

Interleukin-1 β 가 중이 진주종의 골파괴에 미치는 영향

대구가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실,¹ 수성예일이비인후과²
손수준¹ · 신승현¹ · 이영호¹ · 김창균¹ · 이태우²

The effect of Interleukin-1 β on Bone Resorption in Aural Cholesteatoma

Soo-Joon Sohn, MD¹, Seung-Heon Shin, MD¹, Young-Ho Lee, MD^{1,2},
Chang-Gyun Kim, MD¹ and Tae-Woo Lee, MD²

¹Department of Otolaryngology, College of Medicine, Daegu Catholic University, Daegu,
²Susung Yael ENT Clinic, Daegu, Korea

—ABSTRACT—

Background and Objectives : Cholesteatoma is characterized by temporal bone erosions resulting in fatal intracranial complications. Osteoclasts are the principal cell of bone resorption playing a major role in focal bone erosion associated with cholesteatoma. Inflammatory cytokines such as interleukins and tumor necrosis factor are implicated in osteoclastic bone resorption. This study was conducted in order to investigate the effect of interleukin-1 β (IL-1 β) on bone resorption in cholesteatoma. **Materials and Methods** : The concentration of IL-1 β in cholesteatoma epithelium was measured by enzyme linked immunosorbent assay. The effects of osteoclastogenesis and osteoclastic bone resorption were measured in receptor activator for NF- κ B ligand-induced mouse osteoclast cultures and by osteoclastic bone resorption assay. **Results** : The concentration of IL-1 β in cholesteatoma epithelium was significantly elevated compared with control. Treatment with IL-1 β (10 ng/mL and 100 ng/mL) significantly increased osteoclastogenesis. The resorption surface area on dentin slices were significantly increased by osteoclasts which were stimulated with IL-1 β (10 ng/mL). IL-1 receptor antagonist (10 ug/mL) blocked the upregulatory effect of IL-1 β on osteoclastogenesis. **Conclusion** : These results suggest that the increased IL-1 β produced by cholesteatoma epithelium directly stimulates osteoclasts leading to focal bone erosion in cholesteatoma. (J Clinical Otolaryngol 2008;19:177-182)

KEY WORDS : Cholesteatoma · Bone resorption · Osteoclast · Interleukin-1beta.

서 론

염증성 골파괴질환의 하나인 중이 진주종은 각질세포

가 중이강내로 침입하여 발생하며, 특징적인 측두골 파괴로 인한 난청, 현훈, 안면신경마비 혹은 뇌막염, 뇌농양 등 치명적인 두개내 합병증을 유발하여 종종 응급수술을 필요로 한다.¹⁾

논문접수일 : 2008년 8월 28일
논문수정일 : 2008년 9월 24일
심사완료일 : 2008년 10월 21일
교신저자 : 신승현, 705-034 대구광역시 남구 대명4동 3056-6, 대구가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (053) 650-4525 · 전송 : (053) 650-4533
E-mail : hsseung@cu.ac.kr

이러한 진주종에서의 골파괴에는 골수 대식세포에서 유래하는 거대 다핵세포인 파골세포가 주요한 역할을 한다.²⁾ 각종 염증성 사이토카인, 프로스타글란딘, 신경펩타이드 등이 진주종을 비롯하여 류마티스 관절염, 치주염, 인공관절 주위염 등 여러 염증성 골파괴질환에서의 파골세포 증식 및 골흡수에 직, 간접적으로 관여한다.^{3,4)} 대

표적인 염증성 사이토카인인 interleukin-1 β (IL-1 β)는 파골전구세포인 골수 대식세포를 염증장소로 유인하고 파골세포로 분화하도록 자극하며, 분화된 파골세포를 활성화하여 주위골의 흡수를 유도하는 것으로 알려져 있다.⁵⁾

진주종에서 이러한 IL-1 β 의 과발현을 증명하는 많은 보고⁶⁻⁸⁾가 있으나 대부분 면역조직화학법이나 in situ hybridization 등에 의한 것으로서 고정된 상피세포들에서의 발현정도를 간접적으로 살펴보는 것이었으며, 진주종의 상피조직에서 IL-1 β 의 농도를 직접 측정하여 정상조직과 비교한 연구는 없었다. 또한 IL-1 β 가 파골전구세포나 파골세포를 직접 자극하여 골파괴를 유도하는지, 아니면 파골세포의 분화와 활성을 자극하는 다른 세포를 자극함으로써 간접적으로 골파괴에 관여하는지에 대해서는 논란이 있다.

