



HL60 세포분화시 Rb 항암단백질과 세포주기조절인자들의 발현

Expression of Rb Protein and Cell Cycle Control Genes During HL60 Cell Differentiation

저자 (Authors)	조재위, 백원기, 서성일, 박종욱, 서민호 Jae-We Cho, Won-Ki Baek, Seong-Il Suh, Jong-Wook Park, Min-Ho Suh
출처 (Source)	The Journal of the Korean Society for Microbiology 34(1) , 1999.2, 77-84 (8 pages)
발행처 (Publisher)	대한미생물학회 The Korean Society For Microbiology
URL	http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01491808
APA Style	조재위, 백원기, 서성일, 박종욱, 서민호 (1999). HL60 세포분화시 Rb 항암단백질과 세포주기조절인자들의 발현. <i>The Journal of the Korean Society for Microbiology</i> , 34(1), 77-84.
이용정보 (Accessed)	계명대학교 203.247.13.27 2016/01/08 13:14 (KST)

저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.

이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.

You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

HL60 세포분화시 Rb 항암단백질과 세포주기조절인자들의 발현

계명대학교 의과대학 미생물학교실¹, 면역학교실²

조재위¹ · 백원기¹ · 서성일¹ · 박종욱² · 서민호¹

=Abstract=

Expression of Rb Protein and Cell Cycle Control Genes During HL60 Cell Differentiation

Jae-We Cho¹, Won-Ki Baek¹, Seong-Il Suh¹, Jong-Wook Park² and Min-Ho Suh¹

*Departments of Microbiology¹ and Immunology², Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea*

Differentiation will be divided into three general steps: cell cycle exit, apoptosis protection, and tissue-specific gene expression. The role of cell cycle control genes in the process of cell cycle exit is a largely unresolved issue. HL60 cells, a promyelocytic leukemia cell line, were differentiated into macrophage-like cells by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). During TPA-induced HL60 cell differentiation, the expression patterns of the cell cycle control genes were investigated. The expression of hypophosphorylated Rb protein was remarkably increased compared with the control. Cyclin E and A proteins were dramatically decreased and cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and 4 proteins were gradually decreased, but cyclin D1 proteins were gradually increased during differentiation. The expression of p21^{WAF1} was increased 1 day after TPA treatment and then remarkably up-regulated 2 days after TPA treatment. The expression of p27^{KIP1} was also remarkably up-regulated 1 day after TPA treatment.

In conclusion, the increased expression of p21^{WAF1} and p27^{KIP1}, and the decreased expression of cyclin E and A may cause the decreased activity of CDKs; and then hypophosphorylated Rb protein will be increased during the differentiation. The increased hypophosphorylated active Rb protein will stop the cells in G1 and produce proper conditions for cell cycle exit.

Key Words: HL60 cell, Differentiation, Cell cycle control genes

서 론

미분화암세포에 분화유도제를 사용하여 성숙한 세포로 분화시키는 연구는 분화와 관련된 분자생물학적 기전을 이해하는데 도움이 될 뿐만 아니라 새로운 암 치료법으로서의 가능성도 있어 현재 HL60 세포를 이용한 분화유도과정의 연구

는 많은 연구자들에 의해 수행되고 있다^{1,3,4,10,11}. HL60 세포는 급성전골수성백혈병 (acute promyelocytic leukemia) 환자로부터 분리하여 확립한 세포주로서 여러가지 분화유도 물질에 의해 과립구계열 (granulocytic lineage) 또는 단구/대식세포 계열 (monocyte/macrophage-like cells)로 분화되는 미분화암 세포주이다⁶.

지금까지 알려진 HL60 세포의 분화유도 물질

접수 : 1999년 1월 29일, 게재결정 : 1999년 3월 18일

Corresponding author: 서민호, 700-712 대구시 중구 동산동 194번지 계명대 미생물학교실, Tel: (053) 250-7441, Fax: (053) 255-1398, E-mail address: minho@dsmc.or.kr

로는 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), 1, 25-dihydroxy vitamin D3 (Vitamin D3), retinoic acid, dimethyl-sulfoxide (DMSO) 등이 있으며¹⁰⁾, 분화유도제에 따라서 분화양상과 그에 따른 분자생물학적 조절기전에도 차이가 있는 것으로 보고되어 있다.^{4,10,19)}

