

흰쥐 후두에 분포된 신경에서 Substance P 및 Calcitonin Gene-Related Peptides의 발현양상

고려대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실

박정수 · 정광윤 · 최종욱

= Abstract =

The Distribution of Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptides Immunoreactive Fibers in the Rat's Larynx

Jung Soo Park, M.D., Kwang Yoon Jung, M.D., Jong Ouck Choi, M.D.

*Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery,
Korea University, College of Medicine, Seoul, Korea*

The larynx has three major functions such as protective reflex, respiration and phonation, and is richly innervated by sensory, sympathetic and parasympathetic nerves. The sensory innervation of the laryngeal mucosa, which is involved in the perception of pain, mechanical and chemical irritation, protects the airway via various laryngeal reflexes. We studied the distribution of Substance P (SP) and Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) sensory fibers in the rat's larynx using the immunohistochemical methods.

Many SP and CGRP immunoreactive fibers were found in all regions of the laryngeal mucosa except the vocal cords. SP immunoreactive fibers showed a very similar distribution to the CGRP fibers in the epithelium and submucosa. But SP immunoreactive fibers were sparser than CGRP immunoreactive fibers in distribution density. Both reactive fibers were denser in the supraglottic region than subglottic region. Especially, intraepithelial fibers displayed the densest innervation to the laryngeal surface of the epiglottis. In the subepithelium, SP and CGRP immunoreactive fibers were distributed along the wall of vessels and around the glands.

The present results suggest that the regional distribution of SP and CGRP immunoreactivity may be responsible for the protective reflex function of the laryngeal inlet.

Key Words : Substance P Calcitonin Gene-Related Peptides, Larynx

I. 서 론

후두는 호흡, 발성 기능 외에 외부의 자극으로부터 기도를 보호하는 기능을 한다. 즉, 외부의 해로운 자극이 기도내 침입시 기침, 호흡의 변화, 기관수축, 후두수축, 혈압상승 및 연하반사 등 연속적인 일련의 불수의적인 반응이 일어나 기도를 보호하게 된다¹⁾. 이러한 일련의 반응 중 반드시 성문폐쇄반사가 발생하며 이 반사는 기도를 보호하기 위하여 매우 중요하다.

이와 같은 반사의 변화는 후두의 감각신경인 상후두신경에 의하여 조절되어 지고 있으며, 상후두신경의 핵은 연수에서 고속핵(高速核, solitary nucleus)을 이룬다. 고속핵은 후두의 감각뿐만 아니라 미각과 다양한 장기의 반사를 담당하며, 이 핵의 세포체들은 vasoactive intestinal polypeptide (VIP), peptide histidine methionine (PHM), calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP), neuropeptide tyrosin (NPY), C-flanking peptide of NPY (CPON) 및 somatostatin 등 여러 종류의 신경펩타이드와 신경전달물질에 면역양성 반응을 보인다^{2,11,18)}. 이 핵으로 전달되는 정보는 미주신경 및 설인신경, 안면신경에 의해 전달되는 것 외에도 상부기도를 포함한 장기운동에 관여하는 뇌간의 정보이다.

이 중 substance P와 calcitonin gene-related peptide는 외부의 자극을 받아들이는 감각신경인 무수 C-신경섬유에 존재한다. SP는 외부의 자극, 특히 유해한 자극(nociceptive stimuli)을 받아들이며 이러한 자극에 의하여 국소적인 축색반사를 통하여 선분비를 조절한다⁴⁾.

CGRP는 외부의 해로운 자극을 받아들이고 자율신경계와 내분비계를 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 후두에서 CGRP의 분포는 SP의 분포와 유사하며, 혈관과 분비선의 주변 및 상피내와 상피하에 존재하여 강력한 혈관확장을 통하여 혈류량을 조절하며¹⁰⁾, 평활근의 근 종말 부위에 존재하며 근수축에 관여하는 것으로 보고되어 있다.

SP 및 CGRP 면역반응 신경섬유는 개^{6,7)}, 고양이^{8,12)}, 원숭이⁹⁾ 및 사람⁸⁾ 등 여러 종류의 포유류에서 관찰되고 있다. 존재하는 위치는 후두개의 후두측

면과 피열연골 주변에서는 많이 발견되지만 성문부의 상피세포에서는 거의 관찰되지 않는다. 그리고 성문하부보다는 성문상부에서 많이 관찰된다. 이러한 것으로 보아 발성이나 호흡기능보다는 외부의 자극으로부터 기도를 보호하는 기능에 관여하는 것으로 생각되어진다.

