

DMBA 매식과 방사선 조사로 유도된 백서 타액선 종양에서 H-ras 암유전자의 활성화

서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 치학연구소

* 연세대학교 원주의과대학 생화학교실

허기순 · 최종환* · 최순철 · 박태원 · 유동수

목 차

- I. 서 론
- II. 연구재료 및 방법
- III. 연구성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록
- 사진부도

I. 서 론

사람을 포함한 포유동물의 genome에는 3종류의 *ras* 유전자가 존재한다고 밝혀졌는데¹⁻³⁾ 그것은 *H-ras* 1, *K-ras* 2 및 *N-ras* 유전자로 불리며, 또한 *H-ras* 2와 *K-ras* 1이라는 가성유전자가 백서와 사람에게 존재하는 것으로 밝혀졌다⁴⁾. 이들 3종의 *ras* 유전자들은 분자량 21,000인 p21로 알려진 단백질을 기억하지만 각각의 단백질들은 그 아미노산 배열이 다른 것으로 알려졌다⁵⁾. *K-ras* 2 유전자를 제외한 나머지 *ras* 유

전자의 coding 배열은 4개의 exon에 분포되어 있으며⁶⁾ 이같은 포유동물의 *ras* 유전자는 그 coding 배열 내에서 점 돌연변이에 의해서 형질 전환을 유도하는 성질을 가지고 있다⁷⁾. 자연적으로 발생하는 돌연변이는 codon 12, 13, 59와 61에서 빈번하게 발생되지만 in vitro에서 발암제에 의한 돌연변이의 유발은 codon 12, 61, 63, 116과 119에서 자주 발생되는데 특히 codon 12와 61에서 가장 높은 빈도로 발생된다⁸⁾. 이와 같은 *ras* 유전자의 활성화는 p21의 생리적 기능을 변화시켜 종양의 발생을 유도한다^{2, 4, 9, 10)}.

ras 단백질(p21)의 활성화는 *ras* 유전자내의 점 돌연변이의 결과로써 이중 아미노산 하나가 치환되어^{7, 11)} 일어나는데 사람의 경우에 조직 종류에 따라 활성화되는 *ras* 암유전자 종류가 다르다. 방광이나 생식기의 종양에는 주로 *H-ras*가, 폐와 대장의 종양에는 *K-ras*가, 그리고 혈액종양에서는 주로 *N-ras*가 활성화되는 것으로 밝혀졌다¹¹⁻¹⁴⁾. 사람의 방광암 DNA를 polymerase chain reaction(PCR) 시행 후에 그 산물의 유전자 서열을 읽어 *ras* 유전자를 조사하였을 때 *H-ras* 유전자의 12번째 codon이 돌연변이 되는 경우가 조사한 전체 종양중 18%였으며 돌연변이의 대부분은 glycine(GGC)이 valine(GTC)으로 변화되어 일어났다^{7, 12, 15)}.

일반적으로 대부분의 화학발암제는 돌연변이

*이 논문은 1997년도 서울대학교병원 지정연구비(02-97-239) 지원에 의해 이루어진 것임.

접수일:1998년 1월 13일
채택일:1998년 1월 24일

유발물질로써 점 돌연변이를 유발시키거나 DNA 염기와 부가물을 형성하며 *ras* 암유전자도 여러 실험동물에서 화학발암제의 유도에 의해서 활성화되는 것으로 밝혀졌다⁸⁾. 이와 같이 발생하는 종양은 투여한 발암제의 종류와 조직에 따라 활성화되는 암유전자의 종류가 다르다. 백서의 유선과 임파선에 *N-nitroso-N-methylurea* (NMU)의 투여시 유방암과 임파선암이 유발될 수 있으며, 이때 유방암의 발생은 *H-ras* 1 유전자의 활성화에 의해, 임파선암의 발생은 *N-ras*와 *H-ras* 유전자의 활성화에 의한 것으로 밝혀졌다¹⁶⁾. 또한 백서와 생쥐의 피부에 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene(DMBA)와 dibenz (c,h) acridine(DBACR)의 처리는 피부 종양을 유도할 수 있으며, 이 종양 발생은 *H-ras* 1 유전자의 활성화가 원인인 것으로 알려졌다^{17,18)}. 그리고 백서와 생쥐의 폐에 tetranitromethane (TNM) 투여는 폐종양을 유도시킬 수 있으며 이는 *K-ras* 유전자의 활성화가 그 원인으로 알려졌다⁹⁾. 이와 같은 NMU에 의한 암유전자의 활성화는 유전자내의 염기 guanine을 adenine으로 전환시켜 *ras* 유전자의 codon 12의 2번째 염기가 점 돌연변이 되어 일어나는 것으로 조사되었다¹⁷⁾. 또한 DMBA는 *ras* 유전자의 codon 61에서 부가물을 형성해 돌연변이를 일으키는 것으로 조사되었을 뿐 아니라¹⁹⁾, codon 61의 두 번째 염기 adenine을 thymine으로 전환시켜 점 돌연변이를 유도하는 것으로 보고되었다^{18, 20, 21)}.

ras 유전자 산물인 p21은 합성된 후에 지방과 상호작용하여 수정(modification)되어²²⁻²⁴⁾ 원형질막의 세포질 면에 위치한다. p21은 GDP와 GTP에 대한 친화도가 높고 GTPase 활성도를 가지는 G 단백질의 특징을 가지고 있다²⁴⁻²⁸⁾. *ras* 유전자의 codon 12와 61의 점 돌연변이에 의한 하나의 아미노산 치환은 p21의 위치, lipidation 및 guanine nucleotide와의 결합 특성에 변화를 주지는 않으나 형질전환 능력을 활성화시키고 GTP 가수분해 속도를 크게 감소시킨다.^{24, 26, 27, 29)} G 단백질의 유사체인 *ras* 유전자의 돌연변이에 의한 p21의 활성화는 GTP 가수분해를 억제하여 G 단백질의 생리적인 불활성화를 억제한다³⁰⁾.

사람 및 여러 실험동물에서 아직까지 타액선에서 자연적으로 발생되거나 화학발암제에 의해 유도되는 종양이 어떤 종류의 암유전자의 활성화에 의해 일어나는지에 대한 조사가 미미하다^{8, 31)}.

따라서 본 논문에서는 백서 타액선에 화학발암제인 DMBA 매식 또는 DMBA 매식 및 방사선 조사를 병행하여 유도된 타액선 종양에서 다양한 종류의 암 유전자중 *H-ras* 암유전자상의 돌연변이 여부를 조사하고, 두 군간에 *H-ras* 암유전자 활성화 현상의 차이가 있는지를 구명하고자 본 연구를 수행하였다.

II. 연구재료 및 연구방법

1. 실험동물

체중 100g 내외의 Sprague-Dawley계 웅성 백서를 실험동물로 사용하였으며 실험기간 중 쥐 사료(제일제당)로 사육하였다.

2. 타액선 종양 유발

Cataldo와 Shklar의 방법³²⁾에 따라 소포나 전달체가 없이 순수한 형태의 DMBA 40mg을 마취한 백서의 악하선에 매식함으로써 종양 유발기간을 단축하고 종양 발생빈도를 높였다. 또한 DMBA를 매식한 후 백서가 마취에서 깨어나지 않은 상태에서 방사선을 조사하였다. DMBA를 매식한 4주 후부터 30주까지 2주 간격으로 2-3마리씩 백서를 희생시켜 DMBA를 매식한 타액선을 떼어내어 -70°C에 보관하거나 바로 DNA를 분리하였다.

