각막내피세포 뮤신층의 성상과 생성기원

연세대학교 대학원

의과학사업단

박 중 원

각막내피세포 뮤신층의 성상과 생성기원

지도 김 응 권 교수

이 논문을 박사 학위 논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

박 중 원

박중원의 박사학위 논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 아낌없는 지도와 관심을 베풀어주시고 저를 아껴주신 김응권 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 아울러 조언과 격려를 아끼지 않으셨던 김수찬 선생님, 이진성 선생님, 이원택 선생님, 성공제 선생님께도 감사드립니다. 발전의 기회를 주신 약리학 교실의 김경환 교수님과 안과학교실의 권오웅 교수님께 감사드립니다. 아울러 대구에 계시는 김원준 교수님께도 감사드립니다. 실험에 많은 도움을 준 임상연구동 정승은 연구원에게도 감사드립니다. 끝없는 믿음으로 늘 지켜봐 주시던 부모님과 장인, 장모님 그리고 항상 곁에서 힘이 되어준 아내 지혜, 사랑하는 두딸 주형, 주경이와 이 영광을 함께 하고 나누고 싶습니다.

저자 씀.

차 례

국문요약 1

Ⅰ. 서 론 3

Ⅱ. 재료 및 방법 7

1. Lectin을 이용한 각막내피 뮤신의 당질 성분염색과 위치 분석 7

가. Lectin 의 성분염색의 광학 현미경적 관찰 7

(1) 실험 동물 및 재료 7

(2) 실험 방법 8

나. Lectin-gold complex binding의 전자 현미경적 관찰 9

2. 인체 각막 내피층의 RT-PCR과 *in situ* hybridization 11

가. RNA 분리 11

나. 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction) 11

다. 부차클로닝과 염기서열분석 12

라. *In situ* hybridization 13

3. 웨스턴 블롯팅 14

4. 면역조직화학 염색 15

Ⅲ. 결 과 17
1. 각막내피세포 뮤신층의 lectin 염색의 광학현미경적 관찰 실험 17
2. 각막내피세포 뮤신층의 lentin-gold 입자 반응 후 전자현미경 관찰 17
3. 각막내피세포 뮤신층의 MUC1의 발현 18
4. 인체 각막내피의 면역조직화학 염색법 19

Ⅳ. 고 찰 28

Ⅴ. 결 론 35

참고문헌 37

Abstract 43

표 목 차

표 1. 각 lectin에 반응하는 당단백의 성분 9

그림 목차

그림 1. 인체 각막내피세포 표면의 뮤신 4
그림 2. 가토 각막내피세포 표면의 뮤신 4
그림 3. 가토 안에서 전방 내에 Healon® 주입 후 제거한 뒤의 소견 5
그림 4. 가토 안에서 전방 내에 Viscoat® 주입 후 제거한 뒤의 소견 5
그림 5. PHA-E로 반응시킨 가토 각막상피세포의 뮤신층 20
그림 6. PHA-E로 반응시킨 가토 각막내피세포의 뮤신층 20
그림 7. WGA로 반응시킨 가토 각막상피세포의 뮤신층 21
그림 8. WGA로 반응시킨 가토의 각막내피세포의 뮤신층 21
그림 9. MAA로 반응시킨 가토의 각막내피세포의 뮤신층 21
그림 10. 가토 각막상피세포 표면의 WGA-gold complex에 대한 반응의 주사현미경 소견 22
그림 11. 가토 각막내피세포 표면의 WGA-gold complex를 반응시킨 후의 주사현미경 소견 22
그림 12. WGA-gold complex를 처리하지 않은 가토 각막내피세포 표면의 주사현미경 소견 22
그림 13. WGA-gold complex 반응 후 각막내피세포의 투사 전자현미경 소견 23
그림 14. WGA-gold complex 반응 후 각막내피세포의 투사 전자현미경 소견 23
그림 15. WGA-gold complex 반응 후 각막내피세포의 투사 전자현미경 소견 23

그림 16. 인체 각막내피세포 층의 MUC1 mRNA의 역전사 중합효소 연쇄반응 결과 24
그림 17. 인체 각막내피세포 층의 *in situ* hybridization 소견 25
그림 18. 음성 대조군의 인체 각막 내피세포 층의 *in situ* hybridization 소견 25
그림 19. 인체 각막내피세포의 웨스턴 블롯팅 소견 26
그림 20. 인체 각막내피세포의 항 MUC1 항체에 대한 면역조직화학 염색 소견 27
그림 21. 인체 각막 내피세포 층의 항 MUC1 항체의 반응을 생략한 면역 조직화학 염색 소견 27

국문요약

각막내피세포 뮤신층의 성상과 생성기전

각막내피세포는 각막의 투명성 유지에 중요한 역할을 한다. 현재 안과 영역에서 흔한 질병인 백내장 수술시 발생할 수 있는 내피세포의 과도한 소실은 시력을 잃게 하고, 나아가 각막이식수술을 받게 되는 주요 요인이 되고 있다. 그러므로 안과수술 중 각막내피세포의 보호는 항상 중요한 과제로 여겨지고 있다. 최근 각막내피세포의 표면이 점액 층으로 싸여 있다는 보고가 있었고, 이에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 이 점액 층의 성상과 생성기전에 관해 알아보고자 하였고, 이러한 연구는 추후 각막내피세포의 보호방안과 점탄성 물질의 개발 시 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

점액층의 주성분은 뮤신이고, 뮤신은 중앙의 단백질을 중심으로 주변에 많은 당질이 붙어있는 형상을 하고 있으므로, 이 당질 층의 조성을 알아보기 위해 lectin을 이용하여 성분염색을 하였다. 각각 특정 당질과 부착하는 11가지의 lectin 염색에서 모두 양성반응을 보였고, 그중 RCA-1, PHA-E, SNA, WGA, MAA, CON-A는 강한 양성반응을 보였으며, PNA 의 경우 중등도 반응을, SBA, LCA, DBA, UEA-I에서는 약한 양성반응을 보였다. 즉 각막내피세포를 덮고있는 점액 층은 뮤신을 구성하는 요소인 여러 종류의 당질로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다.

뮤신의 위치와 구조상의 특성을 알아보기 위해 WGA lectin-gold complex를 이용하여 투사 전자현미경 관찰을 한 결과, WGA lectin-gold 입자가 각막 내피세포 내 주머니 형태, 내피세포 표면, 그리고 세포밖에 존재하는 뮤신층 내에서 관찰되었다. 즉 뮤신이 각막내피세포에서 생성되고 내피세

포 내에서 주머니 형태로 존재하다가 세포 밖으로 배출되는 것임을 알 수 있었다. 그리고 뮤신이 각막내피세포막 밖을 덮고 있는 점액층의 구성성분임을 알 수 있었다.

인체 각막내피세포 뮤신층의 생성기전과 생성원류를 알아보고자 각막에서 비교적 흔하며, 각막상피세포에서도 발견되는 뮤신인 MUC1의 존재를 밝히고자 하였고, 3가지의 분자생물학적 실험을 하였다. 인체 각막내피세포의 역전사 중합효소 연쇄반응결과 기존에 알려진 MUC1 mRNA와 같은 크기의 산물을 관찰할 수 있었다. 각막내피세포의 MUC1의 역전사 중합효소 연쇄반응산물인 368 bp의 밴드를 정제하여 *E. coli*(DH-5α)에 부차클로닝 한후 자동염기서열분석기를 이용하여 염기서열을 분석한 결과 이미 밝혀져 있는 MUC1의 염기서열과 일치하여, 증폭된 역전사 중합효소 연쇄반응산물의 염기서열이 MUC1임을 확인하였다. 그리고 *in situ* hybridization을 이용하여 MUC1 mRNA의 분포를 살펴본 결과 MUC1 mRNA가 각막내피세포 핵 주위에 존재함을 알 수 있었다. 또한 기존의 MUC1의 존재가 입증되어 있는 인체 각막상피를 양성 대조군으로 사용하여 시행한 웨스턴 블롯팅에서 각막내피세포도 같은 크기의 MUC1 단백질이 존재함을 알 수 있었다. MUC1에 대한 항체를 이용한 면역조직화학 염색상 인체 각막내피세포의 안쪽과 바깥쪽에서 염색 양성 소견을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 각막내피세포 표면에는 여러 종류의 lectin과 반응하는 당질이 풍부한 층이 있음을 확인할 수 있었고, 적어도 뮤신의 일종인 MUC1이 존재하는 것을 알 수 있었다.

핵심되는 말 : 각막내피세포, 뮤신, 역전사 중합효소 연쇄반응, *in situ* hybridization, lectin, MUC1

각막내피세포 뮤신층의 성상과 생성기전

< 지도교수 김 응 권 >
연세대학교 대학원 의과학사업단
박 중 원

Ⅰ. 서 론

각막내피세포는 각막의 내측면에 단층으로 위치하고 각막의 가장 중요한 존재 목적인 투명성을 유지하는데 핵심적인 역할을 하며, 그 숫자는 신생아 때는 3000-4000개/mm^2로 많은 편이나 나이가 듦에 따라 매년 일정한 수가 자연적으로 손실되어 60세의 경우 2000개/mm^2로 줄어들며 인체의 경우 파손되면 재생되지 않는다. 이러한 각막내피세포는 내피세포가 다량으로 손상되어 밀도가 500개/mm^2 이하로 될 경우는 각막혼탁 및 부종으로 인한 실명이 초래되어 타인(사체)의 각막을 이식하여야 하는 경우도 생긴다[1].

각막내피세포의 파손 원인은 여러 가지가 주장되고 있으나 수술 중 기구에 의한 접촉 또는 전방의 허탈로 인한 내피와 홍채간의 접촉으로 인한 물리적인 파손이 주원인으로 지적되고 있다. 이러한 물리적 파손을 방지하기 위하여 백내장, 녹내장 및 망막 등의 안내 수술 중에는 점탄성 물질(viscoelastics)의 전방 내 주입이 이용되고 있다. 최근까지 이러한 점탄성 물질은 전방에 주입될 경우 각막내피세포의 표면에 직접 부착된다고 인식되어 왔다. Madsen 등[2,3]은 각막내피세포 후면에서 하이알유론산의 수용체를 발견하였으며, 따라서 하이알유론산로 이루어진 점탄 물질은 수술 중 각막내피세포 표면에 도포되어 내피세포를 보호한다고 하였다. Monson 등[4]은

하이알유론산과 황산콘드로이틴으로 이루어진 물질은 황산콘드로이틴이 가진 음전하로 인하여 각막내피세포 표면에 부착하여 각막내피세포를 물리적인 타격으로부터 보호한다고 하였다.

