KISEP Otology Korean J Otolaryngol 1999;42:1349-52

실험적으로 유도된 중이 진주종에서 TM(Thrombomodulin)의 발현에 대한 면역조직화학적 연구

아주대학교 의과대학 이비인후과학교실
박기현 · 박홍준 · 이진석 · 엄주현

Immunohistochemical Study of Thrombomodulin in Experimental Cholesteatoma

Keehyun Park, MD, Hong-Joon Park, MD, Jinsuk Lee, MD and Ju-Hyun Eum
Department of Otolaryngology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : The hyperproliferative character of human cholesteatoma epithelium was confirmed through various hyperproliferation associated antibody expressions. Among the various approaches for evaluating proliferative activity, thrombomodulin (TM) is a cell surface glycoprotein which forms a high affinity non-covalent complex with thrombin and is a differentiation marker for spinous layer keratinocytes. Several animal models have been introduced to study cholesteatoma pathogenesis, among which canal ligation model using Mongolian gerbils is of much interest, because it can potentially provide information on cell differentiation and proliferation of cholesteatoma. In this study, we investigated the hyperproliferative characteristics of canal ligation cholesteatoma by comparing deep meatal skin and retroauricular skin. Another purpose of this study was to provide the morphological basis for further animal studies concerning cholesteatoma pathogenesis. **Materials and Method** : Using immunohistochemical technique with anti-monoclonal antibody, we investigated TM expression in the canal ligation cholesteatoma, deep meatal skin and retroauricular skin of Mongolian gerbil. **Results** : Experimental cholesteatoma induced by canal ligation and deep meatal skin showed TM expression especially in the suprabasal layers. TM expression of experimental cholesteatoma is much more intense than that of deep meatal skin. **Conclusion** : Experimental cholesteatoma revealed an altered differentiation in suprabasal layer, suggesting that this animal model can be used for further study in the epithelial differentiation and proliferation of cholesteatoma. **(Korean J Otolaryngol 1999;42:1349-52)**

KEY WORDS : Immunohistochemical study · Thrombomodulin · Experimental cholesteatoma.

서 론

정상 상피세포의 성장과 사멸 과정에서 세포의 증식은 주로 기저층에서 이루어지고, 세포가 분화하고 성숙되면서 기저상층 또는 각질층에서 케라틴 형성과 함께 세포 탈락이 일어나 자연스럽게 고사하게 된다. 이와 같이 정상 상피세포는 분화와 증식이 서로 균형을 이루고 있지만 진주종은 이러한 항상성이 깨지면서 과증식 및 과각화라는 이상현상을 보이게 된다.

논문접수일 : 1999년 4월 15일 / 심사완료일 : 1999년 9월 30일
교신저자 : 박기현, 442 - 749 경기도 수원시 팔달구 원천동 산5
아주대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (0331) 219 - 5265 · 전송 : (0331) 219 - 5264
E - mail : parkkh@madang.ajou.ac.kr

