

발생중인 흰 쥐 뇌하수체의 Acetylcholinesterase에 대한 연구

고신대학 의학부 해부학 교실

김순옥, 우재형

A Histochemical Study of Acetylcholinesterase in the Hypophysis of Developing Rat

Soon Ok Kim and Jae Hyung Woo

*Department of Anatomy
Kosin Medical College, Pusan 602-030, Korea*

= Abstract =

Experiments were made to determine the presence of cholinergic biomaker, acetylcholinesterase (AChE) in the rat hypophysis of development. A histochemical procedure for AChE was used to provide visualization of structure containing this enzyme.

AChE activity of developing rat hypophysis first demonstrated in 16 days and then the more increased activity was found in 19 and 20 days. Cells staining for AChE were found in the pars distalis and pars intermedia of the developing rat hypophysis. Nerve fibers staining for AChE activity were observed in the pars nervosa.

The presence of AChE and choline acetyltransferase (ChAT) (Sarah and Donald, 1983) in the pars intermedia and the pars nervosa is evidence for a cholinergic innervation to these regions. In the pars distalis, where other investigators have found muscarinic receptors, intense staining for AChE and absence of ChAT activity (Sarah and Donald, 1983) may indicate non-innervated, acetylcholine-sensitive sites.

I. 서 론

뇌하수체는 생명현상을 유지시키는데 중요한 역할을 하는 여러종류의 호르몬(hormone)을 분비하는데, 이런 호르몬들의 합성 및 분비가 hypothalamic peptide와 dopamine에 의하여 조절되는 사실이 이미 밝혀졌다.

여러 연구자들의 생화학적 그리고 조직화학적 연구에서 acetylcholine도 신경전달물질의 역할을 한다는 연구결과를 얻어 이런 사실을 재입증하였다. Koslow¹⁴⁾등 (1974)은 시상하부(hypothalamus)에서 고농도의 acetylcholine이 검출되는데 그 생리학적인 의의는 불분명함을 보고하였고 Müller 등¹⁹⁾(1977)은 신경전달물질(neurotransmitters)이 뇌하수체에 직접적인 조절요인으로 작용한다고 하였다.

이와같이 성숙된 뇌하수체에서 ACh의 연관성을 다룬 연구는 많이 있으나 발생중인 뇌하수체의 AChE를 검출한 연구발표는 희소하므로 본 연구자들은 발생중인 흰쥐 뇌하수체에서 신경전도물질인 AChE 활성반응의 변화를 규명하며, 아울러 뇌하수체 호르몬 분비시기를 추적하고자 실험을 실시하였다.

II. 실험재료 및 방법

실험재료

실험동물은 체중 200 g 내외되는 건강한 Sprague-Dawley계의 백서를 사용하였다. 백서는 인간에 비교하여 임신기간 중 배자기가 길기 때문에 여러기의 배자를 쉽게 구할 수 있는 잇점이 있는 것으로 알려졌다.

백서의 임신은 암, 수 한 쌍의 백서를 한 쥐장에 넣고 아침 저녁 질 도말검사를 하여 교접이 확인된 때를 발생 0일로 하였다. 임신 13일 5마리, 14일 6마리, 15일 6마리, 16일 6마리, 17일 6마리, 18일 6마리, 19일 6마리 그리고 20일 5마리, 합계 46마리의 임신 쥐를 사용하였다.

실험방법

임신백서를 ether마취 시킨 후 복부의 하중양선으로 개복하여 양쪽 자궁을 적출하고 자궁을 절개한 후 배자를 적출하였으며 살아있는 배자의 전체 뇌 부분을 분리하여 일부는 일반적인 구조를 보기 위하여 통상적인 염색법 hematoxylin-eosin 염색에, 일부는 조직화학적 연구에 사용하기 위하여 즉시 cryostat로 6 μ m두께의 동결절편을 만들었다.

Acetylcholinesterase 활성반응 검출은 Kar-novsky¹¹⁾(1964)가 고안한 방법에 의하여 실시하였는데 배지에는 acetylthiocholine iodide, 0.1M malate buffer, 0.1M sodium citrate, 30mM CuSO₄ 그리고 5mM potassium ferricyanide가 함유되었으며 37°C에서 2시간 동안 incubation 하였다. 그후 1% ammonium sulfide 액에 2~3분간 침적시킨 후 glycerol jelly로 봉입하여 관찰하였다. Acetylcholinesterase 활성반응의 불가역억제제로서 10⁻⁶M 및 10⁻³M의 diisopropylfluorophosphate(DFP) 용액을 사용하였다.

incubation 배지에 주기질인 acetylthiocholine-iodide가 제거된 표본 및 10⁻⁶M 및 10⁻³M DFP에 처리한 표본에서는 incubation 시간의 장단에 관계없이 AChE 활성반응은 음성으로 관찰되었다.

