

하사근 기능항진 환자에서
하사근 미오신 중쇄 (myosin
heavy chain) 아형의 발현

연세대학교 대학원

의 학 과

장 윤 희

하사근 기능항진 환자에서
하사근 미오신 중쇄 (myosin
heavy chain) 아형의 발현

지도 이 중 복 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2003년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

장 윤 희

장윤희의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2003년 12 월 일

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 끊임없는 지도와 격려를 베풀어 주시고 저를 아껴주신 이종복 교수님께 감사를 드립니다. 논문을 준비하는 동안 많은 조언과 가르침을 주신 김희남 교수님, 김태승 교수님, 한승한 교수님, 이준행 교수님께도 감사를 드립니다. 실험에 도움을 주신 아주대학교 생명과학과 김혜선 교수님과 김민정 대학원생, 병리과 한재호 교수님께 진심으로 감사를 드리며 실험이 진행되는 동안 관심과 격려를 보내주신 아주의 대 안과 유호민 주임교수님과 교실원 여러분께 감사의 말씀을 드립니다. 오늘이 있기까지 보살펴 주시고 이해해 주신 양가 부모님, 항상 곁에서 어려운 일을 도와주고 힘이 되어 준 남편, 그리고 소중한 두 아들 원준이, 원재와 함께 이 기쁨을 나누고 싶습니다. 끝으로 좋은 배움의 기회를 주신 하느님께 감사를 드립니다.

저자 씀

<차례>

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 재료	6
2. 방법	7
가. 미오신 중쇄 아형의 면역조직화학염색	7
나. 미오신 중쇄 아형의 동초점 현미경(confocal microscope) 검사	7
다. 미오신 중쇄 아형의 sodium dodecyl sulfate(SDS) polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)와 western blot 분석	8
3. 통계학적 분석	9
III. 결과	9
1. 하사근 근육의 층 분석	9
2. 미오신 중쇄 아형의 면역조직화학염색	11
3. 미오신 중쇄 아형의 동초점 현미경검사	14
4. 미오신 중쇄 아형의 SDS-PAGE와 western blot 분석	14
IV. 고찰	19
V. 결론	24
참고문헌	25
영문요약	29

그림 차례

그림 1. 하사근의 층분석	10
그림 2. fast 아형의 특이항체로 염색한 하사근의 안와층	11
그림 3. slow 아형의 특이항체로 염색한 하사근의 안와층	12
그림 4. developmental 아형의 특이항체로 염색한 하사근의 안와층	12
그림 5. fast 아형의 특이항체와 간접 면역형광으로 염색한 하사근의 안와층 동초점 영상	13
그림 6. slow 아형의 특이항체와 간접 면역형광으로 염색한 하사근의 안와층 동초점 영상	13
그림 7. developmental 아형의 특이항체와 간접 면역형광으로 염색한 하사근의 안와층 동초점 영상	13
그림 8. Coomassie blue로 염색한 polyacrylamide gel에서의 미오신 중쇄 단백질 띠	15
그림 9. fast 아형에 대한 western blot 분석	16
그림 10. slow 아형에 대한 western blot 분석	17
그림 11. developmental 아형에 대한 western blot 분석	18

하사근 기능항진 환자에서

하사근 미오신 중쇄 (myosin heavy chain) 아형의 발현

하사근 기능항진은 비교적 흔하게 관찰되는 안구 운동질환으로 안구가 내전할 때 상전되는 현상이며 특히 하사근의 작용 방향으로 안구가 움직일 때 반대편 안구에 비해 더 많은 상전이 나타나는 것이 특징이다. 하사근 기능항진은 임상적으로 원발성과 속발성 하사근 기능항진으로 분류한다. 원발성 하사근 기능항진은 그 원인이 밝혀져 있지 않으며, 제1안위에서는 상사시가 조금 있거나 혹은 거의 나타나지 않는다. 반면 속발성 하사근 기능항진은 주로 한쪽 눈에 나타나며, 동측 제4뇌신경 마비로 인한 상사근 마비나 반대쪽 눈의 상직근 마비로 인해 생긴다. 제1안위에서 수직사시의 편위가 크고 회전사시도 동반되는 것이 원발성 하사근 기능항진과의 차이점이다. 이와 같은 임상 양상의 차이로 두 유형의 구분이 가능하게 되는데 속발성 하사근 기능항진의 원인이 상사근의 마비 등에 인한 것으로 알려진 반면, 원발성 하사근 기능항진의 원인은 아직 뚜렷이 밝혀지지 않은 실정이다. 본 연구에서는 원발성과 속발성 하사근 기능항진이 있는 환자의 하사근에서 각각 미오신 중쇄의 아형과 그 분포를 조사하고 비교하였으며, 정상 하사근과 비교 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 안와층은 근섬유가 직경이 작고 원형이며 하사근의 바깥쪽을 U자 모양으로 둘러싸고 있는데, 근섬유의 직경이 큰 중심부의 안구층과 뚜렷이 구별이 되었다.

2. fast 아형은 가장 풍부한 아형으로 안와층과 안구층에서 동일한 염색양상을 나타내었는데, 정상 하사근에 비해 원발성 하사근 기능항진의 하사근에서 fast 아형의 발현이 감소되어 있었고, 이 차이는 통계적으로 유의하였다(근사유의확률=0.000). 속발성 하사근 기능항진의

하사근에서는 정상에 비해 의미있는 차이가 없었다.

3. slow 아형은 안와층과 안구층에 광범위하게 흩어져 염색되었으나 안와층에서 좀 더 우세하게 염색되어 나타났고 정상에 비해 원발성 기능항진, 속발성 기능항진으로 갈수록 통계적으로 의미있게 증가되어 발현되었다(근사유의확률=0.000).

4. developmental 아형은 안와층에만 나타나고 안구층에는 나타나지 않았는데, 정상 하사근과 원발성 기능항진에 비해 속발성 기능항진의 경우에 통계적으로 의미있게 증가되어 발현되었다(근사유의확률=0.000).

정상 하사근과 원발성 및 속발성 하사근 기능항진이 있는 하사근에서 다양한 미오신 중쇄 아형의 발현에는 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 이러한 차이가 원발성 혹은 속발성 하사근 기능항진의 병인에 어떤 역할을 하는지는 구체적으로 확인할 수는 없었지만 이러한 연관성의 인과관계에 대해 추가적인 연구가 수행된다면 하사근 기능항진의 병인을 이해하는 데에 도움이 되리라 생각된다.

핵심되는 말 : 원발성 하사근 기능항진, 속발성 하사근 기능항진, 미오신 중쇄 아형, 안와층, 안구층

하사근 기능항진 환자에서
하사근 미오신 중쇄 (myosin heavy chain) 아형의 발현

<지도교수 이 종 복 >

연세대학교 대학원 의학과

장 윤 희

I. 서론

하사근 기능항진은 비교적 흔하게 관찰되는 안구 운동질환으로 안구가 내전할 때 상전되는 현상이며 특히 하사근의 작용 방향으로 안구가 움직일 때 반대편 안구에 비해 더 많은 상전이 나타나는 것이 특징이다.¹ 하사근 기능항진은 임상적으로 원발성 하사근 기능항진과 속발성 하사근 기능항진으로 분류한다. 원발성 하사근 기능항진은 그 원인이 밝혀져 있지 않으며, 임상적 특징으로는 주로 양안에 나타나는데 우측을 볼 때 좌안이, 좌측을 볼 때 우안이 상전된다. 내사시 혹은 외사시와 동반되어 나타나며 제1안위에서는 상사시가 조금 있거나 혹은 거의 나타나지 않는다. 반면 속발성 하사근 기능항진은 주로 한쪽 눈에 나타나며, 동측 제4뇌신경 마비로 인한 상사근 마비나 반대쪽 눈의 상직근 마비로 인해 생긴다. 역시 안구가 내전할 때 상전이 나타나지만 제1안위에서 수직사시의 편위가 크고 회선사시도 동반되는 것이 원발성 하사근 기능항진과의 차이점이다. 또한 마비사시인 속발성 하사근 기능항진은 Bielschowsky 두경사 검사법에서 양성으로 나타난다.

