

ALI 배양법을 이용한 비강 점막 상피세포의 미세구조와 ¹⁴C-mannitol 투과도

부산대학교 의과대학 내과학교실, 의학연구소*, 이비인후과학교실**

곽경록, 황지윤, 이지석, 박혜경, 김윤성
이민기, 박순규, 김유선*, 노환중**

= Abstract =

Ultra-Structures And ¹⁴C-Mannitol Transport Study of Human Nasal Epithelial Cells Using ALI Culture Technique

Kyung Rok Kwak, M.D., Jee Yoon Hwang, M.D., Ji Seok Lee, M.D.,
Hye Kyung Park, M.D., Yun Seong Kim, M.D., Min Ki Lee, M.D.,
Soon Kew Park, M.D., Yoo Sun Kim*, Hwan Jung Roh, M.D.**

*Department of Internal Medicine and Otorhinolaryngology**, Collage of Medicine, Pusan National University,
Medical Research Institute of Pusan National University Hospital*, Pusan, Korea*

Background : The information on nasal transport and the metabolism of peptides have been obtained from pharmacokinetic investigations in experimental animals. However, there are no transport and metabolic studies of human nasal epithelial cells. In this study, the permeability characteristics and the metabolic properties of *in vitro* human nasal cell monolayers were investigated.

Material and Methods : Normal human inferior nasal conchal tissue samples were obtained from patients undergoing endoscopic nasal cavitory surgery. The specimens were cultured in a transwell using an air-liquid interface (ALI) culture, and the transepithelial electrical resistance (TEER) value of the blank filter and confluent cell monolayers were measured. To determine the % leakage of mannitol, 4μmol ¹⁴C-labelled mannitol was added and the % leakage was measured every 10 minute for 1 hour.

Result : Human nasal epithelial cells in the primary culture grew to a confluent monolayer within 7 days and

Address for correspondence :

Min Ki Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Pusan National University College of Medicine
10 1-Ga Ami-dong, Seo-gu, Pusan, Korea

Phone : 051-240-7216 Fax : 051-254-3127 E-mail : leemk@pusan.ac.kr

expressed microvilli. The tight junction between the cells was confirmed by transmission electron microscopy. The TEER value of the blank filter, fifth day and seventh day reached 108.5 ohm.cm², 141 ohm.cm² and 177.5 ohm.cm², respectively. Transcellular % leakage of the ¹⁴C-mannitol at 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes was 35.67 ± 5.43, 34.42 ± 5.60, 32.75 ± 5.71, 31.76 ± 4.22, 30.96 ± 3.49 and 29.60 ± 3.68 %, respectively.

Conclusion : The human nasal epithelial monolayer using ALI culture techniques is suitable for a transcellular permeability study. The data suggests that human nasal epithelial cells in an ALI culture technique shows some promise for a nasal transport and metabolism study. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 205-212)

Key words : Air-liquid interface culture, nasal epithelial cell, ¹⁴C-mannitol transport.

서 론

기도상피세포는 각종 비염, 부비동염, 만성기관지염, 천식 등에서 인체방어기전의 첫 장소이고 세균의 첫 표적세포들이므로 이의 생리학적 현상에 대한 연구는 매우 중요한 의미를 갖는다. 또한 비강을 통한 약물의 투여는 통증이 없고 점막의 혈관이 잘 발달되어 있으며 단면적이 상대적으로 넓어서 흡수가 빠르며 간을 통한 first-pass effect를 피할 수 있어서 생체 이용률이 높다는 등의 장점으로 인해 그 사용이 증가하고 있는 추세이다^{1,2}. 1922년 Woodyatt³가 비강으로 투여한 인슐린의 효과를 알아보기 위한 연구를 시행한 바 있으며 이후부터 thyrotrophin-releasing hormone (TRH), oxytocin, vasopressin, desmopressin, calcitonin 및 luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) 등과 같은 peptide에 대한 비강 상피세포의 운반 체계에 대한 연구가 진행되었다. 이런 peptide들은 경구 투여시 불활성화되기 때문에 비강을 통한 투여는 주사요법을 대체할 수 있는 좋은 방법이 될 수 있다. 비강에서 약물이 투과하여 전신 순환계로 들어가기 위해서는 비강세포의 점막과 효소 작용 등의 여러 관문을 통과해야 한다^{4,5}. 지금까지 비강 점막을 통한 약물의 이동이나 대사 등은 쥐^{6,7}, 토끼^{7,8}, 양⁸ 등 실험 동물을 이용한 연구가 주로 이루어져 왔으나 사람의 비강 상피세포를 통한 약물의 이동 및 대사에 대해서는 아직까지 연구가 없었기 때문에 그 기전이 정확히 알려져 있지 않다. 이런 기전을 알기 위

