

백내장 환자의 연령에 따른 수정체낭 Type IV 아교섬유의 분포와 수정체낭 상피세포 자연사 및 전자현미경적 변화에 대한 연구

인제대학교 의과대학 안과학교실, 해부학교실[†]

허 준 · 양영철[†] · 원인건

국문초록: 백내장 환자의 수정체낭에서 연령차이에 따른 아교질과 type IV 아교섬유의 면역화학 반응 양상, apoptosis현상 및 수정체 상피세포의 전자현미경적인 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Van Gieson염색소견은 수정체낭의 앞층과 앞아래층에서 짙은 염색반응이 있었으나 나이가 많을수록 반응이 감소되었다. Type IV 아교섬유 면역화학반응은 수정체낭의 앞층과 상피세포 주위에서 현저하게 일어났으며 나이가 많을수록 반응이 감소되었다. Periodic acid Schiff-alcian blue 반응의 변화는 수정체낭의 앞층에서 나이가 많을수록 현저하게 감소되었다. 세포자연사 현상은 수정체낭 상피세포의 핵내에서 일어났으며 나이가 많을수록 반응이 일어나는 세포의 수가 감소되는 경향을 보였다. 수정체 상피세포의 전자현미경적인 변화는 40대까지는 외측 세포막의 folding (이하 주름)과 세포질내 공포가 증가되고 골지복합체가 발달되었으나 60대에서는 부분적으로 돌기는 내지만 골지복합체는 관찰되지 않았다. 수정체 상피세포의 바닥막부분에서는 나이가 들수록 거친 섬유들이 수정체 상피세포와 수정체낭을 격리시키고 있었으며, 수정체낭의 중간층은 40대군은 특징적으로 과립상의 구조물들이 집단적으로 축적된 부분들이 관찰되었고 60대군에서는 선상의 섬유성 구조들이 나타났으며 짙은 전자밀도를 가진 과립의 수가 감소하였다.

서 론

수정체낭은 수정체의 상피세포에 의해서 만들어진 비후된 바닥막으로 수정체조직 전체를 덮고 있는 특수한 조직이다. 수정체낭의 두께는 75세까지 매년 1.2%씩 점진적으로 증가하며 그 이후에는 약간 감소된다¹¹⁾. 수정체낭의 노화는 기계적인 내구력을 점진적으로 소실하여 나이가 들수록 신축성이 줄어들게 되는데 이러한 노화현상은 수정체상피와 피막의 구조적인 성분 변화에 기인된다^{17,21,23)}. 수정체낭의 주성분인 아교질과 glycoprotein 및 glycosaminoglycans에 대한 연구는 생화학적인 면에서나 면역화학적인 소재에 이르기까지 동물에서 뿐 만 아니라 사람에서도

많은 연구가 이루어 졌으나 아직 완전히 밝혀져 있지 않다^{13,16,18)}. 또한 수정체낭은 다른 조직의 바닥막에 비해 현저하게 두껍고 물질수송에 있어 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있으나 사람의 수정체낭의 조직성분과 물질수송 관계도 아직 명확히 밝혀진 바가 없다.

특히 수정체혼탁을 진행시키는 하나의 원인으로 수정체낭의 막기능이 중요시되고 있으며, 수정체낭의 미세 구조적인 변화는 막의 투과성과 물질수송을 조절하는 막기능의 변화를 일으켜 수정체상피세포의 능동수송 및 그 자체의 기능에 영향을 미치게 되고 결국 수정체의 투명성 유지에 지장을 초래한다는 가설이 일반적이다.

백내장 성상에 있어 이러한 수정체낭의 구조적 변화는 노화 (aging process)에 의한 정상적인 세포의 예정된 변화이기도 하며¹²⁾, 비정상적인 수정체낭의 구조적인 변화와 혼탁이 정상으로 회복되는 현상도 넓은 의미의 세포자연사와 관

* 논문접수: 1998년 11월 2일

수정재접수: 1998년 11월 27일

[†] 별책요청 저자

련이 있다고 한다^{4,31}). 즉 어떠한 원인에 의해 수정체낭의 세포손상이 시작되면 수정체낭 상피세포의 증식이 유도되는데 c-myc mRNA의 증가가 일어나 빠른 세포성장과 세포들이 S-phase로 들어가는 것이 증가되어 조직변화 및 혼탁이 시작된다³⁰). 세포자연사가 bcl-21, Fas, c-myc, c-fos, PD-1, p-53 등의 유전자와 관련되어 있고 대부분의 RNA와 단백질합성 등과 연관된 능동적인 세포 자연사의 과정이라는 점에서 보면 수정체낭의 혼탁도 세포자연사와 연관된 한 과정으로 추측된다³²).

이러한 점에서 본 연구에서는 백내장 환자의 수정체낭 혼탁과정에서 수정체낭을 구조적으로 지지하는 아교질이나 proteoglycans의 형태학적인 변화를 연령별로 관찰하고, 세포자연사의 양상과 피막의 type IV 아교섬유의 변화 양상 및 수정체 상피세포의 전자현미경적인 변화를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

표본채취와 조직처리. 수정체낭 표본은 1997년 3월부터 9월까지 부산백병원을 내원한 백내장환자를 대상으로 하였으며 수정체 적출시 continuous circular capsulorhexis로 얻은 20개의 수정체낭을 사용하였다. 수정체낭은 연령별로 20~30대를 20대군, 40~50대를 40대군, 60~70대를 60대군으로 나누어 4℃의 변형된 Karnovsky's 면역조직화학용 고정액 (pH 6.8)으로 고정시킨 다음 광학현미경용과 전자현미경용 표본으로 분리하여 처리하였다.

