



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 박사학위 논문

실험적으로 유도된 진주종
상피의 가역성에 대한 연구

아주대학교 대학원

의학과

이진석

실험적으로 유도된 진주종 상피의 가역성에 대한 연구

지도교수 박기현

이 논문을 의학 박사학위 논문으로
제출함.

2001年 2月

아주대학교대학원

의학과

이진석

이진석의 의학 박사학위 논문을
인준함.

심사위원장 (인)

심사위원 (인)

심사위원 (인)

심사위원 (인)

심사위원 (인)

아주대학교대학원

2000년 12월 22일

감사의 글

의과대학에 입학한 지가 얼마 되지 않은 것 같은데 벌써 수 많은 시간이 흘러 우여곡절 끝에 박사 과정을 마치게 된 데에는 수 많은 분들의 도움과 지도 격려가 없었다면 불가능 하였을 것입니다.

이비인후과를 시작하여 수련과정을 무사히 이수하고 본 연구를 마칠 때까지 오랜 기간 동안 저를 항상 올바른 길로 인도해 주시고 격려해 주신 박기현 학장님, 이비인후과 학문과 실험 연구에 끊임없는 조언과 지도를 해 주신 박홍준 교수님, 항상 새로운 지식과 아이디어로 어두운 길에 햇불 같으셨던 전영명 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 가까운 친 형님처럼 어려움이 있을 때마다 발 벗고 도와 주신 서경식, 고중화 선생님께도 감사의 말을 전합니다. 그리고 석·박사 기간 동안 연구에 여러모로 학문적 지도를 해 주신 정명현 교수님, 임인경 교수님, 하만준 교수님, 이영돈 교수님께도 감사 드립니다.

마지막으로 여러 가지로 부족한 제가 이 자리에 까지 오게 해 주신 부모님, 생각만 해도 항상 힘이나게 해 주는 제 아내 윤선이, 사랑스런 아들 토마스와 함께 이 기쁨을 함께하고 싶습니다.

2000년 12월

저자 씀

실험적으로 유도된 진주종 상피의 가역성에 대한 연구

조직의 파괴 및 이동, 비정상적인 증식 및 분화는 창상의 치유가 제대로 이루어지지 않는 경우에 볼 수 있는 현상으로 교대나 전환을 통해 이루어진다. 진주종 또한 증식 및 분화에 이상을 보이는 질환으로 알려져 있지만 염증이 있거나 감염이 된 진주종에서 비정상적인 분화 및 증식 현상이 발생하는 일인지는 밝혀지지 않았다 만약 이러한 현상이 감염이나 염증상태에만 일어나는 일이고 감염이나 염증과 같은 요소를 제거하면 정상 피부 상피와 같은 형태로 돌아간다면 진주종의 병인이 가역적이라고 할 수 있다. 실제 임상에서 진주종의 병인이 가역적일 수 있다는 가능성을 짐작할 수 있는데 외래에서 염증을 조절하고 케라틴을 제거함으로써 병의 진행이 멈춰진 상태가 지속되는 외이도 진주종이 그 예이다.

본 연구에서 저자는 진주종의 병인이 가역적이라고 가정하였고 이를 증명하기 위하여 Mongolian gerbil의 실험적 진주종 모델을 이용하여 실험 대상의 외이도 결찰을 통하여 얻은 실험적 진주종군과 진주종의 케라틴을 제거하고 처치를 한 치료군(실험군), 정상 심부 외이도 상피인 정상군으로 나누고 이들에게 증식표지인자로 알려진 PCNA, CK13/16에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하고, natural cell death로 apoptotic cell을

볼 수 있는 TUNEL 염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

PCNA, CK 13/16, TUNEL 염색 모두 케라틴을 제거하고 점액을 점적한 치료군은 진주종군보다는 정상 심부외이도 상피와 더 유사하였고 병기에 따라서는 조기의 진주종을 치료한 치료군이 진행된 병기의 치료군보다 정상 심부 외이도 상피와 더 유사한 양상을 보였다.

이 결과를 통하여 진주종에서 보이는 비정상적인 증식이나 조기 세포의 사멸은 가역적일 수 있다는 사실을 알 수 있었고 이 점이 향후 중이 진주종의 치료 방향 결정에 좋은 지침으로 쓰일 수 있을 것으로 생각한다.

핵심되는 말 진주종, 실험적 진주종, 상피 증식 및 분화, 가역성,
PCNA, CK13/16, TUNEL 염색

차 례

논문인준서	· · · · ·	i
감사의 글	· · · · ·	ii
국문 요약	· · · · ·	iii
차례	· · · · ·	v
그림차례	· · · · ·	vi
표 차례	· · · · ·	vii
I. 서론	· · · · ·	1
II. 재료 및 방법	· · · · ·	4
III. 결과	· · · · ·	7
IV. 고찰	· · · · ·	18
V. 결론	· · · · ·	24
참고문헌	· · · · ·	25
영문요약	· · · · ·	30

그림 차례

Fig.1 Expression of proliferation markers (PCNA, CK13/16) at normal skin and experimental cholesteatoma.	9
Fig.2 TUNEL staining at normal skin and experimental cholesteatoma.	10
Fig.3 PCNA staining at experimental cholesteatoma and treated experimental cholesteatoma (stage I, II).	11
Fig.4 PCNA staining at experimental cholesteatoma and treated experimental cholesteatoma (stage III, IV).	12
Fig.5 CK 13/16 staining at experimental cholesteatoma and treated experimental cholesteatoma (stage I, II).	13
Fig.6 CK 13/16 staining at experimental cholesteatoma and treated experimental cholesteatoma (stage III, IV).	14
Fig.7 TUNEL staining at experimental cholesteatoma and treated experimental cholesteatoma (stage I, II).	15
Fig.8 TUNEL staining at experimental cholesteatoma and treated experimental cholesteatoma (stage III, IV).	16

표 차 례

Table 1. Summary of results of immunohistochemistry and TUNEL staining in experimental cholesteatoma group and treated experimental cholesteatoma group.	17
--	----

