KISEP Otology Korean J Otolaryngol 2003;46:464-8

레티노인산 결핍에 의한 사람 중이점막 상피세포의 각화편평상피세포로의 분화

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 두뇌한국21의과학사업단[2]
최재영[1] · 강주완[1] · 윤주헌[1,2]

Retinoic Acid Depletion Induces Keratinizing Squamous Differentiation in Human Middle Ear Epithelial Cell Culture

Jae Young Choi, MD[1], Ju Wan Kang, MD[1] and Joo-Heon Yoon, MD[1,2]
[1]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul; and [2]BK21 Project for Medical Science, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : The pathogenesis of cholesteatoma behind an intact tympanic membrane remains controversial. Squamous metaplasia of the middle ear mucosa is thought to be a possible mechanism in such cases. However, to date, no definitive experimental results have proved the association. This study was undertaken to investigate whether normal human middle ear epithelial (NHMEE) cells undergo keratinizing squamous differentiation in retinoic acid (RA)-deficient culture. **Materials and Method** : We examined the morphological differences between RA-deficient and RA-sufficient cultures, and determined the expressions of the mucin gene and cornifin-α mRNAs as indicators of mucous and squamous differentiation, respectively. **Results** : Histomorphologically, the NHMEE cells differentiated into a keratinizing squamous epithelium in RA-deficient culture. In addition, the expressions of mucin gene 5AC (*MUC5AC*) and *MUC8* mRNA were suppressed, and the expression of cornifin-α mRNA increased progressively as a function of differentiation in RA-deficient culture. **Conclusion** : Our study shows that RA depletion induces keratinizing squamous differentiation in NHMEE cell culture. **(Korean J Otolaryngol 2003;46:464-8)**

KEY WORDS : Middle ear · Cell culture · Cholesteatoma · Squamous differentiation · Retinoic acid.

서 론

중이진주종은 각화편평상피세포의 과증식으로 측두골의 파괴를 가져오는데, 그 병인은 고막이나 외이도의 편평상피세포(squamous epithelial cell)가 중이내로 침범하여 생겨나는 것으로 알려져 있다. 함입낭형성(retraction pocket cholesteatoma), 기저세포 과증식 그리고 고막천공을 통한 상피세포의 내향성장이론(migration therory)이 이를 뒷받침 한다.[1-3] 그러나 진주종 상피세포가 외이도나 고막의 상피세포와 연결되어 있지 않는 경우가 있으며, 이런 경우 진주종의 병리 기전을 설명하기 위해 이형성이론(metaplasia theory)이 제안되었다.[4)5)] 이는 중이 점막이 이형성변환(metaplastic change)을 통해 진주종이 형성된다는 것으로, 만성중이염환자의 중이점막에서 편평상피세포가 관찰되는 점이 이를 뒷받침한다.[4)5)] 그러나, 아직 중이점막 상피세포의 편평상피세포로의 이행을 유도하는 인자에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

레티노인산(Retinoic acid ; RA)은 기도 점액섬모상피를 유지하는데 필수적인 인자의 하나로 알려져 있다.[6-9)] 햄스터에서 비타민A를 결핍시켰을 때 기관지의 점액섬모상피가 각화편평상피로 변화하며, 배양된 사람의 호흡기상피세포 또한 RA을 결핍시키면 각화편평상피로 변하게 된다.[7-9)] 중이점막의 경우에도 비타민 A의 부족시 백서의 중이점막이 편평상피로 변화하는 사실이 보고되었다.[10)] 그러나 진주종의 이형성 이론을 뒷받침할 생체 외(*in vitro*)

논문접수일 : 2003년 1월 6일 / 심사완료일 : 2003년 3월 13일
교신저자 : 윤주헌, 120 - 752 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361 - 8482 · 전송 : (02) 361 - 0580
E - mail : jhyoon@yumc.yonsei.or.kr

실험결과는 아직 없는데, 이는 중이 상피 세포의 완전한 분화를 유도할 적절한 방법이 없었기 때문이다. 최근 저자들은 passage - 2 정상사람중이세포(Normal Human Middle Ear Epithelial cells;NHMEE cells)를 배양하여 생체내의 사람중이점막과 그 구조 및 기능이 유사한 점액섬모상피세포로 분화시키는데 성공하였다.[11)12)] 만약 RA가 결핍된 배양환경에서 정상사람중이세포가 편평상피세포로 분화한다면, 이는 중이 진주종의 이형성 이론을 뒷받침할 수 있는 한 증거가 될 것이라 생각한다.

