

아세틸 아르소네이트의 면역세포와 암세포에 미치는 영향 : L1210, Sarcoma 180, MOLT-4 등 사람과 생쥐에 대한 작용비교

정용자[#] · 성영기
경성대학교 약학대학
(Received July 19, 1996)

Influence for Carcinoma Cell and Lymphatic Cell of Acetyl Arsonate

Yong Za Chung[#] and Yung Ki Sung
College of Pharmacy, Kyung Sung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract—Acetylarsionate was prepared for testing antitumor and immunological effects. It showed cytotoxicity directly on Sarcoma 180, L1210 and MOLT-4 by MTT assay. It did not seem to trigger the mitosis of human lymphocytes in culture, but that showed the cytotoxicity with higher dose. The rosette formation and spleen weight of mouse which acetylarsionate was administered to for 2 weeks were increased. Furthermore, peripheral helper T- and cytotoxic/suppressor T-lymphocytes were increased in acetylarsionate-injected-mice significantly when it was estimated with simultaneous 2 color analysis using anti Lyt2-FITC and L3T4-PE monoclonal antibody by Flow cytometer.

Keywords □ acetylarsionate, cytotoxicity, mitosis, rosette formation, lymphocyte, splenocyte, surface antigen

정상인의 손톱에도 존재하며(보통 dietary factors)¹⁾, aliphatic arsenicals의 적은량이 19C 부터 치료에의 응용이 보고되어 왔다. 독작용과 더불어 생체 정상작용에도 관여하며, trypanosomiasis의 치료에도 상승작용을 나타내는 등 여러 작용으로 미루어 암세포와 면역계에 미치는 영향이 어떠한지를 관찰해 보았다. 암세포는 Swiss Webster Sarcoma 180 ascite 유래세포, L1210과 MOLT-4를, 면역세포로는 생쥐의 비장과 사람혈액에서 분리해서 얻고, 세포배양으로 증식 속도에 미치는 영향을 비교하였다. Rosette형성능과 세포주기에 미치는 영향 및 표면항원 검색을 행하였으며, *in vivo* test로 생쥐에서 육종암의 증식속도를 측정했다.

실험방법

실험재료

1. acetylarsionate의 제조 : As_2O_3 , acetic acid
2. 암세포 독성(직접효과)
cell lines : Sarcoma 180, L1210, MOLT-4
세포배양 : RPMI1640, FBS, (pharmacia)
penicillin G, streptomycin
MTT colorimetric assay : MTT(sigma)
3. *in vivo* 항암 효과: Sarcoma mice
4. 림프구에 미치는 영향
 - a. mitogenesis : isopaque-Ficol, ammonium chloride, Tryphan blue
 - b. Rosette형성능 및 면역장기의변화 : Hank's sol. Alservier보존액, Giemsa 시약
 - c. 세포주기 분석 : RNase, propidium iodide.

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 051-620-4887 (팩스) 051-628-6540

FACS 440

- d. 림프구 표면항원검색 : Lyt2-FITC, L3T4-PE(Coulter), FACS 440

방법

1. Acetylarsonate의 제조

우선 Palmer 등이 aliphatic과 aromatic arsonic acetic acid로 가용성 유기비소를 합성한 방법²⁾과 유사한 방법으로 acetylarsonate을 합성하여 실험에 사용했다. As₂O₃ 4g에 acetic acid 500 ml을 가하고 환류시키면서 4시간 가열하여 반응시킨후 상온에 방치하여 식히고, 여과하여 침전물은 제거한다. 이 상등액은 ICPQ 1000으로 arsonate농도를 측정하고, 같은 방법으로 측정된 표준곡선과(Fig. 1)비교 정량했다(As농도 : 0.13 mg/ml). sodium acetate로 pH를 조절(pH 5.3)하고 희석하여 실험에 사용 했다. 사용된 용량은 ICPQ로 측정된 As농도(≈2.6 ppm)로 표시된³⁾ 것이다.

2. 암세포 독성(직접효과)

a. cell lines

본 실험에서 사용된 암세포 cell line은 아래와 같다. Sarcoma 180는 생쥐의 육종암세포로서⁴⁾ Swiss Webster Sarcoma 180 ascites에서 유래한것으로 배양병의 표면에 부착하여 자라며, 2 배加 시간은 약 16~17 시간이었다.

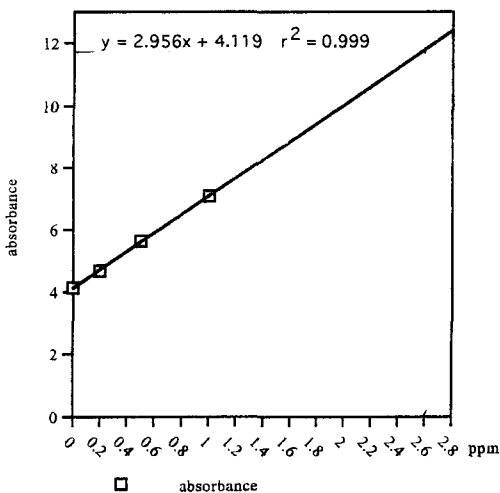


Fig. 1 -- Standard curve on As ppm counted by Shimadzu ICPQ 1000. Absorbance of sample solution (2%) was 11.73. $11.73 = 2.956x + 4.119$, $x \approx 2.6$ ppm.

