

무당개구리(*Bombina orientalis* Boulenger) 皮膚 顆粒腺의 微細 構造에 關한 研究

金基榮 · 金寬善 · 文明珍 · 金宇甲

高麗大學校 理科學科 生物學科

무당개구리(*Bombina orientalis* Boulenger) 피부과립선의 組織化學的 性質과 그 微細構造를 光學, 走査 및 透過型 電子顯微鏡으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

무당개구리의 과립선은 眞皮에 위치한 單胞狀腺으로서 腺腔內에 함유된 분비과립의 형태와 그 조직화학적 특성에 따라서 분비과립의 크기가 작은(3.6 μm) I형과립선과, 분비과립이 큰(7.5 μm) II형 과립선의 두종류로 구분되었다. 이들은 공통적으로 점액선에 비해 腺分泌部가 잘 발달되어 있었으며, 內腔이 없고 인접세포간의 세포경계가 관찰되지 않는 多核體(syncytium)의 형태를 하고 있었다.

조직화학반응의 결과, 두 종류의 과립선은 Alcian blue(pH 2.5)에 전혀 반응하지 않았고, PAS반응에는 I형 과립선만이 약한 양성반응을 나타내었다. 또한 주사전자현미경으로 관찰한 과립선 開口部の 표면구조는 공통적으로 피부에 돌출된 氣孔(stomata)과 흡사한 형태를 하고 있었는데, I형 과립선의 개구부는 미세한 網狀構造를 가진 세포로 이루어져 있었고 II형 과립선은 비교적 큰 과립상의 표면구조를 가진 세포로 이루어져 있었다.

한편 과립선의 腺分泌部는 공통적으로 외부의 筋上皮細胞層과 내부의 腺上皮細胞層으로 되어 있었고, 腺上皮細胞內에 함유된 각각의 분비과립들은 모두 粗面小胞體로부터 起源하였으며, 과립의 성숙정도에 따라서 다양한 形態的 變異가 관찰되었다.

KEY WORDS: Ultrastructure, Histochemistry, Cutaneous granular glands, Frog

양서류의 피부 과립선에서 분비되는 물질의 주 성분은 catecholamine으로서 (House, 1970; Lillywhite, 1971; Dapson *et al.*, 1973), 성숙된 과립 분비물의 속에는 대부분 5-hydroxy tryptamine이 함유되어 있으며(Pearse, 1961; Vanable, 1964; Kramer, 1970), 점액선과는 달리 주로 adrenalin 이나 신경의 자극에 의해 그 분비가 조절되는 것으로 알려져 있다(Dockray and Hopkins, 1975).

양서류의 피부선에 관한 연구는 歐美 稜息種을 대상으로 Noble과 Noble(1944), Bovbjerg(1963), Belanger(1963), Dapson(1970) 등에 의해 각 선의 조직화학적 성질이 밝혀졌으며, Voute(1963), Parakkal과 Matoltsy(1964), Farquhar(1965) 등에 의해 그 미세구조가 관찰되었다.

국내 서식종에 대한 연구로서는 Kim(1973)에

의해 몇종의 無尾兩棲類를 대상으로 피부선의 조직학적 연구가 시행된 바 있으며, Jo 등(1972), Kim 등(1975), Park(1974, '75) 등에 의해 피부선에서 분비되는 물질의 조직화학적 성질에 관한 연구가 수행되었다. 또한 전자현미경적인 연구로서는 Kim 등(1978), Do 등(1987)에 의해 양서류 점액선의 미세구조가, 그리고 Kim 등(1979, '80), Moon 등(1988)에 의해 과립선의 미세구조가 관찰 보고된 바 있다.

본 연구는 피부선이 잘 발달되어 있는 *Bombina*屬 중에서 유일하게 국내에 서식하는 무당개구리(*Bombina orientalis* Boulenger)를 재료로 하여 피부 과립선의 組織化學的 性質과 그 微細構造, 그리고 開口部の 表面構造를 走査 및 透過型 電子顯微鏡으로 관찰하였다.

材料 및 方法

강원도 춘성군 일대에서 채집한 무당개구리 (*Bombina orientalis* Boulenger) 成體를 실험실 내에서 5일간 항온저리(18°C)한 후 실험에 사용하였다.

