

기니픽 망막에서 개시형 콜린성 아마크린세포에 연접하는 칼레티닌 면역반응성 신경절 세포

김형정¹ · 서 울² · 문정일³ · 최규룡²

한길안과병원¹, 이화여자대학교 의과대학 안과학교실², 가톨릭대학교 의과대학 안과학교실³

목적 : 기니픽 망막의 신경절세포층에 존재하는 칼레티닌 면역반응성 전위 아마크린세포의 특성을 조직면역화학요법 및 전자 현미경 소견을 통해 알아보고자 한다.

대상과 방법 : 4마리 기니픽의 망막표본을 칼레티닌에 대한 마우스 단일클론성 항체와 배양한 뒤 관찰하였다. 이중 표지 면역조직화학요법을 위해 칼레티닌에 대한 마우스 단일클론성 항체, 토끼 다클론성 항체와 함께 콜린아세틸트랜스퍼라제에 대한 염소 다클론성 항체, GABA에 대한 토끼 다클론성 항체, GABA_A수용체 $\alpha 1$, $\beta 2/3$ 아형에 대한 마우스 단일클론성 항체와 혼합배양한 후 동초점의 주사형 현미경과 형광 현미경을 이용하여 분석하였으며, 3마리 기니픽 망막은 투과 전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

결과 : 칼레티닌 면역반응성 세포는 신경절세포층의 신경절세포, 전위 아마크린세포, 속핵층의 다른 아마크린세포이다. 칼레티닌 면역반응성 전위 아마크린세포는 개시형 콜린성 세포로 칼레티닌 면역반응성 신경절세포에 연접하며 GABA를 가지며 신경절세포의 수상돌기에는 GABA_A수용체 $\beta 2/3$ 아형이 있다.

결론 : 본 실험결과는 기니픽 망막에서 개시형 콜린성 아마크린세포가 GABA_A 수용체 $\beta 2/3$ 아형을 통해 칼레티닌 면역반응성 신경절세포를 조절함을 제시해주는 형태학적 근거가 될 것으로 생각된다.

〈한안지 49(2):340-351, 2008〉

칼슘결합단백질은 세포내 자유칼슘농도를 제한하는 완충작용과 여러 종류의 효소와 이온 채널, 세포표면수용체의 활성도를 조절하는 칼슘 감각 작용을 하는 것으로 알려져 있다.¹ 칼레티닌은 최근 연구가 활발히 진행되고 있는 칼슘결합단백질 중 하나로 척추동물의 망막에 널리 분포되어 있으며 원뿔세포와 AII 아마크린 세포의 신경표지자로 쓰이고 있다.²⁻⁷ 이전 연구에서 칼레티닌은 마우스망막에서 별모양 형태를 보이는 콜린성 아마크린세포와 연관되어 있으며, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체와도 관련되어 있다고 기술하였다.⁸⁻¹¹

포유류 망막을 대상으로 한 전자현미경연구에서 콜린성 세포는 주로 두극세포에서 신호를 받으며, 신경절세포의 가지돌기가 주된 후부연접대상임을 보고하였다.¹²⁻¹⁹ 콜린성 세포사이의 신경세포 접합부 연결은 신경절세포의 방향선택적 특성 측면에서도 기술되었으며 Ariel et al.^{21,23}은 토끼망막에서 GABA에 의해 조절되는 신경절세포의 방향선택성은 또한 아세틸콜린에도 민감하며 가지돌기는 내망상층의 아마크린세포의 가지돌기와 충화되어 있다고 보고하였다.^{20-22,24,25}

그러나 이제까지 칼레티닌 면역반응성 신경절세포와 콜린아세틸트랜스퍼라제(ChAT) 면역반응성 세포의 상호작용에 관한 보고는 없었다. 따라서 본 연구에서는 면역조직화학요법과 전자현미경 검사를 통해 개시형 콜린성 아마크린세포와 칼레티닌 면역반응성 신경절세포에 대해 알아보고자 한다. 또한 콜린성 아마크린세포의 전부 또는 후부 연접하는 세포들에 의해 발현되는 것으로 추측되는 GABA_A 수용체의 $\alpha 1$, $\beta 2/3$ 아형과 이중표지면역조직화학요법을 시행하여 기니픽망막에서 개시형 콜린성 아마크린세포가 GABA_A수용체를 통해 칼레티닌 면역반응성 신경절세포를 조절하는지를 알아보고자 한다.

〈접수일 : 2007년 2월 23일, 심사통과일 : 2007년 9월 4일〉

통신저자 : 최 규 룡

서울시 양천구 목동 911-1

이화여자대학교 목동병원 안과

Tel: 02-2650-5154, Fax: 02-2654-4334

E-mail: ckrey02@ewha.ac.kr

* 본 논문의 요지는 2006년 대한안과학회 제95회 춘계학술대회에서 구연으로 발표되었음.

대상과 방법

1. 조직 표본 제작

네 마리의 기니픽을 사용하였으며 실험동물들은 국립보건원의 지침과 일치하는 가톨릭대학교의 가톨릭 윤리위원회가 정한 규정에 따라 취급하였다. 동물들은 4% chloral hydrate (4 ml/100g body weight)를 복강내 주사하여 안락사시킨 후 안구를 적출하였다. 적출된 안구에서 모양체 앞쪽의 전안부를 제거한 후 망막을 박리하여 0.1 M phosphate buffer (PB: pH 7.4)로 희석한 4% paraformaldehyde/0.2% picric acid에 2~3시간동안 담가 고정시킨 다음 PBS로 희석한 30% sucrose액에 24시간동안 4℃에서 유지시켰다. 액체질소에 넣어 냉동과 해동과정을 거친후 0.01 M PB로 세척하였다.

2. 면역조직화화요법

50 μ m 두께 절편과 전조직표본에서 조직의 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 10% 염소혈청과 1% Triton X-100을 포함하는 PBS용액에 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 조직표본은 0.5% Triton X-100이 포함된 PBS에서 칼레티닌에 대한 마우스 단일클론성 항체(Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA; dilution 1:1000)와 4℃에서 밤새도록 배양시킨 후 45분(3회×15분)동안 PBS로 세척하였고 2시간동안 FITC결합된 항마우스 IgG (Jackson Immuno Labs, West Grove, PA, USA dilution 1:50)와 배양하였다. 0.1 M PB로 30분간 세척후 슬라이드 위에 올려 표본을 만들었다. Adobe Photoshop version 5.5 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA)을 이용하여 영상을 분석하였으며 선명도 및 대비도는 동일한 기준을 적용하였다.

3. 이중 표지 면역조직화화요법

조직표본을 4℃에서 밤새도록 칼레티닌에 대한 마우스 단일클론성 항체 또는 토끼 다클론성 항체(Chemicon; dilution 1:1000)와 함께 ChAT에 대한 염소 다클론성 항체(Chemicon; dilution 1:100), GABA에 대한 토끼 다클론성 항체(Sigma, St. Louis, CA, USA dilution 1:2000), GABA_A 수용체 α 1에 대한 마우스 단일 클론성 항체(Chemicon; dilution 1:100)와 GABA_A 수용체 β 2/3에 대한 마우스 단일클론성 항체(Chemicon; dilution 1:100)를 혼합하여

배양하였다. 조직절편은 0.01 M PBS로 30분간 세척 후 실온에서 12시간동안 FITC를 결합시킨 항마우스 항토끼, 항 염소 IgG (Jackson Immuno Labs dilution 1:150)와 Cy3를 결합시킨 항토끼 혹은 항마우스 IgG (Jackson Immuno Labs dilution 1:500)와 배양하였다. 0.1 M PB로 다시 30분간 세척후 슬라이드에 올려 표본을 만들었다. 부적절한 일차 항체와 교차반응하는 이차항체를 예방하고자 일부 조직 표본은 마우스에 대한 이차항체와 반응시킨후 토끼 다클론성 일차항체와 배양하였으며, 일부 다른 조직은 토끼나 염소에 대한 이차항체와 반응후 마우스 일차 항체와 배양하였다.

