의학 석사학위 논문

중이 진주종에서 PDGFR, EGFR 및 PI3-K의 발현

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이 상 혁

중이 진주종에서 PDGFR, EGFR 및 PI3-K의 발현

지도교수 박 기 현

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2004년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이 상 혁

이상혁의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 _____ 인

심 사 위 원 _____ 인

심 사 위 원 _____ 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2004년 12월 19일

- 감사의 글-

우선 본 연구를 시작하여 여러 힘들고 어려운 상황에서도 무사히 마칠 수 있도록 도와주신 주님께 감사 드립니다. 또 여러 가지 부족한 저에게 물심 양면 지도 편달을 아끼지 않으시고, 의학자로서의 자세와 태도에 대하여 깨우쳐주신 박기현 교수님, 문성균 교수님께 깊은 감사를 드립니다.
마지막으로 이 논문이 나오기까지 저에게 용기와 힘을 북돋아 주시고, 믿음과 사랑으로 지켜봐 주신 부모님, 항상 웃음으로 힘이 되어준 사랑하는 아내에게 감사 드립니다.

2003 년 12 월
저자 씀

- 국문요약 -

중이 진주종에서 PDGFR, EGFR 및 PI3-K의 발현

중이 진주종은 병리조직학적으로 각화성 편평상피가 비정상적으로 중이강내 존재하는 것으로, 조직학적으로는 정상상피와 유사하지만 증식 및 분화과정에서 과증식과 분화 이상의 특성을 갖는 각화 상피의 존재를 특징으로 한다. 이 질환은 골조직을 포함한 주위구조물을 파괴하고, 난청과 어지럼증 등의 내이질환을 유발함은 물론 심할 경우에는 두개강 내까지 침범하여 생명을 위협할 수 있는 질환으로 그 원인과 발병기전에 대하여 그 동안 많은 관심과 연구가 있었지만, 아직 발생기전과 병태생리에 관한 명확한 기전은 확실하게 밝혀지지 않은 상태이다. 최근에는 분자생물학 및 면역학의 발달에 따라 세포외의 신호가 상피세포의 표면수용체 뿐만 아니라 세포내에서 어떻게 전달되는 지에 대한 연구가 시작되고 있다. 외부로부터의 정보가 세포막을 통해 여러 이차전달물질을 이용하여 세포의 내부로 전달되어 세포핵까지 이르는 일련의 과정을 신호전달체계라고 한다. 진주종의 발병기전에 대한 연구에 있어서 세포의 성장과 분화 그리고 종양화 변환까지도 유발할 수 있는 신호전달체계에 대한 연구는 매우 중요하리라고 생각되며, 세포의 성장과 분화를 조절하는 유전자의 이상이 진주종의 형성에 관련될 수 있다는 가설이 제시되고 있어서 그 중요성이 더욱 강조될 수 있다고 생각한다. 또한 현재 진주종 상피의 증식능의 발현을 규명하려는 연구가 활발히 진행되어 진주종 상피의 과증식과 분화이상 상태와 여러 성장인자 및 그 수용체와의 관계가 밝혀지고 있다.

이에 저자는 중이 진주종 상피세포의 과증식과 과분화를 확인하기 위하여 세포의 성장 및 증식에 관여하는 세포표면 수용체인 platelet-derived growth factor receptor(PDGFR), epidermal growth factor receptor(EGFR), 세포내 신호전달물질인 phosphatidylinositol 3’-kinase(PI3-K)에 대한 면역조직화학적 연구를 사용하여 이들의 진주종 내 분포를 알아보고자 하였다.

면역조직화학적 염색 결과 진주종 및 후이개 상피에서 PDGFR, EGFR 및 PI3-K 의 발현을 확인하였고, 특히 PI3-K 의 경우 기저층에 비하여 기저상층에서 더욱 발현이 증가되어 있음을 알 수 있었다. 중이 진주종의 과증식 성향과 분화이상이 기저상층에서 활발히 이루어지고 있는 것을 확인할 수 있었으며, 진주종 상피의

과증식과 분화이상에 다른 많은 인자들이 관여하겠지만, 본 실험에서 세포표면 수용체인 PDGFR, EGFR 보다도 세포 내 신호전달 물질인 PI3-K 가 진주종 병인에 더 관여하고 있음을 알 수 있으며, 향후 계속적인 연구가 진행 되어야 할 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 중이진주종, 신호전달체계, PDGFR, EGFR, PI3-K, 면역조직화학적 염색

차 례

그 림 차 례

표 차례

I. 서 론

정상 상피세포의 성장과 사멸 과정에서 세포의 증식은 주로 기저층에서 이루어지고, 세포가 분화하고 성숙되면서 기저상층 또는 각질층에서 케라틴 형성과 함께 세포 탈락이 일어나 자연스럽게 고사하게 된다. 이와 같이 정상 상피 세포는 분화와 증식이 서로 균형을 이루고 있지만 진주종은 이러한 항상성이 깨지면서 과증식 및 과각화라는 이상 현상을 보이게 된다. 중이 진주종은 점막으로 구성된 중이강내를 각화된 편평상피가 침입하여 각화성 편평상피가 과증식 되어 케라틴을 축적시키면서 주위의 골조직을 파괴하는 염증성 질환으로 만성 화농성 중이염과 달리 임상적으로 난청, 두개내 합병증, 안면신경마비, 내이염 등 심각한 합병증을 유발하여 근치적인 수술요법을 필요로 하고 약물치료 등의 보존적 방법으로는 치료가 되지 않는 질환으로, 이 질환의 발생기전과 병태생리에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔다. 현재까지 상피세포의 과증식, 과분화, 이동 등이 중요한 발병기전이 되는 것으로 생각되고 있으나,[1,2] 명확한 기전은 아직 확실하게 밝혀지지 않은 상태이며, 특히 중이 진주종에서의 세포의 신호전달체계에 대한 연구는 아직 초기단계에 있다.

