

DMBA 유도 햄스터 협낭암 발생과정에서 방사선 조사가 증식세포핵항원(PCNA)의 발현과 apoptosis 유발에 미치는 영향

서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 치학연구소
전인성 · 허민석 · 최항문 · 이삼선 · 최순철

The Effect of Irradiation on the Expression of PCNA and Apoptosis Induction during the DMBA Induced Carcinogenesis in Hamster Buccal Pouch

In-Seong Jeon, Min-Suk Heo, Hang-Moon Choi, Sam-Sun Lee, Soon-Chul Choi

Department of Oral and Maxillofacial Radiology & Dental Research Institute, College of Dentistry, Seoul National University

ABSTRACT

Purpose : This study was carried out to investigate the effect of irradiation on the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis induction during the carcinogenesis in hamster buccal pouch.

Materials and methods : Three months old Syrian golden hamsters were divided into control and 2 experimental groups. Hamsters in control group were left untreated on buccal pouchs. Twenty four hamsters were treated with 0.5% DMBA tri-weekly on the right buccal pouch. Forty eight hamsters were treated with 0.5% DMBA tri-weekly and irradiated with the dose of 5 Gy and 10 Gy at 6, 9, 12, 15 weeks after DMBA application. Resected buccal pouches were sectioned and examined for potential expression pattern of PCNA and apoptosis.

Results : The PCNA index was increased with the stages of buccal pouch epithelium carcinogenesis except the hyperplasia stage in control group ($p < 0.05$). The irradiation did not effect on the PCNA index in the dysplasia and the carcinoma in situ stage, but in the hyperplasia stage, the PCNA index was increased with 10 Gy radiation and decreased in the carcinoma stage ($p < 0.05$). The apoptotic index was significantly decreased from the carcinoma in situ stage and the lowest in the carcinoma stage. The apoptotic index was significantly decreased in the hyperplasia and dysplasia stage with the 5 Gy irradiation and significantly increased only in the carcinoma stage with the 10 Gy irradiation ($p < 0.05$).

Conclusion : The PCNA and apoptotic index were varied according to the irradiation period and dosage in each carcinogenesis stage. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol 2000 ; 30 : 207-216*)

KEY WORDS : proliferating cell nuclear antigen, apoptosis, neoplasm, radiation

서 론

두경부에 생기는 암종 중 편평상피암종은 매우 높은 발생빈도를 보이고 있고 이러한 암종의 조기발견을 위해 여러 가지 종양표식자가 개발되어 임상적으로 일부 유용하게 사용되고 있으며¹ 이러한 종양표식자는 암종의 병리조직학적 단계에 따라 여러 가지 변이가 나올 수 있다.² 발암 과정에서 각 단계가 진행될수록 이상 분열 및 핵-세포질

비율이 증가하는 양상을 보이게 되는데 과형성 단계는 외부의 자극에 의해 조직의 세포수가 증가하는 것을 말하며 상피세포가 편평상피세포로 화생 (metaplasia)되는 경우가 많고 이형성 단계에서는 개세포의 균일성과 구조적 배열성을 상실하므로 어느 정도의 다형성과 핵의 과염색성을 보이고 극성의 상실과 세포의 방향상실 (disorientation) 등이 나타난다. 상피내암에서는 이러한 이형성이 심하고 표피의 전 층을 침범하면서 나타나는데 상피층의 더 많은 부분들이 비정형세포로 대체된다. 마지막 암종의 단계는 상피내암과 매우 유사하며 암종이 결체조직으로 침윤된다.

여러 보고들에 의하면 사람에게 생기는 두경부암에서 상피성장인자수용체 (Epidermal Growth Factor Receptor : EGF-r)가 과발현되고³ 증식세포핵항원 (Proliferating Cell Nu-

접수일 : 2000년 5월 9일 채택일 : 2000년 6월 12일
Correspondence to : Prof. Soon-Chul Choi
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Seoul National University, 28-22, Yeongun-dong, Chongno-ku, Seoul, 110-749, Korea.
Tel) 02-760-2622, Fax) 02-744-3919
E-mail) raychoi@snu.ac.kr

clear Antigen : PCNA)이 증가하며,⁴ p53 종양억제유전자 역시 많이 발현된다고 알려져 있다.⁵ 이 중 PCNA는 DNA polymerase delta의 보조 단백질로 알려져 있으며,⁶ Bravo 등⁷에 의하면 PCNA의 발현이 세포의 증식기 중 G1 중기에 급속도로 증가하여 S기에 가장 많이 나타나고 G2/M기에 감소가 시작되므로 세포의 증식정도를 평가하는데 유용하다고 알려져 있다. 그러므로 PCNA는 병소의 조직학적 진전과 커다란 상관 관계가 있어 다단계 발암과정현상을 이해하는 유용한 생체표식자가 될 수 있다.^{4,6}

