

Benzo(a)pyrene과 dimethylbenz(a)anthracene에 의한 사람 림프아 세포(NC-37)의 c-myc, c-H-ras 유전자 변화

조무연[†] · 어완규* · 이상욱* · 정인철

고신대학교 의학부 생화학교실, 내과학교실*

Genomic changes of c-myc, c-H-ras in benzo(a)pyrene and dimethylbenz(a)anthracene treated human lymphoblast NC-37 cells

Moo Youn Cho, Wan Kyu Eo*, Sang Uk Lee*, In cheol Jeong

Dept. of Biochemistry, Internal Medicine* School of Medicine, Kosin University, Pusan 602-702, Korea

Abstract

To investigate genomic changes in c-myc gene by a chemical carcinogen, human lymphoblast NC-37 cells were exposed to benzo(a)pyrene(BP) and dimethylbenzanthracene(DMBA), and the c-myc gene expression was evaluated by Northern and Southern blot hybridization techniques. The results are as follows : When the genomic DNA of NC-37 cells exposed to several concentrations(1.25, 2.5 and 5ug/ml) of BP was treated with HindII/XbaI restriction enzyme, the c-myc genes were cut at the same region regardless of BP concentration. However, the c-myc gene was most significantly enhanced with 2.5ug/ml of BP. The expressions of c-myc gene in NC-37 cells was stimulated by BP and DMBA. Addition of TPA reduced the gene expression BP-treated cells, whereas it enhanced the gene expression in DMBA-treated cells. The expression of c-H-ras gene was slightly increased by treatment with BP and DMBA alone and in combination with TPA, however the magnitude of increase was not significantly different between each other. The expressions of c-myc and c-H-ras genes in Burkitt's lymphoma cells were greater than those in NC-37 cells. When the DNA extracted from NC-37 cells exposed to various concentrations of BP were amplified by polymerase chain reaction using a primer set containing c-myc exon I, the amplified products were of the same size in all groups. To evaluate the BP toxicity in E.coli to which human c-myc gene-cloned pBR322 vector was inserted, Southern blot hybridization was conducted on c-myc genes digested with EcoRI/ HindIII and SmaI/XbaI restriction enzymes, and observing that in 2 ug/ml BP-treated cells a 3.5Kb fragment was generated in addition to 1.3Kb fragment which can be observed in normal cells. Direct nucleotide sequence analysis of polymerase chain reaction products showed a mutation of G→A transition at the SmaI recognition site.

Key words : c-myc, c-H-ras, Benzo(a)pyrene, Dimethylbenz(a)anthracene, 12-o-Tetra-decanoylphobol-13-acetate, Lymphoblast NC-37 cell.

[†] Corresponding author

서 론

원암유전자의 돌연변이에 의한 발현의 증가는 세포의 증식을 유발하는 핵내 변화를 일으켜 세포의 성장을 무절제하게 한다. 따라서 세포내 원암 유전자는 종양진행 및 발암과 연관성을 가지고 있고 세포 증식을 규제하는데 중요한 역할^{1, 2, 3)}을 할 것으로 보고 있다. 원암 유전자에서 c-myc 원암유전자는 정상세포의 분열을 조절하며 세포의 형질전환이 일어나는 과정에 관여하고¹⁾, 간장의 재생 세포⁴⁾와 간암^{5, 6, 7, 8, 9)}의 발생 과정에서 c-myc 유전자의 발현이 증가하며, 화학적 발암물질에 의해 유도된 쥐의 간 종양조직에서도 증폭된 c-myc 유전자가 발견되었다^{6, 8)}. 한편 c-H-ras 원암유전자는 사람 및 동물의 종양조직에서 발견되었으며^{10, 11)}, 발암물질에 유도된 종양조직에서 매우 활성화 되어 있다^{12, 13, 14)}. 따라서 화학적 발암물질로 인해 발생한 암세포에서는 c-myc 혹은 c-H-ras 원암유전자의 발현의 이상 및 구조적 변화가 일어나며^{15, 16, 17)}, 이와같은 현상이 암의 발생초기에 잘 나타난다¹⁸⁾고 하였다. c-myc 혹은 c-H-ras 암 유전자를 삽입하여 변형시킨 transgenic mice에서 어떤 조직은 매우 커지고 세포변형의 과정을 거쳐 암 세포로 되지만 대부분의 경우, c-myc 및 H-ras 암 유전자가 발현되더라도 반드시 암이 유발되지는 않는다. 따라서 정상세포가 악성세포로 형질전환 하는데는 적어도 두개이상 적당히 활성화된 암유전자의 협동 및 상호작용이 필요하다고 하였다¹⁹⁾. c-myc 암 유전자와 그의 암 유전자 생성물(P62)은 세포 증식과 분화와 관련이 있고 세포 주기를 규제하는데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다^{19, 20, 21)}. 더욱이 c-myc은 세포를 영생(immortalize) 시키기도하고 복합적인 발암 작용을 통해서 영생 세포로 변형시킬수 있는데 독특한 ras 암 유전자 와 협동 작용을 하는 것으로 보고하였다¹⁹⁾. c-myc 암유전자는 human Bukitt's lymphoma 의 chromosome 2, 14, 22의 immunoglobulin 부위에 chromosome 8의 c-myc 부위가 전위되던가 B-cell acute lymphocytic leukemia가 되면 활성이 된다^{22, 23, 24, 25)} 더 나아가, c-myc은 human promyelocytic leukemia cell line HL60²⁶⁾, non-Burkitt's B-lymphoma cell lines²⁷⁾, human colon carcinoma(COLO320)인 neuroendocrine세포²⁸⁾, human lung carcinoma cell line²⁹⁾, human gastric adenocarcinoma 세포³⁰⁾에서는 증폭되고 유전자의 결손(deletion)³¹⁾으로 발현이 증가된다. 이 경우에 c-myc유전자의 증폭과 결

손이 신생종양 형성에 밀접한 상호관계를 가진다한다. 이와 같이 다양한 종양에서 변형된 c-myc유전자를 광범위하게 연구하였지만 아직도 c-myc-encoded 생성물과 c-myc 발현의 증가가 세포의 형질전환에 어떻게 관여하는지모른다. ras gene은 P21의 12,13,61,63의 단일 점 돌연변이로 대개 human solid tumor^{32, 33)}나 acute myeloid leukemia³⁴⁾에서 활성화되고 P21의 발현이 위암^{35, 36)}, 방광암³⁷⁾, 난소암³⁸⁾ 및 유방³⁹⁾과 전립선⁴⁰⁾의 악성종양에서 증가하였다. 또 고 준위의 과발현을 일으킨 ras 원암유전자는 NIH3T3 세포를 형질전환할수 있었다¹¹⁾. 그렇기때문에 단지 질적인 변화만이 아니라 ras유전자의 증폭의 정도에 따라 세포의 형질전환과 관련이 되는 것으로 보여진다. 또 embryofibroblast세포에 ras 암유전자를 단독 전이시키면 암세포로 변형시킬수없으나 viral myc이나 c-myc유전자를 복합전이시킨 경우 암세포로 변형²¹⁾되는 것으로 보아 세포의 발암 과정에 c-myc 유전자의 활성이 선행되어야 함을 암시한다.

