

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건
 을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 <u>이용허락규약(Legal Code)</u>을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer 🗖





이학석사 학위논문

급성골수성백혈병세포에서 에리불린에 의한 세포사 기전 연구 Study on the Mechanism of Cell Death by Eribulin in Acute Myeloid Leukemia Cells

> 울 산 대 학 교 대 학 원 의 과 학 과 김 도 경

급성골수성백혈병세포에서 에리불린에 의한 세포사 기전 연구

지도교수 최윤숙

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2021년 8월

울 산 대 학 교 대 학 원 의 과 학 과 김 도 경

김도경의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 조 재 철 😥

심사위원 최 윤 숙 🎨

심사위원 허숙경

울 산 대 학 교 대 학 원 2021년 8월

국 문 요 약

배경: 급성골수성백혈병은 골수성 백혈구의 분화 단계 중 초기 단계에 있는 전구세포인 골수 모세포가 미분화 상태로서 축적하고 비정상적으로 증식하는 혈액 악성 종양이다. 시타라빈과 안트라사이클린 계열 항암제가 주된 치료제로 사용되고 있으나, 50~70%의 환자들은 재발을 겪는다. 에리불린은 전이성 유방암과 지방육종의 치료에 쓰이고 있는 약물로 해면 스펀지에서 추출 및 분리한 halichondrin B를 기본으로 한 합성의약품으로 급성골수성백혈병에서의 효과는 아직 알려지지 않았다. 본연구에서는 급성골수성백혈병 세포에서의 에리불린의 효능을 평가하고 신호기전에 대한 연구를 진행하였다.

방법: 급성골수성백혈병 세포주인 HL60에 에리불린을 처리한 후 MTS Assay와 Annexin V 염색을 사용하여 세포 생존율과 세포사를 확인하였고 세포사멸이 일어나는 경로를 Caspase 발현도 및 활성도와 DiOC₆(3) 염색을 통한 미토콘드리아 막전위를 통해 확인하였다. 세포주기의 변화를 보기 위해 Propidium idodide(PI) 염색을 통해 확인하였다. 세포사와 관련된 단백질들의 발현을 Western blot Assay를 통해 확인하였고 혈액 세포의 분화와 성숙에 관련된 표지자인 여러 표면 항원들의 발현도를 확인하였다.

결과: 에리불린을 HL60 세포에 처리하였을 때 에리불린의 농도가 높아질수록 세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였고 세포사멸이 일어나는 세포의 비율은 증가하는 것을 확인하였다. 세포사멸의 경로를 확인하기 위한 실험에서 에리불린의 농도가 높아질수록 Caspase 활성도가 증가하고 미토콘드리아 막 전위는 감소하는 것을 확인하였다. 세포주기를 분석한 결과 에리불린에 의해서 G2/M기의 정지가 유도됨을 확인하였고 그와 관련된 단백질 발현 또한 에리불린에 의해 조절되는 것을 확인하였다. 또한 혈액 세포의 분화와 성숙에 관련된 표지자인 CD11b, CD14, CCR1, CCR2, ICAM-1, HLA-DR의 발현 정도를 확인하였을 때 에리불린의 농도가 높아질수록 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

결론: 에리불린은 급성골수성백혈병 세포에서 세포독성과 세포사멸 유도 효과가 있으며 미성숙 백혈병 세포의 분화를 유도하여, 새로운 백혈병 치료제로서의 가능성이 있다.

목 차

국문요약	· I
목 차	ii
List of Figures i	V
I. 서 론	1
II. 실험재료 및 방법	2
1. 시약 & 항체	2
2. 세포 배양	2
3. 세포 생존율 측정	3
4. 세포사멸에 대한 유세포 분석기 분석	3
5. Caspase 활성도 측정을 위한 유세포 분석기 분석	3
6. 미토콘드리아 막전위 측정을 위한 유세포 분석기 분석	4
7. Cytochrome <i>C</i> 방출량 측정	4
8. 세포주기에 대한 유세포 분석기 분석	4
9. 세포 표면 표지자에 대한 유세포 분석기 분석	5
10. Western blot 분석	5
11. 통계 처리	6

III.	불과	. 7
	1. 급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 세포독성 유발 효과	. 7
	2. 급성골수성백혈병에서 에리불린에 의한 Caspase 활성화를 통한 세포사멸 전	
	3. 급성골수성백혈병세포에서 에리불린에 의한 미토콘드리아 막의 탈 분극화 관련된 세포사멸 유도	
	4. 급성골수성백혈병세포에서 에리불린에 의한 세포주기에 미치는 영향	14
	5. 급성골수성백혈병세포에서 에리불린에 의한 세포 분화 및 분화성숙 유도과	
IV.	고 찰	19
V.	r고문헌	22
영	요약	27

List of Figures

Figure	1.	급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 세포독성 효과8
Figure	2.	급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 세포사멸 유도 효과 9
Figure	3.	급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 Caspase의 활성화를 통한 세포사멸 유도11
Figure	4.	급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 미토콘드리아 막의 탈 분극화와 관련된 세포사멸 유도13
Figure	5.	급성골수성백혈병세포 HL60에서 에리불린에 의한 G2/M 세포주기 정지 유도15
Figure	6.	급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 세포 분화 유도 효과
Figure	7.	급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 세포 분화성숙 유도 효과18

서 론

골수성 백혈병은 전체 암 발생의 1%를 차지하고 주로 50세 이상의 성인에게서 발생한다. 골수성 백혈병은 급성과 만성으로 나뉘고 그 중 급성골수성백혈병은 가장흔한 형태의 백혈병으로 골수성 백혈구의 분화 단계 중 초기 단계에 있는 전구세포인 골수 모세포가 미분화 상태로서 축적하고 비정상적인 증식을 하는 것이 특징인혈액 악성종양이다 [1-2].

