

## 세포외 기질 세포 배양법에 의한 유선상피세포의 성장 및 분화 유도

백기주 · 윤정현 · 김동염 · 전성실 · 양한석 · 김남득\*

부산대학교 약학대학 약학과

### Growth and Differentiation of Mammary Epithelial Cells in Extracellular Matrix Culture

Kee-Joo Paik, Jeong-Hyun Yoon, Dong-Yeom Kim, Seong-Shil Jeon,  
Han-Suk Yang and Nam Deuk Kim\*

Dept. of Pharmacy, College of Pharmacy,  
Pusan National University, Pusan, 609-735, Korea

#### Abstract

Mammary organoids(ductal and endbud fragments) were cultured in a complete hormone medium(CHM) with 10% FBS, estradiol, progesterone, hydrocortisone, insulin, and prolactin. Several types of colonies were observed: stellate( $14 \pm 5.5\%$ ), duct( $41 \pm 5.6\%$ ), web( $35 \pm 5.6\%$ ), squamous( $6 \pm 2.1\%$ ), and lobuloduct( $4 \pm 1.2\%$ ). Squamous colony was typical squamous metaplasia(SM) with several layers of squamous epithelia and keratin pearls. At the immunocytochemical study, casein proteins were predominantly localized near the apical surfaces of the cells or in the lumina of ductal or lobuloductal colonies. To inhibit the formation of SM, we treated organoids with all-trans retinoic acid(RA) from  $10^{-6}$  to  $10^{-17}$  M in CHM. Formation of SM was completely inhibited at  $10^{-9}$  M RA in CHM. The frequency of lobuloductal colony formation was increased with the augmentation of RA concentration.

*Key words* : Mammary epithelial cells, Matrigel, squamous metaplasia, retinoic acid

#### 서 론

세포외 기질을 이용한 세포 배양법은 종래의 평면적인 플라스틱 배양기 상에서의 세포 배양법이 주던 한계를 극복하고 생체에서와 아주 유사한 형태의 환경을 만들어 줌으로 말미암아 세포들이 이차원적이 아닌 삼차원적인, 즉 입체 구조의 다세포 구조물(multicellular structure)을 형성하게 된다. 이들 구조물들은 생체의 대응 구조물과 아주 유사하거나 동일하다. 초기에는 agarose gel 등을 사용하였

으나 점차 collagen gels, laminin, fibronectin, Matrigel 등 생체의 세포외 기질과 유사한 단백질을 사용하고 있다.

생체 내 유선상피세포와 유사한 환경을 가진 세포외 기질상에서 세포를 배양할 때 배양한 세포의 형태와 기능에 큰 차이가 있다. 즉 플라스틱 세포 배양기 상에서 배양한 세포는 세포외 기질 등을 형성할 수 없으며 기능적 분화를 이루지 못한다. Floating collagen gel 상에서 배양한 세포들은 일부 제한적이거나 세포외 기질을 형성하지만 이들도 생체 내에서 관찰할 수 있는 완전한 삼차원적 분화를 이루지 못

\* Corresponding author

한다. 그러나 세포의 기질 상에서 배양한 세포들은 세포의 기질로 이루어진 기저막을 형성할 뿐 아니라 삼차원적 구조를 형성함을 알 수 있다.

Rat에서 유래한 유선 상피세포들의 세포 분화와 유선 조직 발생에 있어서도 세포의 기질이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다.<sup>1, 2)</sup> 이들은 주로 유선 조직에서 미세 조직 절편(organoids, ducts와 end-bud를 함유한 미세 조직 절편)들을 Matrigel을 이용하여 배양하였다. 그리고 조직 절편이 아닌 single cells들이나 특정 세포 표면 표식자를 이용하여 flow cytometry로 sorting한 단일 유선 세포군을 Matrigel에서 배양하였을 때 이들 세포들로부터 여러 종류의 다세포 구조물이 생성됨을 확인하였다.<sup>3)</sup> 이때 a) stellate, b) duct, c) web, d) squamous, e) lobuloduct 등 다섯 종류의 다세포 구조물들이 생성되었다.

