

신생 흰쥐의 기관섬모에서 α -tubulin의 발현과 섬모형성 양상에 대한 면역전자현미경적 연구

건국대학교 의과대학 이비인후과학교실

김보형 · 진정연 · 임대준 · 김동욱 · 이근수 · 강성호

= Abstract =

An Immuno-Electron Microscopic Study of Expression of α -tubulin on Ciliogenesis in Newborn Rat Trachea

Bo-Hyung Kim, MD, Jeong Eon Jin, MD, Dai June Lim, MD,
Dong Wook Kim, MD, Geun Soo Lee, MD, Seong Ho Kang, MD

*Department of Otolaryngology, College of Medicine,
Konkuk University, Chungju, Korea*

Background and objectives : This study was undertaken to detect the patterns of ciliogenesis in newborn rats trachea. **Materials and Methods** : The experimental animals(Sprague-Dawley strain) were divided five groups, one day, two day, three day, five day and seven day newborns as experimental groups. To obtain differential distribution of α -tubulins in the ciliated cells and patterns of ciliogenesis, we used immunohistochemical stain method with mouse anti α -tubulin monoclonal antibody as the primary antibody and gold particles conjugated goat anti mouse IgG as the secondary antibody. And we observed the specimens by electron microscope (Hitach-600 Model). **Results** : 1) The distribution of the α -tubulin reactions in apical zone was slightly decreased from three day after birth. 2) From 5th day after birth, the decreasing number of gold particles in intermediate zone was remarkable. 3) On the comparison with the other zones, the number of gold particles in the Golgi zone for seven days showed no statistical difference. **Conclusion** : The ciliogenesis of the tracheal ciliated cells in early newborn rat were made via centriolar and acentriolar pathways, in late groups, from five day after birth, the major ciliogenesis pattern might be centriolar pathway.

Key Words : Ciliogenesis, α -tubulin

교신저자 : 김보형(Bo-Hyung Kim, MD)

380-150 충북 충주시 교현동 620-5 건국대학교의료원 충주병원 이비인후과학교실

Tel : 0441) 845-2501,225 Fax : 0441) 843-6165 E-mail : bhkim@kcucc.cj.konkuk.ac.kr

I. 서 론

인체내의 섬모가 존재하는 호흡기, 부비동, 척수 및 뇌실, 난관 및 정관에서의 섬모세포의 발생과정과 형태학적 연구는 MaDowell 등¹⁾이 설치류의 태생기 후반의 기관을 절취하여 기관 섬모의 형성과정을 전자 현미경을 이용한 연구를 통해 섬모는 운동성을 지닌 9+2구조를 지니고 있다고 발표한 이후 활발히 진행되었다. Gordon 등²⁾은 tubulin 항체를 사용한 섬모에 대한 면역염색법을 보고하였으며, Sandoz 등³⁾은 이 염색법을 사용하여 섬모의 축삭(axoneme)내의 tubulin, 기저체(basal body)의 tubulin, 그리고 중심소체(centrioles)에서의 tubulin 분화를 연구하여 중심소체경로에 의한 섬모 형성을 발표하였다. Josh⁴⁾는 α , β -tubulin이 모여서 이루어진 미세소관의 형성을 주도하면서 형태적 분화도를 유지하는 곳을 미세소관형성중심(microtubule-organizing centers ; MTOC)이라고 하였으며 이는 중심소체와 기저체에 존재한다고 보고하였다. Lemullois 등⁵⁾은 섬모형성시 골지체에서 형성된 tubulin이 중심소체로의 이동은 actin-myosin system에 의하여 이루어진다고 주장했다. 이와는 다르게 Tamm 등⁶⁾은 섬유성과립(fibrogranules)으로 이루어진 치밀체(dense body)인 기저체에서 섬모를 완성되는 경로를 보고하였는데, 이는 세포질내 세망에서 만들어진 α , β -tubulin이 골지체에서 쌍을 이루어 미세소관(microtubule)이 되며 상피층의 기저소체로 이동하여 섬모를 형성하는 비중심소체경로이다. 이에 저자들은 흰쥐의 성장에 따라 기관 섬모세포의 섬모형성 과정중 α -tubulin의 발현양상과 시간경과에 따른 섬모형성의 경로를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

