

## 7, 12-dimethylbenzanthracene으로 유발된 생쥐표피의 증식성 변화와 Langerhans세포수의 변동

연세대학교 의과대학 병리학교실

한창순 · 박영년 · 이광길 · 최인준

### The Epidermal Proliferation and the Number of Langerhans Cells in 7, 12-dimethylbenzanthracene Induced Epidermal Changes

Chang Soon Han, M.D., Young Nyun Park, M.D., Kwang Gil Lee, M.D. and In Joon Choi, M.D.

*Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine*

Chemically induced epidermal carcinogenesis is usually divided into two stages, the initiation and promotion. The initiation involves conversion of some epidermal cells into latent neoplastic cells and the promotion is proliferation of the transformed cells. As immunosurveillance is thought to be a host defense against tumors, Langerhans cells, being essential in initiation of local cutaneous immunologic reaction, is suggested to be important in the carcinogenesis of the epidermis. This study is attempted to investigate the epidermal proliferative changes in mice induced by application of 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA) on the skin initiated with 7, 12-dimethylbenzanthracene(DMBA) and its relationship with Langerhans cell.

Ninty five male inbred BALB/c mice weighing 20~25 g were divided into five groups; the 33 week-group, the 21 week-group, the 12 week-group and the 4 week-group according to the duration of carcinogen application, and the control group. The carcinogen was applied with a brush on the dorsal skin of mice after depilation. Ten days after application of 800 nmole DMBA in 0.4 cc acetone, 20 nmole TPA in 0.4 cc acetone was applied twice per week and the control group was applied with the same amount of acetone for 4 weeks. Animals were sacrificed 3 days after the last application of TPA. One hour before sacrifice, bromodeoxyuridine(BrdU) (1 mg/g) was injected via the tail artery for BrdU stain of S phase cells. A strip of dorsal skin was used for hematoxylineosin stain, immunohistochemical stain for BrdU and Ia antigen of Langerhans cell, and flow cytometry. The results are as follows: 1. Cellular proliferation, hyperkeratosis and dysplasia of the epidermis were increased in relation to duration of carcinogen application. Papillomas were developed 12 weeks after application of the carcinogen. 2. BrdU labelling and proliferative indices of the 20 weeks' application group were significantly higher than those of the 12 weeks' application group. The number of Langerhans cell was decreased markedly after 4 week' application of the carcinogen. 3. All epidermal lesions including a case of squamous cell carcinoma were diploidy in flow cytometry. It is thought that disturbance of immunosurveillance, caused by depletion of Langerhans cell, may permit proliferation of epidermal cells. Although abnormal quantitative change of nuclear DNA has not occurred even when the epidermal proliferative activity and dysplastic change were increased markedly, it is thought that the occurrence of structural change of chromosome is remained to be clarified. (**Korean J Pathol 1993; 27: 590~604**)

**Key Words:** Carcinogenesis, Epidermal proliferation, Langerhans cell, Flow cytometry

접 수: 1993년 1월 9일, 게재승인: 1993년 6월 23일

주 소: 서울시 서대문구 신촌동 134번지, 우편번호 120-752

연세대학교 의과대학 병리학교실, 이광길

## 서 론

발암성 화학물질은 우리 주위에 흔히 있고 이와 관련된 암이 인체에서 다수 발견되어, 발암의 과정이나 기전에 관해 동물실험을 통한 연구가 많이 시도되어 왔다<sup>1-4</sup>. 화학발암제에 의한 피부표피의 발암현상은 다소 복합적이거나 주로 개시(initiation)와 촉진(promotion)의 2단계를 거친다<sup>5-7</sup>. 종양개시제는 발암성 물질로서 DNA를 손상 혹은 변형시켜 유전자의 변화를 일으키며, 알킬화성 약물(alkylating agent), 다환상 방향성 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbon), nitrosamine 등이 이에 속한다. 그중 방향성 탄화수소의 일종인 7, 12-dimethylbenzanthracene(DMBA)은 mixed function oxidase 효소인 aryl hydrocarbon hydroxylase에 의해 대사되어 친전자성 반응물질을 형성하여 DNA나 RNA 또는 methionine이나 cysteine의 S<sup>-</sup>와 같은 세포의 친핵성 물질과 반응하여 손상을 유발한다. 종양촉진제는 비발암성 물질로서 개시제에 의해 변형된 세포의 선택적 증식을 일으키며, 그 밖에 세포막 및 인지질의 대사의 변형, 유전자 표현의 촉진 또는 억제, 피부 분화의 변형 등을 유발한다. 촉진제로는 phorbol ester, benzoyl peroxide, anthralin 등이 있으며, phorbol ester의 일종인 12-O-tetradecanoly-phorbol-13-acetate(TPA)가 잘 알려져 있다. TPA는 표피분화의 조절작용을 하는 phosphatidylinositol-protein kinase C second messenger system의 protein kinase C에 선택적으로 결합하며, 개시제를 전 처치한 후 도포하면 표피분화는 일어나지 않으며, 개시된 세포의 증식이 빨라진다<sup>8</sup>.

피부의 Langerhans세포는 접촉성 알레르기 항원을 선택적으로 포착하여 항원 표현에 관여하며 세포매개성 면역에 중요한 역할을 하는 세포로 면역방어기능에 필수 불가결한 세포이다. 잡재성 종양세포의 형성과 암으로의 진행은 인체의 다른 부위에서와 마찬가지로 면역학적 감시하에 있으며 피부면역방어기능의 중요한 요소인 Langerhans세포와 관계가 있을 것으로 생각할 수 있다<sup>9-11</sup>. 최근의 연구보고에 의하면 Muller등<sup>12</sup>은 생쥐 피부에 발암성 물질을 도포한 실험에서 종양이 형성됨에 따라 Langerhans세포가 소실되며 이중 일부에서는 Langerhans세포가 다시 출현함에 따라 종양이 퇴화함을 보고하였고, Halliday 및 Muller<sup>13</sup>은 생쥐 피부에서 종양촉진제가 표피의 Langerhans세포를 감소시킨다고 보고하였다. 또한 인체 피부에서도 모반과 여러 단계의 악성흑색종에서 S-100에 대한 면역화학염색을 시행하여 본 결과 심한 침습성 악성흑색종에서는 Langerhans세포가 소실된 반면 모반과 표재성 및 초기의 침습성 악성 흑색종에서는 비교적 별 변화가 없었다는 보고도 있다<sup>14</sup>. 이들

보고들로 보아 Langerhans세포의 항종양 면역반응과 잡재성 종양세포의 증식력 및 종양형성 사이에 밀접한 관련이 있을 것으로 추정된다.

따라서 본 연구에서는 발암제인 DMBA를 전처치한 후 촉진제인 TPA를 단기 및 장기 도포하여 표피세포의 형태학적 변화에 다른 표피세포의 세포주기분포와 DNA ploidy를 알아보며, 이러한 세포의 증식력과 표피내 Langerhans세포의 수적 변화를 알아봄으로서 실험적인 종양형성과정의 조직학적 변화, 세포증식력 및 Langerhans세포의 변동과의 관계를 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 실험동물

실험동물은 체중 20~25 g의 근친교배계통 BALB/c 수컷 생쥐(한국 과학기술원 제공) 94마리를 사용하였으며, 2주간 동일조건에서 시판혼합사료로 예비사육한 후에 약물도포 유무 및 기간에 따라 다음과 같은 실험군으로 나누어 실험하였다.

- 실험군: 제 1 군: 33주간 약물도포군 .....20마리  
 제 2 군: 21주간 약물도포군 .....20마리  
 제 3 군: 12주간 약물도포군 .....22마리  
 제 4 군: 4주간 약물도포군 .....23마리  
 제 5 군: 대조군 .....10마리

### 2) 방 법

(1) 약물도포: 생쥐 배부의 피부를 2.5×2 cm 크기로 제모제(니트, 일동제약)를 이용하여 털을 제거한 후 DMBA(Sigma, St Louis, MO, USA) 800 nmole을 아세톤 0.4 cc에 용해하여 이 부위에 붓으로 1회 도포하였다. 10일 후 TPA(Sigma, St Louis, MO, USA) 20 nmole을 아세톤 0.4 cc에 용해하여 동일부위에 회생시기까지 매주 2회씩 도포하였다. 대조군은 아세톤을 실험군과 동일한 방법으로 4주간 도포하였다.

(2) 실험동물 관찰 및 도살: 매주 각 동물에서 피부병변의 발생 여부를 관찰하였으며, 각 군의 계획된 약물도포 기간이 끝난 후 S기 세포를 보기 위한 bromodeoxyuridine(BrdU)염색을 위해 회생 1시간 전에 동물 체중 g당 1 mg의 BrdU(Sigma, St Louis, MO, USA)를 생리식염수 0.1 cc에 희석하여 ether로 마취된 실험동물의 꼬리동맥에 주입하였다.

(3) 육안 및 조직학적 검사: 회생시킨 동물의 약물도포부위의 피부병변의 모양, 크기 및 갯수에 대하여 조사하였다. 약물도포 부위의 피부를 절제하여 통상의 조직 표본제작에 따라 포르말린에 고정, 수세 및 파라핀 포매과정을 거쳐 2μm의 연속절편을 만들어 he-

matoxylin-eosin 염색을 시행한 후 광학현미경하에서 표피증식정도, 이형성증, 과각화증과 양성 및 악성 종양의 발생에 대해서 관찰하였다.

**(4) 표피세포의 BrdU염색 및 BrdU표지지수 산정:** 파라핀에 포매된 조직절편을 xylene으로 탈파라핀하고 알콜로 탈수한 후 1N HCl로 37°C에서 20분간 가수분해시키고 trypsin에 20분간, 그리고 1% periodic acid와 15분간 반응시킨 다음 증류수로 씻었다. 내인성 과산화효소의 작용을 억제시키기 위해 3% 과산화수소용액에 10분간 반응시킨 후 정상 말혈청에 30분간 방치하였다. 그후 실온에서 50배로 희석된 항 BrdU항체(Dako, Santa Babara, CA, USA)와 14시간, biotinylated anti-mouse IgG과 30분간, avidin-biotin peroxidase complex(ABC)에 30분간 차례로 반응시켰다. Tris완충액으로 세척한 다음 peroxidase chromogen kit(aminoethylcarbazole)로 발색시키고 헤마톡실린으로 대조염색하였다. 미세계측자를 부착한 광학현미경하에서 모낭사이 표피의 과립층하부에 존재하는 표피구성세포 500개를 세어 표피구성세포수에 대한 BrdU양성세포의 백분율을 구하여 BrdU표지지수로 하였다.

