KISEP Original Articles
臨床耳鼻：第14卷 第1號 2003
J Clinical Otolaryngol 2003;14:113-117

진주종 유래 섬유아세포에서의 Insulin-Like Growth Factor I과 Binding Protein의 역할

을지의과대학교 이비인후과학교실
이창훈 · 조진생 · 박경유 · 김준우 · 이관원 · 이병권 · 이재수

The Role of Insulin-Like Growth Factor I and Binding Protein in Cholesteatoma Fibroblasts

Chang Hoon Lee, MD, Chin Saeng Cho, MD, Kyung-You Park, MD, Joon Woo Kim, MD, Gwan Won Lee, MD, Byung Kwon Lee, MD and Jae Soo Lee, MD
Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine, Eulji University, Deajeon, Korea

－ABSTRACT－

Background and Objectives：Insulin like growth factor-I is an important growth regulator for epidermis and its activity is regulated by specific insulin like growth factor binding protein. Authors observed the expression of mRNA of Insulin-like Growth FactorI（IGF-I）and mRNA of Insulin-like Growth Factor Binding Protein（IGFBP）in fibroblast of patient with cholesteatoma to find out the function of fibroblast in the progress of cholesteatoma. **Materials and Method**：During the operation in middle ears, the cholesteatoma and normal skin tissue were extracted from 10 patients with Cholesteatoma. Some cytokines were added such as Interferon β, Interferon γ and TNF α to those extraced fibroblast. We analyzed the expression of IGF-I, IGFBP-3, and IGFBP-5 by semi-quantative RT-PCR. **Results**：After stimulation by inflammatory cytokine, the expression of IGF-I from cholesteatoma was significantly increased ,while the expression of IGFBP-5 was significantly reduced. **Conclusion**：These results indicate that cholesteatoma fibroblast could play an important role in the proliferation of cholesteatoma tissue. **(J Clinical Otolaryngol 2003;14:113-117)**

KEY WORDS：Cholesteatoma · Fibroblasts · Cytokines.

서 론

중이의 진주종은 조직학적으로는 피부조직과 유사하나 병리적 활성은 정상조직과는 많은 차이를 보이고 있으며, 그 발병원인, 기전, 치료 등에 논란이 많은 질환이다. 현재까지 많은 연구에도 불구하고 골파괴와 비정상적 세포증식을 핵심으로 한 병리기전에 대하여는 명확히 밝혀 지지 않고 있다. 과거에 단순히 상피하 조직의 구성요소로만 인식되던 섬유아세포의 면역학적 능동적 역할이 최근 밝혀지면서[1] 진주종에서의 그 역할과 상피층인 각화세포와의 상호작용에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다. 특히, 비정상적 세포증식은 염증반응의 직

논문접수일 : 2003년 4월 6일
심사완료일 : 2003년 5월 21일
교신저자 : 조진생, 301 - 070 대전광역시 중구 목동 24
을지의과대학교 이비인후과학교실
전화 : (042) 259 - 1324 · 전송 : (042) 259 - 1321
E - mail : cscho@emc.eulji.ac.kr

접 혹은 간접적인 결과로서 인식될 수 있으며 거기에는 상피하조직의 염증반응과의 연관성을 생각할 수 있을 것이다. Insulin-like growth factor(IGF)는 중요한 상피 성장인자로서 각화세포가 아닌 섬유아세포에서 생산되며 Insulin-like growth factor binding protein(IGFBP)에 의해 그 활동성이 조절되는 것으로 알려져 있다.[2] 본 연구는 진주종과 정상 조직 유래 섬유아세포를 각각 배양하여 염증성 싸이토카인으로 자극한 후, IGF와 그 결합 단백질중 피부에 많이 분포하는 것으로 알려진 IGFBP-3와 IGFBP-5의 발현을 비교하여 진주종에서 상피하 조직과 상피조직의 상호 조절기전과 각화세포의 증식에 있어서 염증반응의 역할을 이해 하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

1차적인 섬유아세포 배양은 10명의 진주종성 중이염 환자의 중이 진주종과 정상 피부조직을 적출하여 이루어졌다.

