

7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene (DMBA)에 의해 유도되는 백서 타액선종양에서의 종양특이항원에 대한 연구

연세대학교 대학원 치의학과
(지도 윤 중 호 교수)

김 지 학

I. 서 론

인체 조직에 발생하는 종양의 기원과 그 진행과정을 밝혀내기 위해 여러 분야의 기초학적 연구가 오래전부터 계속되어오고 있으며, 최근 실험재료 및 실험방법의 다양한 시도를 통해, 종양의 조기 진단 및 치료, 나아가 예방에 대한 무한한 가능성을 제시해주고 있다. 특히 면역학적 관점으로 정상세포가 종양세포로 이행되는 과정에서 세포막에 나타나는 항원성이 특이하여, 숙주에 의해 이질항원, 즉 종양특이항원으로 인식될 수 있다는 Paul Ehrlich²⁶⁾의 주장이후로 그 종양특이항원의 분리정제 및 특성 규명에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

구강내 발암유도를 위한 동물실험으로는 1927년 Bonne⁹⁾에 의해 백서 구개부에서 상피암이 처음 유도되었고, 그 후 여러 학자들^{33, 59)} 이 실험적으로 구강암을 유발시켰으나, Levy⁴⁷⁾는 백서 치은에서 구강의 구조적 한계때문에 종양유도에 실패하였음을 보고하였다. 그러나 1954년 Salley⁶⁷⁾가 hamster 협낭점막에서 상피암을 성공적으로 유도한 후, 발암물질을 수용하기 용이한 해부학적 구조를 갖는 hamster 협낭이 실험대상으로 선호되어 왔으며^{27, 30, 55, 84)}, 또한 1942년 Steiner⁷⁸⁾가 생쥐, 백서, hamster 및 가토의 악하선에 화학발암제를 주입하여 편평상피암 및 선종을 유발시킨 이래, 과립성 회선관 세포(granular convoluted tubule cell)들이 잘 발달되어 타액선 종양유도가 용이한 백서의 악하선 역시 실험대상으로 많이 사용되어지고 있다^{16, 17, 19, 71, 77)}.

종양유발에 흔히 사용되는 7, 12-dimethylbenz

(a) anthracene (DMBA)은 세포내의 DNA나 RNA, 단백질과 같은 고분자와 부가물을 형성하며^{11, 12, 20, 36, 75)}, 특히 DNA에서는 deoxyadenosine이나 deoxyguanosine과 공유결합을 하고 있고^{7, 24, 25, 54, 56, 69, 70, 74, 76)}, 다른 발암제에 비해 급속히 작용하여 섬유육종보다 상피암 유발가능성이 높다⁷⁷⁾.

종양특이항원에 대한 연구에 있어 그 존재는 면역형광법⁴⁰⁾, 혼합혈구 응집반응^{38, 39, 52)}, 세포 독성 항체^{41, 80)}, 세포집락 억제반응^{41, 42)} 등으로 확인되었으며 이러한 종양특이항원을 추출해내기 위해 Baldwin등³⁾은 백서 간장암세포에 papain을, Natori등⁵⁷⁾은 생쥐의 섬유육종 원형질막에 Nonidet P-40을, Pellis등⁶¹⁾은 같은 섬유육종 원형질막에 trypsin과 3 M KCl용액을 사용하였으나, 1981년 Stevens등⁷⁹⁾은 3M KCl용액만을 사용하여 보다 완전한 형태의 종양특이항원을 분리할 수 있다고 보고하였다. 또한 종양특이항원의 임상적 응용을 위한 면역학적 연구 역시 활발하였으나^{6, 23, 52, 53)}, 아직 화학발암제에 의해 유도되는 타액선종양에서의 종양특이항원에 대한 연구는 드물어, 저자는 지용성 발암제인 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA)의 압착결정 소구(pellet)를 백서의 악하선에 직접 매식하여 그 발암과정을 육안적, 병리조직학적으로 관찰하고, 3 M KCl을 이용한 단백질 추출등의 생화학적 방법으로 종양특이항원의 출현 및 그 분자량을 구명하여 다소의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

체중 100gm 내외의 Sprague-Dawley계 정상 백

서를 암수 구별없이 280마리를 대조군과 실험군 각 140마리씩 나누어 사용하였으며, 실험기간중 시판 쥐사료(제일제당)로 사육하였다. 실험군에 사용한 발암물질은 지용성 발암제인 7, 12-dimethylbenz (a)anthracene (DMBA; Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.(Fig. 1))을 사용하였다.

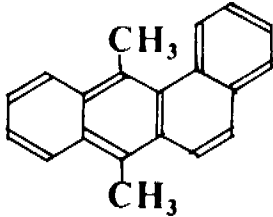


Fig. 1. 7,12-Dimethylbenz (a)anthracene (DMBA)

2. 실험방법

가. 종양의 유발

Cataldo와 Shklar¹⁵⁾의 방법에 따라 용제의 첨가없이 DMBA를 순수한 분말형태의 압착결정소구(pellet)로 만들어 실험군 우측 악하선에 매식하였다.

1) 압착결정소구의 형성

무균처리한 15-gauge 주사바늘을 자루로부터 4 mm만 남기고 절단하였다. (Fig. 2A). 그리고 절단된 4mm공간의 주사바늘속에 DMBA 분말을 세게 다져넣은 다음, 15-gauge 주사바늘에 꼭 맞는 직경(1mm)을 가진 plunger를 상하로 움직여 자루까지 넘쳐나오지 않도록 압축시켰다(Fig. 2B). 이때 4 mm만 남기고 절단한 주사침속의 균질화한 DMBA 분말의 무게는 약 5mg이었다.

2) 압착결정소구의 매식

실험군의 백서를 체중 100mg 당 0.1cc(2.5mg)의 pentothal sodium으로 복강마취하고, 목의 복면(ventral surface)의 정중부에 상하로 약 3cm정도 절개한 다음, 둔절개(blunt dissection)에 의해 우측 악하선을 노출시키고 15-gauge 주사바늘을 주입시킨 후, 주입구에 미리 준비된 절단 주사바늘을 끼워 plunger로 DMBA 압착결정소구를 밀어넣었다(Fig. 2C). 그런 후 3-0 silk로 절개부를 봉합하고 항생제를 도포하였으며, 성별에 따라 구분하여 사육하였다. 대조군의 경우 우측 악하선에 같은 조건으로 sham operation을 시행하였다. 대조군, 실험군 모두

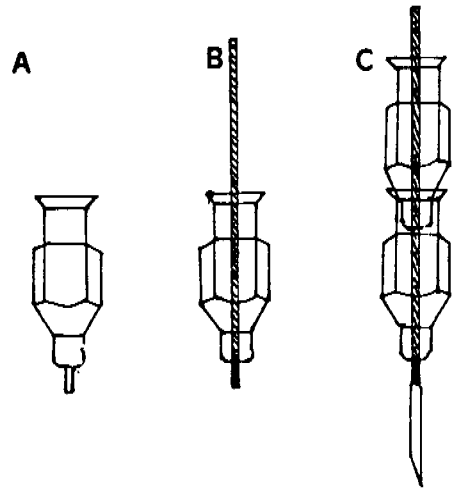


Fig. 2. Diagram showing technique of carcinogen pellet formation.

A: 15-gauge needle shortened to leave only 4mm of shaft extending from hub.

B: Shortened needle with plunger in position.

C: Shortened needle inserted into needle for transfer of pellet.

매 2주마다 10마리씩의 백서를 28주까지 회생시킨 다음 좌, 우측 악하선을 적출하여 부계를 제고, 실험군의 경우 매 2주마다 남아 있는 압착결정소구를 제거하여 무게를 측정하였다.

