

## 흰쥐 폐 발생시 Laminin의 발현에 대한 연구

정호삼\*, 박철홍, 백두진, 백태경<sup>1</sup>, 김원규, 윤지희, 서윤경  
한양대학교 의과대학 해부학 및 세포생물학교실, 의학연구소  
<sup>1</sup>울지의과대학 해부학 및 신경과학교실

## Laminin Expression in the Rat Lung Development

Ho-Sam Chung, Chul-Hong Park, Doo-Jin Paik, Tae-Kyung Baik<sup>1</sup>,  
Won-Kyu Kim, Jee-Hee Youn and Yun-Kyung Suh  
Department of Anatomy · Cell Biology, College of Medicine,  
Institute of Biomedical Science, Hanyang University  
<sup>1</sup>Department of Anatomy · Neurosciences, School of Medicine, Eulgi University  
(Received February 13, 2001)

### ABSTRACT

Laminin, a kind of multidomain glycoproteins, is mainly localized in the basement membranes of various tissues. It is known that laminin plays an important part in mammalian lung morphogenesis. The authors have undertaken this study to investigate the changes in the distribution of laminin, and to find out cells which synthesize laminin during the organogenesis and differentiation of the lung.

The fetal and neonatal rats (Sprague-Dawley strain) were used as experimental animals. The immunohistochemical methods were employed for detection of laminin within the developing lung tissue and the immunogold cytochemical methods were performed for detection of cells which synthesize laminin according to each stage of development.

The results are as follows;

1. During fetal life, strong immunoreactivity for laminin is maintained in the basement membranes of the blood vessels and the bronchioles, the extracellular matrix of the mesenchyme, and basal lamina of the alveolar septum in the fetal rat lung.
2. After birth, laminin immunoreactivity at the alveolar septum is gradually reduced.
3. During fetal life, laminin is mainly detected within the cytoplasm of the mesenchymal cells, the endothelial cells of blood vessels and the fibroblasts in fetal rat lung.
4. According to the differentiation of type I and type II pneumocyte after birth, laminin is detected within cytoplasm of the type I pneumocytes, type II pneumocytes and fibroblasts.

It is consequently suggested that laminin is largely expressed in the developing lung and laminin may be also synthesized by the type II pneumocytes at early newborn stages.

**Key words** : Immunogold method, Laminin, Lung development

\* Correspondence should be addressed to Dr. Ho-Sam Chung, Department of Anatomy · Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University, #17 Haengdang-dong, Sungdong-ku, Seoul, 133-791 Korea. Ph.: 02-290-0600, FAX: 02-281-7841

## 서 론

Laminin은 조직의 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)을 구성하는 구조당단백질로서 생체내 세포 혹은 조직의 기저막에 다량 분포되어 있다. 포유동물 조직내에는 다양한 종류의 laminin이 존재하고 있으나, 최초로 mouse EHS종양 (Engel-Breth-Holm-Swarm Tumor)에서 추출된 물질을 laminin 1으로 명명한다. 일반적으로 laminin은  $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ 의 3개 polypeptide chains으로 구성되어 있고 십자형의 구조를 나타낸다고 보고되어 있다 (von der Mark & Kuhl, 1985; Beck et al., 1990; Mecham et al., 1989; Engel et al., 1981).

Laminin의 생체내 역할에 관한 연구는 많은 학자에 의해서 연구되어 왔다. Yurchenko & O'Rear (1981)은 laminin은 시험관내에서  $Ca^{2+}$ 의 영향하에 스스로 oligomer로 중합되어 large networks를 만든다고 하였고, Fox et al. (1991)은 polymer로 자가중합되는 laminin의 특성이 생체내 기저막의 supramolecular organization의 기초가 된다고 하였으며, Kouzi-Koliakos et al. (1989)은 laminin이 entactin, nidogen과 높은 친화력으로 결합하고 type IV collagen과 결합하여 망상구조를 형성한다고 하였다. Sonneberg et al. (1990)은 laminin과 결합하는 주된 수용체는 integrin  $\alpha_6\beta_1$ 이며, 특히  $\alpha$  chain의 G-region과 결합하여 세포접착, 세포의 분산 등을 촉진시킨다고 보고했다. Beck et al. (1990)에 의하면 laminin은 세포접착을 매개하고 이러한 기능은 세포외기질의 분자와 상호작용을 통해 이루어지는 것으로 알려져 있다. Kanemoto et al. (1990)은 laminin이 조직내 화학주행성 (chemotaxis)과 tumor metastasis의 유도를 촉진시킨다고 주장했고, Hynes (1992)와 Kleinman et al. (1993)은 세포내 신호전달의 시작을 유도한다고 하였다.

Laminin은 포유동물의 배자기 (embryonic period)부터 나타나며 (Leivo et al., 1980; Wu et al., 1983), 포유동물의 발생과정에 중요한 역할을 하고, 특히 생쥐의 폐 발생에서 laminin 1의 3개의 polypeptide chain의 mRNA가 상피세포 및 간엽세포 등에서 발현되며, 기관형성 (tubulogenesis) 이후 조직 및 세포내 함량이 점점 늘어난다고 보고되어 있다 (Schuger et al., 1992;

Thomas & Dziadeck, 1994; Lallemand et al., 1995).