실험적으로 유도된 진주종 상피의 가역성에 대한 연구

(지도교수 박 기 현)
아주대학교 대학원 의학과
이 진 석

I. 서론

중이 진주종은 임상적으로 골파괴나 강한 침습성향, 수술 후 높은 재발등의 임상적 성향과 세포생물학적으로 상피세포의 과증식과 세포분화의 이상을 보인다는 면에서 종양세포와 유사점이 있다. 그럼에도 불구하고 현재까지 분자생물학적연구나 유전학적인 어떠한 연구의 결과에서도 진주종은 실제 종양세포와는 완전히 구별된다. 즉 중이진주종은 감염이나 고막의 유착 등에 의해 유발되는 지속적인 염증반응의 결과 각종 염증의 매개인자들이 상피세포의 분화와 증식의 변화를 초래한다고 이해된다. 그러나 이러한 변화가 과연 가역적인 변화냐, 아니면 비가역적, 즉 한번 진주종으로 변화되면 정상적인 상피로 돌아올 수 있는지는 아직까지 많은 논란이 있다. 이러한 논란은 임상적으로 진주종은 어떠한 경우에서도 완전히 제거되어야 된다는 주장과 염증이 제거되고 진주종상피가 외부로 노출되

는 환경이 가능한 경우에는 보존될 수 있다는 주장이 맞서고 있는 이유가 된다. 저자는 중이진주종의 비정상적인 증식 및 분화가 감염이나 염증과 같은 특수한 환경속에서만 발생하는 현상이라고 가정하며, 따라서 진주종의 비정상적인 분화 및 증식은 가역적일 수 있다고 생각한다. 실제로 이러한 가능성은 임상에서도 간혹 볼 수 있는데 외이도 진주종 환자의 경우나 초기 진주종 환자의 경우 케라틴을 잘 제거하고 염증을 적절히 조절하면 시간이 지나도 특별한 문제가 생기지 않는 것이 그 실례이다. 하지만 진주종에 의해 내이에 누공이 발생되어 수술을 시행할 때, 누공을 덮은 진주종의 일부를 완전히 제거하지 않고 남겨 둔 경우 특별한 염증 반응 없이도 감음신경성 난청이 진행되는 경우도 있다. 이런 상반된 점들을 생각해 볼 때 아직까지도 증식 및 분화에 이상을 보이는 진주종이 다른 종양과 마찬가지로 증식 및 분화에 비가역적인 변화를 보이는 것인지, 아니면 케라틴 및 염증이 조절되면 정상적인 상피 세포의 특성으로 돌아갈 수 있는지에 대한 의문점이 제기되고 있지만 이를 입증하는 연구는 미비한 실정이다. 따라서 진주종 피부 상피세포 증식 및 분화의 이상이 염증이나 케라틴 축적과 같은 비 정상적인 조건을 정상적인 조건으로 변화시킬 때 증식 및 분화는 어떠한 양상을 보이는지 규명하는 것은 임상적으로 중요한 의미를 가질 수 있다.

저자는 진주종에게 정상적인 환경이 제공된다면 정상 상피 조직과 같은 증식 및 분화의 특성을 보일 수 있다는 가정 하에 이를 실험적 진주종 모델을 통하여 알아 보고자 하였다. 외이도 결찰을 통하여 실험적 진주종을 유도하고, 외이도 결찰을 풀고 케라틴을 제거한 후 외이도를 환기시키고 점액액을 점적한 군을 실험군으로, 외이도를 계속 묶고 아무런 처치를 하지 않은 군을 진주종군으로, 정상적

인 심부 외이도 상피 군을 정상군으로 삼았다. 이들 군간의 증식의 차이를 알고자 여러 가지 증식을 나타내는 표지인자들 중 PCNA, CK13/16을 이용하였고 세포 사멸의 차이를 알기 위하여 TUNEL 염색을 통하여 세포사멸(apoptosis)을 비교 관찰하였다. 진주종군과 실험군을 병기에 따라 나누어 관찰하여 이들이 병기에 따라 어떤 변화가 있는지 알아보았으며, 분화 및 증식에 이상을 보인 진주종의 변화가 가역적인 변화인지 비가역적 변화인지를 알아봄으로써 앞으로 중이 진주종의 치료방향 결정에 도움이 되고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. 실험 재료

실험 동물은 정상 고막을 가진 성숙한 Mongolian gerbil (*Merione unguiculatus*) 20마리를 대상으로 하였으며 20 마리 중 18마리는 양귀에 외이도 결찰을 시행하였고 나머지 2마리는 정상군으로 하였다.

B. 실험 방법

1. 실험적 진주종의 유발

McGinn 등이¹ 사용한 방법처럼 Mongolian gerbil의 양쪽 귀에 외이도 결찰을 하여 실험적 진주종을 유도하였다. 이들에게 Xylazine과 Ketamine hydrochloride를 근육 주사한 후 귀 뒤의 피부를 절개하여 외이도 연골이 확인 될 때 까지 박리한 후 외이도에 손상이 없도록 주의하면서 봉합사를 이용하여 외이도를 결찰하였다.

2. 실험적 진주종의 병기 분류

외이도 결찰 기간을 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월로 서로 다르게 나누었다. 외이도 결찰로 유발된 진주종은 그 정도에 따라 Chole의 분류에 따라 stage I-V까지 구분할 수 있다.² stage I은 고막의 위치 변화 없이 케라틴이 외이도에 가득 찬 경우이고, stage

II는 고막이 안으로 밀려들어 왔으나 와우에는 도달하지 않는 경우, stage III는 고막이 와우와 접촉한 경우, stage IV는 골포 전체가 진주종으로 가득 찬 경우, stage V는 진주종이 두 개강으로 진행된 경우이다. 진주종 병기의 확인은 Mongolian gerbil을 국소마취 후에 후이개 상피를 절개하고 골포를 일부 제거한 후 안을 관찰하여 판정하였다.

