

## Streptozotocin을 투여한 흰쥐 태자 폐조직의 렉틴 조직화학 염색성

홍 혜 남 · 김 동 호

### Lectin histochemistry of lung tissues in the Streptozotocin rat fetus

Hong Hea Nam and Kim Dong Hou

(Received March 13, 1993)

#### ABSTRACT

This study was to investigate the effects of maternal diabetes on the lung tissue of the fetal rat using lectin histochemistry and electron microscope technique.

Maternal diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (75 mg/kg the body weight) into pregnant Sprague-Dawley rats on the 7th day of gestation.

Fetuses of streptozotocin induced diabetic rats exhibited delayed lung maturation and reduced air space. In lectin histochemistry, the binding of Maclura pomifera (MPA) to fetal lungs from diabetic mothers was reduced, but no significant changes in the bindings of Concanavalin A (Con A), Wheat germ agglutinin (WGA), Ricinus communis I (RCA I) and Griffonia simplicifolia (GSI-B<sub>4</sub>) were noted.

Because the MPA has affinity to terminal N-acetyl-D-galactosamine residues constantly linked O-glycosidically to serine or threonine, the present findings may indicates that maternal diabetes interfere with the processes of O-linked glycosylation in fetal rat lung.

**Key words:** Maternal diabetes, lectin, O-linked glycosylation

#### 서 론

당뇨병(diabetes mellitus)는 여러종류의 장기에 영향을 끼쳐 기능의 변화를 초래하는 널리 알려진 병리현

상이다. 당뇨병으로 인하여 심각한 변화가 유발되는 장기 가운데 폐(lung)는 특히 lipid protein complex를 형성하고 분비하는 특징적인 기능을 표적으로 하여 다양한 연구가 진행되어 왔다. Plopper와 Morishige(1978; 1979)는 실험적으로 당뇨병을 유발시킨 쥐의 폐에서 세

울산대학교 의과대학 해부학교실

Dept. of Anatomy, University of Ulsan College of Medicine.

이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대학육성)과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음

기판지세포(Clara cell)와 과립폐포세포(alveolar type II cell)의 미세구조가 변화됨을 관찰한 바 있으며, streptozotocin을 투여한 뒤 surfactant의 주요 phospholipid인 phosphatidylcholin의 합성량이 현저히 감소됨과 형태적인 미성숙이 나타남을 보고 하였다 (Erickson *et al.*, 1983; Gewolb *et al.*, 1985). Brown (1991)은 과립폐포세포를 culture한 실험에서 diabetic state가 세포내 adenylyate cyclase의 활성에 영향을 미쳐 surfactant의 분비능에 변화가 오는 것이라고 추정한 바 있다.

이러한 직접적인 당뇨병의 영향이외에도 모체가 당뇨병에 걸리면 모체의 hyperglycemia가 태자에게서 hyperinsulinemia를 유발시키는데 (Obenshain *et al.*, 1970), 이 효과가 태자의 폐에 미치는 영향은 크다. 당뇨병이 유발된 모체에서 채취한 태자의 폐를 대상으로 이루어진 많은 실험의 결과들을 보면 다음과 같다. 먼저 폐의 성장이 지연되었으며 (Tyden *et al.*, 1980; Bourbon and Farrell, 1985), 그에 따른 형태적인 변형 (Sosenko *et al.*, 1980)과 기능의 저하 (Bose *et al.*, 1980; Gewolb *et al.*, 1983)가 관찰되었고, 유리막(hyaline membrane)의 형성빈도가 높아 경상군의 6 배에 달하는 호흡곤란증(respiratory distress syndrome)이 유발되었다 (Robert *et al.*, 1976).

Diabetic pregnancy 동안 유발된 형태적, 생화학적 발달의 지연은 발생중에 있는 조직의 성장과 분화과정에 중요한 역할을 하는 세포표면의 glycoprotein발현에도 큰 영향을 미치게 된다. 세포표면에 나타나는 glycoprotein은 세포질내의 조면 내형질망(rough endoplasmic reticulum)에서 합성되기 시작하는데 최종 glycoprotein을 형성하기 까지 여러 단계의 합성과정을 거치게 된다. 그 중 하나가 당질화(glycosylation) 과정으로 protein에 oligosaccharide가 부착되는 단계이다. 이 과정은 asparagine잔기의 NH<sub>2</sub>기에 oligosaccharide 가 부착되는 N-linked glycosylation과 serine이나 threonine잔기의 hydroxyl group에 부착되는 O-linked glycosylation의 두 종류가 존재한다 (Albert *et al.*, 1989). 최종적으로 세포표면에서 발견되는 oligosaccharide는 각각의 합성과정에 따른 산물로써 나타나게 되는데, 발생중의 환경변화는 glycoprotein 조성에 영향을 미치게 된다.

그러나 모체의 당뇨병으로 인한 태자 폐 조직의 여러

변화를 세포표면의 glycoprotein 조성의 변화와 연관시키려는 시도는 극히 적었는데, Dixon과 Jersild(1983)가 Concanavalin A (Con A)와 Wheat germ agglutinin (WGA) 등 두 종류의 lectin을 사용하여 결합양상을 관찰한 것 이외에는 그다지 밝혀진 결과가 없다. 알려진 대로 lectin은 각 oligosaccharide에 특이적으로 결합하는 특징을 나타내는데 Con A와 Ricinus communis I (RCA I) lectin은 N-linked glycosylation의 최종 산물인 α-mannose나 galactose와 결합하고, O-linked glycosylation의 주산물인 N-acetylgalactosamine은 Maclura pomifera (MPA) lectin과 결합하게 되므로 lectin을 probe로 하여 세포의 glycoprotein 조성의 변화를 관찰할 수 있게 된다.

따라서 본 실험은 streptozotocin으로 당뇨병을 유발한 뒤 모체의 당뇨병이 태자 폐 세포의 glycoprotein 조성에 미치는 영향을 알아보고자 lectin histochemistry의 방법으로 수행 되었다.

## 재료 및 방법

### 1. Streptozotocin 투여

실험동물은 체중 200~250g 내외의 Sprague-Dawley계의 female rat를 사용하였다. Mating을 시킨 후 질 도말표본(vaginal smear)에서 sperm이 발견된 날을 임신 0일로 계산하여 임신 7일째 되는 날 streptozotocin(Sigma Chemical Co.)을 투여하였다. Streptozotocin은 75 mg/kg을 50 mM citrate buffer (pH 4.0)에 녹여 intraperitoneal injection을 하였으며, 대조군은 동량의 citrate buffer를 투여하였다. 희생시키기 전 glucose analyzer로 rat의 blood를 측정하여 serum glucose치가 300 mg/dl 이상인 rat를 실험군으로 사용하였다.

### 2. Lung preparation

#### 1) 일반적 처치

임신 19 일과 21 일째 되는 날 pentobarbital로 임신한 쥐를 마취시킨 뒤 cesarean section을 하여 양막과 함께 fetus를 절개해 낸 뒤 열음위에 올려 hypothermia상태로 만든다. Fetus의 머리를 재빨리 자른 뒤 왼쪽 폐의 일정부위를 제거해 내어 normal saline에 담근다.

