

중이염 동물 모델에서 중이점막의 분비능에 대한 항생제 및 스테로이드 요법의 효과

연세대학교 원주의과대학 이비인후과학교실,¹ 병리학교실²
박상유¹ · 박동준¹ · 김성일¹ · 권장우¹ · 조미연²

The Effects of Antibiotic and Steroid Therapy on the Secretory Capacity of Middle Ear Mucosa in Animal Model with Acute Otitis Media

Sang-Yoo Park, MD¹, Dong-Joon Park, MD¹, Sung-Il Kim, MD¹,
Jang-Woo Kwon, MD¹ and Mi-Yeon Jo, MD, PhD²

¹Department of Otolaryngology and ²Pathology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Korea

—ABSTRACT—

Background and Objectives : The abnormal secretory capacity of the middle ear mucosa is known to promote the chronicity of otitis media. In this study we investigated the efficacy of a combination therapy of steroid and antibiotic in controlling secretion of the middle ear mucosa. **Materials and Methods** : Healthy New Zealand White rabbits were randomized into groups. Middle ear infection was induced by injecting a strain of pneumococci through the tympanic membrane. Study groups were classified and treated with steroid only, antibiotic only, and combination regimen. After treatment, we analyzed the distribution of the inflammatory cells, goblet cell density and MUC5AC immunoreactivity. **Results** : The combination treatment group showed more decrease in goblet cell density compared to the antibiotic only group. Interestingly the steroid only group showed the most severe inflammation, however the secretory capacity was greatly reduced. **Conclusion** : Combination therapy could play a potential role in treatment of the acute otitis media by means of controlling increased secretory function of the mucosa. (J Clinical Otolaryngol 2007;18:33-40)

KEY WORDS : Acute otitis media · Middle ear mucosa · Steroid · Goblet cells.

서 론

급성 중이염은 7세 이전 유소아의 93%에서 적어도 한번 이상 발병하는 질환으로 67%에서 중이강내 삼출

논문접수일 : 2006년 12월 19일
심사완료일 : 2007년 3월 7일
교신저자 : 박상유, 220-701 강원도 원주시 일산동 162
연세대학교 원주의과대학 이비인후과학교실
전화 : (033) 741-0643 · 전송 : (033) 732-8287
E-mail : sangyoo3@yonsei.ac.kr

액 저류(Middle ear effusion ; MEE)가 동반된다. 최근에는 삼출액에서 세균이나 바이러스가 발견되는 경우가 더욱 많아지고 있으며, 가장 흔한 원인균은 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)과 인플루엔자균(*Haemophilus influenzae*)이다.¹⁾ 따라서 급성 중이염이 초기에 적절히 치료되지 못할 경우 세균에서 만들어진 독성 물질과 이와 관련한 염증대사물이 작용하여 중이 점막과 고막의 충혈, 점막 모세혈관의 투과성 증가 및 염증세포의 침윤을 일으키고, 점막 상피에서 배세포(goblet cell)로의 분화가 증가되어 삼출성 중이염이 발생된다.²⁾ 이러한 삼

출액의 생성기전은 다양한 원인으로 인하여 이관의 기능에 장애가 생기면 중이강 내에 음압이 발생하여 혈장 여과액(transudate)이 중이강에 고인다는 'hydrops excavuo theory'로 설명되어 왔다. 하지만 삼출액의 성분 중 점막의 점액선이나 배세포에서 분비되는 점액성 분비물인 당단백질이 고농도로 존재하며, lysozyme과 secretory IgA 등 장액선에서 분비되는 성분도 혈장에 비해 그 농도가 증가되어 있고, 또한 삼출성 중이염 환자의 중이점막에서 분비세포들이 과다 증식되어 있다는 보고에 의해 삼출액은 삼투압의 차에 의해 수동적으로 분비되는 혈장여과액과 더불어 중이점막에서 능동적으로 분비되는 성분도 포함하고 있음을 알 수 있다.³⁾⁴⁾