방사선 조사는 Guerrero 등³³⁾과 Yuan 등³⁴⁾의 방법을 변형하여 수술부위에 1cm 두께의 한천으로 만든 괴(bolus)를 얹어 연조직 효과를 얻은 후 방사선 조사기(Philips linear accelerator SL-75-5)를 사용하여 실온에서 선량을 350 cGy/min 로 20Gy를 매주 1회씩 3주 동안 총 조사량 60 Gy를 조사하였다.

3. Genomic DNA 분리

백서를 희생시켜 떼어낸 타액선 조직, 정상 및 형질전환된 NIH 3T3 세포로부터의 DNA 분리는 Sinha 등³⁵⁾의 방법에 따라 다음과 같이 시행하였다. 타액선을 백서로부터 잘라내어 가위로 아주 잘게 자른 후 완충액 [10mM EDTA, 100mM Tris-HCl (pH 7.5), 50mM NaCl, 2% SDS, 100 μ g proteinase K/ml]에 넣어 55 $^{\circ}$ C에서 2시간 (또는 37 $^{\circ}$ C에서 18시간) 동안 진탕한 후 파쇄하였다. Phenol/chloroform 추출방법에 따라 DNA를 분리하고 5mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA, 10mM NaCl 용액에서 24시간 이상 투석시키고 용액 1ml당 100 mg RNase를 넣어 1시간동안 반응시켜 RNA를 분해시킨 후 phenol/chloroform으로 DNA를 추출한 다음 TE 완충액(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5)으로 4 $^{\circ}$ C에서 하루동안 투석시켰다. 분리한 DNA는 0.4% agarose gel 전기영동을 실시하여 그 크기와 양을 조사하였고 transfection과 중합효소 연쇄반응의 시료로 사용하기 위해 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

4. Transfection

DNA를 transfection시키기 위해 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입한 NIH 3T3 세포를 사용했으며 10% 우태아 혈청 (Gibco Co.)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에서

5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C로 배양하였다. 타액선 종양으로부터 얻은 DNA를 calcium-phosphate precipitation 방법³⁶⁾에 따라 NIH 3T3 세포에 transfection시켰다. 먼저 배양 플라스크에서 자란 NIH 3T3 세포를 0.1% trypsin (Gibco Co.)이 포함된 DMEM으로 플라스크 바닥에서 떼어내고, hemocytometer를 사용하여 5 \times 10⁵개의 세포를 60mm 배양 접시에서 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM으로 24시간 동안 배양하였다. 정상 타액선 및 타액선 종양에서 추출한 DNA를 각각 20 μ g씩 2M CaCl₂와 2 \times HEPES-buffered saline (HBS: 140mM NaCl, 5mM KCl, 0.75mM Na₂HPO₄·2H₂O, 6mM dextrose, 50mM HEPES, pH 7.05)으로 최종 농도가 0.125M CaCl₂와 1 \times HBS로 되도록 잘 섞은 후 20-30분간 상온에 방치한 다음 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 5ml씩을 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양한 후 5% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 5ml로 배양액을 갈아주고 3-4일 간격으로 되풀이했으며 2-3주 동안 형질전환 국한점 (transformation foci)을 관찰하였다.

5. H-ras 유전자의 증폭

H-ras 유전자는 Table 1에 표시한 시발체 쌍을 사용하여 중합효소 연쇄반응에 의해서 두 차례에 걸쳐서 증폭하였으며 그 과정은 다음과 같다. 첫 번째 중합효소 연쇄반응 sense 시발체 10 μ mole, antisense 시발체 10 μ mole, 2.5mM

Table 1. Oligonucleotide primers for the detection of H-ras gene.

Position			Sequence(5' → 3')
12th codon	outer,	sense	AGGAGCGATGACGGAATATAAGC
		antisense	GGCTCACCTCTATAGTGGGGTCGTATT
	inner,	sense	AATATAAGCTGGTGGTGGTGGGCGC
		antisense	GGGGTCGTATTCGTCCACAAAATC
61th codon	outer,	sense	GTGGTCATTGATGGGGAGACGTGC
		antisense	CTCACGGGGTTCACCTGTACTGGT
	inner,	sense	TGCCTGTTGGACATCCGGGATACCGCC
		antisense	CTGGTGGATGTCCTCAAAGACTTG

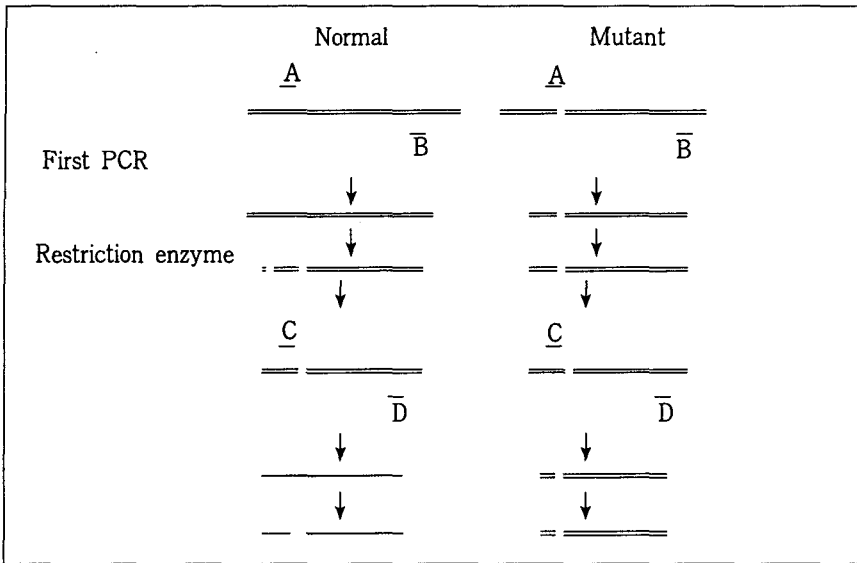


Figure 1. H-ras mutation analysis using two-step PCR-RFLP.

The DNA, which may contain a mutation(*), is amplified using outer primers A and B. Incubation with the restriction enzyme cleaves the amplified wild type sequence and leaves mutant sequence intact. The inner primers C and D are used in a second PCR, and now the uncleaved mutant sequence is amplified. The products of the second PCR are incubated with the restriction enzyme. The restriction enzyme-resistant DNA fragment is diagnostic for the presence of a mutant.

dNTPs 2μl, Taq DNA polymerase (Promega) 0.5unit, 25mM MgCl₂ 2μl, Taq DNA

polymerase 완충용액(10mM Tris-HCl, pH 9.0, 40mM KCl, 0.1% Triton X-100)에 DNA 0.2μg을 첨가하고 2차 증류수로 최종 부피가 20μl가 되도록 하였다. 반응액을 95°C에서 5분간 가열하여 DNA를 변성시키고 중합효소 연쇄반응은 95°C에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 소성 (annealing), 72°C에서 1분간 extension으로 10회 Thermal Cycler(MJ Research)에서 시행하였다. 첫 번째 중합효소 연쇄반응물 10μl를 두 번째 중합효소 연쇄반응 시료로 사용하거나 제한 효소(Nae I, Msp I, Bst NI, Eae I)로 절단하고 두 번째 중합효소 연쇄반응 주형으로 사용하였다. 두 번째 중합효소 연쇄반응은 반응 횟수를 30회로 하고 나머지는 첫 번째와 동일한 조건으로 시행하였다. 중합효

소 연쇄반응물 10μl를 2.0% agarose gel 전기영동을 시행하고 ethidium bromide로 염색한 다음에 UV illuminator하에서 그 크기를 확인하였다³⁷⁾.

