

## 중이진주종의 과증식성향에 대한 면역조직화학적 연구

아주대학교 의과대학 이비인후과학교실

엄 주 현 · 전 영 명 · 박 기 현

### Hyperproliferative Characteristics of Human Middle Ear Cholesteatoma

Ju-Hyun Eum, Young-Myoung Chun and Keehyun Park

Department of Otolaryngology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Human epidermis is a continuously dividing tissue, in which the keratinocytes gradually differentiate and mature while moving from the basal cell compartment to the upper cell layers. However, cholesteatoma is characterized by the presence of squamous epithelium invading the middle ear. This epithelium is believed to have hyperproliferative properties. Using immunohistochemical techniques, we investigated the reaction pattern of monoclonal antibody to PCNA and cytokeratin 16 as proliferating markers, and of monoclonal antibody to cytokeratin 13 and DBA as basal cell markers in the cholesteatoma to determine whether the number of proliferating cells is increased, and whether proliferating cells are found beyond the basal cell layer in cholesteatoma.

The results were as follows:

- 1) When the tissues were stained with the proliferating markers PC10 and K8.12, the normal epithelium of ear canal showed focal staining in the basal cell layer, whereas epithelium of cholesteatoma showed dense, diffuse staining not only in the basal cell layer but also in the suprabasal cell layer.
- 2) When the tissues were stained with the basal cell markers KS-1A3 and DBA, both epithelium of the normal ear canal and of cholesteatoma showed staining in only a single basal cell layer.

These results suggest that increased epidermal cell proliferation in cholesteatoma may be due to increased proliferative activity in suprabasal keratinocytes as well as in the basal compartment.

**Key Words:** Cholesteatoma, Hyperproliferation, Immunohistochemistry

## 서 론

중이진주종은 조직학적으로는 중이강내 각화성 편평상피가 존재하는 것으로 정의되며, 임상적으로는 주위

저자연락처: 엄주현, (442-749) 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5번지, 아주대학교 의과대학 이비인후과, Tel (0331)-219-5265

골조직을 파괴함으로써 여러 합병증을 유발한다. 그러나 진주종의 발생기전에는 아직도 많은 논란이 있으며 임상적으로 여러 유형의 진주종이 각각 다른 발생기전으로 설명되고 있다. 즉 고막천공이나 retraction pocket 등을 통해 외이도나 고막의 상피세포가 침입하여 형성될 수 있으며, 기저상피세포들의 증식 혹은 고실성형술 등의 술후 합병증으로도 유발될 수 있다. 또한 중이점막

상피의 편평상피화나 태생기의 편평상피가 중이내 잔류하여 생기는 선천적 원인도 진주종의 가능한 병인으로 보고되고 있다<sup>1-6</sup>.

과각질화를 특징적인 소견으로 나타내는 중이진주종은 상피세포의 비정상적인 과다증식성향을 보이는 것으로 알려져 있다. 이러한 과다증식성향의 병리기전을 현재까지 보고된 연구로 추론하면 첫째 증식능력을 가진 기저세포의 증가에 의하거나 둘째 새로운 증식능력을 가진 기저상층세포의 형성 또는 셋째 기저세포의 케라틴형성능력의 증가 등을 생각할 수 있다. 이러한 추론의 배경으로는 Wullstein등<sup>7</sup>이 진주종에서 basal cell proliferation theory를 제시한 바 있다. 반면에 Broekaert 등<sup>8</sup>은 기저세포의 케라틴합성능력의 증가를 실험하여 기저세포가 정상적인 케라틴합성능력을 보였다고 보고하였다. 상피세포 질환 중에서 중이진주종과 유사하게 비정상적인 과각질화를 특징적인 소견으로 보이는 건선(psoriasis)에서 Leigh등<sup>9</sup>은 기저세포가 정상상피와 유사하게 단층을 유지하며 과다증식이 주로 기저상층세포층에 의한다고 보고하였으며, Kariniemi등<sup>10</sup>은 정상상피와 건선상피에서 비슷한 기저세포분화를 나타낸다고 보고하였다. 국내에서 보고된 상피질환에 대한 면역조직화학적 보고를 살펴보면, 중이진주종 상피의 사이토케라틴에 대한 면역조직화학적 연구에서 중이진주종 상피는 각질세포의 과다증식성향을 나타내며 중이진주종 상피와 외이도 상피가 비슷한 사이토케라틴 발현양상을 보인다고 보고하였고<sup>11</sup>, 진주종 상피의 lectin에 대한 연구에서 중이진주종 상피와 정상외이도 상피의 lectin 결합형태가 서로 상이한 결과를 보인다고 보고하였고<sup>12</sup>, proliferating cell nuclear antigen(PCNA)을 이용한 세포증식에 대한 면역조직화학적 연구에서는 PCNA의 양성표현율이 병리조직학적 분화와 유의한 상관관계가 있다고 보고하였다<sup>13</sup>.

이에 본 연구에서는 진주종의 중요한 병인의 하나로 알려져 있는 기저세포의 분화 및 증식의 변화를 알아보고자 과다증식지표를 이용하여 중이진주종 상피세포의 증식성향을 확인하고, 기저세포지표를 이용하여 기저세포의 상태를 알아봄으로써 과다증식성향의 기전이 분화능력을 가진 기저세포의 증식능력의 증가에 기인된 것인지 혹은 다른 증식능력을 가진 세포의 증가에 기인된 것인지를 면역조직화학적 염색을 통해 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

아주대학병원 이비인후과로 내원하여 중이진주종으로 임상적 진단을 받고, 유양동 삭개술(mastoidectomy)을 시행받은 환자중 조직 표본이 양호한 8명의 중이진주종 상피조직과 외이도 상피조직을 사용하였다.