각막내피세포 표면에는 원형질막 밖으로 뮤신층과 유사한 층이 존재한다는 보고가 일부 있었다. Barany 등[5]은 황부엉이(*Strix aluco*)의 전방(前房)에 공기를 주입한 결과 공기가 각막내피세포 쪽으로 접근하지 못하는 것을 관찰하여 각막내피세포와 홍채 사이에 알려지지 않은 층이 존재하리라고 암시하였으며, Schroder 및 Sperling[6]은 ruthenium red를 이용하여 각막내피세포의 당질을 고정하고 관찰한 결과 투과 전자현미경 하에서 이 층이 다당류를 포함하고 있으며 구조적으로나 화학적 조성이 서로 다른 성분이 세 가지 이상 존재하고 있다고 보고하였다. Kim 등[7]은 실험 결과 가토 및 인체 기증 안 각막내피의 표면에서, 기존의 glutaraldehyde 고정액을 이용하여서는 관찰되지 않던 점액층을 점액안정제인 sodium cetylpyridinium chloride를 사용하여 고정한 후 발색시킴으로써, 약 1 μm 두께의 새로운 층을 제시하였다(그림 1, 2).

그림 1. 인체 각막내피세포의 뮤신. 약 0.5-1.0 μm 의 두께를 보이고 있다.

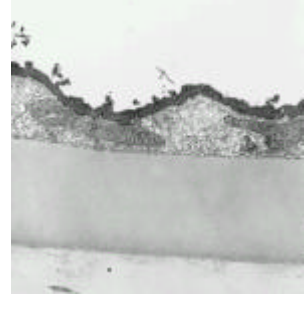

그림 2. 가토 각막내피 표면의 뮤신. 뮤신 염색으로 발견된 약 0.5-1.0 μm 두께의 당단백 층이 보인다.

Kim 등[8]은 전방에 주입되었던 점탄성 물질이 하이알유론산으로 이루어진 경우에는 점탄성 물질이 제거되어도 각막내피세포의 뮤신층이 원형 그대로 보존되었으나, 점탄성 물질이 황산콘드로이틴으로 이루어진 경우에는 뮤신층이 뜯겨져 나오는 것을 관찰하였다. 현재까지는 점탄성 물질이 각막내피세포의 원형질막과 직접 접촉하는 것으로 알려져 왔으나 실험 결과 점탄성 물질은 반드시 이 새로 발견된 층과 접촉함을 알게 되었다(그림 3, 4).

그림 3. 가토 안에서 전방 내에 Healon® 주입 후 제거한 뒤의 소견. 각막내피세포의 뮤신층은 정상적으로 유지되고 있다. Healon®은 하이알유론산으로 구성된 점탄 물질임.

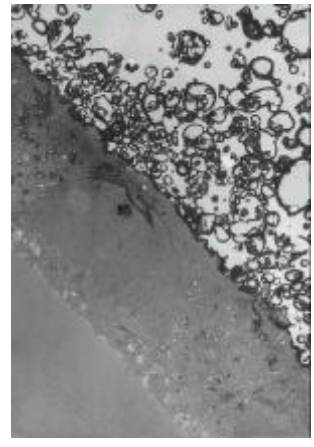

그림 4. 가토 안에서 전방 내에 Viscoat® 주입 후 제거한 뒤의 소견. 뮤신층이 각막내피세포의 표면으로부터 분리되어 있는 것이 관찰되었다. Viscoat®는 하이알유론산과 황산콘드로이틴으로 구성된 점탄 물질임.

이러한 사실을 종합하면 백내장 수술시 전방에 주입된 점탄 물질들은 각막내피세포의 원형질막과 직접 접한다기보다는 뮤신층과 접촉 및 상호작용을 통해 작용하는 것임을 알 수 있다.

그러나 각막내피세포의 뮤신은 그 존재가 교과서에 언급되어 있지 않고 그 생성 및 기능이 전혀 알려져 있지 않은 바, 이에 본 연구자는 각막내피세포 표면에 새로이 발견된 뮤신층의 성상을 연구하고 그 생성 원류를 조사하기 위한 뮤신층의 생화학적, 조직화학적 성상 연구의 필요성을 느끼게 되었다.

뮤신은 중앙에 단백질중추가 있고 그 주변을 당질의 긴 가지로 포장하여 가지가 많은 나무 형태를 유지하고 있는 복합체로서 그 특성이 주변의 당질 층과 밀접한 관계가 있다. 따라서 그 주변의 당질 층의 조성을 밝히는 것이 필요하나 각막내피세포 수량의 제한성 때문에 화학적 분석은 타당하지 않다.

본 연구는 각막내피세포의 손상을 차단하기 위한 노력의 일환으로 새로이 발견된 뮤신층의 성분을 당질의 성분염색을 통하여[9,10] 그리고 뮤신층의 생성원류를 분자생물학적 기법을 통하여 밝힘으로서 각막내피세포의 보호방안과 추후 점탄성 물질의 개발 시 필요한 자료를 제공하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

동물실험은 연세대학교 임상연구센터 실험동물위원회의 검토와 승인 하에 이루어 졌으며 체중 2 4kg의 성인 백색 가토를 암수 구별 없이 사용하였다. 가토의 평균 직장온도는 38.5 39.5℃이며 사육은 22±2℃의 온도, 50±10%의 습도, 40 50phon 이하의 소음, 12시간의 명/암 조명이 되는 환경 하에 이루어졌다. 실험은 외견상 외안부 질환이 없는 10마리 20안을 본 실험에 이용하였다.

기증된 인체 안구 중 각막이식술에 부적합한 안구 9안의 각막을 뮤신 primers와 probes를 이용한 역전사 중합효소 연쇄반응, *in situ* hybridization 그리고 MUC1의 면역조직화학 염색 실험에 이용하였다.

1. Lectin을 이용한 각막내피 뮤신의 당질 성분염색과 위치 분석

가. Lectin의 성분염색의 광학 현미경적 관찰

(1) 실험 동물 및 재료

가토는 pentobarbital sodium(Entobar®, 한림제약) 과량을 정맥 주사하여 희생시킴과 동시에 0.12M 농도의 인산완충용액(phosphate buffered saline solution; PBS, pH 7.4)에 1% paraformaldehyde와 1% glutaraldehyde이 포함된 고정 액을 점안하여 각막 표면 뮤신층을 고정하였다. 표면이 고정된 가토의 각막을 적출 하여 즉시 동일한 고정 액에 담가 실온에서 24시간 고정시킨 후 탈수과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다.

본 실험에서 사용한 lectin은 WGA, SNA, MAA, Con-A, PNA, RCA-1, DBA, SBA(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), PHA-E, LCA, UEA-I(Honen corporation, Tokyo, Japan)의 11종류이었다(표 1).

(2) 실험 방법

보관된 파라핀 블록은 2㎛ 두께의 절편으로 자르고 파라핀 제거 과정과 함수과정을 거친 후 lectin 염색을 다음과 같이 시행하였다.

조직을 증류수로 5 10분 세척 후 0.3% 과산화수소수(H_2O_2)가 포함된 메탄올 용액에 20분간 담근 다음 lectin중 MAA와 SNA를 사용할 조직은 0.05M tris 용액으로 씻고, 나머지 lectin을 사용할 조직은 0.12M 인산완충용액으로 세척하였다. 비 특이적 반응을 줄이기 위해 조직에 1% bovine serum albumin을 5분간 반응시킨 다음 tris 용액 또는 인산완충용액으로 세척하였다. Biotinylated lectin(lectin의 농도; 20㎍/㎖)은 4℃, 습윤 챔버에서 12시간 반응시켰다. 그 후 조직들을 0.12M 인산완충용액으로 10분간 세척하였다. 조직을 UltraTek® anti-polyvalent antibody(Scy Tek laboratories, Logan, UT, USA)에 10분간 반응시킨 후, 인산완충용액에 10분간 세척하고 UltraTek® HRP(horse reddish peroxidase)로 10분간 반응시켰다. 그후 조직을 0.12 M 인산완충용액으로 세척하였으며 발색제인 AEC(3-amino-9-ethylcarbazole) 용액을 2분간 반응시키고, 인산완충용액과 증류수로 발색제를 세척하고 5분간의 hematoxylin 대조염색을 거쳐 Olympus 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰 및 촬영(D Plan 100x. NFK 2.5x)하였다.

각 lectin의 종류 및 반응하는 탄수화물 기는 다음과 같다(표. 1).

표 1. 각 lectin에 반응하는 당단백의 성분

Lectins	Source	Specificity
Con A	*Concavalia ensiformis*	α-D-Glc*, α-D-Man+
DBA	*Dolichos biflorus*	D-GalNAc≠
PNA	*Arachis hypogea*	β-D-Gal§
RCA-1	*Ricinus communis*	β-D-Gal
SBA	*Glycine max*	α/β D-GalNAc
MAA	*Maackia amurensis*	NeuAc‖ (α2,3)Gal
PHA-E	*Phaseolus vulgaris*	D-Gal, D-GlcNAc#
SNA	*Sambucus nigra*	NeuAc(α2,6)Gal
WGA	*Triticum vulgaris*	$(\beta\text{-D-GlcNAc})_2$, NeuNAc‖
UEA-I	*Ulex europaeus*	α-L-Fucose
LCA	*Lens culinaris*	α-D-Glc, α-D-Man

*Glc : Glucose

+Man : Mannose

≠ GalNAc : N-acetyl-galactosamine

§ Gal : Galactose

#GlcNAc : N-acetyl-glucosamine

‖ NeuNAc : sialic acid

나. Lectin-gold 의 전자 현미경적 관찰.

가토는 pentobarbital sodium 과량을 정맥 주사하여 희생시킴과 동시에 0.12M 농도의 인산완충용액에 1% paraformaldehyde와 1% glutaraldehyde 이 포함된 고정액을 점안하여 각막 표면 뮤신층을 고정하였다.

표면이 고정된 가토 안의 전방에 고정 액을 천천히 주입시켜 내피

세포 표면조직을 고정시킨 후 각막을 적출 하여 즉시 동일한 고정 액에 담가 0℃ 4℃에서 2시간 동안 전 고정시킨 후, 고정된 조직을 TEM(transmission electron microscopy)에 사용될 조직은 1㎜ × 3㎜, SEM(scanning electron microscopy)에 사용될 시료는 조직 편을 3㎜ × 3㎜의 크기로 잘랐다. Microcapsule(Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA) 내에 고정 액에 삽입한 후 0℃ 4℃ 의 온도에서 부드럽게 진탕하였다.

0.12M 인산완충용액 혹은 카코딜산 완충용액(cacodylate buffer; pH 7.4)으로 microcapsule내의 고정 액을 씻어낸 후 전 고정된 재료들은 0℃ 4℃의 온도에서 2% osmium tetroxide 고정 액에 1시간 30분간 후 고정하였다.

0.12M 인산완충용액 혹은 카코딜산 완충용액으로 세척한 다음, 고농도의 alcohol로 탈수 후에 Lowicryl HM 20 mixture에 처리하고 60℃ 오븐기에서 24시간 포매하였다. 포매된 각막은 microtome ultra cut(Leica, Wien, Austria)으로 절편을 제작하였다. Lectin-gold 입자인 WGA를 습윤 챔버에서 30분간 반응시켰다. Nickel grid에 부착시켜 uranyl acetate와 lead citrate 로 이중 염색한 후, 전자현미경으로 관찰하였다(TEM: Philips CM-10, Eindhoven, Netherland, SEM: Hitachi S-800, Tokyo, Japan).

2. 인체 각막 내피 층의 RT-PCR 과 *in situ* hybridization

가. RNA 분리

전체 RNA분리는 Chomcaynski 등[11]의 AGPC(acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction) 방법으로 하였다.

