

무미양서류 꼬리 퇴화과정중 피부 상피조직의 세포사에 관한 조직화학적 및 미세구조적 연구

이 혜 원, 문 명 진*

단국대학교 첨단과학대학 생명과학과 및 기초과학연구소

Histochemical and Fine Structural Visualization of the Epithelial Apoptosis in the Anuran Tadpole during the Tail Regression Stages

Hye-Won Lee and Myung-Jin Moon*

Department of Biological Sciences & Institute of Basic Sciences, Dankook University,
Cheonan 330-714, Korea

(Received April 14, 2009; Accepted June 19, 2009)

ABSTRACT

The programmed cell death of the cutaneous epithelial tissue during tail regression stages in anuran tadpoles of the black-spotted frog, *Rana nigromaculata* were visualized by the histochemical and transmission electron microscopic techniques. Metamorphic changes in the tail regression during the period of the Shumway stage number 31 to 33 are characterized by the disappearance of mucous layer and formation of compound epithelium through cutaneous thickening. Following the TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated d-uridine triphosphate nick end labeling) staining technique, the apoptotic cells were detected at the distal region of the tail skin initially, but they can be seen at the proximal region according to their following development. It has been also revealed that the number of the TUNEL-positive cells gradually increased from apical to basal direction of the epithelial layers during the tail regressing stages. Following the TEM observation, the early apoptotic cells shown in the epithelium demonstrated condensation and margination of the chromatin material at the nuclear periphery. Another epithelial apoptotic cells were shown nuclear fragmentation, membrane blebbing and cytoplasmic condensation. Following the process of the apoptotic degradation, well preserved organelles and nuclear fragments can be identified in the cytoplasm of lysosome-rich cells, however they soon reduced to lysosomal residual bodies through the progressive degradation.

Keywords : Apoptosis, Frog tadpole, TEM, TUNEL, Metamorphosis, *Rana nigromaculata*

서 론

일반적으로 세포의 사멸과정은 세포괴사(necrosis)와 세포
자멸사(apoptosis)와 같은 두 가지 경로에 의해 일어난다. 세

포괴사는 저산소증(hypoxia)이나 상처, 바이러스 감염 등의
외부적 자극에 의해 세포막에 회복 불능의 손상이 초래되었
을 때 생겨나는 반응이며, 세포자멸사는 발생과정중 호르몬
자극에 대한 반응이나 T 림파구와 NK 세포의 작용에 의한
것으로 생리적 환경의 변화로 인해 핵의 변형이 일어나면서

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

결국 세포의 사멸이 유발되는 현상이다(Wyllie et al., 1980; Searle, 1982; Thompson, 1995).

세포자멸사는 예정된 세포사멸 (programmed cell death) 과정으로도 해석되는데, 수명을 다한 세포가 사전에 이미 준비된 상황에서 사망 프로그램을 가동시킴으로써 능동적인 죽음을 맞이한다는 개념이다(Ellis et al., 1991; Jacobson et al., 1997). 이는 특정 발생과정이나 성체 단계에서 적절한 수의 세포와 적절한 형태의 구조를 유지하기 위한 상호작용으로 해석되며, 정상적인 발생과정과 항상성을 유지하기 위해 여분의 세포들이 도태됨으로써 세포분열과 세포사멸의 균형을 유지하게 되는 것이다(Hengartner & Horvitz, 1994a, b).

다세포 생물에서 몸체를 구성하는 각 세포의 존재 가치는 세포 개개의 생존에 있는 것이 아니라 개체의 효율적 생존에 기반을 두고 있기 때문에 세포자멸사라는 정교한 기전에 의한 능동적인 세포사멸 과정은 개체의 생존을 위한 고도의 전략으로 해석되기도 한다(Wyllie et al., 1980; Wyllie, 1987). 이들 세포사의 과정은 연관된 단백질분해효소들 사이의 뚜렷한 차이에 의해 생화학적으로 구분할 수 있지만, 초기에 나타나는 형태적 차이에 의해서도 구별이 가능한 것으로 알려지고 있다(Kerr et al., 1974).

세포괴사(cell necrosis)는 느슨한 짜임새의 염색질 가장자리 응집과 리보솜의 분산을 동반한 과립세포질세망의 확장, 그리고 미토콘드리아의 팽창이 일어나 결국 핵막과 세포소기관 및 세포막의 파괴 현상으로 나타나는 반면(Wyllie et al., 1980; Wyllie, 1987), 세포자멸사는 세포의 응축(condensation)과 분절(fragmentation), 세포핵의 농축 현상인 염색질의 핵막 편중 등의 미세구조적 특징을 보이며, 세포소기관은 외형을 간직한 채 apoptotic body를 형성하여 주변의 다른 세포에 의해 포식(phagocytosis)되는 양상을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Kerr et al., 1974; Gavrieli et al., 1992).

다세포로 구성된 기관에서 발견되는 생리적 세포사에 관한 관찰은 Vogt (1892)가 양서류 *Alytes obstetricians* 발생 과정에서 최초로 보고한 이후, Kerr 등(1972)은 쥐 유방암 세포가 죽을 때 핵물질이 서로 엉키며 침전하는 단계와 핵이 수축하는 단계, 그리고 염색체가 과립으로 잔존하다 사라지는 세 단계의 사멸과정을 관찰하고 이를 apoptosis라 명명하였다. 이후 apoptosis가 태생기나 성숙기 모두에서 불필요한 세포들을 제거하기 위한 중요한 기전임이 인식되어 이와 관련된 활발한 연구가 진행되고 있다.

본 연구는 무미 양서류의 변태과정중 피부 상피의 조직학적 변화에 수반되는 예정된 세포사멸 과정을 규명하기 위하여 국내에 서식하는 참개구리(*Rana nigromaculata*) 유생을 실험재료로 꼬리의 퇴화가 진행되는 발생단계의 시료를 선별하여 세포자멸사의 과정을 관찰하였다. TUNEL 염색기법을 통해 세포자멸사가 진행중인 세포들을 조직화

적으로 확인하였으며, 고배율의 투과전자현미경 관찰을 통해 세포자멸사에 의해 초래된 상피의 미세구조적 특성과 세포소기관의 변화를 중점적으로 관찰하였다.

