

## 햄스터 구강암 발생 과정에서 Heat Shock Protein에 관한 면역조직화학적 연구

최규환 · 이동근 · 김은철\* · 정창주

원광대학교 치과대학 구강악안면외과교실, 구강병리학교실\*

### Abstract

### A IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON HEAT SHOCK PROTEIN IN ORAL CARCINOGENESIS IN HAMSTER

Kyu-Hwan Choi, Dong-Keun Lee, Eun-Chul Kim\*, Chang-Joo Jeong

*Department of Oral and Maxillofacial, Department of Oral Pathology\*,*

*College of Dentistry, Wonkwang University,*

Heat shock protein (HSP) expression is unregulated in tumor cells and, HSP expression is likely marker of the malignant potential of oral epithelial lesion. Furthermore, the 70kDa HSP is implicated in the degree of tumor differentiation, the rate of tumor proliferation and the magnitude of the anti-tumor immune response. Accordingly, the distribution and intensity of HSP70 and HSP47 expression was assessed in the DMBA induced oral carcinogenesis in hamster.

Golden Syrian hamsters which were 3 months-age and 90~120g were collected. 9,10-dimethyl -1,2-benzanthracene (DMBA) in a 0.5% solution in mineral oil was painted on the buccal pouch mucosa 3 times per week in the study group.

In each control and experimental groups of 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 weeks, specimen were sectioned for immunohistochemical study with anti-HSP47 and anti-HSP70 antibody.

The following results were obtained.

1. HSP47 positive cells were rare or negative of normal oral mucosa, increased mildly in basal and suprabasal basal layer, and spinous cell layer after experimental 6 weeks (dysplastic or CIS stage). In CIS stage, HSP47 expression is prominent in dysplastic free or normal adjacent epithelium.
2. HSP47 positive cells in connective tissue were mainly inflammatory cells, which is gradually increased from control to precancerous and cancer stage. But HSP47 positive cells after 14 weeks were decreased, especially normal and cancer adjacent epithelium.
3. The positive staining cells of HSP70 in control, dysplastic, and CIS stage were not seen. But they were mild findings in basal layer and moderate findings in spinous layer after experimental 14 weeks (cancer stage).
4. HSP70 positive cells were increased in precancerous and cancer stage than control group in connective tissue. After experimental 16 weeks, we could not find the HSP expression in cancer cells according to cancer differentiation or cancer stage.

It is concluded that HSP70 or HSP47 expression is not a definitive marker of oral malignancy or malignant potential. However, with further development, HSP immunoreactivity may be valuable as an adjunct to conventional histology for assessing the malignant potential of oral mucosal lesions.

**Key words :** Oral carcinogenesis, Epithelial dysplasia, Squamous cell carcinoma, Heat shock protein

## I. 서 론

인체 악성 종양의 진단 및 치료와 예방을 위하여 악성 종양의 발생 기전, 발암 과정에 대한 연구는 현대에 이르러 많은 진전을 이루었으며 종양과 관련된 발현 단백질에 대한 연구는 발암 과정에 따르는 관련 유전자의 개입 여부나 정도 및 시기를 추측할 수 있을 뿐만 아니라 임상 전 단계의 기준이 되는 정보를 얻을 수 있을 것이므로 종양 관련 유전자와 그 단백질 산물분석은 구강암 환자에서 중요한 진단 방법으로서 사용할 수 있다<sup>[3]</sup>.

스트레스 단백질 또는 열충격 단백질(Heat Shock Protein, 이하 HSP)은 세포가 여러 다양한 자극에 노출될 때 생성되어지는 일종의 단백질로<sup>[4-9]</sup>. 1962년 Ritossa<sup>[10]</sup>가 *Drosophila*에 고온을 처리했을 때 염색체 puffing이 일어나는 것을 관찰한 이후 Tissieres 등<sup>[11]</sup>은 고온에 의하여 유도된 염색체의 puffing은 열충격 단백질이라는 특수한 단백질의 합성과 관계 있다는 것을 밝혀냈다.

열충격 단백질은 온도가 갑자기 상승했을 때 세포에서 합성되어지는 단백질로 생각되었으나, 고온 이외에도 여러 가지 다양한 자극에 의하여 열충격 단백질을 합성할 수 있다고 하여 스트레스 단백질이라고도 명명되었다<sup>[12]</sup>. 열 이외에 비소와 같은 에너지 대사의 억제제, oxygen free radicals, 자외선 조사, 알콜, adriamycin과 같은 화학요법제, DNA 바이러스의 감염, interleukin-1 (IL-1), interleukin-2, tumor necrosis factor (TNF) 등과 같은 싸이토카인 등이 열충격 단백질을 합성할 수 있는 자극이며<sup>[9,13-15]</sup>, 또한 한냉 충격 (cold shock)이 *Drosophila melanogaster*와 *Escherichia coli* 및 yeast에서 HSP를 생성할 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>[16-18]</sup>.

세포내 열충격 단백질의 생물학적 역할은 아직 명확하지 않으나, 기능 중의 하나로 스트레스에 의하여 손상된 단백질을 안정화시키는 작용을 한다<sup>[19]</sup>. 일반적으로 모든 생명체에는 환경의 갑작스러운 변화에 대응하는 방어 체계들이 있으며 이와 관련하여 열충격 단백질은 생명체의 진화에 대하여도 대단히 보존적으로 유지되어, 생명체의 유지에 중요한 역할을 하였을 것으로 보고되고 있다<sup>[8]</sup>. 즉 열충격 반응은 미생물 뿐만 아니라 동식물에서 열에 대한 내성을 갖게 하여 고온에 대하여 생존률을 높일 수 있게 해주는데 이 내성의 물리적 기초에 대하여서는 아직 명확히 밝혀져 있지 않으나 고온 스트레스에 의하여 세포의 활성이나 구조가 변화되어 고온에서 방어가 유지되는 동안 RNA splicing의 방해, 단백질 합성 활성의 상실, HSP70의 핵내외로 이동 등이 관찰되었다<sup>[12,19]</sup>. 이와 같이 생명체의 고온 내성에 대한 반응을 질병의 치료에 유용하게 이용하는 방법으로 종양 치료를 비롯하여 많은 분야에 걸쳐 시도되고 있는데 방사선 단독보다는 고온과 방사선의 병합 치료

가 효과적이어서 최근 이 방법이 많이 도입되고 있으나 암 세포의 고온 내성 기전을 극복할 수 있는 방법이 아직까지 연구되지 못하고 있다<sup>[19]</sup>.

구강 악안면 부위에서 종양 발생의 주요 관심사는 이형성 상피 병소가 악성으로 진행될 수 있는가를 감별하는 것으로 현재까지 확실하고 정량적인 표지자 (marker)는 없지만<sup>[20]</sup>, 이형성이 심할수록 악성 잠재력은 높으며 미분화 악성 종양인 경우 예후가 더욱 나쁜 것으로 알려져 있다. 90년대 이후에 Burkitt 임파종<sup>[21,22]</sup>, 유방암<sup>[23]</sup>, 난소암종<sup>[24]</sup>에서 열충격 단백질의 발현이 증가한다고 보고되어 왔으나 이런 발현의 기능적 의의는 불확실하다. 종양세포에서 열충격 단백질 발현은 특히 면역 인식을 증가시켜 암종의 면역반응에 중요한 것으로 보고되었는데<sup>[25,26]</sup>, Ciocca 등<sup>[23]</sup>과 Kimura 등<sup>[24]</sup>의 유방암이나 난소 암종에서 열충격 단백질 발현이 적은 경우 발현 수준이 높은 것보다 생존율이 증가한다고 하였다. 이러한 소견은 열충격 단백질 발현이 악성세포의 종양 정도를 반영하기 때문에 구강 상피성 악성종양의 진행과정에 관련된 부가적인 정보를 줄 수 있으리라고 여겨진다.

