

碩士學位論文

말 서골코기관내 protein kinase C의
면역조직학적 관찰



濟州大學校 大學院

獸醫學科

李光協

2005年 6月


말 서골코기관내 protein kinase C의 면역조직학적 관찰

指導教授 申 台 均

李 光 協

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2005 年 6 月

 제주대학교 중앙도서관
李光協의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長_____

委 員_____

委 員_____

濟州大學校 大學院

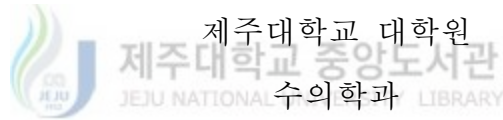
2005年 6月

초 록

말 서골코기관내 protein kinase C의 면역조직학적 관찰

(지도교수 : 신 태 군)

이 광 협



서골코기관 (vomeronasal organ)은 부후각계통의 말초부분으로 플레멘 행동에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 플레멘 행동에는 여러 가지 신호전달 물질이 관여하는 것으로 알려지고 있다.

본 연구에서는 말의 서골코기관에서 protein kinase C (PKC)의 발현을 관찰하기 위하여 仔馬와 成馬에서 PKC의 발현을 면역조직화학적 방법으로 비교 조사하였다.

仔馬에서는 서골코기관 감각상피의 지지세포와 신경감각세포에서 PKC α , β I 및 δ 가 약하게 발현되었으며, 기저세포에서는 PKC β I만 약하게 발현하였다. 샘세포에서는 PKC α , β I 및 δ 가 약하게 발

현되었으나, PKC δ 인 경우에는 감각상피, 샘세포 및 신경다발에서 모두 발현되지 않았다. 신경다발에서는 PKC α 와 β I이 약하게 발현되었다.

成馬에서는 서골코기관의 감각상피와 샘세포에서 PKC 아형이 모두 강하게 발현하였고, 신경다발에서도 PKC α , β I 및 δ 가 발현하였다. 이러한 成馬의 서골코기관내 감각상피, 샘상피, 및 신경다발에서 PKC의 발현은 仔馬의 경우와 비교했을 때 더욱 강한 발현을 나타내었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, PKC 아형에 따라 서골코기관의 감각상피, 신경다발 및 샘세포에서 각 PKC 아형의 발현의 차이가 인정되었으며, 연령이 증가함에 따라 발현이 강해지는 것으로 나타났다.



주요어 : protein kinase C, 서골코기관, 면역조직화학, 말

목 차

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법	4	
III. 결	과	6
IV. 고	찰	13
V. 결	론	15
VI. 참 고 문 헌	16	
영 문 초 록	20	



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

I. 서 론

서골코기관 (vomeronasal organ)은 대부분의 포유류에 존재하는 부후각신경의 한 부분이다 (Salazar 등 1995). 이 기관은 비중격의 저부 좌우측에 위치하는 관상기관으로서 내강은 감각상피 및 호흡상피로 구성되어 있고, 기관 외부와의 교통은 종에 따라 구강 또는 비강으로 다양하게 나타나며 (Keverne, 1999; 모, 1989; Taniguchi 등 1992), 형성 시기 또한 동물마다 다르다 (Salazar 등 2003; Salazar 등 2004; Hinds, 1968). 또한 서골코기관은 기능적으로 포유류에서 페로몬을 인지하는 역할을 하는 기관으로 성적행동을 유발하는데 중요한 역할을 하며 (Holy 등 2000), 일부 동물에서 보이는 플레멘 행동은 이 기관 속으로 보다 많은 페로몬을 받아들이기 위해 입술을 위로 올리는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 현상은 페로몬을 감지한 감각상피세포가 다양한 경로를 통해 뇌 조직에 정보를 전달하여야만 나타나는데, 그 과정 중 감각상피세포에서는 다양한 형태의 신호전달이 일어나게 된다. 특히 서골코기관은 변식행동에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나 (Keverne, 1999), 그 감각신호 전달에 관여하는 효소들에 대한 연구나 성 성숙에 따른 신호전달의 변화에 관한 연구는 많지 않다.

