

흰쥐 척수손상후 뇌줄기와 척수에 분포한 Calbindin D-28K와 Parvalbumin양성세포의 변화에 관한 면역조직화학적 연구

김종중, 장인엽, 정윤영, 윤상필, 문정석, 윤현중
조선대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : 척수를 손상시키지 않은 정상군, 반쪽과 완전히 손상시킨 후 5일간 사육한 실험군(각 실험 II, III군)의 흰쥐 뇌줄기와 각 척수 분절의 회색질기둥과 백색질에서 calbindin D-28K와 parvalbumin에 대한 고도의 특이성을 지닌 단세포군 항체를 사용하여 면역조직화학적 방법으로 염색하여 calbindin D-28K 양성신경세포와 parvalbumin 양성신경세포의 분포상과 세포의 크기 및 형태에 대하여 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. calbindin D-28K 양성신경세포와 parvalbumin 양성신경세포는 습뇌의 그물핵과 중간뇌의 흑색질에서 가장 많이 관찰되었다.
2. 척수의 각 분절에서 calbindin D-28K와 parvalbumin에 양성반응을 보이는 염주모양의 신경섬유가 백색질과 회색질기둥에 고루 분포하고 있었다.
3. 척수 각 분절의 회색질기둥 뒤뿔 I, II층에서 calbindin D-28K와 parvalbumin에 강한 양성반응을 나타내는 작은 반점과 섬유들이 분포하고 있었다.
4. calbindin D-28K 양성신경세포와 parvalbumin 양성신경세포는 척수 각 분절의 회색질기둥 앞뿔의 앞가쪽핵, 앞안쪽핵, 뒤가쪽핵, 뒤안쪽핵, 중심핵 등에서 관찰할 수 있었다. 특히 허리분절에서 강한 양성반응을 나타내었다.
5. 실험 II군에서 왼쪽 손상부위보다 오른쪽 손상부위에서 calbindin D-28K 양성신경세포와 parvalbumin 양성신경세포의 출현이 현저하였다.
6. 실험 III군의 경우 완전히 손상 받은 가슴분절 아래부위에서는 calbindin D-28K 양성신경세포와 parvalbumin 양성신경세포를 전혀 관찰할 수 없었다.
7. calbindin D-28K 양성신경세포와 parvalbumin 양성신경세포는 방추형, 타원형, 원형, 삼각형이었으며 크기는 30~40 μ m정도였고, 모양은 홀극, 두극, 못극이었다.
이상의 실험 결과를 요약하면 calbindin D-28K 양성신경세포와 parvalbumin 양성신경세포는 뇌줄기의 중간뇌 흑색질과 습뇌 그물핵에서, 각 손상받은 척수분절의 회색질기둥 뒤뿔의 I, II 층에서, 그리고 허리분절에서 가장 많이 관찰할 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 뇌줄기와 척수에 분포한 Calbindin D-28K와 Parvalbumin양성세포 관찰

서 론

고등동물의 뇌와 척수는 생명활동의 전 영역을 통제, 관장하는 중심중추로서 신체의 모든 세포를 지배하며 운동, 감각기능은 물론 사람에 있어서는

판단, 기억, 학습, 사고, 인식 등 고도의 기능을 수행하는 것을 통괄하며 이와 같이 뇌가 신체의 모든 기능을 총괄하는 것은 뇌와 척수에서 뻗어 나와 전신에 분포하고 있는 신경과 신경그물에 의해 다스려지고 있다고 알려지고 있다(Snell 1987).

따라서 척수가 손상을 받게되면 손상의 부위에 따라 여러 신경로가 차단되고 그로 인해서 여러

기능이 상실된다. 척수가 완전히 차단되면 내림신경로가 손상되어 내림신경로의 아래부위는 완전히 기능이 마비되어 모든 몸감각, 운동기능, 내장감각, 반사활동, 근육긴장, 체온조절기능이 소실될 뿐만 아니라 동시에 모든 오름신경로가 중단되어 손상 부위의 아래 부위의 감각이 상실되는 것으로 알려지고 있으며, 척수의 절반이 손상을 받게 되면 같은 쪽의 상위운동신경증후군, 촉각분별력의 심한 장애, 운동감각의 소실, 근육긴장 감소 등의 마비증상이 나타나며 손상된 반대쪽에서는 절단부위보다 한 척수분절 아래의 통각소실과 절단부위보다 두 척수분절 아래의 온도각의 소실이 나타나게 되는데 이는 척수시상로의 교차섬유가 차단되었기 때문으로 알려지고 있다(Carpenter 1991).

한편 칼슘은 신경세포에서 대부분 결합한 형태로 존재하며 극히 소량만이 축삭질 내에 유리되고 이온화 된 형태로 존재하여 대단히 낮은 이온화 된 칼슘의 농도 변화가 생리적 현상을 유발하는 중요한 유발제(trigger)의 역할을 함으로서 칼슘은 가로무늬근육을 자극하고 수축시키며 또한 내분비샘과 신경조직 내에서도 자극과 흥분을 시키는 일을 수행할 뿐만 아니라 신경연접에서 신경전달물질의 방출과 연접세포가 융합하는데 있어서 직접적인 역할을 수행하며 혈관 내에서 혈액을 강력히 응고시키며 문자를 학습하고 기억하는 일에도 관여하는 것으로 알려지고 있다(Celio 1990). 반면 신경세포 내에서 칼슘농도의 상승과 세포막전위 정보전달자(transmembrane information transfer)의 역할을 수행하지 못할 경우 신경세포가 사멸할 수도 있다는 사실이 오늘날의 생물학에서 가설로서 인정하고 있는 실정이며 troponin-C 같은 친화력이 높은 세포 내 수용단백질은 칼슘과 결합하여 가로무늬근육의 수축을 유도하며 calmodulin 같은 칼슘 결합단백질(calcium-binding protein)이 칼슘과 대단히 넓게 결합되어 그 신호가 최소한 15가지 이상의 생물학적 선택효과를 야기하는 것이 이들 칼슘이온에 의해서 전달되는 것으로 밝혀졌고 “Trigger protein(유발단백질)”이라고 명명되었으나 어떻게 해서 calmodulin이 단독으로 이런 모든 효능을 유발하는지는 아직까지도 완전히 밝혀지지는 않은

실정이며 아마도 세포 내에서 분화과정의 분포상 혹은 기존의 세포 내에서 많은 다른 칼슘결합단백질의 조합(combination)과 치환(permutation)이 이뤄지고 있는 것으로 생각된다(Kawaguchi 등 1987, Andressen 등 1993).

Calbindin D-28K(이하 CB라 한다)와 Parvalbumin(이하 PV라 한다), 그리고 여러 조직에 분포하고 있는 calmodulin과 troponin-C 및 일부 다른 단백질은 높은 친화력을 가지고 칼슘과 결합하는 것으로 알려지고 있으며 이들을 vitamin-D 의존성 칼슘결합단백질이라 한다. 그 가운데 CB와 PV은 여러 종(species)의 특이한 신경세포집단에서 관찰된 적이 있으며 대단위 가족집단의 모든 구성물질로 알려지고 있다(Stichel 등 1987, Mattson 등 1991, Van Brederode 등 1991, Kubota와 Jones 1993, Alonso 등 1995, Pickel과 Heras 1996)

또한 CB와 PV의 중추신경계통 내에서의 기능적 역할에 대해서는 아직까지 명료하게 밝혀지지 않았으나 최근 CB와 PV는 신경세포 내에서 칼슘의 항상성을 조절하고 여러 가지 다양한 세포작용의 과정에서 일시적인 칼슘의 완충작용, 소위 수송/완충단백질(transport/buffer protein)로서 작용하는 것으로 알려지고 있으며 고농도의 칼슘이 신경세포 내에 축적된 경우 손상을 받는 신경세포를 보호할 뿐만 아니라 허혈(ischemia), Parkinson 병, Huntington 병 그리고 Alzheimer 병 등 신경퇴행성 질환에서 특수 신경세포 집단을 보호하는데 관련이 있으며 이들 칼슘결합단백질과 결합한 세포는 전기생리학적 성질과 대사작용에서 특수한 기능을 수행하는 것으로 알려지고 있다. 또한 빠른근육섬유에서 CB와 PV은 일시적으로 칼슘과 결합함과 동시에 근육을 싸고 있는 피질망에서는 왕복(shuttle) 기능을 수행하여 근육 이완 속도를 증가시키는 것으로 알려져 있다(Ichimiya 등 1988, Iwamoto와 Emson 1991, Patrick과 John 1991, Ferrer 등 1992, Tunon 등 1992, German 등 1997). 칼슘결합단백질은 Wasserman과 Taylor(1966)에 의하여 닭의 작은창자 점막에서 최초로 분리된 이래 흰쥐의 중추신경계통(Garcia-Segura 등 1984, Enderin 등 1987, Celio 1990), 망막(Nag와 Wadhwa 1996), 시각중추(Schmidt-Kastner

등 1992), 해마(Kawaguchi 등 1987, Sloviter 1989, Mattson 등 1991), 줄무늬체(Hendry 등 1989, Waldvogel 등 1991), 뇌줄기(Aoki 등 1990) 및 소뇌(Légrand 등 1983, Rogers 1989) 등에도 분포하고 있는 것으로 보고되고 있으며, 또한 사람을 비롯한(Ferrer 등 1992, Nag와 Wadhwa 1996) 흰쥐(Kosaka와 Heizmann 1989, Ronald 등 1990), 고양이(Stichel 등 1989), 병아리(Philippe와 Droze 1988)의 중추신경계통에도 광범위하게 분포하고 있는 것으로 보고되고 있다.

한편 척수의 신경차단술이나 대동맥의 수술, 또는 심한 저혈압을 유발하는 수술 등의 결과로 동맥공급이 조금만 차단되어도 척수의 허혈이 쉽게 일어나는데 Terman 등(1996)은 주머니쥐의 발생 초기 단계에서 척수신경로를 차단시킨 후 뒤척수소뇌로의 성장에 관한 실험을, Wang 등(1995)과 Foster 등(1990)은 손상시킨 척수에 신선한 태아신경조직을 이식하여 척수의 신경분포와 손상부위의 회복에 관한 실험을 시행하였으며, Goff 등(1998)은 만성 통증을 유발시킨 후 척수 뒤뿌리의 재생에 관한 실험을 각각 시행하여 척수의 운동과 감각기능이 회복된다는 좋은 결과를 얻었다고 보고하였으며 Sally 등(1981)은 흰쥐 척수의 허리분절에서 oxytocin을 포함한 8개의 펩티드의 분포상을 자세히 보고하였으며 그 밖에 여러 연구자들은(Monaghan 등 1983, Dielz 등 1985, Mouchet 등 1986, Privat 등 1988, Sieradzian과 Vrbova 1989, Willis와 Coggeshall 1991, Dun 등 1993, Beal과 Bice 1994, Kashiba 등 1996, Hu 등 1997, Miki 등 1997) 척수의 뒤뿌리와 신경로를 손상시킨 후 척수 내의 신경전달물질의 분포상과 신경조직형성에 대한 실험결과를 보고하였다. 그러나 척수 가슴분절을 손상시킨 후 손상 받은 신경세포에서 칼슘결합단백질인 CB와 PV의 분포상에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 흰쥐를 이용하여 척수의 가슴분절을 완전히, 그리고 오른쪽과 왼쪽을 절단한 후 5일 동안 사육한 실험동물에서 면역조직화학적 방법을 이용한 CB와 PV의 양성반응신경세포를 뇌줄기와 각 척수 분절에서 그 크기 및 분포상과 형태를 관찰하여 정상군과 비교함과 동시에 알

로 이들 두 칼슘결합단백질의 신경전달물질로 알려진(Hendry 등 1989, Ronald 등 1990, Pickel과 Heras 1996) GABA 및 glycine의 표식자의 기능을 수행하는 기전을 밝혀 내기 위한 깊이 있는 연구를 수행함과 동시에 손상 받은 각 척수분절에서 칼슘결합단백질의 생리생화학적 및 약리학적인 연구에 필수적인 형태학적 분포상을 확립하고자 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 암수 구별 없이 흰쥐(Sprague-Dawley) 40마리(몸무게 200~250 g)를 조선대학교 동물사육장에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험군

- 제 I 군(10마리): 척수를 손상시키지 않은 정상군
- 제 II 군(20마리): 척수의 오른쪽과 왼쪽을 손상시킨 후 5일 사육한 군
- 제 III 군(10마리): 척수를 완전히 손상시킨 후 5일 사육한 군

3. 척수손상

실험동물은 ketamine (3 ml/kg, i.p.)으로 전신마취시킨 후 정위고정대(stereotaxic frame)에 얹드린 자세로 고정하여 등의 털을 깨끗이 깎아내고 9째와 10째 등뼈를 노출시킨 다음 척추궁절제술을 시행하여 11번 해부칼을 이용하여 제 II 군은 척수 좌, 우 반쪽을 손상시키고 제 III 군은 척수를 완전히 손상시켰다. 그 후 수술부위를 깨끗이 소독하고 근육과 피부를 봉합하여 소독된 사육장에서 사육하였다. 수술한 바로 다음 날부터 5일 동안 수술부위를 소독하고 오줌과 대변을 인위적으로 배설시켜 주었다.