II. 대상 및 방법

실험동물은 SPF(specific pathogen free)의 건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 교배하여 얻은 신생흰쥐를 사용하여 출생 후 연령에 따라 출생 후 제1일군, 제2일군, 제3일군, 제5일군, 그리고

제7일군 등 5개의 실험군으로 분류하였고, 각 군에 각각 5마리의 웅성 흰쥐를 배정하였다. 대조군은 섬모형성이 끝난 생후 8주된 5마리의 흰쥐들로 정하였다.

출생후 경과 시간대별로 실험동물을 희생시켜 기관조직을 절제하여 즉시 0.1% glutaldehyde-4% paraformaldehyde-3% sucrose가 함유된 cacodylate buffer혼합용액(pH 7.4)으로 3시간 전고정한 후 조직을 cacodylate buffer로 세척하고 ethanol로 탈수시킨 후 paraformaldehyde 용액으로 3시간 동안 4°C에서 후고정하였다. 이 조직을 다시 cacodylate buffer용액으로 세척하고 ethanol에서 탈수시킨 후 gelatin capsule에 넣고 LR white로 1시간 동안 예비침투 시킨 후 48시간 동안 43°C에서 중합하여 Nickel gride로 600 Å 두께의 전자현미경용 초박절편을 제작하였다.

면역조직염색을 시행하기 위하여 만들어진 초박절편을 증류수로 세척한 후 NH_4Cl 을 함유한 Tris buffer에서 30분간 침적시키고 Tris buffer로 여러번 세척한 후 bovine serum albumin이 함유된 Tris buffer에 24시간 동안 침적시켰다. 일차항체로는 mouse anti α -tubulin monoclonal antibody(Sigma Co. Ltd.)를 bovine serum albumin이 첨가된 Tris buffer로 1 : 20으로 희석하여 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. Tween 20과 NaCl이 함유된 Tris buffer로 수회 세척한 후 bovine serum albumin이 함유된 Tris buffer로 5분간 침적시키고 직경 5 nm의 금과립(gold particle)이 함유된 goat anti mouse IgG(Sigma Co. Ltd)를 이차항체로 하여 bovine serum albumin이 첨가된 Tris buffer로 1 : 40으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다.

반응이 끝난 조직은 Tween 20과 NaCl이 함유된 Tris buffer 및 증류수로 세척한 후 건조시켜서 2% uranyl acetate로 2분간 후염색하고 Hitachi-600형 투과 전자현미경으로 관찰하였다. 전자현미경 사진에서의 금과립의 계측은 섬모의 기저체부위를 첨부세포질대(apical zone, zone 1)로 하고 핵과 골지체가 있는 주변을 골지체주변대(Golgi zone, zone 3)로, 그리고 두 구역의 사

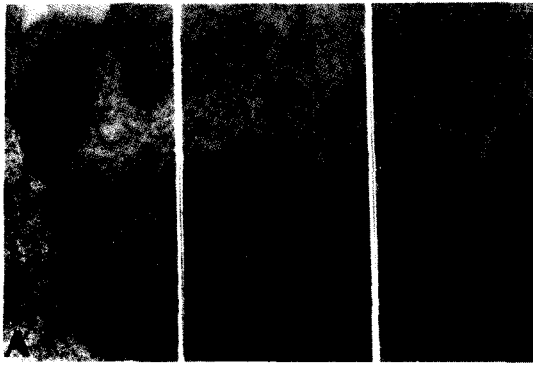


Fig. 1. Electron micrographs of the apical zone(A), intermediate zone(B), and Golge complex zone(C) of tracheal ciliated cells in 1 day old rats. Large amounts of gold particles are seen in the apical and intermediate zones, a few particles in Golgi zone of ciliated cells. Immunogold and uranyl acetate stain, X 30,000.