(1) 組織化學的 方法

4°C에서 15분간 저온저리하여 활동을 억제시킨 무당개구리 背皮 및 腹皮의 일정부위를 0.64% 생리식염용액 내에서 切開하여 10% buffered neutral formalin 용액에 固定한다음, ethanol 농도 상승순으로 脫水하여 paraffin에 包埋하였다.

포매된 조직은 microtome(AO Spencer 820)으로 5 μ m 두께의 연속절편을 제작한 다음, 皮膚腺의 일반적인 구조를 관찰하기 위한 Heamtoxylin-Eosin 染色 이외에, 조직화학적 성분을 구분하기 위하여 Alcian blue(pH 2.5) (Mowry, 1956), Periodic acid-Schiff(PAS) 反應 등을 실시하였으며, 이들을 감별 염색하기 위한 Alcian blue(pH 2.5)-PAS 혼합염색(Kelly, 1966)도 실시하였다.

관찰방법은 Spicer(1963), Spicer와 Sun(1967)의 방법에 따라 조직화학적 염색반응에 전혀 반응을 나타내지 않을 경우를 -, 염색반응도가 낮은 경우를 +, 중간정도의 반응을 나타내는 경우를 ++, 그리고 염색반응도가 높은 경우를 +++로 표시하였다.

(2) 電子顯微鏡的 方法

무당개구리 背皮의 일정부위를 0.64% 생리식염용액 내에서 잘라내어 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde(4°C, Sorenson's phosphate buffer, pH 7.2)와 1% OsO₄(4°C, Sorenson's phosphate buffer, pH 7.2)로 前, 後固定한 뒤, ethanol 농도상승 순으로 脫水하였다.

탈수가 끝난 조직의 절편중 透過電子顯微鏡用 試料는 propylene oxide로 置換하여 Epon-Araldite 혼합액에 包埋한 뒤, ultramicrotome(LKB)으로 먼저 semithin section하여 1% borax에 녹인 1% toluidine blue로 hot plate(60°C) 상에서 染色한 다음 광학현미경으로 관찰하였으며, 이어서超薄切片을 제작하여 copper grid에 부착시킨 다

음, uranyl acetate와 lead citrate로 二重染色하여 투과 전자현미경(JEM 100 CX-II型)으로 80kV에서 관찰하였다.

한편 走査電子顯微鏡用 試料는 isoamyl acetate로 置換하였으며, critical point dryer(Hitachi SPC-2型)로 건조시킨 후, ion coater(Eiko IB-3型)에서 20 nm의 두께로 鍍金하여 주사 전자현미경(Hitachi-450S型)으로 15kV에서 관찰하였다.

結 果

1. 組織化學的 性質

과립선의 腺腔내에 함유되어있는 分泌物質의 성분을 확인하기 위하여 Alcian blue(pH 2.5)와 PAS의 2가지 조직화학적 실험을 시행한 결과, I型과립선과 II型과립선의 2가지 종류가 구분되었다. Alcian blue(pH 2.5)의 염색에서는 背皮 및 腹皮에 분포하는 I型和 II型的 과립선들이 부위에 관계없이 모두 반응하지 않았고, 특히 I型和과립선은 PAS반응에서도 背皮와 腹皮 모두에서 전혀 반응을 나타내지 않았다. 그러나 II型 과립선은 背皮와 腹皮 모두에서 PAS에 약한 양성반응을 나타내어서 전혀 반응이 나타나지 않는 I型 과립선에 비해 약간의 차이를 나타내었다(Table 1).

2. 走査 電子顯微鏡的 觀察

무당개구리 皮膚에 형성된 皮膚腺의 표면구조를 走査 電子顯微鏡으로 관찰한 결과, 피부의 표면에는 돌출된 皮膚隆起가 많이 형성되어 있었으며, 피부선은 이 구조물들을 중심으로 고루 분포

Table 1. Comparison between type I and type II of cutaneous granular glands in *Bombina orientalis*.