저자들은 흰쥐의 후두에서 ABC 법을 통한 면역조직화학적 염색을 이용하여 SP와 CGRP 신경섬유의 분포를 관찰함으로써 후두의 기능과 어떠한 관계가 있는가를 알아보고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 검체의 처치

200-250gm의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 15마리를 사용하여 nembutal(pentobarbital sodium 30mg/kg)을 복강내 주사로 마취한 후, 개흉하여 좌심실을 통하여 상행대동맥으로 heparin(2 IU/ml)을 첨가한 생리식염수를 관류하여 혈액을 씻어낸 후 고정액(4% paraformaldehyde in 0.1Mol/L sodium phosphate buffer, pH 7.4)으로 관류 고정시킨 다음 후두와 기관을 적출하였다. 그 후 동일한 고정액으로 24시간, 4°C에서 침투고정하였다.

그 다음 인산완충식염수용액(phosphate buffered saline: PBS, pH 7.4)으로 세척하고 4% EDTA(4% ethylene-diaminetetraacetic acid in 0.1Mol/L sodium phosphate buffer)로 약 3일간 탈회한 후 20% 수크로우스 용액으로 24시간 수세 후 냉동절편기를 이용하여 15 μ m 두께의 절편을 얻어 poly-L-lysine을 입힌 슬라이드에 붙였다.

2. 면역조직화학적 염색

조직절편을 0.3% H₂O₂/methanol로 10분 동안 상온에서 처리하여 내인성 peroxidase의 활성을 억제하였다. 인산완충식염수로 세척한 후 정상 혈청용액(3% normal goat serum, 1% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100)에 1시간 동안 실온에서 처리하고 다시 인산완충식염수로 세척 후 각각 1차항체(1:1,000 rabbit anti-substance P serum, Chemicon, and 1:1,000 rabbit anti-calcitonin gene-related peptide, Chemicon)로 실

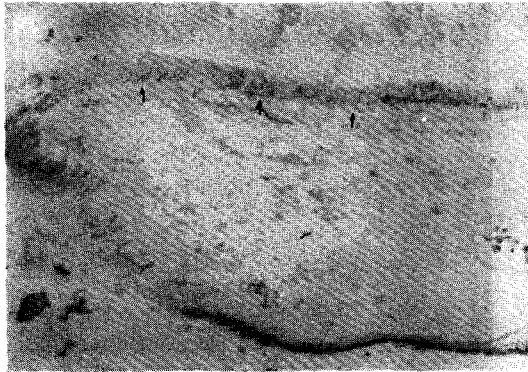


Fig. 1. SP immunoreactive nerve fibers in the laryngeal mucosa are abundantly distributed in the laryngeal surface of epiglottis (arrow), but not in the pharyngeal surface of epiglottis(X 100).

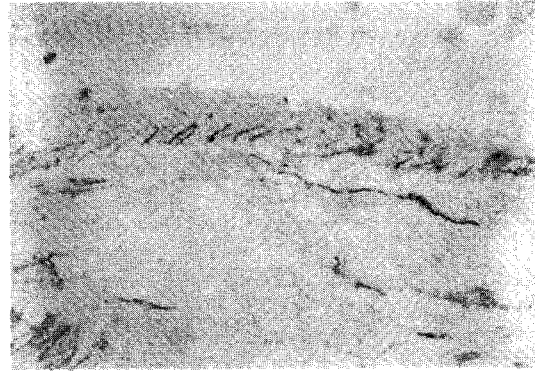


Fig. 2. Many CGRP immunoreactive fibers are distributed in intraepithelial area of laryngeal surface of epiglottis(X 200).

온에서 24시간 동안 반응시켰다. 다시 인산완충식염수로 세정하고 2차항체(biotinylated anti-rabbit Ig G, Vector)에 1시간 동안 실온에서 반응시킨 다음 인산완충식염수로 세척하였다. 그 후 avidin-biotin-complex(Vectastain ABC reagent, Vector)에 1시간 동안 반응시키고 다시 인산완충식염수로 세척후 DAB (0.05% 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride/0.006% H₂O₂/0.05Mol/L distilled water, pH 7.4 : Sigma, USA)액에 발색반응을 시켰다. Ethanol과 xylene에 탈수 및 탈지과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경으로 후두의 면역조직화학적 염색 반응성을 관찰하였다.