### 2. 방 법

1) **표본 제작:** 중이수술시 채취한 진주종 상피와 외이도 상피조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 다음 상승 알코올 계열에서 탈수시킨 후, 파라핀에 포매시켜 보관한다. 진주종 상피조직과 외이도 상피조직을 면역화학적으로 관찰하기 위하여 보관된 조직을 4~5 μm 두께로 연속 절편하여 표본당 5~8장의 조직절편을 제작하였다.

2) **과다증식지표 및 기저세포지표:** 과다증식지표로, 세포의 증식상태와 직접적으로 관련이 있으며 휴지기의 세포나 조직에서는 매우 작은 양이 존재하나 증식하는 세포에서 증가하여 세포의 증식여부를 판정할 수 있는 지표로 알려져 있는 핵단백의 일종인 Proliferating cell nuclear antigen(이하 PCNA라 약함)에 대한 단클론항체인 PC10(Novocastra Laboratories Ltd., United Kingdom)과, 건선, 아토피성피부염, 지루성피부염등 양성 과증식질환과 편평상피암등 악성 과증식 질환에서 발견되는 사이토케라틴 16에 대한 단클론항체인 K8.12(Sigma, St. Louis, MO)를 사용하였다. PC10은 mouse monoclonal antibody로서 IgG2a이며 PBS에 1 : 50으로 희석시켰고 K8.12는 mouse IgG1 isotype이며 PBS에 1 : 20으로 희석시켜 사용하였다.

기저세포지표로, 정상상피 및 건선상피에서 기저세포에만 결합반응을 보이는 것으로 알려져있는 DBA(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)와 태아상피와 진주종 상피의 기저층에서 발견되며 keratinocyte의 기저세포지표로 알려져있는 사이토케라틴 13에 대한 단클론항체인 KS-1A3(Sigma, St. Louis, MO)을 사용하였다. DBA는 PBS에 1 : 20으로 희석하였고 KS-1A3은 mouse IgG1 isotype이며 PBS에 1 : 100으로 희석시켜 사용하였다.

3) **면역조직화학적 염색:** PC10, K8.12, KS-1A3에 대한 면역조직화학적 염색은 Microprobe immunostaining station(Biomedica, Pittsburgh, PA)을 이용하였다.

파라핀에 포매시켜 보관했던 조직을 이용하여 제작

한 조직절편을 xylene과 histoclear의 혼합용액인 탈랍제(dewaxing agent)로 섭씨 60도에서 1분씩 3회, 상온에서 1분간 1회에 걸쳐 탈파라핀 처치를 시행한 후, 무수 알코올로 xylene과 histoclear를 제거하기 위해 상온에서 2회 세척하였고, 조직절편의 탈수효과를 위해 상온에서 다시 2회 세척하였다. 내재성 peroxidase를 억제할 목적으로 methanol과 periodic acid가 포함된 endo/blocker(Biomed, Pittsburgh, PA)에 조직절편을 섭씨 40도에서 2분간 방치(incubation) 후 상온에서 tris-buffer로 세척하였다. 비특이성 반응을 줄여 조직항원이 잘 노출될 수 있도록 조직절편을 단백분해효소인 pepsin에 섭씨 40도에서 4분간 방치시킨 후, 상온에서 tris-buffer로 세척하였다. 조직항원과 항체간의 반응에 있어서 비특이적 결합을 억제하기 위해 차단항체(blocking serum)인 정상혈청과 함께 섭씨 40도에서 2분간 방치시켰다. 조직절편에서 여분의 혈청을 흡입한 후, 1차 항체와 함께 섭씨 40도에서 9분간 둔 다음 tris-buffer로 상온에서 2회 세척하였다. 2차 항체로 섭씨 40도에서 4분간 방치 후, 상온에서 tris-buffer로 1회 세척하였다. peroxidase의 역가를 높이기 위해 peroxidase enhancer(Biomed, Pittsburgh, PA)로 상온에서 1회 세척 후, 원하는 강도의 색을 얻기 위하여 섭씨 40도에서 chromogen(AEC: 3-amino-9-ethyl carbazole)과 함께 10분씩 2회에 걸쳐 방치시켰다. 조직절편을 상온에서 증류수로 세척 후, Mayer's hematoxylin으로 30초간 길항염색을 실시했다. 염색이 끝난 조직절편을 증류수로 세척 후, tris-buffer로 세척한 다음, 다시 증류수로 세척하고, 봉입하였다. 음

성 대조조직은 모든 과정을 동일하게 하면서 1차 항체 대신 diluent를 사용하는 방법을 선택하였다.

