

Benzo(a)pyrene 독성에 의한 사람 림프아 세포(NC-37)에서 c-myc 유전자의 발현

고신대학교 의학부 생화학 교실
하봉준 · 정인철 · 곽충근 · 조무연

Expression of c-myc gene in benzo(a)pyrene-poisoned human lymphoblast NC-37 cells

Bong Jun Ha, In Cheol Jeong, Choong Keun Kwak and Moo Youn Cho

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

= Abstract =

To investigate expression in c-myc gene by a chemical carcinogen benzo(a)pyrene(BP), human lymphoblast NC-37 cells were exposed to various concentrations of BP and the c-myc gene expression was evaluated by northern and slot blot hybridization methods. When NC-37 cells exposed to BP of 0-4 μ g/ml were treated with HindII/XbaI restriction enzyme, the c-myc genes were cut at the same region regardless of BP concentration. The site of cleavage by the restriction enzyme, HindII/XbaI was identical in the control, BP-treated and BP-washed cells. However, the m-RNA expression in slot blot hybridization appeared to be 4-5 times higher in BP-treated cells than in the control, and this effect was partially removed by washing the BP. When the DNA isolated from NC-37 cells exposed to various concentrations(0, 2, 4 μ g/ml) of BP were amplified by polymerase chain reaction using a primer containing c-myc exon I, the resulting DNA were of the same size in all groups. These results suggest that overexpression of c-myc oncogene may be required for the malignant transformation and maintenance in benzo(a)pyrene poisoned human lymphoblast NC-37 cells.

* 이 논문의 연구비 일부는 기초의학 연구비(1995년)로 이루어 졌음

서 론

Protooncogene, c-myc 유전자가 돌연변이에 의한 발현으로 단백질 합성이 증가되면 이로 인해, 세포의 증식을 유발하는 핵내 변화를 일으켜 세포를 무한히 자라게한다. 따라서 c-myc 유전자가 세포 증식을 조절하는데 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 왔다.^{6,19)}

그간의 연구에 의하면 c-myc 유전자는 정상 세포의 분열을 조절하며 세포의 형질전환이 일어나는 과정에 관여하고⁶⁾, c-myc 유전자의 발현이 간장의 재생 세포³⁵⁾와 간암^{8,14,16,34,37)}의 발생 과정에서도 증가한다고 하였다. c-myc 유전자의 증폭이 화학적 발암 물질에 의해 유도된 쥐 간 종양조직에서 발견 되었고^{14,34)}, c-myc 암 유전자의 발현 증가를 화학 물질 혹은 자외선에 의해 형질 전환된 C3H/10T1/2(cl 8) 마우스 태아 섬유아 세포⁴⁾에서도 관찰 되었다. 또한 다른 연구자는 c-myc 유전자 활성이 다른 분자기전을 종양이 발생한 세포에서 볼 수 있었는데, virus에 형질 전환된 세포에서 c-myc 발현의 규칙이 없어지는 것을 exon 부위 중 일부를 잘라 내므로서 조절 인자의 재배치로 인해 염색체 전위(translocation)가 일어난다는 것을 버키트 임파종^{13,29)}과 마우스 형질세포종^{30,37)}의 heavy chain의 immunoglobulin constant region에서 발견할수 있었으며, c-myc 유전자의 증폭이 사람의 폐암 및 직장암에서도 관찰되었다고 보고하였다^{12,23,27)}. 또한 마우스 형질세포종과 사람 버키트 임파종 세포의 c-myc 유전자 인접한 곳에서 염색체 증폭^{4,23)} 혹은 전이^{10,11,17)}가 일어나는 것으로 보아 이들 종양의 병리 발생에 c-myc 유전자가 관여한다는 것을 강력히 암시해 주었다¹⁸⁾. 이와같이 c-myc coding region에서 구조적 돌연변이가 일어나는데, 이는 protooncogene c-myc이 oncogenic activation으로 정상적인 단백질의 구조가 변형되어서 오는것이 아니라 유전자

의 발현에 이상^{17,20,21,36)}이 생겨서 오는 것이라 생각할 수 있으며, 유전자에 관여하는 구성 성분이 부적당한 high level을 유지하던가 조절할수 없을때 c-myc 유전자의 변형에 의해 신생 종양의 발생을 예측할 수 있을것이다. 따라서 형질전환 세포가 정상 세포와 다른점은 c-myc 유전자 발현이 무분별하게 증식되던가 조절 능력이 소멸(deregulate) 되는 것으로 짐작할수 있으며 이들 유전자의 발현 및 구조 변화로 인해 암이 발생되고 유지되는데 필요 조건임을 암시한다.

