

Doxorubicin이 HL-60 사람 백혈병 세포내 topoisomerase 의 활성과 발현에 미치는 영향

조무연, 정인철

고신대학교 의과대학 생화학 교실

Effects of doxorubicin on the activity and expression of topoisomerase in HL-60 human leukemia cells

Moo Youn Cho, In Cheol Jeong

Department of Biochemistry, Kosin University College of Medicine, Busan 602-702, Korea

Abstract

Background DNA topoisomerases are essential enzymes present in all organisms. They modify DNA topology in connection with a number of nuclear processes, such as replication, transcription, chromatin remodeling, chromatin condensation/decondensation, recombination and repair. In the strand-breakage reaction by a DNA topoisomerase, a tyrosyl oxygen of the enzyme attacks a DNA phosphorus, forming a covalent phosphotyrosine link and breaking a DNA phosphodiester bond at the same time. DNA topoisomerases have been shown to be the molecular targets of many antimicrobial and anticancer agents. Among topoisomerase-targeting drugs in clinical use at present, most act by trapping the covalent DNA-enzyme intermediates to convert a normal cellular enzyme to a DNA damaging agent. This study was designed to elucidate whether pretreatment of HL-60 human leukemia cells with the topoisomerase I - directed drug doxorubicin would increase the expression of topoisomerases and to investigate the activity of topoisomerase mediated by doxorubicin in nuclear extract from HL-60 human leukemia cells. **Methods** We have conducted experiments on topoisomerase assay using gel electrophoresis, pUC-X I cloning, DNA sequencing, cell cytotoxicity in drug-treated cells, topoisomerase purification, quantitative RT-PCR analysis, northern blotting techniques, respectively. **Results** Doxorubicin inhibited the relaxation activity of topoisomerase in pUC19 DNA at various concentrations (0.4 - 50 μ M), while it enhanced the cleavage of topoisomerase in the pUC-X I by forming a cleavable complex at 0.4-2 μ M. The levels of the topoisomerase II α mRNA from RT-PCR analysis and northern blot were increased in HL-60 cells treated with doxorubicin, whereas the expression of topoisomerase I and II β mRNA from RT-PCR analysis remained no significant change. **Conclusion** Our results suggest that overexpression of topoisomerase II α mRNA by topoisomerase II-directed drug treatment is due to stabilizing drug-enzyme-DNA "cleavable complex".

Key words : Doxorubicin, Topoisomerase activity, Expression, HL-60 cells

서론

DNA topoisomerase는 DNA 가닥의 절단과 재결합을 촉매하여 DNA의 topological 상태를 조절하는 효소로서 복제, 전사, 재조합과 유사분열 과정 등의 DNA 대사에 관여한다.¹⁻⁴⁾ 이와 같이 topoisomerase는 DNA 초기 대사 과정에 중요한 역할을 담당하기 때문에 그 억제제는 세포 독성과 함께 DNA cleavable complex를 안정화시킴으

교신저자 : 정 인 철
TEL : 051-990-6418 FAX : 051-990-3081
E-mail : jpfe@kosin.ac.kr

* 본 연구는 고신대학교 의과대학 연구비(2001)일부 지원에 의하여 이루어진 것임.