3. 진주종군, 정상군과 치료군(실험군)의 선정

실험군으로 치료군은 양쪽 귀중 한쪽귀의 결찰을 풀고 케라틴을 완전히 제거하고 외이도에 환기를 유지시키고 Ofloxacin 점액을 점적하여 귀의 청결을 유지한 후 외이도가 완전히 마르고 외견 상 염증의 소견이 없을 때 까지 국소 치료를 하였는데 2주가 소모되었다. 치료 후 측두골 절편을 얻기 위해 측두골을 분리한 후 10% formaldehyde에서 고정하고 5% EDTA로 약 3주간 탈석회화하였다. 조직은 파라핀에 포매한 후 5 μ m의 두께로 연속절편을 만들어 실험에 사용하였다. 치료를 하지않은 반대쪽 진주종을 진주종군으로 삼았고 정상 심부 외이도 상피를 정상군으로 삼고 같은 과정을 통하여 조직 절편을 얻었다. 조직 절편 중에서 각 군에서 같은 부위에 해당하는 고막에 인접한 절편들을 비교하여 실험에 사용되었다.

4. 면역조직화학적 염색

염색을 위해 준비된 조직 절편을 탈파라핀시키고 탈수한 다음 3% 과산화수소수로 내재성 peroxidase를 억제시킨다. 상피 증식의 표지인자로 1차 항체인 항PCNA(Dako, Carpinteria, CA, U.S.A.), 항CK 13/16(Sigma chemical company, St. Louis, U.S.A.)를 각각 1:100,

1:20으로 희석한 후 4 °C에서 12시간 반응시켰고, 이차 항체를 처리한 후 ABC (avidine-biotin peroxidase complex)법으로 염색한 후 AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Vector, CA, U.S.A.) 로 발색하였다. 대조 염색은 Harris hematoxylin을 사용하였다.

5. TUNEL 염색

면역조직화학적 염색법과 동일한 방법으로 준비된 조직절편에 In situ Apoptosis Detection Kit(Takara Shuzo Co., Japan)을 이용하여 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)와 labeling 혼합용액을 투여하고 37 °C, 90분간 습한 용기내에서 반응시켰다. 반응 종료 후 다시 PBS로 세척하고 (10분, 3회) anti-FITC HRP conjugate와 37 °C 30분간 반응시켰다. 발색은 AEC, 대조염색은 Harris hematoxylin을 사용하였다.

6. 결과 분석

진주종균 상피, 치료군의 상피 및 심부 외이도 상피를 기저층(basal layer)과 기저 상층(suprabasal layer)으로 나누어 염색의 강도를 비교 하였다. 염색 반응 정도에 따라 반응이 나타나지 않은 경우를 음성(negative, -)으로, 반응이 애매한 경우를 모호성(equivocal, ±)으로, 약하게 염색된 경우를 양성(positive, +)으로, 강하게 염색된 경우를 강양성(strong positive ++)으로 분석하였다.

TUNEL 염색은 실험적 진주종 상피와 정상 심부 외이도 상피를 비교하여 사람에서 보고된 결과와 동일하게 TUNEL 양성세포가 현저하게 증가됨이 확인된 후 치료군과 진주종균을 비교하였다.

III. 결과

A. 각 병기의 진주종균, 치료군의 수 및 정상 심부 위이도 상피의 수

위이도 결찰을 시행한 Mongolian gerbil 18마리를 2개월 후부터 매달 각각 3마리를 한쪽은 진주종균 한쪽은 치료군으로 나누어 진행한 결과 실험적 진주종 균이 stage I이 3귀 stage II가 3귀, stage III가 3귀, stage IV가 2귀였다. 각 병기에 따른 치료군의 수도 동일하였다.

한쪽 귀 또는 양쪽귀에서 실험적 진주종이 유도되지 않은 Mongolian gerbil은 실험에서 제외 시켰는데 이들이 4마리였고 사망하여 실험이 불가능해진 Mongolian gerbil이 3마리였다.

B. 면역조직화학적 염색 (Figure 1, Figure 3-6)

1. PCNA

진주종 상피의 경우 기저층뿐만 아니라 기저상층에서도 양성 발현되는 세포를 많이 발견할 수 있었다. 병기 별로는 stage I,II와 같은 초기 단계인 경우보다 stage III,IV와 같이 진행된 경우에 기저상층에 더 많은 양성 발현을 관찰할 수 있었다.

치료군에서는 기저층에는 약하게 양성 발현을 보였지만 기저상층

에는 거의 발현이 되지 않아 심부 외이도 상피와 비슷한 양상을 보였다. 병기 별로는 stage IV에서만 기저층이 강하게 기저상층이 약하게 양성 발현을 보였다.

2. CK 13/16

진주종 상피에서는 CK 13에 의하여 기저층이 발현되고 과증식을 볼 수 있는 CK 16에 의하여 기저상층에서도 양성 발현되는 세포를 많이 발견할 수 있었다. 병기 별로는 stage I,II와 같은 초기 단계인 경우보다 stage III,IV와 같이 진행된 경우에 기저상층에 더 많은 양성 발현을 관찰할 수 있었다.

치료군에서는 기저층에는 약하게 양성 발현을 보였지만 기저상층에는 발현이 되지 않아 심부 외이도 상피와 비슷한 양상을 보였지만 stage IV의 경우 기저층이 강하게 기저상층이 약하게 양성 발현을 보였다.

C. TUNEL 분석 (Figure 2, Figure 7-8)

TUNEL 염색의 결과를 보면 진주종에서 TUNEL 양성인 세포가 증가되어 있고 치료군의 경우는 TUNEL 양성인 세포 수는 정상 심부 외이도 상피와 비슷하였다. 각 stage에 따라 큰 차이는 보이지 않았지만 진행된 경우(stage IV)에는 진주종과 유사한 특성을 보였다.

