

# 아프리카왕달팽이(*Achatina fulica*) 내장신경절 및 우체벽신경절에 관한 연구 I. 면역조직화학적 방법

장남섭, 김상원, 한종민, 이광주<sup>1)</sup>, 황선종<sup>1)</sup>

목원대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>1)</sup>충북대학교 의과대학 해부학교실

## Immunohistochemical Studies on the Visceral Ganglion and Right Parietal Ganglion of the African Giant Snail, *Achatina fulica*

Nam-Sub Chang, Sang-Won Kim, Jong-Min Han, Kwang-Ju Lee<sup>1)</sup> and Sun-Jong Hwang<sup>1)</sup>

Department of Biology, Mokwon University, Taejon 302-729, Korea

<sup>1)</sup>Dept. of Anatomy, Chungbuk National University College of Medicine, Chungju, Korea

### ABSTRACT

The visceral ganglion and the right parietal ganglion of the African giant snail, *Achatina fulica*, consists of two hemispheres, each in left and right side, respectively, like a butterfly. The surface of cortex and medulla in the two ganglions are crowded with nerve cells, but nerve fibers form a network at the middle portion.

The nerve cells in the cortex and medulla of the visceral ganglion and the right parietal ganglion are classified into the following four classes according to their sizes: giant (above 200  $\mu\text{m}$ , in diameter), large (60-70  $\mu\text{m}$ , in diameter), middle (30-40  $\mu\text{m}$ , in diameter) and small (10-15  $\mu\text{m}$ , in diameter) nerve cells, respectively.

The giant and large nerve cells are rarely found(20-22 eas. in total) while the middle and small nerve cells are found in large quantities (middle: 400-500 eas., small: 700-800 eas.).

In the AB/AY double staining, the giant nerve cell is identified as light yellow cells (LYC), while large and middle nerve cells as dark green cells (DGC)

or yellow green cells (YGC), and small nerve cells as yellow cells (YC) or blue cells (BC).

The DGC, which reacts positively to somatostatin immunostain reaction, inhibits the secretion of the growth control hormone. The giant and large nerve cells are identified to do the functions of phagocytosis as well as neurosecretion.

**Keywords:** Ganglion, Immunohistochemistry, *Achatina fulica*

### 서 론

신경분비작용을 전통적인 조직화학적 방법과 미세구조적 방법을 이용한 연구는 20세기 중반까지 계속되어 왔다 (Brink and Boer, 1967; Boer *et al.*, 1968).

그러나 이러한 방법만으로는 신경분비세포를 찾아내고 분비기전을 이해하는데는 많은 어려움이 있었다. 이에 Wendelaar-Bonga(1970) 및 Peute and Karmer (1967)가 개발한 AB/AY 염색법과 Romeis(1968) 염색법을 이용 *Lymnaea stagnalis*의 신경분비세포 종류를 분류하는데 성공하였으며 최근에는 면역세포화학법(immunocytochemical method)을 이용 뇌신경절의 light green cell(LGC)이 neuropeptide를 신경종말로부터 비연접상태(nonsynapse)로 분비한다는 사실을 알아냈으며(Roubos and Wal-Divendal, 1980; Buma *et al.*, 1984; Joosse, 1988; Heumen and Roubos, 1990), 이어 Brink and Boer(1967)와 Wendelaar-Bonga (1970)는 Canopy세포는 LGC 계열에 속하며 4종류의 서로 다른 insulin-like neuropeptides를 분비한다고 하였다(Smit

Received March 13, 2000; Accepted May 20, 2000

Corresponding author: Chang, Nam-Sub

Tel: (82) 42-829-7582, e-mail: nschang@mokwon.ac.kr

1225-3480/16101

© The Malacological Society of Korea

et al., 1988, 1993a, b; Geraerts et al., 1989).

그러나 이와 같은 연구는 소수의 복족류에만 국한되고, 신경분비세포가 분포하고 있는 신경절(뇌신경절, 체벽신경절, 복막신경절 그리고 내장신경절 등) 등의 전반적 구조와 이에 따른 신경분비세포들의 분포상황을 연구한 논문은 최근 Chang and Han(1999)이 *Achatina fulica*의 뇌신경절을 대상으로 한 논문 등이 있을 뿐이며 내장신경절과 우체벽신경절을 대상으로 한 연구는 매우 드문 실정이다. 이에 본 연구에서는 식용으로 널리 이용되고 있는 아프리카왕달팽이를 재료로 AB/AY 염색법(alcian blue-alcian yellow double staining)과 면역조직화학법인 rabbit anti-somatostatin antibody를 이용 신경절 중 내장신경절과 우체벽신경절의 신경분비세포의 종류 및 성장에 관여하는 neuropeptide 분비 세포의 분포상태를 연구코자 본 실험을 시도케 되었으며, 계속해서 신경분비세포에 따른 미세구조를 연구하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

