

랫드 후각점막내 Zinc 이온의 조직화학적 동정

남동우, 손원재, 김성주, 김용국,
김수진¹, 유윤조², 정영길³, 조승묵*
한림대학교 의과대학 해부학교실, ¹한림대학교 자연과학대학 생물학과,
²우석대학교 한의학과, ³전양대학교 의과대학 해부학교실

Histochemical Detection of Ionic Zinc in the Rat Olfactory Mucosa: Zinc Selenium Autometallography (ZnSe^{AMG})

Dong Woo Nam, Yuanjie Sun, Sung Joo Kim, Yong Kuk Kim, Soo Jin Kim¹,
Yun Cho Yu², Young Gil Jeong³ and Seung Mook Jo*

Department of Anatomy, Hallym University, ¹Department of Biology, Hallym University,

²Department of Oriental Medicine, Woosuk University,

³Department of Anatomy, Konyang University

(Received May 31, 2003; Accepted June 16, 2003)

ABSTRACT

The present study was designed to demonstrate ionic zinc in the rat nasal mucosa by means of zinc selenium autometallography (ZnSe^{AMG}). Rats were given sodium selenide either intraperitoneally (i.p) or intranasally (i.n). Prior to the i.n. administration the rats were anesthetized with pentobarbital sodium (30 mg/kg, i.p.). A thin plastic tube coupled to a Hamilton syringe was then inserted into the right nostril and 10 μ l of the solution was instilled. For the i.p. administration non-anesthetized rats were given 100 μ l of the sodium selenide solution (10 mg/kg). Control rats were instilled with saline. After 2 hrs survival, the rats were anaesthetized and transcardially perfused with 3% glutaraldehyde. The olfactory area was removed and put into same fixative. The nose was then sectioned (30 μ m) horizontally, autometallography (AMG) was performed according to Danscher et al.(1997).

After silver enhancement, fine AMG grains were scattered in the whole length of the olfactory epithelium containing olfactory receptor neurons, sustentacular and basal cells. However, much higher concentration of the AMG grains occupied near the surface and in the basal region of the olfactory epithelium. Both groups of i.p. and i.n. administration showed almost same level in the concentration of the AMG grains. In i.n. group, few AMG grains were also found in olfactory nerves of the lamina propria, suggesting zinc transport into the olfactory bulb via olfactory axons.

At the electron microscopic level, the AMG grains were most entirely found in the supporting cells of the

이 논문은 한국과학재단에서 지원하는 연구비(R02-2001-00625)로 이루어진 것임.

* Correspondence should be addressed to Dr. Seung Mook Jo, Department of Anatomy, College of Medicine, Hallym University, Okchon-1-Dong, 200-702 Chunchon, Korea. Ph.: 033-256-2523, FAX: 033-255-1614, E-mail: smjo@hallym.ac.kr

Copyright © 2003 Korean Society of Electron Microscopy

olfactory epithelium, and they were mostly localized in lysosome like organelles. The i.n. group showed various signs of tissue damage of the olfactory mucosa, where dense concentration of AMG grains were localized at crystalloid structures.

The present study demonstrated dense population of ionic zinc in the rat olfactory epithelium. zinc may play a role in the olfactory function and in the pathogenesis of the neurodegenerative disorders affecting nose.

Key words : AMG grains, Lysosome, Olfactory mucosa, Rat, Sodium selenide, Supporting cells, Zinc

서 론

Zinc는 중추신경계통, 특히 해마복합체를 비롯한 중뇌의 특정 신경세포 집단의 신경종말내 고농도로 존재한다는 오래 전에 밝혀진 사실이다(Danscher, 1981, 1982; Frederickson et al., 1989, 1992). 대부분의 (90%) zinc는 단백질에 결합되어 있으며 이온상태에 zinc (Zn^{2+})는 불과 10% 이하(Peres-Clauswill & Danscher, 1985)이다. Zn^{2+} 은 소위 "Zinc-enriched (ZEN) Terminals"에 국한되어 분포하며 이러한 ZEN terminals은 Autometallography (AMG) (Danscher et al., 1984, 1985) 혹은 Quinoline (TSQ)형광법(Frederickson et al., 1987)으로 광학 및 전자현미경하에서 가시화된다. Zn^{2+} 은 주로 Glutamate성 신경세포의 연결점 신경종말의 연결소체에 glutamate 및 GABA와 공존하면서 여러 신경전달물질의 기능을 조절한다고 알려져 있다(Frederickson, 1989; Wenzel et al., 1997). 하지만 그 정확한 작용기전에 대하여는 아직 논란의 대상이 되고 있으며, 중추신경계통내 이들 신경세포의 분포에 대한 형태학적인 연구 조차 완성되지 못한 실정이다. 따라서 특정 신경부위내 ZEN neurons의 정상적인 분포를 밝히는 것은 Zinc의 신경활동을 짐작하는데 매우 중요한 자료가 될 수 있다.

ZEN 신경종말의 연결소포내로 zinc의 축적 및 분비 등을 조절하는 막성단백질(zinc transporter)이 수종 보고된 바 있는데, 그 중에서도 연결소포 내로 zinc를 끌어들이는데 관여하는 것이 zinc transporter3 (ZnT3)라고 밝혀졌으며(Palmiter et al., 1996), 최근에는 ZnT3를 유전적으로 제거한 생쥐, 소위 ZnT3-knockout mouse가 개발되었다(Cole et al., 1999). 이러

한 실험동물을 이용해 기억, 학습, 감각운동기능 등에 관한 zinc의 기능을 밝히려는 연구가 각광받고 있다. 그럼에도 불구하고 zinc가 중추신경계통에서 어떤 신경생물학적 기능을 영위하는지는 명확하지 않으며, 다만 간질발작(Suh et al., 1996; Lees et al., 1997), 뇌허혈(Koh et al., 1996) 및 Alzheimer병(AD)과 같은 퇴행성 뇌질환(Cuajungco & Lees, 1997)의 병리기전에서 zinc가 밀접한 관련이 있으며, 최근에는 통증에도 관련있음을 시사하는 연구보고(Larsson & Kitto, 1999; Liu et al., 1999)가 있다.