Thrombomodulin(TM)은 세포막에 존재하는 당단백 물질로 주로 혈관 내피, 림프관, 또는 혈구세포 등에 존재하지만 상피세포에도 존재하는 것으로 알려져 있다.[1)2)] 상피세포에서 TM의 역할은 편평상피암과 같이 상피세포의 과분화를 보이는 질환에서 발현이 증가되는 것을 볼 때[3)] 상피세포의 분화에 관여하며 특히 기저상층의 분화에 관여하는 인자로 알려져 있어[4)] 진주종 상피세포의 분화 상태를 연구하는데 좋을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 Mongolian gerbil의 외이도 결찰을 통하여 실험적 진주종을 유발하고 상피의 분화인자로 알려진 TM에 대한 면역조직화학적 연구를 시행하므로써 진주종 과분화의 성향에 대한 연구에 기초자료를 삼고 아울러 외이도 결찰에 의한 진주종 모델이 향후 진주종 병인 연구에 적합한지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물로는 체중 65 70g의 생후 3 4개월된 Mongolian gerbil 8마리 16귀를 대상으로 하였다. 6마리의 Mongolian gerbil을 이개 후방을 절개한 후 외이도를 결찰하여 진주종의 발생을 유도하였다. 2개월 후 유양돌기포를 박리하여 formaldehyde에 24시간 고정 후 EDTA로 탈석회화 하였다. 조직은 paraffin에 포매 하였다. 이들 중 진주종이 유발되지 않은 2귀를 제외시키고, 진주종이 유발된 10귀를 실험 대상으로 삼았으며 외이도 결찰을 하지 않은 2마리 4귀에서 심부 외이도 상피을 얻고 6귀의 후이개 상피를 채취하여 같은 방식으로 조직을 만들었다. 조직을 5 6 μm로 절편을 만들어 poly-L-lysine으로 도포된 슬라이드에 조직을 부착시켰다. 조직이 부착된 슬라이드를 섭씨 58℃ 오븐에서 12시간 처리하고 xylene으로 탈파라핀 하였다. 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올에 각각 10분간 처리한 후 10분간 증류수에 함수 시켰다. 조직내에 내인성 과산화 효소의 활성을 억제시키기 위하여 과산화수소수에 반응시키고 phosphate buffered saline(10 mM, pH 7.4, PBS)으로 세척하였다. 조직내의 비특이적 항원 항체 반응을 억제하기 위하여 조직을 정상 염소 혈청을 1 : 20으로 희석하여 30분간 처리 후 1차 항체인 goat anti-mouse polyclonal 항TM항체(Santa cruz Biotec Inc. Santa cruz, CA)를 1 : 100으로 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBS에 세척한 후 2차 항체로 biotin과 결합된 biotinylated anti-goat 항체(Vector laboratory Inc. Burlingame, CA)를 1 : 200으로 희석하여 45분간 실온에서 반응시킨 후 PBS에 세척하였다. Avidin biotin complex와 30분간 반응시킨 뒤 PBS에 세척하고 AEC (3-amino-9-ethyl-carbizole)에 5분간 반응한 후 hemotoxylin으로 가볍게 대조 염색하였다. 염색 된 조직을 상피를 기저층(basal layer)과 기저상층(suprabasal layer)으로 나누어 관찰하였다. 1차 항체 대신 PBS를 도말시킨 표본을 음성대조군으로 하여 세포막 주변만 약하게 염색이 된 경우를 약양성(focal staing, F), 400배 시야를 거의 채우는 정도로 염색이 된 경우를 양성(+), 전체가 염색이 안된경우를 음성(-)으로 판정하였으며 우선 100배 현미경 시야에서 염색이 잘 된 부위를 확인하고 400배 시야에서 판정하였다.

결 과

실험적 진주종의 유발(Table 1)

12귀를 외이도 결찰한 결과 10귀에서 진주종이 유발되었으며 Stage II, III의 진주종이 각각 4귀, 6귀에서 관찰되었다.

Table 1. Experimental cholesteatoma

Stage	Number (Ears)
Not induced cholesteatoma	2
I	4
II	6

Stage I : Medial displacement of tympanic membrane by keratin debri
Stage II : Aural cholesteatoma came in contact with the cochlea

Table 2. Thrombomodulin expression in the cholesteatoma, deep meatal skin and retroauricular skin (number of staining / number of test)

	Chole		DMS		RAS	
	B	SB	B	SB	B	SB
TM	-	+ (10/10)	F (1/4)	+ (3/4)	-	F (1/6)

Chole : cholesteatoma
RAS : retroauricular skin
SB : suprabasal cell layer
- : no staining
+ : heavy staining
DMS : deep meatal skin
B : basal cell layer
TM : thrombomodulin
F : focal staining

Thrombomodulin의 발현(Table 2, Figs. 1, 2 and 3)

진주종 상피와 심부 외이도 상피에서 기저상층에는 발현이 되지만 기저층은 발현이 되지 않았으며 후이개 외이도 상피에서는 기저층 및 기저상층 모두에서 발현이 되지 않았다. 심부 외이도 상피와 진주종 상피를 비교할 때 기저 상부층에 발현 된 강도가 진주종 상피에서 더 강하게 보였다.