삼출액의 점도가 증가되면 점액섬모수송체계(mucociliary transport system)의 장애가 일어나 삼출액이 이관으로 원활히 배출되지 못하여 중이염은 만성화되고 약물치료를 잘 반응하지 않으며 다양한 합병증을 일으킬 수 있다.⁵⁾ 그러나 급성중이염의 만성화를 조장하는 중이 점막의 분비능에 대한 체계적인 연구와 효과적인 치료방법은 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 중이염의 만성화를 조장하는 중이 점막의 과다 분비능에 대한 효율적인 조절과 관련하여 최근 경험 축적에 의해 시도되고 있는 항생제 및 스테로이드 복합투여요법이 항생제 단독투여보다 뚜렷한 점액분비억제 효과가 있는지 새로운 실험적 급성 중이염 동물 모델을 통해 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험적 급성 중이염 모델

동일조건 하에서 사육한 건강한 체중 2 kg 내외의 New Zealand White rabbit 20마리를 사용하였으며, 이경 검사로 건강한 외이와 중이를 확인하였다. 케타라(Ketamine hydrochloride, 유한양행[®])와 렉핀(Xylazine, Bayer[®])을 근육주사하여 실험동물을 마취시킨 후 수술용 현미경하에서 KCTC 5080 *Streptococcus pneumoniae* 균주를 McFarland No. 1.0과 동일한 균수를 가지도록 하여 멸균 생리 식염수에 녹여 고막을 통해 중이강 내로 0.2 ml를 주입하였고, 정상대조군에는 0.2 ml의 멸균 생리 식염수를 같은 방법으로 주입하였다(Fig. 1).

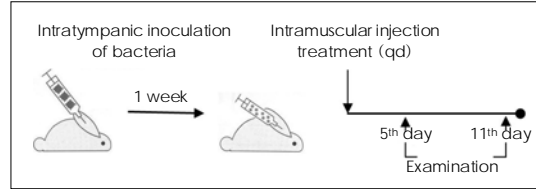


Fig. 1. Schematic diagram of injection schedule.

투여 약물

실험군에 사용한 항생제는 주사용 Penicillin G를 16만 Unit/kg의 용량으로 1일 1회 근육 주사하였고, 스테로이드제는 Dexamethasone을 1 mg/kg의 용량으로 1일 1회 근육 주사하였다.

실험군의 분류 및 약물투여

정상대조군 4마리는 일측 귀에 멸균 생리식염수를 고막천자를 통해 주입하였고, 감염대조군 4마리는 일측 귀에 실험적 급성 중이염을 유발 후 치료를 시행하지 않았다.

제 1군(n=4)은 항생제 단독투여군으로 일측 귀에 감염대조군과 동일하게 처치한 후 7일째부터 Penicillin G를 10일간 근육주하였다.

제 2군(n=4)은 항생제와 스테로이드의 복합투여군으로 감염대조군과 동일한 처치 후 7일째부터 Penicillin G와 Dexamethasone을 10일간 근육주하였다.

제 3군(n=4)은 스테로이드 단독투여군으로 감염대조군과 동일한 처치 후 7일째부터 Dexamethasone만을 10일간 근육주하였다.

조직채취 및 표본제작

각 실험군 모두 시간에 따른 중이점막의 조직변화 정도 및 치료효과를 관찰하기 위해 약물투여 5일, 11일째 각 군별로 2마리씩의 개체를 희생시켜, 측두골을 적출한 후 이닝(bulla)를 개방한 뒤 예리한 수술용 메스를 사용하여 중이 감각부의 점막을 채취하였다. 그 후 4% paraformaldehyde용액에 24시간 고정 후 파라핀에 포매시킨 조직을 5 μm의 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켰다. 중이점막의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 Hematoxylin-Eosin(H-E)염색을 하였고, 점액분비세포의 관찰을 위해서는 Periodic acid Schiff-Alcian blue

(PAS-AB) (pH 2.5) 염색 및 MUC5AC 모노클로날 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 실시하였다.

병리조직학적 소견의 판독

염증세포 침윤정도의 판독은 광학현미경(Olympus BX 51)의 400배 고배율시야에서 사진을 촬영하여 침윤한 염증세포의 수를 상피내층(intraepithelial)과 상피하층(subepithelial)으로 구분하여 측정하였는데 부위별 오차를 줄이기 위하여 각 슬라이드당 무작위로 10군데를 측정한 후 이를 평균한 값으로 하였다. 점액분비세포의 수는 염증세포 측정과 같은 방법으로 각 슬라이드당 400 배 고배율 시야에서 무작위로 10군데에서 사진을 촬영한 후 PAS-Alcian blue 염색에 양성인 배세포의 수를 측정하여 이를 평균한 값으로 하였다.

