

급성 전골수성 백혈병에 대한 Arsenic trioxide(As_2O_3)의 항암 작용

계명대학교 의과대학 소아과학교실, 미생물학교실*, 내과학교실†

송기영· 박진휘· 조윤정· 백원기*· 권기영†· 김흥식· 강진무

Anticancer Effect of Arsenic Trioxide in Acute Promyelocytic Leukemia

Ki Young Song, M.D., Jin Hye Park, M.D., Yoon Jung Cho, M.D., Won Ki Baek, M.D.*
Ki Young Kwon, M.D.†, Heung Sik Kim, M.D. and Chin Moo Kang, M.D.

Department of Pediatrics, Microbiology, Internal Medicine†
School of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea*

Purpose : Acute promyelocytic leukemia (APL or APL, M3) represents a unique model for cancer research in terms of biological and clinical features. Since 1988, it has been widely confirmed that all-trans retinoic acid (ATRA) can induce complete clinical remission in over 85% of APL patients by a differentiation process, with PML-RAR α protein possibly being the direct target of ATRA. However, ATRA treatment has two clinical limitations, namely, retinoic acid syndrome and retinoic resistance. Recently, it has been shown that arsenic trioxide used in some traditional Chinese remedy is very effective in retinoic resistant APL treatment. We tried to observe arsenic effect on cell lines and APL patient cells.

Methods : We investigated arsenic trioxide-induced apoptosis on APL, HL60, K562, KPH1 cell lines through MTT assay, DNA fragmentation assay and morphologic features.

Results : In MTT assay, cell survival rate decreased as the concentration of arsenic trioxide increased. In DNA fragmentation assay with HL60 cell line, DNA fragmentation was more frequent in high concentrations of arsenic trioxide than in low concentrations. During arsenic trioxide treatment, the morphologic change in bone marrow cells of APL patient, included nuclear differentiation and dark cytoplasmic granule during arsenic trioxide treatment. Serum arsenic reached peak level at 4hr after injection. We experienced a case of a 9-year-old male with APL who had relapsed after cessation of retinoic acid treatment. The patient successfully achieved remission following arsenic trioxide treatment without bone marrow depression and exacerbating bleeding diathesis.

Conclusion : Arsenic trioxide can be used effectively to treat APL patients by inducing apoptosis and partial differentiation in tumor cells. The precise cellular and molecular mechanisms of its therapeutic effects remain to be determined. (*J Korean Pediatr Soc* 2000;43:327-334)

Key Words : Arsenic trioxide, Acute promyelocytic leukemia (APL), Childhood

서 론

접수 : 1999년 7월 11일, 승인 : 1999년 10월 8일
책임저자 : 김흥식, 계명대학교 동산의료원 소아과
Tel : (053)250-7516 Fax : (053)250-7783

소아기의 악성 종양은 소아에서 질병으로 인한 사

망의 가장 흔한 원인으로, 이중 급성 백혈병이 30-40%로 가장 많은 빈도를 차지한다. 소아 백혈병에서 급성 골수구성 백혈병은 림프구성 백혈병보다는 빈도가 낮으나 그 치료법이 아직 만족스럽지 못하여 사망률 또한 높은 실정이다. 급성 전골수성 백혈병(acute promyelocytic leukemia, APL)은 치료중 범발성 혈관내 응고증(disseminated intravascular coagulation)으로 인하여 사망률이 높으며¹⁾ 염색체 검사상 t(15;17)이 특징적으로 나타나고, 이는 promyelocytic leukemia (PML) 유전자와 retinoic acid receptor α (RARA) 유전자의 재배열에 의한 PML-RARA chimeric 단백 발현의 결과로 인한 것임이 밝혀져²⁻⁴⁾, 이 단백질에 직접적으로 작용하는 all-trans retinoic acid (ATRA)를 사용하여 APL 치료에 많은 도움을 주었다⁵⁻¹⁰⁾. 그러나 ATRA 치료 후 진행성 저산소증이나 여러 장기의 기능 부전이 동반되는 retinoic acid 증후군이 나타나고 거의 모든 환자에서 약제를 중단하면 재발한다는 것이 문제로 남아 있다^{8, 11)}. 최근에 중국에서 보고된 arsenic trioxide(As_2O_3) 치료가 ATRA 또는 기존 항암제에 효과가 없는 환자들이나 ATRA 치료후 재발된 환자에게 사용되어 좋은 결과를 보이고 있다¹²⁾. 특히 arsenic trioxide는 다른 항암제에서 보이는 골수 억제 작용이 없으며 APL에 관련된 출혈 경향을 일으키지 않는다는 장점이 있다¹²⁾.

