

세균에 의한 연골과 측두 근막의 세포 외 단백 분해

을지대학교 의과대학 이비인후과학교실

박노선 · 장동식 · 조진생 · 박승구 · 김지찬 · 이호윤

Bacterial Extracellular Proteolysis of Cartilage & Temporalis Fascia

No-Seon Park, MD, Dong-Sik Chang, MD, Chin-Saeng Cho, MD,

Seung-Gu Park, MD, Ji Chan Kim, MD and Ho Yun Lee, MD

Department of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery, College of Medicine, Eulji University, Daejeon, Korea

– ABSTRACT –

Background and Objectives : Temporalis fascia and cartilage are well-known materials for the restoration of defective tympanic membrane. Common organisms of postoperative infection in tympanoplasty are *S. aureus* and *P. aeruginosa*. This study was done to understand the resistance of cartilage and fascia to extracellular bacterial proteolytic enzyme of the pathogens. **Materials and Methods** : *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* were put in LB broth and Nutrient broth, incubated each other during 24 hours under 37°C. We concentrated culture supernatants on ammonium sulphate precipitation, and dialyzing it with normal saline. Extracellular enzyme with same sized cartilage and temporalis fascia tissue were nourished during 48 hours. The amounts of degraded proteins were measured, then proteins on molecular weight enforced by SDS-PAGE were classified. The activities of proteolytic enzyme by enforcement of zymography were detected. **Results** : We showed the proteolytic activities of cartilage and temporalis fascia by the reaction of extracellular enzyme. *S. aureus* had the most potent destructive power and the cartilage was more resistant to bacterial extracellular proteolysis in *S. aureus* than fascia. **Conclusions** : It could suggest that the cartilage is good for the graft material in aspect of the resistance to extracellular bacterial proteolysis. (J Clinical Otolaryngol 2014;25:150-155)

KEY WORDS : Cartilage · Fascia · Tympanoplasty · Proteolysis · Chronic otitis media.

서 론

고실 성형술의 이상적인 목표는 천공의 영구적이면서도 완전한 폐쇄와 청력의 개선이라 할 수 있다. 현재 고막

결손 회복을 위해 사용되는 이식편 재료로는 측두 근막, 연골, 정맥, 연골막, 골막 등이 알려져 있다.^{1,2)} 측두 근막은 좋은 청각적 특성을 가지지만 구조적으로 안정성이 떨어지는 단점이 알려져 있고, 연골은 안정성이 확보되지만, 청력 개선에 있어서 논란의 여지가 있어서 다양한 술자들에 의해 이를 극복하는 방법이 제시되고 있는 실정이다.³⁻⁵⁾

논문접수일 : 2014년 9월 18일

논문수정일 : 2014년 10월 2일

심사완료일 : 2014년 11월 7일

교신저자 : 이호윤, 302-799 대전광역시 서구 둔산서로 95

을지대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (042) 611-3133 · 전송 : (042) 611-3136

E-mail : hoyun1004@gmail.com

고실 성형술 후 세균 감염에 의해 이식편의 생착이 실패하는 경우는 국내 발표에서 34% 정도까지 보고되고 있다.⁶⁾ 이식편 생착의 실패에 관여하는 요소로 결손(dehiscence)이나 혈행 장애 등에 의해서도 발생할 수 있지만, 중이 점막에 남아 있는 해결되지 않은 감염이나 술 후 세

균 감염에 의해서도 가능할 것으로 생각되어 이번 연구를 진행하게 되었다.

