

두경부 편평상피세포암 세포주의 수립 및 특성

서울대학교 의과대학 이비인후과학교실, 단국대학교 의과대학 이비인후과학교실,*
암연구소,** 암세포주은행**

김광현 · 정필상* · 박현민* · 이재서 · 박재갑**

= Abstract =

Establishment and Characterization of Cell Lines Derived from Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck

Kwang Hyun Kim, M.D., Phil-Sang Chung, M.D.,* Hyun Min Park, M.D.,*
Chae-Seo Rhee, M.D., Jae Gahb Park, M.D.**

*Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine,
Seoul National University, Seoul, Korea*

*Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine,
Dankook University,* Chunan, Korea*

*Cancer Research Center,** SNU Cell Line Bank,** Seoul, Korea*

We have characterized 4 human squamous carcinoma cell lines established from the larynx and hypopharynx area. All the cell lines were cultured in RPMI-1640 medium.

During the growth they showed monolayer adherence pattern in culture flask. They showed tonofilament on transmission electromicroscopy which is characteristic of squamous cell epithelium. DNA finger-printing using Hinf-1 proved them to be originated from different beings. Flow cytometric analysis revealed them to show aneuploidy. Immunohistochemical staining for cytokeratin was done using CK1, CK8.13, CK19 and CAM5.2 antibody, and produced various patterns of positivity. All the cell lines showed varying degrees of tumorigenicity in athymic nude mice when injected subcutaneously, but only heterotransplanted SNU-1041 cell line showed continuous tumor growth. Histopathologic findings of the heterotransplanted tumors were identical to those of the original tumors of patients.

This study suggests that establishment of many different squamous cell lines might bestow great capability in researches of the head and neck cancer.

KEY WORDS : Squamous cell carcinoma of the head and neck · Cell lines · Characterization.

서 론

두경부암은 대부분이 구강, 비강, 인두, 후두 부위의

점막으로부터 발생하고 이 중에서 편평상피세포암은 두경부영역에서 발생하는 암의 85~90%를 차지한다. 이러한 두경부암의 원인을 살펴보면 담배와 술이 가장 중요한 요인이고, 이외에 목재의 분진이나 중금속 등이 비

강암의 흔한 원인이 된다. 태양광은 자외선을 포함하여 구순암이나 두경부 영역의 피부암을 유발시킨다. 바이러스도 암의 생성에 중요한 역할을 하는데, Epstein-Barr 바이러스는 비인강암이나 Burkitt's lymphoma의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 또한 최근 들어서는 Human Papilloma 바이러스도 두경부암의 생성에 관여하고 특히 면역기능이 저하된 환자에서 그 역할이 더욱 중요한 것으로 알려지고 있다.

1980년 이전에는 두경부암에 대한 세포주는 매우 드물었는데 이는 두경부암이 대부분 배양하기 힘든 편평상피세포암이었고 또한 두경부암에 대한 연구가 미진했던 때문이다. 1980년대 들어 영국의 Easty¹⁾ 등과 미국의 Rheinwald²⁾나 Carey³⁾⁴⁾⁵⁾ 등이 두경부영역의 편평상피세포암 세포주의 수립에 성공하였다. 이렇게 수립된 세포주는 nude mouse에 이종이식되어 연구에 이용되거나⁶⁾, 세포막의 암항원에 대한 연구⁷⁾, extracellular matrix protein에 관한 연구⁸⁾, 방사선치료에 대한 반응⁹⁾ 등 다양한 분야에서 두경부영역의 암에 대한 연구에 이용되고 있다. 또한 이러한 세포주들은 새로운 항암제나 암치료법의 치료효과를 검사하는 중요한 자료가 된다¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾.

본 연구에서는 1989년 11월부터 1991년 8월까지 사이에 저자들에게 의해 세포주 수립에 성공한 4례의 두경부 편평상피세포암 세포주에 관하여 문헌고찰과 함께 보고하고자 한다.

연구 재료 및 방법

세포주 수립에 사용한 재료는 1989년 11월부터 1991년 8월까지 서울대학교병원 이비인후과에 입원한 후두암환자나 하인두암 환자들의 수술 중에 채취한 조직을 사용하였으며, 조직은 가위로 잘게 부수어 RPMI-1640 배지에 우태혈청을 10% 첨가한 배지에 넣어 배양하였다.