각 군마다 H-E counter-staining 을 병행하였다.

III. 결과 및 고찰

발생 13일된 백서 뇌하수체의 H-E 소견은 3엽 즉 원위부(pars distalis), 중간부(pars intermedia), 신경부(pars nervosa)의 각 부위가 뚜렷하지는 않으나 희미하게나마 그 윤곽은 알 수 있었다. 3엽이 비교적 뚜렷하게 구획되어지는 때는 발생 16일된 뇌하수체에서였으며, 발생 19일된 뇌하수체의 광학현미경 약확대(X 40)상은 성숙한 뇌하수체 약확대상과 거



Fig. 1. The rat hypophysis of 19 days of development. H-E staining x40
PD, pars distalis ; PI, pars intermedia;
PN, pars nervosa. 6 μ m section.

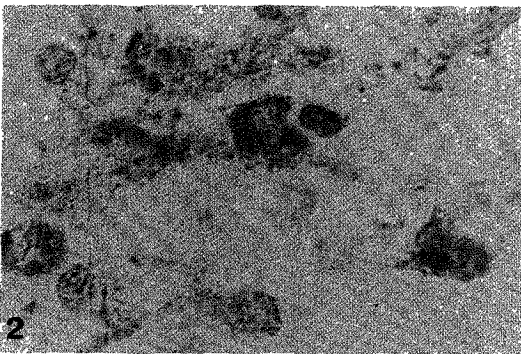


Fig. 2. The pars distalis of the adult rat.
Stained for AChE, x400

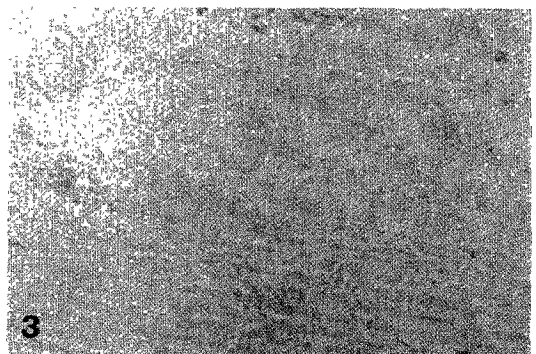


Fig. 3. The rat pars distalis of 17 days of development.
Stained for AChE. Observed potential ACh-sensitive cells. x400

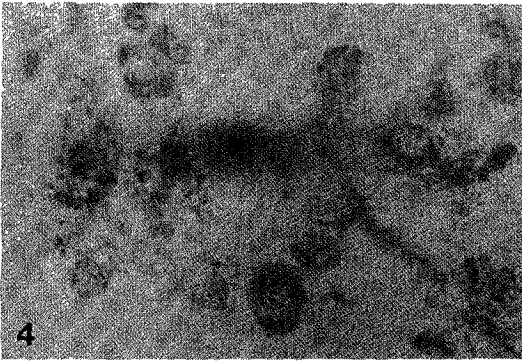


Fig. 4. The rat pars distalis of 20 days of development.
Stained for AChE. x400

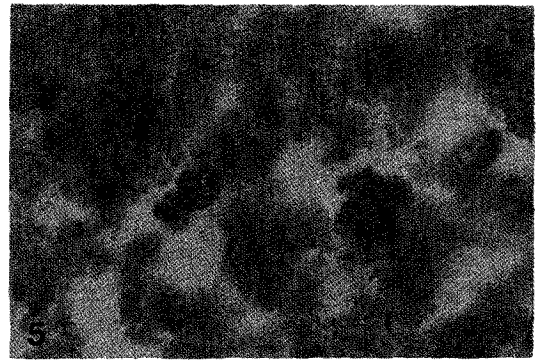


Fig. 5. H-E counter-staining of Fig. 4. x450

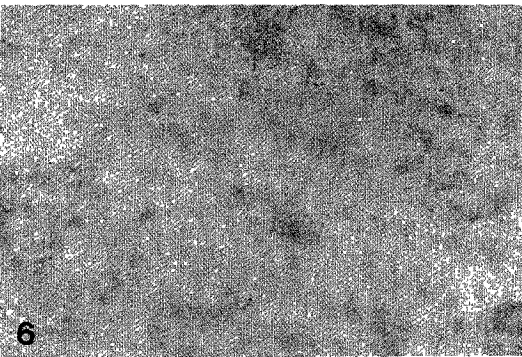


Fig. 6. The rat pars intermedia of 20 days of development.
Stained for AChE. x400

