creative commons

COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000236531

2008年 8月
博士學位 論文

국내자생 피조개의 암세포 분화유도 및 면역조절 기능 연구

朝鮮大學校 大學院

藥 學 科

朴 來 洙

국내자생 피조개의 암세포 분화유도 및 면역조절 기능 연구

Induction of cancer cell differentiation and immune modulation effect of Korean Blood shell, *Scapharca broughtonii*

2008年 8月 25日

朝鮮大學校 大學院

藥 學 科

朴 來 洙

국내자생 피조개의 암세포 분화유도 및 면역조절 기능 연구

指導敎授　柳　鎭　鐵

이 論文을 藥學 博士學位申請 論文으로 提出함

2008年　4月　18日

朝鮮大學校 大學院

藥 學 科

朴　來　洙

朴來洙의 博士學位論文을 認准함

委員長　高麗大學校 敎授　金 泰 成　印

委員　　朝鮮大學校 敎授　金 成 俊　印

委員　　朝鮮大學校 敎授　高 玉 鉉　印

委員　　朝鮮大學校 敎授　白 采 善　印

委員　　朝鮮大學校 敎授　柳 鎭 鐵　印

2008年　6月 20日

朝鮮大學校 大學院

목차

도목차
표목차
약어표
ABSTRACT

Ⅰ. 서론 ---------- 1

Ⅱ. 문헌연구 ---------- 3

1. 피조개 ---------- 3
2. 악성종양 및 백혈병 ---------- 5
1) 악성종양 ---------- 5
2) 백혈병의 정의 및 분류 ---------- 6
3) 치료에 대한 연구 ---------- 8
4) HL-60 cell ---------- 9
5) 1,25-dihydroxyvitamin D_3 ---------- 10
6) All-*trans* retinoic acid ---------- 11
3. 면역조절 ---------- 18
1) 면역계 ---------- 18
2) Interleukin-12---------- 20
3) Nitric oxide ---------- 22
4) NF-κB ---------- 23

Ⅲ. 재료 및 방법 ---------- 32

1. 피조개의 alcohol 분획 준비 ---------- 32
2. 세포배양과 시약 ---------- 32

3. 세포의 생존력과 증식의 판정 ---------- 33
4. 분화유도의 준비 ---------- 33
5. 세포분화의 판정 ---------- 34
1) 형태학적 연구 ---------- 34
2) NBT분석법을 이용한 분화된 HL-60 세포의 비율측정 ---------- 34
3) 세포형광분석법을 이용한 세포표면 항원 발현여부 확인 ---------- 35
6. Nitric oxide의 측정 ---------- 35
7. IL-12 p40 promoter 구조와 일시적인 유전자이입 ---------- 36
8. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ---------- 36
9. 역전사-중합효소 연쇄반응 ---------- 37
10. NF-κB binding activity 측정 ---------- 38
11. 통계처리 ---------- 39

Ⅳ. 결과 및 고찰 ---------- 41

1. 피조개의 ethanol 분획이 세포의 증식에 미치는 영향 ---------- 41
2. 피조개의 ethanol 분획이 HL-60 cell의 분화와 증식에 미치는 영향 ---------- 41
3. 피조개의 ethanol 분획이 1,25-dihydroxyvitamin D_3와
all-*trans* retinoic acid로 유도된 HL-60 cell의 분화에 미치는 영향 -------- 42
4. 피조개의 ethanol 분획이 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포의 NO 생성에
미치는 영향 ---------- 49
5. 피조개의 ethanol 분획이 LPS에 의해 자극된 mouse의 macrophage에 의한
IL-12의 생산에 미치는 영향---------- 49

Ⅴ. 결론 ---------- 55

Ⅵ. 참고문헌 ---------- 56

Ⅶ. Publications ---------- 80

도목차

Fig. 1 Molecular pathogenesis of APL ---------- 13

Fig. 2 Differentiation induction
in HL-60 human promyelocytic leukemia cells cultured *in vitro* -------- 14

Fig. 3 Chemical structures of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and all-*trans* retinoic
acid ---------- 15

Fig. 4 Multiple pathways involved in 1,25-dihydroxyvitamin D_3 induced
differentiation of HL-60 cells ---------- 16

Fig. 5 Multiple pathways involved in all-*trans* retinoic acid induced
differentiation of HL-60 cells ---------- 17

Fig. 6 Schematic diagram of IL-12 and proximal nucleotide sequences of IL-12
p40 promoter ---------- 26

Fig. 7 IL-12 production and IL-12 receptor expression ---------- 27

Fig. 8 Multiple pathways involved in the modulation of IL-12 production ----- 28

Fig. 9 Biological functions of IL-12 in immune system ---------- 29

Fig. 10 Overview of Th cell differentiation ---------- 30

Fig. 11 Activation of NF-κB by the TNF-α pathway ---------- 31

Fig. 12 Sample preparation by purification of blood shell(SIII) extract ----- 40

Fig. 13 Effects of the ethanol fraction of blood shell(SIII) on HL-60 cell differentiation and celluar proliferation ---------- 45

Fig. 14 Morphologic analysis of HL-60 cells treated with the ethanol fraction of blood shell(SIII) alone or in combination with 1,25-$(OH)_2D_3$ or all-*trans* retinoic acid ---------- 47

Fig. 15 The ethanol fraction of blood shell(SIII)-mediated HL-60 cell differentiation as determined by cytofluorometric analysis using mAb for differentiation marker CD11b ---------- 48

Fig. 16 Inhibition of IL-12 expression in LPS-activated monocytic RAW 264.7 cell-line by the ethanol fraction of blood shell(SIII) ---------- 52

Fig. 17 Analysis of ethanol fraction of blood shell(SIII)-mediated transcriptional repression of IL-12 p40 promoter constructs activated by lipopolysaccharide ---------- 53

Fig. 18 Ethanol fraction of blood shell(SIII)-mediated inhibition of NF-kB binding by NF-kB ---------- 54

표목차

Table 1. The FAB Classification of Acute Myelogenous Leukemia ---------- 12

Table 2. Cytokine and receptor(IL-12) ---------- 25

Table 3. Effects of the ethanol fraction of blood shell(SIII) on HL-60 cell differentiation ---------- 46

약어표

AML	Acute myelogenous leukemia
APCs	Antigen presenting cells
APL	Acute promyelocytic leukemia
ACE	Angiotensin-converting enzyme
BRM	Biological response modifier
CAM	Cell adhesion molecule
CLMF	Cytotoxic lymphocyte maturation factor
$1,25(OH)_2D_3$	1,25-dihydroxyvitamin D_3, Vitamin D_3
DIC	Disseminated intravascular coagulation
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl-sulfoxide
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
FAB	French-American-British
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HDL	High density lipoprotein
Ig	Immunoglobulin
IGFs	Insulin like growth factors
IKK	I-κB kinase
IL	Interleukin
IL-12	Interleukin-12
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MDADS	Multiparameter data acquisition and display system

MPS	Mononuclear phagocytic system
MRD	Minimal residual disease
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium
NBT	Nitroblue tetrazolium reduction
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NK cell	Natural killer cell
NKSF	Natural killer cell stimulatory factor
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
cNOS	Constitutive NOS
eNOS	Endothelial NOS
iNOS	Inducible NOS
nNOS	Neuronal NOS
PA	Plasminogen activator
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
TGFs	Transforming growth factors
Th1	T helper type 1 cell
Th2	T helper type 2 cell
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
VDR	Vitamin D receptor

ABSTRACT

Induction of cancer cell differentiation and immune modulation effect of Korean Blood shell, *Scapharca broughtonii*

Park Nae-Soo
Adviser : YOO Jin-Cheol Ph.D.
Department of Pharmacy,
Graduate School of Chosun University

The effect of alcohol fraction(SIII) prepared from blood shell on cell differentiation was investigated in a HL-60 cell culture system. Treatment of HL-60 cells with 2.5-20 ㎍/㎖ alcohol fraction of blood shell for 72h result in inhibited cell proliferation by the concentration more than 5 ㎍/㎖ and induced increase in cell differentiation.

Interestingly, synergistic induction of HL-60 cell differentiation was observed when the alcohol fraction of blood shell was combined with either 5nM 1,25-$(OH)_2D_3$ or 50nM all-*trans* retinoic acid. Flow cytometric analysis indicated that combinations of 1,25-$(OH)_2D_3$ and alcohol fraction of blood shell stimulated differentiation predominanatly to monocytes whereas combinations all-*trans* retinoic acid and the acetone fraction of bamboo leaf stimulated differentiation predominantly to granulocytes. These results suggest that the alcohol fraction of blood shell enhanced leukemia cell differentiation and suggest a possibility of blood shell in the treatment of leukemia.

Also, We investigated the effects of ethanol fraction prepared from blood shell on the production of IL-12 from mouse macrophages stimulated with lipopolysaccharide(LPS). Pharmacological inhibition of interleukin-12(Il-12) production may allow a therapeutic strategy for preventing development and progression of disease in experimental models of autoimmunity. The alcohol fraction of blood shell potently inhibited the LPS-induced IL-12 production from RAW 264.7 monocytic cell-line in a dose-dependent manner. The effect of the alcohol fraction of blood shell on IL-12 gene promoter activation was analyzed by transfecting RAW 264.7 cells with IL-12 gene promoter/luciferase constructs. The repressive effect mapped to a region in the IL-12 gene promoter containing a binding site for NF-κB. Futhermore, activation of macrophage by LPS resulted in markedly enhanced binding activity to the NF-κB site, which significantly decreased upon addition of the alcohol fraction of blood shell, indicating that the alcohol fraction of blood shell inhibited IL-12 production in LPS-activated macrophages *via* inhibition of NF-κB binding activity.

Ⅰ. 서론

피조개(Blood shell 또는 blood ark shell, *Scapharca broughtonii*)는 경제적으로 중요한 식용 조개류로서 한국의 남부 해안에서 널리 양식되고 있다. 또한, 피조개는 이들의 근육에서 다양한 D-아미노산 및 D-아미노산 유도체의 발견에 기인하여 약리학적 연구에서 주목을 받고 있다. N-메틸-D-글루타메이트(NMDG) 및 N-메틸-L-글루타메이트(NMLG)의 존재가 피조개의 조직에서 입증되었는 바, 이는 N-메틸-D-아스파테이트(NMDA)를 함유하는 것으로 알려져 있다. 이들 화합물은 이미 강력한 포유류에서 운동과다증(hypermotility)을 포함하는 신경흥분작용(neuroexcitatory activity) 및 혈청 황체형성 호르몬의 강력한 방출 작용을 갖는 것으로 알려져 있다. 또한, 산성 오파인류의 하나로서 해양동물에서 유인제 및 동해방지제로서 작용하는 베타-알라노핀이 피조개의 내전근(adductor muscle) 에서 관찰되었다. 최근, 항응고제 단백질이 피조개의 식용부에서 단리되었다. 그러나, 아직까지 피조개의 추출물의 항암효과 또는 면역 질환의 치료에 가능성이 구체적으로 제시된 바는 없다.

본 연구는 피조개 추출물이 갖는 약리학적 기능을 탐색하고자 피조개의 근육부를 유기 용매 및 활성탄을 처리하여 수득한 피조개의 알코올 분획 추출물이 미분화된 전골수구세포를 분화시키고, 대식구 세포에서 비정상적으로 증가된 인터루킨-12(IL-12)의 생산을 감소시킴으로써 피조개 알코올 추출물이 전골수구성(promyelocytic leukemia) 백혈병 및 타입-1 사이토카인 응답에 의해 두드러지는 면역-매개 질환의 치료제로서 사용될 수 있음을 확인하고자 하였다.

생체 외(*in vitro*)에서 세포 분화를 연구하기 위한 탁월한 model system인 인간의 전골수세포성 백혈병 HL-60 cell은 1,25-dihydroxyvitamin D_3 [$1,25(OH)_2D_3$] 혹은 all-*trans* retinoic acid로 각각 처리하였을 때 단핵구(monocyte) 혹은 과립구(granulocyte) 계통(lineage)으로 분화된다(Breitman et al., 1980; Tanaka et al., 1983). $1,25(OH)_2D_3$와 all-*trans* retinoic acid는 HL-60 cell의 내인성인 분화자극제로서(Chen et al., 1991) 널리 사용되어지기 때문에 본 연구에 사용하였으며 all-*trans* retinoic acid는 임상적으로 급성 전골수세포성 백혈병의 치료제로 널리 사용되어 지

고 있다(Orfanos et al., 1987).

Interleukin-12(IL-12)는 2개의 유전자에 의해 암호화된 35(p35)kDa과 40(p40)kDa의 아단위(subunit)가 2개의 이황화결합((disulfide binding)에 의해 구성된 이형복합체 cytokine으로 IL-12의 발현유도는 다양한 미생물뿐만 아니라 그들의 생성물들에 의한 자극에 반응하는 식세포와 항원 제시세포에 의해 설명되고 있다.(Ma & Trinchieri, 2001). IL-12는 T cell과 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)를 통해 다양한 생물학적 활성들을 발휘하는데, 세포독성은 증가시키고 interferon-γ의 생산을 유도하며 세포증식을 촉진한다. IL-12생성은 T helper type 1 cell(Th1 cell)의 발생과 세포매개면역반응의 개시를 위해 매우 중요하다. 최근 type-1 당뇨병, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 감염성 장질환 그리고 급성 graft-*versus*-host와 같은 Th1 매개 자가면역질환의 설치동물 model에서 발병에 있어 IL-12의 주요한 역할이 증명되었다(Adorini, 1999). 따라서 IL-12의 생성을 약리학적으로 조절함은 type-1 cytokine 반응으로 나타나는 특이 면역매개질환을 조절하는 중요한 방법이다.

Ⅱ. 문헌연구

1. 피조개

피조개(*Scapharca broughtonii*)는 우리나라 남해안 및 동해남부 해안에 분포하며 고막류 중 가장 큰 종으로서 각장 12cm에 달한다 (Shimizu, M., et al., 1989 , Heo, H. T., et al., 1986). 고막류는 돌조개목(Arcoida), 돌조개과(Arcidae)에 속하며, 전 세계에 140여종이 알려져 있으나 우리나라에서는 16종이 서식하고 있다(Yoo, S.K. 1979, Kyon, O.K., et al., 2001). 산업적으로 중요한 종으로는 피조개, 새고막 및 고막이 있으며, 이들은 특이하게 혈액 중에 β-carotene등 carotenoid와 호흡색소인 hemoglobin을 함유하고 있어 체액이 붉고 육질은 적색을 띠고 있는 것이 특징이다(Tsuchiya, Y. et al., 1962, Suyama, M. et al., 1987, Shimizu, M., et al.,1989). 피조개는 낮은 농도의 산소조건인 진흙 속에서도 생존할 수 있으며 혈액내에 유핵의 적혈구가 존재하는 해양 무척추 동물로써 (Zhukova, N. V. 1986), 산소공급이 충분하거나 또는 불충분하거나 그 환경 조건에 따라 혈액내의 철분대사 및 헤모글로빈 생합성이 환경에 변화한 것으로 생각된다. 그리하여 혈액내에 철분의 농도도 매우 높은 것으로 조사되었으며(Kim,K.-S. 1990) 피조개는 실제로 철분식품으로 널리 애용되고 있다. 피조개는 1970년대부터 양식기술이 보급되어 1986년도에는 60,351톤을 생산하였으나 그 이후 점점 감소되고 있다(Ministry of Agriculture, 1993, Ministry of Marine Affairs and Fisheries. 2001). 산란기는 6-10월이며 성숙기는 7-8월이고(Heo, H. T., et al.,1986) 맛 좋은 시기는 겨울철에서 봄철로 알려져 있다(Shimizu, et al., 1989, Yamaguchi, et al.,1987). 서식 수심은 3-50M의 연안 개펄이며 패각표면의 융기선인 방사륵수는 42-43줄이다(Heo, H. T.,et al.,1986, Yamaguchi, A., et al., 1987, Nose, Y., et al.,1989, Ryu, J.S. 1995). 피조개는 주로 생식으로서 회, 초밥요리, 식초요리, 샐러드요리 등의 소재로 이용되고 있다(Shimizu, M.,et al.,1989 ,Nose, Y., et al., 1989). 진해만, 통영만, 벌교 등지는 천연어장으로 알려져 있다(Ryu, J.S. 1995). 피조개는 주로 생선회나 초밥등의 날것으로 소비가 되고 있어서 원료상

태에서의 맛과 밀접한 관계가 있는 함질소 엑스성분에 대한 연구가 이루어졌는데 엑스분 질소는 479 mg/100g 이고, 유리 아미노산은 총량으로 1,921 mg/100g 이었으며 그 중 taurine, β-alanine, glutamic acid, alanine이 특히 풍부하게 함유되었고 이는 유리 아미노산 총량의 35.9%를 차지하였다.

ATP관련 화합물 등을 분석한 결과 ATP, ADP, AMP, IMP, inosine 및 Hypoxanthine이 검출되었고 그 총량은 1.99 umol/g 이었다. Betaine류 로서는 glycinebetaine, γ-butyrobetaine, homarine, trigonelline의 4종이 검출되었으며 그 총량은 329 mg/100g 이었다. Creatine 함량은 10 mg/100g 미만으로 미량이었다 (박춘규, 2002).

진해만내 잠도 부근에 서식하는 피조개 모패를 1996년 1월부터 1998년 12월까지 월 1회 채취하여 생식특성과 건강도를 연구한 논문에 의하면 잠도산 피조개 모패의 생식주기는 2월부터 분열증식기가 나타나기 시작하며, 성장기는 3-6월, 성숙기는 5-8월, 산란기는 7-9월에 걸쳐 나타났다. 그리고 퇴화기는 8-11월, 휴지기는 9월에서 다음해 8월까지 관찰되었다. 육질부건조중량 : 패각건조중량의 비는 본격적인 산란이 시작되는 8월과 9월에 조사하였을 때 해가 감에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 피조개 모패의 글리코겐 함량은 연도별 차이는 있었으나 주 산란기인 8월과 9월에 낮은 값을 나타내었으며, 헤모글로빈 함량은 성숙기 및 산란기인 6-8월에 비교적 낮은 경향을 나타내었다. 피조개 육질부의 일반 체성분은 생식소가 발달하기 시작하는 2월부터 단백질 및 지방함량이 증가하기 시작하여 주 산란기인 8월을 기점으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 먹이 부족 시기 및 산란기에 증가하는 것으로 알려진 지방함량은 성숙기 및 산란기인 6-8월에 각각 13.13, 13.27, 14,23%로 높게 나타났다. 그리고 탄수화물 함량은 주 산란기인 8월에 6.08%로 가장 낮았다 (박미선. et al., 진해잠도산 피조개, *Scapharca broughtonii* 모패의 생식 특성과 건강도,).

한국산과 중국산 피조개를 대상으로 형태적 차이와 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 기법을 이용한 유전적 차이점을 비교 연구한 결과 한국산과 중국산 피조개간의 유전적 유사도는 0.29로 매우 낮아 두 집단 간의 유전적 구별이 명확하게 나타났다 (이정미.et al., 1997).

2. 악성종양 및 백혈병

1) 악성종양

종양이란 비정상적인 과잉발육으로 체내의 각 부위에 확산되고 침윤되어 정상 조직을 파괴하는 질환으로 이중에서 악성종양을 흔히 암이라 일컫는다(서울대학교의과대학, 1993; 예방의학과 공중보건편집위원회, 1987). 현재 한국인의 질병 중에서 사망원인으로 순환기질환에 이어 2위를 차지하고 있다(통계청, 1995). 따라서 현대의 암은 우리 인류가 극복해야할 난치병중의 하나로 인식되어 많은 연구를 시행하고 있다.

악성종양을 병리학적으로 암이라 규정하고 있고 빠른 침윤성 성장과 체내 각 부위로의 확산 및 전이와 같은 특이성을 지니고 있어 생명에 위험을 초래할 뿐만 아니라 현재의 인류에게 가장 큰 위험성 있는 전신질환으로 인식하고 있다(서울대학교의과대학, 1993; 錢伯文, 1980; 이승제, 1967; 대한병리학회, 1990; 홍원식, 1980).

악성종양을 치료하기위해 수술요법, 방사선요법, 화학요법, 면역요법 및 유전자요법 등이 사용되고 있으나 수술요법과 방사선요법은 국소적인 치료법이기 때문에 한계성이 있고 면역요법은 전신적인 치료법이나 현재로서 치료방법이 정립되어 있지 않는 상태이며 화학요법은 화학 약재의 독성문제를 아직 해결하지 못하고 있는 실정이다(Fish, 1984; Goodman et al., 1987). 즉 외과수술요법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법 등은 암의 종류에 따른 감수성의 차이와 치료 후의 경과 및 부작용이 각기 다르고 치료에 많은 문제점을 안고 있기 때문에 부작용이 경미하고 항종양 효과가 우수한 새로운 천연물의 개발에 관심이 요구되고 있다. 천연물들은 세포분열 및 기능의 변화에 관련되어 항종양 효과를 나타내고 있으며 이들의 항종양 효과가 종양세포의 분열을 직접적으로 억제하거나 암을 가진 동물(tumor-bearing animal)의 면역능을 증가시키는 것으로 밝혀지고 있기 때문이다(Harsh & Ereireish, 1986; Stajerward & Vanky, 1982; Mavlight et al., 1982; Golub & Morton, 1984; Kokker, 1982; Kotani et al, 1975). 현재까지 개발된 천연물들은 암의 치료에 응용되어 항종양 효과를 보이고 있으며 특히 새로운 천연물질(BRM 또는 항종양 물질)의 추출 및 개발과 관련된 재료로 민간요법에서 사용되어진 전통약물을 선택하여 긍정적이고 성공적인 결과를 얻어내고 있는 추세이다. 일반적으로 암 연구의 방법은 세포독성, 종양면역, 생화학적 연구, 분자생물학

적 연구, 세포소멸, 혈관형성저해, 발암유발인자 연구, 세포주기전달, 세포주기조절 연구, 유전자요법 및 전이예방 등에 관한 연구가 주로 수행되고 있다(김성훈, 1988).

많은 종류의 암들이 세포의 비정상적인 분화 혹은 분화의 중지에 의해 발생되는 것으로 알려져 있고 이러한 암의 특징을 이용하여 암 세포에만 특이적으로 작용하는 암세포를 분화유도하는 물질에 의한 항암제를 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 세포 분화와 증식은 서로 상반되는 관계로 분화가 진행 될수록 증식은 저해를 받고 증식이 진행될수록 분화는 저해를 받는다. 세포의 분화는 세포의 성숙단계에 있어 필수과정이나 암세포의 경우 이 분화과정이 정지되고 세포증식 단계에 머물러 있으면서 이러한 세포들이 계속해서 축적되는 것이 관찰되고 있다(koeffler, 1983). 결국 분화의 정지는 암의 치료에서 중요한 인자가 되며 생체외에서 세포의 분화와 성숙을 유도할 수 있는 물질의 개발 또는 발견은 임상적으로 아주 중요한 의의를 가진다.

