

흰쥐 시상하부에서 brain natriuretic peptide면역반응 신경세포의 생후 발달에 관한 연구

정윤영, 정영욱, 박영란, 김종중, 문정석, 김 복, 오재욱
조선대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : Brain natriuretic peptide (BNP)는 atriopeptin과 구조적으로 동일한 신경펩타이드로 돼지의 뇌에서 처음으로 추출되었다. 시상하부의 뇌실결핵과 시각로위핵의 큰 세포 부분에 있는 신경세포들은 많은 신경호르몬들을 합성하고 분비하는 것으로 알려져 있다. 이 연구에서는 흰쥐 시상하부에서 ABC방법과 면역형광염색 등을 이용한 면역조직화학염색으로 BNP면역반응 양성세포들의 분포 양상을 생후 연령별로 관찰하였다. 실험 결과, BNP면역반응 양성세포는 생후 10일에 처음으로 뇌실결핵과 시각로위핵에서 관찰되었으며 성숙 흰쥐에서는 셋째뇌실 주변의 등쪽안쪽시상하부핵, 배쪽안쪽시상하부핵, 활꼴핵 및 정중용기의 안쪽 층 등 시상하부 전체에 광범위하게 분포하였으나, 뇌실결핵과 시각로위핵을 제외한 대부분의 시상하부핵에서는 염색반응이 약하였다. 생후 15일에는 가쪽시상하부구역에서 처음으로 BNP면역반응 양성 신경세포와 신경섬유가 관찰되었으며, 시각뒤교차시각로위핵에서는 BNP면역반응 양성 신경세포 및 신경섬유들이 생후 20일에 두드러지게 나타났으며 성숙 흰쥐에서 가장 잘 관찰되었다. 또한 BNP면역반응은 시상하부의 신경세포의 세포체와 신경섬유 모두에서 뚜렷한 반응을 나타냈다. 뇌에서의 BNP의 기능에 대해서는 아직도 확실히 밝혀지지 않았지만, 시상하부에서의 분포 양상으로 미루어 시상하부의 생후 발달과정동안 BNP는 신경호르몬을 분비하는 신경세포들에 신경조절물질로서 작용하여 신경분비 기능을 조절할 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : Brain natriuretic peptide, 시상하부, 흰쥐, 생후 발달, 면역조직화학

서 론

Brain natriuretic peptide (BNP)는 돼지의 뇌에서 처음으로 추출되었으며 포유동물의 natriuretic peptide (NP) 중 대표적인 atriopeptin (AP)과 상동성을 가지고 있는 펩타이드로 분류되고 있다(Sudoh 등 1988). 포유동물의 NP 계열은 모두 구조적으로 상동성을 가지고 있으며 혈액의 항상성 유지와 심혈관 계통 및 내분비계통에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나 말초신경계통과 중추신경계통에서의 발

현 양상은 서로 다른 것으로 생각되고 있다(Imura 등 1992, Ruskoaho 1992).

지금까지 알려진 NP 계열에 속하는 펩타이드로는 BNP와 atrial natriuretic peptide (ANP) 및 C형 natriuretic peptide (CNP) 등 세 가지가 밝혀졌다. 특히 심부전증, 고혈압 및 급성 심근경색증 등을 포함한 여러 가지 심장혈관 질환을 가지고 있는 환자의 심실(ventricle)에서 ANP와 BNP 유전자 발현이 증가하였으며(Morita 등 1993, Ogawa와 Nakao 1995), ANP와 BNP는 NP가 생물학적 작용을 하는데 필수적인 이황화물 결합에 의해 형성되는 17 아미노산 고리 구조를 가지고 있다는 특징도 공유하고 있어서 ANP와 BNP는 기능적으로나 구조적으로나 매우 밀접한 관련이 있으며 심장의 NP 계열을 구성한다고 알려

*이 논문은 2003년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

교신저자: 정윤영 (조선대학교 의과대학 해부학교실)

전자우편: yyjung@mail.chosun.ac.kr

져 있다(Ogawa와 Nakao 1995).

ANP와 CNP는 면역조직화학염색의 면역반응성이나 mRNA 분포가 대부분의 척추동물 중추신경계통의 신경세포에 광범위하게 나타나며 거의 같은 분포 위치를 나타내는데 특히 시상하부에서 뚜렷한 것으로 보고되었다(Skofitsch와 Jacobowitz 1988, Langub 등 1995, Ryan과 Gundlach 1995). 그러나 BNP는 돼지의 뇌(Sudoh 등 1988) 뿐만 아니라 사람(Imura 등 1992)이나 흰쥐(Langub 등 1995)의 중추신경계통에서도 *in situ* hybridization (ISH)기법이나 면역조직화학적 방법을 이용한 결과에 있어서 그 분포 위치에 상당한 차이가 있는 것으로 알려져 있다.

지금까지 알려진 BNP의 작용으로는 심방과 심실에서 생성되는 심장호르몬으로서의 작용이 있어 강력한 이노작용, 나트륨배설증가작용, 혈관이완작용 및 체액의 항상성과 혈압 조절작용 등의 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Mukoyama 등 1991, Ogawa와 Nakao 1995). 이외에도 BNP는 신경계통에도 작용하여 배양중인 신생 별아교세포의 증식을 억제하는 것으로 보고되어져 있으며(Levin과 Frank 1991), BNP는 전형적인 ANP-A 수용체에 ANP와 같은 정도로 결합하며, ANP-B 수용체에는 ANP보다 BNP가 7배 이상 강력한 결합력을 가지고 있는 것으로 보고되어져 있다(Chang 등 1989). 따라서 돼지의 심장에는 ANP-B 수용체의 분포가 우세하므로 심장 조직에 있어서는 ANP보다 BNP가 생리적 작용을 하는데 더 많은 영향을 미칠 것으로 생각되고 있다.