폐의 발생과정에서 Laminin 1이 기관지의 분지와 형성, 폐포세포의 접착, 폐포상피세포의 증식 및 극성형성과 폐 공간의 형성 등에 관여한다는 것은 잘 알려져 있다 (Schuger et al., 1990, 1995). Schuger (1997)는 mouse의 분화중인 폐에서 laminin 1은 상피세포와 간엽세포에서 생성되고 기관지의 분지와 폐포의 형태적 분화에 밀접한 관계가 있다고 하였으며, laminin 1에 존재하는 multidomain의 각 site는 분화단계에서 각각 다른 기능으로 폐의 형태완성을 촉진한다고 주장하였다. 즉  $\alpha_1$  및  $\beta_1$  chain의 outer globular region은 laminin의 polymerization을 조절하고 기저막과 상피세포의 극성을 발현 및 유지하며,  $\beta_1$  chain의 inner globular region은 heparan sulfate proteoglycan과 결합하여 폐포 내에 공간의 형성을 촉진한다고 보고하였다. 그러나 laminin이 폐포형성을 억제한다는 보고도 있다. Matter 등 (1994)은 폐장의 폐포형성 (alveolar formation)의 억제에 직접적으로 연관되는 곳은 laminin의 carboxy-terminal fragment E8이라고 실험적으로 밝혔다.

이상과 같이 laminin이 생체 내에서 어떠한 역할을 하는지 또, 어떤 분자와 협동작용을 하는지에 대한 여러 학자들의 보고가 있었다. 대부분의 학자들은 laminin은 조직 내에서 세포의 접착, 이동, 분화 등을 유발하거나 발생을 정상적으로 진행되도록 한다고 주장하고 있다. 폐의 발생과 분화과정에서 laminin의 역할에 대한 연구, 보고는 다수 있으나, 폐의 형태와 기능이 성숙되어 감에 따라 laminin의 분포변화에 대한 연구 및 폐의 분화상태에 따라 laminin을 합성하는 세포가 변동되는가에 대한 연구는 드물다.

저자들은 폐의 발생이 시작되는 태생기에서부터 분화와 성숙이 완료되는 신생 원쥐에 이르기까지 폐 조직내 laminin의 생성과 분포 위치를 밝힘으로써 폐 분화에서 laminin의 역할을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에서는 체중 200 gm 내외의 Sprague-Da-

wley계 암수흰쥐를 교배시켜 임신한 모체내 흰쥐 태자와 신생 흰쥐를 실험동물로 사용하였다. 야간에 암컷 흰쥐와 수컷 흰쥐를 교배시키고, 다음날 아침 질도말법을 시행하여 정자가 확인된 날을 임신 제 1일로 정하였다. 임신이 확인된 날로부터 제 14일, 제 16일, 제 18일, 제 20일에 자궁을 절개하여 흰쥐태자를 적출한 후 폐를 절취하였고, 생후 제 1일, 제 3일, 제 5일 및 제 7일에 신생 흰쥐를 희생시켜 폐를 절취하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 면역조직화학적 연구

흰쥐 폐조직내 laminin의 분포 및 형성 정도를 면역조직화학적염색으로 관찰하기 위하여 각 조직을 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액 (pH 7.4)에 고정시킨 후 두께 6 $\mu$ m의 파라핀 절편을 제작하고 염색을 시행하였다. 통상적 방법에 따라 탈파라핀 및 합수 과정을 거친 후 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 세척하고 2~3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-methanol 용액에 5분간 반응시킨 다음 PBS 및 protienase K (DAKO Co, USA)에 37°C에서 15분간 적용하였다. 일차항체는 rabbit anti-laminin (Sigma CO, USA)을 1:30으로 희석하여 37°C에서 90분간 반응시켰으며, PBS로 세척한 후 이차항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vectastain Co, USA)에 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 이어서 ABC 복합액 (avidin-biotin complex, Vectastain Co, USA)에 30분간 반응시킨 다음 PBS로 세척하였다. 발색은 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)를 이용하였으며, 1% methylene blue로 대조염색하고 탈수, 청명과정을 거쳐 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다. 면역조직 반응이 확실한지 여부를 확인하기 위해 일차항체를 제외한 반응액으로 음성대조군의 염색을 시행하였다.

### 2) 면역도금법적 연구

면역도금법을 이용한 laminin의 세포화학적 연구를 위하여 caccodylate buffer를 사용하여 제조한 4% paraformaldehyde-0.5% glutaraldehyde-3% sucrose 혼합액 (pH 7.4)으로 상온에서 3시간 고정된 조직을 수세 및 탈수 과정을 거쳐 경도 굳기의 LR White

(London Resin White Co, UK)로 포매하고 열중합과정을 거친 후 초박절편기로 두께 약 800Å인 절편을 제작하고 염색하였다. 1% bovine serum albumin이 들어있는 Tris-buffer로 특이반응을 억제하였으며, 일차항체로는 면역조직화학적검색에서 사용한 항체를 20배 희석하여 사용하였고, 2차항체로는 직경 12 nm의 금과립 (gold particle)이 결합된 goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research Laboratories Inc. USA)를 20배 희석하여 사용하였다. 2% uranyl acetate로 15분간 대조염색을 한 후 Hitach 600 (Japan) 투과전자현미경으로 가속전압 800 KV에서 관찰하였다. 면역도금법의 특이성을 검증하기 위해 일부 조직은 일차항체 없이 이차항체만을 사용하여 반응시키고 동일한 염색을 시행하여 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 면역조직화학적 연구

#### 1) 흰쥐 태자 폐 조직의 laminin 면역활성 소견 (Table 1 참조)

발생 제 14일의 흰쥐 태자의 폐조직에서는 약간의 기관지와 기관지 사이에 혈관 및 간엽조직이 관찰되었으며, 기관지의 기저막에서 미약한 laminin면역활성과 혈관의 기저막에서 강한 laminin 면역활성이 관찰되었다 (Fig. 1).

