

생약으로부터 세포분화유도물질의 검색 및 분리 및 분리 (I)

박은정, 김진웅*

서울대학교 약학대학

Screening and Isolation of the Cell Differentiation Inducers from Medicinal Plants (I).

Eun Jung Park and Jinwoong Kim*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract - 300 extracts derived from 100 plants were tested for their potential to induce HL-60 cell differentiation using NBT assay and NSE/SE staining methods. Morphological changes from suspended to adherent state of the cells were also observed by microscopic examination. In result, 55 extracts induced cell differentiation into monocyte/macrophage lineage in the NBT and the NSE assay.

Key words - Cell differentiation inducer: HL-60 cell line: NBT assay: NSE/SE staining method: chemoprevention.

지난 수십 년간 암에 대한 연구 결과로 암의 생물학적, 분자생물학적 지식 및 항암제로 개발 가능한 물질들에 대한 정보들이 많이 축적되었음에도 불구하고 암에 의한 사망률과 발암율은 계속 증가되고 있는 추세이며, 일단 암이 발생되면 암종에 따라 다소 차이가 있으나 평균 50%의 치사율을 보이고 있다.¹⁾ 따라서 화학요법, 외과적 수술, 방사선 치료 등, 기존에 사용되고 있는 암 치료방법과는 다른 작용기전을 갖는 새로운 항암제에 대한 관심이 증가하고 있다.^{2,3)}

혈액암이나 고형암에 있어 tumor stem cell은 대응하는 정상세포보다 상당히 느린 속도로 분화하거나 어느 단계에서 분화가 멈춰버린다. 이렇게 비정상적 분화과정을 거친 암세포는 화학적 분화유도물질에 의해 원래의 정상적 분화과정으로 돌아갈 수 있게 되어 더 이상 악성화하지 않거나 정상세포로 전환될 수 있다. 이러한 이론을 바탕으로 종양세포의 성숙을 유도하여 암을 치료하고자 하는 연구방법

은 새로운 암치료 방법의 일환으로서 가능성을 보이고 있다.^{4,5)}

일반적으로 세포분화유도물질의 검색을 위한 실험으로, rat 등을 이용한 *in vivo* model을 사용할 수 있으나, 막대한 수의 동물과 수년 동안의 시험기간이 필요하므로 많은 시료를 단시간에 검색하기에는 적합하지 않다.⁶⁾ 따라서 다량의 시료를 대상으로 하는 일차적인 세포분화유도물질의 검색을 위해서는 종양세포간의 재생과 분화를 정확하게 측정할 수 있고 세포성숙유도과정에서의 세포독성과는 구별할 수 있는 적절한 *in vitro* model을 사용하는 것이 바람직하다. 현재 가장 널리 이용되고 있는 *in vitro* model로는 promyelocytic leukemia 환자로부터 유래한 HL-60 세포주를 이용하는 방법이 있으며, 이 방법은 형태학적, 조직학적 특징이 화학요법을 투여하기 전의 환자와 유사하고, stem cell의 두 가지 분화경로인 granulocyte like cell이나 macrophage like cell로의 분화과정을 관찰할 수 있는 특징이 있다.⁷⁾ HL-60 세포는 혈액암세포이므로 현탁배양이 가능하며 분화가 진행되면서 cell의

*교신저자 : Fax 02-887-8509

형태와 운동성이 변하는 형태학적 변화의 관찰과 superoxide 생성, phagocytosis 등의 생물학적 변화, 효소활성의 변화, 세포증식의 감소 및 정지 등의 관찰이 가능한 장점이 있다.⁸⁻⁹⁾

따라서 본 연구실에서는 HL-60 세포주를 이용한 세포분화유도물질 검색법을 확립하고, 기존에 사용되고 있는 생약 및 무작위 추출한 야생식물들을 선정하여 세포분화유도활성을 검색하고 그 활성성분을 분리하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료-검색 대상 식물들은 천마산, 광덕산, 광릉, 울릉도, 경동시장 등에서 채집 또는 구입하였다. 검색용 식물엑스는 80% MeOH로 초음파추출하여 MeOH 엑스를 얻고, 물로 현탁시킨 후 CHCl_3 으로 분획하여 CHCl_3 엑스와 수층 엑스를 얻어 3가지 엑스를 모두 검색 대상으로 하였다.

