

연구자료
독성94-2-10

P34^{cdc2} Kinase 효소의 활성도를 이용한 새로운 발암성 평가에 관한 연구

1994

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 연구 결과를 1994년도 산업보건연구원의 연구사업 중
“P34^{cdc2} kinase 효소의 활성도를 이용한 새로운 발암성 평
가에 관한 연구”에 대한 최종 결과 보고서로 제출합니다.

1994년 12월 31일

제출자 : 산업보건연구원장 문 영 한

연구책임자 : 책임연구원 유 일 재

공동연구자 : 선임연구원 김 현 영

연 구 원 임 철 홍

“ 맹 승 희

목 차

Abstract	1
I. 서론	2
II. 연구방법	5
1. 조사대상	5
2. 기기 및 재료	5
III. 결과	9
1. Flow cytometry 실험	9
2. MTT assay	9
3. 세포분열의 현미경상 관찰	10
4. P34 ^{cdc2} kinase 활성 측정	10
5. P34 ^{cdc2} kinase, cyclin A, cyclin B 단백질량 측정	11
IV. 고찰	22
V. 결론 및 요약	24
VI. 참고문헌	25

THE EFFECT OF BENZO(A)PYRENE (BaP) AND MITOMYCIN C (MMC) ON HELA CELL DIVISION CYCLE

I J Yu, C H Lim, H Y Kim, S H Maeng, Y H Chung
Industrial Toxicology Laboratory, Industrial Health Institute, Korea
Industrial Safety Corporation,
34-4 Kusan dong, Buk gu, Inchon, 403-120, Korea

Abstract

Recently there has been significant progression in understanding the control of the cell division cycle. To investigate the effect of toxic substance on the cell cycle, we analyzed the effect of BaP and MMC on synchronized HeLa cells during the cell cycle. The rate of cell growth was measured by MTT assay. Fifteen percent of cell growth was decreased by incubating 30 μ M BaP for 24 h and 12% by 0.5 μ M MMC. To synchronize HeLa cells, 10^6 cells were grown for 1 d and were treated with 1 mM hydroxyurea (Hu) for 14-16 hour. The arrested cells were allowed to proceed through their cell cycle by removing Hu and resupplying fresh medium. The arrested cells in G1/S transition were proceeded to S at 4 h, G2/M at 8 h, G2/M at 8 h, and G1 phase at 12 h after resupplying fresh medium. To assay the effect of BaP and MMC, treated and untreated cells were harvested at desired time points, and their amounts of protein were normalized for further assays. The p34^{cdc2} kinase activity measured by using p34^{cdc2} specific peptide was peaked at 8 h and declined at 12 h. Treatment of 30 μ M BaP delayed the peak of p34^{cdc2} kinase activity to 2-4 h and 0.5 μ g/ml of MMC significantly reduced the kinase activity. The amount of p34^{cdc2} was not changed either the untreated or BaP and MMC treated cells during the cell cycle. To further study the effect of BaP and MMC on cell cycle, cyclin B level was assayed by immunoblotting. Cyclin B level was peaked at 8 h in untreated cells corresponding to p34^{cdc2} activity, but peaked at 10-12 h in BaP treated cells. There was no significant change of cyclin B level in MMC treated cells. It is suggested that BaP and MMC do not affect synthesis of p34^{cdc2} but formation of cyclin B.

P34^{cdc2} kinase 효소의 활성도를 이용한 새로운 발암성

평가에 관한 연구

유 일재, 임 철홍, 김 현영, 맹 승희, 정 용현

한국산업안전공단 산업보건연구원 산업독성실
인천시 북구 구산동 34-4, 430-120

I. 서 론

직업병으로서의 암은 약 2백년전 굴뚝청소부의 음낭암이 처음 보고되었으며, 최근까지 많은 화학물질의 발암성이 보고되고 있다. 암은 현재까지 확립된 치료방법이 없고 화학물질의 폭로에 의한 양·반응 관계성이 없어 저농도에서 1회 폭로되어도 유발될 수 있는 특성을 가지고 있다(1).

화학물질에 의한 건강장해를 방지하기 위하여 OECD, WHO, UNEP 및 IPCS등 국제기구에서는 GLP시험방법의 규정, 독성시험자료의 국제적인 상호인정, IARC monography의 발간, IPCS Environmental health criteria의 발간 등 화학물질의 유해성자료의 조사하고 있으며(2-4), 특히 미국에서는 정부의 여러기관에서 독성시험자료 및 독성평가결과를 조사하고 있다(5,6). ILO에서는 특히 직업성암의 예방을 위한 국제적인 상호 협조를 촉구하고 있으며 이를 위하여 변이원성시험 및 설치류를 이용한 2년발암성 시험을 실시하기를 권고하고 있다.

한국에서는 현재 산업안전보건법 제40조에 화학물질의 유해성조사를 규정하여 신규물질에 의한 직업성암의 방지를 위한 최소한의 독성시험을 실시하고 있다. 현재 실시하고 있는 유해성조사 방법중 가장 일반적인 방법은 1970년대 개발된 Ames 시험법(7)과 Chromosomal aberration(8) 시험법이며 이들 시험법은 많은 화학물질이 유전자에 손상을 주어 발암성을 일으킨다는 사실을 응용한 발암물질 screening 방법이다. 이들 screening 방법은 유전자에 손상을 주는 많은 발암성 화학물질의 Screening에 유용한 결과를 보이며 시험의 간편성, 경

제성등의 이유로 현재 신규화학물질의 유해성조사에 가장 많이 이용되고 있으며 또한 가장 많은 화학물질에 대하여 자료가 축적되어 있다(9). 그러나 이들 시험으로 발암성이 예측되지 않는 많은 발암물질의 발견, 즉 면역계의 이상에 의한 발암유발 물질, DNA 손상의 복구기전에 영향을 주는 물질, 및 원인이 확실하지 않은 발암성 물질등이 다양하게 발견되고 있으며, virus에 의한 암의 발생, 유전자 자체의 이상에 의한 암의 발생 등의 여러가지 발암기전이 밝혀짐에 따라 이들 암의 예방 및 치료의 차원에서도 보다 다양한 암의 연구가 진행되고 있다.(3).

최근 생명공학 기술의 발전으로 암에 관여하는 다양한 유전자의 발견(10-12)되고 cell division cycle을 조절하는 물질이 밝혀짐(13-17)에 따라 암의 원인을 밝히는 연구가 가속화되었으며 이를 이용한 화학물질의 발암성에 관한 연구도 병행되어 수행되고 있다(18-20).

진핵세포의 Cell division cycle은 Gap phase 1(G1), DNA 복제의 S Phase, Gap phase 2(G2), 및 두개의 딸 세포로 분리하는 M phase로 나눌수 있으며, Cell division cycle은 세포의 성장 및 분화에 가장 중요한 조절현상으로 암연구나 세포분화 연구의 실마리를 푸는 단서가 되고 있다(21). P34^{cdc2}는 cyclin류와 결합하여 활성화 되며 cell division cycle을 진행시키는 진행시키는 중요한 조절물질로 밝혀졌다. 현재 cyclin류는 A 부터 E까지 알려져 있다. Cyclin A는 S phase초기에 합성되어 mitosis중에 분해되며 cyclin B는 G2/M phase에 관여하는 cyclin으로 알려져 있다(15). P34^{cdc2}에 대한 연구는 cell division cycle의 조절점인 late G1과 G2의 필수적인 유전자로 밝혀져 영국의 Paul Nurse의 그룹이 처음시작하였으며 ts(temperature sensitive) cell cycle mutant에서 cell cycle arrest하는 mutant가 cdc2가 활성화되면서 cell cycle이 진행하는 것을 보여 주었다(22-23). 암의 발생에 있어서의 p34^{cdc2} 및 cyclin의 역할에 대한 연구는 Patrizia등의 사람 혈액암에서의 Cyclin A 증가를 응용한 암 marker로의 가능성 연구, Philip등의 oncogene으로서의 cyclin gene의 역할 (18,19) 연구등 다양한 연구가 시도가 되고 있으며 cell division cycle에 대한 화학물질의 영향 연구도 암의 예방 및 치료를 위하여 연구되고 있다(20, 24-27).