이와 같은 임상 양상의 차이로 두 유형의 구분이 가능하게 되는데

속발성 하사근 기능항진의 원인이 상사근의 마비 등에 인한 것으로 알려진 반면, 원발성 하사근 기능항진의 원인은 아직 뚜렷이 밝혀지지 않은 실정이다. 하사근의 근막 구조에 선천성 이상이 있거나, 내직근이 비스듬하게 안구에 종지함으로 인해 내직근의 작용 방향인 내전시 안구가 상전된다고 보고된 바 있다.² 또한 하사근 기능항진에서 뇌신경으로부터의 신경 자극이 동측 내직근과 하사근에 동시에 전달되어 생긴다는 보고도 있다.³ 한편 원발성 하사근 기능항진이 동반된 외사시 환자들과 외사시만 있는 환자들을 대상으로 하사근 종지부의 위치를 각막연과의 거리 관계를 통하여 관찰하기도 하였으나 두 군간에 의미 있는 차이는 없었다.⁴ Spencer와 McNeer는 하사근의 전자현미경적 미세 구조가 원발성 및 속발성 하사근 기능항진에서 차이가 없었으며, 이로써 원발성 하사근 기능항진은 양쪽 상사근의 불완전 마비에 의할 것이라고 보고하였다.⁵ 하사근 기능항진이 있는 어린이와 성인환자의 하사근에서 생화학적 분석으로 lactate dehydrogenase의 동종효소(isoform)의 분포를 관찰한 결과 하사근 기능항진이 있었던 어린이들의 동종효소 분포가 대조군의 분포와 다르게 관찰되었고 H subunit가 M subunit보다 더 많이 관찰되는 소견으로 보고하였으나 역시 정상과의 비교만 이루어졌을 뿐 원발성 하사근 기능항진과 속발성 하사근 기능항진간의 비교는 이루어지지 않았다.⁶ 또한 하사근 근소포체를 통한 Ca^{2+} 의 이동을 조사해 보았을 때 원발성 하사근 기능항진 환자에서 근소포체(sarcoplasmic reticulum)로 Ca^{2+} 의 재흡수가 느리게 나타나므로 근세포내 고농도의 Ca^{2+} 이 과도한 수축에 영향을 줄 것이라는 보고도 있다.⁷ 최근에는 상사근 활차의 해부학적 변이를 자기공명 영상을 이용하여 고찰한 결과 활차의 위치 변이가 하사근의 기능항진과 함께 상사근의 기능저하를 가져올 수 있다는 보고가 있었다.⁸ 즉 원발성 하사근 기능항진의 원인에 대한 만족할 만한 설명은 아직 보고되지 않은 상태이다.

미오신(myosin)은 골격근에 가장 많이 존재하는 근수축 단백질로

2개의 중쇄(heavy chain)와 4개의 경쇄(light chain)로 구성되어 있으며, 중쇄는 근수축의 성상을 결정하는 데 가장 중요하고, 경쇄는 중쇄의 기능을 조절한다. 성숙한 근육은 다양한 세포나 근섬유로 이루어져 있는데, 각각은 서로 다른 미오신 중쇄의 아형을 합성함으로써 뚜렷하게 구별되는 생리적 대사적 특징을 갖게 된다. 미오신 중쇄의 아형에 따라 근섬유의 기능적 성상에 차이가 나타나는데 미오신 중쇄의 아형은 조직에 특이하게, 발생과정 중에 조절되어 발현된다.⁹

외안근은 골격근 중에서도 독특한 표현양상을 보인다.¹⁰ 직근과 사근은 서로 다른 근섬유로 구성되는 두 개의 뚜렷이 구분되는 층을 갖고 있는데, 골막과 안와골에 근접해 있는 바깥의 안와층(orbital layer, OL)과 시신경과 안구에 근접해 있는 안쪽의 안구층(global layer, GL)으로 이루어져 있다. 건으로 구별되는 근육의 부착부까지 근육 길이 전체에 걸쳐 뻗어 있는 안구층과는 달리 안와층은 근육이 건으로 바뀌기 전에 소실된다. 안와층은 풍부한 사립체와 혈관을 포함하는 직경이 작은 근섬유로 이루어져 있고, 안구층은 사립체의 수가 다양하고 혈관이 적고 직경이 큰 근섬유로 이루어져 있다.¹¹ 외안근은 미오신 중쇄 아형들의 구성에 관해서도 특이한데, 모든 근육들은 배아 상태에서는 developmental 아형, neonatal 아형, slow 아형 및 fast 아형을 지니고 있다가 출생 직후 developmental 아형과 neonatal 아형은 사라진다. 그러나 외안근 안구층에서는 이 두 미오신 중쇄 아형들이 사라지지만 안와층에서는 성체가 되어도 이 두 아형들이 사라지지 않고 존재한다.¹²

시각체계가 외안근 운동단위 발달의 조절에 어떤 역할을 하는지에 대해서는 별로 알려진 바가 없다. 눈운동체계에서 요구하는 외안근의 독특한 역할을 수행하고 조절하기 위해서 미오신이 조직에 특이하게 발현될 것으로 추측되고 있다.¹³ 미오신 중쇄의 아형은 서로 다른 근섬유의 분류만을 의미하는 것은 아니다. 각각의 근섬유 간에 관찰되는 ATPase의 활성도, 근수축 속도, 근력 생성, 열역동학적 효율의 차

이가 미오신 증쇄의 특이 아형의 유무와 직접 연관이 있다. 외안근의 생리와 질병에 대한 감수성을 이해하기 위해서는 그 연관성에 대한 명확한 이해가 선행되어야 할 것이다.

본 연구에서는 조직에 특이하게, 발생과정 중에 조절되어 발현되는 미오신 증쇄의 아형에 따라 근섬유의 기능적 성상에 차이가 나타난다는 점을 고려하여 원발성과 속발성 하사근 기능항진이 있는 환자의 하사근에서 각각 미오신 증쇄의 아형과 그 분포를 조사하고 비교하였으며, 정상 하사근과 비교함으로써 원발성 하사근 기능항진의 병태생리를 보다 이해하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

신촌 세브란스병원 안과에서 원발성 또는 속발성 하사근 기능항진으로 진단받은 환자를 대상으로 하였다. 환자들 중 병력상 안과적 질환으로 치료받거나 수술을 받은 과거력이 있는 경우는 대상에서 제외하였다. 하사근 기능항진의 정도는 1+~4+로 분류하였고 기능적으로 또한 미용상으로 수술이 필요했던 3+ 이상의 환자에서 전신마취하 근절제술을 시행함으로써 조직을 얻었다. 하사근 부착부로부터 가능한 일정한 부위에서 최소한의 조작으로 근절제술을 시행하였다. 연령이 미오신 증쇄 아형의 발현에 미치는 영향을 배제하기 위해서 환자의 연령이 만 4세인 경우만을 대상으로 하였다. 발달장애나 기타 전신질환이 동반된 환자, 외상의 과거력이 있는 경우도 대상에서 제외하였다.

대상은 원발성 하사근 기능항진 환자가 2명(4안)이었고 속발성 하사근 기능항진 환자가 2명(2안)이었다. 대조군인 정상 하사근은 망막모세포종으로 진단받은 만 4세 환자 2명(2안)에서 안구적출술을 시행

할 때 하사근 절제술을 동시에 시행해서 얻었다. 외안근 외 골격근 대조군으로는 넓다리뼈 골절로 수술을 받는 5세 환아의 넓다리 곧은근(rectus femoris)을 소량 얻었다.

얻어진 조직은 액체질소가 들어 있는 영하 70°C의 냉동고에서 급속히 냉동시켜 실험할 때까지 보관하였다.

2. 방법

가. 미오신 중쇄 아형의 면역조직화학염색

각 근섬유의 미오신 중쇄 아형은 각 아형에 대한 특이 단클론항체 (fast, slow, developmental; Novocastra Laboratories, Newcastle, England, UK)와의 결합을 통해 확인하였다. 특이 단클론항체 염색 protocol에 따라 근육조직은 12 μ m의 두께로 냉동절편을 만들었고 super ABC kit(Novocastra Laboratories, Newcastle, England, UK)를 이용하여 면역조직화학염색을 하였다.^{14,15} 냉동절편은 5% goat serum에 보관한 후 세척하고, 적절한 농도로 희석한 일차항체에 담가 두었다: fast(1:40), slow(1:80), developmental(1:40). 모든 항체는 0.3%~0.5%의 normal bovine serum이 첨가된 phosphate-buffered saline(PBS)으로 희석해서 비특이적 결합을 방지하였다. ABC 반응 후에는 diaminobenzidine(DAB)으로 발색하여 조직에서 아형을 확인한 후 Harris hemayoxylin(Sigma, St. Louis, Missouri, USA)으로 대조염색을 하였다. 조직은 광학현미경으로 검사하였다.

나. 미오신 중쇄 아형의 동초점 현미경(confocal microscope) 검사

조직을 염색하는 방법은 Patricia Laboski의 방법과 Dent의 방법을 수정해서 사용하였다.¹⁶ 요약하면, 냉동절편 조직을 PBS로 세척하고 근육을 통한 투과도를 증가시키기 위해 36°C에서 30분간 collagenase에 노출시켰다. 근육을 PBS로 세척한 후 2% 탈지분유와 0.5% Triton

X-100을 함유한 PBS(PBSMT)에 담가 두었다. 조직은 적절한 농도로 희석된 일차항체를 포함하는 PBSMT에 하룻밤 염색한 후 철저히 씻어내고 fluorescein isothiocyanate(FITC)-labeled goat anti-IgG에 하룻밤 노출시켰다. 모든 반응은 동일한 시간, 동일한 조건에서 시행하였으며 동일한 형광조건에서 레이저 주사 동초점 현미경으로 검사하였다.