본 연구에서는 polycyclic aromatic hydrocarbon 화합물 중 발암성이 강한 benzo(a)pyrene(BP) 및dimethylbenzanthracene을 투여하여 배양한 사람 림프아(human lymphoblast) NC-37 세포에서 c-myc과 c-H-ras유전자의 발현과 TPA 투여에 의한 영향을 관찰하고, 사람 c-myc 유전자를 pBR322에 cloning한 pHSRI plasmid를 이용하여 BP에 의한 DNA의 배열의 변화를 조사하여 유전자 발현에 대한 BP의 작용기전을 밝히고저하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Benzo(a)pyrene, Dimethylbenz(a)anthracene 그리고 12-o-tetra-decanoyl phorbol-13-acetate(TPA)는 Aldrich 사 제품을 구입하였고, benzanthracene, dimethyl formamide, RNase A, proteinase K, guanidinium thiocyanate, formamide, dextran sulfate, salmon sperm DNA는 Sigma 회사로부터, restriction enzyme, Hyperfilm-MP와 nylon membrane(Hybond N), poly(A) RNA isolation kit, ³²P-dCTP, multiprime DNA labeling kit, Taq polymerase 는 Amersham 사 제품을 구입하였다. fetal bovine serum, RPMI 1640, agarose는 Gibco-BRL, Taquence cycle sequencing kit는 USB 제품을 구입하였으며, 그의 일반적인

Benzo(a)pyrene과 dimethylbenz(a)anthracene에 의한 사람 림프아 세포(NC-37)의 c-myc, c-H-ras 유전자 변화

시약은 분석용을 구입하여 사용하였다. pHSR1(human c-myc)은 연세대학교 의과대학 유전공학 연구소로부터 제공 받았다.

세포 배양

사람 림프아 NC-37 세포(ATCC, CCL214)와 Burkitt lymphomas (Raji) 세포(ATCC, CCL86)를 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 150 cm²의 flask에 ml당 3×10⁵ 세포를 접종시켜 각각의 실험에 이용하고 세포수가 대략 4×10⁹~9×10⁹ 정도 되었을때 400xg에서 원침하고 4°C로 차게한 세척 용매(10 mM Tris HCl, pH 8.1, 1mM EDTA, 0.14M NaCl)로 2 번 씻어낸 후 pellet을 즉시 -70°C에 동결 보관하였다가 실험에 사용하였다.

BP 투여한 NC-37세포에서 c-myc 유전자 변화

NC-37 세포를 150cm²의 배양 flask에서 약 1×10⁹의 활성적인 세포로 자란 배지에 benz(a)anthracene (3ug/ml)을 넣어 24시간 배양하고 농도별(1.25, 2.5, 5.0ug/ml) BP를 넣고 24시간 더 배양하여 세포를 모으고 상기와 같은 방법으로 실행하였다. 유전자 발현을 확인하기 위하여 DNA는 Blin과 Stafford의 방법⁴², total RNA는 acid guanidium thiocyanate-phenol chloroform 추출법⁴³으로, mRNA는 poly(A) RNA isolation kit(Amersham Co.)를 사용하여 분리하였다. DNA는 HindII와 XbaI으로 절단하고 1% agarose gel에서 전기영동을 전개하여 Sambrook⁴⁴의 방법으로 Southern blot을 실행하였다. NC-37 세포의 c-myc exon 1 부위의 변화를 보기 위하여 SmaI(sense)과 SacI(antisense)을 포함하는 primer(Table 1 참조)를 사용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)기기로 증폭하였다.

NC-37 세포에서 BP와 DMBA에 의한 c-myc, c-H-ras 위치에서의 유전자 변화 관찰

NC-37 세포에서 BP투여군(2.5ug/ml)과 동량의 BP와 125ng/ml의 TPA 동시투여군, 1.5ug/ml의 DMBA투여군과 동량의 DMBA와 125ng/ml의 TPA 동시투여군, Burkitt lymphoma(Raji) 세포군 그리고 saline을 투여한 NC-37 세포를 정상대조군으로 나누어 상기와 같은 방법으로 24시간

배양하여 DNA를 분리하였다. c-myc DNA는 SmaI으로, c-H-ras 유전자는 SacI으로 잘라 1% agarose gel에서 전기영동을 실행하여 Southern blot하고 중합효소 연쇄반응기를 이용하여 합성한 1Kb의 DNA 절편(fragment)을 probe로 사용하여 hybridize한후 autoradiography하여 유전자의 변화를 비교 관찰하였다. 분리한 RNA에서 Northern blot과 slot blot을 실시 하였다.

cloning vector에 삽입된 c-myc 부위의 BP에 의한 유전자 변화

c-myc 부위에서 유전자 변화를 관찰하기 위하여 pBR 322 vector에 사람 c-myc 유전자가 cloning된 plasmid(pHSRI c-myc, 그림 1)의 숙주세포(HB 101)를 LB medium(1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl; pH 7.0)에서 BP를 농도별(2, 4, 8ug/ml)로 투여하여 10일간 배양하였다. 이 세포에서 DNA를 분리하고 EcoRI/HindIII와 SmaI/XbaI으로 절단하여 전기영동을 실시하고, Southern hybridize하여 autoradiography를 하였다. probe는 Exon I 부위를 포함하는 SmaI/SacI 위치 DNA 절편을 중합 효소 연쇄반응으로 증폭하여 사용하였다. DNA 염기서열의 결정은 c-myc locus의 active region을 PCR기기로 증폭시켜 Taquence cycle sequencing kit(USB Co.)를 사용하여 sequencing하였다.

c-myc과 c-H-ras DNA의 증폭

Primer

사람 c-myc과 c-H-ras 유전자의 DNA fragment를 합성하기 위한 primer는 DNA 합성기(Model 381A, Applied Biosystems, USA)로 합성하였는데 primer의 염기서열은 Table 1에 표시하였다.

