

# 섬유모세포의 종류에 따른 불멸화된 구강 각화세포의 삼차원적 배양에 관한 연구

정정권 · 윤규호 · 김은철\*

인제대학교 의과대학 상계백병원 구강악안면외과, \*원광대학교 치과대학 구강병리학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:211-220)

## ROLE OF FIBROBLASTS IN ORGANOTYPIC CULTURES OF IMMORTALIZED HUMAN ORAL KERATINOCYTES

Jeong-Kwon Cheong, Kyu-Ho Yoon, Eun-Cheol Kim\*

*Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, Sanggye Paik Hospital, College of Medicine, Inje University,*

*\*Dept. of Oral Pathology, College of Dentistry, Wonkwang University*

**Objective:** In organotypic culture of immortalized human oral keratinocytes (IHOK), the change of the growth and differentiation was investigated according to the fibroblast type and the involvement of mitogen-activated protein (MAP) kinase.

**Materials & Methods:** IHOK was cultured three dimensionally with gingival fibroblast (GF), dermal fibroblast (DF) and immortalized gingival fibroblast (IGF). We characterized biologic properties of three dimensionally reconstructed IHOK by histological, immunohistochemical, and Western blot analysis. We also investigated whether MAP kinase pathway was involved in epithelial-mesenchymal interaction by Western blot analysis.

**Results:** The best condition of three dimensionally cultured IHOK was the dermal equivalent consisting of type I collagen and IGF. IGF increased the expression of more proliferating cell nuclear antigen (PCNA), involucrin than GF and DF in response to co-culture with IHOK. Extracellularly regulated kinase (ERK) pathway was activated in organotypic co-culture with IGF.

**Conclusion:** The organotypic co-culture of IHOK with dermal equivalent consisting of type I collagen and IGF resulted in excellent morphologic and immunohistochemical characteristics and involved ERK pathway. The epithelial-mesenchymal interaction was activated according to the fibroblast type.

**Key words:** Fibroblasts, Keratinocytes, Mitogen-activated protein kinase

## I. 서 론

구강암은 인체에 발생하는 암의 약 3-5%를 차지하며, 그 중 90% 이상이 편평세포암종이다. 구강암은 전암 병소인 백반증이나 홍반증이 동반되며 다른 장기에서와는 달리 그 진행 과정을 육안으로 관찰하기 용이한 전형적인 단단계의 발암 모델이다<sup>1)</sup>. 불멸화된 구강 각화세포 (immortalized human ker-

atinocyte; IHOK)는 human papilloma virus (HPV) 16으로 transfection시킨 상피 세포로서 구강암 전암 병소의 소견을 가진 것으로 보고되고 있어 구강암의 진행을 연구하는 데 좋은 발암 연구 모델이다<sup>2,3)</sup>.

세포 배양을 이용한 실험은 생물학적 복잡성을 최소화할 수 있는 장점 때문에 많이 사용되어 왔다. 생체 내에서의 세포는 단일층만을 형성하지는 않으며 주변 기질 세포나 세포외기질과의 반응과 상호 작용을 통하여 증식과 분화를 조절하게 된다. 따라서 단일층만을 형성하는 기존의 배양 방식을 이용한 연구 방식은 한계가 있다<sup>4)</sup>. 기존의 상피 세포 배양 방법의 한계점은 크게 세가지 원인에 의해 발생하는데 첫째, 암종 세포 주변 결합조직의 결여에 의해 암종 세포-결체조직 간의 상호작용이 없고 둘째, 기저막의 소실로 인해 상피-결체조직 간의 상호 작용이 소실됨으로써 생체와 유사한 극성을 가질 수 없으

### 정 정 권

139-707 서울특별시 노원구 상계7동 761-1

인제대학교 상계백병원 구강악안면외과학교실

**Jeong-Kwon Cheong**

*Dept. of OMFS, Sanggye Paik Hospital,*

*761-1, Sanggye-7dong, Nowon-gu, Seoul, 139-707, Korea*

*Tel: 82-2-950-1161 Fax: 82-2-950-1163*

*E-mail: dentpd@hanmail.net*

\* 본 논문은 2005년도 인제대학교 학술연구조성비 보조에 의한 것임.

며 세번째로 단층 배양할 때 배지 아래에서 성장함에 따라 생체와 같은 대기 접촉이 소실되어 상피 세포나 암종 세포의 분화가 유도되지 않는다<sup>6,9</sup>. 이러한 문제를 해결하기 위해 배양할 때 바닥에 laminin, 제4형 교원질 등의 세포외기질을 도포하는 방법이 소개되기도 했으나 상피 세포의 부착과 증식에는 도움이 되지만 분화의 유도나 중층 형성은 이루어지지 않았다<sup>7,9</sup>. 따라서 생체와 유사한 조직을 형성하기 위해 생체의 상피나 점막과 유사한 실험실 조건, 즉 결체조직 또는 점막하조직과 유사한 환경을 형성하고 대기와 접촉하는 조건 (air-liquid interface)을 제공함으로써 삼차원적으로 재현된 실험실 모델이 연구되고 있다<sup>7</sup>.

정상 상피의 경우 결체조직 부위를 재생하기 위하여 기증된 사체에서 만들어진 de-epidermised dermis가 이용되기도 하였으나 재료가 제한되고 일관된 실험 결과를 얻기 어렵다는 점 때문에 최근에는 제1형 교원질을 이용한 연구 모델의 개발이 활발히 이루어지고 있다<sup>6,10,11</sup>. 상피-간엽 상호작용이 상피 형태 발생, 항상성 및 재건에 필수적인 것으로 생각되고 있으나 그 기전은 아직 정확히 밝혀져 있지 않고 주로 피부 상피 세포에서 연구가 이루어지고 있다. 섬유모세포는 상피 하방의 결체조직에서 가장 많은 세포이고 세포외기질과 성장 인자의 대부분을 생산한다. 생체의 실험에서 상피 하방의 섬유모세포는 성장 인자를 통해 각화세포 성장을 촉진할 수 있으며, 이런 각화세포는 섬유모세포 유전자의 발현을 유도할 수 있다<sup>12,13</sup>. 서로 다른 결체조직에서 섬유모세포의 유사성에도 불구하고 다른 표현형이 존재해 인체 부위 간의 창상 치유에서 차이가 생기는 것은 이런 표현형의 차이에 의해 발생한다<sup>14-16</sup>. 측분비 성장 인자인 hepatocyte growth factor (HGF)와 keratinocyte growth factor (KGF)는 주로 섬유모세포에서 생산되어 그 각각의 수용체가 상피 세포에 의해 주로 발현된다. 구강 점막이나 피부같은 조직의 상피 하방의 섬유모세포는 이런 인자를 발현하고 정상 상피 성장과 창상 치유동안 상피 재생 모두에 영향을 준다<sup>17-19</sup>.