**(5) 표피 Langerhans세포 염색 및 Langerhans 세포지수 산정:** 절제된 피부조직을 영하 20°C에서 4µm의 두께로 동결박절하여 슬라이드에 부착한 후 실온에서 하룻밤 건조시켰다. 다음날 4°C 아세톤에 15분간 고정 후 건조시킨 다음 Tris 완충액으로 세척하였다. 내인성 과산화효소의 작용을 억제시키기 위해 3% 과산화수소용액에 10분간 반응시킨후 정상 말혈청에 30분간 방치하였다. 그후 실온에서 50배로 희석된 Ia특이 단세포군 항체(Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA)와 1시간, biotinylated anti-mouse IgG과 30분간, avidin-biotin peroxidase complex(ABC)에서 30분간 차례로 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척한 다음 peroxidase chromogen kit (aminoethylcarbazole)로 발색시키고 헤마톡실린으로 대조염색하였다. 미세계측자를 부착한 광학현미경하에서 모낭사이 표피의 과립층하부의 표피구성세포 500개를 세어 표피구성세포에 대한 Ia양성세포의 백분율을 구하여 Langerhans세포지수로 하였다.

**(6) 유세포측정:** 병변이 발생한 부위의 신선피부조직을 취하여 10 ml의 RPMI 배지가 들어있는 petridish 위에서 개개의 세포가 유리되도록 No. 20 blade로 계속 긁어서 세포부유액을 만들었다. 세포부유액을 53µm nylon mesh에 여과 후 1,000 rpm으로 원심분리하였다. 여과액의 일부를 취하여 hemocytometer를 이용하여 유리세포수가 1~3×10<sup>6</sup>/ml가 되도록 조정하였다. 1,200 rpm으로 5분간 원심분리후 상층액은 버리고, propidium iodide(PI)염색완충액(modified Krishan buffer; 0.1% sodium citrate+0.02 mg/ml DNase)를 적정량 첨가하여 2초

간 vortex하였다. 얼음 위에서 30분 내지 1시간 동안 incubation시켰으며 이때 알루미늄박지로 시험관을 싸서 빛에 노출되지 않도록 하였다. 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 PI완충액을 바꿔준 후 10초간 vortex시키고, 27 gauge침을 끼운 주사기로 채취하여 37µm의 nylon mesh를 통과 시킨다음 FACScan(Becton Dickinson)을 작동시켰다. DNA Histogram의 분석을 통해 표피 또는 종양세포들의 세포주기분포, DNA ploidy, 증식지수 및 S기 분획을 구하였다.

**(7) 통계적 유의성 검정:** 실험군 측정치의 통계적 유의성을 검정하기 위하여 1요인 분산분석, X<sup>2</sup> 검정과 상관분석(SPSS 프로그램)을 이용하였다.

## 결 과

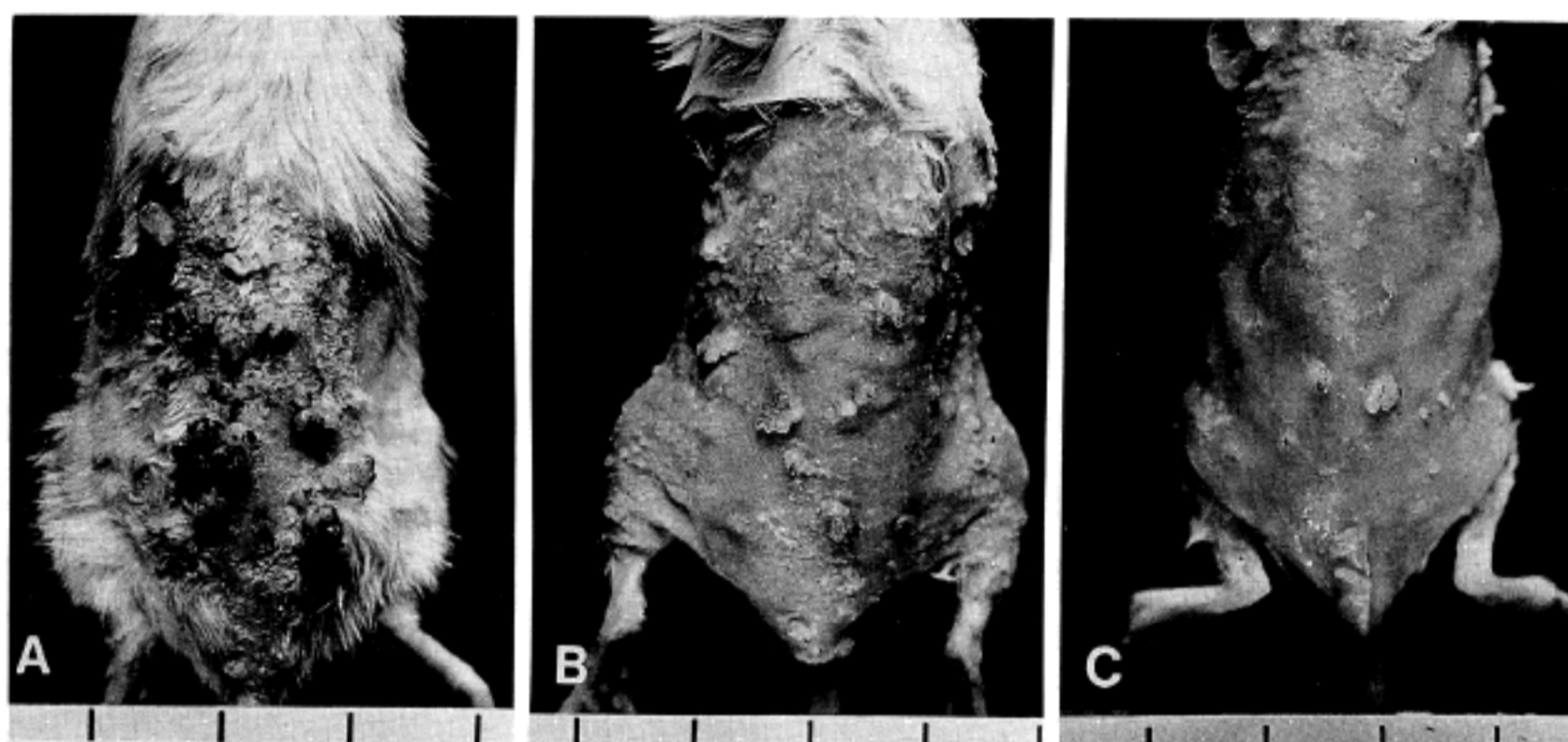
### 1) 피부병변의 육안소견

실험동물에 DMBA를 1회 도포하고 10일 후부터 주 2회 TPA도포를 시행한 결과, 2주 경부터 표피에 가피가 덮힌 장경 1~3mm의 용기되지 않은 병변들이 생성되었으며, TPA도포 3.5주 경부터 우체형 표면을 가진 장경 2~3mm의 유두종이 발생되었다. TPA를 계속 도포함에 따라 유두종의 수 및 크기는 증가되었다. 제 1군에서는 약물도포 28주경부터 1에에서 우측 둔부에 발생된 1개의 결절이 크기가 커지고 고정성이 되며 상부에 궤양이 발생되었다. 실험기간중 동물이 사망하거나 ether 마취중 사망한 동물 수를 제외하면 제 1군 16마리, 제 3군 22마리, 제 4군 22마리, 대조군 9마리에서 최종결과를 얻을 수 있었다.

33주간 약물을 도포한 제 1군에서 16마리중 12마리(75%)에서 유두종이 발생되었으며, 그중 1에에서는 유두종 외에 장경 1cm의 궤양을 동반한 고정성 종괴가 발생되었다. 21주간 약물을 도포한 제 2군에서는 16마리중 13마리(81%)에서, 12주간 약물을 도포한 제 3군에서는 22마리중 8마리(36%)에서 유두종이 발생되었다(Fig. 1). 한편 4주간 약물을 도포한 제 4군에서는 22마리중 유두종이 발생된 예는 없었다.

각 군에서 발생된 유두종 수의 평균은 제 1군은 3.3개, 2군은 2.9개, 3군은 0.9개로 약물도포기간이 길어질수록 유두종의 발생수가 증가되었는데, 특히 12주간 약물을 도포한 제 3군에 비해 9주간 약물을 더 도포한 제 2군에서 유의있는 증가가 관찰되었으며(p < 0.05), 제 2군에 비하여 12주간 약물을 더 도포한 제 1군에서 유두종 수의 유의있는 증가는 없었다(Table 1).

각각의 실험동물에 발생된 피부병변들의 크기는 서로 비슷하였으나 그 중 가장 큰 크기의 것을 살펴보면 table 2와 같다. 제 3군에서 발생된 피부의 유두종은 모두 장경 2mm 이내의 작은 크기였으며, 제 2군에서는 장경 2mm 이내의 작은 유두종이 발생된 경우



**Fig. 1.** Gross finding of skin lesions. The number and size of papilloma were increased in relation to the duration of TPA application after initiation with DMBA. Papillomas in the group of 33 weeks'(A), 21 weeks'(B), and 12 weeks'(C) application of carcinogen.

