

생쥐 배아 혀 상피의 발생과정에서 나타나는 사이토케라틴 1, 14와 PAX 9에 관한 면역조직화학적 연구

정혜인, 진명욱¹, 조제열, 정한성², 김재영

경북대학교 경조직-바이오치아 재생 연구소 치의학전문대학원 구강생화학교실,
¹경북대학교 치의학전문대학원 보존학교실, ²연세대학교 치과대학 구강생물학교실

간추림 : 피부의 상피에 대한 연구는 부속기관의 발생 그리고 보호장벽 형성과 같은 다양한 분야에서 연구되어 왔다. 혀 상피조직의 발생과 관련된 보호장벽의 형성 및 상피조직 분화에 대해서는 많은 연구가 필요한 실정이다. 본 연구에서는 혀의 보호장벽이 형성되고 상피의 분화가 일어나는 발생중인 혀를 이용하여 보호장벽 형성과정을 면밀하게 관찰하였고, 피부의 상피에서 나타나는 다양한 사이토케라틴의 발현양상을 발생중인 혀에서 조직면역화학방법으로 확인하였다. 혀 상피의 발생과정에서 PAX 9의 발현이 사이토케라틴 14와 겹쳐서 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 Ki67을 이용한 상피세포의 증식양상과 비교해 볼 때, 유사하게 나타나는 것을 확인할 수 있는데 이는 PAX 9, 사이토케라틴 14와 세포의 증식이 혀 보호장벽 형성에 관여하는 중요한 인자로 작용할 수 있을 것이라고 생각한다. 이러한 다양한 상피분화관련 인자들의 발현양상들을 비교해 볼 때, 혀 상피의 분화는 E15에서 본격적으로 시작되어 보호장벽의 형성 이전에 사이토케라틴 14와 PAX 9과 같은 인자들의 발현이 먼저 나타나게 되면서 상피의 분화가 진행되고, 이후 사이토케라틴 1과 같은 각질화 관련 인자가 보호장벽 형성에 기여한다고 생각된다.

(2008년 9월 26일 접수, 2008년 11월 20일 게재승인)

찾아보기 낱말 : 혀 상피, 발생, 보호장벽, 사이토케라틴, PAX 9, 증식, 분화

서 론

점막은 창자관, 코안 및 기타 외부와 통하는 몸 안의 내면을 덮고 있는 습윤한 표면을 지칭한다. 이중 입안의 내면을 덮고 있는 입안점막은 보호, 감각, 분비 및 체온조절 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 현재까지 일반적인 해부학과 조직학적인 방법으로 연구되어 왔다. 구강과 혀의 상피는 발생단계를 거치는 동안 치아와 침샘 그리고 혀의 부속기관인

혀 유두 등을 형성한다. 이러한 입안점막과 입안의 기관들은 상피와 중간엽의 상호작용(epithelial-mesenchymal interactions)으로 발생한다(Pispa와 The-sleff 2003, Lee 등 2006). 혀 유두는 입안점막의 다른 부위와 다르게 특수 감각기관으로 분류되며, 맛을 느낄 수 있는 버섯유두(fungiform papillae), 성곽 유두(circumvallate papillae), 잎새유두(foliate papillae)와 각질화된 조직으로 저작에 관련된 기능을 하는 것으로 알려진 실유두(filiform papillae)로 구성되어 있다(Kim 등 2003). 특히, 혀등 표면은 실유두에 의해 뾰뾰하게 싸여져 있는 구조를 확인할 수 있는데, 이러한 실유두의 형태와 크기는 종마다 뚜렷한 차이가 있다(Jonker 등 2004). 실유두는 소화와 관련된 저작기능 외에도 피부 상피와 상부 소화기

*이 논문은 2007년도 경북대학교 신임교수정착연구비에 의하여 연구되었음.

교신저자: 김재영(경북대학교 경조직-바이오치아 재생 연구소
치의학전문대학원 구강생화학교실)

전자우편: jykim91@knu.ac.kr

계통에서 확인되는 세포 외부의 유해인자 또는 감염성 미생물들로부터 세포를 보호하는 보호장벽 형성 (protective barrier formation)에도 관여한다 (Marshall 등 2000).

보호장벽 (protective barrier)은 외부의 자극이나 변화로부터 상피나 입안점막을 보호할 수 있는 보호막으로 각질세포층과 세포간 지질막으로 구성되어 있다. 피부상피와 입안점막의 보호장벽은 각질형성세포(사이토케라틴)의 독특한 분화에 의해 형성되는 각질층(각질화된 덩개, cornified envelope)으로 만들어진다. 각질화된 덩개는 수많은 구조단백질과 불용성 거대 분자간의 상호결합으로 이루어진다 (Fuchs와 Raghavan 2002, Kalinin 등 2002). 생쥐의 피부 보호장벽은 배아시기 16일 (embryonic day 16: E16)에 등쪽에서 시작되어 2일에 걸쳐 배쪽으로 이동하면서 형성된다 (Hardman 등 1998). 또한 이전 연구에서 밝혀진 혀의 보호장벽 형성도 이와 비슷한 시기인 E16.5에서 시작되어 2일에 걸쳐 완성된다 (Marshall 등 2000). 그러나 현재까지 혀의 보호장벽 형성과정의 정확한 조직학적인 변화와 분화 표지인자의 발현과 관련된 연구가 미미한 실정이다.