Probe

사람 c-myc 유전자를 가지고 있는 plasmid(pHSRI c-myc, 그림 1)를 중합효소 연쇄반응에 의해 exon I을 포함하고 있는 약 1Kb의 DNA 절편을 합성하여 전기영동을 실행하였으며 gel slice를 electroelution하여 분리하고 ³²P-dCTP를 첨가한 multiprime DNA labelling 방법으로 ³²P-labeled probe를 제조하여 hybridization에 사용하였다. 그리고 c-H-ras용 probe는 NC-37 DNA를 exon I 부위인 sense, antisense primer와 Taq polymerase를 이용하여 196

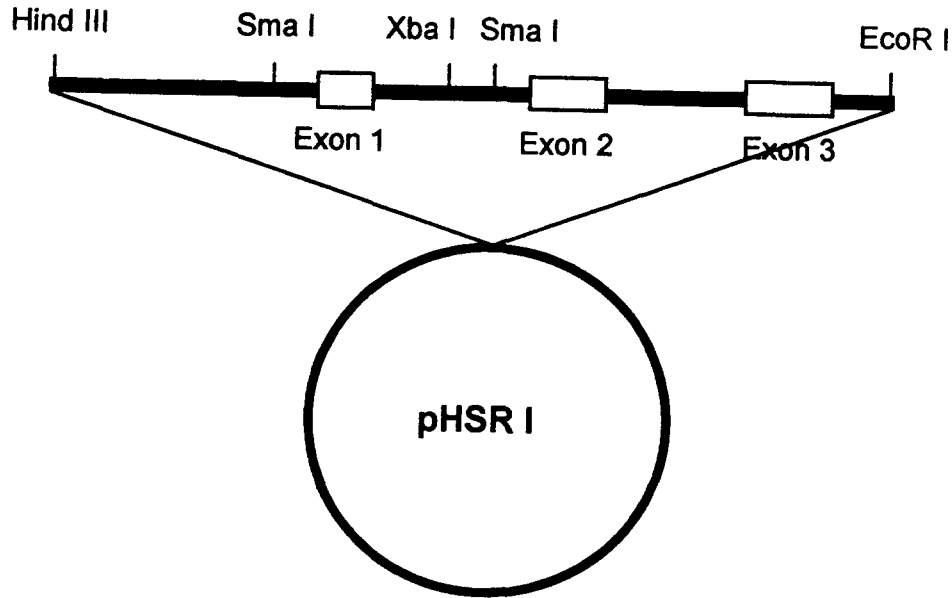


Fig. 1. Schematic representation of the restriction map of the human c-myc protooncogene

Table 1. The sequence of primer used in this study

Primer set	Sequences(5'→3')	Product size
c-myc		
Sence1	TCCCGGGTCCCAAAGCAGAG(21mer)	1,055bp
Antisence1	ACTCCAAGGAGCTCAGGATGC(21mer)	
Sence2	TTCTCTGTGTGGAGG(15mer)	552bp
Antisence2	CGCTGGAATTACTACAGCGA(20mer)	
c-H-ras		
Sence1	CAGGAGACCCTGTAGGAGGA(20mer)	196bp
Antisence1	AGCAGCTGCTGGCACCTGGA(20mer)	

bp fragment를 합성한 후 위와 같은 방법으로 labelling하여 실험에 사용하였다.

중합효소 연쇄반응

중합효소 연쇄반응은 반응 완충액(10×) (500mM potassium chloride, 100mM Tris HCl; pH 8.0, 20mM magnesium chloride, 0.01% gelatin) 5ul에 template DNA 1ug을 넣고 양방향의 primer를 각각 20pmol, 2 unit의 Taq DNA polymerase(Amersham Co.) 첨가하고,

100uM의 dNTP mixture를 넣고 증류수를 가하여 전체 부피를 50ul로 하여 thermocycler(Technie 회사제품, USA)에서 반응시켰다. 반응 온도는 세단계로 나누어 1단계는 95℃에서 5분간 변성시키고 64℃에서 1분간 annealing한 후, 72℃에서 1.5분간 중합시키고 2단계에서는 95℃에서 1분, 54℃에서 1분, 72℃에서 1분씩 연속 30회 반응시켰으며, 마지막으로 95℃ 1분, 54℃ 1분, 72℃에서 10분간 더 반응시켜 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다.

결과 및 고찰

BP 투여한 사람 림프아 NC-37 세포에서 c-myc 부위의 유전자 변화

본 연구에서 BP를 투여하고 배양한 사람 림프아 NC-37 세포에서 c-myc 위치의 유전자 변화를 구명하기 위하여, NC-37 세포에서 DNA를 분리하고 HindII와 XbaI으로 절단한 후 전기 영동을 실시하여 Southern blot을 실시한 결과는 Fig. 2에서 보느냐와 같이 정상대조군과 같은 3.5Kb 크기의 전형적인 c-myc 위치에서 관찰되었는데 이는 발암의 원인이 되는 proviral promoter sequence가 삽입되거나⁷⁾ 전위^{16, 45)}, 결손³¹⁾ 또는 절단(truncate)⁴⁶⁾된 현상은 아닌 것 같다. 그러나 c-myc의 발현 정도를 측정하기 위하여 Northern blot(Fig. 3)을 실시한 결과에서는 BP 투여군에서 대조군에 비해 많은 증가가 있는 것으로 보아 어떠한 경로를 통한 비정상적인 발현이 있는 것으로 보인다. 또한 BP의 농도가 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하

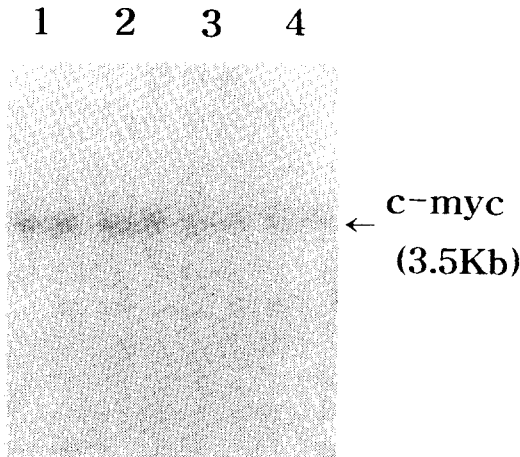


Fig. 2. Southern blot hybridization of genomic DNA in NC-37 cells treated with BP
DNA was digested with HindII and XbaI, electrophoresed in 1% agarose gel and hybridized to ³²P-labeled c-myc specific probes as described in "Materials and Methods".
Lane 1, Control DNA ; lane 2, BP(1.25ug/ml) ; lane 3, BP(2.5ug/ml) ; lane 4, BP(5ug/ml)

