

치은 각화상피세포와 섬유아세포를 이용한 삼차원적 배양시 중층화 동안의 변화

정태흡¹ · 현하나¹ · 김윤상¹ · 김은철² · 유형근¹ · 신형식¹

원광대학교 치과대학 치주과학교실¹, 구강병리학교실²

I. 서론

치주질환은 연령이 증가함에 따라 일반적으로 증가하는데 성인에 있어 그 빈도가 치아우식증에 비해 현저하게 높으며, 또한 치아상실의 주 원인이 되고 있다. 치주질환은 치석과 치태내 치주 병원균에 의한 만성 감염성 질환이며, 치아 주위 조직의 염증과 치주인대의 파괴, 부착 상실, 치조골의 소실로 인한 깊은 치주낭의 형성 등으로 특징 지워지며, 치은, 치주인대, 백악질 및 치조골 등으로 구성되는 치주조직을 파괴시켜 치아를 상실하게 하는 질환이다¹⁻³⁾.

치주조직의 재생에 관여하는 주된 세포로는 치은 상피세포, 치은 섬유아세포, 치조골 세포, 치주인대 세포등이 있고 이들 중 치은 섬유아세포가 조직재생에 주로 관여한다는 주장도 있으나⁴⁾, 주로 치주인대에서 유래된 세포가 질환으로 손상된 조직의 재생에 주로 관여한다고 보고되었다⁵⁻⁹⁾. 이러한 생체실험과 병행하여 치주 세포들의 성상을 규명하기 위한 시험관적인 연구가 진행되어, 치주인대 세포의 배양에 성공한 이래¹⁰⁾, 많은 연구가 이루어졌다¹²⁻¹⁷⁾.

따라서 최근에는 세포 배양법이 많이 이용되고 있는 바, 세포를 이용한 연구는 세포를 충분히 얻을 수 있고, 같은 실험을 쉽게 반복할 수 있으며, 살아있는

상태에서의 세포내 대사작용을 연구할 수 있을 뿐만 아니라, 체내에서 불가능한 여러가지 조작이 가능하다는 장점이 있다. 그러나 생체실험에서는 재생에 관계되는 특정세포나 상세한 치유과정, 조직재생에 관여하는 생화학적인 매개체에 관하여 정확히 규명되지 못하였고, 생체내에는 치주인대세포 단독으로 존재하는 것이 아니라 다른 세포들과 상존하기 때문에 세포간의 상호작용으로 그 양상이 다르게 나타날 것이다.

이와 같은 종래 단일 세포배양 방법을 이용할 경우 많은 양의 상피 세포 또는 섬유아세포를 얻을 수는 있지만 (1) 분화 억제제로 인한 미분화 상피 세포의 과성장, (2) 적절한 상피-상피, 상피-결체 조직간의 조절 기능 부족으로 인해 분화 기능이 소실됨으로써 원래의 생체내 조직과는 다른 형태학적, 생화학적, 기능적 특성을 갖게 된다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 또한 특정 생화학적 물질의 투여나 생리적인 조건의 변화를 통해 증식이나 분화를 유도할 수는 있지만 생체 내에서의와 같이 증식과 분화가 평형을 이룬 입체적인 구성을 이룰 수는 없다¹⁹⁾.

생체 내에서의 세포는 단일 층을 형성하지는 않으며 주변 기질 세포나 세포의 기질과의 반응과 상호작용을 통하여 증식과 분화를 조절한다. 포유 동물의 발생 과정 뿐만 아니라 성인 조직이 정상 기능을

수행하는데 있어서도 상피와 결합 조직간의 상호 작용 (epithelial-mesenchymal interaction)의 중요성은 이미 널리 알려져 왔으나 이러한 개념이 세포 배양에 적극적으로 도입되지는 않았다.²⁰⁾ 최근 배양 접시 바닥에 laminin, type IV collagen 등의 세포의 기질을 도포하는 방법이 소개되기도 했으나 상피 세포의 부착과 증식에는 도움이 되지만 분화의 유도나 중층 형성 (stratification)은 이루어지지 않았다²¹⁻²²⁾.

일차 배양된 세포를 이용하여 실험실에서 생체와 유사한 조직을 형성하기 위한 노력이 계속되어 이를 위해 생체의 상피, 점막과 유사한 실험실 조건, 즉 결합 조직 또는 점막 조직과 유사한 환경을 형성하고, 대기와 접촉하는 조건 (air-liquid interface)을 제공함으로써 삼차원적으로 재현된 실험실 모델이 연구되고 있다²³⁾. 정상 상피의 경우 결합조직 부위를 재생하기 위하여 기증된 사체에서 만들어진 de-epithelialized dead epidermis가 이용되기도 하였으나²⁴⁾, 이는 재료가 제한되고 일관된 실험 결과를 얻기 어렵다는 점 때문에 최근에는 제1형 교원질을 이용한 연구 모델의 개발이 활발히 이루어지고 있다²⁵⁻²⁶⁾.

그러나 치주영역에서는 1997년 Tomakide 등이 처음으로 일차배양한 치은세포와 구강상피세포를 이용하여 organotypic culture를 처음으로 시도하였으나²⁷⁾ 치은 섬유아세포를 이용한 삼차원적 연구는 많이 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구는 제 1형 교원질과 치은섬유아세포를 이용한 인공 결합 조직과, air-liquid interface를 유지할 수 있는 배양조건을 제공하는 organotypic raft culture를 이용하여 stratification 동안 광학 현미경을 통한 형태학적 특성을 비교 분석하고 상피세포의 분화과정에서 gap junction을 확인하기 위해 connexin-43을, 상피분화를 위해 involucrin, 상피방어체계의 확인을 위해 HSP70에 대한 면역조직화학적 염색을 통해 비교 연구하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 사람 치은 각화 상피세포(normal human gingival keratinocyte; 이하 NHOK표기) 배양

교정치료를 목적으로 발거한 건강한 제1소구치의 치은연조직을 채취하여 300unit/ml penicillin, 300 μ g/ml streptomycin, 1.5 μ g/ml amphotericin-B가 포함된 HBSS(Gibco, Grand Island, New York, USA)으로 5회 세척한 후 dispase(grade II; 2.4mg/ml, Boehringer, Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로 60분간 5% CO₂가 포함된 37℃ 배양기에 넣어 하방 결합조직으로부터 상피를 분리하고 단일세포로 용해하기 위해 trypsin에 60분간 37℃에 처리하여 이를 PBS로 세척하고 Keratinocyte Growth Medium(KGM, supplement with pituitary extract, Clonetics, San Diego, CA USA)에 resuspend하여 60mm배양접시에 5 \times 10⁴농도로 배양하였다. NHGK가 증식되어 완전히 배양접시를 덮는 단층이 형성되면 0.05% Trypsin/0.02% EDTA로 처리하여 배양접시로부터 세포를 박리하고 1:3으로 계대배양하여 이 시험에서는 3-4세대의 세포를 사용하였다.

