

성대의 양성질환과 편평상피세포암에서
Nitric Oxide Synthase 유전자 발현

연세대학교 대학원

의 과 학 과

조 정 일

성대의 양성질환과 편평상피세포암에서
Nitric Oxide Synthase 유전자 발현

지도 최 홍 식 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2003년 6월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

조 정 일

조정일의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2003년 6월 일

감사의 글

짧지 않은 학위 과정을 끝내면서 송구스러운 마음으로 학위 논문을 완성하게 되었습니다. 그간 개인적인 어려움이 많았지만 믿고 도와주신 주위 분들에게 너무도 큰 신세를 지는 것 같습니다. 항상 따듯한 격려와 배려를 아끼지 않으신 최홍식 지도교수님과 윤주현 지도교수님께 감사드리며 연동수 교수님, 김영호 교수님, 김세현 교수님께 감사드립니다. 연구의 기획과 진행 과정에 조언과 도움을 주신 인하의대 박창신 교수님과 동승모 님께 감사드립니다.

힘들었을 때나 즐거웠을 때나 항상 같이한 나의 사랑스러운 가족 아내 정은이와 두 아들 민영, 윤영이에게 사랑한다는 말을 이 논문에 담고 싶습니다.

저자 씀

목 차

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	8
1. 조직의 채취	8
가. 정상 성대조직에서의 NO 신경지배의 확인	8
나. 성대 질환에서 NO의 발현의 차이	8
2. RT-PCR을 통한 mRNA의 측정	9
3. Western blot을 이용한 단백질 정량 분석	11
4. NADPH consumption rate를 이용한 NOS activity의 측정	12
5. 면역조직화학 염색	12
6. 면역전자현미경 연구	13
III. 결과	14
1. 정상 성대 조직에서 NO 신경지배	14
가. nNOS mRNA의 발현	14
나. nNOS 특이 단백질의 발현	15
다. 성대조직내 nNOS의 국소 분포	15
2. 성대 질환에서 NO 발현의 차이	17
가. 성대질환의 면역조직화학적 염색	17

(1) iNOS의 발현	18
(2) eNos의 발현	18
나. Western-blot	19
3. 성대질환에서 NOS activity(NADPH 소비율)	22
4. 성대폴립과 성대 상피암에서의 면역전자현미경 연구	23
IV. 고찰	25
V. 결론	38
참고문헌	39
영문요약	47

그림 차례

Figure 1. Expression of nNOS mRNA and protein in human vocal fold using RT-PCR and Western-blot	14
Figure 2. Expression of nNOS mRNA and protein in the rat vocal fold using RT-PCR and Western-blot	15
Figure 3. Photomicrographs of nerve fibers stained immunohistochemically with anti-nNOS in the human vocal fold	16
Figure 4. Photomicrographs of nerve fibers stained immunohistochemically with anti-nNOS in the rat vocal fold.	16
Figure 5. Photomicrographs of squamous epithelium stained with anti-iNOS	17
Figure 6. Photomicrographs stained with anti-eNOS in a squamous cell carcinoma and vocal polyp	18
Figure 7. Western-blot analysis of iNOS expression in normal mucosa, vocal polyp, dysplasia and squamous carcinoma	20
Figure 8. Western-blot analysis of eNOS expression in normal mucosa, vocal polyp, dysplasia and squamous carcinoma	21

Figure 9. Western-blot analysis of nNOS expression in normal mucosa, vocal polyp, dysplasia and squamous carcinoma	21
Figure 10. NOS activity in normal mucosa, vocal polyp, and carcinoma	22
Figure 11. Transmission electron microscopic finding of squamous carcinoma stained with anti-iNOS	23
Figure 12. Transmission electron microscopic finding of squamous carcinoma stained with anti-eNOS	24
Figure 13. Transmission electron microscopic finding of vocal polyp stained with anti-eNOS	24

표 차례

Table 1. Oligonucleotide primers & PCR product size for nNOS DNA	10
Table 2. iNOS and eNOS expression in normal mucosa, vocal nodule, vocal polyp, dysplasia and squamous carcinoma.	19

국문요약

성대의 양성 질환과 편평상피세포암에서 Nitric Oxide Synthase 유전자 발현

연구배경 Nitric oxide(이하 NO)는 많은 조직과 세포로부터 nitric oxide synthase(이하 NOS)라는 효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는데 NO는 중요한 세포간 정보전달물질 중 하나로서 신체 전부에 걸쳐 신경계와 면역계, 심혈관계 등에서 광범위한 세포학적 기능에 영향을 주고 여러 가지 질병에도 관여하는 것으로 밝혀지고 있다. 특히 호흡기의 NO는 대부분 상기도에서 생성되고 하기도는 부분적 역할만 한다는 것이 밝혀졌으며 인간의 호기(expiratory phase)의 NO는 비강에서 주로 생성되며 비강 질환의 생성에 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 상기도강 중 인간의 성대 조직에서 NO 관련 신경의 국소 분포와 기능에 관한 연구는 극히 드문 실정으로 더욱이 암종을 비롯한 성대의 각종 질환에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 정상 성대조직에서 NO 관련 신경의 후두 지배 양상을 살펴보고 또한 양성 성대 질환과 성대암종에서 후두의 주요 신경전달물질의 하나인 NO의 유전자적 발현과 국소 분포의 차이를 살펴보고자 하였다.

연구목적 본 연구에서는 흰쥐와 인간의 정상 성대 조직에서 nNOS의 발현을 살펴봄으로써 성대조직에서 NO가 신경전달물질로 작용할 수 있음을 제시하고자 하였으며 성대 결절과 폴립성 질환, 이형성증 및 편평상피세포암에서의 NO 연관성을 NOS의 3가지 아형인 nNOS, iNOS, eNOS의

국소 분포, 발현 정도의 차이를 살펴 보고 아울러 세포내 NO의 기원을 밝힘으로써 성대 질환에서 NO 관련성을 추정해보고자 하였다.

연구방법 인간의 정상 성대조직 5례와 5마리 흰쥐에서 얻은 성대조직을 이용하여 nNOS에 대한 RT-PCR, Western-blot 분석, anti-nNOS 면역조직학적 염색을 하여 nNOS 유전자의 발현을 살펴보고 성대 조직내 NO 지배신경의 국소 분포를 살펴보았다. 성대폴립 15례, 성대결절 10례, 후두이형성증 5례, 성대암(편평상피세포암) 8례 환자의 조직에서 anti-nNOS, anti-eNOS, anti-iNOS에 대한 면역조직화학염색, Western-blot, NADPH 소비율을 측정하여 각 질환별 NOS 발현의 차이를 알아보았다. 성대폴립 조직과 성대암 조직에서는 NO 발현의 근원을 알아보기 위해 anti-eNOS, anti-iNOS에 대한 면역전자현미경연구를 시행하였다.

연구결과 RT-PCR을 이용하여 nNOS mRNA의 증폭산물을 검출한 결과 인간의 성대조직(761 bp)과 흰쥐의 성대조직(401 bp)에서 nNOS mRNA 역전사 증폭 산물이 발현되었으며 nNOS Western-blot 검사 결과로 확인하였다. 성대조직내 nNOS는 상피세포의 기저부와 고유층내 분비선 주위와 혈관 주위에 집중되어 있었다. 정상 성대조직에서의 iNOS의 발현은 성대결절, 성대 폴립, 이형성증, 편평상피세포암에 비해 통계적으로 유의있게 낮았으며 성대결절과 성대폴립간에 iNOS의 발현의 차이는 통계적으로 의의가 없었다. eNOS에 대한 반응은 성대폴립의 경우 성대결절에 비해 eNOS 양성반응이 강하게 관찰되었으나 이형성증 및 상피세포암과는 통계적인 차이를 보여주지 못하였다. 정상성대조직에 비해 성대폴립, 성대상피암에서 NOS activity가 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었으며 상피

암조직에서 폴립보다 높은 activity를 보였다. 성대폴립에서는 EGTA 처리 후 NOS activity가 정상 수준으로 감소하였으나 성대상피암에서는 EGTA 처리 후 다양한 양상을 보였다. 성대폴립과 성대상피암에서의 면역전자현미경 연구에 의하면 종양세포와 단핵세포의 세포질에서 반응 particle을 관찰할 수 있었으며 특히 세포질의 변연부의 분비과립내에서 많은 NO particle을 관찰할 수 있었다.

결론 흰쥐와 인간의 성대조직에서 NO가 신경전달물질로 관여한다는 사실을 알 수 있었으며 다른 신경조직에서와 마찬가지로 nNOS가 NO의 생산을 담당한다는 것을 확인하였다. 정상성대조직, 성대양성질환, 후두이형성증, 후두암 조직에서 NO를 생성할 수 있는 각각의 NOS의 발현에 차이가 있었으며 암조직에서는 특히 iNOS, eNOS가 강하게 발현되었고, 성대양성질환에서는 eNOS가 강하게 발현되는 것으로 보아 성대의 각 질환에서 iNOS와 eNOS가 주된 역할을 할 것으로 추정되었다.

핵심되는 말 : 성대, NO, NOS, 성대폴립, 후두암

성대의 양성 질환과 편평상피세포암에서 Nitric Oxide Synthase 유전자 발현

<지도교수 최홍식>

연세대학교 대학원 의과학과

조 정 일

I. 서 론

짧은 반감기를 갖고 L-arginine으로부터 생성되는 nitric oxide(이하 NO)는 NADPH, 산소분자를 기질로 하는 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 생성된다. NOS에는 constitutive NOS(이하 cNOS)와 inducible NOS(이하 iNOS)의 아형이 있으며 최근에는 cNOS도 endothelial form(이하 eNOS)과 neuronal form(이하 nNOS)으로 대별되어 모두 세가지 종류의 아형이 존재한다. nNOS는 주로 중추 및 말초신경조직에서 검출되며 새로운 신경전달물질로써 알려져 있으며 eNOS는 혈관내피에서 발견되며 혈관 평활근의 조절에 관여한다. iNOS는 대식구, 호흡상피세포 등 다양한 조직에서 발견되는데 다른 세포학적 기능과 함께 면역조절과 세포독성 기전에 관여하는 것으로 알려져 있다. NO는 반감기가 짧아서 직접 측정할수 없기에 NO를 생산하는 매개체인 NOS를 이용하여 간접적으로 측정하고 있다.¹⁻²

NO는 다양한 세포 군에서 발견되면서 그 광범위한 생체 내 역할이 예견

되고 있었다. 즉, NO는 중요한 세포간 정보전달물질의 하나로서 생체 내 전 기관에 걸쳐 신경계와 면역계, 심혈관계 등에서 세포간 상호작용, 세포 독성, 세포증식 억제성, 항상성 기전, 그리고 염증반응을 비롯한 많은 생리학 과정에 관여하고 있는데 뇌, 간, 심장, 연골 및 부신 등 다양한 조직에서 병변의 매개체로, 또는 보호물질로 알려져 있다.³⁻⁵ 인간의 호기 (expiratory phase)의 NO의 존재는 Gustafsson 등에 의해 처음 기술되었고 이후 비강내 NO의 존재가 보고 되면서 호흡기의 NO는 대부분 상기도에서 생성되고 하기도는 부분적 역할만 한다는 것이 밝혀졌다.⁶⁻⁷ 기도에서의 NO의 역할은 주로 신경전달물질로서의 역할을 하는데 염증반응이나 지혈반응, 그리고 혈관생성이나 혈관의 근육긴장도를 조절하는 것으로 알려져 있다. 상기도에서 NO의 연구는 비강에서 활발하게 연구되고 있으며 알레르기성 비염과 비폴립 등에서 iNOS 매개에 의해 상피세포층에서 생성된 NO가 염증반응을 조절하여 비강 질환의 생성과정에 관여하는 것으로 보고되었다.⁸ 후두의 NO 관련 신경 지배에 관해서는 어디에서 얼마만큼의 NO가 생성되는지 정확히 알려져 있지 않지만, 성대 상피층과 고유층에 NO 관련 신경 조직이 존재하고 생성된 NO는 상기도강으로 확산되는 것으로 알려졌다.

