

DNA 합성 억제제가 IMR-32 세포의 *c-myc* 발현 및 Choline Acetyltransferase 활성도에 미치는 영향

서울여자대학교 생물학과

이 정 은 · 조 경 혜†

국문초록: 신경아세포종 세포 분화의 조절에 대한 연구는 아직 초기 단계에 불과하나 신경아세포종의 임상적인 치료에 매우 중요한 기초가 된다. 본 연구는 신경아세포종 세포의 분화를 유도할 수 있는 유용한 시약을 찾아내고자 하는 노력의 일환으로, 잘 알려진 DNA 합성 억제제가 신경아세포종의 분화를 유도할 수 있는지를 살펴보고자 신경아세포종양 세포의 형태적, 생화학적 및 유전자 발현에 미치는 효과를 살펴보았다. 신경아세포종양으로부터 수립된 세포주, IMR-32 세포에 DNA 합성 억제제인 sodium butyrate, hydroxyurea, cytosine arabinoside를 각각 처리한 결과 처리하지 않은 대조군과는 달리 정상신경 세포 분화시 볼 수 있는 신경 돌기의 성장이 유도됨을 관찰할 수 있었으며, 신경 전달 물질인 acetylcholine의 합성 효소인 choline acetyltransferase의 활성도가 현저히 증가되었다. 또한 DNA 합성 억제제를 처리하지 않은 IMR-32 세포에서 탐지되지 않았던 *c-myc* 유전자의 발현이 시약 처리시 확연히 탐지됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 실험 결과들은 DNA 합성 억제제가 IMR-32 세포의 성장을 억제하고 분화를 유도했음을 보여준 것이며, 어린 아이 시기에 많이 발병되는 신경아세포종양의 급속한 악성화나 전이의 억제기전을 제시해 줄 수 있으리라 생각한다.

서 론

Neuroblastoma IMR-32 세포는 신경아세포 (neuroblast cell)가 신경아세포종 세포 (neuroblastoma cell)로 형질 전환된 암세포이다. IMR-32 세포는 과핵성 세포 (hyperdiploid cell)로서, 정상세포보다 더 큰 2개의 표지 염색체 (marker chromosome)를 갖는다²⁹. 신경아세포 종양은 어린아이 시기에 많이 나타나게 되는 데^{18,27}, 체내에서 때때로 양성 신경절성신경종 (benign ganglioneuroma)으로 분화되어지기 때문에²⁷, 이 종양의 분화 상태에 대한 연구는 악성 종양 세포를 양성화시킬 수 있는 길을 찾아내는 데 기여할 수 있으므로 많은 주목을 받아오고 있다. 특히 in vitro에서 DNA 합성 억제제이며 분화를 유도하는 시약들이 이용되고 있으며, 많은 신경아세포종 세포들에서 이

들 시약들에 의해 형태적으로 그리고 생화학적으로 분화상태가 유도됨이 보고되었다^{7,27}. 신경아세포종 세포가 분화될 때에는 세포 표면에 신경돌기가 나타나는 형태적인 특징을 보인다.

포유동물 세포에서 DNA 합성을 억제하는 시약으로 sodium butyrate, hydroxyurea, cytosine arabinoside 등이 알려져 있다^{3,20,25}. Sodium butyrate는 4-carbon fatty acid의 염기 형태로, 체내에서 자연적으로 ethyl butyrate의 가수분해에 의해 생성되어지며 포유 동물 세포에서, 특정한 유전자들의 발현 정도를 변화시키므로 형태적 변화뿐 아니라 세포 성장률 및 생화학적 특성에도 영향을 미침은 물론 특히 신경 세포에서는 신경 전달 물질의 발현을 조절한다고 보고되었다^{7,26}. Sodium butyrate의 작용 기전은 아직 잘 알려져 있지 않으나, Wright는 CHO (Chinese hamster ovary) 세포에서의 작용기전으로서 sodium butyrate가 세포막의 지질 분자내 삽입됨으로써 막형태 (membrane configuration)를 변화시켜 세포 형태를 변화시킨다는 기전과 adenylate cyclase 활성을 변화시킴으로써 cAMP 농도를 증가시켜 DNA 합성을

* 본 논문은 1996년도 보건복지부 연구개발사업 지원에 의하여 이루어졌음.

