

의 학 박 사 학 위 논 문

방광암 세포주의 세포성장 억제 및
세포고사에 비소화합물이 미치는
영향

2004년 8월

서울대학교대학원
의학과 비뇨기과학전공
조 문 기

방광암 세포주의 세포성장 억제 및 세포고사에
비소화합물이 미치는 영향

지도교수 이 종 욱

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함.

2004년 4월

서울대학교 대학원

의학과 비뇨기과학 전공

조 문 기

조문기의 의학박사 학위논문을 인준함.

2004년 6월

위원장 이 상 은 (인)

부위원장 이 종 욱 (인)

위원 허 대 석 (인)

위원 박 인 애 (인)

위원 이 현 무 (인)

Effects of Arsenic Compound on Inhibition of Cell
Growth and Induction of Apoptosis of Bladder
Cancer Cell Lines

by Moon Ki Jo, M.D.

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Doctor of Philosophy in Medicine
(Urology)

In the Seoul National University, Seoul, Korea
2004

Doctoral Committee

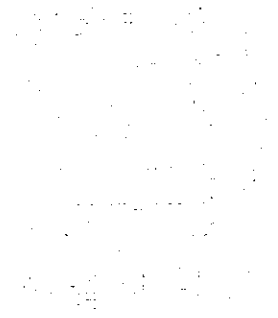
Professor _____ Chairman

Professor _____ Vice Chairman

Professor _____

Professor _____

Professor _____



학위논문 원문제공 서비스에 대한 동의서

본인은 본인의 연구결과인 학위논문이 앞으로 우리나라의 학문발전에 조금이나마 기여 할 수 있도록, 서울대학교 중앙도서관을 통한 “학위논문 원문제공 서비스”에서 다음과 같은 방법 및 조건하에 논문을 제공함에 동의합니다.

1. 인터넷을 통한 온라인 서비스와 보존을 위하여 저작물의 내용을 변경하지 않는 범위 내에서의 복제를 허용함.
2. 저작물을 이미지DB(PDF)로 구축하여 인터넷을 포함한 정보통신망에서 공개하여 논문 일부 또는 전부의 복제·배포 및 전송에 동의함.
3. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판허락을 하였을 경우 1개월 이내에 서울대학교 중앙도서관에 알림.
4. 배포, 전송된 학위논문은 이용자가 다시 복제 및 전송할 수 없으며 이용자가 연구목적이 아닌 상업적 용도로 사용하는 것을 금함에 동의함.

논문제목 : 방광암 세포주의 세포성장 억제 및 세포고사에 비소화합물이 미치는 영향

학 과(부) : 의 학 과

학 번 : 2002-30755

연 락 처 : 011-9459-9569

제 출 일 : 2004 년 4 월 14 일

저 작 자 : 조 문 기 (인)

국문초록

방광암 세포주의 세포성장 억제 및 세포고사에 비소화합물이 미치는 영향

서울대학교 대학원
의학과 비뇨기과학 전공
조 문 기

목적: 방광의 이행상피세포암은 비뇨기계에서 가장 흔한 암이다. 이 중 전이성방광암의 치료에는 항암화학요법이 가장 효과적인 방법이지만 치료에 대한 반응률이 낮고 부작용은 상대적으로 높아 새로운 항암요법에 대한 요구가 계속되고 있다. 최근 급성전골수구성백혈병에서 삼산화비소가 이용되고 있는 것에 착안하여, 이와 유사한 작용을 갖고 있으나 부작용이 적고 경구투여가 가능한 육산화사비소가 최근 일부 암세포주에서 항암 및 항신생혈관효과가 있다고 보고됨에 따라 방광암세포주에서도 항암효과가 있는가를 확인하고 그 작용기전을 밝혀 향후 항암화학요법제로서의 개발 가능성을 알아보고자 하였다.

방법: 방광암세포주에 대해서 세포성장도측정법으로 세포생존곡선을 구하여 육산화사비소의 세포독성을 확인하였다. Annexin 표지 세포흐름측정법(flow cytometry)을 실시하여 세포고사의 정도를 측정하였다. ApoAlert™ Mitochondrial Membrane Sensor Kit를 이용하여 미토콘드리아 막전위 소실을 측정하여 세포고사의 미토콘드리아 의존여부를 측정하였고, Western blot으로 procaspase를 측정하여 caspase의 활성화를 평가하였다. DCFH-DA 표지 세포흐름측정법으로 반응성산소종의 발생을 측정하였고 반응성산소종 억제제인 NAC을 처리 후 annexin표지 세포흐름측정법을 실시하여 반응성산소종이 세포고사에 직접적으로 작용하는

지를 확인하였다. 생체에서의 항암효과를 보기 위하여 nude mouse에 세포주를 이식하고 비소화합물을 경구투여하여 이식세포의 성장억제를 관찰하였다.

결과: 방광암세포주에 비소화합물을 첨가하였을 때 유의한 세포성장의 억제를 관찰할 수 있었다. 1.0 μ M에서 50%의 억제를 관찰할 수 있었고 2.5 μ M 이상에서는 약 90%의 성장억제를 관찰하였다. 세포고사는 2.0 μ M의 농도에서 대조군에 비해 2배 이상의 증가(6.15%대 13.33%)를 보였다. 미토콘드리아 막전위 소실은 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다. Caspase는 1.0~2.0 μ M에서부터 procaspase가 감소하므로 비교적 저농도에서부터 활성화되는 것으로 생각된다. 반응성세포종은 비소화합물 투여 직후부터 3시간이내에는 4~5배가량 증가하였지만 그 이후로는 대조군에 비해 단지 30~40% 가량 증가하였다. 반응성산소종 억제 실험에서 세포고사의 억제는 관찰되지 않았다. 백서에 이식 후 3주간 비소화합물을 경구투여한 후 측정된 종양의 크기는 대조군에 비해 약 75% 정도의 성장억제를 보였고($p < 0.05$), 투여 용량에 따른 차이는 없었다.

결론: 육산화사비소는 방광암세포주의 성장을 낮은 농도에서부터 억제하였고 동물실험에서도 유사한 결과를 보였다. 그 기전은 caspase의 활성화와 반응성산소종의 증가로 인한 세포고사가 중요한 작용을 할 것으로 생각된다. 세포성장을 억제하는 기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되며, 향후 인체에서 방광암의 항암화학요법으로의 이용가능성을 확인하였다.

주요어 : 육산화사비소, 방광암, 세포성장억제, 세포고사

학번 : 2002-30755

Abstract

Effects of Arsenic Compound on Inhibition of Cell Growth and Induction of Apoptosis of Bladder Cancer Cell Lines

Moon Ki Jo, M.D.

(Directed by Professor Chongwook Lee, M.D.,
Ph.D.)

Seoul National University College of Medicine,
Seoul, Korea

Purpose: Transitional cell carcinoma of the bladder is the most common cancer in urologic fields. Anticancer chemotherapy is widely used in patients with metastatic cancer. However, it has relatively high treatment-related complication rates. Arsenic trioxide, a kind of inorganic trivalent arsenic compounds, has been used in recurrent or refractory acute promyelocytic leukemia. Tetraarsenic oxide has similar effects with minimal complications and it is orally absorbable. It has been reported to have anticancerous and antiangiogenic effects. On the basis of these facts, it is hypothesized that tetraarsenic oxide can be an effective antitumor agent against human bladder transitional cell carcinoma. This study was designed to explore its potential therapeutic use in bladder cancer.

Methods: After treatment with tetraarsenic oxide, cell proliferation rates were measured by cell proliferation assay. Annexin V-FITC labeled flow cytometry was performed to estimate the possible apoptotic effects. Loss of mitochondrial membrane potential was evaluated by ApoAlert™ Mitochondrial Membrane Sensor Kit. Activity of caspases was also measured by Western blotting. Production of radical oxygen species (ROS) was studied by flow cytometric analysis using DCFH-DA. Inhibition of apoptosis by N-acetyl-L-cysteine (NAC), a well-known ROS scavenger, was measured by flow cytometry. To see in vivo effects of tetraarsenic oxide, bladder cancer cells were inoculated subcutaneously into nude mice. From the next day of inoculation, tetraarsenic oxide was administered orally for 3 weeks into 3 randomly divided groups of nude mice with different dosage-nontreated, 25mg/kg/day, and 50mg/kg/day. Tumor sizes were measured daily.

Results: Cell proliferation inhibition rate was 50% in 1.0µM of tetraarsenic oxide and 90% in 2.0µM. Apoptosis rate was doubled in 2.0µM compared to control group. No significant difference in loss of mitochondrial membrane potential was observed. Caspase activity was increased with dose-dependent manner. ROS was significantly increased during the first 3 hours and subsided thereafter. Apoptosis after treatment with NAC showed no significant difference in inhibition of apoptosis. Tumor sizes of treated group were about 25% of those of nontreated ($p < 0.05$). However there was no significant difference in dosage of orally administered tetraarsenic oxide.

Conclusion: Tetraarsenic oxide was effective in inhibiting cell growth

in bladder cancer cell lines as well as in the animal experiments. The mechanisms of cell growth inhibition seemed to be apoptosis by activation of caspase cascade and increase of ROS. Further investigation of its mechanism and effectiveness in the anticancer treatment of transitional cell carcinoma of the bladder is required.

