

백서 상부 소화기계의 발달 시기별 Telomerase 활성 및 PCNA(proliferating cell nuclear antigen)의 발현 변화

성일용* · 김종렬**

울산대학교 의과대학 구강악안면외과학교실*,
부산대학교 치과대학 구강악안면외과학교실**

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2004;30:85-99)

THE CHANGES OF TELOMERASE ACTIVITY AND PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN(PCNA) EXPRESSION IN THE DEVELOPMENTAL STAGES OF RAT'S UPPER DIGESTIVE SYSTEM

Iel-Yong Sung*, Jong-Ryoul Kim**

*Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Ulsan University**
*College of Dentistry, Pusan National University***

Purpose: This study observed the changes in the telomerase activity, it's developmental regulation, PCNA expression, and their correlation in rat's upper digestive organs during growth and aging.

Materials and Methods: Upper digestive organs(buccal mucosa, gingiva, palate, submandibular and parotid glands, and tongue) were aseptically removed from Sprague-Dawley rats of fetal(gestational 20 days), growing(1, 2, 3, 5, and 7 weeks after birth) and adult(12 week old). Samples for telomerase activity were frozen on liquid nitrogen immediately after sacrifice, and stored until the use at -75°C in order to measure it. Telomerase activity was measured by a PCR-based telomeric repeat amplification protocol(TRAP) assay and quantitated with Photometric Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA plus(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). PCNA expression were measured immunohistochemistry with anti PCNA Ab-1, Clone PC10(NeoMark, California, USA).

Results:

1. Telomerase activities in buccal mucosa, palate and gingiva were the highest in fetus and decreased gradually or rapidly after birth and then diminished, but In salivary gland and tongue were the highest in fetus and also high at 1 week and then decreased rapidly.
2. PCNA expression in buccal mucosa, gingiva, Tongue and salivary gland was the highest in fetus and decreased gradually and then diminished. but only in palate decreased rapidly after birth and then diminished.

Conclusion: The highest telomerase activity of embryonic stage decreased rapidly after birth in rat's upper digestive organs. There may be a developmental regulation of telomerase activity, but not a tissue-specific. This telomerase activity seems correlated closely with PCNA expression in rat's upper digestive system.

Key words : Telomerase, PCNA, Upper digestive system

I. 서 론

Telomere의 길이를 유지시키는 효소를 telomerase라 하며, 이 효소는 RNA와 단백질로 구성된 리보핵산단백질(ribonucleoprotein)

로서 염색체 말단에 있는 telomeric DNA를 합성하며, telomere에 G-rich 가닥을 연장시키기 위해 주형으로 telomerase의 자체 구성 성분인 RNA를 이용하는 역전사효소(reverse transcriptase)이다.^{1,2)}

Telomerase 활성은 정상 성인의 체세포 조직에서는 발견되지 않지만, 피부, 혈액, 장 등의 줄기세포, 고환과 난소의 생식 세포 및 암세포와 같은 활동적으로 분열하는 세포에서는 관찰된다^{3,4)}. 최근 두경부암 등^{5,6)}의 종양세포에서 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 이용한 PCR-based telomeric repeat amplification protocol(TRAP) 분석법⁷⁾에 의하여 telomerase 활성이 발견되면서 telomerase 활성이 대부분의 종양 발생에 필수적인 것임

성 일 용

682-714, 울산광역시 동구 전하동 290-3

울산대학교병원 울산대학교 의과대학 치과/구강악안면외과학교실

Iel-Yong Sung

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, Ulsan University Hospital

290-3 Jeonha-Dong, Dong-Gu, Ulsan 682-714, Korea

Tel : +82-52-250-7230 Fax : +82-52-250-8078

E-mail : ielyongsung@hanmail.net

이 밝혀지고 있으며 정상 세포에서 불멸세포(immortal cell)로의 진행에는 안정된 telomere의 길이가 유지되어야 하며 이러한 telomere 길이의 유지는 telomerase 활성에 의하여 일어난다고 알려져 있다⁸⁹⁾. 그러므로 telomerase 활성은 세포의 증식능과 밀접한 관련이 있을 것으로 추정된다. 최근 분자 생물학적 기법의 발달과 함께 세포 주기에서 세포 증식을 나타내는 생물학적 지표들의 발견과 세포의 증식능력의 정도를 측정하는 여러 방법들이 개발되었다¹⁰⁻¹³⁾.

정상 포유류의 체세포에서의 telomerase 활성은 종족 특이적, 조직 특이적, 그리고 세포 특이적으로 조절되고 있는 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁷⁾. Yamaguchi 등¹⁰⁾은 백서의 발달 시기와 나이에 따라 telomerase와 telomere의 길이가 발생학적 그리고 조직 특이적으로 조절 받고 있다고 하였다. 그리고 Brestilny 등¹⁷⁾에 의하면 정상 사람의 체세포에서 telomerase 활성이 없는 것은 아마도 발생학적으로 효소 활동을 억압하는 엄격한 억제 조절 기전이 있기 때문일 것으로 추정하였다.

이에 본 연구는 백서 상부 소화기계의 발달 시기에 따라 telomerase 활성 변화를 관찰하여, 발생학적, 조직 특이적으로 telomerase 활성이 영향을 받는지를 알아 보고자 하였다. 그리고 백서의 상부 소화기계의 발달 시기에 따른 세포의 증식 능력을 평가하기 위해서 PCNA 발현율의 변화를 관찰하고, telomerase 활성과 세포의 증식능과의 상호 관련성도 알아보고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

대한 실험 동물센터에서 태생기(태생 20일), 성장기(생후 1주, 2주, 3주, 5주 및 7주) 및 성숙기(생후 12주)의 Sprague-Dawley 백서를 각 시기별로 암수 구별 없이 5마리씩 총 35마리를 공급 받았다. 35마리의 백서들을 공급 받은 당일 telomerase 활성 실험을 위하여 각 시기별로 3마리씩 총 21마리를, PCNA 발현 실험을 위하여 각 시기별로 2마리씩 총 14마리를 희생시켜 상부 소화기계인 혀점막(buccal mucosa), 치은(gingiva), 구개(palate), 악하선(submandibular gland), 이하선(parotid gland) 그리고 혀(tongue) 조직을 적출하였다.

2. 연구 방법

각 조직의 허혈을 방지하기 위하여 백서를 에테르를 이용하여 흡입 마취시킨 상태에서 수술을 시행하였다. 백서를 수술대에 위에 양와위로 누인 후 사지를 압핀으로 고정시킨 다음 털이 없는 태생 20일 및 생후 일 주의 백서를 제외한 모든 백서들은 목과 얼굴 부위의 털을 깨끗이 깎은 후 베타딘 및 알코올로 소독하였다. 미세기구를 이용하여 혀점막, 치은, 구개, 악하선, 이하선, 그리고 혀 조직을 적출하였다. 태생 20일과 생후 1주 및 2주는 수술 현미경(Dual zoom stereomicroscope. Nisso Optical Co., Japan)하에서 조직을 적출하였다.

Telomerase 활성 실험을 위하여 각 시기별로 백서를 3마리씩 희생시켰으며, 검체들은 적출 즉시 -196°C 액체 질소에 동결한 후 -75°C 초저온 냉동고에 실험 수행 때까지 보관하였다. 그리고 PCNA 발현 실험을 위하여 각 시기별로 백서를 2마리씩 희생시킨 후 검체를 적출 즉시 10% 포르말린 용액에 24시간 동안 고정시킨 후 파라핀 블록을 만들어 실험 수행 때까지 보관하였다.

1) TRAP 분석법에 의한 telomerase 활성 측정

Telomerase 활성 측정은 현재 주로 이용되고 있는 PCR을 근간으로 한 TRAP 분석법⁷⁾을 이용하여 telomerase 활성도를 광효소면역 측정법(photometric enzyme linked immunoassay)인 TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA plusTM(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kit를 이용하여 측정하였다.

(1) Preparation of Extracts from Tissues

동결된 조직을 microtome을 이용하여 10~15 μ m 두께로 절단하여 200 μ l ice-cold Lysis reagent가 있는 소독된 reaction tube에 대략 50개 정도의 절편을 넣고 30분 정도 얼음속에서 배양한다. 4°C에서 20분 동안 16,000 \times g에서 lysate를 원심 분리하여 조심스럽게 supernatant를 제거하고 다시 fresh tube에 옮겨 넣는다. Pelleted cell의 세포성 debris는 옮겨지지 않도록 tissue extract를 175 μ l 정도만 pipetting하고 standard methods로 단백질 농도를 측정한다. TRAP 반응을 수행할 때까지 액체 질소에 급냉 시켜서 -80°C에 추출물을 보관하였다.

(2) TRAP Reaction

조직 추출 단계는 조직을 해동하는 즉시 얼음속에 담가 4°C를 유지하면서 모든 조작을 실시하였다. 각 검체들은 control template를 위해서 25 μ l reaction mixture(biotinylated telomerase substrate P1-TS, optimized anchor-primer P2, nucleotides, and Taq DNA polymerase)과 5 μ l internal standard(216bp internal standard, DNA 0.001 mol/ μ l, IS)을 PCR amplification하기에 적절한 tube로 각각 옮기고 동시에 분석을 하기 위하여 모든 검체와 control plate를 위해서 master-mix를 준비한다. 각 PCR 반응마다 PCR amplification을 위해서 적절한 tube로 30 μ l의 master-mix를 옮기고 검체는 각 tube에 1~3 μ l cell extract(10^3 - 3×10^5 cell equivalents or 0.5~10 μ g total protein)를 더한다. Negative control은 각 tube에 corresponding heat treated cell extract(10^3 - 3×10^5 cell equivalents or 0.5~10 μ g total protein)를 1~3 μ l 더하고 control template는 2개의 각각의 tube에 1 μ l lysis reagent와 1 μ l control template(positive control template DNA with the same sequence as a telomerase product with 8 telomeric repeats, TS8)를 pipetting한다. Total volume 50 μ l을 위해서 nuclease-free water(double-distilled)를 더하고 thermal cycler내로 tubes를 옮겨 아래 protocol을 따라서 primer elongation과 amplification을 시행한다. Primer elongation 25°C 10~30분, telomerase inactivation 94°C 5분, amplification은 denaturation 94°C 30초, annealing 50°C 30초, polymerization 72°C 90초를 30 cycle 반복 시행하고 72°C 10분간 둔다. 그리고 4°C에 유지시킨다.

