

생쥐 상악치조부에서의 파골세포의 당단백 합성 및 이동에 관한 전자현미경 자기방사법적 연구

김 명 국

An Electron Microscopic Radioautographic Study of the Synthesis and Migration of the Glycoproteins in the Osteoclast of the Mice Maxillary Alveolar Bone

Kim, Myung Kook

(Received November 13, 1992)

ABSTRACT

The pathway and time course of fucose-containing glycoprotein synthesis and intracellular translocation in osteoclasts of the mice maxillary alveolar bone were investigated by electron microscopic radioautography.

Male Balb-C mice weighing 17gm were anesthetized with Nembutal and injected via the external jugular vein with 2.5 mCi of L-[6-³H]-fucose (specific activity 16.8 mCi/mmol) in 0.1 ml of sterile saline solution. At 5, 10, 20, 35 minutes and 8 hours after administration of the ³H-fucose, animals were killed by intracardiac perfusion of 30ml of 2% glutaraldehyde in a modified Tyroid solution, pH 7.4. The maxillae were then removed and further fixed in Karnovsky fixative for an additional 3-4 hours. After rinsing in 0.1M cacodylate buffer for 10 minutes, the maxillae were demineralized for 2 weeks at 4°C in ethylene diamine tetraacetate containing 2% glutaraldehyde. The first interdental areas were mesiodistally sectioned into slices of 1mm thickness and postfixed in osmium tetroxide. Tissues were then dehydrated and embedded in Poly Bed. To prepare electron microscopic radioautography, the dipping method of Kopriwa (1973) was employed. Thin sections were coated with a crystalline monolayer of Ilford L₄ photographic emulsion.

After exposure for 4 months at 4°C, the sections were developed Kodak Microdol-X and Phenidon (for compact grains), fixed in 30% sodium thiosulfate, stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in the electron microscope (JEOL 1200 EX).

At 5, 10 and 20 minutes after injection, ³H-fucose was concentrated in Golgi cisternae of the

서울대학교 치과대학 구강해부학 교실

Department of Oral Anatomy, College of Dentistry, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

osteoblasts. By 35 minutes the labels were observed over small vesicles in the supranuclear area of osteoclasts. At 8 hours, numerous silver grains were located on the ruffled border and cell membrane of osteoclasts.

These results indicate that fucose molecules are added in the Golgi apparatus and small vesicles appear to be responsible for translocation of the glycoproteins to the marginal portion of osteoblasts. The glycoproteins are distributed on the osteoclast cell surface and especially over the ruffled border.

서 론

각종 세포에서 당단백의 합성과 분비를 조사하기 위해서는 당단백의 전구물질인 ^3H -fucose를 사용하고 있으며, 그동안 조상아세포 (odontoblast)의 교원합성과 분비에 대하여는 많은 연구가 있으나 (Carneiro와 Leblond, 1959; Young과 Greulich, 1963; Weinstock와 Leblond, 1974), 당단백의 합성과 분포에 대하여는 관심이 적었다 (Weinstock 등, 1972; Warshawsky와 Josephsen, 1981; Cho와 Garant, 1985).

당단백의 전구물질인 ^3H -fucose의 은입자는 조상아세포의 Golgi 복합체에 빠르게 표지되고, 1시간 후에는 조상아세포로부터 분비되며, 4시간 후에는 전상아질-상아질 경계부에 축적된다고 하였다 (Weinstock 등, 1972).

다른 종류의 세포, 즉 간세포, 대식세포, 흉선세포 및 장상피세포에서는 은입자가 분비성당단백 뿐만 아니라 세포막과 용해소체과립에도 표지되는데, 이것은 fucose를 함유하는 당단백이 이러한 구조에 지속적으로 합쳐져 가는 것을 보여주는 것이라 하였다 (Bennett와 Leblond, 1970; Bennett와 Leblond, 1971; Bennett 등, 1974; Bennett와 Leblond, 1977; Hand, 1979).

Warshawsky와 Josephsen (1981) 및 Cho와 Garant (1985)는 생쥐에 ^3H -fucose를 주사한 후 조상아세포의 당단백 합성과 이동에 대하여 자기방사법으로 조사하였다.

본 연구는 생쥐에 ^3H -fucose를 주사한 후 상악 치조부 파골세포의 당단백합성과 이동에 관하여 전자현미경 자기방사법으로 관찰하였다.