**Table 1.** Number of skin lesions

Group	No. of animals	No. of skin lesions									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1*	16	4	—	2	5	1	—	2	—	1	1
2 <sup>†</sup>	16	3	4	1	2	2	1	—	3	—	—
3 <sup>‡</sup>	22	14	4	2	1	—	—	—	—	1	—
4	22	22	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	9	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—

\*p<0.05, as compared with group 3, 4 and 5

<sup>†</sup>p<0.05, as compared with group 3, 4 and 5

<sup>‡</sup>p<0.05, as compared with group 4 and 5

**Table 2.** Size of skin lesions

Group	No. of animals	Size of skin lesions			
		1~2 mm	3~5 mm	6~9 mm	over 10 mm
1*	16	1	6	4	1
2 <sup>†</sup>	16	6	3	4	—
3	22	8	—	—	—

\*p<0.05, as compared with group 3

<sup>†</sup>p<0.05, as compared with group 3

가 6예(46%)로 가장 많았으며, 장경 3~5 mm 및 장경 6~9 mm에 달하는 것도 각각 3예와 4예에서 발생되었다. 제 1 군에서는 장경 3~5 mm의 유두종이 발생한 경우가 6예(50%)로 과반수였으며, 1예에서는 궤양을 동반한 장경 1 cm의 피부종괴가 발생되었다. 피부유두종의 크기도 약물도포기간에 비례하여 증가하였는데 제 1 군 및 제 2 군이 각각 제 3 군에 비하여 유의적인 증가를 보였으며( $p < 0.05$ ), 제 1 군과 제 2 군 사이에는 통계적 의의가 있는 차이는 없었다( $p > 0.05$ ).

2) 조직학적 소견

(1) 표피세포 증식: 표피의 증식정도는 표피층의 각

Table 3. Degree of cellular proliferation

Group	No. of animals	Degree of cellular proliferation				
		0	1+	2+	3+	4+
1	16	-	-	4	-	12
2	16	-	-	3	-	13
3	22	-	3	5	6	8
4	22	-	8	14	-	-
5	9	9	-	-	-	-

0 : 1~3 cell thickness of epidermis

1+ : 4~5 cell thickness of epidermis

2+ : 6~11 cell thickness of epidermis

3+ : over 12 cell thickness of epidermis

4+ : development of papilloma

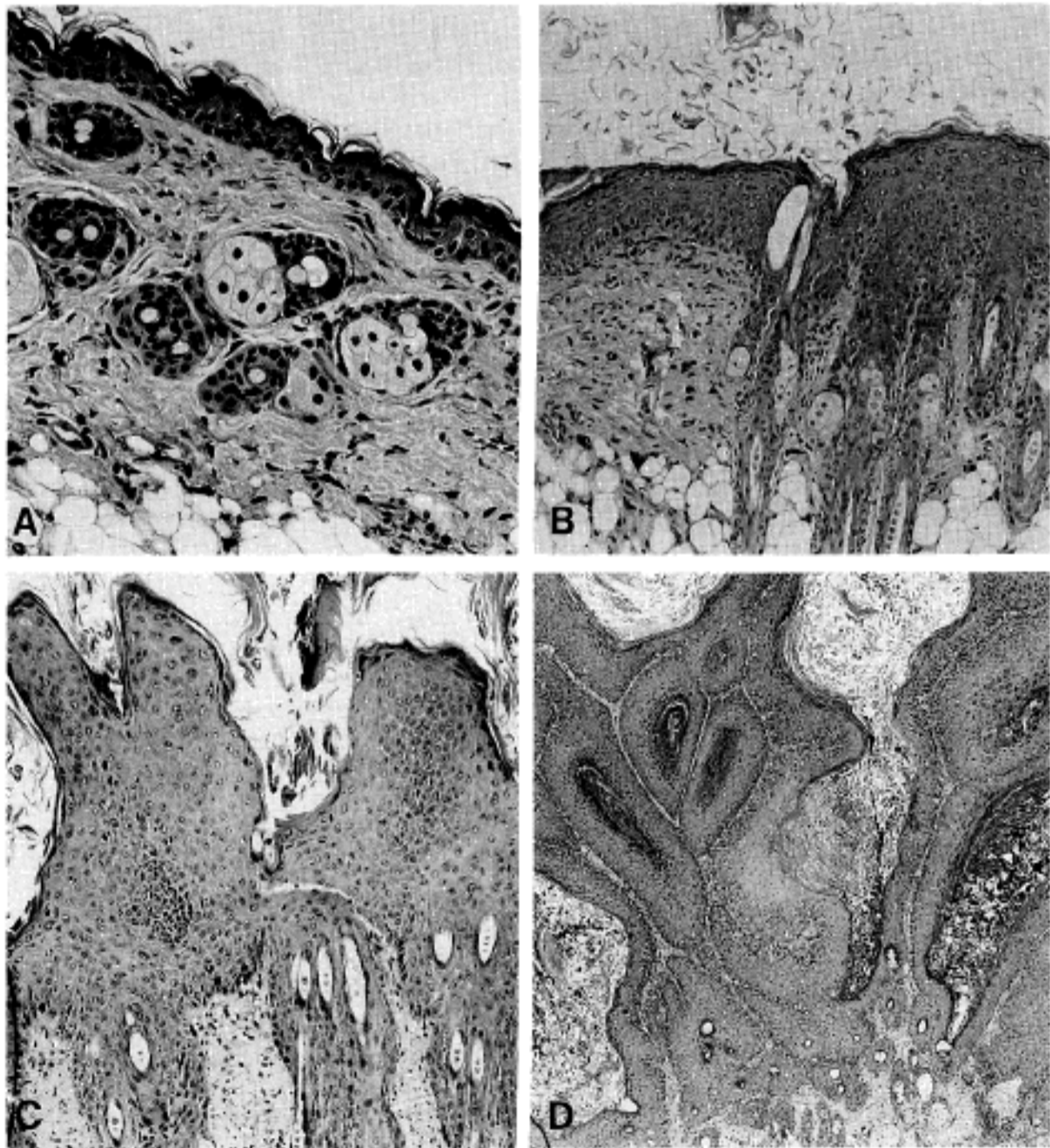


Fig. 2. Histologic finding of cellular proliferation. A: The control group showed 1~3 cell thickness. B: The epidermis was thickened up to 6~11 cell thickness in the group of 4 weeks' carcinogen application. C: The group of 12 weeks' carcinogen application showed over 12 cell thickness of epidermis without formation of papilloma. D: The papilloma occurred after 12 weeks' carcinogen application.

질세포층 수에 따라 1~3층을 0, 4~5층을 1+, 6~11층을 2+, 12층 이상을 3+, 유두종이 형성된 경우를 4+, 편평상피세포암종이 발생한 경우를 5+로 정하였으며 그 결과는 다음과 같다(Table 3).

정상대조군인 제 5 군은 0~3층 정도의 표피세포층 수를 보였으며, 4주간 약물도포한 제 4 군에서는 기저세포의 증식으로 인해 표피가 4~11층으로 두꺼워졌다. 12주간 약물을 도포한 제 3 군에서 표피의 층수가 12층 이상으로 증가되었으며, 유두종이 발생되었다. 21주간 약물을 도포한 제 2 군에서 세포의 증식은 더욱 왕성해져서 유두종의 발생이 증가되었으며, 33주간 약물을 도포한 제 1 군에서는 유두종의 발생 외에 편평상피세포암종이 1예 발생되었다(Fig. 2). 표피세포의 층수 증가, 유두종 및 암종의 발생은 약물도포기간에 따라 유의있는 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). 유두종은 처음 발생시에는 비교적 단순한 모양이었으나, 약물도포기간이 증가됨에 따라 기저세포층이 증식되며, 2차, 3차 분지를 내어 좀더 복잡한 형상을 취하였다. 편평상피세포암종은 상부에 궤양이 있었으며 근육층까지 침습하였다. 암종세포들에서 세포분열이 자주 관찰되었으며 세포질에서는 각화물질의 생성이 관찰되었고 종괴의 내부에 허혈성 괴사가 동반되어 있었다.

**(2) 과다각화증:** 각질층이 정상표피 두께의 1/2 이상인 경우를 과다각화증으로 정하였을 때 과다각화증은 약물을 도포한 모든 군에서 관찰되었으나, 정상대조군에서는 관찰되지 않았다. 각질층이 정상 표피두께의 1/2 이상이나 표피전층 보다는 얇은 경우를 1+, 정상 표피두께보다 2배이상 과다각화증이 발생한 경우를 3+, 그 중간을 2+로 정하여 관찰하였다(Table 4).

약물도포를 4주간 실시한 제 4 군에서는 전예에서 1+ 내지 2+ 정도의 과다각화증을 관찰할 수 있었는데 1+가 22예중 19예(86.4%)로 대부분이었다. 12주간 약물을 도포한 제 3 군에서는 1+와 2+의 과다각화증 외에 3+의 과다각화증이 관찰되었으며, 2+가 22예중 11예(50%)로 가장 많았다. 22주 및 33주간 약물을 도포한 제 3 군 및 제 4 군에서는 모두 2+ 이상의 과다각화증이 있었으며, 제 2 군에서는 3+이 16예중 11예(68.9%)인 것에 비해 제 1 군에서는 16예중 13예(81.3%)로 제 2 군에 비해 제 1 군에서 더 심해지는 경향을 보였다. 3+ 정도의 심한 과다각화증은 유두종이 발생한 군에서만 관찰되었으며 특히 유두종의 상부에서 현저하였고 밀집된 각화층의 소견을 보였다(Fig. 3). 전반적으로 보아 과다각화증은 약물도포기간이 길어짐에 따라 그 정도 및 발생빈도가 증가되었다( $p < 0.05$ ).

**(3) 표피 이형성 변화:** 이형성을 그 정도에 따라 표피층의 하부 1/3층에 국한된 경우를 1+, 하부 2/3층까지 관찰되는 것을 2+, 표피의 전층에서 이형성이 관찰되는 경우를 3+로 나누었으며 그 결과는 table 5와 같다.

