



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2009年 2月
博士學位論文

기니픽 중간뇌의 중심회색질에 대한
신경화학적 구획

朝鮮大學校 大學院

醫學科

張赫眞

기니픽 중간뇌의 중심회색질에 대한
신경화학적 구획

Neurochemical Compartmentalization of the Midbrain
Periaqueductal Gray in the guinea pig

2009年 2月 日

朝鮮大學校 大學院

醫學科

張赫眞

기니픽 중간뇌의 중심회색질에 대한
신경화학적 구획

指導教授 김 상 훈

이 論文을 醫學博士學位 申請 論文으로 提出함

2008年 10月 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

醫 學 科

張 赫 眞

張赫眞의 博士學位 論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 박 상 학 印

委員 朝鮮大學校 教授 도 남 용 印

委員 全南大學校 教授 박 사 훈 印

委員 朝鮮大學校 教授 전 제 열 印

委員 朝鮮大學校 教授 김 상 훈 印

2008 12月 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

목 차

1. 목 차	
A. 표목차	i
B. 도목차	i
C. 용어요약표	ii
2. 영문초록	1
3. 본문	
A. 서론	3
B. 실험재료 및 방법	6
C. 결과	9
D. 고안	18
E. 결론	21
4. 참고문헌	22
5. 부록	
A. 사진설명	27
B. 사진 및 모식도	34

도 목 차

Table 1. Summary of distribution patterns of neuroanatomical markers in the subregions within the PAG	34
Figure 1. PAG 세로수준에 따른 CB-와 CR-면역반응성 분포상의 변화	35
Figure 2. VL 영역의 변화	36
Figure 3. dPAG-RIC에서의 NADPHd와 CB의 분포상	37
Figure 4. dPAG-RIC에서의 AChE의 분포상	38
Figure 5. Level I에서 CB와 CR의 분포상	39
Figure 6. Level II에서 CB, CR, NADPHd와 AChE의 분포상	40
Figure 7. Level III에서 CB와 CR의 분포상	41
Figure 8. Level III에서 CB, CR, PV, CO, NADPHd와 AChE ...	42
Figure 9. Level IV에서 CB, CR, NADPHd와 AChE	43
Figure 10. PAG의 입쪽 끝의 종료 양상	44
Figure 11. Level II의 PAG 구역분획 및 표지자들간의 상관성...	45

용어 요약표

Abbreviations

3N:	Nucleus of oculomotor nerve
4N:	Nucleus of trochlear nerve
4n:	Trochlear nerve
AChE:	Acetylcholinesterase
CB:	Calbindin D _{28K}
CB-ir:	Calbindin-immunoreactive
Cnf	Cuneiform nucleus
CO:	Cytochrome oxidase
CR:	Calretinin
CR-ir:	Calretinin-immunoreactive
DK:	Nucleus of Darkschewitsch
DL:	Dorsolateral periaqueductal gray
DM:	Dorsomedial periaqueductal gray
dPAG-RIC	Dorsal periaqueductal gray at inferior collicular recess
DRN:	Dorsal raphe nucleus
DTg:	Dorsal tegmental nucleus
IAP:	Interaural plane
IC:	Inferior colliculus
JPJA:	Juxtaqueductal periaqueductal gray
L:	Lateral periaqueductal gray
LDTg:	Laterodorsal tegmental nucleus
N+A:	Double labeling with NADPHd and AChE
NADPHd:	β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase
PAG:	Periaqueductal gray
PV:	Parvalbumin
RD:	Rostradorsal nucleus
RIC:	Recess of inferior colliculus
SC:	Superior colliculus
Su3:	Supraoculomotor nucleus
Su3C:	Supraoculomotor cap nucleus
Su4:	Supratrochlear cluster of CR-ir perikarya
VL:	Ventrolateral periaqueductal gray
VLC:	Ventrolateral cape nucleus

ABSTRACT

Neurochemical Compartmentalization of the Midbrain Periaqueductal Gray in the Guinea Pig

Hyuk-Jin Jang

Advisor: Prof. Kim Sang-Hoon Ph.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

Current concept of the longitudinally columnar organization of the midbrain periaqueductal gray (PAG), which was originally proposed in the functional studies, could not be readily convinced by the general histological investigations. Among five longitudinal cell columns (LCC) including dorsomedial(DM), dorsolateral (DL), lateral (L), ventrolateral (VL), and juxtaaqueductal columns, only the boundary for DL has been elucidated in most of neuroanatomical studies. This study aims at searching neurochemical basis suitable for the identification and further subdivision of each LCC region in the PAG.

Histochemistry for acetylcholinesterase (AChE), NADPH-diaphorase(NADPHd), and cytochrome oxidase (CO) and immunohistochemistry for calbindin-D_{28K} (CB), calretinin (CR), and parvalbumin(PV) were carried out in coronally- sectioned midbrain slices of the guinea pig.

CB-immunoreactive (CB-ir) perikarya and plexus of fibers and endings were selectively distributed in DL, VL and ventromedial part of the L but absent from DM and the junctional part between DL and L. Distribution patterns of CB-ir and CR-ir perikarya and fibers appeared to be mostly similar on the judgement criteria of LCC regions, but they were complementary each other within the same LCC region. Clusters of CB-ir or CR-ir perikarya revealed themselves to form LCC structure within the PAG whose rostral and caudal endings were reliably displayed. Difference in the distribution patterns between CB and CR revealed two neuroanatomically innominate nuclei. One was the supratrochlear cluster of CR-ir perikarya, and the other was rostradorsal nucleus marked with CB-ir perikarya and endings in the rostral DM. PV-immunoreactivity in the PAG were very low and almost neglectable. Distribution of CO activity revealed regional

subdivisions only in the longitudinally intermediate portion of the PAG in a pattern of higher CO activity in subregions with poor distribution of CB-ir or CR-ir perikarya. Comparison the distribution patterns among CB, CR, PV, NADPHd, AChE, and CO revealed the neuroanatomy of the rostral end of the PAG and the relationship between these neuroanatomical markers.

These data suggested that each LCC regions within the PAG could be neurochemically identified and further subdivided into specific sub- compartments, based mainly on the distribution patterns of CB- or CR-ir perikarya and fibers.

Key Words: Periaqueductal gray, Calbindin, Calretinin, NADPH-diaphorase, Acetylcholinesterase, Cytochrome oxidase.

서 론

중간뇌의 수도관 (aqueduct, Aq) 주변을 둘러싸고 있는 중심회색질 (periaqueductal gray, PAG)은 신경생리학적 측면에서 유해자극(통각)을 포함하여 다양한 위기상황에 대처하는 자율신경성 및 행동적 반응을 총괄한다고 알려져 있다 (1-5). 또한 PAG에서 통합 조정되는 각 기능별로, PAG 내 자극부위에 따라서 그 반응결과가 상반되게 나타나고 (6-8), 동일한 양상의 반응을 일으키는 자극부위들은 PAG 내부에서 일정한 위치에서 세로방향으로 연속되어진다고 정리되었다. 이러한 생리학적 및 행동반응에 대한 연구결과들을 바탕으로 하여 Bandler 연구진은 PAG 내부에서 신경세포들이 세로기둥 (longitudinal cell columns, LCC)을 이루고 있다고 주장하였다 (9). 즉, PAG는 등안쪽 (dorsomedial, DM), 등가쪽 (dorsolateral, DL), 가쪽 (lateral, L), 배가쪽 (ventrolateral, VL)이라는 4개의 LCC로 구성된다는 이론이다. 현재의 정설로는 LCC 이론을 수용하고서, Onstott 등이(10) 제시한 Aq 바로 바깥쪽에 좁은 폭의 고리모양으로써 juxtaaqueductal (JA) column을 5번째 LCC로 추가로 채택하여 PAG 내부를 5개의 LCC 영역으로 구분하는 추세이다.

PAG 내부구조에 관한 근거로서, 시기적으로 앞섰던 신경해부학적 소견들보다도 생리학적 반응결과가 우선적으로 대두되었던 이유는, PAG의 조직학적 특성에 기인한다. PAG의 내부는 크기가 작고 형태가 서로 유사한 신경세포들이 고밀도로 채워져 있는 양태로 관찰된다. 따라서 단일 염색상의 세포형태 (11-14) 또는 수초의 배열상 (15)을 기준으로 한 연구들에서 PAG 내부를 안쪽과 가쪽으로 동심원적 이분하는 점만 공통적일 뿐이고, PAG 영역 내부를 구분한 결과들이 연구자에 따라서 다르게 보고되어 있다. 신경계 내에서 PAG와의 신경로 연결을 탐색한 연구결과를 종합한 문헌 (16, 17)에서도, PAG의 세로방향 수준에 따라 특정한 LCC에 주로 연결되어진다는 국소적인 소견들만 나열되어 있을 뿐, 전체적인 범주의 PAG 내부구조를 제시하지 못하였다. 또한 신경전달물질과 그에 관련되는 효소 및 수용체 등의 분포상을 총망라한 문헌 (18)에서도 거의 모든 종류의 신경전달 관련 물질들이 PAG 내에 고루 분포하는 양상으로만 도식화되어 있고 PAG 영역의 내부를 구분하지는 못하였다.

한편 PAG 내부 LCC의 경계를 제시하는 소견들은 신경화학적 연구들에서 보고되었다. PAG 내의 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPHd)의 분포상에 의하여 DL (19)과 눈놀림신경위모자핵 (supraoculomotor cap nucleus, Su3C; 20) 구역들의 경계가 제시되었다. Cytochrome oxidase (CO) 활성도를 관찰한 연구 (21)에서는 DM 전체와 VL 영역의 가쪽 절반에서 CO의 높은 활성도를 나타낸다고 보고하였다. 또한 PAG 내 acetylcholinesterase (AChE) 분포상을 관찰한 연구 (22)에서 L의 가쪽 절반, DM의 가쪽 절반, Su3C, 그리고 JA의 배쪽 절반이 강한 양성구역들이며, 이들 구역들이 LCC 형태를 나타냄을 보고하였다. 그렇지만 이들 화학물질들은 PAG 내 LCC 구조를 제시하는 표지자로서는 충분하지는 않다. NADPHd와 CO 분포상은 DL 구역을 명확히 제시하기에 양측의 DL 사이에서 반대적 반응구역인 DM 구역도 부수적으로 파악되지만, L과 VL 구역의 경계는 제시되지 않는 것이다. 무엇보다도 CO와 AChE는 PAG 내에서 그 양성반응 구조물이 신경세포체가 아니라 들신경섬유 성분이라는 사실이다. 신경해부학적으로 신경핵 영역을 설정함에 있어서, 들신경섬유의 특성보다는 신경핵을 이루는 신경세포체들의 특성을 기준으로 삼아야 함이 타당할 것이다.