급성골수성백혈병의 치료법은 크게 항암제를 사용하는 화학요법, 방사선요법, 골수이식요법으로 나뉜다. 화학요법의 표준 치료법으로 사용되는 항암제는 다우노루비신, 아이다루비신, 시타라빈을 이용한 병용요법이 쓰이고 있다. 하지만 이러한 치료법은 지난 몇십 년간 사용된 오래된 화학 요법에 기반하고 있고 그에 대한 문제점으로 약물에 대한 높은 독성과 기존 약물에 대한 저항성, 높은 재발 위험성이 나타나므로 급성골수성백혈병을 효과적으로 치료할 수 있는 새로운 화학 요법제의 연구와 개발이 필요하다 [3-4].

에리불린은 현재 전이성 유방암과 지방육종의 치료에 쓰이고 있는 약물로 할라벤이라는 상표명으로 판매되고 있다. 에리불린은 콜라젠으로 이루어진 해면 스펀지에서추출 및 분리한 halichondrin B에서 얻어진 천연 화합물이다 [5-6]. 에리불린은 세포골격을 구성하는 튜불린에 특이적으로 작용하는데 튜불린이 미세소관으로 중합되는 것을 방해함으로써 정상적인 세포분열이 일어나지 못하게 하여 암세포가 사멸하는 기전으로 항암효과를 나타낸다. 에리불린은 다른 미세소관 중합 억제제들과는 다르게 미세소관 자체의 단축에는 영향을 주지 않고 중합만을 방해한다는 것이 특징이고 세포의 미세소관 말단에 결합하여 중합을 방지하고 G2/M기에서의 세포주기 정지를 유도함으로써 작용하여 세포 분열을 방해하고 세포 사멸을 유발함으로써 암세포의 성장을 억제한다 [8-12]. 현재 에리불린은 전이성 유방암 [8], 폐암 [14], 지방육종 [10], 골육종 [11], 교모세포종 [12], 자궁육종 [13] 등 다양한 고형암에서 항 혈관 형성 [17], 항증식 [18], 항암효과 [8-14] 를 가진다고 연구된 바가 있다. 하지만 급성골수성백혈병에서 에리불린의 효과에 관한 연구는 알려진 바가 없으므로 본 연구에서는 급성골수성백혈병 세포에서의 에리불린의 효능을 평가하고 신호기전에 대해 연구하고자 하였다.

재료 및 연구방법

1. 시약 & 항체

이 실험에 사용된 약물인 Eribulin mesylate를 3차 증류수에 희석하여 필요한 농도 로 사용하였다. 유세포 분석기를 이용한 실험을 하기 위한 항체들은 anti-human anti-human CD11b-PE, anti-human CD14-PE, ICAM-1-PE, anti-human HLA-DR-FITC, Mouse IgG1-PE-isotype control, Annexin V-FITC는 BD Bioscience (San Diego, CA, 미국)에서 구입하였고 anti-hCCR1-PE, anti-hCCR2-PE는 R&D Systems (Minneapolis, MN, 미국)에서 구입하였다. Caspase 활성도를 측정하기 위 한 시약인 FITC-DEVD-FMK, FITC-LEHD-FMK는 eBioscience (Atlanta, GA, 미국)에서 구입하였다. 세포 생존율 측정을 위한 Celltiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay는 promega에서 구입하였다. 미토콘드리아 막 전위 분석을 위한 DiOC₆(3)(3,3'-DihexyloxacarbocyanineIodide)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, 미국) 에서 구입하였다. Cytochrome C 의 방출량을 확인하기 위해 세포질 추출 준비는 Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents가 사용되었고 ThermoFisher에서 구 입하였다. 세포 주기 분석을 위한 Propidium iodide(PI)/RNase staining buffer는 BD pharmingen (San Diego, CA, 미국)에서 구입하였다. Western blot을 위한 시약인 Western ECL substrates는 BIO-RAD (Hercules, CA, 미국)에서 구입하였고 항체인 anti-cleaved caspase-7, anti-cleaved anti-cleaved caspase-3, anti-cleaved PARP, anti-Bcl-xL, anti-Bak, anti-Bax, anti-Mcl-1, anti-CyclinD1, anti-CyclinD3 , anti-CDK4, anti-DK6, anti-p21^{cip1}, anti-p27^{kip1}, anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP, anti-Mouse IgG(H+L)-HRP는 cell signaling technology (Beverly, MA, 미국)에서 구입하였다. anti-GAPDH, anti-Bcl-2, anti-CDK2, anti-CyclinE, anti-cytochrome C는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, 미국)에서 구입하 였다.

2. 세포 배양

본 연구에서 쓰인 세포는 급성골수성백혈병 세포주 HL60이다. 세포 배양에 쓰인 배지는 소태아혈청 (GibcoBRL) 10%와 페니실린-스트렙토마이신 1%를 첨가한

RPMI1640 배지 (GibcoBRL, Grand Island, NY, 미국)가 사용되었다. 세포는 37℃, 5% CO₂ 배양기의 조건에서 배양되었고 배지는 2~3 일에 한 번씩 교체해주며 계대 배양 해주었다.

3. 세포 생존율 측정

24 well plate에 HL60 세포를 1x10⁵cells/well로 seeding하고 에리불린을 0, 0.5, 1, 2 nM로 농도별로 처리하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 72시간이 지난 후 96 well plate에 세포를 200μl씩 옮기고, 각 well 마다 Celltiter 96® Aqueous One Solution을 20μl 처리하여 알루미늄 호일로 96 well plate 를 감싸 약 4시간 동안 37℃ incubator 에서 배양해주고 PowerWave XS2 Microplate 분광 광도계 (BioTek, Winooski, VT, 미국)를 사용하여 490 nm에서 측정을 통해 흡광도를 분석하여 정량한다.

4. 세포사멸에 대한 유세포 분석기 분석

에리불린에 의해 영향을 받아 세포사멸이 일어나고 있는 세포를 확인하기 위하여 위의 실험과 동일하게 HL60 세포를 plate에 seeding하였다. 그리고 에리불린을 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 배양하고 72시간이 지났을 때 세포를 수거한 후 phosphate buffered saline (PBS)에 2% FBS를 추가하여 제조한 FACs Buffer를 이용하여 2번 세척해준다. 그 후, Annexin V (BD pharmingen) 로 실온에서 15분 동안 염색하여 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 세포를 분석하여 Annexin V 양성세포의 비율을 통해 세포사멸이일어난 세포의 비율을 확인한다.

