

흰쥐 腺臟外分泌細胞의 走查電子 顯微鏡的 觀察

慶北大學校 醫科大學 痘理學教室

權 建 榮 · 郭 精 植 · 孫 泰 重

= Abstract =

Scanning Electron Microscopy of the Ultrastructure of Pancreatic Acinar Cells

Kun Young Kwon, M.D., Jyong Sik Kwak, M.D. and Tae Joong Sohn, M.D.

Department of Pathology, Kyungpook National University, School of Medicine, Taegu, Korea

Several methods of tissue preparation and different modes of operation of the scanning electron microscope were used to study the ultrastructure of cells. The author examined ultrastructure of rat pancreatic acinar cells prepared by Osmium-DMSO-Osmium and subsequent cracked with razor blade, and discussed the scanning electron microscope images in comparison with light microscopic and transmission electron microscopic findings. The results were as follow.

The ultrastructure of pancreatic acinar cells prepared by Osmium-DMSO-Osmium method was well exposed.

The transmission electron microscopy easily revealed the cellular organelles which were poorly visualized by light microscope.

The ultrastructures of pancreatic acinar cells studied by SEM were well correlated with results obtained by TEM. The surface of nuclear membrane was smooth. Mitochondria were round or elongated and had many cristae. RER arranged in lamellar pattern with occasional dilatation. Golgi complex was composed of vesicles, lamellae and vacuoles. The inner surfaces of above mentioned organelles revealed relatively granular textures. One important point revealed by cracked samples concerns the findings of spherical secretory granules within thin walled cavities, which suggestive of Golgi vesicle origin. These vesicles appear connected by small openings. It is suggested that they may represent a system of intercommunicating chambers(vacuoles).

緒 論

생물의 미세구조는 두파전자현미경과 초박절법의 발달에 의해 20수년 사이에 아주 미세한 구조까지 관찰할 수 있게 되었다.

여기서 생물의 윤곽이나 표면을 보는법, 즉 생물을 입체적으로 관찰하는 방법은 돌보기에서 시작하여 실체 현미경으로 진보하였으나, 그 이상의 진전은 오랫

접 수 : 1982년 11월 9일

동안 정지하고 있었다. 이와같은 상황중에 획기적인 수단으로서 주사전자현미경이 개발^{1,2)}되어 종래에 상상되어온 지식이 확인, 정정됨과 더불어 새로운 지식이 비약적으로 얻어져가고 있음을 잘 알려져 있다^{3~13)}.

주사전자현미경이 의학 및 생물학 방면에 도입된 것은 1962년부터이며¹⁴⁾, 처음에는 치아등의 단단한 조직이 관찰의 대상이 되었으나, 1967년경부터 점차로 혈액, 섬모, 결합조직등의 연구에도 이용¹⁵⁾되어 오다가 1970년대부터는 갑자기 연구자의 인구가 증가하고 거의 모든 조직의 표면관찰에 널리 이용되게 되었다¹⁶⁾.

주사전자현미경이 이와 같이 비교적 짧은 시기 동안에 널리 이용되게 된 그 이유는 대체적으로 다음 3가지 점이라 생각된다.

첫째로 광학현미경에 비해서 분해능이 매우 좋다는 것이다. 둘째로 시료제작이 간단하다는 것이다. 투파전자현미경에서는 시료를 전자가 통과하지 않으면 안되기 때문에 재료를 아주 쉽게 끓을 필요가 있다. 그런데 이 초박절편을 만든다는 것은 대단한 숙련이 요하고 어려운 일이다. 여기에 비해서 주사전자현미경의 그것은 block 체로 관찰할 수 있기 때문에 시료제작이 쉽다는 것이다. '셋째로 像이 입체적으로 보인다는 것이다. 이들 세 가지가 주사전자현미경 보급의 주된 원인¹⁶⁾이라 생각되는데, 그 밖에 주사전자현미경 자체의 기기의 진보 및 시료제작법의 발달도 들 수 있다. 즉 기계적인 면에서는 30 nm 이전 분해능이 3 nm 가 되었고¹⁷⁾, 시료제작면에서는 종래의 공기건조에서 critical point drying^{18,19)}으로 개량된 것을 들 수 있다.

그러나 주사전자현미경은 투파전자현미경에 비해서 기계적인 면이나 시료제작면에 있어서는 아직도 많은 문제점을 가지고 있다²⁰⁾. 특히 이들 중 의학생물학 영역에 종사하는 우리들에 있어서는 시료제작법의 확립이 가장 시급한 문제인데, 이에 대해 지금으로서는 관찰면의剖出(exposure)→乾燥(drying)→導電(conduction)이란 기본방향의 설정¹⁴⁾은 되었으나 이들에 대한 방법에 있어서는 연구자마다 조작방법이 다르기 때문에 이에 대한 지침서 조차없는 형편이다.