6. H-ras 유전자의 점 돌연변이 조사

H-ras 유전자 12번째 codon의 점 돌연변이는 Nae I이나 Msp I에 의해서 절단될 수 있고, 61번째 codon은 Bst NI 이나 Eae I에 의해서 절단될 수 있어 agarose gel 전기영동상에서 그 크기로 돌연변이 유무를 확인할 수 있다. 따라서 점 돌연변이 유무를 조사하기 위하여 Figure에서 표시한 2단계 polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)을 이용하였다^{38, 39)}. 1차 중합효소 연쇄반응이 끝나면 반응물 10μl를 제한 효소로 절단하고 2차 중합효소 연쇄반응을 시키거나

1차 반응 산물을 바로 2차 반응을 시키고 2차 반응물을 제한 효소로 절단하여 절단 유무를 확인하였다.

III. 연구성적

1. 백서 타액선 종양 유발

백서 타액선에 DMBA 매식이나 DMBA 매식 및 방사선 조사를 병행하였을 때 모든 타액선에서 종양이 유도되었으며 (Figure 2), 종양이 유도되는 데에는 최소한 10주 이상이 소요되었다. DMBA 매식 후 4주에서 30주 사이의 백서를 2주 간격으로 희생시켜 genomic DNA를 분리하여 NIH 3T3 세포에 transfection 시키거나 중합효소 연쇄반응의 주형(template)으로 사용하였다.

2. Transfection assay

DMBA를 매식한 실험군과 DMBA 매식 및 방사선 조사를 병행한 실험군에서 생성된 백서

타액선 종양으로부터 분리한 genomic DNA를 NIH 3T3 세포에 transfection시켰을 때 형질 전환된 NIH 3T3 세포가 관찰되었으나(Figure 3) 정상 타액선에서 분리한 genomic DNA를 NIH 3T3 세포에 transfection시켰을 때에는 형질전환이 일어나지 않았다. DMBA를 매식한 실험군에서 형질전환 국한점은 종양 DNA μg 당 0.01-0.02 foci의 빈도로 발생하였고 DMBA 매식과 방사선 조사를 병행한 실험군에서는 0.01-0.03 foci의 빈도로 발생하였다(Table 2).

3. H-ras 유전자의 중합효소 연쇄반응 생성물의 확인

H-ras 유전자의 12번째와 61번째 codon을 각각 포함하는 특이적인 시발체 쌍을 사용하여 2차 중합효소 연쇄반응 생성물의 크기를 agarose gel 전기영동상에서 그 크기를 조사하였을 때 Table 3에 표시한 예상되는 크기인 95bp와 135bp의 DNA 조각을 각각 확인하였기의 중합효소 연쇄반응물을 Figure 1에 표시된 것처럼 확인할 수 있었다.

Table 2. Incidence of the transforming genes and the transformation efficiency in the normal salivary glands and the salivary gland tumors.

Source of DNA	Transforming genes /samples tested	Transformation efficiency (foci / μg DNA)
Normal salivary gland	0/10	0
Salivary gland tumors induced by DMBA implantation	9/30	0.01-0.02
Salivary gland tumors induced by DMBA implantation and irradiation	10/30	0.01-0.03

Table 3. DNA fragments by two step PCR-RFLP for the detection of H-ras mutations

Mutation position of H-ras	PCR	DNA fragment of PCR product	Restricted size with enzyme
Point 12	1st PCR	125	85,40
	2nd PCR	95	69,26
Point 61	1st PCR	175	127,48
	2nd PCR	135	108,27

Table 4. Frequency of H-ras point mutations using two step PCR-RFLP

Position of codon	Salivary gland tumors induced by DMBA-implantation (n=36)	Salivary gland tumors induced by DMBA-implantation and irradiation(n=39)
Codon 12	2(5.6%)	3(7.7%)
Codon 61	3(8.3%)	3(7.7%)
Total	5(13.9%)	6(15.4%)

4. H-ras 유전자의 점 돌연변이 확인

Table 3에 표시한 H-ras 유전자의 12와 61번째 codon의 점 돌연변이의 유무를 조사하기 위하여 2차 중합효소 연쇄반응물을 제한효소로 절단하고 agarose gel 전기영동을 시행하여 그 크기를 조사하였다.

H-ras 유전자의 12번째 codon의 점 돌연변이 유무를 알아보기 위하여 제한효소 Nae I이나 Msp I으로 2차 중합효소 연쇄 반응물을 절단하였을 때 정상 타액선과 대부분의 타액선 종양에서 모두 절단되었지만 절단되지 않는 일부 타액선 종양이 관찰되었다(Figure 6과 7). DMBA 매식에 의해 유도된 2개의 타액선 종양에서 12번째 codon의 점 돌연변이가 일어났으며 DMBA 매식과 방사선 조사에 의해 유도된 3개의 종양 타액선에서 점 돌연변이가 유발되었다. 또한 Bst NI과 Eae I을 이용하여 61번째 codon에서의 점 돌연변이를 조사하였을 때 DMBA 매식에 의해 유도된 타액선 종양에서는 3개가, DMBA 매식과 방사선 조사로 유도된 경우에도 3개가 각각 점 돌연변이를 일으키는 것으로 나타났다(Figure 8, 9, Table 4).

이와 같은 결과를 확인하기 위하여 1차 중합효소 연쇄반응물을 제한효소로 절단하고 2차 중합효소 연쇄반응을 시행하였을 때 정상이나 12와 61번째 codon에서 점 돌연변이를 일으키지 않은 경우에는 Figure 1에서 예상한 것처럼 DNA 생성물을 관찰할 수 없었지만 점 돌연변이를 일으킨 경우에는 95bp와 135bp 크기의 예상되는 DNA를 확인할 수 있었다(Figure 10).

5. H-ras 유전자의 점 돌연변이 발생을

백서 타액선에 DMBA 매식이나 DMBA 매식

과 방사선 조사에 의해 유발되는 종양에서 H-ras 유전자의 12번째와 61번째 codon의 점 돌연변이가 발생하는 빈도를 Table 4에 표시하였다. DMBA 매식에 의해 유도된 타액선 종양 36개중 5개(13.9%)에서, DMBA 매식과 방사선 조사에 의해 유발된 타액선 종양 39개중 6개(15.4%)에서 H-ras 유전자 12번째와 61번째 codon의 점 돌연변이가 관찰되었다.

IV. 총괄 및 고안

ras 암유전자는 Harvey와 Kirstein murine sarcoma 바이러스로부터 처음 분리되었고³¹⁾ 이것의 염기서열은 murine retrovirus에 의해 형질도입된 쥐의 DNA에서 조사되었다⁴⁰⁾. H-ras와 K-ras 유전자의 염기서열은 사람, 쥐와 무척추동물의 genome에서 조사되었고 N-ras는 사람의 신경모세포종과 육종 세포주에 조사되었다⁴¹⁾. ras 유전자들은 exon-intron 구조가 유사하며 각각 21 kDa의 단백질(p21)을 encoding한다. H-ras 유전자는 비뇨기관계 종양에서 N-ras나 K-ras 유전자보다 더 자주 활성화되고⁴²⁾ 12와 61번째 codon에서 점 돌연변이가 잘 일어나는 것으로 조사되었다⁴³⁾.

종양을 유발시키는 화학발암제의 대부분은 DNA와 직접 상호작용하여 돌연변이를 유도하는 것으로 알려졌는데, 이같은 돌연변이는 암유전자내의 exon이나 intron내에 점 돌연변이나 부가물 형성을 유발시켜 형질전환을 유도하기 때문이다. 특히 이와 같은 돌연변이는 주로 exon내에서 일어나는 것이 보통이지만⁴⁴⁾ intron내에서 돌연변이가 일어난다는 보고도 있다⁴⁰⁾.

