

가토 각막 표층 뮤신의 Lectin 염색에 의한 성분 분석

김응권 · 박중원 · 김수진* · 강신정** · 김형래*** · 임지현

= 요약 =

각막 표층에 존재하는 점액층은 대부분이 뮤신으로 구성되어 있으며, 중심부 단백질 뼈대구조와 두꺼운 주변부 당질(oligosaccharide)이 둘러싸고 있는 구조적 특성 때문에 성분 및 조성은 별로 알려진 것이 없다. 저자들은 각막 표층 뮤신의 성분을 11개의 lectin과 해당 특이성 당(inhibitory sugar)을 이용하여 염색, 분석함으로써 뮤신 당질의 구성 조합을 관찰하였다. 1% paraformaldehyde와 1% glutaraldehyde이 포함된 고정액에 24시간 실온에서 고정된 가토의 각막을 파라핀(paraffin)에 포매한 후 2 μ m 두께의 절편으로 자른 후 lectin 염색을 시행한 결과, 11개의 biotinylated lectin 중 RCA-I, PHA-E, SNA, WGA, MAA, SBA 등은 비교적 강한 양성으로 염색되었고, DBA와 PNA는 중등도의 반응을, Con A와 UEA-I는 약한 반응을 보였다. LCA의 경우 매우 약한 반응만을 보였다. 가토 각막 표층 뮤신은 β -D-Galactose, D-Galactose, D-N-acetyl-galactosamine, NeuAce(α 2,6)Gal, NeuAce(α 2,3)Gal, D-GalNAc, β -D-GlcNAc이 상당량 포함된 것으로 생각된다. α -D-Glucose 또는 α -D-Mannose와 α -L-Fucose는 적은 것으로 추측된다. 이상의 결과로 가토 각막 표층 뮤신에는 여러 성분의 당이 포함되어 있음을 발견하였다(한안지 40:1763~1769, 1999).

<접수일 : 1999년 3월 2일, 심사통과일 : 1999년 4월 19일>

연세대학교 의과대학 안과학교실, 시기능 개발연구소

Address reprint requests to Eung Kweon Kim, M.D.

Department of Ophthalmology, The Institute of Vision Research, Yonsei University College of Medicine
#134 Shinchon-dong, Seodaemun-ku, Seoul, 120-752, Korea

Tel : 82-2-361-8450, 8459, Fax : 82-2-312-0541

한림대학교 자연대학 생물학과*

Department of Biology, Hallym University, Chuncheon, Korea*

인제대학교 의과대학 상계 백병원 안과학교실**

Department of Ophthalmology, Inje University Sanggye Paik Hospital, Seoul, Korea**

이화여자대학교 의과대학 생화학교실***

Department of Biochemistry, Ewha Woman's University College of Medicine, Seoul, Korea***

* 이 보고서는 보건복지부에서 시행한 '97년도 보건의료기술개발 사업'의 결과 보고서입니다.

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

= Abstract =

Lectin Histochemistry of the Mucin on Corneal Epithelial Surface in Rabbit

Eung Kweon Kim, M.D., Jung Won Park, M.D., Su Jin Kim, Ph.D.*
Shin Jeong Kang, M.D.** , Hyung-Lae Kim, M.D.***, Ji Hyun Lim, B.S.

The mucous layer located on the cornea epithelial surface is mainly composed of mucin. It is unique in being composed of a central protein backbone surrounded by an outermost dense oligosaccharide matrix, yet its precise composition is still unknown.

In order to contribute to an understanding of the poorly characterized mucin of the corneal epithelial surface, we investigated the distribution of specific sugar moieties, an important component of mucin, in rabbits using biotinylated-lectin complexes and inhibitory sugars with 11 different lectins(RCA-I, PHA-E, SNA, WGA, MAA, SBA, DBA, PNA, UEA-I, LCA, Con A). The corneas were fixated with 1% glutaraldehyde-1% paraformaldehyde for 24 hrs and then embedded in paraffin. Lectin(20 μ g/ml) staining was performed on 2 μ m thickness sections for 8 hrs. RCA-I, PHA-E, SNA, WGA, MAA, and SBA reacted intensely. DBA and PNA bound moderately, Con A and UEA-I bound weakly, and LCA bound only slightly to the surface of the corneal epithelium. The strong staining of RCA-I, PHA-E, SNA, WGA, MAA, and SBA showed that β -D-Galactose, D-Galactose, D-N-acetyl-galactosamine, NeuAce(α 2, 6)Gal, NeuAce(α 2, 3)Gal, D-GalNAc, and β -D-GlcNA are the main components of mucin on the corneal epithelium in rabbits.