한편 AD 환자의 후각점막에서 zinc의 양이 상당히 증가되어 있으며 이것은 AD 환자에서 활성유리기(reactive free radical)가 증가되어 있는 것을 neutron activation analysis로 증명된 바 있다(Samudralwar et al., 1995). 또한 cytotoxic reactive oxygen species의 형성과 oxidative stress를 억제하는 copper-zinc superoxide dismutase가 reactive oxygen species의 투여에 의해 사람의 후각점막에서 고농도로 발현된다는 것을 면역조직화학법으로 보여준 바 있다(Kulkarni-Narla et al., 1996). 이상의 연구들은 후각점막내 zinc가 고농도로 존재하며, 그 곳에서 이들이 갖는 기능 또한 다양할 것임을 시사하고 있으나 아직까지 후각점막에 내재하는 zinc의 분포를 형태학적으로 기술된 연구가 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 랫드 후각점막에 분포하는 zinc를 조직화학적으로 동정하고, 이들의 분포양상을 광학 및 전자현미경하에서 기술하고자 하였다.

본 연구의 결과는 후각점막의 이상으로 나타나는 여러 가지 질환의 병리에서 zinc가 영위하는 신경생물학적 기능을 밝히는데 유용한 기초자료가 될 수 있을 것으로 기대한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

이번 연구에서는 성숙한 수컷 랫드(Sprague-Dawley 계통) 30마리를 실험동물로 사용하였다. 우선 생리식염수만을 복강에 주사한 대조군, selenium을 복강주사한 실험군, 그리고 selenium을 직접 비강점막에 투여한 실험군 등 3개의 실험군으로 나누어 각 군에 10마리씩 배정하였다.

2. Selenium 투여

우선 미세한 zinc입자(10 nm 이하)를 형태학적으로 가시화하기 위해서는 zinc 이온과 특이한 결합력을 가진 selenium을 생체내에 주사하여야 한다. 이를 위해 sodium selenide(20 mg/kg, Sigma)를 생리식염수 5 ml에 녹여 만든 selenium용액을 만들었다. 이 연구에서는 두 가지 다른 방법, 즉 복강주사(i.p)하는 실험군과 비강내 직접 점적(i.n)하는 실험군으로 대별하였다. 복강주사를 위해서는 우선 동물은 전신마취시킨 후 만들어진 selenium 용액 100 μ l를 복강에 주사하였고, 다른 방법으로는 selenium 용액 10 μ l를 비강 깊숙히 플라스틱관을 삽입한 후 Hamilton 주사기로 한 방울씩 떨어뜨렸다.

3. 조직화학법(Autometallography, AMG)

후각점막내 zinc를 조직화학법으로 동정하기 위해서 zinc 특이성이 높은 AMG법(Dansch, 1985)을 이용하였다. 각 실험군의 동물은 주사 후 2시간에 이르러 pentobarbital sodium(30 mg/kg, i.p)로 깊게 마취하고, 3% Glutaraldehyde(GA)액으로 관류고정함으로써 희생시켰다. 고정후 비중격을 중심으로 후각점막이 포함된 후각부위를 떼어내 GA 용액에 2시간 동안 후고정(postfixation)한 후 30% sucrose에 가라앉을 때까지 실온에서 방치하였다. 그 후 dry ice를 이용하여 떼어낸 조직을 급냉하고, 냉동정단기(cryomicrotome, Leica) 위에서 30 μ m 두께의 관상절편 얻었고, 젤라틴이 발라진 유리슬라이드에 올린 후 실온에서 20분간

건조시켜 -70°C 냉동고에 보관하였다. 여기서 AMG법을 간단히 요약하면, 몇가지 화학물질의 일정한 혼합비율로 만들어진 AMG developer가 준비되어야 한다. 유리Jar에 조직절편이 부착된 유리슬라이드를 끼워 놓고 준비된 developer를 실온에서 들이 붓고는 가볍게 흔들어 준다. 이어서 Jar를 26°C 로 유지되며, 어둡게 밀폐된 흔들물통수조(shaking water bath)에서 1시간 교반시키고 나면 조직절편내 갈색이 드러난다. 그 후 Jar를 꺼내어 developer를 40°C 수돗물로 몇 차례 헹군다. AMG 반응이 끝나면 toluene blue(TB)로 대조염색하고, 알코올과 자일렌 등을 이용한 탈수과정 및 청명과정을 거쳐 반영구적인 광학현미경 조직 표본을 완성하여, 광학현미경하에서 관찰하였다.

전자현미경적 절편을 만들기 위해 전자현미경 관찰을 위한 실험으로 vibratome을 사용하여, 100 μ m 두께의 가로절편을 만들어 유리그릇에 모았다. 이어서 AMG법은 위에서 말한 동일한 방법으로 하되 단지 다른점은 슬라이드와 Jar를 이용하지 않고, 유리그릇안에서 염색이 이루어졌다. 그후 일반적인 전자현미경 포매과정, 즉 후고정, 탈수 및 epon 포매과정을 거쳐, ultramicrotome에서 2 μ m 두께의 semithin section을 만들어 광학현미경으로 관찰하고, 필요한 부위를 찾아 100 nm의 thin section을 만들어 우라닐과 납을 이용한 이중염색을 시행한 후 투과전자현미경(Zeiss TEM 109, Germany)하에서 관찰하였다.

