

Histologic Changes of Vocal Fold Aging in a Rat Model

Dong-Wook Lim, Jeong-Seok Choi, Jae-Yol Lim and Young-Mo Kim

Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Inha University School of Medicine, Incheon, Korea

Rat Model의 노화에 따른 성대에서 나타나는 조직학적 변화

임동욱 · 최정석 · 임재열 · 김영모

인하대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실

Received May 7, 2013

Revised June 17, 2013

Accepted June 19, 2013

Address for correspondence

Young-Mo Kim, MD, PhD
Department of Otorhinolaryngology-
Head and Neck Surgery,
Inha University School of Medicine,
27 Inhang-ro, Jung-gu,
Incheon 400-711, Korea

Tel +82-32-890-3472

Fax +82-32-890-3580

E-mail ymk416@inha.ac.kr

Address for co-correspondence

Jae-Yol Lim, MD
Department of Otorhinolaryngology-
Head and Neck Surgery,
Inha University School of Medicine,
27 Inhang-ro, Jung-gu,
Incheon 400-711, Korea

Tel +82-32-890-3570

Fax +82-32-890-3580

E-mail jyylim@inha.ac.kr

Background and Objectives Aging causes atrophy in mucosa of vocal folds, resulting in various deleterious changes in phonation. Eventually, these changes impair an elderly individual's ability to communicate with others and affect their quality of life. This investigation was carried out to determine the morphological characteristics of vocal folds in two different aged groups of rats, and to perform a validation of a rat model of age-related changes in larynx.

Subjects and Method Larynges were obtained from 12 rats, of which 6 rats were 6 months old and the others 18 months old. The middle portion of each vocal folds were stained with haematoxylin and eosin (H&E), Masson's trichrome (MT), Alcian blue (AB) and compared.

Results Extracellular matrix in lamina propria of vocal folds presented lower density in 18 months-old rats than in 6 months-old rats ($p < 0.05$). Also more severe fibrosis was observed in 18 months-old rats than in 6 months-old rats ($p < 0.05$). Six months-old rats showed higher concentration of hyaluronic acid than did 18 months-old rats ($p < 0.05$).

Conclusion Aged vocal folds showed increased fibrosis and decreased density of collagen and hyaluronic acids in the lamina propria compared to young vocal fold.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2013;56:506-10

Key Words Aging · Extracellular matrix · Hyaluronic acid · Lamina propria · Larynx · Vocal cord.

서론

성장이 끝난 후의 성대는 점차 노화의 과정을 걷게 되며, 사 람은 주로 50대를 전후해서 음성이 변화하기 시작한다.¹⁾ 이는 성대 내 조직학적 변화, 주위 근육의 위축, 폐활량의 감소, 성대의 운동신경체계의 변화와 같은 전신적인 노화현상에 의거한 다. 특히 성대 고유층의 조직학적 변화와 같은 후두의 구조학 적 변화는 노화의 진행에 따라 성대의 운동과 음조의 변화를 야기한다.^{1,2)}

대표적인 음성 변화로 제한적인 음도 및 강도, 발생시간의 감 소, 약한 음성(weak voice), 기식음(breathiness), 쇄소리(hoarseness) 등의 음성변화가 나타난다. 이학적 소견상 궁형성대

(vocal fold bowing), 성대 위축증(vocal fold atrophy), 불완 전한 성문폐쇄(glottal incompetence)의 후두소견과 함께, 후 두스트로보스코프(videostroboscopy)에서 점막진동의 비대 칭성이나 초고속 디지털 영상법 촬영시 성문 개대기(open ph-ase)의 증가 소견이 나타나기도 한다.²⁻⁴⁾

성대의 고유층내 세포외기질은 섬유 단백질, 사이질 단백질, 지질, 탄수화물로 구성되어 있으며 아교질 및 탄력 섬유가 성 대의 방향과 평행하게 주행하여 성대의 탄력을 유지해 주는 데, 노화에 따라 구성이 점차 변하게 되어 조직이 위축되어 얇 아지게 된다. 성대 기능에 직접적인 영향을 주는 층은 성대 고 유층으로 연령에 따른 구조의 변화와 음성 변화의 핵심 부위 라 볼 수 있다.¹⁾

본 연구에서는 성대 내 고유층의 구성을 두 연령군의 rat model에서 조직학적으로 비교하여 노화에 따른 성대 내 조직학적 구성의 차이를 확인함으로써 음성의 변화 원인을 규명하는 동시에 향후 후두 모델에 대한 연구에 있어 rat model의 적용 가능성을 보고자 하였다.