화학발암제에 의한 종양의 유발이 DNA상의 돌연변이가 그 원인이 된다는 것을 확인할 수 있는 방법에는 transfection assay와 중합효소 연

쇄반응을 이용한 single strand conformation polymorphism (SSCP), dot hybridization, sequencing 및 RFLP 등이 있다⁴⁵⁻⁴⁷). 본 논문에서 DMBA 매식에 의해 유발된 타액선종양에서 DNA를 분리하여 NIH 3T3 세포에 transfection 시켰을 때 DNA μg 당 0.01-0.02 형질전환 국한점을 관찰할 수 있었고, DMBA 매식과 방사선 조사로 유발된 타액선종양에서는 0.01-0.03 형질전환 국한점을 얻었다 (Table 2). DMBA 매식에 의해서만 유발된 것보다 DMBA 매식과 방사선 조사에 의해 유발된 일부 종양에서 더 많은 국한점(0.03)이 관찰되었지만 통계적인 큰 의미는 없었다. Balmain과 Pragnell⁴⁸)은 생쥐 피부종양에서 분리한 DNA μg 당 0.04-0.09 형질전환 국한점을 얻었다고 보고하였으며 Sukumar 등⁴⁹)은 백서 종양 DNA로부터 0.01-0.08 형질전환 국한점을 얻었다고 보고하였다. 그런데 임의로 선택한 종양 중 약 10-15%가 *ras* 암유전자가 활성화되어 종양을 유발한 것으로 알려졌으며 또한 임의로 선택한 종양 중 10-20%만이 transfection 시켰을 때 형질전환 능력을 가지고 있다고 알려졌다⁵⁰). 이처럼 형질전환 국한점 발생율이 크게 차이가 나는 원인은 아직 정확하게 알려진 것은 없지만 Brown 등²¹)은 형질전환 초기단계에 형질전환을 일으키는 돌연변이 유전자의 발현이 미미하여 사라지거나 형질전환을 유도할 수 없는 암유전자가 활성화되거나 종양 억제 유전자의 비활성화가 그 원인으로 추정되고 있다. 특히 *ras* 유전자의 활성화에 의한 종양 유발은 두 단계의 종양화 과정²⁰)을 거쳐 일어나고 첫 번째 단계와 두 번째 단계 때의 *ras* 유전자의 돌연변이 종류가 다른 것으로 생각된다.

실험동물에 총 조사량 60Gy의 방사선을 조사하였을 때 4-6개월 후에 실험동물 약 25%에서 종양이 발생되었다고 보고되어^{51, 52}) 백서 타액선에 DMBA 매식과 동시에 방사선 조사를 하면 DMBA 매식만을 한 것에 비해 종양 유발 기간을 단축하고 종양을 유발하는 발암 종류가 다를 것으로 추정하였다. 그러나 본 실험결과에서 백서 타액선에 DMBA를 매식하였을 때 유발된 종양의 13.9%에서, 그리고 DMBA 매식과 방사선 조사를 하였을 때 유발된 종양의 15.4%에서 H-*ras* 유전자의 점 돌연변이가 관찰되어 두

실험군 사이에 통계학적인 유의한 차이가 없었다. 따라서 백서 타액선의 종양 발생은 방사선 조사에 의한 효과보다 DMBA 매식이 종양 유발에 효과적이었던 것으로 생각된다.

DMBA를 매식한 후 유발된 종양 중 5개에서 H-*ras* 점 돌연변이가 관찰되었는데 이것은 DMBA 매식 후 14주, 16주, 18주, 24주 및 26주 된 종양에서 하나씩 나타났고, DMBA와 방사선 조사를 한 종양에서는 14주에서 두 개, 16주, 20주, 22주, 28주에서 하나씩 나타났지만 codon 12와 61에서 동시에 점 돌연변이가 일어난 종양은 관찰할 수 없었다. 종양 유발 후 발생한 H-*ras* 점 돌연변이 중에서 14주에서 20주 사이에 63.6%(7/11)가 나타났으나 이것이 종양 발생시기와 어떤 연관이 있는지는 아직 알려져 있지 않다⁵³). 이와 같은 H-*ras* 유전자의 돌연변이가 나타난 종양에서 정상 H-*ras* 유전자가 모두 검출되었는데 (Figure 4-7) 이것은 대립유전자 중 하나만 돌연변이가 일어나고 다른 대립유전자는 정상이기 때문이다. 정상세포가 종양 세포로 형질전환되는 종양화 과정 중에 정상 대립유전자가 사라진다는 보고는 없으며¹⁵) 정상 대립인자는 돌연변이된 대립인자의 형질전환 능력을 억제하는 효과가 있는 것으로 추정되고 있다⁵⁴). H-*ras* 유전자가 돌연변이를 일으킨 종양을 2 단계 PCR-RFLP를 시행하면 전기영동상에 나타난 DNA band의 강도는 시료마다 차이가 있고 정상과 돌연변이된 유전자 사이에도 차이가 있었다 (Figure 4-7). 이 같은 차이는 종양 세포 내에 돌연변이된 유전자의 비율이 다르게 분포되어 있거나 정상조직의 포함 정도가 다르기 때문이라고 생각된다.

본 연구에서는 사람에서 발생하는 모든 암 조사시 약 20% 정도에서 관계하고 있다고 알려져 있는^{7, 12, 15}) *ras* 암유전자만을 조사하였고, 더욱이 *ras* 암유전자군 중에서도 H-*ras* 암유전자에서 가장 높은 빈도로 점 돌연변이가 일어난다고 알려진 codon 12와 61만을 조사하였다. 따라서 DMBA 매식 및 방사선 조사에 의해 유도된 타액선 종양 발생기전과 암유전자 사이의 보다 진전된 관련성을 조사하기 위해서는 다른 *ras* 암유전자군에 대한 조사가 시행되어야 할 뿐만 아니라 이미 잘 알려져 있는 다른 30여 종류의 암유

전자와의 연관성을 구명해야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

화학 발암제인 DMBA를 백서 타액선에 매식하여 종양을 유발시킨 실험군과 DMBA 매식과 방사선 조사로 타액선 종양을 유발시킨 실험군에서 각각 DNA를 분리하여 transfection 분석과 2단계 PCR-RFLP을 시행하였을 때 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 두 실험군에서 종양 DNA를 각각 분리하여 NIH 3T3 세포에 transfection시켰을 때 형질 전환 국한점이 발생하였다.
2. Transfection 분석을 시행하였을 때 형질전환 발생율은 DMBA를 매식한 실험군에서 DNA g당 0.01-0.02 foci였고, DMBA 매식과 방사선 조사를 한 실험군에서 0.01-0.03 foci였다.
3. 2단계 PCR-RFLP을 이용하여 H-ras 유전자의 점 돌연변이 발생율을 조사하였을 때 DMBA를 매식한 실험군에서 13.9%(5/36)로 나타났고, DMBA 매식과 방사선 조사를 병행한 실험군에서는 15.4%(6/39)로 나타났다.
4. DMBA를 매식한 실험군에서 H-ras 유전자의 12번째 codon의 점 돌연변이가 5.6%(2/36)로 나타났고 61번째 codon에서는 8.3%(3/36)로 나타났다.
5. DMBA 매식과 방사선 조사를 시행한 실험군에서 H-ras 유전자의 12번째 codon의 점 돌연변이가 7.7%(3/39)로 나타났고 61번째 codon에서도 7.7%(3/39)로 나타났다.

