梨花醫大誌 : 第 12 卷 · 第 1 號 · 1989
Ewha Med. J. Vol. 12, No. 1, 1989

흰쥐 편도체의 Dopamine 수용체에 대한 전자현미경 자기방사법적 연구*

이화여자대학교 의과대학 해부학교실
이 희 래

=Abstract=

Ultrastructural Localization of Dopaminergic Receptors in the Amygdala of Rat

Hee Lai Lee

Department of Anatomy, College of Medicine, Ewha Womans University

The present study was performed to identify the dopaminergic receptor sites in rat amygdala. Identification of the receptor sites at ultrastructrual level has been done by autoradiography after cerebral ventricular perfusion of ^{3}H-haloperidol.

From 434 examples of silver grains, 5% were labeled in soma, 36% in thick dendrites, 26% in the thin branches of axons and dendrites, 21% in thick axons and terminals and 12% in synapses with synaptic vesicles. In the cases of labeled synapses, all of axon terminals contained small round vesicles and showed asymmetric contact with dendrites. By these results it may be implied that dopamine receptors in the amygdala are located in both pre-and post-synaptic sites of the asymmetric axo-dendritic synapses with small round vesicles and the axons of labeled synapses originated from the dopaminergic neurons in the midbrain.

서 론

포유류의 뇌에서 편도체는 신선조체의 복측에 자리잡고 있으면서 기능적으로는 변연계에 속하는 부위로서 그의 구조와 신경연결에 대해서는 많이 연구되어 왔다.

편도체에 분포하는 신경세포는 형태학적으로 대형 및 중형세포로 구분한바 있으며, 조직화학적 연구에 의해서는 enkephalin 합성신경세포[2)3)4)]를 비롯하여 substance P신경세포[5)6)], somatostatin신경세포[7)], cholecystokinin 신경세포[8)9)10)] 및 GABA 신경세포[11)] 등이 존재하는 것으로 보고된 바 있다.

편도체의 신경 연결을 보면 편도체에 분포하는

*본 연구는 1988년도 이화여자대학교 교수연구기금 연구비로 이루어졌음.

신경세포로 부터 수출되는 신경섬유는 시상하부[6][12], 분계조[13], 시상과 대뇌피질[14] 및 선조체[15]등의 부위로 투사하며, 편도체로 수입되는 신경섬유는 후구에서 기원하는 glutamate 섬유[16][17]를 비롯하여 시상하부의 histamine섬유[18], 흑질과 복측 피개야의 dopamine섬유[19][20][21], 청반의 norepinephrine섬유[22] 및 봉선핵의 serotonin섬유[23] 등을 받는 것으로 보고되었다.

위의 여러 연구결과들을 종합하여 볼때 편도체에는 생화학적으로 여러 종류의 신경전달물질과 관련된 신경세포가 분포할 뿐 아니라 뇌의 많은 부위로부터 여러 종류의 신경전달물질을 가진 신경섬유를 받고 있음을 알 수 있다.

그런데 편도체로 수입되는 각종 신경전달물질의 신경섬유는 편도체내에서 형태학적으로 어떤 신경연접을 형성하고 있는지에 대해서는 아직 많이 알려져 있지 않다. 편도체의 수입신경섬유 중에서 특히 중뇌의 흑질과 복측 피개야에서 기원하는 dopamine신경섬유는 흔히 중뇌-변연계 신경로라고 하여 감정 및 행동과 관련된 변연계의 기능에 관여하는 매우 주요한 신경로임이 알려졌다[24]. 그러나 중뇌-변연계 dopamine 축삭로의 축삭종말이 편도체내에서 어느 신경세포와 연접을 형성하며 어떤 형태의 연접을 형성하는지 그의 정확한 신경회로의 연결은 자세하게 밝혀져 있지 않다.

그러므로 본 연구에서는 편도체에 존재하는 dopamine 신경섬유를 식별하는 간접적인 방법으로서 전자현미경 자기방사법을 이용하여 편도체내의 dopamine 수용체의 분포 양상을 관찰하되 특히 dopamine 수용체와 관련있는 신경연접을 관찰하고자 시도하였다.