The authors' results showed that mucin on the corneal epithelium in rabbit is composed of complex glycoproteins(J Korean Ophthalmol Soc 40:1763~1769, 1999).

Key Words : Corneal epithelium, Lectin, Mucin

각막 표층 뮤신(mucin)은 결막 상피의 배상세포에서 주로 생성되어 눈의 감박임에 따라 각막 표면에 도포되며, 동시에 노쇠한 뮤신은 실 모양으로 변하여 뭉쳐지고 하원개부로 모여 비측 안각에 집합하게 된 후 손으로 눈을 비빌 때 제거, 소멸되는 과정을 거친다¹⁾. 눈물의 일부분을 구성하기도하는 각막 표면의 뮤신은, 친수성인 눈물의 수성층이 소수성인 각막상피세포 위에 넓게 퍼지도록 중간 매개체의 역할을 하며 상피를 보호하는

것으로 알려져 있다¹⁾.

각막 표층 뮤신의 생산 또는 성상의 변화는 안과를 방문하는 환자 중 흔히 발견되는 건성안의 증세를 유발하며, 비타민 A 부족증, 스티븐스-존슨 증후군, 눈천포창, 화학 화상 등과도 관계가 있어 정상 각막 표층 뮤신의 조성을 밝히기 위한 연구는 그 필요성이 제기되어 왔다.

이러한 중요성에도 불구하고, 질량의 50%를 탄수화물이 차지하고 있으며 중심에는 단백질 뼈대

구조가 있고 그 주변을 당질(oligosaccharide)이 두껍게 둘러싸고 있는 뮤신의 구조의 특성²⁾ 때문에 성분 및 조성에 대하여 별로 알려진 것이 없다.

Lectin은 세균, 식물 또는 동물에서 생성된 단백질 또는 당단백질로서 각기 일정한 당질에만 결합하는 특성이 있어 물질내의 일정 성분의 당질이 포함되어 있는지 여부를 밝히기 위하여 쓰이고 있다.^{3,4)} 현재 안과 영역에서는 각막의 상피, 실질 및 내피세포에 대한 lectin의 반응은 발표되었으나^{5,7)} 표층 뮤신에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

이 연구의 목적은 여러 종류의 lectin과 해당 특이성 당(inhibitory sugar)을 이용하여 염색, 분석함으로써 각막 표층뮤신의 당질 구성 조합을 밝히는데 있다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 재료

실험동물은 외견상 외안부 질환이 없는 체중 2~3kg의 백색가토 6마리 12안을 사용하였다. 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 고정액을 점안하여 각막 표면 뮤신층을 고정하였다. 표면이 고정된 가토의 각막을 적출하여 즉시 동일한 고정액에 담가 실온에서 24시간 고정시킨 후 탈수과정을 거쳐 파라핀(paraffin)에 포매하였다.

