

HL-60 세포에 대한 건강의 분화유도 효과

오유미 · 주성민² · 김영미 · 윤용갑¹ · 전병훈² · 김원신*

원광대학교 자연과학대학 생명과학부, 1: 원광대학교 한의과대학 방제학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of Rhizoma Zingiberis Siccatum Extract on the Induction of HL-60 Human Leukemia Cell Differentiation

Yu Mi Oh, Seong Min Ju², Young Mi Kim, Young Gab Yun¹, Byung Hun Jeon², Won Sin Kim*

Division of Natural Science, College of Natural Sciences, 1: Department of Prescription, College of Oriental Medicine, 2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

We have examined the induction of HL-60 cell differentiation by treatment of the water extract of Rhizoma Zingiberis Siccatum, which is a Korean traditional herbal medicine. It was observed that HL-60 cell proliferation was dose-dependently inhibited by treatment with various dose of Rhizoma Zingiberis Siccatum extract. The level of inhibition was identical to those of ATRA-treated cells. Rhizoma Zingiberis Siccatum extract treatment caused a significant change in NBT reduction (47%) and enhanced ATRA-induced NBT reduction. Treatment of Rhizoma Zingiberis Siccatum to HL-60 cells increased only CD11b expression in the cells, and also increased markedly G0/G1 stage arrest. This can suggest that Rhizoma Zingiberis Siccatum induced the differentiation of HL-60 cell and enhanced ATRA-induced differentiation predominantly along the granulocytic lineage. The results present here show that Rhizoma Zingiberis Siccatum extract contains the potential effect of differentiation induction or acts as a agent enhancing the induction of differentiation.

Key words : Differentiation, HL-60, ATRA, Rhizoma Zingiberis Siccatum

서 론

세포의 분화 (cell differentiation)는 항상성과 정상적인 성장을 위한 기초적인 과정이다. 백혈병 세포를 포함하는 대부분의 혈액 암세포는 미분화된 세포가 최종 분화세포 (terminal differentiated cell)로의 성숙할 수 있는 기능이 결함 되어 나타나는데, 이는 미분화된 세포의 과잉성장과 높은 증식상태로 남아 정상적인 세포들의 기능을 방해 한다^{6,9,15}. 모든 혈액세포는 공통의 전능성 조혈간세포 (stem cell)로부터 유도되며 특성의 분화코스를 거치게 하는 진로결정 조절기구가 여러 곳에서 작동하여 최종분화세포가 되기 전까지 세포는 유한의 횟수의 증식 (proliferation)을 반복하게 되어 정상의 혈구세포에서는 그 증식과 분화 (differentiation)의 평형상태가 항상 유지된다. 이에 비하여 백혈병 (Leukemia)은 조혈모세포 (hematopoietic cell)가 기능

을 가진 성숙한 세포로의 분화 능력의 상실과 세포사멸 (apoptosis)의 이상에 의해 나타나는 질병이다. 즉, 미분화된 세포가 통제된 증식으로부터 빠져나가거나, 분화과정이 차단되거나 하여 최종 분화세포까지 도달하지 못하는 세포에서 발생한다. 세포의 백혈병화는 전능성 조혈간세포가 분화하는 어느 단계에서든 일어날 수 있으며, 그 단계의 분화코스에 의해서 화학물질에 의한 분화유도 과정이 다르며, 미분화한 상태에 있는 백혈병 세포는 분화의 유도가 가능한 화학물질에 의하여 분화할 수 있다^{14,26}. 급성전골수성백혈병 (acute promyelocytic leukemia; APL)은 급성골수성백혈병 (acute myelocyte leukemia; AML)의 subtype으로 17번 염색체의 retinoic acid receptor (RAR)-α gene과 15번 염색체의 PML (promyelocyte leukemia) nuclear protein gene의 염색체 전위에 의해 재배열된 t(15;17)(q22;q21)에 의한 현상으로 인해 특징이 나타나게 된다^{8,19}. 분화유도에 이용되는 세포주로는 HL-60 (급성전골수성백혈병), U-937 (단구성백혈병), ML1, 2, 3 (골수성백혈병), K-562 (만성골수성백혈병) 등이 있으며²⁷, 그 중에서도 1977년 급성전골수성백혈병 환자로부터 분리하

* 교신저자 : 김원신, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 자연과학대학

· E-mail : wsnkim@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6578

· 접수 : 2006/03/01 · 수정 : 2006/03/30 · 채택 : 2006/04/07

여 확립한 세포주인 HL-60 세포는 동일질병의 다른 환자의 경우와 달리 *in vitro* 상에서 사멸되지 않고 여러 가지 분화 유도 물질에 의해 granulocyte, monocyte/macrophage 등으로 분화가 유도되는 세포주이기 때문에 백혈병 연구 및 조혈세포 분화의 model system으로 유용하게 사용되고 있다^{6,17}.

HL-60 세포의 분화 유도 물질로는 interferon-gamma (INF- γ)와 granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) 등과 같이 세포에서 분비되는 것도 있지만, granulocyte로 분화를 유도하는 ATRA (all-trans retinoic acid)², mycophenolic acid, actinomycin D, vitamin D³¹⁹, DMSO (dimethyl sulfoxide), hypoxanthine 등의 화학물질이 알려져 있다¹⁷. 또한 Phorbol ester, INF- γ 등과 같은 화학물질에 의해서는 monocyte로 분화가 되며, TPA (12-*o*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate)¹, GM3 ganglioside에 의해서는 macrophage로 분화가 유도되며⁹, GM-CSF에 의해서는 eosinophil로 분화 유도가 일어나는 것으로 알려져 있다^{20,24}.

