한국전자현미경학회지 제 28 권 제 3 호 1998
Korean J. Electron Microscopy 28(3), 329~343(1998)

무당개구리 (*Bombina orientalis*) 피부의 초기 상처치유반응

정 문 진 · 문 명 진
단국대학교 자연과학대학 생물과학부

Early Healing Responses of the Skin Wounds in the Korean Fire-Bellied Toad, *Bombina orientalis*

Moon-Jin Jeong and Myung-Jin Moon
Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences,
Dankook University, Cheonan
(Received July 13, 1998; revised August 28, 1998)

ABSTRACT

Early wound healing responses in the skin of the Korean fire bellied toad, *Bombina orientalis*, were examined using histochemical, scanning and transmission electron microscopical techniques. Cutaneous wounds were induced by sharp razor blade, and maintained in special cages for up to 3 days. By this treatment whole parts of epithelium and dermis were profoundly affected.

After injury, retraction of damaged surface of the skin was observed. At 3 hours after injury, poly-band was form by mucous substance. The wound skin consisted of mucous gland secreted mucous substance which flows into wound cavity and the wound area was sealed by mucous substance which form thick layer at 6 hours. It appeared that natural disposition showed acid and neutral mucous substance by reaction of PAS and Alcian blue (pH 2.5) staining.

After formation of the poly-band, epithelial cells were formed by migration of regenerating epithelial cells. These cells moved over the wound surface by migration at 12 hours after wounding. Poly-band was much increased in thickness and migrating cells were completely formed wound closure at 24 hours post-wounding. After 72 hours regenerated epithelial layer consists of four or five cell layers which are similar to clear, granular, and spinous layer.

Key words : Wound Healing, Skin Wounds, Toad, *Bombina orientalis*

서 론

조직이나 세포는 외부환경에 의해 계속적으로 물리적, 기계적인 자극이나 손상을 받고 있다. 이러한 자극이 경미할 경우 조직과 세포는 자극을 제거하여 곧 안정상태로 돌아오는 항상성을 나타낸다. 그러나 물리적 자상이나 상처와 같은 비가역적 손상인 경우

에는 그곳의 세포가 손상을 입어 구조가 변하고 괴사(necrosis)와 같은 현상으로 세포가 파괴된다(Hinchliffe, 1981; Hurle, 1988; Clarke, 1990; Abbadie *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1995).

피부는 이러한 기계적 손상이 가장 빈번히 일어나는 조직이며, 하등동물에서는 고등동물보다 더욱 다양한 초기반응을 나타낸다. 지렁이는 폐쇄혈관계로 되어 있어 사람과 같은 염증은 일어나지 않고 체벽의 결합조직에서 재생이 이루어진다(Metchinikoff, 1983). 곤충은 이물질이 체내로 들어오면 비특이적 방어기구를 이용하며, 만일 혈구들이 소화할 수 없는 물질이 유입되었을 경우에는 결절(nodule)을 형성하는 것으로 알려져 있다(Gupta, 1986; Lackie, 1988; Chang *et al.*, 1992). 거미의 경우는 곤충과는 다르게 빠른 혈림프의 응고로 상처난 부위를 외부의 감염으로부터 차단시키고(Jeong and Moon, 1997), 사람의 경우는 혈액이 관여하여(Clark, 1988), 혈구에 의한 세포성 면역반응(cellular immune responses)과 혈장에 의한 체액성 면역반응(humoral immune responses)이 일어난다(Demarchez *et al.*, 1985).

현재까지 상처에 의한 피부의 치유반응은 실험용 생쥐를 대상으로 많은 연구가 수행되었으나(Krueger *et al.*, 1983; Demarchez *et al.*, 1987; Ihara and Motobayash, 1992), 대부분 상피세포의 이주(migration)에 관하여만 보고된 실정이며, 초기 반응의 형태학적 및 조직학적 특성에 관하여는 미비한 실정이다. 또한 이러한 상처 치유반응은 생쥐와 같은 단일 서식환경에서 생활하는 동물에 비해 육상과 수중에서 서식하는 동물일 경우 두 가지 환경에 적응하며, 효과적인 방법으로 상처초기에 반응할 것으로 생각된다.

따라서, 본 연구는 무미 양서류에 속하는 개구리 중 국내에 서식하는 한국산 무당개구리(*Bombina orientalis*)를 대상으로 등쪽 피부에 인위적인 상처를 유도한 후 일정시간 마다 조직표본을 제작하여 상처초기에 반응하는 피부의 반응과 미세구조의 변화를 고배율의 전자현미경과 광학현미경을 이용하여 규명하고자하였다.

재료 및 방법

경기도 포천군 심곡리 왕방산 일대에서 채집한 무당개구리(*Bombina orientalis*) 성체를 실험실(26°C ±2°C)에서 사육하여 실험에 사용하였다. 무당개구

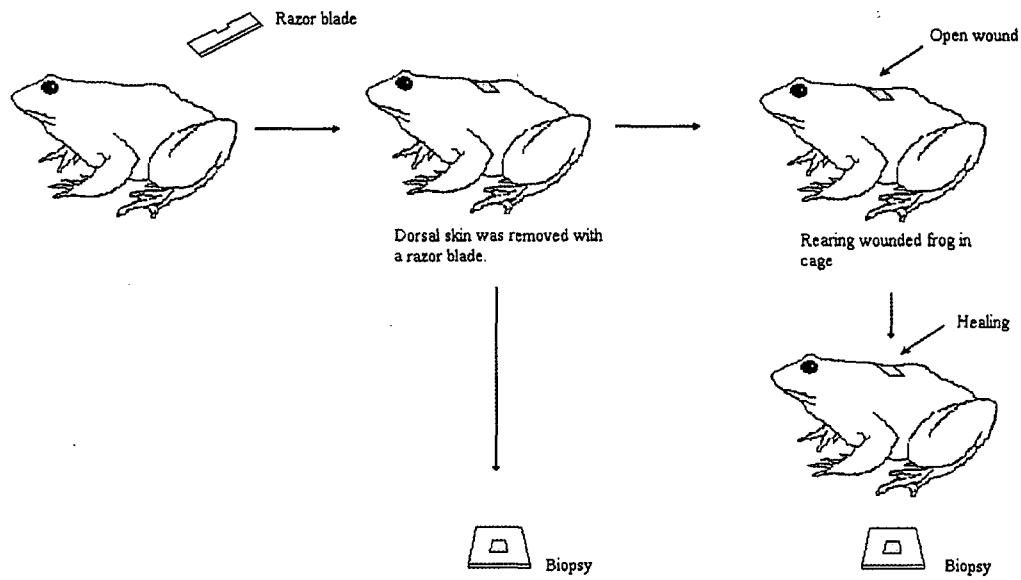


Fig. 1. Diagrammatic illustration of techniques employed to obtain the samples of wound healing systems described in the text.

리 녹색발현 배피(dorsal skin)의 일정부위를 70% ethanol로 소독한 후 시중에서 시판되는 양면면도칼을 이용하여 1×1 mm^2의 크기로 절개하였다. 초기 상처치유과정을 관찰하기 위하여 상처유도 후 사육실에서 사육하면서 일정시간 간격(상처직후, 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간)으로 시료를 제작하여 관찰하였다(Fig. 1).

절개된 조직은 4 % formaldehyde (phosphate buffer, pH 7.2)용액에 고정한 다음, ethanol 농도 상승순으로 탈수하여 Paraplast (Sherwood Medical Industries, St. Louis)에 포매하였다. 포매된 조직은 microtome (Reichert-Jung 820)으로 6 μm두께의 연속절편을 제작한 다음, 회복되는 피부의 구조를 관찰하기 위한, Hematoxylin-Eosin염색 이외에, 조직화학적 성분을 구분하기 위하여 Alcian blue(pH 2.5), Periodic acid-Schiff (PAS) 반응 등을 실시하였다.