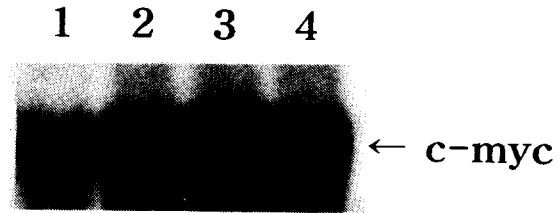


Fig. 3. Northern blot analysis of cytoplasmic RNA of NC-37 cells treated with BP
One ug of poly(A)-containing RNAs were electrophoresed in denaturing agarose gel and hybridized to ³²P-labeled c-myc probes as described in "Materials and Methods".
Lane 1, control RNA ; lane 2, BP(1.25ug/ml) ; lane 3, BP(2.5ug/ml) ; lane 4, BP(5ug/ml)

여 각 농도별(방법 참조)로 투여했을때 2.5ug/ml의 BP 농도에서 발현의 강도가 가장 높았으며 5.0ug/ml에서는 오히려 감소하는데 이는 세포의 생육이 억제된 현상으로 여겨진다.

BP와 DMBA에 의한 사람 lymphoblast NC-37 세포에서 c-myc과 c-H-ras 위치의 DNA 유전자 변화와 RNA의 발현

정상적인 NC-37 세포에 투여한 BP 또는 DMBA에 의한 유전자 변화를 관찰하고 이에 TPA의 영향을 관찰하고 또한 Burkitt lymphoma 세포(Raji)와 비교 관찰한 결과, SmaI으로 절단한 c-myc DNA에서 2.0 kb의 띠를 보였으며 SacI으로 절단한 c-H-ras에서는 2.9kb의 위치에서 띠를 보였는데 이는 각 lane 1의 대조군과 비교하여 차이가 없었다(Fig. 5). c-myc과 c-H-ras 유전자의 발현은 Fig. 8에서 보는 바와 같이 정상 대조군(lane 1)에 비교하여 각군이 전부 증가하였다. 그러나 c-myc RNA 발현에서는 DMBA 또는 BP단독 투여에서는 BP투여군의 RNA 발현이 더 증가하였고(lane 2, 4) Burkitt lymphoma(lane 6)에서 높은 증가를 보였다. 또한 TPA 동시 투여에서는 DMBA+TPA투여군의 발현은 DMBA단독 투여보다 증가한 반면 BP+TPA투여군에서는 BP단독 투여 보다 오히려 감소(lane3, 5)하였다. 이를 slot blot 분석으로 확인한 결과에서는 DMBA+TPA 투여군에서 가장 높았으며 1.25

ug에서도 각군과 비교하여 차이가 있었다(Fig. 9). c-H-ras 유전자는 정상 대조군에 비교하여 각군이 약간의 증가가 있었으나 상호간에 뚜렷한 차이점은 발견할수 없었다(Fig. 8B) 이 결과에서 BP, DMBA 및 TPA 투여에서 SmaI로 절단한 c-myc부위가 정상 대조군과 일치한다는 것은 exon 1이 존재하는 이 부분에서 size에서는 변화가 없다는 것을 뜻한다. 그러나 BP 혹은 DMBA에 TPA를 같이 투여한 경우에 일반적으로 murine이나 human fibroblast에서 TPA에 의해 c-myc mRNA를 증가시킨다^{47,48)}고 한것과 꼭 일치하지는 않았다. 따라서 BP+TPA에서 c-myc 발현을 감소시키고 DMBA+TPA에서 발현이 증가하는 것은 세포의 성장과 분화에 세포의 종류와 개체에 따라 다르다는 것을 의미한다^{49, 50)}. c-myc과H-ras 유전자는 임파종, 백혈병, 또는 골수에서 발병하는 악성종양등에 관계가 있다^{51, 52, 53)}하고 발암물질인 3-methyl-4-diaminoazobenzene에 의해 발생한 rat liver tumor에서 증가⁵⁴⁾한다 하나 본연구의

H-ras유전자의 발현에서 TPA투여군이나 투여치 않은군에서 대조군과 비교하여 각군의 미세한 증가는 있으나 c-H-ras유전자에는 TPA가 관여하지는 않는 것으로 보이며 NC-37 세포에서는 정상세포가 악성세포로 형질전환하는데 두 개이상의 활성화된 암 유전자의 협동²¹⁾이 이루어 지지 않고 있음을 알수있었다.

BP 투여한 NC-37세포에서 중합효소 연쇄반응 기법에 의한 c-myc유전자의 증폭

상기의 연구결과에서 BP에 의한 c-myc유전자의 구체적인 작용부위를 알기 위하여, 각각의 시료로 부터 얻어진 template DNA에서 중합효소 연쇄반응에 의한 c-myc의 promoter부위와 exon I을 포함하고 있는 부분을 증폭하여 c-myc 절편을 얻었다. primer는 exon I의 upstream 쪽에 위치한 SmaI 부위와 exon I의 downstream 쪽에 위치한 SacI부위(Fig. 1 참조)를 사용하여 증폭시킨 유전자(1055 bp)를 전기영동으로 확인한 결과(Fig. 4), 정상군에 비해 BP 투여군 및 BP 제거군에서 중합효소 연쇄반응에서 증폭의 수율은 일정치 않으나 같은 크기의 유전자로서 차이가 없음을 보여 주었다.

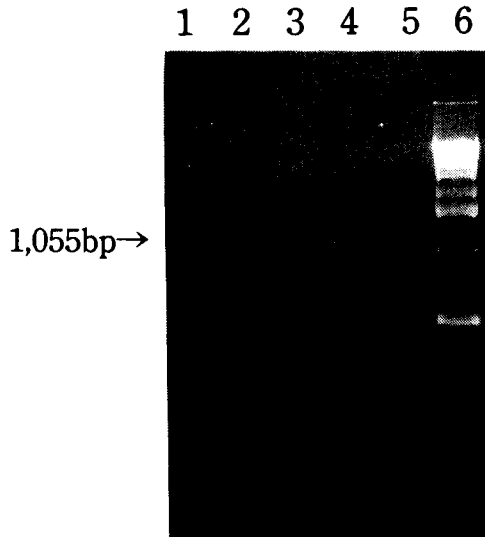


Fig. 4. PCR amplification of genomic DNA of NC-37 cells treated with BP
The amplified product was analyzed by electrophoresis through 1.2% agarose gel.
Lane 1, control ; lane 2, BP(1.25ug/ml) ; lane 3, BP(2.5ug/ml) ; lane 4, BP(5ug/ml) ; lane 5, negative control ; lane 6, 1Kb DNA ladder

