

# HL-60 세포의 유전자 발현 및 topoisomerase의 기능 활성화에 미치는 억제제의 영향

정인철\* · 조무연 · 박장수<sup>1</sup>

고신대학교 의과대학 생화학 교실, <sup>1</sup>부산대학교 자연과학대학 화학과

Received December 6, 2007 / Accepted November 11, 2007

**Effects of Inhibitors on the Function and Activity of Topoisomerase, and Gene Expression in HL-60 Human Leukemia Cells.** In Cheol Jeong\*, Moo Youn Cho and Jang Su Park<sup>1</sup>. *Department of Biochemistry, Kosin University College of Medicine, Busan 602-702, Korea, <sup>1</sup>Department of Chemistry, College of Natural Science, Pusan National University, Busan 609-735, Korea* - This studies were designed to elucidate whether inhibitors of topoisomerase regulate function and activity of topoisomerase, and gene expression in HL-60 human leukemia cells. HL-60 cells were treated with 10-hydroxycamptothecin or doxorubicin, total RNA was isolated, and expressed genes were investigated with human oligonucleotide microarray containing 10K gene, respectively. Expression profiles of the human leukemia HL-60 cells treated with 10-hydroxycamptothecin (10-CPT) or doxorubicin associated with signal transduction, cell adhesion, cell cycle, cell growth, cell proliferation, cell differentiation, transcription and immune response, especially genes related with transcription and cell growth. In HL-60 cells treated with 10-CPT, the expression of topoisomerase III $\alpha$ , III $\beta$  and I gene from oligo chip microarray analysis were increased over, but the expression of topoisomerase II $\alpha$  and II $\beta$  gene were decreased over. In contrast, the expression of topoisomerase II $\alpha$  and II $\beta$  gene were increased over in HL-60 cells treated with doxorubicin, whereas the expression of topoisomerase III $\alpha$  and III $\beta$  mRNA remained no significant change. These results suggest that these data may be useful for novel therapeutic markers.

**Key words :** Topoisomerase, 10-hydroxycamptothecin (10-CPT), doxorubicin, expression profile, oligonucleotide microarray

## 서 론

인체 DNA topoisomerase는 그 촉매 기전에 따라 크게 두 형태인 type I과 type II로 분류되며, type I은 양과 음의 supercoiling plasmid에 대한 활성화도, DNA상의 결합 방식, Mg<sup>2+</sup>의 요구 성에 따라 다시 세 개의 subfamily인 type IA (topoisomerase III $\alpha$  and III $\beta$ ), type IB (topoisomerase I) 그리고 type IIA (topoisomerase II $\alpha$ , II $\beta$ )로 나누며, 최근까지 밝혀진 생물들을 포함한 다양한 원핵생물과 진핵생물의 topoisomerase들을 각각 분류하고 있다[1]. Type I은 DNA duplex의 한 가닥을 phosphodiester bond에서 끊고, 절단된 한 끝을 상대편 DNA 가닥을 축으로 한 바퀴 회전시킨 후, 끊어졌던 부분을 다시 연결하며, type II는 DNA의 두 가닥을 거의 동시에 끊고, DNA duplex의 다른 부분이 절단된 곳을 통과한 후 절단 부위를 재 봉합하는데, 촉매과정에서 ATP 가수분해를 필요로 하는 것이 type I과 다른 점이다[4,22,26-28]. 이 효소들의 공통된 작용기전은 DNA의 phosphodiester bond를 절단한 후 효소 내 tyrosine기의 OH에 의해 DNA와 phosphotyrosine bond를 형성하여 "cleavable complex"를 이룬 후에 다시 끊어졌던 DNA 부위를 재 봉합하는 특징을 가

지고 있는데, 이 효소의 억제제들은 세포독성과 함께 DNA cleavable complex를 안정화시킴으로서 항암제의 표적 효소로서 널리 알려져 있다[16].

Topoisomerase I의 억제제로는 1960년대에 중국의 *Camptotheca acuminata*라는 나무에서 추출한 camptothecin (CPT)의 항암 활성이 알려져[25] 현재 irinotecan, topotecan 등의 camptothecin 유도체들이 있고, eukaryotic DNA topoisomerase II 억제제로는 mAMSA, doxorubicin, actinomycin D, idarubicin, daunorubicin, mitoxantrone, ellipticine, epipodophyllotoxin 계열의 VP-16과 VM-26, genistein 등이 있으며 이들 유도체를 이용한 다양한 억제제의 개발과 임상적 응용에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다 [17,19,29]. 그리고 이러한 억제제들이 topoisomerase의 작용과 관련된 DNA 복제, 전사, 재조합과 유사분열 과정에 영향을 미치게 되면 세포내 유전자들의 발현 변화를 유도하게 될 것이고 특히 억제제의 1차 표적소인 topoisomerase의 유전자 발현에도 영향을 미칠 것으로 추정된다. 그러나 topoisomerase 억제제들의 유전자 발현에 미치는 영향에 대한 연구로는 c-myc과 같은 일부 유전자에 대한 연구[5,6,8,18,28]들과 이들 억제제들의 작용에 따른 표적 효소인 topoisomerase의 유전자 발현에 대한 연구[11,12,17,21,23,24] 및 microarray 법에 의한 세포 유전자 발현 양상에 대한 연구는 부족한 실정이다[2,3,7,9,10,13-15,30].