약술하면, 기증된 인체의 안구를 인산완충용액으로 조심스럽게 세척 후 우선 Bard-Parker 15번 나이프로 각막 상피세포를 채취한 후 해부현미경 하에서 각막내피세포를 채취하여 100㎎ 조직 당 2㎖의 solution D(4M guanidinium, 25mM Sodium acetate, 0.5M Sarcosyl, 0.1M β-mercaptoethanol)와 water-saturated phenol이 1:1로 섞인 용액을 넣고 균질화한 후, 0.2㎖의 chloroform을 혼합한 후 15초간 소용돌이 시켜 혼합한 다음 , 얼음에 5분간 두고 나서 4℃에서 12,000 g 15분간 원심 분리하였다. 그리고 나서 상층을 취해 새 튜부로 옮긴 후 동량의 isopropanol과 혼합 후 얼음에 15분간 두고 나서 4℃에서 12,000 g 15분간 원심분리 하였다. 여기서 얻어진 펠레트를 75% ethanol로 세척한 후 공기 중에서 5분간 말리고 펠레트를 DEPC를 처리한 멸균수(RNase-free 물)에 녹인 후 분광 광도 계로 260 nm영역에서 흡광도를 측정하였다.

나. 역전사 중합효소 연쇄반응

기증된 인체 각막 내피세포에서 얻어진 전체 RNA 와 Perkin Elmer RNA-PCR core kit(Roche Molecular Systems Inc, Branchburg, NJ)를 이용해 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 우선 0.5-1㎍ RNA에 10배 농축된 buffer 2㎕와 25mM $MgCl_2$ 4㎕, 10mM dNTP을 각각 2㎕씩, random hexamer 1㎕와 RNasin(RNase inhibitor) 1㎕ 그리고 역전사효소

1 ㎕를 넣고 최종량을 20 ㎕로 하여 실온에서 10분, 42℃에서 45분간 반응시킨 후 94℃에서 5분간 열처리하였다. 여기서 얻어진 cDNA와 제작된 human MUC1 specific primer(5' primer TCTCACCTCCTCCAATCAC, 와 3' primer GAATGGCACATCACTCAC)를 이용하여 PCR을 수행하였다[12]. 먼저 template로 역전사 반응산물 20㎕에 20pmol primers를 각각 1 ㎕씩, 10X buffer 8㎕, 25mM $MgCl_2$ 4㎕를 섞은 후 94℃에서 5분간 열처리 후 이 혼합물에 0.5㎕ *Taq* polymerase를 넣고 최종량 100㎕를 가지고 94℃ 30초, 55℃ 1분, 75℃ 2분으로 cycle을 40번 수행한 후 last extension을 72℃ 10분으로 하여 반응을 Perkin Elmer PCR 기계(Gene Amp PCR System 2400, Roche System Inc, Norwalk, CA, USA)에서 수행하였다. 얻어진 역전사 중합효소 연쇄반응산물은 ethidium bromide을 포함한 2% agarose gel에 PCR marker(Promega, Medison, WI, USA)와 같이 전기영동한 후 UV transilluminator하에서 관찰 후 사진 촬영하였다. 양성 대조로는 MUC1의 발현이 밝혀진 각막 상피조직을 사용하였고 음성대조로는 cDNA template 없이 중합효소 연쇄반응을 수행한 것을 사용하였다.

다. 부차클로닝과 염기서열분석

얻어진 중합효소 연쇄반응 산물을 전기영동 후 MUC1 밴드(368 bp)를 잘라서 gel extraction kit(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 정제한 다음 pT7Blue T-vector(Novagen, Medison, WI, USA)와 같이 16℃의 온도에서 8시간 연결 반응하였다. 이 연결산물을 Gene pulser(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 *E. coli*(DH-5α)에 형질 전환하여 양성콜로니를 선별한 후, Wizard Plus SV miniprep DNA purification system (Promega, Medison, WI, USA)을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다.

선발된 클론은 자동염기서열분석기(ALFexpress™ DNA sequencer, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)으로 염기서열을 분석한 후 이 결과를 NCBI(National Center for biology Information)의 EMBL Gen Bank site의 BLAST program으로 분석한 결과 human MUC1 sequence(Gene bank accession number; J05582)와 일치하였다.

라. *In situ* hybridization

기증된 인체 각막을 -30℃의 isopentene용액에 담가 급속 냉동시킨 후 M1 embedding matrix(Lipshaw #1310)로 포매하여 6㎛로 동결절편을 만든 후 gelatin coating slide에 부착시켰다. 이를 4% paraformaldehyde에 10분간 고정 후 인산완충용액으로 세척하였다. 이를 proteinase K로 37℃에서 30분간 반응시킨 후 아세틸화하였다. Prehybridization수행 후 hybridization을 하였다. Hybridization 용액의 조성은 50%(v/v)의 deionized formamide와 4배로 농축된 saline-sodium citrate(0.6M sodium chloride, 0.06M sodium citrate), Denhardt's solution(0.02% ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 0.02% bovine serum albumin, Sigma, USA)과 10%(w/v)의 dextran sulfate, 250㎍/㎖ yeast tRNA, 0.5㎎/㎖ denatured salmon sperm DNA, 10mM DTT 등이다. 이 hybridization용액과 ^{35}S 표품된 anti-sense ribo probe(2×10^{7}cpm/㎖)를 혼합하여 52℃에서 16시간동안 hybridization을 수행하였다. Probe는 2종류의 MUC1 tandem repeat들로 하였다. 하나는 450 bp의 단편이고 다른 하나는 345 bp의 5' MUC1 tandem repeat 단편으로서 Dr. Michael A. Hollingsworth(University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE)로부터 제공받았다. 이 probe들을 제한 효소를 사용하여 선형화하여 ^{35}S로 표품한 후 사용하였다. 반응은 선형화된 plasmid(1㎍/㎕), 5배

로 농축된 전사용액(4㎕, Promega, Medison, WI, USA), 0.2M DTT(2㎕), 2.5mM GTP/ATP/CTP 혼합액(2㎕, pH 8.0), placental ribonuclease 억제제(1㎕, 100U/㎕), ^{35}S-UTP(5㎕, 1000-15000Ci/mmol, 10mCi/㎖, NEN), T7 or SP6 RNA polymerase(1㎕, 10U/㎕, Stratagen, La jolla, CA, USA)를 혼합하여 37℃에서 1시간동안 *in vitro* 전사방법으로 합성하였다. 그 후에 2배로 농축된 SSC-50% formamide로 57℃ 15분간 2번 수세하여 posthybridization 과정을 수행하고 나서 필름에 감광하였다. 그 후 이 절편들을 photographic emulsion(NBT-2; Kodak, Rochester, NY, USA)에 담가 4℃에서 3주 동안 노출한 후 현상하고 hematoxylin으로 대조 염색하여 현미경하에서 관찰 후 사진 촬영하였다.

3. 웨스턴 블롯팅

인체 각막의 상피와 내피세포는 역전사 중합효소 연쇄반응에서와 같이 채취한 후 조직 100㎎당 200㎕ lysis 용액(25mM HEPES pH 7.5, 0.3M NaCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.2mM EDTA, 0.05% TritonX-100, 20mM β-glycerophosphate, 1mM orthovanate, 0.5mM DTT, 0.4mM PMSF, 2㎍/㎖ leupeptin, 1㎍/㎖ pepstain)를 넣고 균질화 하였다. 4℃에서 15분간 반응 후 12,000 rpm 10분간 원심분리 하고 나서 상층액을 새 튜브에 옮겼다. 여기서 얻어진 단백질을 Bradford 방법으로 정량 후 5배로 농축된 SDS sample 용액(60mM Tris HCl pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophemol blue)과 혼합한 단백질용액을 4% stacking, 10% separating겔을 만들어 SDS-PAGE(sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하였다. 그리고 나서 acrylamide 겔의 단백을 Immobilon-P(Millipore corporation, Bedford, MA)

PVDF막에 전이시켰다. 우선 PVDF막을 메탄올에 5분간 담그고 나서 전이용액(25mM Tris base, 0.2M Glycine, 20% methanol)에 5-10분간 담근 후 겔을 PVDF막으로 300mA의 전류로 하여 4℃에서 하룻밤동안 전이하였다. 그리고 나서 전이가 끝난 막을 neuraminidase로 전 처리하였다. 50mM sodium acetate, 10mM calcium acetate 용액에 0.1U/㎖의 neuraminidase(Type V; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 넣고 37℃에서 1시간동안 반응하고 나서 TBS-T(0.1% Tween-20 포함 TBS(tris buffered saline); Tris base, NaCl pH 7.6)로 5분간 수세 후 차단 용액(5%(W/V) non fat dry milk, 0.1% Tween-20, TBS)으로 하룻밤동안 차단하였다. 일차항체로는 HMFG-1 (human milk fat globule antibody(Biodesign, Kennebunk, ME, USA)를 1:100으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시키고 이차항체인 anti-mouse IgG(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) 1:1000으로 희석하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. Enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)용액으로 실온에서 1분간 검출 후 Hyper film ECL(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)을 가지고 현상하였다.

4. 면역조직화학적 염색

인체 각막을 4℃에서 4% paraformaldehyde용액으로 3시간 동안 고정하여 파라핀 블록으로 만들어 나서 2㎛및 4㎛의 슬라이드 절편을 제작한 후 파라핀 제거과정을 거쳤다. 실온에서 xylene에 5분간 6번, 100% ethanol에 5분간 3번, 그리고 95%, 85%, 70% 순서대로 5분간 담가 탈수 처리하였다. 다음에 인산완충용액에 5분씩 2번 세척하였다. 모든 조직은 neuraminidase

(Sigma, St. Louis, MO, USA) 전처리를 다음과 같이 하였다. 즉 슬라이드 절편을 50mM sodium acetate, 10mM calcium acetate pH 6.5 용액에 담가서 평형화 시키고 나서 50mM sodium acetate, 10mM calcium acetatepH 6.5 용액에 0.5U/㎖ neuraminidase를 혼합하여 점적한 후 37℃에서 1시간 동안 처리하였다. 그리고 나서 Ultra Tek® HRP anti-polyvalent Super Block 차단용액으로 실온에서 10분 동안 차단하였다. 일차항체는 HMFG-1 또는 VU4H5(antibody to tandem repeat portion of human MUC1; Santacruse Biotech, CA, USA)을 가지고 1:100으로 희석하여 4℃에서 하룻밤동안 반응시켰다. 다음날 0.02% Triton X-100이 포함된 인산완충용액으로 5분간 3번 세척하였고 이차항체 Ultra Tek® anti-polyvalent antibody를 실온에서 10분 반응시키고 삼차항체 UltraTek® HRP를 실온에서 10분간 처리하였다. 그 후 발색제인 VIP substrate kit for peroxidase(Vector, Burlingame, CA, USA)으로 발색시킨 후 faramount(DAKO, Carpintera, CA, USA)로 봉입(mounting)한 후 현미경(Olympus AX-80, Tokyo, Japan)에서 관찰하고 사진 촬영하였다.

Ⅲ. 결　과

1. 각막내피세포 뮤신층의 lectin 성분염색의 광학현미경 관찰실험.