발생 제 16일의 흰쥐태자의 폐조직에서는 다수의 소기관지가 발달되어 있고 소기관지 사이에는 혈관이 풍부하게 분포되어 있는 거짓샘시기 (pseudoglandular period)에 해당되는 소견을 보여주고 있었다. 소기관지의 기저막과 혈관의 기저막에서는 강한 laminin 면역활성이 발현되었고 세포외기질에서 중등도의 면역활성이 관찰되었으며, 간엽세포는 미약한 면역활성을 나타내었다 (Fig. 2).

발생 제 18일의 흰쥐 태자의 폐조직에서는 세기관지가 다수 분지되어 있고 일부 세기관지는 폐포관을 형성하는 소위 세관시기 (canalicular period)의 말기에 해당하는 조직소견을 보였다. 세기관지 및 혈관의 기저막은 강한 laminin 면역활성을 나타내었으나, 세포외기질에서는 약한 면역활성이 관찰되었다 (Fig. 3).

발생 제 20일의 흰쥐 태자의 폐조직은 종말주머니 시기 (terminal sac period)에 해당하는 조직소견을 나타내었으며, 제 1형 폐포세포와 제 2형 폐포세포가 동시에 관찰되었다. 세기관지와 종말주머니 표면의 기저막에서 약한 laminin면역활성이 관찰되었다 (Fig. 4).

**2) 신생 흰쥐 폐조직의 laminin 면역활성 소견 (Table 1 참조)**

출생 제 1일의 신생 흰쥐의 폐조직에서는 원시폐포가 세기관지에 연결되어 있는 초기 폐포시기 (alveolar period)에 해당하는 소견이 관찰되었다. 폐포막에 강한 laminin 면역활성이 관찰되었다 (Fig. 5).

출생 제 3일의 신생 흰쥐의 폐조직에서는 폐포막의 두께가 얇아지면서 중배엽세포가 거의 관찰되지 않고 폐의 실질세포인 제 1형 폐포세포 및 제 2형 폐포세포가 성숙되어 있어 성숙 흰쥐의 폐조직과 거의 동일한 소견을 나타내었다. 폐포막에서 약한 laminin

면역활성이 관찰되었다 (Fig. 6).

출생 제 5일근과 제 7일의 신생 흰쥐의 폐조직에서는 전형적인 폐포와 세기관지 및 혈관이 관찰되었고, 폐포막은 중등도의 laminin면역활성을 나타내었다 (Figs. 7, 8).

**2. 면역도금법 소견**

**1) 흰쥐 태자 폐조직의 면역도금법 소견 (Table 2 참조)**

발생 제 16일의 흰쥐 태자의 폐조직에서는 간엽세포의 세포질, 세포외기질 및 원시세기관지의 기저막에서 다수의 금과립이 관찰되었다 (Figs. 9, 10).

발생 제 18일의 흰쥐 태자의 폐조직에서는 세기관지의 기저막, 세포외기질, 혈관의 내피세포 및 간엽세포의 세포질에서 소량의 금과립이 관찰되었다 (Figs. 11, 12, 13).

발생 제 20일의 흰쥐 태자의 폐조직에서는 공기혈

**Table 1. Laminin Immunohistochemistry on the developing Rat Lung**

Period	Tissue	Basement membrane of bronchiole	Basement membrane of vessel	Extracellular matrix	Basement membrane of terminal sac
Fetal period	14th day	+	+++	NA	NA
	16th day	+++	+++	++	NA
	18th day	+++	+++	+	NA
	20th day	+	++	+	+
Neonatal period	1st day	+++	++	+++	+++
	3rd day	++	++	+	+
	5th day	±	+	+	+++
	7th day	±	++	++	+++

\*Symbols  
 +++: Strongly positive    ++: Moderately positive    +: Weakly positive  
 ±: Trace    NA: Not available

**Table 2. Laminin Immunogold Cytochemistry on the developing Rat Lung**

Period	Site	Mesenchymal cell	Extracellular matrix	Endothelial cells of vessel	Basement membrane of air-blood barrier	Pneumocyte type I	Pneumocyte type II
Fetal Period	14th day	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	16th day	++	+++	+	NA	NA	NA
	18th day	+	+	+	NA	NA	NA
	20th day	NA	++	+	+	++	NA
Neonatal Period	1st day	NA	+++	+	+++	NA	+
	5th day	NA	±	+	+	NA	+
	7th day	NA	+	+	+++	+	+

\*Symbols  
 +++: Strongly positive    ++: Moderately positive    +: Weakly positive    ±: Trace NA: Not available

관장벽 (air-blood barrier)의 기저막과 제 1형 폐포세포에서 소량의 금과립이 관찰되었다 (Figs. 14, 15).

## 2) 신생 흰쥐 폐조직의 면역도금법 소견 (Table 2 참조)

출생 제 1일의 신생 흰쥐의 폐조직에서는 공기혈관장벽의 기저막과 폐포막의 섬유세포에서 다수의 금과립이 관찰되었다 (Figs. 16, 17).