신경계통에서 BNP의 분포에 대한 연구를 보면 BNP 항혈청을 이용하여 BNP면역반응 신경세포의 분포를 관찰한 연구(Saper 등 1989)가 있는데, 이 보고에 의하면 BNP면역반응 신경세포가 주로 교감신경과 부교감신경 및 척수의 등쪽뿌리신경절(dorsal root ganglion)에 주로 분포하며, BNP면역반응 신경 섬유들이 뇌혈관인 윌리스 고리를 구성하는 혈관들에 분포한다고 보고하여 BNP가 자율신경계통 및 감각을 조절하는 신경조절물질로서의 작용과 뇌혈관을 확장시키는데도 작용한다고 하였다.

한편 시상하부(hypothalamus)는 사이뇌의 앞쪽

끝부분에 위치하며 많은 핵들로 나뉘어져 있으며 시상하부의 신경세포들은 자율신경계통 및 내분비계통과 밀접한 관련이 있어 호르몬 생성을 조절할 뿐만 아니라 체온, 식욕, 수면, 하루주기리듬(circadian rhythms), 성에 관련된 행동 등 다양한 기능을 조절하는데 매우 중요한 구조이다. 시상하부의 신경세포들은 신경전달물질로 작용하는 여러 가지 신경펩타이드들을 함유함으로써 이러한 기능들을 수행하는 것으로 알려지고 있다(Sawchenko 등 1984). 특히 내분비계통과 관련된 기능은 시상하부의 신경내분비세포에서 신경펩타이드를 연결됨새가 아닌 순환계통 안으로 분비함으로써 조절된다고 하였다(Sawchenko 등 1984). 이 신경펩타이드들이 신경조절물질이나 신경전달물질로 작용하여 자율신경계통과 관련된 기능을 조절하므로 뇌 중에서도 시상하부 핵들의 신경내분비세포들이 심장 NP 중의 하나인 BNP를 합성, 분비하는지를 형태학적으로 밝히는 것이 BNP의 기능을 규명하는데 도움이 될 것이다. 정(2001)은 성숙 흰쥐 시상하부 중 특히 뇌실결핵(paraventricular nucleus)과 시각로위핵(supraoptic nucleus)에서 BNP함유 신경세포의 면역반응을 면역조직화학기법을 시행하여 공초점레이저주사현미경(confocal laser scanning microscope)을 이용하여 형태학적으로 관찰해 보고한 바 있다. 이 연구에서는 면역조직화학기법 중 ABC방법 및 면역형광염색을 시행하여 생후 발달 단계에 따른 흰쥐 시상하부에서 BNP면역반응의 생후 발현 시기 및 분포 위치와 세포의 형태 변화 등을 연령별로 비교 조사하여 포유동물 뇌에서 BNP의 역할을 이해하는데 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 200~250 g 내외의 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 교배시켜 태어난 생후 0, 5, 10, 15, 20, 30일의 어린 쥐(P0, P5, P10, P15, P20, P30)와 생후 90일 이상 된 성숙 수컷 흰쥐(P90, 체중 250~300 g) 각각 4마리씩을 본 실험에 사용하였다.

2. 동물 희생 및 조직 처리

성숙 흰쥐는 pentobarbital sodium (60 mg/kg)을 복막안에 주사하고, 어린 쥐는 에테르로 마취시킨 후 가슴안을 열고 원심실에 관류용 도관을 삽입한 후, heparin (250 unit/mL)을 함유한 생리식염수로 관류 세척하고 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4)에 녹인 4% paraformaldehyde 용액이나 Zamboni 고정액으로 관류 고정된 다음 뇌를 적출하여 동일한 고정액에 담가 4°C에서 12시간 후고정하였다. Free-floating 방법으로 면역조직화학염색을 시행하기 위해 고정된 뇌 조직은 후고정한 다음에 30% sucrose에 넣고 24시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 동결절편기를 이용해 35 µm 두께의 연속관상 동결절편을 제작하여 저장용액에 담아 4°C에 보관하였다.

3. 표본제작 및 조직염색

1) 뇌슬염색

고정된 뇌 조직의 일부는 ethanol 탈수과정과 xylene 투명과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 5~8 µm 두께의 관상단면 연속절편을 제작하여 탈파라핀 및 함수 과정 등을 거쳐 cresyl violet 염색을 시행하였다. 또한 동결절편기를 이용하여 35 µm 두께의 연속관상 동결절편을 제작하여 매 5장마다 1장씩을 취하여 cresyl violet 염색을 시행하여 탈파라핀한 염색절편과 비교하였고, 이들 염색 표본에서 정확한 시상하부의 핵들을 확인하였다.

2) 면역조직화학염색

저장용액에 보관한 조직절편을 매 5장마다 1장씩을 취하여 0.1 M PB로 옮겨서 수 차례 수세한 후 과산화수소(H₂O₂)를 처리하여 내인성 과산화효소의 활성을 억제하였으며 다시 0.1 M PB로 세척한 후 면역조직화학반응을 실시하였다.