Arsenic trioxide는 PML/RARA 단백질의 퇴화를 유도하고 PML의 amino-terminal sequences에 주로 작용하여 세포 고사(apoptosis)를 일으킴으로서 항암 효과를 나타낸다고 한다. 본 연구에서는 APL 세포주인 HL60 세포주와 APL 환자의 골수 세포를 이용하여 arsenic trioxide에 대한 세포의 항암제 감수성 검사를 시행하고 arsenic trioxide투여 후 세포의 형태적 변화 및 DNA 변화를 관찰하여 세포 고사 여부를 확인해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 재 료

미분화암 세포주인 HL60 세포는 APL 환자의 말초 혈액에서 유래된 세포주¹³⁾, American type culture collection(ATCC, Rockville, MD)로 부터 구입하였다. RPMI -1640 배지에 10% 우태 혈청을 섞어서 HL60 세포 배양중 세포 생존율이 85% 이상인 경우 실험에

이용하였다.

KPH1은 계명의대 소아과학 교실에서 확립한 간 모세포종 세포주이며 K562는 적백혈병 세포주이다. APL1은 남아 9세로 1997년 APL로 진단되어 ATRA와 화학 요법으로 관해 되었다가 1년 후 다시 재발했을 당시의 골수 세포이며, APL2는 여자 25세로 1999년 5월에 APL로 처음 진단 당시의 골수세포이며 (blast : 74.4%), APL3는 여자 23세로 1999년 7월에 APL로 진단 받은 환자의 골수세포이다(blast : 80.6%).

2. 실험 방법

1) 항암제 감수성 검사(MTT assay : methyl thiazol tetrazolium assay)

Arsenic trioxide(Sigma, USA)를 1% NaOH 용액에 용해시켜 96 well plate에 stock 농도 $10^{-4}M$ 을 최고농도로 하여 단계적으로 희석하였다. HL60 세포주는 $10^6/mL$, 골수 세포는 $10^7/mL$ 로 세포 부유액을 만들고 각 well에 세포 부유액을 100 μ L씩 첨가하여 37°C, 5% CO_2 항온기에서 96시간 배양하였다. 여기에 MTT 50 μ L (0.1mg)을 넣은 후 6시간 추가 배양하고 상청액 220 μ L를 조심스럽게 제거한 후 DMSO 150 μ L를 첨가하였다. DMSO로 인해 용해된 세포를 ELISA reader로 540nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. Arsenic trioxide외에 agaricus (10 μ g/mL), adriamycin (1 μ g/mL), cisplatin (4 μ g/mL), VP-16 (20 μ g/mL), Ara-C (20 μ g/mL)도 동일하게 7단계 농도로 만들어 HL60 세포주에 첨가하여 세포 생존율을 구하였다.

2) DNA fragmentation assay

HL60 세포주와 APL1 골수세포에 arsenic trioxide, agaricus, adriamycin을 첨가하고, 1일 배양 후 2,000rpm에서 2분간 원심 분리하여 상청액을 완전히 제거하고 20 μ L 용해 완충액을 넣어 천천히 세포덩어리를 용해시켰다. 여기에 1 μ L RNase A (100 mg/mL)를 넣고 섞은 후 37°C에 1시간 배양시키고 20 μ L proteinase K (10mg/mL)를 넣고 혼합한 후 이것을 50°C 수조에서 2시간 30분 가열하고 1.2% agarose gel을 이용하여 2시간 30분간 30volt에서 전기 영동시켰다.

3) 형태학적 변화(광학현미경 검사)

Arsenic trioxide, adriamycin을 첨가한 HL60 세포를 각각 1×10^5 개로 만들어 500rpm에서 5분간 cy-

tospin(Shandon, Cheshire, UK)후 공기중에서 잘 말리고 9% paraformaldehyde가 첨가된 phosphate buffered saline으로 5분간 고정하고 세포의 탈락을 막기 위해 poly-L-lysine이 처리된 유리 슬라이드를 이용하여 Wright 염색을 하고 광학 현미경하에서 세포 고사 여부를 확인하였다.

4) APL1 환자에게 arsenic trioxide의 투여

ATRA 투여로 관해되었다가 재발된 9세 남자(APL1)에서 부모의 동의를 받은 후 arsenic trioxide를 투여하였다. 0.1% arsenic trioxide 5mL를 5% D/W 500mL 용액에 섞어서 3시간 동안 하루 한 번 정맥 주사하였다. Arsenic trioxide 투여후 혈중 농도를 측정하고 매주 골수 검사를 시행하여 세포 모양을 관찰하였다.

결 과

1. 항암제 감수성 검사

HL60, K562, KPH1 세포주를 이용한 MTT assay에서 arsenic trioxide를 첨가하였을 때 모든 세포주가 arsenic trioxide 농도 증가에 따라 세포 생존율이 감소하였으며, HL60 세포주는 6.25-3.125 μ M의 농도에서, K562, KPH1 세포주는 3.125-1.5625 μ M의 농도에서 가장 급격한 세포 생존율 감소를 보였다(Fig. 1).