HL-60 세포배양-HL-60 (human promyelocytic leukemia) 세포는 서울대학교 의과대학 암연구소로부터 분주받아, 5% heat-inactivated fetal bovine serum(Hyclon)과 penicillin(100 units)-streptomycin(100 µg/ml) (Gibco-BRL)를 첨가한 RPMI 1640 medium(Sigma)을 사용하여 37°C, 5% CO_2 의 조건하에서 continuous suspension culture로 유지하였다. 세포독성 및 세포분화유도활성의 검색시에는 시료처리 18시간 전에 세포를 12×10^4 cells/ml의 농도로 전배양한 후 사용하였다.

시료의 조제-검색용 식물엑스는 증류한 공업용 용매로 추출하여 얻었고, 기타 시약 및 표준품은 특급으로 사용하였다. 세포독성시험 및 분지 및 부착 검색법을 위한 시료의 농도는 최고농도 100 µg/ml을 시작으로 5배씩 희석하여 최소 3개의 농도에서 quadruplicate로 하였다. 세포분화유도활성시험을 위한 시료의 농도는 대량의 시료를 단시간에 처리하기 위하여 일률적으로 DMSO에 10 mg/ml의 농도로 녹여, 시료의 최종 시험 농도는 10 µg/ml, 최종 DMSO 농도는 0.1%(v/v)가 되도록 하였다. 만약 10 µg/ml의 농도에서 독성을 보이는 시료의 경우는 농도를 낮추어 재시험하였다.

분지 및 부착 검색법-시료에 의한 HL-60 세포의 분지 및 부착정도를 알기 위하여, 시료를 최종농도가

100, 20, 4 µg/ml이 되도록 duplicate로 96 well plate에 처리하고, 18시간 동안 전배양한 HL-60 세포를 가하여 4일 동안 배양한 후 역상 현미경으로 관찰하였다. 이때 양성대조군으로는 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)를 사용하였다.

생존율 시험법-24 well plate에 duplicate로 시료를 처리한 후, 미리 배양한 HL-60 세포를 2 ml씩 가하여 4일 동안 배양하였다. 세포 용액 100 µl과 250 µl의 trypan blue(0.4% in 0.85% saline), 150 µl의 HBSS를 넣어 잘 섞은 후 현미경상에서 전체 세포 중의 살아있는 세포의 백분율을 구하였다.

Nonspecific/specific acid esterase(NSE/SE) assay-시료의 생존율을 고려하여 100×10^4 cells/ml의 농도로 세포를 취한 후, 2,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 배지를 제거하고 PBS로 두 번 세척하였다. 100 µl의 PBS를 넣은 후 혼합하고 slide glass에 duplicate로 세포용액을 1적씩 떨어뜨려 실온에서 건조시켰다. NSE/SE staining kit(Sigma)를 사용하여 slide glass를 염색하고 최소 200개의 세포 중 양성으로 나타난 세포의 백분율을 구하였다. 양성대조군으로는 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃을 사용하였다.

Nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay-NSE/SE assay에서 사용하고 남은 세포용액에 100 µl의 NBT/TPA 용액을 가하고 차광하여 1시간 동안 37°C에서 배양한 후 slide glass에 duplicate로 1적씩 떨어뜨려 실온에서 건조시켰다. 이때 NBT/TPA 용액은 2 mg/ml NBT와 1 µg/ml TPA의 농도로 사용 직전 조제하였다. 건조된 slide glass를 순수한 MeOH로 고정시키고, 0.3%(w/v, MeOH) safranin O로 염색하여 formazan이 포함되어 있는 세포의 수를 현미경상에서 세어 최소 200개의 세포 중의 백분율을 구하였다. 양성대조군으로는 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃을 사용하였다.

