

진주종에서 증식표지인자의 발현

중앙대학교 의과대학 이비인후과학교실

장경훈·도홍림·양훈식·홍영호·김 훈·김춘길

= Abstract =

Expression of Proliferative Markers in Cholesteatoma

Kyung Hoon Chang M.D., Hong Lim Do M.D., Chan Seung Hwang M.D., Hoon Shik Yang M.D.,
Young Ho Hong M.D., Hoon Kim M.D., Chun Gil Kim M.D.

Department of Otolaryngology, College of Medicine, Chung Ang University, Seoul, Korea

Middle ear cholesteatoma is often invasive with consequent bone destruction. Inflammatory stimulation of the underlying connective tissue may be responsible for the dysregulation and abnormal proliferative feature of the keratinocytes in cholesteatoma. Comparative investigations were performed to assess the epithelial cell kinetics of cholesteatoma and auditory meatal skin. Monoclonal antibody PCNA and Ki-67 immunohistochemical stainings were applied.

Specimens of cholesteatoma samples (n=30) showed an average PCNA score (quotient of the PCNA positive cells and the total number of cells) of $26.6 \pm 10.1\%$ and an average Ki-67 score of $15.9 \pm 7.2\%$. Auditory meatal skin (n=8) revealed an average PCNA score of $8.2 \pm 3.4\%$ and an average ki-67 score of $4.9 \pm 0.8\%$. The results of this study confirm a highly increase in the proliferation rate of cholesteatoma keratinocytes, which had an PCNA score that was 3.24 times higher than the score for keratinocyte of auditory meatal skin, Ki-67 score of cholesteatoma was 3.24 times higher than auditory meatal skin. Since the cholesteatoma possesses a variable degree of proliferative activities depending on its histologic composition, the formation and accumulation of the keratin due to the continuous epithelial growth probably are important element in inducing the inflammation. The results confirm that cholesteatoma is a hyperproliferative activity and indicate that PCNA and Ki-67 immunohistochemical stainings are valuable tool for assessing cell kinetics in cholesteatoma.

KEY WORDS : Cholesteatoma · PCNA · Ki-67

서 론

중이진주종은 조직학적으로 중이강내 각화성 편평상피가 존재하는 것으로 정의되며, 일반적인 중이염과는 달리 주위 골 조직을 파괴하며 만성적이고 지속적으로 염증반응을 일으켜 수술적으로 제거하는 것만이 병변의 치료 및 합병증을 예방할 수 있다^{12,16}.

진주종의 발생기전에는 아직도 많은 논란이 있으며 임상적으로 여러 유형의 진주종이 각각 다른 발생기전으로 설명되고 있다.

최근 세포증식도를 측정할 수 있는 새로운 방법과 항원들이 소개되면서 악성종양에서 조직학적 분화도, 병기, 림프절전이, 예후 등의 연구에 많이 이용되고 있으며, 진주종에서도 증식표지인자를 이용하여 진주종의 세포증식양상 및 예후인자로의 가능성에 대한 연구가 보고^{3,40}되고 있다.

본 연구의 목적은 세포의 증식표지인자로 알려진 PCNA (proliferating nuclear cell antigen)와 Ki-67을 면역조직화학적 염색을 이용하여 진주종성 중이염과 외이도에서의 발현양상을 관찰함으로써 진주종의 상피의 증식, 분화정도 및 발현의 차이를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1994년 1월부터 1995년 12월까지 2년동안 중앙대학교 이비인후과학교실에서 진주종으로 중이수술을 받은 환자의 표본조직 가운데 비교적 상태가 양호한 30례를 대상으로 하였으며 대조군으로는 8명의 환자로부터 외이도 상피를 얻어 시행하였다.

2. 방 법

1) 면역조직화학적 염색방법

파라핀 포매체를 5 μ m로 절편하여 L-lysine으로 처리된 슬라이드에 조직 절편을 부착시켰다. Xylene으로 탈파라핀 및 에탄올로 함수처

리한 후 내재성 과산화효소의 활성 반응을 없애기 위해 3% H₂O₂를 사용하여 5분간 처리하였다. Citric acid 완충용액 (0.01M, pH 6.0)이 들어있는 용기에서 5분 동안 2회에 걸쳐 microwave를 이용하여 가열 처리한 후 tris 완충용액 (0.05M, pH 7.6)으로 세척한 다음 protein blocking agent를 첨가하여 실온에서 10분동안 반응시켰다.