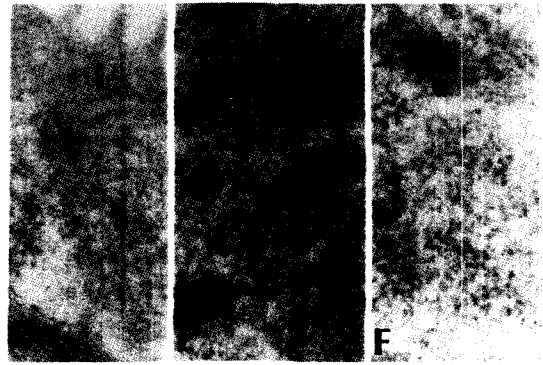


Fig. 2. Electron micrographs of the apical zone(D), intermediate zone(E), and Golge complex zone(F) of tracheal ciliated cells in 2 day old rats. Large amounts of gold particles are seen in apical zone, a few particles are seen in intermediate zone and Golgi zones of ciliated cells. Immunogold and uranyl acetate stain, X 30,000.

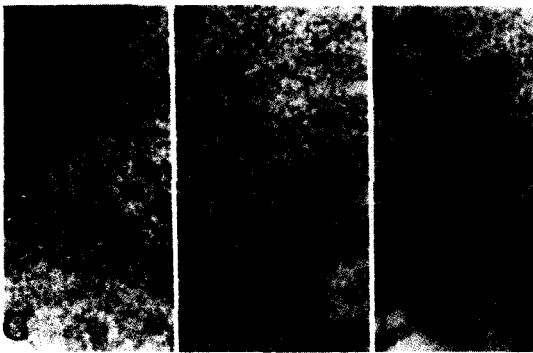


Fig. 3. Electron micrographs of the apical zone(G), intermediate zone(H), and Golge complex zone(I) of tracheal ciliated cells in 3 day old rats. Moderate numbers of gold particles are seen in apical zone, but in intermediate and Golgi zones, a few particles are seen. Immunogold and uranyl acetate stain, X 30,000.

이를 세포중간대(intermediate zone, zone 2)로 나누어 가로 5 cm, 세로 3 cm내의 금과립의 수를 계측하였다.

III. 결 과

1. 섬모세포의 첨부세포질대(zone 1)의 α -tubulin 반응조건

출생 제1일군의 기관섬모상피세포내 첨부세포질대의 금과립(α -tubulin면역반응)의 분포는 기저체의 양측 가장자리와 섬모의 축색을 따라 다수(+++)분포되어 있었고 세포질에도 금과립이 연결되어 다수(+++) 분포되어 있었다(Fig. 1A). 출생 제2일군에서는 금과립이 기저체와 섬모내에 다수(+++)관찰되었고 세포질에도 고루 분포되어 있었다(Fig. 2A). 출생 제3일군에서 금과립의 분포는 기저체와 섬모에 다수(+++) 관찰되었고, 세포질에도 중등도(++)로 관찰되었다(Fig. 3A). 출생 제5일군의 신생원취의 섬모세포에서는 기저체, 섬모 및 첨부세포질에 다량(+++)의 금과립이 밀집되어 나타났다(Fig. 4A). 출생 제7일군에서는 금과립이 소량 관찰되었다(Fig. 5A). 각 실험군에서 섬모의 첨부세포질내 금과립의 분포는 출생 제1일부터 5일까지는 거의 변화가 없이 다량 관찰되지만 제7일군에서는 급속히 감소되는 경향을 보였다(Fig. 6, Table 1).

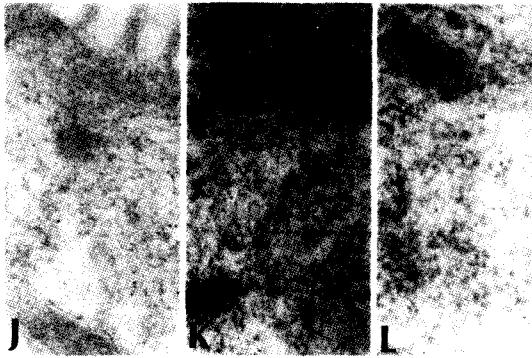


Fig. 4. Electron micrographs of the apical zone(J), intermediate zone(K), and Golge complex zone(L) of tracheal ciliated cells in 5 day old rats. Large amounts of gold particles are seen in the apical zone, few numbers of gold particles are seen in intermediate and Golgi zone respectively, Immunogold and uranyl acetate stain, X 30,000.