열충격에 의하여 유도되는 유전자들로부터 발현되는 포유동물의 단백질은 대략적인 분자량에 따라 HSP60족, HSP70족 및 HSP90족 등으로 분류되며 이 중 가장 많이 연구된 것이 HSP70족이다<sup>[27]</sup>. HSP70은 세포내에서 단백질의 변성을 방지시키거나 변성된 단백질을 재생하는데 관여한다고 보고되고 있고<sup>[28]</sup> 각종 암종에서의 연구<sup>[23-26]</sup>가 활발히 이루어진 반면 구강암에서는 거의 이루어지지 않았다. 또한 HSP47은 47kDa의 분자량을 가지며 인산화된 열충격 단백질로 collagen-binding membrane glycoprotein이다. HSP47의 합성은 Rous sarcoma virus에 의하여 형질전환된 닭 배아 섬유모세포에서 감소하고 전사 이후 단백질의 인산화 정도는 증가한다고 알려져 있어<sup>[29]</sup> 암종 발생에도 관여할 것이라고 간주되어지고 있다.

종양 억제유전자의 변이형 단백질인 p53과 종양유전자인 c-myc가 구강암이나 인접 이형성 부위에 나타난다고 알려졌는데<sup>[30-32]</sup>, 최근 악성으로 형질전환된 세포에서 HSP70이 p53 및 c-myc와 함께 oligomeric complex를 이룬다는 점이 관심의 대상이 되었다. HSP70과 p53 혼합체 (complex)가 변이형 단백질인 p53의 반감기를 증가시키는 것으로 보고되고 있는데 이러한 점이 종양세포에서 p53 단백질의 축적을 설명할 수 있으며<sup>[33]</sup> HSP70과 c-myc 혼합체가 종양세포 주기를 억제할 수 있어 이런 결과로 종양세포분화를 촉진하게 된다<sup>[34]</sup>. 따라서 구강 상피 이형성증이나 구강암에서 보고된 p53 및 c-myc 이상은 HSP70발현과 관련될 것이라고 생각되어 본 연구를 시행하였다.

따라서 본 연구에서는 발암 과정의 단계별로 열충격 단백질의 발현과 조직학적 악성도를 비교하면 구강암 발암 과정에 따르는 관련 단백질의 개입 여부나 정도, 시기를 추측할

수 있을 것으로 생각되어 구강암 발생 과정에서 단계별로 HSP47과 HSP70의 분포 양상과 발현 정도를 비교하여 연구하고자 하였다.

## Ⅱ. 연구 재료 및 방법

### 1. 연구 재료

본 연구에 사용된 실험 동물은 체중 100g 이상 200g 이내의 54마리 웅성 golden Syrian hamster를 동일 조건下에서 사육용 고형 사료를 이용하여 사육하였다. 이들은 실험군과 대조군으로 구분하여 대조군은 6마리, 실험군은 8군 (6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20주)으로 각 군당 6마리씩을 배정하였다.

대조군은 mineral oil을 20주 동안 협낭에 주 3회 면봉으로 도포하였으며 실험군은 발암을 위하여 mineral oil에 용해한 0.5% 농도의 9, 10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA : Sigma Co, USA)을 협낭에 주 3회 도포하고 6주, 8주, 10주, 12주, 14주, 16주, 18주 및 20주 후에 각각 희생시켜 협낭을 적출하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 조직 병리학적 검사

협낭을 적출하여 중성 포르밀린에 고정하고 통상적인 방법에 의한 파라핀 표본 제작 및, Hematoxylin & Eosin 중 염색을 시행하여 조직병리학적으로 악성도를 비교 검경하였다.

#### 2) 면역 조직화학적 검사

면역조직화학 검사를 위하여 labelled streptavidine biotin (LSAB, Dako Co, USA) kit를 이용하였다. 파라핀으로 포매된 절편들은 xylene으로 탈파라핀화 하였으며 증류수로 재수화 하였고 내인성 peroxidase에 의한 artifact를 피하기 위하여 절편들을 실온에서 15분 동안 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 ice cold solution으로 반응시킨 후 tris-buffered saline (TBS)로 5분 동안 세척하였다. Blocking serum으로 normal rabbit serum을 30분간 적용시켰다. HSP47 (StressGen, USA)은 1/150, HSP70 (Santa Cruz, USA)은 1/60로 희석하여 일차 항체를 30분간 반응시킨 다음 TBS로 5분 동안 3회 세척한 후에 link antibody (anti-mouse IgG, Dako, USA)를 20분간 반응시켰다. 염색은 probe on plus 슬라이드를 맞추어서 발생하는 capillary gap action의 원리를 이용한 microprobe system (Fisher, USA)에서 streptavidine alkaline phosphatase로 30분간 반응시킨 후 aminoethyl carbazole

(AEC, Zymed Co, USA)로 발색 시키고 Harrison hematoxylin으로 대조 염색하여 glycerin 도포 후 검경하였다.

#### 3) 면역 조직학적 관찰

염색된 조직표본에서 각각의 항체에 대한 양성 반응을 상대적인 발현 정도에 따라 심도 (+++), 중등도 (++) 경도 (+), 경미 (±), 음성 (-)으로 구분 하였으며, 상피에서는 기저층, 상기저층, 유극층, 천층의 4층으로 분류하여 계측하였고 결체조직의 섬유모세포와 염증세포를 대상으로 하였다.

## Ⅲ. 연구성적

### 1. 조직 병리학적 소견

대조군은 정상적인 햄스터 협낭 점막을 보이며 망상 융선의 발달이 미약하고 상피의 두께가 여러개의 세포층을 가지는 균일한 양상을 보였으며 결체조직에는 특기할 만한 소견은 없었다.

실험군 6주 경과에서는 경도의 기저세포 증식이 관찰되며 정상 상피층의 증식과 비대, 각화층이 대조군에 비하여 뚜렷해졌고 8주 경과군에서는 상피 기저층에 핵 농축, 과색소증, 이형성의 초기 징후가 보였다. 10주에서는 8주와 유사하게 이형성의 단계에 해당하는 세포 증식이 보였고 극세포증식증과 과각화증을 관찰할 수 있었다. 12주에서는 상피층의 비대와 이형세포의 출현이 불규칙한 배열을 가지며 기저막은 명료하였고 결체조직 내로의 침투는 없는 상피내암의 소견을 볼 수 있었다.

14주 이후에는 이형성 상피세포가 결체조직으로 침투하여 분화도가 좋은 편평 상피암종의 소견이 관찰되기 시작하였고, 16주와 18주에서는 종괴가 궤양상을 보이면서, 침투성의 편평 상피암종을 보이는데 부분적으로는 암도가 형성되어 있었다. 20주에서는 분화가 잘된 편평 상피암종의 소견을 보였고 부분적인 피사의 소견도 보였다. 이상의 조직 병리학적 소견을 요약하면 Table 1과 같다.

