대한안과학회지 : 제 42 권 제 1 호 2001
J Korean Ophthalmol Soc Vol. 42, No. 1

인체 각막표층의 MUC1의 생성 및 분포

김소영[1] · 정승은[1,2] · 서경률[1] · 백자현[2,3] · 이종은[4] · 김응권[1,2]

〓 요 약 〓

각막 표면에 존재하는 뮤신중 MUC1은 결막 및 각막 상피세포가 생산하여 세포막 점액을 구성케 하는 것으로 알려져 있다. 저자들은 이 뮤신 MUC1의 인체 각막에서의 생성양상 및 존재양상을 알아보고자 하였다. 인체 적출 안구의 표면에 4% paraformaldehyde가 포함된 고정액을 점안한 후 각막만을 분리하여 sucrose 처리하고, 이를 급속 냉동한 후 연속절편으로 만들어 면역조직화학 염색, 면역 형광 염색, *in situ* hybridization으로 관찰하였다. 면역조직화학 염색상, 인체 각막의 표면 상피세포막에 MUC1이 관찰되었다. 면역 형광 염색상, 이 표면 상피세포막의 MUC1은 세포마다 다른 양의 분포를 보였다. *In situ* hybridization상 MUC1의 mRNA는 각막의 상피세포 전층에서 발견되었다. 뮤신 MUC1은 인체 각막 뮤신층의 일부로서의 표층으로 이동한 표면 상피세포의 첨부 세포막에 존재하며, 각 세포마다 그 양에는 차이를 보였다. 이는 MUC1의 발현이 상피세포의 수직이동과 관련되며, 각각의 세포에 따라 영향을 받는 것으로 보인다(한안지 42:145~151, 2001).

＜접수일 : 2000년 4월 18일, 심사통과일 : 2000년 11월 1일＞

[1] 연세대학교 의과대학 안과학교실, 시기능 개발 연구소
Address reprint requests to Eung Kweon Kim, M.D.
The Institute of Vision Research, Department of Ophthalmology, College of Medicine, Yonsei University
#134 Shinchon-dong, Seodaemun-ku, Seoul, 120-752, Korea
Tel : 82-2-361-8450, Fax : 82-2-312-0541

[2] 연세대학교 의과대학 BK21 의과학사업단
Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University, Seoul, Korea

[3] 연세대학교 의과대학 분자생물학교실
Department of Molecular Biology, Medical Research Center, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

[4] 연세대학교 의과대학 해부학교실
Department of Anatomy, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

* 본 연구는 '97년도 보건의료기술개발사업(HMP-97-M-2-0031)'의 지원에 의하여 이루어진 것임.

Abstract

The Expression and Distribution of MUC1 in Human Corneal Epithelium

So Young Kim, M.S.[1], Seung Eun Jung, M.S.[1,2], Kyoung Yul Seo, M.D.[1], Ja-Hyun Baik, Ph.D.[2,3], Jong Eun Lee Ph.D.[4], Eung Kweon Kim, M.D.[1,2]

Corneal and conjunctival squamous epithelial cells have been known to express the mucin MUC1. We attempted to reveal the expression and localizational characteristics of the membrane-spanning mucin MUC1 as a component of the mucous layer in the human corneal epithelium. An antibody to the MUC1 was used to detect the MUC1 on the corneal epithelium by immunohistochemistry and immunofluorescent staining. *In situ* hybridization was performed to determine the distribution of MUC1 mRNA in the ocular surface. Immunohistochemically, the MUC1 mucin was observed along the apical membranes of the corneal epithelium. According to immunofluorescent staining, cells varied in the amount of mucin MUC1. Expression of MUC1 mRNA was observed in all layers of the corneal epithelium. The MUC1 mucin synthesized by the corneal epithelia exists on the apical membrane of the superficial cells. The amount of MUC1 may vary with the vertical migration and the activity of the cells(J Korean Ophthalmol Soc 42:145~151, 2001).