본 연구에서는 골파괴를 유도하는 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 농도를 진주종 상피에서 직접 측정하여 정상조직에서보다 그 농도가 증가되어 있는지를 확인하였다. 그리고 IL-1 β 가 파골세포 성장 및 기능에 미치는 직접적인 영향을 규명하기 위해 생쥐 골수에서 대식세포만을 분리, 배양하고 이들 세포가 파골세포로 분화하는 과정에 IL-1 β 를 투여하여 파골세포 분화에 대한 IL-1 β 의 효과를 살펴보았다.

또한, IL-1 β 가 그 수용체를 통하여 파골세포 분화를 자극하는지를 알아보기 위해 파골세포 배양시 IL-1 β 와 함께 그 수용체 차단제인 IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)를 동시 투여하여 그 효과를 살펴보았고, 파골세포의 골흡수 기능에 대한 IL-1 β 의 역할을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

IL-1 β enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit은 R & D systems (Minneapolis, MN)에서, IL-1 β , IL-1ra, macrophage colony stimulating factor (mCSF), receptor activator for nuclear factor kappa B ligand(RANKL) 등은 Sigma(St. Louis, MO)에서 구입하였다.

방 법

조직채취 및 처리

29명의 중이 진주종 환자에서 수술시 채취한 진주종 상피를 액화질소에 급속냉동한 후 -70 $^{\circ}$ C의 냉동고에 보관하였다. 대조군으로는 12명의 진주종 혹은 비진주종성 중이염 환자의 수술시 소량 채취한 이주 혹은 후이개 피부부를 사용하였다. 냉동 보관된 각 조직 30 mg당 1 mL의 균질화 완충액(1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS를 함유한 인산완충용액)을 가하여 조직균질기로 1~5분간 갈아서 균질화시켰다. 균질화된 조직을 15,000 g(10,000 rpm)에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻어서 실험에 사용하였다.

총단백량 및 IL-1 β 의 농도 측정

총단백량은 bicinchoninic acid (BCA)법을 이용하여 측정하였다. IL-1 β 의 농도는 ELISA kit을 이용하여 측정하였으며 그 방법은 다음과 같다. 조직을 처리하여 얻은 상층액을 실온에서 2시간동안 rabbit antihuman polyclonal antibody와 반응시켰다. Goat antirabbit conjugated alkaline phosphatase와 다시 2시간동안 반응시켜 잔류 사이토카인과 결합하게 한 뒤 착색제 A-B(chromogenic substrate)와 반응시킨 후 광학식 독해장치를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 회사에서 제공된 표준용액에 의한 흡광도를 기준으로 하여 각 조직의 IL-1 β 의 pg/mL로 구하였으며 이는 다시 각 조직에서 구한 총단백량에 따라 pg/mg total protein(pg/mg TP)로 환산되었다.

파골세포 배양

4~6주 연령의 C57B1/6 생쥐 대퇴골 및 경골에서 골수를 채취하여 10% fetal calf serum을 함유한 α modified eagle media(α 10 MEM)에서 37 $^{\circ}$ C하에 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배양용기에 유착되지 않은 세포들을 모아 Ficoll-Hypaque용액(Sigma, St. Louis, MO)에서 원심분리하여 중간층에 모인 골수 대식세포를 조심스럽게 흡입하여 mCSF(10 ng/mL)를 함유한 배지에서 3~5일간 배양하여 사용하였다. 파골세포 배양 시에는 48-well 배양용기를 사용하였으며, mCSF(10