재료 및 방법

충청남도 천안시 안서동 일대에서 채집한 참개구리(*Rana nigromaculata*) 유생을 실험실의 항온($25 \pm 2^\circ\text{C}$) 수조에서 사육하며, 꼬리의 퇴화가 진행되는 변태기의 시료를 발생단계에 따라 제작하였다. Shumway (1940)에 의해 제시된 개구리 발생단계 중에서 제31단계에서 제33단계까지의 유생을 선별하여 퇴화중인 꼬리부분으로부터 조직을 적출하여 본 실험에 사용하였다.

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated d-Uridine triphosphate Nick End Labeling) 염색은 세포자멸사가 진행되는 세포에서 DNA 분절이 일어난다는 현상을 이용하여 이를 조직화학적으로 확인하기 위해 사용되는 방법이다(Gavrieli et al., 1992; Negoescu et al., 1996, 1998). 적출한 조직을 4% paraformaldehyde (4°C , pH 7.4, in 0.1 M phosphate buffer)에 고정된 후, 흐르는 물로 수세하고 ethyl alcohol로 탈수하였으며 xylene으로 치환 후, Paraplast Plus medium (Polysciences Co., USA)에 포매하였다. 포매가 끝난 시료는 절편제작기(microtome)를 이용하여 $4\mu\text{m}$ 두께의 절편을 제작하고, 젤라틴이 코팅된 슬라이드 글래스에 부착하였으며, xylene 용액으로 탈파라핀(deparaffin)하고, ethyl alcohol 용액을 이용하여 친수화 처리하였다.

친수화가 완료된 시료는 0.05 M PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) 용액으로 수세한 다음, proteinase K로 처리하고, absolute ethanol에 용해된 3% hydrogen peroxide로 실온에서 처리하였다. 이어서 0.05 M PBS에 다시 수세하고, TdT equilibration buffer로 실온에서 15분 처리한 후, 다시 37°C 에서 1시간 반응시켰다. 처리가 끝난 시료는 stop buffer로 반응을 정지시키고, 0.05 M PBS로 수세한 후, blocking buffer로 처리하였다. 다시 conjugate로 처리하고, 0.05 M PBS로 수세한 후, 3,3-diaminobenzidine (DAB) 용액으로 발색 처리하였다. 반응이 끝난 시료는 증류수로 수세하고 methyl green으로 대조염색(counterstain)한 후, ethyl alcohol 농도 상승순으로 탈수하고 xylene 용액에 담갔다가 Permount mounting medium을 도포하고 커버 글래스를 덮은 다음, 화상처리장치가 부착된 복합현미경으로 관찰하였다.

투과전자현미경용 시료는 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (4°C , pH 7.4, 0.1 M phosphate buffer) 혼합용액에서 전고정(pre-fixation)하고, 완충용액 (4°C , pH 7.4, 0.1 M phosphate buffer)으로 수세한 후, 1% OsO_4 (4°C , 0.1 M phosphate buffer) 용액으로 약 2시간 후고정(post-fixation)하였다. 이를 다시 동일 완충용액으로 3회 수세한 후, 농도 상승순의

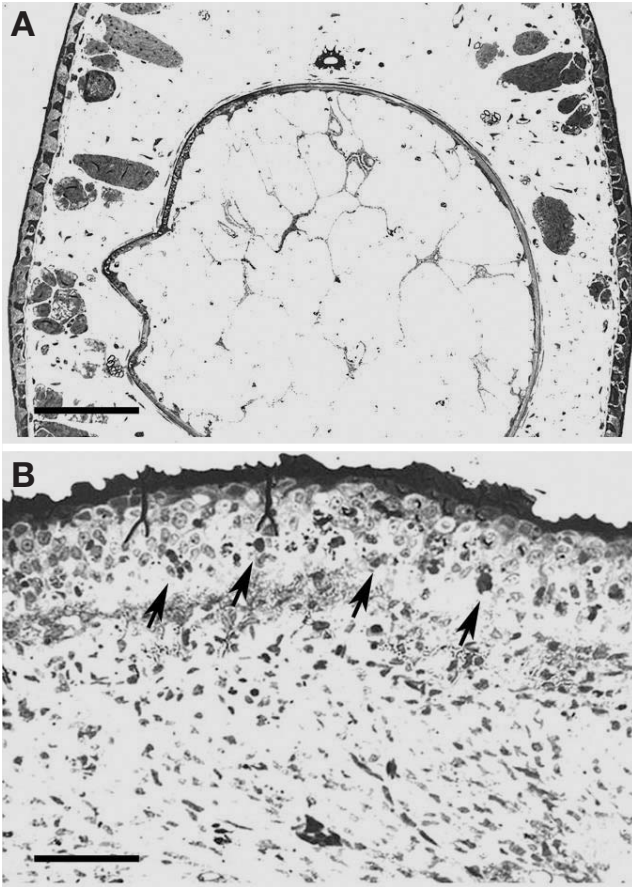


Fig. 1. Light micrographs of the cutaneous epithelial tissue. A: Transverse section of the tail in the Shumway stage 31. Apoptotic bodies in the epithelial tissue are indicated by arrows. B: Transverse section of the tail in the stage 33. The epidermal tissue became multi-layer more than the earlier stages. Note the apoptotic bodies (arrows) in the epidermal tissue. Scale bars indicate 100 μm (A) and 20 μm (B), respectively.

ethyl alcohol 용액으로 탈수하였으며, propylene oxide로 치환한 후 EM Poly/Bed 812 (Polysciences Co., USA) 혼합용액으로 포매하여 60°C의 진공건조오븐에서 중합하였다.

포매가 완료된 시료는 LKB ultramicrotome으로 0.5 μm 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 이중 염색하여 JEM 100CX-II형 투과전자현미경(JEOL Co. Ltd., Japan)으로 80 kV의 가속전압에서 관찰하였다.

