

육아조직의 fibronectin의 면역조직학적 검색*

제명대학교 의과대학 병리학교실

이상숙·정재홍

경북대학교 의과대학 이비인후과학교실

박준식

=Abstract=

Immunohistological Demonstration of Fibronectin in Human Granulation Tissues

Sang Sook Lee, MD; Chai Hong Chung, MD

Department of Pathology, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea

June Sik Park, MD

Department of Otolaryngology, Kyungpook National University
School of Medicine, Taegu, Korea

This study describes the distribution of fibronectin and its association with reticulin fibers (type III collagen) in incisional wounds and previous biopsy sites of randomly sampled patients. The specimens were examined using immunofluorescence and immunoperoxidase to localize affinity-purified antibodies to fibronectin. Tissue samples were also stained with hematoxylin and eosin, and reticulum stain. Fibronectin was observed in the matrix surrounding individual fibroblasts and codistributed with reticulin fibers in early granulation tissue. Dense fibrillar networks of fibronectin and fibroblasts, giving the granulation tissue a highly stuctured and organized appearance. When the collagen had matured into bundles, fibronectin diminished or disappeared. These findings suggest that fibronectin may be important by functioning as a primary matrix for organization of the collagenous connective tissue during the tissue repair process.

서론

Fibronectin(이하 FN이라 칭함)은 44만 dalton의 분자량을 가지는 큰 당단백으로 많은 세포들, 간질조직과 혈장내에 존재한다¹⁾. FN은 페브린·교원질 세포들과 proteoglycan에 특수한 결합부위를 가져 세포와 세포, 세포와 간질의 접촉등, 세포의

골격을 유지한다¹⁻³⁾. FN은 성인의 모든 조직에 존재하는 주요 결합 단백으로 대부분의 기저막, 임파조직의 베티콜린간질과 조성결합조직에 교원질과 같이 분포하나⁴⁻⁶⁾ 연골과 풀조직, 인대, 각막과 상아질 같은 성숙한 치밀한 결합조직에는 존재하지 않는다⁷⁾. FN의 기능에 대한 연구가 섬유아세포의 빠양으로 이루어졌는데, 여기서 FN은 광범위하게 세포주위의 기질을 형성하여 세포와 세포사이, 세포

* 이 논문은 1987년도 제명대학교 원생연구비 및 통신의교원조사 연구비로 이루어져 있음.

와 기질사이의 접착을 끼쳤다⁵⁾. 혈장의 FN은 섬유아세포가 특징적으로 증식하는 만성염증과 창상 치유때 생기는 육아조직의 형성에서⁶⁾ 옵소닌으로 작용하여 FN과 상호작용하는 교원질, 피브린과 다른 불용성 거미 분자들이 탐식세포들에 의해 재거되는 것을 용이하게 한다⁷⁾. 이때 섬유아세포내와 주위에 다양한 FN이 관찰되었는데 이는 세포성 또는 혈장 FN이 피브린이나, 면밀한 교원질과 세포표면이 상호작용하여 조직의 손상받은 부위와 그곳에서 형성된 응고주위의 결합조직과 결합하고⁸⁾ 대식구의 부착을 유도하여 창상의 치유에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다⁹⁾. Grinnell 등¹⁰⁾은 면역형광법에 의해 육아조직과 fibrin 엉어리에서 FN을 관찰하였고, Kurkinen 등¹¹⁾은 실험적 육아조직에서 FN의 침착을 보아 FN이 wound의 한 요소임을 제시하였다. 또한 Repesh 등¹⁰⁾은 가토의 wound에서 FN의 분포와 reticulin fiber와 hyaluronic acid의 수반관계를 연구하여 FN이 migrating cells의 extracellular scaffold로 작용할 것이라고 발표하였다. 이에 저자는 수출한 환자의 수술일이나 기왕생검부위에서 얻은 육아조직 22예를 내장으로 광학현미경적 및 FN의 면역조직학적 검색을 하여 사람의 육아조직내의 FN의 분포 및 그 의의를 규명하고자 본실험을 하게 되었다.

재료 및 방법

1. 재료

1987년 1월부터 5월까지 경북대학병원 이비인후과에서 수출한 환자의 수술전개연에서 수술후 3일에서 25일 사이에 절취한 12예와 재생대학과 의과대학 동산병원 병리과에 보관중인 파라핀블록 2일에서 50일 경과된 기왕생검부위를 포함하는 10예를 선택하여 실험에 제공하였다.