본 연구에서는 PAG 내 LCC 표지자로서 세포내 칼슘결합단백인 calbindin-D_{28k} (CB)와 calretinin (CR)을 채택하였다. CB와 CR은 신경해부학적 표지자로서 일찍부터 인정되어(23) 수많은 연구에서 활용되었으나, 실제로 PAG 내부의 LCC 구조와 관련하여 이들의 PAG 내 분포상을 면밀히 관찰한 보고는 없는 실정이다. 본 연구자는 예비 연구 (24)에서 CB가 DL 뿐만이 아니라 L과 VL에도 분포하기 때문에 하나의 관상면 조직절편에서 PAG의 LCC 구조를 동시에 제시하는 표지자로서 유용함을 보고한 바가 있다. 현재 신경해부학적 연구에서는 실험동물로서 흰쥐를 보편적으로 사용하지만 본 연구에서는 기니픽 (학술명 *Cavia Porcellus*)을 채택하였다. PAG 내부의 LCC 구조를 관찰하려는 본 연구의 목적상 CB-양성반응 세포체의 군락들의 경계를 분리하기가 기니픽이 상대적으로 더욱 분명하기 때문이다. 또한 기니픽의 PAG에서는 LCC가 여지껏 전혀 파악되어 있지 않기에, 본 연구는 이 관점의 첫 번째 연구로서도 의의 있다고 판단하였다.

이상과 같은 배경으로 추진한 본 연구는 다음 사항들을 밝히는 것을 목표로 하였

다.

첫째 기니픽 PAG 내에서 CB- 또는 CR-양성 신경세포체들의 분포상은 LCC 구조를 어느 정도로까지 제시하는가?

둘째, CB- 또는 CR-양성 세포체 군락의 분포상은 상호간에 또는 기존에 흰쥐에서 보고되어진 다른 신경화학적 표지자들의 분포상과 어떠한 차이를 나타내는가?

셋째, 다양한 신경화학적 표지자들의 분포상을 종합하여 분석하면, 현재 통념상의 LCC 구조보다도 PAG 내부를 더욱 세분할 수 있는가?

이러한 의문점을 밝히고자 다양한 표지자들에 대한 조직화학 및 면역조직화학 염색들을 시행하고, 그 소견들을 비교검토하였다.

실험재료 및 방법

실험동물과 마취

실험동물로는 체중 400g 이상의 기니픽 (*Cavia porcellus*, n=14)을 자웅의 구별없이 사용하였다. 각 동물의 마취를 위하여 ketamine hydrochloride (Ketar[®], 유한양행)를 50 mg/kg 용량으로 복강내 주사하였다.

조직절편 제작

마취된 동물을 4% paraformaldehyde 고정액으로 심장관류를 시행한 후, 중간뇌 부위를 적출하였다. 수거한 중간뇌를 동일한 고정액으로 4℃에서 12시간 후고정하였다. 이후 10, 20, 30% sucrose를 함유한 0.1M phosphate-buffered saline (PBS)에 순차적으로 담갔다가, dry ice로 동결시켜서 슬라이딩 절편기를 사용하여 두께 40 μm 의 관상면 절편을 얻었다. 이때의 절단면이 현재 통용되는 기니픽 뇌정위부도들 (25-27)에 일치하도록 주의를 기울였다. 연속되는 절편을 순차적으로 여섯 절편군에 속해지게 배열하였다. 처음 세 군은 NADPHd, AChE, CO의 조직화학염색을, 다음 두 군은 CB, CR 또는 parvalbumin (PV)에 대한 면역조직화학염색을, 남은 한 군에서는 필요에 따른 이중염색을 시행하는 것을 원칙으로 하였다.

조직화학 염색

NADPHd 조직화학 염색은 일반적인 Scherer-Singler 등 (28)의 방법을 사용하였다. 간략히 기술하면 1 mM β -NADPH, 0.3 mM nitroblue tetrazolium, 0.08% triton X-100을 포함한 용액을 사용하여 조직절편들을 실온에서 30분간 반응시켰다.

CO의 활성도는 Wong-Riley (29)의 조직화학 염색법으로 제시하였다. 즉 30 mg

cytochrome oxidase (Sigma, cytochrome oxidase C from horse heart와 50 mg의 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)를 녹인 0.1M PBS 100 ml 용액 속에 조직절편들을 넣고 광선을 차단한 상태로 38°C에서 3시간 반응시켰다.

AChE 활성도의 제시는 Woolf와 Butcher (30)의 방법을 사용하였다. 이 방법을 간략히 기술하면, 절편을 먼저 0.2M Tris-malate buffer (pH 5.7) 5 ml에 0.02M tetraisopropyl pyrophosphoramidate 100 μ l를 섞은 용액에 30분간 전처리하여 비특이성 cholinesterase를 억제시켰다. 이후 절편을 다음과 같은 조성의 반응용액에서 조직절편이 붉은 벽돌색을 나타낼 때까지 약 4시간 반응시켰다: 0.2M Tris-malate buffer (32.5 ml), 0.005 potassium ferricyanide (5 ml), 0.1M sodium citrate (2.5 mM), 증류수 5 ml, 0.03M cupric sulfate (5 ml), acetylcholine iodide (25 mg).

면역조직화학 염색

세포내 칼슘결합단백들인 CB, CR 그리고 PV 등에 대한 면역조직화학 염색은, 조직절편들을 용액내 부유시키며 Avidin-Biotin Conjugate (ABC) 방법으로 염색하였다. 먼저 10% goat 혈청과 0.3% triton X-100을 함유한 0.1M PBS에 2시간 부치하였다. 이후 절편들을 일차항체와 4°C에서 48시간 반응시켰다. 사용한 일차 항체들로 mouse monoclonal anti-calbindin D_{28K} (1:500, Sigma), mouse monoclonal anti-calretinin (1:500, Chemicon), mouse monoclonal anti-parvalbumin (1:500, Sigma)였다. 이후 1:200 또는 1:400으로 희석한 biotinylated goat anti-mouse IgG (Chemicon) 용액에 조직절편을 옮겨서 실온에서 2시간 반응시킨 후, ABC kit (Vector)를 이용하여 Avidin-peroxidase complex를 실온에서 30분간 반응시켰다. 발색반응은 100 ml의 0.1M PBS에 50 mg DAB와 33 μ l 0.3% H₂O₂를 함유한 용액으로 유도하였다.

이중염색

일부 절편들에서 NADPHd 조직화학 염색을 시행한 후, 다시 면역조직화학염색을 중복 시행하였다. 이러한 이중염색에서는 선행되는 NADPHd 염색의 반응시간을 20분으로 단축하여, NADPHd 반응에서 생성되는 formazan 물질이 면역조직화학 염색에서의 DAB 반응결과에 끼칠 영향을 제한시켰다.

신경해부학적 검색 및 도식화

조직절편내 PAG의 세로방향 수준에 대한 표기는, 조직절편의 PAG와 Aq의 형태를 기준으로 하여 Rapisarda와 Bacchelli의 기니픽 뇌정위부도 (27)에서 상응하는 수준으로 표기하였다. 한편 PAG 내 LCC에 대한 구획은 흰쥐의 뇌정위부도 (31)와 생쥐의 뇌정위부도 (32)를 참고하였다.

결 과

PAG와 중심수도관 (aqueduct, Aq)의 크기 및 형태는 중간뇌의 세로방향 수준에 따라 다양하게 관찰되었다. 따라서 본 연구에서는 PAG의 세로수준을 임의로 5단계로 나누어서 PAG내 염색소견을 기술하기로 하였다. Level I은 아래둔덕(inferior colliculus, IC)의 후미진 부위 (recess, RIC)와 뒤가쪽뒤관핵 (laterodorsal tegmental nucleus, LDTg)이 중간뇌 관상면 절편에서 관찰되어지는 PAG의 꼬리쪽 끝으로서 Rapisarda와 Bacchelli의 뇌정위부도 (26)에서 표기된 기준으로는 Level I은 양귀사이면 (interaural plane, IAP)으로부터 입쪽으로 (+로 표시) +1.0 mm부터 +2.4 mm 범주에 상응하였다. Level II는 뒤솔기핵 (dorsal raphe nucleus, DR) 영역의 주변에 LDTg와 도르레신경핵 (nucleus of trochlear nerve, 4N)이 관찰되지 않는 세로수준이고, IAP +2.4 mm부터 +3.0 mm 미만의 범주였다. Level III는 4N이 관찰되는 +3.0 mm이상 +3.5 mm 미만의 범주로 정하였고, Level IV는 눈돌림신경핵 (nucleus of oculomotor nerve, 3N)이 분명하게 관찰되는 +3.5 mm 이상 +4.3 mm 범주로 구분하였다. Level V는 nucleus of Darkschewitsch (DK)가 관찰되고 뒤맞교차 (posterior commissure, PC)에 의해 PAG가 분리되는 입쪽 끝까지 (+4.3 mm 이상)의 범주로 설정하였다.

각 세로수준에서 PAG내의 관찰소견을 Level I부터서 기술한다는 방침에 따라, PAG내 각 LCC의 세로범주를 표현하는 데 있어서도 꼬리쪽 끝 수준에서 '시작'이라는 용어를, 그리고 입쪽 수준에서 '끝'이라는 용어를 사용하는 것으로 정하였다.

중간뇌 세로수준에 따른 PAG내 CB- 또는 CR- 면역반응성 세포체들 분포상의 변화

중간뇌의 세로수준에 따라 PAG의 외형이 변모하지만, PAG 내부에서는 CB- 또는 CR- 면역반응성 (immunoreactive, ir) 세포체들의 분포구역은 세로방향으로 일정하게 유지되는 양상으로 관찰되었다 (Fig. 1). PAG의 꼬리쪽 부위에서 (Level I-II, IAP +1.5 mm부터 +3.0 mm까지) CB- 또는 CR-ir 세포체들이 PAG내에서 선택적으로 분포하는 구역들을 기존의 LCC 개념으로써 표현하면, DL 영역 전반과 L 영역의 안쪽 구역, 그리고 VL 영역의 전반에 해당되었다 (Fig. 1A-1C, 1a-1c).