면역조직화학염색 및 판독

파라핀 블록을 5 μm로 박절한 후 10% xylene에서 파라핀을 제거하고 100%, 95%, 70% 알코올에서 흡수하고 흐르는 물로 10분간 씻었다. Tris-EDTA(pH 9.0, Labvision, CA, USA)에서 20분간 microwave를 이용하여 전처치를 한 후 30분간 실온에 방치하였다. TBST(Tris buffer saline+Tween 20)로 세척하고 내인성 과산화수소의 활성을 막기 위하여 0.5% 과산화수소에서 10분간 처리하고 증류수로 세척한 후 Ultravision LP detection system(Labvision, CA USA)으로 면역조직화학적 염색을 하였다. 간략한 단계는 다음과 같다. 1 : 100으로 희석한 MUC5AC 모노클로날 항체(Neo-Marker, CA, USA)를 실온에서 2시간 반응시킨 후 TBST

로 5분간 세 차례 세척하고 biotin이 부착된 이차항체를 20분간 반응시켰다. Streptavidin과 결합한 과산화효소 복합체에서 20분간 반응시킨 후 AEC(amino-ethyl carbazol)로 발색하고 Meyer hematoxylin으로 대조염색을 하였다. 면역조직화학적 염색의 음성 대조군은 일차항체를 음성대조시약으로 대체하였고 양성대조군은 각 검체의 슬라이드에 대장조직 절편을 붙여 함께 염색하였다. 세포질이 적갈색으로 강하게 염색된 세포의 수를 측정하였다.

통계학적 검증

각 대상군의 통계학적 분석방법은 paired t-test에서 유의수준은 5%로 하였다.

결 과

정상 대조군

고막천자를 통하여 증류수를 주입한 후 11일째와 18일째에 조직학적으로 염증세포의 침윤은 없었고, 중이갑각의 상피는 대부분 입방상피가 분포함을 알 수 있었다. PAS-Alcian blue 염색 및 MUC5AC 모노클로날 항체에 대한 염색에서 점액을 분비하는 배세포 및 MUC5AC 양성반응은 관찰되지 않았다(Fig. 2).

감염 대조군

고막천자를 통하여 폐렴구균을 주입한 후 치료를 시행치 않은 11일째와 18일째의 검체에 대해 조직학적으로 비교한 결과 시간에 따른 차이는 없었으며, 모두 과

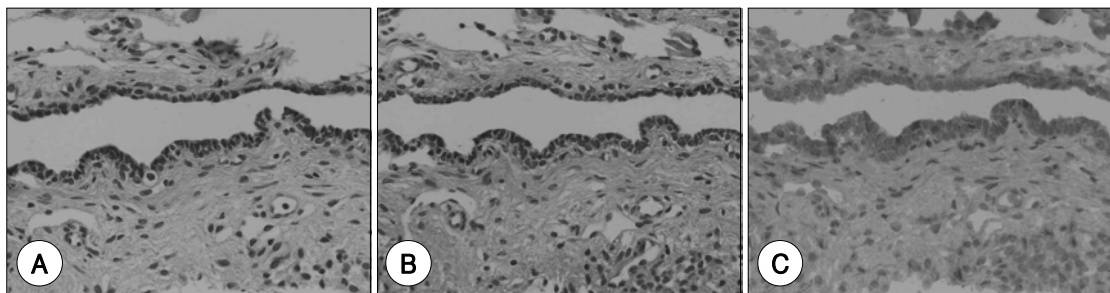


Fig. 2. H & E stain, ×400 (A), PAS-AB stain (B) and MUC5AC immunohistochemical stain (C) of rabbit middle ear mucosa in normal control group at 18 days after distilled water injection (×400). Goblet cells, inflammatory cells and MUC5AC immunoexpression are not found.

도한 화농성 삼출액 및 중이 점막의 심한 괴사를 보였고 조직소견상 점막 상피층이 부분적으로 소실되었으며 주로 림프구, 형질세포, 호중구 및 호산구 등으로 구성된 과량의 염증세포들이 상피내층(평균 359±7.5)과 상피하층(평균 944±9.2)에 혼재된 상태로 관찰되었다. MUC5AC 모노클로날 항체에 대한 염색시 상피층에서 적갈색의 양성반응이 다수 관찰되었지만 뚜렷한 배세포의 형태는 관찰되지 않았으며, 항생제 단독투여군과 비교해 볼 때 상피층의 양성반응이 다소 감소된 소견을 보였다(Fig. 3).

