가토의 비후성 반흔에서 세포외 알칼리성 인산효소 발현의 변화

조용기 · 유선열
전남대학교 치과대학 구강악안면외과학 교실

Abstract

THE CHANGE OF EXTRACELLUAR ALKALINE PHOSPHATASE EXPRESSION IN HYPERTROPHIC SCAR IN RABBITS

Young- Ki Cho, Sun-Yul Ryu

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Chonnam National University

ALP (alkaline phosphatase) is a membrane-bound metalloenzyme that is expressed in osteoblasts, hepatocytes, lung, kidney, endothelial cells, leukocytes and other cells. Normal soft tissue and skin show little tissue nonspecific ALP (TN-AP). However, scar tissue contains high levels of TN-AP activity, and in fact, TN-AP is expressed intensely in regenerating connective tissue after the wounding.

The purpose of this study was to evaluate the change of ALP expression in hypertrophic scar model in rabbits and the effect of triamcinonolone on ALP expression. Adult male New Zealand white rabbits, weighing about 2.5 kg, were used. After full-thickeness wounding over the ventral surface of each ear , either saline (control ear) or triamcinolone (contralateral ear) was injected on day 16. Rabbits were sacrificed on day 3, 7, 15, 17, 19, 23, and the specimens were retrieved en bloc. Histologic and immunohistochemical examinations of tissue samples were done. The results obtained were as follows :

On day 3, ALP reaction was observed on fibroblasts and inflammatory cells in wound margin. On day 7, ALP reaction was more intense than day 3 in capillaries, inflammtory cells, and fibroblasts behind newly formed epithelium. On day 15, ALP reaction was lessened in both groups and appeared mainly in subepidermal capillary network. Since day 17, ALP reaction was lessened in both groups and weaker in triamcinolone-injected group than in saline-injected group.

These results suggest that ALP reaction isn' t increased in triamcinolone-injected scar and triamcinolone reduces scar not by increasing TN-AP expression but other mechanism.

Key Words : Hypertrophic scar, Alkaline phosphatase

I. 서 론

연조직의 외상 또는 수술로 인한 피부 손상 후에 발생하는 비후성 반흔(hypertrophic scar)은 심미적 및 기능적으로 환자와 외과의사에게 심각한 문제를 야기한다. 최근까지 비후성 반흔의 실험에 적절한 동물모델이 없어 아직 비후성 반흔에 대하여 병리학적으로 완전히 밝혀지지 않고 있다.

Adulkader 등[1]은 흰쥐에서 실험적으로 비후성 반흔을 발생시켰다. Goss와 Crimes[2]는 가토의 귀에서 치유와 재생을 비교한 실험에서 비후성 반흔이 나타나는 것을 관찰하였다. Mostoe 등[3]은 가토의 진피 궤양 모델에서 형성된 비후성 반흔이 상당 기간 동안 유지됨을 관찰하였다. Morris 등[4]은 위의 실험에 근거하여 가토의 귀에서 성공적으로 비후성 반흔을 발생시키고 가토를 과다 진피 반흔(excessive dermal scarring)의 동물모델로서 보고하였다.

Higgins와 Eady[5]가 말단 세동맥(arteriole)의 내피에서 특이적으로 알칼리성 인산효소(alkaline phosphatase : ALP) 반응이 나타난다고 보고한 이래, ALP는 다양한 조직에서 모세혈관의 증식의 조직화학적 표지자(marker)로 사용되어 왔다. 이를 기초로 하여 Alpaslan 등[6]은 쥐에서 피부 손상 후 시간 경과에

따른 ALP 활성을 관찰하고 세포외 ALP가 치유 과정의 조직화학적 표지자로 사용될 수 있다고 보고하였다.

Baker와 Whitake[7]에 의해 처음으로 스테로이드 직접 도포 방법이 보고된 이래, triamcinolone 주입법은 비후성 반흔의 치료에 일차로 선택되는 치료방법이 되었다[8]. Morris[4]등은 가토의 비후성 반흔에서 triamcinolone투여시 반흔이 감소되는 효과가 있다고 하였으나, 어떤 기전에 의해 반흔을 감소시키는지에 대해서는 아직 정확히 밝혀지지 않았다.