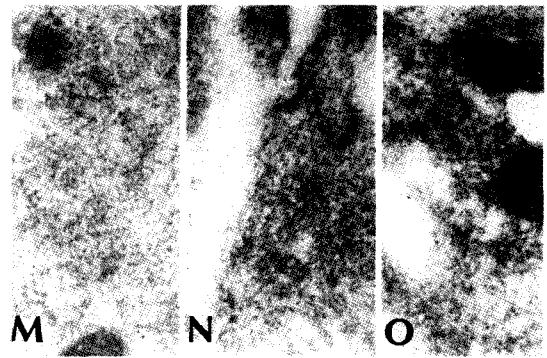


Fig. 5. Electron micrographs of the apical zone(M), intermediate zone(N), and Golge complex zone(O) of tracheal ciliated cells in 7 day old rats. Moderate numbers of gold particles are seen in the apical and Golgi zone, respectively. Few gold particles are seen in intermediate zone. Immunogold and uranyl acetate stain, X 30,000.

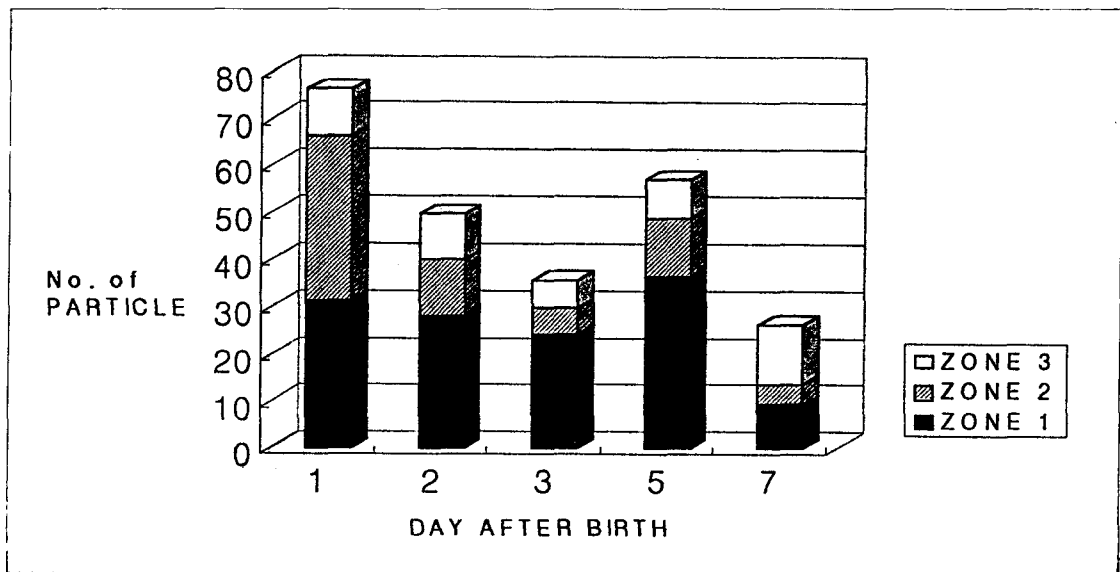


Fig. 6. Distribution of gold particles(α -tubulin reactions) in ciliated cells in rat newborn trachea.