HL60 세포주에 arsenic trioxide, agaricus, adriamycin, cisplatin을 첨가한 MTT assay에서 arsenic trioxide 3.125 μ M농도시 세포 생존율 98%에서 6.25 μ M의 농도에서 9%로 세포 생존율이 급격히 감소하였고,

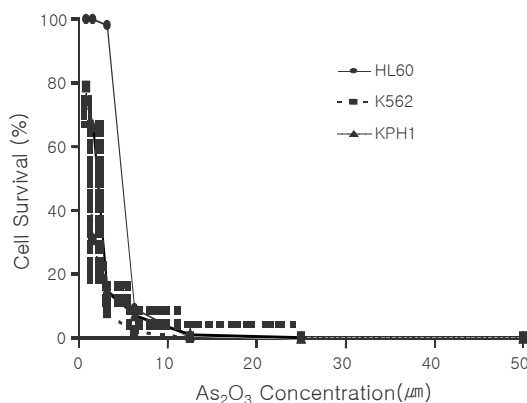


Fig. 1. Chemosensitivity of arsenic trioxide using MTT assay of the HL60, K562 and KPH1 cell lines.

그 외 약제에서는 완만한 감소를 보였다. Arsenic trioxide는 12.5 μ M의 농도에서, adriamycin은 0.5 μ g/mL의 농도에서, cisplatin은 2.0 μ g/mL의 농도에서 세포 생존율 0%를 나타내었으며 agaricus는 최고농도 10mg/mL에서도 23.5%의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 2).

APL1 세포에 arsenic trioxide를 첨가한 MTT assay에서 0.78125 μ M에서 100%, 1.5625 μ M에서 67.2%, 3.125 μ M에서 58.4%, 6.25 μ M에서 17.2%, 12.5 μ M에서 2%, 25 μ M 이상의 농도에서 세포 생존율 0%로 농도 증가에 따라 세포 생존율이 감소하였고(Fig. 3), APL2 세포를 이용한 MTT assay에서 arsenic trioxide를 첨가했을 때에도 농도 증가에 따라 급격히 세포 생존율이 감소하여 12.5 μ M에서 세포 생존율 0%이었고, VP-16, Ara-C는 농도 증가에 따라 세포 생존율의 완만한 감소를 보여 최고 농도 20 μ g/mL에서 세포 생존율 0%이었고 agaricus에는 전혀 반응이 없었다(Fig. 4). APL3 세포를 이용한 MTT assay에서도 arsenic trioxide가 가장 민감한 반응을 보여 25 μ M의 농도에서 세포 생존율 0%를 나타내었고 cisplatin은 2 μ g/mL의 농도까지 71.3%의 세포 생존율을 나타내었으나 4 μ

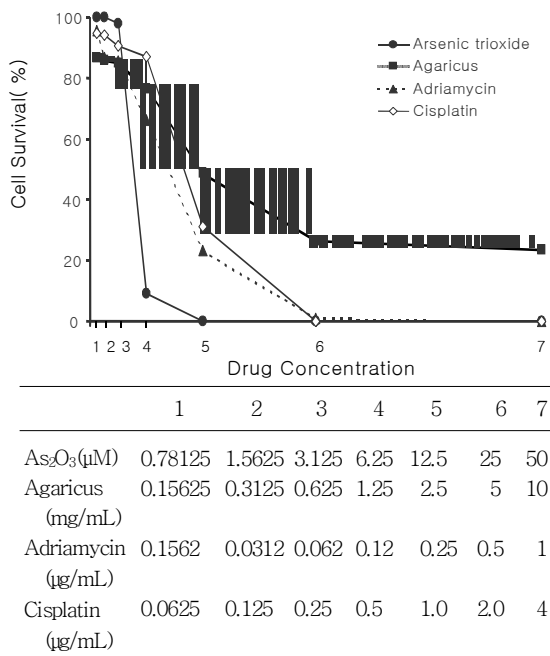


Fig. 2. Chemosensitivity of various drugs using MTT assay of the HL60 cell line.