상피분화 표지인자로 알려진 케라틴은 제 1형 (산성 케라틴)과 제 2형 (중성과 염기성 케라틴)으로 구성되어 있는데, 위의 두 가지 케라틴은 상피세포의 세포골격인 중간세사를 형성하는 단백질이며, 머리두피와 손톱의 케라틴과 구별하기 위하여 사이토케라틴이라 부른다. 산성 (40~60 kd)과 중성-염기성 (50~70 kd)의 사이토케라틴은 중간세사 단백질을 형성하기 위해 동일한 양으로 결합한다고 알려져 있다. 사이토케라틴은 상피분화의 표지인자로 잘 알려져 있으며, 상피에서 형태학적인 변화에 앞서 특정 부위에서 발현된다. 사이토케라틴은 사람의 경우, 발생 동안 상피의 분화에 있어 아주 다양한 발현양상을 나타내며, 적어도 49개의 다른 사이토케라틴 유전자를 가지고 있다. 예를 들면 사람의 침샘에서 메켈 (Merkel) 세포는 사이토케라틴 7, 8, 18, 19를 포함하는 단순 상피 사이토케라틴을 나타내며, 사이토케라틴 8과 18은 샘파리세포 (acinar cell)와 도관세포 (duct cell)에서 나타나고, 사이토케라틴 7과 19는

도관세포에서만 나타난다. 이러한 사이토케라틴 8의 발현 결과는 사이토케라틴 18의 발현과 유사하며 이는 사이토케라틴이 짝으로 중합되는 사이토케라틴 8과 18의 구성이 단순상피에서 주로 확인되는 것과 일치한다 (Wong 등 2000).

혀의 보호장벽의 형성에 관여하는 유전자로는 현재까지 Sprr1A (small proline-rich region proteins의 구성원; Steinert 등 1998)가 있으며, 이는 혀의 보호장벽 형성에 중요한 역할을 하는 각질층 덩개의 형성과 함께 나타난다. 특히 Sprr1A는 피부에서는 나타나지 않는 특징을 보이며, 최근에 Sprr-like (Sprrl) 유전자가 사람과 쥐의 상피분화 동안 혀와 피부에서 상이하게 나타난다 (Marshall 등 2001, Wang 등 2001). 이전 연구 결과들은 입안과 같은 습윤한 환경과 피부와 같은 마른 환경에서 상피의 분화가 다르게 나타나며, 이러한 분화의 상이성은 결국 보호장벽을 형성하는 과정에서도 차이가 있을 것이라고 보고하였다 (Jonker 등 2004). 이와 마찬가지로 사이토케라틴의 경우도 유전자의 특정 조합이 입안점막, 피부상피, 혀의 점막에서 다르게 작용할 것으로 예상된다. 예를 들면 생쥐에서 사이토케라틴 6a와 6b를 불활성화시킨 경우, 혀의 상피에서는 심각한 문제가 생기는데 반해 피부의 상피에서는 전혀 이상이 없었다는 점이 그 증거이다 (Wong 등 2000). 이외에도 PAX 9 유전자가 불활성화된 생쥐를 이용하여 입안점막과 피부 상피에서 나타나는 다양한 유전자 발현을 micro-array기법으로 확인한 결과, PAX 9과 다양한 사이토케라틴들의 변화를 입안점막에서 특이적으로 확인할 수 있었다 (Jonker 등 2004).

피부의 사이토케라틴 발현과 관련된 발생에 대한 연구는 활발하게 되어 있는데 반해 혀 상피와 발생에 관련된 사이토케라틴의 발현양상에 대한 연구는 현재까지 미흡한 실정이다. 입안은 생명현상을 유지하기 위해 필수적이며, 몸의 내부로 통하는 일차관 문이어서 외부인자로부터 가장 쉽게 노출될 수 있는 혀 상피의 분화와 보호장벽의 형성은 매우 중요하다. 발생단계의 정확한 보호장벽 형성과정의 이해는 상피세포의 분화에 대한 이해 및 다양한 기관의 보호장벽의 형성을 이해하는 중요한 연구가 될 것

으로 생각된다. 본 연구에서는 생쥐의 허 상피의 발생과정을 형태학적인 방법으로 자세하게 확인하고, 이전 연구에서 제시되었던 상피의 발생에 중요한 표지인자인 사이토케라틴들과 PAX 9의 발현양상과 위치를 발생단계별로 면역조직화학방법으로 확인하고 Ki67 항체를 이용하여 허 상피의 증식양상을 확인하였다. 이러한 연구결과는 다양한 세포 분화 연구의 기본적인 토대가 되는 자료로 활용될 수 있을 것이며, 나아가 다양한 조직의 상피분화 기작을 이해할 수 있는 기본 자료로 활용할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

성체 ICR 생쥐는 항온(22°C)이 유지되고 상대습도가 55%인 동물 사육실에서 인공조명(오전 5시부터 오후 5시까지)하에서 음식과 물에 대한 자유로운 접근이 가능하도록 하였다. 배아는 시기를 맞추어 임신한 ICR mouse 에서 채취하였다. 교배를 위해 저녁 7시에 암컷 생쥐 3마리를 수컷 생쥐 1마리가 들어있는 cage에 합사하였고, 다음날 아침 7시에 질마개(vaginal plug)가 확인된 암컷을 E0로 선정하여 실험에 필요한 시기까지 사육하였으며, 실험에 필요한 E14에서 E17까지의 임신 생쥐를 경추탈구법으로 희생하여 자궁을 절개하고 배아를 적출하였다. 임신중인 생쥐배아의 발생단계별 변이를 감안하여 배아의 형태를 확인하고 이를 이전 문헌에서 확인된 형태와 비교하여 정확한 발생단계별로 실험에 사용하였다(Theiler 1989). 각 시기별로(E14, E15, E16, E16.25, E16.5, E17) 정확하게 형태학적으로 염색된 배아를 10마리씩 배당하여 실험에 이용하였다.

2. 보호장벽 실험

실험에 필요한 생쥐 배아를 시기별로 수집하여, 발생중인 허를 미세해부하여 메탄올에서 탈수하고, PBS(phosphate buffered saline)용액에서 씻어낸 후, 0.1% toluidine blue 염색 용액을 이용하여 발생단계

별로 적절한 시간을 두고 염색하였다. 염색 후 PBS에서 탈색시키고 광학현미경으로 관찰하고 디지털 카메라로 촬영하여 발생단계별로 보호장벽의 형성과정을 세심하게 관찰하였다(Hardman 등 1998).

