

한국산 서해낙지(*Octopus minor*)와 살오징어(*Todarodes pacificus*)의 시엽(Optic lobe)에 관한 미세구조 및 면역조직화학적 연구

한종민 · 장남섭 · 김상원
목원대학교 생명과학부

서론

두족강(Cephalopod)의 뇌신경계(Central nervous system)와 시엽(Optic lobe)에 관한 연구는 Kopsch(1899)과 Cajal(1917)을 필두로 많은 연구가 진행되어 왔다(Young, 1962a, b, 1971, 1974; Chichery and Chichery, 1974). 특히 Young은 1962년 광학현미경을 이용하여 뇌신경절 중 시엽을 망막과 시신경 등으로 구분하였고, 1974년에는 시엽의 수질부를 palisade layer, frontier zone, zone of radial columns, the zone of tangential bundles 등 5부위로 구분한 바 있다.

전자현미경적 연구는 Hama(1962)가 두족강의 뇌신경계를 관찰한 것을 비롯하여 시엽에 관해서 많은 연구가 진행되어 왔다(Dilly et al., 1963; Woodhams, 1977; Haghghat et al., 1984). 이들 중 Dilly등(1963)은 *Octopus*와 *Eledone*의 시신경은 많은 축삭 다발을 갖고 있고, 축삭은 시엽으로 들어와서 신경분비세포사이를 지나 망상층에 신경연접이 이루어진다고 하였다. 또한 이들은 세포질 속에 소포체, 리보솜, 무과립성 소포체 그리고 난원형 또는 구형의 과립들을 갖고 있는 작은 neuron이라고 칭한 바 있다.

두족강의 뇌신경계나 시엽내에서 분비되는 acetylcholine, catecholamines, histamine 등의 신경전달물질에 관한 연구(Florey and Winesdorfer, 1968; Boadle, 1969; Juorio, 1971)가 시작되면서 신경과 근육의 연접부위에서 존재하는 cholinergic neuron의 구조와 기능에 대한 연구(Jones, 1975; MacIntosh and Collier, 1976)가 병행되어 왔다. 이어 Galanin(Suzuki et al., 2000)이나 Serotonin(Uemura et al., 1987), Somatostatin(Feldman, 1986)와 같은 항체를 이용하여 뇌신경절과 시엽을 구성하는 다양한 종류의 신경분비세포를 찾는 연구도 계속되어 왔다.

이와 같이 두족강은 종에 따라 시엽의 구조가 조금씩 다르고 또한 시엽내 신경분비세포들의 분포상태도 다양하게 관찰된 바 있어, 지금까지 연구가 활발하지 않았던 한국산 서해낙지(*Octopus minor*)와 살오징어(*Todarodes pacificus*)를 재료로 하여 시엽을 미세구조적, 면역조직화학적 으로 연구한 결과 2종 사이에 유의할 만한 차이가 확인된 바

있어 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 재료는 한국산 서해낙지(*Octopus minor*)와 살오징어(*Todarodes pacificus*)로 30% ethyl alcohol을 첨가하여 마취시킨 다음, 눈과 연결되어 있는 머리부위를 절개하여 뇌신경절과 시엽을 적출 하였으며, 실험에 사용할 수 있도록 필요한 부위를 적당한 크기로 잘라낸 후, 2.5% paraformaldehyde- 3% glutaraldehyde로 1시간 30분 전고정하고, 이어서 OsO₄로 2시간 후고정하였다. 고정이 끝난 재료는 0.2M phosphate buffer(pH 7.3)로 3회 세척하고, ethanol 농도순으로 탈수시킨 다음, 통상법에 의하여 Epon 812로 포매하였으며 60°C 파라핀 오븐에서 40시간 경화시켰다. Epon블럭은 LKB-V ultramicrotome을 사용하여 1 μ m 두께의 박절편을 만들고 이를 methylene blue로 단일염색 후 광학현미경하에서 정확한 부위를 확인한 다음, 초박절편을 만들었다. 초박절편을 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색을 한 후, Hitachi H-600 투과전자현미경(80KV)으로 관찰하였다.

면역조직화학적 반응을 위한 실험은 적절한 재료를 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°C)으로 포매하였다. 파라핀 블록은 rotary microtome(Leica Jung histocut 820)을 사용하여 7 μ m 두께로 얇은 박편을 만들었으며, Harris hematoxylin-eosin double staining(H-E double staining)과 여러 가지 항체를 이용하여 면역염색을 실시하였다. 염색된 시료는 카메라가 부착된 BHS Olympus 자동노출 광학 현미경을 사용 촬영하였다. Serotonin과 galanin, somatostatin에 대한 일차 항체는 polyclonal antibody인 rabbit anti-serotonin, rabbit anti-galanin 그리고 rabbit anti-somatostatin(Zymed, S. San Francisco, California, USA)을 각각 사용하였다.

