중이 진주종에서 In Situ Hybridization과 면역조직화학법에 의한 상피성장인자 수용체 mRNA와 단백의 발현에 관한 연구

대구파티마병원 이비인후과, 경북대학교 의과대학 이비인후과학교실*
계명대학교 의과대학 병리학교실**
손수준 · 이상호 · 박준식* · 이상흔* · 이상숙**

= Abstract =

Expression of Epidermal Growth Factor Receptor mRNA and Protein by In Situ Hybridization and Immunohistochemistry in Aural Cholesteatoma

Soo-Joon Sohn, M.D., Sang-Ho Lee, M.D., June-Sik Park, M.D.,*
Sang-Heun Lee, M.D.,* Sang-Sook Lee, M.D.**
Department of Otolaryngology, Fatima Hospital, Taegu, Korea
Department of Otolaryngology, Kyungpook National University School of Medicine, Taegu, Korea*
*Department of Pathology,** Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea*

Background and Objectives : Cholesteatoma is characterized by the hyperproliferation of keratinizing squamous epithelium in the middle ear cleft. This study was performed to elucidate the role of EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor) in the hyperproliferation of chole-steatoma epithelium by mRNA in situ hybridization and immunohistochemistry.

Materials and Methods : Cholesteatoma tissues from 34 patients with cholesteatoma were obtained during tympanomastoid surgery. A synthetic oligonucleotide probe labelled with digoxigenin at the 3 ′-terminal was used to hybridize the mRNA encoding the external domain of the human EGFR. A monoclonal antibody recognizing an epitope of external domain of the EGFR was used in a streptavidin-biotin complex technique.

Results : mRNA in situ hybridization using EGFR synthetic oligonucleotide probe revealed the strong positive signal of EGFR mRNA in 18 out of 34 cholesteatoma cases. The EGFR mRNA was located mostly along the suprabasal layer as well as the basal layer. However, normal skin tissues showed weakly positive signal only in the basal layer. A heterogeneity in the expression of the signal was also found in different parts of the same cholesteatoma samples. Expression of the EGFR mRNA was observed in the immune cells in the stroma of the normal skin samples and also of the cholesteatomasamples. Immunohistochemistry for expression of the EGFR protein using EGFR

논문접수일 : 1997년 7월 9일
심사통과일 : 1997년 10월 7일

monoclonal antibody showed a strong positive expression of the EGFR protein in the whole layers of the thickened squamous epithelium in 15 cholesteatoma cases. Control skin cases showed weakly positive signals only in the basal layer.

Conclusion : The hyperproliferation of the cholesteatoma epithelium is possibly induced by the overexpression of the EGFR in all layers of the cholesteatoma epithelium. However, other growth factors seems to influence the hyperproliferation of cholesteatoma epithelium. The expression of EGFR mRNA or EGFR protein by the immune cells in the subepithelial stroma was also found in cholesteatoma samples, along with some normal skin samples. **(Korean J Otolaryngol 40 : 11, 1997)**

KEY WORDS : Cholesteatoma · EGFR mRNA · EGFR protein · In situ hybridization · Immunohistochemistry.

서 론

진주종은 장기간의 이루 및 청력감퇴 등 일반적인 중이염의 증상들 외에도 골파괴에 의한 미로염, 안면신경마비 등 측두골내 합병증과 뇌막염, 뇌농양 등 치명적인 두개내 합병증을 일으키는 만성 염증성 중이질환이다. 그간 중이 수술에 많은 발전이 있었음에도 불구하고 여전히 많은 진주종 환자들이 재발 및 청력감퇴 등 합병증에 시달리고 있다.

이러한 진주종은 조직학적으로 중이강에 존재하는 각화성 편평상피의 과증식으로 정의된다(Fig. 1). 진주종의 발생기전으로는 몇 가지의 학설[1-4]이 있으나 빈번한 재발과 특징적인 상피의 과증식에 대한 만족할 만한 설명이 부족한 실정이며 중이내 상피의 기원을 밝히기 위해 최근 cytokeratin 등의 단구항체를 이용한 연구들이 시행되어 왔다[5]. 그리고 진주종의 특징적인 병리소견은 주위 골벽이나 이소골 등의 파괴현상인데 그 기전에 대해서도 많은 논란이 있다.

이러한 진주종의 상피증식 및 골파괴의 원인으로 연구되고 있는 또 다른 한 분야는 진주종 상피의 증식능, 즉 상피증식 표지인자에 관한 것이다. Huang 등[6]은 상피세포에 interleukin-1과 종양괴사인자(tumor necrotic factor α등의 여러 성장인자들이 존재하고 이들이 복합적으로 상피세포의 수용체에 작용하여 세포의 이동, 분화 및 증식을 일으킨다고 하였다. Bujia 등[7]은 그 중 특히 상피성장인자 수용체가 상피세포의 증식에 깊이 관여하며 진주종에서는 그 발현이 매우 증가되어 있다고 보고하였으나 아직까지 논란이 되고 있는 실정이다[8][9]. 진주종에서 상피성장인자 수용체의