5. Caspase 활성도 측정을 위한 유세포 분석기 분석

살아있는 세포에서 활성화 된 Caspase를 확인하기 위하여 60mm plate에 HL60 세포를 $1x10^5$ cells/well로 seeding한 후, 에리불린을 0, 0.5, 1, 2 nM로 처리하여 37° C, 5% CO_2 배양기에서 배양하고 72시간이 지났을 때 Caspase 3 활성 측정을 위한 FITC-DEVD-FMK와 Caspase 9 활성 측정을 위한 FITC-LEHD-FMK를 각 1μ l 처리하고

알루미늄 호일을 사용해 빛을 차단해준 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 동안 염색하였다. 그 후, 세포를 수거하여 FACs Buffer로 2회 세척하고, PBS를 약 300 μ I 추가해준 후 FACSCalibur flow cytometer를 사용하여 세포의 Caspase 활성도를 측정한다.

6. 미토콘드리아 막전위 측정을 위한 유세포 분석기 분석

DiOC₆(3)는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 대해 선택적인 세포 투과성을 지닌 표지자로 미토콘드리아의 막 전위에 따라 미토콘드리아의 세포질에 축적된다. 24 well plate에 HL60 세포를 $1x10^5$ cells/well로 seeding 하고 에리불린을 농도별로 처리하여 37° C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 72시간이 지났을 때 각 well 마다 DiOC₆(3)를 5μ M 처리해주고 빛을 차단하여 37° C, 5% CO₂ 배양기에서 30분동안 염색하였다. 그 후, 세포를 수거하여 PBS로 2회 세척하고 PBS를 약 300μ I 추가해준 후 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 DiOC₆(3) 양성 세포의 비율을 분석한다.

7. Cytochrome *C* 방출량 측정

세포사멸을 유도하는 인자인 Cytochrome C의 발현량을 확인하기 위해 에리불린을 농도별로 처리한 후 72시간 동안 배양된 HL60 세포를 수거하여 PBS로 세척한다. Cytoplasmic Extraction Reagent (CER) I 과 단백질분해효소 억제제를 처리하고 15초간 Vortex 해준 후, 얼음에서 10분간 배양한다. 그리고 CER Π 를 처리하여 얼음에 1분간 배양한 후, 5분동안 16,000g 원심분리를 하여 상등액만 분리해 Western blot과 동일한 방법으로 gel loading한다. 그 후 , anti-cytochrome C를 사용하여 immunoblotting하여 검출된 단백질을 확인한다.

8. 세포주기에 대한 유세포 분석기 분석

에리불린이 처리 되었을때 세포주기의 변화를 관찰하기 위해 세포의 세포주기 내에 서의 DNA 함량을 확인하였다. 60 mm plate에 HL60 세포를 $1 \text{x} 10^5 \text{cells/well}$ 로 seeding 한 후 에리불린을 0, 0.5, 1, 2 nM로 처리하고 $37 ^{\circ}$ C, $5 ^{\circ}$ CO $_2$ incubator에

배양하였다. 72시간이 지났을 때 세포를 수거하고 PBS로 2회 세척하고, -20℃, 75% 에탄올을 1ml 첨가해주어 하루동안 고정시킨다. 그 후, FACs Buffer로 2회 세척하고 Propidium iodide(PI)/RNase A(BD pharmingen)를 500µl씩 처리해주고 빛을 차단한 상태로 실온에서 15분동안 염색해준다. 염색 된 세포를 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 세포의 세포주기를 분석한다.

9. 세포 표면 표지자에 대한 유세포 분석기 분석

각 세포에서 특징적으로 발현하는 항원들을 확인하기 위해 24 well plate에 HL60 세포를 1x10⁵cells/well로 seeding하였다. 그리고 에리불린을 0, 0.5, 1, 2nM로 처리하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고 72시간이 지났을 때 세포를 수거해 FACs Buffer로 2회 세척해준다. 그 후, anti-human CD11b-PE, anti-human CD14-PE, anti-human ICAM-1-PE, anti-human CCR1-PE, anti-human CCR2-PE, anti-human HLA-DR-FITC 와 각각 PE와 FITC Mouse IgG isotype control을 4℃에서 30분 동안염색한다. 염색이 된 세포를 PBS로 2회 세척해주고 세포를 PBS에 부유시켜 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 세포에서 발현하는 표면항원의 발현을 분석한다.

10. Western blot 분석

에리불린을 농도별로 처리한 후 72시간 동안 배양된 HL60 세포를 걷어낸 후 PBS 세척과 원심분리를 통해 세포를 얻어낸다. 세포에 RIPA lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholic acid, 0.1% SDS, 1mM PMSF), 단백질분해효소 억제제 혼합제 (AEBSF 1mM, Arotinin 800mM, Bestatin 50µM, E64 15µM, Leupeptin 20µM, Pepstatin A 10µM)를 이용해 용해시킨다. 용해된 세포를 13,200rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 얻어내고 Bicinchoninic acid (BCA) 단백질 분석 시약 (Thermo fisher, Waltham, MA, 미국)으로 정량 하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하여 Nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 항체와 단백질의 비 특이적인 결합을 막기 위해 5% 무지방 탈지유 (BD Difco, Bedford, MA, 미국) in Phosphate buffered saline with tween20

(PBST)로 상온에서 shaker 위에서 2시간 동안 교반하였다. 그 후 PBS로 3회 세척해준 후, 1차 항체를 5% 무지방 탈지유 in PBST에 희석시켜 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. PBST로 세척한 후, 2차 항체를 PBST에 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 그 후, PBST로 세척하여 western ECL blotting 기질 (Bio-Rad, Hercules, CA, 미국)로 특이적인 단백질을 검출하였다.

11. 통계 처리

모든 결과는 3번 이상 실행된 독립적인 실험에 의한 평균 \pm 표준 오차(SEM)를 사용하여 통계처리 하였다. 얻은 결과 값을 분석하기 위해 GraphPad prism7.0 소프트웨어(GraphPad, San Diego, CA, 미국)를 사용하였다. 또한, 모든 값은 Tukey's range test에 따른 one way ANOVA에 의해 분석되었고 차이는 p<0.05 (95% confidence intervals)로 유의함을 보여주었다.