99년 7월경 경기도 근교의 사육농원에서 아프리카왕달팽이(*Achatina fulica*)를 실험실로 옮긴 후 사육 관찰한 다음 실험재료로 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 조직화학적 실험

아프리카왕달팽이를 30% ethyl alcohol로 마취시킨 다음 측각 아래 머리부위를 절개하여 내장신경절 및 우체벽신경절을 위시해서 모든 신경절들을 적출하였으며, 실험에 사용할 수 있도록 필요한 부위를 적당한 크기로 잘라낸 후, 10% buffered neutral formalin으로 1일간 고정하였다. 이어 0.2 M phosphate buffer(pH 7.3)로 3회 세척하고 ethanol 농도 순으로 탈수시킨 후 통상적인 방법에 따라 경질 파라핀(58°C)으로 포매하였다(단 AB/AY 염색을 위해서는 ethanol과 amyl-acetate농도 순으로 탈수 및 치환시킴). 파라핀 블록은 rotary microtome(Leica Jung histocut 820)을 사용하여 7 μm 두께로 얇은 박편을 만들었으며, 신경분비세포의 화학적 성분 확인을 위해서 여러 가지 염색을 수행하였다. 염색된 시료는 카메라가 부착된 자동노출 광학 현미경(Olympus, BHS)을 사용 촬영하였다. 또한 신경분비세포의 화학적 성분확인을 위해 Harris hematoxylin-eosin double staining(H-E double staining) 및 Peute and Karmmer(1967)와 Romeis(1968)의 alcian blue-alcian yellow double staining(AB-AY double staining)을 사용하였다.

#### 2) 면역화학적 실험

파라핀 포매조직을 5 μm 두께로 박절하여 gelatin-coated slide에 부착시킨 다음 xylene으로 파라핀을 제거하였다. 100%와 95% alcohol로 탈수시킨 다음 실온에서 0.5 M Tris-HCl buffer(pH 7.2-7.6)에 5분간 처리하였다. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 실온에서 5분간 처리하여 비특이성 반응을 억제시킨 후 항원(somatostatin)에 대한 일차 항체를 조직위에 떨어뜨리고 실온에서 1시간 30분간 반응시켰다. Somatostatin에 대한 일차 항체는 polyclonal antibody인 rabbit anti-somatostatin(Zymed, S. San Francisco, California, USA)을 사용하였다. 최적염색을 위한 희석배율을 정하기 위하여 정상대조군을 대상으로, 항원의 항체는 10, 50, 100, 200, 500으로 희석하여 각기 염색하였다. somatostatin은 50배 희석에서 각기 최적의 염색정도를 보여 이 비율로 희석하여 사용하였다. 면역조직화학 염색은 Histostain™-Plus Kit(Zymed Laboratories Inc. USA)를 사용하여 ABC(Avidin-Biotin-Peroxidase Complex) 방법으로 염색하였다. Link antibody 용액을 첨가하여 실온에서 20분간 처리하였다. 각 단계와 단계 사이에는 0.5 M Tris-HCl buffer(pH 7.2-7.6)로 2회씩 세척하여 각 단계에서 여분의 항체를 제거하였다.

마지막으로 AEC substrate-chromogen 용액을 첨가하여 실온에서 10분간 처리한 후 증류수로 세척하였다. 염색 과정이 끝난 후 Mayer hematoxylin시약을 사용하여 핵에 대한 대조염색을 시행하였다. 또한 각 예마다 일차항체 대신 음성대조군 용액(Zymed Laboratories, USA)을 사용하여 염색을 병행하였다. 갈색이나 붉은 색으로 염색된 경우를 양성으로 판독하였다.

## 결 과

### 1. 내장신경절(visceral ganglion) 및 우체벽신경절(right parietal ganglion)의 구조

아프리카왕달팽이 두부 내에는 뇌신경절(cerebral ganglion)을 위시해서 내장신경절(visceral ganglion)과 이들을 좌, 우에서 감싸고 있는 체벽신경절(left and right parietal ganglion), 좌, 우 복막신경절(left and right pleural ganglion) 그리고 족신경절(pedal ganglion) 등이 등골개 환상구조를 이루고 있다.

그 중 내장신경절은 우체벽신경절과 밀접하게 연결되어 있어 두 신경절의 모습이 뇌신경절과 비슷한 나비모양을 하고 있었으며 뇌신경절에 비해 약간 컸다. 또한 내장신경절과 우체벽신경절은 표피를 포함하는 피질부와 속부분을 포함하는 수질부로 나눌 수 있었는데 피질부와 수질부의 표피부위에는 많은 대소형의 신경세포들이 모여 있는 반면, 중앙부위에는 이들로부터 뻗어 나온 신경섬유들이 망

상구조를 이루면서 신경망을 구성하고 있어 좌, 우 뇌신경절과 비슷한 모습을 하고 있었다(Figs. 1-2).