그런데 이와 같은 정상적인 구조물 외에 편평상피화생(squamous metaplasia)의 소견을 가지는 구조물이 높은 빈도로 발생하는 것이 확인되었다. 이들 편평상피화생 조직은 만성 자극을 받은 침샘, 전립선, 기관지, 후각 조직 등에서 발견되는 것으로 알려져 왔다.<sup>4-9)</sup> 현재 이들 조직의 발생 기전은 잘 알려져 있지 않으나 상습 흡연자들의 기관지에서 흔히 발견되기도 하고 비타민 A가 부족하거나 여러 가지 화학 및 물리적 자극을 받게 되면 발생한다고 알려져 있는 비정상적인 조직이다. 특히 중요한 사실은 이것이 흔히 여러 종류의 암 발생 초기 단계에 나타난다는 것이다.

기관지 상피세포와 전립선 등에서 발생한 편평상피화생의 발생에 있어서 비타민 A 유도체(retinoic acid, RA)가 중요한 역할을 하는 것이 알려졌다.<sup>10)</sup>

비타민 A가 결핍될 경우에 편평상피화생이 발생하고 여기에 비타민 A를 처리하였을 때 이들 세포들이 분화하여 정상적인 세포로 되는 것이 확인되었다.<sup>11)</sup> 비타민 A는 그 동안 비타민으로써의 역할 외에 항암 효과를 가지는 약물로서 많은 연구가 되어 왔다.<sup>12-14)</sup> 이것은 편평상피화생 뿐 아니라 F9 기형암세포(teratocarcinoma cells)들에 처리했을 때 이들 중앙 편이 세포주들의 분화를 유도하여 정상과 유사한 형태의 세포로 역분화를 시키는 것을 확인하였다.<sup>12)</sup>

본 실험에서는 유선조직 절편을 Matrigel에서 배양하여 유선 상피세포의 성장 및 분화를 유도하여 다세포 구조물을 생성하였고 이때 생성되는 유선 다세포 구조물의 종류와 이들 조직의 유선상피세포 분화에 미치는 RA의 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 유선 절편 조직 배양

세포 배양법은 기존의 방법을 약간 변경하여 사용했다.<sup>15)</sup> 7-8주된 정상 F344종 흰쥐를 이산화탄소 과량 노출로 죽인 뒤에 쥐의 서혜부와 복부의 유선을 절취한 다음 수술용 가위로 미세하게 분쇄했다. 이들 분쇄 조직 절편들을 collagenase(Type III, 2mg/ml; Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA)를 함유한 배지(DMEM, Dulbecco's modified eagle's medium with 50 $\mu$ g/ml gentamicin sulfate and 0.33mg/ml glutamine; Gibco, Grand Island, NY, USA) 180ml에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 진탕하면서 반응시킨 후 유선 조직 등을 분리하기 위해 수회 세척 과정을 거쳤다. 이렇게 하여 얻어진 유선 조직 미세 절편들을 40 $\mu$ m 크기의 Nytex 필터(Tetko, Briarcliff Manor, NY, USA)로 여과하고 필터에 채집된 조직 절편들을 포획한 뒤 수회에 걸쳐 배지로 세척하고 이들을 현미경 하에서 수를 계산하였다. 유선 상피세포와 도관들로 구성되어 있는 이들 미세 조직 절편 약 100여 개를 100 $\mu$ l의 배지와 혼합하고 여기에 300 $\mu$ l의 Matrigel(Collaborative Research Inc., Bedford, MA, USA)을 섞은 뒤 24-well 배양 plate에 넣고 Matrigel이 응고되도록 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 둔 뒤 적합한 배양용 배지 1.0ml을 넣고 3-4주간 배양했다. 배지는 3일 마다 교환했다.

이때 사용한 배지 DMEM에는 10% FBS, 0.005 $\mu$ g/ml 17 $\beta$ -estradiol, 0.5 $\mu$ g/ml cortisol, 5 $\mu$ g/ml insulin(이상 Sigma), 5 $\mu$ g/ml bovine prolactin(Hormone Distribution Office, National Institute of Arthritis, Digestive Disorders and Kidney Diseases, Bethesda, MD, USA)등을 함유한 배지를 사용했다.<sup>16)</sup>

### 다세포구조물의 관찰

2-3일 간격으로 역상 현미경하에서 세포들의 증식을 관찰하고 필요하면 사진 촬영을 하였다.