\*Corresponding author

Tel : +82-51-990-6418, Fax : +82-51-990-3081

E-mail : jpf@kosin.ac.kr

이와 같은 연구 배경에 따라 본 실험에서는 topoisomerase type I과 type II의 대표적 억제제인 10-hydroxycamptothecin (10-CPT)과 doxorubicin을 투여한 인체 백혈병 HL-60 세포에서 유전자의 발현 양상을 조사하고, topoisomerase 기능 활성화에 영향을 미치는 topoisomerase type별 유전자 발현의 차이를 비교 검토하여 topoisomerase 억제제들의 세포내 작용기전을 밝히는데 기초 자료를 얻고자 본 연구를 수행하였다.

**재료 및 방법**

**시약 및 재료**

Doxorubicin과 10-CPT는 Sigma (Sigma-Aldrich Co, St. Luis, MO, USA)에서, fetal bovine serum, gentamicin과 RPMI 1640은 Gibco (Invitrogen Co, Grand Island, NY, USA)에서, 10k oligo chip과 관련 kit 시약들은 Macrogen (Seoul, Korea)에서 구입하였다. Total RNA정제용 kit는 RNazol™B (Tel-Test Inc, Friendswood, Texas, USA)를, HL-60세포는 KCTC HC18103 (한국생명공학연구원, Daejeon, Korea)을, 그 외의 일반적인 시약은 분석용을 사용하였다.

**Cell cytotoxicity 측정법**

10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 ml 당  $2 \times 10^4$  세포의 농도로 희석한 배지 10 ml에 10-CPT와 doxorubicin을 각각 농도별 첨가하여 28시간(cell doubling time)동안 처리한 후 원심분리하고 phosphate buffered saline으로 씻어 약물을 제거하고, 56시간(two doubling time)동안 새 배지에 배양한 후 인체 백혈병 HL-60 세포 수를 hemocytometer로 측정하였다.

**Oligo chip에 의한 microarray hybridization**

HL-60 세포를 약물을 처리하지 않은 정상 HL-60 세포와 10-CPT 또는 doxorubicin을 처리한 세포에서 각각 total RNA를 추출하여 RT-PCR 과정에서 Cy3 (control), Cy5 (test)의 형광물질로 표지하고 10K human oligo chip상에서 하룻밤 hybridization 하였으며, 세정 후 Affymetrix 428 Array Scanner (Affymetrix Inc, Santa Clara, California, USA)로 scan하고, 형광 감도 해석 프로그램을 사용하여 얻은 Cy3과 Cy5의 감도 값을 house keeping gene의 감도 값, 외부 유전자의 감도 값을 가지고 보정한 후 통계 처리하여 topoisomerase 유전자를 포함한 10K 유전자의 발현 양상을 분석하였다.

**Gene Bank 검색 및 동정**

Oligo microarray 분석 결과 발현의 뚜렷한 증가 또는 감소를 나타내는 유전자를 NCBI (National Center for Biotech-

nology Information, USA) Gene Bank 검색을 통하여 유전자의 기능을 동정하였다.

**결 과**

**HL-60 인체 백혈병 세포에서 10-CPT와 doxorubicin에 의한 세포 독성**

ml 당  $2 \times 10^4$  세포 농도로 된 10 ml의 배양액을 분주한 25 cm<sup>2</sup> culture flask에 10-CPT와 doxorubicin을 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 nM을 각각 투여한지 28시간 후 정상 배지로 갈아주고 다시 56시간(two doubling time) 배양하여 세포의 생육에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 1). 10-CPT는 2.5 nM의 10-CPT를 투여하였을 때 80%, 5 nM의 경우 약 70%의 생육 도를 나타내었으며, doxorubicin은 10 nM 이하를 투여하였을 때는 90% 이상 의 생육을 나타내었고 25 nM 이상에서는 급격한 세포 수의 감소를 확인하였다. 따라서 2 가지 약물에 대한 동일한 생육 조건에서 각종 유전자의 발현 양상을 분석하기 위해 70-80%의 생육정도를 나타내는 농도인 4 nM (10-CPT)과 25 nM (doxorubicin)을 유전자 발현 실험의 투여 농도로 정하였다.

**HL-60 인체 백혈병 세포에서 10-CPT와 doxorubicin에 의한 세포 유전자 발현 양상**

Topoisomerase I 억제제인 10-CPT와 doxorubicin을 각각 처리한 세포 및 정상 세포주로부터 total RNA를 분리하여

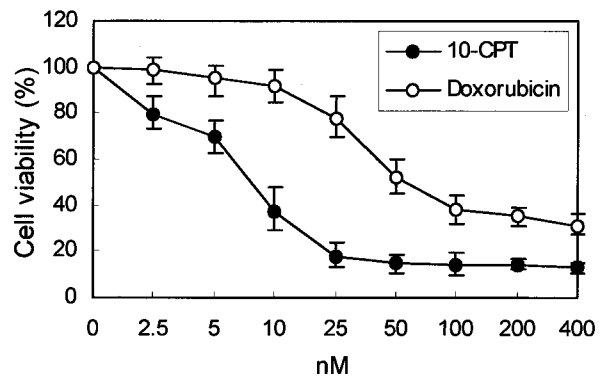


Fig. 1. The growth effects of various concentrations of 10-CPT and doxorubicin on HL-60 cell lines. Cells were suspended in RPMI 1640 medium at a level of  $2 \times 10^4$  cells/ml. They were treated 2 days later with increasing concentrations of doxorubicin for one cell doubling time (28 hr). After washing with phosphate buffered saline, the cells were further grown for two doubling times (56 hr) in normal medium, counted in a hemocytometer. Each point are representatives of six independent experiments; points given represents the mean, bars show  $\pm$ SD.

