KISEP Otology Korean J Otolaryngol 1999;42:284-9

중이 저류액에서 Superoxide Dismutase의 발현

계명대학교 의과대학 이비인후과학교실
김 덕 준

Expression of Superoxide Dismutase in Otitis Media with Effusion

Deok Jun Kim, MD
Department of Otolaryngology, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : It is well known that reactive oxygen species (ROS) and antioxidant enzymes are responsible for the pathogenesis of several kinds of diseases including inflammatory process. The aim of this study was to ffind out if superoxidedismutase (SOD), one of antioxidant enzymes, is responsible for the pathogenesis of otitis media with effusion (OME). **Materials and Methods** : The authors performed the RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) and ELISA techniques using middle ear effusions (MEEs) from patients with OME to find out the presence of mRNA and SOD protein. **Results** : The mRNA for SOD was detected in 3 cases out of 12 MEEs from patients with OME, and SOD protein was detected in 4 cases out of 6 MEEs. **Conclusion** : These results suggest that ROS and SOD are responsible for the pathogenesis of OME. It will be possible to take advantage of the antioxidant drugs and therapy available to treat and prevent OME in the future. **(Korean J Otolaryngol 1999;42:284-9)**

KEY WORDS : Otitis media with effusion · Reactive oxygen species · Superoxide dismutase.

서 론

삼출성 중이염(Otitis Media with Effusion)은 유소아에서 감기 다음으로 발생빈도가 높은 질환으로 근래 진단기술의 발달에 따라 점차 발생이 증가하는 경향을 보이고 있으며 적절한 시기에 적당한 치료가 잘되지 않으면 난청으로 인하여 언어발달이나 지능발육장애 또는 의사소통의 장애가 초래될 수 있어 조기진단 및 치료가 중요한 질환이다.[1] 이 질환의 병인으로는 급성화농성 중이염, 이관기능의 장애, 알레르기, 세균감염, 국소적 면역반응 및 숙주인자 등이 언급되고 있으며 높은 발생율 및 치료후 빈번한 재발로 인해 과거로부터 자세한 병태생리를 규명하기 위해 꾸준한 많은 연구가 계속되어져 왔으나 아직까지 그 명확한 원인은 밝혀지지 않고 있는 실정이다.[2]

활성 산소(Reactive oxygen species, ROS)는 화학적으로 매우 반응성이 높고 불안정하며 세포독성도 가지고 있는 물질로 신체 내의 에너지 생성과정, 정상적인 신진대사 과정 및 면역체계를 통해 끊임없이 생성된다.[3][4] 그러므로 이들 없이는 에너지를 생성하지도 감염원과 싸우지도 못할 뿐만 아니라 신체에 필요한 화학 물질도 생성하지 못한다. 그러나 과잉의 통제되지 않는 활성 산소는 세포에 손 상을 주며 각종 질병을 일으키는 원인으로 작용한다. 이러한 유해 산소의 세포 손상 작용이 축적되어 동맥 경화,[5] 심장질환,[6] 암,[7] 노화,[7] 신장질환[8] 및 간 등의 소화기계 질환[9] 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 각종 염증반응에서 활성산소가 관여하는 것으로 알려져 있으며 [3][4] 생체는 이러한 활성 산소에 의한 산화적 손상에 대하여 이를 방어하는 1차적 항산화계로서 항산화 효소계를 가지고 있는데 [3][10] 이들 항산화 효소중 가장 먼저 항산화 반응에 관여하는 것이 superoxide dismutase(SOD)이다.[3][10] 따라서 삼출성 중이염도 일종의 염증 반응이므로 활성 산소가 관여할 것이다. 만약 활성 산소가 삼출성 중이염이라는 염증 반응에 관여한다면 생체는 활성 산소에 의한 손상을 방어하기 위하여 SOD의 유전자 발현을 할 것이고 이는 중이 저류액에 나타날 것이다. 본 실험은 삼출성 중이염의 병인에 활성산소의 관여로 SOD가 발현되는지를 알기 위하여 삼출

