

혈소판 활성화인자에 의한 상악동 점막상피의 손상에 대한 전자현미경적 변화

단국대학교 의과대학 이비인후과학교실

정 필 섭

= Abstract =

Electron Microscopic Changes in the Epithelial Damage of the Maxillary Mucosa Induced by Platelet Activating Factor

Pil-Seob Jeong, MD

*Department of Otolaryngology -Head and Neck Surgery,
College of Medicine, Dankook University, Cheonan, Korea*

Platelet activating factor (PAF) has been known as implicating as one of potent inflammatory mediators and reported to be involved in inflammation and allergy. PAF induces ciliary dysfunction and epithelial damage of human paranasal sinus mucosa in vitro. However, several recent papers have reported that PAF may not readily damage the airway epithelium. The aim of this study was to investigate the ultrastructural evidence to elucidate the pathogenesis of epithelial damage induced by PAF. Sixteen μ g of PAF was applied into the maxillary sinuses of 6 rabbits. Rabbits were divided into 2 subgroups along with time interval at 1st and 3rd experimental day, and sinus mucosae were taken for the histopathologic study using electron microscopy. At 1st day, epithelial cells showed no ultrastructural change. Ultrastructures of the cilia were well preserved. Subepithelial space showed no evidence of the infiltration of inflammatory cells. Intravascular platelet aggregation and swelling of endothelial cells were evident. At 3rd day, epithelial cells showed vacuolar degeneration. Fusion of cilia forming giant cilia and focal loss of cilia were evident. Eosinophils were infiltrated in subepithelial and intraepithelial space. Swelling of endothelial cells, and migration of inflammatory cells into the connective tissue were evident. This study implies that epithelial damage induced by PAF may be secondary to the cytotoxicity of mobilized eosinophils rather than direct cytotoxicity of PAF.

Key Word: platelet activating factor, ultrastructural changes, maxillary mucosa

교신 저자 : 정필섭(Pil-Seob Jeong, MD)

330-714 충남 천안시 안서동 산 29 단국대학교 병원 이비인후과

Tel : 0417) 550-3974 Fax : 0417) 556-1090 E-mail : psjeong@anseo.dankook.ac.kr

* 본 연구는 단국대학교 대학연구비에 의해 수행되었음.

I. 서 론

혈소판활성인자는 염증과 알레르기에 관여하는 강력한 염증매개체로서, 사람의 부비동 점막에 세포독성을 유발하여 시간과 농도에 비례하여 섬모 억제, 섬모정체(ciliostasis), 그리고 점막상피의 세포손상을 나타낸다^{1,2)}. 또한 혈소판활성인자는 호산구에 대한 강력한 화학주성인자로 작용하며, 기도 호산구증(airway eosinophilia)을 유발하며,^{3,4} 기도 평활근을 수축시키고, 미세혈관에서의 혈장유출(microvascular leakage), 염증세포들의 응집을 유발하며, 또한 기도의 점액섬모운동을 감소시키며, 상피세포의 손상을 유발한다⁵⁾.

그러나 현재까지 혈소판활성인자에 의해 유발된 상피세포 손상에 대한 기전은 논란이 많은 실정이다. 가토에서 혈소판활성인자를 기관내로 주입한 경우 농도에 비례하여 폐의 급성염증이 유발되며 사람의 부비동 점막에서 혈소판활성인자에 의해 유발된 섬모정체, 부종, 상피세포의 탈락 등이 보고되고 있다^{1,2,6)}. 혈소판활성인자의 세포독성은 직접 섬모기능장애와 상피세포의 손상을 유발한다고 알려져 있다. 그러나 최근의 연구에서는 가토⁷⁾나 기니피그⁸⁾에서 혈소판활성인자를 흡입시킨 경우 기관에서 상피세포의 탈락의 증거를 관찰할 수 없었다. 이것은 혈소판활성인자가 기도 상피세포의 손상을 쉽게 유발하지 않는 것을 의미한다.

본 연구의 목적은 혈소판활성인자에 의해 유발된 상피세포의 손상 기전을 알기 위하여 미세구조의 변화를 알고자 함이며 이를 위하여 저자는 혈소판활성인자를 가토 상악동내에 경피적으로 주입한 후 1, 3일째에 상악동 점막의 미세구조, 특히 섬모, 상피세포, 상피내 및 상피하층, 염증세포, 모세혈관내의 변화를 관찰하였다.