### 2) 동결표본 제작

Saline에서 2번 수세한 폐조직을 filter paper로 옮겨 잠시 건조시킨 뒤 -30°C에서 미리 차게 해 둔 isopen-tane 용액에 재빨리 넣어 급속동결시킨 뒤 aluminium foil에 싸서 자르기 전까지 deep freezer에 보관해 둔다. Tissue section은 crystat에서 5 μm 두께로 잘라 poly-L-lysine으로 coating한 slide에 붙여 냉장고에 보관한다.

### 3) Historesin표본 제작

폐조직을 2% paraformaldehyde-1% glutaldehyde 고정액(pH 6.8)으로 4~8시간 고정하고 glycomethacrylate로 포매한 뒤 60°C oven에서 overnight시킨다. Tissue section은 Supercut(Leica Instrument Ltd.)을 사용하여 1 μm로 잘라 poly-L-lysine으로 coating한 slide에 붙인다.

## 3. Lectin histochemistry

### 1) Lectins

실험에 사용된 lectin은 모두 Vector사 (Burlingame, Calif.) 제품의 biotin-conjugated lectin으로 working solution(20 μg/ml)과 inhibitory sugar(0.2 M)를 만들 때는 lectin buffer(10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 0.04% Sodium azide, 0.1 mM Ca<sup>++</sup>, 0.01 mM Mn<sup>++</sup>)로 회석하여 사용하였다. 각 lectin의 결합 특성과 lectin의 활성을 저해하는 sugar를 Table 1에 나타내었다.

### 2) Lectin staining

Slide를 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액에 30분간 처리하고 PBS(10 mM phosphate buffer, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9% NaCl pH

7.4)로 잘 수세한 뒤 1% bovine serum albumin(BSA)으로 전처리를 하였다. BSA를 blotting으로 제거한 뒤 각 lectin을 working solution으로 만들어 조직을 염색하였으며, 이 때 inhibitory sugar가 첨가된 용액을 따로 만들어 lectin의 결합특성도 함께 조사하였다. 4°C에서 overnight시킨 slide를 PBS로 잘 수세하여 avidine-biotin-complex용액으로 60분간 incubation하고, PBS로 수세한 뒤 3, 3-diaminobenzidine 4 HCl(DAB, 0.02%)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.01%) 용액으로 20~30분간 발색시켰다. Tris buffer, PBS 그리고 중류수로 수세한 뒤 hematoxylin으로 counterstain하여 관찰하였다.

## 4. 전자현미경 표본 제작

### 1) En bloc method

작은 block으로 만든 조직을 통째 염색한 뒤 수지에 포매하는 en bloc method는 Meban(1986)의 방법을 조금 변형하여 사용하였다. 폐조직을 두께 0.5 mm 이하로 잘라 0.1 M phosphate buffer에 4% paraformaldehyde와 1% glutaldehyde가 포함된 고정액(pH 7.4)으로 2~4시간 고정한 뒤, 0.5 mM의 CaCl<sub>2</sub>가 포함된 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)로 깨끗이 수세하였다. Free aldehyde group을 제거하기 위하여 0.5 M ammonium chloride 용액에 2시간 동안 담궈둔 뒤, Table 1의 biotinylated lectins(100 μg/ml)으로 실온에서 1시간 염색하였다. PBS 용액으로 5분간 3번 수세하고 avidine-biotin complex(ABC) 용액에 1시간 incubation 한 뒤 3, 3-diaminobenzidine tetrachloride(DAB, 0.02%)-Hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.01%) 혼합 용액에 1시간 동안 발색시켰다. 그 뒤 조

Table 1. Lectins used in this study.

Lectin	Carbohydrate specificity	Inhibitory sugar
Concanavalin A (Con A)	α-D-glucose α-D-mannose	α-Methyl-D-mannose
Wheat germ agglutinin(WGA)	N-acetyl-D-glucosamine N-acetyl-neuraminic acid	N-acetyl-D-glucosamine
Ricinus communis I (RCA I)	β-galactose	lactose
Maclura pomifera (MPA)	N-acetyl-α-D-galactosamine α-D-galactose	methyl-α-galactosamine
Griffonia simplicifolia (GSI-B <sub>4</sub> )	α-D-galactose	α-D-galactose

직을 1% osmium tetroxide용액으로 1시간 동안 osmification 시킨 뒤 일반적인 탈수과정과 침투과정을 거쳐 Epon 812 수지에 포매하였다. Ultrathin section 을 하여 collodion-coated grid(200 mesh)에 올린 표본은 DAB 발색 표지를 확인하기 위해 uranyl acetate 염색은 하지 않고 lead citrate 염색만 시행하여 관찰하였다.

## 2) Colloidal gold method

Berryman과 Rodewald(1990)의 enhanced method에 준하여 다음과 같이 표본을 제작하였다. 1 mm<sup>3</sup> 이하로 자른 조직을 4% formaldehyde, 1% glutaldehyde, 0.2% picric acid 그리고 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> 가 포함된 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 2~3시간 동안 고정한 뒤 3.5% sucrose가 들어 있는 PBS(pH 7.4)로 2시간 이상 수세하였다. Free aldehyde기를 제거하기 위하여 상기의 PBS에 50 mM ammonium chloride를 첨가시켜 0°C에서 1시간 동안 담궈둔 후 다시 phosphate ion을 제거하기 위하여 3.5% sucrose가 포함된 cold 0.1 M maleate buffer(pH 6.5)로 15분씩 4회 수세하였다. 그 뒤 2% uranyl acetate로 0°C에서 2시간 동안 후고정을 하고 Lowicryl K4M에 포매하기 위하여 저온에서 탈수과정을 진행시켰다. 즉 50% ethanol은 0°C에서, 70%와 90% ethanol은 -20°C에서 각각 45분간 조직을 탈수 시켰으며 infiltration과정 역시 저온에서 시행하였다. Cross linker 2.7 gm, monomer 17.3 gm에 initiator 0.1 gm을 혼합하여 만든 Lowicryl resin과 ethanol(95%)을 1:1로 섞어 -20°C에서 1시간, 2:1의 비율로 1시간, 역시 -20°C에서 pure resin만으로 1시간 둔 뒤 -40°C로 온도를 낮추고 새로 갈아준 pure resin으로 overnight 시켰다. 탈수와 침투과정 동안 계속 rotator를 사용하여 agitation이 충분히 이루어지도록 하였다. Beem capsule에 조직을 포매하여 UV light(15W, 2 lamp, Sankyo denki Co., Ltd) 30 cm 하에서 24시간 동안(-40°C), 그리고 실온에서 2~3일간 polymerization 시킨 뒤 ultramicrotome으로 thin section 하였다.