일반적인 감각신호전달을 위한 첫 단계로 후각관의 감각상피세포는 세포바깥으로부터 다양한 정보를 받아들여 뇌로 전달하는데,

이에 여러 가지 복잡한 신호전달 효소들이 관여되는 것으로 알려지고 있다. 이런 감각정보에 관여할 수 있는 신호전달효소로는 signal-transduction receptor proteins G alpha, adenylyl cyclase II 등과 2차 신호전달 효소로써 inositol triphosphate, protein kinase C 등이 잘 알려져 있다 (Berghard 등 1996; Frings, 1993; Garcia-Suarez 등 1997).

여러 가지 신호전달효소들 중에 특히 transmembrane signal transduction에 중요한 역할을 하는 protein kinase C (PKC)는 세포의 증식과 분화, 호르몬 분비에 관여하는 중요한 효소로서 거의 모든 조직에 분포하고 (Nishizuka, 1986; Nishizuka, 1988; Wetsel 등 1992), Domain 구성에 따라 conventional PKC (cPKC)와 novel PKC (nPKC)의 두 그룹으로 나누어지며, cPKC에는 α , β I, β II, γ 와 nPKC에는 δ , ϵ , ζ , μ , θ 로 분류된다 (Nishizuka, 1989). cPKC는 3개의 domain, 즉 인지질, DAG (Diacylglycerol)/phorbol ester 결합 C1 domain, 칼슘 결합 C2 domain 그리고 촉매성 C3 domain을 함유하며, 칼슘, 인지질 그리고 DAG에 의해 활성화된다. 반면 nPKC는 칼슘 결합 C2 domain이 없으므로 Ca^{2+} 에 관계없이 활성화될 수 있다 (Burns 등 1990; Nishizuka, 1988). 이미 보고된 것과 같이 PKC는 아형에 따라 서로 다른 경로를 통해 활성화 시킬 수 있는 인자에 의해 두개의 그룹으로 구분되나, 각각의 PKC 아형들의 발현은 장기와 조직내에서 상당한 차이를 나타낸다 (Osborn 등 1994; Brandt 등 1987).

PKC는 대부분의 세포에서 위와 같은 여러 신호전달 효소의 흐

를 중간에 위치할 수 있는 것으로 서골코기관과 비슷한 세포 구조를 가진 후각상피에서 PKC의 발현이 증명된 바 있으며 (Frings, 1993), 成馬의 서골코기관에서 PKC 아형의 발현은 확인된 바 있다 (이 등 2001). 그러나 成馬와 仔馬의 서골코기관에서 PKC 발현 양상을 비교한 보고는 거의 없다.

본 연구는 서골코기관에서 연령에 따라 PKC의 발현 차이가 있는지 조사하기 위하여 젓먹이 仔馬와 2세 成馬의 서골코기관에서 PKC 아형을 면역조직화학적으로 비교하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험에 이용한 말은 Thoroughbred 6두이며 1개월령 젃먹이 망아지 3두를 미성숙된 仔馬로, 24개월령 2세마 3두를 성성숙된 成馬로 간주하였다. 실험에 사용한 서골코기관은 조직학적 소견상 병변이 없는 것을 이용하였다.

2. 사용한 항체

사용한 항체로는 mouse monoclonal anti-PKC α (BD Biosciences, San Jose, CA), rabbit polyclonal anti-PKC β I (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit polyclonal anti-PKC β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 그리고 rabbit polyclonal anti-PKC β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)이며, 면역조직화학은 avidin-biotin peroxidase complex Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 사용하였다.

3. 조직표본 준비와 조직 검사

말을 희생시켜 서골코기관을 채취하였으며, 파라핀블록으로 제

작할 조직은 10% 중성 포르말린으로 고정하고 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포매 한 후, 5 μm 의 두께로 조직절편을 만들어 hematoxylin and eosin 염색을 실시하였다.

4. 면역조직화학 염색

조직을 5 μm 의 두께로 절편을 만들어 파라핀을 제거한 후 내재성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% H_2O_2 가 포함된 메탄올에 20분간 반응시켰다. 각 조직의 비특이적 반응을 방지하기 위해 PKC α 는 10% normal horse serum으로, PKC βI , β 및 θ 는 10% normal goat serum에 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체로 mouse monoclonal anti-PKC α (1:100), rabbit polyclonal anti-PKC βI (1:100), rabbit polyclonal anti-PKC β (1:100) 그리고 rabbit polyclonal anti-PKC θ (1:100)을 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PKC α 는 biotinylated anti-mouse IgG로, PKC βI , β 및 θ 는 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (1:100)로 45분간 반응시켰다. 이어서 avidin-biotin peroxidase complex Elite kit (Vector Lab.)로 실온에서 45분간 반응시켰다. 각 단계가 끝나고 PBS (pH 7.4)로 5분간 3회 충분히 세척하였으며, 면역반응이 끝난 조직절편은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) substrate kit (Vector Lab.)를 활용하여 발색하였다. 그리고 hematoxylin 용액으로 대조염색을 한 후, 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 말 서골코기관의 구조