세포내에서 일어나는 여러 가지 생리적 현상은 세포의 외부환경으로부터 전달되어 오는 다양한 신호를 세포들 사이에서 전달하는데 이는 연결물질(ligand)이 세포 표면에 있는 수용체에 결합함으로써 이루어진다. 이렇게 외부의 정보가 세포내로 전달되는 과정을 신호전달이라고 한다.[3] 이러한 세포내의 생리적 현상은 diacylgylcerol(DAG)와 inositol 1,4,5-triphosphate(PIP3)가 관여하는데,[3-5] phospholipase C(PLC)는 PDGFR 나 EGFR 와 같은 receptor tyrosine kinase 의 기질로 phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate(PIP2)를 PIP3 와 DAG 로 가수분해하여 protein kinase C(PKC) 활성 및 Ca^{2+}의 대사조절, c-fos 와 C-myc 의 발현, MAP kinase 의 활성 등의 DNA 증가와 세포의 분화 및 세포의 종양화 변환을 유발하고 arachidonic acid 의 생성에도 관여하는 이차전달물질로 알려지고 있다.[3-8] 최근 여러 연구에서, PLC-γ1 은 PDGFR 이나 EGFR 과 같은 receptor protein tyrosine kinase 와 PLC-γ1 내에 존재하는 Src homology2(SH2) domain 에 의해서 반응한 후 활성화되어 신호가 전달되는 것으로 알려졌다.[5] PI3-K 는 주로 세포의 성장 및 증식에 관여하는 세포 내 신호전달물질로, 과증식, 과분화하는 경향이 있는 진주종 조직에서도 이러한 효소가 증가되어 있을 것으로 생각된다. 또한 중이 진주종 상피의 형성과정에 세포의 성장과 분화를 조절하는 유전인자의 이상과

연관될 수 있다는 가설이 제시되고 있어 세포의 성장과 분화에 관여하는 여러 신호전달 인자들을 규명하는 것이 중요하다고 생각된다.[2]

이에 저자는 중이 진주종에서 일어나고 있는 신호전달체계를 이해하기 위해 단세포 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 통해 진주종과 및 후이개 상피에서의 PDGFR, EGFR 및 PI3-K 의 발현을 관찰하여 향후 중이 진주종 병인연구의 기초자료를 마련하고자 본 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

A. 실험재료

아주대학교 의과대학 부속병원 이비인후과에서 진주종성 중이염으로 수술을 받은 환자 중 상태가 양호한 12 명의 환자로부터 수술 시 중이 진주종 상피조직을 취하였고, 정상 대조군으로 같은 환자에서 수술 시 후이개 상피조직을 채취하였다.

B. 실험방법

1. 표본제작

중이수술시 채취한 진주종 상피와 후이개 상피조직을 10% 중성 포르말린에 48 시간 고정한 후 상승 알코올 계열에서 탈수시킨 후, 파라핀에 포매시켜 보관하였다. 얻어진 상피조직을 면역조직화학적으로 관찰하기 위하여 보관된 조직을 4~5 ㎛ 두께로 연속 절편하여 표본당 5~8 장의 조직절편을 제작하였다.

2. 면역조직화학적 염색(Immunohistochemical staining)

파라핀에 조직절편을 xylene 과 histoclear 의 혼합용액인 탈랍제(dewaxing agent)로 탈파라핀 처치를 시행한 후, 무수 알코올로 xylene 과 histoclear 를 제거하기 위해 상온에서 2 회 세척하였고, 조직절편의 탈수효과를 위해 상온에서 다시 2 회 세척하였다. 내재성 peroxidase 를 억제할 목적으로 methanol 과 periodic acid 가 포함된 Endo/blocker(biomeda, Pittsburgh,PA)에 조직절편을 섭씨 40 도에서 2 분간 방치(incubation)한 후 상온에서 tris-buffer 로 세척하였다. 비특이성 반응을 줄여 조직항원이 잘 노출될 수 있도록 조직절편을 단백분해효소인 pepsin 에 섭씨 40 도에서 4 분간 방치시킨 후 상온에서 tri-buffer 로 세척하였다. 조직항원과 항체간의 반응에 있어서 비특이적 결합을 억제하기 위해 차단항체(blocking serum)인 정상혈청과 함께 섭씨 40 도에서 2 분간 방치시켰다. 그 다음 일차항체인 항 PDGFR 항체(Santa Cruz Biotec. Inc. Santa Cruz, CA, U.S.A.)를 1:30 으로, 항 EGFR 항체(Santa Cruz Biotec. Inc. Santa Cruz, CA, U.S.A.)를 1:100 으로, 항 PI3-K 항체(Santa Cruz Biotec. Inc. Santa Cruz, CA, U.S.A.)를 1:50 으로 각각 희석 시켜서 40 도에서 16-18 시간 동안 반응시켰다. TBS 로 세척한 후 이차항체를 처리하고 Avidin-biotin complex 와 30 분간 반응시킨 후 0.5% 3-

amino-9-ethylcarbazole(AEC)로 발색반응 후 Mayer's hematoxylin 으로 대조 염색을 시행하였다. 염색의 특이성을 증명하기 위해 음성 대조군으로 TBS 를 1 차항체 대신에 도말시킨 표본으로 사용하였으며, 400 배 시야에서 광학현미경으로 관찰하였다.