관찰방법은 Spicer (1963), Spicer와 Sun (1967)의 방법에 따라 조직화학적 염색반응에 전혀 반응을 나타내지 않을 경우를 -, 염색반응도가 미비할 경우를 ±, 염색반응이 낮은 경우를 +, 중간정도의 반응을 나타내는 경우를 ++, 그리고 염색반응도가 높은 경우를 +++ 로 표시하였다. 한편 주사전자현미경용 시료는 ethanol 농도 순으로 탈수한 뒤, Hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma)로 건조시킨 후, Polaron Sputter Coater (Bio-Rad, USA)로 gold plasma를 피복 하여 JEOL 840A (JAPAN) 주사 전자현미경으로 15 kV에서 관찰하였다.

절개된 조직 중 일부는 2.5% paraformaldehyde -glutaraldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.2)와 1 % OsO_4로 전, 후고정한 뒤, ethanol 농도상승순으로 탈수하였다. 탈수를 마친 조직은 propylene oxide로 치환하여 Epon 혼합액(Polyscience)에 포매한 뒤, ultramicrotome (LKB)으로 먼저 1% toluidine blue (1% borax)로 hot plate (60°C)상에서 염색한 다음 광학현미경으로 관찰하였으며, 이어서 초박절편을 제작하여 copper grid에 부착시킨 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과 전자현미경(JEM 100 CX-II형)으로 80 kV에서 관찰하였다.

결 과

1. 정상조직과 상처유도 직후, 1시간 경과후의 피부조직변화

무당개구리 배피는 크게 표피와 진피로 나뉘며, 표피는 4~5층의 중층 상피세포로 이루어져 있었으며, 진피에서는 진피성 색소세포, 과립선, 점액선 등이 관찰되었다. 진피는 진피성 색소세포가 위치하고 있는 유두층(papillary layer)와 과립선 이나 점액선이 위치하는 그물층(reticular layer)으로 구분되었다(Figs. 2, 3).

상피의 기저부위에는 상피의 원기세포들이 기저세포들 사이에 위치하고 있었으며, 핵은 세포질의 대부분을 차지하였고, 부분적으로 심하게 함입된 형으로 관찰되었다. 기저층 세포의 측면에는 짧고 얇은 세포질 돌기들이 돌출되어 있었으며, 데스모소옴으로 연결되어 있었다(Fig. 4). 기저막 아래로 위치하고 있는 진피성 색소세포는 기저막에 인접한 부위로부터 황색소세포, 홍색소세포, 흑색소세포들이 차례로 3층을 이루고 있었으며, 가장 내측에 위치한 흑색소세포는 세포질 내에 흑색소과립이 치밀하게 집적되어 핵을 관찰하기가 어려웠고, 세포질 내에 멜라닌색소를 함유한 흑색소과립의 크기는 0.2~1.0 μm로써, 전자밀도가 매우 높은 구형 또는 타원형으로 관찰되었다(Fig. 5).

상처직후 손상된 표피조직은 대부분 파괴되어 비가역적 손상을 입었고, 주변상피의 각질층에서 투명층까지 PAS 반응에 양성을 나타내었으며, 상피조직의 세포들은 세포질이 파괴되어 외부로 용출되었다. 진피조직 역시 상처부위가 수축되었고, 유두층에서 양성반응을 나타내었으며, 진피능선(dermal ridge) 부위에서 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 6). 1시간 경과한 상처주변의 상피는 각질층으로부터 아래쪽으로 심하게 수축되었으며, 손상된 세포는 괴사가 진행되었다. 손상된 상피세포들은 세포간의 간격이 더욱 조밀해졌으며, 세포간의 결합부위인 데스모소옴도 전자밀도가 높게 관찰되었다(Fig. 7).

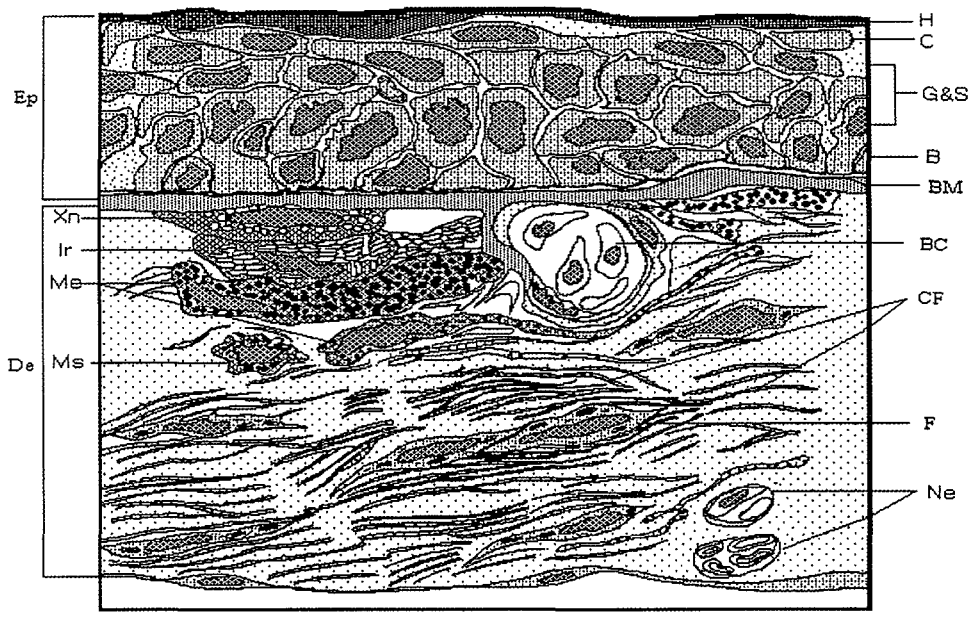


Fig. 2. Diagram of normal dorsal skin in *Bombina orientalis*. Ep, epidermis; H, horny layer; C, clear layer; G&S, granular and spinous layer; B, basal layer; BM, basal membrane; De, dermis; Xn, xanthophore; Ir, iridophore; Me, melanophore; Ms, mesenchymal cell; BC, blood cell; CF, collagen fiber; F, fibroblast; Ne, nerve.

2. 상처유도 후 3, 6, 12시간 경과후의 조직 변화

상처주변의 상피조직은 3시간 경과한 시료에서 수축되어 관찰되었으며, PAS와 Alcian blue (pH 2.5) 반응을 실시한 결과, 기저층부터 각질층까지 전반에 걸쳐 강한 반응을 나타내었고, 상처부위에 인접한 점액선(mucous gland)에서도 강한 염색반응을 나타내었다. 상처로 손상된 조직의 대부분은 괴사되었다 (Figs. 8, 9).

6시간 경과된 무당개구리의 피부조직은 상처부위에 가깝게 인접한 점액선에서 분비된 물질이 상처 안쪽으로 흐른 후 상처조직을 외부와 차단시키며 poly-band를 형성하였으며, 이 막은 PAS염색에 강한 반응을 나타내었다. 이 시기에 상처주변 상피조직은 각질층위로는 PAS염색의 양성반응이 현저하게 감소되었으나 진피층에서는 Alcian blue (pH 2.5)와 PAS반응에 강한 반응을 나타내었다(Figs. 10, 11). 상처주변 상피조직 에서는 6시간째에 감소한 PAS반응이 12시간째에서 높아지는 것으로 확인되었으나, 진피층의 염색반응은 6시간과 동일하였다. 수축된 상피조직은 세포의 괴사가 현저하게 진행되고 있었고, 세포간 데스모소옴 부위에서 당김미세섬유가 관찰되었다. 세포질에는 다수의 공포들이 있었으며, 세포를 결합해주는 데스모소옴의 전자밀도는 정상조직에 비하여 높게 관찰되었다(Figs. 11, 12, 13, 14).