2) 백혈병의 정의와 분류

백혈병은 조혈모세포들로부터 유래되는 암으로써 이들 조형모세포들은 골수에서 증식되어 나중에는 말초 혈액, 비장, 림프절 등으로 퍼져 나가게 된다. 일차적으로 림프절에서 발생하여 말초 혈액과 골수로 파급되어 백혈병단계까지 진행하는 림프종과는 구별된다. 백혈병의 분류는 임상경과의 진행속도에 따라서 급성 혹은 만성으로 나누며 세포의 기원에 따라서 림프구성 혹은 골수성 백혈병으로 나누었으나 최근에는 생물학적, 항원성, 분자생물학적인 특성에 따라 구분하는 추세이다. 백혈병의 발생에서 유전학적, 환경적 인자들이 중요하기는 하지만 대부분의 환자에서 원인을 밝히기는 어렵다. 백혈병이 생후 1년 이내에 발생하는 경우에 쌍생아에서 높은 유사성을 보이며, 매우 높은 유병률을 보이는 가족들이 존재하기도 한다. 급성백혈병은 다운(Down), 블룸(Bloom), 클라인펠터(Kleinfelter), 판코니(Fanconi), 위스콧-알드리히 증후군(Wiskott-Aldrich syndrome) 같은 다양한 선천성 질환들에서 높은 빈도로 발견된다. 환경적 요인도 백혈병의 발생에 중요한 역할을 한다. 실험동물에서 방사선을 조사하면 백혈병이 발생되며, 사람에서도 방사선 피폭량과 백혈병 발생 빈도 사이에는 명확한 연관성이 있다. 방사선은 만성골수성 백혈병, 급성골수성 백혈병의 발생빈도를 증가시키며, 급성림프구성 백혈병에서도 가능성이 있으나 만성림프구성 백혈병이나 모발상

세포 백혈병(hairy cell leukemia)에서는 연관성이 없는 것으로 알려져 있다. 벤젠이나 다른 방향성(aromatic) 탄화수소 같은 화학물에 노출되거나 알킬화 약물 등의 항암제로 치료를 받은 경우에도 급성골수성 백혈병의 발생이 증가된다. 호지킨씨병과 같이 항암제와 방사선 치료를 병행하는 경우 다른 백혈병이 발생되기도 한다. 급성백혈병은 미성숙된 조형모세포들의 클론성 증식으로 특징지을 수 있다. 백혈병은 단일 조혈전구세포들(hematopoietic progenitors) 가운데 악성화된 클론이 세포 복제와 확장(expansion)을 거쳐서 발생된다. 급성백혈병을 구성하는 악성 세포들의 가장 두드러지는 특징을 보면 급성골수성 백혈병에서는 골수모구(myeloblast)나 전골수구(premyelocyte) 단계 이상으로 성숙하는데에 결함이 발생하며, 급성림프구성 백혈병에서는 림프모구(lymphoblast) 단계에서 결함이 발생한다. 골수내에서 증식하는 백혈병 세포들은 정상적인 조혈작용을 억제하여 궁극적으로는 정상 골수 조직을 대체한다. 따라서 정상 조혈모세포들의 부족으로 인해 빈혈, 감염, 출혈 등의 특징적인 합병증들이 나타난다. 백혈병을 발생시키는 악성 전환의 기전은 잘 알려져 있지 않지만 그 악성 세포들에게 유전적인 형질을 전해주는 디옥시라이보핵산(DNA)의 기본적인 변화와 관련이 있음은 알려져 있다. 백혈병 세포의 염색체 재배열은 세포내 종양형성유전자의 구조와 조절에 변화를 일으키며, 그들 유전자의 산물에 양적 질적인 변화를 일으켜 백혈병의 시작 및 유지에 중요한 역할을 한다(Harrison's Principles of internal medicine, 13th Edn. 1997)

최근에 백혈병의 발생 빈도가 점점 증가하는 추세이므로 인류의 건강증진 및 생명연장을 위하여 백혈병에 대한 기초적인 연구와 항암 물질의 개발이 지속적으로 이루어지고 있다. 그러나 최근에 사용되고 있는 화학요법의 항암제들은 독성이 강하여 간장과 신장 기능 장애, 약물의 축적에 의한 독성작용, 조혈작용 장애 등 부작용이 발생하는 문제점이 있다(Ruddon, 1990). 그러므로 정상세포에는 아무런 독성을 미치지 않으면서 암세포만을 특이적으로 공격하여 파괴하는 항암제의 개발이 절실히 요구되고 있으며 천연물질을 이용한 새로운 항암제의 개발 가능성을 입증하기 위한 실험 보고들이 증가하고 있다(Ito & Shimura, 1985).

French-American-British(FAB) Cooperative Group에 의하여 급성 백혈병의 분류가 제안되었고 급성 골수성 백혈병(Acute Myelogenous Leukemia, AML)이라는 용어는 골수암세포에서 기원하는 모든 급성 백혈병을 포함한다. 즉 AML은 골수계 계열(myeloid

lineage)의 특정 단계에서 분화정지와 함께 암세포의 클론성 증식이 일어나는 것으로 골수에서 정상적인 조혈기능을 할 수 없는 혈액 암의 일종이다. AML은 골수계 계열의 특정 계열 및 관련된 계열의 어느 단계에서 기원하였느냐에 따라 형태학적으로 8종류의 아형(FAB분류상 M0~7)으로 나누어지고 각기 다른 염색체 이상과 면역표현형을 동반하는 다양한(heterogeneous) 질환군이다(Table 1). 세포유전학 검사를 통해 AML의 클론성 염색체이상(clonal chromosomal aberrations)을 규명할 수 있으며 AML의 과반수 이상에서 염색체 이상이 나타난다(Lowenberg et al., 1999; 이홍기, 1997).

3) 치료에 대한 연구

AML의 치료는 크게 관해유도(remission induction)와 관해후 치료(postremission therapy)로 나눈다. 관해유도는 정상적인 조혈기능을 할 수 있는 여건을 만들어 주기 위한 치료이고 관해후 치료는 환자 몸속에 존재하는 미세잔류 암세포(minimal residual disease, MRD)를 제거함으로서 재발을 예방하여 궁극적으로 완치를 시키고자 하는데 목적이 있다(이종욱, 2002).

M3 아형인 급성 전골수성 백혈병(Acute Promyelocytic Leukemia, APL)은 세포유전학 검사에서 특징적인 t(15:17)가 관찰되고 분자생물학 검사에서 *PML/RAR* mRNA가 검출된다(Melinick and licht, 1999)(Fig. 1). 분화유도제인 all-*trans* retinoic acid의 사용은 최근 10년간 이 분야에서 획기적인 치료의 하나로 평가되고 있다. All-*trans* retinoic acid는 vitamin A 유도체로서 *PML/RAR* 유전자 산물에 의해 차단된 세포분화를 교정하여 APL의 세포분화를 유도한다. All-*trans* retinoic acid를 관해 유도제로 사용할 경우 APL의 발병시 잘 동반되는 범발성 혈관내 응고증(Disseminated Intravascular Coagulation, DIC)이 수일 내 호전되고 약 90%이상의 높은 완전 관해율을 나타낸다. APL에서 all-*trans* retinoic acid와 관련된 많은 전향적 비교연구를 통해 얻은 현재까지의 결론은 관해유도시 all-*trans* retinoic acid와 함암제를 병행 투여하고 관해 후 치료로서 2~3회의 공고요법을 마친 후 all-*trans* retinoic acid를 포함한 유지요법을 약 2년간 실시하는 것이다(Fenaux et al., 1999). 이러한 치료로 APL은 약 80%의 높은 장기 생존율을 나타내기 때문에 재발에 대한 고위험군(진단시 백혈구수가 높은 경우와 공고요법 종료 후 골수검사에서 *PML/RAR* mRNA가 RT-PCR에서 양성인 경우)

을 제외하고는 1차 관해상태에서 동종 조혈모세포이식을 실시하지 않는다. 따라서 APL의 치료방침은 다른 종류의 AML과 차이가 있기 때문에 골수검사에서 형태학적으로 APL이 의심스러우나 t(15:17)가 관찰되지 않으면 반드시 생물학(분자유전학) 검사를 실시하여 확인하여야 한다(이종옥, 2002).

4) HL-60 cell

미분화암세포에 분화유도제를 사용하여 성숙한 세포로 분화시키는 연구는 분화와 관련된 분자생물학적 기전을 이해하는데 도움이 될 뿐만 아니라 새로운 암 치료법으로서의 가능성도 있어 현재 HL-60 cell를 이용한 분화유도과정의 연구는 많은 연구자들에 의해 수행되고 있다(서 등, 1997; Akiyama & Toyoshima, 1990; Bruger et al., 1994; Jiang et al., 1994; Koeffler, 1983).

HL-60 cell은 APL 환자로부터 분리하여 확립한 세포주로서 여러 가지 분화유도 물질에 의해 과립구계열(granulocytic lineage) 또는 단핵세포/대식세포계열(monocyte/macrophage-like cells)로 분화되는 미분화 암세포주이다(Collins, 1987)(Fig. 2).

지금까지 알려진 HL-60 cell의 분화유도 물질로는 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA), 1,25-dihydroxyvitamin D_3(Vitamin D_3), retinoic acid, dimethyl-sulfoxide(DMSO)등이 있으며(Jiang et al., 1994) 분화유도제에 따라서 분화양상과 그에 따른 분자생물학적 조절기전에도 차이가 있는 것으로 보고 되어있다(Bruger et al., 1994; Jiang et al., 1994; Hamel et al., 1993).

다양한 분화관련 유전자들의 정교한 조절에 의해 세포분화가 이루어지며 그 중에서도 세포주기 조절은 분화에 있어서 매우 중요한 부분을 차지하고 있는데(Akiyama & Toyoshima, 1990; Jiang et al., 1994; Steinman et al., 1994) 세포가 분화될 때에는 세포주기를 조절하는 인자들의 상호작용으로 세포주기가 G1에 머물면서 분화와 관련된 유전자들이 순차적으로 발현됨과 동시에 세포소멸 보호(apoptosis protection)가 일어나는 것으로 알려져 있다(Yee et al., 1998).

5) 1,25-dihydroxyvitamin D_3

Steroid hormone인 1,25-dihydroxyvitamin D_3 [$1,25(OH)_2D_3$, calcitriol]는 비타민 D_3의 활성대사물질로써 체내의 칼슘대사에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 왔으나(Norman et al., 1982) 최근에는 면역계의 조절에 중요한 역할을 하는 호르몬임이 밝혀지고 있다(Fig. 3). $1,25(OH)_2D_3$와 관련된 생물학적 기능은 정상 조혈세포와 악성 조혈세포의 성장과 분화조절 및 이들 세포에 대해 다양한 생리적 기능을 나타내고 있음이 확인되었다(Pols et al., 1990)(Fig. 4). 이 호르몬의 본래의 작용기관인 뼈, 소장 및 콩팥 등에 대해서는 nongenomic 영향을 나타내지만 $1,25(OH)_2D_3$에 의한 세포작용의 대부분은 세포내 수용체(Vitamin D receptor, VDR)에 의해 조절되어지며 이 수용체는 호르몬과 높은 친화력으로 결합한다(Pike, 1991). 호르몬 수용체의 복합체는 이 복합체와 반응하는 세포의 특이한 유전자의 전사를 조절하므로 생물적 기능을 나타낸다.

조혈세포(hematopoietic cells)의 분화에 $1,25(OH)_2D_3$가 미치는 영향에 관한 연구에서 U937 cells(human monoblastic leukemia cell line)과 HL-60 cells(human promyelocytic leukemia cell line)은 액체배양(liquid culture)에서 $1,25(OH)_2D_3$에 의해 세포성장이 저해되고 monocyte/macrophage로 분화되어지며(Mangelsdorf et al., 1984; Tanaka et al., 1984; Olsson et al., 1983) 세포분화에 따른 c-*myc*(Simpson et al., 1987), c-*fos*(Brelvi & Studzinski, 1986) 및 c-*fms*(Scariban et al., 1985) 등의 원종양형성 유전자(proto-oncogene)의 발현이 mRNA level에서 저해되었다.

쥐에 골수성 백혈병 세포를 접종시킨 뒤 $1,25(OH)_2D_3$를 투여한 결과, *in vivo*에서 생명기간이 연장되었다(Honma et al., 1983). $1,25(OH)_2D_3$수용체가 함유된 monocytes와 mitogen으로 활성화된 T 임파구는 이 호르몬의 표적세포이다. Monocyte는 이 호르몬에 의해 macrophage로 분화가 촉진되며(Provvedini et al., 1986) antigen presentation에 있어서 monocyts의 기능이 향상된다. 한편 mitogen으로 활성화된 T 임파구에는 VDR이 발현되며(Provvedini et al., 1983) 이 호르몬은 T 임파구에 대해 cyclosporin A와 같이 면역억제 물질로 작용한다(Rigby, 1987). 또한 최근에는 T 임파구의 활성과 분화에 관여하고 B 임파구와 monocyte에서 생성되는 interleukin 12(IL-12)의 생성을 억제함이 확인되었다.

6) All-*trans* retinoic acid

비타민 A 유도체인 all-*trans* retinoic acid는 HL-60, ML-1, U-937 세포주(Haskovec et al,. 1990; Hongo et al., 1990) 뿐만 아니라 t(15:17)의 염색체 이상을 보이는 APL세포를 분화 유도시킨다(Fig. 3~5). 1988년에 Huang 등이 24명의 APL 환자에게 all-*trans* retinoic acid를 사용하여 100%의 완전 관해율을 얻었다고 보고하였으나 이후 진행된 다수의 결과에 의하면 최초의 보고와는 같지 않지만 처음 발병하였거나 1차 재발한 APL 환자들에 있어서 80~90%의 높은 완전 관해율을 얻을 수 있었다(Huang et al., 1988; Castaigne et al., 1990; Chenet al., 1991, Warrel et al., 1991). 이러한 all-*trans* retinoic acid의 탁월한 관해유도효과에도 불구하고 all-*trans* retinoic acid를 단독으로 사용하거나 소량의 항암제만을 재발방지를 목적으로 투여한 경우에 조기 재발율이 높았지만 강력한 항암화학치료를 시행한 경우는 재발율이 감소하였다(Degos et al., 1990; Ohashi et al., 1992; Sun et al., 1994). All-*trans* retinoic acid증후군은 all-*trans* retinoic acid 투약기간에 발생하는 부작용 중에서 가장 심각한 것으로 25~30% 환자에서 나타나며 투약 개시 후 2일에서 3주 사이에 백혈구수의 급속한 증가와 함께 심장과 신장의 기능부전이 동반되고 심하면 사망에 이른다(Frankel et al., 1992; Frankel et al., 1994). 그러나 대부분의 all-*trans* retinoic acid증후군은 백혈구의 증가가 선행되어 나타나지만 10,000/㎕미만에서도 발생하는 경우도 보고되고 있다(Wang et al., 1993).

Table 1. The FAB Classification of Acute Myelogenous Leukemia

Category	Abbreviation	Criteria
AML M0 Myeloblastic leukemia	AML	90% or more of nonerythroid marrow cells are type I myeloblasts; 3% or less of blasts stain for myeloperoxidase or for Sudan black B.
AML M1 Myeloblastic leukemia	AML	30% or more of nonerythroid marrow cells are myeloblasts; 3% or more of blasts stain for myeloperoxidase or for granule phospholipid (Sudan black).
AML M2 Myeloblastic leukemia	AML	30% or more of nonerythroid marrow cells are myeloblasts, >10% are promyelocytes, and <20% are monocytic elements.
AML M3 Myeloblastic leukemia	APL	Most marrow cellls are abnormal hypergranular promyelocytes; some may contain bundles of Auer rods.
AML M4 Promyelocytic leukemia	AMML	30% or more of nonerythroid marrow cells are blasts. Granulocytic elements make up >20% of nonerythroid marrow cells. A monocytic component is identified by: a.5,000/㎕ or more monocytic elements in the blood and either (1)20% or more of monocytic lineage in the cells marrow, or (2)A serum lysozyme level >3 times normal. b.If monocytic elements in the blood are <5,000/㎕, recognition of 20% or more cells of monocytic lineage in the marrow with confirmation by cytochemical stains shoeing fluoride-inhibited nonspecific esterase activity or by elevated serum or urine lysozyme.
AML M5 Myelomonocytic leukemia	AMoL	80% or more of all nonerythroid marrow cells are monoblasts, promonocytic cells are monoblasts; In subtype $M5_A$, 80% or more of all monocytic cells are monoblasts; in subtype $M5_B$, <80% of monocytic cells are monoblasts.
AML M6 Monocytic leukemia	AEL	50% or more of all nucleated marrow cells are erythoroid precursors, and 30% or more of the remaining nonerythroid cells are blasts.
AML M7 Megakaryoblastic leukemia	AMegL	30% or more of cells are of megakaryocytic lineage in a marrow aspirate. If aspirate is unobtainable because of marrow fibrosis, then identification may be made by: a.A marrow biopsy showing excess blasts and, often, increased numbers of maturing megakaryocytes plus b.Circulating megakaryoblasts. Megakaryocytic lineage of blasts should be confirmed by platelet peroxidase reaction on electron microscopy or immunologic identification with antibodies to platelet glycoproteins or von Willebrand factor.

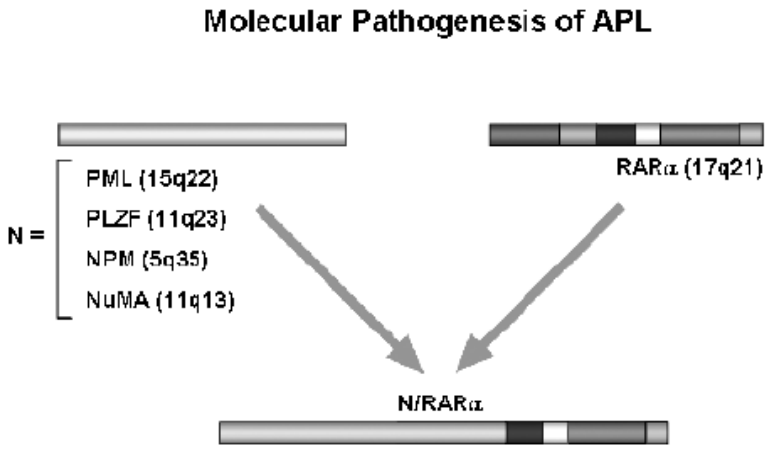

Fig. 1 Molecular pathogenesis of APL

The four chromosomal translocations associated with APL result in fusion proteins RARα,including the DNA binding and ligand binding domains of protein, are linked to four different nuclear proteins containing self-association domains.

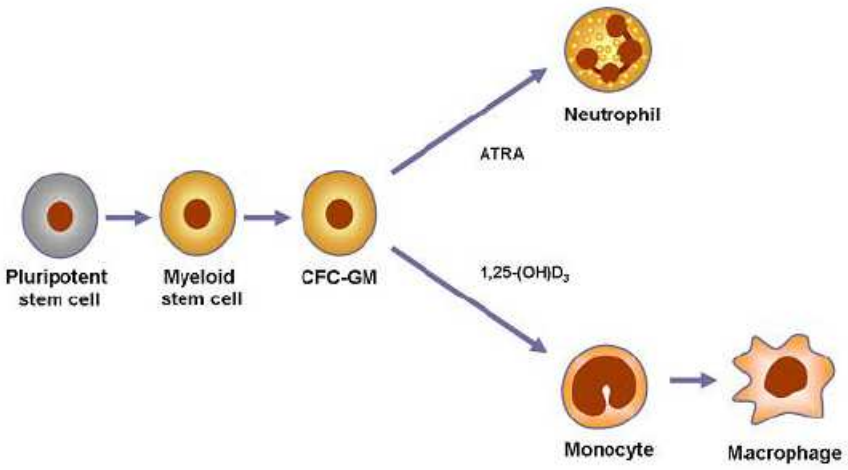

Fig. 2 Differentiation induction in HL-60 human promyelocytic leukemia cells cultured *in vitro*

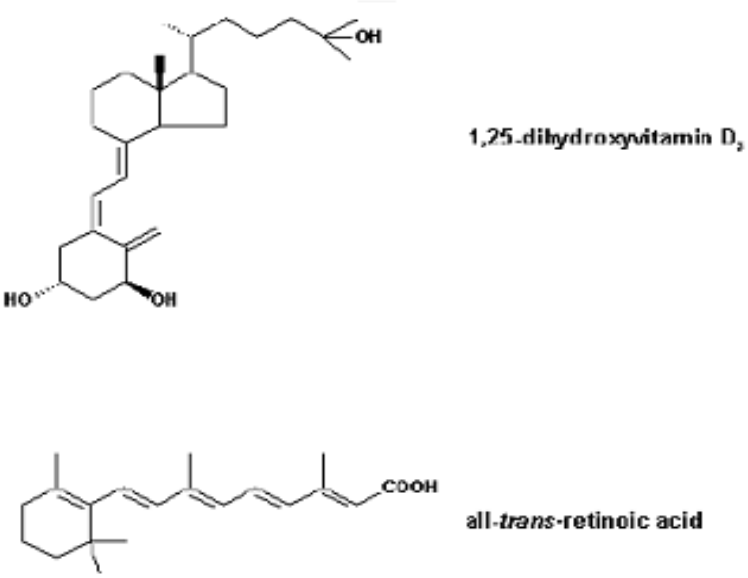

Fig. 3 Chemical structures of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and all-*trans*-retinoic acid

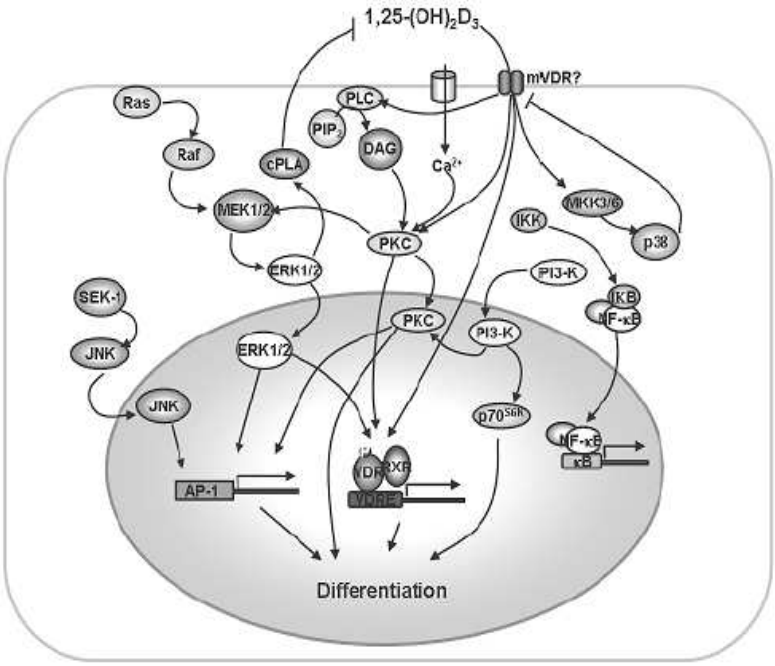

Fig. 4 Multiple pathways involved in 1,25-$(OH)_2D_3$ induced differentiation of HL-60 cells