말의 서골코기관은 끝이 막힌 관 모양 구조로 비강 중격의 좌우 측 기저부에 위치하며 연골에 의해 싸여 있었다. 가로 단면에서 관찰한 결과 서골코기관이 시작되는 부위는 원형에 가까우나, 가운데 부위에서는 긴 타원형의 내강이 관찰되었다. 내측벽은 감각상피로 덮여 있고, 외측벽은 호흡 상피로 덮여 있었다. 감각상피를 구성하는 세포는 신경지각세포, 지지세포 및 기저세포이고 점막 밑에는 신경다발이 관찰되었다. 호흡상피의 거짓중층원주상피는 섬모원주세포, 무섬모원주세포, 술잔세포 그리고 기저세포로 구성되어 있고 점막 밑에는 샘세포가 발달되어 있었다 (Fig. 1).

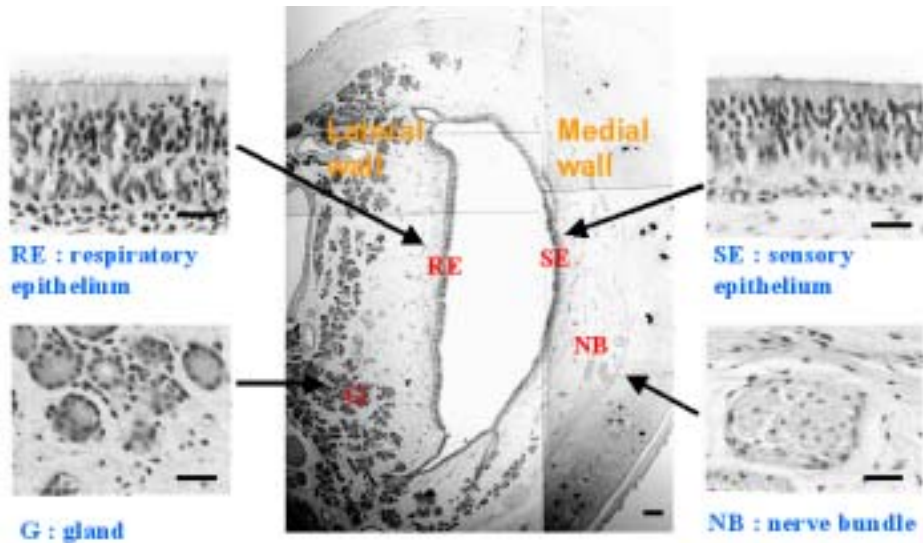


Figure 1. Histological findings of a horse vomeronasal organ. The lateral epithelium includes ciliated and nonciliated cells, whereas the medial epithelium contains neurosensory and sustentacular epithelial cells. Respiratory epithelium (RE); sensory epithelium (SE); gland (G); nerve bundle (NB). Hematoxylin and eosin staining. Scale bars=30 μ m.

2. 감각상피에서 PKC 아형의 발현

仔馬 서골코기관 감각상피의 지지세포와 신경감각세포에서 PKC α , β I 및 δ 가 약하게 발현되었고, 기저세포에서는 PKC β I만 약하게 발현하였다. PKC θ 는 지지세포, 신경감각세포 및 기저세포에서 발현을 관찰할 수 없었다 (Fig. 2A-D)(Table 1).

成馬 서골코기관 감각상피의 지지세포에서 PKC α 와 β I이 강하게 발현하였고, PKC δ 와 θ 는 약하게 발현하였다. 신경감각세포와 기저세포에서는 PKC α , β I 및 δ 가 강하게 발현하였으며, PKC θ 는 약하게 발현하였다 (Fig. 2E-H)(Table 1).



