



# 구강 상피성 종양연구에 필요한 배양된 정상인 구강 및 피부 각화상피세포에서 분화 단백질 표지자

단국대학교 치과대학 구강병리학교실

부교수 이 종 헌

## 서론

사람 피부 각화 세포막(Cornified cell envelope)은 기저세포가 최종 분화를 거쳐 마지막으로 만들어진 구조이다. 이 막은 공기 중 건조한 상태에서 각화 세포막 하부에 있는 세포를 보호하는 중요한 역할을 하며 이러한 환경적응에 필요한 단백질로 구성되어 있다. 정상인 구강 각화상피세포(Normal human oral keratinocyte, NHOK)는 정상인 피부 각화상피세포(Normal human skin keratinocyte, NHEK) 처럼 최종분화를 하지만 건조한 상태에 있는 상피세포 특징과 다르다. 즉 정상인 구강 각화상피세포는 피부세포와 동일하게 마지막 분화 단계를 거치지만 여러 가지 미생물, 단백질 분해효소 및 성장인자를 포함하는 타액에 노출되어 습한 상태로 존재한다. 따라서 양 각화세포막의 성분이 서로 다르며 작용도 상이할 것으로 생각된다. 그러나 최근까지 피부 각화 상피세포의 단백질 성분을 구강질환 연구에 적용하여 사용하고 있는 실정이다.

피부 각화상피세포막을 구성하는 주 단백질은 loricrin으로 알려져 있으며 fillagrin, SPR family, involucrin, cystatin a, elafin, keratin desmosomal component, annexin-1, S100A11, S100A10, plasminogen activator inhibitor-2 등도 보고되고 있으나 구강 각화상피세포막에 관한 정확한 연구는

거의 없다.

본 연구의 목적은 사람에게서 일차 배양된 피부 및 구강 각화상피세포에서 각화 세포막을 유도하고 이 세포막에 존재하는 아미노산을 연구하고 단백질 성분을 예측하여 앞으로 호발하는 구강질환과 종양 연구에 분화 표지자로 응용 하고자 한다.

## 연구 재료 및 방법

사람 태아 포피와 건강한 정상인 치은에서 얻은 조직을 KGM bullet kit를 사용하여 일차 세포배양을 하였다. 배양조건은 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 칼슘 농도 0.05, 0.15, 1.2mM로 하였고 각각 배양하여 분화를 유도하였다. 역상차 현미경을 사용하여 분화된 형태학적 변화를 관찰하였고 통법에 따라 처리하여 각화 세포막을 얻어 분광 흡광계를 사용하여 양을 측정하였으며 주사전자현미경으로 각화세포막을 관찰하였다. 또한 아미노산 비율을 구하기 위하여 HPLC를 사용하였고 이 비율에 따라 알고리즘을 사용하여 연관되는 단백질을 예측하였다.

## 연구 결과

사람 피부 및 구강 각화 상피세포는 1.2mM 칼슘

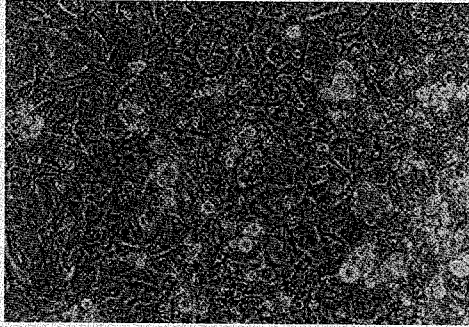


그림 1a. 1.2mM 칼슘농도에서 분화된 NHEK로 다각형 모양을 보이며 중층화 세포도 관찰(x200).

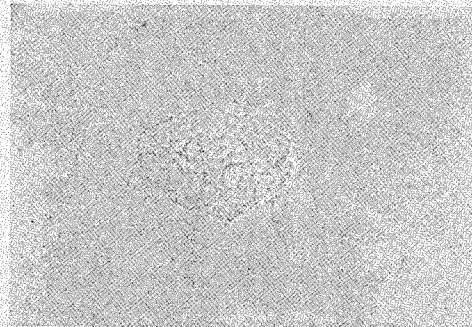


그림 1b. 1.2mM 칼슘에서 유도된 NHEK의 각화세포막(x200).

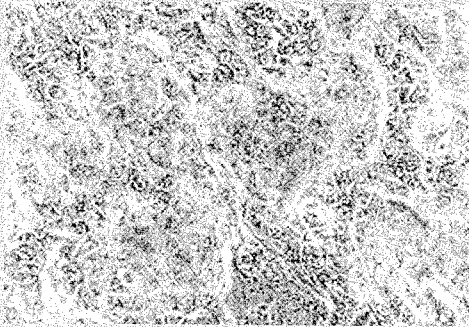


그림 2a. 1.2mM 칼슘농도에서 분화된 NHOK로 NHEK 보다 중층화 세포가 다수 보임(x200).

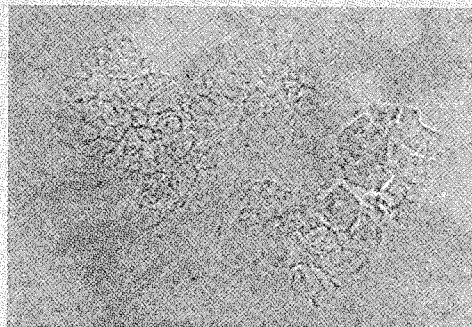


그림 2b. 1.2mM 칼슘에서 유도된 NHOK의 각화세포막(x200).

