

아프리카 왕달팽이(*Achatina fulica*) 내장신경절 및 우체벽신경절에 관한

연구 I. 면역조직화학적 방법

장남섭·김상원·한종민

목원대학교 자연과학대학 생명과학부

서론

신경분비작용을 전통적인 조직화학적 방법과 미세구조적 방법을 이용한 연구는 20세기 중반까지 계속되어 왔다(Brink and Boer, 1967; Boer *et al.*, 1968). 그러나 이러한 방법만으로는 신경분비세포를 찾아내고 분비기전을 이해하는데는 많은 어려움이 있었다. 이에 Wendelaar-Bonga (1970) 및 Peute and Karter(1967)이 개발한 AB/AY 염색법과 Romeis(1968) 염색법을 이용 *Lymnaea stagnalis*의 신경분비세포의 종류를 분류하는데 성공하였으며 최근에는 면역세포화학법(immunocytochemical method)을 이용 뇌신경절의 light green cell(LGC)이 neuropeptide를 신경종말로부터 비연접상태(nonsynapse)로 분비한다는 사실을 알아냈으며(Roubos and van der wal-Divendal, 1980; Buma *et al.*, 1984; Joosse, 1988; Heumen and Roubos, 1990), 이어 Brink and Boer(1967)와 Wendelaar-Bonga(1970)는 Canopy세포는 LGC 계열에 속하며 4종류의 서로 다른 insulin-like neuropeptides를 분비한다고 하였다(Smit *et al.*, 1988, 1993a, b; Geraerts *et al.*, 1989). 그러나 이와 같은 연구는 소수의 복족류에만 국한되고, 신경분비세포가 분포하고 있는 신경절(뇌신경절, 체벽신경절, 복막신경절 그리고 내장신경절 등)등의 전반적 구조와 이에 따른 신경분비세포들의 분포상황을 연구한 논문은 최근 Chang and Han(1999)이 *Achatina fulica*의 뇌신경절을 대상으로 한 논문 등이 있을 뿐이며 내장신경절과 우체벽신경절을 대상으로 한 연구는 매우 드문 실정이다. 이에 본 연구에서는 식용으로 널리 이용되고 있는 아프리카 왕달팽이 *Achatina fulica*를 재료로 AB/AY 염색법(alcian blue-alcian yellow double staining)과 면역조직화학적 방법인 rabbit anti-somatostatin antibody를 이용 신경절 중 내장신경절과 우체벽신경절의 신경분비세포의 종류 및 성장에 관여하는 neuropeptide 분비 세포의 분포상태(I)를 연구코자 본 실험을 시도케 되었으며, 계속해서 신경분비세포에 따른 미세구조(II)를 연구하고자 한다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 재료는 아프리카 왕달팽이(*Achatina fulica*)로 30% ethyl

alcohol로 마취시킨 다음 측각 아래 머리부위를 절개하여 내장신경절 및 우체벽신경절을 위시해서 모든 신경절들을 적출 하였으며, 실험에 사용할 수 있도록 필요한 부위를 적당한 크기로 잘라낸 후, 10% buffered neutral formalin으로 1일간 고정하였다. 이어 0.2M phosphate buffer(pH 7.3)로 3회 세척하고 ethanol 농도순으로 탈수시킨 후 통상법에 따라 경질 파라핀(58℃)으로 포매하였다(단 AB/AY 염색을 위해서는 ethanol과 amyl-acetate농도순으로 탈수 및 치환시킴). 파라핀 블록은 rotary microtome(Leica Jung histocut 820)을 사용하여 7 μm 두께로 얇은 박편을 만들었으며, 신경분비세포의 화학적 성분 확인을 위해서 여러 가지 염색을 수행하였다. 염색된 시료는 카메라가 부착된 BHS Olympus 자동노출 광학현미경을 사용 촬영하였다. 또한 신경분비세포의 화학적 성분확인을 위해 Harris hematoxylin-eosin double staining(H-E double staining) 및 Peute and Karmner(1967)과 Romeis(1968)의 alcian blue-alcian yellow double staining(AB-AY double staining)을 사용하였고, somatostatin에 대한 일차 항체는 polyclonal antibody인 rabbit anti-somatostatin(Zymed, S. San Francisco, California, USA)을 사용하였다.

결과 및 요약

아프리카 왕달팽이 *Achatina fulica*의 내장신경절과 우체벽신경절은 좌,우 양반구로 구성된 나비모습을 하고 있으며, 이들 신경절의 피질부와 수질부의 표피부위에는 신경세포가 밀집되어 있는반면 중앙부위에는 신경섬유가 망상형으로 신경망을 구성하고 있었다.

두 신경절의 피질부 및 수질부에 위치한 신경세포들은 초대형신경세포(200μm이상)와 대형신경세포(직경 60~70μm이상), 중형신경세포(직경 30~40μm) 그리고 소형신경세포(직경 10~15μm) 등 4종류로 구분할 수 있었다.

초대형 및 대형신경세포는 35~40개 정도로 매우 소수가 관찰된 반면, 중형신경세포(약 400~500개)와 소형신경세포(약700~800개)는 다수가 관찰되었다.

AB/AY 이중염색반응에서 초대형신경세포는 light yellow cell(LYC)로, 대형 및 중형신경세포는 yellow green cell(YGC)와 dark green cell(DGC) 등 두 종류로 그리고 소형신경세포는 yellow cell(YC)와 blue cell(BC) 등으로 각각 확인되었다.

Somatostatin 면역염색반응에서 양성반응을 나타낸 DGC는 성장조절물질 분비의 억제에 관여하는 것으로 확인되었으며, 초대형 및 대형신경세포는 신경분비기능 이외 포식작용을 수행하는 것으로 각각 확인되었다.

참고문헌

- Brink, M. and Boer, H.H. (1967) An electron microscopical investigation of the follicle gland(cerebral gland) and of some neurosecretory cells in the lateral lobe of the cerebral ganglion of the pulmonate gastropod *Lymnaea stagnalis* L. *Z. Zellforsch.*, **79**: 230-243.
- Buma, P., Roubos, E.W. and Buijs, R.M. (1984) Ultrastructural demonstration of exocytosis of neural, neuroendocrine and endocrine secretions with an in vitro tannic acid(TAR)-method. *Histochemistry*, **80**: 247-256.
- Chang, N.S. and Han, J.M. (1999) Immunohistochemical study on the cerebral ganglion of the edible african giant snail, *Achatina fulica*. *Korean J Malacol.*, **15**: 1-11.
- Geraerts, W.P.M., Smit, A.B. and Joosse, J. (1989) Peptide messenger evolution: The invertebrate contribution. In F.F. Casanueva and C. Dieguez (eds.): Recent Advances in Basic and Clinical Neuroendocrinology. pp. 3-37. Amsterdam: Excerpta Medica.
- Heumen, W.R.A. van, and Roubos, E.W. (1990) Ultrastructural evidence for synthesis, storage and release of insulin-related peptides in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*, **39**: 493-500.
- Romeis, B. (1968) Mikroskopische Technik. 16nd ed. München-Wien: Oldenbourg Verlag.
- Roubos, E.W. and van der Wal-Divendal, R.M. (1980) Ultrastructural analysis of peptide-hormone release by exocytosis. *Cell Tissue Res.*, **207**: 267-274.
- Wendelaar-Bonga, SE. (1970) Ultrastructure and histochemistry of neurosecretory cells and neurohaemal areas in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Z Zellforsch.*, **108**: 190-224.