4) **Lectin의 염색:** 파라핀 포매시켜 보관한 조직을 연속 절편하여 xylene에 10분씩 3회 세척한 후 hydration 시키기 위해 ethanol 용액 100%, 90%, 80%, 70%에 차례로 5분씩 담근 후 흐르는 물에 10분간 세척하였다. 내재성 peroxidase를 억제할 목적으로 methanol로 희석한 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 조직절편을 30분간 둔 후 0.01M phosphate buffered saline(PBS)으로 5분간 3회 세척하였다. 비특이성 반응을 줄여 조직항원이 잘 노출될 수 있도록 1% bovine serum albumin에 상온에서 5분간 방치(incubation)시킨 후 PBS로 세척했으며 dolichos biflorus agglutinin(이하 DBA라 약함)을 섭씨 4도 moist chamber에 하룻밤 방치시켰다. PBS로 5분간 3회 세척 후 biotinylated lectin을 확인하기 위해 ABC(Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macromolecular Complex) 시약을 상온에서 30분간 방치시킨 후 PBS로 5분간 3회 세척하였다. Chromogen(DAB: diaminobenzidine tetrahydrochloride)으로 5분간 발색시키고 상온에서 증류수로 10분간 세척한 다음 Mayer's hematoxylin으로 상온에서 30초간 길항염색을 실시하였다. 염색이 끝난 조직절편을 탈수시키기 위해 ethanol 용액 70%, 80%, 90%, 100%에 차례로 5분씩 담근 후 xylene에 10분씩 3회 세척한 후 balsam으로 mounting하여 각 표본의 DBA에 대한 반응 정도를 관찰하였다. 음성 대조조직은 모든 과정을 동일하게 하면서 DBA대신 PBS로 방치하는 방법을 선택하였다.

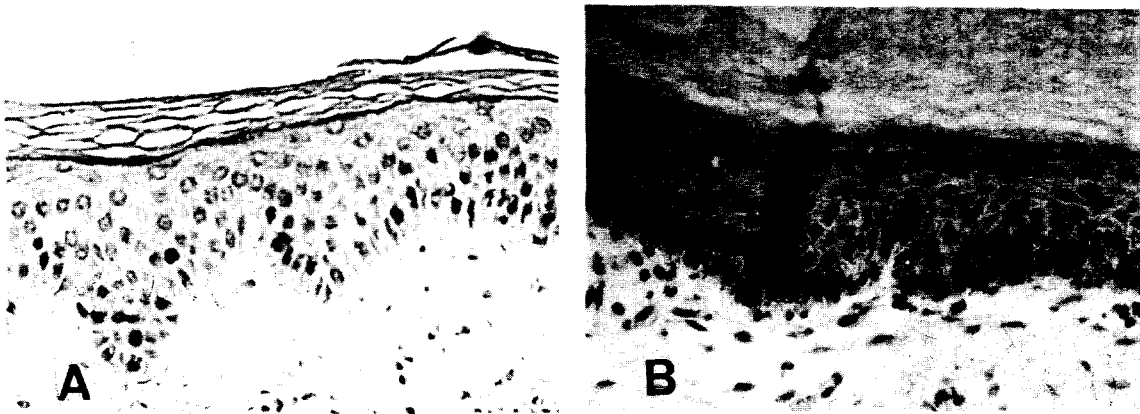


Fig. 1. The staining pattern of ear canal(A) and cholesteatoma(B) epithelium using PC10: Positive staining was localized in the basal cell layer of ear canal skin(A), whereas in cholesteatoma(B), there is dense staining of both basal and suprabasal cell layers(X200).

5) 관찰방법: 중이진주종 상피와 정상외이도 상피조직의 반응은 염색 반응에 따라, 전반적으로 염색 반응이 나타나지 않는 경우를 -, 전반적으로 약한 반응을 보이는 경우를 ±, 반응을 보이거나 군데군데 반응을 보이는 경우를 focal(F), 전반적으로 강한 반응의 경우를 +로 정하고 200배 시야 하에서 광학현미경(Olympus, Vanox-S형)으로 관찰하였다.

결 과

1. 과다증식지표

1) PCNA에 대한 반응: PCNA에 대한 반응을 살펴보

Table 1. The result of stain using proliferating and basal cell markers

	Cholesteatoma		Ear canal skin	
	B	SB	B	SB
PC10	+	+	F	-
K8.12	+	+	+	-
KS-1A3	-	-	+	-
DBA	±	-	+	-

B: basal cell, SB: suprabasal cell, F: focal staining  
 +: staining, -: no staining, ±: weak staining

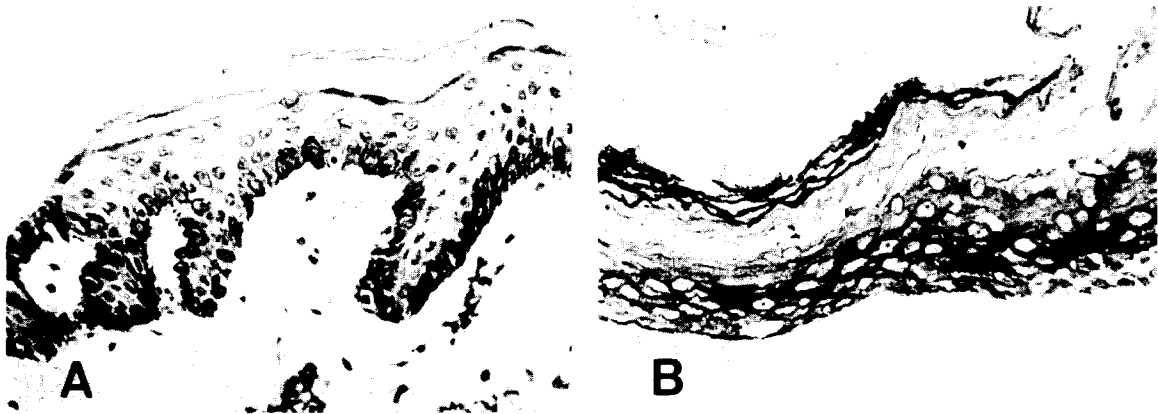


Fig. 2. The staining pattern of ear canal(A) and cholesteatoma(B) epithelium using K8.12: Positive staining was limited to the basal cell layer in ear canal skin(A), whereas in cholesteatoma(B), there is dense staining of both basal and suprabasal cell layers(X200).

