



HL60세포 분화에 따른 p21^{WAF1} 유전자의 발현

p21^{WAF1} mRNA Expression During HL60 Cell Differentiation

저자 (Authors) 서성일, 정준아, 조재위, 백성덕, 박문현, 백원기, 서민호
S.I. Suh, J.A. Jung, J.W. Cho, S.D. Paik, M.H. Park, W.K. Baek, M.H. Suh

출처 (Source) [The Journal of the Korean Society for Microbiology 32\(4\)](#), 1997.8, 455-465 (11 pages)

발행처 (Publisher) [대한미생물학회](#)
The Korean Society For Microbiology

URL <http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01489264>

APA Style 서성일, 정준아, 조재위, 백성덕, 박문현, 백원기, 서민호 (1997). HL60세포 분화에 따른 p21^{WAF1} 유전자의 발현. The Journal of the Korean Society for Microbiology, 32(4), 455-465.

이용정보 (Accessed) 계명대학교
203.247.13.27
2016/01/08 13:38 (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).

HL60세포 분화에 따른 p21^{WAF1} 유전자의 발현

계명대학교 의과대학 미생물학교실¹, 의과학연구소² 및 의학유전연구소³
서성일^{1,2,3} · 정준아¹ · 조재위¹ · 백성덕¹ · 박문현¹ · 백원기¹ · 서민호^{1,2,3}

=Abstract=

p21^{WAF1} mRNA Expression During HL60 Cell Differentiation

S.I. Suh^{1,2,3}, J.A. Jung¹, J.W. Cho¹, M.H. Park¹, S.D. Paik¹,
W.K. Baek¹ and M.H. Suh^{1,2,3}

Departments of Microbiology¹, Institute for Medical Science² and Institute for Medical Genetics³, Keimyung University School of Medicine, Taegu, 700-712, Korea

p21^{WAF1} is the mammalian cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor to be discovered. p21^{WAF1} which is found to be induced by p53 mediates growth arrest by inhibiting G1 CDKs. But, recently p21^{WAF1} was also found to be induced in senescent and quiescent cells which were low in p53 level and in p53-deficient growth-arrested tumor cell lines. The present study has been investigated the effect of differentiation inducing agents on expression of p21^{WAF1} gene and cyclin genes in p53-mutant HL60 cell lines by using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. p21^{WAF1} mRNA was increased within 15 minutes during monocytic and within 6 hours during granulocytic differentiation of HL60 cell lines. Cycloheximide (CHX), potent protein synthesis inhibitor, alone had no detectable effect on the accumulation of p21^{WAF1} mRNA but combination of CHX and TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate) for 6 hours increased levels of p21^{WAF1} mRNA. Actinomycin D (ACT) alone and combination of ACT and TPA for 6 hours did not increase levels of p21 mRNA. These results indicated that protein synthesis is not required for the induction of p21^{WAF1} by TPA and p21^{WAF1} appeared to be an immediate early response gene. In HL60 cells the increased expression of p21^{WAF1} mRNA by TPA occurred at the transcriptional level and did not result from change in p21^{WAF1} mRNA stability. We also studied the involvement of cyclins during monocytic differentiation of HL60 cell lines. While levels of cyclin A, B, C and E mRNA were gradually decreased but unexpectedly, levels of cyclin D1 remarkably increased after incubation with TPA. These result showed that monocytic differentiation of HL60 cells by TPA were related with transcriptional level inactivations of cyclin A, B, C and E, but the mechanismss of increased expression of cyclin D1 mRNA during differentiation remains to be elucidate.

Key Words: p21^{WAF1}, CDK inhibitor, Cyclin, HL60 Cell

Reprint Request to: 서성일, 대구광역시 중구 동산동 194번지 계명대 미생물학교실 700-712, 전화: 053-250-7442, Fax): 053- 255-1398, E-mail: Seong@dsmc.or.kr.

이 연구과제는 1997년도 동산의료원 특수과제연구비로 이루어졌습.

서 론

항암유전자인 p53의 주기능은 세포의 유전자의 전사, DNA 이상복구 및 복제 등에 관여하여 세포주기억제 및 apoptosis를 통한 세포증식의 억제, 즉 암발생을 억제하는데 관여한다고 알려져 있다^{6,17}. p53이 세포증식을 억제하는 기전은 p53이 직접, 또는 p53에 의해 발현이 유도되는 유전자산물에 의해 간접적으로 이루어질 것으로 생각되고 있다. p53에 의해 발현이 유도되는 유전자로는 Gadd45²³, GLN retroviral element⁴⁸, Mdm2⁴, IGF-BP3⁷, Bax³¹, 및 cyclin G³⁴ 등이 알려져 있다. 이들 유전자 산물이 세포증식 억제작용을 어떤 기전을 통하여 나타내는지에 대해서는 아직 잘 규명되어 있지 않지만, 최근 p53에 의해 발현이 유도된다고 알려진 p21^{WAF1}에 의해 세포주기의 조절을 통한 기전이 가장 잘 밝혀져 있다. p21^{WAF1} 유전자는 El-Deiry 등¹⁴, Harper 등¹⁸, Xiong 등⁴⁵ 및 Noda 등³³의 연구진에 의해 독립적으로 각각 wild-type p53 activated protein (WAF1), CDK-interacting protein 1 (CIP1), 그리고 senescent-derived cell inhibitor (SDI1)로 보고되었다. p53에 의한 세포증식억제기전은 특히 세포의 DNA에 손상이 생기면 p53이 이를 감지하여 p21^{WAF1}의 발현을 유도하여 이루어 진다고 알려져 있다¹³. 이렇게 발현이 유도된 p21^{WAF1}은 retinoblastoma 단백질 (pRb)의 인산화에 관여하는 cyclin-dependent kinase (CDK)의 활성을 억제하여 세포증식억제 기능을 나타내는데, p21^{WAF1}에 의한 CDK의 비활성화는 pRb의 인산화가 저해되어 pRb로부터 E2F의 유리가 억제되어 E2F-response gene의 발현이 이루어지지 않아 세포가 S세포주기로 들어가지 못하고 G1세포주기에 머물게 됨에 따라 세포의 증식이 억제된다^{9, 13, 18}. p21^{WAF1}의 주 기능은 앞에서 언급한 CDK의 활성억제 뿐만 아니라 DNA복제에 필요한 DNA polymerase d의 보조인자인 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)와 결합하여 DNA복제를 억제하는 작용도 가진다¹⁵.