성대질환은 양성 질환, 이형성증, 종양성 질환으로 대별된다. 성대의 양성 질환은 성대 폴립, 결절, 라인케 부종, 그리고 기타 접촉성 육아종이나 궤양성 병변을 말하는데 이러한 성대 양성 질환의 발생 기전에 대해서는 아직까지는 명확하지 않으나 음성의 과도한 사용에 의한 물리적 충격과 이에 수반되는 반응에 의하며 성대 상피층의 기저막대와 성대 고유층이 변화를 일으키는 것으로 설명하고 있다.⁹⁻¹³ 하지만 아직까지 반복적인 음성충격 후 결절성 질환(nodular lesion; nodule)과 폴립성 질환(polypoid lesion; polyp, edema)으로 나뉘어져 발생하는 그 기전은 명확하지 않다. 즉, 성대 손상 후 양성 성대 질환에서 보이는 주요 병리학적 소견은 기저막의 비후,

부종, fibrin 축적, iron 축적, hemorrhage, 염증성 반응, thrombosis, 혈관벽의 비후 등 다양하게 나타날 수 있는데 최근 출혈의 흔적을 보이면서 iron, fibrin의 축적, 혈전이 보이면 성대 폴립을 진단할 수 있고 기저막의 비후와 함께 부종, 출혈의 흔적이 있으면서 혈관벽의 비후를 동시에 보이면 라인케 부종을 진단할 수 있으며, 기저막이 비후되었으나 출혈의 흔적이거나 부종을 동반하지 않으면 결절을 진단할 수 있다. 알레르기성 비염과 비폴립, 만성 부비동염 환자에서 시행한 분자생물학적 연구에 의하면 정상 조직에 비해 염증성 비강 질환에서 NOS의 활성도가 증가되는 것이 보고되었는데 iNOS의 활성도가 cNOS 보다 훨씬 증가되는 것을 관찰할 수 있었다 하며 그 분포는 주로 상피층에 국한되어 있다고 하였다.¹⁴⁻¹⁸ 이와같이 NO가 비강 질환의 발생 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지며 비폴립 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 이러한 사실은 성대의 결절양 병변과 폴립양 병변의 생성 과정에 NO 연관성을 추정해 볼 수 있으며 특히 NO의 여러 가지 작용 중 혈관의 이완작용에 의한 투과성의 증대는 결절과 폴립의 병리학적인 차이를 뒷받침할 수 있을 것으로 사료된다.

성대이형성증 및 성대암의 발생 기전은 아직 정확하게 알려지지 않았으나 polynuclear hydrocarbons나 N-nitroso compound와 같은 화학물질들이 발암기전에 중요하게 작용하는 것으로 생각되고 있으며 또 실제로 담배연기와 알코올에 ethyl nitrate가 과량 함유된 것으로 알려져 있다.¹⁹ 이러한 화학 물질들은 세포내 효소에 의해 대사 및 활성화되어 강력한 발암인자로 변화되고 이로 인하여 비정상적인 상피세포의 증식의 결과로 과각화 및 세포 이형성으로 진행하게 된다. 악성변화와 세포이형성은 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있으며 세포이형성을 동반한 경우 이형성을 동반하지 않은 경우 보다 10배 이상 암의 발생률이 높은 것으로 알려져 있다. 최근 많은 연구자들에 의해 암종 조직에서의 NO의 역할이 연구되면서 혈

관증식, 면역억제, 돌연변이 유발, 세포독성 및 전이 등에 직접 관여할 것으로 보고되고 있다.²⁰⁻²⁴ NO는 발암성 nitrosamine의 내인성 생성이나 DNA nucleotide의 탈아미노화를 통해 혈관증식 및 생성에 관여하는 것으로 보이며 염증조직에서의 NO의 과도한 생성은 p53의 종양억제기능을 저해함으로써 발암기전에도 일익을 할 것으로 생각된다. 그러나 각 암종마다 NOS의 발현과 활성도에 차이가 있어 NO는 조직특이적으로 각각 다른 효과를 가질 가능성을 배제할 수 없다.

이와 같이 성대에서 phonotrauma 등의 일정한 성대 손상 후라도 나타나는 병리 소견은 매우 다르며 이에 따라 나타나는 임상 양상도 결절양 질환 폴립양 질환 등 달라지게 되는데 이 과정에는 혈관 투과성의 변화가 주요 병태생리로 지금까지 잘 알려지지 않았지만 NO의 연관성의 규명은 의의있는 일이라 생각된다. 또한 성대의 이형성증 및 악성 질환의 생성과 성장이라는 측면에서 필요한 혈관화와 혈관 증식의 측면에서도 NO 연관성의 규명은 많은 성대 질환의 여러 가지 발생 기전 중의 하나로 NO의 관련성을 고려할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 배경에서 저자는 첫째, 흰쥐와 인간의 정상 성대 조직에서 nNOS의 발현을 살펴봄으로써 성대조직에서 NO가 신경전달물질로 작용할 수 있음을 제시하고자 하였으며 둘째, 성대 결절과 폴립성 질환, 이형성증 및 편평상피세포암에서의 NO 연관성을 면역조직화학적 연구, 분자생물학적, 생화학적 연구를 통하여 nNOS, iNOS, eNOS의 국소 분포, 발현 정도의 차이를 밝힘으로써 성대 질환의 병태생리에서 NO 생성의 차이와 근원을 알아보하고자 하였다.

II. 연구 방법 및 재료

1. 조직의 채취

가. 정상 성대조직에서의 NO 신경지배의 확인 (nNOS)

전후두적출술을 통하여 얻은 인간의 정상성대조직 5례와 5마리 흰쥐에서 얻은 성대조직을 이용하여 nNOS에 대한 RT-PCR, Western-blot 분석으로 NO 유전자의 발현을 살펴보고 anti-nNOS 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 하여 성대 조직내 NO 지배신경의 국소 분포를 살펴보았다. 흰쥐는 200-300gm의 수컷 Sprague-Dawley를 이용하였다.

나. 성대 질환에서 NO의 발현의 차이 (nNOS, eNOS, iNOS)

정상성대조직 5례와 양성 성대 질환으로 후두 미세 수술을 시행 받은 임상적으로 확연히 구분되는 성대폴립 15례, 성대결절 10례를 채취하였고 후두 이형성증 5례, 성대암(편평상피세포암) 8례 환자에서 얻은 시료를 대상으로 하였다. 각 질환에서 anti-nNOS, anti-eNOS, anti-iNOS에 대한 면역조직화학염색을 하여 질환별 NOS의 발현 정도를 비교하였고 NADPH 소비율을 측정하여 생화학적인 차이를 알아보았다. 분자생물학적 연구를 위한 조직은 수술시 적출하자마자 액체 질소에 담귀 즉시 동결시켰고 -80℃에서 보관한 후 Western-blot 분석에 이용하였다. 또한 성대폴립 조직과 성대암 조직에서는 NO 발현의 근원을 알아보기 위해 anti-eNOS, anti-iNOS에 대한 면역전자현미경연구를 시행하였다.

2. RT-PCR을 통한 nNOS mRNA의 측정

조직 내에 분포하는 총 RNA는 Qiagen RNeasy mini kit(Germany, GmbH)를 이용하여 추출하였다. 동결된 조직 약 20mg을 액체질소 내에서 마쇄한 후 1%의 농도로 β -mercaptoethanol 10 μ l가 포함 된 RLT buffer 400 μ l를 가하여 완전히 혼합하였다. 이어서 3cc 주사기와 23G 주사바늘을 이용하여 핵 DNA를 절편화하고 균등화된 시료를 3분간 원심분리(13000 rpm, microcentrifuge) 하였다. 원심분리된 상층액에 70% ethanol 400 μ l를 혼합한 후 RNeasy mini spin column에 넣고 1분간 원심분리(10000 rpm) 하였다. RW1 washing buffer 700 μ l를 column 시료에 가한 후 원심분리(10000 rpm)를 이용하여 2회 세척하였다. column 내에 잔존하는 ethanol 성분을 완전히 제거하기 위하여 10000 rpm 으로 약 3분간 원심분리한 후 최종적으로 column resin에 결합된 총 RNA를 분리하기 위하여 50 μ l의 RNase-free water를 첨가한 후 10000rpm으로 1분간 원심분리하여 RNA를 추출하였다. RNA의 농도와 순도는 260nm와 280nm에서의 자외선 흡광분석(Pharmacia, UK)을 이용하여 결정하였다.

Reverse transcriptase를 이용하여 총 RNA로부터 단일 가닥의 cDNA를 만드는 과정은 RNA PCR kit (TaKaRa Shuzo Co.,Ltd. Ver. 2.1)을 사용하여 수행하였다. total RNA(1 μ g) 1 μ l, RNase free distilled H₂O 8.5 μ l, 10 X RNA PCR Reaction buffer 2 μ l, 5 mM MgCl₂ 4 μ l, 1 mM dNTP mixture 2 μ l, 1 unit/ μ l RNase inhibitor 0.5 μ l, 0.25unit/ μ l Reverse transcriptase 1 μ l, 0.125 μ M Oligo dT-Adaptor primer 1 μ l, 25 μ M Radom primer(9 mers) 1 μ l로 RT-PCR을 위한 반응혼합물을 만들고 20 μ l의 반응 혼합물을 Genius thermal cycler(Techno Ltd. Duxford, U.K.)에서 30 $^{\circ}$ C에서 5분, 42 $^{\circ}$ C에서 30분, 99 $^{\circ}$ C에서 5분간 역전사 반응을 수행하고 5 $^{\circ}$ C에서 반응을 정지시켰다. 역전사반응을 통해 합성된 1차 단일 cDNA

를 주형으로 하여 nNOS의 cDNA에서 특이적으로 제조된 oligonucleotide (Table 1)를 이용하여 Genius thermal cycler(Technie Ltd. Duxford, U.K.)에서 PCR을 수행하였다.

이때 반응용액의 조성은 다음과 같다.

cDNA template(1st DNA)	5 μ l
RNase free distilled H ₂ O	32 μ l
10 X RNA PCR Reaction buffer	4.5 μ l
5 mM MgCl ₂	4 μ l
1 mM dNTP mixture	2 μ l
<i>Taq</i> polymerase(5 unit/ μ l)	0.5 μ l

상기 50 μ l의 반응 혼합물을 94 $^{\circ}$ C에서 40초간 변성시키고, 반응과정으로 55 $^{\circ}$ C에서 40초간, 신장과정으로 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초간 총 30 cycle을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 DNA sequencing에 의해 확인한 후 ethidium 이 포함된 2% oligonucleotide (sense, antisense) 각 1 μ l agarose gel(GTG Seakem, FMC, ME)상에서 전기영동(80 V) 한 후 polaroid film type 665(pos/neg B & W)를 사용하여 사진을 찍었다. 음성대조군으로 상기 반응과정 중 reverse transcriptase를 생략함으로써 DNA contamination의 가능성을 배제하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers & PCR product size for nNOS DNA

primer	sequence	length
nNOS	sense ATGTGCCTGTCGTCCTCAACAACCC	761bP
	anisense GGACATCGAAGCGGCCTCTAGGC	

3. Western blot을 이용한 단백질 정량 분석(nNOS, eNOS, iNOS)

조직 내의 전체 단백질을 분리하기 위하여 320mM sucrose, 20mM HEPES, 1mM EDTA가 함유된 pH 7.2의 buffer에 1mM DTT, 10 μ g/ml의 leupeptin, 10 μ g/ml의 soybean-trypsin inhibitor, 2 μ g/ml의 aprotinin이 함유된 용액을 제조하여 조직당 5ml(조직의 3-5배)씩 가하고 30초간 조직 파쇄시킨 후 10 μ g/ml의 PMSF 1mM을 첨가하여 다시 한번 조직 파쇄시켰다. 각 sample은 10000g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 택하여 100000g에서 1시간 초고속 원심분리 하였다. 상층액인 세포질성 단백질 분액은 -80°C에 보관하고 침전물은 다시 동일한 buffer를 첨가하여 100000g에서 30분간 원심분리하는 세척과정을 수행하였다. 침전물에 CHAPS ((3-[(3-Cholamidopropyl) demethylaminonio] -1-propanesulfonate), Sigma)가 포함된 동일한 buffer에서 조직파쇄한 후 20분간 rolling하고 100000g에서 30분간 원심분리하여 particulated form으로 용해된 NOS 단백질인 상층액을 분리하였다.