Keywords : Tetraarsenic oxide, bladder cancer, cell growth inhibition, apoptosis

Student Number : 2002-30755

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

List of Figures

Figure 1. Chemical structure of tetraarsenic oxide (2,4,6,8,9,10-Hexaoxa-1,3,5,7-tetraarsatricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane, tetraarsenic oxide; As₄O₆)

Figure 2. Cell proliferation assay of T24, 48 hours after the treatment of arsenic compound. The curve showed rapid decline near the concentration of 2.5µM.

Figure 3. Cell proliferation assay of J82, 48 hours after the treatment of arsenic compound.

Figure 4. Cell proliferation assay of UM-UC-3, 48 hours after the treatment of arsenic compound.

Figure 5. Cell proliferation assay of SW780, 48 hours after the treatment of arsenic compound.

Figure 6. Apoptosis of J82 cell lines 48 hours after the treatment of arsenic compound. Control(left), As₄O₆ 5.0µM(right).

Figure 7. Apoptosis of T24 cell lines 48 hours after the treatment of arsenic compound. Control(left), As₄O₆ 3.0µM(right).

Figure 8. Apoptosis of TCC-SUP cell lines 48 hours after the treatment of arsenic compound. Control(left), As₄O₆ 5.0µM(right).

Figure 9. Apoptosis of UM-UC-3 cell lines 48 hours after the treatment of arsenic compound. Control(left), As₄O₆ 2.0µM(right).

Figure 10. Histogram of mitochondrial membrane potential assay of T24 cell lines. Control(left), As₄O₆ 2.0μM(right).

Figure 11. Histogram of mitochondrial membrane potential assay of TCC-SUP cell lines. Control(left), As₄O₆ 2.0μM(right).

Figure 12. Caspase activation in arsenic compound-induced apoptosis of T24 cell lines. Upper(caspase-3), lower(caspase-8). Concentration of arsenic; control, As₄O₆ 1.0, 2.0, 2.5, 3.0μM(from the left).

Figure 13. H₂O₂ production in arsenic compound-induced apoptosis. Control(left), 15 minutes after the treatment of As₄O₆(middle), 2 hours after the treatment of As₄O₆(right).

Figure 14. Tumor cell growth 3weeks after inoculation. Tetraarsenic oxide was injected for 20days. Average tumor volume of control group was 1.35, 0.34 in low dose treated group, 0.32 in high dose treated group. Difference between control and arsenic treated group was statistically significant($p < 0.05$), however there was no significant difference between low and high dose treated group($p > 0.95$).

Figure 15. Histopathologic findings of resected tissues from nude mice. H&E staining, reduced from x400. Control (left), 25mg/kg/day (middle), 50mg/kg/day (right).

Figure 16. Histopathologic findings of resected tissues from nude mice. Ki-67 staining, reduced from x400. Control (left), 25mg/kg/day (middle), 50mg/kg/day (right).

List of Abbreviation and Symbols

DCFH-DA, dichlorodihydrofluorescein diacetate

FDA, Food and Drug Administration

FITC, fluorescein isothiocyanate

NAC, N-acetyl-*L*-cysteine

ROS, radical oxygen species

목 차

I. 서론	1
II. 대상 및 방법	4
III. 결과	9
IV. 고찰	11
V. 결론	19
VI. 참고문헌	20

2024. 10. 10. 10:00

I. 서론

이행상피세포암은 비뇨기계에서 가장 흔한 암으로서 2002년 한국중양암 등록사업 연례 보고서 통계에 의하면 우리나라 전체 암 환자 99,025명 중에서 2,551명으로 원발장기별 발생빈도가 2.6%이며, 남자에서는 3.6%, 여자에서는 1.3%의 빈도를 보이고 있다. 이 중 방광암은 2,204명으로 발생 빈도는 2.2%로서 남자에서는 3.2%, 여자에서는 1.0%로 전체 이행상피세포암의 약 86.4% 정도를 차지하고 있다.

방광암은 암세포의 침윤 정도에 따라 표재성방광암과 상피내암, 침윤성방광암 및 전이성방광암으로 분류된다. 표재성방광암은 경요도방광종양절제술이 치료법으로 이용되고 상피내암의 경우에는 방광내약물주입법, 침윤성방광암은 근치적방광적출술이 행해진다. 적절한 치료에도 불구하고 주위장기로의 종양의 침윤이 있거나 원격전이가 있을 경우에는 항암화학요법이 이용된다.

방광암에서의 항암화학요법은 cisplatin, methotrexate, vinblastine, doxorubicin 중 1가지 약제만을 사용하는 단일제제에 의한 항암화학요법도 이용되었으나 치료효과가 복합요법에 비해서 떨어지고 부작용의 빈도는 더 높은 것으로 알려져 최근에는 거의 사용되고 있지 않다(Loehrer 1992, Saxman 1997).

일반적으로 백금화합물(*cis*-diamminedichloroplatinum(II), cisplatin)을 주약제로 하는 복합요법이 가장 치료효과가 우수한 것으로 알려져 널리 사용되어왔다. 과거에는 CISCA(cisplatin, cyclophosphamide, doxorubicin), CMV(cisplatin, methotrexate, vinblastine) 등이 이용되었으나 1985년 이래로 MVAC(methotrexate, vinblastin, doxorubicin, cisplatin) 요법을 표준치료로 사용하고 있다(Sternberg 1989). 최근 들어서는 치료효과는 큰 차이가 없으나 부작용을 감소시킨 GC(gemcitabine, cisplatin) 요법이 시도되고 있다(Moore 1999).

그러나 항암화학요법의 반응률이 40~70% 정도이고, 그 중 완전반응률

은 13~35% 밖에 되지 않으며, 그나마 최근의 보고에서는 더 낮게 보고되고 있다. 특히 최근 가장 많이 이용되는 MVAC요법의 경우에도 림프절 전이의 효과는 비교적 양호하나 타 장기로의 전이에는 효과가 낮은 것으로 보고되었다. 이러한 치료효과에 비해 치료로 인한 치사율은 3~4%로 보고되는 등 심한 부작용을 유발하는 경우가 많아 적절한 용량 및 치료주기의 유지가 쉽지 않은 현실이다. 게다가 중앙생존기간도 12~13개월에 지나지 않는다. 그러므로 보다 높은 효과를 보이면서 부작용이 적은 치료법에 대한 요구가 높아 이에 관한 연구가 다양하게 진행되고 있다.

혈액암에서 비소화합물에 대한 연구가 진행되어 1992년에 3가의 무기비소화합물 중 하나인 삼산화비소(As_2O_3)가 함유된 화합물을 이용하여 재발성 혹은 불응성 급성전골수구성백혈병(acute promyelocytic leukemia, APL)에서 완전관해를 유도하는데 효과적이라는 연구가 보고되어 백혈병의 치료제로서 관심을 갖게 되었다(Sun 1992). 비소화합물에 대한 연구는 급성전골수구성백혈병의 병인론을 밝혀내는데 상당한 공헌을 하였으며, 이후 다른 혈액암이나 고형암에서도 충분히 적용가능성이 있다는 것을 확인하였다. 이에 따라 FDA에서 비소화합물 중 삼산화비소의 임상적용에 대한 승인이 이루어졌고, 현재 다른 혈액암이나 일부 고형암에서도 임상연구가 진행되고 있다.

최근 육산화사비소(tetraarsenic oxide, As_4O_6)라는 3가의 무기비소화합물로서(Fig. 1), 같은 3가의 삼산화비소와는 다른 물리, 화학적인 성질을 갖고 있는 비소화합물에 관한 연구가 보고되었다(Park 2003b). 육산화사비소는 경구투여가 가능하고 기존의 삼산화비소의 독성을 크게 완화시켜 백서를 이용한 동물실험에서 50mg/kg/day까지 투여하여도 아무런 부작용이 관찰되지 않았고 정중치사농도(median lethal dose: LD_{50})는 120-180mg/kg로 나타났다. 또한 기존의 밝혀진 삼산화비소의 암세포주에서의 세포고사 유도보다 더욱 낮은 농도에서 고효율로 유도되었다고 보고되었다. 현재 육산화사비소의 항암효과 및 기타 약리작용에 관하여 임상1상시험이 진행 중이다. 본 실험에서는 새로운 비소화합물인 육산화사비소

를 사용하여 방광암에서의 비소화합물의 유용성을 알아보고자 하였다.

비소화합물이 방광암과 같은 이행상피세포암에서의 적용가능성을 확인하기 위하여 다음과 같은 연구를 실시하였다. 먼저 방광암 세포주에 대하여 비소화합물이 세포성장의 억제나 세포고사가 발생할 수 있는지, 발생한다면 어떤 기전에 의한 것인지를 알기 위하여 실험을 실시하였고, 다음으로 생체에서의 작용 및 독성을 검증하기 위한 목적으로 nude mouse를 이용하여 세포주를 이식하여 동물실험을 실시하였다.

II. 연구재료 및 방법

1) 연구재료

가) 방광암 세포주: American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)으로부터 방광암세포주를 구입하였다. 세포주의 종류는 T24(No. HTB-4), TCC-SUP(No. HTB-5), UM-UC-3(No. CRL-1749), J82(No. HTB-1), SW780(No. CRL-2169)를 사용하였다.