이와같은 배경하에 본 연구에서는 polycyclic aromatic hydrocarbon 화합물중 발암성이 강한 benzo(a)pyrene(BP)을 투여하여 배양한 사람 림프아(human lymphoblast) NC-37세포에서 DNA와 total RNA를 분리하여 c-myc 유전자의 변화와 발현을 관찰하여 BP의 작용기전을 밝히고저하였다.

실험 재료 및 방법

1. 시약 및 재료

Benzo(a)pyrene는 Aldrich사 제품을 구입하였고, dimethylformamide, formaldehyde, salmon sperm DNA, Guanidine-HCl, dextran sulfate와 bovine serum albumin은 Sigma 회사에서, restriction enzyme, ³H-BP, α -³²P-dCTP, Hyper-film-MP, Hybond N⁺, multiprime labeling kit와 Taq DNA polymerase kit는 Amersham사 제품을 구입하였다. fetal bovine serum과 RPMI 1640은 Gibco사, agarose는 Promega사에서, Proteinase K와 RNase A는 Boehringer Mannheim제품을 구입하였으며, 그 외의 일반적인 시약은 분석용을 구입하여 사용하였다. pHSR1(human c-myc gene)은 연세대학교 의과대학 유전과학 연구소로부터 제공받았다.

2. 세포 배양

사람 림프아 NC-37세포(ATCC CCL 214)를 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640 medium을 사용하여 75cm²의 flask에 ml당 3x10⁵의 세포를 접종시켜 5% CO₂가 공급되고 37°C를 유지하는 배양기에서 배양하여 세포수가 대략 4x10⁹-9x10⁹ 정도 되었을때 400xg에서 원심하고 4°C로 차게한 세척 용매(10mM Tris HCl, pH 8.1, 1mM EDTA, 0.14M NaCl)로 2번 씻어낸 후 pellet을 -70°C에 동결 보관하였다.

3. 사람 림프아 NC-37 세포에 BP 투여 및 제거

150cm²의 배양 flask에 NC-37세포수가 약 1x10⁸이 되게한 배양 배지내에 BP(2.5μg/ml)와 tritiated BP(³H-BP) 5μCi를 가하여 24시간 배양한 다음, 세포에 결합(incorporate)된 BP 및 BP 대사산물을 제거하기 위해 혼합 용매(N,N-Dimethyl formamide : Methyl alcohol : n-Heptane; 2:3:1 비율)을 함유한 새 배지를 넣어 24시간 배양하는 방법으로 씻어내고 2번 더 실행하였다. BP를 제거하기 위해 nonpolar-semipolar-polar 용매를 만들어 세포가 자라는데 손상을 덜 받는 조건의 혼합 용매를 찾아 사용하였으며, 이 용매로 세포를 씻어 BP를 제거하였다. 여기서 사용한 용매는 BP가 매우 높은 지질 친화성을 가지고 있고 intracellular nuclear 결합 부위

가 비극성 부위와 친화력 때문에 수용액에 잘 씻기지 않고 세포를 benzene이나 toluene 같은 hydrocarbon으로 씻으면 소수성의 이들 용매가 매우 극성이 높은 aqueous compartment를 통해 침투하는데 어려울 것으로 생각되어 혼합 용매를 사용하였다.

4. BP에 의한 c-myc 부위의 유전자 변화 관찰

BP를 투여치않은 정상군, BP를 투여한 BP투여군과 BP를 용매로 씻어낸 BP제거군의 세포에서 DNA는 Blin과 Stafford⁵⁾, total RNA는 Strohman³²⁾과 MacDonald등²⁴⁾의 방법을 약간 수정하여 분리하였으며, DNA는 HindII/XbaI으로 자르고 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 southern blot하고 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 기법으로 합성한 1Kb의 DNA 절편(fragment)을 probe로 사용하여 hybridize한후 autoradiography하여 유전자의 변화를 비교 관찰하였다. 그리고 유전자 발현을 확인하기 위하여 분리한 RNA를 northern blot과 slot blot을 실시하였다.

* Probe 제조

사람 c-myc 유전자를 가지고 있는 plasmid(pSHRI c-myc)를 중합효소 연쇄반응에 의해 exon I 포함하고 있는 약 1Kb의 DNA 절편을 합성하였는데 primer의 조성은 Table 1에 표시하였다.

