

## Imidazole 염색에 의한 분비지질의 조직화학적 연구

김 은 수\*, Paul G. Mahlberg<sup>1</sup>  
전국대학교 이과대학 생명과학과, <sup>1</sup>인디애나대학교 생물학과

### Histochemical Study of Secretory Lipids by Imidazole Staining

Eun Soo Kim\* and Paul G. Mahlberg<sup>1</sup>  
Department of Biological Sciences, Konkuk University  
<sup>1</sup>Department of Biology, Indiana University, USA  
(Received April 23, 2000)

#### ABSTRACT

Lipophilic glandular trichomes form secretory vesicles that accumulate in a distended noncellular secretory cavity. Imidazole-buffered osmium tetroxide solution was used to visualize unsaturated lipids in glands of *Cannabis sativa*. This method of staining revealed two kinds of secretory vesicles in the cavity of glands. Some smaller and rounded vesicles in the secretory cavity and secretory cells were positively stained with the imidazole, and they appeared electron-dense. The other type of vesicles which have bigger sizes more or less were not reacted, however, they appeared transparent. A high contrast of the cuticles which cover the gland was also strongly reacted with that processing. Those result suggest that the dark vesicles in the cavity may contribute to enlarge the subcuticular wall and cuticle when contents of these vesicles are dispersed into wall.

**Key words** : Histochemistry, *Cannabis*, Imidazole, Glandular trichome, Secretory vesicle

#### 서 론

대마의 분비모는 소수성 분비물질을 분비소포 형태로 분비하여 분비강내에 저장한다(Hammond와 Mahlberg, 1977, 1978). 이들 분비모의 분비세포로부터는 각 발생단계에 따라서 색소체로부터 다양한 분비물질을 합성하고, 이를 분비강으로 분비한다(Kim과 Mahlberg, 1991, 1997b; Mahlberg와 Kim, 1992). 특히, 대마의 성분물질인 cannabinoids는 대마 분비모의

분비세포로부터 합성되어 분비강에 축적되는데 최종 산물인 tetrahydrocannabinol (THC)는 분비세포의 세포벽과 분비강의 세포외막, 큐티클에 면한 세포벽쪽에서 강한 활성을 나타내지만, 색소체에서는 전혀 반응이 나타나지 않는다. 이러한 사실은 색소체로부터 합성되는 cannabinoids는 적어도 THC가 아니며, THC는 저장형태의 cannabinoids로서 세포질에서 합성되고 분비강으로 분비된 후에야 나타나는 형태임이 밝혀졌다(Kim과 Mahlberg, 1997a).

한편, 분비강내의 분비물질이 분리되어 GC/MS에

본 논문은 1998년도 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의해 지원되었음.

\*Correspondence should be addressed. Ph.: (02) 450-3430, FAX: (02) 3436-5432, E-mail: Kimes@konkuk.ac.kr

Copyright © 1999 Korean Society of Electron Microscopy

의한 성분분석이 이루어져서 다양한 terpenoids가 함유되어있는 사실을 입증하였다 (Turner 등, 1978; Lanyon 등, 1981). 그러나, 분비세포와 분비강에서 발견되는 분비과립의 세포화학적 특성이 어떠한 지, 이들 다양한 종류의 분비물질이 어떤 과립에 어떻게 존재하는지에 대해서 아직 어떤 연구도 이루어지지 않았다. 본 연구는 확인되지 않은 이러한 중요한 문제점을 형태적으로 확실히 밝히고자 실험에 착수하였다.

## 재료 및 방법

본 연구에 사용된 대마는 Mexican계통의 *Cannabis sativa* L.로서 일장(명: 8시간-암: 16시간)과 온도(22~24°C) 및 습도가 일정 유지되는 인디애나 대학 생물학과의 온실에서 재배된 재료를 사용하였다. 분비모를 지닌 암꽃의 포조직을 1% dimethyl sulfoxide가 첨가된 0.12M sodium phosphate 완충액으로 제조된 3% glutaraldehyde (pH 7.2)에 72시간 전고정 시킨 다음 (Kim과 Mahlberg, 1991), 0.02 M imidazole (Sigma, I-0125, Grade 1) 수용액에 15분씩 2번 처리한 후 (pH 7.5), 4% osmium tetroxide를 동량 첨가시켜 30분간 후고정 시켰다. 수세시킨 조직은 2% uranyl acetate로 4°C에서 1시간동안 bloc-staining 하고 ethanol 농도상승 순으로 탈수시켜, propylene oxide로 치환시킨 다음 Spurr 혼합액에 포매 시킨다. 포매된 재료는 60°C에서 24시간 중합시키고, 재료를 초박절편기 (Ultracut S, Reichert-Jung)와 diamond knife로 절단하여, 은색절편을 200~300 mesh copper grid에 수집하고 lead citrate와 uranyl acetate로 염색시킨 후 투과전자현미경 (JEOL-1010)으로 관찰하였다.