논문접수일 : 1998년 8월 23일 / 심사완료일 : 1999년 1월 27일
교신저자 : 김덕준, 700 - 712 대구광역시 중구 동산동 194
계명대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (053) 250 - 7719 · 전송 : (053) 250 - 7719
E - mail : djkin@dsmc.or.kr

성 중이염 환자에서 중이 저류액을 채취하여 SOD mRNA 발현 여부 및 SOD 단백의 존재를 reverse transcription - polymerase chain reaction(RT - PCR)과 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 측정하였다. 저자는 본 연구를 통해 삼출성 중이염의 병인에 활성산소 및 항산화계가 관여함을 알아내고, 향후 활성산소를 적절히 통제함으로써 삼출성 중이염을 예방하거나 새로운 치료 방법을 찾는데 도움이 되고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 검체

1996년 7월부터 1997년 6월까지 계명대학교 동산의료원 이비인후과에서 삼출성 중이염으로 진단 받고 2개월 이상 항생제 등 약물치료후 호전되지 않아 고막절개 및 환기튜브 유치술을 시행 받았던 3세에서 12세 환자의 중이 저류액을 재료로 하였고 수술 후 중이 저류액은 즉시 저온상태에서 옮겨, 실험에 사용되기 전까지 - 70℃에서 냉동보관 하였다. 총 89례의 중이 저류액중 양이 너무 적거나, 점도가 너무 강하여 조작이 불가능한 경우, 혈액오염, 육안적인 변성, 추출한 RNA양이 너무 적어 결과를 얻을수 없었던 경우 등을 제외한 19예를 대상으로 하였고 이 중 13예는 RT - PCR, 6예는 ELISA를 실시하였다.

RNA 분리 및 cDNA합성

50 200 μl 중이 삼출액을 RNAZOL - B 용액(Bioteck Laboratory, Houston, Texas, USA) 1 2 ml로 완전히 균질화한 후 chloroform 100 μl로 처리하여 유기용매층의 DNA와 변성된 단백질을 제거하였다. 수용액층의 RNA는 동량의 isopropanol을 처리한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전 회수하였다. 분리된 RNA 4 μg을 oligo - dT(16mer)를 사용하여 40 μl 용량으로 역전사(reverse transcription, RT)를 시행하였다. 반응혼합액의 조성은 RNA 2 μg, 5 mM MgCl2, 50 mM KCl, 10 mM Tris - HCl(pH 8.3), 1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 U/μl RNase inhibitor(Perkin - Elmer Corporation), 2.5 μM oligo - dT로, 반응 조건은 42도에서 1시간, 99도에서 5분, 그리고 5도에서 5분으로 하였다.

PCR

사람의 Cu/Zn SOD를 지시하는 mRNA에 대한 염기 서열을 확인한 후 superoxide dismuatse의 sense primer로 5' - TAGCGAGTTATGGCGACGAA - 3'와 antisense primer로 5' - ACGACTTCCAGCGTTTCCTG - 3'의 서열이 되도록 하였고, GAPDH의 sense primer의 염기 서열은 5' - CGTCTTCACCACCATGGAGA - 3'과 antise - nse primer로 5' - CGGCCATCACGCCACAGTTT - 3'이 되도록 각각의 primer를 (주) 바이오니아에 주문 제작하였다. 이를 이용하여 RT - PCR을 실시하여 441 base pair 크기의 band를 확인하여 SOD mRNA의 발현 여부를 조사하였다. PCR은 5 μl의 10× reaction buffer(15 mM MgCl2, 100 mM Tris - HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)와 각각 10 mM의 dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 그리고 20 mM sense 및 antisense primer를 각각 1 μl를 넣은 mixture에 2 μl의 반응시킨 cDNA reaction mixture와 2.5 unit의 Taq polymerase(Perkin - Elmer Corporation)를 넣은 후 증류수로 50 μl로 용량을 맞추고 30 μl의 mineral oil을 중층한 다음 DNA thermal cycler(Perkin - Elmer Corp., Norwalk, CT, USA)를 사용하여 PCR을 시행하였다.