2. 시약

- Human fibronectin antisera (Biomedical Technologies Inc, BT551, USA)는 간접효소항체법과 간접면역형광법에서 1차 항체로서 phosphate buffered saline, pH 7.2, (이하 PBS과 함)에 1:100으로 희석하여 실온에서 30분간 부란하였다.
- Goat anti-rabbit IgG(HRP), affinity purified (BTI, BT572, USA)는 간접효소항체법의 2차항체로서 PBS로 1:40으로 희석하여 실온에서 30분간 부란하였다.

3) Goat anti-rabbit IgG(FITC) (BTI, BT557, USA)는 간접면역형광법의 2차 항체로서 PBS로 1:40으로 희석하여 실온에서 30분간 부란하였다.

4) Pepsin(Sigma P7012, USA)는 0.1N 염산으로 4mg/ml의 농도로 만들어 간접면역조직화학법의 1차항체 사용전에 슬라이드에 부착된 조직전편 위에 충분량을 놓아 37°C에서 1시간 부란하여 포르말린고정으로 mask 된 조직내 항원성을 회복하는 목적으로 사용하였다¹²⁾.

5) DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrachloride, Sigma D5637, USA)는 6mg의 DAB를 10ml의 0.05M Tris buffer, pH 7.6에 용해하고 사용직전에 신선한 1% H₂O₂를 0.1ml 추가하여 간접효소항체법의 발색에 사용하였다.

6) Phosphate buffered saline, 0.01M, pH 7.2은 Na₂HPO₄ 1.48gm과 KH₂PO₄ 0.43gm과 NaCl 7.2gm을 1000ml의 중류수에 용해하여 간접면역조직화학법에서 1차와 2차 항체 사용전후에 10분씩 3번 수세하는데 사용하였다.

7) Tris buffer, 0.05M, pH 7.6은 tris(hydroxymethyl) aminomethane(Sigma T1378, USA) 6.1gm을 중류수 50.0ml에 녹이고 37ml의 1N 염산을 가한후 중류수로 전체양이 1L가 되게 희석하여 DAB substrate를 만드는데 사용하였다.

3. 방법

1) 광학현미경적 연구

광학현미경 검사를 위해 절제된 육아조직실편을 10% 중성포르말린용액을 고정한 후 일반조작과정을 거쳐 4μm 두께로 절파 hematoxylin-eosin 염색과 reticulum 염색으로 검정하였다. 세공된 paraffin block도 역시 같은 과정을 거쳐 검정하였다.

2) 면역조직화학법에 의한 fibronectin의 육아조직내 분포연구

조직내 fibronectin의 분포를 알기 위하여 간접효소항체법과 간접면역형광법을 사용하였다¹³⁻¹⁵⁾. 포르말린용액으로 고정되고 파라핀포매된 육아조직을 4μm 두께로 절파 슬라이드에 부착하여 달파파인과 핫수과정을 거친 후 중류수에 37°C에 10분간 부란하고 0.01 N 염산으로 만든 0.4% pepsin 용액 37°C에서 1시간 부란하였다¹⁶⁾. 그후 흐르는 물에 10분간 두어 효소소화과정을 중지시켰다. 그후 0.3~0.5% H₂O₂와 혼합한 methanol (Merck, W. Germany)이 담긴 coplin jar에 슬라이드를 30분간

남구어 대인성 peroxidase에 대한 반응을 차단시켰다. 1차 항체로 rabbit anti-fibronectin IgG, 1:100, 을 사용하여 실온에서 30분간 부란하였다. 간접호소항체를 위해 2차 항체로 peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG, 1:40, 으로 실온에서 30분간 부란한 후 DAB로 빌색하여 광학현미경으로 검정하였다. 간접면역형광을 위해 2차 항체로 FITC-labeled goat anti-rabbit IgG, 1:40, 을 사용하여 실온에서 30분간 부란하고 슬라이드에 봉입한 후 Olympus model BH-RFL-W 형광현미경으로 검정하였다. 이때 청(青) 여기셀터를 이용하고 주파장을 495nm, 보조여기셀터는 490nm, 배안렌즈용여기셀터는 515W를 사용하였다. 양성대조염색으로는 paraquat를 먹고 폐섬유증으로 사망한 사람의 폐조직을 사용하였다. 음성대조염색으로 동일한 육아조직으로 1차 항원 대신에 정상가토힐링 또는 PBS를 사용하였다. 1차와 2차항체의 사용진후에 PBS로 10분씩 3번의 수세과정을 거쳤다.

