

백서의 7, 12 - Dimethylbenz(a)anthracene 유도 악하선 종양발암과정에서의 효소 특이활성도에 대한 연구

연세대학교 대학원 치의학과
(지도교수 이의웅)

심현구

I. 서론

종양의 조기 진단과 진행과정에 대한 연구중 악성세포에 대한 표현형 표식자(phenotypic markers)로써 사용되는 조직항원과 효소들은 진단수단으로써의 중요성이 높아지고 있다^{46, 71)}. 1923년 Warburg 등⁸⁷⁾이 암조직은 정상조직보다 더 높은 비율의 호기성 당분해 작용을 보인다고 보고한 이래, Potter⁶²⁾, Weber 와 Lea⁸⁰⁾, Farron 등²⁰⁾에 의해 암조직에서의 효소 결손을 규명하기 위한 연구들이 계속되어 오고 있다. 이들 효소들의 일부는 혈청내 존재하고 기관특이성을 갖거나 대사에 관계하게 되며, 조직, 노 및 체액등에 나타나 암세포의 조기 발견뿐 아니라 진행과정, 종양의 성장과 치료후 평가등을 가능하게 한다^{48, 71)}.

혈청내 존재하는 혈청 아밀라제(Serum Amylase), 알칼리성 인산효소(Alkaline phosphatase), 5'-핵산염 분해효소(5'-Nucleotidase) 및 감마 글루타미드 펩티드 전이효소(γ -glutamyl Transpeptidase, GGT)등과 당분해성으로 대사에 관계되며 편재성 효소라 불리우는 일련의 큰 효소군들인 이소메라제(isomerase), 탈수소효소(dehydrogenases) 및 트랜스페라제(transferases)등이 암환자들에서 광범위하게 연구되고 있다^{20, 45, 48, 71)}.

GGT는 막결합효소(membrane bound enzyme)로 펩티드의 감마 글루타미드 군을 다른 펩티드와 아미노산에 전이시키는 과정을 촉매하며⁸⁰⁾ 백서^{18, 34, 38, 45, 57)}, 생쥐¹⁷⁾, 햄스터^{8, 56, 75, 76, 91)} 및 인체^{3, 46)}등의 종양조직에서는 GGT의 활성도가 상승한다.

5'-Nucleotidase 역시 막결합효소로서 핵산염의

가수분해를 촉매시키며 정상조직^{21, 47)}에도 존재하나 간^{71, 72)} 및 유방³⁶⁾, 난소종양¹³⁾ 환자의 종양조직에서도 불규칙적으로 높은 활성도를 갖는다.

또한 세포의 대사와 증식에 필수적인 폴리아민의 생합성과정에서 핵심조절 효소인 Ornithine decarboxylase(ODC)는 단백질과 DNA의 합성이 활발한 경우와 세포성장시 증가하기 때문에^{16, 61, 65)} 폴리아민과 ODC가 인체 종양에 대한 유용한 표식자가 될 수 있다^{24, 31, 69)}.

1958년 Wakil과 Gibson^{65, 66)}이 발견한 Acetyl-Co A carboxylase는 지방합성에 관여하는 첫번째 기능적 비오틴 효소(functional biotin enzyme)로써 Holland와 Hardie³⁵⁾, Majerus 등⁴⁰⁾은 백서의 간에서, Ahmad 등^{1, 2)}은 백서의 유선에서, Hardie와 Cohen²⁰⁾은 토끼의 유선에서 효소 활성도 및 조절기전에 관해 연구하였으나 종양에서의 연구는 드물다.

또한 타액선 종양에서의 암세포 증식에 따른 GGT, 5'-Nucleotidase, ODC 및 Acetyl-Co A carboxylase의 특이 활성도(specific activity)에 대한 연구는 드물어 이에 저자는 암세포의 빠른 증식에 있어 다량의 단백질, DNA 및 지방등의 합성이 증가할 것으로 추정하여 백서 악하선 종양에서 이들 효소가 전암세포에 대한 표식자로써 유용한지를 알아 보고자 지용성 발암제인 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene(DMBA) 암착결정소구(pellet)를 매식하여 유도한 종양발암과정에서의 특이 활성도 변화를 생화학적 방법으로 측정하여 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

체중 100gm 내외의 Sprague-Dawley 계 정상백서 120마리를 암수 구별없이 우측 악하선을 실험군, 좌측을 대조군으로 하고, 실험기간중 시판사료(제일제당)로 사육하였다.

발암물질로는 지용성 발암제인 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 사용하였다.

2. 실험방법

가. 종양의 유발

Cataldo와 Shklar¹¹⁾의 방법에 따라 용제의 첨가 없이 DMBA를 순수한 분말형태의 압착결정소구(pellet)로 만들어 실험군 백서 우측 악하선에 매식하였다.

1) 압착결정소구의 형성

멸균된 15gauge 주사침을 자루로부터 4mm만 남기고 절단한 후 절단된 4mm공간의 주사침속에 DMBA 분말을 세계 다져 넣었다. 15gauge 주사침에 꼭 맞는 직경 1mm의 plunger를 상하로 움직여 자루까지 넘쳐 나오지 않도록 압축시켰다. 이때 4mm만 남기고 절단한 주사침속의 균질화된 DMBA 분말의 무게는 약 5mg이었다.

2) 압착결정소구의 매식 및 동물 희생

백서를 체중 100mg당 0.1cc(2.5mg)의 pentothal sodium으로 복강마취한 후 경부의 복면 정중부에 상하로 3cm 크기의 절개를 하였다. 양측 악하선을 노출시킨 후 우측 악하선은 실험군으로써 15gauge 주사침을 삽입하고 주입구에 압착된 DMBA가 담긴 절단 주사침을 끼워 plunger로 DMBA 압착 결정소구를 밀어 넣었다. 절개부는 3-0 silk로 봉합하고 항생제를 도포하였으며, 좌측 악하선은 대조군으로써 실험군과 비교하기 위해 주사침에 의한 창상만을 형성하여 주었다. 실험동물은 자기 30마리씩 4군으로 나누어 분리 사육하였고 각 군별로 매 3주마다 5마리씩의 백서를 희생시켜 좌, 우측 악하선을 적출하여 각각 무게를 측정하였다.

나. 효소 활성도 측정

1) γ -glutamyl transpeptidase(GGT) 활성도 측정
적출된 악하선을 2.5mM Tris-HCl(pH 7.5)내에

0.1mM EDTA, 2mM dithioerythritol(DTT), 2% Triton X-100이 함유되어 있는 완충용액으로 30% 조직 균등액을 만들었다. 이 조직 균등액을 Sorvall 원심분리기에서 SS-34 rotor를 사용하여 10,000×g로 20분간 원심분리한 뒤 상층액을 얻었다. 이때 얻은 상층액을 사용하여 Tate와 Meister¹²⁾의 방법을 보완하여 효소활성도를 다음과 같이 측정하였다. 반응 용액으로써 Tris-HCl(pH 8.0), glycyglycine(pH 8.0), L- γ -glutamyl-p-nitroanilide(pH 8.0)의 최종농도가 각각 60mM, 20mM, 1mM이 되게 혼합한 뒤, 위에서 얻은 적당량의 상층액을 최종적으로 가하여 효소 반응을 일으켰다. 이때 일어나는 효소 반응을 Spectrophotometer를 이용하여 파장 410nm에서 시간 변화에 따른 흡광도 변화를 측정하여 확인하였다. 여기서 GGT 활성도의 1unit는 glycyglycine(20mM) 존재하에 L- γ -glutamyl-p-nitroanilide(1mM)로부터 1분당 형성되는 P-nitroanilide의 1 μ mole에 해당하는 양으로 정하였다.

본 실험에서 단백질의 정량은 Lowry 등¹³⁾의 방법으로, 핵산의 정량은 Burton¹⁴⁾의 방법을 변형한 Waterborg와 Matthews¹⁵⁾의 방법으로 시행하였다.