나) 배지 및 배양환경: T24는 McCoy's 5a medium(JBI, Daegu, Korea)를 사용하였고, TCC-SUP, UM-UC-3, J82는 MEM(Minimum essential medium; JBI, Daegu, Korea)를 배지로 하였으며 SW780은 Leibovitz's L-15 medium(JBI, Daegu, Korea)를 이용하였다. 모든 배지에는 10% FBS(fetal bovine serum; JRH Biosciences, Lenexa, KS)와 1% penicillin-streptomycin을 첨가하였다. SW780은 이산화탄소가 없는 배양기에서 세포배양을 하였고 나머지는 모두 5% 이산화탄소 상태에서 배양하였다.

다) 비소화합물: 분자량이 394인 육산화사비소 As_4O_6 (Cheonjisan Institute, Seoul, Korea)를 1 N NaOH에 녹여 0.05M stock solution (육산화사비소 0.394gm을 20ml의 NaOH용액에 용해시킨다)을 만들어 4°C에 보관하였다. 이 용액에 적당량의 배지를 첨가하여 필요한 농도로 조절한 후 4°C 냉장고에 보관하여 사용하였다. 실험동물에 투여할 경구용 육산화사비소용액은 1% methyl cellulose 용액을 만든 후 1ml 당 5mg의 비소를 용해시켜 만들었다.

라) 항체 및 감광제: Caspase에 대한 1차 항체로 caspase-3 mAb(Transduction Laboratories, Newington, NH), caspase-8

rabbitAb(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 사용하였고, 2차 항체는 GAM HRP-mouse(Bio Rad Laboratories, Hercules, CA), R HRP-rabbit(Bio Rad Laboratories, Hercules, CA)을 사용하였다. 감광제는 ECL™(Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont Bucks, England)를 사용하였다.

마) 백서: 6주령의 KP700 NU/NU BALB/c 옹성 nude mouse를 사용하였다. 백서는 실험 1주전에 구입하여(Charles Rivers, Tokyo, Japan) 실험실 환경에서 적응시킨 후 실험하였다.

2) 실험방법

가) 세포성장곡선(Cell growth curve): 방광암 세포주의 성장을 시간대별, 비소화합물의 농도별로 측정하였다. 세포의 염색은 trypan blue exclusion assay로 살아있는 세포와 죽은 세포를 구별하여 계수하였다. 방광암 세포주는 6well plate에 2×10^5 의 수로 분주하였고 비소화합물을 대조군, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 μ M/ml로 처리한 후 1, 2, 3, 4, 5 일에 각각의 성장의 정도 및 괴사의 비율을 측정하였다.

나) 세포성장도 측정(cell proliferation assay, MTT assay): 세포의 성장도는 CellTiter® 96 Non-Reactive Cell Proliferation Assay Kit(Promega, Madison, WI)를 사용하였다. Microplate reader를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다. 같은 농도에 5개의 시료를 측정하여 최고값과 최저값을 제외한 나머지 3개의 평균값을 취한 후 그 값에서 시료가 들어있지 않은 빈 well의 평균값을 뺀 수치를 그 농도의 상대적인 세포의 성장도로 하였다. 비소화합물의 농도는 0.1, 0.25,

0.5, 1.0, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 μ M/ml로 처리한 후 3일 후 측정하였다.

다) 세포고사도 측정(Annexin V/PI assay): Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I(BD, Franklin Lakes, NJ)을 사용하였다. 배지와 dish의 모든 세포를 모아 두 가지 방법으로 모두 염색한 후 FACSsort(Becton Dickinson, San Jose, CA)를 이용하여 flow cytometry를 실시하였다.

다) 미토콘드리아 막전위 소실 측정(Mitochondrial transmembrane potential assay): ApoAlertTM Mitochondrial Membrane Sensor Kit(Clontech, Palo Alto, CA)를 사용하였다. 비소화합물을 처리한 배지에 MitoSensor를 넣어 염색하고, 세포를 모아 flowcytometry를 실시하였다. 염색한 세포를 band-pass filter를 사용하여 현미경으로 직접 관찰하였다.

라) Caspase 활성화 측정(Evaluation of caspase activation): Caspase 3과 caspase 8을 측정하였다. 비소화합물의 농도는 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 μ M로 하였다. 비소화합물에 반응시킨 세포주들에서 단백질을 추출하였고 이를 Western blot을 실시하여 caspase와 procaspase를 분리하였다.

마) Western blot: 단백질을 추출한 후 정량분석을 하여 일정한 양의 단백질을 전기영동을 실시한 후 여과지(Whatman 3MM paper)에 단백질을 전사(transfer)하였다. 전사된 여과지에 1차 항체와 overnight, 2차 항체와 60분간 반응시킨 후 ECLTM 처리한 후 감광시켜 결과를 얻었다.

마) 반응성 산소종 억제 실험(ROS inhibition assay):

NAC(N-acetyl-L-cysteine)을 처리한 시료와 비소화합물만 첨가한 시료에서 세포고사가 일어나는 정도를 세포고사도 측정법인 Annexin V/PI로 분석하였다.

바) 반응성 산소종의 정량분석(H_2O_2 production assay): 세포를 비소화합물로 15분에서 72시간까지(15분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 24시간, 48시간, 72시간) 단계적으로 처리한 후 plate에서 분리한 다음, DCFH-DA(dichlorofluorescein diacetate)에 10분간 처리한 후 flowcytometry를 실시하였다. 시간별 처리를 하기 전에 세포고사를 일으키는 적절한 농도를 선정한 후 실시하였다.

사) 실험동물에 대한 방광암 이식: KP700 NU/NU BALB/c 음성 nude mouse에 방광암 세포주를 측복부에 피하접종하여 방광암을 이식하였다. 방광암 세포주는 $1 \times 10^8/ml$ 의 농도로 만들어 1ml을 주사하였다. 이식은 우선 백서에 이식한 후 정상적으로 성장한 종양조직을 절개하여 다시 다른 백서에 이식하여 유사한 정도의 성장이 가능하도록 하였다. 실험동물의 성장은 주 1회 측정하였으며, 이식한 종양의 크기는 주 3회 caliper를 이용하여 측정하였다. 종양의 부피는 가로×세로×높이× $\pi/6(0.523)$ 의 술식으로 구하였다.

아) 실험동물에 대한 비소화합물 투여: 육산화사비소를 3주간 매일 투여하였다. 대조군은 1% methyl cellulose 0.2ml을 경구투여하고, 육산화비소의 투여량은 저농도군은 25mg/kg/day, 고농도군은 50mg/kg/day로 경구투여하였다. 투여하는 약물 이외의 조건은 모두 동일하게 하였다.

자) 이식조직에 대한 조직병리학적인 변화 관찰: 이식조직을 실험이 종료된 후 백서를 희생시킨 후 절편을 만들어 통상적인 H&E 염색 및

Ki-67 염색을 실시하였다. Ki-67 염색은 Anti-Human Ki-67 Antigen[®](DAKO, Glostrup, Denmark)을 사용하였다. 2~3 μ m로 절편한 조직을 파라핀을 제거한 다음 항체로 처리한 후 diamminobenzidine으로 발색하여 슬라이드로 만들어 관찰하였다. H&E 염색과 Ki-67 염색 모두 100배와 400배 시야에서 관찰하였다.

Ⅲ. 연구결과

- 가) 세포성장도 측정: 5가지의 세포주에 대해서 실시하였다(Fig. 2, 3, 4, 5). 대개 2.5 μ M에서부터 세포성장의 억제를 확인할 수 있었고 J82 세포주는 1.0 μ M에서 50%의 성장억제를 관찰할 수 있었다.
- 나) 세포고사도 측정: 4개의 세포주에 대해서 측정하였다(Fig. 6, 7, 8, 9). 육산화사비소를 투여한 후 UM-UC-3 세포주에서는 대조군 6.15%, 1.5 μ M 17.39%, 2.0 μ M 20.19%로 대조군에 비해 3배 이상 증가하는 소견을 보였다. J82세포주에서는 대조군 2.08%, 2.0 μ M 5.41%, 5.0 μ M 12.58%로 2.0 μ M에서는 약 2.6배의 증가를 보였다. TCC-SUP 세포주는 대조군 12.32%, 2.0 μ M 17.70%, 5.0 μ M 41.91%를 나타냈다. T24 세포주는 대조군 11.12%, 2.0 μ M 15.34%, 5.0 μ M 42.50%를 보였다.
- 다) 미토콘드리아 막전위 소실: TCC-SUP와 T24 세포주에 대해 실시하였다(Fig. 10, 11). 그러나 전반적으로 대조군과 유의한 차이는 발견할 수 없었다. 육산화사비소를 투여한 후 대조군 108.01, 2.0 μ M 136.67로 127%로 증가양상을 보였고, T24 세포주에서는 다른 세포주와 마찬가지로 유의한 차이는 없고 분포만 광역화되는 양상을 보였다.
- 라) Caspase활성도 측정: T24 세포주에 대해서 실시하였다(Fig. 12). 1.0~2.0 μ M에서부터 procaspase가 감소하는 소견을 보였다.
- 마) 반응성 산소종 억제실험: T24 세포주에 대해서 실시하였다. NAC을 이용하여 반응성 산소종을 억제하여 세포고사를 억제하려고 하였으나 비소화합물과 같이 첨가한 경우에 세포고사를 억제하는 효과가 없었고, 비소화합물을 첨가하지 않고 NAC만 넣은 세포에서는 대조군의

50% 이하의 세포성장의 억제가 관찰되었다. 3~4일 정도 경과한 후에는 NAC에 의해서 성장이 억제되었던 세포들이 다시 정상적으로 성장하였다.

