 는 고유판의 후각샘세포에서 발현되고, PKC β I, PKC β II는 미 세용모세포에서 발현되는 차이점을 보였다²⁴. 그러나 PKC δ 는 후각상피의 점막에서도 수용체세포에서 발현되는 것은 유사하다. 그러나 이런 차이점이나 유사한 점은 동물종에 의한 것인지 아니면 후각 상피와 서골코기관의 감각상피의 차이에 의한 것인지는 확인할 수 없었다.

NOS는 신경전달 물질로 알려져 있으나 최근의 연구

결과에 의하면 여러 형태의 세포에서 발현되고 그 기능도 다양한 것으로 확인된다²³. 특히 neuronal NOS는 마우스의 부후각망울에서 많은 양이 존재하고 이 NOS는 성행동과 페로몬 인식에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁵. 또한 NOS는 랫트의 비점막의 혈관주위나 장점액선의 신경섬유에서 발현되고 후각 신경상피세포에서는 발현되지 않는다는 보고도 있다²⁶. 우리의 보고에서는 NOS가 PKC와 마찬가지로 말의 서골코기관에서 감각상피세포에서 발현됨을 확인할 수 있었고 특히 endothelial NOS가 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다. 결론적으로 말의 서골코기관에서 감각신경상피는 최소한 PKC와 NOS의 활성화를 통해 신호전달이 이루어짐을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Keverne EB. The vomeronasal organ. *Science*, 286:716-720, 1999.
2. Mo KC. Morphological studies on the vomeronasal organ of Korean native cattle and Korea native goats. *J Vet Res*, 29:231-237, 1989.
3. Taniguchi K, Taniguchi K, Arai T, et al. Enzyme histochemistry of the olfactory and vomeronasal sensory epithelia in the golden hamster. *J Vet Med Sci*, 4:1007-1016, 1992.
4. Holy TE, Dulac C, Meister M. Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli. *Science*, 289:1569-1572, 2000.
5. Garcia-Suarez O, Germana G, Naves FJ, et al. Sensory epithelium of the vomeronasal organ express TrkA-like and epidermal growth factor receptor in adulthood. An immunohistochemical study in the horse. *Anat Rec*, 247:299-306, 1997.
6. Berghard A, Buck LB. Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for G alpha o, G alpha i2, and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. *J Neurosci*, 16:909-918, 1996.
7. Kroner C, Breer H, Singer AG, et al. Pheromone-induced second messenger signaling in the hamster vomeronasal organ. *Neuroreport*, 7:2989-2992, 1996.
8. Frings S. Protein kinase C sensitizes olfactory adenylyl cyclase. *J Gen Physiol*, 101:183-205, 1993.
9. Lysakowski A, Singer M. Nitric oxide synthase localized in a subpopulation of vestibular efferents with NADPH diaphorase histochemistry and nitric oxide synthase immunohistochemistry. *J Comp Neurol*, 427:508-521, 2000.
10. Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233:305-312, 1986.
11. Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, et al. Tissue and cellular distribution of the extended family of

- protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol*, 117:121-133, 1992.
12. Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C family for cellular regulation. *Cancer*, 63:1892-1903, 1989.
 13. Burns DJ, Bloomenthal J, Lee MH *et al.* Expression of the α , β II, and γ protein kinase C isozymes in the baculovirus-insect cell expression system. Purification and characterization of the individual isoforms. *J Biol Chem*, 265:12044-12051, 1990.
 14. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 344:661-665, 1988.
 15. Osada S, Mizuno K, Sadio TC *et al.* A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC η , a new member of the protein kinase C family predominantly in lung and skin. *J Biol Chem*, 265:22434-22440, 1990.
 16. Osborne NN, Wood J, Groom N. The occurrence of three calcium-independent protein kinase C subspecies (δ , ϵ and ζ) in retina of different species. *Brain Res*, 637:156-162, 1994.
 17. Brandt SJ, Niedel JE, Bell RM. Distinct pattern of expression of different protein kinase C mRNAs in rat tissues. *Cell*, 49:57-63, 1987.
 18. Shin T, Jin JK, Kim JJ, *et al.* Immunohistochemical location of protein kinase C theta in mouse tissues. *Kor J Lab Anim Sci*, 12:189-191, 1996.
 19. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol. Rev*, 43:109-142, 1991.
 20. Kroll J., Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2(KDR). *Biochem Biophys Res Commun*, 252:743-746, 1998.
 21. Cheng Z, Lin C, Hwang T, *et al.* Brousochalcone A, a potent antioxidant and effective suppressor of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Biochem Pharmacol*, 61:939-946, 2001.
 22. 김원재, 윤영수, 김민석 등. 칙샘에서 Nitric oxide synthase의 면역조직화학연구, 대한해부학회지, 487-495, 2000.
 23. Knowles RG, Moncada S. Nitric Oxide in submandibular acinar cells. *J Oral Biology*, 1-6, 1995.
 24. Kang WS, Lee WK, Seo MS, *et al.* Cellular distribution of isoenzymes of protein kinase C in the septal olfactory epithelium of mice. *Neurosci Lett*, 288:143-146, 2000.
 25. Okere CO, Kaba H. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the accessory olfactory bulb during the formation of olfactory recognition memory in mice. *Eur J Neurosci*, 12:4552-4556, 2000.
 26. Hanazawa T, Konno A, Kaneko T, *et al.* Nitric oxide synthase-immunoreactive nerve fibers in the nasal mucosa of the rat. *Brain Res*, 657:7-13, 1994.