본 연구에서는 RA를 결핍시켰을 때 NHMEE cell이 각화편평상피로 분화되는지를 확인해보고자 하였다. 이를 위해 RA가 결핍된 배양액과 RA가 공급된 배양액에서 배양된 세포의 형태적 차이를 조사하였으며, 두 조건에서 점액세포로의 분화지표인 점액(mucin) mRNA와 편평상피세포로의 분화의 지표로서 cornifin - α mRNA의 발현의 차이를 조사하였다.

재료 및 방법

Air - Liquid interface 배양과 레티노인산(RA)

화학적 미로절제술(chemical labyrinthectomy)을 시행받은 6명의 환자들에서 정상으로 보이는 중이점막을 채취하였다. 채취한 조직은 4℃에서 18시간동안 1% Pronase (type 14 protease, Sigma, St. Louis, MO)를 처리하여 단일세포로 분리한 후, 섬유모세포(fibroblasts)와 내피세포(endothelial cells)의 제거를 위하여 세포를 플라스틱 용기에 넣고 37℃에서 30분간 배양하였다. 이전의 연구[11)12)]에서 기술한 방법대로 passage - 2세포(1×10^5 cells/well)를 Transwell® 배양기(Costar, Cambridge, MA)에서 접종하였고, 이 세포들은 95% 공기와 5%의 CO_2하에서 7~9일간 bronchial epithelial cell basal medium(BEEM)과 Dulbecco 's modified Eagle 's medium(DMEM)의 1 : 1 혼합용액에서 합류(confluence)를 이룰 때까지 배양하였다. 이 후 세포표면의 배양액을 제거함으로써 air - liquid interface(ALI)를 형성하였다. 채취한 합류(confluence)를 이룬 세포들은 레티노인산을 함유한 배양액과 레티노인산을 포함하지 않은 배양액에서 각각 배양되었다. RA를 함유한 배양액에는 10^{-7}M의 *all-trans* retinoic acid을 지속적으로 공급하였으며, 레티노인산 결핍군에서는 레티노인산을 배양액에서 배제하였다. 세포들은 합류(confluence) 이후 각각 7일, 14일, 21일간 각각 배양하였다. 배양액은 매일 갈아주었으며, 각 실험은 세번 이상 시행되었다.

형태학적 관찰

배양조건에 따른 형태학적 차이를 관찰하기 위하여, 반투과막에서 배양된 세포들을 10% 완충중성포르말린으로 고정한 다음, 파라핀으로 고정시키고 각각의 배양시기마다 절편을 만들어 H & E 염색을 시행한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 주사전자현미경관찰(Scanning electron microscopy ; SEM)을 위해서 세포를 2.5% glutaraldehyde에 4~6시간 고정시킨 후 0.1 M 인산 완충용액으로 세척하였다. 1% osmium tetroxide에 2시간 동안 다시 고정한 후 주사전자현미경(H - 800, Hitachi, Japan)을 통해 관찰하였다.

Total RNA 분비 및 northern blot 분석

Total RNA는 Tri - Reagent(Molecular Research Center, Cincinnati, OH)를 이용하여 각각의 배양조건 및 시기에 따라 분리하였다. 10 μg의 RNA를 1.4% agarose gel에 전기영동하여 분리한 후, nylon membrane(Schleicher & Schuell, Keene, NH)에 전이하였다. Membrane을 건조시킨 후, uv - crosslink를 시행한 후, 42℃하에서 1시간동안 prehybridization을 하였다. Prime - a - gene labeling kit (Promega, Madison,WIS)와 [$^{-32}$P] deoxycitidine triphosphate(Dupont NEN, Wilmington, DE)을 이용하여 cornifin - α cDNA fragment(A generous gift from Dr. Jetten AM)과 대조유전자인 β - 2 microglobulin(β - 2M) 50 ng에 radiolabeling을 시행하였다.

점액 mRNAs 발현 및 정량을 위한 reverse transcription (RT) - polymerase chain reaction(PCR)

*MUC5AC*와 *MUC8* mRNAs를 검출하고 정량하기 위한 방법들은 이미 보고된 바 있다.[9)] 이를 간단히 소개하면 위에서 얻어진 total RNA를 cDNA로 역전사(reverse - transcripted)한 후, 이미 알려져 있는 서열에 따라 Oligonucleotide primer를 고안하였다.[9)] Polymerase chain reaction(PCR)의 산물은 ethidium bromide를 포함하고 있는 2% agarose gels(FMC Byproducts, Rockland, ME)을 이용하여 분리하였고, CSC(Chemiluminescences Detection Module ; Retest, Straubenhardt Germany)를 이용하여 bands를 분석하였다.