(3) Hybridization and ELISA

각 검체를 위해서 2개의 분리된 reaction tubes에 10 μ l denaturation reagent(0.5% sodium hydroxide 이하)를 pipetting한다. 각 tube에 2.5 μ l amplication product를 넣고 10분간 실온에서 배양을 하고 한 tube에는 100 μ l hybridization buffer T(DIG-labeled detection probe complementary to telomeric repeat sequences, P3-T)를 그리고 다른 tube에는 100 μ l hybridization buffer IS(DIG-labeled detection probe complementary to the internal standard, P3-IS)를 넣고 vortexing하여 전체적으로 혼합시킨다. Pipetting scheme에 따라서 kit와 같이 공급된 precoated MTP modules의 각 well에 100 μ l mixture를 각각 넣고 self-adhesive cover foil로 well들을 덮는다. 37°C에서 2시간 동안 shaker에 MTP modules 배양하고 완전히 hybridization solutions을 제거 한다. 각각의 well을 washing buffer에 최소한 30초 이상 3번 정도 수세한 다음 washing buffer를 조심스럽게 제거한다. 각 well에 100 μ l Anti-DIG-HRP working solution을 넣고 cover foil을 가지고 MTP modules를 덮는다. Plate가 300 rpm으로 회전하는 동안 30분간 실온(18~22°C)에 정온시키고 solution을 완전히 제거한다. 250 μ l washing buffer로 최소한 30초 이상 각 well을 5번 수세를 한 다음 washing buffer를 조심스럽게 제거 하는데 각 well에 실온에서 prewarmed 100 μ l TMB substrate solution(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine)을 넣고 well들을 foil로 감싼다. Plate가 300 rpm으로 회전하는 동안 10~20분간 실온에서 color development를 위해서 정온을 하고 reacted substrate를 제거 할 필요없이 color development를 멈추게 하기 위해서 각 well에 stop reagent(5% sulfuric acid 이하)를 넣는다. 이 stop reagent는 reacted HRP substrate를 파랑(blue)색에서 노랑(yellow)색으로 변하게 하는데, 이는 maximum sensitivity를 얻는데 필요하다. Microtiter plate(ELISA) reader를 이용하여 stop reagent를 넣은 후 30분내에 450 nm에서 reference wavelength인 690 nm와 같이 검체의 흡광도(absorbance)를 측정한다.

Telomerase reaction의 specificity를 검사하기 위한 음성 대조군(negative control)의 검체를 열처리(heat treatment)하여 사용한다. 이는 telomerase specific detection probe(P3-T)로 분석을 했을 때 흡광도는 telomerase inactivation의 효과에 달려 있기 때문이다. 음성 대조군(negative control)은 0.1(A450nm-A650nm units) 이하이다. 양성 대조군(positive control)은 1 μ l control template, low와 1 μ l control template, high를 이용하여 얻었다. 즉 IS(internal standard), (ATS8-ATS8.0)/ATS8(ATS8: absorbance of control template, ATS8.0: absorbance of lysis buffer)로 값을 얻었다. 10분간 substrate reaction후에 각각 high는 2.0~4.0 그리고 low는 0.2~0.5 범위를 하였다. 검체의 흡광도에서 대조군의 흡광도의 평균을 뺀 값(AS-AS.0)으로 하였다(AS: absorbance of sample, AS.0: absorbance of heat-treated sample). 흡광도의 차이가 2 이상을 telomerase의 활성도가 있는(telomerase-positive)것으로 간주하였다.

2) PCNA에 대한 면역 조직화학적 염색

(1) 조직의 처리

통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거친 조직을 4 μ m 두

께의 절편을 제작하여 xylene으로 5분간 3회 탈파라핀화하여 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 고농도에서 저농도로 단계별 1분간 처리한 후 증류수로 5분간 2회 수세한다.

(2) 일차항체

일차항체는 mouse monoclonal antibody로 PCNA Ab-1인 Clone PC10™(NeoMark, California, USA)을 사용하였다.

(3) 면역조직화학적 염색

탈파라핀화한 후 함수시킨 절편을 3% 과산화수소수로 내인성 과산화효소(peroxidase)를 제거하기 위해서 10분간 반응을 시킨 다음 증류수로 수세시키고 pH 6.0 tris buffered saline(TBS) 완충액으로 다시 수세를 시킨다. Antigen retrieving을 위해서 autoclave에 121°C 15분간 처리한다. TBS완충액에 5분간 2회 세척한 후 blocking serum에 10분간 반응시키고 일차항체를 가한 다음 4°C에서 12~14시간 동안 반응을 시킨다. 그 후 다시 TBS 완충액에 5분간 2회 세척한 후 이차항체를 실온에서 15분간 반응을 시킨 다음 다시 TBS 완충액에 5분간 2회 세척을 한다. 그리고 Streptavidin-Horseradish Peroxidase(HRP)를 15분간 반응을 시킨다. Histostain-plus kits(Zymed Laboratories Inc.)를 이용하여 30분간 반응시키고 다시 TBS 완충액에 5분간 2회 세척을 하고 3, 3'-diaminobenzidine(DAB)을 이용하여 실온에서 10분간 발색시킨 다음 10분간 수세를 한다. 마지막으로 Meyer's hematoxylin으로 실온에서 10분간 대조염색을 시행하고 봉입한다.

(4) PCNA 표지지수 측정 및 결과 판정

PCNA 표지지수는 염색된 모든 조직 표본을 광학 현미경(Olympus BH60, Japan) 100배 시야에서 염색이 잘된 부위를 선택하여 200배 시야에서 관찰하여 1,000개의 세포를 세어 양성 핵수와 음성 핵수를 계산하여 백분율을 표현하였다. 염색 결과의 판독은 핵에 국한되어 뚜렷한 갈색 과립성으로 염색된 경우를 양성으로 판정하였다.

3) 통계학적 분석

상부 소화기계의 각 조직의 telomerase 활성과 PCNA 표지지수와의 관련성은 상관분석(Kendall-tau)을 시행했다. 그리고 상부 소화기계의 조직 특이성 관찰하기 위해서 조직간의 telomerase 활성의 차이는 ANOVA를 사용하여 검정하였다.

III. 연구결과

1. Telomerase의 활성 변화

1) 협점막 조직의 telomerase 활성 변화

협점막의 TRAP 반응 결과를 태생기, 성장기, 성숙기로 나누어 각 시기별로 비교하면 태생 20일에서는 telomerase 활성이 가장 높게 발현 되었으며 생후 1주는 태생 20일 보다는 낮지만 상당히 높게 발현되었다. 생후 2주에는 생후 1주 보다 현저히 낮게 발현

되었으며 생후 3주 이후 부터는 성숙기인 12주까지는 활성이 일정하게 낮게 발현되었다(Fig. 1A). 혀점막에서 telomerase의 활성을 각 시기별로 정량적인 양으로 비교하면은 태생 20일에는 양성대조보다 2배 이상 정도 높았고, 생후 1주는 1배 정도 높았다. 생후 2주부터 성숙기인 12주까지는 일정하게 낮게 유지되었다(Fig. 1B).

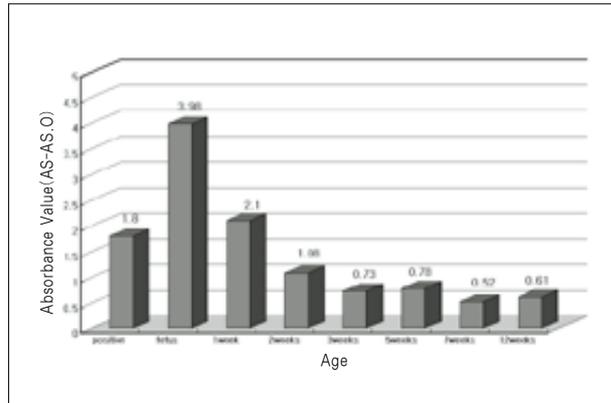
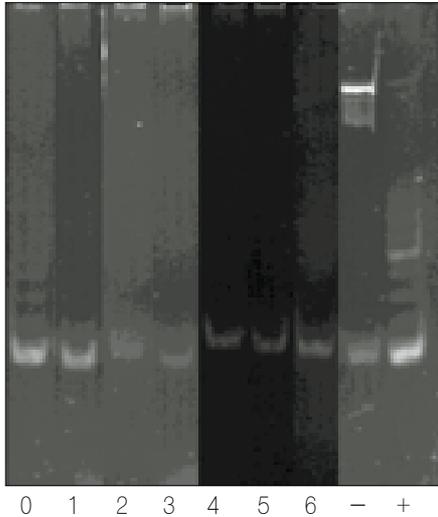


Fig. 1. Expression(A) and quantitative assay(B) of telomerase activities in development stages of rat's buccal mucosa. Telomerase activities in buccal mucosa were the highest in fetus and then decreased gradually after birth.

Lane 0, gestational 20 days; Lane 1, 2, 3, 4, 5, and 6, 1-, 2-, 3-, 5-, 7-, and 12-weeks after birth. Lane -, +: Negative control, positive control, respectively.

2) 치은 조직의 telomerase 활성 변화

치은 조직의 TRAP 반응 결과를 태생기, 성장기 및 성숙기로 나누어 각 시기별로 비교하면 태생 20일에서는 치은 조직의 telomerase 활성이 가장 높게 발현되었으며 생후 1주에서도 높게 발현되었다. 생후 2주 이후에서 성숙기인 12주까지는 거의 telomerase 활성이 발현되지 않았다(Fig. 2A). 치은 조직에서 telomerase의 활성을 각 시기별로 정량적인 양으로 비교하면은 태생 20일에서는 양성대조보다 2배 이상 높았고, 생후 1주는 양성대조와 유사하였다. 생후 2주에서부터 성숙기인 12주까지는 거의 발현이 되지 않았다(Fig. 2B).