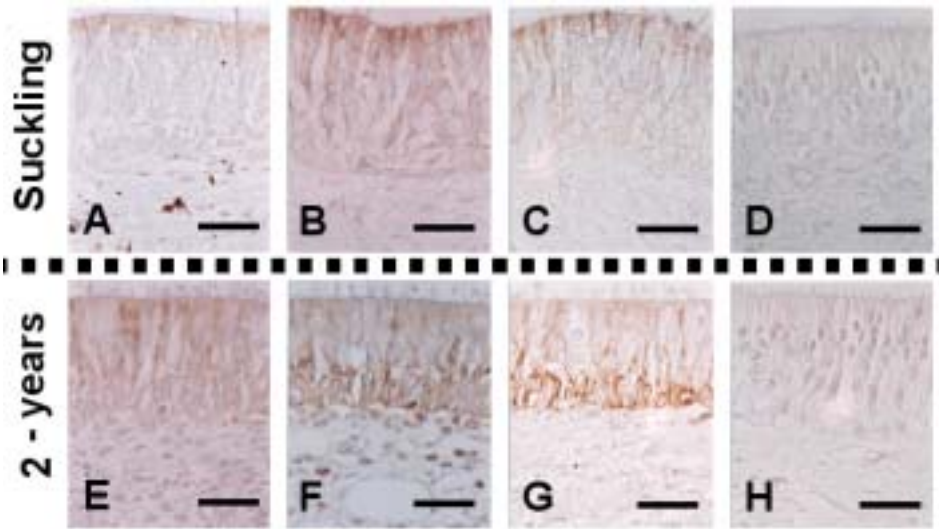


Figure 2. Immunohistochemical staining of PKC α (A and E), β I (B and F), δ (C and G) and θ (D and H) in the vomeronasal sensory epithelium of suckling (A-D) and 2-year-old (E-H) horses.

A-H: Counterstained with hematoxylin. Scale bars = 30 μ m.

3. 신경다발에서 PKC 아형의 발현

仔馬의 신경다발에서는 PKC α 와 β I이 약하게 발현하였고, PKC δ 와 θ 는 발현되지 않았다 (Fig. 3A-D) (Table 1). 成馬의 신경다발에서는 PKC α 와 β I이 강하게 발현되고, PKC δ 는 약하게 발현되었으며, PKC θ 는 발현되지 않았다 (Fig. 3E-H) (Table 1).

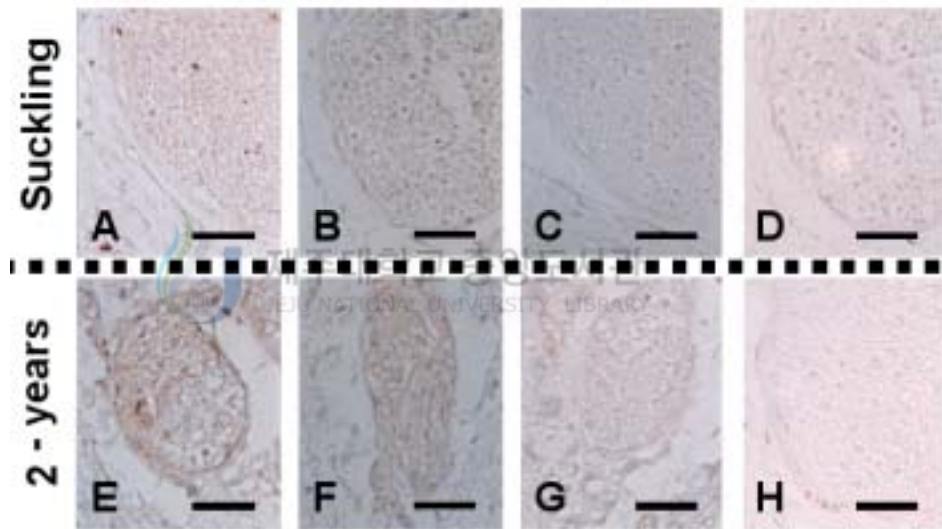


Figure 3. Immunohistochemical staining of PKC α (A and E), β I (B and F), δ (C and G) and θ (D and H) in the vomeronasal nerve bundle of suckling (A-D) and 2-year-old (E-H) horses.

A-H: Counterstained with hematoxylin. Scale bars = 30 μ m

4. 샘세포에서 PKC 아형의 발현

仔馬의 샘세포에서는 PKC α , β I 및 δ 가 약하게 발현하였고, PKC θ 는 발현되지 않았다 (Fig. 4A-D) (Table 1). 成馬의 샘세포에서는 PKC α 와 β I이 강하게 발현하였고, PKC δ 와 θ 는 약하게 발현하였다 (Fig. 4E-H) (Table 1).