나. 표본 제작

전 실험기간을 통해 악하선이 있는 목 부위를 일주일에 한번씩 촉진하거나 시진하여 종양형성을 관찰하였으며 조직학적 소견을 보기 위하여 2주마다 10마리씩 회생시킨 백서에서 악하선을 적출하여 그 일부를 10% formaline 용액에 고정한 후, paraffin에 포매하여 5-7 μ 의 박절표본을 제작하고 Hematoxylin-Eosin (HE)으로 증염색하여 광학현미경용 표본을 제작 검정하였다. 또한 실험군에서 광학현미경상 종양 발생비율을 매 2주마다 측정하였다.

다. 단백질 추출 및 정량

1) 단백질 추출

백서 악하선 조직으로부터 단백질을 추출하기

위하여 Lim⁴⁶⁾의 방법을 일부 수정하여 시행하였는데, 전 실험군에서 악하선을 적출하고 묻어있는 혈액을 제거하기 위하여 생리식염수로 여러번 세척하였다. 각 군에서 얻은 악하선을 무게 측정한다음, 멸균된 수술용 가위로 잘게 절단하여 균등질 상태로 만든 후, phosphate buffered saline(PBS), pH 7.4 용액을 가하고 Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Co., Connecticut, U.S.A.)에서 SS-34 rotor를 이용하여 5,000xg로 세번 세척하고, 완충액에 녹아나오는 여러 물질과 세포질 용액을 제거하여, 남아있는 침전물에 PBS, pH 7.4 용액에 녹인 3M KCl 용액을 조직 g당 2ml씩 가하고 4°C에서 18시간 진탕하였다. 같은 원심분리기에서 SS-34 rotor를 이용하여 20,000xg에서 50분간 원침한 다음, 상층액을 Hitachi SCP 85H 초원심분리기(Hitachi Koki Co., Tokyo, Japan)에서 RP-80T-3 rotor를 이용하여 110,000xg에서 90분간 원침하여, 상층액을 4°C에서 18시간 투석하였다. 이때 500 volume의 PBS, pH 7.4 용액을 3번 교환하여 투석하였으며, 그 투석된 용액은 초원심분리기에서 동일한 rotor를 사용하여 110,000xg에서 90분간 원침시켜 상층액을 2ml씩 분주하고 -70°C에 보관하였다.

2) 단백질 정량

Bradford¹⁰⁾의 방법에 따라 단백질 추출액을 적당량(단백질 양이 10-100 µg 사이) 취하여 증류수로 100 µl 까지 되도록 조정한다음 단백질 시료 5ml를 가하고 2분후에 spectrophotometer로 595nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 용액으로는 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.) 용액을 사용하였다. 단백질 시료는 Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.) 100mg을 95% ethanol 50ml에 녹이고, 여기에 85% (W/V) phosphoric acid 100ml를 가한 후 1L까지 증류수로 희석하였다.

라. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동

Sodium dodecyl sulfate (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)를 함유한 polyacrylamide gel 전기영동은 Hahm³⁷⁾의 방법으로 slab gel을 사용하는 PROTEAN II Slab and Tube Electrophoresis Cell (Bio-Rad Lab., Calif., U.S.A.)을 사용하여 실시하였다. 분리 gel (12%, 70ml)은 monomer 용액 (30% acrylamide, 0.8% N, N'-methylenebisacrylamide

(Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)) 28.0ml, 1.5 M Tris-HCl 완충액(pH 8.8) 8.1ml, 10% SDS 0.7ml, 재증류수 23.0ml를 혼합하여 진공 펌프로 공기를 제거한 후 N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED (Bio-Rad Lab., Calif., U.S.A.)) 0.07ml, 20% ammonium persulfate 0.175ml를 첨가하여 실온에서 중합시켰다. 누적 gel (4.0%, 20ml)은 monomer 용액 2.6ml, 0.5M Tris-HCl 완충액 (pH 6.8) 2.5ml, 10% SDS 0.2ml, 재증류수 14.7ml를 넣어서 공기를 제거한 후, TEMED 0.02ml, 20% ammonium persulfate 0.05ml를 첨가하고 분리 gel위에 comb을 설치한 후 누적 gel 용액을 부어 중합시키고, comb을 영동조 완충액(0.063M Tris-0.192M glycine-0.1% SDS, pH 8.3)으로 씻었다. 단백질 시료는 시료 완충액(0.125M Tris-HCl 완충액 (pH 6.8), 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.024% bromophenol blue) 50 µl와 혼합하여 100°C에서 2분간 처리한 후 전기영동하였으며, 전기영동은 slab gel당 20mA의 일정한 전류로 4°C에서 행하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)로 18시간 방치하여 염색하였으며, 30% methanol-10% acetic acid 용액에서 탈색하였다. 분자량을 알기 위한 표준 단백질로는 bovine serum albumin(분자량 66,000), egg albumin(ovalbumin, 분자량 45,000), pepsin(분자량 34,700), trypsinogen (분자량 24,000), β-lactoglobulin (분자량 18,400)을 사용하였다.

마. 당단백질 염색

확인된 종양특이단백질이 당단백질인지의 여부를 확인하기 위하여 Zacharius³⁸⁾의 방법에 따라 다음과 같이 periodic acid-Schiff(PAS) 염색을 시행하였다. 전기영동을 실시한 후 PAS 염색할 부위를 절단한 다음, 12.5% trichloroacetic acid (TCA(25-50ml/gel))에 30분간 담근 후 꺼내어 증류수를 여러 번 바꾸면서 세척하였다. 이 gel을 0.8% sodium metabisulfite-1.2M HCl-0.4% basic fuchsin으로 조성된 fuchsin-sulfite 염색용액에 50분간 담근 다음 꺼내어, 사용 직전에 새로 만든 0.5% metabisulfite 용액(25-50ml/gel)으로 10분씩 3번 세척한 후 과량의 염색용액을 제거하기 위해 증류수를 수시로 바꾸면서 18시간동안 세척하여 3-7.5% acetic acid 용액에 보관하였다. (Fig. 3).

III. 실험성적

1. 육안적 관찰조건

대조군은 실험 전 과정을 통해 육안적인 이상소견을 발견할 수 없었다. 실험군의 경우 DMBA 암착결정소구를 매식시킨 우측 악하선에서 시진 및

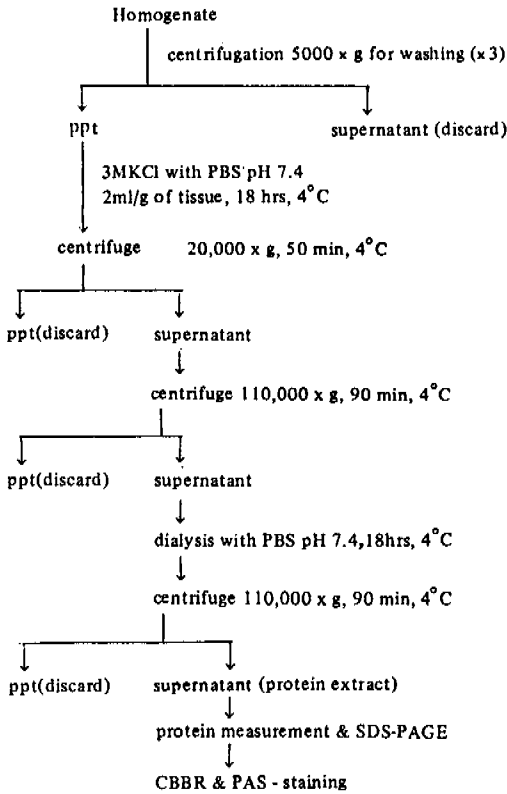


Fig. 3. Biochemical method.