### 2. 구강 발암 단계에 따른 HSP47 발현 분포

HSP47의 면역 발현은 모든 실험군 및 대조군 세포의 세포질과 핵에 주로 염색됨을 보였고 대조군에서는 상피 및 결합조직에서 미약 또는 거의 발현이 안되었으나 (Photo 1), 실험 6주 경과시 기저층에 주로 국한되어 경도의 양성 발현을 보였으며 (Photo 2) 특징적으로 상피하 결합조직내 염증세포에서 HSP47에 양성 발현되는 세포를 볼 수가 있었다. 8주, 10주에는 발현 부위가 주로 기저층에서 나타났

지만 상기저층과 유극층에서도 발현되기 시작했으며 결합조직과 상피조직과의 경계 부위에서 중등도의 양성으로 발현되었다. 결합조직내 HSP47 양성 세포들도 주로 상피 직하부에 집중되어 6주에서 12주까지는 대조군보다 증가되었지만 군간에 큰 변화가 없었다 (Photo 3).

12주에서는 상피이형성 부위의 기저층과 상기저층 유극층에서 발현이 고른 분포를 보였으며 인접 정상 또는 이형성세포가 없는 경계 상피층에서의 발현이 전 실험군을 통하여 가장 많이 나타나 전암 단계중 상피이형성 단계에서 인접 경계조직의 HSP47 발현이 크게 증가함을 알 수 있었다 (Photo 4). 14주 경과 후 암종세포에서의 HSP47 양성 발현이 갑자기 현저하게 감소되었고 인접 암종세포가 없는 정상 상피 또는 경계부에서의 발현도 크게 감소되었으나 (Photo 5) 결합조직내 HSP47 양성 세포는 암종의 변연부를 따라 12주에 비하여 크게 증가된 소견이었다 (Photo 6). 16주 후에는 암세포에서 발현 정도가 많지 않고 경미하였으나 암세포의 둘레를 따라 HSP47 양성 세포들이 배열되고 있었으며 (Photo 7), 결합조직내 양성 세포들도 14주

이후의 증가된 상태를 유지하고 있었다. 인접 정상 상피 또는 암세포가 없는 부위에서도 HSP47 양성 세포들이 12주 상피내암 단계보다는 감소되었으나 초기 상피이형성 단계보다는 증가된 경도의 양성으로 부위에 관계없이 산재성으로 발현되었다 (Photo 8). 상기의 HSP47의 발현 정도를 요약하면 Table 2, 3과 같다.

### 3. 구강 발암 단계에 따른 HSP70 발현 분포

대조군에서는 기저층, 유극층, 각화층에서 경미한 발현을 보였으며 상피하조직에서 양성세포는 거의 없었다 (Photo 9). 기저세포 증식 단계인 6주에서는 상피층에서는 큰 변화를 보이지 않았지만 결합조직내 염증세포 침윤부위에서 대조군보다 HSP70의 발현 증가를 보였다 (Photo 10). 중등도 이형성단계인 8주와 10주, 상피내암 단계인 12주에서는 기저층을 비롯한 상피부위에 HSP70와는 달리 발현이 거의 보이지 않아 (Photo 11, 12) 6주에서 12주까지 HSP70 발현정도에서 큰 차이를 보이지 않았다.

침윤성 암종인 14주에서는 12주와 다르게 HSP70이 암종의 표층에서 주로 경도의 발현이 있었으며 결합조직내 세포에서는 심도의 발현이 관찰되었다 (Photo 13, 14). 14주 이후의 발암 조직에서는 암종의 중심부와 변연부 간에 큰 차이가 없었고 (Photo 15), 정상 경계부 또는 인접 정상상피에서도 유극층 또는 상기저층에서 주로 발현을 보였다 (Photo 16). 이런 발현은 12주 이전의 이형성 단계보다는 증가되었으나 암종이 진행됨에 따라서는 큰 차이가 없었다. 14주 이후의 암종 단계에서 HSP70은 종양세포에 전체적으로 고른 경미한 발현을 보였는데 분화가 좋은 단계인 14주와 중등도 분화 단계인 18주 20주에서와 큰 차이가 없이 유사한 유형을 보였다. 이형성 및 상피내암종의 변연부 잔존조직에서는 대조군의 점막상피에서와 유사하게 상피에

**Table 1.** Summary of Histopathologic Change During Oral Carcinogenesis

Week	Finding
Control	Normal
6 Weeks	Basal cell hyperplasia. Mild dysplasia
8 Weeks	Moderate dysplasia
10 Weeks	Severe dysplasia
12 Weeks	Carcinoma in situ
14 Weeks	Squamous cell carcinoma
16 Weeks	Squamous cell carcinoma
18 Weeks	Squamous cell carcinoma
20 Weeks	Squamous cell carcinoma

**Table 2.** Degree of HSP47 Immunoactivity according To Epithelial Layer Distribution and Oral Carcinogenesis in Hamster.

Week \ Site	Basal layer	Parabasal layer	Spinous layer	Keratin layer	Connective tissue
control	±	±	±	±	±
6 weeks	+	+	±	±	+
8 weeks	++	+	±	±	+
10 weeks	++	+	+	±	+
12 weeks	++	++	++	±	+
14 weeks	+	±	±	±	+++
16 weeks	±	±	±	±	+++
18 weeks	±	±	±	±	+++
20 weeks	±	±	±	±	++

(-):Negative ±:rare +:mild ++:moderate +++:severe

**Table 3.** Degree of HSP47 Immunoactivity according to Cancer Histologic Focus Distribution and Oral Carcinogenesis in Hamster

Week \ Site	Cancer or dysplasia center	Cancer or dysplasia periphery	Cancer free area or adjacent normal epithelium
control	±	±	±
6 weeks	+	±	±
8 weeks	++	++	++
10 weeks	++	++	++
12 weeks	++	++	+++
14 weeks	+	+	+
16 weeks	±	±	+
18 weeks	±	±	+
20 weeks	±	±	+

(-):Negative ±:rare +:mild ++:moderate +++:severe

**Table 4.** Degree of HSP70 Immunoactivity according to Epithelial Layer Distribution and Oral Carcinogenesis in Hamster.

Week \ Site	Basal layer	Parabasal layer	Spinous layer	Keratin layer	Connective tissue
control	±	±	±	±	±
6 weeks	±	±	±	±	+
8 weeks	±	±	±	±	+
10 weeks	±	±	±	±	++
12 weeks	±	±	±	±	++
14 weeks	±	±	+	+	+++
16 weeks	±	±	+	+	+++
18 weeks	±	±	+	+	+
20 weeks	±	±	+	+	+

(-:Negative ±:rare +:mild ++:moderate +++:severe)

전반적으로 경미하게 염색이 되어 발현 차이가 없었던 반면 암종 단계인 14주 이후에서는 기저층은 발현이 약하나 극 세포층에서 염색이 증가된 양상으로 나타났다. 상기의 HSP70 발현 정도를 요약하면 Table 4, 5와 같다.

#### IV. 총괄 및 고찰

암이란 정상 세포가 자극에 의하여 유전자의 형질 전환이 발생하고 그 결과 세포의 형태학, 생물학, 화학, 물리학, 면역학적 행동이 변한 변형 세포가 유전적으로 무절제한 증식을 함으로써 형성된 변형 세포의 집단을 뜻하며 다단계의 동적인 과정이다<sup>35)</sup>. 유전자의 형질 전환을 발생시킬 수 있는 발암원으로는 화학적 발암물질, 방사선 그리고 바이러스에 의한 돌연변이 등이 연구되어지고 있다<sup>35)</sup>.