세포독성 시험-HL-60 세포에 대한 세포독성을 MTT assay에 의해 결정하였다.¹⁰⁾ HL-60 세포의 접종농도는 2.5×10^5 cells/ml로 하였고 48시간 동안 배양하였다.

결과 및 고찰

HL-60 세포주를 이용한 세포분화유도물질의 개

받은 최근 각광을 받고 있는 암예방물질연구의 일환으로, 일단 발생한 tumor의 progression 단계에서 작용할 수 있는 물질을 대상으로 한다.⁶⁾ 세포분화유도물질은 암이 더이상 진행되지 않도록 하거나, 전골수성세포의 상태에서 정체되어 있는 세포를 hematopoietic lineage에 따라 단핵구 또는 과립구로 정상적인 분화과정을 거치도록 유도할 수 있는 물질을 의미한다. 이러한 유형의 반응들, 즉 정체되어 있던 분화과정의 진행은 독특한 것으로서 다른 검색법에서는 관찰하기 어렵다. 세포분화유도물질로는 $1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ 과 그 동족체,¹¹⁾ DMSO 등의 저분자 극성화합물들,¹²⁾ retinoic acid 류¹³⁾ 등이 있고 이것들은 이미 임상실험에 시도되어 어느 정도의 결과가 보고되고 있다.¹⁴⁾

세포분화에 의한 HL-60 세포의 형태학적 변화는 매우 극적인 것으로 원형의 부유세포인 HL-60 세포가 배양용기에 부착하여 운동성이 사라지며, 마치 신경세포에서처럼 돌기가 뺏어 나오며 분지한다. 이러한 형태로 분화되는 것은 시료에 의해 HL-60 세포가 단핵구로 분화한 것을 암시하는 것으로, 양성대조군으로 사용되는 TPA의 경우에는 극명하게 관찰되는 반면, 과립구로 분화를 유도하는 DMSO의 경우, 세포의 분화가 이루어져도 세포의 분지나 부착은 이루어지지 않는다. 세포분지 및 부착은 현미경 상에서 관찰이 가능하며 그 결과는 분지의 유무로 결정하였다. 이러한 형태학적 변화를 일으키는 식물들은 주로 TPA와 같은 phorbol ester류의 diterpene성분을 가지고 있는데, 그 대표적인 예가 파두이다. 파두는 저농도(16 ng/ml)에서도 강한 형태학적 변화를 일으키는데 그것은 파두에 포함되어 있는 수종의 phorbol ester류의 성분들에 의한 것으로 생각된다. 이밖에 감수, 누로, 패모 등이 세포분지활성을 보였다.

NBT assay는 시료에 의해 미분화 상태의 세포가 중성구로 분화되면서 superoxide ion을 발생하게 되고 발생된 superoxide ion이 가용성 tetrazolium염을 환원시켜 불용성 formazan을 생성하는 반응을 이용한다. 이때 생성된 formazan은 세포 내에 포함되고 이것을 safranin O로 염색하면 감청색의 세포로 염색되어 관찰이 가능하게 된다. 따라서 분화경로 중 중성구로의 분화를 유도하는 시료를 찾을 수 있게 된다.

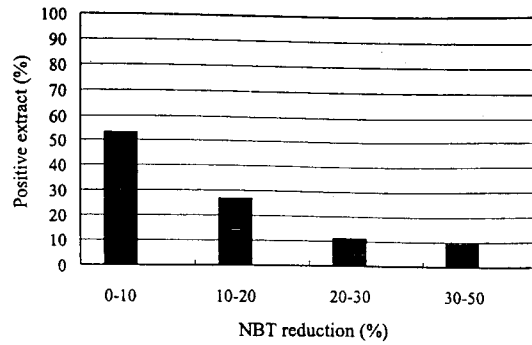


Fig. 1. Distribution of response rate mediated by plant extracts in NBT assay.