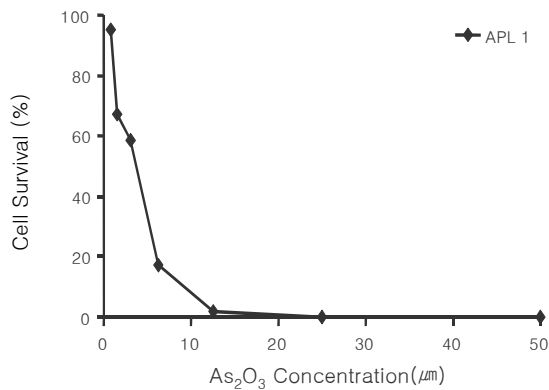
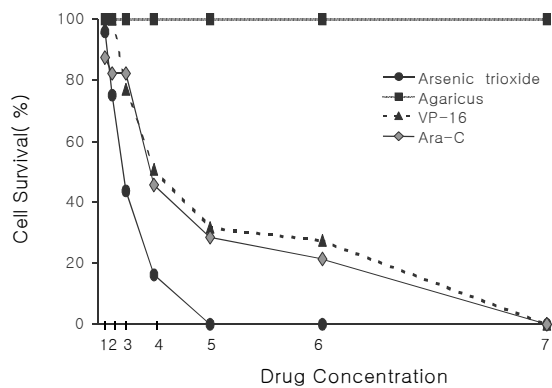


Fig. 3. Chemosensitivity of arsenic trioxide using MTT assays of the APL1 cells.



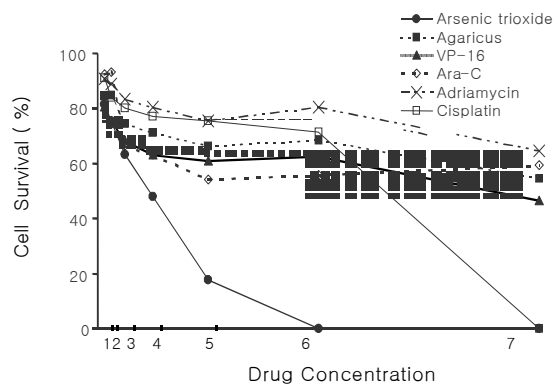
	1	2	3	4	5	6	7
As_2O_3 (μM)	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50
Agaricus (mg/mL)	0.15625	0.3125	0.625	1.25	2.5	5	10
VP-16, Ara-C ($\mu g/mL$)	0.3125	0.625	1.25	2.5	5.0	10	20

Fig. 4. Chemosensitivity of various drugs using MTT assay of APL2 cells.

g/mL의 농도에서 세포 생존율 0%로 급격한 감소를 나타내었고, 나머지 약제(agaricus, VP-16, Ara-C, adriamycin)에서는 최고 농도(10mg/mL, 20 $\mu g/mL$, 20 $\mu g/mL$, 1 $\mu g/mL$)에서도 반응이 거의 없었다(Fig. 5).

2. DNA fragmentation assay

HL60 세포주에서 고농도의 arsenic trioxide(10–50 μM)와 agaricus(100 μL)를 첨가하였을 때 분절된 DNA를 gel상에서 볼 수 있었다(Fig. 6a).



	1	2	3	4	5	6	7
As_2O_3 (μM)	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50
Agaricus (mg/mL)	0.15625	0.3125	0.625	1.25	2.5	5	10
VP-16, Ara-C ($\mu g/mL$)	0.3125	0.625	1.25	2.5	5.0	5	10
Adriamycin ($\mu g/mL$)	0.01562	0.0312	0.062	0.12	0.25	0.5	1
Cisplatin ($\mu g/mL$)	0.0625	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4

Fig. 5. Chemosensitivity of various drugs using MTT assay of the APL3 cells.

APL1 세포에 arsenic trioxide를 농도별로 처리하여 대조군과 비교하여 보았을 때 고농도의 arsenic trioxide를 첨가 하였을 때 DNA 분절이 더 잘 생겼다(Fig. 6b).

3. 형태학적 변화

HL60 세포주에 arsenic trioxide를 첨가한 후 염색질의 응축과 핵의 분해, 세포질 용적의 감소 등의 특징적인 소견을 보이는 세포의 고사 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 7A). 같은 세포에 adriamycin을 첨가하였을 때에는 핵의 변화는 거의 없었고 세포질에 공포가 형성되었다(Fig. 7B).

4. APL1 환자에서 arsenic trioxide 치험례

APL1 환아는 치료 받은지 1년 후 재발된 예로 arsenic trioxide를 28일간 차차 증량시켜 80 μM 의 용량을 사용 후에는 핵이 더 분화되고 세포질 내 과립이 더 진하게 변화되었으며, 49일간 사용후에는 blast가 5% 이하로 완전 관해된 것을 볼 수 있었다. 같은 환아에서 진단 당시 blast가 72%였고 arsenic trioxide