2) 5'-Nucleotidase 활성도 측정

5'-Nucleotidase 활성도 측정은 Heppel과 Hilmo¹⁶⁾의 방법으로 다음과 같이 중복하여 정량하였다.

1) 항에서 얻은 악하선 조직상층액을 각각 20 μ l씩 시험관에 취하고 재증류수 80 μ l씩을 가하였다. 여기에 50mM Na-AMP(pH 7.0), 0.5M glycine-NaOH 완충용액(pH 9.1), 0.1M MgCl₂ 및 H₂O를 1:2:1:5의 비율로 섞은 반응혼합액을 0.4ml씩 가하여 잘 섞은 후 37°C에서 30분간 진탕시키면서 반응시켰다. 실온에서 8% TCA 용액 2.5ml씩 가하여 반응을 정지시킨후 4.0% ascorbic acid 용액 1.5ml와 2.5% ammonium molybdate 용액 1.5ml을 가하고 잘 섞었다. 위의 시료용액이 반응하는 동안 6개의 시험관에 재증류수 3.0, 2.9, 2.8, 2.7, 2.6 및 2.5ml를 각각 취하고 0.5mM KH₂PO₄ 표준시료용액을 0, 100, 200, 300, 400 및 500 μ l씩을 가하여 최종 부피가 3ml가 되게한 후 4.0% ascorbic acid 용액 1.5ml와 2.5% ammonium molybdate 용액 1.5ml을 가한 반응용액을 위 시료에 대한 표준용액으로써 사용하였다. 위의 시료용액과 표준용액을 37°C에서 2시간동안 진탕시키면서 반응시킨후 Spectro-

photometer를 이용하여 파장 820 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성도를 정량하였다.

3) Ornithine decarboxylase(ODC) 활성도 측정

ODC에 대한 효소활성도 측정은 Olson과 Russell의 방법²⁰⁾을 응용하여 다음과 같이 시행하였다. 1) 항에서 준비한 악하선 상층액에 Sodium phosphate(pH 7.3), pyridoxal-phosphate, dithiothreitol, EDTA 및 L-ornithine의 최종농도가 각각 37.5mM, 0.2mM, 5mM, 1mM 되게 첨가된 효소반용액 1ml씩을 Center well이 장치되어 있는 20ml크기의 air tight Erlenmeyer flask에 각각 취하였다. Center well에는 ¹⁴CO₂ trapping solution(Ethanolamine : methoxyethanol=2:1) 200μl씩을 취하고 효소반용을 위해 취하였던 1ml 반응용액내에 0.5μCi의 DL-(1-¹⁴C)-ornithine을 최종 가하여 37°C에서 30분간 반응을 진행시킨후 6NHCl 200μl을 가하여 효소반용을 중지시켰다. 이때 일어난 효소반용을 trapping solution에 모아진 ¹⁴CO₂의 양을 liquid scintillation counter에서 수를 세어 정량하였다. 이효소의 특이활성도(specific activity)는 단백질 mg당 37°C에서 30분동안 반응하여 분해되어 나온 ¹⁴CO₂의 nmoles로써 표시되었다.

4) Acetyl-Co A carboxylase 활성도 측정

Acetyl-Co A carboxylase 효소 활성도 측정은 Giffhorn과 Katz²³⁾의 방법으로 시행하였다. 1) 항에서 얻은 악하선 조직 상층액내에 5mM MgCl₂, 5mM Citrate, 1.25mM 2-mercaptoethanol과 지방을 제거한 albumin(1g/1l)이 함유되게한 후 37°C에서 30분간 반응시켜 Acetyl-Co A carboxylase를 증합시킨다. 이 반응액에 2.8mM ATP, 0.15mM Acetyl-Co A와 1.56mM KH(¹⁴C)O₃(Specific activity, 0.1Ci/mol)를 첨가하여 정확히 10분간 다시 반응시킨후 6NHCl 0.02ml를 가하여 효소반용을 정지시켰다. 이 반응액을 Bechman microfuge 12에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 100μl을 scintillation counting vial에 옮기고 80°C의 oven에서 완전 건조시켰다. 건조된 vial에 200μl H₂O를 가하여 완전히 녹인 후 Cocktail Solution 15ml를 넣고 liquid scintillation counter에서 radioactivity를 추정하여 효소활성을 단위시간에 단백질 mg당 또는 DNA mg당 units로 표시하였다. 이때 1unit은 37°C에서 단백질 mg당 H(¹⁴C)O₃가 1

μmole/mm의 속도로 malonyl-Co A로 삽입되어지는 양에 해당하였다.

III. 실험 성적

1. 적출된 악하선의 무게

대조군인 좌측 악하선은 실험 전과정을 통해 무게의 차이가 거의 없었으나, 실험군의 경우 DMBA 압착결정소구 매식 6주후에는 약 2배, 15주후에는 약 7배로 증가했으며 15주째의 대조군과의 무게 비율은 약 5.3배였다(Table 1, Fig. 1 참조).

Table 1. Wet weight of submaxillary gland

Period (weeks)	Control (Left)	Experimental (Right) (gm)
0	0.61 ± 0.12	0.60 ± 0.11
3	0.65 ± 0.21	0.93 ± 0.25
6	0.71 ± 0.16	1.20 ± 0.36
9	0.78 ± 0.23	2.16 ± 0.45
12	0.85 ± 0.31	3.50 ± 0.58
15	0.88 ± 0.25	4.65 ± 0.80

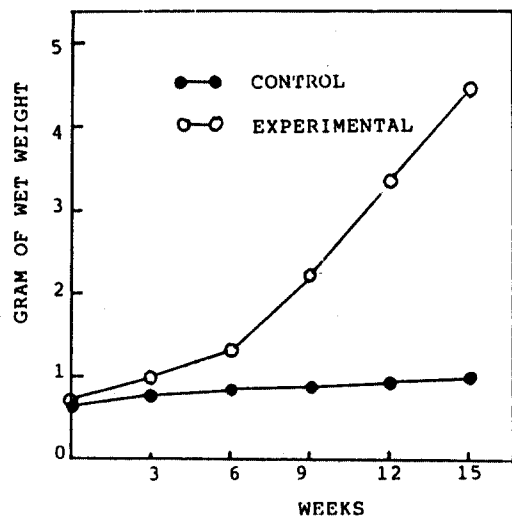


Fig. 1. Changes of wet weight of submaxillary gland

2. γ-glutamyl transpeptidase 효소 활성도

GGT의 활성도를 보면, 대조군은 특기할 만한

차이를 보이지 않았으나, 실험군의 경우 9주째에 최고치인 1.766 ± 0.082 units/mg of DNA 로 실험초기보다 약 8배 가량 증가하였다(Table 2,3 및 Fig. 2,3 참조).

Table 2. γ -glutamyl transpeptidase activity.

Period (weeks)	(units/mg of protein)	
	Control group	Experimental group
0	0.00157 ± 0.00015	0.00164 ± 0.00021
3	0.00160 ± 0.00021	0.00290 ± 0.00024
6	0.00153 ± 0.00027	0.00349 ± 0.00036
9	0.00165 ± 0.00031	0.00537 ± 0.00029
12	0.00161 ± 0.00014	0.00607 ± 0.00041
15	0.00170 ± 0.00032	0.00533 ± 0.00031

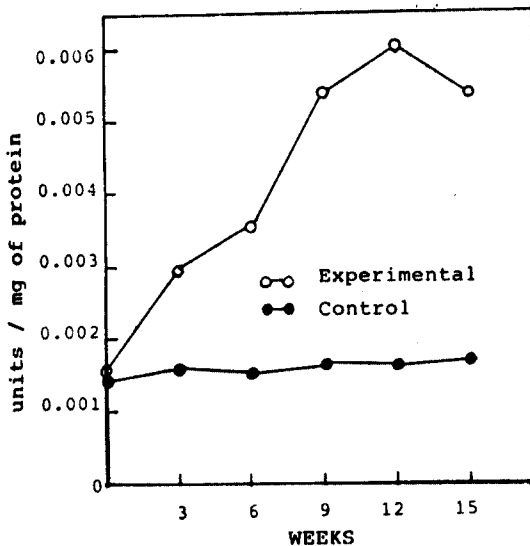


Fig. 2. γ -glutamyl transpeptidase activity. (units/mg of protein)

Table 3. γ -glutamyl transpeptidase activity.