광학현미경용 조직은 중성 포르말린 (pH 7.4) 용액으로 고정한 후 통상의 방법에 따라 에탄올로 탈수시키고 xylene으로 청명한 후에 파라핀으로 포매하였다.

1) Van Gieson's 염색; Van Gieson's 염색을 위하여 95% ethanol 100 ml에 hematoxylin crystals 1 g을 혼합한 용액과 2% aqueous ferric chloride 4.0 ml를 증류수 95 ml와 농염산 1 ml를 혼합한 용액을 동량으로 섞어서 Weigert's hematoxylin working 용액을 만들었다. Van Gieson's 용액은 1% aqueous acid fuchsin 2.5 ml와 포화 picric acid 용액 97.5 ml를 섞어 만들었다. 염색을 위한 절편은 탈파라핀 후 함수시켜 증류수에 담구어 두었다가 van Gieson's 용액에서 1~3분간 염색하였다

2) Periodic Acid Schiff-Alcian blue (PAS-AB) 염색; 절편을 탈파라핀시키고 충분히 수화시킨 뒤 3% acetic acid에서 3분간 매염시킨 후 alcian blue, pH 2.5 용액에서 30분간 반응시키고 증류수에 담군 다음 1% periodic acid에서 10분간 산화시키고 흐르는 물로 10분간 수세하였다. 수세 후 Schiff reagent 용액으로 10분간 반응시키고 0.5% sodium metabisulfite로 3회 각 2분간씩 수세하여 흐르는 물에 10분간 담구어 두었다가 Kemechtrot 용액으로 5분간 대조염색을 하였다

3) Type IV 아교섬유에 대한 염색; DAKO LSAB Kit를 이용하여 염색하였다. 절편을 탈파라핀 후 3% hydrogen peroxide에 5분간 반응시킨 뒤 증류수로 수세하고 신선한 tris 완충액에 5분간 둔 다음 생리식염 인산염완충액 (PBS)으로 5분 동안 반응시키고 type IV 아교섬유항체로 10분간 반응시킨 후 tris 완충액 bath에 5분간 두었다.

반응시킨 절편은 생리식염 인산염완충액으로 만든 biotinylated anti-rabbit와 anti-mouse immunoglobulins으로 10분간 반응시킨 후 tris 완충액으로 수세하고 streptavidin peroxidase in 0.05 M tris 완충액 (pH 7.6)내에서 10분간 둔 다음 다시 tris 완충액으로 수세 후 tris bath에 5분간 두었다. 발색 반응은 2 ml의 기질완충액을 눈금있는 시험관에 넣고 각 완충액 2 ml마다 AEC chromogen 용액을 1방울씩 첨가하고 즉시 혼합한 다음 완충액 2 ml마다 기질-hydrogen peroxide 용액 1방울씩 첨가하고 즉시 혼합하여 제조한 기질-chromogen 용액으로 10분간 반응시켰다.

4) 세포자연사 염색; ApopTag in situ apoptosis detection kit peroxidase (Oncor cat # S7100-kit)를 이용하여 염색하였다. 탈파라핀 후 수화시킨 조직은 coplin jar에 넣어서 0.05 M PBS로 제조한 2% H₂O₂로 5분간 담구었다가 같은 용액으로 4분간 2회 세척하였다. 세척 후 절편 위에 equilibration 완충액 2방울을 표본에 직접 적용시켜 플라스크 커버슬립을 덮어 실온에서 10~15초간 두었다가 과도한 액은 여과지로 잘 제거하였다. 다음 단계로 working strength TdT enzyme 54 µl를 절편 위에 적용시키고 커버슬립을 다시 덮어 습윤상자 내에서 37℃로 1시간 두었다. 효소를 적용한 절편은 working strength stop/wash 완충액 (1.5 cc: 51 cc)가 들어 있는 coplin jar에 넣고 15초간 진탕시켜서 실온에서 10분간 항온시키고 생리식염 인산염 완충액으로 5분간 3회 세

척한 다음 anti-Digoxigenin- peroxidase를 2방울 떨어뜨린 후 커버슬립을 덮고 습윤상자에 실은 상태에서 30분간 반응시켜 생리식염 인산염 완충액으로 실온에서 5분간 3회 세척하였다. 절편을 발색시키기 위하여 H₂O₂를 여과된 DAB를 표본이 완전히 덮히도록 충분히 첨가하고 3~6분간 실온에 두었다가 증류수로 수세 후 methyl green으로 10분간 대조염색하였다.

전자현미경적인 관찰을 위한 수정체낭의 표본 처리. 고정 후 수정체낭은 두께가 0.5 mm이내가 되도록 잘라 4℃의 변형된 Karnovsky's 용액 (pH 6.8)으로 고정하였고, 후고정은 인산염 완충액로 만든 1%오스뮴산을 사용하였다. 고정한 조직은 통상의 방법으로 에탄올로 탈수하고 폴리수지 (polyresin)를 이용하여 침투시킨 후 포매하여 블

럭을 만들었다. 전자현미경의 관찰은 초박절편 후 200 mesh의 구리그리드에 얹어 uranyl acetate - lead citrate 이중염색을 시행하여 투과 전자현미경 (JEOL 1200EX II)으로 관찰하였다.

결 과

광학현미경적인 변화. 수정체낭의 관찰은 상피로부터 수정체 상피세포 바로 아래 부분인 바닥층 (basal zone), 가장 넓은 중간부분인 중간층 (middle zone), 앞 아래 부분인 앞밑층 (subanterior zone), 수정체낭의 가장 앞부분인 앞층 (anterior zone)으로 구분하여 관찰하였다.