앞서 얻은 세포질성 단백질 분액과 함께 단백질 농도를 측정 한 뒤 각각 10 μ g씩 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)로 125V에서 2시간동안 전기영동 하였다. 그리고 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF, Bio-Rad, CA)에 transfer 한 후(25 V, 2시간) Tris-HCl(pH 7.5) 10mM (2M stock 5ml)과 NaCl 100mM (5M stock 20ml), 0.1% Tween 20 1ml, 증류수 976ml이 함유된 buffer로 세척하고 탈지건분유(nonfat-dry milk 2.5g, 5%)를 washing buffer 50ml에 녹여 제조한 4°C blocking 용액에서 16시간 처리하였다. 반응 후 membrane은 각 NOS 1차 항체를 적절히 희석시켜 상온에서 1시간동안 반응시켰다. washing buffer로 세척 후 membrane을 alkaline phosphatase로 표지된 goat anti-rabbit IgG와 1시간동안 반응시키고 다시 washing buffer로 세

척하였다. membrane을 ECL detection kit(Amersham, UK) 용액에서 1분 간 처리하고 X-ray film에 조사시켜 결과를 확인하였다.

4. NADPH consumption rate를 이용한 NOS activity의 측정

증류수에 1mM KPO₄와 50mM KPO₄(pH 7.4 stored at 4°C)를 20 μ l 넣고 250 μ M CaCl₂와 25mM CaCl₂을 10 μ l 넣어 37°C까지 예열한 후 substrate로 2mM L-arginine(store at -20°C) 10 μ l와 10mM NADPH (fresh store at -20°C) 10 μ l을 넣고 cofactor로 100 μ l FMN 10 μ l, 100 μ M FAD 10 μ l, 1mM BH₄ 10 μ l, 10 μ M CaM 20 μ l 를 넣고 반응을 유발시켰다. 측정된 dA/min 값으로 NADPH의 소비율을 계산하였다. 한편 1mM EGTA (ethyleneglycol-bis-(b -amino-ethyl ether)n,n'-tetra-acetic acid)로 Ca²⁺을 chelating하여 Ca²⁺ 의존 혹은 비의존 NOS enzyme의 변화를 살펴 보았다. NO activity는 /pmol/min mg protein)으로 나타내었다.

5. 면역조직화학 염색

면역조직화학 검사를 위해 얻은 조직을 포르말린에 고정하여 4 μ m 두께로 박절한 뒤 gelatin으로 전처리한 슬라이드에 부착하였다. phosphate buffered saline(PBS) 세척 과정을 거친 후 통상적인 면역조직화학적 방법에 따라 내인성 peroxidase의 차단을 위해 3% H₂O₂로 처리하고 증류수로 세척한 후 0.5% triton에 반응시켰다. 정상 goat serum을 처리한 뒤 PBS에 희석한 1차 항체(iNOS, 1:100; eNOS, 1:1000; nNOS, 1:500 , rabbit, polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, INC., CA, USA)로 반응시키고 2차 항체는 biotinylated anti-rabbit immunoglobulin을 이용하였다. peroxidase-conjugated avidin-biotin-

complex(ABC kit, Vector Lab, CA, USA)를 이용하여 반응시킨 후 DAB로 발색시키고 hematoxyline으로 대조 염색 후 계열에탄올과 xylene 과정을 거친 후 광학 현미경하 검색하였다. 음성 대조군으로는 일차항체 대신에 정상 serum만을 반응시켜 동일한 방법으로 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 면역반응정도는 염색된 영역의 정도를 -, +(10% 이하), ++(10-50%), +++(50% 이상 염색)의 4단계로 판독하고 각 반응을 0, 1, 2, 3점으로 계수화하였다.

6. 면역전자현미경 연구

면역 염색된 조직(DAB products)을 4% paraformaldehyde에 고정한 뒤 2% OsO₄로 osmification(4°C, 30분) 한 후 계열에탄올로 탈수하고 epon에 10일간 포매하였다. 1% ovalbumin에 반응시킨 후 일차항체(anti-eNOS, anti-iNOS; 1:100, 4°C)에 반응시켰다. immunogold에 1시간 반응시킨 후 ultrathin section(70-100 nm) 하였다. uranyl acetate와 lead citrate로 대조 염색 후 전자현미경으로 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 정상 성대 조직에서 NO 신경지배

가. nNOS mRNA의 발현

RT-PCR을 이용하여 nNOS mRNA의 증폭산물을 검출한 결과 인간의 성대조직(764 bp)과 흰쥐의 성대조직(401 bp)에서 nNOS mRNA 역전사 증폭 산물이 발현되었다(Figure 1, 2).

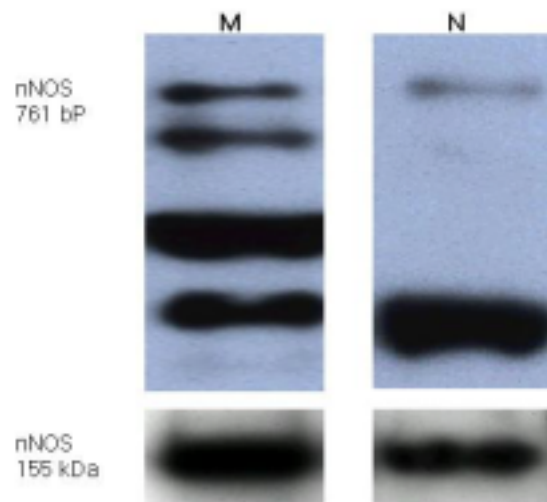


Figure 1. Expression of nNOS mRNA and protein in human vocal fold using RT-PCR(upper panel) and Western-blot(lower panel) at marker (M) and normal vocal fold(N). A band corresponding to 761 bp PCR product nNOS mRNA was observed and a band corresponding to 155 kDa of nNOS protein was observed.

나. nNOS 특이 단백질의 발현

인간과 흰쥐의 성대조직에서 nNOS Western-blot 검사 결과 nNOS 특이 단백질이 발현되었는데 세포질성 단백질 분액(cytosolic fraction)과 소포체성 단백질 분액(microsomal fraction) 모두에서 reference로 사용된 뇌조직에서와 같은 155 kDa의 특이 단백질이 확연하게 관찰되었다(Figure 1, 2).

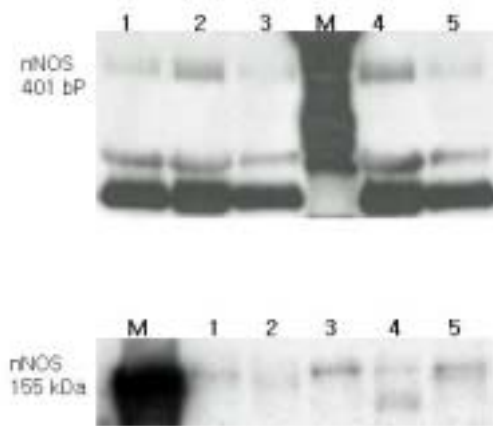


Figure 2. Expression of nNOS mRNA and protein in the rat vocal fold using RT-PCR and Western-blot at marker(M) and all samples(lane 1-5). A band corresponding to 401 bp PCR product of nNOS mRNA was observed and a band corresponding to 155 kDa of nNOS protein was observed

다. 성대조직내 nNOS의 국소 분포

인간과 흰쥐의 성대조직내 신경섬유에서 nNOS가 강하게 면역반응을 보였다. 성대 점막의 상피세포층에서 nNOS 양성 면역 반응을 확인할 수 있었는데 인간과 흰쥐 모두에서 기저부 부위에서 면역반응 신경섬유를 관찰할 수 있었다. 고유층내 nNOS 양성 신경섬유의 분포는 분비선 주위와 혈관 주위에 집중되어 있었는데 동맥과 정맥의 내피세포, 분비선 세포를 따라 염주상의 배열을 보이고 있었다. 성대근육내에서도 혈관 주위에서 nNOS 양성 신경섬유를 관찰할 수 있었으며 특히 운동신경말단과 유사한 구조물에서도 면역반응을 관찰할 수 있었다(Figure 3, 4).

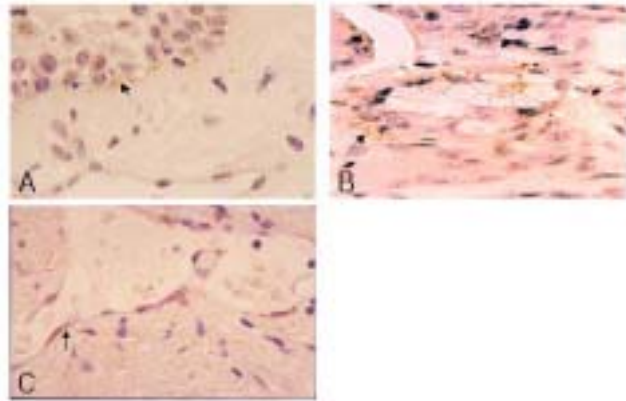


Figure 3. Photomicrographs of nerve fibers stained immunohistochemically with anti-nNOS in the human vocal fold.
 A. Immunoreactivity at basal normal squamous mucosa of vocal fold (arrow, x400).
 B. Immunoreactivity around submucosal glands of vocal fold (arrow, x400).
 C. Immunoreactivity around blood vessel of vocal fold (arrow, x400).

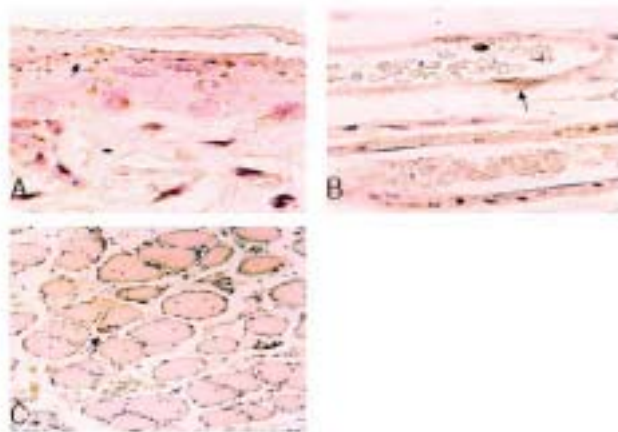


Figure 4. Photomicrographs of nerve fibers stained immunohistochemically with anti-nNOS in the rat vocal fold.
 A. Immunoreactivity at basal normal squamous mucosa of vocal fold (arrow, x1000).
 B. Immunoreactivity around blood vessel of vocal fold (arrow, x1000).
 C. Immunoreactivity at motor end-plate like structure of vocal fold muscles (arrow, x400).

2. 성대 질환에서 NO 발현의 차이

가. 성대질환의 면역조직화학적 염색

정상 성대조직(5례), 성대결절(10례), 성대폴립(10례), 성대이형성증(5례), 성대 편평상피세포암(8례)에서 iNOS, eNOS를 항원으로 하는 면역조직화학 염색을 시행하였다. NO 면역반응 양성 구조는 세포질내에서 갈색의 과립으로 나타났다. anti-iNOS에 대한 면역염색은 상피세포와 염증세포, 암세포에서 보였으며 특히 상피세포에서는 국소분포 양상에 variation을 보여 상피세포층의 기저부에서 강한 반응을 보이던 것이 이형성이 심했던 경우와 암세포에서는 소실되는 경향을 보였다(Figure 5). anti-eNOS에 대한 면역염색 양상은 성대질환의 상피세포에서 국소적 혹은 전체적 염색 양상을 보여주었으나 iNOS의 강도 보다는 약한 경향을 보여 주었으며 특히 강한 eNOS 면역반응이 중앙 주위 혈관의 내피세포와 타액분비선세포에서 보였다(Figure 6).