세포가 어느 쪽의 분화경로로 분화하는가는 세포의 효소활성의 변화로서 알 수 있다. 즉 단핵구는 세포질의 esterase의 기질 특이성에 의해 과립구와 구별할 수 있다. 단핵구의 esterase는 α -naphthyl acetate를 가수분해하는 반면, 과립구의 esterase는 naphthyl AS-D-chloroacetate를 분해한다. 따라서 단핵구는 nonspecific esterase assay(NSE)에서 양성반응을, 과립구는 specific esterase assay(SE)에서 양성반응을 나타낸다. 이러한 세포화학적 변화는 염색법에 의해 쉽게 판단할 수 있으며, 방법이 단순하며 민감하고 재현성이 우수하다.¹⁵⁾

검색대상의 시험농도는 시료의 평균적인 세포독성 농도를 고려하여 결정하였으며 세포독성이 강한 시료의 경우 시험농도를 낮추어 재시험하였다. NBT assay의 경우, 전체 300개의 식물엑스 중 83%의 엑스들이 0~20%의 활성을 보였고, 30% 이상의 활성을 보인 것은 8.7% 였다(Fig. 1). NSE assay에

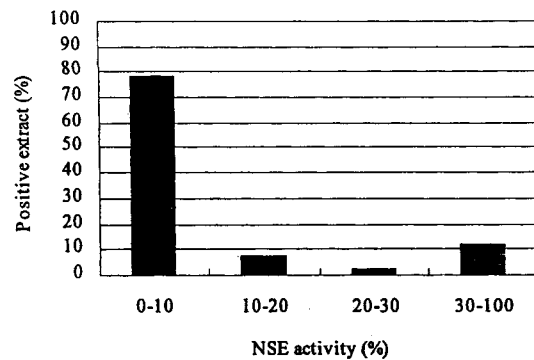


Fig. 2. Distribution of response rate mediated by plant extracts in NSE assay.

서도 이와 비슷한 경향을 나타내었다(Fig. 2). 따라서 세포분화유도활성은 NBT assay와 NSE/SE assay 중 한가지 이상에서 30% 이상의 활성을 보이는 것을 활성이 있다고 판단하였다.

300종의 식물 추출물들의 HL-60 세포에 대한 세포독성과 세포분화활성을 검색한 결과(Table I), 같은 식물의 경우 수층엑스에서 보다 MeOH 엑스에서, MeOH 엑스에서보다 CHCl₃ 엑스에서 강한 활

Table I. Cell differentiation inducers against HL-60 cell line

Drug name	Scientific name	Part used ^a	Extract ^b	NBT	NSE
괴각	<i>Sophora japonica</i>	FR	M	23.6	<10
			C	30.1	<10
			H	<10	<10
구기자	<i>Lycium chinense</i>	FR	M	36.2	<10
			C	22.2	<10
			H	19.9	<10
구절초	<i>Chrysanthemum zawadskii</i>	AP	M	26.8	<10
			C	46.3	<10
			H	<10	<10
금은화	<i>Lonicera japonica</i>	FL	M	42.5	<10
			C	37.6	<10
			H	20.0	<10
낭미파화	<i>Lysimachia barystachys</i>	AP	M	40.2	<10
			C	17.1	<10
			H	<10	<10
녹제초	<i>Pyrola japonica</i>	AP	M	37.4	<10
			C	25.0	<10
			H	<10	<10
누로	<i>Rhaponticum uniflorum</i>	RT	M	<10	<10
			C	44.7	18.0
			H	10.8	<10
대계	<i>Cirsium japonicum</i>	AP	M	11.2	<10
			C	34.3	<10
			H	<10	15.0
동규자	<i>Malva verticillata</i>	SE	M	12.5	32.3
			C	32.7	<10
			H	22.1	<10
마전자	<i>Strychnos nux-vomica</i>	SE	M	14.6	<10
			C	30.0	32.1
			H	<10	<10
마황	<i>Ephedra sinica</i>	AP	M	12.7	<10
			C	34.8	34.7
			H	<10	<10
만형자	<i>Vitex rotundifolia</i>	FR	M	12.9	<10
			C	35.6	<10
			H	<10	<10
목단피	<i>Paeonia suffruticosa</i>	RB	M	43.9	<10
			C	27.4	38.2
			H	<10	<10
목방기	<i>Cocculus orbiculatus</i>	RT	M	16.3	<10
			C	<10	<10
			H	<10	<10
목별자	<i>Momordica cochinchinensis</i>	SE	M	<10	<10
			C	27.6	40.6
			H	<10	<10