만성 중이염의 흔한 원인균으로 황색 포도알균과 녹농균이 대표적이며 녹농균은 금속 단백질 분해 효소(엘라스타아제 및 알칼리성 단백질 분해 효소), 지질 분해 효소, 알칼리성 인산 분해 효소, 외독소 등을 분비하며, 황색 포도알균의 경우 스태필로키나아제, 히알루론산 분해 효소, 백혈구 파괴소, 금속 단백질 분해 효소(엘라스타아제 및 알칼리성 단백질 분해 효소), 핵산 분해 효소, 혈장 응고 효소, 외독소, 장독소 등을 분비하는 것으로 알려져 있다.^{7,8)}

연골은 측두 근막과 조직학적 구성이 다르기 때문에, 이러한 세균의 단백질 분해력에 대해 저항성에 차이를 보일 것으로 추정하였으며 이를 검증해 보기 위해 먼저 세포 외 세균 단백질 분해력에 대한 연골과 측두 근막이 가지는 저항성의 차이를 확인하여 수술 시 이식편 선택에 있어서의 판단 기준을 마련하고자 하였다.

대상 및 방법

환자에서 채취한 이주 연골과 측두 근막의 크기와 두께를 통일하기 위해 측미계(micrometer)와 연골 슬라이서(cartilage slicer)를 사용하여 가로세로 0.7 cm, 두께는 100 μ m로 연골 및 측두 근막을 박편하였다.

대장균(DH5- α), 황색 포도알균(ATCC 6538)를 LB배지(Luria-Bertani broth)에, 녹농균(ATCC 9027) 표준 균주를 영양 배지에 접종하고 37°C에서 180 rpm으로 24시간 배양하였다. 4°C, 3,000 rpm에서 30분간 초원심 분리 후 배양 상청액을 ammonium sulphate 침전법으로 농축하고 생리 식염수로 투석하여 세포 외 효소를 10배 농축한 뒤 0.022 gm으로 표준화시킨 연골 및 근막 조직을 각 세균 별 세포 외 효소 농축액 속에서 37°C에서 140 rpm으로 48시간 배양하였다.⁹⁾ 배양 상청액 속의 단백질 함량을 Lowry법에 의해 세포외 효소에 의하여 분해된 단백질의 함량을 정량적으로 측정하였으며, 세 균주에 대해 각각 동일한 실험을 4회 반복 시행하였다.¹⁰⁾ 다음으로 각 세균별 세포 외 효소 처리를 한 군과 안한 대조군으로 나누어 분해도를 도식화하고, 최종적으로 가장 높은 값을 1로 두고 나머지 값에 대한 상대적 파괴도를 도식화했다.

배양 상청액 속의 단백질을 DTT(Dithiothreitol)로 처

리하여 이황화 결합을 끊고 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하여 분자량에 따라 분류하였다.

이후 단백질 분해력을 확인하기 위해 배양 상청액의 DTT 처리를 하지 않은 비변성 단백질 SDS-PAGE의 결과물로서 자이모그라피(gelatin zymography)를 시행하였다. 단백질로 젤라틴을 사용하였으며, 8% 젤, 120 v, 3시간 반 동안 영동하고 하룻밤 동안 37°C로 배양 후 0.5% 쿠마시 블루(Coomassie blue)로 30분간 염색한 후 결과를 확인하였다. 본 실험은 4회의 독립 실험을 시행하였고, 측정치는 paired t-test로 분석하였으며, 유의 수준 $p < 0.05$ 에서 검증하였다. 이번 연구는 기관연구심의위원회의 허가를 받았다.

결 과

각각의 세균 별로 연골군과 측두 근막군으로 나누어 실험하였다. 실험 시작할 때와 48시간 후의 사진을 비교했을 때 시간에 따른 현탁도의 차이는 볼 수 없었지만 측두 근막에서 48시간 배양 후의 갈색이 탈색 된 것을 볼 수 있었다(Fig. 1).

Lowry법(Lowry assay)에 의해 OD 750 nm에서 흡광도 측정을 하고 BSA(Bovine serum albumin)를 이용하여 표준화 곡선을 그린 후 Beer의 법칙을 따라 샘플의 농도를 측정했다. 배양 전의 단백질 농도는 세균이 순수히 만들어낸 단백질이며, 48시간 배양 후 단백질의 농도는 각각의 조직이 분해된 것과 세균이 만들어낸 단백질이 합쳐진 것이므로, 시간차에 따른 농도 간의 차이에 의해 조직이 분해된 정도를 구했다(Table 1).