분화과정에 있는 세포는 G1세포주기에 머물러 있는데 세포의 G1세포주기에의 정지와 pRb의 저인산화는 많은 세포에서 분화유도물질에 반응하여 일어남이 알려져 있지만 그 기전은 잘 알려져 있지 않다^{3, 5, 9}. U937, HL60 및 M1세포주를 과립구 또는 단핵구로 분화유도했을 때 이들

세포는 G0/G1세포주기에 머물러 있다³⁶. 세포가 G1세포주기에 머물기 위해서는 pRb가 인산화되지 않은 상태여야 하는데 이렇게 되기 위해서는 CDK의 활성이 저하되어야 한다. 최근에 CDK의 활성을 조절하는 CDK Inhibitor (CDKI)들의 발현은 세포가 내외부의 신호에 반응하여 어떻게 증식이 조절되는지에 대한 새로운 이해를 도출하게 되었다. 그러므로 분화유도물질은 pRb의 인산화를 억제하는 p21^{WAF1}과 같은 CDKI의 발현을 유도하여 세포가 G1세포주기에 머물게 할 것으로 생각되고 있다. p53의 주기능이 세포증식억제 작용이며 또한 약 50%의 악성종양에서 p53유전자의 변이가 관찰되는 것으로 보아 p53에 의해 발현이 유도되는 유전자의 이상 또한 암발생과 상당한 관계가 있을 것이다^{19, 25}. 그런데 최근 p21^{WAF1}의 발현이 p53과 무관하게 일어나는 경우도 있고 또한 p53과 관계없이 분화가 유도될 수도 있다는 보고들이 있다^{12, 20, 22, 40}. 본 실험은 p53돌연변이 세포주인 HL60세포주를 과립구 및 단핵구로 분화유도하면서 p53과 무관하게 p21^{WAF1}의 발현이 이루어지는지, 그리고 분화정도에 따른 p21^{WAF1} 및 각종 cyclin유전자들의 발현에 어떠한 변화가 있는지를 조사하여 세포분화에 있어서 세포주기조절인자들의 분자생물학적 기능을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 세포분화유도

한국세포주 은행에서 분주받은 사람 전골수성 백혈병 세포주 (HL60세포주)를 본 실험에 사용하였다. 세포배양은 10% fetal bovine serum, glutamine 및 HEPES가 함유된 RPMI1640배양액을 이용하여 5% CO₂ 및 섭씨 36도하에서 배양하면서 실험하였다. 계대배양시 trypan blue dye exclusion방법으로 세포생존율을 산정하여 생존 세포수가 6 × 10⁵/ml 되도록 하여 배양하면서 분화유도 하였다^{1, 44}. HL60세포주의 분화유도물질로 알려진 DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma Chemical Co, USA) 및 TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, Sigma Chemical Co, USA)를 각각 1.25% 및 32 nM 농도로 사용하여 분화를 유도하였다. TPA로 분화 유도하는 경우에는 1% Nobel agar (Difco Co)를 바닥에 얇게 부어 말린 세포배양용 flask를 이용하였다.

2. 분화능 측정

상기의 분화유도 물질에 의한 분화정도를 측정하기 위하여 분화유도 전 및 유도후의 세포를 Wright stain을 하여 관찰하였으며, NBT (nitro blue tetrazolium, Sigma Chemical Co, USA) reduction assay⁴⁶⁾ 및 non-specific esterase산생 정도를 측정하였다⁴¹⁾. NBT reduction assay는 세포 배양액 (1×10^6) 0.1ml를 취하여 원침한 다음 0.1ml의 NBT/TPA stock solution으로 부유하여 섭씨 37도에서 20분간 둔 다음 cytospin (Shandon Scientific Limited, USA)을 이용하여 cytospin slide에 부착시킨 후 0.5% safranin O로 대조염색하여 현미경 하에서 관찰하였다. Non-specific esterase산생 정도는 Sigma Chemical회사의 kit를 이용하여 측정하였다. 아울러 TPA를 이용하여 분화유도하는 경우에는 세포의 세포배양용 flask부착능도 함께 관찰하였다⁴⁴⁾.

3. RNA 분리

Chomczynski 등¹⁰⁾의 방법을 다소 수정하여 RNA를 분리하였다. 세포를 guanidium-thiocyanate (GT) buffer (4M guanidium thiocyanate, 25mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol, 0.33% antifoam A emulsion (Sigma Chemicals), pH 7.0)로 용해시킨 다음 water-saturated phenol-chloroform-isoamylalcohol mixture (24: 24: 1, V: V: V)과 2M 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 재 원침한 후 70% ethanol로 세척하고 SpeedVac (Savant Instrument Inc)을 이용하여 말린 후 DEPC (diethylpyrocarbonate)-treated water에 녹여 spectrometer로 260nm에서 RNA농도를 측정하고 영하 20도에서 보관하면서 2주일 이내에 사용하였다.

4. 역전사중합효소연쇄반응을 이용한 mRNA의 정량적 분석

1) 역전사 중합효소를 이용한 cDNA합성

분리된 RNA 2 μ g을 oligo-dT (16mer)를 사용하여 40 μ l 용량으로 역전사 (reverse transcription, RT)를 시행하였다. 반응혼합액의 조성은 RNA

2 μ g, 5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1mM dATP, 1mM dTTP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 1 U/ μ l RNase inhibitor (Perkin-Elmer Corporation), 2.5 U/ μ l MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer Corporation), 2.5 μ M oligo-dT로, 반응 조건은 42도에서 1시간, 99도에서 5분, 그리고 5도에서 5분으로 하였다.