Table 1 The sequence of primer used in this study

Primer set	Sequences(5'-->3')	Product size
Sence	TCCCGGGTTCCCAAAGCAGAG(21mer)	1,055bp
Antisence	ACTCCAAGGAGCTCAGGATGC(21mer)	

중합효소 연쇄반응은 500 μ l micro tube를 사용하여 반응 완충액(10x)(500mM potassium chloride, 100mM Tris HCl; pH 8.0, 20mM magnesium chloride, 0.01% gelatin) 5 μ l에 template DNA 1 μ g을 넣고 양방향의 primer를 각각 20pmol, 2 unit의 Taq DNA polymerase (Amersham Co.) 첨가하고, 100 μ M의 dNTP mixture를 넣고 증류수를 가하여 전체 부피를 50 μ l로 하여 혼합한 후 증발을 막기 위해 mineral oil을 두 방울 넣고 thermocycler(Technie 회사제품, USA)에서 반응시켰다. 반응온도는 세단계로 나누어 1단계는 95°C에서 5분간 변성시키고, 54°C에서 1분간 annealing한 후, 72°C에서 1.5분간 중합시키고, 2단계에서는 95°C에서 1분, 54°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 연속 30회 반응시켰고, 3 단계는 95°C 1분, 54°C 1분, 72°C 10분간 실시하여 증폭한 후 1% agarose gel에서 전기영동과 전기용출을 실시하여 DNA를 분리하였고 32 P-dCTP를 첨가한 multiprime DNA labeling 방법으로 32 P가 표지된 probe를 제조하여 hybridization에 사용하였다.

* Hybridization 과 autoradiography

southern blot, northern blot 그리고 slot blot한 nylon membrane에 prehybridize solution(50% formamide, 5x SSC, 5x Denhardt's solution, 50mM sodium phosphate buffer; pH 6.5, 200 μ g/ml Salmon sperm DNA)에 담귀서 42°C의 배양기 내에서 서서히 흔들려주면서 4시간 동안 전 처리한 후 hybridization 용액(50% formamide, 5x SSC, 1x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, 100 μ g/ml salmon sperm DNA, 20mM sodium phosphate; pH 6.5)에 표지된 c-myc probe를 첨가하여 hybridize 하였고, 세척 조건은 0.5xSSC/0.1% SDS 용액

으로 실온에서 30분간 씻고, 다시 같은 용액으로 30분 처리한 후 0.1x SSC/0.1% SDS 용액으로 42°C에서 1시간 처리하고, 같은 농도의 용액으로 68°C에서 1시간 씻은 다음, 자연 건조시키고 UV cross linker를 사용하여 DNA 및 RNA를 고정시킨 후 Hyperfilm-MP (Amersham Co.)를 사용하여 -70°C에서 autoradiography하였다.

연구 결과

1. BP 투여한 사람 림프아 NC-37 세포에서 혼합용매에 의한 c-myc 부위의 유전자 변화

BP에 의한 NC-37 세포의 c-myc 위치의 유전자 변화를 구명하기 위하여, NC-37 세포의 정상군, BP 투여군 그리고 BP제거군(실험방법 참조)에서 c-myc DNA 및 c-myc RNA의 변화를 관찰하였다. 이 실험에서 BP와 혼합용매의 농도가 NC-37세포의 생육에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각각 농도별로 BP는 배양액 ml당 2,4,6,8,10 μ g 과 혼합용매는 배지 ml당 0.2%로 부터 점차 증가시켜 7일간 배양시켜 살아있는 세포를 계산한 결과, Fig.2,3에서 보는 바와 같이 각각 약 4 μ g/ml, 0.4%에서는 생육과정에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인 하였다. 따라서 이 조건으로 세포를 배양하여 DNA를 분리하였고, HindII와 XbaI으로 절단한 후 전기영동을 실시하여 southern transfer와 autoradiography를 시행하였다(Fig.4). 2 μ g/ml과 4 μ g/ml의 BP 투여 군(lane 2와 3), 그리고 4 μ g/ml의 BP를 투여하고 0.4%의 혼합용매를 사용한 BP 제거군(lane 4)에서는 정상대조군과 같이 3.5Kb 크기의 전형적인 c-myc 위치에서 관찰되었으나, c-myc의 발현 정도를 측정하기 위하여 northern blot(Fig.5)과 slot blot(Fig.6)을 실시한 결과에서는 BP 투여군에서 약 4-5

배의 증가를 보였으며 BP 제거군에서는 정상대조군 보다 증가하였으나 BP투여군보다 감소되었다.