로서 항암제의 표적 효소일 것이라 하여 임상적으로 그 중요성이 점차 증가되고 있다.^{4,6)} 현재까지 발견된 대표적인 bacterial gyrase 저해제로서 novobiocin, coumermycin A1, nalidixic acid 그리고 oxolinic acid 등이 있고, topoisomerase I의 저해제로는 1960년대에 중국의 *Camptotheca acuminata*라는 나무에서 추출한 camptothecin (CPT)의 항암 활성이 알려져⁷⁾ 현재 irinotecan, topotecan 등의 camptothecin 유도체를 이용한 다양한 저해제의 개발과 임상적 응용에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 또한 eukaryotic DNA topoisomerase II 저해제로는 mAMSA, doxorubicin, actinomycin D, idarubicin, daunorubicin, mitoxantrone, ellipticine, epipodophyllotoxin 계열의 VP-16과 VM-26, genistein 등이 있다. 이러한 topoisomerase 억제제들의 작용에 의해 DNA 복제, 전사, 재조합과 유사분열 과정에 영향을 미치게 되면 특히 암 유전자 발현의 억제에 의해 항암 활성을 가질 것으로 추정됨으로 억제제들의 암 유전자 발현에 미치는 영향에 대한 보고⁸⁾들 중 특히 c-myc에 대한 연구⁹⁻¹²⁾들이 다수 있지만 이들 억제제들의 작용에 따른 표적 효소인 topoisomerase의 유전자 발현에 대한 연구들은 거의 없는 실정이다.

이와 같은 연구 배경에 따라 본 실험에서는 topoisomerase II의 억제제인 doxorubicin을 투여한 사람 백혈병 HL-60 세포로부터 topoisomerase의 활성화와 발현에 미치는 영향을 조사하여 topoisomerase II 억제제들의 세포내 작용기전을 밝히기 위한 기초자료를 얻고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

Doxorubicin, ATP, Tris-HCl, formamide, dithiothreitol과 proteinase K는 Sigma회사로부터, bovine serum albumin(BSA)은 Pharmacia LKB사에서, γ -³²P-ATP, α -³²P-dCTP, restriction enzyme, Hyperfilm-MP, Hybond N⁺와 rediprime labeling kit는 Amersham사 제품을, 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, pUC19과 HB101세포는 USB사에서, HL-60 세포는 KCTC에서 분양 받았고 그 외의 일반적인 시약은 분석용을 사용하였다.

2. Type II topoisomerase 의 이완 활성 측정법

Type II topoisomerase의 이완(relaxation) 활성은 Minford 등¹³⁾의 방법으로 측정하였으며, 효소의 활성은 37 °C에서 30분내에 400 ng의 DNA를 완전히 relax시키는 효소의 양을 1 unit로 정하였다.

3. pUC-X I DNA의 제조

pUC-X I DNA 제조 과정은 HB101세포로부터 DNA isolation kit를 사용하여 DNA를 정제하고 X-1 sense primer와 X-2 antisense primer (표 1 참조), polymerase chain reaction (PCR) premix-top (Bioneer 사)을 사용하여 PCR을 실시하였다. 반응온도는 1 단계는 95°C에서 5분간 변성시키고, 51°C에서 1분간 annealing한 후, 72°C 1분간 중합시키고, 2 단계에서는 95°C 1분, 51°C 1분, 72°C 1분 씩 연속 60회 반응시켰고 3 단계는 95°C 1분, 51°C 1분, 72°C 10분간 실시하여 459 bp의 DNA 절편을 합성하였다. PCR 산물과 pUC19 DNA를 각각 EcoR I과 Hind III를 처리한 후 phenol/chloroform으로 단백질을 제거하고 ethanol로 침전시켜 각각의 DNA를 회수하고, 합성한 DNA를 Sambrook 등¹⁴⁾의 방법에 따라 vector에 삽입하고, 형질전환을 유도한 후 재조합 plasmid(pUC-X I)를 분리하였다.

4. DNA 염기서열 결정

순수분리한 pUC-X I DNA를 X-1 sense primer를 사용하여 형광 염기 자동 분석장치(ABI model 3700)를 이용하여 염기 서열을 결정하였다.

5. Type II 효소의 DNA cleavage 활성 측정법

5' 끝에 ³²P가 표지된 pUC-X I DNA 절편을 얻기 위하여 pUC-X I DNA를 Eco R I으로 잘라 Sambrook 등¹⁴⁾의 방법에 따라 5'-말단에 ³²P를 표지한 후 Hind III로 절단

하여 agarose gel 전기영동하고 linear한 459 bp의 DNA 절편을 전기 용출 방법으로 회수하였다. Topoisomerase에 의한 효소활성은 앞의 이완 활성 측정법과 같은 방법으로 분석하였으며, 1.2 % agarose gel 전기영동에서 2 V/cm의 속도로 15시간 동안 전개시킨 후 autoradiography하였다.

