

HL-60세포의 분화에 따른 c-myc, c-Ha-ras, c-rafl 및 c-mos 암유전자의 발현

계명대학교 의과대학 미생물학교실¹, 안과학교실²

면역학교실³ 및 의과학연구소⁴

서 성 일^{1,4} · 김 종 욱² · 백 원 기^{1,4}

박 종 욱^{3,4} · 최 병 길^{3,4} · 서 민 호^{1,4}

= Abstract =

Expression of c-myc, c-Ha-ras, c-rafl, and c-mos Oncogenes During HL-60 Cell Differentiation

Seong-Il Suh^{1,4}, M.D., Jong-Wook Kim², M.D., Won-Ki Baek^{1,4}, M.D.
Jong-Wook Park^{2,4}, M.D., Byung-Kil Choe^{2,4}, M.D. and Min-Ho Suh^{1,4}, M.D.

*Department of Microbiology¹, Ophthalmology², Immunology³ and Institute for Medical Science⁴
School of Medicine, Keimyung University*

The acute myelogenous leukemia cell line, HL-60 is capable of differentiating to granulocytes or monocytes, it provides a good model to understand gene expressions that are associated with cell differentiation. The present study has been investigated the effects of dimethyl sulfoxide(DMSO) and phorbol 12-myristate 13-acetate(TPA) on HL-60 cell differentiation and expressions of protooncogenes(c-myc, c-Ha-ras, c-rafl, and c-mos). DMSO(1.25%) and TPA (32 nM) induced HL-60 cells to more differentiated phenotypes as determined by various analytic methods. These inductions of differentiation were associated with a loss of proliferative capacity and decreases in clonogenic survival. To determine if modulations of these oncogenes were important in the differentiation of HL-60 cells to either granulocytes or monocytes, levels of mRNAs of these oncogenes were determined by Northern blot analysis at various times following treatment with DMSO and TPA. DMSO induced granulocytic differentiation of HL-60 cells and resulted in a down-regulation of c-myc expression and a transient up-regulation of c-Ha-ras expression. TPA induced monocytic differentiation of HL-60 cells and resulted in also a rapid decline of c-myc expression, while no detectable change in the level of c-Ha-ras mRNA was found. But there were not found detectable mRNA levels of c-rafl and c-mos in control group and DMSO- and TPA-treated group. These results suggest that changes in c-myc expression can be associated with the monocytic and granulocytic differentiation of HL-60 cells and the transient elevation of c-Ha-ras mRNA in HL-60 cells may correlated temporally with differentiation to granulocyte-lineage cells. These results also suggest that expression of c-rafl and c-mos may not be play a role in differentiation of HL-60 cells but further evaluations will be needed.

Key Words: c-myc, c-Ha-ras, c-rafl, c-mos, HL-60 cell

서 론

인간에 있어서 자연적으로 종양이 치유되는 경우는 아주 드문 일인데 악성 melanoma, hypernephroma, choriocarcinoma, retinoblastoma 등에서는 가끔 관찰되기도 한다^{1~5)}. 또한 실험적으로 l-ethyl-1-nitrosourea에 의해 유도된 malignant lymphoma와 같은 종양에서도 관찰된다⁶⁾. 종양의 자연 치유와 관련된 기전은 종양의 종류에 따라 다르며 복잡하나 자세한 것은 아직 잘 알려져 있지 않다. 그러나 아마도 아직까지 밝혀지지 않은 어떤 내외적인 환경 등의 자극과 관련된 암세포의 완전분화와는 관계가 있다. 암세포는 미분화 세포이므로 여러가지 분화 유도 물질을 이용하여 생체내에서 분화를 유도할 수 있다면 암치료에 새로운 계기를 열어 줄 것으로 생각된다. 특히 백혈병에 대한 분화유도 연구가 많이 이루어지고 있다^{7~14)}.

HL-60세포주는 1977년 Collins등¹⁵⁾이 acute promyelocytic leukemia환자로부터 분리하여 확립한 세포주로서 동일 질병의 다른 환자의 경우와는 달리 in vitro상에서 사멸되지 않고 또 여러가지 분화 유도 물질에 의해 granulocyte, monocyte등으로 분화가 유도되는 세포주이다. 분화 유도 물질로는 interferon-gamma(IFN- γ), granulocyte-monocyte colony stimulating factor(GM-CSF)등과 같은 세포에서 분비되는 것도 있지만 retinoic acid, actinomycin D, demethyl sulfoxide(DMSO), hypoxanthine, vitamin D₃, sodium butyrate, phorbol ester, butyric acid등과 같은 화학 물질이 알려져 있다^{7,16)}. HL-60세포주에 이러한 분화 유도 물질중 retinoic acid, actinomycin D, DMSO, hypoxanthine등을 가하면 granulocyte로 분화가 일어나며, vitamin D₃, sodium butyrate, IFN- γ , phorbol ester등에 의해서는 monocyte-macrophage로 분화가 일어나며, butyric acid, GM-CSF 등에 의해서는 eosinophil로 분화 유도가 일어난다^{7~17)}. 이러한 물질에 의한 분화 유도 기전은 아직 잘 알려지지 않은데 retinoic acid등과 같은 물질을 정상 및 백혈병 세포에 처리하면 특정 유전자발현의 급격한 변화를 볼 수 있어, 이는 분화 유도 물질에 의해