내부구조를 보면, 내장신경절과 우체벽신경절은 피질부

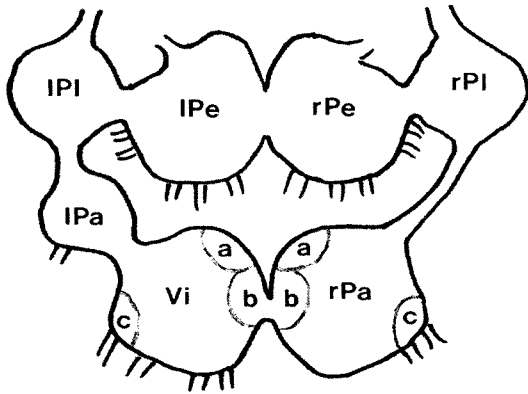


Fig. 1. Diagram of central nervous system (except cerebral ganglion) in *Achatina fulica*. a, upper region; b, central region; c, lateral region; IPa, left parietal ganglion; IPE, left pedal ganglion; IPI, left pleural ganglion; rPa, right parietal ganglion; rPE, right pedal ganglion; rPI, right pleural ganglion; Vi, visceral ganglion.



Fig. 2. Light micrograph showing the medulla of visceral ganglion (V) and right parietal ganglion (P). Hematoxylin-eosin double staining. Scale bar = 500  $\mu$ m.



Figs. 3-4. Magnification of Fig. 2. Light micrographs showing the left (V) and right (P) upper portion in the visceral ganglion and right parietal ganglion. Hematoxylin-eosin double staining. arrow, large nerve cell; arrowhead, middle nerve cell; openarrow, small nerve cell. Scale bars = 100  $\mu$ m, 100  $\mu$ m.

로부터 수질부로 이행됨에 따라 신경세포와 신경섬유 관계가 가변적이어서 피질부에는 신경세포들이 나비 모습 중 중앙부위에 밀집된 데(Fig. 6) 비해 수질부에서는 신경세포들이 전체적으로 고무 분포하는 양상을 보였다(Fig. 2). 또한 중앙에는 두 신경절을 좌, 우 양반구로 나누는 얇은 결합조직층이 수직으로 뻗어 있었고, 이들 주위에는 좌, 우 양측으로 다양한 크기(대, 중, 소형)의 신경세포들이 약 500개 정도가 두 개의 군집을 이루면서 모여 있었다(양측 1000개 정도)(Figs. 7-8). 그러나 상단부위나 측면부위에는 각각 90개와 40개 정도의 신경세포가 관찰되어 중앙부에 비해 적은 수가 분포하고 있었다(Fig. 6).

그러나 피질부로부터 수질부로 이행되면 신경세포의 수는 감소하는 반면, 신경망의 분포는 증가하였는데, 특히 두 신경절 중앙부위의 결합조직층에 많은 변화가 있었다. 즉, 결합조직의 상단과 하단 부위에 신경섬유의 관통에 의한 교차부위가 있어, 두 신경절의 좌, 우 양반구는 2개의 교차부위에 의해 서로 연결되어 있음이 확인되었으며(Fig. 2), 양 교차부위의 중앙에는 길고 좁은 두 신경절을 관통하는 큰 혈관(크기  $750 \times 50 \mu\text{m}$ )이 존재하고 있었다(Fig. 6).

신경세포의 분포에 있어서도 수질부인 경우에는 신경세포의 집단과 신경망의 분포가 피질부와 달랐다. 즉, 신경세



Fig. 6. Light micrograph showing the cortex of visceral ganglion (V) and right parietal ganglion (P). Hematoxylin-eosin double staining. arrow, giant nerve cell. Scale bar =  $500 \mu\text{m}$ .



