

t-Butyl Alcohol 동결건조법을 이용한 흰쥐 간장의 주사전자현미경적 관찰

엄 창 섭* · 박 은 경 · 박 창 현^{1,2}

고려대학교 의과대학 해부학교실 및 유전병연구소, ¹전자현미경실
²건국대학교 축산대학 수의학부

Tissue Preparation with t-Butyl Alcohol Freeze-drying Method for Scanning Electron Microscopy: Application for Rat Liver

Chang-Sub Uhm, Eun Kyung Park and Chang-Hyun Park^{1,2}

Institute of Medical Genetics and Department of Anatomy

¹Electron Microscope Facility, Korea University College of Medicine

²Department of Animal Husbandry, College of Veterinary Medicine

Konkuk University, Seoul, KOREA

(Received June 21, 1998; revised August 26, 1998)

ABSTRACT

T-butyl alcohol (TBA) freeze-drying method originally designed by Inoue and Osadake (1989) was adopted to dry specimens for scanning electron microscopy and the results were compared with those dried using critical point dryer (CPD).

Small pieces (1×1×3 mm) of liver of Sprague-Dawley rats were cut and fixed in 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer after anesthesia, and processed for scanning electron microscopy by several modifications of TBA freeze-drying methods and by the standard preparation method using CPD.

The bile canaliculi and sinusoidal endothelial surface were observed. Tissue dehydrated with TBA before TBA freeze-drying preserved the structures best comparable to those prepared with CPD.

This result suggests that combination of dehydration with TBA and TBA freeze-drying is a superior method to the original TBA freeze-drying method dehydrated with ethanol.

Key words : Bile canaliculi, Scanning electron microscopy, T-butyl alcohol freeze-drying method, Tissue preparation

* 본 연구는 1998년도 고려대학교 특별연구비 (엄창섭)의 일부 지원에 의해 이루어졌음.

서 론

주사전자현미경 관찰을 위한 표본을 제작할 때 사용되는 건조법에는 여러 가지 방법이 있는데, 그 중 밀폐된 용기 안에 시료를 넣고 열과 압력을 가하여 표면장력을 없애도록 고안된 장치인 임계점건조기를 사용하는 방법이 가장 보편적으로 널리 사용되고 있다(박창현 등, 1988; Gabriel, 1982).

동결건조법은 건조과정에서 발생할 수 있는 조직의 변형을 최소화시킬 수 있어 현재까지 알려진 주사전자현미경 표본 제작법 중에서 가장 우수한 방법으로 알려져 있다. 주사전자현미경 표본제작을 위한 동결건조의 경우에는 보통 조직을 고정된 후 수용성 완충액에서 직접 동결시키는 방법과 유기용매로 치환한 후 동결시키는 방법이 있는데, 유기용매로 치환하는 것이 동결건조 과정 중 발생하는 조직내 얼음조각(ice crystal)의 형성을 줄일 수 있기 때문에 보다 우수한 방법으로 알려져 있다(Boyde and Franc, 1981). 그러나, 동결치환건조법은 값비싼 장비가 마련되지 않으면 시행할 수 없는 단점 때문에 국내에서는 널리 사용되지 못하고 있다. t-Butyl alcohol (TBA)은 빙점이 25.7°C로 실온 및 냉장고에서 동결이 가능하고 대부분의 전자현미경실에서 보유하고 있는 evaporator를 사용하여 진공상태에서 승화시킬 때 그 온도가 -25°C까지 떨어지는 특성이 있다(Inoue and Osadake, 1988). 최근에 몇몇 연구자들에 의해 주사전자현미경 표본제작에 TBA를 적용하는 방법이 시도되어 기존의 동결치환건조법에 버금가는 좋은 결과가 보고된 바 있다(Inoue and Osadake, 1988; Mizuta *et al.*, 1990). 이에 연구자들은 이미 보고된 방법의 타당성 및 활용가능성을 검증하고 그 방법을 개량하기 위해 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

실험동물은 체중 170 gm 내외의 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 사용하였다. 실험동물은 복강내로 Nembutal (6 mg/kg)을 주사하여 마취하고 개복하여 간

장을 제거한 후 1×1×3 mm의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde, 0.12 M cacodylate buffer (pH 7.3) 용액에 담가 고정하였다. 고정된 조직은 동일 완충액으로 완충된 2% osmium tetroxide 용액으로 4시간 동안 후고정한 후, 4가지 방법(방법 2-5)에 의하여 100% t-Butyl alcohol (TBA)로 옮긴 후 냉동고(-22.5°C, 이하 같음)에서 동결시킨 후 High vacuum evaporator (Hitachi HUS-5GB)를 사용하여 진공상태(1×10^{-5} torr)에서 2시간 동안 동결건조(freeze dry)하였다.