Key Words : Mucin, MUC1, Human, Corneal epithelium

각막상피세포층은 전체 각막두께의 약 10%를 차지하며 두께가 약 60 μm이고 5~7층의 비각질화된 중층편평(stratified squamous) 상피세포층으로 이루어져 있다[1]. 이중 표면세포의 첨부는 점액층을 포함하는 눈물층으로 덮여있다[2].

점액층은 친수성으로 안구 표면 상피세포 자체의 막점액(membranous mucin)과 결막의 술잔세포(goblet cell)에서 분비되는 분비점액(secretory mucin)으로 구성되어 있다[3]. 점액층은 세포막의 당질층에 의해 보존되며 이는 당질층과 점액층이 결합되어 있다는 것을 의미한다.

그러나, 중심에는 단백질 뼈대구조가 있고 그 주변을 질량의 50%를 차지하는 당질(oligosaccharide)이 두껍게 둘러싸고 있는 뮤신의 구조의 특성[4] 때문에 뮤신의 성분 및 조성에 대해선 별로 알려진 것이 없다.

각막상피 표면에 위치한 뮤신이 생성되는 곳은 결막의 술잔세포와 각결막상피조직으로 알려져있다. Watanabe 등[5]은 단일항체(monoclonal antibody)를 이용하여 뮤신 유사 당단백질(mucin-like glycoprotein)이 인체 각막상피 및 결막 세포에서 생성 및 발현됨을 밝혀내었다. 그후 이 뮤신의 구성성분으로 MUC5AC가 결막술잔세포에서 발현되고[9] 각결막편평상피층에서는 MUC1[6], MUC4[4,7]가 발현됨이 밝혀졌다. 이로서 그 성분에 따라 각기 다른 세포로부터 유래함이 입증된 상태이다.

저자들은 특정 뮤신의 특정 당질과 선택적으로 결합하는 lectin gold를 이용하여 각막 상피의 가장 바깥층에만 뮤신이 존재하는 것을 관찰하였다(Fig. 1). 이러한 사실은 뮤신의 세포외로의 분비가 상피세포층 중에서 표층에서만 일어남을 추측케 하는 것으로, 본 연구는 이런 각막상피세포에서 생산되는 뮤신 MUC1의 생성양상 및 존재양상을 분자 생물학적으로 규명하고자 하였다.

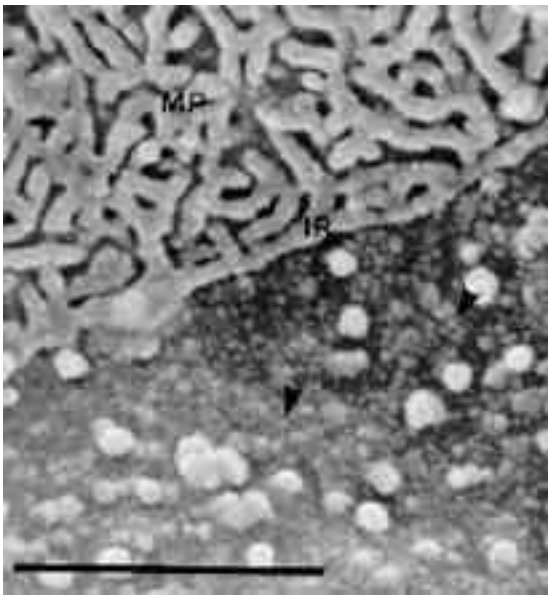

Figure 1. Scanning electromicroscopy of corneal epithelial surface after mucin stabilization and lectin gold staining. WGA lectin staining shows numerous gold particles(arrow heads) on the epithelial mucin layer. But the epithelial cell exposed after detachment of the superficial cell shows no WGA lectin particles. but microplicae(MP)(bar=1 ㎛).

재료 및 방법

1. 인체각막표면의 면역조직화학 염색

각막 표면에서의 MUC1의 수직적인 존재 위치를 확인하기 위하여 조직절편법을 사용하였다.