바) 반응성 산소종의 정량분석: T24 세포주에 대해서 실시하였다. 육산화사비소를 2.0 μ M의 농도로 처리한 후 정량분석을 실시하였다. 시간대에 따라 617%, 233%, 485%, 546%, 575%로 급증하였다(Fig. 13). 3.0 μ M의 농도에서도 599%, 538%, 441%, 578%, 1,029%로 역시 급증하였다.

사) 동물실험: 실험동물의 성장은 각 군 간에 유의한 차이가 없었다. 비소화합물을 3주간 투여한 후 측복부에 이식한 방광암세포주의 크기는 대조군 1.35 \pm 0.30cm³, 저농도 투여군 0.34 \pm 0.16cm³, 고농도 투여군 0.32 \pm 0.15cm³으로 대조군과 투여군 간에 유의한 차이가 있었으나 저농도 투여군과 고농도 투여군 간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Fig. 14).

아) 조직병리학적인 관찰: H&E 염색에서는 대조군과 투여군에서 유의한 차이를 관찰할 수가 없었다 (Fig. 15). Ki-67염색에서는 대조군은 30~40% 정도의 증식을 보였고, 투여군은 저농도군과 고농도군 모두 약 10~20% 정도를 보였으나 유의한 차이를 관찰하지는 못하였다 (Fig. 16).

IV. 고찰

1) 비소화합물의 의학적 이용의 역사적 배경

비소화합물은 매우 흔하게 자연적으로 존재하는 화합물로서 약 2,400년 이전부터 의학적인 목적으로 사용되어왔다(Klassen 1996). 지금까지 흔히 알려진 비소화합물 중 무기화합물로는 크게 3가지가 있는데, 이황화비소(arsenic disulfide, As_2S_2)인 적비소(red arsenic, realgar, sandaraca)와 삼황화비소(arsenic trisulfide, As_2S_3)인 황비소(yellow arsenic, arsenikon, aurum pigmentum, orpiment)는 독성이 있는 불안정한 황화합물이며, 백비소(white arsenic, trisenox)는 황화합물들의 연소 시 발생하는 삼산화비소(arsenic trioxide, As_2O_3)를 의미한다. 유기화합물은 탄소분자와 삼중공유결합 혹은 오중공유결합의 형태를 유지하고 있다.

히포크라테스는 비소화합물 중 이황화비소 및 삼황화비소를 궤양치료에 이용하였으며, 디오스코리데스는 삼황화비소를 탈모제로 이용하였다고 기록되어 있다. 18세기와 19세기에는 많은 비소화합물이 매우 다양한 질병에 대해 다양한 방법으로 사용되어 왔다(Haller 1975). 그러나 대부분의 경우 시행착오를 반복하면서 약제의 효능을 규명하는 방식으로 이용되었고, 인체에 대한 부작용으로 피부의 열감이나 빈맥, 각막염, 소화기장애 등이 나타나기도 하였으며, 이러한 부작용의 발현이 치료의 증거로 평가되기도 하였다.

17세기 토마스 파울러(Thomas Fowler)에 의해 삼산화비소를 이용한 파울러용액(Fowler's solution)이 개발되어 천식, 무도병, 습진, 천포창, 건선 등에 사용하였고, 이후 빈혈, 호지킨병, 백혈병 등에 사용되어 왔다(Aronson 1994, Kwong and Todd 1997, Forkner and Scott 1931). 1878년 비소화합물과 백혈구에 미치는 영향에 대한 보고에서는 2명의 정상인과 1명의 만성골수성백혈병(CML) 환자에게 파울러용액을 투여한 결과, 이들 모두에서 백혈구수의 감소가 나타나며 약의 투여를 중단하면 다시 수치가 상승한다고 하였다(Cutler 1878). Forkner 등(1931)은 9명의 만성

골수성백혈병 환자에 대해 삼산화비소를 이용한 치료를 실시하여 백혈구 수가 감소하고 간비대 및 비장비대가 개선되었으며, 골수에서 조혈기능의 정상화가 관찰되었다고 하였다. 그러나 만성골수성백혈병 환자 6명에 대해 삼산화비소를 투여한 후 그중 5명에서 심각한 독성이 나타났다는 보고가 있는 후(Kandel and LeRoy 1937), 이 분야의 치료에서 비소화합물의 이용은 급격히 감소하기 시작하였고 때마침 등장한 방사선치료와 항암화학요법이 그 자리를 대체하기에 이르렀다.

비소화합물은 전염성질환에서도 사용되었는데, 파울 에를리히(Paul Erlich)는 500가지 이상의 비소의 유기화합물을 개발하였다. 그중 살바르산(salvarsan, compound 606)을 이용하여 매독치료에 사용하였으며, 또 다른 유기 비소화합물인 malarsoprol은 중추신경계를 침범한 파동편모충증(trypansomiasis)의 치료에 사용되었다(Aronson 1994).

1960년대 들어 악성종양의 치료의 분야에서 비소화합물은 그 효과에도 불구하고 심각한 부작용으로 말미암아 동물실험 이외에는 기생충치료 등 극히 제한된 분야에서만 이용되어 왔다(Tarnowski 1966, Knock 1971). 그 이유는 피부암 등을 유발할 수 있는 발암물질의 가능성이 제기된 데에 기인하고 있다(Jackson 1975, Cuzick 1982). 환경학자들은 비소를 발암물질의 하나로 규정하여 1979년 국제암연구소(The International Agency for Research on Cancer; IARC)는 발암물질에 대한 전체적인 분류를 실시하면서 비소 및 비소화합물을 1군으로 분류하게 되었다(Chan 1997). 그러나 실제적으로는 현재 사용되고 있는 항암제의 상당수의 작용기전이 유전자에 독성이 있거나 암을 유발할 가능성을 안고 있다고 알려져 있다(Schwartz 1999, Buchner 1997, Wolden 1998, Sklar 2000). 그러나 비소는 동물모델에서 암을 유발한 적이 없었고, 고형암의 경우 인체에서도 암을 일으킨 적은 없었다. 게다가 아직까지 장기간의 노출에 따른 독성에 대해서도 밝혀진 것이 없었다.

2) 급성전골수구성백혈병에서의 비소화합물의 이용 배경

급성전골수구성백혈병에 있어서 지금까지 알려진 가장 중요한 병인론은 17번 염색체의 RARa 유전자가 15번 염색체의 PML 유전자로 전위(translocation)되어 *PML-RARa* 유전자 재배열을 이룸으로서 발생한다고 알려져 있다(Borrow 1990, de Thé 1990).

급성전골수구성백혈병이 관심을 갖게 된 것은 그 발생기전이나 치료에 있어서 급성골수성백혈병(acute myeloid leukemia, AML) 중 몇 가지 특징을 가진 특이한 아형이기 때문이었다. 이 질환의 경우 분화요법으로서 All-trans-retinoic acid(ATRA)를 투여하면 대부분의 환자에서 완전관해에 도달할 수 있으며, anthracycline을 포함한 항암화학요법과 같이 투여할 경우 높은 완치율을 얻을 수 있다. 그리고 치료에 있어서 cytarabine이 필요하지 않고 유지요법이 도움이 된다는 것이 다른 급성골수성백혈병과의 차이점이라고 할 수 있다. 그러나 재발성, 불응성 급성전골수구성백혈병의 경우에는 동일한 약재의 재투여나 리포솜성 ATRA, 합성 레티노이드, 조혈모세포이식술 등이 있으나, 아직까지는 치료방침이 확립되어 있지 않고 치료효과도 높지 않아 이런 환자들의 경우에 삼산화비소의 투여가 추천되고 있다.

3) 비산화합물의 임상연구

Sun 등(1992)은 중국에서 민간요법으로 시행되어온 약재 중 한가지인 Ailing-1이라는 삼산화비소 함유물을 급성전골수구성백혈병 환자 32명에게 투여하여 21명(65.6%)에서 완전관해를 보였고 50%의 5년 생존율을 보였다고 하였다. 그 후 같은 연구자들은 추가적으로 42명의 환자에서 22명(52%), 30명의 초기치료환자에서 22명(73%)에서 완전관해를 보고하였다(Zhang 1996).

이러한 보고는 일본, 유럽, 미국에서 임상실험을 통하여 검증되었다(Soignet 1998). 메모리얼 슬로언 케터링 암 센터(Memorial Sloan Kettering Cancer Center, MSKCC)에서 용량증강연구를 실시하여 ATRA 투여 후 재발한 급성전골수구성백혈병 환자 12명에서 삼산화비소를 이용

한 치료로 11명에서 완전관해에 도달하였다. 이 결과를 근거로 시행된 다기관 임상연구에서 기존의 치료 후 재발한 40명에서 34명(85%)이 중앙값 35일 만에 완전관해에 도달하였다(Soignet 2001). 두 연구결과를 통합한 52명의 환자의 18개월 생존율은 66%이었고, 무재발 생존율은 50%이었다.