결 과

1. 급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 세포독성 유발효과

급성골수성백혈병 세포에 에리불린이 처리되었을 때 세포독성을 가지는지 확인하기 위해 0, 0.5, 1, 2 nM로 처리하여 72시간 후 MTS Assay를 이용해 세포 생존율을 확인하였다. HL 60 세포주에서 에리불린을 농도 (0, 0.5, 1, 2 nM)에 따라 처리하여 분석하였을 때, 세포 생존율이 에리불린의 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 보아 에리불린이 급성골수성백혈병에서 세포독성을 유발한다는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 에리불린에 의한 세포 생존율의 감소가 세포사멸과 연관이 있는지 확인하기 위해 Annexin V를 사용해 염색하여 유세포 분석기로 세포 분석을 한 결과, 세포사멸이 일어났을 때 증가하는 Annexin V 양성 세포의 비율이 에리불린의 농도가 높아질수록 증가하였다 (Fig. 2). 이를 통해 에리불린은 급성골수성백혈병 세포에서 세포독성을 가지기 때문에 세포 생존율이 감소하고 이는 세포사멸과 연관이 있다는 것을 확인하였다.

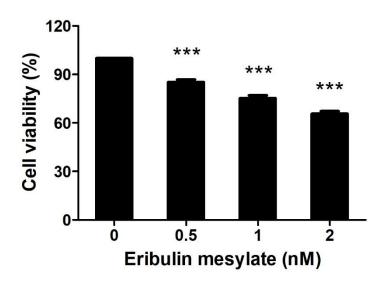


Figure 1. 급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 세포독성 효과

HL60 세포를 Eribulin 0, 0.5, 1, 2nM 로 처리 후 72시간 동안 배양했다. 에리불린의 농도에 따른 세포 생존율 결과를 막대그래프로 표시하였다. 세포 생존율은 MTS asssy를 이용하여 분석하였다.

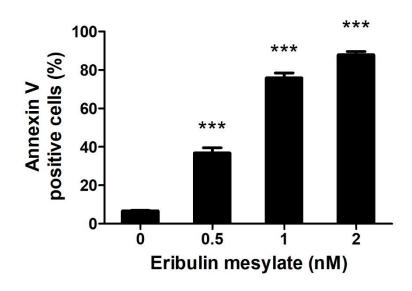


Figure 2. 급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 세포사멸 유도 효과

에리불린을 0, 0.5, 1, 2nM 처리 하고 72시간 지난 후 세포 사멸의 유세포 분석을 통해 확인하였다. 세포 사멸이 진행 중인 세포의 비율은 Annexin V 양성 세포의 비율로 결정된다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다.; *, p <0.05, ***, p <0.001. * 실험군의 결과값은 대조군과 유의하게 다르다.

2. 급성골수성백혈병에서 에리불린에 의한 Caspase 활성화를 통한 세포사멸 기전

에리불린에 의한 HL60 세포의 세포독성이 세포사멸 기전을 유도한다는 것을 확인하였고 그와 관련된 세포사가 세포사멸에 필수적이라고 알려진 Caspase 효소들을 매개로 하는 경로를 거치는지 확인하기 위해 그와 관련된 단백질 분석을 Western blot Assay를 통해 확인하였다. 에리불린의 농도가 높아질수록 cleaved caspase-3, -7, -9와 -PARP의 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 3A). 또한, Caspase 활성도를 확인하는 시약인 FITC-DEVD-FMK와 FITC-LEHD-FMK를 염색하였을 때 에리불린의 농도 의존적으로 caspase-3와 9의 활성도가 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 3B). 이를 통해 에리불린에 의한 급성골수성백혈병의 세포사멸 기전은 caspase 경로에 의존적으로 나타나는 것을 확인하였다.

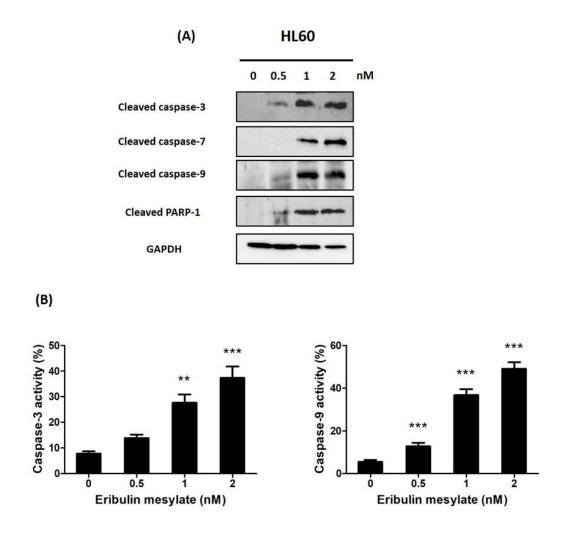


Figure 3. 급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 Caspase의 활성화를 통한 세포사멸 유도

(A) 전체 세포 추출물을 이용해 Cleaved caspase -3, -7, -9 및 PARP에 대해 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. GAPDH는 anti-GAPDH mAb로 다시 반응시켜 동일한 로딩을 확인했다. (B) 급성 골수성 백혈병 세포에서 Caspase-3 및 9 효소 활성은 유세포 분석을 통해 측정되었다. 실험은 4회 반복되었고 데이터는 평균 ± SEM.; ***, p <0.001로 표시된다. * 실험군의 결과값은 대조군과 유의하게 다르다.

