KISEP Otology Korean J Otolaryngol 2003;46:727-32

사람 진주종 상피 세포 배양에서 레티노익산에 의한 점액 세포로의 분화

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 두뇌한국21의과학사업단[2]
최재영[1] · 최현승[1] · 조규남[2] · 윤주헌[1,2]

All-Trans Retinoic Acid Induces Mucociliary Differentiation in a Human Cholesteatoma Epithelial Cell Culture

Jae Young Choi, MD[1], Hyun Seung Choi, MD[1], Kyu-Nam Cho[2] and Joo-Heon Yoon, MD[1,2]
[1]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul; and [2]BK21 Project for Medical Science, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Retinoic acid (RA) can prevent keratin formation and induce mucous differentiation in epithelia. In the present study, we attempted to induce keratinizing squamous epithelium from human cholesteatoma epithelial (HCE) cells using an air-liquid interface (ALI) technique. We also examined the effect of RA on the phenotype of keratinizing HCE cells. **Materials and Method** : HCE cells were cultured in RA-free defined media at an ALI or in a submerged state. We examined the morphological differences between ALI and the submerged cultures, and histologically investigated changes of the phenotype after RA treatment. We also determined the effect of RA on the mRNA expressions of the cornifin-α and mucin genes as indicators of squamous and mucous differentiation, respectively. **Results** : Using an ALI technique, we were able to diffe-rentiate HCE cells into a keratinizing squamous epithelium. When we treated the keratinizing HCE cells with RA, the morphological phenotype progressively changed to mucociliary epithelium. In addition, the expression of cornifin-α mRNA was suppressed, and the expressions of mucin gene 5AC (*MUC5AC*) and *MUC5B* mRNA were increased progressively with RA treatment. **Conclusion** : We successfully developed a culture system for keratinizing differentiation of HCE cells using the ALI technique in a defined medium. Our study also clearly showed that RA treatment led to mucociliary differentiation of HCE cells. **(Korean J Otolaryngol 2003;46:727-32)**

KEY WORDS : Cholesteatoma · Retinoin · Keratin · Mucins.

서 론

비타민 A와 그 호르몬 유도체인 레티노익산은 세포분화에 있어서 필수적인 물질로 작용한다. 특히, 레티노익산은 상피 세포의 표현형에 결정적인 영향을 미친다. Chick embryo skin을 배양할 때, 레티노익산을 배양액에 넣으면 편평 상피(squamous epithelium)의 형성이 억제되고, 점막으로의 이형성(mucous metaplasia)이 발생한다.[1] 또한 레티노익산은 분화된 각질 표피 세포(epidermal keratinocyte)에서 각질화가 나타나는 것을 억제한다.[2] 이러한 각질 형성 억제 작용으로 인해 레티노익산은 건선이나 여드름과 같은 과각질화와 관련된 질환의 치료에 이용되고 있다.[3][4]

중이 진주동의 조직학적 특징은 상피세포의 과증식과 과각질화이다. 그러므로 몇몇 연구자들은 진주종의 치료에 있어 레티노익산을 이용하였으며, 레티노익산이 진주종의 치료에 효과적이라고 보고하였다.[5][6] 그러나, 진주종의 치료에 레티노익산의 유용성을 뒷받침할만한 분자생물학적 배경은 아직까지 없다. 이전의 연구에서 저자들은 air-liquid interface(ALI)를 이용하여 사람 중이 상피세포를 배양하였고,[7] 이때 레티노익산을 배양액에서 결핍시켰으며, 사람 중이 상피 세포에서 각질 편평 상피로의 분화를 보고하였다.[8] 본 연구에서는 역으로 분화된 사람 진주종 상피 세포에서 레티노익산의 효과에 대해 알아보고자 하였다. 레티노익산이 각질화된 진주종 상피를 점액 섬모 상피로 변화

논문접수일 : 2003년 5월 19일 / 심사완료일 : 2003년 7월 16일
교신저자 : 윤주헌, 120-752 서울 서대문구 신촌동134
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361-8482 · 전송 : (02) 393-0580
E-mail : jhyoon@yumc.yonsei.ac.kr

시킬 수 있다면, 이는 중이 진주종의 병인을 밝히고, 치료 방법을 개발하는데 있어서 주요한 기초 자료가 될 것이다.