참고문헌

1. Defeo D, Gonda MA, Young HA, Chang EH, Lowry DR, Scolinick EM, Ellis RW: Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. Proc Natl Acad Sci 78:3328-3332, 1981.
2. Parada LF, Tabin CJ, Shin C, Weinberg RA: Human bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. Nature 297:474-478, 1982.
3. Hall A, Marshall CJ, Spurr NK, Weiss RA: Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. Nature 303:396-400, 1983.
4. Ellis RW, Defeo D, Shih TY, Gonda MA, Young HA, Tsuchida N, Lowy DR, Scolinick EM: The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of family of normal vertebrate genes. Nature 292:506-511, 1981.
5. Bar-Sagi D, Feramisco JR: Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. Cell 42:841-848, 1985.
6. Shimizu K, Birnbaum D, Ruley MA, Fasano O, Suard Y, Edlund L, Taparowsky E, Goldfarb M, Wigler M: Structure of the K-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. Nature 304:497-500, 1983.
7. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolinick EM, Dhar R, Lowy DR, Chang EH: Mechanism of activation of a human oncogene. Nature 300:143-149, 1982.
8. Barbacid M: ras gene. Ann Rev Biochem 56: 779-827, 1987.
9. Uchida T, Wada C, Ishida H, Egawa S, Ao T, Yokoyama E, Koshiba K: Infrequent involvement of mutations on neurofibromatosis type 1, H-ras, K-ras and N-ras in urothelial tumors. Urol Int 55:63-67, 1995.
10. Shimizu K, Goldfarb M, Perucho M, Wigler M: Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. Proc Natl Acad Sci USA 80:383-387, 1983.
11. Bos JL, Toksoz D, Marshall CJ, Verlaan de Vries M, Veeneman GH, van der EB AJ, van Boom JH, Janssen JW, Steenvoorden AC: Amino acid substitutions at codon 13 of the

- N-*ras* oncogene in human acute myeloid leukaemia. *Nature* 315:726-730, 1985.
12. Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M: A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300:149-152, 1982.
 13. Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Aaronson SA, Barbacid M: Oncogenes in solid human tumours. *Nature* 300:539-542, 1982.
 14. Bos JL, Verlaan-de Vries M, Marshall CJ, Veeneman GH, van Boom JH, van der Eb AJ: A human gastric carcinoma contains a single mutated and an amplified normal allele of the *Ki-ras* oncogene. *Nucleic Acids Research* 14:1209-1217, 1986.
 15. Burchill SA, Neal DE, Lunec J: Frequency of H-*ras* mutations in human bladder cancer detected by direct sequencing. *Br J Urol* 73:516-521, 1994.
 16. Yuasa Y, Srivastava SK, Dunn CY, Rhim JS, Reddy EP, Aaronson SA: Acquisition of transforming properties by alternative point mutations within *c-bas/has* human proto-oncogene. *Nature* 303:775-779, 1983.
 17. Zarbl H, Sukumar S, Arthur AV, Martin-Zanca D, Barbacid M: Direct mutagenesis of Ha-*ras-1* oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature* 315:382-385, 1985.
 18. Bizub D, Wood AW, Skalka AM: Mutagenesis of the Ha-*ras* oncogene in mouse skin tumors induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Proc Natl Acad Sci* 83:6048-6052, 1986.
 19. Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M: Structure and activation of the human N-*ras* gene. *Cell* 34:581-586, 1983.
 20. Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, Balmain A: Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-*ras* during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322:78-80, 1986.
 21. Brown K, Buchmann A, Balmain A: Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-*ras* gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression. *Proc Natl Acad Sci* 87:538-542, 1990.
 22. Furth ME, Davis LJ, Fleurdelys B, Scolnick EM: Monoclonal antibodies to the p21 products of the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus and of the cellular *ras* gene family. *J Virol* 43:294-304, 1982.
 23. Sefton BM, Trowbridge IS, Cooper JA, Scolnick EM: The transforming proteins of Rous sarcoma virus, Harvey sarcoma virus and Abelson virus contain tightly bound lipid. *Cell* 31:465-474, 1982.
 24. Finkel T, Der CJ, Cooper GM: Activation of *ras* genes in human tumors does not affect localization, modification, or nucleotide binding properties of p21. *Cell* 37:151-158, 1984.
 25. Papageorge A, Lowy D, Scolnick EM: Comparative biochemical properties of p21 *ras* molecules coded for by viral and cellular *ras* genes. *J Virol* 44:509-519, 1982.
 26. McGrath JP, Capon DJ, Goeddel DV, and Levinson AD: Comparative biochemical properties of normal and activated human *ras* p21 protein. *Nature* 310:644-649, 1984.
 27. Sweet RW, Yokoyama S, Kamata T, Feramisco JR, Rosenberg M, Gross M: The product of *ras* is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* 311:273-275, 1984.
 28. Manne V, Bekesi E, Kung HF: Ha-*ras* proteins exhibit GTPase activity: point mutations that activate Ha-*ras* gene products result in decreased GTPase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:376-380, 1985.
 29. Gibbs JB, Sigal IS, Poe M, Scolnick EM: Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic *ras* p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5704-5708, 1984.
 30. Der CJ, Finkel T, Cooper GM: Biological and biochemical properties of human *rasH* genes mutated at codon 61. *Cell* 44:167-176, 1986.
 31. Bos JL: The *ras* gene family and human carcinogenesis. *Mutation Res* 195:255-271, 1988.
 32. Cataldo E, Shklar G: Chemical carcinogenesis in the hamster submaxillary gland. *J Dent Res* 43:53, 1977.
 33. Guerrero I, Calzada P, Mayer A, Pellicer A: A molecular approach to leukemogenesis: mouse lymphomas contain an activated *c-ras* oncogene. *Proc Natl Acad Sci* 81:202-205, 1984.
 34. Yuan J, Yeasky TM, Rhee MC, Glazer PM: Frequent T:A→G:C transversion in X-irradiated mouse cells. *Carcinogenesis*, 16:83-88, 1995.
 35. Sinha S, Webber C, Marshall CJ, Knowles MA, Proctor A, Barrass NC, Neal GE: Activation of *ras* oncogene in aflatoxin-induced rat liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 85:3673-3677, 1988.
 36. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R, Urlaub GI, Chasin L: DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyl-transferase locus into

- mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 76: 1373-1376, 1979.
37. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis M: *Gel electrophoresis of DNA*. In *molecular cloning: A laboratory manual* Vol. I 2nd ed. Cold Harbor Laboratory Press, 1989.
 38. Saito S: Detection of H-*ras* gene point mutations in transitional cell carcinoma of human urinary bladder using polymerase chain reaction. *Keio J Med* 41:80-86, 1992.
 39. Cerutti P, Hussain P, Pourzand C, Aguilar F: Mutagenesis of the H-*ras* protooncogene and the p53 tumor suppressor gene. *Cancer Res* 54:1934-1938, 1994.
 40. Sekiya T, Fushimi M, Hori H, Hirohashi S, Nishimura S, Sugimura T: Molecular cloning and the total nucleotide sequence of the human c-Ha-*ras*-1 gene activated in a melanoma from a Japanese patient. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4771-4775, 1984.
 41. Manne V, Bekesi E, Kung HF: Ha-*ras* proteins exhibit GTPase activity: point mutations that activate Ha-*ras* gene products result in decreased GTPase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:376-380, 1985.
 42. Visvanathan KV, Pocock RD, Summerhayes IC: Preferential and novel activation of H-*ras* in human bladder carcinomas. *Oncogene Res* 3:77-86, 1988.
 43. Fujita J, Yoshida O, Yuasa Y, Rhim JS, Hatanaka M, Aaronson SA: Ha-*ras* oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours. *Nature* 309:464-466, 1984.
 44. Cohen JB, Levinson AD: A point mutation in the last intron responsible for increased expression and transforming activity of the c-Ha-*ras* oncogene. *Nature* 334:119-124, 1988.
 45. Sugano K, Kyogoku A, Fukayama N, Ohkura H, Shimosato Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and simple detection of c-Ki-*ras* 2 gene codon 12 mutations by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. *Lab Invest* 68:361-366, 1993.
 46. Koh EH, Chung HC, Lee KB: Point mutation at codon 12 of the c-Ha-*ras* gene in human gastric cancers. *J Korean Med Sci* 7:110-115, 1992.
 47. McMahon G, Davis E, Wogan GN: Characterization of c-Ki-*ras* oncogene alleles by direct sequencing of enzymatically amplified DNA from carcinogen-induced tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4974-4978, 1987.
 48. Balmain A, Pragnell IB: Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-*ras* oncogene. *Nature* 303:72-74, 1983.
 49. Sukumar S, Notario V, Martin-Zanca D, Barbacid M: Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-*ras*-1 locus by single point mutations. *Nature* 306:658-661, 1983.
 50. Balmain A: Transforming *ras* oncogenes and multistage carcinogenesis. *Br J Cancer* 51:1-7, 1985.
 51. Coop KL, Sharp JG, Osborne JW, Zimmerman GR: An animal model for the study of small-bowel tumors. *Cancer Res* 34:1487-1494, 1974.
 52. Stevens RH, Cole DA, Cheng HF: Identification of a common oncofetal protein in X-ray and chemically induced rat gastrointestinal tumours. *Br J Cancer* 43:817-825, 1981.
 53. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525-532, 1988.
 54. Spandidos DA, Frame M, Wilkie NM: Expression of the normal H-*ras*1 gene can suppress the transformed and tumorigenic phenotypes induced by mutant *ras* genes. *Anticancer Res* 10:1543-1554, 1990.

ACTIVATION OF H-RAS ONCOGENE IN RAT SALIVARY GLAND TUMORS INDUCED BY DMBA AND IRRADIATION

Key-Soon Hu, Jong-Whan Choi*, Soon-Chul Choi, Tae-Won Park, Dong-Soo You

*Department of Oral and Maxillofacial Radiology & Dental Research Institute,
College of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea*

** Department of Biochemistry, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Korea*

Cellular transforming genes have been identified in a number of different tumor cell lines and tumor types. A significant number of these oncogenes belong to the *ras* gene family. The *ras* gene family consists of three closely related genes: *H-ras*, *K-ras* and *N-ras* which code for a related 21 kDa protein. Mutations in codon 12, 13 and 61 of one of the three *ras* genes convert these genes into acute oncogenes. The presence of *H-ras* gene mutations has important prognostic implications in various tumors.

Each genomic DNA was isolated from tumors induced by implantation with DMBA, or by treatment with DMBA-implantation/irradiation. When genome DNA was transfected into NIH 3T3 cells and investigated by two-step PCR-RFLP, the following results were concluded:

1. Transformation foci developed in two groups when the genome DNA of two experimental groups were transfected into NIH 3T3 cells.
2. Transformation efficiency was 0.01-0.02 foci/ μ gDNA in the experimental group with the DMBA-implantation, 0.01-0.03 foci/ μ gDNA in the experimental group with the DMBA-implantation/irradiation according to results of transfection assay.
3. When the point mutation of *H-ras* gene was investigated by a two-step PCR-RFLP, there was 13.9%(5/36) in the experimental group with the DMBA implantation, 15.4%(6/39) in the experimental group with the DMBA-implantation/irradiation.
4. The point mutation in codon 12 and 61 of *H-ras* was 5.6%(2/36) and 8.3%(3/36) in the experimental group with the DMBA implantation.
5. The point mutation in codon 12 and 61 of *H-ras* gene was 7.7%(3/39) in the experimental group with the DMBA-implantation/irradiation.

논문사진부도 설명

- Figure 2.** Normal(A) and tumor-induced(B) salivary gland of rats.
Tumor salivary gland of rats was induced by DMBA-implantation or DMBA-implantation/irradiation.
- Figure 3.** Morphological changes of NIH 3T3 cells transformed by DNA isolated from tumor induced salivary gland of rat.
Control NIH 3T3 cells and transformed NIH 3T3 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) containing 10% fetal calf serum. NIH 3T3 cells were seeded (2×10^5 cells/60mm plates), cultured for 24 hours, and transfected with $20 \mu\text{g}$ of DNA according to calcium-phosphate precipitation method.
Panel A: Control NIH 3T3 cells
Panel B: Transformed NIH 3T3 cells
- Figure 4.** Analysis of amplified DNA including codon 12 of *H-ras* gene.
PCR products of DNA isolated from normal(lane N) or tumor-induced salivary glands 10(lane 1), 14(lane 2), 18(lane 3), and 22 weeks(lane 4) after DMBA-implantation, and tumors 10(lanes 5), 14(lane 6), 18(lane 7), and 22 weeks(lane 8) after DMBA-implantation/irradiation. The DNA bands were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. Size marker(M) was used with 1 kbp ladder.
- Figure 5.** Analysis of amplified DNA including codon 61 of *H-ras* gene.
PCR products of DNA isolated from normal(lane N) or tumor-induced salivary glands 10(lane 1), 14(lane 2), 18(lane 3), and 22 weeks(lane 4) after DMBA-implantation, and tumors 10(lanes 5), 14(lane 6), 18(lane 7), and 22 weeks(lane 8) after DMBA-implantation/irradiation. The DNA bands were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. Size marker(M) was used with 1 kbp ladder.
- Figure 6.** Detection of point mutation at codon 12 of the *H-ras* gene.
Point mutation was detected using two-step PCR-RFLP. The amplified DNAs were cleaved by *Nae* I, and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. One or two bands were generated from tumor samples with DMBA-implantation(lane 1-4) or DMBA-implantation/irradiation(lane 5-8). Lane N; normal, lane 1; 12 weeks, lane 2; 16 weeks, lane 3; 24 weeks, lane 4; 28 weeks, lane 5; 12 weeks, lane 6; 14 weeks, lane 7; 16 weeks, and lane 8; 22 weeks. Size marker M and M1 was used with 1 kbp ladder and 50 bp ladder.
- Figure 7.** Detection of point mutation at codon 12 of the *H-ras* gene.
Point mutation was detected using two-step PCR-RFLP. The amplified DNAs were cleaved by *Msp* I, and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. One or two bands were generated from tumor samples with DMBA-implantation(lane 1-4) or DMBA-implantation/irradiation(lane 5-9). Lane N; normal, lane 1; 12 weeks, lane 2; 16 weeks, lane 3; 24 weeks, lane 4; 26 weeks, lane 5; 12 weeks, lane 6; 14 weeks, lane 7; 16 weeks, lane 8; 28 weeks, and lane 9; 30 weeks.
- Figure 8.** Detection of point mutation at codon 61 of the *H-ras* gene.
Point mutation was detected using two-step PCR-RFLP. The amplified DNAs were cleaved by *Bst* NI, and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. One or two bands were generated from tumor samples with DMBA-

implantation(lane 1-5) or DMBA-implantation/irradiation(lane 5-10). Lane N; normal, lane 1; 12 weeks, lane 2; 14 weeks, lane 3; 18 weeks, lane 4; 26 weeks, lane 5; 30 weeks, lane 6; 12 weeks, lane 7; 14 weeks, lane 8; 20 weeks, lane 9; 22 weeks, and lane 10; 26 weeks.