Examination Body Slide	Gland		Type I		Type II	
	Dorsal	Ventral	Dorsal	Ventral	Dorsal	Ventral
Alcian blue(pH 2.5)	-	-	-	-	-	-
Periodic Acid Schiff	-	-	+	+	-	-
Gland Size(μ m)	270	220	190	200	-	-
Granule Size(μ m)	3.6		7.5		-	-

-, No reaction; +, Weak positive reaction

되어 있었다. 과립선의 분포밀도는 점액선에 비해 낮았으나, 개구부의 직경은 현저하게 큰 것으로 관찰되었으며, 피부선의 종류에 따라 분비관을 이루는 上皮細胞의 형태가 서로 다른 것으로 확인되었다. (Fig. 1).

과립선의 開口部는 상피의 표면으로 돌출되어 마치 식물의 잎에서 관찰되는 氣孔(stomata)과 비슷한 모양을 하고 있었으며, 개구부를 이루는 상피의 형태에 따라 I형 과립선과 II형 과립선의 두 종류로 구분되었다. I형 과립선은 분비관의 개구부가 미세한 網狀構造를 가진 상피세포로 이루어져 있는 반면, II형 과립선은 비교적 큰 과립상의 표면구조를 가진 세포로 이루어져 있었다(Fig. 2).

3. 透過 電子顯微鏡의 觀察

무당개구리의 과립선은 腺腔내에 함유된 분비과립의 크기와 그 조직화학적 반응의 차이에 따라서 분비과립의 크기가 작은 I형 과립선과, 분비과립이 큰 II형 과립선의 두 종류로 구분되었다. 이들은 공통적으로 구형의 腺分泌部가 眞皮에 있고, 分泌管이 表皮와 연결되어 체외로 개구된 單胞狀腺(simple alveolar gland)으로서 점액선에 비해 腺分泌部가 잘 발달되어 있었다(Table 1, Fig. 3,4).

(1) I형 과립선

I형 과립선의 선분비부는 외부에 한층의 筋上皮細胞(myoepithelial cell)가 배열되어 있었고, 그 내부에서는 구형의 분비과립을 함유한 腺上皮細胞(glandular epithelial cell)가 관찰되었다(Fig. 5).

근상피세포는 긴 방추형의 세포로서 핵은 핵막의 함입이 심한 타원형이었고, 세포질의 내부에는 미세섬유가 치밀하게 집적되어 내부의 선상피세포에 비해 전자밀도가 다소 높게 나타났다(Fig. 6). 근상피세포의 원형질막 주변에서는 작은 小胞가 분포되어 있었고, 인접한 근상피세포의 사이에는 desmosome에 의해 연결되어 있었으며, 전자밀도가 다른 두 종류의 근상피세포가 관찰되는 경우도 있었으나, 이 세포들 사이의 미세구조적인 차이는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 7). 또한 근

상피세포의 기저부 원형질막은 대부분 매끄러운 표면을 갖고 진피층의 결합조직과 hemidesmosome을 이루고 있었으나, 일부는 원형질막이 심하게 굴곡되어 관찰되기도 하였다(Fig. 8).

선상피세포의 핵은 약간의 핵막굴곡을 지닌 구형 또는 타원형으로서, 세포의 基部에 위치하였으며, 異質染色質은 주로 핵막의 주위에 분포되어 있었다. 전체 선상피세포는 인접세포간의 세포경계가 관찰되지 않는 多核體(syncytium)의 형태를 하고 있음이 관찰되었다(Fig. 9). 핵의 주변부에는 粗面小胞體가 발달되어 있었고, 이들과 연결된 電子密度가 낮은 小胞들도 다수 관찰되었으며(Fig. 10), 선상피세포에 함유된 분비과립의 표면에는 전자밀도가 비교적 낮은 손가락 모양의 돌기들이 부착되어 있는 형태도 흔히 관찰되었다(Fig. 11). 선상피세포의 세포질에 함유된 분비과립은 평균직경이 $3.6 \mu\text{m}$ 인 球形과립으로서 전자밀도가 매우 높았으며, 성숙된 분비과립은 주로 세포의 內腔部에 위치하고 있었다(Fig. 12)