4. 동초점의 주사형 현미경 검사

조직표본은 Bio-Rad Radianc Plus 동초점의 주사형 현미경(Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK)과 Nikon Eclipse E600 형광 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다. FITC 라벨링은 아르곤레이저의 488 nm line과 HQ513/30 (Bio-Rad) 투과필터를 사용하였으며 Cy3 신호는 green HeNe 레이저의 543 nm line과 605/32 (Bio-Rad) 투과필터를 사용하였다. Adobe Photoshop version 5.5 (Adobe Systems)을 사용하여 상을 수집하여 선명도 및 대비도는 동일한 기준을 적용하였다.

5. 전자현미경 검사

망막조직은 0.1 M phosphate로 희석한 4% paraformaldehyde/0.2% picric acid에 실온에서 30분간 담가 고정시킨 후 망막을 조심스럽게 분리한 후 4℃에서 2시간동안 추가로 고정시켰다. PBS로 희석한 30% sucrose액에 6시간동안 더 유지시킨 후 액체질소에 넣어 냉동과정을 거친후 중앙부위에서 떼내 50 μ m 두께로 절개하였다. 이후 실온에서 1시간동안 PBS에 혼합된 10% NGS와 반응시킨후 4℃에서 12시간동안 1:1000으로 희석화된 칼레티닌에 대한 항체와 배양하였다.

조직절편은 15분간 3회 PBS로 주의하여 세척하였고 2시간동안 biotin 처리된 항토끼 염소 IgG와 2시간동안 반응시킨후 다시 세척하였다. 조직절편은 avidin-biotin-peroxidase 복합체(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; dilution 1:100)와 1시간동안 반응시킨후 tris buffer로 세척하였고 0.01% H₂O₂ 포함된 0.05% 3,3'-diaminobenzidine 용액에서 배양후 저배율 현미경으로 관찰하였다.

배양된 세포에 PB이 함유된 1% glutaraldehyde를 투여하여 1시간동안 후고정시킨후 PB에 희석된 4.5% sucrose액에서 5분간 3회 세척하였다. 1시간동안 1% osmium tetroxide에 후고정시키고 다시 4.5% sucrose액으로 세척후 일련의 단계별 에탄올로 탈수시켰다.

대조염색으로 uranyl acetate를 사용하였으며 Epoxy resin (Epon 812)에 포매시킨후 60℃에서 3일간 polymerization 시켰다. Reichert-Jung 절개도를 이용하여 70-90 nm 두께의 절편을 만들어 투과 전자 현미경(JEOL 1200EX, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

결 과

1. 기니픽 망막에서 칼레티닌 면역반응성

기니픽 망막을 칼레티닌 면역표지한 수직 단면에서 칼레티닌 면역반응성은 속핵층과 신경절세포층에서 관찰되었다(Fig. 1). 속핵층에서 칼레티닌 면역반응 세포는 AII 아마크린 세포 형태를 나타내는 아마크린세포였으며 이는 이전에 토끼, 고양이, 랫트, 마우스 등을 대상으로 한 연구결과와 일치하였다.²⁶⁻³⁶ 신경절세포층의 칼레티닌 면역반응 세포는 전위 아마크린세포와 신경절세포였으며, 두 세포는 속열기층의 4번째 층에 가

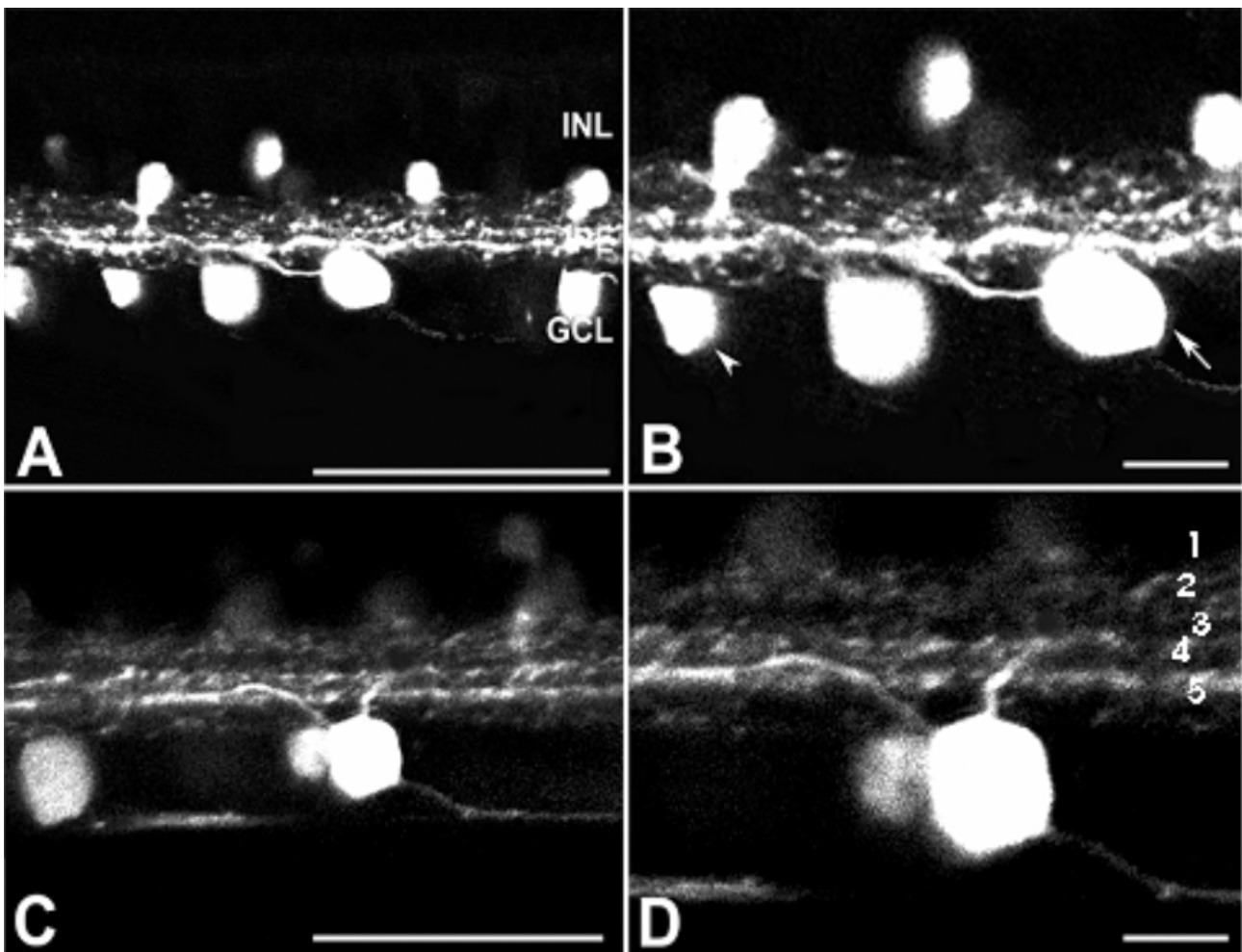


Figure 1. Light micrographs taken from 50 μ m thick vertical vibratome sections processed for calretinin immunoreactivity. (A) A low-power micrograph shows dense calretinin immunoreactivity in the inner half of the retina. Number of amacrine cells in the INL and cells in the GCL express calretinin. Inner plexiform layer contains immunoreactive fibers deriving from amacrine and cells in the ganglion cell layer. (B) A high-power micrograph of (A) shows calretinin immunoreactivity in displaced amacrine cell (arrowheads) and ganglion cell (arrows) that showed axon-like processes entering into the optic fiber, ramifies in stratum 4 of the IPL. (C) Calretinin immunoreactive ganglion cell showing their dendrites in strata 3 and 4 of the IPL is also seen. (D) Higher magnification of (C). Number 1, 2, 3, 4, 5 indicate stratum of IPL. INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bars in A, C=50 μ m in B, D=10 μ m.

