大韓獸醫學會誌(1998) 第38卷 第1號
Korean J Vet Res(1998) 38(1) : 1~8

연령에 따른 청둥오리 장관 내분비세포에 대한 면역조직화학적 연구

이재현 · 구세광 · 이형식*

경북대학교 수의과대학
경산대학교 생물학과*
(1997년 9월 30일 접수)

Immunohistochemical studies in the intestine of the duck, Anas platyrhynchos platyrhyncos Linne, with ages*

Jae-hyun Lee, Sae-kwang Ku, Hyeung-sik Lee*

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University
*Department of Biology, Kyungsan University**
(Received Sep 30, 1997)

Abstract : The relative frequency and distribution of bovine chromogranin(BCG)-, serotonin-, somatostatin(SOM)- and S-100 protein-immunoreactive cells in the intestinal tract of the duck (*Anas platyrhynchos platyrhyncos*, Linne) with ages were studied using immunohistochemical methods.

BCG-immunoreactive cells were detected in duodenum on 23 days of incubation. Thereafter these cells were occurred throughout the intestine. SOM-immunoreactive cells were detected in the small intestine from hatching to 9 weeks. Thereafter they were also observed in colon. Serotonin-immunoreactive cells were detected throughout the intestinal tracts after hatching.

These immunoreactive cells were increased with ages except that BCG-immunoreactive cells were decreased with ages from 6 weeks after hatching. BCG- and serotonin-immunoreactive cells were most frequently detected in colon regions and SOM-immunoreactive cells in duodenum regions, but no S-100 protein-immunoreactive cells were detected in this study.

Key words : BCG, somatostatin, serotonin, S-100 protein, duck, intestine, age, immunohistochemistry.

이 연구는 '96년도 경북대학교 공모과제 연구비 지원에 의한 것임.
Address reprint requests to Dr. Jae-hyun Lee, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Tae-gu 702-701 Republic of Korea.

서 론

각종 동물의 위장관에 산재하여 주로 소화관의 생리 기능을 담당하는 호르몬을 합성 및 분비하는 위장관 내분비세포는 동물의 계통, 종 및 소화관의 부위에 따라서 심한 분포 및 출현빈도의 차이를 나타낸다. 포유류에 있어서 이들 소화관 내분비세포에 대해서는 다수 보고된 바 있으나[1-8], 조류에 대한 보고는 드물며[9-14] 특히 조류의 연령에 따른 소화관 내분비세포의 변화에 대한 보고는 거의 찾아볼 수 없는 바, 본 연구에서는 bovine chromogranin(BCG), serotonin, somatostatin(SOM) 및 S-100 protein 등의 항혈청을 이용하여 청둥오리에서 연령에 따른 이들 내분비세포의 분포 및 출현빈도를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

대구광역시 달성공원에서 분양받은 청둥오리(*Anas platyrhynchos platyrhyncos*, Linne)의 수정난을 습도 70%, 온도 35.8℃의 조건하에서 부화기(KE 300, EUN JO Incubator company)로 부화시켰으며, 부화일수는 26~28일이었다. 청둥오리를 부란 23일과 부화직후, 부화후 1주, 2주, 3주, 5주, 6주, 7주, 9주, 10주 및 32주로 구분하여 각 5마리씩 실험에 사용하였다. 실험동물은 방혈후 소화관을 십이지장, 공장, 회장, 맹장 및 결장의 5부분에서 절취하여 Bouin 액에 24시간 이상 고정하였으며, 고정한 조직은 에타놀 계열에 탈수한 후 파라핀 포매하였고, 3~4μm의 연속절편을 제작하였다. 각 조직절편은 조직학적 구조를 확인하기 위하여 (H-E) 염색을 실시하였다.

또한 절편은 PAP 법(peroxidase anti-peroxidase method)[15]으로 면역염색을 실시하였으며, 이때 사용된 항혈청 및 희석배율은 Table 1에 나타내었다. 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 normal goat serum을 처리하였으며, DAB 용액(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.01% H_2O_2 in HCl buffer, pH 7.6)으로 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 counter stain을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Table 1. Antisera used in this study

Antisera*	Code	Source	Dilution
BCG	517210	Incstar	1 : 500~1,000
Serotonin	BO68082C	BioGenex	1 : 20
SOM	PUO421295	BioGenex	1 : 26
S-100 protein	PUO580695	BioGenex	1 : 25

*All antisera were raised in rabbits.