**Table 4.** Degree of hyperkeratosis

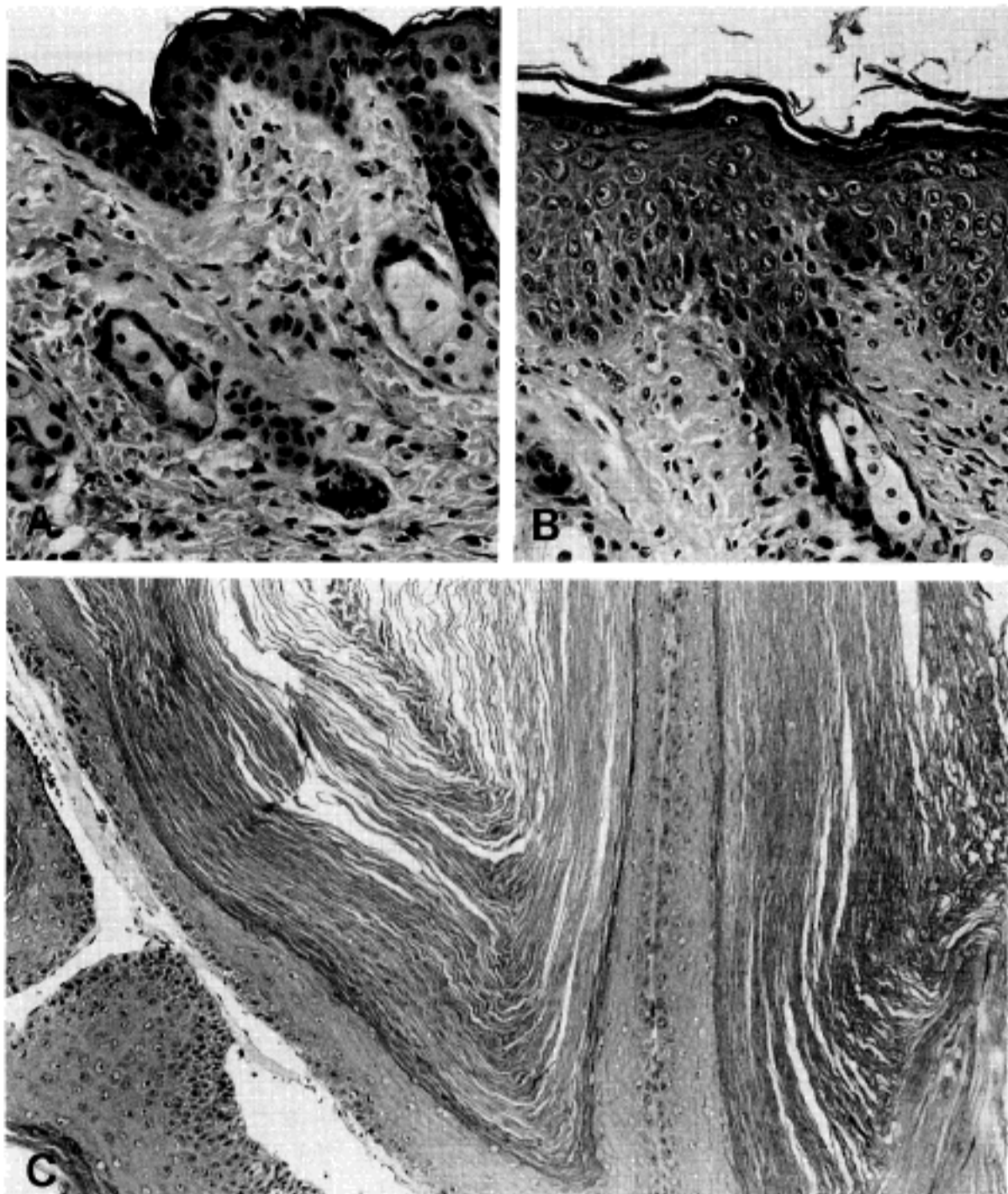
Group	No. of animals	Degree of hyperkeratosis			
		0	1+	2+	3+
1	16	-	-	3	13
2	16	-	-	5	11
3	22	-	4	11	7
4	22	1	19	2	-
5	9	9	-	-	-

- 0 : keratin layer not thicker than 1/2 of epidermal thickness of normal control
- 1+ : hyperkeratosis thicker than 1/2 but thinner than the epidermal thickness of normal control
- 2+ : hyperkeratosis thicker than 1 time but thinner than 2 times of epidermal thickness of normal control
- 3+ : hyperkeratosis thicker than 2 times of epidermal thickness of normal control

정상 대조군인 제 5 군에서는 9예중 2예(22.2%)에서만 1+ 이형성이 관찰되었고, 약물도포를 4주 시행한 제 4 군에서는 1+ 이형성이 22예중 7예(31.8%)로 증가되었다. 약물도포를 12주 시행한 제 3 군부터 2+ 이형성이 발생되었으며, 1+ 이형성도 7예(31.8%) 있었으나 상당 부분인 14예(63.6%)에서는 이형성이 관찰되지 않았다. 약물도포를 21주 시행한 2군에서는 이형성의 발생이 증가되어 총 16예중 1+ 이형성 10예, 2+ 이형성 2예로 모두 12예(75%)에서 이형성이 있었으나 3+ 이형성은 관찰되지 않았다. 33주간 약물을 도포한 제 1 군은 16예 전예에서 이형성이 관찰되었으며, 1+ 이형성 2예(12.5%), 2+ 이형성이 11예(68.8%), 3+ 이형성이 3예(18.8%)로 3+ 이형성이 처음 관찰되었다. 또한 편평상피세포암종이 발생한 1예에서는 주변 상피조직에서 3+ 이형성이 함께 관찰되었다(Fig. 4). 이상과같은 이형성의 정도 및 발생빈도는 약물도포기간이 길어짐에 따라 증가되는 경향을 보였다( $p < 0.05$ ).

### 3) 표피세포의 BrdU표지지수

면역조직화학염색에서 BrdU표지세포는 핵이 갈색의 과립상을 보였다. BrdU는 대부분 기저세포층 및 모낭구성세포들에서 표지되었는데 BrdU표지지수는 모낭사이 표피에서 과립층하부의 표피구성세포 중에서 BrdU염색에 양성인 세포를 세어 BrdU표지지수로 하였으며 모낭구성 세포는 제외하였다. 유두종 또는 암종이 발생한 경우는 그 부위에서 BrdU양성 세포를 세었다. 유두종에서도 BrdU는 주로 기저층에서 표지



**Fig. 3.** Histologic finding of hyperkeratosis. A: The control group showed thin keratin layer. B: Hyperkeratosis thicker than 1/2 layer of normal epidermis occurred after 4 week-carcinogen application. C: The papilloma showed thick and compact layer of keratin.

**Table 5.** Degree of dysplasia

Group	No. of animals	Degree of dysplasia				
		0	1+	2+	3+	4+
1	16	-	2	11	2	1
2	16	4	10	2	-	-
3	22	14	7	1	-	-
4	22	15	7	-	-	-
5	9	7	2	-	-	-

0 : without dysplasia

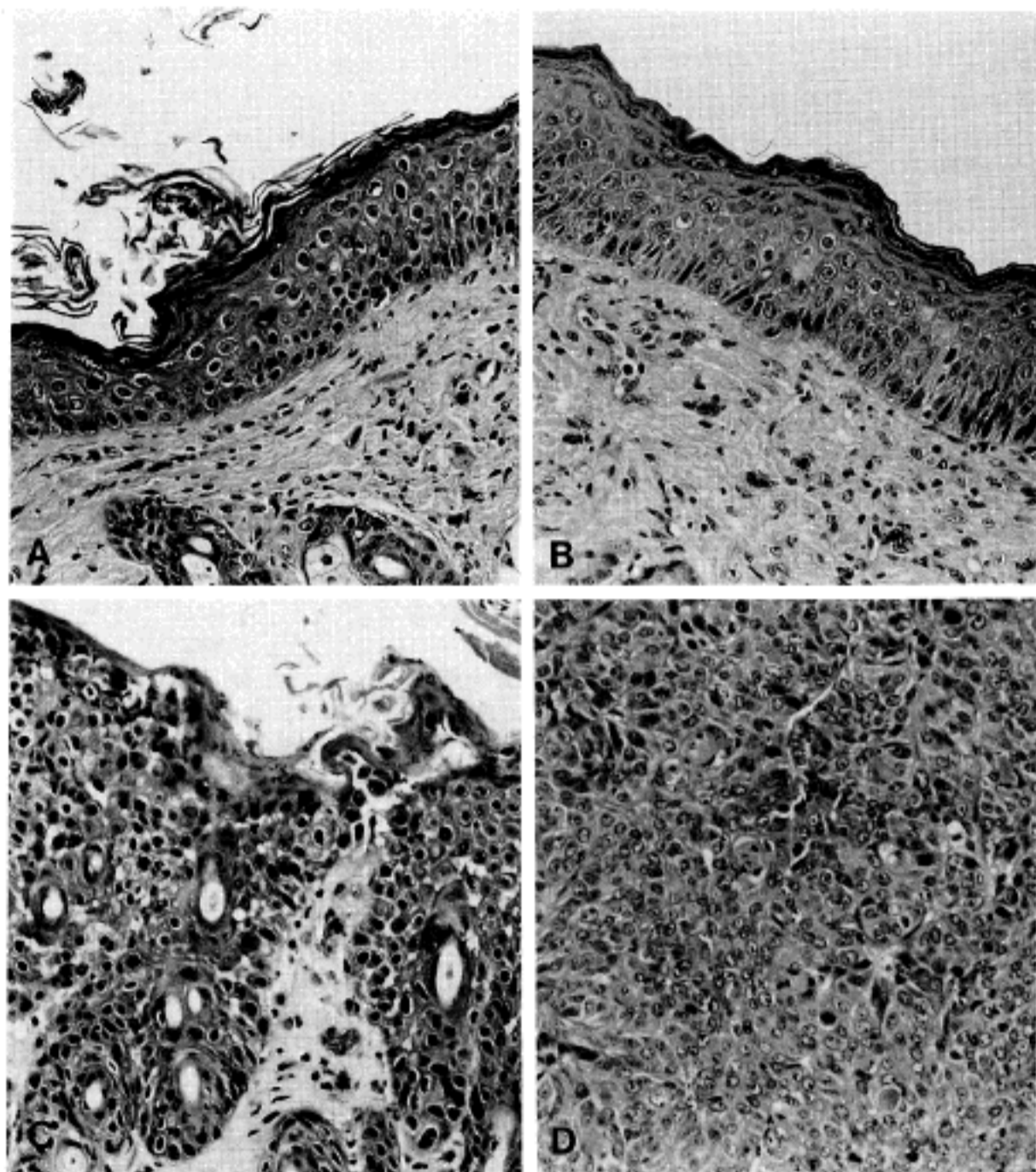
1+ : dysplasia confined to lower 1/3 of epidermis

2+ : dysplasia confined to lower 2/3 of epidermis

3+ : dysplasia in full thickness of epidermis

4+ : squamous cell carcinoma

되었으며, 편평상피암종에서는 암종의 전 부위에서 관찰되었다(Fig. 5). 각군의 BrdU표지지수는 fig. 6 및 table 6과 같다. BrdU표지지수의 평균은 제1군은 20.0, 제2군은 17.3, 제3군은 8.1, 제4군은 6.6, 제5군은 6.3으로 약물도포 기간에 따라 증가되었는데 특히 약물도포기간이 33주 및 21주인 제1군 및 제2군에서는 BrdU표지지수가 높아 각각 제3군, 4군 및 5군과 비교시 유의있는 차이를 보였고, 21주 이상 약물도포군과 12주 이하 약물도포군의 BrdU표지지수 차이가 현저하였다( $p < 0.05$ ). 제1군과 2군, 제3군과 4군, 제4군과 5군 사이에는 BrdU표지지수의 유의 있는 차이가 없었다( $p > 0.05$ ).