2. 섬모세포의 세포질중간대(zone 2)의 α -tubulin 반응소견

출생 제1일군의 신생흰쥐에서 기관섬모상피세포의 세포질 중간대에 금과립이 다량(+++) 분포

되었고(Fig. 1B), 출생 제2일군과 5일군의 섬모세포에서는 중등도(++)의 금과립이 관찰되었다(Fig. 2B, 4B). 출생 제3일군과 7일군의 섬모세포에서는 금과립이 급속히 감소되어 소량(+)만이

Table 1. Distribution of gold particles(α -tubulin reactions) in ciliated cells in rat newborn trachea. Data were expressed as mean \pm standard deviation

	zone 1*	zone 2**	zone 3***
1 day	31.3 \pm 3.5	35.0 \pm 3.6	10.0 \pm 1.0
2 day	28.0 \pm 2.6	12.0 \pm 3.5	9.7 \pm 0.6
3 day	24.3 \pm 3.1	5.3 \pm 1.5	6.0 \pm 2.0
5 day	36.3 \pm 3.1	12.7 \pm 1.2	8.0 \pm 0.0
7 day	9.3 \pm 1.5	4.3 \pm 1.5	12.7 \pm 5.7

(*apical zone, **intermediate zone, ***Golgi zone)

관찰되었다(Fig. 3B, 5B). 각 실험군의 섬모세포의 중간세포질내 금과립의 분포변화는 출생 제1일군에서는 첨부세포질과 거의 같은 다량의 분포가 관찰되나 출생 제2일부부터는 급속히 하락하여 소량의 분포가 지속되었다(Fig. 6, Table 1).

3. 섬모세포의 골지체 주변대(zone 3)의 α -tubulin 반응소견

제1일군과 제7일군의 섬모세포에서는 중등도(++)의 금과립의 분포가 관찰되었고(Fig. 1C, 5C), 제2일군, 제3일군 및 제5일군의 섬모세포에서도 제1일군보다는 감소하지만 중등도(++)의 금과립이 관찰되었다(Fig. 2C, 3C, 5C). 전 실험군의 섬모세포에서 골지체 주변대의 α -tubulin의 분포의 변화는 거의 없는 것으로 판명되었다(Fig. 6, Table 1).

IV. 고찰

인체의 호흡기도의 섬모상피세포는 기도내의 먼지나 기타 유해한 물질을 체외로 배출하는 기능이 있어 항상 기도를 청결하게 유지하는 기능을 하고 있다. 호흡기도의 섬모 분포 중 정상적인 운동을 하지 못하는 섬모가 많은 비율을 차지하면 그 고유한 기능의 효율이 저하됨으로 만성적인 호흡기 증세인 기침, 가래, 콧물, 코막힘 및 비출혈의 증세를 보이고 만성호흡기 질환인 기관지 확장증, 부비동염, 기관지 천식, 비염, 기

관지염 및 폐렴 등의 질환이 복합적으로 유발된다⁷⁾.

호흡기관지와 난관 등에 분포되어 있는 섬모형성세포의 중심소체와 기저체는 미세소관형성 중심을 이루고 있는데, 기저체는 세포의 첨부세포질과 섬모의 기부에 있으며 중심소체는 핵 가까이 분포되어 있고 쌍을 이루고 있다. 그러나 두 소기관의 미세구조는 동일한 것으로 판명되었고 모두 미세소관과 결속되어 있는 단백질 복합체이다. 섬모형성은 미세소관형성중심의 형성에 의해서 이루어지고 있으나 그 기전은 아직도 명확히 밝혀져 있지 않아서 골지체에서 이곳으로 이행되는 미세소관의 구성물질인 tubulin의 추구에 의해서 섬모형성 경로를 밝히기 위해 많은 학자들이 노력해 왔다^{8,9,10,11)}.

섬모형성은 중심소체경로와 비중심소체경로의 두 방식으로 이루어지는데, Youson¹²⁾은 칠성장어의 변태기(stage 3)에 관상 신원(tubular nephron)의 경부분절에 있는 상피세포에서 섬모형성을 관찰한 결과 비중심소체경로를 보고하였다. 비중심소체방식은 처음에 골지체에서 전자밀도가 높은 과립(dense granule)인 전중심소체가 형성되고 이들은 점차로 세포의 첨부표면으로 이동하며 이때 기저체의 원위에서 축색(axoneme)이 발생하는데 이러한 것은 척추동물과 거의 같으며 기저체의 근위에서는 rootlet가 세포질쪽에 밀착되어 있다.

