

## Tight epithelia의 세포특성과 수송체계에 관한 전자현미경적 연구

전진석  
계명대학교 자연과학대학 생물학과

### Electron Microscopic Studies on Cellular Characteristics and Transport Systems in Tight Epithelia

Jin Seok Jeon

Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704, Korea  
(Received December 4, 1995)

#### ABSTRACT

This study analysed the transport properties of bladder mucosa known as the typical system of "tight epithelia" by using TEM observation with both rapid freeze-fracture electron microscopy and thin-section method and mainly analysed the cellular characteristics of turtle bladder epithelial cells.

The bladder epithelium, like other tight epithelia, consists of a heterogenous population of cells. The majority of the mucosal cells are the granular cells and may function primarily in the process of active  $\text{Na}^+$  reabsorption in turtle bladder. The remaining two types of cells are rich in mitochondria and is believed to be responsible for a single major transport system, namely,  $\text{H}^+$  transport by A-type of cell and urinary  $\text{HCO}_3^-$  secretion by B-type of cell.

As viewed in freeze-fracture electron micrograph, the tight junctions form a continuous tight seal around the epithelial cells, thus restricting diffusion in tight epithelia. In addition, the apical surface membranes have a population of rod-shaped intramembranous particles (IMPs). It is believed that these IMPs probably represent the components of the proton pump. However, it is likely that these characteristics of the apical transporter remain to be clarified in tight epithelial cells.

**Key words :** Bladder mucosa, Epithelial transport systems, Freeze-fracture electron microscopy

\* 본 연구는 1994년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어 졌음

## 서 론

Tight epithelia의 수송체계에 관한 세포학적 연구는 지난 10여년 동안 주로 표피 (skin) 및 신장상피 (renal epithelia)에서 광범위하게 연구되었다. 특히 방광점막 상피 (bladder mucosa)는 tight epitheliad의 전형적인 모델상피로서 toad나 turtle에서 가장 많이 연구하였으며 (Asher *et al.*, 1988; Wade & Kachadorian, 1988; Brem *et al.*, 1989; Jeon, 1990, 1993), 이들 상피수송의 과정 및 여러 가지 전해질의 수송 메커니즘의 연구는 수송상피세포의 핵심적인 주제가 되었다. 근래에 수송세포의 투과성조절에 대한 연구에서 세포의 동결전단법 (freeze-fracture technique)을 적용하므로써 세포막의 수송 특성을 효과있게 관찰할 수 있으며 (Rash and Hudson, 1979; Steinmetz and Stetson, 1986; Hui, 1989; Jeon, 1989, 1992), 세포막의 수송 저해 물질을 포함하는 용액에서 세포가 어떤 반응을 나타내는가를 분석하므로써 수송생리의 연구가 활발하였다. 수송 조절물질은 ouabain, amiloride, forskolin, phorbol ester 등이 있으며 (Garty & Benos, 1988; Schaeerer *et al.*, 1991), 그밖에 상피세포의 수송율은 여러가지 호르몬에 의하여 영향을 받는다 (Wade, 1989; Wade & Kachadorian, 1988; Brem *et al.*, 1989, 1991). 이와 같은 수송조절물질에 의한 tight cell의 수송체계의 연구는 수송물질 전반에 걸쳐 논의되고 근본적으로 세포막이 중요한 역할을 하고 있다.

본 연구에서 취급하는 tight epithelia의 수송체계의 연구에서 전압고정법 및 전자현미경 동결기법의 적용은 필수적이며, 특히 수송막의 구조와 기능분석을 위한 최적한 연구수단이라고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 전형적인 tight epithelia의 세포특성을 분석하기 위하여 통상적인 전현법에 의한 세포미세적 관찰은 물론 시료의 동결절단법 및 동결건조법을 적용하여 표면막 특성을 파악하고자 하였으며, 나아가서는 forskolin 자극에 의한 정단세포막 투과성의 조절을 세포막수송과 상호 연관시켜 논의하고자 하였다.