3. 염색판정

400 배 시야에서 광학 현미경으로 관찰하여 상피층을 기저층(basal layer)과 기저상층(suprabasal layer)로 나누어 비교하여 그 염색반응이 나타나지 않은 경우를 음성(-), 세포막 주변부만 약하게 염색된 경우를 약양성(±), 400 배 시야를 거의 채우는 정도로 강하게 염색된 경우를 강양성(++)으로 정의하고, 100 배 광학 현미경 시야에서 염색이 잘된 부위를 확인하고, 400 배 시야에서 10 회 판독하여 평균치를 구하였다.

III. 결 과

1. PDGFR

총 12 례의 진주종 조직에서 10 례에서 기저상층부에서 강양성을 보였고, 기저층 대부분에서는 약양성이 관찰되었다. 후이개 상피 역시 동일한 조건에서 염색한 결과 기저상층부에서는 8 례에서 강양성이었고, 기저층에서도 10 례에서 약양성이 관찰되었다(Table 1, Fig.1).

2. EGFR

12 례의 진주종 조직을 후이개 상피와 동일한 조건하에서 염색하여서 본 결과 진주종의 경우는 9 례의 조직에서 기저층에서 강양성, 기저상층에서 약양성을 보였으며, 3 례에서는 기저상층에도 강양성을 보였다. 후이개 상피의 경우는 10 례에서 기저상층에서 약양성을 보이고, 7 례에서 기저층에서 약양성을 보였다(Table 1, Fig.2).

3. PI3-K

총 12 례의 진주종 조직에서 10 례의 조직이 기저상층부에서 강한 양성반응을 보였으며, 기저층에서는 8 례에서 약양성 보였다. 후이개 상피의 경우 기저층에서 6 례 기저상층부에서 7 례에서 강양성을 보이고, 나머지에서도 대부분에서 약양성을 보였다(Table 1, Fig.3).

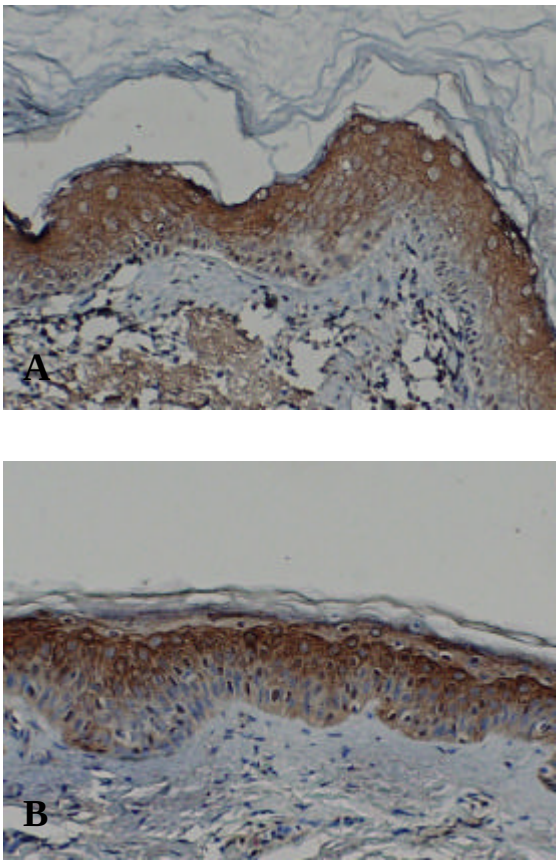

Fig. 1. PDGFR immunostaining. Cholesteatoma matrix(A) shows strong positive staining in the suprabasal layer and weak positive staining in the basal layer, retroauricular skin(B) shows strong positive staining in the suprabasal layer and weak positive staining in basal layer (x400).

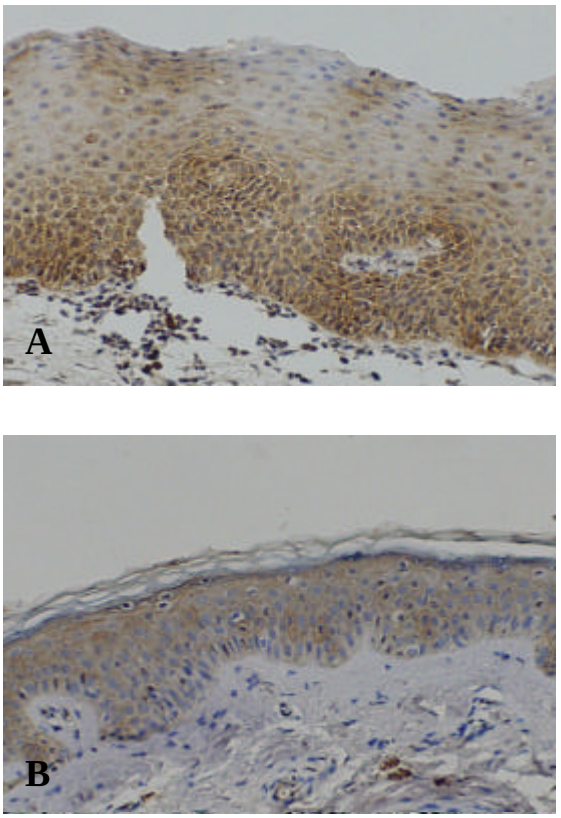

Fig. 2. EGFR immunostaining. Cholesteatoma matrix(A) shows weak positive staining in the suprabasal layer and strong positive staining in the basal layer, and retroauricular skin(B) shows weak positive staining in the suprabasal and basal layer(x400).