결 과

1. 광학현미경적 관찰

Selenium 용액 대신에 생리식염수만을 복강투여한 대조군에서는 후각점막 어느 부위에서도 AMG 반응이 전혀 없었다. TB로 염색된 랫드 후각점막의 일반적인 구조를 관찰하였다. 후각상피와 고유판(lamina propria)으로 이루어진 후각점막으로 덮여 있으며, 코안의 천정을 이루는 뼈바깥막(periostrum)에 붙어 있다. 후각점막의 고유판은 성긴결합조직으로 뼈바깥막에 붙어 있으며, 그 속에 혈관, 림프관, 후각신경 및 후각샘(Bowman's gland)이 존재하였다(Fig. 1).

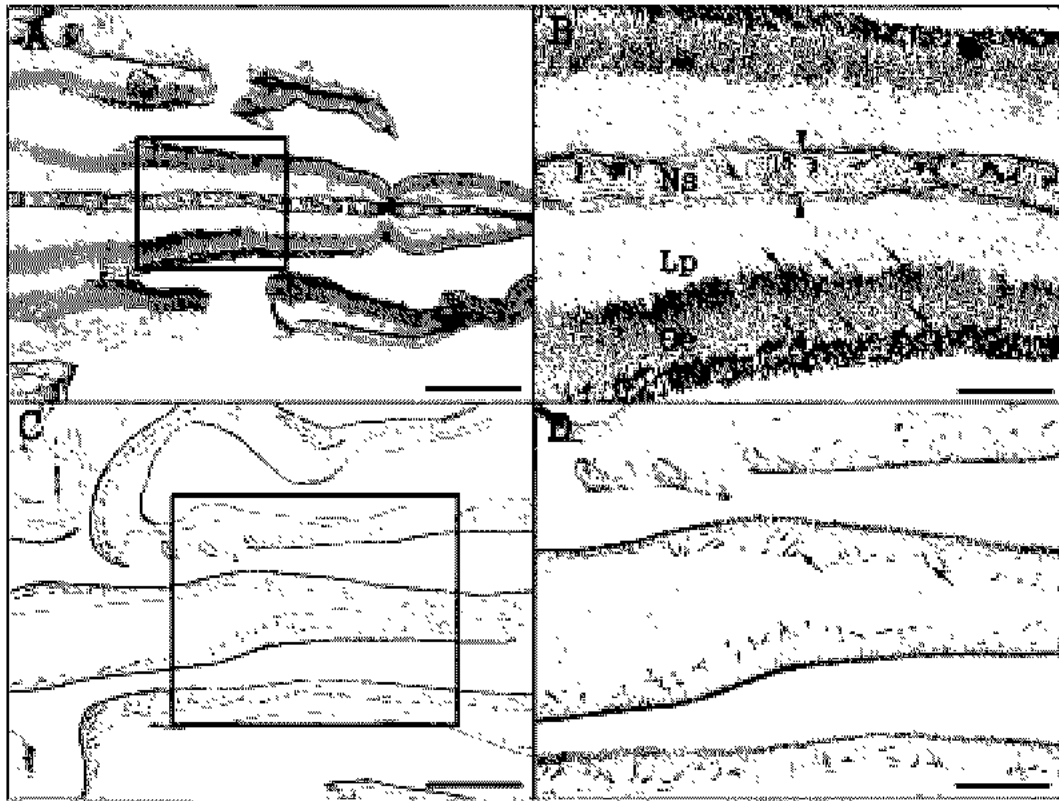


Fig. 1. Light micrographs showing autometallographically-stained olfactory mucosa in the rat administrated *i.p.* (A & B) and *i.n.* (C & D) with sodium selenide. Fig. 1B & D are magnifications of the rectangular areas depicted in Fig. 1A & B, respectively. Note dark AMG staining (arrows) in the apical and basal regions of olfactory epithelium (OE) and lamina propria (Lp). Arrowheads indicate periosteum anchoring to nasal septum (Ns). Scale bars: (A & C) 500 μ m; (B & D) 200 μ m.

Selenium 용액을 복강에 투여한 *i.p.* 실험군에서는 30 μ m 두께의 후각점막의 상층부와 기저부에서 강한 AMG 반응산물, 즉 짙은 갈색의 도은성 염색 (silver stain)이 관찰되었으나 기저막아래 고유판에서는 전혀 관찰되지 않았다 (Fig. 1A, B). 2 μ m 두께의 epon 절편에서는 위에서 관찰된 갈색의 반응산물들이 점상 (dot-like)의 구조로 각각 구분되었다. 이러한 점상의 구조는 후각점막의 상층부에 밀집되어 있었고, 기저부에서는 중간정도로 관찰되었고, 세포체가 위치하는 후각점막의 중간부위에서는 소수로 관찰되었으나, 고유판내에서는 전혀 보이지 않았다 (Fig. 2A).

반면 selenium 용액을 비강점막에 직접 도포한 *i.n.* 실험군에서는 *i.p.* 실험군과 같이 후각점막에서 강한

AMG 반응이 관찰되었을 뿐만 아니라 이러한 반응이 기저막내 후각실 (fila olfactoria)의 주행을 따라 관찰되었다 (Fig. 1C, D).