출생 제 5일의 신생 흰쥐의 폐조직에서는 다수의 금과립이 공기혈관장벽의 기저막에서 관찰되었으며, 제 2형 폐포세포의 세포질에 약간의 금과립이 관찰되었다 (Figs. 18, 19).

출생 제 7일의 신생 흰쥐의 폐조직에서는 폐포막의 기저막과 세포외기질에 다량의 금과립이 관찰되었고 제 2형 폐포세포와 제 1형 폐포세포에서도 소량의 금과립이 관찰되었다 (Fig. 20).

## 고 찰

Laminin은 생체조직에서 기저막과 세포외기질의 구성 당단백의 일종으로 조직구성물질의 결합, 접착, 이동 및 신호전달 등에 직접 혹은 간접적으로 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 태생기와 신생아기의 조직에서 활발한 활성을 나타내고, 분자구조에 따라 여러 종류의 아형 (subtype)으로 나누어 진다.

Laminin은 분자량이 900 KD인 mosaic protein으로 3개의 polypeptide chain인 A, B1, B2 chain으로 이루어져 있고 수 개의 뚜렷한 결합 domains가 있으며 이 부분이 조직내 다른 물질과 결합할 수 있다. Laminin은 mouse의 EHS종양 (Engelbreth-Holm-Swarm Tumor)에서 처음으로 추출되었고 이것을 laminin 1이라고 명명하였다. 3개의 구성 chain을  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  및  $\gamma_1$ 이라고도 하고, 3개의 단완 (short arm)과 1개의 장완 (long arm)을 갖는 십자형 구조를 갖는 것으로 알려져 있다 (Burgeson et al., 1994; Mecham et al., 1989; Beck et al., 1990; von der Mark & Kühn, 1985). Laminin은 구성하고 있는 polypeptide chain의 아형, 결손 및 변형에 따라 여러 종류의 아형으로 분류되어 있으며, 특정 조직에 주로 나타나는 laminin형이 발견되어 있다 (Miner et al., 1997; Leivo & Engvall,

1988; Ehrig et al., 1990; Sanes et al., 1990; Kroll et al., 1994).

포유동물에서 조직의 발생, 분화 및 성숙이 진행되는 동안 laminin이 관여한다는 연구보고는 다수 있다. Ekblom (1981)은 콩팥을 이용한 실험에서 배자 시절부터 laminin이 조직 내에서 발견된다고 하였고, Cooper & MacQueen (1983)은 mouse의 two-cell stage에서 laminin을 관찰하였음을 보고하였다. Wu et al. (1983)은 착상 전인 배자의 조직에서도 laminin 1을 발견할 수 있었다고 하였으며, Wan et al. (1984)은 임신 제 12일의 mouse 태자조직의 기저막에서는 monoclonal anti-laminin에 대한 반응을 관찰할 수 없었으나, 임신 제 14일의 태자조직내 일부 기저막에서 laminin의 면역활성이 관찰되었고, 임신 제 17일 이후의 태자에서부터 신생 mouse의 대부분 조직의 기저막에서 laminin의 면역활성이 지속되었다고 주장하였다. Klein et al. (1990)의 연구에 의하면 laminin 1은 mouse tumor에서 추출한 laminin 종류와 동일한 종류로서 기저막에 분포되어 있는 당단백질 중 가장 분자량이 큰 당단백이고, A, B 및 B2 polypeptide chains을 갖고 있으나 세포의 종류에 따라 A chain이 없는 동종형 (isoform)이 분포하는 경우도 있다고 밝혀져 있으며, 또한 동 연구자는 mouse 기관발생 (organogenesis) 과정동안 발현되는 동종형 laminin에 대한 연구를 계속하여 laminin의 A chain은 B chains에 비하여 한정된 지역에 분포하며 상피조직의 기저막에서 주로 검색된다고 하였고, B chains은 있으나 A chain이 없는 경우도 상당수 있다고 하였다.

폐조직내 기저막과 폐포형성과의 관계는 오랫동안 관심의 대상이 되어 왔다. Thurlbeck (1975)은 사람의 연령이 8세에 이르면 2억 8천만개의 폐포가 생기게 되고 종말세기관지에서 돌출된 폐포는 제 2형 폐포세포가 서로 접촉되는 기저막의 출현과 동시에 생성된다고 했다. Mason & Williams (1991)는 제 2형 폐포세포는 제 1형 폐포세포의 기간세포로 역할을 하고 제 2형 폐포세포가 급속히 증식되고 변형되어서 제 1형 폐포세포로 분화된다고 하였다. McGowan (1992), Sannes (1991) 그리고 Lwebugu-Mukasa (1991)은 성숙된 폐포에서 공기가 찬 공간은 제 2형 폐포세포 및 제 1형 폐포세포에 의해서 둘러 싸여 있고 이들 세포

의 기저부는 얇은 기저막에 놓여 있다고 주장하였다.