각막이식을 위해 기증된 안구중 각막이식에 적절치 않은 안구 2안을 사용하였다. 안구는 먼저 4% paraformaldehyde가 포함된 고정액을 점안하여 각막 표면 뮤신층을 고정하였다. 표면이 고정된 각막을 적출하여 30% sucrose에 담가 냉장고에서 침강할 때까지 두었다.

침강된 각막조직을 급속 냉동후 8 ㎛의 두께로 연속절편으로 만들어, MUC1의 core protein을 항체에 노출시키기 위해 neuraminidase(Genzyme, U.S.A) 전처치후 ABC(Avidin-Biotin complex) Kit을 이용한 면역조직화학 염색을 시행하였다.

Neuraminidase 전처치는 먼저 조직을 50 mM sodium acetate에 10분을 둔 후 neuraminidase 0.5 U/ml과 50 mM sodium acetate 용액에 37 ℃에서 1시간 동안 두었다. 면역조직화학 염색을 위해 조직을 증류수로 5~10분 세척 후 0.3% 과산화수소수(H_2O_2)가 포함된 용액에 30분 담근 다음, 증류수와 0.12 M 인산완충용액으로 각 5분씩 3회 세척하였다. 비특이적 반응을 줄이기 위해 조직에 1% bovine serum albumin을 5분간 반응시킨 다음, 인산완충용액으로 세척하였다.

일차 항체는 monoclonal anti human milk fat globulin(HMFG-1, Biodesign, U.S.A.)으로 사용하였고, 그 후 조직은 0.12 M 인산완충용액으로 각 5분씩 3회 세척하였다. 이차 항체(anti-mouse IgG)로 30분 반응시킨 후 다시 인산완충용액으로 세척하였으며 3차 항체(Avidin-Biotin complex)로 30분 반응 후 세척했다. 발색제로 DAB(3,3'-Diaminobenzidine, sigma, U.S.A.)액을 2분간 반응시키고, 인산완충용액과 증류수로 발색제를 세척하고 5분간의 hematoxylin 대조염색을 거쳐 Olympus 현미경으로 관찰 및 촬영(D Plan 100x. NFK 2.5x)하였다. 대조군은 위 과정중 일차항체 과정을 생략하여 비교하였다.

2. 면역 형광 염색

위의 과정과 같이 고정된 각막을 neuraminidase 전처치후 ABC Kit를 이용한 면역 형광 염색을 시행하였다.

안구는 먼저 4% paraformaldehyde가 포함된 고정액을 점안하여 각막 표면 뮤신층을 고정하였다. 표면이 고정된 각막을 적출하여 30% sucrose에 담가 냉장고에서 침강할 때까지 두었다. 면역조직화학 염색 때와 같은 방법으로 neuraminidase 전처치후 ABC(Avidin-Biotin complex) Kit을 이용한 면역형광 염색을 시행하였다.

조직을 증류수로 5~10분 세척 후 0.3% 과산화수소수(H_2O_2)가 포함된 용액에 30분 담근 다음, 증류수와 0.12 M 인산완충용액으로 각 5분씩 3회 세척하였다. 비특이적 반응을 줄이기 위해 조직에 1% bovine serum albumin을 5분간 반응시킨 다음, 인산완충용액으로 세척하였다.

일차 항체는 monoclonal anti-human milk fat globulin(HMFG-1, Biodesign, U.S.A.)을

사용하였고, 그 후 조직은 0.12 M 인산완충용액으로 각 5분씩 3회 세척하였다. FITC가 부착된 이차항체(FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG)로 1시간 반응시킨 후 다시 인산완충용액으로 세척하였으며 각 조각은 내피측과 외피측으로 분리시킨 후 외피측을 슬라이드 유리판에 올리고 Cover slip으로 덮어 이 유리판을 confocal laser scanning microscopy(CLSM, Leica TCSMT, Leica laser technik GMBH, Heidelberg, Germany) 하에 관찰하였고, 필요에 따라 형광필터하에 사진촬영하였다(Leica DMRBE).