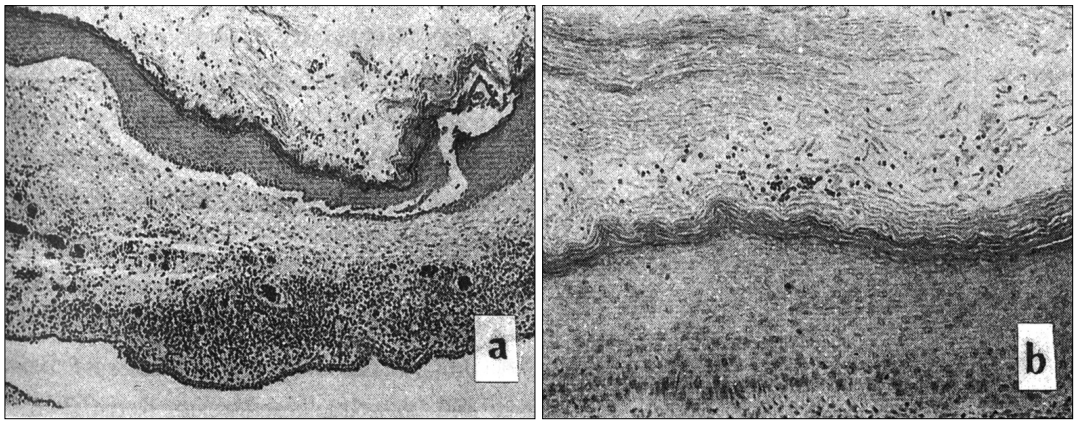

Fig. 1. Hematoxylin and Eosin stain. Due to hyperkeratosis, the epithelial layer of cholesteatoma is thickened markedly. The subepithelial connective tissue is infiltrated by the immune cells. Original magnification ×100(a), ×200(b).

분포 및 발현정도가 명확히 규명된다면 그 특징적인 상피의 과증식 및 골파괴 현상을 해명할 수 있는 단서를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

상피성장인자 수용체에 대한 검색법으로는 정량적 분석방법[10]외에 조직내에서의 분포를 관찰하기 위해 면역조직화학법이 주로 이용되었다[11]. 최근 분자생물학적 기법의 발전으로 조직에서 특정 유전자의 염기서열, 즉 DNA나 RNA의 염기서열을 찾을 수 있게 되었는데 Southern blotting 이나 Northern blotting 이 조직속의 DNA나 RNA에 대한 검사법인데 반하여 in situ hybridization은 조직절편내의 특정 세포 혹은 단일 세포내에서 특정 DNA나 RNA의 존재여부 및 양적 분포를 확인할 수 있는 장점이 있다. 이 방법은 면역조직화학법에 비해 민감도가 높고 단구항체 대신 DNA나 RNA외에 oligonucleotide를 합성하여 probe로 사용할 수 있다. 따라서 진주종의 조직절편에서 상피성장인자 수용체의 mRNA에 대한 in situ hybridization을 시행하면 진주종의 과증식된 상피 및 상피하 조직의 형태학적 구조가 유지된 상태에서 그 유전자 산물의 분포를 알 수 있다. 그러나 진주종에서상피성장인자 수용체의 mRNA에 관한 연구는 아직 매우 드물고[12], 특히 그 단백에 관한 검색과 동시에 시행되어 비교 검토된 예는 전무한 실정이다. 이에 저자는 포르말린으로 고정되고 파라핀에 포매된 진주종 조직을 대상으로 상피성장인자 수용체 mRNA in situ hybridization과 면역조직화학적 염색을 동시에 시행하여 상피성장인자 수용체 mRNA와 단백의 상피 및 상피하 조직내 분포와 발현정도를 측정하고자 하였다. 이 결과를 비진주종성 중이염 환자의 외이도 및 후이개 피부와 비교하여 진주종에서 상피의 과증식에 대한 상피성장인자 수용체 mRNA 및 단백의 역할을 규명함에 본 연구의 목적을 두었다.

재료 및 방법

1. 재 료

진주종성 중이염 환자 34례(34귀)의 중이 수술시 채취한 진주종 조직편을 사용하였다. 환자는 남자 15례, 여자 19례였다. 그 중 7례에서는 2개 이상의 진주종 조직편을 채취하여 사용하였다. 진주종 조직편은 상고실을 포함한 중이강에서 채취한 것이 30개, 유양동을 포함한 유양돌기내에서 채취한 것이 15개로 모두 45개였다.

대조군으로는 비진주종성 중이염 환자 7례(7귀)의 중이 수술시 채취한 고막륜 근처의 외이도 후상부 피부편 7개와 후이개 피부편 4개(총 11개)를 사용하였다.

수술 중 채취한 조직은 10% 중성 포르말린에 담궈 하룻밤 동안 고정한 후 파라핀에 포매하여 사용하였다.

양성 대조군으로는 만성 악하선염으로 절제된 타액선 조직을 사용하였다.

2. 방 법

1) In situ hybridization 기법

유리 슬라이드를 1M 염산에 20분 담근 후 흐르는 물에 15분 동안 수세하였다. 다시 증류수로 수세한 후 공기에 건조시켰다. 아세톤에 2%로 용해한 3-amino-propyltriethoxysilane(APES, Sigma, St Louis MO, USA)으로 2분간 처리한 후 증류수로 수세하여 공기에 건조시켰다. 37℃ 오븐에 하룻밤 말린 후 RNase를 차단하기 위해 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma, St Louis MO, USA)에 3분간 두 번 담근 후 말려 사용하였다. 전처치한 유리 슬라이드 위에 4μm 두께의 조직절편을 붙여 60℃ 오븐에 하룻밤동안 두어 조직절편을 슬라이드에 밀착시켰다. 다 음날 조직절편이 붙은 슬라이드를 xylene에 5분씩 세 번 담궈 파라핀을 제거한 후 100% 에탄올에 2분씩, 95% 에탄올에 2분씩 각각 두 번 담궈 함수한 후 DEPC-water로 씻어 내었다. 조직절편위에 5μg/ml의 proteinase K(Boehringer Mannheim, Gaithersrg MD, USA)를 적당량 놓고 1시간 두어 세포질 및 핵의 단백 일부를 제거하고 DEPC-water로 두 번 수세하였다. 0.4% Paraformaldehyde 및 95% 에탄올로 후고정한 후 공기에 건조시켰다. 상피성장인자 수용체 mRNA 검출을 위하여 상피성장인자 수용체의 external domain에 대한 24 base pair(bp)의 oligoeotide인 상피성장인자 수용체 probe(Korea Research Intitute of Bioscience and Biotechnology, Daejon, Korea)를 합성하여 사용하였으며, 그 염기서열은 다음