Apoptosis란 “원치 않는” 세포를 정확하게 잘 조절하여 제거하도록 하는 계획적인 세포의 자연사멸을 말하고⁸ 이는 조직의 괴사에서 나타나는 세포사와는 다른 형태이다.⁹ 종양의 크기가 증가할 때 종양의 내부세포에서 apoptosis가 나타나고 종양에 대한 방사선 치료시 종양의 크기가 감소하는 것은 apoptosis와 관련이 있다고 보고되었다.¹⁰ Apoptosis는 세포사멸의 중요한 형태로서 성장장기의 발생과 분화, 세포수의 조절, 세포분열 및 종양형성에 깊이 관여한다고 알려져 있어 최근 종양표식자들과의 연관성과 그 기전에 관한 연구가 이루어지고 있다.¹¹ 인체의 여러 장기에서 종양세포의 증식능력에 따른 예후¹² 및 개개 장기의 apoptosis에 대한 연구가 진행되고 있으며 또한 이미 유발된 암중에 방사선을 조사하여 암종의 조직 증식능을 평가하는 연구는 많이 보고된 바 있으나¹³⁻¹⁶ 인위적으로 암종을 유발해 가는 과정에서 방사선을 조사하였을 때의 변화에 관한 연구는 미미한 실정이다. 또한 방사선이 apoptosis를 유발하는 인자로 보고되었으나^{17,18} 암종의 진행단계에 따라 방사선이 조사되었을 때 유발되는 apoptosis의 발현 정도에 대해서는 알려져 있지 않다. 이에 저자는 햄스터의 협낭에 인위적으로 암을 유발시켜 가면서 정상, 과형성, 이형성, 상피내암, 암종의 5단계에서 방사선을 조사하였을 때 나타나는 PCNA의 발현 및 apoptosis의 유발 정도를 정량분석하여 발암 단계에 따른 방사선조사에 의한 조직증식능 및 apoptosis의 발현을 비교평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

일정한 실내온도와 습도 하에서 고품사료, 야채 및 물로 일정기간 사육한 생후 3개월된 체중 90-120 gm의 햄스터 80마리를 종양 유발군, 종양 유발 후 방사선 조사군, 대조군으로 나누어 사용하였다.

2. 연구방법

1) 암 생성

발암물질로는 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthra -cene (DMBA:

Sigma Co, USA)을 mineral oil에 용해하여 0.5%의 농도로 협낭에 주 3회씩 실험 전 기간에 걸쳐 면봉으로 도포하고 6주, 9주, 12주, 15주 후에 각각 6마리씩 희생시켰다.

2) 방사선조사

암을 유발해 나가는 과정에서 각각 6주, 9주, 12주, 15주째에 세습 137을 선원으로 하는 MK 1-68 Irradiator (Shepherd & Associates, USA)를 사용하여 협낭 부위에 5 Gy와 10 Gy의 방사선을 국소적으로 단일 조사한 후 24시간 후에 각각 6마리씩 희생시켰다.

대조군은 생후 3개월의 햄스터 8마리로 하였다.

3) 발암단계 평가

햄스터 협낭암에서 조직을 채취하여 10% 중성 포르말린 용액에 고정된 후 통상방법에 따라 파라핀에 포매하고 5 μm 두께의 표본을 제작하여 HE 염색한 후 2회에 걸쳐 광학현미경으로 발암단계를 평가하였다. 발암 단계는 정상군, 과형성군, 이형성군, 상피내암군, 암종군의 5단계로 구분하였다.

4) PCNA 발현 조사

(1) PCNA 염색

병변을 대표하는 소견을 보이고 보관상태가 양호한 파라핀 블록 1개를 선택한 후 avidin biotin immunoperoxidase staining system을 사용하여 PCNA에 대한 면역염색을 시행하였다. 파라핀 블록을 5 μm 두께로 잘라서 poly-L-lysine으로 피복된 유리 슬라이드 위에 부착시켜 60°C에서 1시간 부란시킨 후 조직을 xylene과 알코올로 탈파라핀 및 탈수시켰다. 0.1 M PBS에 10분 수세 후 구연산 완충액 (pH 6.0)에 담아서 전자오븐에 30초간 전 처치하고 냉각시켰다. 3% 과산화수소(H₂O₂)에 5분간 작용시켜 내인성 peroxidase의 작용을 차단시킨 후 증류수로 5분간 수세하였다. pH 7.6 Tris 완충액에 약 5분간 2회 담구고 나서 정상 염소 혈청 (DAKO)으로 10분간 작용시켜 비특이적 단백 염색을 차단하였다. PCNA에 대한 항체 (PC 10, DAKO PATIS, A/S Denmark)는 1:100으로 희석하여 사용하였고 약 1시간 반응시켰다. 다시 pH 7.6 Tris 완충액에 약 5분간 2회 씻은 후 이차항체로 바이오틴이 부착된 rabbit anti-mouse IgG link antibody를 15분간 작용시키고 다시 Tris 완충액으로 2회 5분간 세척하였다. Streptoavidin-biotin complex (DAKO, LSAB K681)에 약 15분간 작용시킨 후 다시 Tris 완충액으로 5분간 2회 세척하였다. diaminobenzidine (DAB)으로 5-10분간 발색시키고 수세한 후 crystal mount로 봉입하였다.

(2) PCNA 지수의 판정

PCNA 지수의 판정은 400배 시야에서 사진을 촬영하여 핵이 갈색으로 분명하게 염색된 세포만을 양성으로 간주하였으며 1,000개 이상의 세포를 세어 전체 세포 수에 대한 양성 세포수의 백분율을 구하고 이에 대한 평균 및 표

준편차를 구하여 t-test로 통계처리하였다.

5) apoptosis 유발 조사

(1) apoptosis 염색

10% 포르말린 용액에 고정한 후 통상방법에 따라 파라핀에 포매하여 5 μm 두께로 박절하고 poly-L-lysine으로 전처리한 후 유리 슬라이드에 부착시켰으며 xylene으로 파라핀을 제거하고 단계적인 알코올 함수한 후 표본 슬라이드를 제작하여 Apoptag kit (Apoptag^R, In situ Apoptosis Detection Kit, Fluorescein Oncor^R)를 이용한 TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay로 검사하였다. 지시된 염색과정에 따라 유리 슬라이드를 증류수에 수세한 후 37°C PBS에 30분간 방치하였다. PBS를 제거한 후 20 μl/ml의 proteinase K 용액을 가하고 37°C에서 30분간 작용시켰다. 증류수로 2분간씩 4회 수세하였다. DNA nick end labeling 과정으로 54 μl의 TdT buffer II를 가한 후 5-10분간 실온에 방치한 후 용액을 제거하고 54 μl의 TdT 용액을 가하여 37°C에서 60분간 작용시켰다. 그 후 TB 완충액을 용기에 넣고 유리슬라이드를 실온에 30분 둔 후 증류수로 수세하였다. 50 μl의 차단용액으로 10분간 실온에서 방치한 후 PBS 완충액으로 5분씩 3회 세척하였고 Anti-Digoxigenin-Fluorescein에 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 실온의 moisture chamber에서 30분간 둔 후 유리슬라이드 표본을 PBS 완충액으로 세척하였고 Propidium Iodide (PI) staining solution으로 발색시켰다. 그 후 슬라이드를 PBS 완충액으로 다시 세척하였고 흐르는 물에 수세한 후 알코올 탈수 과정을 거쳐 봉입하였다.

