

甘松香 물추출물의 세포주기 정지를 통한 U937세포의 성장억제 효과

강민수¹ · 주성민¹ · 전병제¹ · 양현모¹ · 김원신^{3*} · 전병훈^{1,2*}

1: 원광대학교 한의과대학 병리학교실, 2: 한국전통의학연구소, 3: 원광대학교 자연과학대학 생명과학부

Nardostachys Chinensis Induces G0/G1 Phase Cell Cycle Arrest in U937 Cells

Min Soo Kang¹, Sung Min Ju¹, Byung Jae Jeon¹, Hyun Mo Yang¹,
Won Sin Kim^{3*}, Byung Hun Jeon^{1,2*}

1: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, 2: Research Center of Traditional Korean Medicine, 3: Division of Natural Science, College of Natural Sciences, Wonkwang University

Nardostachys chinensis (*N. Chinensis*) belonging to the family Valerianaceae have been used in traditional medicine to elicit stomachic and sedative effects. The present study investigated the effects of water extract of *N. Chinensis* in human lymphoma U937 cells. The proliferation of U937 cells was decreased by *N. Chinensis*. Anti-proliferative effect of *N. Chinensis* on U937 cells was associated with G0/G1 phase arrest, which was mediated by regulating the expression of p21 and p27 protein. In addition, the levels of CDK2, CDK4, CDK6, Cyclin D3, and Cyclin A were decreased, but Cyclin D1, Cyclin D2 and Cyclin E were essentially undetectable. *N. Chinensis* induced the differentiation of U937 as shown by increased expression of differentiation surface antigen CD11b, but not CD14. Taken together, these results demonstrated that *N. Chinensis* potently inhibits the proliferation of U937 cells via the G0/G1 phase cell cycle arrest in association with p21 and p27, and induces granulocytic differentiation.

Key words : *Nardostachys chinensis*, Anti-proliferation, Cell cycle arrest, Differentiation, U937 cells

서 론

甘松香은 唐代의 本草拾遺에 수재된 이래 開寶本草에 처음으로 正品으로 기재된 약품이며, 원래 인도 히말라야산의 향료식물로서 산스크리트어로 “Jatamansi”라 하고, 漢音으로 “苦彌哆”라고 불린다^{1,2}. 이 약재는 敗醬科(마타리과 Valerianaceae)에 속한 多年生矮小草本인 甘松(*Nardostachys chinensis*Batal) 혹은 넓은 잎 甘松(*N.jatamansi* DC)의 뿌리줄기 및 뿌리를 건조한 것인데 甘松, 香松 등으로도 불린다^{1,3-6}. 性味が 辛甘溫하고 無毒 혹은 有小毒하며, 歸經은 脾, 胃 혹은 心脾라 하였으며, 理氣止痛 醒脾健胃하여 胃痛, 胸腹脹滿, 食慾不振, 嘔吐, 牙痛, 頭痛, 癆病,

脚氣 등을 치료하는데 사용한다^{1,3-6}. 약리작용에 대한 연구에서 진통, 항경련, 수면증강 등의 중추신경계 억제작용, 진정효과, 신경세포 및 뇌허혈 보호효과가 보고되었으며, 진통과 기관지이완 효과 등이 알려져 있다^{14,7}.

甘松香에는 sesquiterpenoid가 풍부하고, 이 물질은 antimalarial, antinociceptive, 세포독성 및 신경성장인자들을 강화시키는 것으로 알려져 있다⁷⁻¹⁰. 또한 구¹¹)등은 甘松香의 정유 성분이 중추신경 억제효과가 있는 것으로 보고하였으며, Yoon¹²)등은 甘松香 물추출물이 HL-60 세포의 분화를 유도하는 것으로 보고하였고, Lee¹³)등은 甘松香 물추출물이 B16F10 세포의 멜라닌합성을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고하였다. 이 외에 항산화효과 및 항염효과와 수지상세포 성숙효과가 있는 것으로 보고되었다¹⁴⁻¹⁶.