2. 치은 섬유아세포 (Human Gingival Fibroblasts, 이하 HGF로 표기) 배양

교정치료를 위하여 내원한 환자로부터 발거한 건강한 치은조직을 채취하기 위하여 항생제가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(Gibco/BRL, 이하 DMEM으로 표기)을 생검배지로 준비한 후 제일 소구치 부위에 내사면 절개를 가한 다음 건강한 치은 조직을 채취하여, 채취된 시편들을 생검배지로 3회 세척 후 치은조직을 세절한 다음 35mm배양접시에 고르게 분포시킨 후 10% Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco/BRL)과 100unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM을 넣고, 37℃, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합배양기에서 배양하였다.

치은섬유아세포가 조직절편으로부터 증식되어 완전히 배양접시를 피개하는 단층이 형성된 후 100mm 세포 배양용 접시를 이용하여 계대 배양하였다. 본 실험에서는 성장 특성을 명확히 비교하기 위하여 동일 환자, 동일 세대의 세포를 이용하였으며 5세대 이상의 세포는 사용하지 않았다.

3. 삼차원 배양을 위한 진피 유사체(dermal equivalent)의 제조

진피 유사체 (dermal equivalent) 제조를 위해 사용되는 섬유 세포는 일차 배양된 치은 섬유아 세포를 사용하였다. 확립된 구강치는 조직 세포의 삼차원 재건을 위해 제 1형 교원질 (pH 3, Nitta Gelatin, Japan)을 이용하며 이를 중화 완충 용액 (2.2% NaHCO_3 , 0.05N NaOH , and 200mmol/L HEPES)과 10배의 DMEM/F12 농축 배지를 8:1:1의 비율로 혼합하고, 진피 세포로는 구강 치은 섬유세포를 이용하였다. 치은 섬유아 세포는 제 1형 교원질에 $1.2 \times 10^5/\text{ml}$ 의 농도가 되도록 혼합하여 gel matrix에 섬유 세포가 균일하게 분포하게 하여 반지름 12mm의 0.2 μm pore size membrane으로 제작된 millicell에 casting 한후 37°C 배양기에서 12시간 이상 중합과 수축이 일어나도록 하였다.

4. 구강점막치은상피의 삼차원 배양

계대 배양중인 치은 구강상피를 PBS로 3회 세척 후 0.125% Trypsin-EDTA를 처리하여 모은 후 원심 분리하여 hemocytometer로 세포수를 측정하였다. 상피 세포는 6-well plate에 내부에 위치한 millicell의 각 well 당 3×10^5 개의 세포가 되도록 분주하였고, 바깥쪽은 DMEM과 F12가 3:1 비율로 혼합되고 100IU/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 0.6mg/ml L-glutamine과 함께 10% FBS가 포함된 배지 3ml를 넣어 주어 5% CO_2 , 37°C 배양기에서 배양하였다. 배지는 2-3일 간격으로 교환하였고, 5일 후에는 상피세포 상층부의 배지를 제거하여 상피 세포가 대기에 노출되도록 하여 3일, 5일, 10일간 추가 배양하여, 10% 중성 포르말린에 고정하였다.

5. 삼차원 배양된 구강 치은 조직의 형태학적 특징 분석

제 1형 교원질 상에서 배양된 구강 조직은 10% 중성 포르말린에 12시간 이상 고정하고 통법에 의해

파라핀에 포매한 후 4 μm 의 연속 절편을 H/E, PAS 염색하여 광학 현미경에서 세포의 분화도, 각질 형성 등의 소견을 관찰하고 비교 검토함으로써 삼차원적 배양이 생체 조건과 유사한 배양 환경을 제공했는지를 판별하였다.

6. 면역조직화학 염색

파라핀 포매된 절편들은 xylene으로 탈파라핀화하였으며 증류수로 재 수화하였고 내인성 peroxidase에 의한 artifact를 피하기 위해 절편들을 실온에서 15분 동안 3% H_2O_2 의 ice cold solution으로 반응시킨 후 tris-buffered saline(TBS)로 5분 동안 세척하였다. blocking serum으로 normal rabbit serum을 30분간 적용시켰다. HSP 70(Santa Cruz, USA)은 1/60로 희석해, connexin43(Bioscience Co, USA)은 1/30으로, involucrin(Biomedical Tech, USA)은 1/100 일차항체를 30분간 반응시킨 다음 TBS로 5분 동안 3회 세척한 후에 link antibody(anti-mouse IgG, Dako, USA)를 20분간 반응시켰다. 그 후 streptavidine alkaline phosphatase로 30분간 반응시킨 후 aminoethyl carbazole(AEC)로 발색시키고 Harrison hematoxylin으로 대조 염색하여 glycerin으로 도포 후 검정하였다. 염색된 조직표본에서 각각의 항체에 대한 양성반응을 상대적인 발현 정도에 따라 세포들의 90%이상, 30-90%, 5-30%, 그리고 5%미만이 양성으로 염색되었을? 각각 심도(+++), 중등도(++), 경도(+), 경미(±), 음성(-)으로 구분하였으며, 상피에서는 기저층, 상기저층, 유극층, 천층의 4층으로 분류하여 계측하였다.

III. 연구결과

1. 치은 각화상피와 섬유아세포를 이용한 삼차원적 재건시 조직학적 형태

정상 구강각화세포를 배양한 진피 대체물에서 관찰되는 결체조직 구조는 건전한 상태이었으며 간질 핵세포의 대부분은 열게 염색되고, 난원 또는 둥근세

포로 Fig. 1에서는 $\times 100$ 시야에서 20-30개 정도 관찰되었지만 중층화(stratification) 되는 과정 기간에 따른 결체조직 차이 또는 변화는 없었다(Fig. 1, Fig. 3).