Niu 등은 11명의 신환과 47명의 재발성 급성전골수구성백혈병 환자에 대하여 삼산화비소를 투여한 결과 완전관해율이 각각 73%(8/11), 85%(40/47)를 보였고, 재발한 환자의 중앙무병생존기간은 17개월이라고 보고하였다(Niu 1999). 또한 완전관해에 도달한 33명의 환자에 대하여 실시한 관해후요법에서 2년 무병생존율은 42%이었지만 삼산화비소와 항암화학요법을 병용하였을 때 재발률이 유의하게 낮았다고 보고하였다.

비소화합물이 혈액암 등에서 높은 치료효과를 보이며 최근 들어 고형암에서도 전임상단계의 효과를 인정받아 미국 국립암연구소(National Cancer Institute, NCI)에서는 혈액암 및 고형암에 대한 임상 2상 연구를 진행 중이다. 고형암 분야에서 진행되고 있는 연구는 진행성 호르몬 불응성 전립선암과 진행성 신장암, 진행성 자궁경부암, 그리고 불응성 방광암 등이다(Zhou 1999, Zheng 1999, Yang 1998).

4) 비소화합물의 작용기전

앞에서 언급한 바와 같이 비소화합물이 급성전골수구성백혈병에 사용하게 된 것은 세포고사를 일으키는 기전이 PML-RAR α 단백을 분해하는 것이라고 생각하였는데(Lanotte 1991), 급성전골수구성백혈병 세포이외에도 림프종 세포, 골수종 세포, 식도암 등 다른 고형암세포에서도 고사를 일으킨다는 것이 보고되어 PML-RAR α 와는 다른 기전이 작용한다는 것을 알 수 있었다.

이외에도 비소화합물이 미토콘드리아에 작용하는 기전이 알려지게 되었다. 미토콘드리아는 대표적인 세포고사 단백질인 Bax와 Bcl-2 계열이 작용하는 중요한 세포내기관으로서, 미토콘드리아 막의 투과성에 급격한 변화에 의해 고사가 일어난다고 알려져 있다(Crompton 2000). Larochette

등(1999)은 삼산화비소가 미토콘드리아의 막전위($\Delta\Psi_m$) 소실을 유발하고 미토콘드리아 투과성 전이구멍 복합체(permeability transition pore complex, PTPC)에 직접 영향을 미쳐 세포고사를 유도한다고 보고하였다. 즉, 미토콘드리아 막전위의 변화가 일어나고 거기에 따라서 막의 투과성이 변화되어 cytochrome C와 같은 고사유도인자가 미토콘드리아로부터 유리되고 caspase가 활성화되면서 DNA를 파괴하여 세포고사를 일으킨다는 것이다. 이러한 막전위의 소실은 삼산화비소가 세포내 환원계에 작용하여 글루타티온을 감소시켜, 반응성 산소종(Reactive oxygen species, ROS)의 활성화농도가 증가하여 유발한다고 한다(Chen 1998, Jing 1999).

또한 삼산화비소는 고사억제유전자인 *bcl-2*를 억제하고 히스톤 H3 및 H4를 과아세틸화(hyperacetylation)시킨다(Perkins 2000). 급성전골수구성 백혈병 세포에서 PML-RAR α 융합단백은 histone deacetylase와 더불어 nuclear co-repressor(n-CoR)를 유도하여 세포의 전사를 억제하는데, 삼산화비소를 투여하면 PML-RAR α 에서 n-CoR과 histone deacetylase 복합체를 분리시켜 정상적인 전사과정이 이루어지도록 한다는 것이다. 실제로 백혈병세포주에 삼산화비소를 투여하면 아세틸화 히스톤이 3~4배가량 증가한다고 알려져 있다. 또한 백혈병세포주와 같은 혈액암에서 혈관내피성장인자를 억제하며 체내에서 혈관내피세포의 증식을 억제한다고 하였다(Roboz 2000).

5) 방광암에서의 비소화합물의 연구 동향

방광암의 경우 전임상단계의 실험에서 비소화합물에 대하여 반응을 보이고 있으나 작용기전에 대한 연구는 극히 미미한 상태이다. 여러 세포주들과의 비교에서 다른 세포나 비소화합물 연구에서 가장 흔히 이용되는 NB4 세포주보다 우수한 결과를 보이고 있다(Yang 1999).

Yang 등(1999)은 50% 억제농도(Inhibitory concentration of 50%, IC₅₀s)의 측정과 IC₅₀s에 따른 세포내 글루타티온(Glutathione, GSH) 농도의 차이와 글루타티온에 관계된 효소를 측정하였다. 방광암에서의

IC₅₀s(0.34±0.03, 0.47±0.08μM)는 NB4세포주(0.64±0.11μM)에 비해 우수한 효과를 보인다고 하였다. 백금화합물에 저항성인 세포주에 대해서는 비소화합물의 세포성장억제효과가 떨어지는 것으로 보고되고 있다(2.59±0.41μM). 그러나 이러한 결과도 비소화합물의 인체 내 안전농도(4~6μM)보다는 현저히 낮은 농도이다. 또한 세포내 글루타티온의 농도가 높을수록 IC₅₀s가 높아져서 글루타티온에서 의해서 비소화합물의 효과를 떨어뜨린다고 하였다. 그 외에도 GST-π(glutathione-S-transferase-π)나 MRP1(multidrug resistance-associated protein)의 과발현도 역시 비소화합물에 저항성을 갖게 한다고 하였다. 그러나 저자들이 사용한 방광암세포주가 널리 사용되고 있는 세포주가 아니라는 점이 제한점이라고 할 수 있다.

Tong 등(2001)은 세포성장억제비율(cellular proliferation inhibition rate, CPIR) 및 세포내 DNA 합성률(cellular DNA synthesis rate)의 측정과 비소화합물 투여에 따른 세포의 형태학적 변화를 측정하였다. 그리고 bcl-2 발현의 억제와 DNA 생성의 감소를 비교분석하였다. 세포성장의 억제 농도 및 시간 의존적이었으며, 세포내 DNA 생성억제율이 55.64%로서 DNA의 생성억제가 한 가지 기전으로 작용한다고 할 수 있다. 비소화합물을 처리하였을 때 세포의 형태학적 변화도 관찰되었는데, 세포의 부피가 감소하고 모양이 불규칙해지며, 전자현미경소견에서는 전형적인 세포고사의 형태인 핵의 위축, 염색질의 응집, 세포부피의 감소 등이 관찰되었다.

Pu 등(2002a)은 방광암세포주의 세포고사를 평가하기 위하여 고사체(apoptotic body)의 현미경적 관찰 및 sub-G₁ 분율 분석(sub-G₁ fraction analysis), 반응성 산소종, 미토콘드리아 막전위의 소실, 세포내 caspase-3 활성화 등을 관찰하였다. 이들은 비소화합물에 저항성을 갖는 세포에서 세포내 GSH의 농도가 높으므로 BSO(buthionine sulfoximine)을 투여하여 세포내 GSH의 농도를 낮춤으로서 비소화합물에 대한 민감성을 높였다. BSO는 단독투여할 경우에는 고용량(1,000μM)을 투여하여도 세포독성을

갖지 않는 물질이다. 실제로 비소화합물을 투여하는 경우 세포의 고사가 관찰되고 BSO를 같이 투여하는 경우 그 효과가 증가되는 것을 확인하였다. sub-G1 분을 분석에서도 대조군에 비해 증가하고 BSO를 같이 투여하는 경우 현격한 증가양상을 볼 수 있었다. 반응성 산소종도 증가하는 양상을 볼 수 있었다. 세포내 caspase-3의 활성화도 대조군에 비해 4.4~11.8배까지 증가하였다. 저자들은 결론적으로 비소화합물이 방광암세포주(백금화합물 저항성인 세포주를 포함)에서 초기에는 반응성산소종을 증가시키고, 미토콘드리아 막전위를 소실시켜 cytochrome-C를 분비하도록 하며, 1~2일 경과 후에는 caspase-3를 활성화시켜 세포고사를 유발한다고 하였다.

또 다른 보고에서는 생체의 화학민감도분석(in vitro chemosensitivity assay)을 실시하여 세포내 GSH의 양과 글루타티온 억제제인 BSO와의 관계를 비교하였다(Pu 2002b). BSO의 농도가 10 μ M까지 농도의존적으로 GSH의 감소가 관찰되었고 BSO와 비소화합물을 동시에 투여하는 것이 효과적이라고 보고하였다.

6) 육산화사비소(As_4O_6)에 관한 연구

육산화사비소는 경구투여가 가능하다는 것 이외에는 삼산화비소와 유사한 작용기전에 의해 세포성장억제 및 세포고사를 일으킨다고 알려져 있다. 육산화사비소는 또 다른 3개의 비소화합물인 삼산화비소와 마찬가지로 중국 등에서 민간요법으로 많이 이용되고 있는데, 몇몇 미발표연구에서 효과가 입증되기도 하였다. 그러나 기존의 육산화사비소는 물에 용해되었을 때 쉽게 분자구조가 변형되는 등 취약한 분자구조를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 사용된 육산화사비소는 수용상태에서도 안정된 분자구조를 가지고 있다고 알려져 있다.