다양한 분화관련 유전자들의 정교한 조절에 의해 세포분화는 이루어지며, 그 중에서도 세포주기 조절은 분화에 있어서 매우 중요한 부분을 차지하고 있는데^{3,10,16)} 세포가 분화될 때에는, 세포주기 조절인자들의 상호작용으로 세포주기가 G1에 머물면서 분화관련 유전자들이 순차적으로 발현됨과 동시에 apoptosis protection이 일어나는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 세포분화시 세포주기의 G1 정지기전에는 세포주기 조절인자 중 Rb 항암단백질 (Rb), E2F, cyclin, cyclin-dependent kinase (CDK), 및 CDK inhibitor (CKI) 등이 깊이 관여하는데^{8,17)}, 세포분화 과정에서 나타나는 G1 세포주기 정지의 분자생물학적 기전을 규명하는 것은 분화와 조직발생 (tissue biogenesis) 과정을 이해하는데 가장 핵심적인 부분일 뿐만 아니라, 현대 의학 및 생물학의 많은 연구분야 중에서 최대의 관심분야가 되고있다.

이 연구에서는 Rb 및 cyclin A, E, D1 그리고 CKI인 p21^{WAF1}과 p27^{KIP1} 등의 세포주기 조절인자들이 세포분화시 G1 정지유도에 관여하는 기전을 규명하고자 HL60 세포에 TPA를 처리하여 분화를 유도하면서 단백질 차원에서 이들 유전자들의 발현을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

이 실험에서는 미분화암세포주인 HL60 세포를 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine 및 HEPES가 함유된 RPMI1640 배양액을 이용하여 36°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하면서 실험에 사용하였다. 계대배양시 trypan blue 배제법으로 세포 생존율을 산정하여 생존세포가 6x10⁵/ml 되도록 유지하면서 분화를 유도하였다.

2. 세포분화 유도

분화유도 물질로 알려진 32 nM TPA (Sigma Co., USA)를 HL60 세포 (7x10⁵/ml)에 처리하여 삼일간 분화유도하였다. 그리고 분화유도 이틀째에는 동

량의 분화유도제를 함유한 RPMI1640 배양액 10 ml를 다시 첨가해 주었다.

3. Trypan blue 배제 실험

0.4% trypan blue 50 µl에 세포액 50 µl를 넣고 혼합한 후 hemocytometer에 넣고 1분 후 trypan blue가 배제된 밝은 세포수를 세어 생존세포수를 계수하였으며, 두개의 시료를 각각 계수 후 그 평균치를 취하였다.

4. Western blot 분석

분화유도된 세포를 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100)에 0.2 M phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride 및 proteinase inhibitor cocktail (0.02 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 5 mM phenanthroline, 28 mM benzamidine-HCl)을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 12000 rpm, 4°C에서 원심하여 상층액을 취한 후, Biorad protein assay kit으로 정량하였다. 100 µg의 단백질을 12% 또는 6.5%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 다음, nitrocellulose paper (Millipore Co., USA)로 전이하였다. 전이된 membrane을 blotting 용액 (5% 탈지분유, 20 mM Tris (pH 7.5), 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20)에 넣어 4°C에서 하룻밤 진탕 (shaking)하였다. membrane을 실온에서 일차항체 용액에 2시간 incubation 후 TBS-T buffer (20 mM Tris (pH 7.5), 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20)로 세척하고, 이차항체 용액 (실온)에 1시간 incubation한 후 TBS-T buffer로 세척하고 Enhanced chemiluminescence kit (Amersham Co., USA) 방법으로 detection하였다. 사용한 일차항체들은 다음과 같다 (Rb:G3-245, PharMingene Co., USA; cyclin A:sc-239, Santa Cruz Co., USA; cyclin E:sc-247, Santa Cruz Co., USA; cyclin D1:cc-04, Santa Cruz Co., USA; CDK2:M2, Santa Cruz Co., USA; CDK 4:c-22, Santa Cruz Co., USA; p53:Ab-2, Oncogene Science Co., USA; p21:WAF1, PharMingene Co., USA; p27:KIP1, PharMingene Co., USA).