고 찰

중이 진주종은 중이강이나 유양동내에 존재하는 상피 함입 낭종으로 정의되며 조직학적으로는 중층의 편평상피와 표피각질로 구성된 기질과 상피하 결합조직인 육아조직으로 이루어져 있다.[5)6)] 진주종은 정상 고막이나 외이도 상피와 비교할 때 상피하 염증조직 외에는 조직학적 차이가 발견되지 않는다. 정상 조직의 성장 및 사멸은 기저세포가 증식하고 기저 상부 세포로 분화하면서 성장 이동하여 결국 각질층에 도달하여 각질을 형성하고 apoptosis되는 운명을 거치게 된다. 정상 상피 세포는 증식과 분화가 균형을 유지하는데 비해 진주종에서는 이 균형이 깨지면서 지나친 증식과 분화가 가속화되어 과각화를 이루게 된다. 결국 이런 현상이 진주종 특유의 특성인 골파괴 및 합병증 유발에 한 인자로 작용하게 되는데 최근 분자 생물학적 기법이 발전하면서 이러한 진주종의 병리 기전에 대한 연구가 활발하게 이루어져 TNF-α,[7)] TGF-α,[8)] TGF-β,[9)] EGF,[10)]

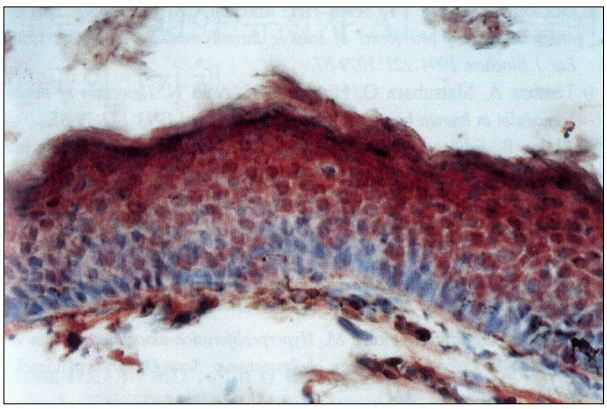

Fig. 1. Immunostaining of normal retroauricular skin : Thrombomodulin-positive cells are rarely observed in the whole layer of epithelium (ABC immunostain, orginal magnification ×400).

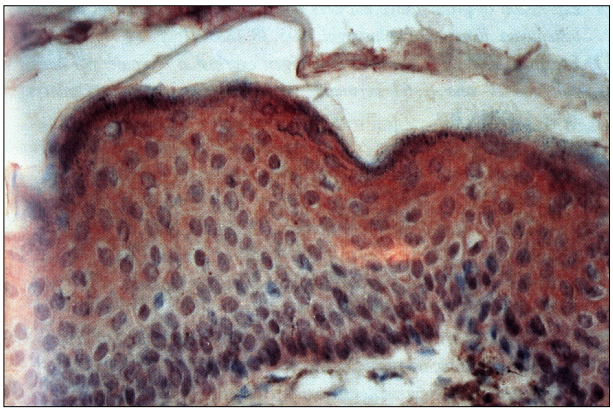

Fig. 2. Immunostaining of deep meatal skin : Thrombomodulin-positive cells are mainly observed in the suprabasal layers of epithelium (ABC immunostain, original magnification ×400).

EGFR,[10] Ki-67,[11] IL-1,[12] involucin,[13] filaggrin,[13] PCNA[14] 등 여러 가지 증식 및 분화인자에 대한 연구가 계속되고 있다.

