

## 발생중인 흰쥐 망막의 분화 및 Acetylcholinesterase 활성화에 관한 연구

김 완 종 · 최 준 섭  
순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

### **A Study on the Differentiation and Acetylcholinesterase Activity of the Developing Rat Retina**

Kim, Wan-Jong and Jun-Sub Choi  
Department of Biological Science, Soonchunhyang University  
(Received April 15, 1997)

#### **ABSTRACT**

The present study was carried out to investigate the processes of the ultrastructural differentiation and the acetylcholinesterase (AChE) activities of the developing rat retina. The results are as follows. The retina of fetal rat on the 13th day of gestation showed the early stage of differentiation. Briefly, there appeared dividing chromosomes, the plentiful free ribosomes, and the high ratio of nucleus to cytoplasm. The reaction products by AChE were localized at the membrane of endoplasmic reticulum and on the outer membrane of nucleus. Ultrastructures and AChE activities in the retina of the fetal rats on the 18th day of gestation were similar to those of the prior stages, except the appearance of rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. According to the ultrastructural observations, the rat retina was still in immature state at birth, but the pigment epithelial cells were fully differentiated, e.g. the increase of melanin granules, the development of mitochondria and Golgi apparatus. The AChE activity was weakly detected. The differentiated retinal layers and the outer segment of photoreceptor cells were observed on the 7th postnatal day. And the pigment epithelium appeared to be fully differentiated. On the 14th postnatal day, rat retina were completely differentiated. In other words, the rat retina was characterized by the prominent outer segments, phagocytosed residues in the pigment epithelium, and the localization of reaction products by AChE in the synapses. In conclusion, the differentiation of rat retina is characterized by the changes of cell shape, the increase of retinal layers, and the alterations of AChE activities. It seems that rat retina is to be functional from 2 weeks of birth onward, coinciding with the eye opening of the juvenile rats.

**Key words** : Rat, Retina, Differentiation, Acetylcholinesterase

## 서 론

척추동물의 눈은 발생초기에 돌출된 전뇌의 양쪽 부위에 홈이 나타나서 안포(optic vesicle)를 형성하고, 이어서 안포의 함입에 의해 두 층의 벽을 갖는 안배(optic cup)가 나타남으로써 발생이 시작된다. 사람의 경우 이 과정은 발생 4주경에 이루어지는데 이후의 안배는 외층과 내층으로 구별되며 외층은 색소상피층(pigment epithelium)으로, 내층은 실질적인 망막층(retinal layer)으로 각각 분화하게 된다. 한편 흰쥐의 경우 안배는 배발생 10일째 형성되며 이후 빠르게 분화가 이루어져, 사람과 흰쥐의 망막발생을 비교한 것을 보면 발생 4개월이 경과한 사람 태아의 망막과 출생 직후 흰쥐 망막의 발달정도가 거의 일치한다고 보고되어 있다(Kuwabara and Weidman, 1974).

포유동물 망막은 혈관이 발달된 맥락막과 결합조직 성분인 공막에 의해 둘러싸여져 있다. 한편 망막의 최외층 부분인 색소상피층은 주로 입방형 세포들로 구성되어 있다. 망막의 시각부위는 광수용기세포들과 다양한 종류의 신경세포들의 연결점으로 그 구조가 매우 복잡한 양상을 보인다. 간상세포(rod cell)와 원추세포(cone cell)들로 이루어진 광수용기세포들(photoreceptor cells)은 구조적으로 극성을 지니고 있는데, 외절(outer segment)부분은 색소상피층에 접하여 있고, 이어서 세포질 부분인 내절(inner segment) 및 이극신경세포와 시냅스를 형성하는 부위인 외신경총층(outer plexiform layer)으로 구성되어져 있다(Weidman and Kuwabara, 1969; Deung and Kim, 1985).

빛은 외절내의 로돕신(rhodopsin)을 분해시키며, 이 분해된 분자들은 연속된 촉매과정을 거쳐 증폭된 신호로 전달이 일어난다. 이러한 신호는 광수용기세포들의 막을 과분극시키며, 과분극된 신호로 신경세포에 전달되어 뇌의 시엽으로 보내지게 된다(Vander et al., 1994).

망막의 발생에 관한 연구들은 주로 포유동물을 대상으로 하여 많이 이루어져 왔으나, 포유동물 이외의 동물들에서도 활발히 연구되어져 왔다(Raymond et al., 1988; Mack and Fernald, 1995).