3. 24, 48, 72시간 경과후의 상처조직

24시간 후 상처로 생긴 빈 공간은 주위의 점액선에서 분비된 물질에 의해서 비후된 막으로 완전하게 차단되었고, 그 위로 상피세포가 재생되고 이동되어 재생된 상피를 형성하였다. 재생된 상피 세포층과 주변 상피는 바깥쪽에서 모두 PAS에 강한 반응을 나타내었다(Figs. 15, 16, 17).

상처주변의 상피세포는 세포질 전반에 걸쳐 당김미세섬유와 리보솜을 풍부하게 함유하고 있었으며, 다수의 공포도 관찰되었다. 상처로 손상된 상피세포

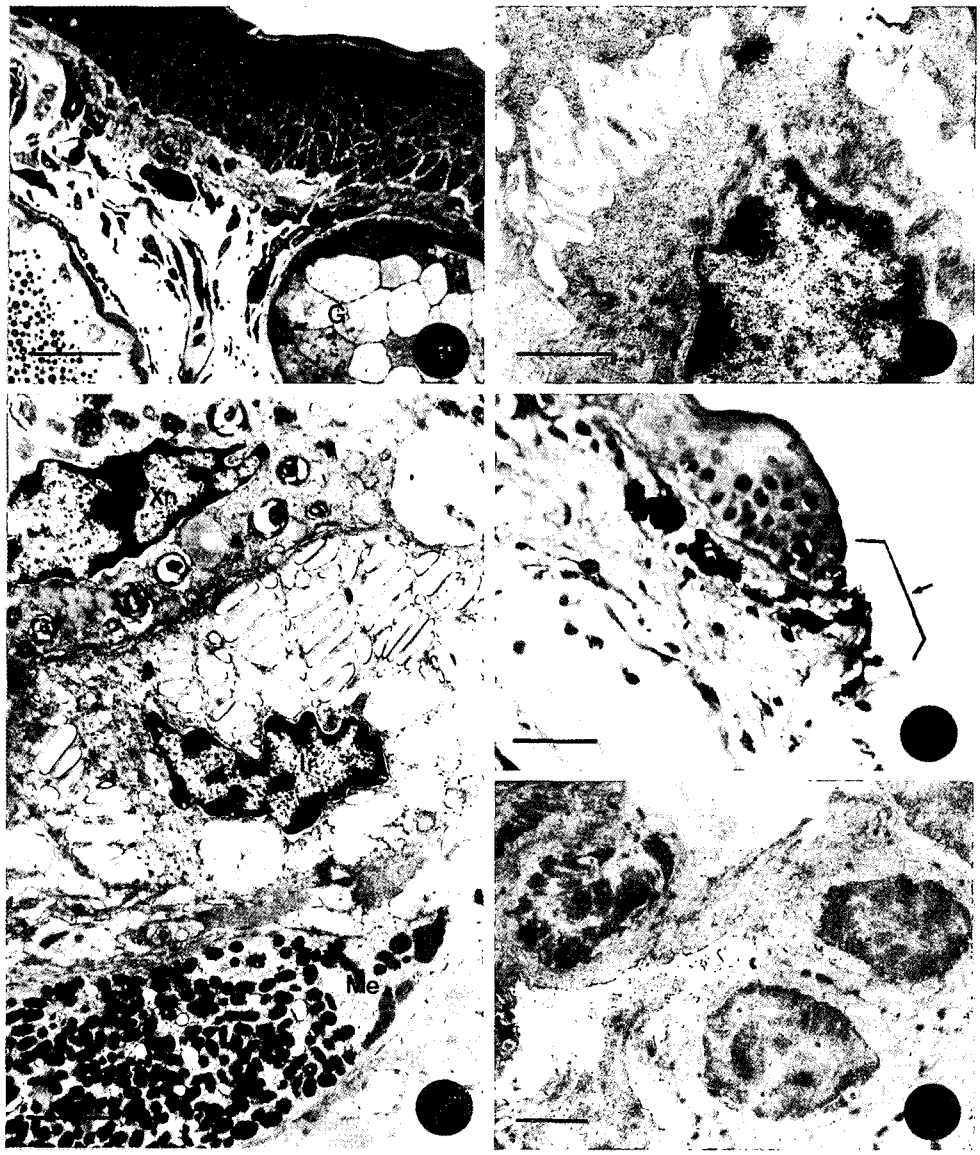


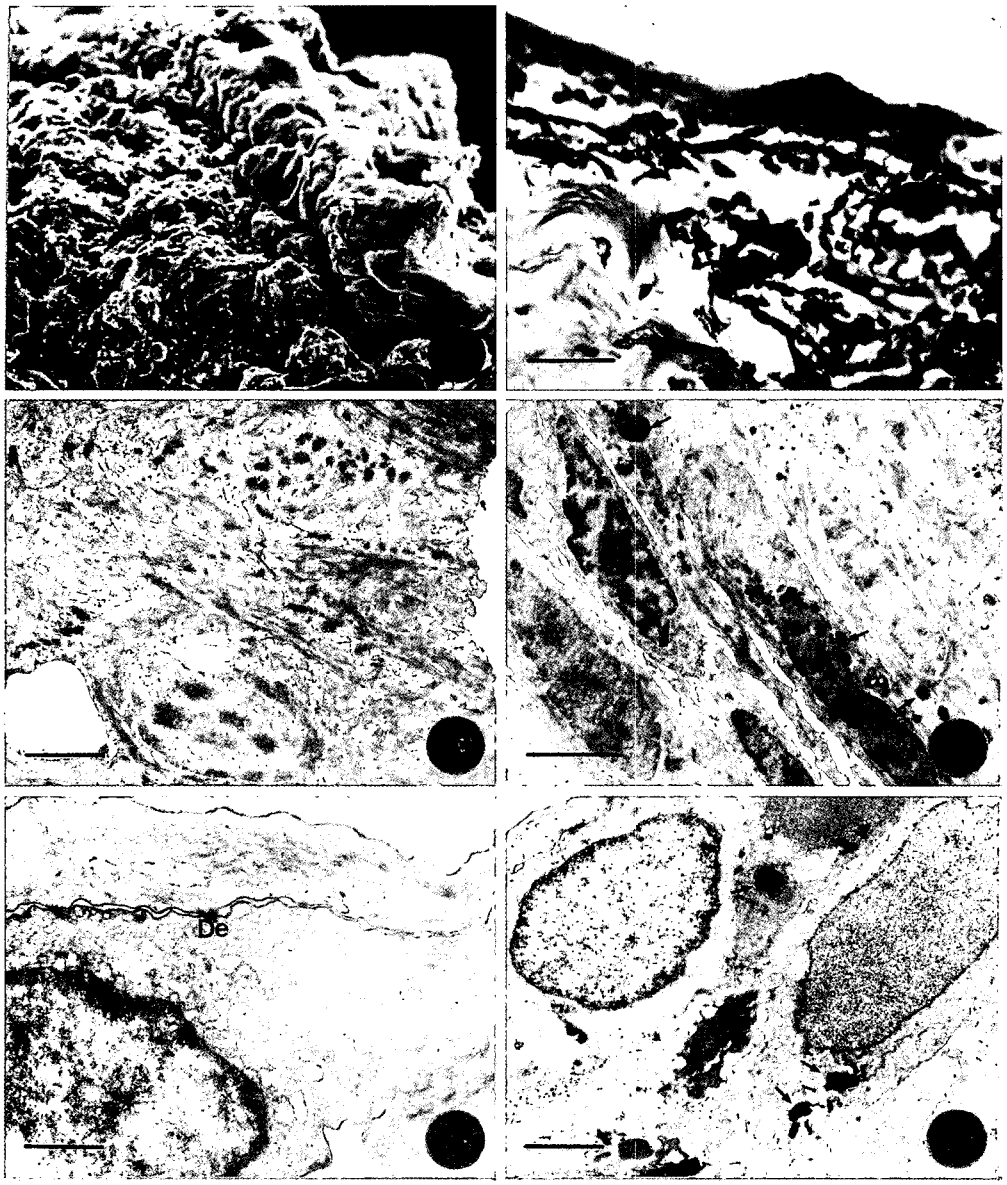
Fig. 3. Photomicrograph of normal dorsal skin. The epidermis (Ep) is a stratified squamous epithelium. Beneath the epidermis three layer of dermal chromatophores (Ch) are seen. Large granular grands (G) originate from epidermis. Bar indicates 10 μm.