1 : 10으로 희석한 PCNA에 대한 단클론 항체 (Monosan사 제품)와 1 : 50으로 희석한 Ki-67에 대한 단클론 항체 (Zymed사 제품)를 첨가한 후 실온에서 하룻밤 동안 반응시켰고 tris 완충용액으로 세척한 후 anti-mouse biotinylated IgG 2차 항체를 도포하여 실온에서 20분간 반응시켰다. Peroxidase-labeled streptavidine anti-rabbit immunoglobulin으로 20분간 처리한 후 aminoethylcarbazole (AEC) chromogen을 도포하였으며 Mayer hematoxylin에 5분간 대조염색한 다음 crystal mount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2) 염색판정 및 표지지수의 산정

세포핵에 진한 갈색으로 염색된 것을 양성으로 하였고, 상피층의 양성 염색세포수를 광학현미경을 이용하여 임의로 선택한 한 개의 시야를 400배 시야에서 5번 세어 평균을 구하였다.

관찰방법은 상피층의 아래층을 형성하는 기저층, 그 윗부분인 기저적상부, 그리고 세포질이 풍부한 표층으로 구분하여 관찰하였으며, 다음과 같은 방법으로 표지지수 (proliferating index)를 구하였다.

$$\text{표지지수(%)} = \frac{\text{상피층내의 양성 염색 세포수}}{\text{상피층내의 전체 세포수}} \times 100$$

결 과

1. 진주종에서 PCNA의 발현

진주종에서 PCNA 표지지수의 발현양상은 기저층에서는 23.4 \pm 13.9%, 기저적상부에서는 36.3 \pm 12.2%, 표층에서는 11.3 \pm 7.9%로 관찰

Table 1. PCNA score index for middle ear cholesteatoma and auditory meatal skin epithelium

Epithelium	Mean Ki-67 score ± SD	Score range: Minimum	Score range: Maximum
Cholesteatoma (n=30)	26.6 ± 10.1	10.8	54.0
Basal layer	23.4 ± 13.9	2.1	63.0
Suprabasal layer	36.3 ± 12.2	18.3	63.8
Superficial layer	11.3 ± 7.9	0	30.0
Skin (n=8)	8.2 ± 3.4	4.4	13.1
Basal layer	7.6 ± 4.9	3.1	18.5
Suprabasal layer	10.5 ± 4.2	4.8	16.9
Superficial layer	3.8 ± 3.2	0	9.5

SD=standard deviation, 단위 : %

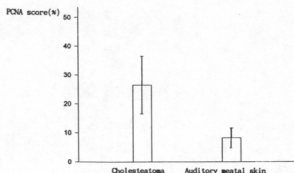


Fig. 1. Mean PCNA score in cholesteatoma and auditory meatal skin

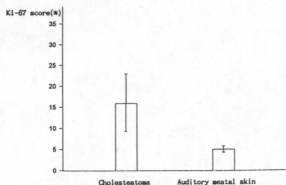


Fig. 2. Mean Ki-67 score in cholesteatoma and auditory meatal skin

되었고, 평균 PCNA 표지자수는 10.8%에서 54.0%까지였으며 평균값은 26.6 ± 10.1%이었다 (Table 1, Fig. 1, 3, 4). 기저적상부에서 가장 많은 양성반응을 보였고, 평균 PCNA 표지자

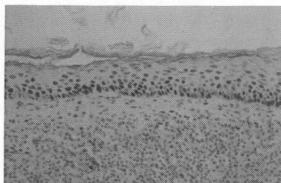


Fig. 3. Immunohistochemical staining for PCNA in cholesteatoma, showing many PCNA-positive keratinocytes in the basal and suprabasal layer. Proliferating cells were found highly dense within the inflamed connective tissue (×200).