출생 전 후 망막의 분화정도를 특정부위에 한정하여 비교하거나, 출생 후 망막의 형태형성과정을 빛에 의한 반응성과 비교하여 연구하였다(Case and Plummer, 1993). 또한 망막 광수용기세포층의 외절(outer segment)이 형성되는 과정에 대해서도 조사한 바 있으며, 원숭이 혹은 사람의 경우 망막의 광수용기세포들의 분화과정과 분포에 대해 연구되었고, 시신경의 빛에 대한 자극반응성, growth factor, rhodopsin 대사에 관한 생화학적 연구, 빛이 유전자 발현에 미치는 영향, 망막의 신경세포에서 일어나는 여러가지 신경전달 물질과 신경세포 및 혈관과의 상호작용, 빛과 망막 질환과의 관계, 망막의 퇴화와 아미노산에 의해 유도된 광수용기세포 외절의 탐식작용, 빛에 의한 망막의 손상 및 빛을 제거했을 때 나타나는 특징 등에 관하여 다양하게 연구가 이루어져 있는 상태이다(Futerman, 1963; Galbavy and Olson, 1979; Tamai and Chader, 1979; Sanyal et al., 1993; Wikler and Rakic, 1994).

Acetylcholinesterase (AChE)는 화학적 신경전달 물질들 중의 하나인 아세틸콜린(acetylcholine)을 가수분해하는 효소로서 소포체막에서 형성되어 세포막으로 이동하여 그 기능을 수행한다. 즉, 아세틸콜린은 신경세포의 축색말단에서 시냅스틈(synaptic cleft)으로 분비되어져 시냅스 후 뉴우런의 세포막의 수용체에 결합함으로써 활동전위를 전달시키는 물질이며, 이 물질은 수용체와 결합한 직후 AChE에 의해 choline과 acetate로 분해되고, 이 분해된 물질은 세포내로 흡수되어 재 사용된다는 사실은 널리 알려져 있다. 망막에서 AChE에 대한 연구는 주로 신경세포층에서 이루어져 있으며, ganglion cell에서의 acetylcholine 반응 및 수용기에 대한 연구, nicotinic acetylcholine 및 수용기, 항체를 이용한 acetylcholine의 면역세포화학적 연구 등이 이루어져 있다(Faminglietti and Tumosa, 1987; Dowing and Kaneko, 1992; Hankin et al., 1993; Zoli et al., 1995).

상기의 내용들을 토대로 하여 본 연구에서는 흰쥐의 발생단계에 따른 망막의 형태적 분화과정과 망막내 AChE의 활성도를 조사하고자 하였다. 즉 출생 전 후에 나타나는 망막의 분화상의 특징을 미세구조적으로 관찰하고, 화학적 신경전달물질을 가수분해하는 효소

인 AChE의 활성 정도와 분포에 관하여 세포화학적 방법으로 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

실험에 사용된 흰쥐 (*Rattus norvegicus*)는 Sprague-Dawley 계통이었고, 성체를 동물사육실에서 15일간 고행사료와 물을 공급하면서 기초사육한 다음, 오후 7시경에 흰쥐 cage당 암수의 비를 3:1로 합사시켰고, 다음날 오전 8시경에 암컷 흰쥐를 질도말 (vaginal smear)하고 현미경으로 관찰하여 정자가 확인된 날을 발생 0일로 정하였다. 해부현미경하에서 배 발생 13일째부터 수일 간격으로 자궁내 태아들을 분리해냈으며 출생 후 성체가 되는 시기까지도 동일한 방법으로 흰쥐를 희생시켜 안구를 분리하였다. 적출된 안구는 인산완충용액 (0.1 M, pH 7.4)으로 조성된 4% glutaraldehyde 용액에 30분 정도 고정하여 수정체를 제거하고 망막부위를 세절하여 이후의 실험과정을 수행하였다.

### 2. 전자현미경 표본 제작

적출한 안구는 0.1 M 인산완충용액 (pH 7.4)으로 조성된 4% glutaraldehyde에 전고정하였고, 1% osmium tetroxide로 후고정 하였다. 세척은 동일한 완충용액으로 실시하였다. 탈수는 60% 에탄올에서부터 무수알코올까지 농도상승순으로 이루어졌으며, propylene oxide로 치환하였다. 포매제는 MNA, DDSA, Poly/Bed 812 Resin, DMP 30으로 조성된 epon 혼합액을 사용하였다. 포매된 시료를 60°C의 dry oven에서 36시간 중합시켰다.