폐의 발생과정에 laminin이 관여하고 형태적 및 기능적 성숙단계에 따라 laminin의 분포양상이 변화된다는 보고도 다수 있다. Schuger et al. (1990)은 태생기 mouse 폐의 형성과정에서 기저막에 있는 주요 당단백인 laminin의 역할과 축적의 형태를 관찰하기 위하여 태령 13일의 배자에서 폐원기(lung primordia)를 절취하여 anti-laminin 상태의 liquid air interface에 3일간 배양한 결과 폐가 변형되어 형성되었으므로 이러한 결과는 laminin이 정상적인 폐 발생에 깊숙히 관련이 있음을 증명하는 것이라고 주장하였다. Schuger et al. (1991)은 배양중인 mouse의 배자폐를 이용한 실험에서 폐 발생과정 중에 일어나는 laminin의 각 영역(domains)에서 축적과 기능을 조사한 결과, laminin 면역활성의 대부분이 기저막에서 발현되었고 간엽조직의 세포외기질에도 소량이 발현되었다고 하였다. 이 학자들의 실험에서 5가지 mono-clonal antibodies를 사용하였던 바 항체 1(AL-1)과 항체 5(AL-5)는 각각 laminin의 교차지역과 laminin의 B chain인 외측 단완(short lateral arm of laminin)에 각각 결합되는데 폐내 기관의 분지(branching)를 억제하고, 그외 AL-2, AL-3, AL-4 및 laminin 중성항체(laminin-neutralized antibodies)는 폐의 형태형성(morphogenesis)을 변화시키지 않는다고 주장하였다. Schuger et al. (1992)은 laminin의  $\beta$  및  $\gamma$  chain을 차단하면 laminin의 자가응집을 방해하고 상피와 간엽조직 사이에 분포하는 laminin polymer의 결손은 상피의 극성, 정상적인 형태 및 유지를 방해한다고 했으며, 또 laminin 합성의 부족은 폐의 분지상태(branching pattern)에 중요한 변화를 유발한다고 하였다. Matter et al. (1994)은 laminin은 3개의 polypeptide chains이 교차되어 있는 heterotrimer이면서 3가지 기능적인 부분(domains) 즉, proteolytic fragment, P1 pepsin fragment 그리고 E8 elastase fragment로 나눌 수 있다고 하였으며, fragment E8은 250 KD으로 carboxy-terminal의 1/3부분에 해당하고 B1, B2 및 A chain의 일부를 모두 함유하고 있으며 폐포의 형성을 억제하는 기능을 한다고 주장하였다. Rannels 등 (1987)은 SD계 흰쥐의 정상적인 폐조직에서 제2형 폐포세포를 분리한 후 배양한 결과 생체실험에서 보

다 정상적인 분화가 되지 않고 세포내 lamellated bodies도 소멸되었지만 plastic plate에 laminin-rich gel(substratum)을 도말 후 제2형 폐포세포를 배양한 결과 정상적인 분화가 일어났다고 보고하였고, laminin은 폐의 제1형 및 제2형 폐포세포의 분화에 직접적으로 영향을 미친다고 주장하였다. Durham & Synder (1995)는 토끼의 폐 발생기간에 따른 laminin  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma_1$  subunit chains의 발현을 관찰하여 laminin은 주로 기관지, 세기관지, 폐포관 및 혈관의 기저막에서 분포되어 있고, 태령 19일 태자의 폐내 간엽세포에서도 소수 관찰되었다고 보고한 바 있다. 이들은 laminin의  $\alpha_1$  chain은 초기 간엽세포에는 없으며,  $\beta_1$  chain은 기관지, 소기관지 등의 기저막에 분포된다고 하였고, 제1형 폐포세포와 제2형 폐포세포 주위에 laminin이 분포되거나 축적되는 것은 토끼의 태자 폐의 발생에서 분화를 조절하는 것으로 생각된다고 보고하였다. 본 연구에서도 폐의 발생 및 분화가 일어나는 임신 제14일부터 출생 제7일까지 폐조직내 laminin의 발현을 관찰한 결과, laminin 면역활성이 임신 제14일의 흰쥐 태자의 폐조직에서 관찰되기 시작하였고 발생이 진행됨에 따라 면역활성의 분포와 활성도에 변화가 일어남을 관찰할 수 있었다.

흰쥐의 폐 발생과정에서 폐포세포와 실질세포에서 분비되는 물질에 대한 연구도 다수 있다. 특히 laminin의 생성과 분비는 연구의 초점이 되고 있다. Rannels et al. (1992)은 흰쥐의 폐내 제2형 폐포세포와 세포외기질의 형성과의 관계를 조사하기 위하여 제2형 세포를 배양, 관찰한 결과 제2형 폐포세포의 분화도에 비례하여 세포외기질도 축적된다고 하였다. Skinner et al. (1987)은 흰쥐의 제2형 폐포세포는 proteoglycans를 분비한다고 하였고, Sage et al. (1983)은 제2형 폐포세포가 fibronectin, 제4형 아교질, thrombospondin 등을 분비하거나 합성한다고 주장했다. 한편 Crouch et al. (1987)은 배양중인 흰쥐의 제2형 폐포세포가 아교질을 분비하는 것을 관찰한 바 있고 이때 분비되는 아교질의 형은 제4형 원시 아교질(type IV pro-collagen)이라고 발표하였다.