면역염색의 첫 단계로 비특이적 반응을 줄이기 위하여 3% 염소혈청(normal goat serum)을 실온에서 1시간 반응시켰다. 1차 항체는 rabbit anti-BNP (1:500, Biogenesis)를 사용하였으며, 4°C에서 24~48시간 동안 진동시키면서 반응시켰다. 그 후 0.1 M PB로 10분씩 3회 수세 과정을 거쳤으며, 2차 항체

는 biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200, Vector)를 실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.1 M PB로 10분씩 3회 수세하였다. 그리고 peroxidase가 표지된 avidin-biotin complex (ABC, Vector)를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 가량 반응시킨 후, 0.1 M PB로 10분간 다시 3회 수세하고 나서 3-3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma)를 0.1 M PB에 녹여 기질용액으로 사용하였는데 반응 직전에 H₂O₂를 0.003%가 되도록 첨가하였으며, 실온에서 5~10분간 반응시킨 후 현미경하에서 발색 정도를 확인하였다. 또한 흑색을 띄는 nickel chloride를 DAB에 용해시켜 여과하고 0.003% H₂O₂를 첨가하여 발색 반응을 확인하였다. 그 후 0.1 M PB로 2~3회 세척한 후 염색한 조직절편들을 젤라틴이 피막된 슬라이드에 부착하여 실온에서 12시간 이상 건조한 다음, 통상의 조직처리 과정을 거쳐 polymount (Polyscience)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 면역형광염색

조직절편을 0.1 M PB로 수 차례 수세한 후 항원의 비특이적 반응을 방지하기 위하여 10% normal goat serum-0.5% bovine serum albumin이 희석된 0.1 M PB로 처리하였다. Rabbit anti-BNP를 1:500으로 희석하여 4°C에서 24~48시간 동안 진동시키면서 반응시켰다. 일차 항체를 함유한 용액은 0.2% triton X-100을 넣어 조직 내 항체 투과율을 높였다. 조직절편을 0.1 M PB로 수세한 후 제2항체인 fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-rabbit IgG (1:80, Sigma)를 실온에서 60~90분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 절편은 0.1 M PB로 수세한 후 형광물질을 보존하기 위하여 수용성 봉입제인 Gel Mount (Biomedica)로 봉입하여 형광현미경으로 관찰하였다.

결 과

출생 첫 날과 생후 5일에는 BNP면역반응 양성 신경세포를 시상하부에서 관찰할 수 없었으며 생후 10일에 뇌실결핵과 시각로위핵에서 처음으로 관찰

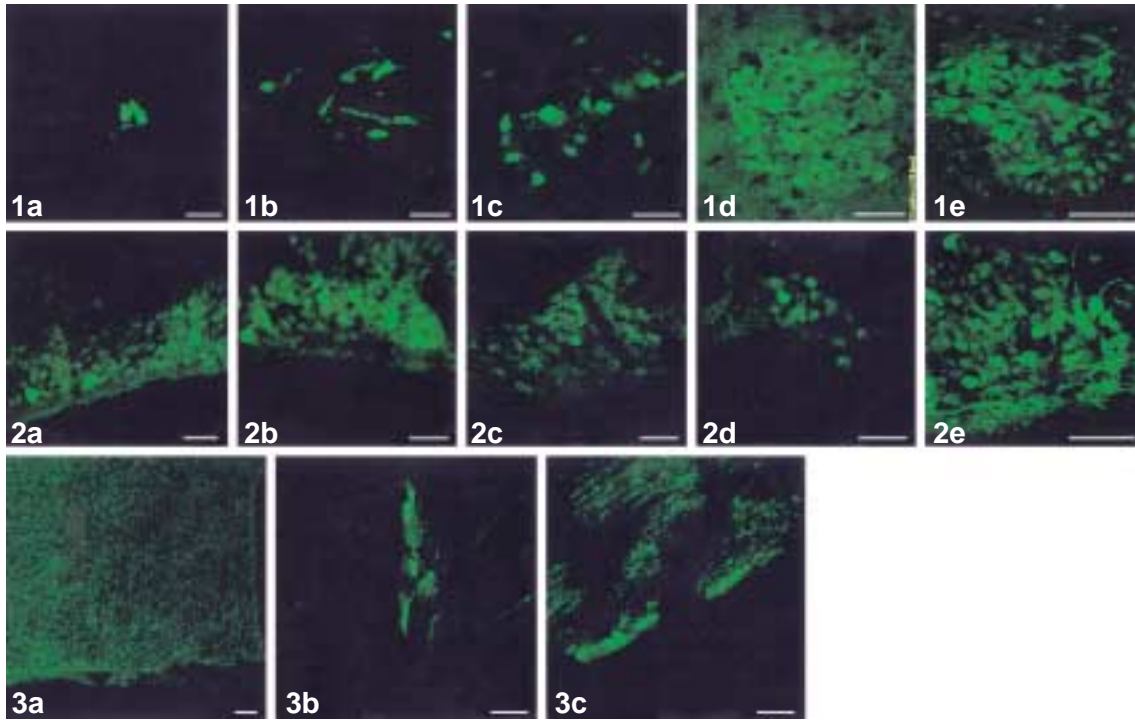


Fig. 1. Immunofluorescent images of BNP-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus at P10 (a), P15 (b), P20 (c), P30 (d), and P90 (e). BNP-immunoreactivity first appeared in the lateral magnocellular division of paraventricular nucleus (PaLM) at P10. The number of BNP-immunoreactive cells markedly increased at P30. Bars = 50 μ m.

Fig. 2. Immunofluorescent images of BNP-immunoreactive neurons in the supraoptic nucleus at P10 (a), P15 (b), P20 (c), P30 (d), and P90 (e). BNP-immunoreactivity first appeared in the supraoptic nucleus at P10. The number of BNP-immunoreactive cells markedly increased at P90. Bars = 50 μ m.

