

## 면역조직화학적 방법에 의한 흰쥐 후각상피 재생에 대한 비타민 A의 영향

이화대학교 의과대학 이비인후과학교실  
정 성 민

= Abstract =

### Effect of Vitamin A on the Regeneration of Mouse Olfactory Epithelium in Immunohistochemical Analysis

Sung-Min Chung, M.D.

*Department of Otolaryngology, College of Medicine,  
Ewha Womans University*

Although Olfaction is a very primitive sense, it is still poorly understood. Recently, new research into nerve cell transduction and regeneration is unlocking mechanisms that may help in treating patient with olfactory and other neural problems.

During development of the olfactory epithelium, groups of cells continuously divide, migrate, and differentiate to form mature olfactory receptor neurons. And among the four main cell types of olfactory epithelium, basal cells act as stem cells to replace the dying olfactory receptor cells. This capacity for renewal of the receptor cells continues throughout the life of the animal and appears to be unique among mammalian neural systems.

Evidence for morphological and biochemical studies has demonstrated that neuronal cell death and subsequent renewal can be enhanced by turnover induced by chemical destruction of the olfactory epithelium by zinc sulfate lavage or bullectomy.

In the treatment of anosmia without obstructive nasal and sinus disease, although about 30 % of patient regain olfactory ability spontaneously, there is no definite therapy about it.

Various vitamins and minerals have been promoted for the treatment of olfactory loss. Unfortunately, none of these has been succesful in controlled trials or predictable enough to warrant their use. Vitamin A has been suggested because it is necessary for repair of epithelium, because rats deficit in vitamin A become anosmia, and because mammalian olfactory epithelium contains considerable amounts of it.

Therefore author tried vitamin A subcutaneous injection to the mouse after chemical destruction of olfactory epithelium by 1% zinc sulfate lavage. And their regeneration was examined by immunohistochemical study with cytokeratin specific for basal cell and neuron-specific enolase(NSE) specific for olfactory receptor cells.

The result showed that more intense cytokeratin immunoreactivity was seen in the vitamin

A injected animals than not injected ones. But NSE reactivity of vitamin A injected group demonstrated a staining pattern similar to that seen in the not injected one.

It suggests that vitamin A induces more enhanced proliferative response of basal cell after trauma of olfactory epithelium, which means that it would be possible that vitamin A is effective for treatment of anosmia by olfactory neuron damage. But vitamin A did not promote proliferation of olfactory receptor cells directly in 3 weeks after trauma. So we will have further study about this phenomenon.

KEY WORDS : Olfactory epithelium · Vitamine A · Cytokeratin · Neuron-specific enolase.

## 서 론

후각은 매우 원시적인 감각이지만 아직 기전은 분명하게 알려져 있지는 않다. 최근에 신경 세포 재생과 전달기전에 대한 새로운 실험들이 진행되고 있어 후각장애를 포함한 신경장애 환자 치료에 도움이 되리라 생각된다. 그러나 아직도 사람에게 있어서 비강이나 부비동의 질환이 없이 발생한 무후각증에는 특별한 치료방법이 발견되고 있지 않다. 따라서 여러종류의 비타민과 무기질을 후각상피의 치료에 사용하여 보았으나 아직까지는 사용을 권장할 만큼 충분한 효과가 입증된 것은 없다.

그러나 그중에서 비타민 A가 치료방법의 하나로 제시되고 있는데 그 이유는 비타민 A가 상피의 회복에 필수적이기 때문이며, 또한 비타민 A가 부족된 식사로 사육된 쥐에서 무후각증이 발생된 보고가 있으며 그외에도 포유동물의 후각상피는 상당한 양의 비타민 A를 포함하고 있기 때문이다<sup>1)</sup>.

이에 저자는 흰쥐의 후각상피를 1% 황산아연으로 세척하여 화학적으로 파괴시킨 다음 실험군의 동물들 두 군으로 나누어 실험 1군은 비타민 A 투여없이 사육하고 실험 2군은 비타민 A를 매일 200IU씩 투여하면서 사육하였다. 그 후 실험 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21일에 각각 해당된 동물들을 희생시킨 다음 후각상피의 재생상태를 cytokeratin과 NSE(Neuron-specific enolase)를 이용하여 후각수용체 세포와 기저세포의 증식상태로 관찰하였다.