(2) II형 과립선

II형 과립선도 앞서 관찰한 I형 과립선과 마찬가지로 외부의 筋上皮細胞는 방추형의 세포로 이루어져 있었고, 세포질 내에는 미세섬유가 세포의 장축방향을 따라서 길게 뻗어 있었으며, 미토콘드리아 이외의 다른 세포소기관은 거의 관찰되지 않았다. 근상피세포와 내부에 위치한 腺上皮細胞의 원형질막은 desmosome에 의해 연결되고 있었고, 특히 이들 사이에는 細胞間隙이 잘 발달되어 있었는데, 이 부위를 통해 선상피세포의 基部 원형질막에 형성된 많은 微細絨毛가 분포되어 있었다(Fig. 13). 또한 진피의 결합조직과 접하는 근상피세포의 기저부 원형질막에는 hemidesmosome이 형성되어 있었고(Fig. 14), 인접한 근상세포의 사이에는 desmosome이 관찰되었다(Fig. 15).

그리고 이 종류의 과립선에서는 선상피세포의 細胞質突起가 근상피세포층 사이로 뻗어나온 경우도 흔히 관찰되는데(Fig. 16), 세포질돌기의 내부에는 많은 液胞가 형성되어 있었고(Fig. 17), 진피의 결합조직과 hemidesmosome에 의하여 직접 연결되어 있는 특이한 형태도 관찰되었다(Fig.

18).

腺上皮細胞는 세포질내에 분비과립이 집적되어 있는 분비성세포로서 기저부에는 핵막의 함입이 심한 구형의 핵이 위치하고 있었고, 핵 주변부의 세포질에는 분비과립외에도 미토콘드리아나 粗面小胞體와 같은 세포소기관이 발달되어 있었다(Fig. 19). II형 과립선도 I형 과립선과 마찬가지로 腺分泌部의 내부에 內腔이 형성되어 있지 않았고, 인접한 선상피세포와의 사이에도 세포경계가 존재하지 않아서 선상피세포 전체가 하나의 多核體의 형태로 관찰되었다(Fig. 20).

선상피세포의 내부에 함유된 분비과립은 평균 직경이 $7.5 \mu\text{m}$ 로서 I형 과립선의 분비과립에 비해 전자밀도가 높고 과립의 크기도 매우 대형이었으며, 선상피세포에 함유된 대형의 분비과립들 사이에는 전자밀도가 비교적 낮고 소형인 과립도 관찰되었는데, 이들은 전자밀도가 높은 대형의 분비과립과 분리되어 있거나, 또는 서로 연결되어 있는 형태로 관찰되었다(Fig. 21).

보통 성숙된 분비과립은 주로 세포의 內腔部에 위치하고 있는 반면, 미성숙된 소형의 과립은 핵 주변의 基底部에 분포하고 있었으며(Fig. 22), 이들의 일부는 細絲性物質을 함유한 과립의 내부에 전자밀도가 낮은 다수의 소형과립을 함유한 multivesicular body의 형태를 하고 있었는데(Fig. 23), 이 과립의 주변부에는 粗面小胞體가 잘 발달되어 있었으며, 전자밀도가 낮은 소형의 분비과립이 조면소포체와 직접 連接되어 있는 경우도 관찰되었다(Fig. 24).

考 察

양서류의 피부 과립선은 毒腺(granular gland) 또는 漿液腺(serous gland)이라고도 불리우며, 과립상의 자극성물질은 분비함으로써 자기방어의 기능을 수행하는 것으로 알려져 있으며(Friedman *et al.*, 1967; Dapson, 1970), 도롱뇽(*Tarichatorosa*)의 과립선에서 분비되는 毒素에 대해서는 특히 tetrodotoxin이라는 用語가 사용되고 있다(Fuhrman, 1967).

Dapson 등(1973)은 개구리(*Rana pipiens*)의 과

립선을 조직화학적인 방법에 의해 細胞腺(cellular gland)과 內腔腺(luminal gland)의 두 종류로 구분하고, 前者는 과립의 주성분이 carbohydrate, carboxylic acid, tyrosine 및 sulfur등의 물질로 이루어져 있는 반면, 後者는 phospholipid와 primary catecholamine, 그리고 sulfur등의 물질을 함유한 분비과립으로 채워진 선이라고 하였으며, 특히 세포선의 경우는 선상피세포 사이의 경계가 명확하지만, 내강선은 세포간의 경계가 불명확한 형태적 특징을 가진다고 하였다.