**Fig. 4.** Histologic finding of dysplasia. A: Dysplasia confined to the lower 1/3 of epidermis occurred in the group of 4 weeks' carcinogen application. B: Dysplasia confined to the lower 2/3 of epidermis developed in the group of 12 weeks' carcinogen application. C: Dysplasia involving full thickness of epidermis developed in the group of 33 weeks' carcinogen application. D: The squamous cell carcinoma occurred in the group of 33 weeks' carcinogen application.

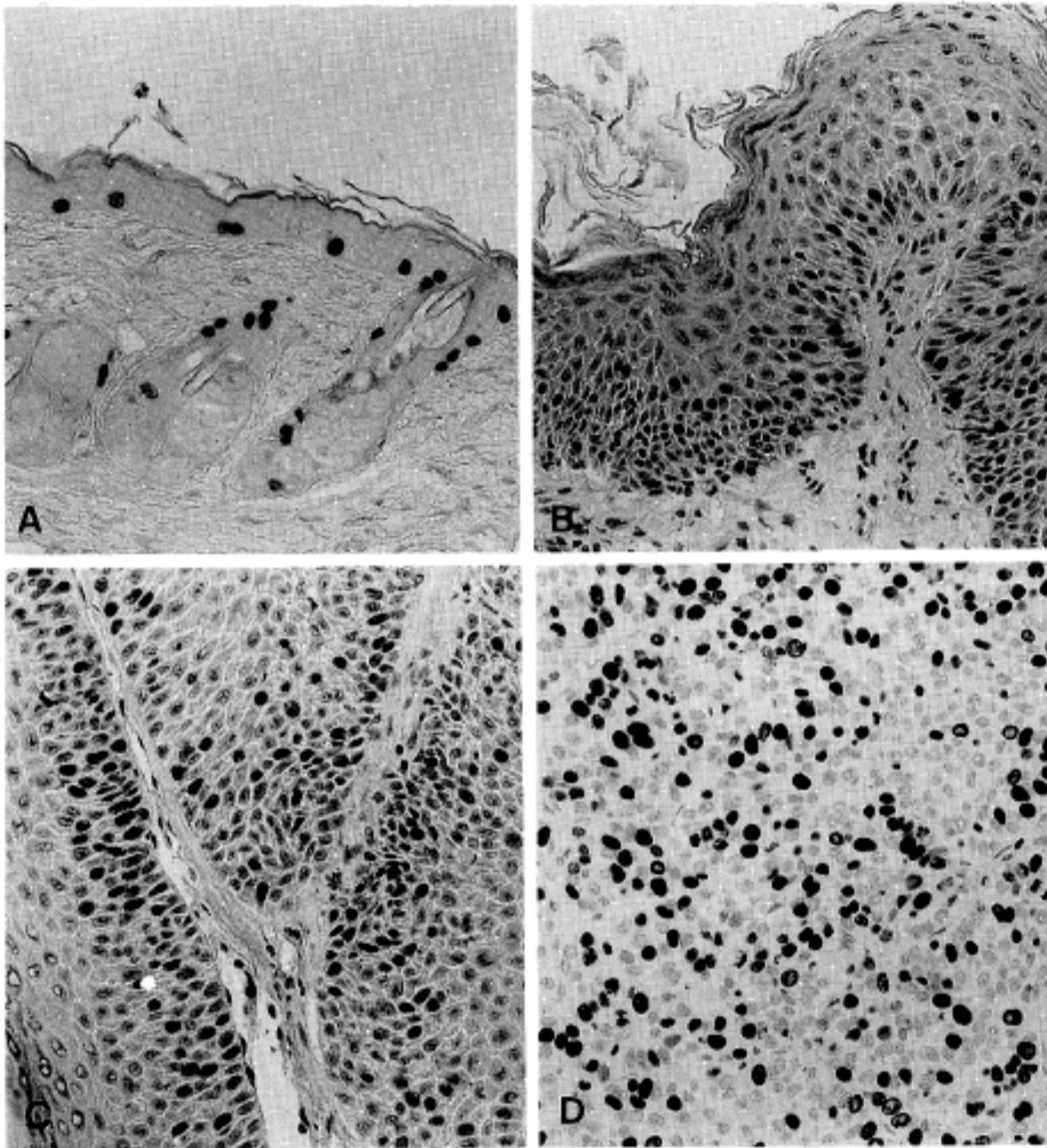
#### 4) 표피 Langerhans세포지수

Ia특이 단세포군 항체를 이용한 면역조직화학염색을 시행하여 수지상의 돌기를 갖는 Langerhans세포들을 관찰하였다. 대조군에서는 수지상의 돌기가 서로 연결되어 망상구조를 이루는 것이 관찰되었으나, 약물을 도포한 군에서는 Langerhans세포가 다른 Langerhans세포와의 연결없이 드물게 관찰되었으며 수지상 돌기의 수 및 크기의 감소도 관찰되었다(Fig. 7). 각 군의 Langerhans세포지수는 fig. 8 및 table 7과 같다. Langerhans세포지수의 평균은 제1군은 2.3, 제2군은 3.3, 제3군은 3.5, 제4군은 4.0, 제5

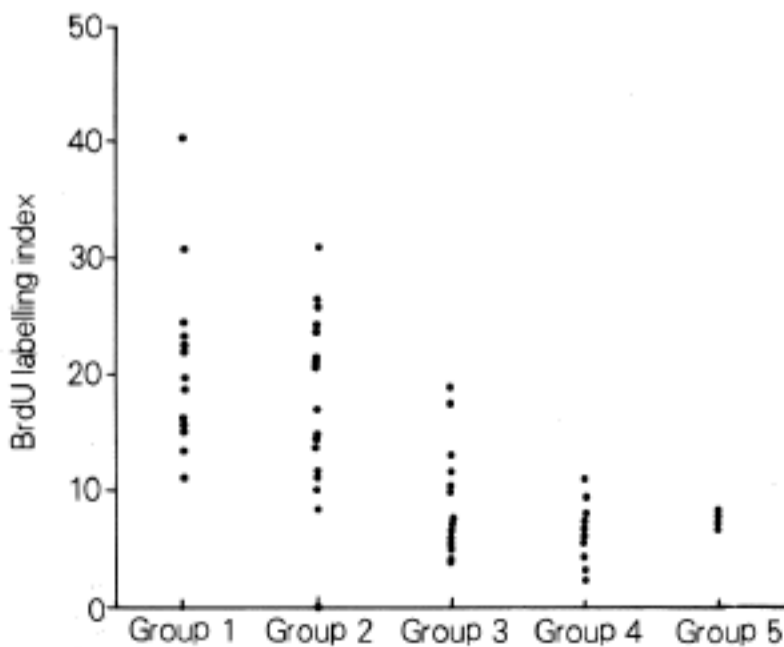
군은 9.3으로 약물도포기간이 증가함에 따라 감소되는 경향을 보였다.

Langerhans세포의 감소는 약물도포 시작 초기인 4주군에서부터 발생되었으며 특히 대조군과 4주간 약물도포한 제4군 사이에 Langerhans세포지수의 차이가 현격하였다( $p < 0.05$ ). 12주 및 21주간 약물을 도포하여 암의 발생은 없이 유두종만 발생되었던 제3군과 제2군 사이에는 Langerhans세포지수의 차이가 없었으나, 33주 동안 약물을 도포하여 암종이 발생되었던 제1군은 제2군에 비해 감소된 Langerhans세포지수를 보였다( $p < 0.1$ ). 편평상피세포 암종에서는 Langerhans세포가 전혀 관찰되지 않았다.