PAG의 중간 부위 (Level III-IV, IAP +3.0 mm부터 +4.3 mm까지)에서는 PAG 꼬리쪽 부위와 비교하여 DL과 DM 영역은 큰 변동이 없으나 VL과 L 영역이 현저하게 축소되고, 4N의 등쪽에서 CR-ir 세포체군락 (supratrochlear clusters of CR-ir perikarya, Su4)이 위치하고 (Fig. 1c의 Su4), L 영역 내부에서도 CB-ir 세포체들이 급감하여 소실되고 (Fig. 1C와 1D), CR-ir 세포체들의 새로운 군락이 L 영역과 DM 영역 내에서 시작되며 (Fig. 1c와 1d의 L 영역내 *표시 구역), Su3C라는 신경핵 (Fig. 1d)이 위치하는 등, PAG 내부의 신경세포들의 구성 및 배치에서 뚜렷한 변화가 이루어짐을 확인하였다.

PAG의 입쪽 부위 (Level V, IAP +4.3 mm보다 입쪽 수준)에서는 DL 영역이 가쪽으로 축소이동하여 PAG의 변두리 쪽에 위치하고, DM 영역내에서 L 영역내 CB-ir 세포체들은 거의 관찰되지 않으며 (Fig. 1E와 F), L 영역전반에 걸쳐 CR-ir 세포체들이 분포하였다 (Fig. 1e와 1f). 또한 DM 영역의 정중선 부위에 새로운 신경핵이 (가칭 rostradorsal nucleus, RD) 위치하였다. 이 RD 신경핵 (Fig. 1E와 1F)은 CB-ir 세포체들 숫자에 비하여 상대적으로 신경섬유들의 밀도가 매우 높았으며 마치 골프채 모양으로 관찰되었다. RD 주변에서 CR-ir 세포체들은 CB-ir 세포체들에 비하여 적은 숫자가 주로 정중선 부근에 분포하였다. 한편 +4.8 mm보다 입쪽에서 뒤맞교차

(posterior commissure, PC)가 PAG 내부로 침입함에 따라 PAG의 외형이 호로병 모양을 나타내었다. PAG 내부로 PC의 침입은 L 영역의 가쪽 부분으로 시작하여서 (Fig. 1F와 1f에서 빨간색 화살표 부위) 점차 PAG 내부로 진행하고 (진행경로는 Fig. 1F와 1f에서 빨간색 점선으로 표시), 종국에는 PAG의 등쪽 일부를 섬과 같은 형태로 분리하였다 (Fig. 10K 참고).

PAG 내 CB-와 CR-ir 세포체들은 그들이 분포하는 LCC 영역내에서 낮은 밀도이지만 군락형태로 (Fig. 1에서 점선원으로 표시) 관찰되고, DL 영역내 군락들의 경우는 세로방향으로 분명하게 기둥구조를 취하고 있음을 제시하였다. 이러한 CB- 또는 CR-ir 세포체들 군락의 위치를 연속절편에서 서로 대조하면 각 LCC 영역의 크기, 위치, 구성성분의 변화와 세로범주에 대하여 추정할 수 있었다. 즉 L 영역내 CB- 및 CR-ir 세포체들이 혼재하는 군락들은 PAG 세로수준에 있어서 level III보다 꼬리쪽에만 국한되며, level IV보다 입쪽 수준의 L 영역내에는 CB-ir 세포체들이 거의 없으며 (Fig. 1D-1F) CR-ir 세포체들이 L 영역의 전반에 분산되어 있음 (Fig. 1d-1f)을 관찰할 수 있었다.

또한 CB-와 CR- 세포체들 군락간의 차이나는 소견들은 새로운 신경핵들을 제시하였다. 즉 level III에서 4N의 등쪽에 CR-ir 세포체들 군락으로서만 확인되어지는 신경핵 (Fig. 1c의 Su4)과, level V의 DM 영역내 정중선 부위에서 주로 CB-ir 섬유들에 의하여 표지되는 RD라는 신경핵 (Fig. 1E와 1F)을 확인할 수 있었다.

PAG 세로수준에 따른 VL 영역의 변화

PAG내 LCC 영역들의 경계를 판정하는데 있어서 CB- 또는 CR-ir 세포체들의 분포상을 기준으로 하는 경우에는 level I과 II에서 L 영역과 VL 영역 사이의 (이하 L/VL로 표기) 경계선 설정이 모호하였다 (Fig. 1A와 1a). 그렇지만 PAG의 배가쪽곶 (ventrolateral cape)의 위치에서 발견되는 NADPHd 양성반응 구역 (Fig. 2E에서 화

살표로 표시)을 근거로 하여 L/VL 경계선을 용이하게 판정할 수 있었다. NADPHd와 CB에 대한 이중염색소견에서 도르레신경의 교차 수준의 VL 영역은 (Fig. 2A), L 영역과 LDTg 영역 사이의 NADPHd-음성구역으로서 그 경계가 명확히 관찰되었다. 즉 L 영역과 LDTg 영역은 NADPHd-양성반응의 결과로 청색을 띠는 구역으로 나타내는데 비하여, VL 영역은 CB-ir 신경섬유들에 의한 갈색반응 구역으로만 관찰되었다. 그렇지만 도르레신경교차 수준보다 입쪽에서는 췌기모양핵 (cuneiform nucleus, Cnf)으로부터 뺏어나온 NADPHd-양성반응 띠 구역이 VL 영역과 맞닿는 세로수준부터서 입쪽 (Fig. 2A와 2B 대조)으로는, VL 영역내에 NADPHd-양성 신경종말들의 분포가 증가되어 관찰되어지고, 배가쪽곳 지역에서 NADPHd와 CB에 이중으로 표지되어지는 2개의 소구역이 서로 격리되어 관찰되었다 (Fig. 2B-2D). 두 소구역 중의 등쪽군은 (Fig. 2B-2D에서 화살표 머리와 점선 원으로 표시) L 영역의 CB-ir 세포체들이 Cnf로 빠져나오는 듯한 지점에 위치하였고, 배쪽군 (Fig. 2B-2D에서 화살표와 실선 원으로 표시)은 Cnf내의 NADPHd-양성 띠가 VL로 들어오는 듯한 지점에 위치하였다. 이렇게 NADPHd와 CB에 이중염색되어지는 두 소구역은 입쪽으로 갈수록 서로간의 간격이 좁아지다가 LDTg가 DR로부터 완전분리되는 세로수준 (Fig. 2E)부터는 하나의 신경핵으로서 관찰되었다. 그리고 배가쪽곳 지역에서 NADPHd와 CB에 의하여 이중으로 표지되는 이 신경핵 (ventrolateral cape nucleus, 이하 VLC)은 level II에서는 VL내의 CB-ir 세포체들 군락과 격리된 위치에서 관찰되다가 (Fig. 2E와 2F), level III에서는 VL 영역의 축소와 맞물려서 VLC도 쇠퇴 및 소실되었다 (Fig. 2G와 2H).

한편 VL내의 CB-ir 세포체들의 분포는 level I에서는 Aq 쪽에 치우쳐 있다가 (Fig. 2A-2D), level II에서는 Aq 쪽과 배가쪽에서 2개의 군락으로 (Fig. 2E와 2F), level III에서는 VL내 CB-ir 세포체들의 숫자가 급격히 감소되는 경향으로 (Fig. 2G와 2H) 관찰되었다.

Level I

PAG의 꼬리쪽 끝 수준에서는 PAG내 L 영역의 가로폭 (mediolateral width)은 매우 가늘지만 이보다 등쪽에서 RIC의 정중선 부위에 L 보다 넓은 가로 폭의 PAG 등쪽 영역 (dorsal PAG at RIC level, dPAG-RIC)이 관찰되었다. 이러한 dPAG-RIC 내에서의 DM과 DL의 꼬리쪽 끝이 시작되는 양상을 파악하기 위하여, NADPHd, AChE, CB, 그리고 CR에 대한 염색소견들을 대조하였다 (Fig. 3과 Fig. 4)

NADPHd와 CB에 대한 이중염색소견 상에서 (Fig. 3), dPAG-RIC와 IC의 경계는 CB 면역반응성 (CB-immunoreactive, CB-ir에서 갈색반응구역) 영역의 위치에 의하여 한 눈에 구분되었다. 즉 IC 영역이 CB에 음성반응을 나타내는 것에 대조적으로, dPAG-RIC의 가쪽 구역에서는 CB-ir perikarya(세포체)들과 섬유종말들이 밀집되어 있어서 CB에 매우 강한 양성반응을 나타내었다 (Fig. 3A). 이 CB-ir 구역의 바로 안쪽에는 NADPHd에 강한 양성반응을 나타내는 구역 (Fig. 3A에서 흰색 점선으로 표시된 청색반응구역)이 위치하였다. PAG 꼬리쪽 끝에서 이렇게 명확히 구별되어 관찰되는 CB-ir 구역과 NADPHd 양성반응 구역들은, 꼬리쪽 끝으로부터 약간 입쪽의 수준에서는 2개의 구역이 겹쳐져서, CB와 NADPHd에 의하여 이중으로 표지 (double-labelled)되어지고, dPAG-RIC의 가쪽 변두리에 위치하여 IC와의 경계를 표지하였다 (Fig. 3B-3E의 흰색 점선 구역). 이러한 CB와 NADPHd 이중 표지 구역이 dPAG-RIC 가쪽으로 축소이동되어지는 것과 맞물려 dPAG-RIC의 정중선 부근에 CB와 NADPHd에 의해 이중으로 표지되는 또다른 한 쌍의 소구역들이 발달되어지면서 DL (Fig. 3C-3F에서 흰색과 검은색 실선의 원들) 영역의 꼬리쪽 끝 형태를 형성하였다.

한편 다른 개체로부터 얻은 연속절편에서 dPAG-RIC 내의 AChE, NADPHd, CB, CR 양성반응 구역들을 대조하였다 (Fig. 4). 가쪽 변두리에 치우친 NADPHd-양성구역 (Fig. 4A-4G에서 실선 원으로 표시된 구역)의 바로 안쪽에 AChE의 활성도가 상대적으로 높은 구역 (Fig. 4A, 4D 및 4G에서 점선 타원으로 표시)이 위치하였으며,

AChE 활성도가 높은 구역은 CB 또는 CR의 면역반응성이 낮은 구역으로 확인되었다 (Fig. 4A-4F), 또한 dPAG-RIC에서 DL 구역의 꼬리쪽 끝을 표지하는 한 쌍의 CB- 또는 CR-ir 세포체들 군락이 관찰되는 세로구준 (Fig. 4H와 4I)에서는 가쪽 변두리의 소구역 (Fig. 4G의 점선원)에서만 AChE 활성도가 높게 관찰되었다.