5%의 탄산가스과 95%공기가 공급되고 적절한 습기와 37°C의 온도가 유지되는 배양기 속에서 배양하며 세포의 모양을 역위 위상차 현미경을 통하여 관찰하였다. 종양세포가 잘 자라게 되면 계대배양을 하면서 일부는 액체 질소 통에 동결 보존시켰다. 세포들은 플라스크 바닥에 부착하여 자랐으며 트립신 처리후 계대배양을 하였다. 배양 초기 단계에서 암세포와 함께 섬유아세포등 간

Table 1. The patient's clinical status of established cell lines

Cell line	Sex / Age	Site	Stage	Prior Tx
SNU-46	M / 65	glottic	T3N2aM0	-
SNU-585	M / 56	transglottic	T3N2cM0	-
SNU-899	M / 57	glottic	T2N0M0	-
SNU-1041	M / 58	hypopharynx	T3N3M0	+

질세포들의 과다한 성장이 관찰되면 순수한 종양세포 집단들을 얻기 위하여 감별 트립신 처리를 하였다.

상기의 과정을 거쳐 계대배양하여 mycoplasma에 감염되지 않은 SNU-46, SNU-585, SNU-899, SNU-1041 편평상피세포암 세포주를 얻을 수 있었다.

SNU-46과 SNU-585, SNU-899는 후두암 환자에서, SNU-1041은 하인두암 환자로부터 채취하여 배양하였다(Table 1).

이 세포주들의 특성을 관찰하여 새로운 세포주를 수립하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다.

1) 배양된 세포들에서 조직형태학적으로 편평상피세포의 특징을 찾기 위해 세포를 원심분리하여 얻은 세포 침전물을 고정하여 투과전자현미경하에서 관찰하였다.

2) DNA의 특성을 보기 위하여 Hinf-1 제한효소를 이용한 Restriction Fragment Length polymorphism(RFLP) 방법을 이용하여 DNA finger printing을 시행하였다.

3) DNA ploidy와 S-phase fraction을 보기 위하여 배양된 세포주들을 flow cytometry를 시행하였다.

4) Antigen expression을 보기 위하여 세포주를 chamber slide에 배양하고 monoclonal mouse antihuman cytokeratin antibody인 CK1, CK8.13, CK19, CAM5.2를 이용하여 ABC technique으로 면역조직화학염색을 하여 관찰하였다.

5) Nude mouse에 이종이식하여 종양의 형성유무를 관찰하기 위하여 각 세포주를 10⁷ cells/0.1 ml의 세포 현탁액을 만들어 nude mouse의 등에 피하로 주입하고 관찰하였다. 또한 형성된 종양이 인체편평상피세포암의 특성을 가지고 있는지를 알기 위해 Hematoxyline and Eosin 염색을 하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

결 과

SNU-46, SNU-585, SNU-899, SNU-1041 편평상

피세포암 세포주의 수립을 위한 특성 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 배양된 세포주를 전자현미경하에서 관찰한 결과 편평상피세포의 특성 중의 하나인 tonofilament를 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

2) DNA finger printing에서는 Fig. 2 에서와 같이 각 세포주가 서로 다른 양상을 보여 각각 별개의 개체로부터 생긴 것임을 확인할 수 있었다.

3) Flow cytometry를 시행한 결과는 모든 예에서

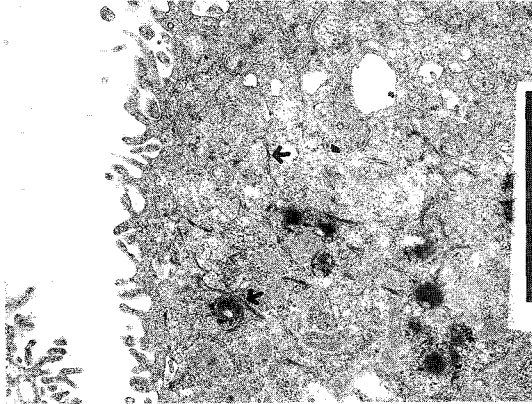


Fig. 1. Tonofilaments are observed on TEM of SNU-1041 cell lines(arrows).