PCR 조건은 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분으로 하여 GAPDH는 25 cycle, SOD는 34 cycle을 시행하였다.

전기영동

1.5% agarose gel에 1×TAE(0.04 M Tris - acetate, 0.001 M EDTA) 완충액과 최종농도 0.3 μg/ml ethidi - um bromide를 사용하였으며, PCR 반응물 20 μl를 100 V(12×14 cm, 4.5 V/cm) 직류 하에서 30분 동안 전기영동 한 후 UV 상에서 사진으로 기록하였다.

중이 저류액에서의 ELISA를 사용한 SOD의 확인

6명의 중이염 환자에서 채취한 중이 저류액에서 enzy - me - linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용한 SOD의 확인은 다음과 같이 시행하였다. 0.1 M carbonate buffer(pH 9.6)로 1 : 8,000, 1 : 16,000, 1 : 32,000 혹은 1 : 65,000 희석한 50 μl의 중이 저류액을 polystyrene microtiter plate에 넣은 후 4℃에서 overnight incubation 한 후 0.05% phosphate buffered saline(PBS) - Tween buffer로 5회 세척하였다. 5회 세척 후 monoclonal anti - human SOD(mouse IgG1 isotype, Sigma Co, St. Louis, MO, USA) 50 μl를 중이 저류액을 coating시킨 polyst - yrene microtiter plate에 넣은 후 4℃에서 overnight in - cubation한 후 0.05% PBS - Tween buffer로 5회 세척하였다. 5회 세척 후 peroxidase conjugated antimouse

IgG antibodies(Sigma Co, St. Louis, MO, USA) 50 μl를 넣은 후 4℃에서 overnight incubation한 후 0.05% PBS - Tween buffer로 5회 세척하였다. 5회 세척 후 o - phenylenediamine(Sigma Co, St. Louis, MO) 0.15 mg/ml가 함유된 citric acid - phosphate buffer(pH 5.0)를 넣어 색을 발현 시켰다. 반응의 중지는 2.5 M 황산 용액을 사용하였으며 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

삼출성 중이염 환자의 중이 저류액에서 SOD의 존재 유무 및 SOD의 유전자 발현을 조사하고자 SOD 및 GAPDH 유전자에 대한 RT - PCR 및 ELISA를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

SOD에 대한 RT - PCR 결과

총 13예중 4번 시료를 제외한 12예에서 GAPDH mRNA가 증폭되어 SOD mRNA 발현을 조사한 결과 3예(25%)에서 발현을 관찰할 수 있었다(Figs. 1 and 2).

SOD에 대한 ELISA 결과

총 6예의 중이 저류액 중 4예(67%)에서 SOD에 대한 양성 반응을 나타내었으며 SOD 단백질이 존재하였던 4예에서 1 : 8,000, 1 : 16,000, 1 : 32,000 혹은 1 : 65,000 희석에서의 흡광도의 변화는 Fig. 3과 같다.

고 찰

삼출성 중이염은 유소아에서 흔히 발생하며 유소아의 후천성 청력장애의 가장 흔한 원인질환에 속한다. 또한 치료 후 빈번한 재발로 인해 치료에 한계를 보이고 있으며 숙주인자, 바이러스, 세균 및 내독소 등의 미생물적 요인, 이관의 기능장애, 염증매개체 및 염증반응산물 등의 생화학적 인자 등이 병인에 관련된 요소들이라고 알려지고 있으나 현재까지 많은 연구에도 불구하고 아직 명확한 원인을 밝혀내지 못하고 있는 실정이다.[11)12)] 삼출성 중이염은 빈번하게 만성 삼출성 중이염으로 이환되며, 이 경우 급성 중이염이 완치되지 않아 중이저류액이 지속되는 경우와 비정상 중이점막에 의한 액분비(secretory otitis media)에 의한 경우로 나눌 수 있으며 후자는 대부분 임상적으로 확연한

