

기니픽 비점막의 Substance P 신경섬유 분포에 대한 면역조직화학적 연구

경상대학교 의과대학 이비인후과학교실*
日本國 三重大學 醫學部 耳鼻科**
전시영*・정필섭*・황의기*・홍순관*
間島 雄一**・坂倉 康夫**

Localization of Substance P-like Immunoreactive Innervation in the Nasal Mucosa of the Guinea Pig.

Sea Yuong Jeon, M.D.*, Pil Seob Jeong, M.D.*, Eui Gee Hwang, M.D.*
Soon Kwan Hong, M.D.*, Yuichi Majima, M.D.***, Yasuo Sakakura, M.D.**

*Department of Otolaryngology, College of Medicine,
Kyeong Sang National University**

*Department of Otolaryngology, College of Medicine,
Mie University, Japan****

= Abstract =

Substance P-like immunoreactive(SP-IR) innervation in the nasal mucosa of the guinea pig was localized by the avidin-biotin-peroxidase(ABC) method of immunohistochemistry. SP-IR innervation was distributed within lining epithelium, in subepithelial layer, along the wall of vessels and around glands, but also within nasal glandular structures.

These findings suggest the morphologic evidence of local neuronal reflex networks between nociception on surface epithelium and actions in local vascular bed and on submucosal glands.

KEY WORDS: substance P, immunohistochemistry, ABC method, nasal mucosa, nasal gland

서 론

비점막 지배하는 자율신경계에는 부교감신경과 교감신경섬유 외, peptide계 신경섬유도 분포하고 있다고 알려져 있다.

Tachykinin계열의 peptide이며 지각신경계의 주된 신경전달물질인 substance P(SP)는 지각신경 말단에서 유리되어 조직내 국소반응을 일으킬 수 있으며, 이는 외부자극에 대한 비점막의 생리적 반응뿐 아니라 비알러지나 비점

* 본 논문은 1991년도 경상대학병원 임상연구비의 일부 보조로 이루어졌음.

막과민반응(nasal hyperreactivity)의 발병기전에도 중요한 역할을 하고 있다고 추정되고 있다¹⁻³⁾.

비점막에 분포하는 SP 신경섬유는 면역조직학적 염색법으로 증명할 수 있다^{1,3,4)}.

avidin-biotin-peroxidase complex(ABC)법은 고도의 감수성으로 최근 널리 보편화 된 면역조직화학적 염색법으로⁵⁾, 저자들은 ABC법을 이용하여 guinea pig 비점막에서의 SP 신경섬유의 분포를 밝히고자 하였다.

연구 방법

조직의 처리

8주된 정상 guinea pig 5마리를 사용하였다. Zamboni 고정액으로 관류 고정하고 하부 비갑개와 삼차신경절을 절취 하여 4°C의 동 고정액에 3시간 더 후 고정한 후, 25% sucrose 첨가 인산 완충 생리식염수(PBS)에 24시간 세정하였다. 조직은 액체질소내에서 동결 시켜 cryostat로 10 μ m 두께의 냉동절편을 제작 하였다.

면역조직화학적 염색

냉동절편은 실온에서 건조시켜 PBS로 세정한 후, 0.5% periodic acid에 5분 처리 하여 내인성 peroxidase의 활성을 억제하였다. PBS로 세정한 후, 정상 혈청용액(3% normal goat serum, 1% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100)에 1시간 동안 처리하고, 이어서 희석한 1차항체(1 : 8,000 rabbit anti-substance P serum, Chemicon)에 16시간 4°C에서 반응시켰다.

PBS로 세정한 후, 2차 항체(biotinylated anti-rabbit IgG made in goat, Vector)에 3시간 반응시키고, 다시 PBS로 세정한 후, avidin-biotin-complex(Vectastain ABC reagent, Vector)에 1시간 반응 시켰다. PBS로 세정한 후 기질액(0.025% diaminobenzidine, 0.004% nickel chloride, 0.03% hydrogen peroxide in PBS) 내에서 정색 반응 시키고, methylgreen으로 대조 염색 하였다.