3. 조직절편 제작

생쥐 배아를 발생시기에 맞추어 해부현미경하에서 미세해부하여 허를 포함한 아래턱 부분 또는 허 조직만 떼어 내어 4% paraformaldehyde 용액에서 고정된 후, 순차적으로 에탄올과 자일렌 유기용매를 이용하여 탈수 과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 그 후 5~7 μ m의 두께로 박절하여 슬라이드에 연속으로 부착하였다. 연속표본은 형태학적인 변화양상을 확인하기위해 Hematoxylin-Eosin염색과 면역조직화학방법을 위해 사용하였다.

4. 면역조직화학 실험

조직절편은 파라핀을 제거하고 다시 수화하여, 내인성 peroxidase 활성에 기인하는 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 슬라이드를 0.3% hydrogen peroxide로 15분 동안 반응시켰다. 이 조직절편은 10 mM citrate buffer(pH 6.0)에 15분 동안 가열한 후, 25°C에서 20분간 식힌 뒤, 조직 슬라이드에 일차 항체로 mouse monoclonal 사이토케라틴 1, 14(Abcam, catalogue No. ab24643, ab53115, UK), PAX 9(Life Span Bio Sciences; catalogue No. LS-C29838, USA), 그리고 Ki67(Thermo scientific, catalogue No. RM-9106-S1, UK)을 각각 1:100으로 antibody diluent(Zymed, catalogue No. 00-3118, USA)에 희석하여 4°C에서 16~18시간 동안 반응시켰다. 그 후 조직 슬라이드를 PBS로 10분 동안 세척한 후, biotinylated rabbit anti-mouse IgG 용액으로 10분 동안 반응시키고, PBS로 10분 세척한 후, streptavidin-peroxidase를 실온에서 10분 반응시켰다. 결과반응은 DAB substrate kit(Zymed, catalogue No. 00-2014, USA)를 사용하여 발색시키고 지용성 마운트 용액(Zymed, catalogue No. 00-2014, USA)으로 표본제작을 마무리한 후 디지털 카메라(Nikon, Eclipse E200,

Japan)로 촬영하였다. PAX 9 면역조직화학의 경우, 정확한 양성 염색을 확인하기 위하여 hematoxylin (Cat. No. TA-060-MH, LabVision)을 이용하여 대조 염색을 실시하였다.

결 과

1. 보호장벽 형성실험

생쥐의 혀 발생 동안 나타나는 보호장벽을 확인하기 위하여 Hardman (1998)이 이전에 고안한 실험 방법을 이용하여 E15와 E16에서 발생중인 혀를 텅스텐 바늘을 이용하여 미세해부한 후, 메탄올에 고정하고 toluidine blue 시약을 이용하여 염색하였다. 보호장벽이 형성된 상피에서는 염색액의 침투가 일어나지 않아 흰색으로 나타나고 보호장벽이 형성되지 않은 부분에서는 침투가 원활하게 일어나 푸른색을 확인할 수 있었다. Marshall (2001)의 실험결과에서는 생쥐의 E16에서 혀의 보호장벽이 형성되었다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 이전 연구와 동일한 결과를 확인할 수 있었다 (Fig. 1A). 보다 자세한 발생 시간대별 변화양상을 확인하기 위하여 E16.25와 E16.5에서 관찰한 결과, 보호장벽의 형성이 혀의 가운데 부분에서 양 측면으로 그리고 가운데에서 앞쪽과 뒤쪽으로 일정한 경향을 보이면서 형성되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B, C). 이 결과를 토대로 혀 상피의 분화양상을 조직학적으로 확인하기 위하여 E14에서부터 E17까지의 조직표본

을 제작하였다.

2. 조직학적 변화양상

생쥐 배아의 발생단계에서 변화하는 혀 상피의 분화양상을 확인하기 위해서 시상절편을 제작한 후, HE 염색을 실시하여 관찰하였다. 조직학적 결과와 보호장벽 형성에 대한 결과를 토대로, 정확한 조직의 변화양상을 확인하기 위하여, 아래턱의 발생중인 앞니 (incisor)가 보이는 절편에서 혀의 앞쪽 1/3 부분의 상피를 기준으로 분화를 확인하였다 (Fig. 2A, B, C, D). E14의 혀의 상피를 고배율로 관찰한 결과, 단층상피의 형태를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2A', A''). E15에서는 중층으로 변화하는 양상을 보다 자세하게 확인하기 위해서 고배율의 관찰을 실시한 결과, 상피세포층의 두께가 이전 시기보다 두꺼워진 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2B', B''). E16에서는 보다 분화된 중층상피의 양상을 확인할 수 있었으며, 이러한 중층상피의 형성은 이전 연구에서 확인된 상피의 중층 형성 시기와 일치하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2C, C', C'') (Hardman 등 1998). E17에서는 성숙한 중층상피에서 확인되는 다양한 형태의 상피세포의 모양을 확인할 수 있었으며, 혀 상피의 가장 위쪽에 실유두의 형성이 확인되었다 (Fig. 2D, D', D''). 이상의 조직학적 변화양상을 토대로, 중층상피의 분화가 일어나기 이전 단계인 E14에서 E16까지의 분화 표지인자인 사이토케라틴들과 PAX 9의 발현양상을 조직면역화학방법으로 확인하였다.