그 결과 비타민 A 투여군에서 실험 7일째까지 cytokeratin의 면역 반응이 비타민 A투여하

지 않은 군에 비하여 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 후각수용체 세포의 전구체인 기저세포의 증식이 비타민 A 투여군에서 좀더 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 후각수용체세포에서 특이적으로 나타나는 NSE 반응은 비타민 A 투여군과 투여하지 않은 군 사이에 별 차이가 없었다. 이것은 기저세포가 후각수용체세포로 성장하는 기간이 3주 이상이기 때문에 두 실험군 사이에 차이가 없게 나타난 것으로 사료된다. 따라서 기저세포의 증가된 증식이 실제로 후각수용체세포의 증가된 증식으로까지 이어지는지에 대해서는 좀더 연구가 필요하겠지만 본 연구에서 저자는 비타민 A가 후각상피손상후 7일내에서 기저세포의 증식을 좀더 증가시킴으로써 후각수용체세포의 재생을 촉진시킬 수 있다는 것을 관찰할 수 있었다.

## 연구 재료 및 방법

### 1. 실험동물

체중 150~200g 정도의 흰쥐(Sprague Darrley)를 사용하였으며 동물군은 대조군과 실험 1군, 실험 2군으로 구분하고 대조군은 각 실험일에 1마리씩 배정하고 실험 1, 2군은 각각 실험 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21일로 구분하고 각 실험일에 5마리씩 배정한 다음 해당일에 희생시켰다.

실험 1, 2군은 모두 1% 황산아연 용액을 주사기(23G)를 사용하여 흰 쥐의 한쪽 전비공을 통하여 비강내에 20방울을 점적하여 후각피를 손상시켰다.

그 다음 실험 1군은 규정사료를 공급하면서 정상상태로 사육하였고 실험 2군은 비타민 A를 매일 200IU씩 피하내로 주사하면서 규정사료로 사육하였다.

또한 대조군은 1% 황산아연용액의 처치없이 정상상태로 사육하였다.

## 2. 연구방법

### 1) 검체의 처리

실험동물은 각 해당일에 membutal마취하여 동물고정대에 놓은 다음 흉강을 열고 상행대동맥을 통하여 10% 중성 formalin으로 관류 고정하였다. 고정된 동물에서 코부분을 절제한 다음 3% nitric acid에서 3일간 탈회시켰다. 탈회된 조직을 ethyl alcohol 탈수과정을 거친 후 파라핀에 포매하고 5 $\mu$ m두께의 절편을 만들어서 slide에 부착시켰다.

### 2) 면역조직화학 염색

파라핀에 포매된 조직은 5 $\mu$ m절편을 만들어 xylene과 alcohol을 이용하여 탈파라핀과 hydration을 시킨 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 endogenous peroxidase를 block시켰다. 그 후 cytokeratin(DAKO) 발현을 보기 위해서 trypsin을 이용하여 trypsin처리를 하였다. PBS(phosphate buffered saline, PH 7.2)로 수세후 1:100으로 희석한 일차항체(cytokeratin)를 실온에서 반응시킨 후 다시 PBS로 수세한 다음 peroxidase가 결합된 streptavidin 용액을 다시 20분간 반응시킨 후 수세하고, AEC(3-amino-9-ethylcarbazole)를 이용하여 발색시켰다. NSE(neuron specific enolase, DAKO) 표현을 보기 위해서는 trypsin 처리한 것은 제외하고는 cytokeratin염색과 동일한 방법으로 시행하였고 희석은 1:50으로 하였다.

그 후 Meyer's hematoxylin으로 대조염색 후 증류수로 수세한 후 수성 접착제를 이용하여 포매하였다.

광학현미경으로 검색시 대부분의 발현 정도는 강한 정도와 분포 등을 고려하여 염색이 전혀 안된 경우를 음성(-)으로 하고 강한 양성을 보이면서 대부분의 세포가 양성을 보이는 경우를 grade 3(+++)로 분류한 후 그 사이의 염색상을 보이는 경우를 등급으로 나누어% 소수

의 세포만 양성인 경우를 trace( $\pm$ ), 대다수의 세포가 양성이나 약한 정도를 grade 1(+), 그보다 조금 강한 정도를 grade 2(+++)로 분류하여 결과를 분석하여 비교하였다(Fig. 1).