(2) apoptotic 지수의 판정

Kr-Ar Laser type의 공초점레이저주사현미경 (confocal laser scanning microscope : CLSM, Bio-Rad, MRC1024)을 사용하여 Fluorescein Isothiocyanate (FITC)와 PI에 대하여 488 nm에서 568 nm의 dual wavelength excitation을 이용하여 각 절편 당 3군테를 임의로 설정하여 사진을 얻은 후 각각 400배의 영상에서 1,000개 이상의 세포를 세어 전체 세포수에 대한 apoptosis 양성 세포수의 천분율을 구하고 평균 및 표준편차를 구하여 t-test로 통계처리하였다.

결 과

1. 발암단계 평가

1) 6주째: 과형성군

결체조직에서 다형핵백혈구와 조직구 및 형질세포가 침윤하는 염증성 반응을 보였으나 편평상피화생 (squamous metaplasia)을 보이는 곳과 세포들의 비정형성은 드물게 관찰되었다. 이 시기에 long rete-peg를 가지는 과각화증이 관찰되었다 (Fig. 1a).

2) 9주째: 이형성군

무질서하게 세포의 증식이 일어났고 개개 세포의 균일성과 구조적 배열성이 상실되었으며 다형성 및 핵의 과염색성을 보였다. 또한 극성의 상실과 세포의 방향상실 (dis-orientation) 등이 관찰되었다 (Fig. 1b).

3) 12주째: 상피내암군

비정형세포들이 편평상피 기저층을 포함하여 표피의 전층에 걸쳐 나타났다. 핵-세포질 비율의 변화와 극성의 소실 뿐만 아니라 유사분열의 증가나 다형증 등이 관찰되었다 (Fig. 1c).

4) 15주째: 암증군

종양세포가 결체조직까지 침범한 형태를 보였고 암 주위로 섬유화가 심하게 진행된 경우가 많았으며 종양이 더욱 고형성으로 변했다. 특히 조직의 괴사와 염증반응이 조직구의 침윤과 함께 동반되었고 암의 분화가 비교적 잘 된 경우도 관찰되었다 (Fig. 1d).

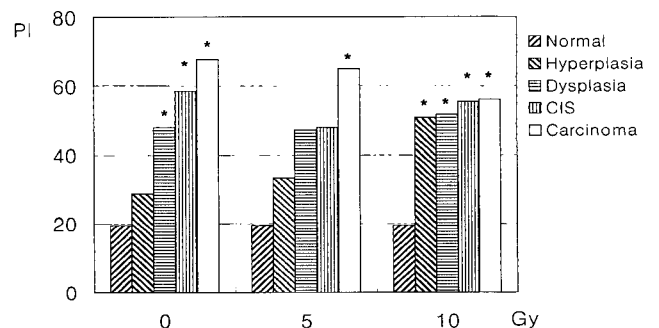
2. PCNA 발현

시간이 경과함에 따라 전반적으로 모든 군에서 PCNA의 발현이 증가하였는데 방사선을 조사하지 않은 군에서는 PCNA 지수가 28.78, 48.02, 58.12, 67.72로 과형성군을 제

Table 1. PCNA index of normal and carcinogenesis group according to radiation dose (%)

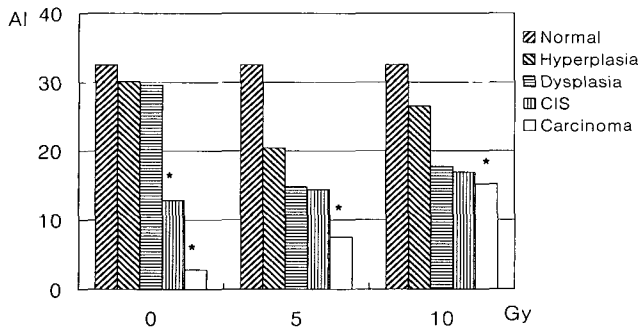
Carcinogenesis	0 Gy	5 Gy	10 Gy
Control	19.50 ± 3.71	19.50 ± 3.71	19.50 ± 3.71
H	28.78 ± 4.44	33.34 ± 8.52	50.72 ± 12.51
D	48.02 ± 6.63	47.24 ± 11.53	51.66 ± 9.18
S	58.52 ± 17.16	48.04 ± 9.33	55.43 ± 6.08
C	67.72 ± 10.45	64.94 ± 7.44	56.07 ± 7.19

H : hyperplasia group, D : dysplasia group, S : carcinoma in situ group, C : carcinoma group

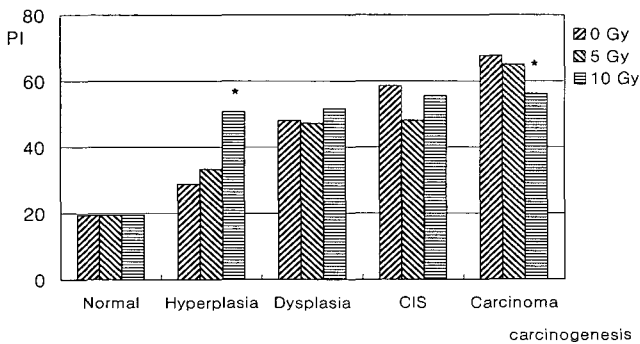


PI : PCNA Index, CIS : carcinoma in situ
* : Statistically significant difference compared to control group (p < 0.05)

Fig. 2. PCNA index of normal and carcinogenesis group according to radiation dose.