각각 Cy3과 Cy5 형광물질로 표지시킨 cDNA를 만들고 Oligo chip에 대한 microarray hybridization을 실시하였다. 형광물질로 표지된 microarray chip상의 10K 유전자 각각에 대한 intensity를 측정하고 보정한 후 통계 프로그램을 사용하여 Scatter plot (Fig. 2)하였고, 의미 있는 데이터로 선정된 약 1,000개의 유전자를 동정하였으며, 그 중에 intensity ratio  $[2\log(3F/5F)]$ 가 약 -3.0 이하인 뚜렷한 발현의 증가를 보이는 유전자와 현저한 발현의 감소를 보이는 약 +3.0 이상의 유전자를 선별하여 Table 1-4에 나타내었다. 10-CPT를 투여한 HL-60세포에서의 과 발현을 보이는 유전자들은 검색을 통하여 생물학적 기능별로 분류한 결과(Table 1), 주로 signal transduction, cell adhesion, cell proliferation, cell differentiation, transcription 등에 관여하는 유전자들이 많았으며, 10-CPT에 의해 억제되는 유전자들은 cell adhesion, transcription, cell cycle, cell growth, cell proliferation, cell adhesion, signal transduction, immune response 등과 관련된 것으로 나타났다(Table 2). Doxorubicin을 투여한 HL-60세포에서 과 발현을 보이는 유전자를 생물학적 기능별로 분류한 결과(Table 3), transcription, signal transduction, cell growth (apoptosis), cell differentiation, cell adhesion, metabolism 등과 관련된 유전자들이 많았으며, 발현이 억제되는 유전자들은 apoptosis, signal transduction, transcription, cell proliferation, cell adhesion 등과 관련이 있었다.

#### HL-60 인체 백혈병 세포에서 10-CPT와 doxorubicin에 의한 topoisomerase 유전자 발현 양상

약물의 1차적 표적소인 topoisomerase 효소 단백질에 약물의 결합을 통해 "cleavable complex"를 유도함에 따른 세포내 topoisomerase 유전자들의 발현 정도를 비교하였다. Topoisomerase type I의 억제제인 10-CPT를 HL-60 세포 주에 투여 하였을 때 type I으로 분류되는 topoisomerase III $\alpha$

의 유전자의 발현은 현저히 증가되었으며, 같은 type인 III $\beta$  및 I의 발현도 약간 증가하였으나 다른 type인 topoisomerase II $\alpha$ 와 II $\beta$ 의 유전자의 발현은 감소되었다(Fig. 3). 반대로 type II의 억제제인 doxorubicin을 투여하였을 때는 앞의 결과와 상반된 topoisomerase II $\alpha$ 와 II $\beta$ 의 유전자의 발현이 현저히 증가되었으며, topoisomerase I의 발현도 약간의 증가를 보였고 topoisomerase III $\alpha$ 와 III $\beta$ 의 유전자의 발현은 약간 감소하는 양상을 보였으나 의미있는 차이는 없었다.

## 고 찰

Topoisomerase type I은 helix DNA의 한 가닥을 절단하고 상대편 DNA가닥을 통과시키고 절단 부분을 다시 연결하여 한 개의 DNA linking number를 변화시키며, type II는 supercoiling DNA의 두 가닥을 동시에 끊어 DNA의 다른 부분을 절단된 곳으로 통과시키고 절단부위를 봉합하는데 ATP를 필요로 하며 2개의 linking number가 변화된다[4,22,26-28]. 인체 DNA topoisomerase I은 type IB에 속하며 91 kDa의 monomer이고 DNA 이완 활성화에 ATP와 Mg<sup>2+</sup>을 요구하지 않는 반면 인체 DNA topoisomerase II는 type IIA에 속하며 170 kDa과 180 kDa의 isozyme을 가지며 homodimer이고 DNA 이완 활성화에 ATP와 Mg<sup>2+</sup>을 요구한다[1]. 현재까지 알려진 생물들의 topoisomerase들 사이에는 유전자 염기 배열상 상동성은 거의 없고 새롭게 밝혀진 효소들의 독특한 특징들이 차츰 밝혀지고 있기 때문에 가까운 장래에 새로운 분류체계가 정립될 것으로 생각된다.

진핵 세포의 topoisomerase I, II의 억제제들은 topoisomerase 촉매 반응의 전 단계인 phosphodiester bond 절단 과정에는 영향을 주지 않으며 그 후속 단계인 phosphodiester bond의 재 봉합을 방해하여 "cleavable complex"를 형성하는데[4,22,26-28] camptothecin은 3'-phosphotyrosyl-

