

Camptothecin을 투여한 HL-60 세포에서 topoisomerase, ras, myc 유전자의 발현 양상

정인철, 이능주*, 이상욱**, 이송재, 조무연

고신대학교 의과대학 생화학 교실, 의예과*, 내과학 교실**

Expression profile of topoisomerase, ras and myc genes in HL-60 cells treated with camptothecin

In Cheol Jeong, Neung Ju Lee*, Sang Uk Lee**, Song Jae Lee, Moo Youn Cho

Department of Biochemistry, *Department of Premedical Sciences, **Department of Internal Medicine,
Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background DNA topoisomerases solve the topological problems associated with DNA replication, transcription, recombination, and chromatin remodeling by introducing temporary single- or double-strand breaks in the DNA. Camptothecin is an antitumor alkaloid that has been isolated from the Chinese tree, *Camptotheca acuminata*. DNA topoisomerase I has been firmly established as the molecular target of the camptothecin group of anticancer drugs. These drugs include camptothecin, topotecan, 9-amino-camptothecin, and irinotecan. Many of them are now in clinical trials and are showing activity against a wide variety of solid human malignancies. DNA chip microarray technology can be used to establish associations between characteristic gene expression patterns and molecular responses to drug therapy. This study was conducted to determine whether pretreatment of HL-60 human leukemia cells with the topoisomerase I - directed drug camptothecin regulates topoisomerase, myc and ras gene expression and to investigate the activity of topoisomerase mediated by camptothecin in nuclear extract from HL-60 human leukemia cells. **Methods** We have conducted experiments on cell cytotoxicity in drug-treated cells, topoisomerase purification, enzyme assay using agarose gel electrophoresis, quantitative RT-PCR analysis, northern blotting techniques and oligo chip microarray analysis, respectively. **Results** Treatment of HL-60 cells with camptothecin resulted in marked inhibition of type I topoisomerase activity and in suppression of c-myc gene from quantitative RT-PCR analysis and northern blotting techniques. In contrast, no significant changes were observed in the topoisomerase I expression levels from RT-PCR analysis. In HL-60 cells treated with camptothecin, the expression of ras and topoisomerase III β gene from oligo chip microarray analysis were increased over, but the expression of c-myc and topoisomerase II α gene were decreased over. **Conclusion** Our results suggest that topoisomerase I is the target of camptothecin cytotoxicity but it does not affect topoisomerase I(type IB) expression, and the suppression of myc and topoisomerase II α mRNA expression by camptothecin is due to (1) a decrease in mRNA transcripts, and (2) an inhibition of cellular proliferation resulted from formation of a cleavable complex with drug.

Key words : Camptothecin, Topoisomerase, Expression, Ras, Myc, HL-60 cell

서론

교신저자 : 정인철
TEL : 051-990-6418 FAX : 051-990-3081
E-mail : jpf@kosin.ac.kr

* 본 연구는 고신대학교 의과대학 기초임상 연구비(1998) 일부 지원에 의하여 이루어진 것임.

DNA topoisomerase는 세포내 DNA 가닥의 절단과 재결합을 촉매하여 DNA의 supercoiling 상태를 조절하고 복제, 전사, 재조합과 유사분열 과정 등의 DNA 대사 초