L1210은 생쥐의 림프구성 백혈병 암세포로서⁵⁾ 부유 상태로 배양되며, 2 배加 시간은 약 8~9시간이었다.

MOLT-4는 사람의 림프아구성 암세포로서 부유 상태로 배양되며⁶⁾, 2 배加 시간은 약 20~22시간이었다.

b. 세포배양⁷⁾

세포 배양을 위해 RPMI-1640 배지를 常法 에따라 용해하여, 여기에 열처리 된 소의 태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 10%, sodium bicarbonate 0.075%, glutamine 2 mM 및 항생제(100 units/ml penicillin G, 100 μg/ml streptomycin) 등을 첨가하였다. 5% 이산화 탄소/95%실내 공기에서 37°C 항온배양기 내에서 배양했다.

c. MTT colorimetric assay⁸⁾

Acetylarsonate의 암세포에 대한 직접적인 항암효과는 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide(MTT) 비색정량법을 이용하여 검색하였다. 이 방법은 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의하여 MTT 가 환원되어 청색결정의 잔류물을 형성한다는 사실을 근거로 한 것이다. 살아 있는 세포가 많을 수록 MTT잔류물의 양이 비례하여 증가하며, 반대로 잔류물의 감소는 시험약물의 세포독작용 이 큼을 의미 한다. 검사는 다음과 같이 시행하였다. 생존 세포수와 MTT법에 의한 흡광도의 관계는 Fig. 2에서 보여 주는 것과 같이 세포종에 따라 차이는 있으나 비례관계를 보여주었다.⁹⁾

Sarcoma 180는 배양병에 부착하여 자라므로 trypsin으로 처리 후 부유상태로하여 취하고, 부유상태로 배양되는 MOLT-4나 L1210은 그대로 취하여 hemacytometer를 이용하여 현미경하에서 세포수를 계산 하였다. 96well-microplate에 2×10^3 cells/0.2 ml well(10^4 cell/ml)씩 넣고 배양기에서 24시간 배양한 후, 각 well에 acetylarsonate를 ml당 1 μ에서 1000 μ까지 3배수씩 증가하는 농도로 첨가 하였다. acetylarsonate대신 용매로 사용된 배지만 더 첨가시킨 well을 대조군으로 하였다. 3일간 같은 방법으로 배양 하여 그동안 acetylarsonate가 세포증식에 어느정도 직접적으로 영향을 미치는가를 판별코져 하였다. 그후 MTT 0.1 mg를 각 well에 가하여, 37°C 항온조에서 4시간 반응 시켰다. 각 plate를 5분간 450×g로 원심 분리하고, 상등액은 제거하였다.

Dimethylsulfoxide(DMSO) 150 μ를 각 well의 내에 넣고 10분간 흔들며 MTT잔류물을 용해시키고

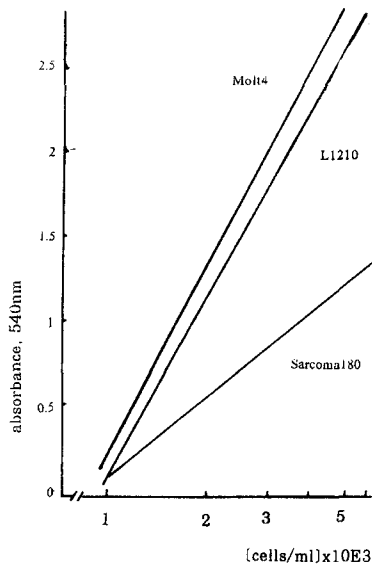


Fig. 2—Correlation between absorbance and the number of cells : MOLT-4, $y=3.90x-11.27$ (x : logarithmic value, $r=0.871$, the number of samples, $n=6$, $p<0.05$) : L1210, $y=3.71x-10.94$ ($r=0.842$, $n=22$, $p<0.05$) : Sarcoma 180, $y=1.69x-4.84$ ($r=0.908$, $n=10$, $p<0.05$).

540 nm에서 Scanning multiwell spectrophotometer(Enzyme-Linked Immunosorbent assay reader : Biotec Instruments Inc., Burlington)로 흡광도를 측정한다.

모든 측정치는 적어도 3 well 이상의 측정치의 산술 평균으로 계산되었으며, 대조군과 비교하여, 각 well의 흡광도의 감소를 acetyl arsonate의 각 암세포에 대한 독작용으로 간주하였다.

Acetyl arsonate의 림프구에 대한 세포분열 촉진 효과를 관찰하기 위해서도 위와 같은 방법으로 행하였다.

3. *in vivo* 항암 효과

배양중인 Sarcoma 180을 trypsin-EDTA로 처리하여 용액상태로 채취한후 BALB/c 생쥐의 복강내 1×10^6 cells/ml 씩 주사하여 7~10일 동안 계대 배양시켰다. 여기에서 얻어진 암세포를 첫째날 18~22g 되는 생쥐의 복강내에 생쥐 한 마리당 3×10^6 cells 씩 주사하여 접종시켰다. 그후, 매일 acetyl arsonate를 3, 10 및 30 μ l/ml 농도로 0.1 ml 씩 복강내 주사하여 Sarcoma의 발병유무와 크기를 육안으로 관찰하였다. 그리고 acetyl arsonate 대신 생리식염수 0.1 ml을 주사한 군을 대조군으로 하여 비교 관찰하였다.