Benzo(a)pyrene(BaP)은 crude oils, shade oils와 coal tars와 화산재 등에 포함되어 있으며 담배연기, 타르 가솔린엔진 석탄등의 연료에서 열분해적으로 생성된다. BaP는 방향족

탄화수소로 생체내에서 7,8부분이 대사되어 변이원성을 나타내며 생쥐에 경구적으로 투여하였을 때 양.반응적으로 발암성을 일으킨다고 보고되었다. 산업위생학적으로 TLV는 정해지지 않았으며 charcoal, silica에 의해 포집될 수 있다(28). BaP에 대한 최근의 연구는 in vivo에서 BaP로 유도된 암에서의 k-ras유전자에 대한 점돌연변이성, in vivo에서 BaP를 투여한 mice의 심장평활근 배양세포에서의 세포내에서 c-Ha-Ras protooncogene의 증가에 대한 연구, 면역기능에 대한 BaP의 영향, DNA의 합성에의 영향등 protooncogene, 단백질합성 등 세포조절에 관한 연구가 활발히 진행중이다(29). Mitomycin C(MMC)는 *streptomyces caespitosus*의 배양액으로 부터 나온 항종양 항생물질이며 DNA와 선택적으로 결합하여 RNA의 합성을 억제하는 것으로 알려져 있으며(30) Ames 시험에 의한 변이원성을 나타내며 발암성도 보고되었다(9).

II. 연구 방법

1. 조사 대상

조사대상은 방향족 탄화수소로 발암성이 보고된 BaP와 항암성 치료제로 사용되는 MMC를 대상으로 하여 이들물질이 세포의 분화 및 암의 성장에 큰 영향을 주는 cell division cycle에 어떤 영향을 주는가를 알아보고자 하였다. 실험에서는 cell division cycle에 대한 영향을 측정하기 위하여 cell division cycle의 주요 조절물질로 알려진 $p34^{cdc2}$ kinase와 $p34^{cdc2}$ kinase와 결합하여 $p34^{cdc2}$ kinase를 활성화시키는 cyclin에 대한 BaP 및 MMC의 영향을 측정하였다.

2. 기기 및 재료

가. 세포종 및 계대

HeLa Cell을 100 mm의 Culture dish에서 10% FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco), 100 unit/ml의 penicillin/streptomycin (sigma), 2.2g/l의 Sodium Bicarbonate (Sigma)이 포함된 MEM(Minimal Essential Medium, Gibco)배지 10ml을 가하고 37℃에서 5% CO₂를 공급하여 배양하였다. HeLa Cell은 3일 간격으로 Trypsin/EDTA(Sigam)를 처리하여 single cell로 하여 계대하였다. Cell division cycle 실험을 하기 위하여 1 mM의 Hydroxyurea(sigma)를 14-16시간 처리하여 HeLa cell을 G1/S transition 상태로 정지시켰다. Cell cycle이 정지된 세포는 hydroxyurea를 제거하고 새로운 배지를 다시 공급하여 cell cycle을 진행시켰다. Cell division cycle에 대한 BaP 및 MMC의 영향을 알아보기 위하여 BaP 및 MMC는 Synchronize된 세포에 새로운 배지를 가할 때 동시에 처리하였으며, cell division cycle이 진행되는 동안

각 시간별로 세포를 수득하여 단백질을 1 mg/ml로 조절하여 p34^{cdc2} 효소활성실험, p34^{cdc2} 효소량, cyclin B 효소의 양 등을 측정하였다.

나. Flow cytometry 실험

Flow cytometric analysis는 Buchkovich(31) 등이 실험한 방법으로 하였다. 5×10^6 의 세포를 냉장된 PBS로 세척하고 0.5 ml로 조정하였다. 세포를 95% ethanol(-20℃)로 혼합하면서 천천히 가하여 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 세척하고 10 µg/ml의 끓인 RNAase A(sigma)와 5 µM의 propidium iodide(sigma)가 포함된 PBS로 다시 현탁하고 37℃에서 30분간 분해 및 염색하였다. 시료의 fluorscenc 강도는 EPICS C system(coulter electronics)로 측정하였다.

다. 단백질 정량

100 mm culture dish 에서 배양한 세포를 냉장 PBS로 3회 세척한 후 pH 8.0의 lysis buffer(50 mM Tris · Cl(Sigma), 150 mM NaCl(Sigma), 0.02% sodium azide(Sigma), 100 µg/ml PMSF(sigma), 1% Triton X-100(sigma) 0.1 ml에 녹인 후 Bradford 방법에 의하여 단백질을 정량하였다. 1:4로 희석한 Bio-rad 단백질정량 용액 1 ml에 2 µl의 세포배양액을 혼합한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포배양액은 이후 시험을 위하여 단백질을 1 mg/ml로 조정하였다.

라. MTT Assay (Cell viability test)

BaP 및 MMC에 의한 세포의 성장 및 생존에의 영향을 측정하기 위하여 MTT assay 방법을 실시하였다. 세포의 미토콘드리아 내 효소인 Succinate-dehydrogenase에 의해 MTT(3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide)는 formazan으로 변하며 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 formazan의 생성이 줄어들게 된다(32). 세포의 분열능을 측

정하는 방법으로 ^3H -thymidine uptake 방법이 일반적으로 사용되고 있는 데, MTT assay는 동위원소를 사용하지 않는다는 장점이 있어 동위원소의 사용이 가능하지 않은 실험실이나 동위원소사용의 규제가 심한 연구소에서 최근 많이 사용되고 있는 방법이다. 96 well의 micro plate에 HeLa Cell 5×10^4 cells/0.1 ml을 각 농도의 BaP 및 MMC와 같이 가한 후 5 mg/ml로 조제한 MTT 10 μl 를 4시간 동안 가하여 MTT가 세포내의 효소에 의해 Formazan으로 변하도록 한 후 100 μl 의 0.01N HCl이 포함된 10% SDS용액으로 Formazan을 녹여 UV spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. Formazan으로 변한 MTT는 실험조건에서 550nm에서 610nm에서 흡광도의 상승이 일어났으며 본 실험에서는 560nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 성장 및 억제능을 측정하였다.