PAG의 level I 입쪽 수준에서 DL 영역의 꼬리쪽끝이 시작됨에 따라, 현재 통용되는 개념상의 LCC 영역들이 비로소 PAG 내부에서 모두 관찰되었다. 그렇지만 통용 개념상의 LCC들 가운데 JA는 neutral red 염색소견 (Fig. 5A, 5D, 5G)에서도 신경세포체들의 밀도가 낮은 구역 (Fig. 3D와 5G에서 Aq 밖의 점선 테두리 지역)으로서 그 범주를 추정할 수 있었지만, CB와 CR 염색소견만으로는 JA 구역을 분리할 수 없었다.

Level I의 각 LCC 영역내에서 CB와 CR의 분포상은 대동소이하였지만 CB-ir 세포체들 수보다 CR-ir 세포체들의 개수가 상대적으로 많은 편이었다. 또한 DL 영역내에서 CB-ir 세포체들은 주로 등쪽 구역에 편중되고, 배쪽 (Aq쪽) 구역에서는 최소하게 분포하는 경향 (Fig. 3E, 4H와 5E)인 반면에 CR-ir 세포체들은 DL 영역내에서 Aq쪽에 편중되는 경향이 (Fig. 4H와 4I의 실선원 구역들 대조와 Fig. 5E와 5F에서 DL 영역내 점선 테두리 구역을 대조) 관찰되었다. L 영역의 가쪽 구역 (L 영역내 점선 테두리 구역)에서도 다수의 CR-ir 세포체들이 분포하는 반면, CB-ir 세포체들은 최소하였다 (Fig. 5B와 5C, 5E와 5F, 5H와 5I에서 각각 L 영역 가쪽의 점선 테두리 구역 대조).

Level II

뒤술기핵 (DR) 영역의 주변에 LDTg과 DTG가 관찰되지 않는 level II에서는 CB-와 CR-ir 세포체들의 분포상은 총체적으로 비슷하였다 (Fig. 6). AChE 활성도가 높은 L 영역의 가쪽 구역 (Fig. 6에서 흰색 또는 검은색 점선으로 테두리 표시)과 DM 영역을 제외한 나머지 PAG 부분에 CB-와 CR-ir 세포체들이 분산되어져 관찰되었

다. 또한 높은 NADPHd 활성도에 의해서 DL 영역은 인접한 DM 영역과의 경계가, 그리고 VL 영역은 인접한 DR 영역과의 경계가 분명히 파악되었다. Level III에 가까워질수록 VL 영역내의 CB-ir 세포체들은 감소되어지는 반면 (Fig. 6B와 6E 대조), CR-ir 세포체들의 수는 증가되어 관찰되었다(Fig. 6C와 6F 대조).

Level III

Level II에서 두드러진 차이를 보이지 않던 (Fig. 7A와 7E 대조) CB-와 CR-ir 세포체들의 분포상은, 4N이 관찰되고 VL 영역이 급격히 쇠퇴하는 (Fig. 7B-7D와 7E-7G) level III에서는 L 영역과 도르레신경핵 등쪽 구역에서 양 군 간에 뚜렷한 차이를 나타내었다. L 영역의 중간에서 CR-ir 세포체들이 분포하지만 (Fig. 7F-7H에서 L 영역내 * 표지된 실선테두리) CB-ir 세포체들이 없는 (Fig. 7B-7D의 L 영역에서 점선 테두리) 구역이 확인되었다. 도르레신경핵의 등쪽 구역에서도 CB-ir 세포체들이 없고 (Fig. 7B-7D의 점선원) CR-ir 세포체들만의 군락 (Fig. 7F-7H의 Su4)이 관찰되었다. CR-ir 세포체들이 표지하는 Su4는 눈돌림신경핵 (3N)의 꼬리끝 수준까지 군락으로서 확대되다가 (Fig. 7H), 3N의 중간수준부터 입쪽에서는 더 이상 군락을 인정할 수 없을 정도로 분산되며 CR-ir 세포체들의 숫자도 감소되었다 (Fig. 9 참조).

Level III의 PAG에서의 CB-와 CR- 세포체들의 분포상을 다른 신경해부학적 표지자들과 대조한 결과는 Fig. 8에 제시하였다. 다른 개체에서 얻었지만 비슷한 세로 수준의 3개의 연속절편군 (Fig. 8A-8C와 8D-8F)에서 CB의 분포상 (Fig. 8B와 8E)을 기준으로 하여서 cytochrome oxidase (CO, Fig. 8A), parvalbumin (PV, Fig. 8C), NADPHd와 AChE (N+A, Fig. 8D) 그리고 CR (Fig. 8F)에 양성반응 구역들을 비교하였다. DL 영역과 L 영역의 안쪽 구역은 CB-와 CR-ir 세포체들이 많이 분포하고 NADPHd의 활성도가 매우 높거나 (Fig. 8D의 DL) 중등도로 관찰되었다. 이와는 대조적으로 L 영역의 가쪽 구역과 DM 영역은 AChE 활성도가 상대적으로 높은 구역

이지만 (Fig. 8D의 L 영역내 갈색반응구역) CB-, CR-, NADPHd- 음성반응 구역으로 관찰되었다. 특징적으로 L 영역내에서 NADPHd와 AChE의 활성도가 가장 낮은 구역은 (Fig. 8D의 화살표 머리로 표시된 점선원), CR-ir 세포체들의 밀도가 높은 구역으로 (Fig. 8F에서 화살표 머리로 표시된 점선원) 확인되었다. 한편 CR-ir 세포체들 군락으로 표시되는 Su4 구역은 (Fig. 8F) NADPHd와 AChE의 활성도가 높은 구역으로 표시되었다 (Fig. 8D의 Su4). 그러나 Su4를 표시하는 NADPHd와 AChE-양성반응 신경종말의 분포는 level III에 한정되었을 뿐, level IV에서는 NADPHd와 AChE-양성반응 신경종말이 표시하는 Su3C 구역에서 CB- 또는 CR-ir 세포체들은 매우 희소하게 관찰되었다 (Fig. 9 참조).

Level IV

눈돌림신경핵 (3N)이 크게 관찰되어지는 level IV의 PAG에서는 VL 영역을 인정할 수 없었다. 또한 L 영역내 CB-양성반응은 신경말단에 의해서만 발현될 뿐, CB-ir 세포체들은 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 9A, 9D와 9G). 이와는 대조적으로 CR-ir 세포체들의 개수는 증가하여서 거의 L 영역 전체에 분산되어 관찰되었다 (Fig. 9B, 9E와 9H). DL 영역은 level III에서보다 영역의 크기가 축소되어, level V에 가까워질수록 가쪽 변두리에 편재되어 관찰되었다 (Fig. 9A와 9G, 9C와 9I 대조). 또한 level IV와 level V의 접경수준에서 이처럼 가쪽으로 편중된 DL 영역내에서는 CR-ir 세포체들의 개수가 급감하여 (Fig. 9H) level V에서는 DL 영역내 CR-ir 세포체들이 거의 관찰되지 않았다. 눈돌림신경핵 (3N)의 등쪽에서 신경종말에 의한 중등도의 AChE-양성반응 구역으로 눈돌림신경위핵 (supraoculomotor nucleus, Su3)이 표시되지만, CB와 CR-ir 세포체들은 매우 희소하였다. Su3C 구역도 NADPHd와 AChE에 대한 중등도 양성반응 구역으로서만 확인될 뿐, Su3C에 대한 CB와 CR의 표지능력은 인정할 수 없었다 (Fig. 9A-9F).

DM 영역에서는 CR-ir 세포체들의 군락이 관찰되었으며 (Fig. 9E와 9H에서 DM

영역내 점선원), 등쪽 정중선 부근에서 CB-ir 세포체와 신경섬유들이 고밀도로 분포하는 신경핵 (Fig. 9D와 9G에서 RD 구역)이 관찰되었다.

Level V

Aq의 배쪽에서 더 이상 3N이 관찰되지 않고 Darkschewitsch 핵 (DK)이 확대되어지는 세로 수준 (level V)에서 PAG가 종료되었다. 이러한 PAG의 입쪽 끝 종료양상은 뒤맞교차 (posterior commissure, PC)가 PAG 내부로 침입해서 관통함에 따라 (Fig. 10에서의 빨간색 화살표와 점선으로 경로 표시) PAG의 등쪽 부분이 Aq 쪽의 PAG 본체와 분리되면서 PAG 영역이 소실되어지는 형태로 관찰되었다 (Fig. 10). Level V에서 PV, CB, CO, NADPHd와 AChE의 양성반응 구역을 검토하였던 결과, PC의 PAG 영역내부로의 침입지점은 L영역의 가쪽 구역이고 (Fig. 9C-9E, 9G-9I), PC의 PAG 관통경로는 RD를 양분하는 (Fig. 9B, 9C, 9F, 9G 그리고 9J) 양상임을 확인하였다.

고 안

본 연구에서는 흰쥐를 대신하여 기니픽을 대상으로 선택하고 CB-와 CR-ir 세포체들의 분포상을 판정근거로 하여 PAG 내부를 어느 정도까지 세분할 수가 있는지, 나아가서 CB- 또는 CR을 기준으로 하는 PAG 내부 분획은 현재 통용되는 개념의 LCC 영역과 일치하는지를 확인하는 것을 주안점으로 하였다. 따라서 현재 통용되는 LCC 경계선을 명확히 파악하는 것을 가장 급선무로 간주하였다. 현재 PAG내 LCC 영역들의 설정은 흰쥐 (31, 33)와 생쥐(32)에서 이루어져 있다. 그렇지만 이들 동물에서 각 LCC 영역의 경계선에 대한 근거는 명확하지 않다. NADPHd 분포지역을 DL 영역으로 간주하고서, 이를 바탕으로 DL/DM 경계선과 DL/L 경계선이 설정되었으며 (28), 그리고 AChE 활성도가 높은 DR과 AChE 활성도가 낮은 VL 영역과의 경계선이 설정되어졌다 (Fig. 6A와 6D 참조). 그러나 L 영역과 VL 영역 사이의 경계선에 관하여는 명확한 근거가 없고 L과 VL 사이의 차이는 확인할 수 없다고 보고되어 있다 (33).