결과 및 요약

한국산 서해낙지(*Octopus minor*)와 살오징어(*Todarodes pacificus*)의 시엽(Optic lobe)에 관한 미세구조 및 면역조직화학적 연구 결과는 다음과 같다.

시엽은 망막(Retina)과 수질부(Medulla)로 구성되어 있고, 망막은 다시 외과립층(Outer granular cell layer), 망상층(Plexiform layer) 또는 외망상층(Outer plexiform layer, 오징어) 그리고 내과립층(Inner granular cell layer)으로 각각 나눌 수 있었다. 특히 오징어인 경우 내과립층의 아래에 다시 내망상층이 관찰되었고, 수질부에서는

Palisade layer와 Frontier zone으로 뚜렷이 구분할 수 있었지만 낙지에서는 관찰할 수 없었다. 망막의 두께는 낙지인 경우 외과립층, 망상층, 내과립층 별로 각각 $5\mu\text{m}$, $10\text{-}12\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}$ 로 총 두께 $25\text{-}27\mu\text{m}$ 정도이고, 오징어에서는 $42\text{-}45\mu\text{m}$ (외과립층, $10\mu\text{m}$; 외망상층, $17\text{-}20\mu\text{m}$; 내과립층, $10\mu\text{m}$; 내망상층, $5\mu\text{m}$)정도로 낙지보다 2배 정도 두터웠다.

전자현미경관찰에서는 낙지와 오징어에서 외과립층을 구성하는 세포는 각각 5종, 3종이 관찰되었고, 망상층에서는 4개의 층(r1, t1, r2, t2)이 확인되었다. 이어 내과립층에서도 4종류의 세포가 각각 관찰된 바 있다. 그러나 수질부에서는 신경망과 신경세포들(낙지 2종, 오징어 4종)이 집단을 이루고 있었고, 특히 오징어에서는 palisade cell이 관찰되어 미세구조적인 차이점이 인정되었다.

항 혈청을 통한 면역조직화학적 실험에서는 연체동물의 중추신경계와 시엽 등에 널리 분포하면서 이들의 기억에 관여하거나, 중추신경계와 시엽 사이의 신경전달물질 교류에 관여하고 있는 것으로 알려진 세포들을 확인하기 위해 Serotonin, Galanin 그리고 Somatostatin 등의 항 혈청 등을 사용하였다. 그 결과 Serotonin 반응은 오징어의 외과립층 상단과 내과립층의 하단에서 소수의 세포만이 양성을 보였으며, 낙지의 외과립층과 두 종의 수질부에서는 양성반응을 보인 세포가 고르게 분포되어 있었다. Galanin 반응은 두 종의 외과립층 상단에서 공통적으로 강한 양성반응을 보인데 비해 내과립층에서는 소수의 세포만이 양성을 보였으며, 수질부에서는 낙지에서만 2-3개의 세포가 양성반응을 보였다. Somatostatin 반응은 낙지에서는 관찰되지 않은데 비해 오징어에서는 내과립층의 하단부와 수질부를 구성하는 세포집단에서 강한 양성반응을 보였다.

참고문헌

- [1] Dilly PN, Gray EG, Young JZ, 1963. Electron microscopy of optic nervous and optic lobes of *Octopus* and *Eledone*. Proc. R. Soc. Lond. Biol. 158, 446-456
- [2] Feldman SC, 1986. Distribution of Immunoreactive somatostatin(ISRIF) in the nervous system of the squid, *Loligo pealei*. J. Com. Neuro. 245, 238-257
- [3] Haghghat N, Cohen RS, Pappas GD, 1984. Fine structure of squid (*Loligo pealei*) optic lobe synapses. Neuroscience 13, 527-546
- [4] Hama K, 1962. Some observations of the fine structure of the giant synapse in the stellate ganglion of the squid *Doryteuthis bleekeri*. Z. Zellforsch. 56, 437-444
- [5] Suzuki H, Yamamoto T, Inenaga M, Uemura H, 2000. Galanin-immunoreactive neuronal system and colocalization with serotonin in the optic lobe and peduncle complex of the octopus (*Octopus vulgaris*). Brain Research 865, 168-176

- [6] Uemura T, Yamashita T, Haga C, Miyazaki N, Kondo H, Matsushita M, 1987. Localization of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of *Octopus vulgaris* by immunohistochemistry. Brain Res. 406, 73-86
- [7] Woodhams PL, 1977. The ultrastructure of a cerebellar analogue in Octopus. J. Comp. Neurol. 174, 329-346
- [8] Young JZ, 1962. The optic lobes of *Octopus vulgaris*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. 245, 19-58
- [9] Young JZ, 1974. The central nervous system of *Loligo*. I. The optic lobe. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. 267, 263-302