결 과

1. 분화에 따른 HL60 세포의 형태적 변화

TPA 처리시 HL60 세포의 형태적 변화를 도립 현미경으로 3일간 관찰하였다 (Figure 1). 분화유도 1일째 약 70%, 분화유도 2, 3일째 약 90%의

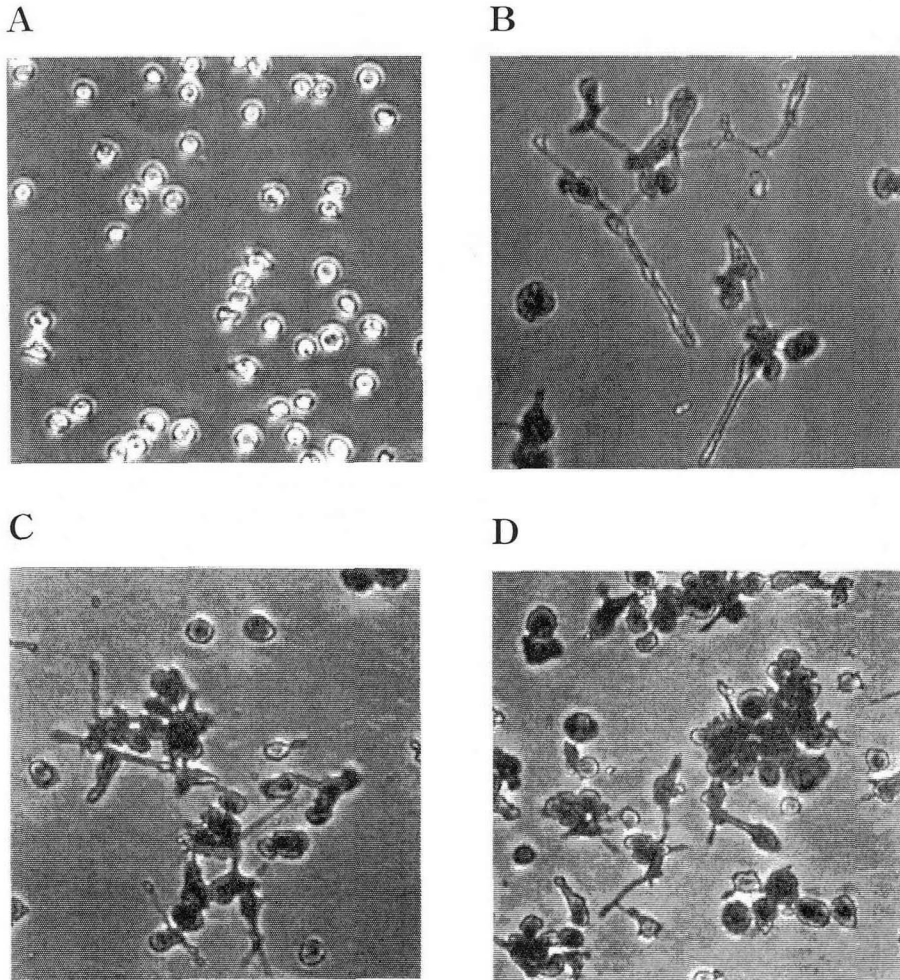


Figure 1. Morphology of HL60 cells after TPA treatment. HL60 cells were cultured in the absence of TPA (A) or in the presence of 32 nM TPA for 1, 2 and 3 days (B, C, D, respectively). Photographs were taken after crystal violet staining ($\times 100$). This experiment was repeated three times.

세포가 세포배양접시 바닥에 부착되면서 다각형 (polygonal) 형태의 단구/대식세포 계열로 분화되었다 (Figure 1B, C, D). 대부분의 HL60 세포는 TPA 처리 3일 내로 단구/대식세포 계열로 분화됨을 볼 수 있었다.

2. TPA가 HL60 세포 성장에 미치는 영향

TPA가 HL60 세포 성장에 미치는 영향을 trypan blue 배제법으로 생존세포수를 계수하여 확인하였다. HL60 세포를 3가지 다른 조건, 즉, 10% FBS를 함유한 RPMI1640 배양액, FBS가 없는 RPMI1640 배양액, 그리고 10% FBS와 TPA (32 nM)를 함께 함

유한 RPMI1640 배양액에서 각각 4일 동안 배양하면서 생존세포수를 계수하였다 (Figure 2). 10% FBS를 함유한 배양액의 경우에는 지속적인 성장곡선을 그린 반면에, FBS가 제거된 경우에는 세포의 분열속도가 약 50% 정도 감소됨을 볼 수 있었다. 그러나 TPA를 처리한 경우에는 FBS가 있음에도 불구하고 24시간째부터는 세포수가 거의 증가되지 않아서, TPA 처리로 인한 세포분화시 세포분열의 뚜렷한 감소를 볼 수 있었다.