해서는 먼저 *in vitro*에서 생체와 유사하게 세포를 배양하고 이를 바탕으로 세포수준의 생물학적인 과정과 이동 현상을 연구해 볼 수 있을 것이다. 최근까지 호흡기 상피세포를 통한 대사 및 이동과정을 연구하기 위한 세포배양 방법으로 submerged⁹, suspension¹⁰, floating¹¹, air-liquid interface(ALI)^{12,13} 등의 다양한 방법들이 사용되고 있다. 본 연구에서는 앞으로 비강을 통한 약물의 이동 및 대사 등의 연구에 기초적 자료를 제공하기 위하여 만성 부비동염 환자의 내시경 수술시 정상 하비갑개의 조직을 채취하여 ALI 방법으로 세포를 배양하여 그 미세구조와 *in vitro*에서 mannitol에 대한 비강점막 상피세포의 투과도를 알아 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험재료 및 기구

본 연구에 사용된 검체는 만성 부비동염 환자의 내시경을 이용한 부비동 수술시 정상 하비갑개의 점막을 채취하여 이용하였다. 원심분리기는 미국 Eppendorf사의 Centrifuge 5415C, liquid scintillation counter(LSC)는 미국 PACKARD사의 liquid scintillation analyzer 2200CA TRI-CARB A2200, LSC cocktail은 미국 PACKARD사의 ULTIMA GOLD LSC cocktail 77-0031을 이용하였으며 transepithelial resistance(TEER) 값의 측정은 미국 WPI

사의 Epithelial Voltohmmeter(EVOM), 위상차 현미경은 일본 Nikon사의 ECLIPSE TE300 기종, 투과전자현미경은 일본 JEOL사의 JEM 1200EX-II 기종을 사용하였다.

2. 상피세포의 배양

1) 세포분리 및 배양

채취한 조직들은 1% protease(type XIV, Sigma, St. Louis, MO)가 들어 있는 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's nutrient F12 (DMEM/F12, Gibco)에 넣어 16~24시간동안 4°C에서 반응시켰다. 유리된 상피세포들을 fetal bovine serum (FBS)이 들어 있는 DMEM/F12로 세척하여 protease의 효소작용을 정지시킨 후 10% FBS가 들어 있는 DMEM/F12에 부유시켰다. 섬유아세포, 근세포 및 혈관내피세포들을 제거하기 위해 플라스틱 배양용기에 평판한 후 37°C에서 1시간동안 정지시켰다. 부유된 상피세포들을 원심분리한 후 pellets을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hydrocortisone, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ epinephrine, 6.5ng/ml triiodothyronine, 25ng/ml epidermal growth factor, 10ng/ml transferrin, 50nM all-trans retinoic acid, 1% w/v bovine pituitary extract, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bovine serum albumin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 50ng/ml의 gentamycin : amphotericin이 들어 있는 Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM, Clonetics, San Diego, CA)에 부유시킨 다음 37°C, 5% CO_2 -95% air의 배양기에서 배양하였다. 배양액은 2~3일에 한번씩 교환해 주었고, 배양후 3일, 5일 및 7일에 상피세포의 모양을 위상차 현미경으로 관찰하였다.

세포가 60~70% 정도 합류를 이루면 계대배양하여 passage-2 세포를 만든 다음 이것을 일부 분리해 냉동 보관하였다.

2) Air-Liquid Interface (ALI) 배양

Petridish에서 배양된 상피세포들은 5~7일째 70%

정도 합류를 이룬 후 0.005% Trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 분리한 다음 1×10^5 cells(passage-2)을 반투과성막의 insert가 들어 있는 6-Transwell (Costar Corp., CA, USA)에 호르몬과 각종 성장인자가 첨가된 BEGM 배지에 부유하여 평판하였다. 세포들은 첫 7일간은 배양액에 잠긴 상태로 두며 배양액은 ALI를 만드는 7일까지 배양용기의 위와 아래쪽 부분을 모두 격일로 갈아주었다. 그 후는 배양액은 아래쪽 부분만 매일 교환해 주며 위쪽은 배양액을 제거하여 공기에 노출시켜 배양하면서 상피세포의 변화를 관찰하였다.