II. 연구대상 및 방법

실험동물로는 체중 2.0 - 3.0 kg의 외견상 건강하고 비공이 깨끗한 백색 가토 9마리를 사용하였으며, 이들을 실험군 6마리와 대조군 3마리로 나누어 실험기간중에는 단국대학교 의과대학 동물사육장에서 토끼류 표준실험사료로 동일한 조건하에서

사육하였다.

실험군은 6마리의 가토를 3마리씩 2개의 아군으

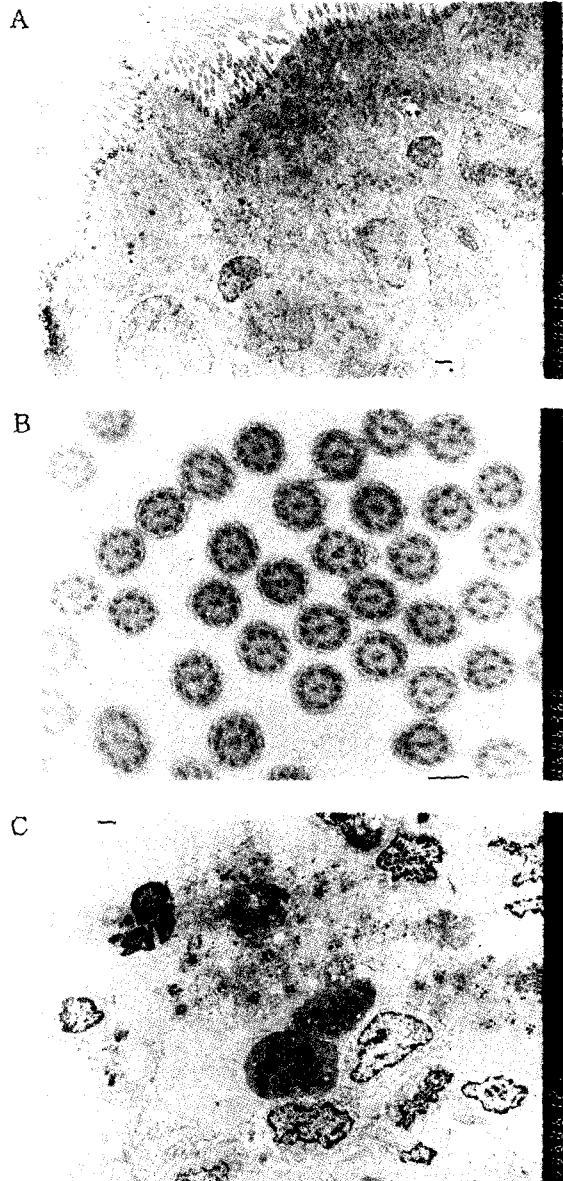


Fig. 1. Transmission electron microscopic findings at 1st day in PAF-applied group. Epithelial cells showed no ultrastructural change and subepithelial space showed no evidence of the infiltration of inflammatory cells (A). Ultrastructures of the cilia were well preserved (B). Intravascular platelet aggregation and swelling of endothelial cells were shown (C). Bar = 1 μ m