Thrombomodulin은 혈관 내막에 존재하며 혈액 응고의 역할을 하는 인자로 처음 소개되었고, 임파 내막, 뇌막, 흉막, 심근 내막, 장간막, 근세포, 적혈구, 백혈구에도 존재하지만 분비 상피나 연골조직, 골조직, 간이나 신장 실질에는 존재하지 않는 것으로 알려져 있다.[1)2)] 최근에는 TM이 상피세포의 기저상층에도 존재한다고 알려져 있다.[3)4)] 아직까지는 상피세포의 TM의 기능에 대해서는 확실하게 알려지지는 않았지만 여러 종류의 폐암 중 TM은 편평상피암에서는 그 발현이 증가되고 선암이나 원주세포종 등 상피에서 기인하지 않는 폐암에서는 그 발현을 볼 수 없으며,[3)] 피부암에서도 편평상피암에서는 발현이 증가 되지만 발생 근원이 다른 기저세포암에서는 발현이 되지 않는다고 보고되고 있어[4)] TM은 기저층의 분화와는 관계없이 기저상층의 분화에 관여하는 preterminal 분화인자로 알려져 있다.[3)4)] 또한 TM은 N-terminal기에 lecitin과 유사한 영역을 가지고 있어 세포간 유착에도 관여하는 물질로 알려져 있다.[3)4)] 하지만 상피세포내 TM은 혈관내로 노출이 되지 않고 있으며 thrombin의 축적이 상피세포에서는 관찰되지 않아 혈액 응고 작용에는 관계하지 않는 것으로 알려져 있다.[2)] 본 연구에서 후이개 상피에 비해 심부 외이도 상피나 진주종 상피의 기저상층에서 더 진하게 염색된 것을 볼 때 진주종 상피와 심부 외이도 상피는 기저상층의 과분화가 일어나고 있으며 진주종 상피가 심부 외이도 상피보다도 더 심한 분화가 일어나고 있음을 시사하는 소견이라 생각되었다. 사람에서 진주종이 증상을 보이게 될 때는 병이 진행되어 병의 진행과정을 규명하기에는 한계가 있을 수 있어 실험적 동물 모델을 통한 진주종의 연구는 진주종의 병인을 연구하는데 더 유용한 점이 많다. 현재까지 동물 모델을 통한 실험적 진주종의 유발 방법에는 중이강내에 propylene glycol같은 화학물질을 주입하거나,[15)] 이관을 폐쇄하는 방법,[16)] 외이도 결찰을 통하여 진주종을 유발하는 방법,[17)] 또는 실험동물의 중이강에 직접 피부 이식을 하는 방법[18)] 등이 있다. 저자들은 외이도 결찰을 통해 진주종을 유발하였는데 이 방법이 중이에 손상을 가하지 않아 손쉽고, 또한 진주종 유발율이 높기에 이 방법을 사용하였다. 진주종을 유발시키는 실험 동물로 Mogolian gerbil은 유양돌기포가 상대적으로 크고, 사육하기도 쉬우며, 쉽게 구할 수 있는 장점 외에도 수술적으로 외이도를 폐쇄하면 고양이, 기니픽, 생쥐, 흰쥐들과는 달리 게라틴 축적이 계속되어도 케라틴 형성이 억제되지 않고 가속화되어 고막이 내측으로 밀리고 중이 진주종을 형성한다는 장점을 가지고 있다.

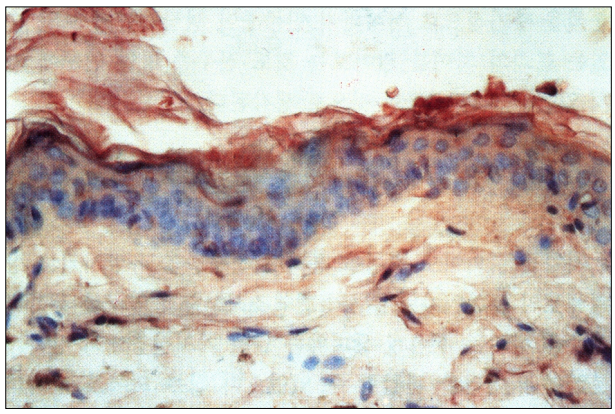

Fig. 3. Immunostaining of experimental cholesteatoma : Thrombomodulin-positive cells are mainly observed in the suprabasal layers of epithelium. It is more intense than that of deep meatal skin (ABC immunostain, original magnification ×400).

본 연구에서는 외이도 결찰을 통하여 발생한 진주종의 stage에 따른 TM의 발현의 차이를 보지는 못하였다. 외이도 결찰을 통해 유발된 진주종이 stage가 높아질수록 과분화 및 과증식 성향이 더 강할 것으로 예상되어 TM을 비롯한 여러 분화 및 성장 표지인자의 발현도 더 강하리라고 추측되어지는데 추후에는 정성적인 분석만이 아닌 정량적인 분석을 추가적으로 시행하여 진주종이 성장하면서 보일 수 있는 분화의 차이를 알아보는 것도 진주종 병인 연구에 가치 있는 자료를 제공할 것으로 생각된다.