Park 등(2003b)은 육산화사비소와 삼산화비소의 항신생혈관형성 효과를 관찰하였다. 두 가지의 비소화합물 모두 용량의존적으로 증식, 세포의 이동, 침범을 억제하였으며 인체 제대정맥 내피세포(human umbilical vein

endothelial cell, HUVECs)의 관형성을 억제하였다. 삼산화비소보다 낮은 농도에서 세포고사의 유도가 고효율로 이루어졌으며 소모세혈관내피 (bovine capillary endothelium, BCE)를 이용한 실험에서 강력한 항신생혈관형성을 나타내며 MMP-2(matrix metalloproteinase-2)의 분비가 억제됨이 입증되었다. 음성 Sprague-Dawley 백서를 이용한 corneal micropocket assay에서는 각막의 bFGF의 자극에 의한 혈관신생의 억제를 확인하였고, 6주령의 SPF 음성 C57BL/6 mouse를 이용하여 B16F10 흑색종 세포주를 경정맥주사하여 실험적 폐전이 연구로 이용하였다. 전이 폐결절의 수가 대조군에서는 단일 폐 당 93.1±6.3이었고, 육산화비소를 투여한 군에서는 39.4±6.3으로 나타나 54%의 수의 감소를 보였다.

또 다른 보고에서는 기존의 삼산화비소에 저항성을 가진 U937 백혈병 세포주의 세포고사를 유도하였다(Park 2003a). 육산화비사비소가 삼산화비소보다 훨씬 낮은 농도에서 세포고사를 유도하며 이는 강력한 반응성 산소종 유도 작용 때문일 것으로 추정하였다. 육산화비소는 조기에 세포내의 활성화산소종을 증가시키고, cellular mitochondrial membrane potential을 감소시켜서 cytochrome C와 caspase-3를 활성화시켰다고 보고하였다.

V. 결론

비소화합물은 과거 만병통치약과 같이 사용되어 오다가 심각한 부작용과 함께 새로운 항생제, 항암제, 기타 다양한 치료법의 개발과 함께 역사속으로 사라졌던 약제이다. 그러나 최근 급성전골수구성백혈병에서 삼산화비소의 치료효과가 입증되어 다시 관심을 갖기 시작했다. 흔히 사용되는 삼가의 무기화합물인 삼산화비소와는 달리 본 연구에서 사용된 육산화사비소는 같은 삼가의 무기화합물이지만 경구투여가 가능하고 삼산화비소보다 낮은 농도에서 세포성장의 억제 및 세포고사를 유도한다고 알려졌다. 이러한 작용은 방광암세포주에서도 확인되었고, 그 기전은 caspase의 활성화와 반응성산소종이 중요한 기전으로 작용할 것이라고 생각된다. 또한 이러한 효과는 생체외실험 뿐 아니라 동물실험을 통해서도 증명되었다. 그뿐 아니라 몇몇 세포주에서 항신생혈관작용을 한다는 것이 보고되어 향후 항암화학요법으로의 이용가능성을 확인하였다. 이를 위하여 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

Aronson SM. Arsenic and old myths. R I Med 1994; 77:233-234.

Borrow J, Goddard AD, Sheer D, et al. Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. Science 1990; 249:1577-1580

Buchner T. Treatment of adult acute leukemia. Curr Opin Oncol 1997; 9:18-25.

Chan PC, Huff J. Arsenic carcinogenesis in animals and in humans: mechanistic, experimental, and epidemiological evidence. J Environ Sci Health C 1997; C15:83-122.

Chen YC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. J Cell Physiol 1998; 177:324-333.

Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. J Physiol 2000; 529(pt1):11-21.

Cutler EG, Bradford EH. Action of iron, cod-liver oil, and arsenic on the globular richness of the blood. Am J Med Sci 1878; 75:74-84.

Cuzick J, Evans S, Gillman M, et al. Medicinal arsenic and internal malignancies. Br J Cancer 1982; 45:904-911.

de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, et al. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukemia fuses the retinoic acid receptor a gene to a novel transcribed locus. *Nature* 1990; 347:558-561

Forkner CE, Scott TFM. Arsenic as a therapeutic agent in chronic myelogenous leukemia. *JAMA* 1931; 97:3-5.

Haller JS. Therapeutic mule: the use of arsenic in the nineteenth century materia medica. *Pharm Hist* 1975; 17:87-100.

Jackson R, Grainge JW. Arsenic and cancer. *Can Med Assoc J* 1975; 113:396-401.

Jing Y, Dai J, Chalmers-Redman RM. Arsenic trioxide selectivity induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood* 1999; 94:2102-2111.

Kandel EV, LeRoy GV. Chronic arsenical poisoning during the treatment of chronic myeloid leukemia. *Arch Intern Med* 1937; 60:846-866.

Klaassen CD. Heavy metals and heavy-metal antagonists. In: Hadrman JG, Gilman AG, Limbird, eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 1996; 1649-1672.

Knock FE, Galt RM, Oester YT, et al. The use of selected sulfhydryl inhibitors in a preferential drug attack on cancer. *Surg Gynecol Obstet*

1971; 133:458-466.

Kwong YL, Todd D. Delicious poison: arsenic trioxide for the treatment of leukemia [letter]. *Blood* 1997; 89:3487-3488.

Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, et al. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 1991; 77:1080-1086.

Larochette N, Decaudin D, Jacotot. Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Exp Cell Res* 1999; 249:413-.

Loehrer PJ Sr, Elson PJ, Crawford ED, et al. A randomized comparison of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: A cooperative group study. *J Clin Oncol* 1992; 10:1066-73

Moore MJ, Murray N, Tannock IF, et al. Gemcitabine plus cisplatin, and active regimen in advanced urothelial cancer: A phase II trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 1999; 17:2876-81

Niu C, Yan H, Yu T, et al. Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 1999; 94:3315-3324.

Park IC, Park MJ, Woo SH, Lee HC, An S, Gwak HS, Lee SH, Hong SI, Bae IJ, Seo KM, Rhee CH: Tetraarsenic oxide induces apoptosis in U937 leukemic cells through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Int J Oncol* 2003a; 23:943-8

Park MJ, Park IC, Bae IJ, Seo KM, Lee SH, Hong SI, Eun CK, Zhang W, Rhee CH: Tetraarsenic oxide, a novel orally administrable angiogenesis inhibitor. *Int J Oncol* 2003b; 22:1271-1276

Perkins C, Kim CN, Fang G, et al. Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L). *Blood* 2000; 95:1014-1022.

Roboz GJ, Dias S, Lam G, et al. Arsenic trioxide induces dose- and time-dependent apoptosis of endothelium and may exert an antileukemic effect via inhibition of angiogenesis. *Blood*. 2000; 96:1525-1530.

Pu YS, Hour TC, Chen J, et al. Arsenic trioxide as a novel anticancer agent against human transitional carcinoma-characterizing its apoptotic pathway. *Anti-Cancer Drugs* 2002a; 13; 293-300.

Pu YS, Hour TC, Chen J, et al. Cytotoxicity of arsenic trioxide to transitional carcinoma cells. *Urology* 2002b; 60:346-350.

Saxman SB, Einhorn LH, Crawford ED, et al. Long-term follow-up of a phase III intergroup study of cisplatin alone or in combination with

methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: A cooperative group study. *J Clin Oncol* 1997; 15:2564-9

Schwartz CL. Long-term survivors of childhood cancer: the late effects of therapy. *Oncologist* 1999; 4:45-54.

Sklar C, Whitton J, Mertens A, et al. Abnormalities of the thyroid in survivors of Hodgkin's disease: data from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3227-3232.

Soignet SL, Maslak P, Wang Z-G. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* 1998; 339:1341-1348.

Soignet SL, Frankel SR, Douer D. U.S. multicenter trial of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2001; 19:3852-3860.

Sternberg CN, Scher HI, Watson RC, et al. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. Efficacy and patterns of response and relapse. *Cancer* 1989; 64:2448-58

Sun HD, Ma L, Hu XC. Ai-Lin 1 treated 32 cases of acute promyelocytic leukemia. *Chin J Integrat Chin West Med* 1992; 12:170-2.

Tarnowski GS, Schmid FA, Cappuccino JG, et al. Chemotherapy studies in an animal tumor spectrum. II. Sensitivity of tumors to fourteen antitumor chemicals. *Cancer Res* 1966; 26(suppl 3 pt 2):181-206.

Tong Q, Zeng F, Zheng L, et al. Apoptosis inducing effects of arsenic trioxide on human bladder cancer cell line BIU-87. *Chin Med J* 2001; 114:402-406.

Wolden SL, Lamborn KR, Cleary SF, et al. Second cancers following pediatric Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1998; 16:536-544.

Yang CH, Kuo ML, Chen JC, et al. Arsenic trioxide sensitivity is associated with low level of glutathione in cancer cells. *Br J Cancer* 1999; 81:796-799.

Yang CH, Wang TY, Chen YC. Cytotoxicity of arsenic trioxide in cancer cell lines [abstract 1552]. *Proc AACR* 1998; 39:227.

Zhang P, Wang SY, Lu LH. Arsenic trioxide-treated 72 cases of acute promyelocytic leukemia (in Chinese). *Chin J Hematol* 1996; 17:58-62.

Zheng J, Deng YP, Lin C, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis of HPV16 DNA-immortalized human cervical epithelial cells and selectively inhibits viral gene expression. *Int J Cancer* 1999; 82:286-292.