각 세균별 세포 외 효소 처리를 한 군과 안한 대조군으로 나누어 분해도를 구하였으며, 최종적으로 가장 높은 값인 황색 포도알균이 측두 근막을 녹인 단백질 농도를 1로 두고 나머지 값에 대한 상대적 파괴도를 도식화했다(Fig. 2).

측두 근막에서 황색 포도알균의 단백질 분해력은 녹농균보다 유의하게 높았으며($p < 0.05$), 연골에서의 녹농균과 황색 포도알균의 단백질 분해력은 대장균보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 황색 포도알균의 경우, 측두 근막의 단백질 분해력이 연골에서의 경우보다 유의하게 높았다($p < 0.05$)

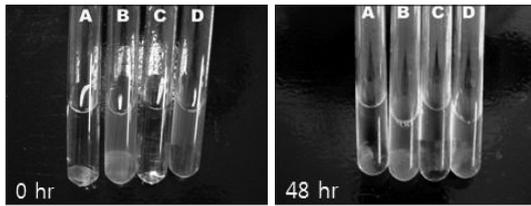
(Fig. 3). 하지만 녹농균과 대장균의 경우, 측두 근막과 연골에서의 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).

배양 상청액 속의 단백질을 DTT로 처리하여 이황화 결합을 끊고 크기에 따른 SDS-PAGE의 전기 영동에 의해 각각의 균주에서 분리된 단백질을 분자량 별로 확인할 수 있었다. 황색 포도알균의 경우 10 kDa, 20 kDa, 37 kDa, 40 kDa의 단백질이 강하게 염색되었으며, 녹농균의

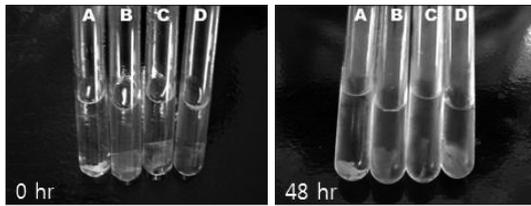
경우 20 kDa, 37 kDa, 40 kDa, 60 kDa에서, 대장균의 경우 20 kDa, 37 kDa, 50 kDa, 100 kDa에서 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

마지막으로 시행한 세 균의 젤라틴 자이모그래피 결과, 100 kDa에서 쿠마시 블루에 강하게 염색되어 황색 포도알균의 경우, 단백 분해 효소의 활성을 확인할 수 있었으며, 녹농균 및 대장균의 경우 단백 분해 효소의 활성을 보이지 않았다(Fig. 5).

E. coli



Pseudomonas aeruginosa



Staphylococcus aureus

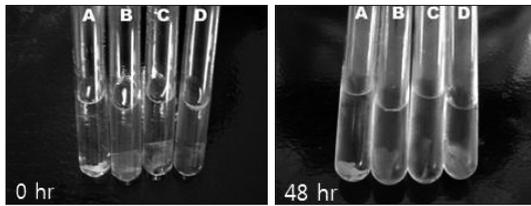


Fig. 1. Figures of before and after culture for 48 hours later. Tube A & C was control group and After 48 hours we measured difference of turbidity. A : normal saline+cartilage, B : supernatant+cartilage, C : normal saline+temporalis fascia, D : supernatant+temporalis fascia.