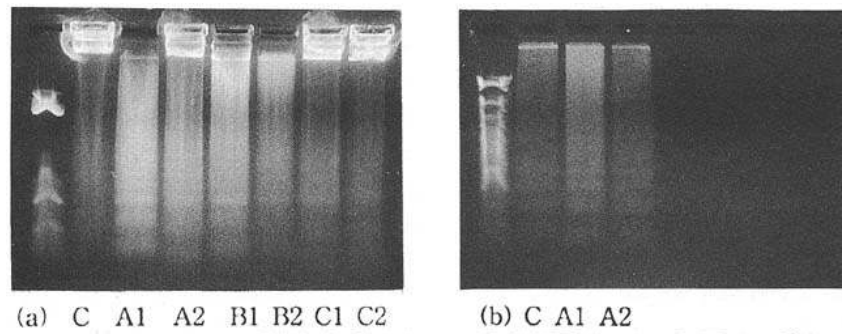


Fig. 6. DNA fragmentation assay with HL60 cell line(a) and APL1 cells(b). C(control), A1 (As_2O_3 , $10^{-5}\mu\text{M}$), A2(As_2O_3 , $10^{-6}\mu\text{M}$), B1 (agaricus 100 μL), B2(agaricus 50 μL), C1 (adriamycin 100 μL), C2(adriamycin 50 μL).

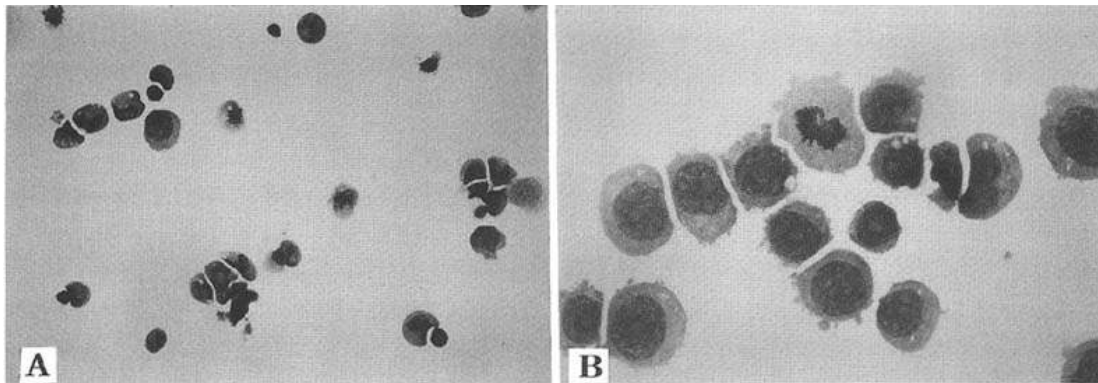


Fig. 7. Arsenic trioxide-induced apoptosis(A) and adriamycin-induced apoptosis with cytoplasmic bleb formation in HL60 cell line(B).

50 μM , 60 μM 의 농도로 사용시 blast의 완만 한 감소를 보이던 것이 80 μM 사용후에 blast의 급 격한 감소를 보였다. 같은 환아에서 1일째와 50일째 arsenic trioxide 농도를 달리하여 투여후(50 μM , 80 μM) 혈중 농도를 시간대 별로 측정 하였을 때(사용전, 30분, 1, 4, 12, 24시간 후), 둘 다 투여 4시간에 최고 농도(20 $\mu\text{g/L}$)에 도달하였다.

고 찰

중양은 미분화상태의 세포가 비정상적으로 증식을 계속하는 질환으로 세포학적 분화의 정도와 임상 경과가 상당히 밀접한 관계를 가진다. 중양 세포는 약제나 물리적 자극에 의해 형태학적 변화뿐만 아니라 비정상적인 증식의 소실이 관찰됨이 알려진 뒤 여러가지 분화 요법제들을 사용한 연구가 활발히 진행되고 있다.

APL은 AML의 약 10%를 차지하고 독특한 임상적 생물학적 특성으로 백혈병의 병인 및 조혈세포 분화에 관한 연구 모델로서 각광을 받고 있다¹⁴⁻¹⁷. APL 환자로 부터 분리하여 확립한 세포주인 HL60 세포의 분화 유도 물질로는 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA), 1, 25-dihydroxy vitamin D, retinoic acid, dimethyl-sulfoxide(DMSO) 등이 있으며, 분화 유도제에 따라서 분화 양상과 그에 따른 분자생물학적 조절 기전에도 차이가 있는 것으로 보고되고 있다¹⁸⁻²¹.