이에 대해 Jo 등(1972)이 참개구리(*Rana nigromaculata*)의 과립선에서 관찰한 결과에 의하면, Alcian blue(pH 2.5)와 PAS뿐만 아니라 aldehyde fuchsin에도 전혀 반응하지 않는 한 종류의 과립선으로 이루어져 있었고, 도롱뇽(*Hynobius leechi*), 두꺼비(*Bufo bufo gargarizans*), 참개구리, 유개구리(*Rana rugosa*) 등의 여러 종과 본 실험에 사용된 재료와 동일한 무당개구리에서도 형태적으로 동일한 한 종류의 과립선만이 관찰되었으며(Kim *et al.*, 1979, '80), 최근에 발표된 두꺼비의 경우도 역시 한 종류의 과립선만으로 이루어져 있는 것으로 보고되었다(Moon *et al.*, 1988).

그러나 본 실험에서는 조직화학적으로는 물론, 미세구조적으로도 相異한 2종류의 과립선이 관찰되어 앞의 연구와는 조금 다른 결과를 나타내었다. 두가지 기본적인 조직화학반응을 실시한 결과, I형 과립선은 Alcian blue(pH 2.5)와 PAS반응 모두에 전혀 반응하지 않았으나, II형 과립선은 PAS에 약한 양성반응을 나타내었다. 뿐만 아니라 과립선의 내부에 함유된 분비과립의 크기도 I형 과립선의 경우는 $3.6 \mu\text{m}$ 이었고, II형 과립선의 경우는 $7.5 \mu\text{m}$ 로서 두 종류의 과립선간의 형태적 차이가 매우 현저한 것으로 관찰되었는데, 여러가지 특징으로 미루어 볼때 두 종류의 과립선은 모두 Dapson(1973)이 보고한 內腔腺에 가까울 것으로 생각되며, 무당개구리의 경우 세포간의 경계가 명확한 細胞腺은 없는 것으로 사료된다.

두 종류의 과립선 외부에 분포된 선상피세포는 신경전달물질의 자극에 의해 세포질내에 함유된 미세한 섬유를 수축시킴으로써 내강속의 분비과립을 외부로 방출하는 것으로 알려져 있는데(Watlington, 1968; Benson and Hadley, 1969).

실제로 Dockray와 Hopkins(1975)는 과립선의 선상피세포와 근상피세포 사이에 分枝된 신경섬유의 말단을 관찰 보고한 바 있다. 또한 Moon 등(1988)도 과립선 근상피세포 표면의 작은 小胞와 선상피세포의 원형질막으로부터 형성된 微細絨毛 등을 관찰하고 이들 구조가 분비과립의 방출에 신경전달물질이 관여함을 보여주는 직접적인 증거라고 하였다.

한편 무당개구리에서 관찰된 두 과립선의 선상피세포는 모두 인접세포간의 경계가 없는 多核體의 형태를 하고 있었는데, 이러한 구조는 Dockray와 Hopkins(1975), Kim 등(1979), De Perez와 Hindelang(1985), Moon 등(1988) 등에 의해서도 언급된 바 있으며, 양서류의 과립선중 內腔腺의 보편적인 특성으로 알려져 있다(Dapson, 1973). 또한 근상피세포층과 선상피세포층 사이에서 관찰된 細胞間隙은 분비전후에 나타나는 체적의 차이를 완충하기 위한 장치이며, 근상피세포와 진피의 결합조직 사이에 형성된 hemidesmosome과 각 세포 사이의 desmosome들은 과립선의 기계적안정에 기여하는 것으로 알려져 있다(Moon *et al.*, 1988).

양서류 피부에서 분비되는 과립성물질의 成分은 steroids, indolealkylamines, imidazolealkylamines, phenylalkylamines, active polypeptides 등의 물질로 이루어져 있고(Eraspamer, 1971), 분비과립의 생성과정에는 대부분의 경우 粗面小胞體(rough ER)가 관여하고 있으며(Hoffman and Dent, 1977; Kim *et al.*, 1979, '80), 선상피세포의 골지複合體로부터 유래된 小胞의 融合에 의해 분비과립이 생성되는 것으로 알려져 있으나(Dockray and Hopkins, 1975; De Perez and Hindelang, 1985), 물두꺼비의 과립선에서는 골지복합체가 없고, 분비과립이 직접 滑面小胞體(smooth ER)와 연결되어 있는 특이한 형태도 보고된 바 있다(Moon, 1988).