Sarcoma mice의 생존유무와 암의 크기는 그후 6주가

지 더 관찰하였으며, 6주되었을때, Sarcoma mice를 치사시켜 육중량과 비장의 크기 등의 변화를 측정하였다.

4. 림프구에 미치는 영향

a. 림프구의 조제

사람의 림프구¹⁰⁾ : Buyum이 고안한 Isopaque-Ficol(IF)용액의 밀도경사를 이용한 원심분리법으로, 전혈에서 사람의 림프구를 다음과 같이 분리하였다. 10 ml의 heparin처리 전혈을 $600 \times g$ 하에서 원심분리하여 적혈구층 위에 있는 백혈구층을 모아 다시 1 ml 콜로이드성 철용액과 섞어준다. 약 30분간 $37^\circ C$ 수욕상에서 진탕 가열한 후, 이 용액을 동일용량의 인산완충액(pH 7.4)과 섞어준다. 이것을 IF용액 3 ml 위에 가볍게 올려놓고 원심분리 시킨다. 원심분리된 후의 중간층에서 림프구를 취하여 실험에 사용하였다.

생쥐의 림프구(Splenocytes)¹¹⁾ : BALB/c 생쥐의 비장을 취하여 소량의 인산완충액(Dulbecco's phosphate buffered saline containing 2% bovine serum)이 담긴 Petri 접시위에 놓고 잘게 자른 후, pasteur pipette로 흡입과 배출을 반복하면서 덩어리가 흩어지게 하였다. 이 과정중에 많은 양의 비장세포가 밖으로 유리된다. 적혈구는 0.83 w/v% ammonium chloride용액으로, 여과된 세포부유액을 처리하여 적혈구는 용혈 제거하고, 다시 세포부유액을 glass wool 필터에 통과 시킴으로써 대식세포와 과립구세포를 어느정도 제거하였다. 그 후, 세포 부유액을 0.5% Trypan blue로 염색하여 살아있는 림프구가 90% 이상 있을 때, 비장세포 부유액을 림프구 실험에 사용하였다.

b. Rosette형성능 및 면역장기의 변화

생쥐에 2주간 acetyl arsonate을 3, 10, 및 30 μ l/mouse/day의 용량으로 주사하여 생리식염수만을 주사한 대조군과 비교하였다. 위의 방법대로 준비한 림프구를 Hank용액에 다시 부유시켜 hematocytometer를 이용하여 세포수를 계산하고 5×10^6 cells/ml이 되도록 조정해 두었다. 양의 전혈 20 ml을 Alservier 보존액 100 ml에 넣고 부유시켜 두었다. 이 부유액을 다시 Hank용액 5배수와 혼합하여 $500 \times g$ 하에서 10분간 원심분리시키고 상등액을 제거하였다. 이와같은 방법을 반복해서 혈구 잔류물을 Hank용액으로 세척한후, 적혈구 부유액을 1.8×10^6 cells/ml이 되게끔 조절하였다. 비장세포 부유액 0.1 ml(5×10^5 cells/ml)과 열처리된 FBS 0.05 ml를 양의 적혈구 부유액 0.1 ml를 $37^\circ C$ 수욕상에서 합하고, 이 혼합액을 $200 \times g$ 에서 5분간 원심분리하고,

4°C에서 2시간 동안 방치하였다. 2시간 경과 후 각 시험관에 glutaraldehyde용액을 가하여 20분간 실온에 방치한다. Giemsa염색을 한 후 현미경하에서 림프구 중에서 Rosette 형의 림프구 비율을 계산하여 acetylarsonate 처치군에서 Rosette형성능의 변화를 관찰하였다¹²⁾. 그리고 비장의 무게와 임파세포의 수를 측정 했다.

c. 현미경 관찰을 위한 Wright's staining¹³⁾

생쥐에 acetylarsonate을 2주동안 복강내 주사한 후, Wright's staining으로 백혈구의 변화를 관찰하였다. 각 생쥐에서 2방울의 혈액을 slide glass에 smear하고 stain을 한방울 떨어뜨린 후 1분동안 고정시킨다. 여기에 완충액 희석액을 2~3배량 첨가한다. 이때 씻겨져 나가지 않게 주의해야 한다. 이때 공기 흐름을 이용하여 희석액이 섞이도록 하고 5분간 방치한다. 그 물을 흡착해서 버리고 공기중에서 말린다. 현미경하에서 백혈구세포수를 센다(×400).

