

위산 역류 질환 동물모델의 확립에 대한 예비결과보고

부산대학교 의학전문대학원 이비인후과학교실,¹ 병리학교실,² 외과학교실³

박성수¹ · 임윤성¹ · 왕수진¹ · 이진춘¹ · 박영민¹
이원용¹ · 정다운¹ · 신동훈² · 전태용³ · 이병주¹

Establishment of Gastric Acid Reflux Animal Model : Preliminary Report

Seong-Soo Park, MD¹, Yun-Sun Lim, MD, PhD¹, Soo-Geun Wang, MD, PhD¹, Jin-Choon Lee, MD, PhD¹,
Young Min Park, MD¹, Won Yong Lee, MD¹, Da Woon Jung, MD¹,
Dong Hun Shin, MD, PhD², Tae Yong Jeon, MD³ and Byung-Joo Lee, MD, PhD¹

¹Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery; ²Pathology; ³Surgery, School of Medicine,
Pusan National University, Busan, Korea

— ABSTRACT —

Backgrounds : To investigate the pathophysiology of laryngopharyngeal reflux disease (LPRD), an experimental animal model is required. Therefore, we tried to make animal model of laryngopharyngeal reflux, modifying Omura's method. **Methods** : In the first phase of study, we used Omura's method to make animal model, ligating forestomach through purse-string suture. In the modified group A, pyrolic stenosis was made with 20F nelaton catheter after 2 mm cut of it and forestomach was ligated by purse-string suture. In the modified group B, pyrolic stenosis was made with 20F nelaton catheter and forestomach was ligated by purse-string suture. **Results** : The survival rate of Omura's animal model was 0% (0/36), modified group A was 24% (5/21), and modified group B was 44% (8/18). Marked ulceration and mild erosion in the distal esophagus were observed in histological examination of modified group A, B, respectively. However, there was no definite inflammatory findings and squamous metaplasia in the larynx. **Conclusions** : The modified A and B methods were useful animal model of gastroesophageal reflux compared to original Omura's method. However, further investigation was required to make an animal model of laryngopharyngeal reflux by these methods. (J Clinical Otolaryngol 2013;24:73-79)

KEY WORDS : Animal model · Laryngopharyngeal reflux disease · Rat.

서 론

인후두역류질환은 이비인후과를 방문하는 외래 환자 중에 10~20% 차지하고, 음성질환을 호소하는 환자들 중에 50%에 육박하는 높은 유병률을 가지고 있다. 그러나 위산 역류에 의한 후두 점막을 이용한 조직학적 병리기

전에 대한 연구는 많지 않다. 그 이유는 환자를 대상으로 한 인두나 후두의 조직학적 검사가 윤리적으로나 실질적으로 힘들기 때문이다.

기존의 인후두역류에 대한 연구는 위산을 직접 후두 점막에 접촉시켜 변화를 보는 방법으로 비생리적이라는 한계가 있다. Thibeault 등¹⁾은 인후두역류증 환자에서 치료 전 후에 성대의 후교련(post. commissure) 점막을 채취하

논문접수일 : 2013년 3월 22일 / 논문수정일 : 2013년 4월 12일 / 심사완료일 : 2013년 5월 21일
교신저자 : 이병주, 602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10 부산대학교 의학전문대학원 이비인후과학교실
전화 : (051) 240-7536 · 전송 : (051) 246-8668 · E-mail : voiceleebj@gmail.com

여 인후두역류에 의한 성대점막의 염증 관련 싸이토키인의 변화를 관찰하였다 그러나 이러한 연구에서도 인후두역류가 없는 정상인에 대한 자료가 없어 연구에 한계가 있었다. 아무증상이 없는 사람을 대상으로 성대 점막을 채취하여 분석하는 것이 윤리적인 문제가 있어 쉽지 않기 때문에 인후두역류에 대한 동물 모델이 필요하다.