2) mRNA의 정량적 분석을 위한 중합효소연쇄반응

중합효소연쇄반응 (PCR)은 5 μ l의 10X reaction buffer (15mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl)와 10mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 0.25 μ Ci의 α -³²P dCTP 그리고 20mM sense 및 antisense primer를 각각 1 μ l를 넣은 mixture에 0.5 μ l의 반응시킨 cDNA reaction mixture와 2.5 unit의 Taq polymerase (Perkin Elmer corporation)를 넣은 후 증류수로 50 μ l로 용량을 맞추고 30 μ l의 mineral oil을 증충한 다음 DNA thermal cycler (Perkin Elmer corporation)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 본 실험에 사용한 GAPDH의 primer염기서열은 5'CGTCTTCACCACCATGGAGA3' 및 5'CGGCCATCACGCCACAGTTT3'이며 p21^{WAF1}의 염기서열은 5'CGGGATCCGGCGCCATGTCAGAACCGGC3' 및 5'CGGGAATTCGTGGGCGGAT-TAGGGCTTCC3'로 합성정제하여 사용하였다. PCR조건은 95도에서 30초, 60도에서 30초, 72도에서 30초로 하였으며, GAPDH 유전자 증폭을 위해서는 24 cycle 그리고 p21^{WAF1} 유전자 증폭을 위해서는 26 cycle을 시행하였다. Cyclin A, B, C, D1 및 E의 primer의 염기서열은 Lucibello 등²⁸⁾에 따라 합성정제하여 사용 하였으며 PCR은 총 25회 실시하였다.

3) 전기영동, autoradiography 및 densitometry analysis

증폭된 PCR 산물 10 μ l를 5% polyacrylamide gel 에 전기영동한 후 x-ray film에 15시간 감광시킨 후 현상하였다. 현상된 film의 band는 GS 365 scanning densitometer (Hoefer Scientific Instruments) 및 gel documentation system (Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 density를 측정하였다. Autoradiography상 나타난 p21^{WAF1}의 density를 각각의 GAPDH의 density로 나누어 relative index (RI)를 구하였다.

5. Western blot 분석

1 × RIPA buffer (10 mM Tris [pH 7.5], 0.2% sodium deoxycholate, 0.2% tritonX-100, 0.2 mM sodium pyrophosphate, 0.2% SDS, 2 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin)를 이용하여 세포로부터 단백질을 분리하였다. 150 µg의 단백질을 7 또는 12.5%의 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동한 다음 Millipore회사제품인 immobilon-P transfer membrane으로 전이하였다 (Sambrook et al., 1989). 그런 후 amidoblack으로 염색하여 size marker를 표시하고 일주야 동안 blotto용액 (5% non-fatty dry milk, 20 mM Tris [pH 7.5], 137 mM NaCl, 0.05% tween 20)에 둔 다음 Pharmingen회사의 p21^{WAF1} polyclonal Ab와 2시간 동안 반응시킨 후 peroxidase-linked secondary Ab와 1시간 반응시킨 다음 Amersham회사의 Enhanced chemiluminescence kit를 이용하여 검출하였다.

결 과

HL60세포의 분화에 따른 p21^{WAF1}유전자의 발현 유무를 알아보기 위하여 TPA처리후 2, 6, 및 12시간 후에 RNA를 분리하여 RT-PCR을 시행한 결과 대조군에서는 p21의 발현을 볼 수 없었으나 TPA처리군에서는 p21^{WAF1}의 발현을 볼 수 있었다. HL-60세포주와 같이 p53유전자의 돌연변이가 있는 K562세포주에서도 TPA처리후에

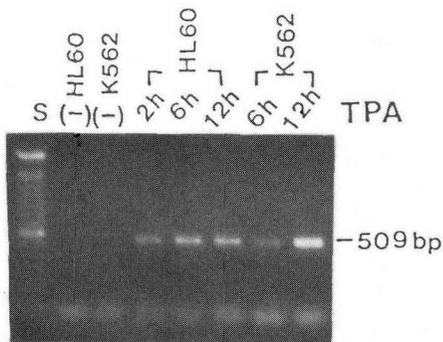


Fig. 1. Effects of TPA on p21^{WAF1} gene expression in HL60 and K562 cells. Cells were treated with TPA for the indicated times. Total RNA(1 µg) was reverse transcribed into cDNA by using oligo-dT (16 mer). PCR was carried out 35 cycles. S represents molecular size marker.

p21^{WAF1} 유전자의 발현이 증가됨을 볼 수 있어 p21^{WAF1} 유전자의 발현이 p53 유전자와는 독립적으로 발현이 이루어짐을 알 수 있었다 (Fig 1). RT-PCR을 이용한 p21^{WAF1} 유전자 발현의 정량적 분석을 위해 PCR의 적정 cycle 수 및 적정 RNA 농도를 알아보기 위하여 TPA 처리 6시간째의 HL60 세포주의 RNA를 분리하여 oligo-dT (16mer)로 역전사시킨 후 PCR의 cycle 수 그리고 total RNA량을 달리하여 PCR을 실시하였다. 적절한 PCR cycle 수를 결정하기 위하여 total RNA량을 50ng으로 하여 18 - 32 cycle의 PCR을 실시한 결과 (Fig. 2), p21^{WAF1}은 24 - 28 cycle 그리고 GAPDH는 20 - 28 cycle 사이에서 적절한 증폭비를 보여

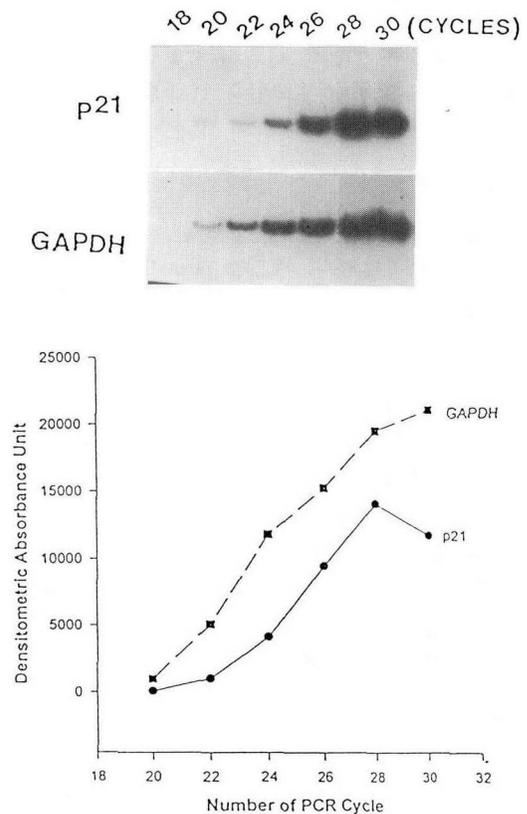


Fig. 2. Correlation between the number of PCR cycles and p21^{WAF1} and GAPDH mRNA levels in TPA-induced HL60 cells. HL60 cells were induced by TPA for 6 hrs. Total RNA (50ng) was reverse transcribed into cDNA by using oligo-dT (16 mer). The PCR cycles examined were from 20 to 30. PCR products were electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and then the gel was subjected to drying and autoradiographed. The levels of amplification were correlated by densitometry.