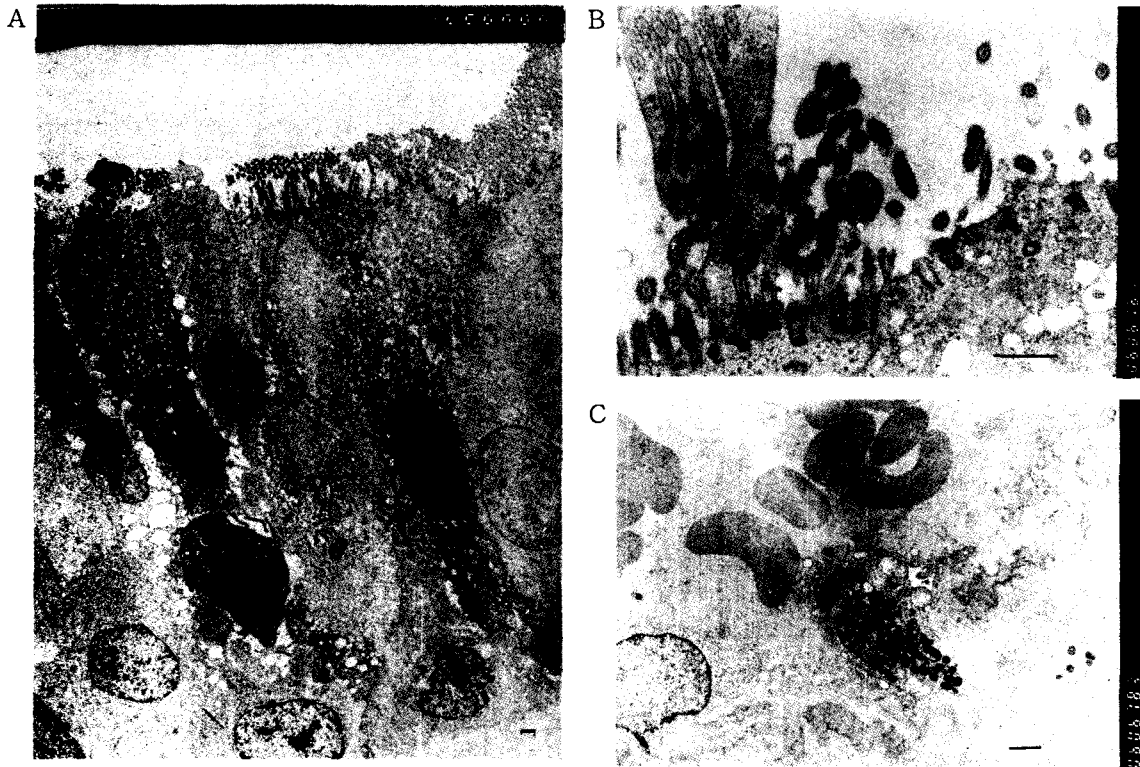


Fig. 2. Transmission electron microscopic findings at 3 days in PAF-applied group. Epithelial cells showed vacuolar degeneration and eosinophils were infiltrated in subepithelial space (A). Fusion of cilia forming giant cilia and loss of cilia were demonstrated (B). Swelling of endothelial cells, and migration of inflammatory cells into the connective tissue were noted (C). Bar = 1 μ m

로 나눈 후, 한쪽 상악동에 비배부의 털을 제거하고 1% povidone iodine으로 소독한 뒤 혈소판활성인자(L- α -phosphatidylcholine, β -acetyl-O-alkyl, chloroform solution 2mg/ml, Approx. 99%, Sigma, St. Louis, Missouri) 16 μ g/ml 용액 1 ml를 상악동에 경피적으로 천자주입하였다. 시간대별로(1일, 3일) 가토를 희생시켜 상악동 내 점막을 채취하여 투과전자현미경적 소견을 관찰하였다. 대조군은 3마리의 가토를 한쪽 상악동에 생리식염수 1ml를 경피적으로 상악동에 천자주입한 후 3일째 가토를 희생시켜 실험군과 같은 방법으로 관찰하였다.

투과전자현미경 관찰을 위한 표본은 조직을 2×3 mm 크기로 절단하여 생리식염수로 세척한 다음 즉시 2.5% glutaraldehyde 용액(1% phosphate buffer, pH 7.4)에 넣어 4°C에서 2시간동안 전 고정

한 후 1% phosphate buffer로 3회 세척하였다. 1% OsO₄(1% phosphate buffer, pH 7.4)에 2시간 동안 고정한 후 다시 3회 세척한 후 50% 알콜부터 100% 알콜까지 단계적으로 농도를 높여가며 탈수한 다음 propylene oxide로 치환한 다음 epon 혼합물로 포매하였다. 1 μ m 두께로 박절하여 alkaline toluidine blue로 염색한 후 광학 현미경에서 관찰 부위를 결정하였다. 30-50 μ m 두께로 초박절하여 동격자(copper grid)위에 올려놓고 lead citrate와 uranyl acetate로 이중전자 염색한 후 투과전자현미경(Hitachi H-600, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

III. 결 과

혈소판 활성인자 주입 1일째 표본에서는 혈소판

의 응집, 적혈구의 정체, 내피세포의 팽윤이 관찰되었다. 그러나 상피하층의 염증세포의 침윤은 관찰되지 않았다. 상피세포와 섬모의 미세구조의 변화 및 상피세포의 탈락은 관찰되지 않았다(Fig. 1a, b, c). 혈소판 활성화 주입 3일째 표본에서는 내피세포의 팽윤과 혈관의 결체조직내로의 염증세포의 이동과 상피하층과 상피세포내로의 호산구의 침윤이 관찰되었다. 상피세포의 공포성 변성이 관찰되었으며 섬모의 융합과 부분적인 소실손상을 보였다(Fig. 2a, b, c). 대조군 표본에서는 이상소견이 관찰되지 않았다.