재료 및 방법

본 실험을 위한 실험동물은 체중 250g 내외의 성숙한 숫 흰쥐(Sprague Dawley) 5마리를 사용하였다. 각 동물은 dopamine 수용체 길항제로 사용되는 ^{3}H-haloperidol(spec. activity, 19.61Ci/m, Conc. 0.167 mCi/ml, Janssen Life Science Products)을 50ul씩 측뇌실에 주입하였다. 뇌실내에 주입 15분후에 동물들은 각각 상행대동맥을 통하여 1% paraformaldehyde−2% glutaraldehyde(phosphate buffer pH7.4) 혼합고정액으로 관류고정하였다. 고정된 동물은 2시간 후 두개골을 제거하고 뇌를 적출하여 동일한 고정액에 1일간 담가 두었고 완전하게 고정된 뇌로부터 편도체의 복측 및 배측부의 중앙부를 중심으로하여 조직을 금속관으로 절취하였다. 절취한 조직은 1% osmium tertroxide(phosphate buffer pH7.4) 용액에 2시간 이상 후고정하였고 ethanol과 aceton을 이용한 소정의 탈수과정을 경과한 다음 epon 812에 포매하고 60℃ oven에서 3일간 중합시켰다.

자기방사표본을 만들기 위하여 편도체 조직을 두께 50nm 정도의 초박절편으로 만들고 이들 절편은 0.5% formvar film으로 slide glass에 부착시킨 nickel grid위에 올려 놓았다. Grid가 부착된 slide glass는 암실에서 40℃ 가온상태의 Ilford L_4 emulsion(증류수로 1:1 비율 희석)에 담근 후 건조시켜서 암상자에 넣고 4℃ 냉장고에서 12주간 노출시킨 다음 phenidone developer로 현상하였다. 현상된 조직은 grid에 놓인 상태로 slide glass에서 떼어 내어 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 관찰하였다. 표본을 관찰할 때에는 구조물 별로 구분하여 은입자의 표지된 상태를 확인하였고 표지된 구조물은 Chan-Palay & Palay[25]의 표지기준에 따라서 판정하였다.

성 적

자기방사법에 의하여 편도체 조직에 표지된 은입자들은 직경 150~200nm 정도의 구형 과립으로 보였으며 은입자들은 개별적으로 분산되어 있되 대개 신경세포막에 근접하여 있었다. 그리고 은입자의 윤곽이 뚜렷하기 때문에 표지된 구조물을 식별하기에 비교적 용이하였다(그림 1, 2).

관찰된 조직내에서 은입자들은 신경세포체를 비롯하여 축삭 또는 수상돌기와 그들의 가느다란 가지에 다양하게 표지되었다. 표지된 은입자의 숫적 분포를 구조물별로 구분하여 보면 임의로 선택한 표본에서 은입자는 신경세포체에 5% 표지된 것을 비롯하여 비교적 굵은 수상돌기에 36%, 축삭 및 수상돌기의 가느다란 가지로 인정되는 부위에 26%정도 표지되었고 비교적 굵은 축삭과 연접을 형성하지 않은 축삭종말에 21%, 그리고 신경연접에 12% 표지되었다(표 1).

각 구조물에 표지된 은입자중에서 특히 신경연접

Table 1. Distribution of labeled silver grains in the different structures of rat amygdala.