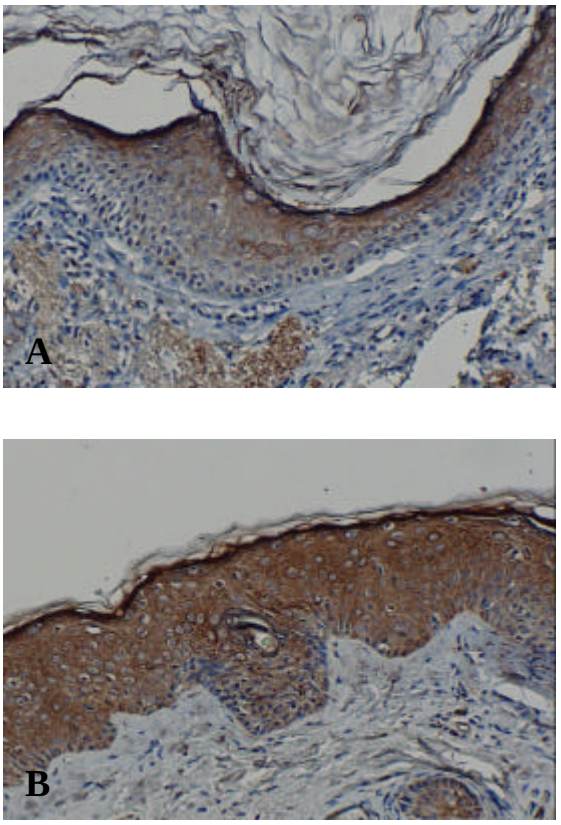

Fig. 3. PI3-K immunostaining. Cholesteatoma matrix(A) shows strong positive staining in the suprabasal layer and weak positive and negative staining in the basal layer, and retroauricular skin(B) shows strong positive staining both in the suprabasal and basal layer (x400).

Table 1. Results of immunohistochemical stain : staining intensity(number of positive stained specimen/number of specimen).

	C		S	
	B	SB	B	SB
PDGFR	±	++	±	++
	(12/12)	(10/12)	(10/12)	(8/12)
EGFR	++	±	±	±
	(9/12)	(9/12)	(7/12)	(10/12)
PI3-K	±	++	++	++
	(8/12)	(10/12)	(6/12)	(7/12)

C : cholesteatoma S : retroauricular skin

B : basal layer SB : suprabasal layer

++ : strong positive staining ± : weakly positive staining - : negative staining

IV. 고 찰

중이 진주종은 중이강내에 각질화된 편편상피가 과증식하여 케라틴이 축적되는 질환으로 만성적이고 지속적인 염증 반응을 유발하여 주위 골조직을 파괴함에 따라 난청을 동반하며, 때로는 내이 누공이나 두개강내 합병증 등의 원인이 될 수 있는 질환이다. 진주종상피의 가장 특징적인 조직학적 소견은 각질형성 세포의 증식으로,[9-11] 중이 진주종 상피의 전례에서 각질화된 중층편평상피와 상피하 결체조직인 주변기질을 관찰 할 수 있었고, 각각 기질은 맨아래쪽부터 기저층, 유극층, 과립층과 각질층으로 구성되어 있었고 피부조직과 유사함을 알 수 있었다. 그러나 정상표피보다 얇고 표피능(rete ridge)이 감소되어 있었으며 일부에서는 각질층에 핵이 발견되기도 하였는데 이는 상피층의 과도한 증식의 증거로 생각된다. 광학현미경학적 조직검사상 정상고막이나 외이도 상피와 비교해 볼 때 상피하 염증조직 이외에는 조직학적 차이는 관찰되지 않으면서도 어떻게 진주종의 특징적인 임상양상을 유발하는지에 대한 중이 진주종의 병리기전 연구은 진주종이 처음 명명된 이후부터 많은 생화학적, 면역조직화학적 연구가 이루어졌고 최근에는 진주종 상피세포의 분자생물학적 연구가 진행되고 있다. 지금까지의 진주종의 병인에 대한 면역 조직화학적 연구결과를 종합해 보면 먼저 진주종의 과증식 성향 연구에 있어서 진주종에서 기저상피세포의 증식이론(basal cell proliferation theory)을 제시한이래 많은 연구를 통하여 증식능력을 가진 기저세포수의 증가를 확인 하였고,[12] 기저세포와 인접하고 있는 기저상부세포의 증식능력이 상실되지 않고 남아있음을 cytokeratin,[13] proliferating cell nuclear antigen(PCNA),[14] cytokine [15] 등을 통한 면역조직화학적 연구에서 확인하였다. 그리고 진주종 상피에서 특징적으로 보여지는 과각질화 현상은 기저세포와 기저상부세포의 과다증식으로 인한 것으로 알려져 있으며,[16] 기저상부세포에서 involucrin 과 filaggrin 분화인자를 이용한 면역조직화학적 연구에서는 조기분화가 확인되었다.[1,17] 정상상피는 지속적으로 분화하는 조직으로 기저막과 접하고 있는 기저세포만 증식능력을 가지며 기저상층으로 이동하면서 분화하게 되고 각질층에 도달한 상피세포는 예정된 능동적 사망기전인 apoptosis 에 의해서 세포의 운명을 다하게 된다.[18] 이러한 분화와 증식이 균형을 이루며 상피세포층을 유지하게 되는데 만약 그 균형이 깨어지면 세포의 과증식 경향이나 분화의 가속화 현상이 기저상층에서 나타날 수 있고, 이는 진주종 상피세포에서의

과도한 케라틴 합성의 원인이 된다. 본 연구에서 세포 내 신호전달 물질인 PI3-K 가 진주종 상피에서, 후이개 상피에서와는 다르게 기저상층부에서 발현이 증가된 것은 세포의 과증식 경향이나 분화의 가속화 현상이 기저상층에서 일어난 결과라고 할 수 있다.