Period (weeks)	(units/mg of DNA)	
	Control group	Experimental group
0	0.232 ± 0.021	0.218 ± 0.012
3	0.242 ± 0.026	0.502 ± 0.036
6	0.229 ± 0.015	1.002 ± 0.052
9	0.236 ± 0.027	1.766 ± 0.082
12	0.218 ± 0.024	1.743 ± 0.090
15	0.226 ± 0.018	0.774 ± 0.038

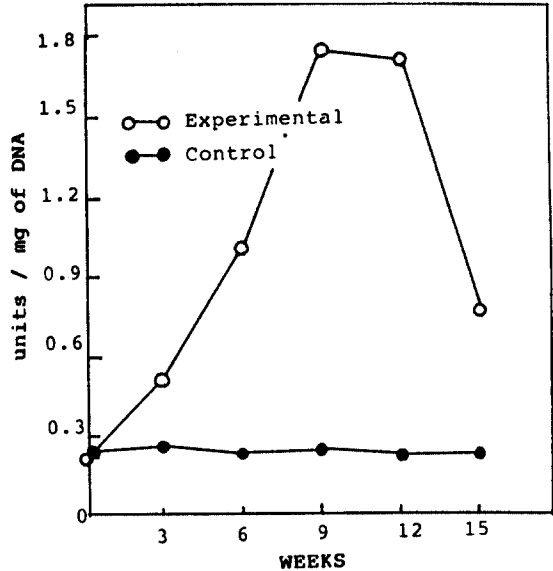


Fig. 3. γ -glutamyl transpeptidase activity. (units/mg of DNA)

3. 5'-Nucleotidase 효소 활성도

실험군에서는 급격히 증가하여 9주째에 최고치인 362.1 ± 53.2 μ moles/mg of DNA 값을 보였으나 단백질양에 대한 비율에서는 3주째에 이미 약 2배 이상 증가한 1.262 ± 0.027 μ moles/mg of protein의 최고치를 보였다(Table 4,5 및 Fig. 4,5 참조).

4. Ornithine decarboxylase 효소 활성도

실험군에서 9주째에 최고의 활성도인 26.2 ± 4.8 nmoles/mg of DNA 를 보였고, 급격히 감소하여 15주째인 실험말기에는 12.5 ± 2.8 nmoles/mg of DNA 로 대조군과 거의 유사한 활성도를 보였다 (Table 6,7 및 Fig. 6,7 참조).

Table 4. 5'-Nucleotidase activity.

Period (weeks)	(μ moles/mg of protein)	
	Control group	Experimental group
0	0.602 ± 0.030	0.599 ± 0.023
3	0.586 ± 0.027	1.262 ± 0.027
6	0.613 ± 0.042	1.143 ± 0.031
9	0.594 ± 0.035	1.101 ± 0.025
12	0.586 ± 0.024	1.061 ± 0.018
15	0.605 ± 0.038	1.030 ± 0.015

Table 5. 5'-Nucleotidase activity.

Period (weeks)	(μmoles/mg of DNA)	
	Control group	Experimental group
0	87.2 ± 12.3	80.6 ± 10.0
3	90.2 ± 13.5	218.3 ± 21.5
6	76.5 ± 11.7	327.2 ± 45.6
9	83.5 ± 14.6	362.1 ± 53.2
12	86.7 ± 18.5	252.2 ± 38.2
15	94.1 ± 21.5	149.5 ± 28.6

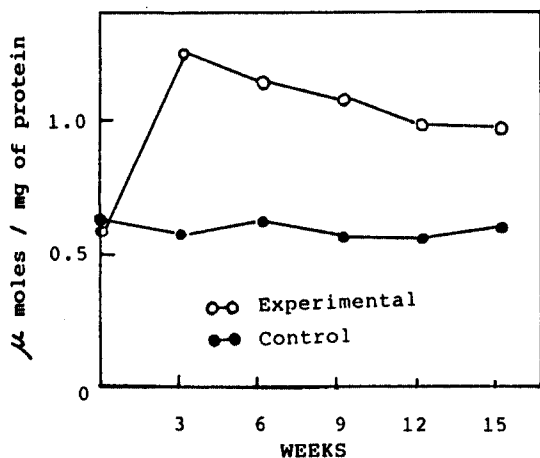


Fig. 4. 5'-Nucleotidase activity. (μmoles/mg of protein)

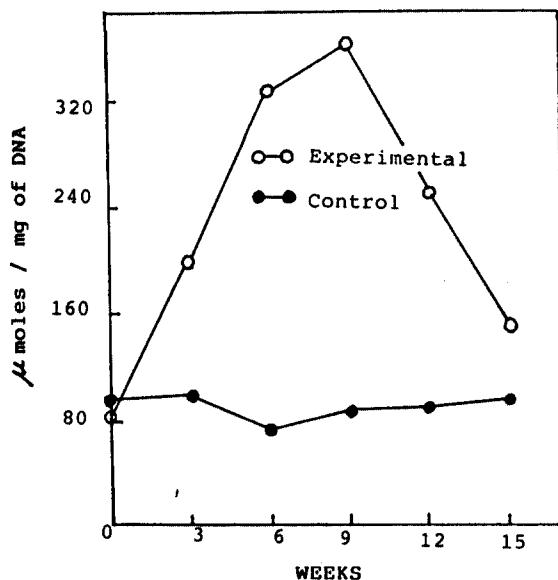


Fig. 5. 5'-Nucleotidase activity. (μmoles/mg of DNA)

Table 6. Ornithine decarboxylase activity.

Period (weeks)	(nmoles/mg of protein)	
	Control group	Experimental group
0	0.086 ± 0.021	0.098 ± 0.011
3	0.100 ± 0.035	0.125 ± 0.032
6	0.094 ± 0.028	0.206 ± 0.057
9	0.084 ± 0.021	0.211 ± 0.048
12	0.098 ± 0.031	0.116 ± 0.031
15	0.092 ± 0.017	0.115 ± 0.021

Table 7. Ornithine decarboxylase activity.

Period (weeks)	(nmoles/mg of DNA)	
	Control group	Experimental group
0	10.1 ± 2.1	10.5 ± 1.2
3	12.6 ± 2.5	19.8 ± 3.2
6	11.3 ± 1.8	25.6 ± 5.1
9	10.6 ± 2.5	26.2 ± 4.8
12	9.8 ± 3.1	17.5 ± 3.6
15	12.3 ± 2.8	12.5 ± 2.8

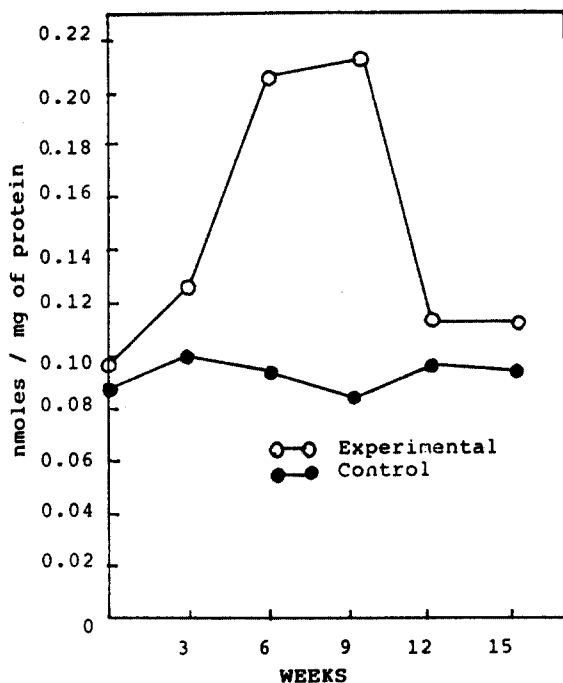


Fig. 6. Ornithine decarboxylase activity. (nmoles/mg of protein)