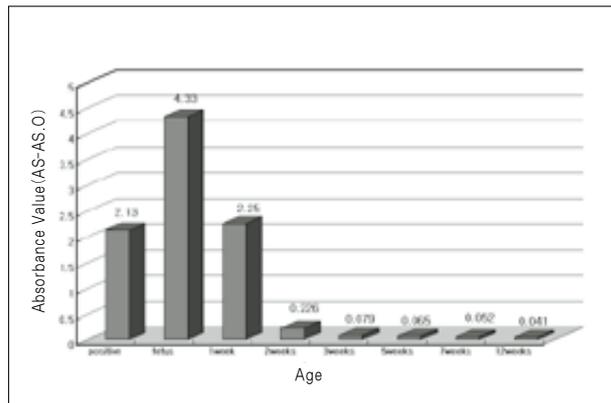
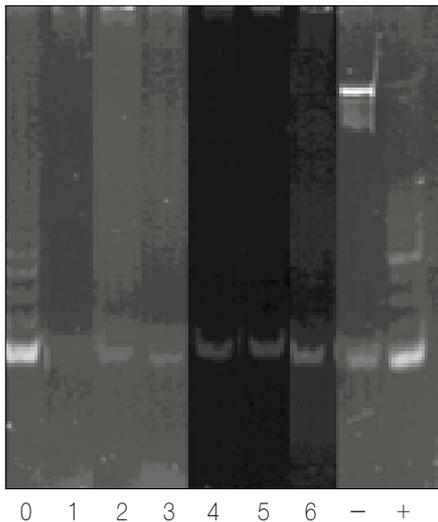


Fig. 2. Expression(A) and quantitative assay(B) of telomerase activities in development stages of rat's gingiva. Telomerase activities in gingiva were the highest in fetus and then diminished rapidly after 2 weeks.

Lane 0, gestational 20 days; Lane 1, 2, 3, 4, 5, and 6, 1-, 2-, 3-, 5-, 7-, and 12-weeks after birth. Lane -, +: Negative control, positive control, respectively.

3) 구개 조직의 telomerase 활성 변화

구개 조직의 TRAP 반응 결과를 태생기, 성장기 및 성숙기로 나누어 각 시기별로 비교하면 태생 20일에서는 구개 조직의 telomerase 활성이 가장 높게 발현되었으며 생후 1주에서도 높게 발현되었다. 생후 2주 이후부터는 점차적으로 감소하여 일정하게 낮게 유지되었고 성숙기인 12주에서는 거의 발현이 되지 않았다 (Fig. 3A). 구개 조직에서 telomerase의 활성을 각 시기별로 정량적인 양으로 비교하면은 태생 20일에서는 양성대조보다 2배 정도

높았고, 생후 1주도 양성대조보다 1.5배 정도 높았다. 생후 2주 이후부터는 점차적으로 감소하여 일정하게 낮게 유지되었고 성숙기인 12주에서는 거의 발현이 되지 않았다 (Fig. 3B).

4) 악하선 조직의 telomerase 활성 변화

악하선 조직의 TRAP 반응 결과를 태생기, 성장기 및 성숙기로 나누어 각 시기별로 비교하면 태생 20일에서는 악하선 조직의 telomerase 활성이 가장 높게 발현되었으며 생후 1주에서도 상당히 높게 발현되었다. 생후 2주 이후부터는 급격히 감소되어 생후 7주에서부터는 거의 발현이 되지 않았다(Fig. 4A). 악하선 조직에서 telomerase의 활성을 각 시기별로 정량적인 양으로 비교하면

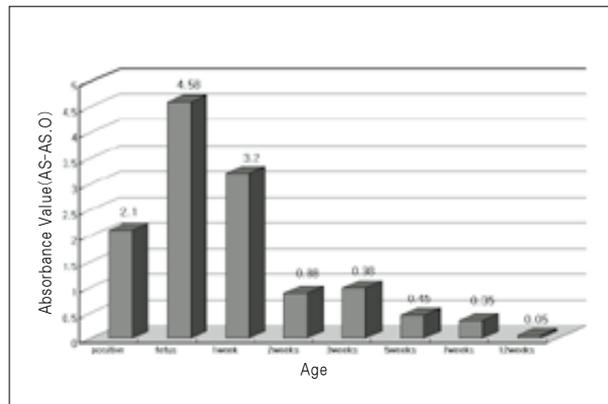
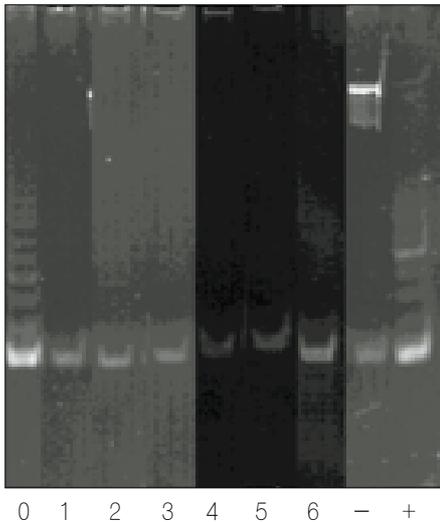


Fig. 3. Expression(A) and quantitative assay(B) of telomerase activities in development stages of rat's palate. Telomerase activities in palate were the highest in fetus and then decreased gradually at 2 weeks and diminished after 12 weeks. Lane 0. gestational 20 days: Lane 1, 2, 3, 4, 5, and 6, 1-, 2-, 3-, 5-, 7-, and 12-weeks after birth. Lane -, +: Negative control, positive control, respectively.

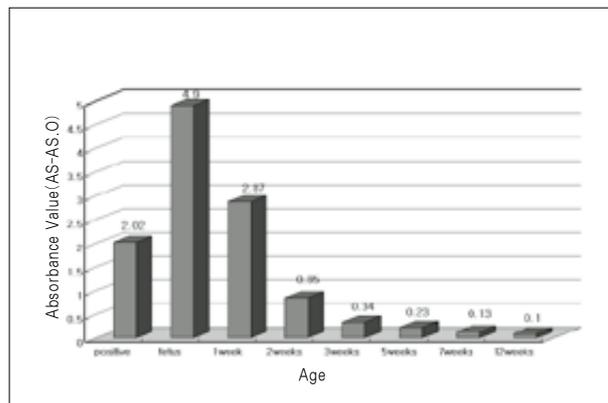
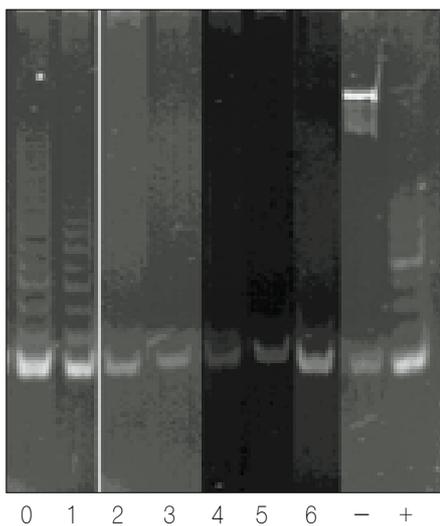


Fig. 4. Expression(A) and quantitative assay(B) of telomerase activities in development stages of rat's submandibular gland. Telomerase activities in submandibular gland were the highest in fetus and also high at 1 week and then decreased rapidly after 2 weeks and diminished after 7 weeks. Lane 0. gestational 20 days: Lane 1, 2, 3, 4, 5, and 6, 1-, 2-, 3-, 5-, 7-, and 12-weeks after birth. Lane -, +: Negative control, positive control, respectively.

은 태생 20일에서는 양성대조보다 2배 이상 높았고, 생후 1주도 양성대조보다도 높은 활성도를 보였다. 생후 2주부터는 급격한 감소를 보였다(Fig. 4B).

5) 이하선 조직의 telomerase 활성 변화

이하선 조직의 TRAP 반응 결과를 태생기, 성장기 및 성숙기로 나누어 각 시기별로 비교하면 태생 20일에서는 이하선 조직의 telomerase 활성이 가장 높게 발현되었으며 생후 1주에서도 높게

발현되었다. 생후 2주부터는 급격히 감소되어 생후 7주에서는 거의 나타나지 않았다(Fig. 5A). 이하선 조직에서 telomerase의 활성을 각 시기별로 정량적인 양으로 비교하면 태생 20일에서는 양성대조보다 거의 2배 정도 높았고, 생후 1주는 양성대조와 유사하였다. 생후 7주부터는 거의 활성이 나타나지 않았다(Fig. 5B).