6. Cell cytotoxicity 측정법

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

7. RT-PCR법에 의한 topoisomerase의 mRNA 정량

Total RNA purification kit를 사용하여 doxorubicin을 투여한 HL-60세포로부터 정제한 total RNA를 Sambrook 등¹⁴⁾의 방법에 따라 cDNA를 합성하였다. 그리고 cDNA 합성 반응 후 증합효소 연쇄반응 시약 조성은 Saiki 등¹⁵⁾과 Wang 등¹⁶⁾의 방법에 따랐으며, 다음과 같이 Wong 등¹⁷⁾의 primer-dropping 방법을 이용하여 반응시켰다. 우선 cDNA와 topoisomerase I, II α , II β primer 1조(표 1 참조)를 각각의 PCR용 원심관에 첨가하여 PCR 반응을 7 cycle 진행한 후 β -actin primer 1조를 추가하여 17 cycle 진행시켰다. PCR 반응온도는 1 단계는 95°C에서 5분간 변성시키고, 57°C에서 1분간 annealing한 후, 72°C 1분간 증합시키고, 2 단계에서는 95°C 1분, 57°C 1분, 72°C 1분씩 topoisomerase는 23 cycle, β -actin은 17 cycle씩 반응시킨 후 2% NuSieve GTG agarose gel상에 4V/cm로 전기영동하여 topoisomerase의 mRNA양을 비교 분석하였다.

8. Northern blot hybridization에 의한 유전자 발현 분석

HL-60세포에서 doxorubicin 투여에 의해 topoisomerase II α 유전자의 발현이 어떻게 조절되는지 확인하기 위하여 Sambrook 등¹⁴⁾의 방법에 따라 northern blot hybridization 후 autoradiography 하였다. Hybridization에 필요한 probe는 topoisomerase II α primer 1조(표 1 참조)

를 사용하여 HL-60세포에서 정제한 genomic DNA를 기질로 하여 topoisomerase II α 유전자 절편을 pUC-X I DNA 제조 과정과 같은 조건에서 PCR법으로 합성한 후 Rediprime labeling kit (Amersham Co.)를 사용하여 α -³²P-dCTP를 표지시켜 probe로 사용하였다.

Table 1. The sequences of primer pair used

name	primer set	sequences (5'→3')	product size
X-1	sense	GTGAATTCATGCGGCTCT	459bp
-2	antisense	TAAAGCTTCGTGGATGCG	
Topo I	sense	AAGCAGAGGAAGTAGCTACG	206bp
	antisense	GCTCATCTGTTTCCGAGCTT	
Topo II α	sense	AGTCGCTTTCAGGGTCTTGAG	75bp
	antisense	TTTCATTTACAGGCTGCAATGG	
Topo II β	sense	GTGGAATGTTGGGAGCA	108bp
	antisense	CAATCTTTCTTTGACCTATTTCTATAGTA	
β -actin	sense	GTGGGGCGCCCGAGGCACGAGGGC	540bp
	antisense	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	

결 과

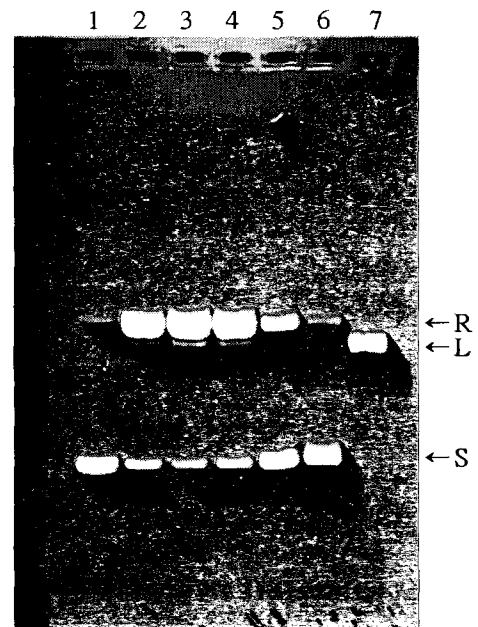


Fig. 1. Effect of doxorubicin on the relaxation activity of type II topoisomerase