AI : Apoptotic Index, CIS : carcinoma *in situ*
 * : Statistically significant difference compared to control group (p<0.05)
Fig. 3. Apoptotic index of normal and carcinogenesis group according to radiation dose.



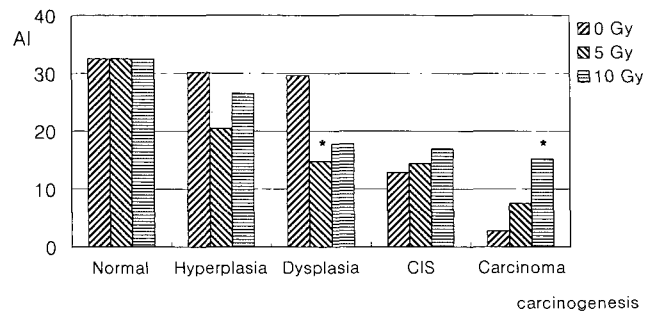
PI : PCNA Index, CIS : carcinoma *in situ*
 * : Statistically significant difference compared to non-irradiated group of each carcinogenesis stage (p<0.05)
Fig. 4. PCNA index of normal and irradiated group according to carcinogenesis stage.

의하고는 발암이 진행됨에 따라 유의성 있게 증가하였다 (p<0.05). 5 Gy 조사시에는 33.34, 47.24, 48.04, 64.94로 암종군만이 정상군에 비해서 유의성 있게 증가하였고 10 Gy 조사시에는 50.72, 51.66, 55.43, 56.07로 과형성군부터 유의성 있게 증가하였으나 그 후로는 크게 다르지 않았다 (Table 1, Fig. 2).

발현양상은 과형성병소에서는 PCNA가 주로 기저층에서 발현되나 이형성증부터는 부기저층에서 발현되기 시작하여 암종이 되면서 점막전층에 걸쳐 PCNA가 발현되었다. 발암상태에 따라 방사선조사량의 변화에 따른 차이를 보면 이형성군과 상피내암군에서는 방사선 조사가 PCNA 발현에 영향을 주지 않았으나 과형성군에서는 10 Gy를 조사한 경우에 PCNA 발현이 증가하였고 암종군에서는 감소하였다 (p<0.05) (Fig. 4).

3. Apoptosis 유발

Apoptosis 지수는 암종이 성숙해 감에 따라 점차 감소하는 소견을 보였는데 방사선을 조사하지 않은 군에서는



AI : Apoptotic Index, CIS : carcinoma *in situ*
 * : Statistically significant difference compared to non-irradiated group of each carcinogenesis stage (p<0.05)
Fig. 5. Apoptotic index of normal and irradiated group according to carcinogenesis stage.

Table 2. Apoptotic index of normal and carcinogenesis group according to radiation dose

Carcinogenesis	0 Gy	5 Gy	10 Gy
Control	32.50 ± 5.36	32.50 ± 5.36	32.50 ± 5.36
H	30.12 ± .65	20.40 ± 6.64	26.50 ± 6.88
D	29.61 ± 7.52	14.78 ± 3.65	17.71 ± 5.93
S	12.82 ± 3.68	14.37 ± 8.70	16.88 ± 7.23
C	2.77 ± 1.20	7.49 ± 2.01	15.18 ± 8.86

H : hyperplasia group, D : dysplasia group, S : carcinoma *in situ* group, C : carcinoma group

30.12, 29.61, 12.82, 2.77로서 상피내암군부터 유의성 있게 감소하였으며 (p<0.05) 5 Gy 조사시에는 20.40, 14.78, 14.37, 7.49, 10 Gy 조사시에는 26.50, 17.71, 16.88, 15.18로 전반적으로 감소하는 경향을 보였으나 암종군에서는 유의성이 있었다 (Table 2, Fig. 3). 발암상태에 따라 방사선조사량의 변화에 따른 차이를 보면 5 Gy의 방사선을 조사한 경우에 과형성군과 이형성군에서 apoptosis 발현이 유의성 있게 감소하였으며 10 Gy의 방사선을 조사한 경우에는 암종군에서만 유의성 있게 증가하였다 (p<0.05) (Fig. 5).

고 찰

종양의 발생기전에 관해서는 아직 해결해야 할 문제가 많이 남아 있지만 발암은 개시와 증진이라는 2가지의 독립된 단계가 필요하다.¹⁹

종양화 과정은 전암병소로부터 암으로 발전되는 다단계 발암과정을 겪게 되는데 이러한 실험종양은 1954년 Salley²⁰가 최초로 DMBA를 햄스터 협낭 점막에 도포하여 편평상피암을 실험적으로 발생시켰고 1961년 Morris²¹에 의해 이 시술이 확립되고 표준화되었다. 햄스터 협낭 점막은 사람과 유사한 다층편평상피로 되어 있으며 면역학적 특성에 의해 쉽게 편평상피암이 유도되고 관찰이 용이한 관계로 널리 이용되고 있으며²⁰ 발암과정의 시기에 관하여 Salley²⁰

