

건조상태가 개구리(*Rana nigromaculata*) 피부 장액선에
미치는 영향에 대한 조직화학적 연구

朴 重 錫
(慶尙大 科學教育科)

Histochemical Study on the Serous Gland of Frog
(*Rana nigromaculata*) Skin under Dry Conditions

Joong-Suk Park

(Dept. of Science Education, Gyeong Sang National Univ.)

(1975. 9. 1 접수)

SUMMARY

This study was performed in order to know the histochemical changes of mucosubstances in granular secretions of the serous gland under normal and dry conditions. The frogs were collected near Jinju and the experimental groups were retained under dry conditions for 24, 48, 72 and 96 hours to make a comparison with normal group. The results obtained were as follows:

1. The secreting granules in serous gland of the frog skin contained neutral and weakly acidic mucosubstances.
2. The secreting granules in serous gland of the frog skin were significantly decreased under dry conditions, as is evident from the histochemical properties. The neutral mucosubstances were decreased more than acidic mucosubstances.
3. Histochemical compositions of the mucosubstances of secreting granules in the lumen of the serous gland were not changed according to dry condition.

서 론

양서류의 피부는 일반적으로 점액선과 장액선을 가지고 있으며 점액선의 점액질은 수분조절을, 장액선의 과립성 분비물은 불쾌하게 하거나 치사의 성질로 그 자신을 보호하는 것이라고 추측한다. 개구리 피부의 분비선은 체내의 수분조절과 외부환경의 기계적 자극에 대한 보호작용을 조절하는 것으로서 많은 연구자에 의해 연구되어 왔다.

양서류 피부의 분비선에 대하여 Noble(1931)은 비과립성이며 염기호성인 분비물을 분비하는 점액선과, 과립성이며 산호성인 분비물을 분비하는 장액선이 있다고 보고하였다. Wilber와 Carroll(1940)은 개구리 피부선은 호흡과 분비작용을 복합적으로 수행하며 전해질의 평형을 유지한다고 보고 하였다. Noble와 Noble (1944), Verma(1965), Dapson 등 (1973), 김(1973) 등은 장액선의 형태와 양서류 유생의 발생에 따른 장액선의 발생을 형태학적으로 자세히 보고 하였고, 최근 Dapson(1970), 조 등(1972), Dapson 등 (1973)은 개구리 피부 장액선의 조직화학적 연구에서 각종 염색반응에 대하여 보고 하였다.

따라서 본 연구에서는 개구리 피부 장액선의 과립성 분비물에 대하여 조직화학적으로 그 조성을 밝히고 건조상태에 노출시킴에 따른 피부 장액선의 형태학적 변화 및 과립성 분비물의 태도를 관찰하고자 본실험을 실시하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 재료는 6월 중순 경남 진주시 근교에서 채집한 개구리(*Rana nigromaculata* Hallowell)로서 정상군과 실험군으로 구분하여 정상군은 채집 직후에, 실험군은 통풍이 잘 되고 온도 $16 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 60 ± 1 인 건조한 종이 상자에 개체마다 격리 수용한다음 24, 48, 72, 96시간만에 희생시켰다.

각조마다 10마리씩 등쪽(背部)과 배쪽(腹部)의 중앙부로 부터 피부를 절취하여 10% 중성 formalin액에 고정한 다음 $5 \mu\text{m}$ 두께의 paraffin 절편을 만들었다. 분비물질의 염색으로는 active methylation과 saponification후에 periodic acid-Schiff반응(PAS), alcian blue pH 2.5염색(AB 2.5), alcian blue pH 1.0염색(AB 1.0)을 시행하였고, 성분상의 판별을 정확히 하기 위하여 PAS-AB 2.5복합염색도 하였으며 조직학적 변화를 관찰하기 위하여는 PAS-H도 실시하였다.