성 적

Hematoxylin-eosin 염색으로 육아조직의 특징은 가는 fibril로 표기되는 수많은 섬유아세포와 모세혈관의 중석으로 끝에 따라 염증세포의 침윤과 그 삼출물 및 fibrin clot도 판찰하였다. 시기가 경과됨에 따라 모세혈관은 감소되고 교원질섬유는 증가되는 추세를 보였다.

민역조직학적 검색결과 육아조직내에 신생되는 모세혈관들 주변에 환형으로 배열된 FN에 강하게 염색된 fibril이 판찰되었다(그림 1-3). Reticulum 염색으로 자라는 육아조직내에 미세한 reticulin fibrils가 FN과 공존하였다(그림 4). 또한 각 fibrils는 FN에 강하게 염색되어 각각의 섬유아세포들을 표기하여 치밀한 세포주변의 기질을 형성했다(그림 5-7). 섬유아세포를 애워싸는 FN에 강하게 염색된 fibrils는 역시 reticulum 염색에서도 강하게 염색되었다(그림 8). Fibrin clot에도 FN이 강하게 염색되었다. 양성대조염색으로 사용된 사람의 폐섬유증조직은 FN에 강하게 염색되었다. 그러나 1차 항원대신에 PBS로 처리된 음성대조염색에서 FN의 염색을 볼 수 없었다.

육아조직은 시간이 경과함에 따라 교원질의 양은 많아지나 반면 FN과 reticulin 양은 감소하였다.

고 쟁

FN의 용성형(soluble form)-은 1948년 처음 Morrison에 의해 분리되어 'cold insoluble globulin' (CIG)라고 불리워졌다. 정상인의 혈장내 FN농도는 약 300 μ g/dl로서 남자가 여자보다 높고 나이가 많아짐에 따라 증가한다^[15]. FN은 성인의 모든 조직에 존재하는 주요 결합 단백으로 대부분의 기저막, 입파조직의 레티콜린기질과 조성결합조직에 교원질과 같이 분포하여 조직학적으로 바디콜린에 상응하였으나 교원섬유 또는 탄성섬유와의 분포와는 부합하지 않았다^[4,14,15]. FN은 섬유아세포, 배식구, 근위세포, 성장세포, 시바세포와 약간의 상피세포에서 핵성된다^[16]. 혈장의 FN은 음소년으로 작용하여 FN과 상호작용하는 교원질, 피브린과 다른 불용성 거래 분자들이 텁식세포들에 의해 제거되는 것은 용이하게 한다^[9]. 유사한 경우가 섬유아세포가 특징적으로 증식하는 만성염증과 창상치유에서의 육아조직의 형성이다^[7,8,10]. 이때 섬유아세포내의 주위에 다량의 FN이 관찰되었는데 이는 세포성 또는 혈장 FN이 혈장 transglutaminase(blood coagulation factor XIII)의 작용으로 피브린과 상호작용하여^[16] 조직의 손상부분 부위와 형성된 응고주위의 결합조직과 결합한다. In vitro 실험에서 thrombin은 사람의 섬유아세포로 하여금 FN 생산을 촉진시킨다고 알려져 있다^[17]. 본 실험의 결과에서도 FN이 분명히 fibrin과 함께 조직복구때 형성되는 근본적 기질의 중요성분임을 알 수 있었다. FN의 기능에 대한 연구가 섬유아세포의 배양으로 이루어졌는데, 여기서 FN은 광범위하게 세포주위의 기질을 형성하여 세포와 세포사이, 세포와 기질사이의 접착을 께하였다^[6]. Fibrin-FN으로 이루어진 기질이 섬유아세포와 내피세포들이 들어와서 정착할 수 있는 발판을 제공하는 듯 하다. 본 실험에서 육아조직을 구성하는 세포들이 FN을 생산하여 기질내에 침착하였다. 육아조직이 시간이 오래 지나면 역시 교원질이 기질내로 침착하는데 이 때 FN의 생산과 교원질의 기질내 침착이 육아조직과 반흔의 기질화에 한 역할을 한다. 육아조직에 reticulin 섬유의 침착도 초기에 일어나 교원질이 나타나기 전에 생긴다. 배양된 섬유아세포들의 기질은 역시 은기호성(aryrophilic)이다. FN과 reticulin이 정상 사람조직에서 친밀하게 공존하므로 초기육아조직의 은기호성(aryrophilia)은 FN 때문이라고 간주된다^[9]. 본

실험의 주된 소견은 FN이 초기의 육아조직에서 강하게 염색된다는 점이다. 시간이 지남에 따라 후에 교원질첨유이 속(東)상으로 기질화되면 FN과 셀유아세포들은 사라졌다. 이는 Kurkinen 등⁷⁾에 의한 실험성 육아조직의 소견과 일치한다. 육아조직은 성숙된 결합조직과는 달리 다른 형과 양의 교원질, proteoglycans과 당단백을 가진다. 그리고 육아조직은 대아피부와 같이 거의 전적으로 III형의 교원질을 가지나 성인피부는 주로 I형의 교원질을 가진다¹⁸⁾.