각막상피세포의 뮤신층과 동일한 층이 각막내피세포에서도 염색되었으며 본 연구에 사용된 11가지 lectin 염색 정도의 차이는 있었지만 모두 양성반응을 보였다. RCA-1, PHA-E(그림 5, 6), SNA, WGA(그림 7, 8), MAA(그림 9), CON-A는 동종에서 개체간 차이 없이 강한 양성반응을 보였으며, PNA 의 경우 중등도 반응을, SBA, LCA, DBA, UEA-I에서는 약한 양성 반응을 보였다.

2. 각막내피세포 뮤신층의 lectin-gold complex binding의 전자현미경 관찰

뮤신의 위치와 구조 특성을 정확히 밝히고자 광학현미경상 양성반응을 보인 lectin인 WGA lectin-gold complex를 이용한 주사 및 투과 전자현미경 조사를 시행한 결과, 각막내피세포에는 반응한 lectin gold 입자가 세포표면에 많이 관찰됨을 발견하였고 소포형태로 세포로부터 배출됨을 관찰하였다.

주사 현미경상 가토 각막상피세포 표면(그림 10)뿐만 아니라 각막내피세포(그림 11)에도 수많은 WGA lectin-gold 입자들이 부착되어 있음을 관찰하였다. 그리고 WGA lectin-gold 입자 처리과정을 생략한 음성대조군에서는 각막내피세포 표면(그림 12)에서 아무런 입자도 발견되지 않음을 관찰하였다.

WGA lectin-gold complex를 이용한 투사 전자현미경 관찰 결과 각막내피세포표면에 부착된 형태(그림 13) 뿐만 아니라 각막내피세포 내 소포형태 (그림 14), 뜯겨져 나가는 뮤신층 내의 WGA lectin-gold 입자(그림 15)등이 관찰되었다. 일부에서는 각막내피세포 내에서 세포 외로 배출되는 WGA lectin-gold 입자가 발견되었다.

3. 각막내피세포 뮤신층의 MUC1의 발현

인체 각막내피세포 층을 RT-PCR한 결과 368 bp에 해당하는 MUC1의 mRNA 해당 부위에 띠를 관찰할 수 있었다(그림 16). 양성 대조군으로 인체 각막상피세포를 이용하여 같은 primer로 실험한 결과 368 bp에서 하나의 밴드를 보였고, template를 사용하지 않은 음성 대조 군에서는 밴드가 나타나지 않았다.

각막내피세포의 MUC1의 역전사 중합효소 연쇄반응의 산물인 368 bp의 밴드를 정제하여 *E. coli*(DH-5α)에 부차클로닝 후 염기서열분석 결과 MUC1의 서열과 일치하여 증폭된 밴드가 MUC1임을 확인하였다.

인체 각막내피세포 층을 *in situ* hybridization을 이용하여 MUC1 mRNA 분포를 살펴본 결과 anti-sense ribo probe를 이용하여 *in situ* hybridization을 수행한 각막내피세포 핵 주위로 다수의 검은입자들이 관찰되어 MUC1 mRNA의 존재를 확인할 수 있었다(그림 17). 그러나 sense ribo probe를 이용한 음성대조군에서는 관찰되지 않았다(그림 18).

이미 기존의 MUC1의 존재가 입증되어 있는 인체 각막상피세포를 양성대조 군으로 사용하여 시행한 웨스턴 블롯팅상 인체 각막상피의 MUC1 부위에 해당하는 210 kD 이상의 분자량에서 각막내피세포 역시 양성의 띠가 관찰되었다(그림 19).

4. 인체 각막내피의 면역조직화학 염색법

뮤신 MUC1에 대한 항체를 이용한 면역조직화학 염색상 결과 인체 각막내피층의 염색양성의 소견을 관찰할 수 있었다(그림 20). 뮤신 MUC1에 대한 항체 반응을 생략한 대조군에서는 아무런 염색소견이 관찰되지 않았다.(그림 21)

염색 정도는 VU4H5 보다는 HMFG-1을 일차항체로 사용한 경우에서 더 짙게 나타났다. 세포질의 염색에서는 세포 내 기저부보다는 세포 상층부가 더 짙게 염색되었다. 얇지만 양성으로 염색된 선이 각막내피세포의 상층부에서 관찰되었다. 음성 대조군으로 일차항체 없이 처리한 각막 표본은 염색되지 않았다.

이상의 결과로 각막내피세포 표면에는 WGA와 반응하는 사이알산을 함유한 새로운 층이 존재하며 이층의 성분 중에는 각막내피세포에서 생성되는 MUC1이 포함되어 있음을 알 수 있었다.

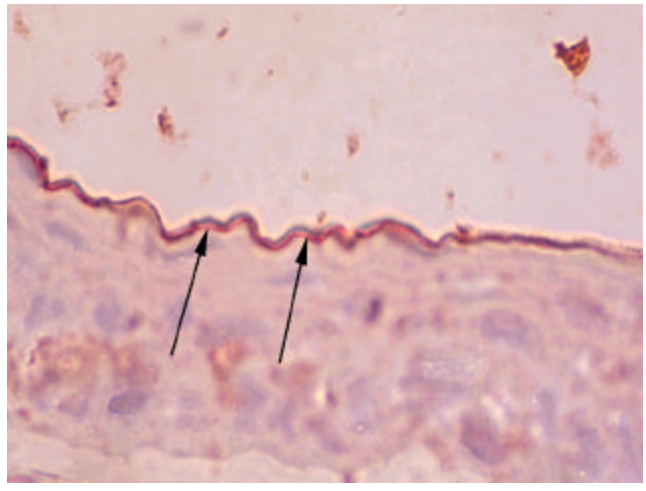

그림 5. PHA-E로 반응시킨 가토 각막상피세포의 뮤신층. 붉은선으로 염색되어 있는 뮤신층을 관찰하였다.(X1000)

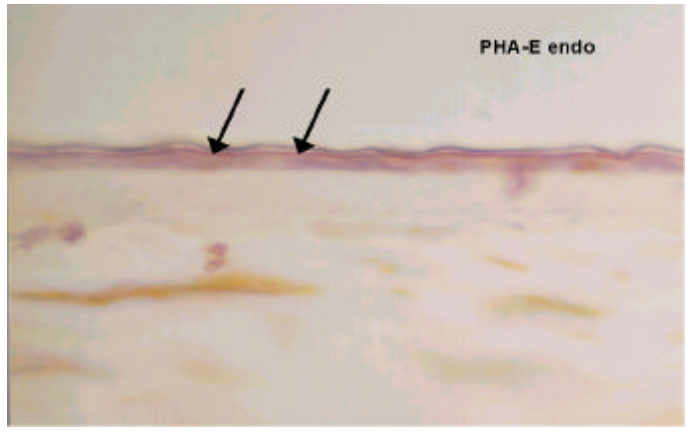

그림 6. PHA-E로 반응시킨 가토 각막내피세포의 뮤신층. 각막 상피세포 표면에서와 같이 붉은색의 뮤신층이 관찰되었다.(X1000)

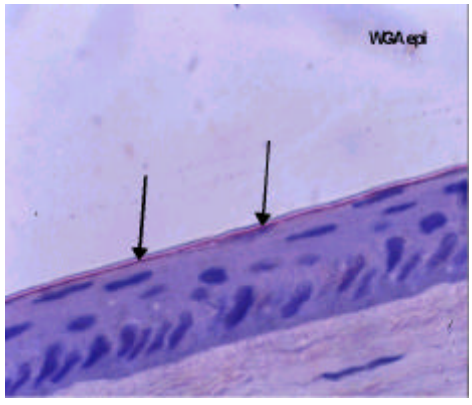

그림 7. WGA로 반응시킨 가토 각막 상피세포의 뮤신층. 붉은선으로 염색된 뮤신층을 관찰하였다.(X1000)

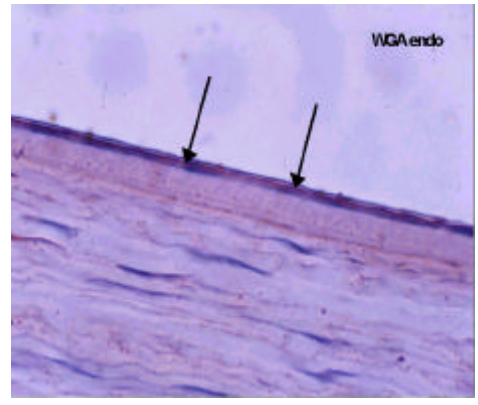

그림 8. WGA로 반응시킨 가토 각막 내피세포의 뮤신층. 붉은색의 뮤신층을 관찰하였다.(X1000)

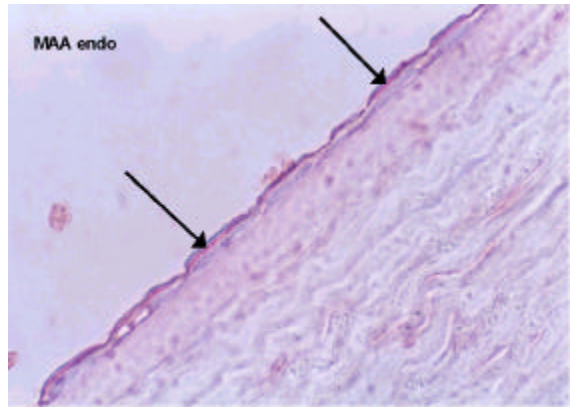

그림 9. MAA로 반응시킨 가토 각막 내피세포의 뮤신층. 붉은색의 뮤신층을 관찰 하였다.(X1000)

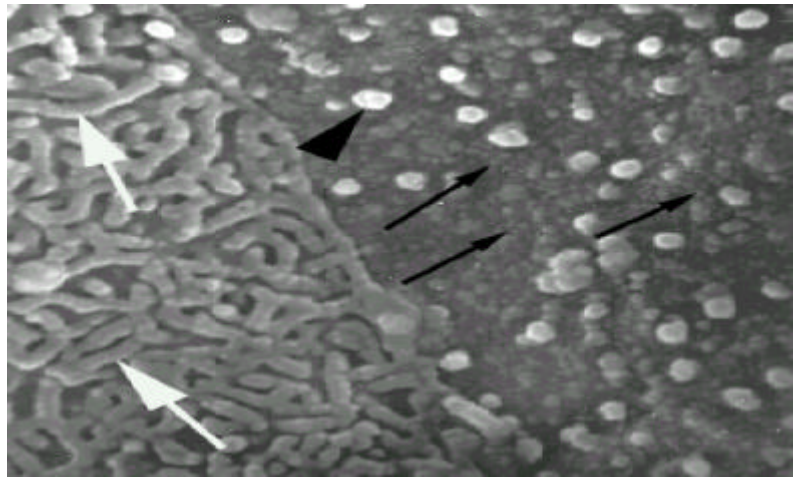

그림 10. 가토 각막상피세포 표면의 WGA-gold complex**에 대한 반응의 주사현미경 소견. 흰 화살표와 화살표 머리는 상피세포표면의** micovilli**를 지시하고 있으며 화살표가 지시하는 작은 입자가** lectin **입자임.**