임상에서 Huang 등⁶이 16명의 APL 환자를 대상으로 ATRA를 사용하여 15명에서 관해된 것을 보고한 이래 ATRA가 기존의 항암 요법에 비하여 범발성 혈관내 응고증이나 골수부전 등의 합병증 없이 높은 관해율을 보임으로서 APL의 치료에 사용하게 되었다. 또한 Degos 등⁹은 ATRA와 항암제 병합 요법시 관해율을 기존 ATRA만 사용하였을 경우보다 높일 수

있다고 하였다. 그러나 retinoic acid를 사용할 때 약 24%의 환자에서 치료시작 2-3주 내에 발열, 호흡곤란 등을 특징으로 하는 retinoic acid 증후군이 발생하며 지속적인 retinoic acid의 유지요법에도 불구하고 완전 관해의 기간이 평균 4개월로 대부분 2-13개월후 재발하게 되며, 이후에는 retinoic acid 치료에 반응하지 않는다는 예가 보고되면서 새로운 치료의 도입이 필요하게 되었다⁸⁻¹¹⁾.

Arsenic trioxide는 원래 경구 투약시 극약으로 인식되어 왔고 피부와 폐의 암을 일으키는 발암제로 알려지기도 하였다²²⁾. 그러나 비경구로 투여 할 때는 부작용이 적어서 1970년도에 중국의 전통의학과 서양의 학의 통합적인 연구로 Harbin 대학에서 급성 전골수성 백혈병치료에 arsenic trioxide의 효율성을 소개하고 다수의 환자에서 사용한 예를 보고하였다¹⁾.

Arsenic trioxide의 작용기전에 대해서는 고농도(0.5-2 μ M/L)에서 NB4 세포의 세포고사의 유도과 저농도에서(0.1-0.5 μ M/L) 부분적 분화에 의한다는 보고가 있고 이 과정에서 PML-RAR α 가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다²³⁾.

유크세포 사멸의 가장 흔한 형태인 세포 고사는 서서히 증식하는 세포군(간세포, 부신피질 상피세포 등)과 빠르게 증식하는 세포군(장점막세포, 분화중인 정자 세포)에서 지속적으로 발생하여 정상조직에서 항상성을 조절하는 역할을 한다고 알려져 있다²⁴⁻²⁶⁾. 악성 종양의 경우 거의 모든 종양에서 세포 고사가 자발적으로 일어나며, 경도의 허혈, 세포 독성 림프구 침윤과 대식 세포에 의한 종양 괴사 인자의 분비 등에 의해서도 발생한다고 한다²⁷⁾. 세포 고사는 세포의 괴사와는 달리 칼슘 이온과 마그네슘 이온에 의존하는 내핵산분해효소(endonuclease)의 활성화에 의해서 genomic DNA를 약 200bp(base pair)의 분절로 자가분해시키는 과정이라고 하였는데, 형태학적 특징은 괴사와는 달리 초기에 세포의 위축이 생기며 염색질이 응축하여 핵의 분해가 일어나고, 핵막에 부착된 고사체(apoptotic body)를 볼 수 있다고 하였다²⁸⁾.

이 연구의 DNA fragmentation assay에서는 HL60세포주에 고농도의 arsenic trioxide와 고농도의 agaricus를 첨가하였을 때 DNA fragmentation을 볼 수 있었다. 그러나 Chen 등²⁷⁾은 arsenic trioxide가 NB4 세포주에 대하여 세포고사를 나타내는 것은 PML-RAR α 유전자의 조절과 bcl-2 유전자의 하향

조절에 의하여 초래되고, HL60 이나 U937 세포주에서는 세포 억제 효과가 뚜렷하지 않았다고 하였다. 연구자는 NB4 세포주는 사용하지 않았으나 APL 환자의 세포에서도 HL60과 비슷한 세포 고사를 나타내는 DNA 분절을 관찰하였다. 현미경상의 세포 변화의 관찰에서도 arsenic trioxide, adriamycin 모두에서 세포 고사를 관찰할 수 있었으나 arsenic trioxide에 비하여 adriamycin을 투여한 경우에 그 형태학적 변화는 경미하게 나타내었다.

세포 고사를 확인하는 방법은 첫째, 세포의 고사가 생기면 DNA가 200bp 정도의 nucleosome 단위로 분절되어 agarose gel 전기영동상 특징적인 사다리 모양의 소견을 나타내는 것을 보는 것과 둘째, 세포 고사의 특징적 형태학적 변화를 관찰하는 것이며 셋째, Apop Tag Kit를 이용하여 고사를 일으킨 세포의 핵에만 선택적으로 되는 염색 양상을 보는 것이다²⁹⁾. 본 실험에서는 agarose gel 전기영동을 이용하여 특징적인 DNA 분절을, 광학현미경으로 형태학적 변화를 관찰함으로써 세포 고사를 확인하였다. 그리고 APL 세포주인 HL60 세포주의 arsenic trioxide에 대한 MTT assay를 시행하여서는 arsenic trioxide의 용량이 증가함에 따라 세포 생존율이 급격히 감소하였고, 이런 변화는 적백혈병 세포주인 K562, 간모세포종 세포주인 KPH1에서도 비슷하였다.