Table 1. Difference of concentration over time

Bacteria	Tissue	Average difference (mg/mL)	STD	SE MEAN
<i>E. coli</i>	Cartilage	67.7	26.6	13.3
	Fascia	96.5	68.8	34.4
<i>P. aeruginosa</i>	Cartilage	123.2	50.6	25.3
	Fascia	119.0	8.2	4.1
<i>S. aureus</i>	Cartilage	170.5	68.7	34.3
	Fascia	297.1	79.0	39.5

Average difference indicates difference of concentration from the beginning to 48 hours later. STD : standard deviation, SE MEAN : standard error of mean

고 찰

측두 근막은 1960년 독일의 Heermann이 사용한 이후로 가장 널리 알려진 이식편 재료이다.¹¹⁾ 이상적인 고막 이식의 재료로는 수술 시야에서 쉽게 얻을 수 있고, 이식 후 생착을 위한 적당한 조직학적 반응이 있어야 하며 음 전달의 음향학적 역할이 우수 해야 한다. 그리고 이식 후 고

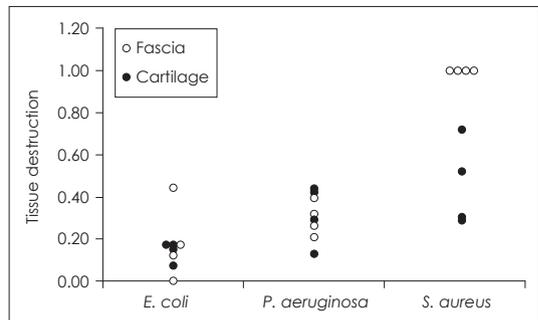


Fig. 2. Difference of tissue destruction classified by bacteria. Score 1 was defined as the most potent proteolytic activity, and we displayed the value of relative score, compared to the score 1. One white or black dot means each one of the experiments, so four "dots" means four times of the experiments. *S. aureus* showed the most potent activity regardless of type of graft.

