KISEP Original Articles
臨床耳鼻：第10卷 第2號 1999
J Clinical Otolaryngol 1999;10:178-183

중이 진주종에서 형질전환성장인자 α 및 β의 발현에 관한 연구

조선대학교 의과대학 이비인후과학교실
박영균 · 도남용 · 나한조 · 박성용 · 마현웅 · 최영환

Immunohistochemical Study on TGF-α & β Expression in Cholesteatoma

Young-Gyun Park, MD, Nam-Yong Doh, MD, Han-Jo Na, MD,
Sung-Yong Park, MD, Hyun-Woong Ma, MD and Young-Hwan Choi, MD
Department of Otolaryngology, College of Medicine, Chosun University, Kwang-ju, Korea

－ ABSTRACT －

Background and Objectives：The cholesteatoma consists of keratinizing squamous epithelium in middle ear cavity. These abnormal behavior of cholesteatoma epithelium seems to be induced by presence of a heavy immune cell infiltrate releasing different cytokines and growth factor in high amount. **Materials and Method**：This study investigated the presence of transforming growth factor-alpha (TGF-α), beta (TGF-β) in the mucosa of cholesteatoma specimens of human middle ear cholesteatoma tissue (N=17) and external auditory canal skin were obtained from patients during ear surgery as a control group. **Results**：Immunostaining for TGF-α showed a cytoplasmic staining pattern in epithelial cells of normal skin and cholesteatoma. In normal skin samples the expression of TGF-α was restricted to epithelial cells in the basal layer and parabasal layer but all epithelial cell layers in cholesteatoma were positive with prominent staining of the basal cells. A number of infiltrated cells in cholesteatoma matrix also expressed TGF-α immunostaining. Cholesteatoma tissue showed a strongly enhanced expression of TGF-β in lymphocytes and fibroblasts of stroma, particularly in an area of heavy inflammatory infiltration. **Conclusion**：According to the well known roles of the TGF-α and β, these results suggest that TGF-α is an important factor for the hyperproliferative behavior of cholesteatoma epithelium and TGF-β protect the infiltration into the matrix of cholesteatoma. **(J Clinical Otolaryngol 1999; 10:178-183)**

KEY WORDS：Cholesteatoma · TGF-α· TGF-β.

서 론

진주종성 중이염은 만성적인 염증과 재발을 특징으로 하며 주위 골조직을 파괴하여 두개내 합병증을 초래하기도 하는 질환으로, 침범하는 편평상피에 의해서 점막이 치환되며,[1)2)] 발생원인과 병인에는 아직도 많은 논란이 있지만 상피세포의 침입설, 증식설, 분화설 등으로 설명되고 있다.[1)]

진주종의 형성은 기질내에 면역세포의 침윤과 상피세포의 이동 및 증식과 관계가 있으며,[3)4)] 최근 연구에서 세포의 성장과 분화를 조절하는 사이토카인과 성장인자가 관여한다고 밝혀졌으며, 면역조직화학적 염색방

논문접수일 : 1999년 3월 30일
심사완료일 : 1999년 9월 1일
교신저자 : 도남용, 510 - 717 광주광역시 동구 서석동 588
조선대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (062) 220 - 3200 · 전송 : (062) 225 - 2702
E - mail : NYDO.@Mail.Chosun.ac.kr

법으로 진주종 조직에서 현재까지 종양괴사인자(Tumor necrosis factor - α&β, TNF - α&β), 표피성장인자(Epidermal growth factor, EGF), 형질전환성장인자(Transforming Growth Factor - α&β, TGF - α&β), IL - 1과 6 등이 국소 확인되었으며,[2-6] 이들 사이토카인과 성장인자들이 진주종의 발생과 증식에 중요한 역할을 하고 있음이 알려져 있다. TGF - α는 활성화된 면역세포로부터 성장인자의 발현을 촉진시킴으로서 진주종의 제한되지 않은 비정상적인 성장에 관여하며,[7][8] TGF - β는 세포의 성장과 이동, 세포기질의 합성과 분해를 조절하고,[9] 진주종 성장을 억제할 것으로 생각되고 있다.[6]

