

Sodium arsenite (NaAsO₂)가 G-CSF에 의해 neutrophilic granulocyte계열 세포로 성장, 분화가 촉진된 골수 세포에 미치는 영향

한성수 · 박재현 · 정혜주* · 김영옥 · 정승태 · 김진호 · 최경백 · 강선경 · 조대현
식품의약품안전청, 국립독성연구소 독성부

The Effect of Sodium Arsenite (NaAsO₂) on the Proliferation and Differentiation of Bone Marrow Cell Stimulated by G-CSF to Neutrophilic Granulocyte Lineage Cells

Seong-Su Han, Jae-Hyun Park, Hye-Joo Chung*, Young-Ok Kim, Seung-Tae Chung, Jin-Ho Kim, Kyoung-Baek Choi, Sun-Kyung Kang and Dae-Hyun Cho

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea
Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul, 122-704, Korea

(Received September 8, 2000)

(Accepted October 31, 2000)

ABSTRACT : To investigate what kinds effect arsenic exert on the proliferation and differentiation of bone marrow cells to the neutrophilic granulocytes lineage cells, we treated sodium arsenite to murine bone marrow cells without or with the stimulation of G-CSF. When we added the various concentrations of sodium arsenite to bone marrow cells without the stimulation of G-CSF for 1, 3, 5 or 7 days, sodium arsenite did not make an any effect up to 2.5 μ M but concentration. of sodium arsenite above 2.5 μ M inhibited the growth of bone marrow cells by dose and time dependent manner as well as 10 μ M of sodium arsenite caused apoptosis of bone marrow cells for all incubation periods. Moreover, we treated the various concentrations of sodium arsenite to bone marrow cells stimulated by G-CSF to proliferate and differentiate to the neutrophilic granulocytes lineage cells for 1, 3, 5 or 7 days. The strong stimulation effect of G-CSF was not affected with sodium arsenite up to 2.5 μ M for 3 days and 0.5 μ M for 5 and 7 days but concentration of sodium arsenite more than those sharply inhibited the proliferation and differentiation of bone marrow cells through dose and time dependent manner for all incubation periods. The apoptosis of bone marrow cells stimulated with 10 ng/ml of G-CSF was induced by the cotreatment of 12.5 μ M sodium arsenite for all incubation periods. Therefore, we suggests that sodium arsenite inhibits the proliferation and differentiation of bone marrow cells stimulated with G-CSF as well as induces the apoptosis via dose and time dependent manner.

Key Words : Sodium arsenite (NaAsO₂), G-CSF, Bone marrow cell culture, Proliferation, Apoptosis

I. 서 론

조혈이란 골수내에서 여러 가지 세포로 분화 가능성이 있는 hematopoietic progenitor cell들이 계속적으로 성장하여 제한된 성장 능력과 짧은 수명을 가진 여러 성숙 blood cell type으로 최종 분화되고, 연속적인 재생산을 통하여 항상 새로운 세포들로 대체되는 것을 의미한다. 이

과정에서 세포의 생존, 성장 촉진 및 억제, 분화와 사멸을 조절하는 많은 양성 또는 음성 조절인자들이 관여하게 되며(Quesenberry, 1990), 특히 여러 가지 cytokine 등은 hematopoietic progenitor 세포들을 여러 유형의 성숙 혈액 세포로의 분화를 유도시킨다고 알려져 있다(Kinoshita 등, 1995). 이러한 hematopoietic 세포들의 성장, 분화 및 기능을 조절하는 hematopoietic cytokine 중 granulocyte colony stimulating factor(G-CSF)는 20~25 kD의 glycoprotein으로 bone marrow stroma cells과 대식세포 등의 세포로부터 분비되며, myeloid progenitor 세포의 neutrophilic gra-

*To whom correspondence should be addressed
Abbreviations: G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; PBS, phosphate buffered saline; FBS, fetal bovine serum

nulocyte로 성장, 분화를 유도한다(Nicola, 1987). G-CSF는 hematopoietin 또는 class I cytokine receptor superfamily의 일종인 하나의 polypeptide chain으로 구성되어 있으며 그 생물학적 효과는 homodimeric complex를 형성하는 G-CSF receptor와의 결합을 통해 일어난다고 알려져 있다(Tian 등, 1996).