한편 우리나라에 있어서의 주사전자현미경의 현황은 이제 몇몇 의과대학에서 도입하여 연구를 시작하고 있는 실정이다. 이러한 현황이기에 저자는 최근에 개발된 세포내剖出法의 하나인 Osmium-DMSO-Osmium 법^{14,21)}으로 세포의 외표면 및 세포내부 구조물의 표면 구조를 알아보고자 우선 세포내 소기관중 특히 RER이 잘 발달된 체장의 외분비세포를 택하여 이를 투파전자현미경의 소견과 비교하여 보고, 주사전자현미경적 측면에서 체장의 미세구조를 재음미하고자 본 연구를 계획하였다.

材料 및 方法

실험재료는 체중 200~300 gm의 Wister 계 흰쥐의 체장을 사용하였다. 먼저 에-텔 마취하에 개복하여 복부 대동맥에 polyethylen tube를 역행성으로 삽입하여 250~300 ml의 생리적식염수를 주입하여 하대정맥을 끊어 탈혈하였다. 탈혈후 즉시 200~250 ml의 1%

glutaraldehyde(GA)를 20~30분에 걸쳐 주입하여 전고정을 하였다. 그후 M/15-phosphate buffer를 200~250 ml 주입하여 세척하였다. 이렇게 한후 체장을 절취하여 일부는 광학현미경 검사자료로, 다른 일부는 투파형 전자현미경의 자료로 나머지는 주사형 전자현미경 검사자료로 제공하였다.

광학현미경 자료는 Zenker 용액에 고정한후 hematoxylin-eosin 염색 및 phosphotungstic acid hematoxylin(P.T.A.H) 염색을 하였다.

투파형 전자현미경 자료는 1 mm³ 정도로 조직편을 잘라서 2.5% glutaraldehyde 용액에 2시간 전고정을 하고 후고정은 1% O₂O₄ 용액에 탈수는 계열 ethanol 으로, 침투는 propylene oxide로, 포매는 Luft 방법²²⁾에 의한 epoxy resin으로, 초박절은 Porter-Blum Ultramicrotome MT-2 B 및 MT-2를 사용하여 400~600 Å 으로 박절한후 Reynolds 법²³⁾으로 이중 전자염색을 하여 Hitachi Hu-11 C 전자현미경으로 관찰하였다.

주사형 전자현미경 자료는 1×1×5 mm 정도 크기의 block를 만들어 이것을 1% O₂O₄로서 후고정한 후 25% 및 50% dimethyl sulfoxide(DMSO)로 각자 1시간씩 침적하여 Eiko 회사제 TF-1 할단기를 사용하여 액체질소에 의한 냉각고정 후 면도칼로 할단하였다. 할단후 50%DMSO 액으로서 해동시켜, M/15 phosphate buffer로서 세척한 후 2.5% GA로 다시 후고정을 하였다. 후고정 후 증류수로서 세척하여 계열 에칠 알콜을 사용하여 탈수를 하고 isoamyl acetate로서 penetration을 한 후 Hitachi HCP-1형 임계점 건조기(critical point dryer)로서 dryice를 사용하여 임계점 건조를 하였다. 건조된 시료는 Eiko 회사제 IB-5형 ion coater에서 백금의 sputtering 증착을 한 후 Hitachi HFS-2ST 형 전계방사형 주사전자현미경(FEG-SEM) 및 Hitachi S-450형 주사형 전자현미경으로 관찰하였다.

成 繢

광학현미경적 소견 : 광학현미경으로 관찰하면 체장 선방은 보통 5개 내지 8개의 피라밋 모양의 세포들이 중심부의 선강을 향해 물러싸고 있다. 각 선방세포에서 첨단에 해당하는 부분을 첨단부(apical portion), 저변에 해당하는 부분을 기저부(basal portion)라 부른다. 핵은 기저부 가까이에 위치하며 둥글고 1개내지 3개의 핵소체(nucleolus)를 가지고 있다. 기저부는 호염기성을 정하며 첨단부는 호산성의 상당한 굴절성을

가지는 파립상을 보이고 있다.