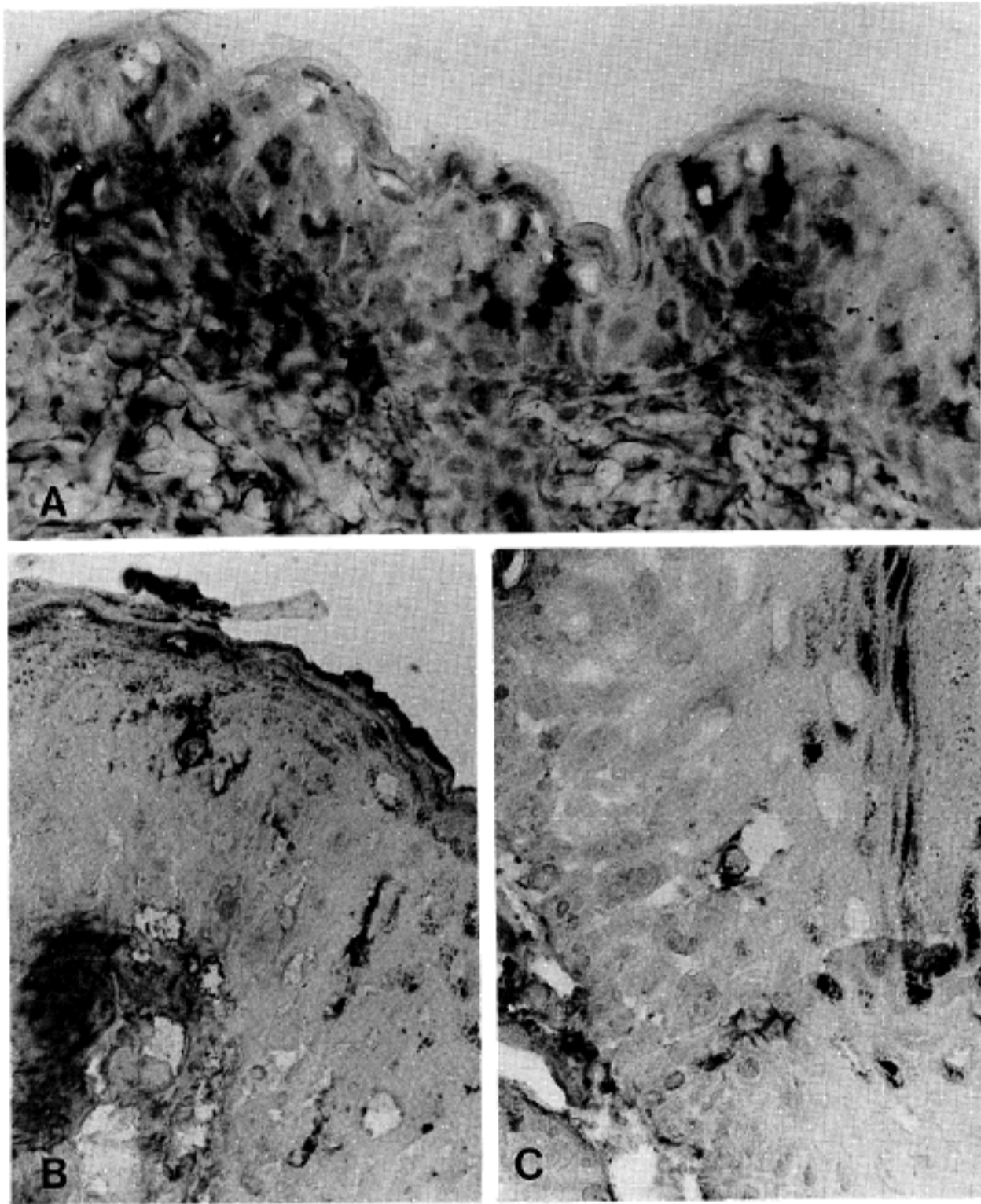




**Fig. 5.** Immunohistochemical staining for BrdU. The BrdU positive cells with dark brown nuclei were found in the basal layer and hair follicles in the control group (A). The number of BrdU positive cells was increased in the thickened epidermis (B) and the papilloma (C). They were confined to the lower part of the epidermis. In squamous cell carcinoma, the number of BrdU positive cells was markedly increased and they were dispersed widely (ABC).



**Fig. 6.** BrdU labelling indices.  
 $p < 0.05$ ; group 1 compared with group 3, 4 and 5  
 $p < 0.05$ ; group 2 compared with group 3, 4 and 5



**Fig. 7.** Immunohistochemical stain for Ia antigen of Langerhans cells. A: The control group showed Langerhans cells with dendritic cytoplasm forming network. B: The number of Langerhans cells was decreased in portions of acanthosis. C: The Langerhans cell was rarely seen and the number and size of its dendritic processes were decreased in the papilloma (ABC).

**Table 6.** BrdU-labelling indices of epidermal cells

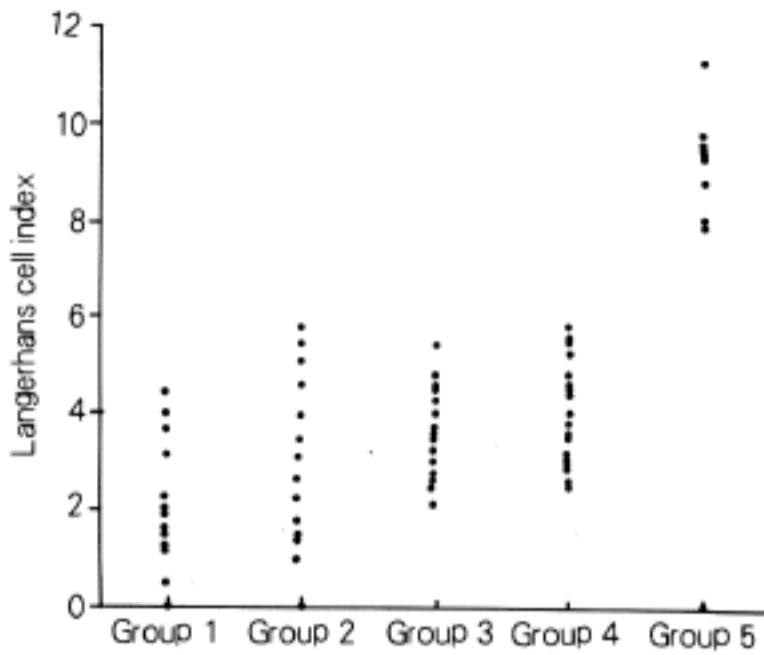
Group	No. of animals	BrdU-labelling index
1	16	20.0±7.41
2	16	17.3±7.79
3	22	8.1±4.36
4	22	6.6±1.89
5	9	6.3±1.77

Values are mean ± SD

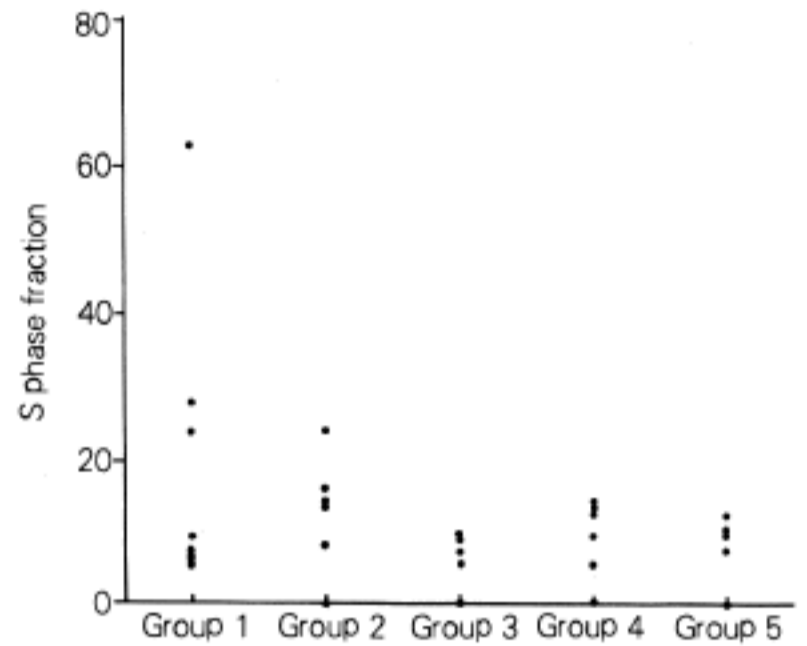
세포의 증식정도와 Langerhans세포와의 관계를 살펴보면 세포의 증식정도가 심해짐에 따라 Langerhans세포는 감소하였으며 비교적 높은 상관성을 보였다( $p=0.00$ , 상관도 = -0.40).

#### 5) 유세포측정

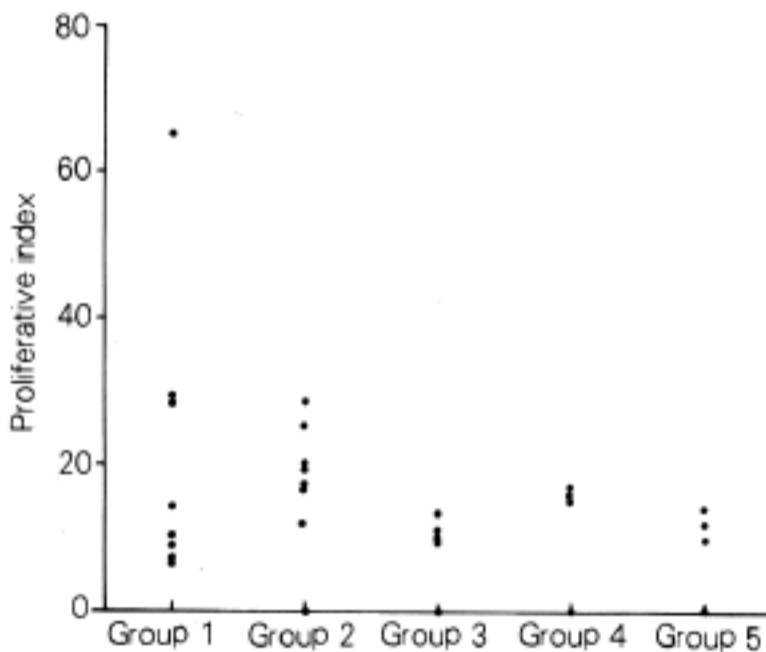
각군의 DNA histogram 분석결과 모든 예가 diploidy였으며 편평상피세포암종을 포함한 모든 예에서 aneuploidy는 1예도 없었다. 각군의 증식지수



**Fig. 8.** Langerhans cell indices.  
 $p < 0.05$ ; group 4 compared with group 5  
 $p < 0.1$ ; group 1 compared with group 2



**Fig. 10.** S phase fractions.  
 $p < 0.05$ ; group 2 compared with group 3, 4 and 5



**Fig. 9.** Proliferation indices.  
 $p < 0.05$ ; group 2 compared with group 3, 4 and 5

**Table 7.** Langerhans cell indices of epidermal cells

Group	No. of animals	Langerhans cell index
1	16	2.3 ± 1.37
2	16	3.3 ± 1.65
3	22	3.5 ± 0.84
4	22	4.0 ± 0.01
5	9	9.3 ± 1.01

Values are mean ± SD

**Table 8.** Proliferation indices and S phase fractions of epidermal cells

Group	No. of animals	Proliferation index	S phase fraction
1	9	20.1 ± 19.00	17.9 ± 18.69
2	7	19.8 ± 5.61	16.1 ± 5.74
3	8	10.2 ± 1.50	7.6 ± 1.67
4	5	13.4 ± 2.90	9.9 ± 2.64
5	4	12.1 ± 1.45	9.7 ± 2.06

Values are mean ± SD

및 S기 분획은 fig. 9, fig. 10 및 table 8과 같다.

