보리 겨층(대맥강)에 함유된 프로안토시아니

석호문 · 김성란
일반작물이용팀

보리를 도정할 때 부산물로 생성되는 겨층인 대맥강으로부터 추출한 폴리페놀추출물(BPE)은 인체유래의 백혈병성 혈액암세포인 HL60 세포에서 세포분화의 지표가 되는 nitro blue tetrazolin(NBT)을 환원시키는 활성과 α-naphthyl butyrate esterase 활성을 유도하는 것으로 보고되었다. 본 논문에서는 보리의 폴리페놀추출물(BPE)에서 정제한 프로안토시아니딘이 HL60 세포주의 세포분화에 미치는 영향을 조사하였다.

프로델피니딘 B-3, T1, T2 및 T3는 26-40%의 NBT-환원활성을 유도하였고, 22-32%의 α-naphthyl butyrate esterase 활성을 유도하는 것으로 나타났다. 프로안토시아니딘은 또한 HL 60 세포주에서 retinoic acid가 유발시킨 과립구 세포분화와 sodium butyrate가 유발시킨 단립구 세포분화를 더욱 촉진시키는 것으로 나타났다.

1. 서 론

보리는 인류가 고대로부터 섭취해온 곡물로서 건강식으로 여겨져 왔다(1). 보리의 식이섬유와 토코트리에놀이 생리활성을 나타내는 주요 성분인 것으로 보고되었으며, 보리에 함유된 수용성 식이섬유는 식후의 혈당 상승을 억제하는데 효과적인 것으로 나타났다(2,3). D-α-토코트리에놀은 닭을 대상으로 한 동물실험에서 간의 콜레스테롤 생합성을 억제하였다(4). 한편 보리는 프로시아니딘과 프로델피니딘과 같은 폴리페놀을 함유하고 있는데(5) 이들의 생리 효과도 보고되었다. 프로안토시아니딘은 식물계에 널리 분포되어 있으며 항산화 활성, 항돌연변이 활성 및 항고혈압 활성 등을 가진다고 보고된 바 있다. Ariga 등은(6) 팥에서 분리한 프로시아니딘이 아스코르브산 또는 α-토코페롤보다 DPPH 래디칼에 대한 수소 또는 전자공여작용이 더 강력하다는 것을 보고한 바 있다.

Sugimoto 등은(7) Ames test에서 Trp-P-2의 돌연변이가 프로시아니딘에 의해 억제됨을 발견하였다. Cheng 등은(8) 프로시아니딘 B-2의 혈관투여로 본태성 고혈압 쥐에 혈압강하 효과가 일어났다고 보고하였다. 그러므로 보리의 식이섬유와 토코트리에놀 뿐만 아니라 폴리페놀 역시 인체의 생리효과면에서 중요시 되어야만 할 것이다. 선행연구에서 보리의 폴리페놀추출물(BPE, barley polyphenol ex- tract)과 프로안토시아니딘은 항산화 활성과 항돌연변이 활성이 있다고 보고되었다. BPE는 수퍼옥사이드를 소거하고 리놀산의 산화를 방지하였다(9). 보리 겨층에서 분리한 프로델피니딘은 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin과 Trp-P-1에 대한 항돌연변이 활성이 프로시아니딘 보다 더 우수한 것으로 나타났다(10).

암 세포의 분화를 조절하는 것은 새로운 화학적 치료법이다. 식품의 암 예방 효과를 밝히기 위한 연구에 의하면 식물체 추출물이 백혈병성 혈액암세포(human leukemia cell)의 분화에 미치는 효과를 연구하였는데, 시금치와 가지 등 일부 채소류에서 human leukemia cell의 분화가 유도되고 세포증식이 억제되는 것으로 나타났다(11).

과일과 채소에 함유된 일부 폴리페놀류도 또한 human leukemia cell의 세포분화를 유도하고 이들 세포의 증식을 억제한다고 보고된 바 있다. 제니스테인과 다이드제인은 HL60 세포의 분화를 일으키고 이들 세포의 성장을 억제하였다(12,13). 밀감에서 분리한 노비레틴(nobiletin)과 탄저레틴(tan- geretin)은 설치류의 척수유래 leukemia cell 세포의 분화를 유발시키고 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 세포의 증식을 억제하였다(14). 그러나 프로안토시아니딘이 myeloid leukemia cell의 분화와 증식에 미치는 효과에 대해서는 연구된 바 없다. 보리의 생리학적 기능을 밝히고 보리 겨층을 활용하기 위한 연구로서 본 논문에서는 BPE와 보리 프로안토시아니딘이 HL 60 세포에게 미치는 세포분화유도 활성을 연구하였다.

