

사람 NC-37 세포에서 Benzo(a)pyrene과 Doxorubicin에 의한 Nuclei 내전과 *c-myc* 유전자의 발현에 대한 연구

김호찬 · 정인철* · 조무연*†

고신대학교 의학부 신경정신과학교실
*생화학교실

Studies on the Nuclei Adduction and Expression of *c-myc* Gene by Benzo(a)pyrene and Doxorubicin in Human NC-37 Cells

Ho Chan Kim, In-Cheol Jeong*, and Moo-Youn Cho*†

Department of Neuropsychiatry, Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea
*Department of Biochemistry

Abstract

Formation of adduct was studied in benzo(a)pyrene(BP)- and doxorubicin(Dx)-treated human NC-37 cells and isolated nuclei. Major adducts formed were determined by fluorescence absorption spectrophotometry and DNA-linked protein assay. When isolated nuclei were exposed to carcinogens BP and DMBA, and anticancer drugs m-AMSA, ellipticine and Dx, varying degrees of adduct formation occurred between DNA-protein complex and these drugs. When the mixture was centrifuged with 1.7 M sucrose solution, binding BP and DMBA appeared to be similar between the sediment and the supernatant. When the sediment was centrifuged again with 0.35% polymin-P, the amount of BP bound was 2-fold greater in the protein(1077±55cpm) than in DNA fraction (470±20cpm), whereas that of DMBA was 1.6-fold greater in the DNA than in protein fraction. In the case of m-AMSA, ellipticine and Dx, the amount of binding was slightly greater in supernatant than in sediment in centrifugation with 1.7 M sucrose, and more than 3 times greater in the DNA- than in protein-fraction in centrifugation with 0.35% polymin-P. DNA fractions which associated with a subset of nonhistone chromosomal protein were isolated from NC-37 cells exposed to ³H-BP and ¹⁴C-Dx. They were separated into two distinct components DNA-S and DNA-P by centrifugation with 2M NaCl chromatin extraction. The results indicated that the amount of ³H-BP bound was 6.0-fold greater in DNA-P as compared with DNA-S, while that of ¹⁴C-Dx binding appeared to be 6.1-fold greater in DNA-S than in DNA-P fraction. When ³H-BP binding was determined in the presence of cold Dx, the amount of binding was reduced only in the DNA-P fraction, indicating that the interaction between DNA and protein is decreased. Gene expression by these drugs, BP treated cells were increased to compare with normal cells but reduced by treatment with BP-Dx.

These results suggest that the protein moiety which tightly bound to DNA-P fraction may play an important role in the regulation of gene expression.

Key words : *c-myc*, benzo(a)pyrene, doxorubicin, NC-37 cell

† Corresponding author

서 론

암을 일으키는 화학물질로 잘 알려진 것으로 polycyclic aromatic hydrocarbon, azo-dye, acetyl amino fluorene, nitrosamine, nitroamides와 ethionine 등이 있다. 화학물질이 암을 유발하는데는 유전자에 직접적인 손상을 주어 회복이 안되던가 유전자에 변이를 일으키어 부분별 증식에 의한 신생종양이 발생한다고 보기 때문에 이에 대한 여러 가지 화합물의 종양성에 대한 연구로 DNA를 중심으로 활발히 진행되고 있다. 그간의 연구에서 종양을 일으키는 기전에 대해서는 발암 물질이 직접 DNA를 공격한다던가, 그들의 대사산물이 DNA에 결합하여 돌연변이를 일으켜 암이 되는 것으로 말하여 왔다^{1,2,3,4)} 그렇기 때문에 많은 연구자들이 이를 DNA-carcinogen adduct(내전)이라 하고 Estman과 Bresnicks⁵⁾는 mice에서 DNA-methyl- cholanthrene 약물의 내전이 신생종양의 전이에 직접적인 원인이 된다 하였으며 Arrend와 Murray⁶⁾ nontarget로 작용하는 섬유아 세포 보다는 target 조직으로 작용하는 human의 폐상피세포의 DNA가 benzo(a)pyrene(BP)대사 산물과 결합을 잘 한다고 하였다. 또한 발암물질은 화학적 성질과 반응성을 나타내기 위해 다수의 고분자 표적소(target site)를 가진다. 따라서 기본적으로 처음 손상을 주는 것은 DNA 결합에 의한 것으로 생각하고 이차적으로 chromosomal protein을 modification 시킬것으로 여겨왔다^{7,8)}. 그러나 Jungmann과 Schweppe⁹⁾는 백서 간에서 분리한 Chromosoma1 단백질과 동위원소로 표지한 N-hydroxy-N-2-fluoroenyl acetamide, -dimethylaminobenzene을 결합시켜 관찰한 결과에서 histone과 nonhistone에 상호 작용이 있음을 발견하였고 Vaught와 Bresnick¹⁰⁾은 백서 간장 nuclei를 BP와 항온 시켰을 때 결합 친화성이 DNA보다 chromosomal 단백질에 있음을 관찰하였으며 BP가 결합하는 active fraction을 측정했을 때 BP가 단백질에서는 94%, RNA 5%, DNA 1%가 결합한다고 하였다¹¹⁾. 최근의 연구에서는 nucleus에 고농도의 염을 처리한 경우 남아있는 단백질의 중요성을 지적하였으나^{12,13,14)}, 지금까지 알려지기는 DMBA, aflatoxin 및 BP가 DNA-adduct로 알려져 있다^{15,16,17,18)}. 반면에 항암제로 작용하는 polyaromatic anthracene 화합물에서 amsacrine, doxorubicin등은 DNA와의 상호작용에 의해 유전자 전이에 영향을 주며^{19,20)}, epipo-

dophy1otoxin(VM-26, VP-16)은 DNA보다 단백질에 작용하는 것으로 알려져 있다. 이와같이 polycyclic hydrocarbon 화합물이면서도 유전자에 작용하는 항암제와 발암제의 특이성은 알수가 없다.