Fig. 3. Immunofluorescent images of BNP-immunoreactivity in the hypothalamus at P0 (a), lateral hypothalamic area at P15 (b), and retrochiasmatic supraoptic nucleus at P20 (c). BNP-immunoreactivity was not found in the hypothalamus at P0. BNP-immunoreactivity first appeared in the lateral hypothalamic area at P15 and retrochiasmatic supraoptic nucleus at P20. Bars = 50 μ m.

되었다(Figs. 1a, 2a, 3a). 이 시기에는 뇌실결핵과 시각로위핵을 제외한 시상하부의 나머지 부위에서는 양성반응 신경세포를 관찰할 수 없었으며, 시각로위핵에 존재하는 BNP면역반응 양성 신경세포가 뇌실결핵에 존재하는 BNP면역반응 양성 신경세포보다 더 많이 분포하였고 세포체의 크기는 20 μ m 이상으로 큰 세포들이었다. 생후 15일에는 뇌실결핵이나 시각로위핵을 제외한 나머지 시상하부 부위에서도 양성반응을 나타냈는데 매우 약한 반응을 보였다. 특히 뇌실결핵의 가쪽 큰 세포부분에서 생후 10, 15, 20, 30일로 연령이 증가할수록 BNP면역반응 양

성 신경세포 수가 증가하는 양상을 보였으며 생후 30일과 성숙 흰쥐에서는 큰 차이 없이 비슷한 수준을 유지하였다(Figs. 1a-1e, 4a-4c, 5a). 시각로위핵에서는 조직 단면의 앞뒤에 따라 약간의 차이가 있었는데 생후 10일부터 15일로 연령이 증가할수록 BNP면역반응 양성 신경세포의 수나 크기가 약간 증가하였으나(Fig. 2a, 2b), 생후 20일과 30일은 큰 차이가 없었다(Fig. 2c, 2d). Immunoperoxidase 염색에서는 생후 15, 20, 30일 모두에서 BNP면역반응이 비슷한 수준으로 시각로위핵에서 관찰되었으며(Fig. 4d-4f), immunoperoxidase 염색이나 면역형광염색