* 논문접수 1997년 4월 30일, 수정재접수 1997년 6월 24일

† 별책요청저자

억제하고 그로인해 유사 분열을 억제한다^{32,33})는 기전을 제시했다. Sodium butyrate는 신경아세포종 세포에서 신경돌기성장과 신경 전달 물질 합성 또는 분해에 관여하는 효소들 (tyrosine hydroxylase, acetylcholine esterase, choline acetyltransferase)의 활성을 증가시킨다고 알려졌는데 분화에 대한 이들 기전으로는 histone H1 단백질의 축적 및 histone deacetylase의 활성 억제가 제시되었다^{7,22}. Sodium butyrate는 위의 제시된 두 가지 기전을 통해 염색질의 전반적인 구조 (chromatin conformation)의 변화 뿐 아니라 유전자의 발현을 조절할 수 있음이 보고되었다^{7,26}. 그와 반면에 hydroxyurea는 4개의 deoxynucleotide의 생산에 필수 효소인 ribonucleoside diphosphate reductase의 활성을 억제함으로써 DNA 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다³⁴. 그러나 cytosine arabinoside는 DNA에 삽입됨으로써 염색체내 절단을 일으키며^{9,25}, 세포 주기 가운데 DNA 합성시기에서 특이적으로 작용하고 그의 활성 대사물인 cytosine arabinoside triphosphate (ara-CTP)는 바이러스, 박테리아, 포유동물에서 DNA 합성 효소에 의한 중합 반응에서 dCTP의 경쟁자로서 작용한다는 가설과 ara-CTP가 DNA 가닥에 삽입되어 사슬 종결 (chain termination), 사슬 신장 둔화 (elongation slowing) 및 비정상 DNA 구조의 형성을 초래한다는 가설이 제시되었다^{3,16}. 정상 신경세포는 일단 분화가 되면 지속적으로 분화 상태를 유지하는 속성을 지니나, 신경 세포가 암세포로 형질 전환되면 탈분화상태가 유도되어 끊임없이 증식하게 된다. 암세포가 정상 세포가 갖는 제한된 세포의 증식으로부터 탈피하여 끊임없이 증식하는 성질은 세포의 증식 및 분화에 관여하는 발암원성 유전자들 (proto-oncogenes)이 정상 세포와는 다르게 발현됨에 기인한다⁵. 암으로 형질 전환되는 데에 있어서 발암원성 유전자들의 기능에 대해서는 이미 알려진 것이 많은데, 특히 핵내에서 전사 인자 (transcription factor)로서 작용하는 발암원성 유전자 *c-myc*에 대해서는 다양한 세포에서 이미 많은 연구가 이루어졌다^{1,4,10,12,15,31}. 세포와 세포의 상호 작용에는 여러가지 형태가 있지만, 분화된 신경 세포의 경우 형성된 시냅스를 통해 계속적인 신경 전달 물질의 전달에 의해 세포내 여러 생화학적, 생리적인 변화가 일어나게 된다. 콜린계의 신경 전달 물질을 합성하는 (cholinergic) 신경 세포의 경우는 일단 시냅스가 형성되면 신

경 전달물질인 아세틸콜린을 합성하는 choline acetyltransferase가 활성을 띠게 된다. 쥐의 교감 신경세포인 두측 경추 신경절 (superior cervical ganglion) 세포에서 1 mM sodium butyrate가 콜린계의 신경 전달 물질의 합성을 유도함이 보고되었다^{6,24,26}. 또 쥐의 중추 신경 세포에서 유사 분열 억제 시약인 cytosine arabinoside를 처리했을 때, 처리하지 않은 것 보다 choline acetyltransferase의 활성도가 두 배 이상 증가됨이 보고되었다¹⁴.

본 연구에서는 DNA 합성을 억제하는 sodium butyrate 뿐 아니라 hydroxyurea, cytosine arabinoside를 IMR-32 세포에 처리하여 IMR-32 세포의 형태 변화 및 *c-myc* 발현 유도를 살펴보았으며, IMR-32 세포 분화의 척도인 choline acetyltransferase 활성도의 변화를 살펴보았다.

재 료 및 방 법

1. 세포주 및 배양조건

신경아세포종 IMR-32 세포는 한국 세포주 은행으로부터 구입하였다. 10% fetal bovine serum, penicillin G 100 unit/ml, streptomycin 0.1 mg/ml, fungison 25 µg/ml (Gibco)을 포함한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)배지에서 배양하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂/95% air로 유지시킨 배양기에서 실시하였다. 구입된 세포가 한 층으로 25 cm² canted neck flask (Corning)에 모두 깔리면 배지를 흡입기로 수거하고 trypsin-EDTA (0.05% trypsin, 0.35 mM EDTA, Gibco)를 포함한 HBSS (Hank's balanced salt solution) 2 ml을 첨가하여 1~2분동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후, 2 ml의 10% 혈청이 들어있는 DMEM 배지를 첨가하고 새로운 flask에다 10⁶ cells/ml의 농도로 분주하였다.

2. 세포 형태 관찰 및 세포 회수

IMR-32 세포를 25 cm² 플라스크에 분주하여 배양한 후 시약을 처리하지 않은 대조군과 sodium butyrate, hydroxyurea 및 cytosine arabinoside를 농도별로 처리한 실험군을 처리 후 3일간 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 3일 후 세포 형태를 현미경하에서 관찰하였으며, 관찰 후 flask에 부착된 세포를 trypsin으로 처리하여 수확한 후 PBS로 세척하고 부유시켜서 choline acetyltransferase 활성 측정과 RNA 분리를 위하여 냉동보관하였다.

실험에서 사용한 각 시약의 농도와 처리시간은 전(前)실험과정에서 각 시약의 농도와 처리시간이 세포의 대사 및 성장을 크게 저해하지 않는 범위로 산정하여 DNA 합성억제 정도가 50% 이내이며 세포 생존률 저하도 20~30% 이내가 되도록 하였다.

3. Total RNA 분리

위의 세포 회수로부터 얻은 침전물에서 acid guanidium thiocyanate phenol chloroform extraction 방법⁸⁾에 의해 total RNA를 분리하였다.