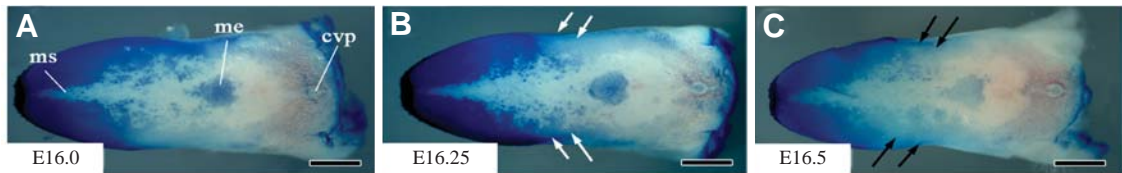


Fig. 1. Tongue barrier formation by toluidine blue staining from E16 to E16.5 of mice development. Tongue barrier formation shows gradual pattern from middle to lateral and from middle to anteroposterior. (A) At E16, toluidine blue stained regions, barrier formation is not completed, are identified in the lateral sides of tongue anterior and molar eminence (me). (B) At E16.25, gradual tongue barrier formation is examined in the median sulcus (ms) and lateral sides of tongue anterior (white arrows). (C) E16.5, black arrows indicate that more increased formation of tongue barrier formation (cvp, circumvallate papilla; ms, median sulcus; me, molar eminence; scale bars: 500 μ m).

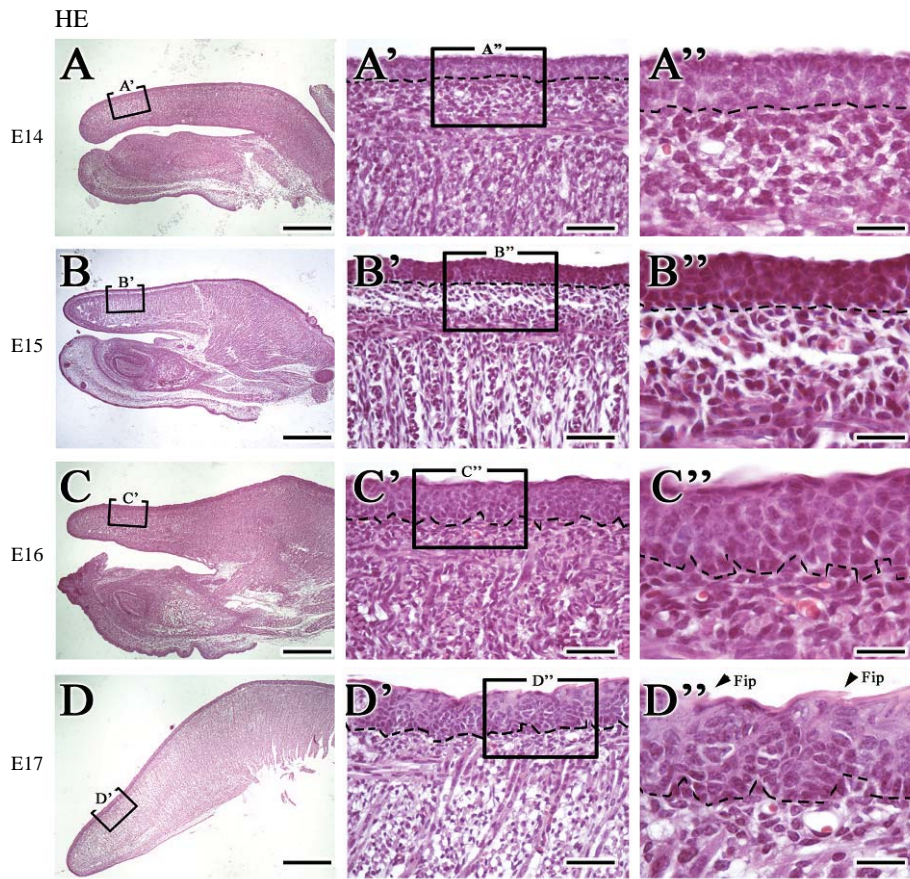


Fig. 2. Morphological examination of tongue dorsal epithelium using HE staining. (A, A', A'') E14. (B, B', B'') E15. (C, C', C'') E16. (D, D', D'') E17. (X, X', X'': X' is higher magnification of X, X'' is higher magnification of X') (black dotted lines demarcate basement membrane; black arrow heads: filiform papillae (Fip); scale bars: A, B, C, D: 500 μ m; A', B', C', D': 50 μ m; A'', B'', C'', D'': 20 μ m).

3. 사이토케라틴 면역조직화학 결과

면역조직화학방법을 이용하여 혀 상피의 발생과 분화에 관련된 다양한 사이토케라틴들의 발현양상을 확인하였다. 특히 사람의 태아 피부와 관련된 이전 연구에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 사이토케라틴 1과 14의 발현양상을 확인하였다 (Song 등 2001) (Fig. 3). 사이토케라틴 1과 14는 이전 연구에서 부분적으로 혀의 발생과 관련하여 보고된 바는 있지만 (Jonker 등 2004, Iwasaki와 Aoyagi 2007), 이를 보다 정확하게 확인하고자 실험을 실시하였다.

사이토케라틴 1의 발현은 E14에서 상피세포의 표면 부분인 태아표피(periderm)에서 확인할 수 있었으며 (Fig. 3A) 고배율에서 관찰한 결과 또한 이와 같은 양상을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A', A''). 상피의 분화가 시작되는 시기인 E15에서는 사이토케라틴 1의 발현양상이 E14에서와 유사함을 확인할 수 있었으며, 전반적으로 상피의 세포층에서 연하고 넓게 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B, B', B''). 특히 E14와 E15의 상피를 저배율에서 관찰하면 구강점막과 피부상피의 경계인 아래턱에서 사이토케라틴 1의 발현 정도에 차이가 있는 것을 확인할 수