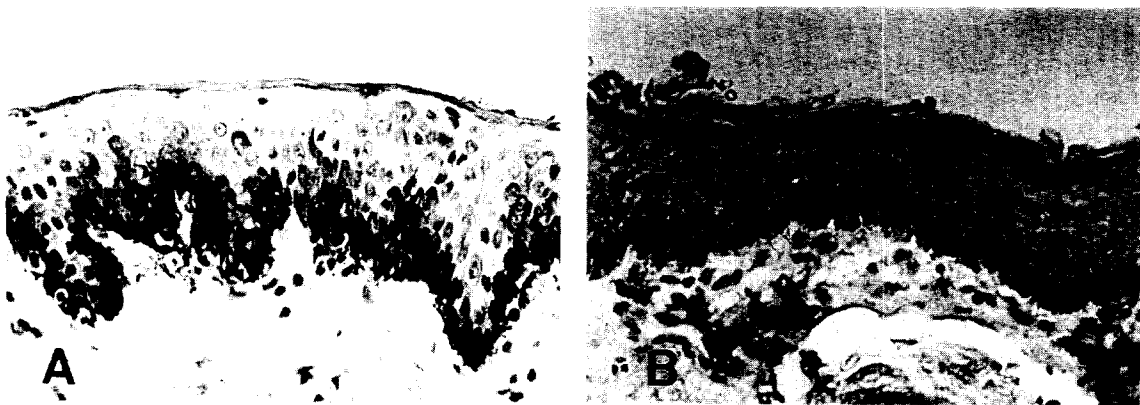
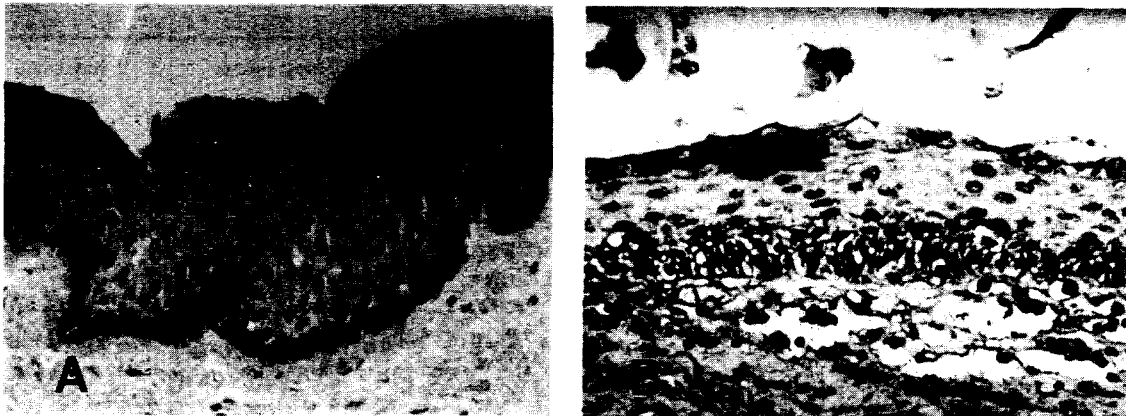


Fig. 3. The staining pattern of ear canal(A) and cholesteatoma(B) epithelium using KS-1A3: Only the basal cell layer of cholesteatoma is positively stained, as in ear canal skin(X200).



**Fig. 4.** The staining pattern of ear canal(A) and cholesteatoma(B) epithelium using DBA: The basal cell layer of both ear canal skin and cholesteatoma is positively stained, but there is weak staining in cholesteatoma(X200).

**Table 2.** The response of ear canal and cholesteatoma epithelium to proliferating and basal cell markers(n=8)

	PC10	K8.12	KS-1A3	DBA
Basal cell	8/8*	8/8	8/8	8/6
Suprabasal cell	/8	8/8		
No response				/2

\*ear canal skin/cholesteatoma epithelium

면, PC10(항PCNA단클론항체)을 이용한 염색에서 대조군에서 기저세포층에만 약하게 군데군데 염색되고, 기저상층세포층에는 염색이 관찰되지 않았다. 이와는 달리 중이진주종 상피에서는 기저세포층전반과 기저상층세포층 모두에 염색되는 것이 관찰되었다(Table 1, Fig. 1).

2) **K8.12에 대한 반응:** cytokeratin에 대한 반응을 살펴보면, K8.12 (항CK13/16단클론항체)를 이용한 염색에서 대조군에서 기저세포층이 염색되는 것이 관찰되었으며 중이진주종 상피에서는 기저세포층과 기저상층세포층이 염색되는 것이 관찰되었다(Table 1, Fig. 2).

**2. 기저세포지표**

1) **KS-1A3에 대한 반응:** KS-1A3(항CK13단클론항체)을 이용한 염색에서 대조군과 중이진주종 상피에서 동일하게 기저세포층이 단층으로 염색되는 것이 관찰되었다(Table 1, Fig. 3).