관찰방법은 Spicer(1963), Spicer와 Sun(1967)의 방법에 따라 장액선 세포내에 존재하는 과립성 분비물의 정색정도 및 양을 대상으로 하여 전연 반응을 나타내지 않는 경우를 -, 염색반응도가 겨우 인정되는 경우를 ±, 반응정도가 낮은 경우를 +, 중등정도의 것은 ++, 염색반응도가 높은 것을 ###, 로서 표시하였다. 그리고 과립성 분비물 성분의 조직화학적 판별에 있어서는 Mowry(1963), Bélanger(1963), Spicer(1963), Spicer와 Sun(1967)이 밝힌바에 따라 PAS반응으로서 적자색인 것을 중성 점액질, AB 2.5에 청색의 반응을 띠는 것을 약산성 점액질, AB 1.0에 청색의 반응을 띠는 것을 강산성 황화점액질로 규정하였다.

결 과

I. 정상군

개구리 피부의 등쪽과 배쪽의 장액선은 점액선과 비슷한 모양인 후라스크형으로서 포피층 바로 밑의 색소층아래 위치한 점액선보다 더 아래에 위치하며 점액선보다 훨씬크고 대부분 구형내지 난형을 이루며 진피내 산재형으로 분포하고, 색소층에 의하여 완전히 둘러 쌓인것과 드물게 둘러쌓인 것등 여러정도가 있었다. 비교적 큰 내강을 가진 난원형 또는 구형의 내분비부가 외근층에 의해 둘러 쌓였고 외근층 외부는 비교적 치밀히 발달되어 있는 결합조직성 섬유들에 의하여 쌓여 있었으며, 선관(腺管)은 점액선보다는 길고

선관은 인식될 정도로 좁으며 선포의 표피쪽 상부에서 거의 직선상으로 진피와 표피를 뚫고 체표에 개구하고 있었다. 장액선의 선관상피는 표피의 개구부가 입방형세포이고 색소층을 거쳐 진피로 내려감에 따라 입방형세포에서 편평세포로 변형되고 선관기부에서는 2~3층의 편평세포들로 되며 외근층의 상부에서 마주친다.

선체는 내분비층과 외근층으로 이루어 졌으며 내분비층 세포는 세포막의 경계가 뚜렷치 못하고 단층상피로 되었으며 점액선에서의 같이 선경부와 선체부의 구별은 없고 구형 또는 난원형을 이루고 있다. 외근층과 색소층은 붙어 있으며 외근층과 내분비층은 떨어져 있으며 외근층의 세포는 편평상피를 이루고 있으며 분비부와 선관과 연결되는 부위는 몇개의 세포들이 모여 2~3층의 세포들로 이루어져 불룩하게 되어있다(Fig. 1). 내분비층의 세포질내에는 드물게 과립성 분비물이 있고, 전반적으로 다른 세포들에 비하여 훨씬 빈약한 양의 세포질을 가지고 있었다. 모든 분비과립들은 점액선의 미세한 과립성 분비물보다는 현저하게 큰 과립성 분비물로서 여러정도의 크기를 이루며 내강에 충전되어 산재해 있다(Fig. 6). 분비과립의 양, 분포 및 염색정도에 있어서도 큰 차이가 없으며 분

Table 1. Histochemical reactions of the serous gland in the frog skin under dry condition.

Portion	Stain	Group				
		Normal	Dry condition			
			24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
Dorsal	PAS	++	++~+	±	+	+
	AB 2.5	+	+ ~ ±	±	+ ~ ±	+ ~ ±
	AB 1.0	-	-	-	-	-
Ventral	PAS	++	++~--	±	+	+
	AB 2.5	+	+ ~ ±	±	+ ~ ±	+ ~ ±
	AB 1.0	-	-	-	-	-

비과립은 물질이 풍부한 등근것. 덜찬 과립성인 분비물에 이르는것과 이들 사이의 중간 정도 것도 여러정도로 나타났다. 내강에 분비된 과립성 분비물은 등쪽과 배쪽이 다 같이 PAS에 ++정도의 적자색을 띠었고, AB 2.5에는 +정도의 청색을 띠고 AB 1.0에서는 전혀 반응이 나타나지 않았다(Table 1).