HL60 세포는 all-trans-retinoic acid(RA), sodium butyrate 및 12-o-tetra-decanonylphorbol-13-acetate(TPA)와 같은 제제에 의해 과립구 또는 단립구/macrophage로의 분화가 일어날 수 있다(15-17). 본 연구에서는 또한 BPE로부터 얻은 프로안토시아니딘이 RA에 의해 야기된 HL60 세포의 과립구(granulocyte) 세포분화, sodium butyrate로 야기된 단립구(monocyte) 세포분화에 미치는 영향도 조사하였다. 본 논문을 통하여 보리 겨층에 함유된 BPE와 프로안토시아니딘이 인체 유래의 HL 60 세포의 분화를 유도시킨다는 것이 밝혀졌다. 보리 겨층으로부터 얻은 프로안토시아니딘은 HL 60세포에 있어 RA에 의한 과립구 세포분화와 sodium butyrate에 의한 단립구 세포분화를 더욱 촉진시키는 것으로 나타났다.

2. 재료 및 방법

2.1 대맥강으로부터 폴리페놀 추출물 제조(BPE)

보리의 겨층은 탈피한 보리를 도정기(Satake, 일본)로 처리하여 얻었다. 이를 헥산으로 탈지한 후, 맥강 1 kg에 75% 에탄올 10 L를 가하여 호모게나이져(Polytron PT-6000, 스위스)로 마쇄(10℃, 8,000rpm, 10분)하였다. 이 추출액을 30℃이하에서 감압농축시키고 원심분리(5℃, 18,800×g에서 15분)하였다. 상징액은 Sepabeads SP-850 수지(Mitsubishi사, 일본)를 탈이온수로 평형화시킨 칼럼(210×30mm)에 주입하였다. 컬럼을 탈이온수로 유량 10ml/min의 속도로 세척하였으며 당류(Molisch 반응) 및 아미노산(닌하이드린 반응) 검출이 음성이 될 때까지 실시하였다. 이어서 2 L의 75% 에탄올로 용출시켜 흡착된 폴리페놀 획분을 얻었으며 이를 30℃이하에서 감압농축 후 동결건조 하였다. 폴리페놀의 함량을 Folin-Denis법(18)에 따라 측정하였으며 (+)-카테킨 당량으로 환산하였다. 이로부터 28.7%의 폴리페놀 함량을 가진 10g의 보리 폴리페놀추출물(BPE)을 얻었다.

2.2 BPE로부터 프로안토시아니딘의 분리

BPE로부터 프로안토시아니딘을 분리하기 위해 BPE를 메탄올에 용해시킨 후 메탄올로 팽윤시킨 Sephadex LH-20 컬럼(920×30mm)에 주입하였다(19). 그 후 용출액의 280nm에서의 흡광도를 측정하였다. Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피에 의해 분리된 피크에 존재하는 프로안토시아니딘은 0.2% 개미산을 함유한 물 용매 중의 메탄올 비율을 순차적으로 높여가면서 Inertsil ODS-3칼럼(250×20mm, GL Science, 일본)을 사용하여 더욱 정제하였다.

프로안토시아니딘의 순도와 분자량은 HPLC와 LC-MS(M-1200 AP, Hitachi)를 사용하여 확인하였다. BPE로부터 분리된 프로시아니딘 B-3, 프로델피니딘 B-3, 프로델피니딘 T1, 프로델피니딘 T2, 프로델피니딘 T3 및 프로델피니딘 T4를 ODS-80Ts칼럼(250×4.6mm, Tosoh사, 일본)으로 분석한 결과 280nm에서 HPLC 크로마토그램상의 전체 피크면적에 대한 각 피크면적의 비율은 각각 95%, 93%, 92%, 94%, 92% 및 92%이었다. 표 1은 BPE에 있는 2량체 및 3량체 프로안토시아니딘의 함량을 나타낸 것이다. 분리된 프로안토시아니딘 용액은 동결건조시켰으며, 사용하기 전 바로 DMSO에 용해시켰다.