2) **Lectin에 대한 반응:** Lectin에 대한 반응을 살펴보

면, DBA를 이용한 염색에서 대조군에서 기저세포층이 단층으로 염색되는 것이 관찰되었으며 중이진주종 상피에서도 기저세포층이 층을 유지하면서 약하게 염색되는 것이 관찰되었다(Table 1, Fig. 4).

**3. 조직표본의 양성율**

정상외이도 상피의 과다증식지표와 기저세포지표에 대한 반응은 8례 모두에서 나타났으며, 중이진주종 상피의 과다증식지표와 기저세포지표에 대한 반응은 DBA의 경우 2예에서 반응을 보이지 않았던 경우를 제외하고 모두 반응을 나타내었다(Table 2).

**고 찰**

중이진주종은 중이강내 각질화된 상피가 축적되는 질환으로 특징적인 과다증식성향을 보이는 것으로 알려져 있다. 이러한 과다증식 성향에 관계할 수 있는 기전으로 정상적으로 증식능력을 가진 기저세포층이 증가된 증식능력을 갖거나, 정상상피에서는 증식능력이 없는 기저상층세포층이 새로운 증식능력을 가지거나 혹은 기저세포층의 각질의 합성증가 등을 가정할 수 있다.

정상상피는 지속적으로 분화하는 조직으로 기저막과 접하고 있는 기저세포만이 증식능력을 가지며 기저세포가 분화하고 성숙되면서 기저 상층으로 이동하게 된다. 상피세포 질환중 중이진주종과 유사한 비정상적 과다증식과 과각질화를 특징적인 소견으로 보이는 전선에서 기저세포층은 단일층을 유지하며 과다증식이 주로 기저상층세포에서 이루어진다는 보고가 있고<sup>9</sup>, 또

다른 보고에 의하면 정상상피와 건선상피를 비교하여 각각의 기저세포층이 비슷한 분화를 나타낸다는 보고가 있다<sup>10</sup>.

정상상피의 분화를 나타내는데 사용할 수 있는 척도(indicator)는 몇 가지가 있다. 이 중 cytokeratin은 세포의 구조 골격을 구성하는 여러성분중 40에서 67 kilodalton(kd)의 분자량을 갖는 비수용성의 중간세사(intermediate filament)로서, 2차원적인 gel 전기영동을 통하여 약 19가지의 인체 표피 cytokeratin을 분리해 낼 수 있으며<sup>14</sup>, 이들은 그 전하(charge)에 따라 산성(acidic, A or type I)과 염기성(basic, B or type II) 아파로 구분된다. cytokeratin의 산성과 염기성 아파는 그들의 면역반응성, mRNA hybridization, peptide-mapping양상 및 아미노산 서열등이 서로 다른 것으로 밝혀져 있다<sup>15,16</sup>. 인체의 모든 표피는 2내지 10가지 정도의 아형의 cytokeratin을 가지고 있는 것으로 되어 있는데, keratin의 발현에는 일정한 원칙이 적용되고 있으며 정상 표피의 분화에 있어 종류가 다른 keratin들은 각기 고유의 역할을 가지고 있음을 추론할 수 있다<sup>17</sup>. cytokeratin은 여러 종류의 진피세포에서 독특한 고유의 특성을 지니며, cytokeratin 세사의 기본단위 구성은 세포의 종류, 태생기의 발생기간, 조직학적 분화도, 세포의 성장과정 및 질병의 상태에 따라 달라진다고 되어 있다<sup>18</sup>. 특히 cytokeratin 기본단위의 변이에 대한 연구를 통하여 여러 표피질환과 편평상피암등에서 질환의 성격과 기원기관을 알 수 있다는 보고가 있었으며<sup>19-21</sup>, 여러 다른 장기(위, 식도, 혀, 간, 피부, 각막등)의 정상표피 및 배양된 세포와 악성종양에서의 아형의 cytokeratin에 대한 연구결과, 정상 조직에서 비정상조직으로 변화할 경우 의의있는 반응의 차이를 보여준다고 보고되고 있다<sup>16,20,22</sup>. 이와 같이 cytokeratin은 종(species) 그리고 조직사이에 뚜렷한 형태학적 차이가 있으며<sup>23</sup>, 다른 중간세사보다 상피분화를 판단할 수 있는 믿을 만한 연구방법이며<sup>15</sup>, 특히 종양의 진단에 유용한 연구방법으로 보고되고 있다<sup>24</sup>. 이러한 cytokeratin을 이용한 중이진주종에 관한 면역조직화학적보고에 의하면, cytokeratin 13과 16을 이용하여 중이진주종이 과증식하는 질환이라는 보고가 있다<sup>25-27</sup>.

cytokeratin 16은 건선, 아토피성피부염, 지루성피부염 등 양성 과증식질환과 편평상피암등 악성 과증식 질환에서 발견되며<sup>14,28,29</sup>, 과다증식의 지표로 인식되어지고 있다<sup>29,30</sup>. cytokeratin 13은 활발히 분화하는 태아상피와 유사하게 진주종 상피의 기저세포층에서 발견된다<sup>20,26</sup>.