저자들은 본 연구에서 첫째, 진주종 상피세포를 ALI 배양 기법으로 각질을 형성하는 상피 세포로 분화되는지 확인하고자 하였고, 둘째, 각질 편평 상피 세포로의 분화가 가능하다면, 레티노익산이 분화된 진주종 상피 세포의 표현형에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

Air-liquid interface(ALI) 배양을 이용한 각질 편평 상피 세포로의 분화 유도

만성 중이염으로 유양돌기 삭개술을 시행받은 5명의 환자에서 수술중 진주종 조직을 얻었다. 이번 연구는 환자들에 대한 술 전 동의 절차를 거쳤고, 병리 조직의 사용은 연세대학교 윤리위원회에서 승인받았다.

진주종 조직에 1% pronase(type XIV protease, Sigma, St. Louis, MO)를 4℃에서 18시간동안 처리하여, 상피세포만을 분리하였다. 분리된 세포는 레티노익산이 없는 bronchial epithelial growth media와 Dulbecco's modified Eagle's media의 혼합액(Clonetics, Walkerswille, MD)에 Hydrocortisone(0.5 μg/ml), insulin(5 μg/ml), transferrin(10 μg/ml), epinephrine(0.5 μg/ml), Triiodothyronine(6.5 ng/ml), gentamycin(50 μg/ml), amphotericin(50 ng/ml)(Clonetics)이 추가된 것을 사용하였으며, 여기에 epidermal growth factor(EGF)(25 ng/ml ; Collaborative Reseach, Bedfore, MA), bovine serum albumin(1.5 μg/ml ; Sigma)을 추가하였다. 배양액은 이틀에 한번씩 교환하였다. 배양된 세포는 0.25% trypsin/ EDTA (Clonetics)로 다시 분리한 후, 2000 cells/cm^2의 세포로 계대 배양하였다. 계대 배양된 진주종 상피 세포(passage2)를 반투과성 막위에 1×10^5 cell/culture 씩 뿌려 배양하였으며, 세포는 합류(confluence)될 때까지는 배양액에 잠긴 상태로 배양하다가, 합류를 이루면 첨부 배양액을 제거하여 air-liquid interface 상태를 만들었다. 배양은 5% CO_2 상태와 37℃를 유지한 상태에서 이루어졌다.

레티노익산의 처리

합류 후 7일간 ALI에서 배양된 분화된 진주종 상피 세포에 10^{-7} M의 all-trans retinoic acid(Sigma)을 처리하였고, 처리 후 1, 4, 10, 21일 동안 더 배양하였으며, 대조군 배양은 dimethylsulfoxide(DMSO)만 처리하였다. 배양액은 매일 교환하였으며, 각 실험은 3번 이상 시행하였다.

형태학적 관찰

반투막의 진주종 상피 세포는 10% 완충 중성 포르말린으로 고정하였고 파라핀에 포배하여 절편을 만든 후, Hematoxilin & eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 주사현미경(scanning electron microscopy) 관찰을 위하여, 배양된 세포는 냉각된 2.5% glutaradehyde에 4~6시간동안 고정시킨 후 0.1M 인산 완충용액으로 세척하였다. 1% osmium tetroxide에 2시간 동안 다시 고정한 후 SEM (H-800, Hitachi, Japan)을 통해 관찰하였다.