또한 실험 1, 2군에서 각각의 실험일에 나타난 염색의 정도를 쉽게 비교해 볼 수 있도록 각 grade를 점수로 환산하여 -는 0점,  $\pm$ 은 1점, +는 2점, ++는 3 점, +++는 4점으로 하였으며 통계학적 처리는 Mann-whitney test를 이용하였다.

## 결 과

### 1. cytokeratin 면역반응 결과

대조군은 실험 각 해당일에 1마리씩 희생시켜 관찰하였는데 cytokeratin면역반응은 모두 음성이었다.

비타민 A를 투여하지 않은 실험 1군의 경우 cytokeratin 면역반응은 실험 1일째는 음성이 2예, trace가 2예, grade 1이 1예로 각 군을 비교해 보기 위해 각 grade를 점수로 환산하여 계산된 평균 점수는 0.8이었다. 실험 2일째는 음성이 2예, trace가 1예, grade 1이 2예로 평균 점수는 1.0이었고, 실험 3일째는 음성이 1예, trace가 2예, grade 1이 1예, grade 2가 1예로 평균 점수는 1.4로 실험 3일째부터 염색정도가 강해지기 시작하였다. 실험 5일째는 음성이 1예, trace가 2예, grade 1이 1예, grade 2가 1예였고 평균 점수는 1.4이었으며, 실험 7일째는 음성이 1예, trace가 1예, grade 1이 1예, grade 2가 1예, grade 3이 1예였으며 평균 점수는 1.0이었다. 실험 14일에는 음성이 1예, grade 1이 1예, grade 2가 2예, grade 3이 1예였고 평균 점수는 2.4이었으며 실험 21일에는 trace가 1예, grade 1이 1예, grade 2가 2예, grade 3가 1예로 평균 점수는 2.6으로 실험 14일에 비해 염색 정도의 큰 변화는 없었다(Table 1).

비타민 A를 투여한 실험 2군에서의 면역반응은 실험 1일에 음성이 2예, trace가 1예, grade 1이 2예로 평균 점수는 1.0이었고, 실험 2일에는 grade 2가 3예, grade 3이 2예로 평균 점수는 3.

Table 1. Cytokeratin immunoreactivity in the olfactory epithelium of experimental group 1(vitamin A not injected)

Immunoreactivity (count)	Experimental day (No. of experimental animal × count)						
	1	2	3	5	7	14	21
-(0)	2(0)	2(0)	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)	
± (1)	2(2)	1(1)	2(2)	2(2)	1(1)		1(1)
+(2)	1(2)	2(4)	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)
++(3)			1(3)	1(3)	1(3)	2(6)	2(6)
+++ (4)					1(4)	1(4)	1(4)
Total(mean)	5(0.8)	5(1.0)	5(1.4)	5(1.4)	5(2.0)	5(2.4)	5(2.6)

Table 2. Immunoreactivity of cytokeratin in the olfactory epithelium of experimental group 2(vitamin A injected)

Immunoreactivity (count)	Experimental day (No. of experimental animal × count)						
	1	2	3	5	7	14	21
-(0)	1(0)						1(0)
± (1)	1(1)		1(1)	1(1)		1(1)	1(1)
+(2)	2(4)		2(4)	2(4)	1(2)	2(4)	1(2)
++(3)		3(9)	1(3)	2(6)		1(3)	1(3)
+++ (4)		2(8)	1(4)		4(16)	1(4)	1(4)
Total(mean)	5(1.0)	5(3.4)	5(2.4)	5(2.2)	5(3.6)	5(2.4)	5(2.0)

4로 대조군에 비해 실험 2일째부터 현저하게 염색정도가 강해진 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 실험 3일에는 trace가 1예, grade 1이 2예, grade 2가 1예, grade 3이 1예로 평균 점수는 2.4이었고, 실험 5일째는 trace가 1예, grade 1이 2예, grade 2가 2예로 평균 점수는 2.2이었다. 실험 7일째는 grade 1이 2예, grade 3가 4예로 평균 점수는 3.6이었고, 실험 14일째는 trace가 1예, grade 1이 2예, grade 2가 1예, grade 3가 1예로 평균 점수가 2.4로 실험 2주째는 염색정도가 약해져서 실험 1군과 비슷해지는 것을 관찰할 수 있었다. 실험 21일째는 음성이 1예, trace가 1예, grade 1이 1예, grade 2가 1예, grade 3이 1예로 평균 점수는 2.0으로 역시 실험 14일에 비해 큰 변화는 발견되지 않았다(Table 2).