비소 화합물은 수세기 동안 강한 독성물질로 알려져 있음에도 불구하고, 케양, 류마티스 관절염 등의 치료제로 이용되어 왔으며, 1900년대 초에는 Fowler's 용액으로 알려진 1% potassium arsenite를 만성 골수성 백혈병 환자에 사용하기도 하였다. 그러나 비소의 독성성질로 인해 피부 색소침착, 경변, 다발성신경염과 같은 여러 부작용이 보고되고(Kandal 등, 1937), X-ray 요법과 일반적인 cytotoxic 치료제의 개발로 서구에서는 암 치료제로써 비소의 이용이 자취를 감추게 되었다. 그러나 최근 미국에서 역학조사에 의하면 음용수에 포함된 비소 화합물에 의한 암 유발률은 주변 담배 연기에 의해 암에 걸릴 확률과 비슷하다고 보고될 정도로 비소의 위험성에 대한 경각심이 크게 대두되고 있는 실정이며(Germolec 등, 1997), 오염된 음용수나 직업상의 접촉을 통한 만성적인 비소 화합물에 대한 노출은 피부, 폐, 신장, 방광 및 간 등에 암을 유발하기도 하며(Niragu, 1994), 표피에 과도한 색소침착이나 각화증을 일으킨다고 보고된 바 있다(Chen 등, 1985). 또한 비소는 자외선, X-ray 또는 alkylating 화합물과 함께 사람의 림프구에 대한 co-mutagen으로의 작용(Jha 등, 1992), 세포주기의 억제(Gonsebatt 등, 1992), 마우스의 3T3 세포에서 유전자 증폭을 통한 암 발달의 촉진(Lee 등, 1988), glutathione(GSH)의 발현을 통한 HL-60의 apoptosis 유발(Ochi 등, 1996), peripheral blood cell의 phytohemagglutinin(PHA)에 의한 mitogenesis 증가를 억제(McCabe 등, 1983)하는 등의 성질이 있음이 보고된 바 있다. 이렇게 비소가 많은 정상 세포와 암 세포의 기능에 영향을 미친다는 것이 많이 알려져 오고 있는 있으나, 비소가 골수 세포의 성장 분화에는 어떠한 영향을 미치는가에 대해서는 아직 연구된 바가 없다. 따라서 본 실험에서는 마우스의 골수 세포를 이용하여 비소(sodium arsenite)가 골수 세포의 neutrophilic granulocytes 계열로의 성장 및 분화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

Sodium arsenite(NaAsO_2)는 Fluka(Buchs, Switzerland)에서, recombinant mouse G-CSF는 R&D system(Minneapolis, MN, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였고, sodium

caseinate는 Acros(Geel, Belgium), fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone Laboratories(South Hyclone Road Logan, UT, USA), MTS {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium}는 Promega(Madison, WI, USA)에서 각각 구입하였으며, 그 외 RPMI 1640 배지는 Gibco Laboratories(Grand Island, NY, USA)에서, 2-mercaptoethanol, penicillin/streptomycin, phosphate buffered saline(PBS), trypan blue 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험 동물

식품의약품안전청 국립독성연구소 실험동물자원실에서 생산한 6~8주령의 암컷 Balb/C 마우스를 분양 받아 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$ 및 12시간 명암주기 하에서 사육하였고, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

3. 골수세포 분리

Myeloblast가 풍부한 골수세포를 유도하기 위하여 10% sodium caseinate/PBS 용액을 마우스에 0.5 ml씩 복강투여 하였다(Nguyen 등, 1993). 투여 후 3일째에 마우스를 경추 탈구하여 희생시키고 무균적으로 대퇴골을 분리한 후 1 ml 일회용 주사기(26G)를 사용하여 10% FBS 및 penicillin/streptomycin(100 IU/100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 50 μM 2-mercaptoethanol을 함유한 RPMI 1640 배지로 대퇴골 선단을 2~3회 flushing하여 골수세포를 부유한 후, 4°C 에서 430 \times g로 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전물에 적혈구 용해 완충액(0.15 M NH_4Cl , 1.0 mM KHCO_3 , 0.1 mM Na_2EDTA ; pH 7.2)을 10 ml 정도 가하여 적혈구를 제거한 후 배지로 3회 세척하고 mesh를 통과시킴으로써 결합조직 및 세포 덩어리를 제거하였다. 이 세포 현탁액을 37°C , 5% CO_2 배양기에서 2시간 배양하여 부착된 세포를 제거하고 소량의 RPMI 1640/10% FBS 배지에 골수세포를 부유한 다음 trypan blue dye exclusion 방법으로 세포 수를 측정하였으며 사용 직전까지 얼음 위에 보관하였다(Gallicchio 등, 1983; Satoh 등, 1990).

4. 약물처리

마우스 대퇴골에서 분리한 골수세포를 RPMI 1640/10% FBS 배지를 이용하여 2×10^6 cell/ml 농도로 조정된 후 96 well plastic plate에 100 μl 씩 분주하고 실험 목적에 따라 여러 농도의 sodium arsenite 또는 G-CSF를 단독 처리하거나, 10 ng/ml G-CSF와 여러 농도의 sodium arsenite를

병용 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1, 3, 5, 또는 7 일간 배양하였다.