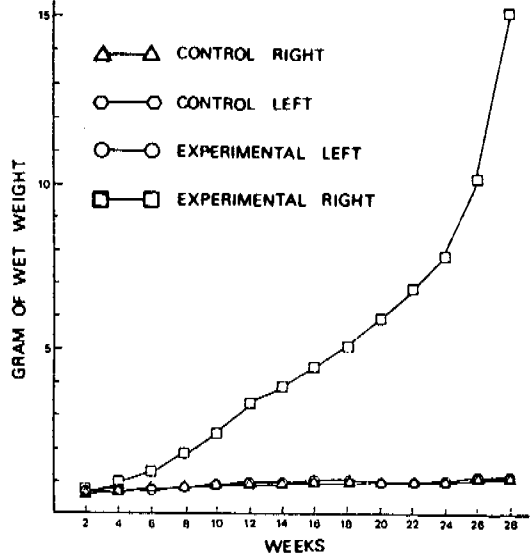


Fig. 4. Changes of wet weight of submaxillary gland.

Table 1. Wet weight of control and experimental submaxillary gland. (gm)

Weeks	Control		Experimental	
	Right	Left	Right	Left
2	0.61 ± 0.23	0.62 ± 0.03	0.69 ± 0.21	0.63 ± 0.25
4	0.63 ± 0.21	0.62 ± 0.23	0.98 ± 0.31	0.65 ± 0.21
6	0.68 ± 0.18	0.67 ± 0.20	1.28 ± 0.42	0.64 ± 0.31
8	0.71 ± 0.23	0.70 ± 0.21	1.78 ± 0.46	0.71 ± 0.26
10	0.75 ± 0.27	0.76 ± 0.31	2.40 ± 0.52	0.75 ± 0.23
12	0.76 ± 0.23	0.76 ± 0.27	3.35 ± 0.64	0.78 ± 0.27
14	0.80 ± 0.30	0.81 ± 0.26	3.84 ± 0.72	0.80 ± 0.23
16	0.83 ± 0.31	0.84 ± 0.25	4.42 ± 0.81	0.85 ± 0.30
18	0.85 ± 0.26	0.85 ± 0.31	5.05 ± 1.02	0.87 ± 0.27
20	0.90 ± 0.23	0.90 ± 0.26	5.85 ± 1.52	0.90 ± 0.26
22	0.91 ± 0.25	0.90 ± 0.31	6.64 ± 2.16	0.91 ± 0.18
24	0.92 ± 0.23	0.91 ± 0.25	7.63 ± 3.28	0.93 ± 0.20
26	0.95 ± 0.31	0.96 ± 0.23	10.08 ± 4.51	0.96 ± 0.27
28	0.98 ± 0.26	0.98 ± 0.21	15.04 ± 6.01	0.99 ± 0.30

촉진에 의해 12주 이후에는 모든 백서에서 병소를 확인할 수 있었으며(photo. 1, 2), 20주 이후에는 궤양이 생겨 피부조직에 누공이 형성되기도 하였다(photo. 3). 그러나 실험군의 좌측 악하선에서는 특기할만한 이상소견을 발견할 수 없었으며, 악하선 적출시에도 아무 이상이 없었다.

또한 대조군의 경우 적출한 좌, 우측 악하선의

무게는 시간이 지남에 따라 약간 증가되었으나, 그 무게비는 거의 변동이 없었다. 그러나 실험군의 경우 좌측 악하선의 무게는 약간 증가되었으나 우측 악하선의 무게는 현저히 증가되어(Photo. 4), 실험 28주에는 15배 이상 증가되었다(Table 1, Fig. 4). 한편 실험군의 좌, 우측 악하선의 무게비도 크게 증가되었다(Table 2, Fig. 5).

Table 2. Ratio of right/left submaxillary gland wet weight.

Weeks	Control	Experimental
2	1.01	1.10
4	0.98	1.51
6	0.99	2.02
8	0.99	2.50
10	1.10	3.18
12	1.00	4.32
14	1.01	4.80
16	1.01	5.18
18	1.00	5.81
20	1.00	6.50
22	0.99	7.32
24	0.99	8.21
26	1.01	10.48
28	1.00	15.22

Table 3. Remained DMBA pellet weight

Weeks	mg of DMBA
0	5.0
2	4.6
4	3.8
6	3.7
8	3.3
10	3.5
12	3.1
14	2.7
16	2.1
18	1.2
20	0.5
22	0
24	0
26	0
28	0

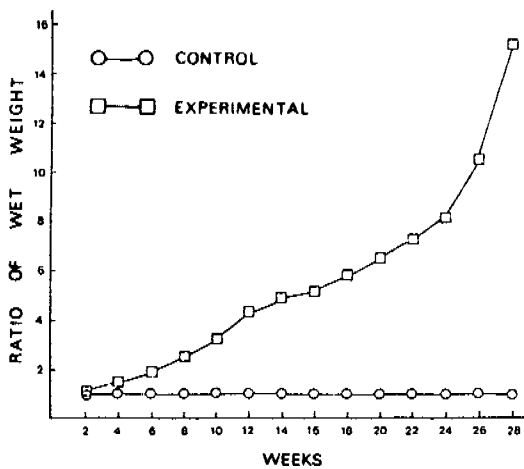


Fig. 5. Changes of ratio of wet weight of right/left submaxillary gland.

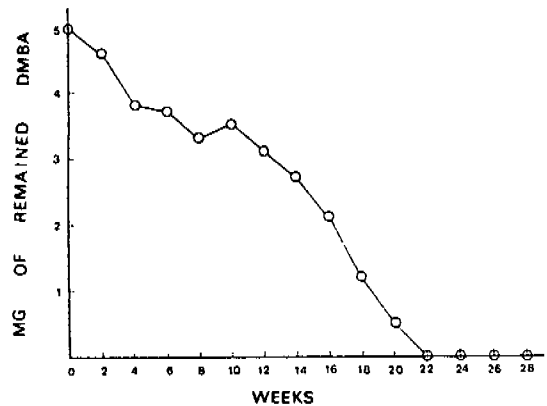


Fig. 6. Weight of remained DMBA.

실험군 우측 악하선에 매식한 DMBA는 시간이 경과함에 따라 대사되어 점점 감소하다가 실험 22주에는 남아있는 DMBA를 발견할 수가 없었다 (Table 3, Fig. 6).

2. 광학현미경적 소견

광학현미경상 대조군의 경우 sham operation을 시행한 우측 악하선이나 정상의 좌측 악하선의 경우 특기할 만한 소견이 관찰되지 않았으나, 실험군 우측 악하선의 경우 실험 6주에 이형성(dysplasia) 소견이 나타났고(Photo. 5), 실험 10주부터는 침윤성 유포피암(invasive epidermoid carcinoma)이 관찰되기 시작하였다.(Photo. 6, Table 4). 광학현미경상 종양이 관찰되는 비율은 실험 10주에 20%이던 것이 실험 20주에는 100%로 관찰되었다(Fig. 7, Table 5).

3. 생화학적 분석 결과

가. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동

각 군에서 얻은 악하선 조직에서 3M KCl로 세포 표면단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 시행한 결과, 대조군의 양측 악하선 모두와 실험군 좌측 악하선에서 추출된 단백질의 전기영동상에서는 특기할 만한 단백질 변화가 없었으나(Photo. 7, 8, 9), DMBA 압착결정소구(pellet)를 매식하여 타액선 종양을 유발한 우측 악하선에서 추출된 단백질의 전기영동상에서는 실험 4주 이후에 많은 단백질대의 변화가 나타나기 시작하였다. 특히 대조군에 비해 실험군 우측 악하선에서 추출된 단백질에는 분자량 10만 이상의 고분자 단백질대가 많이 나타났으며, 66, 48, 41.5, 39, 37.5kd의 새로운 종양특이단백질이 나타났고, 38, 27, 22kd의 단백질은 소실되었다

Table 4. Summary of macroscopic and microscopic findings.