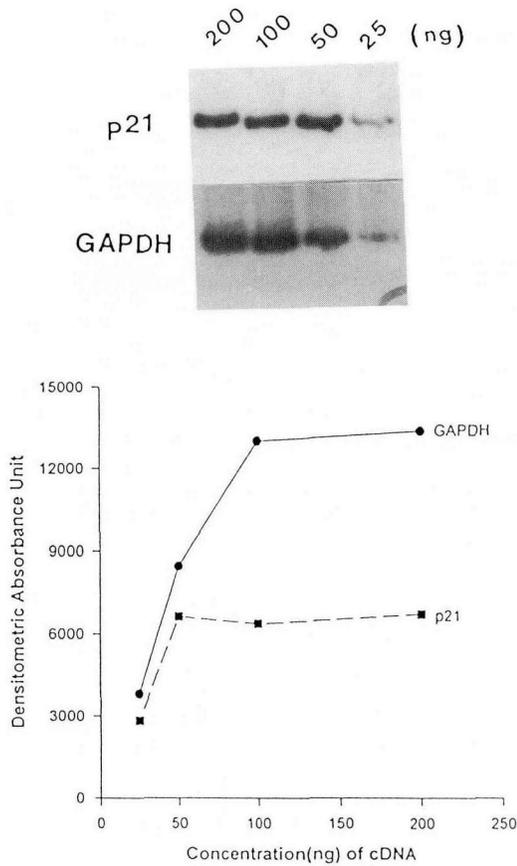


Fig. 3. Correlation between the amounts of total RNAs and the amplified p21^{WAF1} and GAPDH cDNAs. Total RNA was extracted from TPA-treated (6 hrs) HL60 cells and reverse transcribed using 200, 100, 50, and 25ng of RNA. The resulting cDNAs were further amplified by PCR (24 cycles for GAPDH and 26 cycles for p21). PCR products were electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and then the gel was subjected to drying and autoradiographed. The levels of amplification were correlated by densitometry.

GAPDH는 24 cycle 그리고 p21^{WAF1}은 26 cycle로 하여 HL60세포주 분화에 따른 p21^{WAF1} mRNA의 발현 정도를 알아 보았다. 본실험에 사용한 RNA량 (50ng)은 Fig. 3에 따라 결정하였다. Fig. 4는 HL60 세포주를 TPA로 분화 유도한후 RNA를 분리하여 상기에서 제시한 RNA량 (50ng)을 이용하여 oligo-dT로 역전사후에 26 cycle로 PCR을 실시한 결과이다. TPA를 처리하지 않은 세포주에서는 p21^{WAF1} mRNA의 발현이 아주 미미하였으나 TPA를 처리한 군에서는 처리시간이 경과함에 따라, 즉 TPA에 의해 분화가 유도된 세포가 증가

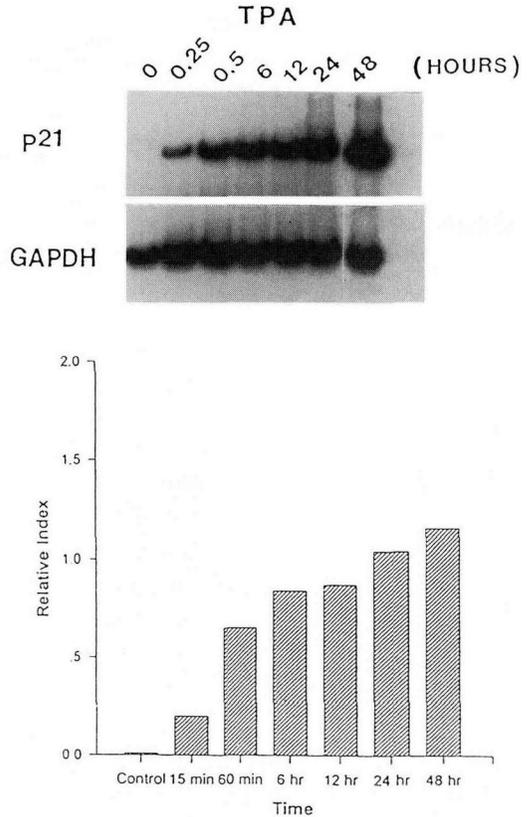


Fig. 4. Increased p21^{WAF1} mRNA expression in TPA-treated HL60 cells. HL60 cells were treated with TPA for the indicated times. Total RNA (50ng) was reverse transcribed into cDNA by using oligo-dT (16 mer). PCR was carried out 24 cycles for GAPDH and 26 cycles for p21^{WAF1}. PCR products were electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and then the gel was subjected to drying and autoradiographed. The levels of amplification were correlated by densitometry. Relative Index is defined arbitrarily the ratio of the densities p21^{WAF1}/GAPDH.

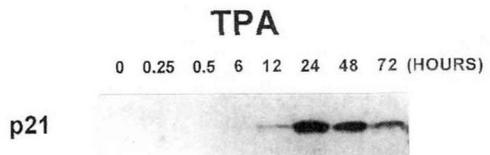


Fig. 5. Expression of p21^{WAF1} protein in TPA-treated HL60 cells. One hundred microgram quantities of total protein were electrophoresed through a denaturing 15% polyacrylamide gel and electroblotted onto immobilon-P transfer membrane. The membrane was incubated with anti-p21^{WAF1} antibody and then incubated with appropriate secondary antibody, the binding of which was detected by enhanced chemiluminescence.