재료 및 방법

본 실험에서 사용한 동물은 17 gm의 웅성 Balb-C 마

우스를 사용하였으며, Nembutal 마취하에 L-[6- ^3H]-fucose (specific activity 16.8 mCi/mmol; New England Nuclear Corporation, Boston, Massachusetts, U.S.A.) 2.5 mCi를 외경정맥을 통하여 주사하였다. ^3H -fucose를 주사한 후 5, 10, 20 및 35분과 8시간에 각 동물은 2% glutaraldehyde (in modified Tyroid solution, pH 7.4) 30 ml을 심장내 관류하여 희생시켰다. 상악골을 떼어내고, 주위조직을 깨끗이 제거한 후 Karnovsky 고정액에 3-4 시간 더 고정하였다.

상악골은 0.1 M cacodylate 완충액에 10분간 담근 다음 ethylene diamine tetraacetate (2% glutaraldehyde 포함, 4°C)에서 2주동안 탈화하였다.

상악골의 치조중격 (interalveolar septum)에서 근원심적 (mesiodistal)으로 1 mm 두께의 절편을 6개 제작하고, 이를 1% osmium tetroxide에 1시간 30분 후 고정 후 탈수 및 포매과정을 거쳐 Poly Bed 812에 포매하였다. 광학현미경 관찰을 위해서는 Porter-Blum MT₂ Ultramicrotome을 사용하여 1 μm 두께의 조직 절편을 만든 후 1% toluidine blue로 염색하여 관찰하였다.

전자현미경자기방사법 :

전자현미경 자기방사법술식은 Kopriva (1973)의 dipping 방법에 의하였다. 깨끗이 닦은 microscope slide (75×25 mm)에 celloidin film (1% celloidin solution in isoamyl acetate)을 입히고, Reichert-Jung Ultratome Supernova를 이용하여 90nm 두께의 초박절편을 만든 후 slide에 올려놓았으며, ILford L 사진유제 (photographic emulsion, 종류수 3 : 사진유제 1)를 입혔다. 4°C 냉장고에서 4개월 노출시켰고, Kodak Microdol-X와 Phenidon 현상액으로 현상하였으며 30% sodium thiosulfate로 고정하였다. Microscope slide에 붙은 celloidin film을 분리시키기 위해 절단선에 희석된 hydrofluoric acid (종류수 40

ml+hydrofluoric acid 8방울)를 3방울 떨어뜨렸다 (김, 1975; 김, 1976; 김과 Hassler, 1980).

그리고 celloidin film 이 water bath 의 물에 띄워지면 EM grid 를 초박절편이 있는곳에 얹어 놓고, 여과지로 celloidin film 을 물에서 건져냈다. 이 여과지(EM grid, 조직, 사진유막 및 celloidin film)를 37°C oven 에서 건조시킨 후 핀셋으로 EM grid(조직, 사진유막 및 celloidin film)를 떼어냈다. 그리고 EM grid 를 isoamyl acetate 가 들어 있는 small petri dish 에 2-3 분 담가서 celloidin film 을 용해시켜 EM grid 에는 조직과 사진유막만 남게 하였으며, uranyl acetate 와 lead citrate 로 염색한 후 투과전자현미경(JEOL 1200 EX)으로 관찰하였다.

결 과

생쥐 상악치조부 파골세포의 당단백합성과 이동을 조사하기 위해 당단백의 전구 물질인 ^3H -fucose 를 사용하여 전자현미경 자기방사법으로 관찰하였으며, ^3H -fucose 를 주사한 후 5, 10 및 20분에서는 은입자가 Golgi 소조에 있었고, 35분에서는 Golgi 복합체 가까이 작은 소포에 있었으며, 8시간에서는 세포막과 주름변연에 있었다. 그리하여 당단백은 파골세포의 Golgi 복합체에 직접 들어간 후 작은 소포를 통해 시간의 경과와 더불어 주름 변연의 표면막으로 이동되는 것을 알 수 있었다.

고 찰

조상아세포의 당단백 합성과 이동에 대한 자기방사법적 연구는 주로 상아질-기질 조성에 초점을 맞추고 있다.

당단백에 함유되는 fucose 는, 주사량의 2%는 다른 당으로 대사되고, 70% 이상은 여러 조직과 혈청의 당단백에 합쳐지며, 나머지는 소변으로 배설되거나 다른 경로를 거치게 된다고 하였다(Bekesi 와 Winzler, 1967; Kaufman 과 Ginsburg, 1968). 이런 이유로 그동안 각종세포의 당단백합성과 이동에 관한 연구에는 fucose 를 사용하고 있다(Bennett 와 Leblond, 1970; Bennett 등, 1974).