2. NC-37 DNA로 부터 중합효소 연쇄 반응 기법에 의한 c-myc의 증폭

위의 각각의 시료로 부터 얻어진 template DNA를 가지고 중합효소 연쇄반응에 의한 c-myc 의 promoter부위와 exon I을 포함하고 있는 c-myc 절편을 합성하여 좀 더 구체적인 c-myc locus상의 유전자 변화를 확인하기위해 DNA 증폭을 실시하였다. primer는 exon I의 upstream 쪽에 위치한 SmaI 부위와 exon I의 downstream 쪽에 위치한 XbaI부위 (Fig.1참조)를 사용하여 증폭시킨 유전자(1055bp)를 전기영동으로 확인한 결과(Fig.7), 정상군에 비해 BP 투여군 및 BP 제거군에서 중합효소 연쇄반응에서 증폭의 수율은 일정치 않으나 같은 크기의 유전자가 합성되었다.

고 찰

원암유전자(protooncogene)및 암 유전자의 DNA 염기배열 순서와 분자구조 그리고 이들로 부터 합성되는 단백질의 구조에 대한 정보가 많이 보고되어 있으나 세포에서 일어나는 생명현상의 과정은 복잡하고 다양하다.

최근 연구보고에 의하면 c-myc 원암 유전자는 암발생 및 유지에 관여하고 있으며 Morris 간종양 세포⁶⁾, 사람의 전골수성 백혈병세포종 (promyelocytic leukemia cell line) HL60^{7,9)}, 사람의 폐암 세포종²³⁾ 또는 위 선암 세포³¹⁾에서 과발현 또는 유전자 증폭을 일으켰다고 보고하였다. 그 뿐만 아니라 화학 발암 물질에 유도된 c-myc유전자의 전사가 증가 되어 있으며^{25,28)}, 간암 형성 초기에 유전자 발현이 증가¹⁵⁾되어 있으나

Beer²⁾ 등은 암 형성 말기에 증가되어 있다고 하였다. 그러나 c-myc 유전자의 발현이 간암 형성 없이도 증가하고 있어서 c-myc 유전자의 발현은 간 세포의 형질전환에 필수적 요건은 될수 있으나 충분 요건은 아니라 하였다²²⁾. 따라서 c-myc유전자의 발암성은 여러가지 요인에 의해 발생할수 있을 것으로 생각되며 c-myc 발현의 증가는 c-myc 유전자 주위에 proviral promoter sequence가 삽입되거나¹⁶⁾, 유전자 증폭^{1,23,26)}, 전위^{10,13,30)} 또는 결손(deletion)³⁾등에 의해 일어나고 있으나 c-myc 유전자의 발현 증가가 세포의 형질전환에 어떻게 관여하는지 모른다.

본연구에서 사람 NC-37세포 배양액에 농도를 달리한 BP를 투여한 후 혼합용매로 BP를 제거하였을때의 c-myc 유전자 변화를 관찰하기 위해서 제한효소 HindII와 XbaI으로 절단하였을때, agarose gel 전기영동의 위치상으로는 유전자 변화가 없었는데(Fig.4), 이는 버킷트 임파종 세포에서 볼수있는 염색체 전위 혹은 유전자가 잘려나간(truncate) 현상³³⁾은 아닌것 같다. 그러나 c-myc 유전자의 발현은 약 4-5배의 증가가 있었고 BP를 제거하기위해 혼합 용매로 씻은 세포군에서 발현에 감소가 있었는데 이는 세포의 생육에 문제가 있었던 것으로 보이나 발현의 억제가 정상적인 기능으로의 회복인지는 알수없다. 따라서 이와같이 같은 크기의 위치에서 유전자 발현의 증가가 유전자 서열에 어떤 변화를 초래할것으로 보고 BP 투여한 NC-37 세포에서 각군 별로 중합효소 연쇄반응으로 c-myc 유전자의 exon I을 포함하고 있는 SmaI/SacI(1,055bp) 부위를 증폭하여 전기영동을 실시하였다.그러나 같은 크기로 동일한 위치에 존재하는 것으로 보아 적어도 이 부위에서 유전자의 전위가 일어나던가 삽입되던가 혹은 잘려나가는 변화는 없는 것으로 보여진다.