다. 미오신 중쇄 아형의 sodium dodecyl sulfate(SDS) polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)와 western blot 분석

냉동 조직을 0.9% 생리식염수에서 5분간 3번 세척해서 혈액과 결체 조직을 제거한 후 여과지로 수분을 제거하였다. 단백질 정량을 위해 근육을 TMDEG(10mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.5mM EDTA, 10% glycerol, pH 7.5) 용해 완충액에 넣고 액틴과 미오신의 응집을 최소화하기 위해 가위로 잘게 썰었다. 혼합물을 40 amp에서 5초간 5회 초음파분쇄기로 균질화하였다. 단백질의 정량은 Bradford의 방법을 사용하였는데 bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백질로 사용하였다.¹⁷ 각각의 조직 1 μ l를 포함하는 500 μ l의 증류수를 500 μ l의 Bradford 용액과 섞었다. 분광측정기(spectrophotometer)를 이용해서 각각의 흡광도를 595nm에서 측정하고 단백질의 정량분석은 BSA의 표준 그래프를 이용해서 계산하였다.

단백질 정량 후, SDS-PAGE를 이용하여 미오신 중쇄의 아형을 분리하였다. 각 근육의 균질혼합물과 4배의 sampling buffer(2-mercaptoethanol, 50% glycerol, bromophenol blue, 8% SDS, 1.0M Tris-HCl, pH 6.8)를 3:1의 비율로 섞고 SDS가 포함된 8% polyacrylamide gel을 사용해 전기영동을 하였다.^{18,19,20} 전기영동이 끝난 후 Coomassie blue로 염색을 하여 분리된 단백질을 확인하였다.

전기영동으로 분리된 단백질을 50V에서 2시간동안 methanol-activated polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane으로

전기적으로 이전하여 western blotting을 수행하였다. 미오신 중쇄의 각 아형은 특이 단클론항체(fast, slow, developmental; Novocastra Laboratories, Newcastle, England, UK)와의 결합을 통해 확인하였다. 5% 탈지분유가 든 Tris-buffer saline(TBS) blocking solution(10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)에 담가 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 이후 미오신 중쇄 아형에 대한 일차항체를 실온에서 1시간 반응시키고 0.1% Tween 20이 들어 있는 TBS로 10분간 네차례 세척하였다. 이차항체(oxidase-conjugated goat anti-mouse IgG; Santa Cruz, CA, U.S.A.)에 반응시켰다. 단백질을 띠는 enhanced chemiluminescence 시약(Amersham Life Science, Little Chalfont, England, UK)을 이용하고 luminescence analyser system으로 가시화하였다. 각 아형의 정량분석은 Scion image program(Scion corporation, Frederick, Maryland, U.S.A.)을 이용하였다.

western blotting은 8회 실시하여 그 평균값을 비교 분석하였다.²¹

3. 통계학적 분석

모든 측정값은 평균±표준편차로 표시하였으며, 미오신 중쇄의 아형별로 각각의 하사근에서의 발현의 차이를 비교하기 위해 Kruskal-Wallis test를 시행하였고, 근사유의확률을 확인하여 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결과

1. 하사근의 층 분석

하사근을 12 μ m 두께로 냉동절편을 만들고 hematoxylin eosin 염색 후 광학현미경으로 관찰하였을 때 두 개의 뚜렷한 층을 확인할 수 있었다(그림 1). 안와층은 근섬유가 직경이 작고 원형이며 하사근의 바깥쪽을 U자 모양으로 둘러싸고 있는데, 근섬유의 직경이 큰 중심부의

안구층과 뚜렷이 구별이 되었다. 정상 하사근, 원발성과 속발성 기능 항진의 하사근에서 조직병리학적 차이는 없었다.

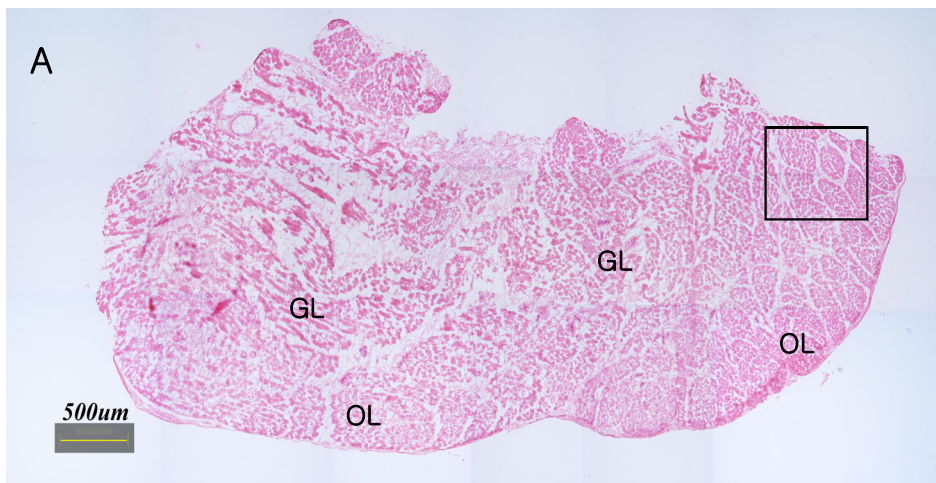
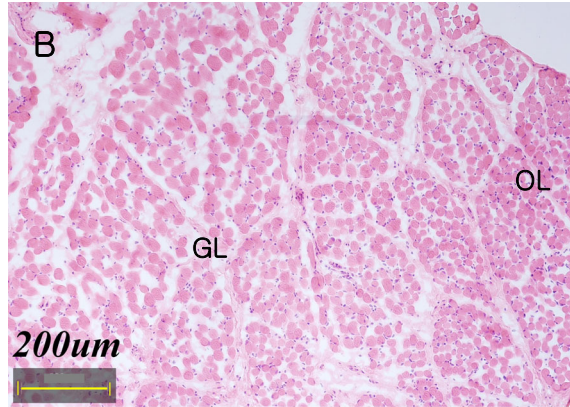


그림 1. 하사근의 층분석. A. 하사근 기능항진이 없는 정상 하사근을 12 μ m 두께로 냉동절편을 만들고 hematoxylin eosin 염색을 하였다. 바닥쪽으로 U자 모양의 안와층이 근육 중심부의 안구층과 잘 구별되어 있다. 초기배율: 20배. B. 고배율 확대 소견. 안와쪽의 안와층은 근섬유의 직경이 작고 밀도가 높은 반면, 근육 중심부의 안구층은 근섬유의 직경이 크고 밀도가 낮다. 초기배율: 100배. (GL: 안구층, OL: 안와층)

2. 미오신 중쇄 아형의 면역조직화학염색

미오신 중쇄의 각 아형은 특이항체에 의해 특이적 결합반응을 나타내었다.

모든 하사근에서 가장 풍부한 아형은 fast 아형이었다. fast 아형은 안와층과 안구층에서 모두 염색되어 나타났으며 두 층에서 동일한 염색양상을 보였다. 면역조직화학염색으로 정상과 하사근 기능항진 간의 정량화된 차이를 구하는 것은 어려움이 있었다(그림 2). 모든 하사근에서 두 번째로 많이 발현된 아형은 slow 아형이었는데 안와층과 안구층에 광범위하게 흩어져 염색되었으나 안와층에서 좀 더 우세하게 염색되어 나타났다(그림 3). developmental 아형은 안와층에만 나타나고 안구층에는 나타나지 않았다. (그림 4).