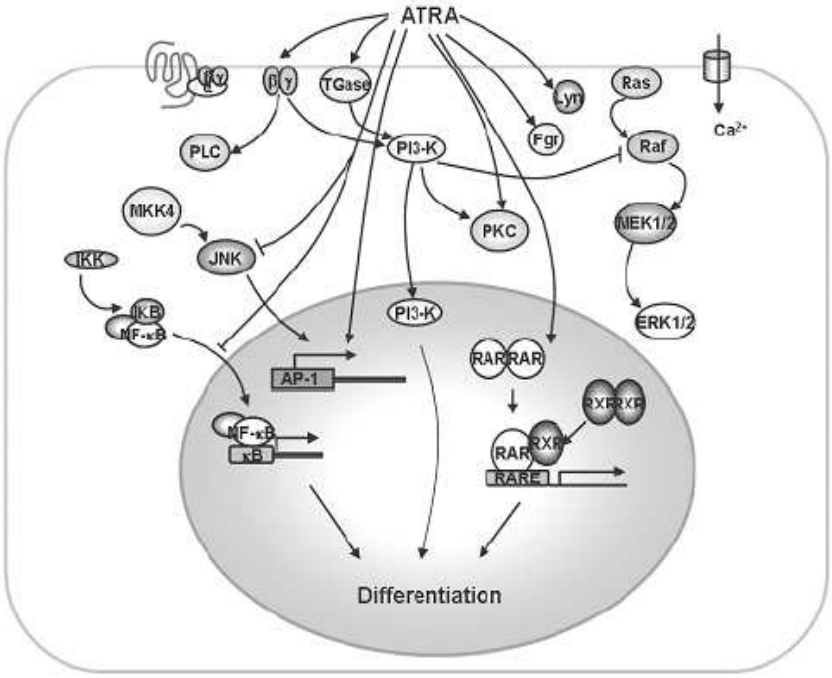

Fig. 5 Multiple pathways involved in all-*trans* retinoic acid induced differentiation of HL-60 cells

3. 면역조절

1) 면역계

면역계는 개체 내부에서 발생하는 이물질을 인식하여 제거하는 면역감시기능을 통하여 개체 내부의 항상성을 유지시키는 바, 이러한 항상성 유지를 위한 면역반응은 크게 비특이 면역반응, 체액성 반응과 세포성 반응으로 이루어진 특이성 면역반응으로 대별된다(김진복, 1986; Chung et al., 1986; 윤정구, 1989). 면역반응은 골수의 전구세포에서 유리한 백혈구에 의해 일어난다. 다능조혈모세포는 적응면역반응을 관장하는 림프구와 내재면역과 적응면역 양자에 모두 참여하는 골수계열 세포를 만들어낸다. 중성구, 호산구, 그리고 호염구는 모두 과립구라 부르며 감염이나 염증부위에서 효과세포로 작용하도록 동원될 때까지 혈관내를 순환한다. 대식세포와 비만세포는 조직에 들어와 분화를 끝내며 숙주방어의 제1선에서 염증반응을 시작하며 효과세포로 작용한다(Charles, 2002).

개체는 수많은 세포로 이루어져 있는데, 이중에서 어떤 세포가 변이를 일으켜 정상세포와는 다르게 빨리 성장할 수 있는 암세포로 전환될 수 있다. 그러나 실제적으로 암세포가 급성장을 하여 암괴를 형성하지 못하는 이유는 암세포가 정상세포와는 다른 항원성 분자를 가지게 됨으로써 숙주의 면역계가 이러한 비자아적 요소를 인식하여 면역반응을 일으키므로 암괴로 성장하기 전에 암세포가 체내에서 제거되기 때문이다(서울대학교의과대학, 1986; 김진복, 1986). 이는 면역계의 암 발생에 대한 면역감시(immunosurveillance)의 개념으로 이때 숙주의 면역계가 보이는 면역반응에는 항체에 의한 체액성 면역반응과 T 세포에 의한 세포성 면역반응 및 NK세포에 의한 자연적 항암작용이 있다(서울대학교의과대학, 1986; 김진복, 1986; 윤정구, 1989). 항종양 체액성 면역반응의 경우, 암세포 표면에 결정적인 결함을 초래하여 사멸시키거나 암세포 표면에 존재하는 항원과 항체가 결합하면 killer 세포(K cell)가 암세포를 사멸시킨다(서울대학교의과대학, 1986; 윤정구, 1989). 또한 항종양 세포성 면역반응의 경우, 암세포에 고유한 항원으로 자극된 T 세포는 세포독성 T세포(cytototoxic T cell)로 되어 암세포를 직접 사멸시킨다(서울대학교의과대학, 1986; 김진복, 1986; 윤정구, 1989).

그러나 NK 세포의 경우는 암세포나 바이러스에 감염된 세포를 어떤 기전인지는 밝혀지지 않았지만 항원으로 인식하여 세포독성을 나타낸다(윤정구, 1989). 이외에도 B 세포에서 생산된 항체가 부착된 암세포는 호중구나 단핵 대식세포계(mononuclear phagocytic system, MPS)에 속하는 탐식세포에 의해 탐식될 수도 있고(서울대학교의과대학, 1986; 김진복, 1986; 윤정구, 1989, Hibbs et al., 1977) T 세포에서 분비되는 lymphokine에 의하여 활성화된 MPS 세포는 일산화질소(nitric oxide, NO)를 합성하여 암세포를 사멸시킬 수 있다(Hibbs et al., 1977; Hibbs et al., 1972; Drapier et al., 1988).

면역조절에 관여하는 세포들의 활성(activation), 증식(proliferation) 및 분화(differentiation)를 관장하는 기전은 크게 2가지로 구분할 수 있다. 그 하나는 세포표면 분자들의 상호반응, 즉 수용체(receptor)와 배위자(ligand)의 반응으로서 이 분자들을 세포접합인자(cell adhesion molecule, CAM)라고 부르며 여기에는 세포표면 immunoglobulin(Ig), T cell receptor/CD3, CD4, CD8, MHC, ICAM-1, ICAM-2 등 Ig super family, VLA, LFA-1 등 integrin family, ELAM-1, LAM 등 selectin이 있다. 또 다른 기전은 세포 상호간의 전달(communication)을 유도하는 수용성 펩타이드 조절인자(soluble peptide regulatory factor)들로서 이들 중 주로 non-immunological cells의 증식 및 분화에 관여하는 peptide들을 성장인자(growth factor)라고 부르며 여기에는 인슐린유사 성장인자(insulin like growth factor, IGFs), 전환 성장인자(transforming growth factor, TGFs), 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF) 및 혈소판조직 성장인자(platelet derived growth factor, PDGF)들이 속한다고 할 수 있다. 면역조절 효과(Immunoregulatory effect)가 주기능인 peptide들은 주로 단핵세포(monocyte) 또는 림프세포(lymphocyte)가 자극을 받을 때 분비하며 이들 분비세포에 따라 monokine 또는 lymphokine이라고 불려왔다. 요즘은 이들 세포 이외의 세포들에서도 분비되고 또한 상호 작용함이 알려져서 이들을 모두 cytokine 또는 interleukin이라고 부른다(변광호, 1992).

Cytokine은 신체에서 다양한 세포에 의해서 유리되는 작은 단백(~25kDa)이며 대체적으로 활성화 자극에 의해 유리되고 특별한 수용체에 결합함으로 반응을 유도한다. 그것들은 자가분비(autocrine) 방법의 형태로 cytokine을 분비하는 세포의 행동에 영향을 미치거나 측분비(paracrine) 방법의 형태로 인접세포의 행동에 영향을 미칠 수

있다. 일부의 cytokine은 비록 순환계로 들어가는 능력과 반감기에 따라 영향을 받으나 내분비 방법으로 행동하여 먼 곳 세포의 행동에 영향을 미칠 수 있다. Cytokine은 면역응답 반응이나 조절 들 세포간의 상호작용에 관여하는 생물활성인자로써 대부분 림프구나 대식세포에 의해 생성되는데 낮은 농도(10^{-9} M 이하)의 cytokine이 분비되면 숙주세포의 면역반응을 유도하지만, 높은 농도(10^{-7} M 이상)로 분비되면 세포사멸과 같이 숙주세포에게 치명적인 피해를 입히기도 한다.

Chemokine은 화학주성 성질을 가진 cytokine 계열이며 적절한 수용체를 가지고 chemokine이 분비된 근원지로 이동하게 한다. 병원체에 반응하여 대식세포에 의해 분비되는 cytokine은 구조적으로 다양한 분자그룹으로 interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6), interleukin-12(IL-12), tumor necrosis factor-α(TNF-α) 그리고 chemokine interleukin-8(IL-8)을 포함한다. 숫자에 따라오는 이름인 interleukin(IL)은 백혈구에 의해 분비되고 작용하는 물질에 대한 표준화된 명명법을 만들기 위한 시도로 만들어졌다. 그러나 이는 다양한 근원, 구조, 효과들을 가진 이미 증가하는 수의 cytokine이 발견되었을 때 혼란을 가져왔으며 비록 IL의 명칭이 여전히 사용하기는 하지만 점차적으로 cytokine의 구조에 바탕을 둔 명명법이 발전되기를 기대하고 있다. Cytokine과 그들의 수용체들은 주요 구조적 3계열이 있다. 적응과 내재면역 둘 다에서 역할을 하는 많은 IL 뿐만 아니라 성장호르몬을 포함하는 조혈 계열(hematopoietin 계열), 적응과 내재면역 둘 다에서 역할을 하고 일부의 막결합 구성원들을 포함하는 종양괴사인자 계열(TNT 계열)과 chemokine 계열이 있다(Charles, 2002).

2) Interleukin-12

IL-12는 자연살해세포 자극인자(natural killer cell stimulatory factor, NKSF) 혹은 세포독성 림프구 성숙인자(cytotoxic lymphocyte maturation factor, CLMF)로 불리어졌으며 기능적으로 활성화된 IL-12는 분자량 70kD의 cytokine으로 40kD와 35kD의 펩타이드가 결합되어 있는 cytokine 중에서는 유일한 이종이합체(heterodimer)이다(Table 3, Fig. 6). 2개의 아군은 이황화물 결합에 의해 공유적으로 연결되므로 활성화된 cytokine 분자를 형성한다(Trinchieri, 1995; Kobyashi et al., 1989; Stem et

al., 1990). 또한 p40은 IL-12 p70 활성화의 길항제로서 작용하는 것으로 알려져 있다 (Gillesses et al., 1995). IL-12는 주로 대식세포와 B 세포에서 분비되어 T 세포와 NK 세포에 작용하는데, 항원제시세포(Antigen presenting cells, APCs)에서 IL-12의 생성은 CD40L에 의한 CD40의 자극 또는 lipopolysaccharide(LPS)에 의한 CD14의 활성에 의해 유도되어진다. IL-12생산은 IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, TGF-β와 INF-α/β에 의해 억제된다. 반면 IFN-γ, TNF-α 와 GM-CSF에 의해 IL-12의 생산은 증가되어진다. IL-12 수용체 발현은 IL-4, IL-10과 TGF-β에 의해 down regulation되며 interferon-γ(IFN-γ),IL-2, IL-7과 IL-15에 의해 up regulation된다. IL-12 p40 동종복합체(homodimer)[IL-12 $p(40)_2$]는 Th cell에 있는 IL-12 수용체의 자연 길항제(natural antagonist)이다(Fig. 7). 또한 IL-12의 생산은 세포내 cyclic AMP level의 상승, NA/H antiporter의 억제, calcium influx의 차단이나 NF-κB의 억제 등 다양한 경로에 의해 억제조절 되어진다(Fig. 8). IL-12의 기능을 3가지로 요약하면, 첫째 NK 세포를 활성화시켜 세포용해능력을 증가시키고 NK 세포의 성장인자가 되며 IFN-γ의 생산을 유도한다(Kobyashi et al., 1989). 둘째 세포독성 T 림프세포(cytotoxic T lymphocyte, CTL)를 활성화시키며 T 세포의 증식을 촉진시키고 IFN-γ의 생산을 유도한다(Stem et al., 1990). 셋째 native helper T 세포를 T helper type 1 cell(Th1)로 분화시킨다(Hsieh et al., 1993). T helper cell은 Th1과 Th2로 나누어지는데, Th1은 IL-2, IFN-γ를 분비하여 세포매개면역반응이 잘 일어나게 하고 Th2는 IL-4, IL-5, IL-10을 분비하여 체액성 면역반응(humoral immunity)이 잘 일어나게 한다 (Trinchieri, 1995; Kemp, 1993)(Fig. 9).

Th0 세포가 Th1 세포 또는 Th2 세포로 분화될 때 여러 가지 요인이 작용하지만 cytokine의 영향이 가장 중요하며 Th2 세포는 Th0 세포로부터 분화될 때 IL-4의 영향을 받아서 분화가 촉진되고 반면에 IL-12는 Th2 세포로의 분화는 억제하고 Th1 세포로의 분화를 촉진시킨다(Borish & Rosenwasser, 1996)(Fig. 10). Th1이 유도하는 세포매개 면역반응이 세포내 세균감염, 종양, AIDS등에 효과적으로 작용하기 때문에 많은 연구가들이 IL-12에 큰 기대를 걸고 있다 (Hall S.S., 1995).

IL-12는 활성화된 대식세포에서 분비되는 초기 항염증성 cytokine으로 세포매개면역에서 중요한 역할을 담당한다. 최근에는 건선, 알레르기성 접촉피부염, 피부 T세포 림프종 등의 표피와 진피 말초신경 말단에 IL-12 발현이 증가되어 있는 것이 관찰되었다

(Turka et al., 1995).

이 cytokine은 종양 동물모델이나 사람의 임상연구에 매우 효과적으로 숙주(host) 항종양반응을 자극하는 것으로 보고 되었을 뿐만 아니라(Lamont & Adorini, 1996; Boder et al., 1994) IL-12의 이용은 첫째 B 세포나 대식세포 같은 전문적인 항원제시 세포에서만 생성되기 때문에 IL-12를 암부위에 국소적인 투여로 내인성 면역반응을 유도할 수 있고 둘째 고농도의 IL-12를 국소투여로 전신의 독성이 없이 면역반응을 유도할 수 있으며 셋째 종양세포나 림프세포에 비해 다른 장소로의 이동이 적은 장점을 가진다. 그러므로 IL-12를 이용한 유전자 치료는 매우 전망이 있다고 사료된다(박 등, 2003).

3) Nitric oxide

대기오염물질이며(Goldsmith et al., 1983; Spicer, 1982) 담배연기에 포함된 수많은 화학물질중의 하나인(Hugod, 1981) nitric oxide(NO)는 독성을 가진 매우 불안한 기체이며 저농도에서는 인체에서 중요한 생리적인 조절인자로 작용하지만 고농도에서는 세포의 기질적 손상을 초래하는 유리기(free radical)의 하나이다. NO는 면역계에서 종양세포나 세포내 기생물에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호전달 물질이며 유리분자(radical molecule)이다. 일산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)의 작용에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 변화되는 과정에서 생성된 NO(Knowles & Mocada, 1992)는 대부분의 조직세포에 영향을 미쳐 순환기계에서는 혈관 이완물질로, 중추신경계에서는 신경전달물질로, 면역계에서는 방어물질로 알려져 있다(Wade, 1990). 탐식작용을 일으킨 대식세포는 NOS를 유도하여 NO를 생성한다(Moncade & Higgs, 1993)(Fig. 8). NOS는 물리화학적 성질에 따라 Type Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ 등 3종류의 동종효소로 분류된다. Type Ⅰ인 신경성 NOS(neuronal NOS, nNOS)와 Type Ⅲ인 내포세피성 NOS(endothelial NOS, eNOS)는 세포 속에 계속적으로 존재하기 때문에 내재성 NOS(constitutive NOS, cNOS)로 분류되며 상대적으로 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 등 면역학적 변화로 인해 유도한 경우에만 발현되는 Type Ⅱ인 유발성 NOS(inducible NOS, iNOS)가 있다(Nathan, 1992).

Ca^{2+}/calmodulin에 비의존적이며 혈관내피세포, 근육세포를 포함한 다양한 조직에서 면역학적 변화로 인해 유도되고, 세균류에 의해 분비되는 내독소인 LPS나 체내에서 면역반응의 매개체인 사이토카인 특히 IL-1, TNF-α, IFN-γ등에 의해 유도되는(Tetsuka et al., 1994; Vane et al., 1994) iNOS인 경우 오랜 기간 동안 다량의 NO를 생성하게 되고 생성된 NO는 guanylyl cyclase의 활성과 동시에 주위 조직에 세포독성을 나타내는 것이 특징이다. 대식세포의 NOS는 항상 존재하는 것이 아니라 IFN-γ, TNF-α와 같은 여러가지 사이토카인과 LPS 등에 의해 NOS 유전자의 발현이 유도되기 때문에 iNOS라고 하며 L-arginine으로부터 다량의 NO를 생산하게 된다(Hibbs et al., 1998). NO는 매우 작으면서 반응성이 있고 전기적으로 중성이기 때문에 합성된 곳에서 곧바로 확산되어 사방으로 퍼져 혈관 투과성, 부종 등의 염증을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(Scott & Hancock, 2000; Lee et al., 1998). 일반적으로 iNOS의 발현은 면역반응이 활성화되면 유발되고 생체에 유리된 NO는 일반적으로 이롭게 작용하지만 과다하게 생성되면 prostaglandin 등의 생합성을 촉진하여 염증반응을 심화시키며(Barnes & Liew, 1995; McCartney-Francis et al., 1993) 패혈증 shock를 일으키는 등 해롭게 작용하기도 한다(Blowenstein et al., 1994). 현재 NO에 대한 많은 연구보고들에 의해 생체에서 여러 가지 생리화학적 현상의 전령분자(messenger molecule)로서 매개자(mediator), 신경전달물질(neuro-transmitter) 또는 조정자(regulator) 등으로 다양하게 작용함이 밝혀지고 있다(Kuo & Schroeder, 1995). 일반적인 NO의 형성은 정상세포의 손상을 초래하여 염증을 유발시키고 조직손상, 유전자의 변이 및 신경손상 등을 유발한다(Stushr et al., 1991; McCartney-Francis et al., 1993; Weisz et al., 1996). 세포의 생존에 대한 NO의 효과는 세포의 종류에 따라 세포의 증식을 유발하거나 반대로 세포의 고사를 유발하는 경우도 있는 것으로 알려져 있다(Brűne et al., 1998; Beck et al., 1999).

4) NF-κB

그람 음성균의 막 구성성분인 LPS는 대표적인 IL-12의 생성을 증가시킨다고 알려져 있다(Ma & Trinchieri, 2001). IL-12의 생성을 증가시키는 기전으로 전사인자인 핵성 전사조절인자 κB(NF-κB)의 핵 내로의 이동을 촉진시킨 후 핵 내에서 IL-12의 프로모

터에 결합하여 IL-12의 생성을 증가시킨다는 보고가 있다(Gri et al.,1988). NF-κB는 DNA 결합부위와 이량체 형성을 위한 부위로 구성된 공통적인 Rel 유사부위(Rel homology domain, RHD)를 공유하는 단백질계의 동종이량체나 이종이량체로 구성되어 있다. Sen과 Baltimore에 의해 NF-κB가 발견된 이후 수많은 연구자가 전사인자 NF-κB의 기능을 밝히기 위해 노력해 왔다(Sen & Baltimore, 1988). NF-κB는 면역과 염증반응 및 세포사멸 조절을 유도하는데 일차적으로 관여한다(Baeuer & Henkel, 1994; Ghosh et al., 1998; Barnes & Karin, 1997; Beg & Baltimore, 1996; Foo & Nolan, 1999). 이들의 표적유전자들은 세포접합분자(cell adhesion molecules), cytokines, chemokines 그리고 세포사멸억제인자(anti-apoptotic factors)를 생산한다. NF-κB의 역할을 저지하는 I-κB분자는 NF-κB의 RHD부위를 차폐함으로서 세포질에 머물게 한다. 세포가 IL-1, TNF-α와 같은 cytokines들에 의해 자극이 되었을 때 I-κB 인산화 효소(I-κB kinase, IKK)라 부르는 이차 복합체가 활성화된다. IKK의 γ 아단위는 조절구성원이고 α와 β 아단위들은 kinase 기능들을 가진다. 활성화된 IKK 복합체는 ubiquitin-유도성 단백질분해과정에 의한 분해를 위해 준비된 I-κB를 인산화 시킨다. 이 과정으로 NF-κB는 자유로워지고 표적유전자들의 전사를 활성화를 위해 핵으로 이동을 할 수가 있게 된다(Israel, 2000; Karin & Ben-Neriah, 2000).

NF-κB는 저산소증, 이온화 방사능, 전염증 cytokine들(proinflammatory cytokines)이 중요한 역할을 하는 침입성 미생물에 대한 저항 등과 같이 환경조건에 따른 손상에 대한 세포방어기작 동안에 작용하는 전사인자로 잘 알려져 있다. 이들 모두는 NF-κB를 핵 안으로 이동을 유도함으로 일반적인 신호전달경로의 활성화를 자극한다. 요약하면 이온화 방사능 혹은 독소들(toxins) 같은 환경위험인자들이나 TNF-α와 같은 cytokine들이 IKK의 활성을 경유하여 NF-κB를 핵 안으로 이동하는 것을 시발한다. NF-κB는 p65와 p50 같은 Rel 계통 단백질의 이량체로 구성되었으며 I-κB와 결합한 상태로 세포질에 존재한다. IKK는 NF-κB에 결합된 I-κB를 인산화 시키며 이들의 인산화 반응은 ubiquitin ligase이 의해 I-κB의 유비키틴화를 위한 신호이다. 이것은 proteasome에 의해 분해되기 위한 I-κB의 표식이며 그 후 NF-κB가 방출되게 된다. 이제 전사인자는 자유로이 핵 안으로 이동할 수 있게 되었으며 핵 안에서 특이적 DNA 요소와 결합한다. 그리고 NF-κB에 의존하는 유전자의 발현을 활성화한다(김 등, 2003)(Fig. 11).