3) 배양된 상피세포의 미세구조 관찰

Transwell에서 합류한 후 공기에 노출하여 배양한 상피세포로부터 미세구조를 관찰하기 위하여, 세포를 PBS로 세척하고 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 4~6시간 동안 고정한 후 1% OsO₄ (osmium tetroxide)로 4°C에서 1시간 동안 고정하였다. 이후 50%에서 100% 에탄올까지 단계적으로 탈수하여 Epon 812에 포매하였다. 포매된 조직을 toluidine blue로 염색한 다음 semithin section(1000nm thickness)하여 광학현미경으로 적당한 부위를 선택하고 ultra-thin section (50-60nm thickness)하여 uranyl acetate에 실온에서 6분, lead citrate에 실온에서 3분간 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

3. 투과 연구 (Transport Study)

배양된 세포의 mannitol의 투과도를 알아보기 위해 transwell을 장치한 후 12일째에 ^{14}C 가 부착된 mannitol 4 μmol 을 배양액과 함께 투여하고 1시간 동안 10분 간격으로 % leakage를 측정하였다. Monolayer는 TEER 값을 측정하기 전에 transport buffer (Hank's balanced salt solution supplemented with glucose, sodium bicarbonate, HEPES)로 37°C에서 60분간 평형상태가 되도록 처리하였다. TEER 값은 EVOM을 이용하여 측정하였으며 blank

filter resistance로 교정하였다.

^{14}C -mannitol이 포함된 sample $300\mu\ell$ 를 60분 간 10분 간격으로 채취하여 LSC cocktail 2ml와 함께 vial에 넣고 잘 섞은 다음 liquid scintillation analyzer를 이용하여 count 하였으며 3회 반복하였고 단위는 CPM 이었다.

Mannitol의 % leakage는 아래의 식에 의해 계산되었다.

$$\% \text{ leakage} = \frac{\text{basolateral CPM}}{\text{apical CPM}} \times \frac{1}{\text{hr} \times A} \times 100$$

여기서 A는 투과면적(cm^2)이다.

4. 통 계

통계 프로그램은 MINITAB을 이용하였고, TEER 값은 student t-test, mannitol의 % leakage는 ANOVA를 시행하였으며 p값이 0.05 미만인 경우에 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

상피세포들을 평판한 후 3일째 부분적으로 cluster를 이루어 자라기 시작했고 5~7일째에 거의 70% 이상 함유되었으며 대부분의 세포들은 위상차 현미경으로 관찰한 결과 전형적인 상피세포의 형태를 보였다 (Fig. 1). 견고연접(tight junction)의 생성은 TEER 값의 측정과 투과전자현미경으로 확인하였다. Blank filter의 TEER 값은 108.5 ohm.cm^2 이었으며 배양 5일째는 141 ohm.cm^2 , 배양 7일째는 177.5 ohm.cm^2 로 측정되어 견고연접이 형성되고 있음을 알 수 있었다(Fig. 2). 투과전자현미경으로 관찰한 결과 섬모의 발생이 관찰되었고, 세포사이에 세포사이에연접(intercellular junction)의 하나인 견고연접의 형성이 잘 관찰되었다(Fig. 3).

ALI 방법에 의해 배양된 사람의 비강점막 상피세포에서 barrier function이 있는지를 알아보기 위하여 배양 12일째 ^{14}C -mannitol을 monolayer에 처

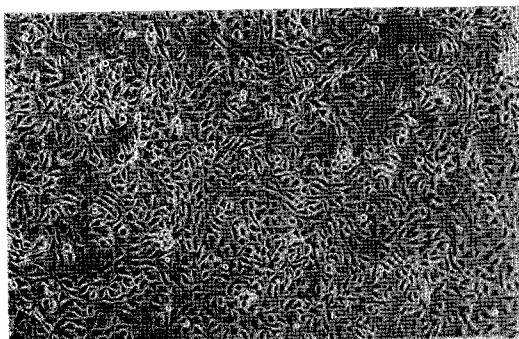


Fig. 1. Phase contrast micrograph of the cultured nasal epithelial cells. The full confluent cultured cells showed typical shape of epithelial cells($\times 100$).