Section은 carbon coated nickel grid(200 mesh)에 mount하여 50 mM Tris buffered saline(TBS, pH 7.4)에 5분간 담궈둔 뒤 biotinylated lectin(50~100 μg/ml)을 실온에서 1시간 적용시키고 TBS로 5분간 3

회 셧어 내었다. Streptavidin-gold(15 nm, Amersham U.K)는 1:30~50으로 희석하여 1시간 동안 labelling 시킨 뒤 다시 TBS로 5분간 3회 셧어 내었으며 이와같은 section의 염색및 수세는 paraffin으로 만든 plate 위에서 시행하였다. 그 뒤 lead citrate로 counterstain 한 뒤 JEM-1200EX II (Jeol. Ltd) 전자 현미경으로 50KV 전압 하에서 관찰하였다.

## 결 과

Streptozotocin을 투여한 실험군의 blood glucose value는 300~400 mg/dl을 나타내었으며 대조군의 glucose value는 80~130 mg/dl로 측정되었다. Streptozotocin 투여에 따른 litter size의 차이는 관찰되지 않았다.

### Light Microscopy

실험군과 대조군의 폐를 관찰해보면 전체적인 성숙도에 있어서 뚜렷하게 차이가 난 것은 아니지만 대체로 실험군에서 발달과정이 느리게 일어남을 알 수 있었다. 특히 태자기 21일째의 표본을 보면 정상군의 폐조직은 폐포관(alveolar duct)을 가진 폐포낭기(terminal sac stage)를 형성하며 잘 발달된 폐포상피를 나타내고 있으나(Fig 1), 실험군의 폐조직은 입방형의 상피세포와 중간엽이 많이 존재하였으며 두꺼운 격막과 상대적으로 감소된 air space를 가진 구역이 자주 관찰되었다(Fig 2).

다섯 종류의 lectin으로 염색하여 각 군의 폐세포 glycoprotein 조성을 알아본 결과는 다음과 같다. 먼저 각 lectin의 결합특성을 조사하기 위하여 저해제를 첨가하여 염색한 뒤 나타난 결과를 Table 2에 나타내었다.

Con A와 RCA 및 MPA에서는 저해제를 함께 처리한 후 결합 양상이 나타나지 않았으나 WGA와 GSI-B4의 경우는 처리한 저해제만으로 완전히 차단 되지 않고 약한 결합양상을 나타내었다. 정상군과 실험군의 태자기 19일째 폐조직을 다섯종류의 lectin으로 염색하여 나타난 결과를 Table 3에 요약하였다.

태자기 19일 폐조직에서 실험군과 정상군의 뚜렷한 차이점은 없으나 대체로 정상군 보다 실험군이 중간엽에서 약한 결합반응을 나타내었다. WGA의 경우는 정상군 중에서도 중간엽의 lectin결합력이 가장 뛰어났는데

**Table 2.** Effect of inhibitors on the binding of lectins.

Lectin	Inhibitor	Lectin Binding in Presence of Inhibitor
Concanavalin A	$\alpha$ -methyl-D-mannose(0.2 M)	No binding
Wheat germ agglutinin	N-acetyl-D-glucosamine(0.2 M)	Occasional weak binding
Ricinus communis I	lactose(0.2 M)	No binding
Maclura pomifera	methyl- $\alpha$ -D-galactosamine(0.2 M)	No binding
Griffonia simplicifolia	$\alpha$ -D-galactose(0.2 M)	Occasional weak binding

**Table 3.** Lectin binding to the lung tissue of 19-day fetus from normal and diabetic pregnancies.

Lectin	Normal		Diabetes	
	Mesenchyme	Alveolar area	Mesenchyme	Alveolar area
Con A	—	++	+	++
WGA	+++	++	—	+++
RCA I	+	+++	—	+++
MPA	+	+	—	—
GSI-B <sub>4</sub>	+	—	+	+

Abbreviations : +, weakly positive : ++, moderately positive  
: +++, strongly positive : —, negative.

**Table 4.** Lectin binding to the lung tissue of 19-day fetus from normal and diabetic pregnancies.

Lectin	Normal		Diabetes	
	Mesenchyme	Alveolar area	Mesenchyme	Alveolar area
Con A	+	++	+	++
WGA	+	+++	—	+++
RCA I	++	+++	+	+++
MPA	+	+++	—	+
GSI-B <sub>4</sub>	+	++	—	+

Abbreviations : +, weakly positive : ++, moderately positive  
: +++, strongly positive : —, negative.

(Fig 3), 실험군의 경우 중간엽에서의 반응이 거의 나타나지 않고 alveolar area에서의 결합력이 높게 나타났다(Fig 4). MPA의 경우는 실험군이 정상군에 비해 결합력이 감소되어 전 조직에서 반응이 나타나지 않았다.

정상군과 실험군의 태자기 21 일째의 폐조직에 대한 lectin 결합양상을 Table 4에 요약하였다.

Con A의 반응양상은 두 군의 폐조직에서 차이를 보이지 않았으며 RCA I는 실험군과 정상군에서 강한 결합력을 나타내었는데 폐포상피에서도 특히 luminal surface쪽의 반응이 강하게 나타났다. MPA와 GSI-B를 처리한 조직에서는 실험군이 정상군에 비해 lectin의 결합력이 약하게 나타났는데 특히 MPA의 경우 정상군

의 alveolar area, 그 중에서도 과립폐포세포로 간주되는 곳에서 강하게 나타났던 반응(Fig 5)이 실험군에서는 약하게 관찰되었다(Fig 6).

#### Electron Microscopy

전자현미경으로 정상군과 폐조직을 관찰해 보면 잘 분화된 세포들이 주로 정상군에서 발견되는데 특히 이러한 양상을 뚜렷이 비교할 수 있었던 것은 21 일째 태자기 조직의 과립폐포세포이었다. 과립폐포세포는 신장된 입방 형태로 중앙에 위치한 핵, lamellar body, microvilli 등으로 특징지을 수 있는데 정상군의 조직에서는 세포의 기질(extracellular matrix) 내의 lamellar body가 자

주 관찰되었으며 glycogen particle과 glycogen space도 관찰할 수 있었다(Fig 7, 8). 한편 실험군의 조직에서 관찰된 과립페포세포는 microvilli의 수가 대체로 감소되어 나타났고 세포질내 glycogen particle이 잘 나타나지 않는 대신 mesenchymal lipid droplet 등을 많이 가지고 있었다(Fig 9, 10). 또한 intracellular lamellar body는 관찰되었으나 extracellular matrix에서는 lamellar body를 찾아보기가 힘들었다.