Total RNA의 분리와 cornifin-α mRNA의 northern blot analysis

Total RNA는 Tri-Reagent(Molecular Research Center, Cincinnati, OH)를 이용하여 각각의 배양 조건 및 시기에 따라 분리되었다. 1.4% agarose-formaldehyde gel electrophoresis를 이용하여 10 μg의 RNA를 분리하여, nylon membrane(Schleicher & Schuell, Keene, NH)에 모세관현상을 이용하여 전이하였다. Membrane을 건조시킨 후, uv-crosslink를 시행한 후 42℃하에서 1시간 동안 prehybridization을 하였다. Prime-a-gene labeling kit(Promega, Madison, WIS)와 [$^{-32}$P] deoxycitidine triphosphate(Dupont NEN, Wilmington, DE)을 이용하여 cornifin-α cDNA fragment(generous gift from Dr. Jetten AM)와 대조 유전자인 β-2 microglobulin(β-2M) 50 ng에 radiolabeling을 시행하였다. Membrane에 radiolabeling probes(specific activity of ~10^9 cpm/μg DNA)를 하루 동안 hybridization시키고, 42℃에서 15분간 saline sodium citrate(SSC)/0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)로 3회, 55℃에서 10분간 0.1×SSC/0.1% SDS로 1회 세척하였다. 이것을 -70℃에서 하루동안 hyperfilm-MP autoradiography film (Amersham)에 흡착시켰다.

Reverse Transcription(RT)-polymerase chain reaction (PCR) for mucin mRNAs

MUC5AC와 MUC5B mRNAs를 검출하고 정량하기 위한 방법들은 이전 보고에 상세하게 기술된 바 있다.[13] 얻어진 total RNA를 cDNA로 역전사(reverse-transcription)하였으며, 이미 알려진 염기 서열에 따라 Oligonucleotide primers를 고안하였다(MUC5AC ; 5' primer : TCCGGCTC-ATCTTCTTCC, 3' primer : ACTTGGGCAC-

TGGTGCTG, MUC5B ; 5 'primer : ACTCCAGAGA-CTGTCCACAC, 3 ' primer : TACCACTGGTCTGTG-TGCTA). Polymerase chain reaction(PCR)시 magnesium chloride의 농도는 1.5 mmol/L였으며, 95℃에서 1분간 denaturation시키고, 60℃에서 annealing과정을 거친 후, 72℃에서 1분간 extension을 시행하였다. PCR에 의한 산물을 ethidium bromide이 포함된 2% agarose gels(FMC By-products, Rockland, ME)을 이용하여 분리하였고, CSC Chemiluminescence 's Detection Module (Retest, Straubenhardt Germany)를 이용하여 bands를 분석하였다.

결 과

진주종 상피 세포 배양에서 각질 편평 상피로의 유도

배양된 세포는 증식하여, 5일이 지나면 합류(confluence)를 이루었으며, 이후 여러 층의 상피세포로 분화하였다. 합류 7일 후 진주종 상피 세포는 각질 중층 편평 상피 세포로 분화되었으며(Fig. 1A), 이는 stratum basale, stratum spinosium, stratum granulosum, stratum cornium으로 구성되어 있어 생체내의 진주종 조직과 유사하였다. 특히 분화된 상피 세포는 유핵(有核)의 stratum cornium를 형성하는 parakeratosis현상을 보였고, 이는 생체내 진주종 조직과 유사한 특징이다. 그러나 배양액에 잠긴 상태(submerged)로 배양된 진주종 상피 세포는 각질층을 형성하지 않았다(Fig. 1B). 이는 공기중으로의 노출이 진주종 상피 세포의 각질화에 필수적이라는 사실을 말해주고 있다.

