

가토 Bruch 막의 음이온부위에 관한 실험적 연구*

이화여자대학교 의과대학 안과학교실

한 영 복

= Abstract =

Anionic Sites in Bruch's Membrane of Rabbit Eyes

Young Bock Han

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Ewha Womans University

Anionic sites are thought to act as anionic barriers regulating passage of proteins across Bruch's membrane of the eye. The cationic electron microscope tracer, polyethyleneimine (PEI), was used to study the distribution of the anionic sites in the Bruch's membrane of the control rabbit eyes and sodium iodate injected eyes. In Bruch's membrane of the control eyes, electron dense particles are present along the both sides of the basal lamina of the RPE and choriocapillaris and along collagen and elastic fibers. In the sodium iodate treated eyes, the RPE cells are severely degenerated and anionic sites are significantly decreased in the Bruch's membrane. These changes suggest that RPE cells play an important role in maintaining the anionic sites in the Bruch's membrane.

서 론

Bruch막은 맥락막 모세혈관과 망막색소상피세포 사이에서 영양공급 및 대사산물의 이동등 중요한 역할을 하고 있으나 아직 이러한 정상 생리적 기능에 관해서는 별로 알려진 것이 많지 않다. Bruch막에 구조적인 변화나 구성성분에 변화가 올 경우 궁극적으로 망막색소상피세포 및 망막의 기능에 이상이 초래될 수 있다.

신장의 사구체 기저막에는 고정된 음전하를 가진 구조가 있어서 혈장단백 같이 음전하를 지닌 물질이 투과하는 것을 억제하여¹⁾ 소변으로 혈장단백이 배출되지 않도록 하며 이 음이온 부위는

주로 heparan sulfate proteoglycan으로 구성되어 있다²⁾. Bruch막에도 최근 여러 연구결과에서 음이온 부위가 증명되고 있으며 투과장벽으로 작용할 것으로 생각되고 있다³⁾⁴⁾⁵⁾.

본 연구에서 폴리에틸렌아민(Polyethyleneimine, PEI)을 양이온 표식자로 사용하여 정상 가토 Bruch막의 음이온 부위를 관찰하고, Sodium iodate를 투여하여 망막상피세포를 파괴시킨 후 음이온 부위의 변화를 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법

실험동물은 체중 2kg 내외의 유색가토 6마리를 사용하였다. 실험전에 1%아트로핀으로 산동하여 안저에 이상이 없는 것을 확인하고 사용하였다. 실험군(3마리, 6안)동물에 투여한 sodium iodate

*본 연구는 1991년도 생활과학연구원 연구비에 의하여 이루어졌음.

는 생리식염수에 녹여 20% 용액(pH 7.4)으로 만들어 (3마리, 6안) 실험동물 kg당 40mg을 이 정맥에 주사하였다. 대조군(3마리, 6안)에는 체중 kg당 같은 양의 생리식염수를 이 정맥에 주사하였다. 실험동물군은 sodium iodate를 투여하고 2주 경과한 후 펜토탈을 정맥주사하여 전신마취시키고 2% 염산 리도카인을 구후주사하여 국소마취한 후 안구를 적출하였다. 안구후극부에서 1×1mm의 크기로 조직을 얻은 후 공막을 분리하여 제거하였다. 대조군에서도 생리식염수를 주입하고 2주 후에 같은 방법으로 안구적출하여 조직을 채취하였다. 채취한 조직은 0.5% PEI(분자량 1800, 미국 Polyscience제) 용액(pH 7.4, 8.5% sucrose 함유)에 30분간 담근 후 0.1M 카코딜레이트 완충용액에 10분씩 3회 세척하였다. 2% 텅스텐산과 0.1% 글루타르 알데하이드의 혼합용액에 1시간 동안 염색하고 그 다음 다시 0.1M 카코딜레이트 완충용액에 10분씩 3회 세척하였다. 그 후 1% 사산화 오스미움 용액에 섭씨 4도상태로 2시간 동안 후고정시켰다. 60% 에탄올에서 절대에탄올까지 옮겨가면서 탈수시키고 Poly Bed-812에 포매하고 70 nm 두께의 초박절편을 만들어 uranyl acetate 와 lead citrate로 염색하여 전자현미경(Hitachi H-600)으로 관찰하였다.