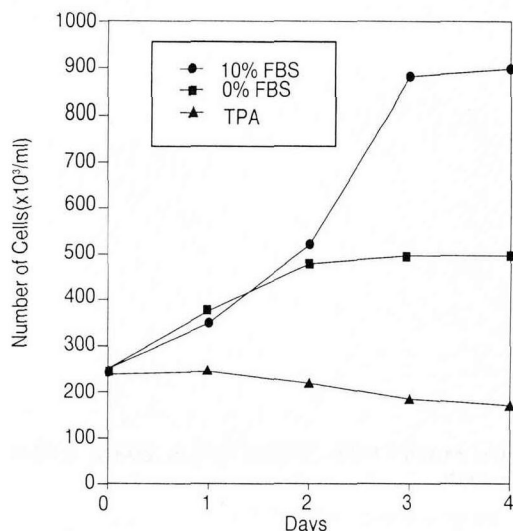


Figure 2. The effect of TPA on HL60 cell proliferation. HL60 cells were seeded at a concentration of 2.5×10^5 /ml and then cultured under three different conditions for 4 days; RPMI 1640 medium containing 10% FBS (●) or 0% FBS (■) or 32 nM TPA (▲). Viability was determined by trypan blue dye exclusion test. This experiment was repeated three times.

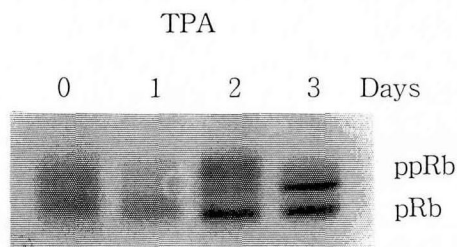


Figure 3. Western blot analysis of Rb protein in TPA-treated HL60 cells. HL60 cells were cultured in the presence of 32 nM TPA for 0, 1, 2 and 3 days. Proteins were extracted at the indicated days and were subjected to immunoblotting with a monoclonal anti-Rb antibody. This experiment was repeated three times. pRb: hypophosphorylated Rb; ppRb: hyperphosphorylated Rb.

3. TPA 분화유도시 세포주기 조절인자들의 발현 양상

TPA 분화유도시 세포분열의 뚜렷한 감소와 관련된 세포주기 조절인자들의 발현 양상을 규명하기 위해 TPA 처리전 및 처리 1일, 2일, 3일째 단구/대식세포 계열로 분화된 세포로부터 각각의 단백

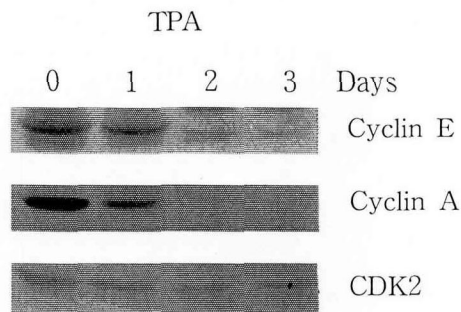


Figure 4. Western blot analysis of cyclin E, cyclin A and CDK2 in TPA-treated HL60 cells. HL60 cells were cultured in the presence of 32 nM TPA for 0, 1, 2 and 3 days. Proteins were extracted at the indicated days and were subjected to immunoblotting with a monoclonal anti-cyclin E, a monoclonal anti-cyclin A, and a monoclonal anti-CDK2 antibody. This experiment was repeated three times.