비타민 A를 투여하지 않은 군과 투여한 군 사이의 염색정도를 비교하여 보면 비타민 A를 투여한 군이 실험 2일째부터 실험 7일째까지

투여하지 않은 군에 비해 통계적으로 유의하게 염색정도가 증가된 것을 관찰할 수 있었고 ( $p < 0.05$ ), 실험 2주와 3주째는 두 군사이에 염색정도의 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

## 2. NSE 면역반응 결과

대조군에서의 NSE 면역반응은 각 실험일에 걸쳐 모두 grade 2 정도의 염색정도를 나타내었다.

비타민 A를 투여하지 않은 실험 1군의 경우 NSE의 면역반응 정도는 실험 1일째에 음성이 1예, trace가 4예였으며 평균 점수는 0.8이었다. 실험 2일째는 trace가 3예, grade 1이 2예였고 평균 점수는 1.4이었으며, 실험 3일째는 trace가 4예, grade 1이 1예로 평균 점수는 1.2이었다. 실험 5일째는 음성이 1예, trace가 3예, grade 1이 1예로 평균 점수는 1.0이었고, 실험 7일째는 음성이 1예, grade 1이 2예, grade 2가 2예로

평균 점수는 1.2이었다. 실험 14일째는 음성이 1예, trace가 4예로 평균 점수는 0.8이었고 실험 21일째는 음성이 2예, grade 1이 2예, grade 2가 1예였고 평균 점수는 0.8이었다(Table 3). 이와 같이 각 실험일에 따른 염색정도의 변화는 관찰되지 않았다.

비타민 A를 투여한 실험 2군에서 NSE의 면역반응 정도는 실험 1일에는 음성이 1예, trace가 2예, grade 1이 2예였고 평균 점수는 1.2이었다. 실험 2일에는 음성이 1예, trace가 1예, grade 1이 3예였고 평균 점수는 1.4였으며, 실험 3일에는 trace가 3예, grade 1이 2예였고 평균 점수는 1.4였다. 실험 5일에는 trace가 4예, grade 1이 1예였으며 평균 점수는 1.2였다. 실험 7일에는 음성이 1예, trace가 3예, grade 1이 1예였으며 평균 점수는 1.0이었으며, 실험 14일에는 음성이 1예, trace가 2예, grade 1이 2예로 평균 점수는 1.2였으며, 실험 21일에는 음성이 1예, trace가 3예, grade 1이 1예로 평균 점수는

1.0이었다(Table 4).

이와 같이 비타민 A를 투여한 군에서 비타민 A를 투여하지 않은 군과 마찬가지로 NSE 반응 정도는 grade 1이하가 대부분이었고 실험 결과에 따른 염색 정도의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4). 실험 1군과 2군에서 NSE 염색 정도를 비교해 보았을 때 두 군 사이에 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 5).

## 고 찰

포유동물의 신경계중 수용체가 일생동안 재생되는 것은 후각신경세포가 유일하다. 이러한 신경세포의 죽음과 연이는 재생은 후각상피 또는 후구의 손상에 의해 더욱 강화되고 있는 것이 형태학적 또는 생화학적으로 증명되고 있다

2,3,6,13)

최근에 신경세포의 재생과 전달기전에 대한

Table 3. Immunoreactivity of cytokeratin in the olfactory epithelium of experimental group 2(vitamin A injected)

Immunoreactivity (count)	Experimental day (No. of experimental animal × count)						
	1	2	3	5	7	14	21
— (0)	1(0)			1(0)	1(0)	1(0)	2(0)
± (1)	4(4)	3(3)	4(4)	3(3)	2(2)	4(4)	2(2)
+(2)		2(4)	1(2)	1(2)	2(4)		1(2)
++(3)							
+++ (4)							
Total(mean)	5(0.8)	5(1.4)	5(1.2)	5(1.0)	5(1.2)	5(0.8)	5(0.8)

Table 4. NSE immunoreactivity in the olfactory epithelium of experimental group 2(vitamin A injected)

