

## 흰쥐 시상하부의 Vasopressin 및 Oxytocin 분비세포에 관한 면역조직화학적 연구

### Immunocytochemical Localization of Vasopressinergic and Oxytocinergic Neurons in the Hypothalamus of the Rat by Monoclonal Antibodies

서울大學校 醫科大學 解剖學教室

趙 士 先 · 李 夏 圭 · 白 相 豪

#### 서 론

Vasopressin과 oxytocin은 신경하수체(neurohypophysis)의 축삭종말(axon terminals)에서 분비되며 이들을 합성하는 신경세포체(cell body)는 시상하부(hypothalamus)에 위치한다. 지금까지 호르몬검출법(hormone assay)이나 면역조직화학(immunohistochemistry)방법 등에 의하여 이들 두 호르몬은 주로 시상상핵(supraoptic nucleus)과 방실핵(paraventriculeus)을 이루고 있는 세포들로부터 긴 축삭(axons)을 통하여 뇌하수체후엽까지 이동(transport)되어 분비되는 것으로 알려져 있다(Dierickx, 1980; Silverman & Zimmerman, 1983; Swanson & Sawchenko, 1983).

이들 분비세포들의 분포양상에 대하여 Sokol등(1976)은 oxytocin과 vasopressin을 분비하는 세포들이 시상상핵과 방실핵에 각각 같은 비율로 분포한다고 하였고, Swaab등(1975)의 형광항체법에 의하면 시상상핵 및 방실핵 모두에서 vasopressin분비세포가 oxytocin분비세포보다 더 많이 존재하는 것으로 보고되어 있다. 이와 같이 두 종류의 호르몬 분비세포들의 숫적분포비는 연구자들에 따라 그 결과가 일치하지 않고 있다.

이는 연구방법에 따라 그 결과가 달라짐을 의미하며 이들 세포들을 형태학적으로 가시화(visualize)하는데 중요한 관건이 항체의 특이성에 달려있기 때문이다(Swaab & Pool, 1975). 지금까지 사용된 항체들은 동물체내에 항원을 반복 주사하여\*얻은 항혈청으로서, 필연적으로 불필요한 항체들이 섞여있어 특이성이 떨어지고 교차반응을 일으키는 문제를 안고 있었다.

저자들은 세포융합법에 의하여 oxytocin 및 arginine

vasopressin에 대한 단세포군 항체를 개발하여(조등, 1984) 이를 흰쥐뇌조직에 적용한 결과 다소의 지견을 얻었기에 보고한다.

#### 재료 및 방법

실험동물: 체중 300g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐 10마리를 pentobarbital마취하에 개복하여 과심실을 통하여 10% neutral buffered formalin, lysine periodate, Bouin's solution등을 관류시킨 후 뇌를 적출하여 다시 같은 고정액에 충분히 고정되도록 하였다. 고정이 끝난 다음 PBS에 12시간 세척시키고 10% sucrose용액에 침적시킨 다음 cryostat를 사용하여 10um 두께의 연속 동결절편을 만들었다. 먼저 cresyl violet 염색을 하여 시상하부 조직절편을 선정한 다음 면역조직화학반응을 시행하였다.

항체: 본 교실에서 만든 oxytocin과 arginine vasopressin에 대한 각각의 단세포군항체(monoclonal antibody)를 제 1 항체로, 그리고 제 2 항체는 peroxidase가 표지된 rabbit anti-mouse immunoglobulin(Dako)을 각각 사용하였다.

면역조직반응: 동결절편을 PBS로 충분히 세척한 다음 제 1 항체를 4°C에서 24시간 반응시켰다. 다시 PBS로 10분씩 3회 세척한 후 제 2 항체를 실온에서 1시간 동안 반응시키고 또 다시 PBS로 3회 세척하였으며 이를 기질액(substrate)에 넣어 정색반응을 시행하였다. 기질액은 PBS에 3, 3'-diaminobenzidine을 포화시킨 것으로 사용직전에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 0.003%가 되도록 첨가하였다. 이상과 같이 처리한 조직을 통상의 탈수과정을 거쳐 balsam 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

세포의 계수: Vasopressin과 oxytocin항체를 연속된 인접조직에 각각 반응시킨 다음 매 100 $\mu$ m 두께마다 대

† 1984년 7월 14일 접수

표적인 조직을 선정하였다. 각 표본의 시삭상핵과 방실핵에 나타나는 총 세포수를 계수하여 2종 세포의 출현비율로 나타내었다.