ng/mL)와 RANKL(200 ng/mL)을 함유한 배지 1 mL 당 200,000~300,000개의 골수 대식세포를 배양하였다. IL-1 β (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ng/mL)는 배양 첫날부터 투여하였으며 파골세포는 대개 5일째부터 관찰되기 시작하였다. 7일째에 세포를 고정한 후 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)염색 후 광학현미경하에서 디지털카메라로 각 well당 무작위로 4군데의 사진을 찍어서 영상분석 프로그램인 SigmaScan[®] Pro version 5.0(SPSS Science, Chicago, IL)을 이용하여 TRAP염색된 면적을 구하였다. 각 실험군에서의 TRAP염색된 면적은 IL-1 β 를 투여하지 않고 배양한 well에서의 TRAP염색된 면적에 대한 백분율로 환산되었다. 또한, 파골세포에 대한 다른 요소의 효과를 배제하고 IL-1 β 가 그 수용체를 통해 작용하는지를 알아보기 위해 파골세포 배양시 IL-1 β 와 IL-1ra를 동시에 투여하여 그 효과를 측정하였다.

파골세포의 골흡수 면적 측정

골흡수를 측정하기 위해 먼저 골수 대식세포를 상아질 조각 위에 놓고 배양하여 파골세포로 분화하도록 하였다. 파골세포가 관찰되는 배양 5일째부터 IL-1 β (0~10 ng/mL)를 투여하였으며 9일째에 dentin조각 위의 파골세포를 제거한 후 toluidine blue용액을 이용하여 골흡수로 인한 함몰부(pit)를 염색하고 광학현미경하에서 디지털카메라로 각 상아질 조각당 무작위로 4군데의 영상을 얻은 후 SigmaScan[®] Pro version 5.0을 이용하여 염색된 면적을 구하였다. 각 실험군에서의 함몰부의 면적은 IL-1 β 를 투여하지 않고 배양한 상아질 조각에서의 함몰부의 면적에 대한 백분율로 환산되었다.

통계처리

실험을 통해 얻어진 data는 SigmaStat[®](SPSS Inc., Chicago, IL)을 이용한 t-test와 One-way ANOVA 및 Dunn's multiple comparison법을 사용하여 대조군과 비교하였으며, p<0.05인 경우 통계학적인 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

IL-1 β 의 농도는 진주층 상피, 대조군에서 각각 16.62

± 10.71 , 2.67 ± 1.56 pg/mg TP이었으며, 진주층 상피에서의 농도가 대조군에서보다 유의하게 높았다(Fig. 1). IL-1 β 의 파골세포 분화에 대한 직접적인 영향을 규명하기 위해 이 연구에서는 골수대식세포만을 분리하여 배양하였으며, IL-1 β 의 작용을 매개할 수 있는 기질세포 혹은 골모세포는 배제하였다. mCSF와 RANKL을 함유한 배지에서 배양 5~7일째에 여러 개의 핵을 가지고 TRAP 염색에 양성반응을 보이는 파골세포들이 다수 관찰되었으며 그 수 및 면적은 IL-1 β 의 농도의 증가함에 따라 증가하였으며 IL-1 β 10 ng/mL과 100 ng/mL 투여시 대조군에 비해 $194.4 \pm 24.2\%$ 와 $202.8 \pm 58.8\%$ 로 통계학적으로 유의하게 TRAP염색되는 세포의 면적이 증가하였다(Fig. 2). 그러나 IL-1 β (10 ng/mL)와 IL-1ra (10 μ g/mL)를 동시에 투여하였을 때에는 배양된 파골세포의 수와 면적이 대조군에 비해 $40.5 \pm 18.9\%$ 로 유의하게 감소하였다(Fig. 3). 배양된 파골세포에 의한 골흡수로 인해 생성된 상아질조각 표면의 함몰부의 면적은 IL-1 β (10 ng/mL) 투여 5일이 경과 후 대조군에 비해 305.2 ± 170.6 으로 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

고 찰

염증성 중이질환인 중이 진주종은 고막에서 유래하는 각질세포가 중이강내에서 과증식함으로써 발생하게 되는데, 각질의 침착과 함께 주변 골의 파괴를 동반하여 측두