Table 2. Cytokine and receptor(IL-12)

Family	Unassigned
Cytokine (alternative names)	IL-12 (NK cell stimulatory factor)
Size (no. of amino acids and form)	197 and 306, heterodimer
Receptors (c denotes common subunit)	IL-12Rβ1 IL-12Rβ2
Producer cells	B cells, macrophages
Actions	Activates NK cells, induces CD4 T-cell differentiation to T_H1-like cells
Effect of cytokine or receptor knoctout(where known)	IL-12 : impaired in IFN-γ production and T_H1 responses

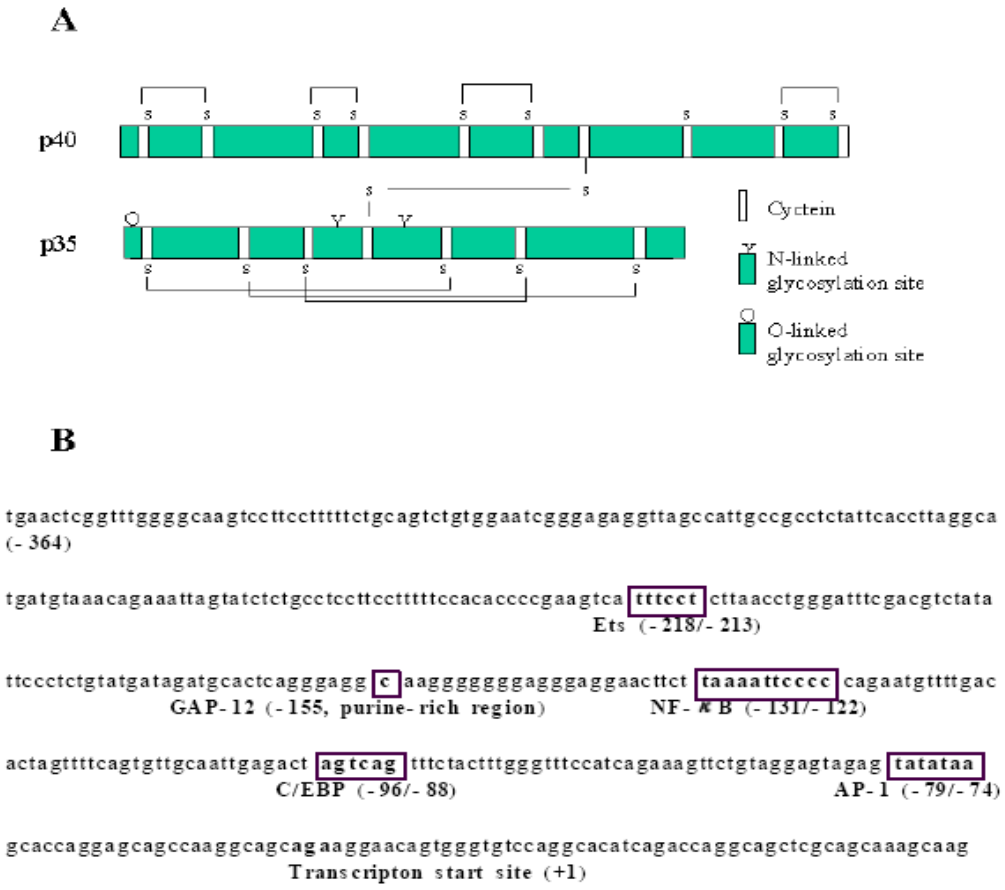

Fig. 6 Schematic diagram of IL-12 and proximal nucleotide sequences of IL-12 p40 promoter

A, Schematic diagram of the IL-12 molecule, a heterodimer formed by a heavy chain(p40, above) and a light chain(p35, below). B, map of the mouse IL-12 p40 promoter. Proximal nucleotide sequences of the murine IL-12 p40 promoter are shown. The promoter sequences are numbered relative to the transcription start site. the putative motifs for binding of transcription factors are boxed.

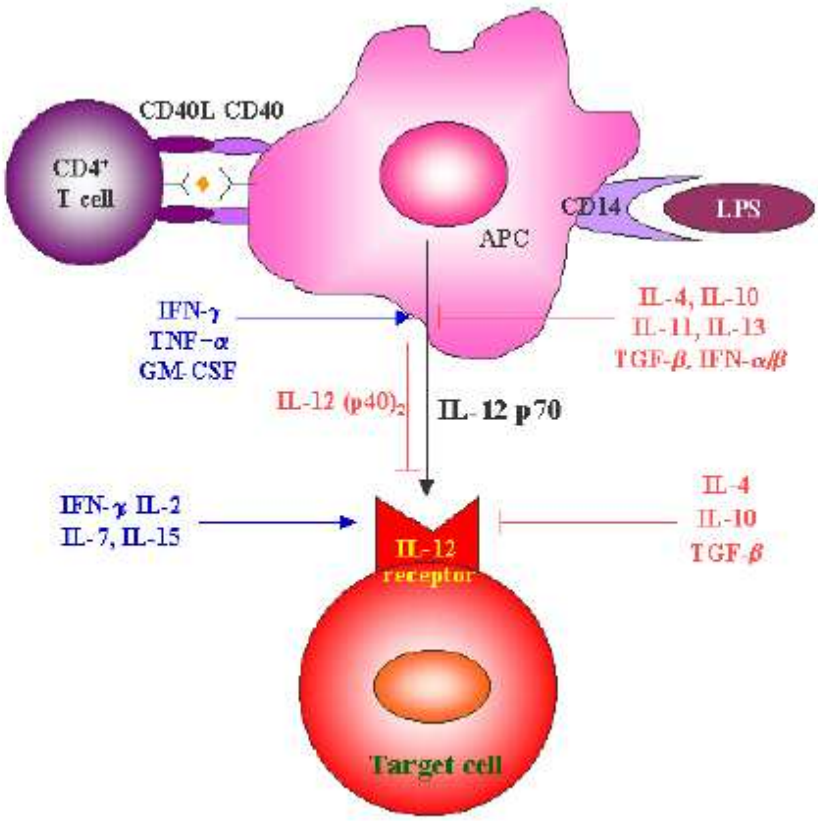

Fig. 7 IL-12 production and IL-12 receptor expression

The production of IL-12 in APCs is induced by stimulation of CD40 by CD40L or activation of CD14 by LPS. The production of IL-12 is subject to inhibition by IL-4, IL-10,IL-11, IL-13, TGF-β and IFN-α/β. In contrast, the production of IL-12 is augmented by IFN-γ, TNF-α and GM-CSF. IL-12 receptor expression is down-regulated by IL-4, IL-10 and TGF-β, and up-regulated by IFN-γ, IL-2, IL-7 and IL-15. The IL-12 p40 homodimer, IL-12 $p(40)_2$ is a natural antagonist of the IL-12 receptor on Th cells.

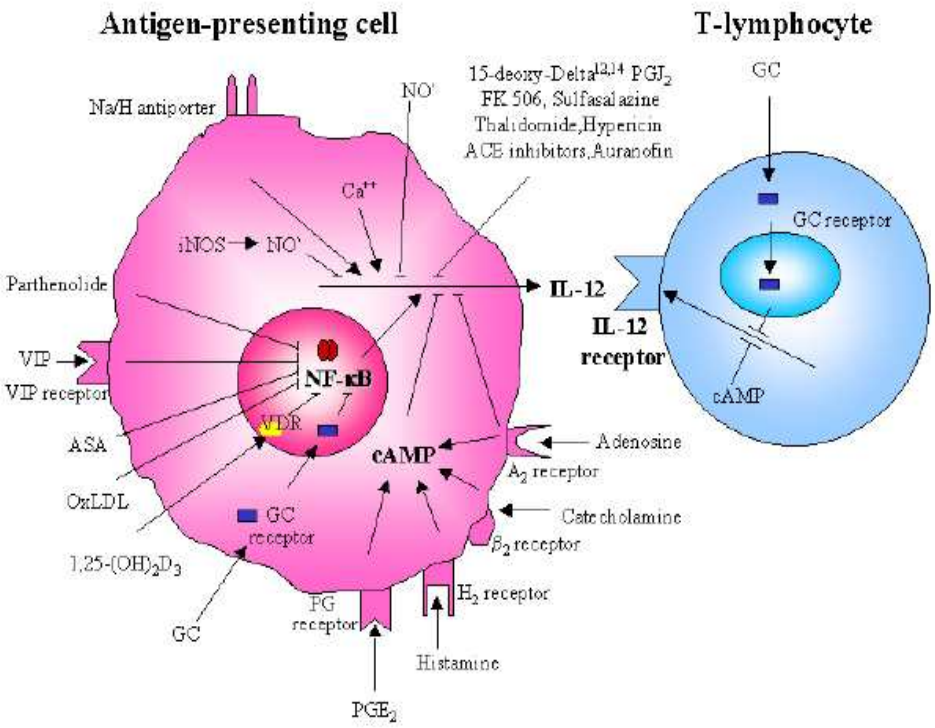

Fig. 8 Multiple pathways involved in the modulation of IL-12 production

IL-12 production can be inhibited by various approaches including elevation of intracelluar cyclic AMP levels, inhibition of NA/H antiporter, blocking of calcium influx or inhibition of NF-κB.

Abbreviations: $1,25-(OH)_2D_3$, 1,25-dihydroxyvitamin D_3: ACE, angiotensin-converting enzyme: ASA, acetyl salicylic acid: GC, glucocorticoid: iNOS, inducible nitric oxide synthase: NO, nitric oxide: NF-κB, nuciear factor -kappaB: OxLCL, oxidized low density lipoprotein: PG, prostaglandin: VIP, vasoactive intestinal peptide.

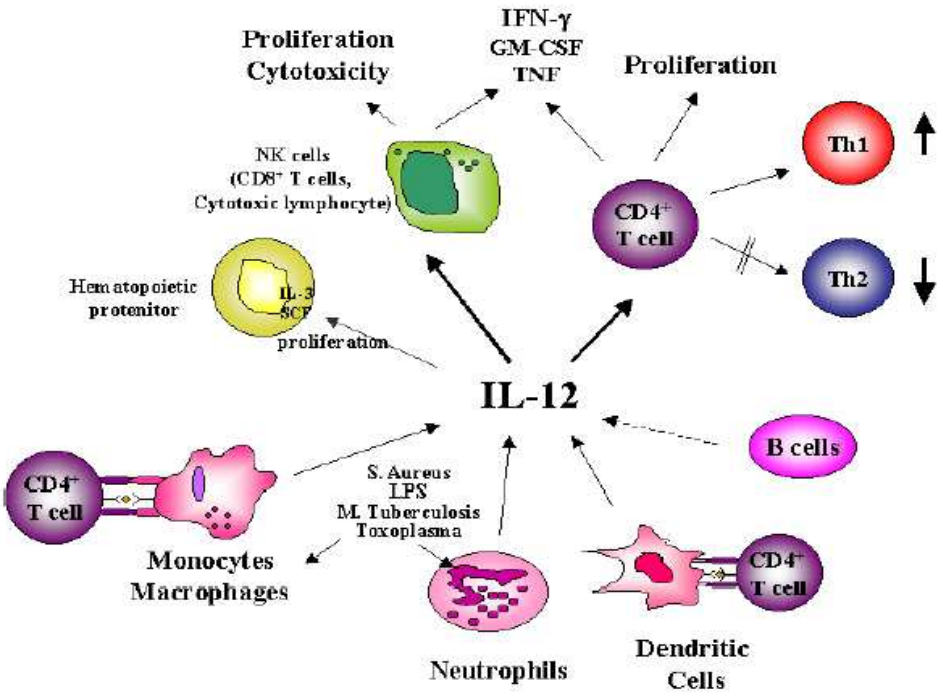

Fig. 9 Biological functions of IL-12 in immune system

IL-12 was originally described as a product of B-cell lines: it is predominantly produced by phagocytic cells and dendritic cells, in response to infectious agents or upon interaction of the CD40 receptor with CD40L on activated T cell. IL-12 is active on T cells and NK cells and induces cytokine production, proliferation, enhanced cell-mediated cytotoxicity, and generation of Th1 cells. It is also active on hematopoietic progenitor cells in combination with other hematopoietic growth factors and mediated both direct and indirect effects on B-cell functions.

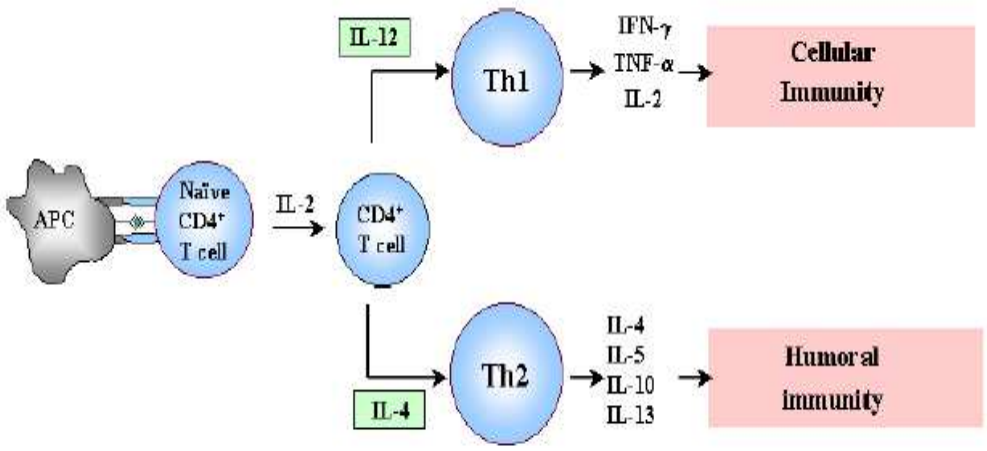

Fig. 10 Overview of Th cell differentiation

Naive $CD4^+$ T cells are differentiated into polarized subsets, Th1 and Th2. IL-12 promotes IFN-γ production and Th1 cells responsible for cell-mediated immunity. In contrast, ligation of the IL-4 receptor by Il-4, leading to Th2, have been implicated in humoral immunity.

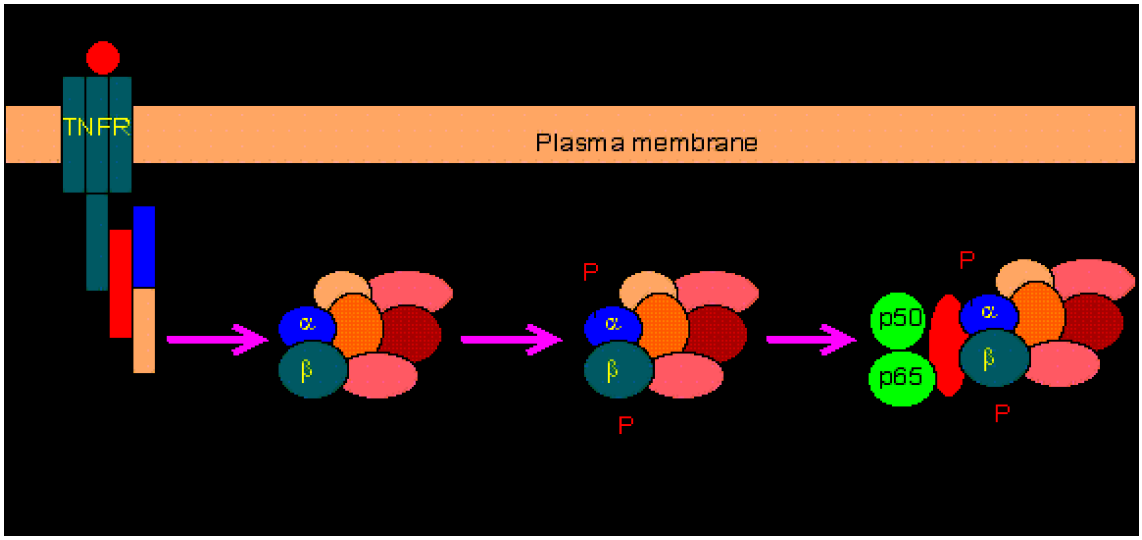

Fig. 11 Activation of NF-κB by the TNF-α pathway

(1) Binding of TNF-α to its receptor recruits TRADD(TNF receptor-associated death domain protein), RIP(receptor-interacting protein) and TRAF2(TNF receptor -associated factor 2).

(2) TRAF2 activates IκB kinase (IKK).

(3) The active IKK activates NF-kB by degrading the inhibitor protein IκB

(4) After NF-κB is activated, it may serve as a transcription factor or inhibit apoptosis.

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 피조개 alcohol 분획제조

한국의 남해안에서 채취한 피조개(*Scapharca broughtonii*)의 생물 견본을 국내 광주의 수산 시장에서 구입하였다. 피조개의 조직(근육)을 제거하고 빙냉 식염으로 세척한 후 사용할 때까지 -30℃에 보관하였다. 동결 조직 (500g)을 잘게 썰어서 실온에서 7일 동안 2L 에탄올/물(60: 40, v/v)에 담구었다. 고상 잔류물을 원심분리하여 제거하고, 얻어진 에탄올-수용액을 감압하에 30℃에서 회전증발기로 증발시켜 에탄올을 제거하였다. 결과의 수용액에 활성탄(20 g/ℓ)을 첨가한 후 이것을 2 시간 동안 교반시켰다. 활성탄을 여과에 의해 수용액으로부터 분리하고 증류수로 세척하였다. 유효 물질들을 각각 80% 아세톤 및 100% 에탄올을 사용하여 활성탄으로부터 용출시켰다. 두 용출물을 합하여 감압하에 30℃에서 회전증발기로 건조시켰다. 건조 잔류물을 100% 에틸 아세테이트, 100% 에탄올 및 100% 메탄올 100 ml로 단계적 용출에 의해 분획화하였다. 얻어진 에탄올 분획(A) 및 메탄올 분획(B) 추가로 정제하였다. 에탄올 분획을 2ml로 농축시킨 후 실리카-겔 (2.5 x 20 cm)의 컬럼에 가하였다. 에틸 아세테이트로 세척한 후, 유효 물질들을 에틸 아세테이트/에탄올 (2:1, v/v)로 용출시키고 회전증발기로 건조시켰다. 건조 잔류물(35mg: SⅢ)을 -30℃에서 저장하고 후속 실험에 사용하였다. 메탄올 분획(B)은 10ml로 농축시킨 후 실리카-겔 (2.5 x 20 cm)의 컬럼에 가하였다. 에틸 아세테이트로 세척한 후, 유효 물질들을 에틸 아세테이트/메탄올 (9:1, v/v)로 용출시키고 회전증발기로 건조시켰다. 농축물에서 형성된 유적(430mg: AⅡ)을 고체 화합물로부터 분리하여 후속 실험에 사용하였다.(Fig. 12)

2. 세포배양과 시약

HL-60 cell line은 ATCC(American Type Culture Collection, MD,USA)로부터 입수하였고 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 보충한 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, USA)에 보관하여 배양하였다. Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell을 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 RPMI 1640배지에서 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. mice로부터 분리한 비장세포와 macrophage는 10% fetal bovine serum과 항생제가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 보관하였다.

1,25(OH)$_2$D$_3$와 all-*trans* retinoic acid, Giemsa staining solution, ethanol, methanol-free paraformaldehyde, LPS(from E. coli 0111:B4)와 다른 시약들은 Sigma-Aldrich Chemical co.(St. Louis MO, USA)로부터 구입하였다.

3. 세포의 생존능 및 증식의 판정

세포의 생존력은 trypan blue exclusion assay(Coligan et al., 1995)에 의해 판정하였다. 생존력은 total cell에서 살아있는 cell의 %로 계산하였다. 세포의 증식은 MTT〔3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium〕 시약을 사용하여 그 활성정도를 측정하였다. MTT assay는 다음과 같이 실시하였다. 10㎕의 MTT(5㎎/㎖)를 96-well plates의 각 well에 첨가하고 37℃에서 4시간동안 incubation한 후, 상층액을 제거해 주고 DMSO로 형성된 불용성 침전물을 0.04N HCl(in isopropanol) 100㎕에 녹였다. 각 well의 흡광도를 540㎚에서 kinetic microplate reader를 사용하여 측정하였다.

4. 분화유도의 준비

1mM 1,25(OH)$_2$D$_3$와 1mM all-*trans* retinoic acid의 stock solution을 absolute ethanol(Hayman, UK)에 용해시켜 -70℃에서 보관하였다. 피조개의 ethanol 분획(SIII) 또한 ethanol에 용해시켜 40㎎/㎖의 stock solution을 만들었다. 최종농도의 ethanol

이 HL-60 cell의 분화와 증식에 영향을 미치지 않게 하기 위해 growth medium으로 최소한 1,000배 정도 희석하였다. 모든 조작은 부드러운 빛에서 수행하였다.

5. 세포 분화의 판정

1) 형태학적 연구

HL-60 세포주를 10% FBS가 포함된 RPMI 1640배지(Gibco BRL, USA)에서 배양하고 배지에 HL-60 세포만, 배지에 2.5~20 ㎍/ml의 피조개의 ethanol 분획(SIII), 5nM $1,25\text{-}(OH)_2D_3$, 2.5~20 ㎍/ml의 피조개의 ethanol 분획(SIII)과 5nM $1,25\text{-}(OH)_2D_3$, 50nM all-*trans* retinoic acid 또는 2.5~20 ㎍/ml의 피조개의 ethanol 분획(SIII)과 50nM all-*trans* retinoic acid 혼합액을 각각 HL-60 세포가 있는 배지에 첨가하고 37℃에서 72시간 배양하였다. 각각의 배양물로부터 single cell 부유물을 수집하고, 수집한 각각의 세포(2×10^5cell)를 cyto-funnel에 넣고 cytospin centrifuge에서 500rpm으로 회전시켰다. slide들은 methanol로 고정시키고 건조시킨 후 Giemsa staining solution으로 20분간 염색하였다. 염색 후 탈이온수로 세척하여 건조시키고 현미경으로 관찰하였다. 염색된 세포의 크기, 세포 가장자리의 형태, 핵의 형태학적인 특성 등을 평가하였다.

2) NBT분석법을 이용한 분화된 HL-60 세포의 비율측정

HL-60 cell의 분화는 Collins 등이 사용한 NBT(nitroblue tetrazolium reduction) assay에 의해 측정하였다(Collins et al., 1979). NBT assay는 조직 PA(plasminogen activator)로 자극시 phagocytic cell이 superoxide를 생산하는 능력에 기초를 하고 있다. HL-60 세포주를 10% FBS가 포함된 RPMI 1640배지(Gibco BRL, USA)에서 배양하고 배지에 각각 0, 2.5, 5, 10 또는 20㎍/ml의 농도로 피조개의 ethanol 분획(SIII)을 첨가하였으며 각 농도의 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 첨가된 배지에 5nM $1,25\text{-}(OH)_2D_3$

또는 50nM all-*trans* retinoic acid를 각각 첨가한 다음, 37℃에서 72시간 배양하였다. 이어 각 배양물을 원심분리하여 수집한 각각의 세포(2× 10^5cell)를 0.2% nitroblue tetrazolium과 PA가 1ng/㎖가 용해된 PBS에 현탁시키고, 37℃에서 30분간 암실에서 배양하였다. Cytospin slide를 준비하고 PMA로 자극시킨 호흡폭발반응(respiratory burst)의 지표인 blue-black nitroblue diformazan 침전물, 즉 발생된 청흑반점의 생성빈도를 측정하였다. 최소한 200 cell이 각 시험에서 확인되었다.