기단계의 효율성에 영향을 주어, 이러한 과정들이 진행되는 단계에서 발생하는 DNA의 topological problem을 해결해 준다.¹⁻⁴⁾ Topoisomerase는 DNA 초기 대사 과정에 중요한 역할을 담당하기 때문에 그 억제제는 세포독성과 함께 DNA cleavable complex를 안정화시킴으로서 항암제의 표적 효소일 것이라 하여 임상적으로 그 중요성이 점차 증가되고 있다.⁴⁻⁶⁾ Camptothecin은 1960년대에 중국의 *Camptotheca acuminata*라는 나무에서 추출한 topoisomerase I의 저해제로서 항암 활성이 알려져⁷⁾ 현재 irinotecan, topotecan 등의 camptothecin 유도체를 이용한 다양한 저해제의 개발과 임상적 응용 그리고 암 유전자의 발현에 미치는 영향에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 새로운 유전공학적 수단으로, 작은 면적의 고체 표면위에 수백에서 수만 종류의 DNA 조각들을 고밀도 배열해 놓은 DNA chip기술의 개발로 생물의 유전 정보가 어떻게 발현되고 있는가를 대규모로 검색할 수 있게 되었다. 1990년도부터 미국을 중심으로 시작된 인간 게놈 프로젝트는 현재 인간 유전체 염기서열이 완전히 해독되어, 과거에는 한, 두 유전자에 대한 집중 연구에서 각 유전자들의 상호작용이 어떻게 이루어지며 관련된 유전자의 기능을 보다 폭 넓게 이해할 수 있게 되었다. 따라서 여러 종류의 유전자 또는 단백질의 변화를 추적하기 위한 한 방법으로 개발된 기술이 과거의 northern blot 기법을 이용한 DNA chip기술을 통한 유전자 발현 양상을 비교하면 질환의 발생기전과 함께 문제되는 유전자를 찾아낼 수 있으며, 이러한 정보가 축적되면 환자의 진단과 예측, 그리고 치료에 따른 반응을 계속 추적할 수 있는 좋은 시스템을 제공하며, 치료 약물의 개발에도 적용될 수 있다. 이러한 중요성에 따라 현재 DNA chip을 이용한 유전자 발현의 연구들이 다수 보고되고 있으나 topoisomerase 억제제들이 세포내 유전자 발현에 미치는 영향에 관하여서는 발표된 자료는 거의 없는 실정이다.

이와 같은 연구 배경에 따라 본 실험에서는 topoisomerase I의 억제제인 camptothecin이 세포내 topoisomerase 효소 활성과 유전자 발현, myc과 ras 암 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR, northern blot과 oligonucleotide microarray 기법으로 분석하여 camptothecin의 세포내 작용기전을 밝히기 위한 기초자료를

얻고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

Camptothecin은 Aldrich사에서, Triton X-100, phenylmethanesulfonylfluoride(PMSF), Tris-HCl, formamide, dithiothreitol과 proteinase K는 Sigma회사로부터, Ultrogel A6와 bovine serum albumin은 Pharmacia LKB사에서, agarose, fetal bovine serum, gentamicin과 RPMI 1640은 Gibco-BRL사에서, NuSieve GTG agarose는 FMC사에서 구입하였다. Eukaryotic DNA와 plasmid DNA의 정제용 kit는 Promega에서, total RNA정제용 kit는 Tel-Test사에서, DNA primer와 Taq DNA polymerase는 Bioneer 제품을, RNase A, pUC19는 USB사에서, HL-60세포는 KCTC에서 분양 받았고, 10k oligo chip과 관련 kit 시약들은 마크로젠에서 구입하였으며 그 외의 일반적인 시약은 분석용을 사용하였다.

2. Cell cytotoxicity 측정법

10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 2×10^4 cell/ml의 농도로 희석한 배지 10 ml에 camptothecin을 농도별 첨가하여 cell doubling time(28시간)동안 처리한 후 원심분리하면서 phosphate buffered saline으로 씻어 camptothecin을 제거하고, 56시간(two doubling time)동안 새 배지에 배양한 후 사람 백혈병 HL-60 세포 수를 hemocytometer로 측정하였다.

3. HL-60 세포에서 topoisomerase의 분리 및 이완 활성 측정법

10 % fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640배지를 사용하여 배양한 사람 백혈병 HL-60 세포를 Minford 등⁸⁾의 방법으로 핵 추출물을 얻은 후 40 % - 80 %의 ammonium sulfate를 사용하여 분별 침전시키고 하룻밤 dialysis하여 탈염과 함께 nucleus 완충액으로 평형시킨 후 Ultrogel A-6 column chromatography에 의해 효소 분획을 얻었다. Topoisomerase의 이완(relaxation) 활성은 Minford 등⁸⁾의 반응 조건에서 400 ng의 pUC19 DNA와

분리한 HL-60 topoisomerase 효소 분획을 2 μ l씩 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 0.8 % agarose gel을 사용하여 4V/cm로 전기영동을 실시하여 분석하였다.