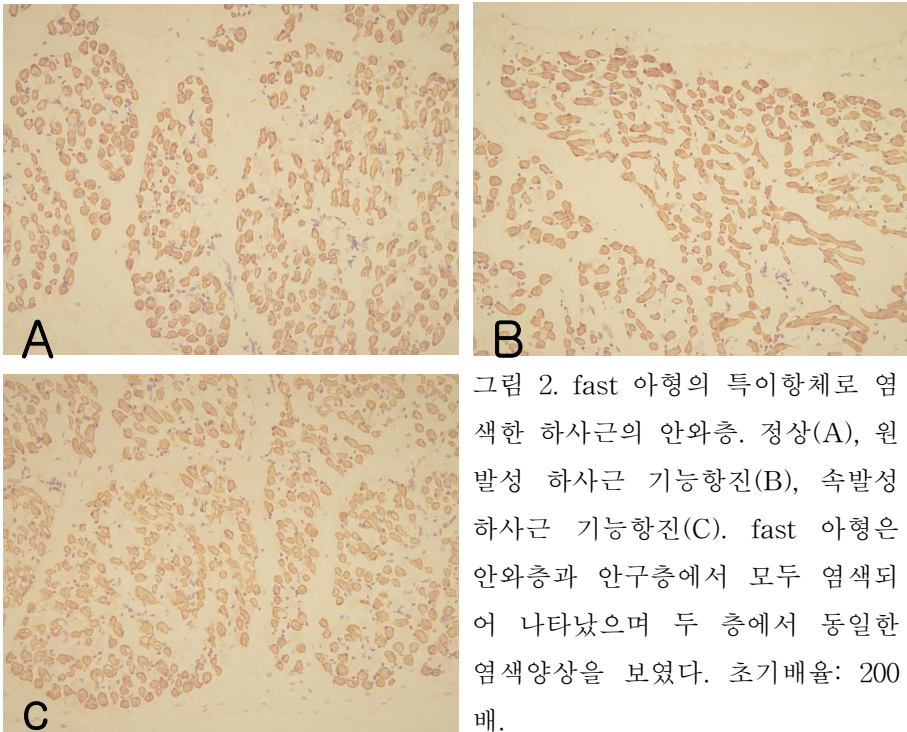


그림 2. fast 아형의 특이항체로 염색한 하사근의 안와층. 정상(A), 원발성 하사근 기능항진(B), 속발성 하사근 기능항진(C). fast 아형은 안와층과 안구층에서 모두 염색되어 나타났으며 두 층에서 동일한 염색양상을 보였다. 초기배율: 200 배.

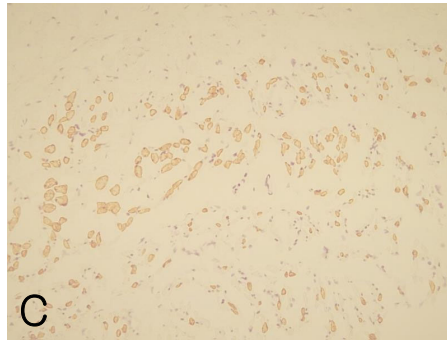
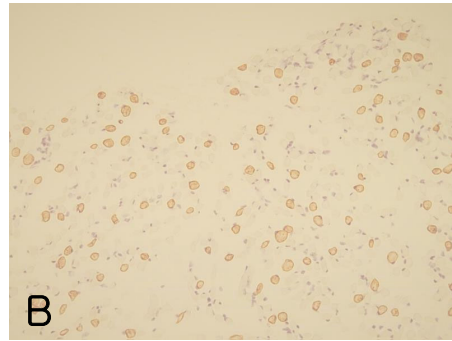
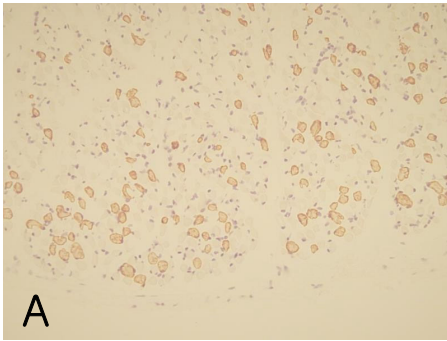


그림 3. slow 아형의 특이항체로 염색한 하사근의 안와층. 정상(A), 원발성 하사근 기능항진(B), 속발성 하사근 기능항진(C). slow 아형은 안와층과 안구층에 광범위하게 흩어져 염색되었으나 안와층에서 좀 더 우세하게 염색되어 나타났다. 초기배율: 200배.

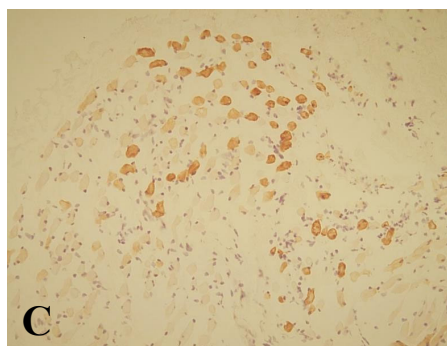
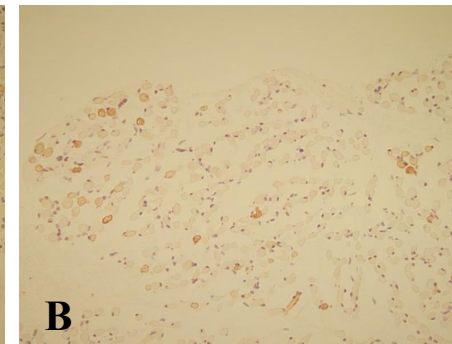
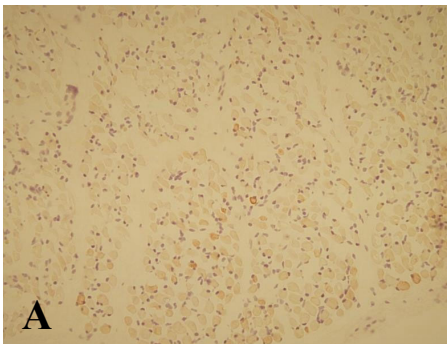


그림 4. developmental 아형의 특이항체로 염색한 하사근의 안와층. 정상(A), 원발성 하사근 기능항진(B), 속발성 하사근 기능항진(C). developmental 아형은 안와층에만 나타나고 안구층에는 나타나지 않았다. 초기배율: 200배.

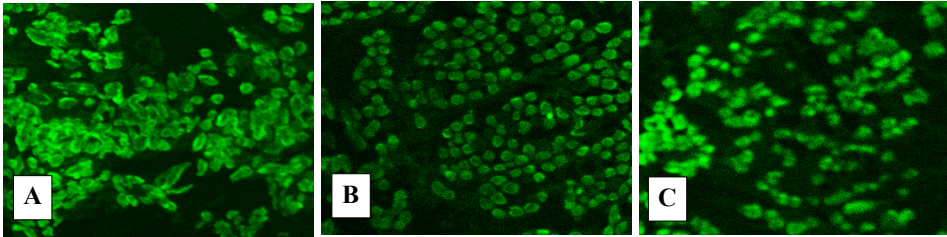


그림 5. fast 아형의 특이항체와 간접 면역형광으로 염색한 하사근의 안와층 동초점 영상. 정상(A), 원발성 하사근 기능항진(B), 속발성 하사근 기능항진(C). 정상과 속발성 기능항진이 있는 하사근이 원발성 기능항진의 하사근보다 형광이 진한 경향을 보였다. 초기배율: 400배.

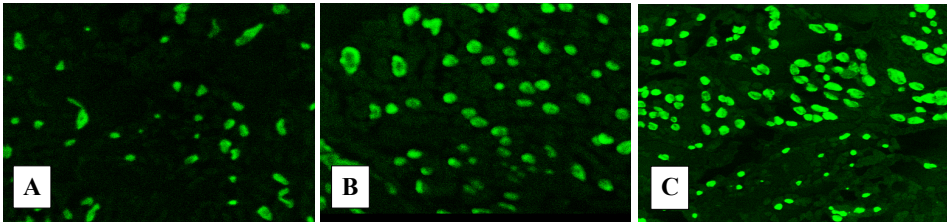


그림 6. slow 아형의 특이항체와 간접 면역형광으로 염색한 하사근의 안와층 동초점 영상. 정상(A), 원발성 하사근 기능항진(B), 속발성 하사근 기능항진(C). 정상에서 원발성 하사근 기능항진, 속발성 하사근 기능항진으로 갈수록 형광이 점차 진해지는 경향을 보였다. 초기배율: 400배.

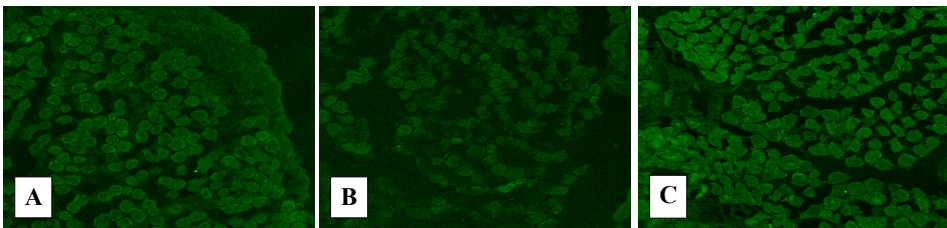


그림 7. developmental 아형의 특이항체와 간접 면역형광으로 염색한 하사근의 안와층 동초점 영상. 정상(A), 원발성 하사근 기능항진(B), 속발성 하사근 기능항진(C). 정상이나 원발성 기능항진에 비해 속발성 기능항진의 하사근에서 형광이 진한 경향을 보였다. 초기배율: 400배.