수가 진주층에서 외이도 상피보다 3.24배 크게 나타났다. PCNA 표지자수는 상피의 두께가 증가할 수록 증가하였으며, 많은 수의 증식 각화세포가 편평상피 원추 (squamous epithelial cone)내에서 발견되었다 (Fig. 6).

2. 외이도에서 PCNA의 발현

외이도 상피에서 PCNA 표지자수는 기저층에서 7.6 ± 4.9%, 기저적상부에서 10.5 ± 4.2%, 표층에서는 3.8 ± 3.2%로 관찰되었고, 평균 PCNA 표지자수는 8.2 ± 3.4%이었다 (Table

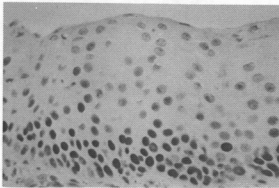


Fig. 4. Immunohistochemical staining for PCNA in cholesteatoma, showing many PCNA-Positive keratinocytes in the basal and suprabasal layer (× 400).

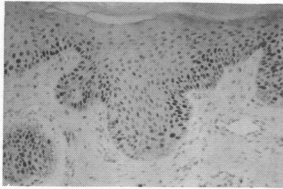


Fig. 6. Immunohistochemical staining for PCNA for cholesteatoma, an increased number of proliferating keratinocytes within epithelial cones have infiltrated the underlying stroma (× 200).

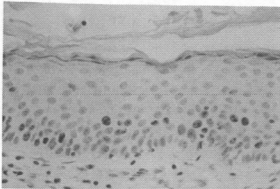


Fig. 5. Immunohistochemical staining for PCNA in auditory meatal skin, showing few PCNA-positive keratinocytes in the basal and suprabasal layer (×400).

1, Fig. 1, 5).

3. 진주종에서 Ki-67의 발현

진주종에서의 Ki-67 표지지수의 발현양상은 기저층에서는 $13.7 \pm 7.7\%$, 기저적상부에서는 $23.8 \pm 10.6\%$, 표층에서는 $2.5 \pm 4.6\%$ 로 관찰되었고, 평균 Ki-67 표지지수는 5.4에서 34.6%까지였으며 평균값은 $15.9 \pm 7.2\%$ 였다 (Table 2, Fig. 2, 7). 기저적상부에서 가장 많은 양성반응을 보였고 진주종에서 평균 Ki-67 표지지수는 외에도 상피보다 3.24배 컸다. 많은 수의 증식 각화세포가 평편상피 원추 (squamous epithelial cone)내에서 발견되었다 (Fig. 9).

Table 2. Ki-67 score index for middle ear cholesteatoma and auditory meatal skin epithelium

Epithelium	Mean Ki-67 score ± SD	Score range: Minimum	Score range: Maximum
Cholesteatoma (n=30)	15.9 ± 7.2	5.4	34.6
Basal layer	13.7 ± 7.7	3.8	32.6
Suprabasal layer	23.8 ± 10.6	8.5	54.5
Superficial layer	2.5 ± 4.6	0	24.7
Skin (n=8)	4.9 ± 0.8	4.0	5.8
Basal layer	3.1 ± 1.9	0	5.6
Suprabasal layer	7.7 ± 1.3	5.1	9.4
Superficial layer	0.6 ± 0.6	0	1.6

SD=standard deviation, 단위 : %

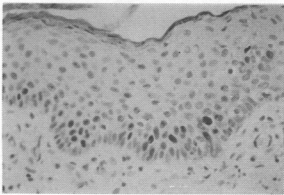


Fig. 7. Immunohistochemical staining for Ki-67 in cholesteatoma, showing many Ki-67 positive keratinocytes in the basal and suprabasal layer ($\times 400$).

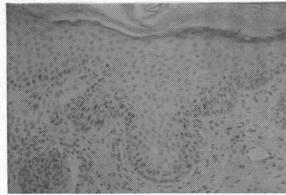


Fig. 9. Immunohistochemical staining for Ki-67 for cholesteatoma, an increased number of proliferating keratinocytes within epithelial cones have infiltrated the underlying stroma ($\times 200$).