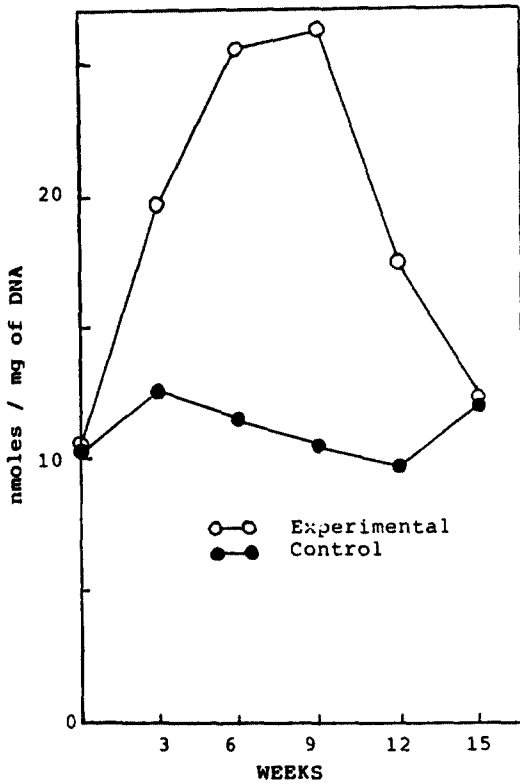


Fig. 7. Ornithine decarboxylase activity. (nmol/mg of DNA)

5. Acetyl-Co A carboxylase 효소 활성도

다른 효소들보다는 다소 빠른 실험 6주째에 최고치인 0.178 ± 0.013 units/mg of DNA 로 실험초기보다 약 2.8배 활성도가 증가하였으며, 그후 급격히 감소하여 ODC와 유사한 양상으로 실험말기에는 대조군과 비슷한 효소 활성도를 보였다(Table 8.9 및 Fig. 8,9 참조).

전실험기간중 대조군에서는 각 효소들의 특기할 활성도 변화가 관찰되지 않았다.

Table 8. Acetyl-Co A carboxylase activity. (units/mg of protein)

Period (weeks)	Control group	Experimental group
0	0.00051 ± 0.00008	0.00055 ± 0.00009
3	0.00048 ± 0.00011	0.00074 ± 0.00008
6	0.00061 ± 0.00013	0.00089 ± 0.00005
9	0.00053 ± 0.00006	0.00069 ± 0.00009
12	0.00058 ± 0.00011	0.00065 ± 0.00013
15	0.00060 ± 0.00013	0.00049 ± 0.00021

Table 9. Acetyl-Co A carboxylase activity. (units/mg of DNA)

Period (weeks)	Control group	Experimental group
0	0.059 ± 0.009	0.063 ± 0.008
3	0.064 ± 0.011	0.085 ± 0.005
6	0.070 ± 0.013	0.178 ± 0.013
9	0.068 ± 0.005	0.081 ± 0.005
12	0.071 ± 0.011	0.074 ± 0.005
15	0.065 ± 0.008	0.061 ± 0.008

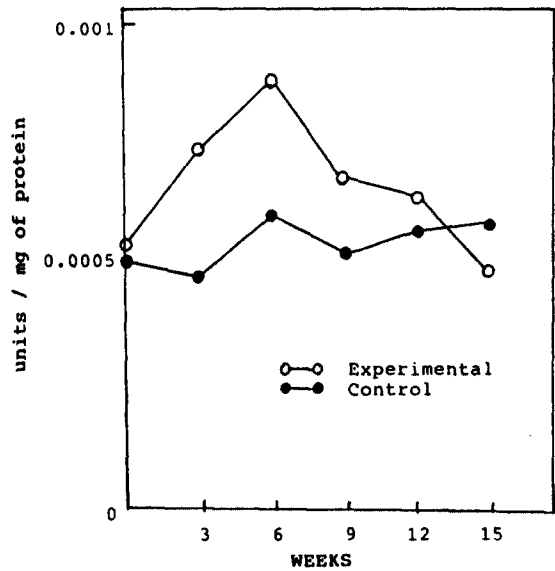


Fig. 8. Acetyl-Co A carboxylase activity. (units/mg of protein)

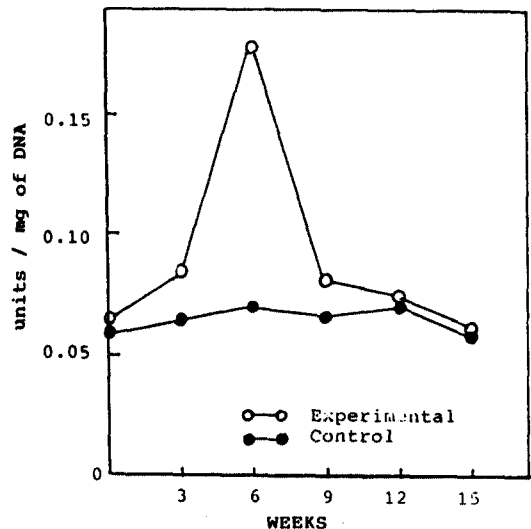


Fig. 9. Acetyl-Co A carboxylase activity. (units/mg of DNA)

IV. 총괄 및 고찰

가장 널리 연구된 구강의 실험 종양 모델은 햄스터 협낭점막의 유포피암으로 1954년 Salley⁶⁸⁾에 의해 처음으로 발표되었으며 타액선 실험종양은 1942년 Steiner⁷⁹⁾가 여러 설치류 악하선에 화학발암제를 주입하여 편평상피암과 선종을 유발한 이래 Bauer와 Byrne⁵⁾은 다양한 형태의 타액선 종양 발생을 보고하였다. 최근에는 강력한 화학발암제인 DMBA에 의한 햄스터^{11, 14, 19, 77)}, 생쥐^{4, 81)} 및 타액선 종양 유도가 용이한 백서 악하선도^{12, 14, 73, 74, 78, 88, 93)} 실험대상으로 많이 이용되고 있다.

GGT는 입과구뿐 아니라 공장의 용모, 담관, 췌장의 소포 및 신장의 근심 곡노세관의 상피세포에서 발견되는 막결합효소로써^{44, 46)} Rutenburg 등⁶⁶⁾이 처음으로 조직화학적 분석 방법을, Szasz⁶⁰⁾은 동적 측광분석법(Kinetic photometric method)을 소개하였으며, 백서의 간^{1, 6, 18, 34, 38, 45, 84)}, 신장⁵⁷⁾ 및 햄스터 협낭^{8, 56, 75, 78, 91)} 점막의 실험종양에서 조직화학적으로 상승된 효소 특이활성도가 입증되어 전암세포에 대해 조직화학적 표식자로서 유용하다. 또한 De Young 등¹⁷⁾은 상승된 GGT 활성도가 간종양에 대한 유용한 표식자가 될 수 있다고 가정하여 생쥐의 정상과 피부암조직에서 조직화학적 방법으로 검사한 결과 유두종에서는 음성이었으나 대부분의 편평상피암은 양성을 보였다고 보고하였다. 반면 생화학적 방법으로 측정된 효소 활성도에 대한 연구는 Cameron 등⁹⁾과 Tsuchida 등⁸⁴⁾이 백서 간종양에서 보고한 바 있으며, 타액선 조직에서는 Hata 등^{27, 28, 29)}, Matsukawa 등⁴³⁾이 실험동물의 정상 이하선 및 악하선에서 보고하였을 정도로 드문 실정이다. 인체에서는 1965년 Albert³⁾가 여러부위의 종양조직에서의 활성도를 발표하였고 최근에는 Calderon-Solt와 Solt⁷⁾가 구강, 인두 및 후두점막의 전암병소와 암병소에서, Chiba와 Jimbow¹⁵⁾는 피부암에서, Mock 등⁴⁴⁾ 구강편평상피암에서 조직화학적 방법으로 GGT 활성도를 측정하여 전암변화에 대한 강력한 표식자가 될 수 있다는 가능성을 제기하였다. 본 실험에서 대조군은 거의 변동이 없었으나 실험군의 경우는 실험초기부터 증가하기 시작하여 6주에는 약 5배의 활성도 증가를 보였고 9주 이후에는 최고치를 보이며 이후 비교적 높은