따라서 본 연구에서는 다양한 약리작용을 나타내는 甘松香 물추출물을 사용하여 인체 림프종 세포주 U937 세포증식에 미치는 효과에 대하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

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

· E-mail : wskim@wku.ac.kr, omdjbh@wku.ac.kr

· Tel : 063-850-6578, 063-850-6835

· 접수 : 2011/02/01 · 수정 : 2011/03/14 · 채택 : 2011/04/11

재료 및 방법

1. 甘松香 물추출물 제조

甘松香 100 g은 증류수 1 L를 사용하여 100℃에서 3시간 추출하였다. 추출물은 2,000 rpm에서 15분 원심 분리하여 비수용성 성분을 제거하였다. 상층액은 부크너칼테기 위에 왓만 No. 4 여과지를 통하여 여과하였다. 여과물은 12시간 -20℃에 보관 후, 동결 건조하였다. 추출물의 수율(W/W)은 약 12.82%였다. 동결 건조된 추출물은 PBS(pH7.4)에 20 mg/ml 농도로 용해하여 -20℃에 보관하였고, 실험에 사용하기 전에 희석하여 사용하였다.

2. 시약 및 항체

Anti-β-actin, all-trans-Retinoic acid (ATRA), Propidium iodine (PI), Ribonuclease A (RNase A), Protease inhibitor cocktail은 Sigma-Aldrich Chemical(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Anti-CDK2, anti-CDK4, anti-CDK6, anti-Cyclin D1, anti-Cyclin D2, anti-Cyclin D3, anti-Cyclin A, anti-Cyclin E, anti-p21, anti-p27 항체들은 Santa Cruz Biotechnology, INC.(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. RPE-conjugated anti-CD11b와 FITC-conjugated anti-CD14 항체들은 DAKO (Glostrup, Denmark)사로부터 구입하였다.

3. 세포배양

U937 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 분양 받았고, 10% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 RPMI1640 배지 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada)를 사용하여 37℃와 5% CO2상태에서 배양하였다.

4. 세포수 측정

세포수 측정은 Hemocytometer를 사용하여 측정하였다. U937 세포는 1×10^5 cells/ml로 12 well 플레이트에 분주한 후, 甘松香 물추출물을 0, 50, 100 µg/ml의 농도로 각각 1일 간격으로 5일 처리하였다. 처리 후에, 세포를 수확하여 PBS(pH7.4)에 현탁하였고, 세포 현탁액 10 µl와 0.4% trypan blue 용액 10 µl를 혼합하여 Hemocytometer에 적용하여 광학현미경으로 세포수를 측정하였다. 세포수는 ml당 세포수(cells numbers/ml)로 계산하였다.

5. 세포주기분석

U937 세포는 100 µg/ml의 甘松香 물추출물을 5 일 처리한 후, 세포 모두를 수확하여 PBS(pH 7.4)로 세척하였다. 세척한 세포는 냉각된 70% 에탄올로 4℃에서 1 시간 고정하였다. 고정된 세포는 PBS(pH 7.4)로 다시 세척하고 1 ml의 PI(10 µg/ml)/RNase A (100 µg/ml)용액으로 재 부유시켜 37℃에서 암실조건으로 1 시간 배양하였다. DNA 양은 FACS-Calibur(BD Biosciences, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 세포주기분석은 고정된 후, 염색한 세포로부터 DNA 양을 측정하여 결정하였다.