구강암 모델에 관한 최초의 연구는 Sally<sup>36)</sup>가 햄스터 협낭에 편평세포암종을 발생시켜, 조직과 발암제의 상관관계를 보고한 아래로 햄스터 협낭이 종양 발생이 신속하고 용이하게 발생되며 기간 경과에 따라 조직병리학적 소견이 일정하고 조직학적 분석이 용이하다는 점때문에 구강암 연구에서 주로 이용되고 있다<sup>37,38)</sup>.

Gimenez-Conti와 Slaga<sup>39)</sup>에 따르면 DMBA를 이용한 햄스터 발암 과정은 2주에는 미약한 염증 세포의 침윤을 보이고 4주에는 전반적인 극세포증을 보이며 8주에서는 미약한 상태의 이형성 변화를 관찰하였으며 12주에서 거핵세포, 다핵세포, 비정상 세포분열등의 전형적인 상피내암의 소견을 보이며 결체조직내로의 유두상 증식 소견을 보였다. 또한 16주에서는 전형적인 편평세포암종의 모습을 보이고 상피 세포들의 결체조직내로의 침습양상이 심해지며 부분적으로는 암도가 형성되어 있는 곳도 관찰되었고 20주에서 분화가 잘된 편평세포암종의 소견을 보였고 부분적인 괴사의 소견도 보였으며 암도는 분화가 잘된 소견을 볼 수 있었

**Table 5.** Degree of HSP70 Immunoactivity according to Cancer Histologic Focus Distribution and Oral Carcinogenesis in Hamster.

Week \ Site	Cancer or dysplasia center	Cancer or dysplasia periphery	Cancer free area or adjacent normal epithelium
control	±	±	±
6 weeks	+	±	±
8 weeks	++	++	++
10 weeks	++	++	++
12 weeks	++	++	+++
14 weeks	+	+	+
16 weeks	±	±	+
18 weeks	±	±	+
20 weeks	±	±	+

(-:Negative ±:rare +:mild ++:moderate +++:severe)

고 25주에선 20주와 거의 같은 소견을 보였다고 보고하였다. 본 연구에서도 6주군에서 기저 세포 과증식증, 미약한 이형성증을 나타내었으며 8주군에서는 중등도의 이형성증을 나타내었고 10주군에서는 심한 이형성증을 보였다. 12주군은 상피내암의 소견을 나타내었고 14주에서부터 20주 까지는 편평상피암종의 소견을 나타내어 선학들의 연구와 일치하였다.

원핵과 진핵세포는 스트레스 단백질을 합성하고 정상 단백질의 post-translation 합성을 방해하는 열과 다른 환경적 스트레스에 반응한다<sup>8,40)</sup>. 이런 반응은 외상시 세포내 항상성을 유지시킬 때 반드시 나타나며<sup>41)</sup>, 스트레스 단백질은 열보다는 다른 다양한 요인에 의하여 유도되는데 아미노산 유사물, 중금속, 에탄올, 에너지 대사의 방해자, 산화적 손상, 바이러스 감염, in vivo ischemia와 염증 등에 의하여 나타난다<sup>35)</sup>.

이러한 HSP를 유도할 수 있는 많은 조건 중에서 한냉 충격 역시 Drosophila<sup>15)</sup>, Escherichia coli<sup>16)</sup>, yeast<sup>17)</sup>, Sarcophaga crassipeltis<sup>42)</sup>에서 스트레스 단백질 또는 한냉 충격단백질의 합성을 유도할 수 있는 것으로 밝혀졌고 최근 인체 세포에서 한냉 충격이 HSP를 유도할 수 있는지에 대한 실험이 시도되고 있다<sup>43)</sup>. HSP 유전자를 활성화시키는 유도 인자들은 크게 두 가지 군으로 나뉜다. 즉 에타놀이나 아미노산 유사체, purorucycin이 포함되는 군은 새로 생성되는 단백질의 이상을 유발하고, heat shock, 중금속, 저산소증, ammonium chloride, ionophore, hydrozylamine 등을 포함하는 군은 기존의 단백질에 변성을 초래하는 것으로 알려져 있다<sup>44)</sup>. HSP 유전자의 기능에 대하여 일반적으로 받아들여지고 있는 것은 'chaperone' 기능으로써, 자극을 받지 않은 세포에서는 새로운 단백질이 합성되면서 생긴 미성숙 폴리펩티드가 제대로 형태를 형성하도록 하거나 중합체를 이를 수 있도록 유지시키며, 다른 구조

적인 개조에 필요한 효소 반응을 위하여 더 이상의 접힘을 막고 있다가 ATP를 사용하여 분리되면서 기능이 있는 정상적인 단백질을 형성하도록 한다. 또한 스트레스 상태나 심하게 손상 받은 단백질이 세포내 단백질 분해 체계의 작용을 받도록 도와서 비정상 단백질을 없애는데 필요하다는 것이다<sup>44,45)</sup>.

HSP47은 47kDa의 분자량을 가지며 인산화된 열충격 단백질로 collagen-binding membrane glycoprotein이다. HSP47의 합성은 Rous sarcoma virus에 의하여 형질 전환된 닭배아 섬유모세포에서 감소하고 전사이후 단백의 인산화 정도는 증가한다고 알려져 있다<sup>34)</sup>. 꿀 발생에서는 성장기 쥐의 장골 및 구치에 HSP47이 발현된다는 보고가 있고<sup>46)</sup>, 교원질이 치근막에서 중요한 단백질인 것처럼 HSP47은 만성 치주염, 치조골의 수복과 재생에 관여할 수 있으며 스트레스에 관여하는 세포적 활동과 스트레스 단백질의 방어 활동, 특히 HSP47에 대한 세포 손상을 조절하는 분야가 관심의 대상이 되고 있다<sup>47)</sup>. HSP47은 구치 맹출 동안 procollagen I 생성 발현에 관여한다는 Shroff<sup>48)</sup>의 연구가 보고되었고, 주로 생체외 실험에서 치주인대세포와 관련이 있다는 Suak<sup>48,49)</sup> 연구가 있었을 뿐 암종에서 스트레스 단백질의 역할은 추측될 뿐 보고된 예가 많지 않았다. 또한 단백질의 농도는 retinoic acid와 dibutylcyclic AMP를 가한 마우스의 teratocarcinoma 세포에서 현저하게 증가한다고 보고되었다<sup>50)</sup>.

생체나 생체외 실험에서 임파종이나 유방암의 종양세포들은 HSP가 많이 발현되며 생존율과 관련이 있어<sup>21-24)</sup>. 암에 대한 면역반응에서 중요하다고 보고되었다<sup>25,26)</sup>. 이러한 사실들은 HSP가 암의 발현과 진행에 연관이 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구는 구강암에서 발암 단계의 기준이 될 수 있는 정보를 얻어 발암 시기를 예측하고 구강암의 진단과 치료에 도움이 되고자 구강내 발암 과정에서 이형성 단계 및 악성 암조직에서의 각 단계별로 HSP47과 HSP70의 발현을 면역 조직화학적 연구를 통하여 시도하였다.

열충격 단백질의 역할은 아직까지 완전히 규명되지 않은 상태이지만, 숙주와 병인 사이의 상호작용에서 복잡한 부분을 차지할 것으로 생각되는데, 열충격 단백질은 산소유리기 같은 산화성 손상, 염증성 싸이토카인에 대하여 세포를 보호하는 역할을 하며 병인 제거에도 관여할 수 있다고 생각된다. 암종발생에서 상피 및 결체조직에서 어떻게 HSP47 발현을 유도하는지에 대한 기전은 아직 정확히 밝혀지지 않았으나 상피 및 결체조직에서 발생되는 세포내 변화가 세포에 손상을 입히는 기전으로부터 HSP47의 발현에 대한 단서를 얻을 수 있을 것이라 생각한다.