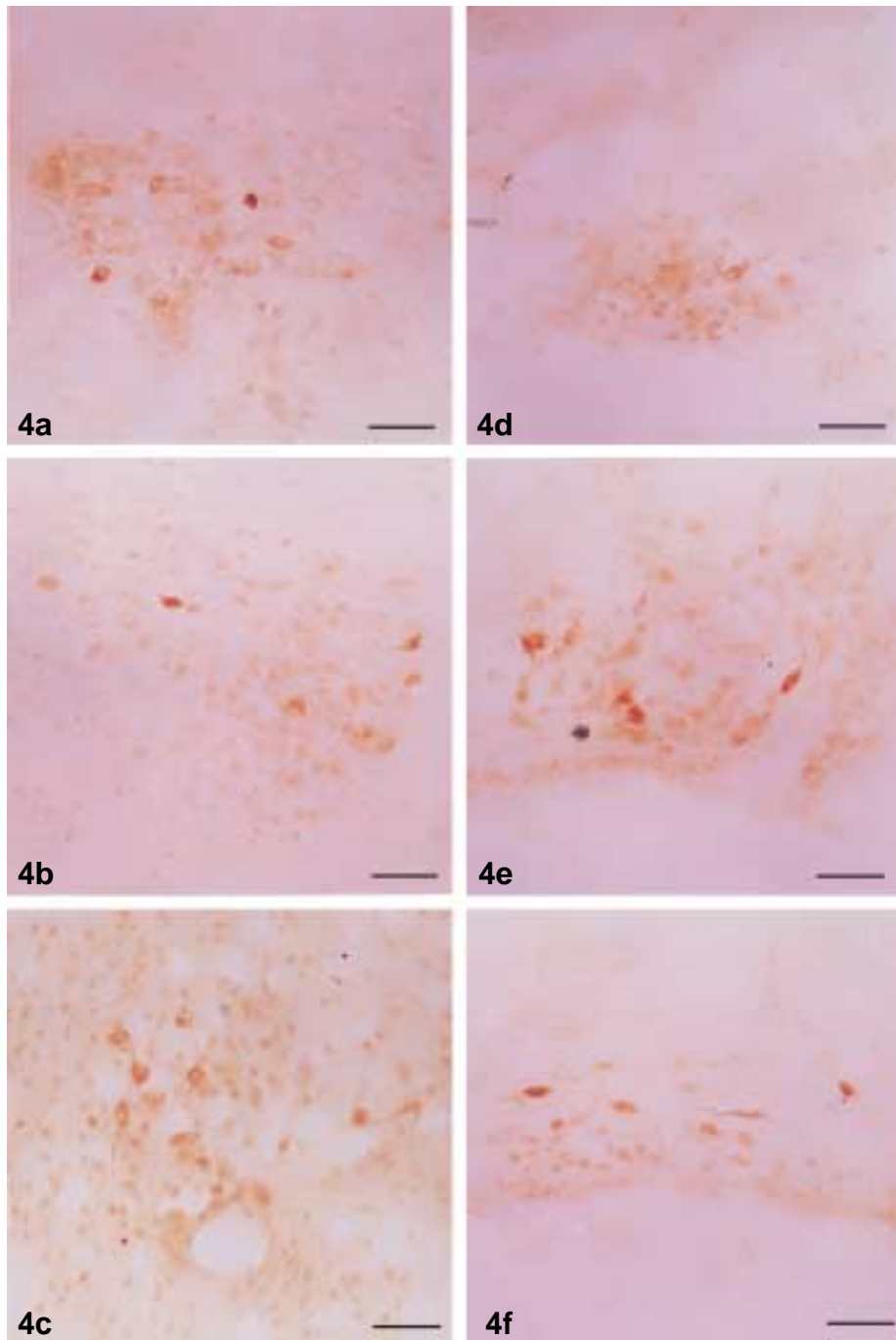


Fig. 4. Immunoperoxidase images of BNP-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus at P15 (a), P20 (b), P30 (c), and supraoptic nucleus at P15 (d), P20 (e), P30 (f). Their morphological character was similar. But BNP-immunoreactive fibers were remarkable in paraventricular nucleus at P30. Bars = 50 μ m.

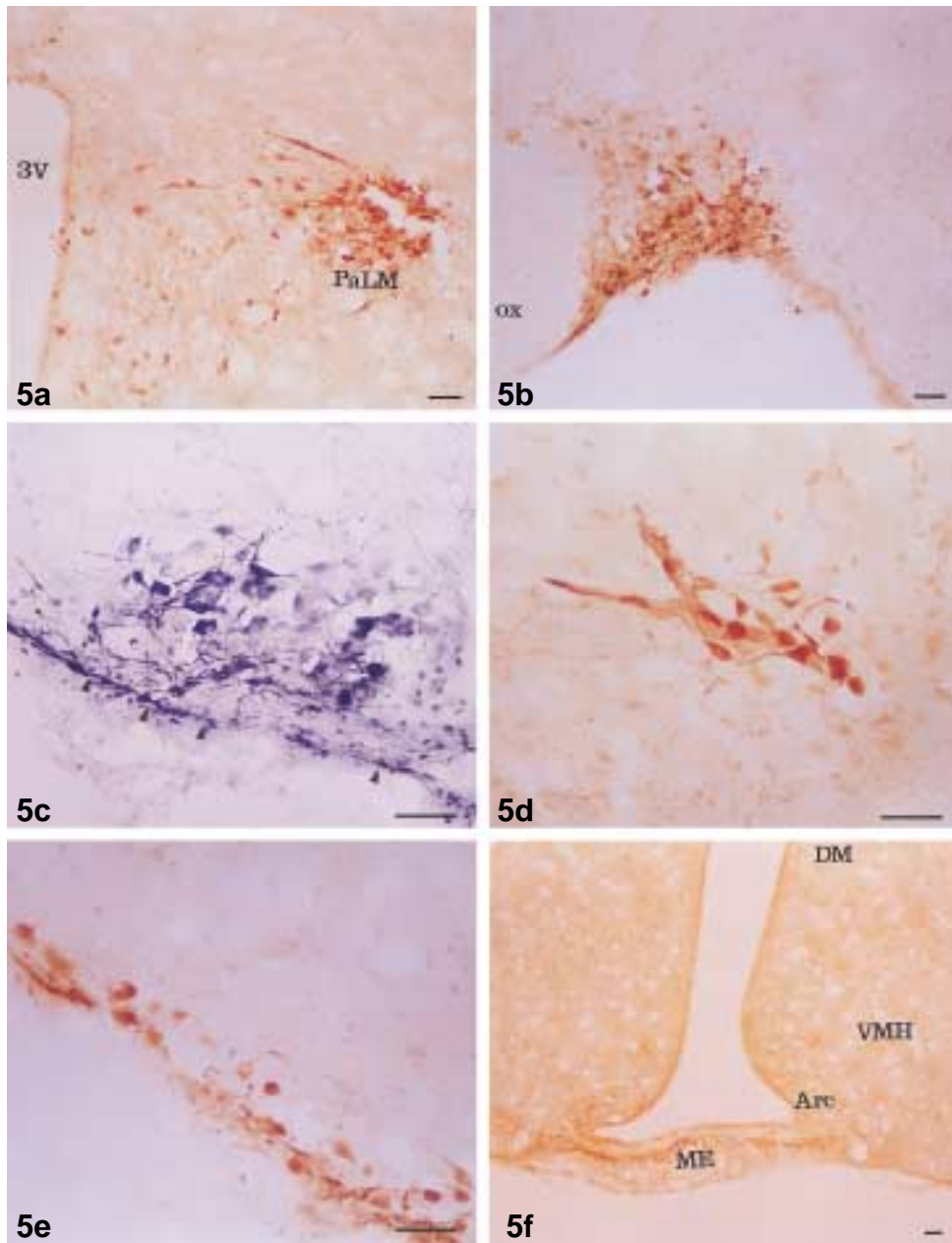


Fig. 5. Photomicrographs of BNP-immunoreactivity in the adult rat hypothalamus, peroxidase staining, (a) lateral magnocellular division of paraventricular nucleus (PaLM), third ventricle (3V); (b) supraoptic nucleus (SO); SO situated lateral to the junction of the optic chiasm (ox) contains the greatest concentration of BNP immunoreactive neurons. Note the absence of staining in the optic chiasm; (c) many positive cell bodies and fibers in the magnocellular neurons of the SO and dendrites of SO neurons in the cell-poor region abutting the pial surface (arrowheads); (d) lateral hypothalamic area; (e) retrochiasmatic supraoptic nucleus; (f) dorsomedial hypothalamic nucleus (DM), ventromedial hypothalamic nucleus (VMH), arcuate nucleus (Arc) and median eminence (ME). Bars = 50 μ m.