Structure	Soma	thick dendrites	Thin branches of the axons and dendrites	Thick axon and terminals	Synapse	Total
No. of labeled silver grain	20	155	113	92	54	434
(%)	(5)	(36)	(26)	(21)	(12)	(100)

에 표지된 것을 살펴 보면 은입자는 연접전부 즉 연접소포를 함유한 축삭종말에 표지된 경우도 있었고(그림 3, 4), 또 연접 후부 즉 축삭종말과 연접을 형성하고 있는 수상돌기에 표지된 경우도 있었다(그림 4). 표지된 연접의 형태학적 특징을 보면 이들의 축삭종말은 직경 50nm정도의 소원형연접소포(small round vesicles)를 함유하였고 연접소포의 함유량은 축삭종말에 따라서 매우 다양하였다. 연접소포가 적은 경우에는 연접전막 부근에 소수가 분포하였고 연접소포가 많은 경우에는 소포가 신경종말을 전체적으로 꽉 채우는 정도였다. 또 이들 축삭종말은 거의 대부분이 크기가 다양한 수상돌기에 접촉하여 축삭수상돌기연접을 형성하였고 특히 연접후막이 두꺼운 비대칭연접을 이루고 있었다(그림 4).

고 찰

흰쥐의 편도체에서 dopamine 수용체의 분포상태를 ^{3}H-haloperidol을 이용한 자기방사법으로 관찰한 결과 은입자는 신경연접을 비롯하여 연접을 형성하지 않은 축삭 및 수상돌기의 가지에 많이 표지되었다.

이처럼 ^{3}H-haloperidol에 의하여 은입자가 표지된 사실은 자기방사표본에서 표지된 은입자의 수와 실제 수용체의 수는 반듯이 일치하지 않는다는 견해[25]에 따라서 표지된 은입자와 편도체의 dopamine 수용체의 수는 1 : 1의 비율로 표지되었다고는 생각할 수 없다. 그러나 각 구조물내에 은입자가 표지된 점은 그 구조물의 세포막에 존재하는 dopamine 수용체에 ^{3}H-haloperidol이 선택적으로 결합됨으로서 은입자가 표지된 결과라고 생각된다.

그리고 표지된 은입자는 수상돌기 뿐 만 아니라 일부는 축삭종말을 포함하여 축삭에서도 많이 관찰되었다. 이러한 결과는 dopamine 수용체는 dopamine 신경섬유의 연접후부(post-synaptic site)와 연접전부(pre-synaptic site) 양쪽 모두에 존재한다는 보고[26]에 의하여 표지된 축삭은 dopamine 신경섬유로서 이에 존재하는 dopamine 수용체에 ^{3}H-haloperidol이 결합된 것이고, 표지된 수상돌기나 세포체는 dopamine 신경섬유에 의하여 형성되는 연접후부에 해당하는 부위로서 그곳에 분포하는 dopamine 수용체에 ^{3}H-haloperidol이 결합되어 표지된 것이라고 생각된다.

더우기 편도체는 중뇌의 흑질 및 복측피개야에 분포하는 신경세포로부터 섬유를 받는다는 보고[19][20][21]로 미루어 볼 때 편도체에서 표지된 축삭의 가지들은 중뇌의 dopamine 축삭에 의하여 형성된 것이라고 생각된다. 본 실험에서 표지된 연접은 모두 소원형소포를 함유한 비대칭연접이었다. 이러한 결과는 편도체의 신경연접은 형태학적으로 원형소포(round vesicles)를 함유한 비대칭연접과 편평형소포(flattened vesicles)를 함유한 대칭연접으로 구분된다는 보고[1]에 비교하여 보면 표지된 소원형소포를 함유한 비대칭연접들은 편도체에 분포하는 여러 형태의 연접 중에서 ^{3}H-haloperidol에 선택적으로 결합된 연접이라고 말할 수 있다. 따라서 이들 연접의 축삭은 중뇌의 dopamine 신경세포에서 기원한 것이라고 추정된다.

이러한 사실은 ^{3}H-spiroperidol 또는 ^{3}H-haloperidol을 주입한 흰쥐의 신선조체에서 표지된 은입자는 소원형소포를 함유한 비대칭연접에서 관찰되었다는 보고[27][28]로 본 실험에서 표지된 연접이 dopamine 신경섬유에 의하여 형성된 것임을 간접적으로 뒷받침한다.