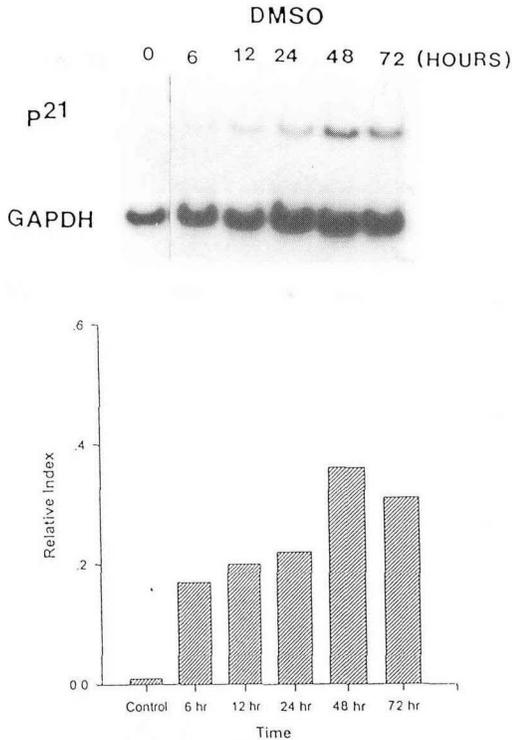


Fig. 6. Increased p21^{WAF1} mRNA expression in DMSO-treated HL60 cells. HL60 cells were treated with DMSO for the indicated times. Total RNA (50ng) was reverse transcribed into cDNA by using oligo-dT (16 mer). PCR was carried out 24 cycles for GAPDH and 26 cycles for p21^{WAF1}. PCR products were electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and then the gel was subjected to drying and autoradiographed. The levels of amplification were correlated by densitometry. Relative Index is defined arbitrarily the ratio of the densities p21^{WAF1}/GAPDH.

함에 따라 p21^{WAF1} mRNA의 발현이 증가됨을 알 수 있었다. 특히 TPA처리 후 48시간째 발현이 가장 높아 p21^{WAF1}의 단백질발현과 비교한 결과 TPA처리 후 6시간째부터 p21^{WAF1} 단백질의 발현이 유도되었으며 24시간째 가장 높은 발현을 보여 p21^{WAF1} mRNA 발현과 단백질발현에는 약간의 시간차이를 나타내었다. Fig. 6는 DMSO로 분화 유도한 후의 RT-PCR의 결과인데 DMSO처리후 6시간에서 48시간 사이에서는 p21^{WAF1} mRNA의 발현이 증가하는 추세를 보였으나 72시간 처리군에서는 48시간 처리군에 비해 다소 발현이 감소하였다. Fig. 7은 TPA, cycloheximide (CHX), 및 actinomycin D (ACT)를 단독 또는 병합하여 6시간 처리한 후 RT-PCR한 결과인데 TPA단독 및

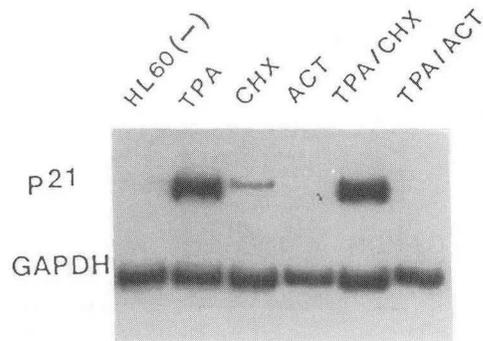


Fig. 7. Effects of cycloheximide (CHX) and actinomycin D (ACT) on p21^{WAF1} mRNA levels in HL60 cells. Cells were treated with TPA in the absence or presence of 5μg/ml CHX and 5μg/ml ACT. The PCR products were resolved on 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. S represents molecular size marker.

TPA/CHX병합 처리군에서 p21^{WAF1} mRNA의 발현은 대조군에 비해 증가되었으나 ACT단독 및 ACT/TPA병합 처리군에서는 p21^{WAF1} mRNA의 발현을 거의 볼 수 없었다. Cyclin A, B, C, D1 및 E의 발현을 살펴보면 cyclin A, B, C 및 E는 TPA 처리 처리시간이 길수록 발현이 감소하는 양상을 보였으며 cyclin D1의 발현은 증가하는 양상을 보였다 (Fig. 8).

고 찰

본 연구에 사용한 primer가 정확히 GAPDH, p21^{WAF1} 및 cyclin (A, B, C, D1 및 E) mRNA를 증폭할 수 있는지를 알아보기 위하여 HL60세포 및 TPA로 6시간 분화 유도한 HL60세포로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시한 후 pGEM-T vector (Promega Co.)로 cloning을 하였다. 이 plasmid를 분리하여 염기서열을 분석한 후 GeneBank 프로그램 (Hitachi Co.)을 이용하여 homology분석을 실시한 결과 염기서열이 동일하여 본 실험에 사용한 primer를 이용하면 정확한 GAPDH, p21^{WAF1} 및 cyclin mRNA를 증폭할 수 있음을 확인하였다.

진핵세포에 있어서 G1, S, G2 및 M 세포주기를 통한 증식에 대한 기전은 많은 부분이 알려져 있으나 세포가 세포주기를 벗어나 일생동안 비증식 상태를 유지하는 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다. 세포주기의 조절은 CDK로 알려져 있는

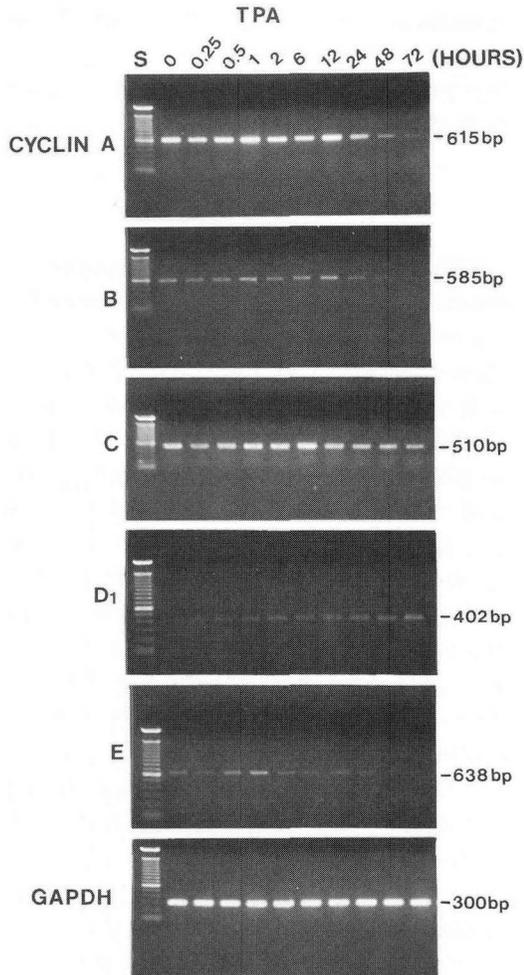


Fig. 8. Effects of TPA on cyclin A, B, C, D1, and E gene expression in HL60 cells. Cell were treated with TPA for the idicated times. Total RNAs (50ng) was reverse transcribed into cDNA by using oligo-dT (16 mer). PCR was carried out 26 cycles for cyclin genes and 24 cycles for GAPDH. The PCR products were resolved on 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. S represents molecular size marker.