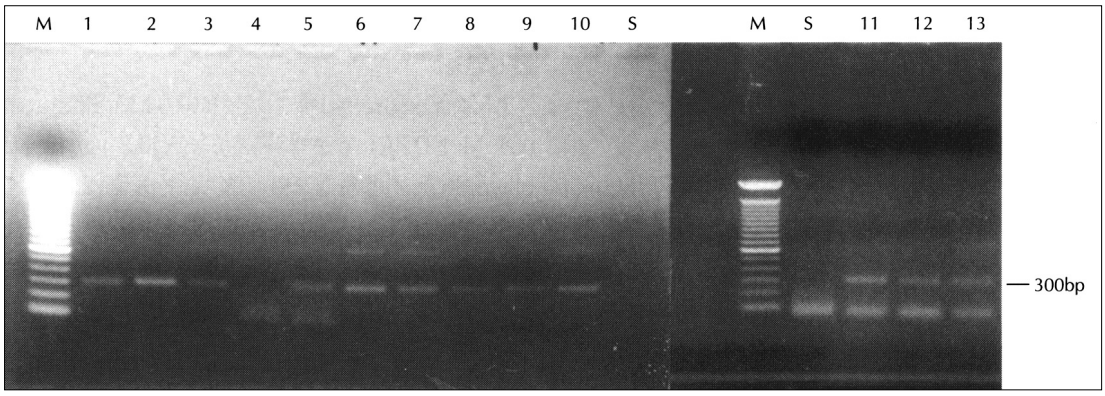

Fig. 1. Detection of the expression for GAPDH mRNA by RT-PCR. Lanes : M ; marker, S ; serum, 1 to 13 ; Samples of OME

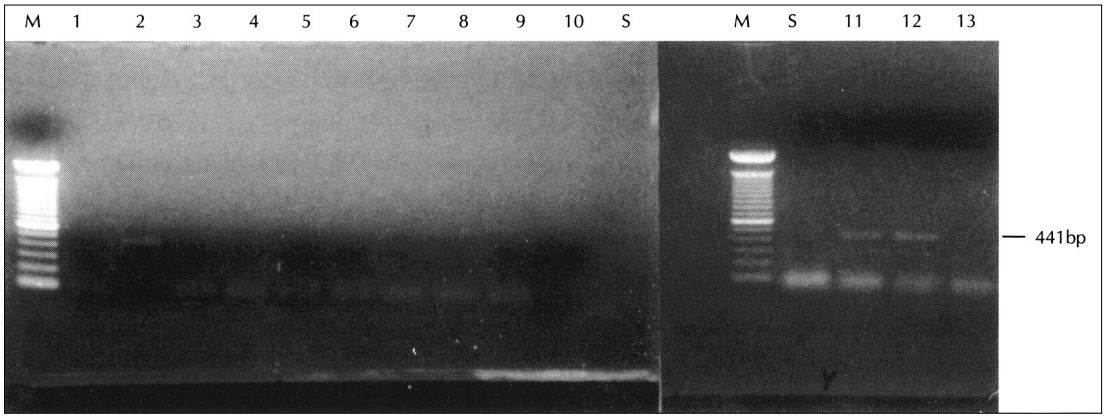

Fig. 2. Detection of the expression for SOD mRNA by RT-PCR. Lanes : M ; marker, S ; serum, 1 to 13 ; Samples of OME