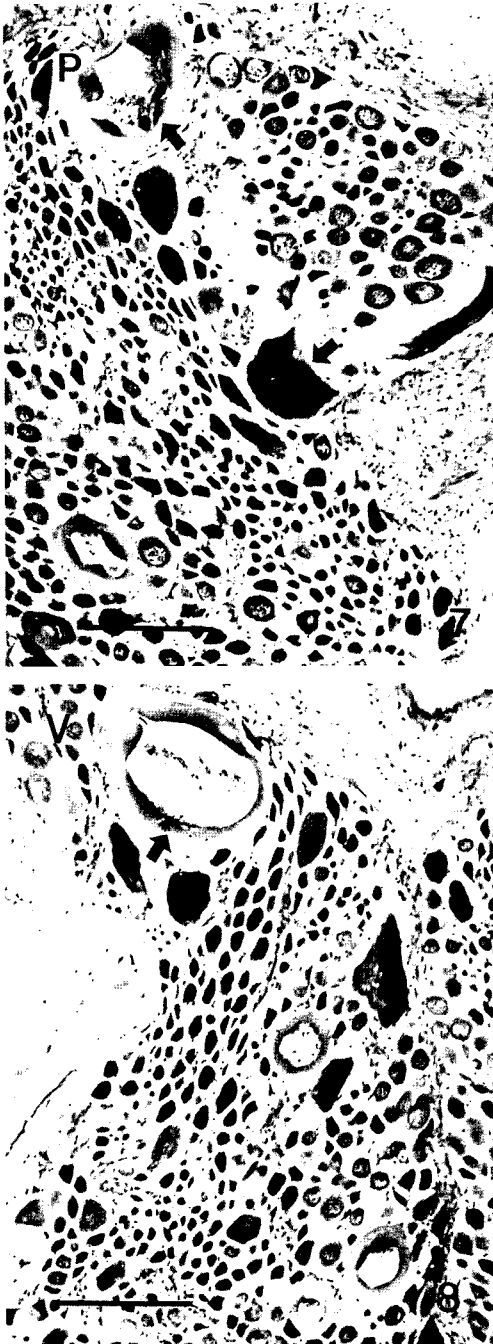
Fig. 5. Magnification of Fig. 2. Light micrograph showing the right side of middle portion in the visceral ganglion (V) and right parietal ganglion (P). Hematoxylin-eosin double staining. Scale bar =  $100 \mu\text{m}$ .

포들은 두 신경절의 상단부위에서 80개와 50개 정도가 각각 관찰되고(Figs. 3-4), 이들의 중앙부위(내장신경절 및 우체벽신경절 사이 혈관 존재)의 좌, 우측에서는 각각 100개 정도씩(Fig. 5) 200개가 밀집되어 관찰된 반면, 이들의 외측에서는 50개 정도가 각각 관찰되었다.

내장신경절과 우체벽신경절의 피질부와 수질부에서 관찰된 신경세포의 형태와 크기 그리고 그 숫자도 부위별로 특징이 있었던 바, 직경  $200-250 \mu\text{m}$  크기의 초대형 세포는 대부분 타원형이거나 불규칙형으로 두 신경절 피질부의 좌, 우측 상단에서 각각 1개씩 관찰되었다(Figs. 6-7, 9). 대형신경세포인 경우는 대부분 원형으로 직경은  $60-70 \mu\text{m}$  정도 크기이고 두 신경절의 좌, 우측 상단에서 각각 10개씩 관찰되고(Figs. 3-4) 피질부인 경우는 중앙부위와 상단부위에서 7개 정도가 관찰되었다(Figs. 7-8).

그러나 중형세포인 경우는 원형과 불규칙형 두 종류가 관찰되었는데 그 크기는  $30-40 \mu\text{m}$  정도로서 두 신경절의 수질부에서 100-110개 정도가(Figs. 3-5), 피질부에서는 300-400개 정도가 관찰되어(Figs. 7-8) 총 400-500개 정도가 관찰된 바 있다.

소형신경세포는 그 크기가  $10-15 \mu\text{m}$  정도로 매우 작고 불규칙형이었으며, 두 신경절의 피질부와 수질부 전체에서 약 700-800개 정도가 관찰되어 신경세포 중 가장



Figs. 7-8. Magnification of Fig. 5. Light micrographs showing the visceral ganglion (V) and right parietal ganglion (P). Hematoxylin-eosin double staining. arrow, giant nerve cell. Scale bars = 200  $\mu$ m, 200  $\mu$ m.

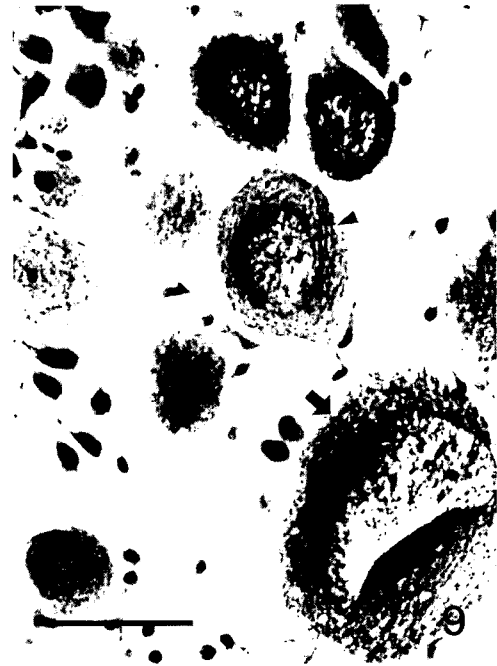


Fig. 9. Light micrograph showing the giant large cell and large cells. Hematoxylin-eosin double staining. arrow, giant nerve cell; arrowhead, middle nerve cell. Scale bar = 50  $\mu$ m.