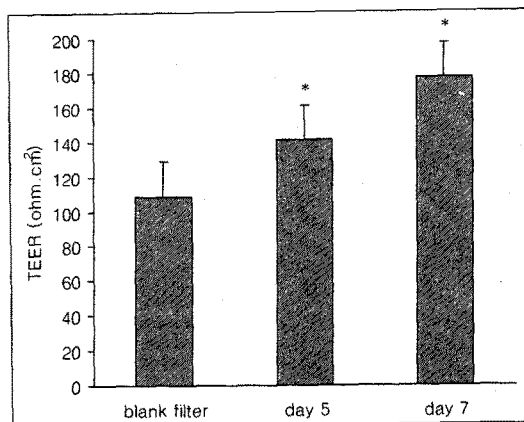


Fig. 2. TEER values of cultured nasal epithelial cells.

* $p < 0.05$ compared with blank filter.

리한 뒤 % leakage를 구하였다. Transwell에 사람의 비강 상피세포를 monolayer로 배양한 다음 ^{14}C -mannitol $4\mu\text{mol}$ 을 배양액과 함께 투여한 후 10분 간격으로 60분간 상부에서 하부로 monolayer를 통과한 sample을 채취하여 % leakage를 구하였다. 시간에 따른 ^{14}C -mannitol의 % leakage는 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분에 각각 35.67 ± 5.43 , 34.42 ± 5.60 , 32.75 ± 5.71 , 31.76 ± 4.22 , 30.96 ± 3.49 , 29.60 ± 3.68 로 시간에 따라 비교적 일정한

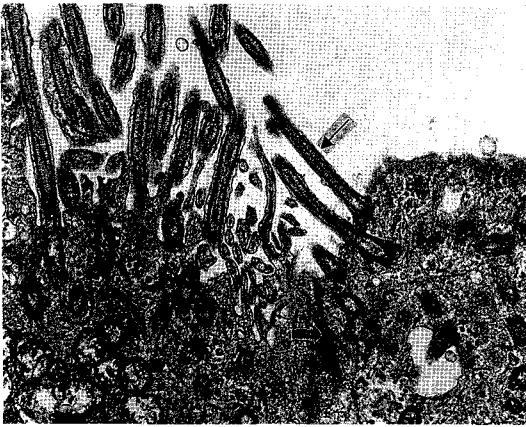


Fig. 3. Transmission electron micrograph of cultured nasal epithelial cells. The cultured cells formed cellular sheets exhibiting cilia(→) and tight junction (⇨) (×12,000).

Table 1. % leakage of ¹⁴C-mannitol on cultured nasal epithelial cells.

Time (min)	mannitol leakage(%)*
10	35.67 ± 5.43
20	34.42 ± 5.60
30	32.75 ± 5.71
40	31.76 ± 4.22
50	30.96 ± 3.49
60	29.60 ± 3.68

*values are mean ± SD (p>0.05)

% leakage를 나타내어 배양된 상피세포는 barrier function이 있음을 알 수 있었다(Table 1).

고 찰

정상적인 사람의 비강 점막은 상피세포(epithelial cell), 점막하 샘(submucosal gland), 점막 연결 조직으로 구성되어 있다⁴. 상피세포는 다시 섬모성 상피세포(ciliated epithelial cell), 비섬모성 상피세포(nonciliated epithelial cell), 배상세포(goblet

cell), 기저세포(basal cell) 등으로 세분된다. 이 중에서 섬모성 상피세포와 비섬모성 상피세포는 각각 비강 상피세포의 15~20%와 60~70%를 차지하고 있으며 모두 윗면(apical surface)에 200-400개 정도의 미세융모(microvilli)로 덮혀 있어 비강 점막의 단면적을 넓히는 역할을 한다⁴.