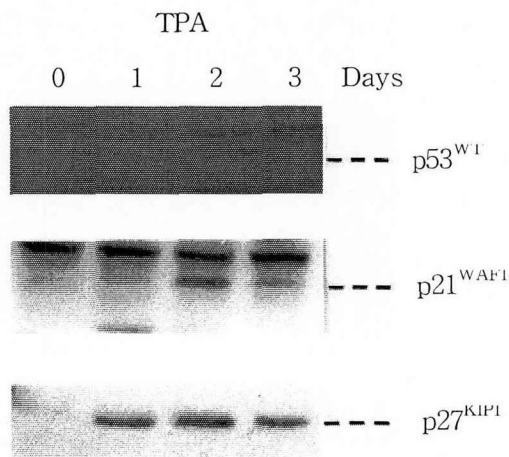


Figure 5. Western blot analysis of p53^{WT}, p21^{WAF1} and p27^{KIP1} in TPA-treated HL60 cells. HL60 cells were cultured in the presence of 32 nM TPA for 0, 1, 2 and 3 days. Proteins were extracted at the indicated days and were subjected to immunoblotting with a monoclonal anti-p53^{WT}, a monoclonal anti-p21^{WAF1}, and a monoclonal anti-p27^{KIP1} antibody. This experiment was repeated three times.

질을 추출하여 western blot 분석을 시행하였다 (Figure 3, 4, 5, 6). Rb는 분화유도전에 비해 분화유도 2일 및 3일째 저인산화 Rb의 현저한 발현 증가를 보였다 (Figure 3). Cyclin E, cyclin A는 분화유도 1일째부터 발현이 감소되어 분화유도 2, 3일째에는 발현을 볼 수 없었고, CDK2는 분화유도 동안 점진적

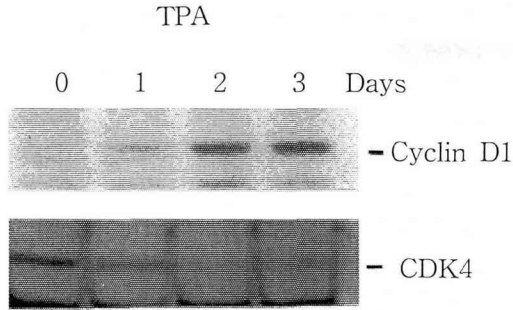


Figure 6. Western blot analysis of cyclin D1 and CDK4 in TPA-treated HL60 cells. HL60 cells were cultured in the presence of 32 nM TPA for 0, 1, 2 and 3 days. Proteins were extracted at the indicated days and were subjected to immunoblotting with a monoclonal anti-cyclin D1 and a polyclonal anti-CDK4 antibody. This experiment was repeated three times.

으로 발현이 감소되었다 (Figure 4). $p21^{WAF1}$ 은 $p53^{WT}$ 의 발현 없이 분화유도 1일째부터 증가되기 시작하여 2일째 현저하게 증가하였으며, $p27^{KIP1}$ 은 분화유도 1일째부터 현저하게 발현이 증가되면서 분화유도 3일째까지 그대로 유지되었다 (Figure 5). Cyclin D1은 분화유도 1일째부터 점차적으로 발현이 증가되었으나, CDK4는 분화유도 동안 점차적으로 발현이 감소되었다 (Figure 6). 이상의 결과들에서 추론되는 TPA 분화유도시 세포주기 조절인자들의 발현 양상을 요약 정리하였다 (Figure 7).

고 찰

HL60 세포주는 여러 종류의 분화유도 물질에 의해 과립구계열 또는 단구/대식세포 계열로 분화되는데, 분화유도 물질인 vitamin D3, TPA 등에 의해서는 단구/대식세포 계열로 분화되며, retinoic acid, DMSO 등에 의해서는 과립구계열로 분화된다⁶⁾. HL60 세포가 분화유도 물질에 노출되면 분화유도 물질은 세포막에 존재하는 수용체와 결합하게 되고, 뒤이어 세포내부로 분화관련 신호를 전달하는 각종 신호전달체계가 활성화되는 것으로 알려져 있다¹²⁾. TPA 처치에 의한 HL60 세포 분화시 주로 밝혀진 신호전달경로는 protein kinase C (PKC) 활성화에 의한 신호전달경로이다^{2,9,12)}. TPA 처치시 활성화된 PKC는 세포의 분열 및 분화에 중요한 역할을 하는 c-jun, c-fos, 및 c-myc과 같은 조기유전자 (early response gene)들의 발현을

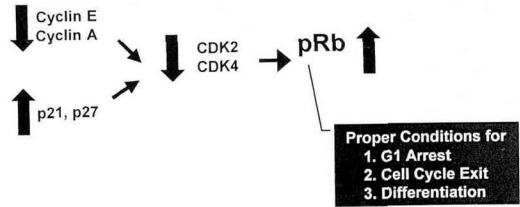


Figure 7. Effects of TPA on the expression of cell cycle control genes in HL60 cell. pRb: hypophosphorylated Rb.