(1) 대조군. 통상적인 방법에 의해 상승농도의 ethanol로 탈수, isoamylacetate 치환 후 임계점건조기(critical point dryer, Hitachi HCP-2)를 사용하여 건조하였다.

(2) 급속동결군(FF군). 후고정 후 완충액으로 세척한 조직을 액체질소로 냉각된 liquid Freon에 담가 급속동결시킨 후 액체질소에 옮겨 할단하고 100% TBA에 담갔다.

(3) 완충액으로 세척-TBA 동결치환건조군(CT군). 후고정된 조직을 동일 완충액으로 세척한 후 100% TBA에 옮겼다.

(4) Ethanol 탈수-TBA 동결치환건조군(ET군). 후고정된 조직을 Ethanol로 탈수한 후 100% ethanol에서 100% TBA로 치환하였다.

(5) TBA 탈수-TBA 동결치환건조군(TT군). 후고정된 조직을 TBA로 탈수하여 100% TBA에 보관하였다.

FF군을 제외한 나머지 시료는 건조된 후 실온에서 forcep으로 할단한 후 시료대에 부착하고 ion coater (Eiko IB-5)를 사용하여 20 nm 두께의 gold coating을 시행한 후 Hitachi S-450 주사전자현미경으로 20 kV의 가속전압하에서 관찰하였다.

결 과

흰쥐의 간장의 여러 구조물 중 본 연구에 있어서는 담즙 분비의 통로로서 중요한 담세관과 동모양혈관 내피의 보존 상태에 주안점을 두고 관찰하였다.

대조군의 담세관은 직경이 비교적 일정하였으며 내강은 많은 미세용모로 채워져 있었는데, 이들의

길이는 비교적 일정하였으며 내강을 향해 직각으로 존재하였다(Fig. 1a). 동모양혈관의 내피의 표면은 비교적 편평하였으며 다양한 크기의 내피창을 가지고 있었다(Fig. 1b).

FF군의 담세관은 약간 팽창되어 있었고 내강에 존재하는 미세용모는 길이가 다양하였으며 형태는 독특하게 변형되어 있었다. 담세관의 가장자리는 융기되어 있었는데, 융기의 첨단에 존재하는 미세용모는 표면위로 돌출되어 있었다(Fig. 2a). 동모양혈관의 내피의 표면은 많은 주름과 작은 과립형 돌출물에 의해 왜곡되어 있어서 내피 표면의 굴곡 사이에 틈의 형태로 존재하는 내피창은 관찰하기 어려웠다(Fig. 2b).

CT군의 담세관 내강은 불규칙하였고 미세용모는 집단으로 뭉쳐져 담세관 밖으로 돌출되어 있는 것이 많았다(Fig. 3a). 동모양혈관의 내피의 표면은 비교적 편평하였으나 내피창의 가장자리는 불규칙한 융기를 이루고 있었으며 작은 돌기들을 가지고 있었다(Fig. 3b).

ET군의 담세관 내강도 일정하지 않았으며, 미세용모는 CT군에 비하여는 그 정도가 약하였으나 몇 개씩 뭉쳐진 형태로 존재하였다(Fig. 4a). 동모양혈관의 내피는 많은 주름에 의해 왜곡되어 있었으나 FF군에서와 같은 과립상은 관찰되지 않았다. 내피창은 표면의 굴곡과 관계없이 흩어져 있었다(Fig. 4b).

TT군의 담세관은 직경이 비교적 일정하였으며 내강에 존재하는 미세용모는 내강을 가득 채우고 있었다(Fig. 5a). 동모양혈관의 내피의 표면은 편평하였으며 소수의 돌기를 가지고 있었다. 내피창의 형태는 대조군과 유사하였다(Fig. 5b).