가토가 비후성 반흔의 연구를 위한 동물모델로 제시되었으나[2-4], 가토에서 비후성 반흔 형성시에 나타나는 ALP 발현과 비후성 반흔의 치료약제 투여시에 나타나는 ALP 활성의 변화에 대하여 상세히 구명할 필요가 있다.

본 연구는 Morris 등[4]이 제시한 가토의 비후성 반흔에서 치유 과정중에 나타나는 세포외 ALP 활성과 스테로이드 주입시에 나타나는 ALP 발현의 변화에 대하여 조직학적 및 면역조직화학적으로 관찰하였다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물로는 체중 2.5kg 내외의 웅성 뉴질랜드산 가토 7마리를 이용하였다.

2. 실험방법

염산 케타민 (케타라®, 유한양행, 한국) 10mg과 Xylazine (럼푼®, 바이엘, 한국) 8mg을 혼합한 용액을 근육주사하여 전신마취하였다.

가토에서 귀의 배부의 털을 깎고 소독하였다. 직경 6mm의 원형 창상을 좌우측에 각각 2개씩 도안하고 연골이 노출되도록 피부를 절제하였다. 접착형 polyurethane dressing (Tegaderm 3M®, Minneapolis, USA)으로 덮고 창상 형성후 12일 동안 유지하였다. 창상 형성후 16일에 50㎕ Gastight microsyrynge (Hamiton Co., Reno, USA)에 28-gauge luer-lok needle을 장착하고 귀의 창상에 20㎕의 Triamcinolone acetonide (트리암시놀론®, 동광제약, 한국)를 주사하였다. 이때 반대측 귀의 창상에는 20㎕의 멸균 식염수를 주사하고 이를 대조군으로 하였다. 술후 3, 7, 15, 17, 19, 23일에 각각 가토를 희생시키고 창상을 포함한 조직을 절취하였다.

조직학적 평가를 위해 절취한 조직을 중성 포르말린에 고정한 다음 통법에 따라 파라핀 포매괴를 제작하여 3 - 4㎛의 연속 조직절편을 제작하였고 hematoxylin-eosin 염색후 광학현미경으로 관찰하였다.

면역조직화학적 평가를 위해 절취한 조직을 12시간 동안 30% sucrose solution에 침수후, 냉동절편기(Yamato Kohki, Japan)를 이용하여 30 - 40㎛ 두께로 절편하여 floating section을 7% sucrose를 함유하는 0.1mol/L phosphate buffer (pH 7.4)에 보관하였다. ALP 활성에 대한 면역조직화학적 염색은 Naphtol AS-MX phosphate (Sigma, St Louis, MO)와 substrate 및 capture reagent로서 Rast Red Violet Tr salt (Sigma)를 사용하는 AZO dye method로 수행하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 3일 소견

분화구 형태의 궤양이 형성되었으며 창상 표면에는 삼출물과 호중구가 관찰되고 하방에는 괴사조직과 호중구가 나타났다. 연골은 파괴되고 많은 염증세포가 침윤되어 있었다 (Fig. 1). ALP 양성 반응은 창상변연 주위의 염증세포와 섬유아세포에서 관찰되었다(Fig. 2).

2. 7일 소견

분화구 형태의 궤양이 관찰되었으며 그 하방으로 창상연에서 창상 중앙부를 향하여 상피의 증식이 관찰되었으나 양끝이 연결되지는 않았다(Fig. 3).

ALP 양성 반응은 새로 형성 중인 상피 하방의 혈관, 염증세포, 섬유아세포에서 가장 강하게 나타났다(Fig. 4).

3. 15일 소견

얇은 층의 상피 형성이 완성되어 재상피화가 완료되었고, 하방에는 콜라겐의 방향이 상피조직과 평행하게 배열된 섬유조직이 형성되어 있었다(Fig. 5).

ALP 양성 반응은 상피하방의 혈관에서 주로 나타나고 다른 세포에서는 거의 관찰되지 않았다. 7일에 비해 ALP 반응이 전체적으로 많이 감소되어 있었다(Fig. 6).