The relaxation activity was analyzed by the agarose gel assay described in "Materials and Methods". The gel mobilities for the different DNA forms are indicated for each gel, where form S is supercoiled, form R is relaxed circular, form L is linear DNA. Each lane was used 500 ng of pUC19 DNA. Lane 1; pUC19 DNA only, lane 2; lane 1 + type II topoisomerase (80 ng), lane 3,4,5,6; lane 2 + 0.4, 2, 10, 50 μ M doxorubicin, respectively, lane 7; pUC19/Hind III

cloned DNA					
1	GCTCGTTATC	GAGCTGTTTG	TCGATNCCCG	GNAATTAGGC	TACCCGCCAG 50
51	TCGGCACGCC	AAAGTTATCC	ACCGGCAGCT	CACCGCTACG	GGTTAAGGTT 100
101	GTGACTTTGC	GTTTCGATATC	GAGAATAGCA	GAGGACGGGG	TCGCGAGTTC 150
151	ATCTGCCACA	TGGCCATACA	GATGGCCCAT	CTGGGTAAAT	AACTCACGCA 200
201	TATGTCGCGC	ACCACCGCCG	GAAGCGGCCT	GGTAGGTTGC	AGCGGACACC 250
251	CAATCAACAA	GATCATTGGC	GAATAAACCA	CCCAACGACA	TCAACATCAG 300
301	GCTTACGGTA	CAGTTACCGC	CAACAAAAGT	CCTGATGCCA	TTATTTAATC 350
351	CGTCGGTAAT	GACGTCCTGA	TTGACGGGGT	CAAGAATGAT	GATGGCGTCA 400
401	TCTTTCATGC	GCAGAGACGA	TGCTGCGTCA	ATCCAGTAAC	CTTGCCATCC 450
451	GCATCCACGA	AGCTTGCGGT	AATCATGGTC	ATAGCTGTTT	CCTGTGTGAA 500
501	ATTGTTATCC	GCTCACAATT	CCACACAACA	TACGAGCCGG	AAGCATAAAG 550
551	TGTAAAGCCT	GGGGTGCCTA	ATGAGTGAGC	TAATCAGCAT	TAATTGCGTT 600
601	GCGCTCACTG	CCCGCTTTCC	AGTCGGGAAA	CCTGTCGTGC	CAGCTGCATT 650
651	AATGAATCGG	CCAACGCGCG	GGGAGAGGCG	GTTTGCGTAT	TGGGCGCTCT 700
701	TCCGCTTCCT	CGCTCACTGA	CTCGCTGCGC	TCGGTCGTTC	GGCTGCGGCG 750
751	AGCGGTATCA	GCTCACTCAA	AGGCGGTAAT	ACNGGTATCC	ACAGAATCAG 800
801	GGGATAACGC	AGGAAAGAAC	ATGTGAGCNA	AAGGNCAGCA	AAAGGNCAGG 850
851	AACCGTAAAA	ANGGCCGCGT	TGCTGGCGTT	TTTCATAGGC	TCCGCCCCCT 900
901	GACNAGCATT	N			

Fig. 2. Partial nucleotide sequence of the pUC-X I

1. Doxorubicin이 type II topoisomerase의 활성에 미치는 영향

pUC19 plasmid를 type II topoisomerase의 기질로 사용하여 doxorubicin에 의한 topoisomerase II의 이완 활성 변화를 관찰한 결과는 (그림 1)과 같다. Doxorubicin을 0.4와 2 μ M을 첨가하였을 경우 약물을 첨가하지 않은 2번 lane에 비해 linear DNA가 증가하였으며, 10, 50 μ M로 약물의 농도의 증가함에 따라 이완 활성은 억제되는 양상을 나타내었다.