1. Van Gison염색상의 조직학적 변화. 20대군에서는 둥근 핵을 가진 수정체 상피세포 바로 아

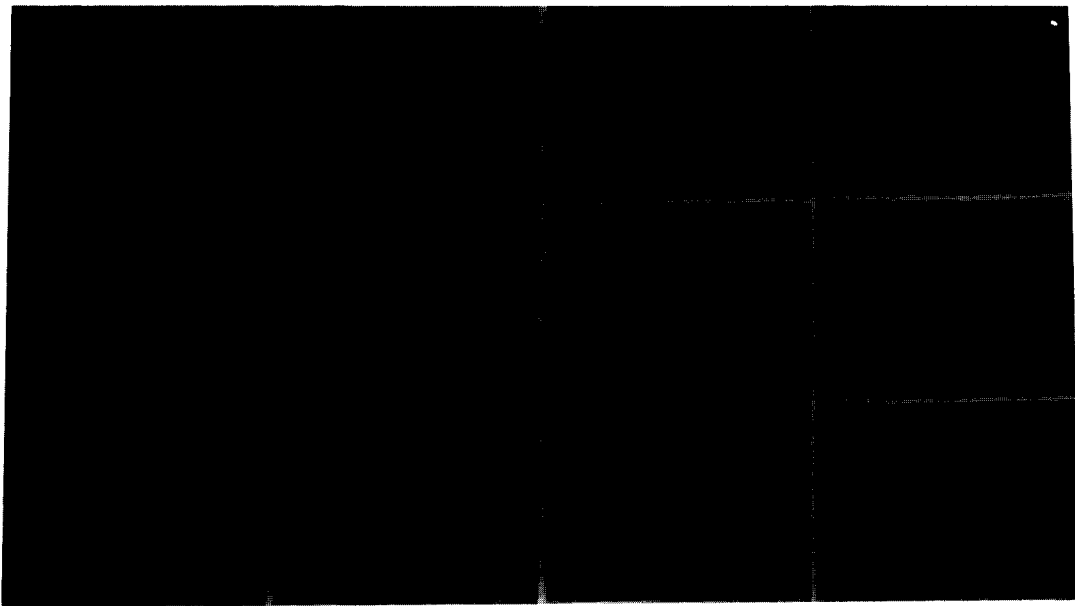


Figure 1. Van Gieson staining of the 20-year-old group, Anterior zone of the lens capsule is very deeply stained X 400. **Figure 2.** Van Gieson staining of the 40-year-old group, Anterior zone of the lens capsule is discontinuously stained X 400. **Figure 3.** Van Gieson staining of the 60-year-old group, Anterior zone of the lens capsule is less stained X 400. **Figure 4.** Immunohistochemical staining of type IV collagen in the 20-year-old group, It shows strong positive in the anterior zone X 400. **Figure 5.** Immunohistochemical staining of type IV collagen in the 40-year-old group, It shows moderate positive in the anterior zone X 400. **Figure 6.** Immunohistochemical staining of type IV collagen in the 60-year-old group, It shows strong positive in the anterior zone X 400. **Figure 7.** PAS-AB staining of the 20-year-old group, It shows strong positive in the anterior zone X 400. **Figure 8.** PAS-AB staining of the 40-year-old group, It shows weak positive in the anterior zone X 400. **Figure 9.** PAS-AB staining of the 60-year-old group, It shows negative in the anterior zone X 400. **Figure 10.** Apoptotic reaction of the 20-year-old group shows in the nucleus of several lens epithelial cells X 400. **Figure 11.** Apoptotic reaction of the 40-year-old group shows in the nucleus of a few lens epithelial cells X 400. **Figure 12.** Apoptotic reaction of the 60-year-old group shows in the nucleus of few lens epithelial cells X 400.

래 부분에 상피와 약간 간격을 두고 중등도로 염색된 바닥층이 관찰되었다. 가장 넓은 중간층은 염색이 약하였으나 균질하게 보였고 좀 더 짙게 염색된 앞밀층이 띠모양으로 연결되어 관찰되었다. 앞층은 약간의 간격을 두고 매우 짙게 염색된 선상으로 나타났다 (Figure 1).

40대군에서는 작은 타원형의 핵을 가진 수정체 상피세포 바로 아래부분에 상피와 직접 접촉된 선상의 바닥층이 관찰되었다. 가장 넓은 중간층은 덜 염색되었으며 불규칙한 과립상의 물질이 있어 균질하게 보이지 않았다. 앞밀층은 부분적으로 짙게 염색되어 끊어져 나타났고 앞층은 앞밀층과 같이 끊어진 상태로 가늘게 나타났다 (Figure 2).

60대군에서는 납작한 핵을 가진 수정체 상피세포의 아래로 중등도로 염색된 바닥층이 관찰되었다. 가장 넓은 중간층은 염색성이 약하게 나타났으며 바닥부분에서 수직으로 선상물질이 뿔어나오는 것이 희미하게 관찰되었다. 앞밀층은 중간층과 겨우 구분이 될 정도였으며 앞층도 약간 짙게 선상으로 나타났다 (Figure 3).

2. Type IV 아교섬유 면역화학염색의 변화. 20대군에서는 둥근 핵을 가진 수정체 상피세포 주위에 그물모양의 type IV 아교섬유의 미약한 반응이 있었으며 가장 강하게 나타난 부분은 앞층으로 선상으로 강한 반응을 보였다 (Figure 4).

40대군에서는 작은 타원형의 핵을 가진 수정체 상피세포 주위에 약간의 미약한 양성반응을 보였으며 가장 강한 양성반응은 앞층에서 관찰되었고 20대보다는 약한 반응을 보였다 (Figure 5).