Isopropylalcohol을 첨가하여 얻은 RNA 침전물을 diethylpyrocarbonate (DEPC, Sigma)로 처리된 증류수에 녹인 후, 분리된 RNA의 양을 spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 추출된 total RNA를 취하여 전기영동을 하였다. 전기영동에 사용된 gel은 1.2% agarose, 1×MOPS (0.02M MOPS, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA), 2.2 M formaldehyde를 포함한 용액으로 100 ml이 되게 하여 사용하였다. Running buffer로는 1×MOPS가 사용되었고, 100볼트에서 2 시간 전기영동시켰다. 영동이 끝난 후 UV transilluminator (TR 365, 서린 과학)를 이용하여 RNA를 확인하였다.

4. c-myc probe 준비

Probe로는 pSVc-myc-2 plasmid로부터 두 번째 및 세 번째 exon 부위를 포함하는 2.4 kilobase pairs (kb)의 *XbaI-HindIII* fragment를 사용하였다^{16,19)}. 분리된 DNA fragment를 ECL (enhancing chemical luminescence, Amersham) kit을 이용한 직접적인 핵산 (direct nucleic acid) 표지 방법으로 표지하였다. 즉, DNA probe를 100℃에서 5 분간 열처리 후 4℃에서 5 분간 방치한 후, 같은 부피의 horse radish peroxidase 용액과 glutaraldehyde 용액을 섞어 주고 37℃에서 30 분간 배양함으로써 표지하였다.

5. Slot blot Analysis

대조군 및 시약 처리된 실험군 각각에서 분리한 10 µg씩의 RNA에 formamide, formaldehyde, 20×SSC (3M NaCl, 0.3M Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O: pH 7.0)을 최종 농도가 각각 50%, 60%, 1×가 되게 섞은 후 65℃에서 5분간 변성시켰다. 이를 잘 섞어준 후 PR 600 Slot blot kit (Hoefer scientific

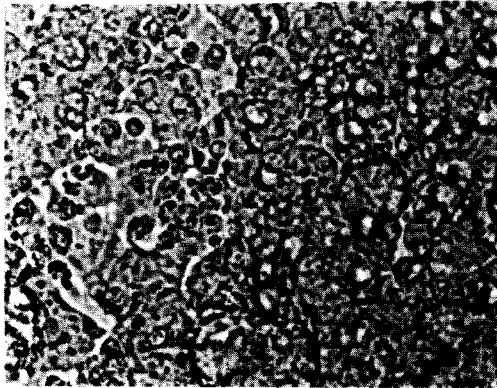
instruments)을 이용하여 vacuum을 걸어 ECL N⁺-nylon membrane 에 transfer시켰다. RNA가 부착된 membrane을 10×SSC로 가볍게 씻어주고 365 nm에서 7분간 transilluminator (TR 365, 서린 과학)를 이용하여 UV로 cross-link 시킨 후 hybridization buffer (gold hybridization buffer, 0.5 M NaCl, 5% w/v blocking agent, Amersham)에 넣어 42℃에서 4시간 동안 prehybridization 시켰고, 그 후 membrane을 표지된 DNA probe가 들어 있는 새로운 hybridization buffer에 넣어 42℃에서 12-16 시간 동안 hybridization 시켰다. Hybridization 후 ECL N⁺-nylon membrane을 42℃에서 0.5×SSC와 0.4% SDS를 포함한 용액으로 2번 씻은 다음 실온에서 0.2×SSC 용액으로 1번 씻은 후 paper towel에 건조시키고 kit내에 들어 있는 detection agent 1과 2를 1:1로 섞은 용액에 2분간 담근 후 꺼내어 건조시켰다. 그 후 ECL 전용 X-ray film을 사용하여 1시간 동안 감광시켰다. Slot blot band의 양적 증감은 spectrophotometer (DH-60, Beckman)에 내장된 gel scan system을 이용하여 측정 한 후 대조군에 대한 상대적인 값을 구하였다.

6. Choline acetyltransferase 활성도 측정

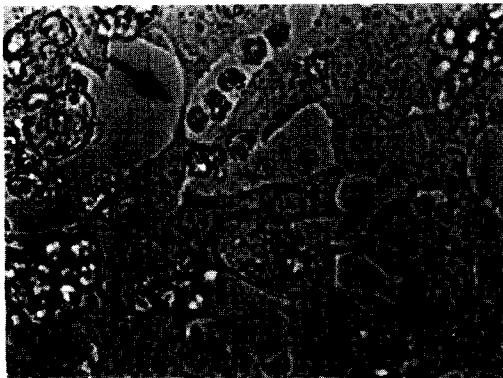
세포 회수시 준비해 둔 50 µl의 세포 부유액을 해동시켜 4℃에서 1,500 x g로 5분간 원심 분리시키고 상층액을 버린 후 침전물에 0.1% Triton X-100을 포함한 5 mM Tris-HCl (pH 7.4) 용액 200 µl을 넣어 고주파를 이용하여 분해 (sonication)시킨 후, 4℃에서 3,000 x g로 5분간 원심분리시키고 상층액을 취하여 단백질 정량 (BCA법) 및 choline acetyltransferase 활성도를 측정하였다. Choline acetyltransferase 활성도는 Fonnum¹⁰⁾의 방법을 토대로 하여 측정되었다. 2 ml의 cocktail solution (scinti-AXF, Amersham)을 첨가하여 효소 작용에 의해 생긴 반응 생성물의 양을 liquid scintillation counter (LSC, Packard TRI-CARB 4530)로 측정하였다.