표 1. 보리 폴리페놀 추출물(BPE) 중의 프로안토시아니딘 2량체와 3량체 함량[a]

	함량(㎎/g)
프로시아닌 B3	41.5
프로델피니딘 B3	44.7
프로델피니딘 T1	23.0
프로델피니딘 T2	26.8
프로델피니딘 T3	15.2
프로델피니딘 T4	15.2
총 폴리페놀[b]	287.2

a) McMurrough 등의 방법(19)으로 측정
b) Folin-Denis법(18)으로 측정 후 (+)-카테친 당량으로 산출

2.3 세포주 및 세포배양

일본 암연구자원은행(JCRB 0085)으로부터 분양받은 인체 유래의 myeloid leukemia cell line인 HL 60은 10%의 불활성화시킨 10% 소 태아 혈청을 사용한 RPMI 1640배지로 5% CO_2 멸균기에 보관하였다. 세포(5×10^4 cell/ml)는 100mm 배양접시에 접종하고 BPE 또는 프로안토시아니딘의 존재유무를 달리하여 5일간 배양시켰다. RA에 의한 HL 60세포의 과립구 세포분화와 sodium butyrate에 의한 단립구 세포분화에 프로안토시아니딘이 미치는 효과를 살펴보기 위해 RA와 sodium butyrate를 프로안토시아니딘과 함께 배지에 첨가하였다. 생존세포 수는 hemocytemeter로 계측하였다. 세포생존력은 trypan blue exclusion을 사용하여 측정하였다.

2.4 분화유도의 검출

HL 60세포에 있어 nitro blue tetrazolin(NBT)을 환원시키는 활성과 α-naphthyl butyrate esterase 활성을 분화의 지표로서 측정하였다. NBT 환원력은 Collis들의 방법으로 산출하였다(20). α-naphthyl butyrate esterase 활성은 염색 검출법을 이용하여 측정하였다(21). HL 60세포에 있어 NBT-양성 및 α-naphthyl butyrate esterase-양성세포는 현미경으로 계측하였다. 형태학적 변이는 Giemsa 염색으로 관찰하였다.

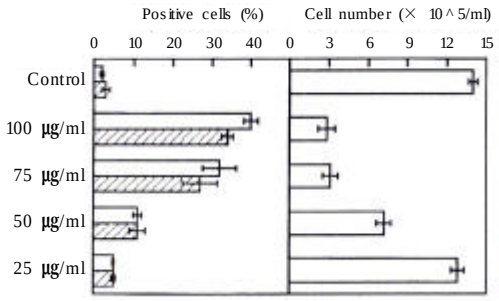


그림 1. 보리 폴리페놀 추출물(BPE)이 HL-60세포의 분화와 증식에 미치는 효과

세포(5×10^4 cell/ml)는 BPE 첨가유무를 달리하여 5% CO_2, 37℃에서 5일간 배양. 3회 반복측정 후 평균과 SD로 표기. □ NBT-양성 세포, ▨ α-naphthyl butyrate esterase 양성 세포

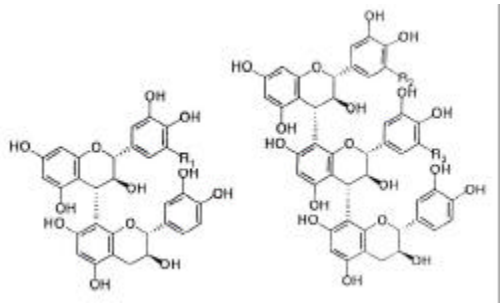
3. 결 과

3.1 BPE가 HL 60 세포분화 및 증식에 미치는 영향

HL 60세포를 100μg/ml의 BPE로 처리하면 40% NBT-양성세포와 35% α-naphthyl butyrate esterase-양성세포를 야기시켰으며, BPE는 50-100μg/ml에서 HL 60세포의 증식을 억제하였다(그림1). 이와 같은 효과들은 BPE의 농도에 의존하였다. BPE처리한 HL 60세포는 형태학적으로는 아무런 변화가 없었다.