결 과

BCG, serotonin 및 SOM 면역반응세포의 연령에 따른 부위별 출현빈도는 Table 2~4에 나타내었다.

Table 2. The relative frequency of BCG-immunoreactive cells in the intestine of the duck

	Duo	Jej	Ile	Cec	Col
23 days of incubation	+	±	-	-	-
At hatching	++	±	+	+	++
1 week	++	+	+	+	+
2 weeks	++	+	+	+	+
3 weeks	++	+	+	+	++
5 weeks	+++	+	+	+	++
6 weeks	+++	+	+	++	+++
7 weeks	+++	+	++	+	+++
9 weeks	++	+	++	+	+++
10 weeks	++	++	+++	++	+++
32 weeks	+	+++	+++	+++	+++

* - : not detected, ±: rare, + : a few, ++ : moderate, +++ : numerous.
* Duo : duodenum, Jej : jejunum, Ile : ileum, Cec : cecum, Col : colon.

Table 3. The relative frequency of SOM-immunoreactive cells in the intestine of the duck

	Duo	Jej	Ile	Cec	Col
23 days of incubation	-	-	-	-	-
At hatching	±	±	±	-	-
1 week	±	±	±	-	-
2 weeks	±	±	±	-	-
3 weeks	±	±	±	-	-
5 weeks	+	+	±	-	-
6 weeks	++	+	±	-	-
7 weeks	++	+	±	-	-
9 weeks	++	+	+	-	-
10 weeks	++	+	+	-	±
32 weeks	++	+	+	-	+

* - : not detected, ±: rare, + : a few, ++ : moderate.
* Duo : duodenum, Jej : jejunum, Ile : ileum, Cec : cecum, Col : colon.

Table 4. The relative frequency of serotonin-immunoreactive cells in the intestine of the duck

	Duo	Jej	Ile	Cec	Col
23 days of incubation	-	-	-	-	-
At hatching	+	+	++	++	++
1 week	++	++	+++	++	++
2 weeks	++	+++	+++	++	++
3 weeks	++	+	++	++	+++
5 weeks	++	+	++	++	+++
6 weeks	++	+++	++	++	+++
7 weeks	+++	++	+++	+	+++
9 weeks	+++	++	+++	+	+++
10 weeks	+++	+++	+++	+	+++
32 weeks	+++	+++	+++	+	+++

* - : not detected, ±: rare, + : a few, ++ : moderate, +++ : numerous.
* Duo : duodenum, Jej : jejunum, Ile : ileum, Cec : cecum, Col : colon.

BCG 면역반응세포의 경우, 십이지장과 공장에서는 전 연령에 걸쳐 관찰되었으며 회장, 맹장 및 결장부위에서는 부화시에서부터 전 연령에 걸쳐 관찰되었다. 한편 연령에 따른 면역반응세포들의 출현빈도는 십이지장의 경우 출생시에서부터 부화후 6주까지 증가되나 그후 감소되었으며 공장, 회장, 맹장 및 결장에서는 연령에 따라 증가되는 경향을 나타내었다. 부위별 출현빈도는 부화후 6주령까지는 십이지장, 결장, 회장, 맹장 및 공장순의 빈도를 나타내었으나 부화후 32주령에서는 십이지장에서 가장 낮은 빈도를 나타내었다(Fig 1a~g).

SOM 면역반응세포는 십이지장, 공장, 회장의 경우에는 부화직후부터 관찰되기 시작하여 연령에 따라 증가하였으나 맹장에서는 전 연령에 걸쳐 관찰되지 않았고, 결장에서는 부화후 10주령에서부터 관찰되기 시작하였다. 부위별 출현빈도는 전 연령에서 십이지장, 공장, 회장의 순으로 나타났다(Fig 2a~f).

또한 serotonin 면역반응세포들은 모든 장 부위에서 부화직후부터 전 연령에 걸쳐 관찰되었으며, 결장에서 가장 높은 빈도를 나타내었고, 십이지장, 공장, 및 회장에서는 유사한 빈도를 나타낸 반면 맹장에서는 비교적 낮은 빈도로 관찰되었다(Fig 3a~i).

한편 이들 면역반응세포들은 주로 상피와 점막 기저부에서 원형 또는 세포질 돌기를 가진 방추형의 세포로 출현하였으며, S-100 protein 면역반응세포들은 전 연령에서 관찰되지 않았다.