본 연구에서는 강력한 발암제로 작용하는 BP, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene(DMBA)과 항암제로 작용하는 m-AMSA, ellipticine, doxorubicin(Dx)을 사용하여 in vitro 실험으로 nucleus에서의 작용을 관찰하고, in vivo에서 ³H-BP와 ¹⁴C-Dx을 투여한 사람 림프아 NC-37 세포에서 chromatin 분획(fraction)에 내전이 어떻게 이루어 지고 있으며, DNA-단백질 결합 친화성(binding affinity)에 미치는 영향을 조사하여 유전자 변이와의 상관 관계를 구명하고자 하였다.

실험 재료 및 연구 방법

1. 시약 및 재료

Human NC-37(CCL214)세포는 ATCC(USA)에서 구입하였으며 ³H-Benzo(a)pyrene, ¹⁴C-Doxorubicin, α -³²P-dCTP, Hyperfilm-MP, Hybond N⁺, mutilabeling kit은 Amersham Co(USA), benzo(a)pyrene, doxorubicin, 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene, amsacrine(m-AMSA), ellipticine, Tris-HCl, diphenylamine, proteinase K, dithiothreitol, phenylmethanesulfonylfluoride는 Sigma Co.에서 구입하였으며, agarose, XbaI, HindIII는 GIBCO-BRL(USA)에서 구입하였다. pHSRI는 연세대학교 의과대학 유전공학 연구소에서 제공받았으며, 그외의 일반적인 시약은 분석용으로 특급 및 1급을 사용하였다.

2. 세포배양 및 nuclear extract의 분리

사람 림프아 NC-37세포를 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640 medium을 사용하여 5%의 CO₂와 37℃가 유지되는 75cm² 또는 25cm²의 배양 flask에 넣어 10일간 배양한후에, 실험군으로 단독 투여군에서는 ³H-BP(5 μ Ci/ml)와 cold BP(10⁻⁶M) 혹은 ¹⁴C-Dx (0.01 μ Ci/ml)와 cold Dx(5⁻⁶M)을 투여하여 2일간 더 배양하여 harvest한 군과 ³H-BP에 cold BP를 넣고 2일간 배양한 다음, 정상 배양액으로 씻어 내고 cold Dx을 투여하고 1일간 더 배양한 군 또는 cold BP를 넣고 2일간 배양한 후 정상 배

양액으로 씻어 내고 ^{14}C -Dx 과 cold Dx을 넣어 1일간 더 배양한 균으로 나누어 배양하고 harvest 하였다. 이세포에서 nuclear 추출물(extract)를 Minford 등²¹⁾의 방법을 일부 변형하여 분리하였는데 이 세포는 Sorvall 3000rpm에서 원침하여 배양액을 버리고 차거운 washing buffer(10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 0.14M NaCl)로 3번 씻어 내어 회수하였다. 이를 -70°C 에 사용할 때 까지 보관하였다.

3. Chromatin 분획의 분리

동결 보관한 세포를 4°C 에서 녹여 Triton X-100이 들어 있는 lysing buffer(10mM Tris-HCl, 1.5mM MgCl_2 , 0.1 M NaCl, 0.1mM PMSF, pH7.9)에 깨트렸다. 여기서 나온 nuclei를 3000rpm에서 5분간 원침하였으며 이 nuclei에서 Triton X-100을 제거하기 위해 TPD(10mM Tris-HCl, 0.2mM dithiothreitol, 0.1mM PMSF, pH8.0)용액으로 재차 씻어 냈다. Nuclei를 Wheaton's hand homogenizer로 균질화시켜 깨트렸으며 1.7 M sucrose가 함유된 TPD용액을 2 vol넣고 혼합하고 15,000rpm에서 원침하여 2M NaCl의 chromatin 분획을 얻기위해 Bekhor와 Mirell의 방법²²⁾을 사용하였다.

4. Polycyclic hydrocarbon 화합물중 BP, DMBA와 m-AMSA, ellipticine, Dx 들에 대한 fluorescence scanning

Polycyclic hydrocarbon 화합물중 발암물질인 BP, DMBA와 항암 물질로 알려진 m-AMSA, ellipticine, Dx을 용매에 녹여 fluorescence spectrophotometer에 scanning하여 최적의 excitation 파장과 emission 파장을 측정하여 이들의 특성 연구에 이용하였다.

5. Nuclei 분획에 대한 polycyclic hydrocarbon 화합물의 결합 친화성

NC-37 세포에서 위에 기술한 방법으로 분리한 nuclei를 사용하여 polycyclic hydrocarbon 화합물과 37°C 수욕에서 30분간 반응시킨 후 1.7M sucrose 용액에 의한 분획과 이의 침전물에 0.35% polymin-P를 사용해서 얻어진 분획을 사용하여 fluorophotometer를 이용하여 polycyclic hydrocarbon 화합물의 농도를 측정하고 단백질과 DNA에 결합한 polycyclic hydrocarbon 물질의 결합 친화성과 단백질-DNA간의 상호 작용을 조사 분석하였다.