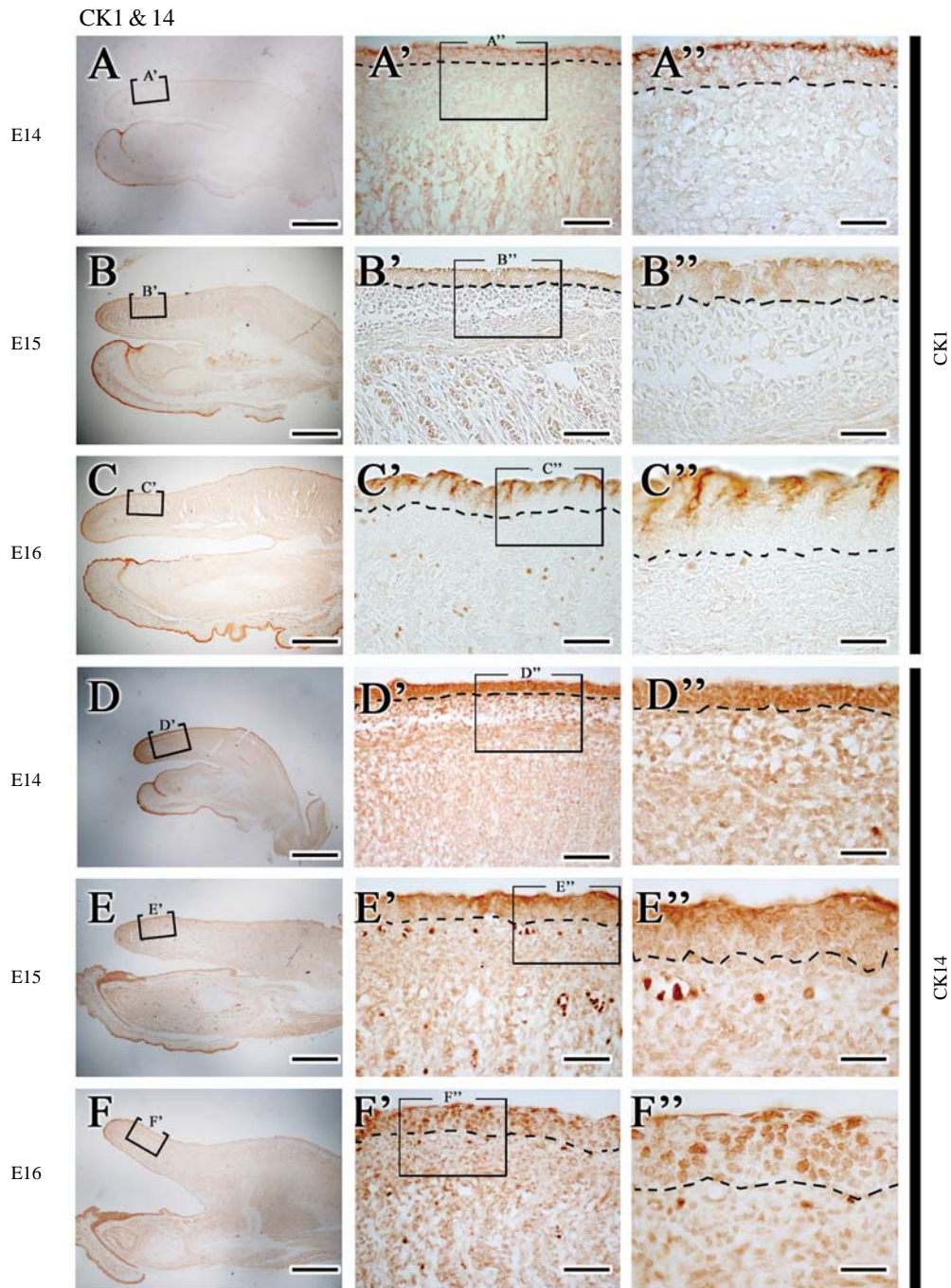


Fig. 3. Immunohistochemistry of Cytokeratins. (A, B, C) Cytokeratin 1. (A, A', A'') E14. (B, B', B'') E15. (C, C', C'') E16. (D, E, F) Cytokeratin 14. (D, D', D'') E14. (E, E', E'') E15. (F, F', F'') E16. (X, X', X'': X' is higher magnification of X, X'' is higher magnification of X') (black arrows indicate positive staining; black dotted lines demarcate basement membrane; scale bars: A, B, C, D, E, F: 500 μ m; A', B', C', D', E', F': 50 μ m; A'', B'', C'', D'', E'', F'': 20 μ m).