마. p34^{cdc2} 효소의 활성화 측정

p34^{cdc2} 효소 활성을 측정하기 위하여 ADAQHATPPKKKRVDPKDF의 아미노산 배열을 가지는 펩타이드를 이용하여 [^{32}P] P_0 가 p34^{cdc2} 특이 펩타이드에 결합하는 성질을 이용하였다(33). 1 mg/ml로 조정된 시료 5 μl 를 p34^{cdc2} 특이 기질 1 mM, ATP 0.1 mM이 포함된 pH 7.4의 p34^{cdc2} buffer (20 mM Tris·HCl(sigma), 10 mM MgCl₂(sigma), 1 mM EGTA(sigma), 1 mM DTT(sigma))로 총 30 μl 의 반응액을 만든 후 37°C에서 20분간 반응시켰다. 반응의 시작은 100 μM 의 [γ - ^{32}P]-ATP (1000-3000 cpm/pmol, Amersham corp.)를 가하여 시작하였다. 100 mg/ml의 BSA(sigma) 5 μl 와 80%의 Trichloroacetic acid(sigma) 5 μl 를 가하여 반응을 중지시켜 1.5 cm x 1.5 cm의 p81 여지에 10 μl 의 반응액을 가하고 5% phosphoric acid(sigma)로 3회 세척한 후 scintillation counter로 cpm을 측정하였다.

바. 전기영동 및 Immunoblotting(34)

10 μg 의 단백질 분획중 p34^{cdc2}, cyclin A, cyclin B의 양을 측정을 위하여 10%의 SDS polyacrylamide gel로 전기영동하고 nitrocellulose에 transfer 하였다. nitrocellulose는

3% BSA/PBS를 가하여 block 하고 anti p34^{cdc2} antibody (G6, 1/2000), anti cyclin A antibody(oncogene, 10 µg/ml)또는 anti cyclin B antibody (oncogene,10 µg/ml)를 2시간동안 처리하였다. Primary antibody가 결합된 nitrocellulose paper는 TN buffer (50 mM Tris · Cl(pH 7.5), 150 mM sodium chloride)로 세척한 후 alkaline phosphate가 부착된 anti-rabbit IgG 또는 anti-mouse IgG를 2시간 처리하고 TN beffer 및 pH 9.5의 alkaline phosphate buffer(100 mM Tris · Cl, 100 mM sodium chloride, 5 mM magnesium chloride(sigma))로 세척한 후 alkaline phosphate buffer에 NBT(Sigma)와 BCIP(Sigma)각각 330 µg/ml, 165 µg/ml을 각각 가하여 nitrocellulose paper를 발색시켜 측정하였다.

III. 결 과

1. Flow cytometry 실험

HeLa 세포는 hydroxyurea를 처리하여 G1 phase에서 cell division cycle을 정지시켰으며 hydroxyurea를 제거하고 새로운 배지를 다시 가하여 cell cycle을 진행시켰다. Synchronize 되지 않은 세포는 G1이 53.55, S가 16.5%, G2/M이 24.9%로 구성되었으며(Fig. 1 A), Hydroxyurea를 14-16시간 처리하여 cell cycle을 정지시킨 세포는 G1이 70%, S가 13.3%, G2/M이 12.3%였다(Fig. 1 B). Hydroxyurea를 제거 후 4시간의 세포는 S phase로의 진행이 현저하여 G1이 18.8%, S가 54.4%, G2/M이 21.3%로 구성되었으며(Fig. 1 C), 8시간 후에는 G1이 23.35, S가 5.7% G2/M이 57.8%인 세포 분열기로 진행하였다(Fig. 1 D). 12시간 후에는 G1이 63.3%, S가 5.7%, G2/M이 24.9%로 대부분의 세포가 G1 phase에 있었으며(Fig. 1 E), 16시간 후의 세포분포는 G1이 74.5%, S가 7.6%, G2/M이 10.7%였다(Fig. 1 F).

2. MTT assay(Cell viability test)

MTT 방법에 의한 세포의 성장 및 억제에 대한 실험조건을 구하기 위하여 MTT 및 세포에 의해 변화된 formazan을 300 nm에서 700 nm의 범위에서 흡광도를 측정한 결과 시험조건에서 550 nm에서 610 nm에서 흡광도의 상승을 보였다(figure 2). MTT로 BaP 및 MMC의 세포성장에 대한 효과를 측정한 결과 투여 24시간 이내에서는 유의적인 결과를 보이지 않았으며(data not shown) 24시간 이상처리시 농도 비례적으로 Formazan의 생성을 억제하였다. BaP를 7.5 μ M에서 480 μ M까지 계열 희석하여 처리한 결과 24시간, 48시간, 72시간에서 정상군에 비하여 30 μ M BaP처리군에서 각각 15%, 18%, 45% 억제하였으며, 480 μ M 처리군은 세포의 성장이 거의 나타나지 않았다(Fig. 3). MMC는 0.125 μ g/ml에서 8 μ g/ml까지 계열 희석하여 처리하였다. 0.5 μ g/ml의 MMC를 24시간, 48시간, 72시간 처리시 각각 12%, 33%, 48%의 억제를 보였다. 2

μg/ml의 MMC 처리시에는 HeLa cell의 세포성장이 정지하였으며 8 μg/ml 처리시는 Formazan의 생성을 감소시켰다. (Fig. 4)

3. 세포분열의 현미경 관찰

Synchronize된 HeLa cell은 현미경 관찰로 세포분열 상태를 관찰할 수 있었다. 정상세포에서는 Hydroxyurea로 G1 phase로 정지시킨 상태에서는 분열중인 세포를 관찰할 수 없었으며 (Fig 5 A) hydroxyurea 제거 후 4시간에서 분열중인 세포가 7.7% 관찰되었다(Fig 5 B). cell cycle 진행 후 8시간에서 52.8%의 분열중인 세포가 관찰되었으며(Fig. 5 C), 10시간에서는 분열중인 세포가 감소하여 17% 되었다(fig. 5 D). 30 μM BaP 처리군에서는 4시간에서 7.0%(fig 6 B), 8시간에서 38.0%(fig. 6 C), 10시간에서 26.9%의 분열중인 세포가 관찰되었다(fig. 6 D). MMC 0.5 μg/ml 처리군에서는 분열중인 세포가 4시간에서 3.5%(fig. 7 B), 8시간에서 0.7%(fig. 7C), 10시간 후에는 2%(fig. 7 D)가 관찰되어 시험시간중에 분열중인 세포를 거의 관찰할 수 없었다.

4. P34^{cdc2} kinase 활성 측정

Hydroxyurea를 처리하여 cell division cycle을 G1 phase에 정지시킨 HeLa 세포는 p34^{cdc2}kinase의 활성이 가장 낮았으며(368 cpm) cell division cycle이 진행됨에 따라 활성이 증가하여 G2/M phase인 8시간에서 가장 높은 활성(1948 cpm)을 보였다. p34^{cdc2}kinase는 cell cycle이 진행됨에 따라 활성이 감소하여 12-16 h 사이에서 가장 활성이 낮았다. 감소된 p34^{cdc2} kinase activity는 16 h 이 후 다시 증가하였다(Fig. 8).

30 μM의 BaP처리 후 p34^{cdc2} kinase activity를 측정 한 결과 BaP는 8시간에서는 p34^{cdc2} kinase activity가 정상군보다 낮았으나 8시간 이후 정상군은 P34^{cdc2}kinase의 활성이 감소하였으나 BaP 처리군에서는 p34^{cdc2}kinase의 활성이 증가하였다. 0.5 μg/ml의 MMC는 정상군에 비하여 전 측정시간에서 p34^{cdc2}kinase의 활성이 낮았다(Fig. 9, table 1).