6. Human lymphoblast NC-37 세포에서 ^3H -BP와 ^{14}C -Dx의 작용

NC-37 세포에 ^3H -BP와 ^{14}C -Dx의 단독 투여와 ^3H -BP 단독 투여군을 2일후에 정상 배지로 BP를 씻어내고 cold Dx를 투여한 배지를 사용하여 상기 방법에서와 같이 배양한후 chromatin 분획을 얻어 각 분획에 결합한 표지된 BP와 Dx의 농도를 측정하였으며, 단백질 또는 DNA와의 intercalation된 양과 결합 양상을 측정하고 단백질-DNA 상호작용에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 chromatin 추출물에서 얻어진 분획을 proteinase K를 가하여 37°C 의 항온 수조에서 overnight한 후 실온에 5분간 방치하여 phenol을 가하여 교반기에서 1분간 혼합하고 14,000rpm에서 원침하여 상층액에서 DNA와 중간의 phenol층에서 단백질을 측정하였다. 또 상기와 같은 방법으로 각각의 분획에 10%의 trichloroacetic acid를 가하여 2.5%가 되게하여 끓는수욕에 10분간 항온 한후 식혀 5,000rpm으로 원침하여 DNA가 들어있는 용액층과 침전물의 단백질층을 얻어 각각에 결합한 동위원소를 packard scintillation counter를 이용하여 측정하였으며, 이 각각의 시료에 ethylacetate용액을 넣고 1분간 교반하여 용액층과 ethylacetate층에 녹아나온 동위원소와 각각의 전체 분획에서의 동위원소를 count하였다. 단백질은 Lowry 방법²³⁾, DNA는 diphenylamine 방법²⁴⁾으로 측정하였다.

7. BP와 Dx에 의한 human NC-37 세포에서 c-myc 유전자 변화

상기 실험에서 동결 보관된 세포를 이용하여 RNA는 guanidine-HCl를 사용한 Strohman과 MacDonald등의 변형된 방법²⁵⁾으로 분리하였고, northern blot은 total RNA 20 μg 을 사용하여 1.2% formaldehyde-agarose gel에서 전기영동하고 TransVac(Hoefer co.)에서 20X SSC용액을 사용하여 nylon membrane (Hybond N⁺)에 이동시켰으며, nylon membrane을 실온에서 충분히 말린 후 80°C 에서 고정하여 hybridization을 실시하였다. Hybridization에 필요한 probe는 pHSRI c-myc을 HindIII/XbaI으로 잘라 유전자의 exon 1 site를 포함하고 있는 부분을 전기용출 방법으로 분리하였고 α - ^{32}P -dCTP를 multiprime labeling kit로 표지시켜 사용하였다. hybridization은 42°C 에서 2시간 prehybridization한 후 probe를 포함한 hybridization용액

(50% formamide, 0.5% SDS, 6x SSC, 0.05x BLOTTO)에 넣어 24시간 동안 42°C에서 hybridize하였고 Hyperfilm MP를 사용하여 autoradiography 하였다²⁵⁾.

결 과

1. Fluorophotometry에 의한 polycyclic hydrocarbon 화합물의 파장 및 함량의 변화

Polycyclic hydrocarbon인 BP와 DMBA, 그리고 이와 비슷한 구조를 가지고 있는 ellipticine, m-AMSA, doxorubicin(Dx)의 고유한 파장을 알기 위하여 fluorospectrophotometer을 이용하여 scan한 결과는 그림 1에서 보는 바와 같이 BP와 DMBA는 각각 Ex.이 410, 295nm와 Em.이 515, 430nm이었으며 ellipticine, m-AMSA, Dx은 Ex.이 각각 305, 385, 470nm이고 Em.이 525, 420, 550nm이었다. 이들의 고유한 파장에서 물질의 함량의 변화를 관찰하였는데 비교적 nM 농도 까지 검출할수 있었으며 Dx인 경우 약간의 예민성이 떨어졌다.

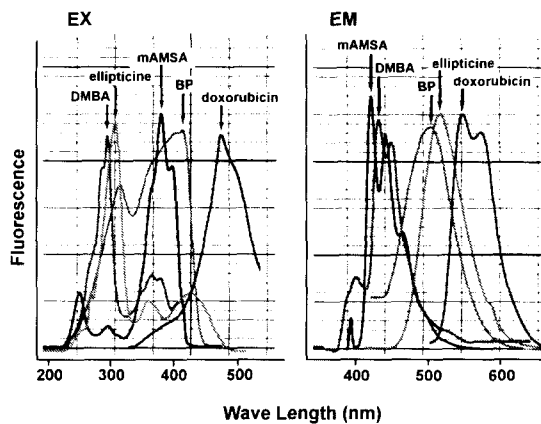


Fig. 1. Fluorescence spectra of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds
BP ; benzo(a)pyrene, DMBA ; 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, mAMSA ; 4'-(9-acridinyl-amino) methansulfon-m-aniside(Amsacrine)

2. Nuclei 분획에 내전된 발암제인 BP와 DMBA 그리고 항암제인 ellipticine, m-AMSA, Dx의 결합 친화성

Human NC-37 cell에서 분리한 nuclei를 사용하여 BP, DMBA, ellipticine, m-AMSA, Dx을 각각 넣고 내전된 결합 친화성을 관찰하였는데, 그림 2에서 보는바와 같이 1.7M sucrose 용액에서는 BP와 DMBA가 침전물과 용출액에 서로 비슷한 결합력을 가지고 있으나 m-AMSA 인 경우, 용액층이 침전층에 비해 1462±19와 549±21로 약 2.8배의 감소를 보였으며, Dx투여에서는 1464±56와 1037±33로 0.5배의 감소, ellipticine에서는 침전층에 약간의 감소가 있었다. 그러나 1.7M sucrose 침전물을 사용하여 0.35% polymin-P 방법으로 단백질과 DNA를 분리하는 과정의 결합 친화성을 측정하였을때는 BP가 단백질층에 1070±55인 반면 DNA층에는 471±20으로 단백질층에 2.3배의 증가가 있었으며 DMBA는 단백질층에 475±15, DNA층에 769±20으로 오히려 DNA층이 1.6배 높았다. m-AMSA, ellipticine, Dx인 경우 모두가 3배이상의 차이로 DNA층에 결합 친화성이 컸다.