HL60 세포주에 arsenic trioxide와 백혈병 치료제인 adriamycin, cisplatin 등의 약제와 항암 효과가 있다고 알려진 agaricus 버섯 추출액을 처리하였을 때에도 세포 생존율은 arsenic trioxide에 의하여 가장 급격하게 감소하였고 VP-16과 Ara-C는 비슷하였으며 agaricus는 효과가 적었다. 이것은 Chen 등²⁷⁾의 연구와는 다른 결과를 보여주는데 이들은 trypan blue 염색법을 이용하였고, 본 실험에서는 MTT assay를 이용하였으므로 방법상의 차이에 기인하는지는 향후 NB4 세포주를 이용한 실험이 필요하리라 생각된다. 또한 세포 고사에 관련된 PML-RAR α , bcl-2를 포함하여 Rb 유전자²⁹⁾, Fas 유전자 등³⁰⁾에 대한 연구도 필요할 것이다.

APL 환자에서도 arsenic trioxide의 실험실내 항암제 감수성검사 및 형태학적 변화에 대한 효과는 비슷하였고 항암제는 환자에 따라 효과가 달라서 APL2 환자에서는 VP-16과 Ara-C가 완만하게 세포생존율의 감소를 보였고 agaricus는 효과가 없었으나, APL3 환

자에서는 cisplatin만이 효과를 보였다.

소아환자에 arsenic trioxide를 사용하였을 경우 환자의 진찰소견이나 검사 소견에는 별 변화가 없었고, 골수의 백혈세포는 관해될 때까지 서서히 감소하는 경향을 보였다. 혈중 농도는 투여 1시간 후까지는 별 변화를 보이지 않았고 4시간에 최고치(20 μ g/L)를 나타내었고 12시간에 투여전 농도로 낮아졌다. 이는 Chen 등²⁷⁾과 Shen 등¹²⁾의 보고와 비슷하였으나, 투여농도를 증가시켜도 최고치는 변함이 없었던 점은 잘 설명되지 않아 차후 더 많은 예에서 혈중농도를 측정해 보고 약동학을 고찰해 보아야 할 것으로 생각된다.

요 약

목 적 : HL60 세포주와 APL환자의 골수 세포를 이용하여 arsenic trioxide에 대한 세포의 항암제 감수성 검사를 시행하고 arsenic trioxide투여 후 형태학적 변화 또는 DNA 변화를 관찰하여 세포고사를 확인해 보고자 하였다.

방 법 : 연구 재료로 HL60 세포주와 간모세포종 세포주인 KPH1, 적백혈병 세포주인 K562, APL 세포(AML1, APL2, APL3)를 이용하여 항암제 감수성 검사, DNA fragmentation assay를 하였다.

결 과 : 각 세포에 arsenic trioxide, agaricus, adriamycin, cisplatin, VP-16, Ara-C를 첨가하여 항암제 감수성 검사를 실시한 결과 HL60, K562, KPH1 세포주에서 arsenic trioxide의 농도 증가에 따라 세포 생존율이 감소함을 볼 수 있었고 APL 세포들에서도 arsenic trioxide 첨가시 농도 증가에 따라 세포 생존율이 감소함을 볼 수 있었으나 다른 약제에서는 완전한 반응을 보였다. HL60 세포주와 골수세포에 arsenic trioxide, agaricus, adriamycin을 첨가하여 실시한 DNA fragmentation assay에서 저농도보다 고농도에서 DNA 분절이 더 잘 일어났으며 HL60 세포주에 adriamycin을 첨가하였을 때에는 광학 현미경상 핵의 변화가 거의 없었으나 arsenic trioxide를 첨가하였을 때는 염색질의 응축과 핵의 분해, 세포질 용적 감소 등의 고사가 일어난 세포를 관찰할 수 있었다. 재발된 APL1 환자에서 arsenic trioxide를 사용하여 49일후 blast가 5% 이하로 완전 관해를 볼 수 있었고, arsenic trioxide를 투여후 혈중 농도를 측정하였을 때 4시간 후에 최고 농도에 도달하였다.