7. 세포 생존도 측정

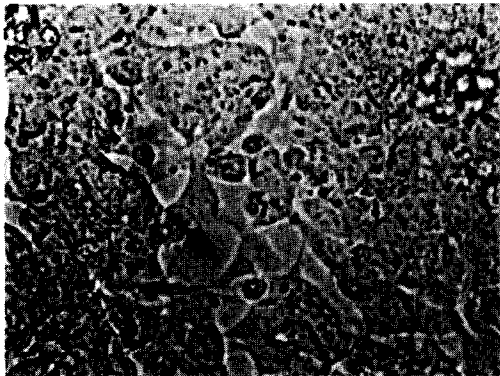
한층으로 깔린 IMR-32 세포에 trypsin을 처리하여 혈구 세포 측정기 (haemocytometer)로 세포 수를 측정 한 후 12개의 35×10 mm tissue culture dish (Corning)에 각각 10⁶ cells/ml 농도가 되도록 분주하였다. 분주한 지 3일 후에 세포가 바닥에 붙은 것을 확인한 후 배지를 수거하고 대조군에는 DMEM 배지를, 실험군에는 3 mM sodium bu-



a) Control. Magnification, $\times 500$.



b) Hydroxyurea 2 mM. Magnification, $\times 500$.



c) Cytosine arabinoside 2 $\mu\text{g/ml}$. Magnification, $\times 500$.

Fig. 1. Effect of hydroxyurea or cytosine arabinoside on the morphological changes of IMR-32 cells. IMR-32 cells were grown in complete medium in the absence (a) or presence of either hydroxyurea (b) or cytosine arabinoside (c) as described in Materials and Methods. Arrows indicate neurite-like processes formed.

tyrate를 포함한 DMEM 배지를 넣어 배양하였다. 24 시간, 48 시간, 72 시간 후에 각각 대조군 및 3

mM sodium butyrate를 처리한 dish를 배양기에서 꺼내어 trypsin을 처리하여 세포를 수확하고 0.4% trypan blue를 사용한 dye exclusion assay 법²⁸⁾으로 생존 세포수를 측정하였다.

결 과

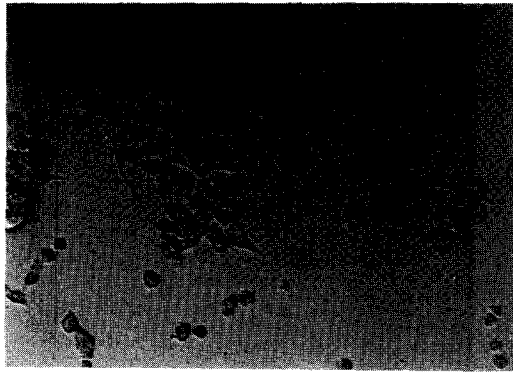
1. DNA 합성 억제제 처리에 따른 신경아세포종 IMR-32 세포의 형태학적 변화

신경 아세포종 IMR-32 세포에 DNA 합성 억제제를 처리한 후 세포 형태를 관찰하였다. 본 실험 결과에 사용된 시약의 농도와 처리기간은 전(前) 실험을 통하여 DNA 합성억제 정도가 50% 이하이며 ($< \text{KI}_{50}$) 세포생존을 저하도 30% 미만으로 하여 세포의 유전자 발현 및 효소활성을 크게 저해하지 않는 범위로 국한하여 시행하였다. 억제제를 처리하지 않은 대조군에 비해 hydroxyurea와 cytosine arabinoside를 처리한 세포들에서 신경 세포 특유의 돌기신장이 관찰되었으며, 실험에 사용한 농도범위 내에서는 시약의 농도 증가에 따라 돌기의 수와 형태가 더욱 뚜렷해져서 분화된 형태를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). Sodium butyrate를 처리시에도 마찬가지로 IMR-32 세포에서 신경 돌기가 뻗어 나와 분화된 모습을 보였다 (Fig. 2). 정상 신경 세포에서 형질 전환된 암세포 IMR-32에 세가지 다른 DNA 합성 억제제를 처리한 결과 정상 신경 세포에서 분화시킬 수 있는 것과 유사한 돌기의 형성을 관찰할 수 있었다. 그러므로 본 실험에 사용된 3가지 다른 DNA 합성 억제제들은 IMR-32 세포의 분화 유도 인자로서 작용할 수 있음을 시사한 것이라 볼 수 있다.

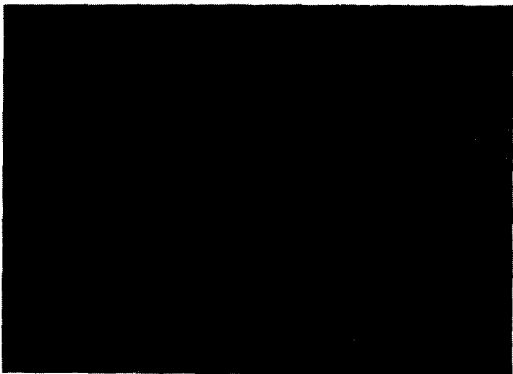
2. DNA 합성 억제제에 의한 *c-myc* 유전자 발현의 증가

Sodium butyrate를 포함한 DNA 합성 억제제에 의하여 신경아세포종 IMR-32 세포에서의 전사 인자인 *c-myc* 유전자 발현효과를 살펴보기 위하여 slot blot을 시행하였다. 이를 위하여 대조군 및 시약이 처리된 배양세포를 수확하여 total RNA를 추출하고 전기영동하여 28S 및 18S RNA band를 포함한 RNA band를 관찰할 수 있었다. Slot blot에 사용된 2.4 Kb 크기의 *XbaI-HindIII c-myc* DNA fragment는 전기영동으로 크기 및 단일 band임을 확인하였다.