대상 및 방법

동물 모델 및 실험 방법

본 연구는 인하대병원 임상시험심사위원회(IRB) 및 동물 실험 센터의 승인 하에 시행되었다. 양측 성대의 운동성이 정상임이 내시경을 통해 확인된 건강한 생후 6개월의 암컷 쥐(Sprague Dawley®, Samtako Bio Inc, Osan, Korea)와 생후 18개월의 암컷 쥐를 각각 12마리 사용하였다. Ketamin®(Huons Co., Ltd, Seongnam, Korea)(70 mg/mL)과 Xylazine®(SF. Co., Ltd, Ansan, Korea)(7.5 mg/mL)을 각각 60 mg/kg, 6 mg/kg씩 복강내 주사하여 전신 마취를 시행한 후 후두를 적출하였다.

표본 제작과 염색

각 검체들은 10%의 formaldehyde 용액에 보관 후 탈수하였고 paraffin block으로 제작하였다. 각 군의 검체들은 6개씩 나누어 각각 축상면과 관상면으로 4 µm 두께로 절편을 만들어 슬라이드로 제작하였다.

각 연령군 성대 조직의 전체 양상 비교를 위해 haematoxylin and eosin(H&E) 염색을 하였고, 섬유화 양상 및 고유층 내

콜라겐의 밀도를 비교하기 위해 Masson's trichrome staining (MTS) 염색을 하였으며, hyaluronic acid(HA)를 비교하기 위해 Alcian blue 염색을 하였다.

관찰 방법 및 통계 분석

염색 농도는 Image J 프로그램을 이용하여 구하였다. 먼저 400배를 현미경 슬라이드 사진을 이용하여 점막 고유층만 나온 부분을 따로 캡처한 후 그 안에 있는 염색된 조직의 면적을 전체 면적으로 나누었다. 같은 방법으로 전체 슬라이드의 염

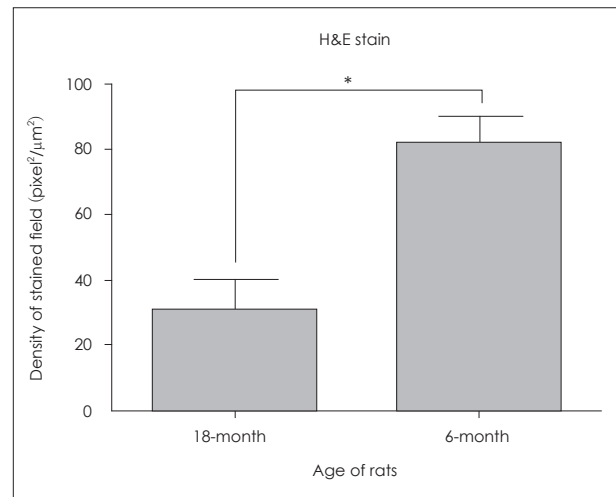


Fig. 2. Cellular density of lamina propria presented by H&E stain between 18-months old rats and 6-months old rats. Cellular density of the 18-months old rats shows less density than 6-months old rats (Mann-Whitney U test * $p < 0.05$). H&E: haematoxylin and eosin.

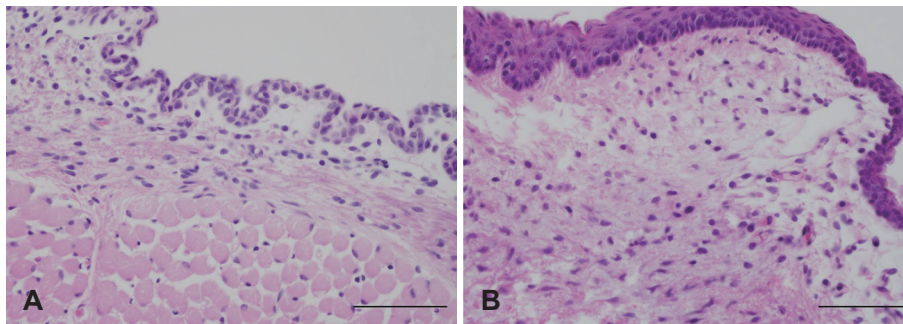


Fig. 1. Light microscopic findings of the vocal fold from 6-months old rats (A) and 18-months old rats (B)(black bar: 100 µm, H&E staining, ×400). Density of lamina propria of 18-months old rats is less dense than that of 6-months old rats. H&E: haematoxylin and eosin.