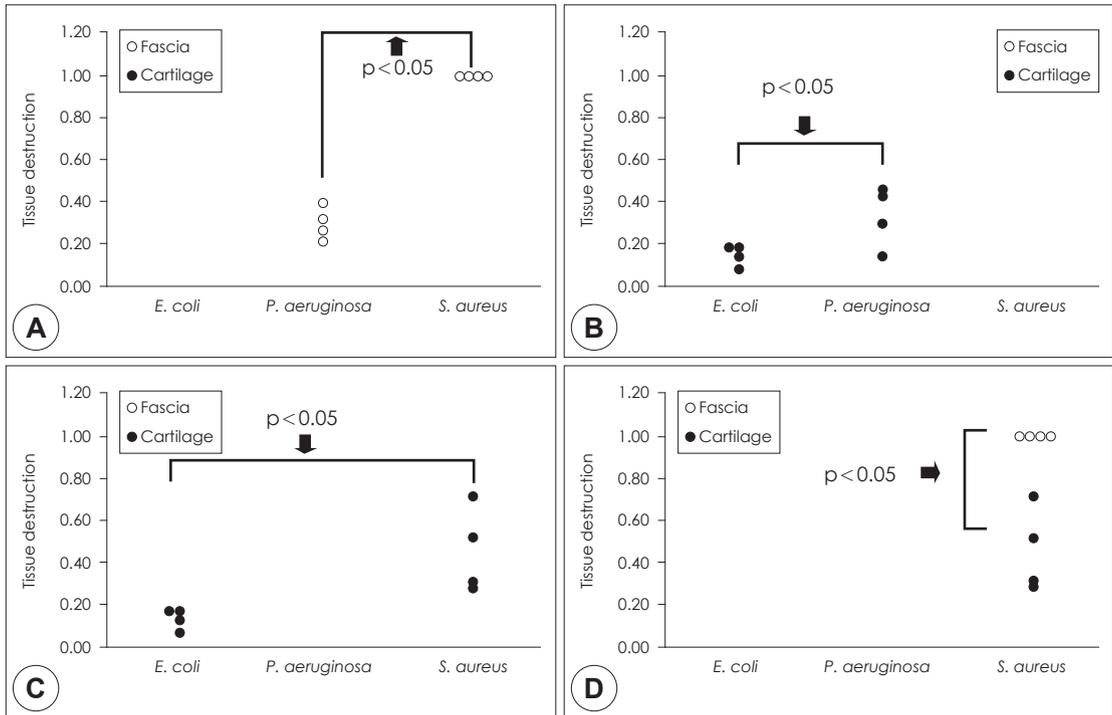


Fig. 3. Difference of tissue destruction between pathogens in accordance with type of graft. *S. aureus* showed significant degradating activity in rather temporalis fascia than cartilage better and could break down temporalis fascia better than *P. aeruginosa* ($p < 0.05$). *P. aeruginosa* showed more potent activity to degrade cartilage rather than *E. coli* ($p < 0.05$). A : Difference of tissue destruction between *P. aeruginosa* and *S. aureus* in Fascia. B : Difference of tissue destruction between *P. aeruginosa* and *E. coli* in cartilage. C : Difference of tissue destruction between *S. aureus* and *E. coli* in cartilage. D : Difference of tissue destruction between Fascia and cartilage in *S. aureus*.

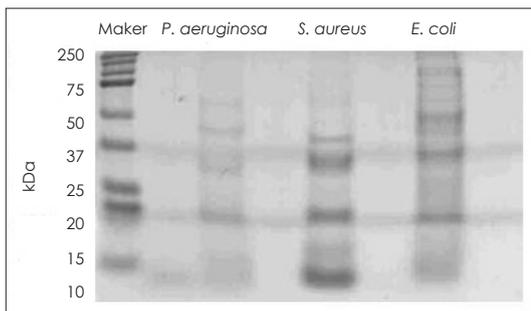


Fig. 4. Result of SDS-PAGE of isolated proteins. Using SDS-PAGE, we could identify proteins, which were separated from bacteria, by molecular weight. SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, kDa : kilodalton.

막이 잘 지지될 수 있는 물리적 안정성 또한 중요할 것이다. 측두 근막 이식편의 단점으로는 예측 불가능한 근막의 수축으로 인한 낮은 안정성, 일정한 두께로 인하여 유착성 중이염이나 전 천공 등의 특수한 경우에서 두께 조

절이 불가능하다는 점등이 단점으로 거론되고 있다.⁶⁾

최근에는 연골을 이용한 고실 성형술의 사례가 많이 보고되고 있다. 연골편 이식은 유연성이 떨어지고 두께 조절이 힘들어 이식 후 소리 전도의 지연이나 뒤틀림 현상이 발생할 수 있는 단점이 있지만 수술 후 안정성이 좋고 재천공이 적으며 채취가 쉽다는 이점이 있고, 최근 한 연구에서는 연골을 사용한 고실성형술이 측두근막을 이용했을 때보다, 이식 안착률이 더 높다고 보고하기도 하였다.¹²⁾ 본 연구에서는 임상적으로 종종 경험하게 되는 술 후 감염에 대해 이식편의 종류에 따른 저항성의 차이를 객관적으로 평가하고 이를 활용하기 위해 측두 근막과 연골을 비교하였다.

Lee 등¹³⁾에 의하면, 405명의 만성 중이염 환자에서 동정된 세균은 MRSA, 녹농균, 혈장 응고 효소 음성 포도알균, 메치실린 민감성 황색 포도알균 순으로 많았다고 보고하였다. Myung 등¹⁴⁾이 보고한 연구에서도, 유사하게

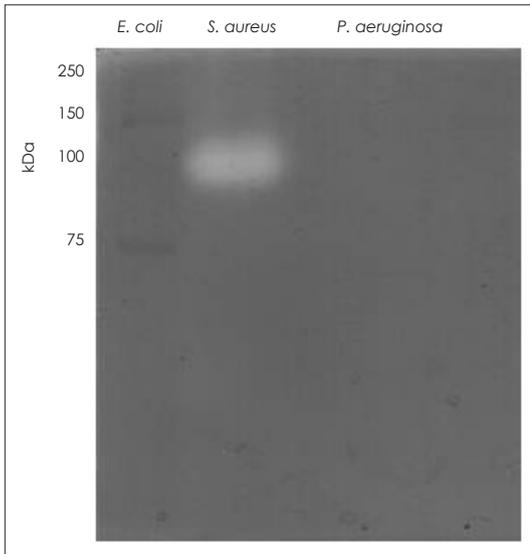


Fig. 5. Gelatin zymography. *S. aureus* was dyed strongly by Coomassie blue in 100 kDa. On the other hand, *E. coli* and *P. aeruginosa* were not dyed, which meant that the latter had relatively less potent proteolytic activity than *S. aureus*. kDa : kilodalton.