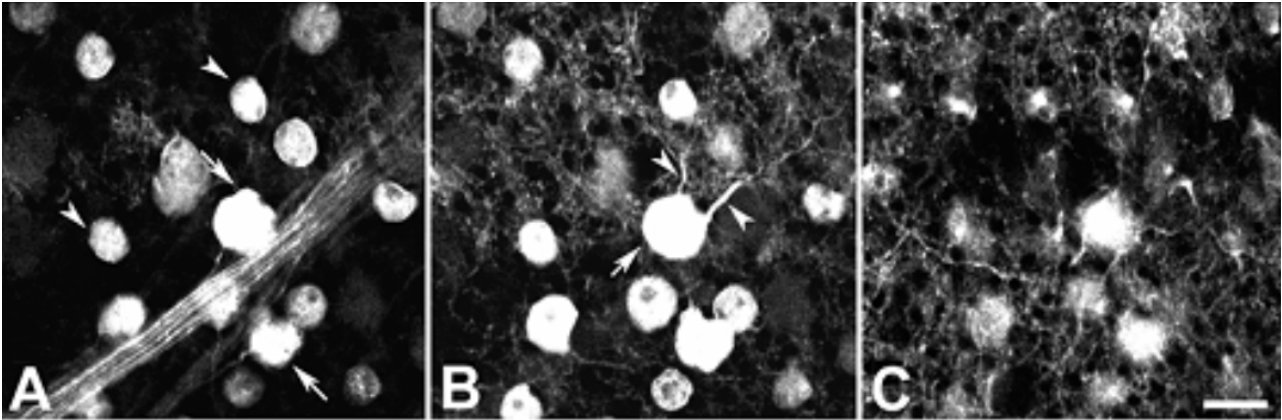


Figure 2. Light micrographs taken at different focal planes in the same field of a whole-mount guinea pig retina processed for calretinin immunoreactivity. (A) A micrograph focused at the calretinin immunoreactive cells in the GCL. Two subpopulations of calretinin immunoreactive cells can be distinguished by their soma size and presence of axon entering optic fiber, medium cells (arrowheads) with no axon and large cells (arrows) with axon. (B) The focus is on the different focal plane of (A) within the outer aspect of the IPL. Calretinin immunoreactive ganglion cell (arrow) shows several stout primary dendrites emerging from the soma (arrowheads) and branched dendrites. (C) The focus is on the IPL slightly different focal plane as (B). Bushy processes of calretinin immunoreactive cells in GCL are visible. Scale bar=10 μ m.

지를 형성하였다(Fig. 1A, 1B). 신경절세포는 4번째 층에 가지를 형성하는 형태와 3번째 층, 4번째 층에 가지를 형성하는 두가지 형태를 보여주었다(Fig. 1C). Figure 1D에서는 같은 시야 범위에 대해 좀 더 확대된 상을 보여주고 있다.

전조직표본에서 신경절세포층에 초점을 맞추었을 때, 두 종류의 세포를 관찰할 수 있었으며 시신경섬유 근처에서 축삭이 보이는 큰 세포는 신경절세포로 여겨지며, 축삭이 없는 중간 크기의 세포는 전위 아마크린세포로 추측하였다(Fig. 2A). Figure 2A와 동일한 망막 영역에서 속열기층의 외측면 내의 다른 초점면에서 관찰한 Figure 2B에서는 칼레티닌 면역반응성 신경절세포의 일차 수상돌기가 관찰되었으며 세포체에 인접해 있지 않은 먼 쪽 영역에서 분지를 형성하는 것이 관찰되었다. 칼레티닌 면역반응성 전위 아마크린세포에서도 분지된 수상돌기가 관찰되었다. Figure 2B와 약간 다른 초점면에서 얻은 Figure 2C에서는 표지된 가지돌기들이 혼합되어 있어 분석이 어려웠다. 기니픽 망막에서 관찰된 칼레티닌 면역반응성 양상은 토끼 망막을 대상으로 한 이전의 연구 결과와 일치하였다.¹⁰ 그러나 칼레티닌이 신경절세포층에서 몇몇 형태적으로 전혀 다른 신경집단에 존재한다는 것이 명백하기 때문에 정확한 농도 및 분포 측정은 시도하지 않았다.

2. 칼레티닌과 ChAT의 이중 면역형광

이전 실험에서 신경절 세포층의 칼레티닌 면역반응

세포는 속열기층의 4번째 층에서 가지를 형성함을 확인할 수 있었는데, 이는 개시형 콜린성 아마크린세포의 가지돌기 층화양상과도 일치한다. 이전의 여러 논문에서 콜린성 세포는 두극 세포로부터 자극을 받아 신경절 세포와 다른 아마크린세포에 연결 출력을 하는 것으로 보고되었다.^{8,32,35-42} 따라서 칼레티닌 면역반응성 가지돌기가 4번째 층에서 콜린성 아마크린세포의 가지돌기와 함께 층화하는지를 알아보기 위해서 칼레티닌과 ChAT에 대한 항혈청을 이용하여 이중 표지를 하였다(Fig. 3).

이중 표지 실험 결과, 대부분의 개시형 콜린성 아마크린세포가 칼레티닌 면역반응성 신경절세포가 아닌, 칼레티닌 면역반응성 전위 아마크린세포와 함께 위치하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3C). 칼레티닌 면역반응성 신경절 세포의 가지돌기와 콜린성 아마크린세포의 미세 가지돌기와의 관련성을 알아보기 위하여 전조직 표본에서 칼레티닌(Fig. 3E, H, K)과 ChAT (Fig. 3F, I, L)를 이중 표지하였다. Figure 3G에서 칼레티닌 면역 반응성 전위 아마크린세포는 ChAT에 대하여 면역반응성을 나타냈다(Fig. 3G). 또한 콜린성 가지돌기가 속열기층에서 칼레티닌 면역반응성 신경절세포의 가지돌기와 함께 다발을 형성함을 관찰할 수 있었으며 이는 이전에 Vardi et al⁴³에 의해 발표된 결과와 일치하였다. 이를 토대로 개시형 콜린성 아마크린세포는 칼레티닌 면역반응성 신경절세포의 가지돌기로 연결을 형성할 것을 추측하였으며 이를 전자 현미경검사를 통해 확인하였다.