Kurkinen 등⁷⁾에 의하면 FN은 초기의 육아조직에서 III형 precollagen의 속(東)과 진밀하게 수반되어 서로 관계를 가짐이 FN과 교원질 분자간의 친화성에 의해 지지된다. 세포배양하에서도 FN과 교원질은 침착된 fibrillar pericellular matrix 내에 국한되었다.

이상의 성격을 종합하면 FN은 30일 미만의 어린 육아조직의 기질화에 특수하게 관여함을 시사해 준다.

참 고 문 헌

- Hood LE, Weissman I: *Immunology*, ed 2. California, Benjamin/Cummings Publishing Co, 1984, pp 160-161.
- McDonagh J: Fibronectin. A molecular glue. *Arch Pathol Lab Med* 1981; 105: 393-396.
- Mosesson MW: The role of fibronectin in monocyte/macrophage function. *Prog Clin Biol Res* 1984; 154: 155-175.
- Linder E, Stenman S, Lehto VP, et al: Distribution of fibronectin in human tissues and relationship to other connective tissue components. *Ann NY Acad Sci USA* 1978; 312: 151-159.
- d'Ardenne AJ, Bruns J, Sykes BC, et al: Comparative distribution of fibronectin and type III collagen in normal human tissues. *J Pathol* 1983; 141: 55-69.
- Stenman S, Vaheri A: Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J Exp Med* 1978; 147: 1054-1064.
- Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ, et al: Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest* 1980; 43: 47-51.
- Grinnell F, Billingham RE, Burgess L: Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. *J Invest Dermatol* 1981; 76: 181-189.
- Oh E, Pierschbacher M, Ruoslahti E: Deposition of plasma fibronectin in tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3218-3221.
- Repesh LA, Fitzgerald TJ, Furcht LT: Fibronectin involvement in granulation tissue and wound healing in rabbits. *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 351-358.
- Kirkpatrick P, d'Ardenne AJ: Effects of fixation and enzymatic digestion on the immunohistochemical demonstration of laminin and fibronectin in paraffin embedded tissue. *J Clin Pathol* 1984; 37: 639-644.
- Taylor CR: Immunoperoxidase techniques. Practical and theoretical aspects. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102: 113-121.
- Mauro A, Bertolotto A, Germano I, et al: Collagenase in the histochemical demonstration of laminin, fibronectin and factor VIII/R Ag in nervous tissue after fixation. *Histochemistry* 1984; 80: 157-163.
- Dixon AJ, Burns J, Dunnill MS, et al: Distribution of fibronectin in normal and diseased human kidneys. *J Clin Pathol* 1980; 33: 1021-1028.
- Eriksen HO, Clemmensen I, Hansen MS, et al: Plasma fibronectin concentration in normal subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 1982; 42: 219-295.
- Mosher DF: Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin stabilizing factor. *J Biol* 1975; 66: 4.
- Mosher DF, Williams EM: Fibronectin concentration is decreased in plasma of severely ill patients with disseminated intravascular coagulation. *J Lab Clin Med* 1978; 91: 729.
- Gabbiani G, Le Lous M, Bailey AJ, et al:

Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. *Virchows Arch B:Cell Pathol* 1976; 21:133.

Legend for Figures

Fig. 1. Immunoperoxidase staining of a 2 weeks wound. Granulation tissue stains densely for fibronectin. Numerous capillaries are present (original magnification $\times 200$).

Fig. 2 and 3. Immunofluorescence staining of a 2 weeks wound. Developing granulation tissue reveals brilliant green staining for anti-fibronectin around the capillary wall (original magnification $\times 200$, $\times 400$).