5. 세포 생존율 측정

Sodium arsenite 또는 G-CSF가 골수세포의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTS assay를 실시하였다. 실험 목적에 따라 여러 농도의 sodium arsenite와 G-CSF를 각각 단독 처리하거나, 10 ng/ml의 G-CSF와 여러 농도의 sodium arsenite를 함께 처리하여 CO₂ 배양기에서 37°C를 유지하면서 1, 3, 5 및 7일 동안 배양하였다. 배양 후 well 당 PMS/MTS 혼합액을 20 µl씩 가하고 다시 4시간 배양한 후 ELISA reader(Molecular Devices Co., USA)를 사용하여 파장 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Apoptosis assay

비소의 골수 세포에 대한 apoptosis 유도를 확인하고자 DNA fragmentation 분석시험을 실시 하였다. 6 Well plastic plate를 이용하여 골수세포(3×10^6 cell/ml)에 10 µM sodium arsenite와 10 ng/ml G-CSF를 단독 또는 병용 처리하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1, 3, 5, 7 및 9일간 배양한 후 Puregene DNA isolation kit D-5000(Gentra System, Minneapolis, MN, USA)을 사용하여 골수세포로부터 DNA를 분리하였다. 먼저 배양된 세포를 모아 15,000×g에서 5초간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 세포 용해 용액 0.6 ml를 가하여 세포를 용해시킨 후 RNase A 용액 3 µl를 넣고 25번 정도 흔들어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 15분간 배양하였다. 여기에 단백침전 용액 0.2 ml를 넣고 강하게 20초간 흔들어 주고 15,000×g에서 5분간 원심분리한 다음, 70% ethanol 0.6 ml로 세척하여 상온에서 증발시키고 마지막으로 DNA hydration 용액 80 µl를 가하여 냉장고에서 하룻밤 방치시켰다.

Ethylene bromide(5 µl/100 ml)가 함유된 1.8% agarose gel을 만들어 100 V에서 약 30분간 전기영동을 시행하여 DNA의 절단 정도를 확인하였다.

III. 결 과

1. Sodium arsenite가 골수 세포의 성장에 미치는 영향

Sodium arsenite를 다음과 같이 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 25, 50 µM의 농도로 골수 세포에 처리하여 1, 3, 5, 7일 동안 배양한 후 MTS assay를 시행하였다.

골수세포의 성장율은 sodium arsenite를 처리하지 않은

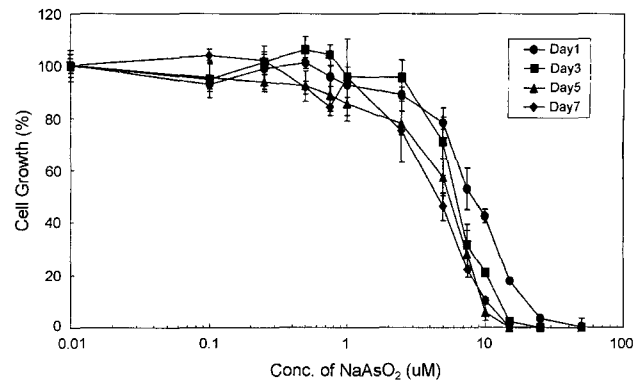


Fig. 1. The effect of sodium arsenite on bone marrow cells. Bone marrow cells (2×10^5 /well) were cultured with the various concentrations of sodium arsenite as indicated for 1, 3, 5 and 7 days. Cells were added with PMS/MTS mixture during the last 4h culture and then measured absorbance at OD₄₉₀. Data represent the mean±SE of triplicate determinations. Results are presented as percent of control, which was untreated (medium only) and the response in the control (100%) was 0.949 at OD₄₉₀.

골수세포의 흡광도치를 100%로 하여 각각의 흡광도치를 환산한 후 그 결과를 나타내었다(Fig. 1). 골수세포에 sodium arsenite를 처리한 후 그 성장율을 관찰한 결과, 1일 배양한 경우에는 2.5 µM 농도까지는 골수 세포의 성장에 별다른 영향을 주지 못했으나, 5 µM 농도에서는 71%, 7.5 µM에서는 32%, 10 µM에서는 17%의 성장율을 나타내는 등 고농도로 갈수록 급격히 골수 세포의 성장 억제를 유발하였다. 또한 배양기간에 따른 성장율을 관찰한 결과, 2.5 µM 농도의 경우, 1일 배양시 98%, 3일 배양시 82%, 5일 배양시 81%, 7일 배양시 76%의 골수 세포의 성장이 나타났으며, 15 µM 이상의 비소 농도에서는 1, 3, 5, 7일째 모두 거의 완전한 골수 세포의 성장 억제가 일어남을 확인하였다 이상의 결과로부터 sodium arsenite가 골수 세포를 농도와 시간 의존적으로 성장을 억제시킴을 확인하였다.