SP와 반응시켜 비활성화 시킨 1차항체 [51 μ g of synthetic SP(substance P, Peptide Institute) per ml of diluted antiserum]를 adsorption control에 사용 하였으며, 삼차신경절의 절편은 positive control로 사용하였다.

결 과

SP 양성 면역반응(SP-IR)은 guinea pig 비점막 상피, 혈관, 그리고 선조직 내에 분포 하였다. 상피 조직에는 주로 상피하층에서 망상분포하고, 가끔 섬세한 섬유상 SP-IR가 상피층을 관통하는 양상을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1). 혈관 조직에서는 섬세한 섬유상 SP-IR가 sinusoid의 벽을 따라 달리고(Fig. 2A), 소동맥벽의 중외층(medioadventitia layer)을 따라 다소 강하게 분포하고 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 선조직에서는 주로 분비선과 분비관의 주위에 망상 분포하고(Fig. 3A), 분비선의 내부에도 다수의 SP-IR가 점상분포 하고 있음이 관찰되었다(Fig. 3B). Positive control인 삼차신경절에서는 SP-IR 신경절세포와 SP-IR 신경 섬유가 관찰 되었다. Adsorption control에서는 상피의 가장자리를 따라 약간의 비특이성 반응이 보였으나 그외의 선택적 면역반응은 관찰되지 않았다.

고 안

비점막에서의 SP 신경섬유의 분포는 과거 여러가지 면역조직화학적 염색법으로 증명 되었다. ABC법을 이용한 저자들의 연구결과는, 선조직에서의 SP-IR 분포상을 제외하고는 이에 대한 문헌상의 보고와 거의 일치 하였다. 선조직에서의 SP 신경섬유의 분포는 문헌에 따라 차이가 있어, 선조직에는 분포하지 않는다는 보고^{1,3)}도 있으나, 일반적으로 선과 분비관의 주위에 망상분포 한다고 알려져 있다^{4,6)}. 저자들은 분비선과 분비관의 주위 뿐 아니라 분비선의 내부에도 점상분포하는 다수의 SP-

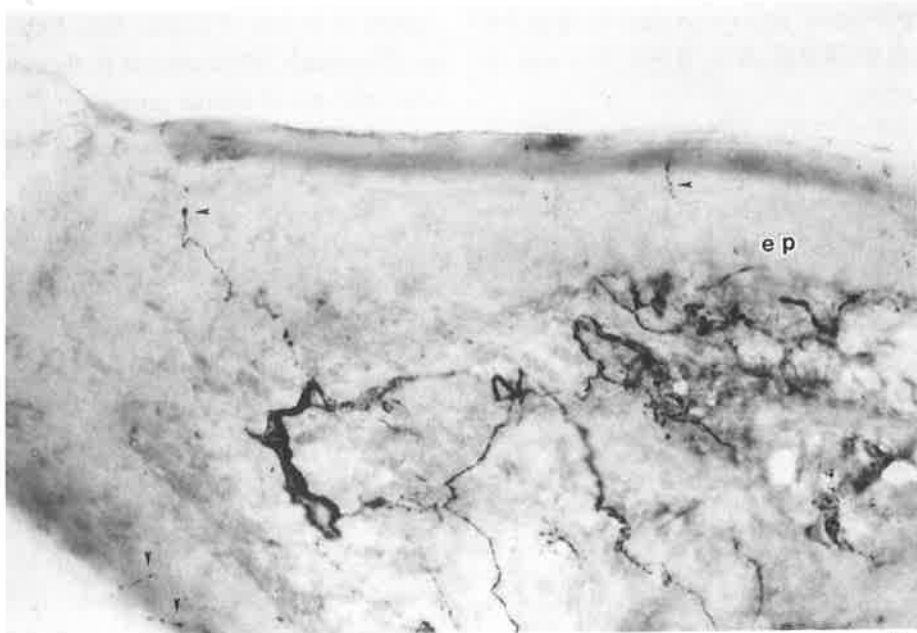


Fig. 1. SP-IR nerve fibers forming a dense network arrangement in subepithelial layer. Fine SP-IR nerve fibers penetrating into the epithelium are seen (arrowhead). Epithelium is indicated by ep. $\times 100$

IR을 관찰하였으며, 이는 선방(acinus)에 분포하는 SP 신경섬유로서 조직절편제작시 신경주행 방향에 대하여 직각으로 절단된 신경섬유말단(nerve ending)이라고 사료된다.

