

대장암 세포주와 기타 암세포주의 C-myc 발현의 비교*

계명대학교 의과대학 외과학교실

배옥석 · 박성대 · 강중신

영국 Beatson 암 연구소

G.D. Birnie

서 론

대장암이 주로 서구에 많았으나 최근 한국등 동양에서도 대장암의 빈도는 점점 증가하고 있으며 이의 원인으로 고지방 저섬유질 음식 섭취가 많아 지므로 인한 식생활의 변화가 그 원인의 일종으로 생각된다. 그러나 아직까지 대장암의 원인에 대한 정설이 없으므로 환경적 요인이 아닌 유전자의 변이와 악성종양과의 관계를 밝히려는 노력이 시도되고 있다. 지금까지 대장암의 유전자적인 원인은 RAS 변이와 17P손실에 의한 보고는 많이 보고되어 왔지만는 c-myc에 대한 연구는 활발하지 않다.

저자들은 과발현이 보고되어 있는 HL60 세포주와 발현이 정상인 태아섬유세포주등에서 DNA, RNA 등을 추출하여 각각 Southern, Northern blot으로 대장암 세포주인 HT29 세포주와 비교하여 보았다.

재료 및 방법

재료 : 세포주 HT 29, HL60, Hela EJ,

정상 인체 백혈구

방법

1. Southern blot

Chambon 방법으로 DNA를 추출한 후 DNA 30μg, EcoR1, BamH1, Pst1, Pvu2를 각각 300 unit, Enzyme

buffer 50μl에 TE를 첨가하여 500μl로 만든 다음 37°C에서 5시간 둔 후 150unit의 제한효소를 다시 첨가한 후 다시 18시간 동안 37°C에서 절단하였다.

buffer의 영향을 제거하기 위하여 Sartorius를 사용하여 4°C에서 약 5시간 투석후에 다시 DNA농도를 측정한 후 각각 DNA 20μg을 냉동 건조시킨 후에 TE 10μl를 부가하여 1% agarose에 전기영동후 Southern blot 시켰다.

2. Northern blot

Chomzinski의 RNA Zol™B 방법으로 RNA를 추출후 전기 영동하여 RNA 순도를 확인 후에 RNA 10μg을 1% agarose에 전기영동후 nitrocellulose filter에 RNA를 blotting 시켰다.

3. c-myc 탐지자 제법

c-myc DNA 30ng, 5μl Reaction mix, 50μCi ³²P d-CTP, 1μl Klenow enzyme를 사용하여 Random primed DNA labeling 방법으로 탐지자를 만든 후 Radioactivity를 측정하였다.

4. Hybridization

42°C에서 약 20시간 prehybridization 후 c-myc 탐지자로서 약 23시간 hybridization을 시행하였다.

5. Autoradiography와 현상

-70°C에서 24시간 노출하고 현상후 판독하였다.

* 이 논문은 1992년도 계명대학교 을종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌다.

* 이 논문의 요지는 1992년도 추계 대장항문병학회에서 구연발표 되었음.

성 적

Southern blot으로 EcoR1, BamH1, Pst1, Pvu2 lanes에서 대장암 세포주의 c-myc 증폭이 타세포주 rthern blot에서는 유의한 발현의 차이를 확인할 수

없었다(Fig. 3).

고 칠

대장종양은 동양보다는 서양에 발생율이 높으며



Fig. 1.
EcoR1—Lanes 1 : WBC 2 : EJ 3 : HT29
BamH1—Lanes 4 : WBC 5 : EJ 6 : HT29
7 : HFF7

Hybridization assay of normal cell and tumor cell DNA digested with various kinds of restriction enzyme, probed with the c-myc gene.

Amplification of c-myc gene was detected in HT29 lanes (lanes 3, 6, 8, 13)
HL60 showed high level amplification of c-myc gene (lanes 12, 17).

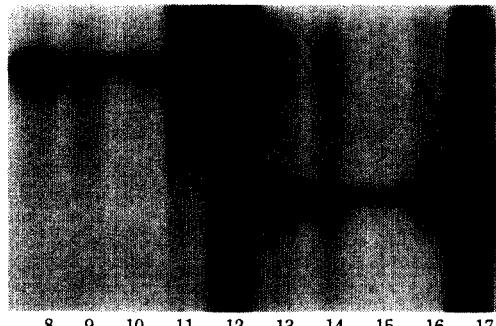


Fig. 2.
Pst1—Lanes 8 : HT29 9 : EJ 10 : HFF7 11 : Hela 12 : HL60
Pvu2—Lanes 13 : HT29 14 : EJ 15 : HFF7 16 : Hela 17 : HL60



Fig. 3. Autoradiograph on Northern hybridization related to the c-myc gene.
Lanes 1—PhiX 174 size Marker 2 : HT29 3 : HFF7
4 : HL60
5 : Hela 6 : EJ
Elevated expression of c-myc is not found.