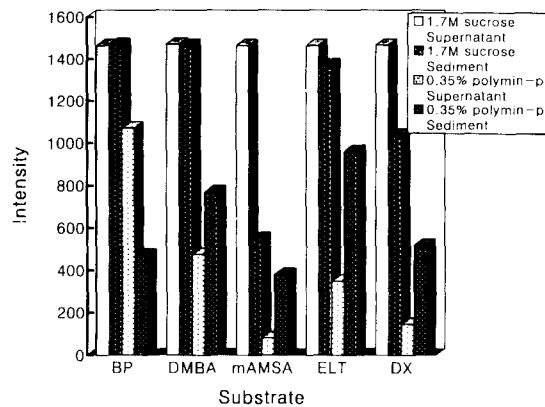


Fig. 2. Fluoro-intensity of nuclei adduct of polycyclic hydrocarbon compounds from 1.7M sucrose and 0.35% polymin-p solution
BP ; benzo(a)pyrene, DMBA ; 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, mAMSA ; 4'-(9-acridinyl-amino) methansulfon-m-aniside, ELT ; ellipticine, DX ; doxorubicin

3. Nuclear 분획에 내전된 ³H-BP와 ¹⁴C-Dx의 분포도 및 BP와 DX의 공존시 서로의 내전에 미치는 효과

Human NC-37 세포에 BP혹은 Dx을 투여하고 배양한 세포군에서 순수분리한 chromatin분획에서 BP와 Dx의 binding affinity를 관찰하고 서로 공존할 때 세포에 미치는 내전의 변화를 보기 위하여 표지된 동위원소를 사용하였다. 실험에서 측정하고자하는 약물(³H-BP와 cold BP)를 2일전에 투여하여 배양한후 washing한 다음 cold Dx을 투여하여 1일간 더 배양하였으며 반대로 cold BP를 2일전에 넣고 배양한후 씻어내고 ¹⁴C-Dx와 cold Dx를 투여하여 1일간 배양하여 harvest하였다. Nuclear 분획을 얻어 각 분획에 결합한 분포도를 알기위해 표지된 동위 원소를 scintillation counter로 측정하였는데, 결과는 chromatin에서 ³H-BP투여군은 663,930cpm,이고 DNA-S fraction에 70,865, DNA-P에 416,605cpm으로서 DNA-S에 비해 DNA-P 분획이 약 6배의 증가를 보였으며, ¹⁴C-Dx의 투여에서는 chromatin 분획이 16,820cpm이고 DNA-S에는 13,235cpm, DNA-P가 2,170cpm으로 BP 단독투여 때와 달리 DNA-S 분획이 DNA-P 분획보다 6.1배 높았다. 그러나 공존시에는 ³H-BP 군에 Dx투여에서 DNA-S분획이 20,150cpm이고 DNA-P 분획이 81,065로 양쪽 분획에 BP 단독 투여에서 보다 incorporation이 낮았고 DNA-P에 약 4배가 높았다. 또한 ¹⁴C-Dx군에 cold BP 투여에서는 DNA-S가 6,300cpm, DNA-P은 3,740으로 1.7배가 BP와는 달리 DNA-S에 증가하였다(그림 3).

4. Chromatin 분획의 DNA와 단백질에 결합한 ³H-BP와 ¹⁴C-Dx의 분포도와 BP 독성에 미치는 Dx의 효과
상기에서와 같은 방법으로 세포에서 분리한 nuclear 분

획을 각각의 실험군에 protinase K를 처리한 다음, phenol 추출에서 얻어진 상층액의 DNA와 phenol 층의 단백질에서 각각에 결합한 BP와 Dx의 동위원소를 측정할 결과 표1에서 보는바와 같이 ³H-BP군에서는 2M NaCl supernatant에서 얻어지는 histone-nonhistone 분획은 단백질에 14,035cpm이 결합되어 있고 DNA에는 6,415cpm으로 단백질과 DNA의 ratio가 2.19이었으며, DNA-S에는 단백질(27,843cpm)과 DNA(9,270cpm)으로 ratio가 3.0이었고 DNA-P 분획의 단백질 부위는 254,321cpm이고 DNA에는 42,887cpm으로 전체 합은 297,210cpm이고 서로의 ratio는 6.22이었다. 또한 Dx투여군에서는 2M NaCl supernatant 분획의 단백질과 DNA의 합은 3,570cpm이며 ratio는 0.53, DNA-S에는 전체 합이 18,940cpm, 이의 비가 0.87, DNA-P에는 전체가 4,250cpm, 1.23이었다. 이들의 경우 단독 투여에서 단백질과 DNA의 비가 BP의 DNA-P fraction에서 가장 높았다. 반면에 Dx를 투여로 인한 ³H-BP처리 군에서의 변화는 단백질과 DNA의 ratio가 각각 2.01, 2.84, 3.57로서 BP 단독 처리시와의 비교에서 2M NaCl supernatant와 DNA-S 분획은 별 차이가 없으며, DNA-P 분획에서는 전체가 261,100cpm이고 단백질과 DNA의 비가 3.57로서 DNA-P 분획 간에는 별차이가 없으나 상호간의 비에서는 약 2배의 차이가 있었다.

5. DNA-S와 DNA-P 분획의 결합 친화성의 형태

상기 방법으로 얻어진 DNA-S와 DNA-P fraction을 proteinase K digestion과 trichloroacetic acid 사용으로 단백

Table 1. Changes of DNA and protein adduct formed in chromatin fraction by ³H-BP,¹⁴C-Dx and ³H-BP of Dx treated, respectively

Fraction	Treatment	³ H-BP	¹⁴ C-Dx	³ H-BP - cold Dx
	(Ratio)	*Total cpm×10 ³ (Protein / DNA)	Total cpm×10 ³ (Protein / DNA)	Total cpm×10 ³ (Protein / DNA)
2M NaCl supernatant		*20.45	3.57	17.05
		(2.19)	(0.53)	(2.01)
DNA-S		37.11	18.94	32.31
		(3.04)	(0.87)	(2.84)
DNA-P		297.21	4.25	261.10
		(6.22)	(1.23)	(3.57)