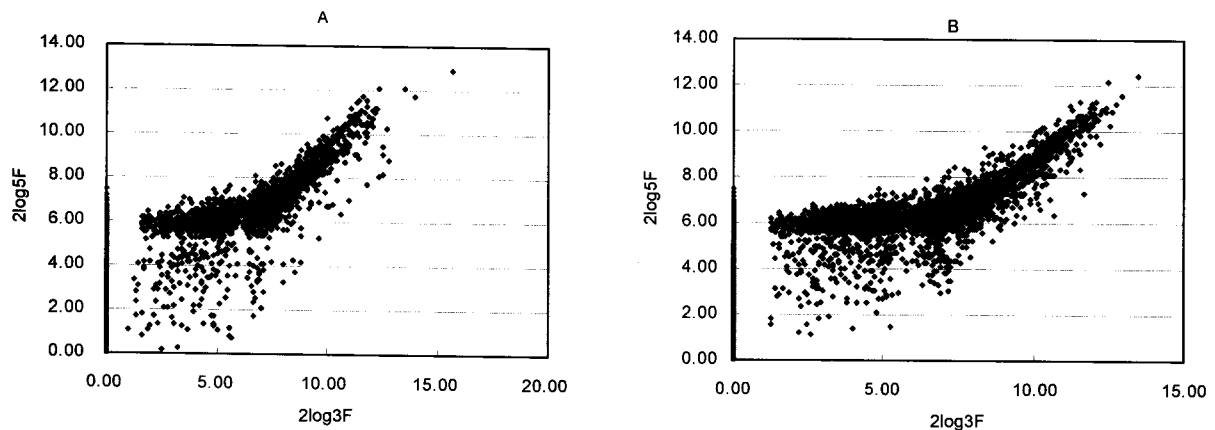


Fig. 2. Scatter plot analysis. In panel A, expression profiling of 10 K genes between 10-CPT-treated (Cy5) and 10-CPT-untreated (Cy3) HL-60 cells. In panel B, expression profiling of 10K genes between doxorubicin-treated (Cy5) and doxorubicin-untreated (Cy3) HL-60 cells.

Table 1. List of highly up-regulated genes in 10-CPT-treated HL-60 cells

Gene Bank accession No.	Intensity ratio 2log (3F/5F)	Gene description	Function	Process
nm_000376	-4.58	vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor	transcription factor activity	signal transduction
nm_006369	-4.32	leucine rich repeat containing 41	protein binding protein	ubiquitin cycle
nm_019884	-4.25	glycogen synthase kinase 3 alpha	serine/threonine kinase activity	protein amino acid phosphorylation
nm_006567	-4.22	phenylalanyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	phenylalanine-tRNA ligase activity	translation
nm_012317	-4.21	leucine zipper, down-regulated in cancer 1	protein binding	negative regulation of cell proliferation
nm_005720	-4.19	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41 kDa	protein binding	cell adhesion
nm_000899	-4.17	KIT ligand	growth factor activity, protein binding	cell adhesion, signal transduction
nm_020638	-4.16	fibroblast growth factor 23	growth factor activity	cell differentiation
nm_002722	-4.15	pancreatic polypeptide	G-protein-coupled receptor binding	protein secretion
nm_004152	-4.13	ornithine decarboxylase antizyme 1	protein binding	polyamine biosynthetic process
nm_014601	-4.10	EH-domain containing 2	protein domain specific binding	endocytosis
nm_016270	-4.07	Kruppel-like factor 2 (lung)	protein binding	transcription
nm_003956	-3.96	cholesterol 25-hydroxylase	steroid hydroxylase activity	lipid metabolic process
nm_024016	-3.93	homeobox B8	transcription factor activity	regulation of transcription, DNA-dependent
nm_002515	-3.92	neuro-oncological ventral antigen 1	RNA binding	RNA splicing
nm_003802	-3.81	myosin, heavy chain 13, skeletal muscle	actin binding	striated muscle contraction
nm_005249	-3.79	forkhead box G1	transcription factor activity	transcription
nm_000938	-3.78	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B, 140 kDa	DNA-directed RNA polymerase activity	transcription
nm_005263	-3.73	growth factor independent 1 transcription repressor	RNA polymerase II transcription factor activity	transcription

공유결합에 의한 중간 산물을 형성하여 DNA 재 봉합을 방해하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다[16]. 이러한 결과들은 본 실험실의 선행된 연구결과[3,9-12]를 통해 HL-60 인체 백혈병 세포에서 topoisomerase II의 저해제인 doxorubicin 과 topoisomerase I의 저해제인 camptothecin, 10-hydroxycamptothecin, irinotecan이 topoisomerase의 이완 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, topoisomerase 억제제들은 모두 cleavable complex를 유도함을 확인하였고, doxorubicin을 HL-60 세포에 투여하였을 때 핵내 topoisomerase의 활성과 topoisomerase의 발현을 조사한 결과[3], doxorubicin의 투여에 의해 topoisomerase의 활성이 감소하였기 때문에 topoisomerase의 유전자 발현에 영향을 미칠 것으로 추측하였으나 topoisomerase 활성의 감소에도 불구하고 topoisomerase

II $\alpha$  유전자 발현은 약간 증가한 반면 topoisomerase I과 II $\beta$  유전자 발현은 큰 변화가 없었다. 또한 topoisomerase I 억제제인 camptothecin을 HL-60 세포에 투여하였을 때에도 topoisomerase I의 활성은 억제되었으나 topoisomerase I의 발현에는 영향을 미치지 못하였는데[11,12], 이는 1999년 Pu 등 [20]이 melphalan (alkylator)을 HL-60세포에 투여하여 내성을 가진 세포 주에서 Topo II $\alpha$ 의 활성은 증가한다고 하였으나 Topo II $\beta$ 와 Topo I의 활성에는 아무 변화가 없는 것을 확인한 바 있는데 본 실험에서도 같은 경향을 나타내었다. 또한 Perego 등[19]이 여러 type의 인체 세포 주에서 camptothecin에 의한 topoisomerase I 유전자 발현을 조사한 결과와도 일치하는데, 앞의 핵 추출물의 topoisomerase I 활성 실험에서 활성이 약물에 의해 억제되는 점으로 미루어 볼 때