는 증식, 유두종, 상피내암 및 침윤성상피암의 4단계를 거친다고 하였으나 저자에 따라 약간의 차이가 난다. 본 실험에서는 정상군을 포함하여 과형성, 이형성, 상피내암, 암종의 5단계로 분류하였다. 본 실험에서 사용한 DMBA는 polycyclic aromatic hydrocarbon으로 대사과정에서 핵산의 공유결합구조를 변형시켜 암을 유발하는데 대부분 용매에 녹여서 바르거나 주입하며 결정소구로 만들어 생체 내에 매식하기도 한다.²²⁻²⁴ 본 연구에서는 편평상피암종의 유발을 위해 직접 바르는 실험을 하였다. 편평상피암종은 대략 12주 이상에서 발현하였고 상피의 과형성은 6주째, 이형성은 9주째, 상피내암은 12주째에 나타났으며 약간의 오차를 보이기도 하였으나 이는 종에 따른 차이와 그 외의 여러 환경적 요인에 의한 것으로 생각할 수 있다. 15주 이상에서는 100%의 암종 발생을 보였고 이러한 조직학적 소견은 Sumitomo 등²⁵의 결과와 유사한 양상을 보이고 있다.

암 유전자의 활성화와 암억제 유전자의 불활성이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 암 유전자를 3군으로 분류하는데 제 1군은 myc, ras, abl과 같은 종양유전자로서 세포의 성장과 증식을 촉진하는 유전자이며 제 2군은 p53과 Rb로 세포의 성장과 증식을 억제하는 유전자이고 제 3군은 주로 계획된 apoptosis에 관여하는 bcl-2와 같은 유전자를 포함하고 있다.²⁶ 암 조직에서 암 유전자나 종양 억제 유전자의 변화를 보는 방법으로는 직접 유전자를 추출해서 서열분석을 하여 돌연변이 여부를 가리는 방법과 고정된 조직 혹은 동결조직에서 면역조직화학적 방법을 이용하여 유전자의 산물인 특이단백의 변화 혹은 발현을 관찰하는 방법이 있는데 전자는 돌연변이 여부와 그 부위를 정확하게 밝힐 수 있는 반면 후자는 조기발견을 가능하게 해주고 간편하게 결과를 알 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 후자의 면역조직화학적 염색 방법을 이용하여 PCNA 지수를 산출하였고 apoptosis 지수는 apoptotic체를 분명하게 검출하기 위하여 형광발색시킨후 공초점레이저주사현미경을 이용하여 계산하였다.

Ogata 등,²⁷ Robins 등,²⁸ Hall 등²⁹은 종양주변의 정상상피에서도 PCNA 양성 세포가 현저히 증가되었다고 보고하면서 그 이유는 종양세포가 성장인자를 분비하여 주변세포의 PCNA의 발현을 증가시키기 때문이라고 하였다. 본 실험에서도 시간이 경과함에 따라 PCNA의 발현이 증가하였는데 특히 편평상피암이 생긴 12주 이상부터 크게 증가하였으며 암종이 고형화되는 15주 경부터도 계속 PCNA에 강하게 염색되는 소견을 보였다. 그러나 방사선을 조사하였을 경우에는 PCNA의 발현 양상이 달라져 5Gy 조사시에는 암종군 만이 정상군에 비해서 유의성 있게 증가하였고 10Gy 조사시에는 과형성군부터 유의성 있게 증가되었으나 그 이후로 PCNA 지수는 큰 변화를 보이지 않았다. 방사선조사 자체에 의해서 정상조직의 PCNA 지수가 변화되는 것을 방지하기 위해서 방사선조사 24시간 후에 바로

실험동물을 희생시켰다. 따라서 본 연구의 의도대로 다단계 발암과정에서 방사선조사가 암종세포에 영향을 주어 PCNA 지수변화를 나타낸 것으로 생각된다. 0Gy, 5Gy, 10Gy의 경우 모두에서 PCNA는 증가하는 양상을 보이나 방사선조사량이 많을수록 발암과정에 따른 증가율이 완만해지는 것을 볼 수 있고 이는 암종세포의 억제현상으로 조심스럽게 생각할 수 있다. 5Gy를 조사한 경우에 이형성군과 상피내암군에서는 거의 차이를 보이지 않았으나 방사선을 조사하지 않은 군에 비해서는 약간 감소한 것을 볼 수 있고 10Gy 조사시에는 오히려 증가하였는데 유의성은 없었으며 암종군에서는 10Gy 조사시에 유의성 있게 감소하였다. 햄스터 협낭암을 대상으로 한 본 실험에서 PCNA 발현양상을 보면 과형성병소에서는 PCNA가 주로 기저층에서 발현되나 이형성증부터는 부기저층에서 발현되기 시작하여 암이 되면서 점막전층에 걸쳐 PCNA가 발현되었다. 이는 사람의 구강상피 내 전암병소 중 정상과 과형성병소에서는 PCNA는 기저층에서 발현되나 이형성, 상피내암과 침윤성 암에서는 부기저층에서 PCNA가 발현되어 이형성과 부기저층의 PCNA 발현이 매우 높은 관계가 있다는 Sumitomo 등²⁵의 결과와 유사하였다. Sumitomo 등²⁵의 연구에서 PCNA 지수는 3주에 12-25%, 4주에 30%, 6주에 37%, 8주 이후에는 38%로 본 연구보다는 전반적으로 각 단계마다 약간씩 낮게 나왔으나 이들 상호간의 수치의 차이는 관찰자에 따라 어느 정도의 염색을 양성으로 택하는가가 다르기 때문인 것으로 생각된다.