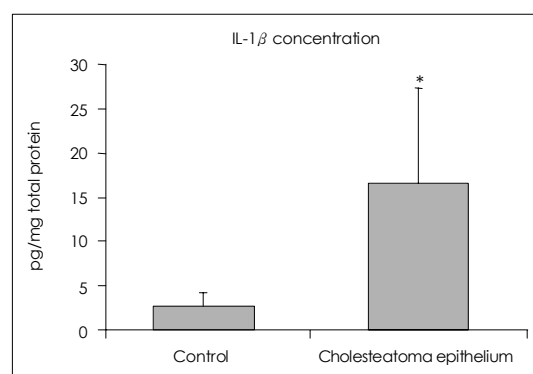


Fig. 1. Concentration of interleukin-1 β (IL-1 β) in cholesteatoma epithelium and control skin measured by enzyme linked immunosorbent assay. Cholesteatoma epithelium showed significantly elevated IL-1 β concentration compared with control. * : p<0.05 versus control.

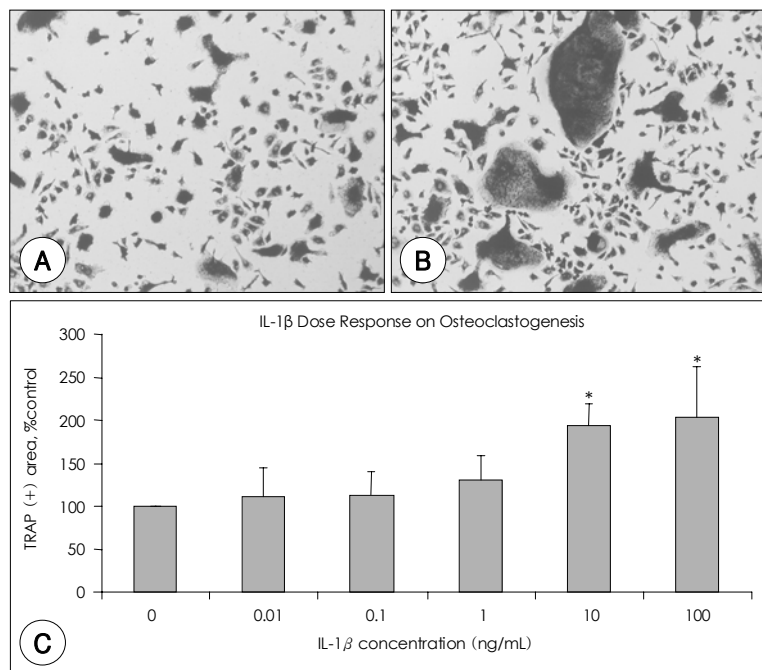


Fig. 2. Interleukin-1 β (IL-1 β) upregulates osteoclastogenesis directly in vitro. Mouse bone marrow macrophages were isolated and cultured in the presence of macrophage colony stimulating factor (mCSF, 10 ng/mL) and receptor activator for NF- κ B ligand (RANKL, 200 ng/mL). A : Pure population of multinucleated tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) (+) cells were generated on day 7 (\times 400). B : Treatment with IL-1 β (100 ng/mL) from day 1 of the culture significantly increased TRAP (+) area compared with control. C : IL-1 β upregulated osteoclastogenesis in a dose-dependent manner. * : $p < 0.05$ versus control.

골 내외에 다양한 합병증을 초래할 수 있다. 진주종에서 골파괴의 원인으로는 침착된 각질에 의한 물리적인 압박, 골파괴 효소의 작용 등이 제시되었으며 최근에는 파골세포의 과증식 및 활성화가 가장 유력한 원인인 것으로 생각되고 있다.^{9,10} 진주종에서 침착된 각질은 국소적인 염증반응을 야기하여 염증세포의 침윤을 초래하며, 이들 염증세포들이 분비하는 각종 염증성 사이토카인들은 파골세포를 자극하여 acid phosphatase, collagenase, cathepsin 등 골파괴효소를 분비케 함으로써 골파괴를 유도한다는 것이다. 실험적으로 각질을 두개골 표면에 투여하면 염증반응이 일어나고 파골세포가 증식하며 골파괴가 일어난다.¹¹⁻¹³ 그러나 진주종에서의 골파괴에 어떤 사이토카인이 직접적으로 관여하여 파골세포의 증식 및 활성화를 자극하는지는 아직 규명되지 않고 있다.