백혈병 세포와 같이 미분화된 세포의 분화 연구에서 조사해야 할 중요한 점은 첫째, 세포의 증식이 억제 (inhibited proliferation)되거나 정지 (arrest)해야 하며²⁴ 둘째, 최종분화세포에서 특이적인 기능이 발현해야 한다. 특히 혈구세포에서는 분화과정에서 세포 표면항원 (cell surface antigen)이 존재하게 되는데, 어떠한 표면항원이 출현하는지에 의해서 분화 방향성을 알 수 있다²⁷. 최종 분화세포에서 나타나는 기능성 marker를 보면 혈소판은 peroxylase, PDGF, TGF β 1, 적혈구는 헤모글로빈 생산 능력이 있는 benzidine 양성세포의 출현, granulocyte, monocyte/macrophage의 표면항원인 CD11b, CD14 등을 기능 marker로 사용하여 세포의 분화 방향성을 확인 할 수 있다²¹.

골수성 세포의 leukocyte adherence 활성을 증대하는 α 1 β 1 heterodimer는 granulocyte와 monocyte/macrophage로 분화가 되었을 때 나타나는 표면 수용체로 공통적인 β subunit인 CD18과 CD11a (LFA-1, α L), CD11b (Mac-1, α M), 또는 CD11c (p150, α x)의 세 가지 다른 α subunit가 비공유적으로 조합되어 세포의 표면에 항원으로 나타나게 된다¹¹. 백혈구 세포의 종류에 따라 α 1 β 1 heterodimer의 각각 다른 조합으로 발현이 되는데, CD11a/CD18 복합체는 T-lymphocyte에서 발현이 되며, 반면에 CD11b/CD18은 사람의 neutrophil (polymorphonuclear leukocyte ; PMN)과 granulocyte의 표면에서 발현이 되며 이것은 C3bi-coated 입자와 내피 세포의 부착을 증대하게 된다. 또한 CD11c/CD18 복합체는 monocyte-derived macrophage에서 발현되는 것으로 알려져 있다¹². CD11b는 integrin- α M β 2로 CD11b/CD18, MAC-1 (macrophage-1 antigen) 또는 CR3로 알려져 있으며 골수성 세포가 충분히 기능을 갖춘 granulocytic lineage 세포로 성숙하고 최종으로 분화되었을 때 세포의 표면에서 발현이 되나 증식중인 세포에서는 발현되지 않는 특징이 있어 유도제에 의한 분화가 유도 될 때 분화 방향성을 위한 marker로 검출할 수 있다. CD11b의 발현은 분화 유도제를 처리한 후 9시간에서 14시간 후에 시작되어 24시간 이내에 발현되어 진다²³. 세포주기의 G1기에서 저해된 세포에서 발현의 시작이 뛰어난 것으로 보여 지나 CD11b의 발현은 항상 분열 정지에 앞

서지는 않는 것으로 알려져 있다⁹.

본 연구에서는 전통 한약재가 백혈병 세포주인 HL-60 세포를 최종분화세포로 유도시킴으로서 백혈병에 대해 치료목적으로 효과가 있는지, HL-60 세포의 분화 유도제로서의 가능성을 알아보고자 하였다. 이는 한약재가 HL-60 세포에 대해 증식의 저해와 성장 억제를 나타내는지를 MTT assay와 cell viability, FACS analysis를 통해 세포주기를 관찰하여 확인하고, NBT-reduction assay와 granulocytic lineage 세포로의 분화 방향성을 제시할 수 있는 표면항원인 CD11b의 발현 여부를 관찰하여 한약재가 분화 유도제로서의 효과가 있는지 확인 하고자 한다.

재료 및 방법

1. Cell culture and conditions

HL-60 세포주는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul Korea)에서 구입하였고, 세포배양은 10% Fetal bovine serum (FBS)과 1% Antibiotics-antimycotic solution (GIBCO, BRL)이 포함되어 있는 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)-1640 (GIBCO, BRL) 배지에서 100 mm culture dish에 1 ml당 2×10^5 개의 세포를 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

2. Drug and treatment

한약재인 건강 (乾薑, Zingiber officinale Roscoe)은 원광대학교 한의과대학 병리학교실에서 제공받아 사용하였으며, positive control로 all-trans retinoic acid (ATRA, Sigma)를 사용하였다. 건강과 ATRA는 각각 20 mg/ml 과 1 mM의 농도로 PBS (phosphate-buffer saline)에 녹여 사용하였다. 한약재를 처리하기 위해 24well plate에 HL-60 세포가 2×10^5 cells/ml 이 되게 분주한 후 건강은 농도가 0, 50, 100, 150, 200 μ g/ml이 되게 처리하였으며 ATRA는 1 μ M의 농도로 처리하여 배양하였다. 배양시간은 실험에 따라 각각 다른 조건으로 배양하였는데, NBT reduction, MTT assay, cell viability를 위한 세포는 한약재 처리 후 72시간동안 배양하고, 세포주기 관찰과 CD11b, CD14의 발현 여부를 확인하기 위한 세포는 한약재를 처리한 후 24시간, 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

3. Cell viability of Gungang by MTT assay

세포의 증식억제를 확인하기 위해 한약재를 처리한 세포를 원심분리로 모아서 0.4% trypan blue로 1분간 염색시킨 후 hemocytometer를 사용하여 생세포와 사세포의 수를 계측하였다. 세포 수를 셀 때에는 구획내의 200개 이상의 전 세포의 수를 측정한다. 또한 세포에 미치는 건강의 생존율을 확인하기 위해 3,4,5-dimethylthiazol-2-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) assay를 시행하였다. 건강을 0, 50, 100, 150, 200 μ g/ml의 농도로 처리하여 72시간 동안 배양시키고, MTT는 5 mg/ml의 농도로 PBS 에 녹여 사용하였다. 각 농도별로 처리한 세포를 2,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후에 5 mg/ml 농도의 MTT 500 μ l로 세포를 부유시켜 formazan을 형성시키기 위해 37 $^{\circ}$ C에서 3시간