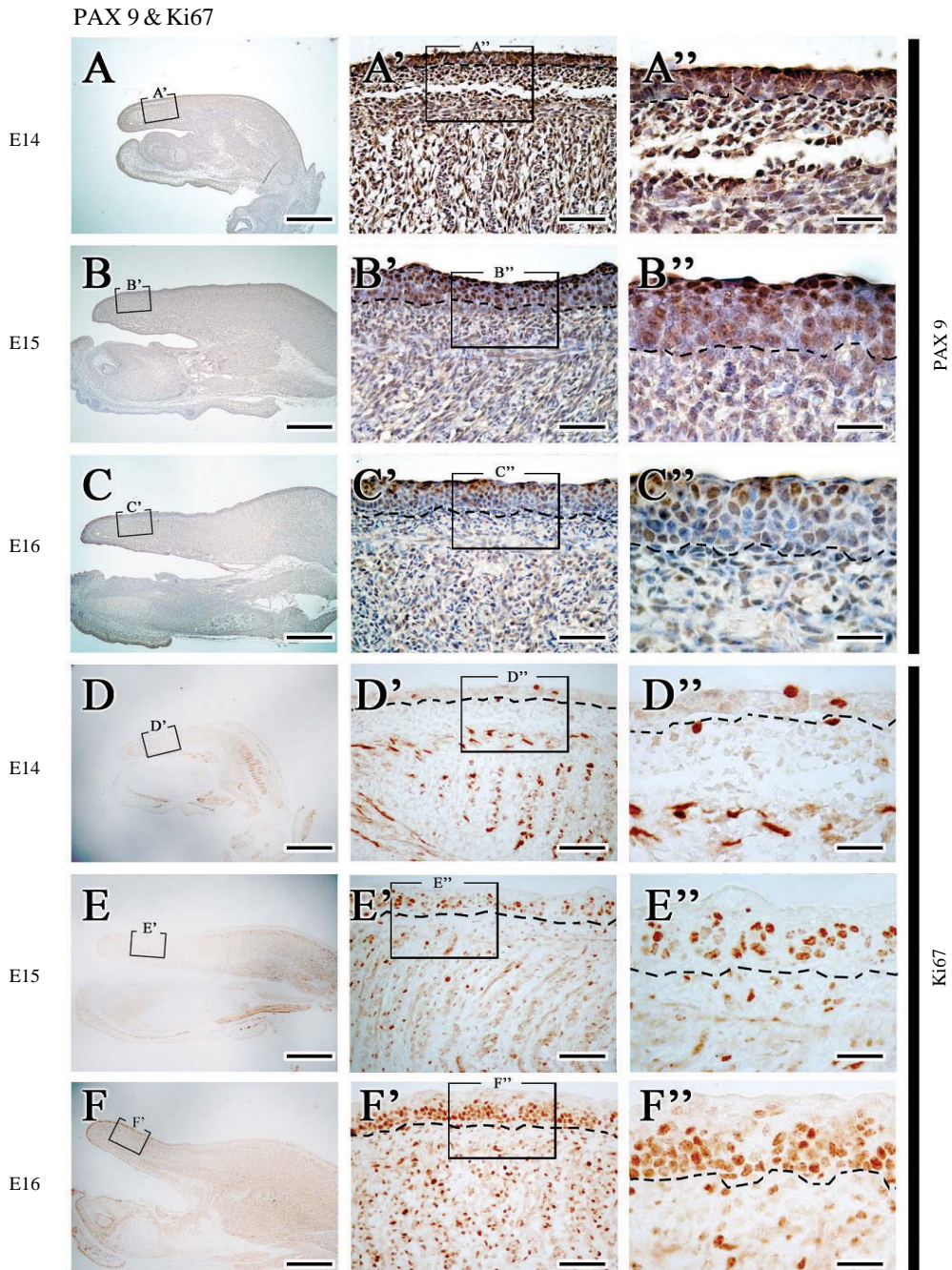


Fig. 4. Immunostaining of PAX 9 and Ki67. (A, B, C) PAX 9. (A, A', A'') E14. (B, B', B'') E15. (C, C', C'') E16. (D, D', D'') E14. (D, E, F) Ki67. (E, E', E'') E15. (F, F', F'') E16. (black arrows indicate positive staining; black dotted lines demarcate basement membrane; scale bars: A, B, C, D, E, F : 500 μ m; A', B', C', D', E', F' : 50 μ m; A'', B'', C'', D'', E'', F'' : 20 μ m).

있었다(Fig. 3A, B). 상피의 분화와 보호장벽의 형성이 본격적으로 진행되고 있는 시기인 E16에서는 사이토케라틴 1의 발현이 실유두의 형성과 관련하여 각질화될 부분에서 나타나는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 3C), 고배율에서 확인한 결과 사이토케라틴 1의 발현이 앞쪽에서 뒤쪽으로 극성(polarity)을 가진 경향으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3C', C'').

사이토케라틴 14의 경우는 사이토케라틴 1과는 다른 발현양상을 확인할 수 있었는데, E14에서는 전반적으로 상피세포에서 넓게 발현되었다(Fig. 3D, D', D''). 상피의 분화 초기인 E14와는 다르게 E15에서는 상피의 분화와 함께 상피세포의 위쪽 부분에서 사이토케라틴 14의 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 3E, E', E''). 이상의 결과를 토대로 발생단계에 따른 사이토케라틴들의 특이적인 발현은 보호장벽의 형성과 상피세포의 분화를 설명할 수 있는 근거가 될 것으로 생각된다. E16에서는 사이토케라틴 1의 발현양상과는 다르지만 상피의 기저층(basal membrane) 쪽에 치우친 사이토케라틴 14의 발현양상을 확인할 수 있었다(Fig. 3F, F', F'').

4. PAX 9 면역조직화학 결과

이전 연구에서 부분적으로 확인된 실유두의 발생과 혀 보호장벽의 형성에 관련된 중요한 인자인 PAX 9의 발현을 면역조직화학방법으로 확인하였다. E14에서 PAX 9의 발현은 사이토케라틴 14와 유사하게 전반적으로 상피세포에 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A, A', A''). 또한 E15에서도 사이토케라틴 14의 발현양상과 비슷하게 상피세포의 위쪽 부분에 분포하고 있는 PAX 9의 발현양상을 확인할 수 있었다(Fig. 4B, B', B''). E16에서도 PAX 9이 상피의 기저층 근처에 발현되는 것을 확인할 수 있었는데(Fig. 4C, C', C''), PAX 9의 전반적인 발현양상이 사이토케라틴 14와 유사함을 확인할 수 있었다. 이 결과를 토대로 상피의 발생을 위해 사이토케라틴들과 PAX 9이 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다.

5. Ki67 면역조직화학 결과

혀 상피의 발생을 정확하게 이해하기 위하여 Ki67을 면역조직화학 염색방법으로 확인하여 상피세포의 증식에 관한 경향을 확인하였다. 혀 상피의 발생 동안 Ki67에 양성으로 반응하는 세포를 E14에서 E16까지 각 시기별로 확인한 결과, 중층상피로 분화가 일어나는 시기의 상피세포에서 Ki67의 발현양상을 확인할 수 있었다. E14에서는 발생이 진행되는 동안 상피세포의 증식이 적은 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 4D, D', D''). E14의 결과와는 달리 E15에서는 증식중인 상피세포를 많이 관찰할 수 있었으며, 대부분의 Ki67 양성을 나타내는 상피 세포들은 주로 기저층 부근에서 관찰되었다(Fig. 4E, E', E''). E16에서도 Ki67의 양성을 나타내는 상피세포들이 주로 기저층에 치우쳐 나타났으며 이는 PAX 9과 사이토케라틴 14의 발현양상이 매우 유사함을 확인할 수 있었다(Fig. 4F, F', F''). 이상의 결과는 혀의 보호장벽과 같은 상피세포의 분화에 사이토케라틴들과 PAX 9의 발현 및 상피세포의 증식이 중요한 역할을 할 것이라고 생각되었다.