3) 면역형광염색 및 세포형광분석법

분화된 HL-60 세포의 세포 표면항원인 CD11b의 발현정도를 세포형광분석법을 이용하여 분석하였다. Immunfluorescence의 정량적 측정은 Kim 등(Kim et al, 1995)이 사용한 multiparameter data acquisition and display system(MDADS)이 장착된 flow cytofluorograph(Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA)에서 수행하였다. 간단히 살펴보면 HL-60 세포주를 10% FBS가 포함된 RPMI 1640배지(Gibco BRL, USA)에서 배양하고 배지에 10㎍/ml 피조개의 ethanol 분획(SIII) , 5nM 1,25-$(OH)_2D_3$, 10㎍/ml의 피조개의 ethanol 분획(SIII)과 5nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 혼합액, 50nM all-*trans* retinoic acid ,10㎍/ml의 피조개의 ethanol 분획(SIII)과 50nM all-*trans* retinoic acid 혼합액을 각각 첨가하고 37℃에서 72 시간동안 배양하였다. 각각의 배양물로부터 single cell 부유물을 다양한 배양으로부터 수집하여 ice-cold phosphate buffered saline(PBS, pH7.4)로 2회 세척하였다. 형광(Fluorescein isothiocyanate, FITC)표지된 anti-human CD14 단클론항체 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 첨가한 후, 4℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어 배양된 세포를 PBS로 세척하고 1% paraformaldehyde이 함유된 PBS에 고정시켰으며 cytoflurorometric 분석을 수행하였다. Background 염색은 특이항체로 염색한 cell을 FITC-conjugated isotype control 단클론항체로 염색한 cell로 대치시켜 판정하였다. One parameter fluorescence histogram은 최소한 1× 10^4cell을 분석하여 결정하였다.

6. Nitric oxide의 측정

NO가 IL-12의 생성량에 영향을 준다는 보고와 함께 후천성 면역에도 관여될 수 있다는 가능성이 제시되고 있어 RAW 264.7 세포에 피조개의 ethanol 분획(SIII)을 처리하였을 때 NO 생성량에 어떤 변화가 나타나는지를 조사하고자 아래와 같은 실험을 수행하였다. RAW 264.7 세포를 각각 세포수가 2× 10^6cells/㎖로 되도록 조절한 후 48-well plate에 넣고 1~2시간 전 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 LPS 0.5㎍/㎖와 피조개의 ethanol 분획(SIII) 여러 농도를 동시에 처리하여 48시간 배양하였다. 배양 후 상층액에 Sulfanilamide와 Naphthyletylene diamine을 가해서 각각 5분 정도 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. IL-12 p40 promoter 구조와 일시적인 유전자이입

pXP2로 부터의 murine IL-12 p40 promoter -689/+98 fragment(Ma et al., 1996)를 pGL3-basic luciferase vector(Promega, Madison, WI)의 *Kpn*I/*Xho*I 부위에 넣어 subclone하였다. 모든 deletion 돌연변이는 BamHI 부위를 포함하고 있는 primer를 사용한 polymerase chain reaction(PCR)에 의해 제조되었다. Linker-scanning 돌연변이체는 NF-κB site에 대한 돌연변이된 sequence를 포함한 내재 overlapping primer를 사용하여 2단계의 PCR의 과정에 따라 발생시켰다. Transfection을 위해 세포는 10% fetal bovine serum이 첨가된 배지로 24-well plates에서 24시간 배양하였고 manufacturer's protocol(Qiagen, Valencia,CA)에 따라서 Superfect의 존재 하에 지시된 plasmid와 함께 transfect하였다. 12시간 후 세포를 세척하고 10% fetal bovine serum이 포함된 DMEM으로 다시 배양하였다. 24시간 후 cell을 harvest하고 luciferase 활성을 assay하였다. 활성측정 결과는 LacZ 발현으로 표준화시켰다.

8. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

IL-12는 외부자극이 존재할 때 그에 반응하여 당단백질 형태로 세포외로 분비된다. 따라서 대식세포의 특징을 갖는 세포주 RAW 264.7에서 피조개의 alcohol분획이 IL 생성량에 어떤 영향을 주는지 보기 위해서 이 실험을 진행하였다. 특히 이렇게 분비된

cytokine은 분자량이 작은 편에 속해서 이를 특이적으로 측정하기 위해서 두개의 항체를 이용해서 IL-12를 각각 다른 부위에서 결합하도록 하였다. 배양 상층액에서 IL-12 p40의 정량은 IL-12 p40에 특이 단클론 항체를 사용한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)에 의해 측정하였다(Kang et al., 2002). RAW 264.7 세포를 각각 세포수가 2×10^4 가 되도록 준비한 후 24시간 37℃, 5% CO_2 상태에서 배양하였다. IL-12의 자극원인 LPS(0.5㎍/ml)와 피조개의 ethanol분획을 여러 농도로 희석해서 준비된 세포에 처리하였다. 48시간 배양한 후, 상층액을 취해서 이미 단클론 항체로 코팅된 판에 넣어 주었다. 코팅된 단일 항체와 결합한 상층액내의 IL-12를 바이오틴이 결합된 제2의 단클론항체와 반응시킨 후 이를 HRP-streptavidin과 결합시켰다. 이때 plate에 도포한 단클론항체는 anti-IL-12 p40 monoclonal antibody C17.8(PharMingen, San Diego, CA)을 사용하였고 바이오틴이 결합된 제2의 단클론항체는 anti-IL-12 p40 monoclonal antibody C15.6(PharMingen, San Diego, CA)을 사용하였다. 두개의 단일 항체와 결합된 IL-12를 측정하기 위해서 과산화효소의 기질인 OPD(o-phenylene diamine)를 반응시킨 후 490nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard curve는 재조합 IL-12를 사용하여 결정하였고 최소 감지농도는 30pg/㎖이었다.

9. 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

IL-12의 생성은 주로 전사단계에서 조절이 된다고 알려져 있다. 피조개의 ethanol 분획(SIII) 처리 시 IL-12의 생성량에 대한 영향을 전사과정에서 알아보기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응법(Reverse transcription-polymerase chain reaction)을 이용해 IL-12의 mRNA 발현수준을 조사해 보았다. RAW 264.7 세포를 각각 세포수가 1×10^6이 되도록 준비한 후 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640배지(Gibco BRL, USA)에서 37℃, 5% CO_2의 조건하에서 24시간동안 배양한 다음, 아무것도 처리하지 않은 음성대조군, 0.5㎍/ml LPS 만을 처리한 양성 대조군, 0.5 ㎍/ml LPS 와 10 ㎍/ml의 피조개 ethanol분획을 동시에 처리한 실험군을 준비하고, 다시 6시간 동안 배양하였다. TRIZOL 시약을 사용해 각 세포에서 total mRNA를 얻고 이를 주형으로 하고 primer로서 oligo(dT)를 사용한 RT-PCR을 수행하여 각 mRNA에 대한 cDNA를 얻었다. 그리고 얻어진 cDNA를 PCR방법(Chung et al., 2003)으로 증폭시켜서 IL-12 p40, β-actin의 유전자를

각각 얻었다. 이때 사용된 PCR primer의 sequences는 다음과 같다.

mouse IL-12 p40 sense, 5'CAGAAGCTAACCATCTCCTGGTTTG3'
antisense, 5'TCCGGAGTAATTTGGTGCTTCACAC3'
β-actin sense, 5'TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC3'
antisense, 5'TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG3'

PCR 반응은 MJ thermal cycler(Watertown, MA)를 사용하여 94℃ 30sec, 58℃ 45sec, 72℃ 30sec 동안 35cycle을 수행하였다. 증폭한 후 RT-PCR 생성물 6㎕는 1.5%(w/v) agarose gel에 전기영동 시킨 후 ethidium bromide로 염색하고 자외선 투사기에서 관찰하였다.

10. NF-κB binding activity 측정(Electrophoretic Mobility shift assay, EMSA)

그람 음성균의 막 구성성분인 LPS는 대표적인 IL-12 생성을 증가시킨다고 알려져 있다. IL-12의 생성을 증가시키는 기전으로 전사인자인 NF-κB의 핵 내로의 이동을 촉진시킨 후 핵 내에서 IL-12의 프로모터에 결합하여 IL-12의 생성을 증가시킨다는 보고가 있다. 이러한 LPS에 의한 증가된 IL-12의 생성을 피조개의 alcohol분획이 NF-κB의 작용을 억제함으로서 IL-12의 생성을 감소시키는지 보기 위해서 핵 내 단백질을 분리한 후 NF-κB probe와의 결합정도를 측정하였다. RAW 264.7 세포를 각각 세포수가 2×10^6이 되도록 준비한 후 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640배지(Gibco BRL, USA)에서 37℃, 5% CO_2의 조건하에서 24시간동안 배양하였다. 아무것도 처리하지 않은 음성대조군, 0.5㎍/ml LPS 만을 처리한 양성 대조군, 0.5 ㎍/ml LPS 와 1, 5, 10㎍/ml의 피조개의 ethanol분획을 동시에 처리한 실험군을 각각 준비하고, 다시 1시간 동안 배양하였다 핵 내 단백질을 분리한 후(Dignam et al., 1993) 분리한 핵 내 단백질을 32p로 표지된 NF-κB probe〔Immunoglobulin κ-chain에 있는 NF-κB와 결합된 부위를 포함하고 있는 oligonucleotide(5 'CCGGTTAACAGAGGGGGC -TTTCCGAG3')〕와 반응시킨 후 결합정도를 확인하였다. 단백질과 NF-κB의 특이적인 결합은 50배량의 비표지된, 동일 oligonucleotide 혹은 cAMP 반응인자함유 oligonucleotide로 경쟁실험에 의하여 확인

하였다.

11. 통계처리

Student's t-test와 ANOVA test를 사용하여 다양한 실험군과 대조군에 대한 차이의 통계적 유의성을 결정하였고 P-values <0.05이 유의한 것으로 고려되었다.

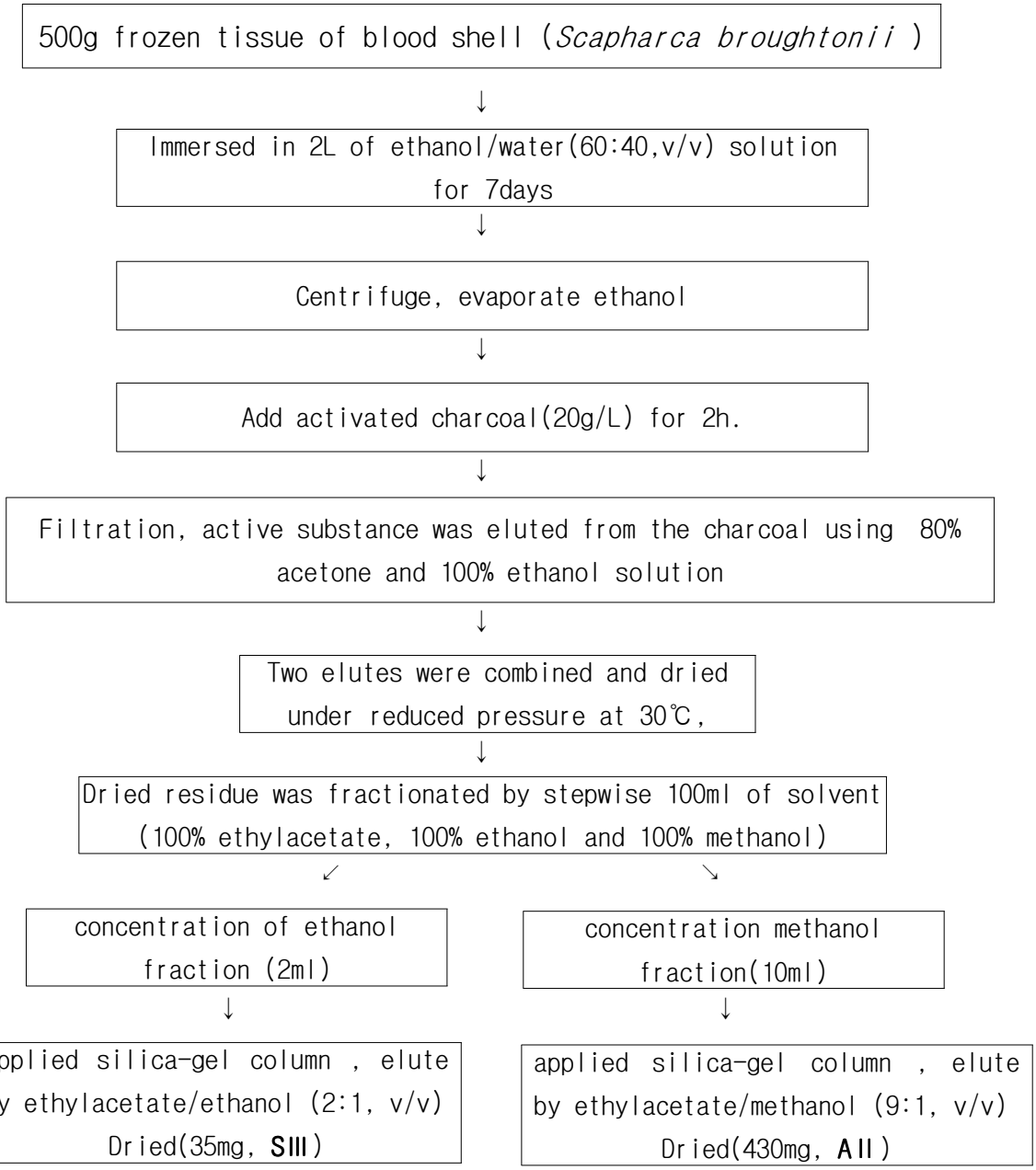

Fig. 12 Sample preparation by purification of blood shell(SIII) extract

Ⅳ. 결과와 고찰

1. 피조개의 ethanol 분획(SⅢ)이 세포의 증식에 미치는 영향

피조개의 ethanol 추출액(SⅢ)이 HL-60 cell과 RAW 264.7 세포에 미치는 세포독성을 알기 위해 MTT assay로 실험한 결과 5 ㎍/ml의 농도로 세포를 72시간동안 처리한 결과에서는 세포증식에 영향을 미치지 않았다. 그러나 5 ㎍/ml 이상의 ethanol 추출액(SⅢ)으로 세포를 72시간 처리했을 때 세포의 증식이 상당히 억제되었다.

2. 피조개의 ethanol 분획(SⅢ)이 HL-60 cell의 분화와 증식에 미치는 영향

HL-60 cell을 2× 10^5cell/㎖ 농도로 접종하였고 세포는 배지 자체 혹은 2.5-20㎍/㎖의 피조개의 ethanol 분획(SⅢ)과 함께 72시간동안 각각 처리하였다. HL-60 cell의 분화에 미치는 피조개의 ethanol 분획(SⅢ)의 효과를 NBT assay로 측정하였다. 각 data는 평균 SEM (n=3)으로 나타내었다. Fig. 13A에서와 같이 2.5㎍/㎖ 이상의 ethanol 분획(SⅢ)으로 incubation시킨 경우에는 농도가 증가함에 따라 cell의 분화가 유도되었다. 20㎍/㎖의 ethanol 분획(SⅢ)으로 HL-60 cell을 72시간 동안 처리한 경우에는 세포의 증식이 억제되었고 세포분화가 20% 정도 증가되었다. 이 결과는 피조개의 ethanol 분획(SⅢ)은 HL-60 cell 분화에 있어 양호한 유도제임을 의미한다.

HL-60 cell을 피조개의 ethanol 분획(SⅢ) 5㎍/㎖로 처리하였을 때 세포의 증식에 영향을 주지 않았다. 그러나 5㎍/㎖ 이상의 ethanol 분획(SⅢ)으로 72시간 처리하였을 때 세포의 증식이 상당히 억제되었다.

세포의 Giemsa staining에 의하면 피조개의 ethanol 분획(SⅢ)이 세포의 형태학적인 면에 미치는 영향은 약간 혹은 거의 효과가 없었다(Fig. 14B).

3. 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 1,25-dihydroxyvitamin D_3와 all -*trans* retinoic acid로 유도된 HL-60 cell 분화에 미치는 영향

피조개의 ethanol 분획(SIII)이 1,25-dihydroxyvitamin D_3와 all -*trans* retinoic acid 에 유도된 HL-60 cell 분화에 미치는 효과를 측정하기 위하여 HL-60 cell에 피조개의 ethanol 분획(SIII)을 $1,25(OH)_2D_3$ 혹은 all-*trans* retinoic acid와 함께 처리하여 세포의 분화를 NBT assay 방법으로 측정하였다. Fig. 13와 같이 피조개의 ethanol 분획(SIII)은 $1,25(OH)_2D_3$와 all-*trans* retinoic acid에 유도된 HL-60 cell 분화를 상승적으로 강화시켰다. 20㎍/㎖ 피조개의 ethanol 분획(SIII)을 5nM $1,25(OH)_2D_3$와 병용 처리하였을 때 각각 처리한 효과의 합인 36.6%보다 훨씬 높은 93.5%의 세포 분화를 나타냈다. 또한 피조개의 ethanol 분획(SIII)과 all-*trans* retinoic acid를 병행 처리하였을 때도 유사한 상승효과를 나타냈다. 피조개의 ethanol 분획(SIII) 20㎍/㎖을 50nM all-*trans* retinoic acid와 병용 처리하였을 때 각각 처리한 효과의 합인 38.2%보다 높은 91.5%의 세포 분화를 나타냈다(Table 3).

피조개의 ethanol 분획(SIII)에 의한 세포 분화가 증가되는 것을 측정하기 위해 HL-60 cell의 형태학적 표현형과 세포표면 항원발현을 분석하였다. HL-60 cell은 72시간 동안 담체 단독(A), 10㎍/ml ethanol 분획(SIII) (B), 5nM $1,25(OH)_2D_3$ (C), 10㎍/ml ethanol 분획(SIII) + 5nM $1,25(OH)_2D_3$ (D), 50nM all-*trans* retinoic acid (E), 또는 10㎍/ml ethanol 분획(SIII) + 50nM all-*trans* retinoic acid (F)로 처리하였다. Fig. 14와 같이 Giemsa 염색된 미분화 HL-60 cell(Fig. 14A)은 우세하게 둥글고 규칙적인 세포 가장자리와 큰 핵을 가진 promyelocyte가 보이는데, 이것은 세포들이 DNA 합성에서 높은 활성화로 빠르게 증식함을 나타내고 있다. 피조개의 ethanol 분획(SIII) 10㎍/ml, 5nM $1,25(OH)_2D_3$ 혹은 50nM all-*trans* retinoic acid로 처리된 세포는 Fig. 14B, 14C, 14E와 같이 불규칙한 세포 가장자리 등 세포 형태학적면에서 상대적으로 적은 변화들을 나타내고 있다. 피조개의 ethanol 분획(SIII) 10㎍/ml을 5nM $1,25(OH)_2D_3$

혹은 50nM all-*trans* retinoic acid와 병용 처리하였을 때 HL-60 cell은 Fig. 14D, 14F와 같이 상당히 감소된 세포 크기, 농축된 염색질과 증가된 세포질 대 핵비(N/C비율,nuclear/cytoplasmic ratio)를 나타내었으며 이로부터 HL-60 cell DNA의 합성이 저하되었음을 알 수 있다. Fig. 14D와 14F에 나타난 바와 같이 일부 세포들은 horseshoe(말편자) 모양의 핵을 나타내는데, 이는 monocytic lineage로 세포가 분화하는 징후라 할 수 있고 일부 세포들은 multilobed 핵이 나타나는데, 이는 granulocytic lineage로 분화하는 징후를 각각 나타낸다.

세포형광분석은 HL-60cell의 특정 표면 항원의 발현여부를 검사하였다. CD11b(Mac-1)는 활성화된 monocytes, granulocytes, lymphocytes 그리고 NK cell의 sub set에서 발현된다. HL-60 cell은 고농도의 $1,25(OH)_2D_3$와 all-*trans* retinoic acid에 의해 monocytes/macrophages와 granulocyte로 각각 분화될 때 세포표면 marker CD11b를 발현한다(Kansas et al., 1990). HL-60 cell은 72시간 동안 담체 단독(A), 10㎍/ml ethanol 분획(SIII) (B), 5nM $1,25(OH)_2D_3$ (C), 10㎍/ml ethanol 분획(SIII) + 5nM $1,25(OH)_2D_3$ (D), 50nM all-*trans* retinoic acid (E), 또는 10㎍/ml ethanol 분획(SIII) + 50nM all-*trans* retinoic acid (F)로 처리하였다. 세포들은 PE-conjugated anti-CD11b mAb (unshaded area) 또는 PE-conjugated isotype control mAb (shaded area)을 사용하여 세포형광분석법에 의해 평가하였다. Fig. 15와 같이 피조개의 ethanol 분획(SIII)을 5nM $1,25(OH)_2D_3$ 혹은 50nM all-*trans* retinoic acid와 병행 처리하였을 때 CD11b-positive cell의 수를 상승적으로 증가시켰는데 이것으로부터 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 $1,25(OH)_2D_3$ 혹은 50nM all-*trans* retinoic acid에 유도되는 HL-60 cell 분화를 더욱 상승적으로 강화시킴을 알 수 있었다.

본 연구의 결과들은 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 세포분화의 연구에 대한 model system으로 널리 사용되고 있는 인간의 전골수구세포성 백혈병 HL-60 cell에서 $1,25(OH)_2D_3$와 all-*trans* retinoic acid로 유도되는 분화를 강화시켜줌을 보여주고 있다. HL-60 cell을 피조개의 ethanol 분획(SIII)과 $1,25(OH)_2D_3$ 혹은 all-*trans* retinoic acid와 병용 처리하였을 때 monocytes 혹은 granulocytes로서 상승적인 분화를 촉진하였다. 이전의 많은 연구에서 HL-60 cell 분화에 대한 상가 혹은 상승효과를 나타내는 몇 가지 화학물의 병용 처리를 보여주고 있다. 이런 병용은 butyrate와 all-*trans* retinoic acid 혹은 hexafluoro vitamin D_3(Brietman & He, 1990; Yoshida et al.,

1992), vitamin D_3와 interferon-γ(Weinberg et al., 1986), vitamin D_3와 tumor necrosis factor-α(Wang et al., 1991), all-*trans* retinoic acid와 α-tocopherol(Makishima et al., 1996), vitamin D_3와 vitamin E succinate(Sokoloski et al., 1997) 등이 있다.