3. 급성골수성백혈병세포에서 에리불린에 의한 미토콘드리아 막의 탈 분극화와 관련된 세포사멸 유도

에리불린에 의한 급성골수성백혈병 세포의 세포사멸 과정이 미토콘드리아 막 전위의 변화와 관련이 있는지 확인하기 위해 막 전위를 측정하였다. 에리불린을 농도별로 처리하고 72시간이 지난 후 살아있는 세포에서 미토콘드리아 막 전위를 감지할수 있는 DiOC₆(3)로 염색했을 때, 에리불린의 농도 의존적으로 DiOC₆(3) 양성 세포가 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 4A). 또한, 미토콘드리아로부터 세포질로 방출되는 Cytochrome C의 발현을 확인하였을 때 에리불린의 농도가 높아질수록 발현량이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 4B). 그리고 미토콘드리아의 기능에 중요한 역할을 담당하고 있는 BCL-2 단백질 계열 중 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2, Bcl-xL, MCL-1의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였고, pro-apoptotic 단백질인 Bax와 Bak이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 4C). 이 결과들을 통해 에리불린에의한 세포사멸은 미토콘드리아 막의 탈 분극화가 유도되고 그에 따른 기능 손상에의한 영향을 받아 일어난다는 것을 확인하였다.

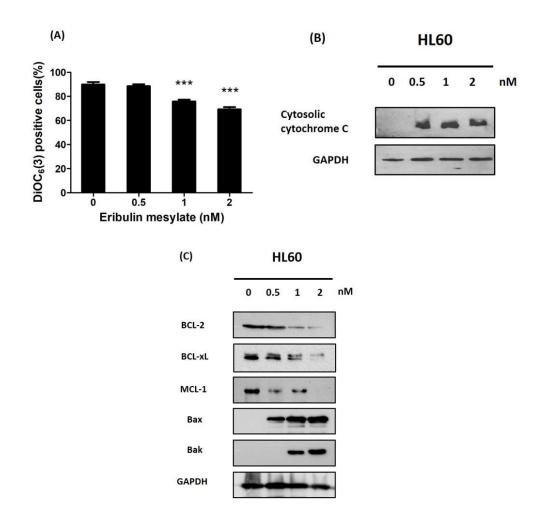


Figure 4. 급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 미토콘드리아 막의 탈 분극화와 관련된 세포사멸 유도

(A) DiOC₆(3)의 형광 강도 감소는 미토콘드리아 막 전위의 손실과 함께 세포에 표시된다. 급성골수성백혈병 세포에서 에리불린 처리는 미토콘드리아 막의 탈분극을 유도했다. (B) 급성골수성백혈병 세포에서 에리불린을 처리하고 72시간이 지난 후 사이토크롬 *C*가 미토콘드리아에서 세포질로 방출된다. anti-GAPDH mAb를 사용해 동일한 로딩을 확인했다. (C) anti-apoptosis 단백질, BCL-2, BCL-X1, MCL-1은 감소하였고 pro-apoptosis 단백질인 Bax 및 Bak은 농도 의존적으로 증가한 것을 웨스턴 블롯으로 평가했다. anti-GAPDH mAb로 다시 반응시켜 동일한 로딩을 확인했다.

4. 급성골수성백혈병세포에서 에리불린에 의한 세포주기에 미치는 영향

급성골수성백혈병 세포에서 에리불린에 의한 세포사멸이 세포주기에 어떤 영향을 끼치는지 확인하기 위해 에리불린을 농도별로 처리한 후, Propidium iodide(PI)/RNase로 염색하였다. 그 후 유세포 분석기를 통해 세포 주기를 분석한 결과, 에리불린의 농도 의존적으로 G2/M기 구간을 차지하는 세포의 비율은 감소하고 G2/M기세포의 비율이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 5A). 세포주기를 조절하는 단백질인 CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, Cyclin B1, Cyclin D1, Cyclin D3 의 발현은 감소하고 사이클린 의존성 인산화효소 억제제인 p27kip1은 발현은 증가하였다 (Fig. 5B). 이를 통해 에리불린이 급성골수성백혈병 세포에서 세포 주기 구간 중 G2/M기구간을 정지시켜 세포 증식을 억제하고 세포사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.

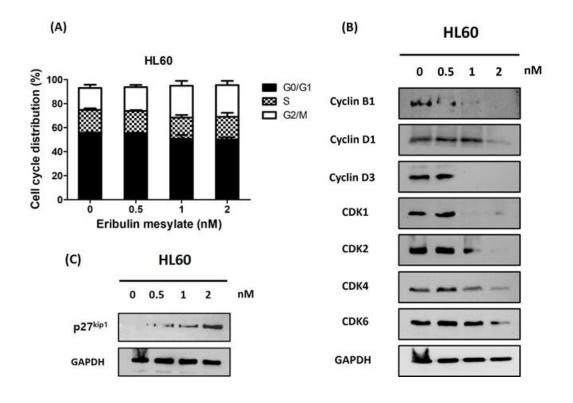
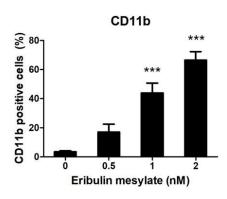


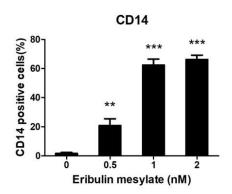
Figure 5. 급성골수성백혈병세포 HL60에서 에리불린에 의한 G2/M 세포주기 정지 유도

(A) 표시된 농도의 에리불린을 HL60 세포에 처리 후 72시간 동안 배양하였다. 유세포 분석 후 대표적인 그래프 및 정량적 세포주기 분석 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다.; **, p <0.01, ***, p <0.001. * 실험군은 대조군과 유의하게 다르다. (B, C) G2 / M 단계 관련 단백질, Cyclin B1, Cyclin D1, Cyclin D3, CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 및 p27kip1의 발현 수준은 웨스턴 블롯에 의해 검출되었다. anti-GAPDH mAb로 다시 반응시켜 동일한 로딩을 확인했다.

5. 급성골수성백혈병세포에서 에리불린에 의한 세포 분화 및 분화성숙 유도 효과

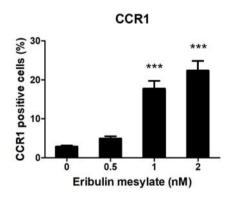
에리불린이 급성골수성백혈병 세포의 미성숙한 세포의 분화에 영향을 미치는지 조사하기 위해 세포 분화 관련 표면 항원인 CD11b와 CD14의 발현을 분석한 결과 두항원의 발현이 에리불린의 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 6). 이를 통해 에리불린이 급성골수성백혈병 세포의 미성숙한 세포가 세포의 증식은 멈추고 성숙한 세포로의 분화과정을 거치도록 유도한다는 것을 확인하였다. 또한 분화를 시작하고 성숙하는지 과정을 확인하기 위해 표면 항원 CCR1, CCR2, ICAM-1, HLA-DR의 발현을 분석하였다. 그 결과 에리불린의 농도 의존적으로 모든 표면 항원들의 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 7). 이러한 결과를 통해 에리불린이 급성골수성백혈병 세포에서 미성숙한 세포의 분화와 성숙을 유도하여 최종적으로 세포의 증식을 억제하고 세포사멸에 이르게 한다는 것을 확인하였다.