Figure 9. Detection of point mutation at codon 61 of the *H-ras* gene.

Point mutation was detected using two-step PCR-RFLP. The amplified DNAs were cleaved by *Eae* I, and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. One or two bands were generated from tumor samples with DMBA-implantation(lane 1-4) or DMBA-implantation/irradiation(lane 5-8). Lane N; normal, lane 1; 12 weeks, lane 2; 14 weeks, lane 3; 18 weeks, lane 4; 26 weeks, lane 5; 30 weeks, lane 6; 12 weeks, lane 7; 14 weeks, lane 8; 20 weeks, lane 9; 22 weeks, and lane 10; 26 weeks.

Figure 10. Analysis of *H-ras* point mutation from tumor samples.

1st PCR products were cleaved by *Nae* I(lane 1-5) or *Bst* NI(lane 6-10), and it was performed 2nd PCR. One band was generated from mutated *H-ras* tumor samples, but a band was not amplified in tumor samples with normal *H-ras* gene and normal samples. Lane 1, 6; normal, lane 2-5; tumor samples 14, 16, 24, and 26 weeks after DMBA-implantation, lane 7-10; tumor samples 12, 14, and 18 weeks after DMBA-implantation.

사진부도

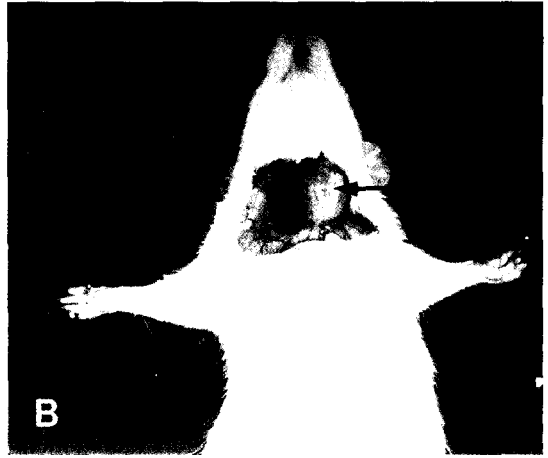


Fig 2

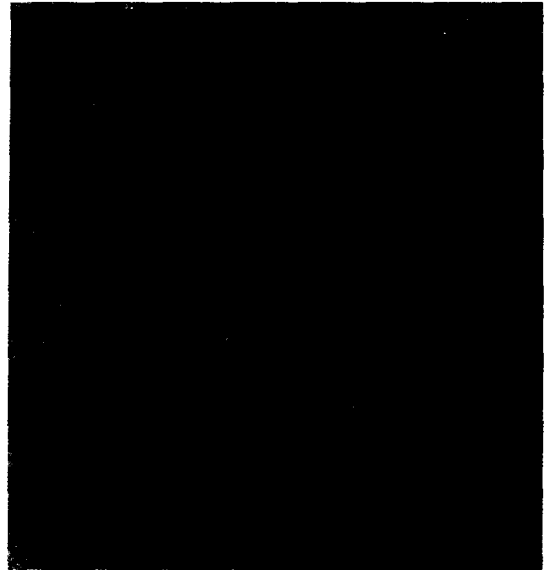
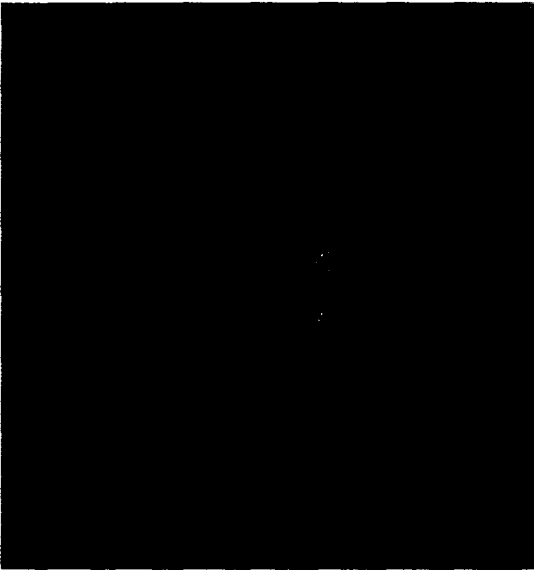