60대군에서는 납작한 핵을 가진 수정체 상피세포 주위에 20대와 40대군보다는 type IV 아교섬유에 대한 양성반응이 더 잘 나타났지만 특징적으로 앞층과 앞밀층에서 40대보다 미약한 양성반응이 보이는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 6).

3. PAS-AB 반응의 변화. 20대군에서는 둥글고 분홍색으로 염색된 핵을 가진 수정체 상피세포의 세포질에는 alcian blue에 염색된 파란색 부분과 PAS에 염색된 분홍색 염색이 혼재하여 나타났다. 수정체낭의 대부분은 미약한 반응을 보였으며 앞층은 짙은 파란색의 염색이 선상으로 나타났다 (Figure 7).

40대군에서는 작은 타원형으로 분홍색으로 염색된 핵을 가진 수정체 상피세포의 세포질에는 분홍색의 세포질이 관찰되었으나 20대보다는 더

미약한 염색성을 보이는 수정체낭이 관찰되었고 앞층은 다소 옅은 파란색의 염색이 희미해진 가는 선상으로 나타났다 (Figure 8).

60대군에서는 납작한 분홍색 핵을 가진 수정체 상피세포의 세포질은 40대보다 덜 염색된 분홍색의 세포질이 관찰되었다. 수정체낭의 대부분은 염색성을 거의 보이지 않았고 앞층조차도 염색성이 나타나지 않았다 (Figure 9).

4. 세포자연사염색 반응. 20대군에서는 여러 세포들에서 둥글고 파란색으로 염색된 핵내에 갈색과립으로 이루어진 apoptotic반응이 나타났다 (Figure 10).

40대군에서는 군데군데 모여있는 몇 개의 세포들에서 긴 타원형의 파란색으로 염색된 핵내에 다소 짙은 apoptotic반응 과립이 나타났다 (Figure 11).

60대군에서는 다소 납작해진 모양을 가진 소수의 세포만이 핵내에 과립 형태의 apoptotic 반응이 나타났다 (Figure 12).

전자현미경적인 변화.

1. 수정체 상피세포의 관찰. 20대군에서 수정체 상피세포의 핵은 굵게 뭉쳐진 염색질이 상당한 부분을 차지하고 있었고 뚜렷한 핵막이 있었으나 핵소체는 관찰되지 않았다. 세포막 외측은 작은 돌기모양으로 된 세포막의 주름이 있었고 세포질내에는 소수의 공포와 바닥막쪽으로 위치하고 있는 층상으로 배열된 골지복합체가 관찰되었다 (Figure 13).

40대군에서 수정체 상피세포의 핵은 가는 뭉친염색질이 그물망을 이루고 있었고 뚜렷한 핵막은 있었으나 핵소체는 관찰되지 않았다. 외측 세포막은 구불구불하게 인접하는 세포와 연결하였고, 세포질내에는 말기구조양의 구조물을 가진 큰 공포와 작은 공포들이 많이 분포하고 있었다. 골지복합체는 바닥막 부분쪽에만 위치하지 않고 핵과 근접하여 외측에도 층상으로 배열되어 있었다 (Figure 14).

60대군에서 수정체 상피세포의 핵은 작아져서 굵은 뭉친염색질이 많은 부분을 차지하고 있었으며 핵막은 바깥막이 분리되어 확장되는 변화를 보였다. 세포막의 외측부는 부분적으로 전자밀도가 짙은 돌기를 내어 서로 주름져 있었으며 세포질내에는 아주 작은 소수의 공포와 돌기쪽에 약간의 polysome이 관찰되었으나 골지복합체나

다른 세포소기관은 관찰되지 않았다 (Figure 15).

2. 수정체낭 바닥막의 관찰. 20대군의 바닥막 쪽 상피의 세포막에는 가는 융모성 돌기들이 수정체낭쪽으로 돌출되어 있었고 이웃하는 세포의 돌기가 삽입되어 있었다. 돌기 주위에는 가는 섬유성 물질이 돌기와 근접하여 위치하는 것이 관찰되었다. 바닥막 쪽 상피의 세포질에는 소수의 공포들과 함께 말미구조양 물질을 가진 공포를 함유한 봉입체들이 관찰되었다 (Figure 16).

40대군의 바닥막 쪽 상피의 세포막은 수정체낭

과 편평한 경계를 보였으며 원래 수정체 상피세포의 세포질은 수정체낭과 닿아있지 않고 이웃하는 세포들의 돌기들이 삽입하여 차단되어 있었다. 경계 주위의 세포질에는 많은 공포들과 함께 작은 공포를 함유한 봉입체들이 관찰되었다 (Figure 17).

60대군의 바닥막 쪽 상피의 세포막에는 매우 큰 공포가 관찰되었으며, 수정체낭의 바닥막 부분은 균질한 중간부와는 달리 사이에 가는 공간을 보이는 거친 섬유들로 이루어져 수정체낭 상