결 과

전자현미경 관찰을 위해 제작한 시편을 준초박절편(semi-

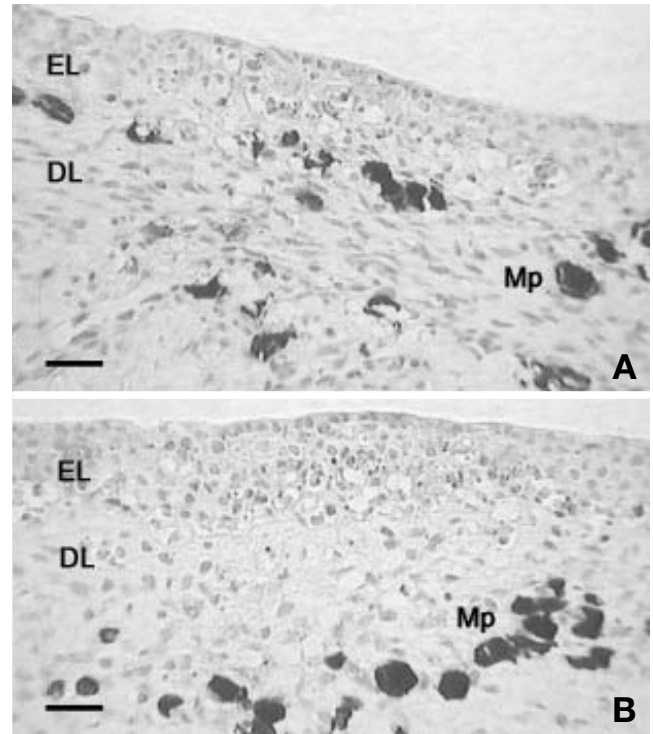


Fig. 2. Light micrographs of the TUNEL stain and negative stain along the transverse section of the tail in the stage 33. The epithelial cells of both of anterior (A) and posterior (B) portions have the apoptotic bodies. DL: dermal layer, EL: epidermal layer, Mp: melanophores. All scale bars indicate 25 μm .

thin section)으로 제작하여 toluidine blue로 염색하여 관찰한 결과, 개구리 변태과정중 꼬리 퇴화가 시작되는 발생 31 단계의 개구리 유생의 피부는 중층입방상피로 이루어져 있었고, 표면에는 점액층이 발달되어 있었다. 상피의 세포층은 기저판(basal lamina)과 연결된 한 층의 기저세포층과 상부의 입방세포층으로 이루어져 있었다(Fig. 1A). 전 단계에 비해 꼬리의 퇴화과정이 현저한 발생 32 단계의 시료에서는 꼬리가 차지하던 비율이 전 단계에 비해 1/3 이하로 줄어들었으며, 두 층으로 구분되던 상피조직의 층상구조가 세포층의 증가에 따라 불규칙하고 비후된 형태로 관찰되었다(Fig. 1B).

꼬리의 퇴화과정이 마무리되는 발생 33 단계의 개구리 피부에서는 상피의 두께가 더욱 비후되었으며, apoptotic body를 형성한 세포들의 수가 급격히 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 세포자멸사에 의한 상피의 조직화학적 변화를 확인하기 위하여 TUNEL 염색을 시행한 결과, 특히 이 단계의 시료에서는 상피 표면의 점액층이 소실되었고 기저부의 세포층에서는 상피세포의 핵과 세포질이 응축되어 apoptotic body를 형성한 세포들이 관찰되었으며, TUNEL 염색을 하지 않은 대조군의 조직과 비교한 결과, 이들 세포의 양성반응이 조직 특이적임을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

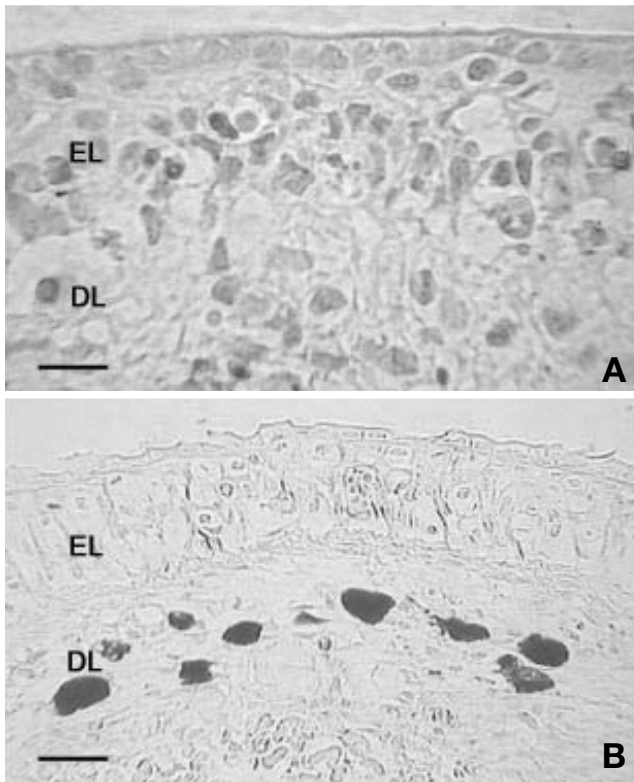


Fig. 3. Light micrographs of the TUNEL stain and negative stain along the transverse section of the tail in the stage 33. A: Higher magnification reveals the apoptotic bodies in the epithelial cells. B: Control negative stain for the TUNEL reaction. DL: dermal layer, EL: epidermal layer. Scale bars indicate 10 μm (A) and 25 μm (B), respectively.

발생 31 단계의 개구리 상피의 경우 최상부에 위치한 일부 세포에서 약한 양성반응이 나타났으나 기저층의 상피세포에서는 양성반응이 관찰되지 않았다(Fig. 4A). 또한 양성반응이 나타난 세포들을 고배율로 확대하여 관찰한 결과, 특이적인 핵의 응축이나 분절 현상 등은 확인되지 않았다. 이 시기의 개구리 유생 상피에서는 기저부의 세포층에 비해 내강부의 상피세포층 분화가 매우 현저하여 여러 층의 입방상피세포들이 출현하였는데, 이들은 퇴화가 일어나기 시작하는 꼬리의 모든 부분에서 비교적 규칙적인 배열을 유지하였다(Fig. 5A).