Subcloning vector를 이용한 c-myc 부위의 유전자 변화

이와같이 c-myc의 크기에는 변화가 없으나 발현에 많은 증가가 구조적인 변화에 영향이 있을것으로 보고 사람 c-myc 유전자를 pBR322 vector에 subcloning(pHSRI c-myc)한 숙주세포를 배양 과정중 BP를 농도별로 투여하고 분리된 c-myc DNA의 변화를 관찰하였다. 분리한 plasmid DNA는 EcoRI/HindIII와 SmaI/XbaI으로 절단한 후 전기영동을 실시하고 Southern blot hybridize하였다. Fig. 8에서 보는바와 같이 농도별(2, 4, 8ug/ml)투여한 각군을 대조군과 비교하여 보면 고농도의 lane 3, 4에서는 대조군의 1.3kb 절편과 차이가 없으나 2ug/ml의 BP를 투여한 lane 2에서는 1.3Kb 절편과 SmaI 위치가 절단되지 않은 것으로 여겨지는 3.5Kb절편의 DNA 띠를 볼수있었다. 이를 확인하기위하여 pHSRI c-myc DNA를 SmaI/SacI site를 가지고 있는 primer를 사용하여 중합효소 연쇄반응으로 증폭하여 1.2% agarose gel 전기영동을 실시한 결과에서 정상군과 마찬가지로 BP투여군에서도 증폭이 되었으며 합성

Benzo(a)pyrene과 dimethylbenz(a)anthracene에 의한 사람 림프아 세포(NC-37)의 c-myc, c-H-ras 유전자 변화

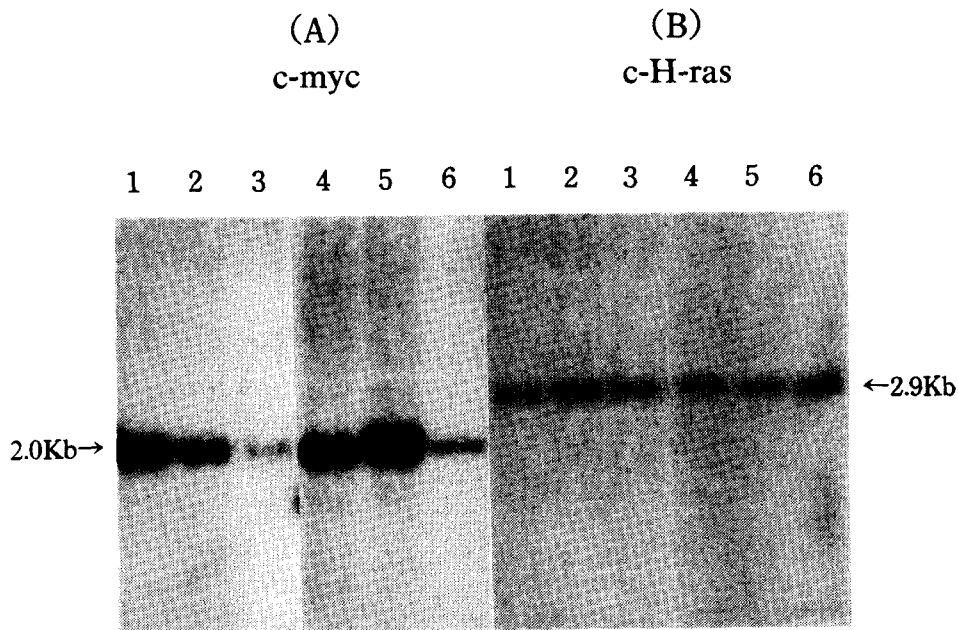


Fig. 5. Southern blot analysis of c-myc(A) and c-H-ras(B) gene in NC-37 cells treated with DMBA, BP and TPA. DNA was digested with SmaI(A) or SacI(B), electrophoresed in 1% agarose gel and hybridized to ³²P-labeled c-myc or c-H-ras probes as described in "Materials and Methods". Lane 1, control DNA; lane 2, DMBA(1.5ug/ml); lane 3, DMBA(1.5ug/ml)+TPA(125ng/ml); lane 4, BP(2.5ug/ml); lane 5, BP(2.5ug/ml)+TPA(125ng/ml); lane 6, Raji DNA

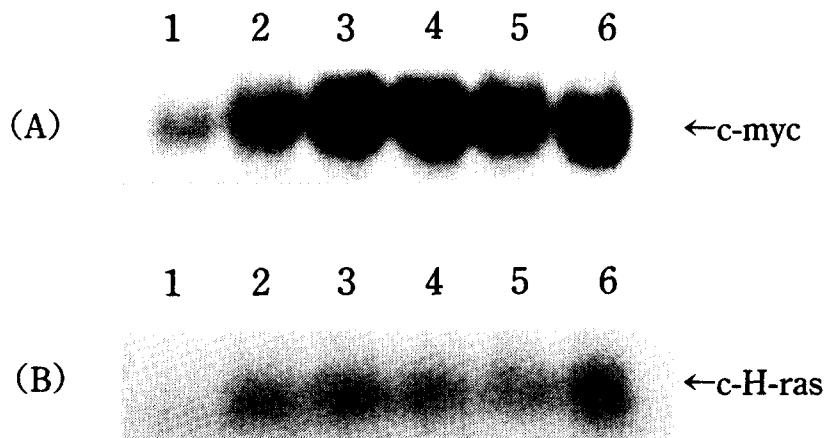


Fig. 6. Expression of c-myc(A) and c-H-ras(B) in NC-37 cells treated with DMBA, BP and TPA. One ug of poly(A)-containing RNAs were electrophoresed in denaturing agarose gel and hybridized to ³²P-labeled c-myc or c-H-ras probes as described in "Materials and Methods". Lane 1, control RNA; lane 2, DMBA(1.5ug/ml); lane 3, DMBA(1.5ug/ml)+TPA(125ng/ml); lane 4, BP(2.5ug/ml); lane 5, BP(2.5ug/ml)+TPA(125ng/ml); lane 6, Raji RNA