3. 미오신 중쇄 아형의 동초점 현미경검사

미오신 중쇄 아형의 구성 및 발현양의 차이를 좀 더 대조적으로 비교하기 위해 동초점 현미경검사를 시행하였다. 계대배양세포나 세포주(cell line)가 아닌 생체조직을 검사하는 것이어서 컴퓨터 프로그램을 이용한 형광정량분석에는 한계가 있었다.

fast 아형은 정상과 속발성 기능항진이 있는 하사근이 원발성 기능항진의 하사근보다 형광이 진한 경향을 보였다(그림 5). slow 아형은 정상에서 원발성 하사근 기능항진, 속발성 하사근 기능항진으로 갈수록 형광이 점차 진해지는 경향을 보였다(그림 6). developmental 아형은 정상이나 원발성 기능항진에 비해 속발성 기능항진의 하사근에서 형광이 진한 경향을 보였다(그림 7).

4. 미오신 중쇄 아형의 SDS-PAGE와 western blot 분석

각 근육조직에서의 미오신 중쇄는 SDS-PAGE를 이용해서 분리하였다(그림 8). 액틴을 양성표식자(positive control)로 사용하였다. 미오신 중쇄는 분자량이 큰 단백질로 대략 205kDa에 해당하는데 근육섬유에서 이 분자량에 해당되는 유일한 단백질이므로 Coomassie blue로 염색해서 확인하는 것이 가능하였다. 정상에 비해 원발성 기능항진, 속발성 기능항진으로 갈수록 미오신 중쇄의 양은 대체적으로 증가하는 경향을 보였다.

미오신 중쇄의 아형에 대한 정량분석은 각 아형에 대한 특이단클론항체를 반응시켜서 얻은 단백질 띠를 scion image program으로 밀도계측 후 정량화하였다. western blot 실험을 여덟 번 반복한 후 얻은 평균값으로 통계적인 정량분석이 가능하였다. 미오신 중쇄 특이 아형별로 정상 하사근에서 발현된 아형의 양을 100%로 하였을 때 각 근육에서의 발현의 비율로 표현하였다. 정상 하사근에 비해 원발성 기능항진의 하사근에서 fast 아형의 발현이 감소되어 있었고, 이 차이는 통계적으로 유의하였다(근사유의확률=0.000). 속발성 기능항진의

하사근에서는 정상에 비해 의미있는 차이가 없었다(그림 9). slow 아형은 정상에 비해 원발성 기능항진, 속발성 기능항진으로 갈수록 통계적으로 의미있게 증가되어 발현되었다(근사유의확률=0.000, 그림 10). developmental 아형은 정상 하사근과 원발성 기능항진에 비해 속발성 기능항진의 경우에 통계적으로 의미있게 증가되어 발현되었다(근사유의확률=0.000, 그림 11).

요약하면 원발성 기능항진에서는 정상에 비해 fast 아형이 의미있게 감소되어 있고 slow 아형은 증가되어 있었다. 속발성 기능항진에서는 정상에 비해 slow와 developmental 아형이 의미있게 증가되어 있었다.

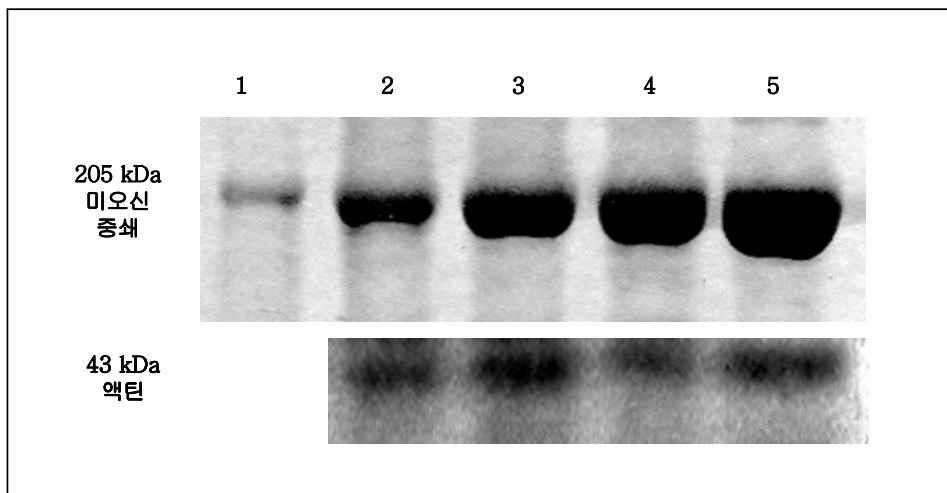


그림 8. Coomassie blue로 염색한 polyacrylamide gel에서의 미오신 중쇄 단백질 띠. 액틴은 양성표식자로 사용하였다. 205kDa에 해당되는 부위가 미오신 중쇄이다. 정상에 비해 원발성 기능항진, 속발성 기능항진으로 갈수록 미오신 중쇄의 양은 대체적으로 증가하는 경향을 보였다. 레인 1: 분자량 표지자, 레인 2: 정상 하사근, 레인 3: 원발성 하사근 기능항진, 레인 4: 속발성 하사근 기능항진, 레인 5: 넓다리 골은근.

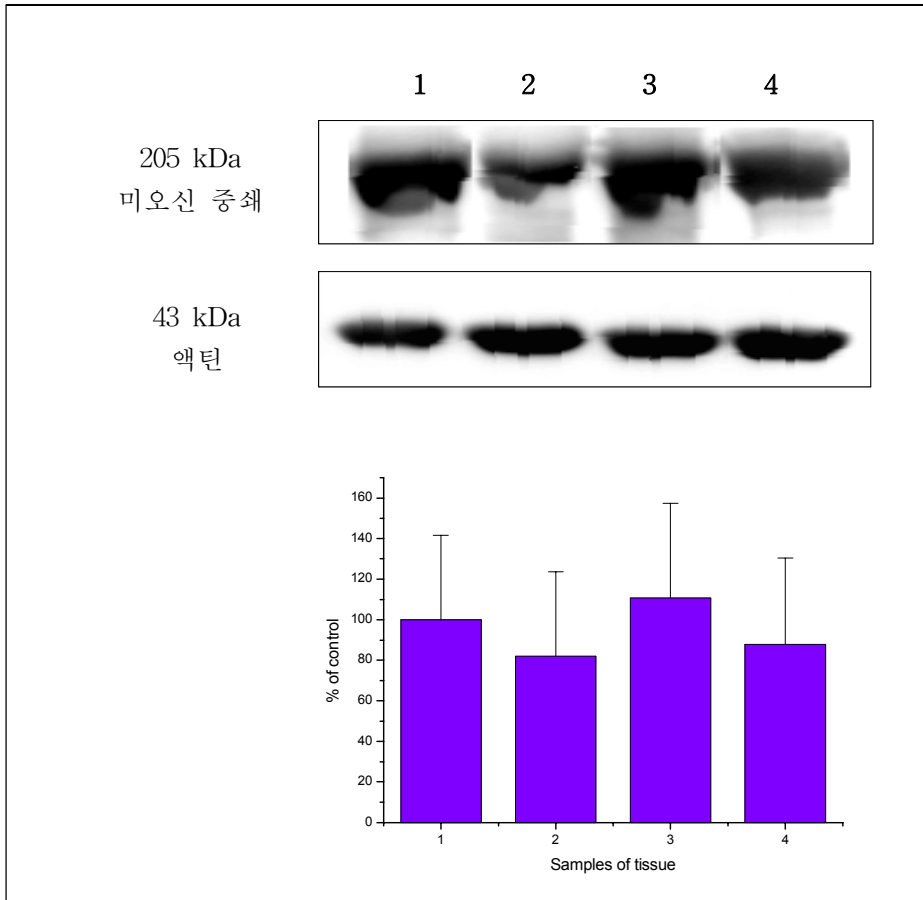


그림 9. fast 아형에 대한 western blot 분석. western blot 실험을 여덟 번 반복한 후 얻은 평균값을 나타내었으며, 정상에 대한 비율로 표현하였다. 단백질 띠의 밀도계측분석 결과, 정상 하사근에 비해 원발성 하사근 기능항진의 하사근에서 fast 아형의 발현이 감소되어 있었고, 이 차이는 통계적으로 유의하였다(근사유의확률=0.000). 반면 속발성 하사근 기능항진의 하사근에서는 정상에 비해 의미있는 차이가 없었다. 레인 1: 정상 하사근, 레인 2: 원발성 하사근 기능항진, 레인 3: 속발성 하사근 기능항진, 레인 4: 넓다리 끝은근.