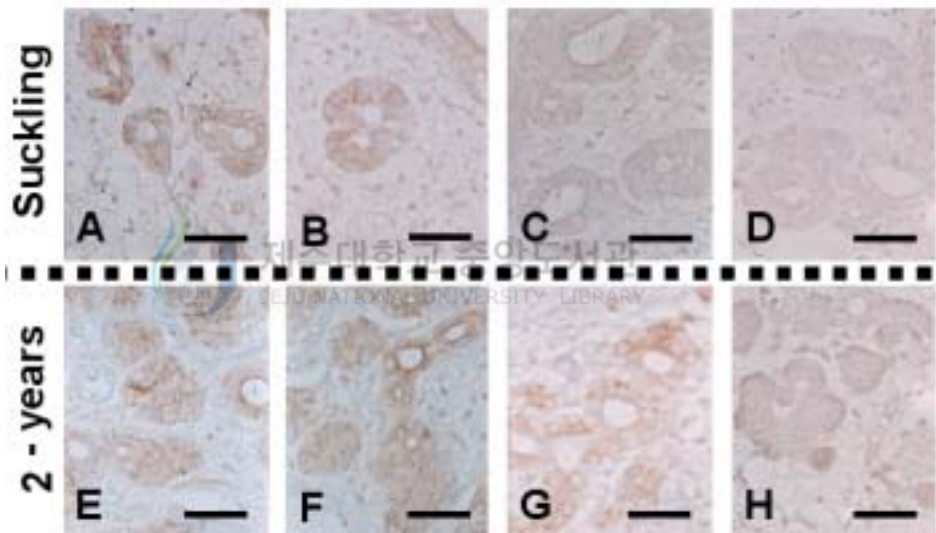


Figure 4. Immunohistochemical staining of PKC α (A and E), β I (B and F), δ (C and G) and θ (D and H) in the vomeronasal glands of suckling (A-D) and 2-year-old (E-H) horses.

A-H: Counterstained with hematoxylin. Scale bars = 30 μ m

Table 1. Immunohistochemical localization of PKC isoforms in the vomeronasal organ of horses

Cell type	suckling				2-year-old			
	α	βI	δ	θ	α	βI	δ	θ
supporting cells	++	+	+	-	++	++	+	+
receptor cells	+	+	+	-	++	++	++	+
basal cells	-	+	-	-	++	++	++	+
acini	+	+	+	-	++	++	+	+
nerve	+	+	-	-	++	++	+	-

* The intensity of PKC in the vomeronasal organ was arbitrarily classified as absent (-), weak (+) and intense (++) by three blinded observers.

IV. 고 찰

본 실험에서는 仔馬와 成馬의 서골코기관에서 PKC의 발현을 면역조직화학적으로 비교 분석하였다. 그 결과 conventional PKC인 PKC α 와 β I 그리고 novel PKC인 PKC δ 와 θ 의 4종의 PKC가 成馬에서 발현함을 확인하였고, 仔馬에서는 PKC θ 를 제외한 모든 PKC의 발현을 확인하였다. 이 연구결과는 成馬의 서골코기관에서 PKC 아형의 발현을 조사한 결과 (이 등 2001)와 일부 일치하였다. 仔馬 서골코기관의 감각세포에서 일부 PKC 아형이 관찰되지 않았고, 발현된 일부 세포에서도 성 성숙이 이루어진 成馬 보다 약하게 발현되는 것을 볼 때 PKC가 성 성숙에 따라 활성이 증가됨을 알 수 있었다. 이상의 소견으로 보아 말의 연령이 증가함에 따라 신경상피세포에서 PKC의 발현이 증가됨을 처음으로 확인하였으며 이는 연령의 증가에 따라 이들 신경세포가 많은 자극 물질에 노출되면서 그에 반응하는 것으로 추정되었다.

成馬 서골코기관의 감각상피와 신경다발에서 PKC α , β I, δ 그리고 θ 가 발현하는 것으로 보아 성행동을 유발하는 페로몬을 인지하는데 있어 감각상피에서 받아들여진 페로몬을 신경 다발로 전달하는데 PKC가 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 말의 서골코기관에서 PKC α , β I, δ 그리고 θ 의 발현 양상을 비교 조사한 첫 보고이며, 서골코기관 감각상피세포에서 PKC의 활성화를 통해 플레멘 행동의 신호 전달

이 이루어질 수 있을 것으로 추측된다. 서골코기관에서 PKC 아형의 발현 차이를 규명하는 것은 말의 번식 행동 및 번식 관련 신경 감각세포의 연구에 도움을 줄 것으로 생각된다.