제 1군(항생제 단독투여군)

항생제투여 5일째와 11일째의 검체조직을 정량적으로 측정된 염증세포와 배세포의 수를 통계학적으로 비교한 결과 시간에 따른 차이는 없었으며(p>0.05), 11일

째의 조직소견상 염증세포의 침윤은 상피층 내에서는 평균 38±3.4개, 상피하층에 64±4.4개로 동일 시기의 약물투여를 하지 않은 감염 대조군 조직에 비하여 염증 소견이 뚜렷하게 감소하였다(p<0.05). PAS-Alcian blue 및 MUC5AC에 양성인 점액분비세포는 평균 160±4.6개로 스테로이드제 단독투여 또는 병합투여한 2군과 3군보다 증가되어 있는 소견을 보였다(p<0.05, Figs. 4 and 7).

제 2군(항생제와 스테로이드 병합투여군)

항생제와 스테로이드투여 5일째와 11일째의 검체조직을 정량적으로 측정된 염증세포와 배세포의 수를 통계학적으로 비교시 시간에 따른 차이는 없었으며(p>0.05), 11일째의 조직소견상 염증 세포의 침윤은 상피층 내에서 평균 8±2.7개, 상피하층에 평균 30±5.3개로 동일

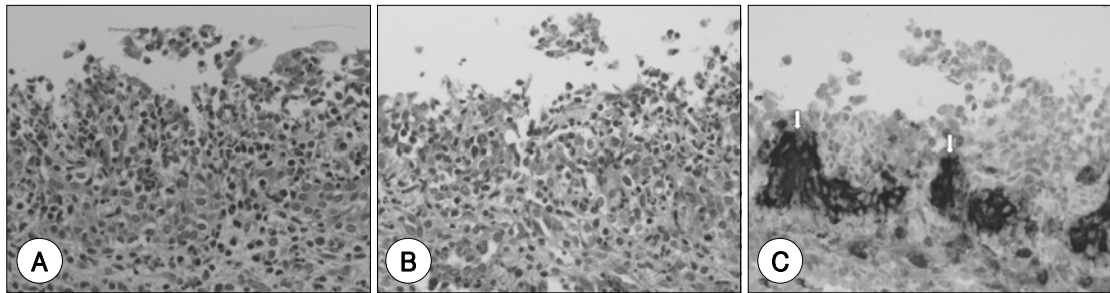


Fig. 3. H & E stain, ×400 (A), PAS-AB stain (B) and MUC5AC immunohistochemical stain (C) of rabbit middle ear mucosa in infected control group at 18 days after bacterial inoculation (original magnification ×400). Many inflammatory cells are seen on intraepithelial and subepithelial layers. Goblet cells are not found, but immunohistochemical staining with MUC5AC monoclonal antibody shows densely reddish-brown colored immunorexpression (arrow) on whole mucosa.

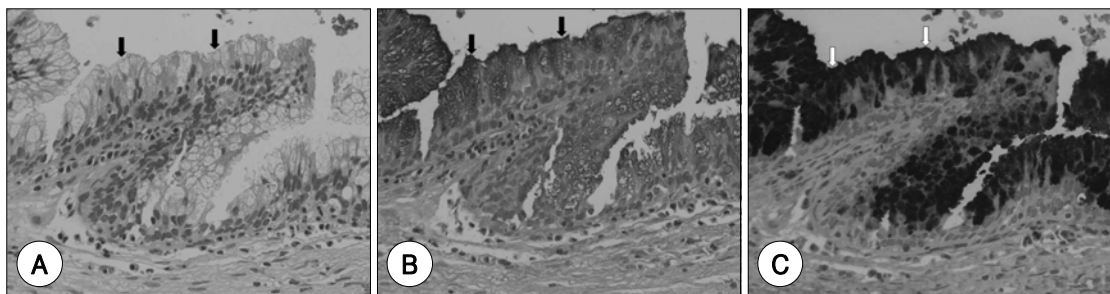


Fig. 4. H & E stain, ×400 (A), PAS-AB stain (B) and MUC5AC immunohistochemical stain (C) of rabbit middle ear mucosa in the group treated with antibiotic at 11 days after treatment (original magnification ×400). Infiltration of inflammatory cells in this group is significantly decreased compared to the infected control group. But Alcian blue positive goblet cells (black arrows) and MUC5AC immunorexpression (white arrows) are significantly increased compared to the groups of steroid only or combination treatment.