한편 대뇌의 측두엽에서 편도체로 투사한 신경섬유의 종말은 소원형소포를 함유한다는 관찰결과[1]도

있어서 본 실험에서 표지된 연접은 편도체에 있는 소원형소포를 함유한 다수의 연접 중에서 일부는 dopamine 신경섬유이고 이들이 dopamine 수용체를 갖고 있기 때문에 표지된 것으로 믿어진다. 그 외에 일부 소수의 은입자는 신경세포체 또는 유수신경섬유에서 세포막으로부터 비교적 격리된 부위에서 관찰되었는데 이들도 dopamine 수용체에 결합되어 표지된 것인지 아니면 비선택적으로 표지된 것인지에 대해서는 보완적 연구관찰이 필요하다.

결 론

흰쥐의 측뇌실에 ^{3}H-haloperidol을 주입한 다음 편도체에서 dopamine 수용체의 분포상태를 전자현미경 자기방사법으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

편도체내에서 은입자는 신경세포체에 5%, 굵은 수상돌기에 36%, 축삭 및 수상돌기의 가느다란 가지에 26%, 굵은 축삭 및 종말에 21%, 그리고 신경연접에 12% 정도 표지되었다. 표지된 연접의 축삭종말은 모두 소원형소포를 함유하며 비대칭의 축삭수상돌기 연접을 형성하였다.

이러한 결과에 따라서 편도체에서 dopamine 수용체는 소원형소포를 함유한 비대칭 축삭수상돌기 연접의 연접전부 및 연접후부에 존재하며 표지된 연접의 축삭은 중뇌의 dopamine 신경세포로 부터 기원하는 것을 생각한다.

References

1) Hall E : *Some aspects of the structural organization of the amygdala. In advances in behavioral biology vol.2. The neurobiology of the amygdala. Ed. Eleftheriou BE., Plenum Press, New York, 1972 ; pp95-122*

2) Finley JCW, Maderdrut JL and Petrusz P : *The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. J Comp Neurol 1981 ; 198 : 541-565*

3) Arluison M, Conrath-Verrier M, Taue M, Mailly P, Seraphin dela Manche I, Cesselin F, Bourgoin S and Hamon M : *Different localization of Met-enkephalin-like immunoreactivity in rat forebrain and spinal cord using hydrogen peroxidase triton X-100 light microscopic study. Brain Res Bull 1983 ; 11 : 555-571*

4) Khachaturian H, Lewis ME, Hollt V and Watson ST : *Terencephalic enkephalinergic systems in the rat brain. J Neurochem 1983 ; 3 : 844-855*

5) Ben-Ari Y, Le Gal La Salle G and Kanazawa : *Regional distribution of substance P within the amygdaloid complex and bed nucleus of the stria terminalis. Neurosci Lett 1977 ; 4 : 299-302*

6) Sakanaka M, Shiosaka S, Takatsuki K, Inagaki S, Senba E, Kawai Y, Matsuzaki T and Tohyama M : *Experimental immunohistochemical studies on the amygdalofugal peptidergic(substance P and somatostatin) fibers in the stria terminalis of the rat. Brain Res 1981 ; 221 : 231-241*

7) Epelbaum J, Arancibial LT, Kordon C, Ottersen OP and Ben-Ari Y : *Regional distribution of somatostatin within the amygdaloid complex of the rat brain. Brain Res 1979 ; 174 : 172-174*

8) Innis RB, Correa FMA, Uhl GR, Schneider B and Snyder SH : *Cholecystokinin octapeptide-like immunoreactivity ; histochemical localization in rat brain. Proc Natl Acad Sci 1979 ; 76 : 521-525*

9) Loren I, Alumets J, Hakanson R and Suncler F : *Distribution of gastrin and CCK-like peptides in rat brain. Histochemistry 1979 ; 59 : 249-257*

10) Vanderhaegen JJ, Lotstra F, De Mey J and Gilles C : *Immunohistochemical localization of cholecystokinin-and gastrin-like peptides in the brain and hypophysis of the rat. Proc Natl Acad Sci 1980 ; 7 : 1190-1194*