En bloc method로 lectin staining을 하여 실험군과 정상군에서 각 lectin의 binding affinities를 관찰한 결과 Con A와 WGA는 type I, II epithelial cell 뿐 아니라 세기관지 섬모상피(ciliated bronchiolar epithelial cell)에도 결합됨을 알 수 있었다(Fig 11). 주로 호흡상피세포 표면에 binding affinity를 가진다고 알려진 RCA I의 경우, 뚜렷이 호흡상피세포에만 결합한다는 사실을 확인하기는 힘들었으며 전반적으로 산만하게 반응이 나타났다. 반면 MPA의 경우, 주로 과립페포세포에만 결합특성을 나타내어(Fig 12) 광학현미경 소견을 뒷받침 할 수 있게 해 주었다. 그리고 다른 lectin들이 정상군과 실험군에 있어서 별다른 차이점을 나타내지 않은 데 비해, 실험군에서 과립페포세포의 MPA에 대한 결합능은 정상군에 비해 미약하게 나타남을 관찰하였다(Fig 13, 14).

Colloidal gold method는 많은 조작 단계와 반복실험을 거쳤으나 저자들의 미숙함으로 만족할 만한 결과를 얻을수는 없었다. 그러나 RCA I과 MPA의 경우 광학현미경 소견과 en bloc method에서 얻은 결과와 일치하는 양상을 관찰할 수 있었다. MPA로 염색하고 streptavidine-gold particle로 간접염색한 조직에서 과립페포세포표면을 관찰해 보면 정상군이 실험군에서 보다 많은 gold particle들이 부착되어 있음을 알 수 있었으며(Fig 15, 16) glycogen space내와 표면 내형질망의 cisterna내에서도 gold particle들을 관찰할 수 있었다.

## 고 찰

태자기(fetal period) 때 일어나는 여러가지 형태학적, 기능적 변화는 어느 장기에서나 중요한 사건이지만 그중에서도 폐상피세포(pulmonary epithelial cell)은 폐의 발생단계에 따라 분화할 뿐만 아니라 생후의 호흡에 관여하는 물질을 생성하게 됨으로 이때 외부환경인자

로서의 모체의 상태는 매우 중요한 의미를 갖게된다. 목표기관(target organ)이 lung으로 알려진 모체의 병리현상으로는 diabetes mellitus를 들 수 있는데 본 실험에서는 streptozotocin을 투여하여 모체의 당뇨병을 유발시켰다. 그러나 streptozotocin의 투여시기를 임신후로 택하였기 때문에 Deuchar(1978)의 지적처럼 모체의 당뇨병 단독 영향뿐 아니라 streptozotocin의 직접적인 효과도 관여하였을지 모른다는 우려도 있다. 하지만 Dixon과 Jersild(1983)에 따르면 streptozotocin은 모체에서 재빨리 대사되고 배설되어 그 직접적인 효과는 곧 사라진다고 하였으므로 본 실험에서 관찰된 변화양상들은 모체에 유발된 당뇨병의 영향으로 인정하여도 될 것이다.

세포표면에 존재하는 macromolecules 중 carbohydrate와 protein의 공유결합으로 이루어진 glycoprotein은 분화과정과 발생과정시 중요성을 인정받고 있는데 그이유는 발생중의 세포들이 연속적으로 세포표면의 glycoprotein을 발현시키고 있기 때문이다. 서론에서 서술한 것처럼 세포표면에 나타나는 glycoprotein은 세포질 내의 조면 내형질망과 골지체를 거치면서 여러단계의 합성과정에 따른 산물로 형성되는 것이다. 따라서 발생 중의 태자에게 있어 모체의 병리현상은 세포내 소기관의 기능변화를 가져와 세포표면에 발현되는 glycoprotein 조성에 영향을 미칠 수 있게 된다.

Streptozotocin을 투여하여 모체에 당뇨병을 유발시킨 태자의 폐조직을 다섯종류의 lectin으로 염색한 뒤 정상군과 비교해 보았을 때 큰 차이를 나타내지 않은 lectin은 우선 Con A와 RCA I을 들수 있다. 두 lectin이 결합 특이성을 갖는 terminal sugar는 각각  $\alpha$ -D-mannose와  $\beta$ -galactose이며 이 특이성은 inhibitory sugar의 첨가시 양성반응이 일어나지 않은 것으로 확인되었다. 또한  $\alpha$ -D-mannose와  $\beta$ -galactose는 N-linked oligosaccharide에 속한다.

N-linked oligosaccharide의 형성은 조면 내형질망(rough endoplasmic reticulum: RER)에서 protein이 합성되면서부터 시작된다. 형성된 protein에 oligosaccharide가 부착되는 초기 당질화(initial glycosylation)과정이 ER의 luminal surface에서 일어나는데 asparagine잔기의 NH<sub>2</sub>기에 부착된다 하여 N-linked glycosylation이라 부른다. ER에서 만들어진 N-linked oligosaccharide는 계속적인 'trimming'과

'processing' 과정을 거쳐 최종 glycoprotein을 형성하는데 이 과정은 주로 Golgi apparatus에서 일어나게 된다(Albert *et al.*, 1989). 세포표면에서 발견되는 N-linked oligosaccharide에는 크게 두 종류가 있는데, high-mannose oligosaccharide와 complex oligosaccharide이다. High-mannose type은 새로운 sugar의 첨가없이 나타나게 되어 Con A lectin과 결합하게 되며, complex type은 Golgi apparatus에서 계속적인 processing으로 복잡한 terminal region을 가지나 그 side chain이 다시 잘려져 N-acetylglucosamine 혹은 galactose를 갖게 되어 WGA와 RCA등에 반응을 나타내게 된다.

역시 N-linked glycoprotein을 찾아가는 WGA와 GSI-B<sub>4</sub>의 경우 실험군과 정상군에서 뚜렷한 결합반응의 차이를 나타내지 않아, 모체의 당뇨병이 태자 폐 조직의 glycoprotein 중 N-linked group에는 별다른 영향을 나타내지 않는 것으로 생각되었다. Inhibitory sugar 첨가시 약한 반응을 나타낸 WGA는 조직내의 sialic acid가 반응을 나타낸 것으로 생각되며, inhibitor로  $\alpha$ -D-galactose의 첨가시 약한 반응을 나타낸 GSI-B<sub>4</sub>의 경우는 secondary affinity를 가진 N-acetyl-D-galactosamine에 반응을 나타낸 것으로 생각된다.

한편 정상군과 비교하여 결합반응이 상당히 감소되어 나타난 MPA의 경우 주로 N-acetyl-D-galactosamine과 결합되는데, 이 sugar는 O-linked glycosylation과 정을 통해 발현된다. O-linked glycosylation은 아직까지 그 pathway가 완전히 밝혀지지 않은 또 다른 glycosylation과정으로, protein의 serine이나 threonine 잔기의 hydroxyl group에 oligosaccharide가 부착되는 것을 말한다. O-linked glycosylation의 초기 당질화 과정은 Golgi apparatus의 cis side에서 일어나는데, 주로 N-acetylgalactosamine을 가지게 되어 MPA등의 lectin과 결합하게 된다고 알려져 있다(Ihida *et al.*, 1991). 따라서 실험군의 lectin특이성은 N-linked oligosaccharide와의 결합능에는 별 차이를 보이지 않은 반면 O-linked oligosaccharide와의 결합반응은 감소되어 나타났으므로 O-linked glycosylation 과정 중 어느 단계가 저해된 것이 아닌가 하는 추측을 일으키게 된다.

