

참개구리 (*Rana nigromaculata*) 유생기 상피 세포사의 미세구조

이 혜 원, 문 명 진*
단국대학교 생명과학과

Fine Structure of the Epithelial Apoptosis in the Anuran Tadpole *Rana nigromaculata*

Hye-Won Lee and Myung-Jin Moon*

Department of Biological Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
(Received May 24, 2010; Revised June 15, 2010; Accepted June 18, 2010)

ABSTRACT

The fine structural characteristics of the apoptotic cells in the cutaneous epithelium of the anuran tadpole of the black-spotted frog, *Rana nigromaculata* was examined using the TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated d-Uridine triphosphate Nick End Labeling) staining technique and TEM (transmission electron microscopy) observations. The cutaneous epithelium of the tadpole was composed of stratified cuboidal cells and the apoptotic cell death was observed continuously during the tail degeneration stages from the Shumway stage number 31 to 33. The early apoptotic cells shown in the epithelium demonstrated condensation and margination of the chromatin material at the nuclear periphery, and nuclear breakdown and cytoplasmic condensation were followed. Subsequent cytoplasmic degeneration of the apoptotic cell were produced by membrane-bounded cell fragments with relatively well preserved organelles. Following the processes of autophagic degradation, the late apoptotic cells being phagocytosed by other surrounding cells. These nearby cells, presumptive intraepithelial macrophages, contain a variety of lysosomal residual bodies which fuses with other cell organelles or other cytoplasmic material to form secondary lysosomes. They are soon transformed into lamellar shaped vesicles and finally disappeared during the process of degradation.

Keywords : Apoptosis, Fine structure, *Rana nigromaculata*, Tadpole, TUNEL

서 론

세포자멸사(apoptosis)란 세포가 사멸하는 과정에서 준비된 사망 프로그램을 가동시켜 능동적으로 죽음을 맞이한다는 개념으로 일반적으로 다세포생물에서 일어나는 세포의 예정사(PCD: programmed cell death)를 지칭하는데(Ellis et al., 1991; Jacobson et al., 1997), 특징적으로 세포의 형태적

변화와 죽음을 초래하는 일련의 생화학적 과정들을 포함하고 있다(Kerr et al., 1995).

다세포생물이 지향하는 진화의 방향은 개체의 효율적인 생존에 있으므로 몸체를 구성하는 세포들을 적절히 유지하고 통제하는 정교한 기전을 발달시켜 왔으며, 그 중의 하나가 세포분열과 세포사멸의 균형을 유지하는 것으로 해석되고 있다(Hengartner & Horvitz, 1994a, b). 세포분열과 세포사멸의 과정은 개체발생 단계와 성체 단계에서 필요한 세포의

* Correspondence should be addressed to Myung-Jin Moon, Department of Biological Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea. Ph.: (041) 550-3445, Fax: (041) 550-3409, E-mail: moonmj@dankook.ac.kr

수를 유지하기 위해 필수적이며 이를 통해 각 개체는 균형 잡힌 몸체를 가지게 된다. 따라서 세포자멸사라는 정교한 기전에 의해 통제되는 세포의 능동적 사멸과정은 다세포생물의 생존을 위한 고도의 전략(Wyllie et al., 1980; Wyllie, 1987)임을 알 수 있다.

다세포로 구성된 기관에서 생리적 세포사에 관한 최초의 관찰이 양서류의 발생과정에서 최초로 보고된 후(Vogt, 1842), Glücksmann (1951)은 발생과정에서 항상성을 유지하기 위해 일정 시기에 일부의 세포들이 도태된다는 사실을 확인하고 세포사의 과정을 자세히 관찰하여, 핵물질이 서로 엉키며 침전하는 1단계와 핵이 수축하는 2단계, 그리고 염색체의 과립으로 남아 있다가 없어지는 3단계로 구분하였다. 후에 Kerr et al. (1972)은 쥐의 유방암 세포에서 동일한 패턴의 사멸과정을 관찰하고 이를 apoptosis라 명명하였다.

이후 활발한 연구를 통해 자멸사를 유발하는 세포의 인자의 규명에 초점이 맞춰지고, 환경성 인자로서 glucocorticoid와 gamma선 조사, T 세포수용체의 자극 등이 중요하다는 사실이 밝혀지게 되었다(Bicknell et al., 1994). 또한 Cohen & Duke (1984)에 의해 세포사가 일어나려면 새로운 RNA와 단백질의 합성이 필요하다는 사실이 보고된 후 세포사멸을 통제하는 유전자를 찾기 위한 실험이 활발히 진행되었으며, 그 결과 Hockenbery et al. (1990)에 의해 세포사멸사를 억제하는 막결합 단백질을 만드는 bcl-2 유전자 등이 발견되기도 하였다.

한편, 세포자멸사는 세포괴사(necrosis)와는 여러 측면에서 상이한 특성을 보이는 것으로 알려지고 있는데, 생화학적 측면에서 관련된 단백질분해효소들 사이에 현저한 차이를 보이기도 하지만, 형태 및 미세구조적인 측면에서도 뚜렷하게 구분된다(Kerr et al., 1995). 즉, 생리적 환경의 변화에 의해 핵의 변형이 일어나면서 세포사멸이 유발되는 세포자멸사와는 달리, 세포괴사의 경우에는 세포막에 회복할 수 없는 손상이 수반되는 것으로 알려지고 있다.