2. Linear DNA에서 doxorubicin의 농도에 따른 DNA 절단 효과

재조합 pUC-X I plasmid DNA의 염기배열을 분석한 결과는 (그림 2)와 같다. 이 DNA를 EcoR I으로 잘라 γ - 32 P-ATP로 5'-말단에 32 P를 표지하고 다시 Hind III로 절단하여 얻은 459 bp의 DNA 절편에 topoisomerase의 농도를 80 ng으로 고정하고 doxorubicin의 농도를 0 μ M, 0.4 μ M, 2 μ M을 각각 주었을 때 절단 활성은 doxorubicin의 농도에 비례하여 증가하였으며 EcoR I 자리로부터 대략 160, 200, 220, 250, 280, 320, 350위치를

절단하였다(그림 3).

3. HL-60 사람 백혈병 세포에서 doxorubicin에 의한 세포 독성 검사

DNA topoisomerase의 활성과 topoisomerase 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 doxorubicin 투여시 세포의 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 우선 실험에 사용한 HL-60세포의 doubling time은 28시간이었으며 ml당 2×10^4 세포를 10 ml의 배양액에 분주한 25 cm²의 culture flask에 doxorubicin을 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 nM을 각각 투여한지 28시간 후 정상 배지로 갈아주고 다시 56시간(two doubling time) 배양하여 세포의 생육정도를 비교한 결과(그림 4) 10 nM 이하에서는 90% 이상 생육하였고 25 nM 이상에서 급격히 세포 수가 감소하는 것을 확인하였다.

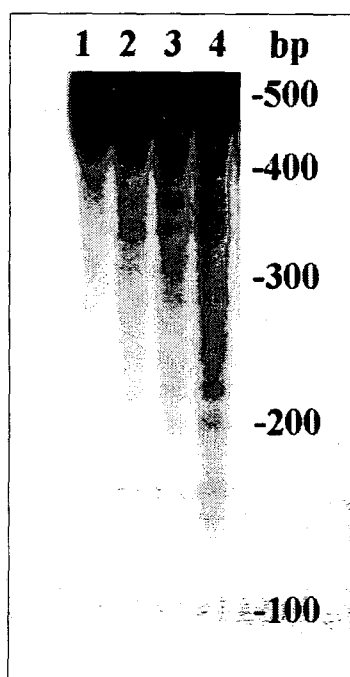


Fig. 3. Effect of doxorubicin on type II topoisomerase-mediated DNA cleavage

The cleavage activity was analyzed by the agarose gel assay described in "Materials and Methods". Lane 1; pUC-X I/EcoR I, Hind III fragment, lane 2; lane 1 + type II topoisomerase (80 ng), lane 3-4; lane 2 + 0.4 μ M or 2 μ M of doxorubicin

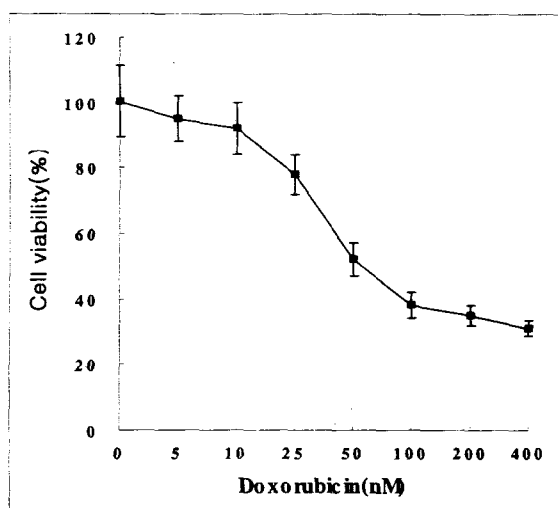


Fig. 4. The growth effects of various concentrations of doxorubicin on HL-60 cell lines