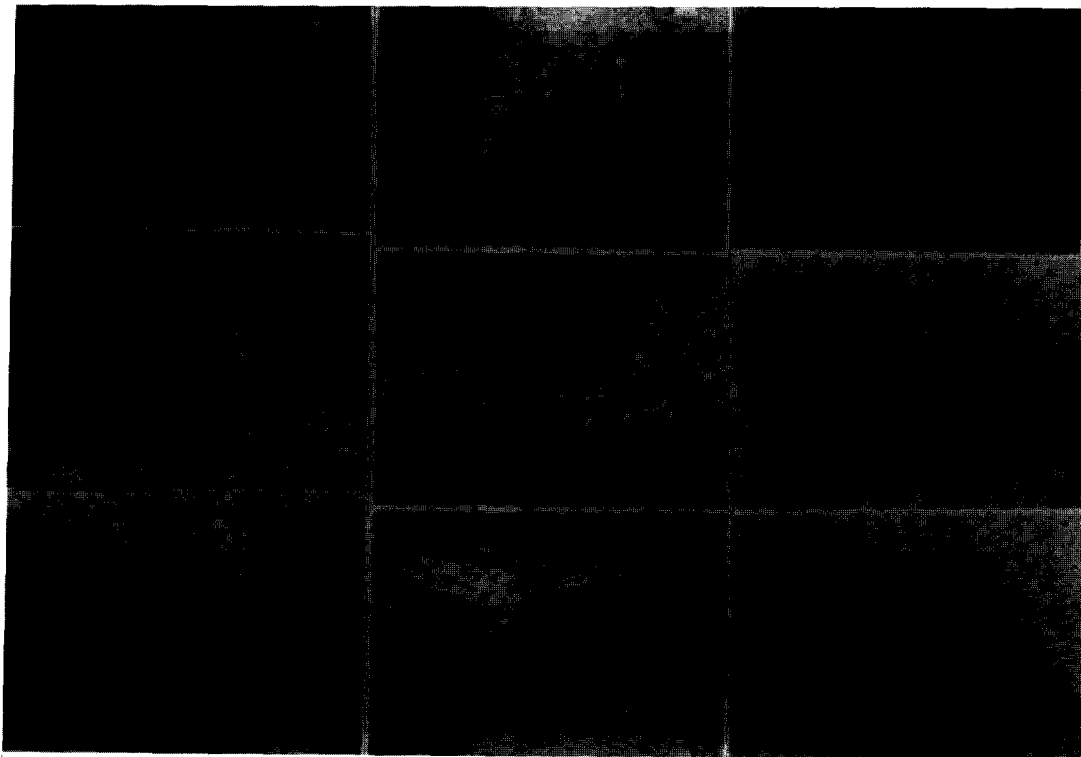


Figure 13. Electron micrograph of the lens epithelial cell in the 20-year-old group, It shows developed Golgi complex, a few vacuoles and lateral foldings X 5000. **Figure 14.** Electron micrograph of the lens epithelial cell in the 40-year-old group, It shows large vacuole containing myelin figured material, many small vacuoles X 5000. **Figure 15.** Electron micrograph of the lens epithelial cell in the 60-years-old group, It shows separation of nuclear membrane, several vacuoles and lateral foldings with electron dense processes X 5000. **Figure 16.** Electron micrograph of the basal zone of the lens capsule in the 20-year-old group, It shows fine villous processes toward the lens capsul with adjacent cell processes X 5000. **Figure 17.** Electron micrograph of the basal zone of the lens capsule in the 40-year-old group, The cytoplasm of the lens epithelial cell is in no contact with the lens capsule by the insertion of the adjacent cell processes X 500. **Figure 18.** Electron micrograph of the basal zone of the lens capsule in the 60-year-old group, The rough fibers separate the lens epithelial cell and the lens capsule X 5000. **Figure 19.** Electron micrograph of the middle zone of the lens capsule in the 20-year-old group, The fine electron dense granules is homogeneously distributed X 5000. **Figure 20.** Electron micrograph of the middle zone of the lens capsule in the 40-year-old group, It shows the aggregation of granular structures and fine electron dense granules X 5000. **Figure 21.** Electron micrograph of the middle zone of the lens capsule in the 60-year-old group, It show the increased fine granules and the fine linear fibers X 5000.

피들 사이로 끼어들어 상피세포들을 격리시키고 있었다 (Figure 18).

3. 수정체낭 중간층의 관찰. 20대군의 수정체낭의 중간층에는 거의 균질한 가는 점상의 배경 위에 전자밀도가 약간 짙은 과립들이 비교적 균등하게 분포하고 있었다 (Figure 19).

40대군의 수정체낭의 중간층에는 20대와 비슷하게 나타났으나 특징적으로 과립상의 구조물들이 집단적으로 축적된 부분들을 관찰 할 수 있었다 (Figure 20).

60대군의 수정체낭의 중간층에는 거의 균질한 가는 점상의 배경과 함께 선상의 섬유성 구조들이 나타났으며 전자밀도가 약간 짙은 과립들의 수가 감소하는 경향을 나타내었다 (Figure 21).

고 찰

수정체낭의 주요성분은 type IV 아교섬유망으로 구조적으로는 다각형의 면을 형성하는 띠들로 이루어진 3차원적인 망의 형태를 가지고 있으나 규칙적으로 배열하고 있는 것은 아니며¹⁴⁾, 바닥막내에서는 미세섬유성 구조이지만 비주기적인 조직으로 알려져 있다²⁾.

사람의 수정체 상피세포는 장기간 배양하면 단단한 단층의 중심층 (central zone), 불규칙하고 집적된 다층의 중간층 (midperipheral zone), 느슨한 단층을 가진 가장자리층 (peripheral zone)의 분명한 세 층이 관찰된다¹⁾.

본 실험에서는 van Gieson 염색소견에서 20대군이 중등도로 염색된 바닥층, 염색성이 저하된 균질한 가장 넓은 중간층, 띠모양의 더 짙게 염색된 앞밀층, 매우 짙게 염색된 선상의 앞층의 4개 부분으로 구분되어 뚜렷한 선상의 염색을 보였다.