3.2 BPE로부터 분리한 프로안토시아니딘 2량체 및 3량체가 HL 60세포의 분화와 증식에 미치는 영향

프로안토시아니딘은 보리 폴리페놀의 주성분인 것으로 알려져 있다. McMurrough 등은(19) 2량체 및 3량체 프로안토시아니딘의 함량이 총 플라바놀 함량의 57-65%에 달한다고 보고하였다. 따라서 2량체 및 3량체 프로안토시아니딘의 역할을 밝히기



Dimer
Procyanidin B-3,B1=H
Prodelphinidin B-3,R1=OH

Trimer
Prodelphinidin T1,R2=R3=OH
Prodelphinidin T2,R2=OH,R3=H
Prodelphinidin T3,R2=H,R3=OH
Procyanidin T4, R2=R3=H

그림 2. 보리 폴리페놀 추출물(BPE)에서 분리한 프로안토시아니딘의 구조

위해 본 연구에서는 McMurrough 등의 방법(19)에 따라 이들을 분리하여 HL 60세포의 분화와 증식에 미치는 효과를 조사하였다.

그림 2는 BEP로부터 분리한 2량체 및 3량체 프로안토시아니딘의 구조를 나타낸 것이다. 2량체와 3량체의 함량은 BPE에 존재하는 총 폴리페놀의 약 58%이었다. 프로안토시아니딘을 처리한 HL 60세포의 NBT 환원력과 α-naphthyl butyrate esterase 활성은 배양 5일 후 측정하였다(그림3). NBT-양성세포와 esterase-양성 세포의 비율은 상관관계를 나타냈다. 프로델피니딘은 26-40%의 NBT-양성세포와 22-32% α-naphthyl butyrate esterase-양성세포를 야기시키고 세포증식을 억제시켰으나, 프로시아니딘은 이들 활성을 미약하게 유발시켰다. 프로델피니딘을 40μM이상 처리한 HL 60세포는 모두 사멸되었다. 12μM이하의 프로시아니딘을 처리한 HL 60세포에서는 증식 억제와 양성세포-유도가 나타나지 않았다.

HL 60세포의 분화 유도에 있어 프로안토시아니딘의 효력은 다음과 같은 순서로 감소하였다. 즉 3량체 프로델피니딘>프로델피니딘 B-3>프로시아니딘 T4>프로시아니딘 B3 순이었다. 세포증식을 억제하는데 있어 프로안토시아니딘의 효력은 다음과 같은 순서로 감소하였다. 즉 프로델피니딘 B-3>T1>프로델피니딘 T2, T3>프로시아니딘 T4>프로시아니딘 B-3 순이었다.