꼬리의 퇴화과정이 급격하게 진행되는 발생 32 단계의 조직 표본에서도 몸통 쪽의 근위부 상피에서는 이전 단계에서 관찰된 결과와 유사한 조직학적 특성을 보였으나, 원위 말단부의 꼬리 상피에서는 세포층의 배열이 보다 조밀한 상태 분화되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). TUNEL 염색 결과, 상피의 최외각층에 위치한 세포에서 강한 양성반응이 관찰되었고, 기저판과 접한 일부의 세포들을 제외한 대부분의 상피세포에서도 양성반응이 확인되었다. 최외곽에

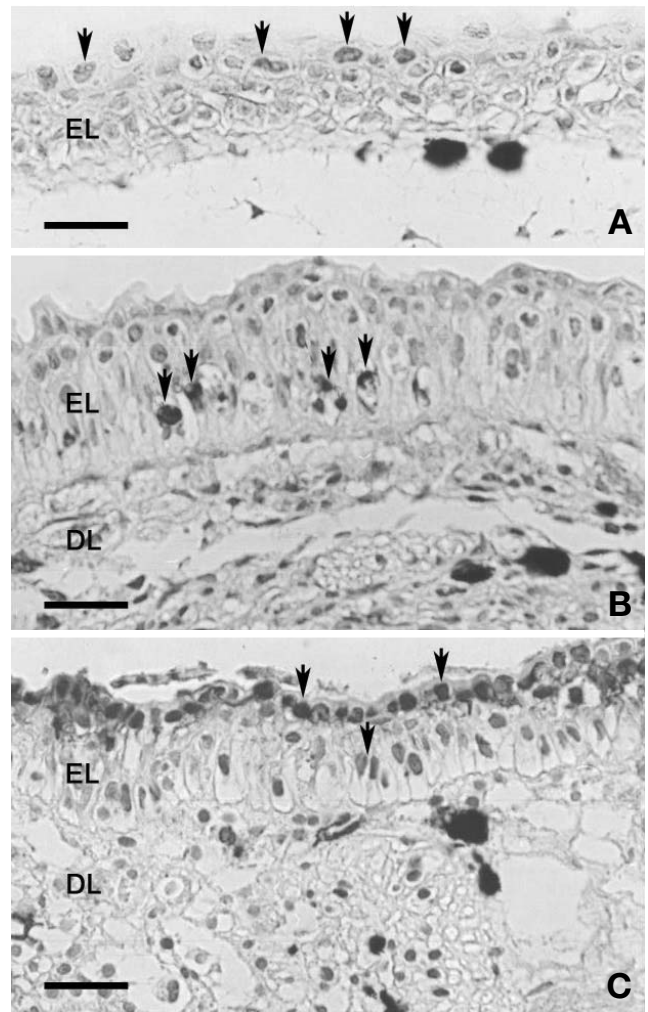


Fig. 4. Light micrographs of the TUNEL stain in transverse section of the tail from stage 31 to 33. A: The epidermis of anterior portion in the stage 31. B: The epidermis of anterior portion in the stage 32. C: The epidermis of posterior portion in the stage. Irregular change at the surface of epithelial tissue can be seen. Arrows indicate the TUNEL-positive apoptotic cells. DL: dermal layer, EL: epidermal layer. All scale bars indicate 25 μm .

분포된 상피의 층상 배열은 다소 불규칙하였고, 기저판에 접한 상피세포층에서도 apoptotic body가 형성된 세포들이 일부 확인되었다(Fig. 5B).

꼬리의 퇴화과정이 종료되는 발생 33 단계의 개구리 피부에서는 유생시기의 상피배열이 사라지고 성체시기의 상피로 완전히 전환되었음이 확인되었다. 상피의 두께가 비후됨에 따라 상피층의 수도 급격히 증가하였고, 상피의 배열도 매우 조밀한 상태를 유지하였다(Fig. 4C). 상피세포층 전역에 걸쳐 핵과 세포질의 응축이 뚜렷한 세포들이 다수 출현하였고, 분절된 핵을 가진 상피세포들도 확인되었으며, 기저층의 상피에서는 핵의 응축과 분절화로 인해 세포질이 소

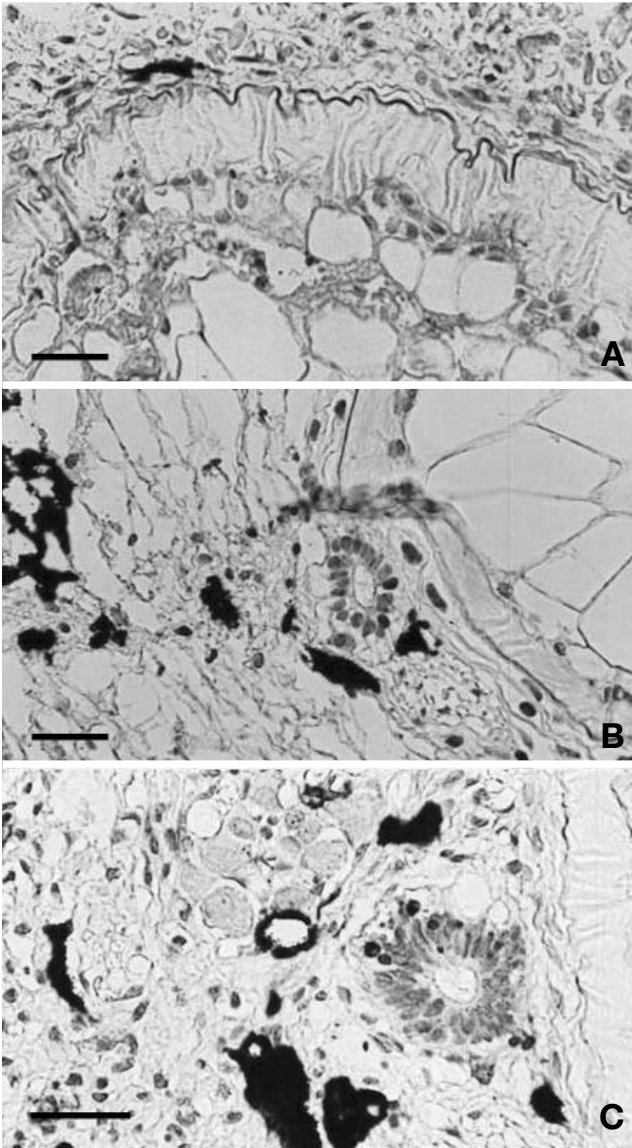


Fig. 5. Light micrographs of the TUNEL stain in transverse section of the tail from stage 31 to 33. The TUNEL-positive cells appear brown and dark brown color. The normal cells are counter-stained with methylene green. A: The cutaneous layer of anterior portion in the stage 31. B: The skin of anterior portion in the stage 32. C: The skin of posterior portion in the stage 33. All scale bars indicate 20 μ m.