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 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

4. Doxorubicin을 투여한 HL-60 사람 백혈병 세포의 topoisomerase 활성에 미치는 영향

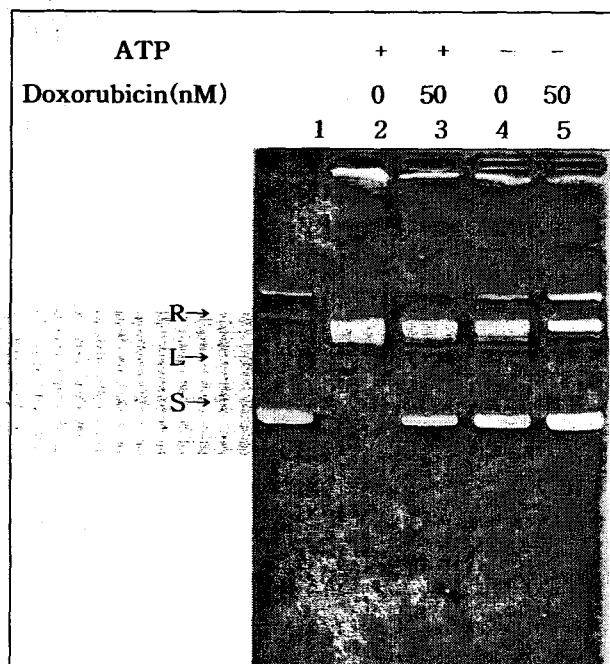


Fig. 5. Topoisomerase activity of nuclear extract from HL-60 cells treated with doxorubicin

Lane 1; pUC19 DNA (400 ng) only, lane 2; lane 1 + topo II reaction buffer (with 1mM ATP) + nuclear extract, lane 3; lane 1 + topo II reaction buffer (with 1 mM ATP) + nuclear extract (treated with 50 nM doxorubicin), lane 4; lane 1 + topo I reaction buffer (without ATP) + nuclear extract, lane 5; lane 1 + topo I reaction buffer (without ATP) + nuclear extract (treated with 50 nM doxorubicin).

Extraction of nuclear extract was performed as described in Materials and Methods". After 30 min incubation at 37 $^{\circ}$ C, the reaction mixture was subjected to 0.8% agarose gel electrophoresis followed by Et-Br staining.

그림 4에서 doxorubicin을 50 nM 투여하였을 때 약 50%의 생육도를 나타내었는데 이와 같은 조건에서 HL-60 세포 핵 추출물의 ATP 존재 여부에 따른 topoisomerase 활성을 약물 투여하지 않은 대조구와 비교하였다(그림 5). Lane 2와 3은 반응 과정에 ATP를 첨가한 경우이므로 세포의 type I, II topoisomerase 활성을 나타내며, lane 4와 5는 ATP를 제외시킨 가운데 type I topoisomerase의 활성을 측정 한 결과이다. Doxorubicin을 투여한 경우 type I에 비해 type II topoisomerase 효소 활성이 현저하게 억제됨을 확인하였다.

5. Doxorubicin이 topoisomerase 유전자의 발현에 미치는 영향

Doxorubicin을 HL-60세포에 투여시 topoisomerase를 생성하는 유전자의 발현에 어떻게 영향을 미치는지 조사하기 위하여 경쟁적 RT-PCR 기법으로 topoisomerase mRNA 농도를 비교 분석한 결과(그림 6) doxorubicin의 농도 증가에 따라 topoisomerase I, II α , II β 의 mRNA 농도의 큰 폭의 증감은 관찰되지 않았으나 topoisomerase II α 의 양은 대조구에 비해 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서 doxorubicin을 투여한 세포와 대조구로 부터 total RNA를 분리하여 전기영동하고 nylon membrane에 옮긴 후, PCR 기법으로 합성한 topoisomerase II α DNA 절편을 α -³²P-dCTP로 표지시켜 probe로 사용하여, hybridize하였을 때 RT-PCR 기법에서의 결과와 비슷한 양상으로 약물의 증가에 따라 topoisomerase II α 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(그림 7).