Groups	Regimens	Time to 1st dysplasia	Time to 1st carcinoma	Time to 1st palpable mass
Control	Right sham operation	—	—	—
	Left —	—	—	—
Experimental	Right DMBA implantation	6th week	10th week	12th week
	Left —	—	—	—

Table 5. Percentage of carcinoma in experimental group.

Weeks	% of carcinoma
2	0
4	0
6	0
8	0
10	20
12	30
14	40
16	50
18	80
20	100
22	100
24	100
26	100
28	100

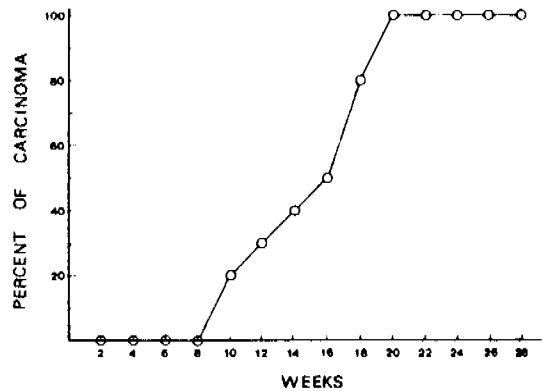


Fig. 7. Tumor incidence rate.

(Photo. 10, 11).

나. 당단백질 염색

대조군 악하선과 실험군 종양성 악하선으로부터 3M KCl로 추출한 단백질을 SDS-PAGE 시행한 후 PAS 염색을 한 결과 서로 많은 차이가 있었는데, 특히 10만 이상의 당단백질이 실험군에서 많이 나타났으며, 37.5kd의 단백질은 새로이 나타나는 종양특이당단백질이었으며, 38kd의 당단백질은 소실되었다(photo. 12).

IV. 총괄 및 고찰

구강내 발암유도를 위한 실험대상으로 hamster 협낭이 선호되어 왔으나^{27, 30, 55, 67, 64}, 이는 발암제 도포시에 적합한 해부학적 구조와 단순한 조직학적 구성을 갖는 반면, 반복도포의 번거로움, 용매제의 첨가, 그리고 일정한 형태의 종양(상피암)만이 유발되는 단점이 있다. 1942년 Steiner⁷⁰가 여러 설치류의 악하선에 화학발암제를 주입하여 타액선종양을 처음 유발시킨 이래로 많은 학자들에 의해 백서^{4, 14, 17, 19, 35, 66, 71, 72, 77, 78, 81}, hamster^{15, 17, 18}, 생쥐^{28, 50, 82}의 타액선에서 종양유도가 시도되었는데 주로 유상피암과 선종, 그리고 드물게 섬유육종이 관찰되었다. 본 실험에서는 DMBA를 암착결정소구로 만들어 백서의 악하선에 매식한 결과 유상피암만이 관찰되었다. 이는 종양유발이 종특이성(species-specificity)이나 기관특이성(organ-specificity)을 갖는다는 사실⁷¹과 관련이 있다고 생각되어진다.

화학발암제를 hamster협낭에 도포한 경우, Morris³⁵는 11주, Salley⁶⁷는 7주, 박³⁴은 10주에 종양의 발생을 인지하였고, 용매제에 녹인 발암제를 타액선에 주입한 경우, Cataldo¹⁶은 10주, El-Asfahani²⁸은 11주, Standish⁷⁷는 8주, Turbiner¹⁵은 10주에 인지하였으나 본 실험에서는 다소 빠른 6주에 이형성이 관찰되었다. 이러한 차이는 실험동물의 종류, 종양유발부위, 그리고 실험방법에 기인하는 것으로 추정된다.

화학발암제에 의해 발생하는 종양특이항원에 대한 연구로는 4-dimethylaminoazobenzene (DAB)에 의한 연구^{2, 3}, methylcholanthrene에 의한 연구^{31, 32, 45, 51, 57, 61, 62, 64} 등이 보고된 바 있다. 특히 Baldwin³은 DAB를 사용해 백서 간장암을 유발시켜 그 종양세포를 백서 복강내에 이식시킨 후, 이 종양세포

에 papain을 처리하여 종양특이항원을 분리하고, 그 분자량을 55kd(=kilodalton)이라 발표한 바 있으며, Natori⁵⁷은 생쥐에서 methylcholanthrene에 의해 유발된 섬유육종 원형질막을 Nomidet P-40으로 처리하여 종양특이항원을 분리, 그 분자량을 70kd이라 보고하였고, Pellis⁶¹은 같은 섬유육종 원형질막을 trypsin으로 처리한 후, 3M KCl용액으로 단백질을 추출하여 분자량 40kd과 75kd의 2가지 종양특이항원을 보고하였다. 최근에 김⁴⁴은 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene (3'-Me DAB)으로 백서 간장암을 유발하고 간장암 세포를 3M KCl용액으로 단백질을 추출한 후, 분자량 66kd와 서로 등전점이 다른 분자량 73kd의 두가지 단백질 등 세가지 종양특이표면단백질을 보고하였으며, 이들 종양특이 단백질이 diethylnitrosoamine(DENA)과 2-acetylaminofluorene(AAF)에 의해 유발된 종양에서도 발견되는 공통항원임을 밝힌 바 있다.

본 실험에서는 DMBA 암착결정소구(pellet)를 이용하여 백서 타액선 종양을 유발한 후 악하선을 적출하고, 3M KCl용액으로 단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 시행한 결과, 새로운 단백질이 나타남을 관찰하였다. 육안적, 조직학적으로 아무런 이상 소견이 나타나지 않았던 대조군의 경우, 양측 악하선 모두에서 실험기간 전 과정을 통해 새로운 단백질이 나타나지 않고 거의 같은 단백질 분포양상을 보였으며, 실험군의 좌측 악하선에서 추출된 단백질의 성적도 대조군과 같은 양상이었다. 그러나 실험군 우측 악하선의 경우 육안적으로 12주에 종양 병소가 처음 감지되었고, 병리조직학적으로 6주에 이형성의 소견이 관찰되었으나, 생화학적으로 추출된 단백질대의 차이는 4주째부터 이미 나타나기 시작하였다. 즉 실험 4주에서부터 분자량 10만 이상의 많은 단백질대가 새로이 나타났고, 정상에는 존재하지 않았던 66, 48, 41.5, 39, 37.5 kd의 새로운 종양특이단백질이 출현한 반면 38, 27, 22kd의 단백질은 소실되었다. 이는 정상세포와 종양세포간의 차이에 기인된, 새로운 단백질 합성이 증가되어 조직학적으로 이형성이 관찰되기 전에 종양특이단백질이 나타난 것으로 유추된다.

정상세포가 종양세포로 이행되면 세포간 정보교환(interaction) 및 인지(recognition)에 관여하는 많은 원형질막 당단백질에 변동이 오는데¹³, Blithe 등^{8, 34, 58, 66}은 특히 악성 종양에서는 N-acetylgluco-

samine-galactose-sialic acid의 trisaccharide unit가 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서도 새로이 나타나는 단백질이 당단백질인지의 여부를 관찰하기 위해 PAS염색을 한 결과 37.5kd의 단백질은 당단백질이며 분자량 10만 이상의 단백질은 거의 다 당단백질임을 확인하였다.

한편 종양특이항원을 임상적으로 응용하기 위한 연구로 Bhattacharya등⁶⁾은 사람의 난소선암에서 분자량 48kd의 peptide를 추출한 후 이 특이항원이 사람의 난소종양에서는 90%, 다른 양성 및 악성종양에서도 60%의 비율로 검출되나, 정상조직이나 혈청내에서는 검출되지 않았다고 보고하였다. 또한 Metzgar등^{52, 53)}은 체장암에서 5가지의 단세포군 항체(monoclonal antibody)를 얻었는데 이 중 DU-PAN-1과 반응하는 항원이 방광의 이행세포 암에서도 발견되었다고 보고하였다. 그리고 Dewitt²³⁾은 자외선에 의해 유발되는 피부종양실험에서 특이성이 다른 여러 종류의 항체를 유도하여, 이들 항체가 자외선이나 화학발암제에 의하여 유발되는 다른 부위의 종양세포에 대해서는 강하게 반응하나, 정상 세포나 태아의 섬유아세포와는 반응을 나타내지 않는다고 하였다.