4. RT-PCR법에 의한 c-myc과 topoisomerase I의 mRNA 정량

Total RNA purification kit를 사용하여 camptothecin을 투여한 HL-60세포로부터 정제한 RNA를 Sambrook등⁹⁾의 실험 방법에 따라 cDNA를 합성하였다. 증합효소 연쇄반응은 Saiki등¹⁰⁾의 반응 조건에서 Wong등¹¹⁾의 primer-dropping 방법을 적용하였는데, 즉 cDNA와 c-myc exon 2 또는 topoisomerase I primer 1조(표 1 참조)를 첨가하여 PCR을 7 cycle 진행한 후 β -actin primer 1조를 추가하여 17 cycle 진행시켰다. PCR 반응은 1 단계는 95°C에서 5분간 변성시키고, 57°C에서 1분간 annealing한 후, 72°C 1분간 중합시키고, 2 단계에서는 95°C 1분, 57°C 1분, 72°C 1분씩 연속 30회 반응시켰고 3 단계는 95°C 1분, 57°C 1분, 72°C 10분간 실시하여 증폭한 후 전기 영동하여 PCR 산물을 전기 용출 방법으로 분리하였고, 이를 α -³²P-dCTP를 Rediprime labeling kit (Amersham Co.)로 표지시켜 probe로 사용하였다.

Table 1. The sequences of primer pair used

name	primer set	sequences (5'→3')	product size
Topo I	sense	AAGCAGAGGAAGTAGCTACG	206bp
	antisense	GCTCATCTGTTCCGAGCTT	
c-myc (exon 1)	sense	GTGAATTCATGCGGCTCT	965bp
	antisense	CCAAGCTTGACAAGTCAC	
c-myc (exon 2)	sense	AAGAGGCGAACACACAACGT	218bp
	antisense	AACTGTTCTCGTCGTTTCCG	
β -actin	sense	GTGGGGCGCCCCAGGCACCGGGC	540bp
	antisense	CTCCTTAATGTACGCACGATTTC	

5. Northern blot hybridization에 의한 유전자 발현 분석

HL-60세포에서 camptothecin을 투여시에 c-myc 유전자의 발현이 어떻게 조절되는지 확인하기 위하여 세포로부터 정제한 total RNA를 Sambrook등⁹⁾의 방법에 따라 northern hybridization을 실시하였다. Hybridization에 필요

한 probe는 c-myc exon 1 primer 1조(표 1 참조)를 사용하여 pUC19에 사람 c-myc 유전자를 cloning한 pUC-MYC I plasmid DNA를 기질로 하여 c-myc exon 1 유전자 절편을 PCR 법으로 합성하였다. 반응 조건은 1 단계는 95°C에서 5분간 변성시키고, 57°C에서 1분간 annealing한 후, 72°C 1분간 중합시키고, 2 단계에서는 95°C 1분, 57°C 1분, 72°C 1분씩 연속 30회 반응시켰고 3 단계는 95°C 1분, 57°C 1분, 72°C 10분간 실시하여 증폭한 후 전기 영동하여 PCR 산물을 전기 용출 방법으로 분리하였고, 이를 α -³²P-dCTP를 Rediprime labeling kit (Amersham Co.)로 표지시켜 probe로 사용하였다.

6. Oligo chip에 의한 microarray hybridization

HL-60 세포를 약물을 처리하지 않은 control group과 camptothecin을 처리한 test group으로부터 각각 total RNA를 분리한 후 각각 Cy3과 Cy5 형광물질로 표지시킨 후 Oligo chip에 대한 microarray hybridization을 실시하였다. 형광물질로 표지된 microarray chip상의 topoisomerase, myc 그리고 ras 유전자를 포함한 10K 유전자 각각에 대한 intensity를 Affymatrix사의 428 Array Scanner로 측정하고 통계 프로그램을 사용하여 분석하였다.

결 과

1. HL-60 사람 백혈병 세포에서 camptothecin에 의한 세포 독성 검사

약물에 의해 세포내의 일정한 생육 조건에서 topoisomerase의 활성과 c-myc과 topoisomerase I 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 우선 camptothecin 투여시 세포의 생육에 미치는 영향을 조사하였다. ml당 2×10^4 세포를 10 ml의 배양액을 분주한 25 cm²의 culture flask에 camptothecin을 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 nM을 각각 투여한지 28시간 후 정상 배지로 갈아주고 다시 56시간(two doubling time) 배양하여 세포의 생육 정도를 비교한 결과(그림 1) 2.5 nM의 camptothecin을 투여하였을 때 80 %, 4 nM의 경우 50 %의 생육도를 나타내었다.