모두에서 성숙 흰쥐에서의 BNP면역반응 양성 신경 세포가 가장 두드러지게 관찰되었다(Figs. 2e, 5b, 5c). BNP면역반응 양성 신경세포의 세포체의 크기는 뇌실결핵과 시각로위핵 모두에서 대략 20~30 μm 정도였으며 연령이 증가할수록 많은 돌기를 가지고 있는 못극신경세포들이 주로 관찰되었다. 세포체 모양은 주로 원형이나 타원형이 가장 많았고 많은 신경섬유들이 세포체들 사이에 산재성으로 엉켜 신경그물을 형성하고 있었으며 수평으로 배열된 신경섬유들도 관찰되었다. 특히 입쪽 시상하부 대부분에서 BNP면역반응 양성 신경섬유들이 광범위하게 나타났으며, 전혀 염색되지 않은 시각교차와 뚜렷하게 구별되어 시각교차 바로 옆에 위치한 시각로위핵에서는 강한 양성 반응을 관찰할 수 있었다. 또한 시각로위핵의 큰세포부분 아래쪽에 연결막과 인접한 부분에서도 양성반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 5b, 5c, 5e). 뇌실결핵 중에서는 가쪽 큰세포부분에 BNP면역반응 양성 신경세포가 가장 뚜렷하게 관찰되었으며, 시각로위핵에 존재하는 BNP면역반응 양성 신경세포도 시각교차 바로 가쪽의 큰세포부분에서 가장 두드러지게 관찰되었다. 따라서 BNP를 함유하고 있는 세포들은 시상하부의 핵들 중에서도 주로 뇌실결핵과 시각로위핵에 존재하는 크기가 큰 신경분비세포들로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 큰신경분비세포들이 존재해 있는 시상하부의 이들 두 핵에서 BNP면역반응 신경세포의 분포를 비교해보면 뇌실결핵에서는 연령이 증가할수록 점점 증가하여 생후 30일 정도에는 성숙 수준에 도달하나, 시각로위핵에서는 어린 연령에서 양성 반응이 잘 나타나고 연령 증가에 따른 큰 변화가 없다가 성숙 흰쥐에서 가장 두드러진 양성 반응을 보인다는 것을 알 수 있었다(Figs. 1, 2).

또한 생후 15일에는 가쪽시상하부구역(lateral hypothalamic area)에서 처음으로 BNP면역반응 양성 신경세포와 신경섬유가 관찰되었으며, 성숙 흰쥐에서도 세포체들 사이에 신경섬유들이 신경그물을 형성하는 양상을 띠었다(Figs. 3b, 5d). 시각로위핵(supraoptic nucleus, retrochiasmatic)에서는 BNP면역반응 양성 신경세포 및 신경섬유들이 생후 20일에 두드러지게 나타났으며 성숙 흰쥐에서도 잘

관찰되었다(Figs. 3c, 5e). 또한 성숙 흰쥐에서는 셋째뇌실 주변의 등쪽안쪽시상하부핵(dorsomedial hypothalamic nucleus), 배쪽안쪽시상하부핵(ventromedial hypothalamic nucleus), 활꼴핵(arcuate nucleus) 및 정중융기(median eminence)의 안쪽 층에서 양성 반응을 나타냈다(Fig. 5f).

고 찰

이 실험에서는 흰쥐 시상하부에 존재하는 BNP함유 신경세포들의 발현을 생후 발달 과정에 따라 알아보았는데 실험 결과, 어린 쥐의 시상하부에서도 BNP면역반응 양성 신경세포는 정(2001)이 보고한 성숙 흰쥐의 시상하부에서와 같이 주로 뇌실결핵과 시각로위핵에서의 변화가 가장 두드러지게 관찰되었다.

중추신경계통에서 BNP면역반응에 관한 보고를 보면 BNP면역반응 신경섬유가 대뇌결질의 전층에 분포하는데 방사상으로 퍼지는 돌기를 가지고 있는 못극신경세포이거나 방추신경세포들이 많다고 하였다(Saper 등 1989). 이 실험에서는 어린 연령에서의 세포체 모양은 주로 원형이었으며 한 두 개의 짧고 두꺼운 신경돌기를 가지는 미성숙 신경세포들이 관찰되었는데 생후 연령이 증가할수록 뇌실결핵과 시각로위핵 모두에서 긴 신경돌기를 가진 못극신경세포가 가장 많이 관찰되었으며 수많은 신경돌기들을 내며 신경그물을 형성하였다. 또한 성숙 흰쥐에서는 시각로위핵의 큰세포부분 아래쪽에 연결막과 인접한 부분에는 시각로위핵의 신경세포 가지돌기들과 신경아교세포들이 많이 분포해 있는데 이 부분에서도 양성반응을 관찰할 수 있었다.