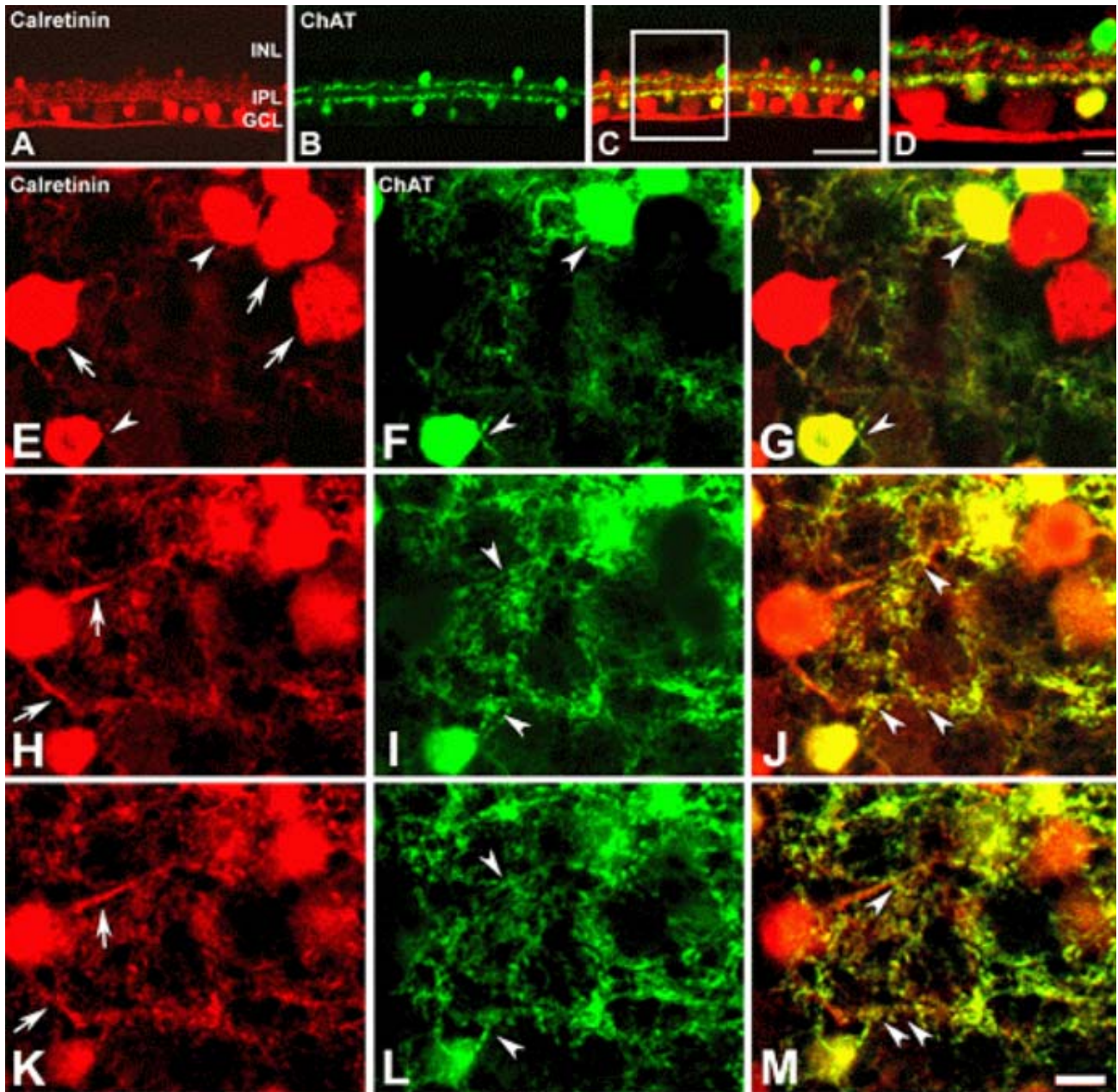


Figure 3. Confocal micrographs taken from 50 μ m thick vertical vibratome sections (A-D) and whole mount (E-M) processed for calretinin (A, E, H, K) and ChAT (B, F, I, L) immunoreactivities. Calretinin immunoreactivity was visualized using a Cy3-conjugated secondary antibody. ChAT immunoreactivity is visualized using anFITC-conjugated secondary antibody. (A) Calretinin immunoreactivity in amacrine cell, displaced amacrine cells, and ganglion cell is seen (red). (B) ChAT immunoreactivity shows in mirror symmetric populations of amacrine cells in the INL and displaced amacrine cells in the GCL (green). (C) Double exposure of A and B. Colocalization (yellow) of calretinin and ChAT immunoreactivities is visible in sublamina b of the IPL and displaced amacrine cells in the GCL. (D) The high-magnification view of the inset rectangle in (C). E-G: The focus is on the GCL. (E) Calretinin immunoreactivity shows in displaced amacrine cells (arrowheads) and ganglion cells (arrows). (F) ChAT immunoreactivity shows in displaced amacrine cells (arrowheads). (G) Double exposure of E and F. Colocalization (yellow) of calretinin and ChAT immunoreactivities is visible in the displaced amacrine cells (arrowheads). H-M: The focus is on the different focal plane of (E-G) within the outer aspect of the IPL. (H, K) Dendrites of calretinin immunoreactive ganglion cell (arrows) and displaced amacrine cell are seen. (I, L) ChAT immunoreactive dendrites are seen (arrowheads). (J, M) Double exposure of H and I; K and L, shows colocalization (yellow) of ChAT immunoreactive dendrites and calretinin immunoreactive ganglion cell dendrites (arrowheads). Scale bar in A-C=50 μ m; in D-M=10 μ m.

3. 칼레티닌 면역반응성 세포의 전자 현미경검사

Figure 4에서 속열기층의 4번째 층에서 표지된 신

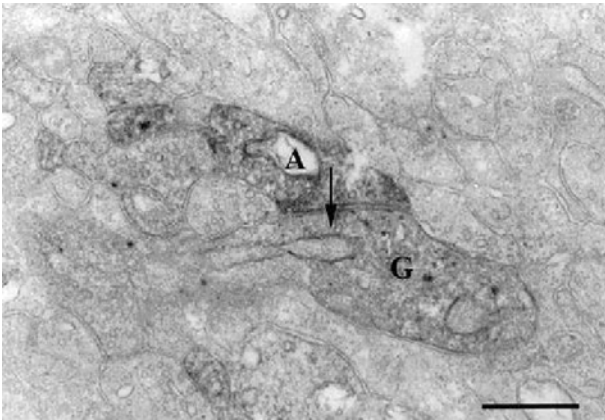


Figure 4. An electron micrograph taken from a vertical ultrathin section in stratum 4 of the IPL of the guinea pig retina processed for calretinin immunoreactivity. A calretinin immunoreactive displaced amacrine cell (A) makes chemical synapse onto the calretinin immunoreactive ganglion cell dendrite (G). Arrow indicates direction of impulse transmission. Scale bar=0.5 μ m.

경절세포의 가지돌기와 시냅스 앞부분을 이루는 아마크린세포의 가지돌기를 관찰할 수 있었다. 전자 현미경 검사를 통해 기니픽의 망막에서 개시형 콜린성 아마크린세포가 칼레티닌 면역반응성 신경절세포쪽으로 연결을 형성함을 확인할 수 있었다.

4. 칼레티닌과 ChAT 면역 반응성 세포의 신경화학적 특성

칼레티닌 면역반응성 아마크린세포는 토끼와 기니픽 망막에서 글라이신 면역반응성을 나타내는 것으로 알려져 있다.^{37,44} 하지만 포유동물의 망막에서 콜린성 아마크린세포는 GABA 작용성 아마크린세포의 부분집합이 되는 것으로 나타났다.^{45,46}

본 연구에서는 신경절세포층의 칼레티닌 면역반응성 세포가 GABA 면역반응성을 나타내는지를 알아보기 위하여 칼레티닌, ChAT, GABA 각각에 대한 항혈청을 이용하여 이중 표지 면역조직화학요법을 시행하였다. Figure 5는 칼레티닌(Fig. 5A)과 ChAT (Fig. 5D), GABA (Fig. 5B, E)를 이중표지한 절편 사진으로 Figure 5C와 5F에서 관찰된 것과 같이, 모든 칼레티닌 면역반응성 전위 아마크린세포와 개시형 콜린성