4. 17일 소견

대조군에서는 약간 융기된 형태의 종괴를 형성하였고 상피가 증식하여 중앙부에서 잘 발달된 rete peg를 관찰할 수 있었다. 상피 하방에는 만성염증 세포가 침윤된 육아조직이 형성되어 있고 부분적으로 연골의 증식이 관찰되었다. 상피 하방의 혈관과 섬유아세포, 주위의 염증세포에서 ALP 양성 반응이 나타났다(Fig. 7).

스테로이드 투여군에서는 대조군과 대체로 비슷한 조직소견을 보였으며 상피 하방에 혈관이 풍부하고 염증세포가 거의 없는 육아조직이 관찰되었다. ALP 양성 반응은 상피 하방에 있는 소수의 혈관과 섬유아세포에서 관찰되었고 대조군

에 비해 감소되어 나타났다(Fig. 8).

5. 19일 소견

대조군에서는 과각화된 얇은 상피가 관찰되며 상피 하방에서는 크고 불규칙한 섬유아세포와 모세혈관이 관찰되었다. ALP 양성 반응은 상피 하방의 혈관에서 나타났다(Fig. 9).

스테로이드 투여군에서는 대조군과 크게 다르지는 않으나 상피 하방의 혈관은 크고 풍부하며 섬유조직의 증식이 감소된 소견을 보였다. ALP 양성 반응은 거의 나타나지 않았다(Fig. 10).

6. 23일 소견

대조군에서 ALP 양성 반응은 상피 하방의 혈관에서 나타났다(Fig. 11).

스테로이드 투여군에서는 대조군에 비해 섬유조직의 증식이 감소된 소견을 보였다. ALP 양성 반응은 거의 나타나지 않았으나, 상피 하방의 혈관에서 미약한 양성 반응을 보였다(Fig. 12).

Ⅳ. 고 찰

ALP는 membrane-bound metalloenzyme으로 신체 여러 기관에서 생리적 또는 병적 상태에서 방출된다. ALP의 기원은 조직 비특이성, 소장성, 태반성, 배세포성이며, 그중 조직 비특이성 ALP (tissue nonspecific ALP : TN-AP)는 골아세포, 간세포, 폐, 신장, 혈관 내피세포, 백혈구 등에서 나타난다[9]. 혈청내 ALP 농도의 측정은 지난 반세기 이상 임상적 진단 방법의 하나로 주목받아 왔으며 다양한 증상을 호소하는 환자의 초진시에 골진환, 간질환, 종양 등의 진단을 위해 가장 많이 시행되고 있는 임상 생화학검사 항목의 하나이다. 임상 생화학 분야에서 ALP는 확고한 위치를 차지하고 있다.

ALP가 창상 치유과정 중에 어떠한 역할을 하는지에 대해서는 아직까지 확실히 밝혀지지 않았다. 창상 치유는 염증기, 증식기, 재형성기의 3단계로 진행되며, 많은 인자들이 창상 치유에 영향을 미친다[10]. Alpaslan 등[6]은 흰쥐에서 이차 치유에 의한 피부의 창상 치유 기간 동안에 나타나는 ALP 활성이 3일에 나타나 7일에 강한 반응을 보이다가 30일까지 시간 경과에 따라 감소된다고 하였으나, 이것이 치유과정에 나타나는 단순한 현상인지 또는 육아조직의 세포외 기질이나 콜라겐의 성숙에 어떤 역할을 하는지는 알 수 없다고 하였다. 정상 연조직과 피부에서는 거의 TN-AP 활성이 나타나지 않지만[11], 재생 중인 결합조직이나 반흔조직은 강한 TN-AP 활성을 보이는 것으로 알려져 있다[12]. Hui 등[13]은 쥐의 섬유아세포에서 TN-AP 활성이 높으면 세포증식이 억제되고 세포분화가 촉진된다고 하였다.

본 연구결과에서 ALP 양성반응은 3일에 창상연 주위의 염증세포와 섬유아세포에서 관찰되었고, 7일에는 상피 하방의 혈관, 염증세포, 섬유아세포에서 가장 강하게 나타나, 재생중인 결합조직이나 반흔조직에서 강한 ALP활성을 보인다는 Fell과 Danielli[11], Andracchi와 Korte[12]의 보고와 일치하였다. 육아조직이 성숙된 15일에는 ALP 양성 반응이 감소되어 상피 하방의 혈관에서 주로 관찰되었으며, 17일 이후에는 시간이 경과할수록 점점 감소되었다.