동안 반응시켰다. 반응시킨 세포는 다시 1,000 rpm으로 30초간 원심분리한 후 DMSO (dimethyl sulfoxide ; Sigma) 200 μ l로 풀어주고 96well plate에 옮겨 ELISA reader를 사용해 OD570nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. NBT differentiation assay

Nitroblue tetrazolium (NBT ; Sigma) reduction - TPA stimulation 방법을 통해 HL-60 세포가 분화되었는지 확인하였다. 건강을 농도별로 처리해 72시간동안 배양한 후 세포를 2,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 2 mg/ml 농도의 NBT용액 100 μ l에 부유시키고 1 μ g/ml 농도의 TPA (phorbol 12-meristate 13-acetate, Sigma)를 1 μ l 넣어 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨다. 반응시킨 세포는 1 N HCl을 100 μ l 넣어 섞어 준 뒤 얼음에 5분간 방치하여 반응을 정지시켰다. NBT-reduction 반응이 정지된 세포를 200 μ l의 DMSO에 부유시킨 후 96well plate에 옮겨 ELISA reader를 사용해 560nm에서 흡광도를 측정하였다. 전 세포에 대해 NBT-positive 세포의 비율을 확인하기 위해 0.4% trypan blue를 사용하여 cell counting을 병행하여 전 세포의 수를 계측한다.

5. Flow cytometric analysis of cell cycles by PI staining

Propidium iodide (PI, Sigma)를 사용하여 DNA를 염색하여 세포주기 내에서의 DNA contents를 확인함으로써 세포가 분화되는 동안 세포 주기의 변화를 관찰하였다. HL-60 세포를 2×10^5 cells/ml이 되도록 분주 하여 분화 유도가 뚜렷이 나타나는 50 μ g/ml과 100 μ g/ml의 농도로 건강을 처리해 배양한 후, 세포를 모아 얼음에 준비해둔 PBS를 사용하여 두 차례 세척한 다음 70% ethanol을 사용하여 4°C에서 고정 시킨다 (fixation). 세포의 핵을 PI staining solution (PBS/ 10 μ g/ml PI/ 100 μ g/ml RNase A)을 사용하여 37°C에서 1시간 동안 염색을 시킨다. 염색이 된 세포는 FACS (Fluorescence activated cell sorter ; Becton Dickson)를 사용하여 분석하였다 (CELLQuest software).

6. Analysis of CD11b and CD14 expression

HL-60 세포가 granulocytic 또는 monocytic lineage 세포로 분화가 되었는지를 표면항원인 CD11b와 CD14의 발현 여부를 비교하여 확인하였다. 높은 생존율과 NBT-positive를 보이는 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도로 건강을 처리한 세포를 모아 PBS로 두 차례 세척하고 100 μ l의 0.25% BSA (bovine serum albumin)가 포함된 PBS에 세포를 부유시켜 RPE-Conjugated anti-CD11b monoclonal antibody (Clone 2LPM19c, DAKO)와 FITC-Conjugated anti-CD14 monoclonal antibody (Clone TÜK4, DAKO)를 각각 10 μ l를 혼합시킨 뒤 4°C에서 30분 동안 반응시킨다. 반응시킨 후 0.25% BSA가 포함된 PBS로 두 차례 세척해준 뒤 1% formaldehyde가 포함된 PBS로 고정시켜 FACS로 분석하였다.

결 과

1. Effects of Gungang on the proliferation of HL-60 cells.

HL-60 세포는 2×10^5 cells/ml의 농도로 접종시킨 후 96시간의 배양시간 동안 세포는 증식하여 최대 15×10^5 cells/ml의 농도에 도달한다. 하지만 HL-60 세포가 분화 유도되는 동안에는 이러한 세포의 증식이 억제되어야 한다. 시간과 건강의 농도에 따른 세포의 증식 억제를 확인하기 위해 2×10^5 cells/ml의 HL-60 세포에 건강을 50, 100, 150, 200 μ g/ml의 농도로 처리하여 24, 48, 72, 96시간동안 배양한 후 hemocytometer (혈구계산판)를 사용해 세포의 수를 계측하였다. 건강을 처리하지 않은 대조군 (control)의 경우 위와 유사한 비율의 증식을 보였으며, 대조군은 계속적인 증식을 보이는 반면 건강을 처리한 세포의 경우 48시간부터 72시간에서 현저한 증식억제를 나타내고 있다 (Fig. 1). 보다 정확한 증식억제의 효과를 보기위해 건강을 농도별로 처리해 72시간 동안 배양하여 세포수를 계측한 결과 역시 현저히 감소된 세포 증식을 나타내고 있다. 또한 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도의 건강은 granulocytic lineage 세포로의 분화에 강력한 유도제로 사용되는 ATRA (1 μ M)나 DMSO (1.5%)와 유사한 범위 내에서 증식억제의 효과를 나타내고 있다 (Fig. 2). 이와 같은 결과는 건강이 ATRA나 DMSO와 마찬가지로 HL-60 세포에 대해 증식을 억제하는 것으로 보여진다.