어떤 유전자 발현의 변화와 동시에 미분화 세포가 성숙분화 세포로 분화됨을 볼 수 있다. 그러므로 분화 유도 물질을 이용하여 미분화 세포를 성숙화 세포로 분화유도하면서 그 동안 일어나는 유전자발현 양상을 조사하면 다소나마 분화와 관련된 기전을 이해하는데 도움을 줄 것이다.

protooncogene은 여러 종류의 암 발생과 관련이 있지만, 정상적으로도 세포의 분화 및 성장에 관여하는 잘 알려져 있다. 특히 HL-60세포주에 있어서는 c-myc암유전자가 15~30배 정도로 증폭되어 있으며 또한 이외 다른 암유전자의 변이가 관찰된다^{7,18)}. 본 실험은 HL-60세포주를 granulocyte 및 monocyte-macrophage로 분화 유도하면서 세포분화에 따른 c-myc 및 c-Ha-ras 암유전자와 protein serine/threonine kinase활성을 가진 c-rafl 및 c-mos 등의 암유전자 발현을 조사하여 암유전자 발현과 세포 분화 관계를 알아 보고자 실험하였으며, 아울러 세포 분화의 일부 기전을 분자생물학적 수준에서 규명하여 향후 분화에 따른 c-rafl 및 c-mos암유전자의 신호 전달체계 그리고 암의 발생원인 및 치료 등에 응용할 기본 자료를 얻고자 실험하였다.

재료 및 방법

1) 세포주 및 세포배양

한국세포주 은행에서 분주받은 사람 전골수성 백혈병 세포주(HL60세포주)를 본 실험에 사용하였다. 세포배양은 10% fetal bovine serum(Gibco BRL), 2 mM glutamine 및 HEPES(2 mg/l)가 함유된 RPMI1640(Gibco BRL)을 이용하여 5% CO₂ 및 섭씨 36도하에서 배양하면서 실험하였다. 각 계대배양시 trypan blue dye exclusion방법으로 세포생존율을 산정하여 생존 세포수가 7×10^5 /ml 되도록 하여 배양하면서 분화 유도 하였다¹⁷⁾.

2) 세포분화유도

분화유도 물질로 알려진 DMSO(Sigma Chemical) 및 TPA(phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma Chemical)를 각각 1.25% 및 32 nM 농도로 사용하여 분화를 유도하였다. TPA로 분화 유도하는 경우에는 1% Noble agar(Difco Co)를 바닥에 얹게

부어 말린 세포배양용 flask를 이용하였다.

3) 분화능의 측정

분화 정도를 측정하기 위하여 분화유도 전 및 유도 후의 세포를 Wirght stain을 한 후 관찰하였으며, 그리고 NBT(nitro blue tetrazolium, Sigma Chemical) reduction assay¹⁹⁾ 및 non-specific esterase산생 정도를 측정하였다. NBT reduction assay는 세포 배양액 0.2 ml를 취하여 원심한 다음 0.2 ml의 NBT/TPA stock solution으로 부유하여 섭씨 37도에서 20분간 둔 다음 cytopsin(Shandon Scientific)을 이용하여 slide에 부착시킨 후 safranin O로 대조염색하여 현미경하에서 관찰하였다. Non-specific esterase산생 정도는 Sigma Chemical 회사의 kit를 이용하여 분화능의 정도를 측정하였다. 아울러 TPA를 이용하여 분화유도하는 경우에는 세포의 세포 배양용 flask에 부착능의 정도도 함께 관찰하였다¹⁹⁾.

4) RNA 분리

Chomczynski 및 Sacchi 방법²⁰⁾을 다소 수정하여 RNA를 분리하였다. 세포를 guanidium-thiocyanate(GT) buffer(4M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol, 0.33% antifoam A emulsion (Sigma Chemical), pH 7.0)로 용해시킨 다음 water-saturated phenol-chloroform-isoamylalcohol mixture(24: 24: 1, V: V: V)와 2 M sodium acetate(pH 5.2)를 넣고 섭씨 4도에서 20분간 10,000 rpm으로 원심한 후 상층액을 취하였다. 여기에 ice-cold isopropanol을 동량 넣고 원침하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA를 GT buffer에 녹인 다음 2.5배의 ice-cold ethanol을 넣어 RNA를 재원침한 후 70% ethanol로 세척하고 SpeedVac (Savant Instrument Inc)을 이용하여 말린 다음 DEPC(diethylpyrocarbonate)-treated water에 녹여 spectrometer로 260 nm에서 RNA농도를 측정하고 영하 20도에서 보관하면서 2주일 이내 사용하였다.