골수의 기질세포, 골모세포, T 림프구 등으로부터 분비되는 mCSF와 RANKL은 골수 대식세포가 파골세포로 분화하는데 필수적인 두 가지 인자이다.¹⁴ mCSF는 체외 배양시 골수 대식세포의 생존을 유지하는데 필요한 요소이다. 최근에 발견된, 오랫동안 찾아왔던 단백질이며 파골세포의 성장에 가장 중요한 인자인 RANKL은 골수

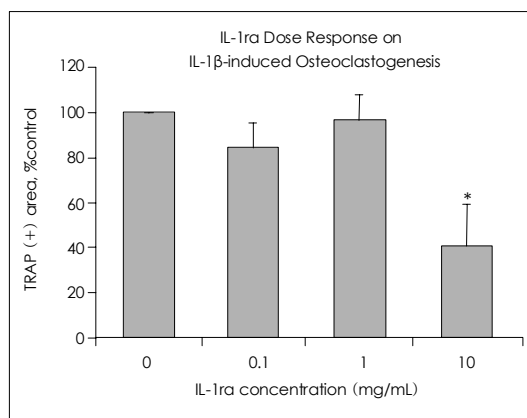


Fig. 3. IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) blocks the upregulatory effect of IL-1 β on osteoclastogenesis. When IL-1 β (10 ng/mL) and IL-1ra (10 μ g/mL) were administered simultaneously, TRAP (+) area was significantly reduced. * : $p < 0.05$ versus control.

대식세포 표면의 수용체인 RANK(receptor activator for nuclear factor kappa B)와 결합하면 세포내의 전사인자(transcription factor)인 NF- κ B(nuclear factor kappa B), c-jun 등을 자극하여 특정 mRNA를 전사하게 함으로써 대식세포가 파골세포로 분화하는데 필

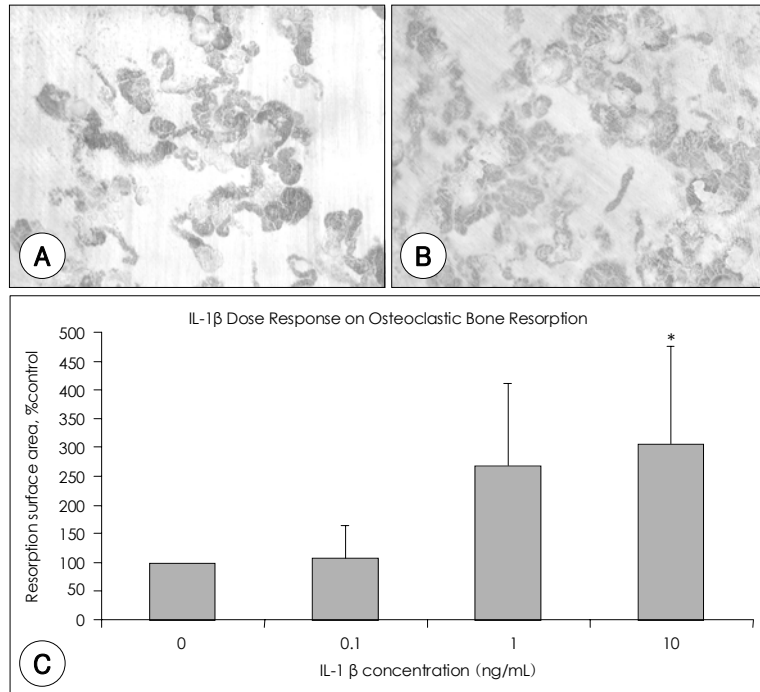


Fig. 4. IL-1 β activates osteoclastic bone resorption in vitro. Bone marrow macrophages were isolated and plated on dentin slices in the presence of mCSF (10 ng/mL) and RANKL (200 ng/mL). A : On day 9 of culture, multiple resorption pits were identified on the surface of dentin slices ($\times 400$). B : Treatment with IL-1 β (10 ng/mL) from day 5 significantly increased resorption pit number and surface area. C : IL-1 β (10 ng/mL) significantly increased resorption surface area compared with control. * : $p < 0.05$ versus control.