이는 수정체낭으로 부터 추출한 아교질이 segment-long spacing crystallites의 형태로 침전되었다는 보고²⁵⁾와 같이 선상의 배열을 보이면서 4개의 부분으로 구분되어 대체로 일치하는 경향을 나타내었다. 하지만 20대군에서 분명하게 짙은 선상의 앞층과 띠모양의 앞밀층의 4개부분으로 구분되는 점은 배양세포와 생체에서의 세포활성의 차이에 기인한다고 생각된다.

40대군에서 불연속성으로 염색성이 희미해지면서 앞층과 앞밀층의 경계가 불분명해진 것은 수정체낭이 한 종류의 아교질로 구성된 것이 아

니고²⁰⁾, 40대 수정체낭의 모든 아교질들이 같은 정도로 감소되지 않았기 때문에 아교질들의 3차원적인 불규칙한 배열¹⁰⁾이 무너지면서 일어난 결과로 생각된다.

본 실험의 type IV 아교섬유 면역화학염색에서도 20대군은 선상으로 강한 반응을 보였으나 나이가 들수록 반응이 감소되어 60대군에서는 중등도의 양성반응으로 앞층과 앞밀층에서 희미하게 관찰되었다.

이러한 결과는 53~59세 사이의 피막밑백내장 (subcapsular cataract)의 혼탁한 부분에서 type I과 III 아교섬유는 미만성으로 염색되었으나 type IV 아교섬유는 줄무늬를 띤 양상으로 염색된다는 보고⁷⁾와 일치하는 결과로 생각된다.

PAS-AB염색반응은 앞층과 세포질에서 현저하였고 나이가 들수록 감소되어 60대군에서는 앞층에서조차도 염색되지 않았다. 이는 수정체낭은 투명, 균질하며 아교질 사이에는 점액다당류로 채워져 있고 10%의 탄수화물을 함유하고 있어서 PAS-AB염색이 잘 된다는 보고²⁷⁾와 일치하는 결과이며 염색성이 나이가 들수록 저하된 것은 고연령의 백내장 수정체에서는 proteoglycans의 합성이 감소되고 proteoglycans의 glycosaminoglycan 구성인자들의 합성정도가 변화된다¹⁵⁾는 점을 간접적으로 시사하는 것이다.

본 실험에서 세포자연사염색 반응은 20대군에서는 여러 세포들에서 apoptotic반응과립이 나타났으나 나이가 들수록 반응과립이 존재하는 세포의 수가 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 아직까지 백내장 수정체낭에서 세포자연사의 반응에 대한 연구가 전혀 이루어지지 않았지만 Alport증후군의 수정체 혼탁이 type IV 아교섬유의 $\alpha 5$ 사슬에 대한 유전정보가 들어있는 유전자 COL4A5의 돌연변이에 의해서 일어난다는 보고⁶⁾와 전기영동법 분석에서 섬유성 전아교섬유 (fibrillar procollagen) 유전자를 표현하여 유일한 눈의 바닥막인 수정체낭을 형성한다는 보고²⁴⁾와 같이 수정체낭의 형성에 유전자가 관련된 점으로 미루어 향후 분자생물학적인 접근을 시도한다면 여러 가지의 세포자연사에 관련된 유전자가 수정체낭의 혼탁에 어떤 방식으로 관여하는지 규명할 수 있을 것이다.

정상 수정체낭을 전자현미경으로 보면 비교적 균질하고 치밀한 과립성 물질이 없으며, 수정체상피는 구형의 세포핵을 가지며 중등도의 사립

체, 과립과 활면 세포질세망을 가지고 있고 가쪽 벽은 깊은 함입을 보인다³⁾. 수정체 상피세포의 세포소기관은 뚜렷하지 않으며 바닥면과 꼭대기 부분은 편평하고 이웃하는 세포와 구불구불한 가쪽 모서리는 평행으로 접하고 있다고 한다²⁷⁾.

쥐에서는 노화된 수정체세포가 음모성 돌기를 형성하고 특이한 변화로 봉입체가 출현하며 봉입체내에는 과립세포질세망, 유리 리보소체들과 미세섬유성 기질이나 덩어리를 함유하고 있었고 나이가 들수록 심해져 수정체의 혼탁이 일어났다고 하였다²⁸⁾.

41~91세 사이 백내장 환자에서 수정체 상피세포는 꼭대기 부분에는 골지복합체가 위치하고 층판구조를 이루고 있었으며 비정상적인 세포는 확장되고 투명한 세포질세망의 수조가 보였고 세포질내 리보소체들과 무리리보소체들이 들어 있었다고 보고하였다²⁶⁾.

여러 가지 형태의 백내장에서 수정체 상피세포의 주요한 변화는 세포질의 공포화가 나타나는 점이라고 하였으며²⁹⁾, 백내장 수술 후 얻은 수정체낭에서 세포내용물이 대조적으로 감소되어 나타나는 것은 세포퇴행시의 징후이고 세포질의 가장자리에 공포화 변성을 보이는 사립체와 미세섬유의 존재는 명백한 퇴행성 과정을 시사하는 것이라고 하였다⁹⁾.

이러한 수정체 상피의 퇴행성 과정은 세포가 핵농축이 되고 염색질의 변화가 일어나며 세포질의 퇴행은 사립체의 종창으로부터 시작하여 핵이 풍선같이 불거지고 미세섬유성 그물망이 존재하게 되며 세포의 퇴행과 세포질 내용물의 소실로 세포가 파괴된다고 하였다⁹⁾.

본 실험에서도 수정체낭의 상피세포는 20대군에는 소수의 골지복합체가, 40대군에서는 발달한 층판상의 골지복합체가 관찰되었다. 그러나 백내장 수정체낭에서 20대보다 40대에 골지복합체가 더 많이 나타났는지는 자기방사법과 *in situ* hybridization으로 더 추구하고보아야 할 문제라고 생각된다.