5) Northern blot analysis에 의한 mRNA 분석

상기의 방법으로 분리한 20 µg의 RNA를 formamide와 formaldehyde등을 첨가한 후 65도에서 10분간 그리고 얼음에 10분간 둔 후 2.2 M의 formaldehyde가 들어있는 0.9% agarose gel을 이용하여 6 volt/cm로 submarine electrophoresis한 다음 nitrocellulose(NC) filter(Hoefer Scientific Co)로 약 14~16시간 전이하였다. 그런 후 NC filter를 공기 중에서 건조시킨 다음 vacuum oven (Colparmer Inc)에서 90분간 두어 RNA를 filter에 고정시키고 0.45 M NaCl/45 mM sodium citrate(pH 6.8), 50% formamide, 0.1% SDS, 5% Denhardt's solution(0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% bovine serum albumin, 및 0.1% ficoll), 그리고 5% salmon sperm DNA를 함유한 용액으로 42도에서 12시간 prehybridization하였다. RNA-cDNA유전자 재결합반응(hybridization)은 cDNA(c-myc, c-Ha-ras, c-rafl, c-mos, 및 GAPDH)를 ³²P-dCTP(DuPont Inc)로 nick translation하여 특이 활성도가 1×10^8 cpm/µg 이상되는 경우에 위의 용액에 cDNA가 10 ng/ml되도록 첨가하여 실시하였다. 그런 후 2X SSC(0.3 M NaCl 및 0.03 M sodium citrate, pH 6.8) 및 0.1% SDS 용액으로 실온에서 20분간 세척하고, 또 0.2X SSC 및 0.1% SDS가 들어있는 용액으로 65도에서 10분, 그리고 0.1X SSC 및 0.1% SDS가 들어 있는 용액으로 65도에서 10분간 세척한 다음 영하 70도에서 70~76시간 x-ray film에 노출시킨 후 현상하였다²¹⁾. mRNA 정량은 IBM computer에 연결된 음영농도계측기(Hoefer GS300 scanning densitometer, Hoefer Scientific Co)를 사용하여 측정되는 각 음영의 면적을 Gaussian intergration방법으로 측정하였다.

결 과

HL-60 세포를 DMSO 및 TPA로 분화 유도하면서 세포의 증식 정도를 생존세포수로 조사한 결과 (Fig. 1), DMSO로 분화 유도한 경우는 대조군과 유사하게 세포수가 48시간 배양 때까지 증가하다가 그

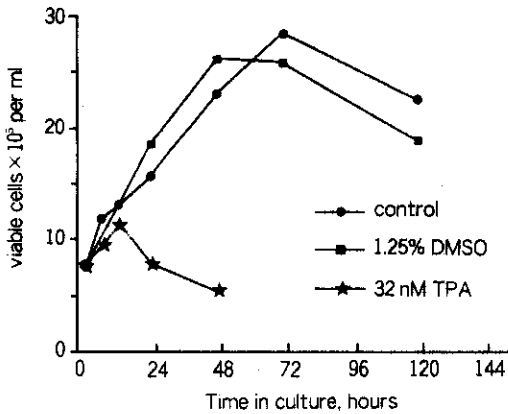


Fig. 1. The effect of DMSO and TPA on HL-60 cell proliferation. Cells were seeded at a concentration of 7×10^5 cells per ml on hour 0 and cells were counted in hemacytometer chamber. Viability was determined by trypan blue dye exclusion.

후 감소하는 경향을 보였으며, TPA의 경우는 12시간까지는 증가하였으나 그후 감소하였다. 이는 각각 48시간 및 12시간 후부터 세포의 분열이 정지되면서 분화 유도가 초래 되었음을 보여준다. 이것을 확인하고자, 즉, 세포의 분화 유무 및 정도를 알아보기 위하여 12시간 간격으로 세포를 취하여 Wright stain을 실시한 결과(Fig. 2), 대조군의 경우(Fig. 2A 및 2B)는 전형적인 promyelocytic leukemia세포임을 알 수 있었고 DMSO로 96시간(Fig. 2C) 그리고 TPA로 48시간 분화유도한 경우(Fig. 2D)는 70%이상의 세포에서 각각 granulocyte 및 monocyte쪽으로 분화가 유도 되었음을 알 수 있었다. Monocyte로 분화가 되는 경우는 세포가 세포배양용 flask에 부착되는 성질이 있는데, 이를 조사한 결과(Fig. 3) 대조군의 경우는 48시간 동안 배양하여도 flask에 부착하는 세포 수가

Fig. 2. Morphology of HL-60 cells after culture with DMSO and TPA. Cytospin cell preparation were stained with Wright's stain and photographed through a $\times 20$ or $\times 100$ oil-immersion objective. (A) control cells($\times 20$), (B) control cells($\times 100$), (C) cells cultured for 96hr with DMSO($\times 20$), and (D) cells cultured with 48 hr with TPA($\times 20$).