III. 결 과

1. SP 항체를 이용한 면역조직화학적 염색 소견
 후두 및 기관의 상피세포층의 세포사이에 양성반응을 보이는 신경섬유들이 관찰되었다. 상피세포층 아래부분의 결체조직과 상피세포층 사이에서 양성반응을 보이는 신경섬유들이 다수 관찰되었다. 이러한 소견은 후두개로부터 기관 사이에 존재하는 상피세포층에서 관찰이 가능하였으나 성대부분의 상피세포층에서는 관찰되지 않았다. 또한 상피세포의 표면을 향하여 분지하는 섬유들이 관찰되었다. 피열연골 주변과 후두개 부분의 상피세포층에 더 많이 분포하고 있었으며 성문하부의 상피세포층보

다는 성분상부에서 더 많이 관찰할 수 있었다.

후두개의 인두측의 상피세포층에서는 관찰되지 않았으나, 후두측의 상피세포층에서는 관찰이 가능하였다(Fig. 1).

상피세포층 하부의 결체조직층에서는 선조직과 혈관주위에서 양성반응을 나타내는 신경섬유들이 관찰되었다. 많은 양성반응을 나타내는 신경섬유들이 포상선, 분비관, 집합선에서 망상조직을 형성하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 혈관 주위에서도 양성반응을 보이는 섬유들이 망상조직을 형성하고 있었으며 근조직은 모두 음성이었다.

2. CGRP 항체를 이용한 면역조직화학적 염색소견

SP 항체로 염색한 소견과 유사한 결과를 관찰할 수 있었다. 상피세포층에서 세포 사이에 존재하는 양성섬유의 관찰이 가능하였으며, 상피세포층 아래부분에서도 관찰되었다. 후두개의 상피세포층에서도 유사한 분포를 나타내는데, 인두측에서는 관찰이 되지 않고, 후두측면에서만 관찰이 가능하였다(Fig. 2). 결체조직층에서도 관찰이 되었다. 선조직과 혈관주위에서 양성반응을 보이는 신경섬유가 관찰되었다. 선조직의 주위에서 망상조직을 형성하고 있는 양성 신경섬유가 관찰되었다. 피열연골 주변과 후두개, 후두전정 부위의 상피세포층에서 더 잘 관찰할 수 있었으며, 성문하부보다는 성문상부에서 더 많이 존재하고 있었다(Fig. 3). 그러나

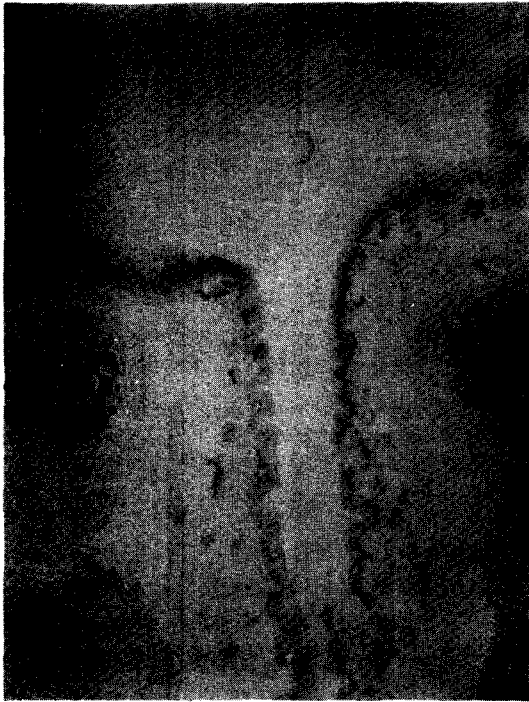


Fig. 3. In the posterior commissure area, numerous epithelial CGRP immunoreactive nerve fibers were observed(X 100).



Fig. 4. No CGRP immunoreactive fibers were detected in membranous vocal cord epithelium(X 100).

막성성대 부분에서는 면역양성 신경섬유들이 관찰되지 않았다(Fig 4). CGRP 양성반응을 보이는 신경섬유는 SP 양성반응을 나타내는 신경섬유보다 상피층에서는 다소 많이 관찰되었으나 별 차이는 없었다. 그러나 상피하층의 결체조직의 선조직과 혈관주변에서는 더 많이 관찰되었다. 또한 SP 양성반응 신경섬유가 관찰되지 않았던 후두내인근의 운동종판(motor end-plate)에서 양성반응을 나타내는 섬유들이 관찰되었다.