상기도 점막의 선조직에 분포하는 주요 peptide계 신경 전달물질로서는 vasoactive intestinal polypeptide(VIP)나 neuropeptide Y가 알려져 있으며^{2,7,8)} SP는 주로 혈관 조직에 분포하여 국소 혈관운동성이나 투과성의 조절에 중요한 역할을 하고 있다고 알려져 있다^{1,2,6)}.

선분비 조절에 대한 SP의 역할은 아직 확실치 알려져 있지는 않다.

SP는 비점막 선분비에 있어 구심성지각 신경섬유(sensory afferent neuron)와 원심성 부교감신경섬유(parasympathetic efferent neuron)로 이루어진 신경반사궁을 통하여 간접적 조절 기능을 갖고 있다고 알려져 있으나¹⁾, 최근 선세포에 대한 직접적인 조절 기능을 갖고 있을 단서들이 보고 되고 있다^{9,10,11)}.

저자들이 관찰한, SP 신경 섬유 말단의 선조직내 점상분포는 비점막 분비선에 대한 SP의 직접적 조절기능에 대한 형태학적 단서가

될 수 있다고 사료된다.

비점막에 분포하는 SP 신경 섬유는 삼차 신경절에 존재하는 SP-IR 신경절세포로부터 기원한 것이라고 알려져 있다^{3,12)}. 따라서 저자들은 positive control로써 삼차신경절 절편을 이용하였으며, 일차 항체의 특이성은 adsorption control로써 검증 하였다.

결 론

저자들은 ABC법을 이용하여 guinea pig 비점막내 SP 신경 섬유의 분포를 증명하였다.

SP 신경 섬유는 상피내, 상피하층, 혈관조직내, 선조직의 주위 및 선조직의 내부에 분포하였으며, 이는 비점막 상피로부터의 유해 자극의 감수(nociception)와 이에 대한 국소 혈관 운동 및 선분비에 대한 조절 기능을 갖는 직접적 국소신경반사궁(local neuronal reflex arc)의 존재에 대한 형태학적 단서라 사료된다.