결 론

화학 발암물질에 의한 c-myc 유전자의 변화를 관찰하기 위해 Benzo(a)pyrene(BP)을 투여한 사람 림프아 NC-37 세포에서 c-myc 유전자의 발현과 활성을 northern blot과 southern blot hybridization으로 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 여러 농도(2,4µg/ml)의 BP로 처리된 사람 림프아 NC-37 세포를 HindIII/XbaI 제한 효소로 절단하였을 때 c-myc 유전자는 BP 농도에 상관없이 일정한 위치에서 절단되었다. NC-37 세포의 정상군, BP 투여군 및 BP 제거군에서 제한 효소에 의한 c-myc DNA의 절단 위치에는 변화가 없었으나 slot blot hybridization에서 정상군에 비해 BP 투여군에서 mRNA의 발현이 4-5배 증가하였고 BP 제거군에서는 BP 투여군에 비해 그 증가 정도가 낮았다. BP를 농도별로 투여한 NC-37 세포에서 분리한 DNA를 c-myc exon I을 포함하는 primer를 사용하여 중합 효소 연쇄 반응 기법으로 증폭하였을 때 DNA는 모두 같은 크기로 나타났다. 이상과 같은 결과는 benzo(a)pyrene 독성에 의한 사람 림프아 세포(NC-37)의 malignant transformation과 그 유지에 있어서 c-myc 유전자의 과발현이 필요한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Alitalo K, Schwab M, Lin CC, Varmus HE, Bishop JM: Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci. USA* 80: 1707, 1983
2. Beer D, Coloma J, Schwarz M, Sawada N, Pitot H: Protooncogene expression isolated gamma glutamyl transpeptidase-positive hepatocytes. *Proc Am Assoc Cancer res* 27: 79, 1986
3. Bentley DL, Groundine M: Sequence requirements for premature termination of transcription in the human c-myc gene. *cell* 53: 245, 1988
4. Billings PC, Shuin T, Lillehang J, Miura T, Roy-Burman P, Landolph JR: Enhance expression and state of the c-myc oncogene in chemically and X-ray transformed C3H/10T1/28 mouse embryofibroblasts. *Cancer Res* 47: 3643, 1987
5. Blin N, Stafford DW: A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res* 3: 2303, 1976
6. Cole MD: The myc oncogene: Its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet* 20: 361, 1986
7. Collins S, Groundine M: Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukemia cell line. *Nature* 298: 679, 1982
8. Cote GJ, Lastra BA, Cook JR, Huang DP, Chiu JF: Oncogene expression in rat hepatomas and during hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 26: 1221, 1985
9. Dalla-Favera R, Wong-Staal F, Gallo RC: Onc gene amplification in promyelocytic leukemia cell line HL60 and primary leukemia cells of the same patient. *Nature* 299: 61, 1982
10. Dunnick W, Shell BE, Dery C: DNA sequences near the site of reciprocal

- recombination between a c-myc oncogene and an immunoglobulin switch region. *Proc. Natl Acad Sci USA* 80:7269, 1983
11. Erickson J, Nishikura K, Ar-Rushidi A, Finan J, Emanuel B, Lenoir G, Nowell P, Croce C: Translocation of an immunoglobulin kappa locus to a region 3 of an rearranged c-myc oncogene enhances c-myc expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 7581, 1983
12. Erisman MD, Rothberg PG, Diehl RE, Morse CC, Spandorfer JM, Astrin SM: Deregulation of c-myc gene expression in human colon carcinoma is not accompanied by amplification or rearrangement of the gene. *Mol Cell Biol* 5: 1969, 1985
13. Haluska FG, Tsujimoto Y, Croce CM.: *Trends Gen* 3: 11, 1983.
14. Hayashi K, Makino R, Sugimura T: Amplification and overexpression of the c-myc gene in Morris hepatomas. *Gann* 75: 475, 1984
15. Huber BE, Heilman CA, Thorgeirsson SS: Gene expression in the progressive development of hepatocellular carcinoma in the rat. *Proc Am Assoc Cancer Res* 27: 7, 1986
16. Huber BE, Thorgeirsson SS: Analysis of c-myc expression in a human hepatoma cell line. *Cancer Res* 47: 3414, 1987
17. Klein G: The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis. *Nature* 294:313, 1981
18. Keath EJ, Caimi PG, Cole MD: Fibroblast lines expressing activated c-myc oncogenes are tumorigenic in nude mice syngenic animals. *Cell* 39: 339, 1984
19. Kelly, K, Siebenlist U: The role of c-myc in the proliferation of normal and neoplastic cells. *J Clin Immunol* 5: 65, 1985
20. Land H, Parada LF, Weinberg RA: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304: 596, 1983
21. Leder P, Battey J, Lenoir G, Moulding C, Murphy W, Potter H, Stewart T, Taub R: Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* 222: 765, 1983
22. Leder A, Pattengale PK, Kuo A, Stewart TA, Leder P: Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development. *Cell* 45: 485, 1986
23. Little CD, Lau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD: Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306: 194, 1983.
24. MacDonald RJ, Swift GH, Przybyla AE, Chirgwin JM: Isolation of RNA using guanidium salts. *Method Enzymol* 152: 219, 1987
25. Makino R, Hayashi K, Sato S, Sugimura T: Expression of the c-H-ras and c-myc in specific cell types during hepatocarcinogenesis. *Mol Cell Biol* 5: 780, 1985
26. Modjtahedi N, Lavialle C, Poupon MH, Landin RM, Cassingena R, Monier R, Brison O: Increased level of amplification of the c-myc onco-