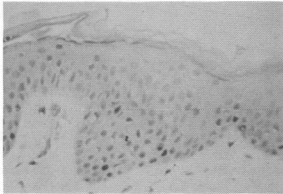


Fig. 8. Immunohistochemical staining for Ki-67 in auditory meatal skin, showing few Ki-67 positive keratinocytes in the basal and suprabasal layer ($\times 400$).

4. 외이도에서 Ki-67의 발현

외이도 상피에서 평균 Ki-67 표지자수는 기저층에서는 $3.1 \pm 1.9\%$, 기저직상부에서는 $7.7 \pm 1.3\%$, 표층에서는 $0.6 \pm 0.6\%$ 으로 관찰되었고 평균 Ki-67 표지자수는 $4.9 \pm 0.8\%$ 이었다 (Table 2, Fig. 2, 8).

고 찰

중이진주종은 각화성 평편상피가 중이내로 들어가면서 탈락된 각질이 쌓이는 질환으로 만성적이고 지속적인 염증을 특징으로 하며 주위 골조직을 파괴하여 심한 난청과 두개내 합병증을 유발하는 질환으로 1838년 Muller가 진주종 (cholesteatoma)이라고 명명한 이후 이에 대한 병리조직학적 연구가 활발히 진행되어왔다. 태생기때 남아있던 편평상피가 증식하여 발생한다는 기전 (congenital theory)과, 이차적으로는 외상후 편평상피가 침입하여 형성될 수 있고 (implantation theory), 고막천공을 통해 편평상피가 이동하여 형성될 수 있으며 (immigration theory), 중이염에 의한 만성적인 자극으로 중이점막이 각화편평상피로 화생 (metaplasia)하여 진주종을 형성한다는 여러가지 가능한 병인으로 보고되고 있으나 이런 상피 이동, 분화, 증식에 관여하는 요소는 복잡하고 다양하며 아직 완전히 이해되지는 않았다 (1,12,18,24,25,27,29).

최근들어 세포증식도를 측정하는 새로운 방법과 항원들이 소개되고 있는데 진주종 상피에서 epidermal growth factor-receptor (EGFR)와 transforming growth factor- α (TGF- α)의

과도한 증식이 증명되었고³⁴⁾ 세포활동성에 대한 정보가 진주층의 분류와 재발과 골과피의 위험에 대한 정보를 줄 수 있다. 진주층의 병리학 특징인 골과피는 EGF, interleukin-1 (IL-1), osteoclast activating factor, platelet-derived growth factor, TGF- α , tumor necrosis factor- α , β 등과 같은 사이토카인에 의해 조절된다¹³⁾.

PCNA는 전신성 흉방성 낭창환자에서 발견되는 자가항체로서, 세포주기중 G₁기와 S기에 합성되는 DNA중합효소의 δ 보조단백의 일종이며 36kD의 산성핵단백으로 증식하는 세포의 증식표지인자로 알려져 있고^{2,22,26)} 세포증식을 유발하는데 중요한 역할을 한다¹⁶⁾. 위암, 방광 이행상피암, 췌장암, 활액육종 (synovial sarcoma) 등 악성종양에서 조직학적 분화도, 병기, 림프절 전이, 예후등의 연구에서 이용되고 있다.^{11,15,19,22,23)} 또한 PCNA는 진주층에서 세포 증식능과 골조직과피 및 여러 종류의 진주층의 예후를 예측하는데 도움이 될 수 있다²⁰⁾.

Ki-67은 세포주기중 G₀기를 제외한 모든 세포주기 (G₁, S, G₂)에 나타나는 핵기질의 한 구성요소로^{8,9)} 증식표지인자로 널리 사용되고 있으며 건선과 악성흑색종에서 확인되었다^{25,26)}. 또한 유방암, 간암, 자궁경부암 등에서 종양세포 활성도연구에서 예후인자로 인정되고 있다^{14,17,28,34)}. 많은 연구에서 Ki-67 면역반응도와 flow cytometry³⁴⁾, thymidine labelling¹⁷⁾, bromodeoxyuridine³⁵⁾과 같은 세포증식 지수사이에 상관관계를 보여주고 있다. 염증세포에 의해 둘러싸인 부위에서 Ki-67이 강하게 염색되고 있는데 이것은 국소적으로 발생한 염증매개체가 각화세포의 증식을 촉진한다고 생각된다²⁰⁾. 진주층에서는 증가된 Ki-67의 표현으로 진주층의 과도한 증식양상을 확인할 수 있었다⁷⁾.