### 다세포구조물의 구조와 기능 규명

4주간 배양한 뒤 이들 Matrigel을 배양 plate로부터 취하고 MeOH/Chloroform/Acetic acid(6/3/1) 고정액에 넣은 뒤 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 고정시켰다. 이들 gel을 일상

적인 조직 표본 처리법에 따라 파라핀 블록을 만든 뒤 5-6 $\mu$ m 두께로 microtomb을 이용해 자르고 헤마톡실린과 에오신으로 염색하고 광학 현미경 하에서 관찰했다.

다세포 구조물이 유선 조직에서 유래한 것이기에 이들 분비물이 유선 조직의 가장 대표적인 분비물인 casein 단백질을 분비하는지를 조사했다. 이것을 위해 Strept AB-Complex kit(Dako, Carpinteria, CA, USA)를 이용한 Avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) 염색법<sup>17)</sup>으로 casein 단백질의 존재 유무를 확인하였다. 5-6 $\mu$ m 두께의 절편에 토끼에서 유래한 항casein 항체를 부착시킨 뒤 다시 biotin이 부착된 2차 항체를 반응시킨 후 Strept-avidin-peroxidase complex로 처리했다. 그리고 diaminobenzidine과 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응시키면 갈색의 침전물이 생성되는 것을 종말점으로 했다.

#### 다세포 구조물에 대한 Retinoic acid의 영향 연구

유선 조직 절편들을 Matrigel에서 배양을 하면서 all-trans retinoic acid(Sigma)의 영향을 조사하기 위해 RA를 배지 10<sup>-17</sup>M에서 10배씩 희석하여 10<sup>-6</sup>M까지 되도록 첨가했다. 상기한 방법으로 유선 미세 조직 절편들을 배양하면서 이들로부터 편평상피화생의 발생 빈도를 RA를 첨가하지 않은 대조군과 비교하면서 편평상피화생의 조직학적 변화와 그 외 다세포 구조물들을 관찰하였다.

### 결과 및 고찰

유선의 미세 조직 절편을 Matrigel과 혼합한 후 24-well culture plate에서 lactogenic hormones들을 함유한 혈청 배지로 4주간 배양하였더니 a) stellate, b) duct, c) web, d) squamous, e) lobuloduct colony들이 생성되었다. 그리고 이들 다세포 구조물들의 발생 빈도를 조사하였더니 stellate (14 $\pm$ 5.5%), duct (41 $\pm$ 5.6%), web (35 $\pm$ 5.6%), squamous (6 $\pm$ 2.1%), lobuloduct (4 $\pm$ 1.2%)였다(그림 1). Stellate와 web colony를 구성하는 세포들은 대부분 foamy cytoplasm을 가지는 단일 세포군들로 이루어졌고 squamous colony들은 중심부에 keratin pearl과 여러층의 keratin layer를 가지는 squamous metaplasia였다(그림 2A). 그리고 가장 분화가 많이 이루어진

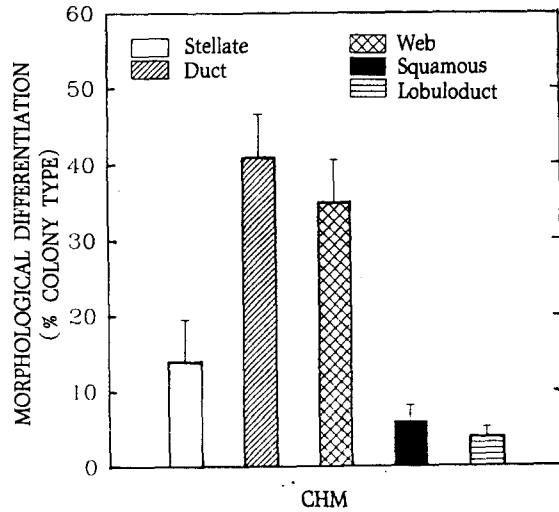


그림 1. 유선 상피세포들을 lactogenic hormone들을 함유하는 배지하의 Matrigel 내에 4주간 배양하였을 때 생성된 다세포 구조물들의 발생 빈도 (3개 이상 well의 mean  $\pm$  SEM).