2. Sodium arsenite에 의한 골수 세포의 apoptosis 유발

비소가 골수 세포의 성장 억제까지만 유도하는지는 다른 세포들처럼 apoptosis까지도 유도하는지를 확인하고자 80% 정도의 성장 억제를 보여준 10 µM 농도의 비소를 골수 세포에 처리 후 1, 3, 5, 7일 간격으로 배양한 후 DNA를 추출하여 DNA fragmentation 실험을 하였다. 그 결과 1일째에 DNA fragmentation이 유도된 후 3, 5, 7일째 모두에서 DNA fragmentation이 나타났으며, 시간 의존적으로 거의 완전한 DNA의 가수 분해가 일어나는 것으로 보아 고농도의 비소는 골수 세포에서 성장 억제 뿐 아니라 apoptosis까지 유발함을 확인하였다. 그러나, 비소를 처리하지 않은 경우는 DNA fragmentation이나 가수분해가 나

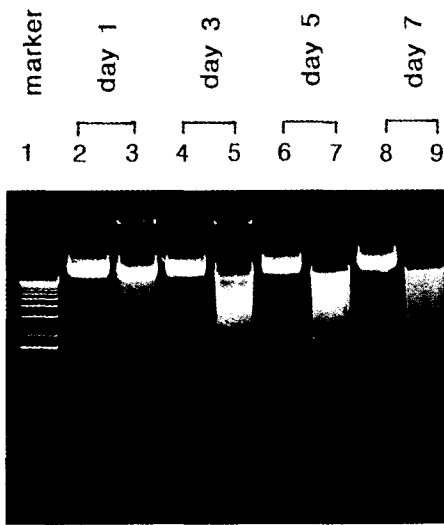


Fig. 2. Electrophoresis of DNA obtained from bone marrow cells onto 1.8% agarose gel following exposure to 10 μ M sodium arsenite for 1, 3, 5 and 7 days. Lane 1: 1 kb marker, lane 2, 4, 6, 8: DNA obtained from bone marrow cells incubated without sodium arsenite at days 1, 3, 5 and 7, lane 3, 5, 7, 9: DNA obtained from bone marrow cells exposed to 10 μ M of sodium arsenite at days 1, 3, 5 and 7, respectively.

타나지 않았다(Fig. 2).

3. G-CSF가 골수 세포의 성장, 분화에 미치는 영향

골수 세포의 G-CSF에 의한 neutrophilic granulocyte 계열로 성장, 분화율을 측정하기 위하여 G-CSF를 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 ng/ml의 여

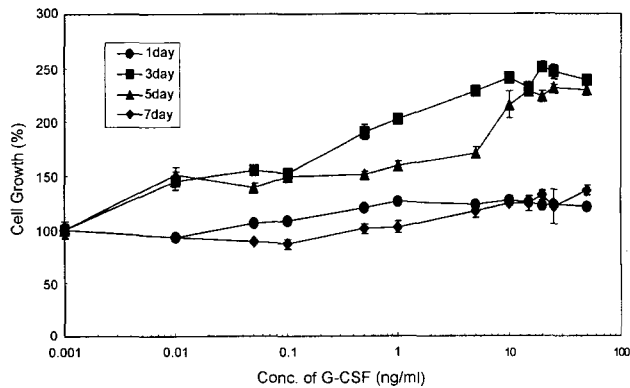


Fig. 3. The effect of G-CSF on bone marrow cells. Bone marrow cells (2×10^5 /well) were cultured with the various concentrations of G-CSF as indicated for 1, 3, 5 and 7 days. Cells were added with PMS/MTS mixture during the last 4 h culture and then measured absorbance at OD₄₉₀. Data represent the mean \pm SE of triplicate determinations. Results are presented as percent of control, which was untreated (medium only) and the response in the control (100%) was 0.886 at OD₄₉₀.

러 농도로 골수 세포에 처리하고 1, 3, 5, 7일 간격으로 배양한 후 MTS assay를 시행하였으며, G-CSF를 처리하지 않은 골수세포군의 흡광도치를 100%로 하여 각각의 흡광도치를 환산한 후 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

G-CSF와 1일 배양한 골수세포의 최고 성장률은 120%, 3일째에는 251%, 5일째에는 230%를 각각 나타내었으며, 7일째의 경우에는 G-CSF에 의한 성장·분화가 오히려 둔화되어 1일째의 결과와 유사한 양상을 나타내었다. 이상의 결과로부터 G-CSF로 자극된 골수세포는 3~5일째에 최대의 성장·분화를 나타내다가 그 이후에는 점차 성장·분화가 감소되었고, G-CSF는 10~30 ng/ml 사이의 농도에서 골수세포의 최대 성장·분화를 유도할 수 있었다.