Table 1. The effect of BaP and MMC on p34^{cdc2} activity

GROUP	TIME(hour)					
	0	1	2	4	8	12
Normal	510	518	528	785	1638	902
BaP	510	505	ND	792	1320	1433
MMC	510	403	363	476	812	624

5. p34^{cdc2}kinase, cyclin A, cyclin B 단백질량의 측정

BaP 및 MMC처리에 의한 p34^{cdc2}kinase의 활성 변화의 원인을 확인하기 위하여 p34^{cdc2}, cyclin A, 및 cyclin B의 단백질량을 western blotting 방법으로 측정하였다. 그 결과 p34^{cdc2} 단백질량은 cell cycle 전 단계에서 일정하였으며 BaP 및 MMC 처리에 의해서도 p34^{cdc2} kinase 단백질량은 변하지 않았다(Fig. 10). Cyclin A는 S phase 초기에 나타나 p34^{cdc2}kinase와 결합한다고 알려져 있는 단백질이다. 실험에서는 cyclin A를 측정할 수 없었다(data not shown). Cyclin B는 late G1 phase에서 합성되기 시작하여 G2/M phase에서 최대가 되며 이 후 분해되어 없어진다고 알려진 단백질로 본 실험에서 정상적인 세포는 synchronize후 4시간에서 나타나기 시작하여 8시간에서 최대가 되며 이후 감소하여 12시간 후에는 다시 관찰되지 않았다. BaP처리군에서는 4시간 이후부터 나타나서 10시간까지 증가하여 이후 감소하였다. MMC 처리군에서는 Cyclin B를 확인할 수 없었다.

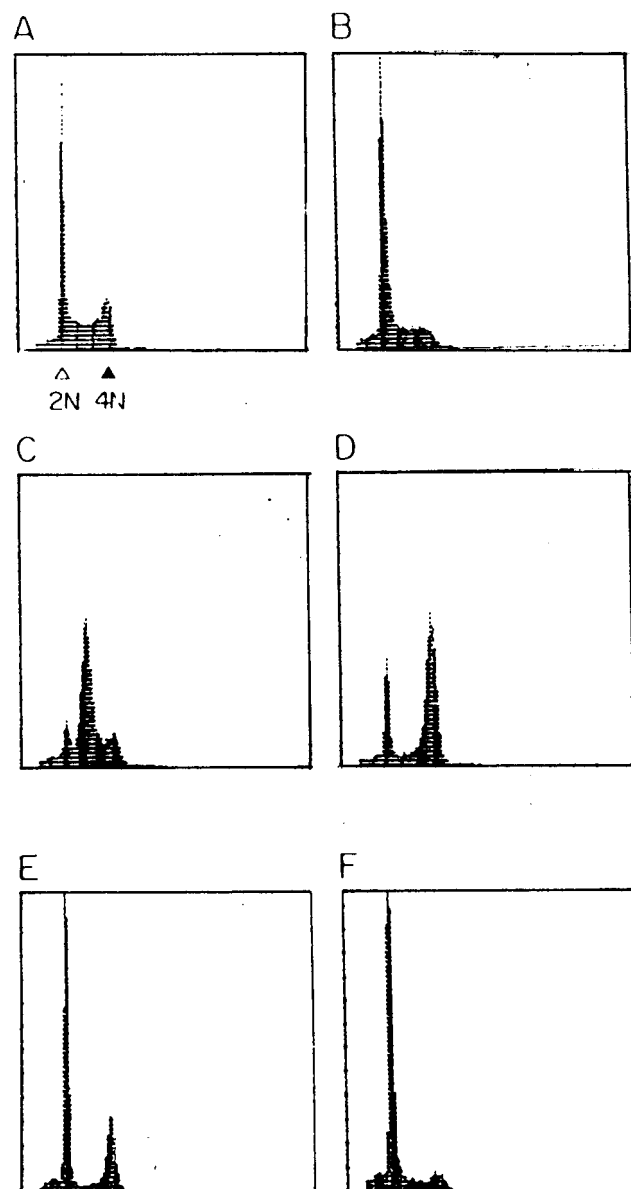


Fig. 1. FACS analysis of HeLa cells synchronized with 1 mM Hydroxyurea and allowed to proceed their cell cycle by resupplying fresh medium. Samples were collected every 4 h and processed for FACS analysis.

A: asynchronous HeLa cells
 B: 0 h after release of hydroxy urea
 C: 4 h after release of hydroxy urea
 D: 8 h after release of hydroxy urea
 E: 12 h after release of hydroxy urea
 F: 16 h after release of hydroxy urea
 open triangle: 2 N DNA content
 closed triangle: 4 N DNA content

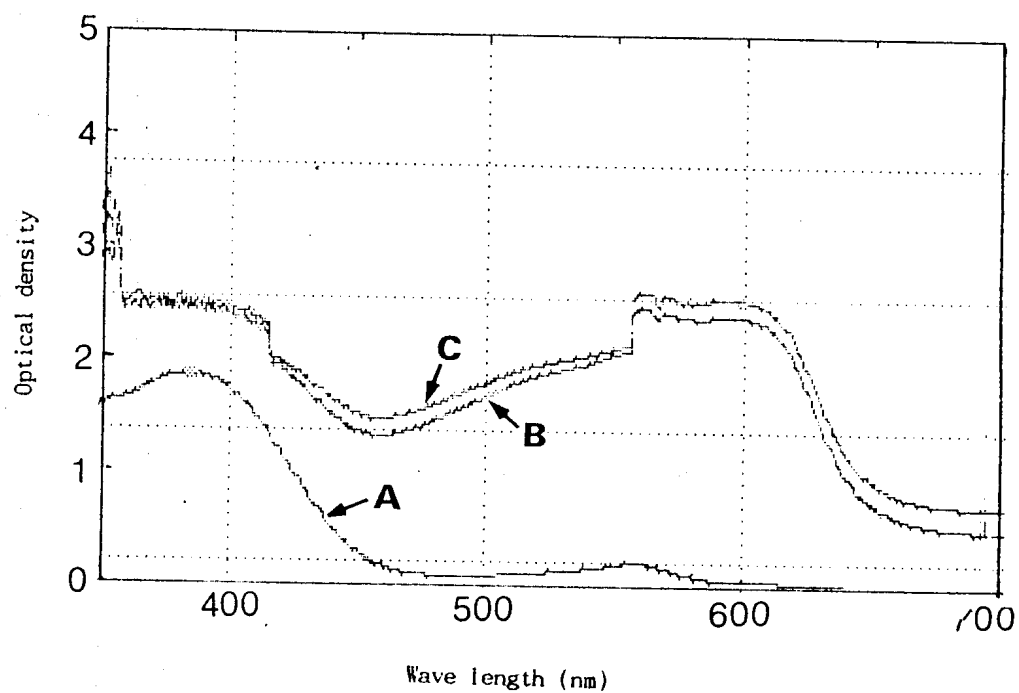


Fig. 2. MTT and formazan absorption spectra.
 MTT was obtained adding MTT in MEM medium and formazan was
 obtained treating MTT in MEM medium containing 1×10^5 HeLA
 cells. Optical density was measured adding 10% SDS containing
 0.01 N HCl