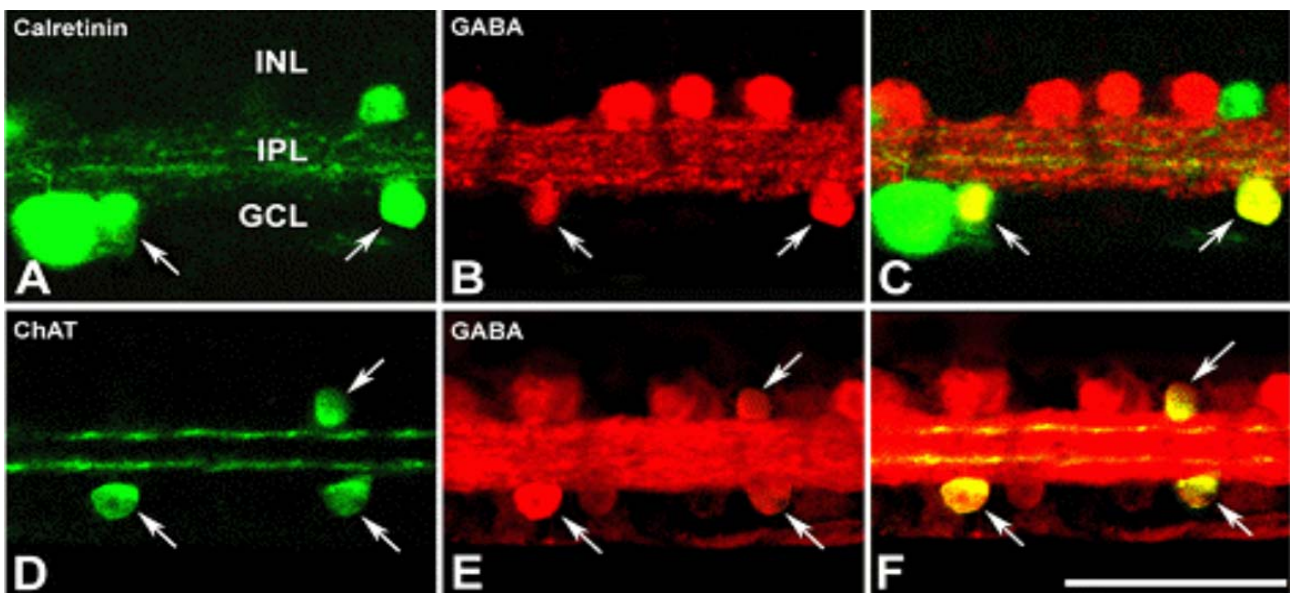


Figure 5. Confocal micrographs taken from 50 μ m thick vertical vibratome sections processed for calretinin (A), ChAT (D), and GABA (B, E) immunoreactivities. Calretinin and ChAT immunoreactivities were visualized using a FITC-conjugated secondary antibody. GABA immunoreactivity was visualized using a Cy3-conjugated secondary antibody. (A) Calretinin immunoreactive displaced amacrine cell, ganglion cell and their dendrites are visible (green). (B, E) Several GABA immunoreactive cell bodies (red) in INL and GCL are visible. (C) Double exposure of A and B. Colocalization (yellow) of calretinin and GABA within the same cell (arrows) is clear in the GCL. (D) ChAT immunoreactive cell bodies (green) in INL and GCL are visible. (F) Double exposure of D and E shows colocalization (yellow) of ChAT and GABA within the same cells in the INL and GCL (arrows). Scale bar=50 μ m.

아마크린세포 및 폐쇄성 콜린성 아마크린세포에서는 GABA면역 반응성을 관찰할 수 있었으나, 칼레티닌 면역반응성 신경절세포에서는 GABA 면역반응성이 관찰되지 않았다.

5. GABA_A 수용체 아형과 칼레티닌 면역반응성 세포의 증화현상

포유류를 대상으로 한 이전 연구에서 아마크린세포와 신경절세포에서 GABA_A 수용체가 발현된다는 결과를 보고하였으며, 특히 토끼의 망막을 대상으로 한 실험에서는 GABA_A 수용체의 $\alpha 1$ 아형은 콜린성 아마크린세포의 가지돌기에 근접한 부위에 밴드를 보여준 반면, $\beta 2/3$ 아형은 콜린성 아마크린 세포의 가지돌기와 약하게 겹친 결과를 보여주었다.^{39,47-52}

Brandstatter et al⁵³은 이들 수용체가 콜린성 아마크린세포의 전연접 및 후연접 부위에 위치함을 제시하였다.

본 연구에서는 망막의 수직 절편에서 GABA_A 수용체의 $\alpha 1$ 아형(Fig. 6B, H), $\beta 2/3$ 아형(Fig. 5E, K)과 함께 칼레티닌(Fig. 6G, J), ChAT (Fig. 6A, D)에 대한 항혈청을 이용하여 이중 표지법을 시행하였다. ChAT 면역반응성은 속핵층과 신경절세포층의 세포체와 속열기층의 가지돌기 밴드에서 나타났다(Fig. 6A, D). $\alpha 1$ 아형은 콜린성 아마크린세포와의 면역반응성을 관찰할 수 없었으나, $\beta 2/3$ 아형은 ChAT 면역반응성 세포의 가지돌기와 다발형성을 하였다(Fig. 6C, 6F). $\alpha 1$ (Fig. 6I)과 $\beta 2/3$ (Fig. 6L)와 함께 칼레티닌을 융합한 상에서, ($\beta 2/3$ 면역 반응성은 칼레티닌 면역반응성 전위 아마크린세포와 신경절세포의 가지돌기와 함께 다발형성을 하였다(Fig. 6L). 신경절세포의 가지돌기가 GABA_A 수용체 $\beta 2/3$ 아형을 지나는지 확인하기 위해서 비스듬한 수평 절단을 시행하였으며, Fig. 6O에서 칼레티닌 면역반응성 신경절세포의 가지돌기가 GABA_A 수용체 $\beta 2/3$ 면역반응성의 점적 표지함을 확인할 수 있었다. Figure 6O와 같은 영역에서 얻은 Figure 6P에서도 역시 칼레티닌 면역반응성 신경절세포가 GABA_A 수용체 $\beta 2/3$ 아형을 지니며 돌기들이 함께 증화되고 다발을 형성함을 관찰할 수 있었다.

고 찰

본 연구에서 칼레티닌 면역반응성은 아마크린세포, 전위 아마크린세포, 신경절세포에서 관찰할 수 있었으며 이는 토끼와 기니픽 망막을 대상으로한 이전의 연구결과와 일치한다.^{10,37} 칼레티닌이 표지된 아마크린 세

포는 속핵층에서 한 줄로 위치하고 있었으며, Lee et al³⁷에 의해 AII 아마크린세포로 보고되었다. 마우스와 토끼를 대상을 한 이전 연구에서 칼레티닌 면역반응성 전위 아마크린세포는 콜린성 아마크린세포로 보고되었으며 NMDA와 같은 칼슘-투과성 수용체를 통하여 칼슘 농도를 조절하는데 관여하는 것으로 알려졌다.^{10,11} 또한 Volgyi et al¹⁰은 칼레티닌 면역반응성 신경절세포에 관해 보고하였으나 신경절세포의 다양한 형태학적 특징 때문에 세포 특성에 관해서는 아직 확실히 밝혀지지 않은 상태이다.

본 실험에서 속열기층의 4번째층에 가지를 형성하는 형태와 3번째 및 4번째 두층에 가지를 형성하는 형태, 이런 두 형태의 신경절세포를 관찰할 수 있었다. 망막의 신경절 세포는 그 표면이 기울어져 있으며 아마크린 세포와 두극세포의 가지돌기는 속열기층내의 특별한 층에 부지하기 때문에, 형태학적으로 다른 신경절세포는 각기 다른 망막의 신경 소단위와 작용한다.⁵⁴⁻⁵⁶ 속열기층내의 신경 가지돌기가 그 기능에 따라 분리되기 때문에 이러한 사실은 신경절세포 사이에서 기능적인 차이점을 반영할 것이다. 망막 세포의 가지돌기는 빛자극이 없는 상태에서는 속열기층의 하층a에 분지하는 반면, 빛자극이 있는 상태에서는 속열기층의 하층b에 분지한다.^{57,58} 그러므로 본 실험에서 관찰되었던 두 형태의 신경절세포는 속열기층에서 가지돌기의 증화현상에 근거해서 개시형 신경절세포로 생각되어진다. 그러나 전위 아마크린 세포 또한 신경절세포처럼 같은 층에서 분지한다는 사실에 의해 신경절세포의 전체 가지돌기 영역을 얻을 수 없었기 때문에, 칼레티닌 면역반응성 신경절세포와 다른 포유동물의 망막에 존재하는 신경절세포를 비교할 수는 없었다.

포유동물 망막에서 칼레티닌 면역반응성 전위 아마크린세포와 신경절세포의 가지돌기 위치는 개시형 콜린성 아마크린세포의 위치와 동일하다.^{8,12,59} 이러한 위치의 동일성은 칼레티닌이 콜린성 아마크린 세포에서 어떤 역할을 하는지 모호하게 하지만, 칼레티닌은 세포 내에서 초과된 세포내 칼슘량 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다.