Mitogen-activated protein (MAP) kinase는 세포 외부에서 들어오는 각종 자극에 의해 활성화되어 그 신호를 핵으로 전달하여 유전자 발현을 조절하는 기능을 수행한다<sup>20,21</sup>. 삼차원적 배양에서 주로 정상 상피 분화 및 조절의 특성을 밝히는 제한된 범주만 연구되었고 IHOK를 대상으로 섬유모세포의 종류에 따라 삼차원 배양을 통한 증식과 분화의 변화를 밝힌 것은 없다. 또한 최근 암세포를 비롯하여 세포의 성장 및 자극을 받은 세포에서 MAP kinase 활성화 경로가 관여한다는 사실이 보고되고 있으나 상피-간엽 상호작용에서 섬유모세포의 종류에 따라 MAP kinase 활성화 경로를 통한 상피 형성이 이루어진다는 보고는 아직까지 발표된 바가 없다<sup>22</sup>. 피부 영역에서는 삼차원적 배양으로 제조된 인공 피부 모델을 이용하여 주로 피부 각화 세포의 증식과 분화에 중점을 두고 연구되어 왔고 구강 각화 세포를 대상으로는 1991년 정상 구강 각화세포에 HPV로 transfection시킨 불멸화된 구강 각화세포주를 처음으로 개발한 이래 정상 상피의 증식과 분화 연구에 비교 이용하고 있다<sup>23</sup>.

## II. 연구 대상 및 방법

### 가. 세포 배양

#### 1. 사람 구강 각화세포 (normal human oral keratinocyte; NHOK) 배양

교정 치료를 목적으로 발거한 건강한 제1소구치의 치은 조직을 채취하여 300 unit/ml penicillin, 300 µg/ml streptomycin, 1.5 µg/ml amphotericin-B가 포함된 Hanks' balanced salt solution (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)으로 5회 세척하였다. Dispase (grade II, 2.4 mg/ml, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로 60분 동안 5% CO<sub>2</sub>가 포함된 37°C 배양기에 넣어 하방 결체조직으로부터 상피를 분리하였다. 단일 세포로 용해하기 위해 trypsin에 60분 동안 37°C로 처리하여 이를 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고 keratinocyte growth medium (Clonetics, San Diego, CA, USA)에 부유해 60 mm 배양 접시에서 5 × 10<sup>6</sup> 농도로 배양하였다. NHOK가 증식되어 완전히 배양 접시를 덮는 단층이 형성되면 0.05% trypsin / 0.02% EDTA로 처리하여 배양 접시로부터 세포를 박리하고 1:3으로 계대 배양하였으며 본 실험에서는 4-5 세대의 세포를 사용하였다.

#### 2. IHOK 배양

IHOK 배양을 위해 HPV 16 genome을 포함하고 있는 pBR322로부터 E6과 E7의 full length를 클론화하여 hygromycin B resistance가 있는 pBabe vector의 BamHI과 Sall 부위에 삽입하였다. pBabe HPV 16 E6/E7 plasmid DNA를 gel purify하고 에탄올 침전, 정량화와 함께 BamHI과 Sall으로 확인하였다. Transfection 전에 G418 resistance가 있는 PKC peak 8 green fluorescent protein을 일차 배양한 NHOK에 transfection하여 transfection 효율을 검사하였다. Lipofectamine plus kit (Gibco/BRL)를 이용하여 60 mm dish의 NHOK가 70-80%의 성장에 도달했을 때 pBabe E6/E7과 음성 대조군으로 pBabe vector만을 transfection하였다. 2일 후 세포에 10 µg/ml의 hygromycin (Boehringer Mannheim)을 2주간 transfection하지 않은 대조군 세포가 모두 사라질 때까지 처리하여 hygromycin resistant colony를 클론화하여 배양하였으며 본 연구에 사용한 IHOK는 50 계대 이상의 세포를 사용하였다. 4종류의 IHOK를 연구 대상으로 하였는데 IHOK #5는 pBabe-E6E7 불멸화 세포이고, IHOK #12는 pBabe IHOK에서 클론화된 세포주이며 IHOK #8과 #9는 pLXSN-E6E7으로 불멸화한 세포였다.

#### 3. 피부 각화세포 (HaCaT)와 구강암세포 (HN30)의 배양

HaCaT은 불멸화된 피부 각화세포주이고 HN30은 구강에서 기원한 원발성 암종에서 배양한 편평상피암종세포주로서 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco/BRL)이 포함된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco/BRL)에서 배양하였다.

#### 4. 치은 섬유모세포 (gingival fibroblast; GF)의 배양

GF 배양은 항생제가 포함된 DMEM을 생검 배지로 준비한 후 고정 치료를 위하여 내원한 환자의 제1소구치 부위에 내사면 절개를 가한 다음 건강한 치은 조직을 채취하였다. 채취된 시편들을 생검 배지로 3회 세척 후 치은 조직을 세절한 다음 35 mm 배양 접시에 고르게 분포시킨 후 10% FBS와 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 DMEM을 넣고 37°C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기 혼합 배양기에서 배양하였다. GF가 조직 절편으로부터 증식되어 완전히 배양 접시를 덮는 단층이 형성된 후 100 mm 세포 배양용 접시를 이용하여 계대 배양하였다.

#### 5. 불멸화된 치은 섬유모세포 (immortalized gingival fibroblast; IGF)의 배양

IHOK 배양과 동일한 방법으로 GF에 HPV 16을 transfection하여 40 계대 이상의 IGF를 사용하였다.

#### 나. 삼차원 배양을 위한 진피 유사체의 제조

구강 치은 조직 세포의 삼차원 재건을 위해 제1형 교원질 (Nitta Gelatin, Osaka, Japan)을 이용하였고 이를 중화 완충 용액 (2.2% NaHCO<sub>3</sub>, 0.05 N NaOH, and 200 mmol/L 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)과 10배의 DMEM/F12 농축 배지를 8:1:1의 비율로 혼합하였다. 진피 유사체 제조를 위해 사용되는 섬유모세포는 일차 배양된 진피 섬유모세포 (dermal fibroblast; DF), GF와 IGF 3종류를 사용하였다. 섬유모세포는 제1형 교원질에 1.2 × 10<sup>6</sup> /ml의 농도가 되도록 혼합하여 gel matrix에 섬유모세포가 균일하게 분포하게 하여 반지름 12 mm의 0.2 µm pore size membrane으로 제작된 millicell (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 casting한 후 37°C 배양기에서 12시간 이상 중합과 수축이 일어나도록 하였다.

#### 다. 구강 점막의 삼차원 배양

계대 배양 중인 상피 세포를 PBS로 3회 세척 후 0.125% trypsin-EDTA를 처리하여 모은 후 원심 분리하여 hemocytometer로 세포 수를 측정하였다. 상피 세포는 6-well plate 내부에 위치한 millicell의 각 well 당 3 × 10<sup>6</sup> 개의 세포가 되도록 분주하였고 바깥쪽은 DMEM과 F12가 3:1 비율로 혼합되었다. 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.6 mg/ml L-glutamine과 함께 10% FBS가 포함된 배지 3 ml를 넣어 37°C 배양기에서 배양하였다. 배지는 2-3일 간격으로 교환하였고 5일 후에는 상피 세포 상층부의 배지를 제거하였다. 상피 세포가 대기에 노출되도록 하여 14일간 추가 배양한 후 10% 중성 포르말린에 고정하였다.

#### 라. 삼차원 배양된 구강 치은 조직의 형태학적 특징 분석

제1형 교원질 상에서 배양된 구강 조직은 10% 중성 포르말린에 12시간 이상 고정하고 통상의 방법에 의해 파라핀에 포매한 후 4 µm의 연속 절편을 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 하였다. 광학 현미경에서 세포의 분화도, 각질 형성 등의 소견을 관찰하고 비교 검토함으로써 삼차원적 배양이 생체 조건과 유사한 배양 환경을 제공했는지를 판별하였다.