조직표본은 Reichert supernova ultramicrotome (Leica)으로 200 nm의 두께로 후박절편하여 0.5% toluidine blue로 염색하였고, 망막부위 조직을 관찰한 후 60~70 nm로 초박절편하였다. 이 표본은 uranyl acetate와 lead citrate 이중염색하여 JEM1010 투과전자현미경 (JEOL사)으로 80 kv하에서 관찰하였다.

### 3. AChE 활성 표본 제작

세포내의 AChE의 위치와 분포 조사는 효소 세포화학적 방법으로 실험하였으며, Lewis와 Shute (1977)의 copper-glycine법을 약간 변형하여 실시하였다 (Kim *et al.*, 1988). 모든 과정은 4°C에서 실행하였고, 반응용액의 pH는 5.3~5.5로 맞추었다.

실험에 사용된 copper thiocholine용액은 4.0 ml의 증류수에 100 g의 acetylthiocholine iodide를 용해시키고, 0.1 M의 copper sulfate 7.0 ml를 첨가하여 완전히 섞어준 후에, 300~600 xg로 15~20분 동안 원심분리시키고, 상층액 10 ml에 glycine 62 mg을 더하여 만들었다. 반응액으로서, copper thiocholine solution 8 ml, isotonic sodium sulfate (38 g/l) 8 ml, 2 ml의 증류수, 0.5 M succinic acid 2 ml을 혼합한 용액에 1 N NaOH를 추가하여 pH를 맞추어 (약 1 ml 필요) 사용하였다. 세척용액은 0.5 M succinic acid 10 ml, 0.2 M calcium acetate 1 ml, Isotonic sodium sulfate (38 g/l) 60 ml의 혼합액에 1 N NaOH로 pH를 맞추고 (약 7 ml 필요) 전체 부피가 100 ml가 되도록 증류수로 채웠다.

적출한 조직을 2% glutaraldehyde로 2시간 고정시켰으며 고정 30분 후에 반응액의 침투를 빠르게 하기 위하여 조직을 가능한 작게 세절하였고, 0.1 M의 sodium phosphate buffer로 1시간 세척하였다. 반응액에서 4시간 반응시키고 후에 세척용액으로 세척시켰으며 완충반응액 (buffered sulfide solution)에 다시 1시간 반응시켰다. 그리고 1% osmium tetroxide로 30분동안 후고정하고 0.1 M의 sodium phosphate buffer로 세척하였다. 이후의 과정은 통상적인 전자현미경 표본제작법과 동일하게 진행하였고, 초박절편을 uranyl acetate로 20분간 단일염색하여 전자현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 미세구조 관찰

발생중인 태아의 망막을 후박절편하여 광학현미경으로 관찰하였던 바, 발생이 진행되어감에 따라 망막의 두께가 점차 두꺼워지고, 망막을 구성하는 세포들의 층 수도 증가하는 경향을 보였다. 즉 태아시기에는 신경아세포층 (neuroblastic cell layer)에서 활발한 유

사분열상을 관찰할 수 있었고, 망막을 구성하는 대부분의 세포들의 형태도 구형이었으며, 핵세포질비(N/C ratio)도 큰 것으로 나타났다. 또한, 망막을 구성하는 여러 층들의 분화는 출생 이후부터 이루어지기 시작하여 출생 후 14일 경에 거의 모든 층들이 광학현미경 상에서 구별이 가능하였다. 즉, 색소상피층은 초기에 편평한 모습을 하고 있었으나, 발생 20일 경에는 대체로 입방형의 형태로 나타났고, 신경아세포층도 다양한 신경세포들로 구별되었다. 출생 후 14일이 경과한 어린 흰쥐의 망막의 구조는 광학현미경상에서 성체의 경우와 매우 유사한 정도로 망막을 구성하는 여러 층들의 분화가 이루어져 있었다(Figs. 1, 2).