제 1 형 교원질과 치은 섬유아 세포로 구성된 진피 유사체상에서 배양된 치은조직 세포는 배양 10일의 경우 정상적 성숙과 stratification 즉 5-10층의 중층화를 이루며 성장하였고 표층에는 각질이 뚜렷한 형성을 보였으며 상피형태 구조도 유지되었지만 결체 조직내로의 침윤은 없어 정상적인 치은 조직구조를 관찰할 수 있었다(Fig. 2, Fig. 3).

배양 5일째에는 이런 상피층의 수가 3-6층으로 감소되었으나 표층의 각질은 유지되었고, 상피의 형태 구조가 유지되어있으나, 배양 3일에는 상피구조가 국소적으로는 관찰되어도 전반적인 형태유지가 잘 이루어지지 않았으며, 상피층의 두께도 2-4층밖에는 없었다(Table 1).

2. 삼차원 배양된 구강 조직의 상피분화, 세포간 전달, 방어의 확인 표지자

구강 각질세포의 삼차원적 배양기간에 따른 중층화 변화를 알기 위해 표지자에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 air-exposure 배양 기간에 따른 비교를 하였다. 상피 세포의 각질 분화 표지자인

involucrin은 배양기간에 관계없이 모두에서 각질 분화가 관찰되는 부위에서 발현하고 있었지만, 기저층과 표층의 구분은 없었다(Fig. 4, Fig. 7)

상피방어 표지자인 HSP는 Fig. 5와 8에서 처럼 삼차원적 재건 상피의 전층에서 특히 기저층에 집중해서 발현되고 있었고 중층화 기간에 따른 변화는 미약해 10일과 5일은 심도의 발현을 3일은 상피층의 형성이 제대로 이루어지지 않았어도 중등도의 발현을 보였다.

세포간 전달물질인 connexin 43은 Fig. 6와 Fig. 9에서와 같이 발현정도가 매우 미약하였으며 주로 상피기저층을 중심으로 경미한 발현을 보였는데 배양기간의 중층화동안 변화는 없었다.

IV. 고찰

치주질환이 중증으로 진행되면 치주인대의 파괴는 물론 치조골의 흡수와 치아의 동요가 심화되고 궁극적으로 치아의 상실을 초래하게 된다. 따라서 치주치료의 주된 목적은 질환의 진행을 중지시키고 파괴된 치조골을 회복시키며 치아와 치조골 사이의 부착을 재생시키는데 있다. 일반적으로 치주치료에 따른 치유과정은 시술 후 초기단계에서는 결손부주위로 섬유아세포가 이주하고 증식하며, 이들 세포내

Table 1. Histological findings of three-dimensionally cultured oral keratinocyte & gingival fibroblasts during stratification

	Epithelial layer	Keratinization in superficial layer	Epithelium Architecture
air-exposure 3 days culture	5-10	+	+
5 days culture	3-6	+	+
10 days culture	2-4	+/-	+/-

+ : positive, - : negative, +/- : focal

Table 2. Comparison between immunohistochemical findings of raft culture

	Involucrin	HSP70	Connexin 43
air-exposure 10 days culture	+	+++	+/-
5 days culture	+	+++	+/-
3 days culture	+	++	+/-

+ : positive, - : negative, +/- : focal

에서 교원섬유와 기질이 합성되는 동시에 신생 백악질 형성으로 치면과 재생골에 교원섬유가 함입하여 신부착이 형성됨을 의미한다²⁸⁾.

구강 점막을 포함한 치주염의 발생과정은 전형적인 다단계 모델을 따르게 되지만 이러한 생체실험에서는 재생에 관계되는 특정세포나 일련의 순서, 생화학적인 매개체에 관하여 정확히 규명하기가 어려웠다. 이후에 생체실험과 병행하여 세포의 성상을 규명하기 위한 치주인대세포와 치은 섬유아세포에 관한 시험관적인 많은 연구가 이루어졌다¹⁰⁻¹⁶⁾.

세포 배양을 이용한 시험관내 실험은 생물학적 복잡성을 최소화 할 수 있는 장점 때문에 최근 가장 많이 사용되는 연구 방법이다. 그러나 지금까지의 상피 배양 연구가 증식 유도에 의한 상피 재생에 초점을 맞추어져 있어 상피 세포와 주변 조직과의 유기적인 관계를 재생해 주지는 못하였다. 즉 세포 배양을 이용한 연구 방법이 계속 발전하여 세포가 성장하는데 필요한 영양소, 호르몬 등을 충분히 제공함으로써 세포의 증식을 유도하고, 분화나 apoptosis를 유도하는 약제의 투여에 의해 세포의 변화를 연구하는 방식을 취해왔다.²⁹⁾ 그러나 생체 내에서의 세포는 단일 층만을 형성하지는 않으며 주변 기질 세포나 세포의 기질과의 반응과 상호 작용을 통하여 증식과 분화를 조절하게 되므로 단일층(monolayer)만을 형성하는 종래의 배양 방식(culture system)을 이용한 연구 방식은 한계가 있어 왔다^{20,30)}. 즉 생체와 유사한 조건을 제공함으로써 생체 조직과 유사한 특성을 갖는 모델을 만들려는 시도가 계속되어 왔으며 종래의 배양 방식은 결체 조직층이 없고, 세포간의 직접 신호 전달체계가 단절되어 있었다.

이러한 문제를 해결하기 위해 배양 접시 바닥에 laminin, type IV collagen 등의 세포외 기질을 도포하는 방법이 소개되기도 했으나 상피 세포의 부착과 증식에는 도움이 되지만 분화의 유도나 중층 형성(stratification)은 이루어지지 않았다²³⁾. 포유 동물의 발생 과정 뿐만 아니라 성인 조직이 정상 기능을 수행하는데 있어서도 상피와 결체 조직간의 상호 작용(epithelial-mesenchymal interaction)의 중요성은 이미 널리 알려져 왔으나 이러한 개념이 세포 배양에

적극적으로 도입되지는 않았다^{21, 24)}.