결 과

가토를 대상으로 하여 Bruch막의 음이온부위를 관찰하기 위하여 polyethylenimine 표식자를 사용하여 투과형 전자현미경으로 관찰하였다. 정상안의 Bruch막에서는 음이온부위가 주로 망막색소상피세포 및 맥락막 모세혈관의 기저막에 분포하였으며 교원섬유층 및 탄력섬유층에서도 관찰이 되었다. 일부는 망막색소상피세포의 basal infoldings에서도 관찰이 되었다(Fig. 1). Sodium iodate를 주사하고 2주 경과한 후 소견은 망막색소상피세포가 심하게 변성되어 있었으며 Bruch막의 음이온부위가 정상안에 비하여 현저하게 감소되어 있었다(Fig. 2, 3).

고 찰

Bruch막은 망막색소상피세포와 맥락막 모세혈



Fig. 1. Transverse section through Bruch's membrane (B) of control rabbit eyes showing electron dense anionic sites(→), and anionic sites within the RPE basal infoldings(BI) (×25,000).

관 사이에 위치하는 세포외기질 (extracellular matrix)로 조직학적으로는 망막색소상피세포와 맥락막 모세혈관의 기저막, 내측 및 외측의 교원섬유층, 중앙의 탄력섬유층등 다섯층으로 구성된 조직이다(6)7). 맥락막 모세혈관, Bruch막, 그리고 망막색소상피세포는 정상적인 망막기능을 유지하는데 매우 중요한 역할을 한다. Bruch막의 기능에 관해서는 알려진 것이 많지 않으나 맥락막으로부터 망막색소상피세포로의 물질이동에 상당한 영향을 미치며(8)9) 망막색소상피세포의 유착, 망막하 신생혈관의 발생을 억제하는 등의 사실이 알려져 있다.

신장의 사구체는 눈의 망막색소상피세포, Bruch막, 맥락막 모세혈관의 구조와 유사하며 사구체 기저막은 혈장단백이 소변으로의 투과를 억제하는 일차적인 역할을 하고 있으며 이러한 작용은 사구체 기저막의 선택적 투과성에 기인한다.

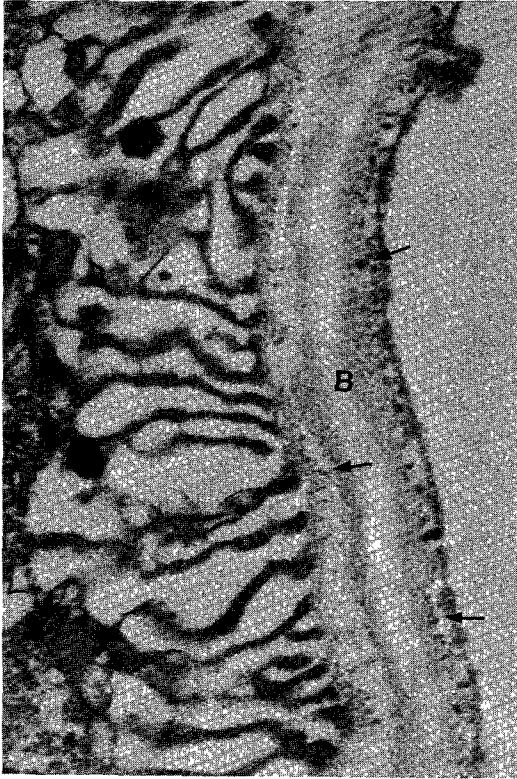


Fig. 2. Transverse section through Bruch's membrane (B) of sodium iodate injected eyes showing electron dense anionic sites (arrows) which are reduced in number compared with controls ($\times 25,000$).