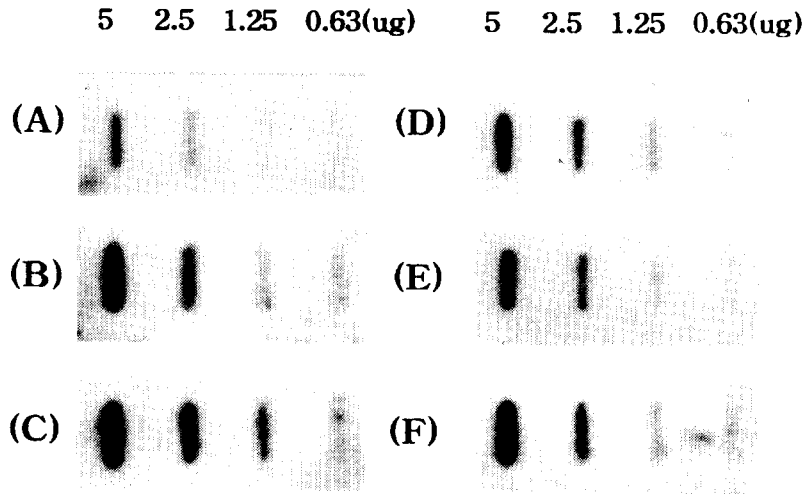


Fig. 7. Slot blot analysis of c-myc RNA in NC-37 cells treated with DMBA, BP and TPA

The indicated amount of total RNA isolated NC-37 cells were spotted on nitrocellulose paper and hybridized with the ^{32}P -labeled c-myc probe as described in "Materials and Methods". (A), control RNA ; (B), DMBA(1.5ug/ml) ; (C), DMBA(1.5ug/ml) + TPA(125ng/ml) ; (D), BP(2.5ug/ml) ; (E), BP(2.5ug/ml) + TPA(125ng/ml) ; (F), Raji RNA

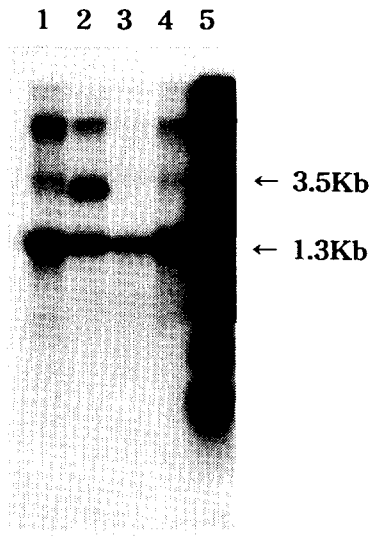


Fig. 8. Southern blot analysis of human c-myc DNA transformed into E. coli treated with BP

The experiments were performed as described in "Materials and Methods".

DNA was digested with HindIII/EcorRI and SmaI/XbaI. Lane 1, control DNA ; lane 2, BP(2 ug/ml) ; lane 3, BP(4ug/ml) ; lane 4, BP(8ug/ml) ; lane 5, 1kb DNA ladder

되는 크기는 1055bp의 위치에서 나타나고 상호간에 차이가 없었다.(Fig. 9) 이는 중합효소 연쇄반응에서 크기에 차이가 없는 것으로 보인다.

c-myc 유전자의 exon 1 upstream 부위의 DNA 염기서열

3.5 Kb의 DNA의 염기서열을 확인하기 위하여 c-myc 유전자의 exon 1의 upstream에 위치한 1960번-2511번 까지 PCR로 증폭하여 Taq polymerase를 이용한 direct sequencing 방법으로 실행하였다. 2227번 위치의 염기서열이 G가 A으로 바뀌었으며 이자리가 제한효소 SmaI의 작용부 위이기도 하였다. 정상적인 세포에서의 c-myc 유전자의 발현은 first exon sites에 존재하며 여기에 donor splite site가 있고 여기에 20k protein이 code 할수 있으며 여기로부터 upstream 쪽으로 stop codon을 인지할수 있는 large open reading frame이 있고⁵⁵⁾ 이 상태에서는 transforming activity가 없다고 한다. 그러나 이전의 연구자들이 전사 과정의 조절 및 deregulation의 model^{56, 57)}에서 제안한거와 같이 정상적인 c-myc 유전자에 억제자(repressor)가 결합하면 전사 준위(transcriptional level)의 조절작용을 방해하고, c-myc 유전자를 잘라내던가, 결손 혹은 exon 1 주변

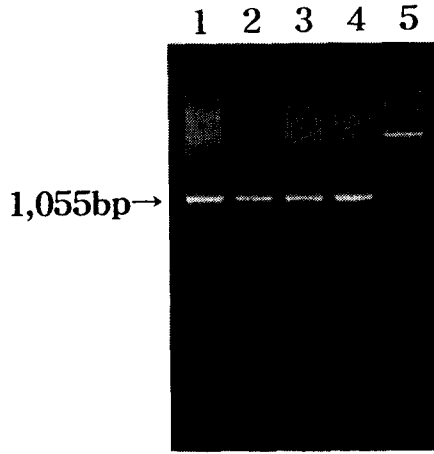


Fig. 9. Amplification of the DNA extracted from *E. coli* treated with BP
The amplified product was analyzed by electrophoresis through 1.2% agarose gel.
Lane 1, control; lane 2, BP(2ug/ml); lane 3, BP(4ug/ml); lane 4, BP(8ug/ml); lane 5, DNA marker

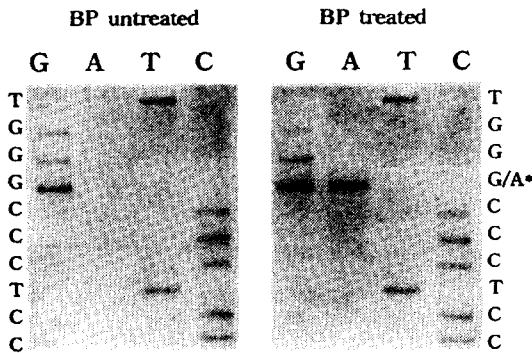


Fig. 10. Direct sequences of PCR products from human c-myc DNA transformed into *E. coli* treated with BP
The experiments were performed as described in "Materials and Methods".

이 돌연변이되어 억제자의 결합이 배제되면 불규칙한 c-myc 발현이 될수있다고 한다. 본 연구에서 BP에 의해 c-myc 유전자에 직접적인 영향을 준 부위는 Exon I의 upstream에 위치한 P1 promoter 근처에 영향을 준다는것을

알수 있었다. 정상적인 원암 유전자 c-myc의 조절 능력이 상실되면 promoter부위가 P2에서 P1으로 이동 한다⁵⁸⁾고 한다. 따라서 유전자의 손상은 발암물질이 활성을 나타내는 작용 부위가 다르기때문인 것으로 보이며, 또한 c-myc의 전사 과정이 이들 promoter의 upstream과 downstream에 존재하여 양성적 혹은 음성적으로 작용하는 구성성분에 의해 조절^{59, 60)}되어지는 것으로 보여진다.