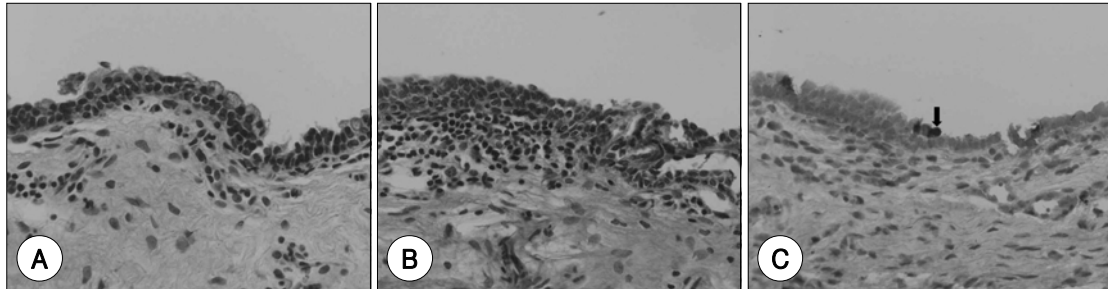


Fig. 5. H & E stain, $\times 400$ (A), PAS-AB stain (B) and MUC5AC immunohistochemical stain (C) of rabbit middle ear mucosa in the group of antibiotic and steroid combination therapy at 11 days after treatment (original magnification $\times 400$). Infiltration of inflammatory cells in this group is markedly decreased compared to the infected control group. Few goblet cells are found on the mucosa. MUC5AC immunoexpression (arrow) is found in only a small portion of middle ear mucosa.

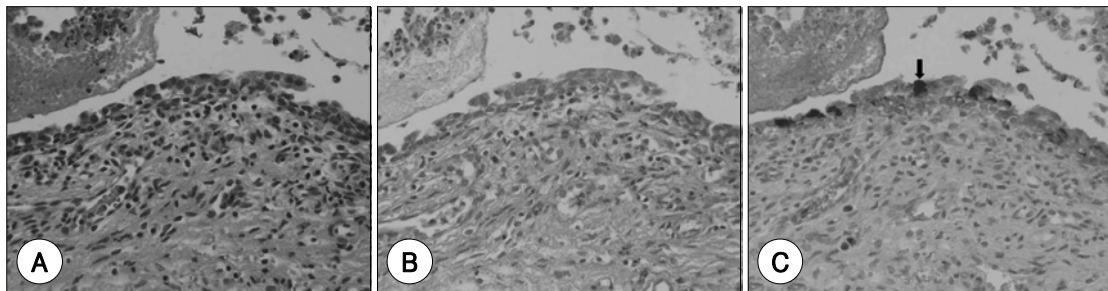


Fig. 6. H & E stain, $\times 400$ (A), PAS-AB stain (B) and MUC5AC immunohistochemical stain (C) of rabbit middle ear mucosa in the group with steroid only therapy at 11 days after treatment (original magnification $\times 400$). Inflammatory cells were markedly increased compared to the antibiotic treated group. Obvious goblet cells are not found and only a few MUC5AC immunoexpression (arrow) is observed in a small portion of middle ear mucosa.

시기의 항생제와 스테로이드를 각각 단독투여한 1군과 3군 조직에 비해 현저히 감소한 소견을 보였다($p < 0.05$). PAS-Alcian blue 및 MUC5AC에 양성인 점액분비세포도 평균 6 ± 1.7 개로 1군보다 훨씬 감소한 소견을 보였으나($p < 0.05$), 3군과는 유사하였다(Figs. 5 and 7).

제 3군(스테로이드 단독투여군)

스테로이드 투여 5일째와 11일째에서도 조직학적 비교시 시간에 따른 차이는 없었으며($p > 0.05$), 11일째의 조직소견상 염증세포의 침윤은 상피층 내에서는 평균 78 ± 4.9 개, 상피하층에는 평균 112 ± 7.6 개로 항생제를 단독 투여한 동일 시기의 1군조직과 비교시 염증세포의 침윤이 매우 심하였다($p < 0.05$). 반면 PAS-Alcian blue 및 MUC5AC에 양성인 점액분비세포는 평균 6 ± 1.8 개로 1군에 비해 현저히 감소된 소견을 보였지만($p < 0.05$), 병합요법을 시행한 2군과의 차이는 없었다(Figs. 6 and 7).