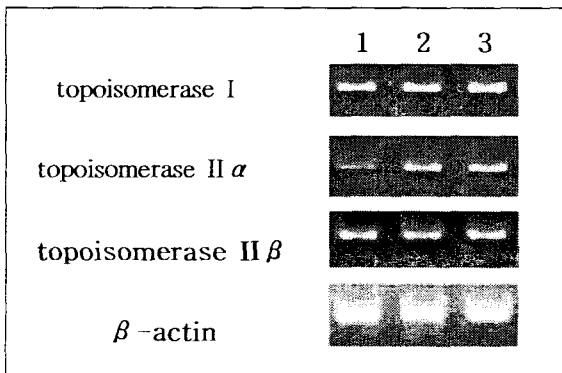


Fig. 6. Quantitation of the topoisomerase mRNA by RT-PCR in HL-60 cells treated with doxorubicin

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 topoisomerase expression of treatment with 10 nM, 50 nM doxorubicin, respectively

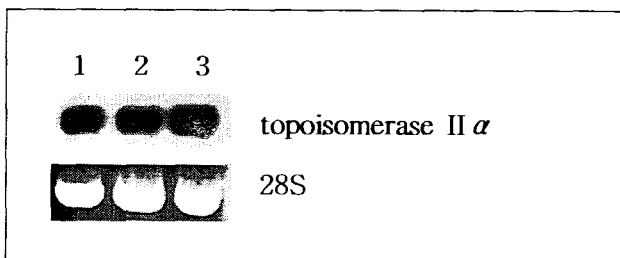


Fig. 7. Northern blot analysis of topoisomerase II α RNA in

HL-60 cells treated with doxorubicin

20 μ g of total RNAs were electrophoresed in denaturing agarose gel, transfer to nitrocellulose membrane, hybridized to ³²P-labeled probe. Northern blot analysis was performed as described in "Materials and Methods". Lane 1: control RNA, lane 2: doxorubicin(10 nM), lane 3: doxorubicin(50 nM)

고찰

Topoisomerase는 그 촉매 방법에 따라 type I topoisomerase와 type II topoisomerase로 크게 두 그룹으로 나눈다. 전자는 helix DNA의 한 가닥을 절단하고 상대편 DNA가닥을 통과시키고 절단 부분을 다시 연결하여 한 개의 DNA linking number를 변화시킨다. 후자의 경우는 supercoiling DNA의 두 가닥을 동시에 끊어 DNA의 다른 부분을 절단된 곳으로 통과시키고 절단 부위를 봉합한다. 이 때 ATP를 필요로 하며 2개의 linking number가 변화된다. DNA와 topoisomerase의 반응 메카니즘은 DNA의 phosphodiester bond를 절단한 후 topoisomerase의 tyrosine기의 OH와 phosphodiester bond를 형성하여 효소와 DNA 사이에 공유 결합한 "cleavable complex"를 이룬 후에 다시 끊어졌던 DNA 부위가 재 봉합되는 특징을 가지고 있다^{18,19)}. 또한 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⁾ 본 연구에서는 현재까지 발견된 topoisomerase II의 대표적 저해제로 항암 활성을 나타내는 doxorubicin이 type II topoisomerase의 이완 및 절단 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 supercoil된 pUC19 plasmid DNA의 이완 활성화는 이미 밝혀진 대로 topoisomerase 촉매 반응의 전 단계인 phosphodiester bond 절단 과정에는 영향을 주지 않으며 그 후속 단계인 phosphodiester bond의 재 봉합을 방해하여 cleavable complex를 유도하였다. 또한 doxorubicin에 의해 유도된 절단 위치를 살펴보면 기질인 ³²P-linear DNA를 type II topoisomerase가 선택적으로 특정한 위치를 절단하였다. 그러나 이미 분석된 염기 배열상의 특징과 절단 위치 사이에는 서로 상관성 없이 입체적으로 20-40 bp 간격을 두고 무작위 절단하는 것을 확인하였