6. Western blot analysis

세포는 얼음 냉장된 PBS(pH 7.4)로 세척하고 1% protease inhibitor 혼합액이 포함된 얼음 냉장 용해 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium vanadate)으로 부유 시킨 후 얼음 위에서 30분 용해하였다. 세포용해액들은 4℃에서 14,000 rpm으로 20분 원심분리 하였고, 단백질 농도는 Bradford 검사법을 이용하여 측정하였다. 총 30 µg의 단백질 샘플을 SDS-PAGE 겔로 분리하였고 40V에서 3 시간 nitrocellulose 막 위로 단백질을 전이시켰다. 단백질이 전이된 막은 5% BSA가 포함된 Tris-buffered saline+Tween-20 (20 mM Tris-HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 차단시킨 후, 1차 항체를 결합시켰다. 면역 활성화는 peroxidase가 붙어있는 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체를 사용하여 SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Pierce, Rockford, IL, USA)에 의해 탐지하였다.

7. 분화도 검사

甘松香 물추출물을 처리한 세포는 수확하여 ice-cold PBS에 2번 세척한 후, 0.25% BSA/PBS 용액 100 µl에 suspension하였다. 그 다음 RPE-conjugated anti-CD11b mAb 또는 FITC-conjugated anti-CD14 mAb를 10 µl첨가하여 4℃에서 30분 암실조건으로 배양하였다. 그 후, 세포는 0.25% BSA/PBS용액에 2번 세척하였고 1% formaldehyde/PBS용액 600 µl에 고정하였다. 세포에 결합된 항체의 레벨은 fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur (BD Biosciences, CA, USA)을 이용하여 측정하였다.

8. 통계처리

모든 데이터의 결과는 마이크로소프트 오피스 엑셀(EXCEL) 2003 프로그램을 통하여 통계처리 하여 mean±standard deviation(SD)로 기록하였다.

결 과

1. 甘松香 물추출물의 세포 증식억제에 대한 효과

U937 세포의 甘松香 물추출물에 대한 세포 증식억제의 효과를 조사하기 위해 甘松香 물추출물을 50 µg/ml과 100 µg/ml 농도로 1, 2, 3, 4, 5일간 처리하였다. 세포수는 trypan blue 염색을 통한 hemocytometer를 이용하여 측정하였다. 甘松香 물추출물을 5일간 처리한 결과 50 µg/ml과 100 µg/ml 농도에서 대조군과 비교하여 각각 약 20%와 50% 세포수를 감소시켰다(Fig. 1).

2. 甘松香 물추출물의 세포주기변화에 대한 효과

甘松香 물추출물의 U937 세포의 증식억제 효과를 조사하기 위해 유세포 분석을 통하여 세포주기를 분석하였다. U937 세포는 100 µg/ml 농도의 甘松香 물추출물을 5일간 처리 후, PI 염색하여 세포주기를 분석하였다. 甘松香 물추출물 처리 후, SubG1

기가 0.72%에서 3.46% 증가하였고, G0/G1기는 48.37%에서 69.89% 증가하였다(Fig. 2). S기는 32.73%에서 16.75% 감소하였고, G2/M기는 18.80%에서 9.46% 감소하였다.

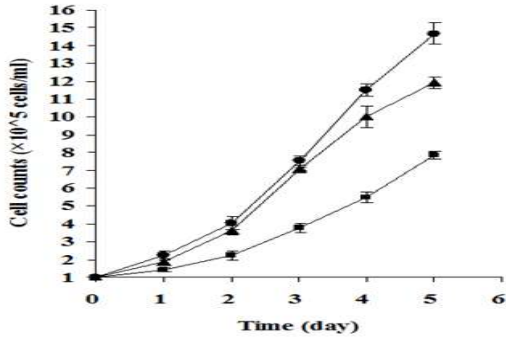


Fig. 1. Effects of *N. Chinensis* on proliferation of U937 cells. The cells were incubated with various concentrations of *N. Chinensis* for 1, 2, 3, 4 or 5 days. Cell numbers were counted using hemocytometer. Value are means \pm SD, N = 3. ●: Control; ▲: 50 μ g/ml *N. Chinensis*; ■: 100 μ g/ml *N. Chinensis*