과 같다. 5′-GGA GCG CTG CCC CGG CCG TCC CGG-3′. 이 probe에 digoxigenin을 labelling하여 사용하였으며, 그 방법은 다음과 같다. Microtube에 4㎕ 완충액(potassium cacodylate, 1 M/l ; Tris-HCl, 0.125 M/l ; bovine serum albumin, 1.25mg/l, pH 6.6), 4㎕ $CoCl^2$ (25 mM/l), 100 pM oligonucleotide, 1㎕ digoxigenin-dUTP (1mM/l), 1㎕ dATP(10 mM/l), 그리고 1㎕l terminal transferase(50U㎕)를 담아 얼음위에서 혼합하였다. 37℃에서 15분간 반응시킨 후 1㎕l glycogen과 200 ㎕l EDTA(0.2M/l, pH 8.0)의 혼합액을 가해 반응을 중지시켰다. 70%의 찬 에탄올로 수세하고 진공상태에서 건조시킨 후 적당량의 증류수에 녹여서 사용하였다. Prehybridization은 hybrid 결합 혼합물에서 probe를 제외한 용액을 가한 후 37℃의 수조에서 2시간 동안 반응시켰다. 주된 hybridization은 적당량의 hybrid 결합 혼합물을 조직절편위에 놓은 후 37℃의 수조에서 하룻밤(약 20시간)동안 두어 반응시켰다. 이때 hybrid 결합 혼합물의 최종농도는 50% formamide(Sigma, St Louis MO, USA), 4×SSC(0.6M NaCl, 60mM sodium citrate, pH 7.0), 5×Denhardt's solution, 5 mg/ml sodium pyrophosphate in 5mM Tris-Hcl, pH 7.5와 100㎍/ml salmon sperm DNA(Sigma, St Louis MO, USA), 그리고 0.3ng/㎕l digoxigenin-labelled probe로 구성하였다. 조직절편위에 각각 30 ㎕l의 hybrid 결합 혼합물을 놓고 덮개유리를 덮은 후 고무풀로 봉하였다. 다음날 결합되지 않은 probe를 씻어내기 위해 37℃에서 2×SSC로 10분간 두 번, 0.1×SSC로 10분간, 그리고 실온에서 0.1×SSC로 5분간 각각 수세한 후 blocking reagent인 0.5% normal sheep serum과 30분간 반응시켰다. 발색반응을 위해 anti-digoxigenin Fab alkaline phosphatase(Boehringer Mannheim, Gaithersburg MD, USA, 1 : 500)와 30분간 결합시킨 후 70% dimethylformamide(Boehringer Mannheim, Gaithersburg MD, USA)에 각각 5% 농도로 녹인 nitro blue tetrazolium(NBT, Boehringer Mannheim, Gaithersburg MD, USA) 및 5-bromo-4-chloroindolyl phosphate(BCIP, Boehringer Mannheim, Gaithersburg MD, USA)로 18시간 동안 반응시키고 methyl green으로 대조염색하였다. 음성 대조군으로는 동일한 조직절편을 사용하여 주된 hybridization시 hybrid 결합 혼합물에서 probe를 제외한 용액과 반응시켰으며 그 밖에는 실험군과 동일한 방법으로 실시하였다. 광학 현미경으로 관찰하여 세포질 혹은 핵에 미만성으로 암청색의 발색이 있으면 양성으로 판정하였다. 반응의 기준은 Schulz 등[13]의 방법을 채택하여, 정상 피부의 기저 세포층에서와 같은 경미한 발색을 양성(positive,+)으로, 이보다 진한 발색을 강양성(strongly positive,++), 그리고 발색이 없으면 음성(negative,-)으로 판정하였다.

2) 면역조직화학법

전처치한 유리 슬라이드 위에 4㎛ 두께의 조직절편을 붙여 37℃ 항온기에 하룻밤 방치한 후 xylene 용액에 5분간 3번 담궈 파라핀을 제거하고 100% 에탄올, 90% 에탄올, 75% 에탄올에 단계적으로 함수하였다. 조직에 존재하는 내인성 peroxidase를 차단하기 위해 메탄올과 30% 과산화수소수가 9 : 1의 비율로 섞인 용액에서 30분간 처리하고 1×PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 3번 수세하였다. 조직에 감추어진 항원을 노출시키기 위해 0.01M citrate buffer 용액에 담궈 microwave 오븐으로 10분간 가열하였다. 실온에서 식힌 후 증류수 및 PBS로 수세하였다. 일차항체로 상피성장인자 수용체 단구항체(E-2760 , Sigma, St Louis MO, USA)를 1 : 500으로 희석하여 조직에 적당량 가한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 그 후 PBS로 세척하고 이차항체로는 biotinylated anti-mouse immunoglobulin (DAKO LSAB kit, Carpinteria CA, USA)을 가하여 37℃에서 10분간 반응시켰다. 다시 PBS로 수세한 후 streptavidin-peroxidase conjugate(DAKO LSAB kit, Carpinteria CA, USA)를 가하여 37℃에서 10분간 반응시키고 PBS로 수세한 후 diaminobenzidine tetrahydro-chloride(DAB)-H_2O_2 용액(Biogenex, San Ramon CA, USA)으로 암시야에서 10 20분간 발색시켰고, 대조염색은 Mayer's hematoxylin으로 하였다. 음성대조군으로는 동일한 조직절편을 사용하여 단구항체 대신 PBS와 반응시킨 후 위와 동일한

방법으로 실시하였다.

광학 현미경으로 관찰하여 세포막이나 세포질내에 갈색 혹은 암갈색의 발색이 보이면 양성으로 판정하였다. 반응의 기준은 in situ hybridization에서와 같다.