인체에 약물을 투여하는 방법으로 여러 가지 경로가 이용되고 있지만 비강을 통한 방법은 통증이 없으며 비강 점막의 단면적이 넓고 혈관이 풍부하여 약물 흡수에 매우 효과적이며 간을 통한 first-pass effect 등이 없다는 등의 장점이 있기 때문에 비강을 통해 약물을 투입하는 방법은 1970년대 이후부터 관심이 증가하여 왔다^{1,2}. 알레르기성 비염 환자들에게 비강을 통한 약물투여가 흔히 사용되고 있는 실정이지만^{14,15} 현재까지는 사람의 호흡 상피세포를 통한 약물의 투과에 대한 연구가 없었기 때문에 비강을 통한 약물의 투과에 대한 정확한 기전을 알아볼 필요성이 제기되었다. 그러나 이런 연구가 진행되기 위해서는 사람의 비강 상피세포를 *in vitro*에서 생체와 유사하게 배양하는 기술이 필요하다. 그 동안 상피세포의 정확한 기능과 분화, 환경 오염물질, 바이러스성 혹은 화학적 발암물질 및 세균의 영향 등을 연구하기 위해 다양한 호흡상피의 배양이 시도되어 왔다. 초기에는 호르몬이나 성장인자가 포함된 혈청을 사용하여 상피세포를 배양하였으나, 대부분의 배양모델에서 섬모상피세포의 분화가 관찰되지 않았으며 일부 배양이 된 상피세포에서도 섬모는 2~3일밖에 유지되지 못하고 편평상피세포로 변하는 문제점이 있었다¹⁶. 그러나 기도 상피세포를 배양하는 기술은 지난 10여년 동안 적절한 배양 배지와 투과막(filter membrane)의 발전과 더불어 다양한 배양기술의 개발이 되어왔으며 현재 suspension 방법과 ALI 방법이 주로 사용되고 있다. Suspension 방법은 1989년 Jorissen 등¹⁷이 사람의 비강점막을 이용하여 실험하였는데 분비상피세포가 형성되지 못하였다. ALI 방법은 permeable filter에 세포를 배양하여 비강점막 상피세포가 견고연접을 완전히 형성할 때까지 지속적으로 배양액을 제거하여 상

피세포를 공기에 노출시키는 상태로 배양하는 방법인데, 배양 조건이 생체에서 상기도 점막의 상피세포는 섬모족이 공기에 노출되어 있다는 점과 유사하다. 따라서 이렇게 세포를 배양함으로써 생체와 유사한 형태와 생리학적, 생화학적 특성을 가진 세포로의 분화를 유도할 수 있다는 장점이 있다. 이 방법은 1993년 Kaartinen 등¹⁸이 쥐의 기관지 점막에 처음 적용하여 많은 분비상피세포의 관찰을 보고한 바 있으며 Chang 등¹⁹은 각각상피세포의 배양에서 ALI 방법이 각각 상피세포의 형성을 촉진시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 ALI 방법을 이용하여 사람의 정상 비강점막 상피세포를 생체와 유사한 형태와 생리학적 및 생화학적 특징을 가진 세포로의 분화를 유도하고자 하였다. 배양된 상피세포들은 평판한지 7~9일 후에 transwell에서 함유를 이루었으며 세포가 함유를 이루면 필터 위의 배지를 제거하여 공기에 노출시키고, 배양액의 성분 변화 없이 매일 배지를 교환하여 상피세포의 분화를 유도하였다. 필터를 공기에 노출한 후 1~2일 정도는 필터위로 배양액이 올라오지만 그 이후에는 배양액이 올라오지 않아 세포의 공기중 노출이 잘 이루어졌다. 노출 8~12일 후에는 transwell에서 필터를 분리하여 투과전자현미경적 관찰을 실시한 결과 미세용모로 덮여 있는 분비상피로 추정되는 세포와 세포사이에 견고연접을 관찰할 수 있었다. 이 배양법은 위에서 언급한 바와 같이 배양 환경이 생체와 유사하기 때문에 *in vitro*에서 배양된 세포가 생체의 세포와 형태 및 생리학적, 생화학적으로 유사하므로 세포에 대한 약물의 운반(transport) 및 대사 등에 대한 연구에 효과적으로 이용될 수 있다.