뇌의 나머지 부위에 대한 보고에서 BNP면역반응 신경섬유는 후각망울, 해마, 편도체의 바닥안쪽핵 등에도 넓게 분포하며, 소뇌에서는 조롱박신경세포층에서 연결막에 평행하게 주행하는 신경섬유들이 존재한다고 하였다(Saper 등 1989). 그리고 시상하부에서는 앞배쪽뇌실주위핵에서 AP면역반응 신경세포는 많이 출현하였으나 BNP면역반응은 전혀 나타나지 않았으며, 반대로 윙기유두핵에서는 BNP면역

반응은 잘 나타났으나 AP면역반응은 전혀 나타나지 않았다고 하였다(Standaert 등 1986, Saper 등 1989). 또한 시상하부의 일부에서는 AP면역반응 신경세포와 BNP면역반응 신경세포가 같이 분포하는 부분이 있는데 가쪽 시상하부에서였다(Standaert 등 1986). 이 실험 결과 생후 10일부터 뇌실결핵에서는 가쪽 큰세포부분에서 가장 뚜렷하게 관찰되었으며, 시각로위핵에서는 시각교차 바로 가쪽의 큰세포부분에서 가장 두드러지게 관찰되었고 가쪽 시상하부 구역에서는 생후 15일에 양성 반응이 나타나기 시작해 성숙해질 때까지 비슷한 양상을 나타냈다. 따라서 시상하부에서는 BNP면역반응은 태어난 후 어느 정도 시기가 지난 후부터 나타난다는 것을 알 수 있었으며, 위의 보고들과도 그 분포에 약간의 차이가 있었다.

지금까지 알려진 NP에 대한 형태학적 분포와 그 기능에 관한 보고를 보면, 흰쥐 뇌에서 대부분의 BNP면역반응은 ANP를 함유하고 있는 구조에서 주로 나타나기 때문에 BNP가 ANP와 유사한 항상성 기능을 가지고 있을 것이라고 생각된다고 하였다(Saper 등 1989). 그러나 아귀과 물고기 뇌에서는 NP면역반응은 여러 부위에 광범위하게 나타나는데 BNP나 CNP면역반응 간에는 뚜렷한 차이가 없었고, 사이뇌의 시각로앞부위에서 면역반응을 나타내는 신경 세포체를 관찰할 수 있었으며 신경섬유는 매우 많이 관찰되었는데 끝뇌, 시각로앞부위, 입쪽 시상하부 및 시상 가쪽 부분에서였다. 그러나 ANP면역반응은 아귀과 물고기 뇌에서는 관찰할 수 없다고 하여(Donald와 Evans 1992) 본 실험결과와 위의 보고들을 종합해 보면 NP는 포유동물과 포유류가 아닌 척추동물간에 그 분포나 기능에 상당히 차이가 있을 것이라 생각된다. 비포유류 척추동물에서 우세한 NP는 ANP가 아닌 BNP와 CNP 두 가지 형태이며 흰쥐를 포함한 포유동물에서는 세 가지 형태의 NP가 모두 뇌에서 합성, 분비될 것으로 사료된다. 특히 이 실험 결과 시상하부의 뇌실결핵과 시각로위핵에 광범위하게 나타나는 BNP면역반응 신경세포와 신경섬유의 분포로 보아 이 두 핵이 포유동물의 순환과 삼투압 등을 조절하는 중요한 부위이므로(Brody와 Johnson 1980) 물고기 뿐만 아니

라 대부분의 포유동물에서도 BNP의 기능은 크게 다르지 않을 것이라 생각할 수 있다. 또한 NP는 세포의 성장과 증식 및 포유동물의 발달 과정에 적절하게 관여할 것으로 여겨지고 있다(Ryan과 Gundlach 1998).

특히 시상하부의 시각로위핵과 뇌실결핵의 신경세포는 신경뇌하수체로 투사되며, 큰세포들로 구성된 신경분비세포라고 한 보고(Bargmann과 Scharrer 1951)에 비추어 볼 때 본 실험 결과, BNP는 시상하부의 핵들 중에서도 뇌실결핵과 시각로위핵에 위치하는 크기가 큰 신경분비세포들에 생후 10일부터 주로 존재한다는 것을 알 수 있었다. 또한 이 큰 세포들은 vasopressin과 oxytocin 같은 신경호르몬을 합성하고 이 펩타이드들은 축삭을 따라 이동하여 축삭종말에서 분비되며 신경뇌하수체의 창이 있는 모세혈관으로 흡수되어 혈류로 들어가는 시상하부 뇌하수체계통을 구성하는데 이 계통은 여러 가지 자극에 반응하여 혈류로 신경호르몬들을 이동시키는 경로가 되는 것으로 알려져 있다(Renaud와 Bourque 1991). 그러나 ANP와 같은 펩타이드들을 함유하는 신경세포들은 뇌실결핵의 앞쪽이나 안쪽 작은 세포 부분에 주로 분포하여 대부분 정중용기의 바깥층이나 시상하부이외의 부위로 투사되는 것으로 알려져 있다(Swanson 1987). 따라서 이 연구 결과를 종합해 보면, 뇌에서의 BNP의 기능에 대해서는 아직도 확실히 밝혀지지 않았지만, 시상하부에서 BNP는 생후 10일 경에 시각로위핵과 뇌실결핵의 큰 세포 부분에 위치하는 신경세포에서 주로 합성, 분비되어 신경호르몬을 분비하는 신경세포들에 신경조절물질로서 작용하여 신경분비 기능을 조절할 것으로 생각된다. 또한 발달 중인 시상하부의 시각로위핵과 뇌실결핵의 큰 세포 부분에 위치하는 신경세포들의 성장과 증식에도 관여할 것으로 생각된다. 그러나 BNP가 어떤 경로를 통해 그 기능을 나타낼 것인지를 확실히 밝히기 위해서는 앞으로 BNP 뿐만 아니라 ANP 및 CNP 등과 같은 펩타이드들이 같은 신경세포에 공존하는지 또한 시상하부에 분포하는 다른 신경호르몬 등과의 공존 유무 및 분포 양상의 차이점을 형태학적으로 밝혀보는 것도 매우 흥미로운 것이라 생각된다.