본 연구는 세포자멸사가 진행중인 세포에서 나타나는 형태적 변화를 미세구조적인 측면에서 분석하기 위하여 변태기에 꼬리의 퇴화가 일어나는 제31단계에서 제33단계까지의 참개구리 유생을 실험재료로 하여 피부 상피세포에서 세포자멸사의 과정을 전자현미경으로 관찰하였다. 이를 위해 TUNEL 염색기법을 통해 자멸사가 진행중인 세포들을 세포화학적으로 확인하였으며, 세포자멸사의 과정에서 발현되는 핵과 세포질의 미세구조적 변형을 투과전자현미경 관찰을 통해 분석하였다.

재료 및 방법

충청남도 천안시 안서동 단국대학교 천안캠퍼스 주변에

서 채집한 무미 양서류의 일종인 참개구리(*Rana nigromaculata*) 유생을 실험실의 수조에서 사육하며 실험재료로 사용하였다. 발생 및 변태의 단계는 Shumway (1940)가 제시한 방법에 따라 구분하였고, 꼬리의 퇴화가 진행되는 제31단계에서 제33단계까지의 유생을 선별하여 퇴화중인 꼬리 부분으로부터 조직을 적출하여 실험재료로 사용하였다. 그리고 전자현미경 관찰을 위한 최적의 시료는 세포자멸사가 진행되는 세포에서 일어나는 DNA 분절현상을 이용하여 이를 조직화학적으로 확인하는 TUNEL 염색(Garvrieli et al., 1992; Negoescu et al., 1996, 1998)을 실시하여 선별하였다.

적출한 재료를 4% paraformaldehyde (pH 7.2, 0.1 M phosphate buffer)에 고정된 후, 흐르는 물로 수세하고 ethanol로 탈수하였으며 xylene으로 치환 후, Paraplast Plus medium (Polysciences Co., USA)에 포매하였다. 포매가 끝난 시료는 절편제작기를 이용하여 4µm 두께의 절편을 제작하고, 젤라틴이 코팅된 슬라이드 글래스에 부착하였으며, xylene 용액으로 파라핀을 제거하였다. 이어서 ethanol 용액을 이용하여 친수화 처리하였으며 0.05 M PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2) 용액으로 수세한 다음, proteinase K로 처리하고 absolute ethanol에 용해된 3% hydrogen peroxide로 실온에서 처리하였다.

다시 0.05 M PBS로 수세하고 TdT equilibration buffer로 실온에서 15분 처리한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 처리가 끝난 시료는 stop buffer로 반응을 정지시키고, 0.05 M PBS로 수세한 후, blocking buffer로 처리하였으며 conjugate로 처리하고, 0.05 M PBS로 수세한 후, 3,3-diaminobenzidine (DAB) 용액으로 발색 처리하였다. 반응이 끝난 시료는 증류수로 수세하고 methyl green으로 대조 염색한 후, ethanol 농도 상승 순서로 탈수하고 Permount mounting medium로 봉입하여 Zeiss Axiophot 광학현미경(Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

투과전자현미경용 시료는 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (pH 7.2, 0.1 M phosphate buffer) 혼합용액에서 전고정(pre-fixation)하고, 완충용액(pH 7.2, 0.1 M phosphate buffer)으로 수세한 후, 1% OsO₄(0.1 M phosphate buffer) 용액으로 약 2시간 후고정(post-fixation)하였다. 이를 다시 동일 완충용액으로 3회 수세한 후, 농도 상승순의 ethanol 용액으로 탈수하였으며, propylene oxide로 치환한 후 EM Poly/Bed 812-Araldite (Polysciences Co., USA) 혼합용액으로 포매하여 60°C의 진공 건조 오븐에서 중합하였다.

포매가 완료된 시료는 LKB ultramicrotome으로 0.5µm 두께의 준초박절편(semithin section)을 제작하여 1% borax에 녹인 1% toluidine blue 용액으로 hot plate (60°C) 상에서 염색하고 증류수로 수세하여 광학현미경으로 관찰 부위를 확인하였다. 이어서 초박절편(ultrathin section)을 제작하여 copper grid에 부착시킨 다음, uranyl acetate와 lead citrate로