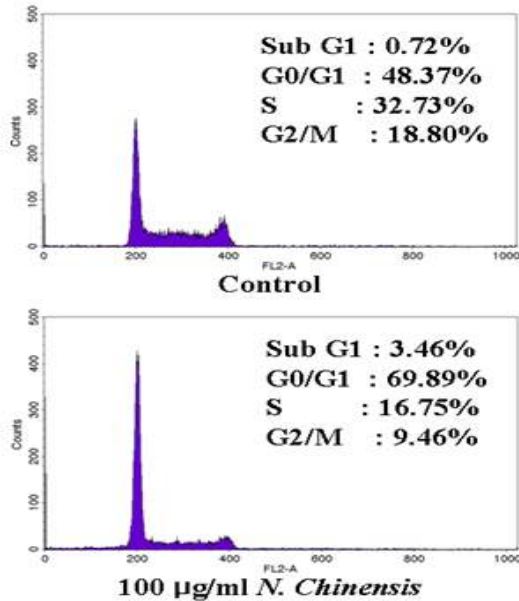


Fig. 2. Effect of *N. Chinensis* on cell cycle in U937 cells. The cells were incubated with or without 100 μ g/ml *N. Chinensis* for 5 day. The cells were fixed and stained with PI and the DNA content was analyzed by flow cytometry.

3. 甘松香 물추출물의 p21과 p27 단백질 발현에 대한 효과

甘松香 물추출물의 G0/G1기 정지에 관여하는 CDK활성 조절 억제자인 p21과 p27 단백질의 발현을 조사하였다. p21 단백질은 甘松香 물추출물 처리 4일째 발현량이 증가하기 시작하였고, p27 단백질 발현은 시간의존적으로 증가하였다(Fig. 3).

4. 甘松香 물추출물의 CDKs와 Cyclins 단백질 발현에 대한 효과

甘松香 물추출물의 G0/G1기의 세포주기 진행에 관여하는 CDKs와 Cyclins 단백질 발현을 조사하였다. 甘松香 물추출물 처리 5일 후, CDK2, CDK4, CDK6, Cyclin D3, Cyclin A의 단백질 발현은 감소하였다. 그러나 Cyclin D1, Cyclin D2, Cyclin E의 단백질 발현에는 甘松香 물추출물이 아무런 영향을 미치지 못하였

다(Fig. 4).

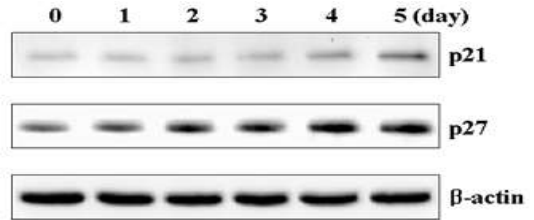


Fig. 3. Effect of *N. Chinensis* on expression of p21 and p27 protein in U937 cells. The cells were treated with or with *N. Chinensis* (100 μ g/ml) for 1, 2, 3, 4 and 5 days. Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis with anti-p21 and anti-p27 antibodies.

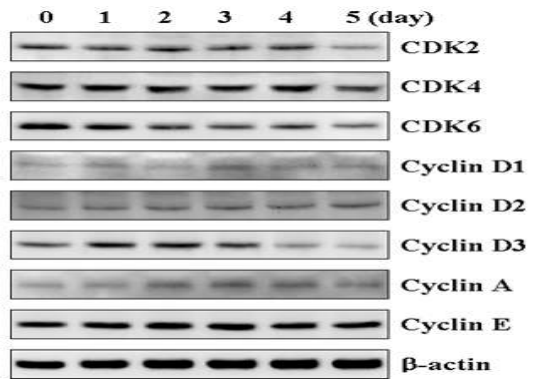


Fig. 4. Effect of *N. Chinensis* on expression of CDKs and Cyclins protein in U937 cells. The cells were treated with or with *N. Chinensis* (100 μ g/ml) for 1, 2, 3, 4 and 5 days. Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis with anti-CDK2, anti-CDK4, anti-CDK6, anti-Cyclin D1, anti-Cyclin D2, anti-Cyclin D3, anti-Cyclin A, and anti-Cyclin E antibodies.