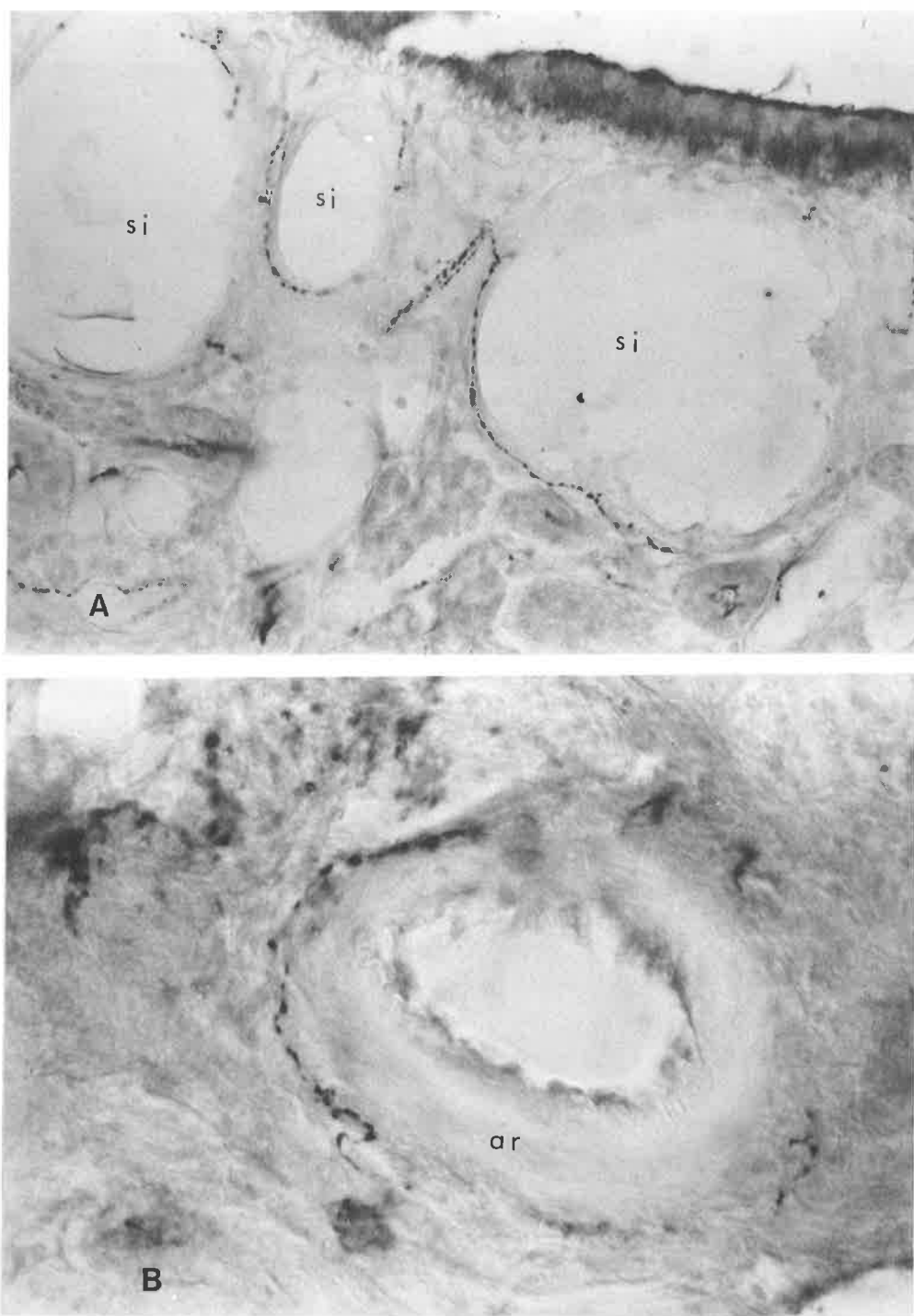


Fig. 2. SP-IR nerve fibers along the wall of sinusoid(A) and small arteriole(B). SP-IR nerve fibers are located in the medioadventitia border. Sinusoid is indicated by si, arteriole is indicated by ar. A \times 100, B \times 200