수치를 계속 나타냈는데, 이는 GGT가 감마 글루타밀 회로의 일부분인 세포내로의 아미노산수송기전에 작용하며³⁰⁾, 이런 대사과정의 가속화가 종양 발생시 필수적인 역할을 한다³²⁾는 관점에서 보면 본 실험의 결과에서도 3주경에 약 2배로 증가한 것으로 보아 발암과정이 시작됐음을 유추할 수 있었다.

5'-Nucleotidase는 세포질막에 대한 표식자로 세포대사에서 세포의 nucleoside 5'-monophosphate를 가수분해 시킨다^{21, 67)}. 동물세포에서의 성질 및 역할에 대해 Frick과 Lowenstein²¹⁾, Harb 등²⁰⁾, Sakai 등⁶⁷⁾이 발표하였고, Campbell^{9, 10)}은 인체에서의 활성도 측정방법을, Schwartz와 Bodansky⁷²⁾는 정상인과 암환자의 혈청내에서 효소 활성도 측정의 의의를 보고하였다. Ip과 Dao³⁶⁾는 유방암환자의 혈청내 효소 활성도의 차이는 임상 상태뿐 아니라 종양의 크기와 관련이 있음을, Chatterjee 등¹³⁾은 난소암환자에서 종양 발생초기에 활성도가 상승됨을 발표하였다. 이효소는 원형질막 표식자로서 받아들여지기 때문에 혈청내의 비정상적인 수치는 세포표면물질의 가속화된 파괴와 방출을 의미한다고 볼 수 있다. 그러므로 이효소의 활성도는 간담즙성 질환뿐 아니라 조기 악성 유방종양진단 및 전이범위 측정시 가치가 있다^{36, 71, 72)}. 그러나 종양 조직자체의 생화학적 효소특이활성도에 대한 연구는 드문 실정이다. 본 실험의 결과에서는 실험군 3주째부터 급격히 증가하여 9주째에 최고치를 나타내나 12주 이후 급격히 감소하는 결과를 보여 이시기에 세포대사가 활발했음을 알 수 있었다. 이들 GGT와 5'-Nucleotidase는 막결합효소로 종양조직이 형성될 때까지는 활성도가 급격히 증가하나 말기에는 혈청내로 효소가 유리되어 조직내에서는 활성도가 떨어지는 것으로 추측된다.

ODC는 세포대사와 증식에 필수적인 역할을 하는 폴리아민생합성경로의 핵심조절효소로 성숙해 세포에 의해 활성도가 조절되거나 성장요인, 호르몬 및 종양증진제를 포함한 많은 자극에 의해 쉽게 유도되는 놀라운 유도력과 매우 짧은 분자반감기를 갖고 있다^{37, 53, 58)}. 이효소의 활성도 증가는 polyamines인 putrescine, Spermidine 및 Spermine의 축적을 야기하며, DNA와 단백질 합성에 좌우되고 조직성장시 중요한 역할을 하므로 폴리아민 및

ODC 활성도의 측정이 인체 종양에 대한 유용한 표식자가 될 수 있다^{24, 31, 69, 70}). O'Brien 등^{50, 51, 52, 54, 55})은 생쥐 피부종양발생과정에서 ODC 활성도의 변화는 종양발생과정의 필수적인 표현형 변화라 보고하였다. Noguchi 등⁴⁹)은 생쥐 간종양에서 ODC의 활성도 증가는 종양세포의 세포내 요소, 아마도 핵과 밀접한 관련이 있다고 하였다. 인체에서는 Scalabrino 등⁶⁹)은 피부상피종에서, Hietala 등³¹)은 편평상피암에서 Glikman 등²⁰)은 유방암에서 Rozhin 등⁶⁰)은 백서와 인체의 결장암에서 ODC 활성도가 종양성장률과 밀접한 관계가 있으며 예후에 대한 신빙성있는 표식자가 될 수 있다고 주장하였다. 본 실험에서도 실험 3주에 2배, 9주에 약 3배의 ODC 활성도를 보여 발암과정과 밀접한 관계가 있음을 나타냈으며 9주 이후 급격히 감소하였다. Inoue 등³⁵)은 생쥐 이하선에서 DNA 합성을 자극하기 위해 isoproterenol을 투여한 후 관찰한 결과 폴리아민 대사의 변화는 DNA 합성과 밀접한 관련이 있으며 폴리아민의 최고치는 ODC 활성도의 증가전에 선행된다고 하였다. 본 실험에서도 6주에 이미 최고치와 유사한 활성도를 나타내어 이 시기에 폴리아민의 대사는 최고치에 이르고 DNA 합성이 왕성했던 것으로 보아 발암과정이 활발했다고 추측되며 9주 이후 변화양상은 육안적으로도 인지할 수 있는 심한 종양조직의 괴사로 인해 세포대사가 저하되어 대사성효소인 ODC의 활성도가 급격히 감소한 것으로 추정된다.

세포막의 지방합성에 관여하는 중요효소인 Acetyl-Co A carboxylase는 malonyl-Co A를 형성하기 위해 biotin과 ATP-dependent Carboxylation을 촉매한다⁴²). 이효소의 활성도는 Citrate, malonyl-Co A, 1가 이온들, covalent modification 및 단백질분해등 다수의 요인들에 크게 영향을 받으며^{60, 83, 86}), 병아리의 간²²), 백서의 간^{33, 40}), 유선^{1, 2}) 및 토끼유선²⁶)등에서 활성도가 연구되었으나 암세포 증식과의 연관관계에 대해서는 연구가 미비하다. Majerus 등⁴⁰)은 백서의 간암에서 지방산 생합성의 이상조절을 보고하였고, Ahmad 등^{1, 2})은 백서의 정상 및 유방암에서의 효소의 차이점을 발표하였다. 저자의 결과에서는 GGT, 5'-Nucleotidase 및 ODC 보다는 다소 빠른 실험 6주에 최고치에 달했으며 그후

급격히 떨어져 실험말기에는 대조군과 유사한 값을 보였다. 이는 발암과정중에는 활성도가 급격히 상승하나 일단 종양이 발생되면 종양조직괴사 등으로 활성도가 떨어지는 것으로 추측된다.