흰쥐에서 설정된 DM/DL, DL/L, 그리고 VL/DR의 경계선을 같은 기준으로 기니픽에서 판정하는 것에 어려움이 없었다. 기본적으로 Aq 주변에 PAG, DR, 안구운동 관련 신경핵군, 그리고 그 바깥에 아랫둔덕과 윗둔덕, 그리고 그물핵들이 위치하는 중간뇌의 기본구조는 서로 다른 동물의 종 간에도 거의 동일한 편이었다. 실제로 본인의 앞선 연구 (24)에서도 흰쥐, 생쥐, 토끼의 PAG에서 CB-ir 세포체들의 분포상이 매우 흡사하다는 사실을 확인하였다. 오히려 기니픽에서의 PAG 내부 분획은 흰쥐에 서보다 LCC 영역의 경계선들에 대한 근거들이 더욱 분명하게 파악되었다. 그 이유는 세 가지를 들 수 있다. 첫째, PAG의 크기와 CB- 또는 CR-ir 개수가 기니픽이 흰쥐보다 우월하다. 둘째, CB-와 CR-ir 세포체들의 분포상의 차이가 기니픽에서는 분명하게 구별되어진다. 셋째, L/VL 사이의 경계선도 기니픽에서는 타당하게 설정할 수 있다.

본 연구에서는 L/VL 사이의 경계선을 PAG 배가쪽끝 지역에서 NADPHd-양성반응 구역으로서 VLC라는 신경핵을 발견하고서, VLC를 이용하여 L/VL 사이의 경계

선을 합리적으로 설정할 수가 있었다. 이러한 L/VL 사이의 경계선은 VLC를 가쪽 지점으로, 그리고 안쪽 지점으로는 Aq 형태상 가쪽고랑 (lateral sulcus)을 정하여서, 두 지점을 연결하는 직선으로 간주할 수 있었다. 실제로 가쪽 고랑은 도르레 신경교 차 수준부터서 나타나서, VL 영역이 쇠퇴 및 종료되는 수준에서 원만한 곡선으로 사라지는 양상으로 (Fig. 2C와 2G 대조) VL 영역의 등쪽 한계에 대한 표지능을 인정할 수 있었다.

본 연구에서는 연속되는 한 쌍의 절편들에서 CB와 CR의 분포상을 비교하였다. 하나의 절편에서 CB와 CR에 대한 이중염색소견보다는 정확도가 떨어지지만, PAG의 구조가 LCC로 이루어진다는 사실을 감안하면 본 연구에서의 비교에 방법상 오류는 없을 것으로 간주하였다. 연속절편에서 CB-ir 세포체들 군락과 CR-ir 세포체들 군락의 위치는 서로 다르게 관찰되었다. CB-와 CR-ir 구역들에 대한 표현을 현재 개념대로 5개 LCC를 단위로 하여 기술하면 둘 사이에 차이가 나지 않을 정도로까지, PAG의 꼬리쪽 부분에서는 (level I-II) CB와 CR의 분포상은 대동소이하었다. 그러나 자세히 관찰하면 CB와 CR-ir 세포체들의 분포가 맞물려 엇갈림을 파악할 수 있었다. 즉 CB-ir 세포체들의 군락구역은 CR-ir 섬유종말 분포구역으로, CB-ir 섬유종말 분포 구역은 CR-ir 세포체 군락 구역에 해당되었다. 그러나 도르레 신경핵 (4N)부터 입쪽 수준의 PAG에서는 (level III-V) CB-와 CR-ir 세포체 군락의 분포상에서 분명한 차이를 나타내었다. 즉 4N 수준에서의 CR-ir 세포체 군락으로서 Su4라는 신경핵의 존재와 (Fig. 7) L영역내 CB-와 CR-ir 세포체들의 분포상의 차이는 (Fig. 9) CB-와 CR-세포체들 군락이 독자적인 분포상과 세로방향 연속성을 지니고 있음을 시사하였다.

도르레신경핵 (4N) 등쪽에 발견되는 CR-ir 세포체군락도 세로방향으로 상당한 범주의 기둥구조를 이루며, 이 Su4는 PAG내에서 VL 영역의 입쪽에 위치하는 격이다. 실제로 VL 기둥과 이 Su4기둥의 세로방향 길이를 합하면, CB-ir 세포체 군락이 표지하는 L 영역의 세로기둥 길이와 거의 일치한다. 흰쥐와 생쥐에서는 이러한 특징을 지닌 신경핵을 눈돌림신경위모자핵 (supraoculomotor cap nucleus, Su3C)으로 간주하고 있다 (26, 27).

Su3C는 NADPHd (9)와 AChE (11)에 대한 염색에서 뚜렷한 양성반응을 나타내는 조직학적 특성이 알려져 있다. 본 연구에서도 4N 수준에서는 기니픽의 Su4가 흰쥐에서의 Su3C의 특징처럼 NADPHd와 AChE에 양성반응구역과 거의 일치함을 확인하였지만 (Fig. 8D와 8F), 기니픽의 Su4를 Su3C의 꼬리쪽 부분으로 확실하게 간주할 수가 없었다. 기니픽의 Su4는 4N과 눈돌림신경핵(3N) 수준에 걸쳐서 배쪽과 가쪽으로 더욱 확대되어서, Su4의 가장 배쪽부분의 CR-ir 세포체들은 눈돌림신경위핵 (supraoculomotor nucleus, Su3)의 등쪽 일부에 해당되어진다 (Fig. 9). 이와는 대조적으로 NADPHd와 AChE에 양성반응을 보이는 구역은 3N 수준에서는 등쪽으로 이동되어진다 (Fig. 9F). 만일 3N 수준에서 NADPHd와 AChE 양성반응 구역을 Su3C로 간주하면, Su3C 구역엔 CR-ir 세포체들이 거의 분포하지 않는 것이다. 즉 기니픽을 제외한 대부분의 동물에서 Su3C를 표지하는 CB를 대신하여 기니픽에서는 Su3C를 CR이 표지한다는 격으로 해석할 수가 없는 것이다. 이와 같은 이유로 본 연구에서는 Su4를 Su3와 Su3C의 이중적 특성을 지닌 별도의 신경핵으로 간주하였다.

본 연구에서는 CB- 또는 CR-ir 구역을 대조한 결과, 현재 알려진 PAG 내 LCC 구조의 입쪽 한계는 3N 수준 (level IV)까지임을 파악하였다. PAG의 3N 수준에서는 L 영역 내부 주된 구성원이 CR-ir 세포체들로 대체되고 (Fig. 9), 3N 보다 입쪽 수준 (Fig. 10)에서는 DL 영역도 변두리로 축소이동되며, DM 영역의 내부에서도 내 RD (rostradorsal) 신경핵이라는 새로운 CB-ir 신경핵이 위치함을 확인하였다. 즉 level IV에서도 L 영역과 DM 영역이 설정될 수는 있지만, 각각의 내부를 구성하는 신경세포들의 신경화학적 특성이 level II 및 III에서와 매우 다름을 제시할 수 있었다.

본 연구에서 PAG의 LCC 영역들에 대한 각종 표지자들의 분포상을 PAG level에 따라 세분하여 정리하면 Table 1과 같다. CB-와 CR-ir 세포체들의 분포상은 기존에 흰쥐에서 보고되었던 CO (10)와 AChE (11)의 분포상과는 정반대임을 확인하였다. 이는 CB와 CR의 면역반응성이 주로 세포체에서 발현되고, AChE와 CO의 활성도는 주로 신경섬유에 의해서 발현되는 차이에서 기인하는 것으로 추정된다. 따라서 AChE와 CO의 높은 활성도를 보이는 PAG의 변두리 (가쪽) 구역들은 PAG로의 들 신경섬유가 많은 지역이고 PAG의 속 (안쪽) 구역들은 PAG에서 날신경섬유를 내보내는 신경세포들이 많은 지역으로 간주할 수 있었다.

본 연구에서 관찰하였던 PAG 내부에서의 CB, CR, PV, NADPHd, AChE, 그리고 CO의 분포상을 기준으로 하여 표지자들간의 상관성을 제시할 수 있었다 (Fig. 11). 즉 CB와 CR 그리고 NADPHd는 PAG내 분포상이 매우 비슷하고, AChE와 CO 그리고 PV의 분포상은 전자들과는 반대적인 양상으로써 비슷한 분포상을 제시하는 것으로 파악되었다.

결 론

단일 PAG 조직절편에서 CB 또는 CR에 면역반응성 (ir)을 나타내는 신경세포체 및 신경섬유의 분포상은 PAG 내부를 등안쪽 (DM), 등가쪽(DL), 가쪽 (L), 배가쪽 (VL) 구역으로 나누는 경계선을 명확히 제시하였다.

CB- 또는 CR-ir 신경세포체들은 PAG의 각 구역 내에서도 특정 소구역에 편중되어 군락형태를 나타내었고, 세로방향으로 세포기둥 (LCC) 구조를 제시하였다.

CB-와 CR-ir 세포체들 군락 양상의 차이는 도르레신경핵 등쪽에서 supratrochlear nucleus와 DM 기둥의 입쪽 끝에서 rostrrodorsal nucleus라는 새로운 신경핵들을 제시하였다.

PAG내에서 각종 표지자들의 분포상을 대조하여서 PAG내 LCC 영역의 세로범주를 파악할 수 있었으며 표지자들간의 상관성을 제시할 수 있었다.

이상의 결과들을 종합하여 CB 또는 CR은 PAG 내 LCC 구조를 해부학적으로 증명하는 우수한 표지자이고, CB와 CR의 분포상을 주된 기준으로 하여 PAG 내부를 현재 개념보다도 더욱 세분할 수 있다고 결론지었다.

참 고 문 헌

1. Dennis BJ, Meller ST. Investigations on the periaqueductal gray(PAG) of the rabbit: with consideration of experimental procedures and functional roles of the PAG. *Prog Neurobiol* 1993;41:403-434.
2. Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 1995;46:575-605.
3. Renn CL, Dorsey SG. The physiology and processing of pain. *AACN Clin Issues* 2005;16:277-290.
4. Brandao ML, Zanveli JM, Ruiz-Martinez RC, Oliveira LC, Landeira-Fernandez J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. *Behav Brain Res* 2008;188:1-13.
5. Kerman IA. Organization of brain somatomotor-sympathetic circuits. *Exp Brain Res* 2008;187:1-16.
6. Bandler R, Keay KA, Floyd N, Price J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs passive emotional coping. *Brain Res Bull* 2000;53:95-104.
7. Vianna DML, Brandao ML. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:557-566.
8. Bandler R, Carrive P, Zhang SP. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Prog Brain Res* 1991;87:269-305.
9. Bandler R, Shipley MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* 1991;17:379-389.
10. Onstott D, Meyer B, Beitz AJ. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons

anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: Analysis using laser confocal microscopy. *Brain Res* 1993;610:317-324.