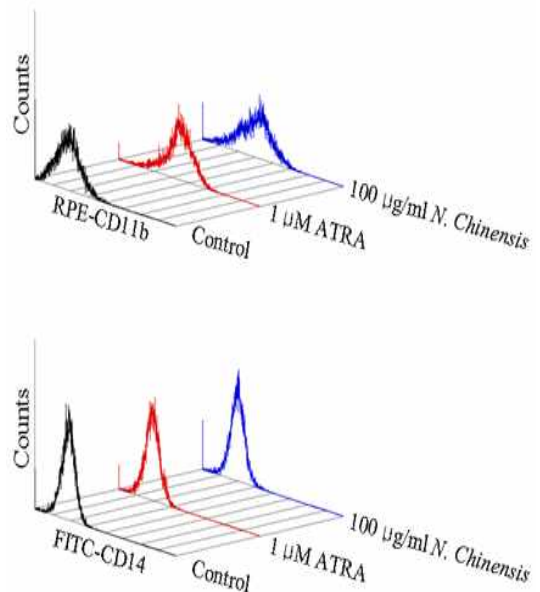


Fig. 5. Effect of *N. Chinensis* on differentiation of U937 cells. The cells were treated with 100 μ g/ml *N. Chinensis* for 5 day. The cells were assessed by FACS analysis using RPE-conjugated anti-CD11b mAb (A) or FITC-conjugated anti-CD14 mAb (B).

5. 甘松香 물추출물의 분화유도 효과

甘松香 물추출물의 증식 억제효과가 U937세포의 분화에 영향을 미치는지 조사하기 위하여 유세포 분석을 사용하였다. 甘松香 물추출물을 100 µg/ml 농도로 5일간 처리 후, 유세포 분석을 통하여 분화표지자인 CD11b와 CD14의 발현을 조사하였다. 甘松香 물추출물을 100 µg/ml 농도로 처리한 실험군에서 CD11b-양성(+) 세포는 대조군과 비교하여 뚜렷하게 증가하였다(Fig. 5). 그러나 CD14-양성(+) 세포는 대조군과 비교하여 아무런 차이가 없었다.

고 찰

마타리과에 속하는 甘松香의 뿌리와 뿌리줄기는 性味가 辛甘溫하며 脾胃에 歸經하는 약물로서 理氣止痛하고 醒脾健胃하는 효능을 나타낸다. 임상에서는 신경성 위통 및 소화촉진과 항부정맥 및 진정효과를 나타내는데 사용되고 있다¹⁷.

많은 종류의 암들이 세포의 비정상적인 분화 혹은 분화의 중지 에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 암의 특징을 이용하여 암세포에만 특이적으로 작용하는 암세포 분화 유도 물질에 의한 항암제 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 세포분화와 증식은 서로 상반되는 관계가 있으며 증식이 진행될수록 분화는 저해를 받는다^{18,19}.

본 연구에서 甘松香 물추출물의 U937 세포에 대한 세포증식 억제 및 세포주기정지효과에 대하여 확인하였고, 또한 세포분화 효과에 대해서도 확인하였다. 甘松香 물추출물은 U937 세포의 수를 감소시켰고 이 결과는 甘松香 물추출물이 U937 세포의 증식억제에 효과가 있다는 것을 보여주고 있다.

甘松香 물추출물의 세포증식억제는 유세포분석에 의해 G0/G1기 정지와 관련되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 甘松香 물추출물은 대조군과 비교하여 약 20%증가 하였고, 대조적으로 S기와 G2/M기는 각각 약 16%와 9%감소 하였다. 이 결과들은 甘松香 물추출물이 G0/G1기 정지를 통하여 U937 세포의 증식을 억제하는 것을 보여주고 있다.