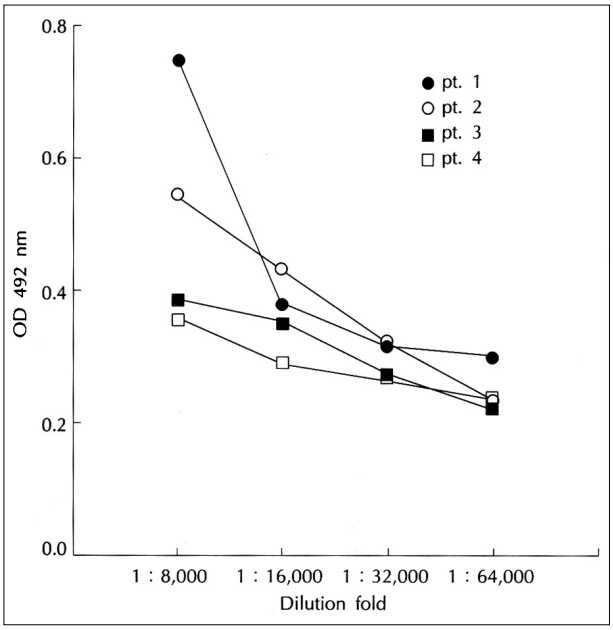

Fig. 3. Superoxide dismutase(SOD) from middle ear fluid of otitis media with effusion reacted with anti-human SOD in ELISA analysis.

급성 중이염을 보이지 않고 서서히 발생한다.[13] 지금까지 삼출성 중이염의 중이 저류액을 재료로 질병의 병인 및 만성화를 밝히기 위해 cytokine을 포함한 염증에 관여하는 여러 가지 염증매개체에 대한 생화학적인 연구 및 면역학적인 연구가 계속되어지고 있으나[14-17] 염증매개체에 대한 비교적 많은 연구 보고와는 달리 삼출성 중이염의 병인에 관하여 활성산소에 대한 연구는 그리 많지 않다.

Free radical이라고 하는 것은 분자의 최외각에 쌍을 이루고있지 않은 분자나 분자조각을 말하며 이는 화학적으로 매우 반응성이 높고 불안정하며 세포내 단백질, 탄수화물, nucleotide, 지질 등과 반응하여 세포독성을 나타낸다.[3)4)] 활성 산소는 분자 산소의 partial reduction에 의해서 생성되며 산소를 포함한 free radical이나 산소 유도체로서 역시 생체에서 세포독성을 가지고 있고 superoxide free radical($O_2^- \cdot$), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical($OH \cdot$) 등이 있다.[3)4)] 이들 활성 산소들은 화학적으로 매우 반응성이 높고 불안정하며 각종 염증 반응을 비롯한 저산소증 후의 산소 재 공급시 심장, 뇌 등에서 세포소기관들과 세포막 등에 막대한 손상을 주는 것으로 알려져 있다.[6)] 따라서 염증반응이 주가되는 삼출성 중이염의 병인에 활성산소가 관여하리라는 가정이 가능하며 최근 이에 대한 연구가 보고되고 있다.[18-20)] Parks[18)]과 Kim 등[19)]은 실험적인 중이염 및 삼출성중이염 환자의 중이 저류액에서 free radical에 의한 조직손상의 표지자가 되는 malondialdehyde(MDA)를 측정하여 중이염에 free radical이 관여한다고 주장하였다.