투과형 전자현미경적 소견 : 광학현미경적으로 잘 관찰되지 않던 세포내 미세구조들이 투과형 전자현미경으로 더욱 상세히 볼 수 있었다(사진 1참조). 즉 핵은 둥글며 세포의 기저부에 위치하고 미세한 파립상의 염색질이 주로 핵막의 내면과 핵소체 주위로 분포되어 있으며 핵소체는 파립상 및 섬유성의 물질로 구성되어 핵의 변연부쪽으로 위치해 있다. 핵은 여러개의 pore를 가지며 때때로 RER(rough endoplasmic reticulum)의 cisterna와 연결된다. 세포의 기저부에는 층상구조의 RER로 빽빽히 차여져 있으며 이는 단백합성이 활성히 행해지고 있다는 것을 나타내고 있다. 쥐의 체장외분비 세포에서 RER은 평평한 망상을 정하고 다수가 평행해 있으며 절편으로 볼 때 보기 좋은 레스모양을 나타내고 있다. RER 상호간에는 가끔 교통하는 문합부가 관찰된다. 이 문합은 실제로 사진을 추적하여 때때로 볼 수 있는 것으로서 RER 전체로서는 하나의 연속된 통로를 형성하고 있는 것이라 볼 수 있다. 간혹 cisternal granule이라 부르는 분비파립과 유사한 전자밀도를 가진 파립들이 RER의 cisterna 내에 발견된다. RER과 함께 세포의 기저부에는 상당수의 mitochondria를 볼 수 있으며 이들은 많은 cristae를 가지며 matrix 내에 전자밀도가 높은 파립들을 포함하고 있다. Golgi 장치는 핵의 상단에 위치하며 막상, 층판상, 소포상 그리고 공포상으로 이루어져 있으며, 몇몇 Golgi 장치의 공포 또는 농축 공포내에는 중등도의 전자밀도를 가진 물질을 포함하여 분비파립 형성에 있어 이행기(transitional stage)를 나타내고 있다. 분비파립은 첨단부에 풍부하게 분포되어 있고 분비파립 내에는 체장 소화효소의 비활성 전구물질을 포함하면서 막으로 둘러싸여 있다. 체장 첨단부의 형질막으로부터 선강내로 돌출해 있는 미용모들도 관찰할 수 있다.

주사형 전자현미경적 소견 : Osmium-DMSO-Osmium 법²¹⁾으로 선방세포 표면 및 세포내 미세구조의 표면을 잘 부출하므로서 인근 세포들과의 관계와 함께 체장선방에 대한 3차원적인 입체상을 관찰할 수 있다. 또한 1 μm 얇은 절편을 만들어 methylene blue로 단염색한 것과 TEM을 이용하여 관찰한 소견들과 비교하므로써 주사형 전자현미경적 관찰에 많은 도움을 얻을 수 있다.

체장선방은 둥근형 또는 타원형의 기다란 세포들의 덩어리로 나타난다(사진 2참조). 체장 선방의 각 세포들은 불규칙한 타원형 또는 피라밋형으로 보이며 각 선방세포의 크기는 약 15~20 μm를 정한다. 이런 커다란 선방세포들은 가운데 크기가 보다 작은 세포를

간혹 볼 수 있는데 이것은 다각형 또는 입방형의 모양을 가지면서 구형의 파립들을 포함하지 않는 것으로 이보다 더 큰 선방세포와 구별이 가능하며, 이것을 centroacinar cell 또는 미성숙된 선방세포라 한다.

체장 선방세포의 한면을 관찰하면 기저부에 위치해 있는 파립상의 염색질을 가진 핵은 그 모양이 둥글며 핵표면은 대체로 매끈하고 전자밀도를 달리하는 핵소체는 핵의 변연부로 위치해 있다. 핵을 중심으로 주변에 잘 발달된 RER 및 mitochondria를 볼 수 있으며(사진 3참조) 배율을 높혔을 때 RER은 그 cisterna를 이루는 내강벽의 입체적인 구조를 관찰할 수 있다. 즉 내강의 면은 비교적 매끈한 편이며 약간의 파립상을 정하고 있고 내강이 확장되어 있는 것과 층판상의 배열을 하는 것을 관찰할 수 있고 일부 RER은 단열되기도 하고 어떤 RER들은 서로 연결하여 연속된 통로를 형성하는 것도 볼 수 있다. 그리고 핵 상부에는 층판상 또는 소포상을 겸한 Golgi 장치를 발견할 수 있으며(사진 4참조). 부분적으로 free ribosomes, lysosomes과 함께 세포질 내에 빈 공간들도 관찰할 수 있다. 체장 선방의 첨단부 위에서는 크기가 다양한 구형의 분비파립들이 선강을 향해 분포되어 있는 것을 볼 수 있다(사진 3참조). 배율을 높히면 이런 분비파립들의 대부분이 그 표면이 매끈하지 않고 약간 불규칙적이며 다양한 전자밀도를 가진 파립상의 물질에 의해 차여져 있음을 볼 수 있다. 또한 그 분비파립들을 담고 있는 공동들도 볼 수 있으며 이 공동들은 얇은 막으로서 그 벽을 이루고 있다(사진 3, 4참조). 이런 공동들은 전반적으로 둥글거나 다각형인 minialveolar chambers로 보인다. 비록 그 공동들이 전반적으로 얇은 벽으로 둘러싸여 있지만 때때로 조그만한 openings을 통해 이들이 서로 연결되는 것도 볼 수 있다(사진 4참조). 한편 선방세포의 기저면에서는 미세한 망상 및 교원섬유들로 덮혀 있으며 Osmium-DMSO-Osmium 법을 사용하므로서 이런 섬유들이 체장 선방세포와 잘 분리되어 본 실험에서 기저면에 일부 남아 있을 뿐이었다.