11) Le Gal Salle G, Paxinos G, Emson P and Ben-Ari Y : *Neurochemical mapping of GABAergic systems in the amygdaloid complex and bed nucleus of the stria terminalis. Brain Res 1978 ; 330 : 194-196*

12) Leonard CM and Scott JW : *Origin and distribution of amygdalofugal pathways in the rat ; An experimental neuroanatomical study. J Comp Neurol 1971 ; 144 : 313-330*

13) Hall EA : *Efferent connections of the basal and lateral nuclei of the amygdala in the cat. Am J Anat*

1963 ; 113 : 139-151

14) Krettek JE and Price JL : *A direct input from the amygdala to the thalamus and the cerebral cortex. Brain Res 1974 ; 67 : 169-174*

15) Kelley AE, Domesick VB and Nauta WJH : *The amygdalostriate projection in the rat ; An anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods. Neuroscience 1982 ; 7 : 615-630*

16) Shipley MT and Adamek GD : *The connections of the mouse olfactory bulb ; A study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. Brain Res Bull 1984 ; 12 : 669-688*

17) Nieuwinhuys R : *Chemoarchitecture of the brain. Springer-Verlag, Berlin, 1985 ; pp162-168*

18) Watanabe T, Taguchi Y, Hayashi H, Tanaka J, Shiosaka S, Tahyama M, Kubeta H, Terano Y and Wada H : *Evidence for the presence of a histaminergic neuron system in the rat brain ; An immunohistochemical analysis. Neurosci Lett 1983 ; 39 : 249-254*

19) Ungerstedt U : *Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. Acta Physiol Scand (suppl) 1971 ; 367 : 1-48*

20) Lindvall 0 and Björklund A : *Organization of catecholamine neurons in the rat central nervous system. In Iversen LL, Iversen SD, and Snyder SH. Ed. Handbook of psychopharmacology vol 9, Plenum Press, New York, 1978 ; pp139-231*

21) Specht LA, Pickel VM, Joh TH and Reis DJ : *Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. II. Late ontogeny. J Comp Neurol 1981 ; 199 : 225-276*

22) Fallon JH and Moore RY : *Catecholamine innervation of the basal forevbrain. IV. Topology of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. J. Comp. Neurol. 1978 ; 180 : 545-580*

23) Steinbush HWM : *Distribution of serotonin immunoreactivity in the central nervous system of the rat. Cell bodies and terminals. Neuroscience 1981 ; 6 : 557-618*

24) McGeer PL, Eccles JC and McGeer EG : *Molecular neurobiology of the mammalian brain. Plenum Press, New York, 1987 ; pp294-308*

25) Chan-Palay V and Palay SL : *Ultrastructural localization of r-aminobutyric acid receptors in the mammalian central nervous system by means of ^{3}H-muscimol binding. Proc Natl Acad Sci 1978 ; 75 : 2977-2980*

26) Roth RH : *Dopamine autoreceptors ; Pharmacology, function and comparison with post-synaptic dopamine receptors. Communications in Psychopharmacology 1979 ; 3 : 429-445*

27) 이희래 : 흰쥐 뇌 선조체내의 *dopamine* 축삭종말에 대한 자기방사법적 연구. 한국생활과학연구원 논총 *1985 ; 36 : 101-108*

28) 이희래 : 흰쥐 피각의 *dopamine* 수용체에 대한 ^{3}*H-haloperidol*을 이용한 전자현미경 자기방사법적 연구. 대한해부학회지 *1987 ; 20 : 205-212*

