梨花醫大誌 : 第 24 卷 第 1 號 2001
Ewha Med J Vol. 24, No. 1, 2001

두경부편평상피암 연구의 3차원적 *In Vitro* 실험 모델 확립 : Spheroid 모델과 Raft 배양모델*

이화여자대학교 의과대학 이비인후과학교실
변 성 완 · 김 춘 동

= Abstract =

Establishment of Three Dimensional *In Vitro* Laboratory Model in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck : Spheroid Model and Raft Culture Model

Sung-Wan Byun · Chun Dong Kim

Department of Otolaryngology, College of Medicine Ewha Womans University

Objective : To establish new *in vitro* model systems that better reflect *in vivo* condition, multicellular tumor spheroids(MTS) and raft culture were developed using cell lines of squamous cell carcinoma(SCCHN) of the head and neck in these 3-dimensional systems.

Materials and Methods : Four SCCHN cell lines were used for MTS and raft culture.

Results : All cell lines formed MTS, but only Tu-138 showed a good stratification at the air-liquid interface in the raft culture system.

Conclusions : MTS and raft culture system were established successfully from the SCCHN cell lines.

KEY WORDS : Multicellular tumor spheroid · Raft culture · Squamous cell carcinoma of the head and neck.

서 론

발암기전이나 치료법의 개발을 위한 악성종양의 연구에는 반드시 일정 실험조건을 검증하기 위한 model이 필요하다. 그러한 연구의 방법군으로 크게 *in vivo* model과 *in vitro* model이 있는데, *in vivo* model에서는 실험적 조작을 인체에 직접 가하여 행해지는 인체실험과 실험동물을 이용한 방법이 있으며 인체를 이용한 실험에는 여러 제약이 따르게 되는 것은 주지의 사실이므로 질환에 대한 연구의 많은 부분은 동물실험에 의지하여 이루어지고 있다. 그러나 동물실험의 경우에도 두경부편평상피암에 대한 syngeneic model이 드물고, xenograft model을 이용한 연구 model도 아직 동물실험의 결과에서 재현되지 못하는 경우가 대부분 이고 연구자료의 인체로의 extrapolation에 아직 미흡한 실정이다. In vitro 연구 model로서 가장 기본적인 cell culture는 flask의 표면을 따라 세포가 이차원적으로

*본 논문은 1998년 이화여자대학교 교내연구비의 보조로 이루어 졌음.

성장해가는 monolayer culture system으로 배양이 다른 방법보다 쉬워 연구를 수월이 할 수 있으나 생체와는 여러면에서 조건이 다르다. 이런이유로 monolayer culture model에서 항암효과가 있는 것으로 판명된 여러 cytokine들이 생체내에 투여했을 때에는 효과가 없는 결과를 나타내어 *in vitro* model의 결과와 *in vivo* model의 결과의 차이에 대한 해석을 요구하게 되어 생체의 조건과 비슷한 새로운 실험 model의 요구는 계속되고 있는데 multicellular tumor spheroids(MTS)는 종양세포가 3차원적으로 뭉쳐서 구형의 세포 덩어리를 형성한 것으로 형태학적, 기능적인 면에서 생체내의 무혈관성 미세전이(microscopic avascular metastasis)와 비슷한 생물학적 조건을 제공하며, 이 모델에서는 종양세포들이 뭉쳐 자라므로 단층배양에서보다 더 많은 세포간의 접촉이 있게 되고 세포 사이에 생체내와 비슷한 세포외기질(extracellular matrix)이 형성된다[1)2)]. 따라서 MTS는 세포-세포 관계에 대한 연구에서 중요한 모델로 사용될 수 있으며, MTS의 중심부에는 저산소상태의 세포군이 존재하고, 세포주기(cell cycle time)가 각 세포마다 다양하므로 치료방사선학적 연구 또는 화학요법 연구에도 널리 쓰일 수 있다[1)3)].