Immunoreactivity (count)	Experimental day (No. of experimental animal × count)						
	1	2	3	5	7	14	21
— (0)	1	1(0)			1(0)	1(0)	1(0)
± (1)	2(2)	1(1)	3(3)	4(4)	3(3)	2(2)	3(3)
+(2)	2(4)	3(6)	2(4)	1(2)	1(2)	2(4)	1(2)
++(3)							
+++ (4)							
Total(mean)	5(1.2)	5(1.4)	5(1.4)	5(1.2)	5(1.0)	5(1.2)	5(1.0)

새로운 실험들이 진행되어 후각장애를 포함한 신경장애 환자의 치료에 도움이 되리라 기대되고 있다. 후각의 경우 후각신경의 재생은 후각 상피를 이루는 4가지 세포 즉 후각수용체 세포, 지지세포, 미소용모세포, 기저세포 중 기저세포에서 기원되는 것이 이미 알려져 있으며<sup>7,12,16,18)</sup> 후각의 실제적인 전달기전은 cyclic AMP를 세포내 2차전령으로 사용하는 G-protein coupled cascade에 의해 중개되는 것으로 밝혀진 바 있다<sup>9)</sup>.

그러나 아직도 폐쇄성 비강 및 부비동 질환이 없이 상기도 감염, 두부 손상 등의 신경세포 상실에 의한 후각장애에 대해서는 손상 3~6개월 후에 약 1/3 정도에서 후각기능이 저절로 회복된다는 보고가 있을 뿐<sup>4,5,8)</sup> 뚜렷한 치료방법이 제시되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 후각신경세포 성장을 조절하는 요소에 많은 연구가 필요한데 이러한 연구는 후각상실뿐 아니라 다른 신경의 재생도 가능하게 만들 수 있다고 하겠다.

그동안 후각장애의 치료를 위해 여러종류의 비타민과 무기질 등이 사용되어 왔으나 아직까지 성공적인 치료제는 발견되지 않고 있다. 그러나 그중에서도 비타민 A는 상피세포의 치유에 필요하기 때문에 꾸준히 관심의 대상이 되고 있다. Duncan 등<sup>5)</sup>은 비강이나 부비동에 병변이 없이 발생한 무후각증에서 후점막이 손상된 경우 비타민 A 투여로 치료되었다고 보고하고 있으며 Stanbygard<sup>20)</sup>도 ozena를 비타민 A로 치료하여 좋은 결과를 보고하고 있다. 그외에도 Le Maignen과 Rapaport<sup>11)</sup>도 흰쥐에서 비타민 A가 결핍된 식사를 주었을 때 체중이 감소하면서 무후각증이 되는 것을 관찰하였고 Millars<sup>15)</sup>는 소의 후점막 추출물에서 비타민 A와 carotenoid색소를 발견하였다. 이와같이 비타민 A는 후각세포에 영향을 미치며 특히 후각세포의 재형성으로 후각이 돌아오게 하는 원인이 된다고 하며 비타민 A의 작용부위는 후각세포의 소포와 돌기로 생각된다고 보고하고 있다<sup>5)</sup>.

최근들어 비타민 A에 대한 관심이 높아지고 많은 연구가 진행되고 있다. 비타민 A와 그것의 대사산물 및 합성유사물인 retinoids가 정상세

포, 암전구세포, 암세포 등에서 성장 및 분화를 조절하는 것으로 생각되고 있으며 상피세포는 비타민 A의 생리작용의 중요한 표적의 하나로 생각되는데 왜냐하면 비타민 A의 과잉과 결핍 모두 상피세포에 심한 변화를 나타내기 때문이다. 즉 비타민 A 결핍은 편평세포화를 일으키며 비타민 A과잉은 각화를 발생하여 여러 종류의 상피조직을 점막화시킨다고 하였다<sup>17)</sup>. 그외에도 비타민 A는 EGF(epidermal growth factor) 수용체 유전자 표현의 억제로 화학적 예방(chemoprevention)의 효과가 있는 것으로 추측되고 있으며<sup>10)</sup> 이러한 비타민 A와 retinoids가 표피세포의 발달을 지연시키는 작용은 아직 밝혀지지 않았지만 DNA 합성과 면역증강에 의한 것으로 추측하고 있다<sup>19)</sup>. 그외에는 Barnett와 Szabo<sup>11)</sup>는 성인포유동물의 상피는 비타민 A에 대해 형태발생 반응을 가지며 이는 주어진 상피의 역치에 의존한다고 하였고 이런 현상은 비타민 A가 어떤 방법으로도든지 결국 유전자발현(gene expression)에 영향을 미친다는 것을 의미한다고 하였다.