칼레티닌 면역반응성 신경절세포의 증화 정도는 거의 개시형 신경절세포와 같으며 개시형 콜린성 아마크린세포로부터 자극을 받는다. 전자현미경 검사법에 의해서 개시형 콜린성 아마크린 세포가 칼레티닌 면역반응성 신경절세포쪽으로 연접을 형성함을 확인할 수 있었다. Kaneda et al¹⁹에 따르면 콜린성 연접은 흥분성으로 생각되어지며 콜린성 아마크린세포는 지속적인 탈분극에 따른 일시적 탈분극과 함께 수용성 중심 영역에서 빛자극에 따라 반응한다.⁶⁰⁻⁶² 그러므로, 이러한 개

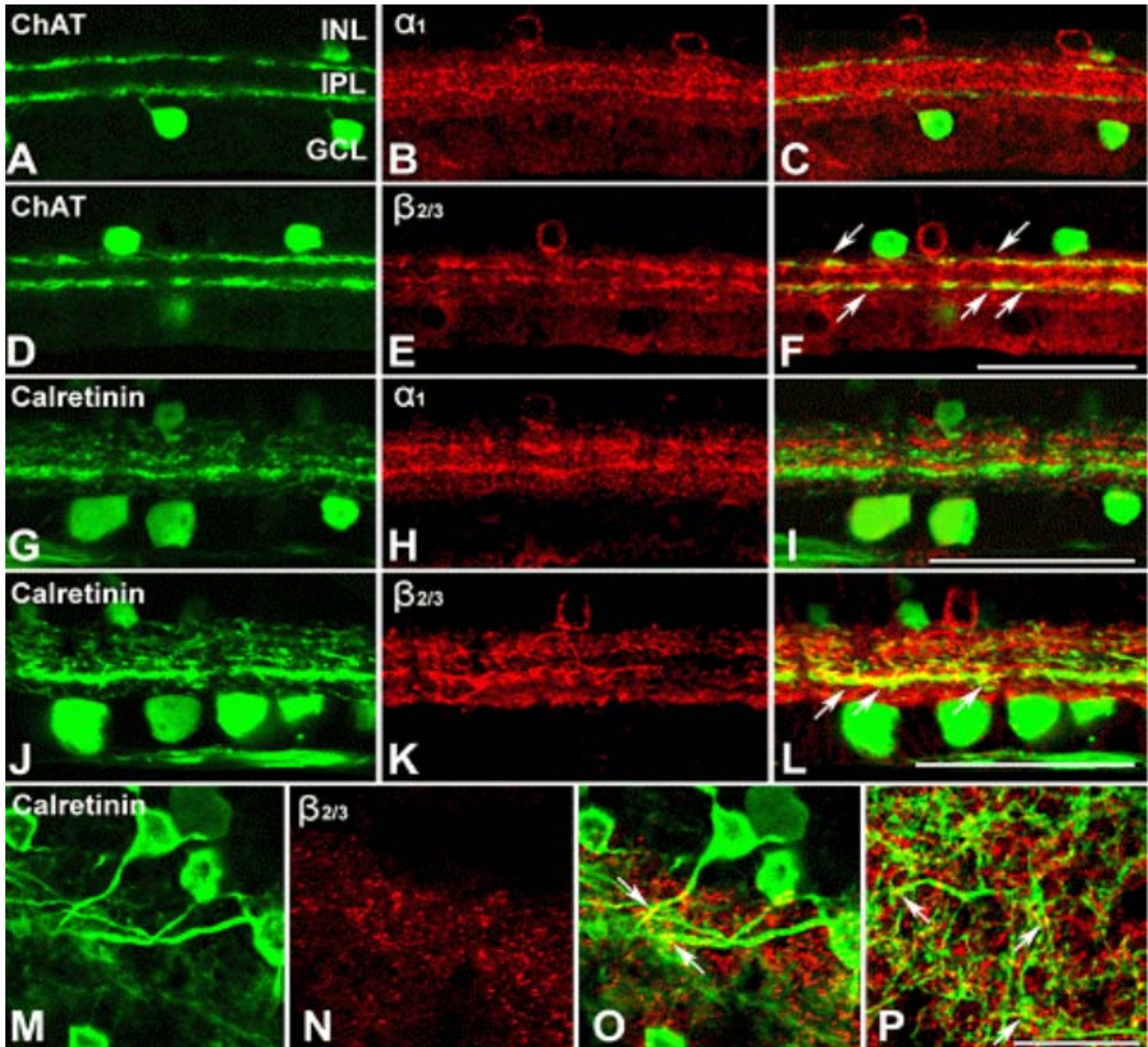


Figure 6. Confocal micrographs taken from 50 μ m thick vertical vibratome sections processed for ChAT [A, D], 1 [B, H] and 2/3 [E, K] of GABA_A receptors, and calretinin [G, J] immunoreactivities. ChAT and calretinin immunoreactivities are visualized using an FITC-conjugated secondary antibody. The α 1 and β 2/3 of GABA_A receptors, immunoreactivities were visualized using a Cy3-conjugated secondary antibody. (A, D) ChAT immunoreactivity shows in mirror symmetric populations of amacrine cells in the INL and displaced amacrine cells in the GCL (green). (G, J) Calretinin immunoreactivity in amacrine cell, displaced amacrine cells, and ganglion cell is seen (green). (B, E, H, K) GABA_A receptor, α 1 (red) and β 2/3 (red), immunoreactivities are visible in cells in the INL and two bands in the IPL. (C, F) Double exposure of ChAT [A, D] and GABA_A receptor, α 1 [B] and β 2/3 [E], shows ChAT immunoreactive cells completely devoid of GABA_A receptor, α 1, immunoreactivity, whereas, dendrites of ChAT immunoreactive cells show very weak GABA_A receptor, β 2/3, immunoreactivity (yellow; arrows). (I, L) Double exposure of calretinin [G, J] and GABA_A receptor, α 1 [H] and β 2/3 [K], shows calretinin immunoreactive cells completely devoid of GABA_A receptor, α 1, immunoreactivity, whereas, dendrites of calretinin immunoreactive cells show GABA_A receptor, β 2/3, immunoreactivity (yellow; arrows) in the sublamina b of the IPL. (M-O) Confocal micrographs taken at a horizontal section processed for calretinin [M] and GABA_A receptor, β 2/3 [N], immunoreactivities. [O] Double exposure of M and N, dendrites of calretinin immunoreactive ganglion cells show GABA_A receptor, β 2/3, immunoreactivity (yellow; arrows). [P] A micrograph taken at different focal planes in the same field as [O], GABA_A receptor, β 2/3, immunoreactive bands cofasciculating calretinin immunoreactive dendrites are visible. Scale bar=50 μ m.

시형 콜린성 아마크린세포는 빛자극의 시작점에서 칼레티닌 개시형 신경절 세포를 흥분시킬 것이다. 이전의 연구에서 콜린성 아마크린세포는 두극세포로부터 주로 자극을 받으며, 신경절세포에 직접적인 흥분효과를 전달하는 것으로 알려졌다.^{12,13,63} 따라서, 칼레티닌 면역반응성 신경절세포는 기니픽 망막에서 아세틸콜린의 흥분성 효과를 지닐 수 있다.