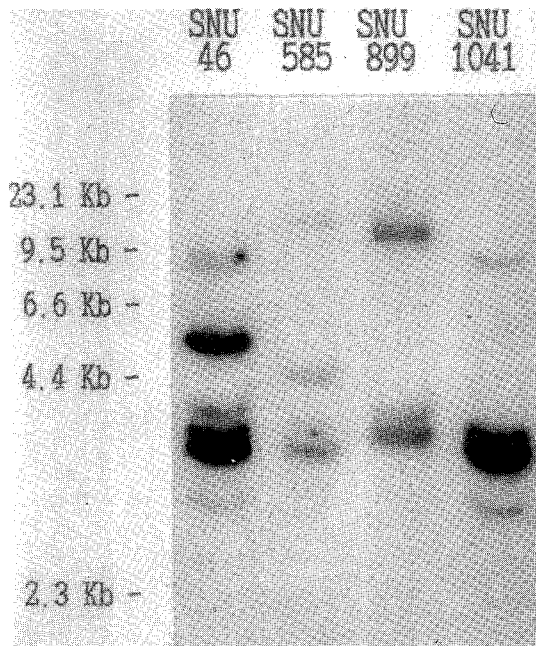


Fig. 2. DNA finger printing shows genomic DNA of different pattern.

aneuploid 양상을 보였다(Fig. 3). S-phase fraction과 peak ratio는 SNU-46에서 각각 9.3과 1.97, SNU-585에서 31.1과 1.39, SNU-899에서 32.8과 2.86, SNU-1041에서 10.4와 1.41 이었다.

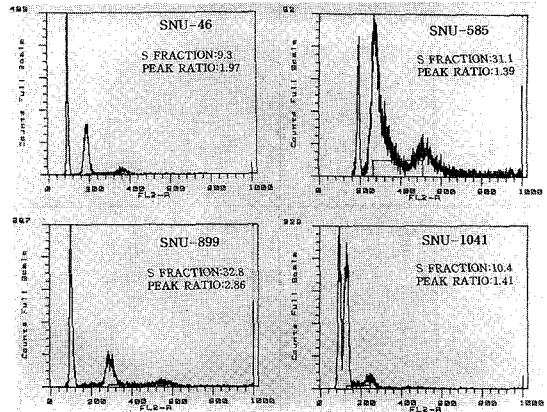


Fig. 3. Flow cytometric findings of SNU cell lines.

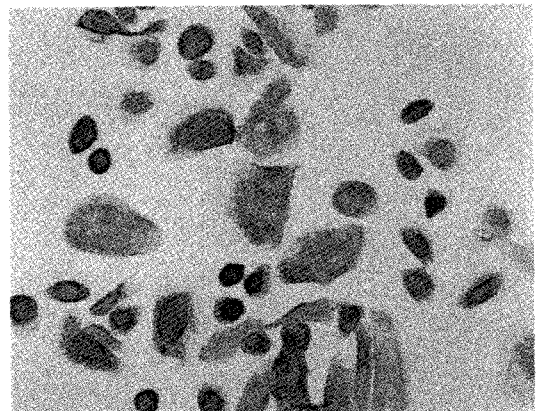


Fig. 4. SNU-899 cells shows positive immunohistochemical staining with CK1 Ab.

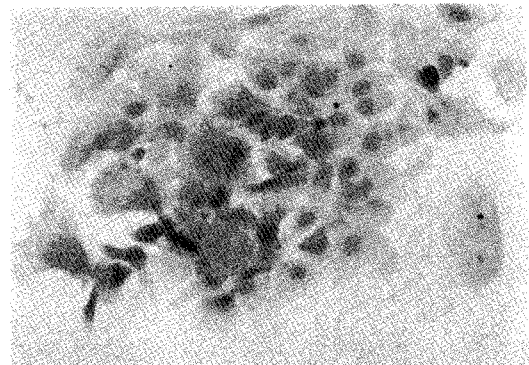


Fig. 5. SNU-1041 cells shows negative immunohistochemical staining with CK19 Ab.

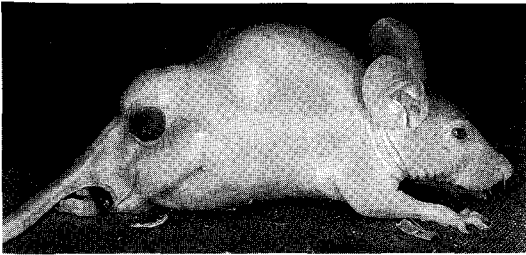


Fig. 6. Formation of a huge tumor on the back of nude mouse 8 weeks after heterotransplantation of SNU-1041 cell line.