4. 조직표본처리 및 면역조직화학적 염색

실험동물은 척수를 손상시킨 후 5일 후에 keta-

mine (3 ml/kg, i.p.)으로 마취시켜 원심실을 통하여 100 ml의 Ringer-dextrose로 관류한 다음 400~500 ml의 4% paraformaldehyde와 1% glutaraldehyde (0.1 M Phosphate buffer, pH 7.4) 고정액을 38°C~40°C 온도로 조절한 후 심장을 통하여 관류 고정시켰다. 관류 고정시킨 후 실험동물은 고정대에서 1시간~2시간 동안 방치시킨 다음 조심스럽게 뇌와 척수를 적출하여 2차 고정액에 넣어 4°C에서 하룻밤 동안 더 고정하였다. 그 다음날 후고정된 뇌와 척수에서 뇌줄기와 척수의 목분절, 가슴분절, 허리분절, 엉치분절 등 실험에 사용할 각 척수분절 부위를 조심스럽게 적출한 후 30% sucrose가 들어 있는 phosphate buffer 용액에 넣어 조직 속에 충분히 침투되도록 4°C에 하룻밤 동안 침적시켰다. 다음 날 조직을 꺼내 vibratome과 cryocut을 이용하여 35~40 μm 두께로 연속관상절편과 시상절편을 만들었다. 이 절편들은 항체의 조직 투과성을 높이기 위하여 0.05% Triton X-100 (Sigma)을 사용하였으며 그 후 조직절편 전체를 phosphate buffer (PB)에 여러 번 씻어 낸 후 10% normal serum에 30분 동안 침적시킨 후 PB로 수 차례 세척하여 3% H₂O₂로 20~30분간 실온에서 처리하여 내인성 과산화효소의 활성을 억제시킨 다음 1% normal albumin과 0.05% Triton X-100이 들어 있는 PB 혼합 용액에 약 2시간 정도 처리하여 비특이성 반응을 억제시킨 후 제 1 항체인 monoclonal rabbit anti-mouse calbindin D-28K (Sigma) 항체는 1 : 2,000 ~ 1 : 5,000으로, monoclonal calf anti-mouse parvalbumin (Sigma) 항체는 1 : 2,000 ~ 1 : 2,500으로 희석하여 4°C에서 24~36시간 반응시켰다. PB에 10분씩 3회 세척한 후 제 2 항체인 goat anti-rabbit IgG (Dako)를 1 : 200으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 세척한 다음 제 3 항체인 avidin-biotin peroxidase complex (Vector)를 1 : 100으로 희석하여 1시간 반응시켰다. 과산화효소에 대한 발색제는 3,3'-diaminobenzidine (Sigma)을 사용하였다. 반응이 끝난 조직은 gelatin이 발라진 slide 위에 얹어 통상의 탈수 과정을 거쳐 polymount로 봉입하여 광학현미경을 이용하여 CB와 PV에 대한 양성신경세포를 관찰하였다.

결 과

대조군의 척수, 척수의 오른쪽과 왼쪽을 손상시킨 군과 척수를 완전히 손상시킨 실험군의 뇌줄기와 척수 각 분절의 회색질과 백색질에서 Calbindin D-28K 양성신경세포 (이하 CB-IR이라 한다)와 Parvalbumin 양성신경세포 (이하 PV-IR이라 한다)에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 신경섬유의 분포상, 크기, 그리고 양성신경세포체의 모양과 형태를 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

1. 실험 1군 (대조군)

1) Calbindin-D 28k 양성신경세포 (Fig. 8)

대체적으로 흰쥐 뇌줄기의 중간뇌, 다리뇌, 숨뇌와 각 척수분절에서 CB-IR를 관찰할 수 있었다 (Figs. 1A, C, E, G, I). CB-IR에 비해서 PV-IR가 뇌줄기 전 구역과 각 척수분절에서 더 많이 출현하였다. 각 척수분절의 회색질기둥 뒤뿔에서는 CB-IR의 신경섬유와 신경세포체 같은 원형의 양성반응을 나타내는 물질들이 I, II 층에서 가장 많이 출현하였으며 나머지 층에서도 출현하였다. 회색질기둥 앞뿔리에서는 회색질기둥 뒤뿔과는 달리 뚜렷한 양성반응을 나타내는 CB-IR는 질게 염색되어 다수 출현함을 관찰할 수 있었으며 두극 및 못극 모양이었다 (Figs. 1C, G). 양쪽 기둥을 잇는 회색질 맞교차 부위에서는 중심관 주변에서 양성반응을 나타내는 신경세포를 관찰할 수 있었다. 백색질의 앞섬유단, 가쪽섬유단, 뒤섬유단 (anterior, lateral, posterior funiculus)에서도 양성반응을 나타내는 신경섬유들이 산재성으로 분포하고 있었다 (Figs. 1C, E).

뇌줄기의 중간뇌에서는 흑색질 (substantia nigra), 적색핵 (red nucleus), 그물핵 (reticular formation), 솔기핵 (raphe nucleus), 위둔덕핵 (nucleus of superior colliculus), 아래둔덕핵 (nucleus of inferior colliculus) 등 여러 핵에서 강한 양성반응을 나타내는 신경세포와 섬유들이 분포하고 있었다. 다리뇌의 다리뇌핵 (pontine nucleus), 삼차신경척수핵 (spinal nucleus of trigeminal nerve), 그물핵, 달팽이핵 (co-

chlear nucleus), 능형체핵 (trapezoid nucleus) 등에서, 그리고 숨뇌에서는 널판핵 (gracile nucleus), 췌기핵 (cuneate nucleus), 올리브핵 (olivary nucleus), 그물핵 등의 여러 핵에서 양성반응의 신경세포와 섬유를 관찰할 수 있었으며 뇌줄기 전 부위에서 CB-IR의 신경섬유들이 서로 엉켜있는 신경그물을 관찰할 수 있었다. 그러나 뇌줄기의 강한 양성반응을 나타내는 CB-IR들이 집단적으로 밀집되어 있어서 세포 수를 셀 수 없었다.

척수의 목분절 (cervical segments)의 회색질기둥 뒤뿔 I, II 층에서 강한 양성반응을 나타내는 세포체 같은 점과 백색질의 가쪽섬유단으로 뻗어나가는 신경섬유들이 많이 출현하였다. 아교질 층에서는 양성반응이 없었으며 그물핵에서는 양성반응의 신경섬유들이 서로 얽혀 신경그물을 형성하고 있었고 일부 섬유는 백색질까지 뻗어 있었다 (Fig. 1C). 회색질기둥 앞뿌리의 앞가쪽핵, 앞뒤쪽핵, 뒤가쪽핵, 뒤안쪽핵 그리고 중심핵에서 강한 양성반응을 나타내는 크고 중간정도 크기의 전형적인 신경세포를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1C). 회색질기둥 양쪽 앞뿌리에서 67개의 CB-IR가 출현하였다. 척수 목분절의 백색질에서는 앞뿌리와 뒤뿔에서 긴 축삭들이 각각 해당되는 섬유삭으로 뻗어 나오고 있었으며 그 외에도 각 섬유삭에 가느다란 신경섬유들이 흩어져 있었다.

척수의 가슴분절 (thoracic segments)의 회색질기둥 뒤뿔 I, II 층에서 강한 양성반응을 나타내는 신경섬유를 관찰할 수 있었으며 아교질 층에서는 양성반응이 없었으며 가쪽뿔의 중간가쪽기둥과 중간안쪽기둥에서도 양성반응을 나타내었다. 회색질기둥 앞뿌리의 전체 핵에서 양성반응을 나타내는 신경세포를 관찰할 수 있었으며 특히 앞가쪽핵과 앞안쪽핵에서 관찰되는 신경세포는 긴 축삭을 백색질의 앞섬유삭까지 내보내고 있었다 (Fig. 1E). 회색질기둥 양쪽 앞뿌리에서 91개의 CB-IR가 출현하였다. 이 분절의 백색질에서도 목분절에서와 같은 양상이었으며 특히 가쪽뿔에서 기다란 축삭이 가쪽섬유단으로 뻗어 나오고 있었다.

척수의 허리분절 (lumbar segments)은 매우 강한 양성반응을 나타내는 CB-IR와 섬유들이 회색질기

둥 뒤뿔의 뒤모서리핵의 I, II 층에 집단적으로 분포하고 있었으며 아교질 층에서는 양성반응을 나타내지 않았다. 그물핵에서는 양성반응을 나타내는 신경섬유들이 서로 얽혀 신경그물을 형성하고 있었다. 중심관 주변의 앞, 뒤 교차섬유에 강한 양성반응을 나타내었으며 가슴분절에서와 마찬가지로 회색질기둥 앞뿌리의 전체 핵에 강한 양성반응을 나타내고 있는 신경세포와 섬유를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1G). 회색질기둥 양쪽 앞뿌리에서 양성반응을 나타내는 신경세포는 약 72개 정도의 CB-IR가 출현하였다. 허리분절의 백색질에는 회색질기둥에서 뻗어나온 신경섬유들이 산재성으로 흩어져 있었다.

척수의 엉치분절 (sacral segments)에서도 회색질기둥의 I, II 층에 매우 강한 양성반응을 나타내는 신경세포체같은 둥근 형태의 점들이 매우 치밀하게 출현함을 관찰할 수 있었다. 또한 회색질기둥의 앞뿌리의 전체 핵에서도 양성반응을 나타내는 신경세포들이 출현하였다 (Fig. 1I). 회색질기둥 양쪽 앞뿌리에 출현한 신경세포의 수는 약 25개 정도였다. 엉치분절의 백색질에서는 회색질기둥의 신경세포에서 뻗어 나온 CB에 강한 양성반응을 나타내는 신경섬유를 관찰할 수 있었으며 신경그물을 형성하고 있었다. 이상의 각 척수 분절에서 관찰되는 CB-IR의 형태는 대부분 두극 및 못극형이었으며 세포체의 크기는 30~40 μm 정도였다.

2) Parvalbumin 양성신경세포 (Fig. 8)

뇌줄기 중간뇌의 PV-IR는 CB-IR가 출현한 여러 핵에서와 같이 비슷한 양상으로 분포하고 있었으나 CB-IR에 비하여 PV-IR가 더 많이 출현하였으며 PV-IR의 형태학적 특징을 따라 핵, 핵 주변부, 그리고 모든 돌기에서도 양성으로 나타남을 관찰할 수 있었다. 대부분의 PV-IR들은 못극신경세포들이었으나 수평으로 위치하고 있는 두극신경세포도 관찰할 수 있었다. PV-IR들이 뇌줄기 전 영역에 걸쳐 양성반응의 신경섬유가 서로 얽혀 신경그물을 형성하고 있었다.

뇌줄기의 PV-IR의 가지돌기의 염색성, 부위별 분포상은 CB-IR와 비슷한 양상으로 나타났으며

PV-IR가 CB-IR보다 더 크고 염색성이 더 양호하였다. 또한 못극형세포의 PV-IR는 세포체에서 방사선 모양으로 3~4개의 일차 가지돌기들이 뻗어 나가는 양상이었다(Fig. 1B). PV-IR수는 핵의 집단을 이루고 있어서 계수 할 수 없었으며 세포체의 크기는 20~40 μ m 정도였다.

척수의 각 분절에서 매우 강한 양성반응을 나타내는 PV-IR를 관찰할 수 있었으며 CB-IR보다 더 많이 출현하였다. 척수 회색질에서 양성반응의 PV-IR와 신경섬유 그리고 신경종말이 뒤뿔과 앞뿌리에 분포하고 있었으며 양성반응의 PV-IR의 축삭이 모든 백색질의 섬유삭에 뻗어 나가고 있음을 관찰할 수 있었다. CB-IR와는 달리 회색질기둥의 뒤뿔에 있는 뒤가장자리핵을 제외하고는 II, III 층에서는 PV-IR를 관찰할 수 없었으나 뒤뿔의 IV, V 층과 중간회색질기둥(VII 층)의 안쪽 면에는 양성반응의 PV-IR 산물이 밀집되어 있음을 관찰할 수 있었다. 목분절(Fig. 1D)에만 있는 목중심핵과 가슴분절(Fig. 1F)에만 있는 가슴핵(Clarke-Stilling nucleus)에서 양성 반응을 나타내고 있는 PV-IR를 관찰할 수 있다. 각 척수 분절(Figs. 1D, F, H, J)의 앞뿌리에서 CB-IR와 같이 두극과 못극형태를 하고 있는 양성 PV-IR를 관찰할 수 있었으며 세포체의 크기는 35~45 μ m였으며 세포 수는 목분절의 양쪽 앞뿌리에서 약 109개, 가슴분절의 양쪽 앞뿌리에서 약 102개, 허리분절(Fig. 6)의 양쪽 앞뿌리에서 약 91개, 그리고 엉치분절의 양쪽 앞뿌리에서 약 42개 정도를 계수 할 수 있었다. 한편 백색질에는 크고 많은 PV-IR의 축삭들이 각 섬유삭에 뻗어 있었으며 특히 널판다발(gracile fascicle)과 췌기다발(cuneate fascicle)에서 긴 축삭이 존재함을 관찰할 수 있었다. 각 섬유삭에 분포하고 있는 양성반응신경섬유의 크기는 중간정도였다.