## 결 과

imidazole 염색은 oleic acid, olein과 같은 불포화지방산에 강한 양성반응을 나타내지만 palmitic acid, stearic acid와 같은 포화지방산에서는 음성반응을 나타낸다. 따라서 분비모의 발생단계에 따라서 다양하게 출현하는 소수성 분비과립을 구분하고, 이들 과립 속에 저장된 지질성분의 화학적 성상을 파악하기 위

해 대마의 분비모를 imidazole로 처리하여 염색반응시킨 후, 절편을 투과전자현미경으로 관찰하여 다음의 결과를 얻었다.

대마의 분비모는 표피세포로부터 분화되고 발생단계에 따라서 분비강이 형성된다. 분비강이 형성된 후에는 분비세포의 색소체로부터 분비물질이 합성되어 분비강으로 분비되어 축적되는데 분비강의 안쪽에는 크고 작은 분비소포가 가득 차게 된다. 분비소포는 분비세포로부터 이동된 다양한 종류의 분비물질이 저장되는데 이들은 형태적으로 구분하기 어렵다. 분비소포 사이에는 분비세포벽으로부터 분리된 섬유소들이 분비소포의 막에 붙어 있었다 (Fig. 1).

대마 분비모의 분비강에는 imidazole에 양성반응을 나타내는 분비소포와 음성반응을 나타내는 분비소포의 2가지 종류의 소포가 관찰되었다. 양성반응을 나타내는 분비소포는 크기가 0.5~0.7  $\mu\text{m}$ 에 달하는 비교적 작은 것이었으나, 음성반응을 나타내는 것은 크기가 10~20  $\mu\text{m}$ 에 달하는 큰 종류의 분비소포들이었다 (Figs. 2, 3). 또한, 분비강을 둘러싸는 세포벽의 큐티클은 강한 양성반응을 나타내었다 (Fig. 2).

분비세포내 색소체로부터 합성된 분비물질은 형태가 불규칙한 무정형을 이루고 있거나 구형을 이루고 있었는데, imidazole에 양성반응을 나타내는 것은 거의 구형을 이루며 크기가 1.0~1.5  $\mu\text{m}$ 에 달하는 작은 것이었다 (Fig. 4).

한편, imidazole을 처리하지 않은 분비세포는 모든 분비소포의 전자밀도가 균일하여 분비소포의 종류를 서로 구분할 수 없었다. 대마의 분비세포는 세포의 활성이 매우 높아서 폴리소음, 조면소포체, 미토콘드리아가 가득 차있었으며 액포의 안쪽과 세포질에는 분비물질들이 자주 관찰되었다 (Fig. 5).

## 고 찰

imidazole 염색은 Angermuller와 Fahimi (1982)에 의해 처음 보고된 후, 주로 동물조직에서 소포체 소낭의 지질을 조직화학적반응으로 확인하기 위하여 이용되어 왔으나 (Franke와 Dargel, 1985; Nibbering 등, 1987; Soares와 Souza, 1988; Thiery 등, 1995) 식물조직에 있어서는 거의 사용되어지지 않았다. imidazole

염색은 oleic acid, olein과 같은 불포화지방산에 강한 양성반응을 나타내지만 palmitic acid, stearic acid와 같은 포화지방산에서는 음성반응을 나타낸다. 따라서 발생단계에 따라서 분비세포에 다양하게 출현하는 대마의 소수성 분비과립의 특성을 밝히는데 있어서 매우 유용한 방법이다.