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

2. 실험방법

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

조직을 증류수로 5~10분 세척 후 0.3% 과산화수소수(H₂O₂)가 포함된 메탄올 용액에 20분간 담

근 다음 lectin 중 MAA와 SNA를 사용할 조직은 0.05M Tris buffer로 씻고, 나머지 lectin을 사용할 조직은 0.12M 인산완충용액으로 세척하였다. 비특이적 반응을 줄이기 위해 조직에 1% bovine serum albumin를 5분간 반응시킨 다음 Tris buffer 또는 인산완충용액으로 세척하였다. Biotinylated lectin(lectin의 농도; 20 μ g/ml)은 4 $^{\circ}$ C, moist chamber에서 12시간 반응시켰다. 그 후 조직들을 0.12M 인산완충용액으로 10분간 세척하였다. 조직을 UltraTek[®] anti-polyvalent antibody(ScyTek laboratories, Logan, Utha, U.S.A)에 10분간 반응시킨 후, 인산완충용액에 10분간 세척하고 UltraTek[®] HRP(horse red-dish peroxidase)로 10분간 반응시켰다. 그 후 조직을 0.12M 인산완충용액으로 세척하였으며 발색제인 AEC(3-Amino-9-Ethylcarbazole) 용액을 2분간 반응시키고, 인산완충용액과 증류수로 발색제를 세척하고 5분간의 hematoxylin 대조염색을 거쳐 Olympus 현미경으로 관찰 및 촬영(D Plan 100x, NFK 2.5x)하였다.

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

3. 대조군

본 실험에서는 조직내에 특이한 당이 존재하지 않으면 그에 상응하는 lectin이 조직에 부착하지 않는다는 것을 밝히기 위하여는 대조군이 필요하여 해당 특이성이 있는 당 성분(inhibitory sugar)을 lectin과 시험관내에서 4시간 미리 반응시킴으로써 사용하고자 하는 lectin의 결합능력을 미리 상쇄시키는 방법과 상기 염색법 중에서 biotinylated lectin 염색과정을 삭제하는 방법을 사용하였다. 본 실험에 사용된 해당 특이성 당의 농도는 1.0M이며 당의 종류는 다음과 같다(Table 2).

결 과

1. 가토 각막 표층 뮤신의 lectin 염색결과

Lectin 염색결과 사진에서와 같이 각막상피와 인접한 주위부터 바깥쪽으로 붉게 염색되는 부위(화살표)와 투명한 부위, 그리고 검은 경계선(화

살표머리)이 관찰되었다(Fig. 1). 붉게 염색되는 부위는 당질과 결합에 부착된 lectin에 붙어있는 anti-polyvalent antibody성분을 AEC(3-Amino-9-Ethylcarbazole)가 발색시킨 결과로

서 결국 그 부위에 당질을 함유한 뮤신이 존재하는 양성반응이다.

사용된 11개의 biotinylated lectin 중 RCA-I, PHA-E, SNA, WGA, MAA, SBA 등은 개체간 차이없이 비교적 강한 양성으로 염색되었다. DBA와 PNA는 중등도의 반응을, Con A와 UEA-I는 약한 반응을 보였다. LCA의 경우실험 4, 5, 6, 7에서만 매우 약한 양성반응만을 보였을 뿐 다른 실험에서는 음성반응을 나타내었다(Table 3). 동일한 종이라도 개체마다 각막표면

Table 1. List of lectins and specific glycoproteins used in this study

Lectins	Source	Specificity
Con A	Concavalina ensiformis	α -D-Glc*, α -D-Man [†]
DBA	Dolichos biflorus	D-GalNAc [‡]
PNA	Arachis hypogea	β -D-Gal [§]
RCA-I	Ricinus communis	β -D-Gal
SBA	Glycine max	α/β D-GalNAc
MAA	Maackia amurensis	NeuAc (α 2, 3)Gal
PHA-E	Phaseolus vulgaris	D-Gal, D-GlcNAc [¶]
SNA	Sambucus nigra	NeuAc(α 2, 6)Gal
WGA	Triticum vulgare	(β -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

||NeuAc : sialic acid

¶GlcNAc : N-acetyl-glucosamine

Table 2. List of inhibitory sugars used in this study

Lectins	Inhibitory sugar	Concentration
Con A	α -D-methyl-Man	1M
DBA	α -D-GalNAc	1M
PNA	D-Galactose, Lactose	1M
RCA-I	Lactose	1M
SBA	α -D-GalNAc, Galactose	1M
MAA	high concentration lactose	high concentration
PHA-E	α -D-GalNAc	1M
SNA	α -D-GalNAc, Lactose	1M
WGA	α -D-GlcNAc	1M
UEA-I	α -L-Fucose	1M
LCA	α -D-methyl-Man	1M