발생과정중의 흰쥐 태아 망막의 미세구조를 전자현미경으로 관찰하였던 바, 흰쥐 망막의 분화에 따른 미세구조 특징은 세포분열에 의한 망막층의 비후, 세포형태의 변화, 세포 소기관들의 분화 및 세포간 연결의 발달 등으로 요약될 수 있었다. 배발생 13일이 경과한 흰쥐 태아 망막의 미세구조를 보면, 색소상피층 외측의 맥락막에서는 혈관들이 뚜렷이 관찰되었고, 색소상피층과 신경아세포층 사이에서는 세포간 연결부위에 전자밀도가 높은 물질인 경계막이 두 층을 구별짓고 있었다. 신경아세포(neuroblast)들은 아직 분화중인 세포들에서 염색체들이 심하게 응축되어 있는 모습도 나타났다. 구형의 작은 미토콘드리아와 약간의 조면소포체도 관찰할 수 있었다. 색소상피층은 편평한 모양의 세포들로 이루어져 있고, 핵의 모양도 비교적 납작한 형태를 하고 있었다. 세포질내에 유리리보솜들이 발달하였고, 농축중인 멜라닌과립들도 관찰할 수 있었다. 색소상피세포간 연결은 주로 교소체(desmosome)들로 확인되었으며, 신경아세포의 원위부에서는 섬모가 관찰되기도 하였다(Fig. 3). 배발생 18일째 흰쥐 망막의 신경아세포층의 외측에서도 섬모들이 나타났고, 분열중인 세포들이 출현하며, 신경아세포층과 색소상피층간의 세포연접도 잘 발달하는 등, 배발생 13일의 망막의 미세구조와 유사하였으나, 세포질내에서 조면소포체와 Golgi 복합체가 다소 발달하는 차이를 나타냈다. 또한 신경세포들의 세포질 돌기들이 잘 발달하여 서로 연결되어 있는 모습도 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

출생 직후의 흰쥐 망막의 미세구조는 층의 분화나

세포소기관들의 특징으로 보아 기능 수행이 어려울 것으로 판단되었다. 즉, 외질의 분화가 없었으며 다만 외질로 분화되기 위한 섬모들이 다수 관찰되었다. 한편, 색소상피세포내에서 증가된 멜라닌과립을 관찰할 수 있었고, 조면소포체와 미토콘드리아도 발달되어 있었다(Fig. 5). 출생 후 7일이 경과한 흰쥐의 망막은 분화가 크게 진행되어 있었다. 즉, 다양한 종류의 신경세포층과 색소상피층들이 관찰되었고, 신경세포간 시냅스도 잘 발달되어 있었으며, 광수용기세포들의 외절도 형성되고 있었다. 이 과정에서 나타나는 내절에서의 특징은 구형 혹은 난형의 미토콘드리아가 발달된 크리스테를 포함하고 있고, 와상형의 막구조(membrane whorl)가 관찰되며, 대부분의 외절부위에서 섬모들의 관찰이 가능하였으며, 골지복합체들도 나타나고 있었다(Fig. 6). 출생 14일이 경과한 흰쥐 망막의 미세구조는 성체의 경우와 거의 유사하게 관찰되었다. 색소상피층이 맥락막층과 접한 경계부위 및 광수용기세포들과 접합된 부위에는 색소상피세포의 원형질막이 크게 미세돌기를 형성하여 막미로(membranous labyrinth)를 구성하고 있었고, 세포질내에서는 다수의 미토콘드리아와 유리리보솜들이 나타났고, 리소솜들도 관찰되었으며, 드물게 광수용기세포들의 외절부위가 탐식되고 있는 모습도 관찰되었다. 광수용기세포들의 외절은 색소상피층을 향하여 조밀하게 분화되고 있었다. 외신경총층을 구성하는 신경세포들은 핵세포질비가 크고, 핵내에서 이질염색질의 분포가 증가되어 있으며, 신경세포들간에 시냅스도 발달되어 있었다(Fig. 7). 출생 후 18일이 경과한 군에서도 미세구조적 특징은 대체로 14일 군과 유사하였으나, 색소상피층에서 광수용기세포의 외절들이 탐식되는 모습이 더욱 증가하였다. 한편, 이극신경세포들은 난형을 하고 있었으며, 핵의 전자밀도가 낮고, 세포질내에서 조면소포체도 발달하고 있었다. 한편, 성체 망막의 외절은 평행으로 배열된 막구조들이 편평한 판모양의 전형적인 중첩된 구조를 하고 있었다(Figs. 8, 9).