위산 역류에 대한 동물 모델은 1999년 Omura 등²⁾이 쥐를 이용하여 처음 보고하였다. 저자들은 Omura 등의 방법뿐만 아니라, 생존률을 높이기 위한 변형된 동물 모델을 고안하였고 인후두역류 동물 모델로서 적합한지 분석하였다.

대상 및 방법

실험동물

특정 무 병원체 환경에서 사육된 200~220 g의 백서(Sprague-Dawley) 75마리를 대상으로 하였다. 실험 1주 전부터 온도 20~23℃, 습도 45~70%의 실험실에서 사육하여 실험실 환경에 적응하도록 하였으며, 이 기간 내에 상기도 감염의 증상이나 다른 질환이 관찰되는 백서는 실험에서 제외하였다. 모든 실험은 본원 동물실험위원회의 동의를 거쳐 시행하였고 가능한 인도적인 방법으로 모든 동물 실험을 진행하였다.

인후두역류 동물 모델 확립

수술 전 12시간을 금식시킨다. Isoflurane inhalation (2~3% delivered at 0.8~1.5 L/minute)을 이용한 전신마취를 유도하며 이어 유지요법으로서 추가로 ketamine hydrochloride(90 mg/kg)과 xylazine hydrochloride(9 mg/kg)을 intraperitoneal(IP)로 주입하였다. 복부의 털을 제거한 후 소독을 시행한 후, 복부에 2~3 cm 정도의 수직 절개를 한 후 여러 치수의 Nelaton catheter를 조작하여, 유문에 삽입하고, 3-0 Soft silk로 고정하여 유문협착증(Pyloric stenosis)을 인위적으로 만들었다. 또한 3-0 Silk를 이용하여 전위(forestomach)을 결찰하였다. 수술 후 1일째 물을 공급하고 수술 후 2일째부터 일반음식을 공급한다. 인후두역류 수술 후 4주, 12주 후에 후두를 채취하여 조직검사를 시행하였다.

Omura 방법에 의한 인후두역류 동물 모델

Omura 등이 제안한 방법에 따라 백서 6마리를 18F Nelaton catheter를 2~3 mm 정도로 절단하여 유문에 삽입하고 3-0 Soft silk로 고정하여 유문협착증(Pyloric stenosis)을 인위적으로 만들었다. 또한 3.0 Silk를 이용하여 전위(forestomach)을 결찰하였다.

Omura가 시행했던 전위(forestomach) 결찰은 결찰한 부위의 괴사를 일으킬 수 있기 때문에, 백서 30마리를 3-0 Soft silk를 이용하여 전위 결찰을 purse-string suture를 시행하였다.

인후두역류 동물 모델의 변형 A형

21마리의 백서를 Omura 동물 모델 방식으로 복부 절개를 일으킨 다음, 유문 협착 완화를 위해 20F nelaton (diameter : 4.5 mm)을 2 mm 세로로 절단한 것을 적용한다. 마찬가지로 3-0 Soft silk를 이용하여 전위(forestomach)을 purse-string suture를 시행하였다.

인후두역류 동물 모델의 변형 B형

18마리의 백서를 Omura 동물 모델 방식으로 복부 절개를 일으킨 다음, 유문 협착을 변형 A보다 더 완화하기 위해 20F nelaton을 그대로 사용한다. 마찬가지로 3-0 Soft silk를 이용하여 전위(forestomach)을 purse-string suture를 시행하였다.

인후두역류에 대한 방사선학적 검증

실험 동물의 안락사 시키기 전에 barium 조영제를 18F Nelton 카테타를 이용하여 주입하였다. 주입한 barium 조영제가 식도와 인두로 역류하는 것을 확인하기 위해 식도조영술을 시행하였다.

후두에 대한 조직학적 소견 비교

채취한 후두를 Cryostat(CM-3050 S, Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 관상 단면(coronal plane)으로 약 8µm 간격으로 조직을 절단하였다. 한 개의 후두 조직 당 가능한 많은 연속적 section을 얻어 hematoxylin and eosin(H&E) 염색으로 세포를 관찰하였다. 각 조직 슬라이드에서 염증(inflammation) 진행 정도를 염증세포 수(acute inflammatory cell, e.g., eosinophil, lymphocyte)

로 확인하였고, 또한 편평상피화생(squamous metaplasia)에 대해 분석하였다.