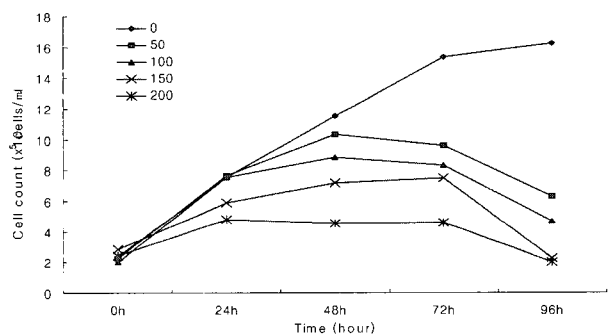


Fig. 1. Time-dependent cell viability in Gungang-treated HL-60 cells. HL-60 cells were plated at a density of 2×10^5 cells/ml, and treated with Gungang 24, 48, 72, 96 h at indicated concentration. Cell viability was measured by cell counting as described in "Materials and Methods". Values represent the mean \pm SD of three different experiments.

2. Induction of NBT reduction activity of HL-60 cells by Gungang

건강이 HL-60 세포에 대해 분화를 유도하는지 확인하기 위해 NBT-reduction assay를 시행하여 전 세포에 대해 NBT-positive 세포의 비율을 분석하였다. HL-60 세포가 NBT 환원력을 최대로 갖출 수 있는 72시간 동안 배양한 결과 건강을 처리하지 않은 대조군에 비해서 positive control로 사용한 1 μ M ATRA가 약 41%의 NBT-positive를 보이며, 건강을 50, 100, 150, 200 μ g/ml의 농도별로 처리한 세포에서는 약 25%에서 최대 47%의 NBT-positive를 나타내고 있다 (Fig. 3). 또한 건강과 1 μ M ATRA를 함께 처리한 결과 건강만을 처리했을 때보다 약 20%에서 최대 34%이상의 NBT-positive의 증가를 보이며 특히 50 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도에서 최대의 분화 유도가 증폭된 효과가 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 4).

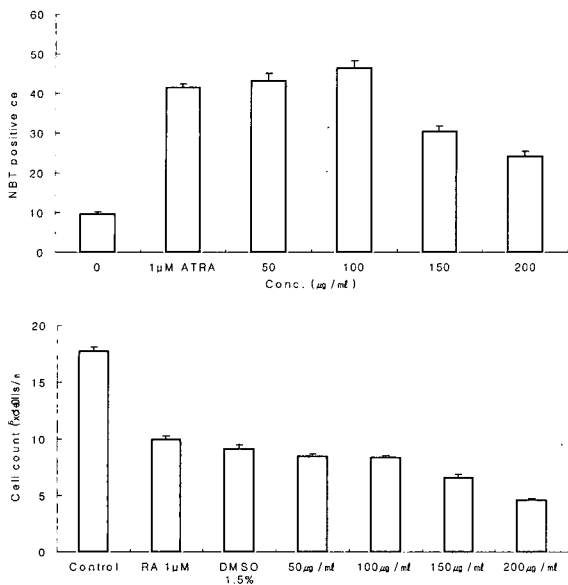


Fig. 2. Dose-dependent cell viability in Gunggang-treated HL-60 cells. HL-60 cell (2×10^5 cells/ml) were treated with Gunggang, ATRA and DMSO for 72 h at indicated concentrations. Cell viability was measured by cell counting as described in "Materials and Methods". Values are the mean \pm SD of four different experiments.

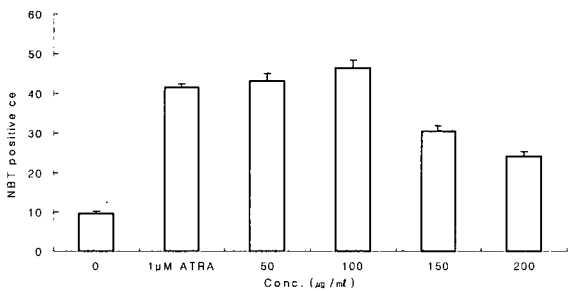


Fig. 3. Induction of NBT reduction in Gunggang-treated HL-60 cells. HL-60 cells were incubated for 72 h with various concentration of Gunggang. NBT reducing activity was determined and results are mean \pm SD of triplicated determinations.

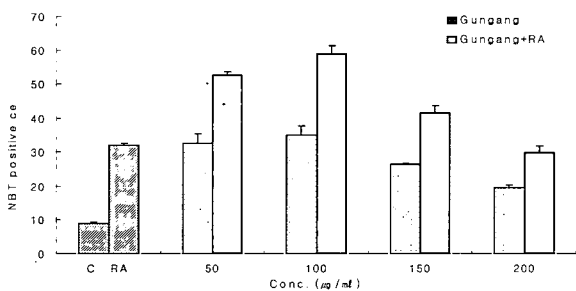


Fig. 4. Gunggang enhanced ATRA-induced NBT reduction. HL-60 cells were incubated for 72 h with various concentrations at Gunggang with 1 μM ATRA. NBT reducing activity was determined and results are mean \pm SD of triplicated determinations.

3. Flow cytometric of cell cycle by PI staining

HL-60 세포가 분화 유도되는 동안 일어나는 세포의 증식억제 효과가 건강에 의한 세포주기의 변화 때문인지를 확인하기 위해 건강을 처리해 24시간동안 배양한 후 PI staining을 실행하여

FACS 분석을 통해 세포주기의 각 단계에서의 DNA contents를 확인한 결과, 건강을 처리한 세포는 대조군에 비해 G0/G1기에 정지되어 있는 세포가 약 47%에서 58%로 증가하였고 S기와 G2/M기의 세포는 약 23%에서 14%로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 5).