방 법

세포 분리 및 배양

수술시 채취한 조직을 200 IU/ml의 페니실린(Gibco BRL. U.S.A) 및 200 ug/ml의 스트렙토마이신(Gibco BRL. U.S.A)이 첨가된 인산완충식염수에 담갔으며, 절취된 조직을 직경 100 mm의 배양용 접시에 옮겨 조직파편과 각질층을 제거하고 75% 알콜에 60~90초간 처리하여 오염되어 있는 세균을 살균한 후 즉시 인산완충식염수에 옮겨 알콜에 대한 노출을 정지시켰다. 이 조직을 4℃에서 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액에 옮겨 12시간이 지나면, 15 ml 시험관에 옮겨 5% fetal calf serum(FCS, Gibco BRL. U.S.A)이 첨가된 인산완충식염수 10 ml를 넣고 1~2분간 흔들어 세포가 낱개로 유리되도록 하였다. 시험관을 실온에서 5~10분 세워놓고 낱개의 조직을 침전시킨 다음 부유되어 있는 세포를 다른 원심분리용 시험관으로 옮겨 원심분리하여 인산완충식염수로 3회 세척한 후 배양하였다. 10% FCS가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL. U.S.A)액으로 배양한 결과 방추형의 세포가 관찰되었다.

염증성 싸이토카인 자극

정상 피부조직과 진주종에서 유래한 섬유아세포에서 대조군은 10% fetal calf serum(FCS) 로만, 실험군은 10% fetal calf serum(FCS)에 IFN-α(1000 U/ml ; Genzyme, Cambrige, Mass.), IFN-γ(500 U/ml ; Maruho, Osaka, Japan), TNF-α(1000 U/ml ; R & D Systems, Minneapolis, Minn)를 첨가하여 자극시켰으며, 총 RNA 분리전에 8시간동안 배양하였다. 5회 passage된 세포로 시행되었다.

역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

배양된 섬유아세포의 총 RNA는 acid-guanidinium Thiocyanate-phenol-chloroform method에 의해 혈액 RNA prepmate(Bioneer K-3070)를 사용하여 배양 8시간후 분리되었다. 총 RNA(1 μg of each sample)는 DMEM with 10% FCS를 완전 배양액으로 하고, TNFα(1000 U/ml), INFβ(500 U/ml), INFγ(1000 U/ml)를 배양첨가물로 사용하여 역전사 시켰다. 반응혼합물은 25℃에 10분간, 42℃에 54분간, 99℃에 5분간, 4℃에 5분간 배양 시켰다. 결과로서 생기는 cDNA 일정 부분은 2 mm $MgCl_2$, 50 mm KCl, 10 mM Tris-Hcl, PH 8.3, 0.025 U/μl recombinant Taq DNA polymerase, 0.5 μM of each of the forward & reverse primers를 포함하여 최종 부피가 25 μl가 되도록 열성 실린더를 사용하여 증폭시켰다. 중합효소 연쇄 반응법을 위한 oligonucleotide primers는 상용화된 mRNA 배열에 기초해 합성하였다. 사용된 primer는 for human G3PDH 5'-CCCATCACCATCTTCCAG-3' upstream & 5'-CCTGCTTCACCACCACCTTCT-3' downstream ; for IGF-I 5'-ACATTGCTCTCAACATCTCCC-3' upstream & 5'-GCAATACATCTCCAGCCTCC-3' downstream ; IGF-IBP3 5'-AA-