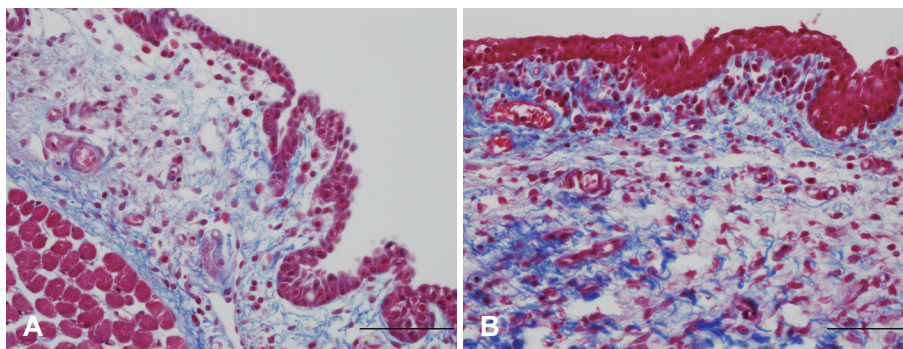


Fig. 3. Light microscopic findings of the vocal fold from 6-months old rats (A) and 18-months old rats (B)(black bar: 100 µm, MT staining, ×400). Fibrous tissues (blue stained region) in LP of 18-months old rats are more dense than those of 6-months old rats. MT: Masson's trichrome, LP: lamina propria.

색된 조직의 밀도를 구한 후, 6개월과 18개월 두 개의 군으로 평균을 구한 후 두 군간의 통계적 유의 수준을 측정하였다. 통계 측정에는 GraPad(GraPad Software version 5.0 Inc., San Diego, CA, USA) 프로그램을 사용하여 Mann-Whitney U test로 통계 분석 하였으며, p value가 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

H&E 염색을 한 18개월군 첫번째 슬라이드의 경우 $405 \times 259 \mu\text{m}^2$ 에 46029 pixel^2 면적의 조직이 성대 고유층 내에 염색되어 있었다(Fig. 1). 이는 $79.91 \text{ pixel}^2/\mu\text{m}^2$ 의 밀도를 의미하며, 마찬가지로 나머지 슬라이드는 28.82, 19.87, 25.44, 11.24, 15.74 ($\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2$)의 밀도가 측정되었으며 평균 밀도는 $30.17(\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2)$ 로 측정되었다. 6개월군의 경우 51.57, 101.45, 92.81, 84.31, 60.43, $100.51(\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2)$ 로 평균 밀도 $81.85(\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2)$ 가 측정되었다. 이는 18개월군보다 6개월군의 경우에서 성대 고유층 내의 세포외기질의 밀도가 높음을 알려준다($p=0.0087$)

(Fig. 2).

MTS 염색의 경우 18개월군의 슬라이드에서 염색된 조직의 밀도가 37.88, 76.16, 25.86, 67.32, 84.22, $63.37(\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2)$ 로 평균 밀도 $59.14(\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2)$ 로 측정되었고, 6개월군의 슬라이드에서 1.02, 3.63, 8.40, 4.62, 7.11, $17.34(\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2)$ 로 평균 값 7.02의 조직 밀도가 측정되었다(Fig. 3). 이는 18개월군에서 6개월군보다 점막고유층의 콜라겐 밀도 및 섬유화 정도가 현저히 진행되었음을 알려준다($p=0.0022$)(Fig. 4).

Alcian blue 염색의 경우 18개월군은 1.75, 1.04, 1.44, 2.01, 0.71, $0.57(\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2)$, 6개월군은 4.56, 5.75, 4.67, 11.02, 7.21, $4.43(\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2)$ 의 조직 밀도로 각각 평균값 $1.253, 6.273(\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2)$ 이 측정됨으로써(Fig. 5), 18개월군보다 6개월군의 경우 HA가 더욱 풍부함을 알려준다($p=0.0022$)(Fig. 6).