결 과

Omura 방법에 의한 인후두역류 동물 모델

Omura 등이 제안한 방법에 의해 인후두역류 동물 모

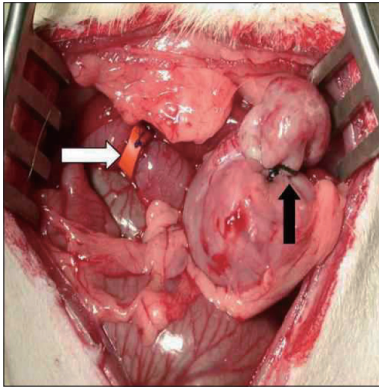


Fig. 1. Preparation of the rat model of reflux laryngitis. White arrow is pyloric stenosis created with 18F nelaton catheter. Black arrow indicates the ligation of fore-stomach.

델은 6마리를 시행하였으나 모두 1주일 이내에 폐사하였다. 전위를 purse string suture시행한 30마리(Fig. 1) 역시 2주 이내에 모두 사망하여 후두를 관찰할 수 있는 실험동물은 없었다. 이러한 방법으로는 수술 후 사망률이 너무 높아서 인후두역류 동물 모델을 만들 수가 없었다.

인후두역류 동물 모델의 변형 A형

Nelaton catheter의 치수를 늘려 유문협착 정도를 완화된 변형 A(Fig. 2)방법에서는 21마리 중 5마리가 4주째까지 생존하여, 수술 후 4주 생존률은 24%(5/21)이었다. 4주 이상 생존한 백서의 식도에서는 과도한 궤양성 변병이 관찰되었고(Fig. 3), 후두에서는 경미한 염증 소견이 관찰되었다(Fig. 4).

인후두역류 동물 모델의 변형 B형

변형 A보다 유문협착 정도를 좀 더 완화된 변형 B(Fig. 5)방법에서는 서 18마리 중 최소 4주 이상 생존한 백서는 8마리가 생존하여 생존률은 44%(8/18)이었다. 유문 협착을 더 약하게 한 변형 B형에서 유문 협착을 많이 한 변형 A형 보다 생존률이 높았다. 조직 소견상 원위부 식도와 근

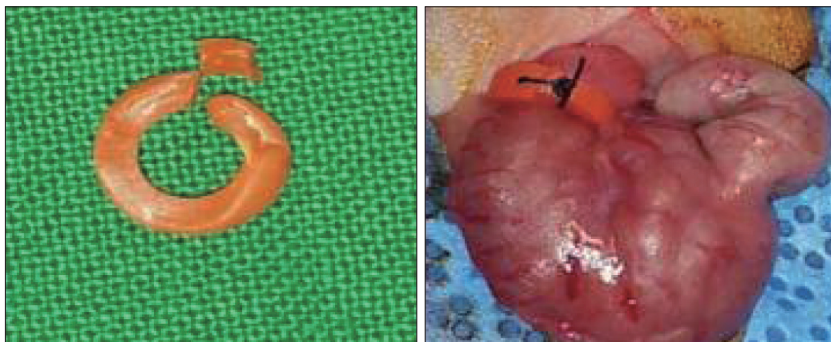


Fig. 2. The modified group A. Pyloric stenosis was made with 20F nelaton (diameter : 4.5 mm, width 2.0 mm) catheter after removal of 2 mm length. Fore-stomach was ligated by purse string suture.