Table 2. List of highly down-regulated genes in 10-CPT-treated HL-60 cells

Gene Bank accession No.	Intensity ratio 2log (3F/5F)	Gene description	Function	Process
nm_020872	4.95	contactin 3 (plasmacytoma associated)	protein binding	Cell adhesion
nm_003416	4.76	zinc finger protein 7	DNA binding	transcription
nm_002216	4.03	inter-alpha (globulin) inhibitor H2	serine-type endopeptidase inhibitor activity	hyaluronan metabolic process
nm_001006600	4.02	erbB2 interacting protein	ErbB-2 class receptor binding	cell adhesion, cell cycle, cell growth
nm_001005340	3.99	glycoprotein (transmembrane) nmb	transcriptional initiation site	cell proliferation
nm_130386	3.96	collectin sub-family member 12	pattern recognition receptor activity	innate immune response
nm_001448	3.96	glypican 4	GPI anchor binding	cell proliferation
nm_002042	3.89	gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 1	GABA-A receptor activity	gamma-aminobutyric acid signaling pathway
nm_004488	3.65	glycoprotein V (platelet)	protein binding	cell adhesion
nm_004702	3.59	cyclin E2	protein binding	cell cycle
nm_001033113	3.45	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8	ATP, calcium ion, nucleotide binding	integral to membrane
nm_014337	3.45	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 2	isomerase activity	protein folding
nm_003927	3.45	methyl-CpG binding domain protein 2	DNA, protein binding	transcription
nm_031812	3.42	CD164 antigen	cell adhesion, immune response	signal transduction
nm_005230	3.35	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	transcription factor activity	transcription, signal transduction
nm_000142	3.27	fibroblast growth factor receptor 3	receptor activity	cell growth
nm_000870	3.18	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4	receptor activity	signal transduction
nm_005039	3.18	proline-rich protein BstNI subfamily 1	rhodopsin-like receptor activity	receptor protein signaling pathway
nm_005950	3.00	metallothionein 1G	ion binding	protein binding

camptothecin은 topoisomerase I의 기능에는 영향을 나타내지만 효소 발현의 조절에는 아무 영향을 주지 못하는 것으로 추정하였으나 RT-PCR 기법을 통한 일부 효소에 대한 단편적인 연구보다는 topoisomerase 종류에 따른 발현을 종합 분석하여 상호 관계 연구가 필요할 것으로 생각된다. 반면 camptothecin처리한 군에서 RT-PCR법으로 분석한 결과 c-myc 유전자 발현이 억제되었는데 northern blot 분석에서도 비슷한 양상을 나타내었다[11].

DNA chip은 slide glass상에 수백에서 수천 개의 DNA 유전자를 정렬, 고정화 한 것으로 해석하고자 하는 세포에서 추출한 RNA로 조제한 형광표식 cDNA 또는 oligonucleotide를 hybridization하여 각 유전자의 발현 변화를 측정하는 방법으로, 한 번의 실험으로 매우 많은 유전자의 발현변화에 대한 정보를 얻을 수 있기 때문에 체계적인 발현해석을 위한 강력한 screening tool로 이용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 이들의 선행된 연구 결과들을 좀 더 폭 넓게 유전자들의 변화와 상호작용을 동정하기 위하여 본 연구에서는 인체 백혈병 HL-60 세포에 현재까지 발견된 항암 활성을 나타내는 topoisomerase의 억제제 중 topoisomerase type I의 억제제인 10-CPT와 type II의 억제제인 doxorubicin을 투여하였을 때 세포내 유전자 발현 양상을 microarray 방법으로 비교 분석하였다. 본 실험을 위한 약물의 적정 투여량을 결정하기 위하여 세포독성 실험을 통해 약 70-80%의 생존율을 나타내는 조건에서 약물을 투여하였고, 10K 유전자 중에 통계프로그램을 통해 선정한 약 1,000여개의 의미있는 발현 양상을 나타내는 유전자들을 생물학적 기능별로 분류하였다. 10-CPT를 투여한 세포에서 유전자 발현이 촉진 또는 억제되는 유전자들은 signal transduction, cell adhesion, cell cycle, cell growth, cell proliferation, cell differentiation, transcription, immune response에 관여하는 유

Table 3. List of highly up-regulated genes in doxorubicin-treated HL-60 cells

Gene Bank accession No.	Intensity ratio 2log (3F/5F)	Gene description	Function	Process
nm_005924	-5.03	mesenchyme homeobox 2	transcription factor activity	regulation of transcription, DNA-dependent
nm_005037	-4.64	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	transcription factor activity	transcription, signal transduction
nm_006899	-4.43	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta	isocitrate dehydrogenase (NAD+) activity	metabolic process
nm_002904	-4.29	RD RNA binding protein	RNA, protein binding	transcription
nm_003170	-4.22	suppressor of Ty 6 homolog	transcription factor activity	regulation of transcription, DNA-dependent
nm_004433	-4.14	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	transcription factor activity	regulation of transcription, DNA-dependent
nm_002627	-4.05	phosphofructokinase, platelet	6-phosphofructokinase activity	glycolysis
nm_002275	-4.00	keratin 15	protein binding	epidermis development
nm_003226	-3.95	trefoil factor 3 (intestinal)	defense response	digestion
nm_001290	-3.81	LIM domain binding 2	transcription cofactor activity	multicellular organismal development
nm_000679	-3.77	adrenergic, alpha-1B-, receptor	receptor activity	cell growth, signal transduction
nm_001005909	-3.75	inositol hexaphosphate kinase 2	inositol hexakisphosphate kinase activity	positive regulation of apoptosis, negative regulation of cell growth
nm_006270	-3.68	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	GTPase activity, GTP binding	Ras protein signal transduction
nm_021247	-3.62	protamine 3	DNA binding	cell differentiation
nm_001337	-3.47	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	protein binding	signal transduction, cell adhesion
nm_001003827	-3.40	tripartite motif-containing 34	protein binding, metal ion binding	biological_process
nm_001397	-3.33	endothelin converting enzyme 1	endothelin-converting enzyme 1 activity,	proteolysis
nm_000312	-3.32	protein C (inactivator of coagulation factors Va and VIIIa)	protein binding, calcium ion binding	negative regulation of apoptosis
nm_001011666	-3.30	cAMP responsive element binding protein 5	transcription factor activity	transcription
nm_007192	-3.14	suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae)	positive transcription elongation factor activity	DNA replication, transcription