효소의 활성화에 의해 이루어지는데^{17, 18, 29, 32}, 만약 G1세포주기에 관여하는 CDK가 활성화되면 세포는 S 세포주기로 이행되고 증식하게 되며, 반대로 CDK가 비활성화되면 세포는 더 이상 분열하지 않고 G1 또는 G0세포주기에 머물게 된다. 최근에 CDK의 활성을 조절하는 CDK Inhibitor (CKI)들이 발견되어 세포가 내외부의 신호에 반응하여 어떻게 증식이 조절되는지에 대한 새로운 이해를 도출하게 되었다. 진핵세포는 크게

두 종류의 CKI를 가지는데, 이중 하나는 p21^{WAF1} family로서 p21^{WAF1}, p27⁴² 및 p57 등²⁴)이 알려져 있으며, 다른 하나는 INK4 (Inhibitor of CDK4) family로서 p15, p16, p18 및 p19 등이 알려져 있다.^{8, 21, 37}. 이들 중 p21^{WAF1}은 세포의 DNA손상시 p53유전자에 의해 전사가 유도되어 CDK를 억제함으로써 세포를 G1 세포주기에 머물게 하는데 관여한다고 알려져 왔지만 최근에 p21^{WAF1}유전자는 p53과 무관하게 발현될수도 있음이 보고되고 있는데^{20, 22, 38, 40}, 본연구에서도 p53유전자에 돌연변이가 있는 HL-60 및 K562세포에서 p21^{WAF1}의 발현이 유도되는 것으로 보아 (Fig. 1) p21^{WAF1}유전자 발현의 조절에는 p53유전자 이외에도 어떤 다른 경로가 있다고 생각된다. 그리고 HL60세포주의 분화에 따른 p21^{WAF1} 및 각종 cyclin유전자들의 발현 정도를 알아보하고자 RT-PCR을 실시하였다. RT-PCR을 이용한 mRNA의 정량을 위한 여러 가지 방법이 고안되어 있으나 정량적 분석에는 아직도 많은 문제점이 있다고 알려져 있다^{11, 16, 35, 41, 43, 47}. 특히 PCR의 cycle수가 증가됨에 따라 PCR산물의 양은 cycle에 따라 비례하여 증가하지만 한계가 있다. 그래서 본 연구에서는 p21^{WAF1}유전자의 발현 정도를 RT-PCR방법으로 반정량적으로 측정하기 위하여 먼저 RNA농도에 따른 PCR의 cycle수와 PCR산물과의 관계를 알아보았다. 25ng에서 200ng의 분리한 total RNA를 oligo-dT로 역전사 시킨 후 PCR을 실시한 결과 (Fig. 2 및 3), RNA농도는 GAPDH의 경우에는는 25~100ng사이에서 그리고 p21^{WAF1}의 경우에는는 25~50ng사이에서 적절한 증가의 비를 보였다. 그리고 PCR의 cycle수는 GAPDH의 경우에는는 20 - 28 cycle, 그리고 p21^{WAF1}의 경우에는는 24 - 28 cycle에서 적절한 증가의 비를 보여, 본 연구에서는 RNA량을 50ng으로 하여 GAPDH는 24 그리고 p21^{WAF1}은 26 cycle로 하여 PCR을 실시하였다. 그리고 cyclin 유전자의 발현은 Lucibello 등²⁸)이 제시한 방법에 따라 실험하였다.

TPA 및 DMSO를 처리한 경우 처리시간이 길수록 p21^{WAF1}의 발현이 증가되는 경향을 보여 p21^{WAF1}의 발현은 세포분화와 상당히 밀접한 관계가 있다고 사료되며 TPA 및 DMSO가 p21^{WAF1}의 발현을 직접 유도하는지, 혹은 분화에 따른 발현의 증가인지에 대해서 연구할 필요가 있다. p21^{WAF1}의 발현이 p53과 무관하게 유도된 원인으로는 TPA가 protein kinase C (PKC)를 활성화하

고, 활성화된 PKC가 미지의 신호전달체계를 자극하여, 그 결과 p21^{WAF1}의 발현이 증가되었을 것으로 생각된다. TPA를 이용하여 단핵구로 분화 유도한 경우 TPA처리 후 15분부터 발현이 유도되었으며 (Fig. 4), TPA/CHX처리 군에서도 발현이 증가되는 것으로 보아 TPA처리에 따른 p21^{WAF1}의 발현의 증가는 새로운 단백질 합성을 요구하지 않는 조기반응 유전자로 생각된다. 그러므로 HL60세포에 있어서 TPA처리에 따른 p21^{WAF1}의 발현증가는 전사수준 (transcriptional level)에서의 조절이 중요하다고 사료된다. 그리고 CHX단독 처리군에서는 p21^{WAF1}의 발현이 미약하지만 증가가 관찰 (Fig. 6)되어 CHX가 p21^{WAF1}의 발현을 superinduction하는 것으로 사료된다. 이와 더불어 ACT 및 TPA/ACT처리군에서는 발현이 유도되지 않은 것으로 보아 TPA처리에 따른 p21^{WAF1}의 발현의 증가는 mRNA의 안정성의 변화에 따른 것이 아니라고 사료된다.