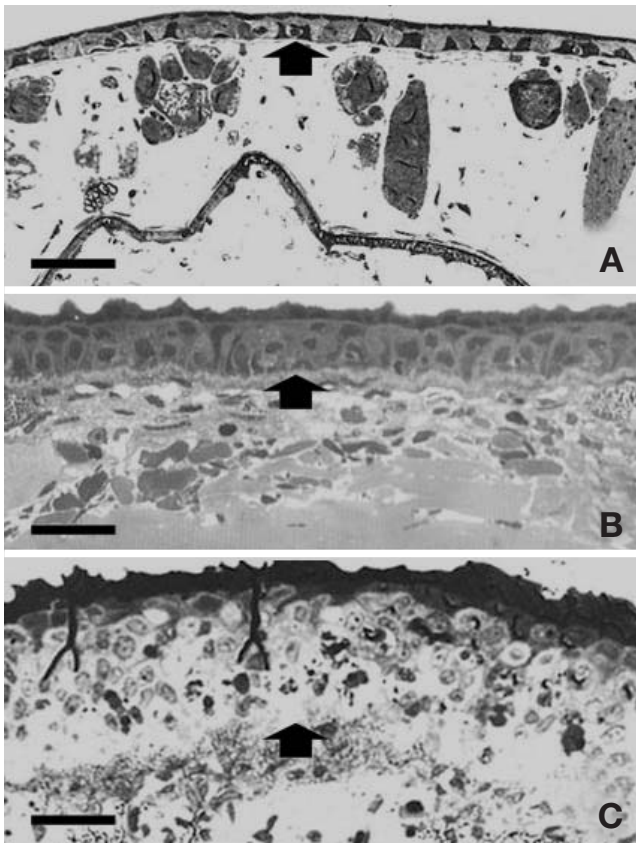


Fig. 1. TUNEL stain of the cutaneous epithelium of the developing anuran tadpole of the black-spotted frog, *R. nigromaculata*. During the stages of Shumway 31 (A), 32 (B), and 33 (C), the TUNEL-positive cells (arrows) can be seen at the epithelial layer (E) of the tail skin. The number of the TUNEL-positive cells gradually increased from apical to basal direction of the epithelial layer during the tail regressing stages of metamorphosis. All scale bars indicate 25 μ m.

이중 염색하여 JEM 100CX-II형 투과전자현미경 (JEOL Co., Japan)으로 80 kV의 가속전압에서 관찰하고 그 영상을 기록하였다.

결 과

세포자멸사가 진행 중인 세포의 미세구조적인 변화를 확인하기 위하여 꼬리 퇴화 과정에 있는 무미 양서류의 참개구리를 실험재료로 하여 Shumway 31단계에서 33단계에 해당하는 변태기 유생의 꼬리부분에서 상피를 적출하여 TUNEL 염색법으로 세포자멸사가 진행 중인 세포의 출현과 그 조직학적으로 분포를 관찰한 결과, 제31단계의 상피에서부터 양성반응이 나타남을 확인할 수 있었다 (Fig. 1A). 제32단계의 유생에서는 상피 전역에 걸쳐 핵과 세포질의 응축이 관찰되었고 (Fig. 1B), 제33단계의 시료에서는 분절된 핵과 자멸소체 (apoptotic body)를 지닌 상피세포들이 확연히 구분되

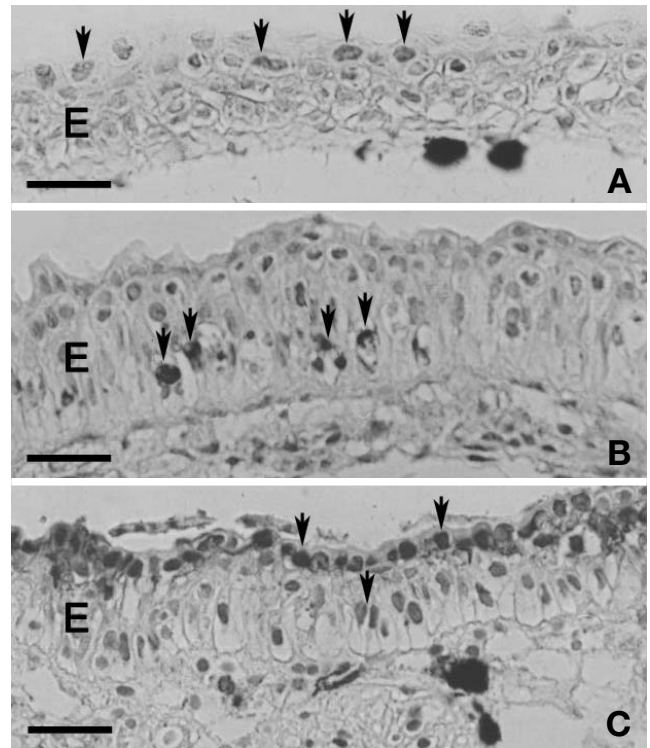


Fig. 2. Photo micrographs of the cutaneous epithelial tissue of the developing anuran tadpole during the period of metamorphosis from the Shumway's stage 31 to 33. The epithelium was composed of stratified cuboidal cells, and the apoptotic cell death was observed continuously during the tail degeneration stages. Arrows indicate developing epithelium of the skin. Scale bars indicate 50 μ m (A), 25 μ m (B), and 10 μ m (C), respectively.

었다 (Fig. 1C).

전자현미경 관찰을 위해 제작한 시편을 준초박절편으로 제작하여 toluidine blue로 염색하여 관찰한 결과, 제31단계의 조직은 입방형의 세포로 이루어져 있었고 상피층이 얇았으며, 점액층이 발달되어 있었다 (Fig. 2A). 꼬리의 퇴화가 활발히 진행되는 제32단계에서는 점액층이 소실되고 상피층이 비후되어 다층상피의 층상구조가 확연히 구분되었다. 상피에서는 세포자멸사가 진행 중인 세포들이 광범위하게 출현하였으며 핵과 세포질이 응축된 자멸소체가 다수 관찰되었다 (Fig. 2B). 그리고 꼬리의 퇴화가 완료된 제33단계의 조직에서는 상피가 비후되어 전형적인 성체의 피부구조가 형성되었고 상피 전역에서 자멸소체의 존재가 확인되었다 (Fig. 2C).