요한 단백질을 합성케 한다. 아직 RANKL외에는 골수 대식세포를 파골세포로 분화하게 하는 물질이 발견되지 않았다. 골흡수에 관여하는 염증성 사이토카인들이 골수 대식세포에서 NF- κ B 등을 직접 자극하여 파골세포로 분화하게 하는지, 혹은 RANKL을 분비하는 세포를 자극함으로써 간접적으로 골파괴를 유도하는지에 대해서는 논란이 있다. 최근 Sohn¹⁵⁾은 신경 펩타이드의 하나인 substance P(SP)가, Lam 등¹⁶⁾은 TNF- α 가 각각 골수 대식세포에서 NF- κ B 혹은 c-jun을 자극함을 증명하나 있으나, 이들은 RANKL에 의해 유발된 파골세포 분화를 증폭할 뿐 RANKL의 투여가 없이 SP 혹은 TNF- α 단독으로는 파골세포 배양이 가능하지 않다.

대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1은 주로 대식세포, 단핵구, 림프구 등 면역세포에서 분비되며 연관된 물질들로는 IL-1 α , IL-1 β 그리고 IL-1ra가 있다. 진주중에서는 IL-1 α 와 IL-1 β 가 모두 증명되지만 배양된 진주중세포는 주로 IL-1 α 를 분비한다. 강력한 골파괴 인자인 IL-1은 파골세포를 자극할 뿐만 아니라 진주중 조직에서 프로스타글란딘의 합성을 증가시킴으로써 골파괴를 유도한다.¹⁷⁾ IL-1 β 에 의한 골파괴는 IL-1ra에

의해 억제된다고 한다.¹⁸⁾ 진주중 상피에서 IL-1 β 의 과발현은 주로 면역조직화학법에 의해 증명되었으나 본 연구에서와 같이 그 농도를 직접 측정된 경우는 없었다. 본 연구에서는 수술시 채취한 진주중 상피조직에서 ELISA법을 통하여 측정된 IL-1 β 의 농도가 정상피부에서보다 높음을 증명하였다. 이는 실제적으로 진주중에서는 IL-1 β 의 활성도가 정상조직에서보다 높으며, 진주중에서 염증이 심할수록 골파괴가 심하다는 것을 의미한다.

IL-1이 골수 기질세포, 골모세포 등을 자극하여 RANKL을 분비케 함으로써 간접적으로 파골세포를 자극하는지, 혹은 TNF- α 처럼 골수 대식세포를 직접 자극하는지는 아직 논란이 있는 실정이다. 본 연구에서는 IL-1 β 가 파골세포의 성장 혹은 기능에 미치는 직접적인 영향을 규명하기 위해 골수조직에서 기질세포 등을 배제하고 대식세포만 분리, 배양하여 적정농도의 mCSF와 RANKL을 투여하여 파골세포로 분화하도록 하였다. 배양시 mCSF나 RANKL을 투여하지 않은 경우에는 파골세포가 전혀 배양되지 않았으므로(data not shown) 대식세포 외에 mCSF나 RANKL 등을 분비하는 다른 세포들은 완전히 배제되었다고 생각된다. 본 연구에서 IL-1 β (10 ng/mL,

100 ng/mL)의 투여는 mCSF와 RANKL에 의해 분화된 파골세포의 수와 크기를 유의하게 증가시켰으며, 이는 100 ng/mL까지는 IL-1 β 의 농도가 상승함에 따라 증가되었다. 골흡수 측정실험에서는 파골세포가 출현하기 시작하는 5일째부터 IL-1 β 를 투여하였으며 IL-1 β (10 ng/mL)의 투여는 파골세포에 의한 골흡수 면적을 유의하게 증가시켰다. 또한, IL-1 β 의 수용체 차단제인 IL-1ra(10 ng/mL)를 IL-1 β 와 동시투여하였을때는 파골세포 발생이 감소하였다. 이는 IL-1 β 가 골수 대식세포 혹은 파골세포의 표면에 존재하는 수용체를 통하여 파골세포 분화 및 골흡수기능에 직접적으로 작용하는 것을 의미한다.