lobuloductal colony들은 다양한 형태를 가졌고 외견상으로 foamy한 모양을 한 세포들로 이루어졌다. 그러나 조직학적으로는 분비 과립을 함유한 한층의 상피세포층으로 이루어졌고 내강을 가지는 duct가 주종을 이루었다(그림 2 B,2C). 그리고 이들 조직들을 구성하고 있는 상피세포들이 casein 단백질을 분비하는지를 조사하기 위해 면역학적으로 염색한 결과 분비 과립을 함유한 상피세포로 이루어진 duct와 lobuloduct구조물에서는 양성 반응을 보였으나 분비 과립을 함유하지 않은 상피세포로 이루어진 duct와 편평상피화생 다세포 구조물은 음성 반응을 보였다(그림 3).

이들 조직의 성장 및 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 RA를 처리하였을 때 편평상피화생의 혈청 배지에서 ~6% 정도로 생성되었는데 10<sup>-9</sup>M 이상의 RA 농도에서는 편평상피화생의 생성이 억제되었다(그림 4). Lobuloduct의 구조물들의 발생 빈도는 RA의 농도 증가에 비례하여 증가하였다(그림 5). 그리고 duct 구조물의 발생 빈도는 RA의 농도가 증가할수록 약간씩 감소하였고 그의 stellate와 web 구조물의 발생 빈도는 큰 변동이 없었다(결과 보이지 않았음).

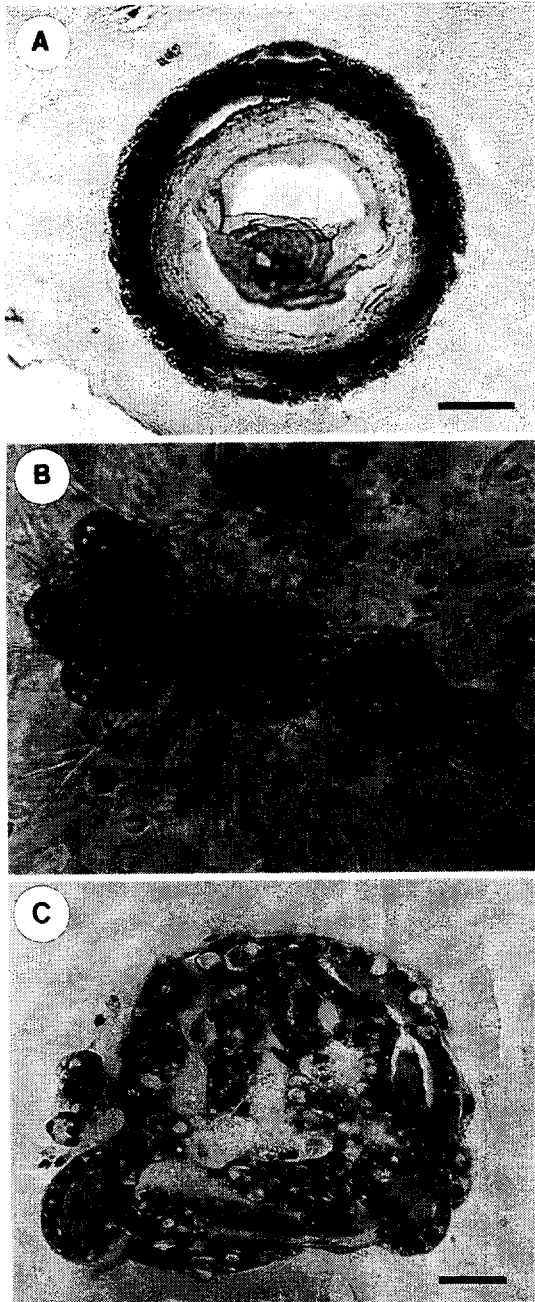


그림 2. 유선 조직 절편(organoids)을 Matrigel 내에 4주간 배양하였을 때 생성된 편평상피화생의 조직학적 소견(A). 구조물의 가장자리는 여러개의 편평상피세포층이 있고 중앙에는 케라틴층을 이루고 있다. lobuloduct의 구조(B) 및 lobuloduct의 조직학적 소견(C). 분비과립을 함유한 세포들로 이루어져 있고 중앙에는 내강을 이룬 duct형 구조물이다. Bars : 50 $\mu$ m.