양측면에서 집단을 이루고 있었는데 이들은 신경섬유에 의해 3-4개씩 연결되어 수질부의 신경망으로 합류하는 현상을 보였다(Fig. 4).

## 2. 신경세포들의 면역조직화학적 반응

### 1) 초대형신경세포

이들은 크기가 250×200  $\mu$ m 정도의 타원형 세포로서 내장신경절과 우체벽신경절의 상단부위와 중앙부위에서 7개 정도가 관찰되었는데 AB/AY 이중염색에서 모두 밝은 황색으로 염색되어 light yellow cell(LYC)로 확인되었다(Fig. 10).

### 2) 대형신경세포

대형신경세포는 60-70  $\mu$ m 정도 크기의 원형의 세포로서 두 신경절 수질부의 좌, 우측 상단에서 24개와 피질부의 중앙부위 및 상단부위에서 8개 정도가 관찰되었다. 이들은 AB/AY 염색에서 황록색으로 염색되어 yellow green cell(YGC)로 확인되었다(Fig. 11).

그 수가 많았다.

특이한 점은 이들 소형신경세포들은 두 신경절의 수질부

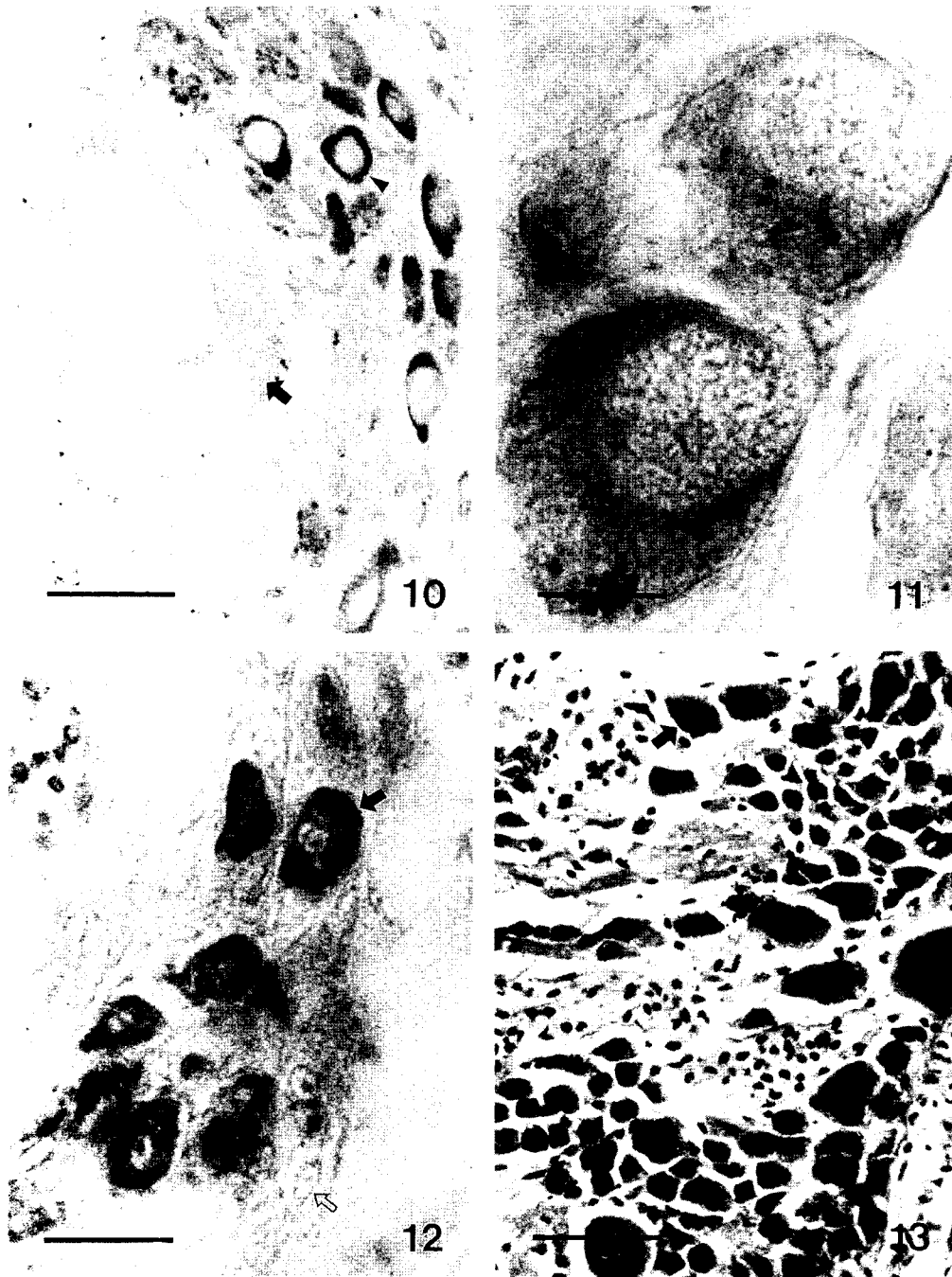


Fig. 10. Light micrograph showing the LYC cell (arrow) and DGC cells (arrowhead). Alcian blue-alcian yellow double staining. Scale bar = 100  $\mu$ m.

Fig. 11. Light micrograph showing the YGC cells. Alcian blue-alcian yellow double staining. Scale bar = 20  $\mu$ m.

Fig. 12. Light micrograph showing the BC cells (arrow) and YC cells (arrowhead). Alcian blue-alcian yellow double staining. Scale bar = 20  $\mu$ m.

Fig. 13. Light micrograph showing the positive reaction (red color, arrow) to anti-somatostatin serum. Scale bar = 100  $\mu$ m.