한편, 세포자멸사가 나타나는 초기의 세포는 제31단계의 유생 상피에서 관찰되었는데, 꼬리의 퇴화가 시작되는 변태기 유생의 상피는 중층의 입방형세포로 이루어져 있었고 인접한 세포들은 세포질돌기에 의한 세포간교 (intercellular bridge)와 부착반 (desmosome)이 발달되어 있었다. TUNEL 염색에 약한 양성반응을 보인 내강부의 세포들은 공통적으

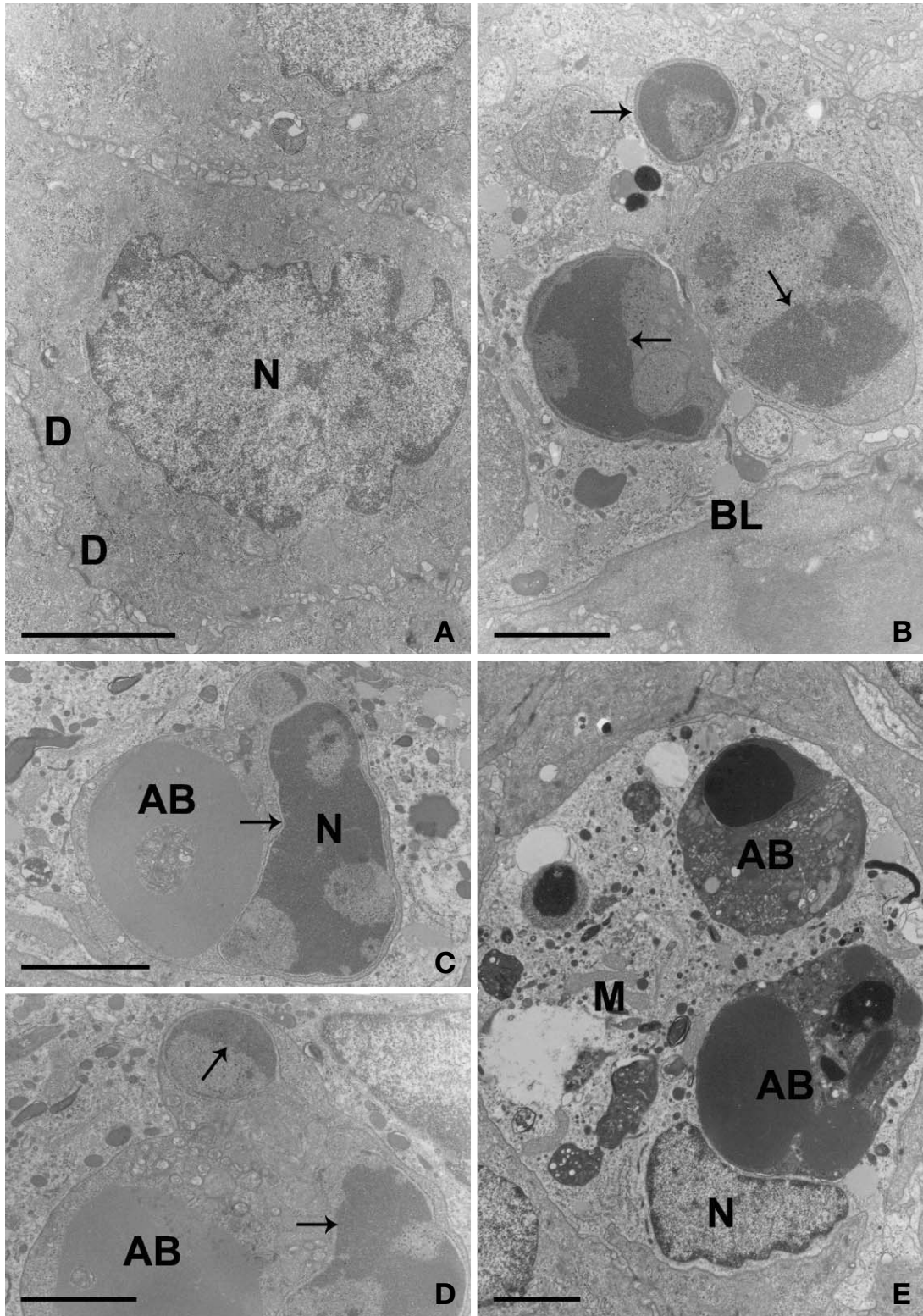


Fig. 3. A: Transmission electron micrographs of the normal cutaneous epithelial cells in the stage 31. The predominant cells in normal epithelial layer are connected to neighboring cells with the junctions of intercellular bridges and desmosomes (D). B: The early apoptotic cells shown in the epithelium demonstrated condensation and margination of the chromatin material (arrows) at the nuclear periphery. C, D: At early stage of the degradation, well preserved organelles and nuclear fragments (arrows) can be identified in the cytoplasm. E: By progressive degradation, apoptotic bodies (AB) are phagocytosed by the neighboring cells and to form lysosomal residual bodies. BL: basal lamina, M: mitochondria, N: nucleus. Scale bars indicate 2 μm (A, C, E) and 1 μm (B, D), respectively.