2. 실험 II군(척수를 반쪽씩 손상시킨 후 5일간 사육한 군)

1) Calbindin D-28K 양성신경세포 (Figs. 9, 10)

척수 가슴분절의 오른쪽과 왼쪽손상 후 5일간 사육한 군의 뇌줄기의 중간뇌에서 CB-IR는 흑색

질(Figs. 2A, 3A), 적색핵, 그물핵(Fig. 5), 솔기핵, 위둔덕핵, 아래둔덕핵 등 여러 핵에서 강한 양성반응을 나타냈으며 위둔덕핵과 아래둔덕핵에서는 두극신경과 못극신경세포들이 대부분이었으며 다른 핵에서는 이들 두 종의 세포뿐만 아니라 홀극신경세포와 피라밋형의 신경세포들이 섞여서 분포하고 있었다. 다리뇌의 다리뇌핵, 삼차신경척수핵, 그물핵, 달팽이핵, 능형체핵 등에서 양성반응의 CB-IR를 관찰할 수 있었다. 숨뇌의 널판핵, 췌기핵, 올리브핵, 그물핵 등에서 양성반응의 CB-IR를 관찰할 수 있었다. 다리뇌와 숨뇌에서 관찰되는 양성신경세포는 홀극, 두극, 못극신경세포 등 다양한 형태였으며 뇌줄기 전체의 신경세포체는 원형, 타원형, 방추형, 삼각형 등 다양했으며 세포체의 크기는 30~40 μ m였다. 또한 이 오른쪽과 왼쪽을 손상시킨 실험군에서 CB-IR의 분포상, 크기, 형태의 차이는 구별할 수 없었다.

척수 목분절의 회색질기둥 뒤뿔의 위모서리인 I, II 층에서 오른쪽, 왼쪽 모두 양성반응을 나타내는 돌기가 없는 신경세포체 같은 수많은 점들이 활모양의 띠로 출현하였으며 왼쪽보다는 오른쪽(Fig. 7)에서 더 강한 양성반응을 나타내었다(Figs. 2C, 3C).

척수 가슴분절의 오른쪽과 왼쪽 손상부위의 위쪽에 해당하는 목분절 회색질기둥 뒤뿔의 아교질층과 III~V 층에서는 양성반응을 관찰할 수 없었다. 회색질기둥 앞뿌리의 앞가쪽핵, 앞안쪽핵, 뒤가쪽핵, 뒤안쪽핵 그리고 중심핵 등에서 강한 양성반응을 나타내는 CB-IR를 양쪽 손상부위 모두에서 관찰할 수 있었으며 양쪽 앞뿌리에서 약 82개의 세포를 계수 할 수 있었다. 목분절 양쪽 백색질의 앞, 뒤, 가쪽섬유삭에는 회색질기둥을 들고 나는 CB-IR신경섬유들이 그물모양을 이루며 분포하고 있었다.

척수 가슴분절은 손상부위 위 5mm지점과 아래 5mm지점을 대상으로 관찰하였는데 손상부위 위 5mm부위 회색질기둥 뒤뿔의 I, II 층에서 매우 강한 양성반응의 세포체 같은 점 모양의 구조물들이 밀집된 상태로 출현하였으나 손상부위 아래 5mm부위 회색질기둥 뒤뿔의 I, II 층에서는 아주 약한 양

성반응을 나타냈다. 가슴분절 손상부위 위, 아래의 회색질기둥 뒤뿔의 아교질을 포함하여 III, IV 층에서는 양성반응을 관찰할 수 없었으며 가슴분절에만 있는 가슴핵에서는 손상부위 위쪽에서는 양성반응의 CB-IR를 관찰할 수 있었으나 아래부위는 양성반응을 전혀 관찰할 수 없었다.

오른쪽 손상부위 위쪽 회색질기둥 양쪽 앞뿌리의 앞가쪽핵, 앞안쪽핵, 뒤가쪽핵, 뒤안쪽핵 등에서 강한 양성반응의 CB-IR를 관찰할 수 있었으며 왼쪽 손상부위의 회색질기둥 앞뿌리 왼쪽은 오른쪽 손상부위의 분포상과 비슷하였으나 앞뿌리 오른쪽은 양성반응이 매우 강하게 나타났다 (Figs. 2E, 3D). 오른쪽 손상부위 위쪽 양쪽 앞뿌리에서 양성반응신경세포 수는 약 85개 정도였고 세포체의 크기는 40~50 μm였다. 왼쪽 손상부위 위쪽 양쪽 앞뿌리에서 양성반응신경세포 수는 약 63개 정도로 오른쪽 손상부위와 차이가 있었다. 세포체의 모양은 원형, 타원형, 삼각형, 방추형, 피라미형이었으며 크기는 오른쪽 부위와 같았다. 백색질은 오른쪽, 왼쪽 손상부위 위쪽에서는 앞섬유단, 가쪽섬유단, 뒤섬유단에는 앞뿌리, 뒤뿔 그리고 가쪽뿔과 연결되어 있는 매우 강한 양성반응을 나타내는 신경섬유들이 그물을 이루고 있었으나 신경섬유의 크기는 크고 굵었다. 손상부위 아래의 백색질에서는 중등 정도의 양성반응을 나타내는 신경섬유가 산재성으로 그물을 이루며 분포하고 있었다.

척수 허리분절에서 오른쪽을 손상시킨 회색질기둥 뒤뿔의 I, II 층의 분포상은 목 및 가슴분절의 분포상과 비슷한 양상이었으며 앞뿌리의 앞가쪽핵, 앞안쪽핵, 뒤가쪽핵, 뒤안쪽핵 등에 매우 강한 양성반응을 나타내는 CB-IR가 다수 출현하였다. 양쪽 앞뿌리에서 양성반응신경세포 수는 약 170개 정도였고 모양은 가슴분절과 비슷하였으며 세포의 크기는 50~60 μm로 각 척수 분절 중에서 가장 컸다. 왼쪽을 손상시킨 회색질기둥 뒤뿔도 분포상은 오른쪽 손상부위와 비슷하였으나 양성반응 양상은 약하게 나타났다. 백색질은 오른쪽 손상부위에서 앞, 뒤, 가쪽섬유삭에 잘 발달된 양성신경세포가 고루 분포하고 있었으며 특히 가쪽섬유단에서는 매우 잘 발달된 긴 섬유가 가쪽뿔과 연결되어 있는

것을 관찰할 수 있었다. 왼쪽 손상부위에서는 오른쪽 손상 부위의 분포상과 비슷하였으나 염색성이 매우 약하게 나타났다 (Figs. 2G, 3G).

척수 영치분절의 오른쪽 손상부위의 회색질기둥 뒤뿔의 I, II 층의 분포상은 척수의 다른 분절과 비슷하였으며 앞뿌리도 비슷한 분포상이었다. 양쪽 앞뿌리에서 양성신경세포 수는 약 105개 정도였고 세포체의 모양은 방추형, 원형, 타원형, 삼각형 등이었으며 세포체에서 2~3개의 가지들이 뻗어 나가고 있어 두극 및 못극신경원이었고 세포의 크기는 45~50 μm 정도였다. 왼쪽 손상부위는 오른쪽 손상부위와 비슷하였으나 양성반응의 발색도가 희미하였다. 백색질에는 각 섬유삭에 양성반응을 나타내는 신경섬유가 고루 분포하고 있었다 (Figs. 2I, 3I).

대체적으로 오른쪽, 왼쪽을 손상시킨 실험군에서 손상부위 위 분절에서는 양쪽이 신경세포와 섬유의 분포양상이 비슷하였으나 손상부위 아래 분절에서는 오른쪽을 손상시킨 실험군이 강한 양성반응을 나타냈으며 손상부위인 가슴분절의 회색질기둥 앞뿌리에서 CB-IR의 양성반응은 매우 적게 출현하였다.

2) Parvalbumin 양성신경세포 (Figs. 9, 10)

뇌졸중의 중간뇌에서 PV-IR는 흑색질, 적색핵, 그물핵, 솔기핵 (Fig. 3B), 위둔덕핵, 아래둔덕핵에 고루 분포하고 있었으며 다리뇌의 다리뇌핵 (Fig. 2B), 삼차신경척수핵, 그물핵, 달팽이핵, 능형체핵 등과 습뇌의 널판핵, 췌기핵, 올리브핵, 그물핵 등에서도 PV-IR가 고루 분포하고 있었다. 이 실험군의 뇌졸중기에서 관찰할 수 있는 PV-IR는 CB-IR보다 더 많이 관찰되었고 매우 좋은 양성반응을 나타내었다. 세포 수는 CB-IR와 마찬가지로 PV-IR가 집단으로 모여 핵을 이루고 있어서 계수 할 수 없었다. 양성반응세포체는 원형, 난원형, 방추형, 삼각형 등 매우 다양한 형을 하고 있었으며 세포는 두극신경, 못극신경이고 세포체의 크기는 약 40~50 μm 정도였다.

척수 목분절 (Figs. 2D, 3E), 가슴분절 (Figs. 2F, 3F), 허리분절 (Figs. 2H, 3H), 영치분절 (Figs. 2J, 3J)의 오른쪽 손상부위에서 회색질기둥 뒤뿔 I, II 층

에서 양성반응을 나타내는 점 모양의 구조물들을 관찰할 수 있었으며 뒤뿔과 앞뿔리의 경계부위에서 양성반응신경세포를 관찰할 수 있었다. 앞뿔리의 앞가쪽핵, 앞안쪽핵, 뒤가쪽핵, 뒤안쪽핵 그리고 중심핵 등에서 매우 강한 양성반응을 나타내는 전형적인 두극 및 못극신경세포를 관찰할 수 있었다. 왼쪽 손상부위에서도 비슷한 분포상을 나타내고 있었으나 CB-IR와 마찬가지로 양성반응은 희미하게 나타났다. 특히 가슴분절에서는 손상부위 위쪽에서 가쪽뿔에서부터 가쪽섬유단으로 뻗어 나가는 전형적인 축삭을 관찰할 수 있었으나 손상부위 아래쪽에서는 이런 양상은 나타나지 않았다. 목분절의 양쪽 앞뿔리에서 관찰할 수 있는 양성세포 수는 약 139개 정도였고, 가슴분절에서는 손상부위 위쪽에서는 약 90개, 아래쪽에서는 약 61개, 허리분절에서는 약 149개, 영치분절에서는 약 110개 정도였다. 신경세포체의 모양은 대부분 삼각형, 피라밋형이었으며 세포는 두극 및 못극신경세포였고 세포체의 크기는 45~50 μm 정도였다. 백색질은 흑색질과 연결하고 있는 수많은 양성반응신경섬유가 다양하게 분포하고 있었으며 가슴분절과 허리분절에서 다른 분절보다 특이하고 다양하게 양성신경세포와 섬유가 분포하고 있었으며 CB-IR보다는 PV-IR가 더 많이 출현하였다.

3. 실험 III 군(척수를 완전히 손상시킨 후 5일간 사육한 군)

1) Calbindin D-28K 양성신경세포 (Fig. 11)

척수를 완전히 손상시킨 후 5일 동안 사육한 군에서 뇌줄기 중간뇌의 흑색질, 적색핵, 그물핵, 위둔덕핵, 아래둔덕핵과 다리뇌의 다리뇌핵, 삼차신경척수핵, 그물핵, 달팽이핵, 능형체핵 (Fig. 4A), 그리고 숨뇌의 널판핵, 췌기핵, 올리브핵, 그물핵 등에서 양성반응을 나타내는 CB-IR는 대조군의 뇌줄기 핵에서 관찰한 분포상과 비슷한 양상이었으며 세포의 모양과 세포체의 형태 및 크기도 비슷하였다.

척수 목분절에서 회색질기둥 후각의 I, II 층에서 양성반응을 나타내는 점 같은 구조물들을 많이 관찰할 수 있었으며 아교질 층을 포함한 III, IV 층에

서는 양성반응을 관찰할 수 없었다. 회색질기둥 앞뿔리의 앞가쪽핵, 앞안쪽핵, 뒤가쪽핵, 뒤안쪽핵, 중심핵 등에서 강한 양성반응을 나타내는 CB-IR를 관찰할 수 있었다 (Fig. 4C). 양성세포 수는 약 85개 정도였고 세포의 형태는 두극신경과 못극신경이 대부분이었으며 세포체는 원형, 타원형, 방추형, 삼각형 등 다양했으며 크기는 40~50 μm 정도였다. 백색질에는 양성반응을 나타내는 신경섬유들이 앞섬유단, 가쪽섬유단, 뒤섬유단에 다양하게 분포하고 있었다.

척수 가슴분절에서 손상부위 위 5mm지점 부위의 회색질기둥 뒤뿔은 목분절 뒤뿔의 분포상과 비슷하였으나 손상부위 아래 5mm지점 부위의 회색질기둥 뒤뿔의 I, II 층에서 양성반응은 흔적적이었으며 점 모양의 구조물들이 매우 산만하게 분포해 있었고 회색질기둥 앞뿔리의 여러 핵에 분포해 있는 신경세포들을 관찰할 수는 있었으나 세포의 모양이나 세포체의 형태는 매우 불규칙하고 찌그러져 있었으며 팽대되고 변형된 모양이었다. 세포체 안에 있는 핵의 위치도 한쪽으로 치우쳐져 있었고 니슬소체도 용해되어 있음을 관찰할 수 있어서 전형적인 역행성 변화가 일어나고 있음을 관찰할 수 있었다. 따라서 세포를 계수 할 수 없었으며 크기도 잴 수 없었다. 백색질에서도 일부 양성반응을 나타내는 신경섬유가 분포하고 있었으나 매우 산만하고 불규칙하였으며 군데군데 손상되어 있었다 (Fig. 4D).