Apoptosis는 1972년 Kerr 등³⁰이 처음 언급한 이래 현재까지 다양한 분야에서 연구되고 있고 국내에서는 apoptosis를 세포자연사, 세포사멸, 소멸, 고사 등 여러 가지 용어로 번역하고 있으나 아직 통일되지 않은 실정이다. 원칙 없는 세포를 정확하게 잘 조절하여 제거하도록 하는 유전자의 제어에 의한 계획적인 세포의 자연사멸을 말하고³¹ 정상조직의 turn over, 돌연변이, 내분비와 관련된 위축, 방사선 조사 등에 의해 나타날 수 있다.³²⁻³⁴ Apoptosis의 특징으로는 세포질의 농축, 원형질막 미세섬포의 소실, 핵의 농축과 분해를 들 수 있으며 염색체 DNA가 약 180 bp의 oligomer로 심한 붕괴를 일으키게 된다. 즉 염색질의 응집이 일어난 후 핵이 여러 조각으로 나뉘고 각각의 조각은 세포질로 쌓이며 이때 세포질안에는 핵 조각과 세포내 소기관이 포함되어 있는데 이것을 apoptotic체라고 한다.³⁵

Apoptosis의 발현여부는 광학현미경적 관찰에 의존해 왔으나 apoptotic체의 크기가 작고 침윤한 림프구와 감별이 어려운 단점이 있었다. 그래서 최근에는 apoptotic 체를 검출할 수 있는 특수염색법이 개발되었고 in situ end labeling (ISEL)법³⁶이나 terminal deoxynucleotidyl transferase mediated UTP nick end labeling (TUNEL)법³³ 등을 이용하여 보다 정확하게 apoptosis를 검출할 수 있게 되었다. 이 중 Gavrieli 등³³이 개발한 TUNEL법은 한 개의 세포에서

DNA 조각을 in-situ로 볼 수 있고 이는 통상의 형태학적인 방법보다도 더 예민하다. 관찰에 이용된 공초점 레이저주사현미경은 레이저를 광원으로 이용한 것으로 정교한 초점을 쉽게 맺을 수 있고 표본 내부로 투영되어 표본을 얇은 단면을 내어 주사할 수 있으며 컴퓨터 프로그램에 의하여 초점 바깥의 상은 모두 제거되고 초점이 맞는 상만을 볼 수 있게 되어 해상력이 매우 높은 선명한 상을 얻을 수 있다.³⁷ 본 연구에서는 Kr-Ar Laser type의 공초점 레이저주사현미경을 사용하여 FITC와 PI에 대하여 488 nm에서 568 nm의 dual wavelength excitation을 이용하여 apoptosis를 관찰하였다. 방사선이 apoptosis를 유발한다는 것은 이미 알려져 있고³³ 이를 종양의 치료에 이용하고자 하는 연구가 많이 이루어지고 있다. apoptosis를 일으킬 수 있는 방사선조사량은 세포의 종류와 상태에 따라 매우 다양한다. Delic 등³⁸은 백혈병환자에서 2 Gy의 저선량이 백혈구의 apoptosis를 일으켰고 Kubota 등³⁹은 흉선세포에서는 5 Gy의 방사선조사시 apoptosis가 발생된 것을 보고하였으며 Gorczyca 등⁴⁰은 백혈구에 20 Gy의 방사선을 조사시 apoptosis가 일어남을 보고하였다. 본 실험에서 방사선을 조사하지 않은 경우에 apoptosis 지수는 암종이 성숙해감에 따라 점차 감소하는 경향을 보이는데 정상군, 과형성군, 이형성군 간에는 큰 차이를 나타내지 않았으나 상피내암군부터 급격한 감소를 보이기 시작하여 암종군까지 정상군과 비교하여 유의성 있는 차이를 나타내었다. 이는 병리조직학적인 관점에서 발암과정 중 상피내암군부터 암종세포가 전 상피층에 이환되는 진성암종으로 생각할 수 있는데 그 이전의 발암단계와 확실히 구분된다는 것과 맥락을 같이 한다. 5 Gy 조사시에는 발암과정이 진행됨에 따라 전반적으로 감소하였으나 암종군만이 정상군에 비해서 유의성 있게 감소하였고 10 Gy 조사시에도 역시 전반적으로 감소하는 경향을 보였으나 암종군만이 유의성 있게 나타났다. 다단계 각 발암단계에서의 PCNA 지수 변화량을 보면 이형성군과 상피내암군에서는 방사선조사에 의한 유의성 있는 변화가 없었으나 10 Gy를 조사한 경우에 과형성군에서는 증가되고 암종군에서는 감소되었다. 또한 apoptosis 지수변화량은 과형성군, 이형성군에서는 방사선을 조사하지 않은 경우에 비교하여 5 Gy를 조사한 경우에 유의성 있게 감소하였으나 10 Gy를 조사한 경우에는 암종군에서만 오히려 유의성 있게 증가하였다. 과형성군에서 10 Gy 조사시 PCNA 지수의 증가와 5 Gy 조사시 apoptosis 지수의 감소를 보여 발암단계 초기에서는 방사선이 오히려 암종의 치료라는 관점에서는 역효과를 나타내었는데 이는 방사선이 암종의 진행을 가속화시키려는 경향으로 이해할 수 있어 방사선이 암종의 초기단계에서는 치료에 역행하는 것으로 이해할 수 있지만 이에 대하여는 좀 더 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다. Tannapfel 등^{12,15}은 종양성 병변에서 항암방사선 치료시 종양세포의 세포증식은 억제되고