제 1 군에서 발생된 암종의 증식지수 및 S기 분획은 65.3과 62.8로 같은 군의 암종이 발생되지 않은 예들의 평균 14.5와 12.3에 비하여 뚜렷한 증가를 보였다. 증식지수와 S기 분획도 약물도포기간이 길어짐에 따라 증가되었고, 제 2 군에서 제 3 군, 제 4 군 및 제 5 군에 비해 뚜렷한 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). S기 분획도 제 2 군이 제 3 군, 제 4 군 및 제 5 군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 제 1 군과 제 2 군 사이에는 통계적 의의가 있는 차이는 없었다.

## 고 찰

화학발암제에 의한 피부의 발암과정은 개시와 촉진의 2단계를 거치며 일반적으로 DMBA는 개시제로, TPA는 촉진제로 알려져 있다<sup>15,16</sup>. TPA를 첫번째

도포하면 처음에는 DNA의 합성이 감소되나 곧 DNA의 합성이 증가되어 모낭사이 표피층의 두께가 증가된다. 두번째 TPA 도포시는 DNA의 합성이 초기의 감소없이 첫번째 도포시 보다 더 많이, 더 빠른 기간내에 일어나 표피층의 층수가 더 많이 증가되므로, TPA 1회 도포가 그 이후의 TPA도포효과를 더 강력하게 하는 작용이 있으며 이러한 작용은 TPA용량에 비례한다<sup>17)</sup>. 유세포추정을 이용한 실험에서도 TPA도포 후 초기에는 S기로의 진행이 저지되고 G<sub>2</sub>기에서의 진행 정지가 일시적으로 발생되나 곧 G<sub>1</sub>기 통과시간이 감소되므로 한 세포주기에 걸리는 시간이 감소되어 증식을 시작한 세포들의 증식속도는 오히려 증가됨이 관찰되었다<sup>18)</sup>. 또한 TPA를 장기간 단독 도포시 유두종 및 편평상피암종을 유발시킬 수 있어 촉진제로서의 작용 이외에 미약하기는 하나 발암제로서의 작용도 있음이 알려졌다<sup>19)</sup>.

본 연구에서는 개시제로 알려진 DMBA를 1회 도포하고 10일 후부터 TPA를 동일부위에 매주 2회씩 도포하였다. 4주간 약물을 도포한 제 4군에서 육안적으로 관찰할 수 있는 피부병변의 발생은 없었으나, 조직학적 소견상 표피층이 11층 정도까지 증가되어 있었다. 12주간 약물을 도포한 제 3군에서 유두종이 발생되었으며 21주간 약물을 도포한 제 2군에서는 제 3군에 비해 유두종의 수 및 크기가 의미있게 증가하였다. 33주간 약물을 도포한 제 1군에서는 제 2군에 비해 유두종의 발생정도 및 크기의 유의있는 차이는 없었으나, 1예에서 침습성 성장을 하는 편평상피암종이 발생되었다. 본 실험에서 비교적 장기간 약물을 도포한 제 1군에서도 암종이 1예 밖에 발생되지 않았던 것으로 보아 유두종이 암종으로 바뀌는 데에는 유두종 세포의 유전적 변화를 유발할 수 있는 개시제의 역할이 더 중요하고 촉진제인 TPA는 그 효과가 적기 때문인 것으로 생각되나<sup>20)</sup>, 본 연구에서 실험동물로 사용한 BALB/c 생쥐가 비교적 발암물질에 덜 예민한 동물주인 것에 기인할 수도 있다<sup>21)</sup>. 표피세포 이형성은 4주군에서는 표피의 하부 1/3에 국한되었으나, 제 2군과 3군에서는 표피의 하부 2/3까지 진행된 이형성이 관찰되었으며, 제 2군에서 이형성 발생 빈도가 더 높았다. 표피의 전층에 걸친 이형성과 암종은 제 1군에서만 발생되었다. 이상의 소견에서 표피세포의 증식은 12주간 약물도포 이후 급격히 증가되었고 표피세포 이형성은 33주 약물도포군에서 심화된 것으로 보아, 세포증식력의 왕성한 증가 후에 이형성의 정도가 더 심화되는 것으로 생각된다.

본 실험에서는 피부병변들의 증식능을 알아보기 위하여 BrdU표지 검색법을 사용하였다. BrdU는 생체내 주입후 곧 thymidine과 치환되므로 BrdU에 대한 단클론 항체를 이용하여 면역조직화학적으로 BrdU표지 세포를 염색하는 방법이 이용되고 있으며 세포주기 중 S기 세포를 표지하는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 모낭을

제외한 표피구성 세포들에서 BrdU표지 정도를 살펴 보았을 때 BrdU표지수는 약물도포 기간에 따라 증가되었는데 제 1군 및 2군에서 제 3군, 4군 및 5군에 비하여 의미있게 증가하였으며, 특히 제 1군에서 발생된 암종에서 높은 BrdU표지수를 보였다. 또한 유세포추정을 시행하여 증식지수 및 S기 분획에 대해서 살펴 본 결과 BrdU세포지수와 유사한 분포 소견을 보였다. 특히 세포주기 중 S기의 세포가 증가되어 있었는데 이는 조직학적 소견상 표피층이 두꺼워져 있는 곳이나 유두종에서 세포분열은 거의 관찰되지 않으면서 크고 농밀된 핵을 가지는 세포들이 다수 관찰되는 것과 연관이 있는 것으로 생각된다. 제 3군에 비하여 제 4군 및 5군에서 증식지수 및 S기 분획이 다소 높은 수치를 보였는데, 이는 유세포추정 검체내에 세포 증식력이 비교적 높은 모낭구성세포가 포함되어 이것이 비교적 세포증식 정도가 미약한 제 4군과 5군의 증식지수 및 S기 분획의 수치를 높이는 결과를 나타낸 것으로 생각되므로 별 의미가 없다고 생각된다. 본 연구에서는 어느 시기에 염색체의 수적 이상이 초래되는가를 알아보기 위해 유세포추정을 이용하여 DNA ploidy에 대하여 조사한 결과 편평상피암종 1예를 포함한 모든 예가 diploidy여서 심한 이형성이나 암종 발생시에도 염색체의 수적 이상이 발생되지 않았음을 알 수 있다. 그러나 본 연구 결과만으로는 소량의 염색체의 결손 혹은 그 구조적 이상의 발생 가능성을 배제할 수 없다고 생각된다.

피부의 Langerhans세포는 골수에서 유래되며 이 종조직적합항원인 Ia를 표지한다<sup>23)</sup>. Langerhans세포는 표피세포의 2~6%를 차지하며 수지상 돌기로 서로 연결되어 망상구조를 이루고 있다<sup>24)</sup>. 수지상 돌기로 구성된 망상구조의 역할에 대해서는 알려진 바가 적으나, 외부에서 들어온 항원의 포착에 도움이 되리라고 추측되고 있다<sup>25)</sup>. 외부 항원을 포착한 Langerhans 세포는 전피의 림프관을 통하여 국소림프절로 이주하여 이곳에서 항원을 세포막에 존재하는 이종조직적합항원에 붙여 T 림프구에 제공하여 면역반응을 개시한다<sup>10,26)</sup>. 이와같이 Langerhans세포는 표피와 전신 면역계를 연결하므로 피부종양에 대한 면역반응에 중요한 역할을 수행할 가능성이 있다. 화학발암제 중 특히 촉진제가 생쥐표피의 Langerhans세포 수를 감소시키며, 종양이 형성됨에 따라 Langerhans세포지수가 감소하고 Langerhans세포가 다시 출현함에 따라 종양이 퇴화된다는 보고가 있다<sup>12,26)</sup>. Halliday 및 Muller<sup>12)</sup>는 생쥐에 DMBA를 도포하여 Langerhans세포가 감소된 표피를 dinitrofluorobenzene(DNFB)으로 감작시키면 접촉성 과민반응이 일어나지 않으며, 같은 생쥐에서 DMBA를 도포하지 않은 부위를 다시 DNFB로 감작시키거나 또는 비장의 림프구를 다른 생쥐에 이식하여 DNFB로 감작시켜도 면역반응이 발생되지 않아, 발암제로 Langerhans세포가 감소된 피

부를 감작시키면 억제 T 림프구가 활성화되어 면역반응이 억제된다고 보고하였다.

본 연구에서도 Langerhans세포수는 약물도포 기간이 길어질수록 점점 감소되었으며, 세포의 증식능력을 나타내는 BrdU지수가 증가될수록 Langerhans지수는 감소되는 밀접한 상관관계를 보였다. 특히 높은 세포증식력을 보이는 암종에서는 Langerhans세포가 전혀 관찰되지 않았다. 또한 Langerhans세포 수는 약물도포 초기인 4주군에서 급격히 감소한 반면, 세포 증식능력은 약물도포 12주 이후 현저히 증가된 것으로 보아, Langerhans세포 수의 감소가 일어난 후 활발한 세포증식이 발생된다고 생각한다. 본 연구결과로 보아 Langerhans세포 수의 감소는 표피세포증식과 긴밀한 관계가 있으며 Langerhans세포 수의 감소로 인해 발암제 도포로 변형된 잠재성 종양세포가 면역학적으로 탐지되지 못하여 잠재성 종양세포가 면역반응에 의해 간섭받지 않고 증식할 수 있는 것으로 생각된다. Langerhans세포는 수적 감소외에 모양도 변화되어 수지상 돌기의 수 및 크기가 감소되었으며 이러한 변화는 유두종내에 뚜렷하였다. 이러한 소견은 다른 연구자의 보고에도 언급되어 Bergfelt등<sup>27)</sup>에 의하면 생쥐 피부에 종양을 이식한 경우 그 상부 표피의 Langerhans세포들에서도 수지상 돌기의 수 및 크기가 감소된 반면 비종양성 세포의 이식이나 실리콘 도포시는 이러한 변화가 발생되지 않았다고 한다.