d. 세포주기 분석¹⁴⁾

Acetylarsonate가 림프구의 세포분열에 어떠한 영향을 미치는가를 관찰하기 위하여 Crissman과 Steinkamp가 고안한 propidium iodide염색을 이용한 세포주기분석법을 이용했다. 앞의 방법으로 준비된 사람의 림프구를 acetylarsonate 5, 10, 20, 50 및 100 µl/ml의 함유배지에서 2일간 배양하였으며, acetylarsonate를 넣지 않은 군을 대조군으로 하였다. 배양된 림프구 용액의 각 시험관에 70%알코올을 가하여 1시간동안 4°C에 방치하여 고정시키고, 원심분리하여 상등액을 버리고 citrate 완충액으로 잔류물을 세척한다. RNase(0.5 mg/ml)를 함유하고있는 propidium iodide(0.1 mg/ml, pH 7.6) citrate완충액으로 염색한다. 4°C에서 30분정도 방치하였다가 FACS 440(Becton-Cickinson)을 이용하여 붉은색의 DNA형광을 측정하였다. 이때, 200 mW 출력이 지속되는 argon laser의 488 nm로 형광분자를 여기시켰다. DNA 분포도에 의한 세포주기 분석은 FACS 440에 내장되어 있는 software (Becton-Dickinson, DNA cell cycle analysis software : ver C5/87)를 사용하여 계산하였다.

e. 림프구 표면항원검색^{15, 16)}

Acetylarsonate를 2주간 3, 10 및 30 µl/mouse/day씩 각군별로 주사한 후, 대조군과 acetylarsonate 처치군의 전혈을 각 시험관에 50 µl씩 취하고 FITC-표지 시약(anti-mouse Lyt₂-FITC)과 PE-표지 시약(anti-mouse L3T4-PE)을 각각 10 µl 넣고 가법계 섞

어준 후 실온에서 약 15분간 방치 하였다.

0.83% ammonium chloride 2 ml을 넣고 적혈구를 용혈, 제거한 다음 원심분리하여 잔류물만 취하였다. 인산완충액(pH 7.2) 으로 가법계 흔들면서 섞어주어 원심분리를 반복하는 방법으로 세척하였다. 다시 인산완충액 0.5ml에 용해시켜 FACS 440(software : BDIS CONSORT 30-Ver G 3/89)로 형광의 양을 측정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 암세포에 대한 독성시험

배양시간에 따른 증식속도와, concanavalin A와 acetylarsonate의 증식속도에 미치는 영향을 Sar-

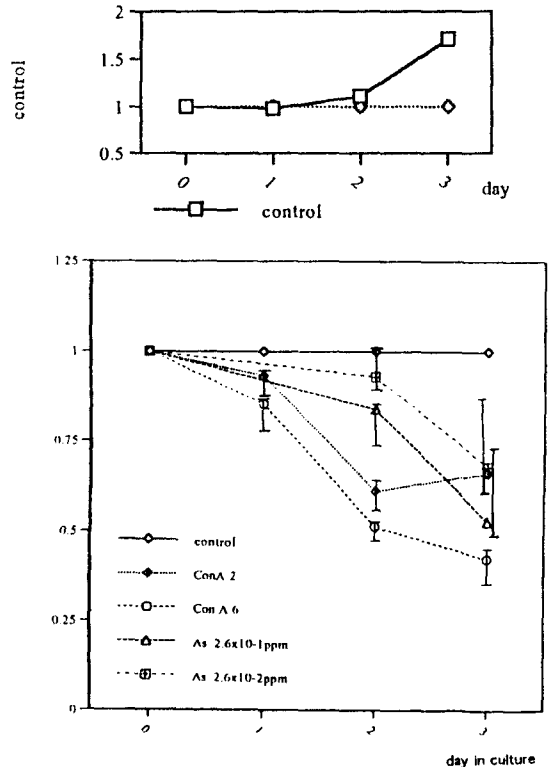


Fig. 3—Effects of Con.A and As on proliferation of Sarcoma 180 in culture. Compared with that of the nontreated control group to be considered as 1.0 each day. The upper graph represents the change of number of Sarcoma 180 of the control in culture when the number of Sarcoma in preculture (Day-0) is considered as 1.0. Each value denotes the mean± the standard error of the mean of 3-4 experiments.

coma 180 cell line에 비교하고(Fig. 3). 배양 3일을 검정일로 선택했다.

Acetylarsionate가 Sarcoma 180, L1210나 MOLT-4에 대한 직접 세포 독성을 acetylarsionate의 용량에 따른 비교결과, 농도에 비례해서 증식저해를보였으며, L 1210에서 세포독작용을 크게 보였다(Fig. 4). Fig. 5은 Sarcoma 180에 대한 concanavalin A, acetylarsionate 그리고 항암제인 5Fu와 동류의 germanium을 사용해서, 세포독작용을 3일배양 후 비교한 것이다. Sarcoma 180에대한 arsenic 작용은 26 ng/ml에서 약하게 증식저해작용을 보였으며, 그 이하 농도에서는 세포 증에 따라 다르나 거의 저해작용을 나타내지 않았다.

2. *in vivo* 항암 효과

Acetylarsionate가 *in vivo*에서는 어떤 효과를 나타내는가를 관찰하기 위하여 Sarcoma mouse에 매일 6주간 acetylarsionate를 78 ng/day(30 μ l, Table 2

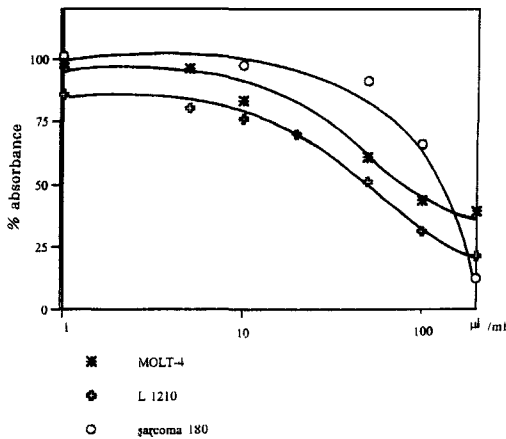


Fig. 4— Cytotoxicity of acetylarsionate on proliferative Sarcoma 180 (o), MOLT-4 (*) and L1210 (♣). Absorbance was evaluated by MTT assay after incubation for 3 days in culture medium containing various concentration of acetylarsionate and compared with the control which was cultivated in absence of acetylarsionate. Each value denotes the mean of % absorbance. (As 2.6 ppm solution).