#### 마. 면역조직화학 염색

파라핀 포매된 절편들을 xylene으로 탈파라핀화하였으며 증류수로 함수화하였고 내인성 peroxidase에 의한 artifact를 피하기 위해 절편들을 실온에서 15분 동안 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 ice cold solution으로 반응시킨 후 tris-buffered saline (TBS)으로 5분 동안 세척하였다. Blocking serum으로 normal rabbit serum을 30분간 적용시켰다. Cytokeratin 4 (CK4), CK6, CK10, CK16, CK19 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)는 1/60, proliferating cell nuclear antigen (PCNA, Biotest, Kennebunk, ME, USA), p53 (Biotest)은 1/30, involucrin (Biomedical Technology, Cambridge, MA, USA)은 1/100로 희석해 일차 항체를 30분간 반응시킨 다음 TBS로 5분 동안 3회 세척한 후에 link antibody (anti-mouse IgG, Dako, Glostrup, Denmark)를 20분간 반응시켰다. 그 후 streptavidin alkaline phosphatase로 30분간 반응시킨 후 aminoethyl carbazole (AEC)로 발색시키고 Mayer hematoxylin으로 대조 염색하여 glycerin으로 도포 후 검경하였다. 염색된 조직 표본에서 각각의 항체에 대한 양성 반응을 상피에서는 기저층, 상기저층, 유극층, 표층의 4층으로 분류하여 평가하였다.

#### 바. Western blot 분석

100 mm dish에 각각의 단일 배양 세포와 삼차원 배양한 세포에서 trypsin-EDTA로 세포를 수확하고 원심 분리하여 cell pellet을 만들었다. Lysis buffer (RIPA buffer)로 단백질을 추출하고 bicinchoninic acid assay (BCA)를 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 각 실험군별로 추출된 단백질 50 µg씩을 사용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행한 후 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. 비특이 항체의 결합을 막기 위하여 실온에서 membrane을 blocking 용액 (Zymed, San Francisco, CA, USA)에 1시간 30분 처리하였다. 그 후 세포 증식의 표지자로는 PCNA, 세포 분화 표지자로는 involucrin, CK6, CK19에 일차 항체와 이차 항체를 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)으로 각각의 단백질을 확인하였다.

### III. 결 과

#### 가. 섬유모세포의 종류에 따른 삼차원적 조직학적 형태 변화

교원질에 포함된  $5 \times 10^6$  개의 섬유모세포를 이용하여 상피세포의 형태 발생을 관찰하였다. 피부와 구강 각화세포를 배양한 진피 대체물에서 관찰되는 결체조직 구조는 건전한 상태였으며 간질핵세포의 대부분은 열게 염색되고 난원형 또는 둥근 세포로  $\times 100$  시야에서 5-10 개 정도 관찰되었지만 중층화되는 과정동안 결체조직의 형성 차이는 거의 없었다. 진피 유사체의 구성 성분인 섬유모세포를 GF, DF와 IGF로 나누어 각각 삼차원 배양했을 때, HaCaT와 IHOK 4종류의 모든 세포에서 IGF를 이용하였을 때 삼차원적 상피 형태 형성이 가장 우수하였다. HaCaT의 경우 IGF를 이용하여 삼차원 배양했을 때 상

피층이 8-9 층인데 비해 GF는 4-7 층으로 감소하였고 DF는 1-3 층으로 가장 작은 것을 볼 수 있었다. 각화층, 기저막 형성이나 결체조직 침범에 대한 섬유모세포의 영향은 없었다. IHOK 종류를 다르게 하여 삼차원 배양했을 때 IGF와 GF는 IHOK #5와 IHOK #8에서 큰 차이가 없었으나 IHOK #9와 IHOK #12에서는 상피층의 중층화 감소가 GF일 때 나타났고 DF는 더욱 현저히 감소되었다. IHOK #5에서는 IGF가 GF보다 상피층의 치밀함이 크고 GF와 DF는 IGF를 이용하였을 때에 비해 기저막 형성이 잘 이루어지지 않았다. 특히 IHOK #8에서는 IGF에 비해 GF와 DF를 이용했을 때 상피층의 구분이 잘 되지 않고 표층 박리와 상피 변성이 나타났다. IHOK #9와 IHOK #12는 상피의 중층화나 상피층 형성이 IHOK #5와 IHOK #8에 비해 작았는데 특히 DF를 이용 시 기저막 형성, 상피층 형성이 작았다 (Fig. 1, Table 1).

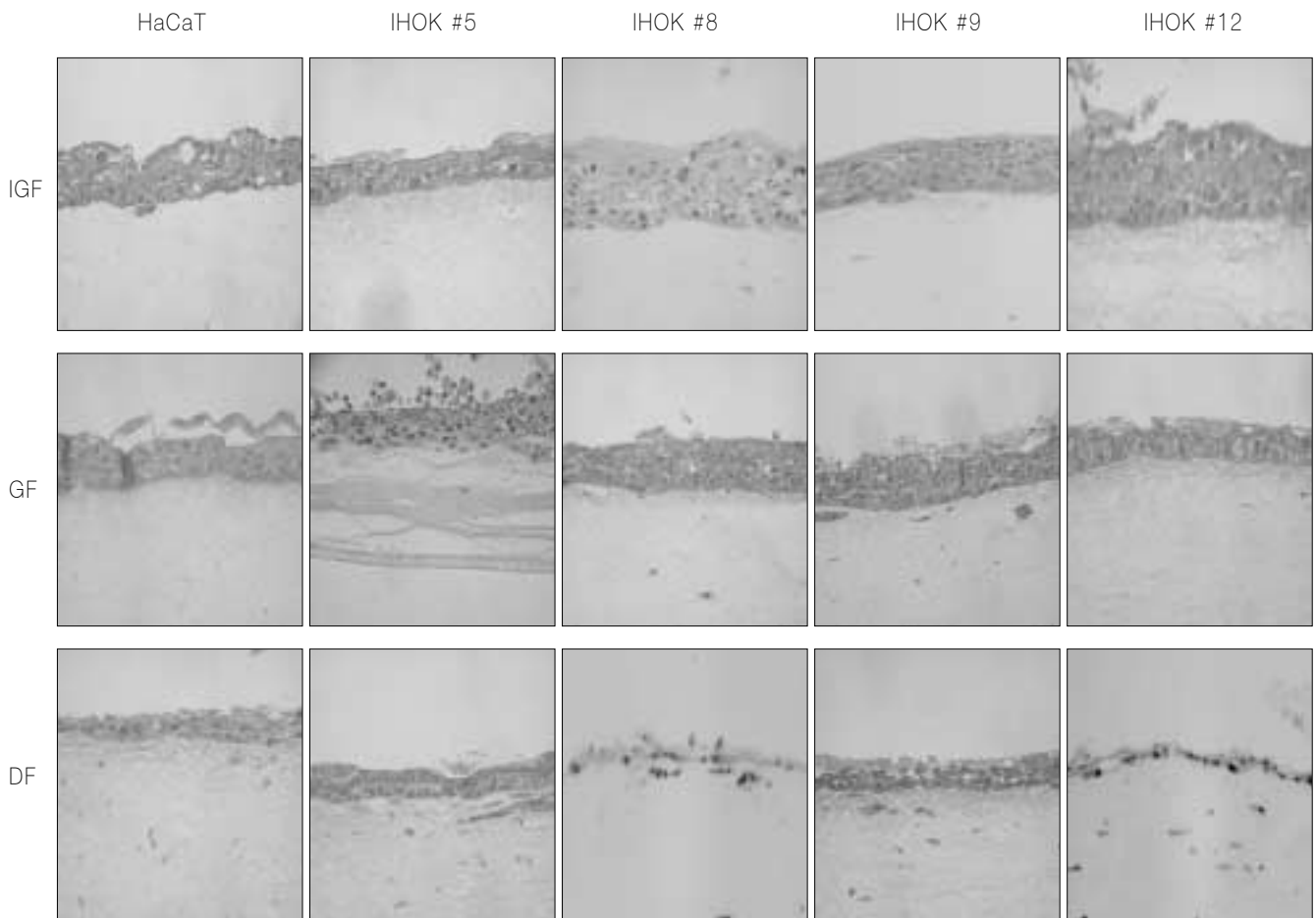


Fig. 1. Histologic features of the reconstructed keratinocytes according to the fibroblast type (H&E stain,  $\times 200$ ).