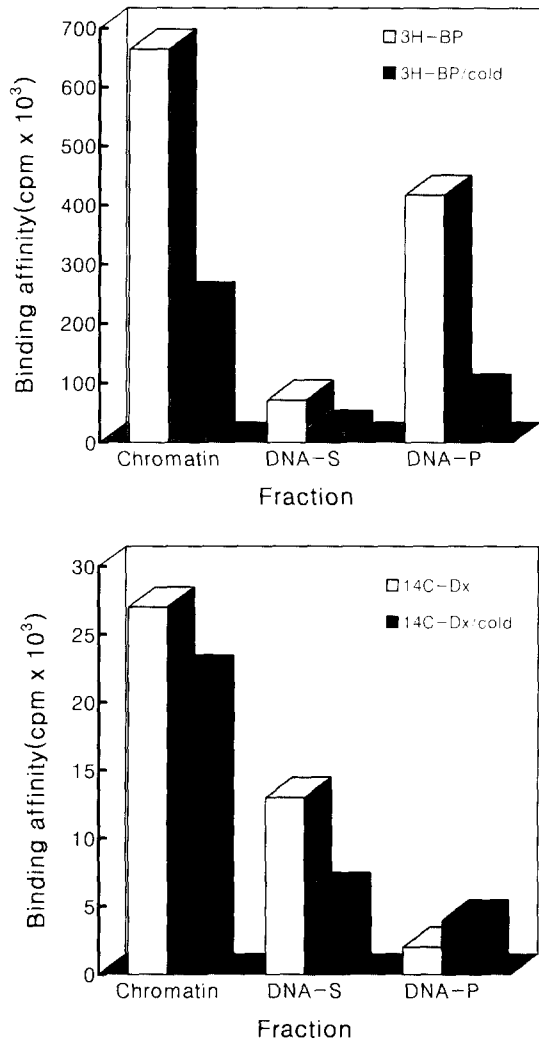


Fig. 3. The binding affinity of ³H-benzo(a)pyrene and ¹⁴C-doxorubicin in human NC-37 cells and its effects of against to cold benzo(a)pyrene and cold doxorubicin

Table 2. Contents of DNA and protein in DNA-S, DNA-P fraction with drugs treated

Treatment	BP	Dx	BP-Dx
DNA-S	146*/0.53**	196*/0.43**	246*/0.50**
DNA-P	334*/5.42**	167*/5.02**	250*/5.25**

* : μ g of DNA per ml of fraction

** : mg of Protein per ml of fraction

질과 DNA를 분리하여 정량하고 이에 결합한 공유 결합 (covalent bonding)을 조사하기 위해 ethylacetate 방법으로 실험한 결과, 표2 에서 보는바와 같이 DNA의 함량은 DNA-S와 DNA-P 분획에서 BP투여는 각각 146, 334 μ g/ml of fraction으로 2배 이상 증가하고, Dx에서는 196, 167 μ g이며 BP-Dx에서는 246, 250 μ g/ml of fraction으로 별 차이가 없다. 단백질의 함량에서는 DNA-S에서 각각 0.53, 0.43, 0.50mg/ml of fraction으로 Dx에서 약간 감소하나, DNA-P에는 5.42, 5.02, 5.24mg으로 각군에 별 차이가 없다. 이 결과 BP의 DNA-P분획에서 Dx나 BP-Dx에 비해 단백질에 결합한 DNA가 증가 했음을 볼수있다. 이들의 분획에서 결합하고 있는 양상을 보았는데(표 3), BP, Dx, 또는 BP-Dx을 각각 투여하고 분리한 chromatin 분획에서 DNA-P분획은 30, 55, 15%의 공유결합(covalent bond)형성으로 비공유결합(noncovalent bond)이 많은 반면, DNA-S에서는 66, 96, 61%로 공유결합 형성이 많았다. 이들 분획을 구성하고있는 단백질과 DNA에 결합한 BP, Dx, BP-Dx의 공유결합을 보면 BP군은 단백질과 DNA의 비가 DNA-S에 94 : 6, DNA-P는 87 : 13으로 단백질에 공유결합의 형성이 많으나 Dx은 DNA-S에 11 : 89, DNA-P에 38 : 62으로 DNA쪽이 많다. BP-Dx에서는 BP 단독 투여에서와 비슷하게 공유결합 형성이 단백질과

Table 3. Aspects of binding affinity of ³H-BP, ¹⁴C-Dx and ³H-BP/Dx treated in DNA-S and DNA-P fraction

Covalent bond (%)	³ H-BP		¹⁴ C-Dx		³ H-BP/Dx treated	
	DNA-S	DNA-P	DNA-S	DNA-P	DNA-S	DNA-P
Covalent	66	30	96	55	61	15
DNA	6	13	89	62	4	12
Protein	94	87	11	38	96	88

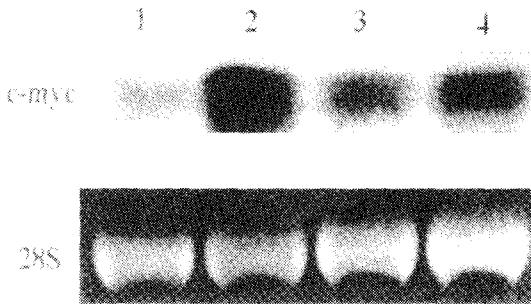


Fig. 4. Northern blot analysis of cytoplasmic c-myc RNA of NC-37 cells treated with benzo(a)pyrene and doxorubicin

20 μ g of total RNA were electrophoresed in denaturing agarose gel, transferred to nitrocellulose membrane, hybridized to ³²P-labeled c-myc probe. The ethidium bromide-stained 28S ribosomal band of the corresponding lane is shown in the bottom panel.

Lane 1, control RNA ; lane 2, BP(10 μ M) ; lane 3, Dx(5 μ M) ; lane 4, BP(10 μ M)+Dx(5 μ M)

DNA에 DNA-S에 96 : 4, DNA-P에 88 : 12이었다.