Raft 배양에서는 세포가 섬유모세포가 섞여있는 콜라겐젤(fibroblast-containing collagen gel)위의 공기-액체 경계면(air-liquid interface)에서 공기에 노출된 채 성장하여 3차원적으로 층을 이루며 중첩되어 자란다. 배양으로 얻어진 조직은 형태학적으로 원발부위의 조직과 비슷한 형태로 분화되므로[4-6)], raft 배양 역시 생체 조건에 보다 가까운 세포배양 모델이라고 할 수 있다. 더욱이 이것은 세포가 공기에 노출된다는 점에서 대부분의 두경부종양이 발생하는 환경과 비슷한 조건을 가지므로 특히 두경부 영역 종양의 특성을 연구하는데 유용한 모델이 될 수 있다.

본 연구에서는 최근 새로운 *in vitro* model로 이용되고 있는 방법으로서 세포를 3차원적으로 배양하여 성장하는 세포덩어리를 형성하여 생체에서 암세포가 미세전이한 상태(avascular metastasis)와 유사한 조건을 제공하는 multicellular tumor spheroid(MTS) model과 배양시 암세포를 직접 공기에 노출시켜 피부, 호흡기계, 구강등에서 발생하는 암종과 유사한 환경을 제공하는 방법인 raft culture model을 고찰하고자 한다.

연구 재료 및 방법

1. 세포주와 단층배양

SCCHN 세포주로서 본 연구에서는 Pittsburgh Cancer Institute에서 수립한 PCI-series(PCI-1, -13, -50)[9)10)]와 M.D. Anderson Cancer Center에서 수립한 Tu-138[11)]을 이용하였다. 각 세포주는 75-cm^2 배양플라스크에서 배양하였고 세포배양기는 습도 100%, 5% CO_2, 37℃의 환경을 유지하였다. 배양액으로 PCI 세포주는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM ; GIBCO, Grand Island, NY, US)을, Tu-138 세포주는 DMEM과 Ham's F12 medium을 1 : 1로 섞어 사용하였고 각 배양액은 10%의 우태혈청과 50mg/L의 gentamicin을 포함하였다.

단층배양에서 세포성장이 합류(confluence)에 이르면 trypsin-EDTA(0.25% w/v ; GIBCO)를 37℃에서 3~5분 처치하여 세포를 분리하고 계대배양하였다.

2. MTS의 형성과 성장

본 연구에서는 liquid overlay법에 의하여 MTS를 형성하였다[3)12)13)]. 단층배양된 세포로부터 단세포부유액(single-cell suspension)을 만든 후, 이것을 0.5% agarose로 coating된 U-bottomed 96-well plate(Costar, Cambridge, MA, US)에 주입하여 동요가 없는 상태에서 배양하였다. 세포 분주 전날 액체상태의 agarose로 plate를 무균적으로 coating한 후 자외선 하에서 건조시켰다. 주입하는 세포수는 0.2ml/well의 배양액에 10,000개를 선택하였다. 세포배양액은 원래 세포주의 배양액을 동일하게 사용하였고 주 2회 well 당 0.1ml씩 교환하였다. MTS가 성숙되는 과정을 매일 현미경하에서 관찰하였으며 graticule을 이용하여 직각의 각도를 가진 최장경과 최단경을 측정하였다. 2주까지 관찰한 후 MTS를 수집하여 냉동절편을 만들었다.

3. Raft 배양

Regnier 등[14)]의 방법에 의해 raft 배양을 시행하였다. Type I collagen(Nitta Gellatin, Yao, Japan)에 10X P medium과 HEPES를 8 : 1 : 1의 비율로 섞고 여기에 마우스 3T3 J2 섬유모세포를 1.5×10^5개/ml의 농도로 섞어서 13mm polycarbonate filter chamb-

er(3.0μm Millicell-pc : Millipore Co., Bedford, MA, US)용기에 0.25ml씩 분주하였다. 배양기에서 2시간 동안 굳힌 후 배양액과 함께 3일 동안 배양하여 collagen-fibroblast lattice(dermal equivalent)를 성숙시킨 후 세포주에 대한 기질로 사용하였다. 이 위에 배양하고자 하는 세포주를 millicell당 2×10^5개씩 분주하였다. 세포를 1주일 동안 배양액에 잠기게 배양하여(submerged culture) 단층(tight monolayer)을 형성시킨 후, 공기중에 노출시켜 공기-액체 단면(air-liquid interface)에서 2주일 동안 배양하여 중첩된 다층(stratified multilayer)를 형성시켰다.