하나의 생물체가 주위 환경의 자극에 반응하고 생명현상을 유지하기 위하여 세포 내에서 일어나는 여러 가지 생리적 현상은 세포의 외부환경으로부터 전달되어 오는 다양한 신호를 세포들 사이에서 대화로 전달하고, 세포와 세포간에 정보의 교환이 원활하게 이루어져야 하는데, 이는 연결물질(ligand)이 세포 표면에 있는 수용체에 결합함으로써 이루어진다. 이렇게 외부의 정보가 세포내로 전달되는 과정을 신호전달이라고 한다.[3,19,20] 즉 신호전달체계란, 외부의 정보가 세포막을 통과하여 세포질을 거쳐 핵 내로 전달되어 세포의 변화를 유발하는 일련의 과정으로 성장과 분화, 대사 등 생명현상의 모든 과정에 필수적이며, 이러한 신호전달체계의 이상은 여러 질병을 초래하게 된다. 이 여러 단계들 중에서 한 부분의 이상이 있다면 신호전달과정이 정상적으로 이루어지지 않을 것이고, 비정상적인 증식이나 세포의 괴사 등을 유발할 수도 있을 것이다. 진주종 세포에서 이 신호전달체계의 기전이 밝혀진다면 진주종의 병태생리에 대한 이해는 물론이고 나아가서 진주종의 치료와 예방에 있어서 중요한 전기를 마련할 수도 있을 것으로 사료된다. 이 신호전달과정을 이해하기 위해서는 수용기, membrane phospholipids, 여러 종류의 phospholipase, 그리고 protein phospolylation 등의 상호관계를 이해함이 필요하다.

편평상피세포의 증식과 분화의 조절에는 일차신호전달물질들인 interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor-á(TNF-á), tumor necrosis factor-ß(TNF-ß), transforming growth factor-á(TGF-á), prostaglandin, leukotrien, PDGF 등이 관여하고, 이중 TGF-á, EGF, PDGF 는 각각의 수용체내에서 phosphorylation 을 통해 tyrosine kinase 를 활성화시켜 세포증식을 유도하는 중요한 물질로 알려져 있으며, tyrosine kinase 가 활성화되면, 이 효소의 기질인 신호전달물질로 Src homology 2(SH2) domain 을 갖고 있는 PI3-K, PLC-γ, Grb2/Sos1, Src 등 10 여종이 활성화되어 신호전달이 이루어지는 것으로 알려져 있다.[6,19-21]

PDGFR 은 PDGFR-á(170KD)와 PDGFR-ß(180KD)의 형태로 존재하며 PDGF 와 결합하여 수용체내의 tyrosine kinase 를 활성화시킨다. PDGF(300KD)는 A, B 2 개의 polypeptide chain 이 disulfide bond 에 의해 연결되어 이합체(AA, AB, BB)의 형태로 존재하는 성장인자로 각 chain 은 서로의 아미노기 배열상 60% 동질성을 공유하고

있다. 강력한 화학주성인자이며 또한 섬유아세포나 혈관내피세포 등에서 세포분열을 촉진시킨다. PDGFR-á 는 PDGF 의 양쪽 chain 모두에 작용하며 PDGFR-ß 는 B chain 에만 작용하여 유사한 생화학적 작용을 나타낸다.[20] 본 연구에서는 Mongolian gerbil 에서 실험적으로 유도된 진주종에서 발현이 관찰되지 않은 결과와 달리,[22] PDGFR 이 진주종상피의 기저상층부에서 강양성을 기저층에서 약양성을 보였고, 후이개 상피 역시 진주종과 비슷한 결과를 보였다. 실험적으로 유도된 진주종과 사람의 진주종에서의 PDGFR 발현의 차이는 앞으로 더 규명해야 될 부분이라고 생각된다.