실된 세포들도 확인되었다(Fig. 5C).

미세구조적 특성을 관찰하기 위한 투과전자현미경 관찰에서 개구리 피부의 상피조직은 중층입방상피로 이루어진 규칙적인 배열을 하고 있었으며 상피세포 사이의 연결부에서는 세포질 돌기(cytoplasmic process)에 의한 세포간교(intercellular bridge)가 형성되어 있음이 관찰되었다. 또한 피부 상피세포의 연결부에서는 부착반(desmosome)이 매우 발달되어 있었고, 기저판과 기저상피세포의 세포막이 접하는 부분에는 치밀한 반부착반(hemidesmosome)이 형성되어

있었다. 기저판과 접한 기저상피세포들은 내강부의 상피세포보다 전자밀도가 비교적 낮고, 굴곡이 많은 난형의 핵에는 진정염색질(euchromatin)이 발달되어 있었으며, 세포질에는 미세섬유가 조밀하게 분포되어 있었다(Fig. 6A).

반면, 내강부의 상피세포는 기저부의 상피에 비해 전자밀도가 비교적 높았고, 굴곡이 많은 타원형의 핵에는 이질염색질(heterochromatin)이 발달되었으며, 핵 주변부에는 잘 발달된 조면소포체(rough endoplasmic reticulum)가 풍부하게 함유되어 있었다(Fig. 6B). 고배율의 투과전자현미경 관찰을 통해 세포자멸사에 의해 초래된 상피의 미세구조적 특성과 세포소기관의 변화를 관찰한 결과, 꼬리의 퇴화가 시작되는 발생 31 단계의 피부 상피에서는 리소좀(lysosome)을 다수 포함하는 세포들이 관찰되었다. 이 세포들은 주로 기저판에 접한 기저부의 상피층에서 출현하였으며, 세포질 내부에 미세섬유가 발달되지 않았고, 미토콘드리아와 조면소포체, 골지체, 자유 리보솜(free ribosome), 지방 방울(lipid droplet) 등이 발달되어 있었다. 또한, 미세섬유가 발달된 다른 상피세포와는 달리, 세포 연결부에서는 부착반이 관찰되지 않았다(Fig. 6B).

꼬리의 퇴화가 본격화되면서 세포사의 과정이 활발하게 나타나는 발생 32 단계의 조직 표본에서는 가장 먼저 세포간교에 의해 유지되던 세포의 연결부가 심하게 변형되어 세포간극(intercellular space)이 사라지면서 인접세포와 밀착되는 현상이 관찰되었다. 핵은 핵막이 불규칙하게 변형되었으며, 세포질에서는 자유 리보솜이 현저하게 증가하는 것으로 관찰되었다(Fig. 7A). 발생 33 단계의 조직 표본에서는 핵의 분절이 일어난 후, 미세섬유가 응축되어 apoptotic body를 지닌 세포들이 나타나는데, 이들은 최종적으로 라멜라 구조를 지닌 잔여소체(residual body)를 형성하였다(Fig. 7B).

고 찰

조직을 구성하는 세포의 수와 활성이 갑작스럽게 변화하는 것은 호르몬에 의존하는 조직들의 공통적인 특징으로, 프로그램된 세포의 자멸사(apoptosis) 역시 다른 세포에 의해 분비되는 신호물질에 의해 활성화되거나 억제됨이 알려져 있다(Wyllie, 1987; Schwartzman et al., 1993). 퇴화중인 양서류 꼬리 조직에서는 상피세포에 의해 콜라겐 분해효소(collagenolytic enzyme)가 분비되고 간층세포에서 hyaluronidase가 분비된다는 사실이 밝혀졌으며(Eisen & Gross, 1965), 갑상선호르몬(thyroid hormone) 또한 양서류의 변태 과정에서 꼬리 퇴화에 필수적이라는 사실이 보고되었다(Gona, 1969; Hamburgh, 1981; Brown & Cai, 2007).

