

중이 진주종 및 만성중이염에서 랑게르한스 세포에 관한 면역조직화학적 연구

원광대학교 의과대학 이비인후과학교실·병리학교실*
이정헌·이재훈·소병수·강금위·조항정*·문형배*

= Abstract =

Immunohistochemical Study of Langerhans Cells in Cholesteatoma and Chronic Otitis Media

Jung Hun Lee, M.D., Jae Hoon Lee, M.D., Byung Soo Soh, M.D.,
Keum Wee Kang, M.D., Hyang Jeong Cho*, M.D., Hyung Bae Moon*, M.D.,
Department of Otolaryngology . Pathology, College of Medicine
Wonkwang University*

Middle ear cholesteatoma is biologically invasive keratinizing squamous epithelial cyst that contains the desquamated debris. And it is clinically important entity because it causes destruction of adjacent bones and serious complications.

The pathogenesis and pathophysiology of cholesteatoma has been debated but there are basic theories of epithelial ingrowth and metaplasia of middle ear epithelium. Also there is concept that expanding process of desquamation causes bone destruction and that it may be due to proteolytic enzymes such as collagenase. Recent works suggest that Langerhans cells have an immunologic altering function and have a role of generating and maintaining the chronic inflammatory reaction which induces bone resorption.

The morphologic feature of cholesteatoma was similar to that of the tympanic membrane but there was a increase of Langerhans cells in cholesteatoma. Langerhans cells are the bone marrow-derived immune cells of the epidermis. They express Ia antigens and receptors for the Fc portion of IgG and complement components. Langerhans cells appear to recognize antigen and present them to T-lymphocyte and possibly macrophage.

The authors used immunohistochemical method to identify and quantify distribution of Langerhans cells(S-100 protein), T-lymphocyte(HLA-DR, CD3) using monoclonal antibody techniques.

We compared distribution of Langerhans cells in cholesteatoma matrix, infected tympanic membrane and adjacent canal skin of chronic otitis media of which were taken from patients during operation.

The obtained results were as follows :

1) The Langerhans cells in cholesteatoma matrix increased significantly compared to those in chronic otitis media and post auricular skin. The Langerhans cells in chronic otitis media were more increased numbers than those in post auricular skin($p < 0.05$).

2) The Langerhans cells and T lymphocytes with inflammatory reaction in subepithelial tissue of cholesteatoma were significantly higher than those chronic otitis media($p < 0.05$).

KEY WORDS : Langerhans cells · Cholesteatoma · Chronic otitis media · Immunohistochemistry.

서 론

중이 진주종은 만성중이염과 달리 주위 조직의 손상이나 이소골을 포함한 골파괴 정도가 심하여 심한 전음성 난청을 초래할뿐만 아니라 미로염, 뇌막염, 뇌농양, 측정맥동염, 안면신경 마비 등과 같은 이성 및 두개내 합병증을 초래하기 쉽다. 또한 수술후에도 재발율이 높아 임상적인 측면에서 매우 중요한 질환이다.

중이 진주종은 발생원인에 따라 선천성은 태생기 표피아의 미입으로 발생하고, 후천성은 고막의 변연 천공이나 이완부 천공으로 진주종을 형성하게 된다. 고실내의 각화중편평상피는 염증성 병변 등으로 발육이 촉진되고 탈락된 각질이 그 속에서 축적되어 주위 골조직을 압박괴사 하거나 Collagenase와 같은 Proteolytic enzyme에 의해 골의 Collagen이 용해되어 골파괴를 초래하게 된다. 진주종 기질내에 존재하는 랑게르한스 세포가 이러한 과정을 조절하는데 중요한 면역학적 역할을 할 것으로 사료된다. 중이 진주종에 대한 병인, 병태생리 및 골파괴 기전에 대하여 그동안 많은 연구가 진행되어 왔으나 아직도 규명해야 할 부분이 많이 남아 있다.

랑게르한스 세포는 1868년 Paul Langerhans에 의해 발견되어 1950년대 전자현미경적 연구가 이루어지기까지는 역할의 중요성에 대한 인식이 없었으나 최근 면역학의 발달로 인해 그 중요성이 재인식되면서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 랑게르한스 세포는 기능상 및 면역학적으로 대식세포와 같은 계통으로 골수로부터 유래하며 미세구조상 세포

질내에 Birbeck 과립을 가지고 있다. 세포 표면에는 Ia항원(혹은 HLA-DR항원)이 존재하며 C3b 및 IgG의 Fc portion에 대한 막수용체, OKT-6 단클론항체에 의해 인식되는 세포막항원 등이 있다. 항원전달능력이 있는 랑게르한스 세포는 Interlukin-1을 생산하여 T 림프구 활성화에 유도하고 면역학적 감시 기능을 갖는다.^{3,6,12,19,25)}

Lim 등¹⁴⁾과 Lim과 Saunders¹⁵⁾는 전자현미경을 이용한 형태학적 관찰을 통해 진주종의 상피는 고막의 상피와 동일하지만 랑게르한스 세포가 정상 피부에 비하여 진주종 조직에서 더 많이 존재한다는 것이 알려진 후 중이 진주종에서 랑게르한스 세포의 역할에 대한 연구가 국내에서도 활발히 연구되어 왔다. 특히 골파괴를 수반하는 생물학적 특성에 대한 원인으로써 랑게르한스 세포의 면역학적 연구가 진행되어 왔다.