IV. 고 안

기도 상피세포의 역할은 유해물질의 침입에 대한 보호작용이다. 그러나 상피세포 손상 또는 상피세포 탈락은 천식과 후기 알레르기 반응의 특징으로 알려져 있다^{9,10}. 혈소판활성인자를 에어로졸(aerosol) 형태로 정상인과 천식환자에게 주었을 때 기관지 과민반응이 유발되며^{11,12}, 혈소판활성인자는 세포독성에 의하여 기도 상피세포의 손상을 유발한다고 알려져 있다^{12a}.

본 연구에서 혈소판활성인자는 시간대에 따라 상피세포내에 호산구의 침윤을 유발하였으며, 상피세포의 변성을 초래하였다. 혈소판활성인자 주입 1일째 표본에서는 상피세포의 변성을 관찰하지 못하였다. 그러나 혈소판활성인자 주입 3일째 표본에서는 상피세포내와 상피세포하층으로 호산구의 침윤을 동반한 상피세포의 변성을 관찰할 수 있었다. 시간대에 따른 본 연구결과에서 혈소판활성인자는 상피세포내로 이동한 호산구의 세포독성에 의한 이차적인 결과를 통하여 상피세포의 손상을 유발하였다고 볼 수 있다.

여러 가지 체외 연구에서 기도 상피세포에 대한 혈소판활성인자의 직접적인 세포독성이 보고되고 있는^{12a} 반면, 최근의 체내 연구에서는 혈소판활성인자의 세포독성은 보고되지 않고 있다. 그러나 이들 체내 연구는 혈소판활성인자 주입후 하루 이상의 후기 변화를 관찰하지는 않았다. 그러므로 체외 연구에서 기관(organ), 시간대별에 따른 차이와 단백질분해효소의 활성도(protease activity)에 의한

조직 분해의 가능성이 이런 상반된 결과를 설명할 수 있다.

혈소판활성인자는 여러 가지 염증세포 즉 혈소판, 중성구, 호산구, 대식세포 등의 여러 가지 염증세포들에 대하여 화학주성을 가진 매개체중의 하나이다. 특히 혈소판활성인자는 호산구에 대한 강력한 화학주성이 있다⁵. 혈소판활성인자는 알레르기성 질환에서 호산구 침윤의 유발과 유지에 결정적인 역할을 하며, 호산구 침윤은 상피세포 손상과 밀접한 관계가 있다^{5,13}. 체외에서 14시간 동안 배양(incubation)한 후 혈소판활성인자에 의해 활성화된 호산구는 기니피 기관 상피세포를 파괴하는 반면, 혈소판활성인자 자체로는 상피세포를 파괴할 수 없는 것으로 알려져 있다¹⁴. 혈소판활성인자에 의해 활성화된 호산구는 상피세포를 파괴하는 세포독성의 매개체를 분비하는 것으로 제시되고 있다¹⁵. 이와 같은 상피세포의 파괴는 상피세포에서 유래된 완화인자(epithelium derived relaxation factor)의 소실¹⁶, 화학매개체의 분비, 감각신경의 노출 등으로 인하여 기도 반응을 증가시킬 수 있다⁹.

혈소판 응집, 적혈구 정체, 그리고 내피세포의 종창 등의 모세혈관의 변화들은 혈소판활성인자 주입 1일째 표본에서 관찰되었고, 3일째 표본에서도 내피세포의 종창이 지속되었으며 내피상피를 통한 호산구의 이동이 관찰되었다. 혈소판활성인자를 혈관내에 주입한 경우 혈소판 응고, 내피세포의 종창성 변성과 폐포 모세혈관의 기저막의 해리가 관찰된다고 알려져 있다¹⁷.

본 연구에서 모세혈관내의 변화는 이전의 연구결과와 비슷하였다. 그러므로 내피세포가 혈소판활성인자에 의해 유발된 호산구의 경내피 이동(transsepithelial migration)에 중요한 역할을 한다고 보여진다. 내피 세포의 종창은 혈소판활성인자에 의해 유발된 호산구의 경내피 이동에 있어서 내피세포의 동적인 역할에 대한 형태학적인 증거를 제시하고 있다¹⁸.

본 연구에서 혈소판활성인자 16 $\mu\text{g/ml}$ 을 주입하였는데, 그 이유는 Rhee 등¹⁹이 기니피 기관에서의 혈소판활성인자에 의한 점액섬모운동 실험에서 16 $\mu\text{g/ml}$ 에서 점액섬모운동이 가장 지연되었기 때문이다. 그리고 본 연구에서 비강 또는 기관 대신

에 상악동을 사용한 것은 상악동 점막에 대한 혈소판활성인자의 지속적인 반응을 관찰하기 위해서였다.