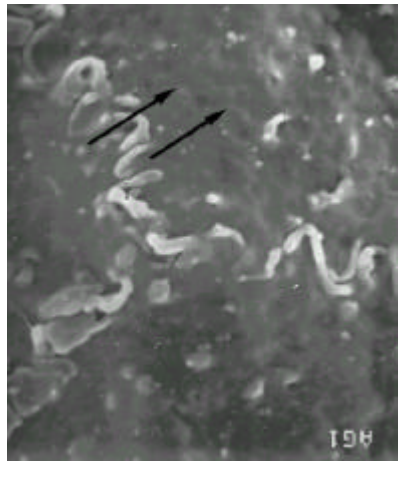

그림 12. WGA-gold complex **를 처리하지 않은 가토 각막 내피세포 표면의 주사 현미경 소견.(음성 대조군)**

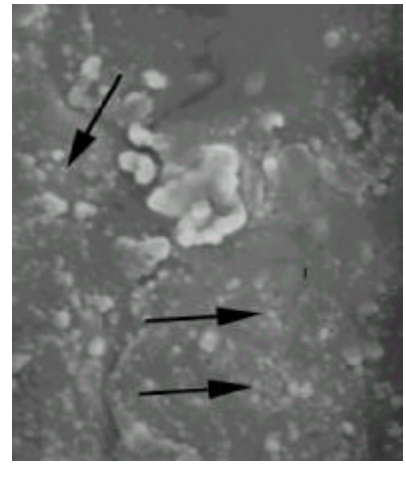

그림 11 가토 각막 내피세포 표면의 WGA-gold complex**를 반응시킨 후의 주사현미경 소견.** lectin-gold **입자들이 부착된 것을 관찰하였다.**

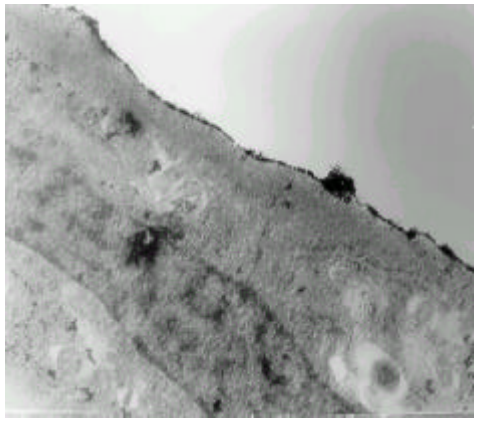

그림 13. WGA-gold complex **반응 후 각막내피세포의 투사 전자현미경 소견. 각막내피세포 표면에 부착된** lectin gold **입자들이 관찰되었다.**

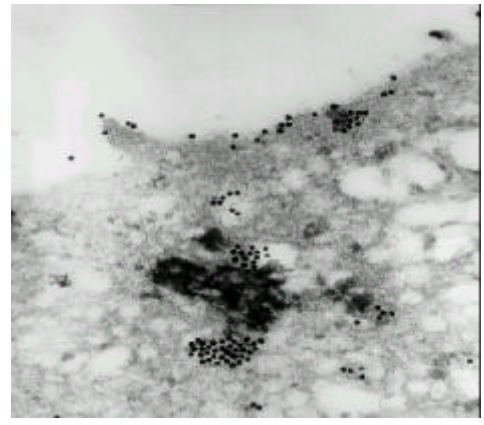

그림 14. WGA-gold complex **반응 후 각막내피세포의 투사 전자현미경 소견. 뮤신이 각막내피세포내 주머니의 형태로 존재하였다가 밖으로 배출되는 것이 관찰되었다.**

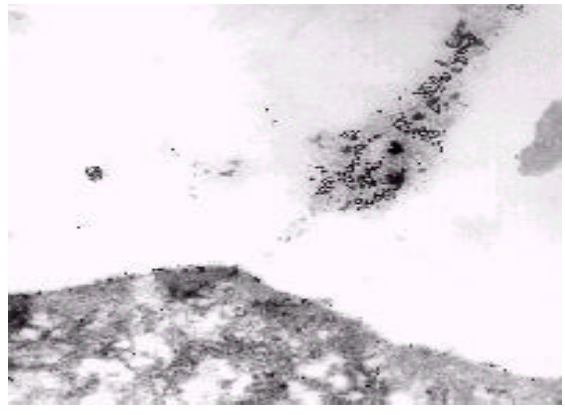

그림 15. WGA-gold complex **반응 후 각막내피세포의 투사 전자현미경 소견. 내피세포 표면으로부터 뜯겨져 나가는 뮤신층 내에** WGA-gold **입자들이 다수 관찰되었다.**

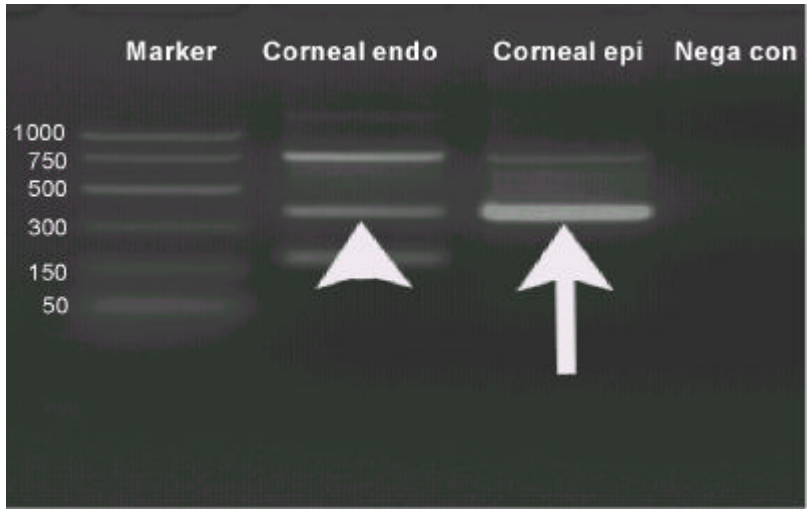

그림 16. 인체 각막내피세포 층의 MUC1 mRNA**의 역전사 중합효소연쇄반응 결과.** 368 bp**의 밴드를 관찰할 수 있었다. 왼쪽에서 부터** DNA size marker, **두번째는 각막내피세포, 세번째는 각막 상피세포(양성대조군), 네번째는 음성대조군**(template **를 생략한것) 이다.**

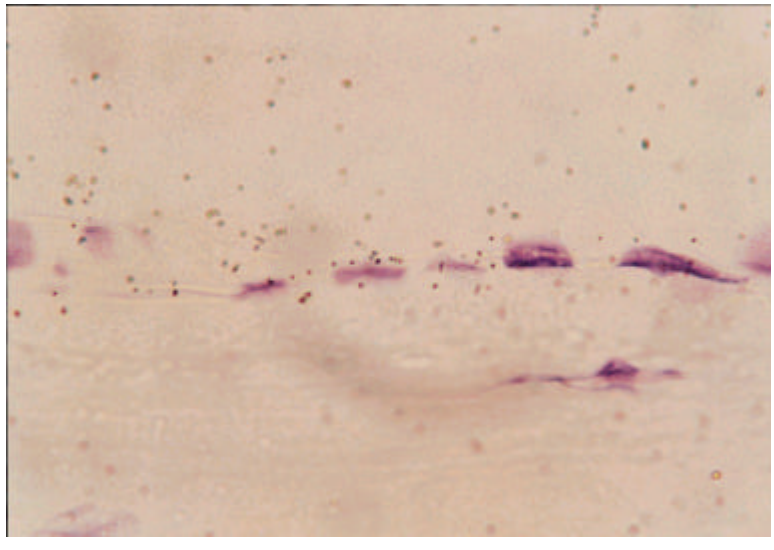

그림 17. 인체 각막내피세포 층의 *in situ* hybridization **소견**. Anti-sense probe**를 사용하여 각막내피세포 핵 주위로 다수의 검은 입자들을 관찰되었고**MUC1 mRNA**가 존재함을 확인 할 수 있었다**.

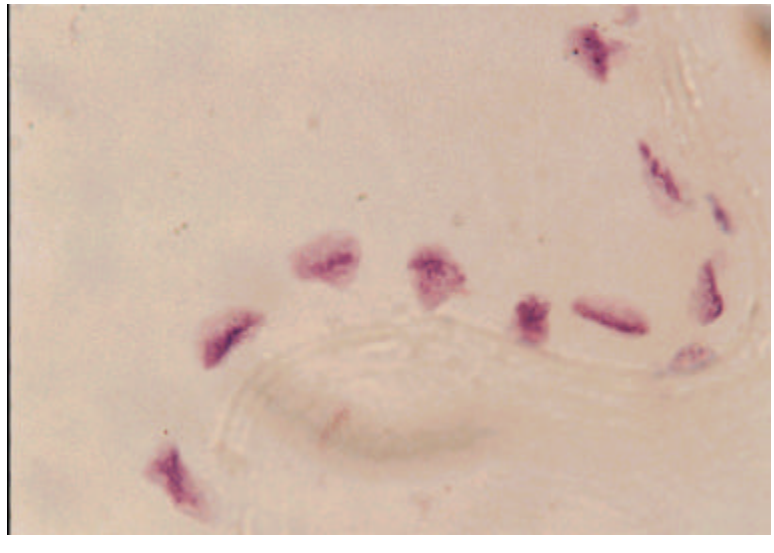

그림 18. 대조군의 인체 각막내피세포층의 *in situ* hybridization **소견**. Sense probe**를 사용하여** MUC1 mRNA**를 관찰 할 수 없었다**.(**음성대조군**)

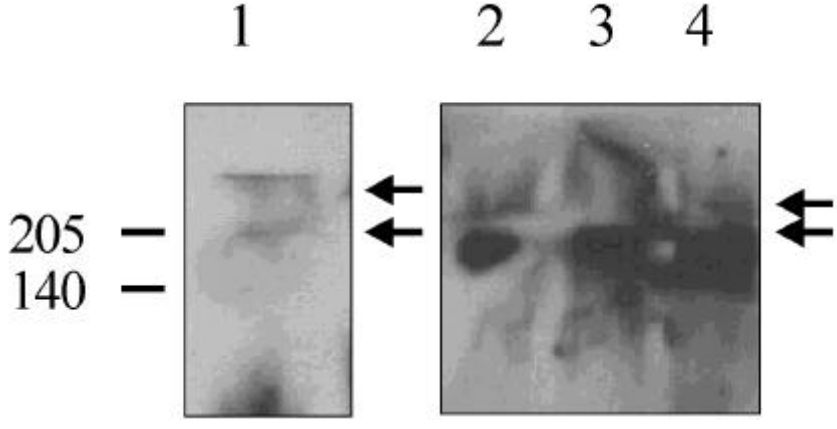

그림 19. 인체 각막내피세포의 웨스턴 블롯팅 소견. 인체 각막상피의 MUC1 부위에 해당하는 분자량 210 kD에서 각막내피세포 역시 양성의 밴드가 관찰 되었다. 동시에 MUC1 특유의 다형성(polymorphism)**도 관찰되었다.**
1: **각막내피세포**, **2**: **각막상피세포**(60ug), **3**: **각막상피세포**(80ug)
4: **각막상피세포**(100ug)

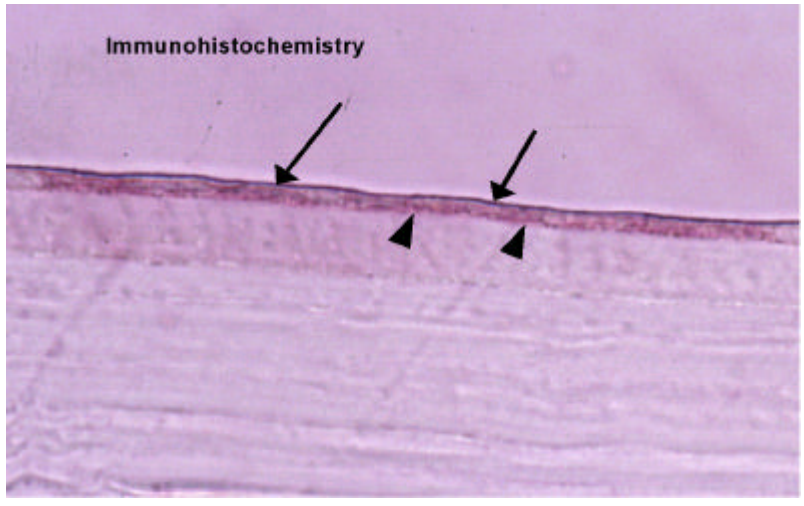

그림 20. 인체 각막내피세포의 항 MUC1 항체에 대한 면역조직화학 염색 소견. 각막내피세포 층에 붉게 염색되는 양성 반응이 관찰되었다.