### 성 적

흰쥐의 시상하부에서 면역조직화학반응에 의하여 oxytocin 및 vasopressin을 분비하는 세포들을 관찰한 결과 이들 분비세포들은 원형, 난원형 또는 방추형으로 직경이 10~15 $\mu$ m 정도 되었으며, 주로 시삭상핵(제 3도)과 방실핵(제 4도)에서 나타났으며, 궁상핵(arcuate nucleus)(제 6도), 부시삭상핵(accessory supraoptic nucleus), 뇌궁주핵(perifornical area)(제 5도), 실주핵(periventricular area), 시교차상핵(suprachiasmatic nucleus)등에서도 소수 출현되었다.

위와같은 여러 부위중에서 이들 분비세포들이 대다수 존재하는 시삭상핵과 방실핵에서의 분포양상을 비교하기 위하여 100 $\mu$ m 두께의 간격으로 조직을 선정할 다음 분비세포 수를 계수하였다. 시삭상핵에서는 oxytocin 및 vasopressin을 분비하는 세포들이 전반부(anterior portion)에서 중심부(middle portion)으로 갈수록 그 수가 증가하다가 후반부(posterior portion)로 갈수록 감소하는 양상을 나타냈으며, 그 수에 있어서는 vasopressin을 분비하는 세포가 819개이었으며 oxytocin을 분

비하는 세포가 699개로 이들의 비율은 대체로 6:5 정도로 나타났다(제 1도). 방실핵에서의 oxytocin분비세포들은 시삭상핵에서와 마찬가지로 전반부에서 중심부로 갈수록 그 수가 증가하다가 후반부로 갈수록 감소하는 양상을 나타냈으나, vasopressin을 분비하는 세포는 전반부에서는 전혀 관찰되지 않다가 중심부부터 나타나기 시작하여 그 수가 급격히 증가한 다음 다시 격감되는 것을 관찰할 수 있었고, 그 수에 있어서는 oxytocin을 분비하는 세포가 536개이었으며, vasopressin을 분비하는 세포가 262개로 이들의 비율은 대체로 2:1 정도로 출현되었다(제 2도).

### 고 찰

Vasopressin과 oxytocin은 주로 시상하부내의 시삭상핵과 방실핵을 이루고 있는 세포들에 의하여 만들어 진다는 것이 비교적 오래전부터 알려져 있다(Orkand and Palay, 1966; Sokol and Valtin, 1967; Burford 등, 1974; Choy and Watkins, 1977). 또한 최근에 Rhodes 등(1981)과 Kawata and Sano(1982)가 각각 흰쥐와 원숭이를 대상으로 조사한 바에 의하면 시삭상핵과 방실핵 외에도 전교련핵(anterior commissural nuclei), 부시삭상핵(accessory supraoptic nucleus), 실주핵(periventricular area), 뇌궁주핵(perifornical area), 분계조핵(nucleus of the stria terminalis), 분계조내부(pars interna of the stria terminalis)에서 oxytocin과 vasopressin 세포들이 존재한다고 하였다.

본 실험결과 oxytocin 및 vasopressin분비세포들은 시삭상핵과 방실핵에 집중되어 관찰되었고, 궁상핵(arcuate nucleus), 부시삭상핵(accessory supraoptic nucleus), 뇌궁주핵(perifornical area), 실주핵(periventricular area), 시교차상핵(suprachiasmatic nucleus)에서도 소수 출현되었다. 이와같은 결과는 이미 발표된 여러 연구자들의 결과와 대체로 일치하며 특히 시삭상핵 및 방실핵 이외의 oxytocin 및 vasopressin분비세포들의 존재(Rhodes 등, 1981; Kawata and Sano, 1982)를 재확인할 수 있었는데 이는 본 실험에 사용한 vasopressin 및 oxytocin 항체의 특이성을 입증하는 것으로 사료되며 과거에 이들 2종의 호르몬이 시삭상핵과 방실핵에 극한된 것으로 보고된(Orkand and Palay, 1966; Sokol and Valtin, 1967; Burford 등, 1974; Choy and Watkins, 1977) 것은 항체의 특이성이 그만큼 낮아 산발적으로 출현되는 분비세포들을 감지(detect)할 수 없는데서 온 결과로 생각된다. 이들 분비세포들은 원형·난원형 또는 방추형으로 직경이 10~15 $\mu$ m 정도로 고양이