척수 허리분절의 회색질기둥 뒤뿔의 I, II 층에 양성반응을 나타내는 점 모양의 구조물들이 관찰되었으나 손상부위 위의 목분절이나 가슴분절의 반응에 비하여 미약하였다. 회색질기둥 앞뿔리의 앞가쪽핵, 앞안쪽핵, 뒤가쪽핵, 뒤안쪽핵, 중심핵에서 양성반응의 세포들을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4G). 이와 같이 여러 핵에서 관찰된 신경세포 수는 약 136개 정도였고 일부 양성신경세포는 강한 양성반응을 나타냈으며 일부 세포들은 흔적으로 출현하였다.

세포의 모양은 전형적인 두극 및 못극신경이었으며 세포체는 타원형, 방추형, 피라밋형 등 다양한 형태였고 세포체의 크기는 50~60 μm 정도였다. 백

색질에서는 앞, 뒤, 가쪽섬유단에 양성반응의 신경 섬유들이 엉켜 그물을 이루고 있었다. 특히 가쪽섬유단과 가쪽뿌를 잇는 신경섬유를 관찰할 수 있었다. 섬유들의 굵기는 중등도였다.

척수 엉치분절은 대조군과 비슷하였으며 신경세포 수는 약 108개 정도였고 세포의 모양과 세포체 그리고 크기는 허리분절에서 관찰한 것과 비슷하였다. 백색질의 양성신경섬유의 분포도 허리분절과 비슷한 분포상이었다 (Fig. 4I).

2) Parvalbumin양성신경세포 (Fig. 11)

척수를 완전히 손상시킨 후 5일 동안 사육한 실험동물에서 양성반응을 나타내는 PV-IR의 뇌졸중 (Fig. 4B)과 척수 각 분절 (Figs. 4E, F, H, J)의 분포상, 세포모양, 형태, 크기는 CB-IR에서 관찰한 결과와 비슷하였다. 각 분절에서 관찰된 양성신경세포 수는 목분절에서 약 102개, 가슴분절에서는 셀 수 없었으며, 허리분절에서 약 140개, 엉치분절에서 약 120개 정도로 CB-IR보다 더 많이 관찰되었다. 백색질에서도 회색질기둥과 같이 CB-IR의 분포상과 비슷하였다.

고 찰

본 연구에서 일반적으로 흰쥐의 뇌졸중과 척수에서 CB-IR과 PV-IR의 크기와 형태는 비슷하였으나 분포양상은 약간 차이가 있음을 관찰할 수 있었고 두 양성신경세포의 분포양상은 상호 보상적이었으며 뇌졸중과 각 척수분절에서 CB-IR보다 PV-IR가 더 많이 출현하였으며 뇌졸중에서는 CB-IR들이 제한적으로 독립된 세포 무리를 형성하며 분포하고 있음을 관찰할 수 있었다. CB-IR와 PV-IR는 대부분 두극신경세포와 못극신경세포들이었으며 일부 세포들은 정상적인 피라밋형이거나 혹은 역피라밋형이거나 별모양의 세포들이 출현하였다. 척수 뒤뿌리의 I, II 층에서는 CB-IR와 PV-IR의 신경섬유와 신경세포체 같은 원형의 양성반응 물질들이 출현하였으며 앞뿌리에서 CB-IR와 PV-IR들이 많이 출현하였는데 PV-IR의 염색성이 더 좋았다. 이는 여러 연구자들 (Dietl 등 1985,

Fournet 등 1986, Enderin 등 1987, Hendry 등 1989, Celio 1990, Andressen 등 1993, Kubota와 Jones 1993, Beal과 Bice 1994)의 보고와 일치하였다.

뇌졸중과 척수의 뒤뿌리와 앞뿌리에서 세포의 형태 뿐만 아니라 층별 세포의 밀집도는 실험 I, II군에서 비슷하였다. 즉 뇌졸중의 중간뇌에서 흑색질과 적색핵 그리고 슬기핵에서, 뇌졸중 다리뇌의 삼차신경핵과 달팽이핵, 그리고 숨뇌의 널판핵, 췌기핵 등에서 CB-IR와 PV-IR가 강한 양성반응을 나타냈는데 이는 Celio (1990)의 흰쥐 중추신경계통의 뇌졸중 연구 보고와 일치하였고, Garcia-Segura 등 (1984)과 Fournet 등 (1986)의 뇌졸중에서 CB-IR의 분포상에 대한 보고와 일부는 비슷하였으나 중간뇌의 적색핵과 다리뇌의 달팽이핵 등에서는 양성반응을 관찰할 수 없었다고 보고하여 본 연구와 차이를 보였으며 PV-IR에 대한 실험이 없어서 비교할 수가 없었다. 실험 III군의 뇌졸중에 있는 여러 핵에서 실험 I, II군의 CB-IR와 PV-IR의 분포상과 비슷하였으나 양성반응에 대한 염색성이 매우 약하게 출현함을 관찰할 수 있었다. 이는 척수를 완전히 손상하였기 때문에 오름신경로가 전부 차단되었기 때문이라 생각되며 이런 형태의 실험 결과의 문헌을 접할 수 없어서 비교할 수 없었다.

실험 I, II군의 척수 목분절, 가슴분절, 허리분절, 엉치분절의 회색질기둥의 뒤뿌리의 I, II층에서 공통적으로 강한 양성반응을 나타내는 염주모양을 하고 있는 신경섬유와 세포체모양의 구조물을 관찰할 수 있었으며 그물핵에서 강한 양성반응의 신경 섬유들이 서로 얽혀 신경그물을 형성하고 있었고 일부 섬유는 백색질까지 뻗어 있었다. 회색질기둥 앞뿌리의 앞가쪽핵, 앞안쪽핵, 뒤가쪽핵, 뒤안쪽핵, 그리고 중심관 주변을 둘러싸고 있는 중심핵에서 양성반응을 나타내는 크고 중간정도 크기의 전형적인 신경세포를 관찰할 수 있었는데 이는 Celio (1990)와 Dun 등 (1993), Magnusson 등 (1996)의 흰쥐, 고양이, 생쥐 등의 척수 분절에서 CB-IR과 PV-IR의 분포상의 보고와 일치하였다. 본 실험군에서 특히 목분절에만 존재하는 목중심핵과 가슴분절에만 있는 가슴핵에서 양성반응을 나타내는 PV-IR를 관찰할 수 있었으며, 특히 허리분절의 회색질기

동 앞뿌리에서 가장 크고 강한 양성반응을 나타내는 CB-IR과 PV-IR를 관찰할 수 있었으며 실험 II군에서 척수 가슴분절 오른쪽을 손상시킨 군이 왼쪽을 손상시킨 군 보다 더 좋은 반응을 보였으나 다른 연구자들의 보고된 문헌을 접할 수 없어서 비교할 수가 없었다. 실험 III군에서 척수 목분절에서 양성신경세포들의 밀집도를 보면 CB-IR와 섬유는 회색질기둥 뒤뿌 I, II층에서 많이 출현하였고 PV-IR는 회색질기둥 앞가쪽핵, 앞안쪽핵, 뒤가쪽핵, 뒤안쪽핵 등에서 양성반응을 나타내는 것은 실험 I, II군과 비슷하였으나 척수 가슴분절, 허리분절 그리고 엉치분절에서는 양성반응을 관찰할 수 없었는데 이는 척수가 완전히 손상되었기 때문에 오름신경로와 내림신경로가 차단되어 손상부위 아래의 척수분절의 기능이 마비되었기 때문으로 생각된다. Foster 등(1994)은 척수를 손상시킨 후 5HT와 substance P가 함유된 중간뇌 솔기핵을 이식하여 척수의 기능회복에 관한 실험에서 좋은 결과를 얻었다고 보고하였으며 Goff 등(1998)은 최근 척수 회색질기둥 뒤뿌에 급성 통증을 유발시킨 후 흰쥐의 행동변화를 관찰한 결과 손상 받은 뒤뿌의 신경공급 영역이 마비증상을 일으킨다고 보고하였고, Hu 등(1997)은 뒤뿌리 신경절의 내막에는 분명히 substance P의 자동수용기가 있다고 보고하였고, Kashiba 등(1996)은 흰쥐 뒤뿌리 신경절에 substance P의 수용기 뿐만 아니라 somatostatin, neurotrophin, preprotachykinin 등과 같은 신경전달물질의 수용기도 존재한다고 보고하였으며, Mouchet 등(1986)은 흰쥐 각 척수 분절에서 신경전달물질인 catecholamine 양성세포는 각 분절의 뒤뿌에 고루 분포하고 있으며 특히 허리분절의 뒤뿌에서 강한 양성반응을 관찰하였다고 보고하였다. 그러나 척수의 가슴분절을 손상시킨 후 척수 각 분절에 분포한 CB-IR과 PV-IR에 대한 문헌이 없어서 본 연구의 결과와 비교할 수가 없었다. 실험 I, II군의 각 척수 분절의 백색질에서는 양성반응의 신경세포는 관찰할 수 없었으며 회백주에서 뻗어 나온 신경섬유들이 백색질의 앞섬유단, 가쪽섬유단, 뒤섬유단에 산재성으로 흩어져 있어 신경그물을 이루고 있었으며 이는 Celio (1990)와 Garcia-Segura 등(1984)의

보고와 일치하였다. 그러나 실험 III군의 가슴분절 아래 부위의 각 척수분절 백색질에서는 매우 산만한 신경섬유를 관찰할 수 있었다.

한편 Van Brederode 등(1991)이 흰쥐의 감각 및 운동피질에서 세포의 밀집도는 감각피질의 2/3층과 5/6층의 경계부에서 더 많은 PV-IR가 출현하였으며 CB-IR는 4층에서 더 많이 관찰되며, 운동피질에서는 PV-IR가 3층에서 많이 출현하고 CB-IR는 2층과 3층에서 더 많이 관찰된다고 보고하였고 Celio (1990)는 흰쥐의 몸감각 피질에서 PV-IR의 작은 세포더미가 선택적으로 출현한다고 보고하였으며 또한 PV는 이들 양성신경세포에서 형태학적 표지자로서 사용된다고 제시하였다. Hendry 등(1989)은 원숭이 운동피질과 마루피질에서 PV-IR와 신경그물을 국소적으로 비교 보고하였는데 PV-IR는 마루피질과 운동피질에서는 3층과 5층에서 가장 많이 발견되며 원숭이의 시각피질과 줄무늬체에서 PV-IR가 작은 세포집단으로 출현하였으며 이 부위의 신경그물도 아주 치밀하게 분포하고 있다고 보고하였다. 이와 같이 다양한 실험동물을 이용하여 뇌의 여러 부위에서 CB-IR과 PV-IR의 분포를 보고하였으나 실험동물 종에 따라 다소 차이가 있는 것은 개체 동물별로 각각 특성이 있기 때문이라고 판단되나 자세한 이유는 앞으로 계속 더 연구되어야 한다고 생각된다. PV-IR의 분포가 대뇌피질의 부위별로 차이가 있었던 것과 마찬가지로 비록 뇌의 여러 부위는 아니지만 본 연구에서는 뇌줄기와 척수부위에서 CB-IR는 PV-IR보다 양성반응이 미약하였다. 뇌줄기와 척수의 상위 층에서 CB와 PV는 신경세포체, 신목상돌기, 그리고 대부분의 신경세포의 축삭 등 신경세포 전체에 분포하여 CB-IR와 PV-IR의 염색성의 치밀도를 나타내는 것으로 판단할 수 있으며 이와 같이 윗 층에서 CB-IR와 PV-IR를 확인할 수 있는 것은 dihydropyridine과 민감한 칼슘통로의 분포와 더욱 밀접한 상호관련이 있는 것으로 생각된다(Braun 등 1988, Kosaka와 Heizmann 1989, Rogers 1989). Monaghan 등(1983)은 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용기의 분포는 흰쥐 이마마루피질의 제일 상위 층에 편중적으로 분포하고 있었으며 이는