Fig. 3. Morphological changes after TPA treatment of HL-60 cell. (A) control cells, (B) TPA treated for 6hr, (C) TPA treated for 12hr, and (D) TPA treated for 48hr.

5%미만으로 거의 대부분의 세포가 부유상태로 있었으나(Fig. 3A), TPA로 분화 유도한 경우에는 (Fig. 3B, 3C 및 3D)배양시간이 증가함에 따라 부착되는 세포수가 증가하였으며 그리고 세포가 다소 길어지는 모양을 보여 분화 유도가 되었음을 나타내었다. HL-60세포가 granulocyte 및 monocyte쪽으로의 분화 정도를 알아 보기 위해서 NBT reduction assay 및 non-specific esterase test를 실시한 결과(Fig. 4), 대조군(Fig. 4A 및 4C)의 경우는 각각 약 5%미만의 세포에서 양성을 보여 대조군으로써의 조건은 적절하였으며, DMSO 및 TPA로 분화 유도한 경우에는 NBT reduction assay 및 non-specific test의 결과는 각각 약 86% 및 95%정도 이상의 세포에서 양성반응을 보여 분화유도는 잘 되었음을 알게 되었다. 이렇게 분화 유도를 확인한 다음 분화에 따른 유전자의 발현의 변화유무를 조사하였다.

Fig. 5는 DMSO로 분화 유도를 한 다음 total RNA를 분리한 후 c-myc, c-Ha-ras, c-rafl 그리고 c-mos 암유전자에 대해 Northern blot analysis를 한 결과이다. GAPDH의 Northern blot analysis 그리고 전기영동 후 EtBr로 염색한 28S 및 18S ribosomal RNA의 양과 위치를 실험대조군 및 size marker로 사용하였다. c-myc의 경우는 분화유도 후 48시간 부터 발현이 감소되는 것을 볼 수 있었으며, c-Ha-ras의 경우는 48시간 까지는 발현이 다소 증가되다가 72시간 후 부터 감소하기 시작하여 120시간 때에는 현저한 감소를 나타내었다. c-rafl 및 c-mos의 경우는 대조군 및 분화 유도군 세포에서 발현양상을 관찰할 수 없었다.

Fig. 6은 TPA로 분화유도한 다음 Northern blot analysis를 한 결과이다. c-myc암유전자의 발현은 12시간째 부터 현저한 감소를 나타 내었는데 이

Fig. 4. Differentiation effects of DMSO(A, B) and TPA(C, D) on HL-60 cells. (A) 72hr control, (C) 48hr control, (B) granulocytic differentiation tested by NBT reducing ability, and (D) monocytic differentiation demonstrated by the induction of non-specific esterase.

Fig. 5. Effects of DMSO on c-myc(A), c-Ha-ras(B), c-raf(C), and c-mos(D) gene expression in HL-60 cells. HL-60 cells were treated with 1.25% DMSO for the indicated times. Total cellular RNA(20 μ g) was hybridized to 32 P-labeled c-myc, c-Ha-ras, c-raf1 and c-mos probes. GAPDH cDNA probe and ethidium bromide staining of the gel were used as a control for the amount of RNA loaded.

는 분화유도후 12시간 이전부터 현저한 감소 경향을 나타내었다. c-Ha-ras의 경우에는 분화 유도후 24시간 까지 발현정도가 대조군과 유사함을 나타내었다. c-raf1 및 c-mos의 경우는 DMSO로 분화 유도한 경우와 마찬가지로 발현을 관찰할 수 없었다.