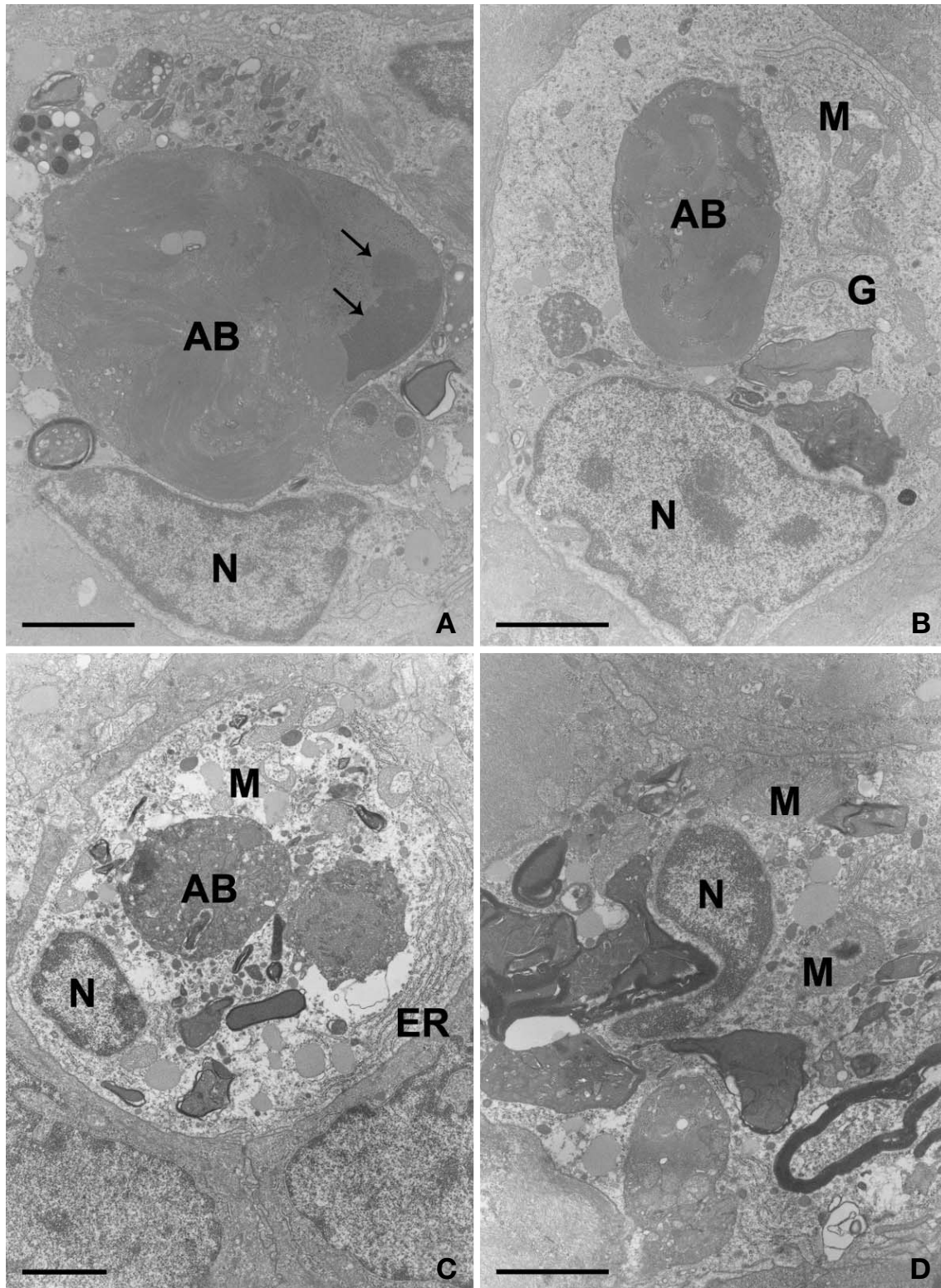


Fig. 4. Electron micrographs of the cutaneous epithelium of the developing anuran tadpole of the black-spotted frog, *R. nigromaculata*. A,B: Degraded apoptotic bodies (AB) can be seen at the vicinity of the nucleus (N) of the neighboring cells of the epithelial tissue. The apoptotic body in the nearby cells can still be recognized by the presence of typical nuclear fragment (arrows). C, D: After phagocytosis, apoptotic bodies are degraded by lysosomal enzymes derived from the cell and are soon reduced to amorphous debris. The residual bodies and numerous lamella shaped vesicles are observed in the cytoplasm of this stage. ER: rough endoplasmic reticulum, G: Golgi complex, M: mitochondria. Scale bars indicate 2 μm (C) and 1 μm (A, B, D), respectively.

로 기저부의 상피에 비해 전자밀도가 비교적 높았고, 이질 염색질(heterochromatin)은 핵막 주변부에 분포되어 있었다. 핵막의 함입이 심한 타원형의 핵 주변부에 미토콘드리아와 조면소포체가 분포되어 있음이 관찰되었다(Fig. 3A).

세포자멸사의 초기 과정에서 발현되는 핵과 세포질의 미세구조적 변형을 투과전자현미경 관찰을 통하여 확인한 결과, 변태기의 개구리 유생 상피에서 세포자멸사가 일어난 세포들은 퇴행과정이 진행되면서 상피세포층 전역에 걸쳐 세포질과 핵의 응축이 뚜렷하게 나타났고, 그 결과 상피세포의 핵이 분절된 양상으로 관찰되었다. 분절된 핵은 염색질의 분포에 따라 다양한 모습으로 출현하였으며, 퇴행중인 인(nucleolus)의 구조도 명확히 관찰되었다. 또한 핵의 응축 및 분절화와 동시에 세포질의 변형이 초래되어 다양한 크기와 형태의 자멸소체들이 생성되었다. 기저판에 가까이 위치한 세포들에서는 세포질 내에 여러 개의 자멸소체를 함유한 세포들도 다수 관찰되었다(Fig. 3B).