3. *In situ* hybridization

In situ hybridization에는 450-bp의 tandem repeat fragment와 345-bp의 5'position의 tandem repeat fragment 두 종류의 cDNA를 사용하였다. 이 두 cDNA는 홀링워드 박사(미국 네브라스카 메디칼 병원)로부터 기증 받았다.

T7 및 T3 RNA polymerase와 [^{35}S]UTP를 이용하여 *in vitro* transcription 방법으로 동위원소가 표지된 riboprobe를 얻었다.

표지된 probe가 함유된 hybridization용액(50% formaldehyde, 10% dextran sulfate, 0.7% ficoll, 0.7% polyvinyl pyrrolidone, 0.7% bovine serum albumin, 0.15 mg/ml yeast tRNA, 0.33 mg/ml denatured salmon sperm DNA, 20 ㎛ dithiothreitol; 1×10^{7} cpm/㎖)을 각 slide 당 60 ㎕씩 점적하고 coverglass로 덮은 후 Tm 값에서 얻은 온도에서 16~24시간 동안 반응(hybridization)시켰다. 반응이 끝나면 상온에서 4×SSC 용액에 담궈 coverglass를 제거한 후 4×SSC에 5분씩 네 번 세척한 후 37°C에서 30분간 RNase를 처리(20 ㎍/ml RNase A, 0.5 M NaCl, 10 mM EDTA, pH 8.0)하였다. RNase 처리 후 2×SSC로 한번씩 세척한 후 60°C에서 0.1×SSC에 30분 수세한 후 에탄올로 탈수시킨 후 공기 중에서 말려 max Hyperfilm(Amersham U.K.)에 일정량의 동위원소가 함유된 절편이 동위원소 양에 따라 붙어있는 standard slide와 함께 5일간 노출시켜 현상하여 결과를 분석하였다. Hematoxylin으로 대조 염색하였다.

결 과

1. 인체 각막 상피표면의 면역조직화학 염색

항 MUC1 항체인 monoclonal anti-human milk fat globulin(HMFG-1)을 이용한 면역조직화학 염색결과, 사진과 같이 각막표면상피에 대조군과 구별되는 갈색 띠가 관찰되었다(Fig. 2B). 이 띠는 이외의 세포층에서도 약하게 염색을 관찰할 수 있었으나 주로 각막표면상피의 가장 바깥쪽인 첨부 세포막의 위치에서 관찰되었다. 반면 일차항체 과정을 생략한 대조군에서는 특별한 염색소견이 각막 상피의 전층에서 보이지 않았다(Fig. 2A).