이러한 선택적 투과성은 여러 요인이 작용하며 특히 사구체 기저막에는 고정된 음전하를 가진 구조가 있어서 혈장단백질이 음전하를 지닌 물질이 투과하는 것을 억제한다고 하였다¹⁾. 이 음이온 부위는 주로 heparan sulfate proteoglycan으로 구성되어 있으며²⁾ 이것은 효소를 사용하여 heparan sulfate proteoglycan을 제거 하였을때¹⁰⁾ 혹은 다중 양이온으로 음전하 부위를 중화시켰을때¹¹⁾ 사구체 기저막의 투과성이 증가하는 사실이 이를 뒷받침한다. 따라서 Bruch막에도 이와 같은 투과장벽이 있을 것으로 생각할 수 있으며 최근 여러 연구결과에서 음이온 부위가 증명되고 있다³⁾⁴⁾⁵⁾. 음이온부위는 이외에도 뇌의 맥락막층, 폐, 혈관, 교원섬유 등¹²⁾ 신체의 여러곳에 광범위하게 분포한다. Bruch막-맥락막은 전기적으로 음전하를 띠고 있으며 이러한 성질은 망막과 맥락 사이의 분자



Fig. 3. Transverse section through Bruch's membrane (B) of sodium iodate injected eyes showing the severe degenerative changes of the retinal pigment epithelium (RPE) and few anionic sites (arrow) ($\times 25,000$).

이동에 하나의 전기적인 장벽으로 작용하며¹³⁾ 이 음전하는 Bruch막에 존재하는 proteoglycan에 의한 것으로 생각된다. Das 등은¹²⁾ heparan sulfate proteoglycan은 Bruch막의 양쪽 기저막과 교원섬유층에 위치한다고 하였으며 Pino 등은³⁾ 쥐에서 정상 Bruch막 음이온부위는 망막색소상피기저막에는 heparan sulfate가, 맥락막모세혈관기저막에는 chondroitin sulfate가 주로 분포한다고 하였다.

Bruch막 음이온부위의 변화는 투과성의 변화등을 초래하며 노인성 변화로 형태학적, 조직화학 변화가 나타나며¹⁴⁾ 노인성 황반부병성¹⁵⁾, 당뇨병⁵⁾ 등에서의 변화는 궁극적으로 망막의 기능에 영향을 미칠 수 있다. Campochiaro 등은 Bruch막에서 발견되는 교원섬유, fibronectin, laminin 등 세포외기질의 많은 성분이 망막색소상피세포에서 합성되며 정상적인 기능을 유지하는데 중요한 역

할을 하고 이러한 기능이 망막하신생혈관의 발생에 물리적인 장벽으로 작용하며 증식성 초자체망막증의 발병기전에 중요한 역할을 할 것이라고 하였다¹⁶⁾. 당뇨병을 지닌 쥐에서 Bruch막의 음이온부위가 현저하게 감소되어 있고 망막색소상피세포와 맥락막 모세혈관의 기저막이 현저하게 두꺼워지며⁵⁾ 망막색소상피세포가 증식하며 basal infoldings에 변화가 오며¹⁷⁾¹⁸⁾ 음이온부위는 망막색소상피세포 및 맥락막 모세혈관이 Bruch막에 부착하는 데에도 영향을 미치어 당뇨병에서 음이온부위의 감소가 Bruch막으로부터 망막색소상피세포가 박리되는 원인으로 생각되고 있다¹⁹⁾. Hewitt 등은²⁰⁾ 배양된 망막색소상피세포로부터 주로 heparan sulfate proteoglycan이 합성되는 것을 관찰하고 Bruch막에 존재하는 heparan sulfate는 대부분이 망막색소상피세포로부터 합성되는 것이라고 하였다. 본 실험의 결과에서도 망막상피세포가 파괴되고난 후 Bruch막의 음이온부위가 현저하게 감소된 소견을 보이는데 이것은 음이온부위를 구성하는 물질이 주로 망막색소상피세포에서 합성되기 때문이라고 생각된다.