G1 cyclin으로 알려진 cyclin C, D1 및 E는 CDK2, 4, 또는 6와 함께 pRB를 인산화시켜 pRB의 세포증식억제 기능을 억제하여 G1세포주기의 세포를 S세포주기로 이행하도록 하는데 관여한다³⁹⁾. Matsushime 등³⁰⁾은 colony stimulating factor 1 (CSF-1)를 제거하여 세포를 G1세포주기 초기에 정지시킨 경우에는 cyclin D1의 발현이 감소되어 있으나 CSF-1을 첨가하면 G1에서 S세포주기로 이행되기 직전에 발현의 증가가 관찰되었음을 보고하였고, 또한 Lew 등²⁶⁾에 따르면 cyclin E도 G1세포주기 후반에 발현이 증가되는 것으로 보아 TPA에 의해 분화 유도된 HL60세포주에서는 G1 cyclin의 발현이 감소될 것으로 생각할 수 있다. 본 연구에서는 cyclin A, B, C 및 E는 TPA처리 후 다소 증가하다가 24시간째부터 감소하는 양상을 보인 반면에 cyclin D1은 계속 증가하는 추세를 보였다 (Fig. 6). 세포 분화시 cyclin C의 변화에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않아 앞으로 연구가 진행되어야 할 부분으로 생각된다. S세포주기와 M세포주기로의 이행에 관련하는 cyclin A와 B의 감소는 예상할 수 있으나 cyclin D1의 발현 증가는 어떤 기전에 의해서 일어났는지 설명하기가 어렵다. 아마도 p21^{WAF1}에 의해 cyclin D1-CDK2의 기능이 억제되어 이에 대한 보상작용으로 cyclin D1이 증가되었다고 생각된다. 그리고 Akiyama 등²⁾도 TPA를 처리한 HL60세포에서 cyclin D1의 발현 증가를 보고하

여 cyclin D1 mRNA의 발현 증가가 세포증식에 반드시 필요한 것은 아닐 것으로 보고한바 있어, 세포분화와 cyclin D1과의 관계는 앞으로 밝혀져야 할 부분이 많을 것으로 생각된다.

결 론

세포주기의 조절은 CDK (cyclin dependent kinase)로 알려져 있는 효소의 활성화에 의해 이루어지는데, 최근 CDK의 활성을 조절하는 CDKI (CDK inhibitor)들의 발견은 세포가 내 외부의 신호에 반응하여 어떻게 증식이 조절되는지에 대한 새로운 이해를 도출하게 되었다. 이들 CDKI 중 p21^{WAF1}은 세포의 DNA손상시 p53유전자에 의해 전사가 유도되어 CDK를 억제함으로써 세포를 G1 세포주기에 머물게 하는 것으로 알려져 왔지만, 최근에 p21^{WAF1}유전자의 발현이 p53과 무관하게 발현될 수도 있음이 보고되고 있다. 본 연구는 p53돌연변이 세포주인 HL60세포주를 과립구 및 단핵구로 분화 유도하면서 p21^{WAF1}의 발현이 어떻게 조절되며, p53과 무관하게 발현이 이루어질 수 있는지, 그리고 분화 정도에 따른 p21^{WAF1} 및 각종 cyclin들의 발현에 어떠한 변화가 있는지를 역전사-중합효소연쇄반응 (RT-PCR)을 이용하여 조사하였다. p53유전자의 돌연변이가 있는 HL60 및 K562세포주에 TPA (phorbol 12-myristate 13-acetate)를 처리하여 세포분화를 유도한 결과 대조군에서는 p21^{WAF1}의 발현을 볼 수 없었으나 TPA처리군에서는 p21^{WAF1}의 발현을 볼 수 있었다. 분화 정도에 따른 p21^{WAF1}유전자 발현의 정도는 TPA 및 DMSO를 처리한 군에서는 처리시간이 경과함에 따라 p21^{WAF1}의 발현이 증가되어 p21^{WAF1}유전자의 발현은 p53유전자와 독립적으로도 발현이 이루어질 수 있음을 알 수 있었으며, p21^{WAF1}의 발현은 분화와 밀접한 관계가 있다고 사료되었다. TPA처리 후 15분부터 p21^{WAF1}의 발현이 유도되었고 TPA/CHX (cycloheximide)처리군에서는 발현이 증가되는 것으로 보아 TPA처리에 따른 p21^{WAF1}의 발현의 증가는 새로운 단백질 합성을 요구하지 않는 조기반응 유전자로 생각된다. 또한 actinomycin D (ACT) 및 TPA/ACT처리군에서는 p21^{WAF1}의 발현이 유도되지 않은 것으로 보아 TPA처리에 따른 p21^{WAF1}의 발현의 증가는 p21^{WAF1} mRNA의 안정성의 변화에 따른 것이 아니라고 사료된다. 그러므로 HL60세

포에 있어서 TPA처리에 따른 p21의 발현증가는 전사수준에서의 조절이 중요하다고 사료된다. Cyclin A, B, C, 및 E는 분화유도처리 시간이 길수록 발현이 감소하는 양상을 보였으나, cyclin D1은 발현이 증가하는 양상을 보였다. 특히 TPA에 의해 분화 유도된 HL60세포주에서는 증식에 관련되는 cyclin들의 발현이 감소될 것으로 생각할 수 있으므로 cyclin D1의 발현 증가는 세포 증식에 반드시 필요한 것은 아닐 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 서성일, 김종욱, 백원기, 박종욱, 최병길, 서민호 : HL-60세포의 분화에 따른 c-myc, c-Ha-ras, c-raf1 및 c-mos 암유전자의 발현. 대한암학회지 **27**: 292-302, 1995.
- 2) Akiyama N, Sasaki H, Katoh O, Sato T, Hirai H, Yazaki Y, Sugimura T and Terada M : Increment of the cyclin D1 mRNA level in TPA-treated three human myeloid leukemia cell lines: HEL, CMK and HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **195**: 1041-1049, 1993.
- 3) Antoun GR, Re GG, Terry NH and Zipf TF: Molecular genetic evidence for differentiation-proliferation coupling transcription elongation block in the c-myc gene. *Leuk Res* **15**: 1029-1036, 1991.
- 4) Barak Y, Juven T, Haffner R and Oren M: mdm-2 expression is induced by wild-type p53 activity. *EMBO J* **12**: 461-468, 1993.
- 5) Barker KA and Newburger PE: Relationships between the cell cycle and the expression of c-myc and transferrin receptor genes during induced myeloid differentiation. *Exp Cell Res* **186**: 1-5, 1990.
- 6) Bates S and Vousden KH: p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 12-18, 1996.
- 7) Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR and Kley N: Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* **377**: 646-649, 1995.
- 8) Chan FK, Zhang J, Cheng L, Shapiro DN and Winoto A: Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16^{ink4}. *Mol Cell Biol* **15**: 2682-2688, 1995.
- 9) Chen P-L, Scully P, Shew J-Y, Wang JYJ and Lee W-H: Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* **58**: 1193-1198, 1989.
- 10) Chomczynski P and Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159, 1987.
- 11) Deng G, Yu M and Smith HS, 1993. An improved method of competitive PCR for quantitation of gene copy number. *Nucleic Acids Res* **21**: 4848-4849.
- 12) Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS and Bradley A: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* **356**: 215-221, 1992.
- 13) El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW and Vogelstein B: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* **54**: 1169-1174, 1994.
- 14) El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW and Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817-825, 1993.
- 15) Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean F, Pan Z-Q, Harper JW, Elledge SJ, O'Donnell M and Hurwitz J: Cdk-interacting protein 1 directly binds with PCNA and inhibits replication catalyzed by the DNA polymerase δ holoenzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8655-8659, 1994.
- 16) Gilliland G, Perrin S, Blanchard K and Bunn HF: Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2725-2729, 1990.
- 17) Haffner R and Oren M: Biochemical properties