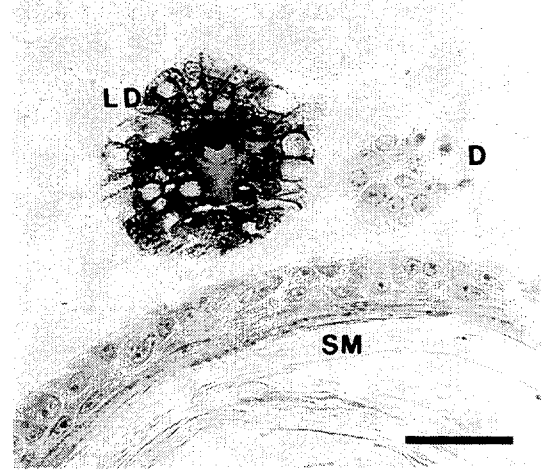


그림 3. 면역화학적으로 염색한 다세포 구조물에서의 casein 단백질. 분비과립을 함유한 상피세포로 구성된 lobuloduct 구조물(LD)는 양성 반응을 보였으나 분비과립을 함유하지 않은 duct(D)와 편평상피화생(SM) 구조물은 음성 반응을 보인다. Bars : 100 $\mu$ m.

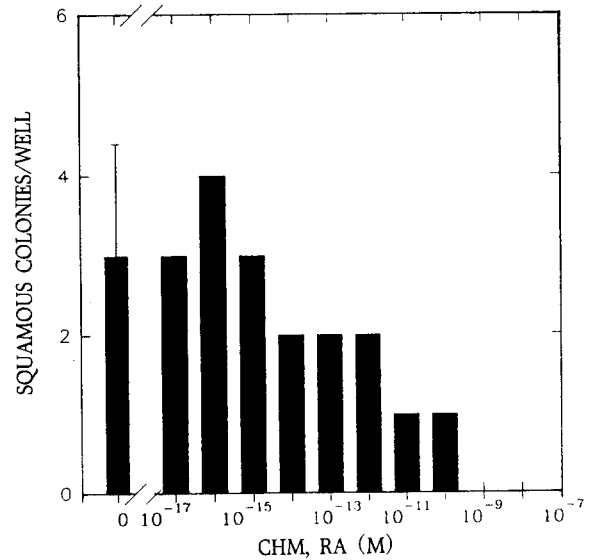


그림 4. Retinoic acid(RA)를 함유한 배지에서 편평상피화생의 발생 빈도. RA가 없거나 낮은 농도일 경우 편평상피화생이 생성되다가 10<sup>-9</sup>M에서부터 생성이 억제되었다.

세포의 기질 세포 배양법에 의한 유선상피세포의 성장 및 분화 유도

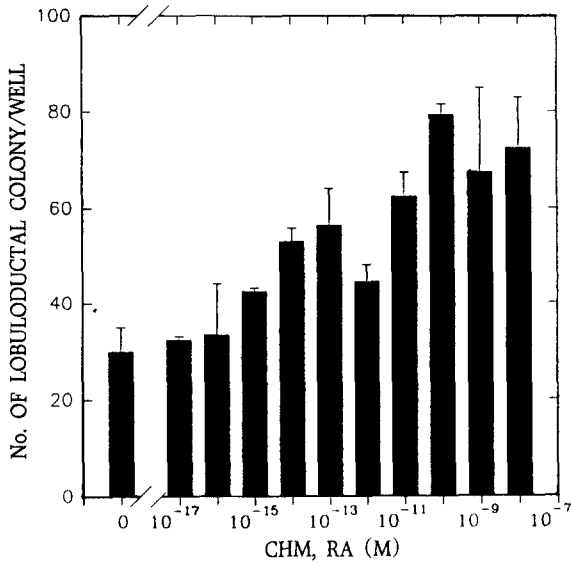


그림 5. Lobuloduct 다세포 구조물의 발생 빈도에 미치는 RA의 영향. RA의 농도가 증가될수록 lobuloduct의 발생 빈도가 증가함을 알 수 있었다.