Proliferation markers

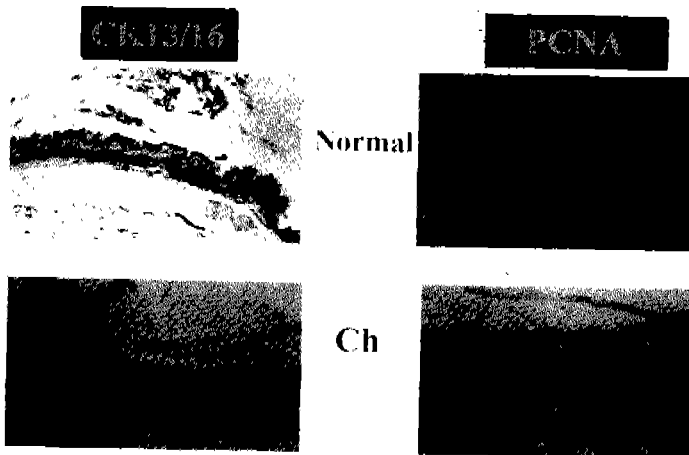


Fig.1 Expression of proliferation markers (PCNA, CK13/16) at normal skin and experimental cholesteatoma(Ch).

Cholesteatoma in basal layer and suprabasal layer were stained. However, normal skin in basal layer were stained.

TUNEL staining

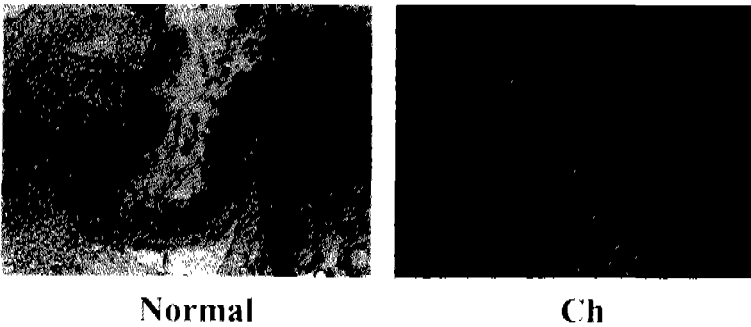


Fig.2 TUNEL staining at normal skin and experimental cholesteatoma(Ch)

Cholesteatoma in superficial layer and deep layer were stained. However, normal skin in superficial layer were stained.

PCNA

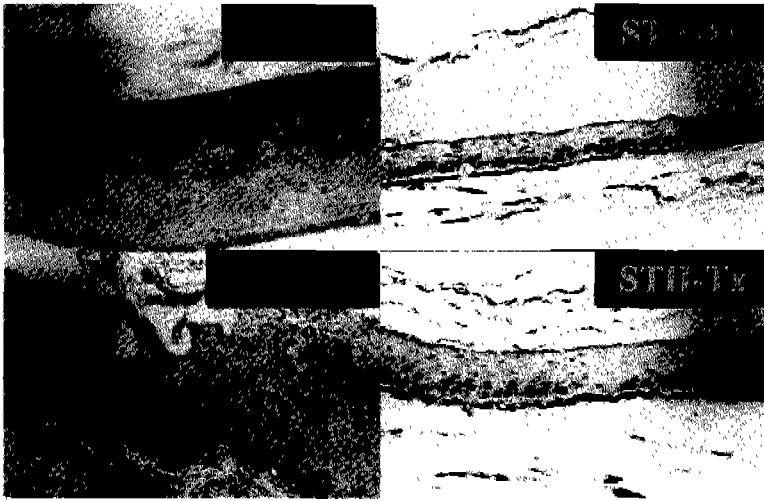


Fig.3 PCNA staining at experimental cholesteatoma and treated experimental cholesteatoma (stage I, II).

(ST : stage, Ch : experimental cholesteatoma,
Tx : treated experimental cholesteatoma)

Experimental cholesteatoma in basal layer and suprabasal layer were stained. However, treated experimental cholesteatoma in basal layer were stained.

PCNA

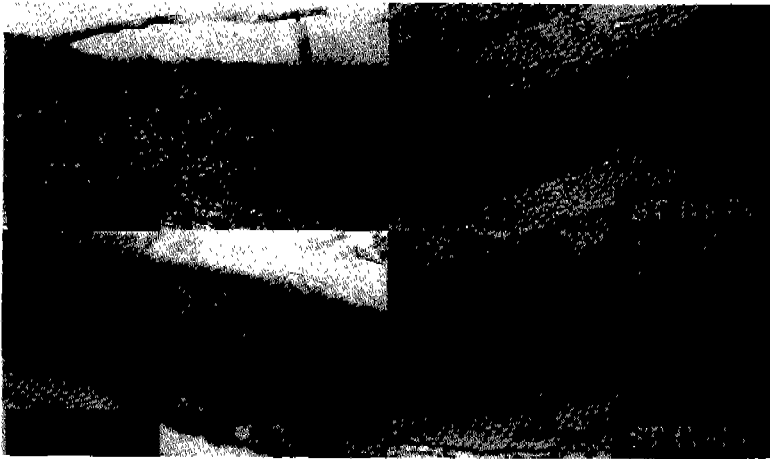


Fig.4 PCNA staining at experimental cholesteatoma and treated experimental cholesteatoma (stage III, IV).

(ST : stage, Ch : experimental cholesteatoma,
Tx : treated experimental cholesteatoma)

Experimental cholesteatoma in basal layer and suprabasal layer were stained. However, treated experimental cholesteatoma in basal layer were stained.