1979년 Bell 등이 collagen lattice를 이용한 배양상피 제조법 삼차원적 배양법을 처음 소개한 후 이에 대한 본격적인 연구가 이루어져 왔다.³¹⁾ 처음에는 dead de-epidermized dermis(DED)를 이용하여 상피하방에 결체 조직을 제공하였으나,¹⁸⁾ 최근에는 실험의 간편성과 재현성을 위해 제 1형 교원질과 섬유세포로 구성된 진피 유사체(dermal equivalent)를 이용한 방법이 선호되고 있다¹⁹⁾. 최근까지 실험 방법의 많은 개량을 통해 거의 정상 상피와 유사한 형태학적, 생리-화학적 특성을 갖는 상피의 재생이 가능하게 되었고, 이를 이용하여 상피 역학, 생화학적 물질에 의한 상피 세포의 분화-증식 유도, 종양 형성 기전 연구, 상피 조직내의 바이러스 증식 및 역학 연구, 배양 상피의 외과적 수복과 약리학적 효과와 기전 연구^{34,35)} 등의 수많은 분야에 응용되고 있다.³²⁻³⁵⁾ 따라서 치주질환의 치료법을 개발하기 위해서는 한국인 고유의 세포주 확보와 이를 이용한 실험실 모델을 확립하는 것이 필수적이라고 생각되며 본 연구에서도 organotypic culture를 통하여 단층배양과는 달리 중층의 조직을 얻을 수 있었고, 진피 유사체 상에서 삼차원 배양된 구강 각화 세포는 중층화, 각화층형성, 상피형태 유지를 관찰할 수 있어 치은 조직과 유사한 형태학적 특징을 가졌다.

본 연구에서는 제 1형 교원질과 치은 섬유아세포로 구성된 dermal equivalent 상에서 확립된 구강각화세포를 이용하여 삼차원 배양을 시도하였다. air exposure 3일을 제외한 대부분의 구강 세포는 dermal equivalent 상에서 배양하였을 때 5일 이후에는 중층화가 이루어 본 실험에서 사용한 모델이 치은 섬유아세포와 구강각화상피를 이용하여 삼차원적 조직을 얻는데 효과적임을 알 수 있었다.

최근 상피세포를 이용하여 본 연구와 같은 organotypic 세포 배양법으로 삼차원 배양하였을 때, dermal equivalent에 사용한 섬유 세포의 종류에 따라, 즉 종양에서 유래한 섬유 세포를 사용했을 때 정상 점막의 섬유 세포를 사용했을 때 보다 종양 세포의 중층화와 분화와 침윤이 잘 일어난다는 보고가 있어, 삼차원 배양시 섬유 세포의 중요성이 부각되어 있

다. 즉, 유방 암조직 주변의 섬유 세포는 진피 유사체 내의 중앙에서 유래한 중앙 세포가 정상조직에서 유래한 섬유 세포와는 달리 중앙 세포의 침윤성 성장을 촉진한다는 것이다. 이러한 차이는 중앙 세포와 섬유세포간의 상호 정보 교환(cross-talking)의 차이에서 기인한다고 하였으나 정확한 기전을 제시하지는 못하였다^{36, 37)}. 본 연구에서는 치은에서 생검하여 일차 배양한 섬유 세포를 사용하였을 때 삼차원 배양된 구강점막 조직은 형태학적으로 중층화에 따른 배양 5일과 10일에서는 상피층의 층 수를 제외하고는 양태에 있어 큰 차이를 보이지 않았다.

섬유세포와 상피사이의 직접 접촉은 세포간 소통의 또 다른 결정인자이며, 세포직접접촉이 기질막의 성장 표시효과에 필수적이라고 하였고, 각화상피세포와 섬유세포의 직접세포접촉은 IL-6의 과생산을 유발한다고 하였다³⁸⁾. 이는 섬유세포의 plasma membrane과의 경계에서 각화상피세포의 성장 인자에 의존하여 또한 이러한 효과를 위해서는 직접상피접촉이 요구된 결과이다. 그러나 생체 조직에서는 암종이라할지라도 비록 불규칙하게나마 기저막이 존재하여 암종 세포와 섬유세포의 직접적인 접촉은 거의 없다. 따라서 섬유세포와 상피 세포의 직접적인 접촉이 더 중요하다는 연구 결과는 임상적으로 중요성이 떨어지고, 본 연구에서와 같이 교원질 내에 섬유세포를 포함시키는 것이 더 유용한 연구 모델이 될 수 있을것으로 생각한다.

생체상태와 아주 유사함에도 불구하고 organotypic raft system은 정상피부와 비교하여 약간의 결함이 있는바, 기저막의 재생이 어렵다는 점이다³⁹⁾. 최근 정상 구강 점막 세포에서 제4형 교원질과 laminin의 적절한 공급으로 보다 완벽한 기저막의 재생이 유도된다고 알려져 있지만, 아직 침윤성 성격이 강한 중앙 세포를 대상으로 삼차원 배양하여 기저막이 형성되었다는 보고는 없어 organotypic culture는 상처회복과정중의 피부와 유사한 모델로 간주하기도 하지만, 최근 상피세포와 기저막으로 구성된 미세환경(microenvironment)의 중요성이 부각되고 있어 이 분야에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

각질형성세포는 정상적으로 증식과 분화가 서로

조화를 이루어서 표피를 일정하게 유지한다. 정상피부나 구강상피에서는 분화가 계속됨에 따라 과립층과 같은 표피 상층부에서는 과립층의 keratohyaline granule이 filaggrin으로 되며, 핵, 미토콘드리아등의 세포 소기관들이 소실되고 각질소체가 출현하는데, 이는 세포간격으로 분비되어 표피 투과성의 장벽대로 작용한다. 각질형성세포가 이렇게 각화세포로 분화되어가면서 최종단계에서는 원형질막내에 각화세포외막(cornified cellular envelope)이라 불리는 구조물이 형성되는데 여기에는 Ca⁺⁺ 의존성 transglutaminase가 작용하며 involucrin이나 loricrin과 같은 전구 단백질이 기질로 사용된다. 따라서 면역조직화학적 염색시 정상피부에는 involucrin, loricrin이 과립층에 발현되며 유극층 상부에도 involucrin이, loricrin은 각질층에도 발현된다^{40, 41)}. 본 연구방법과 동일한 피부상피 삼차원적 배양에서도 involucrin은 모든 상피층에서 기저층까지 발현된다고 하였는데⁴¹⁾, 구강상피를 이용한 본 연구 연구와도 동일한 소견으로 상피층간에 발현 구분은 되지 않았다.

또한 특히 치은 구강각화상피 세포의 삼차원적 배양시 세포주에서는 플라스크에서 배양할 때 전혀 발현되지 않는다고 알려진 involucrin이 발현하여, 제 1형 교원질과 섬유아 세포로 이루어진 dermal equivalent가 구강각화 세포의 적절한 분화를 유도함을 보여준다.