고 찰

본 실험의 결과, BCG 면역반응세포는 십이지장과 공장에서 전 연령에 걸쳐 관찰되었으며 회장, 맹장 및 결장부위에서는 부화시부터 전 연령에 걸쳐 관찰되었다. 조류의 chromogranin 면역반응세포 대하여 Takayanagi *et al* [16]은 닭의 췌장에서, D'Este *et al* [14]은 위장관 상피와 신경요소에서 관찰된다고 하였으나 이들 chromogranin의 연령에 따른 부위별 출현빈도 및 분포에 대한 보고는 찾아볼 수 없다. 그러나 이들 chromogranin은 다양한 내분비세포 및 내분비 기관에 존재하는 산성 단백질 계통으로 대부분의 amine, peptide 산생세포의 분비과립에 존재하고, 내분비세포의 marker로 알려져 있으므로[1,17~23], 본 연구에서도 다른 내분비세포가 marker 된 것으로 생각된다.

소화관에서 SOM 면역반응세포는 위 전정부 점막에 주로 분포하며, 주된 작용은 대부분의 호르몬에 대한 억제작용을 나타낸다고 한다[24,25]. 본 연구의 결과 SOM 면역반응세포는 십이지장, 공장 및 회장에서는 부화직후부터 관찰되기 시작하여 연령에 따라 증가하였으나 맹장에서는 전 연령에 걸쳐 관찰되지 않았고, 결장부위에서는 부화후 10주령부터 관찰되기 시작하였다. 또한 부위별 출현빈도는 전 연령에서 십이지장, 공장 및 회장의 순으로 관찰되었다. 조류에 있어서 이들 SOM 면역반응세포의 연령에 따른 분포 및 출현빈도에 대한 연구는 극히 소수에 불과하다. Yamanaka *et al* [10]은 닭에서 SOM 면역반응세포가 소장부위에서만 관찰되며, 부위별 출현빈도는 십이지장, 공장 및 회장 순으로 보고하였고, Richardson *et al* [9]은 벌새에서 십이지장, 공장, 회장, 맹장 및 결장에서 극소수의 면역반응세포들이 관찰된다고 보고하였다. 본 연구의 결과는 Yamanaka *et al* [10]의 보고와 대체로 일치하였으나 Richardson *et al* [9]의 보고와는 다소 차이를 나타내었다. 이같은 차이는 동물종간의 특성인지 사용한 항혈청의 차이인지는 알 수 없다. 또한 본 실험의 결과 SOM 면역반응세포가 태생기에서는 전 부위에서 관찰되지 않아 소화관에서 SOM 면역반응세포의 분화시기가 다른 세포의 분화시기 보다 느리다는 Ito *et al* [24]과 Alumet *et al* [26]의 보고와 일치한다고 생각된다.

Serotonin은 소화관의 장크롬친화성 세포에서 분비된다고 알려져 있으며[27], 조류의 장관에서는 전 장관에 걸쳐 다수의 면역반응세포가 관찰된다고 보고되어져 있다

[9,10]. 본 연구에서도 serotonin 면역반응세포들이 모든 장관 부위에서 부화직후부터 관찰되기 시작하여 전 연령에 걸쳐 관찰되어 이전의 보고[9,10]와 일치하는 소견을 나타내었다.

한편 S-100 protein은 척추동물의 뇌에서 최초로 확인된 단백질로서[28] 근래에 들어서는 비신경성 조직내에서도 발견되어 진다고 하며[29-31] 특히 오리에서는 췌장섬의 내분비세포, 신장의 근위곡세관 및 집합세관의 상피에서 면역반응성을 나타낸다[32]. 그러나 본 연구의 결과 청둥오리의 위에서는 전혀 관찰되지 않았다.

이상에서 청둥오리의 장관에서는 연령별 차이가 인정되나 BCG, serotonin 면역반응세포는 전 부위에서 관찰되며, SOM 면역반응세포는 십이지장, 공장, 회장 및 직장에서 관찰되나 S-100 protein 면역반응세포는 전 부위에서 관찰되지 않았고, 특히 SOM 면역반응세포는 맹장에서 전 연령에 걸쳐 관찰되지 않았다. 그러나 이들 면역반응세포외 다른 내분비세포의 존재와 연령에 따른 분포 및 출현빈도에 대해서는 금후 더 연구가 수행되어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