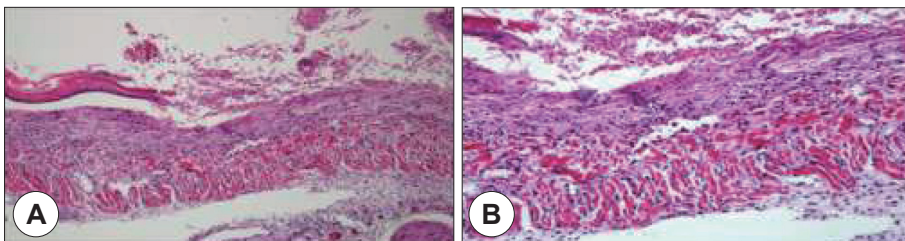


Fig. 3. The modified group A : Histologic finding in distal esophagus (HE stain). Marked ulceration is identified. A : H&E stain (100×). B : H&E stain (200×).

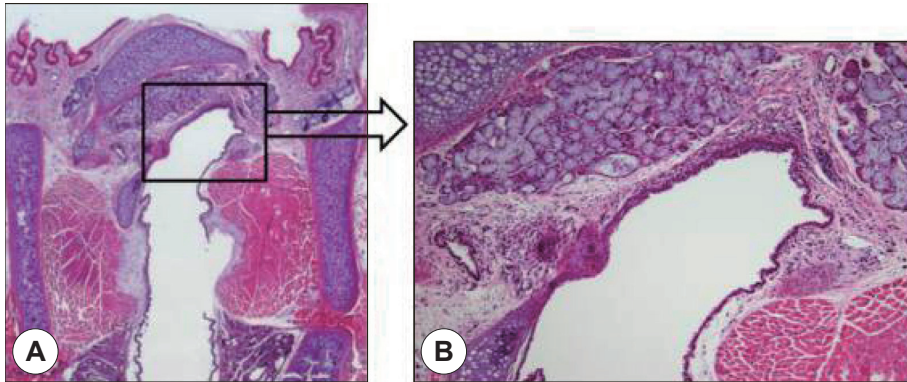


Fig. 4. The modified group A : Histologic finding in larynx (HE stain). A little inflammatory cell in epiglottis. A : H&E stain (100×). B : H&E stain (200×).

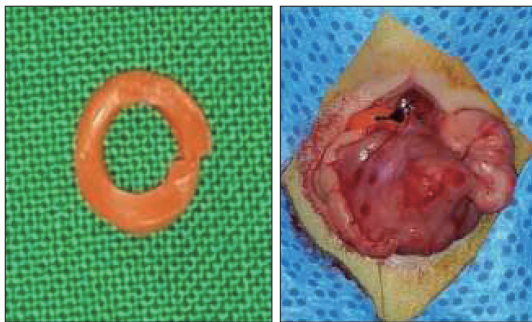


Fig. 5. The modified group B. Pyloric stenosis was made with 20F nelaton (diameter : 4.5 mm, width 2.0 mm) catheter. Fore-stomach was ligated by purse string suture.

위부 식도에서는 미란성의 병변만 관찰 되었고(Fig. 6), 후두에서는 경도의 염증성 소견이 관찰되었다(Fig. 7).

실험적 동물에서 위산두역류의 확인

인후두역류 유발 수술을 한 후 4주 이상 생존한 백서에서 위산역류를 알아보기 위하여 바륨 조영제 검사를 시행하였다. 검사결과 근위부 식도까지 역류하는 바륨 영상을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

인후두역류 유발 수술 방법에 따른 후두의 조직학적 소견차이 분석

각 조직 슬라이드에서 염증(inflammation) 진행 정도를 파악하기 위하여 염증세포에 대한 세포수와 편평상피화생(squamous metaplasia)에 대해 분석하였다. 호산구(eosinophil) 및 림프구(lymphocyte)의 침윤의 차이는 보이지 않았고, 편평상피화생의 변화도 미미하였다(Table 1).

인후두역류 유발 수술 방법에 따른 백서의 생존률 차이

Omura의 방법에 의한 수술법에 의해서는 4주 생존률이 0%이었다. 그러나 변형된 수술법 A에서는 24%의 4주 생존률을 보였고, 변형된 수술법 B에 의해서는 44%이었다(Table 2). 본 연구에서는 기존의 Omura 방법을 변형한 B형 방법이 인후두역류 동물 모델을 만드는 데 더욱 적합한 것으로 나타났다.