열충격단백질(Heat Shock Protein)또는 스트레스 단백질(이하 HSP)은 세포가 여러 다양한 자극에 노출될 때 생성되어지는 일종의 단백질이다⁴²⁻⁴⁷⁾. 과거에는 열충격단백질은 온도가 갑자기 상승했을 때 세포에서 합성되어지는 단백질로 생각되었으나 그후 고온이외에도 비소와 같은 에너지 대사의 억제제, oxygen free radicals, 자외선 조사, 알콜, adriamycin과 같은 화학요법에 사용하는 약제들, DNA바이러스의 감염, interleukin-2 등이 열충격단백질을 합성할 수 있는 자극으로 밝혀짐에 따라 스트레스 단백질이란 용어가 도입되었다⁴⁸⁾.

세포내 열충격단백질의 생물학적인 역할은 아직 명확하지 않은데 이들의 기능 중의 하나는 스트레스에 의해 손상된 단백질을 안정화시키는 작용을 한다

고 제시되고 있다⁴⁹⁾. 열충격단백질은 면역반응과도 밀접한 관계를 가지고 있는데 interleukin-2나 interferon과 같은 사이토카인이 HSP를 유도하거나 조절할 수 있으며^{50,51)} 고온충격단백질의 보존성 때문에 일부 병원균은 숙주 침입시 이들 단백질을 항원으로 인지하는 많은 항체와 T림프구를 유도해 내기도 한다⁵²⁾.

열충격에 의해 유도되는 유전자들로부터 발현되는 포유동물의 단백질은 대략적인 분자량에 따라 각 유형을 명명하여 ubiquitin, small HSP족, HSP 60족, HSP 70족 및 HSP 90족등으로 분류할 수 있는데 이중 가장 많이 연구된 것이 HSP70족이다⁵³⁾. HSP 70족은 세포내에서 단백질의 folding과 assembly를 매개하며 단백질의 변성을 방지시키거나 변성된 단백질을 재생하는데 관여한다고 보고되고 있다⁵⁴⁾.

치주인대에는 섬유아세포, 조골세포, 파골세포, 조백악세포 및 그 전구세포들이 다양한 분화정도로 혼합되어 있고⁵⁵⁾, 치근막에서 유래한 섬유아세포는 경조직과 연조직을 조절하는 역할을 할 것으로 여겨지는데 외과적 혹은 병리적 손상 후, 재생이나 수복하기 위해 체계화된 특정 단백질성분을 합성하고 증식하는 것으로 보고되고 있고 HSP는 동물실험에서 열 상태에서 합성되는 것으로 보아 염증과 관련이 있는 것으로 보고되기 시작하고 있다⁵⁶⁾.

치주조직내에서 HSP 발현양상에 관한 연구는 아직까지 미비한 실정이다. HSPs의 정확한 기능이 완전히 이해된 것은 아니지만 세포가 oxygen free radical과 같은 환경적 스트레스뿐만 아니라 상승온도에 노출되었을 때 살아남기 위하여 HSPs가 필수적이라고 보고되고 있다⁵⁶⁾.

HSP에는 여러 종류가 존재하는데 HSP의 분자량에 따라 명명되었고 진핵생물에서의 경우 HSP110, HSP95 HSP84—HSP70, HSP60, small HSP등은 보통 세포에서도 존재하다가 자극을 받으면 그 양이 증가하는 반면 HSP70은 자극을 받았을 때에만 급격하고 민감하게 반응하여 상당한 양의 증가를 보이고 회복 시기에는 가장 먼저 감소한다^{57, 58)}.

인간 치주인대세포에서 43°C의 열, sodim arsenite, 등에 의해서 HSP가 발현되며 치주질환같은 염증시

조직보호 역할을 할 수 있다고 보고하였는데^{59, 60)} 인공적인 피부 재건시 HSP 70이 세포손상, 조직상태를 평가할 수 있는 중요한 표지자라고 하였고⁶¹⁾ 본 연구에서는 HSP는 삼차원적 재건 상피의 전층에서 특히 기저층을 중심으로서 발현되고 있었고 중층화 기간에 따른 변화는 미약하였다. HSP의 기능중의 하나인 세포성 스트레스의 발현지표로 볼 수 있어 면역염색에 따라 상피층에서 HSP가 발현 한다는 것은 향후 치은의 혈관내피를 통한 백혈구 이주뿐 아니라 치은 열구내에 있는 상피를 통한 이주에도 관여하여 치주 질환에 대한 국소적인 방어벽을 이룰 수 있다고 여겨진다.

Intercellular communication은 용해인자를 분비하거나, cell adhesion molecule을 통한 직접세포대 세포접촉에 의하거나, gap junction을 통해 metabolic 또는 electric coupling을 통해서 일어날 수 있다⁶²⁾. Gap junction은 인접세포를 연결해주는 세포막내 특정부위로서 cAMP, inositol triphosphate, Ca⁺⁺같은 second messenger를 포함한 소분자 및 이온들이 양방향성 운동을 하기위한 통로를 제공해준다. Functional gap junction channel은 connexin이라 불리는 6 homologous integral membrane의 쌍으로 이루어져 있고 종에 따라, 또는 세포특이성을 보이며 발현되었다⁶³⁾.

Connexin 43은 심장조직에서 1988년 처음으로 분리되어 신장, 뇌, 난소, 평활근, 상피등에서 확인이 되었다^{63, 64)}. RNA hybridization이나 immunodetection연구로 Cx43이 connexin중 가장 풍부하며 널리 분포하는 것으로 보고되었고⁶⁴⁾, 인간 피부에서는 Cx43이 유극층에서 발현히 되며 가장 분화가 많이된 상피층에서는 Cx43 단백질이 거의 결여되었다고⁶⁵⁾ 하였으나 본 연구에서는 구강점막을 삼차원적으로 재현하였지만 Cx43은 발현정도가 매우 미약하였으며 주로 상피 기저층을 중심으로 경미한 발현을 보였는데 배양 기간의 중층화 동안 변화는 없었으나 상피분화동안 미약하나마 Cx43이 관련되는 것으로 여겨진다.