2. 전자현미경 소견

투과전자현미경으로 관찰된 후각상피에서는 후각 세포, 지지세포 및 기저세포의 세가지 세포형으로 구분되었다. 후각세포는 난원형의 핵이 세포의 아래쪽에 위치하였고, 세포질에는 과립세포질세망 및 골지 복합체가 잘 발달되어 있었으며, 소수의 긴 사립체와 신경미세관이 존재하였다. 상피의 표면쪽으로 뻗어 있는 가지돌기의 끝, 즉 후각소포 (olfactory vesicle)는 이웃하고 있는 지지세포보다 약간 더 높게 솟아 있

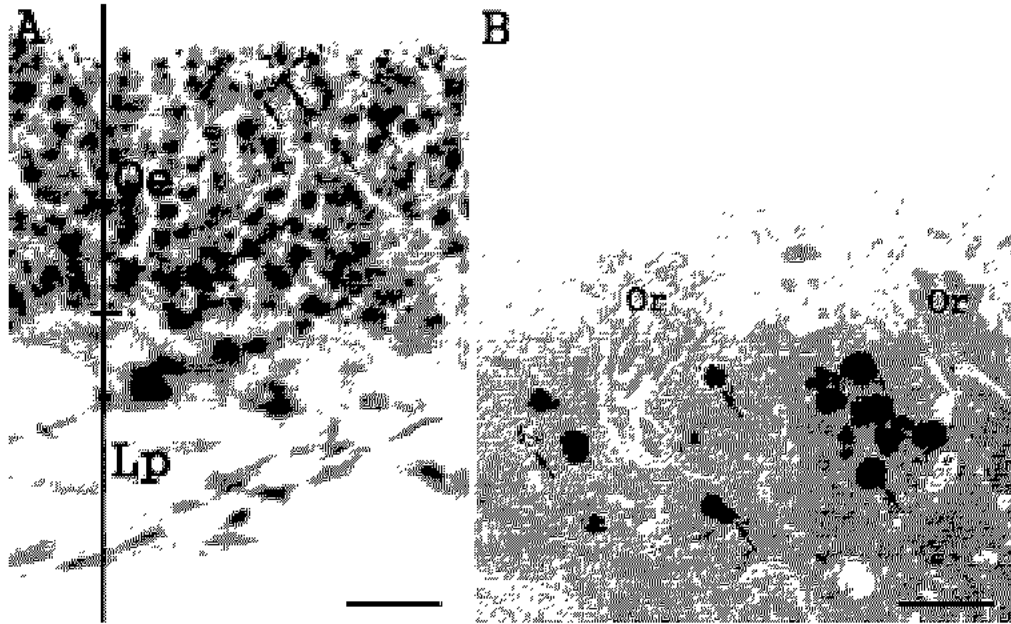


Fig. 2. Light (A) and electron (B) micrographs showing AMG grains (arrows) in the olfactory epithelium (Oe) 2 hr after *i.p.* administration of sodium selenide. Note that no AMG reaction in the lamina propria (Lp) and olfactory receptor (Or). Scale bars: (A) 50 μ m; (B) 5 μ m.

였으며, 둥글게 팽창되어 있었다. 후각소포에는 다수의 긴 사립체와 소량의 과립세포질세망이 있었고, 후각세포가 상피의 표면쪽으로 뻗어 있었다. 지지세포에는 많은 미세용모가 나 있었으며, 핵은 세포의 위쪽에 위치하였고, 이질염색질이 적었고, 뚜렷한 핵소체를 갖고 있었다. 세포질에는 다량의 사립체, 과립세포질세망, 골지체 등의 소기관들이 잘 발달되어 있었으며, 자유면 쪽에는 전자밀도가 낮은 점액과립이 관찰되었다. 기저세포는 지지막쪽에 치우쳐 있으며, 세포질내 소기관의 발달은 미약하였다.

i.p. 실험군의 후각점막에서는 AMG 과립이 지지세포의 세포 상층부에서 관찰되는 분비과립에 국한되는 소견이며, 이곳에서 관찰된 AMG 은과립 (silver grains)은 원형 또는 난원형으로 그 크기는 다양하였다 (Fig. 2B). 이러한 AMG grains은 크기가 작고, 전자밀도가 높은 (electron dense) 분비과립이 반대로 전자밀도 낮고 크기가 큰 분비과립보다 훨씬 많은 AMG grain들을 갖고 있었다. 반면에 세포체 하부에서 관찰된 AMG grains은 주로 용해소체위에서 밀집되어 관

찰되었으며, 핵주변부 및 세포사이공간 (intercellular space)에서는 AMG grains이 날개로 분포하였다 (Fig. 3).

한편 *i.n.* 실험군에서 관찰된 후각점막의 전반적인 구조가 손상된 소견을 보였으며, 후각상피를 이루는 각 세포의 형태 또한 변형되어 관찰되었으나 세포의 분류 및 세포질내 소기관을 구분하는 것은 어렵지 않았다 (Fig. 4). 이들 *i.n.* 실험군의 지지세포에서 관찰된 소견 중에서 가장 특이한 만한 것은 전자밀도가 높고 간상의 crystalloid structure가 지지세포의 위쪽에서 다수 관찰되었고, 이들 구조에 다수의 AMG 과립이 붙어 있었다. 그 외의 소견은 *i.p.* 실험군에서 관찰된 것과 대동소이 하였다. 즉 대부분의 과립이 지지세포의 위쪽에 있는 분비과립과 세포질내 용해소체위에 밀집되어 있었고, 소수의 과립은 세포질내 흩어져 있거나 세포사이공간에서 날개로 관찰되었다 (Fig. 5). 한편 *i.n.* 실험군에서는 *i.p.* 실험군과는 달리 후각세포의 세포질내 소수의 AMG 과립이 관찰되었고, 주로 후각세포의 후각소포와 기저부에서 관찰되