考 察

과거 주사형 전자현미경적 관찰에 대한 연구보고에서 blunt dissection technique²⁴⁾이나 boric acid²⁵⁾에 의한 방법으로 조직으로부터 세포들을 분리하는데 용이함을 보여주었고 Motta 등²⁶⁾의 연구에 의하면 상온에서 glutaraldehyde에 오랫동안 조직을 침적시킴으로

서 세포를 잘 분리시킬 수 있었다고 보고 했지만 저자가 실험한 결과로서는 Osmium-DMSO-Osmium 법²¹⁾을 사용함으로서 혈장 외분비세포내 미세구조의 표면을 잘 부출할 수 있었다. 그리고 과거의 주사형 전자현미경적 관찰에서 그려하였듯이 교원 또는 망상섬유들과 세포간 물질등이 관찰할려는 선방세포의 표면 및 세포내 미세구조의 표면을 흐리게 하였으나, Osmium-DMSO-Osmium 법을 사용함으로서 이들은 혈장 선방세포로부터 잘 분리되었고 기저면에 일부 남아있을 뿐이다. 그러나 간, 혈장, 타액선, 신, 첨막충등과 같은 비교적 결합조직이 적은 조직을 제외한 모든 기관 또는 조직에서도 관찰할려는 면의 부출이 가능한가는 앞으로 연구의 과제가 되고 있다.

광학현미경의 최대배율(1000X)로서도 관찰할 수 없었던 세포내 미세구조들은 투파형 전자현미경의 개발로 상세하게 밝혀지게 되었다²²⁾. 그러나 투파형 전자현미경적像是 평면상으로서 입체상을 얻는 것은 사실상 불가능하기 때문에 세포간 공간이나 세포 소기관들의 상호관계 그리고 세포의 표면 구조들에 대한 입체적 지식은 주로 serial sections을 한 것을 재건(reconstruction)하여 얻어진 결과에 의존하였다²³⁾. 그러나 주사형 전자현미경의 등장으로 세포표면 뿐만 아니라 세포내 소기관들의 표면구조에 대한 입체상도 쉽게 얻어질 수 있었으며 투파형 전자현미경적 소견과 비교하여 세포내 미세구조에 대한 새로운 지식을 얻을 수 있었다. 즉 본 실험 성적에서 투파형 전자현미경으로 선 및 점으로만 보이던 RER이 주사형 전자현미경에 의해 점으로 보이던 ribosome은 구형의 파립상으로서 ER 표면에 비교적 규칙적으로 부착되어 있었고 선으로 보이던 ER의 내강면은 매끈하면서 깊이가 있는 벽으로 이루어져 있으면서 약간의 파립상을 가지고 있었다. 투파형 전자현미경적으로 균질한 전자밀도를 가진 등근모양의 분비파립들은 주사형전자 현미경적으로 분비파립의 표면 및 할면이 파립상을 정하였고 이들 분비파립들이 빠져나간 공동의 벽은 얇은 막으로 되어있으며 투파형 전자현미경적 소견과 비교하여 보았을 때 그 얇은 막으로 둘러싸여진 공동의 벽은 Golgi 장치의 Vesicles에 속하는 것으로 추측된다²³⁾. 상기한 혈장외분비 세포의 주사전자현미경상은 저자와 같은 방법으로 관찰한 黑²⁴⁾의 성적과 일치하는 소견이다. 그러나 주사형 전자현미경적으로 관찰되는 분비파립들의 표면과 막 그리고 세포질내의 빈 공간에서 파립상을 정하는 소견은 세포질 성분에 대한 화학적 구성과 함께 고정액 또는 technical procedure의 상호작용으로 기인된 artifact일 가능성

도 전혀 배제할 수 없다.