결론적으로 본 실험의 결과는 제 1형 교원질과 치은 섬유아 세포로 구성된 진피 유사체상에서 구강

각화상피 세포를 air-liquid 접촉면에서 삼차원 배양하였을 때 조직학적 소견상 치은 생검조직과 유사한 형태학적 특징을 보이며, 면역조직화학 염색에서 세포전달, 방어체계와 분화가 평형을 이룬 조직임을 알 수 있어, 이러한 결과는 삼차원적 배양 모델이 기존의 평면 단층 배양에 비해 보다 생체와 유사한 미세환경을 제공함을 보여주었다. 향후 이러한 연구 모델은 상피-결체 상호작용, 치은염의 생체의 모델개발 및 치주 치료제 개발등에 응용될 수 있을 것으로 생각하며, 이를 위한 체계적이고 지속적인 연구가 필요할 것이다.

V. 결론

결체조직과 상피 세포간의 상호 작용은 세포의 성장 및 분화에 중요한 요소로 작용한다. 포유 동물의 발생 과정뿐만 아니라 성인 조직이 정상 기능을 수행하는데 있어서도 상피와 결체조직간의 상호작용의 중요성은 이미 널리 알려져 왔으나, 이러한 상피-결체 조직 상호간의 조절과정을 실험실에서 재현할 수 있는 연구 모델은 많지 않다.

이에 본 연구에서는 제 1 형 교원질과 치은 섬유세포로 구성된 진피 유사체와 함께 air-liquid interface 환경을 제공하는 organotypic raft culture를 시행하여 생체와 보다 유사한 조건을 만들 수 있는 치은조직의 삼차원적 재생 방법을 확립하고 이의 형태학적, 면역조직화학 염색을 통해 중층화 기간에 따른 비교 분석함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 진피 유사체 상에서 삼차원 배양된 구강 각화 세포는 중층화, 각화층형성, 상 피형태 유지를 관찰할 수 있어 치은 조직과 유사한 형태학적 특징을 가졌다.
2. 삼차원적 결체조직 구조는 건전한 상태이었으며 중층화(stratification) 되는 과정 기간에 따른 결체조직 차이 또는 변화는 없었다.
3. 삼차원적 배양 기간이 길수록 상피의 정상적 성숙과 상피층의 수도 증가하였지만 각질형성은

차이가 없었다.

4. 상피 세포의 각질 분화 표지자인 involucrin은 배양기간에 관계없이 모두에서 각질 분화가 관찰되는 부위에서 발현하였다.
5. 상피방어 표지자인 HSP는 삼차원적 재건 상피의 전층에서 특히 기저층을 중 심으로서 발현되고 있었고 중층화 기간에 따른 변화는 미약하였다.
6. 세포간 전달물질인 connexin 43은 발현정도가 매우 미약하였으며 주로 상피 기저층을 중심으로 경미한 발현을 보였는데 배양 기간의 중층화 동안 변화는 없었다.

이상의 결과로 제 1 형 교원질과 섬유모세포로 구성된 진피 유사체상에서 정상 구강상피를 air-liquid 접촉면에서 삼차원 배양하였을 때 조직학적 소견상 치은조직과 유사한 형태학적 특징을 보이며, 면역조직화학 염색에서 증식과 분화가 평형을 이룬 조직임을 알 수 있었다. 따라서 삼차원적 배양 모델이 기존의 평면 단층 배양에 비해 보다 생체와 유사한 미세환경을 제공함을 보여주었다. 향후 이러한 연구 모델은 치은염의 생체의 모델개발, 치주 치료제, 상피-결체 상호작용 등에 응용될 수 있을 것으로 생각하며, 이를 위한 체계적이고 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

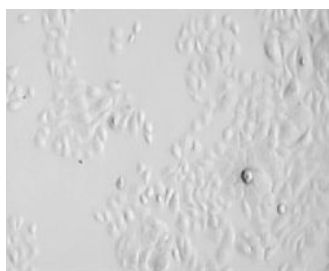
1. Carranza FAJr. Glickman's Clinical Periodontology. WB Saunders Company 7th Edi, 1990.
2. Hancock EB. Regeneration procedures. Proceedings of the world workshop in clinical periodontics. The American Academy of Periodontology. Discussion Section VI 1-26, 1989.
3. Caffesse RG:Resective procedures. Proceedings of the world workshop in clinical periodontics. The American Academy of Periodontology.

- Discussion Section VI 1-27, 1989.
4. Bowers GM, Schallhorn RG, Mellonig JT : Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defect. A literature review. *J Periodontol* 53:509-514, 1982.
 5. Melcher AH : Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Archs Oral Biol* 15: 1183-1204, 1970.
 6. Melcher AH : On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 47: 256-260, 1976.
 7. Boyko GA, Melcher AH, Brunette DM : Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. *J Periodontol Res* 16L 73-88, 1981.
 8. Polson AM, Caton J : Factors influencing periodontal repair and regeneration. *J Periodontol* 53: 617-625, 1982.
 9. Isidor F, Karring T, Nyman S, Lindhe J : The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. *J Periodontol* 13:145-150, 1986.
 10. Arnold LF, Baram P : In vitro culture of periodontal ligament cells. *J Dent Res* 1:953-959, 1972.
 11. Marmary Y, Brunette DM, Heersche JNM : Differences in vitro between cells derived from periodontal ligament and skin of *Macaca Iruis*. *Archs Oral Biol* 21:709-716, 1976.
 12. Brunette DM, Melcher AH, Moe HK : Culture and origin of epithelium-like and fibroblast-like cells from porcine periodontal ligament explants and cell suspension. *Archs Oral Biol* 21: 393-400, 1976.
 13. Brunette DM, Janoza RJ, Marmary Y, Chan J, Melcher AH : Interactions between epithelial and fibroblast-like cells in cultures derived from monkey periodontal ligament. *J Cell Sci* 27: 127-140, 1977.
 14. Brunette DM, Heersche JNM, Purdon AD, Sodek J, Moe HK, Assuras JN : In vitro cultural parameters and protein and prostaglandin secretion of epithelial cells derived from porcine res of malassez. *Archs Oral Biol* 24: 199-203, 1979.
 15. Blomlof I, Otteskog P : Composition of Human Periodontal Ligament Cells in tissue Culture. *Scand. J Dent Res* 89: 43-47, 1981.
 16. Ragnarsson B, Carr G, Daniel JC : Isolation and growth of human periodontal ligament cells in vitro. *J Dent Res* 64: 1026-1030, 1985.
 17. Levine JF, Stockdale EF. Cell-cell interactions promote mammary epithelial cell differentiation. *J Cell Biol* 100: 1415-1422, 1985.
 18. Boyce ST, Hansbrough JF. Biologic attachment, growth, and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes on a graftable collagen and chondroitin-6-sulfate substrate. *Surgery* 103: 421-431, 1988.
 19. Shahabeddin L, Berthod F, Damour O, Collombel C. Characterization of skin reconstructed on a chitosa-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix. *Skin Pharmacol* 3: 107-114, 1990.
 20. Prunieras M. Recent advances in epidermal cell cultures. *Arch Dermatol Res* 264: 243-247, 1979.
 21. Peault B. In-vitro models of stroma-dependent lymphopoiesis. *Semi Immunol* 7: 169-157, 1995.
 22. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240: 177-184, 1988.
 23. Tiollier J, Dumas H, Tardy M, Tayot JL. Fibroblast behavior on gels of type I, III, and IV human placental collagens. *Exp Cell Res* 191: 95-104, 1990.
 24. Hoffman RM. Three-dimensional histoculture: origins and applications in cancer research,