□ 이희래 논문 사진부도 □

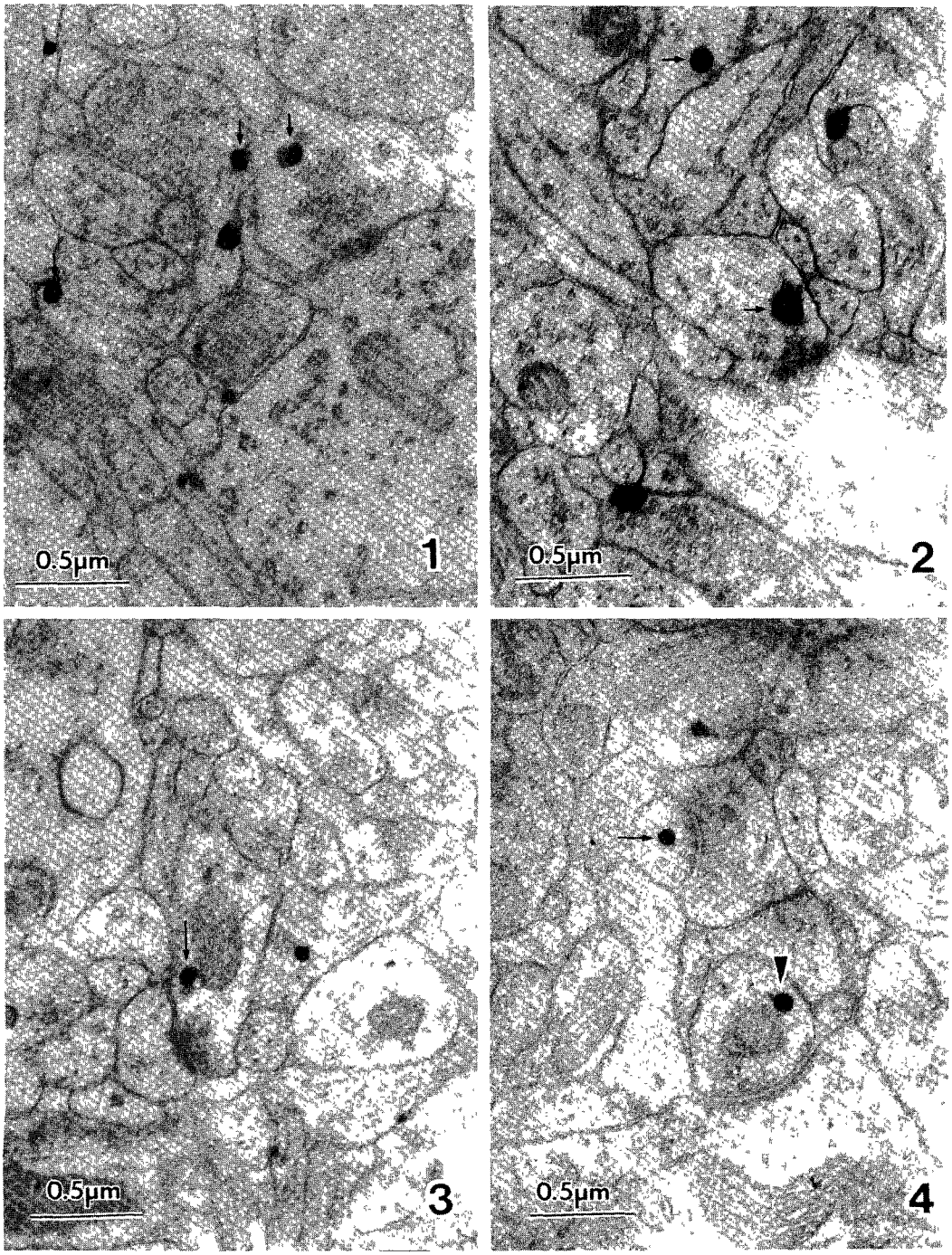

Fig. 1. Silver grains(arrows) are labeled in the axon terminal with synaptic vesicles.
Fig. 2. Silver grains(arrows) are labeled in the dendrites.
Fig. 3. A silver grain(arrow) is labeled in the axon terminal of the asymmetric axo-dendritic synapse.
Fig. 4. Two asymmetric axo-dendritic synapses with small round vesicles are seen. A silver grain(arrow) is labeled in the dendrite of the synapse and another one(arrowhead) in the axon terminal.