要 約

저자는 혈장 외분비 세포의 소기관의 표면 구조를 Osmium-DMSO-Osmium 법을 이용하여 주사전자현미경으로 관찰하고 이와 아울러 광학현미경 및 투파형 전자현미경 소견과 비교하여 보고 일은 성적을 요약하면 다음과 같다.

Osmium-DMSO-Osmium 법으로 혈장 외분비세포의 소기관을 분명하게 부출할 수 있었다.

광학현미경적으로 잘 볼 수 없었던 세포내 미세구조들을 투파형 전자현미경으로 상세하게 관찰할 수 있었다.

주사전자현미경으로 관찰된 혈장 외분비세포의 소기관 즉 분비파립, RER, 핵, Golgi 장치, mitochondria 등은 투파형 전자현미경의 소견과 같이 RER은 층상으로, 핵표면은 매끈하게, Golgi 장치는 vesicle, lamella, vacuole 등 3요소로 그리고 mitochondria는 원형 또는 타원형으로서 그 표면은 매끈하며 많은 cristae를 갖고 있었다.

상기한 각 소기관의 내면들도 모두 대체로 약간의 파립상의 구조를 정하였다.

參 考 文 獻

- 1) Hayat MA: *Introduction to biological scanning electron microscopy*, University Park Press, Baltimore, USA, 1978, p 3
- 2) Knoll M: *Static potential and secondary emission of bodies under electron irradiation*. Z Tech Physik, 16:467, 1935. cited from Hayat¹⁾
- 3) Andrews PM: *A scanning and stereographic ultrastructural analysis of the isolated inner mitochondrial membrane during change in metabolic activity*. Ext Cell Res, 90:127, 1975
- 4) Andrew PM, porter KR: *A scanning electron microscopic study of the neuron*. Am J Anat 140:81, 1974
- 5) Christensen BC, Garbarsch C: *A scanning electron microscopic(SEM) study on the endothelium of the normal rabbit aorta*. Angiologica 9:15, 1972
- 6) Clark JM, Glagov S: *Luminal surface of diste-*

- nded arteries by scanning electron microscopy: Eliminating configurational and technical artifacts. *BrJ Exp Path* 57:129, 1976
- 7) Clark RV: Three-dimensional organization of testicular interstitial tissue and lymphatic space in the rat. *Anat Rec* 184:203, 1976
- 8) Daskal Y, Prestayko AW, Bush H: Surface ultrastructure and cytochemistry of isolated nucleoli from Novikoff hepatoma cell. *Exp Cell Res* 95:333, 1975
- 9) Edanaga M: A scanning electron microscopic study of the endothelium of vessels. I. Fine structure of the endothelial surface of aorta and some other arteries in normal rabbits. *Arch Histol Jap* 37:1, 1974
- 10) Kanazawa K Hamano M, Akabori H: Application of scanning electron microscope to gastrointestinal research. *Jap J Clin Electron Microsc* 5:307, 1972
- 11) Nemanic MK, Pitelka DR: A scanning electron microscopic study of the lactating mammary gland. *J Cell Biol* 48:410, 1971
- 12) Shimamoto T, Yamashita Y, Sunaga T: Scanning electron microscopic observation of endothelial surface of heart and blood vessels. *Proc Jap Acad* 45:507, 1969
- 13) Spector M, Burns L, Kimzed SL: Ion beam etching of red blood cells and latex spheres. *Nature* 274:61, 1974
- 14) 田中敬一, 永谷隆: 圖說走査電子顯微鏡生物試料製作法(日文). 朝倉書店, 東京, 日本, 1980, p. 1
- 15) 坂口弘: 醫學領域에 있어서 走査電子顯微鏡의 現況과 將來의 展望. 細胞 3(1):2, 1971
- 16) Tanaka K: Trends and prospects of scanning electron microscopy in biological research(I). *The cell* 7:2, 1975
- 17) Tanaka K: Trends and prospects of scanning electron microscopy in biological research(II). *The cell* 11:2, 1979
- 18) Nagura T, Tanaka K, Iino: Critical point drying method using crushed dryice. *J Electron Microsc* 24:201, 1975
- 19) Tanaka K, Iino A: Critical point drying method using dryice. *Stain Technol* 49:203, 1974
- 20) Niimi M, Edanaga, Murakami H, Tokunaga M: Several problems in critical point drying method for SEM especially shrinkage and distortion of specimens. *J Electron Microsc* 24:201, 1975
- 21) 木瀬照康: Golgi 장치의 走査電子顯微鏡的考察(日文). 光子醫誌 30(6):527, 1979
- 22) Luft JH: Improvement in epoxyresin embedding method. *J Biophys Biochem Cytol* 9:409, 1961
- 23) Reynolds ES: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, 17:208, 1963
- 24) Miller MM, Revel JP: Scanning electron microscopy of epithelia prepared by blunt dissection. *Anat Rec* 183:339, 1975
- 25) Vial J, porter KR: Scanning microscopy of dissociated tissue cells. *J Cell Biol* 67:345, 1975
- 26) Motta P, Andrews PM, Caramia F, Correr S: Scanning electron microscopy of dissociated pancreatic acinar cell surfaces. *Cell Tiss Res* 176:493, 1977
- 27) Spikermann AR, et al: The fine structure of the exocrine pancreas of the european hamster (*cricetus cricetus* L): electron microscopic investigations. *Z Versuchstierkd* 22:36, 1980
- 28) 田中敬一, 名黒知德: 割断面에 대한 ion etching 과 Osmium-DMSO-Osmium 法의 應用. 第3回 醫學生物學을 위한 走査電子顯微鏡 symposium 記錄(日文). p 20, 1974