이 결과로 미루어 보아 RA 없이 배양한 상태에서는 유선 상피세포의 정상적인 분화보다는 역분화를 유도하여 편평상피화생의 발생을 보였으나 세포 분화 촉진제로 알려진 RA의 작용으로 인해 역분화의 기전이 차단 내지 다른 형태로 유도되어 유선 상피세포의 가장 잘 분화된 형태인 lobuloduct 구조물이 만들어졌으리라 사료된다. 그러나 본 결과를 명확하게 이해하기 위해서는 좀더 체계적인 연구가 필요하리라 생각된다.

세포가 성장하고 분화하는데는 크게 두 가지의 요소가 작용한다. 첫째는 유전자 수준에서 조절되는 기전인데 이것은 모세포(stem cell)에서 비대칭성 세포분열(asymmetric cell division)로 인해 각각 다른 기능을 가진 세포가 만들어지거나, 각 세포에 예정된 어떤 임무에 따라 DNA와 RNA들의 합성과 전사 단계에서 이들이 필요에 맞게 조절되어 형질이 발현된다.<sup>18)</sup> 둘째는 생성된 세포가 위치한 환경의 영향을 받는데 이들 환경적 요소를 요약하면 다섯가지가 된다. 1) 조직이 성장할 때의 세포가 위치한 곳(positional effect)과 세포의 극성(cell polarity), 2) 세포들을 둘러싼 세포의 기질 단백질들과의 상호 작용, 3)

세포 간극(cellular gap junction)을 통한 직접적인 세포간의 접촉, 4) 산소, 영양분, 이온(칼슘 등)들의 농도 구배, 5) 세포 성장 인자나 분화 유도 인자들의 존재 등이 해당된다. 이들 다섯 가지 모두가 세포 성장과 분화에 중대한 영향을 미치는데 이중에서도 최근에 세포의 기질 단백질의 영향에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

세포의 기질은 흔히 collagens(I, IV, V형), proteoglycan, anchorage proteins(laminin, fibronectin, chondronectin), elastin, entactin등이 있다. 이들은 실질 장기를 구성하는 세포들의 기저막과 접촉하고 있기 때문에 세포의 성장과 분화에 많은 영향을 미치리라 생각된다.<sup>19-21)</sup>

생체 조직에 존재하는 세포의 기질과 동일하거나 유사한 조성을 가진 기질 단백질은 Engelbergh-Holm-Swarm(EHS) murine sarcoma에서 분리한 Matrigel이다.<sup>22)</sup> Matrigel은 laminin, collagen type IV, heparan sulfate, proteoglycan, entactin 등의 기질 단백질과 TGF-β, FGF, tissue plasminogen activator 등 생쥐의 연골육종에서 유래한 성장 인자들을 함유한 세포의 기질 단백질체이다. Matrigel을 이용하여 neurons, oligodendrocytes, hepatocytes, Sertoli cells, chick lens, melanoma cells, vascular endothelial cells, thyroid cells, hair follicle cells, mammary epithelial cells 등<sup>23-27)</sup>을 배양하였고 배양하는 세포의 특정 gene expression에 대한 연구가 많으며,<sup>28)</sup> 그외 tumor cell invasion assay,<sup>29-30)</sup> in vivo peripheral nerve regeneration,<sup>31)</sup> angiogenesis 연구 등에 널리 이용되고 있다. 본 실험 결과에서도 유선 조직 절편을 세포의 기질 단백질 내에 배양하였을 때 여러 종류의 정상적인 구조물들이 생성됨으로 본 세포 배양법이 in vitro 상에서의 세포 분화 및 증식 연구에 유용하게 이용되리라 사료된다.