아마크린세포와 신경절세포 뿐만 아니라 두극세포도 GABA_A 수용체에 대해 면역 반응성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 GABA_A 수용체 α1과 β2/3아형은 토끼 망막에서 DAPI-3세포와 함께 위치하는 것으로 알려졌다.^{47-49,52,64} 이중 표지 실험에서, 두 개의 콜린성 면역반응성 밴드가 GABA_A 수용체 α1아형과 함께 위치하지 않고, β2/3과 대해서는 약하게 중첩되는 면역 반응성 밴드를 나타냄을 확인할 수 있었는데 이는 콜린성 아마크린세포가 매우 적은 수준의 GABA_A 수용체 β2/3을 포함했거나 다른 GABA_A 수용체 소단위를 포함했기 때문일 것으로 생각된다. Brandstatter et al.⁵³은 이러한 GABA_A 수용체가 콜린성 아마크린세포와 접촉해 있는 전연접 혹은 후연접에 포함되어 있는 뉴런의 가지돌기에서 발현될 수 있음을 제시하였다. 콜린성 아마크린세포는 칼슘 독립적, 운반체 매개성 기전을 통해 GABA를 분비할 뿐만 아니라 GABA 생합성 효소를 지니고 있으므로 후연접 뉴런은 GABA_A 수용체를 지닐 것을 주장하였다. 또한 본 실험에서 GABA_A 수용체 β2/3 아형이 칼레티닌 면역반응성 신경절세포의 가지돌기와 함께 다발을 형성함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 개시형 콜린성 아마크린세포가 영장류 망막에서 ON 파라솔 신경절세포의 GABA_A 수용체로 GABA를 분비함을 보여주는 이전의 보고와 일치한다.⁶⁵

본 연구에서는 기니픽 망막에서 면역조직화학요법과 전자현미경 소견을 통해 칼레티닌 면역 반응성 신경절세포와 아마크린 세포의 형태학적 특성에 대해 조사하였으며, 실험을 통해 칼레티닌 면역반응성 신경절세포는 개시형 콜린성 아마크린 세포와 후부연접하고 있으며, GABA_A 수용체를 가짐을 확인할 수 있었다. 따라서 이 실험결과는 기니픽 망막에서 개시형 콜린성 아마크린세포가 GABA_A 수용체 β2/3아형을 통해 칼레티닌 면역반응성 신경절세포를 조절함을 제시해주는 형태학적 근거가 될 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* 1996;21:14-7.
- 2) Hamano K, Kiyama H, Emson PC, et al. Localization of two

- calcium binding proteins, calbindin (28kD) and parvalbumin (12 kD) in the vertebrate retina. *J Comp Neurol* 1990;302:417-24.
- 3) Pasteels B, Rogers J, Blachier F, Pochet R. Calbindin and calretinin localization in retina from different species. *Vis Neurosci* 1990;5:1-16.
- 4) Goebel DJ, Pourcho RG. Calretinin in the cat retina: colocalizations with other calcium-binding proteins, GABA and glycine. *Vis Neurosci* 1997;14:311-22.
- 5) Wässle H, Grünert U, Rörenbeck J. Immunocytochemical staining of AII-amacrine cells in the rat retina with antibodies against parvalbumin. *J Comp Neurol* 1993;332:407-20.
- 6) Casini G, Rickman DW, Brecha NC. AII amacrine cell population in the rabbit retina: identification by parvalbumin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 1995;356:132-42.
- 7) Massey SC, Mills SL. A calbindin-immunoreactive cone bipolar cell type in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 1996;366:15-33.
- 8) Famiglietti EV Jr. 'Starburst' amacrine cells and cholinergic neurons: mirror-symmetric on and off amacrine cells of rabbit retina. *Brain Res* 1983;261:138-44.
- 9) Gabriel R, Witkovsky P. Cholinergic, but not the rod pathway-related glycinergic(AII), amacrine cells contain calretinin in the rat retina. *Neurosci Lett* 1998;247:179-82.
- 10) Volgyi B, Pollak E, Buzas P, et al. Calretinin in neurochemically well-defined cell populations of rabbit retina. *Brain Res* 1997;763:79-86.
- 11) Araki CM, Hamassaki-Britto DE. Calretinin co-localizes with the NMDA receptor subunit NR1 in cholinergic amacrine cells of the rat retina. *Brain Res* 2000;869:220-4.
- 12) Brandon C. Cholinergic neurons in the rabbit retina: dendritic branching and ultrastructural connectivity. *Brain Res* 1987;426:119-30.
- 13) Mariani AP, Hersh LB. Synaptic organization of cholinergic amacrine cells in the rhesus monkey retina. *J Comp Neurol* 1988;267:269-80.
- 14) Famiglietti EV Jr. Synaptic organization of starburst amacrine cells in rabbit retina: analysis of serial thin sections by electron microscopy and graphic reconstruction. *J Comp Neurol* 1991; 309:40-70.
- 15) Masland RH, Ames A. Responses to acetylcholine of ganglion cells in an isolated mammalian retina. *J Neurophysiol* 1976;39:1220-35.
- 16) Schmidt M, Humphrey MF, Wässle H. Action and localization of acetylcholine in the cat retina. *J Neurophysiol* 1987;58:997-1015.
- 17) Lipton SA, Aizenman E, Loring RH. Neural nicotinic acetylcholine responses in solitary mammalian retinal ganglion cells. *Pflugers Arch* 1987;410:37-43.
- 18) Downing JE, Kaneko A. Cat retinal ganglion cells show transient responses to acetylcholine and sustained responses to Lglutamate. *Neurosci Lett* 1992;137:114-8.
- 19) Kaneda M, Hashimoto M, Kaneko A. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors of ganglion cells in the cat retina. *Jpn*