Fig. 4. The layers of the epidermis are most easily defined by the changes that occur in keratin as differentiation proceeds. Stem cells are located between epidermal cells. De, desmosome. Bar indicates 1 μm.

Fig. 5. The dermal chromatophores are parallel to the basement membrane. Xn, xanthophore; Ir, iridophore; Me, melanophore. Bar indicates 2 μm.

Fig. 6. The skin tissue was almost destroyed by injury and cells were erupting in injured epithelium. Debris (cells, other cellular components *et al.*) occur by artificial wounding. Arrow indicates wound edge. Bar indicates 10 μm.

Fig. 7. After 1 hours, several further changes had occurred to the tissues at the wound site. The extruded epidermal cells and any other tissue became necrotic and darkened. Bar indicates 2 μm.



Figs. 8, 9. Scanning electron micrograph have demonstrated that there is retraction of wound skin. At 3 hours after injury, the wounded skin retracted at damaged surface and epithelial cells located in wound edge profoundly affected. Left, Bar indicates 20 μm. Right, Bar indicates 10 μm.

Figs. 10, 11. After 6 hours, injured skin is loosely pattern in epidermis and dermis. The extruded epidermal cells and any other tissue became necrotic and darkened. Elongation of epithelial cells are seen in wound epidermis. Damaged epithelial cell is swollen. Amorphous dense materials (arrows) are seen in the cytoplasm. All bars indicate 3 μm.

Figs. 12, 13. Epithelial cells spread over the wound surface by migration at 12 hours after wounding. The epidermal cells are in loose pattern in the injured skin. Desmosome (De) have strong electron density than normal tissue. At this stage, the epidermal cells are higher activity for foreign material and debris phagocytosis. Arrows indicate amorphous dense materials. Left, Bar indicates 1 μm. Right, Bar indicates 2 μm.

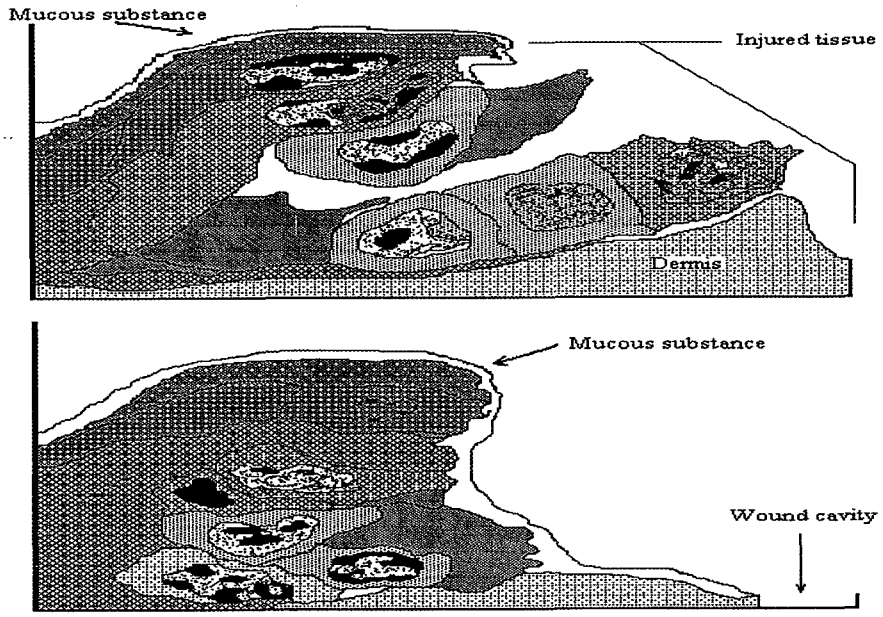


Fig. 14. Diagram of the epithelialization process in *Bombina orientalis* immediately (upper) and 6 hours later (lower) after injury in skin.

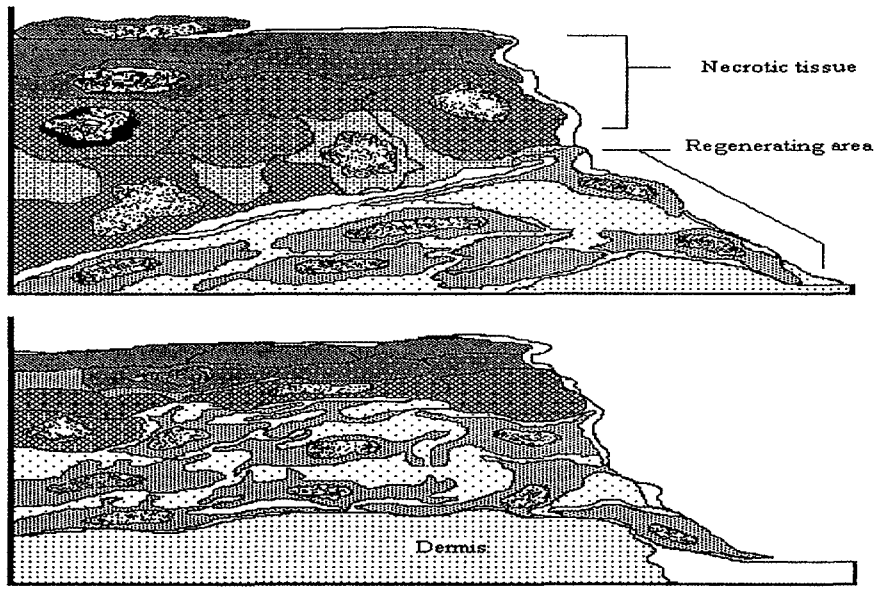
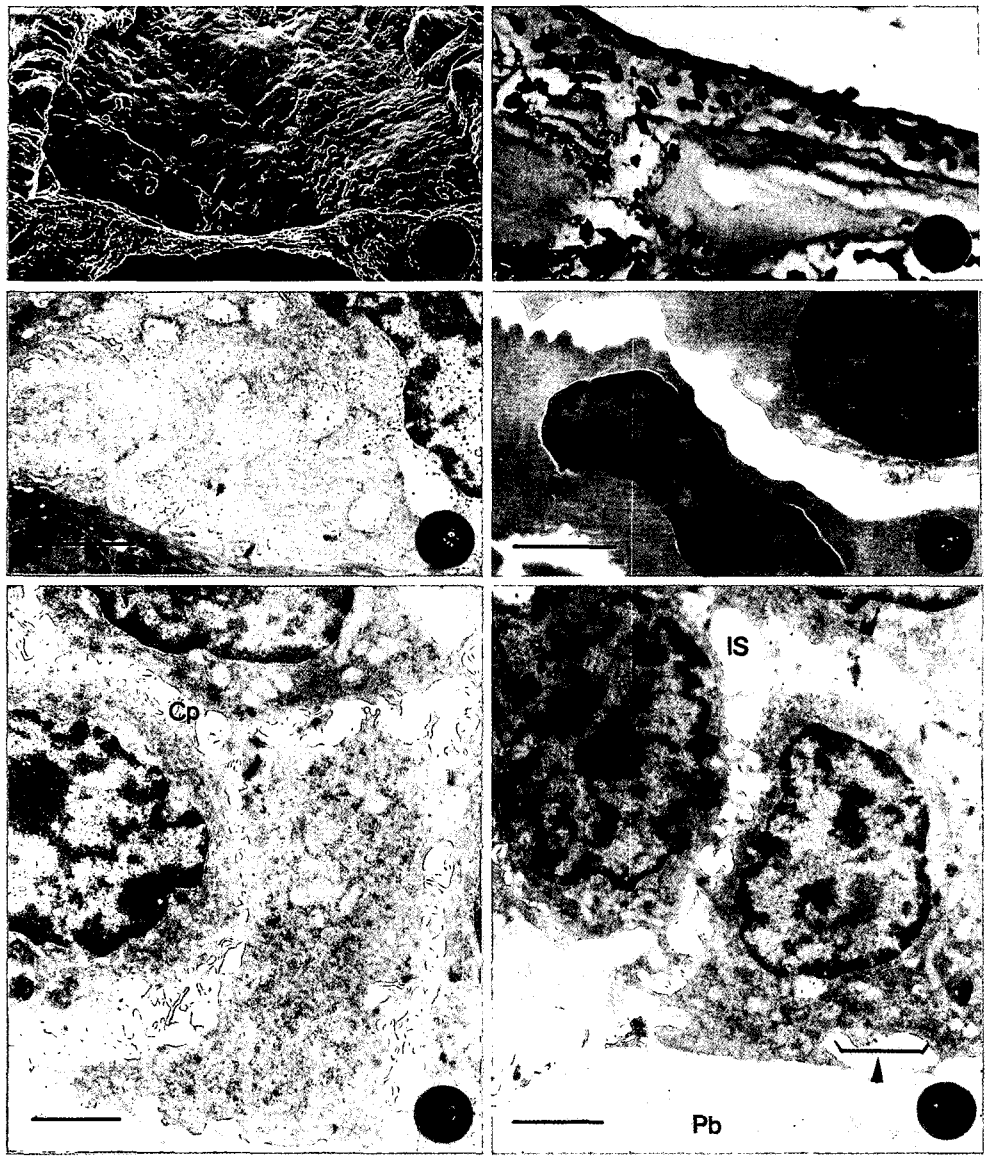