그러나 이와 같은 정상적인 구조물 외에 편평상피화생의 소견을 가지는 구조물이 높은 빈도로 발생하는 것이 확인되었다. 편평상피화생의 발생 기전에 대해서는 명확하게 알려진 것이 없고 또 이것의 발생에 관여하는 인자들에 대한 명확한 보고가 많지 않다. 단지 비타민 A가 결핍되었을 때 생성이 증가된다고 알려져 있을 뿐이다. 그리고 편평상피세포의 분화가 진행될 때 a) type I transglutaminase의 활성과 효소 단백질, mRNA의 증가,<sup>32)</sup> b) cholesterol sulfotransferase activity 및 cholesterol sulfate level의 증가,<sup>33)</sup> c) Keratin 13,<sup>34)</sup> d) SQ10, SQ37(편평상피세포-특이적

mRNA)<sup>35)</sup> e) rSQ20<sup>36)</sup>의 발현이 증가된다는 보고 등이 있으나 결정적인 기전이나 marker들은 아직 알려진 것이 없다. 그렇기에 앞으로 편평상피화생의 생성에 관련된 인자들 및 작용 기전을 이해하기 위한 연구가 필요하리라 사료되며 이것을 알게 될 때 유선 상피 세포들의 분화에 관련된 조절 기구들의 작용 기전을 알 수 있으리라 생각된다.

이상의 결과로써 Matrigel이 정상적인 유선 상피세포들의 성장과 분화에 영향을 미치는 것이 확인되었고 특히 유선 조직의 주요한 marker인 casein 단백질의 합성 및 분비 현상은 이들 유전자의 발현에 세포의 기질 단백질이 어떤 도움을 주었으리라고 사료된다. 이와같은 맥락에서 볼 때 Matrigel은 생체에서만 관찰할 수 있는 삼차원적 조직의 생성뿐 아니라 이들 구성 세포들의 성장과 분화 연구 및 이것에 관여하는 반응의 기전을 이해하는데 주요한 재료로써 이용될 가능성이 높음을 보여주고 있다.

### 감사의 글

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

### 참고문헌

1. Streuli, C. H., Bailey, N. and Bissell, M. J. : Basement membrane involvement in mammary gland differentiation. *J. Cell Biol.*, 115, 1383(1991)
2. Peterson, O. W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A. R. and Bissell, M. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 9064(1992)
3. Kim, N. D., Oberley, T. D. and Clifton, K. H. : Primary culture of flow cytometry-sorted rat mammary epithelial cell (RMEC) subpopulations in a reconstituted basement membrane, Matrigel. *Exp Cell Res.*, 209, 6(1993)
4. Leube, R. E. and Rustad, T. J. : *Virchows Arch B Cell Pathol.*, 61, 227(1991)
5. Triche, T. J. and Harkin, C. J. : *Lab Invest.*, 25, 596(1971)
6. Takeuchi, J., Miura, K., Usizima, H. and Katoh, Y. : *Acta Pathol. Jpn.*, 25, 1(1975)
7. Merk, F. B., Ofner, P. and Kwan, P. W. L. : *Lab. Invest.*, 47, 437(1982)
8. Dardick, I., Jeans, M. T., Sinnott, N. M., Wittkuhn, J. F., Kahn, H. J. and Bauml, R. : *Am. J. Pathol.*, 119, 33(1985)
9. Sugimura, Y., Cunha, G. R., Yonemura, C. U. and Kawamura, J. : *Hum. Pathol.*, 19, 133(1988)
10. Inayama, Y., Hook, G. E. R., Brody, A. R., Cameron, G. S., Jetten, A. M., Gilmore, L. B., Gray, T. and Nettesheim, P. : *Lab. Invest.*, 58, 706(1988)
11. Lancillotti, F., Darwiche, N., Celli, G. and De Luca, L. M. : Retinoid status and the control of keratin expression and adhesion during the histogenesis of squamous metaplasia of tracheal epithelium. *Cancer Res.*, 52, 6144(1992)
12. Nishi, M., Kumar, N. M. and Gilula, N. B. : Developmental regulation of gap junction gene expression during mouse embryonic development. *Dev Biol.*, 146, 117(1991)
13. Verma, A. K., Slaga, T. J., Wertz, P. W., Mueller, G. C. and Boutwell, R. K. : *Cancer Res.*, 40, 2367(1980)
14. Sporn, M. B. and Roberts, A. B. : *Cancer Res.*, 43, 3034(1983)
15. Kamiya, K., Kim, N. D., Gould, M. N. and Clifton, K. H. : Repair of potentially lethal damage in rat mammary clonogens following irradiation in organoid culture. *Int. J. Rad. Biol.*, 59, 1207(1991)
16. Kim, N. D. and Clifton, K. H. : Characterization of rat mammary epithelial cell subpopulations by peanut lectin and anti-Thy-1.1 antibody and study of flow-sorted cells in vivo. *Exp. Cell Res.*, 207, 74(1993)
17. Hsu, S. M. and Fanger, R. L. : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29, 577(1981)
18. Kim, N. D. : Role of mammary stem cells on the development of mammary cancers. *Life Science*, 3, 72(1993)
19. Wessells, N. K. : Tissue interactions and development, Benjamin-Cummings, Meijo Park, CA.(1977)
20. Bissell, M. J. : The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a normal cell in culture. *Int. Rev. Cyt.*, 70, 27(1981)
21. Trelstad, R. L. : Ed. The role of extracellular matrix in development, Alan R. Liss, New York(1984)
22. Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K. and Martin, G. R. : Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparin sulfate proteoglycan from the