Zhou D-C, Gao M, Ferrari AC, et al. Arsenic trioxide is an equipotent

inducer of apoptosis in androgen-dependent and androgen-independent LNCaP prostate cancer cell sublines [abstract 3999]. Proc AACR 1998; 39:588.

7. Figures

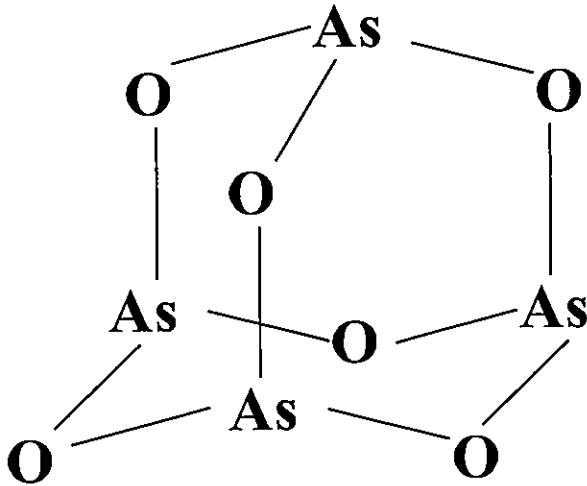


Figure 1. Chemical structure of tetraarsenic oxide (2,4,6,8,9,10-Hexaoxa-1,3,5,7-tetraarsatricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane, tetraarsenic oxide; As₄O₆)

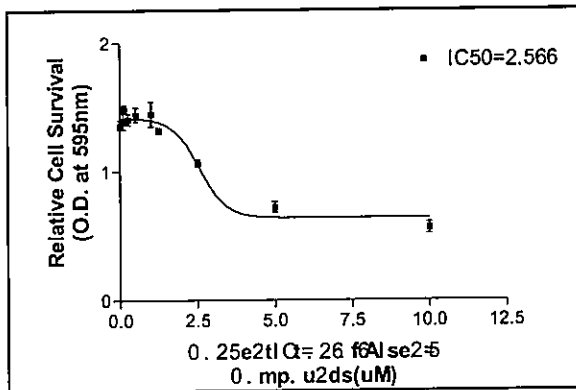


Figure 2. Cell proliferation assay of T24, 48 hours after the treatment of arsenic compound. The curve showed rapid decline near the concentration of 2.5 μ M.

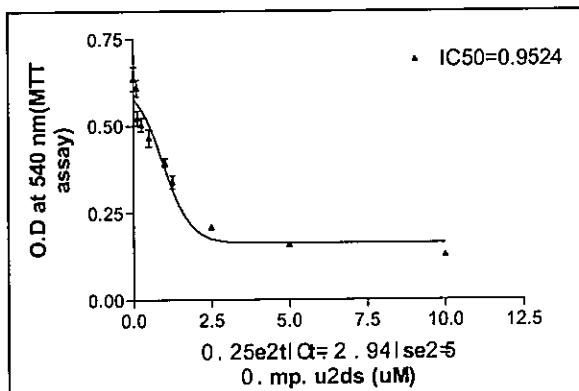


Figure 3. Cell proliferation assay of J82, 48 hours after the treatment of arsenic compound.

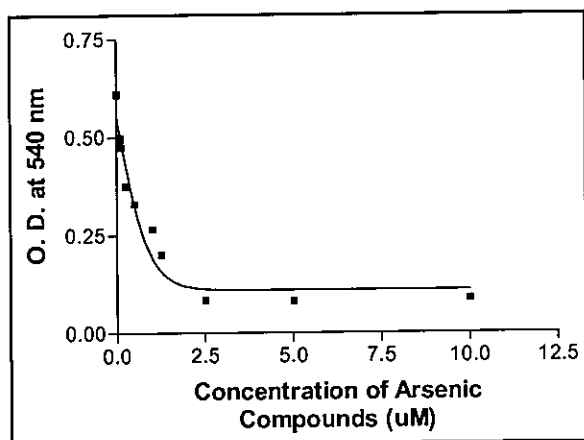


Figure 4. Cell proliferation assay of UM-UC-3, 48 hours after the treatment of arsenic compound.

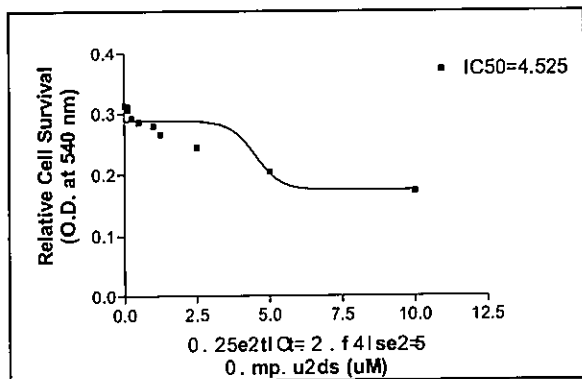


Figure 5. Cell proliferation assay of SW780, 48 hours after the treatment of arsenic compound.

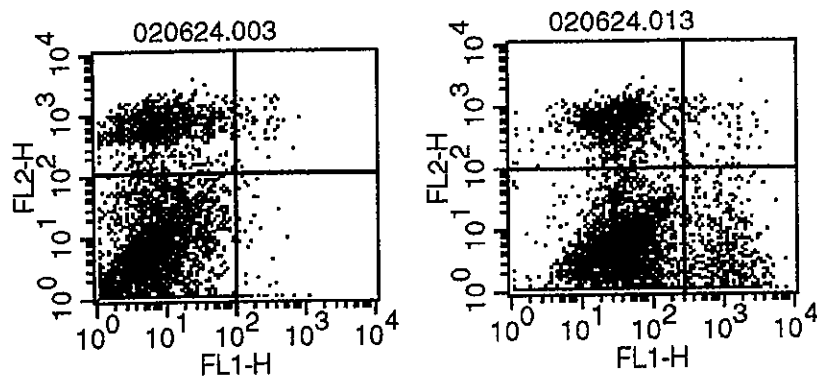


Figure 6. Apoptosis of J82 cell lines 48 hours after the treatment of arsenic compound. Control(left), As_4O_6 5.0 μ M(right).

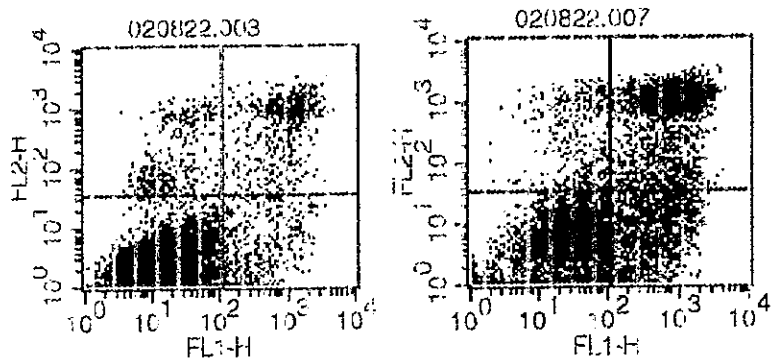


Figure 7. Apoptosis of T24 cell lines 48 hours after the treatment of arsenic compound. Control(left), As_4O_6 3.0 μ M(right).

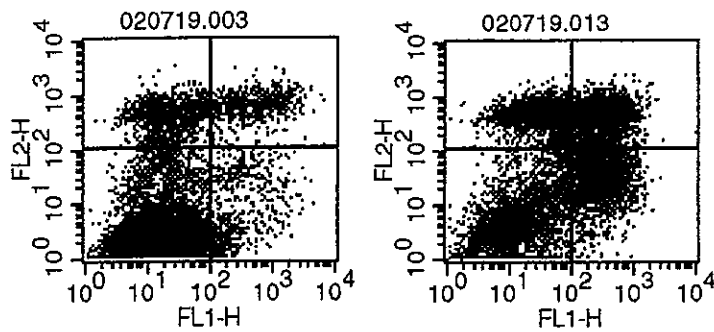


Figure 8. Apoptosis of TCC-SUP cell lines 48 hours after the treatment of arsenic compound. Control(left), As_4O_6 5.0 μ M(right).

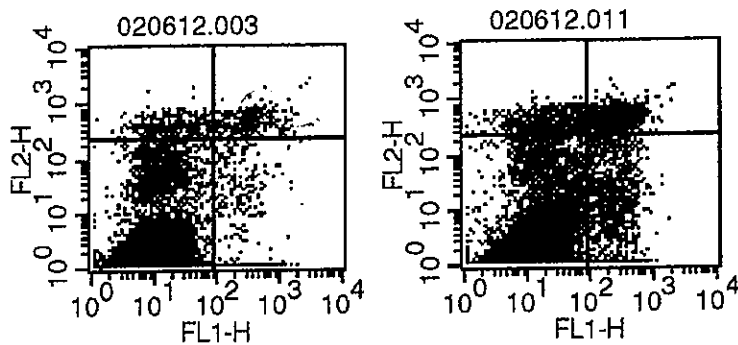


Figure 9. Apoptosis of UM-UC-3 cell lines 48 hours after the treatment of arsenic compound. Control(left), As_4O_6 2.0 μ M(right).