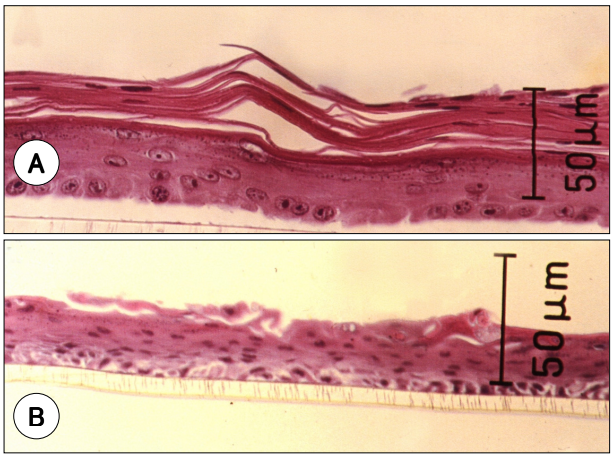

Fig. 1. The morphology of the epithelium formed by human cholesteatoma epithelial (HCE) cells. HCE cells were cultured in retinoid acid-free media for 7 days after confluence. Cross-sections of intact cultures were stained with H & E. A : In the air-liquid interface culture, the HCE cells formed a keratinizing stratified squamous epithelium that resembled an *in vivo* cholesteatoma. B : The HCE cells cultured in the submerged state, no keratin layer formed.

레티노익산 처리 후 각질화된 진주종 상피 세포의 형태학적인 변화

레티노익산 처리 후 세포의 표현형 변화를 관찰하기 위해 10^{-7}M 레티노익산을 첨가한 배양액에서 배양하였다. 레티노익산 처리 1일 후, 세포 표면의 각질층이 떨어지기 시작하였고(Fig. 2A), 4일째 되는 날은 거의 대부분의 각질층이 벗겨졌다(Fig. 2B). 처리 10일 후 1~2개의 기저층을 제외한 편평 세포층이 사라졌고(Fig. 2C), 21일 후에는 원주 섬모 상피로 분화하였다(Fig. 2D). 처리 21일 후 주사전자현미경(SEM)을 통하여 관찰된 상피 세포는 많은 섬모로 덮여 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

각질화된 진주종 상피 세포에서 cornifin - α mRNA 발현에 미치는 레티노익산 처리의 효과

편평 세포 분화의 표식자인 cornifin - α 유전자의 발현에 레티노익산이 어떠한 영향을 미치는지 관찰해 보았다.

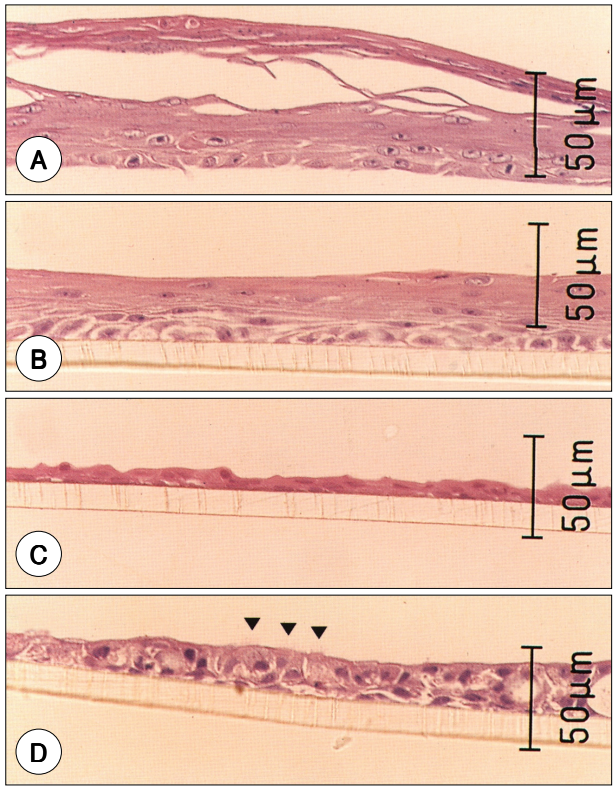

Fig. 2. Phenotype transition of human cholesteatoma epithelial (HCE) cells treated with retinoic acid (RA). Cross-sections of the intact cultures were stained with H & E. The HCE cells were cultured in RA-free medium for 7 days after confluence and then treated with 10^{-7}M RA for up to a further 21 days. The keratin layer began to detach on the 1st day following treatment (Fig. 2A), and progressively exfoliated on the 4th day (Fig. 2B). On the 10th day, only 1- or 2 layers of basal cells remained (Fig. 2C). The epithelium eventually changed into columnar epithelium with cilia (arrow heads) on the 21st day following RA treatment (Fig. 2D).