Fig. 7. Autopsy finding of a nude mouse with a huge heterotransplanted SNU-1041 tumor.

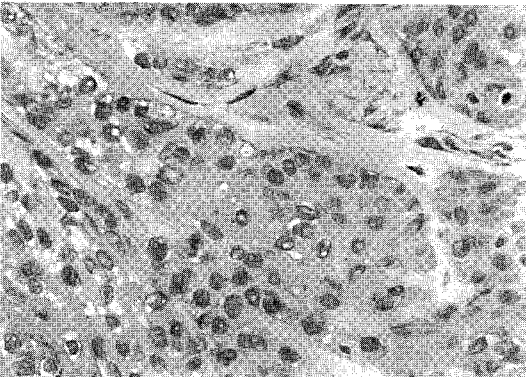


Fig. 8. The heterotransplanted SNU-46 tumor shows the characteristic findings of human squamous cell carcinoma on H & E staining.

4) Cytokeratin에 대한 면역조직화학염색에서는 Fig. 4에서와 같이 진한 갈색으로 염색되는 양성반응과 Fig. 5에서와 같이 갈색으로 염색되지 않는 음성으로 나눌 수 있었다. 각각의 세포에 대한 CK1, CK8.13, CK19, CAM5.2 antibody 발색반응의 결과는 Table 2와

같았다.

5) 세포주의 이종이식에서는 다음과 같은 결과를 얻었다. 모든 예에서 2주 이내에 종양이 형성되었으며 SNU-46, SNU-585, SNU-899 세포주에서 형성된 종양은 부피가 약 600 mm³ 정도에서 더이상 자라지 않았으며 생겼던 종양이 없어지는 경우도 있었다. SNU-1041 세포주로부터 생긴 종양은 계속 자라 8주 후에는 종양이 배부, 복부, 사지를 침범하여 nude mouse를 사망하게 하였다(Fig. 6, 7). 또한 이종이식된 종양을 절제하여 병리조직학적 검사를 한 결과 모든 예에서 인체종양조직에서와 같은 편평상피세포암의 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 8).

고 찰

암 관련 연구에 있어서 신선한 조직표본을 사용하는 경우, 조직의 양이 적다든지, 다시 실험을 하고자 할 때 조직이 부족하여 반복실험이 불가능하거나, 섬유아세포 및 조직구 등 다른 세포들이 섞여 있어 순수한 암세포만을 요구하는 실험을 할 수가 없는 등 여러가지 문제점이 있다. 이에 반해 암세포주를 이용한 연구는 세포를 무한정 얻을 수 있고, 같은 실험을 반복할 수 있으며, 세포가 살아있는 상태에서 세포내의 대사작용을 연구할 수 있고, 체내에서는 불가능한 실험조작을 가할 수 있으며, 연구소간에 세포주를 교환할 수 있어 같은 재료로 다양한 분야의 연구를 진행할 수가 있다.

암세포주는 현재 암연구분야에서 활발히 연구되고 있는 분야인 암세포의 분화, 암유전자의 발현, 항암제에 대한 감수성¹³⁾¹⁴⁾, 방사선 치료에 대한 감수성¹⁵⁾, 함암제에 대한 내성, 암세포의 침습 및 전이, 암표지 항원의 발현 및 분비, 단세포군 항체의 개발, 생체 반응 조절물질의 항암효과¹⁶⁾, 암세포 성장 및 억제 인자와 세포유전자 연구¹⁷⁾ 등에 있어서 매우 유용하게 활용되고 있다.

박 등은 1982년부터 국내의 암세포주를 개발하기 위하여 연구를 시작하였으며 SNU-1 위암세포주를 1984년 4월에 수립한 이후 여러 세포주가 수립되었다^{18) 19)20)}. 아직도 여러 분야의 암 연구를 위하여 현재까지 국내에서 수립된 암세포주로는 절대적으로 미흡하지만 현재 여러 연구소나 연구자들이 각 분야에서 여러 종류의 암 세포주를 수립하기 위하여 노력하고 있다.