고 찰

HL-60세포주는 여러 종류의 분화유도물질에 의해 granulocyte, monocyte-macrophage, 및 eosinophil등으로 분화되는 특성을 가지고 있어, 현재 세포 분화 연구에 가장 흔히 사용되고 있는 세포주 중 하나이다^{8~18}. 그렇지만 분화유도물질에 의해 분화가 유도된 HL-60세포주는 정상적으로 성숙분화를 거친 정상 백혈구세포와는 다소의 차이는 있다. HL-60세포주가 분화유도물질에 의해 분화가 유도될 때 나타나는 특성으로는 여러가지가 있으나 대표적인 특성으로는 DMSO 등에 의해 granulocyte로 분화유도가 일어나는 경우에는 myeloperoxidase감소, transferrin receptor 발현의 감소, superoxide 생성의 증가 등을 볼 수 있으며 TPA 등에 의해 monocyte-macrophage로 분화유도가 일어나는 경우에는 non-specific esterase 생성의 증가, acid phosphatase 생성의 증가, 플라스틱에 부착능의 증가 등을 볼 수 있다^{8~17, 19}. 본 실험에서는 HL-60세포주를 분화유도할 때 분화 유무 및 정도를 알아 보고자 위에서 언급한 특성 중 몇가지를 조사하였다. HL-60세포주는 Wright stain시 myeloperoxidase를 함유한 azurophilic granule 을 많이 함유하고 있음을 볼 수 있는데 분화유도를 한 경우에는 myeloperoxidase활성의 감소 및 mRNA발현의 저하로²² 인한 azurophilic granule의 감소를 관찰할 수 있으며(Fig. 2), DMSO를 이용하여 granulocyte로 분화유도한 경우에는 superoxide의 생성의 증가를 볼 수 있는데, NBT-reduction test결과 대조군에 비해 현저한 증가를 볼 수 있었고(Fig. 4A 및 4B), TPA를 이용하여 monocyte-macrophage로 분화유도한 경우에는 non-specific esterase의 현저한 증가 (Fig. 4C 및 4D), 및 플라스틱에 부착능의 증가를 볼 수 있어서 본 실험의 경우 HL-60세포주의 분화유도가 잘 되었음을 확인하였고 분화유도에 따른 암유전자 발현의 정도를 관찰하였다.

Fig. 6. Effect of TPA on c-myc(A), c-Ha-ras(B), c-raf(C), and c-mos(D) gene expression in HL-60 cells. HL-60 cells were treated with 32nM TPA for the indicated times. Total cellular RNA(20 µg) was hybridized to ³²P-labeled c-myc, c-Ha-ras, c-raf1 and c-mos probes. GAPDH cDNA probe was used as a control for the amount of RNA loaded.

HL-60세포주는 정상 백혈구 세포에 비해 c-myc 암유전자가 15~30배 정도 증폭되어 있어 mRNA의 발현 또한 증가되어 있다^{7,17)}. 수 많은 백혈병 세포 및 임파종 세포를 조사한 결과 HL-60세포주에서 볼 수 있는 c-myc 암유전자의 증폭은 볼 수 없었으며 단지 burkitt's lymphoma에서만 이 암유전자의 이상을 관찰할 수 있어, HL-60세포주에서의 c-myc 암유전자의 증폭은 인간의 혈액종양 중 특이한 경우이다. HL-60세포주의 c-myc 유전자의 발현은 분화유도됨에 따라 감소되는데^{29~30)} 이는 본 실험에서도 분화유도된 HL-60세포주에서도 c-myc 암유전자의 발현 감소를 볼 수 있어 위의 Wright stain, 플라스틱에 부착능 검사, non-specific esterase test, 및 NBT-reduction test의 결과와 더불어 분화 유도가 잘되었음을 시사한다. 이러한 c-myc 암유전자의 발현 저하는 TPA 등에 의해 monocyte-macrophage로 분화유도된 HL-60세포주에 있어서 DNA합성의 중단 및 분화의 결과로 보여진다. 본 실험의 경우 TPA로 분화유도된 HL-60세포주는 증식의 억제와 아울러 분화가 일어남을 볼 수 있는데(Fig. 1, 2, 3 및 4), 세포증식 저하에 따른 DNA합성의 중단 그리고 분화 자체에 의한 c-myc 암유전자의 발현의 감소가 있었다고 생각된다. DMSO 등을 처리한 경우에는 분화과정 그 자체의 결과로 인한 발현 저하의 결과이며 동시에 초래되는 세포 증식의 저하와는 관계가 없는데 왜냐하면 HL-60세포주를 단지 증식만 억제한 경우에는 c-myc 암유전자의 발현 저하를 볼 수 없기 때문으로 알려져 있다²³⁾. 본 실험의 경우는 DMSO를 처리한 48시간 이후에 세포 증식의 저하를 관찰할 수 있었으며(Fig. 1), 아울러 c-myc 암유전자의 발현도 48시간 이후부터 급격한 감소를 볼 수 있어(Fig. 5) 분화 그 자체 뿐만 아니라 세포증식의 억제로 인한 DNA합성의 중단과도 관련있다고 사료된다. 그러나 분화유도될 때 암유전자의 발현의 변화에 대한 정확한 기전은 아직 잘 모르고 있는데, TPA처리시 c-myc 암유전자 발현의 급격한 저하는 TPA에 의한 protein kinase C(PKC)의 지속적인 활성화에 기인되는 것 같다. 한편 INF- γ 에 의해 분화 유도된 경우는 c-myc 암유전자의 발현의 감소와 연관이 없어²⁸⁾, 분화유도 물질의 종류에 따른 기전들이 각기 다르며 또한 복잡하며 c-myc 암유전자와 분화와의 관계는 아직 모호한 실정