저자는 진주종 조직에서의 TGF - α 및 β의 발현정도 그리고, 이들의 기능에 대한 기초자료를 얻고자 수술시에 얻은 진주종 조직과 정상 외이도 피부를 대상으로 TGF - α 및 β의 발현정도 및 양상을 면역조직화학적 염색방법으로 관찰하였다.

재료 및 방법

재 료

진주종성 중이염으로 수술받은 환자 17예(17귀)의 수술시 채취한 진주종 조직과 대조군으로 동일 환자의 염증반응이 없는 외이도 피부를 채취하여 포르말린 고정후 파라핀 포매조직을 제작하였다. 면역조직화학적 검사에 사용된 1차 항체는 monoclonal mouse antihuman antibody로 TGF - α는 Cat#GF10(Calbiochem, Cambridge, MA), TGF - β는 MCA 797(Serotec Ltd, Oxford, England)를 사용하였다. 2차 항체는 LSAB(labelled streptavidin biotin) kit(DAKO, CA, USA)를 사용하였고, 발색제는 AEC(3 - amino - 9 - ethyl - carbazole) substrate chromogen system(DAKO, CA, USA)을 사용하였다.

방 법

조직학적 검색

검체를 10%중성 포르말린에 고정후 통상적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작한 후 4 5 μm 두께의 박절편을 만들어 hematoxylin과 eosin 이중염색을 실시하여 조직학적 검색을 실시하였다.

면역조직화학적 염색

선택된 파라핀 포매 조직을 4 5 μm두께의 절편으로 제작하여 probe on plus slide(Fisher Scientific, USA)에 올린후 68℃ 열판에 1시간 이상 방치시킨후 탈파라핀 과정을 거쳐 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 면역조직화학적 염색과정을 하기 앞서 항원성을 살리기 위하여 검체 슬라이드를 citrate buffer에 넣고 laboratory microwave - oven에 97℃로 고정후 15분간 가열하고 microwave - oven에서 꺼내 실내에 20분간 방치시킨 다음 DAKO사의 LSAB(labelled streptavidin biotin)kit를 이차항체로 사용하여 면역조직화학적염색을 시행하였다. 발색제는 AEC(3 - amino - 9 - ethylcarbazole) kit를 이용하여 ABC(av - idinbi - otin immunoperxidase complex)법으로 시행하였으며 Harris hematoxylin으로 20초간 대조염색을 실시하였다.

면역조직화학적 염색의 판독기준

TGF - α는 염색정도를 4등급으로 분류하여 염색이 되지않는 경우를 (-), 기저세포층 및 방기저세포층에 대조군 상피정도의 양성반응을 보이는 경우를 (++), (+++)이하이지만 확실한 양성인 경우는 (+)로, 대조군 상피의 기저세포층 및 방기저세포층에 양성반응을 보이는 정도 이상으로 강하게 염색된 경우를 (+++)로 분류하였으며 특히, (+++)는 (++)에 비해 간질에서의 염색정도가 더 높은 경우로 하였다.

TGF - β는 염색정도를 4등급으로 분류하여, 염색이 되지않는 경우를 (-), 간질내에 양성으로 염색되는 세포가 하나라도 존재하며 상피의 기저세포층에서만 양성염색 세포가 존재하면(+), 100배 시야에서 가장 강한 양성반응을 보이는 시야를 선택하여 그곳 간질 구성 세포의 10%미만에서 양성인 경우 및 기저, 방기저세포에 강한 양성을 보이는 경우를 (++), 간질구성 세포의 10% 이상에서 양성인 경우 및 상피 5층이상, 전층의 세포가 양성인 경우를(+++)로 분류하였다.