본 실험에 사용된 무당개구리의 경우 I형 및 II형 과립선에 함유된 분비과립이 모두 조면소포체와 연결되어 있었는데, 과립선 내부에 함유된 분비과립의 電子密度가 매우 높다는 점과 일반적으로 脂質의 대사가 활발한 세포에서 활면소포체가 발달되어 있고, 蛋白質合成이 왕성한 세포에서는

조면소포체가 발달되어 있다는 사실 등으로 미루어 볼 때, 무당개구리 과립선에서 생성된 분비과립의 주성분은 단백질 계통의 물질일 것으로 생각되나, 여기에 대해서는 좀더 정확한 물질의 분석과 검토가 필요하다.

References

- Belanger, L. F., 1963. Comparisons between different histochemical and histophysical techniques as applied to mucous secreting cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **106**:364-378.
- Benson, B. J. and M. E. Hadley, 1969. *In vitro* characterization of adrenergic receptors controlling skin gland secretions in two anurans *Rana pipiens* and *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **30**:857-864.
- Bovbjerg, A., 1963. Development of the glands of the dermal plicae in *Rana pipiens*. *J. Morph.* **113**:232-243.
- Dapson, R. W. 1970. Histochemistry of mucous in the frog, *Rana pipiens*. *Anat. Rec.* **166**:615-626.
- 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**:547-560.
- De Perez, G. and C. Hindelang, 1985. Ultrastructure of venom glands in the frog (*Rana esculenta*). *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* **74**:72-84.
- Dockray, G. J. and C. R. Hopkins, 1975. Caerulein secretion by dermal glands in *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* **64**:724-733.
- Eraspamer, V., 1971. Biogenic amines and active polypeptides of the amphibian skin. *Ann. Dev. Pharmacol.* **11**:327-350.
- Farquhar, M. G., 1965. Cell junctions in amphibian skin. *J. Cell Biol.* **26**:263-291.
- Friedman, R. T., N. S. Laprade, R. W. Aiyawar, and E. G. Huf, 1967. Chemical basis for the [H⁺] gradient across frog skin. *Amer. J. Physiol.* **212**:962-972.
- Fuhrman, F. A., 1967. Tetrodotoxin. *Sci. Amer.* **217**:60-71.
- Hoffman, C. W. and J. N. Dent, 1977. Effects of neurotransmitters upon the discharge of secretory product from the cutaneous glands of the red-spotted newt. *J. Exp. Zool.* **202**:155-162.
- House, C. R., 1970. The effect of noradrenalin in the toad skin potential. *J. Physiol.* **209**:513-537.
- Jo, U.B., D. H. Jung, and J. M. Jung, 1972. Histochemical study on the skin of the frog. *J. Pusan Medical*