apoptosis는 유의성 있게 증가한다고 하여 본 연구의 암종군단계와는 그 결과를 같이한다고 볼 수 있다. 이러한 결과들은 방사선조사가 항암효과를 나타내게 되는데 이러한 효과가 4단계의 발암과정 중 암종군에서 의미있는 PCNA 지수의 감소, apoptosis 지수의 증가 등이 나타내게 된다고 생각할 수 있으며 동시에 이형성군과 상피내암군 단계에서는 과형성군과 비교하여 별다른 차이를 기대하기 어렵다는 것을 조심스럽게 추측할 수 있다. 여기에 5 Gy 조사시 과형성, 이형성군에서 유의성 있게 apoptosis가 감소하고 10 Gy 조사시 apoptosis가 증가한 것은 항암효과와 관련하여 볼 때 10 Gy의 조사량부터 의미있는 효과를 나타낸 것이라고 볼 수 있고 결국 암종군에서만 유의성 있는 PCNA 지수 감소 및 apoptosis 증가가 나타난 것이라 생각할 수 있다. 이는 다른 항암효과를 연구한 문헌들⁴¹⁻⁴³에서 일단 암종의 발현이 시작되는 상피내암군부터는 여러 약제가 별다른 효과를 나타내기 어렵다는 것을 발표한 것과는 서로 다른 입장을 취하고 있어 더욱 많은 연구가 필요하리라 생각된다. 또한 다양한 암종 세포와 정상 세포들에 대해 적절한 세포 증식능과 apoptosis를 일으킬 수 있는 적정 조사량에 대한 자료가 아직 확립되어 있지 않은 상태이며 더욱이 다단계의 발암과정에서 세포의 증식능과 apoptosis 간의 관계 파악이 되어야 여기에 방사선조사시 나타난 변화량으로 효과적인 방사선치료를 필요한 기초자료를 더해 줄 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Shin DM, Kim J, Ro JY, et al. Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 321-6.
2. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 3579-84.
3. Shirasuna K, Hayashido Y, Sugiyama M, Yoshioka H, Matsuya T. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor in human oral mucosa and its malignancy. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991; 418: 349-53.
4. Shin DM, Voravud N, Ro JY, Lee JS, Hong WK, Hittelman WN. Sequential upregulation of proliferating cell nuclear antigen in head and neck tumorigenesis: a potential biomarker. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 971-8.
5. Lane DP, Benichou S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 1990; 4: 1-8.
6. Almendral JM, Huebsch D, Blundell PA, Macdonald-Bravo H, Bravo R. Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: Homology with DNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1575-9.
7. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987; 326: 515-20.
8. Savill J. Apoptosis and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 12-21.