본 연구에서는 *in vitro*에서 비강 상피세포를 통한 약물의 운반 및 대사를 알아보기 위한 연구의 일환으로 ALI 방법에 의해 배양된 사람의 비강 상피세포에 대한 ¹⁴C-mannitol(55.0 mCi/mmol)의 투과도를 알아보았다. Mannitol(MW 182)은 단당류(monosaccharide)로서 수용성이며 생체 내에서 대사가 되지 않고 견고연접의 성상을 변화시키지 않으며 이온의 운반 과정에 영향을 주지 않아 세포의 투과성을 알아보

는 연구에서 표지자로 흔히 사용된다²⁰⁻²³.

본 연구에서도 ALI 방법에 의해 배양된 사람의 비강 상피세포의 투과성을 알아보기 위한 방법으로 ¹⁴C-mannitol을 이용하였다. 비강 상피세포를 monolayer로 배양하여 장벽(barrier)을 만든 다음 ¹⁴C-mannitol을 통과시켰을 경우에 Table 1 에서처럼 시간에 따라 통과하는 양이 비교적 일정한 결과를 보여 배양된 상피세포가 barrier function이 있음을 알 수 있었다. Monolayer의 상피세포를 통한 transport study를 위해서는 견고연접의 형성이 필수적인데²⁴ 본 연구에서는 견고연접의 형성을 TEER 값의 측정 및 투과전자현미경으로 확인할 수 있었다.

결론적으로 이 실험에서 사용한 ALI 방법으로 배양된 비강 상피세포는 monolayer로 잘 배양되었으며 시간이 지남에 따라 TEER 값이 증가하고 투과전자현미경상에서 섬모의 발생과 견고연접의 형성이 잘 관찰되었다. 따라서 향후 ALI 배양법으로 사람의 비강 상피세포를 배양하여 각종 peptides나 약물 등의 정확한 운반 기전 및 대사 등을 밝히기 위한 연구에 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

비강 점막을 통한 약물의 이동이나 대사 등은 실험 동물을 이용한 약력학적인 연구가 이루어져 왔으나 사람의 비강 점막 상피세포의 투과에 대한 연구는 없는 실정이다. 따라서 저자 등은 air-liquid interface (ALI) 방법으로 세포를 배양하여 그 미세구조와 *in vitro*에서 비강점막 상피세포에 대한 mannitol의 투과도를 알아보려고 하였다.

방 법 :

만성 부비동염 환자의 내시경을 이용한 부비동 수술시 정상 하비갑개의 조직을 채취하여 ALI 방법을 이용하여 transwell내에 monolayer로 상피세포를 배양하였으며 blank filter, 배양 5일째 및 7일째에 transepithelial electrical resistance (TEER) 값을

측정하고 투과전자현미경을 이용하여 견고연접(tight junction)의 형성을 확인하였다. 배양된 세포의 mannitol의 투과도를 알아보기 위해 12일째에 ¹⁴C가 부착된 mannitol 4 μ mol을 배양액과 함께 투여하고 1시간 동안 10분 간격으로 % leakage를 측정하였다.

결 과

사람의 비강 상피세포는 7일 내에 confluent monolayer로 배양되었으며 투과전자현미경상 섬모와 견고연접의 형성이 잘 관찰되었다. TEER 값은 blank filter는 108.5 ohm.cm², 배양 5일째는 141 ohm.cm², 배양 7일째는 177.5 ohm.cm²로 측정되었다. Monolayer를 통한 ¹⁴C-mannitol의 % leakage는 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분에 각각 35.67 \pm 5.43, 34.42 \pm 5.60, 32.75 \pm 5.71, 31.76 \pm 4.22, 30.96 \pm 3.49, 29.60 \pm 3.68 %로 나타났다.

결 론 :