전자들이 고루 검출되었다(Table 1,2). 또한 doxorubicin을 투여한 HL-60세포에서도 비슷한 양상을 보였다(Table 3,4). 특히 두 약물에서 transcription과 cell growth와 관련된 유전자들이 크게 영향을 받았으며, 약물에 따른 생물학적 기능별 분류상의 큰 차이는 없었으나 개별 유전자의 발현 양상에는 뚜렷한 차이를 나타내었다.

Topoisomerase가 DNA에 결합하여 "cleavable complex"를 이룬 후에 다시 끊어졌던 DNA 부위가 재 봉합하는데 앞

의 선행된 실험 결과[3,9-12]를 통해 type I, II 억제제가 재 봉합을 지연하면 topoisomerase 유전자의 발현에도 일부 영향을 미치는 것을 RT-PCR을 통해 확인하였기 때문에, 따라서 본 연구에서는 type 별 대표적 억제제인 10-CPT와 doxorubicin을 HL-60 세포 주에 투여한 후 topoisomerase의 기능 활성에 영향을 미치는 topoisomerase 종류별 유전자 발현의 차이를 확인하였다(Fig. 3,4). Topoisomerase type I의 억제제인 10-CPT를 HL-60 세포 주에 투여 하였을 때 type I으로 분

Table 4. List of highly down-regulated genes in doxorubicin-treated HL-60 cells

Gene Bank accession No.	Intensity ratio 2log (3F/5F)	Gene description	Function	Process
nm_000594	5.01	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	tumor necrosis factor receptor binding	apoptosis, signal transduction, negative regulation of transcription
nm_005039	4.69	proline-rich protein BstNI subfamily 1	rhodopsin-like receptor activity	G-protein coupled receptor protein signaling pathway
nm_001008660	4.35	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	phospholipid binding	protein complex assembly
nm_002667	3.95	phospholamban	protein binding	circulation
nm_021633	3.91	lch-like 12 (Drosophila)	protein binding	Wnt receptor signaling pathway
nm_000363	3.77	troponin I type 3 (cardiac)	protein binding	negative regulation of angiogenesis
nm_004961	3.40	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon	GABA-A receptor activity	gamma-amino butyric acid signaling pathway
nm_001448	3.32	glypican 4	GPI anchor binding	cell proliferation
nm_001098175	3.31	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	hydrolase activity	cell adhesion
nm_002278	3.28	keratin 32	protein binding	epidermis development
nm_004060	3.08	cyclin G1	cell division	cell cycle
nm_014160	3.04	makorin, ring finger protein, 2	protein binding, metal ion binding	biological_process
nm_003416	3.01	zinc finger protein 7	DNA binding, metal ion binding	transcription

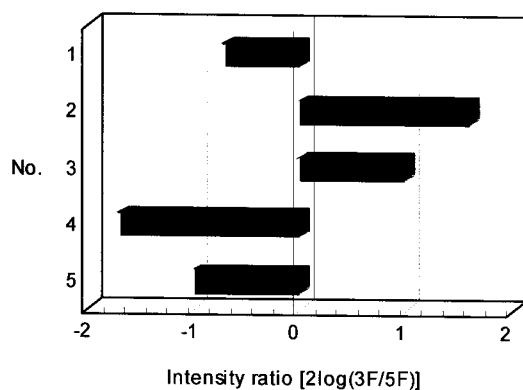


Fig. 3. Comparison of the expression levels of topoisomerase genes between 10-CPT-treated (Cy5) and 10-CPT-untreated (Cy3) HL-60 cells. 1: topoisomerase I, 2: topoisomerase II  $\alpha$ , 3: topoisomerase II  $\beta$ , 4: topoisomerase III  $\alpha$ , 5: topoisomerase III  $\beta$

류되는 topoisomerase III $\alpha$ 의 유전자의 발현은 현저히 증가되었으며, 같은 type인 III $\beta$  및 I의 발현도 약간 증가하였으나 다른 type인 topoisomerase II $\alpha$ 와 II $\beta$ 의 유전자의 발현은 감소되었다. 또한 type II의 억제제인 doxorubicin을 투여하였

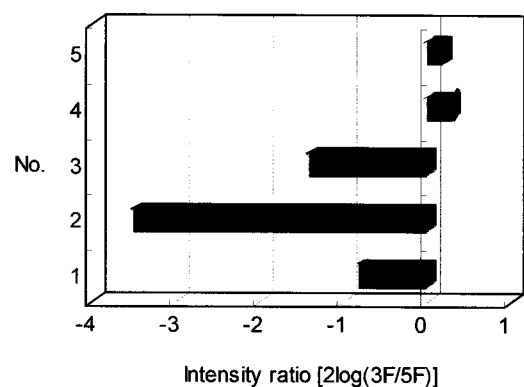


Fig. 4. Comparison of the expression levels of topoisomerase genes between doxorubicin-treated (Cy5) and doxorubicin-untreated (Cy3) HL-60 cells. 1: topoisomerase I, 2: topoisomerase II  $\alpha$ , 3: topoisomerase II  $\beta$ , 4: topoisomerase III  $\alpha$ , 5: topoisomerase III  $\beta$