세포주의 일차배양 및 유지를 위해서는 인체암종으로

부터 얻은 종양조직을 세포배양 용기에서 explant culture하는 방법과 Rheinwald와 Beckett(1981)에 의해 기술된 것처럼 방사선조사된 쥐의 섬유아세포에서 배양하는 방법이 있다^{23,34}. 그러나 후자의 방법에서는 수립하려는 세포주가 쥐의 DNA등을 흡수하여 변질될 수 있으므로 잘 사용되지 않고 있다. 또 다른 방법으로는 인체암 조직을 잘게 썰어 면역기능이 없는 동물에 직접 주입하는 방법이 있다²¹.

두경부영역의 편평상피세포암 세포주 수립의 성공률은 저자에 따라 약간의 차이는 있지만 다른 종류의 암보다는 낮아서 30% 전후이다. 이처럼 두경부 편평상피세포암 세포주의 수립을 어렵게 하는 요인은 다음과 같다. 첫째는 감염으로 이는 인체에서 이미 감염되어 있는 경우가 많고 세포배양 중에도 감염이 흔히 일어날 수 있다. 두번째는 섬유아세포가 과성장하는 것으로 이는 감별 트립신치리로 어느 정도는 해결할 수 있다. 세번째는 암세포는 안 자라고 정상분화된 각질세포만 자라는 경우로 이때는 암세포와 구별이 힘든 경우도 있다. 네번째는 세포배양액의 조성이 특정세포주의 필요한 성장인자를 갖추지 못한 경우로 이 때는 세포주가 자라다가 계대배양이 진행되면서 성장을 멈추거나 세포가 죽게 된다. 저자들의 경우에도 감염이나 섬유아세포의 과성장, 세포주의 발육정지 등으로 일차 배양에 실패한 경우가 있었다^{22,23,24}.

배양된 편평상피세포암 세포주는 대부분 상피세포의 특성을 가지고 있으며 cuboidal 또는 spreading type의 양상을 보인다. Cuboidal type의 세포주에서는 핵/세포질의 비가 높고, 커다란 핵 속에는 여러개의 핵소체가 있으며 세포질은 과립상을 보인다. 편평상피세포암 세포주가 배양용기내에서 자라는 양상도 두가지로 구분되는데, 즉 단층으로 자라는 것과 여러층으로 겹쳐서 자라는 것으로 나눌 수 있다^{4,5,24}.

인체의 세포들은 다섯가지의 intermediate filament를 가지고 있는데 cytokeratin은 상피세포에, vimentin은 중간엽세포에, desmin은 근세포에, neurofilament는 신경세포에, glial filament는 성상세포에서 각각 특징적으로 나타난다. Cytokeratin은 상피세포의 세포질내에 존재하는 keratin intermediate filaments로서 불용성 polypeptide로 구성되어 있으며 현재까지 적어도 19 종 이상의 subtype이 보고되고 있고 그 분자량은 약 40 kilodalton(kD)에서 68 kD 까지

이다^{25,26,27,28}. 본 실험에서 사용한 cytokeratin antibody인 CK1은 6번(56 kD)과 18번(45 kD) subtype 과 반응한다. CK8,13은 1번(68 kD), 5번(58 kD), 6번(56 kD), 7번(54 kD), 8번(52 kD) subtype 과 반응하고, CK19는 10번(56.5 kD), 13번(54 kD), 17번(46 kD) subtype과 반응하며, CAM5.2는 8번(52 kD), 18번(45 kD)과 반응한다. 본 실험에서 SNU-46과 SNU-585는 CK8,13 antibody에 강한 양성반응을 보여 주로 분자량이 큰 cytokeratin subtype을 많이 함유하는 것을 알 수 있었다. SNU-899와 SNU-1041은 CK1, CK8,13, CAM5.2에 대해 강한 양성반응을 보여 분자량이 큰 cytokeratin subtype과 분자량이 중간인 cytokeratin subtype을 많이 함유하는 것을 알 수 있었고, CK19에 대해서는 음성반응을 보여 중간 또는 작은 분자량을 가지고 산성을 띤 cytokeratin subtype은 함유하지 않는 것을 알 수 있었다.