6) 혀 조직의 telomerase 활성 변화

혀 조직의 TRAP 반응 결과를 태생기, 성장기 및 성숙기로 나누어 각 시기별로 비교하면 태생 20일에서는 혀 조직의 telomerase 활성이 가장 높게 발현되었으며 생후 1주에서도 높게 나타났다. 생후 2주에서부터 급격히 감소되어 성숙기인 12주까지는 일정하

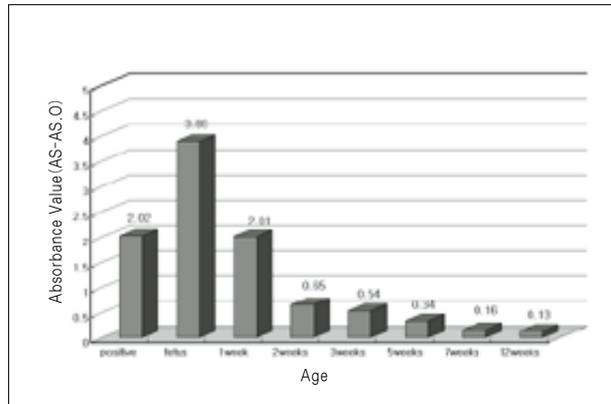
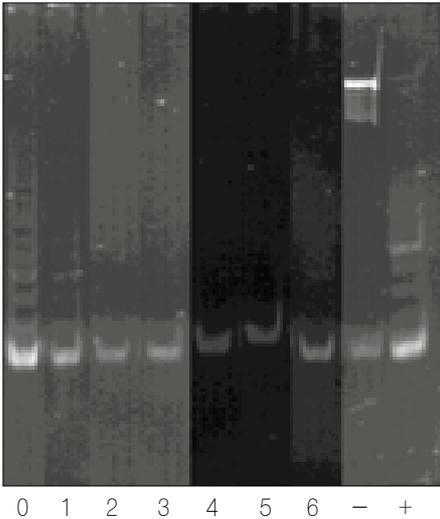


Fig. 5. Expression(A) and quantitative assay(B) of telomerase activities in development stages of rat's parotid gland. Telomerase activities in parotid gland were the highest in fetus and also high at 1 week and then decreased rapidly after 2 weeks and diminished after 7 weeks. Lane 0, gestational 20 days; Lane 1, 2, 3, 4, 5, and 6, 1-, 2-, 3-, 5-, 7-, and 12-weeks after birth. Lane -, +: Negative control, positive control, respectively.

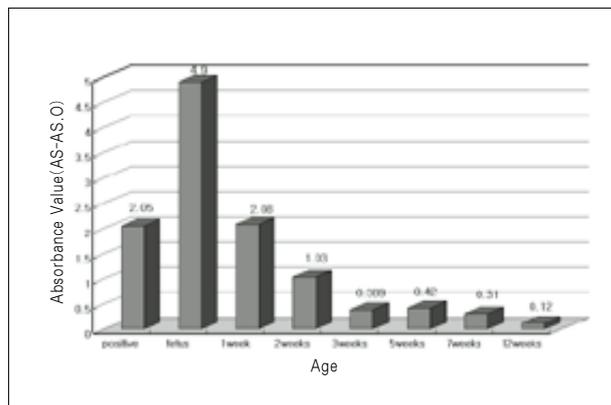
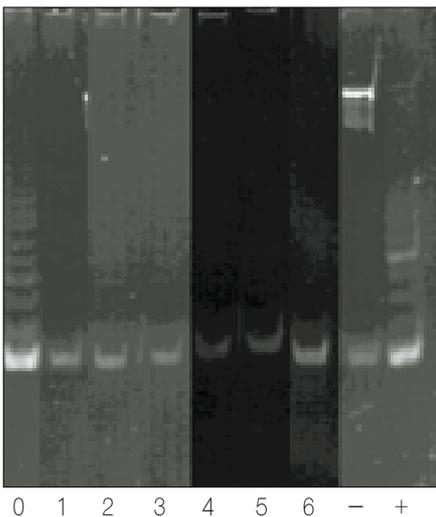


Fig. 6. Expression(A) and quantitative assay(B) of telomerase activities in development stages of rat's tongue. Telomerase activities in tongue were the highest in fetus and high at 1 week and then decreased rapidly at 2 weeks. Lane 0, gestational 20 days; Lane 1, 2, 3, 4, 5, and 6, 1-, 2-, 3-, 5-, 7-, and 12-weeks after birth. Lane -, +: Negative control, positive control, respectively.

게 낮게 유지되었다(Fig. 6A). 혀 조직에서 telomerase의 활성을 각 시기별로 정량적인 양으로 비교하면 태생 20일에서는 양성대조보다 2배 이상 높았고, 생후 1주에서는 양성대조와 거의 유사하였다. 그리고 생후 2주부터 성숙기인 12주까지는 일정하게 낮게 유지되었다(Fig. 6B).

2. PCNA 표지지수

1) 협점막 조직의 PCNA 표지지수

협점막 조직의 PCNA 표지지수를 태생기, 성장기 및 성숙기로 나누어 각 시기별로 나누어 비교하면 태생 20일에 PCNA 표지지수가 가장 높게 발현되었다. 생후 1주에도 높게 발현되었으나 점차적으로 감소되어 생후 3주부터는 거의 발현이 되지 않았다(Fig. 7).

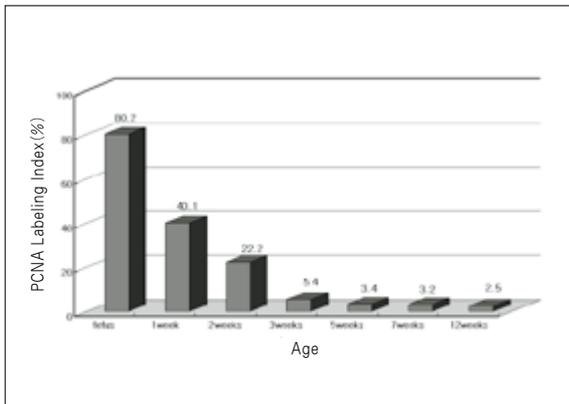


Fig. 7. PCNA expression in the developmental stages of rat's buccal mucosa. PCNA expression in buccal mucosa was the highest in fetus and decreased gradually and then diminished after 3 weeks.

2) 치은 조직의 PCNA 표지지수

치은 조직의 PCNA 표지지수를 태생기, 성장기 및 성숙기로 나누어 각 시기별로 나누어 비교하면 태생 20일에 PCNA 표지지수가 가장 높게 발현되었다. 생후 1주에도 높게 발현되었으나 점차적으로 감소하여 생후 7주에서는 거의 발현이 되지 않았다(Fig. 8).

3) 구개조직의 PCNA 표지지수

구개 조직의 PCNA 표지지수를 태생기, 성장기 및 성숙기로 나누어 각 시기별로 나누어 비교하면 태생 20일에 PCNA 표지지수가 가장 높게 발현되었다. 생후 1주부터 급격히 감소되어 생후 5주부터는 거의 발현이 되지 않았다(Fig. 9).

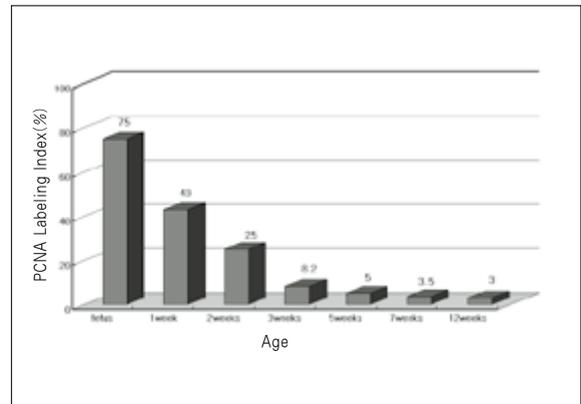


Fig. 8. PCNA expression in the developmental stages of rat's gingiva. PCNA expression in gingiva was the highest in fetus and decreased gradually after 1 week and then diminished after 7 weeks.

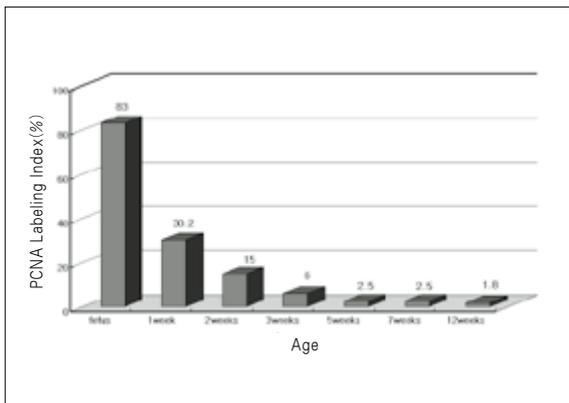


Fig. 9. PCNA expression in the developmental stages of rat's palate. PCNA expression in palate was the highest in fetus and decreased rapidly after 1 week and then diminished after 5 weeks.

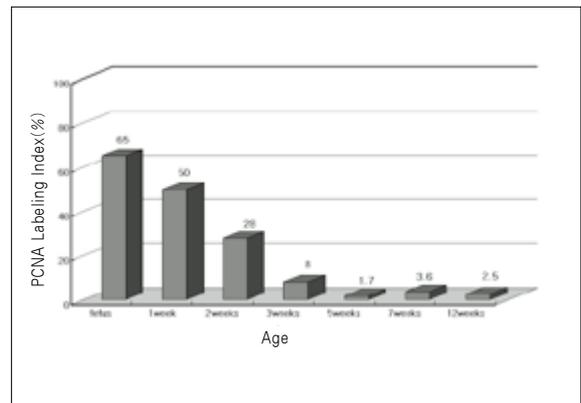


Fig. 10. PCNA expression in the developmental stages of rat's submandibular gland. PCNA expression in submandibular gland was the highest in fetus and decreased gradually after 1 week and diminished after 5 weeks.

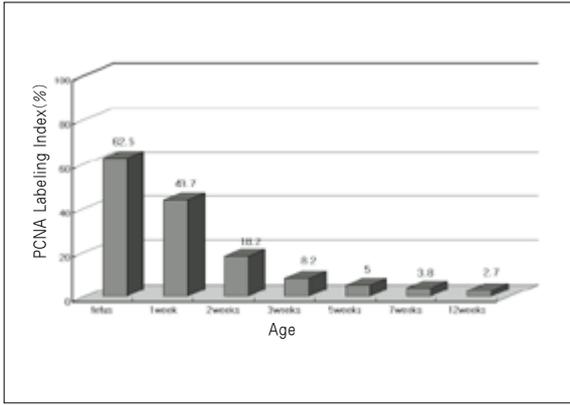


Fig. 11. PCNA expression in the developmental stages of rat's parotid gland. PCNA expression in parotid gland was the highest in fetus and decreased gradually after 1 week and then diminished after 7 weeks.