피조개의 ethanol 분획(SIII)이 $1,25(OH)_2D_3$ 혹은 all-*trans* retinoic acid로 유도된 HL-60 cell 분화를 가능하게 하는 기전은 분명하지 않다. $1,25(OH)_2D_3$와 all-*trans* retinoic acid는 gene transcription(유전자전사)의 regulator에 대한 핵 수용체로(Haussler et al., 1998), 신속한 non-genomic 효과(Norman et al., 1997)를 나타나게 하는 것으로 추정되는 세포막 수용체로 상호작용의 결과로서 세포분화를 가능하게하고 있으며 voltage-gate인 calcium과 chloride channel의 통로(Zanello & Norman, 1997) 그리고 protein kinase C의 활성과 mitogen-활성화된 protein kinase(Pan et al., 1997; Song et al., 1998)를 포함하고 있는 생물학적 반응을 조절한다고 알려져 있다.

All-*trans* retinoic acid는 백혈병 환자의 치료에 사용되고 있고(Warrell et al., 1991) 이들의 유도체는 건선의 치료에 사용되었을 뿐만 아니라(Orfanos et al., 1987) Vitamin D_3와 몇 가지 유도체도 건선의 치료에 사용되고 있다(Kragballe, 1992). 결과적으로 피조개의 ethanol 분획(SIII)과 $1,25(OH)_2D_3$ 병용 혹은 피조개의 ethanol 분획(SIII)과 all-*trans* retinoic acid의 병용은 $1,25(OH)_2D_3$ 나 all-*trans* retinoic acid 단독 사용하는 것 보다 환자의 치료에 있어 독성은 감소되고 더 큰 치료반응을 나타낼 것으로 사료되어진다. 이러한 가능성을 평가하기 위해 현재 부작용을 유도하지 않는다고 알려진 피조개의 ethanol 분획(SIII)의 농도에 대해서 임상적인 연구가 필요하다. Curcuminoids, tocopherols, carotenoids 그리고 다른 식용식물과 같은 많은 식품 화합물은 부분적으로 RAs와 vitamin D_3 등의 내재적으로 생성된 분화자극제와 협력함으로 인간의 암을 예방할 수 있게 한다. 전염병학 연구에서 과일과 몇 가지 야채들을 아주 많은 양 섭취하는 사람은 수많은 종류의 암에 대한 낮은 위험도를 가진다고 보고 되었다(Negri et al., 1991).

결론적으로 피조개의 ethanol 분획(SIII)은 $1,25(OH)_2D_3$와 all-*trans* retinoic acid로 유도된 HL-60 cell의 분화를 강화시켜준다. 이 결과는 피조개의 ethanol 분획(SIII) 등 활성물질들이 anti-carcinogenic 효과를 갖는다는 것을 설명할 수 있고 신생물질환(종양)의 치료에 피조개의 ethanol 분획(SIII)을 사용할 수 있음을 의미한다.

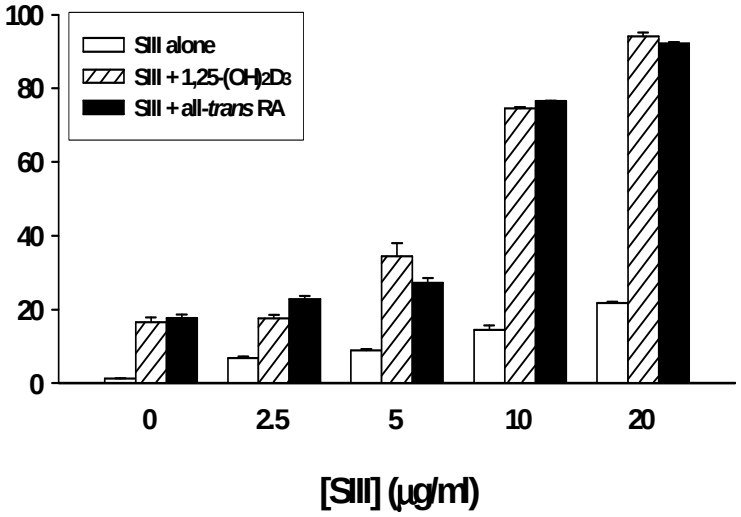

Fig. 13 Effects of the ethanol fraction of blood shell(SIII) on HL-60 cell differentiation and cellular proliferation

HL-60 leukemia cells were treated with various concentrations of the ethanol fraction of blood shell(SIII) alone or in combination with either 5 nM $1,25\text{-}(OH)_2D_3$ or 50 nM all-*trans* RA for 72 h. Afterwards, the cellular differentiation was determined by the NBT reduction assay(A). The cellular proliferation was determined by the MTT assay(B). Each data represent the mean ± SEM (n=3)

Table 3. Effects of the ethanol fraction of blood shell(SⅢ) on HL-60 cell differentiation

Conc. (㎍/ml)	SⅢ		1,25-$(OH)_2D_3$ (5nM)		all-*trans* RA(50 nM)	
	Average	S.D	Average	S.D	Average	S.D
0	2.1	0.09	17.3	0.55	17.9	0.49
2.5	8.1	0.15	18.4	0.41	22.5	1.26
5	9.7	0.12	33.0	1.51	26.2	1.25
10	14.5	0.16	72.2	2.99	74.5	0.60
20	21.7	0.10	93.5	0.49	91.5	1.04

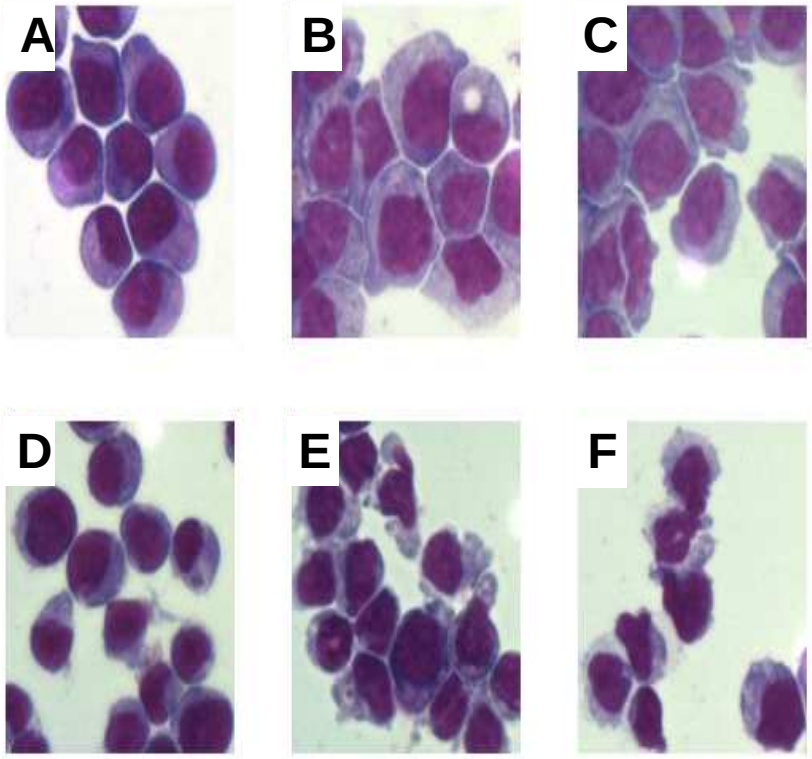

Fig. 14 Morphologic analysis of HL-60 cells treated with the ethanol fraction of blood shell(SIII) alone or in combination with 1,25-$(OH)_2$ D3 or all-*trans* retinoic acid

HL-60 cells were treated for 72 h with vehicle alone (A), 10 ㎍/ml ethanol fraction of blood shell(**SIII**) (B), 5nM 1,25-$(OH)_2D_3$ (C), 10 ㎍/ml ethanol fraction of blood shell(**SIII**) plus 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ (D), 50 nM all-*trans* retinoic acid (E) or 10 ㎍/ml ethanol fraction of blood shell(**SIII**) plus 50 nM ATRA (F). Cytospin slides were made from HL-60 cells ($2x10^5$ cells/ml) and stained with Giemsa staining solution.

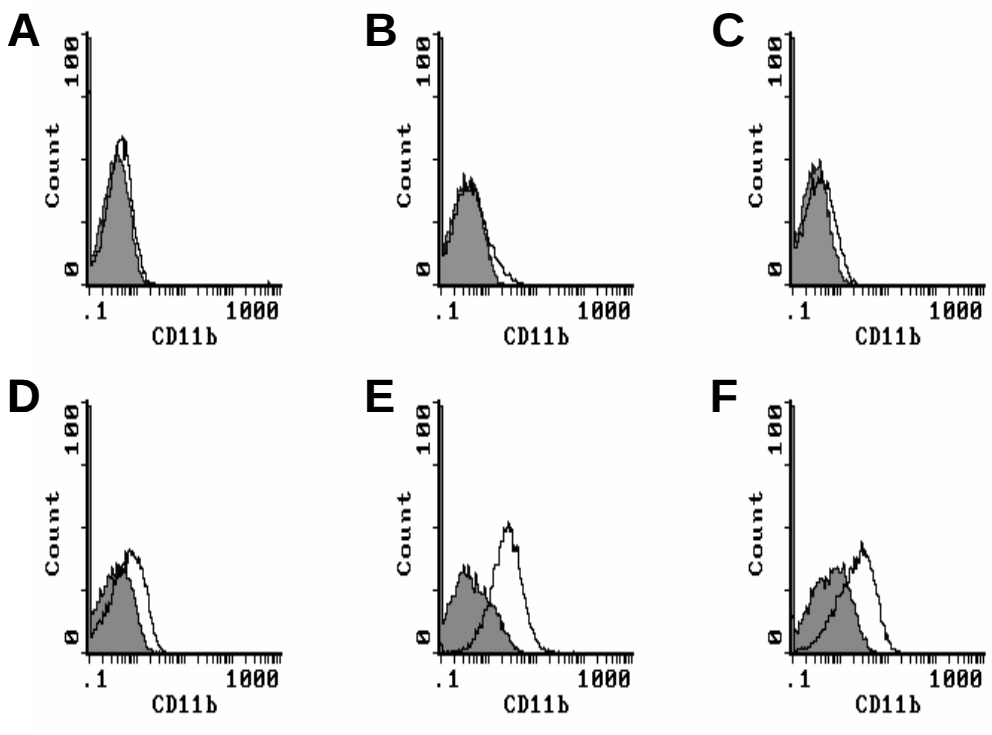

Fig. 15 The ethanol fraction of blood shell(SIII)-mediated HL-60 cell differentiation as determined by cytofluorometric analysis using mAb for differentiation marker CD11b.

HL-60 cells were treated for 72 h with vehicle alone (A), 10 ㎍/ml ethanol fraction of blood shell(SIII) (B), 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ (C), 10 ㎍/ml ethanol fraction of blood shell(SIII) plus 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ (D), 50 nM all-*trans* retinoic acid (E) or 10 ㎍/ml ethanol fraction of blood shell(SIII) plus 50 nM all-*trans* retinoic acid (F). The cells were assessed by cytofluorometric analysis using PE-conjugated anti-CD11b mAb (unshaded area) or PE-conjugated isotype control mAb (shaded area).

4. 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포의 NO 생성에 미치는 영향

피조개의 ethanol 분획(SIII)이 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포의 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 LPS에 의해 자극되어 증가된 NO의 생성을 용량 의존적으로 감소시킴을 알 수 있었다.

5. 피조개의 ethanol 분획(SIII)(SIII)이 LPS에 의해 자극된 mouse의 macrophage에 의한 IL-12의 생산에 미치는 영향

피조개의 ethanol 분획(SIII)이 LPS에 의해 자극된 mouse의 macrophage에 의한 IL-12의 생산에 미치는 효과에 대한 실험을 수행한 결과 Fig. 16A에서와 같이 LPS는 예상한 것과 같이 IL-12의 생성을 빠르게 유도하였다. 그러나 피조개의 ethanol 분획(SIII)은 LPS에 유도된 IL-12 생성을 농도 의존적으로 상당히 억제하였다. 더욱이 IL-12 분비의 억제는 mRNA 생성의 결과인지를 결정하기 위해 IL-12 p40과 p35 mRNA 발현에 있어 피조개의 ethanol 분획(SIII)의 효과를 LPS로 자극된 macrophage로 분석하였다. Fig. 16B에서와 같이 피조개의 ethanol 분획(SIII)은 IL-12 p40 mRNA 수준을 유의성있게 억제하였으며 이는 피조개의 ethanol 분획(SIII)에 의한 IL-12 생성억제가 mRNA 수준에서 일어나고 있음을 보여주고 있다. 반면에 피조개의 ethanol 분획(SIII)으로 처리하였을 때 LPS에 의해 자극된 macrophage의 β-actin mRNA생성 수준에는 영향을 미치지 않았는데 이는 피조개의 ethanol 분획(SIII)에 의한 IL-12 생성 억제효과는 세포활성의 일반적 저해(dampening)의 결과가 아님을 알 수 있었다. 또한 피조개의 ethanol 분획(SIII)에 의한 IL-12 생성 억제가 일반적인 세포 독성효과로부터 기인하지 않았는데 trypan blue exclusion test에 의해 입증된 바와 같이 배양기간 동안에 macrophage의 생존력은 피조개의 ethanol 분획(SIII) 농도의 존재 하에 모든 배양 중 일정하게 유지되었기 때문이다.

최근 일부 화합물들이 monocytes와 macrophage를 포함한 몇 가지 항원제시세포에 있

어 IL-12 생성을 억제하는것으로 보고되고 있다. Corticosteroid는 IL-12 생성을 억제함으로 $CD4^+$ T cell에서 IL-4 합성을 유도하는 macrophage의 능력을 증진시키는 것으로 나타났다(Dekruyff et al., 1998). 또한 angiotensin 전환효소저해제인 captopril, lisinopril 도 마찬가지로 사람의 peripheral blood mononuclear cell로부터 IL-12 생성을 억제함을 보여주었다(Constantinescu et al., 1998). Phosphodiesterase의 inhibitor인 thalidomide는 IL-10, transforming growth factor-β(TGF-β), PGE_2와 같은 IL-12 생성의 내인성 억제제와는 다른 기전으로 사람의 monocytes로부터 IL-12 생성을 억제함이 보고되었다(Moller et al., 1997). Salbutamol을 포함한 β_2-adrenergic 화합물들은 사람의 monocytes 혹은 증가된 세포내 cAMP 수준에 의한 dendritic cell로부터 IL-12 생성을 억제하며 이는 Th1 cell의 발생을 억제시키는 반면 Th2 cell의 분화를 촉진하였다(Panina-Bordignon et al., 1997).

IL-12 생성을 억제하는 피조개의 ethanol 분획(SIII)의 활성을 나타내는 영역을 확인하기 위해 Fig. 17A 에서와 같이 전사개시부위와 연관된 -689에서 +98, -185에서 +98의 부위로부터 IL-12 p40 promotor sequence를 포함하는 보고된 일련의 luciferase reporter 구조체를 제작하였다. IL-12 p40 subunit는 높은 유도성과 정교하게 조절되는 IL-12의 component로 알려져 있다(Kang et al., 1996). Mouse RAW 264.7 monocytic cell를 각각의 구조체로 형질감염시키고 각각에 LPS 단독 혹은 LPS와 피조개의 ethanol 분획(SIII)으로 처리한 후 luciferase activity를 측정하였다. Fig. 17B 에서와 같이 2개의 construct는 피조개의 ethanol 분획(SIII)으로 처리하지 않았을 때는 LPS에 의해 강한 자극을 나타냈지만 피조개의 ethanol 분획(SIII)으로 처리하였을 때는 약화된 자극을 나타냈다. 특히 -185(p40/185) deleting sequence는 LPS 의존 promotor activity을 손상시키지 않았으며 피조개의 ethanol 분획(SIII)의 억제효과는 여전히 관찰되었다. 따라서 피조개의 ethanol 분획(SIII)의 target site는 이 영역 안에 있음을 알 수 있었다. 피조개의 ethanol 분획(SIII)- 매개 억제 작용에 있어서 p40 promotor의 -121과 -131 사이에 발견되는 NF-κB site의 역할에 대한 직접적인 증거를 확보하기 위하여 -689와 +98 construct내의 linker scanning mutation p40/LS을 도입하였다. LPS 의존성 promotor 활성은 상당량 감소되었지만 p40/LS에서는 여전히 관찰되었다. 이러한 결과는 NF-κB site는 p40 promotor의 LPS-매개 유도에 중요한 것으로 보여지고 있다. 그러나 LPS-자극된 cell에 피조개의 ethanol 분획(SIII)을 첨가하면 p40/LS에

단순히 약한 억제 효과를 가졌는데 이로부터 IL-12 생성에 대한 피조개의 ethanol 분획(SIII)의 억제효과는 κB site를 통해 매개되어짐이 명백하게 나타났다.

p40-κB 기능이 피조개의 ethanol 분획(SIII)에 매개된 억제의 기전을 좀 더 자세히 알기위해 LPS로 자극되지 않은 세포, LPS로 자극된 primary macrophage 세포, LPS와 피조개의 ethanol 분획(SIII)으로 처리한 세포의 핵 추출액에 존재하는 NF-κB binding activity를 분석하였다. 피조개의 ethanol 분획(SIII) 1,5,10 ㎍/ml의 존재 또는 부재하에 LPS로 자극시킨 macrophage 세포로부터 제조된 핵 추출물을 공통의 IG-κB부위를 함유하는 labeled oligonucleotide를 사용하여 전기영동에 의한 운동성 shift assay에서 NF-κB 결합 activity에 대해 실험하였다. Fig. 18 에서와 같이 LPS 자극된 macrophage의 핵 추출액은 consensus IG-κB site를 포함하고 있는 labeled oligonucleotide를 사용한 EMSA에서 강력한 NF-κB 결합 activity를 보여 주었다. 이러한 binding activity는 특이적인 것으로 unlabeled된 동일한 oligonuceotide에 의해 억제되지만 관련 없는 비특이성 oligonuceotide와는 경쟁적 저해현상을 보여주지 않았기 때문에 LPS에 의하여 자극된 핵 추출액의 NF-κB binding activity는 특이적인 결합임이 확인되었다. 또한 자극되지 않은 cell로부터의 핵 추출물에서도 특이적인 결합 활성은 나타나지 않았다. LPS와 피조개의 ethanol 분획(SIII)으로 처리한 macrophage의 핵 추출물은 피조개의 ethanol 분획(SIII)물의 용량 의존적으로 NF-κB 결합 activity를 감소시켰다. 본 연구의 피조개의 ethanol 분획(SIII)물에 의한 IL-12 생성의 NF-κB를 매개로 한 억제기전은 이전의 연구 결과들 즉 1.25-dihydroxy-vitamin D_3와 retinoid 그리고 chloromethyl keton이 NF-κB 활성의 downregulating과 IL-12 p40 gene의 NF-κB sequence 결합을 억제함으로써 IL-12 생성을 억제한다는 (D'Ambrosio et al., 1998; Na et al., 1999; Kang et al., 1999) 보고들과 일치하였다.

결론적으로 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 LPS-자극된 macrophage에서 IL-12 p40-κB site에 대한 NF-κB 매개 결합의 down regulating을 통해서 IL-12 생성을 억제함을 보여주고 있다. Macrophage에서 피조개의 ethanol 분획(SIII) 매개 IL-12 생성 억제는 type-1 cytokine 반응에 의해 두드러지는 특정 면역-매개 질환을 제어함에 있어서 피조개의 가능한 용도를 제시해 준다. 항염증 활성을 포함하고 있는 피조개의 ethanol 분획(SIII)의 몇 가지 생물학적 효과를 잘 설명할 수 있다.

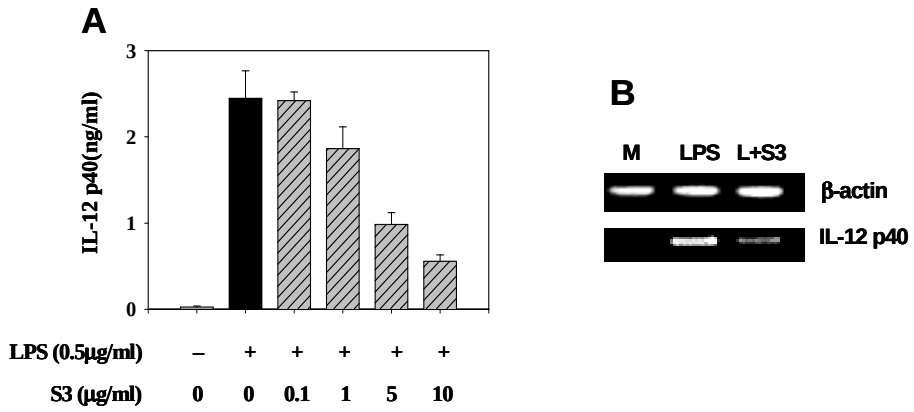

Fig. 16 Inhibition of IL-12 expression in LPS-activated monocytic RAW264.7 cell-line by the ethanol fraction of blood shell(SIII)

(A) RAW264.7 cells were stimulated with LPS (0.5 ㎍/ml) for 48 hr in the absence or presence of various concentrations of the ethanol fraction of blood shell(S III), and IL-12 levels in the culture supernatants were evaluated by an ELISA. The ELISA data represent the mean ± standard error (n=3). *P < 0.01 vs. a group stimulated with LPS alone. (B) Inhibition of IL-12 mRNA expression. RAW264.7 cells were stimulated with LPS (0.5 ㎍/ml) for 6 hr in the absence or presence of 10 ㎍/ml ethanol fraction of blood shell(SIII), and the IL-12 mRNA were investigated by RT-PCR. RT-PCR products for IL-12 p40 and β-actin were analyzed in 1.5 % agarose gels.