결 과

정상 외이도 조직과 진주종의 TGF-α와 β의 면역조직화학적 염색에 대한 발현양상을 광학 현미경하에서 관찰한 결과, TGF-α는 정상 외이도 조직상피에서는 상피세포의 기저세포층에서 양성반응을 보였으나(Fig. 1), 진주종에서는 대조군에 비하여 더 강한 기저세포층의 양성을 보일뿐만 아니라, 방기저세포층 및 증례에 따라 전상피층이 강한 양성반응을 보이는 경우도 있었다(Fig. 2). 진주종의 간질에서는 염증세포, 섬유아세포, 혈관내피세포에서 TGF-α에 강한 염색반응을 보였다(Fig. 3).

TGF-β는 정상 외이도에서 간질내의 소수의 림프

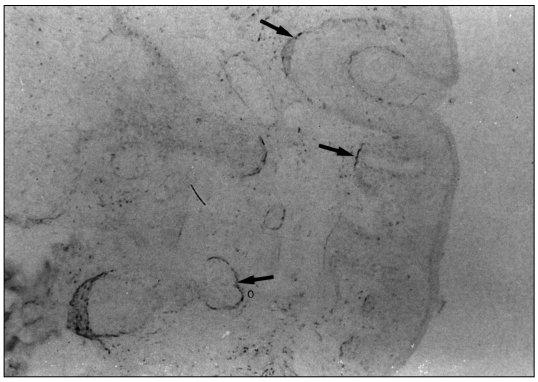

Fig. 1. Positive immunostaining of the basal cell layer for TGF-a in normal EAC skin (ABC method, ×100).

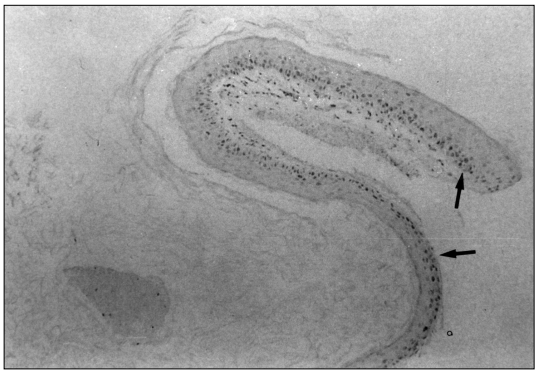

Fig. 2. Positive immunostaining of the basal and parabasal cell layer for TGF-a in cholesteatoma. Note a few positive staining of lymphocytes in subepithelial matrix (ABC method, ×100).

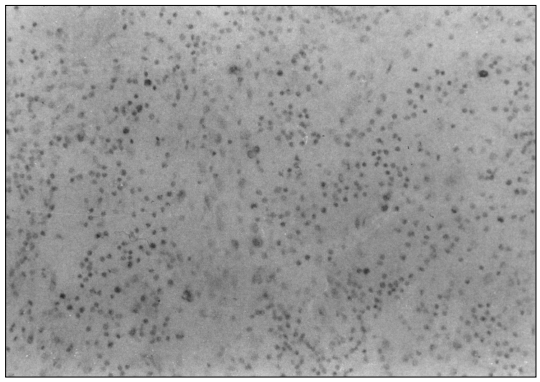

Fig. 3. Positive TGF-a immunostaining of lymphocytes, macrophages and fibroblasts in inflammed matrix of cholesteatoma(ABC method, × 200).