고 찰

인후두역류증은 인두신경증, 음성변화, 만성기침, 연하장애 등을 일으키는 식도의 역류질환이다. 많은 인후두역류증 환자가 이비인후과에 내원하여 치료를 받고 있으며, 위식도역류증을 연구하는 내과의사와 함께, 이비인후과 영역에서도 활발한 연구가 이루어지고 있다. 하지만 위산 내용물의 역류에 의해 발생하는 인후두역류증의 근본 원인은 알지만, 위산에 의한 후두와 인두의 조직학적 변화와 분자생물학적 손상기전에 대한 연구는 미미하다.

Thibeault 등¹⁾은 인후두역류증 환자의 성대의 후교련(post. commissure)에서 점막을 채취하여 염증관련 사이토카인의 변화를 관찰하여, 양성자펌프억제제(PPI, proton pump inhibitor)를 사용한 군에서 치료 후에 interleukin-8, vascular endothelial growth factor, transforming growth factor-beta 1의 증가를 관찰하였다. 그러나 이 연구는 정상인의 성대 후교련에 대한 연구가 없는 것이 제한점이다. 이러한 위산 역류에 대한 후두 점막에 대한 분자생

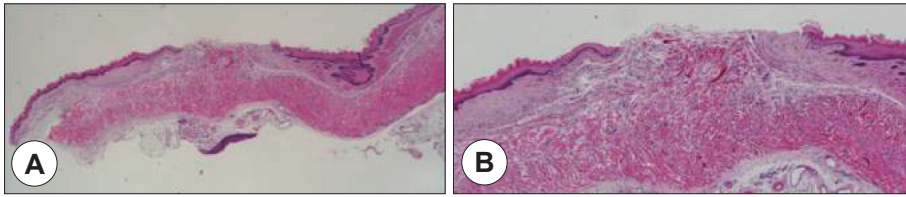


Fig. 6. The modified group B: Histologic finding in proximal esophagus, a mild erosion is observed (HE stain). A : H&E stain (20×). B : H&E stain (40×).

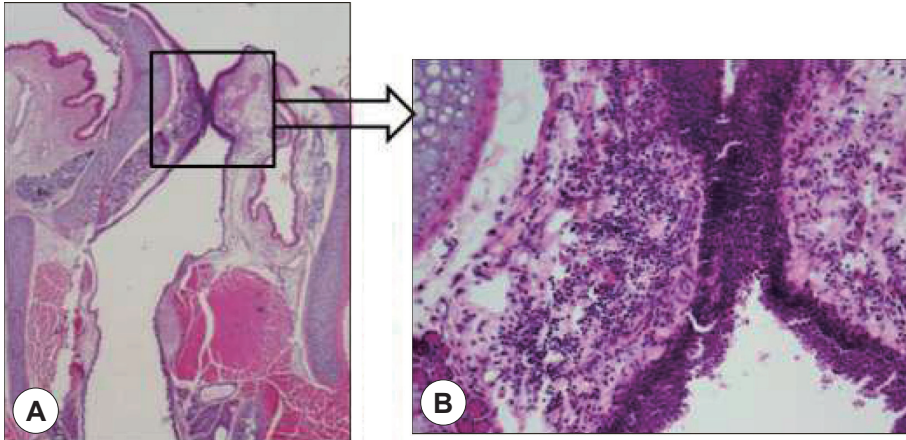


Fig. 7. The modified group B: Histologic finding in larynx. Mild infiltration of inflammatory cell in inter-arytenoid mucosa. A : H&E stain (40×). B : H&E stain (200×).



Fig. 8. Postoperative evaluation of gastric reflux by using radiography with barium contrast. Reflux of barium material was identified.