세포주기정지는 증식과 분화에 있어 중요한 역할을 수행한다. 세포주기는 cyclin-dependent kinases(CDKs)에 의해 양성적으로 조절되지만²⁰, CDK활성을 억제하는 CDK 억제제(CKIs)에 의해 음성적으로도 조절된다²¹. 현재 포유동물세포의 CKIs는 2가지 종류가 있다. 하나는 CIP/KIP 패밀리로 p21WAF/Cip1, p27Kip1, p57등이 있고, 모든 CDK활성에 광범위하게 작용을 한다^{21,22}. 또 다른 종류는 INK4 패밀리인 p15INK4B, p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D로 CDK4와 CDK6의 활성을 조절한다²¹. 이러한 세포주기조절 기전은 세포증식을 조절하는 기본이 되고, 세포분화에도 관련되어 있다²²⁻²⁶. 甘松香 물추출물은 U937 세포의 증식억제에서 p21과 p27 단백질의 발현을 증가시켰다. 세포주기를 조절하는 CDK 중, CDK2, CDK4, CDK6는 G1기 진행과 G1-S기 이행에 있어서 Cyclin D와 Cyclin E와 관련하여 활성화된다²⁷. 甘松香 물추출물에 의한 p21과 p27 단백질 발현 증가는 CDK2, CDK4, CDK6, Cyclin D3, Cyclin E의 단백질 발현을 감소시켰다. 이 결과는 p21과 p27 단백질이 甘松香 물추출물에 의한

U937 세포의 G0/G1기 정지에 관여한다는 것을 보여주고 있다.

백혈병세포는 다양한 화학적 또는 생물학적 치료제들에 의해 세포분화를 유도할 수 있다²⁸⁻³¹. 세포분화는 암 치료에 있어서 중요한 치료방법이다³²⁻³⁴. 이러한 분화치료법은 백혈병과 같은 혈액암에 국한되어 사용되고 있지만, 전립선암과 유방암 같은 다른 암치료에서도 분화를 기초로 하는 치료법이 적용될 수 있을 것으로 전망되고 있다³⁵⁻⁴². 세포분화는 일반적으로 세포주기의 정지와 관련되어 있다. 甘松香 물추출물의 G0/G1기 정지를 통한 U937세포의 증식억제 효과는 세포분화를 유도하였다. 甘松香 물추출물은 U937세포의 분화유도에서 과립성백혈구 표지자인 CD11b의 발현이 증가하였지만, 단핵구/대식세포 표지자인 CD14의 발현은 증가하지 못하였다. 이 결과는 甘松香 물추출물이 U937세포를 과립성백혈구로 분화 유도한다는 것을 보여주고 있다.

결 론

본 연구에서는 甘松香 물추출물의 U937세포의 증식억제에 대한 효과와 그에 따른 분화유도효과를 분자생물학적 방법을 통하여 유의한 결과를 얻었으며, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 甘松香 물추출물의 U937 세포의 증식억제효과는 G0/G1기를 증가시켰고, p21과 p27 발현량을 증가시켰다. 또한 p21과 p27 발현 증가는 CDK2, CDK4, CDK6, Cyclin D3, Cyclin A의 발현량을 감소시켰다. 이러한 甘松香 물추출물의 세포증식 억제효과는 U937세포의 과립성백혈구 분화를 유도하였다. 이상 결과를 종합하면, 甘松香 물추출물에 의해 유도된 U937 세포의 증식억제는 p21과 p27 단백질 발현에 의한 G0/G1기 정지로 기인하였고, 그 결과 과립성백혈구 분화를 유도한 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 원광대학교의 교비 지원에 의해 수행됨.