## 재료 및 방법

본 실험에서는 전형적인 tight epithelia의 모델상피로

서 Turtle의 방광점막 (bladder mucosa)을 재료로서 사용하였으며, 표면적이 넓으므로 상피조직을 chamber 한가운데 두고 전압고정법을 적용하여 상피세포의 막전위를 측정한 후 급속동결하고 동결시료를 포매하였다. 절편제작 후 투과전자현미경으로 세포막 표면구조를 관찰하였는데, 이와같은 동결절단법은 세포조직의 구조파괴를 최소한으로 줄일수 있으므로 세포막 수송생리의 연구에 최선의 방법이 되고 있다.

시료의 동결절단법의 적용은 다음과 같이 하였다. Using chamber 내에서 시료를 고정하고 (2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4), 15~30분 고정 후 Cacodylate buffer에 넣어 overnight 시켰다. 25% glycerol로서 2시간 cryoprotect 처리 후, 고정된 시료는 wax plate에서 세척한 후 gold hats 위에 올려 놓고 여과지를 사용하여 시료 주위의 수분을 제거하였다. 그 후 forcep을 사용하여 freon 12에 10초 동안 급속 동결시킨 후, 액체 N<sub>2</sub> (-196°C)에서 specimen holder에 보관하였다가 vacuum chamber (-110°C) 내에서 10분 후 동결절단하였다. 이 과정 후 시료의 replication을 위하여 platinum (Pt)과 carbon (C) replicas를 만들었으며, 이때 electron gun의 Pt/C rod는 45°/90°를 유지하고 Pt의 density는 22.0 (range × 1: 3.2nm~5.0nm)와 C의 density는 2.0 (range × 10: 4.0nm~5.0nm)으로 coation하였다. 시료의 replica 세척법을 시행한 후 grid에 옮겨서 TEM 관찰을 하였다.

급속동결절단 replica와는 달리 동결된 시료를 절단하지 않고 동결상태에서 전조시키는 표면 replica법을 적용하여 세포특성을 관찰하였다. 동결전조된 시료의 표면 replica법을 위하여 시료를 2.5% glutaraldehyde에 15분 고정하고 중류수로 흐석된 DDT (5 mM)로 10분 동안 세척하였다. 세포조직을 세척하여 여과지 위에 놓고 15% methanol (1분)을 사용하여 cryoprotect 처리를 한 후 aluminum disc 위에 옮겨 Gentleman Jim 장치로 급속 동결시킨 후 vacuum chamber (-90°C)에 넣어 45분 동안 동결전조 시켰다. 동결절단 replica에서와 같이 platinum과 carbon층을 입혔으며 electron gun의 Pt/C rod는 75°/35°로 하였다. 표면 replica는 세척과정을 거쳐 관찰하였으며, 이 방법은 여러가지 화학물질에 의한 세포막표면의 투과성을 관찰하는데 효과적이라 할 수 있다. 이와같은 방법들은 세포막과 관련된 연구에

서는 필수적인 요소로서 특히 시료의 절단기법과 전자밀도를 나타내는 방법에 있어서는 섬세한 기법이 요구되고 있다. 그 밖에 본 실험에서는 통상적인 시료의 고정과 탈수 및 포매과정, 초박절편제작 및 염색과정을 거쳐 여러 가지 유형의 세포미세구조를 TEM으로 관찰하였다.

## 결 과

본 실험에서 관찰한 방광점막의 상피층은 세 종류의 주요 세포로 구성되며 이들 세포는 tight epithelia의 수송막으로서 역할을 수행하고 있다. Fig. 1과 Fig. 2에서 와 같이 과립형세포 (granular cell)는 점막표면적의 대부분을 차지하며 정단세포질에 다수 관찰되는 과립이 특징적이다. 과립의 크기는 약 0.3~0.5  $\mu\text{m}$ 이며 내부에는 전자밀도가 매우 높은 것으로 나타났으며 정단 세포표면에는 비교적 작은 미세융모가 배열되어 있다. 구형의 모습을 보이는 A타입의 세포는 약 10% 내외를 점유하는 것으로 보여지며 (Fig. 2, A), 불규칙적인 미세융모가 배열되어 있고, B타입의 세포는 규칙적인 배열의 미세융모가 있으며 (Fig. 1, B), 이들 두 종류의 세포에서는 세포질 전역에 걸쳐 미토콘드리아가 풍부한 것으로 관찰되었다.