DNA 합성 억제제들을 각각 처리한 세포에서



a) Control. Magnification, × 750.



b) Sodium butyrate on the morphological change of IMR-32 cells.

Fig. 2. Effect of sodium butyrate on the morphological change of IMR-32 cells. IMR-32 cells were grown in complete medium in the absence (a) or presence (b) of sodium butyrate as described in materials and methods. An arrow indicates neurite-like processes formed.

분리한 total RNA들을 처리하지 않은 대조군 세포에서 분리한 total RNA와 함께 N⁺-nylon membrane에 부착시킨 후 표지된 *c-myc* 유전자 탐침과 hybridization시켜 X-ray film에 감광한 후 intensity를 gel scan system을 이용하여 측정한 결과 3 mM의 sodium butyrate, 1 mM의 hydroxyurea 및 0.5 µg/ml의 cytosine arabinoside의 농도에서 각각 *c-myc* 발현이 가장 크게 증가되었다 (Fig. 3).

본 실험 결과 DNA 합성 억제제들을 IMR-32 세포에 처리하였을 경우, 처리하지 않은 세포에서는 탐지될 수 없는 *c-myc* 유전자의 발현이 확연히 탐지됨을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험에 사용된 DNA 합성 억제제들은 IMR-32 세포의 형태적인 분화 뿐만 아니라 세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 한다고 여겨지는 *c-myc* 발현

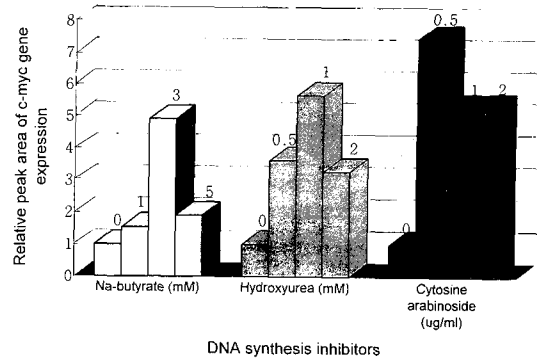


Fig. 3. Effect of DNA synthesis inhibitors on the expression of *c-myc* gene in IMR-32 cells. IMR-32 cells grown in the presence of indicated concentrations of DNA synthesis inhibitors as described in Materials and Methods were harvested and their total RNA was analyzed by slot blot hybridization with 2.4 kb *XbaI-HindIII* DNA fragment probe containing partial genomic *c-myc*. Expression of *c-myc* gene was determined by quantitating an absorbance of each slot band area using DH-60 Beckman spectrophotometer gel scan system. Each value represents relative peak area of a mean from triplicate cultures. The numbers on the rectangular columns represent the concentration of DNA synthesis inhibitors; mM for sodium butyrate and hydroxyurea, µg/ml for cytosine arabinoside.

도 증가시킴을 볼 수 있었다.

3. Choline acetyltransferase 활성도 변화

신경아세포종 세포는 choline acetyltransferase 활성을 가지고 있으므로 신경 전달 물질인 acetylcholine을 합성하여 신경세포간의 신호 전달을 나타낼 수 있는데^{6,7}, IMR-32 세포에 DNA 합성 억제제인 sodium butyrate, hydroxyurea, cytosine arabinoside들을 농도별로 각각 처리하였을 때에는 이들 시약을 처리하지 않은 대조군에 비해 choline acetyltransferase 활성이 증가하는 양상을 나타내었다 (Fig. 4). Sodium butyrate나 hydroxyurea가 각각 *c-myc* 최대발현농도인 3 mM과 1 mM의 농도에서 효소활성증가의 최대값을 보인 반면 cytosine arabinoside는 2 µg/ml의 농도에서도 지속적으로 효소활성이 증가되었다.

본 연구를 통해 IMR-32 세포에 sodium butyrate, hydroxyurea, cytosine arabinoside를 처리한 결과 세포 형태 분화뿐만 아니라 *c-myc* 유전자 발현이 증가되었으며 choline acetyltransferase 활성이 증가되는 결과를 얻을 수 있었다.

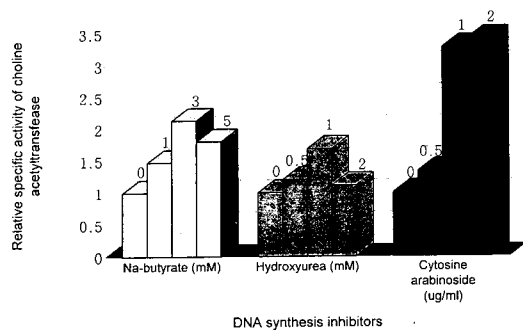


Fig. 4. Effect of DNA synthesis inhibitors on the activity of choline acetyltransferase in IMR-32 cells. IMR-32 cells treated with DNA synthesis inhibitors at indicated concentrations were harvested and assayed for choline acetyltransferase activity and protein content as described in Materials and Methods. Each value represents relative specific activity of a mean from triplicate cultures. The numbers on the rectangular columns represent the concentration of DNA synthesis inhibitors; mM for sodium-butyrate and hydroxyurea, $\mu\text{g/ml}$ for cytosine arabinoside.