4. Sodium arsenite가 G-CSF에 의한 골수 세포의 성장·분화 촉진 효과에 미치는 영향

Sodium arsenite가 G-CSF에 의한 골수 세포의 성장·분화를 억제할 수 있는가를 확인하고자 G-CSF(10 ng/ml)를 단독 또는 비소와(0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 25, 50 μ M) 병용 처리하고 1, 3, 5, 7일 간격으로 배양한 후 MTS assay를 실시 하였으며, 아무처치도 하지 않은 골수세포의 흡광도치를 100%로하여 각각의 흡광도치를 환산하여 그 성장률을 측정하였다. 10 ng/ml의 G-CSF를 단독으로 처리한 경우에는 1일째에 196%, 3일째에 449%, 5일째에 272%으로 골수세포의 성장·분화가 관찰되었으나 그 이후에는 점차적으로 감소되어 7일째에는 124% 정도의 성장·분화가 일어났다. 그러나, sodium arsenite와 함께 병용 처리한 경우, 1, 3일째에는 2.5 μ M가

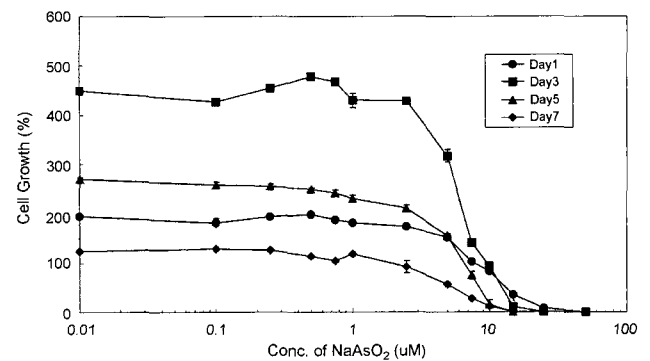


Fig. 4. The effect of sodium arsenite on bone marrow cells stimulated by G-CSF. Bone marrow cells (2×10^5 /well) were cultured with the various concentrations of sodium arsenite with 10 ng/ml of G-CSF as indicated for 1, 3, 5 and 7 days. Cells were added with PMS/MTS mixture during the last 4 h culture and then measured absorbance at OD₄₉₀. Data represent the mean \pm SE of triplicate determinations. Results are presented as percent of control, which was untreated (medium only) and the response in the control (100%) was 0.850 at OD₄₉₀.

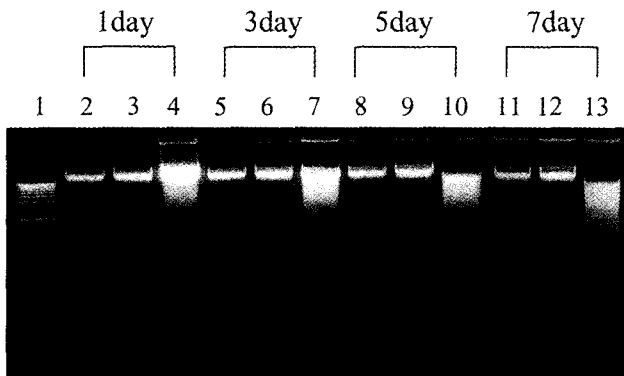


Fig. 5. Electrophoresis of DNA obtained from bone marrow cells onto 1.8% agarose gel following exposure to G-CSF (10 ng/ml) and/or 12.5 μ M sodium arsenite for 1, 3, 5 and 7 days. Lane 1: 1 kb marker, lane 2, 5, 8, 11: DNA obtained from bone marrow cells without G-CSF and sodium arsenite, lane 3, 6, 9, 12: DNA obtained from bone marrow cells stimulated by G-CSF (10 ng/ml) without sodium arsenite at days 1, 3, 5 and 7, lane 4, 7, 10, 13: DNA obtained from bone marrow cells incubated with G-CSF (10 ng/ml) and 12.5 μ M of sodium arsenite at days 1, 3, 5 and 7, respectively.

지, 5, 7일째에는 0.5 μ M까지 G-CSF에 의한 골수 세포의 성장·분화 증가에 별 영향을 미치지 못하다가, 그 이상의 비소 농도부터는 용량 의존적으로 성장·분화 억제제가 나타났으며, 배양 시간이 증가할수록 점점 더 낮은 비소 농도에서 성장·분화 억제제가 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

5. G-CSF에 의해 성장·분화가 촉진된 골수 세포로부터 sodium arsenite에 의한 apoptosis 유발

G-CSF로 자극된 골수 세포의 Sodium arsenite에 의한 성장, 분화 억제제가 apoptosis에 의한 것인지를 확인하기 위하여 10 ng/ml의 G-CSF를 단독 또는 12.5 μ M의 비소와 동시에 처리하여 1, 3, 5, 7일 간격으로 배양한 후 DNA를 분리해 DNA fragmentation 여부를 확인하였다. 아무 것도 처리하지 않은 대조군의 경우와 G-CSF만을 단독으로 처리했을 때는 1, 3, 5, 7일 모두 DNA fragmentation이 나타나지 않았으나, G-CSF와 sodium arsenite를 함께 처리한 경우는 1일째부터 DNA의 fragmentation이 유도되어, 3, 5, 7일째 모두에서 DNA의 fragmentation과 가수 분해가 나타나는 것으로 보아, 고농도의 sodium arsenite는 G-CSF에 의해 성장, 분화가 촉진된 골수 세포로부터 apoptosis를 유도해 골수 세포의 성장을 억제하는 것임을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