결 과

1. 진주종에서 in situ hybridization에 의한 상피성장인자 수용체 mRNA의 검색

상피성장인자 수용체 mRNA의 신호는 주로 세포질에서 미만성으로 나타났으며 핵에도 부분적으로 나타났다. 34례의 진주종 실험군 중 25례(73.5%)에서 양성반응이 관찰되었다. 그 중 18례(52.9%)에서는 기저층 및 기저층 상부의 상피 전층에 걸쳐서 매우 강한 양성반응이 관찰되었다(Fig. 2). 양성반응을 보인 나머지 7례(20.6%) 중 2례에서는 주로 기저층에서 신호를 나타내었고 나머지 5례에서는 상피 전층에서 약한 반응을 보였다. 7례의 대조군에서는 2례의 외이도 후상부 피부와 1례의 후이개 피부에서 양성반응을 보였는데, 주로 기저층에서 약한 신호를 나타냈다(Table 1). 한편 상피하 조직에서의 반응은 진주종 16례(47%)의 상피하 조직에서는 림프구, 대식세포 등 면역세포에서의 반응이 강하게 나타났으나 대조군에서는 주로 혈관내피나 한선, 섬유아세포 등에서 약하게 나타났다.

2. 진주종에서 면역조직화학법에 의한 상피성장인자 수용체 단백의 검색

상피성장인자 수용체 단백은 주로 세포막 주변에서 나타났으며 세포질내에서도 양성반응을 볼 수 있었다. 34례의 진주종 실험군 중 21례(61.8%)에서 양성반응이 관찰되었다. 그 중 15례(44.1%)에서는 상피 전층에서 강한 양성반응을 나타냈다(Fig. 3). 또한, 과립세포층에서는 군데군데 밀집된 발현을 볼 수 있었다. 양성반응을 보인 나머지 6례(17.7%)에서는 기저층에서만, 혹은 과립층 일부에서만 양성반응을 보였다. 7례의 대조군 상피에서는 4례에서 양성반응이 나타났다. 주로 기저층에서 약한 신호를 나타냈으며 외이도 후상

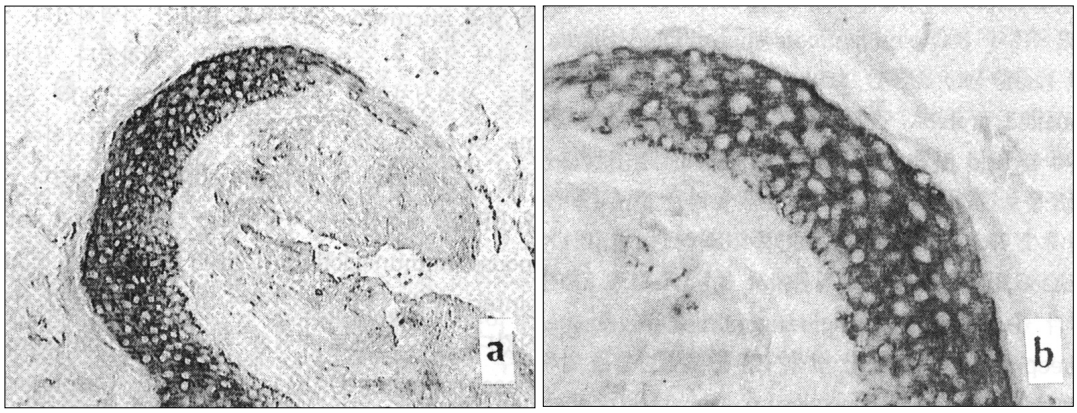

Fig. 2. In situ hybridization using synthetic oligonucleotide probe labelled with digoxigenin. In cholesteatoma, strongly positive expression of the epidermal growth factor receptor mRNA in the pattern of diffuse cytoplasmic staining was observed along the whole layers of the squamous epithelium. Original magnification ×100(a) ×200(b).

Table 1. Expression of EGFR-mRNA by in situ hybridization

Location of expression	Cholesteatoma(n=34)			Control skin tissue(n=7)		
	++	+	-	++	+	-
Basal layer	18	7	9	0	3	4
Suprabasal layer	18	5	11	0	0	7

++ : Strongly positive ; + : positive ; - : negative

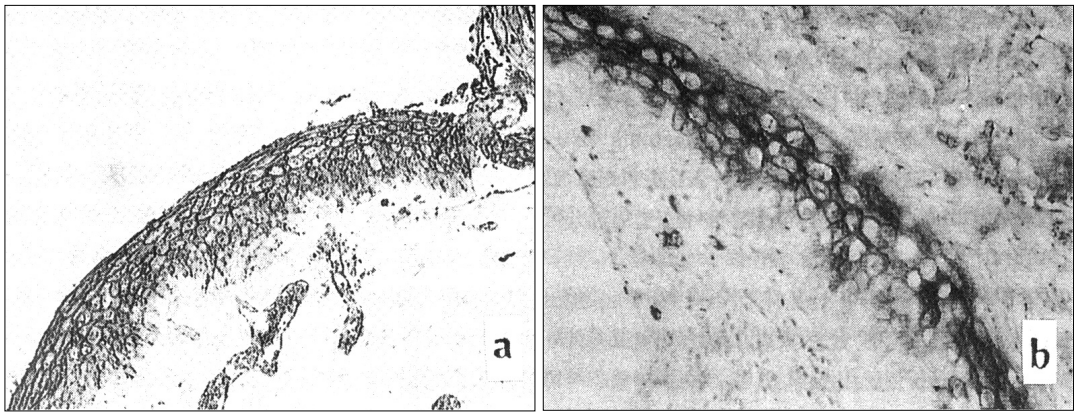

Fig. 3. Immunohistochemistry with streptavidin-biotin complex technique using a monoclonal antibody recognizing an epitope of the external domain of the epidermal growth factor receptor. Strongly positive exprression of the epidermal growth factor receptor protein in the pattern of linear cell surface staining was observed along the suprabasal layer as well as the basal layer of the cholesteatoma epithelium. Original magnification ×100(a), ×200(b).