한편 인체는 이러한 활성 산소에 대한 손상을 줄이려는 항산화계를 가지고 있어서 활성 산소에 의한 손상을 줄이려 하고 있다.[3)10)] 이러한 항산화계에는 새로운 유해 산소 종류가 생성되는 것을 방지하는 역할을 하는 항산화효소계,[3)10)] 유해 산소를 포집하여 연쇄반응을 방지하는 vitamin E 및 vitamin C 등이 있고[3)10)] 유해 산소에 의해 손상된 세포를 복구하는 DNA 복구효소 등이 있다.[10)] 이들중 SOD는 활성 산소 중 가장 먼저 생성되는 superoxide free radical을 제거하는 효소이기 때문에 활성 산소의 처리에는 필수적인 효소로 유핵 세포의 세포질에 존재하며 copper와 zinc를 조효소로 사용한다.[3)10)] 따라서 만약 삼출성 중이염의 병인에 활성 산소가 관여한다면 인체에서는 자가손상을 줄이기 위하여 SOD의 유전자 발현을 할 것이고 이는 중이 저류액에 나타날 것이다. Parks 등[20)]은 동물 실험에서 SOD가 정상중이 점막의 점막상피조직에서만 강하게 분포하고 점막하결체조직 및 골조직에서는 분포가 희박하며 중이염군에서 점막하결체조직의 두께가 대조군에 비해 약 10 20배 증가한 사실을 밝혀내었으며 또한 점막하결체조직을 포함한 점막을 재료로 하여 Western blot을 실시한 결과 중이염군에서 대조군에 비해 전체적인 SOD의 발현이 감소함을 보고하였으나, 이는 SOD가 거의 분포하지 않는 점막하결체조직과 SOD의 발현이 강한 점막상피조직간의 양적인 불균형이 고려되지 않았음을 저자도 밝히고 있다. 현재까지 중이염에서의 활성 산소 및 SOD를 포함한 항산화 물질에 관한 연구는 시작단계에 있으며, 삼출성 중이염의 병인에 SOD가 관련됨을 밝히고 이에 대한 유전자 발현의 과정을 조사하고자 본 연구를 실시하였고, 환자의 중이 저류액에서 SOD 유전자 발현 중 전사(transcription)과정을 확인하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 SOD mRNA의 존재를 확인코자 하였고 번역(translation)과정을 확인하기 위해 ELISA를 이용하여 유전자 발현의 최종 산물인 SOD 단백질 자체를 확인하고자 하였다.

RT-PCR을 이용한 본 실험에서는 GAPDH가 증폭된 12예의 중이 저류액중 3예(25%)에서 SOD에 대한 mRNA의 발현이 있음을 확인하였고 ELISA를 이용한 실험에서는 실험 가능한 6예의 중이 저류액 중 4예(67%)에서 SOD에 대한 단백의 발현이 있음을 확인하였다. 이렇게 RT-PCR의 실험에서 양성 반응이 12예중 3예로 25%에 불과한 것은 연구 재료를 삼출성 중이염 환자의 수술시 채취 가능한 중이 저류액을 사용하였으므로 직접적인 전사가 이루어지는 중이 점막을 재료로 삼지 못하는 제약이 있었으나 양성반응을 보인 경우는 중이 점막에서 중이강내로 빠져나온 염

증세포, 염증이 심하여 중이 점막이 파열되어 점막상피가 중이 저류액에 존재하는 경우 등이 관여하였으리라 사료되며, 중이 저류액 채취시 중이 점막이 중이 저류액에 포함된 경우도 전혀 배제할 수 없다. 그러나 상기한 3가지의 경우 중 마지막을 제외하고는 모두 삼출성 중이염의 질병자체에 의한것이고 수술시 중이점막이 중이 저류액에 포함되는 경우는 그리 많지 않으리라 생각된다.