주사된 ^3H -fucose 는 Golgi 복합체에 제일 먼저 나타나

고, 주사 후 2-10 분에 70% 이상의 은입자가 소기관에 출현한다고 하였고, (Bennett 와 Leblond, 1971) L-fucose 와 같은 말단당(terminal sugar)은 거의 독점적으로 Golgi 복합체에 직접 들어간다고 하였다(Schachter, 1974).

^3H -fucose 와 ^3H -proline 은 전상아질에 20 분과 30 분에 각각 표지 되는데, 이때 10분의 차이는 당단백의 골격단백질(protein backbone)이 과립형질내세망에서 합성된 후 Golgi 복합체로 운반되는데 소요되는 시간일 것으로 사료된다고 하였다(Cho 와 Garant, 1985).

본 연구는, Cho 와 Garant(1985)가 조상아세포에서는 당단백이 Golgi 복합체에 제일 먼저 출현하고, 다음에 용해소체 및 세포막-세포표면으로 이동한다고 보고한 것과 동일한 결과를 얻었다.

다른 각종세포, 즉 간세포, 홍선세포, 타액선의 줄무늬관, 대식세포 및 장원주상피세포에서는 fucose 가 Golgi 복합체에 직접 들어간 후 시간의 경과에 따라 용해소체 및 세포막-세포표면으로 운반된다고 하였다(Bennett 와 Leblond, 1971; Bennett 와 Leblond, 1977; Hand, 1979; Bennett, 1978).

Weinstock 등(1972)은 당단백의 전구물질인 ^3H -fucose 를 생쥐에 주사하여 조상아세포의 당단백합성과 이동에 대하여 자기방사법으로 조사하였는데, ^3H -fucose 를 주사한후 1시간에 은입자가 세포밖으로 분비되고, 4시간 후에 전상아질-상아질에 나타난다고 하였으며, Cho 와 Garant(1985)도 역시 조상아세포의 당단백합성과 분비관계를 조사하기 위해 ^3H -fucose 를 생쥐에 주사하여 자기방사법으로 관찰하였는데, fucose 를 주사한후 10분에 Golgi 복합체에 제일 먼저 들어가고, 20-30 분에 세포막, 종말그물, 조상아세포돌기 및 전상아질기질에 이르며, 4시간에 전상아질 및 전상아질-상아질경계에 도달한다고 하였다.

Weinstock 등(1972), Cho 와 Garant(1985)는 ^3H -fucose 가 조상아세포의 Golgi 복합체에 제일 먼저 표지되고, 다음에 분비관계를 통해 전상아질로 이동된다고 보고한 것처럼, 상악치조부의 파골세포에서도 당단백이 Golgi 복합체에 직접 들어간 후 작은소포를 통해 시간의 경과와 더불어 주름변연의 표면막으로 이동됨을 확인할 수 있었다.

결 론

상악골치조부 파골세포의 당단백합성과 이동을 조사하기 위해 생쥐에 ^3H -fucose 를 주사한후 전자현미경자기방사법으로 관찰하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. ^3H -fucose 를 주사한 후 5, 10 및 20분에서는 입자가 골지소포에 있었고, 35분에서는 골지복합체 가까이 작은 소포에 있었으며, 8시간에서는 세포막과 주름변연에 있었다.

2. 이런 결과로, 당단백은 파골세포의 골지복합체에 직접 들어간 후 작은소포를 통해 시간의 경과와 더불어 주름변연의 표면막으로 이동된다는 것을 알 수 있었다.