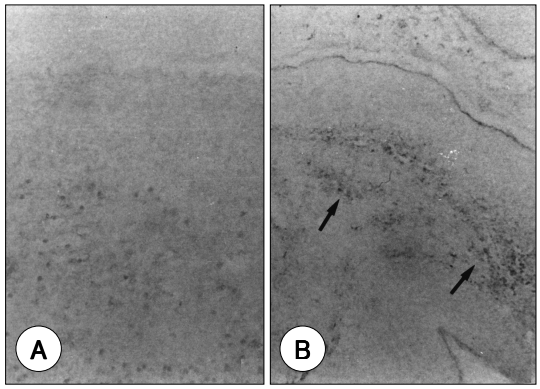

Fig. 4. A : Negative immunostaining of epidermis and a minute scattered of positive immunostaining of matrix lymphocytes for TGF-β in normal EAC skin(ABC method, ×200). B : Positive immunostaining in the subepithelial matrix for TGF-β in cholesteatoma(ABC method, ×100).

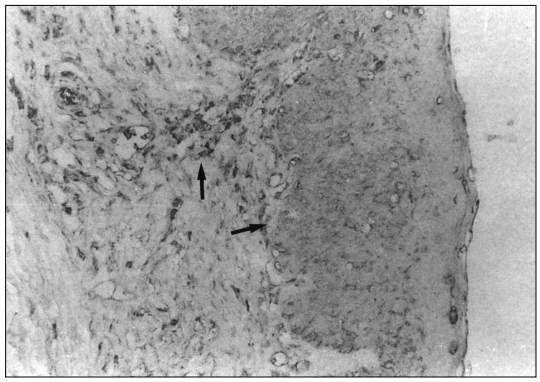

Fig. 5. Positive immunostaining of the basal, parabasal layer and matrix for TGF-b in cholesteatoma(ABC method,×200).

Table 1. TGF-α & β expression on cholesteatoma tissues

Primary Ab Stainability	TGF-α	TGF-β
-	4(23.52)	1(5.88)
+	5(29.44)	8(47.08)
++	2(11.75)	4(23.52)
+++	6(35.29)	4(23.52)
Total	17(100%)	17(100%)

구와 섬유아세포에서 염색되었으나 상피세포는 염색되지 않았다(Fig. 4a). 반면에 진주종에서는 상피하부의 간질에 선상으로 양성을 보이거나(Fig. 4b), 상피의 기저세포층은 물론 방기저세포층 혹은 상피전층에 강한 양성을 보였고, 간질내에서는 림프구나 섬유아세포에서 강한 양성소견을 보였다(Fig. 5).

진주종성 중이염에서 TGF - α에 양성을 보인 경우는 13예(76.48%)였으며 이중(++)이상의 강양성 반응을 보인 경우가 8예(47.04%)였으며, TGF - β에 양성을 보인 경우는 16예(94.12%)였고 이중(++)이상의 강양성 반응은 8예(47.04%)였다(Table 1).

고 찰

중이 진주종은 중이내에 각질화된 편평상피로 구성되어 있고, 진주종의 발생은 만성적인 염증과 관계가 있으며 침범하는 편평상피에 의해서 점막이 치환되고,[1)2)] 이 편평상피는 정상 상피세포에 비하여 과성장의 특성을 보인다고 하며 국소적인 성장과 이소골과 주변 골 조직의 흡수를 유도하게 된다.[1)] 진주종 형성의 여러 관점은 기질내 면역세포의 침윤과 상피세포의 이동 및 증식과 관계가 있다.[3)4)] 진주종에서의 조절이 불가능한 상피 성장은 사이토카인과 성장인자(TGF - α, EGF, IL - 1,6)를 분비하는 면역세포의 침윤으로 유도되는 듯하며,[2)7)] 이러한 사이토카인이 섬유아세포, 파골세포, 염증세포를 자극하여 작용부위에서 조직의 파괴와 조직 개형(remodeling)을 시킨다고 한다.[6)]

사이토카인은 감염부위의 염증세포에 의해 유리되며 염증과 면역반응에 있어 강력한 중재자로서 TNF - α와 β, TGF - β1과 TGF - β2, IL - 1과6이 진주종 상피와 상피하 기질에 국한되어 있다.[2 - 6)]