결 론 : HL60 세포주와 APL 세포에서 MTT assay와 DNA fragmentation assay 및 세포 형태의 관찰 결과 arsenic trioxide는 세포 고사를 일으켜 관해를 유도하는 것이 확인되어 기존의 치료로 관해 유도가 되지 않거나 재발된 APL 환자에게 특별한 부작용 없이 arsenic trioxide를 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballerini P, Berger R, Fenaux P, et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia : I. Clinical results. *Blood* 1990;76:1704-9.
- 2) de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to novel transcribed locus. *Nature* 1990;347:558-61.
- 3) Goddard AD, Borrow J, Freemont PS, Solomon E. Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* 1991;254:1371-4.
- 4) Tong JH, Dong S, Geng JP, Huang W, Wang ZY, Sun GL, et al. Molecular rearrangements of the MYL gene in acute promyelocytic leukemia (APL, M3) define a breakpoint cluster region as well as some molecular variants. *Oncogene* 1992; 7:311-6.
- 5) Kantarjian H, Keating MJ, Walters RS, Smith TL, McCredie KB, Freireich EJ. Role of maintenance chemotherapy in acute promyelocytic leukemia. *Cancer* 1987;59:1258-63.
- 6) Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhao L, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1988;72:567-72.
- 7) Cunningham I, Gee TS, Reich LM, Kempin SJ, Naval AN, Clarkson BD. Acute promyelocytic leukemia : Treatment results during a decade at Memorial Hospital. *Blood* 1989;73:1116-22.
- 8) Warrell RP Jr, Frankel SR, Miller WH Jr, Scheinberg DA, Itri LM, Hittelman WN, et al. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin(all-trans-retinoic acid). *N Engl J Med* 1991;324:1385-93.
- 9) Degos L, Dombret H, Chomienne C, Daniel MT, Miclea JM, Chastang C, et al. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of

- acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1995; 85:2643-53.
- 10) Chen GQ, Shen ZX, Wu F, Han JY, Miao JM, Zhong HJ, et al. Pharmacokinetics and efficacy of low-dose all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 1996;10:825-8.
 - 11) Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240:889-95.
 - 12) Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, et al. Use of arsenic trioxide(As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997;89:3354-60.
 - 13) Collins SJ. The HL60 promyelocytic leukemia cell line: Proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 1987;70:1233-44.
 - 14) Rand JJ, Maloney WD, Sise HS. Coagulation defects in acute promyelocytic leukemia. *Arch Intern Med* 1969;123:39-47.
 - 15) Mertlesmann R, Tzvi Thaler H, To L, Gee TS, McKenzie S, Schauer P, et al. Morphological classification, response to therapy, and survival in 263 adult patients with acute non lymphocytic leukemia. *Blood* 1980;56:773-81.
 - 16) Larson RA, Kondo K, Vardiman JW, Butler AE, Golomb HM, Rowley JD. Evidence for a 15:17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia. *Am J Med* 1984;76:827-41.
 - 17) Davey FR, Davis RB, MacCallum JM, Nelson DA, Mayer RJ, Ball ED, et al. Morphologic and cytochemical characteristics of acute promyelocytic leukemia. *Am J Hematol* 1989;30:221-7.
 - 18) Jiang H, Lin J, Su Z, Collart FR, Huberman E, Fisher PB. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1 expression in the absence of p53. *Oncogene* 1994;9:3397-406.
 - 19) Burger C, Wick M, Muller R. Lineage-specific regulation of cell cycle gene expression in differentiating myeloid cells. *J Cell Sci* 1994;107:2047-54.
 - 20) Horiguchi-Yamada J, Yamada H, Nakada S, Ochi K, Nemoto T. Changes of G1 cyclins, cdk2, and cyclin A during the differentiation of HL60 cells induced by TPA. *Mol Cell Biochem* 1994; 132:31-7.
 - 21) Look AT. Arsenic and apoptosis in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1998;90:86-8.
 - 22) Dong JT, Luo XM. Effects of arsenic on DNA damage and repair in human fetal lung fibroblasts. *Mutat Res* 1994;315:11-5.
 - 23) Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, et al. Use of arsenic trioxide(As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As_2O_3 exerts dose-dependent dual effects on APL cell. *Blood* 1997;89:3345-53.
 - 24) Kerr JFR. Shrinkage necrosis: A distinct model of cellular death. *J Pathol* 1971;105:13-20.
 - 25) Wyllie AH, Kerr JF, Macaskill IA, Currie AR. Adrenocortical cell deletion: The role of ACTH. *J Pathol* 1973;111:85-94.
 - 26) Benedetti A, Jezequel AM, Orlandi F. Preferential distribution of apoptotic bodies in acinar zone 3 of normal human and rat liver. *J Hepatol* 1988; 7:319-24.
 - 27) Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide(As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with down regulation of bcl-2 expression and modulation of PML-RAR α /PML proteins. *Blood* 1996;88:1052-61.
 - 28) Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136:593-608.
 - 29) 조재위, 백원기, 서성일, 박종욱, 서민호. HL60 세포분화시 Rb 항암단백질과 세포 주기조절인자들의 발현. *대한미생물학회지* 1999;34:77-84.
 - 30) 이 석, 민유홍, 정소영, 정성철, 유내철, 이정운. 급성 골수성 백혈병에서 Fas 및 bcl-2 항원의 발현과 그 임상적 의의. *대한혈액학회지* 1996;31:401-3.