결과에서 선택된량 임)씩 주사한 후, 비장과 암종의 크기를 알아보았다. 대조군에 비해 암종의 크기는 현저한 감소를 보였으며, LMP%는 약간의 증가를 보였다 (Table I).

3. 림프구 증식에 미치는 영향

Acetylarsionate이 림프구 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위해 우선 acetylarsionate와 concanavalin A를 분리된 림프구 배양 well에 첨가하고 배양일에 따른 증식곡선을 대조군의 증식속도와 비례값으로 구했다. 결과는 Fig. 6과 같이 배양 2일부터 증식하여, 3일에 분명한 결과를 보여주었다. 그리고 농도별로 acetylarsionate을 섞어 3일간 배양한 후 흡광도를 구하고 같은 방법으로 대조군과 비교하여 얻었다. 대조군은 배지에 acetylarsionate을 첨가하지 않은 군이다(Fig. 7). *in vitro*에서 림프세포 분화는 0.13 ng/ml의 저농도에서 만 증식을 보였다. 세포독작용 시험에 사용했던 비교약물이 림프구의 증식에는 어떤 영향을 미치는가를

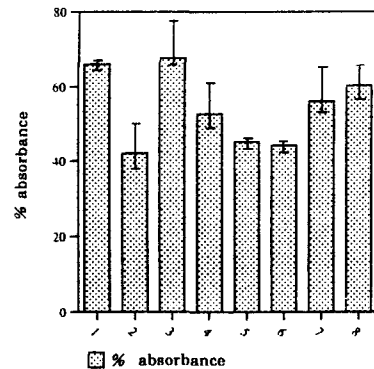


Fig. 5— Cytotoxicity of Con. A, As, Ge and 5Fu on the proliferation of Sarcoma 180. 1: ConA 2 μ g/well, 2: ConA 6 μ g/well, 3:As 2.6×10^6 g/ml, 4: As 2.6×10^7 g/ml, 5: 5Fu 0.2 μ g/well, 6: 5Fu 0.5 μ g/well, 7: Ge 2 μ g/well, 8: Ge 6 μ g/well. The Cells were cultured for 3 days and measured by MTT method. Control value is considered as 1.0 and compared. Each value denotes the \pm mean standard error.

Table I— Effects of Ge and As on the Tumor and spleen weight of mice bearing Sarcoma 180

	Body weight(g)	spleenW. (g)	Tumor (g)	WBC $\times 10^3$	LMP%
normal	27.5 \pm 2.3	0.37 \pm 0.07	4.27 \pm 1.73	7.53 \pm 1.53	71.16 \pm 9.92
Ge 30 μ g	28.7 \pm 2.87	0.28 \pm 0.06	5.65 \pm 3.15	5.2 \pm 1.54	81 \pm 4.0
As 7.8×10^{-6} g	33.2 \pm 2.3	0.21 \pm 0.02	0.29 \pm 0.12	6.15 \pm 1.52	77.2 \pm 3.8

Sarcoma cell (2×10^6) were transplanted at Day-0, and As were administered intraperitoneally once per day from Day-1 to week-6.

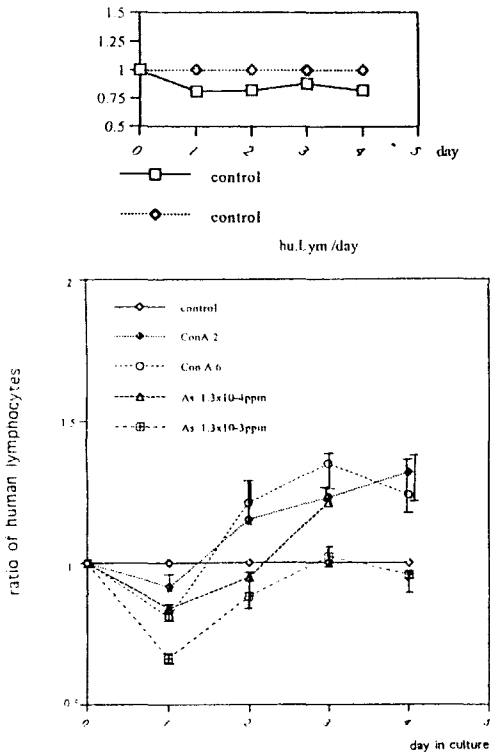


Fig. 6 — Effects of Con.A and As on proliferation of human lymphocytes in culture. Compared with that of the nontreated control group to be considered as 1.0 each day. The upper graph represents the change of number of lymphocytes of the control in culture when the number of lymphocytes in preculture (Day-0) is considered as 1.0. Each value denotes the mean \pm the standard error of the mean of 3~4 experiments.