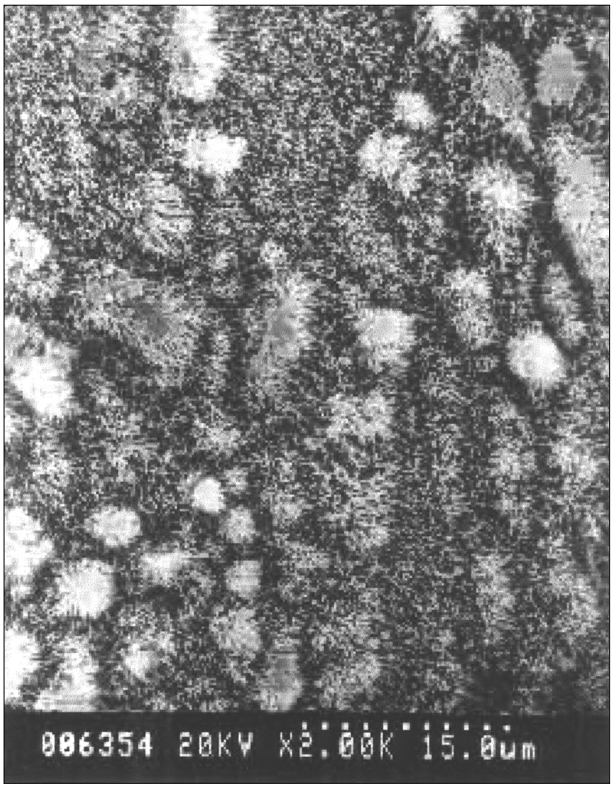

Fig. 3. SEM image of human cholesteatoma epithelial cells on the 21st day after retinoic acid treatment. Note that the apical surface of the epithelium is covered with abundant cilia.

세포에 레티노익산을 처리 1일 후, cornifin - α mRNA는 급격히 감소하였고, 4일 후에는 cornifin - α mRNA가 거의 발현되지 않았다. 그러나 레티노익산이 없는 배양액에서 cornifin - α mRNAs는 배양 기간과 관계없이 강하게 발현되었다. 대조 유전자인 β - 2M의 발현은 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 4). 이는 레티노익산이 진주종 상피 세포가 편평 세포로 분화하는 것을 억제시킨다는 사실을 말해준다.

각질화된 진주종 상피 세포에서 Mucin mRNA의 발현에 미치는 레티노익산의 효과

진주종 상피 세포에서 레티노익산이 점액 상피로의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT - PCR을 이용한 점액유전자의 발현을 연구하였다. 사람 기도에서 대표적인 점액 유전자인 *MUC5AC*와 *MUC5B*에 대해 그 발현을 알아보았다.[14] 레티노익산이 없는 배양에서는 *MUC5AC*와 *MUC5B* mRNA가 배양기간과 관계없이 발현되지 않았다. 그러나 레티노익산을 처리할 경우, 처리 10일 후에 *MUC5AC*와 *MUC5B* 발현이 나타났으며, 시간이 지날수록 그 발현이 증가되었다. 대조군 유전자인 β - 2M의 발현은 실험 기간동안 변화를 보이지 않았다(Fig. 5). 이는 레티노익산이 각질화된 진주종 상피 세포 배양에서도 점막 상피로의 분화를 유도할 수 있음을 보여준다.