Hui[14]는 비후성 반흔의 치료에 쓰이는 dexamethasone과 retinoic acid가 반흔조직 내의 섬유아세포에서 TN-AP 활성을 증가시켜 반흔을 감소시키는 효과가 있다고 하였다. Ketchum 등[15]은 triamcinolone이 콜라겐 분해를 촉진시켜 반흔을 감소시킨다고 하였다. 스테로이드나 어떤 cytockine은 세포 수준에서 metalloproteinase의 분비를 촉진시키는 것으로 알려져 있다[16]. 즉 스테로이드는 섬유아세포의 콜라겐 대사에 영향을 미쳐 콜라겐의 분해를 촉진시킴으로써 반흔을 감소시키며, 스테로이드의 효과는 collagenase의 활성을 촉진시킬 뿐만 아니라 단백질 합성도 억제한다고 보고되었다[17]. Krushche와 Worret[18]은 triamcinolone에 의한 반흔 감소의 주된 효과는 콜라겐의 분해보다 기질의 감소에 기인한다고 하였다. 기질은 물과 glycosaminoglycan으로이루어졌으며 스테로이드가 glycosminoglycan의 합성을 억제하여 수분 함량의 감소와 세섬유간 간극의 감소를 초래하여 결국 반흔의 크기가 감소된다고 하였다[18].

본 연구에서 triamcinolone의 투여시기와 용량은 Morris 등[4]의 방법을 따랐으며, 상피화가 완성되고 창상이 안정된 시기인 창상 형성후 16일에 triamcinolone을 투여하였다. 본 연구결과에서 ALP 양성 반응은 7일에 가장 강하게 나타나고 그 후에는 감소되는 추세를 보였으며, triamcinolone 주사 후에도 대조군에 비해 스테로이드 투여군에서 ALP 양성 반응이 다소 약하게 나타났다. 이는 스테로이드가 섬유아세포의 TN-AP 활성을 증가시켜 세포증식을 억제하는 효과를 나타낸다는 Hui[14]의 주장과는 다른 결과였다. 본 연구결과에서 스테로이드 투여군의 19일과 23일 소견에서 ALP 양성 반응은 증가되지 않았으나 섬유조직의 증식이 감소된 소견을 보였던 것은 Krushche와 Worret[18]의 보고와 같이 기질의 감소에 의한 것으로 추정된다.

본 연구결과를 종합하면 가토의 비후성 반흔 모델에서 triamcinolone주사에 의해 ALP 활성은 증가되지 않았으나 섬유조직 증식이 감소되어 어떤 다른 기전에 의해 반흔 감소효과를 나타낼 것으로 추정된다. 앞으로 ALP 반응을 정량적으로 계측할 수 있는 방법이 개발되어야 할 것으로 생각되며, triamcinolone의 농도에 따른 ALP 활성의 변화와 반흔의 생체계측학적 측정에 의한 평가가 요망된다. 또 비후성 반흔의 치료에 사용되는 다른 약제투여시 ALP 활성 변화에 대한 연

구도 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 가토의 비후성 반흔 모델에서 나타나는 ALP 발현이 시간 경과에 따라, 또 triamcinolone 투여시에 어떻게 변하는지 알아보기 위하여 시행되었다.

체중 2.5kg 내외의 웅성 뉴질랜드산 가토 6마리를 이용하여, 가토의 귀의 배부에 직경 6 mm의 원형 전층 피부 창상을 형성하고 16일 후에 창상에 triamcinolone을 주사하였고, 이때 식염수를 주사한 것을 대조군으로 하였다. 창상 형성후 3, 7, 15, 17, 19, 23일에 조직을 절취하고 조직학적 및 면역조직학적으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다

ALP 양성 반응은 3일에 창상연 주위의 염증세포와 섬유아세포에서 관찰되었고, 7일에는 새로 형성중인 상피 하방의 혈관, 염증세포, 섬유아세포에서 가장 강하게 나타났다. 15일에는 ALP 양성 반응이 감소되어 상피 하방의 혈관에서 주로 관찰되었다. 17일 이후에는 시간이 경과할수록 ALP 양성 반응과 섬유조직 증식이 점점 감소되었으며, 대조군에 비해 스테로이드 투여군에서 반응이 더 약하게 나타났다.