CB의 주된 기능이 비교적 큰 전도형의 전압 (conductance-type voltage)과 수용기-열림 칼슘통로 (receptor-operated calcium channel)를 통해서 들어오는 완충칼슘이라고 제시한 논리를 입증하는 것이라고 생각된다. 또한 실험 I, II, III군에서 관찰된 CB-IR 세포체와 PV-IR 세포체의 크기는 뇌졸중기에서 15~20 μm , 각 척수분절에서 30~40 μm 정도였다. Ferrer 등(1992)은 사람의 신피질에서 CB-IR 세포체의 크기는 15~20 μm 였다고 보고하였으며, Schmidt-Kastner 등(1992)은 흰쥐의 시각계통에서 PV-IR 세포체의 크기는 15~20 μm 정도라고 보고하였으며, Celio (1990)는 CB-IR의 크기는 20~50 μm 정도라고 보고하여 본 연구결과와 일치하였으나, Defelipe 등(1989)은 원숭이 대뇌피질층에서 PV-IR 세포체와 CB-IR 세포체는 8~15 μm 크기로, Alonso 등(1995)은 흰쥐의 뒤뿔피질에서 CB-IR 세포체는 7~9 μm 정도의 크기로, Tunon 등(1992)은 사람의 뒤뿔피질층에서 PV-IR 세포체는 10~15 μm 정도의 크기로 각각 보고하였다. 이와 같이 여러 보고자들의 두 양성신경세포의 크기가 서로 차이가 있는 것은 실험동물과 실험동물의 뇌의 관찰 부위가 다르기 때문이라고 생각된다. CB-IR와 PV-IR는 고양이 대뇌피질 신경세포의 특수한 집단과 기능적 역할을 밝히는데 표지자로서 널리 사용되리라는 가설을 지지할 수 있다고 확신할 수 있었다. 그러나 CB와 PV 존재가 특수 세포 안에서 특이한 세포기능을 수행하는데 있어서 활용할 만한 충분한 가치가 있음에도 불구하고 특별한 전기생리학적 및 대사작용의 특성 혹은 대뇌피질에 있는 칼슘 양을 조절하여 신경세포의 손상을 보호해주는 이들 단백질의 역할을 확실하게 밝혀주는 직접적인 증거를 아직까지는 얻을 수 없었다. 이들 상호관계의 성질을 규명할 필요성 때문에 칼슘결합단백질이 결핍되어 있는 신경세포에 이들 물질을 투여한다면가 아니면 적당한 항체를 투여하여 CB와 PV이 들어있는 세포의 기능을 차단시켜 전기생리학적, 형태학적 특성을 더욱 확실하게 확립시켜야 되리라고 생각한다. 또한 앞으로 이들 칼슘결합단백질과 GABA와의 공존 관계에 대한 연구가 수행되어야 하리라고 생각되며 정상

동물과 노화된 동물의 뇌의 각 부위에서 칼슘결합 단백질의 분포양상을 비교 분석하여 노화에 따른 치매 및 기억력 등 퇴행성 신경질환의 연관성에 대해서 더욱 더 자세한 연구가 수행되어야 하리라고 생각된다.

참 고 문 헌

- Alonso JR, Arevalo R, Garcia-ojeda E, Porteros A, Brinon JC, Aijon J : NADPH-Diaphorase active and Calbindin D-28K immunoreactive neurons and fibers in the olfactory bulb of the hedgehog, *J Comp Neurol* 351 : 307-327, 1995.
- Andressen C, Blumcke I, Celio MR : Calcium-binding proteins : selective markers of nerve cells, *Cell Tissue Res* 271 : 181-208, 1993.
- Aoki E, Semba R, Seto-Oshima A, Heizmann CW, Kashiwatama S : Coexistence of Parvalbumin and glycine in the rat brainstem, *Brain Res* 525 : 140-143, 1990.
- Beal JA, Bice TN : Neurogenesis of spinothalamic and spinocerebellar tract neurons in the lumbar spinal cord of the rat, *Dev Brain Res* 78 : 49-56, 1994.
- Braun K, Scheich H, Zuschratter W, Heizmann CW, Matuue C, Streit P : Postnatal development of Parvalbumin, calbindin, and adult GABA-immunoreactivity in two nuclei of zebra finches, *Brain Res* 475 : 205-217, 1988.
- Carpenter MB : Core Text of Neuroanatomy, 4th ed. Philadelphia, William & Wilkins, pp 369-375, 1991.
- Celio MR : Calbindin D-28K and Parvalbumin in the rat nervous system, *Neuroscience* 34 : 375-475, 1990.
- Defelipe J, Hendry SHC, Jones EG : Synapses of double bouquet cells in monkey cerebral cortex visualized by calbindin immunoreactivity, *Brain Res* 503 : 49-54, 1989.
- Dietl M, Arluison M, Mouchet P, Feuerstein C, Manier M, Thibault J : Immunohistochemical demonstration of catecholaminergic cell bodies in the spinal cord of the rat, *Histochem* 82 : 385-389, 1985.
- Dun NJ, Dun SL, Wu SY, Forstermann U, Schmid HHHW, Tseng LF : Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat, mouse, cat and squirrel monkey spinal cord, *Neuroscience* 54 : 845-857, 1993.
- Enderin S, Norman AW, Celio MR : Ontogeny of the calcium-binding protein Calbindin D-28K in the rat nervous

- system, *Anat Embryol* 177 : 15-28, 1987.
- Ferrer I, Tunon T, Soriano E, Rio A, Iraizoz I, Fonseca M, Guionnet N : Calbindin immunoreactivity in normal human temporal neocortex, *Brain Res* 572 : 33-414, 1992.
- Foster GA, Brodin E, Gage FH, Maxwell DJ, Roberts MHT, Sharp T : Restoration of function to the denervated spinal cord after implantation of embryonic 5HT- and substance-P containing raphe neurons, *Brain Res* 82 : 247-259, 1990.
- Fournet N, Garcia-Segura LM, Norman AW, Orci L : Selective localization of calcium-binding protein in human brain stem, cerebellum and spinal cord, *Brain Res* 399 : 310-316, 1986.
- Garcia-Segura LM, Baetens D, Roth J, Norman AW, Orci L : Immunohistochemical mapping of calcium-binding protein immunoreactivity in the rat central nervous system, *Brain Res* 296 : 75-86, 1984.
- German DC, Ng MC, Liang CL, McMahon A, Iacopino AM : Calbindin-D 28k in nerve cell nuclei, *Neuroscience* 81 : 735-743, 1997.
- Goff JR, Burkey AR, Goff DJ, Jasmin L : Reorganization of the spinal dorsal horn in model of chronic pain: correlation with behaviour, *Neuroscience* 82 : 559-574, 1998.
- Hendry SH, Jones EG, Emson PC, Lawson DEM, Heizmann CW, Streit P : Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities, *Exp Brain Res* 76 : 467-472, 1989.
- Hu HZ, Li ZW, Si JQ : Evidence for the existence of substance-P autoreceptor in the membrane of rat dorsal root ganglion neurons, *Neuroscience* 77 : 535-541, 1997.
- Ichimiya Y, Emson PC, Mountjoy CO, Lawson DEM, Heizmann CW : Loss of Calbindin D-28K immunoreactive neurons from the cortex of Alzheimer type dementia, *Brain Res* 475 : 156-159, 1988.
- Iwamoto N, Emson PC : Demonstration of neurofibrillary tangles in Parvalbumin-immunoreactive interneurons in the cerebral cortex of Alzheimer type dementia brain, *Neurosci Lett* 128 : 81-84, 1991.
- Kashiba H, Ueda Y, Senba E : Coexpression of preprotachykinin-A, α -calcitonin gene-related peptide, somatostatin, and neurotrophin receptor family messenger RNAs in rat dorsal root ganglion neurons, *Neuroscience* 70 : 179-189, 1996.
- Kawaguchi Y, Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K : Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium binding protein Parvalbumin, *Brain Res* 416 : 369-374, 1987.
- Kosaka T, Heizmann CW : Selective staining of a population of Parvalbumin-containing neurons in the rat cerebral cortex by lectins with specific affinity for terminal N-acetylgalactosamine, *Brain Res* 483 : 158-163, 1989.
- Kubota Y, Jones EG : Co-localization of two calcium binding proteins in GABA cells of rat piriform cortex, *Brain Res* 600 : 339-344, 1993.
- Légrand C, Thomasset M, Parkes CO, Clavel MC, Rabino A : A calcium binding protein in the developing rat cerebellum, *Cell Tissue Res* 233 : 389-402, 1983.
- Magnusson A, Dahlfors G, Bomqvist A : Differential distribution of calcium-binding proteins in the dorsal column nuclei of rats: a combined immunohistochemical and retrograde tract tracing study, *Neuroscience* 73 : 497-508, 1996.
- Mattson MP, Rychlik B, Chu C, Christakos S : Evidence for calcium-reducing and excitoprotective roles for the calcium-binding protein Calbindin D-28K in cultured hippocampal neurons, *Neuron* 6 : 41-51, 1991.
- Miki K, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K : Calcitonin gene-related peptide increase in the rat spinal dorsal horn and dorsal column nucleus following peripheral nerve injury: up-regulation in a sub-population of primary afferent sensory neuron, *Neuroscience* 82 : 1243-1252, 1997.
- Monaghan DT, Holets VR, Toy DW, Cotman CW : Anatomical distribution of four pharmacologically distinct 3H-L-glutamate binding sites, *Nature* 306 : 176-179, 1983.
- Mouchet P, Manier M, Dietl M, Feuerstein C, Berod A, Arluison M, Denoroy L, Thibault J : Immunohistochemical study of catecholaminergic cell bodies in the rat spinal cord, *Brain Res Bull* 16 : 341-354, 1986.
- Nag TC, Wadhwa S : Calbindin and Parvalbumin immunoreactivity in the developing and adult human retina, *Dev Brain Res* 93 : 23-32, 1996.
- Patrick RH, John HM : Neocortical neuronal subpopulations labeled by a monoclonal antibody to calbindin exhibit differential vulnerability in Alzheimer disease, *Exp Neurol* 111 : 293-301, 1991.
- Philippe E, Droze B : Calbindin D-28K immunoreactive neurons in chick dorsal root ganglion : ontogenesis and cytological characteristics of the immunoreactive sensory

- neurons, *Neuroscience* 26 : 215-224, 1988.
- Pickel VM, Heras A : Ultrastructural localization of Calbindin D-28K and GABA in the matrix compartment of the rat caudate-putamen nuclei, *Neuroscience* 71 : 167-178, 1996.
- Privat A, Mansour H, Geffard M : Transplantation of fetal serotonin neurons into the transected spinal cord of adult rats : morphological development and functional influence, *Brain Res* 78 : 155-165, 1988.
- Rogers JH : Immunoreactivity for calretinin and other calcium-binding proteins in cerebellum, *Neuroscience* 31 : 711-721, 1989.
- Ronald LC, Charles JW, Piers CE, Claus WH : Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum, *J Comp Neurol* 302 : 197-205, 1990.
- Sally JG, Julia MP, Stephen RB, Patrick DW : The distribution of nine peptides in rat spinal cord with special emphasis on the substantia gelatinosa and on the area around the central canal(lamina X), *J Comp Neurol* 201 : 65-79, 1981.
- Schmidt-Kastner R, Meller D, Eysel UT : Immunohistochemical changes of neuronal calcium-binding proteins Parvalbumin and Calbindin D-28K following unilateral deafferentation in the rat visual system, *Exp Neurol* 117 : 130-246, 1992.
- Sieradzan K, Vrbova G : Replacement of missing motor neurons by embryonic grafts in the rat spinal cord, *Neuroscience* 31 : 115-130, 1989.
- Sloviter RS : Calcium-binding protein Calbindin D-28K and Parvalbumin immunocytochemistry localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neuron to seizure activity, *J Comp Neurol* 280 : 183-196, 1989.
- Snell RS : *Clinical Neuroanatomy for Medical Students*, 2nd ed. Boston, Little Brown, pp 309-315, 1987.
- Stichel CC, Singer W, Heizmann CW, Norman AW : Immunohistochemical localization of calcium binding proteins, Parvalbumin and Calbindin D-28K in the adult and developing visual cortex of cats: a light and electron microscopic study, *J Comp Neurol* 262 : 563-577, 1987.
- Terman JR, Wang XM, Martin GF : Growth of dorsal spinocerebellar axon through a lesion of their spinal pathway during early development in the north american opossum, *Didelphis virginiana*, *Dev Brain Res* 93 : 33-48, 1996.
- Tunon T, Insausti R, Ferrer I, Sobreviela T, Soriano E : Parvalbumin and Calbindin D-28K in the human entorhinal cortex. An immuno-histochemical study, *Brain Res* 589 : 24-32, 1992.
- Van Brederode JFM, Hellisen, Hendricson AE : Distribution of the calcium-binding proteins Parvalbumin and Calbindin D-28K in the sensorimotor cortex of the rat, *Neuroscience* 44 : 157-171, 1991.
- Waldvogel HJ, Faull RLM, Williams MN, Dragunow M : Differential sensitivity of Calbindin D-28K and Parvalbumin immunoreactive cells in the striatum to excitotoxins, *Brain Res* 546 : 329-335, 1991.
- Wang JJ, Chuah MI, Tew DTW, Leung PC, Tsang DSC : Effects of astrocyte implantation into the hemisected adult rat spinal cord, *Neuroscience* 65 : 973-981, 1995.
- Wasserman RH, Taylor AN : Vitamin D3-induced calcium-binding protein in the chick intestinal mucosa, *Science* 152 : 791-793, 1966.
- Willis WD, Coggeshall RE : *Sensory Mechanism in the spinal cord*, 2nd ed. New York, Plenum, pp 1-575, 1991.

Legends for Figures

Fig. 1. Photomicrographs of CB-IR (left column) and PV-IR (right column) in the rat brain stem and spinal cord of the control group.