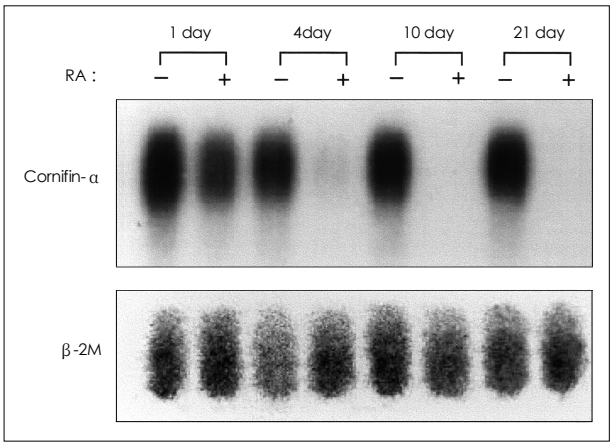

Fig. 4. The time-dependent effects of retinoic acid (RA) treatment on the expression of cornifin-α in human cholesteatoma epithelial (HCE) cells. HCE cells were cultured in RA-free medium for 7 days after confluence, and then treated with 10^{-7}M RA. The cornifin-α mRNA levels were measured by Northern blotting from total RNA isolated on the 1st, 4th, 10th and 21st day following the RA treatment. In the RA-treated group, the expression of cornifin-α mRNA was gradually suppressed in a time dependent manner. The control gene, β-2M, was not affected by the RA treatment.

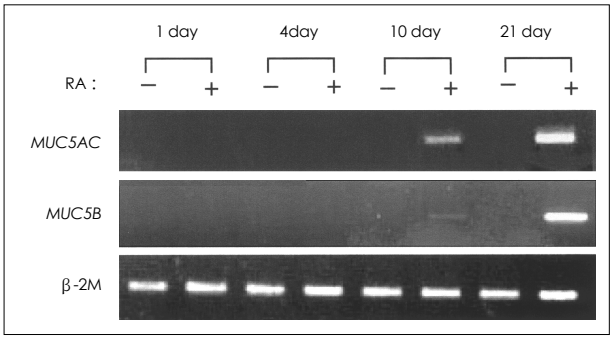

Fig. 5. Induction of mucin gene expression by retinoic acid (RA) in human cholesteatoma epithelial (HCE) cells. The HCE cells were cultured in RA-free media for 7 days after confluence, and treated with 10^{-7}M RA for up to 21 days. The total RNA was isolated from the cultures at different time intervals, and the *MUC5AC* and *MUC5B* mRNA levels determined by RT-PCR. The expression of the *MUC5AC* and *MUC5B* could be detected on the 10th day following RA-treatment and their expressions significantly increased as a function of time. The control gene, β-2M was not affected by the RA treatment.

고 찰

진주종은 대부분 고막이나 외이도의 편평 상피로부터 기원한다고 알려져 있다. 고막의 함입, 기저세포의 과증식, 천공을 통한 상피의 성장 등의 몇 가지 가설들이 진주종의 편평 상피 세포 기원을 설명하는 이론으로 제시되고 있다.[15-17] 그러나, 중이 진주종의 병인은 아직 확실히 밝혀져 있지 않다. 몇몇 연구자들은 진주종이 중이 점막의 이

형성에 의해 발생할 수 있다고 보고하고 있다.[18)19)]

진주종 상피 세포를 생체에서와 같이 각질 편평 상피세포로 배양하는 것은 진주종의 병태생리를 연구하는데 있어서 필수적이다. 이제까지의 진주종에 대한 연구는 대부분 조직 배양(tissue culture)을 통해 이루어져 왔다.[9)10)] 그러나 조직 배양은 이용할 수 있는 조직이 한정되어 있고, 다른 세포 성분에 의해 오염되는 등의 단점이 있다. 따라서 최근 몇몇 연구자들은 진주종의 연구에 있어 세포배양(cell culture)을 이용하였다.[11)] 그러나 이들의 연구에서 배양된 세포들은 각질세포의 형태학적인 특징은 있으나, 생체내의 진주종과 같이 각질을 형성하지는 않았다.