REFERENCES

- Bekesi J.G. and Winzler R.J. 1967. The metabolism of plasma, glycoproteins. Studies on the incorporation of L-fucose-1- ^{14}C into tissue and serum in the normal rat. *J. biol. Chem.* 242, 3873-3879.
- Bennett G. 1978. Synthesis and migration of glycoproteins in cells of the rat thymus, as shown by radioautography after ^3H -fucose injection. *Am. J. Anat.* 152, 223-256.
- Bennett G. and Leblond C.P. 1970. Formation of cell coat material for the whole surface of columnar cells in the rat small intestine as visualized by radioautography with L-fucose- ^3H . *J. Cell Biol.* 46, 409-416.
- Bennett G. and Leblond C.P. 1971. Passage of fucose- ^3H label from the Golgi apparatus into dense and multivesicular bodies in the duodenal columnar cells and hepatocytes of the rat. *J. Cell Biol.* 51, 875-881.
- Bennett G. and Leblond C.P. 1977. Biosynthesis of the glycoproteins present in plasma membrane, lysosomes and secretory materials as visualized by radioautography. *Histochem. J.* 9, 393-417.
- Bennett G., Leblond C.P. and Haddad A. 1974. Migration of glycoprotein from the Golgi apparatus to the surface of various cell types as shown by radioautography after labeled fucose injection into rats. *J. Cell Biol.* 60, 258-284.
- Carneiro J. and Leblond C.P. 1959. Role of osteoblasts and odontoblasts in secreting the collagen of bone and dentine, as shown by radioautography in mice given tritium-labeled glycine. *Expl Cell Res.* 18, 291-300.
- Cho, M.I. and Garant, P.R. 1985. Radioautographic analysis of [^3H]-fucose utilization by mouse odontoblasts with emphasis on intracytoplasmic and plasma membrane glycoproteins. *Archs oral Biol.* 30, 111-120.
- Han, S.S. and Kim, M.K. 1972. An improved method for double-isotope and double-emulsion radioautography using epoxy resin sections. *Stain Technology* 47, 291-296.
- Hand A.R. 1979. Synthesis of secretory and plasma membrane glycoproteins by striated duct cells of rat salivary glands as visualized by radioautography after ^3H -fucose injection. *Anat. Rec.* 195, 317-340.
- Kaufman R.L. and Ginsburg V. 1968. The metabolism of L-fucose by HeLa cells. *Expl Cell Res.* 50, 127-132.
- 김명국 및 Hassler, R. 1980. EM radioautographic techniques 에 관한 연구. -Cork 방법- 한국전자현미경학회지 10, 33-43.
- 김명국, 1975. 전자현미경용 자기방사법. -Loop 방법-. *한국의과학* 7, 333-338.
- 김명국, 1976. 5-Fluorouracil 이 생쥐 책장에 미치는 영향에 관한 전자현미경자기방사법적 연구. *대한해부학회지* 9, 127-132.
- Kopriwa, B.M. 1973. A reliable, standardized method for ultrastructural electron microscopic radioautography. *Histochemie* 37, 1-17.
- Schachter H. 1974. The subcellular sites of glycosylation. *Biochem. Soc. Symp.* 49, 57-71.
- Warshawsky H. and Josephsen K. 1981. The behavior of substances labeled with ^3H -proline and ^3H -fucose in the cellular processes of odontoblasts

- and ameloblasts. *Anat. Rec.* 200, 1-10.
- Weinstock M. and Leblond C.P. 1974. Synthesis, migration and release of precursor collagen by odontoblasts as visualized by radioautography after ^3H -proline administration. *J. Cell Biol.* 60, 92-127.
- Weinstock A., Weinstock M. and Leblond C.P. 1972. Autoradiographic detection of ^3H -fucose incorporation into glycoprotein by odontoblasts and its deposition at the site of the calcification front in dentin. *Calcif. Tiss. Res.* 8, 181-189.
- Young R.W. and Greulich R.C. 1963. Distinctive autoradiographic patterns of glycine incorporation in rat enamel and dentine matrices. *Archs oral Biol.* 8, 509-521.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Low power light micrograph of the first interdental area of demineralized maxillary molars in the mice. EN, demineralized enamel space; E, epithelium; D, dentin; AB, alveolar bone; Ce, cementum; PDL, periodontal ligament; SF, Sharpey's fiber; BV, blood vessel. $\times 240$.
- Fig. 2.** Light micrograph showing the alveolar bone (AB) and periodontal ligament (PDL) of demineralized maxillary molars in the mice. $\times 640$.
- Fig. 3.** Electron microscopic radioautograph (EMRA) of the perinuclear Golgi region of an osteoclast in the alveolar bone of maxilla at 10 minutes after intravenous injection of ^3H -fucose. Note the appearance of silver grains over the Golgi cisterns (arrow). $\times 24,000$.
- Fig. 4.** EMRA of the perinuclear Golgi region of an osteoclast in the alveolar bone of maxilla at 35 minutes after ^3H -fucose administration. Note the distribution of silver grains over the small vesicles (arrow) near Golgi region (G). $\times 24,000$.
- Fig. 5.** EMRA of the marginal portion of an osteoclast at 35 minutes after ^3H -fucose injection. Numerous silver grains are observed in the perinuclear region and ruffled border (arrow) of an osteoclast. AB, alveolar bone; N, nucleus; AP, apical portion. $\times 17,000$.
- Fig. 6.** EMRA demonstrating the localization of silver grains over the cell membrane of the osteoclast (arrows) at 8 hours after ^3H -fucose administration. $\times 12,000$.
- Fig. 7.** EMRA of the ruffled border of an osteoclast in the maxilla at 8 hours after intravenous injection of ^3H -fucose. Note the localization of silver grains over the ruffled border (arrows). Some grains are seen over collagen fibers in bone matrix beneath the ruffled border. $\times 16,000$.