본 실험에서 정상 구강 점막에서 HSP47 양성세포는 거의 발현이 안되었으나 6주 이후에 기저층 및 상기저층에 중등도 이상으로 크게 증가되었고, 상피이형성 단계에는 유극

층에서도 발현대가 이동되었으며 상피암 단계인 12주에서 전암 단계에서 양성세포들이 인접 경계조직에 가장 많은 발현을 보여 암종이 발생하기 직전에 인접 상피에서 방어기전이 작용됨을 알 수가 있었고 특히 결합조직내 염증세포와 섬유모세포에서 HSP47의 발현은 대조군에 비하여 상피이형성 단계에서 증가된 중등도의 양성으로 나타난 점은 HSP47은 염기성 등전위점을 가지며, 세포외 기질에 부착하는 유일한 단백질이라는 점에서 다른 스트레스 단백질과는 다른데<sup>29,50)</sup>. 결체조직에서 교원질은 중요한 단백질이고 HSP47은 결체조직의 재생, 재건에 관여할 수 있어 스트레스 반응에 대한 세포학적 반응에 대한 보다 심도있는 연구가 세포 손상의 조절을 하는데 큰 도움을 줄 것으로 생각된다.

본 연구에서 결합조직내 HSP47 양성세포들은 주로 염증세포들이며 간혹 섬유모세포가 나타났는데 상피이형성 단계보다 암종 단계에서는 증가하여 이에 대한 면역반응의 증가로 볼 수가 있으며 종양세포에서 HSP의 발현은 특히 면역인식을 증가시켜 암종의 면역반응에 중요한 것으로 보고되었는데<sup>25,26)</sup>. 본 연구에서 결합조직내 HSP47의 발현 정도가 증가함에 따라 악성의 정도가 나타나므로 이러한 소견은 HSP 발현이 악성세포의 종양성 정도를 반영할 수 있어 구강내 악성종양의 진행 과정에 관련된 부가적인 정보를 줄 수 있으리라고 여겨진다.

암종세포에서의 HSP47 양성 발현은 상피이형성 단계보다 오히려 감소되었으며 정상상피 또는 경계부에서의 발현도 크게 감소되어, 정상 대조군 상피에서보다 이형성 및 암종 병소가 더 많은 발현이 나타날 것으로 예상을 한 것과는 다른 결과가 나왔는데 이러한 차이점은 전암 단계에서는 스트레스나 발암에 대하여 HSP가 생체 병리적 역할을 하며 산화적 손상에 대한 HSP의 보호 효과가 있고, 숙주와 병인 사이에 관계에 복잡한 역할을 한다는 연구때문으로 생각되어진다<sup>8)</sup>. HSP가 숙주에 더 이로운지 항원에 더 이로운지는 아직 명백하지 않으나 HSP는 oxygen free radical 발생과 독성을 방해하고 보호하기 위한 기전으로 산화적 손상으로부터 숙주세포를 보호하고 병인 제거에 관여한다고 알려져 있어<sup>8)</sup>, 암발생을 억제하고 숙주세포를 보호하고자 하는 작용이 전암 단계에서 더 크고 강하게 나타나며 이미 암발생이 된 단계에서는 이런 숙주방어기능이 깨져 발암에 대하여 기능을 다 할 수 없기 때문에 발현이 되지 않았으리라고 여겨졌다.

HSP47의 기능중의 하나는 세포성 스트레스의 발현 지표로 볼 수 있어 면역염색에 따라 상피층에서 HSP47이 발현한다는 것은 상피를 통하여 방어작용이 이루어지는데 HSP47은 치주질환에 대한 국소적인 방어벽을 이루고 있다는 보고도 있어<sup>49)</sup> 암종하방의 염증성 조직은 염증세포와 HSP47의 활발한 상호작용에 의하여 더욱 강한 반응이 나

타난다고 생각된다.

HSP70족은 세포내에서 단백질의 folding과 assembly를 매개하며 단백질의 변성을 방지시키거나 변성된 단백질을 재생하는데 관여한다고 보고되고 있다<sup>50</sup>. 진핵 생물의 경우 HSP110, HSP95, HSP84, HSP70, HSP60, small HSP 등은 보통 세포에서도 존재하다가 자극을 받으면 그 양이 증가하는<sup>51</sup> 반면 HSP70은 자극을 받았을 때에만 급격하고 민감하게 반응하여 상당한 양의 증가를 보이고 회복시기에는 가장 먼저 감소한다<sup>51</sup>. 지금까지 알려진 HSP70 family는 HSP72, HSP73, glucose-regulated protein (GRP) 75, GRP78이 있으며 그 중 급격하게 자극에 반응하여 그 존재 여부가 좌우되는 것은 HSP72 (유도성HSP<sup>70</sup>)이다<sup>52</sup>. 따라서 본 연구에서 전암 단계나 암종 단계에서 거의 발현이 되지 않은점은 발암원에 대하여 급격하게 반응하고 연속적인 발암기간에 대하여 방어나 충격 완화할 시간이 없이 계속적인 발암원의 자극으로 발현이 안되었을 것이라고 생각하였다.

구강암 환자에서의 HSP연구는 거의 없으나 Sugerman<sup>53</sup>의 연구에서는 미분화 암종에서 HSP70 발현은 분화도가 좋은 암종과는 의미있는 차이를 보인다고 하였고, 정상 대조군 상피에서보다 이형성 및 암종 병소가 많은 발현이 나타났다고 하여 HSP70 발현이 구강상피 이형성이나 편평상피세포암을 연구하는데 상당한 의의가 있다고 밝혔다. 이런 결과는 악성으로 형질 전환 상태 단계라기보다는 증가된 세포증식을 반영할 수 있는 악성이나 악성 잠재력의 표지자로 고려해야 된다고 생각한다.

본 연구에서 대조군 및 상피이형성 단계와 상피내암 단계에서는 HSP70에 거의 면역반응을 보이지 않았으나 암종 단계인 14주 이후에서는 기저층은 발현이 약한 반면 극세포층에서 염색이 약간 증가된 양상으로 나타났으며 Milarski<sup>54</sup>나 Pechan<sup>55</sup>의 연구에서는 상피내 HSP발현이 암종이나 이형성 단계에서 의의있게 증가하는 한편 상피두께와는 관련이 없었다고 하였는데, 본 연구에서는 암종 단계에 따라 현저한 차이를 보이지는 않았다. HSP의 발현은 비치명적 세포성 스트레스의 다양한 범주에 의하여 유도될 수 있는데<sup>56,57</sup>. 전암 병소에서 HSP70의 발현 증가는 이런 병소가 생체내에 기계적인 외상보다는 발암율에 대한 해독작용을 반영할 수 있다고 생각되지만 본 연구에서는 상피층에서의 변화는 별로 없는 반면 결합조직내 HSP70의 발현이 이형성 단계에 증가되었고 암종 단계에서 가장 많이 관찰되어 결합조직내 열충격 단백질은 면역반응과도 밀접한 관계를 가지고 있는 것으로 생각되었다.