V. 결 론

본 연구에서는 전형적인 플레멘 행동을 보이는 말의 서골코기관에서 성장에 따른 PKC의 발현 양상을 알아보기 위하여 仔馬와 成馬의 서골코기관을 면역조직화학적 방법으로 비교 조사하였다.

仔馬에서는 서골코기관 감각상피에서 지지세포와 신경감각세포는 PKC α , β I 및 δ 가 약하게 발현되었으며, 기저세포에서는 PKC β I만 약하게 발현하였다. 샘세포에서는 PKC α , β I 및 δ 가 약하게 발현되었으나, PKC θ 인 경우에는 감각상피, 샘세포 및 신경다발에서 모두 발현되지 않았다. 신경다발에서는 PKC α 와 β I이 약하게 발현되었다.

成馬에서는 서골코기관 감각상피와 샘세포에서 PKC 아형이 모두 강하게 발현하였고, 신경다발에서는 PKC α , β I 및 δ 가 발현하였다. 이러한 成馬에서의 발현은 仔馬와 비교하여 더욱 강한 발현을 나타냈다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 PKC의 아형에 따라 서골코기관의 감각상피, 신경다발 및 샘세포에서 발현의 차이가 인정되었으며 연령이 증가함에 따라 발현이 강해지는 것으로 나타났다.

VI. 참 고 문 헌

Berghard, A. and Buck, K.B. 1996. Sensory transduction in vomeronasal: neurons evidence for G alpha o, G alpha i2, and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. *J. Neurosci.*, 16 909-918.

Brandt, S.J., Niedel, J.E. and Bell, R.M. 1987. Distinct pattern of expression of different protein kinase C mRNAs rat tissues. *Cell*, 49 57-63.

Burns, D.J., Bloomenthal, J., Lee, M.H. and Bell, R.M. 1990. Expression of the α , β II, and γ protein kinase C isoenzymes in the baculovirus-insect cell expression system. purification and characterization of the individual isoforms. *J. Biol. Chem.*, 265 12044-12051.

Frings, S. 1993. Protein Kinase C sensitizes olfactory adenylyl cyclase. *J. Gen. Physiol.*, 101 183-205.

Garcia-Suarez, O., Germana, G., Naves, F.J., Ciriaco, E., Represa, J., and Vega, J.A. 1997. Sensory epithelium of the

vomer nasal organ express TrkA-like and epidermal growth factor receptor in adulthood. An immunohistochemical study in the horse. *Anat. Rec.*, 247 299-306.

Hinds J.W. 1968. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of neurons and neuroglia. *J. Comp. Neurol.*, 134 287-304.

Holy, T.E., Dulac, C. and Meister, M. 2000. Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli. *Science*, 289 1569-1572.



Keverne, E.M. 1999. The vomeronasal organ. *Science*, 286 716-720.

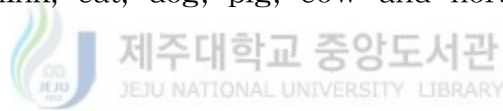
Nishizuka, Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233 305-312.

Nishizuka, Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334 661-665.

Nishizuka Y. 1989. Studies and perspectives of the protein kinase C family for cellular regulation. *Cancer*, 63 1892-1903.

Osborn, N.N., Wood, J. and Groom, N. 1994. The occurrence of three calcium- independent protein kinase C subspecies(δ , ϵ and ζ) in retina of different species. *Brain Res.*, 637 156-162.

Salazar, I., Sanchez Quinteiro, P., and Cifuentes, J.M. 1995. Comparative anatomy of the vomeronasal cartilage in mammals: mink, cat, dog, pig, cow and horse. *Ann. Anat.*, 177 475-481.



Salazar, I., Lombardero, M., Aleman, N., and Sanchez Quinteiro, P. 2003. Development of the vomeronasal receptor epithelium and the olfactory bulb in sheep. *Microc. Res. Tech.*, 61 438-447.

Salazar, I., Sanchez Quinteiro, P., Lombardero, M., Aleman, N., and Fernandez de Troconiz P. 2004. The prenatal maturity of the olfactory bulb in pigs. *Chem. Senses*, 29 3-11.