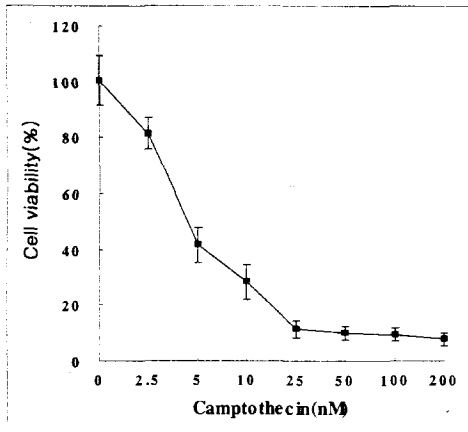


Fig. 1. The growth effects of various concentrations of camptothecin on HL-60 cell lines

Cells were suspended in RPMI 1640 medium at a level of 2×10^4 cells/ml. They were treated 2 days later with increasing concentrations of camptothecin 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

2. Camptothecin이 HL-60 사람 백혈병 세포의 topoisomerase 활성에 미치는 영향

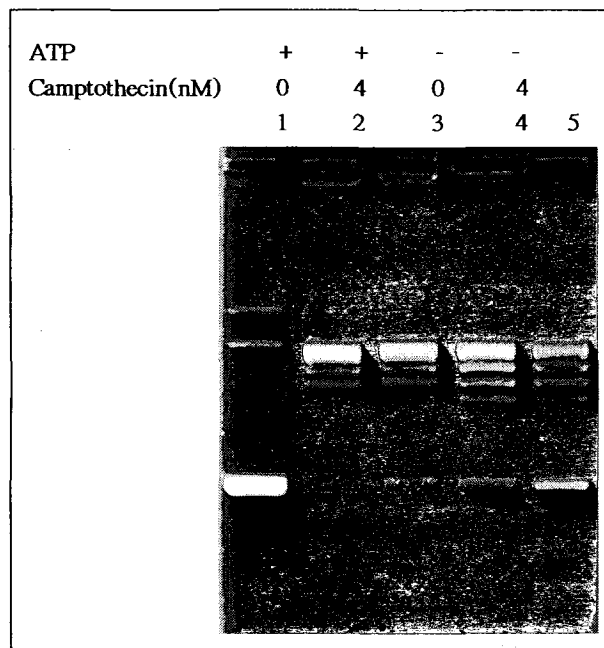


Fig. 2. Topoisomerase activity of nuclear extract from HL-60 cells treated with camptothecin(CPT)

Lane 1; pUC19 DNA(400 ng) only, lane 2; lane 1 + topo II reaction buffer(with 1 mM ATP) + nuclear extract, lane 3; lane 2 + 4 nM CPT, lane 4; lane 1 + topo I reaction buffer (without ATP) + nuclear extract, lane 5; lane 4 + 4 nM CPT. Extraction of nuclear extract was performed as described in "Materials and Methods". After 30 min incubation at 37 °C, the reaction mixture was subjected to 0.8 % agarose gel electrophoresis followed by Et-Br staining.

그림 1에서 camptothecin을 2.5 nM과 4 nM을 투여하였을 때 각각 약 80 %와 50 %의 생육도를 나타내었는데 4 nM의 조건에서 HL-60세포 핵 추출물의 ATP 존재여부에 따른 topoisomerase 활성을 약물을 투여하지 않은 대조구와 비교하였다(그림 2). Lane 2와 3은 반응시 ATP를 첨가한 경우이므로 세포의 topoisomerase I, II 활성을 나타내며, lane 4와 5는 topoisomerase I의 활성을 측정한 결과인데, camptothecin 투여에 의해 topoisomerase I의 활성이 현저히 억제됨을 확인하였다.

3. Camptothecin이 topoisomerase I 유전자와 c-myc 유전자 발현에 미치는 영향

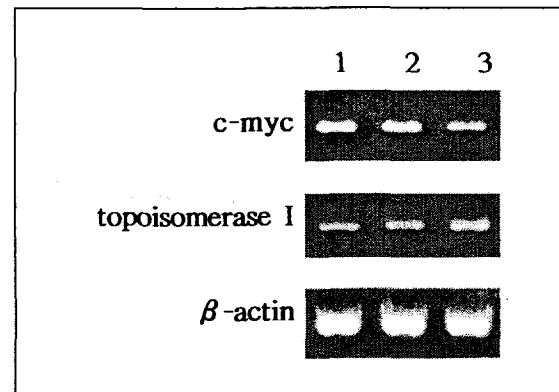


Fig. 3. Quantitation of the c-myc and topoisomerase I mRNA by RT-PCR in HL-60 cells treated with camptothecin(CPT) The mRNA is extracted from the cells using mRNA isolation kit. Determination of mRNA expression by polymerase chain reactions by the primer-dropping method described in "Materials and Methods". Lane 1; control, lane 2, 3; effects on c-myc expression of treatment with 2 nM, 4 nM CPT, respectively