대마(*Cannabis sativa* L.)는 cannabinoids라고 하는 terpene계통의 특징적인 성분물질을 다량 지니고 있다. 일년생 초본인 대마의 영양생장기간 동안 줄기, 잎, 또는 암꽃 포의 표면에는 원표피 세포로부터 발달한 분비모가 다수 밀생하고 있는데, 분비모에는 8~13개의 세포로 이루어진 분비기능이 활발한 한 층의 분비세포들과 이들로부터 분비된 성분물질이 축적되는 장소인 분비강으로 이루어져 있다(Kim과 Mahlberg, 1991). 또한 이들은 병세포와 기부세포에 의해 지지되고 있다. 본 연구자들의 연구결과에 의하면 분비모의 분비강이 형태적으로 완성되기 이전과 완성된 이후의 분비세포의 미세구조에는 많은 차이가 있음이 보고되었다. 이러한 이유는 최종 분비저장물질인 cannabinoids의 효과적인 축적을 위하여 분비강의 발달이 선행되고, 그 이후에 비로소 성분물질의 합성과 이의 분비작용이 활발히 일어나는데 기인한다(Kim과 Mahlberg, 1991; Mahlberg와 Kim, 1992).

분비강내의 분비소포 형성은 분비강이 완성되어지는 과정에서 계속적으로 이루어지지만 이들이 지닌 분비물질에는 분명히 역할이 다른 다양한 물질들이 포함되는 것으로 사료된다. 본 연구에서 양성반응을 나타내었던 분비물질은 큐티클의 재료물질인 것으로 관찰되었다. 분비강의 분비모의 발생과 더불어 점차 확장됨에 따라서 이 구조를 효과적으로 지탱하기 위해서 단단한 세포벽과 큐티클은 필수적이고 이를 위해 분비세포로부터 지속적인 재료물질을 공급받아야만 한다. 세포벽의 섬유소성분은 분비세포벽으로 이탈되어 이들이 사용되는 것은 이미 Mahlberg와 Kim (1992)의 연구에서 밝혀진 것이지만 분비소포의 저장성분에 대한 것은 아직까지 알지 못했다. 그러나, 이번 imidazole 염색에 의해서 분비강내의 2가지 다른 성분을 지닌 분비소포가 있는 것을 알게 되었고 이 가운데에서 양성반응을 나타내는 분비소포가 큐티클의 원료물질이 될 가능성이 매우 높은 것으로

사료되었으며 이들의 구성성분은 불포화지방산으로 구성되었음을 짐작할 수 있었다.

Mahlberg와 Kim (1992)의 연구에서 밝혀진 바와 같이 분비강 확장시에 분비강내 일부 분비소포는 분비강 외벽쪽으로 이동된 후 융합되어 큐티클 형성에 기여하고 있음이 확인된 바 있었다. Fig. 1과 Figs. 2, 3에서 관찰된 바와 같이 분비강내의 분비소포는 크기가 다양하지만, imidazole 염색에 양성반응을 나타내는 것은 0.5~0.7  $\mu\text{m}$ 에 달하는 크기를 지닌 비교적 작은 분비소포들 이었다. 분비강내 분비소포의 대부분을 차지하는 크기가 10~20  $\mu\text{m}$ 에 달하는 큰 분비소포들은 imidazole 염색에 음성반응을 나타내었다. 이러한 사실은 분비강내 대부분의 소포는 cannabinoids를 축적하는 기능을 수행하고 일부 분비소포만이 큐티클 합성에 필요한 재료물질의 이동을 위한 역할을 하고 있음을 보여 주는 것으로서 Mahlberg와 Kim (1992)의 연구를 뒷받침하는 매우 의미있는 연구 결과라고 사료된다.

한편, Fig. 4와 같이 분비세포의 세포질에 있어서도 구형의 작은 분비물질이 imidazole 염색에 양성반응을 나타내었고 전자밀도가 높았지만, 크기가 비교적 크고 불규칙한 형태의 분비물질은 음성반응을 나타내었고 전자밀도는 낮았다. 전자밀도가 높은 작은 크기의 분비물질은 분비강내에서 양성반응을 나타내었던 분비소포의 분비물질과 같은 종류일 것으로 사료된다. 본 연구에 있어서 이들 양성반응을 나타내는 분비물질의 합성장소가 색소체인지는 확실하게 밝히지 못하였다. 다만, cannabinoids의 분비와 더불어 큐티클 형성에 관여하는 물질은 분비강 형성 이후에도 분비세포에서 관찰되는 것으로 보아 지속적으로 분비되고 있음을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- Angermuller S, Fahimi HD: Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy, *Histo J* 14 : 823-835, 1982.
- Attias M, Desouza W: Fine structure and cytochemistry of *Phytomonas davidi*, *J Submicrosc Cytol* 17(2) : 205-212, 1985.