Table 1. Expression of EGFR-mRNA by in situ hybridization

Location of expression	Cholesteatoma(n=34)			Control skin tissue(n=7)		
	++	+	-	++	+	-
Basal layer	15	4	15	0	4	3
Suprabasal layer	15	2	17	0	0	7

++ : Strongly positive ; + : positive ; - : negative

부 피부와 후이개 피부간의 상피성장인자 수용체 단백의 발현의 차이는 없었다(Table 2). 한편 상피하 조직에서의 반응은 진주종 13례(38.2%)의 상피하 조직에서 림프구, 대식세포 등 면역세포에서의 반응이 강하게 나타나 in situ hybridization에서의 결과와 비슷하였으며, 대조군에서는 주로 혈관내피나 한선, 섬유아세포 등에서 약하게 나타났다.

34례의 진주종 실험군 중 11례(32.3%)는 두 실험 모두에서 상피층에 강한 양성반응을 나타냈고 6례(17.6%)는 면역조직화학법에서는 음성이나 in situ hybridization에서는 양성반응을 보였으며, 이와 반대로 in situ hybridization에서는 음성이나 면역조직화학법에서 양성반응을 보인 경우는 2례(5.9%)였다. 7례(20.6%)에서는 양쪽 실험 모두에서 음성반응을 보였다(Table 3).

양성 대조군인 악하선 조직에서는 두 방법 모두에서 양성반응을 나타냈으나 음성대조군에서는 반응이 없었다.

Table 3. Comparison of expressions between in situ hybridization and immunohistochemistry in 34 cholesteatoma cases

Method		In situ hybridization		
		++	+	-
Immunohisto-chemistry	++	11	3	1
	+	3	2	1
	-	4	2	7

++ : Strongly positive ; + : positive ; - : negative.

고 찰

상피성장인자 수용체는 분자량 170KDa의 인당단백으로 세포막에 걸쳐 있으며 세포막외 부분(extracellular ligand-binding domain)과 세포막내 부분(intracellular tyrosine kinase domain)으로 구성되어 있다. 세포막외 부분이 상피성장인자나 변환성장인자와 결합하면 세포막내 부분은 내인성 단백 kinase

가 활성화되어 세포내에서 phosphorylation이 일어나고 곧 이어 일련의 연속적인 생화학 반응이 이루어져서 결국 세포의 분화 및 증식이 일어나게 된다[14-19]. 상피성장인자 수용체는 모든 배엽세포 기원의 조직에 존재하나, 특히 피부, 유방, 위장관 및 비뇨생식기의 상피에 많이 존재한다고 알려져 있다[20]. 상피성장인자 수용체에 대한 초기연구는 주로 피부조직에서 행해졌는데 신생아의 표피나 배양된 조직에서의 상피성장인자의 역할이 연구되어 특히 표피증식성 질환의 하나인 건선에서 상피성장인자 수용체의 과다발현이 잘 알려져 있다[21]. 이것의 세포막내 부분이 avian erythroblastosis virus의 erb-B 종양 유전자 산물과 유사한 구조를 가지고 있음이 밝혀진 이후[19)22)] 많은 종양조직에서의 발현양상이 연구되었다[23-34].

조직에서 특정 유전자 산물의 국소적 편재(spatial distribution)를 알 수 있는 방법으로는 면역조직화학법과 in situ hybridization이 있다. 그 중 면역조직화학법은 그 유전자 산물 즉 단백질에 대한 단구항체를 이용하는 방법으로 그간 상피성장인자 수용체를 비롯한 여러가지 성장인자의 연구에 많이 이용되어 왔다. 그러나 단구항체의 제작이 까다롭고 시간이 많이 걸릴 뿐 아니라 발색반응의 판정에 있어서 오류를 범할 가능성이 많았다[35)36)]. In situ hybridization은 그 유전정보를 전달하는 mRNA를 찾아내는 방법으로 면역조직화학법에 비해 probe를 만들기가 간편할 뿐 아니라 민감도나 특이도가 더 높은 방법으로 알려져 있다[37].

In situ hybridization이 처음 소개 될 때는 주로 DNA의 hybridization에 이용되었으나 mRNA의 탐색이나 유전자 지도 제작 등으로 이용범위가 확장되면서 점차 그 중요성이 강조되고 있다. 본 연구에서는 상피성장인자 수용체 mRNA in situ hybridization의 probe로 oligonucleotide를 합성하여 사용하였다. 것이 cloned DNA보다 유리한 점은 합성이 간편할 뿐 아니라 반응효과가 일정하고 특이도가 높으며 찾고자 하는 유전자의 전체 염기서열을 몰라도 그 아미노산의 서열로부터 합성이 가능하다는 것 등이다[38]. 상피성장인자 수용체의 세포막외 부분은 세포의 표면에 위치하고 있어 probe가 접근하기 쉬우므로 이것에 대한 probe를 제작하였다. Probe는 non-isotope인 digoxigenin으로 labelling하였다.

Non-isotopic labelling으로는 digoxigenin과 biotin이 주로 사용되고 있는데 isotopic labelling에 비해 안전하고 반응이 빠르며 효과가 일정하므로 많이 쓰이고 있다. Digoxigenin은 digoxin의 aglycone 유도체로서 biotin과 비슷한 민감도를 가질 뿐 아니라 digoxin 중독의 진단과 치료에 이용되는 digoxin 항체와 항원-항체 결합을 하므로 항체를 구하기 쉽다는 장점이 있다[39)40)].