11. Hamilton BL. Cytoarchitectural subdivisions of the periaqueductal gray matter in the cat. *J Comp Neurol* 1973;149:1-28.
12. Mantyh PW. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat and monkey: A Nissl, Weil and Golgi analysis. *J Comp Neurol* 1982;204:349-363.
13. Beitz AJ. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. *J Comp Neurol* 1985;237:445-459.
14. Gioia M, Tredici G, Bianchi R. A Golgi study of the periaqueductal gray matter in the cat: Neuronal types and their distribution. *Exp Brain Res* 1985;58:318-332.
15. Gerrits PO, Croon DH, Holstege G. A new subdivision of the rat midbrain periaqueductal gray based on its myeloarchitecture. *Neurosci Lett* 1993;161:232-236.
16. Beitz AJ. Periaqueductal gray. In: Paxinos G editor. *The Rat Nervous System*. 2nd Ed. San Diego: Academic Press; 1995:173-182.
17. Keay KA, Bandler R, Periaqueductal gray. In: Paxinos G editor. *The Rat Nervous System*. 3rd Ed. New York, Elsevier: 2004:243-257.
18. Tohyama M, Takatsuji K. *Atlas of Neuroactive Substances and Their Receptors in the Rat*. Oxford: Oxford University Press: 1998.
19. Herbert H, Saper CB. Organization of medullary adrenergic and noradrenergic projections to the periaqueductal gray matter in the rat. *J Comp Neurol* 1992; 315:34-52.
20. Carrive P, Paxinos G. The supraoculomotor cap: a region revealed by NADPH diaphorase histochemistry. *Neuroreport* 1994;5:2257-2260.
21. Conto F, Barbaresi P, Fabri M. Cytochrome oxidase histochemistry reveals

- regional subdivisions in the rat periaqueductal gray matter. *Neuroscience* 1988;24:629-633.
22. Ruiz-Torner A, Olucha-Brodonau F, Valdere-Navaro AA, Martinez-Sorizno F. The chemical architecture of the rat's periaqueductal gray based on acetylcholinesterase histochemistry: a quantitative and qualitative study. *J Chem Neuroanat* 2001;21:295-312.
 23. Andressen C, Blümcke I, Celio MR. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 1993;271:181-208.
 24. 김상훈, 장혁진, 이진. 중간뇌 중심회백질에서 calbindin-D_{28K}의 신경해부학적 표지성. *조선대학교 의대논문집* 2008;33:56-62.
 25. Luparello TJ. *Stereotaxic atlas of the forebrain of the guinea pig*. Baltimore: Williams & Wilkins Company: 1967.
 26. Tindal JS. The forebrain of the guinea pig in stereotaxic coordinates. *J Comp Neurol* 1965;124:259-266.
 27. Rapisarda C, Bacchelli B. The brain of the guinea pig in stereotaxic coordinates. *Arch Sci Biol* 1977;61:1-37.
 28. Scherer-Singler U, Vincent SR, Kimura H, McGeer EG. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods* 1983;9:229-234.
 29. Wong-Riley M. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res* 1979;171:11-28.
 30. Woolf NJ, Butcher LL. Cholinergic neurons in the caudate-putamen complex proper are intrinsically organized: a combined evans blue and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res Bull* 1981; 7: 487-508.
 31. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Academic Press, 2005.
 32. Paxinos G, Franklin KB. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed.

San Diego, Academic Press, 2004.

33. Paxinos G, Carrive P, Wang H, Wang PU. Chemoarchitectonic Atlas of the Rat Brainstem. San Diego, Academic Press, 1999.

Figure Legends

Figure 1. Caudal (A and a) to rostral (F and f) series of PAG sections showing the distribution of calbindin- (CB, upper row) and calretinin- (CR, lower row) immunoreactive (ir) neuronal perikarya and endings. The distribution of CB- or CR-ir perikarya were selectively localized and clustered in circles with dotted line in the DL, the medial half of L, and V area in the PAG, which was generally similar between CB and CR at levels I and II. AT level III, clusters of CR-ir without CB-ir perikarya marked specific subregions in L (* in c) and supratrochlear (Su4) area. The L area rostral to the level IV emptied CB-ir perikarya (D and E) and was filled with CR-ir perikarya (d and e). The DL area revealed its longitudinally columnar characteristic throughout the whole length of the PAG, but it was restricted into the dorsolateral corner of the PAG at level V (E, e and F). Between levels III and IV, the VL area disappeared and supraoculomotor cap nucleus (Su3C) located rostrally to VL. DM, DL, L and VL, dorsomedial, dorsolateral, lateral, and ventrolateral PAG, respectively; Aq, midbrain aqueduct; DK, nucleus of Darkschewitsch; DR, dorsal raphe nucleus; DTg, dorsal tegmental nucleus; LDTg, laterodorsal tegmental nucleus; Su3C, supraoculomotor cap nucleus; Su4, supratrochlear cluster of CR-ir perikarya; 3N, nucleus of oculomotor nerve; 4N, nucleus of trochlear nerve. In markings for three dimensional axis; C, caudal; D, dorsal; L, lateral; M, medial; R, rostral; V, ventral. The longitudinal levels of PAG sections were numerically expressed as the length in millimeter rostral (+) to the interaural plane (IAP), and were categorized into 5-degree scale used in the present study (in the box). Horizontal bar represents 500 μ m length.

Figure 2. Caudal(A) to rostral (H) series of sections showing the territorial change of the ventrolateral (VL) PAG revealed by the double staining of CB (brown color) and NADPHd (blue color). A, very low NADPHd-reactivity in VL marked the border line between VL and lateral (L) PAG. B and C, two separated nuclei double labelled with CB- and NADPHd-positivity located at the lateral border of VL. The dorsal (encircled with dotted-line and marked with arrow heads) and ventral one (encircled with line and marked with arrows) looked independent from each other and related with L and VL, respectively. D, two nuclei double labelled with CB and NADPHd became adjoined at the ventrolateral cape of the PAG at the level of the disappearance of LDTg neurons from dorsal raphe nucleus (DR). E and F, this double-labeled nucleus (ventrolateral cape nucleus, VLC) was observed as a single cluster disconnected from two large clusters of CB-ir perikarya in VL. G and H, VLC disappeared at the level III with trochlear nucleus (4N). The border line between L and VL (marked as broken line) was drawn based on the location of the remnant of this nucleus. Aq, midbrain aqueduct; Cnf, cuneiform nucleus; me5, mesencephalic trigeminal tract. Mark * represents the location of trochlear nerve. Other legends are as in Fig. 1.

Figure 3. Distribution of calbindin (CB)- and NADPHd-positive neuronal perikarya and endings in the level I PAG at the recess of inferior colliculus (IC). Alphabetical order of photomicrographs represents the caudorostral order of sections: A and F are the most caudal and rostral one of the series, respectively. A, the border of the PAG with the IC was marked with the lateral boundary of CB-positive area. NADPHd-positive area (encircled with white broken line) located just medial to CB-positive area. B, CB- and NADPHd-positive area became slender extending dorsally and appeared almost overlapped with each other. C and D, apart from the CB- and NADPHd-positive area locating along the lateral border of the PAG, two small areas double-labelled with CB and NADPHd (encircled with white and black line) were observed along the midline. E and F, area of the dorsolateral (DL) column were apparent with two separated subcompartments. CB- and NADPHd-positive perikarya and fibers were relatively more abundant in the outer (black circle) and inner (white circle) layer of DL, respectively. N+CB, double staining of CB and NADPHd. DM, dorsomedial PAG; L, lateral PAG. Horizontal bar in F represents 500 μ m.

Figure 4. Comparison of locations of acetylcholinesterase (AChE)-, NADPHd-, CB-, and calretinin (CR)-positive areas in nine consecutive sections of the caudal ending of the level I PAG in alphabetical order from caudal (A) to rostral (I). A-F, area of moderate AChE reactivity (encircled with broken line) located just medial to the NADPHd-labelled area (encircled with line along the lateral border of PAG) and revealed the low CB- or CR-immunoreactivity. G-I, both AChE- and NADPHd-positive areas were shifted laterally due to the development of dorsolateral(DL) PAG in the medial area. Clusters of CB- (circle marked with * in H) and CR-ir perikarya (circles in I) were distributed in different subregions in DL. N+CR, double staining of NADPHd and CR. Other legends are as in Figure 3.

Figure 5. Distribution of CB- and CR-ir neuronal perikarya and endings in the level I PAG. Although the low neuronal density differentiated juxta-aqueductal PAG (narrow area surrounding the aqueduct marked with broken line in D and G) from other PAG subregions in neutral red (NR) staining, the immunohistochemistry for CB and CR did not mark the juxtaaqueductal PAG. In DL area at level I, the inner subregion (marked with dotted line in E and F) contained more CR-ir than CB-ir perikarya. In the lateral half of the L area (marked with broken line in B, C, E, F, H and I), few CB-ir but many CR-ir perikarya were distributed. At the rostral level I, CB- or CR-ir perikarya in the medial half of L area were clustered into 2 groups (marked with circles in H and I). DL, L, and VL, dorsolateral, lateral and ventrolateral PAG, respectively; 4n, trochlear nerve; scp, superior cerebellar peduncle; DR, dorsal raphe nucleus; DTg, dorsal tegmental nucleus; LDTg, laterodorsal tegmental nucleus; Cnf, cuneiform nucleus; IC, inferior colliculus. Horizontal bar in I represents 500 μ m.

Figure 6. Similar distribution patterns between CB and CR immunoreactivity in the PAG at the level II. N+A in photomicrographs A and D, double staining for acetylcholinesterase (AChE) and NADPHd. CB- and CR-ir perikarya were distributed in areas with high NADPHd reactivity. Area with high AChE reactivity (encircled with broken line) revealed the low immunoreactivity for CB or CR. As the level advanced rostrally, the number of CB-ir perikarya decreased (compare B with E) but that of CR-ir perikarya increased in VL (compare C and F). Mark * represents the location of trochlear nerve. Other legends are as in Fig. 5.

Figure 7. Subregions marked with the distribution of only CR-ir perikarya in the level III PAG. A-D and E-H are CB and CR staining, respectively. A pair of tissue sections of each column are consecutive ones. Cluster of CR-ir perikarya marked supratrochlear (Su4) subregions and a dorsomedially middle subregion in L area (marked with *) in F-H. Corresponding subregions in B-D (encircled with dotted line) showed almost no CB-ir perikarya. Whereas VL area at level II (A and E) was marked CB-ir endings and CR-ir perikarya, VL area at level III became significantly narrowed between L and Su4 and contained almost no CR-ir perikarya (F and G). Other legends as in Fig. 5.