나. 상피 세포의 종류에 따른 조직학적 형태 변화

대기 노출 전 배양액에 잠긴 submerged state 배양 기간은 3일이며 대기 노출 기간에 따른 삼차원 배양은 배양 14일째가 가장 우수하였다. 진피 대체물로는 IGF를 이용하였을 때 삼차원적 상피 형태 형성이 가장 우수하여 이러한 조건 하에서 각각의 상피 세포를 발암 단계별로 삼차원적 배양하여 조직학적 형태 형성을 비교하였다. 제1형 교원질과 IGF로 구성된 진피 유사체 상에서 배양된 NHOK, IHOK, HaCaT, HN30은 모두 배양 7일 이후에는 4-10층의 중층화를 이루며 성장하였는데 이중 HaCaT와 HN30이 가장 좋은 상피층과 형태를 보였고 NHOK에서 중층화 형성이 가장 작았다. NHOK는 배양 14일의 경우 정상적 성숙과 3-5 층의 중층화를 이루며 성장하였다. 표층에는 각질의 뚜렷한 형성을 보였으며 상피 형태 구조도 유지되었고 결체조직 내로의 침윤도 없어 정상적인 치은 조직 구조를 관찰할 수 있었다. IHOK 간에 삼차원적 조직 형성 차이가 있었는데 IHOK #5와 IHOK #8이 다른 IHOK보다 중층화나 상피 성숙이 좋아 가장 우수한 삼차원적 재건을 보였으며 IHOK는 모두 기저막 형성을 보였다. IHOK 중에서 결체조직 침범과 상피층 형성 정도나 중층화 정도, 각질층 형성은 IHOK #8이 가장 우수하였다. HN30은 기저층 뿐만 아니라 상층부의 세포에서도 비정상적인 세포 분열이 관찰되어 이형성이 심한 백반증 또는 초기의 침윤성 편평세포암종과 유사하였으며 암종 조직의 표면에서 각질의 형성을 관찰할 수 없었다. 진피 유

사체에 섬유모세포를 포함시키지 않았을 때에도 종양 세포의 중층화가 일어났으나 종양 세포의 침윤성 성장은 보이지 않았다 (Fig. 2, Table 1).

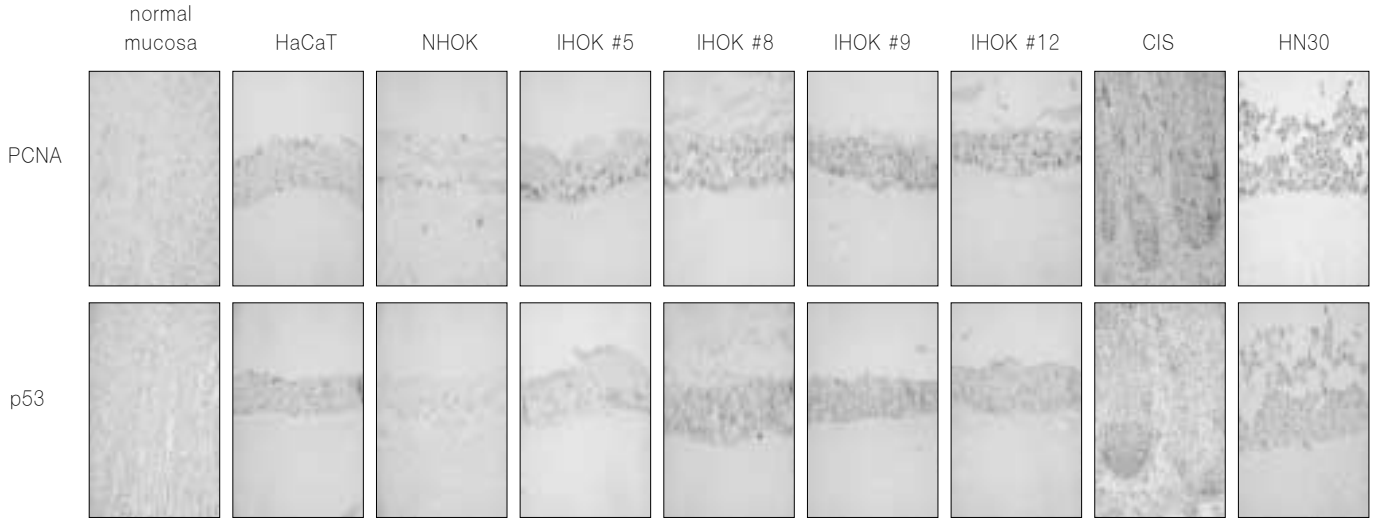
다. 정상, 전암 조직과 악성 구강 상피 세포의 종류에 따른 삼차원적 배양 후 증식 및 분화에 따른 면역조직화학적 차이

각종 각화세포의 삼차원적 배양에 따른 증식 표지자에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하였다. PCNA는 세포의 핵에 염색되었는데 대조군인 정상 점막 조직에서는 기저층과 하 상기저층에서 중등도의 발현이 있었다. 제1형 교원질과 IGF로 구성된 진피 유사체 상에서 배양한 HaCaT의 경우 PCNA 염색은 기저층, 상 및 하 상기저층에서 중등도의 발현을 보여 정상 점막 조직과 발현 위치의 차이가 있었다. NHOK로 배양한 경우 염색 양상은 정상 점막 조직보다 감소된 정도의 발현을 보였으나 발현은 기저층 및 하 상기저층에서 관찰되어 NHOK와 정상 점막 조직 간에 PCNA 발현 부위가 유사함을 보였다. NHOK에 비해 IHOK로 삼차원 배양한 경우 PCNA 발현이 증가하였고 각각의 IHOK에서도 PCNA의 발현 차이를 보였다. 심도의 발현을 보인 IHOK #8, IHOK #9, IHOK #12에 비해 IHOK #5는 중등도의 발현을 보였고 발현 위치도 기저층과 하 상기저층에 국한되어 나타났다. IHOK #8과 IHOK #9는 기저층, 상 및 하 상기저층에, IHOK #12에서는 상피 세포 전층에서 발현 양상을

**Table 1.** Histologic findings of the reconstructed keratinocytes according to the fibroblast type

Fibroblast type	HaCaT			IHOK #5			IHOK #8			IHOK #9			IHOK #12		
	IGF	GF	DF	IGF	GF	DF	IGF	GF	DF	IGF	GF	DF	IGF	GF	DF
Epithelium layer	8-9	4-7	1-3	3-7	3-5	2-3	8-10	7-8	5-7	3-7	3-4	2-4	3-6	2-3	2-3
Horny layer	+	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±	±	-	-	-
Connective tissue invasion	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Basement membrane formation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±
Necrotic change in epithelium	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±	-	±	±

-: negative, +: positive, ±: focal



**Fig. 2.** Expression of the proliferation and oncogene markers in three dimensional culture of immortalized and malignant keratinocytes by immunohistochemistry (× 200).