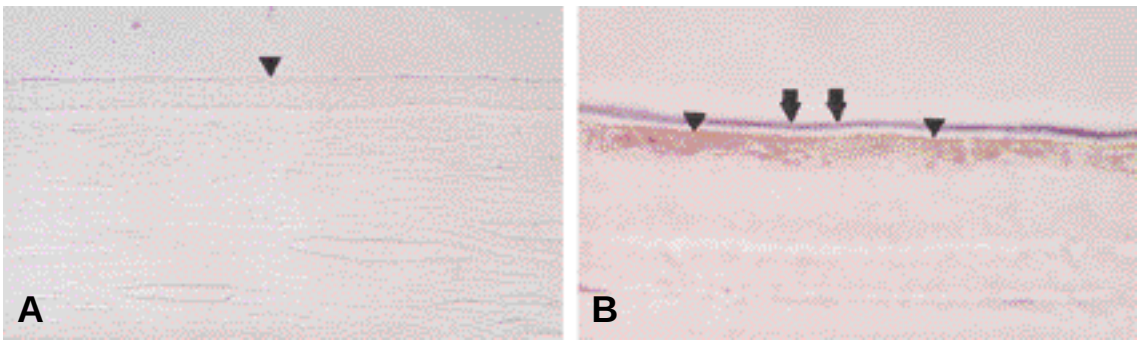

Figure 2. Immunohistochemical staining of mucin MUC1 on the human corneal epithelium with anti-MUC1 antibody(HMFG-1). A. Without the anti-MUC1 antibody, no immunohistochemical staining was observed(arrow head). Original magnification ×200. B. With the anti-MUC1 antibody, immunohistochemical staining was observed(arrow head). Upon that, there existed blue line artifact made by water-soluble fixation media(arrow).Original magnification ×400.

2. 인체 각막 상피의 면역형광염색

HMFG-1을 이용한 면역형광 염색 후 confocal laser scanning microscopy로 관찰한 결과, 표면 상피세포의 세포막에서 차이 있는 형광발색을 보였다. 면역 조직화학 염색과 달리 수평적 관계를 볼 수 있는 이 실험에서, 각 각막상피세포는 그 형광발색의 정도가 다름을 알 수 있었다(Fig. 3A). 세포가 탈락된 부위에서는(Fig. 3B 화살표) 그 아래층의 세포표면이 관찰되었으며, 3차원 분석상 탈락 세포아래에 위치한 세포의 세포막에서는 매우 약한 정도의 발색밖에는 관찰되지 않았다(Fig. 3B). 표면 세포간의 발색의 차이는 세포의 크기와 관계가 있는 것으로 보이며, 세포의 크기가 작은 경우 발색이 강하고 큰 세포가 약한 경향을 보였다(Fig. 3A).

3. *In situ* hybridization

MUC1의 tandem repeat 부분에 대한 RNA probe을 이용한 hybridization상, 발현이 모든 상피층에서 관찰되었다(Fig. 4). 이 발현 정도는 세포층의 위치에 따라 차이를 보이지는 않았다.

고 찰

최근 뮤신을 고정하는 방법이 발전되고, 뮤신의 종류별로 cDNA의 염기서열이 알려지면서 뮤신에 대한 연구는 크게 발전하고 있다. 더욱이, tan-

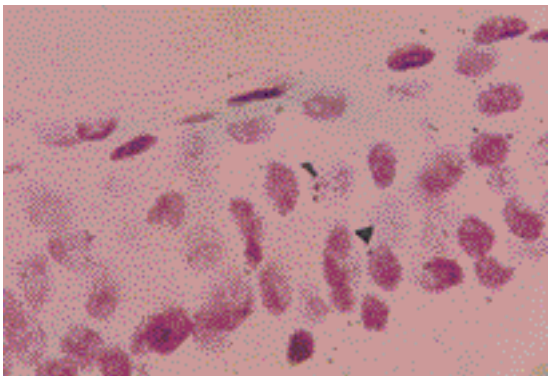

Figure 4. *In situ* hybridization with [^{35}S]UTP labeled RNA probe to the MUC1. In bright field of section hybridized with antisense probe, MUC1 mRNA was observed as dark spots in the all layers of corneal epithelium.