Fig 3

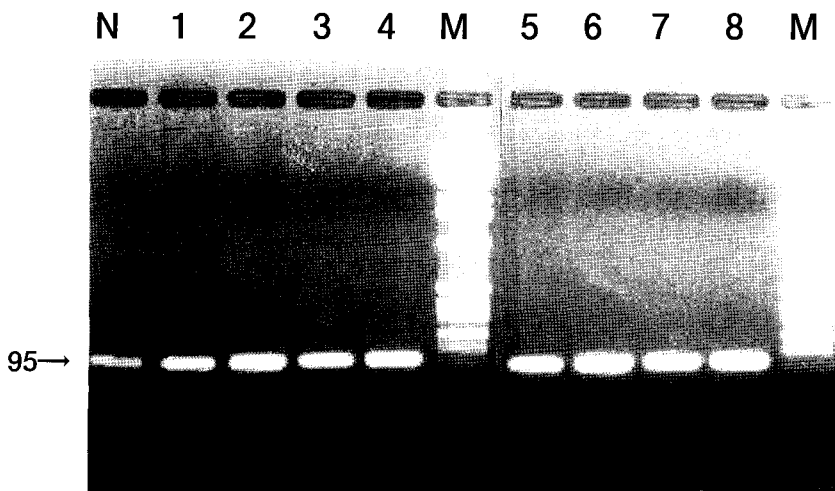


Fig 4

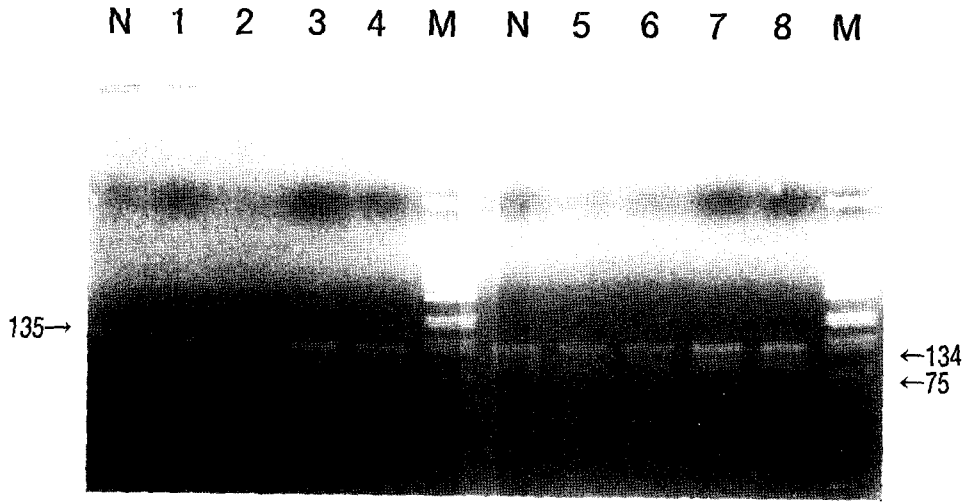


Fig 5

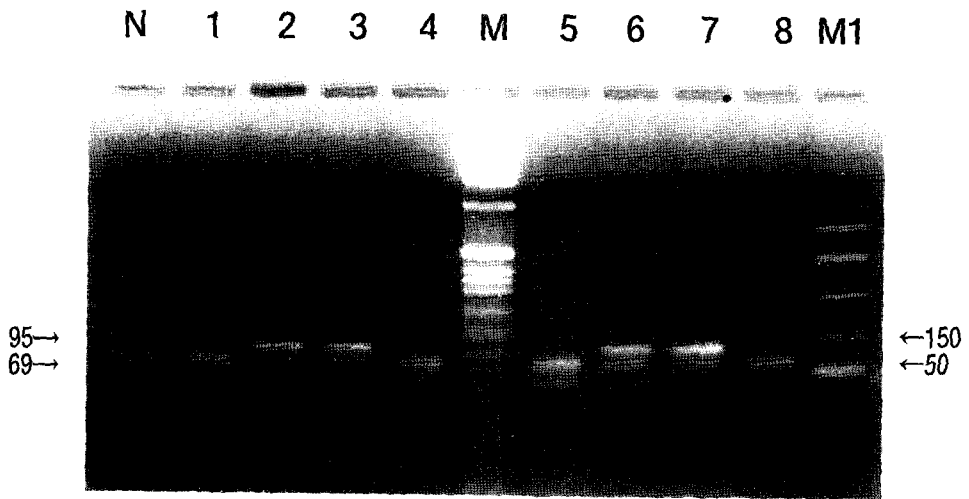


Fig 6

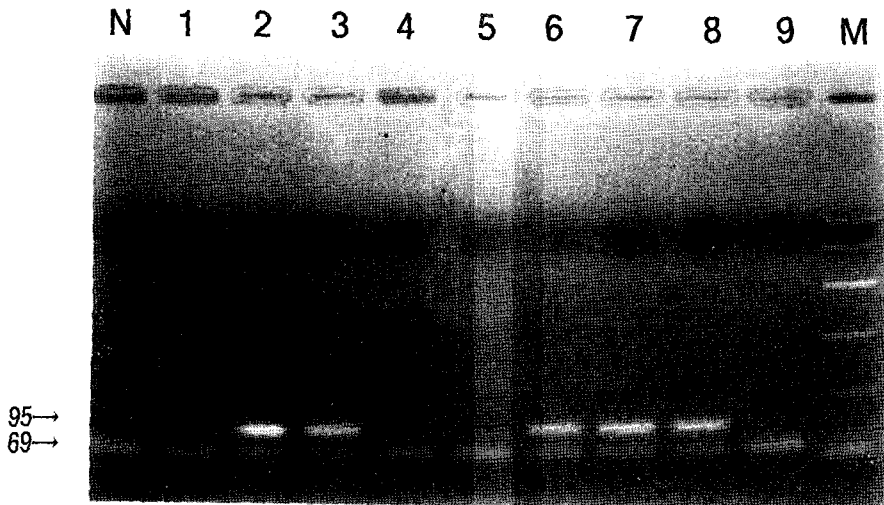


Fig 7

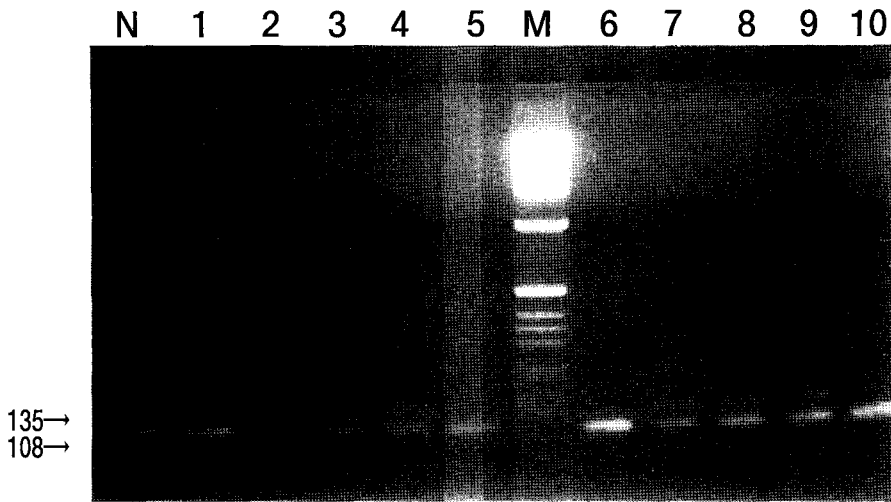


Fig 8

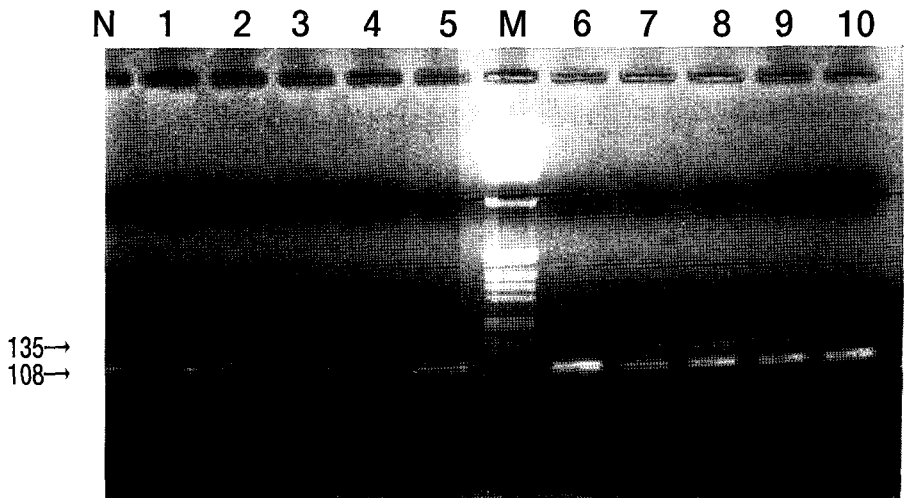


Fig 9

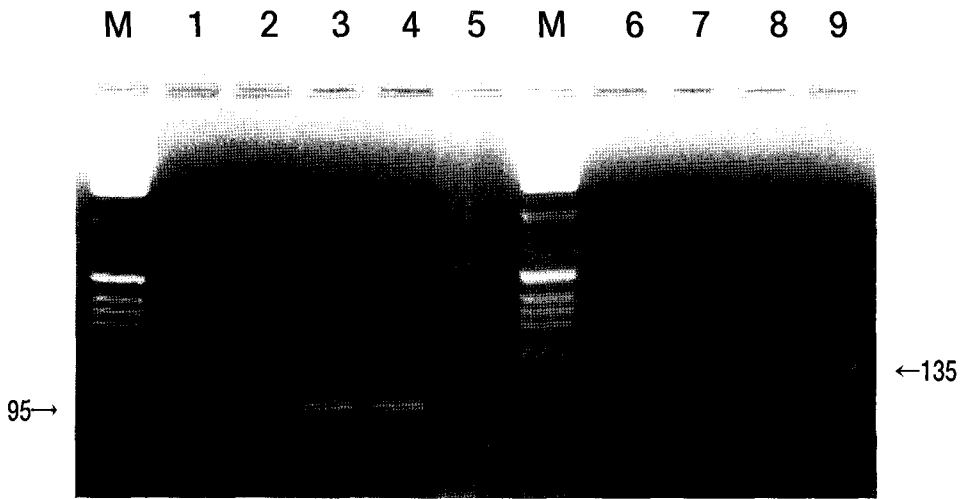


Fig 10