한편 TPA가 대식구와 자연살세포(natural killer cell)의 종양세포 독성을 억제하며<sup>28,29)</sup> 표피에 존재하는 Thy-1 표지 수지상 세포가<sup>30,31)</sup> 종양세포에 대해 자연살세포 활동을 지녔음이 알려졌다<sup>32,33)</sup>. Baxter등<sup>34)</sup>은 생쥐 표피에 TPA도포시 Ia표지 Langerhans세포 수에는 변화없이 Thy-1 표지세포의 감소만이 관찰되어 항종양면역에서 Thy-1 세포의 역할을 강조하였으며, DMBA도포 또는 TPA도포에 의해 Langerhans세포 수가 감소되었다고 보고한 이전의 연구들<sup>12,13,26)</sup>에서는 발암과정 유발에 필요한 용량보다 더 많은 용량의 약물을 도포하였고 TPA도포 초기인 1주 혹은 3주 경에 관찰하였으므로 종양발생에 의한 Langerhans세포의 감소라기 보다는 이 약물들의 독작용에 의한 것일 가능성이 높다고 보고하였다. 본 실험에서 Thy-1 표지세포에 대해서는 관찰하지 않았으나, DMBA를 배부표피에 도포후 괴사나 괴양을 일으키는 TPA용량인 60~80 nmole보다<sup>16)</sup> 훨씬 적은 용량인 20 nmole을 주 2회 같은 부위에 도포하여 종양에 대한 촉진효과로 유두종이 비교적 충분히 발생한 생쥐의 표피에서 Ia에 표지되는 Langerhans세포 수의 감소가 뚜렷하였으므로, Langerhans세포 수의 감소가 항종양면역과 관계가 있을 것으로 생각된다. 그러나 사전 감작이나 조직적합항원의 도움이 없이 종양세포를 파괴할 수 있는 자연살세포 활동을 지닌 Thy-1 표지세포도 중요한 역할을 할 가능성이 있으며 이에

대한 연구가 필요하다고 생각된다.

### 결 론

발암제인 DMBA를 BALB/c 생쥐피부에 전처치한 후 종양촉진제인 TPA를 단기 및 장기 도포하여 표피세포의 형태학적 변화에 따른 표피세포의 세포주기분포와 DNA ploidy 및 이러한 세포의 증식결과와 표피내 Langerhans세포의 수적 변화에 대하여 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) DMBA 전처치 후 TPA를 도포한 결과 유두종은 12주 이상 도포한 군에서 발생하였고 편평상피세포암종은 33주 이상을 도포한 군에서 발생되었다. 유두종의 수 및 크기는 약물도포기간에 비례하여 증가되었다.

2) 표피세포의 증식, 과다각화증 및 이형성은 약물도포기간이 길수록 증가되었다.

3) BrdU표지지수는 약물도포기간에 따라 증가되는 경향을 보였는데 12주 도포군과 21주 도포군 사이의 차이가 뚜렷하였다.

4) Langerhans세포지수는 약물도포기간이 길어짐에 따라 점점 감소하는 경향을 보였다. 특히 약물도포 초기인 4주 도포군에서 급격히 감소하였으며, 암종에서는 Langerhans세포가 전혀 관찰되지 않았다.

5) BrdU표지지수가 증가될수록 Langerhans세포지수는 감소하였다.

6) 유세포측정 검색상 aneuploidy는 1에도 발생되지 않았으며 모든 예가 diploidy였다. 증식지수와 S기 분획은 약물도포기간에 따라 증가하였다.

이상의 결과로 보아 표피에 화학성 발암물질을 도포하면 Langerhans세포는 약물도포 초기에 급격히 감소하고, 세포증식능력은 상당한 시간이 지난 후에 증가되는 것을 알 수 있었으며, 증식력 및 이형성 변화가 현저히 증가된 경우에도 종양세포 DNA의 양적 이상은 발생되지 않았으나 그 구조적인 이상의 가능성은 배제하기 어려운 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Cramer W, Stowell RE. *The early stages of carcinogenesis by 20-methylcholanthrene in the skin of the mouse. I. Experimental technique and macroscopic changes.* J Natl Cancer Inst 1942; 2: 369-78.
- 2) Foulds L. *The experimental study of tumor progression: A review.* Cancer Res 1964; 14: 327-39.
- 3) Hennings H, Boutwell RK. *Studies on the mechanism of skin tumor promotion.* Cancer Res 1970; 30: 312-20.
- 4) Pawlowski A, Lea PJ. *Nevi and melanoma induced by chemical carcinogens in laboratory ani-*

- mals: Similarities and differences with human lesions. J Cut Pathol* 1983; 10: 81-110.
- 5) Boutwell RK. Some biologic aspects of skin carcinogenesis. In: Homburger F, ed. *Progress in Experimental Research, Vol 4*. New York: Karger, 1964: 207-50.
  - 6) Slaga TJ, Klein-Szanto AJP, Fischer SM, Weeks CE, Nelson K, Major S: *Studies on mechanism of action of anti-tumor-promoting agents: Their specificity in two-stage promotion. Proc Natl Acad Sci* 1980; 77: 2251-4.
  - 7) Reddy AL, Fialkow PJ. *Papillomas induced by initiation promotion differ from those induced by carcinogen alone. Nature* 1983; 304: 69-71.
  - 8) Yuspa SH. *Cutaneous chemical carcinogenesis. J Am Acad Dermatol* 1986; 15: 1031-44.
  - 9) Shelley W, Juhlin L. *Selective uptake of contact allergens by the Langerhans cell. Arch Dermatol* 1977; 113: 187-92.
  - 10) Stingl G, Katz SI, Clement L, Green I, Shevach EM. *Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. J Immunol* 1978; 121: 2005-13.
  - 11) Halliday GM, Muller HK. *The role of the Langerhans cells in local defense. IRCS J Med Sci* 1984; 12: 567-9.
  - 12) Muller HK, Halliday GM, Knight BA. *Carcinogen-induced depletion of cutaneous Langerhans cells. Br J Cancer* 1985; 52: 81-5.
  - 13) Halliday GM, Muller HK. *Induction of tolerance via skin depleted of Langerhans cells by a chemical carcinogen. Cell Immunol* 1986; 99: 220-7.
  - 14) Stene MA, Babajanians M, Bhuta S, Cochran AJ. *Quantitative alterations in cutaneous Langerhans cells during the evolution of malignant melanoma of the skin. J Invest Dermatol* 1988; 91: 125-8.
  - 15) Raick AN, Thumm K, Chivers BR. *Early effects of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on the incorporation of tritiated precursor into DNA and the thickness of the interfollicular epidermis, and their relation to tumor promotion in mouse skin. Cancer Res* 1972; 32: 1562-68.
  - 16) Raick AN. *Ultrastructural, histological, and biochemical alterations produced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on mouse epidermis and their relevance to skin tumor promotion. Cancer Res* 1973; 33: 269-86.
  - 17) Raick AN. *Late ultrastructural changes induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in mouse epidermis and their reversal. Cancer Res* 1973; 33: 1096-103.
  - 18) Kirkhus B, Olsen WM, Clausen OPF. *A comparison between the epidermal regenerative responses provoked by a skin irritant and a tumor promotor using anti-BrdUrd/DNA flow cytometry. Carcinogenesis* 1991; 12: 833-7.
  - 19) Astrup EG, Iversen OH. *The tumorigenic and carcinogenic effect of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate when applied to the skin of BALB/c. A and hairless(HR/HR) mice. Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect A* 1983; 91: 103-13.
  - 20) Hennings H, Shores R, Wenk ML, Spangler EF, Tarone R, Yuspa SH. *Malignant conversion of mouse skin tumors is increased by tumor initiators and unaffected by tumor promoters. Nature* 1983; 304: 67-9.
  - 21) Hennings H, Devor D, Wenk ML, Slaga TJ, Former B, Colburn NH, Bowden GT, Elgjo K, Yuspa SH. *Comparison of two-stage epidermal carcinogenesis initiated by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene or N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in newborn and adult SENCAR and BALB/c mice. Cancer Res* 1981; 41: 773-9.
  - 22) Magaud JP, Sargent J, Masson DY. *Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. J Immunol Methods* 1988; 106: 95-100.
  - 23) Stingl G, Tamaki K, Katz SI. *Origin and function of epidermal Langerhans cells. Immunol Rev* 53 1980; 149-74.
  - 24) Halliday GM, Mcardle JP, Knight BA, Muller HK. *New methodology for assessment of the Langerhans cell network. J Pathol* 1986; 148: 127-34.
  - 25) Streilein JW, Bergstresser PR. *Ia antigens and epidermal Langerhans cells. Transplantation* 1980; 30: 319-23.
  - 26) Halliday GM, Mac Carrick GR, Muller HK. *Tumour promoters but not initiators deplete Langerhans cells from murine epidermis. Br J Cancer* 1987; 56: 328-30.
  - 27) Bergfelt L, Bucana C, Kripke ML. *Alteration in Langerhans cells during growth of transplantable murine tumors. J Invest Dermatol* 1988; 91: 129-35.
  - 28) Keller R. *Suppression of natural antitumor defence mechanisms by phorbol esters. Nature* 1979; 282: 729-31.
  - 29) Dunn JJ, Baxter CS. *Inhibition of natural killer (NK) cell activity following topical application of phorbol diesters to mice. Proc Am Assoc Cancer Res* 1985; 26: 141.
  - 30) Bergstresser PR, Tigelaar RE, Dees JH, Streilein JW. *Thy-1 antigen-bearing dendritic cells populate murine epidermis. J Invest Dermatol* 1983; 81: 286-8.
  - 31) Sullivan S, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Streilein

- JW. *FACS purification of bone marrow-derived epidermal population in mice: Langerhans cells and Thy-1<sup>+</sup> dendritic cells.* *J Invest Dermatol* 1985; 84: 491-5.
- 32) Nixon-Fulton JL, Bergstresser PR, Hackett J, Kumar V, Tigelaar RE. *Con A stimulated Thy-1<sup>+</sup> epidermal cells exhibit natural killer(NK)-like activity.* *J Invest Dermatol* 1985; 84: 289.
- 33) Romani N, Stingl G, Tschachler E, Witmer MD, Steinman RM, Shevach EM, Schuler G. *The Thy-1 bearing cell of murine epidermis: A distinctive leukocyte perhaps related to Natural killer cells.* *J Exp Med* 1985; 161: 1368-83.
- 34) Baxter CS, Chalfin K, Andringa A, Miller ML. *Qualitative and quantitative effects on epidermal Langerhans (Ia<sup>+</sup>) and Thy-1<sup>+</sup> dendritic cells following topical application of phorbol diesters and mezerin.* *Carcinogenesis* 1988; 9: 1563-8.
-