### 3) 중형신경세포

중형신경세포(직경 30-40  $\mu\text{m}$ )들은 세포체의 형태가 원형과 타원형 등 2 종류로 확인되었다. 두 신경절의 수질부에서 이들은 그 수가 100-120개 정도 확인된 반면 피질부에서는 300-400개가 관찰되었다. 그 중 신경세포체가 원형인 경우 AB/AY 이중염색에서 황록색으로 염색되어 yellow green cell(YGC)로 확인된 반면 타원형세포는 dark green cell(DGC)로 확인되었다(Fig. 10). 또한 이들은 somatostatin 면역염색에서는 양성을 나타내었다(Fig. 13).

### 4) 소형신경세포

직경 10-15  $\mu\text{m}$ 의 소형신경세포들은 두 신경절의 피질부와 수질부에서 총 700-800개 정도가 관찰되었다. 이들은 AB/AY 이중염색에서 blue cell(BC)로 확인되거나 yellow cell(YC)로 각각 확인되었다(Fig. 12).

## 고 찰

아프리카왕달팽이 내장신경절은 양측에 좌, 우체벽신경절과 연결되어 있었으며, 특히 우체벽신경절은 그 크기가 내장신경절과 거의 같고 내장신경절과 밀접하게 연결되어 있었으며, 그 형태가 뇌신경절과 비슷한 구조인 좌, 우 양반구인 나비모양을 하고 있었다(Wendelaar-Bonga, 1970; Khan *et al.*, 1998). 그러나 좌체벽신경절은 우체벽신경절보다 훨씬 작고 내장신경절과도 일정한 간격을 통해 연결되어 있었다.

내장신경절과 우체벽신경절의 상단에서 관찰된 직경 200  $\mu\text{m}$ (최고 300  $\mu\text{m}$ )이상의 초대형세포는 본 실험에서 2개 정도가 관찰되고 AB/AY염색반응에서 밝은 황색으로 염색되어 LYC로 확인된 바 있다. Wendelaar-Bonga (1972)는 물달팽이(*Lymnaea stagnalis*)에서 이 세포는 다른 세포와 달리 삼투압조절과는 무관한 세포로서, 우체벽신경절과 내장신경절에서만 각각 관찰되었고, 직경은 20-60  $\mu\text{m}$  정도라고 하였다. 본 실험의 뇌신경절과 내장신경절 그리고 체벽신경절에서 관찰된 200  $\mu\text{m}$  이상 크기의 LYC와는 차이가 있었다. 또한 본 실험에서는 이 세포가 포식현상을 나타내며 있어 신경교세포 중 미세교세포와 유사한 기능을 가지고 있는 것으로 확인되었다.

본 실험의 AB/AY 염색 반응에서 황록색으로 염색된 YGC와 암녹색으로 확인된 DGC들은 중형신경세포(크기 30-40  $\mu\text{m}$ )로서 내장신경절과 우체벽신경절에서 모두 400-500개 정도가 관찰되어 Wendelaar-Bonga(1970, 1972)가 *L. stagnalis*에서 관찰한 50-60개 보다 훨씬 많았다.