Table 3. Summary of lectin binding of epithelial mucin in rabbit cornea

Lectins	Experiments							
	1*	2*	3	4	5	6	7 [†]	8 [†]
Con A	-*	+/-	+	+/-	+	+	+	+
DBA	++	++	++	++	+	+	++	+
PNA	++	+	++	+	+	+	++	+
RCA-I	++	+	+	++	+	++	+++	+++
SBA	++	++	+++	+	-	+	++	++
MAA	++	++	-	+	++	+++	+++	++
PHA-E	-/+	-/+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SNA	++	++	+++	++	+++	+	+++	++
WGA	++	++	++	++	++	+++	++	++
UEA-I	+	+	+	+	+	-	+	+
LCA	-	-	-	-/+	-/+	-	-/+	-/+

* identical cornea

† identical cornea

* Results are expressed as intensity of staining as evaluated by light microscopy. Grading performed on the following scale: -, negative; -/+, trace; +, faint; ++, moderate; +++, intense.

의 뮤신에 대한 lectin 염색에 대한 반응의 정도와 반응하는 lectin의 종류도 차이가 있었다. 동일 개체인 1번과 2번 실험의 경우 Con A 염색결과를 제외하고는 비슷하였고, 7번과 8번 실험의 경우에서도 염색의 강도가 차이만 있을 뿐 결과는 비슷하였다(Table 3).

광학현미경상에서 관찰된 붉은 층의 두께는 촬영한 슬라이드를 확대하여 자를 이용하여 측정된 결과 약 0.6 μ m 정도였다(Fig. 1).

2. 대조군의 lectin 염색결과

상기 실험 과정중 biotinylated lectin을 반응하는 과정을 의도적으로 생략한 대조군에서는 모든 실험에서 음성으로 나왔다.

해당 특이성이 있는 당 성분(inhibitory sugar)을 사용한 대조군에서는 PHAE-I, MAA N-acetyl-galactosamine을 사용한 SNA의 경우는 염색의 강도가 감소하였으며 나머지 경우는 모두 음성으로 나왔다(Fig. 2).

고 찰

각막 상피 표층의 뮤신을 각막에 붙인 채로 염색하여 광학현미경으로 관찰하는 방법은 기존의 세포내 구조물 및 세포자체의 염색을 위한 고정법과는 달리 까다로운 조건들을 필요로 하였다. Tuori 등⁵⁾은 소의 눈을 영하 20도의 acetone과 alcohol로 고정한 후 lectin 염색을 하였는데 이들의 결과는 각막 상피세포가 염색된 결과만 보여주었으며 이러한 방법은 상피 표층의 뮤신을 고정하는데는 적당하지 않은 것으로 보인다. 본 연구진은 각막 표층의 뮤신을 염색으로 표현하기 위하여 냉동 절편을 이용

Fig. 1. Light micrograph of mucin on the rabbit corneal epithelium after reaction with PHA-E shows a intense red line(arrow) on the epithelial cell surface. Positive staining denotes AEC-lectin complexes bound to the specific sugar moiety of the mucin on corneal epithelium. It is not clear whether the dark line(arrowhead) would be the margin of the tear film or artifact($\times 1000$).

Fig. 2. Rabbit corneal sections stained with biotin-labeled DBA with(left) or without(right) application of the α -D-GalNAc, an inhibitory sugar to the D-GalNAc. The apparent red line originated from the reaction of D-GalNAc of the mucin with the DBA could not be observed when the lectin was preincubated with α -D-GalNAc.

한 방법(frozen section), 1% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde 및 CPC(cetylpyridinium chloride)로 고정한 후 paraffin에 포매하는 법, 10% formalin과 CPC로 고정한 후 paraffin에 포매하는 법 및 1% paraformaldehyde와 1% glutaraldehyde로 고정한 후 paraffin에 포매하는 법을 사용하였으나 이 중 1% paraformaldehyde와 1% glutaraldehyde로 고정한 후 paraffin에 포매하는 방법의 결과가 가장 우수하였다.