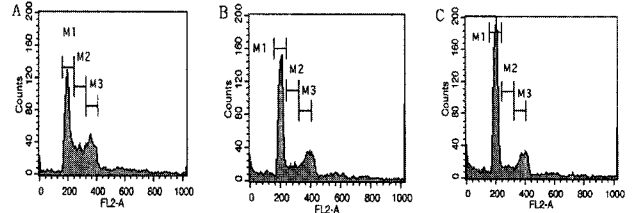


Fig. 5. Cell cycle analysis of Gunggang-treated HL-60 cells. HL-60 cells treated with Gunggang (50, 100 μg/ml) were stained PI as described in "Materials and Methods" and analysed by flow cytometry. (A) Untreated HL-60 cells (control). Gunggang-treated cells (B: 50 μg/ml, C: 100 μg/ml).

4. Induction of CD11b expression in HL-60 cells

건강에 의해 분화가 유도된 HL-60 세포의 분화 방향성을 확인하기 위해 granulocytic 계통에 특이적으로 발현하는 표면항원인 CD11b와 monocytic 계통에서 발현하는 CD14의 발현 여부를 확인하였다. 세포에 대해 독성이 가장 적고 분화 유도가 뛰어난 것으로 보여 지는 50 μg/ml, 100 μg/ml의 농도의 건강을 처리해 48시간동안 배양하여 FACS를 통해 분석한 결과 HL-60 세포는 CD11b의 발현을 보이는 반면 CD14의 발현은 없는 것으로 보여 진다 (Fig. 6). 이와 같은 결과는 건강이 HL-60세포에 대해 granulocytic 계통 세포로의 분화를 유도하는 것으로 판단된다.

Gunggang Concentration	Cell cycle arrest (%)		
	G0/G1 (M1)	S (M2)	G2/M (M3)
A. control	44.34	19.61	23.26
B. 50 μg/ml	47.00	9.38	17.15
C. 100 μg/ml	57.86	7.46	14.14

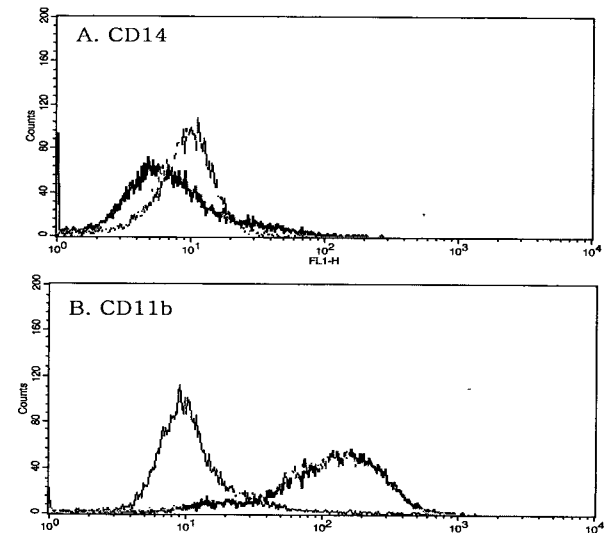


Fig. 6. Expression of surface marker in Gunggang-treated HL-60 cells. HL-60 cells were incubated for 48 h with 50 μg/ml, 100 μg/ml of Gunggang. (A) FITC-conjugated anti-CD14 (B) RPE-conjugated anti-CD11b. Black line (-): control, blue line (-): 50 μg/ml, yellow line (-): 100 μg/ml.

고찰

일반적인 정상조직의 모든 세포는 어느 정도 증식 (proliferation)을 이룬 뒤에는 반드시 분화 (differentiation)과정을 거쳐 정상적인 기능을 갖는 최종분화세포 (terminal differentiated cell)로 존재하게 되며 이런 증식과 분화는 이미 세포 내에서 program되어 있는 유전자 수준에서의 조절에 의한 것으로 알려져 있다. 그러나 암은 이러한 신체의 정상조직에서 유래하기는 하였으나 정상세포와는 달리 정상적인 분화를 하지 못한 채 무제한적으로 증식만 계속하는 미성숙한 세포들로 이루어진 것이다^{16,25}. 암세포와 같은 미분화된 세포의 출현 기전에 대해서는 아직 확실히 알려진 바는 없으나 그 주된 쟁점은 분화가 완료되었던 성숙한 세포가 dedifferentiation 된 것인지, 또는 undifferentiation 상태에 있던 세포들이 분화의 능력을 잃어버린 것인지 하는 점에 있다. 지금까지 보고된 바에 의하면 암세포로의 전환 (transformation)은 증식능력을 가지고 있는 세포에서만 일어난다고 하며, 어떤 경로로의 단기의 운명이 결정되어진 세포의 분화는 비가역적인 반면 최종 분화 과정만은 가역적인 것으로 알려져 있다. 최근에 암세포에서 보여 지는 abnormality가 완전히 비가역적인 것은 아니라는 것이 밝혀져 있어 분화 유도제를 사용하여 암세포를 정상세포로 또는 그와 유사하게 분화유도를 시키는 방법으로 leukemia나 hepatocyte, fibroblast 등에서 많이 시도되어 지고 있다²⁷. 현재 임상적으로 백혈병 치료에 사용되고 있는 ATRA, 1, 25-dihydroxyl vitamin D₃, Ara-C (cytosine atabinoside), 그리고 arsenic trioxide를 포함하는 화학치료법 (chemotherapeutic)을 위한 치료제들은 전골수세포 (promyelocyte)의 세포사멸 (apoptosis)을 유도하거나 성장 저해 (growth arrest)와 분화 (differentiation)를 촉진시키는 방법으로 APL 환자들에게 사용되어지고 있다¹⁴. 1988년 APL 환자의 세포에서 분화가 유도된 ATRA는 분화의 유도를 용이하게 하기 위해 다른 유도제들과 병합으로 백혈병과 같은 암 질병에 자주 사용된다². ATRA는 RA receptor (RAR) family와 상호작용에 의해서 일어나거나 세포 표면에 작용하여 세포 증식의 억제와 분화 유도 기능을 나타내는 것이다²⁸. 기존에 사용하던 항암요법제들은 주로 그 작용 기전이 DNA 복제를 억제하거나 세포 내 대사과 생합성을 감소하거나 free radical을 생성시키는 등 세포독성에 의한 것들로서 증식이 빠른 암세포에 작용해 세포사멸을 유도하는 것을 목적으로 하고 있다. 이런 세포사멸을 유도하는 것은 상당히 고용량의 화학합성약물이 필요하게 되므로 치료 목적 외의 심각한 부작용을 나타내어 항암제의 투여에 많은 제약을 받고 있다⁴. 몇몇의 암 치료요법으로 사용되는 화학치료제들은 비교적 낮은 농도인 1 μM ~1 nM의 농도에서 granulocyte로의 분화 유도에 강력한 효과를 나타내며 Actinomycin-D와 Methotrexate과 같은 화학치료제는 1~10 nM의 농도에서 30%에서 최대 80%정도의 HL-60 세포의 분화 유도 효과를 나타낸다. ATRA의 경우 1nM에 6일 동안 노출되었을 때 HL-60 세포의 분화가 유도될 수 있으며, 약 90%의 최대 분화는 1 μM ATRA에서 유도되어지는 것으로 알려져 있다²². 세포의 분화 유도는 여러