Lectin을 사용한 이전의 실험을 통하여  $\beta$ -galactose에 결합하는 RCA I은 호흡상피세포에, N-acetyl-D-

-galactosamine과 결합하는 MPA는 과립폐포세포에 특이적으로 반응을 하는 것으로 알려져 있다(Brandt, 1982; Joyce-Brady and Jerome, 1990). 따라서 실험군에 나타난 MPA의 감소는 과립폐포세포의 숫자 감소와 미분화에 따른 것이라 추정할 수도 있다.

이를 전자현미경 표본에서 관찰해 본 결과 실험군의 과립폐포세포은 정상군에 비해 cytoplasmic glycogen granule이 감소되어 나타났으며 microvilli 솟자의 감소와 extracellular lamellar body가 관찰되지 않아 기능의 저하를 추측할 수 있었고, mesenchymal lipid droplet가 여전히 남아있어 분화가 지연되고 있음을 알 수 있었다. 한편 MPA는 선택적으로 과립폐포세포 표면에 결합되는 양상을 나타내었으며 이러한 결합능은 실험군에서 현저히 감소되는 현상을 확인할 수 있었다. 따라서 streptozotocin으로 유발된 모체의 당뇨병은 태자 폐 조직 상피세포 중 과립폐포세포 glycoprotein 조성에 변화를 가져왔으며, 숫자 감소와 미분화를 초래하였다. 특히 세포표면에 나타나는 O-linked oligosaccharide의 발현이 감소되어 나타나는 것으로 보아, 모체의 당뇨병은 태자 폐 세포의 O-linked glycosylation 과정에 영향을 미치는 것으로 추측되어 진다.

## 결 론

Sterptozotocin으로 유발된 모체의 당뇨병이 태자 폐 세포의 glycoprotein 조성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 태자기 19일과 21일째의 폐조직을 Con A, WGA, RCA I, MPA, GSI-B<sub>4</sub> 등의 lectin 염색을 하고 광학현미경 관찰을 위해서는 ABC법을, 전자현미경을 위해서는 en bloc method와 colloidal gold method를 사용하였다. 다섯 종류의 lectin으로 조직화학염색을 시행한 결과  $\alpha$ -mannose, N-acetylglucosamine,  $\beta$ -galactose,  $\alpha$ -galactose와 각각 결합하는 Con A, WGA, RCA I, GSI-B<sub>4</sub>의 결합양상은 실험군과 정상군에서 큰 차이를 나타내지는 않았으나 N-acetyl-galactosamine과 결합하는 MPA의 결합력은 실험군에서 감소되어 나타났다. MPA는 과립폐포세포에 특이적인 결합능을 가지고 있었으며, 모체의 당뇨병은 태자의 과립폐포세포의 미분화와 기능저하를 가져올 뿐 아니라 O-linked glycosylation 과정 중 어느 단계에 영향을 미치는 것으로 추측되었다.

찾아보기 날말 : Streptozotocin, lectin, O-linked glycosylation

### 감사의 말씀

본 논문을 위하여 번거롭고도 힘든 실험동물 처리와 표본의 제작에서부터 세세한 실험과정과 논문의 마무리 작업에 이르기까지 아낌없는 노력과 뛰어난 능력을 발휘한 본 교실 조 민호 선생님께 감사 드립니다.

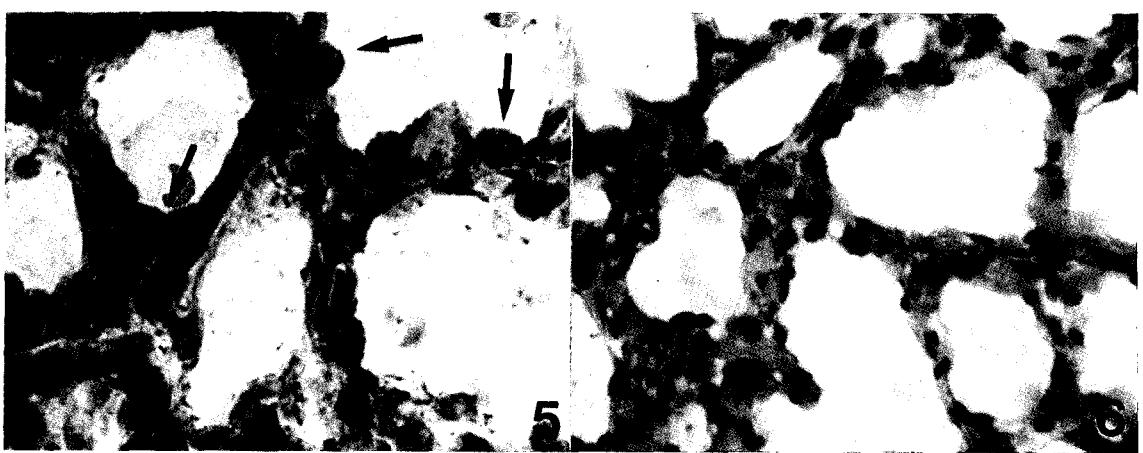
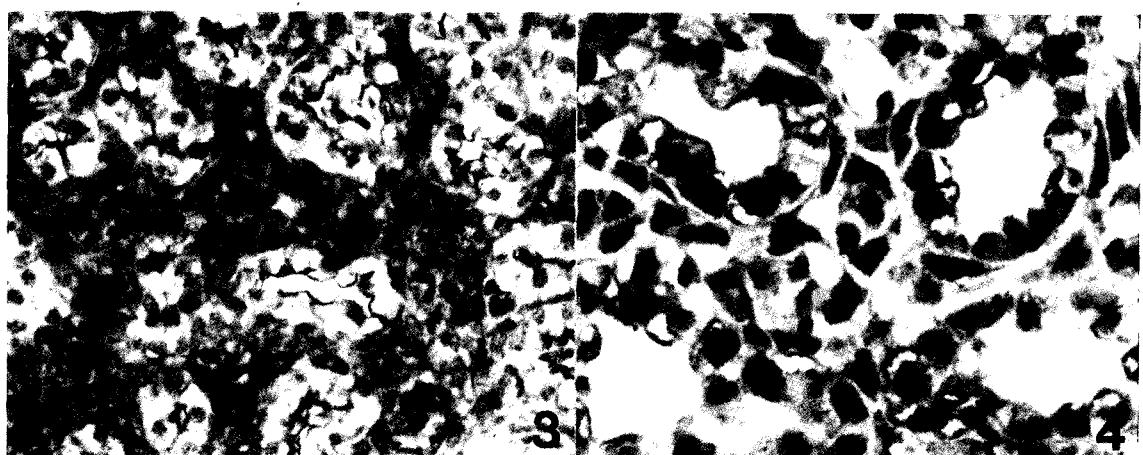
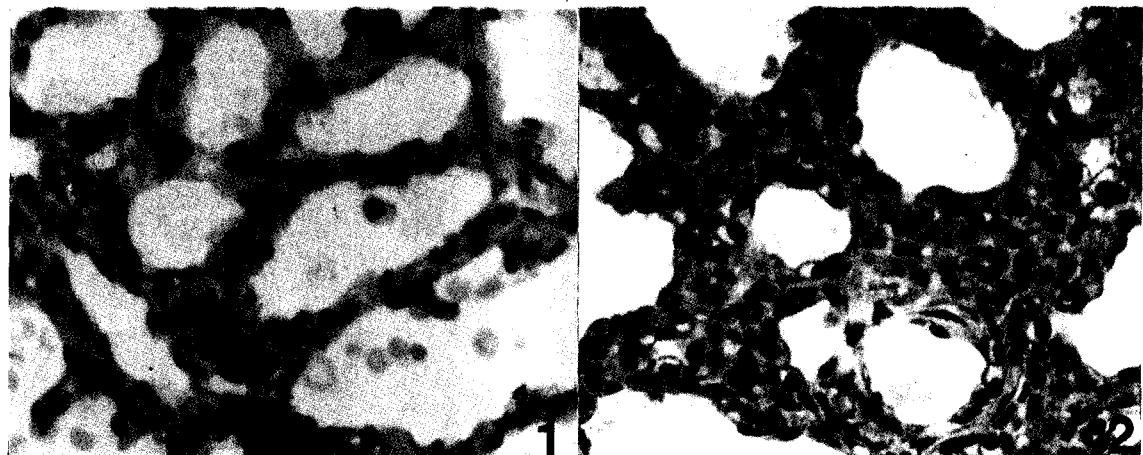
아울러 전자현미경 표본의 제작과 관찰 및 사진을 만드는데 적극 협조하여 주신 서울 중앙병원 해부병리과 정 학인 선생님과 공 미경 선생님께 감사드리며 바쁘신 중에도 실험과정에 대한 세심한 충고와 배려를 아끼지 않으셨음에 다시금 감사 드립니다.