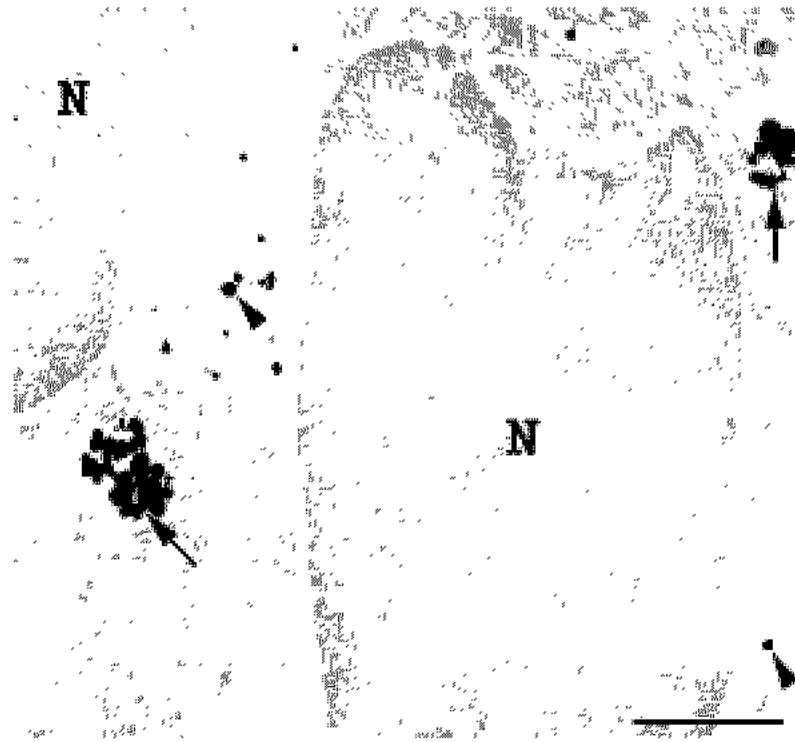


Fig. 3. Electron micrograph showing AMG grains in the cytoplasm of the supporting cells 2 hrs after *i.p.* administration of sodium selenide. Arrows and arrowheads indicate AMG grains on the lysosome-like structure and intercellular space, respectively. Note dense population of AMG grain in the lysosome, but single AMG grain in the intercellular space. Scale bar: 2 μ m.

었다. 그러나 광학현미경 하에서는 후각실내에서 AMG 과립이 뚜렷이 관찰되었던 반면 전자현미경 하에서는 AMG 과립이 매우 희소하게 관찰되었다 (Data not shown).

고 찰

본 연구에서는 selenium 용액을 후각점막에 직접 도포하였을 때의 AMG 결과가 복강내 투여한 것과 그 양상에 뚜렷한 차이를 보였다. 특히 후각점막의 조직학적인 구조가 파괴되고, 미세구조에 변형이 초래되었음은 sodium selenide 자체의 독성을 의미하며, 이는 약물투여 후 30분 이내에 실험동물에서 심한 호흡곤란이 초래되고, 치사율이 높았던 것과 상호 관련이 있다고 판단된다. 그러나 문헌에서 후각점막에

대한 selenium의 세포독성에 관한 연구를 찾을 수 없었으며, 이는 비강으로 투여하는 selenium의 종류, 농도, 투여량 및 투여 후 경과시간에 따른 세포독성의 양상이 어떻게 다른지 연구되어야 할 과제이다. 한편 변형된 세포질내에는 전자밀도가 높고, 막대모양의 결정체 (crystalloid structures)가 세포체 위쪽, 즉 자유면에 가까운 곳에서 다수 관찰되었고, 특이하게도 다량의 AMG 과립들이 이들 구조에 밀착되어 있음이 관찰되었다. 본 연구자들은 이러한 결정구조의 본체가 무엇인지는 모르지만 AMG 과립이 밀집되었던 점으로 미루어 복강투여군에서 보여준 분비과립들이 selenium의 독성으로 변성되어 나타난 것이 아닌가 사료된다. 세포독성에 따른 결정구조의 출현에 관한 연구로 Kim et al. (1994)이 세포토닌 억제제인 parachlorophenylalanine이 랫드 췌장에 대한 독성으로 과립형질내세망 (rough endoplasmic reticulum, RER)내