본 연구에서 cytokeratin 13에 대한 단클론항체인 KS-1A3에 대한 결과를 보면 정상외이도 상피조직에서

기저세포층에 단층으로 양성반응을 보이며 중이진주종 상피에서도 기저세포층에 단층으로 양성반응을 보이는 것이 관찰되었다. cytokeratin 13/16에 대한 단클론항체인 K8.12에 대한 결과를 보면 정상외이도 상피조직에서는 cytokeratin 13에 의해 기저세포층에 양성반응을 보이며, 중이진주종 상피에서는 cytokeratin 13에 의해 기저세포층과 cytokeratin 16에 의해 기저상층세포층에 양성반응을 보이는 것이 관찰되었다. 이는 중이진주종이 과다증식성향을 보이는 질환이며 기저세포층은 정상외이도 상피조직과 유사하게 단층을 유지하는 것을 의미한다.

Lectin은 세포 내에 존재하는 여러 탄수화물과 특이적 결합반응을 보이는 비면역기원의 단백질 또는 당단백질이다<sup>31</sup>. 세포를 구성하는 중요한 구성성분중의 하나인 당단백질은 주로 세포막에 많이 존재하는데 세포막에 노출되어 있는 당질의 말단부 단당류 배열에 따라서 다른 lectin 반응을 나타내고 이는 각 부위의 특이적 기능과 연관 지을 수 있으며<sup>32</sup>, 정상 피부상피와 같이 지속적으로 분화하는 조직에서 lectin의 조직화학적 결합반응을 관찰하는 것은 상피의 단계적인 분화와 성숙도를 관찰하는데 효과적이다. 성인의 피부상피에서 DBA는 horse gram에서 추출된 lectin으로  $\alpha$ -D-acetylgalactosamin과 당특이성이 있으며 상피세포의 기저층에 반응을 보이는 것으로 알려져 있다<sup>10,33</sup>. DBA는 정상상피 및 건선상피에서 단층 기저세포층에만 binding하는 것으로 알려져 있으며<sup>10</sup> 선조직에서도 DBA는 기저세포층에만 binding하는 것으로 알려져 있다<sup>34</sup>. 국내에 보고된 상피 조직의 lectin결합에 대한 연구들에서 김재호 등<sup>35</sup>은 후두 상피조직에서 실험하여 DBA는 기저세포층에 결합반응을 보이지 않았다고 보고하였고, 박홍준 등<sup>12</sup>은 외이도 상피조직에서 실험하여 DBA가 외이도 상피 조직 전층에서 결합반응을 보였다고 보고하는등 본 연구에서 나타난 외이도 상피조직에서 DBA가 단층으로 결합반응을 보이는 것과 상이하게 보고하였다. 이러한 상이한 결과는 김재호 등<sup>35</sup>의 경우 실험에 사용된 조직이 후두 상피조직으로 본 연구에서 사용된 조직과 다르며 사용된 lectin의 농도가 50 ug/ml로 본 연구에서 사용된 농도와 다르고, 박홍준 등<sup>12</sup>의 경우 조직은 같으나 사용된 lectin의 농도가 20 ug/ml로 본 연구에서 사용된 농도와 다르기 때문으로 생각되며, 실험에 이용된 조직의 출처 및 lectin의 농도, 염색방법 및 lectin의 출처에 따라 DBA의 결합반응이 다르게 나타날 수 있다고 생각한다. DBA는 상피조직에 상대적으로 약하게 결합반응을 보인다고 하며<sup>36</sup> 실험에 사용된 농도는 보고

자들마다 다양하여 본 연구에서는 10 ug/ml에서 500 ug/ml까지 여러 농도로 예비실험을 시행하여 가장 높은 염색성을 보이며 배경 및 비특이적 반응을 보이지 않는 농도인 250 ug/ml로 희석하여 사용하였다. 본 연구에서 정상외이도 상피조직에서는 단층의 기저세포층에만 염색되는 것이 관찰되었으며 중이진주종 상피에서도 기저세포층에만 약하게 염색되는 것이 관찰되었다. 이는 중이진주종 상피에서도 정상외이도 상피조직과 유사하게 기저세포층이 단층을 유지하는 것을 의미한다.

PCNA는 1978년 Miyachi 등이 전신성홍반성낭창(systemic lupus erythematosus)환자에서 증식하는 세포들에서만 증명되는 nuclear antigen과 반응하는 혈중자가항체를 발견하고 이 nuclear antigen을 PCNA라고 최초로 발표하였고<sup>37</sup>, 이후 Bravo등<sup>38</sup>이 증식세포에서 특이적으로 발현되는 산성단백을 발견하여 cyclin이라 명명하였는데 Mathews등<sup>39</sup>은 이 PCNA와 cyclin이 동일 물질인 것으로 판명하였다. PCNA는 분자량 36 kd의 DNA polymerase-delta의 보조단백으로 G1 후기부터 핵내에 발현되기 시작하여 S기에 최고로 도달하며 G2 및 M기에 감소한다고 알려져 있으며<sup>38,39</sup>, 세포의 증식을 야기시키는데 결정적 역할을 하는, 세포의 증식능력을 잘 표현하는 핵단백의 일종이다<sup>40,41</sup>. PCNA는 피부와 점막의 기저세포, 비장, 흉선, 및 고환등 분열증식이 있는 세포에서 관찰되며<sup>39</sup>, 증식정도에 따라 PCNA의 표현율이 다르게 나타난다고 알려져 있다<sup>42,43</sup>. PCNA의 level은 세포의 증식상태와 직접적으로 관련이 있어 휴지기의 세포나 조직에서는 매우 작은 양이 존재하나 증식하는 세포에서 증가하여 세포의 증식여부를 판정할 수 있는 지표로 여겨진다 하였다<sup>42,43</sup>. PCNA를 검색하는 방법으로 Garcia등<sup>40</sup>은 파라핀 포매조직으로 항PCNA단클론항체를 이용한 semiquantitative immunocytochemical analysis가 flow cytometric analysis에 비해 간단하고 재생성이 있는 강력한 방법이라고 보고하였다. 국내에서도 파라핀 포매조직으로 항PCNA단클론항체를 이용해 PCNA를 검색한 보고가 있다<sup>13,44</sup>. 본 연구에서 정상외이도 상피조직에서는 기저세포층의 일부에서만 약하게 군데군데 염색되는 것이 관찰되었으며 중이진주종 상피에서는 기저세포층 전반과 기저상층세포층에 염색되는 것이 관찰되었다. 이는 Celis등<sup>42</sup>이 지적한 바와 같이 정상적인 상피조직의 경우 증식능력을 가진 기저세포층의 일부 세포만이 증식을 하는 반면에 중이진주종 상피조직의 경우 기저세포층 전반이 증식을 하며 기저상층세포층에서도 증식하는 세포층이 존재한다는 것을 의미한다.