IV. 고 찰

비소는 최근 gallium arsenide(GaAs)의 형태로 반도체,

태양전지(solar cell) 등의 제조에 사용되면서 이와 관련된 특정집단에서 고농도의 비소에 의한 급성 독성 유발 가능성 및 그 외 식품이나 음용수 등을 통한 비소노출 가능성 때문에 미량의 비소에 대한 만성독성 가능성에 관해서도 그 관심이 증가되어 많은 연구가 진행되어 오고 있다. 한편으로는 임상 시험(Sun 등, 1992; Chen 등, 1997) 등을 통해 arsenic trioxide가 백혈병 치료제로서 유용함이 보고됨에 따라 본 연구에서는 GaAs 및 arsenic trioxide와 체내 동태가 유사한 +3가 상태의 비소화합물인 sodium arsenite(NaAsO_2)를 사용하여 비소가 정상 골수세포 및 G-CSF로 자극된 골수세포에 어떠한 영향을 미치는 지를 비교 관찰하였다. 골수세포는 G-CSF를 처리 후 점차 성장율이 증가하여, 3~5일째에 최고 230~251% 성장률을 나타낸 후에 점차 성장 촉진 효과가 시간 의존적으로 감소하였는데, GM-CSF의 경우 골수 세포를 3~5일째까지는 성장 촉진 및 세포 분열을 유도하고 5일째 이후부터는 더 이상의 성장 촉진이나 세포 분열을 유도하지 않고 granulocytes-macrophage로의 최종 분화를 유도한다는 보고(Jain 등, 1986)와 유사한 결과로 3~5일째에 성장촉진과 세포 분열 효과가 최대가 되고, 이후에는 neutrophilic granulocytes로 최종 분화가 일어남으로써 G-CSF의 성장 촉진 효과가 감소하는 것으로 생각 되었다. G-CSF가 이러한 골수세포의 성장·분화를 나타내는 기전으로는 G-CSF가 G-CSF 수용체에 결합되면, 수용체의 membrane proximal cytoplasmic 부위에 결합하고 있는 cytoplasmic tyrosine kinase인 JAK 1과 JAK 2를 인산화시켜 활성화가 일어나고, 활성화된 JAK 1과 JAK 2에 의해 STAT 1, STAT 3 또는 STAT 5가 인산화되어 homo- 또는 heterodimer를 이루어 핵내로 이동하여 c-myc과 같은 target 유전자의 promoter에 결합, 활성화를 유도, 세포 주기를 조절함으로써 성장·분화를 일으킨다는 보고로 미루어(Tian, 등, 1996, Shimozaki 등, 1997, Koning 등, 1998) 골수 세포 내에서도 세포 성장, 분화에 관여하는 위와 같은 유전자들의 활성을 증가시키는 신호 전달에 의해 G-CSF에 의한 성장 촉진 효과가 일어났으리라고 생각된다.

골수세포에 비소의 영향을 비교 관찰하고자, 골수세포에 비소를 단독 또는 G-CSF와 병용처리한 결과 두 경우 모두에서 골수세포의 성장을 농도 및 시간에 의존하여 억제하는 경향을 나타내었다. 그러나 sodium arsenite는 1 μ M 농도 이하에서는 골수세포의 성장 및 분화에 별다른 영향을 미치지 못하였는데, 이는 마우스 lymphoma에서 비소는 methylation되어 detoxification 과정을 거쳐 비소의 독성이 약화된다는 보고(Moore 등, 1997)와 chinese hamster ovary(CHO) 세포에서 nucleophilic thiol기를 많이 포함하고 있는 metallothionin의 발현이 중금속에 대해 내성을 나타낸다는 기존의 보고(Kelly 등, 1988; Teicher 등, 1987)

로 보아 골수 세포의 경우도 저농도의 비소는 methylation을 통한 detoxification 또는 중금속 내성 단백질 같은 단백질의 발현의 증가 등의 기전으로 비소독성을 약화시킴으로서 sodium arsenite의 성장 및 분화 억제가 효과가 약화된 것으로 생각되어 진다.