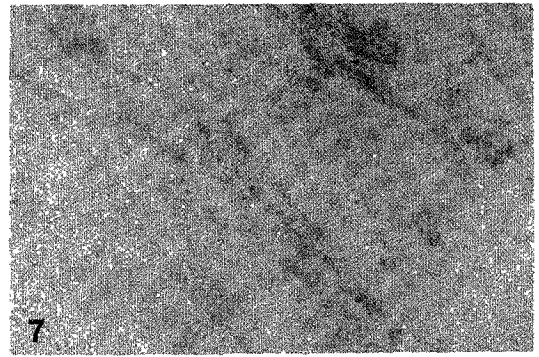


Fig. 7. The rat pars nervosa of 20 days of development.
Stained for ACh. x400

의 비슷하였다(Fig.1).

AChE의 조직화학적 분포(localization)는 발생 16일된 뇌하수체 3엽 모두에서 관찰되었으며 그 활성을 각 엽 모두에서 극히 경미하였다. 발생 시간이 경과될 수록 AChE 염색성은 강하여졌으며 20일 된 뇌하수체에서는 강한 AChE 염색성을 보였다(Fig. 4). 그러나 성숙한 뇌하수체의 AChE 활성(Fig. 2)보다는 약하였다. 원위부에 있어서 AChE활성은 이 부위 전체에 산재되어 있는 염기호성세포로 인정되는 세포에서 관찰되었으며(Fig. 3, 4, 5) 또한 이 세포들은 흔히 혈관 주변에 밀집되어 나타나기도 하였다.

중간부에 있는 실질세포(parenchymal cells)에서도 AChE 활성이 관찰되었으며 그 AChE 활성도는 원위부에서 보다 약하였다.

신경부에서는 AChE활성을 가진 신경 섬유가 이 부위에 산재되어 있는 것이 관찰되었다.

이상의 결과는 Sarah 와 Donald²²⁾(1983)가 성숙 백서 뇌하수체의 AChE 활성의 국소적 분포(localization)를 밝힌 실험결과와 일치되었다.

Koelle¹²⁾(1963)는 choline acetyltransferase (ChAT)및 AChE 는 cholinergic neuron 의 biomarker 로서 널리 사용되고 있는 바 ChAT 의 neuronal localization 은 cholinergic neuron 에 매우 특이적이지만 AChE 은 비신경성 세포에서도 관찰됨을 발표하였다.

Cholinergic neuron 전 영역에서 AChE 가 강한 염색 반응을 나타내는 것은 잘 알려져있으며 cholinceptive nerve 와 그 주변에 있는 효과세포(effector cells)는 AChE를 포함하는 것이 관찰되나 cholinergic neuron 보다는 덜 강하게 염색된다고 알려졌다(Lehmann & Fieber, ¹⁷⁾ 1979).

Koelle 와 Gessey¹³⁾(1961)은 고양이의 누두경(infundibular stalk)과 시상하부(hypothalamus)에서 AChE를 함유하는 신경섬유를 관찰하였으나 Whitaker 와 Labella²⁶⁾(1972)는 백서

뇌하수체의 신경부에서 AChE를 검출하지 못하였다. 이와같은 차이는 이들 연구에 사용된 고정액 차이 때문에 후자의 연구에서는 신경 섬유가 염색되지 않은 것으로 생각된다고 Sarah 등²²⁾(1983)은 논하였다.

앞의 결과에서 기술하였듯이 본 실험에서는 AChE 활성은 원위부와 중간부에서 관찰되었다. Koelle 와 Gessey¹³⁾(1961)은 고양이에서 AChE 활성이 이들 부위에서 관찰되지 않았다고 보고하였다. Whitaker 와 Labella¹⁵⁾(1972)은 백서의 원위부에 산재되어 있는 세포와 중간부에 있는 세포집단들에서 AChE 활성은 경미한 양성반응이 관찰되었다고 하였다. 이와 유사한 관찰이 토끼에서도 보고되었다(Dumont, ³⁾ 1956). 이들 부위에 ChAT 활성도 강하게 검출되므로 원위부와 중간부의 분비세포는 cholinceptive인 것으로 추론된다.