그 원인으로는 식생활 습관의 차이와 인종이 다름으로 인한 유전자 구성의 차이로 추측된다. 또한 서구에서는 염증성 대장질환과 대장암의 전단계로 보고있는 용종과 궤양성 대장염등의 빈도가 동양보다 많다. 그러므로 대장종양의 원인으로 크게 환경적 요인과 유전적 요인으로 대별할 수 있으며 환경적 요인으로는 저섬유질 고지방질 음식의 식생활과 유전적인 원인으로는 유전자에 어떤 원인으로 인하여 점변이로 부터 유전자 손실등에 의한 변이에 의하여 발생하는 것으로 보고 있다. 대장종양은 종양의 유전자의 이상을 연구하는데 가장 좋은 모델이다. 그 이유로서 대장종양의 대부분이 선종 용종동양성질환으로부터 이행되며, 또한 선종성 용종은 동일 가계에서 autosomal dominant식으로 유전되며 대장, 선종, 용종, 악성종양 환자의 가계에서 비교적 그 발생율이 높기 때문이다.

종양에 관련된 c-myc의 증폭은 promyelocytic leukemia (HL60), Colon APUDoma (COLO 320), small cell carcinoma of the lung, carcinoma of the breast, gastric adenocarcinoma 등 다양한 종류의 종양과 관계가 있는 것으로 보고되어 있다. 대장악성종양은 선종이나 궤양성 대장염 드물게는 크론씨병 등으로부터 양성종양에서 악성으로 이행하는 과

정을 거친다는 것이 정설로 되어 있으며 이 과정에서 Fearon와 Vogelstein (1990)은 1990년 발표한 대장 종양의 유전적 모델에서 5q변이 또는 손실, K-ras 변이, 18q DCCgene의 손실, p53 17p 손실등의 유전자 변이를 보고하였고, Shaw등(1991)은 24례의 대장암에서 48%에서 K-ras 변이와 17염색체 단완의 allele loss가 60%, p53 염기서열분석에서 64%의 변이를 보고하였으며, Puig등(1991)은 K-ras변이가 선종에서 악성종양으로 진행되고 고분화 mucinous type에서 변이가 높은 것을 보고하였다.

Pavelic등(1992)은 채양성대장암과 tubular adenoma에서 상피조직의 변화에 따라 c-myc 단백 발현이 증가된 것을 보고하였다. 따라서 저자들은 c-myc 유전자와 대장악성종양과의 관계를 연구하기 위하여 대장암 세포주인 HT29과 HFF7 (fibroblasts) EJ, Hela와 DNA 증폭이 16배 정도로 보고 되어 있는 HL60에서 DNA, RNA를 추출하여 Southern, Northern 방법으로 비교하여 본 결과 대장종양 세포 주인 HT29에서 Southern blot으로는 약 2~4배 정도의 c-myc 증폭을 확인하였으나 Northern blot에서는 유의한 발현증가를 확인할 수 없었다(Fig 1, 2).

Nagai등(1992)은 결장직장악성종양 29례중 3례(10%)에서 c-myc 증폭을 보고하였으며 또한 24예중 6예에서 2내지 10배 발현의 증가를 보고하였다. 그러나 c-myc oncogene의 경미한 증폭 또는 발현이 대장악성종양의 원인의 일부로 판단할 수는 없을 것으로 사료되며 더 많은 실험결과의 축적이 필요할 것으로 사료된다.

요약

HT29 대장암세포주에서 c-myc oncogene의 경미한 증폭 또는 발현이 관찰되었고 또한 이에 대한 보고는 아주 드물게 있으나 아직 c-myc gene과 대장암과의 관계를 정립하기는 어려울 것으로 사료되며 계속적인 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Fearon ER and Vogelstein B: A genetic Model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
2. Nagai MA, Habr-Gama A, Oshima CTF, et al: Association of genetic alterations of c-myc, c-fos, c-Ha-ras protooncogenes in colorectal tumors. *Dis col Rect* 1992; 35: 445-451.
3. Pavelic ZP, Pavelic L, Kuvelkar R, et al: High c-myc expression in benign colorectal lesions correlates with the degree of dysplasia. *Cancer Res* 1992; 12: 171-176.
4. Puig PL, Olsch wang S, Delattre O, et al: Association of K-ras mutation with differentiation pathways in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1991; 49: 220-223.
5. Shaw P, Tardy S, Benito E, et al: Occurrence of K-ras and P53 mutations in primary colorectal tumors. *Oncogene* 1991; 6: 2121-2128.

=Abstract=

A comparative Study between HT 29 Colon Cancer Cell and Other Cells in c-myc Expression

Ok Suk Bae, MD; Sung Dae Park, MD; Joong Shin Kang, MD

Department of Surgery, Keimyung University,

School of Medicine, Taegu, Korea.

G. D. Birnie, PhD

*The Beatson Institute for Cancer Research, Garscube Estate,
Switchback Road, Bearsden, Glasgow G61 IBD, UK.*

Activation of c-myc gene was evaluated by southern and Northern hybridization in HT29 colon cancer cells.

The amplification of c-myc which appears as a 2.4 Kb band in Southern blots appeared as elevated levels ranging from 2 to 4 folds in HT 29 cells, but elevated expression of c-myc in Northern blot was not found.

The amplification of c-myc is rare event in colorectal tumors.

Minor amplification of c-myc is not considered as an etiology of the colonic cancer at the present time but further study is needed in this regard.

Key Words: c-myc gene, HT 29