Fig. 15. Diagram of the epithelialization process in *Bombina orientalis* 12 hours (upper) and 24 hours (lower) after injury in skin.



Figs. 16, 17, 18. During the re-differentiation epidermal cells, stem cells in the basal layer are high activity and cells in the next stage of differentiation enlarge their size. The process from division to moving quickly occurs in this stage. The cytoplasm of these cells is dense electron density. Left, Bar indicates 40 μm. Right, Bar indicates 10 μm. Bar of Figure 18 indicates 2 μm.

Fig. 19. When the wound occur, blood flowed out vessel. Under the wound area, blood cell death process was by fibrous membrane. The cytoplasm of these blood cells was high electron density. Bar indicates 2 μm.

Figs. 20, 21. Regenerating cells have numerous free ribosomes in their cytoplasm. Cytoplasmic processes (Cp) of these cells are numerous and slender form. Intercellular space (IS) is filled with fibrous substance. Between 1 and 2 days, migrating epidermal cells attach to poly-band (Pb) and then after migration of epidermal cells, lateral surface of cell membrane attach to the other cells. The cell junctions are not formed between cell and fibrous substance (arrow head). Left, Bar indicates 1.5 μm. Right, Bar indicates 2 μm.

는 안쪽의 세포와 세포간의 결합이 유실되었으며, 세포질의 전자밀도는 높게 관찰되었다(Fig. 18). 진피 아래에 분포하고 있던 혈관은 상처유도와 동시에 붕괴되어 내강을 흐르던 혈액은 유출 되었다. 유출된 혈구들은 부분적으로 서로 응집되었고, 세포의 형태가 변형되어 심하게 굴곡되고 수축되었다. 혈관내에 흐르던 혈구는 원추형이었으나, 유출된 혈구는 세포질 돌기를 내는 형태로 변하였으며, 핵도 염색질이 응축되어 핵막주변으로 분포하는 세포 괴사의 형태학적 특징을 지니고 있었다(Fig. 19).

상처유도 후 48시간째 재생된 상피세포는 신장되었으며, 세포질에는 많은 리보솜과 조면소포체가 관찰되었다. 또한 세포질 전반에 걸쳐 당김미세섬유들이 분포하고 있었고, 주변으로 많은 톱니모양의 세포질 돌기를 내고 있었다. 이 시기에 상처주변의 정상상피조직은 각질층과 투명층에서 PAS염색에 강한 양성반응을 보였으며, 재생된 상피의 상층은 중간정도의 반응을 나타내었다(Fig. 20). 또한, 재생되어 이동한 상피세포들 중 상처에 바로 인접한 부위의 세포들은 아래로 이동되어 신장된 원주형으로 관찰되었다. 핵은 세포의 중앙부위에 위치하고 있었으며, 아직 세포간의 세포결합 형태는 이루어지지 않았다. 상피세포들은 점액물질이 분비되어 형성된 poly-band의 위를 이동하였으며, 상처의 아래쪽으로 이동한 세포들은 입방형으로 관찰되었으며, 세포간에 데스모소옴이 형성되어 있었다(Figs. 21, 22).

72시간째 재생된 상피는 4~5층의 상피세포로 구성되었으며, 정상 상피층과 유사한 투명층, 과립층, 가시층의 조직학적 특성을 관찰할 수 있었으나, 기저층에 해당되는 부분은 확인되지 않았다(Figs. 22, 23, 24). Poly-band는 PAS염색에 강한 양성반응을 나타내었으며, 혈관외부로 유출되어 변형된 혈구들이 관찰되었다. 재생된 상피 중 내강쪽에 위치한 세포는 많은 리보솜과 조면소포체 그리고 미토콘드리아를 포함하고 있었으며, 세포막은 불규칙하게 관찰되었다. 이들 세포들은 재생되어 이동한 뒤 인접 세포들과 가늘고 긴 세포질 돌기를 뻗어 데스모소옴을 형성하는 등 세포간의 결합이 진행중인 것으로 관찰되었다(Figs. 25, 26, 27).