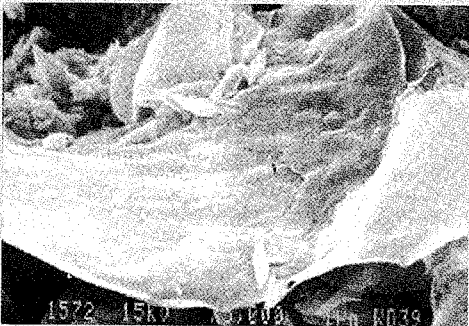


그림 3. NHEK의 각화세포막으로 미세융기와 다량의 홈이 보임(x5000)

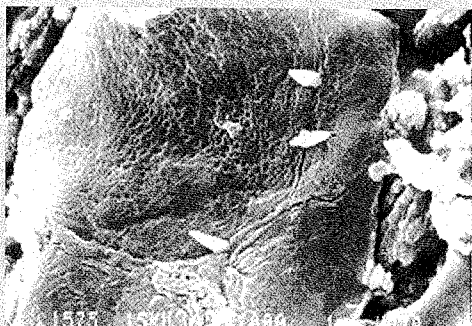


그림 4. NHOK의 각화세포막으로 미세융기와 다량의 홈이 보임(x5000)

농도에서 에서 불규칙한 경계를 갖으며 중층의 편평한 상피세포가 관찰되었다(그림 1a, 2a). 세포질과 핵이 사라지고 각화세포막만 희미하게 보인다(그림 1b, 2b). 양군 공히 각화 세포막에서 홈들이 서로 연결되어 미세능을 이루며 이러한 미세능은 규칙적이며 서로 평행을 이루었다(그림 3, 4). 양군

공히 최종분화시 각화세포막 측정치가 증가하였다. 배양된 정상인 피부 각화 상피세포의 아미노산 비율은 Gln/Glu(Involucrin), Gly(Loricrin) 및 Serine 등이었으며 구강 각화 상피세포는 Pro(SPR), Gln/Glu(Involucrin) 및 Gly(Loricrin) 등을 보였다(그림 5).

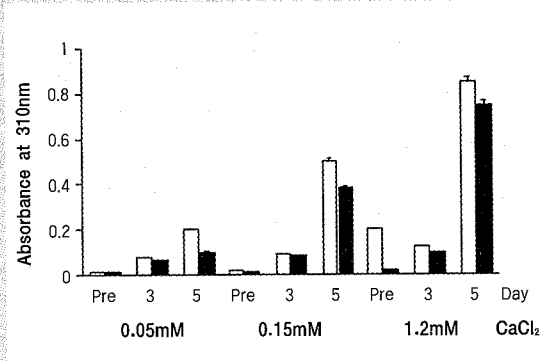


그림 5. 칼슘농도에 따라 NHEK 및 NHOK의 각화세포막 측정치 비교

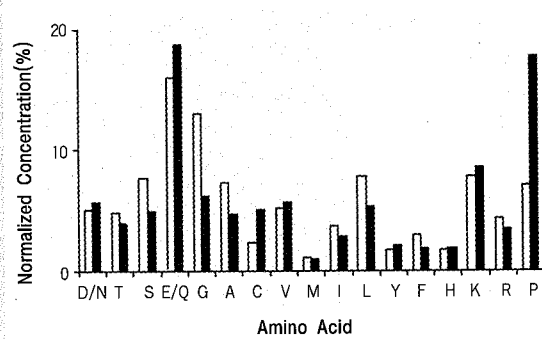


그림 6. 1.2 mM 칼슘농도에서 NHEK 및 NHOK의 각화세포막에서 아미노산 분석 비교

### 연구 결론

위와같은 결과에서 상피세포의 최종분화시 양궁공히 각화세포막 측정치가 증가하였지만 배양된 정상인 피부 각화 상피세포의 아미노산 비율은

Gln/Glu(Involucrin), 구강 각화 상피세포는 Pro(SPR)이 주요한 구성성분으로 생각되었다. 따라서 구강질환 및 종양연구에서 구강 상피세포에 맞는 분화 표지자를 사용할 수 있다고 생각되었다.

### 참고 문헌

- Hole D : Cornified cell envelope, *Dermatologica* 180:201-211, 1990.
- Reichert U, Michel S, Schmidt : The cornified envelope : a key structure of terminally differentiating keratinocytes. In ; Darmon M, Blumenberg M(eds) *Molecular Biology of the Skin*. Academic Press, New York, 1993, pp107-150.
- Steinert PM, Marekov LN : The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin and SPRs are isopeptide crosslinked components of the human epidermal cornified cell envelope. *JBC* 270:17702-17711, 1995.
- Boyce ST, Ham RT : Calcium-regulated differentiation of normal human keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum free serial culture. *J Invest Dermatol* 81:33s-40s, 1983.
- Hole D, Roop D : Loricrin. In ; Darmon M, Blumenberg M(eds). *Molecular Biology of the Skin*. Academic Press, New York, 1993, pp151-179.
- Simon M : The epidermal cornified cell envelope and its precursors, in Leigh IM, Lane E, and Watt FM, *The keratinocyte handbook*, pp275-292, Cambridge Univ, Cambridge.
- Steinert PM, Marekov LN : Involucrin is an important early components in the assembly of the human epidermal cornified cell envelope. *JBC* 272:2021-2030, 1997.
- Candi E, Melino G, Steinert PM : Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. *JBC* 270:26382-26389, 1995.
- Steinert PM, Marekov LN : Small proline-rich proteins are cross-bridging proteins in the cornified cell envelopes of stratified squamous epithelia. *JBC* 272:1-10, 1997.