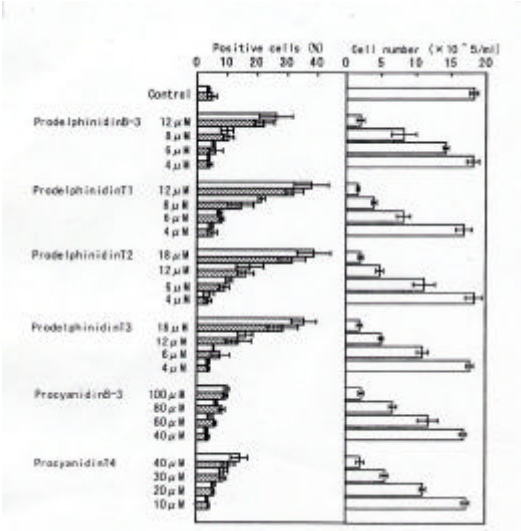


그림 3. 보리 폴리페놀 추출물(BPE)에서 분리한 프로안토시아니딘이 HL-60세포의 분화와 증식에 미치는 효과

□ NBT-양성 세포, ▨ α-naphthyl butyrate esterase 양성 세포

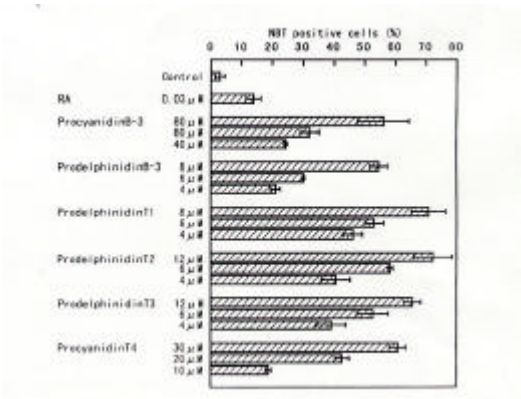


그림 4. 프로안토시아니딘과 RA의 동시투여가 HL-60 세포에서 NBT-환원 활성에 미치는 효과

3.3 BPE로부터 분리한 프로안토시아니딘이 RA에 의해 유발되는 HL 60세포의 과립구 세포분화에 미치는 영향

RA는 HL 60세포에서 NBT 환원활성을 유도하고(2μM의 RA는 83% NBT-양성세포를 야기 시킴)

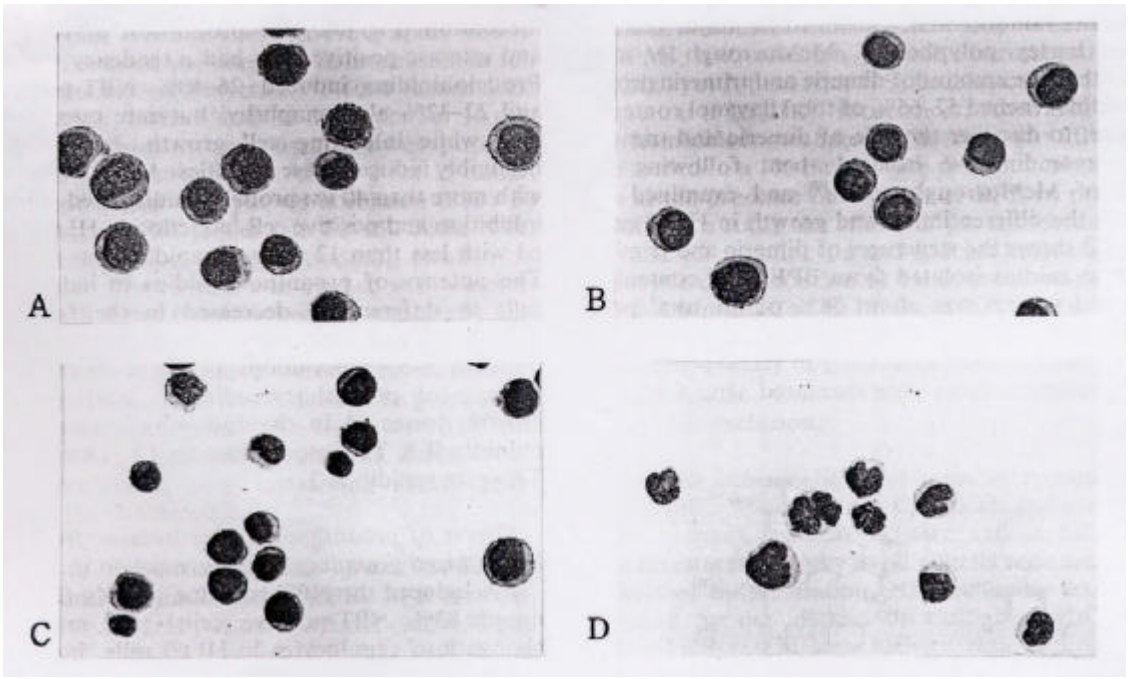


그림 5. 프로델피니딘 T2, RA, 또는 T2와 RA로 처리한 HL-60세포의 현미경 염색사진(Giemsa-stained)

A : 처리하지 않은 세포, B: 12 μM의 프로델피니딘 T2로 처리한 세포, C: 0.03 μM의 RA로 처리한 세포, D: 12 μM의 프로델피니딘 T2와 0.03 μM의 RA로 처리한 세포

과립구로의 형태학적 변화를 유발시킨다. 그렇지만 0.03μM의 RA는 단지 NBT-양성세포를 15% 유발시킬 뿐이며, 형태학적으로는 성숙된 과립구로의 분화를 유발시키지 않는다(그림4, 5). BPE로부터 분리한 프로안토시아니딘이 RA에 의해 유발되는 HL 60세포의 과립구 세포분화에 미치는 영향을 살펴보기 위해 본 연구에서는 프로안토시아니딘을 0.03μM RA와 함께 배지에 첨가하였다. 모든 프로안토시아니딘이 RA에 의해 유발된 HL 60세포의 과립구 세포분화에 효력이 있었다. 12μM의 프로델피니딘 T2를 0.03μM의 RA와 함께 배지에 첨가한 경우 NBT-양성세포는 72%가 유발되었다(그림4).