CK 13/16

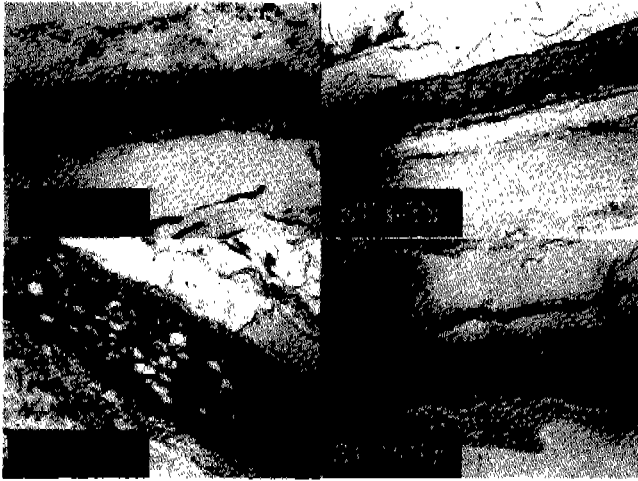


Fig.5 CK 13/16 staining at experimental cholesteatoma and treated experimental cholesteatoma (stage I, II).

(ST : stage, Ch : experimental cholesteatoma,
Tx : treated experimental cholesteatoma)

Experimental cholesteatoma in basal layer and suprabasal layer were stained. However, treated experimental cholesteatoma in basal layer were stained.

CK 13/16



Fig.6 CK 13/16 staining at experimental cholesteatoma and treated experimental cholesteatoma (stage III, IV).

(ST : stage, Ch : experimental cholesteatoma,
Tx : treated experimental cholesteatoma)

Experimental cholesteatoma in basal layer and suprabasal layer were stained. However, treated experimental cholesteatoma in basal layer were stained.

TUNEL staining

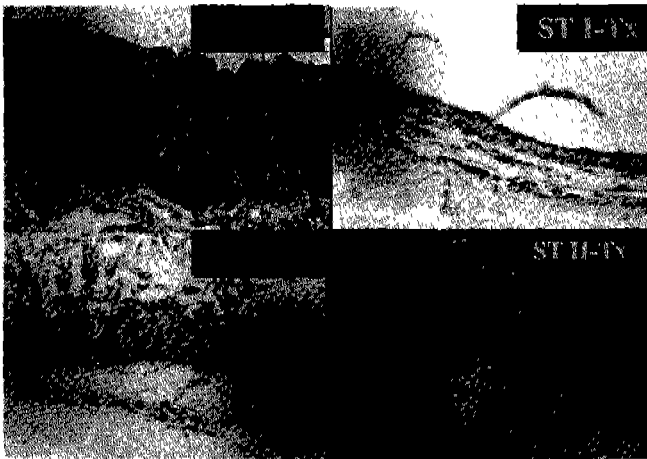


Fig.7 TUNEL staining at experimental cholesteatoma and treated experimental cholesteatoma (stage I, II).

(ST : stage, Ch : experimental cholesteatoma,
Tx : treated experimental cholesteatoma)

Experimental cholesteatoma in superficial layer and deep layer were stained. However, treated experimental cholesteatoma in superficial layer were stained.

TUNEL staining



Fig.8 TUNEL staining at experimental cholesteatoma and treated experimental cholesteatoma (stage III, IV).

(ST : stage, Ch : experimental cholesteatoma,
Tx : treated experimental cholesteatoma)

Experimental cholesteatoma in superficial layer and deep layer were stained. However, treated experimental cholesteatoma in superficial layer were stained.

표 1. 진주종균과 치료군의 면역조직화학염색과 TUNEL 염색의 결과

Table 1. Summary of results of immunohistochemistry and TUNEL staining in experimental cholesteatoma group and treated experimental cholesteatoma group.

	PCNA		CK13/16		TUNEL	
	CH		CH		CH	
	B	Tx	B	Tx	B	Tx
	SB	SB	SB	SB	SB	SB
ST I	++ +	+ -	++ +	+ -	+ ++	- ±
ST II	++ +	+ -	++ +	+ ±	+ ++	- ±
ST III	++ ++	+ -	++ ++	+ ±	+ ++	± +
ST IV	++ ++	++ +	++ ++	+ +	+ ++	± +

-: negative, ± : equivocal, + : weak positive, ++: strong positive

B: basal keratinocyte, SB : suprabasal keratinocyte, CH : cholesteatoma group, Tx: treatment group

IV. 고찰

중이 진주종은 중이강 내에 각화된 편평상피가 존재함으로써 유발되는 비교적 흔한 질환으로 중이강 내에 피부 상피가 존재하면 지속적인 염증반응을 유발하여 상피의 증식 및 분화에 이상을 초래하고 결과적으로 진주종의 특성인 골파괴 현상이 생겨 이소골 파괴 및 소실에 의한 청력장애, 내임파 누공 및 두개내 합병증 등을 유발하는 질환이다. 즉, 중이 진주종은 골파괴를 일으켜서 여러 합병증을 일으킬 수 있는 질환이다.

최근 진주종 병인에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 세포생물학이 발전하면서 사이토케라틴이나 상피의 증식 및 분화의 표지인자를 이용한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.^{3,4,5,6,7,8} 사람의 진주종이나 여러 방법을 통하여 실험적으로 유도된 진주종에서^{2,9,10,11,12} 진주종의 증식 및 분화의 이상을 증명하였고 분화의 최후과정인 세포의 사멸은 apoptosis의 특수한 형태로 진행되고 있다고 알려져 있다.^{4,13} 또한 이러한 분화 및 증식에 이상이 염증 반응의 산물인 여러 가지의 EGF나 cytokine 등에 의한 외부 신호가 PLC- γ 등의 inositol pathway에 의해 이차신호 전달체계로 전달됨으로써 이루어진다고 알려지고 있지만¹⁴ 자세한 신호전달체계나 이들이 어떻게 조절되는지는 알려지지 않았다. 이렇듯이 정상적인 피부 상피의 경우 증식 및 분화가 상호 보완관계를 가지며 세포층을 일정하게 유지하는데^{15,16} 반하여 진주종은 다른 피부 상피에서 발생하는 종양과 비슷

하게 세포의 과증식 및 변화된 분화양상을 보여 종양과도 유사한 특성을 가지고 있다.