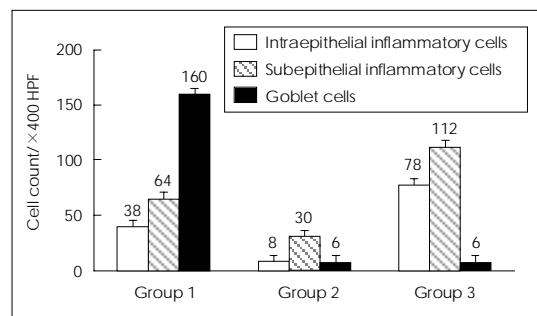


Fig. 7. Quantitative analysis of the inflammatory cells and goblet cells (11 days after treatment). Group 1 : treated with antibiotic only, Group 2 : treated with steroid and antibiotic, Groups 3 : treated with steroid only.

결국 각 군($n=4$) 별로 광학현미경으로 고배율($\times 400$)에서 염증세포와 배세포의 수를 정량분석한 결과 시간 경과에 따른 유의한 차이는 없었으나 항생제를 단독 투여한 1군에 비해 스테로이드가 사용된 2군과 3군은

면적당 배세포의 분포가 통계적으로 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$). 스테로이드만 투여한 3군에서 염증세포의 침윤은 가장 심하였지만 점액분비능을 대변하는 배세포의 분포는 1군에 비해 현저히 감소된 소견을 보였다($p < 0.05$).

고 찰

중이고실 점막은 상기도 점막의 일종으로 편평 또는 입방상피로 덮여 있으나 하고실과 이관이행부로 갈수록 섬모상피로 덮여 있고 그 사이에 분비기능이 있는 배세포가 분포하며 이관과 함께 중이의 청소기능을 담당한다.¹⁾ 정상적으로 배세포는 점액(mucin)을 분비시켜 일차적 방어기능을 수행하며 또한 antileukoprotease를 생산하여 점막통합성(mucosal integrity)을 보강하고, 살균성 분해효소를 생성하여 더욱 특이적인 항균작용을 가능하게 한다.⁶⁾ 그러나 이러한 중이점막에 염증이 생기면 상피화생(columnar metaplasia)이 일어나고, 배세포나 선조직의 증가로 점액이 과분비된다. 이 상태가 지속되면 점액의 점도가 증가되어 점액섬모수송체계(mucocilliary transport system)에 장애가 일어나 중이염의 만성화를 조장하게 된다.

여러 실험적 급성 중이염 동물 모델에서 중이는 점막 내의 혈관 및 점막 자체에 다양한 면역글로불린의 발현과 함께 호중성 백혈구 및 림프구 등의 염증세포가 관찰되어 중이염의 발생에 관여하는 것으로 알려져 있으며,⁷⁾ 또한 배세포증식이 호중성 백혈구의 염증매개물질에 의해 자극되고 NSAID 및 Corticosteroids에 의해 억제되는 현상으로 보아 이러한 염증 매개체들에 의해 점막의 분비능을 증가시키는 배세포의 분화가 유발되며 이러한 현상은 6개월 이상까지도 지속되는 것으로 알려져 있다.⁸⁾ 본 실험에서는 감염대조군의 조직학적 관찰시 심한 염증소견과 함께 상피층에서 다수의 MUC5AC 양성 반응을 보였으나 치료를 시행한 모든 실험군에서 관찰되었던 배세포는 뚜렷이 관찰되지 않았는데 이는 아마도 심한 염증과 상피층의 괴사로 인하여 상피층이 부분적으로 소실되고 배세포의 파괴가 함께 진행되어 나타난 결과로 생각된다.

급성 중이염에서 항생제의 효과는 점막 상피층의 두께를 감소시키고 염증세포의 침윤을 억제하며, 혈관 투과성을 감소시키고, 특히 중이 점막의 상피층이 점액분비세포로 분화되는 현상을 경감시켜 급성중이염에서 삼출성 중이염으로의 진행을 감소시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다.⁹⁾ 본 실험에서도 항생제 단독투여군에서 염증반응이 줄어들고 배세포도 감소된 소견을 보여 간접적으로 과다점액분비능의 감소를 관찰할 수 있었으며, 이는 급성 중이염 초기의 적절한 항생제 투여가 중이염의 만성화를 억제할 수 있다는 치료 원칙과 일치하는 근거가 된다고 할 수 있다. 하지만 최근 내성 균주의 증가와 함께 항생제만으로는 조기 관해를 달성하지 못하는 경우가 많아 수술 이전에 시행할 수 있는 다양한 보존적 치료방법이 연구되고 있으며 특히 스테로이드제의 중이염에 미치는 효과에 대한 관심이 높아졌다.