이상과 같이 제2형 폐포세포가 폐의 발생과정에서 세포외기질의 구성물질을 분비한다는 연구결과는 여러 학자들에 의하여 보고되었으나, 제2형 폐포세포가

laminin을 분비한다는 보고는 거의 없었다. Durham & Snyder (1995)는 폐포발생과정에서 폐포의 간엽세포에서 laminin이 합성된다고 주장했고, Klein et al. (1990)은 laminin은 제 1형 폐포세포 및 혈관내피세포가 laminin을 합성한다고 발표한 바 있다. 최근 Schuger et al. (1992)은 in situ hybridization 기법을 이용하여 임신 제 10일의 mouse 폐조직에서 laminin의  $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\gamma$  chains의 mRNA의 양을 측정된 결과 분화가 진화됨에 따라 그 양이 증가된다고 발표하였고, Mason et al. (1985)은 태자의 폐에서 제 2형 폐포세포가 기저막의 주요 당단백인 제 4아교질, heparan sulfate proteoglycan 및 laminin을 분비할 것이라고 예고하였다.

본 실험에서는 태자와 신생아기의 폐에서 간엽세포, 혈관내피세포, 섬유모세포, 제 1형 폐포세포 및 제 2형 폐포세포가 laminin을 분비하는지를 조사하기 위해서 면역도금법을 채택하여 전자현미경으로 관찰한 결과, 발생 제 16일의 태자에서는 간엽세포에서, 발생 제 18일의 태자에서는 간엽세포와 혈관내피세포에서 laminin 면역활성을 나타내는 금과립이 관찰되었고, 출생 후 제 1일의 신생 흰쥐에서는 섬유모세포에서, 출생 제 5일의 흰쥐에서 제 2형 및 제 1형 폐포세포의 세포질에서 각각 금과립을 발견할 수 있었다. 본 연구의 결과는 폐 발생의 초기에는 간엽세포와 섬유모세포가 laminin을 합성하여 기저막으로 이동시키나 출생 후에는 제 1형 및 제 2형 폐포세포도 laminin을 합성하는 것을 증명하는 것으로 생각되었다.

## 참 고 문 헌

- Beck K, Hunter I, Engel J: Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J* 4 : 148-160, 1990.
- Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, Martin GR, Ortonne JP, Paulsson M, Sanes J, Timpl R, Tryggvason K, Yamada Y, Yurchenco PD: A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol* 14 : 209-211, 1994.
- Cooper AR, MacQueen HA: Subunits of laminin are differentially synthesized in mouse egg and early embryos. *Dev Biol* 96 : 467-471, 1983.
- Crouch EC, Moxley MA, Longmore W: Synthesis of collagenous proteins by pulmonary type II epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 135 : 1118-1123, 1987.
- Durham PL, Synder JM: Characterization of  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  and  $\gamma_1$  laminin subunits during rabbit fetal lung development. *Develop Dynamics* 203 : 408-421, 1995.
- Ehrig K, Leivo I, Argraves WS, Ruoslahti E, Engvall E: Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 3264-3268, 1990.
- Ekblom P: Formation of basement membranes in the embryonic kidney: An immunohistochemical study. *J Cell Biol* 91 : 1-10, 1981.
- Engel J, Odermatt E, Engel A, Madri JA, Furthmayr H, Rhode H, Timpl R: Shapes, domain organization and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J Mol Biol* 150 : 97-120, 1981.
- Fox JW, Mayer R, Misch R: Recombinant nidogen consist of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J* 10 : 3137-3146, 1991.
- Hynes RO: Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 : 11-25, 1992.
- Kanemoto T, Reich T, Royce L, Greatorex D, Adler SH, Shirai Shi N, Martin GR, Yamada Y, Kleinman HK: Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 2279-2283, 1990.
- Klein G, Ekblom M, Fecker L, Timpl R, Ekblom P: Differential expression of laminin A and B chains during development of embryonic mouse organs. *Development* 110 : 823-837, 1990.
- Kleinman HK, Kibbey MC, Schnaper HW, Hadley MA, Dym M, Grant DS: Role of basement membrane in differentiation. In: *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes*. Rohrbach DH, Timpl R, eds. San Diego, CA: Academic; 309-326, 1993.
- Kouzi-Koliakos K, Koliakos GG, Tsilibary Ec, Furcht LT, Charonis AS: Mapping of three major heparin binding sites on laminin and identification of a novel heparin-binding site on the B1 chain. *J Biol Chem* 264 : 17971-17987, 1989.
- Kroll TG, Peters BP, Hustad CM: Expression of laminin