하지만 진주종은 종양과 비슷한 성향을 보이지만 일반적인 종양과는 달리 염증에 의한 여러 가지 매개 물질들에 의해 병이 진행되는 질환이다. 처음에는 이러한 진주종의 변화된 특성 때문에 진주종이 양성 종양의 일종으로 생각되었으나 조직학적인 연구를 통해 종양과 확연하게 구별되는 염증성 질환임이 밝혀졌다. 결국 진주종은 종양과 비슷한 특성을 보이지만 종양과는 구별되는 질환이다. 진주종의 형성과정에서 나타나는 많은 분자 생물학적 물질들은 상피세포가 transformation되는 과정에서 발견되는 물질들과 유사한 것들이라는 주장이 계속되고 있다. 한 예로 EGFR의 분비증가와 활성화는 정상 상피와는 달리, 기저상피세포층에서 관찰되며, 정량적으로 75% 이상 증가되었다. 또한 진주종 상피의 전 층에서 TGF- α 의 증가발현은 공통된 소견이다. 따라서 진주종상피 내에서 이러한 물질들이 autocrine stimulation 형태를 띠기 때문에 진주종이 중이강 내에서 종양과 같이 성장의 제한 없이 자랄 수 있다는 가설이 뒷받침된다. 그러나 최근에 진주종의 DNA 분석을 한 연구의 결과에 따르면, 진주종은 정상적인 상피와 같은 이배체인 염색체 수를 갖고 있음이 확인되어 low grade neoplasm 혹은 premalignant neoplasm으로 보는 견해를 일축하였다. 그렇다면, 과연 진주종은 어떠한 질환이냐는 원천적인 의문은 아직도 완전히 풀리지 않고 있다. 이에 대한 견해 중 최근까지 가장 지지를 받고 있는 주장은 진주종에서 초래되는 유전학적 변화는 염색체 수준이 아니라 유전자 수준이라는 것이다. 다시 말해 진주종의 성장과 침습성향은 세포의 분화조절기능의 일시적인 장애에 기인된 것이라는 주장이다. 즉, 진주종의 결체조직

성분이나 국소적인 주위환경에서 분비되는 여러 성장 인자, lymphokine, 그리고 cytokine의 uncoordinated production이 uncontrolled 성장을 초래한다는 설이다. 이러한 현상은 임상적으로 진주종이 급성기의 감염이나 염증반응이 있는 경우에 더욱 특징적으로 나타나며, 감염이나 염증이 거의 없는 경우에는 매우 약하다.

동물에서 실험적으로 진주종을 유발하는 방법으로는 종이강내에 propylene glycol이나^{13,17,18,19} chemical irritant를 투여하거나^{12,20}, 이관을 폐쇄하여 진주종을 유발하는 방법^{19,21}, 외이도를 폐쇄하는 방법^{1,3,7}, 종이강내에 자가 피부를 이식하는 방법^{4,22} 등이 있다. 이러한 방법들 중에서 진주종의 가역성을 연구하는데 외이도결찰에 의해 유도한 Mongolian gerbil모델은 여러 가지 장점을 갖고 있다. 첫째로 진주종이 유도된 후 지속적인 성장이 가능하며, 둘째로 일단 형성된 진주종을 외과적으로 쉽게 제거할 수 있다. 셋째로 진주종의 세포생물학적인 특성이 사람의 종이 진주종과 거의 동일한 특성을 보인다. 다만 gerbil의 특성은 외이도 상피가 다른 종과 비교할 때 정상적으로 높은 과증식성향을 띠고 있기 때문에 자연 외이도진주종이 잘 유도된다는 점이다. 이러한 특성은 본 연구에서 실시한 TUNEL 염색의 결과에서도 엿볼 수 있다. 즉 정상 상피와 비교해 볼 때 사람의 진주종과 gerbil의 외이도 진주종상피에서 TUNEL염색된 세포는 현저히 증가되었으나, 사람의 경우 TUNEL염색에 양성인 세포는 기저상층에서만 관찰된 반면, gerbil의 경우 일부 기저세포에서도 관찰됨을 알 수 있었다. 이러한 차이는 독특한 증식과 분화특성을 보이는 gerbil의 특성으로 생각된다.

PCNA는 분자량 36 kd의 DNA polymerase δ 의 보조단백으로 증

식하는 세포에서만 증명되는 nuclear antigen과 반응하는 자가항체이다. 1978년 Miyachi 등이 처음 발표한 이 단백질은²³ G1 후기에 핵내에서 발현되기 시작하여 S기에 최고로 도달하며 G2 및 M기에 감소한다고 알려져 있다.^{24,25} PCNA level은 휴지기의 세포에는 미약하게 존재하지만 증식 중의 세포에는 증가하여 세포의 증식에 결정적인 역할을 하고 세포 증식을 아주 잘 표현하는 핵 단백질로 알려져 있다.^{26,27} 진주종의 연구에도 PCNA는 자주 이용되고 정상 상피 세포와는 달리 진주종에서는 기저층만이 아니라 기저상층에서도 PCNA 양성인 세포를 볼 수 있어 진주종에서는 증식도가 증가되었음을 알려주고 있다. 본 연구에서도 진주종군의 PCNA 양성 세포는 많이 증가하였고 그 층이 기저 상층까지 확장되었지만 치료군의 결과에서 stage I, II, III는 정상 상피와 유사하였고 stage IV는 진주종과 유사한 양상을 보였다. 이는 진주종이 너무 진행된 경우에는 진주종의 처치가 불완전하거나 치료기간이 짧았기 때문인 것으로 생각되었다.