다.

중이진주종 상피조직과 정상외이도 상피조직을 과다증식지표와 기저세포지표를 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행한 결과를 종합해 보면 중이진주종은 과다증식을 보이는 상피질환이며 이러한 과다증식은 정상적으로 증식능력을 가진 기저세포층의 과다증식뿐만 아니라 새로이 증식하는 능력을 가지는 기저상층세포층의 과다증식에 기인하는 것으로 생각된다.

## 결 론

연구자는 cytokeratin 13과 16 및 PCNA에 대한 단클론항체와 DBA를 이용하여 중이수술중 채취한 중이진주종 상피조직을 정상외이도 상피조직과 비교 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 과다증식지표로 PC10과 K8.12를 사용하여 염색한 바 정상외이도 조직에서는 기저세포층만이 부분적으로 염색되는데 반하여, 중이진주종 상피조직에서는 기저세포층 전반과 기저상층세포층 모두가 염색되었다.

2) 기저세포지표로 KS-1A3과 DBA를 사용하여 염색한 바 정상외이도 조직과 중이진주종 상피조직에서 모두 기저세포층에만 염색되었다.

중이진주종 상피조직과 정상외이도 상피조직을 과다증식지표와 기저세포지표를 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행한 결과를 종합해보면 중이진주종은 과다증식을 보이는 상피질환이며 이러한 과다증식은 정상적으로 증식능력을 가진 기저세포층의 과다증식뿐만 아니라 새로이 증식하는 능력을 가지는 기저상층세포층의 과다증식에 기인하는 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Abramson M, Gantz BJ and Asarch RG: Cholesteatoma pathogenesis: evidence for the migration theory. In Cholesteatoma, First International Conference(eds. McCabe BF) Birmingham, Aesculapius Publishing Co, 1977, pp176-186
2. Derlacki E and Clemis J: Congenital cholesteatoma of the middle ear and mastoid. Ann Otol Rhinol Laryngol 74: 700-727, 1965
3. Lim DJ: Epithelial invasion, contact guidance and contact inhibition. In Cholesteatoma and mastoid surgery(ed. Sade J) Amsterdam, Kugler, 1982, pp141-152
4. Palva T, Letho VP and Virtanen I: Junctions of squamous epithelium with middle ear mucosa. Acta Otolaryngol (Stockh) 99: 207-304, 1985
5. Sade J, Babiacki A and Pinkus G: The metaplastic and con-