4. 조직학적 검사

MTS 또는 raft 배양으로 얻어진 조직을 액체질소로 냉각시키고 6μm의 두께로 잘라 냉동절편을 만들었다. Raft 배양조직은 Carnoy 용액(ethanol : chlorform : acetic acid : 6 : 3 : 1)에 30분간 고정한 후 paraffin에 고정하여 6μm의 두께로 잘라 절편을 만들었다. 전체적인 형태를 관찰하기 위하여 먼저 hematoxylin and eosin(H & E) 염색을 시행하고 현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. MTS의 형성과 H & E 염색소견

PCI 세포주들은 모두 성공적으로 MTS를 형성하였다. Tu-138은 MTS를 형성하기는하나 부스러지기 쉬워서 조직절편을 만들 수가 없었다. MTS가 성숙되는 과정을 매일 inverted microscope으로 관찰한 결과 모든 군에서 MTS의 크기가 초기에 급격히 작아졌으며 2일에서 5일째에 성숙화되어 6일 경부터는 일정한 크기에서 유지가 되는 양상을 보였다. 이후로 MTS 주위에 증식하는 세포들이 붙어나가는 소견은 볼 수 있었으나 더 커지지 않았다. 한 well당 분주하는 세포수를 4,000개에서 20,000개까지 다양하게 바꿔보고, MTS의 크기가 안정된 후 24 well에 옮겨보는 등의 다양한 시도를 하면서 4주까지 관찰하였으나 크기 자체는 큰 변화를 보이지 않았다. H & E 염색결과 종양세포의 특징을 보이는 세포들이 MTS의 전부분에 걸쳐 골고루 퍼져 있었다. 부분적으로 괴사로 인해 세포가 보이지 않는 부분들이 주로 중심부에 많이 분포하는 것을 관찰할 수 있었으나 중심부에 큰 괴사부위는 각 조건에서 발견되지 않았다(Fig. 1, 2).

2. Raft 배양의 형성과 H & E 염색소견

각 세포주에 대하여 raft 배양을 시행한 결과 Tu-

Fig. 1. Multicellular tumor spheroid model of PCI-50 cell line(H & E staining, ×100).

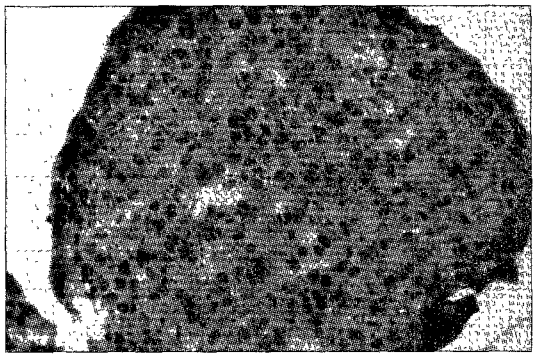

Fig. 2. Multicellular tumor spheroid model of PCI-50 cell line(H & E staining, ×250).

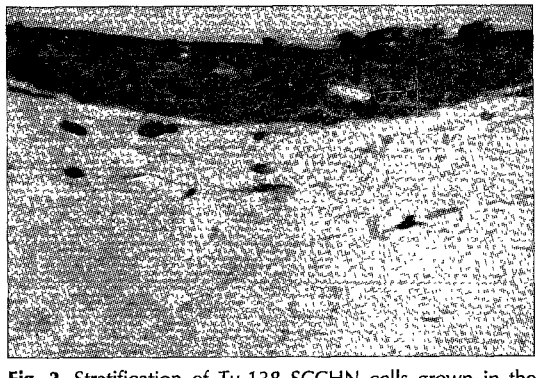

Fig. 3. Stratification of Tu-138 SCCHN cells grown in the raft culture(H & E staining). Two weeks after exposure to the air, the cells formed multiple layers overlying the collagen-fibroblast matrix. Magnification : ×400.