Camptothecin을 2 nM과 4 nM을 각각 HL-60세포에 투여시 topoisomerase I을 생성하는 유전자와 c-myc 유전자의 발현에 어떻게 작용하는지 관찰하기 위하여 RT-PCR 기법으로 topoisomerase I과 c-myc mRNA 농도를 비교

분석한 결과, topoisomerase I mRNA는 약간 증가하였으나 c-myc mRNA 발현은 현저한 감소현상을 나타내었다(그림 3). 그리고 total RNA를 분리하여 전기 영동한 후 nylon지에 옮겨 ^{32}P 로 표지한 probe를 사용하여 hybridize한 후 autoradiography하여 c-myc 유전자 발현을 확인한 실험에서도 camptothecin의 농도(0, 2, 4 nM)의 증가에 따라 현저히 감소하는 현상을 나타내었다(그림 4).

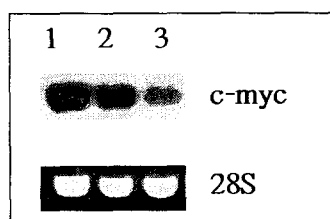


Fig. 4. Northern blot analysis of c-myc RNA in HL-60 cells treated with camptothecin(CPT)

20 μg of total RNAs were electrophoresed in denaturing agarose gel, transfer to nitrocellulose membrane, hybridized to ^{32}P -labeled probe. Northern blot analysis was performed as described in "Materials and Methods". Lane 1; control RNA, lane 2; CPT(2 nM), lane 3; CPT(4 nM)

4. HL-60 사람 백혈병 세포에서 camptothecin에 의한 세포 유전자 발현 양상

약물을 투여하지 않은 정상 HL-60 세포와 4 nM의 camptothecin을 투여한 세포에서 각각 total RNA를 추출하고 RT-PCR한 후 각각 Cy3, Cy5의 형광물질로 표지하여 10K human oligo chip상에 하룻밤 hybridization하고 세정후 Affymatrix사의 428 Array Scanner로 scan하여 형광 감도 해석 프로그램을 사용하여 얻은 Cy3과 Cy5의

감도 값을 얻고, house keeping gene의 감도 값, 외부 유전자의 감도 값을 가지고 보정한 후 통계 처리하여 10K 유전자의 발현 양상을 Scatter plot(그림 5)하였다. 이 10K 유전자중에 camptothecin을 투여에 따라 정상 군에 비해 2배 이상 증가 또는 1/2이하 감소를 보인 topoisomerase, myc 그리고 ras 유전자들의 발현 양상을(표 2)에 열거하였으며, 이를 막대 그래프로 나타내어 topoisomerase 유전자와 myc, ras 유전자의 발현 양상을 비교 검토하였다(그림 6). 그 결과 camptothecin에 의해 topoisomerase III β 와 topoisomerase II α 유전자의 발현은 약간 증가하였으나 topoisomerase I의 발현은 약간 억제되는 경향을 나타내었고, myc 암유전자의 발현은 대체로 억제된 반면 ras 유전자의 발현은 현저히 증가되었다.

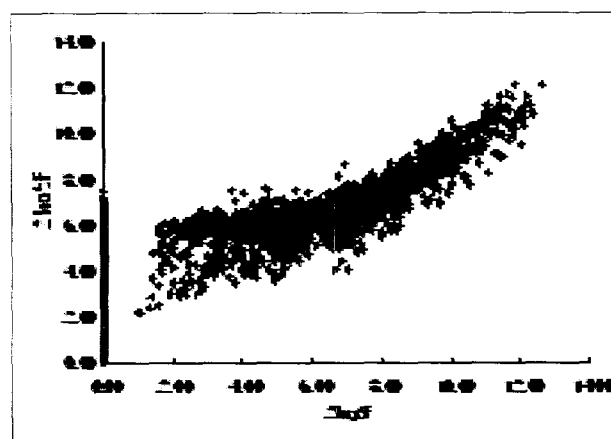


Fig. 5. Scatter plot analysis comparing the expression levels of 10K genes between camptothecin- treated (Cy5) and camptothecin-untreated(Cy3) HL-60 cells.