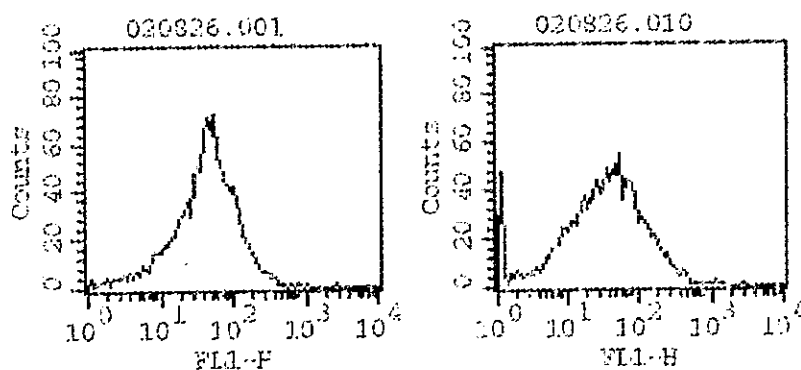


Figure 10. Histogram of mitochondrial membrane potential assay of T24 cell lines. Control(left), As_4O_6 2.0 μ M(right).

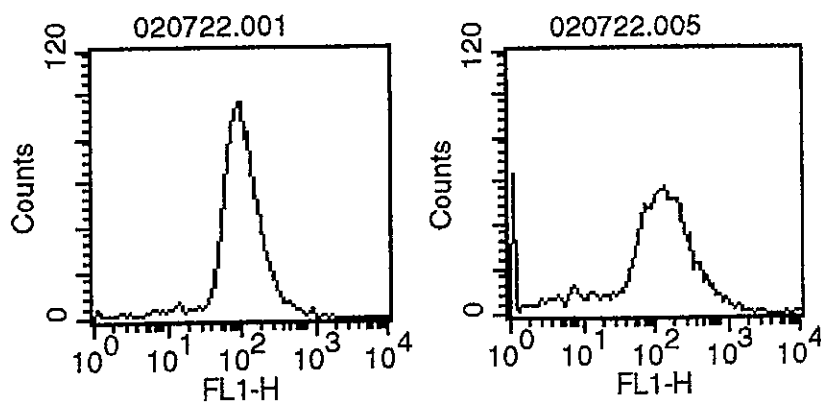


Figure 11. Histogram of mitochondrial membrane potential assay of TCC-SUP cell lines. Control(left), As_4O_6 2.0 μ M(right).



Figure 12. Caspase activation in arsenic compound-induced apoptosis of T24 cell lines. Upper(caspase-3), lower(caspase-8). Concentration of arsenic; control, As_4O_6 1.0, 2.0, 2.5, 3.0 μ M(from the left).

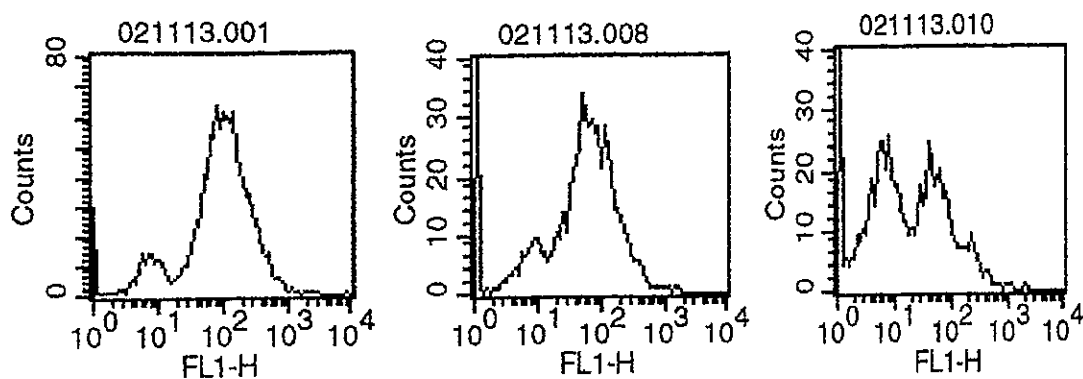


Figure 13. H_2O_2 production in arsenic compound-induced apoptosis. Control(left), 15 minutes after the treatment of As_4O_6 (middle), 2 hours after the treatment of As_4O_6 (right).

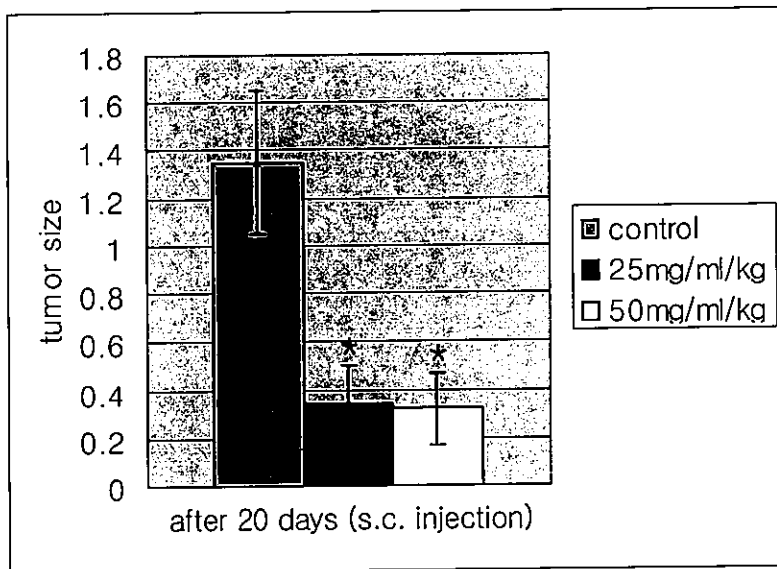


Figure 14. Tumor cell growth 3weeks after inoculation. Tetraarsenic oxide was injected for 20days. Average tumor volume of control group was 1.35, 0.34 in low dose treated group, 0.32 in high dose treated group. Difference between control and arsenic treated group was statistically significant($p<0.05$), however there was no significant difference between low and high dose treated group($p>0.95$).

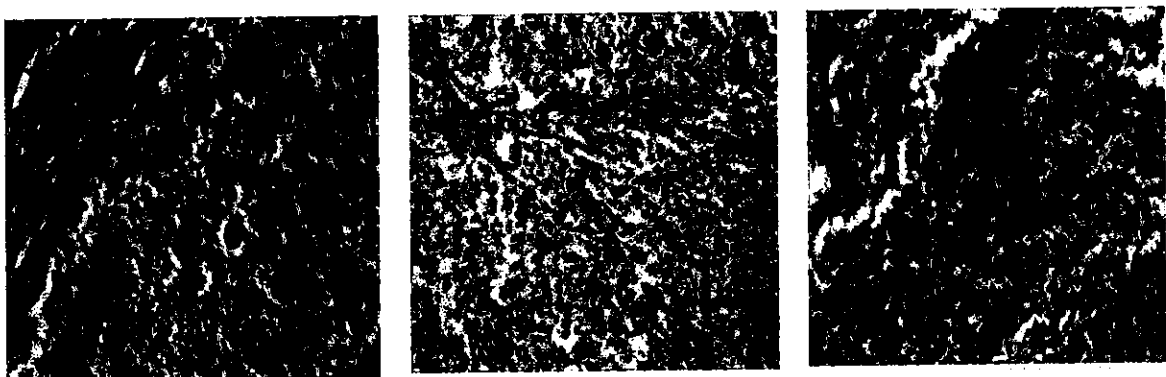


Figure 15. Histopathologic findings of resected tissues from nude mice. H&E staining, reduced from x400. Control (left), 25mg/kg/day (middle), 50mg/kg/day (right).

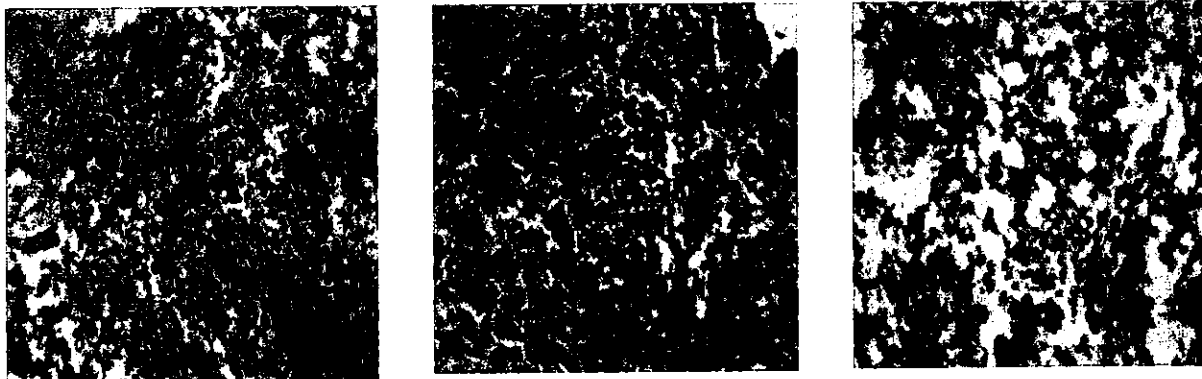


Figure 16. Histopathologic findings of resected tissues from nude mice. Ki-67 staining, reduced from x400. Control (left), 25mg/kg/day (middle), 50mg/kg/day (right).