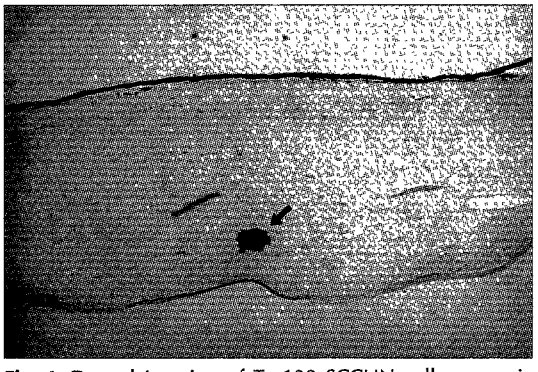

Fig. 4. Dermal invasion of Tu-138 SCCHN cells grown in the raft culture(H & E staining, ×100).

138이 중층을 잘 형성하였다. H & E 염색시 조직의 두께는 일정하였고 단면의 끝부분에서는 조금 더 두껍게 자라있었다. 조직은 전형적인 종양의 특징을 보이고 있었으며 전체적으로 퇴형성과 방향성의 상실을 보이고 있었다. 세포분열양상이 전층에서 관찰되었다. 각각의 세포는 다형성을 보이는 핵을 가지는 고도의 비정형 세포로 구성되어 있었는데 핵대세포질 비율의 증가, 과염색성 핵, 뚜렷한 핵소체 등의 소견을 관찰할 수 있었다. 모든 조직에서 각질화는 관찰되지 않았다(Fig. 3). 모든 조직에서 종양세포는 콜라겐 기질쪽을 침범하여 안쪽으로도 퍼져 있었다(Fig. 4).

고 찰

암세포가 *in vivo*에서 어떻게 발생되어 성장하고, 인체의 면역체계를 비롯한 방어 기전과 어떠한 상호작용을 하는가 연구하기 위해서는 이에 관계되는 여러 조건들을 잘 조절하는 좋은 *in vitro* 실험모델이 필요하다. 암 연구를 위한 기본적인 *in vitro* model로서 사용되는 일반적인 세포배양법은 암세포가 배양용기의 표면에 부착하여 판상으로 분열하고 성장하기 때문에 생체내에서 3차원적으로 성장하는 암종과 그 성격이 같을 수 없어 암세포가 가지고 있는 고유의 생물학적 특성을 *in vitro* culture 중에 잃기도 하고, 때로는 생체내의 암세포는 가지고 있지 않은 새로운 형질을 갖게 되기도 한다. 이러한 단점을 극복하고자 세포가 입체적으로 자랄 수 있는 model을 개발하고자 하는 노력이 시도되어, 3차원적 organ culture, histoculture 등의 방법이 고안되었다. 하지만 이들은 fresh tissue에서 출발하는 배양으로서 일단 조직이 생존하여도 수 대 이상 계대배양을 할 수 없어 대부분 일시적인 관찰에 국한되었다. 결국 계속적으로 분열하고 성장하는 세포의 배양이 요구되었고, 세포주의 수립을 통해 지속적인 암세포의 특성에 관해 연구할 수 있게 되었다.

삼차원적 multicellular tumor spheroid(MTS)는 *in vitro*에서 single-cell suspension으로 부터 형성되는 것으로 단순한 monlayer culture 와 생체에서의 종양과 중간 단계의 성질을 가진다고 생각되며 생체내에서 미세전이(avascular metastasis)한 상태와 조건이 비슷하다. MTS를 형성하는 대표적인 방법은 spinner flask method[7)8)15)]라고 할 수 있다. 이 방법은 spinner flask에 종양세포를 넣고 이것을 계속 움직여 줌으로써 세포가 flask의 벽에 붙지 않고 세포들끼리 뭉쳐서 자랄 수 있게 해 주는 방법이다. 하지만 이 방법은 기술적으로 쉽지 않고, 배양액이 많이 필요하다든지, 개개의 MTS를 오랜 기간동안 연구하기 힘들다든지 하는 단점이 있다. Yuhas 등[3)13)]은 대신에 세포 배양 flask의 표면을 세포가 부착되기 힘들게 만듬으로써 똑같은 효과를 볼 수 있으리라는 가정하에 petri dish의 밑면을 0.5% Noble agar와 세포배양액의 혼합액으로 2, 3mm 정도의 두께로 coating을 하고 그 위에 종양세포를 분주하여 MTS를 형성시킬 수 있음을 보고하였다. 본 연구에서는 Yuhas의 방법을 응용하여[12)] 0.5% agarose로 coating된 바닥이 U 모양으로 생긴 96-well 배양용기에서 spinner flask를 쓰지 않고도 MTS를 형성할 수 있었다.