4. 세포 생존도

3 mM sodium butyrate를 포함한 DMEM 배지를 세포에 준 후 3일간 CO_2 배양기에서 배양시키고 세포 생존도를 측정하였는데, trypan blue를 처리하여 전체 세포 수와 죽은 세포 수를 센 후 그 비율을 환산하였다. 대조군은 처리 후 24시간, 48시간, 72시간 후에 85% 정도의 생존율을 유지한 반면, 3 mM sodium butyrate를 처리한 경우는 24시간, 48시간, 72시간 후 각각 73%, 66%, 62%의 생존율을 보였다 (Fig. 5). 그러나 이러한 정도의 세포성장억제는 세포내의 유전자 발현이나 효소활성에는 크게 영향을 미치지 않는 범위내에서 일어나며 실험결과에서 보이는 바처럼 3 mM의 sodium butyrate를 IMR-32 세포에 처리시 *c-myc* 유전자 발현과 choline acetyltransferase 활성이 효과적으로 증가됨을 나타내었다.

고 찰

Sodium butyrate를 포함한 몇몇 DNA 합성 억제시약들은 여러세포에서 분화를 유도하기도 하며 태아뇌조직 단일세포배양이나 교감신경세포배양들을 사용한 신경계 발달에도 관여하는 것으로 알려져 있다^{2,26,30}. 특히 몇몇 신경아세포종에서는 이들 DNA 합성 억제시약에 의해 신경돌기가 신장되며 몇몇 신경전달물질합성에 관여하는

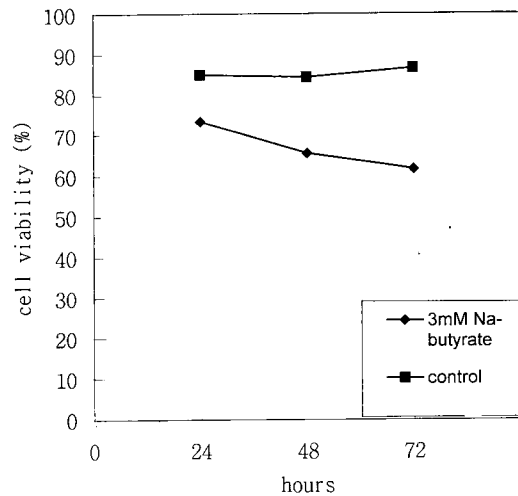


Fig. 5. Effect of 3mM sodium butyrate on cell viability of IMR-32 cells. The cell viability was measured by formula shown below by scoring the numbers of total cells and dead cells. Cell viability (%) = $\{(\text{numbers of total cells} - \text{numbers of dead cells}) \div \text{numbers of total cells}\} \times 100$. At least total 300 cells were scored and each value represents an average of duplicate cultures.

효소 활성의 변화가 유도되기도 한다^{19,23}. 이러한 분화과정을 유도하는 기전으로 제시되는 것들은 Histone H1 단백질의 축적 및 histone의 탈아실화 억제 등이 chromatin구조의 변화를 초래하고 유전발현을 조절한다고 하는 것이다^{16,20}. 그러나 butyrate의 경우에는 세포의 대사활성을 혐기성에서 호기성으로 바꾼다거나 세포막 조성에 영향을 미치며 때로 cAMP 농도의 변화를 가져온다고도 한다^{32,33}. 이러한 sodium butyrate의 작용은 neuroblastoma의 경우에는 기타 다른 세포들과 달리 특이성을 보이고 있고 특히 human cell에서 더욱 그러하다²¹. Retinoic acid의 연구보고⁶와는 달리 butyrate는 cycloheximide의 존재하에서도 acetylcholinesterase활성을 증가시킬 수 있어서 cholinergic phenotype에 대한 효과가 기타 다른 시약들과 다르게 나타난다²⁸. 즉 sodium butyrate는 post-translational modification 효과를 갖고 있어서 choline acetyltransferase의 합성속도나 기질 친화도에 영향을 주기 보다는 촉매로서의 효소 활성에 영향을 주거나 시약을 처리한 neuroblastoma 세포내의 choline acetyltransferase 자체의 안정성을 증가시키는 등의 분화와 관련된 생화학적인 효과를 주게 된다⁷.