결 과

레티노인산 함유배양군과 결핍배양군 사이의 세포형태학적 차이

RA 결핍이 NHMEE cells의 분화에 미치는 효과를 관

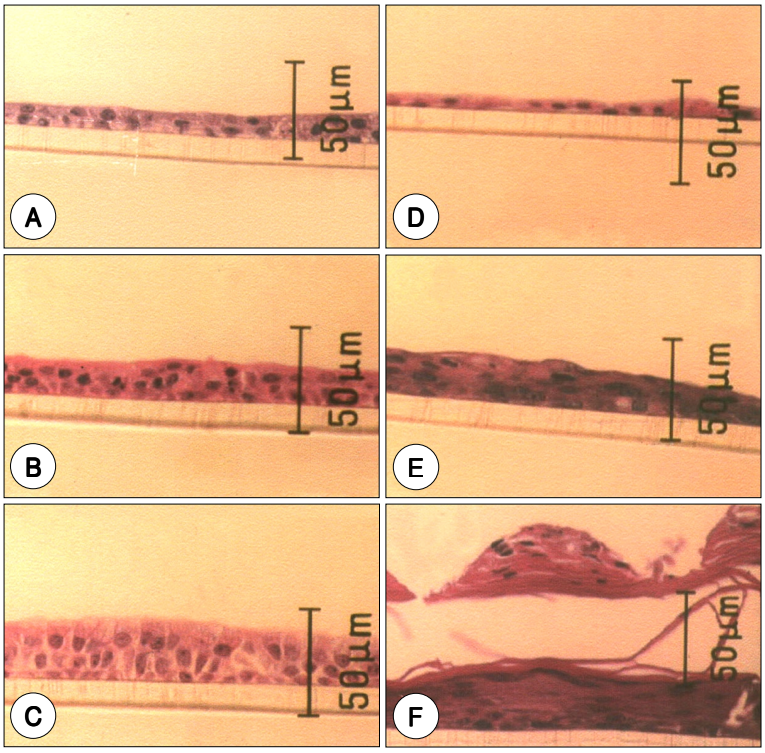

Fig. 1. The effect of retinoic acid (RA)-depletion on the morphology of normal human middle ear epithelial (NHMEE) cells. Cross-sections of intact culture were stained with hematoxylin and eosin. Cells were grown in the presence (A-C) or absence (D-F) of RA for 7 (A and D), 14 (B and E) and 21 (C and F) days after confluence. In the presence of RA, NHMEE cells gradually exhibited a well-organized, pseudostratified columnar epithelium. In the absence of RA, however, the cells formed a multi-layered, stratified squamous epithelium with multiple keratin layers.

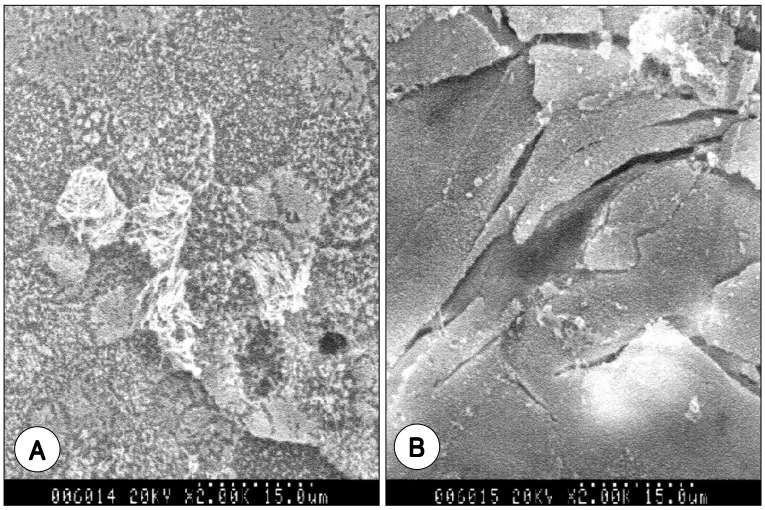

Fig. 2. SEM images of cultured cells on Day 21 after confluence in the presence (A) or absence (B) of retinoic acid.