고 찰

노화에 따라 후두에서는 연골의 골화, 근육의 위축 및 성대 점막의 고유층이 가늘어지게 된다. 특히 노년 남성의 경우 성

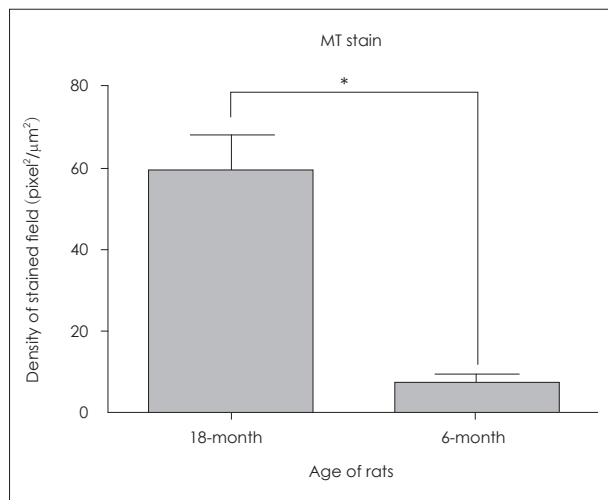


Fig. 4. Collagen accumulation of lamina propria presented by MT stain between 18-months old rats and 6-months old rats. Collagen accumulation of the 18-months old rats shows more density than 6-months old rats (Mann-Whitney U test $*p < 0.05$). MT: Masson's trichrome.

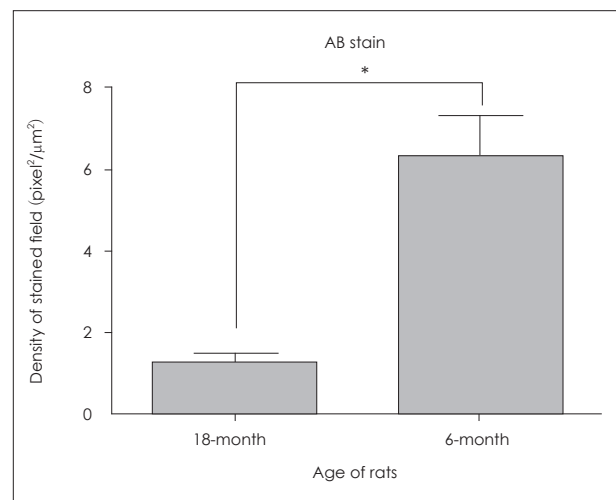
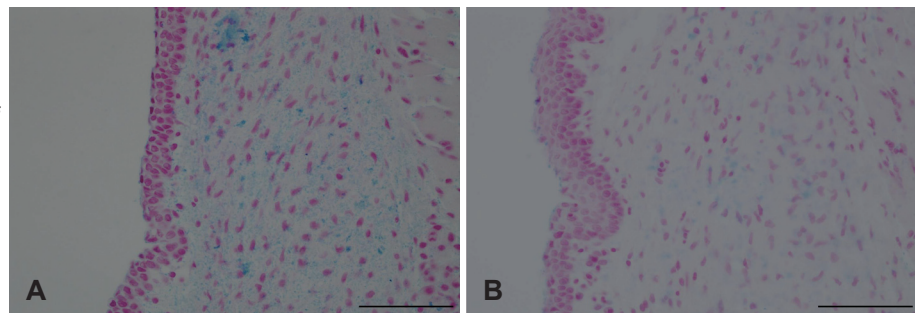


Fig. 6. Hyaluronic acid accumulation of lamina propria presented by AB stain between 18-months old rats and 6-months old rats. Hyaluronic acid accumulation of the 18-months old rats shows less density than 6-months old rats (Mann-Whitney U test $*p < 0.05$). AB: Alcian blue.

Fig. 5. Light microscopic findings of the vocal fold from 6-months old rats (A) and 18-months old rats (B)(black bar: $100 \mu\text{m}$, AB staining, $\times 400$). Hyaluronic acid (light purple colored region) in LP of 18-months old rats is more densely agglomerated than those of 6-months old rats. LP: lamina propria, AB: Alcian blue.