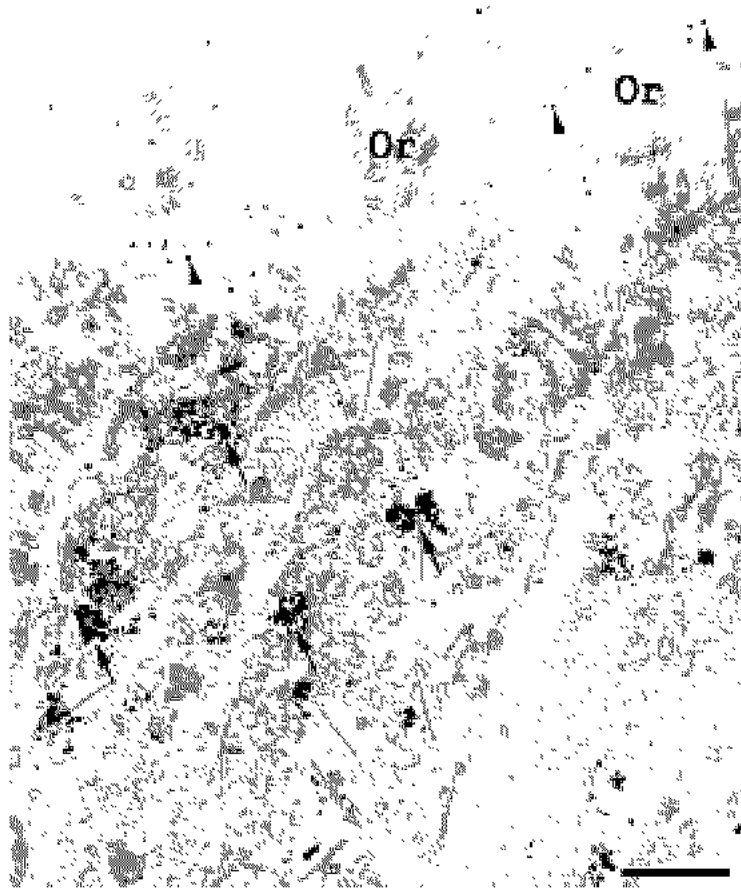


Fig. 4. Electron micrograph showing AMG grains in supporting cells 2 hrs after *i.n* administration of sodium selenide. Arrows indicate AMG grains on the secretory granules in the apical regions of the supporting cells. Note that single AMG grain is attached with microvilli of the supporting cells (arrowheads), and few AMG grains are in the cytoplasm of the olfactory receptor (Or). Scale bar: 5 μ m.

결정함유물(crystalline inclusion)을 만든다고 보고한 바 있다.

본 연구에서 관찰된 후각점막내 AMG 과립은 크게 2개의 zinc pool이 있었다. 즉, 분비과립 또는 용해소체 위에 밀집되어 있는 것과 특정 세포소기관과 관련없이 사이토솔(cytosol)에 날개로 혼어져 존재하고 있는 것으로 구분되었다. 더욱이 분비과립에 따라 과립의 농도가 다르게 나타났는데 전자밀도가 높고 크기가 작은 과립에 가장 높은 밀집도를 보였다. 이러한 결과는 Jo et al.(2000)가 파네스세포에서 보고한 결과와도 일치하는 것으로 이는 분비과립의 발생단계 또는

분비과립의 화학적 조성에 따른 차이라고 사료된다.

본 연구에서는 대부분의 AMG 과립이 후각세포를 주변의 지지세포에 밀집되어 있었으며, 특히 분비과립과 용해소체에 국한되어 있었다. 이러한 결과는 Jo et al.(2000)가 랫드 소장내 파네스세포에 분포하는 AMG 과립의 분포양상에 대한 연구보고와 거의 일치하는 결과로서 분비능력을 가진 세포들의 일반적인 특징이라고 간주할 수 있겠다. 다시 말해서 zinc가 주로 세포의 분비와 관련된 기능에 관여하고 있거나, 반대로 이들 분비세포들이 생체내에 과량의 zinc가 축적되지 않도록 분비과립을 이용하여 체내 필요량

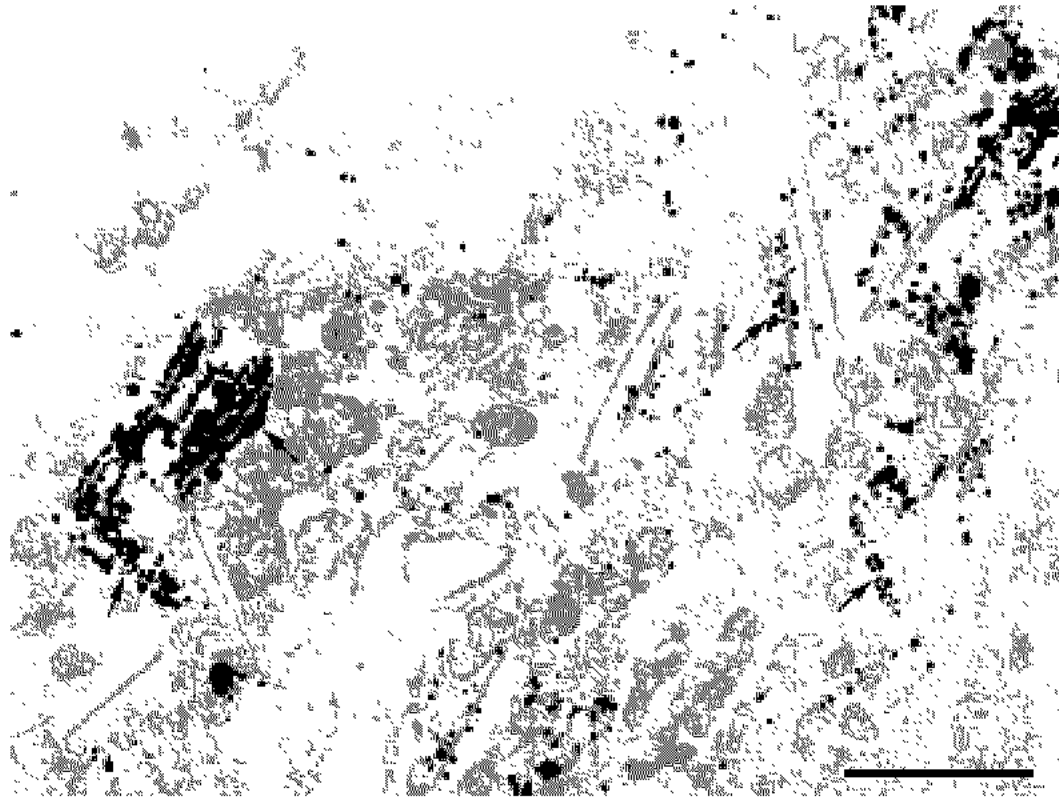


Fig. 5. Electron micrograph showing AMG grains in supporting cells 2hrs after *i.n* administration of sodium selenide. Arrows indicate AMG grains on the crystalloid structures of the supporting cells. Scale bar: 2 μ m.