## 2. AChE의 세포화학적 관찰

흰쥐 망막의 분화과정에서 나타나는 AChE 활성의 특징은 세포내 조면소포체 및 핵외막 혹은 Golgi 복합체에 한정적으로 양성반응이 관찰된다는 것이다. 태아

**Table 1.** Distribution and intensity of the reaction product by acetylcholinesterase (AChE) in various retinal layers during rat development.

	Embryonic day 13	Postnatal day 0	Postnatal day 14
GCL ganglion cell layer	++	+	+++
IPL inner plexiform layer	++	+	++
INL inner nuclear layer	++	+	+
OPL outer plexiform layer	+++	+	+
ONL outer nuclear layer	+++	+	+
OSL outer segment layer	undifferentiated	undifferentiated	-
PCL pigment cell layer	+	++	++

Intensities of reaction products were graded as follows:  
 - : not observed, + : weak, ++ : mild,  
 +++ : strong

시기의 망막에서는 AChE에 대한 양성반응이 비교적 강하게 나타났고, 망막 전체에 걸쳐 넓게 분포하는 것으로 관찰되었다. 이러한 경향은 출생 후에 변화하는데, 출생 직후의 망막에서는 색소상피세포의 조면소포체에 국한하여 양성반응이 관찰되었을 뿐, 신경세포층에서는 거의 나타나지 않았으며, 출생 후 8일째의 경우 외신경총층내의 신경세포들의 핵외막과 소포체막에서 약하게 AChE에 대한 반응산물들을 관찰할 수 있었다. 성체 흰쥐 망막에서는 AChE 활성이 태아 시기의 경우보다 오히려 낮은 것으로 나타났고, 특히 신경세포간 시냅스 부위에 한정되어 강하게 나타났을 뿐, 다른 부위의 세포들에서는 활성이 낮은 것으로 조사되었다(Figs. 10, 11; Table 1).

## 고 찰

본 연구는 발생중인 흰쥐의 태아시기부터 출생 후 내지는 성체에 이르는 시기까지, 망막의 분화과정에 대해 미세구조적 특징과 신경전달물질 분해효소의 하나인 AChE 활성의 변화를 효소세포화학적 방법으로 조사하기 위해 수행되었다. 흰쥐의 경우 안배가 형성되는 시기는 배발생 10일 경으로 알려져 있어서 실험

재료의 적출시기는 그 이후인 13일부터 시작하였는데, 이때의 안구는 해부현미경하에서 망막 부위의 식별이 가능한 정도였다.

실험초기군인 배발생 13일이 경과한 흰쥐 망막을 보면, 망막 외층의 맥락막층에서 혈관이 발달하고, 색소상피층 내외층에서 색소상피세포의 막이 심하게 굴곡되어 미로(labyrinth)를 형성하고 있는 모습이 나타났는데, 이러한 결과는 혈관의 분포가 거의 없는 신경아세포층으로 물질 및 기체의 수송을 위한 구조적 특징인 것으로 판단된다(Deung and Kim, 1985). 또한 이 시기에 신경아세포들의 핵세포질비가 이후 시기와 비교하여 볼 때 비교적 크고 세포질내에서 유리리보솜들이나 폴리솜들이 발달하고 있었는데, 이는 미분화세포들의 미세구조적 특징의 하나로 여겨진다. 색소상피세포들 사이에서 흔하게 관찰되는 교소체들은 한 층의 세포간 결합을 강화시키는 구조로서 상피세포들에서 종종 나타나는 특징이다. 발생이 진행되어감에 따라 색소상피층과 신경아세포층을 구성하는 세포들의 미세구조적 변화가 나타나는데, 색소상피세포들의 형태가 납작한 편평상피에서 다소 입방형의 구조를 하고, 신경아세포내에서 조면소포체 혹은 Golgi복합체들이 증가하고 있었을 뿐만 아니라, 핵의 전자밀도도 점차 감소하는 것으로 조사되었다(Case and Plummer, 1993).