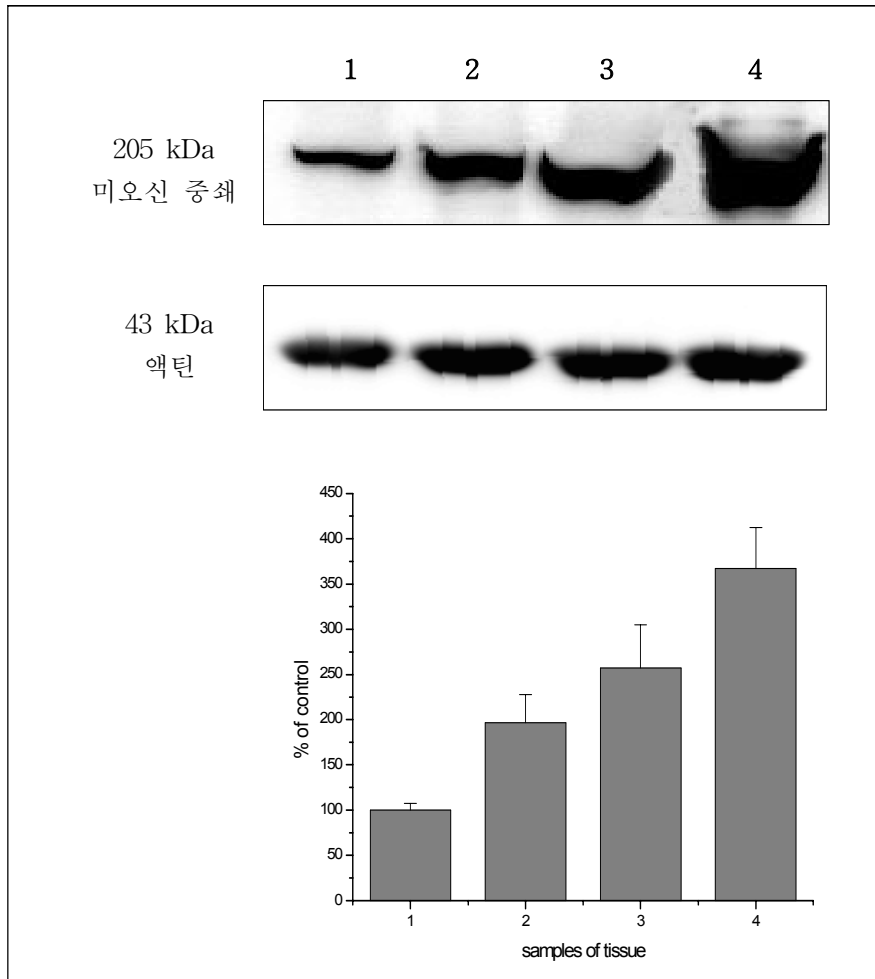


그림 10. slow 아형에 대한 western blot 분석. western blot 실험을 여덟 번 반복한 후 얻은 평균값을 나타내었으며, 정상에 대한 비율로 표현하였다. 단백질 띠의 밀도계측분석 결과, 정상에 비해 원발성 기능항진, 속발성 기능항진으로 갈수록 통계적으로 의미있게 증가되어 발현되었다(근사유의확률=0.000). 레인 1: 정상 하사근, 레인 2: 원발성 하사근 기능항진, 레인 3: 속발성 하사근 기능항진, 레인 4: 넓다리 곧은근.

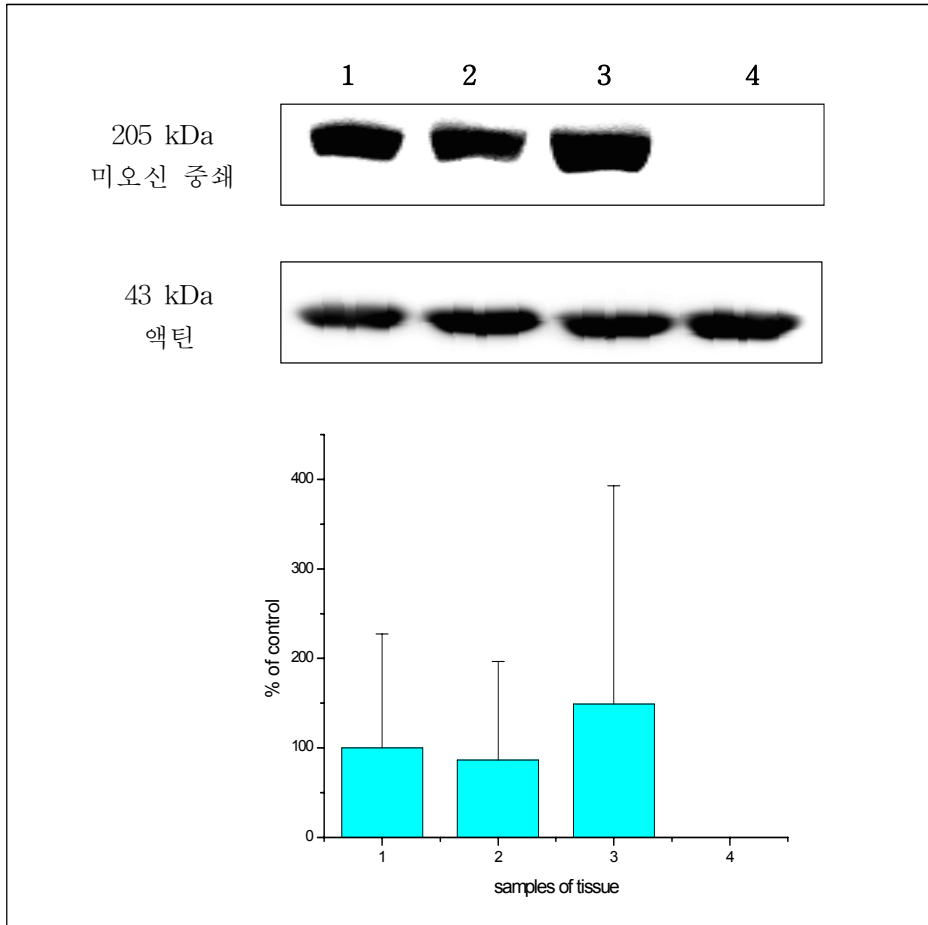


그림 11. developmental 아형에 대한 western blot 분석. western blot 실험을 여덟 번 반복한 후 얻은 평균값을 나타내었으며, 정상에 대한 비율로 표현하였다. 단백질 띠의 밀도계측분석 결과, 정상 하사근과 원발성 기능항진에 비해 속발성 기능항진의 경우에 통계적으로 의미 있게 증가되어 발현되었다(근사유의확률=0.000). 넓다리 끝은근에서는 developmental 아형의 발현이 없는 것이 확인되었다. 레인 1: 정상 하사근, 레인 2: 원발성 하사근 기능항진, 레인 3: 속발성 하사근 기능항진, 레인 4: 넓다리 끝은근.

IV. 고찰

하사근 기능항진 중 원발성 하사근 기능항진의 원인에 대해서는 이제까지 뚜렷이 알려진 것이 없고, 해부학적 변이나 신경지배의 이상, 또는 전자 현미경 소견이 속발성 기능항진과 차이가 없으므로 상사근 혹은 상직근의 부분마비에 의한 것이라는 등의 가설들이 전부이다. 일부에서는 원발성 기능항진은 실제로 존재하지 않고 정도가 경미한 속발성 기능항진이라는 추측도 있었다.¹ 그러나 서론에서 기술한 바와 같이 원발성 하사근 기능항진은 마비사시의 특징을 갖지 않으며 몇 가지 임상양상에 확인한 차이가 있으므로 근육 자체의 수축 등 병인에 차이가 있지 않을까 생각해 볼 수 있다.

근섬유는 기본 단백질인 액틴과 미오신으로 구성되어 있다.¹⁰ 골격근들이 다양한 기능적 차이, 즉 수축 속도 및 운동 피로에 대한 저항 정도는 미오신에 의해 결정된다. 이 미오신은 근 섬유 형태를 구성하는 가장 풍부한 핵심 단백질이며 몇 개의 아형들이 존재한다. 이 미오신 중쇄의 아형들은 근육의 종류에 따라 그 구성 요소가 달라진다. 미오신 중쇄에 따른 근섬유의 조직화학적인 조성은 근육의 수축성상을 예측하는 데에 도움이 된다.²² 따라서 근섬유에서 발현되는 미오신 중쇄에 따라 조직화학적인 근섬유의 분류, 미오신과 근원섬유(myofibrillar) ATPase 활성도, 근섬유의 수축성상이 결정되는 것이다. 고유한 미오신 중쇄 아형의 발현을 조절하는 인자에는 유전적인 인자와 환경적인 인자가 같이 작용할 것으로 추측되지만, 아직 뚜렷이 밝혀진 바는 없다.