- gene in tumors induced in nude mice by a human breast carcinoma cell line. *Cancer res* 45: 4372, 1985
27. Moelling K, Lorenz U, Beimling P, Heimann B, Thomas T, Bading H, Sander T: Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 105, 1986
28. Mulder KM, Levine AE, Hinshaw XH: Up-regulation of c-myc in a transformed cell line approaching stationary phase growth in culture. *Cancer res* 49: 2320, 1989
29. Rabbitts TH, Forster A, Hamlyn PH, Baer R: Effect of somatic mutation within translocated c-myc genes in Burkitt lymphomas. *Nature* 309: 592, 1984
30. Shen-ong GL, Keath EJ, Piccoli SP, Cole MD: Novel myc oncogene RNA from abortive immunoglobulin gene recombination in mouse plasmacytomas. *Cell* 31: 443, 1982
31. Shibuya M, Yokota J, Ueyama Y: Amplification and cellular oncogene (c-myc) in human adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol* 5: 414, 1985
32. Strohman RC, Moss PS, Micou-Estwood J, Spector D, Pryzybla A, Paterson B: Messenger RNA for myosin poly-peptides: Isolation from single myogenic cell cultures. *Cell* 10: 265, 1977
33. Sugiyama A, Kume A, Nemoto K, Lee SY, Asami Y, Nemoto F, Nishimura S, Kuchino Y: Isolation and characterization of s-myc, a member of the rat myc gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:4091,1989
34. Tashiro F, Morimura S, Hayashi K, Makino R, Kawamura H, Horikoshi N, Nemoto K, Ohtsubo K: Expression of the c-Ha-ras and c-myc genes in aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 138: 854, 1986
35. Thompson NL, Mead JE, Braun L, Goyette M, Shank PR, Fausto N: Sequential protooncogene expression during rat liver regeneration. *Cancer Res* 46: 3111, 1986
36. Varmus HA: The molecular genetics of cellular oncogenes. *Ann Rev Genet* 18: 553,1984.
37. Zhang XK, Huang DP, Chiu DK, Chin JF: The expression of oncogenes in human developing liver and hepatomas. *Biochem Biophys Res Commun* 142: 932, 1987

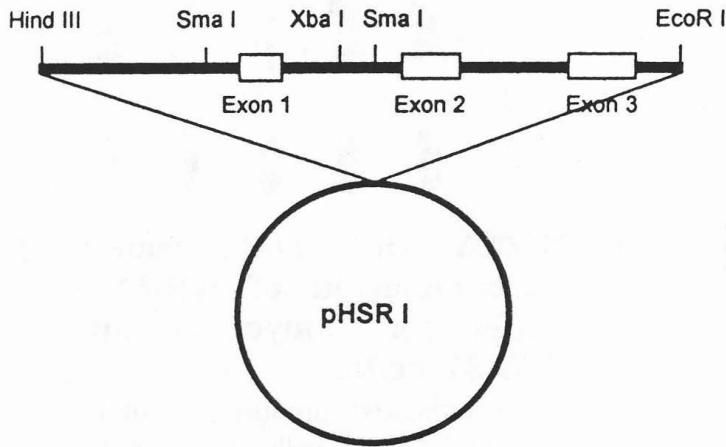


Fig.1. Schematic representation of the restriction map of the human c-myc protooncogene