성장인자와 세포들 사이의 자극과 상호작용, 산소와 영양분의 양 그리고 주위 환경 등에 영향을 받으며 기존의 세포독성을 나타내는 농도보다 저 농도에서 세포의 분화 유도 작용이 있는 것들이 알려지고 있어 저 농도 사용에 따라 심각한 항암제의 부작용을 줄일 수 있다는 점에서도 상당히 고무적인 것으로 받아들여진다¹⁵. 따라서 본 연구에서는 APL 환자들에게 치료 목적으로 사용되어지고 있는 화학 치료제들이 약에 대한 내성 (drug resistance)과 고칼슘혈증 (hypercalcemia)과 같은 부작용이 나타날 수 있는 단점이 있어, 보다 부작용과 내성이 적은 한약재인 건강 (乾薑, Zingiber officinale Roscoe)을 사용하여 백혈병의 치료와 예방 목적으로 사용할 수 있는지에 대해 확인하고자 하였다.

HL-60 세포와 같은 백혈병 세포가 정상적인 기능을 갖춘 최종 분화세포로 분화 유도되는 동안 세포는 증식 억제와 성장 저해가 일어나야한다^{10,25}. 건강을 농도별로 처리해 시간별로 배양하여 cell counting을 시행한 결과 대조군은 지속적인 증식을 보이는 반면 건강을 처리한 세포에서는 뛰어난 증식 억제를 보이고 있다(Fig. 1). 한약재 건강이 HL-60 세포에 대해 다른 유도제들과 유사한 증식억제의 효과가 있는지를 알아보기 위해 강력한 분화 유도제로 사용되는 ATRA (1 μM)나 DMSO (1.5%)를 positive control로 사용하여 비교해본 결과 건강은 이들과 유사한 증식 억제의 효과를 나타냈다(Fig. 2).

Granulocyte와 monocyte로 분화중인 HL-60 세포에서 발생하는 superoxide anion이 NBT를 환원시켜 산출되는 blue-black formazan의 흡광도를 측정하여 HL-60 세포에 대해 분화 유도가 일어나는지 확인할 수 있다^{2,20}. 다양한 농도로 건강 처리 후 72시간동안 배양한 세포의 NBT-reduction assay의 결과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 건강을 처리한 세포에서 대조군에 비해 약 30%에서 최대 40%이상의 NBT-positive를 보이고 있다(Fig. 3). 따라서 건강은 ATRA와 마찬가지로 HL-60 세포와 같은 백혈병 세포를 다른 형질로 분화를 유도함을 알 수 있었다. 또한 1 μM 의 ATRA와 건강을 농도별로 함께 처리하여 NBT-reduction을 측정한 결과 건강을 단독으로 처리했을 때보다 약 30%에서 최대 60%의 NBT-positive를 나타내고 있다. 건강은 ATRA와 함께 HL-60 세포의 분화 유도 효과를 약 20% 이상 증진시키는 것으로 보여진다 (Fig. 4).

건강에 의해 분화가 유도된 HL-60 세포의 분화방향성을 알아보기 위해 분화방향성의 marker인 CD11b와 CD14과 같은 표면항원의 발현 여부를 관찰하였다. CD11b는 granulocyte에서, CD14은 monocyte에서 특이적으로 발현하는 표면항원으로 이미 알려져 있다¹². 건강을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리해 표면항원이 발현할 수 있는 48시간동안 배양하여 antibody를 부착시켜 FACS로 분석한 결과 건강에 의해 분화 유도된 HL-60 세포는 CD14의 발현이 없는 대신 CD11b의 발현이 나타나는 것을 확인하였다(Fig 6). NBT-reduction assay의 결과에서 확인되어진 대조군에 비하여 약 40% 이상의 NBT-positive를 나타낸 것과 CD11b가 발현하는 것으로 보아 건강은 HL-60 세포에 대해 granulocytic 계통 세포로의 분화를 유도하는 것으로 보여진다.