6. Human NC-37세포에 BP, Dx 및 BP-Dx투여로 인한 c-myc 유전자 발현에 미치는 영향

Human NC-37 세포에 BP, Dx 및 BP-Dx를 각각 투여하고 배양한 세포에서 c-myc 유전자의 발현을 관찰하였는데 BP, Dx와 BP-Dx투여에서 DMSO만 투여한 정상 대조군에 비하여 c-myc 발현이 증가하였다. BP와 Dx의 c-myc 발현의 비교에서 BP가 높으며 BP-Dx투여에서는 BP 단독 투여에서 보다 낮아졌다(그림 4).

고 찰

발암물질은 화학적 성질과 반응성을 나타내기 위해서는 다수의 고분자 표적소(target site)를 가진다. 이들이 근본적으로 처음 손상을 주는 것은 DNA 결합에 의한 것으로 생각하고 이차적으로 chromosomal 단백질을 modification 시킬것으로 여겨왔다^{7,8,26}. 화학물질에 의한 유전자 전이에 대한 많은 연구가 있다. 그중에서도 polyaromatic hydro-

carbon 화합물이 있는데 이들 화합물이 nucleus에서 작용하여 어느것은 항암제로 어느것은 발암제로 작용한다. 그간의 연구에서 대부분이 항암제 및 발암제가 DNA와의 상호관계에서 유전자의 변이를 본 것이 대부분이고 일부는 단백질과의 관계를 보았으나 단편적으로 이루어져 있다. 본 연구에서 polycyclic hydrocarbon 화합물이면서 항암제와 발암제로 작용하는 몇가지 약물을 사용하여 DNA 및 핵단백질과의 작용에서 상호관계를 비교 관찰하여 물질에 대한 특이성을 알아보려고 하였다. 각각의 특이성을 알기 위하여 발암제(BP, DMBA)와 항암제(m-AMSA, ellipticine, doxorubicin)을 사용하여 fluorospectrophotometry로 고유 파장을 측정하였더니 서로 다른 파장으로 특성적인 예민성을 나타내었다. 이들의 물질이 유전자 변이에 어떠한 영향을 주는지 보기위해 우선적으로 고유 파장에서 각각의 물질에 대한 nuclei adduct(내전)을 측정하였을때, 1.7M sucrose 용액에서는 BP와 DMBA는 용액층과 침전층에 차이가 없으나 ellipticine, m-AMSA, Dx은 전반적으로 침전층에서 결합 친화성이 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 이의 침전물을 0.35% polymin-P 방법으로 단백질층과 DNA층을 분리하여 각각에 결합한 물질의 친화력을 측정하였을때는 위에서와는 달리 BP와 DMBA의 각층에 결합력이 다르나 ellipticine, m-AMSA, Dx는 전부가 단백질(상층)에 낮게 결합되었으며 이 세 물질이 nuclei와의 친화력에서는 ellipticine이 가장 높았다. 유전자의 발현에서는 DNA에 높은 친화성을 나타내는 nonhistone이 transcription을 특성적으로 조절하는 것으로되어 있고²⁷ nonhistone chromosomal 단백질이 nucleus에서 전사를 조절하는데 중요하다고 여기고 chromosomal 단백질군과 특이적 단백질에 대하여 많은 연구가 되고 있다¹). 이전의 Norman과 Bekhor²⁸의 연구에서 nonhistone chromosomal 단백질에서 유전자 발현에 높은 친화성을 가지고 있을 것으로 보는 DNA-P 분획을 보고하였으며, 본교실에서도 이 분획에 BP의 결합 친화성이 높은것을 확인한 바 있다. 본 연구에서는 이와같이 물질에 따라 특이성이 있을것으로 보고 BP와 비슷한 polycyclic hydrocarbon 화합물인 Dx의 내전 양상과 Dx 존재하에 BP 결합력에 미치는 영향을 보았다. 이의 실험으로 BP와 Dx를 투여한 사람 NC-37 세포에서 분리한 chromatin의 2M NaCl 추출물⁵)에서 DNA-P 분획과 DNA-S 분획을 얻어 각각의 분획에 존재하는 BP와 Dx의 동위원소를 count했을

때, BP는 DNA-S(70,865cpm)보다 DNA-P (416,605 cpm)분획에 6.0배가 많으나 특이하게도 Dx는 DNA-P (2, 170cpm)보다는 DNA-S(13,235cpm)분획에 6.1배나 높음을 관찰하였다. 또한 각각의 분획에서 Proteinase K digestion으로 DNA와 단백질에 결합한 BP 및 Dx 또는 cold Dx투여에 의한 BP의 변화를 보았는데(그림 3), BP 처리군은 histone-nonhistone인 2M NaCl supernatant 분획에서 단백질(14,035cpm)과 DNA(6,415cpm)의 양자간에 결합된 비는 2.19배로 단백질에 높았으며 DNA-S 분획의 비는 3.0 DNA-P의 비는 6.22로 DNA-P의 단백질에 비례적으로 BP가 제일 많이 결합되어있다. 또한 Dx는 DNA-S 분획에서 전체 결합한 양이 18,940cpm 이고 단백질과 DNA의 비가 0.87로서 역시 DNA 분획에 많이 결합하고 있으며 DNA-P는 4,250cpm으로 결합한 전체양이 낮다. 이 결과에서 보면 histone-nonhistone chromatin 분획에 BP와 Dx의 결합 친화력이 높을줄 알았으나 그렇지 않았으며, 이들 BP와 Dx가 DNA-S와 DNA-P 분획에서 서로 상반되는 결합 친화성을 보여주며 많은 양이 존재하였다. 또 BP 처리군에 Dx투여로 인한 영향은 DNA-P 분획만이 단백질과 DNA의 변화에서 단백질은 약간 감소하나 DNA의 증가로 양자간의 비에서 3.57로서 단독 BP처리때보다 줄어들었다(표1). 본 연구에서 이와 같은 결과로 볼때 BP나 Dx가 DNA-P 및 DNA-S 분획의 단백질과 DNA에 intercalation의 영향으로 단백질과 DNA 사이에 결합하는 양상이 다를 것으로 예견되어 chromatin 분획을 proteinase K digestion 및 trichloroacetic acid 사용으로 DNA와 단백질을 분리하여 정량분석에 의한 함량의 변화를 관찰하였는데, BP, Dx, BP-Dx의 각 군이 단백질 함량의 변화에는 차이가 없으나 DNA는 DNA-P 분획에서 가장 높으며 Dx투여에서는 DNA의 함량이 약간줄어 들었으며 Dx에 의한 BP의 영향은 DNA가 DNA-P에서 줄고 DNA-S에서는 늘어났다(표2). 이의 결과는 적어도 DNA-P분획에 BP가 관여하고 있음을 보여준다. 또한 표 3에서보면 ethylacetate를 사용한 BP대사산물의 결합 양상은 covalent 결합이 DNA-S(66%)보다 DNA-P(30%)가 낮았으며 DNA와 단백질에 covalent결합으로 되어 있는 BP는 많은 양이 단백질쪽에 있었다. 그러나 Dx의 경우 전체 covalent 결합은 DNA-S 분획에 96%의 높은 결합을 보였고 단백질 보다는 DNA에 결합이 되어 있으며 DNA-S 분획이 더욱 컸다. Dx투여에 의한 BP 대사