DNA 종양 바이러스^{46, 49)}, RNA 종양 바이러스⁶⁵⁾, 화학발암제^{22, 48, 66)}에 의해 유도된 종양세포에서 분자량 48-55kd에 해당하는 p53 단백질이 원형질막이나 세포질에 나타나며, Eliyahu등^{29, 43, 60)}은 이러한 p-3단백질이 종양으로 변화되는 과정에 관여한다고 보고하였고, Reich등⁶⁾은 정상세포 분화과정에서도 조절기능을 가지고 있어, 휴식상태의 3T3 섬유아세포에 이 단백질을 첨가하면 세포분열이 더욱 활발해진다고 하였다. De Larco 등²¹⁾은 사람의 섬유육종에서 분자량 7kd와 11kd의 증식촉진활성도(multiplication stimulating activity; MSA)를 갖는 단백질이 합성된다고 보고 하였다. 본 실험에서도 나타난 48kd의 단백질이 p53 단백질에 포함되는 단백질인지의 여부를 확인하지 못하였으며, 섬유육종에서 자주 발견되는 7kd, 11kd의 단백질은 본 실험에서 나타나지 않았던 바, 이는 본 실험에서 발현된 종양이 유방피암이기 때문이라 추정된다.

한편 Berenblum⁵⁾이 피부의 종양유도과정에서, 발암물질에 의해 비가역적인 종양 잠재성세포로 변화되는 발암개시단계(initiation stage)와, 비발암성 물질의 자극에 의해서도 쉽게 종양세포로 전환될 수 있는 발암증진단계(promotion stage)의 2상 발

암과정(two stage carcinogenesis)을 보고하였으며, Eisenberg²⁷⁾와 박⁴⁴⁾은 구강 점막의 종양발생과정에서 2상 발암과정을 관찰하였다. 본 실험에서는 2상 발암과정을 유도하지 못하였으나, 앞으로 타액선 종양에서도 2상 발암과정중 종양특이단백질이 구체적으로 언제 발현되는지에 대해 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

저자는 지용성 발암제인 DMBA를 압착결정소구(pellet) 형태로 만든 후 백서 악하선에 배식하여 타액선 종양을 유발시키고 종양발생과정중에 나타나는 종양특이항원을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 실험군의 경우 12주 이후에 육안적으로 종양의 발생을 관찰할 수 있었으며, 광학현미경적으로는 6주에 이행성(dysplasia), 10주에 침윤성 유포피암(invasive epidermoid carcinoma)이 관찰되었다.
2. 대조군의 경우 양측 악하선의 무게비는 별 변동이 없었으나, 실험군의 경우 현저한 차이로 증가되었으며, 실험 28주에는 15배이상의 차이가 있었다.
3. 매식된 DMBA는 실험 22주 이후에는 모두 소실되었다.
4. SDS-PAGE상은 실험군 4주 부터 분자량 10만 이상의 고분자 단백질대가 많이 나타났으며, 분자량 66, 48, 41.5, 39, 37.5kd의 새로운 종양 특이 단백질이 나타났고, 정상에서는 나타났던 38, 27, 22kd의 단백질은 소실되었다.
5. PAS염색결과 분자량 10만 이상의 고분자 단백질은 모두 당단백질이며, 37.5kd의 단백질도 종양특이 당단백질로 확인되었으며, 정상에서는 나타났던 38kd의 당단백질은 소실되었다.

이상과 같은 결과로 보아 DMBA 압착결정소구의 매식은 종래의 도포방식보다 종양의 발생을 조기에 유도할 수 있었으며, 종양특이항원이 육안적, 광학현미경적 소견보다 훨씬 앞서 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 종양특이항원을 종양의 조기진단 및 치료에 대해 임상적으로 응용하기 위해서는 보다 심도있는 연구가 계속되어야 할 것으로 사료되는 바이다.

참 고 문 헌

1. Baldwin, R.W., Glaves, D.: Solubilization of tumor specific antigen from plasma membrane of an aminoazo dye-induced rat hepatoma. *Clin. Exp. Immunol.* 11: 51-56, 1972.
2. Baldwin, R.W., Barker, C.R., Embleton M.J., Glaves, D., Moore, M., Pimm, M.V.: Demonstration of cell-surface antigens on chemically induced tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci. U.S.A.* 177: 268-278, 1971.
3. Baldwin, R.W., Harris, J.R., Price, M.R.: Fractionation of plasma membrane-associated tumor specific antigen from an aminoazo dye-induced rat hepatoma. *Int. J. Cancer* 11: 385-397, 1973.
4. Bauer, W.H., Byrne, J.J.: Induced tumors of the parotid gland. *Cancer Res.* 10: 755-761, 1950.
5. Berenblum, I.: The mechanism of carcinogenesis: A study of the significance of co-carcinogenic action and related phenomena. *Cancer Res.* 1: 807-814, 1941.
6. Bhattacharya, M., Chatterjee, S.K., Barlow J.J.: Identification of a human cancer-associated antigen defined with monoclonal antibody. *Cancer Res.* 44: 4528-4534, 1984.
7. Bigger, C.A.H., Sawicki, J.T., Blake, D.M., Raymond, L.G., Dipple, A.: Products of binding of 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene to DNA in mouse skin. *Cancer Res.* 43: 5647-5651, 1983.
8. Bliithe, D.L., Buck, C.A., Warren, L.: Comparison of glycopeptides from control and virus-transformed baby hamster kidney fibroblasts. *Biochemistry* 19: 3386-3395, 1980.
9. Bonne, C.: Über Geschwülste bei Teertieren. *Zeitschrift für Krebsforschung* 25: 1-22, 1927.
10. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
11. Brookes, P., Heidelberger, C.: Isolation and degradation of DNA from cells treated with tritium-labeled 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene: Studies on the nature of the binding of this carcinogen to DNA. *Cancer Res.* 29: 157-165, 1969.
12. Brookes, P., Lawley, P.D.: Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: Relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to DNA. *Nature* 202: 781-784, 1964.
13. Buck, C.A., Fuhrer, J.P., Soslau, G., Warren, L.: Membrane glycopeptides from subcellular fractions of control and virus-transformed cells. *J. Biol. Chem.* 249: 1541-1550, 1974.
14. Cappuccino, C., Shklar, G.: A transplantable salivary gland tumor model in the rat. *Arch. Oral Biol.* 21: 147-149, 1964.
15. Cataldo, E., Shklar, G.: Chemical carcinogenesis in the hamster submaxillary gland. *J. Dent. Res.* 43: 568-579, 1964.
16. Cataldo, E., Shklar, G., Chauncey, H.H.: Experimental salivary gland tumors in rats: histology and histochemistry. *Arch. Pathol.* 77: 305-316, 1964.
17. Chaudhry, A.P., Liposky, R., Jones, J.: Dose response of submandibular glands to carcinogen pellets in rats and hamsters. *J. Dent. Res.* 45: 1548-1552, 1966.
18. Chaudhry, A.P., Reynolds, D.H., Gorlin, R.J., Vickers, R.A.: Experimental carcinogenesis in submandibular glands of hamsters. *J. Dent. Res.* 40: 426-432, 1961.
19. Chauncey, H.H., Shklar, G., Quintarelli, G.: Histochemistry of experimentally in-