A: 0.25 mg/ml MTT
 B: Formazan #1
 C: Formazan #2

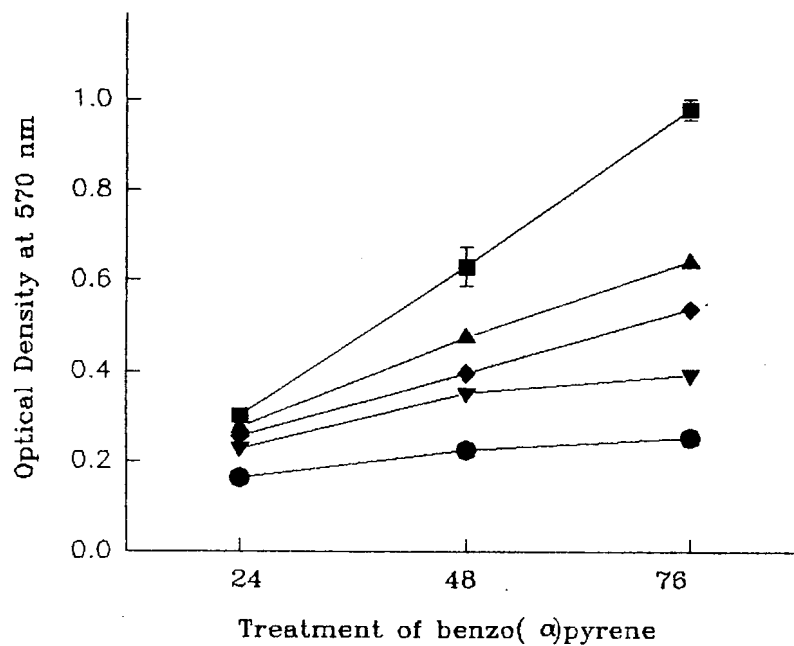


Fig. 3. The effect of benzo(a)pyrene on viability of HeLa cells by MTT assay

- Control group
- ▲ 7.5 μ M of Benzo(a)pyrene
- ◆ 30 μ M of Benzo(a)pyrene
- ▼ 120 μ M of Benzo(a)pyrene
- 480 μ M of Benzo(a)pyrene

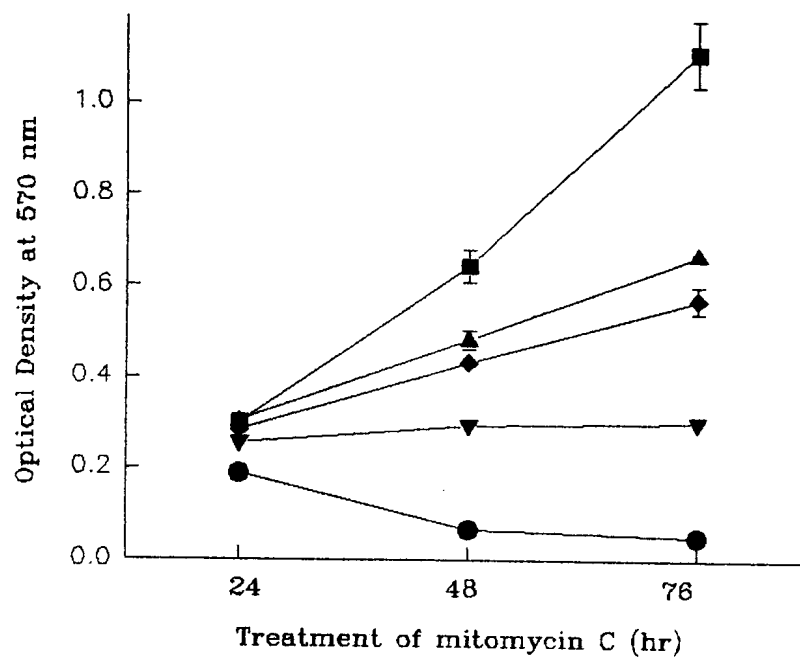


Fig. 4. The effect of mitomycin C on viability of HeLa cells by MTT assay

- Control group
- ▲ 0.125 $\mu\text{g/ml}$ of mitomycin C
- ◆ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of mitomycin C
- ▼ 2 $\mu\text{g/ml}$ of mitomycin C
- 8 $\mu\text{g/ml}$ of mitomycin C

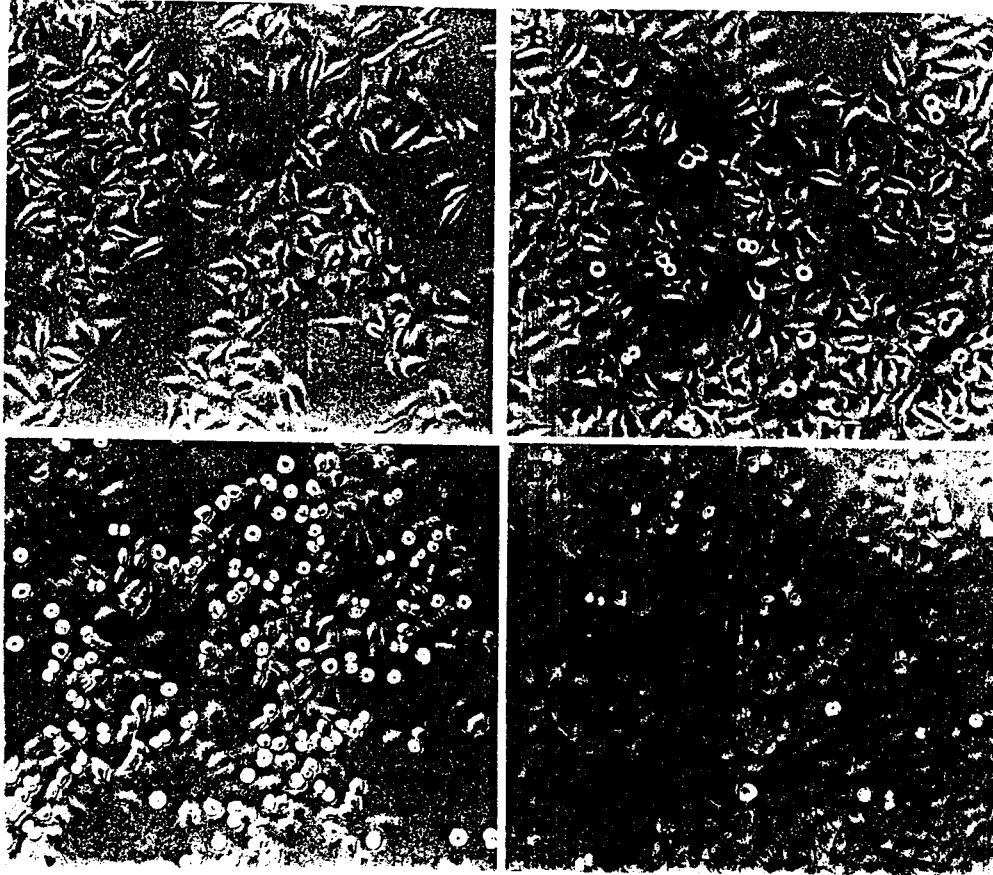


Fig. 5. The picture of HeLa cells synchronized with hydroxyurea and allowed to proceed their cell cycle by resupplying fresh medium. (x100)

- A: 0 h after resupplying fresh medium
- B: 4 h after resupplying fresh medium
- C: 8 h after resupplying fresh medium
- D: 10 h after resupplying fresh medium