이다.

c-myc 암유전자는 세포 증식의 조절에 관여한다고 알려져 있는데, 이 유전자의 발현의 이상은 세포 증식의 이상 및 어떤 종양세포에서의 미분화를 초래한다¹⁶⁾. 그러므로 이 유전자의 과잉 발현을 보이는 HL-60세포주에 있어서 분화유도시 발현의 감소를 추측할 수 있다. TPA는 PKC를 활성화하여 c-jun, fos, 및 myc 등의 조기 발현 유전자의 전사에 관여함이 알려져 있다^{24, 27, 31~34)}. PKC는 세포질내에 존재하는 serine/threonine protein kinase의 일종이며 c-rafl 및 c-mos의 산물도 여기에 속한다³⁵⁾. c-mos는 대부분의 정상세포 뿐만 아니라 종양세포에서도 거의 발현이 되지 않는다고 알려져 있으며 mouse의 myeloma 세포주에서 활성화 되어 있음이 보고되어 있으나 그 기능은 아직 잘 모르는 실정이다³⁵⁾. raf 암유전자에는 c-rafl, A-rafl, 그리고 B-raf 암유전자와 2종류의 pseudogene(c-raf2 및 A-raf-2)등이 알려져 있으며 최근에 mitogen-activated protein kinase(MAPK) kinase의 활성화에 관여함이 보고되었다³⁵⁾.

어떤 분화 유도 물질이 세포를 자극할때 아마도 분화유도 물질은 세포의 수용체와 결합하게 되고 그런 후 수용체의 활성화로 세포내로 외부의 자극을 전달하게 된다. 본 실험은 이러한 신호 체계 중 세포막에 있는 GTP binding protein을 지령하는 c-Ha-ras 암유전자, ras 암유전자의 활성화이 핵으로 전달되는 신호 체계 과정에 관여하는 serine/threonine protein kinase의 일종인 c-rafl, 그리고 c-rafl과 기능이 유사한 c-mos의 발현을 조사하였다. 이러한 암유전자발현의 변화를 살펴보면 c-Ha-ras의 경우는 granulocyte로 분화유도되는 경우에는 다소 증가하다가 감소하는 경향을 보였으나 monocyte-macrophage로 분화유도한 경우에는 대조군과 거의 발현의 차이를 볼 수 없어 Studzinski 및 Brelvi³⁶⁾ 그리고 Brelvi 및 Studzinski³⁷⁾의 결과와 유사하며 c-Ha-ras 암유전자가 granulocyte로 분화유도와 관련이 있을 것으로 사료된다. 그러나 c-rafl 및 c-mos에서는 대조군 뿐만 아니라 분화유도군에서도 발현이 관찰되지 않아 이러한 유전자는 HL-60세포주의 분화와는 관련이 없는 것으로 보인다. 하지만 다른 경우를 생각해 보면 이미 만들어 놓았는 c-rafl 및 c-mos산물들이 분화유도물질 처리시 활성화되어 serine/threonine kinase로

작용했을 가능성을 배제할 수 없으므로 여기에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 요구된다.

c-Ha-ras 암유전자는 여러 종류의 암에서 발현 이상 및 돌연변이 등이 관찰된다^{38, 39)}. 이 유전자의 산물은 약 21 kilodalton의 단백질(p21)로 되어 있는데 그 기능은 세포의 증식과 관련이 있다. 외부로부터 어떤 성장촉진 자극이 들어오면 p21은 Grb2 및 SOS와 복합체를 이루어 serine/threonine protein kinase의 일종인 c-rafl의 산물을 활성화시키고 이것은 또 MAPK와 관련된 경로를 활성화시켜 결국 핵단백질인 c-myc, c-fos, c-jun등을 활성화하여 어떤 유전자의 전사조절에 관여한다^{35, 40, 41)}. 저자들은 여기에 착안하여 HL-60세포주가 분화 유도될 때 c-myc 암유전자의 발현의 감소와 c-rafl의 관계를 조사하였는데 c-rafl 발현이 대조군 뿐만 아니라 분화유도군에서도 관찰되지 않았다. c-rafl과 기능이 유사한 c-mos의 발현을 조사하였는데, c-rafl의 경우와 같이 발현을 관찰할 수 없었다. c-rafl 및 c-mos 암유전자의 발현은 아마도 c-jun, c-fos, 그리고 c-myc 암유전자와 같이 조기에 발현되는 유전자이거나 아니면 앞에서 언급한바와 같이 이미 만들어져 있어서 이것만으로 신호 전달에 충분하여 발현이 없는 것인지에 대해서는 이들 유전자의 promoter, 돌연변이, 및 post-transcriptional regulation 등에 대한 조사가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