대의 단축, 노년 여성의 경우 성대 점막의 부종이 일어난다. 일반적으로 남성은 40~50대에 성대 점막이 가장 두꺼워지며 음성의 기본 주파수가 평균 10 Hz 정도 낮아지나, 연령의 고령화에 따라 성대가 가늘어지고 경직성이 증가하여 기본 주파수가 점차 증가하게 된다.^{5,6)} 여성의 경우 폐경기까지는 일정 상태를 유지하다가 폐경 후에 오는 생리적인 변화의 일부로 성대 점막의 부종성 변화로 인해 음성이 저음화되게 된다.⁷⁾

성대의 고유층은 세포와 기질의 분포에 따라 총 세 층으로 배열되어 있다. 이 중 상피층 바로 아래에는 성대의 진동에 중요한 역할을 하는 레인케 공간(Reinke's space)이 존재하며 이 층은 두껍고, 강한 섬유상 단백질과 함께 HA와 proteoglycan이 풍부하게 존재한다.^{8,9)} 중간과 심부는 성대인대(vocal ligament)를 구성하는 층으로, 성대의 긴장도를 유지하는 기능을 가진다. 각 층의 fiber들은 서로 뒤얽혀 있으며, 이러한 각 층의 공조를 통해 성대는 그 기능에 필수적인 점탄성(viscoelasticity)을 갖게 된다.⁹⁾

음성의 변화와 관련된 많은 요인 중 특히 조직학적인 변화에 대해서 살펴보면, Abdelkafy 등¹⁰⁾은 노화에 따라 점막 고유층의 절대적 콜라겐 성분이 증가된다 하였으며, Hirano 등¹¹⁾의 연구에서도 노화에 따라 콜라겐의 증가가 관찰되었다. Chen과 Thibeault¹²⁾의 연구에서 type I 콜라겐이 상대적으로 증가하는 반면에 조직의 회복과 성장에 관여하는 type III 콜라겐은 감소한다고 보고하였으며, 이는 성대의 fibroblast의 재생 능력이 노화에 따라 감소하는 것을 의미한다고 유추하였다.

본 연구에서도 전반적인 점막 고유층의 두께는 H&E 염색상 18개월의 경우가 6개월보다 육안적으로 얇아졌으며 밀도 역시 더 줄어든 것을 수치상으로 확인할 수 있었다. 또한 MTS 염색에서 나타나는 콜라겐의 밀도는 18개월의 그룹에서 더 증가해 있음이 관찰되어 노화에 따른 콜라겐의 축적이 있음을 알 수 있었다. 이러한 성대 고유층의 콜라겐 축적은 조직의 강도를 올려주고 결국 성대의 진동에 부정적인 환경으로 작용하게 된다.

HA는 역시 type I 콜라겐과 마찬가지로 fibroblast에 의해 생성되어 세포와 기질을 이루게 되는 물질로 성대의 점탄성에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹³⁾ 여러 연구에서 HA의 감소가 노화에 따른 궁형 성대화나 성대의 부종과 같은 성대의 구조적 변화에 직접적으로 작용한다고 보고하고 있다.¹⁴⁾ 본 연구에서도 Alcian blue 염색상 HA의 밀도가 감소해 있음을 확인하였고, 이는 노화에 따른 성대 구성 성분에서 HA가 핵심적인 역할을 한다는 것을 유추할 수 있었다.

따라서 노화에 따른 콜라겐의 축적과 HA의 결핍은 성대의 섬유화를 진행시켜 성대의 움직임이 둔화되는 원인이 되고 이는 본 연구에서도 MTS 염색상 노화된 성대의 섬유화가 현저

히 증가된 양상으로 확인되고 있으며 상대적으로 성대의 탄력성이 줄어들 것으로 예상할 수 있다. 이로 인해 성대의 진동에 변화가 생기게 되며 성문의 폐쇄가 점차 불완전해져 노화된 성대의 음성 변화가 나타날 것이라 예측할 수 있다.

이러한 조직학적 변화는 fibroblast의 활성화와 연관지어 설명되고 있는데, fibroblast는 성대 고유층의 세포와 기질의 가장 중요한 생산자이다. 노화에 따라 fibroblast의 수가 감소하는 것이 확인되었고, 동시에 세포내 골지체(golgi apparatus)와 소포체(endoplasmic reticulum)의 감소가 나타나 세포와 기질을 생성하는 능력이 저하되게 된다.^{15,16)} 따라서 성대의 노화를 치료하기 위해서는 fibroblast의 활성화와 세포의 기질 생성능의 향상을 통해 콜라겐 축적을 줄이고, HA의 생성을 촉진하는 방향의 연구가 필요할 것으로 사료된다. Hirano 등¹⁷⁾은 10명의 환자군을 상대로 basic fibroblast growth factor를 성대에 직접 주사하여 6개월간 추적관찰 후 주관적 증상, 스트로보상 이학적 소견의 호전, acoustic, aerodynamic 척도상의 호전을 관찰하여 보고하였다.