- duced fibrosarcoma in rat submaxillary gland. *J. Dent. Res.* 40: 684, 1961.
20. Davenport, G.R., Abell, C.W., Heidelberger, C.: The interaction of carcinogenic hydrocarbons with tissues: VII. Fractionation of mouse skin proteins. *Cancer Res.* 21: 599-610, 1961.
 21. De Larco, J.E., Todaro, G.J.: A human fibrosarcoma cell line producing multiplication stimulating activity (MSA)-related peptides. *Nature* 272: 356-358, 1978.
 22. DeLeo, A.B., Gilbert, J., Appella, E., DuBois, G.C., Law, L.W., Old, L.J.: Detection of a transformation related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 2420-2424, 1979.
 23. Dewitt, C.W.: Ultraviolet light induces tumors with both unique and host-associated antigenic specificities. *J. Immunol.* 127: 329-334, 1981.
 24. DiGiovanni, J., Fischer, E.P., Aalfs, K.K., Prichett, W.P.: Covalent binding of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene and 10-fluoro-7, 12-dimethylbenz(a)anthracene to mouse epidermal DNA and its relationship to tumor initiating activity. *Cancer Res.* 45: 591-597, 1985.
 25. Dipple, A., Pigott, M., Moschel, R.C., Costantino, N.: Evidence that binding of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene to DNA in mouse embryo cell cultures results in extensive substitution of both adenine and guanine residues. *Cancer Res.* 43: 4132-4125, 1983.
 26. Ehrlich, P.: Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung, 1908.; in *The collected papers of Paul Ehrlich*. Vol. II. Pergamon Press, London. p550, 1957.
 27. Eisenberg, E.: Neoplasia following cessation of DMBA application to hamster buccal pouch. *J. Dent. Res.* 56: 1430, 1977.
 28. El-Asfahani, A., Higashi, G.L., Ahmed M.A.: Chemical carcinogenesis of submandibular salivary gland in BALB/c mice and syngeneic passage of the tumor. *Oral Surg.* 48: 47-52, 1979.
 29. Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., Oren, M.: Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312: 646-649, 1984.
 30. Ferguson, J.W., Smillie, A.C.: Vascularization of premalignant lesions in carcinogen treated hamster cheek pouch. *J. Nat. Cancer Inst.* 63: 1383-1391, 1979.
 31. Foley, E.J.: Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* 13: 835-837, 1953.
 32. Forbes, J.T., Nakao, Y., Smith, R.T.: Tumor specific immunity to chemically induced tumors: Evidence for immunologic specificity and shared antigenicity in lymphocyte responses to soluble tumor antigens. *J. Exp. Med.* 141: 1181-1200, 1975.
 33. Fujita, K., et al: Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local applications of DMBA. *J. Dent. Res.* 52: 327-332, 1973.
 34. Glick, M.C.: Membrane glycopeptides from virus-transformed hamster fibroblasts and the normal counterpart. *Biochemistry* 18: 2525-2532, 1979.
 35. Glucksmann, A., Cherry, D.P.: Sex difference and carcinogenic dosage in the induction of neoplasms in salivary glands of rats. *Br. J. Cancer.*, 25: 212-224, 1971.
 36. Goshmann, L.M., Heidelberger, C.: Binding of tritium labeled polycyclic hydrocarbons to DNA of mouse skin. *Cancer Res.* 27: 1678-1688, 1967.
 37. Hahm, K.S., Tikkanen, M.J., Dargar, R., Cole, T.G., Davie, J.M., Schonfeld, G.:

- Limited proteolysis selectively destroys epitopes on apolipoprotein B in low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 24:877-885, 1983.
38. Härry, P., Defendi, V.: Demonstration of specific antigen(s) on the surface of SV40-transformed cells using mixed hemagglutination technique. *Transplantation* 1: 119, 1968.
 39. Härry, P., Defendi, V.: Use of mixed hemagglutination technique in detection of virus-induced antigens on SV40-transformed cell surface. *Virology* 36: 317-321, 1968.
 40. Härry, P., Defendi, V.: Demonstration of SV40-transformed tumor cells. *Virology* 41: 22-29, 1970.
 41. Hellström, I., Sjögren, H.O.: Demonstration of H-2 isoantigens and plyoma specific tumor antigens by measuring colony formation in vitro. *Exp. Cell Res.* 40: 212, 1965.
 42. Hellström, I., Sjögren, H.O.: In vitro demonstration of humoral and cell-bound immunity against common specific transplantation antigens of adenovirus 12-induced mouse and hamster tumors. *J. Exper. Med.* 125: 1105-1118, 1967.
 43. Jenkins, J.R., Rudge, K., Currie, G.A.: Cellular immortalization by a cRNA clone encoding the transformation associated phosphoprotein p53. *Nature* 312: 651-659, 1984.
 44. Kim, Y.S.: Characterization of tumor specific antigens on the plasma membrane surface of rat hepatoma induced by 3^o-Me DAB and identification of the common tumor specific antigens from rat hepatoma induced by different chemical hepatocarcinogens.; in *Proceedings International Conference Commemorating the Centenary of Yonsei University, 1985*, pp.274-289.
 45. Klein, G., Sjögren, H.O., Klein, E., Hellström, J.: Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.* 20: 1561-1572, 1960.
 46. Lane, D.P., Crawford, L.V.: T-antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 278: 261-263, 1979.
 47. Levy, B.M.: The effect of chemical carcinogen (20-MC) on the oral tissues. *Oral Surg. Oral Med. Oral Path.* 1: 582, 1948.
 48. Lim, I.K.: A study of plasma membrane surface proteins of transformed rat liver cells induced by 3^o-methyl-4-dimethyl aminoazobenzene (Thesis). Seoul, Yonsei University, 1982.
 49. Linzer, D.J.H., Lavine, A.J.: Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52, 1979.
 50. Matsumura, T.: Enzyme histochemistry of experimentally induced tumors in the mouse submaxillary and sublingual glands during carcinogenesis. *Gann.* 57: 251-253, 1966.
 51. McCollester, D.L.: Isolation of Meth A cell surface membrane possessing tumor specific transplantation antigen activity. *Cancer Res.* 30: 2832-2840, 1970.
 52. Metzgar, R.S., Oleinick, S.R.: The study of normal and malignant cells antigens by mixed agglutination. *Cancer Res.* 28: 1366-1371, 1968.
 53. Metzgar, R.S., Rodriguez, N., Finn, O.J., Lan, M.S., Daasch, V.N., Fernsten, P.D., Meyers, W.C., Sindelar, W.F., Sandler, R.S., Seigler, H.F.: Detection of a pancreatic cancer-associated antigen (DU-PAN-2 antigen) in serum and ascites of patients with adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 5242-5246, 1984.
 54. Moore, C.J., Pruess-Schwarz, D., Manthe, R.J., Gould, M.N., Baird, W.M.: Interspecies differences in the major DNA adducts formed from benzo(a)pyrene, but not 7,