- Cancer Cell 3: 86-92, 1991.
25. Robbins KT, Connors KM, Storniolo AM, Hanchett C, Hoffman RM. Sponge-gel supported histoculture drug response assay for head and neck cancer. Correlations with clinical response to cisplatin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 120: 288-292, 1994.
 26. Robbins KT, Varki NM, Storniolo AM, Hoffman H, Hoffman RM. Drug response of head and neck tumors in native-state histoculture. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 83-86, 1991.
 27. Tomakide P, Fusenig NE, Kohl A, Komosch. Histomorphological and biochemical differentiation capacity in organotypic co-culture of primary gingival cells. *J Periodont Res* 32:400, 1997.
 28. Naraynan AS, Nakae H, Miki Y : Biology of the gingiva : The connective tissue in health and disease and molecular aspects of periodontal regeneration a reattachment. *Recent Advances in Clinical Periodontology*. Elsevier Science Publishers 51-61, 1988.
 29. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-343, 1975.
 30. Mendelsohn MG, Dilenzo TP, Abramson AL, Steinberg BM. Retinoic acid regulate in vitro. the two normal pathways of differentiation of human laryngeal keratinocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A: 137-141, 1991.
 31. Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contractio of collagen lattices by human fibroblast of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76; 1274-1279.
 32. Choi YS, and Fuchs E. TGF alpha induces collagen degradation and cell migration in differentiating human epidermal raft cultures. *Cell Regul* 2: 613-662, 1991.
 33. Oda D, Savard CE, Eng L, Lee SP. The effect of N-methyl-N'-mitrosoguanidine (MNNG) on cultured dog pancreatic duct epithelial cells. *Pancreas* 12: 109-116, 1996.
 34. Otto WR, Nanchahal J, Lu QL, Boddy N, Dover R. Survival of allogenic cells in cultured organotypic skin grafts. *Plastic Reconst Surg* 96: 166-176, 1995.
 35. Garlick JA, Taichman LB. Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab Inv* 70: 916-924, 1994.
 36. Dotto GP, Moellmann G, Ghosh S, Edwards M, Halaban RJ. *Cell Biol* 109, 3115-3128. 1989.
 37. Vescio RA, Redfern CH, Nelson TJ, Ugoretz S, Stern PH, Hoffman RM. In vivo-like drug responses of human tumors growing in three-dimensional, gel-supported, primary culture. *Proc Natl Acad Sci* 84: 5029-5033, 1987.
 38. Sarri Atula, Reidar Greman, Stina Syrjanen. Fibroblast can modulate the phenotype of malignant epithelial cells in vitro. *Exp Cell Res* 235: 180-87, 1997.
 39. Asselineau D, Bernard BA, Bailly C, Darmon M, Prunieras M. Human epidermis reconstructed by culture. Is it normal? *J Invest Dermatol* 86: 181-186, 1986.
 40. Tavakkol A, Varani J, Elder JT, Zouboulis CC. Maintenance of human skin in organ culture: role for Insulin-like growth factor -1 receptor and EGFR. *Arch Dermatol Res* 291:643-651, 1999.
 41. A new skin equivalent model: dermal substrate that combines de-epidermized dermis with fibroblasts-populated collagen matrix. *J Dermatol Sci* 23:132-137, 2000.
 42. Ashburner M, Bonner JJ. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell* 17:241-5, 1979.
 43. Burdon RH. Heat shock and the heat shock proteins. *Biochem J* 240:313-24, 1986.

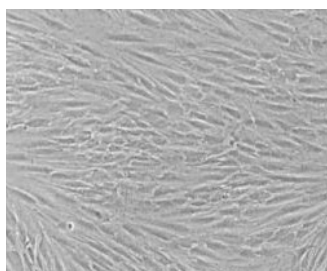
44. Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151-91, 1986.
45. Pelham H. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 46:959-61, 1986.
46. Schlesinger MJ. Heat shock proteins: The search for functions. *J Cell Biol*. 103:321-5, 1986.
47. Muramatsu T., Tada H, Kobayashi N, et al. Induction of the 72-KD heat shock protein in organ-cultured normal human skin. *J Invest Dermatol* 98:786-90, 1992.
48. Polla BS. Heat (shock) and the skin. *Dermatologica* ;180:113-7, 1990.
49. Kusher DI, Ware CF, Gooding LR. Induction of the heat shock response protect cells from lysis by tumor necrosis foactor. *J Immunol* 145:2925-31, 1990.
50. Ciocca DR. Evidence for modulation of a 24K protein in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 57:496-9, 1983.
51. Michael FP, Nancy A N-G, Amrtin B, Geoffrey LG. Estrogen receptor localization in the female genital tract. *Am J Pathol* 123:280-92, 1986.
52. Young D, Lathigra R, Hendrix R, Sweetser D. Young RA. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4276-70, 1988.
53. lindquis S, Craig EA. The heat shock proteins. *Ann Rev Genet* 22:631-77, 1988.
54. Sauchez ER, Meshinchi S, Tienrungrroj W. Relationship of the 90k-Da murine heat shock protein to the untransformed and transformed states of the L cell glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 262:6989-91, 1987.
55. McCulloch CAG : Melcher AH : Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *Am J Anat* 167 : 43-58, 1993b.
56. Polla BS. A role of heat shock proteins in inflammation?. *Immunology Today* 9:134-137, 1988.
57. Burdon RJ: Heat shock and the heat shock proteins. *Biochem J* 240, 313-324
58. Welch WJ, Suhan JP:Cellular and biochemical events in mammalian cells firing and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol* 103, 2035-2052, 1986.
59. Nagata K., Sga S. adn Yamada K. M. A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. *J Cell Biol* 103, 223-229, 1986.
60. Kurkinen M. A., Taylor A., Garrels J. I. and Hogan B. L. M. Cell surface-associated proteins which bind native type IV collagen or gelatin. *J Biol Chem* 259, 5915-5922, 1984.
61. Bowers W, Blaha M, Alkhyat A, Sankovich J, Kohl J, Wong G, Patterson D. Artificial human skin: cytokine , prostaglandin, Hsp70 and histological response to heat exposure. *J Dermatol Sci* 20: 172-182, 1999.
62. Hamblin AS Lymphokines, p1-71. Inmale(ed), In Focus, Oxford 1988.
63. Makowski L. X-ray diffraction studies of gap junction structure. In: *Advances in cell biology*. Vol 2. Miller K, editor. Greenwich, CT:Jai Press,pp. 119-158, 1988.
64. Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA. : Dirrerentia phosphorylation of the gap junction protein connexin 43 in junction communication-competent and-deficient cell lines. *J Cell Biol* 111:2077-2088, 1990.
65. Tomaki P, Cheng H, Kohl A, Komposch G. Connexin 43 expression is downregulated in raft culture of human keratinocyte exprssing the human papilloma virus 16 E5 protein. *Cell Tissue Res* 301:323-327, 2000.