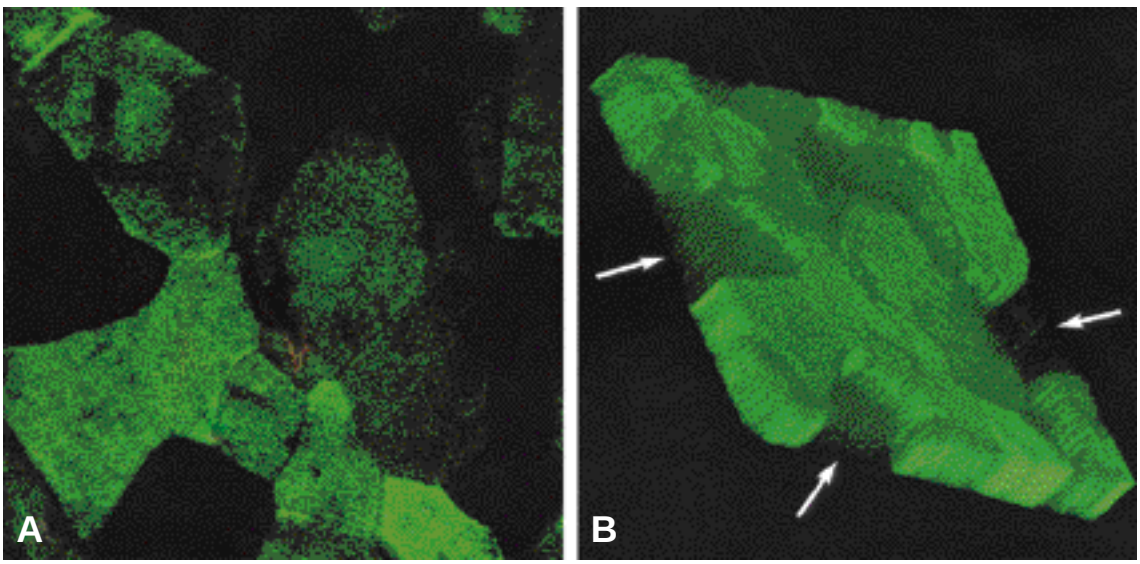

Figure 3. Immunofluorescent staining of mucin MUC1 on the human corneal epithelium with anti-MUC1 antibody(HMFG-1). A. With the anti-MUC1 antibody, strong and weak immunofluorescent staining was observed. Original magnification ×800. B. With 3-dimensional viewing, very weak immunofluorescent staining was observed in the cell located just beneath the desquamated surface epithelium(arrows).

dem repeat portion에 대한 항체가 개발되고[8], neuraminidase와 같은 특정 당질을 절단하는 효소의 사용으로 그 존재와 역할의 규명이 한층 용이해졌다[9]. 이런 토대 위에 각 조직별로 해당 뮤신의 역할과 뮤신이 관여하는 병태생리에 대한 이해가 증가하고 있으며, 많은 질환에서의 뮤신의 결함의 수정을 위한 시도들이 진행되고 있다.

안과적 영역에서 뮤신에 대한 연구는 주로 외안부 점액층에 대한 연구이었으며, 뮤신의 구성성분으로서 MUC5AC가 결막술잔세포에서 발현되며[5] 각결막편평상피층에서는 MUC1[6], MUC4[4,7]가 발현됨이 밝혀졌다. MUC1은 뮤신의 종류 중 막점액(membranous mucin)에 해당하며 인체의 타 장기에도 널리 존재한다[8]. Inatomi 등은 배양 각막 상피에서 RT-PCR과 *in situ* hybridization을 이용하여 MUC1의 mRNA 발현을 보였고, 면역조직화학 염색과 western blot으로 MUC1이 존재함을 입증하였다[6].

본 연구에서 저자들은 이와 같이 생성 발현된 MUC1이 각막 상피의 표층에 다다라서야 세포 외부로 분비됨을 보았다. 즉, 5~7층의 비각질화된 중층편평(stratified squamous) 상피세포층으로 구성된 각막상피중 비로소 MUC1을 세포막에 나타내는 것은 표층에 다다른 후인 것으로 보인다. Inatomi 등은 *in situ* hybridization상 세포전층에 mRNA가 골고루 분포함을 보였으나, 실제 MUC1 단백질의 면역 조직 화학적 검출에 있어서는 명확치 않은 결과 밖에는 제시하지 못했다[6]. 저자들은 뮤신의 구조중 동일 염기서열이 반복되어 나타나는 tandem repeat portion에 대한 항체를 사용하였으며, 이를 더 명확히 보이고자 DAB을 이용한 면역 조직 화학 염색으로 명확히 각막 상피에서 MUC1의 존재와 위치를 보였고, 이를 면역형광 염색을 통하여 재확인하였다.