본 연구는 성대의 노화가 진행함에 따라 콜라겐 밀도가 줄어드는 반면에 섬유화가 증가한다는 점, 또한 HA는 줄어든다는 사실을 동물 실험을 통해 확인할 수 있었다. 또한 본 연구에서 나타나는 소견들은 앞서 진행된 human specimen을 대상으로 시행한 연구들과 결과가 일치하고 있어 향후 노화에 대한 연구를 위한 후두 모델로서 rat의 유용성을 확인할 수 있었다.

하지만, 본 논문의 한계점으로써 대상이 되는 검체의 수가 충분히 많지 않았으며 대상군의 연령 또한 다양하게 구성하지 못한 점, 또한 인간에서의 남성과 여성이 노화됨에 따라 발생하는 호르몬 양의 변화에 따른 성대의 조직학적 변화를 반영할 수 없다는 점을 생각해 볼 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 향후 조직학적 관찰의 범위를 넘어 fibroblast의 mRNA에 대한 분석이나 폐경과 연관된 호르몬 변화와의 연관성, 세포와 기질을 이루는 타 생화학적 지표에 대한 검사와 음성 및 공기 역학적 평가의 동물 모델을 적용함으로써 성대의 노화에 대한 원인적 분석 및 기능학적 분석을 시도하여 치료에 대한 연구를 위한 발판이 될 수 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgments

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea funded by the Korean Ministry of Education, Science and Technology (Grant no. NRF-2010-0004316) and by an Inha University research grant.

REFERENCES

- 1) Roberts T, Morton R, Al-Ali S. Microstructure of the vocal fold in elderly humans. Clin Anat 2011;24(5):544-51.

- 2) Kendall K. Presbyphonia: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;15(3):137-40.
- 3) Pontes P, Brasolotto A, Behlau M. Glottic characteristics and voice complaint in the elderly. *J Voice* 2005;19(1):84-94.
- 4) Takano S, Kimura M, Nito T, Imagawa H, Sakakibara K, Tayama N. Clinical analysis of presbylarynx--vocal fold atrophy in elderly individuals. *Auris Nasus Larynx* 2010;37(4):461-4.
- 5) Russell A, Penny L, Pemberton C. Speaking fundamental frequency changes over time in women: a longitudinal study. *J Speech Hear Res* 1995;38(1):101-9.
- 6) Mueller PB, Sweeney RJ, Baribeau LJ. Acoustic and morphologic study of the senescent voice. *Ear Nose Throat J* 1984;63(6):292-5.
- 7) Linville SE. Vocal aging. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;3(3):183-7.
- 8) Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope* 1999;109(6):845-54.
- 9) Hirano S, Bless DM, Massey RJ, Hartig GK, Ford CN. Morphological and functional changes of human vocal fold fibroblasts with hepatocyte growth factor. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112(12):1026-33.
- 10) Abdelkafy WM, Smith JQ, Henriquez OA, Golub JS, Xu J, Rojas M, et al. Age-related changes in the murine larynx: initial validation of a mouse model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007;116(8):618-22.
- 11) Hirano S, Bless DM, del Rio AM, Connor NP, Ford CN. Therapeutic potential of growth factors for aging voice. *Laryngoscope* 2004;114(12):2161-7.
- 12) Chen X, Thibeault SL. Characteristics of age-related changes in cultured human vocal fold fibroblasts. *Laryngoscope* 2008;118(9):1700-4.
- 13) Hirano S, Kishimoto Y, Suehiro A, Kanemaru S, Ito J. Regeneration of aged vocal fold: first human case treated with fibroblast growth factor. *Laryngoscope* 2009;119(1):197-202.
- 14) Honjo I, Isshiki N. Laryngoscopic and voice characteristics of aged persons. *Arch Otolaryngol* 1980;106(3):149-50.
- 15) Hirano M, Sato K, Nakashima T. Fibroblasts in geriatric vocal fold mucosa. *Acta Otolaryngol* 2000;120(2):336-40.
- 16) Sato K, Hirano M. Age-related changes of the macula flava of the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104(11):839-44.
- 17) Hirano S, Tateya I, Kishimoto Y, Kanemaru S, Ito J. Clinical trial of regeneration of aged vocal folds with growth factor therapy. *Laryngoscope* 2012;122(2):327-31.