이상의 염색반응 결과를 종합하면, 상처직후 주변

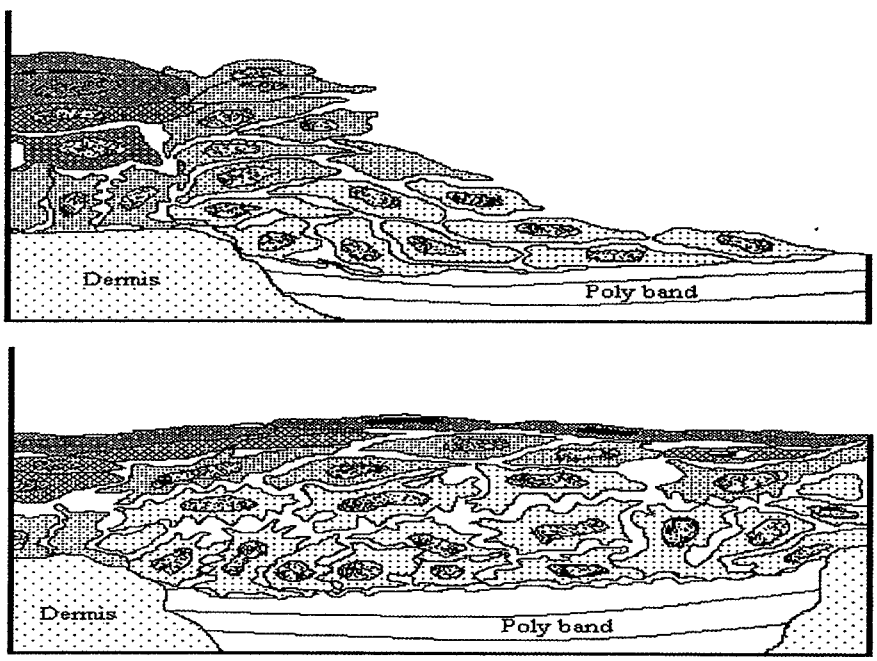
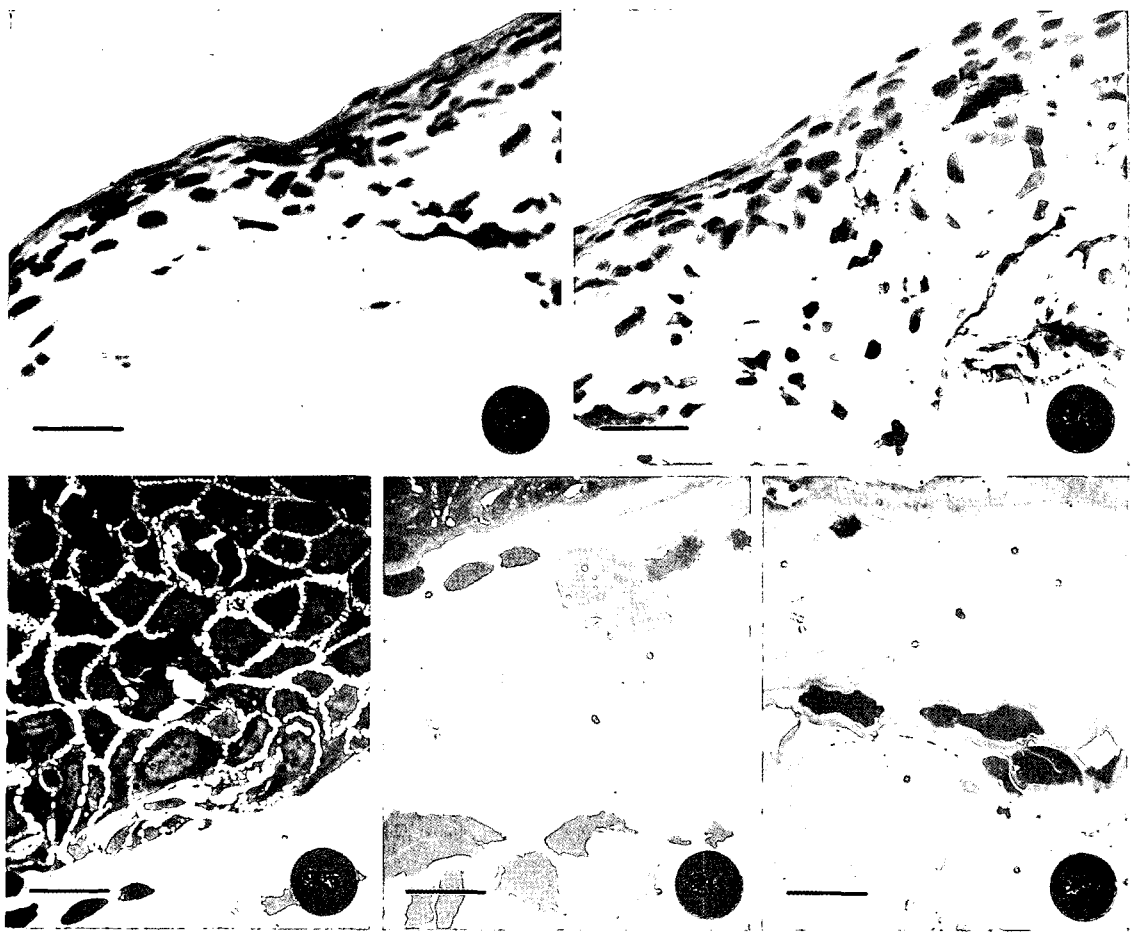


Fig. 22. Diagram of the epithelialization process in *Bombina orientalis* 48 hours (upper) and 72 hours (lower) after injury in skin.



Figs. 23, 24. Migration of epidermal cells to the wound area was completed at 3 days after wounding. Regenerating epithelial layer consists of four or five cell layers, which are similar to granular, and spinous layer. Regenerating epithelial cell layer was strong positive reaction in PAS staining. All bars indicate 8 μm.

Figs. 25, 26, 27. Regenerating epidermal cells have spine-like processes (arrows) are seen in flat and irregular epithelial cells. Thin cytoplasmic processes have attached to other cell process. Mucous layer is much increased in thickness and shows strong positive in PAS and in Alcian blue pH 2.5 staining. All bars indicate 4 μm.

상피의 각질층에서 투명층까지 정상조직과 동일한 PAS 양성반응을 나타내었고, 상처부위에 인접한 점액선(mucous gland)에는 강한 양성반응을 나타내었다. 반면, Alcian blue (pH 2.5)염색에서는 정상조직과 상처직후 동일한 정도의 반응을 나타내었으며, 1시간 경과한 조직에서 음성반응을 나타내었다. 상처 후 3시간이 경과한 조직의 Alcian blue (pH 2.5) 염색에서는 약한 반응을 나타내었으며, 12시간까지 동일반응이 지속되다가 24시간째 조직에서는 중간정도의 반응을 나타내었고 48시간째는 경미하게 반응하였으며, 72시간째 조직에서는 정상조직과 동일하게 약하게 반응하였다. 3시간 경과된 무당개구리의 피부조직은 PAS반응에서 강한 염색성을 나타내었으며, 6시간이 경과된 조직에서는 약하게 염색성이 저하되었고, 12시간부터 증가하여 관찰 종료시점인 72시간까지 강한 염색정도를 나타내는 것으로 확인되

Table 1. Histochemical reactions of marginal wound skin on the early healing responses in *Bombina orientalis*

Examination \ Healing time	Nor.	Imm.	1Hr.	3Hrs.	6Hrs.	12Hrs.	24Hrs.	48Hrs.	72Hrs.
Alcian blue (pH 2.5)	+	+	-	+	+	+	++	±	+
Periodic acid Schiff	++	++	++	+++	+	++	+++	+++	+++

-, no reaction; ±, slightly reaction; +, weak positive reaction; ++, medium positive reaction; +++, strong positive reaction

었다. 특히, 6시간 경과된 무당개구리의 피부조직에서는 상처부위에 가깝게 인접한 진피성 점액선에서 분비된 물질이 상처안쪽으로 흐른 후 상처조직을 외부와 차단시킨 poly-band는 PAS염색에 강한 반응을 나타내는 것으로 확인되었다(Table 1).

고 찰

포유류의 경우 조직표면에 유도된 상처는 초기에 손상된 세포, 혈액, 그리고 피브린을 포함한 물질이 용출되어 상처부위에 남는다. 반면 넓게 유도된 상처부위는 혈구가 응집되는데, 이때는 상처부위에서 분비된 피브린의 수축에 의한 혈액의 응고로 상처를 외부와 차단한다(Baier, 1973). 이렇게 상처에 생긴 세포성 물질의 군집은 주변 조직과 구별되는데, 이 부분은 poly-band라 한다(Viziam *et al.*, 1964).

본 실험에서 무당개구리 녹색발현 배피를 1×1 mm^2의 크기로 절재한 후, 조직은 상피와 진피에 걸쳐 절단부 연접세포들은 대부분 파괴되었다. 이들 세포는 세포질이 절단부위로 용출되었으며, 상처 후 상피와 진피조직이 수축되는 등 조직의 현저한 변형이 관찰되었다. 진피의 혈관은 상처유도와 동시에 붕괴되어 혈관 밖으로 혈액이 유출되었다. 유출된 혈구들은 부분적으로 서로 응집되었으나, 혈구의 역할은 미비한 것으로 확인되었다.

상처유도 후 1시간부터 3시간 경과한 시료에서 PAS와 Alcian blue(pH 2.5)반응을 실시한 결과, 상처주변 상피조직은 기저층부터 각질층까지 전반적으로 강한 반응을 나타내었으며, 상처부위에 인접한 점액선에서도 강한 염색반응을 나타내었다. 6시간째 조직에서 관찰된 특이한 현상은 상처부위에 가깝게 인접한 점액선에서 분비된 물질이 상처조직을 외부와 차단시키면서 poly-band를 형성하는 것이었고, 이 막은 PAS염색에 강한 반응을 나타낸 것으로 보아 점액다당류의 물질인 것으로 확인되었으며, 상처유도시 이 물질은 포유류의 혈장과 동일한 역할을 하는 것으로 추측된다.