출생 직후의 망막에서도 층의 분화는 다소 이루어져 있었으나 광수용기세포의 전형적인 모습이 관찰되지 않는 것으로 보아, 흰쥐의 경우 시각작용이 불가능할 것으로 보이며, 이러한 판단은 출생 후 2주경까지도 눈꺼풀이 폐쇄되어 개안(eye opening)되어 있지 않는 특징과 연관지어 볼 수 있는 내용이다. 출생 후 7일이 경과한 군에서는 색소상피층의 분화가 대부분 이루어져 있는 것으로 나타났으나, 광수용기세포들의 분화는 여전히 불완전한 상태여서 시각작용이 수행되지 않을 뿐만 아니라, 색소상피층의 분화가 광수용기세포의 분화에 선행되어 일어난다는 사실을 암시해 주고 있다. 이 시기의 광수용기세포들의 외절부위와 내절부위사이에서 섬모들이 관찰되었는데, 이는 광수용기세포들이 변형된 섬모세포임을 알 수 있게 해준다(Kuwabara and Weidman, 1974; Dowling and Ehinger, 1978; Sanyal, 1993).

출생 2주가 경과한 흰쥐 망막은 성체의 경우처럼 분화가 거의 이루어져 있었다. 즉 망막을 구성하는 모든 층이 나타나고, 광수용기세포의 외절이 평행으로 중복 배열되어 납작한 모양의 층판구조를 보였으며, 드물게 색소상피층내에서 외절의 일부가 탐식되고 있는 것도 확인할 수 있었다.

이는 광수용기세포들의 외절의 교체과정으로서 망막의 시각작용이 수행되고 있음을 나타내는 특징이며, 더욱이 이 시기에 흰쥐가 눈을 뜨는 특징을 보여, 망막의 분화와 개안시기가 일치함을 알 수 있었다.

안배를 형성한 이후의 망막의 분화과정은 색소상피층과 신경아세포로 나뉜 후, 활발한 분화과정을 거치며, 이러한 분화과정은 먼저 색소상피층이 형성되고, 이른 분화과정을 거치며 이후로 신경세포층의 분화가 다르게 된다(Deung and Kim, 1985). 신경절층, 내핵층과 내신경총층, 외신경총층, 외핵층이 활발한 분화과정을 거쳐 형성된 다음 신경아세포의 변형된 세포로부터 외절이 빠르게 분화형성되는 것으로 알려져 있다. 또한 발생분화과정중 세포의 모양과 세포내의 미세구조도 변화를 나타내고 있음을 관찰할 수 있었다. 외핵층의 핵내 이질염색질의 밀도가 증가하는 것을 볼 수 있었는데 이는 빛 수용에 대한 기능만 수행할 뿐 그외의 물질대사는 미약한 상태임을 암시해 준다(Futterman, 1963). 또한 망막의 발생 초기부터 신경아세포의 외절 형성 부위에 연접복합체(junctional complex)가 띠를 형성하고 있었고, 이 연접복합체는 계속 유지되는데 외절형성후 보이는 외경계막으로 판단되었다.

흰쥐 망막의 분화과정에 따른 AChE의 활성을 효소화학적 방법으로 확인하였던 바, 태아시기의 망막에서는 AChE 활성이 각 층들에서 고르게 나타났으나, 출생 직후에는 오히려 감소하다가 다시 증가하는 2상(2-phase) 과정의 변화를 거치는 것으로 조사되었다. 이 효소의 세포내 분포는 조면소포체와 핵외막에 한정적으로 반응산물(reaction product)이 확인되었을 뿐이다. 이는 AChE가 조면소포체에서 합성된 후 골지복합체로 이동하여 가공됨을 뒷받침하는 결과이다. 이러한 반응은 또한 출생 전에는 세포질내에서 많이 관찰되나 출생 후에 이르러 신경세포층의 세포막 부위에서 많이 관찰되었는데, 이는 신경전달물질을 분해하는

기능을 수행하기 위하여 이동된 것으로 판단되며, 이 시기의 망막의 미세구조적 분화도 거의 이루어진 것으로 관찰되어 망막에 의한 감광작용이 가능할 것으로 사료된다.