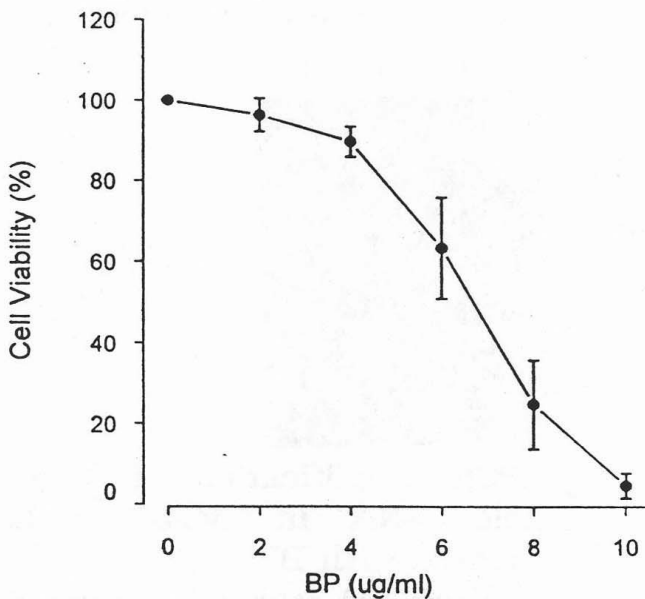


Fig.2. The growth effects of various concentration of BP on NC-37 cell lines.

Cells were suspended in complete medium at a level of 1×10^3 cells/ml and exposed for 7 days to different concentrations of BP

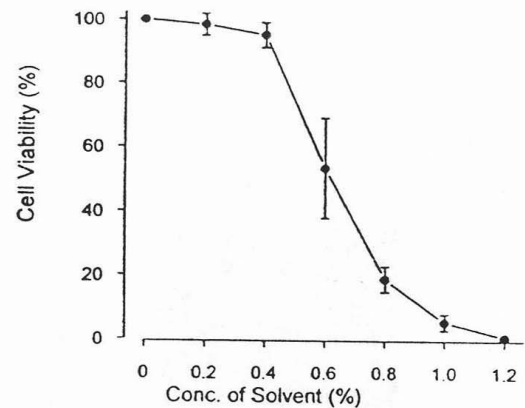


Fig.3. The growth effects of solvent mixture on NC-37 cell lines

Cells were suspended in complete medium at a level of 1×10^3 cells/ml and exposed for 7 days to different concentrations of solvent mixture. Solvent mixture; dimethyl formamide:methanol:heptane; 2:3:1. Points, means (bars, +SD) of four independent determinations, expressed as a percentage of untreated control cells.

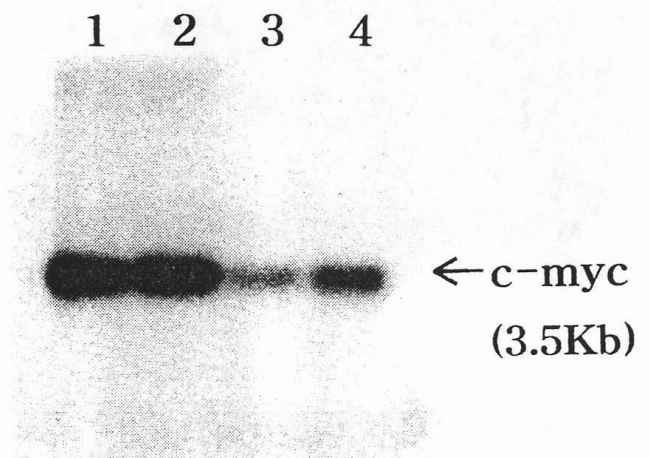


Fig.4. Southern blot hybridization of genomic DNA in NC-37 cells treated with BP and solvent mixture DNA.

DNA was digested with HindII and XbaI, electrophoresed in 1% agarose gel and hybridized to 32 P-labeled c-myc specific probes as described in "Materials and Methods".

Lane 1, Control DNA; lane 2, BP ($2 \mu\text{g/ml}$); lane 3, BP ($4 \mu\text{g/ml}$); lane 4, BP ($4 \mu\text{g/ml}$) + solvent mixture (0.4%)