- genital origin of cholesteatoma. *Acta Otolaryngol(Stockh)* 97: 119-129, 1983
6. Sculerati N and Bluestone CD: Pathogenesis of cholesteatoma. *Otolaryngol Clin North Am* 22(5): 859-868, 1989
  7. Wullstein HL and Wullstein S: Cholesteatoma, etiology, nosology and tympanoplasty. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 42: 313-335, 1980
  8. Broekaert D, Cooreman K, Couke P, Nsabumukunzi S, Reyniers P, Kluyskens P and Gillis E: Keratinization of aural cholesteatoma(keratoma): a quantitative histophotometric study of the sulphhydryl and disulphide content. In *Cholesteatoma and mastoid surgery*(ed. Sade J) Kugler Publications, Amsterdam, 1982, pp161-173
  9. Leigh IM, Pulford KA, Ramaekers FCS and Lane EB: Psoriasis: maintenance of an intact monolayer basal cell differentiation compartment in spite of hyperproliferation. *Brit J Dermatol* 113: 53-64, 1985
  10. Kariniemi A-L and Virtanen I: Dolichos biflorus agglutinin (DBA) reveals a similiar basal cell differentiation in normal and psoriatic epidermis. *Histochem* 93: 129-132, 1989
  11. 박기현, 전영명 및 박홍준: 중이진주종 상피의 사이토케라틴에 대한 면역 조직화학적 연구. *한이인지* 37: 5-13, 1994
  12. 박홍준, 김희남, 이원상 및 박기현: 진주종 상피의 lectin 결합형태에 관한 연구. *한이인지* 35: 271-277, 1992
  13. 박형욱, 도남용 및 김용기: 후두암 환자에서 proliferating cell nuclear antigen의 발현양상에 관한 연구. *한이인지* 38: 89-95, 1995
  14. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Gieger B and Krepler R: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumor and cultured cells. *Cell* 31: 11-24, 1982
  15. Sun TT, Eichner R, Scherner A, Cooper D, Nelson WG and Weiss RA: Classification, expression, and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: a unifying model. *Cancer Cells* 1: 169-176, 1984
  16. Tseng SCG, Jarvinen MJ, Nelson WG, Huang JW, Mitchell JW and Sun TT: Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. *Cell* 30: 361-372, 1982
  17. Ramaeker F, Huijismans A, Schaart G, Moesker O and Vooijs P: Tissue distribution of keratin 7 as monitored by a monoclonal antibody. *Exp Cell Res* 170: 235-249, 1987
  18. Culbertson VB and Freedberg IM: Mammalian epidermal keratin. *Biochemica Biophysica Acta* 387: 178-191, 1977
  19. Franke WW, Schiller DL, Moll R, Witmer S, Schmid E and Engelbrecht I: Diversity of cytokeratins. *J Mol Biol* 153: 993-959, 1981
  20. Moll R, Moll I and Wiest W: Changes in patterns of cytokeratin polypeptides in epidermis and hair follicles during skin development in human fetuses. *Differentiation* 23: 170-178, 1982
  21. Said JW: Immunohistochemical localization of keratin proteins in tumor diagnosis. *Hum Pathol* 14: 1017-1018, 1983
  22. Makin CA, Bobrow LG and Bodmer WF: Monoclonal antibody to cytokeratin for use in routine histopathology. *J Clin Pathol* 37: 975-983, 1984
  23. Banks-Schlegel SP and Harris CC: Tissue-specific expression of keratin proteins in human esophageal and epidermal epithelium and their cultured keratinocytes. *Exp Cell Res* 146: 271-280, 1983
  24. Azumi N and Battifora H: The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol* 88: 286-296, 1987
  25. Broekaert D, Cornille A and Eto H: A comparative immunohistochemical study of cytokeratin and vimentin expression in middle ear mucosa and cholesteatoma and in epidermis. *Vichows Arch Anato* 414: 39-51, 1988
  26. Sasaki H and Huang CC: Expression of cytokeratins 13 and 16 in middle ear cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 110: 310-317, 1994
  27. Vennix PPCA, Kuijpers W, Tonnaer ELCM, Peters TA and Ramaekers FCS: Cytokeratins in induced epidermoid formations and holesteatoma lesions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 116: 560-565, 1990
  28. De Mare S, Van Erp PEJ and Van De Kerkhof PCM: Epidermal hyperproliferation assessed by the monoclonal antibody K8.12 on frozen sections. *J Invest Dermatol* 92: 130-131, 1989
  29. Weiss RA, Eichner R and Sun TT: Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J Cell Biol* 98: 1397-1406, 1984
  30. Bujia J, Schilling V, Holly A, Stammberger M and Kastenbauer E: Hyperproliferation-associated keratin expression in human middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol(Stockh)* 113: 364-368, 1993
  31. Scharn N and Lis H: Cell agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* 177(9): 949-959, 1972
  32. Leatham A: Lectin histochemistry. *Immunochemistry*(eds. Polak JM and Noorden SV) Bristol, John Wright & Sons Ltd, 1986, pp 167-187
  33. Virtanen I, Kariniemi AL and Holthofer H: Fluorochrome-coupled lectins reveal distinct cellular domains in human epidermis. *J Histochem Cytochem* 34: 307-315, 1986
  34. Ookuda Y, Takata K, Nagashima M and Hirano H: Distribution of Glycoconjugates in normal human skin using biotinyl lectins and avidin - horse radish peroxidase. *Histochem* 79: 1-7, 1983
  35. 김재호, 성명훈 및 김광현: 인체후두 상피조직에서 lectin결합에 관한 조직화학적 연구. *한이인지* 36: 66-76, 1993
  36. Nemanic MK, Whitehead JS and Elias PM: Alterations in



- membrane sugars during epidermal differentiation: visualization with lectins and role of glycosidases. *J Histochem Cytochem* 31: 887-897, 1983
37. Miyachi K, Fritzler MJ and Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121: 2228-2234, 1978
38. Bravo R, Frank R, Blundell PA and McDonald-Bravo H: Cyclin/PCNA is the auxillary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 326: 515-517, 1987
39. Mathews MB, Bernstein RM, Franza Jr BR and Garrels JI: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309: 374-376, 1984
40. Garcia RL, Coltrera MD and Gown AM: Rapid communication. analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J Clin Pathol* 134: 733-739, 1989
41. Jaskulski D, DeRiel JK, Mercer WE, Calabretta B and Baserga R: Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxy nucleotides to PCNA/cyclin. *Science* 240: 1544-1546, 1988
42. Celis JE, Bravo R, Larsen PM and Fey SJ: Cyclin; A nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. *Leukemia Research* 8: 143-157, 1984
43. Robins BA, De La Vega D, Ogata K, Tan EM and Nakamura RM: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 111: 841-845, 1987
44. 김찬우, 정광윤, 최종욱 및 김동현: 후두각화증에서 proliferating cell nuclear antigen의 표현양상에 관한 연구. *한이인지* 36: 77-84, 1993
-