상처유도 직후, 어류중 상어와 경골어류에서는 상처부위에 점액이 축적되고(Reif, 1978), 영원류(*Triturus pyrrhogaster*)의 각막에 유도된 상처는 피브린으로 추측되는 물질의 계속적인 분비에 의해서 봉입 된다고 하였다(Yamanaka and Eguchi, 1981).

무당개구리의 경우 상처가 유도되면 정상일 때 보다 다량의 점액물질이 분비되어 상처를 외부와 차단시키는데, 이 물질의 분비는 PAS와 Alcian blue (pH 2.5)반응의 결과 상처직후부터 3시간경과 후까지 증가하였으며 6시간 경에는 약한 반응을 나타내는 것으로 미루어, 이시기에 점액성 물질의 축적으로 층상구조의 형성이 종료된 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 육상과 수중환경에 적응된 무당개구리의 피부는 상처에 대하여 초기에 점액물질에 의한 독특한 방어체계를 지니는 것으로 확인되었다.

포유류의 경우, 상처로 괴사가 진행중인 부위의 상피세포는 비대성(hypertrophy)을 보이나 유사분열의 활성도 증가한다(Winstanley, 1976). 토끼에서는 유사분열 활성의 증가시점은 18시간에서 21시간 사이에 관찰되었고(Viziam *et al.*, 1964), 기니아피그의 경우 약 31시간대에서 증가하였다(Christophers, 1973). 또한 영원류(Notophthalmus), 두꺼비의 올챙이, 그리고 닭의 망막실험(Takeuchi, 1972a, b; Repesh and Oberpriller, 1980; Udoh and Derby, 1982)에서 상피의 비후는 괴사부위를 향하여 이동하는 상피세포들이 축적되어 이루어진다고 하였다(Croft and Tarin, 1970).

본 실험에서도 상피세포의 비대성이 6시간과 12시간 사이의 조직에서 확인되었다. 수축된 상피조직의 세포질에는 다수의 공포를 지니고 있었으며, 세포를 결합해주는 데스모소옴의 전자밀도는 정상조직에 비하여 높게 관찰되는 등 세포괴사가 현저하게 진행되고 있었다. 따라서, 비대성의 증가와 유사분열활성의 증가가 비례하는 점으로 미루어 무당개구리의 재생되는 상피의 유사분열 증가시점은 포유류에 비교하여 빠른 것으로 사료되나 이 점에 관하여는 좀더 연구가 수행되어야 할 것이다.

양서류와 어류의 각막 상피에서, 기저막에 단단하게 부착되어있던 상피세포들은 상처유도 후 세포의 탈락으로 이동하게 된다. 이러한 과정은 생쥐에서는 16시간 정도의 시간이 필요로 하나 양서류와 어류에서는 상당히 짧은 시간 내에 이루어진다(Mittal and Munsh, 1974; Radice 1980a). 만약 상처가 작고 피상적이면 상피세포의 이동은 응고형성과정에 의해서 지연되지 않는다. 이러한 세포의 이동은 특히 양서류와 경골어류에서 매우 빠르게 진행된다(Radice, 1980a, b). 또한 상처가 작을 경우에는 상처가 봉합된 후 세포의 이동이 바로 시작되며(Radice, 1980a), 상처가 큰 경우는 상피세포들의 이동이 진행된 후 성장과 분화가 일어난다(Matoltsy and Viziam, 1970; Odland, 1977).

무당개구리의 상피조직도 주변세포의 탈락현상이 관찰되기는 하였으나, 상처 유도 후 분비되는 점액물질이 상처에 축적되기까지는 상피세포의 이동이 관찰되지 않았다. 그러나, 점액물질이 축적된 3시간에서 6시간 사이에 상피세포의 이동이 확인된 것으로 미루어 크게 유도된 상처임에도 포유류와 어류 그리고 다른 양서류에 비하여 상당히 빠른 시간 내에 상피세포의 유사분열과 이동이 진행되는 것으로 사료된다.

일반적으로 절개로 생긴 상처 또는 물집(blisters)은 가피(scab)로 봉해지며(Krawczyk, 1973), 그 아래로 상피세포가 이동된 후, 진피층으로부터 분리된다(Odland, 1977). 무당개구리의 경우 가피와 유사한 기능을 하는 점액물질로 형성된 poly-band 위로 상피세포가 이동하는 등 독특한 방식을 취하고 있었다. 이 경우 포유류의 가피에 해당되는 poly-band의 유실관계는 확인하지 못하였으며, 이는 상처회복의 전 단계를 연구하면서 규명되어야 할 부분이다.

Repesh와 Oberpriller (1980)는 이동중인 상피세포의 앞쪽이 다른 세포들과 접하면, 상처의 중앙부위 상피세포들은 이동이 거의 순간적으로 멈추고 세포들이 차곡차곡 쌓인다고 하였고, Gill과 Atwood (1981)는 이러한 세포들의 움직임에 의해 상처 중앙부위에서 상피조직의 두께는 점차로 두꺼워 진다고 하였다. 그리고, Keenan 등(1982)은 상피세포들이 상처의 가운데에서 비후되어 가장 위쪽의 세포층은 parakeratosis가 일어나며, 찰상의 기관지 상피세포에서는 편평세포성 화생(squamous metaplasia)이 관찰된다고 하였다. 사람의 경우, 수분유실을 막는 방어벽으로서 기능은 재생되는 상피조직이 정상적으로 각질화세포의 기능을 지닐 수 있을 때까지 parakeratosis가 일어남으로서 복구된다(Matoltsy *et al.*, 1962).

본 연구에서 상처유도 후 24시간째에서 상피 세포층의 재생이 관찰되었는데, 세포들은 입방형이었으며, 상처에 바로 인접한 부위의 세포들은 서로 겹쳐서 비후되었다. 48시간째 조직에서는 재생된 상피세포가 신장되어 원주형인 것으로 확인되었으며, 아직 세포간의 세포결합 형태는 이루어지지 않았다. 따라서, 무당개구리 재생 상피의 이동은 Repesh와 Oberpriller (1980) 그리고 Gill과 Atwood (1981)의 주장과 유사한 방식으로 진행됨이 확인되었으며, 72시간째 재생된 상피층은 4~5층의 상피세포로 구성되었다. 이 상피층에서 기저층은 확인되지 않았으나 투명층, 과립층, 가시층의 형태학적 특성이 관찰되었다. 따라서, 이러한 현상은 재생되는 상피세포들이 회복기간 동안에 사람의 경우와 동일하게 수분유실을 막는 방어벽으로서의 기능과 허물을 벗는데 관여하는 것을 알 수 있다.

결 론

무당개구리(*Bombina orientalis*) 피부의 초기 상처치유반응을 조직화학적 반응과 전자현미경을 이용하여 형태학적으로 분석 확인하였다. 상처직후 유출

된 혈구들은 부분적으로 서로 응집되었으나, 혈구의 역할은 미비한 것으로 확인되었다.

상처 유도 후, 정상일 때 보다 다량의 점액다당류 물질이 분비되어 상처가 외부와 차단되었는데, 이 물질의 분비는 PAS와 Alcian blue (pH 2.5)반응으로 염색정도를 관찰한 결과, 상처 직후부터 3시간경과 후 까지 증가하였으며, 6시간 경에는 미비한 것으로 나타났다. 이 분비물질은 상처유도시 포유류의 혈장과 동일한 역할을 하는 것으로 생각되며, 초기에 다량 분비되어 상처부위를 외부와 차단시켜 박테리아와 같은 이물질의 유입을 막는 등 육상서식 동물에 비하여 독특한 방어체계를 지니는 것으로 확인되었다.