- chains during myogenic differentiation. *J Biol Chem* 269 : 9270–9277, 1994.
- Lallemand A, Ruocco SM, Gaillard DA: Synthesis and expression of laminin during human fetal lung development. *Anat Rec* 242 : 233–241, 1995.
- Leivo L, Engvall E: Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscle and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc Natl Acad Sci* 85 : 1544–1548, 1988.
- Lwebuga–Mukasa JS: Matrix–driven pneumocyte differentiation. *Am Rev Respir Dis* 144 : 452–457, 1991.
- Mason RJ, Williams MC: Alveolar type II cells. In *The Lung*. Vol. I.R.G. Crystal, J.B. West, J.B. Barnes PJ, Cherniack NS and Weibel ER, editors Raven Press, New York, 235–246, 1991.
- Matter ML, Laurie GW: A novel laminin E8 cell adhesion site required for lung alveolar formation in vitro. *J Cell Biol* 124 : 1083–1090, 1994.
- McGowan SE: Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. *FASEB J* 6 : 2895–2904, 1992.
- Mecham RP, Hinek A, Griffin GL, Senior RM, Liotta LA: The elastic receptor shows structural and functional similarities to the 67–kDa tumor cell laminin receptor. *J Biol Chem* 264 : 16652–16657, 1989.
- Miner JH, Patton BL, Leutz SI, Gilbert DJ, Snider WD, Jenkin NA, Copeland NG, Sanes JR: The laminin  $\alpha$  chains: Expression developmental transitions and chromosomal locations of  $\alpha 1$ – $5$ , Identification of heterotrimeric laminins 8–11 and cloning of a novel  $\alpha 3$  isoform. *J Cell Biol* 137 : 685–701, 1997.
- Rannels DE, Dunsmore SE, Grove RN: Extracellular matrix synthesis and turnover by type II pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol* 262 : L582–L589, 1992.
- Rannels SR, Yarnell JA, Fisher CS, Fabisiak JP, Rannels DE: Role of laminin in maintenance of type II pneumocyte morphology and function. *Am J Physiol* 253 : C835–C845, 1987.
- Sage H, Farin FM, Striker GE, Fisher AB: Granular pneumocytes in primary culture secrete several major components of the extracellular matrix. *Biochemistry* 22 : 2148–2155, 1983.
- Sanes JR, Engvall E, Butkowski R, Hunter DD: Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol* 111 : 1685–1699, 1990.
- Sannes PL: Structural and functional relationships between type II pneumocytes and components of extracellular matrices. *Exp Lung Res* 17 : 639–659, 1991.
- Schuger L, O’Shea S, Rheinheimer J, Varani J: Laminin in lung development: Effects of anti–laminin antibody in murine lung morphogenesis. *Dev Biol* 137 : 26–32, 1990.
- Schuger L, Skubitz APN, Morenas A, Gilbride K: Two separate domains of laminin promote lung organogenesis by different mechanisms of action. *Dev Biol* 169 : 520–532, 1995.
- Schuger L, Skubitz APN, O’Shea KS, Chang JF, Varani J: Identification of laminin domains involved in branching morphogenesis: Effects of anti–laminin monoclonal antibodies on mouse embryonic lung development. *Dev Biol* 146 : 531–541, 1991.
- Schuger L, Varani J, Killen PD, Skubitz APN, Gilbride K: Laminin expression in the mouse lung increases with development and stimulates spontaneous organotypic rearrangement of mixed lung cells. *Dev Dyn* 195 : 43–54, 1992.
- Schuger L: Laminins in lung development. *Exp Lung Res* 23 : 119–129, 1997.
- Skinner SJM, Post M, Torday JS, Stiles AD, Smith BT: Characterization of proteoglycans synthesized by fetal rat lung type II pneumocytes in vitro and the effects of cortisol. *Exp Lung Res* 12 : 253–264, 1987.
- Sonnenberg A, Linders CJT, Modderman PW, Damsky CH, Aumailley M, Timpl R: Integrin recognition of different cell–binding fragments of laminin (P1, E3, E8) and evidence that  $\alpha 6$ – $\beta 1$  but not  $\alpha 6$ – $\beta 4$  functions as a major receptor for fragment E8. *J Cell Biol* 110 : 2145–2155, 1990.
- Thomas T, Dziadek M: Expression of collagen alpha I(IV), laminin and nidogen genes in the embryonic mouse lung: implications for branching morphogenesis. *Mech Dev* 45 : 193–201, 1994.
- Thurlbeck WM: Postnatal growth and development of the lung. *Am Rev Respir Dis* 111 : 803–843, 1975.
- Von der Mark K, Kühl U: Laminin and its receptor. *Biochem Biophys Acta* 823 : 47 : 160, 1985.
- Wan YJ, Wu TC, Chung AE, Damjanov: Monoclonal antibody to laminin reveal the heterogeneity of basement membranes in the developing and adult mouse tissue. *J*



- Cell Biol 98: 971-979, 1984.
- Wu TC, Wan YJ, Chung AE, Damajonov I: Immunohistochemical localization of eutaction and laminin in mouse embryos. Dev Biol 96: 467-471, 1983.
- Yurchenco PD, O'Rear JJ: Basal laminin assembly. Curr Opin Cell Biol 6: 674-681, 1981.

### < 국문초록 >

Laminin은 세포외기질의 주요 구성 당단백질로 알려져 있고 특히 기저막에 다량 분포되어 있어 제 4형 아교질, heparan sulfate proteoglycan 및 entactin과 결속되어 있다. Laminin은 세포외기질에 함유되어 조직의 발생, 분화 및 성숙 등에 직접 및 간접적으로 관련되어 있으며, 특히 세포의 분열, 이동에 관여하고 조직내 기저막의 물질 투과성에 영향을 미쳐 상피의 분화 및 재형성과 관계있음이 많은 학자들에 의하여 보고되어 있다.

최근에는 laminin이 포유동물에서 태자기와 신생아기에서 폐의 발생과 분화에 주요한 역할을 함도 일부 보고되어 있다. 이에 저자는 폐의 발생과정에서 조직 혹은 세포내에서 laminin의 발현과 분포 변화를 면역조직화학염색법과 면역도금법을 이용해서 추적하고자 하였다.

실험동물로는 발생 제 14일, 제 16일, 제 18일 및 제 20

일의 태자와 생후 1일, 3일, 5일 및 7일의 신생 흰쥐를 사용하였으며, 각 실험동물의 폐조직을 절취하고 면역조직화학염색과 면역도금법으로 laminin의 면역활성의 변동을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 발생 제 14일, 제 16일, 제 18일 및 제 20일의 흰쥐 태자와 출생 제 1일의 신생 흰쥐 폐조직에서는 혈관, 기관지 및 폐포의 기저막과 폐포막에서 강한 laminin 면역활성이 지속되었고, 폐포가 형성된 출생 제 3일 이후의 흰쥐 폐의 폐포막에서는 laminin 면역활성이 현저히 감소되었다.