성숙한 외안근에서는 발달단계의 골격근에서만 발현되는 미오신 중쇄 아형이 지속적으로 발현되는데 본 실험에서도 넙다리 곧은근과 비교해 봄으로써 외안근에서의 이러한 특징을 확인해 볼 수 있었다. 외안근은 Duchenne 근이양증과 같은 다양한 골격근질환에서는 보존되는 근육이지만, 만성 진행성 외안근마비나 중증 근무력증과 같은

질환에서는 주로 이환되는 근육이 된다.¹³ 이러한 특징은 외안근에서의 미오신 중쇄 아형 발현의 특이성, neural cell adhesion molecule, 미성숙한 형태의 아세틸콜린 수용체, hepatocyte growth factor(HGF), fibroblast growth factor(FGF), insulin-like growth factor(IGF) 등의 다양한 성장인자가 발현되는 것과는 연관성이 있을 것으로 추측되고 있다.¹⁵

포유류의 외안근은 다른 골격근과 비교하여 구조적으로 기능적으로 매우 다른 특징을 지닌다.^{23,24} 구조적으로 외안근은 다른 골격근에 비해 구성하고 있는 근섬유들의 직경이 작고, 하나의 신경 세포가 지배하는 근섬유수가 적으며, 심장근을 제외하고는 어떠한 근육보다 혈류량이 풍부하며 대사활동도가 매우 높다. 이러한 구조적인 특징은 기능적인 특이성을 나타나게 하는데, 외안근은 다른 골격근보다 수축속도가 매우 빠르며 운동 피로에 대한 저항이 강하고 섬세한 운동을 잘 조절하고 있다.²⁵ 또한 외안근은 다른 근육에서 관찰할 수 없는 특이한 구조를 지니고 있는데, 모든 근육들은 빠른 운동 또는 느린 운동 중 한 종류 운동에만 관여하며, 구성하고 있는 근섬유들은 조직학적으로 구별하기 힘든 단일층으로 되어 있는데 반해 외안근은 최고속도가 600°/sec 이상인 신속운동(saccade)뿐만 아니라 한 물체에 지속적인 주시를 유지하기 위한 느린 추종운동(smooth pursuit)까지 눈운동계가 요구하는 역동적이고 다양한 범위의 운동에 관여한다.²⁶ 조직학적으로도 두 개의 뚜렷이 구별되는 층으로 이루어져 있는데, 안구쪽에 위치하고 있는 안구층과 이 안구층을 외측에서 C형 또는 U형으로 둘러싸고 있는 안와층이다. 외안근 두 층간의 기능적 차이는 그리 잘 알려져 있지는 않다. 이제까지 알려진 바에 의하면 안구층은 안구의 내전, 외전, 상전, 하전, 내회전 및 외회전과 같은 안구 운동에 관여하고, 안와층은 안구의 이향 운동(vergence)에 관여할 것으로 추측하고 있다.²⁷

Brueckner 등은 안구층과 안와층 근섬유의 미오신 중쇄 아형에 대

한 흰쥐 연구로서 시자극 차단 후 미오신 중쇄 아형들의 변화를 관찰한 실험에서 시각체계 및 안운동체계 발달의 임계시기(critical period)에 시자극을 차단하면 neonatal 및 developmental 아형들의 발현이 늦어지고 미오신 중쇄 아형의 발현에도 비가역적인 변화가 초래됨을 보고하였다.¹² Porter는 외안근의 Ca^{2+} -ATPase의 성숙정도와 근섬유의 Ca^{2+} , 근소포체의 함량은 비례한다고 주장하였는데, 그는 외안근에서의 양이온 항상성의 발달과 시력 및 안운동 조절의 성숙지표는 서로 연관되어 있다고 하였다.²⁸ 미오신 중쇄 아형의 발현은 외안근 양이온 항상성 기전과 마찬가지로 출생 후 발달과정 중 임계시기에 시각체계 및 안운동체계에 의해 조절되는 것으로 생각된다.

본 연구는 현재까지 해부학적 조직학적 비교에 그쳤던 하사근 기능항진의 기전을 분자생물학적으로 접근하여 비교 관찰하였다는 것에 의미가 큰 것으로 생각된다. 첫 단계로서 하사근에서 뚜렷한 두 층을 확인해 보았는데, 냉동절편에 의한 조직염색이었으므로 한계가 있었다. 미오신 중쇄 아형의 정량적 비교를 위해서는 western blotting이 가장 신뢰있는 방법이기 때문에 처음 조직을 얻었을 때 포르말린 등에 저장하지 않고 냉동보관을 하게 되었다. 냉동절편으로 단백질을 분석하는 데에는 큰 어려움이 없었으나 냉동보관하는 과정에서 근섬유의 소실, 공포화 등이 발생함에 따라 육안 현미경검사에는 제한점이 되었다. 근육조직을 처음 얻었을 때 압설자 등에 잘 고정시켜서 근섬유 주행방향에 따라 잘 정돈시킨 후 얼리는 것이 좋겠고, 두 층을 구별해 보는 데에는 파라핀절편을 만들어 교원질과 탄력섬유가 잘 염색되는 Masson's trichrome 염색을 하는 것이 더 좋을 것으로 생각된다.

실험의 초기에는 fast, slow, developmental, neonatal의 네 가지 아형으로 면역조직화학염색을 시행하였다. neonatal 아형은 안구층에서는 존재하지 않고 안와층에서만 드물게 염색되어 나타났으나 정상과 원발성 및 속발성 하사근 기능항진 간에 의미있는 차이가 없었다.

neonatal 아형도 developmental 아형과 마찬가지로 넙다리 곧은근에서는 발현되지 않았다. 출생 직후에는 주산기에 발현하는 미오신 중쇄의 아형이 주로 나타나고 성장하면서 근육의 복잡한 기능에 맞추어서 아형변화를 일으키는 것으로 알려져 있지만 이러한 변화가 어느 정도의 나이에 완성되는지에 대해서는 알려진 바가 없다.^{29,30,31} 따라서 본 연구에서는 서로 다른 하사근 간에 발달과정 상의 차이를 최소화하기 위해 대상연령을 통일시켰고 근육을 얻는 과정에서도 근육의 위치에 따른 차이를 최소화하기 위해 비슷한 부위를 절제해서 사용하였다. 무엇보다도 정상 하사근을 구하는 것에는 한계가 있었는데 연령에 제한을 두다 보니 대상 조직 수가 적었다.

fast 아형은 모든 하사근에서 가장 많이 발현된 아형이었는데, 안구의 신속운동에 관여하는 아형으로 생각된다.^{32,33} 원래 정상이었던 하사근이 동측 상사근의 마비나 반대측 상직근의 마비에 의해 이차적으로 속발성 기능항진이 되었다는 점을 고려해 보면 속발성 기능항진에서 fast 아형이 정상에 비해 별 차이가 없다는 점이 설명이 된다. 반면 선천적으로 원발성 기능항진이 있는 하사근에서는 fast 아형이 의미있게 감소되어 있고 slow 아형이 증가되어 발현이 되어 있었다. slow 아형은 추종운동 등과 같은 지속적인 운동에 관여할 것으로 생각되는데 이러한 지속적인 근육의 수축이 원발성 기능항진에 작용할 것으로 추측해 볼 수 있다. developmental 아형이 속발성 기능항진에서 많이 발현되는 것은 마비된 다른 근육에 의해 이차적인 기능항진이 일어남으로써 지속적인 아형의 변화, 즉 slow 아형의 지속적인 발현에 역할을 하는 것이 아닐까 추측해 볼 수 있으나 확인할 수는 없었다. 또한 이러한 아형의 변화가 원발성과 속발성 기능항진의 원인적 요소인지 아니면 결과적인 변화인지에 대해서도 의문점이 생긴다. 조직수가 적어서 본 연구의 결과를 일반화하는 데에는 다소 무리가 있는 것은 사실이지만, 인체조직을 사용한 연구라는 데에 의의가 있었고, 실험을 반복함으로써 일관된 결과를 얻을 수 있었다. 정상과 원

발성 및 속발성 기능항진에서의 미오신 중쇄 아형의 정량적인 차이를 좀 더 극대화해 보기 위해서는 mRNA 수준에서의 competitive PCR(polymerase chain reaction)을 이용해 보는 것도 좋은 방법이라 생각된다.

본 연구에서는 정상 하사근과 원발성 및 속발성 하사근 기능항진이 있는 하사근에서 다양한 미오신 중쇄 아형의 발현을 조사 비교해 보았고 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 이러한 차이가 원발성 혹은 속발성 하사근 기능항진의 병인에 어떤 역할을 하는지는 구체적으로 확인할 수는 없었지만 이러한 연관성의 인과관계에 대해 추가적인 연구가 수행된다면 하사근 기능항진의 병인을 이해하는 데에 도움이 되리라 생각된다.

V. 결론

정상 하사근과 원발성 및 속발성 하사근 기능항진 환자들의 하사근에서 미오신 중쇄의 아형을 비교하여 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 안와층은 근섬유가 직경이 작고 원형이며 하사근의 바깥쪽을 U자 모양으로 둘러싸고 있는데, 근섬유의 직경이 큰 중심부의 안구층과 뚜렷이 구별이 되었다.
2. fast 아형은 가장 풍부한 아형으로 안와층과 안구층에서 동일한 염색양상을 나타내었는데, 정상 하사근에 비해 원발성 하사근 기능항진의 하사근에서 fast 아형의 발현이 감소되어 있었고, 이 차이는 통계적으로 유의하였다(근사유의확률=0.000). 속발성 하사근 기능항진의 하사근에서는 정상에 비해 의미있는 차이가 없었다.
3. slow 아형은 안와층과 안구층에 광범위하게 흩어져 염색되었으나 안와층에서 좀 더 우세하게 염색되어 나타났고 정상에 비해 원발성 기능항진, 속발성 기능항진으로 갈수록 통계적으로 의미있게 증가되어 발현되었다(근사유의확률=0.000).
4. developmental 아형은 안와층에만 나타나고 안구층에는 나타나지 않았는데, 정상 하사근과 원발성 기능항진에 비해 속발성 기능항진에 경우에 통계적으로 의미있게 증가되어 발현되었다(근사유의확률=0.000).