산물의 covalent 변화는 DNA-S, DNA-P분획 모두 감소를 보이거나 특히 DNA-P(15%)에 2배의 감소를 보였고 BP단독 투여에서와 같이 DNA와 단백질의 covalent 비에는 변화가 없다(표3). BP단독 투여에서 DNA가 증가해 있다는 사실은 polycyclic hydrocarbon 화합물이 cellular DNA와 covalent 결합으로 유전자에 돌연변이와 발암성의 성질을 나타낸다¹⁴⁾는 결과로 추측된다. 이와같은 변화는 또한 Gate와 Bekor²⁹⁾에 의한 globin 유전자가 활성적인 상태에서는 DNA-P 분획에 존재하고 비활성적인 상태에서는 DNA-S 에 있다는 결과를 고려해볼수 있으나, Dx에서는 DNA-P보다는 DNA-S에 더 친화성있는 것으로 보아 약물에 따라 다를것으로 보인다. 그러나 특히 DNA-P 분획에서 covalent를 Dx가 noncovalent로 전환 시킴으로서 단백질에 DNA의 cross link를 감소시킬 것으로 사료된다. 또한 BP는 DNA-P 분획에 강한 결합 친화성을 가지고 있고 DNA-P 분획이 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 강한 것으로 보아 소수성 단백질이 많이 존재할 것으로 여겨진다. 또한 이들의 유전자 발현을 *c-myc* gene을 사용하여 관찰하였을 때 BP나 DX에 모두 정상군에 비해 증가하였고 BP-Dx 투여에서 BP 단독 투여때 보다 *c-myc*발현이 감소되었고 DNA-P의 covalent 감소가 서로 일치하나 상호간의 관계는 알수없다. 그러나 Beker와 Mirell²²⁾는 DNA(DNA-P)가 활성적 globin 유전자 서열을 가지고 있으며 20배 이상 높고, DNA-P분획에 단단히 결합한 nonhistone chromosomal 단백질이 존재하는 것을 발견하였고, globin 유전자가 비활성적인 상태에서는 protein free DNA-S 분획에 존재하는 것을 발견하였다²⁹⁾. 본연구에서 보면 Dx인 경우, DNA-S 분획의 영향이 크게 작용하는 것으로 보아(표3) 이의 영향으로 단단히 결합되어있는 DNA-P (nonhistone chromosomal protein)분획의 활성적 유전자와의 결합에 영향을 주고 특성적 유전자의 전사과정에 변화(그림4)를 주는 것으로 사료된다. 따라서 이들 약물이 체내에서 대사된 대사산물이 이 분획에서의 상호작용이 유전자의 기능에 중요하게 작용할 것으로 본다.

요 약

BP와 Dx에 의한 nuclei 내전과 유전자 발현의 양상을 보기 위해 human NC-37 세포를 사용하여 다음과 같은

결론을 얻었다. 몇가지 polycyclic hydrocarbon 화합물을 가지고 fluorophometry를 이용하여 nuclei 내전을 관찰하였을 때, 1.7M sucrose 용액의 nuclei에서는 BP, DMBA의 내전에는 차이가 없으나 0.35% polymin-P에 분리된 단백질과 DNA에서 BP는 단백질에 2배의 결합 친화성이 있으나 DMBA는 오히려 DNA에 1.6배가 더 높았다. m-AMSA, ellipticine, Dx에서는 1.7M sucrose 용액에서 nuclei 내전이 침전물보다 상층액에 약간 높고 0.35% polymin-P에서는 단백질 분획보다는 DNA 분획에 3배이상 높았다. 이와 같이 결합 친화성이 물질에 따라 달랐다. ³H-BP 및 ¹⁴C-Dx를 각각 혹은 동시투여하고 배양한 NC-37세포에서 nonhistone chromosomal protein과 결합되어있는 DNA분획(DNA-S와 DNA-P)을 2M NaCl chromatin 추출물에서 얻었다. ³H-BP 대사산물의 결합 친화성은 DNA-S보다 DNA-P분획에 6배가 높고 대부분 단백질(85% 이상)에 결합되어 있는 반면, ¹⁴C-Dx에서는 DNA-S 분획에 6.1배의 증가가 있고 BP와는 달리 DNA(65% 이상)에 많이 결합되어 있었다. Dx투여가 BP의 결합에 미치는 영향은 단백질과 DNA의 비율 변화에는 관계없이 공유결합을 낮추어 주는 것으로 나타났다. 각 군에서 c-myc 유전자의 발현은 Dx보다 BP투여에서 더욱 증가가 있으나 동시투여에서 Dx가 BP에 의한 유전자 발현이 감소되었다.