물학적 및 조직학적 연구는 인후두역류의 원인, 증상, 치료 등을 이해하는 기본 자료가 되는 연구이고, 이러한 연구를 통해 새로운 기전의 치료 약제를 개발하는데 도움

이 된다. 그래서 본 저자는 백서(rat)에서 인후두역류 모델(laryngopharyngeal reflux rat model)을 만들고 이를 이용하여 차후에 인후두역류질환으로 인한 후두 점막 조직학적 변화 및 상부 식도 괄약근 점막 그리고 하부 식도 점막의 변화를 알아내고자 하였다.

지금까지 수술적으로 식도공장문합술(esophagojejunostomy), 식도십이지장문합술(esophagoduodenal anastomosis), 그리고 식도위십이지장 문합술(esophagogastroduodenal anastomosis) 등을 시행하는 위식도 역류질환 연구를 위한 백서 모델은 몇 가지 개발되어 있다.³⁻⁶⁾ 이중 가장 널리 쓰이는 것이 1999년 Omura²⁾가 발표한 모델이며, 18Fr nelaton으로 유문을 좁게 만들고, 이후 전위를 2-0 silk로 결찰 하는 방법이다.

위식도역류질환을 연구하기 위하여 시행한 백서를 대상으로 한 실험에서 실험동물의 생존율은 보고자에 따라 53%에서 83%까지 다양하다.⁷⁻¹⁰⁾ 인후두역류질환 연구를 위한 백서 모델 개발의 예는 Asaoka¹¹⁾가 발표한 모델이 유일하지만, 이 모델 역시 Omura의 모델에서 유문

Table 1. Inflammation between each group

	Eosinophil counter (mean/HPF)	Lymphocyte counter (mean/HPF)	Squamous metaplasia
Modification A	4.52	1.4	0.5
Modification B	3.75	1.75	0.5

Table 2. Survival rate of each group

	N	Survival after 4weeks	Survival rate (%)
Omura's method	36	0	0
Modification A	21	5	24
Modification B	18	8	44

협착 방식을 변함없이 18F nelaton 하고, 단지 그 너비를 2 mm에서 2.5 mm로 늘인 것 밖에 차이가 없다. 본 연구에서는 Omura의 방식의 동물 모델을 만들었을 때 실험 동물의 사망률이 100%에 이르러 이를 통한 인후두역류 실험 동물을 만드는 것은 불가능하였다. 그러나 Habesoglu 등¹²⁾은 Omura의 방법으로 인후두역류 백서 동물 모델을 확립하여, 후두의 조직학적 소견에 대해 연구하였는데, 실험 후 관찰 기간이 증가할수록 염증 세포의 침윤, 혈관 확장(vascular engorgement), 각질화(keratinization), 표피하 부종(subepithelial edema) 등이 증가한다고 하였다. 그러나 Habesoglu 등¹²⁾의 연구는 이러한 후두의 변화가 후두의 어느 부위에서 발생하는지에 대한 정확한 기술이 없다.

변형 A 모델은 유문협착을 완하시키기 위해 유문협착을 20F nelaton을 세로로 2 mm 절단한 것을 사용하였다. 그 결과 24%(5/21) 생존율을 보였다. 유문협착을 좀 더 완하시킨 변형 B는 변형 A보다 더 나은 44%(8/18)의 생존율을 보였다. 조직소견에서도 변형 A는 식도에서는 진행된 궤양 소견을 보였고, 변형 B에서는 경도의 미란성 병변만이 관찰되어 차이를 보였다. 바륨 조영제를 이용한 방사선 검사에서도 근위부 식도까지 역류하는 바륨 영상을 확인하였으나, 후두에서는 호산구(eosinophil) 및 림프구의 침윤 소견의 차이는 보이지 않았으며, 편평상피화생(squamous metaplasia) 소견도 미미하였다. 이는 본 모델이 위산역류 동물모델로는 적합하나, 인후두역류 동물 모델로 아직 한계가 있다고 생각되었다.