- and biological effects of p53. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 84-90, 1995.
- 18) Harper JW and Elledge SJ: Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 56-64, 1996.
 - 19) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* **253**: 49-53, 1991.
 - 20) Jiang H, Lin J, Su Z-Z, Collart FR, Huberman E and Fisher PB: Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* **9**: 3397-3406, 1994.
 - 21) Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA and Sherr C: Novel INK4 proteins, p19 and 18, are specific inhibitors of the cyclin dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Mol Cell Biol* **15**: 2672-2681, 1995.
 - 22) Johnson M, Dimitrov D, Vojta PJ, Barrett JC, Noda A, Pereira-Smith OM and Smith JR: Evidence for a p53-independent pathway for up-regulation of SDI1/CIP1/WAF1/p21 RNA in human cells. *Mol Carcinog* **11**: 59-64, 1994.
 - 23) Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh VW, Plunkett BS, Vogelstein B and Fornace AJ: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasis. *Cell* **71**: 587-597, 1992.
 - 24) Lee M-H, Reynisdottir I and Massague J: Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genet Dev* **9**: 639-646, 1995.
 - 25) Levine AJ, Momand J and Finlay CA: The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**: 453-456, 1991.
 - 26) Lew DJ, Dulic V and Reed SI: Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* **66**: 1197-1206, 1991.
 - 27) Li Y, Jenkins CW, Nichols MA and Xiong Y: Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**: 2261-2268, 1994.
 - 28) Lucibello FC, Sewing A, Brusselbach S, Burger C and Muller R: Deregulation of cyclin D1 and E and suppression of cdk2 and cdk4 in senescent human fibroblasts. *J Cell Sci* **105**: 123-133, 1993.
 - 29) Massague J and Polyak K: Mammalian antiproliferative signals and their targets. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 91-96, 1995.
 - 30) Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA and Sherr CJ: Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* **65**: 701-713, 1991.
 - 31) Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B and Reed JC: Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and Bax gene expression in vitro and vivo. *Oncogene* **9**: 1799-1805, 1994.
 - 32) Motokura T and Arnold A: Cyclins and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1155**: 63-78, 1993.
 - 33) Noda A, Ning Y, Veneble SF, Pereira-Smith OM and Smith JR: Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* **211**: 90-98, 1994.
 - 34) Okamoto K and Beach D: Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J* **13**: 4816-4822, 1994.
 - 35) Piatak M Jr, Luk K-C, Williams B and Lifson JD: Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques* **14**: 70-80, 1993.
 - 36) Sen S, Takahashi R, Rani S, Freireich EJ and Stass SA: Expression of differentially phosphorylated Rb and mutant p53 proteins in myeloid leukemia cell lines. *Leuk Res* **17**: 639-647, 1993.
 - 37) Serrano M, Hannon GJ and Beach D: A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclinD/CDK4. *Nature* **366**: 704-707, 1993.
 - 38) Sheikh MS, Li X-S, Chen J-C, Shao Z-M, Ordonez JV and Fontana JA: Mechanisms of regulation of WAF1/Cip1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent

- and independent signal transduction pathways. *Oncogene* **9**: 3407-3415, 1994.
- 39) Sherr CJ: Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**: 1059-1065, 1993.
- 40) Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Libermann DA and El-Houseini ME: Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* **9**: 3389-3396, 1994.
- 41) Sugimoto T, Fujita M, Taguchi T and Morita T: Quantitative detection of DNA by coamplification polymerase chain reaction: a wide detectable range controlled by the thermodynamic stability of primer template duplexes. *Anal Biochem* **211**: 170-172, 1993.
- 42) Toyoshima H and Hunter T: p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**: 67-74, 1994.
- 43) Wang AM, Doyle MV and Mark DF: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9717-9721, 1989.
- 44) Walz TM, Malm C and Wasteson A: Expression of the transforming growth factor alpha protooncogene in differentiating human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Res* **53**: 191-196, 1993.
- 45) Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R and Beach D: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**: 701-704, 1993.
- 46) Yen A and Guernsey DL: Increased c-myc RNA levels associated with the precommitment state during HL-60 myeloid differentiation. *Cancer Res* **46**: 4156-4161, 1986.
- 47) Yokoi H, Natsuyama S, Iwai M, Noda Y, Mori T, Mori KJ, Fujita K, Nakayama H and Fujita J: Non-radioisotopic quantitative RT-PCR to detect changes in mRNA levels during early mouse embryo development. *Biochem Biophys Res Commun* **195**: 769-775, 1993.
- 48) Zauberman A, Barak Y, Ragimov N, Levy N and Oren M: Sequence-specific DNA binding by p53: identification of target sites and lack of binding to p53-MDM2 complexes. *EMBO J* **12**: 2799-2808, 1993.
-