20대군의 바닥쪽 세포질에는 소수의 공포들과 함께 말미구조양 물질을 가진 공포를 함유한 봉입체들이 관찰되어 상기한 보고와 일치하는 소견을 보였다. 40대군에서는 공포의 수가 많고, 60대에서는 핵막의 바깥막이 분리되고 큰 공포가 출현하여 여러 가지 형태의 백내장에서 주요한 변화는 세포질의 공포화가 나타나는 점

이라는 보고와 일치하였다. 그러나, 공포가 사립체는 아니었으며 오히려 골지복합체로부터 나온 소포에 가깝다고 생각되며 핵이 선과 같이 불거지는 것은 관찰되지 않았으나 60대에서 핵막의 바깥막이 분리되는 현상은 관찰되었다.

상기한 다른 연구자들의 보고에서는 정상 수정체낭 상피에서도 외측벽의 깊은 함입이 관찰되었고 구불구불한 가쪽 모서리가 평행으로 접하고 있다고 하였으나 본 실험의 백내장 환자에서는 이와는 다르게 가쪽 세포막의 주름이 나이가 들면서 음모성 돌기모양을 형성되어 있었다. 또, 바닥막부분의 전자현미경적인 변화에서도 20대군에는 수정체낭과 접촉면을 가지고 있으나, 40대군에는 이웃하는 세포들의 돌기로 차단되었다.

이는 수정체낭의 보전과 수정체 섬유와 상피세포사이 접촉의 존재가 수정체낭 상피의 세포분열 활성을 조절하는 역할을 하며¹⁹⁾, 시험관내에서 수정체 상피세포가 피막에 부착하는데는 아교질 성분이 세포와 바닥막의 상호작용에 적절한 표면을 제공해 준다는 점⁵⁾에서 볼 때 백내장이 노화는 이웃하는 세포들의 돌기에 의해서 상피세포의 분열이나 상피의 부착을 차단하여 발생하는 것으로 생각된다.

본 실험에서는 특징적으로 40대군에서 수정체낭 중간층의 과립상 구조물들이 집단으로 축적되었고, 60대군에서는 선상의 섬유성 구조들이 나타났다. 이는 미세구조적으로 후수정체낭에 있는 수정체 상피세포가 아교섬유성 세포바깥기질을 축적하고 있다는 보고²²⁾를 추론하면 이러한 과립상 및 집단적으로 축적된 구조물은 백내장에 의한 아교성 세포바깥기질의 축적으로 생각되며 그 물질의 성질은 생화학적인 분석이나 단클론항체를 이용한 면역화학적 기법으로 더 추구하고 보아야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Arita T, Murata Y, Lin LR, Tsuji T and Reddy VN (1993): Synthesis of lens capsule in long-term culture of human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **34**: 355-362.
- 2) Barnard K, Burgess SA and Carter DA (1992): Three-dimensional structure of type IV collagen in the mammalian lens capsule. *J Struct*

- Biol*, **108**: 6-13.
- 3) Bergmanson JPG, Jones WL and Chu LWF (1984): Ultrastructural observations on (pseudo-) exfoliation of the lens capsule: a re-examination of the involvement of the lens epithelium. *Br J Ophthalmol*, **68**: 118-123.
 - 4) Caballero A, Salinas M and Marin JM (1997): Spontaneous disappearance of Elschnig pearls after neodymium: YAG laser posterior capsulotomy. *J Cataract Refract Surg*, **23**(10): 1590-1594.
 - 5) Cammarata PR and Spiro RG (1985): Identification of noncollagenous components of calf lens capsule: evaluation of their adhesion-promoting activity. *J Cell Physiol*, **125**: 393-402.
 - 6) Cheong HI, Kashtan CE, Kim Y, Kleppel MM and Michael AF (1994): Immunohistologic studies of type IV collagen in anterior lens capsules of patients with Alport syndrome. *Lab Invest*, **70**(4): 553-557.
 - 7) Hatae T, Ishibashi T, Yoshitomi F and Shibata, Y (1993): Immunocytochemistry of types I-IV collagen in human anterior subscapular cataracts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **231**: 586-590.
 - 8) Jongebloed WL, Kalicharan D, Los LI, van-der-Veen G and Worst JG (1991): Morphological aspects of human lens capsules A comparative LM, SEM, and TEM examination. *Doc Ophthalmol*, **78**: 317-324.
 - 9) Jongebloed WL, Kalicharan D and Worst JGF (1993): Human capsule epithelial cell degeneration A LM, SEM, and TEM investigation. *Doc Ophthalmol*, **85**: 67-76.
 - 10) Kleppel MM, Fan W, Cheong HI and Michael AF (1992): Evidence for separate networks of classical and novel basement membrane collagen. *J Biol Chem*, **267**(6): 4137-4142.
 - 11) Krag S, Olsen T and Andreassen TT (1997): Biomechanical characteristics of the human anterior lens capsule in relation to age. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **38**: 357-363.
 - 12) Li WC, Kuszak JR, Wang GM, Wu ZQ and Spector A (1995): Calcimycin-induced lens epithelial cell apoptosis contributes to cataract formation. *Exp Eye Res*, **61**(1): 91-98.
 - 13) Maisonpierre PC, Goldfarb M, Yancopoulos GD and Gao G (1993): Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family. *Oncogene*, **8**(6): 1631-1637.
 - 14) Marshall GE, Konstas AP and Bechrakis NE (1992): An immunoelectron microscope study of the aged human lens capsule. *Exp Eye Res*, **54**: 393-401.
 - 15) Nakazawa K, Takehana M and Iwata S (1985): Biosynthesis of proteoglycans by lens epithelial cells of cataractous mouse (Nakano strain). *Exp Eye Res*, **40**: 609-618.
 - 16) Nishimoto H, Uga S, Miyata M, Ishikawa S and Yamashita K (1993): Morphological study of the cataractous lens of the senescence accelerated mouse. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **231**(12): 722-728.
 - 17) Okuma M (1991): Age-related changes in the rat lens: morphological and morphometrical studies. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, **95**(3): 209-221.
 - 18) Patek C, Head M and Clayton R (1994): Effects of age and genetic growth rate on the crystallin composition of the chick lens. *Int J Dev Biol*, **38**(4): 717-724.
 - 19) Rakic JM, Galand A and Vrensen GFJG (1997): Separation of fibers from the capsule enhances mitotic activity of human lens epithelium. *Exp Eye Res*, **64**: 67-72.
 - 20) Risteli J, Bächinger P, Engel J, Furthmayr H and Timpl R (1980): 7-S Collagen: Characterization of an unusual basement membrane structure. *Eur J Biochem*, **108**: 239-250.
 - 21) Russell P (1991): Two-dimensional gel electrophoresis of human lens epithelium: a study of spatial protein patterns and aging. *Exp Eye Res*, **52**(5): 613-618.
 - 22) Saika S, Ohme S, Ooshima A, Kimura M, Ohkawa K, Okada Y, Tanaka S, Ohnishi Y and Yamanaka A (1996): Collagen synthesis in lens epithelial cells on capsules containing intraocular lens implants in rabbits: immunolocalization of prolyl 4-hydroxylase. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **234**: 755-760.
 - 23) Sargon MF, Celik HH and Orhan M (1997):