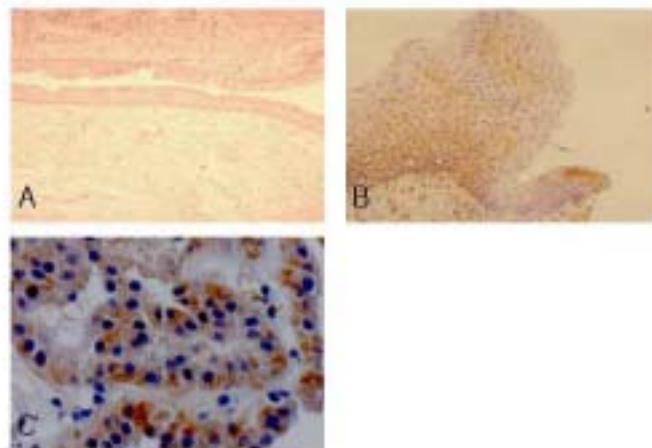


Figure 5. Photomicrographs of squamous epithelium stained with anti-iNOS.
A. No immunoreactivity at normal squamous mucosa of human vocal fold ($\times 100$).
B. Immunoreactivity at basal and parabasal epithelial layers of laryngeal dysplasia ($\times 200$).
C. Intense cytoplasmic immunoreactivity at squamous cell carcinoma ($\times 400$).

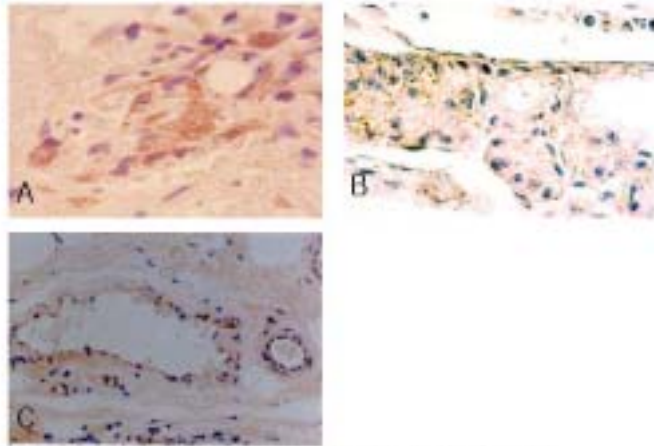


Figure 6. Photomicrographs stained with anti-eNOS in a squamous cell carcinoma and vocal polyp.
 A. Focal immunoreactivity of tumor cells and vessel in a squamous cell carcinoma (x400).
 B. Immunoreactivity of glandular epithelium in a squamous cell carcinoma (x400).
 C. Strong immunoreactivity at endothelium of artery and vein of lamina propria in a vocal polyp (x200).

(1) iNOS의 발현

정상성대조직에서의 iNOS의 평균염색 강도는 0.2 ± 0.4 로 성대결절 2.0 ± 0.5 , 성대 폴립 2.3 ± 0.7 , 이형성증 2.0 ± 0.9 , 편평상피세포암 2.7 ± 0.6 에 비해 통계적으로 유의있게 낮았다. 성대결절과 성대폴립간에 iNOS의 발현의 차이는 통계적으로 의의가 없었다(Table 2).

(2) eNos의 발현

정상성대조직의 혈관내피세포에서는 eNOS 양성반응을 관찰할 수 있었으나 상피세포에서는 eNOS 면역반응은 매우 미약하게 관찰되었다. 성대 질환에서 eNOS의 평균염색 강도는 성대결절 1.5 ± 0.8 , 성대 폴립 2.5 ± 0.7 , 이형성증 2.3 ± 0.8 , 편평상피세포암 2.0 ± 0.7 이었으며 염증을 동반한 경우 면역염색반응의 강도는 증가하는 경향을 보였다. 성대폴립의 경우 성대결

절에 비해 eNOS 양성반응이 강하게 관찰되었으며 이형성증 및 상피세포 암과는 통계적인 차이를 보여주지 못하였다(Table 2).

Table 2. iNOS and eNOS expression in normal mucosa , vocal nodule, vocal polyp, dysplasia and squamous carcinoma.

	iNOS	eNOS
normal mucosa	0.2 ± 0.4*	0.2 ± 0.3*
vocal nodule	2.0 ± 0.5*	1.5 ± 0.8*
vocal polyp	2.3 ± 0.7*	2.5 ± 0.7*†
dysplasia	2.0 ± 0.9*	2.3 ± 0.8*†
squamous carcinoma	2.7 ± 0.6*	2.0 ± 0.7*

*p<0.05 by ANOVA on ranks

† p<0.05 by Student t-test

나. Western-blot

정상성대조직(5례)과 성대폴립(5례), 이형성증(5례), 편평상피세포암(5례)에서 iNOS, eNOS, nNOS에 대한 Western-blot을 시행하였다. 정상성대조직과 성대폴립에 비해 iNOS 특이단백이 이형성증과 상피세포암에서 강하게 발현됨을 확인할 수 있었으며 이형성증에 비해 상피암에서 통계적으로 유의있게 높았다(p<0.05, chi-square)(Figure 7). eNOS에 대한 특이단백은 정상조직에 비해 성대폴립, 이형성증, 상피암에서 강하게 발현되었으며 성대폴립과 이형성증에 비해 상피세포암에서 강한 eNOS 특이단백의 발현을 확인할 수 있었다(p<0.05, chi-square)(Figure 8). nNOS의 경우는 iNOS, eNOS와는 달리 정상 성대조직에서 nNOS 특이 단백질이 강하게 발

현되었으며 폴립조직과 이형성증에서 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 의의는 없었다. 이에 반해 상피세포암에서 nNOS 특이단백의 발현은 강하게 혹은 약하게도 나타나는 등 변이가 있었다(Figure 9). 또한 세포질성 및 소포체성 단백질 분액 모두에서 정상적인 155kDa의 특이 단백질보다 작은 크기의 nNOS 특이 단백질이 대량 검출되었는데 세포질성 단백질 분액에서는 약 45kDa과 50kDa 크기의 단백질이, 소포체성 단백질 분액에서는 약 80kDa 정도의 nNOS 특이 단백질 발현이 확인되었다. 이들의 비교는 Image analyzing program(Bio-Profile, ver.6.0)을 이용하여 상대적인 강도를 막대그래프와 인위적인 수치로 나타내었다.

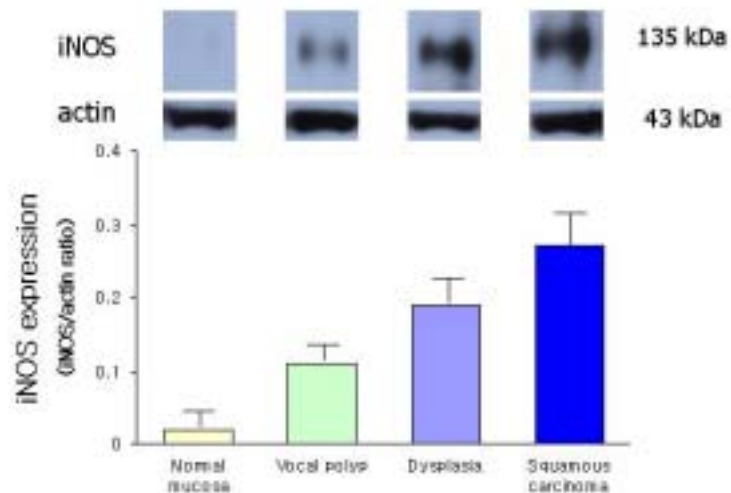


Figure 7. Western-blot analysis of iNOS expression in normal mucosa, vocal polyp, dysplasia and squamous carcinoma. iNOS expression was significantly increased in tissues with laryngeal lesions compared to those with normal tissue.

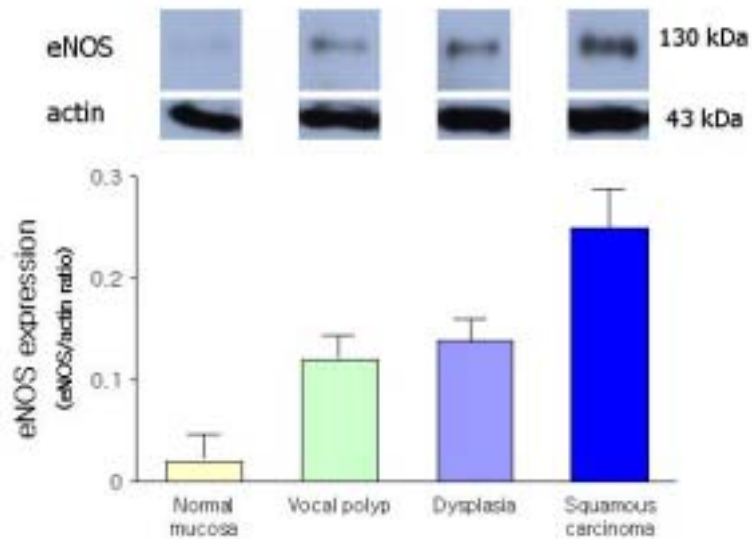


Figure 8. Western-blot analysis of eNOS expression in normal mucosa, vocal polyp, dysplasia and squamous carcinoma. eNOS expression was significantly increased in tissues with squamous carcinoma compared to those with normal tissue, polyp and dysplasia. Note there was no significant difference between eNOS expression of polyp and dysplasia.

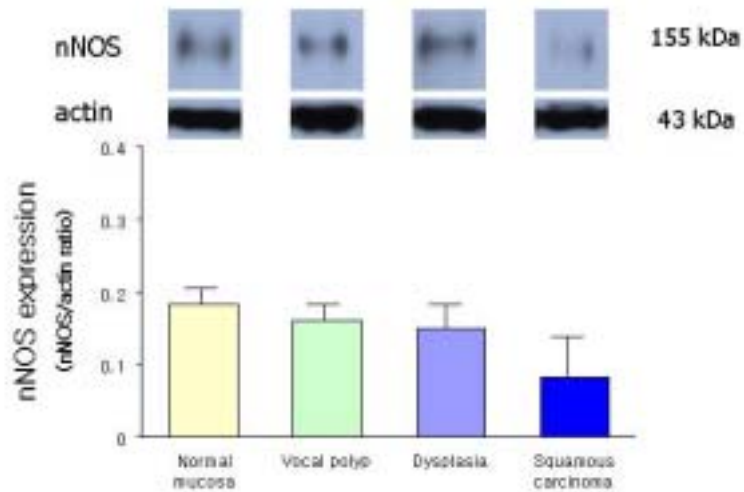


Figure 9. Western-blot analysis of nNOS expression in normal mucosa, vocal polyp, dysplasia and squamous carcinoma. nNOS expression tend to decrease in tissues with carcinoma compared to those with benign regions, though they have lots of variation.

3. 성대질환에서 NOS activity(NADPH 소비율)

정상성대조직에 비해 성대폴립(5례), 성대상피암(8례)에서 NOS activity가 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었으며 상피암조직에서 폴립 보다 높은 activity를 보였다. 1mM EGTA로 calcium을 chelating한 결과 폴립조직에서는 activity가 거의 정상 수준으로 떨어지는 경향을 보여 성대 폴립에서의 NOS activity는 Ca^{++} 에 의존함을 알 수 있었다. 성대 상피암에서는 EGTA 처리 후 다양한 양상을 보여 3조직에서는 정상 조직과 유사한 소견을 보였고 나머지 5조직에서는 처리 전에 비해 변화를 보이지 않아 상피암에서의 NOS activity는 Ca^{++} 에 의존하는 경우도 있고 무관하게 나타날 수 있음을 시사하였다(Figure 10).

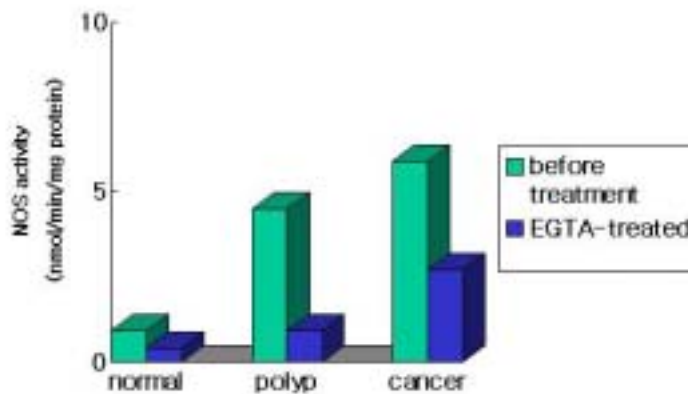


Figure 10. NOS activity in normal mucosa, vocal polyp, and carcinoma. Higher NOS activity of polyp and carcinoma were noted compared to that of normal mucosa. After treatment with EGTA, the activity of NOS in a polyp decrease to that of normal tissue, but the activity of NOS in a carcinoma decrease less than that of polyp.