흡입된 혈소판활성인자는 정상인에서 기관지 반응의 증가를 초래하며, 최대 증가는 혈소판활성인자에 노출된 후 3일째에 일어나기 때문에¹⁰ 혈소판활성인자를 주입한 후의 시간 간격을 1, 3일로 정하였다.

V. 결 론

혈소판활성인자는 상피세포에서 호산구의 침윤을 유발하였고, 시간대에 따라 상피세포의 변성을 초래하였다. 그러므로 혈소판활성인자는 상피세포 내로 침윤된 호산구의 세포독성에 의한 이차적인 변화를 통하여 상피세포의 손상을 초래할 것으로 사료된다.

References

1. Ganbo T, Hisamatsu K: *Mucosal dysfunction and damage induced by platelet activating factor(PAF)*. *Acta Otolaryngol*. 1990; 110: 427-436
2. Hisamatsu K, Ganbo T, Nakazawa T, Murakami Y: *Platelet activating factor induced respiratory mucosal damage*. *Lipids*. 1991; 26: 1287-1291
3. Barnes P: *Pathobiology of platelet-activating factor*. *Pathol Immunopathol Res* 1986; 5: 104-117
4. Townley RG, Hopp RJ, Agrawal DK, Bewtra AK: *Platelet-activating factor and airway reactivity*. *J. Allergy Clin Immunol*. 1989; 83 (6): 997-1010
5. Barnes PJ, Chung KF, Page CP: *Platelet-activating factor as a mediator of allergic disease*. *J Allergy Clin Immunol*. 1988; 81: 919-934
6. Camussi G, Pawlowski I, Tetta C, Roffinello C, Alberton M, Brentjens J et al: *Acute lung inflammation induced in the rabbit by local instillation of 1-O-octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine or native platelet activating factor*. *Am J Pathol*. 1983; 112: 78-88
7. Ohashi Y, Nakai Y, Morimoto K, Tanaka A, Kakinoki Y, Ohno Y, Masamoto T, Kato A: *Platelet activating factor compromise airway epithelial defense functions*. *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 100: 520-526
8. Greiff L, Erjefalt JS, Wollmer P, Sundler F, Persson CG: *Effects of topical platelet activating factor on the guinea-pig tracheobronchial mucosa in vivo*. *Acta Physiol Scand*. 1997; 106: 387-391
9. Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Hauhetela T: *Damage to the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma*. *Am Rev Respir Dis*. 1985; 131: 599-606
10. Nazer RM, Tellez RM, D'Ottavio TE, Bassan AE, David N: *Ultrastructural changes in the human nasal respiratory epithelium in hypersensitivity reactions*. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1986; 14: 619-26
11. Cuss FM, Dixon CMS, Barres PJ: *Effects of inhaled platelet activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man*. *Lancet*. 1986; 2: 189-92
12. Chung KF, Barnes PJ: *Role for platelet-activating factor in asthma*. *Lipids*. 1991; 26: 1277-1279
13. Frigas E, Motojima S, Gleich GJ: *The eosinophilic injury to the mucosa of the air ways in the pathogenesis of bronchial asthma* *Eur Respir J*. 1991; 4(suppl 13): 123-35
14. Yukawa T, Read RC, Kroegel C, Rutman A, Chung KR, Wilson R, Cole PJ, Barnes PJ: *The effect of activated eosinophils and neutrophils on guinea pig airway epithelium in vitro*. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1990; 2: 341-53

15. Barnes PJ: *PAF, eosinophils and asthma. J Lipid Mediat.* 1992; 5: 155-158
16. Barnes PJ, Cuss FM, Palmer JB: *The effect of airway epithelium on smooth muscle contractility in bovine trachea. Br J Pharmacol.* 1985; 86: 685-691
17. Lellouch-Tubiana A, Lefort J, Pirotzky E, Vargatig BB, Pfister A: *Ultrastructural evidence for extravascular platelet recruitment in the lung upon intravenous injection of platelet-activating factor(PAF-acether) to guinea-pigs. Br J Exp Path.* 1985; 66: 345-355
18. Casale TB, Erger RA, Little MM: *Platelet-activating factor-induced human eosinophil transendothelial migration: evidence for a dynamic role of the endothelium. Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993; 8: 77-82
19. Rhee CK, Jeong PS, Kim YH, Lee HJ, Chung PS, Jung TTK: *Effect of platelet-activating factor on the mucociliary function of the eustachian tube in guinea pigs. Recent advances in Otitis media. BC Decker: Philadelphia: BC Decker: 1996. 97-100*