보여 각각 발현 부위의 차이가 있었다. IHOK #8과 IHOK #9는 면역조직화학적 염색에서 PCNA 심도의 발현이 기저층에 나타났다. HN30의 삼차원적 배양 결과 상피 세포 전층에 걸쳐 나타났다고 발현 위치는 정상 점막의 경우 기저층에, 전암 및 IHOK 세포는 기저층과 상 및 하 상기저층에 걸쳐 나타나 NHOK와는 다른 양상을 보였다.

p53 단백질에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 결과 정상 구강점막에는 상피 전층에서 음성으로 발현되었고 HaCaT는 상기저층 상부와 하부, 기저층에서 발현이 나타났으나 NHOK의 경우에는 기저층에만 미약하게 나타났다. IHOK는 NHOK보다 p53 단백질 발현이 증가되었으며 경도의 발현이 기저층과 상기저층에서 나타난 IHOK #5, IHOK #8, IHOK #9에 비해 IHOK #12는 중등도의 발현이 HaCaT과 유사한 위치에서 나타났다. 상피내암(carcinoma in situ; CIS)은 중등도의 발현이 세포 전층에서 나타났다 (Fig. 2).

각종 상피 세포의 삼차원적 배양에 따른 분화 표지자에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 결과, involucrin에 대한 면역조직화학적 염색 시 정상 구강 점막에는 과립층, 유극층, 하 상기저층을 비롯해 주로 상피 표층에서 발현되었다. HaCaT은 상기저층 상부와 하부에서 발현이 나타났으나 표층에는 발현이 전혀 나타나지 않는 특징을 보였다. NHOK의 경우에는 정상 점막과 유사하게 최상층인 각질층과 상기저층 상부와 하부에 involucrin의 발현이 나타났으나 발현 정도는 정상 점막 조직보다 작았다. IHOK는 NHOK에 비해 involucrin의 발현이 감소되는 경향을 보였다. 경도의 발현을 보인 IHOK #8, IHOK #9에 비해 IHOK #5와 IHOK #12는 중등도의 발현을 보였고 발현 위치는 주로 상기저층과 최상층에서 나타났다. CIS는 중등도의 발

현이 최상층과 상기저층 상부에 나타났으며 HN30은 세포 전층에서 경도의 발현이 나타났다. 정상 구강 점막 조직에서는 CK6이 가장 높은 발현을 보였는데 주로 상기저층에서 나타났고 CK19는 음성 발현을 보였다. HaCaT은 정상 구강 점막에 비해 CK19의 발현이 증가되었으나 CK6은 감소되었다. NHOK에서 CK6의 발현이 많은 점은 정상 점막과 동일하였고 CK19의 발현이 나타난 점은 정상 점막과 유의한 차이가 있었다. IHOK의 CK19에 대한 발현은 IHOK #12가 가장 많았고 IHOK #5, IHOK #8, IHOK #9는 NHOK와 유의한 차이가 없었다. CIS의 CK19에 대한 면역 염색은 세포 전층을 통해 심도의 발현을 보였다. CK6은 정상 조직과 NHOK에 비해 IHOK 모두에서 발현이 감소된 소견을 보였는데 주로 상기저층에서 발현되었다. CIS에 대한 CK의 면역조직화학적 염색에서 가장 많은 발현을 보인 것은 CK6과 CK19이었고 정상 및 NHOK보다 발현이 증가한 것은 CK19이었다. HN30의 경우 IHOK보다 발현이 증가한 CK는 없었고 CK6, CK19 모두 유사한 정도의 발현을 보였으며 IHOK와 발현 부위도 비슷하였다 (Fig. 3).

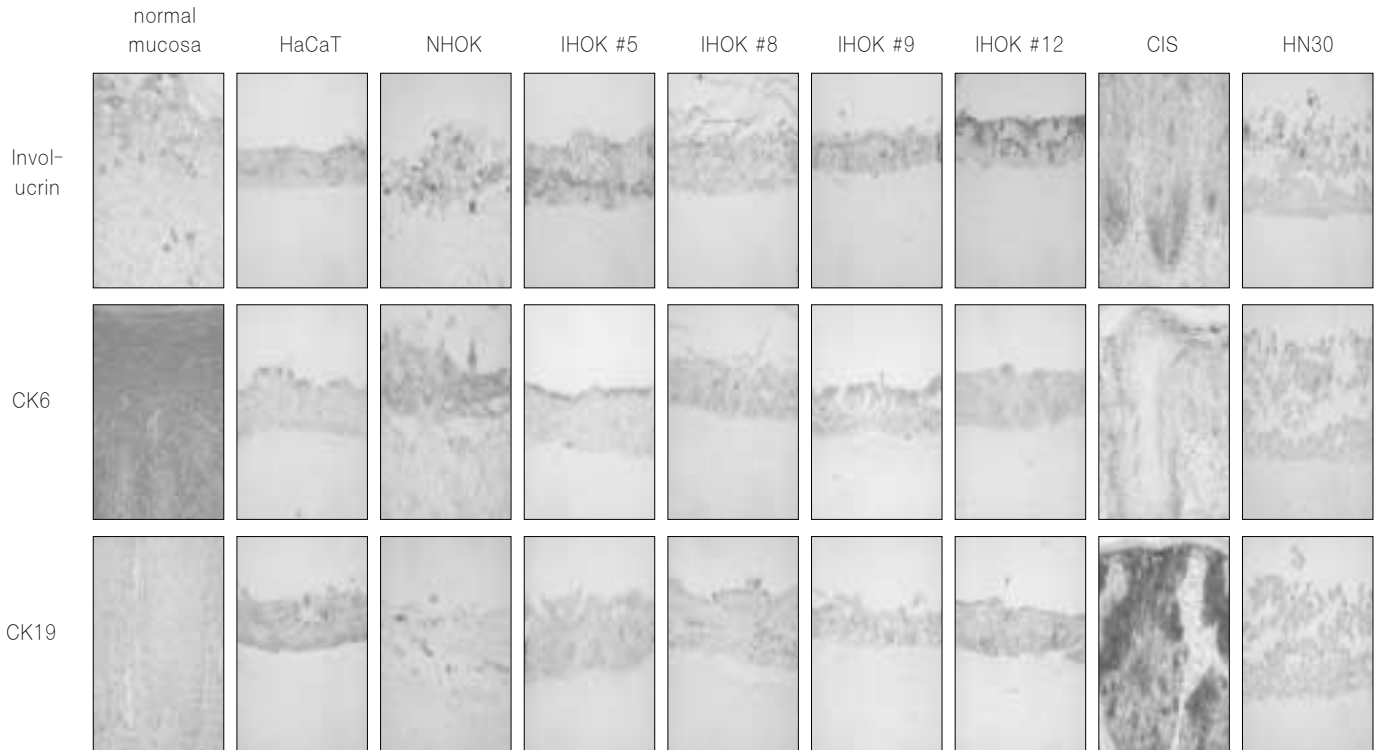
라. 섬유모세포의 종류에 따른 단일 세포 배양과 삼차원 배양에서 증식 및 분화 표지자에 대한 Western blotting 결과