핵 속의 염색질은 응축된 형태로 핵의 가장자리를 따라 분포되어 있었고 핵의 분절현상과 세포질의 응축현상이 뒤따르는 것으로 관찰되었다. 여러 개로 분절된 핵의 가장자리를 따라서 여전히 손상되지 않은 상태의 핵막이 관찰되었고, 염색질과 함께 다양한 모습으로 변형된 인의 잔여소체들이 다수 함유되어 있음이 확인되었다. 특히, 분절된 핵들은 모두 두 겹의 한계막으로 둘러 싸여있음이 명확히 관찰되었다(Fig. 3C). 세포질에는 조면소포체와 유리 리보솜(free ribosome)이 잘 발달되어 있었고 미토콘드리아와 골지체, 지방방울(lipid droplet) 등의 분포나 그 미세구조 등은 상피의 다른 세포들과 비교하여 특이한 차이를 보이지 않았다. 그러나 세포질내 미세섬유의 분포가 미약하였고 인접세포와의 연결부에서는 부착반이 관찰되지 않았다(Fig. 3D).

세포자멸사가 진행된 후기의 세포들은 주변을 둘러싼 세포들에 의해 탐식된 후, 분해의 과정을 거치는 것으로 관찰되었다. 분절과정에 의해 세분화된 핵과 세포질의 자멸소체들은 식작용에 의해 인접세포의 세포질로 유입된 후, 라이소솜과 결합하여 다양한 형태의 식포(phagosome)를 형성하였다. 이들 세포의 세포질에서는 탐식된 세포 구성물에 따라 다양한 형태의 식포들이 함유되어 있었는데, 세포자멸사를 거쳐 식작용된 상피세포의 잔재임을 확인할 수 있는 미세구조적 특성이 다수 관찰되었다. 즉, 전자현미경 관찰을 통해 분절된 핵의 파쇄구조나 세포소기관의 미세구조 등이 확연히 구별되었다(Fig. 3E).

세포자멸사가 일어난 상피세포를 탐식하여 식포를 형성한 세포는 다른 상피세포에 비해 전자밀도가 낮게 관찰되었고, 비교적 소형의 핵이 세포의 가장자리에 편재된 형태적 특성을 지니고 있었다. 특히, 미토콘드리아가 발달되어 있었고 핵 주변부에서는 조면소포체가 밀집 분포되어 있었

는데, 식포를 형성한 상피의 자멸소체들은 분해과정에 의해 크기가 축소되는 과정을 거치는 것으로 관찰되었다(Fig. 4A). 대형의 식포에서는 분절되어 응축된 핵의 이질염색질과 세포질의 파쇄구조 등이 확인되었으며, 이차 라이소솜을 형성하여 다양한 구조로 변형된 식포들도 다수 함유되어 있었다. 식포 속에 분절된 핵의 잔여체가 존재한다는 점으로 미루어 이들 식포들이 세포자멸사에 의해 생성된 자멸소체임을 확인할 수 있었다(Fig. 4B).

주변 세포로 유입된 자멸소체들은 분해효소의 작용으로 급격히 축소되고 분해되어 잔여소체로 변형됨이 관찰되었는데, 분해과정이 활발히 진행되고 있는 세포에서는 액포가 다수 출현하여 세포의 전자밀도가 낮게 나타나며, 세포질 전역에 걸쳐 다양한 크기와 형태의 식포들이 생성되었다(Fig. 4C). 분해된 자멸소체들은 분해되어 농축된 정도에 따라 전자밀도가 높게 나타나며, 최종적으로 층관구조를 지닌 타원형 또는 다면형 소포(vesicle)의 형태로 변형됨이 관찰되었다. 이들은 세포소기관들과 함께 복잡한 세포질의 분포를 이루다가 지속적인 분해과정을 통해 무정형의 부스러기(debris)를 형성한 후 세포질에서 사라지는 것으로 확인되었다(Fig. 4D).

고 찰

일반적으로 세포사(cell death)는 괴사(necrosis)와 자멸사(apoptosis)로 구분된다. 세포의 자멸사는 다세포생물에서 예정된 프로그램에 따라 세포가 사멸하는 과정을 지칭하는데, 일련의 생화학적 반응에 의해 세포는 매우 특징적인 형태적 변화를 일으키며 죽음을 맞이하게 된다. 다양한 형태적 변화를 초래하는 일련의 생화학적 반응에는 핵의 부풀어 오름과 세포막의 변화, 세포의 위축, 핵의 분절, 염색질의 응축, 염색체 DNA의 분절화 등이 포함된다(Wyllie et al., 1980; Searle et al., 1982; Thompson, 1995). 세포의 파편을 제거하는 과정에서 개체에 손상을 초래하지 않는다는 점에서 세포자멸사는 세포괴사와 확연히 구분되는데, 일반적으로 괴사와 자멸사는 그 미세구조적 차이가 확연하기 때문에(Kerr et al., 1972, 1995), 현재까지도 전자현미경을 통한 세포사의 형태적 특성을 관찰함으로써 이들을 구분하고 있다.

포유동물의 세포에서 세포자멸사가 일어날 때 핵질의 연결부위에서 이중으로 된 핵 DNA의 분리가 일어난다는 사실이 알려지고 난 후(Wyllie et al., 1980), 이 과정을 확인하기 위한 수단으로 DNA 전기영동법이 널리 사용되게 되었으며, 형태적 실험법과 결합된 *in situ* end labeling 혹은 nick translation 기법으로 알려진 TUNEL 실험법이 널리 사용되게 되었다(Negoescu et al., 1996, 1998). 이 실험법은 DNA 말단에 deoxynucleotidyl transferase를 처리하여 DNA의 흡

결(nicks)을 탐지할 수 있다는 원리로부터 개발되었으며 (Garvrieli et al., 1992), 심각한 DNA 손상이 일어난 세포를 탐지하는데도 유용하게 사용되고 있다.