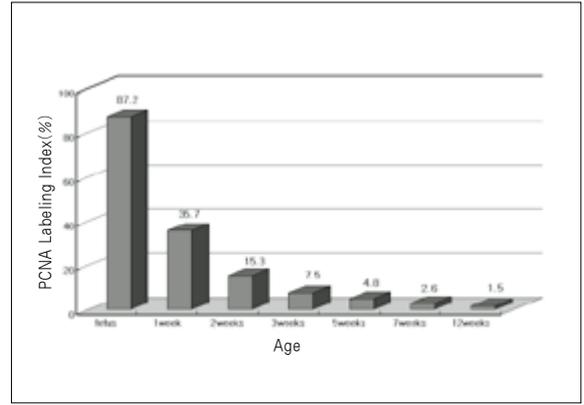


Fig. 12. PCNA expression in the developmental stages of rat's tongue. PCNA expression in tongue was the highest in fetus and decreased gradually after 1 week and diminished after 7 weeks.

4) 악하선 조직의 PCNA 표지지수

악하선 조직의 PCNA 표지지수를 태생기, 성장기 및 성숙기로 나누어 각 시기별로 나누어 비교하면 태생 20일에 PCNA 표지지수가 가장 높게 발현되었다. 생후 1주부터 점차적으로 감소하여 생후 5주부터는 거의 발현이 되지 않았다(Fig. 10).

5) 이하선 조직의 PCNA 표지지수

이하선 조직의 PCNA 표지지수를 태생기, 성장기 및 성숙기로 나누어 각 시기별로 나누어 비교하면 태생 20일에 PCNA 표지지수가 가장 높게 발현되었다. 생후 1주부터 점차적으로 감소되어 생후 7주부터는 거의 발현이 되지 않았다(Fig. 11).

6) 혀 조직의 PCNA 표지지수

혀 조직의 PCNA 표지지수를 태생기, 성장기 및 성숙기로 나누어 각 시기별로 나누어 비교하면 태생 20일에서 PCNA 표지지수가 가장 높게 발현 되었다. 생후 1주부터는 점차적으로 감소되어 생후 7주부터는 거의 발현이 되지 않았다(Fig. 12).

3. Telomerase 활성과 PCNA 표지지수와의 관계

백서의 상부 소화기계의 각 조직간의 telomerase 활성과 PCNA 표지지수와의 관계를 각 시기별로 비교하여 보면 태생 20일에서 telomerase 활성과 PCNA 표지지수 모두가 가장 높게 발현되었고 생후 1주에는 태생기에 비하여 모두 현저히 감소하였다. 생후 2주에는 생후 1주보다 더 감소하였고 생후 12주까지는 일정하게 낮게 발현되었거나 거의 발현이 되지 않았다. 상부 소화기계의 telomerase 활성과 PCNA 표지지수와의 관련성을 상관관계로 분석한 결과 통계학적으로 유의한 관련성이 있었다(Kendall-tau 상관관계수 0.81~1.00, p<0.05).

IV. 총괄 및 고찰

Telomere는 telomeric DNA와 telomere structural protein의 복합체로 이루어져 있는데, 이 telomere structural protein은 telomeric DNA와 결합함으로써 화학적 변형이나 nuclease로부터 telomeric DNA를 보호하는 작용을 하며 DNA 말단과 결합하여 더 이상 연장되는 것을 방지함으로써 telomerase 작용을 조절하는 역할을 한다¹⁸⁻²⁰.

정상 포유류의 체세포에서의 telomerase 활성은 종족 특이적, 조직 특이적 그리고 세포 특이적으로 발생하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁷. Yamaguchi 등¹⁶은 백서의 간, 뇌, 심장, 폐 등 여러 장기를 발달 시기별로 나누어 telomerase 활성을 측정한 결과 발생학적, 그리고 조직 특이적으로 조절받고 있음을 보고 하였다. Prowse 등¹⁵도 telomerase 활성이 발생학적, 그리고 조직 특이적으로 조절 받고 있다고 하였다. 그리고 Bestilny 등¹⁷에 의하면 정상 사람의 체세포에서 telomerase 활성이 없는 것은 아마도 발생학적으로 효소 활동을 억압하는 엄격한 억제 조절기전이 있기 때문이라고 주장하였다.

본 연구에서는 백서의 성장과 나이에 따라 상부 소화기계의 telomerase 활성 변화를 알아보고자 하였다. 백서는 인간과 같은 telomeric DNA의 반복 염기서열 (TTAGGG)n을 가졌고, 인간의 telomerase RNA gene과 백서의 telomerase RNA gene은 65% 정도 동일하며¹⁶, 다른 실험 동물에 비해 태생기부터 성숙기까지의 검체 수집과 검체의 적출 과정이 쉽고, 실험기간 동안 사육 및 관리가 용이하다는 장점이 있다.

백서 상부 소화기계의 혀, 협점막, 구개, 타액선, 그리고 치은 조직은 태생기에서는 telomerase 활성이 높게 발현되었으나 성장기와 성숙기에는 일정하게 낮게 발현을 보이거나 혹은 거의 발현되지 않았다. 태생기 때의 높은 활성이 생후 1주일 이후부터

의미 있게 감소하여 성숙기까지 지속되는 것으로 보아 발생학적으로 조절 받는다고 사료된다. 상부 소화기계의 조직들 간의 telomerase 활성을 비교하여 보면 모두 태생기에서 높은 telomerase 활성이 성장기와 성숙기에서는 감소를 보였지만 각 발달 시기에 따라 조직들 간에도 telomerase 활성은 차이를 보였다. 치은과 타액선 조직은 성장기와 성숙기에는 거의 발현이 없었다. 그러나 혀와 협점막 그리고 구개조직은 지속적인 낮은 발현을 보였다. 그러나 상부 소화기계의 각 조직간의 telomerase 활성을 비교한 결과 통계학적으로 유의한 차이는 없었다($p>0.05$). 상부 소화기계의 telomerase 활성은 조직 특이적으로 조절받고 있다고 생각되지 않는다.

두경부 편평상피세포암에서 telomere를 유지하기 위해서 telomerase의 활성이 매우 중요하다^{21,22}. Mao 등²³과 Mutiraguna 등⁶은 두경부 편평상피세포암에서 80~90%의 telomerase의 활성이 있으나 주위의 정상 조직에는 telomerase 활성이 없었다고 하였다. 그러나 Yasumoto 등²⁴과 Kannan 등²⁵은 정상적인 구강 상피세포에서 telomerase 활성 혹은 hTERT가 발현된다고 보고하였다. 정상 구강 상피세포인 편평 상피세포는 turnover rate가 매우 빠르고 증식이 계속 일어나는 것은 기저세포(basal cells)층에 재생 상피(regenerative epithelium)인 간세포(stem cell)가 존재하기 때문이라고 생각된다.

본 연구에선 구강 조직인 협점막과 구개 조직은 태생기와 생후 1주에서는 높은 telomerase 활성을 보였고 성장기와 성숙기에서는 일정하게 낮은 발현을 보였다. 그러나 치은 조직은 태생기와 생후 1주에서 높은 telomerase 활성을 보인 반면 성장기와 성숙기에서는 거의 발현이 나타나지 않았다. 혀 조직에서는 telomerase 활성이 생후 2주까지 높게 발현 되었으나 생후 3주 이후엔 거의 일정하게 낮은 발현을 보였다. 정상 구강 조직에서의 telomerase 활성은 조직에 따라 약간의 차이가 나타남을 알 수 있었다. 상부 소화기계의 발달 시기에 따른 telomerase 활성은 폐, 신장과 간, 심장 조직 등과 마찬가지로 태생기에서 가장 높았고 성장기와 성숙기에서는 거의 일정하게 낮게 유지하거나 거의 활성이 나타나지 않았다. 그리고 정상 구강 상피 세포에서도 telomerase 활성이 일어난다는 보고^{21,24}가 있어 본 연구에서도 정상 구강 조직에 어느 정도 telomerase 활성 일어 날 것으로 기대했으나 활성은 거의 나타나지 않았다. 물론 동일 종의 같은 성숙기에서도 서로 다른 telomerase 활성이 나타나는 것은 telomerase 반복 염기서열의 길이가 세포 사이 혹은 세포내에서 telomere들 간에도 길이가 다르기 때문에 나타날 수도 있고, 실험 방법이나 실험 과정에 따라 차이가 날 수 있음을 고려 해 볼 수도 있다. 본 연구의 결과와 비교하기 위해 문헌 조사에 이와 유사한 관련 다른 연구가 없어 비교 할 수는 없었다.

인체 여러 부위의 암에서 유용한 진단 도구로 PCR-TRAP을 이용하여 telomerase 활성을 측정하고 있다^{25,26}. 구강암을 포함한 두경부암에서도 80~90%의 telomerase 활성이 나타난다고 한다^{21,23,27}.

Tlomerase의 활성도가 악성 타액선 종양에서 83.3% 정도 존재한다고 한다. 그러나 양성 타액선 종양과 정상적인 타액선에서는 나타나지 않는다고 한다. 그러므로 양성 타액선 종양과 악성

타액선 종양을 구별하는데 특수한 표지자(marker)로 유용할 수 있다는 보고가 있다^{22,27}.

본 연구에서도 이하선과 악하선의 telomerase의 활성은 태생기와 생후 1주에서는 높게 발현되었으나 성장기와 성숙기에서는 발현이 매우 낮게 나타났다. 문헌조사에서 정상 타액선에서의 발달 시기에 따른 telomerase의 활성에 대한 연구가 없어 다른 연구 결과와 비교 할 수 없었다. 그러나 Sumida 등²⁸과 Liao 등²⁷의 연구에서는 정상 타액선에서는 telomerase의 활성은 거의 발현되지 않는다고 하였다. 본 연구에서도 성장기와 성숙기에서 telomerase의 활성이 거의 낮게 발현되어 유사한 결과를 보였다.