Fig. 4. Section of a 2 weeks wound stained for reticulin. The developing granulation tissue stains positively for reticulin

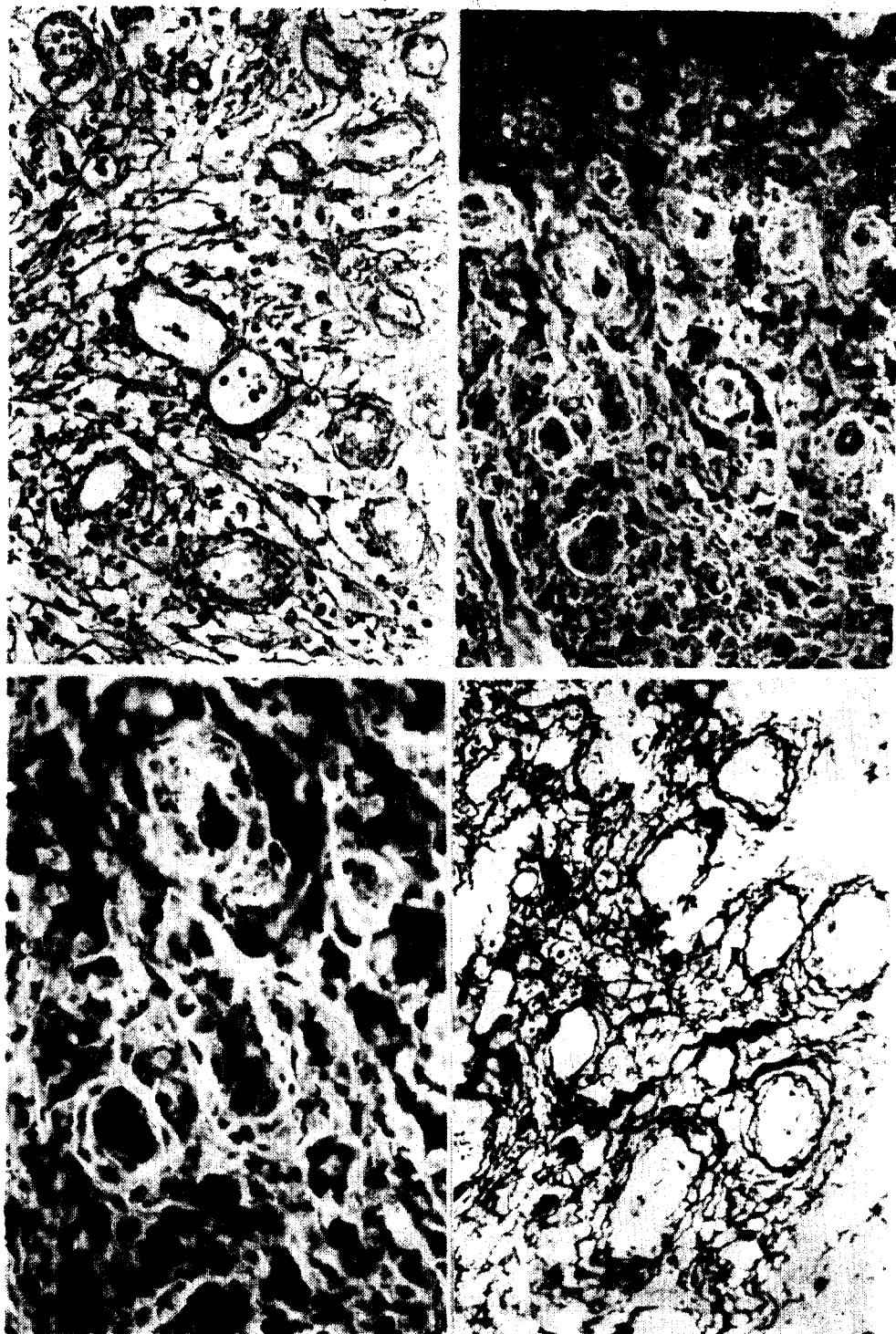
(original magnification $\times 200$).

Fig. 5 and 6. Immunoperoxidase staining for fibronectin of granulation tissue in a 2 weeks wound. Fibroblasts within the granulation tissue are surrounded by a dense fibronectin-positive extracellular matrix (original magnification $\times 200$, $\times 400$).

Fig. 7. Immunofluorescence staining for fibronectin of granulation tissue in a 2 weeks wound. Fibroblasts within the granulation tissue are surrounded by a dense fibronectin-positive extracellular matrix (original magnification $\times 200$, $\times 400$).

Fig. 8. Section of a 2 weeks wound stained for reticulin. Fibroblasts within granulation tissue stains positively for reticulin (original magnification $\times 400$).

<이 · 정 · 박 논문사진 부록 I>



<이·정·박 논문 사진 부도 Ⅱ>