4. 성대폴립과 성대 상피암에서의 면역전자현미경 연구

성대 상피암 조직에서 iNOS 반응 산물은 종양세포와 단핵세포의 세포질에서 반응 particle을 관찰할 수 있었으며 특히 세포질의 변연부의 분비과립내에서 많은 NO particle을 관찰할 수 있었다(Figure 11). eNOS 반응 산물은 종양세포 및 혈관내피세포와 혈관주위의 세포에서 관찰할 수 있었다(Figure 12). 성대폴립의 경우 간질조직 내 염증세포에서 iNOS 반응 particle을 관찰할 수 있었으며 eNOS 반응 particle은 성대상피암과 유사하게 상피세포와 혈관내피세포, 혈관주위의 세포질내에 넓게 산재하거나 분비과립내에 국소적으로 모여있는 양상을 보였다(Figure 13).

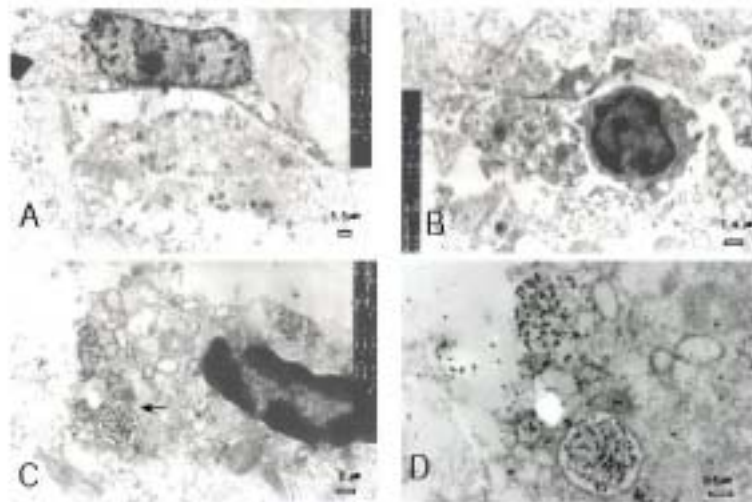


Figure 11. Transmission electron microscopic finding of squamous carcinoma stained with anti-iNOS.
A. Strong immunoreactive gold particles at carcinoma. Note no reactivity at adjacent normal epithelium.
B. Aggregation of immunoreactive particles at suggested secretory vesicles in a monocyte.
C. Immunoreactive particles (arrow, secretory vesicles) seen at periphery of tumor cell.
D. Magnified view.

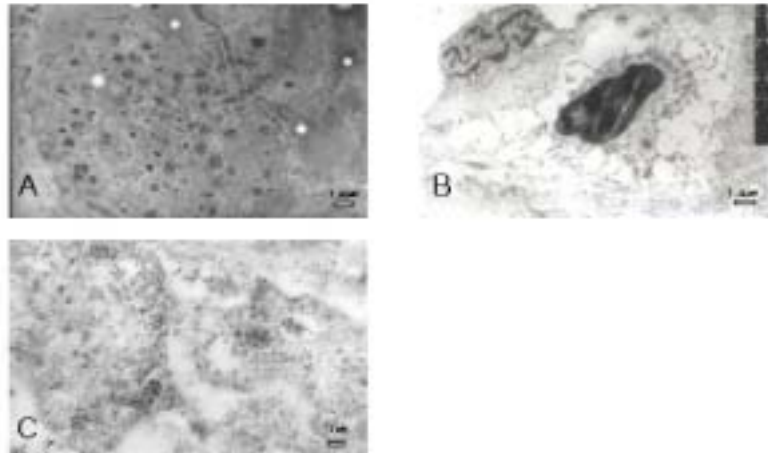


Figure 12. Transmission electron microscopic finding of squamous carcinoma stained with anti-eNOS.
 A. Numerous immunoreactive secretory vesicles at carcinoma.
 B. Immunoreactive particles seen at pericyte of vessel.
 C. Magnified view

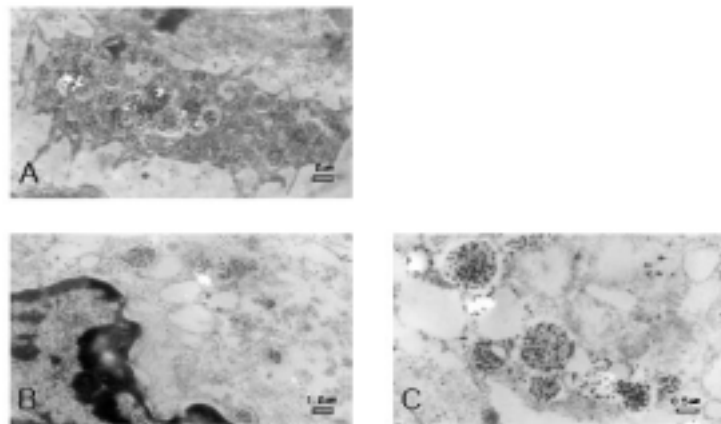


Figure 13. Transmission electron microscopic finding of vocal polyp stained with anti-eNOS.
 A. Numerous immunoreactive secretory vesicles at polyp cell.
 B. Immunoreactive particles seen at endothelial cell of vessel.
 C. Magnified view

IV. 고 찰

1980년대 후반, 예전에는 산업공해물질이며 발암물질의 가능성으로 관심을 끌던 분자인 nitric oxide(NO)에 대해서 이들이 포유동물세포의 산물이며 생리학적 조절물질이라는 사실이 밝혀지면서 수많은 연구가 수행되었다. 고등 포유류의 생물학적 관점에서 NO의 중요성을 밝히기 위한 연구는 크게 세 가지로 분류될 수 있는데 이중 가장 오래된 것으로는 약 80년 전 인간을 포함한 포유류에서 nitrate (NO_3^-)를 생성한다는 영양학적 연구결과이며 최근에는 인간이 생체 내에서 실제로 nitrite(NO_2^-)와 nitrate(NO_3^-)를 생성할 수 있음을 확인한 것이다.²⁵ 이후 Marletta 등은 nitrate의 주된 내인성 기원으로서 대식구를, 그리고 NO에 존재하는 nitrogen 원자 공여체로서 L-arginine 아미노산의 말단 guanidino group을 밝혀냈으며 비슷한 시기의 독립된 연구에서 대식구의 항종양, 살균작용에는 배양배지의 arginine의 존재가 필수적이며 이들 arginine은 nitrite와 nitrate를 생성하면서 citrulline으로 전환됨을 알아냈다.²⁶⁻²⁷ 또한 이들 연구자들은 nitrate와 nitrite 자체의 항암효과가 부족하나 NO 가스는 활성화된 대식구의 항종양능과 비슷함을 알아내고 대식구의 암종 세포를 죽일 수 있는 능력은 arginine을 citrulline과 NO로 전환함에 있다고 결론지었다. 또한 많은 methylated arginine의 analog가 NO 생성을 차단함을 보고하였다. 한편 Furchgott 등은 acetylcholine에 반응하여 혈관내벽에서 분비되는 NO가 혈관이완작용을 일으킴을 밝혀내고 이후 여러 학자들에 의해서 이는 대식구에서처럼 혈관내벽에서 arginine에 연관된 NO의 생성 때문인 것으로 밝혀졌다.²⁸⁻³⁰ 이와 비슷한 시기에 Garthwaite 등은 NO의 신경학적 작용의 증거에 대해 처음으로 기술하기도 하였다.³¹ 상기와 같은 근간이 되는 발견들 이후 여러 가지 조직에서의 NO 생성이 확인되고 이들의 생리학적, 병리생

리학적인 연구들이 급속히 발전하였다.

NO는 매우 짧은 반감기를 갖는 용해성 유리기 가스로서 수많은 조직에서 생리적 조절에 관여하고 있다.³²⁻³³ NO는 L- arginine-NO pathway라고 불리는 과정을 통해서 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 amino acid L-arginine을 L-citrulline으로 전환시키면서 생성된다. L-arginine의 산화과정에는 flavins, tetrahydrobiopterin, NADPH, calmodulin이 관여한다. NOS에는 세가지 아형이 있는데 이들은 각각 eNOS, nNOS, iNOS로 불리우며 순서대로 인간의 염색체 7(eNOS), 12(nNOS), 17(iNOS)에 배열되어 있다. calcium과 calmodulin은 eNOS와 nNOS의 NO 생성율을 결정하며 iNOS는 calmodulin과 단단히 부착되어 calcium/calmodulin 농도와 독립적인 효소 활성을 가지며 기본적으로 미생물 산물과 cytokine들의 전사조절 유도과정을 통해 활성화된다.³⁴ NO는 생물학적 매개체로서 강한 확산력을 가졌을 뿐 아니라 aquos, hydrophobic environment에서 잘 녹으며 고형질의 조직을 통과할 수 있는 매개체이다. 또한 다른 세포간 신호전달 물질(messenger molecule)과는 달리 NO에는 특이한 세포 수용체가 없으며 그 대신 세포막을 통해 확산하여 세포내의 여러 단백질이나 DNA와의 반응을 통해 다양한 생물학적 현상을 유발한다.

호흡기에서 NO의 역할은 기니피그의 기도에서 콜린성 신경전달에 관여하는 물질로 알려진바 있다. 성대를 포함한 후두내 신경전달물질에 관한 Yosida 등³⁵⁻³⁶, Hisa 등³⁷의 보고에 의하면 paraglottic space에 있는 신경절에서 이들이 콜린성 신경전달 물질을 포함하고 있으며 이는 특히 혈관과 분비선에 분포됨을 밝혔다. 또한 쥐의 후두내에 있는 신경절에서 acetylcholinesterase 양성임을 밝힘으로 여기에 분포하는 신경들이 부신경절임을 밝혔다. 이와 관련하여 Hisa 등³⁸은 NADPH-d 양성 신경덩어리들이 후두내 부교감신경절에서 발견되었고 이는 역시 NO가 콜린성 신경전달 물질로 작용한다고 하였으며 실제로 쥐 후두의 혈관과 분비선에서

NADPH-d 양성 신경섬유가 발견되어 NO가 후두에서 혈류와 분비를 담당하는 부교감 신경에 관여함을 알 수 있다고 하였다. 저자의 연구에서도 성대 고유층내 nNOS 양성 신경섬유의 분포가 분비선 주위와 혈관 주위에 집중되어 있었는데 동맥과 정맥의 내피세포, 분비선 세포를 따라 염주상의 배열을 보이고 있었으며 분자생물학적으로 nNOS mRNA 및 nNOS 특이 단백질의 발현을 인간과 흰쥐의 성대에서 확인할 수 있었다. 이를 근거로 NO도 기존에 알려진 다른 신경전달물질과 마찬가지로 후두조직에서 콜린성 신경전달물질로 관여함을 시사한다 하겠고 그 역할은 주로 혈관의 긴장도를 조절하여 혈류에 흐름에 관여하고 후두내의 분비와 관련된 것으로 사료된다.

말초신경계에서 NO는 nociceptive fiber에 관여함이 밝혀졌고 이는 PGE₂와 같은 역할인 통증 조절에 관여한다.³⁹⁻⁴⁰ 후두의 감각 신경지배는 미주신경의 마디신경절에 의하며 이 신경절내 많은 신경세포들이 실제로 NO 지배성 신경임이 밝혀졌다. 보고에 의하면 후두점막의 상피세포에서도 많은 substance P(SP), calcitonin gene related peptide(CGRP) 신경섬유가 감각 신경전달물질로 작용한다고 하였는데 본 연구에서도 인간과 흰쥐의 성대상피층에서 NO 신경을 확인할 수 있었지만 상피층이 비특이적으로 염색되는 경향을 보여 많은 신경은 확인할 수 없었다. 하지만 기존 문헌들의 결과와 비교해 볼 때 성대의 감각신경전달물질로 NO가 관련될 것으로 추정된다. 운동계에서의 NO의 역할은 명확하지 않으며 과거에 중추 및 척수의 운동신경에선 nNOS가 발현되지 않는 것으로 알려졌으나 근래의 연구에서 손상된 척수 운동신경에 국소적으로 NO가 발현된다고는 하였지만 그 기능에 대해서는 밝혀지지 않았다.⁴¹ 특히 본 연구에서 nNOS가 성대 근육조직의 운동신경말단과 같은 구조에 발현되는 것을 명확히 설명할 수는 없지만 후두내 일부 신경전달물질이 운동신경계와 관련이 있을 것으로 보고된 것처럼 성대에서 NO는 자율신경과 감각신경뿐 아니라 일부 운동신경에도 관

여하는 것으로 생각되며 이에 대한 연구가 추가적으로 필요하겠다.