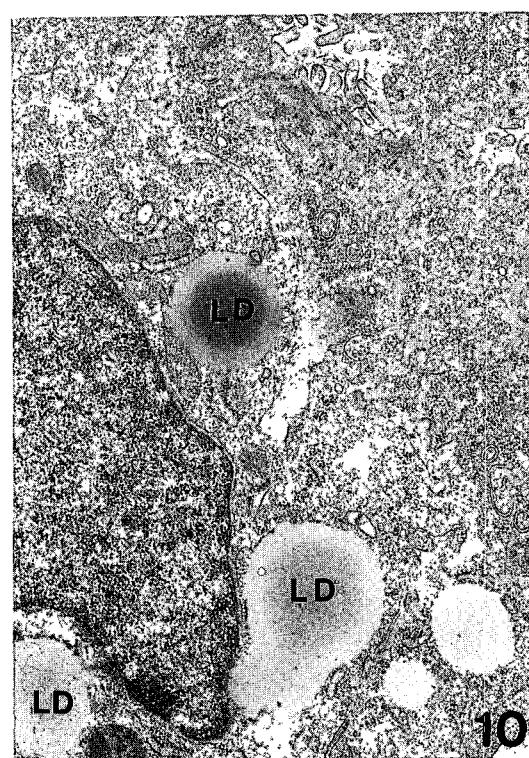
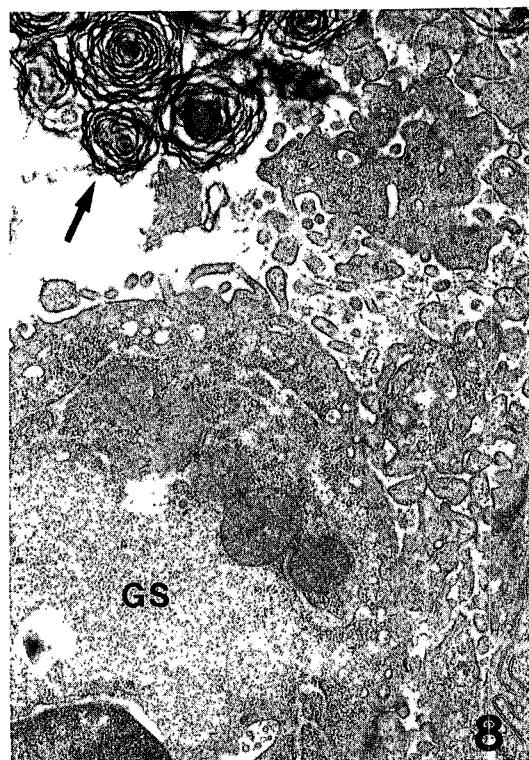
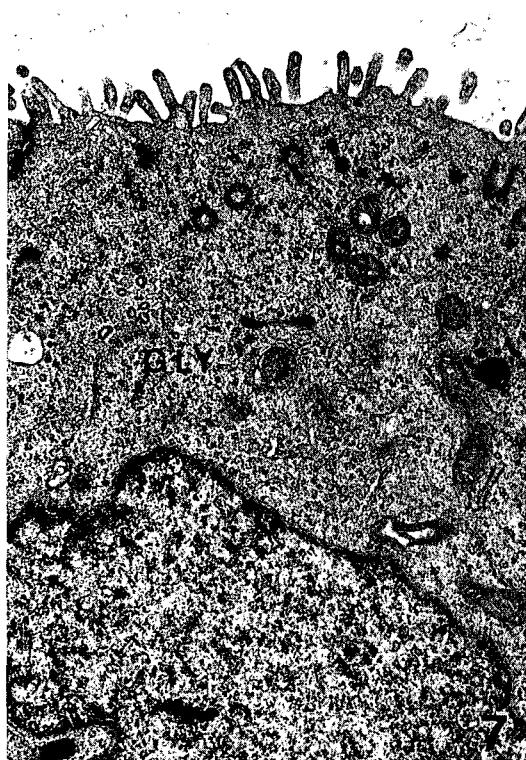
### REFERENCES