이상의 결과로 보아 nonhistone chromosomal 단백질에 단단히 결합되어있는 DNA 분획이 유전자 발현에 중요하게 작용할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문의 연구비 일부는 고신대학교 의학부 기초의학 연구비(1997년) 지원에 의해 수행되었으므로 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Botchan M., Stringer J., Mitchison T and Sambrook J. : Integration and excision of SV40 DNA from the chromosome of a transformed cell. *Cell* 20, 143 (1980)
2. Bottinger D and Durban E.M. : Progenitor-cell populations can be infected by RNA tumor viruses but kansformation is dependent on the expression of specific differentiated functions. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44, 1249 (1979)
3. Buty S.G., Thompson S. and Slaga T.J. : The role of epidermal aryl hydrocarbon hydroxylase in the covalent binding of polycyclic hydrocarbons to DNA and its relationship to tumor initiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 1102 (1976)
4. Chahal S.S., Matthews H.R. and Bradbury E.M. : Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function. *Nature(London) New Biol.* 233, 215 (1971)
5. Eastman A. and Bresnick E. : Metabolism and DNA binding of 3-methyl cholanthrene. *Cancer Res* 39, 4316 (1979)
6. Arrand J.E. and Murray A.M. : Benzo(a)pyrene groups bind preferentially to the DNA of active chromatin in human lung cells. *Nucleic Acids Res.* 10, 1547 (1982)
7. Ehrenberg L. and Teratol S.O.G. : *Carcinogen Mutation* 1, 105 (1980)
8. Kootstra A., MacLeod M.C., Selkirk I.J.K. and Slaga T.J. : Selective modification of nuclear proteins by polycyclic aromatic hydrocarbons and by benzo(a)pyrene diol epoxides. *Carcinogenesis* 3, 821 (1982)
9. Jungmann R.A. and Schweppe J.S. : Binding of chemical carcinogens to nuclear proteins of rat liver. *Cancer Res.* 32, 952 (1972)
10. Vaught J. and Bresnick E. : Binding of polycyclic hydrocarbons to nuclear components in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 587 (1976)
11. Phillips D.H., Grover P.L. and Sims P. : A quantitative determination of the covalent binding of a series of polycyclic hydrocarbons to DNA in mouse skin. *Int. J. Cancer* 23, 201 (1979)
12. Duguet M., Lavenot C., Harper F., Mirambeau G. and DeRecondo A.M. : DNA topoisomerases from rat liver : physiological variations. *Nucleic Acids Res.* 11, 1059 (1983)
13. Holm C., Goto T., Wang J. and Botstein D. : DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* 41, 553 (1985)
14. Long B.H., Huang C.Y. and Pogo A.O. : Isolation and characterization of the nuclear matrix in Friend erythroleukemia cells : Chromatin and mRNA interactions in the nuclear matrix. *Cell* 18, 1079-1090 (1979)
15. Clausen J. : Comparison of DNA adduct formation by means of synchronous scanning and by isotope

- tracers : in-vitro study on formation of DNA adducts in human lymphocytes exposed to benzo(a)pyrene. *Cancer Lett.* 72, 163 (1993)
16. Degawa M., Stern S.J., Martin M.V., Geungerich F.P., Fu P.P. and Ilett K.F. : Metabolic activation and carcinogen-DNA adduct detection in human Larynx. *Cancer Res.* 54, 4915 (1994)
 17. Schoepe K.B., Friesel H., Schurdak M.E., Randerath K. and Hecker E. : Comparative DNA binding of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene and some of its metabolites in mouse epidermis in vivo as revealed by the ³²P-postlabeling technique. *Carcinogenesis* 7, 535 (1986)
 18. Wang C.J., Shiah H.S. and Lin J.K. : Modulatory effect of crocetin on aflatoxin B1 cytotoxicity and DNA adduct formation in C³H/10T1/2 fibroblast cell. *Cancer Lett* 56, 1 (1991)
 19. Cullinane C., Cutts S.M., Rosmalen A.V. and Phillips D.R. : Formation of adriamycin-DNA adducts in vitro. *Nucleic Acids Res.* 22, 2296 (1994)
 20. Rosmalen A.V., Cullinane C., Cutts S.M. and Phillips D.R. : Stability of adriamycin-induced DNA adducts and interstrand cross links. *Nucleic Acids Res.* 23, 42 (1995)
 21. Minford J., Pommier Y., Filipski J., Kohn K.W., et al : Isolation intercalator dependent protein linked DNA strand cleavage activity from cell nuclei and identification as topoisomerase II. *Biochemistry* 25, 9 (1986)
 22. Bekhor I. and Mirell C.J. : Simple isolation of DNA hydrophobically complexed with presumed gene regulatory proteins. *Biochemistry* 18, 609 (1979)
 23. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951)
 24. Buton K. : A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochemical J.* 62, 315 (1955)
 25. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. : *Molecular cloning*. 1, 7.23, Cold Spring Harbor, NY. (1982)
 26. Stacks P.C. : Reactivity and adduct formation of a polyaromatic hydrocarbon, 7-bromomethylbenz(a)anthracene with chromatin histone proteins. *J. Chromatography* 528, 25 (1990)
 27. Chiu J.F., Tsai Y.-H., Sakama K. and Hinilica L.S. : Regulation of in vitro mRNA transcription by a fraction of chromosomal proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 9431 (1975)
 28. Norman G.L. and Bekhor I. : Enrichment of selected active human gene sequences in the placental deoxyribonucleic acid fraction associated with tightly bound nonhistone chromosomal proteins. *Biochemistry* 20, 3568 (1981)
 29. Gates D.M. and Bekhor I. : Distribution of active gene sequences : a subset associated with tightly bound chromosomal proteins. *Science* (Washington DC) 207, 661 (1980)