세포주에 대한 투과전자현미경 검사에서는 모든 세포주에서 tonofilament를 확인할 수 있어 세포주들이 상피세포에서 유래한 것임을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 사용한 nude mouse는 thymus가 없어 T 임파구를 생산할 수 없고 따라서 면역성이 거의 없어서 인체의 종양세포주를 이종이식하여도 거부반응 없이 자랄 수 있는 실험동물이다. 그러나 모든 암세포주가 다 nude mouse에 이종이식이 가능한 것은 아니다. 본 실험에서도 네가지 세포주 모두에서 종양은 형성될 수 있었지만 세포주에 따라 다양한 형성률을 보였다. 이중 SNU-1041에서만 모든 예에서 종양을 형성하였고 nude mouse가 종양에 의해 사망할 때까지 계속 자랐으며 또한 병리조직학적으로 인체편평상피세포암의 소견을 보여 향후 두경부영역의 편평상피세포암에 대한 여러 방면의 연구에서 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

두경부영역의 악성종양에 대하여 DNA의 양은 병의 진행도와 관계가 있어서 조직학적 분류, 임상적 경과, 예후 등이 DNA의 양과 DNA ploidy, S-phase fraction과 밀접한 관계가 있다²⁹. 그러나 김 등은 후두전적 출술을 시행한 환자에서 후향적으로 flow cytometry를 시행하여 DNA와 병의 임상경과와의 상관관계는 발견하지 못하였다³⁰. 본 연구에서는 모든 세포주에서 aneuploid 양상을 보였고, S-phase fraction은 SNU-899와 SNU-1041에서 10% 이상으로 나왔으며, 이들의 수치가 세포주의 상태에 따라 가변적이어서 그 임상적

의의는 찾아내기 어려웠다.

인간의 DNA에는 15내지 100 bp의 조각이 20내지 50회 반복되는 구조를 가지고 있다. 이러한 반복되는 DNA 조각의 길이는 사람 각 개체마다 달라서 이를 법의학에서도 사용하고 있다. 본 실험에서도 RFLP를 통해 모든 예에서 서로 다른 DNA의 양상을 확인하였으며 이는 각 세포주의 고유한 특성이 될 것으로 생각된다.

결 론

저자들은 본 연구를 통해 SNU-46, SNU-585, SNU-899, SNU-1041의 네가지 세포주를 수립하여 그 특성을 분석하였다. 향후 이 세포주를 이용하여 두경부 영역의 암세포의 분화, 암유전자의 발현, 항암제에 대한 감수성, 방사선 치료에 대한 감수성, 함암제에 대한 내성, 암세포의 침습 및 전이, 암표지 항원의 발현 및 분비, 단세포군 항체의 개발, 생체반응 조절물질의 함양효과, 암세포 성장 및 억제 인자와 세포유전자 연구 등에 있어서 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 두경부영역의 모든 부위에서 다양한 종류의 암세포주를 수립함으로써 두경부영역의 암연구와 치료에 획기적인 전기가 마련될 것으로 사료된다.

References

- 1) Easty DM, Easty GC, Carter RL, Monaghan P, et al : Ten human carcinoma cell lines derived from squamous carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 43 : 772-785, 1981
- 2) Rheinwald JG, Beckett MA : Tumorigenic Keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 41 : 1657-1663, 1981
- 3) Carey TE, Kimmel KA, Schwartz DR, et al : Antibodies to human squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 91 : 482-491, 1983
- 4) Carey TE : Establishment of epidermoid carcinoma cell lines. In "Head and Neck Cancer" (re. Wittes, ed.) pp287-314, John Wiley & Sons, New York, 1985
- 5) Carey TE, Van Dyke DL, Worsham MJ, et al : Characterization of human laryngeal primary and metastatic squamous cell carcinoma cell lines UM-SCC-17A and UM-SCC-17B. *Cancer Res* 49 : 6098-