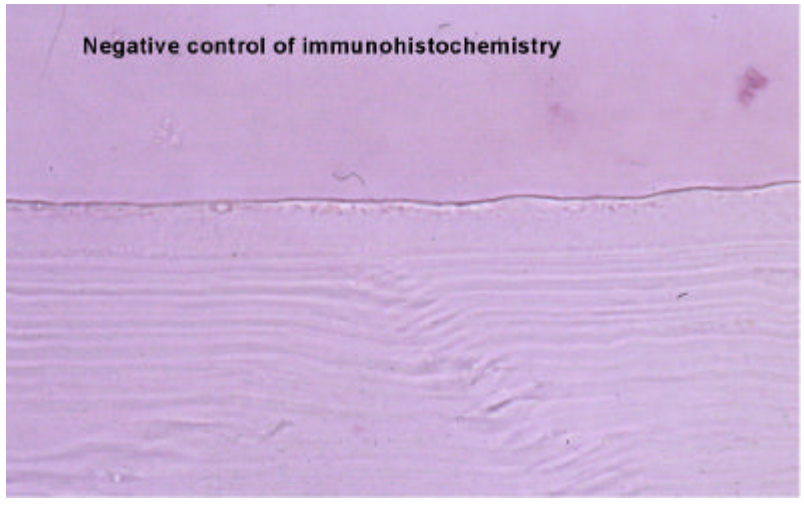

그림 21. 인체 각막내피세포 층의 항 MUC1 항체의 반응을 생략한 면역조직화학 염색 소견. 각막내피세포 층의 염색 반응이 관찰되지않았다.(음성대조군)

Ⅳ. 고 찰

뮤신은 고분자량의 당단백으로서 눈물층의 중요한 구성 성분 중 일부이며 안 조직에서는 주로 결막 및 각막 상피에서 발견되고, 세포보호와 표면 윤활 작용을 하는 것으로 알려져 있다[13]. 지금까지 밝혀진 뮤신은 MUC1-8로 분류된다. 이러한 뮤신에 관한 연구는 그 동안 각종 인체 조직 내의 상피에 국한되어 이루어졌던 게 사실이다. 그러나 인체 내에서는 유체와 지속적으로 접하는 세포들에 있어서 세포의 보호 목적으로 세포막 위에 점액층을 갖고 있는데, 각막내피세포 또한 방수와 지속적으로 접하고 있는 환경을 고려해 볼 때 내피세포를 보호할 어떤 막의 존재 가능성은 추정할 수 있는 것이었다. Barany [5]가 황부엉이에서 각막내피세포와 홍채 사이에 알려지지 않은 층의 존재 가능성을 말하였고, 그후 각막내피세포를 덮고 있는 물질에 대한 연구는 계속되었다. 그러나 상대적으로 각막내피세포에 관한 인식부족과 피검물의 획득과 그 분석에서의 한계로 인하여 그 동안 이 분야에 관한 활발한 연구가 이루어지지 않았었다. 그런데 분자생물학, 유전공학 등의 발전과 함께 최근 10여년 동안 뮤신에 대한 연구는 놀라우리만큼 이루어져서 뮤신 유전자의 분자생물학적 분석과 이로부터 유추한 단백질 구조의 발견은 뮤신의 구조적 특성, 세포 내 뮤신의 분비, 당화반응의 과정을 밝혀주었고[14,15], 그리하여 뮤신의 정상 생리학적 과정뿐 아니라 병적 과정에서의 역할을 이해하게끔 해 주었다[16]. 최근 시행되고 있는 여러 기능적 연구들은 뮤신의 기능이 세포 보호와 표면 윤활에 국한되는지 또는 세포나 조직성분의 점착 등에 관여하는지에 대한 의문을 해결하는데 도움을 줄 것이다.

Schroder 등[6]은 ruthenium red 와 osmium tetroxide로 고정, 염색하여 각막내피세포 표면에 0.06-0.15㎛ 두께의 다당류로 구성된 층이 있음을

발견하였고, Sperling[6] 또한 주사 전자현미경을 통해 각막내피세포와 섬유주 표면의 물질이 ruthenium red 와 osmium tetroxide와 결합하는 것을 관찰하였고, 이 물질이 부분적으로 urokinase, trypsin에 의해 분해됨을 보고, 이 층이 적어도 세 가지의 다른 성분으로 이루어져 있음을 발견하게 되었다. 그후 Carrington 등[17]은 고양이의 각막내피세포 표면의 점액층의 연구에서, 이 층이 조직의 고정과 염색기술에 매우 민감함을 발견하였다.

점액층(mucous layer)의 주성분은 뮤신이며[18], 뮤신은 중앙의 단백질중추와 그 주변의 다당질의 긴 가지로 구성된 복합체로서[19], 그 특성이 주변부의 당질 층과 밀접한 관계가 있다. 그러므로 뮤신의 성상을 밝히기 위해서는 주변부를 구성하는 당질 층의 조성을 밝히는 것이 필요하나, 본 연구에서는 신선한 인체 각막내피세포 수량의 제한성 때문에 가토의 각막을 이용하였고, 뮤신을 구성하는 특정한 당질에 부착하는 것으로 알려진 여러 가지 lectin을 사용하여 뮤신 주변부의 당질의 성분을 간접적으로 알아보고자 하였다. Lectin 은 자연계에 널리 편재하는 단백질로서 특정 당에 특이적으로 부착하는 능력이 있어서[20], 조직의 위치 파악이나 당포합체의 생화학적 특성을 연구하는데 유용한 도구로 쓰여왔다[21,22,23]. Lectin은 당질에 부착하는 특성에 따라 (a) glucose-mannose 군 (b) N-acetylglucosamine 군 (c) galactose/N-acetylgalactosamine 군 (d) L-fucose 군 (e) 사이알산군으로 나눌 수 있다[24]. 안과영역에서 Lectin 은 여러 종에서의 정상 각막을 연구하는데 이용되기도 하였고[25,26,27], 손상 받거나 이영양증이 있는 각막에서 당화반응양상의 변화 관찰에도 이용되었다[28,29,30]. Lectin을 이용한 연구에서는 손상에 대한 각막상피세포와 내피세포의 반응에도 차이가 있음을 보였는데, 손상 후 재생하는 상피세포는 Con-A와 WGA에 대해서 증가된 결합력을 보였고[31], 손상 후 이동하는 내피세포는 똑같은 lectin에 대한 결합력이 떨어져 있다고 하였다[32]. 이것으로 lectin이 세포와 세포사이 또는 세포

와 기질간 결합물질의 변화의 관찰에도 이용됨을 알 수 있다. 본 연구 결과 정도의 차이는 있었으나 11가지 lectin에 대해 모두 양성반응을 보였는데, 이로써 각막내피세포를 덮고 있는 점액 층이 뮤신을 구성하는 여러 종류의 당질로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. 양성반응을 보인 lectin중에서 Con-A, RCA-1, PHA-E , SNA, WGA, MAA 은 강한 양성반응을 보였고, 이는 각막내피세포를 덮고 있는 점액 층에 mannose, galactose, NeuAc galactose, N-acetyl-glucosamine, N-acetyl-neuraminic acid(sialic acid)가 많음을 의미한다. 기존의 쥐의 각막상피에서의 lectin을 이용한 연구에서는 Con-A, WGA, LFA(Limax flavus)에서 양성을 보였으며, mannose, N-acetyl-glucosamine, N-acetyl-neuraminic acid(sialic acid)가 널리 분포함을 알 수 있었다[33]. 그리고 대부분의 lectin 결합형태는 상피와 내피세포에서 유사하게 나타났다. 그러나 sialyl 특이 lectin 인 LFA에 대해서는 쥐의 각막상피세포는 중등도의 양성반응을 보였으나, 내피세포에서는 거의 반응이 나타나지 않았다. 즉 같은 당질 특이성을 가진 lectin도 항상 같은 결합 특성을 보이는 것은 아님을 알 수 있다[24].

인체 내 여러 상피조직에서의 뮤신의 생성은 세포질 내에서 이루어지며, 세포 밖으로 배출되어 세포막을 싸게 된다[14,15,34]. 각막내피세포에서의 뮤신의 위치를 밝히는 실험은 뮤신이 각막내피세포에서 생성되는지를 확인할 수 있는 방법이며, 뮤신의 내피세포 내 생성 기전, 세포외 분비방법, 그리고 뮤신과 내피세포막과의 관계, 뮤신의 각막내피세포에서의 역할 등을 알아볼 수 있는 실험이다. 본 실험에서는 인체 각막으로부터 충분한 양의 각막내피세포 뮤신을 얻을 수 없어서, 가토의 각막을 이용하였고, 광학현미경상 양성을 보인 WGA lectin을 사용하였다.

WGA lectin은 주로 각막의 keratan sulfate에 결합하는데[35,36] 아마도 N-acetylglucosamine을 통해서 부착하는 것으로 보인다. WGA lectin은 사

이알산에 대한 결합력도 갖고 있다.

WGA-lectin gold complex를 이용하여 전자현미경으로 관찰한 결과, WGA-lectin gold 입자가 각막내피세포 표면 뿐 아니라 내피세포 내에서 주머니(vesicle)형태로도 존재하며, 내피세포로부터 뜯겨져 나가는 점액 층에서도 발견되었다. 즉 뮤신이 각막내피세포에서 생성되어 내피세포 내에서 주머니 형태로 존재하다가, 내피세포 밖으로 배출되는 것으로 추정할 수 있었다. 그리고 각막내피세포막과 뮤신의 관계에서도, 뮤신이 내피세포 밖에서 덮고 있음을 알 수 있었다.