청둥오리의 십이지장, 공장, 회장, 맹장 및 결장에서 BCG, serotonin, SOM 및 S-100 protein 면역반응세포의 연령에 따른 분포 및 출현빈도를 관찰하기 위하여 면역조직화학적으로 관찰하였던 바 BCG 면역반응세포의 경우 십이지장과 공장에서는 부란시에서부터 전 연령에 걸쳐 관찰되었으며, SOM 면역반응세포는 부화직후에서부터 십이지장, 공장 및 회장에서 관찰되기 시작하였고, 결장에서는 부화후 10주령에서부터 관찰되기 시작하였다. Serotonin 면역반응세포는 전 부위에서 부화직후부터 관찰되기 시작하였다. 이들 세포들은 십이지장에서 BCG 면역반응세포가 부화후 6주령 이후에서부터 감소되는 것을 제외하고는 대체로 연령에 따라 증가하였다. 부위별 출현빈도는 BCG 및 serotonin 면역반응세포는 결장에서 SOM 면역반응세포는 십이지장에서 가장 높게 나타났으나 S-100 protein 면역반응세포는 전 연령에서 관찰되지 않았다.

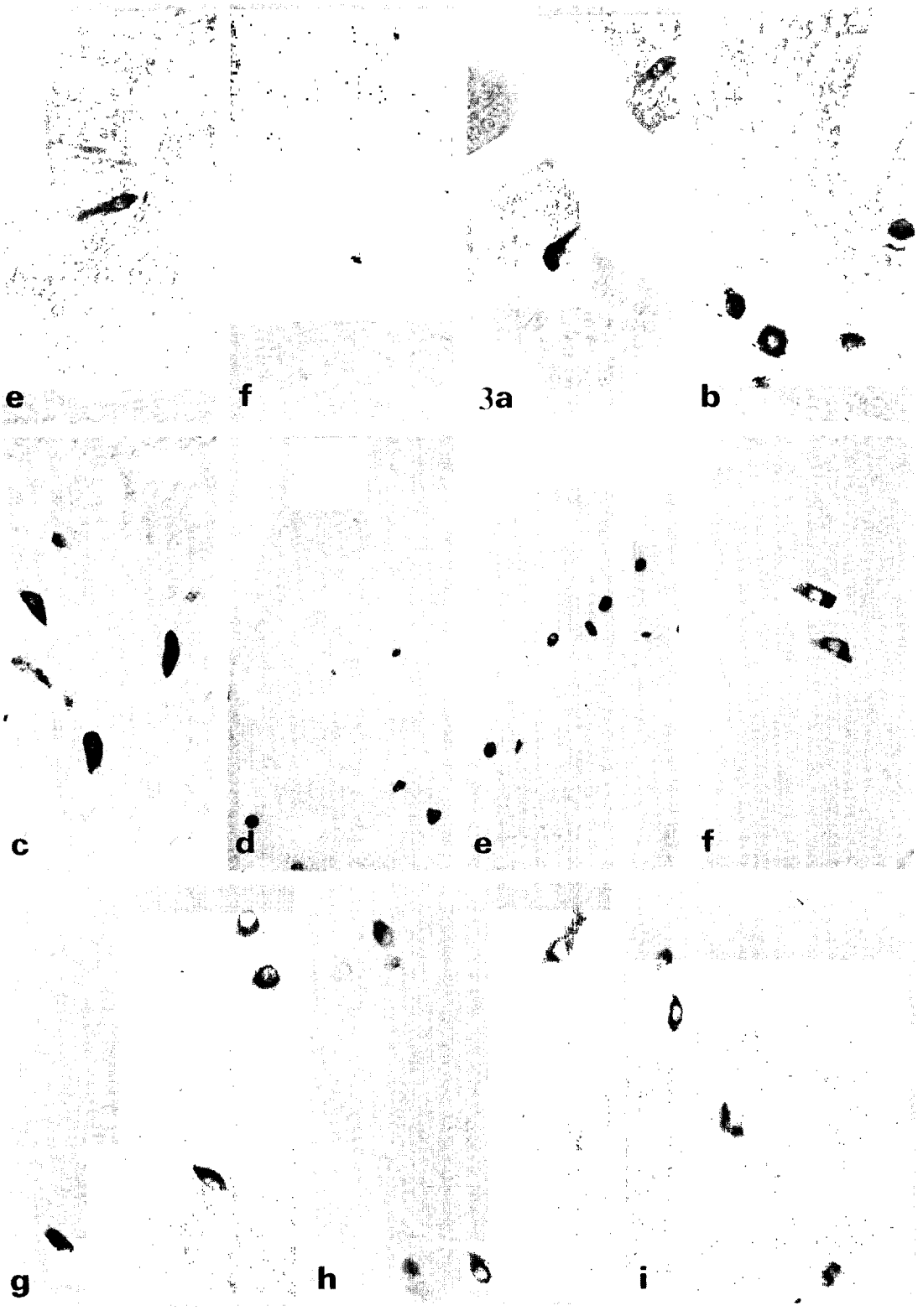
Legends for figures

Fig 1. BCG-immunoreactive cells in the intestinal tract of the duck.
a. Jejunum of 23 days of incubation
b. Duodenum of at hatching
c. Ileum of 1 week after hatching
d. Cecum of 5 weeks after hatching
e. Ileum of 6 weeks after hatching
f. Colon of 6 weeks after hatching
g. Duodenum of 32 weeks after hatching
a-g; ×480, PAP method.

Fig 2. SOM-immunoreactive cells in the stomach of the duck.
a. Duodenum of 23 days of incubation
b. Ileum of at hatching
c. Duodenum of 5 week after hatching
d. Jejunum of 5 weeks after hatching
e. Ileum of 9 weeks after hatching
f. Colon of 32 weeks after hatching
a-f; ×480, PAP method.

Fig 3. Serotonin-immunoreactive cells in the stomach of the duck.
a. Duodenum of at hatching
b. Ileum of at hatching
c. Colon of at hatching
d. Duodenum of 1 week after hatching
e. Cecum of 1 week after hatching
f. Jejunum of 2 weeks after hatching
g. Colon of 3 week after hatching
h. Cecum of 5 weeks after hatching
i. Duodenum of 9 weeks after hatching
a-c, f-i; ×480, d-e; ×240, a-e; PAP method.

1a
b
c


e
f
3a
b
c
d
e
f
g
h
i

참 고 문 헌

1. Rindi G, Buffa R, Sessa F, *et al*. Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. Distribution distinction from costored hormones/prohormones and relationship with the argyrophil component of secretory granules. *Histochemistry*, 85:19-28, 1986.
2. Calingasan NY, Kitamura N, Yamada J, *et al*. Immunohistochemical study of the gastro-enteropancreatic endocrine cells of the sheep. *Acta Anat*, 118:171-180, 1984.
3. Ohara N, Kitamura N, Yamada J, *et al*. Immunohistochemical study of gastroentero-pancreatic endocrine cells of the herbivorous Japanese field vole, *Microtus montebelli*. *Res Vet Sci*, 41:21-27, 1986.
4. Kawano H, Yamashita T, Yamada J, *et al*. A light microscopic study of the gastroentero-pancreatic endocrine cells of the mink(*Mustela vison*). *Ach Histol Jpn*, 1982, 46:559-573.
5. 조성환, 北村蓮夫. 한우의 위장관에 존재하는 내분비세포의 면역세포화학적 연구. 대한수의학회지, 28:251-259, 1988.
6. Sjolund K, Sanden G, Hakanson R, *et al*. Endocrine cells in human intestine. An immunocytochemical study. *Gastroenterology*, 85:1120-1130, 1983.