- College 12:107-113.
- Kelly, J. W., 1966. Acid Mucopolysaccharides; Introduction to Quantitative Cytochemistry. Academic Press, New York, pp 489-505.
- Kim, H. H., Y. T. Noh, and Y. W. Chung, 1975. Histological and histochemical studies on the cutaneous mucous glands according to the development. *Korean J. Zool.* **18**:51-60.
- Kim, H. H., Y. T. Noh, Y. W. Chung, and Y. D. Chi, 1978. The ultrastructure of the mucous secreting cells in the amphibian skin. *Korean J. Zool.* **21**:29-30.
- Kim, H. H., Y. T. Noh, Y. W. Chung, and Y. D. Chi, 1979. Ultrastructure of the granular glands in the amphibian skin. *Korean J. Zool.* **22**:103-114.
- Kim, H. H., Y. T. Noh, and Y. D. Chi, 1980. Ultrastructure of the cutaneous gland in the Asiatic land salamander, *Hynobius leechi*: (II) Granular glands. *Korean J. Zool.* **23**:219-228.
- Kramer, B., 1970. Histochemical demonstration of 5-hydroxytryptamine on granular glands of amphibian skin. *Histochem.* **24**:336-342.
- Lillywhite, H. B., 1971. Thermal modulation of cutaneous mucous discharge as a determinant of evaporative water loss in the frog, *Rana catesbeiana*. *Z. Vergleich Physiol.* **73**:84-104.
- Moon, M. J., K. R. Do, C. W. Kim, and W. K. Kim, 1988. Ultrastructural observations on the cutaneous granular glands and secretory granule formation in the water toad, *Bufo stejnegeri* Schmidt. *Korean J. Zool.* **31**:122-132.
- Mowry, R. W., 1956. Alcian blue techniques for the histochemical study of acidic carbohydrates. *J. Histochem. Cytochem.* **1**:407.
- Nobnle, G. A. and E. R. Noble, 1944. On the histology of frog skin glands. *Trans. Amer. Micro. Soc.* **63**:254-263.
- Parakkal, P. F. and A. F. Matoltsy, 1964. A study of the fine structure of the epidermis of *Rana pipiens*. *J. Cell Biol.* **20**:85-94.
- Park, J. S., 1974. Histochemical study on the mucous gland of the frog (*Rana nigromaculata*) skin under dry conditions. *Korean J. Zool.* **17**:43-50.
- Park, J. S., 1975. Histochemical study on the serous gland of the frog (*Rana nigromaculata*) skin under dry conditions. *Korean J. Zool.* **18**:107-114.
- Pearse, A. G. E., 1961. Histochemistry: Theoretical and Applied. Little Brown, Boston, pp 640-698.
- Spicer, S. S., 1963. Histochemical differentiation of mammalian mucopolysaccharides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **106**:37-388.
- Spicer, S. S. and D. C. H. Sun, 1967. Carbohydrate histochemistry of gastric epithelial secretion in dog. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **140**:762-783.
- Variable, J. W., 1964. Granular gland development during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Devl. Biol.* **10**:331-355.
- Voute, C.L., 1963. Anelectronmicroscopic study of the skin of the frog (*Rana pipiens*). *J. Ultrastruct. Res.* **9**:497-510.
- Watlington, C.O., 1968. Effect of adrenergic stimulation on ion transport across skin of living frogs. *Comp. Biochem. Physiol.* **24**:965-974.

(Accepted February 20, 1989)

**Ultrastructural Study on the Cutaneous Granular Glands
in *Bombina orientalis* Boulenger**

Ki Young Kim, Kwan Sun Kim, Myung Jin Moon, and Woo Kap Kim
(Department of Biology, Korea University, 136-701, Korea)

The histochemical characteristics of the cutaneous granular glands and its fine structure of the Korean fire bellied toad, *Bombina orientalis* Boulenger, the only species inhabited in Korea, were studied with light and electron microscopes.

By the granular size and histochemical properties, the granular glands were subdivided into two types. The type I glands have small secretory granules (3.6 μ m), whereas the type II glands contain relatively larger granules (7.5 μ m). These two types of glands were simple alveolar gland, and they were commonly composed of inner glandular epithelial cells and outermost myoepithelial cells.

By the histochemical reactions, these two secretory granules were not responded to Alcian blue, but weakly positive reaction was observed in type I granular glands by the PAS reaction. And by the scanning electron microscopic observation, external morphology of the opening site of the gland duct was resembled to the stomata of the plant leaves. Especially the epithelial cells of the type I glands had fine reticular surface whereas, type II glands had large vesicular surface.

These types of the glands commonly had larger cavities than those of mucous glands, and forming the multinucleated unicellular structure (syncytium) at the glandular epithelial layers. Secretory granules of these glands were originated from the rough endoplasmic reticulum of the glandular epithelial cells, and by the maturation level of the granule, morphological diversities appeared.