뮤신의 일반적인 기능은 세포보호와 윤활작용이다. 즉 삼투압이나 pH의 변화와 생물학적, 생리학적 손상에 대한 보호막 역할을 하는 것이다[37,38]. 그러나 Klinke 등[39]은 뮤신이 상피세포에서는 세포보호 기능을 하지만, 내피세포나 백혈구에서는 부착물질로서 작용하여 일련의 부착의 일부에 관여한다고 하였다. 뮤신은 일반적으로 threonine 과 serine을 많이 포함하는데, 이들은 광범위하게 O-glycosylation 되어있다. 이런 구조 때문에 뮤신은 섬유상(filamentous) 구조를 갖고 있으며[40,41] 음전하를 띠고 있는 특성 때문에 뮤신은 세포를 보호하는 보호막으로 작용할 수 있다. 그러나 어떤 세포가 뮤신에 대한 수용체가 있다면 뮤신의 부착기능은 보호막 기능을 능가하게 된다. 즉 뮤신은 세포 보호 기능과 함께 다른 세포나 분자의 부착 기능도 갖고 있다. 그리고 당단백 내의 당질은 세포와 미세분자 또는 세포와 세포간의 중요한 인식인자 역할을 하는 것으로 알려져 있고[42,43], 세포표면의 당단백 내의 당질의 분화과정, 성장과정과 악성 종양에서의 변화를 관찰하면 이 당질의 역할에 관한 더 많은 사실을 알 수 있을 것으로 본다[44]. 본 연구에서는 뮤신의 역할을 확실히 밝혀주지는 않았다. 그러나 본 실험에서 관찰했듯이 뮤신이 각막내피세포에서 생성되어 세포 밖으로 분비되고 내피세포막 밖에서 세포를 싸고 있다는 점과 각막내피세포를 싸는 뮤신층

의 성분인 MUC1을 포함한 층의 제거는 내피세포의 손상을 유발한다는 사실[45], 그리고 각막내피세포가 지속적으로 방수와 같은 외부의 환경과 접하고 있다는 사실에서 뮤신이 각막내피세포 보호에 관여할 것이라는 추측은 할 수 있었다.

MUC1은 '상피세포 뮤신'이라고도 하며 조직내의 여러 상피와 여러 종류의 악성종양에서 발견된다[46,47]. 다른 뮤신과 달리 MUC1은 세포막에 걸쳐있으며, 유체와 접하는 대부분의 세포 표면에서 관찰된다. 한편 MUC2-MUC8 은 '분비성 뮤신(secreted mucin)'으로서 점액 층을 형성하면서 이황 결합을 갖고 있다. MUC1은 반복되는 직렬로 나열된 아미노산 조각의 숫자와 당화의 변화에 따라 조직 및 종족간에 다형태성을 띠고 있다. MUC1을 구성하는 중심부 단백질의 세포 외측 부분은 세포막위로 200-500nm 올라와 있고, 이렇게 세포 밖으로 길게 뻗쳐있는 구조는 MUC1의 특정기능과 관련이 있을 것으로 추측된다[48]. 과거 결막의 배상세포에서만 생성되는 것으로 알려진 각막상피 표면의 뮤신은 단일항체를 이용한 실험에서 인체 각막상피 및 결막상피에서 생성됨이 알려졌다[49]. MUC1이 인체 각결막의 상피세포로부터 발현됨이 역전사 중합효소 연쇄반응 결과, *in situ* hybridization, 면역조직화학염색을 통해 밝혀졌고[18], 그 기능 또한 눈물 층의 유지와 병원균이나 외부 세포물질의 부착을 막는 것이라고 한다. 이러한 상피세포 표면에서의 MUC1이 같은 음전하를 띤 다른 뮤신을 밀어냄으로서, 안구표면에서의 점액층이 안정되게 확산과 이동을 되게 한다. 안정된 확산과 이동을 가능하게 해준다.

Muc1 mRNA(쥐의 mucin 1 gene), 단백질이 없는 쥐는 Muc1 knock 마우스는 정상마우스에 비해 결막염이나 안검염에 걸리기 쉬웠는데, 이것으로 MUC1이 안구표면에서 세균 감염에 대한 중요한 보호막으로 작용한다는 것을 추정할 수 있었다[50]. MUC1의 기능 중에는 다른 세포의 부착을

막는 것이 있는데 이것은 MUC1의 분자량이 아주 크기 때문이며, MUC1 표면에 있는 WGA lectin에 반응하는 음전하을 띠는 사이알산에 의한 것으로 추측할 수 있다. 각막상피에 결손이 생기면 녹농균의 각막 표면 부착이 용이해지는데[51,52] 이것은 상처난 각막의 표면에 MUC1 단백이 없는 것과 관련이 있을 것으로 본다. 즉 MUC1은 큰 분자량과 함께 세포 밖으로 길게 뻗쳐진 구조로 인해 세균부착을 막고 세포를 보호하는 역할을 하는 것으로 추정할 수 있다.

본 연구에서는 뮤신 중에서 MUC1을 이용하여 각막내피세포의 뮤신층의 생성원류를 밝히고자 하였는데, 이는 MUC1이 뮤신 중에서 가장 흔하게 존재하고, 각막상피에서도 쉽게 발견되므로 내피세포에서의 비교 연구에 도움이 될 것으로 보기 때문이었다. 본 연구에서는 뮤신층의 생성원류를 밝히기 위하여 3가지의 다른 분자 생물학적 기법을 이용하여 인체 각막내피세포에서의 MUC1 mRNA와 단백질을 증명하고자 하였다. 인체 각막내피세포의 역전사 중합효소 연쇄반응 결과 상피세포에서는 하나의 밴드, 내피세포에서는 세 개의 밴드를 보였다. 비록 내피세포에서 세 개의 밴드가 나타났지만 더 이상의 실험은 하지 않았는데, 왜냐하면 충분한 신선 인체 각막내피세포를 얻기가 어려웠고, 368 base pair 의 뮤신 배열이 염기서열을 배열해 본 결과 MUC1과 99.5% 일치되었기 때문이다. *In situ* hybridization 에서는 다수의 검음색 입자가 각막내피세포 핵 주위서 발견되었는데, 이로써 MUC1 mRNA의 존재를 각막내피세포에서 확인할 수 있었다. 즉 MUC1의 유전자는 각막내피세포에 있으며, MUC1의 생성 또한 내피세포에서 이루어짐을 알 수 있었다. 그리고 각막내피세포의 웨스턴 블롯팅 수행시 이미 MUC1의 존재가 입증된 인체 각막상피세포를 양성 대조군으로 사용하여 본 결과 각막내피세포 역시 약 210 kD 이상의 분자량에서 양성소견을 보임을 관찰하였다. 그리고 많은 논문에서 보고된것[18,40,53]과

마찬가지로 웨스턴 블롯팅 결과에서는 밴드의 위치가 약간 다른 MUC1 특유의 다형성(polymorphism)을 볼 수 있었다. 뮤신은 당화가 많아서 뮤신단백질의 면역조직화학 염색은 아주 어려운 과정인데, 본 실험에서는 인체 각막내피 층의 염색양성의 소견을 관찰할 수 있었다. 각막내피세포 밖에서 염색된 MUC1이 비록 얇은 선으로 관찰되어 양이 적은 것은 짐작할 수 있지만, 이상의 결과로 우리는 MUC1이 각막내피세포 내에서 발현되며, 내피세포로부터 생성된 MUC1이 세포 밖으로 배출된다는 것과 MUC1이 각막내피세포의 표면에 있는 뮤신층의 구성성분이라는 것을 알 수 있었다. HMFG-1로 인체 내피세포를 염색한 것의 강도는 상피보다 훨씬 덜 했는데, 이것은 서로 다른 세포에서의 MUC1 총량의 차이에 따른 것으로 본다.

우리는 MUC1의 생성과 발현에 관한 추가적인 연구를 통해 각막내피세포 보호에 있어서의 MUC1의 구체적인 역할과 각막내피세포와 방수간의 생리적 작용을 규명할 수 있을 것으로 본다.

본 실험에서는 각막내피세포 수량의 제한으로 직접 각막내피를 싸고 있는 뮤신의 화학적 성분을 밝힐 수는 없었으나, 추후 이에 관한 연구가 필요할 것으로 보이고, 그 결과는 각막내피세포의 보호 방안과 추후 각막내피세포를 효율적으로 보호할 수 있는 점탄물질의 개발 시 필요한 자료가 될 것으로 보인다.

Ⅴ. 결 론

각막내피세포의 뮤신층은 그 생성 및 기능에 있어서 알려진 점이 거의 없는 바, 각막내피세포 표면에 존재하는 뮤신층의 성상을 알아보고, 그 생성원류를 알아보고자 하였다.

Lectin을 이용한 뮤신의 당질 성분염색은 가토의 각막표면뮤신을 1% paraformaldehyde와 1% glutaraldehyde로 고정한 후 biotinylated lectin을 12시간 반응시키고, 조직을 UltraTek®anti-polyvalent antibody와 UltraTek® HRP 에 반응시킨 후 광학현미경으로 관찰하였고, WGA lectin-gold complex를 반응시킨 후 전자현미경으로 관찰하였다.

인체 각막내피세포에서 전체 RNA를 분리한 후, RNA-PCR core kit을 이용해서 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행했다. 역전사 중합효소 연쇄반응 산물을 전기 영동 후 MUC1 밴드 (368 base pair)를 잘라서 plasmid DNA를 추출하였고, 선발된 클론을 염기서열 결정 방법으로 MUC1 유전자인지 확인하였다. 그리고 ^{35}S 표품된 anti-sense ribo probe를 hybridization buffer에 넣어서 16시간동안 hybridization을 수행하였다.

조직면역학적 염색은 뮤신 MUC1에 대한 1차, 2차, 3차 항체를 처치하여 관찰하였다. 관찰 결과는 다음과 같다.

1. 정도의 차이는 있었지만 본 연구에 사용된 11가지 lectin 염색 모두 양성반응을 보였다. RCA-1, PHA-E, SNA, WGA, MAA, CON-A는 강한 양성반응을 보였으며, PNA 의 경우 중등도 반응을, SBA, LCA, DBA, UEA-I에서는 약한 양성 반응을 보였다.
2. WGA lectin-gold 입자들이 전자현미경 관찰결과, 각막내피세포에 부착된 형태, 세포 내 주머니 형태, 그리고 뜯겨져 나가는 뮤신층 내에서 발

견되었다.

3. 인체 각막내피세포의 역전사 중합효소 연쇄반응 결과 368bp에 해당하는 MUC1 mRNA 해당부위에서 밴드를 관찰할 수 있었다. 그리고 *in situ* hybridization상 다수의 검은색 입자들이 각막내피세포에서 발견되었고 MUC1 mRNA가 각막내피세포 핵 주위에 존재함을 확인할 수 있었다.
4. MUC1에 대한 항체를 이용한 면역조직화학 염색상 인체각막내피 층에서 염색 양성 소견을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 각막내피세포 표면에는 여러 종류의 lectin과 반응하는 당질 층으로 구성된 점액 층이 있음을 확인할 수 있었고, 이 점액 층의 성분 중에는 각막내피세포에서 생성, 분비되는 MUC1 이 있음을 알 수 있었다.