Taniguchi, K., Taniguchi, K., Arai, T., and Ogawa, K. 1992. Enzyme histochemistry of the olfactory and vomeronasal sensory epithelia in the golden hamster. *J. Vet. Med. Sci.*, 54 1007-1016.

Wetel, W.C., Khan, W.A., Merchenthaler, I., Rivera, I., Halpern, A.E., PHung, H.M., Negro-Vilar, A., and Hannum, Y.A. 1992. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J. Cell Biol.*, 117 121-133.



모기철. 1989. 한우 재래한양 서비기관의 형태학적 연구. *대한수의학회지*, 29 231-237

이광협, 안미정, 이용덕, 하태영, 김희석, 신태균. 2001. 말 서골코기관에서 protein kinase C 및 nitric oxide synthase의 면역조직학적 관찰. *대한수의학회지*, 41 269-273

Abstract

Expression of protein kinase C in the vomeronasal organ of the horse

Advised by Professor Taekyun Shin

Gwanghyeop Lee

Department of Veterinary Medicine
Graduate School, Cheju National University, Jeju
690-756, Korea

Abstract :

The vomeronasal organ in the horse, which involves the Flehmen reaction, is a very delicate sensory organ. To investigate the comparative localization of protein kinase C (PKC) isoenzymes in the vomeronasal organ with sexual maturation of the horse, we analyzed immunohistochemically the distribution of four isoenzymes of PKC, including α , β I, δ , and θ in the vomeronasal

organ of suckling and adult Thoroughbred horses.

In suckling horse, PKC α , β I and δ were weakly expressed in supporting, receptor and gland cells of the vomeronasal organ, while PKC θ was not detected. PKC α and β I were weakly detected in nerve bundle. PKC β I was only expressed in basal cells. Strong immunoreactivity of PKC isoenzymes was detected in the vomeronasal organs of a 2-years-old horse, compared with a suckling horse.

This study demonstrates that by expressing the vomeronasal organ of PKC isoenzymes, They are upregulated in cells of a horse's vomeronasal organ, depending on the age of the horse. These findings also suggest that PKC isoenzymes play an important role in the signal transduction of the Flehmen reaction.

KEY WORDS : Protein Kinase C, vomeronasal organ, immunohistochemistry, horse

감사의 글

항상 부족한 저에게 학문뿐만이 아니라 인격적으로도 많은 가르침을 주신 신태균 교수님께 감사의 마음을 전합니다. 또한 정성으로 저의 논문을 심사하여 주신 이두식 교수님과 이용덕 교수님께 감사드립니다. 그리고 끝까지 저를 격려해 주신 부모님과 장인, 장모님께도 감사드립니다. 제가 훌륭한 의사가 될 수 있도록 지도해주신 김희석 교수님, 임윤규 교수님, 박전홍 교수님, 배종희 교수님, 이경갑 교수님, 우호춘 교수님, 이영재 교수님, 손원근 교수님 그리고 미국에 계신 정종태 교수님, 강원대학교에 계신 위명복 교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

저에게 과분한 격려와 성원을 아끼지 않으셨던 제주경주마 목장의 김준규 과장님과 양재혁 선배님, 학문과 인생의 선배이신 진재광 선배님, 김승준 선배님, 강재운 선배님, 김황룡 선배님, 김철 선배님, 문창중 선배님, 강중철 선배님, 안미정 선배, 김도현 선배, 허승담 선배, 후배이자 대학동기인 희철군, 서울에 있는 경숙 그리고 달수 선배와 기현 선배에게도 감사의 말씀드립니다.

또한 한 식구처럼 지내온 실험실 후배들인 지영, 태기, 지성, 찬우, 정태, 진우 그리고 음으로 양으로 신경써준 양나연 선배, 문혁 선배 그리고 원형에게도 감사의 마음 전합니다.

항상 좋은 일이든 나쁜 일이든 함께 해주고, 이해해 주며 격려를 아끼지 않았던 나의 소중한 아내 지수에게 감사하고, 늘 고마운 지희, 상희, 선희 누나 그리고 광림이 형에게 감사의 마음과 이 작은 결심을 드립니다.

항상 부족했지만 여러분의 성원과 격려가 있었기에 여기까지 올수 있었음을 다시 한번 감사드립니다.

2005. 6.

이 광 협