일반적으로 피부의 상피조직은 무미 양서류의 변태과정에서 리모델링되는 수많은 조직들 중의 하나로서 개구리

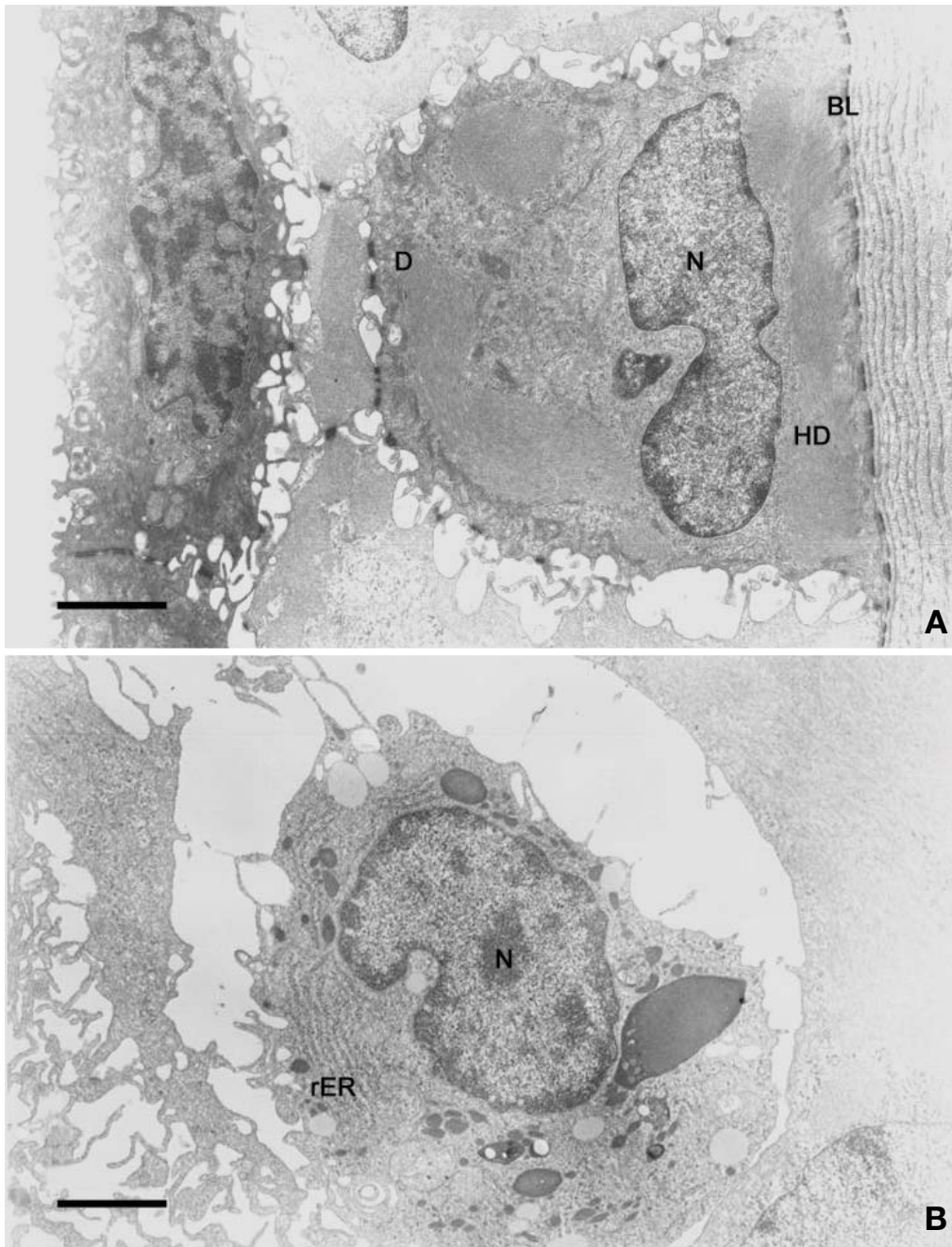


Fig. 6. Transmission electron micrographs of the normal cutaneous epithelial cells in the stage 31. A: Microfibril-rich cells are the predominant cell type in normal epithelial layer which adjoined with basal lamina (BL). B: Lysosome-rich cells appeared among the microfibril-rich cells in the epithelium. D: desmosome, HD: hemidesmosome, N: nucleus, rER: rough endoplasmic reticulum. All scale bars indicate 2 μ m.

유생의 표피는 두층 또는 세층의 세포들로 이루어져 있고, 진피의 콜라겐 층과 연결되어 있다(Eisen & Gross, 1965; Schreiber & Brown, 2002; Brown & Cai, 2007). 변태시에 갑상선호르몬의 분비가 활발해지면 상피의 외부에 있던 두층의 세포들은 세포자멸사에 의해 도태되고(Das et al., 2002; Schreiber & Brown, 2002) 기저부의 세포층이 원기세포가

되어 개구리 성체의 표피조직을 구성하게 된다(Niki et al., 1982; Nishikawa & Yoshizato, 1986; Yoshizato, 1992; Suzuki et al., 2001).

변태직전의 개구리 진피는 콜라겐 라멜라층과 섬유원세포층, 그리고 흑색소세포 등으로 구성되어 있는데(Holbrook, 1983; Robinson & Heintzelman, 1987), 꼬리조직의 퇴화과정