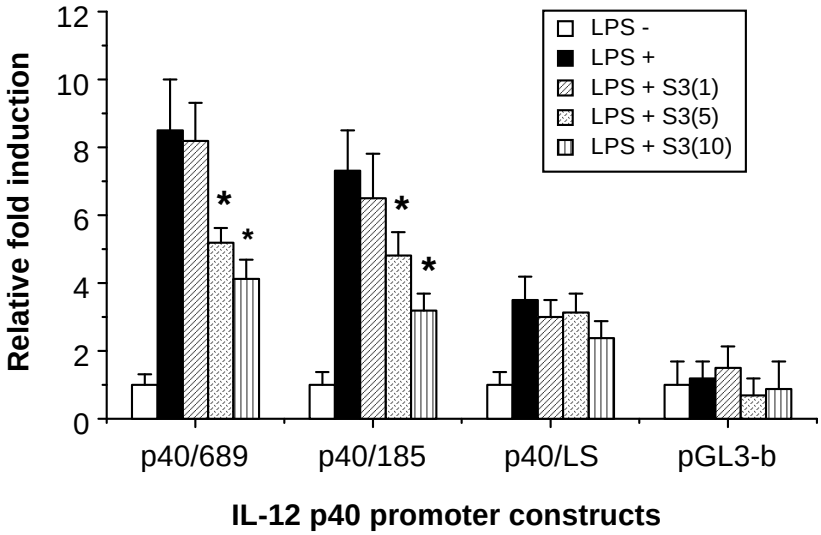

Fig. 17 Analysis of ethanol fraction of blood shell(SIII)- mediated transcriptional repression of IL-12 p40 promoter constructs activated by lipopolysaccharide

RAW264.7 cells were transiently transfected with mouse IL-12 p40 promoter constructs and a linker-scanning mutant of the NF-kB site (schematic representation, A),followed by stimulation with LPS (0.5 ㎍/ml) either in the absence or presence of the ethanol fraction of blood shell(SIII)(1, 5 and 10 ㎍/ml). Normalized luciferase expressions from triplicate samples are presented relative to the LacZ expressions (B). The data represent the mean +/- SD from triplicate determinations. The data are representative of three independent experiments. *P < 0.05 vs. a group stimulated with LPS alone.

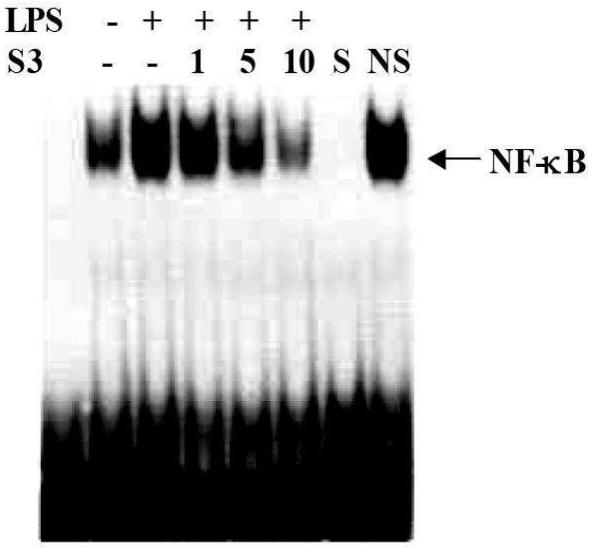

Fig. 18 Ethanol fraction of blood shell(SIII)-mediated inhibition of NF-kB binding by NF-kB

Nuclear extracts prepared from monocytic cells stimulated with LPS either in the absence or presence of ethanol fraction of blood shell(SIII) (1, 5 and 10 ㎍/ml) were examined for NF-kB binding activity in the electrophoretic mobility shift assay using a labeled oligonucleotide containing a consensus immunoglobulin-kB site. The specific binding of NF-kB to kB sites was confirmed in nuclear extracts in the presence of an unlabeled, identical oligonucleotide (S) and nonspecific oligonucleotide (NS), respectively. The specific NF-kB complex is as indicated.

Ⅴ. 결론

국내에서 자생하는 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 세포 분화 및 면역조절에 미치는 영향을 조사하였다. 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 세포분화에 미치는 영향은 HL-60 cell culture system을 통해 관찰하였다. HL-60 cell은 피조개의 ethanol 분획(SIII) 2.5~20 ㎍/㎖로 72시간 처리하였을 때 농도가 증가됨에 따라 세포분화가 유도되었다. 5 ㎍/㎖의 피조개의 ethanol 분획(SIII)농도에서는 세포의 증식에는 영향을 미치지 않았으나 5 ㎍/㎖ 이상의 농도에서는 세포의 증식을 상당히 억제하였다. 20 ㎍/㎖의 피조개의 ethanol 분획(SIII)으로 HL-60 cell을 72시간 처리한 경우에는 세포의 증식이 억제되었고 세포분화가 20% 정도 증가 되었다. Giemsa로 cell을 염색한 결과 피조개의 ethanol 분획(SIII)은 세포 형태학에 거의 영향을 미치지 않았다. Flow cytometric 분석을 통해 피조개의 ethanol 분획(SIII)을 1,25-dihydroxyvitamin D_3와 병용 처리하면 현저하게 monocyte로 분화를 자극하였고 피조개의 ethanol 분획(SIII)을 all-*trans* RA와 병용 처리하면 현저하게 granulocyte로 분화를 촉진시켰다. 이러한 피조개의 ethanol 분획(SIII)의 전골수구성 백혈구 암세포주 분화 촉진효과는 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 항암효과를 가지며 백혈병 치료에 효과적으로 활용할 수 있음을 보여준다.

또한 interleukin-12(IL-12)생성을 억제하는 자가면역질환의 실험적인 model system을 이용하여 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 LPS에 의해 활성화된 mouse macrophage의 IL-12 생성에 미치는 영향을 관찰하였다. 피조개의 ethanol 분획(SIII)은 RAW 264.7 monocytic cell-line에서 용량 의존적으로 LPS에 의해 유도되어지는 IL-12의 생성을 강력하게 억제하였다. 이러한 IL-12 생성 억제 기전은 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 NF-κB 결합 활성을 억제함으로써 LPS에 의한 IL-12생성유도를 저해하는 것으로 밝혀졌다. Macrophage에서 피조개의 ethanol 분획(SIII)이 매개하는 IL-12 생성 억제 효과는 Type-1 cytokine 반응에 의해 나타나는 항염증 활성으로 특정면역- 매개질환을 제어함으로 면역질환 치료제로 사용될 수 있음으로 사료된다.

Ⅵ. 참고문헌

Adorini, L., Interleukin-12, a key cytokine in Th1-mediated autoimmune diseases, Cell Mol. Life Sci., 55, 1610-1625 (1999).

Akiyama, T. and Toyoshima, K., Markes alteration in phosphorylation of the Rb protein during differentiation of human promyelocytic HL60 cells,. Oncogene., 5, 79-183 (1990).

Baeuer, P.A. and Henkel, T., Function and activation of NF-κB in the immune system, Annu. Rev. Immunol., 12, 141-179 (1994).

Barnes, P.J. and Karin, M., Nuclear factor-kappa B : a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases, N. Engl. J. Med., 336, 1066-1071 (1997).

Barnes, P.J. and Liew, F.Y., Nitric oxide and asthmatic inflammation, Immunology Today, 16, 128-130 (1995).

Beck, K.F., Eberhardt, W., Frank, S., et al., Inducible NO synthase : Role in cell signaling, J. Exp. Biol., 202, 645-653 (1999).

Beg, A.A. and Baltimore, D., An essential role for NF-kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death, Science, 274, 782-784 (1996).

Bennett, J.M. et al., Proposal for the classification of the acute leukemias, French-Amreican-British (FAB) Cooperative Group, Br. J. Haematol., 33, 451 (1976).

Blowenstein, C.J., Dinerman, J.L. and Snyder, S.H., Nitric oxide : a physiologic messenger, Ann. Int. Med., 120, 227-237 (1994).

Boder, D.L., Johnson, D.S., Yun, W. and Tarby, C.M., Molecular basis for sequence selective DNA alkylation by (+)- and ent-(-)-CC-1065 and related agents : alkylation site models that accommodate the offset AT-rich adenine N3 alkylation selectivity, Bioorg. Med. Chem., 2, 115-135 (1994).

Borish, L. and Rosenwasser, L.J., Update on cytokine, J. Allergy Clin. Immunol., 97, 719-733 (1996).

Breitman, T.R. and He, R.Y., Combinations of retinoic acid with sodium butyrate, dimethylsulfoxide or hexamethylene bisacetamide synergistically induce differentiation of the human myeloid leukemia cell line HL60, Cancer Res., 50, 6268-6273 (1990).

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. U.S.A., 77, 2936-2940 (1980).

Brelvi, Z.S. and Studzinski, G.P., Change in the 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).

Bruger, C., Wick, M. and Muller, R., Lineage-specific regulation of cell gene expression in differentiating myeloid cells, J. Cell Sci, 107, 2047-2054 (1994).

Brűne, B., Knethen, A., Sandau, K.B., Nitric oxide and its role in apoptosis, Eur. J. Pharmacol., 351, 261-71 (1998).

Castaigne, S., chomienne, C., Daniel, M.T., Berger, R., Fenaux, P. and Degos, L., All trans retinoic acid as a differentiating therapy for acute promyelocytic leukemias, I. Clinical results Blood, 76, 1704, 1990.

Charles, A. Janeway, Immunobiology(5th), 신일상사, 서울, p.71, 716 (2002).

Chen, Z.X., Xue, Y.Q., Zhang, R., Tao, R.F., Xia, X.M., Li, C., Wang, W., Zu, W.Y., Yao, X.Z. and Ling, B.J., A clinical and experimental study on all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients, Blood, 78, 1413-1419 (1991).

Chung, H.T., Samlowski, W.E. and Daynes, R.A., Modification of the Murine Immune System by Glucocorticosteroids of Circulation Lymphocytes, Cell Immunol., 101, 571-585 (1986).

Chung, S.W., Kang, B.Y. and Kim, T.S., Inhibition of interleukin-4 production in CD4+ T cells by peroxisome proliferators-activated receptor-g (PPAR- g) ligands : involvement of physical association between PPAR-g and the nuclear factor of activated T cells transcription factor, Mol. Pharmacol., 64, 1169-1179 (2003).

Coligan, J.E., Kruisbeck, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., Current Protocols in Immunology (2nd ed.), Wiley, New York (1995).

Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E. and Gallo, R.C., Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide, J. Exp. Med., 149, 969-974 (1979).

Collins, S.J., The HL-60 promyelocytic leukemia cell line : proliferation, differentiation and cellular oncogene expression, Blood, 70, 1233-1244 (1987).

Constantinescu, C.S., Goodman, D.B., Ventura, E.S., Captopril and lisinopril suppress production of interleukin-12 by human peripheral blood mononuclear cells, Immunol. Lett., 62, 25-31 (1998).

D'Ambrosio, D., Cippitelli, M., Cocciolo, M.G., Mazzeo, D., DiLucia, P., Lang, R., Sinigaglia, F. and Panina-Bordignon, P., Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3 : Involvement of NF-kB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene, J. Clin. Invest., 101, 252-262 (1998).

Degos, L., Chomienne, C., Daniel, M.T., Berger, R., Dombret, H., Fenaux, P. and Castaigne, S., Treatment of first relapse in acute promyelocytic leukemia with all trans retinoic acid, Lancet., 2, 1440 (1990).

DeKruyff, R.H., Fang, Y., Umetsu, D.T., Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production, J. Immunol., 160, 2231-2237 (1998).

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder. R.G., Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei, Nucleic Acids Res. 11, 1475-1489 (1993).

Drapier, J.C. and Hibbs, J.B., Differntiation of Murine Macrophages to Express Nonspecific Cytotoxicity for Tumor Cells Results in L-argine-dependent Inhibition of Mitochondrial Iron-sulfer Enzymes in the Macrophage Effector Cells, J. Immunol., 140, 2689-2838 (1988).

Dressor, D.R. and Phillips, J.M., The orientation of the adjuvant activity of Salmonella typhosa lipopolysaccharide and lentinam, Immunol., 27, 895 (1974).

Fenaux, P., Chastang, C., Chevret, S., Sanz, M., Dombret, H., Archimbaud, E., Fey, M., Rayon, C., Huguet, F., Sotto, J.J., Gardin, C., Makhoul, P.C., Travade, P., Solary, E., Fegueux, N., Bordessoule, d., Miguel, J.S., Link, H., Dasablens, B., Stamatoullas, A., Deconinck, E., Maloisel, F., Castaigne, S., Preudhomme, C. and Degos, L., A randomized comparison of all-trans-retinoic acid(ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therpy in newly diagnosed acute promyelocyte leukemia, Blood, 94, 1192-1200 (1999).

Fish, B., Clinical trials for the evaluation of cancer therapy, Cancer, 54, 2609 (1984).

Foo, S.Y., Nolan, G.P., NF-kapaB to the rescue : RELs, apoptosis and celluar transformation, Trends Genet., 15, 229-235 (1999).

Frank, D.A. and Sartorelli, A.C., Alteration in tyrosine phosphorylation during the granulocytic maturation of HL-60 leukemia Cells, Cancer Res., 48, 52-58 (1989).

Frank, D.A. and Sartorelli, A.C., Regulation of protein phosphotyrosine content by changes in tyrosine kinase and protein phosphotyrosine phosphatase activities during induced granulocytic and monocytic differentiation of HL-60 leukemia cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 140, 440-447 (1986).

Frankel, S.R., Eardley, A., Heller, G., Berman, E., Miller, W.H., Dmittrovsky, E. and Warrell, R.P., All-trans retinoic acid for acute promylocytic leukemia,

Results of the New York study Ann. Intern. Med., 120, 279 (1994).

Frankel, S.R., Eardley, A., Lauwers, G., Weiss, M. and Warrel, R., The retinoic acid syndrome in acute promylocytic leukemia, Ann. Intern. Med. 117, 292 (1992).

Ghosh, S., May, MJ. and Kopp, E.B., NF-κB and Rel proteins : evolutionarily conserved mediators of immune responses, Ann. Rev. Immunol., 16, 225-260 (1998).

Gillesses, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F.J., Stremlo, D.L. and Familletti, P.C., M.K Mouse interleukine-12 (IL-12) p40 homodimer : A potent IL-12 antagonist, Eur. J. Immunol, 25, 200-206 (1995).

Glasgow, L.A., Fishbach, J. and Bryant S.M., Immunomodulation of host resistant to experimental viral infections in mice : Effect of Corynebacterium and BCG, Infect. Dis., 135, 763 (1977).

Goldsmith, J.P., Griffith, H.L., Detels, R., Beeser, D. and Neumann, L., Emergency room admissions, meteorologic variables, and air pollutants : a path analysis, Am. J. Epidemiol.(UNITED STATES), 118(5), 759-778 (1983).

Golub, S.H. and Morton, D.L., Corelationship of in vitro and in vivo assays immunocompetance in cancer patients, Cancer Res., 34, 1722 (1984).

Goodman, G.E., Yen, Y.P., Cox, T.C. and Crowlry, J., Effect of verapamilon in vitro cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cell, Cancer Res. 47, 2295 (1987).

Gri, G., Savio, D., Trinchieri, G. and Ma, X., Synergistic regulation of the human interleukin-12 p40 promoter by NF-kB and Ets transcription factors in

Epstein-Barr virus-transformed B cells and macrophages, J. Biol. Chem., 273, 6431-6438 (1988).

Hall, S.S., IL-12 at the crossroads, Science, 268, 1432 (1995).

Halpen, B., Fray, A. and Crepin, Y., Corynebacterium parvum, a potent immunostimulant in experimental infections and in malignancies, In Immunolgy, Ciba Foundation Symphosium No.18, ed. by GEW Wolstenholme and J. Knight, E. Elservier, Amsterdam, 217 (1973).

Hamel, P.A., Phillips, R.A., Muncaster, M. and Gallie, B.L., Speculations on the roles of RB1 in tissue-specific differentiation, tumor initiation and tumor progression, FASEB J., 7. 846-854 (1993).

Harsh, E.M. and Ereireish, E.J., Host defence mechanisms and their modification by cancer chemotherapy, In Methods in Cancer Res., New Yock Academic Press, 335 (1986).

Hartwell, J.L. and Schrecker, A.W., Components of podophllin V. the constitution of podophyllotoxin, J. Am. Chem. Soc., 73, 2909-2916 (1951).

Haskovec, C., Lemez, P., Neuwirtova, R., Wilhelm, J. and Jarolim, P., Differentiation of human myeloid leukemia cell line ML-1 induced by retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D_3, Neoplasma, 37, 565 (1990).

Haussler, M.R., Whitfield, G.K., Haussler, C.A., Hsieh, J.C., Thompson, P.D., Selznick, S.H., Dominguez, C.E. and Jurutka P.W., The nuclear vitamin D receptor : biological and molecular regulatory properties revealed, J. Bone Miner. Res. 13, 325-349 (1998).

Heo, H. T., Kim, J.M., Hong, J.S., Kang Y.J.,Son, C.H., and Lee, J.K. Marine Biology, pp.156-158. IN: Echiurida. Minstry of Education, Seoul, 1986

Hibbs, J.B., Lambert, L.H. and Remington, J.S., Possible Role of Macrophage-mediated Nonspecific Cytotoxicity in Tumor Resistance, Nature, New Biol., 235, 48 (1972).

Hibbs, J.B., Taintor, R,R., Chapman, H.A. and Weniberg, J.B., Macrophage Tumor Killing : Influence of the Local Environment, Science, 197 (1977).

Hibbs, J.B., Tanitor, R.R., Vavrin, I. and Eachlin, E.M., Nitric oxide : A cytotoxic activated macrophage effector molecul, Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 87-92 (1998).

Hongo, S., Sakagami, H. and Sato, T., Decrease in asparagine synthetase activity during cell adifferentition of mouse and human leukemia cell line, Leukemia, 4, 708 (1990).

Honma, Y., Hozumi, M., Abe, E., Konno, K. and Fukushima, M., 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and alpha-hydroxyvitamin D_3 prolong survival time of mice inoculated with myleoid leukemia cells. Pro. Natl. Acad. Sci., 80, 201 (1983).

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S. and Wolf, S.F., O'Gassa A and Murphy KM : Development of T_H1 $CD4^+$ T cell through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages, Science, 260, 547 (1993).

Huang, M., Yuchen, Y., Shurong, C., Lu, M.X., Zhoa, L., Gu, L.J. and Wang, Z.Y., Use of all trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia,

Blood, 72, 567 (1988).

Hugod, C., Myocardial morphology in rabbits exposed to various gas-phase constituents of tobacco smoke-anultrastructural study, Atherosclerosis (NETHERLANDS), 40(2), 181-190 (1981).

Israel, A., The IKK complex : An integrator of all signals that activate NF-kappaB, Trends Cell Biol., 10, 129-133 (2000).

Ito, N. and Shimura, K., Studies on antitumor activity of traditional Chinese Medicines. Jpn. J. cancer Chemother., 12, 2149(1985).

Itokawa, H., Research on antineoplastic drugs from natural sources : Especially from higher plants, Yakugaku Zasshi, 108(9), 824-841 (1988).

Itokawa, H., Watanabe, K. and Mihashi, S., Screening test for antitumor activity of crude drugs, Shoyakugaku Zasshi, 33, 95-102 (1979).

Jiang, h., Lin, J., Su, Z., Collart, F.R., Huberman, E., Fisher, P.B., 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).

Kang, B.Y., Chung, S.W., Cho, D., Kim, T.S., Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the induction of interleukin-12 p40 production in mouse macrophages by berberine, a benzodioxoloquinolizine alkaloid, Biochem. Pharmacol., 63, 1901-1910 (2002).

Kang, B.Y., Chung, S.W., Im, S.Y., Hwang, S.Y., Kim, T.S., Chloromethyl ketones inhibit interleukin-12 production in mouse macrophages stimulated with

lipopolysaccharide, Immunol. Lett., 70, 135-138 (1999).

Kang, K., Kubin, M., Cooper, K.D., Lessin, S.R., Trinchieri, G. and Rook, A.H., IL-12 synthesis by human Langerhans cells, J. Immunol. 156, 1402-1407 (1996).

Kansas, G.S., Muirhead, M.J. and Dailey, M.O., Expression of the CD11/CD18, leukocyte adhesion molecule 1 and CD44 adhesion molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans, Blood, 76, 2483-2492 (1990).

Karin, M. and Ben-Neriah, Y., Phosphorylation meets ubiquitination : the control of NF-κB activity, Annu. Rev. Immunol., 18, 621-663 (2000).

Kemp, M., THeander, T.G. and Kharazmi, A., The contrasting roles of $CD4^{+}$ T cell in intracellular infections in humans : Leishmaniasis as an example, Immunol. Today, 17, 13 (1996).

Kikumoto, S., Miyazima, T. and Kimura, K., Study on the polysaccharide produced by Schizophyllan commune Fnes, Jap. J. Agr. Chem., 162, 256 (1971).

Kim, K.K., Kawano, Y. and Yamazaki, Y., A novel prophyrin photosensitizer from bamboo leaves that induces apoptosis in cancer cell lines, Anticancer Res., 23, 2355-2361 (2003).

Kim,K.-S. 1990, *Thesis collection*, Chonbuk national University, Chonju, 32,321

Kim, T.S., Xu, W.S., Sun, T. and Cohen, E.P., Immunization with interleukin-2/interferon-gamma double cytokine-secreting allogeneic fibroblasts prolongs the survival of mice with melanoma, Melanoma Res., 5, 217-227 (1995).

Kingston, D.G., Samararanayake, G. and Ivey, C.A.. The chemistry of taxol, a clinically useful anticancer agent, J. Nat. Prod., 53(1), 1-12 (1990).

Kino, K., Yamashita, A. and Yamaoka, K., Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, LingZhi-8 (LZ-8) from Ganoderma Lucidium, Gann., 5, 557 (1989).

Kinoshita, G., Nakamura, F. and Maruyama, T., Immunological studies on polysacchride from crude drugs, Shoyakugaku Zasshi, 40, 325-332 (1986).

Knowles, R.G. and Mocada, S., Nitric oxide as a signal in blood vessels, TIBS., 17, 399 (1992).

Kobyashi, M, Fitz, L, Ryan, M, Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perusis, P. and Trinchieri, G., Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes, J. Exp. Med., 170, 827 (1989).

Koeffler, H.P., Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells : therapeutic implication, Blood, 62, 709-721 (1983).

Kokker, D.L., Chemical-induced immunodulation, Am. Vet. Med. Assoc., 181, 1102 (1982).

Kosuge, T., Yokota, M., Sugiyama, M., Okamoto, K., Saito, M. and Yamamoto, T., Studies on Chinese Medicines used for cancer III. Cytotoxic constituent against HeLa cells in the fruit of Trapa bispinosa Roxb, Yakugaku Zasshi, 106(2), 183-185 (1986).

Kotani, S., Watanabe, Y. and Shimono, T., Immunoadjuvant activity of cell wall, their water-soluble fractions and peptidoglycan subunits, prepared from varoius gram-positive bacteria and of synthetic N-acety-lmuramyl peptides, Immunitatsforshung and Expermentelle The rapie, 149, 302 (1975).

Kragballe, K., Vitamin D3 and skin diseases, Arch. Dermatol. Res., 284, 3036 (1992).

Kuo, P.C. and Schroeder, R.A., The cmerging multifaceted roles of nitric oxide, Ann. Surg. 221(3), 220-235 (1995).