본 연구에서 PCNA와 Ki-67에 대한 양성반응이 표층에서는 거의 반응이 없었고 기저층과 기저적상부에서는 많은 반응을 보였는데 이것은 결체조직내 깊숙이 위치한 각화세포는 상피생장에 반응하는 반면 상층부의 낙설층 (de-

squamative layer)은 거의 반응을 하지 않는 것으로 생각된다²⁰⁾.

Ottaviani 등은 tritium-thymidine 표지를 이용하여 중이진주층에서 증식능을 증명하는 방법을 소개하였는데, 진주층의 각화세포의 표지 지수가 정상 상피보다 진주층에서 2.8배 증가하였다²³⁾. 본 실험에서 중이진주층의 각화세포의 증식지수가 외이도 상피보다 PCNA와 Ki-67에서 각각 3.24배 높게 나타난 것은 진주층과 외이도 상피 사이의 성장양상 차이를 의미한다. Ottaviani 등의 실험에서는 표지 지수가 2%에서 18%까지였으나 본 실험에서 PCNA표지 지수는 10.8%에서 54.0%까지, Ki-67 표지 지수는 5.4%에서 34.6%까지 넓은 범위로 나타났는데 이것은 실험군 진주층 표본에서의 상이한 증식 양상으로 생각된다.

Bujia 등은 진주층에서 과도한 증식 양상과 상피의 기저적상부에서 EGF-R을 증명하였으며, 과도한 증식의 표지인 사이토케라틴 16을 진주층의 상피에서 발견하였다⁴⁾. 기저적상부에서 각화세포가 PCNA와 Ki-67에 양성반응을 보이는 것은 이 결과를 뒷받침하며 진주층이 상피세의 과도한 증식에 의한 질환이라는 것을 증명하는 것이다.

진주층의 증식양상에 대해 두가지 가능한 설명을 하고 있는데 첫번째는 증식의 조절관으로 TGF- α 에 의하여 진주층상피의 성장촉진으로 증명되었으며, 두번째는 염증으로 유발되는 상피의 재생속도가 증가된 것으로 PCNA와 Ki-67에 양성반응을 보이는 각화세포가 기저층보다 상부에서 나타나는 것으로 설명된다^{4,30)}.

실험적으로 유발된 진주층에서 초기에는 평편상피원추 (squamous epithelial cone)가 생기고 나중에는 상피하의 결체조직에서 격리된다³¹⁾. 이러한 상피원추는 본 연구에서도 발견되었고 이런 원추들은 PCNA와 Ki-67에 양성반응을 보이는 각화세포에서 뚜렷이 증가되었는데 이것은 높은 증식력을 의미한다.

진주층에서 증식 성장의 또다른 중요한 요소는 진주층 상피하 결체조직의 증가된 활성도이다^{3,6,10,20,33)}. 각화세포의 PCNA와 Ki-67 염색

의 이질성(heterogeneity)을 각각 2레에서 진주종으로부터 멀리 떨어진곳에서 발견할 수 있었는데 이것은 국소적으로 다양한 증식도를 나타내는 것으로 생각된다. 상피화결체조직으로 성장하는 상피원추에서 PCNA와 Ki-67의 면역반응성을 볼 수 있었는데 이것은 cholesterol crystal, keratin debris, 이물반응, 그리고 lymphatic reaction과 관계가 있다. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), TGF- α , interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α)같은 성장요소의 국소적 방출은 상피세포와 상피하세포 증식에 영향을 미칠 것이다^{413,300}.

PCNA와 Ki-67 염색은 복잡하고 고가의 다른 방법보다 월등한 장점을 갖고 있는 방법이고 PCNA와 Ki-67로 시행한 면역조직화학적 염색은 세포상실과 조직구조의 상실없이 비교적 쉽고 빠르게 시행할 수 있는 방법이며^{7,34,35)}, 보관된 조직에 대해서도 시행될 수 있다³⁹.