ELISA 결과에서 6예의 중이 저류액 중 4예에서 SOD에 대한 단백의 발현이 있음이 확인된 것은 삼출성 중이염의 병인에 활성 산소가 관여하며 이로 인해 생체는 SOD에 대한 유전자 표현을 하고 있는 것으로 생각된다. ELISA에 의한 SOD 단백의 발현은 67%인데 비해 RT-PCR에 의한 mRNA의 발현이 23%밖에 미치지 못한 것은 직접적인 전사가 일어나는 중이 점막을 재료로 삼지 못하여 발생할 수 있는 상기한 여러 요인이 원인이 될 수 있고, 또한 전체적으로 얻을 수 있는 재료의 양이 적거나 전술한 여러 가지 재료에 대한 제약으로 결과를 얻을 수 있는 재료의 수가 제한되어, 결과 해석에 있어 유전자 표현과정 중 번역과정보다는 전사과정의 불완전함이 최종 산물인 SOD 단백의 발현에 보다 큰 영향을 미친다는 결론을 내리기는 어렵다고 생각되며 보다 많은 대상으로한 추가실험이 필요하리라 사료된다. 또한 본 연구는 염증의 직접적인 원병소가 되는 중이 점막이 대상이 아니라 중이점막의 염증으로 인한 이차적인 산물인 중이 저류액을 재료로 하였기 때문에 ELISA 결과 해석에 염증 매개체를 포함한 여러 인자들이 중이 점막으로부터 중이강내로 분비되는데 관여하는 인자에 대한 고려도 포함되어야 하리라 생각된다. 본 연구는 환자를 대상으로 중이 저류액을 재료로 하였기 때문에 합당한 대조군을 찾을 수가 없었고 보다 명확한 결론을 얻기 위해서는 추후 동물실험이 필요하리라 사료된다. 본 실험의 결과해석에 고려되어야될 상기한 여러 요인들이 있어나, 본 연구는 유전자 표현의 결과로 인한 SOD자체와 SOD에 대한 mRNA가 삼출성 중이염의 중이 저류액에 존재함을 확인하였고 따라서 SOD가 삼출성 중이염의 병인에 직간접으로 관여함을 시사한다. 향후 추가적인 연구를 통하여 중이염에서 SOD를 포함한 항산화 물질이 중이염의 예방 및 치료제 혹은 치료 보조제로 적합한지에 대해 추가 연구가 시행되면 빈번한 재발로 인하여 치료에 한계를 보이고 있는 삼출성 중이염의 병인 및 치료에 대한 새로운 개념 도입에 도움이 되리라 생각된다.

결 론

본 연구는 만성화되는 삼출성 중이염의 병인으로서 활성산소의 역할을 일부 규명하고, 향후 활성산소를 적절히 통제함으로써 삼출성 중이염을 예방하거나 만성화를 막을 수 있는 적절한 방법을 찾는데 있어서 기초 자료가 되고자 SOD에 대한 RT-PCR 및 ELISA를 실행하였다. RT-PCR의 결과 GAPDH가 증폭된 12예의 중이 저류액 중 3례에서 SOD에 대한 mRNA의 발현이 있음을 확인하였고 ELISA 결과 6예의 중이 저류액 중 4예에서 SOD에 대한 단백의 발현이 있음을 확인하였다. 이는 삼출성 중이염의 병인에 활성 산소가 관여하며 이로 인해 생체는 SOD에 대한 유전자 표현을 하고 있는 것으로 생각되고 이러한 유전자 표현의 결과로 SOD 자체와 SOD에 대한 mRNA가 중이 저류액에 나타난 것이 아닌가 생각된다. 향후 추가적인 연구가 지속되면 빈번한 재발로 인하여 치료에 한계를 보이고 있는 삼출성 중이염의 치료 및 예방에 기존의 항생제와 소염제를 넘어서 활성 산소에 대한 새로운 개념 도입에 도움이 되리라 생각된다.

중심 단어 : 삼출성 중이염 · 활성 산소 · Superoxide dismutase.