저자는 흰쥐의 후점막을 1% 황산아연용액으로 세척하여 화학적 손상을 준 후 후각상피의 재생상태를 비타민 A 투여군과 투여하지 않은 군으로 구별하여 관찰한 결과 비타민 A 투여군에서 실험 7일째까지 cytokeatin의 면역반응이 대조군에 비해 증가되어 있어 기저세포의 증식이 비타민 A 투여군에서 더 많이 발생되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나, 후각수용체 세포에서 나타나는 NSE의 반응은 비타민 A투여군과 투여하지 않은 군 사이에 별 차이가 나타나지 않았다. 이러한 현상에 대한 설명은 첫째로 Levey 등<sup>12)</sup>이 보고했던 것처럼 cytokeatin에 대한 면역반응이 음성인 구형의 기저세포가 새로운 후각수용체세포의 전구체이고 같은 기저세포라도 기저막 바로 위에 존재하는 cytokeatin 양성인 수평의 기저세포는 직접 후각수용체세포로 되지는 않고 구형의 기저세포로 분화되는 간세포(stem cell)이기 때문이라고 생각해 볼 수 있겠다. 본 연구의 결과에서 비타민 A 투여군에서 cytokeatin의 면역반응이 대조군에 비해 현저하게 증가된 것은 바로 수평의 기저세

포가 증식했다는 것을 추측해 볼 수 있겠다. 둘째로 생각해 볼 수 있는 것은 cytokeratin 양성인 수평의 기저세포가 cytokeratin 음성인 구형의 기저세포를 거쳐 후각수용체세포가 되기까지의 시일이 3주이상 걸리기 때문에 추측해 볼 수 있겠다. 이러한 현상은 Duncan 등<sup>10)</sup>의 보고에서 비타민 A 투여후 후각이 좋아지기까지는 평균 3~6주가 걸린다고 했던 것과도 일치된다고 보겠다. 그러나 어쨌든 비타민 A 투여후 후각수용체세포의 전구세포인 기저세포의 증식이 더 많이 증가했다는 것은 무후각증에 대한 비타민 A의 치료가능성을 시사한다고 하겠다.

또 본 연구에서 비타민 A 투여군에서 실험 1일째부터 현저하게 cytokeratin 면역반응이 증가되었고 이러한 현상은 실험 7일째까지 지속되었으나 실험 2주째 부터는 cytokeratin 반응이 두 군 사이에 별 차이가 없는 것으로 나타났는데 Matulionis 등<sup>14)</sup>에 의하면 1% 황산아연용액으로 비강 세척후 2일째부터 재생의 초기증후가 보인다고 하였고 처치후 14일째에 표면에 후각 수용체세포가 나타나며 42일 쯤에는 후각 수용체세포의 미소용모가 나타난다고 한 사실과 일치함을 알 수 있었다. 즉 비타민 A를 준후 기저세포의 증식 및 분화는 상처를 준후 1일째부터 왕성하게 일어나고 이런 현상이 7일째까지 지속된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 비타민 A의 사용은 손상 후 즉시 시작하여 2주정도 지속적으로 사용시 기저세포의 증식을 더욱 증가시키므로써 후각수용체 세포로의 성숙 또한 증가시키리라 추측할 수 있겠다. 그러나 본 실험에서 3주정도까지는 두 군 사이에 NSE의 차이가 없는 것으로 보아 비타민 A에 의한 기저세포의 증가된 증식이 후각수용체세포의 증식으로까지 이어지는 과정에 대해서는 좀더 연구가 필요하다고 하겠다.