성대의 양성질환의 발생 기전에 대해서 현재까지는 성대에 가해지는 반복적인 충격에 의한 성대 상피층의 기저막과 고유층의 변화로 설명하고 있다. 즉 직업적으로 오랜 기간 동안 음성을 과다하게 사용하거나 감기 등 상기도 감염 후 음성을 남용하여 기저막에 반복적인 물리적 충격이 가해지면 기저막의 파괴와 비후가 초래되고 이 때 고유층에까지 영향을 주어 고유층내 혈관 투과성의 변화가 동반되어 특징적인 폴립과 결절의 임상 양태를 띠는 것으로 추정하고 있지만 어떤 과정을 거쳐 고유층의 변화가 일어나는가를 설명하기에는 미흡하였다. 성대 고유층은 2가지의 중요한 조직 구성물로 이루어져 있다. 세포 조직과 세포외 조직이 그것인데 고유층내 세포 조직은 그 수가 너무 적고 성대의 진동 특성을 결정짓는 것은 세포외 조직이다. 세포외 조직내에는 2 종류의 macromolecule families로 구성되어 있는데 collagen과 elastin에 의해 섬유 골격이 구성되며 섬유 골격 사이를 채워 주는 filler protein인 proteoglycan과 structural glycoprotein(fibronectin)이 존재한다. 그 중 Fibronectin 은 조직 손상 후 fibroblast에 의해 생성되는데 collagen 축적의 전구 물질로서 상처 형성에 관여한다. 그렇지만 대부분의 성대 손상 후 상처 조직은 형성되지 않는데 이는 상처 형성 과정에 관여하는 fibronectin 반응이 진짜 상처 조직인 collagen I형이 축적되기 전 없어지기 때문이다. 이 현상은 성대의 양성 질환의 발생을 설명할 수 있는 중요한 사실로서 물리적인 충격이 성대에 가해지면 성대 상피층의 기저막대에 손상을 초래하게 되고 성대 고유층에 손상을 주게 된다. 이와 같은 손상이 만약 반복된다면 치유 과정 중 fibronectin이 점차 축적되게 되고 fibronectin에 의해 collagen이 축적되게 되면 점차 성대의 효율적인 진동에 장애를 초래하게 된다. 이러한 유형의 손상은 성대 결절에서 볼 수 있으며 음성 휴식과 적절한 음성 치료로 호전되지 않아 수술을 요하는 성대 결절을 설명해 준다.

성대손상 후 생기는 2번째 병태 생리학적 현상은 collagen이나 fibronectin의 축적이 거의 관찰되지 않으며 성대 고유층의 특징적인 변화를 보이는데 혈관 투과성의 변화와 관련이 있을 것으로 추정하지만 그 기전은 아직까지는 명확하지 않으며 성대 폴립, 라인케 부종 등에서 보이는 현상이다.⁴²

생체 내에서 분비되는 NO의 혈관이완작용과 이로 인한 혈관 투과성의 증가에 대해서는 1980년에 Furchott 등²⁸이 생체에서 분리한 혈관 평활근에 대한 연구를 통하여 acetylcholine이 혈관을 이완시키는 이유는 혈관 내피세포에서 유리되는 물질이 주위 평활근에 퍼져 나가서 혈관을 이완시키기 때문이라고 보고하였고, 이 물질은 발현 시간이 짧고 cyclooxygenase inhibitor에 의해 억제되지 않는 특성이 있음을 밝혀 이를 endothelium-derived relaxing factor(EDRF)라고 하였다. Furchgott 등은 후속연구에서 EDRF가 NO임을 시사하였으며, 1987년 두 곳의 독립적인 연구에서 혈관의 내피세포에서 유리되는 EDRF가 NO와 같은 물질임을 보고하였다.^{30, 43} 이 후 일부 다른 혈관확장 물질이 관여하지만 그 중 NO가 혈관이완의 가장 중요한 역할을 담당하고 있음은 명확하다. 혈관 평활근의 이완에 작용하는 NO는 혈관내피세포의 안쪽막의 eNOS에 의하여 생성되고, 그 효과는 guanylate cyclase에 의하여 매개되어 이루어진다. Ca⁺⁺/calmodulin 의존적인 eNOS는 histamine, bradykinin, acetylcholine, adenosine diphosphate (ADP) 및 여러 호르몬에 의하여 세포막의 채널이 열림으로써 세포내 Ca⁺⁺의 증가함에 따라 활성화되며, 합성된 NO는 사방으로 확산되어 혈관 평활근에 도달하여 혈관확장 작용을 한다. Katsuki 등은⁴⁴ nitroglycerin이나 sodium nitroprusside와 같은 혈관확장/혈압강하제는 NO를 유리하고, 이것이 guanylate cyclase를 활성화시켜 guanosine triphosphate(GTP)를 세포내 신호전달물질인 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)로 전환시키는 것을 보고했으며, Craven 등은⁴⁵ NO가 guanylate cyclase의 heme prosthetic group에 결합하여 효소를 활성화시킴을 증명하였다. 이와 같이

세포 내에서 증가된 cGMP는 평활근의 이완을 유발하여 혈관을 확장시키는 동시에 calcium 운반체를 인산화시키는 protein kinase를 활성화시켜 세포 내 유리 calcium의 농도를 감소시킨다. 뿐만 아니라 혈관내피세포에서 합성되어 확산된 NO는 혈소판의 cGMP도 증가시킴으로써 혈관의 내피세포나 혈소판끼리의 부착이나 응집을 억제시키는 작용이 있어 혈응의 응고를 억제하는 것으로 보고되었다. 본 연구의 성대폴립과 성대결절에 대한 면역조직화학적 연구, 성대폴립의 Western-blot 연구에 의하면 양성 성대질환에서 정상에 비해 iNOS와 eNOS 발현이 통계적으로 유의 있게 높아 양성 성대질환의 생성 과정에 NO가 일정한 역할을 할 것으로 사료되었다. 한편 성대폴립과 결절간에 iNOS 면역조직화학적 발현의 차이는 없었으며 성대폴립의 경우 eNOS가 강하게 발현되는 것을 관찰할 수 있어 양성 성대질환의 2번째 병태생리 기전인 혈관투과성의 변화를 설명할 수 있으리라 기대되었지만 성대결절의 시료가 너무 적은 소량으로 Western-blot에 의한 분자생물학적인 발현의 차이나 NADPH 소비율 등의 차이를 알아보는 것이 어려웠다. 그러나 성대폴립의 경우 성대결절에 비해 면역조직화학적 연구에서 뚜렷한 차이를 보여 두 군간에 eNOS에 의한 NO 발현의 차이에 의한 고유층내 혈관화 및 혈관투과성의 변화는 두 질환의 생성 과정의 차이를 일부 설명할 수 있으리라 사료되었다.

암종의 성장이란 측면에서 NO는 세포 괴사와 종양세포 증식의 매개체로서 이중적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 대식구로부터 유리되는 NO는 종양세포에서 세포괴사를 촉진하는 것으로 알려져 있으며 더 나아가서 iNOS 유전자가 존재하는 종양세포에서 생산되는 NO는 그 자신의 괴사 뿐 아니라 주변의 종양세포의 세포독성과 apoptosis를 유발하기에 충분하다는 보고도 있다.⁴⁶⁻⁴⁸ 반면 암종의 증식에 있어서 NO는 종양의 혈관화와 혈관증식을 촉진시킴으로써, 혈관내피세포로의 종양세포 부착을 매개함으로써, 또는 혈관 투과성을 증진시킴으로써 그 역할을 수행한다. 이와

같은 효과들은 원발암종의 급속한 성장을 유발시킬 뿐 아니라 타부위의 전파에도 역할을 하며 실지로 실험적 연구에서 NOS 활성도가 높은 암종에서 보다 빨리 성장함이 확인되었다. 암종의 발생과 성장에 NO가 직접적으로 관여한다는 증거들은 계속 보고되고 있는데 각각의 가능한 기전은 다음과 같다.

고형암의 성장에는 혈관화와 혈관증식이 절대적으로 필요한데 NO는 혈관 집단에서 극도의 혈관이완을 시킴으로써 종양으로의 혈류증가를 가져오고 혈관증식을 촉진시키며 이 과정에는 혈관내피증식인자(vascular endothelial growth factor)의 유도가 관여한다고 한다.⁵⁰ 예를 들어 동물실험에서 NO에 대한 길항제들은 종양 내의 혈류를 감소시켰으며 이와 같은 효과는 혈관벽에 있는 NOS에 의한 NO 생성의 기질인 L-arginine을 투여함으로써 반전됨이 보고된 바 있다.⁵¹ 암 세포 침윤 및 전이의 첫 단계는 혈관내피 세포로 종양세포의 부착으로 볼 수 있으며 아직 완전히 규명되지는 않았지만 Vidal 등은⁵² L-arginine:NO pathway에 의존하는 cytokine-induced tumor cell adhesion enhancement를 보고한 바 있다. 뿐만 아니라 대량의 NO에 노출된 혈관내피세포는 endothelial-leukocytic adhesion molecule-1 (ELAM-1)을 표면에 과발현시킴을 관찰하였다. 즉 종양세포는 혈관내피세포에 부착시에 iNOS가 관여된 기전이 사용되며 이로써 혈관벽의 투과성이 증가되고 암종의 추가적인 성장과 전파를 위해 떨어져 있는 장소로의 접근을 가능하게 하는 것이다. 고형암에서 NO의 과생산은 혈관투과성의 증진과 관련있다는 보고도 있는데 실제로 N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)로 NO 생성을 억제한 결과 interleukin-2에 의해 유발되는 모세혈관 유출과 실험적 암종에 종양의 성장이 감소되었다고 하였다. Lejeune 등은⁵³ 면역학적으로 암종과 NO의 관계를 설명하였는데 rat의 성장하는 대장암과 종양 자극성 대식구에서 생성되는 NO가 T-림파구의 증식은 억제하였지만 암종의 증식은 억제하지 않았으므로 암종의 성장 중 NO의 면역억제 효과

는 NO의 세포독성효과에 대한 임파구와 종양의 감수성 차이에 기인한다고 하였다. 호중구과 대식구 모두 면역자극을 통해 NO를 생산하며 NO 생산은 염증과 인간의 악성종양에 관여할 것으로 생각된다.

NO나 이의 부산물은 암종으로 발전되는 돌연변이 현상을 유발한다고 알려져 있어 정상적인 생리학적 조건에서도 저농도의 NO는 세포독성과 돌연변이 효과를 가질 수 있다. 즉 superoxide anion과 반응하여 peroxynitrite와 같은 세포독성 물질을 만드는데 peroxynitrite는 강한 세포독성과 돌연변이 형질을 가진 분자로서 이는 다시 강한 독성과 반응성을 가진 toxic hydroxyl radical과 nitrogen dioxide로 분해되며 sulfhydryl group을 산화시킴으로써 membrane lipid peroxidation을 촉진시킨다. 한편 NO는 직접 nitrogen dioxide로 산화되어 5-methylcytosine을 포함한 DNA nucleobases의 탈아미노화(deamination)을 통해 DNA의 합성을 저해하기도 하며 DNA 손상도 가져올 수 있다. 뿐만 아니라 NO와 hydrogen peroxide와의 반응은 강한 독성의 singlet oxygen species를 만들 수 있으며 강력한 발암물질인 nitrosamine의 생성에 관여하기도 한다. 또한 만성 염증과 암종의 p53과의 연관성은 아마도 염증조직에서의 N-Nitroso compound (NOC)를 만들고 DNA 염기의 탈아미노화를 초래하는 NO 생성 때문으로 생각된다.⁵⁴⁻⁵⁷ 상기와 같은 기전으로 NO는 돌연변이 형성과 주변의 정상조직 성장을 저해함으로써 종양세포의 국소적인 침윤에도 영향을 끼칠 것으로 보인다.