MTS의 성장에 대한 다른 연구에서의 보고를 보면[2)3)7)8)15)] 대개 2, 3일 정도의 지연을 거친 후(lag period) 지수적으로 크기가 증가하다가 일정한 크기에서 유지된다고 한다. 하지만 본 연구에서 사용한 PCI 세포주에 의해 만들어진 MTS는 지연기간이 길었고 지수적으로 성장하는 양상을 보이지 않았다. MTS의 성장은 조직형에 따라 변화가 많으며[16)] 이러한 성장양상은 PCI 세포주의 성장 특성이라고 생각된다. 본 연구에서 만들어진 MTS에서는 중심부에 큰 괴사 소견을 볼 수 없었는데 이것은 MTS의 크기가 다른 연구자들의 실험에 비해 작았기 때문이라고 생각된다. 본 연구에서 사용한 방법은 다른 방법보다 기술적으로 아주 쉽고 MTS를

장기적으로 다루기가 쉽다는 장점이 있으므로 종양세포의 연구에 많은 도움이 되리라 생각된다.

두경부의 악성종양 중 가장 흔한 편평상피세포암은 대개 구강, 인두, 후두 등과 같이 호흡기계의 일부에 많이 발생하고, 이 호흡기계는 공기에 노출되어 있는 조건을 형성하여 다른 영역의 종양과 생체환경이 다르다. 따라서 호흡기계에서 발생하는 편평상피세포암의 기초 및 임상응용연구를 수행하기 위하여는 배양시 공기에 노출시켜 실제 생체와 유사한 조건을 제공하는 방법으로 피부의 배양에 사용되는 raft culture를 시행하면 기존의 cell culture model과는 또 다른 생체조건을 재현하는 ***in vitro*** model이 될 것으로 사료된다. 이와같은 호흡기계의 조건과 비슷한 raft model은 현재까지 ***in vitro*** model로 이용되어온 이차원적인 암세포의 배양에서 볼 수 없는 암세포의 침윤기전이나 암세포의 분화유도 연구 및 cytokine의 효과연구 등에 활용될 수 있다.

Raft culture model은 그간 피부에 대한 약물의 효과를 측정하는데 많이 이용되어 왔는데 Asselineau 등(1986)에 의하면[17] 배양된 상피세포는 정상 상피세포에 비해 기저층세포의 모양이 다르고 분화정도를 나타내는 67-kD keratin, involucrin 등의 표현이 약간 다르나 정상 상피세포와 비슷한 것으로 생각하고 실험하여도 문제가 없다고 보고하였다. 이에 따라 피부과 영역에서 새로운 신약의 평가에 있어서 인간에 직접 실험해 보는 여러 문제점들을 피하고 그 효과를 평가할 수 있게 되었다. 특히 약제의 효과 판정에 있어서 약제를 넣어주는 위치에 따라 지역적 혹은 전신적 영향을 각각 평가할 수 있다.