## 결 론

원래 비강내에 1% 황산아연용액을 주입하여 후점막의 후상피를 손상시킨 후 대조군 및 비

타민 A를 투여한 실험 1군과 투여하지 않은 실험 2군으로 나누어 후상피의 재생상태를 cytokeratin과 NSE의 면역반응으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 대조군의 cytokeratin 면역반응은 음성이었고, NSE 면역반응은 grade 2였다.
- 2) 비타민 A를 투여한 군에서 cytokeratin 면역반응이 실험 2일째부터 7일째까지는 통계적으로 유의한 증가가 관찰되었으나 실험 2주와 3주째에는 거의 같은 정도의 염색정도로 발현되어 통계적으로 유의한 차이는 없었다.
- 3) 비타민 A 투여군과 투여하지 않은 군 사이의 NSE의 면역반응정도에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

이상과 같은 결과에 의해 비타민 A는 후각수용체세포로 되는 간세포(stem cell)인 기저세포의 증식은 현저히 증가시켰으나 실험 3주째까지도 후각수용체세포의 증식의 차이는 관찰되지 않아 비타민 A가 후점막의 손상후 기저세포의 증식을 증가시키므로써 후상피 재생을 촉진시킨다는 것이 확인되었으나 직접적으로 후각수용체세포의 재생까지 촉진시키는 것은 관찰하지 못하였다. 따라서 차후에 3주이상 6주까지 비타민 A를 투여하여 후각수용체세포의 증식을 확인하는 것과 또 다른 연구를 통해 증식된 수평의 기저세포의 증식이 후각수용체세포의 증식으로까지 이어지는 것을 관찰해 본다면 후점막 손상에 의한 후각수용체세포의 죽음에 의한 무후각증인 경우 손상 초기에 비타민 A로 치료하는 것이 효과가 있다는 것을 확인해 볼 수 있을 것으로 사료되었다.

## References

- 1) Barnett ML, Szabo G : Effect of vitamin A on epithelial morphogenesis in vitro. Exp cell Res 76 : 118~126, 1973
- 2) Cancalon P : Degeneration-regeneration of olfactory cells induced by ZnSO<sub>4</sub> and other chemicals. Tissue cell 14 : 717~733, 1982

- 3) Costanzo RM : Neural regeneration and functional reconstruction following olfactory nerve section in the hamster. *Brain Res* 361 : 258~266, 1985
- 4) Costanzo RM, Becker Dp : Smell and taste disorders in head injury and neurosurgery patient. In Meiselman HL, Rivlin RS eds, *Clinical measurement of taste and smell*. New York, Macmillan, p 565, 1986
- 5) Duncan RB, Briggs M, Wellington NZ : Treatment of uncomplicated anosmia by vitamin A. *Arch Otolaryngol* 75 : 116~124, 1962
- 6) Graziadei PPC, Kaplan MS : Neurogenesis of sensory neurons in the primate olfactory system after section of fila olfactoria. *Brain Res* 186 : 289~300, 1980
- 7) Graziadei PPC, Okano M : Neuronal degeneration and regeneration in the olfactory epithelium of pigeon following transection of the first nerve. *Acta Anat* 104 : 220~236, 1979
- 8) Hendriks APJ : Olfactory dysfunction. *Rhinology* 26 : 229~251, 1988
- 9) Lancet D : The molecular basis of odor recognition. *Trends Biochemical Sci* 12 : 63~72, 1987
- 10) Lee JS, Kim JS, Blick M et al : Effect of retinoic acid on oncogene expression in a human head and neck squamous carcinoma cell line. In *Head and Neck Oncology Research*(ed. Wolf GT, Carey TE), Amsterdam-Berkeley & Milano, Kugler & Ghedini, pp43~48, 1988
- 11) Le Maignen J, Rapaport A : Method of determining the role of vitamin A in the white rat. *CR Soc Biol(Par)* 145 : 800~803, 1951
- 12) Levey MS, Chikaraishi DM, Kauer JS : Characterization of potential precursor population in the mouse olfactory epithelium using immunocytochemistry and autoradiography. *J of Neurosci* 11 : 3556~3564, 1991
- 13) Matulionis DH : Ultrastructural study of mouse olfactory epithelium following destruction by ZnSO<sub>4</sub> and its subsequent regeneration. *Am J Anat* 142 : 67~90, 1975
- 14) Matulionis DH, Breipohl W, Kwnwar PB : Degeneration and regeneration of olfactory epithelium in the mouse. *Annals Otol Rhinol Laryngology* 91(suppl 89) : 3~11, 1982
- 15) Millars NA, Postman WM, Heggie R : Evidence for presence of vitamin A and carotenoids in olfactory area of the steer. *J Amer Chem Soc* 61 : 1929~1932, 1939
- 16) Morrison EE, Costanzo RM : Morphology of the human olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 297 : 1~11, 1990
- 17) Rotan R : Effect of vitamin A and its analogue(retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochem Biophys Acta* 605 : 53~59, 1980
- 18) Rowley JC 3rd, Moran DT, Jafek BW : Peroxidase backfills suggest mammalian olfactory epithelium contains a second morphologically distinct class of bipolar sensory neuron : The microvillar cell. *Brain Res* 502 : 387~396, 1989
- 19) Shklar G, Schwartz J, Grace D et al. : Inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis by 13-cis-retinoic acid. *Oral Surg* 50-1 : 45~52, 1980
- 20) Stanbygard E : Treatment of ozena and rhinopharyngitis chronica sicca with vitamin A. *Arch Otolaryngology* 59 : 485~491, 1954