REFERENCES

1) Blustone CD, Klein JO. *Otitis media, atelectasis, and Eustachian tube dysfunction. In: Bluestone CD, Stool SE, Scheetz MD. Editors. Pediatric Otolaryngology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1990. p.321-486.*
2) Johnson MD, Fitz gerald JE, Leonard G, Burleson JA, Kreutzer DL. *Cytokine in experimental otitis media with effusion. Laryngoscope 1994;104:191-6.*
3) Punchard NA, Kelly FJ. *Introduction. In: Punchard NA, Kelly FJ. editors. Free radicals. Oxford: Oxford University Press;1996. p.1-8.*
4) Moslen MT. *Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In: Armstrong D. editor. Free radicals in diagnostic medicine: A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York: Plenum Press;1994. p.17-27.*
5) Reaven PD. *Mechanisms of atherosclerosis: Role of LDL oxidation. In: Armstrong D. editor. Free radicals in diagnostic medicine: A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York: Plenum Press;1994. p.113-28.*
6) Ferrari R. *Oxygen free radicals at myocardial level: Effect of ischemia and reperfusion. In: Armstrong D. editor. Free radicals in diagnostic medicine: A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York: Plenum Press;1994. p.99-112.*
7) Ames BN, Shigenaga MK. *Oxidants are a major contributor to cancer and aging. In: Halliwell B, Aruoma. editors. DNA and free radicals. New York: Ellis Horwood;1993. p.1-15.*
8) Waz WR, Feld LG. *Reactive oxygen molecules in the kidney. In: Armstrong D. editor. Free radicals in diagnostic medicine: A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York: Plenum Press;1994. p.171-84.*
9) Yagi K. *Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal and pancreatic disease. In: Armstrong D. editor. Free radicals in diagnostic medicine: A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York: Plenum Press;1994. p.165-70.*

10) Halliwell B, Gutteridge JMC. *Protection against oxidants in biological systems: The superoxide theory of oxygen toxicity. In Halliwell B, Gutteridge JMC editors. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press;1989. p.86-187*.
11) Bernstaein JM. *The pathogenesis of otitis media with effusion: The role of virus and bacteria. In: Mogi G. editor. Recent advances in otitis media. New York: Kugler Pub;1994. p.61-8*.
12) Tos M. *Etiology of secretory otitis media: Tubal dysfunction or infection. In: Mogi G. editor. Recent advances in otitis media. New York: Kugler Pub;1994. p.69-72*.
13) Gates GA. *Acute otitis media and otitis media with effusion. In: Cummings CW, Fredrickson JM, Harker LA, Krause CJ, Richardson MA, Schuller DA, editors. Otolaryngology-Head & Neck Surgery. 3rd ed. Vol 5. St. Louis: Mosby Year Book;1998. p.464-5*.
14) Park JY, Moon IH, Jun BH. *Cytokine mRNA expression of otitis media with effusion in children. Korean J Otolaryngol 1997;40:749-58*.
15) Chang KH, Yeo SW, Suh BD. *Expression of tumor necrosis factor-α and Interleukin 10 in the middle ear effusion and histopathological changes of the middle ear mucosa in the rats with experimental otitis media with effusion. Korean J Otolaryngol 1998;41:703-11*.
16) Maxwell KS, Fitzgerald JE, Burleson JA, Leonard G, Carpenter R, Kreutzer DL. *Interleukin-8 expression in otitis media. Laryngoscope 1994;104:989-95*.
17) Juhn SK, Tolan CT, Garvis WJ, Cross DS, Giebink GS. *The levels of IL-1 β in human middle ear effusions. Acta Otolaryngol (stockh) 1992;suppl. 493:37-42*.
18) Parks RP, Huang CC, Haddad Jr J. *Evidence of oxygen radical injury in experimental otitis media. Laryngoscope 1994;104:1389-92*.
19) Kim DJ, Kim JG, Song DW, Ahn BH, Mun KC. *Oxygen free radical injury in human otitis media. In: McCafferty, Coman W, Carroll R, editors. Proceedings of XVI world congress of otorhinolaryngology head and neck surgery. 1997 March 2-7;Sydney, Australia. Bologna, Italy: Monduzzi Editore;1997. p.889-92*.
20) Parks RP, Huang CC, Haddad Jr J. *Superoxide dismutase in animal model of otitis media. Eur Arch Otorhinolaryngol 1995;252:153-8*.