정중용기(median eminence)에서는 cholinergic nerve terminal 이 많이 분포되어 있지만(Carson et al., ²⁾ 1977, Hoover et al., ⁸⁾ 1978) AChE 은 극히 소량인 것으로 알려졌다. 정중용기에 있는 신경종말(nerve terminal)로부터 유리된 약간의 AChE 는 문맥순환(portal circulation)을 통하여 원위부에 이동되어 오랫동안 머물면서 원위부 세포에 영향을 미치는 것으로 추측되며 이 부위에 있어 AChE는 선택적으로 불확실한 어떤 기능을 담당하는 것으로 설명되고 있다.

Vasopressin(Sladek & Joynt, ²⁴⁾ 1979), Oxytocin(Nordmann et al., ²⁰⁾ 1971), CRF 및 LHRH(Müller et al., ¹⁹⁾ 1977) 의 분비에 있어서 ACh 의 우선적 영향은 시상하부의 중재로 생각되어진다.

몇몇의 연구자들은 뇌하수체에 있어서 ACh 의 직접적인 효과와 뇌하수체에 있는 cholinergic biomaker의 생리화학적 의의를 논하였다. 이들 연구에서 ACh, methacholine 또는 carbachol 로써 뇌하수체를 자극하면 GH(Vivian Labella, ²⁵⁾ 1971; Young et al., 1979, Mukheziee et al., ¹⁸⁾ 1980), TSH(Vivian & Label-

la.²⁵⁾1971), a-MSH(Hadley et al., 1975) 그리고 Vasopressin(Gosbee & Lederis,⁶⁾ 1972)의 유리가 증가한다고 하였다.

그러나 발생 중인 동물 뇌하수체의 AChE 활성과 기능을 연구한 실험은 거의 없다. 따라서 본 연구자들은 발생 중인 백서 뇌하수체의 AChE 활성이 나타나는 시기 및 활성이 여하히 변화하는 지를 규명하고자 실험을 실시한 결과 AChE 활성의 검출은 발생 16일에서부터였으며 AChE 활성의 분포부위는 원위부, 중간부, 그리고 신경부에서 었다. AChE 활성의 강도도 원위부, 중간부, 신경부의 순위였으며 그 강도는 발생시간이 경과될수록 증가되었다. 이와 같은 분포 부위는 발생 16일에서 20일까지 동일하였다.

출생 후 부터 어느 시기까지는 AChE 활성의 양상이 어떻게 변할지는 의문으로 추후 출생 후의 변화를 계속 밝히고자한다.

IV. 결 론

발생 중인 백서 뇌하수체에 있어 cholinergic biomaker 의 하나인 acetylcholinesterase(AChE)활성 변화를 관찰하고자 본 실험을 실시하여 다음과 같은 실험결과를 얻었다.

백서 뇌하수체는 발생 13일에 이미 거의 발생되어 있었다.

AChE 활성이 발생 16일 뇌하수체에서 관찰되기 시작하여 시간이 경과할 수록 그 강도가 강화여졌다.

뇌하수체의 각 부위에 따른 AChE 활성도는 원위부, 중간부 및 신경부의 순위였다. 이러한 순위는 발생 16일에서 발생 20일 까지 계속 되었다.