HL-60세포주는 여러종류의 분화유도 물질에 의해 granulocyte 또는 monocyte-macrophage등의 세포로 분화가 유도됨은 잘 알려져 있지만 그 기전은 아직 잘 밝혀져 있지 않다. HL-60세포주를 비롯한 대부분의 암세포는 미분화 세포인데 생체내에서 정상 성숙 세포로 분화를 유도할 수 있다면 암의 치료 및 예방에 크게 기여할 수 있다. 본 연구는 HL-60세포주를 phorbol 12-myristate 13-acetate(TPA) 및 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 분화유도하여 분화에 따른 c-myc, c-Ha-ras, 그리고 serine/threonine protein(STP) kinase기능을 한다고 알려진 c-rafl 및 c-mos등의 암유전자의 발현을 조사하여 암유전자의 발현과 세포분화간의 관계를 조사하였다. 우선 세

포분화를 유도하면서 Wright stain, nitro blue tetrazolium test, nonspecific esterase test, 그리고 세포의 플라스틱에의 부착능 등을 조사하여 세포의 분화 유무 및 정도를 알아 본 결과 분화 유도가 잘되었음을 확인하였다. 그런 후 암유전자의 발현 변화를 조사하였다. DMSO를 처리하여 granulocyte로 분화를 유도한 경우 c-myc의 발현은 분화 유도 48시간 이후 부터 감소하였으며, c-Ha-ras의 발현은 처음에는 다소 증가하다가 48시간 이후부터 감소하였다. TPA를 처리하여 monocyte-macrophage로 분화 유도한 경우 c-myc은 아주 현저한 발현의 감소가 12일째부터 관찰되었고 c-Ha-ras의 경우는 발현의 변화가 거의 없었다. c-rafl 및 c-mos 암유전자의 경우는 대조군 그리고 DMSO 및 TPA 처리군 전부에서 발현을 관찰할 수 없었다.

이상의 결과를 살펴보면 c-myc의 경우는 HL-60세포주가 granulocyte 및 monocyte-macrophage로 분화될 때 관여할 것으로 생각되며, c-Ha-ras의 경우는 granulocyte로 분화될 때 관여할 것으로 생각된다. rafl의 경우 ras산물에 의해 활성화 되는데 대조군 뿐만 아니라 분화유도군에서 발현을 볼 수 없어 DMSO 처리시 c-Ha-ras의 발현을 증가와는 관계가 없는 것 같다. c-rafl과 기능이 유사한 c-mos의 경우도 대조군 및 분화유도군에서 발현되지 않는 것으로 보아 c-rafl 및 c-mos암유전자 산물인 STP kinase는 HL-60세포주의 분화유도에 따른 신호전달에 관계가 없을 것으로 사료되나, 이러한 암유전자와 분화와의 관계는 암유전자의 발현의 일과성 또는 분화유도 물질마다 분화 기전의 다양성 등에 대한 문제의 해결이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Bolande RP: Spontaneous regression and cytodifferentiation of cancer in early life: the oncogenic grace period. *Surv Synth Pathol Res* 4: 296, 1985
- 2) McGovern VJ: Spontaneous regression of melanoma. *Pathology* 7: 91, 1975
- 3) Pierce GB: Neoplasms, differentiation and mutations. *Am J Pathol* 77: 103, 1974
- 4) Sanborn GE, Augsburg JJ, Shields JA: Spon-