이런 면역인식증가에 대한 연구로는 interleukin-2나 interferon과 같은 싸이토카인이 HSP를 유도하거나 조절할 수 있으며<sup>58,59</sup>, 열충격 단백질의 보존성 때문에 일부 병원균은 숙주 침입시 이를 단백질을 항원으로 인지하는 많은

항체와 T림프구를 유도해 내기도 한다<sup>60</sup>. 또한 자가 면역반응의 가능성 또한 그 보존성으로 인하여 높아질 수 있는데 특히 전신성 홍반성 낭창의 경우 HSP에 대한 자가항체가 검출되기도 한다는 보고에서 처럼<sup>61,62</sup>, 면역반응에 밀접한 관계를 가지고 있기 때문이라고 생각할 수 있었다.

일반적으로 구강내 상피성 병소가 더욱 심한 상피 이형성을 보이는 것이 악성 잠재력이 높다고 고려되고 있고, 상피이형성을 경도, 중등도 등으로 구분하는데 본 연구에서는 상피이형성의 각 단계 6주, 8주, 10주에서는 HSP70의 염색 정도나 분포가 큰 차이가 없었고, 상피이형성과 편평상피세포 암종간에 발현 정도도 뚜렷한 차이는 없었다. 비록 HSP70의 발현 증가가 악성 암종 단계에서 정상 대조군 점막과 비교하여 많이 나타났지만 각 단계별로 뚜렷한 증가가 나타나지 않는 것으로 보아 HSP70 발현이 특이성이 없다고 여겨진다. 또한 구강암세포는 cytokeratin이나 다른 단백질 산물에서 다른 유형을 보이는데<sup>20</sup> HSP70이 단백질 합성, folding, translation<sup>63-65</sup>에 관련하기 때문에 구강 편평상피암종에서 HSP70의 발현 증가가 악성의 표지자라기 보다는 종양세포에 의하여 다양한 단백질의 합성과 관련된 단지 부가현상 일수도 있다고 여겨진다.

본 연구에서는 암종 단계에서 HSP70은 종양세포에 전체적으로 미발현을 보였는데 분화 단계 및 발암기간에 큰 차이가 없을 뿐 아니라 각각의 실험군 사이에 차이가 없이 유사한 유형을 보였으며 18주 이후의 암종세포에서는 거의 음성을 보여 HSP70이 종양 분화도 정도<sup>34</sup>나 종양 증식을<sup>33</sup>, 항종양 면역반응의 정도<sup>60,61</sup>에 관련된다는 연구와 다른 결과를 보였다. 이러한 상이한 연구 결과는 본 연구에서 단백질의 특이 항체를 사용하므로 종양에서의 종양 유전자의 동태를 파악할 수 있었고 전단 병리학적인 측면에서 유용한 점이 많지만, 단백질의 비특이적인 반응이나 단백질 분해효소의 존재, 해당 단백질의 불안정성, 염색 고정 방법 등 때문에 다른 결과를 얻을 수 있다고 여겨져 향후 인체 구강암종에서의 비교가 이루어지고 인체의 많은 임상 예와의 비교 분석이 필요하다고 생각된다.

또한 스테로이드 호르몬인 1,25-dihydroxyvitamin D3도 HSP의 합성을 증가시킬 수 있는 것으로 알려졌는데 이 호르몬과 고온의 병합 요법이 건선의 치료에 도입되고 있으며<sup>66,67</sup> 비소 또한 HSP를 유도할 수 있으므로 건선이나 다른 염증성 질환에 이용할 수 도 있고, 고온내성에 대한 이용은 현재 암종 치료를 비롯하여 많은 분야에 걸쳐 시도되고 있는데 방사선 단독보다 고온과 방사선의 병합치료가 종양치료에 더 효과적이어서 최근 이 방법이 많이 도입되고 있으나 암세포의 고온 내성기전을 극복할 수 있는 방법을 찾아내는 것이 선결 문제이므로 더 많은 연구가 요구된다<sup>68</sup>.

이상과 같은 결과로 HSP70의 발현이 구강암종 단계에서 약간 증가되었지만, 구강악성이나 악성 잠재의 특이한 표지

자는 아니라고 생각되나 결체조직에서의 발현 증가는 각 발암 단계별로 차이가 나기 때문에 종양 HSP70의 발현이 암종의 예후와 진행과정에 의의가 있다고 볼 수 있으며 포르말린 고정된 파라핀 포매조직에서 anti-HSP70 면역반응 정도의 정량적 분석을 해야하지만 구강점막병소의 악성 잠재성을 평가하는데 일반 조직소견에 부가적으로 도움을 줄 수 있으리라 여겨진다. 또한 향후 구강 상피성 병소나 암종에서 HSP70 발현의 정도를 국소적 면역반응이나 임상적 단계 등과 비교하여 연구를 해야 한다고 생각된다.

## V. 결 론

종양세포에서 HSP의 발현은 특히 면역인식을 증가시켜 암종의 면역반응에 중요한 것으로 여겨지고 있으나 구강암에서는 연구된 바가 거의 없어 햄스터 협낭에 DMBA를 도포하여 구강암을 발생시켜고 발암 과정의 단계별로 HSP47과 HSP70의 분포 양상과 발현 정도를 알아 보기 위하여 면역조직화학적 검사를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상 구강 점막에서 HSP47 양성세포는 거의 발현이 안 되었으나 6주 이후에 기저층 및 상기저층에 중등도 이상으로 크게 증가되었고, 상피이형성 단계에는 유극층에서도 발현이 되었으나, 전암단계에서 HSP47은 양성세포들이 인접 경계조직에 가장 많은 발현을 보였다.
2. 결합조직내 HSP47 양성세포들은 주로 염증세포들로 대조군에서 상피이형성, 암종 단계로 갈수록 증가하였으며, 14주 이후에는 정상상피와 경계부에서의 발현도 크게 감소되었다.
3. HSP70의 발현은 대조군 및 상피이형성 단계와 상피내 암 단계에서는 없었으나 암종 단계인 14주 이후의 기저층은 발현이 약한 반면 극세포층에서 발현이 증가된 양상으로 나타났다.
4. HSP70의 결합조직내 발현은 대조군에 비하여 이형성 기간에 증가하였고 암종 단계에서 가장 많이 관찰되었으며, 종양세포에서는 전체적으로 미발현을 보여 분화 단계 및 발암 기간에 큰 차이가 없을 뿐 아니라 16주 이후의 암종세포에서는 거의 음성을 보이며 각군 사이에 차이가 없이 유사한 유형을 보였다.

이상과 같은 소견으로 구강암 발암 단계에 따라 HSP 발현이 구강암의 정도나 악성잠재력의 표지자는 아니라고 여겨지나 발암정도에 따라 결합조직 및 인접경계상피에서의 HSP 발현 증가가 관찰되어 항종양 면역반응의 정도를 반영하기 때문에 구강점막병소의 악성 잠재성을 평가하는데 일반 조직소견에 부가적으로 도움을 줄 수 있으리라 여겨진다.