Table I. continued.

Drug name	Scientific name	Part used ^a	Extract ^b	NBT	NSE
목통	<i>Akebia quinata</i>	AP	M	<10	<10
			C	34.2	49.3
			H	13.2	<10
목통근	<i>Akebia quinata</i>	RT	M	<10	<10
			C	30.2	46.4
			H	<10	<10
박하	<i>Mentha arvensis</i>	AP	M	12.6	<10
			C	37.8	43.6
			H	<10	<10
백부근	<i>Stemona japonica</i>	RT	M	22.2	<10
			C	11.1	31.9
			H	<10	<10
백선피	<i>Dictamnus dasycarpus</i>	RB	M	<10	<10
			C	14.7	49.4
			H	15.8	11.5
복분자	<i>Rubus coreanus</i>	FR	M	12.7	<10
			C	23.2	34.6
			H	<10	<10
부평초	<i>Spirodela polyrhiza</i>	AP	M	<10	<10
			C	23.4	34.0
			H	17.1	<10
비럼	<i>Carduus crispus</i>	AP	M	15.0	44.9
			C	<10	44.9
			H	<10	<10
사초	<i>Cyperus rotundus</i>	LT	M	11.2	<10
			C	13.3	59.7
			H	<10	<10
산두근	<i>Indigofera kirilowii</i>	RT	M	16.4	8.5
			C	37.0	76.4
			H	18.1	18.5
삼릉	<i>Scirpus flaviatilis</i>	RT	M	14.5	<10
			C	36.0	37.8
			H	<10	<10
상기생	<i>Viscum coloratum</i>	LT	M	<10	13.6
			C	24.7	33.3
			H	18.5	22.4
상백피	<i>Morus alba</i>	RB	M	12.7	<10
			C	45.1	19.3
			H	<10	<10
상춘등	<i>Hedera tobleri</i>	LF	M	<10	<10
			C	20.2	43.1
			H	<10	<10
석곡	<i>Dendrobium moniliforme</i>	AP	M	16.9	<10
			C	<10	40.2
			H	<10	<10
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	RS	M	14.4	<10
			C	13.3	35.6
			H	<10	<10
선복화	<i>Inula britannica</i>	FL	M	28.1	<10
			C	19.8	34.0
			H	<10	<10

Table I. continued.