II. 건조실험군

1. 건조 24시간군

건조 상태에 24시간 노출시킨 실험동물의 피부 장액선은 등쪽과 배쪽에 따라 큰 차이는 없으며 정상군에 비하여 전체적으로 큰 변화는 보이지 않았다. 그러나 외근층을 이루는 세포핵과 세포질에서 세포핵은 정상군것에 비하여 다소 커진 경향을 보여주며 타원형의 핵이 구형으로 변화되고 핵주위의 세포질은 정상군에서는 핵의 크기와 같은 두께로 내분비층을 둘러싸고 있었는데 선 중앙부위가 아주 현저하게 팽대하여져 있음을 볼수 있고 선의 상하는 정상군과 별차이는 보이지 않았다. 과립성 분비물의 양적변화에는 별다른 변화는 없고 정상군에서는 구형인 과립이 약간 타원형으로 변화되어 있으며(Fig. 6) 내분비층이나 외근층밖의 색소층에는 정상군에 비해 별다른 변화는 없고 내강이나 선관에도 별다른 차이는 없으며 선 전체의 모습도 후라스크의 모양을 그대로 보여준다(Fig. 2).

과립성 분비물은 PAS반응에 적자색을 띠고 정상군에 비하여 다소 미약한 +~++정도

를 보였다. AB 2.5에는 식별될 수 있는 정도의 청색반응이나 약한 정도의 청색반응을 보여주었으며 정상군과 비슷하거나 다소 미약하였으며, AB 1.0에는 정상군과 마찬가지로 전혀 반응이 없었으며 피부의 등쪽과 배쪽의 염색반응 정도는 같았다 (Table 1).

2. 건조 48시간군

건조 상태에 48시간 동안 노출된 동물의 장액선은 정상군에 비하여 전반적으로 현저히 위축되었고 내분비층은 건조 24시간군과 정상군에서 보여주던 핵의 모습에 비하여 더욱 불확실하고 세포질의 모습도 소실되어 내강사이의 경계를 이루는 세포막의 식별이 매우 곤란해지고 내분비층의 모습은 불규칙 하였다. 외근층의 세포질도 정상군에 비하여 아주 현저하게 불규칙하고 외근층 자체가 분리되는 모습을 보여주고 있으며 내분비층과 외근층사이의 간격은 정상군에 비하여 엄청나게 분리되었다 (Fig. 3).

과립성 분비물의 염색성은 등쪽과 배쪽이 모두 PAS반응에 적자색, AB 2.5반응에 청색을 띠며 겨우 식별되는 정도이고 정상군과는 염색정도에 현저한 차이를 보이고 (Fig. 7) AB 1.0반응에는 정상군과 24시간군 같이 반응이 전혀 없었다 (Table 1).

3. 건조 72시간군

장액선은 전반적으로 더욱 위축된 상태로서 선 모양이 건조 48시간군에 비하여 더욱 쭉그러져있을 뿐 아니라 내분비층의 분비세포의 배열과 세포의 모습도 매우 불규칙하고 내분비층과 외근층 사이의 공간이 건조 48시간군에서 보다 더 가까워지고 진피결합조직의 스폰지망으로 부터 분리가 되기 시작한다.

과립성 분비물은 그 모양이 정상군에서는 구형이든 것이 다소 외소하여져서 타원형인 과립들로 흩어져서 나타나며 내강에는 많은 공간이 관찰되었다.

장액선 분비물은 피부의 등쪽과 배쪽을 막론하고 PAS의 염색반응에는 건조 48시간군에 준하는 정도의 반응을 보였고 AB 2.5의 염색반응에서도 염색정도가 건조 24시간군과 같은 정도의 염색반응을 띠었으며 (Fig. 8) AB 1.0 염색반응에서는 정상군과 같이 염색반응은 없었다 (Table 1).