IV. 고 안

상기도의 기능을 조절하는 신경계에는 교감신경계, 부교감신경계 외에도 non-adrenergic, non-cholinergic 신경계가 있다. Non-adrenergic, non-cholinergic 신경계에는 전통적인 신경전달물질인 아세틸콜린, 노르아드레날린 대신 여러 가지 다양한 신경펩타이드들이 신경물질로 작용하는 것으로

알려져 있다⁸⁾. Peartfield와 Richardson¹⁶⁾은 고양이의 기관에서 non-adrenergic, non-cholinergic 신경계가 존재하며, 이것에 의하여 점액분비가 조절된다는 것을 실험적으로 밝혀냈다. 기도 및 후두의 신경성 조절은 매우 복잡하고 종에 따라 다양하게 나타나지만 대부분의 실험동물에서는 펩타이드를 포함하는 신경섬유들의 분포양상이 유사하다⁸⁾.

호흡기계에서 분포하는 신경펩타이드들은 신경원, 신경내분비 세포 및 염증세포에 존재하며 기도 면적, 혈관면적, 점액분비 및 혈관투과성의 조절에 관여한다. 또한 매개물질의 분비 및 주화반응(chemotactic response)에 관여하여 염증세포의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 신경펩타이드의 종류는 매우 많으며 그 기능도 매우 다양하다. 신경펩타이드의 하나인 SP는 상피세포층과 결체조직의 선조직, 혈관주위에 존재하며 통증, 화학적 자극 및 물리적 자극을 인지하며, 혈관과 분비선에서는 혈류량 조절과 선분비를 조절하는 데 관련된다.

SP는 고양이의 후두 혈관 주변, 혈관 평활근층, 상피세포층과 상피세포하조직에서 발견된다. 또한 포상선, 분비관, 집합선에서 망상조직을 형성하며 선주위, 선내측에서도 망상구조를 이루며 존재한다. 면역전자현미경상 장액세포와 근상피세포의 세포간극에서도 SP 면역양성을 보이는 데, 이는 SP에 의한 점액분비는 근상피세포의 수축 및 장액세포와 점액세포의 직접적인 자극에 의해서 발생되는 것이라고 하였다³⁾.

Tanaka 등¹²⁾은 고양이의 후두에서 SP와 CGRP 면역반응 섬유를 관찰하였는데, 이들은 성대의 막성부를 제외한 점막의 기저막과 상피세포내 및 상피하 조직에서 발견하였다. 또한 혈관 및 선주위에 존재하는 신경섬유를 관찰하였다. 이러한 면역반응을 나타내는 신경섬유들은 성문하 조직보다는 성문상부 조직에서 많이 존재한다고 하였다.

한편 후두 내인근에서 CGRP 면역반응을 나타내는 신경섬유들이 근신경 집합부의 운동종판에서 관찰되어지지만 SP 면역반응섬유들은 관찰되지 않았다고 보고하였다.

Murano 등⁹⁾은 원숭이 후두의 상피세포층에서 SP 및 CGRP 면역반응 신경섬유들은 성대부분을 제외한 후두 전범위에서 관찰되었고 피열연골 주변의 점막에서 가장 많이 분포하고 있었으며, 후두개, 가성대, 후두실 순으로 분포한다고 보고하였다.

이와 유사한 결과는 흰쥐의 후두에서도 관찰된다. 흰쥐의 후두개의 후두측면에서는 SP 및 CGRP 면역반응섬유들이 많이 관찰되지만 성대의 편평상피층에서는 관찰되지 않는다. 한편 선조직의 포상선과 분비관 및 혈관 주위에서도 관찰되어진다³⁾.

저자의 실험에서도 기존의 보고된 것과 유사한 결과를 얻었다. 후두 및 기관에서 SP와 CGRP 면역양성을 나타내는 신경섬유들을 관찰할 수 있었는데 성대의 점막에서는 관찰되지 않았으며 성대를 제외한 후두 및 기관의 점막에서는 상피세포층 및 상피세포층 하부에서 발견되었다. 또한 선조직 및 혈관조직에서도 SP와 CGRP 면역양성을 보이는 신경섬유의 관찰이 가능하였다. 피열연골, 후두개를 포함한 성문상부에 존재하는 면역양성섬유가 성문하부에서 보다 더 많이 관찰되었다. 성문하부보다는 성문상부의 결체조직에서 더 많은 면역양

성섬유가 관찰되었다.

Tanaka 등¹²⁾과 Murano 등⁹⁾에 의하면 SP 양성 섬유들보다는 CGRP 양성섬유들이 더 많이 관찰된다고 하였다. 이러한 결과는 상피세포층에서의 SP와 CGRP 면역 양성섬유의 분포는 유사하지만 상피세포층 하부에서는 CGRP 양성섬유가 SP 양성 섬유가 많이 분포하기 때문에 기인된 것이라고 하였다.