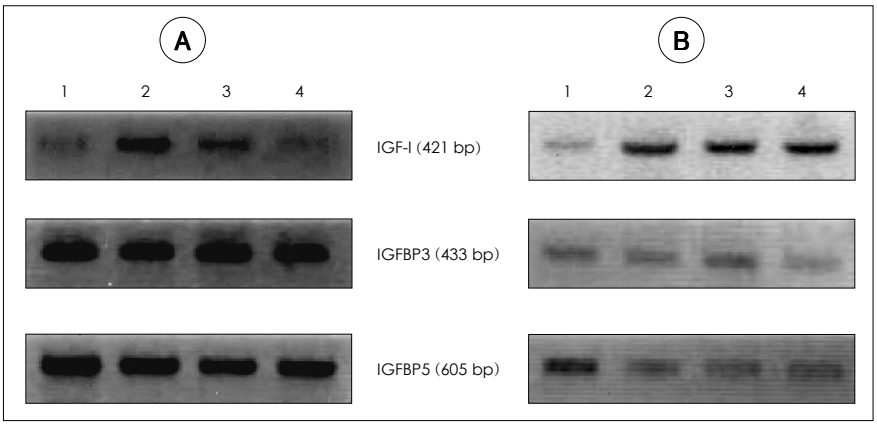

Fig. 1. RT-PCR products of IGF-I, IGFBP3, IGFBP5 derived from normal skin fibroblasts (A) and cholesteatoma fibroblasts (B) (Lane1 : control, Lane2 : TNFα, Lane3 : INFβ, Lane 4 : INFγ).

ATGGAAGACACACTGAAT - 3 ' upstream & 5 '- CTCTTTGCTGACTACTGGAA - 3 ' downstream ; for IGF - IBP5 5 '- CCGGCAGGACGAGGAGAAGC - 3 ' upstream & 5 '- GGGGGTGAGGGAAAGGTT-GG - 3 ' downstream 이다. 중합효소 연쇄 반응법 증폭은 G3PDH, IGF - I, IGFBP - 5에 대해서는 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분 20, 28, 26 cycles을, IGFBP - 3에 대해서는 94℃에서 1분, 52℃에서 1분, 72℃에서 1분으로 16 cycles를 시행하였다.

Products는 5% acrylamide/Tris - borate EDTA gel 혹은 2% agarose gel로 분해하고 크기는 100 bp - Mw marker로 비교하였다(Fig. 1). 증폭된 신호는 농도계로 scan되었고 peak areas는 NIH image software를 사용하는 컴퓨터로 적분 하였다. 증폭된 신호의 크기는 arbitary units(means±SD)로 나타내었다. 그리고 대조군과의 비교는 Student t test로 유의성을 검증 하였다.

결 과

IGF-I

정상피부 조직에서 유래된 섬유아세포에서는 대조군과 염증성 싸이토카인 자극군(TNF - α, IFN - β, IFN - γ 모두) 과의차이는 통계학적 유의성이 없었다. 그러나 진주종에서는 대조군에 비해 염증성 싸이토카인(TNF - α, IFN - β, IFN - γ 모두)에 의해 자극받은 군에서 유의

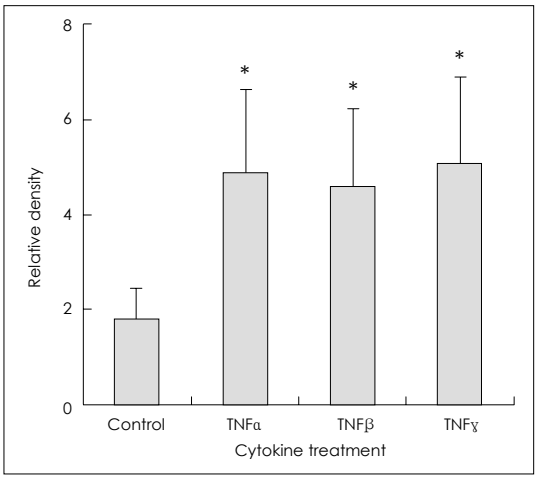

Fig. 2. IGF-I Expression of Cholesteatoma fibroblasts (*p<0.05).

성있게 증가 하였다($p<0.05$)(Figs. 1 and 2).

IGFBP3

정상피부조직과 진주종 모두 염증성 싸이토카인(TNF - α, IFN - β, IFN - γ 모두) 자극전과 자극 후의 변화는 공히 모두 통계학적 유의성이 없었다(Fig. 1).