한편, 고농도의 sodium arsenite 처리 시 나타나는 정상 골수세포 또는 G-CSF로 자극한 골수세포의 성장 및 분화 억제가 apoptosis를 유발에 의한 것인지를 확인한 결과, 두 경우 모두에서 sodium arsenite는 apoptosis를 유도함을 알 수 있었으며, 이는 비소가 oxidative activity를 증가시켜 세포의 apoptosis를 유발시킨다(Watson 등, 1996)는 보고와 CHO 세포와 bovine aortic endothelial cells(BAEC)에서 nitric oxide synthase의 활성을 높여, nitric oxide(NO)의 생산을 증가시킴으로써 DNA strand breaks와 NAD depletion을 일으켜 poly(ADP-ribosylation)이 증가됨으로써 apoptosis를 유발시킨다(Lynn 등, 1998)는 보고 등과 유사한 결과로 이러한 비소의 골수세포의 성장 및 분화억제 기전의 가능성의 하나로 apoptosis유도가 제시되어 질 수 있다고 사료된다.

이러한 비소의 apoptosis 유발 기전으로는 기존에 보고된 NF- κ B 같은 nuclear transcription factor의 활성화에 의한 세포내 활성 산소의 농도 증가나 H₂O₂의 생성증가에 기인한 활성 산소 radical의 생성 증가(Barchowsky 등, 1996; Wang 등, 1996), 세포생존에 상당히 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 bcl-2의 발현 및 apoptosis 억제에 관여하는 PML-RAR α 와 PML의 발현 억제 등 apoptosis에 관련된 유전자의 발현(Chen 등, 1996; Look, 1998; Shao 등, 1998; Kitamura 등, 1997b; Fu 등, 1995), 또는 DNA 수복기능 억제(Yager 등, 1997) 등 다양한 기전이 알려져 있으나, 보다 정확한 sodium arsenite가 골수 세포의 성장 및 분화억제를 일으키는 apoptosis 유도 기전을 밝히기 위해서는 부가적으로 기전연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 이러한 비소의 골수세포에 의한 apoptosis 유발 및 기전연구결과는 향후 백혈병 치료 등 임상에서의 활용가능성이 높을 것으로 사료되어 지속적이고 추가적인 연구 가치가 높을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Barchowsky, A., Dudek, E., Treadwell, M.D. and Wetterhahn, K.E. (1996): Arsenic induces oxidant stress and NF- κ B activation in cultured aortic endothelial cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **21**(6), 783-790.
- Chen, C.J., Chuang, Y.C., Lin, T.M. and Wu, H.Y. (1985): Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: High arsenic artesian well water and cancers, *Cancer Res.*, **45**, 5895-5899.
- Chen, G.Q., Zhu, J., Shi, X.G., Ni, J.H., Zhong, H.J., Si, G.Y., Jin, X.L., Tang, W., Li, X.S., Xong, S.M., Shen, Z.X., Sun, G.L., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T.D., Gazin, C., Naoe, T., Chen, S.J., Wang, Z.Y. and Chen, Z. (1996): *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocyte leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR α /PML proteins, *Blood*, **88**(3), 1052-1061.
- Chen, G.Q., Shi, X.G., Tang, W., Xiong, S.M., Zhu, J., Cai, X., Han, Z.G., Ni, J.H., Shi, G.Y., Jia, P.M., Liu, M.M., He, K.L., Niu, C., Ma, J., Zhang, T.D., Zhang, P., Paul, P., Naoe, T., Kitamura, K., Miller, W., Waxman, S., Wang, Z.Y., The, H.D., Chen, S.J. and Chen Z. (1997): Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocyte leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells, *Blood*, **89**(9), 3345-3353.
- Gallicchio, V.S., Chen, M.G., Gamba-Vitalo, C. and Watts, T.D. (1983): The influence of choline chloride on murine hematopoiesis in vivo and *in vitro*. *Int. J. Cell. Clon.*, **1**, 451-463.
- Germolec, D.R., Spalding, J., Boorman, G.A., Wilmer, J.L., Yoshida, T., Simeonova, P.P., Bruccoleri, A., Kayama, F., Gaido, K., Tennant, R., Burleson, F., Dong, W., Lang, R.W. and Luster, M.I. (1997): Arsenic can mediate skin neoplasia by chronic stimulation of keratinocyte-derived growth factors, *Mutat. Res.*, **386**, 209-218.
- Fu, S., Consoli, U., Hanania, E.G., Zu, Z., Claxton, F., Andreeff, M. and Deisseroyh, A.B. (1995): PML/RAR α , a fusion protein in acute promyelocytic leukemia, prevents growth factor withdrawal-induced apoptosis in TF-1 cells, *Clinic. Cancer Res.*, **1**, 583-590.
- Jain, N.C., BVSc and Ah, MVSc. (1986): Schalm's veterinary hematology, 4th ed, Lea and Febiger, Philadelphia, 350-383 and 676-717.
- Jha, A.N., Noditi, M., Nilsson, R. and Natarajan, A.T. (1992): Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells, *Mutat. Res.*, **284**, 215-221.
- Kandal, E.V. and Leroy, G.V. (1937): Chronic arsenical poisoning during the treatment of chronic myeloid leukemia, *Arch. Intern. Med.*, **60**, 846.
- Kelly, S.R., Basu, A., Teicher, B.A., Hacher, M.P., Hamer, D.H. and Lazo, J.S. (1988): Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs, *Science* (Washington DC), **241**, 1813-1815.
- Kinoshita, T., Yokota, T., Arai, K.I. and Miyajima, A. (1995): Suppression of apoptotic death in hematopoietic cells by signalling through the IL-3/GM-CSF receptors, *EMBO J.*, **14**(2), 266-275.
- Kitamura, K., Kiyoi, H., Yoshida, H., Tobita, T., Takeshita,