EGF 의 수용체인 EGFR(170KD)은 세포표면에 위치하며, 그 구조는 1)성장인자와 결합하는 extracelluar domain, 2)세포막을 관통하는 짧은 hydrophobic domain, 3)수용체와 결합된 신호의 세포내로의 전달을 맡는 intracellular domain 으로 구성되어있다. EGFR 의 extracelluar domain 에 신호가 결합되면 수용체 분자의 입체적 구조의 변화가 초래되며 intracellular domain 의 기능인 tyrosine kinase 가 활성화 되고, 신호전달경로를 통하여 핵내에서 c-jun 또는 c-fos 등의 transcription factor 의 발현을 통하여 결과적으로 DNA 생성과 세포의 증식이 일어나게 되는 것으로 알려져 있다.[2] EGFR 은 주로 활성화된 상피세포에서 관찰되며 이미 피부질환인 건선이나 피부종양, 폐, 후두의 편평세포암, 유방의 선암 등에서 발현이 증가되고, 사람의 진주종에서도 EGFR 의 과발현이 많이 알려져 있다.[21,23,24] 정상 상피에 있어서는 EGFR 의 발현이 기저상층에는 없으나 기저층에서 나타난다는 보고도 있고,[24] 기저상층과 기저층에서 모두 발현이 없다는 보고도 있으며,[23] Mongolian gerbil 에서 유도된 진주종에서는 기저상층과 기저층 모두 강한 발현을 보였다.[22] 저자는 EGF 와 결합한 이후 PDGFR 과 유사한 신호전달체계를 보이는 EGFR 의 발현을 중이 진주종에서 관찰하여, 기저층에서는 강양성을 보이고 기저상층에 약양성을 보임을 확인하였고, 후이개 상피에서는 전층에서 약양성으로 발현을 보이는 것을 확인하였다. EGFR 이 진주종 상피의 세포 표면에 분포함은 진주종 세포의 비정상적인 과증식의 원인 중 하나가 될 가능성이 높을 것으로 생각되며, 후이개 상피 역시 발현을 보이는 것은 다른 보고와 같이 다양하게 나타날 수 있는 것으로 생각된다.[23,24] 본 연구에서 세포의 성장 및 증식에 관여하는 세포 표면수용체인 PDGFR 과 EGFR 은 중이 진주종 상피나 후이개 상피의 발현 양상이 비슷한 것으로 보아 진주종 상피의 과증식 성향이 이 두 수용체에 의한 연관성은 없을지도 모른다는 추측을 할 수 있을 것으로 생각된다.

Phosphatidylinositol 3' -kinase(PI3-K)는 과거 10 년동안 흥미롭게 연구되어 온 세포내 신호전달 물질중의 하나로,[25] inositol lipid 에 작용하여 inositol ring 의 3' position 을 인산화 시키는 lipid kinase 이다. PI3-K 결과산물의 생리학적 중요성은 아직 확실하게 밝혀진 바가 없으나 세포의 성장, 생존, 증식, 분화 및 대사, 그리고 membrane trafficking 조절, apoptosis 의 억제에 관여하는 것으로 알려져 있으며,[20,26-28] 이외에도 상피세포의 MSP(macrophage stimulating protein)에 의한 integrin 의존성 유착반응을 매개한다.[29] 또한, regulatory subunit p85 는 profilin 이라는 actin 결합단백에 작용하여 세포골격의 구성을 조절하고,[30] 세포막기저부의 glucose transporter 의 insulin 에 대한 translocation 이나 recycling 에도 관여하여 insulin 저항성 당뇨환자에서의 한 병인임이 확인됐다.[31] PI3-K 는 2 개의 subunit 즉, regulatory subunit(p85)와 catalytic subunit(p110)로 구성되어 있으며, catalytic subunit 은 PDGFR 에 의해 활성화되는데, 그 과정에 대하여 간략히 설명해 보면 regulatory subunit p85 의 2 개의 SH2 domain 이 PDGFR 의 활성화된 tyrosine kinase 와 결합한 후 p85 의 tyrosine 의 인산화가 일어나게 되어 catalytic subunit p110 의 구조적 변화가 생기게 되고, 이로 인하여 p110 의 효소적 기능의 증대를 가져온다.[20,26,32] 그리하여, tyrosine kinase 수용체에 의해 활성화된 PI3-K 는 inositol lipid 에 작용하게 되는데, 그 중에서도 PIP2 에 먼저 작용하며 18 inositol lipid 의 3' position 의 인산화가 일어나며, inositol lipid 가 활성화되어 세포기능에 영향을 주게 된다.[33] 본 연구에서 PI3-K 가 진주종 상피에서 많은 발현을 보임을 알 수 있었고, 특히 후이개 상피와는 다르게 기저상층부에서 더욱 강한 양성반응을 보였다. 이는 진주종 상피는 기저층에 비해 기저상층에서 조기분화가 일어나고 있으며, 과증식이 진행되고 있음을 추정할 수 있었다.

본 연구결과를 보면, 진주종 상피에서 PDGFR, EGFR 및 이와 관련된 신호전달 물질인 PI3-K 의 발현을 확인함으로 이를 이용하는 신호전달 체계가 있음을 예상할 수 있었다. 그러나 진주종에서의 발현이 저자들의 실험전 예상보다는 적었으며, 후이개 상피에서는 예상보다 많은 발현이 관찰되었다. 이것은 진주종 상피에서 이들 인자 이외에 다른 성장인자의 수용체에 의한 신호전달체계의 존재 가능성을 생각해 볼 수 있을 것으로 생각되며, 진주종의 진행 단계에 따른 차이도 고려해야 할 것으로 사료된다. 또한, 중이 진주종 조직은 사이토케라틴등의 발현으로 볼 때 활동기와 비활동기의 상태가 혼합되어 있는 불균질적 조직으로 조직 채취 시기와 부위에 따라 각각 단백의 발현이 달라 질 수 도 있을 것으로 생각되며,[34] 본 연구에 사용된 진주종