백서 악하선에서의 종양 발생시기에 대해서 Cataldo 등¹²)은 4주에 이형성, 8주에 유표피암 발생을 보고하였고 Standish⁷⁸)는 16주에 종양발생을, Shklar와 Cataldo⁷⁴)는 20주에 역시 같은 결과를 얻었다. 본 실험과 종양유발 방법이 동일한 김⁸²)의 결과는 6주에 이형성을, 10주에 침윤성 유표피암을 보고하였는데 이러한 차이점은 실험동물의 종류, 실험방법간의 차이에 기인하는 것으로 여겨진다. 본 실험에서 각 효소들은 거의 실험 3주 이후에는 정상보다 크게 증가한 효소 특이활성도를 보이며, 실험 9주에 최고치에 달하는 결과로 미루어 이들 효소들의 활성도가 타액선 조직의 전암병소에 대한 표식자가 될 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 따라서 인체종양에 대한 조기진단과 진행에 따른 예후판정에 활용하기 위해서는 향후 혈청 및 종양조직에서의 보다 연관적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

저자는 지용성 발암제인 7,12-dimethylbenz(a)anthracene 암착결정소구를 매식하여 유도한 백서 악하선 종양에서, 종양발생과정중의 γ -glutamyl transpeptidase(GGT), 5'-Nucleotidase, Ornithine decarboxylase(ODC) 및 Acetyl-Co A carboxylase의 특이활성도를 생화학적으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조군인 좌측 악하선의 무게 변동은 거의 없었으나, 실험군의 경우 현저히 증가하여 실험 15주째에는 약 7배로 증가하였다.
2. 대조군의 경우 실험 전 기간에 걸쳐 각 효소들의 활성도 변화가 관찰되지 않았다.
3. 실험군에서 실험 9주째에는 GGT 활성도가 초기의 약 8배로 1.766 ± 0.082 units/mg of DNA의 최고치를 보였다.
4. 5'-Nucleotidase 활성도는 실험 6주째에 급격히 증가하였고 9주째에 최고치인 362.1 ± 53.2

μmoles/mg of DNA 였다.

5. ODC 활성도도 역시 실험 9 주째에 최고치인 26.2 ± 4.8 nmoles/mg of DNA 를 보였고, 그후 급격히 감소하여 실험말기에는 대조군과 유사하였다.
6. Acetyl-Co A carboxylase 활성도는 다른 효소보다 다소 빠른 실험 6 주째에 최고치인 0.178 ± 0.013 units/mg of DNA 를 보였고, 9 주부터 급격히 감소하여 15 주에는 대조군과 유사하였다.

이상의 결과로 보아 이들 효소들은 종양발생과정에서 전암세포에 대한 표식자로서 유용할 것으로 여겨지며, 인체 종양의 조기 진단과 진행에 따른 예후판정에 활용하기 위해서는 향후 혈청 및 종양조직에서의 보다 연관적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Ahmad, P.M., Feltman, D.S., and Ahmad, F. : Studies on acetyl-Co A carboxylase and fatty acid synthase from rat mammary gland and mammary tumours. *Biochem. J.*, 208 : 443 - 452, 1982.
2. Ahmad, F., and Ahmad, P.M. : Studies on rat mammary gland acetyl-Co A carboxylase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 447 : 189 - 201, 1985.
3. Albert, Z. : Gamma-glutamyl transpeptidase in cancers of different human organs. *Nature.*, 205 : 407, 1965.
4. Asfahani, A. El., Higashi, G.I., and 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.
5. Bauer, W.H., and Byrne, J.J. : Induced tumors of the parotid gland. *Cancer Res.*, 10 : 755, 1950.
6. Burton, K. : A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *Biochem. J.*, 62 : 315 - 323, 1956.
7. Calderon-Solt, L., and Solt, D.B. : Gamma-glutamyl transpeptidase in precancerous lesions and carcinomas of oral, pharyngeal, and laryngeal mucosa. *Cancer.*, 56 : 138 - 143, 1985.
8. Cameron, R., Kellen, J., Kolin, A., Malkin, A., and Farber, E. : Gamma-glutamyl transferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, 38 : 823 - 829, 1978.
9. Campbell, D.M. : Determination of 5'-Nucleotidase in blood serum. *Biochem. J.*, 82 : 34p., 1962.
10. Campbell, D.M., and King, E.J. : Serum phosphatases and glycolytic enzymes in cancer of the breast. *Biochem. J.*, 82 : 23p., 1962.
11. Cataldo, E., and Shklar, G. : Chemical carcinogenesis in the hamster submaxillary gland. *J. Dent. Res.*, 43 : 568 - 579, 1964.
12. Cataldo, E., Shklar, G., and Chauncey, H.H. : Experimental submaxillary gland tumors in rats ; Histology and Histochemistry. *Arch. Pathol.*, 77 : 305 - 316, 1964.
13. Chatterjee, S.K., Bhattacharya, M., and Barlow, J.J. : Evaluation of 5'-Nucleotidase as an enzyme marker in ovarian carcinoma. *Cancer.*, 47 : 2648 - 2653, 1981.
14. Chaudhry, A.P., Liposky, R., and Jones, J. : Dose-response of submandibular glands to carcinogen pellets in rats and hamsters. *J. Dent. Res.*, 45 : 1548 - 1552, 1966.
15. Chiba, M., and Jimbow, K. : Expression of gamma-glutamyl transpeptidase in normal and neoplastic epithelial cells of human skin ; a marker for distinguishing malignant epithelial tumours. *British Journal of Dermatology.*, 114 : 459 - 464, 1986.
16. Demetriou, A.A., and Levenson, S.M. : Ornithine decarboxylase as an early indicator of in vitro hepatocyte DNA synthesis. *J. Surg. Res.*, 35 : 163 - 167, 1983.
17. DeYoung, L.M., Richards, W.L., Bonzelet, W., Tsai, L.L., and Boutwell, R.K. : Localization and significance of gamma-glutamyl transpeptidase in normal and neoplastic mouse skin. *Cancer Res.*, 38 : 3697 - 3701, 1978.
18. Edwards, A.M. : Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase in rat hepatocyte monolayer cul-

- tures. *Cancer Res.*, 42 : 1107 - 1115, 1982.
19. Eisenberg, E. : Neoplasia following cessation of DMBA application to hamster buccal pouch. *J. Dent. Res.*, 56 : 1430, 1977.
 20. Farron, F., Hsu, H.H.T., and Knox, W.E. : Fetal-type isoenzymes in hepatic and nonhepatic rat tumors. *Cancer Res.*, 32 : 302 - 308, 1972.
 21. Frick, G.P., and Lowenstein, J.M. : Vectorial production of adenosine by 5'-Nucleotidase in the perfused rat heart. *J. Biol. Chem.*, 253 : 1240 - 1244, 1978.
 22. Fisher, P.W.F., and Goodridge, A.G. : Coordinate regulation of acetyl-Co enzyme A carboxylase and fatty acid synthetase in liver cells of the developing chick in vivo and in culture. *Arch. Biochem. Biophys.*, 190 : 332 - 344, 1978.
 23. Giffhorn, S., and Katz, N.R. : Glucose-dependent induction of acetyl-Co A carboxylase in rat hepatocyte cultures. *Biochem. J.*, 221 : 343 - 350, 1984.
 24. Glikman, P., Vegh, I., Pollina, M.A., Mosto, A.H., and Levy, C.M. : Ornithine decarboxylase activity, prolactin blood levels, and estradiol and progesterone receptors in human breast cancer. *Cancer*, 60 : 2237 - 2243, 1987.
 25. Harb, J., Meflah, K., Duflos, Y., and Bernard, S. : Purification and properties of bovine liver plasma membrane 5'-Nucleotidase. *Eur. J. Biochem.*, 137 : 131 - 138, 1983.
 26. Hardie, D.G., and Cohen, P. : Purification and physicochemical properties of fatty acid synthetase and acetyl - Co A carboxylase from lactating rabbit mammary gland. *Eur. J. Biochem.*, 92 : 25 - 34, 1978.
 27. Hata, K., Abiko, Y., and Takiguchi, H. : Species distribution of gamma-glutamyl transpeptidase in the parotid gland. *J. Dent. Res.*, 59 : 728, 1980.
 28. Hata, K., Hayakawa, M., Abiko, Y., and Takiguchi, H. : Purification and properties of gamma-glutamyl transpeptidase from bovine parotid gland. *Int. J. Biochem.*, 13 : 681 - 692, 1981.
 29. Hata, K., Hayakawa, M., Kobayashi, T., Iwanaga, T., and Takahashi, H. : Species distribution of gamma-glutamyl transpeptidase in the submandibular gland. *Medicine and Biology*. 103 : 225 - 227, 1981.
 30. Heppel, L.A., and Hilmoe, R.J. : 5'-Nucleotidases. In section III-Enzymes in phosphate metabolism. Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., eds. *Methods in enzymology* Vol. II New York, New Academic Press, pp546 - 550, 1955.
 31. Hietala, O., Dzubow, L., Dluhosz, A.A., pyle, J.A., Jenney, F., Gilmour, S.K., and O'Brien, T.G. : Activation of human squamous cell carcinoma ornithine decarboxylase activity by Guanosine triphosphate. *Cancer Res.*, 48 : 1252 - 1257, 1988.
 32. Holley, R.W. : A unifying hypothesis concerning the nature of malignant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69 : 2840 - 2841, 1972.
 33. Holland, R., and Hardie, G. : Both insulin and epidermal growth factor stimulate fatty acid synthesis and increase phosphorylation of acetyl-Co A carboxylase and ATP-citrate lyase in isolated hepatocytes. *FEBS Lett.*, 181 : 308 - 312, 1985.
 34. Huberman, E., Montesano, K., Kuroki, T., St. Vincent, L., P., and Goldfarb, S. : Gamma-glutamyl transpeptidase and malignant transformation of cultured liver cells. *Cancer Res.*, 39 : 269 - 272, 1979.
 35. Inoue, H., Tanioka, H., Shiba, K., Asada, A., Kato, Y., and Takeda, Y. : Effect of isoproterenol on polyamine metabolism in mouse salivary glands. *J. Biochem.*, 75 : 679 - 687, 1974.
 36. Ip, C., and Dao, T. : Alterations in serum glycosyltransferases and 5'-Nucleotidase in breast cancer patients. *Cancer Res.*, 38 : 723 - 728, 1978.
 37. Jänne, J., Pösö, H., and Raina, A. : Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.*, 473 : 241 - 293, 1978.
 38. Laishes, B. A., Ogawa, K., Roberts, E., and Farber, E. : Gamma-glutamyl transpeptidase : A positive marker for cultured rat liver cells derived from putative premalignant and malignant lesions. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 60 : 1009 - 1016, 1978.
 39. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and

- Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265 - 274, 1951.
40. Majerus, P.W., Jacobs, R., Smith, M. B., and Morris, H.P. : The regulation of fatty acid biosynthesis in rat hepatomas. *J. Biol. Chem.*, 243 : 3588 - 3595, 1968.
 41. Manning, R., Dils, R. and Mayer, R.J. : Purification and some properties of acetyl-Coenzyme A carboxylase from rabbit mammary gland. *Biochem. J.*, 153 : 463 - 468, 1976.
 42. Masoro, E.J. : Lipids and lipid metabolism. *Ann. Res. Physiol.*, 39 : 301 - 321, 1977.
 43. Matsukawa, R., Hagakawa, M., and Takigushi, H. : Further study on gamma-glutamyl transpeptidase from bovine parotid gland. *日大口腔科学.*, 11 : 309 - 319, 1985.
 44. Mock, D., Whitestone, B., and Freeman, J. : Gamma-glutamyl transpeptidase activity in human oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg.*, 64 : 197 - 201, 1987.
 45. Moore, M.A., Nakamura, T., and Ito, N. : Immunohistochemically demonstrated glucose-6-phosphate dehydrogenase, gamma-glutamyl transpeptidase, ornithine decarboxylase and glutathione S-transferase enzymes : absence of direct correlation with cell proliferation in rat liver putative preneoplastic lesions. *Carcinogenesis.*, 7 : 1419 - 1424, 1986.
 46. Munjal, D., Chawla, P.L., Lokich, J.J., and Zamcheck, N. : Carcinoembryonic antigen and phosphohexose isomerase, gamma-glutamyl transpeptidase and lactate dehydrogenase levels in patients with and without metastases. *Cancer.*, 37 : 1800 - 1807, 1976.
 47. Naito, Y., and Lowenstein, J.M. : 5'-Nucleotidase from rat heart. *Biochemistry.*, 20 : 5188 - 5194, 1981.
 48. Nemesanazky, É., and Lott, J.A. : Gamma-glutamyltransferase and its isoenzymes : progress and problems. *Clin. Chem.*, 31 : 797 - 803, 1985.
 49. Noguchi, T., Kashiwagi, A., and Tanaka, T. : A factor responsible for increases in ornithine decarboxylase activity in the livers of tumor-bearing mice. *Cancer Res.*, 36 : 4015 - 4022, 1976.
 50. O'Brien, T.G. : The induction of ornithine decarboxylase as an early, possibly obligatory, event in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.*, 36 : 2644 - 2653, 1976.
 51. O'Brien, T.G., Simsiman, R.C., and Boutwell, R.K. : Induction of the polyamine-biosynthetic enzymes in mouse epidermis by tumor-promoting agents. *Cancer Res.*, 35 : 1662 - 1670, 1975.
 52. O'Brien, T.G., Simsiman, R.C., and Boutwell, R.K. : Induction of the polyamine-biosynthetic enzymes in mouse epidermis and their specificity for tumor promotion. *Cancer Res.*, 35 : 2426 - 2433, 1975.
 53. O'Brien, T.G., and Diamond, L. : Ornithine decarboxylase induction and DNA synthesis in hamster embryo cell cultures treated with tumor-promoting phorbol diesters. *Cancer Res.*, 37 : 3875 - 3900, 1977.
 54. O'Brien, T.G., Madara, T., Pyle, J.A., and Holmes, M. : Ornithine decarboxylase from mouse epidermis and epidermal papillomas : differences in enzymatic properties and structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83 : 9448 - 9452, 1986.
 55. O'Brien, T.G., Hietala, O., O'Donnell, K., and Holmes, M. : Activation of mouse epidermal tumor ornithine decarboxylase by GTP ; evidence for different catalytic forms of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84 : 8927 - 8931, 1987.
 56. Odajima, T., Solt, D.B., and Calderon-Solt, L. : Persistence of gamma-glutamyl transpeptidase-positive foci during hamster buccal pouch carcinogenesis. *Cancer Res.*, 44 : 2062 - 2067, 1984.
 57. Ohmori, T., Hiasa, Y., Murata, Y., and Williams, G. M. : Gamma-glutamyl transpeptidase activity in carcinogen-induced epithelial lesions of rat kidney. *Gann.*, 73 : 543 - 548, 1982.
 58. Olson, J.W., and Russell, D.H. : Prolonged induction of hepatic ornithine decarboxylase and its relation to cyclic Adenosine 3', 5'-monophos-