- EHS sarcoma. *Biochemistry*, 21, 6188(1982)
23. Kleinman, H. K., McGarvery, M. L., Hassell, J. R., Star, V., Cannon, F. B., Laurie, G. W. and Martin, G. R. : Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry*, 25, 312(1986)
  24. Hadley, M. A., Byers, S. W., Suarez-Quian, C. A., Kleinman, H. K. and Dym, M. : Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular chord formatin, and germ cell development in vitro. *J. Cell Biol.*, 101, 1511(1985)
  25. Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R. and Lawley, T. J. : *J. Cell Biol.*, 107, 1589(1988)
  26. Darcy, K. M., Black, J. D., Hahm, H. A. and Ip, M. M. : Mammary organoids from immature virgin rats undergo ductal and alveolar morphogenesis when grown within a reconstituted basement membrane. *Exp. Cell Res.*, 196, 49(1991)
  27. Ip, M. M., Shoemaker, S. F. and Darcy, K. M. : Regulation of rat mammary epithelial cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Endocrinology*, 130, 2833(1992)
  28. Li, M. L., Aggeler, J., Farson, D. A., Hatier, C., Hassell, J. and Bissell, M. J. : Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 136(1987)
  29. Taniguchi, S., Tatsuka, M. and Nakamatsu, K. : High invasiveness associated with augmentation of motility of a fos-transferred highly metastatic rat 3Y1 cell line. *Cancer Res.*, 49, 6738(1989)
  30. Terranova, V. P., Williams, J. E., Liotta, L. A. and Martin, G. R. : Use of a reconstituted basement membrane to measure cell invasiveness and select for highly invasive tumor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 465(1986)
  31. Madison, R., Da Silva C. F., Dikkes, P., Chiu, T-H. and Sidman, R. L. : Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin coated gel. *Exp. Neurol.*, 88, 767(1985)
  32. Floyd, E. E. and Jetten, A. M. : Regulation of type I (epidermal) transglutaminases mRNA levels during squamous differentiation : Down regulation by retinoids. *Mol. Cell Biol.*, 9, 4846(1989)
  33. Rearick, J. I., Albro, P. W. and Jetten, A. M. : Increase in cholesterol sulfotransferase activity during in vitro squamous differentiation of rabbit tracheal epithelial cells and its inhibition by retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, 262, 13069(1987)
  34. Jetten, A. M., George, M. A., Smits, H. L. and Vollberg, T. M. : Keratin 13 expression is linked to squamous differentiation in rabbit tracheal epithelial cells and down-regulated by retinoic acid. *Exp. Cell Res.*, 182, 622(1989)
  35. Smits, H. L., Floyd, E. E. and Jetten, A. M. : Molecular cloning of gene sequences regulated during squamous differentiation of tracheal epithelial cells and controlled by retinoic acid. *Mol. Cell Biol.*, 7, 4017(1987)
  36. Lotan, R., Pieniazek, J., George, M. D. and Jetten, A. M. : Identification of a new squamous cell differentiation marker and its suppression by retinoids. *J. Cell. Physiol.*, 151, 94(1992)