IGFBP5

정상 피부조직에서 유래한 섬유아세포는 염증성 싸이토카인(TNF - α, IFN - β, IFN - γ 모두) 자극전 자극 후의 변화는 통계학적 유의성이 없었으며 진주종에

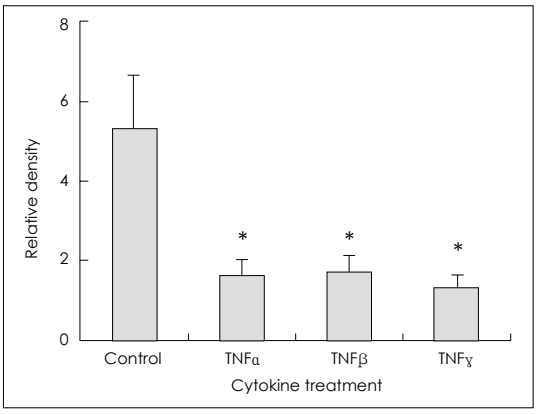

Fig. 3. IGFBP-I Expression of Cholesteatoma fibroblasts (*p<0.05).

서는 염증성 싸이토카인(TNF - α, IFN - β, IFN - γ 모두) 자극후 유의성있게 발현이 감소하였다($p<0.05$) (Fig. 1 and 3).

고 찰

많은 연구에서 다양한 싸이토카인과 성장인자는 진주종 표피의 증식과 발달기전에 관여하는 것으로 알려져 있다.[3)4)]

최근 몇 년간 진주종 표피의 증식에 관한 기전을 밝힐 목적으로 상피증식과 관련되어 있다고 알려진 다양한 싸이토카인의 관련성에 대해 연구가 수행되어왔다.[5-7)] 이런 연구의 결과로, 정상 외이도 상피와 비교하여 진주종 상피에서의 상피 증식 능력이 뚜렷이 활성화되어 있다는 것을 보여주었다.[8)]

최근의 연구들에서의 결과를 보면 진주종상피의 basal, parabasal, upper layer cell의 nuclei에서 cdk2와 cdk4의 발현을 나타내었으며,[9)] 외이도의 정상 상피와 비교하여 발현이 증가됨을 알 수 있었고[10)] 심한 염증반응을 보이는 상피하부위에서 증가하는 경향이 있다는 연구도 있었다.[11)] 이러한 결과를 토대로 생각해보면, 진주종상피의 상피하 염증반응에 의해 상피세포 주기의 진행과 상피 증식을 유도하는 다양한 싸이토카인의 발현이 촉진되는 것을 알 수 있을 것이다.

진주종상피에서 상피 증식의 기전을 추측해보면 상피하 염증반응은 염증세포에 의한 IL - 1a와 같은 싸이토카인의 발현을 유도하고,[12)] 다른 싸이토카인의 발현은 측분비 혹은 자가분비 조절을 통해 유도되며, 상피 증식과 관련된 싸이토카인과 상호작용을 한다고 생각할 수 있을 것이다. 수년전의 보고에서 IL - 1a는 섬유아세포에 의해 IGF의 발현을 유도한다는 것이 증명되었고,[13)14)] 이러한 결과들을 고려해 볼 때 싸이토카인 network가 상피증식에 기여하는 것을 알수 있었다.

최근 섬유아세포가 단순한 상피하조직의 구성요소가 아니라 능동적인 면역학적 역할을 하는 것으로 알려지면서,[15)] 진주종에서 섬유아세포의 작용과 역할에 대한 연구의 필요성이 높아지게 되었다. 게다가 진주종상피의 비정상적인 세포증식과 상피하조직의 연관성 또한 생각할 수 있게 되었다.

IGF는 상피성장 인자로서 Binding protein에 의해 그 활동성이 down regulation되는 것으로 알려져 있다. 6종류의 binding protein중 IGFBP - 3와 IGFBP - 5는 주로 피부조직에 많이 분포하는 것으로 알려져 본연구의 대상으로 정했으며, 본 연구에서는 정상 피부조직과는 달리 진주종에서 유래된 섬유아세포는 염증성 싸이토카인 자극에 의해 IGF - I의 발현이 증가되었고, IGFBP - 5의 발현은 감소되는 소견을 보여 염증성 싸이토카인의 역할이 정상 피부 조직에서보다는 상피성장에 월등히 많은 영향을 미칠 것으로 생각된다. IGFBP - 3는 염증성 싸이토카인의 자극에도 별 변화를 나타내지 않는 반면 IGFBP - 5는 민감하게 반응하는 것은 기질(matrix)이 많은 환경인 섬유아세포 배양상태나 진피 혹은 점막하 조직에서의 활동성이 증가되는 고유의 성질 때문일 것으로 사료된다.