Left column (CB-IR)

- 1A : Red nucleus of the midbrain. Coronal section. $\times 50$.
- 1C : Cervical segment of the spinal cord. Transverse section. $\times 50$.
- 1E : Thoracic segment of the spinal cord. Transverse section. $\times 50$.
- 1G : Lumbar segment of the spinal cord. Transverse section. $\times 100$.
- 1I : Sacral segment of the spinal cord. Transverse section. $\times 50$.

Right column (PV-IR)

- 1B : Reticular formation of the medulla oblongata. Coronal section. $\times 50$.
- 1D : Typical neurons in the ventral root of the gray matter of the cervical segment of the spinal cord. Transverse section. $\times 200$.
- 1F : Thoracic segment of the spinal cord. Transverse section. $\times 100$.
- 1H : Many PV-IR neurons in the ventral root of the gray matter of the lumbar segment of the spinal cord. Transverse section. $\times 100$.
- 1J : Many PV-IR neurons in the ventral root of the gray matter of the sacral segment of the spinal cord. Transverse section. $\times 100$.

Fig. 2. Photomicrographs of CB-IR (left column) and PV-IR (right column) in the rat brain stem and spinal cord of the right spinal hemisection group.

Left column (CB-IR)

- 2A : Substantia nigra of the midbrain. Coronal section. $\times 50$.
- 2C : Neuropils in the dorsal root of the gray matter of the cervical segment of the spinal cord. Transverse section. $\times 100$.
- 2E : Many neurons and nerve fibers in the ventral root of the gray matter of the spinal thoracic segment. Transverse section. $\times 100$.
- 2G : Two cell clusters in the anterolateral and anteromedial nucleus in the ventral root of the gray matter of the spinal lumbar segment. Transverse section. $\times 100$.
- 2I : Several neurons in the ventral root of the gray matter of the spinal sacral segment. Transverse section. $\times 100$.

Right column (PV-IR)

- 2B : Pontine nucleus from the pons showing positive immunostaining for PV. Coronal section. $\times 50$.
- 2D, F, H, J : Positive PV-IR in the ventral roots of the gray matter in the spinal cervical (2D), thoracic (2F), lumbar (2H), and sacral (2J) segments. Transverse section. $\times 100$.

Fig. 3. Photomicrographs of CB-IR (left column) and PV-IR (right column) in the rat brain stem and spinal cord of the left spinal hemisection group.

Left column (CB-IR)

- 3A : Typical substantia nigra from the midbrain showing positive immunostaining for CB. Coronal section. $\times 50$.
- 3C : Several positive CB-IR neurons and fibers in the ventral root and dorsal root of the gray matter of the spinal cervical segment. Transverse section. $\times 50$.
- 3D : Strong positive CB-IR neurons and fibers in the gray matter and white matter of the spinal thoracic segment. Transverse section. $\times 50$.
- 3G : Many CB-IR neurons in the ventral root of the gray matter of the spinal lumbar segment. Transverse section. $\times 100$.
- 3I : A few CB-IR were scattered in the superficial layer of the dorsal horn of the gray matter in the spinal sacral segment. Transverse section. $\times 100$.

Right column (PV-IR)

- 3B : Raphe nucleus of the midbrain. Coronal section. $\times 50$.
- 3E, H, J : Several less intensely labeled PV-IR in the ventral and dorsal roots of the gray matter of the spinal cervical (3E), lumbar (3H), and sacral (3J) segments. Transverse section. $\times 50$.
- 3F : Strong PV-IR neurons and fibers in the gray and white matter of the spinal thoracic segment. Transverse section. $\times 50$.

Fig. 4. Photomicrographs of CB-IR (left column) and PV-IR (right column) in the rat midbrain and spinal cord of the complete spinal section group.

Left column (CB-IR)

- 4A : Trapezoid nucleus of the pons. Coronal section. $\times 50$.
- 4C : Two of the CB-IR neurons had long processes extending toward lateral funiculus of the spinal cervical segment. Transverse section. $\times 100$.
- 4D, G, I : A few positive CB-IR neurons and fibers in the gray matter of the spinal thoracic (4D), lumbar (4G), and sacral (4I) segment. Transverse section. D : $\times 50$. G, I : $\times 100$.

Right column (PV-IR)

4B : Spinal nucleus of trigeminal nerve of the pons. Coronal section. × 50.

4E, F, H, I : A few positive PV-IR neurons and fibers in the gray matter of the spinal cervical (4E), thoracic (4F), lumbar(4H), and sacral (4I) segments. Transverse section. × 50.

Fig. 5. Photomicrographs of several types CB-IR in the reticular formation of the rat midbrain of the spinal hemisection group. Coronal section. × 200.

Fig. 6. Higher magnification showing the typical PV-IR neurons in the ventral root of gray matter of the spinal lumbar segment of the control group. Transverse section. × 400.

Fig. 7. Higher magnification showing the typical several types CB-IR neurons in the ventral root of the gray matter of the cervical segment of the right spinal hemisection group. Transverse section. × 400.

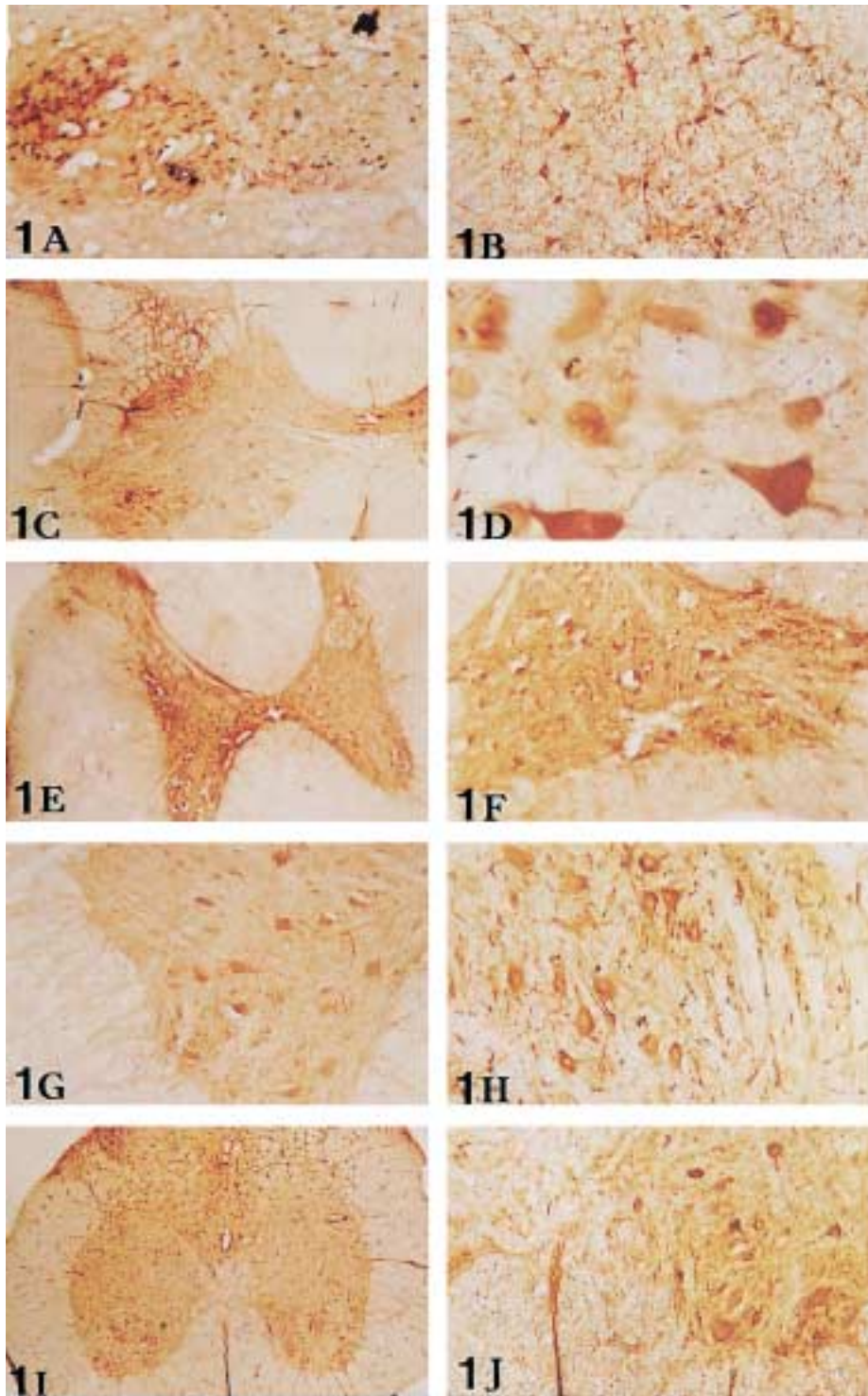
Fig. 8. Diagram of the principle CB-IR (black circles) and PV-IR (stars) neurons and fibers (black rectangles) in the cervical, thoracic, lumbar and sacral spinal segments of the control group.

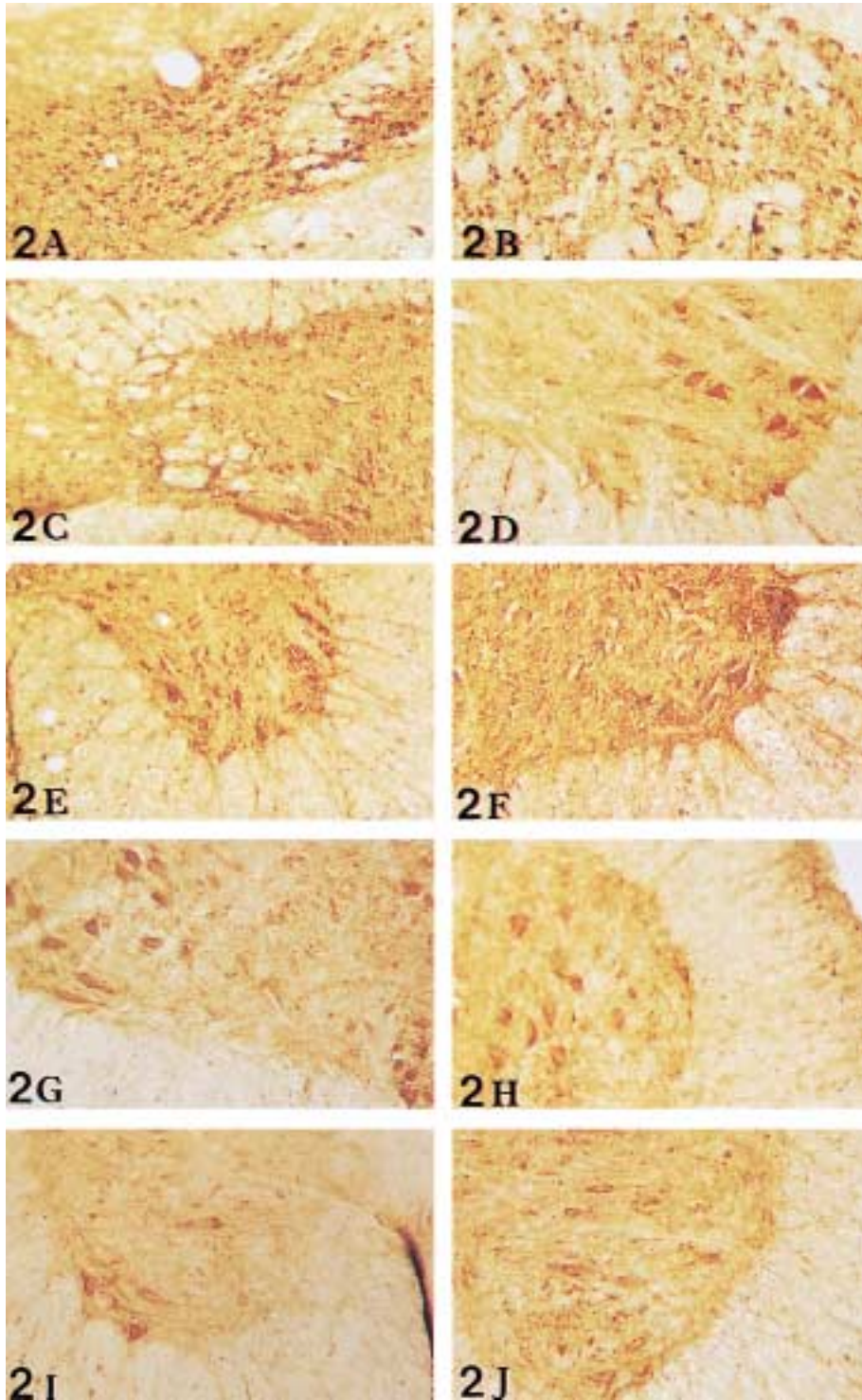
Fig. 9. Diagram of the principle CB-IR (black circles) and PV-IR (stars) neurons and fibers (black rectangles) in the cervical, thoracic, lumbar and sacral spinal segments of the right spinal hemisection group.