조절하며, 이러한 조기유전자들의 발현 변화는 결국 세포주기에도 영향을 미치게 된다고 알려져 있다^{6,13)}.

이 연구에서는 미분화암세포주인 HL60 세포에 TPA를 처리하여 단구/대식세포 계열로 분화시키면서, 분화관련 신호전달체계 중 세포분화시 G1 정지에 깊이 관여하는 세포주기 조절인자들, 즉 Rb, cyclin A, E, D1 그리고 CKI인 $p21^{WAF1}$ 과 $p27^{KIP1}$ 의 발현 양상을 규명하여 세포분화와 관련된 세포주기 조절인자들의 작용 기전을 이해하고자 하였다.

이 연구에서 HL60 세포는 Collins의⁶⁾ 보고와 동일하게 TPA 처리시 24시간 후 대부분의 HL60 세포가 단구/대식세포 계열로 분화되었다. 이러한 단구/대식세포 계열로의 형태적 변화에서는 PKC isoenzymes 중 하나로 알려진 PKC- δ 에 의한 vimentin filament의 인산화가 중요하다고 알려져 있다¹²⁾.

분화유도 24시간만에 세포분열이 뚜렷하게 감소되었는데, 이는 TPA 처리시 세포주기가 G1에 정지되면서 세포분화가 유도되면서 나타난 현상으로 생각된다. 저인산화 Rb는 S 주기 진입에 필요한 유전자들의 전사조절에 중요한 역할을 하는 E2F와 결합하여 E2F의 기능을 억제함으로써 세포주기를 G1에 정지시키는 핵심물질로 알려져 있다^{7,18,20,21)}. TPA 처치에 의한 HL60 세포분화시 저인산화 Rb의 발현 증가가 보고되어 있는데^{3,5)}, 이 연구에서도 TPA 처리에 의한 HL60 세포분화시 저인산화 Rb의 발현이 증가된 것으로 보아 증가된 저인산화 Rb가 세포분화유도에서 나타나는 G1 정지에 깊이 관여되는 것으로 생각된다.

Cyclin-CDK 복합체에 의해서 Rb가 과인산화 되어 불활성화 되면 Rb의 G1 정지 기능은 상실되는 것으로 알려져 있다^{15,18,20)}. 즉, cyclin D-CDK4/6 복합체가 Rb를 인산화 시키고, 뒤이어 cyclin E-CDK2

복합체가 계속해서 Rb를 인산화 시킴으로써 Rb가 억제하고 있던 E2F가 유리되어 활성화되면 G1 진행 (progression)과 DNA 복제에 필요한 여러 유전자들의 발현이 증가되어 세포주기는 G1에서 S로 들어가고 G2 및 M 세포주기를 거쳐 결국 세포분열이 이루어진다^{15,18,20}. 세포 내에는 cyclin-CDK 복합체에 의한 Rb의 과잉한 인산화를 막기 위하여 cyclin-CDK 복합체에 결합하여 기능을 억제하는 억제제 (inhibitor)가 있으며, 현재까지 이러한 CDK inhibitor는 CIP/KIP군과 INK4군으로 분류되어 있다. CIP/KIP군에는 cyclin D-, cyclin E-, cyclin A-의존성 kinase의 기능을 억제하는 p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}이 알려져 있고, INK4군에는 cyclin D-의존성 kinase의 기능을 억제하는 p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}이 알려져 있다^{14,15}.

정상세포에서 대부분의 CDK들은 cyclin, DNA polymerase delta의 subunit인 proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p21^{WAF1}과 4중 복합체를 형성하는데, 이 결합체에 한 분자의 p21^{WAF1}이 결합되어 있으면 Rb를 인산화 시켜 E2F가 활성화되나, 여러 원인에 의하여 p21^{WAF1}의 발현이 증가되어 두 분자의 p21^{WAF1}이 결합체에 존재하게 되면 이 결합체의 Rb 인산화 기능이 불활성화 되는 것으로 알려져 있다¹⁴. 이 실험에서 세포분화 초기에 p21^{WAF1}이 증가한 것으로 보아 p21^{WAF1}에 의한 CDK의 Rb 인산화 기능억제는 TPA 처치에 의한 HL60 세포분화시 나타나는 저인산화 Rb 발현 증가의 중요한 기전 중 하나로 생각되며, Jiang 등¹⁰과 Steinman 등¹⁶도 TPA에 의한 HL60 세포분화시 p21^{WAF1} 단백질이 세포분화 초기에 증가한다고 보고한바 있다. 서 등¹⁾은 HL60 세포분화시 p21^{WAF1} mRNA의 발현 증가를 보고한바 있는데, p21^{WAF1}의 발현은 p53^{WT}에 의하여 유도될 수 있으나^{10,14,15} HL60 세포는 p53^{WT} 유전자가 결손된 세포이므로 p53^{WT} 비의존성 전사조절경로를 통하여 p21^{WAF1} 단백질의 발현이 증가한 것으로 사료된다.