Table 2. List of the expression levels of topoisomerase, ras and myc genes between camptothecin-treated(Cy5) and camptothecin-untreated(Cy3) HL-60 cells.

Gene	2log(3F/5F)	Description
XM_009862.1	-1.16	topoisomerase (DNA) III beta (TOP3B), mRNA
XS2601.1	-0.39	htopI topoisomerase 5' end
XM_008649.1	0.88	topoisomerase II alpha 170kd top2 α
XM_007500.1	0.02	N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2), mRNA
XM_017052.1	-0.15	hypothetical protein FLJ13556 similar to N-myc downstream regulated 3 (FLJ13556), mRNA
XM_018292.1	0.83	MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor) (MAZ), mRNA
XM_045256.1	1.51	myc promoter-binding protein LOC81977
XM_001559.1	1.04	myc promoter-binding protein 1 (LOC81977), mRNA
XM_001867.1	-2.37	RAB4, member RAS oncogene family (RAB4), mRNA
XM_008172.1	-2.03	similar to ras-related protein (H. sapiens) (LOC63428), mRNA

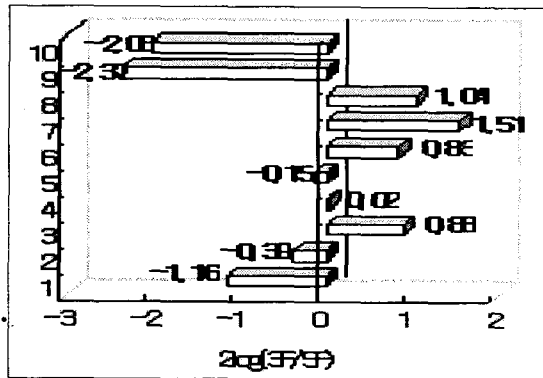


Fig. 6. Comparison of the expression levels of topoisomerase, ras and myc genes between camptothecin-treated(Cy5) and camptothecin-untreated(Cy3) HL-60 cells.

1; topoisomerase (DNA) III beta (TOP3B), mRNA, 2; htop1 topoisomerase 5'end, 3; topoisomerase II alpha 170kd, 4; N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2), mRNA, 5; hypothetical protein FLJ13556 similar to N-myc downstream regulated 3 (FLJ13556), mRNA, 6; MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor) (MAZ), mRNA, 7; myc promoter-binding protein LOC81977, 8; myc promoter-binding protein 1 (LOC81977), mRNA, 9; RAB4, member RAS oncogene family (RAB4), mRNA, 10; similar to ras-related protein (H. sapiens) (LOC63428), mRNA

고찰

DNA와 topoisomerase의 반응은 topoisomerase가 DNA의 phosphodiester bond를 절단하고 topoisomerase의 tyrosine기의 OH와 phosphodiester bond가 형성되어 효소와 DNA 사이에 공유 결합한 "cleavable complex"를 이룬 후에 다시 끊어졌던 DNA 부위가 재 봉합되는 특징을 가지고 있다^{12,13}. 현재까지 발견된 topoisomerase의 저해제중 topoisomerase II에 대한 저해제는 많이 있으나 topoisomerase I의 억제제로는 *Camptotheca acuminata*에서 추출한 camptothecin과 그 유도체만이 알려져 있으며 새로운 항암 활성을 가진 억제제를 발견하기 위한 노력이 계속되고 있다⁷. Camptothecin의 작용기전은 topoisomerase 촉매 반응의 전 단계인 phosphodiester bond 절단 과정에는 영향을 주지 않으며 그 후속 단계인 phosphodiester bond의 재봉합을 방해하여 "cleavable complex"를 형성하는데 camptothecin은 3'-phosphotyrosyl-공유 결합에 의한 중간 산물을 형성하여 DNA 재