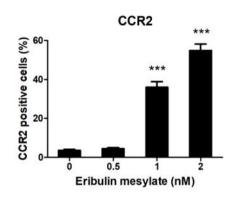


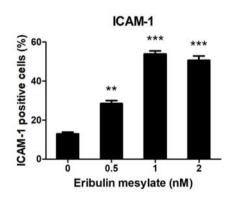


Fiure 6. 급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 세포 분화 유도 효과

급성골수성백혈병 HL60 세포에서 에리불린으로 72시간 처리 한 후 세포 분화 표면 항원 CD11b 및 CD14의 발현을 유세포 분석기를 통해 분석되었다. 실험은 3회 반복되었고 데이터는 평균 \pm SEM.; ***, p <0.001로 표시된다. * 실험군의 결과값은 대조군과 유의하게 다르다.







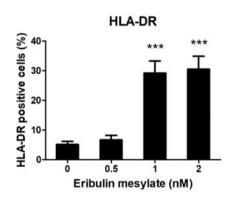


Figure 7. 급성골수성백혈병세포 HL60 에서 에리불린에 의한 세포 분화성숙 유도 효과

급성골수성백혈병 HL60 세포에서 에리 불린을 처리하고 72시간 배양 후 세포 성숙 관련 표면 항원 CCR1, CCR2, ICAM-1 및 HLA-DR의 발현을 유세포 분석기를 통해 분석하였다. 실험은 3회 반복되었고 데이터는 평균 \pm SEM.; ***, p <0.001로 표시된다. * 실험군의 결과값은 대조군과 유의하게 다르다.

고 찰

급성골수성백혈병은 골수에서 만들어지는 골수성 백혈구의 분화 단계 중 초기의 세 포인 골수 모세포가 성숙 과정을 거치지 못하고 골수 내에 축적되고 비정상적인 증 식을 함으로써 발병한다 [3-4]. 골수나 말초혈액에서 정상인의 혈액에서는 골수 모 세포가 5% 미만을 차지하지만 골수 모세포가 차지하는 비율이 20% 이상이면 급성 골수성백혈병으로 진단한다 [29]. 급성골수성백혈병의 발병 원인은 정확하게 알려지 지 않았다. 많은 연구에 따르면 방사선 노출, 염색체의 구조적 이상 및 돌연변이, 벤 젠 및 페인트와 같은 화학물질에 장기간 노출되었을 때 영향을 끼친다고 말한다. 급성골수성백혈병의 증상은 빈혈, 발열, 출혈, 골 통증, 체중감소, 림프선 및 간과 비 장의 종대 등으로 알려져 있다 [5]. 치료법으로는 2~3가지의 항암제를 병용하는 복 합화학요법, 방사선요법, 조혈모세포 이식으로 크게 나눌 수 있고 최근 들어서 항체 를 이용한 치료제를 사용하는 표적 치료법이 주목을 받고 있다. 1차적으로 행해지 는 치료법은 nucleoside analoque인 시타라빈과 다우노루비신이나 이다루비신과 같 은 topoisomerase Ⅱ inhibitor 항암제를 병합하여 사용하는 것이 표준 치료법이다 [21]. 이 항암제의 작용 기전은 세포 내 DNA 합성을 저해하는 방식으로 백혈병 세 포에 독성을 유발하지만 정상적인 혈구세포, 입안, 장 점막이나 피부, 간세포의 독성 을 함께 유발하기 때문에 다양한 합병증이 발생할 수 있어 특히 나이가 많은 환자 에서는 치명적인 부작용이 발생할 수 있으며, 치료 관련 사망률이 높다. 특히 다우 노루비신과 이다루비신은 누적 투여 용량이 400mg/m2 이상을 넘어가면 심각한 심 근 기능 저하를 일으킬 수 있어, 항암제에 반복적으로 노출되는 경우 심부전증 발 생 위험이 크다 [20,27]. 항암제 치료를 받은 급성골수성백혈병 환자의 50~70%가 재발할 수 있고, 동종 조혈모세포 이식을 받더라도 약 20~30% 환자가 재발을 경험 하여 기존 항암제에 대한 약제 내성을 보이기 때문에 급성골수성백혈병을 치료할 효능이 좋은 새로운 치료제의 개발이 필요하다 [1-4].

에리불린은 콜라젠으로 이루어진 해면 스펀지에서 추출한 천연 화합물로 현재 유방 암과 지방육종의 치료에 쓰이고 있는 약물이다. 에리불린은 세포골격을 구성하는 튜불린에 특징적으로 반응하여 유사분열 억제기전을 통해 G2/M 세포주기 차단, 유사분열 방추사를 방해함으로써 세포분열을 방해하고 세포사멸을 유도한다. [5-8] 에리불린이 다양한 고형암에서 항 세포증식, 항 혈관 형성, 항암효과를 가진다고 많은

연구가 되어있으나 혈액암과 급성골수성백혈병에서의 항암효과는 연구된 바가 없다 [8-18].

또한 백혈병 세포처럼 미분화된 세포의 분화 연구에서는 비정상적인 세포의 증식이 억제됨에 따라 최종 분화 세포에서 특이적으로 발현하는 표면 항원들을 확인함으로 써 미분화된 세포의 분화와 성숙이 진행되는 방향을 확인하여야 하고 결국 세포사멸에 이르게 되는지 확인해야 한다 [1-2,15].