2. 흰쥐 태자의 폐조직에서 laminin 면역금과립이 관찰되는 세포는 간엽세포, 혈관내피세포 및 섬유모세포였으나, 신생 흰쥐의 폐에서는 섬유모세포, 제 1형 및 제 2형 폐포세포에서 laminin 면역금과립이 관찰되었으며 금과립이 가장 많이 관찰되는 조직 부위는 공기혈관장벽을 이루는 기저막이었다.

이상과 같은 실험결과는 태생기에서는 laminin이 주로 폐의 세포외기질에 분포되나 출생 후에는 주로 기저막에 분포되므로 폐의 기능이 성숙됨에 따라 laminin의 분포상태에 변동이 일어나고, laminin을 생성하는 세포도 출생 전에는 간엽세포, 혈관내피세포 및 섬유모세포이나 출생 후에는 폐의 실질세포인 제 1형 폐포세포와 제 2형 폐포세포로 합성기능이 이전되는 것으로 생각되었다.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** A photograph of the fetal rat lung, the 14th day of development. Strong immunoreactivity is seen in the blood vessels and moderate immunoreactivity is observed at the mesenchyme. Laminin Immunohistochemistry,  $\times 200$ .
- Fig. 2.** A photograph of the fetal rat lung, the 16th day of development. Strong immunoreactivity is seen at the basement membranes of the blood vessels and the bronchioles. In the extracellular matrix (ECM), moderate immunoreactivity is observed. Laminin Immunohistochemistry,  $\times 200$ .
- Fig. 3.** A photograph of the fetal rat lung, the 18th day of development. Strong immunoreactivity is seen in the basement membranes of the bronchioles and the blood vessels. Weak immunoreactivity shows at the ECM. Laminin Immunohistochemistry,  $\times 200$ .
- Fig. 4.** A photograph of the fetal rat lung, the 20th day of development. Weak immunoreactivity is seen in the basement membrane of the bronchiole and the alveoli. Laminin Immunohistochemistry,  $\times 200$ .
- Fig. 5.** A photograph of the fetal rat lung, 1 day after birth. Strong immunoreactivity is observed at the alveolar septi and the bronchioles. Laminin Immunohistochemistry,  $\times 200$ .
- Fig. 6.** A photograph of the neonatal rat lung, 3 days after birth. Weak immunoreactivity is observed in the alveoli and the bronchioles. Laminin immunohistochemistry,  $\times 200$ .
- Figs. 7, 8.** Photographs of the neonatal rat lung, 5 days and 7 days after birth. Moderate immunoreactivity is seen in the alveolar septi and the basement membranes of the bronchioles. Laminin Immunohistochemistry,  $\times 200$ .
- Fig. 9.** An electron micrograph of the fetal rat lung, the 16th day of development. Large mesenchymal cell (MS) containing immunogold particles in the cytoplasm is observed. Numerous immunogold particles are also seen in the extracellular matrix (ECM). Immunogold Cytochemistry with Uranyl acetate countstain.
- Fig. 10.** An electron micrograph of the fetal rat lung, the 16th day of development. The basal lamina of the bronchiole epithelial cell (E) contains A few of immunogold particles. In extracellular matrix (ECM) with collagen (Co) fibrils, numerous immunogold particles are seen. Immunogold Cytochemistry with Uranyl acetate countstain.
- Figs. 11-13.** Electron micrographs of the fetal rat lung, the 18th day of development. The mesenchymal cells (MS) and the endothelial cell (En) contains several immunogold particles within their cytoplasm. Numerous immunogold particles are seen in the extracellular matrix (ECM). N = nucleus, RBC = red blood cell. Immunogold Cytochemistry with Uranyl acetate countstain.
- Figs. 14, 15.** Electron micrographs of the fetal rat lung, the 20th day of development. A few of immunogold particles are seen in the cytoplasm of the type I pneumocytes ( $P_1$ ) and in the cytoplasm of the endothelial cell (En). RBC = red blood cell. Immunogold Cytochemistry with Uranyl acetate countstain.
- Figs. 16, 17.** Electron micrographs of the neonatal rat lung, 1 day after birth. A few of immunogold particles in the ECM and the basal lamina (BA) show. A few of immunogold particles are also seen in the type I pneumocyte ( $P_1$ ) and the fibroblast (Fb). En = endothelial cell, N = nucleus. Immunogold Cytochemistry with Uranyl acetate countstain.
- Figs. 18, 19.** Electron micrographs of the neonatal rat lung, 5 days after birth. A few of immunogold particles are seen in the type II pneumocytes ( $P_2$ ). On the basal lamina (BA) numerous immunogold particles are seen. N = nucleus. Immunogold Cytochemistry with Uranyl acetate countstain.
- Fig. 20.** Electron micrographs of the neonatal rat lung, 7 days after birth. In the cytoplasm of the type II pneumocyte ( $P_2$ ), a few of immunogold particles are seen. The basal lamina (BA) and the type I pneumocytes ( $P_1$ ) contain several immunogold particles. Immunogold Cytochemistry with Uranyl acetate countstain.