찰하기 위해, 레티노인산 결핍배양군과 함유배양군을 조직학적 및 주사전자현미경을 통하여 관찰하였다. 레티노인산 함유배양군에서는 합류 후 7일째에 입방형의 세포가 관찰되었고, 14일째에는 원주형의 세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 1A and B). 합류 후 21째에는 상피세포는 극성을 띤 원주형의 형태를 나타내었다(Fig. 1C). 주사전자현미경하에서 섬모세포와 분비세포로 생각되는 풍부한 미세융모를 가진 세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). 이와 대조적으로 배양액에서 레티노인산을 제거한 군에서는 합류 후 7일째에 납작한 핵을 가진 세포들이 한층 내지 두층으로 겹쳐져 나타났으며(Fig. 1D), 합류 후 14일째에는 여러층의 편평상피세포로 진행하였다(Fig. 1E). 21일째에는 각화층(keratin layer)을 가진 중층편평상피세포로 진행하였다(Fig. 1F). 합류 후 21일째의 주사전자현미경 사진은 세포 표면에 존재하고 있는 각화층을 잘 보여주고 있다(Fig. 2B).

레티노인산 결핍이 점액 mRNA 발현에 미치는 효과

점액세포로의 분화에 레티노인산 결핍이 미치는 효과를

보기 위하여, RT - PCR을 이용하여 점액 유전자의 발현을 관찰하였다. *MUC5AC*는 사람호흡기에서 분비되는 주요 점액이며, *MUC8*은 저자들이 이전에 보고한 바대로 정상 사람중이세포의 배양후기에 그 발현이 증가하였다.[12] 레티노인산 함유군에서는 세포가 분화함에 따라 *MUC5AC*와 *MUC8*의 발현이 증가하였으나 레티노인산 결핍군에서는 배양기간에 관계 없이 *MUC5AC*와 *MUC8*의 발현이 증가하지 않았다. 대조군으로 사용된 β - 2M의 경우 배양기간 동안 일정한 발현양상을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과는 레티노인산이 결핍되었을 때 점액세포로의 분화가 유도되지 않는다는 것을 보여준다.

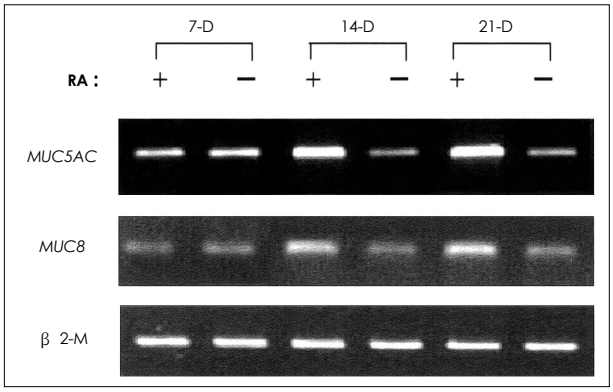

Fig. 3. Time course and retinoic acid (RA) dependence of mucin gene expression in normal human middle ear epithelial (NHMEE) cells. Total RNA was isolated from NHMEE cells in the presence (+RA) or absence (-RA) of RA, and analyzed by RT-PCR. Expression of control gene, β-2M was not affected by the RA.

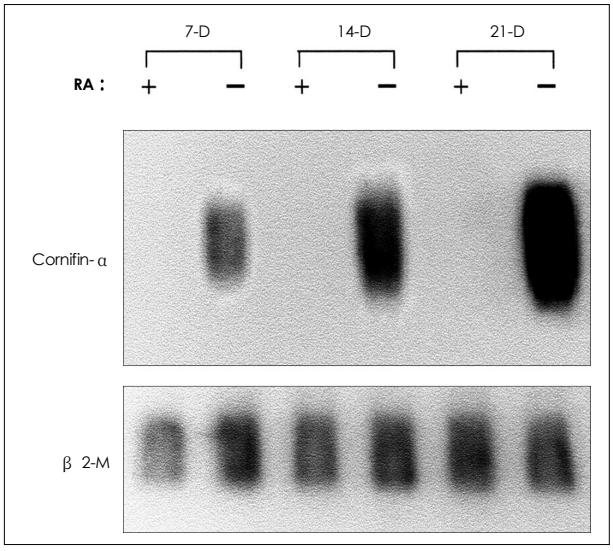

Fig. 4. Time course and retinoic acid (RA) dependence of cornifin-α gene expression in normal human middle ear epithelial (NHMEE) cells. Total RNA was isolated from NHMEE cells in the presence (+RA) or absence (-RA) of RA, and analyzed by northern blot. Approximately 10 μg RNA was loaded per 3-mm lane. Expression of control gene, β2M (*Lower panel*) was unaffected by the RA.