Cytokeratin은 세포의 구조 골격을 구성하는 여러 성분 중 40에서 60 kd의 분자량을 가지는 비수용성의 중간세사로 이들의 종류는 여러 가지가 있고²⁸ 각 조직의 종류, 각 종, 세포의 성장과정, 질병의 상태에 따라 뚜렷한 기본 단위의 차이가 있어²⁹ cytokeratin의 기본 단위의 변이에 대한 연구를 통하여 질환의 기원 기관을 알 수 있을 정도이다.^{28,30,31} 이들 중 cytokeratin 16은 건선, 지루성 피부염, 편평상피암 등과 같이 과증식 질환에서 볼 수 있는 cytokeratin이고^{32,33} cytokeratin 13은 미분화된 상피의 기저 층에서 발견되는 cytokeratin으로³⁴ 진주종에서도 많은 연구가 진행되어 정상 상피와는 달리 진주종에서 다른 과증식 질환과 마찬가지로의 결과를 보인다

고 알려져 있다.⁵ 본 연구에서도 진주종균의 경우 과증식 성향을 보였지만 치료군은 정상 상피와 비슷하였고 본 연구의 PCNA 결과와도 일치 하였다. 임상적으로 중이 진주종의 치료는 수술을 통하여 진주종을 완전히 제거하고 청력을 복원시키는 방법이 이용되고 있다. 하지만 최근에는 과거에 비하여 진주종이 초기인 상태로 발견되는 예가 흔하여 이런 경우 과거와 같이 destructive한 수술을 시행해야 하는 지에 대한 의문점이 제기되고, 진주종에 의해 내이 누공이 있는 경우 진주종 상피를 일부 남기고 수술을 할 것인지, modified radical mastoidectomy를 시행하는 경우 진주종의 내측 피부 상피를 남길 것인지의 여부에 대한 논란은 아직도 지속되고 있다. 진주종에 의한 골과피가 진주종의 과증식 및 분화의 이상에서 오는 과케라틴 형성이나 염증 반응에 의한 여러 분비 물질에 매개되어 일어나는 것이 확인되었다. 만약에 이와 같은 원인 요소를 제거하는 경우 진주종이 다시 정상화되어 정상 상피와 같은 성질을 가지게 된다는 것이 증명된다면 진주종의 치료 방법 설정에 아주 좋은 지표로 이용될 수 있을 것이다.

본 실험의 결과를 보면 치료군의 분화인자 및 TUNEL 염색의 발현이 정상군 과 비슷하게 나타나서 진주종의 성장 및 세포 사멸의 변화가 결국 종양과는 달리 가역적일 수 있다는 것을 증명하였다. 물론 외이도 결찰을 통한 실험적 진주종이 중이 진주종과는 차이가 있을 수 있지만 저자들은 진주종은 특수한 환경속에서 병이 진행될 수 있으며 이러한 환경을 제거하는 경우에는 정상으로 환원될 수 있다고 생각한다. 저자들의 결과에서도 진주종이 상당히 진행된 stage III,IV의 경우에는 처치를 시행한 실험군의 결과가 진주종과 유사한 결과를 보였는데 이는 진주종에서 케라틴을 제거하거나 염

증을 조절하는 것이 현실적으로 어려워서 이러한 결과가 나왔을 것으로 생각되고 이러한 점은 임상에도 연결되리라고 생각된다. 결국, 모든 중이 진주종의 치료에는 적용될 수 없지만 합병증이 동반되지 않은 초기의 진주종이나 외이도 진주종과 같이 경우 수술적 치료 없이 간단한 처치나 약물치료로 진주종의 염증을 제거하고 환기를 시킬 수 있다면 그 자체가 병의 진행을 막는 치료로 이용될 수 있을 것이다.

V. 결론

진주종 상피의 증식 및 세포 사멸의 변화가 가역적인 것인지의 여부를 알아보기 위하여 Mongolian gerbil을 이용하여 실험적 진주종을 유도한 군과 유도된 진주종의 결찰을 풀고 케라틴을 제거한 후 처치를 시행한 실험군 및 정상 심부 외이도 상피에 PCNA, CK13/16, TUNEL 분석을 통해 이들의 증식 및 세포 사멸을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

치료를 한 실험군은 진주종군보다는 정상 상피에 가까운 증식이나 세포 사멸을 보였다. 이는 진주종의 비정상적인 증식이나 변화된 세포의 사멸이 가역적이라는 사실을 뒷받침한다. 결국 진주종은 종양과 같은 비가역적인 질환이 아니라 염증이나 감염, 케라틴의 축적과 같은 비정상적인 환경에서는 종양과 같은 성질을 보이지만 비정상적인 환경을 제거하면 종양과 같은 성질은 정상으로 변화된다. 결국 진주종의 과증식 성향이나 세포의 조기 사멸 같이 진주종의 임상적 특성을 나타내는 변화가 가역적인 것이라면 이 결과는 진주종의 치료 방침이나 방법의 결정에 중요한 지표로 자리 잡을 것이다.

VI. 참고 문헌

1. McGinn MD, Chole RA, HenryKR: Cholesteatoma ; experimental induction in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Acta otolaryngol (stockh)*. 93:61-7,1982.
2. Chole RA, HenryKR, McGinn MD: Cholesteatoma ; spontaneous occurrence in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Am J Otol*. 2:204-10,1981.
3. Chun YM, Park K: Hyperproliferative characteristics in human deep meatal epidermis. *Korean J Otolaryngol*. 40:56-62,1997.
4. Park HJ, Park K: Expression of Fas/APO-1 and apoptosis of keratinocytes in human cholesteatoma Laryngoscope. 109:613-16,1999.
5. Park K, Chun YM, Koo SM, Kim SK: Mitotic activity of tympanic membrane and external auditory canal skin in normal mongolian gerbil. *Korean J Otolaryngol*. 40:976-83, 1997.
6. Park K, Chun YM, Park HJ: Cytokeratin expressions of induced cholesteatoma in gerbil. *Korean J Otolaryngol*. 39: 747-53,1996.
7. Park K, Chun YM, Park HJ: Cytokeratin