7. Holmgren S, Nilsson S. Bombesin-, Gas/CCK-, 5-hdroxytrptamine-, neurotensin-, somatostatin- and VIP-like immunoreactivity and catecholamine fluorescense in the gut of the elasmobranch, Squalus acanthras. *Cell Tiss Res*, 234:595-618, 1983.
8. Yamada J, Campos VJM, Kitamura N, *et al*. Immunocytochemical study of gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine cells in the vampire bat(*Desmodos rotundus*). *Gegenbaurs Morhol Jahrb*, 130:845-856, 1984.
9. Richardson KC, Yamada J, Wooller RD. An immunohistochemical study of the gastro-intestinal endocrine cells of new Holland honeyeater, *Phylidonyris novaehollandiae*. *Aust J Zool*, 36:483-496, 1988.
10. Yamanaka Y, Yamada J, Kitamura N, *et al*. An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the chicken gastrointestinal tract. *Z Mikrosk Anat Forsch*, 103:437-446, 1989.
11. Rawdon BB, Andrew A. An immunohistochemical survey of endocrine cells in the gastro-inteastinal tract of chicks at hatching. *Cell Tiss Res*, 220:279-292, 1981.
12. 정진웅, 박인선, 권홍식. 청둥오리(Anas platyrhynchos platyrhyncos, Linne) 위장관의 gastrin cell에 대한 면역세포화학적 및 미세구조적 연구. 대한해부학회지, 17:55-68, 1984.
13. Watanabe T, Chikazawa H, Chungsamarnyart N, *et al*. Serotonin storing cells of the chicken duodenum : light, fluorescence and electron microscopy and immunohistochemistry. *Cell Tiss Res*, 247:25-32, 1987.
14. D'Este L, Buffa R, Renda T. Phylogenetic aspects of the occurrence and distribution of secretogranin Ⅱ. immunoreactivity in lower vertebrate gut. *Arch Histol Cytol*, 57:235-252, 1994.
15. Sternberger LA. Immunocytochemistry. 2nd ed, New York, John Wiley & Sons, 104-149, 1979.
16. Takayanagi M, Watanabe T. Immunocytochemical colocalizations of in sulin, aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine-beta-hydroxylase, S-100 protein and chromogranin A in B cells of the chicken endocrine pancreas. *Tissue Cell*, 28:17-24, 1996.
17. Cetin Y, Grube D. Immunoreactives for chromogranin A and B, and secretogranin Ⅱ in the guinea pig endocrine pancreas. *Histochemistry*, 94:479-484, 1990.
18. Benedum UM, Baeuerle PA, Konecki DS, *et al*. The primary structure of bovine chromogranin A : a representative of a class of acidic secretory proteins common to a variety of peptidergic cells. *EMBO J*, 5: 1495-1502, 1986.
19. Buffa R, Gini A, Pelagi M, *et al*. Immunoreactivity of hormonally chracterized human endocrine cells against three novel anti-human chromogranin B(B11 and B13) and chromogranin A(A11) monoclonal antibodies. *Arch Histol Cytol*, 52:99-105, 1989.
20. Fischer-Colbrie R, Lassmann H, Hogn C, *et al*. Immunological studies on the distribution of chromo-