백서 상부 소화기계에서의 telomerase 활성이 태생기, 성장기, 성숙기 등의 발달 시기에 따라 변화는 것으로 미루어 세포의 증식능에도 백서의 상부 소화기계의 발달 시기에 따라 변화될 것으로 생각된다.

본 연구에서는 임상적 이용이 쉽고 그리고 후향적 연구가 가능하며, 파라핀 조직에서도 비교적 간단한 방법으로 세포의 증식능을 측정 할 수 있는 PCNA를 이용하여 백서의 상부 소화기계의 발달 시기별 세포의 증식능을 알아보고자 하였다. 즉 세포주기에 따른 PCNA 염색 양상은 G1, G2, M시기에는 매우 약한 염색 성만 보이고 S기에 있는 세포는 다양한 염색 양상을 나타내는 것으로 알려져 있으므로 세포 주기를 벗어나거나 최종 분화를 하고 있는 세포들은 telomerase 활성이 나타나지 않는 점과 상호 관련성이 있을 것으로 생각된다. 또한 개체가 성장하고 나이가 들수록 telomerase 활성이 감소하는 것으로 미루어 세포의 증식능도 성장과 나이가 들수록 감소할 것으로 생각되어 백서의 태생기, 성장기, 성숙기 등 발달 시기에 따른 세포의 증식능과 telomerase 활성과의 상호 관련성도 알아 보고자 시행하였다.

본 연구에서는 광학 현미경에서 100배의 저배율에서 관찰하여 가장 뚜렷하게 염색되는 부위 5군데를 다시 200배의 고배율에서 관찰한 후 핵이 갈색 과립성으로 보이는 세포를 양성으로 판정하였고 1,000개의 세포중 염색이 되는 세포의 개수를 계산하여 백분율을 표시하여 PCNA 표시지수를 산출하였다. 그러나 핵에 국한되어 뚜렷한 갈색의 과립으로 관찰되어 잘 구별이 되는 세포도 있었지만 양성으로 판단되기에 어려운 경우도 있었다. 그래서 염색의 정도가 약한 세포를 양성으로 간주하느냐 혹은 음성으로 간주 하느냐에 따라 양성률에 차이가 있을 수도 있다, 즉 세포주기에 따라 염색의 정도가 다르기 때문에 S기 세포들에 비해 G1과 G2 그리고 M기 세포들은 약하게 염색 될 수 있어 양성으로 판정할 수 있으나, 위양성(false-positive)이 나타날 수 있어 결과에 영향을 미칠 수 있어 양성으로 판정하지 않았다. 혀, 구개, 협점막 그리고 치은등 구강조직에서의 PCNA 발현은 태생기에서 가장 높았다. 그리고 성장기에서는 차츰 감소되거나 혹은 급격히 감소되어 성숙기에서는 거의 발현이 되지 않았다. 타액선 조직에서도 태생기와 출생 1주에서도 높은 발현을 보였으나 성장기에서는 차츰 감소하면서 거의 발현이 되지 않았다. 즉 백서의 상부 소화기계의 PCNA 발현율로 보아 태생기에서는 세포 증식이 높으나, 성장과 성숙기를 지나면서 세포 증식능력이 차츰 감소됨을 알 수 있었다.

PCNA 발현과 telomerase 활성의 상호 관련성에 대한 연구에서 오 등²⁸⁾은 백서 신장의 성장과 나이에 따라 telomerase 활성과 PCNA의 발현에 대해서 상호 관련성이 있다고 하였다.

본 연구에서도 혀, 구개, 협점막 그리고 치은 등 구강 조직의 telomerase 활성과 PCNA의 발현은 태생기에서 가장 높았고 성장과 성숙기 동안에는 점차적으로 감소하거나 거의 발현을 보이지 않아 매우 상호 밀접한 관련성이 있음을 알 수 있었다. 타액선 조직에서도 telomerase 활성과 PCNA의 발현은 태생기에서 가장 높았고 성장과 성숙기 동안에는 급격히 감소하여 거의 발현이 되지 않아 밀접한 상호 관련성이 있음을 알 수 있었다. 그러므로 상부 소화기계의 telomerase 활성과 PCNA의 발현은 성장과 나이에 따라 상호 유의한 관련성이 있음을 알 수 있었다(Kendall-Tau 상관계수 0.81~1.00, p<0.05).

V. 결 론

정상 백서를 상부 소화기계를 태생기(태생 20일), 성장기(생후 1, 2, 3, 5 및 7주) 및 성숙기(생후 12주)로 나누어 상부 소화기계인 협점막, 치은, 구개, 악하선, 이하선 그리고 혀 조직을 발달 과정 동안 telomerase의 활성도 변화와 PCNA의 발현을 변화, 그리고 이의 연관성을 알아보기 위하여 본 연구를 하였다. Telomerase의 측정은 TRAP(telometric repeat amplification protocol) 분석법을 이용한 효소면역측정인 Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA plus™ (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) kit로 측정하여 정량적으로 분석하였다. 세포 증식능의 측정은 증식세포 핵항원인 Clone PC10™ (NeoMark, California, USA)을 이용한 면역화학조직적 염색으로 PCNA 발현율을 관찰하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 백서 상부 소화기계의 혀, 협점막, 구개, 타액선 그리고 치은 조직의 telomerase 활성은 태생기에서 가장 높게 발현되었고 생후 1주에서도 높게 발현되었으나 성장기와 성숙기에는 일정하게 낮게 발현을 보이거나 혹은 거의 발현이 되지 않았다. 그리고 상부 소화기계의 각 조직 간의 조직 특이성은 발견되지 않았다.
2. 백서 상부 소화기계의 혀, 협점막, 구개, 타액선 그리고 치은 조직의 PCNA 발현율은 태생기에서 가장 높게 발현되었으나 성장기와 성숙기에는 차츰 감소되거나 혹은 급격히 감소되어 일정하게 낮은 발현을 보이거나 혹은 거의 발현이 되지 않아 태생기에서는 세포 증식이 높았으나, 성장기와 성숙기에서는 세포 증식 능력이 차츰 감소되었다.
3. 백서 상부 소화기계의 혀, 협점막, 구개, 타액선 그리고 치은 조직의 telomerase의 활성과 PCNA 발현은 태생기에서 가장 높았고 성장기와 성숙기에서는 점차적으로 감소하거나 거의 발현을 보이지 않아 상호 밀접한 관련성이 있었다.

이상의 연구 결과로 백서의 상부 소화기계의 telomerase 활성에서 조직 특이성은 발견되지 않으나 태생기의 높은 telomerase 활성이 성장과 나이에 따라 감소되므로 발생학적으로 조절받고, 세포 증식능과도 밀접한 상호 관련성이 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Greider CW, Blackburn EH: The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51:887-98, 1987.
2. Morin GB: The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59:521-9, 1989.
3. Wright WE, Piatyszek MA, Ranley WE, Byrd W, Shay JW: Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18:173-9, 1996.
4. Harley CB, Villeponteau B: Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 5: 249-55, 1995.
5. Li M, Adel K, El-Naggar, Fan YH, Lee JS, et al: Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* 56:5600-4, 1996.
6. Mutiranguna A, Supiyaphun P, Triekapan S, Sriuranpong V, Sakuntabhai A, et al: Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 56:3530-3, 1996.
7. Kim NW, Wu F: Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol(TRAP). *Nucleic Acids Res* 25:2595-7, 1997.
8. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, et al: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Sci* 266:2011-5, 1994.
9. Cerni C: Telomeres, telomerases, and myc. An update. *Mutation Res* 462:31-47, 2000.
10. Toschi L, Bravo R: Changes in cyclin/PCNA distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 107:1623-8, 1988.
11. Meyer JS, Coplin MD: Thymidine labeling index, flow cytometric s-phase measurement, and DNA index in human tumors: Comparison and correlations. *Am J Clin Pathol* 89:586-95, 1988.
12. Landberg G, Tan EM, Roos G: Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67 antigen. *Exp Cell Res* 187:111-8, 1990.
13. Cohen MB, Waldman FM, Carrol PR, Kerschmann R, Chew K, et al: Comparison of five histopathologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol* 24:411-86, 1993.
14. Yamaguchi Y, Nozawa K, Savcysky E, Hayakawa N, Nimura Y, et al: Change in telomerase of rat organs during growth and aging. *Exp Cell Res* 242:120-7, 1998.
15. Prowse KR, Greider CW: Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4818-22, 1995.
16. Blasco MA, Funk W, Villeponteau B, Greider CW: Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Sci* 269: 1267-70, 1995.
17. Brestilny L, Brown CB, Miura Y, Robertson LD, Riabowol KT: Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines. *Cancer Res* 56: 3796-802, 1996.
18. Blackburn EH: Structure and function of telomeres. *Nature* 350:569-573, 1991.
19. Greider CW: Telomere, telomerase and senescence. *Bioessays* 12:363-9, 1990.
20. Zakian VA: Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet* 23:579-604, 1989.
21. Kannan S, Tahara H, Yokozaki H, Mathew B, Nalinakumari KR, et al: Telomerase activity in premalignant and lesions of human oral mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6:413-20, 1997.
22. Sumida T, Sogawa K, Hamakawa H, Sugita A, Tanioka H, et al: Detection of telomerase activity in oral lesions. *J Oral pathol Med* 27:111-5, 1998.
23. Mao L, El-Naggar AK, Fan YH, Lee JS, Lippman SM, et al: Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* 56:5600-4, 1996.

24. Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, Tahara H, Ohji H, et al: Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 13:433-9, 1996.
25. Takubo K, Nakamura N, Mafune K, Tanaka Y, Miyashita et al: Telomerase activity in esophageal carcinoma. *J Surg Onco* 66:88-92, 1997.
26. Landberg G, Nielsen NH, Nilsson P, Emdin SO, Cajandr J, et al: Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 57:549-54, 1997.
27. Liao J, Mitsuyasu T, Yamana K, Ohishi M: Telomerase activity in oral and maxillofacial tumors. *Oral Onco* 36:347-52, 2000.
28. 오금수, 이상돈: 백서 신장의 발달 시기별 Telomerase 활성 및 Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA) 발현에 관한 연구. *대한비뇨기과학회지* 41:1041-50, 2000.