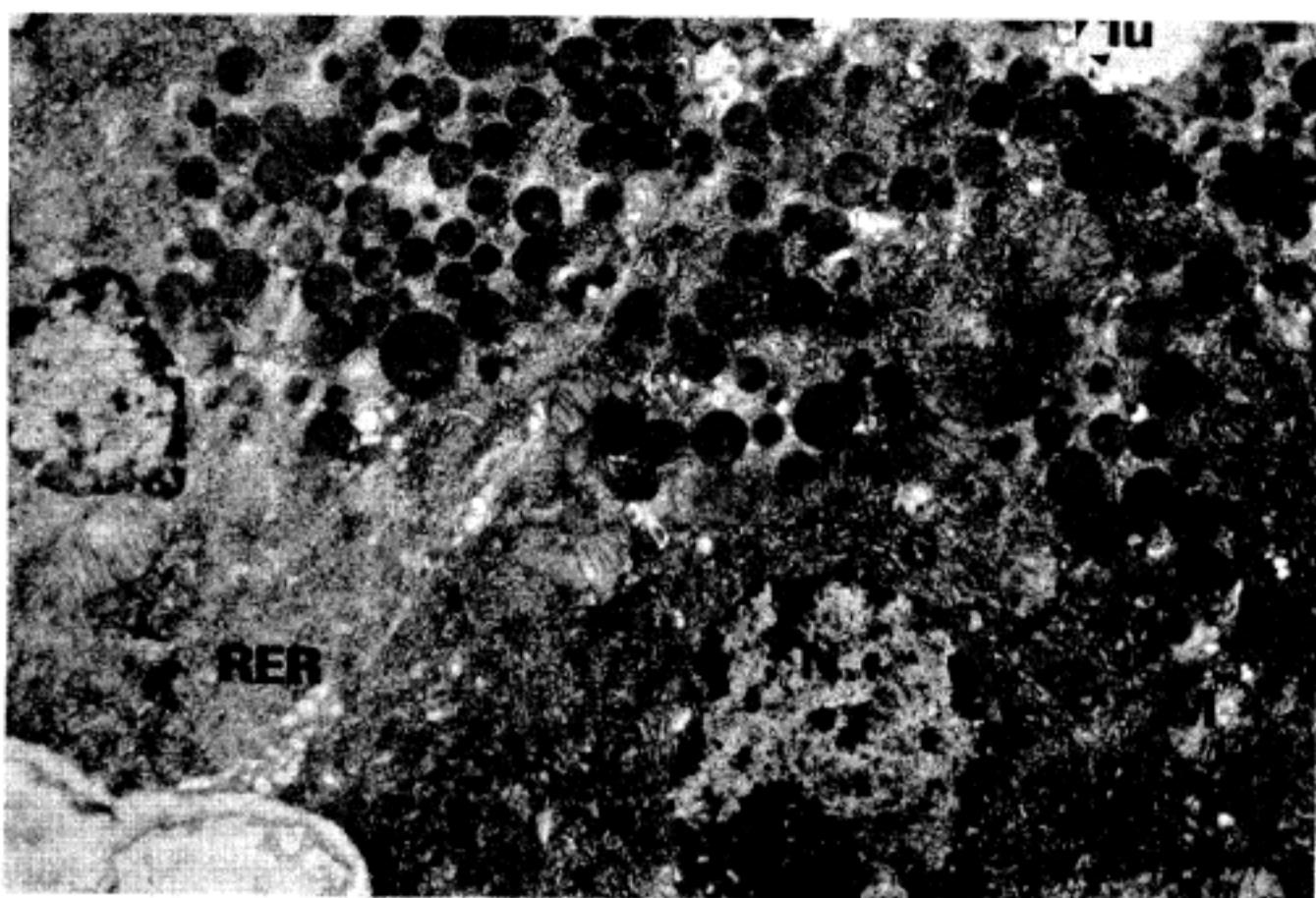


Fig. 1. Acinar cell, pancreas, rat, TEM, Basally situated nucleus(N) which is surrounded by abundant lamellar RER and rounded mitochondria(M). Apically situated secretory granules(S) and luminar projection of microvilli(arrows) are seen. Ni, nucleolus; G, Golgi complex; Lu, lumen($\times 10,000$).