관찰하기 위해 같은 방법으로 실험한 결과는 Fig. 8과 같이 5Fu는 저해작용이 강하고, germanium은 증식작용이 강하게 나타났다.

사람과 생쥐의 림프구에 미치는 영향을 비교한 결과는 Fig. 9에서 보이는 바와같이 생쥐의 림프구에 대한 분화 촉진작용이 사람에서보다 더 크게 나타났다.

4. Rosette형성능 및 면역장기의 변화

말초 림프구의 변화를 관찰하기 위하여 2주간 주사하고 채혈하여 Wright's staining한 후 현미경 하에서 관찰한 결과, *in vitro*시와는 달리 78 ng/mouse/day로 주사한 군에서 림프구 증가를 보였고, 염기호성구와 단핵구의 증가를 보였다(Table II).

Tcell의 활성검사를 위해 Rosette형성능 검사 결과

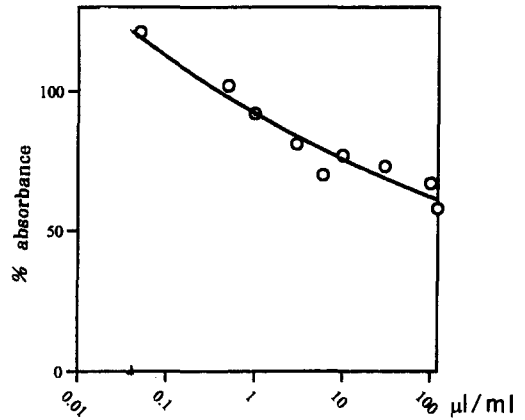


Fig. 7 — Effect of acetylarsonate on the proliferation of human lymphocytes. Absorbance was measured by MTT assay after incubation for 3 days at various concentration, and compared with that of the nontreated control group to be considered as 1.0. Each value denotes the mean.

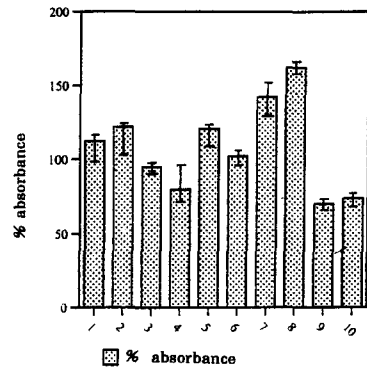


Fig. 8 — Effects of Con A, As, Ge and 5Fu on the proliferation of human lymphocytes : 1: ConA 2 μ g/well. 2: ConA 6 μ g/well. 3: As 2.6×10^{-8} g/ml. 4: As 7.8×10^{-8} g/ml. 5: As 1.3×10^{-10} g/ml. 6: As 1.3×10^{-9} g/ml. 7: Ge 2 μ g/well. 8: Ge 6 μ g/well. 9: 5Fu 0.1 μ g/well. 10: 5Fu 0.5 μ g/well. Cells were cultured for 3 days and measured by MTT method. Control value is considered as 1.0 and compared. Each value donates the mean \pm standard error of the mean of 4~6 experiments.

에서도 Table III과 같이 78 ng/mouse/day와 7.8 ng/mouse/day로 주사한 군에서 활성증가를 보였다. 그리고 약간의 비장무게 증가도 보였다. 면역세포의 증가가 세포주기와 어떤 관계가 있는가, Tcell 표면항원에 대한 변화는 어떠한가를 계속해서 관찰했다.

5. 세포주기 분석

Acetylaronate가 림프구의 세포분열에 어떠한 영향을 미치는가를 관찰하기 위하여 Crissman과 Steinkamp가 고안한 propidium iodide염색을 이용한 세포주기분석법으로 앞의 방법으로 준비된 사람의 림프구를 acetylaronate 5, 10, 20, 50 및 100 µl/ml의 함유배지 하에서 2일간 배양하였으며, acetylaronate를 넣지 않은 균을 대조군으로 했다. RNase를 함유하고 있는 propidium iodide완충액으로 염색하고 방치한 후 FACS 440(Becton-Cickinson)을 이용하여 측정하였다. DNA 분포도에 의한 세포주기를 분석한 결과는 Fig. 10과 같다. 주기분석결과, 저농도에서 G₂ phase가 감소하고 S phase가 상대적으로 증가하는 경향을 약하게 보였다.

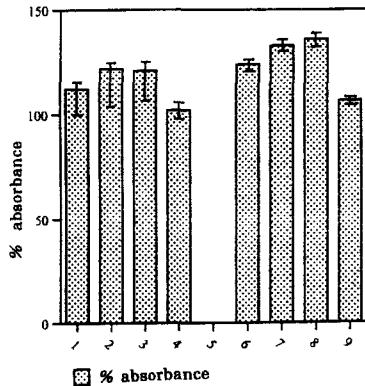


Fig. 9 — Comparison of concanavalin A and acetylaronate on the proliferation of human and mouse lymphocytes. 1: ConA 2 µg/well, 2: ConA 6 µg/well, 3: As 1.3×10⁻¹⁰ g/ml, 4: As 1.3×10⁻⁹ g/ml on human lymphocytes, 6: ConA 2 µg/well, 7: ConA 6 µg/well, 8: As 1.3×10⁻¹⁰ g/ml, 9: As 1.3×10⁻⁹ g/ml on mouse lymphocytes, cell were cultured for 3 days and measured by MTT method. Control value is considered as 1.0 and compared. Each value donates the mean±standard error of the mean of 4~6 experiments.