본 연구에서 PCNA, Ki-67의 경우 각각 2레에서 매우높은 성장을 보였는데 이것은 기존의 생각보다 보다 더 침습적이고 수술후 환자치료에 있어서 나쁜 영향을 줄 것으로 생각된다. 향후 진주종 발생단계에서 PCNA와 Ki-67과 같은 증식표지인자에 대한 계속적인 연구를 통해 진주종의 세포역학 및 예후인자로서의 가능성을 밝혀내어 진주종 치료에 도움이 될 것으로 생각된다. 진주종염색에 대한 장기적인 연구가 PCNA와 Ki-67 지수의 예후의 중요성에 대한 설명과 진주종의 수술적 치료를 발전시킬 것이다.

결 론

외이도 상피에 비하여 진주종 상피에서 PCNA와 Ki-67의 높은 양성반응을 관찰하였으며 이상의 결과로 진주종은 국소적으로 상이한 증식능력을 갖고 있는 과증상의 증이내 질환이라는 것을 확인하였고, PCNA와 Ki-67을 이용한 면역조직화학적 염색이 진주종의 세포역

학을 연구하는데 유용한 방법이라고 생각된다.

References

- 1) Anniko M, Mendel L : Cholesteatoma. Acta Otolaryngol 91 : 275~283, 1981
- 2) Bravo R, Frank R, Blundell PA et al : Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . Nature 326 : 516~517, 1987
- 3) Broekaert D, Ramaekers F, Leperque S et al : Immunohistochemical Analysis of the Cytokeratin Expression in Middle ear Cholesteatoma and Related Epithelial Tissues. Ann Otol Rhinol Laryngol 102 : 931~937, 1992
- 4) Bujia J, Holly A, Schilling V et al : Aberrant Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Aural Cholesteatoma. Laryngoscope 103 : 326~329, 1993
- 5) Cattoretti G, Becker MHC, Key G et al : Monoclonal Antibodies Against Recombinant Parts of The Ki-67 Antigen Detect Proliferating Cell in Microwave-Processed Formalin-Fixed Paraffin Sections. Journal of Pathology 168 : 357~363, 1992
- 6) Chao WY, Huang CC : An Immunocytochemical study of cytokeratin expression in human middle ear cholesteatoma. Arch Otolaryngol 246 : 37~42, 1989
- 7) Ergun S, Zheng X, Carlsoo B : Antigen Expression of Epithelial Markers, Collagen IV, and Ki67 in Middle Ear Cholesteatoma. Acta Otolaryngol (Stockh) 114 : 295~302, 1994
- 8) Gerdes J, Lemke H, Baisch H et al : Cell Cycle Analysis of a Cell Proliferation-Associated Human Nuclear Antigen Defined by the Monoclonal Antibody Ki-