p27^{KIP1}은 분열중인 세포 내에서 소량이 일정하게 발현되고, 휴지기 상태의 세포에서는 다량의 p27^{KIP1}이 발현된다고 보고되어 있으며, cyclin-CDK 복합체는 이러한 p27^{KIP1}의 inhibitory threshold를 극복해야 활성화되는 것으로 알려져 있다^{14,15}. 이 실험에서 세포분화 초기에 p27^{KIP1}의 발현이 증가한 후 대부분의 세포가 단구/대식세포 계열로 분화된 분화유도 3일째까지 증가된 발현이 유지되는 것을 고려할 때, p27^{KIP1}에 의한 cyclin-CDK

복합체의 활성 차단은 HL60 세포분화 초기 및 분화 후기의 세포주기 정지에 중요하게 작용하는 것으로 생각된다.

CDK의 활성을 감소시키는 또 다른 기전으로 cyclin과 CDK의 양적 감소가 있을 수 있다. 이 실험에서 세포분화시 cyclin E, A 및 CDK2, 4 단백질 발현이 감소되었고, Bruger 등⁴⁾도 cyclin E, A, 및 CDK2, 4의 mRNA 발현이 TPA에 의한 HL60 세포분화 동안 감소한다고 보고한 것을 고려할 때, 전사단계에서 cyclins와 CDKs의 발현이 조절되어 세포 내 이들 단백질들의 양적 감소가 cyclin-CDK 복합체 활성 감소의 한 원인으로 작용한다고 생각된다. Cyclin D1 단백질은 세포분화 동안 발현이 증가하였으나, CDK4의 감소와 p21^{WAF1}과 p27^{KIP1}의 증가를 고려할 때 Rb 인산화 기능은 미약할 것으로 판단된다. 세포분화시 cyclin D1의 세포주기 조절기능 이외의 역할을 배제할 수 없어 더 자세한 연구가 필요하다.

이 실험결과들을 종합적으로 분석하면, TPA에 의한 HL60 세포 분화유도시 나타나는 G1 주기 정지에는, p21^{WAF1}과 p27^{KIP1}의 발현 증가와 cyclin E, A 그리고 CDK2, 4의 발현 감소로 인한 CDK2, 4의 Rb 인산화 기능의 감소와 그로 인한 저인산화 Rb의 발현 증가가 중요하게 작용하는 것으로 생각된다.

결론

세포분화는 세포주기의 G1 정지, 세포사 차단, 그리고 조직특이 유전자의 발현이라는 3가지의 기본적인 과정으로 진행된다. 세포주기의 G1 정지는 세포주기를 조절하는 여러 세포주기 조절인자들간의 정밀한 상호작용에 의해서 이루어진다고 알려져 있으나 세포분화시 G1 정지에 깊이 관련되어 있는 세포주기 조절인자들의 역할은 규명해야 할 부분이 많이 남아있다.

이 연구에서는 HL60 세포에 TPA를 처리하여 분화를 유도하면서 Rb 항암단백질 및 cyclin A, E, D1 그리고 CDK inhibitor인 p21^{WAF1}과 p27^{KIP1}의 발현 양상을 규명하여 세포분화와 관련된 세포주기 조절인자들의 작용 기전을 이해하고자 하였다.