- A., Ohno, R. and Naoe, T. (1997b): New retinoids and arsenic compounds for the treatment of refractory acute promyelocytic leukemia: clinical and basic studies for the next generation, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **40**, S36-S41.
- Koning, J.P., Soede-Bobok, A.A., Schelen, A.M., Smith, L., Van Leeuwen, D., Santini, V., Burgering, B.M., Bos, J.L., Lowenberg, B. and Touw, I.P. (1998): Proliferation signaling and activation of Shc, p21Ras, and Myc via tyrosine 764 of human granulocyte colony stimulating factor receptor, *Blood*, **91**(6), 1924-1933.
- Look, A.T. (1998): Arsenic and apoptosis in the treatment of acute promyelocytic leukemia, *J. Nat. cancer Instit.*, **90**(2), 86-87.
- Lynn, S., Shiung, J.N., Gurr, J.R. and Jan, K.Y. (1998): Arsenite stimulates poly(ADP-ribosylation) by generation of nitric oxide, *Free Radic. Biol. Med.*, **24**(3), 442-449.
- McCabe, M., Maguire, D. and Nowak, M. (1983): The effects of arsenic compounds on human and bovine lymphocyte mitogenesis *in vitro*, *Environ. Res.*, **31**, 323-331.
- Moore, M.M., Brock, K.H. and Doerr, C.L. (1997): Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites, *Mutat. Res.*, **386**, 279-290.
- Niragu, J.O. (1994): Arsenic in the environment, Part II. Human health and ecosystem effects, Wiley and Sons, New York, 1-293.
- Ochi, T., Nakajima, F., Sakurai, T., Kaise, T. and Ohta, Y.O. (1996): Dimethylarsenic acid causes apoptosis in HL-60 cells via interaction with glutathione, *Arch. Toxiol.*, **70**, 815-821.
- Quesenberry, P.J. (1990): Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and growth factors, Hematology, 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York, 129-147.
- Satoh, K., Nagasawa, T. and Abe, T. (1990): Stimulation assay for megakaryocyte colony stimulating factor and megakaryocyte potentiator and its application, *J. Lab. Clin. Med.*, **116**, 162-171.
- Shao, W., Fanelli, M., Ferrara, F.F., Riccioni, R., Rosenauer, A., Davison, K., Lamoh, W.W., Waxman, S., Pelicci, P.G., Coco, F.L., Avvisati, G., Testa, U., Pescle, C., Passerini, C.G., Nervi, C. and Miller Jr, W.H. (1998): Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR α protein in acute promyelocytic leukemia cells, *J. Nat. cancer Instit.*, **90**(2), 124-133.
- Shimozaki, K., Nakajima, K., Hirano, T. and Nagata, S. (1997): Involvement of STAT3 in the granulocyte colony stimulating factor induced differentiation of myeloid cells, *J. Biol. Chem.*, **272**(40), 25184-25189.
- Sun, H.D., Ma, L., Hu, X.L. and Zhang, T.D. (1992): Ai-Lin I treated 32 cases of acute promyelocytic leukemia, *Chin. J. Intergrat. Chin. West. Med.*, **12**, 170-179.
- Teicher, B.A., Holden, S.A., Kelley, M.J., Shea, T.C., Cucchi, C.A., Rosowski, A., Henner, W.D. and Frei, E. (1987): Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II), *Cancer Res.*, **47**, 388-393.
- Tian, S.S., Tapley, P., Sincich, C., Stein, R.B., Rosen, J. and Lamb, P. (1996): Multiple signaling pathways induced by granulocyte colony stimulating factor involving activation of JAKs, STAT5, and/or STAT3 are required for regulation of three distinct classes of immediate early genes, *Blood*, **88**(12), 4435-4444.
- Wang, T.S., Kuo, C.F., Jan, K.Y. and Huang, H. (1996): Arsenite induces apoptosis in chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species, *J. cell. Physiol.*, **169**, 256-268.
- Watson, R.W.G., Redmond, H.P., Wang, J.H. and Hayes, D.B. (1996): Mechanisms involved in sodium arsenite induced apoptosis of human neutrophils, *J. Leuk. Biol.*, **60**, 625-632.
- Yager, J.W. and Wiencke, J.K. (1997): Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase by arsenite, *Mutat. Res.*, **386**, 345-351.