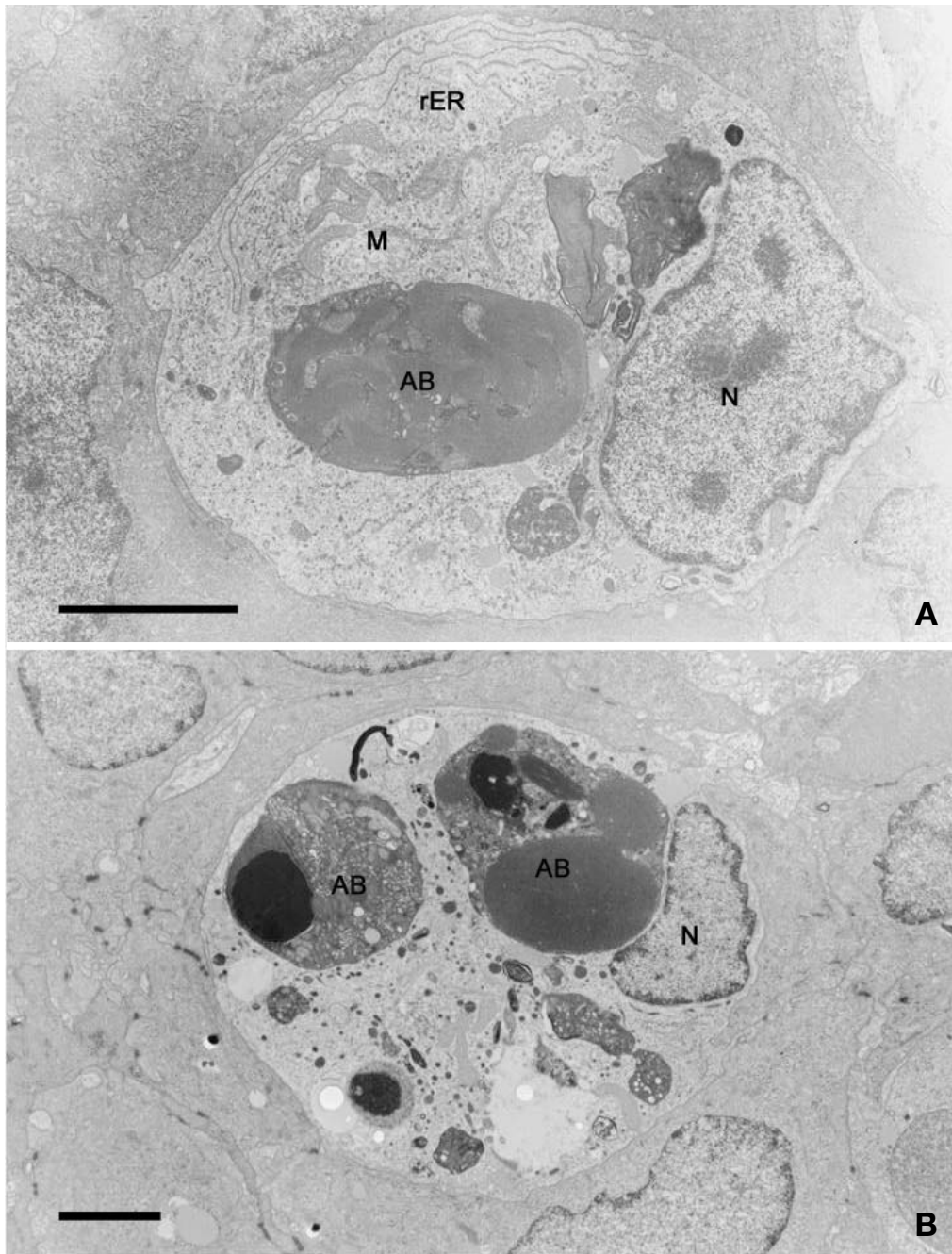


Fig. 7. Transmission electron micrographs of the normal cutaneous epithelial cells in the stage from 32 to 33. A: In the stage 32, the microfibril-rich cells are the predominant cell type in normal epithelial layer which adjoined with basal lamina (BL). B: In the stage 33, nuclear fragments and residual bodies (RB) can be identified in the cytoplasm of the lysosome-rich cells. AB: apototic body, M: mitochondria, N: nucleus, rER: rough endoplasmic reticulum. All scale bars indicate 2 μ m.

에는 갑상선호르몬과 hyaluronidase가 주된 역할을 수행하며, 이때 꼬리의 상피조직을 제거하면 이들 물질의 분비가 중지되어 퇴행과정의 진행이 종료된다는 사실이 보고된 바 있다(Niki et al., 1982; Schreiber & Brown, 2002). 개구리 유생과 성체의 피부에서 가장 현저한 차이점은 유생시기의

표피를 구성하는 모든 세포들이 세포분열하는 반면, 성체에서는 단지 기저부의 세포들만이 분열하는 것으로 알려져 있는데 (Robinson & Heintzelman, 1987; Brown & Cai, 2007), 유생시기의 분열특성은 태생기 포유동물의 표피 분열방식과 동일하고, 성체시기의 분열은 모든 척추동물의 표피에서

공통적으로 관찰되는 분열방식과 일치함을 알 수 있다(Holbrook, 1983).

본 실험을 통해, 참개구리 유생에서 진행되는 꼬리의 퇴화과정도 상피조직에서부터 시작된다는 사실을 TUNEL 염색과 발생단계에 따른 조직 시료의 투과전자현미경 관찰 결과를 통해 확인할 수 있었다. 퇴화중인 꼬리의 피부 상피에서 자멸사가 진행되는 세포들은 초기에 퇴화중인 꼬리의 말단부로부터 나타나기 시작하여 점차 몸통 쪽으로 이행되었으며, 조직학적으로는 상피의 표면부로부터 기저부로 이행됨이 확인되었다.

TUNEL 염색법은 일반적으로 핵산의 말단 부위를 표지하여 DNA의 분절현상을 탐지하는 유용한 실험법으로 apoptosis에 의한 예정된 세포사를 탐지하는 주요 실험법으로 정착되었다. 이 분석법은 마커로 미리 표지시킨 dUTPs에 첨가반응을 촉매하는 디옥시뉴클레오티드 전환효소(terminal deoxynucleotidyl transferase)를 처리함으로써 분절이 일어난 DNA의 홈결(nicks)을 탐지하는 방법에 기초를 두고 있으며(Garvrieli et al., 1992), 개발 초기에는 세포 괴사가 일어난 세포들까지 염색되는 문제점이 발생하여 그 정확성에 의구심이 제기되기도 하였으나(Grasl-Kraupp et al., 1995), 그 이후 실험방법의 획기적인 개선이 이루어져 적절히 처리할 경우 세포자멸사가 확연히 진행된 후기단계의 세포들만 선별적으로 탐지할 수 있는 유용한 실험법으로 자리잡게 되었다(Negoescu et al., 1996, 1998).

꼬리퇴화과정이 시작되는 발생 31 단계의 조직표본의 경우, TUNEL 염색에 양성반응을 보이는 세포들에 대한 미세구조 관찰에서 핵과 세포질의 응축이나 분절이 나타나지 않는 것으로 미루어 세포자멸사의 초기 과정은 세포들이 형태적인 변화를 보이기 이전부터 이미 시작되며, 생리적인 변화가 형태적 변화에 선행한다는 사실을 확인할 수 있었다.

또한, 꼬리의 퇴화가 진행되는 발생 32 단계에서 꼬리의 중간부 상피는 전 단계인 발생 31 단계의 상피와 유사한 배열을 보이지만, 상피의 세포층이 더욱 분화되어 중층을 이루고 있음이 확인되었다. 또한, 상피의 층상구조를 비교한 결과에서도 표면부의 상피층 배열이 불규칙하게 변형되었고, 상피세포층에서는 apoptotic body의 출현이 다수 관찰되었다. 이런 변화가 일어나는 주된 이유는 꼬리의 퇴화과정에서 꼬리의 중간부에 위치한 진피층이 축소되고 꼬리의 길이가 짧아짐에 따라 말단부의 상피가 몸통 쪽으로 이행된 결과로 해석된다.

일반적으로 세포자멸사가 진행중인 세포의 핵에서는 DNA의 분절이 일어나므로 이를 확인하는 방법으로 DNA 전기영동법이 이용되고 있지만, DNA 전기영동의 결과가 항상 일치하는 것은 아니라는 지적이 빈번하게 대두된 바 있다(Cohen et al., 1992; Collins et al., 1992; Oberhammer et al., 1993). 따라서 세포자멸사가 진행중인 세포를 확인하기 위

해서는 기존의 DNA 전기영동법과 병행하여 핵의 분절이나 세포의 미세구조 변형을 형태적인 측면에서 활용하는 것이 매우 효과적일 것으로 사료된다.