상피세포의 비대성은 6시간과 12시간 사이의 조직에서 확인되었는데, 비대성의 증가와 유사분열활성의 증가가 비례하는 점으로 미루어 무당개구리의 재생되는 상피의 유사분열 증가시점은 포유류와 비교하여 빠른 것으로 사료되나 이 점에 관하여는 좀더 연구가 수행되어야 하겠다. 재생된 상피세포는 가피와 유사한 기능을 하는 점액물질로 형성된 poly-band 위로 이동하는 등 독특한 방식을 취하였다.

상피세포 이동은 점액물질이 축적된 3시간에서 6시간 사이에 이루어진 것으로 미루어 크게 유도된 상처임에도 포유류와 어류 그리고 다른 양서류에 비하여 상당히 빠른 시간 내에 상피세포의 유사분열과 이동이 진행되었다. 이런 방식으로 재생된 상피는 투명층, 과립층, 가시층의 형태학적 특성이 확인되었는데, 이러한 조직학적 특성은 회복기간 동안에 수분유실을 막는 방어벽으로서의 기능과 허물을 벗는데 효과적인 반응으로 확인되었다.

감사의 글

이 연구는 1996년도 교육부 기초과학육성연구비의 지원에 의한 것임(과제번호: BSRI-96-4443).

참 고 문 헌

Abbadie C, Kabrun N, Bovali I, Smardova J, Stehelin D, Vandenbunder B, Enrietto PJ, 1993. High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro, Cell 75, 899-912

Baier RE, 1973. Surface chemistry in epidermal repair. In Epidermal wound healing, eds. H.I. Maibach and D.T. Rovee, Year Book Med. Publ. Chicago, pp. 27-48

Chang BS, Yoe SM, Kim WK, Moon MJ, 1992. Electron microscopic study on the hemocytic immune responses to the foreign substances in insects. I. Responses to gold particles, Korean J. Zool. 35, 58-69

Christophers E, 1973. Kinetic aspects of epidermal healing. In Epidermal wound healing, eds. H.I. Maibach and D.T Rovee, Year Book Med Publ. Chicago, pp. 53-69

Clark RAF, 1988. Overview and general considerations of wound repair. In The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair, eds. R.A.F. Clark and P.M. Henson, Pleum Press, New York, pp.3-33

Clarke PG, 1990. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms, Anal. Embryol. 181, 195-213

Croft CB, Tarin D, 1970. Ultrastrastructural studies of wound healing in mouse skin. I. Epithelial behaviour, J. Anat. 105, 63-77

Demarchez I, Desbas C, Prunieras M, 1985. Wound healing of human skin transplanted onto the nude mouse, Brit. J. Dermatol. 28, 177-182

Demarchez M, Hartmann DJ, Herbage D, Ville G, Prunieras M, 1987. Wound healing of human skin transplanted onto the nude mouse. II. An immunohistological and ultrastructural study of the epidermal basement membrane zone reconstruction and connective tissue reorganization, Dev. Biol. 121, 119-129

Gill BP, Atwood JR, 1981. Reciprocy and helicacy used to relate mEGF and wound healing, Nurs. Res. 30, 68-72

Gupta AP, 1986. Arthropod immunocytes. In Hemocytes and Humoral Immunity in Arthropods, ed. A.P. Gupta, John Wiley & Sons,

New Jersey, pp. 3-61

Hinchliffe JR, 1981. Cell death in embryogenesis. In Cell Death in Biology and Pathology, eds. I.D. Bowen and R.A. Lockshin, Chanpman and Hall, New York, pp.35-38

Hurle JM, 1988. Cell death in developing systems, Methods Achiev. Exp. Pathol. 13, 55-86

Ihara S, Motobayashi Y, 1992. Wound closure in foetal rat skin, Development 114, 573-582

Jeong MJ, Moon MJ, 1997. Fine structure of the integumentary wound healing process in the spider, *Pardosa astrigera*, Korean J. Entomol. 27(1), 29-41

Jones, MEE, Haire MF, Kloetzel PM, Mykles DL, Schwartz LM, 1995. Changes in the structure and function of the multicatalytic proteinase (Proteaseome) during programmed cell death in the intersegmental muscle of the hawkmoth Manduca sexta. Dev. Biol. 169, 436-447

Keenan KP, Combs JW, McDowell EM, 1982. Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury. I. Focal lesion: Quantitative morphologic study of cell proliferation, Virchows Arch (Cell Pathol.). 41, 193-214

Krueger GG, Daynes RA, Emam M, 1983. Biology of langerhans cells: Selective migration of langerhans cells into allogeneic and xenogeneic grafts onto nude mice, Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 1650-1654

Krawczyk WS, 1973. Some ultrastructural aspects of epidermal repair in two model wound healing systems, In Epidermal wound healing, eds. H.I. Maibach and D.T. Rovee, Year Book Med. Publ. Chicago, pp. 27-48

Lackie AM, 1988. Haemocyte behaviour, Adv. Insect Physiol. 21, 83-178

Matoltsy AG, Viziam B, 1970. Further observations on epithelialization of small wounds. J. Invest. Dermatol. 55, 20-25.

Matoltsy SG, Viziam B, 1970. Further observations on epithelialization of small wounds, J. Invest. Dermatol. 38, 251-253

Metchinikoff E, 1983. Lectures on Comparative Pathology of Inflammation. London. Kegan Paul, Trench, Trübner & Co.

Mittal AK, Munsh JS, 1974. On the regeneration and repair of superficial wounds in the skin of Rita rita (Ham). (Bagridae, pisces), Acta Anat (Basel). 88, 424-442

Odland GF, 1977. Progression of events of epidermal differentiation in wound healing. In Biochemistry of cutaneous epidermal differentiation, eds. M. Seiji and I.A. Bernstein, Univ. Park Press Baltimore London Tokyo, pp.22-48

Radice GP, 1980a. The spreading of epithelial cells during wound closure in *Xenopus* larvae, Dev. Biol. 76, 26-46

Radice GP, 1980b. Locomotion and cell-substratum contacts of *Xenopus* epidermal cells in vitro and in situ, J. Cell Sci. 44, 201-223

Reif WE, 1978. Wound healing in sharks, Zoomorphology 90, 101-111

Repesh LA, Oberpriller JC, 1980. Ultrastructural studies on migrating epidermal cells during the wound healing stage of regeneration in the adult newt, *Notophthalmus viridescens*, Am. J. Anat. 159, 187-208

Spicer SS, 1963. Histochemical differentiation of mammalian mucopolysaccharides, Ann. N.Y. Acad. Sci. 106, 379-388

Spicer SS, Sun DCH, 1967. Carbohydrate histochemistry of gastric epithelial secretion in dog, Ann. N.Y. Acad. Sci. 140, 762-783

Takeuchi S, 1972a. Wound healing of the cornea of the chick embryo. I. Factors affecting the migration of corneal epithelium, J. Fac. Sci. Univ. Tokyo, 12, 439-447

Takeuchi S, 1972b. Wound healing of the cornea of the chick embryo. II. The stromal wound bed as a substratum for epithelial migration, J. Fac. Sci. Univ. Tokyo, 12, 449-456

Udoh P, Derby A, 1982. The effect of the substrate on tadpole epidermal cells in vitro, J. Exp. Zool. 219, 75-80

Viziam CB, Matoltsy AG, Hescon H, 1964. Epithelialzation of small wounds, J. Invest. Der-

matol. 43, 499-567

Winstanley WE, 1976. Changes in the width of epithelial cells in the healing excised cutaneous wound. Res. Vet. Sci. 20. 306-310

Yamanaka H, Eguchi G, 1981. Regeneration of the cornea in adult newts: overall process and behavior of epithelial cells, *Differentiation* 19, 84-92