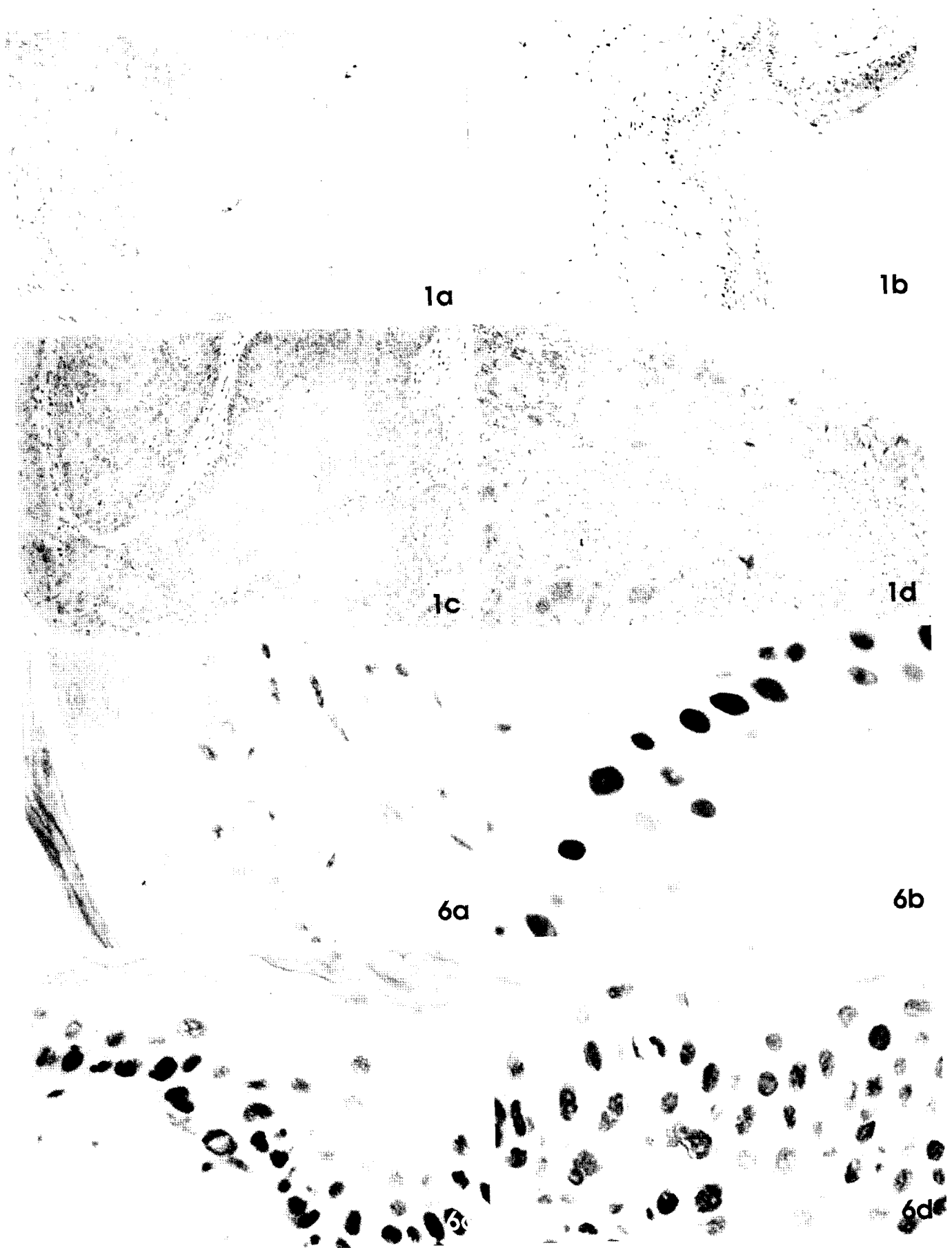
9. Ker JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
10. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-26.
11. Granville DJ, Carthy CM, Hunt DWC, McManus BM. Apoptosis: Molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 1998; 78: 893-913.
12. Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RJ, Kuhn R, Wittekind CW. Incidence of apoptosis, cell proliferation and p53 expression in renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 1997; 17: 1155-62.
13. Oka K, Hoshi T, Arai T. Prognostic significance of the PC10 index as a prospective assay for cervical cancer treated with radiation therapy alone. *Cancer* 1996; 1: 77: 7-13.
14. Oka K, Nakano T, Hoshi T. Transient increase of growth fraction during fractionated radiation therapy for cervical carcinoma. Ki-67 and PC10 immunostaining. *Cancer* 1993; 72: 2621-7.
15. Tannapfel A, NuSlein S, Fietkau R, Katalinic A, Kockerling F, Wittekind C. Apoptosis, proliferation, bax, bcl-2 and p53 status prior to and after preoperative radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41: 585-91.
16. Nakano T, Oka K. Differential values of Ki-67 index and mitotic index of proliferating cell population. An assessment of cell cycle and prognosis in radiation therapy for cervical cancer. *Cancer* 1993; 72: 2401-8.
17. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; 362: 849-52.
18. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jack T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-9.
19. Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* 1984; 44: 4217-23.
20. Salley JJ. Experimental carcinogenesis in cheek pouch of the Syrian hamster. *J Dent Res* 1954; 33: 253-62.
21. Morris AL. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J Dent Res* 1961; 40: 3-15.
22. Cataldo E, Shklar G. Chemical carcinogenesis in the hamster submaxillary gland. *J Dent Res* 1964; 43: 568-79.
23. Bizub D, Wood AW, Skalka AM. Mutagenesis of the Ha-ras oncogene in mouse skin tumors induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6048-52.
24. 허기순, 최종환, 최순철, 박태원, 유동수. DMBA 매식과 방사선 조사로 유도된 백서 타액선 종양에서 H-ras 암유전자의 활성화. *대한구강악안면방사선학회지* 1998; 28: 245-59.
25. Sumitomo S, Hashimura K, Mori M. Growth pattern of experimental squamous cell carcinoma in rat submandibular glands - an immunohistochemical evaluation. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996; 32: 97-105.
26. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogene: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-86.
27. Ogata K, Kurki P, Celis JE, Nakamura RM, Tan EM. Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. *Exp Cell Res* 1987; 168: 475-86.
28. Robbins BA, de la Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 841-45.
29. Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Proliferating cell nuclear antigen immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-94.
30. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
31. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell Death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
32. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991; 32: 223-54.
33. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
34. Wijsman JH, Jonker RR, Keijer R, Van De Velde CJH, Cornelisse CJ. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 7-12.
35. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1994. p. 18-9.
36. Wijsman JH, Jonker RR, Keijer R, Van De Velde CJH, Cornelisse CJ. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 7-12.
37. Itoh J, Kawai K, Serizawa A, Yasumura K, Ogawa K, Osamura RY. A new approach to three-dimensional reconstructed imaging of hormone secreting cells and their microvessel environments in rat pituitary glands by confocal laser scanning microscopy. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 569-78.
38. Delic J, Magdelenat H, Barbaroux C, et al. In vivo induction of apoptosis in human lymphocytes by therapeutic fractionated total body irradiation. *Br J Radiol* 1995; 68: 997-1003.
39. Kubota Y, Takahashi S, Sato H. Effect of γ -irradiation on function and viability of alveolar macrophages in mouse and rat. *Int J Radiat Biol* 1994; 65: 335-44.
40. Gorczyca W, Gong J, Ardel B, Traganos F, Darzynkiewicz Z. The cell cycle related difference in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res* 1993; 53: 3186-92.
41. Lamchouri F, Settaf A, Cherrah Y, et al. Antitumor principles from *Peganum harmala* seeds. *Therapie* 1999; 54: 753-8.
42. Dashwood R, Negishi T, Hayatsu H, Breinholt V, Hendricks J, Bailey G. Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B1: A review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. *Mutat Res* 1998; 399: 245-53.
43. Leppala JM, Virtamo J, Fogelholm R, et al. Controlled trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on stroke incidence and mortality in male smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 230-5.

Explanation of Figures

Fig. 1a. Hyperplasia stage of hamster buccal pouch induced by DMBA. **b.** Dysplasia stage of hamster buccal pouch induced by DMBA. **c.** Carcinoma in situ stage of hamster buccal pouch induced by DMBA. **d.** Carcinoma stage of hamster buccal pouch induced by DMBA. (HE staining, × 200).

Fig. 6a. Hyperplasia stage of hamster buccal pouch induced by DMBA. **b.** Dysplasia stage of hamster buccal pouch induced by DMBA. **c.** Carcinoma in situ stage of hamster buccal pouch induced by DMBA. **d.** Carcinoma stage of hamster buccal pouch induced by DMBA. (Immunohistochemical staining for PCNA, × 400).

Fig. 7a. Hyperplasia stage of hamster buccal pouch induced by DMBA. **b.** Dysplasia stage of hamster buccal pouch induced by DMBA. **c.** Carcinoma in situ stage of hamster buccal pouch induced by DMBA. **d.** Carcinoma stage of hamster buccal pouch induced by DMBA. (Immunohistochemical TUNEL Assay and confocal imaging for apoptosis, × 400).



DMBA 유도 햄스터 협낭암 발생과정에서 방사선 조사가 PCNA의 발현과 apoptosis 유발에 미치는 영향