레티노인산 결핍이 Cornifin - mRNA의 발현에 미치는 효과

편평상피세포로의 분화 정도를 살펴보기 위하여, 각화의 마지막 단계에서 발현되는 conifin - α에 대한 northern blotting을 시행하였다. 레티노인산함유군의 경우 배양기간에 관계없이 cornifin - mRNA는 발현되지 않았으나, 배양액에서 레티노인산을 제거하였을 때, 합류 후 7일째에 cornifin - mRNA가 발현되기 시작하여, 분화가 진행됨에 따라 발현이 증가되었다. 대조군으로 사용된 2M의 경우 의미있는 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4). 이러한 결과를 통해 레티노인산결핍이 정상사람중이점막세포의 각화편평상피세포로의 분화를 유도한다는 것을 알 수 있다.

고 찰

기관지 상피세포의 경우 레티노인산결핍 상태에서 배양되었을 때 각화편평상피세포로 분화된다.[7-9] 중이점막세포는 호흡기상피세포와 발생학적으로 같은 기원을 가지고 있기 때문에, 저자들은 레티노인산결핍상태에서 배양될 경우 각화편평상피세포로의 분화를 보일것으로 가정하였다. 저자들은 조직형태학적 연구 결과 레티노인산결핍시 중이점막세포가 합류 후 14일과 21일 사이에 각화편평상피세포로 분화하는 것을 확인하였다. 또한 저자들은 레티노인산결핍이 점액세포로의 분화에 관여되는 유전자(*MUC5AC*와 *MUC8*)의 발현을 억제하는 것과 편평상피세포로의 분화에 관여하는 유전자(cornifin - α)의 발현을 유도하는 것을 확인하였다. 레티노인산 결핍배양하에서 정상사람중이점막의 각화편평상피세포로의 분화는 비점막세포[9]와 기관지상피세포[7][8]에서 보았던 것과 비슷한 양상을 나타내었다. 그러나 중이점막은 호흡기상피세포에서의 결과와는 약간의 차이를 나타내었는데, 첫째 조직학적으로 각질의 형성이나 conifin - α mRNA의 발현이 호흡기상피세포에서보다 5~7일 늦게 나타났다. 이것은 중이점막이 노출된 환경(산소 분압 등)이 다른 호흡기 상피와는 다른 것이 그 원인이 될 것으로 생각된다. 둘째로 저자들이 예비실험에서 bovine pituitary extract를 포함한 배양액으로 정상사람중이점막세포들을 배양하였을 때는 레티노인산이 결핍된 배양환경하에서도 각질층을 형성하는 데는 실패하였다(data not shown). 이 차이는 bovine pituitary extract가 각질의 형성을 억제할 수 있을 정도의 레티노인산을 함유하고 있는 것으로 설명이 되어질 수 있다.

중이점막세포의 편평상피세포로의 이행은 진주종 발생의 한 기전으로 생각된다. 여러 연구자들이 레티노인산 결핍시 동물에서 중이점막이 편평상피세포로 변화하며, 만성

중이염환자의 중이점막내에 중층편평상피세포가 존재함을 보고하였다.[4)5)10)] 그러나 이런 생체내의 연구들은 단지 편평상피세포가 중이 내에 존재함만을 보여주었을 뿐이며, 각화층의 존재는 확인하지 못하였다. 따라서 진주종이 중이상피세포의 이형성에 의해 발생한다는 이론의 근거로는 부족한 상태이다. 이전의 생체내(*In vivo*) 연구와는 달리, 저자들의 실험에서는 레티노인산이 부족한 배양하에서 생체내의 진주종과 비슷한 형태의 각화편평상피세포가 발생함을 보여주었다. 또한 저자들의 실험에서 이형성상피세포의 일부는 이상각화증(Parakeratosis)을 보여주었으며, 이는 진주종과 같은 과증식성 질환에서 흔히 나타나는 현상이다. 레티노인산의 결핍이 중이 점막의 각화편평상피세포로 분화를 유도하는 저자들의 연구결과가 실제 중이점막에서도 일어난다면, 이는 진주종의 이형성 가설을 뒷받침하는 하나의 증거가 될 수 있다. 생체내에서 레티노인산 결핍의 역할을 밝히기 위해서는 사람 중이점막과 진주종에서의 레티노인산의 농도를 측정하는 연구가 필요할 것이다.