- J Physiol 1995;45:491-508.
- 20) Araki CM, Pires RS, Britto LR, et al. Differential co-localization of nicotinic acetylcholine receptor subunits with calcium-binding proteins in retinal ganglion cells. *Brain Res* 1997;774:250-5.
- 21) Ariel M, Daw NW. Pharmacological analysis of directionally sensitive rabbit retinal ganglion cells. *J Physiol* 1982;324:161-85.
- 22) Kittila CA, Massey SC. Pharmacology of directionally selective ganglion cells in the rabbit retina. *J Neurophysiol* 1997;77:675-89.
- 23) Daw NW, Wyatt HJ. Kittens reared in a unidirectional environment: evidence for a critical period. *J Physiol* 1976;257:155-70.
- 24) Famiglietti EV Jr. Dendritic co-stratification of ON and ON-OFF directionally selective ganglion cells with starburst amacrine cells in rabbit retina. *J Comp Neurol* 1992;324:322-35.
- 25) He S, Masland RH. ON direction-selective ganglion cells in the rabbit retina: dendritic morphology and pattern of fasciculation. *Vis Neurosci* 1998;15:369-75.
- 26) Famiglietti EV Jr, Kolb H. A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res* 1975;84:293-300.
- 27) Vaney DI. The morphology and topographic distribution of AII amacrine cells in the cat retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1985;224:475-88.
- 28) Dacheux RF, Raviola E. The rod pathway in the rabbit retina: A depolarizing bipolar and amacrine cell. *J Neurosci* 1986;6:331-45.
- 29) Wong RO, Henry GH, Medveczky CJ. Bistratified amacrine cells in the retina of the Tammar wallaby *Macropus eugenii*. *Exp Brain Res* 1986;63:102-5.
- 30) Mills SL, Massey SC. Labeling and distribution of AII amacrine cells in the rabbit retina. *J Neurol* 1991;304:491-501.
- 31) Vaney DI, Gynther IC, Young HM. Rod-signal interneurons in the rabbit retina: 2. AII amacrine cells. *J Comp Neurol* 1991;310:154-69.
- 32) Schmidt M, Wässle H, Humphrey M. Number and distribution of putative cholinergic neurons in the cat retina. *Neurosci Lett* 1985;59:235-40.
- 33) Wässle H, Peichl L, Boycott BB. Mosaics and territories of cat retinal ganglion cells. *Prog Brain Res* 1983;58:183-90.
- 34) Pourcho RG, Osman K. Acetylcholinesterase localization in cat retina: a comparison with choline acetyltransferase. *Exp Eye Res* 1986;43:585-94.
- 35) Rice DS, Curran T. Disabled-1 is expressed in type AII amacrine cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 2000;424:327-38.
- 36) Voigt T. Cholinergic amacrine cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 1986; 248:19-35.
- 37) Lee EJ, Kim HJ, Kim IB, et al. Morphological analysis of Disabled-1-immunoreactive amacrine cells in the guinea pig retina. *J Comp Neurol* 2003;466:240-50.
- 38) Famiglietti EV Jr, Tumosa N. Immunocytochemical staining of cholinergic amacrine cells in rabbit retina. *Brain Res* 1987;413:398-403.
- 39) Mariani AP, Cosenza-Murphy D, Barker JL. GABAergic synapses and benzodiazepine receptors are not identically distributed in the primate retina. *Brain Res* 1987;415:153-7.
- 40) Mitrofanis J, Maslim J, Stone J. Catecholaminergic and cholinergic neurons in the developing retina of the rat. *J Comp Neurol* 1988;276:343-59.
- 41) Rodieck RW, Marshak DW. Spatial density and distribution of choline acetyltransferase immunoreactive cells in human, macaque, and baboon retinas. *J Comp Neurol* 1992;321:46-64.
- 42) Kim IB, Lee EJ, Kim MK, et al. Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in the developing rat retina. *J Comp Neurol* 2000;427:604-16.
- 43) Vardi N, Masarachia PJ, Sterling P. Structure of the starburst amacrine network in the cat retina and its association with alpha ganglion cells. *J Comp Neurol* 1989;288:601-11.
- 44) Gabriel R, Volgyi B, Pollak E. Most calretinin-containing amacrine cells in the rabbit retina co-localize glycine. *Vis Neurosci* 1999;16:983-90.
- 45) Kosaka T, Tauchi M, Dahl JL. Cholinergic neurons containing GABA-like and/or glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivities in various brain regions of the rat. *Exp Brain Res* 1988; 70:605-17.
- 46) Brecha N, Johnson D, Peichl L, Wässle H. Cholinergic amacrine cells of the rabbit retina contain glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyrate immunoreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:6187-91.
- 47) Richards JG, Schoch P, Haring P, et al. Resolving GABA_A/benzodiazepine receptors: cellular and subcellular localization in the CNS with monoclonal antibodies. *J Neurosci* 1987;7:1866-86.
- 48) Hughes TE, Carey RG, Vitorica J, et al. Immunohistochemical localization of GABA_A receptors in the retina of the new world primate *Saimiri sciureus*. *Vis Neurosci* 1989;2:565-81.
- 49) Greferath U, Muller F, Wässle H, et al. Localization of GABA_A receptors in the rat retina. *Vis Neurosci* 1993;10:551-61.
- 50) Grunert U, Greferath U, Boycott BB, Wässle H. Parasol (P alpha) ganglion-cells of the primate fovea: immunocytochemical staining with antibodies against GABA_A-receptors. *Vision Res* 1993;33:1-14.
- 51) Gruert U, Hughes TE. Immunohistochemical localization of GABA_A receptors in the scotopic pathway of the cat retina. *Cell Tissue Res* 1993;274:267-77.
- 52) Zucker CL, Ehinger B. Gamma-aminobutyric acid A receptors on a bistratified amacrine cell type in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 1998;393:309-19.
- 53) Brandstatter JH, Greferath U, Euler T, Wässle H. Co-stratification of GABA_A receptors with the directionally selective circuitry of the rat retina. *Vis Neurosci*

- 1995;12:345-58.
- 54) Wässle H, Riemann HJ. The mosaic of nerve cells in the mammalian retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1978;200:441-61.
- 55) Wässle H, Peichl L, Boycott BB. Dendritic territories of cat retinal ganglion cells. *Nature* 1981;292:344-5.
- 56) Rockhill RL, Euler T, Masland RH. Spatial order within but not between types of retinal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2303-7.
- 57) Famiglietti EV Jr, Kolb H. Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells. *Science* 1976;194:193-5.
- 58) Nelson R, Famiglietti EV, Kolb H. Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *J Neurophysiol* 1978;41:472-83.
- 59) Famiglietti EV. Starburst amacrine cells: morphological constancy and systematic variation in the anisotropic field of rabbit retinal neurons. *J Neurosci* 1985;5:562-77.
- 60) Bloomfield SA. Relationship between receptive and dendritic field size of amacrine cells in the rabbit retina. *J Neurophysiol* 1992;68:711-25.
- 61) Taylor WR, Wässle H. Receptive field properties of starburst cholinergic amacrine cells in the rabbit retina. *Eur J Neurosci* 1995;7:2308-21.
- 62) Peters BN, Masland RH. Responses to light of starburst amacrine cells. *J Neurophysiol* 1996;75:469-80.
- 63) Yamada ES, Dmitrieva N, Keyser KT, et al. Synaptic connections of starburst amacrine cells and localization of acetylcholine receptors in primate retinas. *J Comp Neurol* 2003;461:76-90.
- 64) Vardi N, Masarachia P, Sterling P. Immunoreactivity to GABA_A receptor in the outer plexiform layer of the cat retina. *J Comp Neurol* 1992;320:394-7.
- 65) Jacoby R, Stafford D, Kouyama N, Marshak D. Synaptic inputs to ON parasol ganglion cells in the primate retina. *J Neurosci* 1996;16:8041-56.

=ABSTRACT=

The Calretinin Immunoreactive Ganglion Cell Postsynaptic to the ON-Cholinergic Amacrine Cell in the Guinea Pig

Hyung-Chung Kim, M.D.¹, Wool Suh, M.D.², Jung-Il Moon, M.D.³, Kyu-Ryong Choi, M.D.²

Hangil Eye Hospital¹, Incheon, Korea

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Ewha Womans University², Seoul, Korea

Department of Ophthalmology, College of Medicine, The Catholic University of Korea³, Seoul, Korea

Purpose: To demonstrate the characterization calretinin-immunoreactive displaced amacrine cells in the ganglion cell layer using immunohistochemistry and electron microscopy.

Methods: For immunohistochemistry, sections from guinea pig retina were incubated with mouse monoclonal antibody directed against calretinin. For double label studies, sections were incubated in mixture of mouse monoclonal anti-calretinin or rabbit polyclonal anti-calretinin with following antibodies : goat polyclonal anti-ChAT, rabbit polyclonal anti-GABA, mouse monoclonal anti-GABA_A receptor $\alpha 1$, $\beta 2/3$. Sections were analyzed using Bio-rad Radiance Plus confocal scanning microscope. Stained sections from three guinea pig were observed with transmission electron microscope.

Results: Calretinin immunoreactivity was present in displaced amacrine cells and ganglion cells giving rise to processes ramified in the inner part of the inner plexiform layer in stratum 4. The same stratum was also occupied by the dendrites of ON-cholinergic amacrine cells. Double-labeling demonstrated that dendrites and cell bodies of displaced amacrine cells colocalized with ON-cholinergic amacrine cells and dendrites of ganglion cells directly overlapped with dendrites of ON-cholinergic amacrine cells. The synaptic connectivity was identified by electron microscopy. Ganglion cell dendrites received synaptic input from ON-cholinergic amacrine cell. GABA_A receptor $\beta 2/3$ subunit bands cofacilitates the dendrites of displaced amacrine cell and ganglion cell that are juxtapose to the $\alpha 1$ subunit of GABA_A receptor.

Conclusions: These results indicate that ON-cholinergic amacrine cells modulate calretinin-labeled ganglion cell via GABA_A receptor $\beta 2/3$ in the guinea pig retina.

J Korean Ophthalmol Soc 49(2):340-351, 2008

Key Words: Amacrine cell, Calretinin, Ganglion cell, Immunohistochemistry

Address reprint requests to **Kyu-Ryong Choi, M.D.**

Department of Ophthalmology, Ewha Womans University College of Medicine, Mokdong Hospital

#911-1 Mok-dong, Yangcheon-gu, Seoul 158-710, Korea

Tel: 82-02-2650-5154, Fax: 82-02-2654-4334, E-mail: ckrey02@ewha.ac.kr