0.03μM의 RA와 혼합한 프로안토시아니딘은 HL 60세포를 형태학적으로 분화시켰다. 0.03μM RA 또는 12μM의 프로델피니딘 T2를 단독으로 처리한 HL 60세포는 대조구와 유사하게 크고 둥근 핵을 가지며 세포질에 대한 핵의 비율이 높은 전형적인 promyelocyte가 우세하였고 대조구와 유사하였으나, 0.03μM RA와 12μM 프로델피니딘 T2를 함께 처리한 HL 60세포는 과립구로의 형태학적인 변화가 일어났다(그림 5).

3.4 BPE로부터 분리한 프로안토시아니딘이 sodium butyrate가 유발하는 HL 60세포의 단립구 세포분화에 미치는 영향

Sodium butyrate는 HL 60세포에게 단립구 세포 분화의 지표물질인 α-naphthyl butyrate esterase 활성을 유도하게 되는데, 0.5mM의 sodium butyrate는 86%의 α-naphthyl butyrate esterase-양성세포를 유도한다. 반면 0.2mM의 sodi-

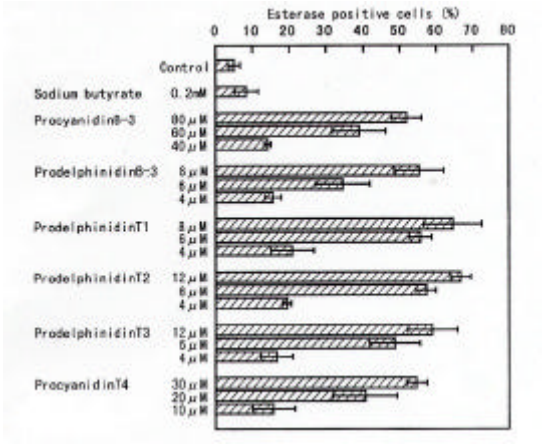


그림 6. 프로안토시아니딘을 sodium butyrate과 함께 투여시 HL-60 세포의 α-naphthyl butyrate esterase 활성에 미치는 효과

um butyrate는 α-naphthyl butyrate esterase -양성세포를 단지 8%만 유도시킬 뿐이다(그림 6). 프로안토시아니딘은 α-naphthyl butyrate este- rase 활성의 유도를 더욱 촉진시키는 것으로 나타났다. 12μM의 프로델피니딘 T2를 0.2mM sodium butyrate와 함께 배지에 첨가하면 α-naphthyl butyrate esterase-양성세포가 67% 수준으로 유도되는 것으로 나타났다.

4. 고 찰

NBT 환원활성은 HL 60세포가 과립구와 단립구로 분화되는 것에 대한 지표이다. HL 60세포에 단립구 세포 분화가 일어날 때, 세포에서 α-naphthyl butyrate esterase 활성이 유도된다. BPE는 HL 60세포에게 이러한 생화학적 분화지표를 유도하였으며, BPE로 처리한 세포는 크고 둥근 핵 그리고 미성숙 세포 또는 단립구로서 세포질에 대한 핵의 비율이 높은 특성을 나타내었다. 이들 결과는 BPE가 HL 60세포에서 단립구로의 분화를 유도한다는 것을 말해주는 것이다.

BPE로부터 분리한 프로안토시아니딘 중 프로델피니딘이 HL 60세포에 있어 NBT 환원활성과 α-naphthyl butyrate esterase 활성을 유도하였다. 프로델피니딘 T1, T2, T3 및 B-3은 HL 60세포가 단립구로 분화되도록 유도하는 것으로 나타났다. 프로시아니딘 T4와 B-3은 HL 60 세포분화를 나타내는 지표가 무시할 정도의 낮은 수준으로 나타났다. 이들 결과는 3개의 B-환 하이드록실기(피로가롤형)가 2개의 B-환 하이드록실기(카테콜형) 보다 더욱 효과적으로 HL 60 세포분화를 유발시킴을 의미한다. 분화유도에 있어 프로안토시아니딘의 효력은 세포증식을 억제하는 프로안토시아니딘의 효력과 관련이 없는 것으로 나타났다.