- taneous regression of bilateral retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* **66**: 685, 1982
- 5) Woodruff M: Interaction of cancer and host. *Br J Cancer* **46**: 313, 1982
- 6) Rice JM: Spontaneous regression of autochthonous malignant lymphomas induced in Swiss and NZW mice by 1-ethyl-1-nitrosourea. *Natl Cancer Inst Monogr* **35**: 197, 1972
- 7) Collins SJ: The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* **70**: 1233, 1987
- 8) Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC: Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compound. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 24458, 1978
- 9) Fischkoff SA, Pollak A, Gleich GJ, Testa JR, Misawa S, Reber TJ: Eosinophilic differentiation of the human promyelocytic leukemia cell lines, HL-60. *J Exp Med* **160**: 179, 1984
- 10) Huberman E, Callahan MF: Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1293, 1979
- 11) Koeffler HP: Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: therapeutic implication. *Blood* **62**: 709, 1983
- 12) Rovera G, O'Brien TG, Diamond L: Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor promoters. *Science* **204**: 868, 1979
- 13) Rovera G, Santoli D, Damsky CD: Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 2779, 1979
- 14) Vandenbark GR, Kuhn LJ, Neidel JE: Possible mechanism of phorbol diester-induced maturation of human promyelocytic leukemia cells. *J Clin Invest* **73**: 448, 1984
- 15) Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE: Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension cultures. *Nature (London)* **270**: 347, 1977
- 16) Young CW, Warrel RP Jr: Differentiating agents. In: Devita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer Principles and Practices of Oncology*, 4th edit, Philadelphia, JB Lippincott Company, 1993: 26436-46
- 17) Walz TM, Malm C, Wasteson A: Expression of the transforming growth factor alpha protooncogene in differentiating human promyelocytic leukemia(HL-60) cells. *Cancer Res* **53**: 191, 1993
- 18) Collins S, Groudine M: Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukemia cell line. *Nature(London)* **298**: 697, 1982
- 19) Yen A, Guernsey DL: Increased c-myc RNA levels associated with the precommitment state during HL-60 myeloid differentiation. *Cancer Res* **46**: 4156, 1986
- 20) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156, 1987
- 21) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edit, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989
- 22) Weil SC, Rosner GL, Reid MS, Chisholm RL, Farber NM, Spitznagel JK, Swanson MS: cDNA cloning of human myeloperoxidase: decrease in myeloperoxidase mRNA upon induction of HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 2057, 1987
- 23) Filmus J, Buick RN: Relationship of c-myc expression to differentiation and proliferation of HL-60 cells. *Cancer Res* **45**: 822, 1985
- 24) Gonda TJ, Metcalf D: Expression of myb, myc and fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukemia. *Nature (London)* **310**: 2449, 1984
- 25) Gowda SD, Koler RD, Bagby GC Jr: Regulation of c-myc expression during growth and differentiation of normal and leukemic human myeloid progenitor cells. *J Clin Invest* **77**: 271, 1986
- 26) Grosso L, Pitot HC: Transcriptional regulation of c-myc during chemically induced differentiation of HL-60 cultures. *Cancer Res* **45**: 847, 1985
- 27) Lee J, Mehta K, Blick MB, Gutterman JU, Lopez-Berestein G: Expression of c-fos, c-myc, and c-myc in human monocytes: correlation with monocytic differentiation. *Blood* **69**: 15442, 1987
- 28) McCachren SS Jr, Salehi Z, Weinberg JB, Neidel JE: Transcription interruption may be a common mechanism of c-myc regulation during

- HL-60 differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **151**: 574, 1988
- 29) Mollineso F, Gajate C, Tugores A, Flores I, Naranjo JR: Differences in expression of transcription factor AP-1 in human promyelocytic HL-60 cells during differentiation towards macrophages versus granulocytes. *Biochem J* **294**: 137, 1993
 - 30) Schwartz EL, Chamberlin H, Brechbuhl A-B: Regulation of c-myc expression by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human leukemia cells. *Blood* **77**: 2716, 1991
 - 31) Kreutter D, Cladwill AB, Morin MJ: Dissociation of protein kinase C activation from phorbol ester-induced maturation of HL-60 leukemia cells. *J Biol Chem* **260**: 5979, 1985
 - 32) Gaynor R, Simon K, Koeffler P: Expression of c-jun during macrophage differentiation of HL-60 cells. *Blood* **77**: 2648, 1991
 - 33) Sariban E, Luebbers R, Kufe D: Transcriptional posttranscriptional control of c-fos gene expression in human monocytes. *Mol Cell Biol* **8**: 3440, 1988
 - 34) Sherman ML, Stone RM, Datta R, Bernstein SH, Kufe DW: Transcriptional and post-transcriptional regulation of c-jun expression during monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **265**: 3320, 1990
 - 35) Cooper GM: *Oncogenes*, Boston: Jones and Bartlett Publishers Inc, 1990
 - 36) Stuszinski GP, Brelvi ZS: Increased expression of oncogene c-Ha-ras during granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Lab Invest* **56**: 499, 1987
 - 37) Brelvi ZS, Studzinski GP: Changes in expression of oncogenes encoding nuclear phosphoproteins but not c-Ha-ras have a relationship to monocytic differentiation of HL-60 cells. *J Cell Biol* **102**: 2234, 1986
 - 38) Neri A, Knowles DM, Greco A, McCormick F, Dalla-Favera R: Analysis of ras oncogene mutations in human lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 9268, 1988
 - 39) Deng G, Lu Y, Chen S, Miao J, Lu G, Li Hua, Cai H, Xu X, E Z, Liu P: Activated c-Ha ras oncogene with guanine to thymine transversion at the twelfth codon in a human stomach cancer cell line. *Cancer Res* **47**: 3195, 1987
 - 40) Marx J: Forging a path to the nucleus. *Science* **260**: 1588, 1993
 - 41) Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A: Complexes of ras-GTP with raf1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* **260**: 1658, 1993