Raft를 만드는 방법은 크게 두가지가 있는데 de-epidermized dermis위에서 세포를 키우는 방법과 collagen-fibrolast lattice위에서 세포를 배양하는 방법이다. 이중 후자의 방법을 간단히 설명하면 polycarbonated millicell 용기에 type 1 collagen matrix의 gelation과정에 fibroblast를 embed하여 collagen-fibroblast lattice(dermal equivalent)를 만들어 세포주에 대한 기질로 사용한다. 이렇게 만들어진 기질위에 배양된 상피세포나 편평상피암의 세포주를 trypsinization하여 single-cell suspension을 만든 후 millicell당 2×10^5의 세포를 submerged culture하여 1주일 배양하면 tight monolayer가 형성된다. Tight monolayer가 형성되면 semi air-liquid interface에 1주내지 2주간 배양하여 multilayer를 형성시키고 이 조직을 고정하고 표본을 만들어 hematoxylin and eosin 염색이나 여러가지 표식자를 이용한 면역조직화학법을 이용하여 암세포의 침윤정도나 배양된 세포의 특징을 연구할 수 있다.

현재 이 모델을 사용하는 연구는 주로 피부의 상피세포를 이용하여 이루어 지고 있는데 주로 retinoic acid, 1,25-dihydroxyvitamin D_3 등을 이용하여 세포들의 분화에 미치는 영향을 관찰한 연구와 여러 가지 약제의 영향을 평가하는데 주로 사용되고있다.

종양세포주로 연구한 실험은 아직 활성화가 되어있지 않고 주로 공기와 접하는 영역에서 발생하는 종양을 대상으로 이루어지고 있다. Doki등(1993)이 한 실험에 따르면[18] esophageal cancer cell line에서 E-cadherin과 invasiveness 의 관계를 raft model 에서 적용하여 E-cadherin의 표현이 되지 않을 때 세포의 접착력이 감소하여 invasion이 증가함을 보고하였다. Shiozaki등(1995)은[19] epidermal growth factor(EGF)나 transforming growth factor α(TGF-α)의 overexpression시 종양의 크기보다 전이나 invasion에 더 영향을 준다고 발표하였다. 본 연구의 raft 배양결과 관찰되는 형태학적 분화소견은 그 세포가 얻어진 조직과 거의 유사한 소견을 보인다[4-6]. Tu-138 세포주의 raft 배양시 악성종양의 특징을 잘 나타내는 10층 정도의 중층을 형성하였고, 또한 기질쪽으로 침범하는 소견을 보여 매우 공격적인 성향을 보였다. 이와 같이 종양의 특성을 관찰하는 연구에서 raft culture의 이용은 우선 종양의 위치가 자궁경부암, 두경부암, 식도암과 같이 공기에 노출될 수 있는 위치이며 조직이 편평상피세포암으로써 monolayer culture에서는 실험하지 못하는 세포의 분화도를 이용하여 hormone,, cytokine, 약제를 사용하여 세포의 분화에 미치는 영향이나 인공으로 만들어진 collagen-fibroblast lattice로의 침윤성에 미치는 영향을 보는데 주로 이용되고 있다.

이 방법의 앞으로의 전망은 raft culture에 의해 배양된 세포들은 피부의 세포들이나 암세포, 유전적변형이 있는 세포들의 약리 효과나 호르몬, cytokine들의 ***in vitro*** 실험 model로 많이 사용될 것으로 판단된다. 특히 이 model은 세가지 관점에서 흥미를 주는데 hor-

mone이나 성장인자(growth factor)를 배양초기에 넣어 세포의 분화도의 변화 연구에 사용하고, 분화가 완성된 배양세포에서 hormone이나 약제를 넣어 그 물질의 효과를 보거나, dermis like matrix의 이용은 dermal pathology를 연구하는데 유용할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 3차원적 배양방법을 SCCHN 세포주들에 적용하여 단층으로 성장하는 일반적 세포배양법에 비해 보다 생체에 가까운 조건하에서 암세포의 생물학적 특성을 연구할 수 있는 모델을 수립하였다.