이러한 연구들로 보아 sodium butyrate의 효과

는 단순히 세포막에 대한 작용에 의한다기 보다는 어떤 경로를 통하여서든 세포내의 유전활성에 관여한다고 하겠다. 본 연구에서도 sodium butyrate는 neuroblastoma cell culture에서 형태적인 변화를 보여서 신경돌기의 돌출증가와 같은 cholinergic phenotype에 영향을 준다. 또한 sodium butyrate는 DNA 합성을 억제하여 세포성장을 저해한다. 따라서 형태학적인 그리고 생화학적인 분화현상이 sodium butyrate를 비롯한 DNA 합성 억제제에 의해 초래되고 이는 발생단계에서 세포 분열의 증지는 형태학적 분화를 동반한다는 것과 일치하는 결과이다. 이러한 사실은 ribonucleotide reductase의 억제제로서 deoxyribonucleotide pool 합성을 억제하는 것으로 알려진 hydroxyurea를 처리하거나 DNA 합성시기에 DNA strand의 구조변화를 일으키는 것으로 알려진 cytosine arabinoside를 처리하였을 때 DNA 합성감소와 함께 *c-myc*의 발현이 증가된다는 본 실험 결과로 보아 더욱 명확해진다고 하겠다. 더구나 세포분열의 증가는 이들 화합물에 의한 neuroblastoma 세포내의 돌기 신장을 초래하기 때문에 이 두 현상은 수평적으로든 또는 서로 독립적으로 일어나든 매우 밀접한 관계를 갖는다고 볼 수 있다. 사용한 모든 DNA 합성 억제제가 세포내 돌기 신장을 초래하고 *c-myc* gene의 발현을 최대로 증가시키는 농도에서 choline acetyltransferase 효소 활성도 최대로 증가시키리라는 기대와는 달리 cytosine arabinoside는 0.5 µg/ml 농도에서 *c-myc*의 최대 발현을 유도하는 한편 효소활성증가는 2 µg/ml 농도까지도 지속되고 있다. 이로써 DNA 합성 억제제가 자체가 직접적으로 효소활성증가에 관여한다고 단정할 수는 없다. 따라서 sodium butyrate를 비롯한 DNA 합성 억제제들은 human neuroblastoma에서 *c-myc* gene의 발현을 전사단계에서 조절할 수 있으며 자세한 작용기전은 알 수 없으나 신경 세포 작용에 필요한 choline acetyltransferase 효소 활성의 변화를 유도한다고 하겠다.

본 실험에 사용된 DNA 합성 억제제들은 신경아세포종양을 양성 신경절성 신경종으로 호전시킬 수 있도록 신경아세포종 세포의 분화를 유도하는 데 사용될 수 있으며, 신경아세포종양세포의 증식과 분화가 어떻게 조절되는가에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않으나 이런 조절에 대한 연구는 신경아세포종양의 치료에 중요한 실험마리를 제공해 줄 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ariga H, Imamura Y and Iguchi-Arigo S (1989): DNA replication origin and transcriptional enhancer in *c-myc* gene share the *c-myc* protein binding sequences. *EMBO J*, **8**(13): 4273-4279.
2. Bhat NR, Shanker G and Pieringer RA (1983): Cell proliferation in growing cultures of dissociated embryonic mouse brain: macromolecule and ornithine decarboxylase synthesis and regulation by hormones and drugs. *J Neurosci Res*, **10**: 221-230.
3. Bhuyan BK, Fraser TJ and Day KJ (1977): Cell proliferation kinetics and drug sensitivity of exponential and stationary populations of cultured L1210 cells. *Cancer Res*, **37**: 1057-1063.
4. Campisi J, Gray HE, Pardee AB, Dean M and Sonenshein GE (1984): Cell cycle control of *c-myc* but not *c-ras* expression is lost following chemical transformation. *Cell*, **36**: 241-247.
5. Cantley LC, Augar KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R and Sohoff S (1991): Oncogenes and signal transduction. *Cell*, **64**: 281-302.
6. Casper D and Davis P (1989): Stimulation of choline acetyltransferase activity by retinoic acid and sodium butyrate in a cultured human neuroblastoma. *Brain Res*, **478**: 74-78.
7. Casper D and Davis P (1989): Mechanism of activation of choline acetyltransferase in a human neuroblastoma cell line. *Brain Res*, **478**: 85-94.
8. Chomczynski P and Sacchi N (1987): Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**: 156-159.
9. Chu MY and Fisher GA (1965): Comparative studies of leukemic cells sensitive and resistant to cytosine arabinoside. *Biochem Pharmacol*, **14**: 333-341.
10. Chung J, Sinn E, Reed RR and Leder P (1986): Trans action elements modulate expression of the human *c-myc* gene in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci*, **83**: 7918-7922.