Kyon, O.K., Min D.K., Lee J.R., Je J.G. and Choe, B.L. Korean Mollusks with Color Illustration, pp.214-217. Hanguel, Busan, 2001

Lamont, A.G. and Adorini, L., IL-12 : a key cytokine in immune regulation, Immunol. Today, 17, 214-217 (1996).

Lee, H.J., Jeong, Y.S., Ryu, S.Y. and Ryu. J.H., Inhibition of nitric oxide synthesis by 8-epi-xanthatin in activated RAW 264.7 cells, Yakhak Hoeji, 42, 5 (1998).

Lee, J.H., Chung, Y.S. and Ha, T.Y., Immunological studies on natural killer cells, J. Kor. Immunol., 6, 15 (1984).

Lowenberg, B., Downing J.R. and Burnett, A., Medical progress : acute myeloid leukemia, N. Engl. J. Med. 341, 1051-1062 (1999).

Ma, X, Chow, J.M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S.F., Dzialo, R. and Trinchieri, G., The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon-g

in monocytic cells, J. Exp. Med., 183, 147-157 (1996).

Ma, X. and Trinchieri G., Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells, Adv. Immunol. 79, 55-92 (2001).

MacEwan, E.G., Immunotherapy, Current Veterinary Therapy (8 ed.) by RW Kirk, Saunders Philadelphia, 45 (1983).

Macness, G.B., Lagrange, P.H. and Ishibashi, T., The modifying effect of BCG on the immunological induction of T cells, J. Exp. Med. 139, 1540(1974).

Makishima, M., Kanatani, Y., Yamamoto-Yamaguchi, Y. and Honma, Y., Enhancement of activity of 1,25-dihydroxyvitamin D3 for growth inhibition and differentiation induction of human myelomonocytic leukemia cells by tretinoin tocoferil, atocopherol ester of all-trans retinoic acid, Blood, 87, 3384-3394 (1996).

Mangelsdorf, D.J. and Koeffler, H.P., 1,25-dihydroxyvitamin D_3 induced differentiation in a human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) : receptor-mediated maturation to macrophage-like cells, J. Cell Biol., 98, 391 (1984).

Mavlight, G.M., Hersh, E.M. and McBride, C.M., Lymphocyte blastogenesis induced by autochtonous human solid tumor cells, Relationship to stage of disease and serum factor, Cancer, 34, 1712 (1982).

McCartney-Francis, N., Allen, J.B., Mizel, D.E., Albina, J.E., Xie, Q.W., Nathan, C.F. and Wahl, S.M., Auppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase, J. Exp. Med., 178, 749-754 (1993).

McCartney-Francis, N., Allen, J.B., Mizel, D.E., Xie, Q.W. Nathan, C.F. and Wahl, S.M., Supperession of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase, J. Exp. Med., 178, 749 (1993).

Miller, T.E., Mackaness, S.B. and Lagange, P.H., Immunopotentiation with BCG, Modulation of the responce to sheep red blood cells, Nat. Cancer Institute 51, 1969 (1973).

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. Statistical Year Book of Agriculture Forestry and Fisheries. Dongtang Munwhasa, Seoul, 1993,

Ministry of Marine Affairs and Fisheries. Statistical Year Book of Marine Affairs and Fisheries. Cheongwoo Munwhasa, Seoul, 2001

Moller, D.R., Wysocka, W., Greenlee, B.M., Ma, X., Wahl, L., Flockhart, D.A., Trinchieri, G. and Karp, C.L., Inhibition of IL-12 production by thalidomide, J. Immunol. 159, 5157-5161 (1997).

Moncade, S. and Higgs, A., The L-arginine-nitric oxide pathway, N. Engl. J. Med., 329, 2002-2012 (1993).

Murakami, H. and Yamaguchi, K., Antitumor acivity of lignin and pyrocatechol and their action on dehydroribonucleic acid, Enzymologia, 35, 139-153 (1968).

Na, S.Y., Kang, B.Y., Chung, S.W., Han, S.J., Ma, X., Trinchieri, G., Im, S.Y., Lee, J.W., Kim, T.S., Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NF-kB., J. Biol. Chem., 274, 7674-7680 (1999).

Nathan, C., Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, FASEB. J., 6, 3051 (1992).

Neale, M.L. and Matthews, S., Antimicrobial effects of a macrophage derived cytotoxin from the serum of BCG-primed rabbits (tumor necrosis serum), Med. Microbial., 17, 211 (1984).

Negri, E., La Vecchia, C., Franceschi, S., D'Avanzo, B. and Parazzini, F., Vegetable and fruit consumption and cancer risk, Int. J. Cancer, 48, 350-354 (1991).

Norman, A.W., Okamura, W.H., Hammond, M.W., Bishop, J.E., Dormanen, M.C., Bouillon, R., van Baelen, H., Ridall, A.L., Daane, E., Khoury, R. and Farach-Carson, M.C., Comparison of 6-s-cis-and 6-s-trans-locked analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D3 indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6-s-cis- nor 6-s-trans-locked analogs are preferred for genomic biological responses, Mol. Endocrinol., 11, 1518-1531 (1997).

Norman, A.W., Roth, J. and Orch, L., The vitamine endocrine system : steroid metabolism, hormone receptors, and biological response, Endocrine Rev., 3, 331 (1982).

Nose, Y., Hanyu, I., Iwai, T.and Shimizu, M. Encyclopedia of Fishers,p.9. Donggyeongdang Chulpan, Tokyo, Japan, 1989

Ohashi, H., Ichikawa, A., Takagi, N., Hotta, T., Naoe, T., Ohno, R., Saito, H., Remission induction of acute promyelocytic leukemia by all-trans-retinoic acid :

Molecular evidence of restoration of normal hematopoiesis after differentiation and subsequent exinction of leukemia clone, leukemia, 6, 859 (1992).

Olsson, I., Gullberg, U., Ivhed, I. and Nilsson, K., Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line, U-937 by 1,25-dihydroxyvitamin D_3, Cancer Res., 43, 5862 (1983).

Orfanos, C. E., Ehlert, R., and Gollnick, H., The retinoids. A review of their clinical pharmacology and therapeutic use. Drugs, 34, 459-503 (1987).

Pan, Q., Granger, J., O'Connell, T.D., Somerman, M.J., and Simpson, R.U., Promotion of HL-60 cell differentiation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulation of protein kinase C levels and activity, Biochem. Pharmacol., 54, 909-915 (1997).

Panina-Bordignon, P., Mazzeo, D., Lucia, P.D., D'Ambrosio, D., Lang, R., Fabbri, L., Self, C., Sinigaglia, F., β2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12, J. Clin. Invest. 100, 1513-1519 (1997).

Pettit, G.R., Singh, S.B. and Hamel E., Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combrestatio A-4 Experimentia, 45, 209 (1988).

Pike, J.W., Vitamin D receptor : Structure and function in transcriptio, Annu. Rev. Nutr., 11, 189 (1991).

Pols, H.A.P., Birkenhagef, J.C., Foekens, J.A. and Van Leewen, J.P.T.M., Vitamin D : A modulator of cell proliferation and differentiation, J. Stetoid Biochem., 37, 873 (1990).

Provvedini, D.M., Deffos, L.T. and Manolagas, S.C., 1,25-dihydroxyvitamin D_3 promotes in vivo morphological and enzymatic changes in normal human monocytes consistent with their differentiaton into macrophage, Bone, 7, 23 (1986).

Provvedini, D.M., Tsoukas, C.D., Deffos, L.T. and Manolagas, S.C., 1,25-dihydroxyvitamin D_3 receptors in human leukocytes, Science, 221, 1181 (1983).

Rigby, W.F.C., Denome, S. and Fanger, M.W., Regultion of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D_3 : specific inhibition of the level of messenger RNA, J. Clin. Invest., 79, 1659 (1987).

Ruddon, R.W., Chemical carcinogenesis, In principles of drug action(3rd), Churchill Livingstone, 735 (1990).

Ryu, J.H., Ahn, H., Kim, J.Y. and Kim, Y.K., inhibitory activity of plane extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophager, Phytother Res., 17, 485-489 (2003).

Ryu, J.S., Korean Shellfishes with Color Illustrsration, pp.109-111, Ijjisa, Seoul,1995

Scariban, E., Mitchell, T. and Kufe, D., Expression of the c-fms protooncogene during human monocytic differentiation, Nature, 316, 64 (1985).

Scott, M.G. and Hancock, R.E., Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system, Crit. Rev. Immunol., 20 (2000).

Scott, P., IL-12 : initiation cytokine for cell-mediated immunity, Science, 260,

496 (1993).

Sen, R., Baltimore, D., Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-κB by a posttranslational mechanism, Cell, 47, 921-928 (1988).

Shimizu, M., Yamaguchi, K. and Takiguchi,M . Fish Guide Book. p. 7, 102. Yeoja Yeongyangdaehak Chulpanbu, Tokyo, Japan, 1989

Simpson, R. U., Hsu, T., Begley, D. A., Mitchell, B. S. and Alizadeh, B.N., Transcriptonal regulation of the c-myc protooncogene by 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in HL-60 promyelocytic leukemia cells, J. Biol. Chem., 262, 4104 (1987).

Sokoloski, J.A., Shyam, K. and Sartorelli, A.C., Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by curcumin in combination with low levels of vitamin D3, Oncol. Res., 9, 3139 (1997).

Song, X., Bishop, J.E., Okamura, W.H. and Norman, A.W., Stimulation of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in promyelocytic NB4 leukemia cells : astructure-function study, Endocrinology, 139, 457-465 (1998).

Spicer, C.W., The distribution of oxidized nitrogen in urban air, Sci. Total Environ(NETHERLANDS), 24(2), 183-192 (1982).

Stajerward, J.M. and Vanky, F., Lymphocytophenia and change in stribution of human B and T lymphocyte in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma, Lancet, 1, 1352 (1982).

Steinman, R.A., Hoffmn, b., Iro, A., Gulliouf, C., Liebermann, D.A.,

el-Houseini, M.E., Induction of p21 (WAF1/CIP1) during differentiation, Oncogene, 9, 3389-3396 (1994).

Stem, A.S., Podlaski, F.J., Hulmes, J.D., Pan, Y.C.E., QUinn, P.M., Wolitzky, A.G., Familleti, P.C., Stremlo, D.L., Truitt, T., Chizzonite, R. and Gately, MK., Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxcic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 6808 (1990).

Stushr, H.H.J., Kwon, N.S., Weise, M. and Nathan, C., Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase : an FAD-and FMN-containing flavoprotein, Proc. Natl. Sci. USA., 88, 7771 (1991).

Suffness, M. and Douros, J.. Current status of the NCI plant and animal product program, J. Nat. Prod., 45(1), 1-14 (1982).

Sun, G., Ouyang, R., Chen, S., Gu, Y., Huang, L., Lu, J., Wang, Z., Follow up of 481 patients with with APL after CR using ATRA, Chin. J. Hematol., 15, 411 (1994).

Suyama, M. and Konosu, S. Susan Sigpumhak, pp 48-70, Hangseongsa Husaenggag, Tokyo, Japan, 1987

Tanaka, H., Abe, E., Miyaura, C., Kuribayashi, T., Konno, K., Nishii, Y. and Suda, T., Alpha, 25-dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukemia cell line (HL-60), The presence of a cytosol receptor and induction of differentiation, Biochem. J., 204, 713 (1984).

Tanaka, H., Abe, E., Miyaura, C., Shiina, Y. and Suda, T., 1,25-dihydroxyvitamin

D3 induces differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) into monocytic macrophage, but not into granulocytes, Biochem. Biophy. Res. Commun., 117, 8692 (1983).

Tetsuka, T., Daphna-Iken, D., Srivastava, S.K., Baier, L.D., DuMaine, J. and Morrison, A.R., Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 168-172 (1994).

Trinchieri, G., Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity, Annu. Rev. Immunol. 13, 251 (1995).

Tsuchiya, Y. Marine Chemistry. pp.8-15. Hangseongsa Husaenggag, Tokyo, Japan,1962,

Turka, L.A., Goodman, R.E., Rutkowski, J.L., Sima, A.A., Merry, A., Mitra, R.S. et al., Interleukine 12 : a potential link between nerve cells and the immune response in inflammatory disorders, Molecular med, 1, 690-699 (1995).

Vane, J.R., Mitchell, J.A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bailey, D.B., Croxtal, J. and Willoughb, D.A., Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 2046-2050 (1994).

Wade, M.I.I., Detecting calcium response in cultured cells using the visible wavelength calcium probe, Fluo-3, Aplication Note Number E-2 (1990).

Wang, S.Y., Chen, L.Y., Wang, S.J., Lin, C.K. and Ho, C.K., Growth inhibition and differentiation in HL-60 leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3

and tumor necrosis factor, Exp. Hematol., 19, 1025-1030 (1991).

Wang, Z.Y., Chen, Z., Hunag, W., Li, X.S., Lu, J.X., Huang, L.A., Zhang, F.Q., Gu, L.J., Ouyang, R.R. and Chen, S.J., Problems existing in differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia (APL) with all-trans retinoic acid (ATRA), Blood Cells, 19, 633 (1993).

Warrel, R.P., Frankel, S.R., Miller, W., Itri, L., Andreeff, M., Jabukowski, A., Gabrilove, J., Gordon, M.S. and Ditrovsky, E., Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all trans retinoic acid), N. Engl. J. Med., 324, 1385 (1991).

Weinberg, J.B., Misukonis, M.A., Hobbs, M.M., and Borowitz, M.J., Cooperative effects of gamma interferon and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in inducing differentiation of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells, Exp. Hematol., 14, 138-142 (1986).

Weisz, A., Cicatiello, I. and Esumi, H., Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopoly-saccharide and NG-monomethyl-L-arginine, Biochem. J., 316, 209 (1996).

Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. and Mathison, J.C., CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, Science, 249, 1431-1433 (1990).

Yamaguchi, A., Ochiai, S. and Kihara, H. Heonshin, pp. 44-45. Yama-Kei publishers Co., Ltd., Tokyo, Japan, 1987

Yee, A.S., Shih, H.H. and Tevosian, S.G., New sperspectives on retinoblastoma

family Functions in differentiation, Front. Biosci., 3, 532-547 (1998).

Yoo, S.K. Shallow-Sea Culture, pp.215-235. Sae-ro Publishing Co., Busan, 1979,

Yoshida, M., Tanaka, Y., Eguchi, T., Ikekawa, N. and Saijo, N., Effect of hexafluoro-1,25-dihydroxyvitamin D3 and sodium butyrate combination on differentiation and proliferation of HL-60 leukemia cells, Anticancer Res., 12, 1947-1952 (1992).

Ysukagoshi, S., Fundmental approaches to cancer immunotherapy using a protein bound polysaccharide PS, K with special reference to its clinical application, In Mizuno, D., Chihara, G., Fukuoka, F., Yamamoto, T., Yamamura, Y., eds Host Defence against Cancer and I Potentiation, Univ. of Tokyo Press, Tokyo, 365 (1975).

Zanello, L.P. and Norman, A.W., Stimulation by 1,25(OH)2-vitamin D3 of whole cell chloride currents in osteoblastic ROS 17/2.8 cells, A structure-function study, J. Biol. Chem., 272, 22617-22622 (1997).

Zhukova, N. V. 1986, *Comp. Biochem. Physiol*. 38B(3), 643

김성훈, 한의학계의 암연구동향과 연구전략에 대한 연구, 대한한의학회지, 19(1), 470-499 (1988).

김종근 외, 신물질 효능검색, 조선대학교 출판부, 광주, pp.122-130 (2003).

김진복, 암면역학과 면역요법, 대한면역학회지, 8(1), 73-79 (1986).

대한병리학회 : 병리학, 고문사, 서울, p.225 (1990).

박미선. 조규선. 안철민, 진해잠도산 피조개, *Scapharca broughtonii* 모패의 생식 특성과 건강도

박은경, 진태형, 윤철구, 최미나, 허승원, 배수미, 김용완, 윤주희, 안응식, 김종국, 이준모, 남궁성은, 김도강, Induction of Anti-tumor Immunity by Vaccination with E7 of HPV16 and IL-12, 대한산부인과학회지, 46(12), 2373-2379 (2003).

박춘규, 피조개, 새고막 및 고막의 함질소 엑스성분 조성 비교, 2002, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. . 34(6), pp. 954-961

변광호, 싸이토카인(인터루킨)의 분자 및 면역작용, 대한신장학회지, 11(6), 19-32 (1992).

서성일, 정준아, 조재위, 백성덕, 박문현, 백원기, 서민호, HL60 세포분화에 따른 $p21^{WAF1}$ 유전자의 발현, 대한미생물학회지, 32, 455-465 (1997).

서울대학교의과대학, 종양학, 서울대학교출판부, 서울, p.2 (1993).

예방의학과 공중보건 편집위원회, 예방의학과 공중보건, 계축문화사, 서울, p.426 (1987).

윤정구, 종양에 대한 생체방어기전, 대한의학협회지, 32(10), 1073-1077 (1989).

이승제, 종양학의 발전을 중심으로 한 개개 종양의 문헌적 고찰, 현대의학, 7, 5 (1967).

이정미. 박지원. 유명숙. 홍용기, 한국산 및 중국산 피조개, *Scapharca broughtonii* (Schrenck)의 형태적 특성과 RAPD기법을 이용한 유전적 분석, 1997, J. korean Fish.

Soc. 30(2), 297-304

이종욱, 급성 골수성 백혈병에서 염색체 이상의 임상적 중요성, 대한내과학회지, 62(6), 597-599 (2002).

이홍기, 급성 백혈병의 FAB 분류 및 면역표현형, 대한내과학회지, 53(2), S562-S563 (1997).

錢伯文, 腫瘤的辨證施治, 上海科學技術出版社, 上海, pp.1-10 (1980).

통계청, 사망원인통계연보, 운고문화사, 서울, p.21 (1995).

홍원식, 현대 중공의 암치료, 영문사, 서울, pp.81-85, 361-377 (1980).

Publications

1). 국제 정기학술지 게재논문

1. Jin Cheol Yoo, Jun Ho Kim, Jung Wan Ha, **Nae-Soo Park**, Jae Kyung Sohng, June Woo Lee, Keun Sik Baik, Mi Sun Kim and Chi Nam Seong. 2007. Production and biological activity of laidlomycin, anti-MRSA/VRE antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684. *Journal of Microbiology*. ; 45(1)(ISSN NO. 1225-8873)
2. Seung Heun Kim, Tae Sung Kim, June Woo Lee, Jung Wan Ha, **Nae-Soo Park**, Hyo Jung Lee and Jin Cheol Yoo. 2007. Inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages *via* suppression of nuclear factor-kB binding activity by *Scapharca broughtonii*.. *Archives of pharmacal Research*. 30(3) ; 350-354. (ISSN No. : 0253-4710)

2) 국내 정기 학술지 게재 논문

1. Hyo-Jung Lee, Jung-wan Ha, **Nae-Soo Park** and Jin-Cheol Yoo. (2007) Isolation of Antioxidants from Rosemarinus officinalis. Journal of The Pharmaceutical Research, 조선대학교 약학연구소 28(1):69-78.
2. Ji-Hyun Kim, Hyo-Jung Lee, **Nae-Soo Park**, Jung-Wan Ha, Jin-Cheol Yoo. (2006 June) Partial Purification and Characterization of Phospholipase D from *Streptomyces* Cs684. Journal of The Pharmaceutical Research, 조선대학교 약학연구소 27(1):11-18
3. Blch Vu-Thi-Ngoc, Hyo-Jung Lee, **Nae-Soo Park**, Jung-Wan Ha, Jin-Cheol Yoo. (2006 June) Production, Partial Purification and Characterization of Phospholipase D from *Streptomyces* sp. VN-3. Journal of The Pharmaceutical Research, 조선대학교 약학연구소 27(1):1-10
4. Hyo-Jung Lee, Su-Min Kim, Eun-Jung Park, Ji-Hyun Kim, **Nae-Soo Park,** Jin-Cheol Yoo. (2005 June) Partial purification and characterization of extracellular Protease from *Thermoactinomyces* CS705. Journal of The Pharmaceutical Research, 조선대학교 약학연구소 26(1):11-20.

3) 국제학술회의 발표 논문

1. Jung-Wan Ha, Hyo-Jung Lee, Su-Min Kim, Jae-Kyung Sohng, Doo-Hyun Nam, **Nae-Soo Park**, and Jin-Choil Yoo. (2006) Construction of polyether Antibiotics -Carrier Protein Conjugates. 2006 International Meeting of the Microbiological Society of Korea. (May 3-4,2006) The Microbiological Society of Korea.

저작물 이용 허락서

학 과	약학과	학 번	20047346	과 정	박사
성 명	한글: 박 래 수	한문: 朴 來 洙		영문: Park Nae Soo	
주 소	조선대학교 약학대학 약품미생물학 교실				
연락처	E-mail : pns46748@hanmail.net				
논문 제목	한글 : 국내자생 피조개의 암세포 분화유도 및 면역조절 기능 연구				
	영문 : Induction of cancer cell differentiation and immune modulation effect of Korean Blood shell, *Scapharca broughtonii*				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대( )

2008 년 8 월 23 일

저작자: 박 래 수 (인)

조선대학교 총장 귀하

감사의 글

약국 근무로 뒤늦게 대학원에 입학해 방황하던 저를 기꺼이 받아주시고 많은 지도와 관심으로 본 논문이 완성될 수 있도록 해주신 柳鎭鐵 지도교수님께 깊은 감사를 올립니다. 아울러 강의와 연구로 바쁘신 가운데도 열성으로 심사하시고 지도와 관심을 주신 고려대학교 金泰成교수님, 조선대학교 金成俊교수님, 高玉鉉교수님, 白采善교수님께도 진심으로 감사 올립니다.

또한 그간 함께 실험과 연구로 고생한 약품미생물학교실 식구들에게도 감사드립니다. 학문의 선배, 동반자로서 조언을 아끼지 않다가 광주대학교 교수로 영전한 李孝貞박사님, 새로운 터전에서 열심히 살고 있는 김수민, 박은정, 김지현 후배들, 실험실에서 오늘도 열심히 연구하는 장소영, 조승식, 박성주, 김광식 식구들, 연구하다 군에 입대한 하정완 약사, 석사학위를 마치고 베트남으로 돌아간 Vu Thi Ngoc Bich, 지금도 연구에 여념 없는 네팔의 Jaya Ram Simhkada선생에게도 감사드립니다.

뒤늦게 늦깍이로 시작한 공부를 묵묵히 지켜보면서 끝까지 격려해준 아내와 착하게 자라고 있는 두 아들 용범, 용관에게도 고마움을 표합니다.
그리고 무엇보다도 뒤늦은 공부를 시작하도록 배려하고 격려해주신 약학대학 모든 교수님들께 감사의 마음을 올립니다.