Roubos(1973)와 Roubos and Moorers-van Delft (1976)는 DGC가 낮은 염용액(salt solution)에서는 활성

화되는 반면, 높은 농도의 염용액에서는 불활성화 됨으로써 환경에 따른 삼투압조절에 관여한다고 하였다. 그러나 Grimm-Jørgensen *et al.*(1984)은 이 세포가 thyrotropic releasing hormone의 분비에 관여할 것이라 언급한 바 있고 *Achatina fulica*(Chang and Han, 1999)의 뇌신경절을 대상으로 한 somatostatin항체를 이용한 면역반응에서는 이 세포가 양성을 보이며 성장조절물질 분비를 억제하는 세포로 확인된바 있는데, 본 연구의 두 신경절에서도 이 세포가 somatostatin 항체 반응에서 양성 반응을 보여서 Chang and Han(1999)의 연구 결과와 같았다.

AB/AY염색반응에서 노란색으로 반응한 YC는 직경이 10-15  $\mu\text{m}$  정도 크기로 나타나 제일 작은 신경세포로 확인된 반면, 그 수는 700-800개 정도로 관찰되어 3개의 신경절에서 그 수가 제일 많은 것으로 확인되었다. 그러나 물달팽이 *L. stagnalis*(Wendelaar-Bonga, 1970, 1972)에서는 YC세포의 직경이 40-50  $\mu\text{m}$  정도로 나타나 중형세포로 확인되었고 낮은 염용액에 노출될 경우 세포가 활성화되어 역시 삼투압조절에 관여할 것이라 하였으나 본 실험에서는 그와 같은 기능을 확인하지 못하였다.

이상과 같은 현상들은 종의 차이에서 오는 것인지 또는 신경분비세포의 염색성이 세포의 생리적 주기에 따라 또는 실험환경의 조건에 따라 매우 민감한 반응을 보이고 있으므로 이를 확인키 위해서는 여러 종을 대상으로 한 다양한 조건 하에서의 많은 실험결과들이 요구된다 하겠다.

둘째, 신경절내 세포의 수와 분포에 있어서도 종마다 다양하고 또한 같은 종에 있어서도 절편의 방향, 절편의 깊이 에 따라 세포의 모양과 수, 그리고 분포 등이 달라질 수가 있다. 더욱이 본 실험에서는 두 신경절의 피질부와 수질부 전체에서 신경세포의 수를 관찰한 수치가므로 내장신경절의 수질부 또는 피질부의 한 부위에서만 관찰한 바 있는 *Lymnaea stagnalis*(Wendelaar-Bonga, 1970, 1972; Vlieger and Lodder, 1985; Smit *et al.*, 1993a, b)나 *Agriolimax reticulatus*(Wijdenes *et al.*, 1980)등의 관찰 내용과는 많은 차이가 있을 것으로 사료된다. 그러므로 신경분비세포의 보다 정확한 수와 분포를 확인키 위해서는 연속절편(serial section)에 의한 각 절편내 나타나는 세포의 수와 분포 등에 관한 평균치를 얻는 것이 중요하다 하겠다.

## 요 약

아프리카왕달팽이 *Achatina fulica*의 내장신경절과 우체벽신경절은 좌, 우 양반구로 구성된 나비모습을 하고 있으며, 이들 신경절의 피질부와 수질부의 표피부위에는 신경세포가 밀집되어 있는 반면 중앙부위에는 신경섬유가 망상형으로 신경망을 구성하고 있었다.

두 신경절의 피질부 및 수질부에 위치한 신경세포들은 초대형신경세포(200  $\mu\text{m}$  이상)와 대형신경세포(직경 60-

70  $\mu\text{m}$  이상), 중형신경세포(직경 30-40  $\mu\text{m}$ ) 그리고 소형신경세포(직경 10-15  $\mu\text{m}$ ) 등 4종류로 구분할 수 있었다.

초대형 및 대형신경세포는 20-22개 정도로 매우 소수가 관찰된 반면, 중형신경세포(약 400-500개)와 소형신경세포(약 700-800개)는 다수가 관찰되었다.

AB/AY 이중염색반응에서 초대형신경세포는 light yellow cell(LYC)로, 대형 및 중형신경세포는 yellow green cell(YGC)과 dark green cell(DGC) 등 두 종류로 그리고 소형신경세포는 yellow cell(YC)과 blue cell(BC) 등으로 각각 확인되었다.

Somatostatin 면역염색반응에서 양성반응을 나타낸 DGC는 성장조절물질 분비의 억제에 관여하는 것으로 확인되었으며, 초대형 및 대형신경세포는 신경분비기능 이외 포식작용을 수행하는 것으로 각각 확인되었다.