형질전환성장인자 알파(transforming growth factor - alpha, TGF - α)는 50개의 아미노산 펩타이드로 구성되어 있으며 EGF와 약 35%의 동일한 염기서열을 보이나, EGF보다 더욱 강력한 생물학적 활동성을 갖는다.[10)] TGF - α는 여러 인간종양에서 증명되는데, 이는 종양유도 및 혈관생성을 담당하는 폴리펩타이드로서,[10)] 진주종의 혈관주위에 다량 침윤된 대식세포에서 의미있는 양의 TGF - α 생산이 증명되어, 진주종의 신생 맥관형성은 진주종 실질내의 활성화된 면역세포로부터 성장인자 발현이 촉진되어 야기됨을 알 수 있다.[8)] Wright 등[11)]은 TGF - α가 심하게 결핍된 waved - 1 mutant mouse를 이용하여 조직검사를 시행한 결과 외이도와 고막에 비정상적으로 성장한 상피를 관찰함으로써 진주종 형성에 TGF - α가 관여할 것이라 하였다. Ergun 등[12)]은 TGF - α와 EGFR(epidermal growth factor receptor)에 의한 자가분비(autocrine) 성장자극은 중이강내에서 진주종상피의 제한없는 성장에 관여할 것으로 생각하였고, TGF - α는 정상 인간 각질형성세포에서 생성되며, 세포 성장을 촉진하는 자가 성장인자로 EGFR에 의해 중재된다고 하였다.[13)] Sudhoff 등은 진주종 상피에서 TGF - α, EGFR, IL - 1의 과발현을 발견하였고 Tanaka 등[14)]도 진주종의 상피가 TGF - α의 과성장촉진 상태에 실제로 있는지는 확실하지 않지만, 상피하 염증세포 침윤이 심했던 지역에서 증식능력이 높았고 주변간질에서 림프구와 대식세포의 과침윤을 발견하였다.[2)]

TGF - α는 자가분비 성장자극에 기초한 상피성장을 촉진하는 것으로 알려져 있으며[14)] TGF - α와 IL - 1에 의한 진주종 편평상피의 자가분비 자극뿐만 아니라 면역세포에 의한 측분비 자극(paracrine)도 관계가 있으며, 이러한 인자들이 중이강내의 진주종의 조절할 수 없는 성장에 관여한다.

형질전환성장인자 베타(transforming growth factor - beta, TGF - β)는 25kD의 분자량을 갖는 carboxyl - 단말의 112 아미노산 전구물질에서 생성된 단백질로 생물학적으로 불활성화된 큰 복합체의 한 부분으로 구성되어 있다. TGF - β는 1에서 5까지의 아형이

존재하며, 아미노산 구성에서 70 80%의 동일성을 보이고, 인간에서는 TGF - β1, β2, β3만이 존재한다고 하며, β1과 β2만이 생물학적으로 특성이 있어 TGF - β1과 β2를 일반적으로 TGF - β라고 부르는데 이들은 N - 단말에서 64 82%의 동일 유전자를 공유한다.[3] 활성화된 TGF - β는 창상치유, 맥관형성, 면역억제, 종양의 침입과 전이의 조절, 세포증식을 포함하는 표적세포의 성장과 생리학적 과정에 의존해서 여러과정의 조절에 관여한다.[13]