- Electron microscopy of the senile changes in lens epithelium. *Okajimas Folia Anat Jpn*, **74**(2-3): 75-79.
- 24) Sawhney RS (1993): Expression of type I and type III procollagen by lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **34**: 2195-2202.
 - 25) Schwartz D and Veis A (1980): Characterization of bovine anterior-lens capsule basement membrane collagen. *Eur J Biochem*, **103**: 29-37.
 - 26) Straatsma BR, Lightfoot DO, Barke RM and Horwitz J (1991): Lens capsule and epithelium in age-related cataract. *Am J Ophthalmol*, **112**(3): 283-96.
 - 27) Tripathi RC and Tripathi BJ (1983): Lens morphology, aging, and cataract. *J Gerontol*, **38**(3): 258-270.
 - 28) Uga S, Kohara M and Ishikawa S (1983): Morphological study of age-related changes in mouse lens. *Jpn J Ophthalmol*, **27**: 157-165.
 - 29) Vasavada AR, Cherian M, Yadav S and Rawal UM (1991): Lens epithelial cell density and histomorphological study in cataractous lenses. *J Cataract Refract Surg*, **17**: 798-805.
 - 30) Wen Y, Shu S, Unakar NJ and Bekhor I (1992): Expression of c-myc protooncogene in rat lens cells during development, maturation and reversal of galactose cataracts. *Mol Cell Biochem*, **112**(1): 73-79.
 - 31) Wride MA and Sanders EJ (1998): Nuclear degeneration in the developing lens and its regulation by TNFalpha. *Exp Eye Res*, **66**(3): 371-383.
 - 32) Yamashita H, Eiya K and Sakai H (1997): Functions of the transforming growth factor-beta superfamily in eyes. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, **101**(12): 927-947.

=Abstract=

**Electron Microscopic Studies on Distribution of Collagen IV
of Lens Capsule and Apoptosis of Lens Epithelium
in Age-related Cataractous Human**

Jun Hur, Young Cheoul Yang[†] and In Gun Won

*Department of Ophthalmology and Department of Anatomy[†],
College of Medicine, Inje University*

Age-related changes in the lens capsule and epithelium of cataractous patients, ranging from 20 to 70 years old, were studied by means of LM, immunohistochemistry, and TEM. The lens capsule was divided into four zones; the anterior, subanterior, middle, and basal zone. The van Gieson staining reaction for collagen was prominent at the anterior and subanterior parts of the lens capsule. The reaction was more decreased in the elder group than the younger group. The collagen type IV reaction was prominent at the anterior zone of the lens capsule and around the cell. The reaction was more decreased in the elder group than the younger group. 3. The Periodic Acid Schiff-Alcian Blue reaction for mucopolysaccharide was prominent at the anterior zone of the lens capsule. The reaction was more decreased in the elder group than the younger group. The Apoptotic reaction was prominent at the nucleus of the lens epithelial cell. In the elder the cataractous group, the number of the apoptotic cells was more decreased. The electron microscopic change of lens epithelial cells were characterized by the increase of lateral fold and the cytoplasm with various vacuoles and Golgi complex. In the basal part, lens epithelial cell protruded toward the lens capsule in the 20-year-old group. The basal part of the 40-year-old group was flattened and covered with the cytoplasmic processes of adjacent cells. In the 60-year-old group, the mass of rough filaments separated lens capsule and the basal part of the lens epithelial cell. The electron microscopic change of the middle part of lens capsule was characterized by the aggregation of electron dense materials in the 40-year-old group, and the appearance of filamentous materials and the decrease of electron dense granules in the 60-year-old group.

Key Words: Cataractous lens capsule, Lens epithelial cell, Apoptosis, Collagen IV, Electron microscopic changes

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 4(2): 77-86, December, 1998]

[†] Corresponding author