참 고 문 헌

- 정윤영 : 흰쥐 시상하부에서 brain natriuretic peptide 면역반응 신경세포의 분포에 관한 연구. 대한해부학회지 34 : 603-610, 2001.
- Bargmann W, Scharer E : The site of origin of the hormones of the posterior pituitary. *Am Sci* 39 : 225-229, 1951.
- Brody MJ, Johnson AK : Role of the AV3V region in the fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation, and hypertension. In : Martini L, Ganong WF (eds) *Frontiers in neuroendocrinology*, vol 6. Oxford University Press, London. pp. 249-292, 1980.
- Chang M, Lowe DG, Lewis M, Hellmiss R, Chen E, Goeddel DV : Differential activation by atrial and brain peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature* 341 : 68-72, 1989.
- Donald JA, Evans DH : Immunohistochemical localization of natriuretic peptides in the heart and brain of the gulf toadfish *Opsanus beta*. *Cell Tissue Res* 269 : 151-158, 1992.
- Imura H, Nakao K, Itoh H : The natriuretic peptide system in the brain : Implications in the central control of cardiovascular and neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol* 13 : 217-249, 1992.
- Langub MC, Watson RE, Herman JP : Distribution of natriuretic peptide precursor mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 356 : 183-199, 1995.
- Levin ER, Frank HJ : Natriuretic peptides inhibit rat astroglial proliferation : Mediation by C receptor. *Am J Physiol* 261 : 453-457, 1991.
- Morita E, Yasue H, Yoshimura M, Ogawa H, Jougasaki M, Matsumura T, Mukoyama M, Nakao K : Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 88 : 82-91, 1993.
- Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, Kambayashi Y, Inoue K, Imura H : Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans—Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 87 : 1402-1412, 1991.
- Ogawa Y, Nakao K : Brain natriuretic peptide as a cardiac hormone in cardiovascular disorders. In *Hypertension*, Eds. Laragh JH, Brenner BM, Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Vol. 1, Raven Press, New York. pp. 833-840, 1995.
- Renaud LP, Bourque CW : Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting and oxytocin. *Prog Neurobiol* 36 : 131-169, 1991
- Ruskoaho H : Atrial natriuretic peptide : Synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* 44 : 479-602, 1992.
- Ryan MC, Gundlach AL : Anatomical localization of preproatrial natriuretic peptide mRNA in the rat brain by in situ hybridization histochemistry : Novel identification in olfactory regions. *J Comp Neurol* 356 : 168-182, 1995.
- Ryan MC, Gundlach AL : Ontogenic expression of natriuretic peptide mRNAs in postnatal rat brain : Implications for development?. *Dev Brain Res* 105 : 251-268, 1998.
- Saper CB, Holmes HR, Hurley KM, Moga MM, Adams SA, Leahy KM, Needleman P : Brain natriuretic peptides: Differential localization of a new family of neuropeptides. *Neurosci Lett* 96 : 29-34, 1989.
- Sawchenko PE, Swanson LW, Vale WW : Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 1883-1887, 1984.
- Skofitsch G, Jacobowitz DM : Atrial natriuretic peptide in the central nervous system of the rat. *Cell Mol Neurobiol* 8 : 339-391, 1988.
- Standaert DG, Needleman P, Saper CB : Organization of atriopeptin-like immunoreactive neurons in the central nervous system of the rat. *J comp Neurol* 253:315-341, 1986
- Sudoh T, Kangawa KK, Minamino N, Matsuo H : A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332 : 78-81, 1988.
- Swanson LW : The hypothalamus. In *Handbook of chemical neuroanatomy*. Elsevier, Amsterdam, vol. 5, pp. 1-124, 1987.

Abstract

**Postnatal Development of Brain Natriuretic Peptide-
immunoreactive Neuron in the Hypothalamus of the Rat**

Yoon-Young Chung, Young-Wook Jeong, Young-Lan Park,
Jong-Joong Kim, Jeong-Seok Moon, Jin Fu, Jae-Wook Oh

Department of Anatomy, College of Medicine, Chosun University

Brain natriuretic peptide (BNP) is a neuropeptide, isolated from porcine brain that is homologous with atriopeptin. Magnocellular neurosecretory cells located in the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus synthesize and secrete neurohormones. The purpose of this study was to investigate distribution of BNP immunoreactivity throughout the rat hypothalamus from the day of birth to 30 days and adult using immunoperoxidase and immunofluorescent staining. The first BNP immunoreactive neurons appeared in the paraventricular and supraoptic nucleus at P10. In adult, BNP immunoreactivity was widely distributed throughout regions of the hypothalamus including dorsomedial hypothalamic nucleus, ventromedial hypothalamic nucleus, arcuate nucleus and internal layer of median eminence. The intensity of BNP immunoreactivity was weak in almost all hypothalamic nuclei except the paraventricular and supraoptic nuclei. BNP immunoreactivity was first observed in the lateral hypothalamic area at P15. In retrochiasmatic supraoptic nucleus, BNP immunoreactivity was first observed at P20 and remarkably distributed in adult. In the present study, distinct localization of BNP immunoreactivity was in the hypothalamic cell bodies and fibers. Although the role of BNP in the brain is yet to be determined, these results indicate that BNP in the neurons of hypothalamus play important role in the regulation of a variety of neurosecretory functions as a neuromodulator during postnatal development of the hypothalamus.

Key words : Brain natriuretic peptide, Hypothalamus, Rat, Postnatal development, Immunohistochemistry