Table III — Increase in % Rosette of mouse splenocytes and spleen weight after long-term (2weeks) administration of acetylaronate

Injected dose	% Rosette	Spleen weight(g)
control group		
vehicle+	8.3±3.3	0.175±0.014(11)
acetylaronate group		
3 µl/mouse/day	12.8±2.1	0.248±0.041(5)
10	9.5±1.2	0.213±0.023(4)
30	15.5±2.1*	0.268±0.029(10)

+, saline, 0.1 ml/mouse/day(i.p.).

*, Significantly different from the control, p 0.05.

The number in parentheses means the number of used mice.

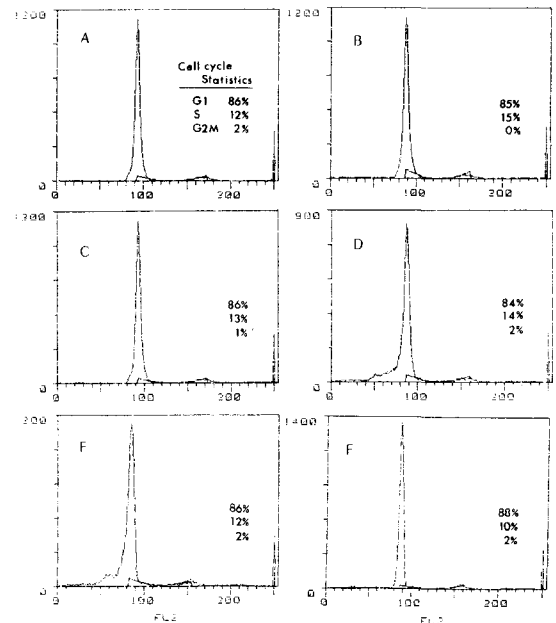


Fig. 10 — Histogram of DNA configuration of human lymphocytes cultured in the presence of acetylaronate (A, control: B, 5 µl/ml; C, 10 µl/ml; D, 20 µl/ml; E, 50 µl/ml; F, 100 µl/ml). DNA content of lymphocytes was analyzed by Flow Cytometer(Becton/Dickinson, FACS 440) after PI staining.

Table II — *in vivo* Comparison of WBC contents at the third day after injected Ge and As during 2 weeks

(Wrights staining)

Inj. Drug per mouse	Lymphocytes	Segmented	Basophils	Eosinophils	Monocytes
normal	55.5	44.5	0	0	0
Ge 2 mg	68	31	0.5	0	0.5
acetylaronate					
** 10 µl	44	55.5	0.5	0	1
***30 µl	65	34	0.5	1	0.5
* 3 µl	44	52	0	0	0

*3 µl=As7.8×10⁻⁹ g. **10 µl=2.6×10⁻⁸ g. ***30 µl=7.8×10⁻⁸ g

Table IV -- %Gated of 2-color analysis of mouse peripheral T-cell surface antigen using anti-mouse monoclonal antibodies after longterm(2 weeks) administration of acetylarsonate

Injected dose (μ l/mouse/day)	Anti-mouse monoclonal antibodies			
	L3T4	Lyt2	L3T4/Lyt2	unbound*
Vehicle+	23.4 \pm 6.5	16.5 \pm 4.4	10.3 \pm 6.4	49.7 \pm 10.3
3	39.4 \pm 5.8#	30.9 \pm 6.8#	9.9 \pm 0.5	19.7 \pm 1.6
10	38.2 \pm 2.3#	17.5 \pm 5.5	13.2 \pm 1.2	31.1 \pm 3.2
30	31.0 \pm 8.0	31.0 \pm 7.8#	11.2 \pm 1.3	26.4 \pm 1.5

*. Unbounded to neither L3T4 nor Lyt2.

+. Normal saline. 0.1ml/mouse/day(i.p.)

#. Significantly different from the control. p0.05.

6. 림프구 표면항원검색

Acetylarsonate를 2주간 3, 10 및 30 ml/mouse/day씩 각 군 별로 주사한 후, 대조군과 acetylarsonate 처치군의 전혈을 각시험관에 취하고 FITC-표지 시약(anti-mouse Lyt₂-FITC)과 PE-표지 시약(anti-mouse L3T4-PE)을 각각 가볍게 섞어준 후, 적혈구를 용혈 제거한 다음 원심분리하여 잔류물만 취하였다. 인산완충액으로 세척한 후 FACS 440로 형광의 양을 측정하여 분석한 결과는 Fig. 11, Table IV과 같다. acetylarsonate 처치군에서 활성화된 T cell 표면항원으로 추정되는 L3T4의 현저한 증가를 보였으며, 표면항원검색에서도 저농도(3 μ l/mouse/day)로 첨가된 군에서의 증가가 큰 결과를 보였다.