저자들은 이전의 연구에서, 레티노익산의 결핍이 사람 중이 상피 세포에서 각질화된 편평 세포 분화를 유도한다는 것을 보고하였고,[8)] 이는 "이형성 가설(metaplasia theory)"의 *in vitro* 증거로 생각된다. 이번 연구에서 저자들은 반대 과정을 실험해보고자 하였다. 즉 저자들은 사람 진주종 상피 세포에서 각질화된 편평 상피 세포로의 분화 유도를 시도한 후, 레티노익산이 각질화된 편평 상피 세포의 점액 섬모 세포 분화를 일으킬 수 있는지를 알아보고자 하였다.

이 연구는 ALI 기술을 사용하여, 사람 진주종 상피 세포로부터 각질층을 포함하는 중층 편평 상피 세포를 유도하였다. 그러나 진주종 상피 세포를 배양액에 잠긴 상태로 배양했을 때는 각질층을 형성하지 못하였고, 이는 배양액이 각질층의 형성을 기계적으로 억제한 것으로 보인다. 진주종 상피 세포 배양에 사용된 배양액은 이전의 중이 상피 세포의 배양액과는 달랐다.[7)] 즉 레티노익산이 들어 있지 않은 배양액을 사용하였고, bovine pituitary extracts(BPE)도 약간의 레티노익산이 함유되었을 것으로 보고 배양액에 첨가하지 않았다. 레티노익산이 없더라도 BPE가 들어있는 배양액을 사용할 경우 진주종 상피 세포에서 각질층은 형성되지 않았다. 또한, 예비 실험에서 진주종 상피 세포는 BPE가 포함된 keratinocyte culture media에서도 각질화된 편평 상피 세포로의 분화가 이루어지지 않았다. 이러한 현상은 BPE에 들어 있는 소량의 레티노익산에 의해 진주종 상피 세포의 각질화가 억제되었을 것으로 추측된다.

다음으로 진주종 상피 세포가 레티노익산 처리 후 점액 섬모 상피로 분화할 수 있는지를 실험하였다. 진주종 상피 세포에 레티노익산 처리 후 편평 세포 분화의 표시 유전자인 cornifin - α의 발현이 억제되었으며, 각질층이 사라지는 것을 볼 수 있었다. 또한 점액 분비 유전자인 *MUC5AC*와 *MUC5B*의 유도를 관찰할 수 있었고, 레티노익산 처리 후 21일째 진주종 상피 세포가 섬모 세포로 분화되는 것을 조직학적으로 확인할 수 있었다.

이전의 연구에 의하면 chick embryo skin과 같은 배아 조직[1)]이나 이형성된 기도 상피[20)]에서는 레티노익산 처리 후 각질화된 편평 상피 세포가 점액 세포로 분화된다고 보고하였다. 그러나 분화된 표피 각질 세포(adult type epidermal keratinocyte)가 점액 세포로 분화된다는 보고는 없었다. 저자들은 레티노익산 처리 후 각질화된 사람 진주종 상피 세포가 점액 섬모 세포로 분화하는 것을 보여주었다. 레티노익산이 없는 배양액에서 사람 중이 상피 세포가 편평 세포로 이형성되는 것을 보여준 이전의 저자들의 연구[8)]와 더불어, 이는 중이 점막 세포로부터 진주종 상피 세포가 기원할 수 있다는 하나의 증거가 될 것이다.

요약하면 저자들은 ALI 기술과 레티노익산이 없는 배양액을 이용하여 진주종 상피 세포를 각질화된 편평 상피 세포로 성공적으로 분화시켰다. 또한 레티노익산을 처리할 경우 분화된 진주종 상피 세포가 점액 섬모 세포로 분화됨을 알 수 있었다.

중심 단어 : 레티노익산 · 진주종 · 편평 상피 세포 · 점액 섬모 세포.