다. 그리고 doxorubicin을 처리한 HL-60 세포내 topoisomerase의 활성을 대조구와 비교하였을 때, doxorubicin의 투여에 의해 type I topoisomerase의 활성이 약간 감소하였는데 이는 doxorubicin에 의한 세포 독성의 결과로 생각된다. 그러나 type II topoisomerase의 활성은 type I에 비해 크게 감소하였는데, 이는 topoisomerase II 억제제인 doxorubicin의 작용에 의한 것으로 생각된다. 따라서 이러한 결과를 토대로 doxorubicin에 의한 topoisomerase의 활성 억제 현상은 세포내 topoisomerase 유전자 발현에도 영향을 미칠 것으로 추측되므로, doxorubicin을 투여한 HL-60세포와 대조구로 부터 total RNA를 분리하고 Wong등¹⁷⁾의 primer-dropping 기법을 이용한 RT-PCR 방법으로 topoisomerase I, II α , II β 유전자의 발현을 조사하였다. 그 결과 topoisomerase II α 유전자 발현은 약간 증가한 반면 topoisomerase I과 II β 유전자 발현은 큰 변화가 없었다. 또한 northern blot의 결과에서도 topoisomerase II α 유전자 발현은 대조구에 비해 증가하였다. 이는 1999년 Pu등²⁰⁾이 melphalan (alkylator)을 HL-60세포에 투여하여 내성을 가진 세포주에서 topoisomerase II α 의 활성은 증가한다고 하였으나 Topo II β 와 Topo I의 활성에는 아무 변화가 없는 것을 확인한 바 있으며, Ramachandran등²¹⁾은 doxorubicin 내성을 가진 사람 melanoma 세포에서 topoisomerase II mRNA의 발현이 증가함을 보고하였는데, 본 실험과 연구 방법상의 차이는 있으나 유사한 경향을 나타내었다.

결 론

본 연구에서 doxorubicin에 의해 유도된 type II topoisomerase의 절단 위치의 동정과 doxorubicin을 투여한 사람 백혈병 HL-60 세포에서 topoisomerase 활성과 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, DNA의 염기 배열상의 특징과 topoisomerase 절단 위치와는 서로 상관성을 확인하지 못하였고, doxorubicin은 topoisomerase I의 활성과 발현의 조절에는 영향을 주지 못한 반면 topoisomerase II 활성을 감소시킴에 따라 세포내 topoisomerase II α 의 발현을 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. Schomburg 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. Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, Wang JC : Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 379(6562): 225-232, 1996
6. Liu LF : DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem.* 58:351-375, 1989
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. 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
9. Clary A, Larrue A, Pourquier P, Robert J : 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(3):245-254, 1998
10. Fornari FA Jr, Jarvis DW, Grant S, Orr MS, Randolph JK, White FK, Gewirtz DA : 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(7):931-940, 1996
11. 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
12. Orr MS, Fornari FA, Randolph JK, Gewirtz DA : 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.* 9:1262(2-3): 139-145, 1995
13. 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
14. Sambrook J, EF, Maniatis T : Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory 2nd eds:1.53-1.84, 1989
 15. 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
 16. Wang AM, Doyle MV, Mark DF : Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:9717-9721, 1989
 17. 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
 18. Champoux JJ : DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*. 70:369-413, 2001
 19. 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
 20. Pu QQ, Bezwodna 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
 21. Ramachandran C, Samy TS, Huang XL, Yuan ZK, Krishan A : Doxorubicin-induced DNA breaks, topoisomerase II activity and gene expression in human melanoma cells. *Biochem Pharmacol*. 24:45(6):1367-1371, 1993