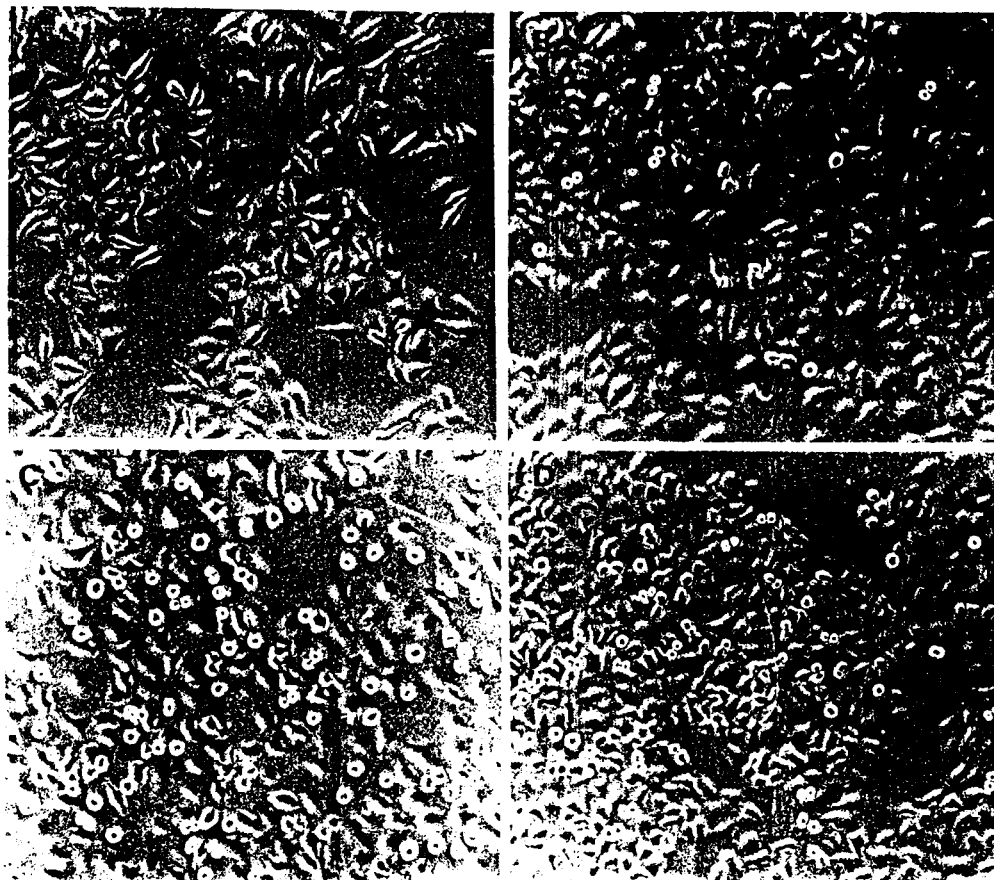


Fig. 6. The picture of HeLa cells synchronized with hydroxyurea and allowed to proceed their cell cycle by resupplying fresh medium and treating with 30 μ M BaP. (x100)

- A: 0 h after resupplying fresh medium
- B: 4 h after resupplying fresh medium
- C: 8 h after resupplying fresh medium
- D: 10 h after resupplying fresh medium

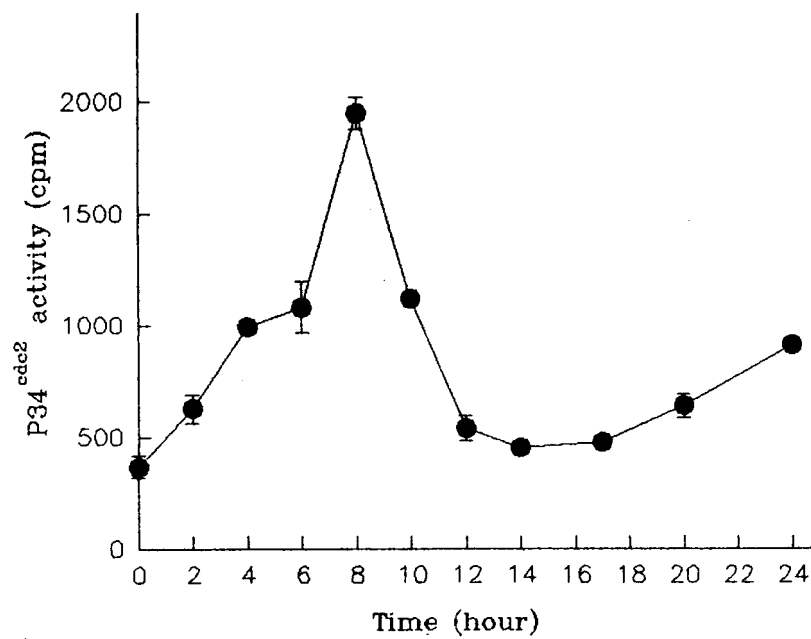


Fig. 8. P34^{cdc2} activity of HeLa cells synchronized with hydroxyurea and allowed to proceed their cell cycle by resupplying fresh medium.

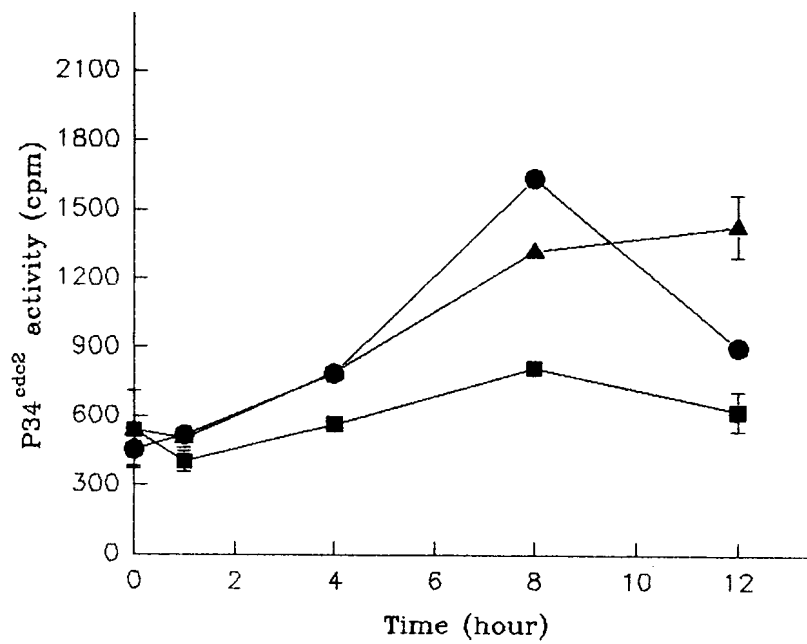


Fig. 9. The effect of benzo(α)pyrene and mitomycin C on p34^{cdc2} activity

- Control group
- ▲ 30 μM of benzo(α)pyrene
- 0.5 μg/ml of Mitomycin C

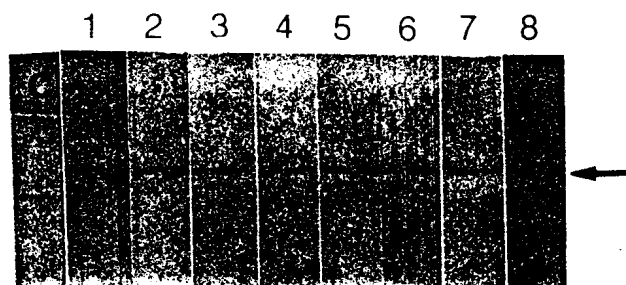
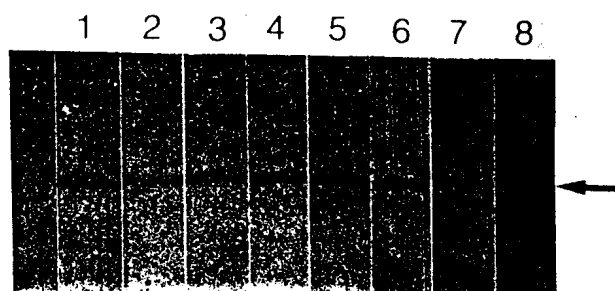
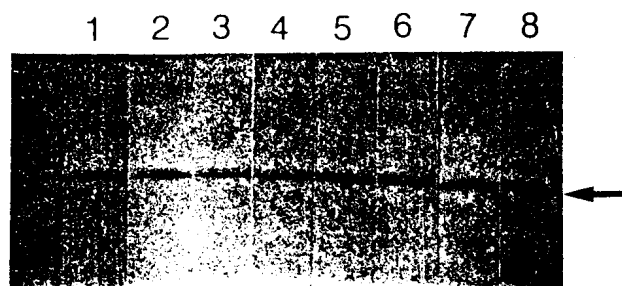