RA는 강력한 세포분화 유도제로 알려져 있지만 생리적 농도(0.01μM)에서 ML-1 mouse leukemia cell에 분화를 유발하지 않는다(22). 본 결과에서는 0.03μM의 RA가 미약하게 HL 60 세포의 분화를 유도하였다. BPE로부터 얻은 프로안토시아니딘은 0.03μM RA의 분화 유도를 더욱 촉진하는 것으로 나타났으며, HL 60세포가 과립구로 분화되도록 유도하였다. 프로안토시아니딘 자체는 HL 60 세포에게 단립구 세포 분화를 유발시키지만, RA와 함께 투여시 RA에 의해 유발되는 과립구 세포분화를 더욱 촉진시켜 주는 효과를 보였다. 이는 RA가 세포분화를 과립구로 일어나도록 방향을 결정하는 특별한 기능을 갖기 때문인 듯 하다. 따라서 프로안토시아니딘은 혈액 세포에서 일어나는 분화를 지지하는 역할을 하는 것으로 추정된다.

Sodium butyrate는 HL 60세포가 단립구로 분화되도록 유도시키는데 사용된다. BPE로부터 얻은 프로안토시아니딘은 0.2mM sodium butyrate가 유도하는 분화를 더욱 촉진시키는 것으로 나타났으며 HL 60 세포를 단립구로 분화되도록 유도하였다. 프로안토시아니딘 중 프로시아니딘은 HL 60세포에 있어 RA에 의한 과립구 세포분화와 sodium butyrate에 의한 단립구 세포분화를 촉진시켰지만, 프로시아니딘 단독으로는 HL 60세포에 분화를 유도시키지 못하였다. 이 결과는 프로시아니딘은 프로델피니딘과 마찬가지로 잠재적인 분화 유도 효과가 있음을 말해주는 것이다. 프로안토시아니딘은 HL 60 세포의 과립구 및 단립구로의 분화 경로 모두를 촉

진시키는 효과가 있었다.

프로시아니딘 및 프로델피니딘이 속한 축합형 탄닌은 쥐의 뇌 중의 protein kinase C (PKC) 활성에 매우 우수한 저해제라고 보고되었다(23). RA에 의한 과립구 세포분화는 staurosporin이 PKC 활성을 억제시킴에 따라 더욱 촉진되는데, 이는 HL 60 세포의 과립구 세포분화 동안 PKC 활성이 감소되는 것과 관련지을 수 있다(24). 따라서 BPE에서 분리한 프로안토시아니딘에 의해 HL 60 세포 분화가 유도되고 촉진되는 것은 PKC 저해와 관련이 있다고 추정할 수 있다.

인체유래의 leukemia cell에 대하여 프로아토시아니딘이 발휘하는 분화유도 활성은 항 돌연변이 효과 뿐 만 아니라 암의 예방에도 기여할 수 있을 것이다. 보리 겨층으로부터 얻은 프로안토시아니딘은 혈액암세포(leukemia cell)의 분화를 유도하고 분화를 유도하는 생체내 여러 인자들의 기능을 촉진시킨다고 볼 수 있겠다. 보리는 혈당의 상승을 억제하고 콜레스테롤의 생합성을 저해하는 기능 이외에도 암 예방 효과를 나타낼 것으로 기대되며 이를 통해 인류의 건강에도 기여할 수 있을 것이다.