참고 문헌

1. Hankinson SE. The epidemiology of age related cataract. In: Albert DM, Jakobiec FA, editors. Principles and practice of ophthalmology. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1994. p.1255-66.

2. Madsen K, Schenholm M, Johnke G, Tengblad A. Hyaluronate binding to intact corneas and cultured endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 1989;30:2132-7.

3. Harfstrand A, Molander N, Stenevi U, Apple D, Schenholm M, Madsen K. Evidence of hyaluronic acid and hyaluronic acid binding sites on human corneal endothelium. J Cataract Refract Surg 1992; 18:265-9.

4. Monson MC, Tamura M, Mamalis N, Olson RJ, Olson RJ. Protective effects of Healon and Occucoat against air bubble endothelial damaage during ultrasonic agitation of the anterior chamber. J Cataract Refract Surg 1991;17:613-6.

5. Barany E, Berggren L, Vravec F. The mucinous layer covering the corneal endothelium in the owl Strix aluco. Br J Ophthalmol 1957;41:25-30.

6. Schroder HD, Sperling S. Polysaccharide coating of human corneal endothelium. Acta Ophthalmol 1977;55:819-26.

7. Kim EK, Cristol SM, Kim HL, Kang SJ, Park JW, Edelhauser HF. The Mucinous layer of corneal endothelial cells. Yonsei Med J 2000;41:651-6.

8. Kim EK, Kang SJ, Kim HB, Hong YJ, Kim SY. The Reaction of endothelial mucinous layer against Viscoat or Healon during irrigation. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology; 1995 May 14-19; Fort lauderdale, Florida;1995.

9. Lawrenson JG, Reid AR, Allt G. Corneal glycoconjugates: an ultrastructural lectin-gold study. Histochem J 1998;30:51-60.

10. Roth J, Lucocq JM, Charest PM. Light and electron microscopic demonstration of sialic acid residues with lectin from Limax flavus. J Histochem Cytochem 1984;32:1167-76.

11. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156-9.

12. Kim SS, Kim KS, Lee JG, Park IY, Koo JS, Yoon JH. Levels of intracellular protein and messenger RNA of mucin and lysozyme in normal human nasal and polyp epithelium. Laryngscope 2000;110:276-80.

13. Nichols BA, Chiappino ML, Dawson. Demonstration of the mucous layer of the tear film by electron microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci 1985;26:464-73.

14. Neutra M, Leblond CP. Synthesis of the carbohydrate of mucus in the golgi complex as shown by electron microscope radioautography of goblet cells from rats injected with glucose-H3. J Cell Biol 1966;30:119-36.

15. Oliver MG, Specian RD. Cytoskeleton of intestinal goblet cells: role of actin filaments in baseline secretion. Am J Physiol 1990;259:G991-7.

16. Gendler SJ. Epithelial mucin genes. Annu Rev Physiol 1995;57:607-34.

17. Carrington SD, Alexander RA, Grocott P, Grierson I. The viscous layer overlying the corneal posterior epithelium of the domestic cat. J Anat 1987;153:77-92.

18. Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Gipson IK. Human corneal and conjunctival epithelia express MUC1 mucin. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995;36:1818-27.

19. Uebermuth C, Augenklinik, Klinikum, Wuppertal. Mucins of the eye. Ophthalmology 1999;96:563-9.

20. Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. What should be called a lectin? Nature 1980;285:66.

21. Roth J. Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glycoconjugates on thin sections. J Histochem Cytochem 1983;31:987-99.

22. Roth J, Lucocq JM, Charest PM. Light and electron microscopic demonstration of sialic acid residues with lectin from Limax flavus. J Histochem Cytochem 1984;32:1167-76.

23. Suganuma T, Tsuyama S, Murata F. Glycoconjugate cytochemistry of the rat fundic gland using lectin/colloidal gold conjugates and Lowicryl K4M. Histochemistry 1985;83:489-95.

24. Tuori A, Virtanen O, Uusitalo H. Lectin binding in the anterior segment of the bovine eye. Histochem J 1994;26:787-98.

25. Holmes MJ, Mannis MJ, Lund J, Jacobs L. Lectin receptors in the human cornea. Cornea 1985;4:30-4.

26. Panjwani N, Moulton P, Alroy J, Baum J. Localization of lectin binding sites in human, cat, and rabbit corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 1986;27:1280-4.

27. Panjwani N, Baum J. A histochemical comparison of human corneal stromal glycoconjugates with eight other species. Distinct species-dictated differences in binding sites of Griffonia simplicifolia I. Histochemistry 1988;89:41-5.

28. Panjwani N, Rodrigues MM, Alroy J, Albert D, Baum J. Alteration in stromal glycoconjugates in macular corneal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci 1986;27:1211-6.

29. Panjwani N, Baum J. Lectin receptors of normal and dystrophic corneas. Acta Ophthalmol 1989;192:171-3.

30. Bishop PN, Bonshek RE, Jones CJP, Ridway AEA, Stoddart RW. Lectin binding sites in normal, scarred, and lattice dystrophy corneas. Br J Ophthalmol 1991;75:22-7.

31. Gipson IK, Riddle CV, Kiorpes TC, Spurr SJ. Lectin binding to cell surfaces: comparisons between normal and megrating corneal epithelium. Dev Biol 1983;96:337-45.

32. Gordon SR, Marchand J. Lectin binding to injured corneal endothelium mimics patterns observed during development. Histochemistry 1990;94;455-62.

33. Lawrenson JG, Reid AR, Allt G. Corneal glycoconjugates: an ultrastructural lectin-gold study. Histochem Journal 1998;30:51-60.

34. Neutra MR, Grand RJ, Trier JS. Glycoprotein synthesis, transport, and secretion by epithelial cells of human rectal mucosa: normal and cystic fibrosis. Lab Invest 1977;36:535-46.

35. Spicer SS, Schulte BA. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. J Histochem Cytochem 1992;40:1-38.

36. Hirsch M, Moulessehoul S, Pouliquen Y. New method of ultrastructural localization of WGA binding sites in the rabbit cornea using quick-frozen specimens followed by freeze substitution. Exp Eye Res 1991;53:317-23.

37. Seregni E, Botti C, Bajetta E, Ferrari L, Martinetti A, Nerini-Molteni S, et al. Hormonal regulation of MUC1 expression. Int J Biol Markers 1999;14:29-35.

38. Strous GJ, Dekker J. Mucin-type glycoproteins. Crit Rev Biochem Mol Biol 1992;27:57-92.

39. Van Klinken. Mucin gene structure and expression:protection vs.adhesion. Am J Physiol 1995;269:G613-27.

40. Patton S, Gendler SJ, Spicer AP. The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. Biochim Biophys Acta 1995;:407-23.

41. Buchheim W, Welsch U, Huston GE, Patton S. Glycoprotein filament removal from human milk fat globules by heat treatment. Pediatrics 1988;81:141-6.

42. Paulson JC. Glycoproteins: what are the sugar chains for? Trends Biochem Sci 1989;14:272-6.

43. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology 1993;3:97-130.

44. Lis H, Sharon N. Protein glycosylation: structure and functional aspects. Eur J Biochem 1993;15;218:1-27.

45. Kim EK, Jung SE, Wan XW, Kim SY, Kim HL. Relationship between the corneal endothelium and posteriorly adjacent glycoprotein layer. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology; 2000 Apr 30-May 5; Fort lauderdale, Florida;2000.

46. Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, et al. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. Cancer Res 1993;53:641-51.

47. Dahiya R, Kwak KS, Byrd JC, Ho S, Yoon WH, Kim YS. Mucin synthesis and secretion in various human epithelial cancer cell lines that express the MUC1 mucin gene. Cancer Res 1993;53:1437-1443.

48. Hilkens J, Ligtenberg MJL, Vos HL, Litvinov SV. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. Trends Biochem Sci 1992;17:359-63.

49. Watanabe H, Fabricant M, Tisdale AS, Spurr-Michaud SJ, Lindberg K, Gipson IK. Human corneal and conjunctival epithelia produce a mucin-like glycoprotein for the apical surface. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995;36:337-44.

50. Kardon R, Price RE, Julian J, Lagow E, Tseng SCG, Gendler SJ, et al. Bacterial conjunctivitis in Muc1 null mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:1328-35.

51. Spurr-Michaud SJ, Barz M, Gipson IK. An organ culture system for study of adherence of Pseudomonas aeruginosa to normal and wounded corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 1988;29:379-86.

52. Klotz SA, Au Y, Misra RP. A partial-thickness epithelial defect increases the adherence of Pseudomonas aeruginosa to the cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 1989;30:1069-74.

53. Hey NA, Grahan RA, Sief MW, Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. J Clin Endocrinol Metab 1994:78:337-42.

Abstract

The structural characteristics and biochemical origin of corneal endothelial mucous layer

Jung Won Park

Brain Korea 21 project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Eung Kweon Kim)

Corneal endothelial cells play a major role in the maintenance of corneal transparency. Excessive loss of corneal endothelial cells during ECCE (Extracapsular cataract extraction), which is one of the most common operations in ophthalmology, results in loss of vision and eventual corneal transplantation. Therefore, the protection of corneal endothelial cell during ECCE is indeed significant.

Recently, there have been reports showing that the corneal endothelial cell surface is covered by a mucous layer. In this study, we investigated the nature of this corneal endothelial mucous layer and the biochemical mechanism of mucin production. These data may be useful in the search for a new viscoelastic material and an innovative protection method for the corneal endothelial cells.

The major component of the mucous layer is mucin and this mucin consists of a core protein with peripheral carbohydrate branches. We stained the carbohydrate of mucin with specific lectin to find out the component of the carbohydrate. All the lectin staining results showed

positive findings. (RCA-1, PHA-E, SNA, WGA, MAA, Con-A :strong positive; PNA: moderate; SBA, LCA, DBA, UEA-I: weak.) The results obtained showed that the mucous layer covering the corneal endothelial cells consists of various kinds of carbohydrate which constitute mucin.

To determine the location and structural characteristic of mucin, we observed WGA lectin-gold complex with transmission electron microscopy. WGA lectin-gold particle was found in the endothelial cell as a vesicular shape located on the surface of endothelial cell and in the separated mucous layer. This suggested that mucin was produced in the corneal endothelial cells, remained in the vesicle, and secreted. The results confirmed that mucin is one of the components of mucus layer overlying the corneal endothelial cell. To confirm the biochemical mechanism of mucin production by corneal endothelial cells, we performed 3 kinds of molecular biologic studies using MUC1, which is present in the cornea. We had detected a MUC1 mRNA band from the RT-PCR results of human corneal endothelial cells, which coincides with the positive control band. Using *in situ* hybridization, silver grains were observed around the nucleus in human corneal endothelial cells representing the expression of MUC1 mRNA in the corneal endothelium. According to Western blot, MUC1 antibodies produced positive signals. Immunohistochemical studies on human corneal sections showed positive statining for the protein product of MUC1 in corneal endothelium.

The results of this study showed that there was a carbohydrate-rich layer which reacts to various lectins on the corneal endothelial surface and MUC1 is one of the components of this layer.

Key Words : corneal endothelial cell, *in situ* hybridization, mucin, lectin, MUC1, RT-PCR