세포의 동결절단법에 의하면 상피세포의 입체구조를 미세적으로 관찰할 수 있으며 수송세포의 기능과 활성을 형태적인 측면에서 추구하는데 효과적이다. 동결절단 투과전자현미경 관찰 결과는 tight epithelia의 세포구성 가운데 가장 중요한 요소가 되는 세포간 연접부 (junctional complex)를 명확히 나타내준다 (Fig. 3). 세포연접부의 견고연접 (tight junction)은 상피수송의 barrier로서의 역할을 하며 세포막의 균성을 유지해주고 있다. 이와같이 tight epithelia에서 견고연접은 상피세포의 표면 가까이에 세포 주변을 완전히 둘러싸는 구조를 보이며 인접하는 세포와 접착되어 있다 (Fig. 4, arrowheads). 본 연구에서 급속 동결시킨 세포조직을 절단하면 생체막은 막 내부의 소수성에서 분할되어 막내면이 노출된다. 이때 세포질에 접한 면이 나타나는 것을 protoplasmic face (PF)라고 하며, 세포밖에 접한 면이 나타나는 외측 면을 exterior face (EF)라고 한다 (Branton, 1975). 견고연접은 그 미세구조가 세포질에 접한 면에 sealing strands로서 관찰되며 (Fig. 5, PF), 이 구조에 의하여

세포간극을 통한 물질의 확산과 이동은 완전히 폐쇄되는 것으로 보인다 (Fig. 6).

급속동결 절단법에 의하면 세포막내에 많은 입자가 노출되는데 (Fig. 7) 이 입자는 세포막을 구성하는 지방분자층에 분포하는 단백질 막내입자 (intramembranous particle, IMP)로서 추정된다. 본 실험에서 동결절단법의 replica 상에서 관찰되는 막내입자는 주로 두 가지 타입의 상피세포에서 세포질 면의 P face에 국한되어 관찰되고 있다. 이와 같은 경우 막내입자는 수송상피에서 특히 이온 투과성과 밀접한 관계가 있는 것으로 보이며 정단부 또는 기저측 세포막에서 pinocytotic vesicles이 밀집되어 나타나고 있다 (Fig. 8). 동결건조시킨 표면 replica 상에서 관찰된 방광상피는 모든 세포의 표면에서 각 세포에 특유한 물질이 붙어 있는 것을 보여주며 (Fig. 9), 이와 같은 구조는 세포 바깥 표면에 노출된 다당류로서 filamentous glycocalyx에 해당되는 것으로 추정된다. 특히 미세융모 윗 부분에서는 잘 발달되어 세포표면을 덮고 있어서 세포막의 생리기능에 필요한 구성요소가 되고 있다.

## 고 칠

체액의 수분 및 삼투조절기관으로서 amphibian skin이나 urinary bladder는 대표적인 tight epithelia로서 표면적이 넓으므로 생체 밖에서 수송막 생리의 연구에 효과적으로 이용되며 (Nagel and Dorge, 1970; Lewis and Diamond, 1976; Foskett and Ussing, 1986; Larsen et al., 1987), 세포막 표면구조의 변화와 수송조절의 상관관계를 추구하는 모델상피로서 특성이 있다. 일반적으로 상피세포는 단세포와 달리 복잡한 세포구성을 나타내고 있으며 세포가 나타내는 전기적 저항의 크기에 따라 크게 둘로 나눌 수 있다. 그 하나는 세포의 저항이 낮아 100 ohm- $\text{cm}^2$  이내인 leaky epithelia이며 신장의 기부선희소관, 담낭, 소장, 회장 등의 상피세포가 여기에 속한다. 반면에 높은 전기저항을 나타내는 tight epithelia는 신장의 단부선희소관, 방광, 결장, 타액선 등의 상피세포가 해당된다 (Schneyer, 1970; Macknight et al., 1980; Friedman, 1986).