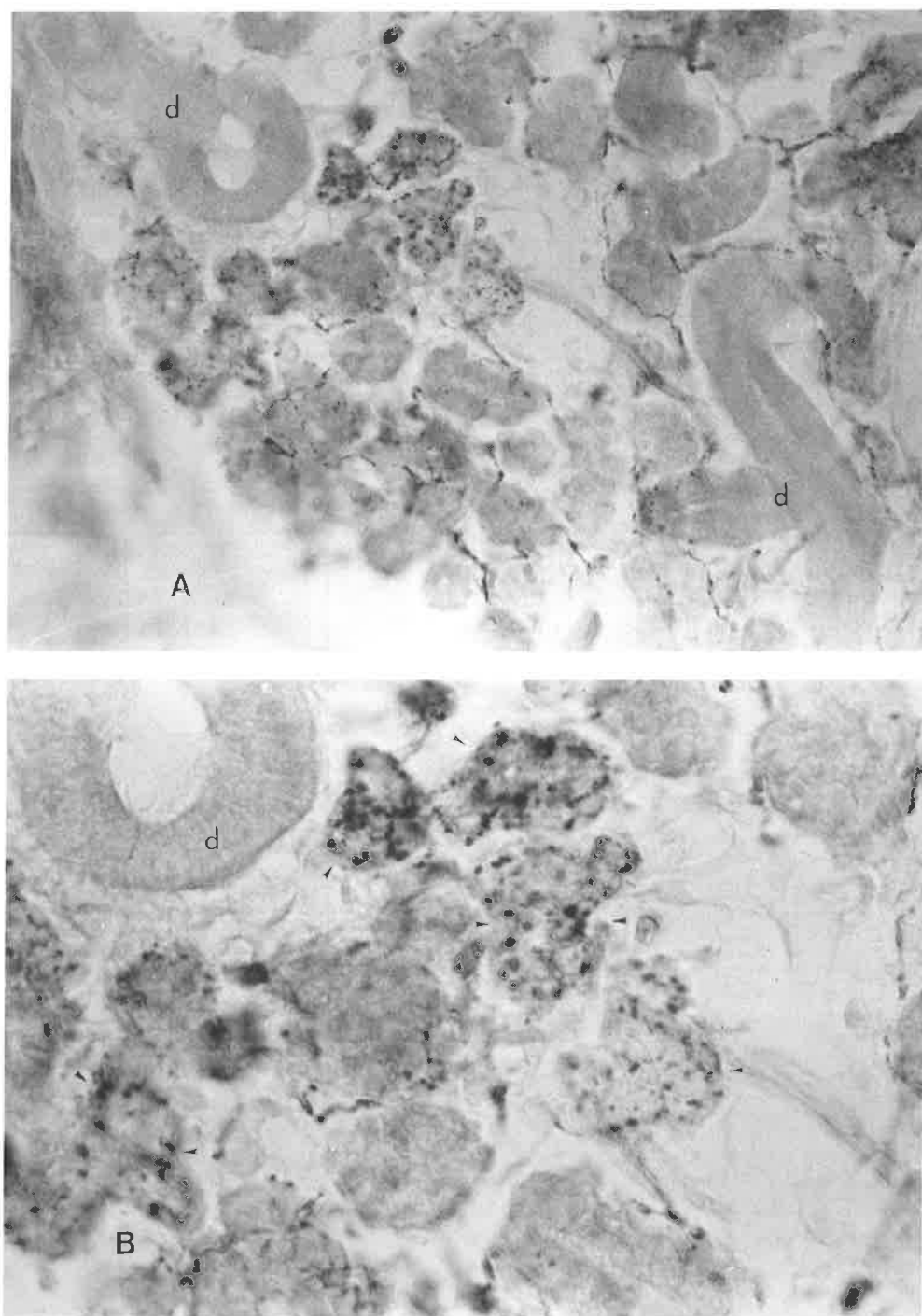


Fig. 3. SP-IR nerve fibers forming network around glands and ducts(A). Lots of fine spotted SP-IR nerve endings(arrow head) within the glandular structure(B). Round masses of soft density are submucosal glands, ducts are indicated by d. A \times 00, B \times 200