11. Fonnum F (1975): A rapid radiochemical method of determination of choline acetyl-transferase. *J Neurochem*, **24**: 407-409.
12. Fukuchi K, Tomoyasu S, Watanabe K, Suzuki H, Kaetsu T, Takagi Y, Tsuruoka N and Gomi K (1991): Increased expression of the proto-oncogene, *c-myc*, in human neuroblastoma cells by reversible inhibition of cell growth. *Anticancer Res*, **11**(6): 1967-1973.
13. Girvitz SC, Bacchetti S, Rainbow AJ and Graham FL (1980): A rapid efficient procedure for the purification of DNA from agarose gel. *Anal Biochem*, **106**: 492.
14. Hayes B, Cadelli D and Kato AC (1991): Differential modulation of the cholinergic activity of rat CNS neuron in culture. *Dev Brain Res*, **62**: 159-168.
15. Iguchi-Ariga S, Ariga H, Okazaki T, Itani T, Ogata M, Sato Y and Ariga H (1989): An initiation site of DNA replication with transcriptional enhancer activity present up-stream of the *c-myc* gene. *EMBO J*, **7**(10): 3135-3142.
16. Karon M, Benedict WF (1972): Chromatid breakage: Differential effect of inhibitors of DNA synthesis during G₂ phase. *Science*, **178**: 62.
17. Land H, Parada LF and Weinberg RA (1983): Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperation oncogenes. *Nature*, **304**(18): 596-602.
18. Leone A, Seeger RC, Hong CM, Hu YY, Arboleda MJ, Brouder GM, Stram D, Slamon DJ and Steeg PS (1993): Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA replication and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene*, **8**: 855-865.
19. Lloyd T, Ebersole BJ and Schneider FH (1978): Stimulation of tyrosine hydroxylase activity in cultured mouse neuroblastoma cells by monocarboxylic acid. *J Neurochem*, **30**: 1641-1643.
20. Macher BA, Lockney M, Moskal JF, Fung YK and Sweeley CC (1978): Studies on the mechanism of butyrate-induced morphological changes in KB cells. *Expl Cell Res*, **117**: 95-102.
21. Mulligan RC and Berg P (1981): Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci*, **78**(4): 2072-2076.
22. Prasad KN, Waymire JC and Weiner N (1972): A further study on the morphological and biochemistry of x-ray and dibutyl cyclic AMP-induced differentiated neuroblastoma cells in culture. *Expl Cell Res*, **74**: 110-114.
23. Schneider FH (1976): Effect of sodium butyrate on mouse neuroblastoma cells in culture. *Biochem Pharmacol*, **25**: 2309-2317.
24. Sher E, Gotti C, Pandiella A, Madeddu L and Clementi F (1988): Intracellular calcium homeostasis in a human neuroblastoma cell line: Modulation by depolarization, cholinergic receptors, and α -latrotoxin. *J Neurochem*, **50**(6): 1708-1713.
25. Silagi S (1965): Metabolism of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine in L cells. *Cancer Res*, **25**: 1446-1453.
26. Swerts JP and Weber MJ (1984): Regulation of enzymes responsible for neurotransmitter synthesis and degradation in cultured rat sympathetic neurons. *Dev Biol*, **100**: 1-11.
27. Thiele CJ, Reynolds CP and Israel MA (1985): Decreased expression of *N-myc* precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature*, **313**(31): 404-408.
28. Tsao D, Morita A, Bella A and Kim YS (1982): Differential effects of sodium butyrate, dimethyl sulfoxide and retinoic acid on membrane-associated antigen, enzymes and glycoproteins of human rectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, **42**: 1052-1058.
29. Tumilowicz JJ, Nichols WW, Cholon JJ and Greene AE (1970): Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res*, **30**: 2110-2118.
30. Walicke PA and Patterson PH (1981): On the role of nucleotides in the transmitter choice made by cultured sympathetic neurons. *J Neurosci*, **1**: 333-342.

31. Watt R, Nishikura K, Sorrentino J, Rushidi A, Croce CM and Rovera G (1983): The structure and nucleotide sequence of 5' end of the human *c-myc* oncogene. *Proc Natl Acad Sci*, **80**: 6307-6311.
32. Willingham MC, Johnson GS and Pastan I (1972): Control of DNA synthesis and mitosis in 3T3 cells by cyclic AMP. *Biochim Biophys Res Comm*, **48**(4): 743-748.
33. Wright JA (1973): Morphology and growth rate changes in chinese hamster cells cultured in the presence of sodium butyrate. *Expt Cell Res*, **78**: 456-460.
34. Yeh YC and Tessman I (1978): Differential effect of hydroxyurea on a ribonucleotide reductase system. *J Biol Chem*, **253**(5): 1323-1324.

=Abstract=

Effects of DNA Synthesis Inhibitors on the Expression of *c-myc* and the Stimulation of Choline Acetyltransferase Activity in Human Neuroblastoma Cell Line, IMR-32

Jung Eun Lee and Kyung Hea Cho[†]

Department of Biology, Seoul Women's University, Seoul, 139-774, Korea

A regulation of differentiation in human neuroblastoma cells remains poorly understood, although it is of great importance in the clinical therapy of neuroblastoma. This study was aimed to elucidate effects of DNA synthesis inhibitors on the differentiation of neuroblastoma cells on the basis of morphological, biochemical and molecular respects. Three DNA synthesis inhibitors, sodium butyrate, hydroxyurea, cytosine arabinoside were used to explore their effects on the cellular morphology, the expression of *c-myc* and the elevation of choline acetyltransferase activity. They led to the extension of neurite-like processes reflecting differentiation of IMR-32 cells. In addition, the treatment of three DNA synthesis inhibitors resulted in the remarkable increases in the expression of *c-myc* as well as the stimulation of choline acetyltransferase activity which is involved in the synthesis of acetylcholine in the differentiated cholinergic neurons. Taken together, these results indicate that DNA synthesis inhibitors play an important role in the induction of cellular differentiation in IMR-32 cells. Furthermore these DNA synthesis inhibitors seem to be future useful to give an important clue (for the treatment of neuroblastoma).

Key Words: DNA synthesis inhibitors, *c-myc* gene expression, choline acetyltransferase, human neuroblastoma IMR-32

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 3(1): 11-20, June, 1997]

[†]Corresponding author