고 찰

본 연구에서는 보호장벽을 형성하는 혀 상피의 발생에 대해 형태학적 연구결과를 토대로 상피세포의 발생에 관련이 있는 것으로 보고된 사이토케라틴들과 PAX 9의 발현양상을 확인하여, 혀 상피의 발생기작에 대한 세포 및 조직 수준에서의 의미를 확인하고자 하였다.

사이토케라틴은 상피에서 형태학적인 변화에 앞서 특정 부분에서 나타나는 분화 표지인자이다(Jonker 등 2004). 피부 상피의 기저층세포(basal cell)는 사이토케라틴 5와 14를 발현하고, 상피의 위쪽(apex)에 분화하는 세포는 사이토케라틴 1과 10을 발현하는 것으로 알려져 있다(Song 등 2001). 사이토케라틴 5와 14의 돌연변이는 유전적으로 피부에서 물집이 생기는 질환인 단순성 수포표피박리증

을 유발한다(epidermolysis bullosa simplex). 이러한 사이토케라틴의 발현은 조직마다 다르고, 종간에도 서로 다르다(Song 등 2001).

PAX 9은 DNA 결합 도메인인 “Paired”를 갖고 있는 9개의 전사인자를 갖는 그룹의 일원이며, 쥐에서 가슴샘(thymus), 부갑상샘(parathyroids), 팔다리(limbs), 이차입천장(secondary palate), 치아(teeth), 척주(vertebral column)의 발생에 중요한 역할을 하는 전사인자이다(Neubuser 등 1995, Peters 등 1997, Peters와 Balling 1999, Stockton 등 2000). 성체 생쥐의 경우 PAX 9의 발현이 혀(tongue), 식도(esophagus), 침샘(salivary glands), 가슴샘에 국한되어 나타나는 것이 확인되었다. 특이하게도 PAX 9의 경우 피부에서는 발현되지 않으며 상부 소화기관의 상피 분화에만 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Peters 등 1997, Gerber 등 2002). 따라서 본 연구에서는 구강의 혀 상피와 상관관계가 있을 것으로 생각되는 사이토케라틴 1, 14와 PAX 9의 발현양상을 혀 상피세포의 분화 동안 면밀하게 확인하고자 하였다.

혀의 보호장벽의 형성은 E16에서 시작되어 하루 정도 발생이 더 진행된다면 완성이 되는 것으로 확인되었고(Fig. 1) 이는 중층상피가 형성되는 과정인 E15와 E16의 조직학적 결과와도 일치하였다(Fig. 2). 또한, 혀의 앞쪽 1/3을 기준으로 E14의 단층상피가 E16에서는 중층의 상피로 분화되었다(Fig. 2). 이러한 중층으로의 분화과정은 보호장벽을 형성하는데 있어 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다(Figs. 1, 2). 혀 상피의 분화에 앞서 나타나는 다양한 분화 표지인자의 발현을 확인하기 위하여, 이전의 다양한 조직에서 연구된 사이토케라틴들의 발현양상을 면역조직화학방법으로 확인하였다(Fig. 3). 혀 발생이 진행되는 시기별로 정확한 발현양상에 대한 보고가 없었던 사이토케라틴 1과 14를 혀의 보호장벽 형성과 관련된 상피분화의 중요한 시기라고 판단되는 E14부터 E16까지 그 발현양상을 확인하였다(Fig. 3). 사이토케라틴들의 발현은 조직 및 발생시기 특이적으로 나타났으며 이는 상피의 분화에 사이토케라틴의 발현이 중요한 작용을 할 것으로 생각되었다. 특히 보호장벽의 형성직전에 실유두의 위쪽에

극성을 띄면서 나타나는 사이토케라틴 1의 경우, 혀 보호장벽 형성을 위해 중요한 역할을 하는 각질화에 관여할 것으로 생각되었다.

사이토케라틴 발현을 정확하게 이해하기 위하여 본 연구에서는 Jonker 등(2004)이 PAX 9을 불활성화시킨 생쥐배아의 혀 상피에서 다양한 사이토케라틴의 발현이 감소한다는 보고에 의거하여, PAX 9의 발현을 사이토케라틴들과 비교하기로 하였다. 특정 단백질의 발현 위치와 경향은 발생 동안 기관의 형성을 이해하는 가장 기본적인 방법으로 많이 연구되고 있으며 본 연구에서도 이러한 발현양상의 비교를 통하여 단백질간의 상호작용에 대해 유추를 하고자 하였다. 혀 상피의 발생 동안 PAX 9의 발현이 사이토케라틴 14와 겹쳐서 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 사이토케라틴 14와 PAX 9의 발현이 상피의 발생을 조절하는 중요한 인자가 될 수 있다고 생각되었다. 또한 PAX 9과 사이토케라틴 14의 발현은 Ki67을 이용한 상피세포의 증식양상과 비교해 볼 때, 유사하게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며 이는 상피세포 증식이 혀 보호장벽 형성에 관여하는 중요한 인자로 작용할 수 있을 것이라고 생각된다. 이러한 다양한 상피분화관련 인자들의 발현양상들을 비교해 볼 때, 혀 상피의 분화는 E15에서 본격적으로 시작되며 보호장벽의 형성 이전에 사이토케라틴 14와 PAX 9과 같은 인자들의 발현이 먼저 나타나게 되면서 상피의 분화가 진행되고, 사이토케라틴 1과 같은 각질화 관련 인자가 보호장벽형성에 기여한다고 생각된다.