고 안

주사전자현미경 표본제작을 위한 건조법 중 임계점건조기를 사용하여 시료를 건조시키는 것은 주사전자현미경 표본을 제작하는 데 사용되는 표준적인 방법이다. 그 외에 최근에는 임계점건조기를 사용하는 시간을 줄이기 위하여 hexamethyldisilazane이나 tetramethyldisilan 등 표면장력을 최소화시키는 액

체를 사용하여 공기중에서 건조시켜 시료 표면의 왜곡을 최소화시킴으로써 좋은 결과를 얻고 있다(박창현 등, 1995; Nation, 1983; Dey et al., 1988). 그러나, 이들 방법들도 표면장력의 변형에 의한 왜곡현상을 완전하게 제거할 수 없기 때문에 시료 중 특히 얇은 부분의 단절과 같은 현상을 자주 관찰할 수 있다(미발표 관찰결과). 이와 반하여 시료를 급속냉동시킨 후 건조시키는 냉동건조법은 시료의 표면 왜곡현상을 최소화시킬 수 있는 가장 좋은 방법으로 제시되어 왔는데(Boyde and Franc, 1981), 이러한 방법이 가지는 단점은 냉동건조기 등 값비싼 장비를 필요로 한다는 것과 시료의 동결과정이 적절하지 못할 경우 조직 내 수분의 결빙현상으로 인하여 오히려 심한 조직의 파괴가 발생하는 것이다. 최근에 Inoue와 Osadake 등(1988)은 조직의 탈수과정 중 100% ethanol을 빙점이 25.7°C인 TBA로 치환한 후, 냉장고의 냉장실(4°C)에서 시료를 동결시키고, 대부분의 전자현미경 실험실에서 보유하고 있는 evaporator를 사용하여 건조시키는 방법을 개발하여 몇 가지 조직에 적용하여 특히 세포내부의 구조를 관찰하는 데 좋은 결과를 보고한 바 있다. 이 방법은 특수한 장비나 특수한 전처리 없이 쉽게 조직을 동결시킬 수 있고, 조직의 동결시 발생하는 얼음결정의 형성을 방지함으로써 조직의 변형을 최소화하고 아울러 동결건조의 효과를 얻을 수 있는 방법으로 판단된다.

본 연구에 있어서는 (1) Inoue와 Osadake에 의해 제안된 TBA 동결치환건조법이 주사전자현미경의 표본제작 방법으로 타당한가를 검증함(방법 4, 5)과 아울러 (2) 조직을 일반적으로 동결하거나 탈수하지 않은 상태에서 조직내에 존재하는 수분이 미치는 영향을 확인하기 위하여(방법 2, 3) 4가지의 TBA치환 방법에 의하여 실험을 하였으며, 통상적인 임계점건조기를 사용한 조직처리법(방법 1)에 의해 얻어진 소견과 비교하였다.

본 실험에서 담세관 및 담세관 내에 존재하는 미세용모가 정상적인 상태로 보존된 경우는 대조군과 TT군이었으며, 기타 군에서는 담세관의 내강이 불규칙하게 확장 변형되거나 미세용모가 뭉치거나 뭉특해지는 등의 왜곡이 관찰되었다. 이러한 왜곡 현

상은 FF군에서 가장 심하였고 CT군, ET군의 순서로 점차 변형이 줄어들었다. 동모양혈관의 내피세포의 경우도 대조군과 TT군에서만 정상적인 상태로 보존되었으며 다른 실험군에서는 정도의 차이는 있으나 표면의 굴곡 변형이 나타나 내피창의 구조를 관찰하기가 어려운 경우도 있었다. 이들 변형은 FF군에서 가장 심하였고, ET군과 CT군의 순서로 점차 변형이 줄어들었다. 이상의 소견은 조직 내의 수분 혹은 ethanol이 TBA로 완전히 치환되지 못한 결과로 발생된 것으로 추정된다.

담세관 내에 존재하는 미세용모의 형태적 변화 즉, 몇 개의 미세용모가 서로 뭉치거나 길이의 변화가 나타나는 것, 가장자리에 붙어서 존재하는 것 등은 담세관의 이상이 있을 때 자주 관찰되는 소견이다. 본 실험에서 대조군과 TT군을 제외한 다른 실험군에서 담세관의 이상이 존재하지 않으면서도 이러한 소견이 나타난 것은 앞으로 주사전자현미경상의 해석에 있어서 부적절한 표본 제작에 의한 변형의 가능성에 대하여도 고려하여야 함을 나타낸다고 사료된다.