Tight epithelia의 수송경로는 세포의 정단부와 기저부를 축으로 세포통과 수송, 세포연접부를 통한 세포간

수송경로 그리고 세포내 수송물질이 세포간격으로 이동하는 분류수송 등의 3가지로 구분할 수 있다. 본 연구에서 관찰된 방광점막층은 여러 종류의 세포로 구성되고 수송 세포는 각기 고유한 수송특성을 가지며, 세포막은 수송 세포의 정단부와 기저측막에서 기능적 분화에 따라 구조적인 특성을 나타내었다. 즉 동결절단법의 replica 상에서 관찰되는 막내입자의 분포는 정단세포막 또는 기저측 세포막의 기능적 분화에 따라 특유한 분포를 나타내고 있으며 이와같은 사실은 상피세포의 막구조적인 변화와 수송기능 사이의 상관관계를 암시해 주는 것이다. 또한 상피세포의 정단부 세포질은 견고연접으로 둘러싸이고 기저측에는 인접세포가 서로 분리되어 있으므로 상피세포층을 경계로 이온조성과 막전위의 차이 때문에 정단부와 기저측막은 각기 다른 수송특성을 가지는 것으로 본다.

일반적으로 leaky epithelia에서는 세포의 저항은 낮고 세포간격의 전도성은 상대적으로 크므로 전해질의 수동적인 수송은 주로 세포간 수송이나 분류수송에 의존하고 있으며, 반면에 tight epithelia에서는 세포의 저항은 높고 견고연접의 특징적인 분포로 인하여 세포간 수송은 억제되는 것으로 볼 수 있다. 이 경우에는 세포통과 수송이 더욱 중요한 역할을 하는데 세포통과수송의 특징은  $\text{Na}^+$ 의 수송율을 조절하는 능력이며, tight epithelia에서는 과립형 세포에 주로 의존하는 것으로 규명되고 있다.  $\text{Na}^+$ 은 정단세포막의  $\text{Na}^+$  channel을 통하여 세포내로 확산되지만 기저측 세포막에 존재하는  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  pump에 의하여 능동수송되어 세포 밖으로 방출된다.  $\text{Na}^+$ 은 기저측 세포막을 통하여 확산되어 세포내로 유입되기도 하지만 이 경우에는  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  pump에 의하여 세포 밖으로 재순환 된다. 따라서 안정상태에서는 세포의  $\text{Na}^+$  유입량과 방출량은 동일한 것으로 보며, 세포통과 수송의 과정에서는 기저측의 능동적인 수송율에 변화를 수반함이 없이 단지 정단세포막의 투과성을 변화시켜서  $\text{Na}^+$  수송율을 조절할 수 있다고 가정하고 있다 (Palmer, 1982, 1985; Fisher and Lockard, 1988). 이와 같은 경우  $\text{Na}^+$  수송율은 일차적인 조절부위로서 정단세포막에 중요성을 두고 있다. 본 실험에서 방광상피세포의 전위는 lumen에서 보통  $-20 \text{ mV}$  크기로 음전위를 나타내고, 이것은  $\text{Na}^+$ 의 재흡수에 따른 현상으로 설명되는데 만일 정단부  $\text{Na}^+$  channel의 저해물질로서 amiloride ( $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ )를 가하거나 기저막에서  $\text{Na}^+$

pump의 저해물질인 ouabain을 처리하면 lumen의 음전위는 소멸되게 된다.  $\text{K}^+$ 의 수송은  $\text{Na}^+$ 의 재흡수율과 lumen의 음전위의 크기에 의존되며  $\text{BaCl}_2$ 는  $\text{K}^+$ 의 분비를 저해하는 물질로서 알려져 있다 (Bentley, 1968; Nielsen, 1982; Koeppen and Giebisch, 1985; Palmer, 1986). 이상에서 살펴본 수송과정은 일반적인 상피세포에서 제시되는 특성과 근본적으로 일치하는 수송모델이 되는 것으로 파악된다.