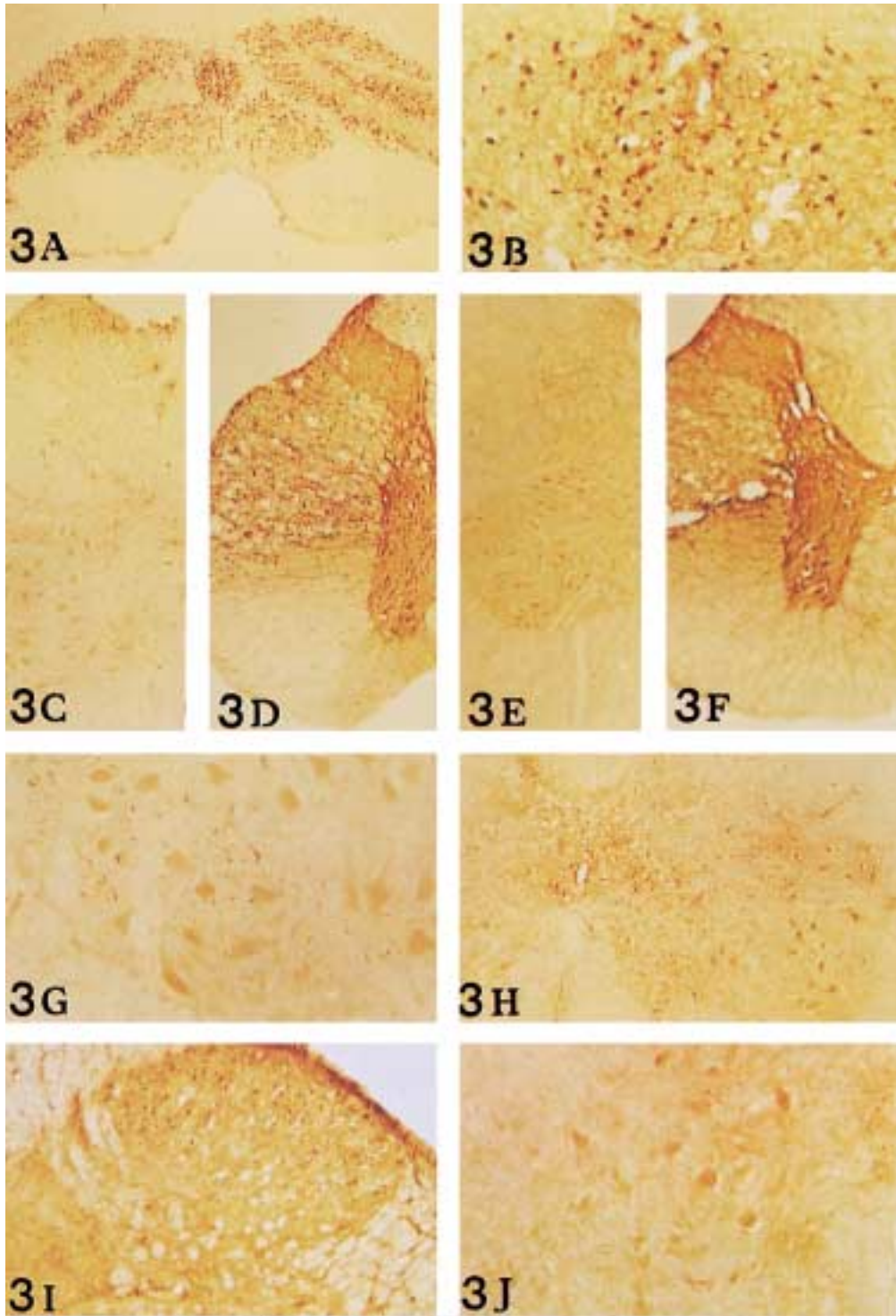
Fig. 10. Diagram of the principle CB-IR (black circles) and PV-IR (stars) neurons and fibers (black rectangles) in the cervical, thoracic, lumbar and sacral spinal segments of the left spinal hemisection group.

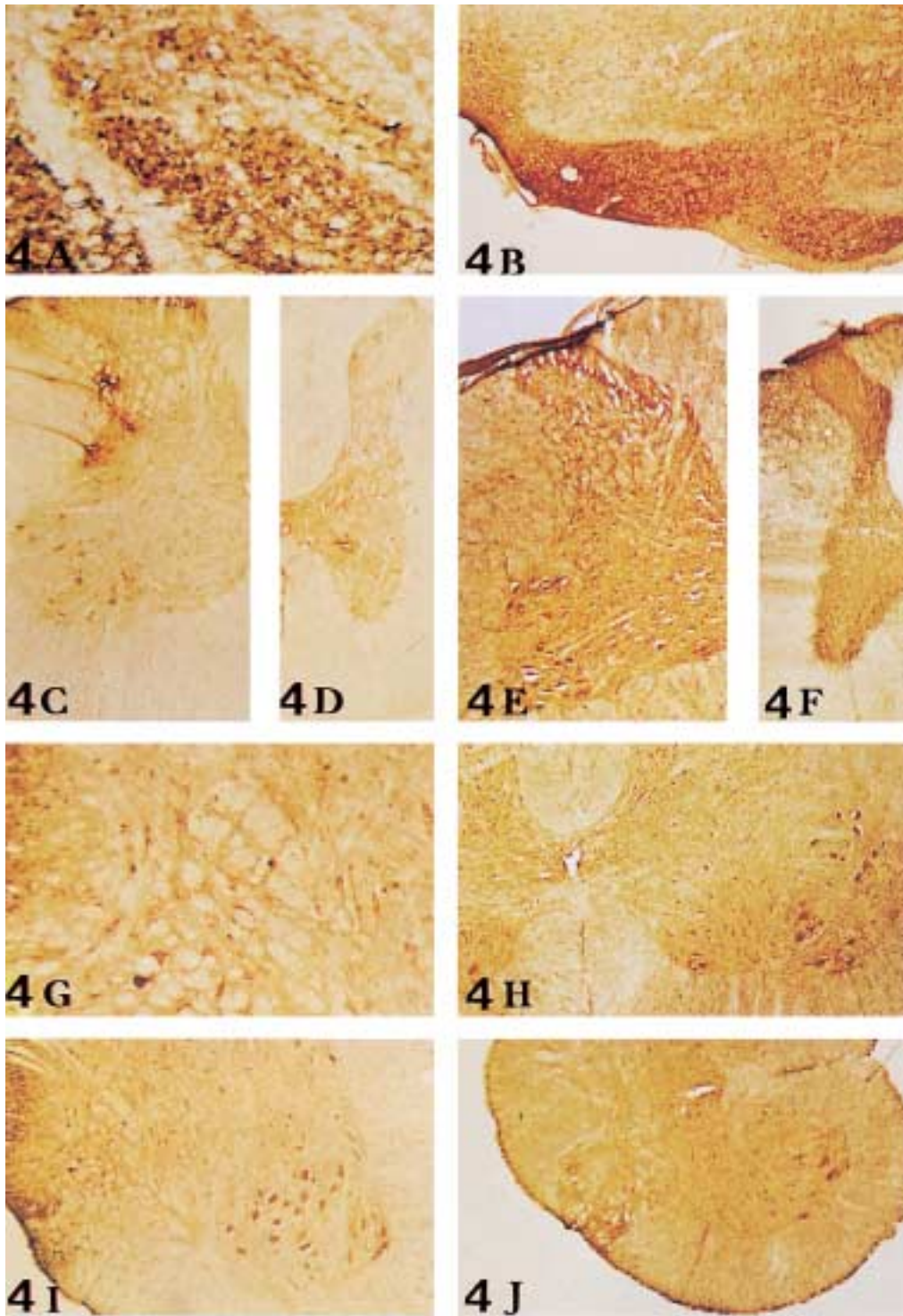
Fig. 11. Diagram of the principle CB-IR (black circles) and PV-IR (stars) neurons and fibers (black rectangles) in the cervical, thoracic, lumbar and sacral spinal segments of the complete spinal section group.

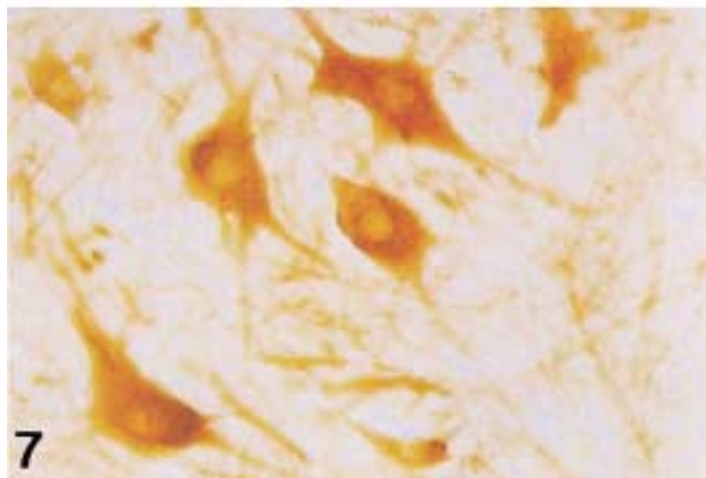
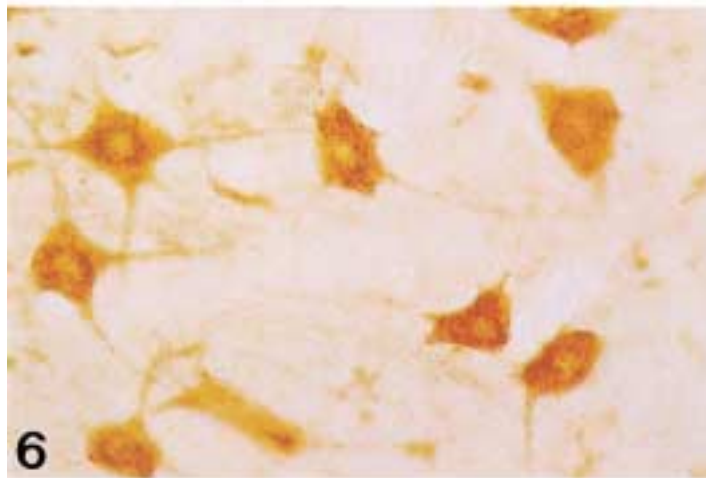
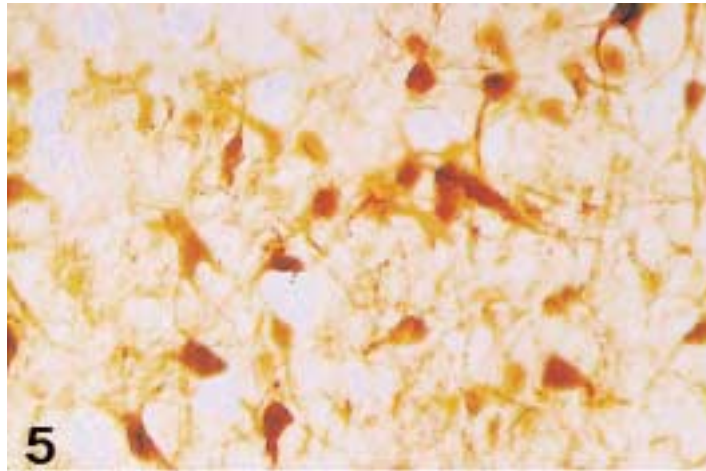
K C I