- 12-dimethylbenz(a)anthracene in rat and human mammary cell cultures. *Cancer Res.* 47: 4402-4406, 1987.
55. Morris, A.L.: Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster check pouch. *J. Dent. Res.* 40: 3-8, 1961.
 56. Morse, N.A., Baird, W.M., Carlson, G.P.: Distribution, covalent binding, and DNA adduct formation of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene in SENCAR and BALB/c mice following topical and oral administration. *Cancer Res.* 47: 4571-4575, 1987.
 57. Natori, T., Law, L.W., Appella, E.: Biological and biochemical properties of Nonidet-P40 solubilized and partially purified tumor-specific antigens of the transplantation type from plasma membranes of a methylcholanthrene-induced sarcoma. *Cancer Res.* 37: 3406-3413, 1977.
 58. Ogata, S.I., Muramatsu, T., Kobata, A.: New structural characteristics of the large glycopeptides from transformed cells. *Nature* 259: 580-582, 1976.
 59. Oyama, S., et al.: Experimentelle Studien über die Entstehung des Zungenkrebs. *Mittlungen aus der Medizinischen Akademie zu Kioto.* 15: 861-880, 1935.
 60. Parada, L.F., Land H., Weinberg, R.A., Wolf, D., Rotter, V.: Cooperation between gene coding p53 tumor antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312: 649-651, 1984.
 61. Pellis, N.R., Shulan, D.J., Kahan, B.D.: Specificity of tumor immunity induced with soluble materials: Purification of antigens inducing tumor resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 1251-1258, 1976.
 62. Prehn, R.T., Main J.M.: Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 18: 759-778, 1957.
 63. Reich, N.C., Levine, A.J.: Growth regulation of cellular antigen p53 in nontransformed cells. *Nature* 308: 199-201, 1984.
 64. Révész, L.: Detection of antigenic differences in isologous host-tumor systems by pretreatment with heavily irradiated tumor cells. *Cancer Res.* 20: 443-451, 1960.
 65. Rotter, V., Boss, M.A., Baltimore, D.: Increased concentration of an apparently identical cellular protein in cells transformed by either Abelson murine leukemia virus or other transforming agents. *J. Virol.* 38: 336-346, 1981.
 66. Rusch, R.P., Baumann, D.A., Maison, G.L.: Production of internal tumors with chemical carcinogens. *Arch. Pathol.* 29: 8-19, 1940.
 67. Salley, J.J.: Experimental carcinogenesis in the check pouch of the syrian hamster. *J. Dent. Res.* 33: 253-262, 1954.
 68. Santer, U.V., Glick, M.C.: Partial structure of a membrane glycopeptide from virus-transformed hamster cells. *Biochemistry* 18: 2533-2540, 1979.
 69. Sawicki, J.T., Moschel, R.C., Dipple, A.: Involvement of both syn- and anti-dihydrodiol-epoxides in the binding of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene to DNA in mouse embryo cell cultures. *Cancer Res.* 43: 3212-3218, 1983.
 70. Schoepe, K.B., Friesel, H., Schurdak, M.E., Randerath, K., Hecker, E.: Comparative DNA binding of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene and some of its metabolites in mouse epidermis in vivo as revealed by the ³²P-postlabeling technique. *Carcinogenesis* 7: 535-540, 1986.
 71. Shafer, W.G.: Experimental salivary gland tumorigenesis. *J. Dent. Res.* 41: 117-124, 1962.
 72. Shklar, G., Cataldo, E.: Effects of a chemical carcinogen on the submaxillary gland of albino rats treated with isoproterenol.

- Cancer Res. 26: 1319-1323, 1966.
73. Shubik, P.: Studies on the promoting phase in the stage of carcinogenesis in mice, rabbits and guinea pigs. *Cancer Res.* 10: 13-17, 1950.
 74. Singletary, K.W., Milner, J.A.: DNA binding and adduct formation of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene by rat mammary epithelial cell aggregates in vitro. *Carcinogenesis* 7: 95-98, 1986.
 75. Slaga, T.J., Bowden, G.T., Shapas, B.G., Boutwell, R.K.: Macromolecular synthesis following a single application of polycyclic hydrocarbons used as initiators of mouse skin tumorigenesis. *Cancer Res.* 34: 771-777, 1974.
 76. Smolarek, T.A., Morgan, S.L., Moynihan, C.G., Lee, H.M., Harvey, R.G., Barid, W.M.: Metabolism and DNA adduct formation of benzo(a)pyrene and 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene in fish cell lines in culture. *Carcinogenesis* 8: 1501-1509, 1987.
 77. Standish, S.M.: Early histologic changes in induced tumors of the submaxillary salivary glands of the rat. *Ammer. J. Path.* 33: 671-689, 1957.
 78. Steiner, P.E.: Comparative pathology of induced tumours of the salivary glands. *Arch. Pathol.* 34: 613-624, 1942.
 79. Stevens, R.H., Cole, B.A., Cheung, H.F.: Identification of a common oncofetal protein in X-ray & chemically induced Rat gastro-intestinal tumors. *Br. J. Cancer* 43: 817-825, 1981.
 80. Tevethia, S.S., Rapp, E: Demonstration of new surface antigens in cells transformed by papovavirus, SV40 by cytotoxic tests. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120: 455-458, 1965.
 81. Turbiner, S., Shklar, G.: Variations in experimental carcinogenesis of submandibular gland in three strains of rats. *Arch. O. Biol.* 14: 1065-1071, 1969.
 82. Wigley, D.B., Carbonell, A.W.: The target cell in the chemical induction of carcinomas in mouse submandibular gland. *Eur. J. Cancer* 12: 737-741, 1976.
 83. Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H., Woodlock, J.J.: Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 31: 148-152, 1969.
 84. 박형식 : Hamster 협낭점막 DMBA 유도 구강상피암의 2상 발암과정 (two phase carcinogenesis)에 관한 세포학적 연구. *대한구강악안면 외과학회지* 10(No. 2): 129-151, 1984.



Photo. 1. Animal with moderate palpable mass on experimental side of neck at 12th week after DMBA implantation.



Photo. 2. Animal with large submaxillary gland tumor mass at 14th week.



Photo. 3. Animal with fistular lesion through skin of neck (A) and anatomical view showing right submaxillary gland tumor mass and severe pus discharge (B) at 20th week.



Photo. 4. Excised submaxillary gland tumor mass (left) and normal submaxillary gland (right).

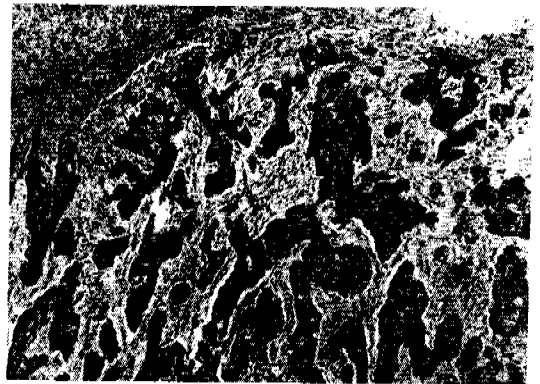
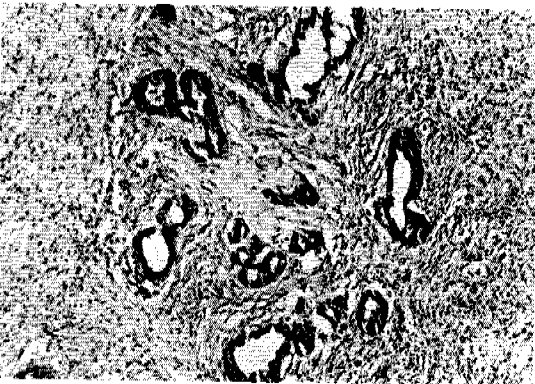


Photo. 5. Microscopic findings at 6th week.

A: Epithelial dysplasia with hyperkeratosis (H&E, $\times 100$).

B: Epithelial dysplasia, not invading to adjacent C-T ($\times 200$).

C: Ductal hyperplasia ($\times 200$).

Photo. 6. Microscopic findings at 10th week.

A: Carcinoma in situ with adjacent invasive carcinoma (H&E, $\times 100$).

B: Keratin pearls formation with infiltrating margin of epidermoid carcinoma ($\times 100$).

C: Invasive epidermoid carcinoma ($\times 200$).