4. 건조 96시간군

장액선은 매우 위축되어 전체가 거의 직사각형으로 표피에 평행으로 위치하고 선내강의 모습도 매우 불규칙하고 내분비층의 세포배열도 정상군에 비하면 현저하게 굴곡을 이루며 세포핵의 모습은 유지되고 있으나 세포질은 정상군에 비하여 극히 적은 양이 겨우 식별될 정도이고 세포막은 그 경계를 구별하기가 매우 곤란할 정도이다. 외근층은 진피성 결합조직으로부터 건조 72시간군에 비하여 더욱 현저하게 분리되어 내분비층에 밀착되었으며 외근층의 두께는 정상군에 비하여 현저하게 얇아졌으며 표피에 개구한 선관은 색소층에서 부터 표피에 도달할 수록 벌어져 V자형으로 되었다.

내강의 분비과립은 그 모양이 정상군에 비하여 매우 현저하게 위축되어 구형의 과립은 매우 드물게 관찰되었고 내강에 흩어져서 건조 72시간군에 비하여 현저하게 넓은 공간을 가지고 있었다.

분비과립의 염색정도는 등쪽과 배쪽에서 PAS와 AB 2.5염색반응에서의 염색정도는 건조 72시간군과 같은 정도의 반응을 보여 주었고 AB 1.0에서는 다른 실험군의 경우와 같이 전혀 반응이 없었다 (Table 1).

고 찰

분비물질의 조직화학적 구분과 생체내의 기본적 분포에 대한 연구로서는 Lison(1954)이 Vic. glycol균과 산성 mucopolysaccharide을 구별하였고, Steedman(1950)은 alcian blue 8GS 염료를 이용한바 있으며, Mowry(1956)는 AB 2.5가 산성점액에 대하여 선택적으로 염색시킨다는 사실을 밝힘으로서 많은 진전이 이룩되었다.

그후 Mowry(1963), Bélanerger(1963), Spicer(1963), Spicer와 Sun(1967)등 여러 연구자들이 분비물에 대한 생화학적 분석과 자기방사법 그리고 alcian blue를 이용한 염색 반응을 검토한 결과 alcian blue 염색액의 pH를 2.5~3.0으로 정하였을때 약산성 분비물이, pH 1.0에서는 강산성 황화분비물이 선택적으로 염색됨을 밝혔다. 또 분비물의 조직화학적 구분에서 AB 2.5—PAS 복합염색 반응의 우수성을 강조하였다. 또 조직화학적으로 점액질 검출에 널리 이용되는 PAS 반응에서 Vic. glycol균을 지닌 중성분비물이 적자색으로 염색됨은 이미 오래전 부터 알려졌다. House(1970)는 exogenous catecholamine이 피부 각 전기적 차이를 바꾸어준다고 하였으며 Benson 과 Hadley(1969), Watlington 과 Huf(1971)은 피부 분비물의 생산과 방출에 의해 이온 함량을 조절한다고 하였다. 또 Lillywhite(1971)는 endogenous catecholamine이 양서류가 잠수하는 동안의 수분조절과 육상에서 햇볕을 쬐는 동안 찬증기의 증발을 조절하는 기능을 수행하며 타 척추동물이 먹이로 취할때 독성을 주어 그 자신을 보호하는 매우 중요한 외분비선이라 하였다. 이들 선으로부터 분비되는 과립성 분비물에 대한 화학적 조성에 대해서는 Dapson(1970)이 *Rana pipiens*의 장액선의 과립성 분비물은 PAS에 아니린적색으로, Azure A pH 4에 회색으로 나타나고, 조(1972)등은 saponification + AB 2.5에서는 등쪽피부 장액선은 -, 배쪽에서는 ±로, methylation + saponification + AB 2.5에서는 전자와 같고 AB 2.5—PAS에서는 배쪽피부 장액선 분비과립은 적자색으로 반응하였다. Dapson(1973)은 장액선을 세포내기과 내장기로 나누어서 과립성 분비물을 여러가지 염색방법으로 염색반응을 수행했으며 특히 PAS에서 +~卍, acetylation + saponification + PAS 염색반응에서 卍로 나타났다. 또 장액선의 분비과립은 carbohydrate, carboxylic acid와 sulfur containing amino acid를 함유하는 산성물질과 수분조절을 하는데 필요한 catecholamine이 들어 있다고 보고 하였으며, 또 김(1973)은 장액선의 분포를 10종류의 양서류에서 보고 하였다. Noble과 Noble(1944), Muhse(1969)는 형태학적으로 장액선의 성숙에 따른 크기와 출현의 변화에 대하여 보고 하였다.