조직은 수술 중 얻어진 조직으로 수술적 치료를 시행하는 경우는 대부분이 상당히 병이 진행된 상태로 그 발생이나 진행과정을 규명하기에는 많은 제약이 따를 것으로 생각되며, 이런 이유로 동물에서 유도된 진주종에서 얻어진 결과와 차이를 보인 것으로 생각된다. 면역조직화학적 염색 역시 조직의 부위별 및 세포별 분포를 알 수 있고, 반정량적 분석이 가능하면서도 비교적 간단한 방법인 반면, 결과를 판독하는데는 관찰자마다 차이가 있을 수 있고, 또한 포르말린 고정 및 파라핀 포매 과정에서 변성을 일으키는 경우도 있어 향후 이를 보완한 연구가 필요하리라고 생각된다. 현재의 결과로 진주종의 광범위한 신호전달체계를 모두 설명할 수는 없으나 앞으로의 연구에 중요한 자료의 일부를 차지할 수 있을 것이라 믿으며, 신호전달체계를 이해하기 위해서는 신호전달물질로써 tyrosine kinase 의 기질로 이용되는 다른 물질들에 대한 연구와 PI3-K 이후의 신호전달 과정에 대한 연구, 그리고 신호전달물질이나 수용체의 tyrosine phosphorylation 과정에서의 다각적이고 심도 있는 연구가 필요하리라고 사료된다.

V. 결 론

중이 진주종은 비정상적으로 상피세포의 과증식과 과각화를 일으키는 질환으로 그 발생기전이나 병태생리에 관한 명확한 기전은 아직 밝혀지지 않은 상태이며 중이 진주종에서의 신호전달체계에 대한 관심은 최근의 일이다.

저자는 중이 진주종에서 PDGFR, EGFR 및 PI3-K 의 발현을 면역조직화학적 연구를 통하여 확인하였고, 특히 PI3-K 의 경우 기저층에 비하여 기저상층에서 더욱 발현이 증가되어 있음을 알 수 있었다. 이는 중이 진주종의 과증식 성향과 분화이상이 기저상층에서 활발히 이루어지고 있는 것을 확인할 수 있었으며, 중이 진주종 상피의 과증식과 분화이상에 다른 많은 인자들이 관여하겠지만, 본 실험에서 세포표면 수용체인 PDGFR, EGFR 보다도 세포내 신호전달 물질인 PI3-K 가 세포내 신호전달체계와 연관된 진주종의 병인에 더 관여하고 있음을 추측할 수 있었고, 이는 현재까지 확인된 여러 성장인자들의 세포내 신호전달체계를 이해할 수 있는 중요한 자료가 되리라 사료된다.

참고 문헌

1. Stammberger M, Bujia J and Kastenbauer E: Alternation of epidermal differentiation in middle ear cholesteatoma. Am J Otol 16:527-31, 1995
2. Shinoda H, Huang CC: Expression of c-jun and p53 protein in human middle ear cholesteatoma : Relationship to kerationcyte proliferation, differentiation, and programmed cell death. Laryngoscope 105:1232-37, 1995
3. Choi JH: Signal transduction in keratinocyte. Korean J Investigative Dermatology 3:99-110, 1996
4. Ryu SH, Cho KS, Lee KY, Suh PG and Rhee SG: Purification and characterization of two immunologically distinct phosphoinositide-specific phospholipase C from bovine brain. J Biol Chem 262:12511-8, 1987
5. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C and Pawson T: SH-2 and SH-3 domains : Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. Science 252:668-74, 1991
6. Meisenhelder J, Suh PG, Rhee SG and Hunter T: Phospholipase C-γl is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein –tyrosine kinases in vivo and in vitro. Cell 57:1109-22, 1989
7. Martin RFJ: Receptor regulation of phosphoinositidase C. Pharmacol Ther 49:329-45, 1991
8. Punnonen K, Denning M, Lee E, Li L, Rhee SG and Yuspa SH: Keratinocyte differentiation is associated with changes in the expression and regulation of phospholipase C isozymes. J Invest Dermatol 101:719-26, 1993
9. Park K, Lee JH, Kim KY, Kang JS and Park SI: Morphological evaluation for cholesteatomatous otitis media. Korean J Otolaryngol 31:212-223, 1998
10. Park K, Chun YM and Park HJ: Cytokeratin immunohistochemistry of acquired cholesteatoma in middle ear. Korean J Otolaryngol 37:5-13, 1994
11. Kim SG, Paik SC, Kim TH, Park JY, Jun BH and Song GY: Histopathological and immunohistochemical study on cytokeratin expression of squamous epithelium of the cholesteatoma. Korean J Otolaryngol 38:1654-69, 1995
12. Wullstein HL, Wullstein S: Cholesteatoma, etiology, nosology, and tympanoplasty. Ann Otol Rhinol Laryngol 42:313-15, 1980
13. Chao WY, Huang CC: An immunohistochemical study of cytokeratin expression in human middle ear cholesteatoma. Arch Otorhinolaryngol 246:37-42, 1989
14. Uchida N, Ito S and Hirano M: Localization of proliferative cell nuclear antigen in aural cholesteatoma. Kurume Med J 40:225-28, 1993
15. Yan SD, Huang CC: Lymphotoxin in human middle ear cholesteatoma. Laryngoscope 101:411-