결 론

인후두역류질환의 원인, 병태생리, 진단, 치료, 예후를

알기 위해서는, 인후두역류 동물 모델의 개발이 필요하다. 이에 널리 알려진 Omura's의 방법으로 실험하였으나, 전수가 폐사하여, 유문협착정도를 완화 하고, 전위를 purse-string suture를 시행한 변형된 동물 모델을 만들었다. 그러나 이 모델들 역시 방사선학적으로는 인후두역류의 가능성이 있으나, 조직학적으로 인후두역류 보다는 위산역류 동물 모델에 적합하였다. 향후 다양한 실험조건들의 변화로 위산이 인후두까지 역류하는 동물 모델 개발이 필요하며, 이를 통해서 인후두역류질환의 병태 생리에 대한 연구가 필요할 것이다.

중심 단어 : 인후두역류질환 · 동물 모델 · 백서.

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2012R1A1A4A01009912).

REFERENCES

- 1) Thibeault SL, Smith ME, Peterson K, Ylitalo-Moller R. *Gene expression changes of inflammatory mediators in posterior laryngitis due to laryngopharyngeal reflux and evolution with PPI treatment: a preliminary study. Laryngoscope* 2007;117(11):2050-6.
- 2) Omura N, Kashiwagi H, Chen G, Suzuki Y, Yano F, Aoki T. *Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. Scand J Gastroenterol* 1999;34(10):948-53.
- 3) Kumagai H, Mukaisho K, Sugihara H, Bamba M, Miyas-hita T, Miwa K, et al. *Cell kinetic study on histogenesis of Barrett's esophagus using rat reflux model. Scand J Gastroenterol* 2003;38(7):687-92.
- 4) Miwa K, Segawa M, Takano Y, Matsumoto H, Sahara H, Yagi M, et al. *Induction of oesophageal and forestomach carcinomas in rats by reflux of duodenal contents. Br J Cancer* 1994;70(2):185-89.

- 5) Miwa K, Sahara H, Segawa M, Kinami S, Sato T, Miyazaki I, et al. *Reflux of duodenal or gastroduodenal contents induces esophageal carcinoma in rats. Int J Cancer* 1996; 67(2):267-74.
- 6) Goldstein SR, Yang G, Curtis SK, Reuhl KR, Liu BC, Mirvish SS, et al. *Development of esophageal metaplasia and adenocarcinoma in a rat surgical model without the use of a carcinogen. Carcinogenesis* 1997;18(11):2265-70.
- 7) Raggi M, Langer R, Feith M, Friess H, Schauer M, Theisen J. *Successful evaluation of a new animal model using mice for esophageal adenocarcinoma. Langenbecks Arch Surg* 2010;395(4):347-50.
- 8) Asaoka D, Miwa H, Hirai S, Ohkawa A, Kurosawa A, Kawabe M, et al. *Altered localization and expression of tight-junction proteins in a rat model with chronic acid reflux esophagitis. J Gastroenterol* 2005;40:781-90.
- 9) Shimazu R, Kusano K, Kuratomi Y, Inokuchi A. *Histological changes of the pharynx and larynx in rats with chronic acid reflux esophagitis. Acta Otolaryngol* 2009;129(8): 886-92.
- 10) Higo T, Mukaisho K, Ling Z, Oue K, Chen K, Araki Y, et al. *An animal model of intrinsic dental erosion caused by gastro-oesophageal reflux disease oral dis. Oral Dis* 2009; 15(5):360-5.
- 11) Asaoka D, Nagahara A, Oguro M, Mori H, Nakae K, Izumi Y, et al. *Establishment of a reflux esophago-laryngitis model in rats. Dig Dis Sci* 2011;56(5):1299-308.
- 12) Habesoglu M, Habesoglu TE, Gunes P, Kinies V, Toros SZ, Eriman M, et al. *How dose reflux affect laryngeal tissue quality? An experimental and histopathologic animal study. Otolaryngol Head Neck Surg* 2010;143(6):760-4.