본 실험(Table 1)에서 보면 개구리의 피부 장액선은 등쪽과 배쪽피부에 따라 장액선의 형태나 분비과립내 점액 성분 상에 차이가 없었고 건조한 상태가 진행됨에 따라서 염색 정도와 양적인 차이를 보였지만 분비과립은 대체로 중성점액질과 약산성 점액질을 포함하고 강산성 황화점액질은 없음을 보여주었다.

이상의 결과에서 정상군의 피부장액선에 대한 형태나 분포등에 있어서는 대체로 앞의 연구자들과 같은 결과였다. 그러나 분비과립의 염색상에 있어서 전체를 대상으로 한다면 앞의 연구자들과 역시 같은 결과이나 염색정도에 있어서는 조(1972)등은 등쪽 피부에서 PAS에 +~卍이고, 본 실험에서는 卍로서 판별상의 차이라 볼수 있으나 배쪽 피부에서 PAS에 -, AB 2.5에 -~±인 것은 판별상의 차이라고 단정할 수 없으므로 앞으로 보다 더 깊은 연구검토가 있어야 될것으로 생각된다. 또 AB 1.0에서는 일치하였으나 이는

분비과립이 pH에 예민하여 반응에 적합한 alcian blue의 pH와 물질조성 규명에 더 많은 검토를 할 필요가 있다고 생각된다. Dapson(1973)등은 PAS에 卣로 보고 하였으나 이는 실험동물이 다른점에서 나타난 결과라 사려된다.

한편 개구리 피부 장액선에 대한 건조상태에서의 영향을 밝힌 실험적보고는 접하지 못하였다. 본 실험결과에서 보면 건조상태에 노출시킨후 경과시간에 따라 장액선이 전체적으로 현저히 위축되며 내분비층과 외근층세포의 배열도 매우 불규칙해짐과 내분비층, 외근층과 결합조직사이의 간격도 뚜렷이 변화됨을 보여주었다. 그리고 분비과립의 화학적 조성은 건조상태에 따라 큰 변화가 없었으나 그 양적인 변화가 현저하였다. 즉 분비과립은 48시간군에서 현저히 감소하며 72시간군에서 다소 증가된 상태로 계속 유지됨은 대체로 노출시간에 따라 감소하되 24시간군 이후에는 감소된 상태로 계속 유지됨을 관찰하였다.

이와 같은 사실로 미루어 볼때 건조상태에 노출된 시간에 따라 분비과립의 성분상 중성물질이 산성물질에 비하여 더 예민한 반응을 보여줌을 알수 있는데 이는 건조상태에 노출된 초기에 과다한 분비물 합성이 미치지 못하고 시간이 경과함에 따라 미흡한 상태나 합성과 분비의 균형이 유지되고 있음을 뜻한다. 따라서 건조상태에 노출시킨 피부 장액선의 변화는 체항상성(homeostasis)을 유지하기 위한 표현이라고 볼 수 있다.

적 요

1. 개구리 피부 장액선의 분비과립은 중성과 약산성점액질이 존재한다.
2. 피부 장액선의 분비과립은 건조상태에서 현저히 감소하며 성분별로 점액질을 볼 때 중성점액질이 산성점액질보다 더 심한 영향을 받는다.
3. 장액선의 내강내에 있는 분비과립내 점액성분은 건조상태의 노출시간에 따라 성분상의 변화는 없다.
4. 이상과 같은 현상은 체항상성을 유지 하기 위한 생체적응현상의 일단이라고 생각한다.