5. 참고문헌

1. Morisue, Y., in `Seibaku Kinenshi" (in Japanese), ed. by All-Japan Barley Processors Assoc. Tokyo, pp. 328-342 (1968).
2. Sato, J., Osawa, I., Hattori, A., Dshida, Y., and Sato, Y., Effects of dietary fiber on carbohydrate metabolism-A study in healthy subjects and diabetic patients-. *Sogo Hoken Taiiku kagaku*(in Japanese), 13, 75-78(1990).
3. Nakamura, K., Ikegami, Y., Takita, T., and Innami, S., Study on the suppressive mechanism of the postprandial blood glucose elevation of barley in humans and rats. *Toho Igaku Gaskai zasshi*(in Japanese), 43, 157-166(1996).
4. Qureshi, A. A., Burger, W. C., Peterson, D. M., and Elson, C. E., The structure of an inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley. *J. Biol. Chem*., 261, 10544-10550(1986).
5. Outtrup, H., Structure of prodelphinidins in barely in `European Brewery Convention Proc. 18th Cong.," Copenhargen, pp. 323-333(1981).
6. Ariga, T., Koshiyama, I., and Fukushima, D., Antioxidative properties of procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans in aqueous systems. *Agric. Biol. Chem*., 52, 2717-2722(1988).
7. Sugimoto, K., Ariga, T., Oshiita, K., and Kikuchi, M., Japan Kokai Tokkyo Koho, 92190774(Jul. 9, 1992).
8. Cheng, J. T., Hsu, F. L., and Chen, H. F., Antihypertensive principles from the leaves of *Melastoma Candidum*. *Planta. Med*., 59, 405-407 (1993).
9. Tamagawa, K., Iizuka, T., Fukushima, S., Endo, Y., and Komiyama, K., Anti-oxidative activity of polyphenol extracts from barley bran. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*(in Japanese), 44, 512-515(1997).
10. Tamagawa, K., Iizuka, T., Kobori, M., Shinmoto, H., and Tsushida, T., Radical scavenging activity and antimutagenicity of proanthocyanidins from barley bran. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*(in Japanese), 45, 420-425(1998).
11. Kobori, M., Miyama, Y., and Tsushida, T., Effect of non-dialyzable extracts of vegetables on the differentiation of U-937 human myeloid leukemia cell line. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 42, 61-68(1995).

12. Constantinou, A., Kiguchi, K., and Huberman, E., Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K-562 leukimia cells by genistein. *Cancer Res*., 50, 2618-2624 (1990).
13. Jing, Y., Nakaya, K., and Han, R., Diferentiation of promyelocytic lukimia cells HL-60 induced by daidzein *in vitro* and *in vivo*. *Anticancer Res*., 13, 1049-1054(1993).
14. Mak, N. K., Wong-Leung, Y. L., Chan, S. C., Wen, J., Leung, K. N., and Fung, M. C., Isolation of anti-leukemia compounds from *Citrus Reticulata*. *Life Sci*., 58, 1269-1276(1996)
15. 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).
16. Yen, A. and Varvayanis, S., DMSO, sodium butyrate, and TPA induce hypophosphorylation of RB with HL-60 cell differentiation. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim*., 31, 164-167 (1995)
17. Lotem, J. and Sachs, L., Regulation in mouse and human myeloid leukemic cells by phorbol esters and the mechanism of tumor promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76, 5158-5862* (1979).
18. Nskabayasihi, T., Studies on tannin of fruits and vegetables part I. Tannin of fruits of Rosaceous fruit-trees. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi (in Japanese)*, 15, 73-78 (1968).
19. McMurrough, I., Loughrey, M. J., and Hennigan, G. P., Content of (+)-catechin and proanthocyanidins in barley and molt grain. *J. Sci. Food. Agric., 34,* 62-72 (1983).
20. 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).
21. Li, C. y., Lam, K. W., and Yam, K. T., Esterases in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem*., 21, 1-12 (1973)
22. Takeda, K., Takuma, T., and Hosoi, T., Differentiation inducing activity of TNF and its enhancement in combination with other biological reponse modifiers. in 〝Tumor necrosis factor / cachectin and related cytokines," ed. by Bonavida, B., Gifford, G. E., Kirchner, H., and Old, L. J., Karger, Basel, pp.102-107 (1988).
23. Wang, B.H., Foo, L. Y., and Polya, G.M., Differential inhibition of eukaryote protein kinase by condensed tannins. *Phytochemistry*, 43, 359-365 (1996).
24. Hashimoto, K., Kishimoto, A., Aihara, H., Yasuda, I., Mikawa, K., and Nishizuka, U., Protein kinase C during differentiation of human promyelocytic leukemia cell line, HL-60. *FEBS Lett*., 263, 31-34 (1990)

<출처 : Biosci. Biotechnol. Biochem., 62(8), 1483-1487(1998)>