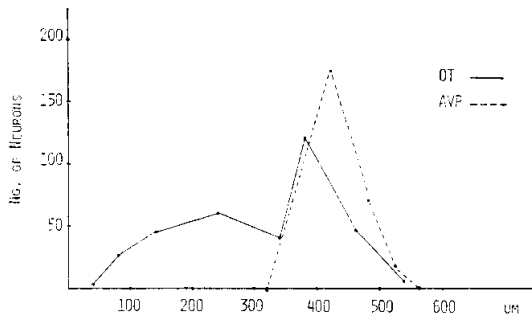


Fig. 1. Distribution of OT and AVP in SON

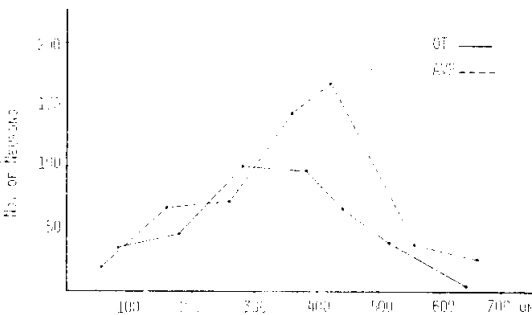


Fig. 2. Distribution of OT and AVP in PVN

(Reaves, Jr. and Hayward, 1979)에서 마찬가지로 이들 분비세포 사이의 형태학적 차이를 발견할 수 없었다. 한편 George 등(1975)이 흰쥐 시상하부 조직을 부위별로 radioimmunoassay에 의하여 oxytocin을 조사한 바에 의하면 정중용기(median eminence)에서 가장 많은 양이 검출되었고 다음이 시삭상핵·방실핵·궁상핵 등의 순서이었다.

Sokol 등(1976)은 oxytocin과 vasopressin 분비세포수를 비교한 바 시삭상핵과 방실핵에 각각 같은 비율로 존재한다고 하였으며 Dayer 등(1973)은 oxytocin세포는 시삭상핵에서, 그리고 vasopressin 세포는 방실핵에서 각각 더 많이 출현된다고 하여 상반된 주장을 하였다.

본 실험의 결과는 oxytocin분비세포와 vasopressin분비세포의 수의비율이 시삭상핵에서는 5:6, 방실핵에서는 2:1 정도되었다. 이는 Sokol 등(1976)의 결과와 대체로 비슷한 결과이나 Swaab 등(1975)이 방실핵에서 vasopressin과 oxytocin분비세포 수를 각각 50%와 40%로 보고한 것과는 상반된다.

2종세포의 조직분포비는 사용한 항체의 특이성과는 직접 관계되므로 서로 다른 항체를 사용한 결과가 달라질 수 있다. 본 실험에 사용한 단세포군 항체들은 조직절편상에서 vasopressin과 oxytocin분비세포를 면역조직화학적으로 감별 염색할 수 있는 특이성이 증명된(조등, 1984) 것으로 두 세포의 감별염색에 높은 신뢰도를 보인 것으로 사료된다. 그러나, 조직절편상에서 세포수를 계수하는데는 대표적인 절편을 선정하여 상대적인 수를 비교할 수 밖에 없으므로 계수방법이나 조직절편의 선정에 따라서는 그 결과가 차이를 보일 것으로 사료된다.

## 결 론

흰쥐의 시상하부에서 oxytocin과 vasopressin분비세포들을 동경하므로써 그 분포양상을 관찰하기 위하여, 성숙한 흰쥐 뇌조직을 대상으로 oxytocin 및 vasopressin에 대한 단세포군 항체를 이용하여 면역조직화학 반응을 시도한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Oxytocin과 vasopressin분비세포의 대다수는 시삭상핵과 방실핵에서 관찰되었으며, 궁상핵(arcuate nucleus), 부시삭상핵(accessory supraoptic nucleus), 뇌궁주핵(perifornical area), 실주핵(periventricular area), 시교차상핵에서도 몇몇 분비세포들이 존재하였다.

2. 시삭상핵에서는 oxytocin 분비세포와 vasopressin 분비세포들의 분포양상은 비슷하였으나 그 수에 있어서는 vasopressin분비세포가 다소 더 많이 출현되었다.

3. 방실핵의 전반부에서는 oxytocin분비세포만 관찰되다가 후반부에서는 oxytocin 분비세포와 vasopressin 분비세포가 공존하였으며 방실핵에서의 oxytocin분비세포 수는 vasopressin분비세포 수에 비하여 2배 정도 많이 나타났다.

4. Oxytocin 및 vasopressin을 분비하는 세포들은 원형·난원형 또는 방추형으로 직경이 10~15 $\mu$ m이었고 이들 세포 사이의 형태적 차이는 보이지 않았다.

## —Abstract—

### Immunocytochemical Localization of Vasopressinergic and Oxytocinergic Neurons in the Hypothalamus of the Rat by Monoclonal Antibodies

Sa Sun Cho, Ha Kyu Lee and Sang Ho Baik

Department of Anatomy, College of Medicine  
Seoul National University

To investigate the distribution of vasopressin and oxytocin neurons, tissue sections of the hypothalamus were examined by immunoperoxidase technique and light microscopy using monoclonal antibodies to oxytocin and arginine vasopressin.