본 연구에서 에리불린을 급성골수성백혈병 세포주인 HL60에 농도별로 처리하였을 때 에리불린의 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하였고 그에 따라 세포사멸이일어나는 세포의 비율도 증가하는 것을 확인하였다. 이 세포사멸을 거치는 경로가 Caspase와 미토콘드리아 경로의 활성화를 통해 일어나는 것을 확인하였다. 그리고 세포주기를 확인하였을 때 많은 세포주기를 조절하는 단백질의 조절을 통해 G2/M기의 정지를 유도한다는 것을 확인하였다. 미분화된 세포의 분화 방향을 확인하기위해 과립구 표면 항원인 CD11b와 단핵구 및 대식세포의 표면 항원인 CD14와 골수성 백혈구의 최종 분화 단계인 대식세포에서 발현한다고 알려진 CCR1, CCR2, ICAM-1, HLA-DR을 확인하였다 [7]. 모든 표면 항원들의 발현이 에리불린의 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였으므로 에리불린이 미분화된 세포의 증식은 억제하고 분화 및 성숙 과정을 유도함으로써 세포사멸에 이르게 한다는 것을 확인하였다.

위의 연구 결과들을 바탕으로 미분화된 세포에서 분화 및 성숙 과정이 일어나는지 mRNA와 단백질 수준에서 확인하는 심화된 연구를 진행할 것이다. 그리고 세포사와 관련된 여러 가지 신호분자들에 관한 연구가 필요하고 세포사멸을 거치는 경로가 미토콘드리아 경로의 활성화임을 확인하였으므로 BCL-2 억제제와 에리불린의 병용연구에 주목할 것이다. 또한 HL60 세포주뿐만 아니라 다양한 급성골수성백혈병 세포주를 이용하여 심화된 연구가 진행되어야 한다. 약물의 효과를 In vitro 실험상에서 확인하였으므로 In vivo 상에서 마우스 이종이식 모델을 통한 에리불린의 안전성과 효능을 확인하는 연구가 필요하며 현재 급성골수성백혈병에 쓰이는 약물과 에리불린을 병용하여 연구함으로써 임상에 응용될 가능성을 확인하는 연구가 진행되어야 할 것이다.

이 연구는 급성골수성백혈병에서 새로운 치료제로서의 에리불린의 가능성을 제시하였다. 에리불린은 이미 고형암에서 승인되어 활발히 사용되고 있는 약제이며, 위험

한 부작용이 없어 전이성 유방암 환자에서 장기간 투여되는 경우도 흔하다 [19,20]. 따라서 백혈병 환자에서 치료제로서 에리불린의 안전성에 대한 우려를 줄이고, 임상 연구를 시도함에 있어서 유리한 면이 있다. 또한 에리불린은 기존의 백혈병 항암제가 가진 DNA 합성 억제, 세포 자멸 유도 이외에, 세포의 분화와 성숙을 유도한다는 새로운 기전이 밝혀짐에 따라 기존 항암제에 내성을 가진 환자들을 치료할 수있는 새로운 기전이 될 수 있고, 비교적 낮은 농도의 약물이 투여되어도 항암 효과가 좋은 것을 확인하였으므로 기존 항암제와의 병합 치료 시의 효과도 기대된다.

결론적으로 에리불린은 급성골수성백혈병 세포에서 세포독성과 세포사멸 유도 효과 가 있으며 미성숙 백혈병 세포의 분화와 성숙을 유도하여, 새로운 백혈병 치료제로 서의 가능성이 있다.

참 고 문 헌

- 1. Sook-Kyoung Heo, Eui-Kyu Noh, Dong-Joon Yoon, Jae-Cheol Jo, Yunsuk Choi, SuJin Koh, Jin Ho Baek, Jae-Hoo Park, Young Joo Min, Hawk Kim. Radotinib Induces Apoptosis of CD11b+ Cells Differentiated from Acute Myeloid Leukemia Cells/ PLoS One. 2015 Jun 12;10(6):e0129853.
- 2. Sook-Kyoung Heo, Eui-Kyu Noh, Dong-Joon Yoon, Jae-Cheol Jo, SuJin Koh, Jin Ho Baek, Jae-Hoo Park, Young Joo Min, Hawk Kim. Rosmarinic acid potentiates ATRA-induced macrophage differentiation in acute promyelocytic leukemia NB4 cells. Eur J Pharmacol. 2015 Jan 15;747:36-44 Epub 2014 Dec 3.
- 3. Sook-Kyoung Heo, Eui-Kyu Noh, Jeong Yi Kim, SungHoo Jegal, Yookyung Jeong, Jaekyung Cheon, SuJin Koh, Jin Ho Baek, Young Joo Min, Yunsuk Choi, Jae-Cheol Jo. Rhein augments ATRA-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. Phytomedicine. 2018 Oct 1;49:66-74. Epub 2018 Jun 21.
- 4. Sook-Kyoung Heo, Eui-Kyu Noh, Jeong Yi Kim, Jae-Cheol Jo, Yunsuk Choi, SuJin Koh, Jin Ho Baek, Young Joo Min, Hawk Kim. Radotinib induces high cytotoxicity in c-KIT positive acute myeloid leukemia cells. Eur J Pharmacol. 2017 Jun 5;804:52-56. Epub 2017 Mar 18.
- 5. Jonathan A. Webster and Keith W. Pratz. Acute myeloid leukemia in the elderly: therapeutic options and choice Leuk Lymphoma. 2018 Feb; 59(2): 274–287
- 6. Xue Yang and Jianxiang Wang. Precision therapy for acute myeloid leukemia.