을 때는 앞의 결과와 상반된 topoisomerase II $\alpha$ 와 II $\beta$ 의 유전자의 발현이 현저히 증가되었고, topoisomerase I의 발현도 약간의 증가를 보였으며 topoisomerase III $\alpha$ 와 III $\beta$ 의 유전자의 발현은 약간 감소하는 양상을 보였으나 의미 있는 차이는

없었다. 이와 같은 연구로는 Kersting 등[15]이 doxorubicin 이 topoisomerase II $\beta$ 의 발현을 유도한다고 하였으며, Stahl 등[23]이 camptothecin에 의해 topoisomerase II를 down-regulation시키며, 앞에 언급한 선행의 연구결과와도 대체로 일치하였다. 이와 같은 결과는 억제제를 받은 효소의 세포내 기능 활성을 회복시키기 위해 같은 type의 효소 발현을 증가시킨 것으로 여겨진다. 그러나 Chen 등[2]은 RT-PCR에 의해 Topotecan (type I 억제제)에 의해 topoisomerase II $\alpha$  mRNA의 발현이 촉진된다는 상반된 보고도 있으므로 따라서 본 실험에서의 뚜렷한 발현의 변화를 보이는 유전자들을 검증하기 위하여 real time PCR과 northern blot 분석, Western blot을 통한 검증 등 그 발현 기전에 대해 앞으로 더 연구하여야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

인체 DNA topoisomerase는 DNA를 단일 또는 두 가닥을 일시적인 절단을 촉매하여 DNA의 topological 문제를 조절함으로써, DNA 복제, 전사, 재조합과 유사분열 과정 등에 관여한다. 이 효소는 많은 항생, 항암제의 표적효소로서 널리 알려져 있으며, 이들 유도체를 이용한 다양한 억제제의 개발과 임상적 응용에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

본 실험에서는 인체 백혈병 HL-60 세포에서 topoisomerase 억제제가 topoisomerase 기능 활성과 유전자 발현을 조절하는지를 규명하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 연구 방법은 HL-60세포에 topoisomerase type I과 type II의 대표적 억제제인 10-hydroxycamptothecin (10-CPT)과 doxorubicin을 투여한 후 total RNA를 분리하였고, 10K-oligonucleotide microarray 방법으로 분석하여 유전자의 발현 양상을 조사하였다.

연구 결과에 의하면 10-CPT 또는 doxorubicin을 투여한 HL-60세포에서의 유전자 발현 양상은 주로 signal transduction, cell adhesion, cell cycle, cell growth, cell proliferation, cell differentiation, transcription 및 immune response 등과 관련이 있었다. Topoisomerase type I의 억제제인 10-CPT를 HL-60 세포주에 투여 하였을 때 type I으로 분류되는 topoisomerase III $\alpha$ , III $\beta$  및 I의 발현은 증가하였으나 type II인 topoisomerase II $\alpha$ 와 II $\beta$ 의 유전자의 발현은 감소되었다. 반대로 type II의 억제제인 doxorubicin을 투여하였을 때는 앞의 결과와 상반된 topoisomerase II $\alpha$ 와 II $\beta$ 의 유전자의 발현이 현저히 증가되었으며, topoisomerase III $\alpha$ 와 III $\beta$ 의 mRNA의 발현은 약간 감소하는 양상을 보였으나 의미 있는 차이는 없었다.

이 연구 결과는 앞으로 항암제의 기전을 밝히고 약물에 대한 치료 반응을 예측하고 새로운 약제 개발에 기초자료가 될 것으로 여겨진다.

## References

1. Champoux, J. J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 369-413.
2. Chen, S., S. P. Gomez, D. McCarley and M. G. Mainwaring. 2002. Topotecan-induced topoisomerase II alpha expression increases the sensitivity of the CML cell line K562 to subsequent etoposide plus mitoxantrone treatment. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **49**, 347-355.
3. Cho, M. Y. and I. C. Jeong. 2004. Effects of doxorubicin on the activity and expression of topoisomerase in HL-60 human leukemia cells. *Kosin Medical J.* **19**, 286-293.
4. Christman, M. F., F. S. Dietrich and G. R. Frink. 1988. Mitotic recombination in the rRNA of *S.cerevisiae* is suppressed by the combined action of topo I and II. *Cell* **55**, 413-425.
5. Clary, A., A. Larrue, P. Pourquier and J. Robert. 1998. Transcriptional down-regulation of c-myc expression in an erythroleukemic cell line, K562, and its doxorubicin-resistant variant by two topoisomerase II inhibitors, doxorubicin and amsacrine. *Anticancer Drugs* **9**, 245-254.
6. Fornari, F. A., D. W. Jarvis, S. Grant, M. S. Orr, J. K. Randolph, F. K. White and D. A. Gewirtz. 1996. Growth arrest and non-apoptotic cell death associated with the suppression of c-myc expression in MCF-7 breast tumor cells following acute exposure to doxorubicin. *Biochem. Pharmacol.* **51**, 931-940.
7. Guo, X., J. Zhang, X. Fu, Q. Wei, Y. Lu, Y. Li, G. Yin, Y. Mao, Y. Xie, Y. Rui and K. Ying. 2006. Analysis of common gene expression patterns in four human tumor cell lines exposed to camptothecin using cDNA microarray: identification of topoisomerase-mediated DNA damage response pathways. *Front Biosci.* **1**, 1924-1931.
8. Jain, P. T., F. A. Fornari, J. K. Randolph, M. S. Orr and D. A. Gewirtz. 1998. Induction of DNA damage, inhibition of DNA synthesis, and suppression of c-myc expression by the topoisomerase I inhibitor, camptothecin, in MCF-7 human breast tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1263-1269.
9. Jeong, I. C. and M. Y. Cho. 2006. Analysis of gene expression profile in 10-hydroxycamptothecin-treated human leukemia HL-60 cells using oligonucleotide microarray. *Kosin Medical J.* **21**, 338-343.
10. Jeong, I. C. and M. Y. Cho. 2006. Effects of irinotecan on the activity and expression of topoisomerase I and III in HL-60 human leukemia cells. *Kosin Medical J.* **21**, 344-348.
11. Jeong, I. C., D. S. Jung, K. J. Ryu, J. S. Park and M. Y. Cho. 2000. Effects of camptothecin on the expression of DNA topoisomerase I and c-myc in HL-60 human leukemia cells. *J. Life Sci.* **10**, 621-629.
12. Jeong, I. C., N. J. Lee, S. U. Lee, S. J. Lee and M. Y. Cho. 2004. Expression profile of topoisomerase, ras and myc genes in HL-60 cells treated with camptothecin. *Kosin Medical J.* **19**, 271-278.
13. John, M., A. Diego, S. Qiu, J. W. Andrew, A. C.