In situ hybridization으로 실험한 경우 진주종 34례중 25례(73.5%)에서 상피성장인자 수용체 mRNA가 양성반응을 나타냈다. 그 중 18례(52.9%)에서는 상피 전층에 걸쳐서 강한 양성반응을 보였고 면역조직화학법은 15례(44.1%)에서 상피성장인자 수용체 단백이 상피 전층에 걸쳐서 강한 양성반응을 보였다. 두 방법 모두에서 상피성장인자 수용체 mRNA 및 단백이 상피 전층에서 강한 양성반응을 보인 것은 11례(32.4%)였다. 대조군에서는 어느 방법에서도 이와 같은 강한 양성반응을 전혀 볼 수 없었다. 이 결과로 보아 상피 전층에서 과다발현한 상피성장인자 수용체 mRNA 및 단백이 진주종 상피의 과증식을 유발하였다고 생각할 수 있다. Kojima 등[12]은 진주종 조직에 대해 40bp의 biotin-labelled DNA probe를 이용한 상피성장인자 수용체 mRNA in situ hybridization을 실시하여 상피 전층에서 강한 양성반응을 관찰하였으며, 24 bp의 digoxigenin-labelled probe를 이용한 본 연구와 유사한 결과를 보고하였다. Bujia 등[7], Schulz 등[13]은 동결절편 조직에서 상피성장인자 수용체에 대해 alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase(이하 AP-AAP)를 이용한 면역조직화학법을 시행하여 진주종 상피는 실험 진주종군의 거의 대부분에서 상피 전층에서, 혹은 기저층 및 기저직상부층에서 강한 양성반응이 나타남을 보고하였다. 본 연구에서는 34례중 18례(52.9%)에서만 이같은 결과가 나타났다. 이는 포르말린으로 고정하고 파라핀에 포매한 조직은 포매시 단백질의 cross-linking이 증가하여 probe 및 항체의 접근이 어려우므로 동결절편에 비해 그 효율이 감소하기 때문인 것으로 생각된다[41)42)].

Bujia 등[7]은 각 진주종 조직마다, 혹은 동일 진주종

절편에서도 부위에 따라 두 가지 반응양상이 혼재하는 양상을 보인다고 하였는데 본 연구에서도 한 조직 절편에서 상피 전층에서의 강한 반응, 기저층 및 과립세포층에서의 강한 반응 또는 전혀 반응이 없는 부위가 다양하게 존재하는 양상을 보였다. 또한 동일 진주종 증례에서도 진주종 조직의 중이내 위치에 따라 반응양상이 다양하였다. 이는 진주종에서 조절되지 못한 상피성장인자 및 그 수용체의 과다 발현을 시사하는 소견이라 간주된다. 본 연구에서는 특히 과립 세포층에서 강한 반응을 보인 경우가 많았는데 Stammberger 등[43]이 지적한 바와 같이 진주종에서는 상피세포의 단백질 및 keratohyalin 등의 합성이 증가하여 과립 세포층이 두꺼워진 탓으로 보인다. 또, 과각화로 인한 각질층내의 상피세포의 존재로 말미암아 각질층에서도 일부 양성반응을 볼 수 있었다. Sudhoff 등[44]은 진주종에서 peroxidase - antiperoxidase(PAP), AP - AAP, avidinbiotin peroxidase complex(ABC) 등을 이용한 면역조직화학법을 시행하여, 진주종의 상피하 기질에 모인 림프구, 대식세포 등 면역세포들에서 interleukin - 1, 변환성장인자 알파, 상피성장인자, 상피성장인자 수용체 등의 발현을 증명하였고, 이들이 상피세포를 자극하여 과증식을 유발한다고 주장하였다. Yukako[10][11]는 진주종을 육아조직 및 분비물의 양에 따라 활동형과 비활동형으로 나누고 육아조직 및 분비물이 많은 활동형 진주종에서는 상피성장인자의 표현이 강하게 나타나며 또한 각질층 및 상피하 조직에서의 반응정도와 진주종의 성장 및 골파괴의 정도가 비례한다고 보고하였다. 본 연구에서도 상피에서 상피성장인자 수용체의 발현이 강한 곳은 대체로 상피하 조직에서도 그 발현을 볼 수 있었다. 그러나 일부 예에서는 상피와 상피하 조직에서의 발현이 일치하지 않았고, 비진주종성 중이염의 외이도 피부나 중이 육아종의 상피하 조직에서의 이들 유전자의 발현 등도 관찰할 수 있었다. 또 진주종의 각질층이 매우 팽창하여 상피하 조직이 아주 얇거나 소실된 경우에도 상피층에서 강한 양성반응을 볼 수 있었다. 따라서 상피하 조직에서의 상피성장인자 수용체 mRNA 및 단백의 발현은 진주종에서 축적된 각질층의 세균감염에 의한 염증세포의 침윤, 신생혈관의 증가 등에 기인한 것으로, 상피층의 증식과는 무관한 현상으로 해석될 수 있다고 생각된다.

In situ hybridization으로 상피성장인자 수용체 mRNA의 분포를 보면 면역조직화학법으로 실험한 경우에서와는 달리 진주종의 각질층에서의 상피성장인자 수용체 mRNA의 발현은 관찰되지 않았다. 진주종 실험군 중 3례의 외이도 후상부 피부는 동일 증례의 진주종 조직에서와 같이 상피 전층에서 강한 양성반응을 보였다. 모두 상고실 진주종으로 개방형 유양동삭개술 및 고실성형술을 시행했던 증례의 외이도 후상부 고막륜 근처의 피부였으며, 이는 진주종귀에서 이 부분 피부의 과다증식능을 뒷받침한다고 할 수 있다.

비진주종귀의 외이도 후상부 피부는 기저층에서 상피성장인자 수용체의 경미한 발현을 보였고 후이개 피부와의 발현양상의 차이는 없었다.

편평상피화한 중이점막은 상피 전층에서 상피성장인자 수용체 및 그 mRNA가 강한 양성반응을 보였다. 따라서 편평상피 화생을 일으킨 중이점막은 상피의 과증식으로 인해 진주종으로 진행할 가능성이 높으므로 중이수술시 철저히 제거해야 할 것으로 생각된다.

면역조직화학적 염색에서 상피성장인자 수용체가 발현하지 않았던 진주종 13례 중 6례에서는 in situ hybridization에서 상피성장인자 수용체 mRNA가 발현하였다. 이는 Kojima 등[12], 조 등[45]이 지적한 바와 같이 in situ hybridization이 좀 더 민감도가 높은 방법인 것으로 생각된다. 또, 세포핵에서 상피성장인자 수용체 유전자가 발현하더라도 세포질에서 상피성장인자 수용체가 합성되지 않을 수도 있으므로 mRNA in situ hybridization이 더 정확한 검사법이라 할 수 있다.