꼬리의 퇴화과정이 진행중인 참개구리 유생을 실험재료로 하여 피부 상피세포의 세포사 과정을 조직에 대한 TUNEL 염색법 및 투과전자현미경으로 관찰한 본 실험에서도 자멸사가 초래된 상피세포에서 DNA 분절과 핵의 응축이라는 미세구조적 특성이 확인되었다. 이는 자멸사가 일어난 세포의 뉴클레오솜에서 DNA가 무작위로 절단되어 DNA 단편화(fragmentation)가 일어났기 때문인데 (Wyllie et al., 1980), 일반적으로 핵이 응축되는 형태적인 변화에 앞서 DNA 분절이라는 생화학적 변화가 먼저 일어나는 것으로 알려지고 있다 (Lee & Moon, 2009).

세포자멸사의 초기 과정에서 발현되는 핵과 세포질의 미세구조적 변형은 참개구리 변태기의 상피에서 세포질과 핵의 응축으로 인한 핵의 분절화, 그리고 자멸소체의 생성 등으로 나타남이 본 실험을 통해 확인되었다. 이는 변태기의 양서류 (Brown & Cai, 2007)와 자멸사가 초래된 세포에서 나타나는 전형적인 구조 변화로 (Kerr et al., 1995), 분절된 핵을 가진 세포들이 증가하고, 핵의 응축과 급격한 분절화로 인해 다양한 형태의 자멸소체가 형성된다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 TUNEL 염색에 양성반응을 보이는 상피세포에서 자멸소체도 함께 관찰되어 전자현미경 관찰에서 얻어진 결과와도 일치함을 확인할 수 있었다.

양서류의 변태과정중 자멸사가 초래된 상피세포들은 주변을 둘러싼 세포에 의해 탐식된 후, 분해의 과정을 거치는 것으로 관찰되었다. 일반적으로 상피조직 내에 형성된 자멸소체들은 상피에 상주하는 대식세포나 인접한 상피세포들에 의해 빠르게 포식됨이 알려져 있는데 (Kerr et al., 1995), Kerr et al. (1974)은 대형의 포식세포를 유사대식세포 (macrophage-like cell)라 명명하고 자멸사에 의해 형성된 자멸소체의 대부분이 이들 세포에 의해 처리되지만 일부는 인접한 상피세포에 의해서도 식작용됨을 보고한 바 있다. 하지만 꼬리의 퇴화가 상당히 진행된 상피에서는 이차 라이소솜이 부족하기 때문에 분절된 세포를 처리하는 과정에서 상피세포의 역할이 제한적이며 (Farbman, 1978), 포유류에서는 중앙이 생긴 상피의 암세포에서 자멸소체의 포식작용이 일어난다는 것으로 알려지고 있다 (Kerr & Searle, 1972).

개구리의 꼬리 상피에서 자멸소체를 포식하고 식포를 형성하는 주변 세포들은 다른 상피세포에 비해 전자밀도가 낮았고, 세포질에 라이소솜 과립들과 함께 미토콘드리아 및 조면소포체가 발달되어 있었다. 또한, 세포의 가장자리에 핵이 편재된 특성을 지니고 있는 점으로 미루어 상피내 대식세포 (intraepithelial macrophage)와 유사한 미세구조적 특성을 지닌 것으로 추정되지만, 이를 확인하기 위해서는 추가적인 정밀 분석이 필요할 것으로 사료되는데, Kerr & Searle

(1973)도 이와 유사한 세포를 흰쥐의 atrophic gland의 정상 조직과 퇴화하는 조직 모두에서 보고한 바 있다.

분절과정에 의해 형성된 자멸소체들은 인접한 세포에 의해 식작용된 후, 라이소솜에 함유된 분해효소의 작용으로 붕괴의 과정을 거치게 되는데 말단 라이소솜 (telolysosome) 속의 구분하기 어려운 부스러기 (nondescript debris) 형태로 변형된 후 소멸됨이 알려져 있다 (Kerr et al., 1995). 특히 붕괴의 과정에서 핵이 파쇄된 잔재물을 함유하고 있을 경우, 해당 세포가 세포자멸사의 경로를 거쳤고 세포 속에 함유된 잔재물의 실체가 자멸소체임을 전자현미경 관찰을 통해 확인할 수 있다고 하였다 (Kerr et al., 1995).