15, 1991

16. Stammberger M, Bujia J, Kastenbauer E and Schilling V: Hyperproliferation associated keratin expression in human middle ear cholesteatoma. Acta Otolarygol(Stockh) 113:364-8, 1993
17. Park K, Park HJ, Chun YM, Lee JS and Kim HJ: Immunohistochemical study for differentiation of human middle ear cholesteatoma. Korean J Otolaryngol 41:1521-6, 1998
18. Park HS, Park K: Expression of Fas/Apo-1 and apoptosis of keratinocytes in human cholesteatoma. Laryngoscope 109:613-6,1999
19. Rhee SG: Inositol phospholipid-specific phospholipase C : interaction of 1 isoform with tyrosine kinase. Trends Biochem Sci 16:297-301, 1991
20. Helden CH, Ostman A and Ronnstrand L: Signal transduction via platelet derived growth factor receptors. Biochemica et Biophysica Acta 1378:70-113, 1998
21. Bujia J, Kim C, Holly A, Sudhoff H, Ostos P and Kastenbauer E: Epidermal growth factor receptor(EGFR) in human middle ear cholestetoma : An analysis of protein production and gene expression. Am J Otol 17:203-6, 1996
22. Lee DH, Park K, Park HJ, Chun JM and Hwang SH: Signal transduction system of experimentally induced cholesteatoma in the Mongolian gerbil. Korean J Otolaryngol 42:679-85, 1999
23. Ergun S, Zheng X and Carlsoo B: Expression of transforming growth factor and epidermal growth factor receptor in middle ear cholesteatoma. Am J Otol 17:393-6, 1996
24. Schulz P, Bujia J, Holly A, Schilling V and Kastenbauer E: Possible autocrine growth stimulation of cholesteatoma epithelium by transforming growth factor alpha. Am J Otol 14:82-7, 1993
25. Sarah S, David F and Richard K: Signal transduction through lipid second messengers. Current Opinion in Cell Biology 8:159-67, 1996
26. Mindaugas V, Andruis K: PLC ã1 and PI3K are downstream mediators of PDGF receptor's mitogenic signal. Cell 73:321-34, 1993
27. Sally JL, Bart V and Michael DW: Signalling through Phosphoinositede 3-kinases : lipids take centre stage. Current Opinion in Cell Biology 11:219-25, 1999
28. Jason L, Dora F, Mingyao L, Irene T, Isabella C, Danifiela R and Martin P:PDGF-induced glycosaminoglycan synthesis is mediated via PI3-K. Am J Physiol 274 1:702-13, 1998
29. Alla D, Alison S and Edward JL: Macrophage stimulating protein-induced epithelial cell adhesion is mediated by a PI3-K-dependent, but FAK-independent mechanism. Experimental Cell Research 248:575-82, 1999
30. Bhargavi V, Veerendra BC and Surya SS: PI3-K binds to profilin through the P85á subunit and regulates cytoskeletal assembly. Biochemistry and Molecular biology international 46:241-8,

1998

31. Torben H, Carsten BA, Soren ME, Soren AU and Jesper OC: Identification of a common aminoacid polymorphism in the p85á regulatory subunit of PI3-K. Diabetes 46:494-501, 1997
32. Matthias K, John CW and Peter B: Platelet-derived growth factor in human brain tumors. Journal of Neuro-Oncology 35:289-301, 1997
33. Alex Toker: The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. Current Opinion in Cell Biology 10:254-61, 1998
34. Kim HJ, Tinling SP, Chole RA: An immunohistochemical study of the expression patterns of cytokeratins in experimental cholesteatomas. Laryngoscope(in press)

-ABSTRACT-

Expression of PDGFR, EGFR and PI3-K in human middle ear cholesteatoma

Sang-hyuk Lee

Department of Medical Sciences,
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Keehyun Park)

Human cholesteatoma in the middle ear is characterized by the presence of a keratinizing epithelium which is believed to have hyperproliferative properties. The pathogenesis of cholesteatoma including its hyperproliferative characteristic is still unknown.

The proliferation and differentiation of cells in specialized tissues and expression of their properties are under the control of a large number of regulatory processes and complex interactions called signal transduction. Signal transduction pathway may be initated by external signals such as growth factors, which bind to receptors and activate tyrosine kinases in the plasma membrane. With the development of the techniques of cell and molecular biology, there have been many efforts to find cause and to examine the biologic behaviors of cholesteatoma.

Phospholipase C-γ1(PLC-γ1) is a substrate of protein kinase located in platelet-derived growth factor receptor(PDGFR), epidermal growth factor receptor(EGFR) and signal transduction through PLC-γ1 participates in the regulation of cell growth and differentiation. Phosphatidylinositol 3'-kinase(PI3-K) is a downstream signal transduction molecule of the platelet-derived growth factor(PDGF)'s mitogenic signal. PI3-K is a lipid kinase that phosphorylates the 3' position of inositol lipid. The physiologic importance of the products of PI3-K remains elusive; however, they accumulate in cells that have been activated by growth factors. It appears that PI3-K plays some role in PDGF-stimulated actin recognization, and directed cell movement, as well as in the stimulation of cell growth and inhibition of apoptosis.

This study was undertaken to elucidate the distribution of PDGFR, EGFR and PI3-K in cholesteatoma matrix and retroauricular skin. Using immunohistochemical techniques, We investigated the reaction patterns of antibody to PDGFR, EGFR and PI3-K as a proliferation maker.

In the immunohistochemical study, PDGFR, EGFR and PI3-K were detected in cholesteatoma matrices as well as in retroauricular skins. In PDGFR and EGFR, there were no expression difference between cholesteatoma matrices and retroauricular skins.

However, in PI3-K, cholesteatoma matrices showed more overexpression in the suprabasal layer than in the basal layer, compared to those of the retroauricular skins. These results may demonstrate that PI3-K is much more related to cholesteatoma mechanism of the signal transduction pathway than PDGFR and EGFR. The further study requires for the signaling pathway in the pathogenesis of middle ear cholesteatoma.

KEY WORDS : Cholesteatoma, Signal transduction, PDGFR, EGFR, PI3-K, Immunohistochemical staining