MRSA(23.7%), 녹농균(22.7%)이 가장 흔하다고 보고한 바 있다. 이와 달리, 2012년도에 보고된 연구에서는 녹농균, 황색 포도알균, 대장균 순으로 흔한 것으로 나타났다.¹⁵⁾ 저자들은 이러한 연구 결과에 따른 차이는, 시간 변화와 지역적 특성의 차이에 기인했을 것으로 추정하고, 최근 연구 결과에 근거하여, 이번 실험에서는 녹농균, 황색 포도알균, 그리고 대장균을 이용하여 분석하였다. 하지만 수술 후 감염시 동정된 균에 대한 체계적인 연구가 현재까지 없었기에, 이에 대해서 수술 전과 수술 후의 세균학적인 차이에 대한 연구도 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

이번 실험의 결과에서 황색 포도알균에서 세포 외 인자에 의한 단백질 분해 현상을 확인하였고, 연골보다 근막에서의 상대적으로 많은 단백질 분해 현상을 확인하였다. 이는 황색 포도알균의 수술 후 감염이 있을 경우 세포 외 인자에 대한 이식재료의 분해의 저항성이 근막보다는 연골이 뛰어난 것임을 암시한다고 볼 수 있을 것이다. 시행된 자이모그래피 상에서도 100 kDa에서 강하게 염색되는 단백질 분해 효소의 활성이 확인되었다. 하지만 중이염에 있어서 황색 포도알균 감염에 의한 조직 파괴는 세포 외 인자의 단백질 분해력의 영향뿐만 아니라 다른 인자들의 영향도 고려해야 하므로 추가적인 연구가 필요할 것

로 보인다. 녹농균은 외에도 표면에서 발견되며, 정상 조직에서는 문제를 일으키지 않으나, 중이 환기관이나 고막 천공, 유양돌기염과 관련하여 중이를 침범하면 병원성을 가지게 된다.

이번 실험에 있어서도, 대장균과의 단백질 분해 비교에서 유의한 차이가 없었고 자이모그래피 상에서도 단백질 분해 효소의 활성은 보이지 않았다. 하지만 임상적으로 볼 때 이식편은 연골은 대개 300 μm로 사용하므로 대략 근막 보다 3배 이상 두껍게 사용하게 된다. 이와 같은 것과 본 실험 결과를 고려하면 고막 이식시 연골의 조직 파괴에 대한 저항성의 정도를 추측할 수 있을 것이다.

녹농균과 황색 포도알균 감염에 있어서, 세포 내 인자로 금속 단백질 분해 효소가, 외 인자로 세포 외 단백질 분해 효소가 중요한 역할을 하는데, 황색 포도알균이나 녹농균이 분비하는 금속 단백질 분해 효소는 엘라스틴, 콜라겐, 피브린과 세포간 연결(intracellular connection)과 숙주 방어를 파괴하여 조직 침범을 하여 세균의 성장을 위한 배지를 생성한다. 이러한 단백질 분해 효소 농도의 증가는 녹농균에 의한 만성 중이염에서 조직의 파괴와 세균의 침입에 기여하는 것으로 알려져 있다.⁷⁾

Ilomostat는 금속 단백질 분해 효소의 강력한 합성 억제제로 알려져 있으며 α₁-Antitrypsin은 neutrophil elastase를 포함하는 세린 단백질 분해 효소의 선택적 억제제로 이를 이용한 만성 중이염 치료 연구들도 보고 되고 있다.^{7,16,17)} 본 연구에서는 세포 외 인자에 대해서만 평가를 하였지만 실험을 통해 감염균의 세포 외 인자에 의한 이식편의 종류에 따른 단백질 분해력의 차이를 확인한 것은 의미가 크다고 하겠다. 추후 금속 단백질 분해 효소 등 세포 내 인자를 고려한 실험을 진행하면, 보다 종합적으로 평가할 수 있을 것으로 기대해본다.