요 약

화학 발암물질에 의한 c-myc유전자의 변화를 관찰하기 위해 Benzo(a)pyrene(BP)과 dimethylbenzanthracene(DMBA)을 투여한 사람 림프아 NC-37세포에서 c-myc유전자의 발현과 활성을 Southern blot과 Northern blot hybridization 기법으로 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 여러 농도(1.25, 2.5, 5.0ug/ml)의 BP로 처리된 사람 림프아 NC-37 세포를 HindII/XbaI 제한 효소로 절단하였을 때 c-myc유전자는 BP농도에 상관없이 일정한 위치에서 절단되었으며 2.5ug/ml의 농도에서 가장 많이 발현되었다. NC-37세포에 BP와 DMBA의 단독 및 TPA의 동시 투여와 Burkitt's lymphomas세포의 c-myc과 c-H-ras의 유전자 발현에서, 정상대조군에 비교하여 발현은 전부 증가하였다. BP+TPA투여군은 BP단독 투여군보다 c-myc유전자 발현이 감소한 반면, DMBA+TPA투여군은 DMBA단독 투여군에 비해 증가하였다. 또한 c-H-ras유전자의 발현은 정상 대조군에 비교하여 각군이 약간의 증가가 있으나 상호간에 차이는 없었다. BP를 농도별로 투여한 NC-37세포에서 분리한 DNA를 c-myc exon I을 포함하는 primer를 사용하여 중합효소 연쇄반응 기법으로 증폭하였을때 DNA는 모두 같은 크기로 나타났다. pHSRI c-myc plasmid의 BP에 의한 유전자 변화를 보기 위하여 c-myc유전자를 EcoRI/HindIII와 SmaI/XbaI으로 절단하여 Southern hybridization을 실시하였을때 2ug/ml의 BP투여군에서는 정상세포에서 나타나는 1.3Kb 이외에 3.5Kb의 절편을 얻었으며 염기서열 결정에서 SmaI 위치의 G→A로 바뀌었음을 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 고신대학교 의학부 기초 임상 공동연구비(19

93년도)로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Cole, M.D. : The myc oncogene : Its role in transformation and differentiation. *Annu.Rev.Genet.*, 20, 361 (1986)
2. Kelly, K., Siebenlist, U. : The role of c-myc in the proliferation of normal and neoplastic cells. *J.Clin. Immunol.*, 5, 65 (1985)
3. Spandidos, D.A. : Mechanism of carcinogenesis : the role of oncogenes, transcriptional enhancers and growth factors. *Ann. Cancer Res.*, 5, 485 (1985)
4. Thompson, N.L., Mead J.E., Braun L., Goyette M., Shank P.R., Fausto, N. : Sequential protooncogene expression during rat liver regeneration. *Cancer Res.*, 46, 3111 (1986)
5. Cote G.J., Lastra B.A., Cook J.R., Huang D.P., Chiu J.F. : Oncogene expression in rat hepatomas and during hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.*, 26, 1221 (1985)
6. Hayashi K., Makino R., Sugimura T. : Amplification and overexpression of the c-myc gene in Morris hepatomas. *Gann.*, 75, 475 (1984)
7. Huber, B.E., Thorgeirsson, S.S. : Analysis of c-myc expression in a human hepatoma cell line. *Cancer Res.*, 47, 3414 (1987)
8. Tashiro, F., Morimura, S., Hayashi, K., Makino, R., Kawamura, H., Horikoshi, N., Nemoto, K., Ohtsubo, K. : Expression of the c-Ha-ras and c-myc genes in aflatoxin B1-induced hepatocellularcarcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138, 854 (1986)
9. Zhang X.K., Huang D.P., Chiu D.K., Chin J.F. : The expression of oncogenes in human developing liver and hepatomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142, 932 (1987)
10. Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos,E., Barbacid, M. : A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 bladder carcinoma oncogene. *Nature*, 300, 149 (1982)
11. Shimizu, K., Goldfarb, M., Suard, Y., Perucho, M., Li, Y., Feramisco, J., Stavnezer, E., Fogh, J., Wifler, M.H. : Three human oncogenes are related to the viral ras oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2112 (1983)
12. Eva, A., Aaronson, S. : Frequent activation of c-kis as a transforming gene in fubrosarcomas induced by methylcholanthrene. *Science*, 220, 955 (1983)
13. Baldmain, A., Ramsden, M., Bowden, G.T., Smith, J. : Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature*, 307, 658 (1984)
14. Sukumar, S., Noratio, V., Martin-Zanca, D., Barbacid, M. : Induction of mammary carcinomas in rats by N-nitroso-methylurea involves malignant activation of Ha-ras-1 locus by single point mutations. *Nature*, 306, 658 (1983)
15. Klein, G. : The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis. *Nature*, 294, 313 (1981)
16. Dunnick, W., Shell B.E., Dery C. : DNA sequences near the site of reciprocal recombination between a c-myc oncogene and an immunoglobulin switch region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 7269 (1983)
17. MacDonald, R.J., Swift, G.H., Przybyla, A.E., Chirgwin, J.M. : Isolation of RNA using guanidium salts. *Method. Enzymol.*, 152, 219 (1987)
18. Erickson, J., Nishikura, K., Ar-Rushidi, A., Finan, J., Emanuel B., Lenoir, G., Nowell, P., Croce, C. : Translocation of an immunoglobulin kappa locus to a region 3 of an rearranged c-myc oncogene enhances c-myc expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 7581 (1983)
19. Land, H., Parada, L., Weinberg, R. : Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblast requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, 304, 596 (1983)
20. Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D., Leder, P. : Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogen and platelet-derived growth factor. *Cell*, 35, 603 (1983)
21. Goyette, M., Petropoulos, C.J., Shank, P.R., Fausto, N. : Expression of cellular oncogene during liver regeneration. *Science*, 219, 510 (1983)
22. Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R., Croce, C.M. : Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7824 (1982)
23. Neel, B.G., Jhanwar, S.C., Chaganti, R.S.K., Hayward, W.S. : Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7842 (1982)
24. Taub, R., Kirsch, I., Morton, G. et al. : Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79,