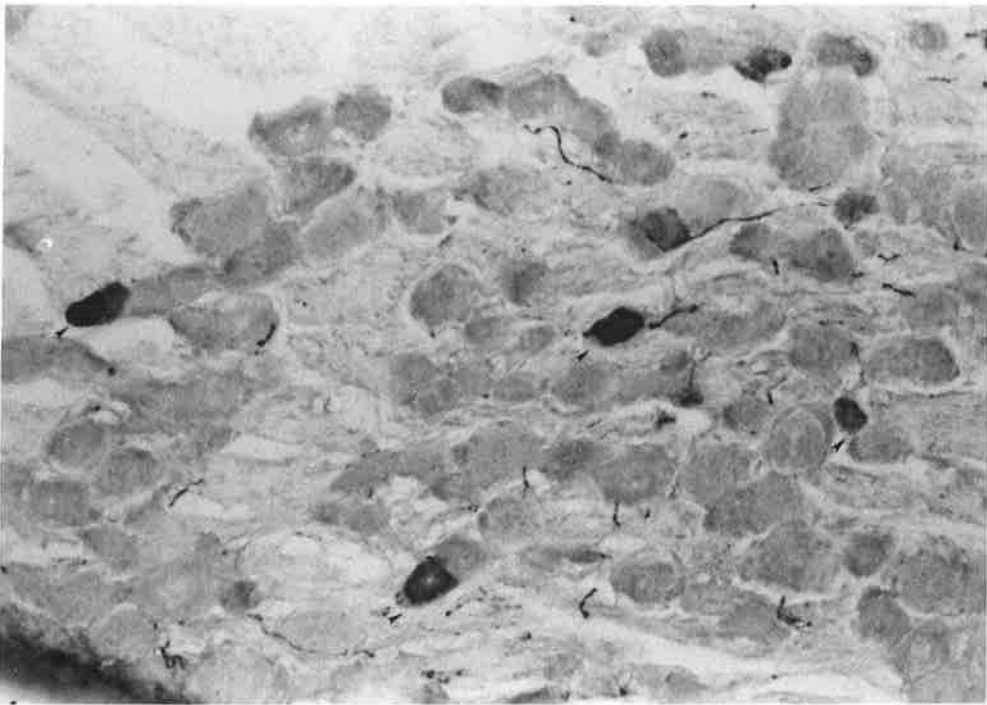


Fig. 4. SP-IR ganglion cells (arrow head) and SP-IR nerve fibers in trigeminal ganglion. $\times 50$

※ 본 논문을 작성하는데 필요한 모든 것을 아낌없이 지원 해 주신 일본 미에(三重)대학 의학부 이비과 사카쿠라(坂倉康夫)교수님과 마지마(間島雄一)선생님께 무한한 감사를 드립니다.

References

1. Anggard A, Lundberg JM, Lundbald L : Nasal autonomic innervation with special reference to peptidergic nerves. *Eur J Respir Dis* 64(suppl 128) : 143~148, 1983
2. Lundblad L, Aria A, Lundberg JM, et al : Increase vascular permeability in rat nasal mucosa induced by substance P and stimulation of capsaicin-sensitive trigeminal neurons. *Acta Otolaryngol* 96 : 479~484, 1983
3. Lundbald L, Lundberg JM, Brodin E, et al : Origin and distribution of capsaicin-sensitive substance P-immunoreactive nerves in the nasal mucosa. *Acta Otolaryngol* 96 : 485~493, 1983
4. Uddman R, Malm L, Sundler F : Substance-P-containing nerve fibers in the nasal mucosa. *Arch Otorhinolaryngol* 238 : 9~16, 1983
5. Coggi G, Dell'Orto P, Viale G : Avidin-biotin method. In : Polak JM, Noorden SV. *Immunocytochemistry, modern methods and applications*. 2nd ed. Bristol : Wright, pp 54~70, 1986
6. Stjarne P, Lundbald L, Anggaed A, et al : Tachykinins and calcitonin gene-related peptide : co-existence in sensory nerves of the nasal mucosa and effects on blood flow. *Cell Tissue Res* 256 : 439~446, 1989
7. Lacroix JS, Anggard A, Hokfelt T, et al : Neuropeptide Y : presence in sympathetic and parasympathetic innervation of