시료의 동결절단법은 막구조의 특성과 막투과성과의 관계를 분석하는데 최적한 연구수단이 되지만, 실제로 어떤 화학물질이 막투과성을 일시적으로 변화 시키거나 이로 인한 막구조의 특징적인 변화와의 관련여부를 명확히 규명하기 위해서는 세포막 전위의 안정성이 중요하다. 본 실험에서는 생체 밖 세포의 전위와 이온농도를 조절하기 위한 실험장치로 전압고정법을 적용하고 forskolin에 활성화된 정단세포막의 투과성 변화로서 나타나는 막표면의 특이성을 확인하였다. Forskolin 자극이 세포막 구조의 변화에 미치는 영향은 정단세포막의 P face에서 관찰되는 IMP로서 추정된다. Forskolin은 직접세포막의 adenylyl cyclase의 활성화를 촉진시킴으로서 cAMP 생성에 의한 막투과성의 변화에 작용하고 있으며 (Sabatini, 1985; Kachadorian et al., 1987), 세포막 내면 P face에 관한 구조적 또는 수송생리적인 해명은 아직 충분한 것은 아니지만 여러 연구결과에 의하면 IMP가 막내 세포질면에 국한되어 존재하는 것으로 나타나며 (Parisi and Bourguet, 1984; Hays, et al., 1985; Stetson and Steinmetz, 1986; Rash and Giddings, 1989; Wade, 1989), 또한 본 실험결과에 의하면 방광세포 A 타입의 정단부세포막 내면 P face에서 많은 막내입자 (IMP)를 관찰할 수 있었다.

Tight epithelia에서 미토콘드리아가 풍부한 A 타입의 세포는  $\text{H}^+$  분자를 세포 밖으로 분비하며 B 타입의 세포는  $\text{HCO}_3^-$ 를 분비하는데, 이러한 분비작용은 거의 전적으로 exocytosis에 의하여 이루어지며 일반적으로 tight epithelia에 있어서  $\text{H}^+$  분비는 electrogenic transport로서 알려져 있다 (Stetson and Steinmetz, 1983; Wade et al., 1986). 투과전자현미경 관찰에 의하면 tight epithelia의 tubulovesicle 정단부 세포질내에는 tubulovesicle이 많이 관찰되는 사실로 미루어 보아 (Trowbridge, 1991; Jeon, 1993) 이러한 transport

vesicle은 proton pump를 함유하는 것으로 생각된다 (Jeon, 1992). 또한 이와같은 구조는 세포질 면의 P face에서 관찰되는 막내입자와 상호관련하여 endocytosis와 세포막 재순환과정에 관여할 수 있는 가능성이 충분하다는 것을 시사해주는 것이다. 동결전조시킨 표면 replica 상에서 관찰된 세포막의 바깥 표면에는 glyco-calyx가 있어서 세포표면의 기능에 필요한 환경을 유지 해주며 수송세포막의 생리기능에 중요한 역할을 하는 세포막 구성요소로 생각된다.

### 결 론

본 연구는 tight epithelia의 수송특성을 분석하기 위하여 방광점막 세포의 급속동결절단 및 동결전조법을 적용하여 전자현미경 관찰을 실시하였다. 방광점막층의 대부분을 점유하는 과립형세포로 주로  $\text{Na}^+$  수송에 주요한 역할을 하고, 미토콘드리아가 풍부한 두 타입의 세포는  $\text{H}^+$  분비에 관여하거나  $\text{HCO}_3^-$  재흡수에 관여할 것으로 생각된다.

Tight epithelia에서 상피세포의 전위는 lumen-negative를 나타내고 있으며 이온수송의 주요경로는 세포통과 수송이다. 그 밖의 상피수송은 견고연접의 특징적인 분포로 인하여 세포간 수송 및 분류수송을 하며 정단 세포막의  $\text{Na}^+$  channel과 기저측세포막의  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  결합수송 및  $\text{HCO}_3^-$  분비수송은 상피세포의 이온평형에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서 forskolin에 유도된 세포막 투과성의 변화와 관련하여 세포막 표면의 구조적 특성은 세포질내면에 접한 P face에서 관찰되는 막내입자의 분포로서 나타나고 있다. 이와같은 세포특성은 수송막의 구조적 변화와 기능상관을 시사해주는 것으로 생각되나 막내입자의 분포에 따른 수송막의 기능적 해명은 더욱 연구되어야 할것이다.