HL60 세포주는 TPA 처치에 의한 세포분화시 세포분열이 뚜렷하게 감소되면서 단구/대식세포 계열로 분화되었고, 세포주기 조절인자들의 변화는 다음과 같았다. Rb 항암단백질은 저인산화 Rb

가 증가하였고, cyclin E, A 단백질은 현저히 감소하였으며, CDK2, 4 단백질은 서서히 감소하였다. p21^{WAF1}은 분화유도 초기부터 증가하기 시작하여 2일째는 현저하게 증가되었으며, p27^{KIP1}은 분화유도 초기부터 현저하게 발현이 증가되면서 분화유도 3일째까지 그대로 유지되었다. 그러므로 TPA에 의한 HL60 세포분화시 p21^{WAF1}과 p27^{KIP1}의 발현 증가와 cyclin E, A의 발현 감소에 의해 결과적으로 CDK2, 4의 Rb 인산화 기능이 감소되어 저인산화 Rb의 발현이 증가된 것으로 생각되며, 증가된 저인산화 Rb는 세포주기의 G1 정지 및 세포주기 이탈에 깊이 관여된 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 서성일, 정준아, 조재위, 백성덕, 박문현, 백원기, 서민호: HL60 세포분화에 따른 p21^{WAF1} 유전자의 발현. 대한미생물학회지 **32**: 455-465, 1997.
- 2) Aihara H, Asaoka Y, Yousida K, Nishizuka Y: Sustained activation of protein kinase C is essential to HL-60 cell differentiation to macrophage. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11062-11066, 1991.
- 3) Akiyama T, Toyoshima K: Marked alteration in phosphorylation of the Rb protein during differentiation of human promyelocytic HL60 cells. *Oncogene* **5**: 79-183, 1990.
- 4) Bruger C, Wick M, Muller R: Lineage-specific regulation of cell cycle gene expression in differentiating myeloid cells. *J Cell Sci* **107**: 2047-2054, 1994.
- 5) Chen PL, Peter Scully, Shew JY, Wang JY, Lee WH: Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* **58**: 1193-1198, 1989.
- 6) Collins SJ: The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* **70**: 1233-1244, 1987.
- 7) Hamel PA, Phillips RA, Muncaster M, Gallie BL: Speculations on the roles of RB1 in tissue-specific differentiation, tumor initiation, and tumor progression. *FASEB J* **7**: 846-854, 1993.
- 8) Heintz N: Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem Sci* **18**: 157-159, 1993.
- 9) James RI, Menaya J, Hudson K, Devalia V, Ryves J, Evans FJ, Thomas S, Clemens MJ: Role of protein kinase C in induction of gene expression and inhibition of cell proliferation by interferon alpha. *Eur J Biochem* **209**: 813-822.
- 10) Jiang H, Lin J, Su Z, Collart FR, Huberman E, Fisher PB: Induction of differentiation in human promyelocytic HL60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* **9**: 3397-3406, 1994.
- 11) Koeffler HP: Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: therapeutic implication. *Blood* **62**: 709-721, 1983.
- 12) Owen PJ, Johnson GD, Lord JM: Protein kinase C- δ associates with vimentin intermediate filaments in differentiated HL60 cells. *Exp Cell Res* **225**: 366-373, 1996.
- 13) Roberts P, Jones M, Gale R, Thomas S, Tidman N, Linch D: The c-myc oncogene is regulated independently of differentiation in myeloid cell lines. *Leuk Res* **13**: 651-659, 1989.
- 14) Sherr CJ, Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**: 1149-1163, 1995.
- 15) Sherr CJ: Cancer cell cycles. *Science* **274**: 1672-1677, 1996.
- 16) Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Gulliouf C, liebermann DA, el-Houseini ME: Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* **9**: 3389-3396, 1994.
- 17) Steller H: Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Science* **267**: 1445-1449, 1995.
- 18) Weinberg RA: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**: 323-330, 1995.
- 19) Yamada JH, Tamada H, Nakada S, Ochi K, Nemoto T: Changes of G1 cyclins, cdk2, and cyclin A during the differentiation of HL60 cells induced by TPA. *Mol Cell Biochem* **132**: 31-37, 1994.
- 20) Yee AS, Shih HH, Tevosian SG: New perspec-

- tives on retinoblastoma family functions in differentiation. *Front Biosci* **3**: 532-547, 1998.
- 21) Zacksenhaus E, Bremner R, Jiang Z, Gill RM, Muncaster M, Sopta M, Phillips RA, Gallie BL: Unraveling the function of the retinoblastoma gene. *Adv cancer Res* **61**: 115-141, 1993.
-