이상의 결과를 요약하면 저자들의 연구에서 정상사람중이점막배양시 레티노인산을 결핍시킨 경우 각화편평상피세포로의 분화를 유도할 수 있다는 것을 보여주었다. 레티노인산 결핍이 편평상피세포로의 분화에 미치는 영향을 밝힘으로써 진주종의 병태생리에 대하여 보다 많은 지식을 얻을 수 있을 것이다.

중심 단어 : 중이점막 · 상피세포 · 진주종 · 편평상피 분화 · 레티노인산.

본 연구는 연세대학교 의과대학 신진교수연구비(2002 - 02) 지원에 의하여 이루어짐.

REFERENCES

1) Bluestone CD, Casselbrant ML, Cantekin EI. *Functional obstruction of the Eustachian tube in the pathogenesis of aural cholesteatoma in children. In: Sade J editor. Cholesteatoma and mastoid surgery. Proceedings of the Second International Conference on Cholesteatoma and Mastoid Surgery. Amsterdam: Kugler Publications;1982. p.211-24.*
2) Huang CC, Shi GS, Yi ZX. *Experimental induction of middle ear cholesteatoma in rats. Am J Otolaryngol 1988;9:165-72.*
3) Palva T, Karma P, Makinen J. *The invasion theory in cholesteatoma and mastoid surgery. In: Sade J editor. Cholesteatoma and mastoid surgery. Proceedings of the Second International Conference on Cholesteatoma and Mastoid Surgery. Amsterdam: Kugler Publications;1982. p.249-64.*
4) Sade J, Babiacki A, Pinkus G. *The metaplastic and congenital origin of cholesteatoma. Acta Otolaryngol (Stockh) 1983;96:119-29.*
5) Kuijpers W, Vennix PP, Peters TA, Ramaekers FC. *Squamous metaplasia of the middle ear epithelium. Acta Otolaryngol (Stockh) 1996;116:293-8.*
6) McDowell EM, Keenan KP, Huang M. *Effects of vitamin A-deprivation on hamster tracheal epithelium: A quantitative morphologic study. Virchows Arch B Cell Pathol 1984;45:197-219.*
7) Yoon JH, Gray T, Guzman K, Koo JS, Nettesheim P. *Regulation of the secretory phenotype of human airway epithelium by retinoic acid, triiodothyronine, and extracellular matrix. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;16:724-31.*
8) Koo JS, Yoon JH, Gray T, Norford D, Jetten AM, Nettesheim P. *Restoration of the mucous phenotype by retinoic acid in retinoid-deficient human bronchial cell cultures: changes in mucin gene expression. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20:43-52.*
9) Yoon JH, Kim KS, Kim SS, Lee JG, Park IY. *Differentiation of serially passaged normal human nasal epithelial cells by retinoic acid: expression of mucin and lysozyme. Ann Otol Rhinol Laryngol 2000;109:594-601.*
10) Chole RA. *Squamous metaplasia of the middle ear mucosa during vitamin A deprivation. Otolaryngol Head Neck Surg 1979;87:837-44.*
11) Moon SK, Lim DJ, Lee HK, Kim HN, Yoo JH. *Mucin gene expression in cultured human middle ear epithelial cells. Acta Otolaryngol (Stockh) 2000;120:933-9.*
12) Choi JY, Kim CH, Lee WS, Kim HN, Song KS, Yoon JH. *Ciliary and secretory differentiation of normal human middle ear epithelial cells. Acta Otolaryngol (Stockh) 2002;122:270-5.*
13) Marvin KW, George ME, Fujimoto W, Saunders MA, Bernacki S, Jetten AJ. *Cornifin, a cross-linked envelope precursor in keratinocytes that is down-regulated by retinoids. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:11026-30.*
14) Broekaert D, Van Oostveldt P, Coucke P, Reyniers P, Kluyskens P, Gillis E. *Differentiation of nuclei during keratinization in middle ear cholesteatoma: NA cytophotometry completed by computerized image analysis. Acta Otolaryngol (Stockh) 1988;105:90-9.*