### 참 고 문 헌

- Asher C, Moran A, Rossier BC, Garty H, 1988. Sodium channels in membrane vesicles from cultured toad cells. Am. J. Physiol. 254:C512-C518
- Bentley PJ, 1968. Amiloride : a potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. J. Physiol. London, 195:317-333
- Branton D, 1975. Freeze-etching nomenclature. Sci. 190:54-56
- Brem AS, Matheson KL, Conca T, Morris DJ, 1989. Effect of carbenoxolone on glucocorticoid metabolism and  $\text{Na}^+$  transport in toad bladder. Am. J. Physiol. 257:F700-F704
- Brem AS, Matheson KL, Barnes JL, Morris DJ, 1991. 11-Dehydrocorticosterone, a glucocorticoid metabolite, inhibits aldosterone action in toad bladder. Am. J. Physiol. 261:F873-F879
- Fisher RS, Matheson KL, Barnes JL, 1988. Complex response of epithelial cells to inhibition of  $\text{Na}^+$  transport by amiloride. Am. J. Physiol. 254:C297-C303
- Foskett JK, Ussing HH, 1986. Localization of chloride conductance to mitochondria-rich cells in frog skin epithelium. J. Membr. Biol. 91: 251-258
- Friedman MH, 1986. Principles and models of biological transport. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp.193-200
- Garty H, Benos DJ, 1988. Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable  $\text{Na}^+$  channel. Physiol. Rev. 68:309-373
- Hays RM, Chevalier J, Gobin R, Bourgues J, 1985. Fusion images and intramembrane particle aggregates during the action of antidiuretic hormone. A rapid-freeze study. Cell Tissue Res. 240:433-439
- Hui SW, 1989. Freeze fracture studies of membranes. CRC Press, Boca Raton, Fl
- Jeon JS, 1989. Studies on transport mechanisms of turtle bladder : 1. Epithelium of urinary bladder. Kor. J. Elect. Microsc. 19:119-137
- Jeon JS, 1990. Freeze-substitution and freeze-fracture studies on epithelial transport of toad bladder. Kor. J. Elect. Microsc. 20:81-101
- Jeon JS, 1992. Mechanisms of proton secretion by anhydrase-containing cells in turtle bladder. Kor. J. Elect. Microsc. 22:84-96
- Jeon JS, 1993. Transepithelial transport and dynamic changes on apical membrane area of turtle bladder. Kor. J. Elect. Microsc. 23:1-14