그러나 IL-1 β 단독투여로는 파골세포가 배양되지 않으므로, IL-1 β 는 파골세포에 직접 작용하나 TNF- α 나 SP와 유사하게 RANKL에 의해 유발된 파골세포 분화를 증폭시키는 것으로 생각된다. 향후 IL-1 β 의 파골세포 분화 혹은 기능에 대한 세포내 신호전달체계를 규명하기 위해서는 IL-1 β 가 골수 대식세포 혹은 파골세포의 NF- κ B, c-jun 등을 활성화하는지에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과들을 종합해 보면 mCSF와 RANKL로 유도된 파골세포는 IL-1 β 에 의해 골흡수를 유도하는 것을 확인할 수 있었으며, 수술시 채취한 진주종 상피세포에서도 정상피부보다 많은 양의 IL-1 β 를 포함하고 있었다. 즉 진주종성 중이염에 의한 골과괴가 진주종 상피세포에서 만들어진 IL-1 β 에 의해 파골세포가 활성화되어 이루어진다는 사실을 확인할 수 있었다.

중심 단어 : 진주종 · 골흡수 · 파골세포 · Interleukin-1 beta.

REFERENCES

- 1) Chole RA. Osteoclasts in chronic otitis media, cholesteatoma, and otosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988;97 (6 pt 1): 661-6.
- 2) Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. *Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. N Engl J Med* 1995;332 (5):305-11.
- 3) Merkel KD, Erdmann JM, McHugh KP, Abu-Amer Y, Ross FP, Teitelbaum SL. Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. *Am J Pathol* 1999;154 (1): 203-10.
- 4) Goldring SR. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14 (4):406-10.
- 5) Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 1999;25 (3):255-9.
- 6) Sudhoff H, Bujia J, Holly A, Kim C, Fissler-Eckhoff A. Functional characterization of middle ear mucosa residues in cholesteatoma samples. *Am J Otol* 1994;15 (2):217-21.
- 7) Marenda SA, Aufdemorte TB. Localization of cytokines in cholesteatoma tissue. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 112 (3):359-68.
- 8) Kim CS, Lee CH, Chung JW, Kim CD. Interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interleukin-8 gene expression in human aural cholesteatomas. *Acta Otolaryngol* 1996;116 (2): 302-6.
- 9) Abramson M. Collagenase activity in middle ear cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1969;78 (1):112-24.
- 10) Chole RA. Cellular and subcellular events of bone resorption in human and experimental cholesteatoma: the role of osteoclasts. *Laryngoscope* 1984;94 (1):76-95.
- 11) Thomsen J, Bretlau P, Kristensen HK. Bone resorption in chronic otitis media. A light-microscopical and histochemical investigation of acid phosphatase activity. *Acta Otolaryngol* 1975;79 (5-6):400-8.
- 12) Moriyama H, Honda Y, Huang CC, Abramson M. Bone resorption in cholesteatoma: epithelial-mesenchymal cell interaction and collagenase production. *Laryngoscope* 1987; 97 (7 pt 1):854-9.
- 13) Chole RA, Hughes RM, Faddis BT. Keratin particle-induced osteolysis: a mouse model of inflammatory bone remodeling related to cholesteatoma. *J Assoc Res Otolaryngol* 2001;2 (1):65-71.
- 14) Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397 (6717):315-23.
- 15) Sohn SJ. Substance P upregulates osteoclastogenesis by activating nuclear factor kappa B in osteoclast precursors. *Acta Otolaryngol* 2005;125 (2):130-3.
- 16) Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 2000;106 (12):1481-8.
- 17) Kurihara A, Toshima M, Yuasa R, Takasaka T. Bone destruction mechanisms in chronic otitis media with cholesteatoma: specific production by cholesteatoma tissue in culture of bone-resorbing activity attributable to interleukin-1 alpha. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991;100 (12):989-98.
- 18) Chole RA, Tinling SP, Faddis BT. Human recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks bone resorption induced by interleukin-1 beta but not interleukin-1 alpha. *Calcif Tissue Int* 1994;55 (1):12-5.