TBA를 사용하여 탈수한 후 동결 건조시키는 방법으로 본실험에서 간조직을 임계점건조기를 사용했을 때와 유사한 수준으로 보존시킬 수 있는 것이 확인되었고, 특히 값비싼 장비를 별도로 필요로 하지 않기 때문에 앞으로 다양한 조직의 표본제작에 적용할 가치가 충분하다고 판단된다. 본 연구자들은 현재 배양세포를 사용하여 개선된 본 방법의 적용에 대한 실험을 진행하고 있다.

결 론

특별한 장비를 필요로 하지 않는 간편한 동결치환 건조법을 활용하여 제작한 주사전자현미경 표본의 상태를 통상적으로 사용되는 임계점건조로 얻어진 표본과 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

TBA를 사용한 동결치환건조법에 있어서 조직내의 수분은 탈수 과정을 통하여 제거하는 것이 좋으며 탈수에는 ethanol을 사용하는 것보다 TBA를 사용하는 것이 우수한 결과를 얻을 수 있었다. 본 실험방법은 우수한 동결치환건조법의 효과를 얻을 수 있고 일반적으로 전자현미경실에서 갖추고 있는 장비를 사용하기 때문에 활용할 가치가 많을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 박창현, 장병준, 조강용, 1995. 전조기법을 달리한 SEM 시료상의 비교검토, 한국전자현미경학회지 25(3), 33-39
- Boyde A, Franc F, 1981. Freeze-drying shrinkage of glutaraldehyde fixed liver, J. Microsc. 122, 75-86
- Dey S, Basu Baul TS, Roy R, Dey D, 1989. A new rapid method of air-drying for scanning electron microscopy using tetramethylsilane, J. Microsc. 156(2), 259-261
- Gabriel BL, 1982. Biological scanning electron microscopy, Van Nostrand Reinhold Co., pp.96-107
- Inoué, T, Osadake H, 1989. A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: The t-butyl alcohol freeze-drying method, Arch. Histol. Cytol. 51(1), 53-59
- Mizuta K, Hoshino T, Morita H, 1990. Scanning electron microscopy of the celloidin-embedded inner ear sections, Scanning Microscopy 4(4), 967-973
- Nation JL, 1983. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy, Stain Technology 58(6), 347-351

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Electron micrographs of liver dehydrated with critical point dryer. In a, hepatocytes (H) forms 2 cell-thick cellular cords and bile canaliculi (arrows) are formed between hepatocytes. Sinusoids (S) with fenestrations (arrowheads) are present between hepatic cords. In b, bile canaliculi are filled with microvilli (arrows). In c, note microvilli (arrows) exposed through sinusoidal fenestrations (arrowheads). Bars =5 μ m (a), 1 μ m (b, c).
- Fig. 2.** Electron micrographs of liver freeze-fractured in liquid nitrogen after fixation and dried by *t*-butyl alcohol freeze-drying method. In a, sinusoid (s) and bile canaliculi (arrow) are noted. Some area are poorly preserved (*). In b, note that edges of bile canaliculus are elevated with thickened, stubby microvilli (arrows). In c, endothelial fenestrations (arrowheads in c) are present between surface ridges (*). Bars=5 μ m (a), 1 μ m (b, c).
- Fig. 3.** Electron micrographs of liver transferred to *t*-butyl alcohol directly from buffer after fixation and dried by *t*-butyl alcohol freeze-drying method. In a, the tissues are relatively well preserved, however bile canaliculi (arrow) are dilatated irregularly. Sinusoid (s) is seen. In b, clumped microvilli project outside bile canaliculus (arrows). In c, thickened edges of endothelial fenestrations are noted (arrowheads). Endothelium has also surface elevations (*). Bars=5 μ m (a), 1 μ m (b, c).
- Fig. 4.** Electron micrographs of liver dehydrated with ethanol, then, substituted with *t*-butyl alcohol and dried by *t*-butyl alcohol freeze-drying method. In a, note that the tissues are better preserved. In b, bile canaliculus has fewer microvilli, and some microvilli are grouped (arrows). In c, endothelial cell surface are irregular and fenestrations (arrowheads) are scattered even in the surface mounds (*). Bars=5 μ m (a), 1 μ m (b, c).
- Fig. 5.** Electron micrographs of liver dehydrated with *t*-butyl alcohol and dried by *t*-butyl alcohol freeze-drying method. In a, note that the tissues are preserved well. Bille canaliculi (arrow) and sinusoid (s) are noted. In b, microvilli (arrows) fill the bile canaliculus. In c, endothelial surface are smooth with fenestrations (arrowheads). Bars=5 μ m (a), 1 μ m (b, c).