악성종양과 연관된 NO에 관한 연구는 대개 편평상피세포암, 대장암, 비뇨기 계통의 암, 산부인과적 종양 등에서 이루어 졌는데 이들 암종의 성장에 관한 NO의 역할에 대해서 암종의 기원에 따라 심지어는 동일한 암종에서도 서로 상충되는 의견들이 많은 실정이다. 1998년 Ambs 등은⁵⁸ 인간의 대장암 조직에서 nNOS와 iNOS의 활성도는 정상 대장조직 및 암종 모두에서 발견되었지만 선종과 암종에서 유의하게 감소되었으며 iNOS 활성도는 정상조직에서는 미미하였고 선종 조직의 5%에서, 암종 조직의 25%

에서 관찰되었다고 하였다. 더구나 대장암의 병기가 진행함에 따라 iNOS 활성도는 감소하였으며 간, 폐 등으로 전이가 있는 경우 가장 낮은 수치를 보였다고 하였고 이와는 반대로 Kojima 등은⁵⁹ 역시 인간의 대장암 조직에서 RT-PCR과 단백질 분석, 면역염색에서 모두 암종에서 정상에 비해 iNOS의 발현이 증가한다고 하여 상반된 의견을 제시하기도 하였다. 부인과적 암종의 연구에서도 이 같은 상반된 결과가 보고되었는데 1995년 Thomsen 등은⁶⁰ 모든 NOS의 아형들이 유방암의 병기와 비례하여 증가함을 보고하였고 이와는 반대로 1999년 Tschugguel 등은⁶¹ 유방암의 전이성향과 반비례하는 iNOS 발현을 보고하기도 하였다.

이와 같이 암종에서 NO의 관여는 복잡하게 얽혀 있는 것으로 보이며 암종의 종류에 따라 다양한 결과들이 보고되고 있다. 두경부의 편평상피세포암에서의 연구결과들은 대개 NO가 발암기전에 있어서 주로 위해 효과를 갖는 것으로 보고되고 있다. Rosbe 등은 처음으로 편평상피세포암종에서 면역염색을 통해 iNOS의 존재를 확인하였고 iNOS 활성도의 증가는 암종의 성장과 관련이 있음을 주장하였다.⁶² 이들은 전체 암종에서 면역반응을 나타냈지만 특히 keratin pearl 근처에서 강하게 염색되었다고 하였는데 종양내 keratin pearl 주변의 편평상피세포에서 증가되어 있는 iNOS 활성도를 관찰한 것도 NO의 돌연변이 유발 성질과 부합되는 소견이며 이는 비정상적인 세포학적 반응이며 비조직화된 분화양상이라고 주장하였다. 한편 1999년 Bentz 등은 두경부의 양성 질환들과 암종에서 eNOS 발현 양상을 조사하였는데 정상 구강점막에서는 eNOS 발현을 거의 관찰하지 못하였으나 반응성 점막 질환과 염증이 동반된 이형성증, 상피세포암에서 eNOS의 강한 발현을 관찰하였다.⁶³ Gallo 등은 인간의 상피세포암 조직에서 생화학적 방법으로 전체 NOS 활성도와 iNOS 활성도를 측정한 결과 정상조직에 비해 월등히 높은 수치를 나타내었으며 임파절 전이가 있었던 조직에서는 더욱 높은 전체 NOS 활성도를 나타내었다고 하였다. 이 같은 현상은 종양

혈관화 정도와 비례하였으며 따라서 편평상피세포암의 혈관증식과 전이성 향에 있어서 NO가 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였다. 또한 NOS 활성도의 관찰은 혈관증식과 암종 전이와 관련하여 두경부암종 생물학적 행태를 예측할 수 있는 정보를 줄 수 있을 것이라고 조심스럽게 추측하였다.⁶⁴ 후두암과 NO의 관계에 관한 연구로 유일하게 보고된 Franchi 등의 연구에 의하면 후두 이형성증에서 후두암으로의 진전 과정에 NO에 의한 혈관화가 주요 병리 기전으로 설명하였고 이를 세포에 대한 cGMP level을 측정함으로써 입증하였으며 암의 발생 과정 시 수반될 수 있는 염증 반응과는 무관하다고 밝혀 암세포에 의해서 iNOS에 의한 NO의 조절이 직접적으로 암의 생성과 증식에 관여한다고 주장하였다.⁶⁵

NO는 국소적인 혈류조절에 중요한 역할을 하는 물질이며 cGMP 축적과 관련하여 상피세포 및 암조직에서의 신호전달물질로 알려져 있지만 아직 인간의 후두암 조직에서 서로 다른 NOS의 아형에 대한 연구는 없다. 본 연구에서는 후두의 편평상피세포암과 후두암의 전구 물질로 알려진 이형성증에서 정상성대조직과 양성 성대 질환에 비해 iNOS 특이 단백질 강하게 발현하는 것을 확인할 수 있었으며 또한 이형성증에 비해 상피암에서 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 아직까지 암종의 생리에 있어서 NO의 역할은 명확하지는 않지만 이미 이전의 많은 연구들에서 고형암과 종양세포주에서의 iNOS 발현을 보고하였듯이 성대의 편평상피세포암과 그 전구 증상 중의 하나인 이형성증에 생성 과정에 iNOS 관여한다는 근거를 저자의 연구에서도 확인할 수 있었다. eNOS에 대한 특이단백은 정상조직에 비해 성대폴립, 이형성증, 상피암에서 강하게 발현되었으며 성대폴립과 이형성증간에 차이는 없었으나 상피세포암에서 강한 eNOS 발현을 확인할 수 있어 후두암의 생성 혹은 증식 과정에 iNOS와 eNOS에 의해 생성된 NO가 관여할 것으로 여겨졌다. 이 결과는 기존의 연구 결과와 마찬가지로 iNOS와 eNOS 그리고 이로 인해 형성된 NO가 직접적으로 후두암의 발암

기전에 역할을 하는 것으로 보여지며 농도에 따라 항암 또는 발암의 양면적인 역할을 할 것이라 추측하고 있는데 다시 말하여 적절한 양의 NO의 생성은 이로운 효과를 가지는데 반하여 과생산이 되거나 비정상적으로 비적절하게 생성된 NO는 후두 이형성증으로부터 후두암으로의 진전과정에 관여할 것으로 여겨진다. 이 결과는 1mM EGTA로 calcium을 chelating한 후 NADPH 소비율의 결과로 본 NO의 활성화 측정에서도 후두암에서는 EGTA 처리 후 성대폴립이나 이형성증과는 다르게 다양한 양상을 보여 서로 다른 아형의 NOS에 의한 NO의 생성이 후두암의 생성 과정에 관여할 것으로 사료되었다. 그렇지만 Gavilanes 등에⁶⁶ 의한 또 다른 두경부 편평상피암종에 관한 연구에서 암종의 병기에 따라 종양 성장 초기에는 iNOS 활성도가 최대이고 진행된 병기로 종양이 성장함에 따라 nNOS, eNOS의 활성도도 같이 증가함을 관찰하고는 암종의 성장에는 시기에 따라 Ca^{2+} -비의존성-NOS로부터 Ca^{2+} -의존성-NOS로의 효소 기원의 변화가 있다고 기술하였듯이 암종의 생성 및 증식 과정 중 시기에 따른 NO의 활성이 각 아형에 따라 다를 수 있으므로 시기에 따른 보완 연구가 필요하겠다. nNOS의 경우는 iNOS, eNOS와는 달리 비록 통계적인 의의는 없었다 할지라도 정상 성대조직에서 nNOS 특이단백이 강하게 발현되던 것이 폴립조직과 이형성증에서 감소하는 경향을 보였으며 상피세포암에서 nNOS 특이단백의 발현은 강하게 혹은 약하게도 나타나는 등 변이가 있었다. 이 결과는 향후 각 조직에서 생성된 NO의 phosphorylation 등을 통한 NO의 직접적인 활성도의 측정 등 추가적인 연구가 있어야 하겠지만 성대의 각 질환 특히 암조직에서 iNOS나 eNOS와는 다르게 nNOS에 의해 생성된 NO의 활성도는 다양하게 나타날 수 있음을 시사하는 소견이다. 아울러 nNOS 발현의 분포에 차이가 있거나 nNOS 단백질의 전체 길이가 아닌 비정상적인 형태로 존재하고 있을 가능성을 배제할 수는 없으며 Western blot에서 155 kDa보다 작은 약 45, 50, 80 kDa 근처에서 대량의 특이 단백질이 검출된

것은 이와 같은 현상의 가능성을 뒷받침한다고 하겠다. 이와 비슷한 구조적 다양성의 가능성은 이전의 연구자들의 보고로도 뒷받침되는데 먼저 1997년 Eliasson 등은⁶⁷ nNOS mRNA의 무작위접합(alternative splicing)으로 인하여 다른 변형인 nNOS α 를 쥐의 뇌조직에서 발견하였고 이후 역시 뇌조직에서 nNOS β , nNOS γ 가, 최근에는 쥐의 근육조직에서 nNOS³⁴가 발견되었다. 이와같이 구조적인 변형이 있음에도 불구하고 nNOS α , nNOS β , nNOS γ 는 정상적인 nNOS의 활성도를 갖는 것으로 알려졌다. 본 연구에서 보인 nNOS에 대한 결과는 후두암종에서 조직특이적으로 구조적 다양성을 가지는 유전자가 존재할 수 있음을 시사하는 소견이라 생각한다.

저자는 성대폴립과 후두암 조직에서의 iNOS, eNOS의 발현을 근거로 세포내 근원을 알아보기 위하여 전자현미경으로 세포내 미세구조에서의 발현을 살펴 보았다. 그 결과 후두암 조직에서 iNOS 반응 산물은 종양세포와 단핵세포의 세포질의 변연부의 분비과립내에서 많은 NO particle을 관찰할 수 있었는데 대부분 종양세포 내에서 관찰되었으며 염증세포로 여겨지는 단핵세포에서는 적은 수가 관찰되어 암종의 NO의 기원은 대부분 종양세포임을 알 수 있었다. 한편 세포와 세포간 desmosome 주위에서도 반응 산물을 관찰 할 수 있어 세포간 신호전달물질로 NO의 가능성을 확인할 수 있었다. eNOS 반응 산물은 종양세포 및 혈관내피세포와 혈관주위의 세포질내에서 넓게 산재해 있는 양상을 보였다. 성대폴립의 경우에는 간질조직내 염증세포에서만 iNOS 반응 particle을 관찰할 수 있었으며 eNOS 반응 particle은 성대상피암과 유사하게 상피세포와 혈관내피세포, 혈관주위세포의 세포질내에 넓게 산재하거나 분비과립내에 국소적으로 모여있는 양상을 보였다. 이 결과는 지금까지의 후두암과 성대폴립에서의 생성 과정에 각 NOS 아형이 서로 다르게 관련됨을 뒷받침하는 소견으로 NO가 각 질환의 국소적인 혈류조절에 중요한 역할을 하는 물질이며 폴립의 상피세포 및 암

조직에서의 신호전달물질로서 성대폴립에서는 eNOS에 의한 NO의 활성을, 암조직에서는 eNOS 및 iNOS에 의한 NO의 활성이 각 질환의 생성 과정에 관여함을 추정할 수 있는 근거가 될 수 있을 것이다.

V. 결 론

정상성대조직, 성대양성질환, 후두이형성증, 후두암 조직에서 NO를 생성할 수 있는 각각의 NOS의 발현에 차이가 있었으며 암조직에서는 특히 iNOS, eNOS가 강하게 발현되었고, 성대양성질환에서는 eNOS가 강하게 발현되는 것으로 보아 성대의 각 질환에서 iNOS와 eNOS가 주된 역할을 할 것으로 추정되었으며 nNOS의 활성도에 관해서는 다양한 결과를 보여 주었다. 과연 이들이 기능적으로 활성을 갖는 단백질을 생성하는지는 NO 활성도의 측정을 통해 밝혀야 할 것이다.