granin A and B in the endocrine and nervous tissues. *Neuroscience*, 16:547-555, 1985.

21. Lloyd RV, Cano M, Rosa P, *et al*. Distribution of chromogranin A and secretogranin I (chromogranin B) in neuroendocrine cells and tumors. *Am J Pathol*, 130: 296-304, 1988.
22. Wakinson A, Tonsson AC, Davison M, *et al*. Heterogenecity of chromogranin A-derived peptides in bovine gut, pancreas and adrenal medulla. *Biochem J*, 1: 471-479, 1991.
23. Lundquist M, Arnberg H, Candell J, *et al*. Silver stains for identification of neuroendocrine cells. A study of the chemical background. *Histochem J*, 22: 615-623, 1990.
24. Ito H, Hashimoto Y, Kitagawa H, *et al*. Ontogeny of gastroenteropancreatic(GEP) endocrine cells in mouse and porcine embryos. *Jpn J Vet Sci*, 50:99-110, 1988.
25. Brazeau P, Vale WR, Burgus N, *et al*. Hypothalamic polypeptides that inhibits the secretion of immmunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 179:77-79, 1973.
26. Alumet J, Sundler F, Hakanson R. Distribution, ontogeny and ultrastructure of somatostatin immunoreactive cells in the pancreas and gut. *Cell Tiss Res*, 185:465-479, 1977.
27. Solcia E, Creutzfelt W, Falkmer S, *et al*. Human gastroenteropancreatic endocrine, paracrine cells : Santa Monica 1980 classification, Ed, Grossmann MI, Brazier MAB and Lechago J, Academic Press, 159-165, 1981.
28. Moore BW. A soulble protein chracteristic of the nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 19:739-744, 1965.
29. Girod C, Durand N, Raccurt M. A comparative study of immunocytochemical localization of S-100 protein in the monkey Macaca irus and the albino rat test. *Biomed Res*, 7:333-337, 1986.
30. Girod C, Durand N, Raccurt M. Immunostaining of a cell type in the islets of Langerhans of the monkey Macaca iris by antibodies against S-100 protein. *Cell Tiss Res*, 247:11-16, 1987.
31. Molin SO, Rosengren L, Baudier J, *et al*. S-100 alpha-like immunoreactivity in tubules of rat kidney. *J Histochem Cytochem*, 33:367-374, 1985.
32. Sugimura M, Shirogane D, Atoji Y, *et al*. S-100 protein immunoreactive cells in non-nervous duck tissues. *Avian Pathol*, 18:503-510, 1989.