Sorokin 등¹²⁾은 태아의 폐세포 배양과 전자현미경을 이용하여 중심소체의경로를 통한 섬모형성을 밝힌 바 있다. 즉, 중심소체의 전구 상태인 전중심소체(procentriole)는 이미 형성된 중심소체에 의해 형성되고 기존 중심소체벽(centriolar wall)에서 형성된다고 하였다. 전중심소체는 쌍중심체(diplosomal centrioles)의 영향아래 형성되는 것이라고 하였으며, 골지체에 가까운 곳에 전구체물질이 침착된다고 기술하였다. 전중심소체는 성숙되어 새로운 중심소체가 되며 이들은 첨부세포막 아래 줄을 지어 배치되고 각 중심소체의 바로 옆에서 satellites가 나와 서로 연결이 되며, 첨부에서는 섬모가 자라는데, 중간섬모는 9+2 정렬을 하고 바깥쪽 섬모는 9+0 배열을 한

다고 보고하였다.

Dirksen 등¹³⁾은 쥐의 난관에서 출생직후 섬모형성이 최고조에 달했을 때의 tubulin함량에 대해 보고하였는데 이때 새롭게 합성되거나 이미 합성된 tubulin의 함량을 측정하기 위해 [3H]-Leucine을 이용한 in vivo 및 배양실험을 하였다. 출생 제3일, 제5일, 제8일 그리고 제12일된 쥐의 난관에서 수용성의 축색 절편 조각을 얻어 sodium dodecyl gel을 이용한 전기영동을 시행하여 tubulin을 측정하였다. 이 실험을 통해 3일째에는 총tubulin양의 90%가 합성되고 5일째에 75%정도 합성된다고 주장하였다. 즉 in vivo와 배양실험을 통해 tubulin pools는 난관세포에 있고 계속적인 재합성과 기저체와 섬모로의 이동이 있음을 주장하였다. Tamm 등⁵⁾은 *Cteophore Boroë*의 macrociliary cell에서 섬모형성에 대한 연구를 통해 핵과 골지체 주위에서 비중심체 방식에 의한 기저체 형성을 관찰하였고 이것은 치밀섬유과립체의 plaque로 계속되어 있다고 주장하였다. 이때 전중심소체는 치밀과립 주변의 plaque를 향하여 외부로 향하고 있으며 새로 형성된 기저체는 그 말단에 긴 세로 무늬의 rootlet를 가지고 있고 기저 세포질에서 미세사의 분사가 세포표면과 같이 평행하게 생성된다고 하였다. 기저체의 rootlet unit는 연결섬유(assembly actin filament)로 연결되어 세포의 첨부세포질에 이송되어 섬모가 형성된다고 주장하였다.

de Jong 등¹⁴⁾은 사람의 기관상피세포를 7-31일간 배양하여 주사 및 투과전자현미경으로 관찰하여 섬모형성과정을 밝혔다. 발생과정의 섬모에서 섬유과립집합체, 전중심소체, 기저체를 관찰했고, 성숙섬모에서 axoneme, 9 doublet, 중심체(두쌍), radial spokes, dynein arm등을 관찰했다고 하였다. Josh⁴⁾는 유핵세포에서 세포내 미세소관형성중심에서 세포성 미세소관의 극형성이 일어나며, 미세소관 응집(microtubule assembly)과 미세소관접착은 음극에서 양극쪽으로 일어나고 원위쪽으로 확장된다고 하였다.

저자들의 실험에서 출생 제1일째 기관섬모상피세포 전역에서 α -tubulin이 가장 많이 분포되고 출생 제2일 및 제3일까지는 섬모상피세포의 첨부

및 골지체 주위세포질에 일정량의 α -tubulin 반응이 지속되었으며, 출생 제3일 이후의 섬모상피세포내 α -tubulin 반응은 중간세포질에서 급속히 감소되어 나타났다. 이와 같은 실험결과는 α -tubulin에 대한 면역반응이 가능한 섬유성과립, 전중심소체, 기저체, 섬모내 축사 및 중심소체의 위치를 고려할 때 흰쥐의 기관섬모상피세포에서의 섬모형성은 출생 초기에는 중심소체경로와 비중심소체경로가 같이 관여하며 출생 제3일 이후의 섬모형성은 거의 대부분 중심소체경로에 의해 일어나는 것으로 생각되었다.