Drug name	Scientific name	Part used ^a	Extract ^b	NBT	NSE
소엽	<i>Perilla frutescens</i>	LF	M	10.6	11.4
			C	33.7	17.3
			H	13.5	14.9
시호	<i>Bupleurum falcatum</i>	FR	M	<10	<10
			C	35.8	13.0
			H	<10	18.0
오수유	<i>Evodia officinalis</i>	FR	M	<10	<10
			C	30.4	<10
			H	<10	<10
적작약	<i>Paeonia albiflora</i>	RT	M	<10	<10
			C	<10	<10
			H	<10	<10
죽여	<i>Phyllostachys nigra</i>	ST	M	16.0	38.8
			C	<10	<10
			H	<10	<10
죽엽	<i>Phyllostachys nigra</i>	LF	M	19.5	30.0
			C	<10	<10
			H	<10	<10
지골피	<i>Lycium chinense</i>	SR	M	32.0	<10
			C	25.0	<10
			H	<10	<10
지유	<i>Sanguisorba officinalis</i>	RS	M	13.7	37.8
			C	<10	<10
			H	<10	<10
천초	<i>Rubia akane</i>	LF	M	<10	42.9
			C	<10	<10
			H	<10	<10
청상자	<i>Celosia argentea</i>	SE	M	<10	32.1
			C	<10	<10
			H	<10	<10
축백엽	<i>Biota orientalis</i>	LF	M	16.7	30.5
			C	18.7	<10
			H	<10	<10
치자	<i>Gardenia jasminoides</i>	FR	M	35.9	<10
			C	<10	<10
			H	<10	<10
택란	<i>Lycopus lucidus</i>	LF	M	15.0	36.6
			C	<10	<10
			H	<10	<10
파두	<i>Croton tiglium</i>	SE	M	<10	33.9
			C	<10	<10
			H	11.0	14.0
패모	<i>Fritillaria ussuriensis</i>	BL	M	12.0	38.4
			C	34.7	51.6
			H	21.0	18.0
하수오	<i>Polygonum multiflorum</i>	RT	M	<10	<10
			C	36.4	<10
			H	12.5	23.8
한채	<i>Rorippa palustris</i>	AP	M	<10	<10
			C	22.9	51.6
			H	20.4	<10

Table I. continued.

Drug name	Scientific name	Part used ^a	Extract ^b	NBT	NSE
현호색	<i>Corydalis ternata</i>	RT	M	10.0	36.3
			C	11.3	<10
			H	17.9	<10
회침	<i>Siegesbeckia orientalis</i>	AP	M	<10	30.7
			C	12.1	<10
			H	27.7	<10

^aPart used: AP, Aerial parts; BL, Bulb; FL, Flower; FR, Fruit; LF, Leaf; LT, Leaf+Twig; RB, Root Bark; RS, Root+Stem; RT, Root; SE, Seed; ST, Stem. ^bExtract: M, Methanol extract; C, CHCl₃ fraction; H, water fraction.

성이 나타났다. 이것은 대부분의 생리활성을 나타내는 이차대사산물들이 주로 중간정도의 극성을 나타내어 CHCl₃층에 분포하기 때문이라고 생각된다. 기존에 알려져 있던 flavonoid,¹⁶⁾ lignan, quinoline alkaloid¹⁷⁾ 등의 천연물 유래의 세포분화물질들은 비교적 저분자물질들로서 암세포에 대한 세포독성을 함께 나타내는데, 두 가지 생리활성을 나타냄에 있어 농도의 차이를 보이며 세포독성을 나타내는 농도보다 충분히 낮은 농도에서 세포분화활성을 보였다.¹⁶⁾

본 연구에서는 식물엑스에 대한 세포분화유도능을 검색할 수 있는 검색법을 확립하여 그 활성기준을 정하였고 100종 식물에서 추출한 300개의 추출물에 대한 생리활성을 검색하였다. 추후 이들 활성 식물에 대한 문헌조사를 거쳐 활성성분들을 분리하고자 한다. 또한 식물엑스에 대한 세포분화유도능을 계속적으로 검색할 예정이다.