본 연구과제는 2002년 김명선 기념 재단 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

REFERENCES

1) Fell H, Mellanby E. *Metaplasia produced in cultures of chick ectoderm by vitamin A. J Physiol 1953;119:470-88.*
2) Asselineau D, Darmon M. *Retinoic acid provokes metaplasia of epithelium formed in vitro by adult human epidermal keratinocytes. Differentiation 1995;58:297-306.*
3) Asselineau D, Bernard BA, Billy C, Darmon M. *Retinoid acid improves epithelial morphogenesis. Dev Biol 1989;133:393-403.*
4) Zouboulis CC. *Retinoids in psoriasis and disorders of keratinization Am Acad Dermatol 1992;27:S8-14.*
5) Palva T, Thesleff I, Saxen L. *Organ culture studies on human skin and cholesteatoma epithelium. Contact with connective tissue and exposure to vitamin A. Acta Otolaryngol 1978;85:307-12.*
6) Nageris BI, Grushko I, Feinmesser R. *Cholesteatoma prevention by local treatment with Vitamin A. Otol Neurotol 2001;22:576-8.*
7) Choi JY, Kim CH, Lee WS, Kim HN, Song KS, Yoon JH. *Ciliary and secretory differentiation of normal human middle ear epithelial cells. Acta Otolaryngol (Stockh) 2002;122:270-5.*
8) Choi JY, Cho KN, Yoo KH, Shin JH, Yoon JH. *Retinoic acid depletion induces keratinizing squamous differentiation in human middle ear epithelial cell culture. Acta Otolaryngol (Stockh) 2003;123:466-70.*
9) Proops DW, Hawke WM, Parkinson EK. *Tissue culture of migratory skin of the external ear and cholesteatoma: A new research tool. J Otolaryngol 1984 ;13:63-4.*
10) 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;100:989-98.*
11) Yoon TH, Lee SH, Park MH, Chung JW, Kim HJ. *Inhibition of*

cholesteatomatous bone resorption with pamidronate disodium. Acta Otolaryngol 2001;121:178-81.

12) Marvin KW, George ME, Fujimoto W, Saunders MA, Bernacki S, Jetten AJ. *Cornifin, a cross-linked envelope precursor in keratinocytes that is down-regulated by retinoids. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:11026-30.*

13) Yoon JH, Kim KS, Kim SS, Lee JG, Park IY. *Differentiation of serially passaged normal human nasal epithelial cells by retinoic acid: Expression of mucin and lysozyme. Ann Otol Rhinol Laryngol 2000;109:594-601.*

14) Thoronton DJ, Howard M, Khan N, Sheehan JK. *Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucin. J Biol Chem 1997;272:9561-6.*

15) Bluestone CD, Casselbrant ML, Cantekin EI. *Functional obstruction of the Eustachian tube in the pathogenesis of aural cholesteatoma in children. In: Sade J editor. Cholesteatoma and mastoid surgery. Proceedings of the second international conference on cholesteatoma and mastoid surgery. Amsterdam: Kugler Publications;1982. p.211-24.*

16) Huang CC, Shi GS, Yi ZX. *Experimental induction of middle ear cholesteatoma in rats. Am J Otolaryngol 1988;9:165-72.*

17) Palva T, Karma P, Makinen J. *The invasion theory in cholesteatoma and mastoid surgery. In: Sade J editor. Cholesteatoma and mastoid surgery. Proceedings of the Second International Conference on Cholesteatoma and Mastoid Surgery. Amsterdam: Kugler Publications;1982. p.249-64.*

18) Sade J, Babiacki A, Pinkus G. *The metaplastic and congenital origin of cholesteatoma. Acta Otolaryngol (Stockh) 1983;96:119-29.*

19) Kuijpers W, Vennix PP, Peters TA, Ramaekers FC. *Squamous metaplasia of the middle ear epithelium. Acta Otolaryngol (Stockh) 1996; 116:293-8.*

20) Koo JS, Yoon JH, Gray T, Norford D, Jetten AM, Nettesheim P. *Restoration of the mucous phenotype by retinoic acid in retinoid-deficient human bronchial cell cultures: Changes in mucin gene expression. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20:43-52.*