PCNA의 Western blotting 결과 단일 세포 배양한 4가지 세포 중 IGF와 DF가 가장 높은 발현을 보였고 GF와 IHOK의 발현이 작았다. 삼차원 배양을 한 경우 IGF에서 가장 많은 발현을 보였다. Involucrin, CK6, CK19 단백질의 발현을 Western blotting으로 확인한 결과 involucrin 발현은 IGF에 의한 삼차원 배양이 GF나

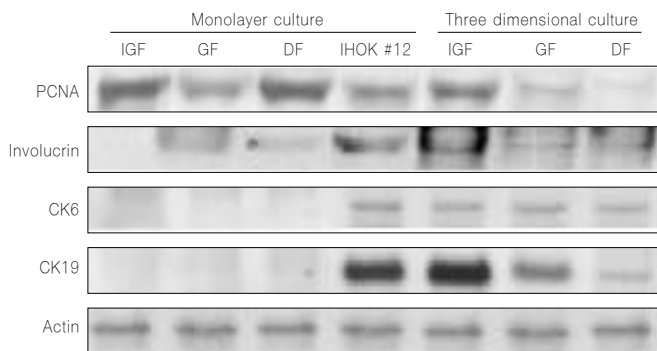
DF보다 유의하게 증가되어 있음을 알 수 있었고 단일 세포 배양한 IHOK보다는 감소되었는데 GF와 DF간의 삼차원 배양에 따른 유의한 발현 차이는 없었다. CK6은 단일 세포 배양한 것과 삼차원 배양한 모든 섬유모세포 종류 간에 유의한 발현 차이가 없었다. CK19는 IGF에 의한 삼차원 배양만이 단일 세포 배양한 IHOK와 유의한 발현 차이가 없었고 나머지 GF나 DF에서는 감소되었다 (Fig. 4).

마. 섬유모세포의 종류에 따른 단일 세포 배양과 삼차원 배양에서 MAP kinase 활성화에 대한 Western blotting 결과

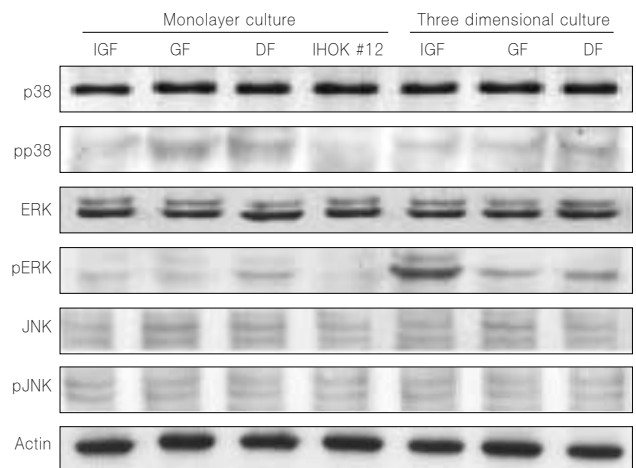
삼차원 배양을 통한 상피-간엽 상호작용으로 인해 IHOK에서 MAP kinase가 활성화되는지 Western blotting으로 신호 전달계를 확인한 결과 phosphorylated p38 MAP kinase는 단일 세포 배



**Fig. 3.** Expression of the differentiation markers in three dimensional culture of immortalized and malignant keratinocytes by immunohistochemistry ( $\times 200$ ).



**Fig. 4.** Western blot analysis for the proliferation and differentiation markers in monolayer and three dimensional culture.



**Fig. 5.** Western blot analysis for the activation of mitogen-activated protein kinase in monolayer and three dimensional culture.

양한 IHOK에 비해 삼차원 배양한 모든 세포에서 활성화되었다. c-Jun N-terminal kinase (JNK)는 삼차원 배양에서 활성화되지 않은 것에 비해 MAP kinase의 active form인 phosphorylated extracellularly regulated kinase 1/2 (pERK)는 삼차원 배양한 모든 섬유모세포군에서 단일 배양한 IHOK에 비해 활성화되었는데 이중 IGF에 의한 삼차원 배양이 가장 높은 활성을 보였다 (Fig. 5).

#### IV. 고 찰

진피 대체물로서 섬유모세포의 종류에 따른 삼차원적 조직학적 형태 변화를 관찰하기 위해 본 연구에서는 진피 유사체의 구성 성분인 섬유모세포를 GF, DF, IGF로 나누어 삼차원 배양을 하였다. HaCaT과 IHOK 4종류의 모든 세포에서 IGF를 이용하였을 때 삼차원적 상피 형태 형성이 가장 우수하였다. 이러한 차이는 상피-간엽 상호작용의 차이에서 나타났다고 생각되는데 성장유도능력이 우수한 IGF로 삼차원 배양했을 때 HGF, KGF 같은 보다 많은 성장 인자가 유도되었다고 여겨진다. 최근 본 연구와 같은 삼차원적 세포 배양 시 종양에서 유래한 섬유모세포를 사용했을 때 정상 점막의 섬유모세포를 사용했을 때보다 종양 세포의 중층화, 분화와 침윤이 잘 일어난다는 보고가 있어 삼차원 배양 시 섬유모세포의 중요성이 부각되었다. 이는 종양 세포와 섬유모세포 간의 상호 정보 교환의 차이에서 기인한다고 하였으나 정확한 기전을 제시하지는 못하였다<sup>24,25</sup>.

본 연구에서 삼차원적 배양을 했을 때 단층 배양과는 달리 중층의 조직과 각질층 형성을 얻을 수 있었다. 제1형 교원질과 IGF로 구성된 진피 유사체 상에서 배양된 NHOK, IHOK, HaCaT, HN30은 모두 배양 7일 이후에는 4-10층의 중층화를 이루며 성장하였는데 이중 HaCaT와 HN30이 가장 좋은 상피층과 형태를 보였고 NHOK에서 중층화 형성이 가장 작았다. 이러한 소견은 정상 세포의 경우 IHOK나 암종 세포에 비해 세포 성장 및 증식이 작기 때문인 것으로 생각되었다. IHOK 간에 삼차원적 조직 형성 차이가 있었는데 결체조직 침범과 상피층 형성 정도나 중층화 정도, 각질층 형성에 있어서 IHOK #8이 가장 우수하였는데, 다른 IHOK와의 차이는 pLXSN-E6E7으로 불멸화된 세포라는 점으로 단순히 expression vector 차이가 아닌 선택된 클론 차이라고 생각된다.

각종 각질세포의 삼차원적 배양에 따른 증식과 분화 표지자에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 결과 HaCaT의 PCNA 염색은 기저층, 상 및 하 상기저층에서 중등도의 발현을 보여 정상 점막과 발현 위치의 차이가 있었고 NHOK보다 발현이 훨씬 증가하였다. 이러한 소견은 삼차원적 배양의 시간 경과에 따라 HaCaT의 증식이 정상 각화세포의 증식보다 높다고 한 보고와 유사하였다<sup>26</sup>. 이러한 과증식이 HaCaT의 삼차원 재건 시 나타나는 이유는 HaCaT의 복제 시간이 짧아지거나 transforming growth factor (TGF)-alpha 같은 자가 분비 성장 인자의 유리가 증가되거나 또는 TGF-beta 같은 억제 간염인자가 부분적으로 유출되어서 나타날 수 있다고 한다<sup>27</sup>. IHOK로 삼차원 배양한