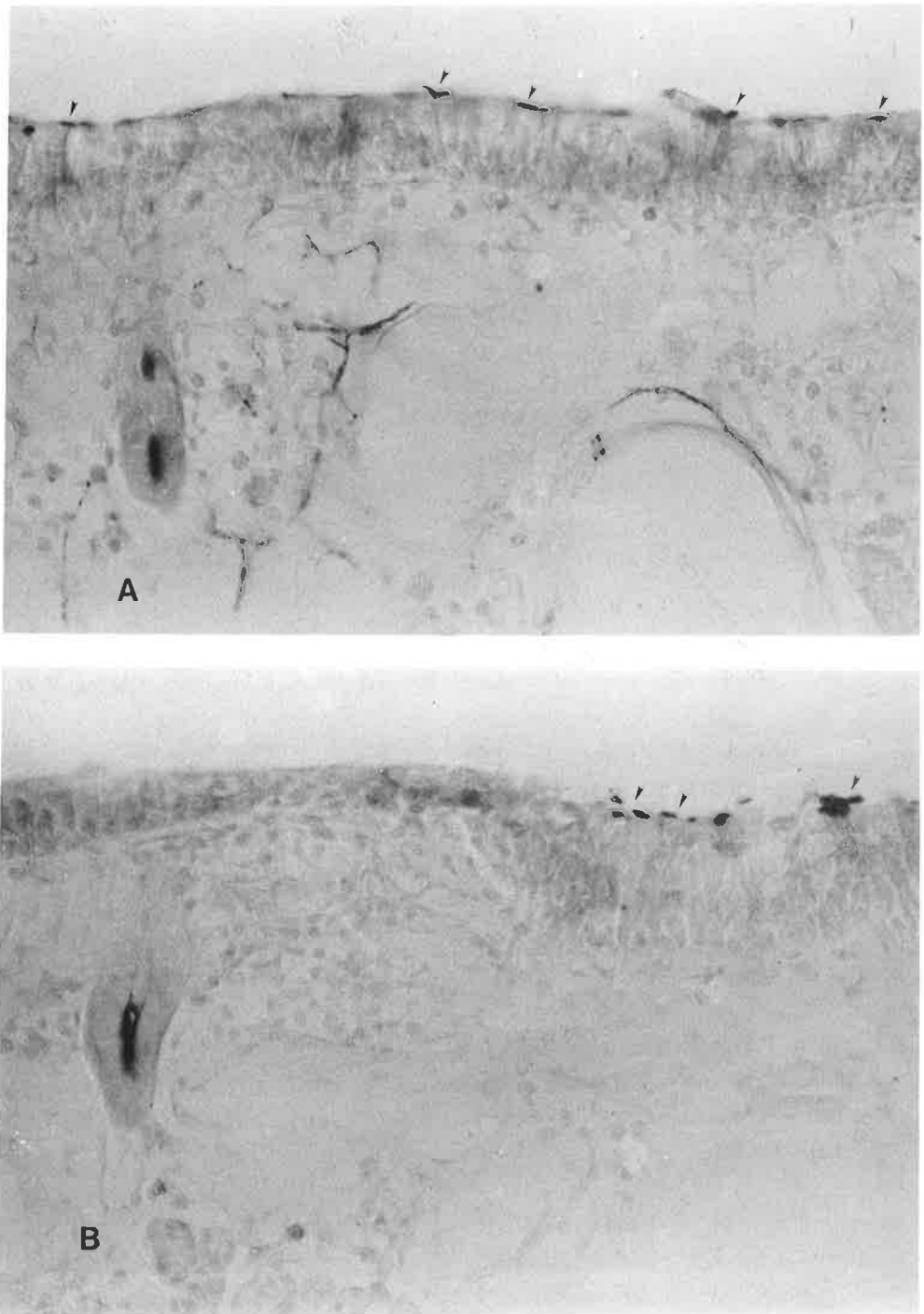


Fig. 5. Adsorption control. SP-IR nerve fibers are observed along the wall of sinusoid in secretion incubated in primary antisera(A). No SP-IR nerve fiber is seen in secretion incubated in adsorbed antisera(B). Reaction along the free surface of lining epithelium (arrowhead) is nonspecific. A, B \times 100

- the nasal mucosa. *Cell Tissue Res* 257, 1990
8. Yokoyama R, Inokuchi T, Takahashi Y, et al : An electron microscopic study of acetylcholinesterase-activity and vasoactive intestinal polypeptide-and neuropeptide Y-immunoreactivity of the intestinal nerve fibers in the nasal gland of the guinea pig. *Arch Histol Cytol* 54 : 59~67, 1991
 9. Gashi AA, Borson DB, Finkbeiner WE, et al : Neuropeptides degranulate serous cells of ferret tracheal glands. *Am J Physiol* 251 : 223~229, 1986
 10. Shimura S, Sasaki T, Ikeda K, et al : Neuropeptides and airway submucous gland secretion. *Am Res Respir Dis* 143 : 25~27, 1991
 11. Baraniuk JN, Lundgren JD, Okayama M, et al : Substance P and neurokinin A in human nasal mucosa. *Am J Resp cell Mol Biol* 4 : 228~236, 1991
 12. Hokfelt T, Kellerth JO, Nissson G, et al : Substance P : Localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science* 190 : 889~890, 1975