전자현미경을 이용한 미세구조 관찰의 결과, 상피에서 초래되는 세포자멸사의 형태적 특징은 DNA의 분절과 함께 시작되고 뒤이어 핵의 응축이 진행되는 것으로 나타났다. 이는 세포자멸사로 죽어가는 세포에서는 뉴클레오솜 사이에서 DNA가 무작위적으로 절단되는 현상인 DNA의 단편화가 일어나기 때문인데(Wyllie et al., 1980), TUNEL 염색에서 양성반응을 보인 세포나 조직의 일부가 전자현미경적 미세구조에서 정상적인 상태를 유지하고 있는 주된 이유는 핵이 응축되는 형태적인 변화에 앞서 DNA 분절이라는 생화학적 변화가 먼저 일어나기 때문인 것으로 유추된다.

퇴화의 마지막 단계인 발생 33 단계의 조직표본에서는 세포들의 퇴화과정이 진행되면서 상피 전역에 걸쳐 핵과 세포질이 응축되어 변형된 상피세포들이 광범위하게 출현하였다. 이는 세포자멸사를 겪는 세포나 조직에서 일반적으로 확인할 수 있는 전형적인 형태적 변형으로(Brown & Cai, 2007), 세포자멸사 과정이 진행됨에 따라 점진적으로 분절된 핵을 가진 상피세포들이 증가하였고, 기저층의 세포들에서는 핵의 응축과 분절화로 인한 세포의 공동화 현상도 관찰되었다. TUNEL 염색을 통해 확인한 결과에서도 양성반응을 보이는 세포의 핵과 apoptotic body가 함께 관찰되어 전자현미경 관찰 결과와도 일치하였다.

참 고 문 헌

- Brown DD, Cai L: Amphibian metamorphosis. *Dev Biol* 306 : 20-33, 2007.
- Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN: Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 286 : 331-334, 1992.
- Collins MK, Marvel J, Malde P, Lopez-Rivas A: Interleukin 3 protects murine bone marrow cells from apoptosis induced by DNA damaging agents. *J Exp Med* 176 : 1043-1051, 1992.
- Das B, Schreiber AM, Huang H, Brown DD: Multiple thyroid hormone-induced muscle growth and death programs during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *PNAS* 99 : 12230-12235, 2002.
- Eisen AZ, Gross J: The role of epithelium and mesenchyme in the production of a collagenolytic enzyme and a hyaluronidase in the anuran tadpole. *Dev Biol* 12 : 408-418, 1965.
- Ellis RE, Yuan J, Horvitz JR: Mechanism and Function of cell death. *A Rev Cell Biol* 7 : 663-698, 1991.
- Gavrieli 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.

- Gona AG: Light and electron microscopic study on thyroxine-induced *in vitro* resorption of the tadpole tail fin. *Z Zellforsch Mikrost Anat* 95 : 483-494, 1969.
- Grasl-Kraupp B, Ruttkey-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R: *In situ* detection of fragmented-DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21 : 1465-1468, 1995.
- Hamburg M, Kim Y: The significance of the latent period in thyroid hormone induced tissue regression during amphibian metamorphosis. *Dev Biol* 81 : 392-398, 1981.
- 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.
- Holbrook KA: Biochemistry and Physiology of the Skin (ed. Hold-smith LA). Oxford Univ Press, pp. 64-101, 1983.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC: Programmed cell death in animal development. *Cell* 88 : 347-354, 1997.
- 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.
- 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.
- Niki K, Namiki J, Kikuyama S, Yoshizato K: Epidermal tissue requirement for tadpole tail regression induced by thyroid hormone. *Dev Biol* 94 : 116-120, 1982.
- Nishikawa A, Yoshizato K: Hormonal regulation of growth and life span of bullfrog tadpole tail epidermal cells cultured *in vitro*. *J Exp Zool* 237 : 221-230, 1986.
- Oberhammer F, Bursch W, Tiefenbacher R, Froschl G, Pavelka M, Purchio T, Schulte-Hermann R: Apoptosis is induced by transforming growth factor-beta 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA. *Hepatology* 18 : 1238-1246, 1993.
- Robinson DH, Heintzelman MB: Morphology of ventral epidermis of *Rana catesbeiana* during metamorphosis. *Anat Rec* 217 : 305-317, 1987.
- Schreiber AM, Brown DD: Tadpole skin dies autonomously in response to thyroid hormone at metamorphosis. *PNAS* 100 : 1769-1774, 2002.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA: Apoptosis: the biochemistry and Molecular biology of programmed cell death. *Endocrinol Rev* 14 : 133-151, 1993.
- 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.
- Suzuki K, Sato K, Katsu K, Hayashita H, Kristensen DB, Yoshizato K: Novel *Rana* keratin genes and their expression during larval to adult epidermal conversion in bullfrog tadpoles. *Differentiation* 68 : 44-54, 2001.
- 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.
- Yoshizato K: Death and transformation of larval cells during metamorphosis of anura. *Dev Growth Differ* 34 : 607-612, 1992.

< 국문 초록 >

참개구리 (*Rana nigromaculata*) 꼬리 퇴화과정에 따른 피부 상피조직의 분화와 세포자멸사에 의해 초래된 상피의 미세구조적 변화를 TUNEL 조직화학적 염색 및 고배율의 투과전자현미경 관찰을 통해 확인하였다. 꼬리의 퇴화가 시작되는 Shumway 31 단계의 올챙이 피부에 발달되어 있던 점액층은 발생 32 단계를 거쳐 사라지고 상피는 비후되어 꼬리의 퇴화가 완료되는 발생 33 단계에 도달하면 성체인 개구리의 다층상피로 전환되었다. TUNEL 염색결과, 꼬리 퇴화과정중 apoptosis 세포의 출현은 원위부(distal region)의 꼬리에서 시작되어 몸통 쪽의 근위부(proximal region)로 이행되었고, 동일 상피층에서는 내강부로부터 기저부로 전이되는 특성을 보였다. 투과 전자현미경 관찰 결과, 세포자멸사에 의한 초기의 변형은 인접세포와의 세포간극이 사라지고 밀착된 후, 핵의 모양이 불규칙해지고 염색질이 응축되었다. 이어서 세포질에 다수의 자유 리보솜이 나타나고, 핵의 분절이 일어난 후, apoptotic body가 출현하며, 이들은 최종적으로 라멜라 구조를 지닌 잔여소체(residual body)를 형성하였다