## 결 론

흰쥐 발생단계에 따른 망막의 분화과정을 미세구조적으로 관찰하고, 망막내 여러 층들에서 나타나는 acetylcholinesterase (AChE) 활성을 효소 세포화학적 방법으로 조사하였던 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 배발생 13일째 흰쥐의 망막은 분화초기 단계에 있는 것으로 나타났다. 망막을 구성하고 있는 신경아세포들의 전자현미경적 소견은 분열중인 염색체들을 볼 수 있었고, 유리리보솜이 발달하였으며 핵세포질비도 큰 것으로 관찰되었다. 드물게 신경아세포내에서 세포막이 확인되기도 하였다. 이 시기에 AChE 활성은 신경아세포층을 구성하는 세포들의 핵외막과 소포체막에서 비교적 높게 조사되었다.
2. 배발생 18일째의 경우 신경아세포층내에서 세포의 존재와 세포분열상은 계속 관찰할 수 있었으며, 특히 세포질내에서 유리리보솜 외에 조면소포체와 Golgi 복합체가 발달되어 있는 경향을 보였으나, 망막의 분화는 완성되지 않은 것으로 나타났다.
3. 출생 직후의 흰쥐 망막에서도 광수용기세포의 외절 형성이 불완전한 상태에서 미세구조적으로 미분화상태였으나, 색소상피층은 멜라닌 색소가 증가하고 조면소포체와 미토콘드리아가 발달하여 있음을 알 수 있었다. AChE 활성은 색소상피층에서만 다소 강하게 나타났다.
4. 출생 후 7일이 경과한 흰쥐 망막의 미세구조를 보면, 여러 층의 신경세포층에서 발달된 신경세포간 시냅스들을 관찰할 수 있었고, 색소상피층도 뚜렷이 발달되어 있었으며, 광수용기세포들의 외절도 형성중인 것으로 관찰되었다. 한편 이 시기의 흰쥐 망막에서 AChE 활성은 신경절 부위 혹은 내신경총층에서 약하게 나타났는데,

반응산물은 세포질내 조면소포체와 핵외막 및 시냅스부위에서도 관찰할 수 있었다.

- 출생 후 14일이 경과한 흰쥐 망막의 미세구조는 성체의 경우와 비교하여 볼 때 분화가 완성된 것으로 나타났다. 즉 광수용기세포들의 외절이 평행으로 배열된 층판상 막구조를 나타낼 뿐만 아니라, 외절의 일부가 색소상피층내에서 탐식되고 있는 모습도 볼 수 있었으며, 여러 종류의 신경세포들의 미세구조적 분화도 크게 진행되어 있었다. 한편 AChE 활성은 신경총 및 신경절층의 신경세포간 시냅스 부위에서 뚜렷하였다.

결론적으로 흰쥐 망막의 분화는 출생 후 2주경에 미세구조적으로 완성되며, AChE 활성은 출생전에는 소포체 및 골지복합체의 막에 한정되어 나타났으나, 출생후에는 신경세포간 접합부에서 뚜렷한 것으로 조사되었다. 본 연구에서 흰쥐 망막의 형태적 분화가 완성되는 시기와 흰쥐 개안시기인 출생 후 14일이 시기적으로 상호 일치하는 결과를 얻었다.

### 참 고 문 헌

- Case CP, Plummer CJ, 1993. Changing the light intensity of the visual environment results in large difference in numbers of synapses and in photoreceptor size in the retinal of the young adult rat. *Neuroscience* 55(3), 653-666.
- Deung YK, Kim WJ, 1985. Ultrastructural study on morphogenesis of rat retina. *Kor. J. Electron Microscopy* 15(1), 59-70.
- Dowing JEG, Kaneko A, 1992. Cat retinal ganglion cells show transient responses to acetylcholine and sustained responses to L-glutamate. *Neurosci. Lett.* 137(1), 114-118.
- Dowling JE, Ehinger B, 1978. Synaptic organization of the dopaminergic neurons in the rabbit retina. *J. Comp. Neur.* 180, 203-220.
- Faminglietti EV, Tumosa N, 1987. Immunocytochemical staining of cholinergic amacrine cells in rabbit retina. *Brain Res.* 413(2), 398-403.
- Futterman S, 1963. Metabolism of the retina. *J. Biol. Chem.* 238(3), 1145-1150.
- Galbavy ESJ, Olson MD, 1979. Morphogenesis of rod cells in the retina of the albino rat: A scanning electron microscopic study. *Anat. Rec.* 1495, 707-718.
- Hankin MH, Hoover F, Goldman D, 1993. Cues intrinsic to the retina induce nAChR gene expression during development. *J. Neurobiol.* 24(8), 1099-1110.
- Kim WJ, Deung YK, Choe RS, 1988. Effects of malathion on the development of the chick embryo cerebrum. *Kor. J. Zool.* 31, 191-206, 1988.
- Kuwabara T, Weidman TA, 1974. Development of the prenatal rat retina. *Invest. Ophthalmol.* 13(10), 725-739.
- Mack AF, Fernald RD, 1995. New rods move before differentiating in adult teleost retina. *Dev. Biol.* 170, 136-141.
- Raymond PA, Bssi CJ, Powers MK, 1988. Lighting conditions and retinal development in goldfish: Photoreceptor number and structure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29(1), 27-36.
- Sanyal S, 1993. Synaptic growth in the rod terminals after partial photoreceptor cell loss. *Prog. Retinal Res.* 12, 247-270.
- Sawai H, Clarke DB, Kittlerova P, Bray GM, Aguayo AJ, 1996. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 stimulate growth of axonal branches from regenerating retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 16(12), 3887-3894.
- Tamai M, Chader GJ, 1979. The early appearance of disk shedding in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 18(9), 913-917.
- Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, 1994. Human physiology: The mechanisms of the body function. 6th ed., McGraw-hill Inc., N.Y. pp. 249-257.
- Weidman TA, Kuwabara T, 1969. Development of the rat retina. *Invest. Ophthalmol.* 8(1), 60-69.
- Wikler KC, Rakic P, 1994. An array of early differentiating cones precedes the emergence of the photoreceptor mosaic in the fetal monkey retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(14), 6534-6538.