과거 눈물의 뮤신층은 그 두께가 0.02-0.05 μm ¹⁾으로 알려져 왔으나 Nichols 등⁸⁾은 cetylpyridinium chloride(CPC)를 이용하여 각막 상피 표면에 위치한 뮤신을 안정화시키고 tannic acid로 염색하여 전자현미경으로 관찰한 결과 0.4~1 μm 정도의 두께를 보고하였다. 최근 Praydal 등⁹⁾은 일체의 처치없이 생체내의 눈물층을 레이저 간섭계로 측정된 결과 각막표면의 평균 눈물층 자체의 전체 두께도 31~45 μm 였고, 점액 제거제인 20% acetylcysteine을 점안한 후 눈물층의 두께가 11 μm 으로 감소하는 것으로 보아, 눈물의 전체 두께는 과거 Holly⁷⁾가 측정된 7 μm 보다 훨씬 두꺼우며, 눈물층의 대부분을 뮤신이 차지하고 있다고 발표하였다. 본 실험에서 양성으로 염색되는 붉은 층이 모두 세포 밖의 당질을 표시하는 것인지 세포막내의 당질도 포함되어 있는 것인지는 광학현미경으로는 정확히 판단할 수 없었다. 또한 뮤신층은 조직의 고정방법과 조작에 따라 그 두께가 변경될 수도 있고, lectin 염색결과를 촬영한 슬라이드를 스크린에 비추는 방식으로 확대한 후 붉은 선의 두께를 측정하는 방식은 붉은 선의 두께를 측정하는데 많은 오차가 있을 수 있다는 점 때문에 단정할 수는 없으나, 본 실험에서 측정된 붉은 선의 두께는 약 0.6 μm 로서 기존에 알려진 눈물의 뮤신 두께인 0.02-0.05 μm ¹⁾보다는 Nichols 등⁸⁾의 결과에 가까운 수치를 보였다. 본 실험에서 붉은 층 바깥쪽의 투명한 층은 염색과정 중 발생한 인공물(artifact) 아니면 수성층인지 등은 확실하게 알 수 없었다.

Moore 및 Tiffany^{10,11)}는 인체 각막 상피 표면의 점액층을 polyacrylamide 전기영동법을 이용

하여 분석이 가능한 정도의 높은 분자량을 가진 mucus-type 당단백질(glycoprotein)을 발견할 수 있었다고 하였으며, gas-liquid chromatography와 fluorimetry를 통하여 각 당질의 구성 성분 및 비율이 fucose 8.3%, mannose 7.9%, galactose 20.2%, glucose 15.0%, galactosamine 7.9%, glucosamine 18.8%, sialic acid 21.9%라고 밝혔으나 각 성분이 어떠한 형태로 조합되어 뮤신을 형성하는지에 대하여는 조사되지 않았다. 본 실험에서 가토 각막 표층의 뮤신은 β -D-Galactose과 반응하는 RCA-I, D-Galactose 또는 D-N-acetyl-galactosamine와 반응하는 PHA-E, NeuAce(α 2,6)Gal과 반응하는 SNA, NeuAce(α 2,3)Gal과 반응하는 MAA, D-GalNAc과 반응하는 SBA, β -D-GlcNAc과 반응하는 WGA에 강한 양성반응을 나타낸 것으로 보아 상기 성분을 상당량 포함 한 것으로 생각되며, 그리고 α -D-Glucose 또는 α -D-Mannose와 반응하는 Con A 및 LCA, α -L-Fucose와 반응하는 UEA-I는 비교적 약한 반응을 보인 것으로 보아 해당 성분은 적은 것으로 추측된다. 본 실험의 결과와 상기 Moore 및 Tiffany^{10,11)}의 결과가 일치하지 않는 것은 본 실험에서는 당의 이성체를 구별하는 능력을 가진 lectin을 사용한 결과일 수도 있고, Dohlman 등¹²⁾이 지적한 대로 뮤신의 성상이 나이, 성별에 따라 차이가 생기는 것처럼 인체와 가토 사이의 차이일 수도 있을 것으로 생각된다.