## REFERENCES

- Boer, H.H., Douma, E. and Kokksma, J.M.A. (1968) Electron microscope study of neurosecretory cells and neurohaemal organs in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Symp Zool Soc Lond.*, **22**: 273-256.
- Brink, M. and Boer, H.H. (1967) An electron microscopical investigation of the follicle gland(cerebral gland) and of some neurosecretory cells in the lateral lobe of the cerebral ganglion of the pulmonate gastropod *Lymnaea stagnalis* L. *Z. Zellforsch.*, **79**: 230-243.
- Buma, P., Roubos, E.W. and Buijs, R.M. (1984) Ultrastructural demonstration of exocytosis of neural, neuroendocrine and endocrine secretions with an in vitro tannic acid(TARI-) method. *Histochemistry*, **80**: 247-256.
- Chang, N.S. and Han, J.M. (1999) Immunohistochemical study on the cerebral ganglion of the edible african giant snail, *Achatina fulica*. *Korean J. Malacol.*, **15**: 1-11. [in Korean]
- Geraerts, W.P.M., Smit, A.B. and Joosse, J. (1989) Peptide messenger evolution: The invertebrate contribution. In: *Recent Advances in Basic and Clinical Neuroendocrinology* (eds. by Casanueva, F.F. and Dieguez, C.). pp. 3-37. Excerpta Medica, Amsterdam
- Grimm-Jørgensen, Y., Conolly, S.M. and Visser, T.J. (1984) Effect of thyrotrophin-releasing hormone and its metabolites on the secretion of sulfated polysaccharides by foot integument of a pond snail. *Gen. Comp. Endocrine.*, **55**: 410-417.
- Khan, H.R., Price, D.A., Doble, K.E., Greenberg, M.J. and Saleuddin, A.S.M. (1998) FMRFamide-related peptides, partial serotonin depletion, and osmoregulation in *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *J. Comp. Neurology*, **393**: 25-33.
- Heumen, W.R.A. van, and Roubos, E.W. (1990) Ultrastructural evidence for synthesis, storage and release of insulin-related peptides in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*, **39**: 493-500.
- Joosse, J. (1988) The hormones of molluscs. In: *Invertebrate Endocrinology Vol. 3. Endocrinology of Selected Invertebrate Types.* (ed. by Laufer, H. and Downer, G.H.). pp. 89-140. Alan R. Liss, New York.
- Peute, J. and Karmer, J.C. van de. (1967) On the histochemical differences of aldehyde-fuchsin positive material in the fibers of the hypothalamo-hypophyseal tract of *Rana temporaria*. *Z. Zellforsch.*, **83**: 441-448.
- Romeis, B. (1968) *Mikroskopische Technik*. 16th ed. Oldenbourg Verlag, München-Wien.
- Roubos, E.W. (1973) Regulation of neurosecretory activity in the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* (L.). A quantitative electron microscopical study. *Z. Zellforsch.*, **146**: 177-205.
- Roubos, E.W. and Moorer-van Delft, C.M. (1976) Morphometric *in vitro* analysis of the control of the activity of the neurosecretory dark green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Cell Tissue Res.*, **174**: 221-231.
- Roubos, E.W. and Wal-Divendal, R.M. van der (1980) Ultrastructural analysis of peptide-hormone release by exocytosis. *Cell Tissue Res.*, **207**: 267-274.
- Smit, A.B., Vreugdenhil, E., Ebberink, R.H.M., Geraerts, W.P.M., Klootwijk, J. and Sokolove, P.G. (1988) Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*, **331**: 535-538.
- Smit, A.B., Thijsen, S.F.T. and Geraerts, W.P.M. (1993a) cDNA cloning of the sodium influx-stimulating peptide in the mollusc, *Lymnaea stagnalis*. *Eur. J. Biochem.*, **215**: 397-400.
- Smit, A.B., van Marle, A., van Elk, R., Bogerd, J., van Heerikhuizen, H. and Geraerts, W.P.M. (1993b) Evolutionary conservation of the insulin



- gene structure in invertebrates: cloning of the gene encoding molluscan insulin-related peptide III from *Lymnaea stagnalis*. *J. Mol. Endocrinol.*, **11**: 103-113.
- Vlieger, T.A. de, and Lodder, J.C. (1985) Electrophysiology and morphology of growth hormone-producing cells in *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Kon. Akad. Wet.*, **C88**: 129-141.
- Wendelaar-Bonga, S.E. (1970) Ultrastructure and histochemistry of neurosecretory cells and neurohaemal areas in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Z. Zellforsch.*, **108**: 190-224.
- Wendelaar-Bonga, S.E. (1972) Neuroendocrine involvement in osmoregulation in a freshwater mollusc, *Lymnaea stagnalis*, *Gen. Comp. Endocrinol (Suppl.)*, **3**: 308-316.
- Wijdenes, J., Minnen, J. van and Boer, H.H. (1980) A comparative study on neurosecretion demonstrated by the Alcian blue-Alcian yellow technique in three terrestrial pulmonates (Stylomonata). *Cell Tissue Res.*, **210**: 47-56.