Fig. 10. The effect of benzo(a)pyrene and mitomycin C on the synthesis of p34cdc2 protein of synchronized HeLa cells by western blotting analysis. (1: 0 hr, 2: 0.5 hr, 3: 1 hr, 4: 2 hr, 5: 4 hr, 6: 8 hr, 7: 12 hr, 8: 24 hr after restarting cell cycle)

A: Control group
 B: 30 μM of benzo(a)pyrene
 C: 0.5 μg/ml of mitomycin C

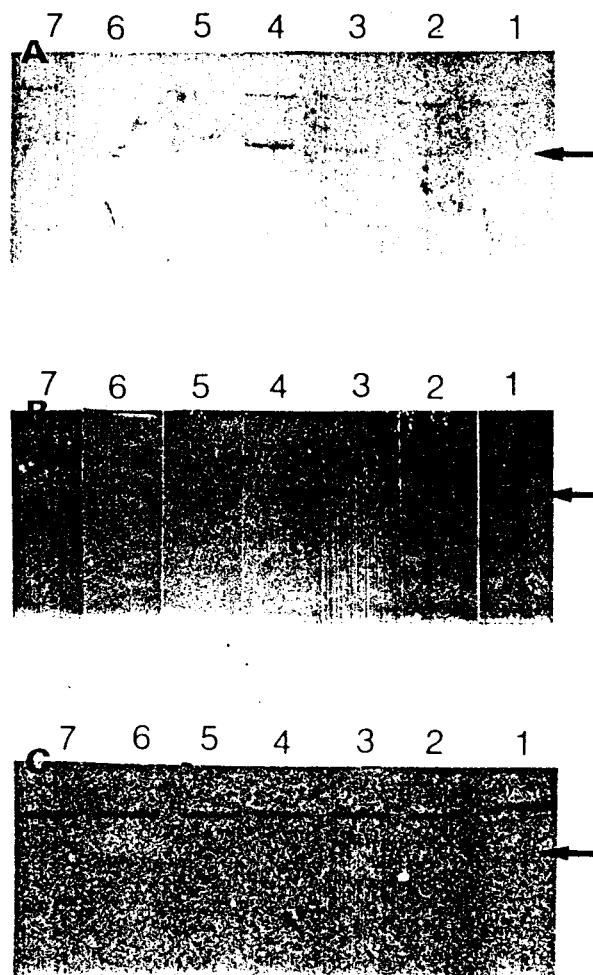


Fig. 11. The effect of benzo(a)pyrene and mitomycin C on the synthesis of cyclin B protein of synchronized HeLa cells by western blotting analysis (1: 0 hr, 2: 4 hr, 3: 6 hr, 4: 8 hr, 5: 10 hr, 6: 12 hr, 7: 12 hr after restarting cell cycle)

- A: Control group
- B: 30 μ l of benzo(a)pyrene
- C: 0.5 μ g/ml of mitomycin C

IV. 고 찰

최근의 생명공학의 발달로 다양한 발암성 유전자(protooncogene) 및 항암유전자(tumor suppressor gene)가 발견되었고, 더불어 세포의 분화와 성장에 가장 중요한 cell division cycle에 관여하는 유전자 및 그 생성물질도 많이 밝혀졌다. 본 연구는 세포의 분열에 영향을 주어 암을 발생시키는 화학물질에 대한 기초 실험으로 최근의 유전공학 및 생화학적 실험기법을 이용하여 발암물질의 발암성 확인 및 그 기전을 알아내고자 하였다. 이미 확인된 발암물질에 있어 세포 및 분자수준에서 물질에 따라 다르게 가질 수 있는 독특한 발암기전을 밝혀가는 것은 이들 화학물질에 대한 발암성평가에 의미있다 하겠다.

본 실험에서 BaP 및 MMC의 cell division cycle 조절에 대한 영향을 연구하기 위하여 먼저 hydroxyurea를 이용하여 HeLa cell을 synchronize하였다. FACS analysis 방법에 의해 hydroxyurea로 synchronize된 HeLa cell은 4시간 후 S phase, 8시간 후 G2/M phase로 진행하여 12-16시간 후 다시 G1 phase로 진행함을 알 수 있었다. BaP 및 MMC를 24시간 처리하여 MTT 방법으로 세포분열능을 측정시 세포성장억제가 비슷한 수준이었던 각각의 농도는 30 μ M, 0.5 μ g/ml이었다. 따라서 이에 대한 cell cycle 실험을 하였다. 현미경 관찰, p34^{cdc2}활성의 측정, p34^{cdc2}단백생성량, cyclin B의 생성량을 측정한 결과 BaP는 세포의 분열을 지연시켰으며 MMC는 세포의 분열을 억제하였다.

Cyclin은 p34^{cdc2}와 결합하여 p34^{cdc2}를 활성화 시키는 단백질로 cyclin A와 cyclin B가 있다. Cyclin A는 S phase초기에 합성되며 cyclin B는 S phase 후반부에 합성되기 시작하여 G2/M phase에서 가장 많이 합성되는 것으로 알려졌다.

본 실험에서 BaP에 의한 세포분열능의 감소는 cyclin B의 합성이 지연되어 세포의 이로 인하여 p34^{cdc2} kinase의 활성화가 정상세포에 비하여 2-4시간 지연된 것에 기인한다. 본 실험에서 BaP에 의한 cyclin B의 합성지연은 Radiation을 이용하여 cyclin A 및 cyclin B의 생성을 실험한 Muschel등과 유사한 결과를 나타내며, in vitro에서 BaP에 의한 단백질 합성의

감소를 실험한 최근의 BaP에 대한 실험과 일치한다. MMC는 cyclin B의 합성을 완전히 차단하는 것으로 보이며 따라서 P34cdc2 kinase의 활성화도 현저히 저하되는 것을 나타내었다.

Cell division cycle를 이용한 화학물질의 평가는 아직 radiation이용한 실험외에는 많이 발표되고 있지 않지만 면역억제제등의 효과연구를 위한 시도는 발표되고있다. 그리고 cell division cycle은 세포의 분열에 중요한 역할을 하며 화학물질에 의해 영향을 많이 받으리라 예측되므로 이에 대한 화학물질의 영향을 연구하는 것은 필요하다고 생각된다.