- immunohistochemistry of acquired cholesteatoma in middle ear. Korean J Otolaryngol. 37:5-13,1994.
8. Park K, Park HJ, Chun YM, Lee JS, Kim HJ: Immunohistochemical study for differentiation of human middle ear cholesteatoma. Korean J Otolaryngol. 4:1521-26, 1998.
 9. Park HJ, Chun YM, Park K: Experimentally induced aural cholesteatoma in the gerbil. Korean J Otolaryngol. 38: 329-33,1995.
 10. Park K, Chun YM, Kim SM, Lee DH: Experimental cholesteatoma by transplanting a free skin graft in the bulla of mongolian gerbil. Korean J Otolaryngol. 39:1138-43, 1996.
 11. Steinbach E; Experimental studies on cholesteatoma formation. Acta Otolaryngol(Belg). 34:56-61,1980.
 12. Vassali L, Harris DM, Gradini R: Propylene glycol induced cholesteatoma in chinchilla middle ear. Am J Otolaryngol. 100:157-61,1988.
 13. Kojima H, Tanaka Y, Tanaka T: Proliferation and apoptosis in human middle ear cholesteatoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 124:261-64,1998.
 14. Lee DH, Park K, Park HJ., Chun JM, Hwang SC: Signal transduction system of experimentally induced cholesteatoma in the morgolian gerbil. Korean J Otolaryngol. 42:679-85,1999
 15. Albino AP, Kimmelman CP, Parisier SC: A molecular and cellular puzzel. Am J Otol, 19:7-19,1998.

16. Bujia J, Spiies I: Epidermal tissue homeostasis. Cell tissue Res. 256:475-86,1989.
17. Huang CC, Shi GS, Yi ZX: Experimental induction of middle ear cholesteatoma in rats. Am J Otolaryngol. 9:165-72,1988.
18. Masaki M, Wright CG, Lee DH, Meyerhoff WL: Experimental choesteatoma epidermal ingrowth through tympanic membrane following middle ear application of propylene glycol. Acta Otolaryngol(Stockh). 108:113-121,1989.
19. Steinbach E: Experimental studies on cholesteatoma formation. Acta Otorhinolaryngol(Belg) 34:56-61,1980
20. Wright CG, Meyerhoff WL, Burns DK: Middle ear cholesteatoma. an animal model. Am J Otolaryngol. 6:327-341 1985
21. Wolfman DE, Chole RA. Experimental retraction pocket cholesteatoma. Ann Otol Rhinal Laryngol. 95:639-44,1986
22. Noguchi M' Experimentelle Studien ueber cholesteatom des ohres. Mitteilung Versuch von Autotransplantation des Epitheles des ausseren Gehoergangs in die Paukenhohle, J Otolaryngol Jpn. 42:1583-607,1986
23. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferaing cells. J Immunol. 121: 2228-34,1978
24. Bravo R, Frank R, Blundell PA, McDonald BH
Cyclin/PCNA is the auxillary protein of DNA

- polymerase-delta. *Nature*. 326:515-17,1987
25. Mathews MB, Bernstein RH, Franza JB, Garrels JI: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*. 309:374-76,1984
 26. Celis JZ, Bravo R, Larsen PH, Fey SJ: Cyclin; A nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. *Leukemia Research*. 8:143-57,1984
 27. Robins BA, De La Vega D, Ogata Tan TM, Nakamura RH: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med*. 111:841-45,1987
 28. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Gieger B, Krepler R: The Catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumor and cultured cells. *Cell*. 31:11-24, 1982
 29. Culbertson VB, Freedberg IM: Mammalian epidermal keratin. *Biochimica Biophysica Acta*. 387:178-91,1977
 30. Franke WW, Schiller DL, Moll R, Wither S, Schmid E, Engelbrecht I: Diversity of cytokeratins. *J Mol Biol*. 153: 993-59,1981
 31. Said JW: Immunohistochemical localization of keratin proteins in tumor diagnosis. *Hum Pathol*. 14: 1017-18,1983
 32. De Mare S, Van Erp PEJ, Van De Kerkhof PCM: Epidermal hyperproliferation assessed by the monoclonal antibody K8.12 on frozen sections. *J Invest Dermatol*. 92: 130-31,1989

33. Weiss RA, Eichner R, Sun TT: Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal disease: a 48 and 56K dalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. J cell Biol. 98:1397-406,1984
34. Sasaki H, Huang CC: Expression of cytokeratins 13 and 16 in middle ear cholesteatoma. Otolaryngol Head Neck Surg. 110 310-17,1994

=Abstract=

**Reversibility for epithelium of experimentally
induced cholesteatoma in Mongolian gerbil**

Jin-Suk Lee

Dept. of medical science

The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Keehyun Park)

Clinical characteristics such as invasion, migration, uncoordinated proliferation, and altered differentiation may arise as a result of defective wound healing process, induction of preneoplastic transformation or genetic alteration. To date, a number of genes have been shown to be differentially regulated in cholesteatoma, which might be responsible for these clinical characteristics. However, it is still unclear whether these phenomena is only overt when cholesteatoma is under specific conditions such as inflammation or infection etc. If these genetic alterations in

the development of cholesteatoma are transient, the pathology of cholesteatoma may be reversible. In fact, this reversibility of cholesteatoma may be frequently experienced in patients with ear canal cholesteatoma. We hypothesized that once cholesteatoma is in a normal environment, the cellular or molecular pathology of cholesteatoma can return to normal epidermal characteristics. The aim of this study was to determine whether common molecular characteristics are reversible or not after removal of inductive factors in induced experimental cholesteatoma in gerbils. In this study, induced experimental cholesteatoma was made by ligation of external auditory canal using Mongolian gerbil. With several proliferation and differentiation markers, we examined differences between treated skin and untreated cholesteatomatous skin. Our results showed that they were reversible. Even though there are some differences in pathogenesis between middle ear cholesteatoma and induced aural cholesteatoma, we believe that their characteristics are not irreversible like neoplasms. They may be overt only when the cholesteatoma is under specific conditions. Also, these results encourage our belief that some cholesteatomas, especially early staged cholesteatoma, might be managed with only minimal treatments such as control of inflammation and maintenance of adequate ventilation.

Key Words : cholesteatoma, differentiation, proliferation
experimental cholesteatoma, reversibility,
PCNA, CK13/16, TUNEL stain