본 연구에서 확인한 혀 상피의 분화 표지인자들의 발현 결과는 상피의 발생기작을 자세하게 이해하기 위한 유전자 기능실험을 위한 기본자료로 활용될 수 있을 것이며, 보호장벽의 형성과 같은 다양한 상피의 발생을 이해할 수 있는 자료로 활용될 것이다.

참 고 문 헌

Fuchs E, Raghavan S : Getting under the skin of epidermal

- morphogenesis. *Nat Rev Genet* 3: 199-209, 2002.
- Gerber JK, Richter T, Kremmer E, Adamski J, Höfler H, Balling R, Peters H : Progressive loss of Pax 9 expression correlates with increasing malignancy of dysplastic and cancerous epithelium of the human oesophagus. *J Pathol* 197: 293-297, 2002.
- Hardman MJ, Sisi P, Banbury DN, Byrne C : Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* 125: 1541-1552, 1998.
- Iwasaki S, Aoyagi H : Expression of keratin 14 in the basal cells of the lingual epithelium of mice during the morphogenesis of filiform papillae: visualization by fluorescent immunostaining and confocal laser-scanning microscopy in the transmission mode. *Odontology* 95: 61-65, 2007.
- Jonker L, Kist R, Aw A, Wappler I, Peters H : Pax 9 is required for filiform papilla development and suppresses skin-specific differentiation of the mammalian tongue epithelium. *Mech Dev* 121: 1313-1322, 2004.
- Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM : Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* 24: 789-800, 2002.
- Kim JY, Mochizuki T, Akita K, Jung HS : Morphological evidence of the importance of epithelial tissue during mouse tongue development. *Exp Cell Res* 290: 217-226, 2003.
- Lee MJ, Kim JY, Lee SI, Sasaki H, Lunny DP, Lane EB, Jung HS : Association of Shh and Ptc with keratin localization in the initiation of the formation of circumvallate papilla and von Ebner's gland. *Cell Tissue Res* 325: 253-261, 2006.
- Marshall D, Hardman MJ, Byrne C : SPRR1 gene induction and barrier formation occur as coordinated moving fronts in terminally differentiating epithelia. *J Invest Dermatol* 114: 967-975, 2000.
- Marshall D, Hardman MJ, Nield KM, Byrne C : Differentially expressed late constituents of the epidermal cornified envelope. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13031-13036, 2001.
- Neubüser A, Koseki H, Balling R : Characterization and developmental expression of Pax 9, a paired-box-containing gene related to Pax 1. *Dev Biol* 170: 701-716, 1995.
- Peters H, Schuster G, Neubüser A, Richter T, Höfler H, Balling R : Isolation of the PAX 9 cDNA from the human esophagus. *Mamm Genome* 8: 62-64, 1997.
- Peters H, Balling R : Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet* 15: 59-65, 1999.
- Pispa J, Thesleff I : Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol* 262: 195-205, 2003.
- Song KY, Lee S, Suh DH, Kim MK, Min HJ, Chi JG : Expression of cytokeratin 1, 10 and 14 in fetal skin. *Korean J Pathol* 35: 226-231, 2001. (in Korean)
- Steinert PM, Candi E, Kartasova T, Marekov L : Small proline-rich proteins are cross-bridging proteins in the cornified cell envelopes of stratified squamous epithelia. *J Struct Biol* 122: 76-85, 1998.
- Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI : Mutation of PAX 9 is associated with oligodontia. *Nat Genet* 24: 18-19, 2000.
- Theiler K : The house mouse, atlas of embryonic development, 2nd ed., New York, Springer-Verlag, pp 94-121, 1989.
- Wang A, Johnson DG, MacLeod MC : Molecular cloning and characterization of a novel mouse epidermal differentiation gene and its promoter. *Genomics* 73: 284-290, 2001.
- Wong P, Colucci-Guyon E, Takahashi K, Gu C, Babinet C, Coulombe PA : Introducing a null mutation in the mouse K6alpha and K6beta genes reveals their essential structural role in the oral mucosa. *J Cell Biol* 150: 921-928, 2000.

Abstract

Localization Patterns of Cytokeratin 1, 14 and PAX 9 in Mouse Embryonic Tongue Development

Hye-In Jung, Myoung-Uk Jin¹, Je-Yoel Cho, Han-Sung Jung², Jae-Young Kim

Department of Biochemistry, School of Dentistry, IHBR,

¹*Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry Kyungpook National University Daegu,*

²*Division in Anatomy and Developmental Biology, Department of Oral Biology,*

Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration, Brain Korea 21 project,

Oral Science Research Center, College of Dentistry, Yonsei Center of Biotechnology,

Yonsei University, Seoul, Korea

Epithelial differentiation and morphogenesis in skin and oral mucosa were elucidated using various experimental tools. However, tongue epithelial differentiation has not been examined properly yet. In this study, we identified the relationship between morphological changes and localizations of differentiation markers, such as cytokeratins and PAX 9 in mice embryonic tongue development. Protective barrier formation and localization pattern of cytokeratins in tongue epithelium were examined with toluidine blue staining and immunohistochemistry respectively. Localization patterns of PAX 9 and Cytokeratin 14 were coincided during tongue epithelium development. In addition, compared with Ki67 localizations, marker for cell proliferation, localization patterns of PAX 9 and Cytokeratin 14 would suggest that these factors would involve in tongue barrier formation through cell proliferation. Based on these results, tongue epithelial differentiation would begin at E14 with the specific localizations of PAX 9 and Cytokeratin 14 prior to protective barrier formation then Cytokeratin 1, keratinization marker, would involve in protective barrier and filiform papillae formations.

Key words : Tongue epithelium, Development, Protective barrier, Cytokeratin, PAX 9, Proliferation, Differentiation