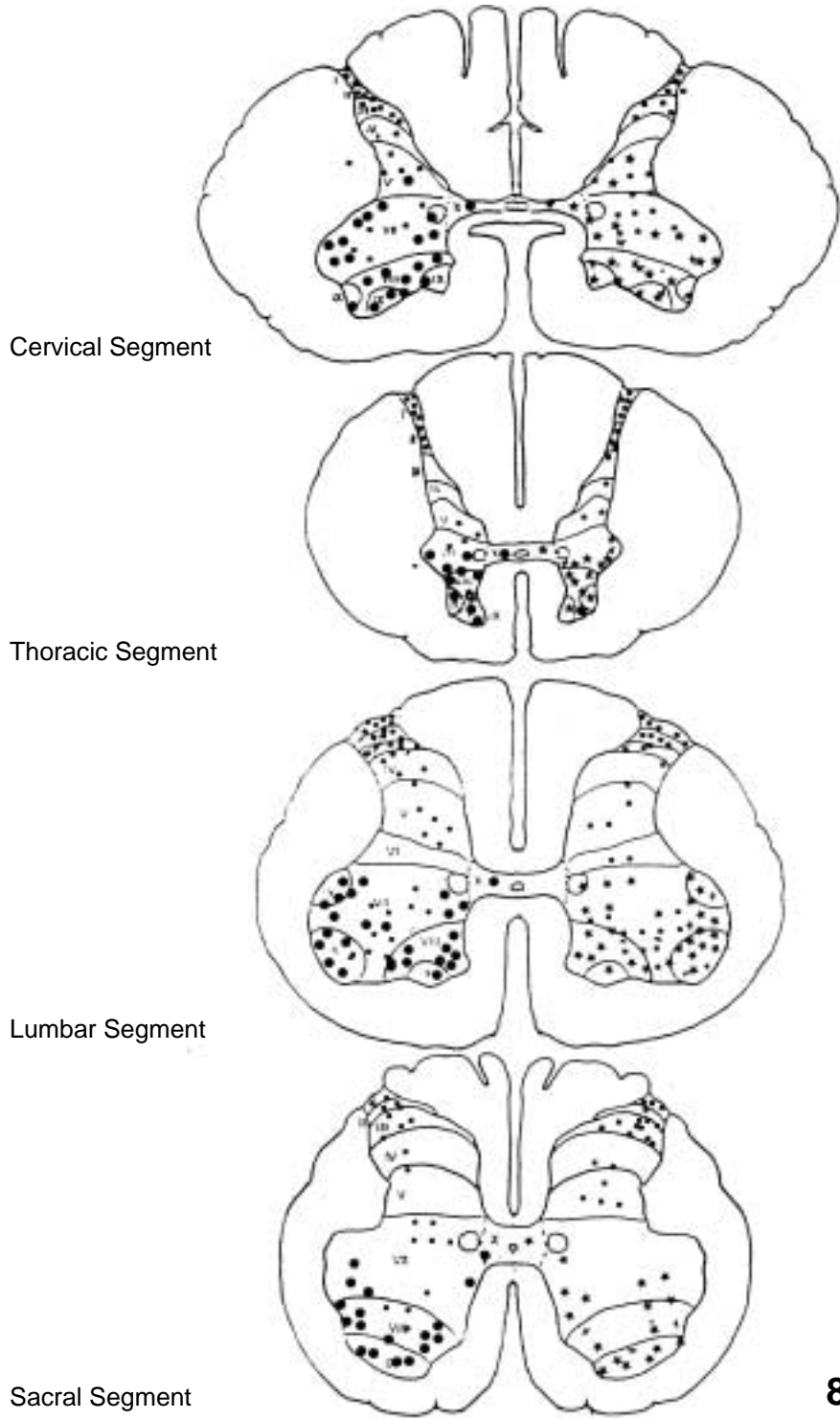




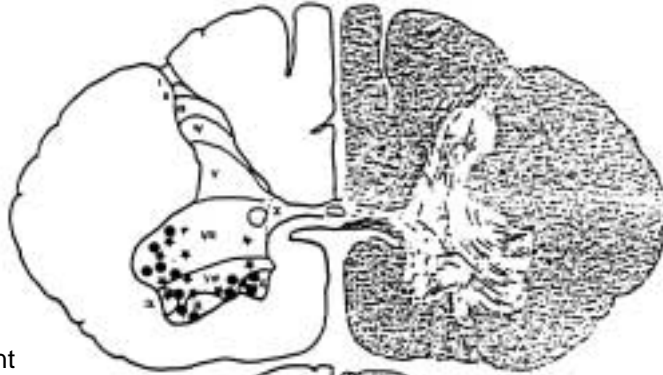








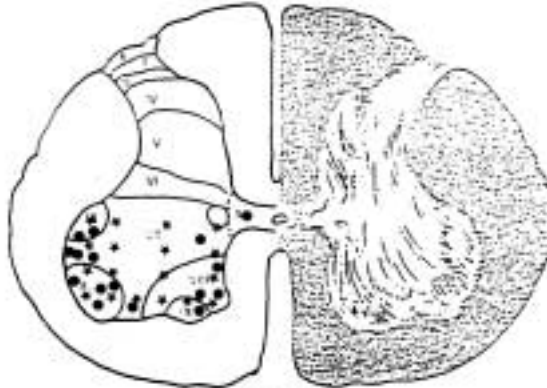
Cervical Segment



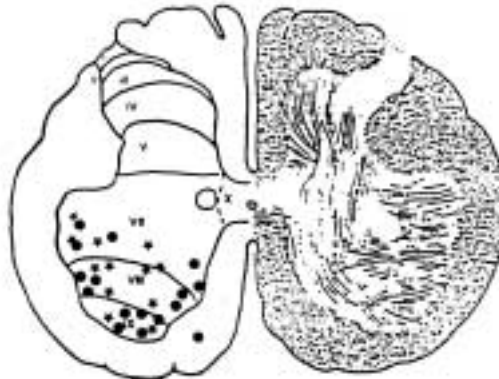
Thoracic Segment

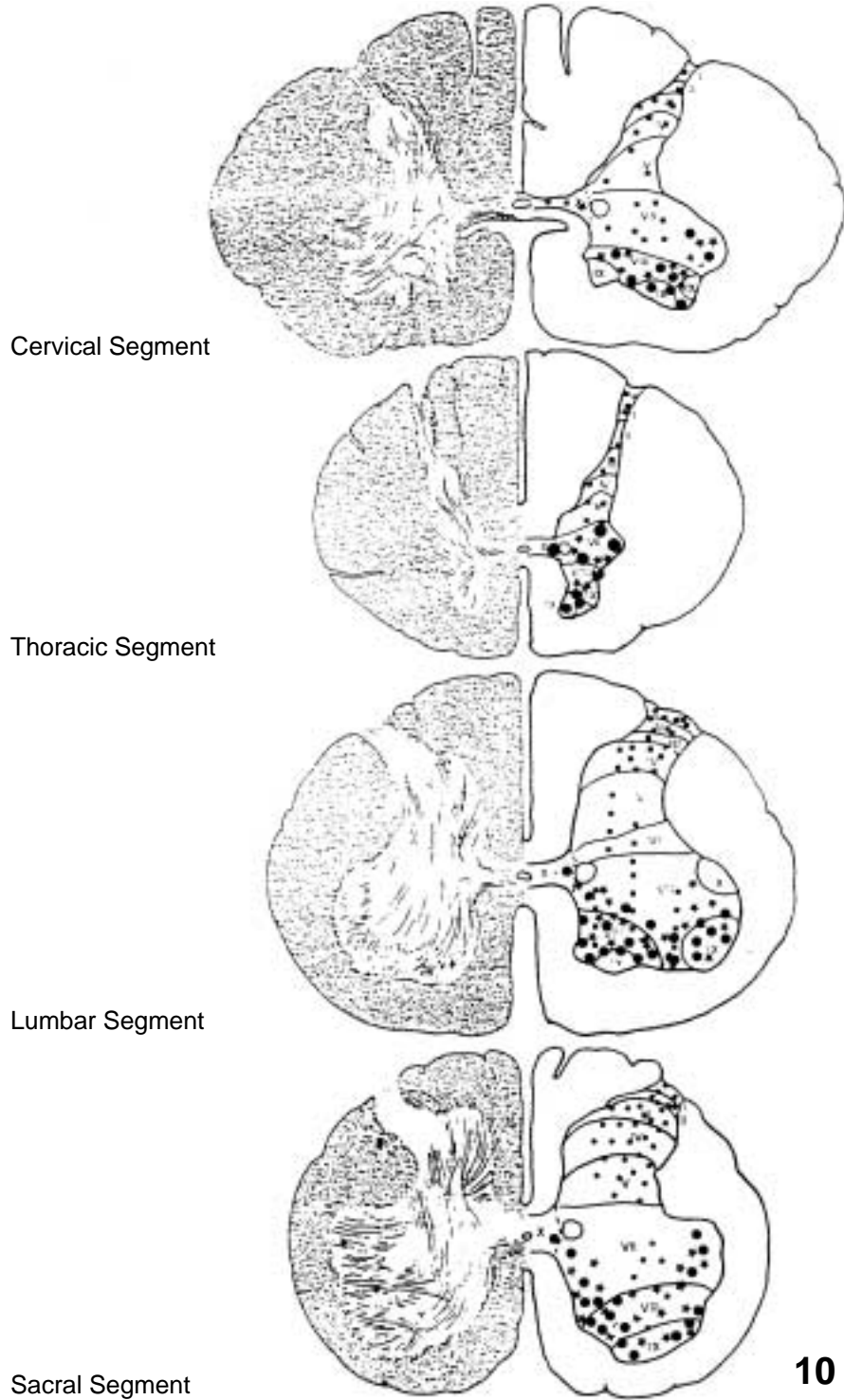


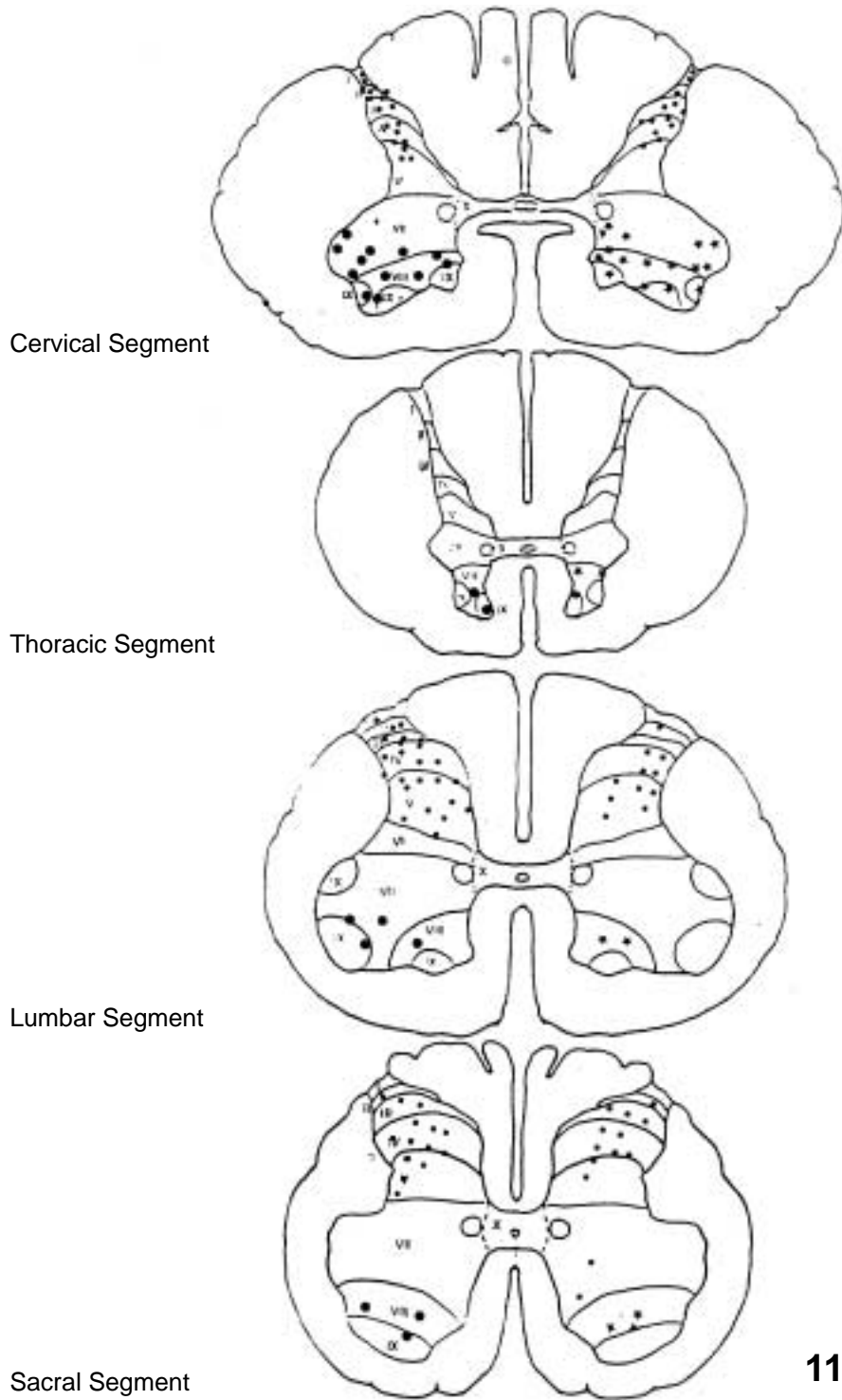
Lumbar Segment



Sacral Segment







Abstract

Immunohistochemical Studies on the Calbindin D-28K and Parvalbumin Positive Neurons in the Brain Stem and Spinal Cord after Transection of Spinal Cord of Rats

Jong-Joong Kim, In-Youb Chang, Yoon-Young Chung, Sang-Pil Yoon,
Jeong-Seok Moon, Hyun-Joong Yoon

Department of Anatomy, College of Medicine, Chosun University

This studies were examined and compared the immunohistochemical distribution of the two calcium-binding proteins calbindin D-28K and parvalbumin positive neurons in the brain stem and spinal cord after transection of spinal cord in rats.

In this experiment, calbindin D-28K immunoreactive neurons were mainly found in many pyramidal cells distributed in the brain stem and spinal cord of rats.

Calbindin D-28K neuropil labeling was strongly noted in brain stem and in spinal all segments of the spinal cord. In contrast to parvalbumin, little differences were found in distribution, size and morphology of calbindin D-28K cell body or neuropil staining in the brain stem and spinal cord.

Parvalbumin immunoreactive cells were demonstrated in all lamina of the gray matter of the spinal cord. These immunoreactive cells had the most high density in the layer I and II dorsal horn and several nuclei of the ventral horn of the all segments of the spinal cord. These immunoreactive cells between the brain stem and spinal cord were quite different markedly in number, cell size and morphology

The number of parvalbumin positive cells were more than twice in the brain stem and spinal cord compared to the calbindin D-28K positive cells.

Calbindin D-28K and parvalbumin-immunoreactive somata were round, oval, spindle and polygonal in shape, and the positive neurons were unipolar, bipolar, multipolar and horizontal in shape.

The diameters of the somata of the two positive neurons were 30~40 μm , respectively. Also dendrites of two positive neurons were densely arrayed in arborization.

Key words : Spinal cord, Calbindin D-28K, Parvalbumin