Fig. 2. Acinus, pancreas, rat, SEM. Cracked acinar cells, pyramidal and/or ovoid in shape, contain a large number of secretory granules(S) in the apical portion. Centroacinar cell(C) is located at the luminar portion. N, nucleus; D, intralobular duct($\times 10,000$).

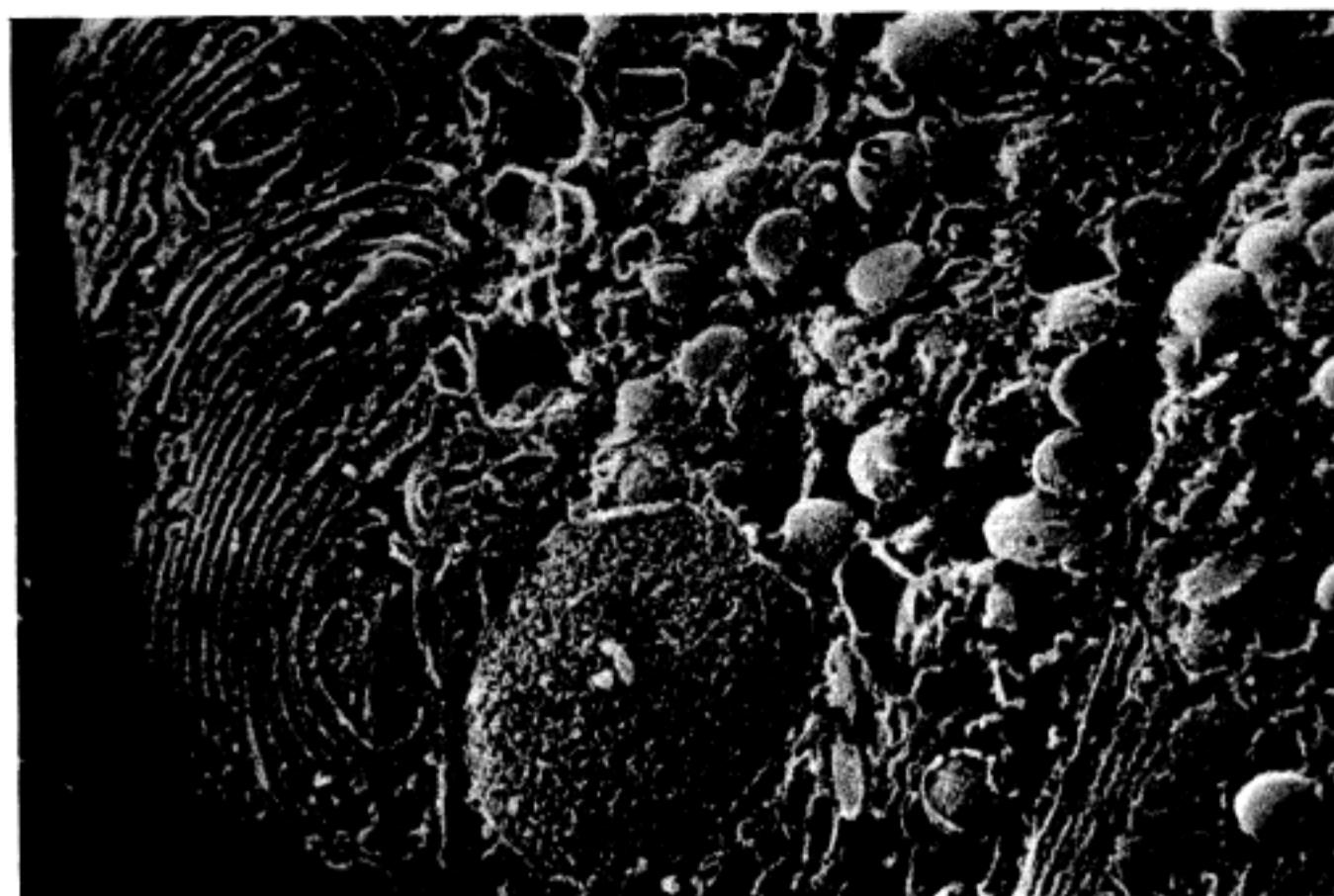


Fig. 3. Acinar cell, pancreas, rat, cracked surface, SEM. Basally situated nucleus(N) contains granular chromatin. Packed lamellar RER and elongated mitochondria(M) are seen around the nucleus. In the apical portion, many secretory granules(S) and scattered cavities(C) contained secretory granule are obserbed($\times 13,900$).