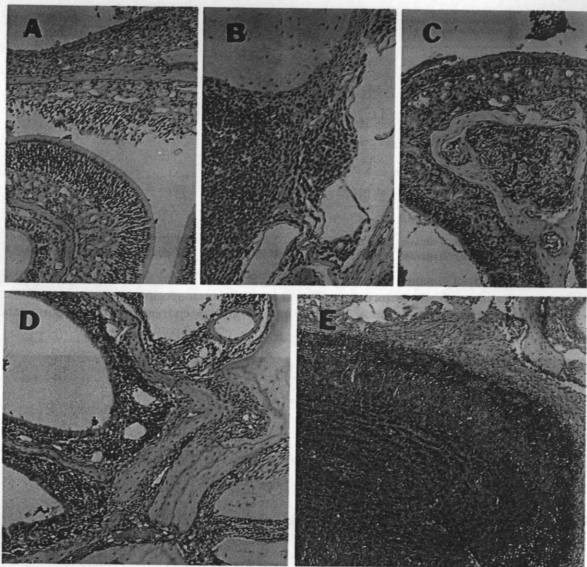


Fig. 1. Grading of results of immunostain( $\times 100$ ).

A : negative (-), B : trace ( $\pm$ ), C : weak positive (+, grade 1), D : moderately positive (++, grade 2), E : strongly positive (+++, grade 3)

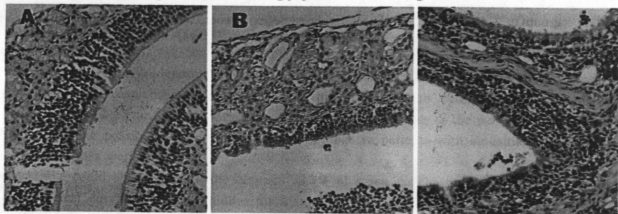


Fig. 2. Representative finding of immunostain for cytokeratin( $\times 200$ ).

A : There's no expression in control group(in 2 days), B : There's weak expression in experimental group 1(in 2 days), C : There's strong expression group in experimental group 2(in 2 days)

Immunoreactivity of cytokine  
in the olfactory epithelium

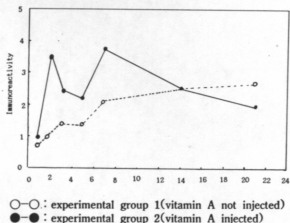


Fig. 3. Comparison of immunoreactivity of cytokine in the olfactory epithelium of experimental group 1 and 2.

NSE immunoreactivity  
in the olfactory epithelium

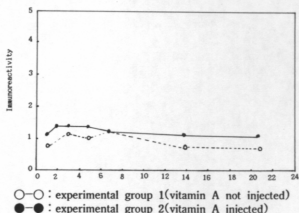


Fig. 5. Comparison of immunoreactivity of neuron-specific enolase in the olfactory epithelium of experimental group 1 and 2.

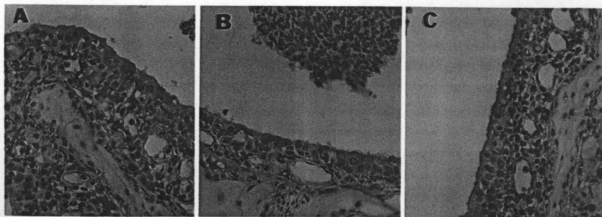


Fig. 4. Representative findings of immunostain for neuron-specific enolase ( $\times 200$ ).  
A: There's moderate expression in control group (in 2 days), B: There's slightly decreased expression (weak positive) in experimental group 1 compared to control group (in 2 days), C: There's relatively same expression (weak positive) in experimental group 2 compared to experimental group 1 (in 2 days)