결 론

저자들은 외이도 결찰을 통하여 진주종을 유발시키고 상피세포의 분화인자인 TM의 면역조직화학적 연구를 통하여 진주종 상피는 후이개 상피와는 달리 기저상층에서 강하게 분화가 일어남을 관찰할 수 있었으며 심부 외이도 상피의 경우에도 후이개 상피와는 달리 진주종 상피와 유사한 분화양상을 나타냄을 관찰할 수 있었다. 진주종의 병인 중 하나로 알려진 과증식 및 과분화 현상은 기저상층의 정상보다 심한 분화가 한 원인임을 추정할 수 있었고, 심부 외이도 상피는 진주종을 유발시킬 수 있는 잠재능력을 가지고 있음을 알 수 있었다. 또한 진주종의 발병기전을 연구하는데 외이도 결찰을 통한 진주종의 실험 모델은 좋은 방법임을 확인할 수 있었다.

중심 단어 : 면역 조직화학적 연구 · 실험적 진주종 · 트롬보모듈린.

REFERENCES

1) Jackson DE, Mitchell CA, Salem HH, Hayman JA. *Immunohistochemical localization of thrombomodulin in normal skin and skin tumors. J Pathol 1995;175:421-32.*
2) Mizutani H, Ohyanagi S, Hayashi T, Groves RW, Suzuki K, Shimizu M. *Functional thrombomodulin expression in epithelial skin tumors as a differentiation marker for suprabasal keratinocytes. Br J Dermatol 1996;135:187-93.*
3) Jackson DE, Tetaz TY, Selen HH, Mitchell CA. *Purification and characterization of two forms of soluble thrombomodulin in human urine. Eur J Biochem 1994;221:1079-87.*
4) Tamura A, Matsubara O, Hirokawa K, Aoki N. *Detection of thrombomodulin in human lung cancer cells. Am J Pathol 1993;142:79-85.*
5) Aberg B, Edstrom S, Bagger-Sjoback D. *Morphologic developmental cholesteatoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1993;119:272-5.*
6) Palva T. *The pathogenesis and treatment of cholesteatoma. Acta Otolaryngol (Stockh) 1990;109:323-30.*
7) Yan S, Huang C. *Tumor necrosis factor alpha in middle ear cholesteatoma and its effect on keratinocytes in vitro. Ann Otol Rhinol Larygol 1991;100:157-61.*
8) Bujia J, Schilling V, Holly M. *Hyperproliferation-associated keratin expression in human middle ear cholesteatoma. Acta Otolaryngol (Stockh) 1993;113:364-8.*
9) Yeo SW, Park YS, Kang JH, Suh BD. *Expression of transforming growth factor beta in middle ear cholesteatoma. Korean J Otolaryngol 1997;40:719-24.*
10) Min WS, Jung HS, Park JY, Jun BH. *Immunohistochemical study on the expression of proliferative markers of the squamous epithelium of the cholesteatoma. Korean J Otolaryngol 1995;38:1884-91.*
11) Ergun S, Zheng X, Carlsoo B. *Antigen expression of epidermal markers, collagen IV and Ki-67 in middle ear cholesteatoma. Acta Otolaryngol 1994;114:295-302.*
12) Marenda SA, Aufdemorte TB. *Localization of cytokines in cholesteatoma tissue. Otolaryngol Head Neck Surg 1995;112:359-68.*
13) Stammberger M, Bujia J, Kastenbauer E. *Alteration of epidermal differentiaton in middle ear cholesteatoma. Am J Otol 1995;16:527-31.*
14) Chang KH, Cho HC, Hwang CS, Yang HS, Kim CG, Park ES. *Expresssion of PCNA in cholesteatoma and auditory meatal skin. Korean J Otolaryngol 1996;39:1832-8.*
15) Vassali L, Harris DM, Gradini R. *Propylene glycol induced cholesteatoma in chinchilla middle ear. Am J Otolaryngol 1988;9:180-8.*
16) Steinbach E. *Experimental studies on cholesteatoma formation. Acta Otolaryngol (Belg) 1980;34:56-61.*
17) Park HJ, Chun YM, Park K. *Experimentally induced aural cholesteatoma in the gerbil. Korean J Otolaryngol 1995;38:330-3.*
18) Park K, Chun YM, Kim SM, Lee DH. *Experimental cholesteatoma by transplanting a free skin graft in the bulla of Mongolian gerbil. Korean J Otolaryngol 1996;39:1138-43.*