TGF - β의 아형중 TGF - β1과 β2만이 생물학적인 특징 및 동일한 기능을 보이며 간엽세포의 성장촉진과 정상과 종양유도 상피세 증식의 억제 및 분화에서 비슷한 역할을 한다고 보고하였다. TGF - β는 체외에서 실험할때는 각 아형이 거의 같은 작용을 하지만 체내에서는 작용부위와 단계마다 각 아형의 효과가 달라서, TGF - β1과 TGF - β2는 생체내에서는 서로 교환할 수 없으며 시 · 공간적으로 기능이 다르다고 주장되고 있다.[15] TGF - β1은 세포외 기질의 생성과 조직개형을 촉진시키고 염증과정을 조절하며 조혈전구세포의 증식을 억제한다고 한다.[16] 또한 TGF - β2는 개체의 발달에 중요하며, 강력하게 중배엽분화를 자극한다. 대식세포는 염증에 의해 손상된 조직의 치료 및 상처 치유에 필요하며, 대식세포에 의해서 생산되는 세포독성 물질은 내피세포, 섬유아세포, 실질세포에 손상을 주는데 TGF - β1과 TGF - β2에 의해서 불활성화 된다.[17] TGF - β는 염증반응에서 중요한 다른 종류의 사이토카인의 활동성을 감소시키며, 연골세포에서 IL - 1의 활동성 억제 및 IL - 1 수용체의 하향조절,[18] 상피하 기질의 간질세포나 염증세포의 IL - 1 수용체 하향조절에 관여하여 진주종 상피의 증식을 억제한다.[3] 또한 골과 결체조직에 강력한 작용을 하며, 조골세포의 증식, 분화 및 여러 골단백 형성의 상향조절과 파골세포 전구세포의 복제와 분화를 억제함으로써 파골세포의 형성을 감소시키고 흡수소와(resorption lacunae)의 형성과 다핵형화(multinucleation)의 억제에 의해서 이미 형성된 파골세포의 활동성을 감소시킨다.[19] TGF - β는 섬유아세포을 촉진시키고, 새로이 형성된 결체조직을 파괴하는 단백분해 효소의 활동을 억제하여 새로운 육아조직이 형성되며[20] TGF - β1과 TGF - β2는 방어기능이 있으며, 또한 이들의 항염증작용과 파골세포, 각질세포 억제작용은 진주종과 연관된 증식과 그 결과로서 생기는 조직파괴를 늦출 수 있고, 진주종 증식부위의 골과 연조직의 보호작용을 하게 된다.[3]

TGF - β는 염증반응의 초기에는 혈소판에 의해서 유리되며, 추후 염증반응 자체에 의해서 유리되며 tenascin과 fibronectin같은 각각의 기질단백의 합성을 촉진함으로써 진주종에서 세포외 기질의 중요한 변화로 인한 tenascin과 fibronectin의 증가는 진주종 형성의 과증식과 관련된 조절되지 않는 세포 - 기질 상호작용을 보여준다.[15]

본 연구에서는 파라핀 포매에 의한 면역조직화학적 염색을 통하여 진주종 상피와 정상 외이도 상피의 TGF - α와 β의 발현 양상을 관찰하였다. TGF - α는 정상 외이도에서는 상피세포의 기저세포층에서만 염색되는것에 반하여, 진주종에서는 정상 상피보다 더 강한 기저세포층 염색뿐만 아니라 간질내의 염증세포, 섬유아세포, 혈관내피세포에 강한 염색 반응을 보여 각질형성세포나 면역학적으로 활성화된 대식세포에서 분비된 TGF - α가 다시 각질형성세포를 증식시키며, 진주종의 과성장에 중요한 인자로 작용할 것으로 사료된다.

TGF - β는 정상 외이도에서는 간질내 소수의 림프구와 섬유아세포에서 염색되었으나 상피세포는 염색되지 않았다. 그러나 진주종에서는 상피세포에서 강한 양성을 보일 뿐 아니라 간질내에서도 림프구나 섬유아세포에서 강한 양성 소견을 보여 진주종의 기질내의 침윤을 방어할 것으로 사료된다.

결 론

중이 진주종의 병인에 TGF - α와 β의 역할을 규명하고자 면역조직화학적발현을 연구한 결과, 중이 진주종 17예에서 TGF - α는 13예(76.48%), TGF - β는 16예(94.12%)에서 발현되었으며 TGF - α는 진주종의 기저세포층에서 정상 외이도 조직보다 강한 양성반응을 TGF - β는 간질내의 림프구와 섬유아세포에서 강한 반응을 보였고 정상외이도 조직과는 달리 상피세포

에서는 양성반응을 보였다. 이상의 결과로 TGF - α는 진주종상피의 과성장에 관여하는 것으로 생각되고 TGF - β는 진주종의 기질내의 침윤을 방어할 것으로 사료된다.