- Georgia, N. Courtney, J. A. Maria, L. Martin, L. S. Edward and H. A. Leonard. 2003. Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer Res.* **63**, 8791-8812.
14. Kazuya, K., R. Manasi, R. Roald, G. E. Abdel, L. B. Michael, S. M. Paul, M. T. Jeffrey, S. D. William and V. C. Khew. 2000. Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray. *Cancer Res.* **60**, 4161-4166.
  15. Kersting, G., M. V. Tzvetkov, K. Huse, B. Kulle, V. Hafner, J. Brockmoller and L. Wojnowski. 2006. Topoisomerase II beta expression level correlates with doxorubicin-induced apoptosis in peripheral blood cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **374**, 21-30.
  16. Liu, L. F. 1989. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 351-375.
  17. Nair, J., F. Traganos and Y. C. Tse-Dinh. 2000. Differential effect of camptothecin treatment on topoisomerase II alpha expression in ML-1 and HL-60 leukemia cell lines. *Anticancer Res.* **20**, 4183-4188.
  18. Orr, M. S., F. A. Fornari, J. K. Randolph and D. A. Gewirtz. 1995. Transcriptional down-regulation of c-myc expression in the MCF-7 breast tumor cell line by the topoisomerase II inhibitor, VM-26. *Biochim. Biophys. Acta.* **1262**, 139-145.
  19. Perego, P., G. Capranico, R. Supino and F. Zunino. 1994. Topoisomerase I gene expression and cell sensitivity to camptothecin in human cell lines of different tumor types. *Anticancer Drugs* **5**, 645-649.
  20. Pu, Q. Q. and W. R. Bezwoda. 1999. Induction of alkylator (melphalan) resistance in HL60 cells is accompanied by increased levels of topoisomerase II expression and function. *Mol. Pharmacol.* **56**, 147-153.
  21. Sandri, M. I., D. Hochhauser, P. Ayton, R. C. Camplejohn, R. Whitehouse, H. Turley, K. Gatter, I. D. Hickson and A. L. Harris. 1996. Differential expression of the topoisomerase II alpha and beta. *Br. J. Cancer* **73**, 1518-1524
  22. Schomburg, U. and F. Grosse. 1986. Purification and characterization of DNA topoisomerase II from calf thymus associated with polypeptides of 175 and 150 kDa. *Eur. J. Biochem.* **160**, 451-457.
  23. Stahl, M., S. Kasimir-Bauer and A. Harstrick. 1997. Down-regulation of topoisomerase II by camptothecin does not prevent additive activity of the topoisomerase II inhibitor etoposide in vitro. genes in human breast cancers. *Anticancer Drugs* **8**, 671-676.
  24. Thielmann, H. W. and O. Popanda. 1998. Doxorubicin and gamma rays increase the level of DNA topoisomerase II alpha in nuclei of normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **124**, 355-366.
  25. Wall, M. E., M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail and G. A. Sim. 1966. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3888-3890.
  26. Wang, J. C. 1985. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 665-697.
  27. Wang, J. C. 1987. Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta.* **909**, 1-9.
  28. Wang, J., J. Medeiros, D. L. Longo, A. Mansoor, M. Raffeld, P. L. Duffey, E. S. Jaffe and M. S. Stevenson. 1996. Use of the polymerase chain reaction technique to determine c-myc expression in follicular center cell lymphoma. *Diagnostic Mol. Pathol.* **5**, 20-25.
  29. Xu, J. M., A. Azzariti, S. Tommasi, R. Lacalamita, G. Colucci, P. G. Johnston, S. W. Church and A. Paradiso. 2002. Combination of 5-fluorouracil and irinotecan on modulation of thymidylate synthase and topoisomerase I expression and cell cycle regulation in human colon cancer LoVo cells: clinical relevance. *Clin. Colorectal Cancer* **2**, 182-188.
  30. Zhou, Y., F. G. Gwadry, W. C. Reinhold, L. D. Miller, L. H. Smith, U. Scherf, E. T. Liu, K. W. Kohn, Y. Pommier and J. N. Weinstein. 2002. Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects. *Cancer Res.* **62**, 1688-1695.