중이염에서 스테로이드제의 단독 투여 또는 항생제와의 병합요법의 효용성은 연구자마다 다른 결과들을 보고하고 있어 일률적인 사용에 대해서는 아직 논쟁의 여지가 있다. 스테로이드제가 점액분비를 억제시키는 작용기전은 먼저 스테로이드-수용체 복합체를 통해 세포핵에 직접 작용하여 점액분비를 자극할 수 있는 다양한 염증성 cytokine의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ Lambert 등¹¹⁾은 스테로이드제가 지속적인 삼출성 중이염의 치료에 있어 효과가 없다고도 하였고, Christopher 등¹²⁾은 스테로이드제 단독 또는 항생제와의 병합투여가 단기적인 중이염의 치료 효과는 있으나 장기적으로 삼출성 중이염 등으로 인한 청력소실의 호전을 유도할 수 있다는 증거가 없다고 부정적 견해를 보이기도 하였다. 반면 Persico 등¹³⁾은 항생제와 병합요법을 사용해 약 64~70%의 치유율을 보고하였고, Rosenfeld 등¹⁴⁾은 소아 삼출성 중이염에서 스테로이드제 투여군이 위약투여군보다 3.6배 높은 치료율을 보인다고 보고하기도 하였다. 본 실험에서는 항생제와의 병합투여군에서 항생제 단독투여군에 비해 경한 염증소견을 보였으며 배세포도 현저히 감소하여, 병합요법은 적어도 항염작용 및 점막분비능 감소 측면에서 항생제 단독사용보다 이득이 있을 것으로 생각되었다.

Fergie 등¹⁰⁾은 주로 MUC5AC와 MUC5B 점액을 분

비하는 완전히 분화된 HT29-MTX 배세포주를 이용하여 glucocorticoids의 점액분비에 대한 효과를 실험한 결과 스테로이드는 용량 의존적으로 비례해서 점액분비를 억제한다고 보고한 바 있는데, 본 실험에서도 스테로이드 단독투여군에서의 염증반응은 항생제 단독투여군 및 병합투여군보다 심했지만 배세포의 분포와 MUC5AC 양성 반응은 항생제 단독투여군보다 현저히 감소한 소견을 확인하였기에 스테로이드 단독투여만으로도 효과적인 점막분비능의 역제가 유도될 수 있다고 잠정적으로 결론을 지었다.

현재까지 알려진 점액유전자(mucin genes)의 종류는 총 12가지인데 이중 MUC5AC, MUC5B와 MUC6는 모두 11번 염색체에 존재하며 중이점막에서 발견되는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 중이점막에서 발견되는 점액유전자에 대한 연구에서 Huton 등¹⁶⁾은 중이 삼출액이 MUC5AC 및 MUC5B의 항체와 반응한다고 하였고 Buisine 등¹⁷⁾은 MUC5AC가 사람의 기관과 기관지의 모든 배세포에서 발견된다고 보고하였으나 이후 Kim 등¹⁸⁾은 사람 비점막에서 배세포의 일부에서만 MUC5AC가 발견되는 것으로 보아 MUC5AC가 모든 배세포에서 발견되는 것은 아니라고 하였으며, Chung 등¹⁹⁾도 점액성 중이염 환아를 대상으로 한 연구에서 중이점막의 배세포 일부에서만 MUC5AC가 발견된다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 토끼와 인간의 기도 상피세포간의 유사성이 있다는 보고²⁰⁾를 바탕으로 진행한 실험으로 토끼의 정상 중이점막에서는 MUC5AC가 발견되지 않았으나, 이전의 다른 연구들과는 달리 거의 모든 염증점막에서 배세포의 증가와 더불어 MUC5AC 양성반응이 강하게 발견되는 것으로 보아 토끼에서는 MUC5AC가 중이 점막 분비능의 이상을 대변할 수 있는 타당한 지표로 생각되었다.