67. The Journal of Immunology 133 : 1710~1715, 1984
- 9) Gerdes J, Schwab U, Lemke H et al : Production of a Mouse Monoclonal Antibody Reactive with a Human Nuclear Antigen Associated with cell Proliferation. *Int. J. Cancer* 31 : 13~20, 1983
- 10) Grote JJ, Van Blitterswijk CA, Hesseling SC et al : Cytokeratin Patterns of Tissue Related to Cholesteatoma Pathogenesis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 98 : 635~640, 1989
- 11) Hall P.A, Levison DA, Woods AL et al : Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Immunolocalization in Paraffin Section : An index of cell Proliferation with Evidence of Deregulated Expression in some Neoplasm. *Journal of Pathology*, 162 : 285~294, 1990
- 12) Herris AJ : cholesteatosis and chronic otitis media. *Laryngoscope* 72 : 954~980, 1962
- 13) Huang T, Yan SD, Huang CC : Colony-Stimulating Factor in Middle Ear Cholesteatoma. *Am J Otolaryngol* 10 : 393~398, 1989
- 14) Irene OL, Jia NA, Edward CS et al : Ki-67 Antigen Expression in Hepatocellular Carcinoma Using Monoclonal Antibody MIB1. *Am J Clin Pathol* 104 : 313~318, 1995
- 15) Jain S, Filipe MI, Hall PA et al : Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma, *J Clin Pathol* 44 : 655~659, 1991
- 16) Jaskulski D, Deriel JK, Mercer WE et al : Inhibitor of cellular proliferation by autosenes oligodexy. *Science* 240 : 1544~1546, 1988
- 17) Kamel OW, Frankin WA, Ringus JC et al : Thymidine labelling Index and Ki-67 Growth Fraction in Lesion of the Breast, *American Journal of Pathology* 134 : 107~113, 1989
- 18) Lim DJ, Saunders WH : acquired cholesteatoma, *Ann Otol* 81 : 2~12, 1972
- 19) Lipponen P.K, Eskelinen M.J : Cell proliferation of transitional cell bladder tumors determined by PCNA/cyclin immunostaining and its prognostic value. *J. Cancer* 66 : 171~176
- 20) Mayot D, Bene MC, Perrin C et al : Restricted Expression of Ki-67 in Cholesteatoma Epithelium. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119 : 656~658, 1993
- 21) Mori M, Kakeji Y, Adachi Y et al : The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen in clinical gastric cancer. *Surgery* 113 : ~690, 1993
- 22) Oda Y, Hashimoto H, Takeshita S et al : The Prognostic Value of Immunohistochemical Staining for Proliferating Cell Nuclear Antigen in Synovial Sarcoma, *Cancer* 72 : 478~485, 1993
- 23) Ottaviani F, Sambataro G, Mantovani M et al : middle ear cholesteatoma. In *Cholesteatoma and Mastoid Surgery* (Ed Tos M), 3rd Ed. Amsterdam, Kugler & Ghedini Publications, pp 119~124, 1989
- 24) Palva T : The Pathogenesis and Treatment of Cholesteatoma. *Act Otolaryngol (Stockh)* 109 : 323~330, 1990
- 25) Palva T, Lehto VP, Virtinen J et al : Junctions of Squamous Epithelium with Middle Ear Mucosa. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 99 : 297~304, 1985
- 26) Prelich G, Tan CK, Kostura M et al : Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxillary protein. *Nature* 517~520, 1987

- 27) Sade J, Babiacki A, Pinkus G : the metaplastic and congenital origin of cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 96 : 119~129, 1983
- 28) Sasaki K, Matsumura K, Tsuji T et al : Relationship Between Labeling indices of Ki-67 and BrdUrd in Human Malignant Tumors. *Cancer* 62 : 989~993, 1988
- 29) Sculerati N, Bluestone CD : Pathogenesis of cholesteatoma. *Otolaryngol Clin North America* 22 (5) : 859~868, 1989
- 30) Sudhoff H, Bujia J, Holly A et al : Functional characterization of middle ear mucosa residues in cholesteatoma samples. *The american journal of otolaryngology* 15 : 217~221, 1994
- 31) Steinbach E : Experimental studies on Cholesteatoma formation. In *Cholesteatoma and mastoid Surgery* (Ed Tos M), 3rd Ed. Berkeley, Kugler & Ghedini Publications, pp 333~336, 1982
- 32) Uchida N, Lto S, Hirano M : Localization of Proliferative Cell Nuclear Antigen in Aural Cholesteatoma. *The Kurume Medical Journal* 40 : 225~228, 1993
- 33) Vennix PP, Kuijpers W, Tonnaer EL et al : Cytokeratins in Induced Epidermoid Formation and Cholesteatoma Lesions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 116 : 560~565, 1990
- 34) Walker RA, Camplejohn RS : Comparison of monoclonal antibody Ki-67 reactivity with grade and DNA flow cytometry of breast carcinoma. *Br. J. Cancer* 57 : 281~283, 1988
- 35) Wersto RP, Herz F, Gallagher RE et al : Cell Cycle-Dependent Reactivity with the Monoclonal Antibody Ki-67 during Myeloid Cell Differentiation. *Experimental Cell Research* 179 : 79~88, 1988