참고문헌

1. 完譯 中藥大辭典, 圖書出版 鼎談, 서울, pp 53-57, 1997.
2. 한국전통과학기술의 국제화에 대한 연구: 생약분야, 한국과학기술재단, 1997.
3. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Vol. I; Chemical Industry Press: Beijing, p 65, 2000.
4. 전국한의학대학교 본초학교수 공저, 本草學, 도서출판 영림사, 서울, pp 367-368, 1991.
5. 張民廣 主編, 抗腫瘤中藥的臨床應用, 人民衛生出版社, 北京, pp 220-221, 1997.
6. 劉春安 主編, 抗癌中藥大辭典, 湖北科學技術出版社, pp 265-268, 1994.
7. Takaya, Y., Takeuji, Y., Akasaka, M., Nakagawasai, O., Tadano, T., Kisara, K., Kim, H.S., Wataya, Y., Niwa, M.

- and Oshima, Y. Novel Guaiane Endoperoxides, Nardoguaianone A-D, from Roots and their Antinociceptive and Antimalarial Activities. *Tetrahedron* 56: 7683-7678, 2000.
8. Xiao, P.G. *Modern Chinese Materia Medica*; Chemical Industry Press: Beijing, p 252, 2002.
 9. Itokawa, H., Masuyama, K., Morita, H. and Takeya, K. Cytotoxic sesquiterpenes from *Nardostachys chinensis*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 41: 1183-1184, 1993.
 10. Li, P., Matsunaga, K., Yamakuni, T. and Ohizumi, Y. Nardosinone, the first enhancer of neurite outgrowth-promoting activity of staurosporine and dibutyryl cyclic AMP in PC12D cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 145: 177-183, 2003.
 11. 구병수, 김대근, 최정현, 이동웅. 감송향 정유성분의 흡입 및 경구투여시의 중추신경 억제효과. *생명과학회지* 16: 156-161, 2006.
 12. 4. Yoon, S.H., Ju, S.M., Kim, N.S., Park, S.C., Kim, S.H., Song, Y.S. and Jeon, B.H. Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) is Required for Water Extract of *Nardostachys chinensis*-Induced Differentiation in HL-60 Cells. *Kor. J. Ori. Physi. Patho.* 20: 1415-1320, 2006.
 13. Lee, S.J., Choi, Y.H. and Choi, B.T. Inhibitory Effects of Aqueous Extracts from *Nardostachys chinensis* on α -Melanocyte Stimulating Hormone-induced Melanogenesis in B16F10 Cells. *Integrative Biosci.* 10: 223-236, 2006.
 14. 박 철, 정 민, 서은아, 권강범, 유도곤 감송향물추출물의 HO-1 발현 촉진을 통한 세포보호 작용 및 항염효과. *동의생리병리학회지* 24: 624-629, 2010.
 15. 백 설, 최재혁, 고성훈, 이용재, 차동석, 박은영, 강양규 전훈 감송향의 in vitro 항산화 및 항염증 효과. *동의생리병리학회지* 23: 853-859, 2009.
 16. 오광우, 정지혜, 정현철, 조한백, 김송백, 최창민 감송향이 수지상세포 성숙에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지* 23: 14-25, 2010.
 17. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Vol. I*; Chemical Industry Press: Beijing p 65, 2000.
 18. Koeffler, H.P. Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: Therapeutic implication. *Blood*, 62: 709-721, 1983.
 19. Kim, J.I., Lee, S.H., Park, J.H., Park, H.J. and Lee, K.T. Induction of differentiation on the human histocytic lymphoma cell line U-937 by Costunolide. *Kor. J. Pharmacogn.* 30: 7-11, 1999.
 20. Covacci, V., Bruzzese, N., Sgambato, A., Di Francesco, A., Russo, M.A., Wolf, F.I. and Cittadini, A. Magnesium restriction induces granulocytic differentiation and expression of p27Kip1 in human leukemic HL-60 cells. *J. Cell Biochem.* 70: 313-322, 1998.
 21. Sherr, C.J. and Roberts, J.M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9: 1149-1163, 1995.
 22. Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T. and Hannon, G.J. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377: 552-557, 1995.
 23. Furukawa, Y., Uenoyama, S., Ohta, M., Tsunoda, A., Griffin, J.D. and Saito, M. Transforming growth factor-beta inhibits phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in human monocytic leukemia cell line JOSK-I. *J. Biol. Chem.* 267: 17121-17127, 1992.
 24. Hui, E.K. and Yung, B.Y. Cell cycle phase-dependent effect of retinoic acid on the induction of granulocytic differentiation in HL-60 promyelocytic leukemia cells. Evidence for sphinganine potentiation of retinoic acid-induced differentiation. *FEBS Lett.* 318: 193-199, 1993.
 25. Cooper, S. Revisiting the relationship of the mammalian G1 phase to cell differentiation. *J. Theor. Biol.* 208: 399-402, 2001.
 26. Wang, Q.M., Jones, J.B. and Studzinski, G.P. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells. *Cancer Res.* 56: 264-267, 1996.
 27. Seo, B.R., Lee, K.W., Ha, J., Park, H.J., Choi, J.W. and Lee, K.T. Saucermetin-7 isolated from *Saururus chinensis* inhibits proliferation of human promyelocytic HL-60 leukemia cells via G0/G1 phase arrest and induction of differentiation. *Carcinogenesis* 25: 1387-1394, 2004.
 28. Huberman, E. and Callahan, M.F. Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 1293-1297, 1979.
 29. Rovera, G., Santoli, D. and Damsky, C. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 2779-2783, 1979.
 30. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E. and Gallo, R.C. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2458-2462, 1978.
 31. Breitman, T.R., Selonick, S.E. and Collins, S.J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 2946-2940, 1980.
 32. Spira, A.I. and Carducci, M.A. Differentiation therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3: 338-343, 2003.