Figure 8. Comparisons of distribution patterns among cytochrome oxidase (CO, A), CB (B and E), parvalbumin (PV in D), NADPHd with AChE (N+A in D) and CR (F) in the PAG at level III. A-C and D-F were triplets of consecutive sections taken from different individuals, but the rostrocaudal levels of two groups were corresponded. The lateral area of PAG (marked with broken line in L) revealed moderate to high activity of CO and AChE but low immunoreactivity for CB and CR. The medial half of L area and most of DL area revealed many CB- (B and E) and CR-ir (F) perikarya and the high activity of NADPHd (D). Supratrochlear (Su4) subregions was marked with NADPHd- and AChE-positive nerve endings (D) and CR-ir perikarya (F). The central subregions in L area (encircled with dotted line and marked with arrow head) was marked with a cluster of CR-ir perikarya(F) and with the very low NADPHd reactivity(D). The central subregions (encircled) in the DM area and the trochlear shell (encircled and marked with *) were marked with a cluster of perikarya with high CO activity (A) and the weak but admissible immunoreactivity for PV (C). Other legends are as in Fig. 7.

Figure 9. Comparison of distribution patterns of CB, CR and NADPHd with AChE (N+A, right column) in the PAG at level IV. The L area at this level contained few CB-ir but abundant CR-ir perikarya (compare the left and the middle columns), especially in the dorsal half of L area (encircled with broken line). At the rostral level III, several clusters of CR-ir perikarya (encircled in E and H) and an anatomically innominate nucleus (RD in D and G) were observed in DM area. At this level, supraoculomotor cap nucleus (Su3C) was not evident in CB or CR immunohistochemistry (left and middle columns), but marked with the weak double-labelling for NADPHd and AChE (right columns). Supraoculomotor nucleus (Su3) was marked with the moderate activity of AChE (C, F and I). At the junction between level IV and V, the DL area was laterally restricted (G and I) and revealed almost no CR-ir perikarya (area between broken lines in H). Other legends are as in Fig. 5.

Figure 10. Comparison of distribution patterns of PV-, CB-, CO-, and NADPHd and AChE (N+A)-positive subregions in the rostral PAG at level V. In the dorsum of the level V PAG, specific nucleus marked with CB-ir perikarya and endings located along the dorsal midline (RD in B, F and J), and the DL area was restricted smaller. Arrows and curved broken lines in red color represent the direction and the route of the penetration of the posterior commissure (PC) into the PAG, respectively. In PV (A, E and I), CO (C and G) and NADPHd with AChE (D, H and L) staining, it was apparent that the PC invaded the PAG through the outer part of L (Lo). In CB (B, F and J) staining, RD nuclei were divided into two by the penetrating PC. Other legends are as in Fig. 1.

Figure 11. Diagrams showing the relationship between neuroanatomical markers used in the present study. A, Distribution patterns of markers in the level II PAG; B, Summary of relationship between markers.

Table 1. Summary of distribution patterns of neuroanatomical markers in the subregions within the PAG

Markers PAG Levels & Regions	CB	CR	PV	NADPHd	AChE	CO
Level I						
RIC (l/m)	++/+	++/+	±/-	++/+	±/++	-/+
L (l/m)	-/++	++/++	-	-/++	+/-	±/-
VL	++	++	-	-	-	-
Level II						
DM	-	-	±	-	+(d)	+
DL	++	++	-	+++	-	-
L (l/m)	-/++	-/++	-/-	-/+	++/-	+/-
VL	++	++	-	+	+	-
Level III						
DM	-	-	±	-	+(d)	++
DL	+++	+++	-	+++	-	-
L (l/m)	-/++	-/++	±/-	-/±	++/-	++/+
VL	-	+	-	±	±	±
Su4	-	+++	-	+	±	-
Level IV						
DM	-	-	±	-	+(d)	++
DL	+++	+++	-	+++	-	-
L (l/m)	-/+	-/++	±/-	-	++/-	++/-
Su3C	±	±	-	+	+	-
Level V						
DM	-	+	-	-	+(d)	+
DL	+	-	-	±	-	-
L (l/m)	-/-	+/>++	±/-	±/-	±/-	±/-
RD	++	+	-	±	-	±

*Grade of distribution: (-), very low reactivity and neglectable amount of neuronal perikarya and endings. (±), low but acceptable reactivity mainly by nerve endings; (+), several perikarya marked and/or moderate reactivity by nerve endings; (++) , many perikarya marked and/or prominent reactivity by nerve endings; (+++) , lots of perikarya marked and dense network of strongly reactive fibers and endings which fill the entire columnar area.

**Neuroanatomical nuclei corresponding to each level: I, recess of inferior colliculus and laterodorsal tegmental nucleus (LDTg); II, dorsal raphe nucleus without LDTg; III, nucleus of trochlear nerve; IV, nucleus of oculomotor nerve; V, nucleus of Darschewitsch and posterior commissure.

***Abbreviations: RD, rostradorsal nucleus; RIC, recess of inferior colliculus; Su3C, supraoculomotor cap nucleus; Su4, supratrochlear CR-immunoreactive area; d, dorsal; l, lateral; m, medial.