결론

세포 외 인자에 의한 연골과 근막의 단백질 분해를 확인하였다. 대장균, 녹농균, 황색 포도알균 중 황색 포도알균이 가장 많이 조직 파괴를 일으켰으며, 황색 포도알균 감염시 근막보다는 연골이 세포 외 단백질 분해 활성에 저항이 높음을 확인하였다. 이러한 점은 고막 이식 재료 선택에 있어서 도움이 될 것으로 사료된다.

중심 단어 : 고실 성형술 · 이주 연골 · 측두 근막 · 단백질 분해 · 만성 중이염.

REFERENCES

- 1) Wullstein H. *Theory and practice of tympanoplasty. Laryngoscope* 1956;66(8):1076-93.
- 2) Zollner F. *The principles of plastic surgery of the sound-conducting apparatus. J Laryngol Otol* 1955;69(10):637-52.
- 3) Zahnert T, Huttenbrink KB, Murbe D, Bornitz M. *Experimental investigations of the use of cartilage in tympanic membrane reconstruction. Am J Otol* 2000;21(3):322-8.
- 4) Lee HY, Lee JS, Chang DS, Choi MS, Cho CS, Park KY. *Change of middle ear mechanics after tympanoplasty type I with thin sliced cartilage island. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2007;50(9):755-8.
- 5) Kirazli T, Bilgen C, Midilli R, Ogut F. *Hearing results after primary cartilage tympanoplasty with island technique. Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132(6):933-7.
- 6) Kim CS, Kim DW, Hwang CH, Ahn SH, Park HJ, Kim CH. *Postoperative results of tympanoplasty type I in adult. Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2002;45(12):1130-5.
- 7) Avidano MA, Cotter CS, Stringer SP, Schultz GS. *Analysis of protease activity in human otitis media. Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;119(4):346-51.
- 8) Teufel P, Gotz F. *Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from Staphylococcus epidermidis. J Bacteriol* 1993;175(13):4218-24.
- 9) Ninomiya J, Ito Y, Takiuchi I. *Purification of protease from a mixture of exfoliative toxin and newborn-mouse epidermis. Infect Immun* 2000;68(9):5044-9.
- 10) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
- 11) Heermann J Jr, Heermann H, Kopstein E. *Fascia and cartilage palisade tympanoplasty. Nine years' experience. Arch Otolaryngol* 1970;91(3):228-41.
- 12) Iacovou E, Vlastarakos PV, Papacharalampous G, Kyrodimos E, Nikolopoulos TP. *Is cartilage better than temporalis muscle fascia in type I tympanoplasty? Implications for current surgical practice. Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013;270(11):2803-13.
- 13) Lee SK, Yeo SG, Hong SM, Sim JS, Hong CK, Lee YC, et al. *Bacteriology of chronic otitis media: changing of detection rate of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2008;51(1):9-15.
- 14) Myung NS, Choi CH, Kim TH, Kim HK, Koo SK. *Bacteriology of otorrhea in chronic suppurative otitis media. J Clinical Otolaryngol* 2006;17(1):94-8.
- 15) Deb T, Ray D. *A study of the bacteriological profile of chronic suppurative otitis media in agartala. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2012;64(4):326-9.
- 16) Antonelli PJ, Schultz GS, Kim KM, Cantwell JS, Sundin DJ, Pemberton PA, et al. *Alpha 1-antitrypsin and ilomastat inhibit inflammatory proteases present in human middle ear effusions. Laryngoscope* 2003;113(8):1347-51.
- 17) Travis J, Salvesen GS. *Human plasma proteinase inhibitors. Annu Rev Biochem* 1983;52:655-709.