ALI 방법으로 배양된 사람의 정상 비강점막 상피세포는 생체와 유사하게 배양되어 세포의 투과도(transcellular permeability)를 알아보는데 적합하며 *in vitro*에서 비강점막을 통한 약물의 transport에 대한 연구에 도움이 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. O'Hagan DT, Illum L. Absorption of peptides and proteins from the respiratory tract and the potential of development of locally administered vaccine. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1990;7:35-97.
2. Lee WA, Longenecker JP. Intranasal delivery of proteins and peptides. *BioPharm Manuf* 1988;1:30-7.
3. Woodyatt RT. The clinical use of insulin. *J Metab Res* 1922;2:793.
4. Petruson B, Hansson HA, Karlsson G. Structural and functional aspects of cells in the nasal mucociliary system. *Arch Otolaryngol* 1984;110:576-81.
5. Schipper NGM, Merkus FWHM. The nasal mucociliary clearance : Relevance to nasal drug delivery. *Pharm Res* 1991;8:807-14.
6. Hirai S, Yashiki T, Matsuzawa T, Mima H. Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat. *Int J Pharm* 1981;7:317-25.
7. Hermens WAJJ, Deurloo MJM, Romeyn SG, Verhoef JC, Merkus FWHM. Nasal absorption enhancement of 17 β -estradiol by dimethyl- β -cyclodextrin in rabbits and rats. *Pharm Res* 1990;7:500-3.
8. Baldwin PA, Klingbeil CK, Grimm CJ, Longenecker JP. The effects of sodium tauro-24, 25-dihydrofusidate on the nasal absorption of human growth hormone in three animal models. *Pharm Res* 1990;7:547-52.
9. Ostrowski LE, Nettesheim P. Inhibition of ciliated cell differentiation by fluid submersion. *Exp Lung Res* 1995;21:957-70.
10. Bridges MA, Walker DC, Harris RA, Wilson BR, Davison AGF. Cultured human nasal epithelial multicellular spheroids : Polar cyst-like model tissues. *Biochem Cell Biol* 1991;69:102-8.
11. Emerman JT, Pietelka DR. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membrane. *In Vitro* 1997;13:316-28.
12. Alder KB, Schwarz JE, Whitcutt MJ. A new chamber system for maintaining differentiated guinea pig respiratory epithelial cells between air and liquid phases. *Biotechniques* 1987;5:145-54.
13. Yoon JH, Gray T, Guzman K, Koo JS, Nettesheim P. Regulation of the secretory phenotype of human airway epithelium by retinoic acid, triiodothyronine, and extracellular matrix. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16:724-31.

14. Ngamphaiboon J, Thepchatri A, Chatchatee P, Chumdermapadetsuk S. Fluticasone propionate aqueous nasal spray treatment for perennial allergic rhinitis in children. *Ann Allergy Asthma & Immunol* 1997;78;479–84.
15. Holm AF, Fokkens WJ, Godthelp T, Mulder PG, Vroom TM, Rijntjes E. Effects of 3 months' nasal steroid therapy on nasal T cells and Langerhans cells in patients suffering from allergic rhinitis. *Allergy* 1995;50;204–9.
16. Chevillard M, Hinrasky J, Zahm JM. Proliferation, differentiation and ciliary beating of human respiratory ciliated cells in primary culture. *Cell Tissue Res* 1991;264;49–55.
17. Jorissen M, Van der Schueren B, Van den Berghe H. The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured in vitro. *Arch Otorhinolaryngol* 1989;246;308–14.
18. Kaartinen L, Nettekheim P, Alder KB, Randel SH. Rat tracheal epithelial cell differentiation in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 1993;29A;481–92.
19. Chang JE, Basu SK, Lee VHL. Air-Interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies. *Pharm Res* 2000;17(6);670–6.
20. Reardon PM, Gochoco CH, Audus KL, Wilson G, Smith PL. In vitro nasal transport across ovine mucosa : effects of ammonium glycyrrhizinate on electrical properties and permeability of growth hormone releasing peptide, mannitol, and lucifer yellow. *Pharm Res* 1993;10(4);553–61.
21. Elia M, Behrens R, Northrop C, Wraight P, Neale G. Evaluation of mannitol, lactulose and ⁵¹Cr-labelled ethyle diamine tetra-aceate as markers of intestinal permeability in man. *Clin Sci* 1987;73; 197–204.
22. Swaan PW, Marks GJ, Ryan FM, Smith PL. Determination of transport rates for arginine and acetaminophen in rabbit intestinal tissues in vitro. *Pharm Res* 1994;11(2);283–6.
23. Laker MF, Bull HJ, Menzies IS. Evaluation of mannitol for use as a probe marker of gastrointestinal permeability in man. *Eur J Clin Invest* 1982;12;485–91.
24. Werner U, Kissel T. In-vitro cell culture models of the nasal epithelium : A comparative histochemical investigation of their suitability for drug transport studies. *Pharm Res* 1996;13;978–88.