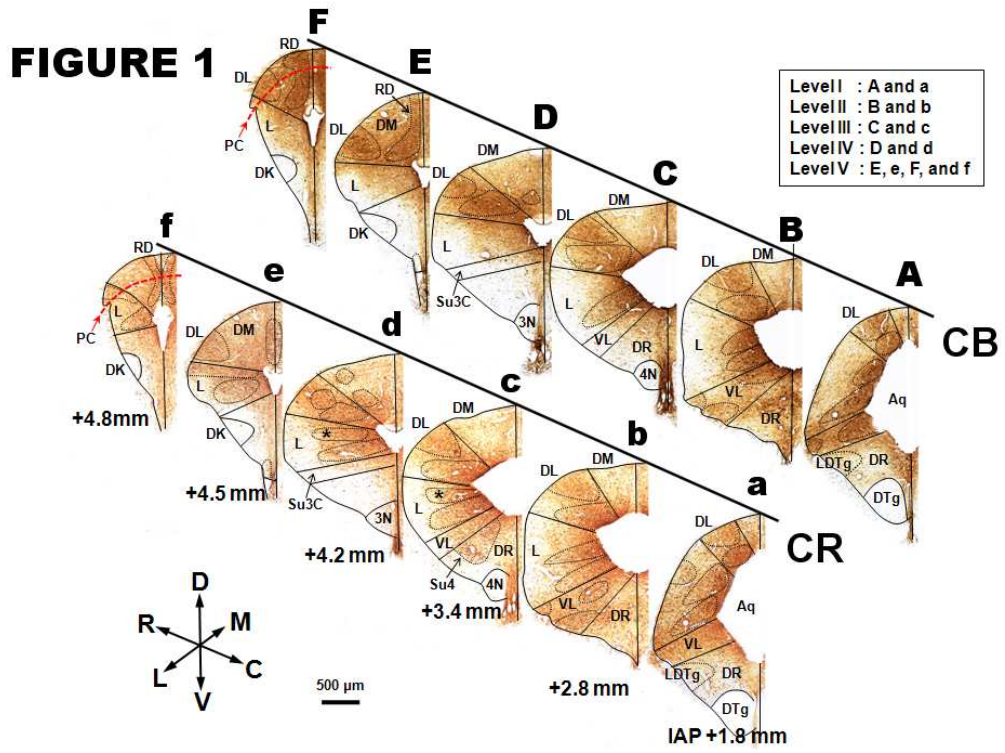


FIGURE 2

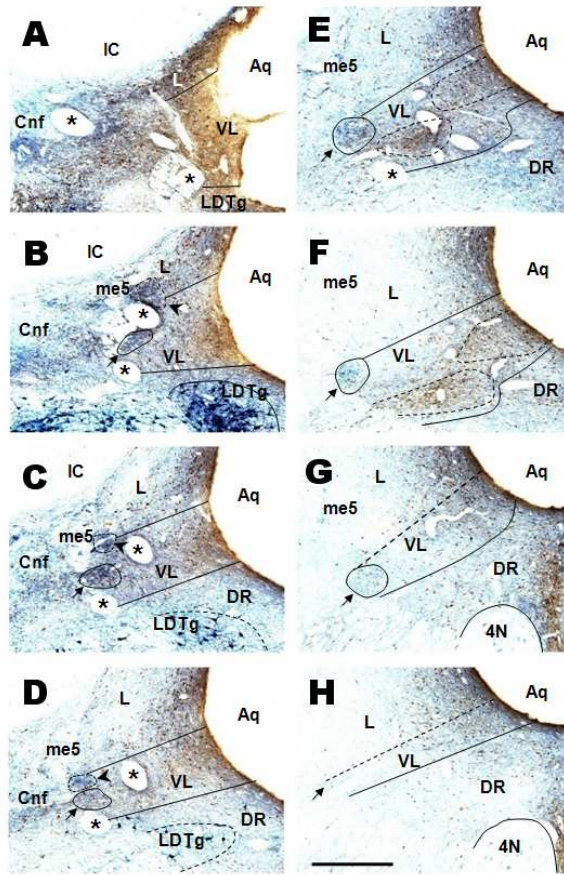


FIGURE 3

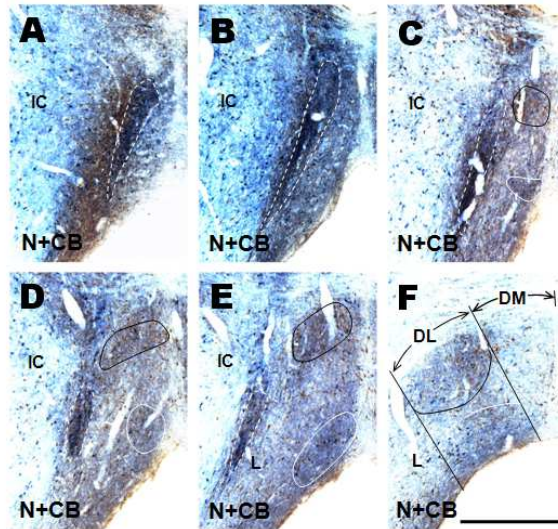


FIGURE 5

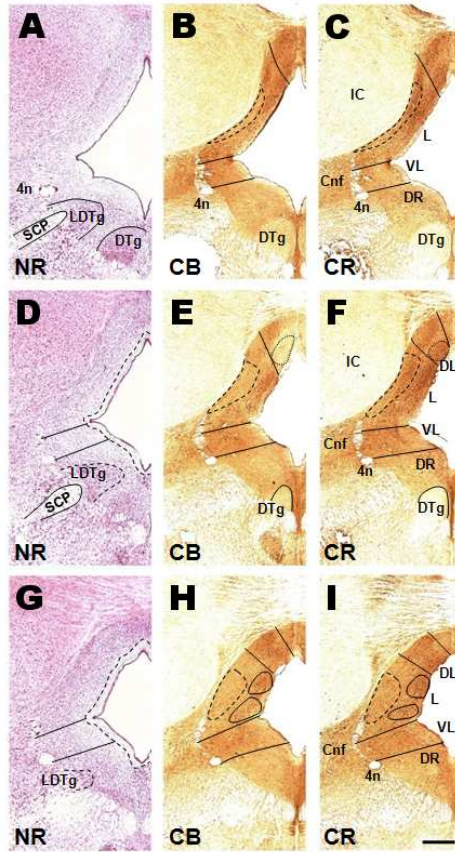


FIGURE 4

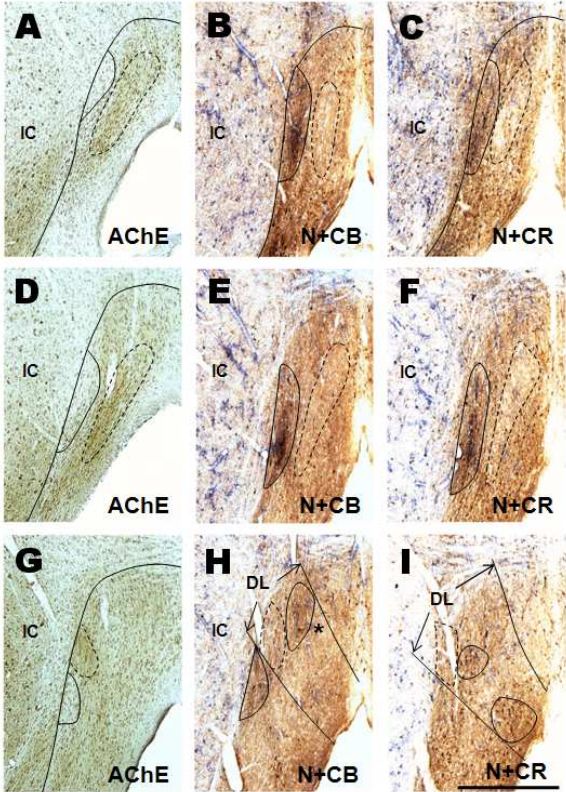


FIGURE 6

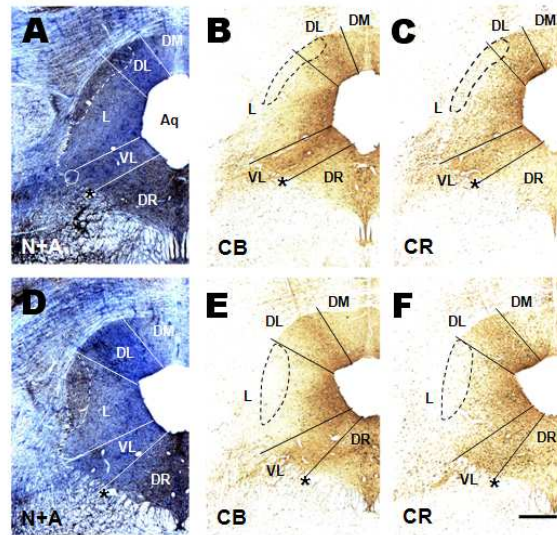


FIGURE 7

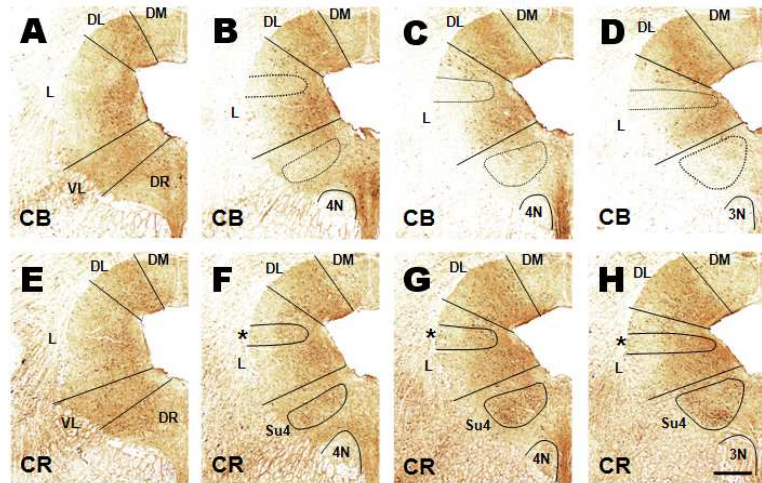


FIGURE 8

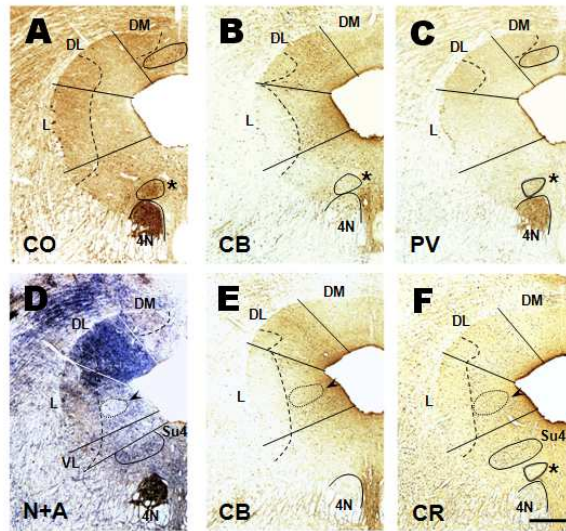


FIGURE 9

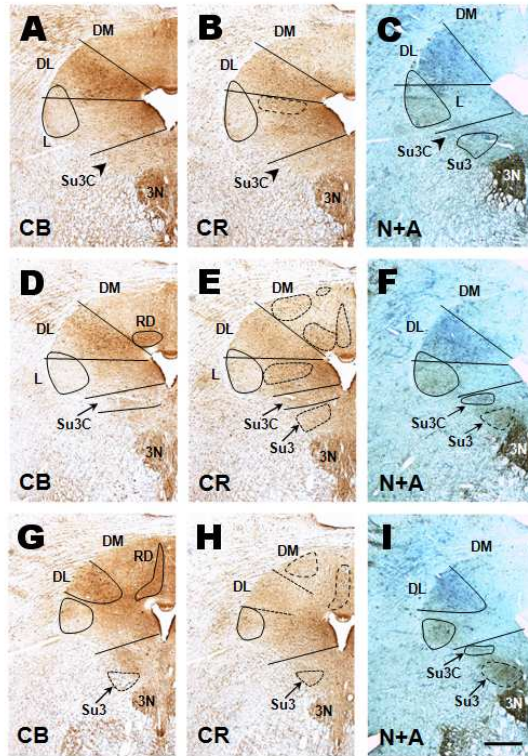


FIGURE 10

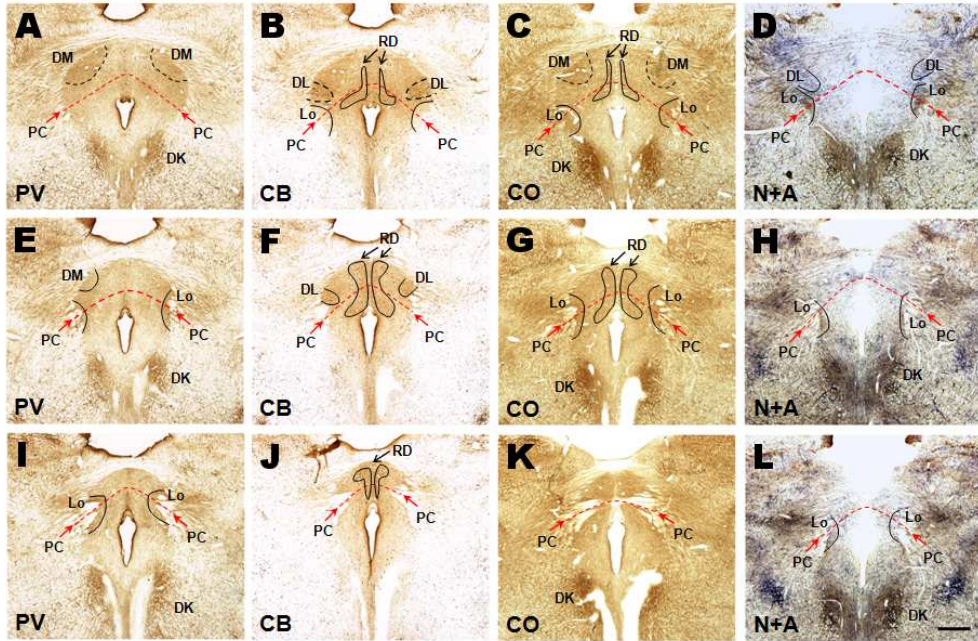
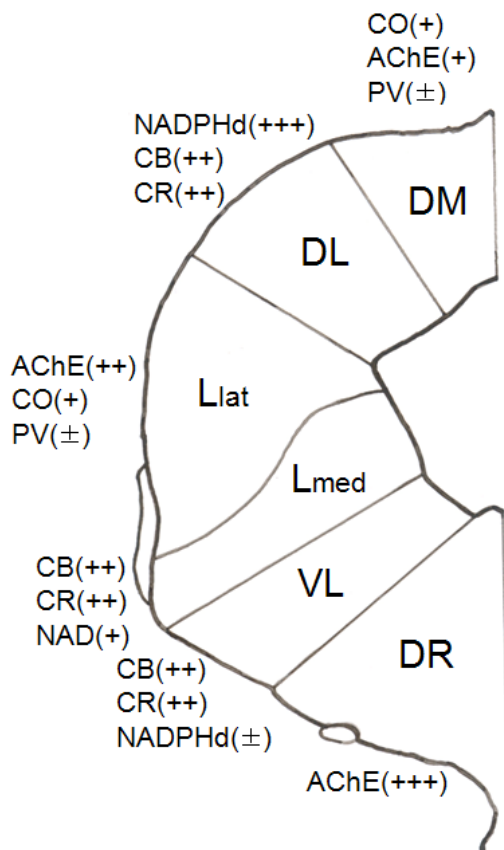


Figure 11

A



B