봉합을 방해하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 topoisomerase 억제제들의 작용에 의해 DNA 복제, 전사, 재조합과 유사분열 과정에 영향을 미치게 되면 유전자 발현의 변화를 초래할 것이며, 특히 암 유전자 발현의 억제에 의해 항암 활성을 가질 것으로 추정하고 있다.¹⁴ 본 연구에서는 camptothecin을 처리한 HL-60 세포에서 분리한 핵 추출물에서 topoisomerase의 활성을 측정하였을 때 대조 구에 비해 활성이 현저히 억제되었는데 특히 ATP를 첨가하지 않은 군에서 현저한 억제 현상을 나타내었다(그림 2). 이는 type I topoisomerase에는 영향을 미치지만 type II 효소에는 작용하지 않음을 나타낸다. 이와 비슷한 실험으로 1999년 Pu등¹⁵이 type II 억제제인 melphalan (alkylator)을 HL-60세포에 투여하여 내성을 가진 세포주에서 Topo II α 의 활성은 증가한다고 하였으나 Topo II β 와 Topo I의 활성에는 아무 변화가 없는 것을 확인한 바 있는데, 이들 실험을 통해 억제제와 세포내에서 생성한 그 대사산물들의 작용도 *in vitro*에서의 억제 작용과 같은 경향을 보이는 것을 알 수 있었다. 그리고 RT-PCR기법에 의한 mRNA 분석 기법은 1989년 이후부터 여러 편 소개된 바 있는데^{11,14,16,17} 본 실험에서도 competitive RT-PCR 방법으로 topoisomerase I 유전자의 발현을 확인하였으며(그림 3), type I 효소 활성의 감소에 따라 topoisomerase I mRNA는 대조 구에 비해 약간 증가한 것으로 나타났다. 그러나 Perego등¹⁸이 여러 type의 사람 세포주에서 camptothecin에 의한 topoisomerase I의 유전자 발현을 조사한 결과와는 약간의 차이가 있으나, 핵 추출물의 topoisomerase I 활성 실험에서 효소 활성이 약물에 의해 크게 억제되는 점으로 미루어 볼 때, camptothecin은 topoisomerase I의 기능에는 영향을 나타내지만 효소 발현의 조절에는 큰 영향을 주지 못하는 것으로 여겨진다. 반면 camptothecin을 처리한 군에서 RT-PCR법으로 c-myc 유전자 발현의 변화를 분석한 결과 c-myc 유전자 발현이 현저히 억제되었는데 northern blot 분석에서도 비슷한 양상을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Jain등¹⁹이 MCF-7 사람 유방암 세포에서 camptothecin에 의해 c-myc 유전자 발현을 억제한다고 한 것과 일치한다.

DNA chip은 slide glass상에 수백에서 수천 개의 DNA 유전자를 정렬, 고정화 한 것으로 해석하고자 하는 세포

에서 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 발현 해석을 위한 강력한 screening tool로 이용되고 있다. 이 microarray 기술은 DNA chip 종류에 따라 cDNA chip과 oligonucleotide chip으로 나눈다. cDNA chip은 gene expression monitoring, 인체 질환 진단, 환경인자에 대한 생물학적 반응 연구, pharmacogenomics, 식품 안전성 검사에 이용될 수 있으며, oligonucleotide chip은 유전 질환의 유전자 변이 검색, SNP 분석, 병원성 미생물 동정, 법의학적 응용등에 이용될 수 있다. Microarray 기법을 이용한 topoisomerase와 관련하여 Wang 등²⁰⁾이 topoisomerase II 억제제인 etoposide 투여에 따른 유전자 발현 양상을 oligonucleotide array 기법으로 분석하였고, Sujuki 등²¹⁾과 Zhou 등²²⁾은 각각 genistein과 camptothecin 처리한 암세포 주에서 cDNA microarray 기법으로 일부 유전자에 대하여 분석한 연구 이외에는 거의 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 HL-60 사람 백혈병 세포에 camptothecin을 투여함에 따라 세포 유전자의 변화 중에 특히 topoisomerase, ras와 myc 유전자의 발현에는 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 DNA chip 기법을 이용하여 분석하였다. 우선 약물의 적정 투여량을 결정하기 위하여 세포 독성 실험을 통해 약 80%의 생존율을 나타내는 조건에서 약물을 투여한 후 핵내 topoisomerase의 활성과 함께 myc, ras oncogene과 topoisomerase 유전자 발현의 변화를 확인하였다. Camptothecin을 투여하였을 때 type I 효소인 topoisomerase III β 의 발현은 현저하게 증가된 반면 II α 와 myc과 관련된 유전자의 발현은 억제되었으며 topoisomerase I의 발현은 약간 증가하였다. 이는 앞의 competitive RT-PCR 방법으로 분석한 결과와 거의 일치한다. Ras oncogene과 그의 산물인 ras 단백질은 GTP 결합 단백질 group에 속하며 세포의 증식과 성장에 필요한 신호전달 경로에서 또한 신경세포의 분화과정에 중요한 역할을 하며, 이의 변이로 인한 ras 단백질이 암을 유발한다는 사실이 밝혀지면서 많은 관심과 연구의 대상이 되어왔다. 본 실험에서 camptothecin이 ras 유전자의 발현에 미치는 영향에 대하여 조사한 결과 다른 유전자에 비해 발

현이 현저히 증가되었는데, 그 기전에 대해서는 앞으로 더 연구하여야 할 것으로 사료된다.