- Franke H, Dargel R: Morphometric studies on lipoprotein particles in developing rat liver and their corticosteroid-induced changes during the late gestational period, *Cell Tissue Res* 242: 661–667, 1985.
- Hammond CT, Mahlberg PG: Morphogenesis of capitate glandular hairs of *Cannabis sativa* from scanning electron microscopy. *Amer J Bot* 64: 1023–1031, 1977.
- Hammond CT, Mahlberg PG: Ultrastructural development of capitate glandular hairs of *Cannabis sativa* L. *Amer J Bot* 65: 140–151, 1978.
- Lanyon VS, Turner JC, Mahlberg PG: Quantitative analysis of cannabinoids in the secretory product from capitate-stalked glands of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) *Bot Gaz* 142: 316–319, 1981.
- Kim ES, Mahlberg PG: Secretory cavity development in glandular trichomes of *Cannabis sativa* (Cannabaceae), *Amer J Bot* 78(2), 220–229, 1991.
- Kim ES, Mahlberg PG: Glandular cuticle formation in *Cannabis* (Cannabaceae), *Amer J Bot* 82(10): 1207–1214, 1995.
- Kim ES, Mahlberg PG, 1997a. Immunochemical localization of tetrahydrocannabinol (THC) in cryofixed glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabaceae), *Amer J Bot* 84(3): 336–342.
- Kim ES, Mahlberg PG: Plastid development in disk cells of glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabaceae), *Mol Cells* 7(3): 352–359, 1997b.
- Mahlberg PG, Kim ES: Cuticle development on glandular trichomes of *Cannabis sativa* (Cannabaceae), *Amer J Bot* 78(8): 1113–1122, 1991.
- Mahlberg PG, Kim ES: Secretory vesicle formation in glandular trichomes of *Cannabis sativa* (Cannabaceae), *Amer J Bot* 79(2): 166–173, 1992.
- Nibbering PH, Furth RV: Microphotometric quantitation of reaction product of several indirect immunoperoxidase methods demonstrating monoclonal antibody binding to antigens immobilized on nitrocellulose, *J Histo & Cyto* 35(12): 1425–1431, 1987.
- Soares MJ, De Souza W: Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study, *J Submicrosc Cytol Pathol* 20(2), 349–361, 1988.
- Thiery G, Bernier J, Bergeron M: A simple technique for staining of membranes with imidazole and osmium tetroxide. *J Histo & Cyto* 43(10): 1079–1084, 1995.
- Turner JC, Hemphill JK, Mahlberg PG: Quantitative determination of cannabinoids in individual glandular trichomes of *Cannabis sativa* (Cannabaceae), *Amer J Bot* 65: 1103–1106, 1978.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** A longitudinal section of glandular trichome with two secretory cells related to enlarged secretory cavity containing numerous secretory vesicles (SV). Wall material accumulated between secretory vesicles also occur in secretory cavity (arrows). Note the grey secretion in cytoplasm and vacuoles of secretory cells. N (nucleus), S (secretion), P (plastid). Bar = 3  $\mu$ m
- Fig. 2.** Secretory vesicles of different sizes are evident in the secretory cavity. The vesicles stained dark with imidazole (M) appear to contact the subcuticular wall. Highly electron-dense wax layer of cuticle (C) is evident. Bar = 500 nm
- Fig. 3.** A portion of secretory cavity showing electron-dense and small secretory vesicles (M) interpreted to represent lipophilic contents being transported from the cavity to the cuticle. Some of them appear to be fused each other. Bar = 1  $\mu$ m
- Fig. 4.** Secretory vesicles stained with imidazole (M) are evident in the cytoplasm of secretory cell. A negative reacted vesicle (SV) is also present upper right corner of the micrograph. Bar = 200 nm
- Fig. 5.** Control micrograph of secretory cell showing its numerous organelles such as mitochondria (T), polysomes, and plastids (P). Note the secretions (S) in the cytoplasm. Bar = 0.5  $\mu$ m