- 6107, 1989
- 6) Baker SR : An in vivo model for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 96 : 43-56, 1985
- 7) Kimmel KA, Carey TE : Altered expression in squamous carcinoma cells of an orientation restricted epithelial antigen detected by monoclonal antibody A9. *Cancer Res* 46 : 3614-3623, 1986
- 8) Bradford CR, Kimmel KA, Van Dyke DL, et al : 11p deletion and breakpoints in squamous cell carcinoma : Association with altered reactivity with the UM-E7 antibody. *Genes Chromosomes Cancer* 3 : 272-282, 1991
- 9) Grenman R, Carey TE, McClatchey KD, et al : In vivo radiation resistance among cell lines established from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 67 : 2741-2747, 1991
- 10) Chung PS, Saxton RE, Rhee CK, et al : Hypericin Uptake in Rabbits and Nude Mice Transplanted With Human Squamous Cell Carcinomas : Study of a New Sensitizer for Laser Phototherapy. *Laryngoscope* 104 : 1417-1476, 1994
- 11) 정필상 : 광역학 치료. *서울심포지움* 5(2) : 193-215, 1995
- 12) Paiva MB, Saxton RE, Chung PS, et al : Laser Photochemotherapy With Anthracyclines on Cultured Human Squamous Carcinoma Cells. *Laryngoscope* 106 : 257-262, 1996
- 13) Pulkkinen JO, Elomaa L, Joensuu H, et al : Paclitaxel-induced apoptotic changes followed by time-lapse video microscopy in cell lines established from head and neck cancer. *J Cancer Research & Clinical Oncology* 122 : 214-8, 1996
- 14) Komiyama S, Matsui K, Kudoh S, et al : Establishment of tumor cell lines from a patient with head and neck cancer and their different sensitivities to anti-cancer agents. *Cancer* 63 : 675-681, 1989
- 15) Bishop JF : Scheduling of chemotherapy and radiotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 12 Suppl 2 : S53-61, 1995
- 16) Chikamatsu K, Eura M, Matsuoka H, et al : The role of major histocompatibility complex expression on head and neck cancer cells in the induction of autologous cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunotherapy* 38 : 358-64, 1994
- 17) Heo DS, Synderman C, Gollin SM, et al : Biology,

- cytogenetics, and sensitivity to immunologic effector cells of new head and neck squamous carcinoma cell lines. *Cancer Res* 49 : 5167-5175, 1989
- 18) 박재갑 · 권남숙 · 노동영 : 성장인자 및 성장 호르몬 첨가 배지를 이용한 SNU 세포주 수립에 관한 연구. *Journal of Korean Cancer Association* 22 : 1-13, 1990
- 19) 박재갑 · 전유미 · 박규주 : 서울대학교(SNU) 세포주에 관한 연구. *대한암학회지* 23(2) : 169-180, 1991
- 20) Jae-Gahb Park, Oie H, Sugarbaker P, et al : Characteristics of Cell lines Established from Human Colorectal Carcinoma. *Cancer Research* 47 : 6710-6718, 1987
- 21) Fogh J, Tiso J, Orfeo T, et als : Thirty-four lines of six human tumor categories established in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 64 : 74-751, 1980
- 22) Eagle H : Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122 : 501-504, 1955
- 23) Giard DJ, Aaronson SA, Todaro G, et als : In vitro cultivation of human tumors : Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51 : 1417-1423, 1973
- 24) Krause CJ, Carey TE, Ott RW, et al : Human squamous cell carcinoma : Establishment and characterization of new permanent cell lines. *Arch Otolaryngol* 107 : 703-710, 1981
- 25) Petrusz P, Ordroneau P, Fanley J : Criteria of reliability for light microscopic immunocytochemical staining. *Histochemical Journal* 12 : 333-348, 1980
- 26) Roland Mall, Warner W, Franke and Dorothea L, Schiller : *The Catalog of Human Cytokeratins : Patterns of Expression in Normal Epithelia, Tumors and Cultured Cells.* *Cell* 31 : 11-24, 1982
- 27) Yang K, Lipkin M : AE1 Cytokeratin Reaction Patterns in Different Differentiation States of Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus. *Cytokeratins in human Esophagus.* *Am J Clin Pathol* 94 : 261-269, 1990
- 28) Yamamoto Y, Izumi K, Otsuka H : An Immunohistochemical Study of Epithelial Membrane Antigen, Cytokeratin, and Vimentin in Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancer* 70 : 2326-2333, 1992
- 29) Moore GE, Sandberg AA : Studies of a human tumor cell line with a diploid karyotype. *Cancer* 17 : 170-175, 1994
- 30) 김광현 · 성명훈 · 정필상 등 : 유세포계측검색 (Flow Cytometry)으로 측정된 후두암세포의 DNA양상에 관한 연구. *대한이비인후과학회지* 35 : 784-793 1992