결 론

급성 중이염의 약물요법에 있어 항생제와 스테로이드 복합투여요법은 중이 점막의 과분비능 감소를 유도할 수 있다는 측면에서 충분한 잇점을 가질 것으로 보이며, 이에 대한 좀더 다양한 측면에서의 접근을 통한 실험이 향후 진행되어야 할 것으로 사료된다.

중심 단어 : 급성 중이염 · 중이 점막 · 스테로이드 · 배세포.

이 논문은 2005년 원주의대 교내교수연구비에 의하여 연구됨.

REFERENCES

- 1) Kim LS, Han CS. Pathophysiology of otitis media with effusion. *J Clinical Otolaryngol* 2000;11:197-205.
- 2) Caye-Thomasen P, Hermansson A, Tos M, Prellner K. Increased secretory capacity of the middle ear mucosa after acute otitis media caused by *Haemophilus influenzae* type B. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;117:263-7.
- 3) Senturia BH, Gessert CF, Carr CD, Bauman ES. Middle ear effusion: Causes and treatment. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1960;64:60-75.
- 4) Harada T, Juhn SK, Adams GL. Lysozyme levels in middle ear effusion and serum in otitis media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;116:54-6.
- 5) Choi JY, Yoon JH, Lee WS, Chung MH. Compositional difference of middle ear effusion according to viscosity of the effusion. *Korean J Otolaryngol* 2001;44:124-8.
- 6) Caye-Thomasen P, Tos M. Eustachian tube goblet cell density during and after acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*: a morphometric analysis. *Otol Neurotol* 2003;24:365-70.
- 7) Svinhufvud M, Hellstrom S, Hermansson A, Prellner K. Mucosal immunoreactivity in experimental pneumococcal otitis media. *APMIS* 1992;100:1015-21.
- 8) Caye-Thomasen P, Hermansson A, Tos M, Prellner K. Middle ear secretory capacity after acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, non-typeable or type B *Haemophilus influenzae*. *Acta Otolaryngol* 2000;543:54-5.
- 9) Caye-Thomasen P, Hermansson A, Tos M, Prellner K. Penicillin reduces secretory capacity in rat middle ear mucosa in acute otitis media. *Am J Otol* 1996;17:354-9.
- 10) Fergie N, Guo L, Sithole J, Pearson JP, Birchall JP. Influence of prednisolone on the secretion of mucin from the HT29-MTX cell line. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2003;28:39-42.
- 11) Lambert PR. Oral steroid therapy for chronic middle ear perfusion: a double-blind crossover study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1986;95:193-9.
- 12) Butler CC, van der Voort JH. Steroids for otitis media with effusion. *Arch Pediatr Adolesc* 2001;155:641-7.
- 13) Persico M, Podoshin L, Fradis M. Otitis media with effusion: a steroid and antibiotic therapeutic trial before surgery. *Ann Otol* 1978;87:191-6.
- 14) Rosenfeld RM, Mandel EM, Bleustone CD. Systemic steroids for otitis media with effusion in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;117:984-9.
- 15) Ho SB. Tissue distribution of secretory mucins and alterations of mucin gene expression in chronic *H. pylori* infection of the stomach. In: Baum GL, Priel Z, Roth Y, Liron N, Ostfeld EJ, eds. *Cilia, mucus, and mucociliary interactions*. New York: Marcel Dekker;1998. p.353-66.

- 16) Hutton DA, Fogg FJ, Kubba H, Birchall JP, Peardon JP. *Heterogeneity in the protein cores of mucins isolated from human middle ear effusions: Evidence for expression of different mucin gene products. Glycoconj J 1998;15:283-91.*
- 17) Buisine MP, Devisme L, Copin MC, Durand-Reville M, Gosselin B, Aubert JP, et al. *Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract. Am J Respir Cell Biol 1999;20:209-18.*
- 18) Kim CH, Song KS, Kim SS, Kim Hu, Seong JK, Yoon JH. *Expression of MUC5AC mRNA in the goblet cells of human nasal mucosa. Laryngoscope 2000;110:2110-3.*
- 19) Chung MH, Choi JY, Lee WS, Kim HN, Yoon JH. *Compositional difference in middle ear effusion: mucous versus serous. Laryngoscope 2002;112:152-5.*
- 20) Pavelka M, Ronge HR, Stockinger G. *Comparative study of tracheal epithelium of different mammals. Acta Anat 1976; 94:262-82.*