사진부도 (1)



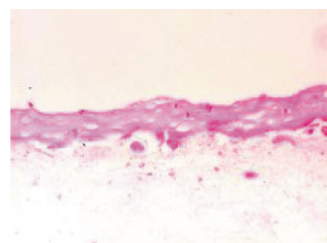
NHOK

Figure 1



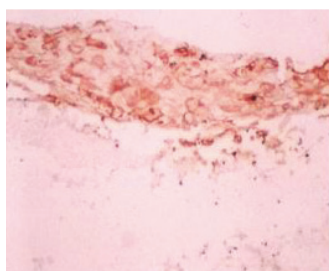
Gingival Fibroblast

Figure 2



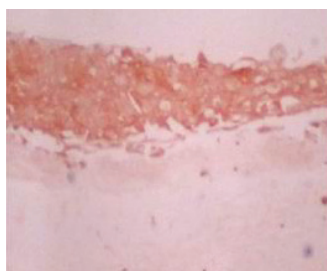
3-D culture(H&E)

Figure 3



10D-Involucrin

Figure 4



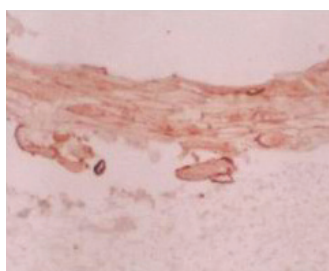
10D-HSP70

Figure 5



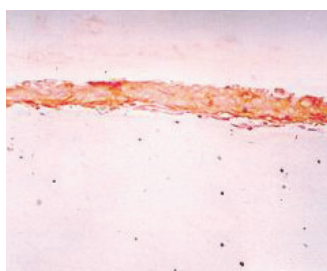
10D-Connexin 43

Figure 6



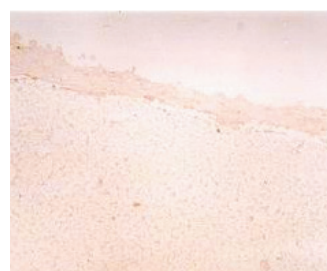
5D-Involucrin

Figure 7



5D-HSP70

Figure 8



5D-Connexin43

Figure 9

Change of Stratification of Three Dimensional Culture by Gingival Keratinocytes & Fibroblasts

Tae-Heup Jung¹, Ha-Na Hyun¹, Yun-Sang Kim¹, Eun-Cheol Kim², Hyung-Keun You¹, Hyung-Shik Shin¹

¹Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

²Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Wonkwang University

Epithelial-mesenchymal interaction plays a important role in cell growth and differentiation. This interaction is already well known to have an importance during the organ development as well as cell growth and differentiation. However, *in vitro* experimental model is not well developed to reproduce *in vivo* cellular micro-environment which provide a epithelial-mesenchymal interaction.

Because conventional monolayer culture lacks epithelial-mesenchymal interaction, cultivated cells have an morphologic, biochemical, and functional characteristics differ from *in vivo* tissue. Moreover, it's condition is not able to induce cellular differentiation due to submerged culture condition.

Therefore, the aims of this study were to develop and evaluate the *in vitro* experimental model that maintains epithelial-mesenchymal interaction by organotypic raft culture, and to characterize biologic properties of three-dimensionally reconstituted oral keratinocytes by histological and immunohistochemical analysis. The results were as follow;

1. Gingival keratinocytes reconstituted by three-dimensional organotypic culture revealed similar morphologic characteristics to biopsied patient specimen showing stratification, hyperkeratinosis, maturation of epithelial architecture.
2. Connective tissue structure was matured, and there is no difference during stratification period of epithelial 3-dimensional culture.
3. The longer of air-exposure culture on three-dimensionally reconstituted cells, the more epithelial maturation, increased epithelial thickness and surface keratinization
4. In reconstituted mucosa, the whole epidermis was positively stained by anti-involucrin antibody, and there is no difference according to air-exposed culture period.
5. The Hsp was expressed in the epithelial layer of three-dimensionally cultured cells, especially basal layer of epidermis. The change of Hsp expression was not significant by culture stratification.
6. Connexin 43, marker of cell-cell communication was revealed mild immunodeposition in reconstituted epithelium, and there is no significant expression change during stratification.

These results suggest that three-dimensional organotypic co-culture of normal gingival keratinocytes with

dermal equivalent consisting type I collagen and gingival fibroblasts results in similar morphologic and immunohistochemical characteristics to *in vivo* patient specimens. And this culture system seems to provide adequate micro-environment for *in vitro* tissue reconstitution. Therefore, further study will be focused to study of *in vitro* gingivitis model, development of novel periodontal disease therapeutics and epithelial-mesenchymal interaction.

Key words : Gingival keratinocytes, Gingival fibroblasts, Stratification, Organotypic Culture, Involucrin, HSP70, Connexin 43.