저자들은 단클론항체를 이용한 면역조직화학적 관찰법을 이용하여 중이 진주종과 만성중이염으로 수술했던 환자를 대상으로 진주종 기질, 만성중이염의 염증성 고막과 인접한 외에도 피부조직을 채취하여 랑게르한스 세포, T 림프구의 존재를 확인하였다. 랑게르한스 세포, T 림프구, B 림프구 등의 세포는 항원성 자극에 따라 이주하는 면역세포로 이들 세포의 분포상태를 관찰함으로써 면역학적 체계 및 중이 진주종과 만성중이염의 병태생리학적 차이를 이해하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

본 연구에서는 중이 진주종 25명, 만성중이염 15명을 대상으로 중이 수술과정에서 조직을 박리하여 채취하였다. 랑게르한스 세포의 수 및 T 림프구의 분포를 관찰하기 위하여 진주종 기질, 만성중이염 환자의 염증성 고막과 인접한 외이도 피부조직을 채취하였다. 대조군으로는 후이개 절개부위의 정상 피부조직을 채취하였다.

2. 방법

대상 조직내의 랑게르한스 세포, T 림프구의 분포를 관찰하기 위하여 다클론항체를 이용한 면역조직화학적 방법으로 염색하였다.

본 실험에 이용한 일차 항체들은 랑게르한스 세포에 대해서는 rabbit-anti S-100 단백질(DAKO사, USA)과 T 림프구는 human leukocyte antigen(CD3, DAKO사, USA), 활성화된 T림프구는 HLA-DR(DAKO사, USA), B 림프구는 CD26(DAKO사, USA), 대식구는 CD68(DAKO사, USA)를 이용하였으며, 이차 항체 및 발색제로써는 horseradish peroxidase를 이용한 avidin biotin complex(ABC)법을 이용하였다. 염색방법은 통상적인 파라핀 고정과 탈회 과정을 거쳐 파라핀에 포매하고 5 μ m두께의 연속절편을 만들었다. Xylene에 담구어 탈파라핀하고 알코올을 거쳐 증류수로 합수시켰다. 그 후 phosphated-buffered saline(PBS, pH 7.6)에 5분간 거친 후 다시 PBS로 2분 정도 수세하였다. 일차 항체에 대한 반응은 각 일차 항체를 PBS에 20배 희석하여 실온에 30분간 둔 후 PBS로 수세하였다. 그후 biotin과 결합된 이차 항체(biotinylated anti-rabbit Ig 또는 biotinylated anti-mouse Ig)를 도포하여 30분간 둔 후, PBS로 2분 정도 씻고 avidin biotin peroxidase reagent를 도포하여 30분간 반응시켰다. 다시 증류수에 1분간 둔 후 발색제인 DAB(diaminobenzidide-4 HCL, DAKO) 0.1mg과 기질액인 H₂O₂ 0.02mL를 Tris-buffer 100mL를 섞어 반응시켰다. Hematoxylin 대조염색후 통상적인 탈수과정을 거쳐 crystal mount로 봉입

하고 광학 현미경으로 관찰하였다.

진주종 기질과 만성중이염 조직, 대조군의 랑게르한스 세포의 분포를 관찰하기 위하여 확대배율 400배에서 무작위로 선택한 6시야에서 나타나는 세포수를 합산하여 평균 개수를 구하였다. 상피하 결체조직의 염증성 병변 정도는 염증세포의 수에 따라, T 림프구의 활성화 정도는 동일조직내의 전체 림프구 수와 HLA-DR 양성 림프구 수를 비교하여 증가 정도를 관찰하였다.

통계학적 검증은 다자간의 유의성을 검증하기 위하여 ANOVA test를 하였으며 P value가 0.05이하인 경우 그리고 사후다중검사이인 Fisher's PLSD를 함께 시행하여 95% 이상인 경우 통계학적 의의가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

후이개 정상 피부조직의 표피층은 뚜렷한 4개층이 관찰되는 증중편평상피였으며 상부 진피는 섬유아세포와 가는 교원섬유로 구성되어 있었다(그림 1). 랑게르한스 세포는 표피층에서 5.3 \pm 2.17개, 진피층에서는 3.8 \pm 1.56개 관찰되었다. T 림프구는 표피층에서 0.2 \pm 0.1개, 진피층에서는 9.1 \pm 2.09개 관찰되었다(표 1).

중이 진주종 기질의 상피는 증중편평상피였으며 각화물질이 현저히 증가되어 있었다. 면역조직화학적염색 결과 랑게르한스 세포는 상피층 17.8 \pm 6.76개, 진피층 16.4 \pm 8.14개였으며, T 림프구는 상피층 2.4 \pm 1.27개, 진피층 39.5 \pm 14.36개였다(표 1). 랑게르한스 세포의 분포는 상피층의 Suprabasal layer와 진피상부에서 뚜렷이 증가하였으며, 분포 양상은 몇 개의 랑게르한스 세포가 Cluster형태를 취하는 경우와 산재되어 분포하는 경우로 표피와 진피의 접합부위에서 저명하였다(P<0.05). 상피하 결체조직의 침윤된 염증세포는 대부분 T 림프구였으며, B 림프구, 대식구 등은 소수 관찰되었다. 중이 진주종 기질에는 만성중이염에서 보다 더 심한 염증성 병변을 보였으며 염증세포의 침