V. 결론 및 요약

본 연구에서는 p34^{cdc2}의 활성을 이용하여 Benzo(a)pyrene 및 Mitomycin C의 cell division cycle에 대한 영향을 연구하고자 hydroxyurea를 처리하여 HeLa cell을 Synchronize 시키고 p34^{cdc2} 활성, 및 P34^{cdc2}의 생성량, cyclin의 생성량 등을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. BaP 및 MMC는 24시간 처리시 30 μ M 과 0.5 μ g/ml 에서 각각 15%, 12%의 세포성장률을 감소시켰으며, MMC는 0.8 μ g/ml에서 강한 세포독성을 나타내었다.
2. p34^{cdc2}의 활성을 측정한 결과 정상적인 HeLa cell은 cell cycle이 진행함에 따라 p34^{cdc2}의 활성이 증가하여 8시간에서 최대를 이루며 이후 활성이 감소하나 30 μ M BaP 처리시는 8시간 이후에도 p34^{cdc2}의 활성이 감소하지 않고 유지되며 0.5 μ g/ml MMC는 정상군에 비하여 p34^{cdc2}의 활성을 감소시켰다.
3. p34^{cdc2} 단백질의 양은 cell cycle에 관계없이 일정하며 BaP 및 MMC의 처리에 의해서도 변화를 보이지 않았다.
4. Cyclin B 단백질은 정상 세포에서 cell cycle 진행 4시간 이후부터 합성되어 나타나기 시작하여 8시간에서 최대가 되며 이후 분해되어 없어졌다. BaP 30 μ M 처리한 세포에서는 8시간 이후에도 cyclin B가 분해되지 않아 10시간에서 cyclin B의 양이 최대가 되며 그 후 cyclin B가 감소하였다. 0.5 μ g/ml의 MMC 처리군에서는 cyclin B가 관찰되지 않았다.
5. 현미경 관찰시 정상세포는 8시간에서 분열중인 세포가 최대(52.8%)였으며 10시간 이후에는 감소하였다(17%). BaP 30 μ M 투여시는 8시간에서 38%, 10시간에서 26.9%로 세포분열이 다소 지연되는 경향을 보였다. 0.5 μ g/ml MMC 처리군에서는 분열중인 세포를 관찰할 수 없었다(8시간: 0.7%, 10시간 2%).
6. 이상의 결과 BaP 및 MMC는 cyclin B의 합성에 영향을 주어 cell division cycle의 진행을 방해하는 판단되며, 특히 BaP는 Cyclin B의 합성 및 분해를 지연시켜 세포분열을 감소시키는 것으로 판단된다. MMC는 cyclin B의 합성에 영향을 주어 cell division cycle을 방해하는 것으로 판단된다.

V. 참고문헌

1. 柳本 武美 등, 역치. 84-100新しい發癌のメカニズムと評價
2. World Health Organization. IPCS international program on chemical safety
3. World Health Organization, IARC monography
4. OECD, OECD guidelines for testing of chemicals
5. U.S. department of health and human services public health service, Agency for toxic substances and disease registry, Draft toxicological profile
6. U.S. Department of health and human services, Public health service. National Toxicology Program
7. Bruce N. Ames, Joyce McCann and Edith Yamasaki, 1975 Method for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 31: 347-364
8. 祖父尼 俊雄, 1992 培養細胞を用いる染色體異常試験 毒性試験講座 12: 53-61
9. Life-Science Information Center, 1927. ,微生物を用いる變異原性試験データ集
10. 東京大學出版會, 1991. がん遺傳子と抑制遺傳子
11. 羊土社, 1992. がん遺傳子ハンテイング
12. 羊土社, 1992. 抑制遺傳子-その作用機構に迫る, 實驗醫學 vol 10.
13. Frederique zindy, Eugenia Lamas, Xavier Chenivresse, Joelle Berthold Henglein, and Christian Brechot. 1992 Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 182: 1144-1154
14. Richard B. Lock. 1992. Inhibition of p34cdc2 kinase activation, p34cdc2 tyrosine dephosphorylation, and mitotic progression in Chinese Hamster Ovary Cells Exposed to Etoposide. *Cancer Research* 52: 1817-1822.
15. Marc Kirschner, 1992, The cell cycle then and now, *TIBS* 17: 281-285

16. Youth H. Kim, Jacques J. Proust, Meredith J. Buchholz, Francis J. Chrest, and Albert A. Nordin, 1992, Expression of the murine homologue of the cell cycle control protein p34cdc2 in T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 149: 17-23
17. Brian G. Gabrielli, Linda M. Roy, Jean Gautier, Michel Philippe, and James L. Maller, The Journal of American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 267: 1969-1975
18. Philip W. Hinds, Steven F. Dowdy, Elinor Ng Eaton, Andrew Arnold, and Robert A. Weiberg, 1994. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 709-713
19. Patrizia Paterlini, Anne Marie Suberville, Frederique Zindy, Josianne Melle, Michelle Sonnier, Jean Pierre Marie, Francois Dreyfus, and Christian Brechot. Cyclin A expression in human hematological malignancies: a new marker of cell proliferation. *Cancer Research* 53: 215-238
20. Ruth J. Muschel, Hong Bing Zhang, and W. Gillies McKenna, 1993. Differential effects of ionizing radiation on the expression of cyclin A and cyclin B in HeLa cells. *Cancer Research*, 53: 1128-1135
21. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson, 1983. Cell growth and division, *Molecular biology of the cell* 611-716
22. Nurse P., Thuriaux P., and Nasmyth K. 1976 *Mol. Gen. Genet.* 146: 167-178
23. Nurse P. and Thuriaux P. 1980, *Genetics* 96: 627-637
24. William G. Morice, Gregory Wiederrecht, Gregory J. Brunn, John J. Siekierka, and Robert T. Abraham. 1993. Rapamycin inhibition of interleukin-2-dependent p33cdk2 and p34cdc2 kinase activation in T lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 22737-22745
25. Claudette Perennes, Li-Xian Qin, Nathalie Glab, Catherine Bergounioux. 1993. Petunia p34cdc2 protein kinase activity in G2/M cells obtained with a reversible cell cycle inhibitor, mimosine. *FEBS letter.* 333: 141-145
26. Thottala Jayaraman and Andrew R. Marks. 1993. Rapamycin-Fkbp12 blocks proliferation, induces differentiation, and inhibition cdc2 kinase activity in a myogenic cell lines. *The Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 268: 25385-25388

27. William G. Morice, Gregory J. Brunn, Gregory Wiederrecht, John J. Siekierka, and Robert T. Abraham. 1993. Rapamycin-induced inhibition of p34cdc2 kinase activation is associated with G1/S-phase growth arrest in lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 260: 3734-3738(*)
28. Esther E. Sandmeyer. 1981, Aromatic hydrocarbons, Patty's industrial hygiene and toxicology third edition, vol. 2b: 3253-3431
29. *The Toxicology*. 1993. Abstracts of the 32nd annual meeting vol 13
30. J.L. Turk, 1989, Immunosuppressive agent, Textbook of immunopharmacology Second edition 312-319.
31. K. Buchkovich, L.A. Duffy, and E. Harlow, 1989, Cell 58:1097-1105
32. Francois Denizot and Rita Lang. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. 89: 271-277.
33. D.R. Marskak, M.T. Vandenerg, Y.S. Bae and I.J. Yu. 1991, J. Cell Biochem., 45: 391-400
34. Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989, Molecular cloning a laboratory manual

P34^{cdc2} Kinase 효소의 활성도를 이용한
새로운 발암성 평가에 관한 연구
(94-2-10)

발 행 일 : 1994. 12
발 행 인 : 문 영 한
발 행 처 : 한국산업안전공단 산업보건연구원
 인천직할시 북구 구산동 34 - 3
 전 화 : (032) 518 - 0861
인 쇄 인 : 김 재 극
인 쇄 처 : 문 원 사

〈비 매 품〉