결 론

식물로부터 세포분화유도물질을 개발하기 위하여 HL-60 세포주를 이용하여 세포의 형태학적 변화, 기능적인 변화와 효소활성의 변화를 측정하였다. 총 100종의 식물들을 MeOH 엑스, CHCl₃ 엑스와 수층 엑스로 나누어 300종류의 엑스에 대해 세포분지능, NBT assay, NSE/SE assay를 실시하였고, 이들 검색법 중 한가지 이상에서 30% 이상의 활성을 보인 엑스를 세포분화유도활성이 있다고 판단하였다. 세포분지능을 보인 추출물은 극히 적어 4종의 식물에서 활성을 보였고, NBT assay에서 활성을 나타낸 것은 27종이었으며, NSE assay에서 활성을 보인 것은 35종이었고 SE assay에서는 활성을

보인 추출물이 없었다. 앞으로 보다 광범위한 식물들을 대상으로 지속적인 활성검색을 계속하여야 할 것이며 이러한 검색결과를 바탕으로 활성이 뛰어난 식물을 선정하여 그 세포분화유도활성성분의 분리를 시도할 필요가 있다고 사료된다.

사 사

이 연구는 1996년도 학술진흥재단 공모과제 연구비 지원에 의하여 수행되었기에 감사드립니다.

인용문헌

- Parker, S. L., Tong, T., Bolden, S. and Wingo, P. A. (1996) Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J. Clin.* 46: 5-27.
- Bailar J. C. III. and Gornik, H. L. (1997) Cancer undefeated. *N. Engl. J. Med.* 336: 1569-1574.
- Astrow, A. B. (1994) Rethinking cancer. *Lancet.* 343: 494-495.
- Reiss, M., Gamba-Vitalo, C. and Sartorelli, A. C. (1986) Induction of tumor cell differentiation as a therapeutic approach: Preclinical models for hematopoietic and solid neoplasm. *Cancer Treat. Rep.* 70: 201-218.
- Koeffler, H. P. (1983) Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: Therapeutic implications. *Blood* 62: 709-721.
- Pezzuto, J. M. (1995) Natural product cancer chemopreventive agents. In Arnason, J. T. (ed.). *Phytochemistry of Medicinal Plants*, 19-45. Plenum Press, New York.
- Collins, S. J. (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: Proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70:

- 1233-1244.
8. Collins, S. J., Bodner, A., Ting, R. and Gallo, R. C. (1980) Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by compounds which induce differentiation of murine leukemia cells. *Int. J. Cancer* 25: 213-218.
 9. Buron, M. I., Rodriguez-Aguilera, J. C., Gonzalez-Reyes, J. A., Villalba, J. M., Alcain, F. J., Navarro, F. and Navas, P. (1993) A quantitative ultrastructural and cytochemical study of TPA-induced differentiation in HL-60 cells. *Leukemia Res.* 17: 863-872.
 10. Park, S. Y. and Kim, J. (1992) Screening and isolation of the antitumor agents from medicinal plants (I). *Kor. J. Pharmacogn.* 23: 264-267.
 11. Ostrem, V. K., Tanaka, Y., Prahl, J., DeLuca, H. F. and Ikekawa, N. (1987) 24- and 26-homo-1,25-dihydroxyvitamin D₃: Preferential activity in inducing differentiation of human leukemia cells HL-60 *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2610-2614.
 12. Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E. and Gallo, R. C. (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2458-2462.
 13. Cornic, M., Agadir, A., Degos, L. and Chomienne, C. (1994) Retinoids and differentiation treatment: A strategy for treatment in cancer. *Anticancer Res.* 14: 2339-2346.
 14. Degos, L., Dombret, H., Chomienne, C., Daniel, M-T., Miclea, J-M., Chastang, C., Castaigne, S. and Fenaux, P. (1995) All-*trans*-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 85: 2643-2653.
 15. Yam, L. T., Li, C. Y. and Crosby, W. H. (1971) Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* 55: 283-290.
 16. Suh, N., Luyengi, L., Fong, H. H. S., Kinghorn, A. D. and Pezzuto, J. M. (1995) Discovery of natural product chemopreventive agents utilizing HL-60 cell differentiation as a model. *Anticancer Res.* 15: 233-240.
 17. Jing, Y. and Waxman, S. (1995) Structural requirements for differentiation-induction and growth inhibition of mouse erythroleukemia cells by isoflavones. *Anticancer Res.* 15: 1147-1152.

(1997년 9월 19일 접수)