결 론

이상의 결과에서 진주종 유래 섬유아세포에서 염증성 싸이토카인 자극은 IGF - I의 발현을 증가시키고, IGFBP - 5의 발현을 감소시킴을 알 수 있었으며 이것은 진주종 상피세포 증식과 상피세포와 상피하층의 섬유아세포의 상호 관계와 상피증식에서 염증 반응의 역할을 이해하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

중심 단어 : 중이 진주종 · 섬유아세포 · 싸이토카인.

REFERENCES

1) Barreca A, De Luca M, Del Monte P, Bondanza S, Damonte G, Cariola G, *et al. In vitro paracrine regulation of hunan keratinocyte growth by fibroblast-derived insulin-like growth factors. J Cell Physiol 1992;151:262-8.*
2) Cle mmons DR, Busby W, Clarke JB, Parker A, Duan C, Nam TJ. *Modification of insulin-like growth factor binding proteins and their role in comtrolling IGF actions. Endocr J 1998;45:S1-8.*
3) Bujia J, Kim C, Ostos-aumente P, Lopez-Villarejo J, Kastenbauer E. *Enhanced epithelial proliferation due to elevated levels of interleukin-1 receptors in middle ear cholesteatomas. Eur Arch Otorhinolaryngol 1997;254(1):6-8.*
4) Ishibashi T, Shinogami M, Kaga K, Fukaya T. *Keratinocyte growth factor and receptor mRNA expression on cholesteatoma of the middle ear. Acta Otolaryngol 1997;117(5):714-8.*
5) Tanaka Y, Kojima H, Miyazaki H, Koga T, Moriyama H. *Roles of cytokines and cell-cycle regulating substances in proliferation of cholesteatoma epithelium. Laryngoscope 1999;109(7):1102-7.*
6) Chae SW, Song JJ, Suh HK, Jung HH, Lim HH, Hwang SJ. *Expression patterns of p27Kip1 and Ki-67 in cholesteatoma epithelium. Laryngoscope 2000;110(11):1898-901.*
7) Bujia J, Kim C, Holly A, Sudhoff H, Ostos P, Kastenbauer E. *Epidermal growth facrtor receptor (EGF-R) in human middle ear cholesteatoma: an analysis of protein production and gene expression. Am J Otol 1996;17:203-6.*
8) Chung JW, Yoon TH. *Different production of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interleukin-8 from cholesteatomatous and normal epithelium. Acta Otolaryngol 1998;118 (3):386-91.*
9) Paukkoene K, Naukkarinen A, Horsmanheimo M. *The development of manifest psoriatic lesions is linked with the invasion of $CD8^+$ T cells and $CD11c^+$ macrophages into the epidermis. Arch Dermatol Res 1992;284:375-89.*
10) Sudhoff H, Borkowski G, Bujia J, Hildmann H, Fisseler-Eckhoff A. *I mmunohistochemical studies with middle ear mucosal remnants in cholesteatoma. HNO 1997;45(8):630-5.*
11) Chao WY, Huang CC. *An i mmunohistochemical study of cyto-keratin expression in human middle ear cholesteatoma. Arch Otorhinolaryngol 1989;246:37-42.*
12) Marcio C, Rubin JS, Csaky KG. *Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. J Biol Chem 1995;270:12607-13.*
13) Saiag P, Coulomb B, Lebreton C, Bell E, Dubertret L. *Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro. Science 1985; 230:669-72.*
14) Krueger GG, Jorgensen CM. *Experimental models for psoriasis. J Invest Dermatol 1990;95:56S-8S.*
15) Weber L, Mauch C, Kirsch E, Muller P, Krieg T. *Modulation of collagen type synthesis in organ and cell cultures of fibroblast. J Invest Dermatol 1986;87:217-20.*