경우 각각의 IHOK 조직에서 PCNA 발현의 차이를 보였다. IHOK #8과 IHOK #9는 면역조직화학적 염색에서 심도의 발현이 기저층과 상 및 하 상기저층에 나타나 상피이형성 또는 CIS의 PCNA 결과와 가장 유사하였다. HN30의 삼차원 배양 결과 상피 세포 전층에 걸쳐 나타나 IHOK와는 다른 양상을 보였다. 이러한 소견은 정상 편평상피는 기저층 및 하 상기저층에서 발현되나 HPV 감염된 침구 컨딜로마 또는 CIS 병소의 경우 분화하는 유극층에서도 발현된다고 하는 Demeter 등<sup>28</sup>의 결과와 유사하였다. 따라서 대조군인 정상 점막 또는 NHOK에 비해 IHOK에서 PCNA가 급격하게 증가하는 것은 정상 세포에서 IHOK로 변하면서 나타나는 양상으로 생각되며 암종 세포에서의 PCNA 발현은 침윤성 암종 양상을 나타낸다고 할 수 있다. IHOK의 삼차원 배양 시 PCNA 발현은 상피층의 전체에서 일어났다. 이러한 소견은 상피층 표층에서도 활발한 증식이 일어나고 있다는 것인데 HPV 병소에서는 이러한 증식 유도가 HPV E7 단백질과 관련되어 세포 숙주의 DNA 복제를 활성화시켜 바이러스 복제를 일으키는 것이라고 한다<sup>29</sup>. 본 연구의 Western blotting에서도 IGF를 이용한 삼차원 배양이 단일 세포 배양한 IHOK보다 더 많은 PCNA 발현을 보였는데 이런 소견은 섬유모세포의 종류에 따른 삼차원적 조직학적 형태 변화와 일치하였다.

정상 피부나 구강 상피에서는 분화가 계속됨에 따라 최종 단계에서는 원형질막내에 각화세포외막 (cornified cellular envelope)이라 불리는 구조물이 형성되는데 여기에는 Ca<sup>++</sup> 의존성 transglutaminase가 작용하여 involucrin이나 loricrin과 같은 전구 단백질이 기질로 사용된다. 따라서 면역조직화학적 염색 시 정상 피부에는 involucrin, loricrin이 과립층에 발현되며 유극층 상부에서는 involucrin이, 각질층에서는 loricrin이 발현된다<sup>30,31</sup>. 본 연구에서 involucrin은 정상 구강 점막 조직에서 기저층을 제외한 과립층, 유극층, 상기저층의 하부에서 발현되었고 NHOK는 정상 점막과 유사하게 최상층인 각질층과 상기저층 상부와 하부에서 발현이 나타났으나 발현 정도는 정상 점막 조직보다 작았다. 이 결과는 정상 구강 점막에는 기저층을 제외한 상피 전층에서 양성 반응을 보이고 구강 상피의 삼차원적 재건 시에는 involucrin에 대해 상부 2/3가 양성 반응을 보인다는 결과와 일치하였다<sup>31,32</sup>. HaCaT의 상기저층 상부와 하부에서 involucrin 발현이 나타났으나 각질층에 해당하는 표층에는 발현이 전혀 나타나지 않는 특징을 보였다. 이러한 소견은 HaCaT에서 involucrin의 발현이 상기저층에 중등도의 발현을 보인다는 Schoop 등<sup>27</sup>의 보고와 일치하였다. 이에 비해 IHOK는 NHOK에 비해 involucrin 발현의 감소를 보였고 경도의 발현을 보인 IHOK #8, IHOK #9에 비해 IHOK #5와 IHOK #12는 중등도의 발현을 보였으며 발현 위치는 상기저층과 최상층에서 대개 나타났다. HN30에서는 최상층에서 경도의 발현이 나타났다. 특히 플라스크에서 배양할 때 암종세포주에서는 전혀 발현되지 않는다고 알려진 involucrin이 발현되어 제1형 교원질과 IGF로 이루어진 진피 유사체가 종양 세포의 적절한 분화를 유도함을 보여주었다. 본 연구에서는 정상 점막에서 전암 단계, 암종 단



계의 세포로 갈수록 involucrin의 발현이 감소하는 것을 알 수 있었다. 세포 분화도가 미성숙할수록 involucrin의 발현이 감소하였기 때문에 IHOK는 정상 분화와는 다른 세포임을 암시하였다.

본 연구에서 p53 단백질의 발현은 정상 점막의 경우 미약하게 나타났다. 전암 및 IHOK에서 상기저층 또는 기저층에서 발현이 증가하다가 최종 암종 세포에선 오히려 감소하여 이미 암종으로 진행된 상태보다는 상피이형성 또는 전암세포에서 p53 단백질 발현이 많은 것을 알 수 있었다. p53 단백질에 대한 반응은 종양 억제 작용이 이미 암으로 발생된 조직에서보다는 암이 진행되는 과정에서 중요한 역할을 한다고 할 수 있다.

CK6은 고세포 대사 회전 각질 (high cell turnover keratin)로 창상 치유의 상피에서 유도될 수 있는데 정상 점막 및 NHOK에선 상기저층에서 발현이 나타났고 대부분의 IHOK도 유사하였지만 종류에 따라 최상층이나 기저층에서도 발현되었다. CK19는 단순 상피 각질에 속하는데 정상 및 NHOK에서는 상기저층에서 관찰되었고 IHOK에서도 유사한 양상을 나타내었으나 악성도가 높을수록 발현 위치는 변화되었다<sup>33)</sup>. 본 연구에서는 정상 구강 점막은 CK19 발현이 없었고 NHOK에서 약양성의 발현을 보여 다른 연구와 유사한 결과를 보였다<sup>34-36)</sup>. 본 연구의 정상 상피에서는 발현이 거의 없다가 IHOK와 암종 세포에서 증가한 CK는 CK19이었다. 이러한 소견은 Hietanen 등<sup>37)</sup>이 자궁내 상피 신생물로부터 얻은 HPV 33 과 HPV 16을 발현하는 세포주를 이용한 삼차원적 배양 연구에서 정상 상피에 비해 CK19가 크게 증가하였다고 한 것과 일치하였다.

본 연구에서 Western blotting으로 involucrin, CK6, CK19 단백질의 발현을 단일 세포 배양과 삼차원 배양으로 나누어서 확인한 결과 involucrin 발현은 IGF에 의한 삼차원 배양이 GF나 DF보다 많음을 알 수 있었다. 이는 성장 인자의 과발현이 이러한 분화를 더 많이 유도한 것으로 볼 수 있다. CK19는 IGF에 의한 삼차원 배양만이 단일 세포 배양한 IHOK와 유의한 발현 차이가 없었고 나머지 GF나 DF에서는 감소되었다.

MAP kinase는 세포 신호 전달 분자를 구성하는 중요한 물질인데 세포 외부에서 들어오는 각종 자극에 의해 활성화되어 그 신호를 핵으로 전달하여 유전자 발현을 조절하는 기능을 수행한다<sup>20,21)</sup>. 현재 MAP kinase는 크게 나누어 ERK, JNK와 p38 MAP kinase로 구분되며 ERK는 주로 성장 인자와 phorbol ester에 의해 활성화되지만 염증 자극에 의한 활성화는 작다. 반면에 JNK와 p38 MAP kinase는 염증성 cytokine과 스트레스 자극에 의해 강하게 활성화되지만 성장인자에 의한 활성화는 미약하다<sup>20,21)</sup>. 본 연구에서 삼차원 배양한 IHOK에서 단일 세포 배양한 것에 비해 ERK가 활성화됨을 확인할 수 있었다. 특히 다른 세포에 비해 IGF의 삼차원 배양에 의한 상피-간엽작용이 ERK 활성화 경로를 직접적으로 자극할 수 있음을 알 수 있었다.