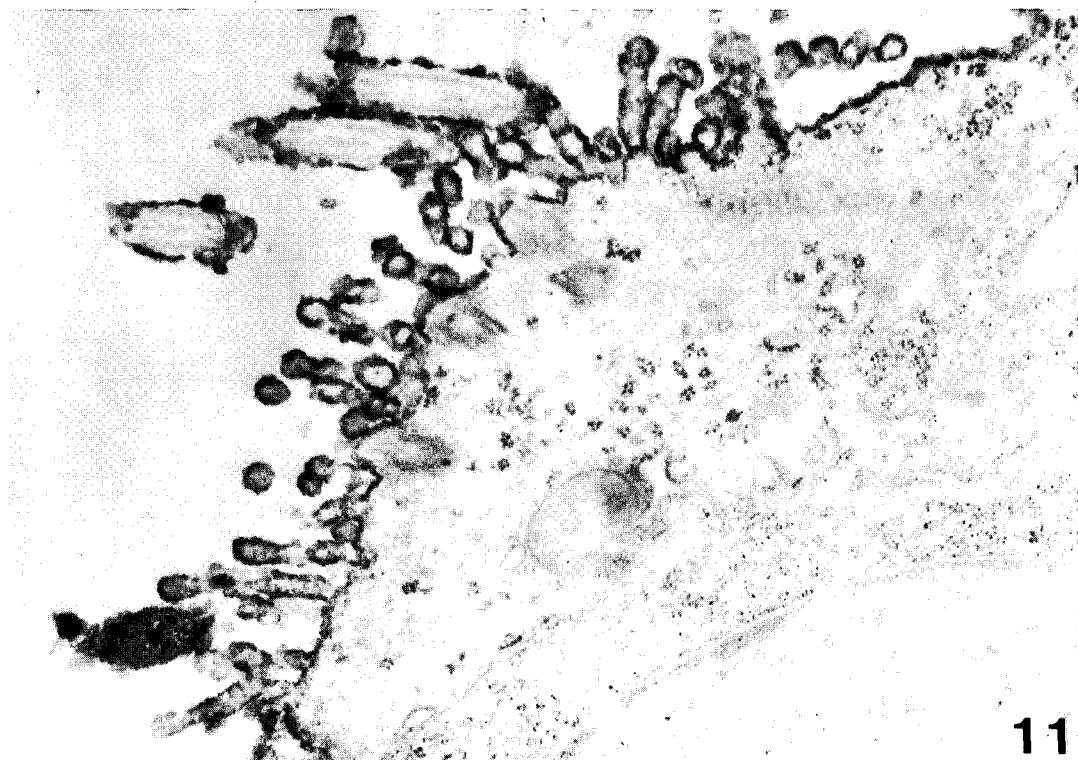
- Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: Molecular biology of the cell. 2nd ed. Garland Publishing, Inc. 446-458, 1989
- Berryman MA, Rodewald RD: An enhanced method for post-embedding immunocytochemical staining which preserves cell membranes. *J.Histochem. Cytochem.* 38 : 159-170, 1990
- Bourbon JR, Farrell PM: Fetal lung development in the diabetic pregnancy. *Pediatr. Res.* 19 : 253-267, 1985
- Bose CL, Mame PN, D' Ercole AJ, Lawson EE: Delayed fetal pulmonary maturation in rabbit model of the diabetic pregnancy. *J. Clin.Invest.* 66 : 220-226, 1989
- Brandt AE: Cell surface saccharides of rat lung alveolar type 1 and type 2 cells. *Fedn.Proc.Fedn. Am.Socs.Exp.Biol.* 41 : 755, 1982
- Deuchar EM: Effects of streptozotocin on early rat embryos grown in culture. *Experientia.* 34 : 84-85, 1978
- Dixon MT, Jersild RA Jr: Diabetic pregnancy. Changes in lectin binding to the surface of rat lung alveolar epithelial cells. *Am.J.Pathol.* 113 (3) : 389-395, 1983
- Erickson UJ, Tyden D, Berne C: Development of phosphatidylglycerol biosynthesis in the lungs of diabetic rats. *Diabetologia.* 24 : 202-206, 1983
- Gewolb IH, Rooney SA, Barrett C, Jugleson LD, Light D, Wilson CM, Walker-Smith GJ, Gross I, Warshaw JB: Delayed pulmonary maturation in the streptozotocin-diabetic rat. *Exp. Lung Res.* 8 : 141-151, 1985
- Gewolb IH, Barrett C, Warshaw JB: Placental growth and glycogen metabolism in streptozotocin diabetic rats. *Pediatr.Res.* 17 : 587-591, 1983
- Ihida K, Tsuyama S, Kashio N, Murata F: Subcompartment sugar residues of gastric surface mucous cells studied with labeled lectins. *Histochem.* 95 : 329-335, 1991
- Joyce-Brady MF, Jerome SB: Ontogeny of pulmonary alveolar epithelial markers of differentiation. *Dev.Biol.* 137 : 331-348, 1990
- Meban C: Lectin binding sites on the surfaces of the pneumonocytes in human neonatal lung. *Histochem.J.* 18 : 196-202, 1986
- Obenshain SS, Adam PAJ, King KC: Human fetal insulin response to sustained maternal hyperglycemia. *N Engl.J.Med.* 283 : 566-569, 1970
- Plopper CG, Morishige WK: Alterations in the ultrastructure of nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells by streptozotocin-induced diabetes in rats. *Am.Rev.Respir.Dis.* 120 : 1137-1143, 1979
- Plopper CG, Morishige WK: Alterations in granular (type II) pneumocyte ultrastructure by streptozotocin-induced diabetes in the rat. *Lab.Invest.* 38 : 143-148, 1978
- Sosenko IRS, Frantz ID, Robertd RJ, Meyrick B: Morphologic disturbance of lung maturation in fetuses of alloxan diabetic rabbits. *Am.Rev.Respir.Dis.* 122 : 687-696, 1980
- Tyden O, Berne C, Eriksson V: Lung maturation in fetuses of diabetic rats. *Pediatr. Res.* 14 : 1192-1195, 1980