- Kachadorian WA, Colemal RA, Wade JB, 1987. Water permeability and particle aggregates in ADH-, cAMP-, and forskolin-treated toad bladder. *Am. J. Physiol.* 253:F120-F125
- Koeppen BM, Giebisch G, 1985. Cellular electrophysiology of potassium transport in the mammalian cortical collecting tubule. *Pfluegers Arch.* 405:S143-S146
- Larsen EH, Ussing HH, Spring KR, 1987. Ion transport by mitochondria-rich cells in toad skin. *J. Membr. Biol.* 99:25-40
- Lewis SA, Diamond JM, 1976.  $\text{Na}^+$  transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium. *J. Membr. Biol.* 28:1-40
- Macknight ADC, Dibona DR, Leaf A, 1980. Sodium transport across toad urinary bladder: A model "tight" epithelium. *Physiol. Rev.* 60:628-636
- Nagel W, Dorge A, 1970. Effect of amiloride on sodium transport of frog skin. 1. Action on intracellular sodium content. *Pfluegers Arch.* 317:84-92
- Nielsen R, 1982. Effect of ouabain, amiloride and ADH on the sodium-transport pool in isolated epithelia from frog skin, *J. Membr. Biol.* 65:221-226
- Palmer LG, 1982. Ion selectivity of the apical membrane  $\text{Na}^+$  channel in the toad urinary bladder. *J. Membr. Biol.* 67:91-98
- Palmer LG, 1985. Interaction of amiloride and other blocking cations with the apical  $\text{Na}^+$  channel in the toad urinary bladder. *J. Membr. Biol.* 87:191-199
- Palmer LG, 1986. Apical membrane  $\text{K}^+$  conductance in the toad urinary bladder. *J. Membr. Biol.* 92:217-226
- Parisi M, Bourguet J, 1984. Effects of cellular acidification on ADH-induced intramembrane particle aggregates. *Am. J. Physiol.* 246:C157-C159
- Rash JE, Hudson CS, 1979. Freeze fracture : Methods, artifacts and interpretation. Raven Press, New York, pp.193
- Rash JE, Giddings FD, 1989. Counting and measuring IMPs and pits: why accurate counts are exceedingly rare. *J. Elect. Microsc. Tech.* 13:204-215
- Sabatini S, 1985. Effect of cyclic AMP on acidification in the isolated turtle bladder. *Kidney Int.* 27:25-30
- Schaerer E, Neutra MR, Krahenbuhl JP, 1991. Molecular and cellular mechanisms involved in transepithelial transport. *J. Membr. Biol.* 123:93-103
- Schneyer IH, 1970. Amiloride inhibition of ion transport in perfused excretory duct of rat submaxillary gland. *Am. J. Physiol.* 245:C113-C120
- Stetson DL, Steinmetz PR, 1983. Role of membrane fusion in  $\text{CO}_2$  stimulation of proton secretion by turtle bladder. *Am. J. Physiol.* 245:C113-C120
- Steinmetz PR, Stetson DL, 1986. Correlation between apical intramembrane particles and  $\text{H}^+$  secretion rates during  $\text{CO}_2$  stimulation in turtle bladder. *Pfluger Arch.* 407:S80-S84
- Trowbridge LS, 1991. Endocytosis and signals for internalization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:634-641
- Wade JB, McCusker C, Coleman RA, 1986. Evaluation of granule exocytosis in toad urinary bladder. *Am. J. Physiol.* 251:C380-C386
- Wade JB, Kachadorian WA, 1988. Cytochalasin B inhibition of toad bladder apical membrane responses to ADH in amphibian bladder. *Am. J. Physiol.* 257:998-1003

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Transmission electron micrograph of a bladder mucosa. B-cells (B) have been suggested to be the type responsible for bicarbonate ion secretion in the bladder mucosa. In this type of cells, numerous mitochondria (M) are present in the cytoplasm. The microvilli (arrowheads) greatly increase the absorptive surface area of these cells. N: nucleus, Lu: lumen, Gr: granular cell.
- Fig. 2.** Transmission electron micrograph of a bladder mucosa. Numerous granules are present around the apical cytoplasm (\*). A-cells (A) have been suggested to be the type responsible for hydrogen ion secretion in the bladder mucosa.
- Fig. 3.** This replica illustrates a tight junction sealing strands between adjacent epithelial cells. PF: P fracture face, EF: E fracture face.
- Fig. 4.** The freeze fracture electron micrograph of the renal epithelia shows a tight junction (arrowheads) composed several parallel sealing strands. The sealing strands completely encircle the cell at the point where the apical (AM) and basolateral membranes (\*) meet, generally just below the apical microvilli. The fracture plane has passed through the cell cytoplasm (CY).
- Fig. 5.** The freeze fracture electron micrograph depicts a tight junction in bladder epithelia cells. At higher magnification tight junctions are composed of sealing strands (arrowheads), which are linear cylindrical strand on the P fracture face.
- Fig. 6.** The freeze fracture electron micrograph depicts the apical portion of a bladder cell. The sealing strands of tight junctions remain on the P fracture face.
- Fig. 7.** The freeze fracture electron micrograph of the apical membrane region of an A type cell illustrates numerous intramembranous particles (IMP) on P fracture face.
- Fig. 8.** The freeze fracture electron micrograph depicts the basolateral portion of a bladder cell. Arrowheads indicate micropinocytotic vesicles.
- Fig. 9.** This surface replica illustrates the apical portion of bladder epithelia. There is no pit on their surface area, but relatively short microvilli extend from the apical surface of the B type cell (arrowheads). Gr: granular cell, B: B type of cell.