참 고 문 험

- Bélangier, L.F., 1963. Comparisons between different histochemical and histophysical techniques as applied to mucous secreting cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **106** (2): 364—378.
- Benson, B.J., and M.E. Hadley, 1969. In vitro characterization of adrenergic receptors controlling skin gland secretion in two anurans *Rana pipiens* and *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. physiol.* **30**: 857—864.
- 조운복, 정덕환, 정진문, 1972, 개구리 피부 점액선에 관한 조직화학적 연구. 부산의대 잡지 **12**(1): 107—113.
- Dapson, R.W., 1970. Histochemistry of mucous in the skin of the frog, *Rana pipiens*. *Anat. Rec.* **166**: 615—526.
- Dapson, R.W., A.T. Feldman, and O.L. Wright, 1973. Histochemistry of granular (poison) secretion in the skin of the frog, *Rana pipiens*. *Anat.Rec.* **177**: 549—560.
- House, C.R., 1970. The effect of noradrenalin on the toad skin potential. *J. Physiol.* **209**:

513—537.

- 김한화, 1973. 한국산 양서류 표면상피의 점액분비 세포의 조직화학적 연구. 최신의학
16 (2) : 56—69.
- Lillywhite, H.B., 1971. Thermal modulation of cutaneous mucous discharge as a determinant of evaporative water loss in the frog, *Rana catesbeiana*. *Z. Vergl. Physiol.* **73** : 84—104.
- Lison, L., 1954. Alcian blue 8GS with chlorantine fast red 5B. A technique for selective staining of mucopolysaccharides. *Stain Technol.* **29** : 131—138.
- Mowry, R.W., 1956. Alcian blue techniques for the histochemical study of acidic carbohydrates. *J. Histochem. Cytochem.* **4** : 407.
- Mowry, R.W., 1963. The special value of methods that color acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins, with revised direction for the colloidal iron stain, the use of alcian blue 8GX and their combinations with the periodic acid-Schiff reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **106** (2) : 402—423.
- Muhse, E.F., 1909. The cutaneous glands of the common toads. *Am. J. Anat.* **9** : 322—359, 7 pls.
- Noble, G.A., and E.R. Noble, 1944. On the histology of frog skin glands. *Trans. Amer. Micro. Soc.* **63** : 254—263.
- Noble, G.K., 1931. *The Biology of the Amphibia*. McGraw-Hill, New York.
- Spicer, S.S., 1963. Histochemical differentiation of mammalian mucopolysaccharides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **106** (2) : 379—388.
- Spicer, S.S., and D.C.H. Sun, 1967. Carbohydrate histochemistry of gastric epithelial secretions in dog. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **140** : 762—783.
- Steedman, H.F., 1950. Alcian blue 8GS: A new stain for mucin. *Quart. J. Microbiol. Sci.* **91** : 477—479.
- Verma, K., 1965. Regional differences in skin gland differentiation in *Rana pipiens*. *J. Morph.* **117** : 73—86.
- Watlington, C.O., and E.G. Huf, 1971. β -adrenergic stimulation of frog skin mucous glands: Non-specific inhibition by adrenergic blocking agents. *Comp. Gen. Pharmacol.* **2** : 295—305.
- Wilber, C.G., and P.L. Carroll, 1940. Studies on the histology of the glands in the skin of Anura. I. The parotoid gland of *Bufo americanus*. *Holbrook. Trans. Micro. Soc.* **59** : 123—128.

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1.** Serous gland under normal condition in dorsal skin of *Rana nigromaculata*, HE X450.
- Fig. 2.** Serous gland under dry condition (24hrs) in dorsal skin of *Rana nigromaculata*, HE X450.
- Fig. 3.** Serous gland under dry condition (48hrs) in dorsal skin of *Rana nigromaculata*, AB 2.5—PAS X450.
- Fig. 4.** Serous gland under dry condition (96hrs) in dorsal skin of *Rana nigromaculata*, AB 2.5—PAS X450.
- Fig. 5.** Granular secretions of serous gland under normal condition, X450.
- Fig. 6-9.** Granular secretions of serous gland under dry conditions(24, 48, 72 and 96hrs) X450.