인간의 성대 기능을 조율하는 여러 가지 신경전달물질 중 NO관련 신경의 성대 내 분포를 알고, 성대의 양성 및 악성 질환과 연관된 NO의 복잡한 기능을 이해함은 성대 질환의 발생과 전파 과정을 밝히는 주요 단서가 될 수 있음은 물론 향후 NO의 작용을 적절히 조절함으로써 성대 질환을 보다 효과적으로 치료할 수 있는 계기가 될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Palmer RMJ. The discovery of nitric oxide in the vessel wall. Arch Surg 1993;128:396-401.
- 2) Amber IJ, Hibbs JB, Jr, Taintor RR, Vavrin Z. The L-arginine dependent effector mechanism is induced in murine adenocarcinoma cells by culture supernatant from cytotoxic activated macrophages. J Leukoc Biol 1988;43:187-192
- 3) Robbins RA, Hamel FG, Floreani AA, Gossman GL, Nelson KJ, Belenky S, et al. Bovine bronchial cells metabolize L-arginine to L-citrulline: possible role of nitric oxide synthase. Life Sci 1993;52:709-716.
- 4) Pasqualotto BA, Hope BT, Vincent SR. Citrulline in the rat brain: immunohistochemistry and coexistence with NADPH-diaphorase. Neurosci Lett 1991;128:155-160.
- 5) Windmueller HG, Spaeth AE. Source and fate of circulating citrulline. Am J Physiol 1981;241:155-160.
- 6) Leone AM, Palmer MJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. J Biol Chem 1991;266:23790-23795.
- 7) Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:2811-2814.
- 8) Ramis I, Lorente J, Rosello-Catafau J, Quesada P, Gelpi E, Bulbena O. Differential activity of nitric oxide synthase in human nasal mucosa and polyps. Eur Respir J 1996;9:202-205.

- 9) Courey MS, Shohet JA, Scott MA, Ossoff RH. Immunohistochemical characterization of benign laryngeal lesions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:525-531.
- 10) Dikkers FG, Nikkels PG. Benign lesions of the vocal folds: histopathology and phonotrauma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:698-703.
- 11) Kotby MN, Nassar AM, Seif EI, Helal EH, Saleh MM. Ultrastructural features of vocal fold nodules and polyps. *Acta Otolaryngol* 1988;105:477-482.
- 12) Dikkers FG, Hulstaert CE, Oosterbaan JA, Cervera-Paz FJ. Ultrastructural changes of the basement membrane zone in benign lesions of the vocal folds. *Acta Otolaryngol* 1993;113:98-101.
- 13) Kambic V, Radsel Z, Zargi M, Acko M. Vocal cord polyps: incidence, histology and pathogenesis. *J Laryngol Otol* 1981; 95:609-618.
- 14) Pasto M, Serrano E, Urocoste E, Barbacanne MA, Guissani A, Didier A, et al. Nasal polyp-derived superoxide anion: dose-dependent inhibition by nitric oxide and pathophysiological implications. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:145-151.
- 15) Hess A, Bloch W, Rocker J, Peters S, Stennert E, Addicks K, et al. Detection of nitric oxide synthases in physiological and pathophysiological processes of the nasal mucosa. *HNO* 2000;48: 489-495.
- 16) Arnal JF, Flores P, Rami J, Murrís-Espin M, Bremont F, Pasto I Aguilla M, et al. Nasal nitric oxide concentration in paranasal sinus inflammatory diseases. *Eur Respir J* 1999;13:307-312.

- 17) Watkins DN, Lewis RH, Basclain KA, Fisher PH, Peroni DJ, Garlepp MJ, et al. Expression and localization of the inducible isoform of nitric oxide synthase in nasal polyp epithelium. *Clin Exp Allergy* 1998;28:211-219.
- 18) Ramis I, Lorente J, Rosello-Catafau J, Quesada P, Gelpi E, Bulbena O. Differential activity of nitric oxide synthase in human nasal mucosa and polyps. *Eur Respir J* 1996;9:202-206.
- 19) Yuspa SH, Dlugosz AA, Cheng CK, Denning MF, Tennenbaum T, Glick AB, et al. Role of oncogenes and tumor suppressor genes in multistage carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 1994;103 suppl 5:90-95.
- 20) Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989;169:1543-1555.
- 21) Mills CD. Molecular basis of suppressor macrophages. *J Immunol* 1993;146:2719-2723.
- 22) Li LM, Killbourn RG, Adams J, Fidler IJ. Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Res* 1991;51:2531-2535.
- 23) Radomski MW, Palmet RMJ, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5193-5197.
- 24) Langrehr JM, Hoffman RA, Lancaster JR Jr, Simmons RL. Nitric oxide—a new endogenous immunomodulator. *Transplantation* 1993;55:1205-1212.
- 25) Tannenbaum SR, Fett D, Young VR, Land PD, Bruce WR. Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. *Science* 1978;200:1487-1489.

- 26) Lyengar R, Stuehr DJ, Marletta MA. Macrophage synthesis of nitric, nitrate and N-nitrosamines: Precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6369-6373.
- 27) Miwa M, Stuehr DJ, Marletta MA, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Nitrosation of amines by stimulated macrophages. *Carcinogenesis* 1987;8:955-958.
- 28) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
- 29) Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-666.
- 30) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9265-9269.
- 31) Garthwaite JS, Charles L, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988;336:385-388.
- 32) Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994;269:13725-13728.
- 33) Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6:3051-3064.
- 34) Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthase: roles, tolls and controls. *Cell* 1994;78:915-918.
- 35) Yoshida Y, Shimazaki T, Tanaka Y, Hirano M. Ganglions and ganglionic neurons in the cat's larynx. *Acta Otolaryngol* 1993;113:415-420.

- 36) Yoshida Y, Tanaka Y, Saito T, Hirano M. Peripheral nervous system in the larynx. *Folia Phoniatr* 1992;44:194-219.
- 37) Hisa Y, Tadaki N, Uno T, Okamura H, Taguchi J, Ibata Y. Neuropeptide participation in canine laryngeal sensory innervation. Immunohistochemistry and retrograde labeling. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994;103:767-770.
- 38) Hisa Y, Tadaki N, Uno T. Nitroergic innervation of the rat larynx measured by nitric oxide synthase immunohistochemistry and NADPH-diaphorase histochemistry. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:550-554.
- 39) Duarte IDG, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1990;186:289-293.
- 40) Morris R, Southam E, Braid DJ, Galthwaite J. Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglion neurones and their satellite cells. *Neurosci Lett* 1992;137:29-32.
- 41) Wu W. Expression of nitric-oxide synthase(NOS) in injured NCS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. *Exp Neurol* 1993;120:153-159.
- 42) Gray S, Hammond E, Hanson D. Benign pathologic responses of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:13-18.
- 43) Hibbs JB, Taintor RR, Varin Z. Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987;235:473-476.
- 44) Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 1977;3:23-35.

- 45) Craven PA, DeRubertis FR. Requirement for heme in the activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochim Biophys Acta* 1983;745:310-321.
- 46) Vamvakas S, Schmidt HH. Just say NO to cancer? *J Natl Cancer Inst* 1997;89:406-407.
- 47) Cifone MG, Cironi L, Meccia MA, Roncaioli P, Festuccia C, De Nuntiis G, et al. Role of nitric oxide in cell-mediated tumor cytotoxicity. *Adv Neuroimmunol* 1995;5:443-461.
- 48) Xie K, Huang S, Dong Z, Juang SH, Wang Y, Fidler IJ. Destruction of bystander cells by tumor cells transfected with inducible nitric oxide (NO) synthase gene. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:421-427.
- 49) Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4392-4396.
- 50) Petruzzelli GJ. Tumor angiogenesis. *Head Neck* 1996;18:283-291.
- 51) Sherman PA, Laubach VE, Reep BR, Wood ER. Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. *Biochemistry* 1993;32:11600-11605.
- 52) Vidal MJ, Zocchi MR, Poggi A, Pellegatta F, Chierchia SL. Involvement of nitric oxide in tumor cell adhesion to cytokine-activated endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20 suppl 12:S155-159.
- 53) Lejeune P, Lagadec P, Onier N, Pinard D, Ohshima H., Jeannin J. Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. *J Immunol* 1994;152:5077-5083.
- 54) Liu RH, Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat Res* 1995;339:73-89.

- 55) Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424-C1437.
- 56) Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991;266:4244-4250.
- 57) Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3030-3034.
- 58) Ambs S, Merriam WG, Bennett WP, Felley-Bosco E, Ogunfusika MO, Oser SM, et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res* 1998;58:334-341.
- 59) Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y, Uchiyama A, Matsunari Y, Mibu R, et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *J Surg Oncol* 1999;70:222-229.
- 60) Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer* 1995;72:41-44.
- 61) Tschugguel W, Schneeberger C, Unfried G. Expressions of inducible nitric oxide synthases in human breast cancer depends on tumor grade. *Breast Cancer Res Treat* 1999;56:145-151.
- 62) Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS, Weissler MC. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:541-549.

- 63) Bentz BG, Haines GK 3rd, Lingen MW, Pelzer HJ, Hanson DG, Radosevich JA. Nitric oxide synthase type 3 is increased in squamous hyperplasia, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:781-787.
- 64) Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, Fini-Storchi I, Vergari WA, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:587-596.
- 65) Franchi A, Gallo O, Paglierani M, Sardi I, Magnelli L, Masini E, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in laryngeal neoplasia: correlation with angiogenesis. *Head Neck* 2002;1:16-23.
- 66) Gavilanes J, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Perez A, Leza JC, Alvarez-Vicent JJ. Nitric oxide synthase activity in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 1999;109:148-152.
- 67) Eliasson MJL, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms : prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3396-3401.

Abstract

**Gene Expression of Nitric Oxide Synthase
in Benign Lesion and Squamous Carcinoma of Larynx**

Jung-II Cho

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Hong-Shik Choi)

Background. Nitric oxide(NO) is generated in mammalian tissue by the conversion of L-arginine to L-citrulline. This reaction is catalyzed by nitric oxide synthase(NOS) enzyme family, at least 3 NOS isoenzyme, with each being the product of a distinct gene. NO is an important bioactive signaling molecule mediating several actions such as vasodilation, neurotransmission, host defense. Increased NO production may contribute in the pathogenesis of variety of disorders including cancer. Despite many research papers written to date on NO, few have concentrated on laryngeal diseases. Recent evidence has suggested NO synthesised within the larynx, but the cellular location and expression of NO are still remained unclear.

Objectives. This study was designed to confirm the expression of nNOS in the rat and human larynx. And this study was also designed to identify

structural and molecular expression of 3 types of NOS (nNOS, eNOS, iNOS) in benign lesion and squamous carcinoma of larynx.

Materials and Methods. 5 rats of either sex and 5 normal human vocal folds were used for RT-PCR and western blot analysis using a polyclonal antibody against nNOS. We investigated expressions of each NOS specific protein at 15 vocal polyps, 10 vocal nodules, 5 dysplasia, 8 squamous carcinoma using western-blot. Formalin-fixed paraffin embedded samples of normal vocal folds and each laryngeal lesions were examined for localization of NOS using immunohistochemistry (light microscopic and electron microscopic examination).

Results. nNOS expressed in every region of the rat and human larynx, especially basal layers of epithelium, around glands and vessels. iNOS and eNOS are expressed very little in histologically normal tissue, while benign and malignant lesions express more significantly more iNOS and eNOS. Western-blot analysis demonstrated higher iNOS and eNOS protein levels in carcinoma, and higher eNOS protein levels in vocal polyp. By immunoelectronmicroscopy, immunoreactive particles for iNOS were showed in cytoplasm and/or in secretory vesicle of tumor cells and inflammatory cells, for eNOS in tumor cells and endothelial cells.

Conclusions. Our data indicate that NO may participate for neuromodulator in the laryngeal innervation and NO play a relevant role in the formation of benign lesion and squamous carcinoma of larynx.

Key words: vocal fold, NO, NOS, vocal polyp, laryngeal carcinoma