본 연구에서 진주종 34례 중 7례는 두 방법 모두에서 상피성장인자 수용체 mRNA와 단백의 발현이 전혀 없었다. 이는 진주종의 상피증식이 상피성장인자 수용체 뿐 아니라 interleukin, cytokeratin 그리고 기타 피부성장인자들과 함께 아직 밝혀지지 않은 다른 여러 인자의 복합적인 영향을 받고 있음을 암시해 준다. 이런 여러가지 성장인자 혹은 그 유전자에 대한 검색이 동시에 시행되면 진주종의 과각화의 원인에

관한 좀 더 확실한 단서를 찾을 수 있을 것이다.

결 론

진주종 상피의 과증식에 대한 상피성장인자 수용체의 역할을 규명하기 위해 34례의 진주종 환자에서 채취한 진주종 조직편과 7례의 비진주종성 중이염 환자의 외이도 및 후이개 피부편의 파라핀 포매조직을 이용하여 상피성장인자 수용체 mRNA와 단백의 진주종 조직내 분포를 보고자 in situ hybridization 및 면역조직화학법을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) In situ hybridization에서 진주종은 18례(52.9%)에서 상피성장인자 수용체 mRNA가 상피 전층에서 세포질에 강하게 발현하였다.

2) 면역조직화학법에서 진주종은 15례(44.1%)에서 상피성장인자 수용체 단백이 상피 전층에 걸쳐 주로 세포질내, 특히 세포막에 연하여 막성으로 강하게 발현하였다. 그 중 과립 세포층에서 밀집된 발현을 보이는 것이 6례(17.6%)였다.

3) 비진주종성 중이염의 외이도 및 후이개 피부는 3례에서 in situ hybridization에 의해 상피성장인자 수용체 mRNA가, 4례에서 면역조직화학법에 의해 상피성장인자 수용체 단백이 기저층에서 약한 반응을 보였다.

4) 상피하 기질에서의 상피성장인자 수용체 mRNA의 발현은 진주종에서 림프구 등 면역세포에서 발현하였다. 그러나 일부 진주종의 상피하 조직에서는 발현이 없는 반면, 비진주종성 중이염 환자의 외이도 상피하 조직에서의 발현도 관찰되었다.

5) 진주종 7례에서는 상피성장인자 수용체 mRNA와 단백이 모두 발현되지 않았다.

이상으로 볼 때 진주종 상피전층에서의 상피성장인자 수용체 mRNA나 단백의 강한 발현은 상피의 과증식을 나타내는 표지자의 하나로 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다. 그러나 일부 예에서는 상피성장인자 수용체 mRNA나 단백의 발현이 전혀 없어 진주종의 특징적인 상피의 과증식에는 상피성장인자 수용체 뿐 아니라 다른 여러 상피증식인자가 관여하는 것으로 생각되어 차후 이들의 유전자 및 단백에 대한 연구가 필요하리라 생각된다. 그리고, 진주종 상피하 조직에서의 상피성장인자 수용체 mRNA나 단백의 발현은 본 연구에서는 일관된 현상이 아니었으므로 좀 더 많은 연구와 보완이 필요할 것으로 생각된다.

References

1) Tumarkin A : *Pre-epidermosis. J Laryngol. 1961 ; 75 : 487-500*
2) Mcguckin F : *Nonmalignant destructive ear disease. Arch Otolaryngol. 1963 ; 78 : 358-363*
3) Cawthorne T : *Congenital cholesteatoma. Arch Otolaryngol. 1963 ; 78 : 248-252*
4) Derlackie E, Clemis J : *Congenital cholesteatoma of the middle ear and mastoid. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1985 ; 74 : 705-727*
5) Bujia J, Schilling V, Holly A, Stammberger M, Kastenbauer E : *Hyperproliferation associated keratin expression in human middle ear cholesteatoma. Acta Otolaryngol. 1993 ; 113 : 364-368*
6) Huang CC, Ahn JM, Huang TY, et al : *Growth factor's role in the growth of chole steatoma. In : Nakano Y. Proceedings of the international conference on cholesteatoma and mastoid surgery. Amstelveen, The Netherlands : Kugler Publications, 1993 : 211-214*
7) Bujia J, Holly A, Schilling V, Negri B, Pitzke P, Schulz P : *Aberrant expression of epidermal growth factor receptor in aural cholesteatoma. Laryngoscope. 1993 ; 103 : 326-329*
8) Boonstra J, de Laat SW, Ponec M : *Epidermal growth factor receptor expression related to differentiation capacity in normal and transformed keratinocytes. Exp Cell Res. 1985 ; 161 : 421-433*
9) Nanney LB, Mckanna JA, Stoscheck CM, et al : *Visualization of epidermal growth factor receptors in human epidermis. J Invest Dermatol. 1984 ; 82 : 165-169*
10) Yukako G : *Epidermal growth factor in Cholesteatoma. The second report : The localization in the horny layer. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. 1990 ; 93 : 1192-1199*
11) Y ukako G : *Epidermal growth factor in cholesteatoma. The first report : The localization in the cholesteatoma tissue. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. 1990 ; 93 : 1186-1191*
12) Kojima H, Shiwa M, Kamide Y, Moriyama H : *Expression and localization of mRNA for epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor*