References

1) Sutherland RM : *Cell and environment interactions in tumor microregions : the multicell spheroid model. Science 1988 ; 240 : 177-184*
2) Donaldson JT, Tucker JA, Keane TE, Walther PJ, Webb KS : *Characterization of a new model of human prostatic cancer : the multicellular tumor spheroid. Int J Cancer 1990 ; 46(2) : 238-244*
3) Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ : *A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. Cancer Res 1977 ; 37(10) : 3639-3643*
4) Coleman N, Stanley MA : *Analysis of HLA-DR expression on keratinocytes in cervical neoplasia. Int J Cancer 1994 ; 56(3) : 314-319*
5) Coleman N, Greenfield IM, Hare J, Kruger-Gray H, Chain BM, Stanley MA : *Characterization and functional analysis of the expression of intercellular adhesion molecule-1 in human papillomavirus-related disease of cervical keratinocytes. Am J Pathol 1993 ; 143(2) : 355-36*
6) Benbrook DM, Rogers RS, Medlin MA, Dumm ST : *Immunohistochemical analysis of proliferation and differentiation in organotypic cultures of cervical tumor cell lines. Tissue Cell 1995 ; 27(3) : 269-274*
7) Gorlach A, Herter P, Hentschel H, Frosch PJ, Acker H : *Effects of nIFN beta and rIFN gamma on growth and morphology of two human melanoma cell lines : comparison between two- and three-dimensional culture. Int J Cancer 1994 ; 56(2) : 249-254*
8) Sacks PG, Racz T, Schantz SP, Rosenblum MG : *Growth inhibition by interferon beta and gamma of MDA 886Ln monolayer cells and multicellular tumor spheroids. A differentiation therapy model for squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1994 ; 120(11) : 1267-1272*
9) Synderman CH, Klapan I, Milanovich M, Heo DS, Wagner R, Schwartz D, Johnson JT, Whiteside TL : *Comparison of in vivo and in vitro prostaglandin E2 production by squamous cell carcinoma of the head and neck. Otolaryngol Head and Neck Surg 1994 ; 111 : 189-196*
10) Liu TJ, Zhang WW, Taylor DL, Roth JA, Goepfert H, Clayman GL : *Growth suppression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene via a recombinant adenovirus. Cancer Res 1994 ; 54(14) : 3662-3667*
11) Yasumura S, Hirabayashi H, Schwartz DR, Toso JF, Johnson JT, Herberman RB, Whiteside TL : *Human cytotoxic T-cell lines with restricted specificity for squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Res 1993 ; 53(6) : 1461-1468*
12) Konur A, Kreutz M, Knuchel R, Krause SW, Andreesen R : *Three-dimensional co-culture of human monocytes and macrophages with tumor cells : analysis of macrophage differentiation and activation. Int J Cancer 1996 ; 66(5) : 645-652*
13) Carlsson J, Yuhas JM : *Liquid-overlay culture of cellular spheroids. Recent Results Cancer Res 1984 ; 95 : 1-23*
14) Regnier M, Asselineau D, Lenoir MC : *Human epidermis reconstructed on dermal substrates in vitro : an alternative to animals in skin pharmacology. Skin Pharmacol 1990 ; 3(2) : 70-85. Review*
15) Waleh NS, Gallo J, Grant TD, Murphy BJ, Kramer RH, Sutherland RM : *Selective down-regulation of integrin receptors in spheroids of squamous cell carcinoma. Cancer Res 1994 ; 54(3) : 838-843*
16) Carlsson J, Nilsson K, Westermark B, Ponten J, Sundstrom C, Larsson E, et al : *Formation and growth of multicellular spheroids of human origin. Int J Cancer 1983 ; 31 : 523-533*
17) Asselineau D, Benard BA, Baily C, Darmon M : *Human epidrmoid reconstructed by culture : is it "normal" ?*

J Invest Dermatol 1986 ; 86 : 181-186

18) Doki, Shirozaki H, Tahara H, Inoue M, Oka H, Iihara K : *Correlation between E-cadherin expression and invasiveness in vitro in a human esophageal cancer cell lines. Cancer Res 1993 ; 53 : 3421-3426*

19) Shirozaki H, Kadowaki T, Doki Y, Inoue M, Tamura S, Oka H : *Effect of epidermoid growth factor in cadherin-mediated adhesion in a human esophageal cancer cell line. Br J Cancer 1995 ; 71 : 250-258*