정상 하사근과 원발성 및 속발성 하사근 기능항진이 있는 하사근에서 다양한 미오신 중쇄 아형의 발현에는 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 이러한 차이가 원발성 혹은 속발성 하사근 기능항진의 병인에 어떤 역할을 하는지는 구체적으로 확인할 수는 없었지만 이러한 연관성의 인과관계에 대해 추가적인 연구가 수행된다면 하사근 기능항진의 병인을 이해하는 데에 도움이 되리라 생각된다.

참고문헌

1. Von Noorden GK, Campos EC. Binocular vision and ocular motility, 6th ed. St. Louis: CV Mosby publisher; 2002. p. 385-389.
2. Bielschowsky A. Ber angeborene und erworbene Blickfelderweiterungen. Ber Dtsch Ophthalmol 1 37:192, 1911 cited from von Noorden: Binocular vision and ocular motility, 4th ed. St. Louis: CV Mosby publisher; 1990.
3. Guiber GP. Synkinetic overaction of the inferior oblique muscle. Am J Ophthalmol 1949;32:100-106.
4. 김태균, 이종복. 원발성 하사근 기능항진에서 하사근 부착부의 해부학적 고찰. 대한안과학회지 1992;33:649-652.
5. Spencer RF, McNeer KW. Structural alterations in overacting inferior oblique muscles. Arch Ophthalmol 1980;98:128-133.
6. Aihara T, Miyata M, Ishikawa S. The lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in the overacting inferior oblique muscle. J Pediatr Ophthalmol Strabismus 1978;15:43-47.
7. Kim HS. Calcium uptake and release through sarcoplasmic reticulum in the inferior oblique muscles in patients with inferior oblique overaction. Seoul: The Graduate School Yonsei University Press; 2000.
8. Clark RA, Miller JM, Rosenbaum AL, Demer JL. Heterotropic muscle pulleys or oblique muscle dysfunction? J AAPOS 1998;2:17-25.
9. Jung HH, Lieber RL, Ryan AF. Quantification of myosin heavy chain mRNA in somatic and brachial arch muscles using competitive PCR. Am J Physiol 1998;275:C68-C74.
10. Porter JD, Baker RS, Ragusa RJ, Brueckner JK. Extraocular muscles: Basic and clinical aspects of structure and function, major review. Surv Ophthalmol 1995;39:451-484.
11. Oh SY, Poukens V, Demer JL. Quantitative analysis of rectus

- extraocular muscle layers in monkey and humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:10-16.
12. Brueckner JK, Porter JD. Visual system maldevelopment disrupts extraocular muscle-specific myosin expression. *J Appl Physiol* 1998;85:584-592.
 13. McLoon LK, Wirtschafter JD. Continuous myonuclear addition to single extraocular myofibers in uninjured adult rabbits. *Muscle Nerve* 2002;25:348-358.
 14. Kranjc BS, Sketelj J, D'albis A, Eren I. Long-term changes in myosin heavy chain composition after Botulinum toxin A injection into rat medial rectus muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:3158-3164.
 15. Rubinstein NA, Hoh JFY. The distribution of myosin heavy chain isoforms among rat extraocular muscle fiber types. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3391-3398.
 16. Dent JA, Polson AG, Klymkowsky MW. A whol-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*. *Development* 1989;105:61-74.
 17. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
 18. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970;227:680-685.
 19. Talmadge RJ, Roy RR. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* 1993;75:2337-2340.
 20. Huey KA, Bodine SC. Altered expression of myosin mRNA and protein in rat soleus and tibialis anterior following reinnervation. *Am J Physiol* 1996;271:C2016-C2026.
 21. Bridges CC, Kekuda R, Wang H, Prasad PD, Mehta P, Huang W, et al. Structure, function, and regulation of human

- cystine/glutamate transporter in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:47-54.
22. Ranatunga KW, Thomas PE. Correlation between shortening velocity, force-velocity relation and histochemical fibre-type composition in rat muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 1990;11:240-250.
23. Porter JD, Baker RS. Muscles of a different 'color': The unusual properties of the extraocular muscles may predispose or protect them in neurogenic and myogenic disease. *Neurology* 1996;46:30-37.
24. Durston JH. Histochemistry of primate extraocular muscles and the changes of denervation. *Br J Ophthalmol* 1974;58:193-216
25. Spencer RF, Porter JD. Structural organization of the extraocular muscles. *Rev Oculomot Res* 1988:33-79
26. Spencer RF, McNeer KW. Botulinum toxin paralysis of adult monkey extraocular muscle. *Arch Ophthalmol* 1987;105:1703-1711.
27. Demer JL, Oh SY, Poukens V. Evidence for active control of rectus extraocular muscle pulleys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1280-90
28. Porter JD, Karathanasis P. The development of extraocular muscle calcium homeostasis parallels visuomotor system maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:678-83.
29. Lim SJ. Postnatal development of myosin heavy chain isoforms in rat extraocular muscles. Seoul: The Graduate School Korea University Press; 2000.
30. Bruechner JK, Itkis O, Porter JD. Spatial and temporal patterns of myosin heavy chain expression in developing rat extraocular muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 1996;17:297-312.
31. Pedrosa-Domellöf F, Holmgren Y, Lucas CA, Hoh JFY, Thornell LE. Human extraocular muscles: Unique pattern of myosin heavy chain expression during myotube formation. *Invest*

Ophthalmol Vis Sci 2000;41:1608-1616.

32. Kjellgren D, Thornell LE, Andersen J, Pedrosa-Domellöf F. Myosin heavy chain isoforms in human extraocular muscles. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44:1419-1425.

33. Wasicky R, Ziya-Ghazvini F, Blumer R, Lukas JR, Mayr R. Muscle fiber types of human extraocular muscles: A histochemical and immunohistochemical study. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41:980-990.

Abstract

Expression of myosin heavy chain isoforms in the inferior oblique muscles in patients with inferior oblique overaction

Yoon-Hee Chang

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Jong Bok Lee)

Inferior oblique overaction (IOOA), an elevation of an eye as it moves toward adduction, is a common oculomotor disease. It has been customary to distinguish between primary and secondary overactions of this muscle. Primary overaction in which there is no evidence for a past or present ipsilateral superior oblique muscle paralysis or paresis is difficult to explain. Secondary overaction is caused by paresis or paralysis of the ipsilateral superior oblique muscle or by paresis or paralysis of the contralateral superior rectus muscle. Secondary overaction is different from primary overaction in that the vertical deviation is large in the primary position with the accompanied torsional deviation. And Bielschowsky head tilt test is positive. Although clinical distinction between primary and secondary overaction is not so difficult, the explanations given for apparent primary overaction in the old literature are vague.

In this study, the expression of myosin heavy chain (MyHC) isoforms in inferior oblique muscles (IO) were investigated in primary and secondary IOOA, and the distribution of MyHC isoforms in IOOA is compared with that in normal control so as to further understand the pathogenesis of IOOA. Two patients (4 eyes) had primary IOOA and 2 patients (2 eyes) had secondary

IIOA. Additional IOs, as normal control, were obtained from two 4-year-old patients (2 eyes) who underwent enucleation due to retinoblastoma. Immunohistochemical assay, confocal microscopy, gel electrophoretic analysis and western blotting analysis were performed.

The results were as follows:

1. The U-shaped orbital layer (OL) on the orbital surface of the IO was readily distinguished from the central global layer (GL) on the basis on smaller fiber size in OL.

2. The most abundant fast isoform had identical staining pattern in OL and in GL. The expression of fast MyHC isoform was decreased significantly in primary IIOA.

3. Slow MyHC isoform was scattered through both layers, but it was detected predominantly in the fibers of OL. There was increasing tendency in expression of the slow MyHC isoform among normal, primary and secondary IIOA.

4. Developmental isoform was detected only in the fibers of OL. The expression of developmental MyHC isoform was increased significantly in secondary IIOA.

It was shown that there is a significant difference in the expression of MyHC isoforms among different IIOAs. The cause-and-effect relationship of this difference has to be further investigated so as to understand the exact pathogenesis of primary IIOA.

Key Words : primary inferior oblique overaction, secondary inferior oblique overaction, myosin heavy chain isoforms, orbital layer, global layer