V. 결론

본 실험을 통해 저자들은 α -tubulin에 대한 면역조직염색과 전자현미경관찰을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 첨부세포질대에서는 α -tubulin의 발현이 출생 제3일 경과 후부터 완만하게 감소되었다.
2. 중간세포질에서는 α -tubulin의 발현이 출생 제5일부터 급속히 감소하였다.
3. 골지체주변대에서는 tubulin의 발현은 출생 제1일에서는 중등도의 발현을 보이나 제2일 및 제3일부터는 그 발현이 약하게 나타났다.

이상과 같은 결과에서 흰쥐의 기관섬모세포의 섬모형성은 출생 후 제5일 및 제7일에서는 성숙 흰쥐와 비슷한 양상을 보였으며, 출생 초기에는 중심성 경로와 비중심성경로의 두 방법에 의해 섬모형성이 진행되다가 출생 5일부터는 중심소체경로가 섬모형성과정을 주도하는 것으로 사료되며 기관지의 질환과 섬모형성경로와의 연관관계를 밝히려는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

1. McDowell EM, Barrett LA, Harris CC, Trump BF: *Abnormal cilia in human bronchial epithelium. Arch Pathol Lab Med 1976; 100: 429-436*
2. Gordon RE, Lane BP, Miller F: *Identifi-*

- cation of contractile proteins in basal bodies of ciliated tracheal epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 1980; 28: 1189-1197
3. Sandoz D, Gounon P, Karsenti E, Sauron ME: *Immuno-cytochemical localization of tubulin, actin and myosin in axonemes of ciliated cells from quail oviduct. Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 3198-3202
 4. Lemullois M, Boisvieux-ulrich E, Laine MC: *Development and functions of the skeleton during ciliogenesis in metazoa. Biol Cell* 1988; 63: 195-208
 5. Tamm S, Tamm SL: *Development of macrociliary cells in Boroë I. Actin bundles and antriole migration. J Cell Science* 1988; 89: 67-80
 6. Joshi HC: *Microtubule organizing centers and gamma tubulin. Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 54-62
 7. Carson IL, Collier AM, HuS-CS: *Acquired ciliary defect in nasal epithelium of children with acute viral upper respiratory infections. New Engl J Med* 1985; 318: 463-468
 8. Coss RA: *Mitosis in chlamydomonas reinhardtii. Basal bodies and in mitotic apparatus. J Cell Biol* 1974; 63: 325-329
 9. Brenner SL, Brinkley BR: *Tubulin assembly sites and organization of microtubule arrays in mammalian cells. Quant Biol* 1982; 46: 241-254
 10. Brinkley BR: *Microtubule organizing centers. Ann Rev Cell Biol* 1985; 1: 45-172
 11. Doonan JH, Grief C: *Microtubule cycle in Chlamydomonas reinhardtii : an immunofluorescence study. Cell Motil Cytoskeleton* 1987; 7: 381-392
 12. Sorokin SP: *Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. J Cell Sci* 1968; 3: 207-230
 13. Youson JH: *Replication of basal bodies and ciliogenesis in a ciliated epithelium of the lamprey. Cell Tissue Res* 1982; 223: 255-266
 14. Dirksen ER: *Straprans I. Tubulin synthesis during ciliogenesis in the mouse oviduct. Dev Biol* 1975; 46: 1-13
 15. de Jong PM, van Sterkenburg, Hesselting SC: *Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface. Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10: 271-277
 16. Eutenever U, Schliwa M: *Evidence for an involvement of actin in the positioning and motility of centrosomes. J Cell Biol* 1985; 100: 96-103