세포주기의 G1기 끝에 존재하는 check point는 세포주기의

분열을 계속할지 무활동 상태로 가능한 분화된 세포로서 G0단계에 들어가야 할지, 또는 세포사멸을 해야 하는지 등 세포의 운명을 결정 한다¹⁴⁾. 세포의 분화가 유도되는 동시에 세포의 증식이 억제되는 동안의 세포주기는 S기와 G2/M기의 세포밀도 (cell population)가 감소하는 반면 G0/G1기의 세포밀도가 증가하는 양상을 보이는 특징이 있는데⁴⁾, 이러한 세포주기의 G0/G1기 저해 (arrest)는 분화 유도제를 처리한 후 약 24시간 이내에 일어나는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 세포주기의 G0/G1기 저해는 CDK 억제자로 알려져 있는 p21^{WAF1/CIP1}의 발현과 연관되어 있는데, p21^{WAF1/CIP1}은 백혈병 세포의 분화 과정 동안 상향 조절되며 cyclin (A, B, D, E)와 관련된 CDK, PCNA (proliferating nuclear antigen)와 함께 복합체를 형성하는 것과 불활성에 영향을 주어 세포주기 G1기의 저해를 유발 한다²⁶⁾. 또한 세포주기와 관련된 유전자 산물인 pRb (retinoblastoma protein)는 불충분한 인산화 상태로 HL-60 세포의 G1기안에서 나타나며, G2기 조절 유전자인 cyclin B와 cdc2는 분화 과정동안 하향 조절되는 것으로 알려져 있다. pRb는 부분적으로 cdc2에 의해 인산화되며 p34cdc2는 cyclin B 뿐만 아니라 G1기 cyclin에도 결합할 수 있어 G0/G1기를 통제하여 세포주기의 저해를 조절하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 이러한 세포주기와 관련된 kinase는 활성의 조절과 인산화 수준의 상태 변화를 통해 세포의 분화 동안 세포주기 G0/G1기의 저해에 기여하게 된다^{3,13)}. 비교적 저 농도인 50 µg/ml, 100 µg/ml의 건강을 처리한 HL-60 세포의 세포주기를 분석한 결과 대조군에 비해 건강을 처리한 세포의 G0/G1기 DNA contents가 증가하는 반면 S기와 G2/M기의 DNA contents는 감소하는 것을 볼 수 있다(Fig. 5). 이는 세포주기의 G1기에서 저해되어 S기와 G2/M기로의 진입이 불가한 상태를 말하는 것이다. 즉, 건강에 의해 HL-60 세포가 분화될 때 일어나는 증식의 억제는 세포주기의 G0/G1기가 저해되어 세포의 성장이 저지되고 증식의 억제가 일어나게 되는 것이다.

이상의 결과로 보아 한약재 건강은 비교적 저 농도인 50 µg/ml과 100 µg/ml의 농도에서 HL-60 세포가 분화를 거치기 위한 과정중 하나인 세포 증식의 억제가 일어나며, 이 증식 억제는 세포주기의 G0/G1기를 저해하여 세포 증식을 억제시키는 것으로 나타났다. 또한 NBT-reduction assay를 시행한 결과 50 µg/ml과 100 µg/ml의 농도에서 NBT-positive 세포의 증가와 granulocyte의 특이적인 표면항원인 CD11b의 발현이 나타나는 것으로 보아 건강은 ATRA와 마찬가지로 HL-60 세포를 granulocytic 계통의 최종 분화세포로 분화를 유도하며, ATRA와 함께 HL-60 세포의 분화 유도를 증폭시키는 것으로 나타났다. 본 연구에서 사용한 한약재 건강이 HL-60 세포에 대해 분화 유도의 능력을 나타낸 것과 비교적 저 농도에서 분화가 유도된 점, 강력한 분화 유도제로 사용되는 ATRA와 함께 synergy 효과를 나타내는 것으로 미루어 보아 한약재인 건강은 급성전골수성 백혈병 세포주인 HL-60 세포의 분화 유도제가 포함되어 있는 것으로 보인다. 따라서 그 성분을 분리 동정하여 분화 유도 기작이 밝혀지게 된다면 백혈병 치료 목적으로 사용되는 화학치료제들과 항암제의 병용에 의한 심각한 부작용과 약에 대한 내성을 나

타내는 단점을 보완하여 백혈병의 치료에 높은 synergy 효과를 나타낼 것으로 사료되어진다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

- Bestilny, L.J., Riabowol, K.T. A role for serine proteases in mediating phorbol ester-induced differentiation of HL-60 cells. *Exp. Cell Res.* 256, 264-271, 2000.
- Breitman, T.R., Selonick, S.E., Collins, S.J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 2936-2940, 1980.
- Brown, G., Drayson, M.T., Durham, J., Toellner, K.M., Hughes, P.J., Choudhry, M.A., Taylor, D.R., Bird, R., Michell, R.H. HL60 cells halted in G1 or S phase differentiate normally. *Exp. Cell. Res.* 281, 28-38, 2002.
- Camarasa, M.V., Castro-Galache M.D., Carrasco-Garcia, E., Garcia-Morales, P., Saceda, M., Ferragut, J.A. Differentiation and drug resistance relationships in leukemia cells. *J. Cell Biochem.* 94, 98-108, 2005.
- Chung, T.W., Choi, H.J., Lee, Y.C., Kim, C.H. Molecular mechanism for transcriptional activation of ganglioside GM3 synthase and its function in differentiation of HL-60 cells. *Glycobiology.* 15, 233-244, 2005.
- Collins, S.J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood.* 70, 1233-1244, 1987.
- Datto, M.B., Li, Y., Panus, J.F., Howe, D.J., Xiong, Y., Wang, X.F. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 5545-5549, 1995.
- Degos, L., Dombret, H., Chomienne, C., Daniel, M.T., Miclea, J.M., Chastang, C., Castaigne, S., Fenaux, P. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 85, 2643-2653, 1995.
- Drayson, M.T., Michell, R.H., Durham, J., Brown, G. Cell proliferation and CD11b expression are controlled independently during HL60 cell differentiation initiated by 1,25 alpha-dihydroxyvitamin D(3) or all-trans-retinoic acid. *Exp. Cell Res.* 266, 126-134, 2001.
- Gianni, M., Ponzanelli, I., Mologni, L., Reichert, U., Rambaldi, A., Terao, M., Garattini, E. Retinoid-dependent