- Fig.1.** Scanning electron micrograph of the skin of the toad. On the surface of the skin, several cutaneous protrusions (P) and the openings of the cutaneous glands (G) are distributed. ($\times 1,750$)
- Fig.2.** Scanning electron micrograph of the two types of the granular glands. The granular glands of this species are observed similar to the stomata of the plant leaves. By the epithelial cell structure, the opening portions of granular glands are composed of two types which are the Type I granular glands (G1) and the Type II granular glands (G2). ($\times 3,000$)
- Fig.3.** Photomicrograph of the cutaneous granular gland Type I (G1). ($\times 400$)
- Fig.4.** Photomicrograph of the cutaneous granular gland Type II (G2). ($\times 400$)
- Fig.5-12.** Electron micrographs of the Type I cutaneous granular glands.
- Fig.5.** Gland cavity of the Type I granular glands are composed of outer myoepithelial cells (ME) and inner glandular epithelial cells (GE). ($\times 5,600$)
- Fig.6.** Electron micrograph of the nucleus (N) and cytoplasm of the myoepithelial cell (ME). In the cytoplasm of this cell fine fibrous structure appeared. ($\times 4,500$)
- Fig.7.** Along the myoepithelial cell membrane, numerous small vesicles (arrows) are distributed. DS: desmosome, IS: intercellular space. ($\times 14,500$)
- Fig.8.** High electron micrograph of the basal plasma membrane of the myoepithelial cell (ME). D: dermis layer. ($\times 14,000$)
- Fig.9.** In the cytoplasm of the inner glandular epithelial cell, multinucleated masses, so-called, syncytial structure is observed. Between two nuclei (N) of the cells, cellular boundary does not exist (arrow). ($\times 5,000$)
- Fig.10.** The rough endoplasmic reticulum (ER) and small electron lucent vesicles (V) are observed near the nucleus (N). ($\times 11,200$)
- Fig.11.** The nucleus (N) of the glandular epithelial cell is located at the basal portion, whereas secretory granules (G) are accumulated at the apical portion. ($\times 7,000$)
- Fig.12.** The secretory material of the Type I granular glands is round-shaped granules (G) sized $3.6\mu\text{m}$ in diameter and has a strong electron density. N: nucleus. ($\times 14,000$)
- Fig.13-24.** Electron micrographs of the Type II cutaneous granular glands.
- Fig.13.** Gland cavity of the Type II granular glands also composed of outer myoepithelial cells (ME) and inner glandular epithelial cells (GE). In particular, well developed intercellular space (IS) between these two cells are seen. ($\times 8,000$)
- Fig.14.** Along the basal plasma membrane of the myoepithelial cell (ME), junctional hemidesmosomes (HD) are observed. D: dermis. ($\times 69,000$)
- Fig.15.** High electron micrograph of the desmosome (DS) between the adjacent myoepithelial cells. ($\times 6,000$)
- Fig.16.** Occasionally, cytoplasmic process (P) of the glandular epithelial cell (GE) which penetrated through the myoepithelial cells (ME) appeared. ($\times 4,200$)
- Fig.17.** At the junctional portion between myoepithelium and glandular epithelial cells, small electron lucent vesicles (V) are seen. ($\times 13,000$)
- Fig.18.** Higher electron micrograph of the cytoplasmic process (P) of glandular epithelial cell penetrated through the myoepithelial cells (ME). D: dermis. ($\times 30,000$)
- Fig.19.** Electron micrograph of the nuclei of the glandular epithelial cells located at the basal portion. Near the nucleus (N), cell organelles such as mitochondria, rough endoplasmic reticulations and large secretory granules (G) are seen. ($\times 4,200$)
- Fig.20.** Similar to the Type I granular glands, glandular epithelial cells of this gland has multinucleated single cell structure, so-called syncytial structure. N: nucleus. ($\times 2,800$)
- Fig.21.** Size of the secretory granule (G) of the Type II granular glands is $7.5\mu\text{m}$. Compare this value to that of the Type I granular glands ($3.6\mu\text{m}$). Arrows indicate small vesicles attached to the large secretory granules. ($\times 2,600$)
- Fig.22.** At the basal portion of the glandular epithelial cell, small electron lucent vesicles (V) are seen. these vesicles seem to be the immature secretory granules. ($\times 6,400$)
- Fig.23.** Among the immature secretory granules, multivesicular bodies (MB) appeared occasionally. ($\times 10,400$)
- Fig.24.** Secretory granules are synthesized from rough endoplasmic reticulum (ER) of the glandular epithelial cells. Limiting membrane of the granule is also originated from this cell organelle. Arrow indicates the secretory granule connected to the rough ER. ($\times 20,800$)