뇌하수체에 있는 AChE 의 분포(localization)를 밝히는 것은 cholinergic anatomy 를 이해하는데 기초지식이 될 것 같으며 뇌하수체의 기능에 있어 ACh 역할을 이해하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Burt RP, Taylor RL : Muscarinic receptor binding in sheep anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 30 : 344, 1980
2. Carson KA, Nemeroff CB, Rone MS, Youngblood WW, Prange AJ, Hanker JS, Kiker JS : Biochemical and histochemical evidence for the existence of a tuberinfundibular cholinergic pathway in the rat. *Brain Res* 129 : 169, 1977
3. Dumont ML : Localisation histochimique d'acetylcholinesterase dans l'adenohypophyse du lapin. *C.R. hebdomadaire des seances de l'Academie des Sciences, Paris* 242 : 296, 1956
4. Gallardo M, Cannata MA, Tramezzani JH : An uneven distribution of choline acetyltransferase activity in the pituitary neurointermediate lobe of the rat. *J endocrinol* 24 : 407, 1975
5. Gallardo MRGP, Cannata MA, Tramezzani JH : Choline acetyltransferase activity in the pituitary neurointermediate lobe of the rat. *J Neural Trans* 41 : 93, 1977
6. Gosbee J, Lederis L : In vivo release of antidiuretic hormone by direct application of acetylcholine of carbachol to the rat neurohypophysis. *Can J Physiol Pharmacol* 50 : 618, 1972
7. Hardly ME, Hiruby VJ, Bower A : Cellular mechanisms controlling melanophore stimulating hormone (MSH) release. *Gen Comp Endocr* 26 : 24, 1975
8. Hoover DB, Hancock JC : Autoradiographic localization of muscarinic receptors in the rat pituitary gland, *Pharmacologist* 24 : 140, 1982
9. Hoover DB, Hancock JC, Tally NS : Binding of [3H] quinuclidinyl benzilate to regions of rat pituitary and hypothala-

- mus. Brain Res Bull 6 : 209, 1981
10. Hoover DB, Muth EA, Jacobowitz DM : A mapping of the distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. Brain Res 153 : 295, 1978
11. Karnovsky, MJ and Root, L. : A "direct colouring" thiocholine method for cholinesterase. J Histochem Cytochem 12 : 219, 1964
12. Koelle GB : cytological distributions of cholinesterases. In Handbook of Experimental Pharmacology (Edited by Eichler O and Frah A) Heidelberg : Springer-Verlag. 15, 187, 1963
13. Koelle GB, Geesey CN : Localization of acetylcholinesterase in the neurohypophysis and its functional implications. Proc Soc Exp Biol Med 106 : 625, 1961
14. Koslow SHG, Racagni G, Costa E : Mass fragmentographic measurement of norepinephrine, dopamine, serotonin and acetylcholine in seven discrete nuclei of the rat telencephalon. Neuropharmacology 13 : 1123, 1974
15. Labella FS, Shin S : Estimation of cholinesterase and choline acetyltransferase in bovine anterior pituitary, posterior pituitary, and pineal body. J Neurochem 15 : 335, 1968
16. Lederis K, Livingston A : Acetylcholine and related enzymes in the neural lobe and anterior hypothalamus of the rabbit. J Physiol Lond 201 : 695, 1969
17. Lehmann J, Fibiger HC : Acetylcholinesterase and the cholinergic neurons. Life Sci 25 : 1939, 1979
18. Mukheizee A, Snyder B, McCann S : Characterization of muscarine receptors on intact rat anterior pituitary cells. Life Sci 27 : 475, 1980
19. Müller EE, Nistico G, Scapagnini U : Neurotransmitters and anterior pituitary function. New York. London : Academic Press. pp. 142~323, 1977
20. Nordmann JJ, Bianchi RE, Dreifuss JJ, Ruf KB : Release of posterior pituitary hormones from the entire hypothalamoneurohypophyseal system in vitro. Brain Res 25 : 669, 1971
21. Resenberry TL : Acetylcholinesterase. Adv Enzymol 43 : 103, 1975
22. Sarah EB, Donal BH : Localization of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the rat pituitary gland. Histochemical Journal 15 : 1087, 1983
23. Schaeffer JM, Hsueh AJW : Acetylcholine receptors in the rat anterior pituitary gland. Endocrinology 106 : 1377, 1980
24. Sladek CD, Joynt RJ : Cholinergic involvement in osmotic control of vasopressin release by the organ-cultured rat hypothalamoneurohypophyseal system. Endocrinology 105 : 367, 1979
25. Vivian SR, Labella FS : Cellular mechanisms of anterior pituitary secretions : estimation of several hormones released in vitro. Mem Soc Endocr 19 : 203, 1971
26. Whitaker S, Labella FS : Electron microscopic histochemistry in the posterior, intermediate and anterior lobes of the pituitary. Zellforsch 130 : 152, 1972
27. Young P, Bickness R, Schofield J : Acetylcholine stimulates growth hormone secretion, phosphatidyl inositol labelling, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ efflux and cGMP accumulation in bovine anterior pituitary glands. J Endocr 80 : 203, 1979