## FIGURE LEGENDS

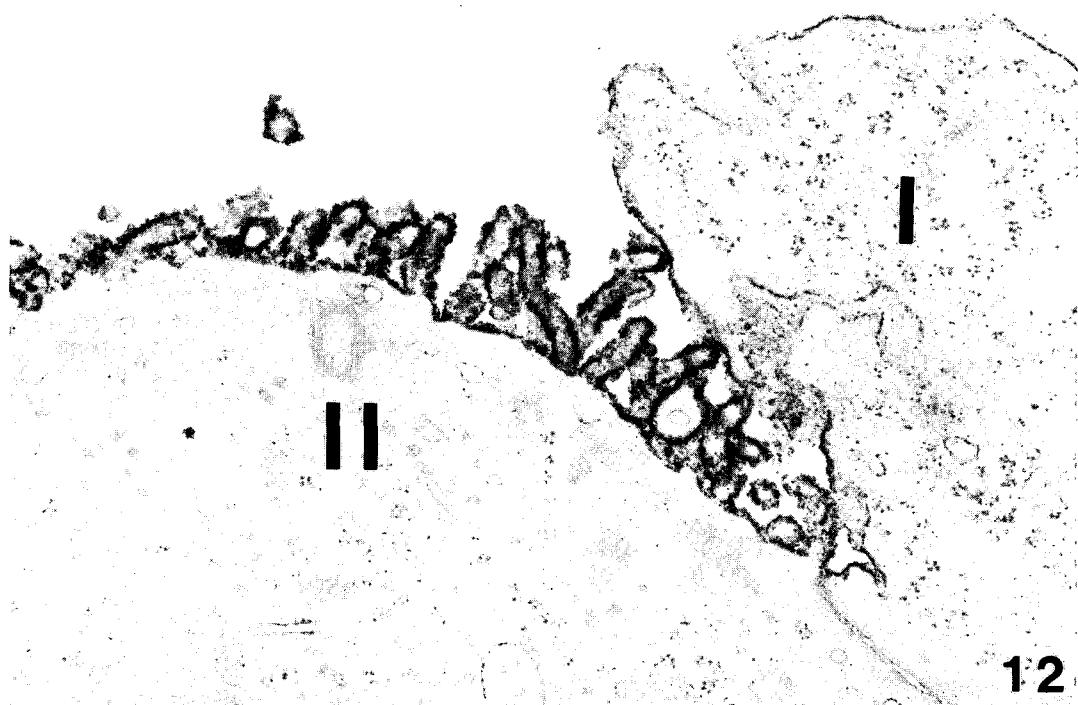
- Fig. 1.** Thin (1  $\mu\text{m}$ ) sections of lung tissue in the terminal sac stage from a 21-day control fetal rat. ( $\times 200$ )
- Fig. 2.** Thin sections of lung tissue from a 21-day streptozotocin rat fetus. The air space walls are thicker than those in Fig 1. and thus are in the late canalicular stage of development. ( $\times 200$ )
- Fig. 3.** Normal 19-day fetal lung tissue incubated in WGA. Reaction is evident on the mesenchyme and alveolar epithelium. ( $\times 200$ )
- Fig. 4.** Lung tissue from a 19-day diabetic fetus show no reaction on mesenchyme after incubation in WGA. ( $\times 400$ )
- Fig. 5.** Normal 21-day fetal lung tissue incubated in MPA. The heavy reaction sites on the type II alveolar cells (arrows) are demonstrated. ( $\times 400$ )
- Fig. 6.** Lung tissue from a 21-day diabetic fetus incubated in MPA. ( $\times 200$ )
- Fig. 7.** Electron micrograph of type II alveolar cell from a 21-day normal fetus, showing microvilli and cytoplasmic glycogens (gly). ( $\times 6,000$ )
- Fig. 8.** Maturing type II alveolar cell from a 21-day normal fetus demonstrate large glycogen space (GS) and extracellular lamellar bodies (arrow). ( $\times 6,000$ )
- Fig. 9.** Type II alveolar cell from a 21-day diabetic fetus. Note rare microvilli and decreased glycogen granule. (IL, intracellular lamellar body:  $\times 10,000$ )
- Fig. 10.** Type II alveolar cell from a 21-day diabetic fetus show many mesenchymal lipid droplets (LD). Mesenchymal lipid droplets suggesting a less differentiated state. ( $\times 6,000$ )
- Fig. 11.** Ciliated bronchiolar epithelial cell of normal fetus incubated with WGA. Counterstain only lead citrate. ( $\times 12,000$ )
- Fig. 12.** Two epithelial cell of normal fetus incubated with MPA. Heavy deposition of osmified particle is visible on the surface of the type II alveolar cell (II). But scant deposition is seen on the type I alveolar cell surface. Counterstain only lead citrate. ( $\times 15,000$ )
- Fig. 13.** Type II alveolar cell of normal fetus incubated with MPA show heavy, uniform reaction on the luminal surface. Counterstain only lead citrate. ( $\times 25,000$ )
- Fig. 14.** Type I alveolar cell from diabetic fetus incubated with MPA. No reaction product is evident on the cell surface. Counterstain only lead citrate. ( $\times 25,000$ )
- Fig. 15.** Binding of the streptavidine-gold to type II cell of normal fetus after incubation in MPA. Heavy deposition of gold particles is visible on the epithelial cell. ( $\times 30,000$ )
- Fig. 16.** Binding of the streptavidine-gold to type II cell of diabetic fetus after incubation in MPA. Gold particle is rarely distributed on the type II cell surface. ( $\times 30,000$ )



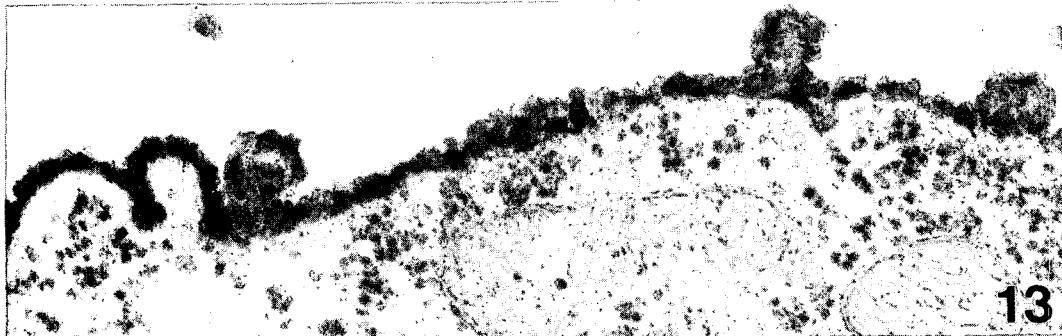




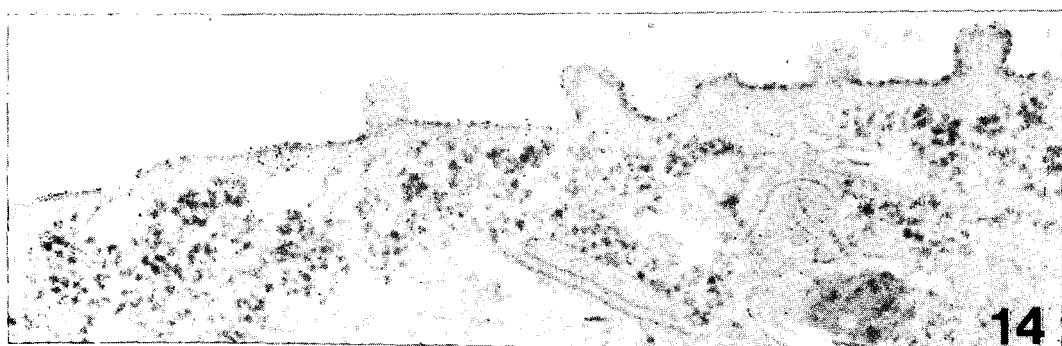
11



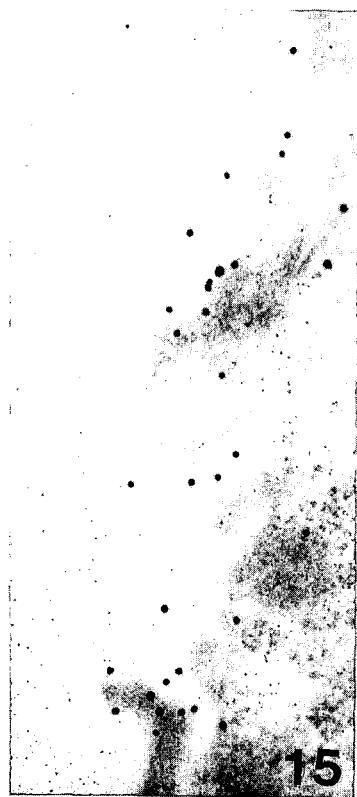
12



13



14



15



16