Our immunocytochemical investigations reveal both vasopressin and oxytocin neurons in the supraoptic nucleus(SON), the paraventricular nucleus(PVN), the arcuate nucleus, the suprachiasmatic nucleus, the accessory supraoptic nucleus, the perifornical area and the periventricular area. Perikarya of these two types neurons did not show distinct morphological differences at the level of light microscopy. Among these nuclei, they were mainly distributed in the SON and PVN, and the ratio of the number of vasopressin neurons to that of oxytocin neurons was 6:5 in the SON, and 1:2 in the PVN. So the SON and PVN are indistinguishable in that both cell types are present in both nuclei, but impressively vasopressin neurons were found only in the posterior half of the PVN.

## REFERENCES

Burford, G.D., R.E.J. Dyball, R.L. Moss and B.T.

- Pickering: *Synthesis of both neurohypophysial hormones in both the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. J. Anat.* 117:261-269, 1974.
- Choy, V.J. and W.B. Watkins: *Immunocytochemical study of the hypothalamo-neurohypophysial system. Cell Tissue Res.* 18:467-490, 1977.
- Dierickx, K.: *Immunocytochemical localization of the vertebrate cyclic nonapeptide neurohypophysial hormones and neurophysins. Int. Rev. Cytol.* 62: 119-185, 1980.
- Dyer, R.G., R.E.J. Dyball, and J.F. Morris: *The effect of hypothalamic deafferentation upon the ultrastructure and hormone content of the paraventricular nucleus. J. Endocr.* 57:509-516, 1973.
- George, J.M., S. Staples, and B.M. Marks: *Oxytocin content of microdissected areas of rat hypothalamas. Endocrinology* 98:1430-1433, 1976.
- Kawata, M. and Y. Sano: *Immunohistochemical identification of the oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamus of the monkey (Macaca fuscata). Anat. Embryol.* 165:151-167, 1982.
- Orkand, P.M., and S.L. Palay: *The fine structure of the supraoptic nucleus in normal rats compared with that in rats with hereditary diabetes insipidus. Anat. Rec.* 154:396, 1966.
- Reaves, T.A. Jr., and J.N. Hayward: *Immunocytochemical identification of vasopressinergic and oxytocinergic neurons in the hypothalamus of the cat. Cell Tissue Res.* 196:117-122, 1979.
- Rhodes, C.H., J.I. Maorrell, and D.W. Pfaff: *Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: Distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin, and vasopressin. J. Comp. Neurol.* 198:45-64, 1981.
- Silverman, A.J. and E.A. Zimmerman: *Magnocellular neurosecretory system. Ann Rev. Neurosci.* 6:357-380, 1983.
- Sokol, H.W., and H. Valtin: *Evidence for the synthesis of oxytocin and vasopressin in separate Neurons. Nature* 214:314-316, 1967.
- Sokol, H.W., E.A. Zimmerman, W.H. Sawyer, and A.G. Robinson: *The hypothalamic-neurohypophysial system of the rat; localization and quantitation of neurophysin by light microscopic immunocytochemistry in normal rats and in Brattleboro rats deficient in vasopressin and a neurophysin. Endocrinology* 98:1176-1188, 1976.
- Swaab, D.F. and C.W. Pool: *Specificity of oxytocin and vasopressin immunofluorescence. J. Endocr.* 66:263-272, 1975.
- Swaab, D.F., F. Nijveldt, and C.W. Pool: *Distribution oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. J. Endocr.* 67:461-462, 1975.
- Swanson, L.W., and Sawchenko, P.E.: *Hypothalamic intergration; Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. Ann. Rev. Neurosci.* 6:269-324, 1983.
- 조사선 · 차중익 · 장가용 · 백상호 · 이광호 : 세포융합에 의한 vasopressin 항체생산. 서울의대학술지. 25:23-28, 1984.

## LEGENDS FOR FIGURES

Micrographs of the rat hypothalamus reacted with either monoclonal anti-vasopressin or anti-oxytocin.

**Fig. 3.** Vasopressin reactive neurons concentrated in the SON. CO: optic chiasm.  $\times 100$ .

**Fig. 4.** Vasopressin reactive neurons localized in the PVN around the third ventricle (V).  $\times 40$ .

**Fig. 5.** A few of vasopressin reactive neurons appeared in the perifornical area (PF) lateral to the PVN.  $\times 40$ .

**Fig. 6.** Oxytocin reactive neurons localized in the arcuate nucleus (arrows). V: third ventricle.  $\times 40$ .