- Zoli M, Le-Novere N, Hill JA, Changeux JP, 1995. Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 15(3) 1912-1939.



**FIGURE LEGEND**

- Fig. 1.** Light micrograph of fetal rat retina at the 13th day of gestation. Various layers of retina are obscure. ( $\times 200$ )
- Fig. 2.** Light micrograph of fetal rat retina at the 18th postnatal day. All the layers of retina, including pigment epithelium, outer segment, inner segment, outer nuclear layer, outer plexiform layer, inner nuclear layer, inner plexiform layer, and ganglion cell layer are readily distinguished. ( $\times 200$ )
- Figs. 3-9.** Transmission electron micrographs of rat retina at the various stages of development. Scale bars on each figure equal  $1\ \mu\text{m}$ .
- Fig. 3.** Pigment epithelium and neuroblastic layer of rat retina at the 13th day of gestation. Cilia (arrows) in the neuroblast are seen.
- Fig. 4.** The outer neuroblastic cells of rat retina at 18th day of gestation. Condensing chromosomes and free ribosomes are prominent.
- Fig. 5.** Pigment epithelium and neuroblastic layers at rat retina at birth. Membranous labyrinth are developed between two layers. Basal body of the cilium is appeared to be typical structure, nine triplet microtubules.
- Fig. 6.** Inner sigments of rat retina at the 7th postnatal day. Limiting membrane is appeared and cytoplasmic organelles, such as free ribosomes, mitochondria and Golgi complex, are observed.
- Fig. 7.** Pigment epithelium and outer segment of photoreceptor cell of rat retina at the 14th postnatal day. Note the differentiated outer segments and its degradation (arrow) in the pigment epithelial cell.
- Fig. 8.** Pigment epithelium and outer segments of photoreceptor cells at the 18th postnatal day. Phagocytosis are seen in the pigment epithelium.
- Fig. 9.** Membranous structure of outer segment of photoreceptor cells of adult rat retina.
- Fig. 10.** Electron micrograph by AChE cytochemistry of developing rat retina. The neuroblastic layer of fetal rat retina at the 13th day of gestation. Reaction products (arrows) are localized at the membrane of endoplasmic reticulum.
- Fig. 11.** Electron micrograph by AChE cytochemistry of the inner plexiform layer of adult rat retina. It shows the positive reactions (arrows) at the intercellular spaces.

**Abbreviations**

BB : basal body of cilia	BV : blood vessel	Mi : mitochondrion
Chr : chromosome	Eu : euchromatin	ML : membrane labyrinth
GCL : ganglion cell layer	Go : Golgi complex	Nu : nucleus
INL : inner nuclear layer		ONL : outer nuclear layer
IPL : inner plexiform layer		OPL : outer plexiform layer
IS : inner segment of photoreceptor cell		OS : outer segment of photoreceptor cell
LM : limiting membrane		PE : pigment epithelium
Ly : lysosome		RBC : red blood cell
MG : melanin granule		Ri : free ribosome