- phate-dependent protein kinase activation after a single administration of diethylnitrosamine. *Cancer Res.*, 39 : 3074 - 3079, 1979.
59. Orlowski, M., and Meister, A. : The gamma-glutamyl cycle ; A possible transport system for amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 67 : 1248 - 1255, 1970.
 60. Pape, M.E., Lopez-casillas, F., and Kim, K.H. : Physiological regulation of Acetyl-Co A carboxylase gene expression : effect of diet, diabetes, and lactation on acetyl-Co A carboxylase mRNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, 267 : 104 - 109, 1988.
 61. Polvinen, K., Sinervirta, R., Alhonen, L., and Janne, J. : Overproduction of ornithine decarboxylase confers an apparent growth advantages to mouse tumor cells. *Biochemical and Biophysical research communications.*, 155 : 373 - 378, 1988.
 62. Potter, V.R. : Biochemical perspectives in cancer reseach. *Cancer Res.*, 24 : 1085 - 1098, 1964.
 63. Raz, A., Collard, J.G., and Inbar, M. : Decrease in 5'-Nucleotidase activity in malignant transformed and normal stimulated cells. *Cancer Res.*, 38 : 1258 - 1262, 1978.
 64. Rozhin, J., Wilson, P.S., Bull, A.W., and Nigro, N.D. : Ornithine decarboxylase activity in the kat and human colon, *Cancer Res.*, 44 : 3226 - 3230, 1984.
 65. Russell, D.H., and Mcvicker, T.A. : Polyamines in the developing rat and in supportive tissues. *Biochim. Biophys. Acta.*, 259 : 247 - 258, 1972.
 66. Rutenburg, A.M., Kim, H., Fischbein, J.W., Hanker, J., Wasserkrug, H.L., and Seligman, A.M. : Histochemical and ultrastructural demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase activity. *J. Histochem. Cytochem.*, 17 : 517 - 526, 1969.
 67. Sakai, Y., Toda, K., Mitani, Y., Tsuda, M., Shinoda, S. and Tsuchiya, T. : Properties of the membrane-bound 5'-Nucleotidase and utilization of extracellular ATP in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Gen. Micro.*, 133 : 2751 - 2757, 1987.
 68. Salley, J.J. : Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J. Dent. Res.*, 33 : 253 - 262, 1954.
 69. Scalabrino, G., Pigatto, P., Ferioli, M.E., Modena, D., Paerari, M., and Caru, A. : Levels of activity of the polyamine biosynthetic decarboxylases as indicators of the degree of malignancy of human cutaneous epitheliomas. *J. Invest. Dermatol.*, 74 : 122 - 124, 1980.
 70. Schuber, F. : Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem. J.*, 260 : 1 - 10, 1989.
 71. Schwartz, M.K. : Enzymes in cancer. *Clin. Chem.*, 19 : 10 - 22, 1973.
 72. Schwartz, M.K., and Bodansky, O. : Serum 5'-Nucleotidase in patients with cancer. *Cancer.*, 18 : 886 - 892, 1965.
 73. Shafer, W.G. : Experimental salivary gland tumorigenesis. *J. Dent. Res.*, 41 : 117 - 124, 1962.
 74. Shklar, G., and Cataldo, E. : Effects of a chemical carcinogen on the submaxillary gland of Albino rats treated with isoproterenol. *Cancer Res.*, 26 : 1319 - 1323, 1966.
 75. Solt, D.B., and Shklar, G. : Rapid induction of gamma-glutamyl transpeptidase-rich intraepithelial clones in 7, 12-Dimethylbenz(a)anthracene-treated hamster buccal pouch. *Cancer Res.*, 42 : 285 - 289, 1982.
 76. Solt, D.B., Calderon-Solt, L., and Odajima, T. : Rapid induction of carcinomas and gamma-glutamyl transpeptidase-rich clones in N-methyl-N-benzyl nitrosamine-treated hamster buccal pouch. *J. Natl. Can. Inst.*, 74 : 437 - 443, 1985.
 77. Solt, D.B., Polverini, P.J., and Calderon, L. : Carcinogenic response of hamster buccal pouch epithelium to 4 polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Oral. Pathol.*, 15 : 5 - 10, 1986.
 78. Standish, S.M. : Early histologic changes in induced tumors of the submaxillary salivary glands of the rat. *Am. J. Pathol.*, 33 : 671 - 689, 1957.
 79. Steiner, P.E. : Comparative pathology of induced tumors of the salivary glands. *Arch. Pathol.*, 34 : 613 - 624, 1942.
 80. Szasz, G. : A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin.*

- Chem., 15 : 124 - 136, 1969.
81. Takai, Y., Murase, N., Hosaka, M., Kawamura, K., and Mori, M. : Immunohistochemical localization of keratin in experimental carcinoma of the mouse submandibular gland. *J. Oral. Pathol.*, 15 : 5 - 10, 1986.
 82. Tate, S.S., and Meister, A. : Subunit structure and isozymic forms of gamma-glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73 : 2599 - 2603, 1976.
 83. Thampy, K.G., and Wakil, S.J. : Regulation of acetyl-Co A carboxylase. *J. Biol. Chem.*, 263 : 6447 - 6458, 1988.
 84. Tsuchida, S., Hoshino, K., Sato, T., Ito, N., and Sato, K. : Purification of gamma-glutamyltransferases from rat hepatomas and hyperplastic hepatic nodules, and comparison with the enzyme from rat kidney. *Cancer Res.*, 39 : 4200 - 4205, 1979.
 85. Wakil, S.J., Titchener, E.B., and Gibson, D.M. : Evidence for the participation of biotin in the enzymic synthesis of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.*, 29 : 225 - 226, 1958.
 86. Wakil, S.J., Stoops, J.K., and Joshi, V.C. : Fatty acid synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 52 : 537 - 579, 1983.
 87. Warburg, O. : *Biochem. Z.* 142(1923), 317 ; *Metabolism of tumors*, translated by F. Dickens (Constable, London, 1930) ; On the origin of cancer cells. *Science.*, 123 : 309 - 314, 1956 ; *Science*, this issue.
 88. Watanabe, Y., Ozono, S., Sato, K., Hisada, T., and Heyden, G. : The application of microspectrocytometry to experimental tumors of rat submandibular gland. *J. Oral. Pathol.*, 16 : 1 - 7, 1987.
 89. Waterborg, A.H., and Matthews, H.R. : The Burton assay for DNA. in *Methods in molecular biology* vol. II. Nucleic acids. Walker, J.M. ed. New Jersey, Humana press. pp1 - 3, 1984.
 90. Weber, G., and Lea, M.A. : The molecular correlation concept of neoplasia. *Advan. Enzyme. Regul.*, 4 : 115 - 145, 1966.
 91. Zhang, L., and Mock, D. : Gamma-glutamyl transpeptidase activity during carcinogenesis of hamster buccal pouch epithelium. *Carcinogenesis*, 8 : 977 - 981, 1987.
 92. 김지학 : 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DM-BA)에 의해 유도되는 백서 타액선 종양에서의 종양특이항원에 대한 연구. *대한악안면성형외과학회지.*, 11 : 203 - 220, 1989.

A STUDY ON SPECIFIC ACTIVITIES OF ENZYMES IN
7, 12 — DIMETHYLBENZ(A)ANTHRACENE(DMBA) - INDUCED
RAT SUBMAXILLARY GLAND CARCINOGENESIS

Hyun Goo Shim, D. D. S., M. S. D.

Department of Dental Science, Graduate School, Yonsei University.
(Directed by Prof. Eui Wung Lee, D. D. S., M. S. D., Ph. D.)

In recent years, tissue antigens and enzymes that will serve as phenotypic markers for malignant cells are becoming increasingly important as diagnostic aids. This study was undertaken to investigate the specific activities of these enzymes in DMBA-induced rat submaxillary gland carcinogenesis. One hundred and twenty Sprague-Dawley rats about 100 gms of body weight were used. In experimental group, DMBA pellet (5mg) was implanted into right submaxillary gland and sham operation was performed into left gland to serve as control.

The animals were sacrificed every three weeks up to 15 weeks. Submaxillary glands were excised on both sides and enzyme assays for γ -glutamyl transpeptidase (GGT), 5'-Nucleotidase, Ornithine decarboxylase (ODC) and Acetyl-Co A carboxylase were carried out biochemically.

The obtained results were as follows ;

1. In control group, there was no significant weight change of submaxillary gland, while in experimental group, weight was increased remarkably about 7-fold at 15th week since DMBA implantation.
2. In control group, there was no change in specific activities of enzymes during the experimental period.
3. GGT activity was rapidly increased reaching a peak of 1.766 ± 0.082 units/mg of DNA, 8-fold greater than that of onset.
4. 5'-Nucleotidase activity was increased reaching a peak of 362.1 ± 53.2 μ moles/mg of DNA at 9th week.
5. ODC activity was rapidly increased, reaching a peak of 26.2 ± 4.8 nmoles/mg of DNA at 9th week and quickly returned to that of control at 15th week.
6. Acetyl-Co A carboxylase activity was rapidly increased earlier than other enzymes, reaching a peak of 0.178 ± 0.013 units/mg of DNA at 6th week and quickly declined to the control level at 15th week.