결론

Camptothecin을 투여한 HL-60 세포에서 topoisomerase, ras 그리고 myc 유전자의 발현 양상을 조사한 결과, camptothecin은 topoisomerase I의 세포 독성을 나타내는 표적으로 작용하지만 topoisomerase I 유전자의 발현을 크게 조절하지 않으며, 세포내 c-myc 암 유전자의 발현은 억제하나 ras 암 유전자의 발현은 증가시키는 것으로 여겨진다.

참고문헌

1. Christman MF, Dietrich FS, Frink GR : Mitotic recombination in the rRNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of topo I and II. *Cell* 55:413-425, 1988
2. Schornburg U, Grosse F : Purification and characterization of DNA topoisomerase II from calf thymus associated with polypeptides of 175 and 150 kDa. *Eur J Biochem.* 160(3): 451-457, 1986
3. Wang JC : DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem.* 54: 665-697, 1985
4. Wang JC : Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* 909:1-9, 1987
5. Liu LF : DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem.* 58:351-375, 1989
6. Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, Wang JC : Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 379(6562):225-232, 1996
7. Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA : Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor. *J Am Chem Soc.* 88(16): 3888-3890, 1966
8. Minford J, Pommier Y, Filipinski J, Kohn KW, Kerrigan D, Mattern M, Michaels S, Schwartz R, Zwelling LA : Isolation of intercalator-dependent protein-linked DNA strand cleavage activity from cell nuclei and identification as topoisomerase II. *Biochemistry* 25(1):9-16, 1986
9. Sambrook J, EF, Maniatis T : Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory 2nd eds:1.53-1.84, 1989
10. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA : Primer-directed enzymatic

amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239(4839):487-491, 1988

11. Wong H, Anderson WD, Cheng T, Riabowol KT : Monitoring mRNA Expression by polymerase chain reaction: The "primer-dropping" method. Anal Biochem. 223:251-258, 1994
12. Champoux JJ : DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. Annu Rev Biochem. 70:369-413, 2001
13. Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WG, Champoux JJ : A model for the mechanism of human topoisomerase I. Science 279(5356):1534-1541, 1998
14. Wang J, Medeiros J, Longo DL, Mansoor A, Raffeld M, Duffey PL, Jaffe ES, Stevenson MS : Use of the polymerase chain reaction technique to determine c-myc expression in follicular center cell lymphoma. Diagnostic Mol Pathol. 5(1):20-25, 1996
15. Pu QQ, Bezvoda WR : Induction of alkylator (melphalan) resistance in HL60 cells is accompanied by increased levels of topoisomerase II expression and function. Mol Pharmacol. 56(1):147-153, 1999
16. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF : Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 87(7):2725-2729, 1990
17. Wang AM, Doyle MV, Mark DF : Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA. 86:9717-9721, 1989
18. Perego P, Capranico G, Supino R, Zunino F : Topoisomerase I gene expression and cell sensitivity to camptothecin in human cell lines of different tumor types. Anticancer Drugs. 5(6):645-649, 1994
19. Jain PT, Fornari FA, Randolph JK, Orr MS, Gewirtz DA : 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(8):1263-1269, 1998
20. Wang Y, Rea T, Bian J, Gray S, Sun Y : Identification of the genes responsive to etoposide-induced apoptosis : application of DNA chip technology. FEBS Lett. 445(2-3):269-273, 1999
21. Suzuki K, Koike H, Matsui H, Ono Y, Hasumi M, Nakazato H, Okugi H, Sekine Y, Oki K, Ito K, Yamamoto T, Fukabori Y, Kurokawa K, Yamanaka H : Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. Int J Cancer. 99(6):846-852, 2002
22. Zhou Y, Gwadry FG, Reinhold WC, Miller LD, Smith LH, Scherf U, Liu ET, Kohn KW, Pommier Y, Weinstein JN : Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects. Cancer Res. 62(6):1688-1695, 2002