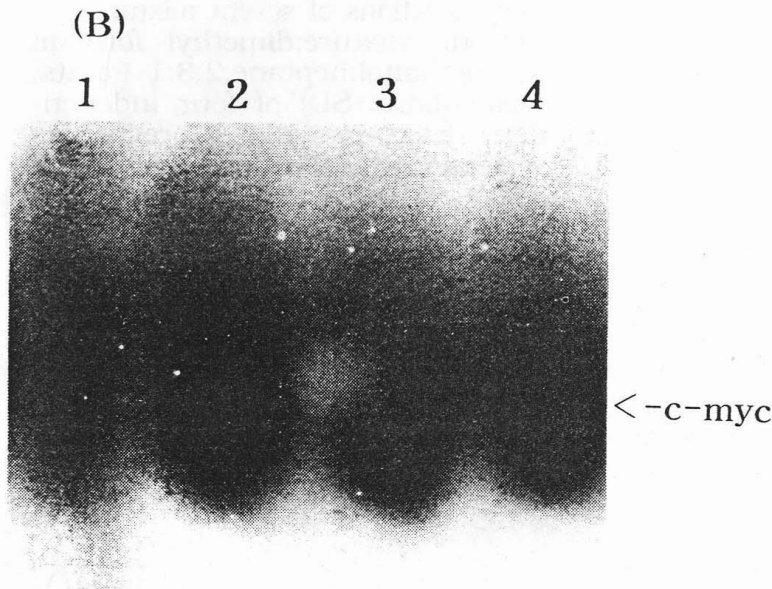
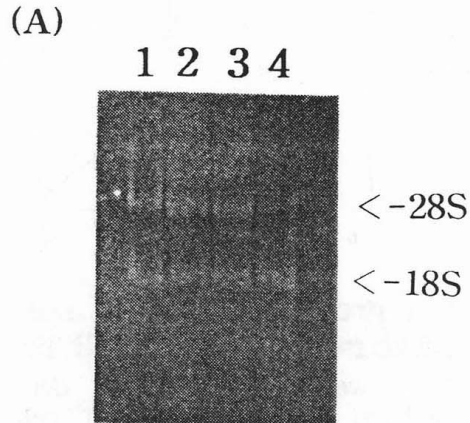


Fig.5. Electrophoresis(A) and northern blot(B) analysis of cytoplasmic RNA of NC-37 cells treated with BP and solvent mixture

The experiments were performed as described in "Materials and Methods". Lane 1, Control RNA; lane 2, BP (2 μ g/ml); lane 3, BP (4 μ g/ml); lane 4, BP (4 μ g/ml)+solvent mixture (0.4%)

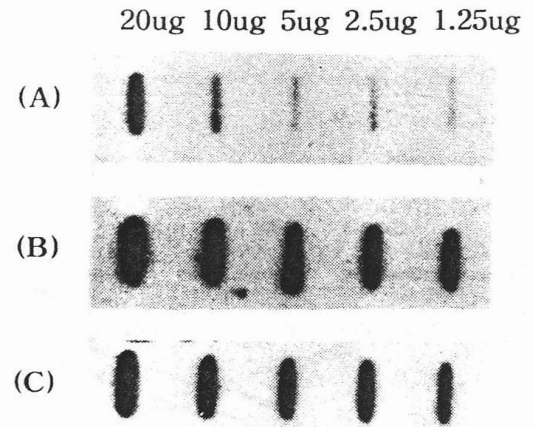


Fig.6. RNA slot blot examining accumulation of mRNA specific for c-myc in human NC-37 cells.

The indicated amount of total RNA isolated NC-37 cells were spotted on nitrocellulose paper and hybridized with the 32 P-labeled c-myc probe as described in "Materials and Methods." (A) control; (B) BP (4 μ g/ml); (C) BP (4 μ g/ml)+solvent mixture (0.4%)

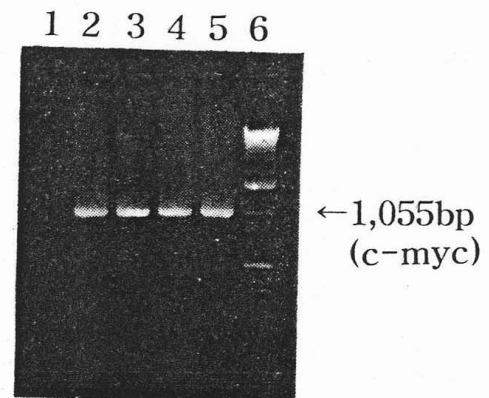


Fig.7. PCR amplification of genomic DNA in NC-37 cells treated with BP

The amplified product was analyzed by electrophoresis through 1.2% agarose gel.

Lane 1, DNA ladder; lane 2, control; lane 3, BP (2 μ g/ml); lane 4, BP (4 μ g/ml); lane 5, BP (4 μ g/ml)+solvent mixture (0.4%); lane 6, 1Kb DNA ladder.