in human cholesteatoma. Acta Otolaryngol Stockh. 1994 ; 114 : 423-429

13) Schulz P, Bujia J, Holly A, Schilling V, Kastenbauer E : *Possible autocrine growth stimulation of cholesteatoma epithelium by transforming growth factor alpha. Am J Otolaryngol. 1993 ; 14 : 82-87*
14) Gill NG, Bertis PJ, Santon JB : *Epidermal growth factor and its receptor. Mol Cell Endocrinol. 1987 ; 51 : 169-186*
15) Taketany Y, Ota T : *Biological action of epidermal growth factor and its functional receptors in normal mammary epithelial cells. Proc Natl Acad USA. 1983 ; 80 : 2647-2650*
16) Marks F : *What's new in oncogenes and growth factors. Pathol Res Pract. 1987 ; 182 : 831-848*
17) Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, et al : *Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature (Lond) 1986 ; 319 : 230-234*
18) Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, et al : *The product of the human c-erb-2 gene : a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science. 1986 ; 232 : 1644-646*
19) Downward J, Yarden Y, Mayes E, et al : *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. Nature. 1984 ; 307 : 521-527*
20) Damjanov I, Mildner B, Knowles BB : *Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptor in normal human tissues. Lab Invest. 1986 ; 55 : 588-597*
21) King LE, Gates RE, Stoscheck CM, Nanney LB : *Epidermal growth factor/Transforming growth factor alpha receptors and psoriasis. J Invest Dermatol. 1990 ; 95 : 10-12*
22) Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, et al : *Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. Nature. 1984 ; 309 : 418-425*
23) Libermann TA, Razon N, Bartal AD, et al : *Expression of epidermal growth factor receptor in human brain tumors. Cancer Res. 1984 ; 44 : 753-760*
24) Nicholson S, Sainsbury JRC, Needham GK, et al : *Quantitative assays of epidermal growth factor receptor in human breast cancer, cut-off points of clinical relevance. Int J Cancer. 1988 ; 42 : 36-41*
25) Berger MS, Greenfield C, Gullick WJ, et al : *Evaluations of the epidermal growth factor receptors in bladder tumors. Br J Cancer. 1987 ; 56 : 553-557*
26) Cerny T, Barnes DM, Hasleton P, et al : *Expression of epidermal growth factor receptor in human lung tumors. Br J Cancer. 1986 ; 54 : 265-269*
27) Flizpatrick SL, Brightwell J, Wittliff JL, et al : *Epidermal growth factor binding by breast tumor biopsies and relationship to estrogen receptor and progestin receptor levels. Cancer Res. 1984 ; 44 : 3448-3453*
28) Hwang DL, Tay YC, Lin SS, et al : *Expression of epidermal growth factor receptors in human lung tumors. Cancer. 1986 ; 58 : 2260-2263*
29) Neal DE, Marsh C, Bennett MK, et al : *Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer : comparison of invasive and superficial tumors. Lancet 1985 ; I : 366-368*
30) Ozanne B, Richards CS, Hendler F, et al : *Overexpression of the epidermal growth factor receptor is a hallmark of squamous cell carcinoma. J Pathol. 1986 ; 149 : 9-14*
31) Sobol RE, Astarita RW, Hofeditz, et al : *Epidermal growth factor receptor expression in human lung carcinomas defined by monoclonal antibody. J Natl Cancer Inst. 1987 ; 79 : 403-407*
32) Veale D, Ashcroft T, Marsh C, et al : *Epidermal growth factor in non-small cell lung cancer. Br J Cancer. 1987 ; 55 : 513*
33) Dazzi H, Hasleton PS, Thatcher N, et al : *Expres-ssion of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung cancer. Use of archival tissue and correlation of EGFR with histology, tumor size, node status and survival. Br J Cancer. 1989 ; 59 : 746-749*
34) Dittadi R, Gion M, Pagan V, et al : *Epidermal growth factor receptor in lung malignancies. Comparison between cancer and normal tissue. Br J Cancer. 1991 ; 64 : 741-744*
35) Hofler H : *In situ hybridization. A Review Pathol Res Pract. 1987 ; 182 : 421-430*
36) Crabbe MI : *Partial sequence homologies between cytoskeletal proteins, c-myc, Rous sarcoma virus and adenovirus proteins, transducin and gammacrystalline. Biosci Rep. 1985 ; 5167-174*
37) Hofler H, Childers H, Montminy MR, Goodman RH, Lechan RM, DeLellis RA, et al : *Localization of somatostatin mRNA in the gut, pancreas and thyroid gland of the rat using antisense RNA probes for in situ hybridization. Acta Histochem Suppl. 1987 ; 34 : 101-105*
38) Lathe R : *Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data : theoretical*

and practical considerations. J Mol Biol. 1985 ; 183 : 1-12

39) Valdes R, Brown BA, Graves SW : *Variable crossreactivity of digoxin metabolites in digoxin immunoassay. Am J Clin Pathol. 1984 ; 82 : 210-213*

40) Herrington CS, Burns J, Graham AK, et al : *Interphase cytogenetics using biotin and digoxigenin labelled probes II : simultaneous detection of two nucleic acid species in individual nuclei. J Clin Pathol. 1989 ; 42 : 601-606*

41) Campell DJ, Habener JF : *Cellular localization of angiotensin gene expression in brown adipose tissue and mesentery : Quantification of mRNA abundance using in situ hybridization. Endocrinology. 1987 ; 121 : 1616-1626*

42) Murray GI, Ewen SWB : *A novel method for optimum biopsy specimen preservation for histochemical and immunohistochemical analysis. Am J Clin Pathol. 1991 ; 95 : 131-136*

43) Stammberger M, Bujia J, Kastenbauer E : *Alteration of epidermal differentiation in middle ear cholesteatoma. Am J Otol. 1995 ; 16 : 527-531*

44) Sudhoff H, Bujia J, Holly A, Kim C, Eckhoff AF : *Functional characterization of middle ear mucosa residues in cholesteatoma samples. Am J Otol. 1994 ; 15 : 217-221*

45) Cho JS, Park JB, Yu YC, Kim EJ, Lee CW, Park CS : *In situ mRNA hybridization and an immunohistochemical study of EGFR in oral cavity squamous cell cancer. Korean J Otolaryngol. 1996 ; 39 : 805-813*