을 조절하는 것이 아닌가 사료된다.

본 연구의 결과 중에서 가장 특이할 만한 소견으로 *i.n* 실험군에서 후각세포에서 zinc가 관찰되었다는 것으로, 더욱이 zinc가 후각실에 밀집되어 있었음은 신경섬유를 통해 zinc의 이동이 있음을 증명하며, 나아가 zinc가 후각전달과정과 관련되어 있음을 암시한다. 이와 관련된 보고로는 Jo et al. (2000)는 후각신경이 연결하는 후각망울(olfactory bulb)내 사구체층에 분포하는 ZEN 신경종말의 기원이 비강에 있는 후각세포일 수 있음을 시사한 바 있다. 그러나 이를 증명하기 위해서는 후각망울로부터 zinc가 축삭이동을 통해 세포체에 이를 수 있음이 역추적법(retrograde tracing method)으로 확인되어야 한다(Jo et al., 2002).

후각세포는 노화현상에 따라 점차 숫적으로 감소하며, 이러한 변화는 후각의 점진적 소실로 나타난다

는 것은 주지의 사실이며, 후각과 관련된 신경활성물질 또한 노화에 따라 변화될 수 있다. Zinc가 후각기능과 관련되어 어떤 신경생물학적 기능을 영위하는지는 알려진 바 없지만 후각계통에서 zinc가 신경로를 따라 자유롭게 이동된다(Takeda et al., 1997; Takeda, 2000). 뿐만 아니라 개체의 정상적인 발생과정에 따라 신경계통내 zinc의 분포에 변화가 있으며(Sawashita et al., 1997), AD와 같은 퇴행성뇌질환 환자의 후각점막에서 zinc가 현저히 증가된다(Samudralwar et al., 1995). 이상의 결과들은 zinc가 분명 정상적인 신경계통의 발달 뿐만 아니라 노화에 따른 신경기능의 저하에 밀접한 관련이 있음을 시사한다.

본 연구의 결과를 요약하면 랫드 후각점막에 존재하는 zinc는 지지세포의 분비과립과 후각세포의 축삭다발인 후각실에서 관찰되었는데 이는 zinc가 후각기

능과 매우 밀접한 관련있음을 시사하며, 이는 향후 후각기능과 zinc의 연관성을 연구하는데 소중한 자료가 될것으로 믿는다.

참 고 문 헌

- Cole TB, Wenzel HJ, Kafer KE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD: Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 1716-1721, 1999.
- Cuajungco MP, Lees GJ: Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol Dis* 4 : 137-169, 1997.
- Danscher G: Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy. *Histochemistry* 71(1) : 1-16, 1981.
- Danscher G: Exogenous selenium in the brain. A histochemical technique for light and electron microscopical localization of catalytic selenium bonds. *Histochemistry* 76(3) : 281-293, 1982.
- Danscher G: Autometallography: a new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochemistry* 81 : 331-335, 1984.
- Danscher G, Howell G, Perez Clausell J, Hertel N: The dithizonid, Timm's sulphide silver and the selenium methods demonstrate a chelatable pool of zinc in CNS: a proton activation (PIXE) analysis of carbon tetrachloride extracts from rat brains and spinal cords intravitaly treated with dithizone. *Histochemistry* 83 : 419-422, 1985.
- Frederickson CJ, Kasarskis EJ, Ringo D, Frederickson RE: A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *J Neurosci Methods* 20 : 91-103, 1987.
- Frederickson CJ, Hernandez MD, McGinty JF: Translocation of zinc may contribute to seizure induced death of neurons. *Brain Res* 480 : 317-321, 1989.
- Frederickson CM, Rampy BA, Reamy Rampy S, Howell GA: Distribution of histochemically reactive zinc in the forebrain of the rat. *J Chem Neuroana* 5 : 521-530, 1992.
- Jo SM, Kim SJ, Park SK, Kang TC, Won MH: Do paneth cells regulate the zinc body burden? *Korean J Electron Microscopy* 30(4) : 357-365, 2000.
- Jo SM, Won MH, Cole TB, Jen MS, Palmiter RD, Danscher G: Zinc enriched (ZEN) terminals in mouse olfactory bulb. *Brain Res* 865 : 227-236, 2000.
- Jo SM, Kim YK, Wang Z, Danscher G: Retrograde tracing of zinc enriched (ZEN) neuronal somata projecting to the olfactory bulb. *Brain Res* 956 : 230-235, 2002.
- Kim IG, Jeong YG, Choi CD, Cho WB: Light and electron microscopic studies on the effects of para-chlorophenylalanine in the exocrine pancreas of rats. *The Korean J Anat* 27(3) : 237-253, 1994.
- Koh JY, Suh SW, Byoung JG, Yong YH, Chung YH, Choi DW: The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* 272 : 1013-1016, 1996.
- Kulkarni Narla A, Getchell TV, Schmitt FA, Getchell ML: Manganese and copper-zinc superoxide dismutases in the human olfactory mucosa: Increased immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 140(2) : 115-125, 1996.
- Larson AA, Kitto KF: Chelation of zinc in the extracellular area of the spinal cord, using ethylenediaminetetraacetic acid disodium calcium salt or dipicolinic acid, inhibits the antinociceptive effect of capsaicin in adult mice. *J Pharmacol Exp Ther* 288(2) : 759-765, 1999.
- Lees GJ, Cuajungco MP, Leong W: Effects of metal chelating agents on the direct and seizures related neuronal death induced by zinc and kainic acid. *Brain Res* 799 : 108-117, 1997.
- Liu T, Walker JS, Tracey DJ: Zinc alleviates thermal hyperalgesia due to partial nerve injury. *Neuroreport* 10(7) : 1619-1623, 1999.
- Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ, Findley SD: ZnT 3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 14934-14939, 1996.
- Perez Clausell J, Danscher G: Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons: a histochemical study. *Brain Res* 337 : 91-98, 1985.
- Samudralwar DL, Diprete CC, Ni BF, Ehmman WD, Markesbery WR: Elemental imbalances in the olfactory pathway in Alzheimer's disease. *J Neurological Sci* 130(2) : 139-145, 1995.
- Sawashita J, Takeda A, Okada S: Changes of zinc distribution in rat brain with increasing age. *Develop Brain Res* 102 : 295-298, 1997.