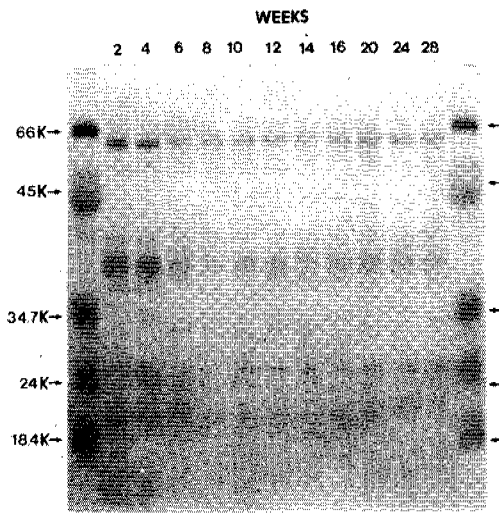


Photo. 7. SDS-PAGE pattern from left submaxillary gland of control group.

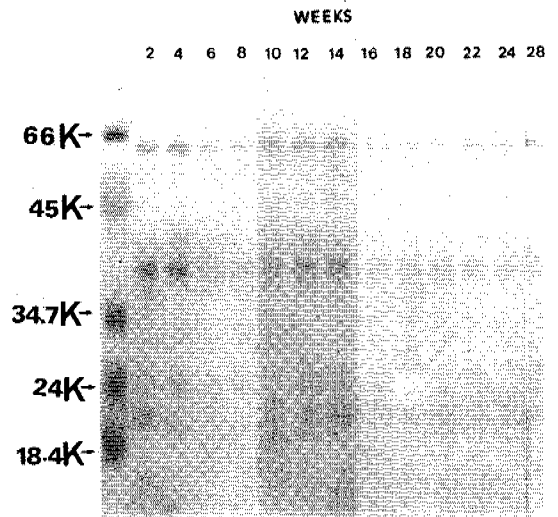


Photo. 8. SDS-PAGE pattern from right submaxillary gland of control group.

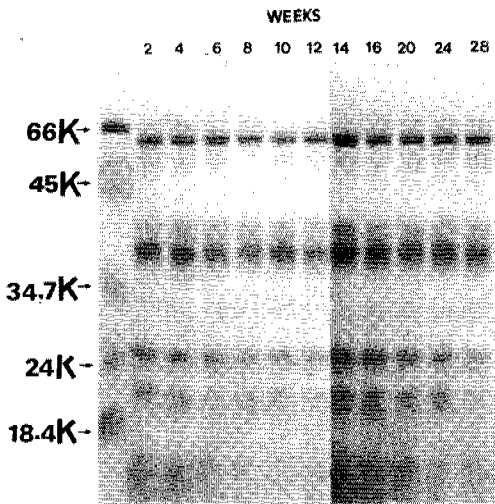


Photo. 9. SDS-PAGE pattern from left submaxillary gland of experimental group.

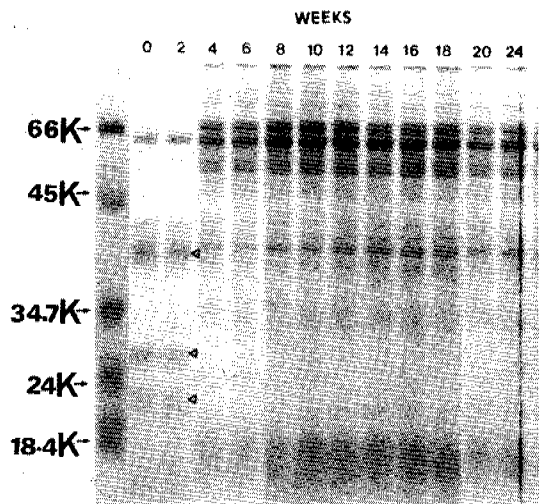


Photo. 10. SDS-PAGE pattern from right submaxillary gland of experimental group.

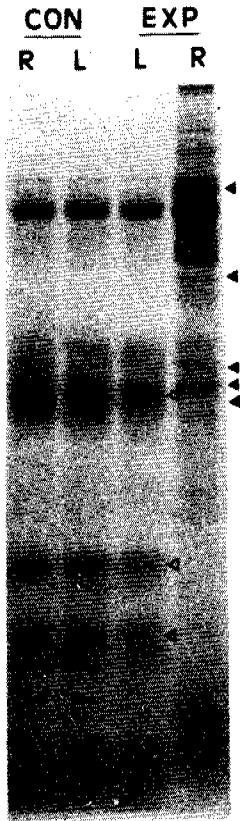


Photo. 11. SDS-PAGE patterns of each group: new appeared tumor specific proteins (◄) and disappeared tumor specific proteins(◄)
 *CON.: Control Exp.: Experimental
 R : Right L : Left

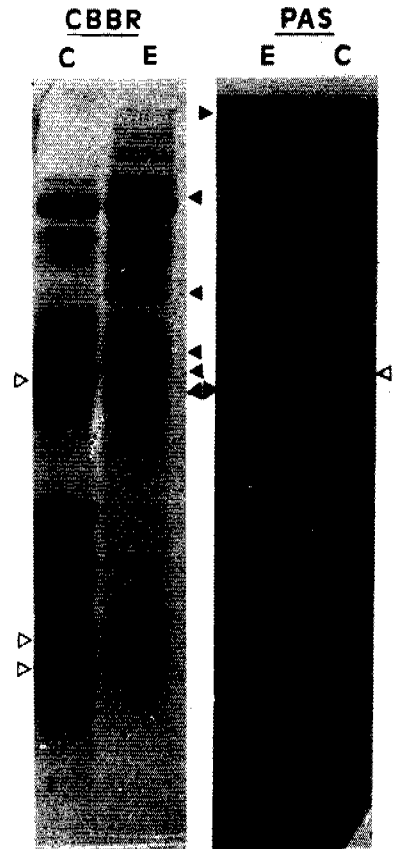


Photo. 12. Glycoprotein staining after SDS-PAGE of each group at 20th week.
 *CBBR: Coomassie Brilliant Blue R-250 staining.
 PAS : periodic acid Schiff staining
 C : Control group.
 E : Experimental group.

: Abstract =

AN EXPERIMENTAL STUDY ON TUMOR SPECIFIC ANTIGENS OF RAT SALIVARY GLAND TUMOR INDUCED BY 7, 12-DIMETHYLBENZ (a) ANTHRACENE (DMBA)

Jee Hack Kim, D.D.S., M.S.D.

Department of Dental Science, Graduate School, Yonsei University.

(Directed by Prof. Jung Ho Yoon, D.D.S., Ph.D.)

Ever since the expression of new tumor-specific antigens was reported during malignant transformation, studies on separation, purification and characterization of these proteins have been so activated recently.

Following experiment was performed to observe tumor-specific antigens by implanting DMBA pellet into submaxillary gland of rat for inducing salivary gland tumor.

After dividing 280 rats into 2 groups, in control group, sham operation was performed on right submaxillary gland and, in experimental group, DMBA pellet (5 mg) was implanted into right submaxillary gland.

Then proteins from excised submaxillary gland by killing 10 rats every two weeks for 28 weeks were extracted with 3M KCl, and SDS-PAGE and PAS-staining were carried out for biochemical examination.

The obtained results were summarized as follows;

- 1) At 12th week since implantation of DMBA pellet, tumor mass formation was inspected. And dysplasia at 6th week and invasive epidermoid carcinoma at 10th week were observed by microscope.
- 2) In control group, the weight ratio of both submaxillary glands had no any change, however, in experimental group, the ratio was increased remarkably.
And at 28th week after DMBA implantation, there was more than 15 times of differences in weight between control and experimental group.
- 3) There was no DMBA remnant after 22nd experimental week.
- 4) In the SDS-PAGE, high molecular protein bands (more than 100 kd) were appeared much, and new prominent protein bands (66, 48, 41.5, 39, 37.5 kd) were appeared after 4th week since DMBA implantation. However, 38, 27, 22kd protein bands were disappeared.
- 5) In PAS-staining, high molecular proteins were all glycoproteins and 37.5kd protein was proved as to be glycoprotein. And 38kd glycoprotein was disappeared after 4th week since DMBA implantation.