결 론

가토 Bruch막에서 PEI음이온 표식자를 이용하여 정상대조군 및 sodium iodate로 망막색소상피세포를 파괴한 후 음이온 부위를 투과형 전자 현미경으로 관찰한 결과음이온 부위가 정상 대조군에서는 망막색소상피세포와 맥락막 모세혈관의 기저막에 주로 분포하였고 교원섬유와 탄력섬유층에도 분포하였으며 일부는 망막색소상피세포의 basal infoldings에도 분포하고 있었다. Sodium iodate를 주입한군에서는 Bruch막의 음이온 부위가 현저하게 감소되어 있었다. 이러한 결과로 보아 Bruch막의 음이온 부위는 주로 망막상피세포에서 합성되는 것으로 생각된다.

References

1) Chang RIS, Deen WM, Robertson CR, et al : *Permeability of the glomerular capillary wall : III Restricted transport of polyanions. Kid Int* 1975 : 8 :

212-218

- 2) Kanwar YS, Farquhar MG : *Presence of heparan sulfate in glomerular basement membrane. Proc Natl Acad Sci USA* 1979 : 76 : 1303-1307
- 3) Pino RM, Essner E, and Pino LC : *Location and chemical composition of anionic sites in Bruch's membrane of the rat. J Histochem Cytochem* 1982 : 30 : 245-252
- 4) Essner E, Pino RM : *Distribution of anionic sites in Bruch's membrane of the rabbit eye. Eur J Cell Biol* 1982 : 27 : 251
- 5) Coldwell RB, Slapnick SM, McLaughlin BJ : *Decreased anionic sites in Bruch's membrane of spontaneous and drug induced diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986 : 27 : 1691-1697
- 6) Hogan M, Alvarado J : *Studies on the human macula. IV Aging changes in Bruch's membrane. Arch Ophthalmol* 1967 : 77 : 419
- 7) Leeson TS, Leeson CR : *Choriocapillaris and lamina elastical(vitrea) of the rat eye. Br J Ophthalmol* 1967 : 51 : 559
- 8) Pino RM, Essner E : *Permeability of rat choriocapillaris and Bruch's membrane. J Cell Biol* 1979 : 83 : 473
- 9) Pino RM, Essner E : *Structure and permeability to ferritin of the choriocapillary endothelium of the rat eye. Cell Tissue Res* 1980 : 208 : 21
- 10) Kanwar YS, Linker A, Farquhar MG : *Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. J Cell Biol* 1980 : 86 : 688-693
- 11) Hunsicker LG, Shearer TP, Shaffer SJ : *Acute reversible proteinuria induced by infusion of the polycation hexadimethrine. Kid Int* 1981 : 20 : 1-17
- 12) Das A, Frank RN, Zhang NL, Turczyn TJ : *Ultrastructural localization of extracellular matrix components in human ratinal vessels and Bruch's membrane. Arch Ophthalmol* 1990 : 108 : 421-429
- 13) Lyda N, Eriksen N, and Krishna N : *Studies on Bruch's membrane : Flow and permeability studies in a Bruch's membrane-choroid preparation. Am J Ophthalmol* 1967 : 44 : 362
- 14) Newsome DA, Huh W, Green WR : *Bruch's membrane age related changes vary by region. Curr Eye Research* 1987 : 6 : 1211

- 15) Goldberg F : *Bruch's membrane and vascular growth. Invest Ophthalmol Vis Sci* 1976 : 15 : 443-446
- 16) Campochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM : *The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells in vivo and its synthesis in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986 : 27 : 1615-1621
- 17) Grimes PA, McGlenn A, Laties AM, and Jaji A : *Increase of basal cell membrane area of retinal pigment epithelium in experimental diabetes. Exp Eye Res* 1984 : 38 : 569
- 18) Blair NP, TSo MOM, Dodge JT : *Pathologic studies of the blood-retinal barrier in the spontaneously diabetic BB rat. Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984 : 25 : 302-311
- 19) Hidayat AA, Fine BS : *Diabetic choroidopathy. Light and electron microscopic observation of seven cases. Ophthalmology* 1985 : 92 : 512-522
- 20) Hewitt AT, Newsome DA : *Altered proteoglycans in cultured human retinitis pigmentosa retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988 : 29 : 720-726