Suh SW, Koh Jy, Choi DW: Extracellular zinc mediates selective neuronal death in hippocampus and amygdala following kainate induced seizures. Soc for Neurosci Abst 22 : 2101, 1996.

Takeda A: Movement of zinc and its functional significance in the brain. Brain Res Rev 34 : 137-148, 2000.

Takeda A, Ohnuma M, Sawashita J, Okada S: Zinc transport in the rat olfactory system. Neurosci Lett 225 : 69-71, 1997.

Wenzel HJ, Cole TB, Born DE, Schwartkroin PA, Palmiter RD: Ultrastructural localization of zinc transporter 3 (ZnT 3) to synaptic vesicles membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. Proc Natl Acad USA 94(23) : 12676-12681, 1997.

< 국문초록 >

본 연구는 후각점막에 내재하는 zinc의 분포를 형태학적으로 뚜렷이 보여준 예가 없기에 조직화학적으로 염색한 후 광학 및 전자현미경으로 이들의 분포를 기술하고자 하였다. 실험동물로는 성숙한 수컷 랫드(SD 계통)를 사용하였다. 우선 동물은 전신마취시킨 후 만들어진 selenium 용액 100 μ l를 복강에 주사하였고(i.p 실험군), 다른 방법으로는 selenium 용액 10 μ l를 비강 깊숙히 플라스틱관을 삽입한 후 Hamilton 주사기로 한 방울씩 떨어뜨렸다(i.n 실험군). 후각점막내 zinc를 조직화학적으로 동정하기 위해서 zinc 특이성이 높은 AMG법(Dansch, 1985)을 이용하였다. 각 실험군의 동물은 주사 후 2시간에 이르러 3% Glutaraldehyde 고정액으로 관류함으로써 희생시켰다. 고정후 비중격을 포함하여 후각부위를 떼어낸 수 30 μ m 두께의 관찰절편을 만들었다. AMG 반응이 끝나면 toluene blue (TB)로 대조염색하고, 알코올과 자일렌 등을 이용한 탈수과정 및 청명과정을 거쳐 광학현미

경하에서 관찰하였다. 전자현미경적 절편을 만들기 위해 전자현미경 관찰을 위한 실험으로 vibratome을 사용하여, 100 μ m 두께의 가로절편을 만들었고, AMG염색이 끝나면 일반적인 전자현미경적 관찰을 위한 일련의 과정을 거쳐 투과전자현미경하에서 관찰하였다.

Selenium 용액을 복강에 투여한 i.p 실험군에서는 30 μ m 두께의 후각점막의 상층부와 기저부에서 강한 AMG 반응산물(silver grains)이 관찰되었으나 기저막아래 고유판에서는 전혀 관찰되지 않았다. 반면 selenium 용액을 비강점막에 직접 도포한 i.n 실험군에서는 i.p 실험군과 같이 후각점막에서 강한 AMG 반응이 관찰되었을 뿐만 아니라 이러한 반응이 기저막내 후각실의 주행을 따라 관찰되었다.

투과전자현미경으로 관찰된 후각상피에서는 AMG 과립이 지지세포의 세포 상층부에서 관찰되는 분비과립에 극한되는 소견이며, 이곳에서 관찰된 AMG은 과립(silver grains)은 원형 또는 난원형으로 그 크기는 다양하였다. 반면 세포체 하부에서 관찰된 AMG grains은 주로 용해소체위에서 밀집되어 관찰되었으며, 핵주변부 및 세포사이공간(intercellular space)에서는 AMG grains이 날개로 구분, 관찰되었다. 한편 i.n 실험군에서 관찰된 후각점막의 전반적인 구조가 손상된 소견을 보였으며, 지지세포의 위쪽에서는 전자밀도가 높고 간상의 crystalloid structure가 다수 관찰되었고, 이들 구조에 다수의 AMG 과립이 붙어 있었다.

본 연구의 결과를 요약하면 랫드 후각점막에 존재하는 zinc는 지지세포의 분비과립과 후각세포의 축삭다발인 후각실에서 관찰되었는데 이는 zinc가 후각기능과 매우 밀접한 관련있음을 시사하며, 이는 향후 후각기능과 zinc의 연관성을 연구하는데 소중한 자료가 될 것으로 믿는다. 또한 본 연구의 결과는 후각점막의 이상으로 나타나는 여러 가지 질환의 병리에서 zinc가 영위하는 신경생물학적 기능을 밝히는데 유용한 기초자료가 될 수 있을 것으로 기대한다.