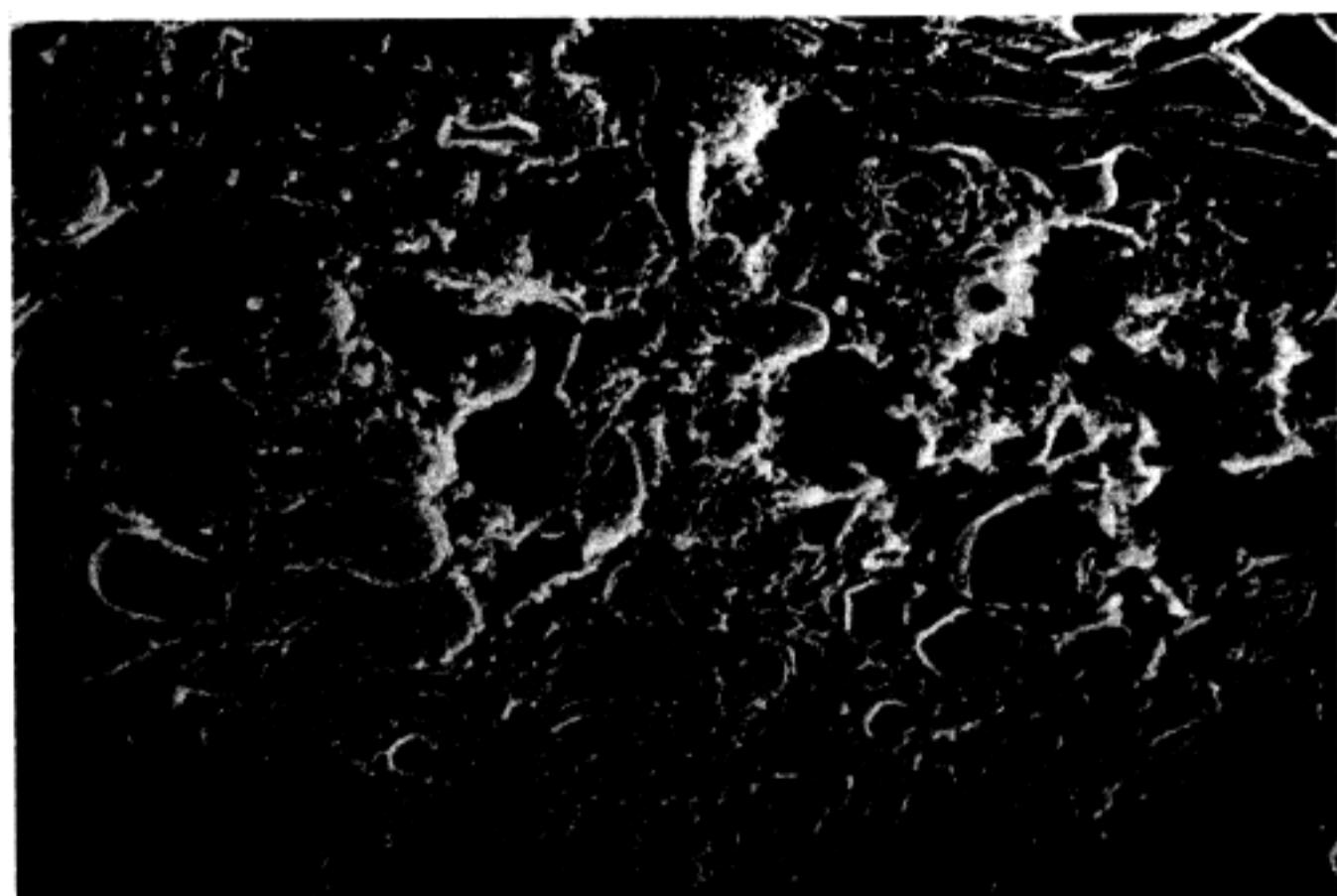


Fig. 4. Acinar cell, pancreas, rat, cracked surface, SEM. In the apical portion, scattered cavities contained secretory granules are delimited by thin wall intercommunicating through small openings(arrows). The secretory granules are granular on cracked surface. N, nucleus; G, Golgi complex($\times 16,000$).