각막상피 표면에 위치한 뮤신의 생성 원류는 과거에는 결막의 배상세포로 알려져 왔다. 그러나 최근에는 각막상피조직에서도 뮤신을 생성한다는 주장이 나오고 있는데 Watanabe 등¹³⁾은 단일항체(monoclonal antibody)를 이용하여 뮤신 유사 당단백질(mucin-like glycoprotein)이 인체 각막상피 및 결막 세포에서 모두 생성 및 발현됨을 밝혀내었다. Nakamura 등¹⁴⁾은 배양된 가토의 각막상피세포에 위궤양 치료제인 gefarnate(ecabet sodium, teprenone, troxipde)를 반응시킨 결과 각막상피세포에서 뮤신과 유사한 당단백질(mucin-like glycoprotein)이 생성되는 것을 lectin 염색으로 증명하였고, 점안기로 안검

을 벌려놓아 안구표면에 눈물이 도포하지 못하는 상황에서 gefarnate를 생체 가토에 점안한 결과 대조군에 비하여 각막상피 파손을 억제할 수 있는 것을 관찰하여, 각막상피에서 배출된 뮤신이 상피의 파손을 억제한다고 발표하였다. Shigemitsu 등¹⁵⁾은 소의 하악선(submandibular gland)에서 추출한 뮤신을 포함한 점안액이 가토의 각막상피 창상의 치유를 촉진한다고 발표하였다. 본 실험에서는 가토 각막 표층 뮤신에는 여러 성분의 당이 포함되어 있음을 발견하였고 각막 표층을 포함한 각막 상피 표면의 뮤신 성분을 정확히 밝히는 작업은 향후 새로운 인공누액의 개발 시 그 조성에 도움을 줄 것으로 생각되며, 뮤신 성분내 결막배상세포에서 분비되는 뮤신과 각막상피세포에서 분비되는 뮤신의 차이점 및 분포비율에 관한 연구도 앞으로 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Holly FJ, Lemp MA : *Tear physiology and dry eyes. Surv Ophthalmol* 22:69-87, 1977.
- 2) Allen A : *Mucus - a protective secretion of complexity. Trends Biochem Sci* 8:169-173, 1983.
- 3) Damjanov I : *Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab Invest.* 57: 5-20, 1987.
- 4) Spicer SS, Schulte BA : *Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. J Histochem Cytochem* 40:1-38, 1992.
- 5) Tuori A, Virtanen I, Uusitalo H : *Lectin binding in the anterior segment of the bovine eye. J Histochem* 26:787-798, 1994.
- 6) Panjwani N, Moulton P, Alroy J, Baun J : *Localization of lectin binding sites in human, cat and rabbit corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci* 27:1280-1284, 1986.
- 7) Lawrenson JG, Reid AR, Allt G : *Corneal glycoconjugates: an ultrastructural lectin-gold study. J Histochem* 30(1):51-60, 1998.
- 8) Nichols BA, Chiappino MR, Dawson CR : *Demonstration of the mucous layer of the tear film by electron microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci* 26:464-473, 1985.
- 9) Pyradal JL, Artal P, Woon H, Campbell FW : *Study of human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometry. Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(6):2006-2011, 1992.
- 10) Moore JC, Tiffany JM : *Human Ocular Mucus. Origins and preliminary characterisation. Exp Eye Res* 29:291-301, 1979.
- 11) Moore JC, Tiffany JM : *Human Ocular Mucus. Chemical Studies. Exp Eye Res* 33:203-212, 1981.
- 12) Dohlman CH, Friend J, Kalevar V, Yagoda D, Balazs E : *The glycoprotein(mucus) content of tears from normal and dry eye patients. Exp Eye Res* 22:359-365, 1976.
- 13) 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* 36:337-344, 1995.
- 14) Nakamura M, Endo K, Hamano T : *Gefarnate stimulates secretion of mucin-like glycoproteins by corneal epithelium in vitro and protects corneal epithelium from desiccation in vivo. Exp Eye Res* 65(4):569-574, 1997.
- 15) Shigemitsu T, Shimizu Y, Majima Y : *Effects of mucin ophthalmic solution on epithelial wound healing in rabbit cornea. Ophthalmic Res* 29(2):61-66, 1997.