33. Lo Coco, F., Zelent, A., Kimchi, A., Carducci, M., Gore, S.D. and Waxman, S. Progress in differentiation induction as a treatment for acute promyelocytic leukemia and beyond. *Cancer Res.* 62: 5618-5621, 2002.
34. Wang, Z., Sun, G., Shen, Z., Chen, S. and Chen, Z. Differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid: 10-year experience of its clinical application. *Chin. Med. J. (Engl)* 112: 963-967, 1999.
35. Aksentijevich, I. and Flinn, I.W. Chronic lymphocytic leukemia: advances in biology and therapeutics. *Curr. Opin, Oncol.* 15:16-22, 2003.
36. Parmar, S. and Tallman, M.S. Acute promyelocytic leukemia: a review. *Expert Opin. Pharmacother.* 4: 1379-1392, 2003.
37. Sciarra, A., Casale, P., Di Chirio, C., Di Nicola, S. and Di Silverio, F. New aspects on prostate cancer: hereditary form, developmental estrogenization and differentiation therapy. *Minerva Urol. Nefrol.* 50: 185-190, 1998.
38. Walczak, J., Wood, H., Wilding, G. Williams, T. Jr., Bishop, C.W. and Carducci M. Prostate cancer prevention strategies using antiproliferative or differentiating agents. *Urology* 57: 81-85, 2001.
39. Myers, C.E. Differentiating agents and nontoxic therapies. *Urol. Clin. North Am.* 26: 341-351, 1999, ix.
40. Yang, Q., Sakurai, T. and Kakudo, K. Retinoid, retinoic acid receptor beta and breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 76: 167-173, 2002.
41. Baj, G., Arnulfo, A., Deaglio, S., Mallone, R., Vigone, A., Rosa, M., Giana, M., Villa, L., Malavasi, F. and Surico, N. Retinoids in breast cancer prevention and treatment. A review of the literature. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 21: 411-415, 2000.
42. Patnaik, A., Rowinsky E.K., Villalona, M.A., Hammond, L.A., Britten, C.D., Siu, L.L., Gortz, A., Felton, S.A., Butron, S., Valone, F.H. and Eckhardt, S.G., A phase I study of pivaloyloxymethylbutyrate, a prodrug of the differentiating agent butyric acid, in patients with advanced solid malignancies. *Clin. Cancer Res.* 8: 2142-2148.