저자들의 연구도 비슷한 결과를 얻을 수 있었는데 상피층에서 SP 및 CGRP 면역반응섬유들이 드문드문 관찰되었으나 점막의 상피세포층 하부 및 선조직, 혈관 주변에서는 상피층보다는 많이 분포하는 신경섬유를 관찰할 수 있었으며 SP 면역반응 섬유보다는 CGRP 면역반응섬유가 더 많이 관찰되었다. 또한 후두 내인근의 운동종판에서 CGRP 면역반응섬유는 관찰가능하였으나 SP 면역반응섬유는 관찰하지 못하였다.

V. 결 론

성대를 제외한 전부분의 후두의 점막 상피층 및 상피하층의 혈관과 선조직 등 결체조직에서 SP 및 CGRP 면역양성섬유를 관찰할 수 있었다. 그 분포에서는 다소 차이가 있었는데 피열연골 및 후두개 부분에서 많이 관찰되었으며, 성문하부보다는 성문상부에 더 많이 존재하였다. SP와 CGRP에 양성을 나타내는 면역섬유는 상피층에서는 큰 차이가 없었으나 상피하층의 혈관과 선조직에서는 CGRP 양성섬유가 SP 양성섬유보다 많이 존재하였다. 후두 내인근에서는 CGRP 양성섬유는 관찰이 가능하였으나 SP 양성섬유는 관찰하지 못하였다.

상피층에서는 기저대뿐만 아니라 표면으로 분지하는 신경종말을 관찰할 수 있었다. 이상의 분포로 보아 SP와 CGRP는 자극을 받아들여 기도를 보호하는 기능에 관여할 것이라 생각되며, 혈관과 선에 작용하여 혈류량과 선분비 조절에 영향을 미칠 것이라고 생각된다.

References

1. Boushey HA, Richardson PS, Widdicombe

- JG, et al : *The response of laryngeal afferent fibers to mechanical and chemical stimuli. J Physiol* 240:153-175, 1974
2. Carpenter MB : *Core text of neuroanatomy, 4th Ed. Baltimore, Williams & Wilkins, pp 131-143, 1991*
 3. Domeij S, Dahlqvist A, Forsgren S : *Regional differences in the distribution of nerve fibers showing substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the rat larynx. Anat Embryol Berl* 183:49-56, 1991
 4. Hauser-Kronberger CE, Albegger K, Saria A, et al : *Regulatory peptides and general neuroendocrine markers in human nasal mucosa, soft palate and larynx. Acta Otolaryngol(Stockh)* 111:373-378, 1991
 5. Hauser-Kronberger CE, Albegger K, Saria A, et al : *Regulatory peptides in the human larynx and recurrent nerves. Acta Otolaryngol (Stockh)* 113:409-413, 1993
 6. Hisa Y, Sato F, Fukui K, et al : *Substance P nerve fibers in the canine larynx by PAP immunohistochemistry. Acta Otolaryngol (Stockh)* 100:128-133, 1985
 7. Hisa Y, Uno T, Murakami Y, et al : *Distribution of calcitonin gene-related peptide nerve fibers in the canine larynx. Eur Arch Otolaryngol* 249:52-55, 1992
 8. Luts A, Uddman R, Alm P, et al : *Peptide-containing nerve fibers in human airways : distribution and coexistence pattern. Int Arch Allergy Immunol* 101:52-60, 1993
 9. Murano K, Ngaoteppuraru P, Chung SK, et al : *Distribution of the calcitonin gene-related peptide and substance P in the monkey larynx. Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 506:75-79, 1993
 10. Peatfield AC, Richardson PS : *Evidence for non-cholinergic, non-adrenergic nervous control of mucus secretion into the cat trachea. J Physiol* 342:335-345, 1983
 11. Rha KS, Majima Y, Sakakura Y, et al : *Distribution of substance P immunoreactive nerve fibers in the tracheal submucosal gland of cats. Ann Otol Rhinol Laryngol* 103:222-226, 1994
 12. Tanaka Y, Yoshida Y, Hirano M, et al : *Distribution of SP-and CGRP-immunoreactivity in the cat's larynx. J Laryngol Otol* 107:522-526, 1993
 13. Villaverde R, Pastor LM, Calvo A, et al : *Nerve endings in the epithelium and submucosa of human epiglottis. Acta Otolaryngol (Stockh)* 114:453-457, 1994
 14. Woodhead CJ : *Neuropeptides in nasal mucosa. Clin Otolaryngol* 19:277-286, 1994