## 참고문헌

1. Barnet ML : The experimental production of carcinoma of the tongue in mice. *J Dent Res* 37:950-958, 1958.
2. Garcia RL, Gown AM : Analysis of proliferating grade using anti PCNA/cyclic monoclonal antibodies in formalin fixed, paraffin embedded tissues comparison with flow cytometric analysis. *Am J Pathol* 134:733-739, 1989.
3. Hall PA, Levison DA, Yu CCW, Kellock DB, Watkins JA : Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunolocalization in paraffin sections : an index of cell proliferation evidence of deregulated expression in some neoplasms *J Pathol* 162:285-294, 1990.
4. Ashburner M, Bonner JJ : The induction of gene activity in Drosophila by heat shock. *Cell* 17:241-245, 1979.
5. Burdon RH : Heat shock proteins. *Biochem J* 240:313-324, 1986.
6. Lindquist S : The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151-1191, 1986.
7. Pelham H : Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 46:959-961, 1986.
8. Schlesinger MJ : Heat shock proteins: The search for functions. *J Cell Biol* 103:321-325, 1986.
9. Muramatsu T, Tada H, Kobayashi N : Induction of the 72-KD heat shock protein in organ-cultured normal human skin. *J Invest Dermatol* 98:786-790, 1992.
10. Ritoosa F : A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in Drosophila. *Experimentia* 18:571-573, 1962.
11. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM : Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84:389-398, 1974.
12. Polla BS : Heat (shock) and the skin. *Dermatologica* 180:113-117, 1990.
13. Kushner DI, Ware CF, Gooding LR : Induction of the heat shock response protects cells from lysis by tumor necrosis factor. *J Immunol* 145:2925-2931, 1990.
14. Jattela M, Saksela K, Saksela E : Heat shock protects W EHI-164 target cells from the cytolysis by tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Eur J Immunol* 19:1413-1417, 1989.
15. Gatto H, Viac J, Charveron M, Schmitt D : Effects of thermal shocks on interleukin-1 levels and heat shock proteins 72(HSP 72) expression in normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 284:414-417, 1992.
16. Peterson NS, Young P, Burton V : Heat shock mRNA accumulation during recovery from cold shock in *Drosophila Melanogaster*. *Insect Biochem* 20:679-684, 1990.
17. Goldstein J, Pollitt NS, Inouye M : Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:283-287, 1990.
18. Kondo K, Inouye M : A cold shock inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266:17537-17544, 1991.
19. Velazquez JM, Lindquist S : HSP70: Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* 36:655-662, 1984.
20. Scully C, Burkhardt A : Tissue markers of potentially malignant human oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 22:246-256, 1993.
21. Fisch P, Malkovsky M, Kovats S : Recognition by human T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* 250:1269-1273, 1990.
22. Kaur I, Voss SD, Gupta RS, Schell K, Fisch P, Scndel PM

- : Human peripheral T cells recognize HSP60 molecules on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol* 150:2046-2055, 1993.
23. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL : Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 85:570-574, 1993.
  24. Kimura E, Enns RE, Alcaraz JE, Arboleda J, Slamon DJ, Howell SB : Correlation of the survival of ovarian cancer patients with mRNA expression of the 60-kD heat-shock protein HSP-60. *J Clin Oncol* 11:891-898, 1993.
  25. Srivastava PK, Maki RG : Stress-induced proteins in immune response to cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 167:109-123, 1991.
  26. Udon H, Srivastava PK : Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med* 178:1391-1396, 1993.
  27. Lindquist S, Craig EA : The heat shock proteins. *Ann Rev Genet* 22:631-677, 1988.
  28. Sauciez ER, Meshinch S, Tienrungroj W : Relationship of the 90k-Da murine heat shock protein to the untransformed and transformed states of the L cell glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 262:6989-6991, 1987.
  29. Nagata K, Sga S, Yamada KM : A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. *J Cell Biol* 103:223-229, 1986.
  30. Field JK : Oncogenes and tumour-suppressor genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*, *Eur J Cancer* 28B:67-76, 1992.
  31. Eversole LR, Sapp JP : c-myc oncoprotein expression in oral precancerous and early cancerous lesions. *Oral Oncol*, *Eur J Cancer* 29B:131-135, 1993.
  32. Zariwala M, Schmid S, Pfaltz M, Ohgaki H, Kleihues P, Schafer R : p53 gene mutations in oropharyngeal carcinomas: a comparison of solitary and multiple primary tumours and lymph-node metastases. *Int J Cancer* 56:807-811, 1994.
  33. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ : Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an HSP70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 8:531-539, 1988.
  34. Twomey BM, McCallum S, Isenberg DA, Larchman DS : Elevation of heat shock protein synthesis and HSP gene transcription during monocyte to macrophage differentiation of U937 cells. *Clin Exp Immunol* 93:178-183, 1993.
  35. Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R : Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger activation of heat shock proteins. *Science* 232:522-524, 1986.
  36. Sally JJ : Histologic changes in hamster cheek pouch during early hydrocarbon carcinogenesis. *J Dent Res* 36:48-55, 1947.
  37. Morris AL : Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J Dent Res* 40:3-15, 1961.
  38. Shklar G : Metabolic characteristics of experimental hamster pouch carcinomas. *Oral Surg* 20:336-339, 1995.
  39. Gimenez-Conti IB, Slaga TJ : The hamster cheek pouch carcinogenesis model. *J Cell Biol Chem (Suppl)* 17F:83-90, 1993.
  40. Craig E, A Jacobsen K : Mutations in cognate genes of *Saccharomyces cerevisiae* hsp70 result in reduced growth rates at low temperatures. *Mol Cell Biol* 5:3517-3524, 1985.
  41. Sauk JJ, Norris K, Foster RA, Moehring JM, Somerman MJ : Expression of heat stress proteins by human periodontal ligament cells. *J Oral Pathol* 17:496-498, 1988.
  42. Joplin KH, Yocom GD, Denlinger DL : Cold shock elicits expression of heat shock proteins in the flesh fly, *Sarcophaga Crassipelpis*. *J Insect Physiol* 36:825-834, 1990.
  43. Holland DB, Roberts SG, Wood EJ, Cunliffe WJ : Cold shock induces the synthesis of stress proteins in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 101:196-199, 1993.
  44. Edwards MJ, Marks R, Dykes PJ, Merrett VR, Morgan HE, O'Donovan MR : Heat shock proteins in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 96:392-396, 1991.
  45. Hendrick JP, Hartl FU : Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 62:349-384, 1993.
  46. Shroff B, Smith T, Norris K, Pileggi R, Sauk J : HSP is localized to regions of type I collagen production in developing murine femurs and molars. *Connective Tissue Res* 29:273-286, 1993.
  47. Van Dierendoeck JH, Wijsman JH, Keijer R, Cornelis JH, Van de Velle Cornelisse CJ : Cell cycle related staining patterns of antiproliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 138:1165-1172, 1991.
  48. Sauk JJ, Norris K, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ : The expression of colligin/hsp47 after stress in human periodontal fibroblasts in vitro. *In Vitro Arch Oral Biol* 35:645-651, 1990.
  49. Sauk JJ, Norris K, Foster R, Moehring J, Somerman MJ : Expression of heat shock proteins by human periodontal ligament cells. *J Oral Pathol* 17:496-498, 1988.
  50. Kurkinen MA, Taylor A, Garrels JI, Hogan BLM : Cell surface-associated proteins which bind native type IV collagen or gelatin. *J Biol Chem* 259:5915-5922, 1984.
  51. Welch WJ, Suhan JP : Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol* 103:2035-2052, 1986.
  52. Beckmann RP, Mizzen LA, Welch JW : Interaction of HSP70 with newly synthesized protein: implications for protein folding and assembly. *Science* 248:850-857, 1990.
  53. Sugerman PB, Savage NW, Xu LJ, Walsh LJ, Seymour GJ : Heat shock protein expression in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, *Eur J Cancer* 31:63-67, 1995.
  54. Milaarski KL, Morimoto RI : Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9517-9521, 1986.
  55. Pechan PM : Heat shock proteins and cell proliferation. *FEBS Lett* 280:1-4, 1991.
  56. Welch WJ : Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72:1063-1081, 1992.
  57. Jaattela M, Wissing K : Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann Med* 24:249-258, 1992.
  58. Ciocca DR : Evidence for modulation of a 24K protein in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Meta* 57:496-499, 1983.
  59. Michael FP, Nancy AN, Amritin B, Geoffrey LG : Estrogen receptor localization in the female genital tract. *Am J Pathol* 123:280-292, 1986.
  60. Young D, Lathigra R, Hendrix R, Sweetser D, Young RA : Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4276-4270, 1988.
  61. Minota SM, Koyasu S, Yahara I, Winfield J : Autoantibodies to the heat shock protein HSP 90 in

- systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 81:106-109, 1988.
62. Minota S, Cameron B, Welch WJ, Winfield JB : Autoantibodies to the constitutive 73-KD member of the HSP 70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 168:1475-1480, 1988.
63. Beckmann RP, Mizzen LA, Welch WJ : Interaction of HSP70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248:850-854, 1990.
64. Eills RJ, Vies SM : Molecular Chaperones. *Annu Rev Biochem* 60:321-347, 1991.
65. Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU : Successive action of the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356:683-689, 1992.
66. Westerhof W, Siddiqui AH, Cormane RH : Infrared hyperthermia and psoriasis. *Arch Dermatol Res* 279:209-210, 1987.
67. Morimoto S, Uoshikawa K : Psoriasis and vitamin D3: A review of our experience . *Arch Dermatol* 125:231-234, 1989.
68. Rofstad EK, Brustad T : Development of thermotolerance in a human melanoma xenograft. *Cancer Res* 44:525-530, 1984.

#### 저자연락처

우편번호 570-711  
전라북도 익산시 신룡동 344-2  
원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실  
최규환

원고 접수일 2001년 01월 05일  
제재 확정일 2001년 02월 15일

#### Reprint requests

Kyu-Hwan Choi

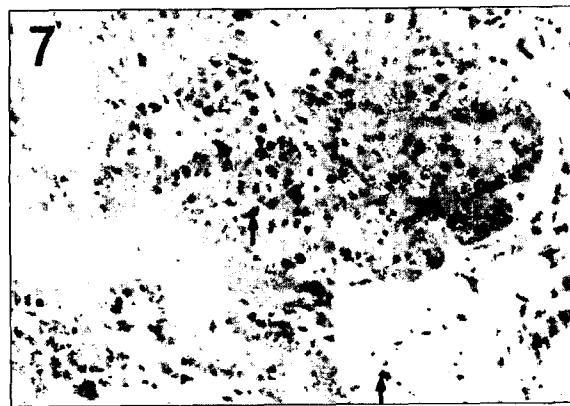
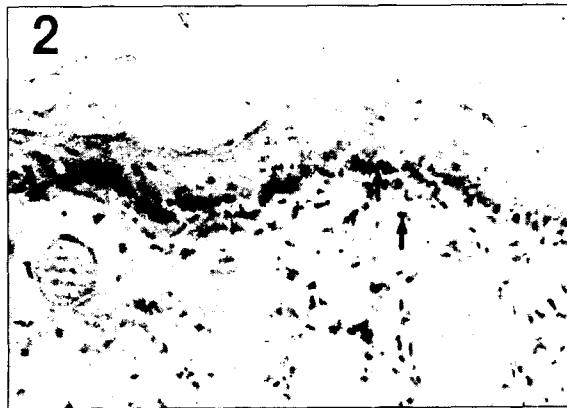
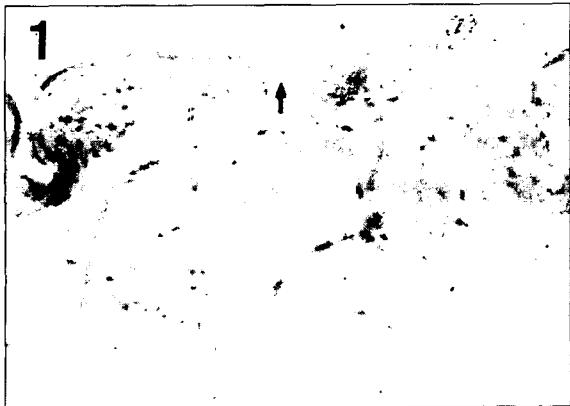
Dept. of OMFS, College of Dentistry Wonkwang Univ.  
344-2, Sinyoung-Dong, Iksan-City, Chunbuk, 570-711, Korea  
Tel. 82-63-850-1921, Fax 82-63-852-4939

Paper received 5 January 2001  
Paper accepted 15 February 2001

### 사진부도 설명

- Photo 1. HSP47 positive cell were rare in epithelial layer of normal oral mucosa (Immunostain for HSP47,  $\times 100$ ).
- Photo 2. HSP47 positive cell were present almost in the suprabasal, basal cell layers and subepithelial inflammatory cells of 6 weeks (Immunostain for HSP47,  $\times 100$ ).
- Photo 3. HSP47 positive cells present in the spinous layer, almost basal & suprabasal cell layers of 10 weeks (Immunostain for HSP47,  $\times 100$ ).
- Photo 4. HSP47 positive cell were present almost in the spinous layers of 12 weeks. Adjacent normal appearing epithelium was more immunoreactive than dysplastic epithelium (Immunostain for HSP47,  $\times 100$ ).
- Photo 5. HSP47 positive cell were rare or absent almost in the cancer cells of 14 weeks (Immunostain for HSP47,  $\times 200$ ).
- Photo 6. HSP47 positive cell were prominent in the inflammatory cells and fibroblasts of connective tissue (Immunostain for HSP47,  $\times 100$ ).
- Photo 7. HSP47 positive cell were rare or in the cancer cells of 20 week (Immunostain for HSP47,  $\times 200$ ).
- Photo 8. HSP47 expression were diffuse in cancer free epithelium (Immunostain for HSP47,  $\times 100$ ).
- Photo 9. HSP70 positive cell were rare in epithelial layer of normal oral mucosa (Immunostain for HSP70,  $\times 100$ ).
- Photo 10. HSP70 positive cell were rare in the suprabasal, basal cell layers but mild in subepithelial inflammatory cells of 6 weeks (Immunostain for HSP47,  $\times 100$ ).
- Photo 11. HSP70 positive cells in 8 weeks were similar pattern of 6 weeks (Immunostain for HSP47,  $\times 100$ ).
- Photo 12 HSP70 positive cell were present almost in the connective tissue of 12 weeks. Dysplastic cells were rare immunoreaction (Immunostain for HSP70,  $\times 100$ ).
- Photo 13. HSP70 positive cell were present in keratin & spinous layer in the cancer cells of 14 weeks (Immunostain for HSP70,  $\times 100$ ).
- Photo 14. High-power magnification of Fig.13. HSP70 positive cell were prominent in the inflammatory cells and fibroblasts of connective tissue (Immunostain for HSP70,  $\times 100$ ).
- Photo 15. HSP70 positive cell were rare in the cancer cells of 18 weeks (Immunostain for HSP70,  $\times 100$ ).
- Photo 16. HSP70 expression positive cells were present in spinous layer of normal appearing or cancer free epithelium of 18 weeks (Immunostain for HSP47,  $\times 100$ ).

사진부도 ①



사진부도 ②