## V. 결 론

제1형 교원질과 GF, DF, IGF로 구성된 진피 유사체 상에서

IHOK가 삼차원 배양되었을 때 조직학적 조건상 상피이형성 또는 CIS 생검 조직과 유사한 형태학적 특징을 보이고 면역조직화학 염색에서 NHOK와 다른 증식과 분화를 보인다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 삼차원적 배양이 기존의 평면 단층 배양에 비해 보다 생체와 유사한 미세 환경을 제공함을 보여준다. 또한 IHOK를 IGF로 삼차원 배양했을 때 GF와 DF에 비해 보다 많은 증식과 분화가 유도되었으며 ERK 경로가 활성화 되는 것을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. Licciardello JT, Spitz MR, Hong WK: Multiple primary cancer in patients with cancer of the head and neck: Second cancer of the head and neck, esophagus and lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;17:467-476.
2. Oda D, Bigler L, Lee P, Blanton R: HPV immortalization of human oral cells: a model for carcinogenesis. *Exp Cell Res* 1996;226:164-169.
3. Yoo GH, Washington J, Piechocki M, Ensley J, Shibuya T, Oda D, et al.: The progression of head and neck cancer in vitro model. *Arch Otolaryng Head Neck Surg* 2000;126:1313-1318.
4. Rheinwald JG, Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331-343.
5. Levine JF, Stockdale EF: Cell-cell interactions promote mammary epithelial cell differentiation. *J Cell Biol* 1985;100:1415-1422.
6. Boyce ST, Hansbrough JF: Biologic attachment, growth, and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes on a graftable collagen and chondroitin-6 sulfate substrate. *Surgery* 1988;103:421-431.
7. Tiollier J, Dumas H, Tardy M, Tayot JL: Fibroblast behavior on gels of type I, III, and IV human placental collagens. *Exp Cell Res* 1990;191:95-104.
8. Peault B: In-vitro models of stroma-dependent lymphopoiesis. *Semi Immunol* 1995;7:169-177.
9. Hoffman RM: Three-dimensional histoculture: origins and applications in cancer research. *Cancer Cell* 1991;3:86-92.
10. Robbins KT, Connors KM, Storniolo AM, Hanchett C, Hoffman RM: Sponge-gel supported histoculture drug response assay for head and neck cancer. Correlations with clinical response to cisplatin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:288-292.
11. Robbins KT, Varki NM, Storniolo AM, Hoffman H, Hoffman RM: Drug response of head and neck tumors in native-state histoculture. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;117:83-86.
12. Boukamp P, Breitkreutz D, Stark HJ, Fusenig NE: Mesenchyme-mediated and endogenous regulation of growth and differentiation of human skin keratinocytes derived from different body sites. *Differentiation* 1990;44:150-161.
13. Smola H, Thiekotter G, Fusenig NE: Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal cell interaction. *J Cell Biol* 1993;122:417-429.
14. Schor SL, Schor AM: Clonal heterogeneity in fibroblast phenotype: implications for the control of epithelial-mesenchymal interactions. *Bioessays* 1987;7:200-204.
15. Tajima S, Pinnell SR: Collagen synthesis by human skin fibroblasts in culture: studies of fibroblasts explanted from papillary and reticular dermis. *J Invest Dermatol* 1991;77:410-412.
16. Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM: Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J Periodontal Res* 1997;32:159-165.
17. Jiang WG, Hiscox S: Hepatocyte growth factor/scatter factor, a cytokine playing multiple and converse roles. *Histopathol* 1997; 12:537-555.
18. Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA: Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell

- growth. *Science* 1989;245:752-755.
19. Dabelsteen S, Wandall HH, Gron B, Dabelsteen E: Keratinocyte growth factor mRNA expression in periodontal ligament fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 1997;105:593-598.
  20. Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY: Up-regulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelial cells: possible role of interferon- $\gamma$  in polarized nitric oxide secretion. *Helicobacter* 2002;7:116-128.
  21. Warny M, Keates A, Keates S, Castagliuolo I, Zacks JK, Aboudola S, et al: p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J Clin Invest* 2000;114:1147-1156.
  22. Chiu LC, Kong CK, Ooi VE: The chlorophyllin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells is associated with ERK deactivation and Cyclin D1 depletion. *Int J Mol Med*. 2005;16:735-740.
  23. Park NH, Min BM, Li SL, Huang MZ, Cherrick HM, Doniger J: Immortalization of normal human oral keratinocyte with type 16 human papillomavirus. *Caricnogensis* 1991;12:1627-1631.
  24. Dotto GP, Moellmann G, Ghosh S, Edwards M, Halaban RJ: Transformation of murine melanocytes by basic fibroblast growth factor cDNA and oncogenes and selective suppression of the transformed phenotype in a reconstituted cutaneous environment. *J Cell Biol* 1989;109:3115-3128.
  25. Vescio RA, Redfern CH, Nelson TJ, Ugoretz S, Stern PH, Hoffman RM: In vivo-like drug responses of human tumors growing in three-dimensional, gel-supported, primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5029-5033.
  26. Stark HJ, Baur M, Breitkretz D, Mirancea N, Fusenig NE: Organotypic keratinocyte coculture I defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *J Invest Dermatol* 1999;112:681-691.
  27. Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE: Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1999;112:343-353.
  28. Demeter LM, Stoler MH, Broker TR, Chow LT: Induction of PCNA in differentiated keratinocytes of human papilloma virus infected lesions. *Human Pathol* 1994;25:343-348.
  29. Cheng S, Schmidt GD, Murant T, Broker TR, Chow LT: Differentiation dependent up regulation of the human papilloma virus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasilar differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 1995;9:2335-2349.
  30. Tavakkol A, Varani J, Elder JT, Zouboulis CC: Maintenance of human skin in organ culture: role for Insulin-like growth factor-1 receptor and EGFR. *Arch Dermatol Res* 1999;291:643-651.
  31. Lee DY, Ahn HT, Cho KH: A new skin equivalent model: dermal substrate that combines de-epidermized dermis with fibroblasts-populated collagen matrix. *J Dermatol Sci* 2000;23:132-137.
  32. Chung JH, Cho KH, Lee DY, Kwon OS, Sung MW, Kim KH, et al: Human oral buccal mucosa reconstructed on dermal substrates: a model for oral epithelial differentiation. *Arch Dermatol Res* 1997;289:677-685.
  33. Hansson A, Bloor BK, Haig Y, Morgan PR, Etstrand J, Grafstrom RC: Expression of keratin in normal, immortalized and malignant oral epithelia in organotypic culture. *Oral Oncol* 2001;37:419-430.
  34. Oda D, Savard CE, Eng L, Sekijima J, Haigh G, Lee SP: Reconstituted human oral and esophageal mucosa. *In Vitro Cell Biol Anim* 1998;34:46-52.
  35. Bloor BK, Su L, Shirlaw PJ, Morgan PR: Gene expression of the differentiation-specific keratins (4/13, and 1/10) in normal human buccal mucosa. *Lab Invest* 1998;78:787-795.
  36. Su L, Lane EB, Morgan PR: Keratin 14 and 19 expression in normal, dysplastic and malignant oral epithelia. a study using in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Oral Pathol Med* 1996;25:293-301.
  37. Hietanen S, Syrjajenen K, Syrjajenen S: Characterization of keratin and cell cycle protein expression in cell lines from squamous intraepithelial lesions progressing towards a malignant phenotype. *Brit J cancer* 1998;77:766-775.