림프구의 분화 촉진에 대한 acetylarsonate의 효능은 0.13 ng/ml에서 보였으며, 생쥐비장 림프구가 사람 혈액 림프구보다 활성화 작용을 더 크게 보여 주었다. 그리고 암세포에 대한 증식 저해작용은 L1210, Sarcoma 180와 MOLT-4에서 모두에서 보이나, 비교적 높은 농도인 26 ng/ml 이상에서 세포독작용을 나타내었다. 특히 생쥐림프구 암세포인 L1210에 대한 저해작용이 현저했다.

이상의 실험결과로 보아 *in vivo*와 *in vitro*결과가 농도와 방법에 따른 결과와, 세포종에 따라 활성증가의 차이는 있으나 저농도($As2.6 \times 10^{-8}$ g/ml 이하)에서 림프구 증식과 면역활성증가의 결과를 보였으며, 암세포 저해는 상대적으로 높은 농도에서 증식저해 현상을 보이고 세포종에 따른 차이 또한 나타났다. 실험결과는 제시하지 않았지만 실험에 사용된 양은 약 7~70 ng/mouse였으며, 급성독성시험으로 980 ng/mouse투여군에서 외형적인

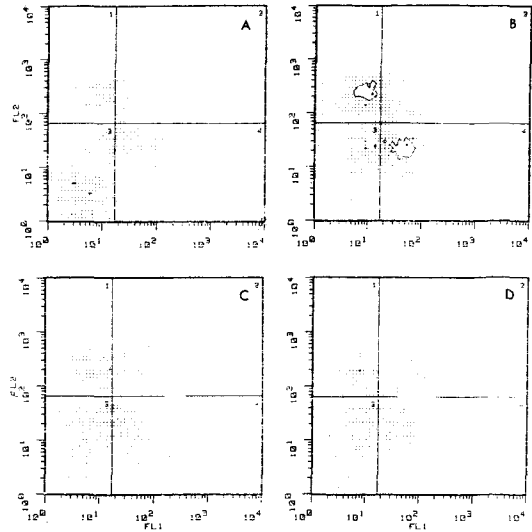


Fig. 11 — FL1 versus FL2 dot analysis displays while flow cytometer is adjusted for two-color analysis. Four distinguishable populations were divided by dashed line which separate negative from positive (1, FL2 positive; 2, positive both FL1 and FL2; 3, negative both FL1 and FL2; 4, FL1 positive). The lymphocytes were obtained from mice to whom acetylarsonate was administered for 2 week(A, control in the absence of acetylarsonate; B, 3 μ l/mouse/day; C, 10; D, 30). %Gated of this analyses were represented in Table 4.

변화가 감지되지 않았다.

문헌

- 1) Agahian B., Lee J. S., Nelson J. H., and Johns R. E. : Arsenic levels in fingernails as a biological indicator of exposure to arsenic. *Am-Ind-Hyg-assoc.-J.*, **51**(12), 646 (1990).
- 2) Palmer C. S. : Aliphatic arseno compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **45**, 3023 (1923).
- 3) Fishman, B., and Spencer, R. : Automated atomic absorption spectrometric determination of total arsenic in water and streambed materials. *Anal. Chem.* **49**, 11, 1599 (1977).
- 4) Cohn, M. : *J. Nat. Cancer Inst.*, **13**, 1299 (1953).
- 5) Moore, G., Sandberg, A. A. and Ulrich, K. : Suspension cell culture and *in vivo* and *in vitro* Chromosome constitution of mouse leukemia L 1210. *J. Nat. Cancer Inst.*, **36**, 405 (1966).

- 6) Minowada, J., Ohnuma, T., and Moore, G. E. : Brief communication: Rosette forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus derived lymphocytes. *J. Nat. Cancer Inst.*, **49**, 891 (1972).
- 7) Adams, R. L. P. : Cell culture for biochemists. New York : Elsevier/North Holland press. p 246 (1982).
- 8) Denizot, F. and Lang, R. : Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Meth.*, **89**, 271 (1986).
- 9) Chung, Y. Z., Jung, H. O. : Antitumor and Immunological effects of Bovine Thymic Extract. *Kor. J. Clin. Pharm.*, **2**, 1.11 (1992).
- 10) Buyum, A. : Separation of Lymphocytes, Granulocytes and monocytes from human blood using iodinated density gradient media. *Immunol. Tech.*, **7**, 88 (1988).
- 11) Hunt, S.(ed) : Preparation of lymphocytes and accessory cells p16. Lymphocytes. Washington : IRL press (1987).
- 12) Bach, L. F. and Dardenne, M. : Antigen recognition by T lymphocytes 1. Thymus and Marrow dependence of spontaneous rosette forming cells in the mouse. *Cell Immunol.*, **3**, 1 (1972).
- 13) Simons, A.(ed.), Technical hematology. (London : Lippincott Co., III 1986), Leukocytes, Wright's staining, p122.
- 14) Crissman, H. A. and Steinkamp, J. A. : Rapid simultaneous measurement of DNA, protein and cell volume in single cells from large mammalian cell population. *J. cell Biol.* **59**, 766 (1973).
- 15) Feaison, D. T. : Cellular receptors for fragments of the third component of complement. *Immunol. Today.* **2**, 105 (1984).
- 16) Roitt, I., Brostaff, J. and Male, D.(ed) : Cell involved in the immune response. p2. Immunology. London : Gower Med. Pub (1985).