이상의 결과 triamcinolone 투여 후 ALP 발현은 증가되지 않았으나 섬유조직 증식이 감소되어, 어떤 다른 기전에 의해 반흔 감소효과를 나타낼 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Abdulkader M, Vasudevan DM, Leena Devi KR, Nair VJ : Experimental production of keloids. Int J Cancer 20:27, 1983
2. Goss RJ, Crimes LN : Epidermal down growths in regenerating rabbit ear holes. J Morphol 146:533, 1975
3. Mustoe TA, Pierce GF, Morishima C, Deuel TF : Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. J Clin Invest 87:694, 1991
4. Morris DE, Wu L, Zhao LL, Bolton L, Roth SI : Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring : Quantitative studies. Plast Reconstr Surg 3:674, 1997
5. Higgins JC, Eady RAJ : Human dermal microvasculature : Enzyme histochemical and cytochemical study. Br J Dermatol 104:521, 1981
6. Alpaslan G, Nakajima T, Takano Y : Extracellular alkaline phosphatase activity as a possible marker for wound healing. J Oral Maxillofac Surg 55:56, 1997
7. Baker BL, Whitaker WL : Interference with wound healing by local action of adrenocortical steroids. Endocrinol 46:544, 1950
8. Rockwell WB, Cohen IK, Ehrlich HP : Keloid and hypertropic scars: A compresive review. Plast Reconstr Surg 84:837, 1989
9. Swallow DM, Povey S, Parkar M, : Mapping of the gene coding for the human liver/bone/kidney isoenzyme of alkaline phosphatase to chromesome 1. Ann Hum Gent 50:229, 1986
10. Maurean AH : The biology of scar formation. Physical Therapy 69:1014, 1989
11. Fell HB, Danielli JF : The enzyme of healing wounds : I. The distribution of alkaline phosphomonoesterase in experimental wounds and burns in the rat. Br J Exp Pathol 24:196, 1943
12. Andracchi S, Korte GE : Expression of plasma membrane alkaline phosphtase in normal and regenerating choriocapillaris in the rabbit. Acta Anat 141:289, 1991
13. Hui M, Hu H, Tenebaum HC : Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue nonspecific alkaline phosphase. Cell Tissue Res 274:429, 1993
14. Hui M : Locally inducing high expression of tissue nonspecific alkaline phosphase might regualte scar tissue maturation. Plast Reconstr Surg 95:206, 1995
15. Ketchum LD, Robinson DW, Johnson ML : The degradation of mauture collagen: A laboratory study. Plast Reconstr Surg 40:89, 1967
16. Page R : The role of inflammatory mediators in the pathogensis of periodontal disease. J Periodont Res 26:230, 1991
17. McCoy BJ, Kiegelmann RF, Cohen IK : In vitro inhibition of cell growth, collagen synthesis, and prolyl hydroxylase activity by triamcinolone acetonide. Proc Soc Exp Biol Med 163:216, 1980
18. Krushche T, Worret W-I : Mechanical properties of Keloids in vivo during treatment with intralesional triamcinolone acetonide. Arch Dermatol Res 287:289, 1995

저자연락처
우편번호 501-757
광주 광역시 동구 학동 8번지
전남대학교 병원 구강악안면외과
조 용 기

원고 접수일 1998년 12월 7일
게재 확정일 1999년 1월 7일

Reprint requests
Young-Ki Cho, DDS
Dept. of OMFS, Chonnam Hospital Univ.
8, Hak-Dong, Dong-Ku, Kwang-Ju, 501-757, KOREA
Tel. 82-62-220-5436 Fax. 82-62-232-8126

Paper received 7 December 1998
Paper accepted 7 January 1999

사진부도 설명

Fig. 1. Photomicrograph of wound at 3 days after wounding.
(H & E stain × 10)

Fig. 2. Photomicrograph of wound 3 days after wounding.
ALP reaction was observed on fibroblasts and inflammatory cells around wound margin.
(ALP stain × 40)

Fig. 3. Photomicrograph of wound at 7 days after wounding .
(H & E stain × 10)