- 7837 (1982)
25. Rabbits, T.H., Hamlyn, P.H., Bear, R. : Altered nucleotide sequences of a translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Nature*, 706, 760 (1983)
 26. Dalla-Favera, R., Wong-Staal, F., Gallo, R.C. : Onc gene amplification in promyelocytic leukemia cell line HL60 and primary leukemic cells of the same patient. *Nature*, 299, 61 (1982)
 27. Hamlyn, P.H., Rabbits, T.H. : Translocation joins c-myc and immunoglobulin-1 genes in a Burkitt lymphoma revealing a third exon in the c-myc oncogene. *Nature*, 304, 135 (1983)
 28. Alitalo, K., Schwab, M., Lin, C.C., Varmas, H.E., Bishop, J.M. : Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80,1707 (1983)
 29. Little, C.D., Nau, M.M., Carney, D.N., Gazdor, A.F., Minna, J.D. : Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature*, 306, 194 (1983)
 30. Shibuya, M., Yokota, J., Ueyama, Y. : Amplification and expression to a cellular oncogene (c-myc) in human gastric adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 5, 414 (1985)
 31. Bentley DL, Groundine M : Sequence requirements for premature termination of transcription in the human c-myc gene. *cell*, 53, 245 (1988)
 32. Santos, E., Reddy, E.P., Pulciani, S., Feldman, R.J., Barbacid, M. : Spontaneous activation of human protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4679 (1983)
 33. Fujita, J., Srivastava, S.K., Krous, M.M., Rhim, J.S., Tronich, S.R., Aaronson S.A. : frequency of molecular alterations affecting ras proto-oncogene in human urinary tract tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3849 (1985)
 34. Johannes, L.B., Matty, V-de.V., Alex, J.E., Johanns, W.G.J., Rund, D.L., Loes, P.C. : Mutation in N-ras predominates in acute myeloid leukemia. *Blood*, 69, 1237 (1987)
 35. Noguchi, M., Hirohashi, S., Shimosato, Y et al. : Histologic demonstration of antigens reactive with anti-p21 ras monoclonal antibody(rap-5) in stomach cancer. *JNCI*, 77, 379 (1986)
 36. Ohuchi, N., Hand, P.H., Merlo, G. et al. : Enhanced expression of c-Ha-ras p21 in human stomach adenocarcinomas defined by immunoassays using monoclonal antibodies and in situ hybridization. *Cancer Res*, 47, 1413 (1987)
 37. Viola, M.V., Fromowitz, F., Oravez, S., Deb, S., Schlom, J. : Ras oncogene p21 expression is increased in premalignant lesions and high-grade bladder carcinoma. *J.Exp.Med.*, 161, 1213 (1985)
 38. Feig, L.A., Bast, R.C.Jr., Knapp, R.C., Cooper, G.M. : Somatic activation of ras gene in a human ovarian carcinoma. *Science*, 223, 698 (1984)
 39. Ohuchi, N., Thor, A., Page, D.L., Hand, P.H., Halter, S.A., Schlom, J. : Expression of the 21,000 molecular weight ras protein in a spectrum of benign and malignant human mammary tissues. *Cancer Res*, 46, 2511 (1986)
 40. Viola, N.V., Fromowitz, F., Oravez, S. et al. : Expression of ras oncogene p21 in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, 314, 133 (1986)
 41. Pulciani, S., Santos, E., Long, L.K., Sorrentino, V., Barbacid, M. : Ras gene amplification and malignant transformation. *Mol. Cell Biol.*, 5, 2836 (1985)
 42. Blin, N., Stafford, D.W. : A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res.*, 3, 2303 (1976)
 43. Chomczynski, P., Nicoletta S. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156 (1987)
 44. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. : Molecular cloning, 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)
 45. Shen-ong, G.L., Keath E.J., Piccoli, S.P., Cole M.D. : Novel myc oncogene RNA from abortive immunoglobulin gene recombination in mouse plasmacytomas. *Cell*, 31, 443 (1982)
 46. Sugiyama, A., Kume, A., Nemoto, K., Lee, S.Y., Asami, Y., Nemoto, F., Nishimura, S., Kuchino, Y. : Isolation and characterization of s-myc, a member of the rat myc gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 4091 (1989)
 47. Bravo, R., Bravo, H.M., Muller, R., Hubsch, D. : Bombesin induces c-fos and c-myc expression in quiescent swiss 3T3 cells. *Exp. Cell Res.*, 170, 103 (1987)
 48. Suzuki, H., Fujita, H., Ogiso, Y., Oda, A., Kuzumaki, N., Uchino, J. : Reduced induction of c-fos but not of c-myc expression in a nontumorigenic revertant R1 of EJ-ras-transformed NIH/3T3 cells treated with TPA. *Exp. Cell Res.*, 184, 524 (1989)
 49. David, M., Michael, C., Samuel, Y., Katherine, B., James, A., Vikas, S., John, C.R. : Phorbol ester-media-

- ted inhibition of growth and regulation of protooncogene expression in the human T cell leukemia line JURKAT. *Oncogene*, 6, 455 (1991)
50. Bos, J.L. : Ras oncogenes in human cancer : a review. *Cancer Res.*, 49, 4682 (1989)
 51. Slamon, D.J., deKernion, J.B., Verma, I.M., Cline, M.J. : Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science*, 224, 256 (1984)
 52. Giallongo, A., Appella, E., Ricciardi, R., Rovera, G., Croce, C.M. : Identification of the c-myc oncogene product in normal and malignant B cells. *Science*, 222, 430 (1983)
 53. Rovigatti, U.G., Astrin, S.M. : Cellular oncogenes : enhancement of their expression in animal and human tumors. In : Pearson ML, Sternberg NL, eds. *Gene Transfer and Cancer*. New York, NY : Raven Press, 207 (1984)
 54. Cote, G.J., Lastra, B.A., Cook, J.R., Huang, D.P., Chiu, J.F. : Oncogene expression in rat hepatomas and during hepatogenesis. *Cancer Lett.*, 26, 121 (1985)
 55. Collins, S., Groundine, M. : Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukemia cell line. *Nature*, 298, 679 (1982)
 56. Leder, P., Battey, J., Lenoir, G., Moulding, C., Murphy, W., Potter, H., Stewart, T., Taub, R. : Translocations among antibody genes in human cancer. *Science*, 222, 765 (1983)
 57. Rabbitts, T.H., Forster, A., Hamlyn, P.H., Baer, R. : Effect of somatic mutation within translocated c-myc genes in Burkitt lymphomas. *Nature*, 309, 592 (1984)
 58. Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., Leder, P. : Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7837 (1982)
 59. Chung, J., Sinn, E., Reed, R.R., Leder, P. : Transacting elements modulate expression of the human c-myc gene in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 7918 (1986)
 60. Mulder, K.M., Levine, A.E., Hinshaw, X.H. : Up-regulation of c-myc in a transformed cell line approaching stationary phase growth in culture. *Cancer res.*, 49, 2320 (1989)