중심 단어 : 중이진주종 · TGF - α · TGF - β.

REFERENCES

1) Broekaert D. *The problem of middle ear cholesteatoma; etiology, genesis and pathology. A Review Acta Otorhinolaryngol Belg 1991;45:355-67.*
2) Sudhoff H, Borkowski G, Bujia J, Hidmann H, Fisseler-Eckhoff A. *Immunohistochemical studies with middle ear mucosal remmants in cholesteatoma. HNO 1997;45:630-5.*
3) Park GT, Woo GH, Jo JH, Jo JS, Park GY. *Study of cholesteatoma epithelial cell growth faciliation by transforming growth factor- α Korean J Otolaryngol 1996;39:561-7.*
4) Park CW, Chang YH, Tae G, Kim SG, Lee GC. *Study of TGF- β expression on the cholesteatoma tissue. Korean J Otolaryngol 1997;40:69-75.*
5) Durum SK, Oppenheim JJ. *Macrophage-derived mediators: interleukin-1, tumor necrosis factor, interleukin-6, interferon, and related cytokines. In: Paul WE, editor. Fundamental immunology. 2nd ed. New York; Raven Press Ltd;1989. p.639-61.*
6) Marenda SA, Aufdemorte TB. *Localization of cytokines in cholesteatoma tissue. Otolaryngol Head Neck Surg 1995; 112:359-68.*
7) Schilling V, Holly A, Bujia J, Schulz P. *Autocrine growth mechanisms of cholesteatoma epithelium. Laryngorhinootologie 1993;72:319-23.*
8) Stammberger M, Holly A, Bujia J. *Immunohistochemical studies of vascularization of cholesteatoma. Laryngorhinootologie 1993;72:170-3.*
9) Bernard JA, Lyons RM, Moses HL. *The cell biology of transforming growth factor- β Biochem Biophys Acta 1990;1032:79-87.*
10) Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R. *Transforming growth factor- α a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. Science 1986;232:1250-3.*
11) Wright CG, Robinson KS, Meyerhoff WL. *External and middle ear pathology in TGF- α deficient animals. Am J Otol 1996;17:360-5.*
12) Ergun S, Zheng X, Carlsoo B. *Expression of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in middle ear cholesteatoma. Am J Otolaryngol 1996;17: 393-6.*
13) Welch DR, Fabra A, Nakajima M. *Transforming growth factor- β stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:7678-82.*
14) Tanaka Y, Shiwa M, Kojima H, Miyazaki H, Kamide Y, Moriyama H. *A study on epidermal proliferation ability in cholesteatoma. Laryngoscope 1998;108:537-42.*
15) Rizzino A. *Transforming growth factor- β multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. Dev Biol 1988;130:411-22.*
16) Ohta M, Greenberger JS, Anklesaria P, Massgu J. *Two forms of transforming growth factor- β distinguished by multipotential hematopoietic progenitor cells. Nature 1987; 329:539-41.*
17) Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. *Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β Nature 1988;334:260-2.*
18) Harvey AK, Hrubey PS, Chandrasekhar S. *Transforming growth factor β inhibition of interleukin-1 activity involves down-regulation of interleukin-1 receptors on chondrocytes. Exp Cell Res 1991;195:376-85.*
19) Mundy GR, Bonewald LF. *Role of TGF beta in bone remodeling. Ann NY Acad Sci 1990;593:91-7.*
20) Sporn MB, Roberts AB. *Transforming growth factor β multiple actions and potential clinical applications. JAMA 1989;262:938-41.*