또한, 이 결과를 고찰함에 있어서 mRNA가 많음에도 불구하고 표층이나 기저세포층에만 면역 조직 화학적 양성 소견이 나온 이유가 Inatomi 등은 다른 세포층에도 이미 세포 내에 생산된 MUC1 단백질이 존재하지만 면역조직화학 염색상 항체의 부착에 충분할 정도의 neuraminidase가 표층 아래의 세포에 작용하지 못했기 때문으로 생각하고 실제로는 비슷한 양의 단백질이 존재하리라 암시하였다.

하지만 첫째, neuraminidase의 전처치 과정은 조직절편을 제작한 후 시행되는 것이므로 이론상 각막 상피의 전층의 neuraminidase 전처치가 불균등하게 되었다고 보는 주장은 설득력이 적다.

둘째, 저자들의 연구 결과에서 보듯이 실제 표층 아래의 세포에는 세포 표면뿐 아니라(Fig. 1), 세포 내부에도 검출되기에 충분한 양의 단백질이 존재하지 않음(Fig. 3)을 볼 수 있다. 이는 neuraminidase 전처치에 차이가 아닌 단백질 자체의 양의 차이 때문인 것을 강력히 시사하는 소견이다.

셋째, 실제 많은 세포에서 여러 단계의 전사후 조절(post-transcriptional control)-RNA transport control, translational control, mRNA degradation control- 을 통해 mRNA 전사 이후에 단백질 생합성을 조절하고 있는 것을 볼 때, mRNA의 증가에도 불구하고 단백질 합성이 활발치 않은 것을 실험적 기법상의 문제라고 보는 것은 무리가 있다.

따라서, 저자들의 이런 결과들은 각막 상피 세포에 있어 뮤신의 생성이 세포층의 위치에 의해 조절되어짐을 보여주며, 실제 이러한 조절에 관여하는 인자들을 탐색할 만한 충분한 근거자료가 된다고 본다.

또한 면역 형광 염색법에서, 일반적으로 젊은 세포로 알려진 비교적 크기가 작은 세포에서 더 많은 뮤신 단백질이 보인 것은, 표면에 존재하는 세포간에 뮤신 발현의 차이가 있으며, 이는 세포의 나이에 따라 영향을 받는다는 것을 보여준다.

이상의 결과를 통해 저자들은 각막 상피 세포의 뮤신의 발현이 세포의 수직적 위치 이동과 세포의 연령에 의해 영향을 받는다는 사실을 발견할 수 있었다.

REFERENCES

1) Hogan MJ, Alvarado JA, Wedell JE : *Histology of the human eye, Phladelphia, Saunders,* 1971, pp.1-687
2) Holly FJ, Lemp MA : *Tear physiology and dry eyes. Surv Ophthalmol* 22:69-87, 1977.
3) Gipson IK, Inatomi T : *Mucin genes expressed by the ocular surface epithelium. Prog Ret Eye*

Res 16:81, 1977.

4) Allen A : *Mucus-a protective secretion of com - plexity. Trende Biochem Sci* 8:169-173, 1983.
5) Watanabe H, Fabricant M, Tisdale AS, Spurr-Michaud SJ, Lindberg K, Gipson IK : *Human corneal and conjunctival epithelia produce a mucin like gylcoprotein for the apical surface. Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:337-344. 1995.
6) Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale A, et al : *Human corneal and conjunctival epithelia express MUC1 mucin. Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:1818, 1995.
7) Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale A, et al : *Expression of secretory mucin genes by human conjunctival epithelia. Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:1684, 1996.
8) Seregni E, Botti C et al : *Structure, function and gene expression of epithelial mucin. Tumori* 83:625-632, 1997.
9) Arg ego P, Herreras JM et al : *Analysis of human ocular mucus: effects of neuraminidase and chitinase enzymes. Cornea* 17:200-207, 1998.