사진부도 ①

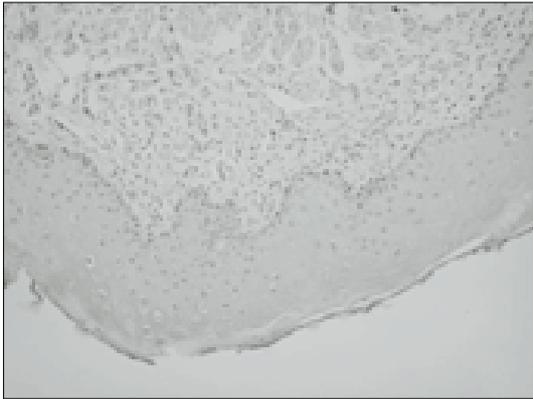


Fig. 13. PCNA immunoreactivity at gestational 20 days in rat's buccal mucosa($\times 200$).

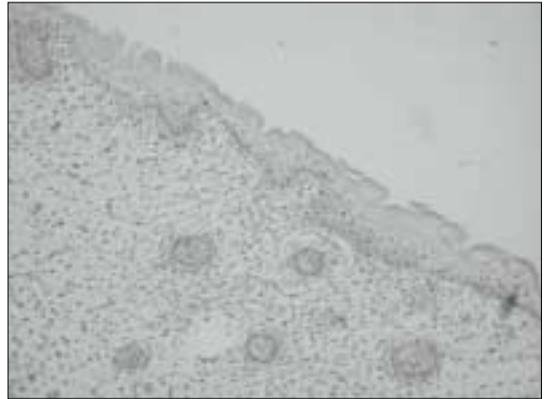


Fig. 14. PCNA immunoreactivity at 1 week after birth days in rat's buccal mucosa($\times 200$).

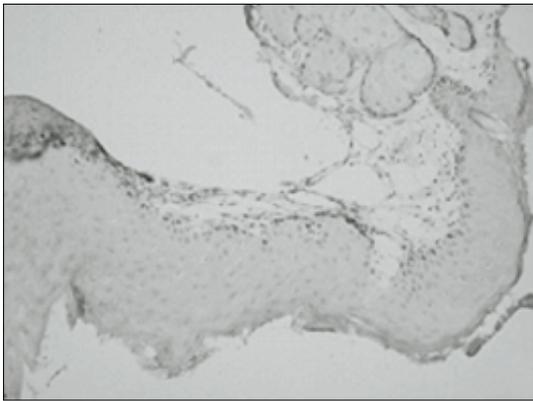


Fig. 15. PCNA immunoreactivity at 3 weeks after birth in rat's buccal mucosa($\times 200$).

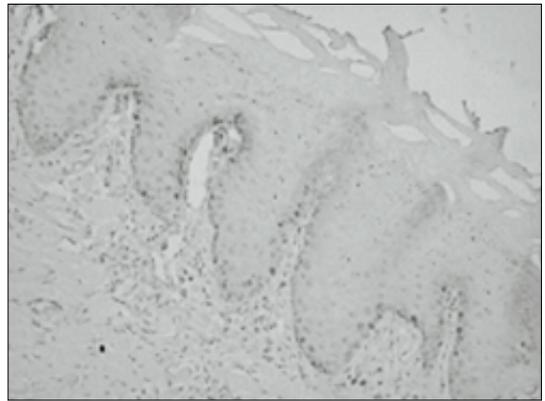


Fig. 16. PCNA immunoreactivity at 12 weeks after birth in rat's buccal mucosa($\times 200$).

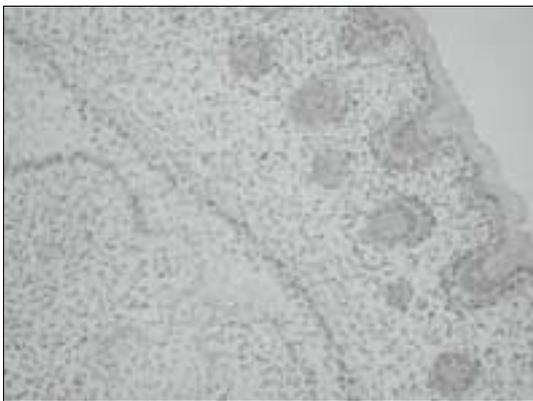


Fig. 17. PCNA immunoreactivity at gestational 20 days in rat's gingiva($\times 200$).

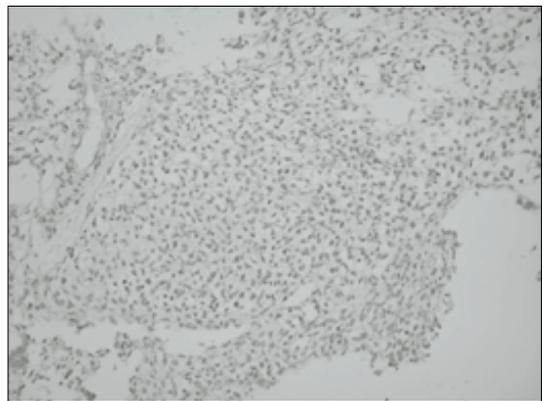


Fig. 18. PCNA immunoreactivity at 1 weeks after birth in rat's gingiva ($\times 200$).

사진부도 ②

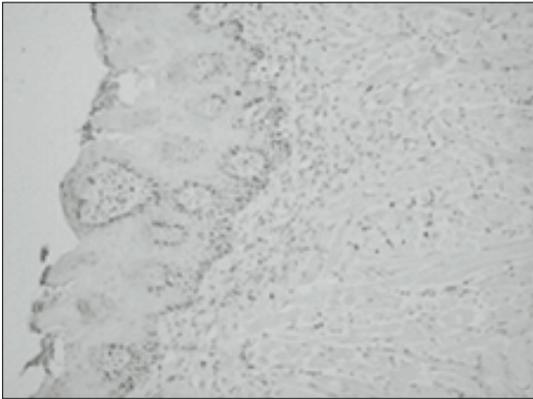


Fig. 19. PCNA immunoreactivity at 7 weeks after birth in rat's gingiva (×200).

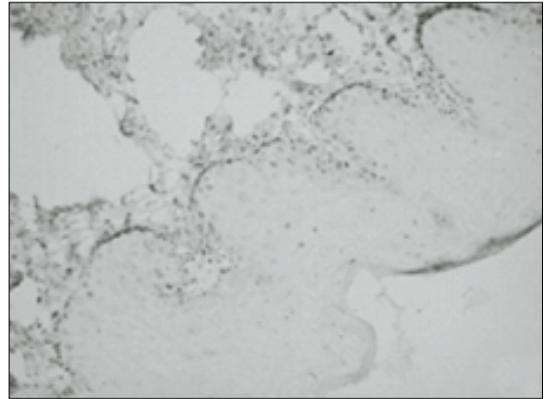


Fig. 20. PCNA immunoreactivity at 12 weeks after birth in rat's gingiva (×200).

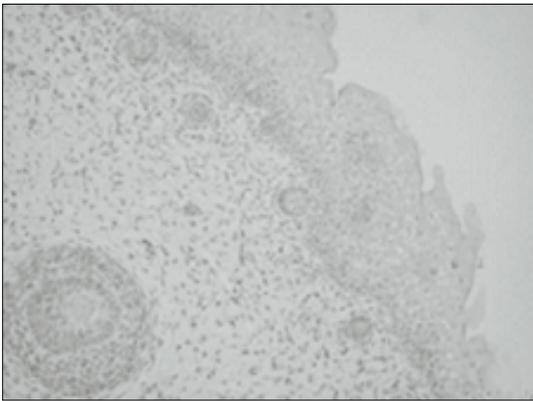


Fig. 21. PCNA immunoreactivity at gestational 20 days in rat's palate(×200).

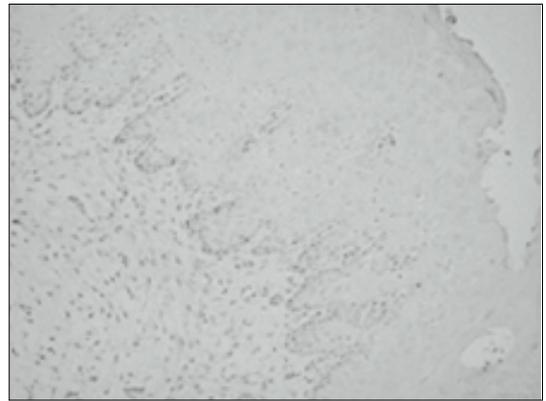


Fig. 22. PCNA immunoreactivity at 1 weeks after birth in rat's palate(×200).

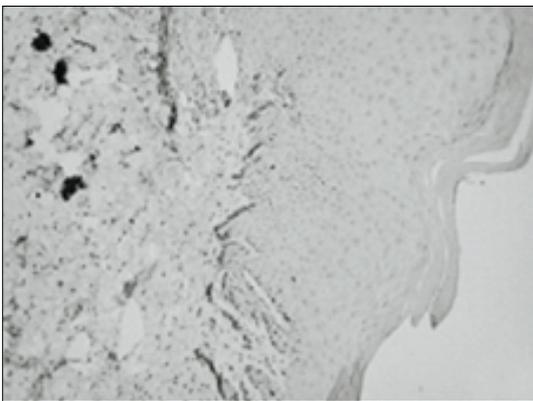


Fig. 23. PCNA immunoreactivity at 12 weeks after birth in rat's palate(×200).