본 연구에서도 식작용을 일으킨 세포에서 다양한 형태의 식포들이 관찰되었고, 자멸사를 일으킨 상피세포임을 보여주는 미세구조적 특징들이 다수 확인되었다. 즉, 분절된 핵과 세포소기관의 파쇄구조 등이 구별되었고, 이차 라이소솜을 형성하여 증착된 층판구조로 변형된 식포들도 다수 함유되어 있었다. 특히, 식포 속에 분절된 핵의 잔여체가 존재한다는 점으로 미루어 이들 식포들이 자멸사에 의해 생성된 자멸소체의 잔재임을 추정할 수 있었다. 또한 분해된 자멸소체들은 다양한 전자밀도와 내부구조를 보이지만, 최종적으로 층판구조를 지닌 소포의 형태로 축소되고 변형된 후 세포질에서 소멸됨을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 주변 세포로 유입된 자멸소체들은 분해효소의 작용으로 급격히 축소되고 분해되어 다양한 크기와 형태의 식포를 생성한 후 잔여소체로 변형됨이 관찰되었는데, 일반적으로 조직 내에서의 식작용과 자멸소체의 분해과정은 매우 급속하게 진행되어 대부분의 경우, 수 시간 이내에 전 과정이 완료되는 것으로 보고되어 있다 (Wyllie et al., 1980; Bursch et al., 1990). 또한 배양중인 세포를 위상차현미경으로 실험한 결과 (Russell et al., 1972; Matter, 1979)와 배양중인 중앙세포를 전자현미경으로 관찰한 결과 (Kerr et al., 1995) 등에서 알려진 바와 마찬가지로, 식세포과정이 매우 급작스럽게 일어나고 세포의 표면이 급격히 부풀어 오르기 때문에 불과 수 분 이내에 한 세포가 자멸소체의 덩어리로 변하게 된다는 보고와도 일치하였다.

참 고 문 헌

- Bicknell GR, Snowden RT, Cohen GM: Formation of high molecular mass DNA fragments is a marker of apoptosis in the human leukaemic cell line, U937. *J Cell Sci* 107 : 2483-2489, 1994.
- Brown DD, Cai L: Amphibian metamorphosis. *Dev Biol* 306 : 20-33, 2007.
- Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R: Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis*

- 11 : 847-853, 1990.
- Cohen JJ, Duke RC: Glucocorticoid activation of a calciumdependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132 : 38-42, 1984.
- Ellis RE, Yuan J, Horvitz JR: Mechanism and Function of cell death. *A Rev Cell Biol* 7 : 663-698, 1991.
- Farbman AI: Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos. *Dev Biol* 18 : 93-116, 1978.
- Garvrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J Cell Biol* 119 : 493-501, 1992.
- Hengartner MO, Horvitz HR: Programmed cell death in *Coenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 4 : 581-586, 1994a.
- Hengartner MO, Horvitz HR: The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development. *Phil Trans R Soc (Lond) B Biol Sci* 345 : 243-246, 1994b.
- Hockenbery D, Nunez G, Willinan C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348 : 334-336, 1990.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC: Programmed cell death in animal development. *Cell* 88 : 347-354, 1997.
- Kerr JFR, Searle J: Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch Path Anat Physiol* 13 : 87-102, 1973.
- Kerr JFR, Wyllie AJ, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 : 239-257, 1972.
- Kerr JFR, Harmon B, Searle J: An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail with special reference to apoptosis of striated muscle fibres. *J Cell Sci* 14 : 574-585, 1974.
- Kerr JFR, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV: Anatomical methods in cell death. In: Schwartz LM, Osborne BA, eds, *Cell Death*, pp. 1-27, Academic Press, San Diego, 1995.
- Lee, HW, Moon MJ: Histochemical and fine Structural visualization of the epithelial apoptosis in the anuran tadpole during the tail regression stages. *Korean J Microscopy* 39 : 107-115, 2009.
- Matter A: Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 36 : 179-190, 1979
- Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E: TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem* 44 : 959-968, 1996.
- Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F: Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother* 52 : 252-258, 1998.
- Russell SW, Rosenau W, Lee JC: Cytolysis induced by human lymphotoxin. cinematographic and electron microscopic observations. *Amer J Pathol* 69 : 103-118, 1972.
- Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ: Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 2 : 229-259, 1982.
- Shumway W: Stages in the normal development of *Rana pipiens*. (I) External form. *Anat Rec* 78 : 139-147, 1940.
- Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 : 1456-1462, 1995.
- Vogt C: Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (*Alytes obstetricians*). Solothurn, Switzerland, 1842.
- Wyllie AH: Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol* 153 : 313-316, 1987.
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 : 251-306, 1980.

< 국문초록 >

변태중인 참개구리 (*Rana nigromaculata*) 유생의 상피에서 세포자멸사가 초래된 세포를 확인하고 이들의 핵과 세포질에서 나타나는 퇴행과정의 미세구조 변화를 TUNEL 염색법과 투과전자현미경 관찰을 통해 분석하였다. 꼬리의 퇴화가 진행되는 Shumway 발생단계 31기부터 33기까지의 유생 상피는 다층의 입방형 세포로 이루어져 있었고, TUNEL 염색으로 관찰한 결과, 상피 전역에 걸쳐 광범위한 세포자멸사가 진행되고 있음을 확인할 수 있었다. 자멸사에 의해 초래되는 상피세포의 초기 변형은 먼저 핵에서 관찰되었는데, 염색질이 응축되어 핵막 주변부로 편재되었고 핵의 분절과 세포질의 응축, 그리고 세포막의 변형이 뒤따르는 것으로 확인되었다. 이어서 세포질의 분절에 의해 자멸소체가 형성되었는데 막으로 둘러싸인 소체 내부에서는 비교적 잘 보존된 형태의 세포소기관들이 관찰되었다. 자멸사가 초래된 세포들은 상피내 대식세포 (intraepithelial macrophage)로 추정되는 인접 세포들에 의해 탐식되어 잔여소체를 형성하였으며, 급속한 퇴화과정을 거쳐 증판구조를 지닌 소포의 형태로 변형된 후 세포질에서 소멸됨이 확인되었다.