Fig. 4. Photomicrograph of wound at 7 day after wounding.
ALP reaction is more intense than Fig. 2 in capillaries, inflammtory cells, and fibroblasts behind newly formed epithelium.
(ALP stain × 40)

Fig. 5. Photomicrograph of wound at 15 days after wounding.
(H & E stain × 40)

Fig. 6. Photomicrograph of wound at 15 days after wounding.
ALP reaction is lessened and appeared mainly in subepidermal capillary network.
(ALP stain × 20)

Fig. 7. Photomicrograph of saline-treated wound at 17 days after wounding.
(ALP stain × 40)

Fig. 8. Photomicrograph of steroid-treated wound at 17 days after wounding. ALP reaction is weaker than Fig. 7.
(ALP stain × 40)

Fig 9. Photomicrograph of saline-treated wound at 19 days after wounding.
(ALP stain × 40)

Fig. 10. Photomicrograph of steroid-treated wound at 19 days after wounding. ALP reaction is weaker than Fig. 9.
(ALP stain × 40)

Fig. 11. Photomicrograph of saline-treated wound at 23 days after wounding.
(ALP stain × 20)

Fig. 12. Photomicrograph of steroid-treated wound at 23 days after wounding. ALP reaction is weaker than Fig. 11.
(ALP stain × 20)

사진부도 ①

Fig. 1.

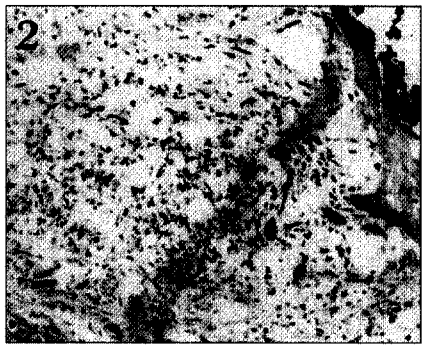

Fig. 2.

Fig. 3.

Fig. 4.

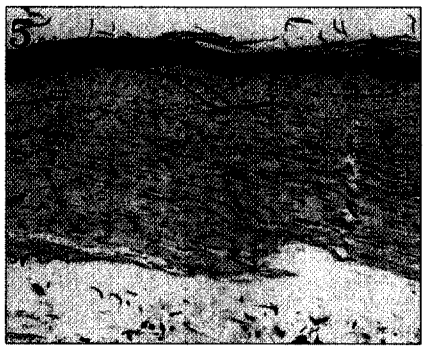

Fig. 5.

Fig. 6.

Fig. 7.

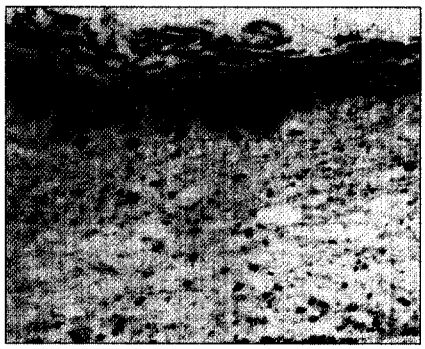

Fig. 8.

Fig. 9.

Fig. 10.

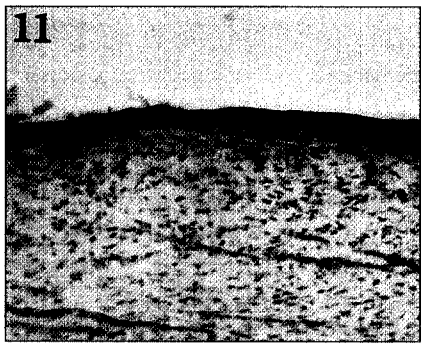

Fig. 11.

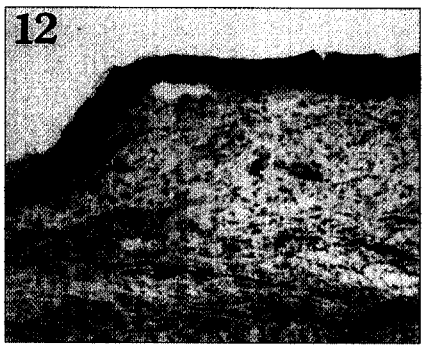

Fig. 12.