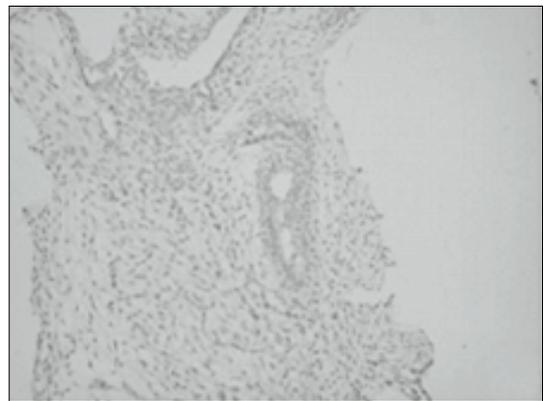


Fig. 24. PCNA immunoreactivity at gestational 20 days in rat's submandibular gland(×200).

사진부도 ③

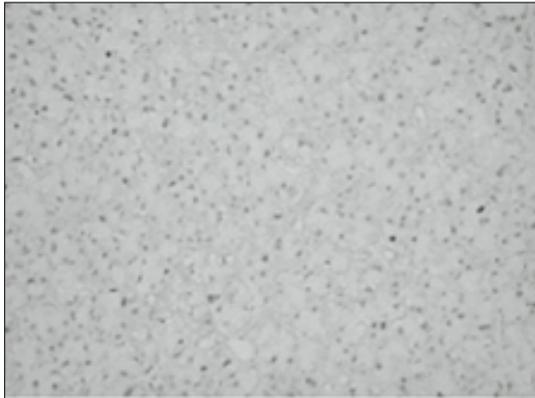


Fig. 25. PCNA immunoreactivity at 1 weeks after birth in rat's submandibular gland($\times 200$).

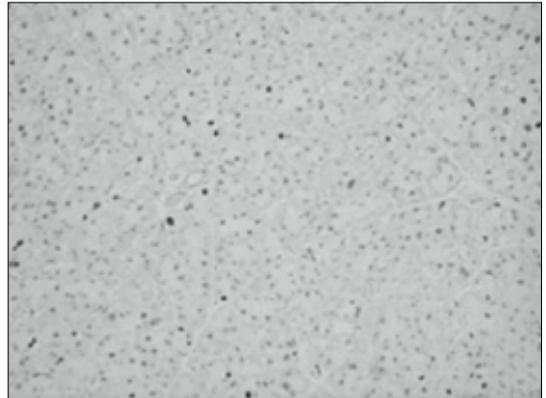


Fig. 26. PCNA immunoreactivity at 5 weeks after birth in rat's submandibular gland($\times 200$).

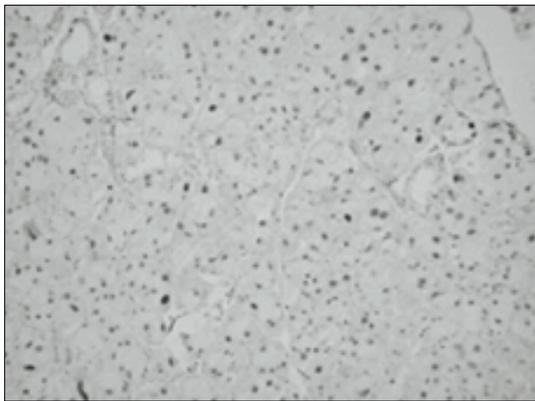


Fig. 27. PCNA immunoreactivity at 12 weeks after birth in rat's submandibular gland ($\times 200$).

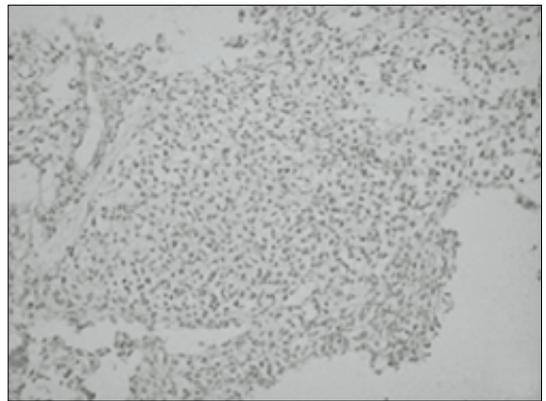


Fig. 28. PCNA immunoreactivity at gestational 20 days in rat's parotid gland($\times 200$).

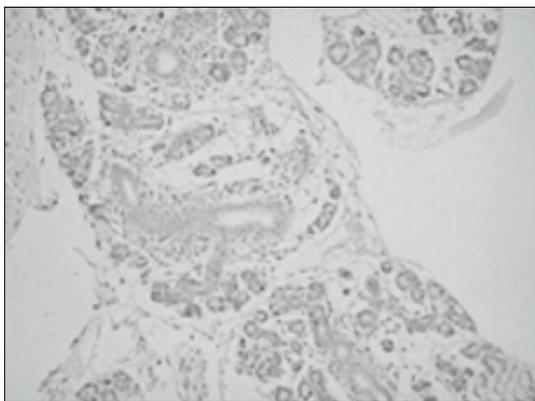


Fig. 29. PCNA immunoreactivity at 1 weeks after birth in rat's parotid gland($\times 200$).

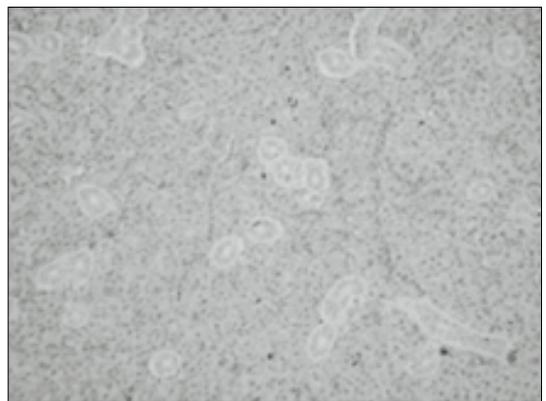


Fig. 30. PCNA immunoreactivity at 7 weeks after birth in rat's parotid gland($\times 200$).

사진부도 ④

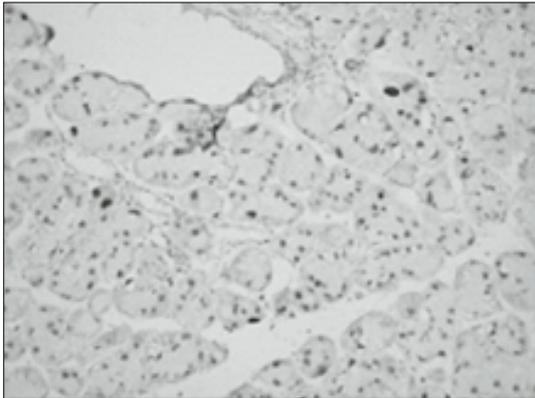


Fig. 31. PCNA immunoreactivity at 12 weeks after birth in rat's parotid gland($\times 200$).

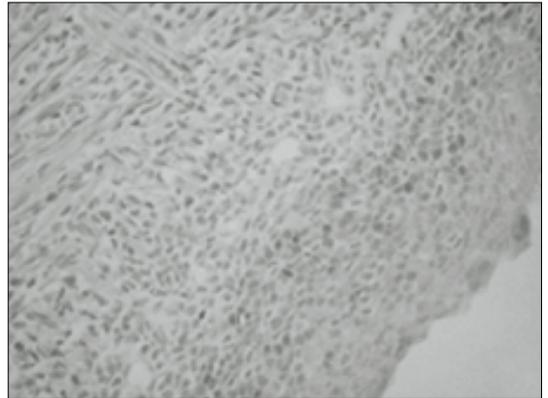


Fig. 32. PCNA immunoreactivity at gestational 20 days in rat's tongue($\times 400$).

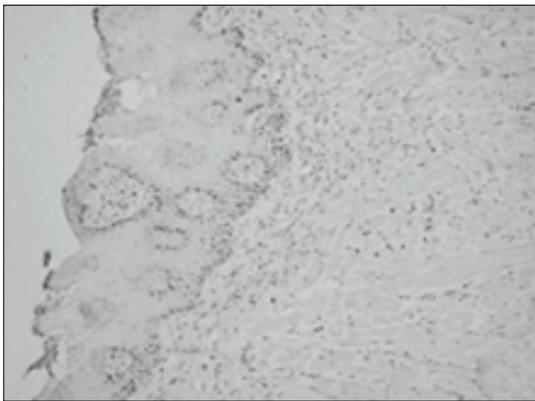


Fig. 33. PCNA immunoreactivity at 1 weeks after birth in rat's tongue($\times 200$).

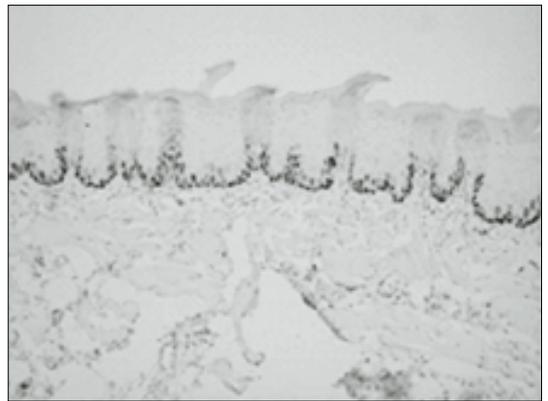


Fig. 34. PCNA immunoreactivity at 7 weeks after birth in rat's tongue($\times 200$).

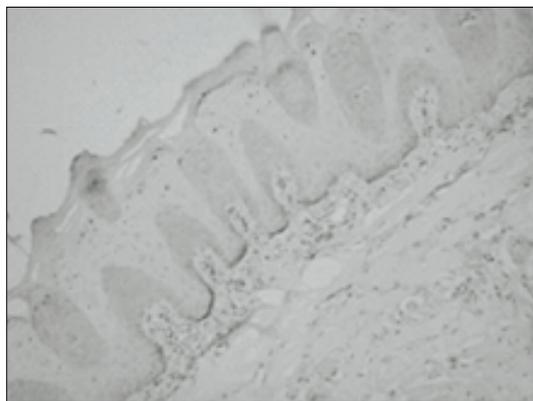


Fig. 35. PCNA immunoreactivity at 12 weeks after birth in rat's tongue($\times 200$).