- growth inhibition, differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. Expression and activation of caspases. *Cell Death Differ.* 7, 447-460, 2000.
11. Hickstein, D.D., Back, A.L., Collins, S.J. Regulation of expression of the CD11b and CD18 subunits of the neutrophil adherence receptor during human myeloid differentiation. *J. Biol. Chem.* 264, 21812-21817, 1987.
 12. Hickstein, D.D., Baker, D.M., Gollahon, K.A., Back, A.L. Identification of the promoter of the myelomonocytic leukocyte integrin CD11b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 2105-2109, 1992.
 13. Horie, N., Mori, T., Asada, H., Ishikawa, A., Johnston, P. G., Takeishi, K. Implication of CDK inhibitors p21 and p27 in the differentiation of HL-60 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 992-997, 2004.
 14. Huang, W.W., Yang, J.S., Lin, C.F., Ho, W.J., Lee, M.R. Pycnogenol induces differentiation and apoptosis in human promyeloid leukemia HL-60 cells. *Leuk. Res.* 29, 685-692, 2005.
 15. James, S.Y., Williams, M.A., Kelsey, S.M., Newland, A.C., Colston, K.W. The role of vitamin D derivatives and retinoids in the differentiation of human leukaemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 54, 625-634, 1997.
 16. Kong, G., Lee, S.J., Kim, H.J., Surh, Y.J., Kim, N.D. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by 2-(allylthio) pyrazine. *Cancer Lett.* 144, 1-8, 1999.
 17. Lee, K.H., Chang, M.Y., Ahn, J.I., Yu, D.H., Jung, S.S., Choi, J.H. Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 1125-1133, 2002.
 18. Makishima, M., Umesono, K., Shudo, K., Naoe, T., Kishi, K., Honma, Y. Induction of differentiation in acute promyelocytic leukemia cells by 9-cis retinoic acid alpha-tocopherol ester (9-cis tretinoin tocoferil). *Blood.* 91, 4715-4726, 1998.
 19. Mishima, S., Inoh, Y., Narita, Y., Ohta, S., Sakamoto, T., Araki, Y., Suzuki, K.M., Akao, Y., Nozawa, Y. Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 5814-5818, 1995.
 20. Newburger, P.E., Chovanec, M.E., Greenberger, J.S., Cohen, H.J. Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation. *J. Cell Biol.* 82, 315-322, 1979.
 21. Noble, J.M., Ford, G.A., Thomas, T.H. Effect of aging on CD11b and CD69 surface expression by vesicular insertion in human polymorphonuclear leucocytes. *Clin. Sci.* 97, 323-329, 1999.
 22. Pae, H.O., Seo, W.G., Kim, N.Y., Oh, G.S., Kim, G.E., Kim, Y.H., Kwak, H.J., Yun, Y.G., Jun, C.D., Chung, H.T. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer. *Leuk. Res.* 25, 339-346, 2001.
 23. Prall, O.W., Sarcevic, B., Musgrove, E.A., Watts, C.K., Sutherland, R.L. Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. *J. Biol. Chem.* 272, 10882-10894, 1997.
 24. Roberts, P.J., Khwaja, A., Lie, A.K., Bybee, A., Yong, K., Thomas, N.S., Linch, D.C. Differentiation-linked changes in tyrosine phosphorylation, functional activity, and gene expression downstream from the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Blood.* 84, 1064-1073, 1994.
 25. Sachs, L. Constitutive uncoupling of pathways of gene expression that control growth and differentiation in myeloid leukemia: a model for the origin and progression of malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 6152-6156, 1980.
 26. Schwaller, J., Koeffler, H.P., Niklaus, G., Loetscher, P., Nagel, S., Fey, M.F., Tobler, A. Posttranscriptional stabilization underlies p53-independent induction of p21^{WAF1/CIP1/SDI1} in differentiating human leukemic cells. *J. Clin. Invest.* 95, 973-979, 1995.
 27. Tsiftoglou, A.S., Pappas, I.S., Vizirianakis, I.S. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol. Ther.* 100, 257-290, 2003.
 28. Yang, L., Zhao, H., Li, S. W., Ahrens, K., Collins, C., Eckenrode, S., Ruan, Q.G., McIndoe, R.A., She, J. X. Gene expression profiling during all-trans retinoic acid-induced cell differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *J. Mol. Diagn.* 5, 212-221, 2003.
 29. Zhu, B., Zhang, L.H., Zhao, Y.M., Cui, J.R., Strada, S.J. 8-chloroadenosine induced HL-60 cell growth inhibition, differentiation, and G(0)/G(1) arrest involves attenuated cyclin D1 and telomerase and up-regulated p21^(WAF1/CIP1). *J. Cell Biochem.* 2005.