- J Hematol Oncol. 2018; 11: 3.
- 7. I De Kouchkovsky and M Abdul 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update' -Hay Blood Cancer J. 2016 Jul; 6(7): e441.
- 8. T. M. Kadia, F. Ravandi, J. Cortes, and H. Kantarjian, New drugs in acute myeloid leukemia. Ann Oncol. 2016 May; 27(5): 770–778.
- 9. Ari Pelcovits, Rabin Niroula. Acute Myeloid Leukemia: A Review. R I Med J(2013) . 2020 Apr 1;103(3):38-40.
- 10. Kenta Watanabe, Yoshihiro Yui, Satoru Sasagawa, Kayo Suzuki, Masahiko Kanamori, Taketoshi Yasuda, and Tomoatsu Kimura Low-dose eribulin reduces lung metastasis of osteosarcoma in vitro and in vivo Oncotarget. 2019 Jan 4; 10(2): 161–174.
- 11. Wei Wen, Emily Marcinkowski, David Luyimbazi, Thehang Luu, Quanhua Xing, Jin Yan, Yujun Wang, Jun Wu, Yuming Guo, Dylan Tully, Ernest S. Han, Susan E. Yost, Yuan Yuan, and John H. Yim. Eribulin Synergistically Increases Anti-Tumor Activity of an mTOR Inhibitor by Inhibiting pAKT/pS6K/pS6 in Triple Negative Breast Cancer Cells. 2019 Sep; 8(9): 1010.
- 12. Li-Yuan Cui, Shi-Feng Chu, Nai-Hong Chen, The role of chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis International Immunopharmacology Volume 83, June 2020, 106314
- 13. TAKAAKI FUJII, SHOKO TOKUDA, YUKO NAKAZAWA, SASAGU KUROZUMI, SAYAKA OBAYASHI, REINA YAJIMA, and KEN SHIRABE Eribulin Suppresses New

Metastases in Patients With Metastatic Breast Cancer In Vivo. 2020 Mar-Apr; 34(2): 917–921.

- 14. Naotaka Hayasaka, Kohichi Takada, Hajime Nakamura, Yohei Arihara, Yutaka Kawano, Takahiro Osuga, Kazuyuki Murase, Shohei Kikuchi, Satoshi Iyama, Makoto Emori, Shintaro Sugita, Tadashi Hasegawa, Akira Takasawa, Koji Miyanishi, Masayoshi Kobune & Junji Kato Combination of eribulin plus AKT inhibitor evokes synergistic cytotoxicity in soft tissue sarcoma cells. Scientific Reports volume 9, Article number: 5759 (2019)
- 15. Andrea Sbrana, Federico Paolieri, Francesco Bloise, Simona Manacorda, Amedeo Nuzzo, Enrico Sammarco, Luca Galli & Alfredo Falcone Dedifferentiated liposarcoma: when eribulin can make the difference FUTURE ONCOLOGYVOL. 16, NO. 1S, 24 Dec 2019
- 16. Tasuku Kiyuna, Yasunori Tome, Kentaro Miyake, Takashi Murakami, Hiromichi Oshiro, Kentaro Igarashi, Kei Kawaguchi, John Hsu, Manish Singh, Yunfeng Li, Scott Nelson, Michael Bouvet, Shree Ram Singh, Fuminori Kanaya, Robert M Hoffman. Eribulin Suppressed Cisplatinum- and Doxorubicin-resistant Recurrent Lung Metastatic Osteosarcoma in a Patient-derived Orthotopic Xenograft Mouse Model Anticancer Res. 2019 Sep;39(9):4775-4779.
- 17. Masamichi Takahashi, Shunichiro Miki, Kenji Fujimoto, Kohei Fukuoka, Yuko Matsushita, Yoshiko Maida, Mami Yasukawa, Mitsuhiro Hayashi, Raku Shinkyo, Kiyomi Kikuchi, Akitake Mukasa, Ryo Nishikawa, Kenji Tamura, Yoshitaka Narita, Akinobu Hamada, Kenkichi Masutomi, and Koichi Ichimura. Eribulin penetrates brain tumor tissue and prolongs survival of mice harboring intracerebral glioblastoma xenografts. Cancer Sci. 2019 Jul; 110(7): 2247–2257.

- 18. Etsuko Fujimoto,corresponding author Kazuhiro Takehara, Tamaki Tanaka, Takanori Yokoyama, Katsuyuki Tomono, Mika Okazawa-Sakai, Shinichi Okame, Yoshifumi Sugawara, and Norihiro Teramoto Uterine leiomyosarcoma well-controlled with eribulin mesylate. Int Cancer Conf J. 2019 Jan; 8(1): 33–38.
- 19. Umang Swami , Umang Shah , Sanjay Goel. Eribulin in non-small cell lung cancer: challenges and potential strategies. Expert Opin Investig Drugs. 2017 Apr;26(4):495-508.
- 20. Qinwan Huang, Lin Wang, Qian Ran, Jin Wang, Chengqiang Wang, Hui He, Li Li, Hongyi Qi. Notopterol-induced apoptosis and differentiation in human acute myeloid leukemia HL-60 cells. Drug Des Devel Ther. 2019 Jun 6;13:1927-1940.
- 21. Javier Cortes, Patrick Schöffski, Bruce A Littlefield. Multiple modes of action of eribulin mesylate: Emerging data and clinical implications. Cancer Treat Rev. 2018 Nov;70:190-198.
- 22. Sergei I Agoulnik, Satoshi Kawano, Noel Taylor, Judith Oestreicher, Junji Matsui, Jesse Chow, Yoshiya Oda, Yasuhiro Funahashi. Eribulin mesylate exerts specific gene expression changes in pericytes and shortens pericyte-driven capillary network in vitro. Vasc Cell. 2014 Mar 1;6(1):3.
- 23. Zoltán Dezső, Judith Oestreicher, Amy Weaver, Stephanie Santiago, Sergei Agoulnik, Jesse Chow, Yoshiya Oda, Yasuhiro Funahashi. Gene expression profiling reveals epithelial mesenchymal transition (EMT) genes can selectively differentiate eribulin sensitive breast cancer cells. PLoS One. 2014 Aug 29;9(8):e106131.

- 24. Ali McBride, Sara K Butler. Eribulin mesylate: a novel halichondrin B analogue for the treatment of metastatic breast cancer. Am J Health Syst Pharm. 2012 May 1;69(9):745-55.
- 25. Alessandra Malato, Giorgia Saccullo, Giovanni Fazio, Beatrice Vergara, Simona Raso, Giovanni Paolo Guarneri, Antonio Russo, Vincenzo Abbadessa, Sergio Siragusa. Drug-related cardiotoxicity for the treatment of haematological malignancies in elderly. Curr Pharm Des. 2010;16(26):2872-9.
- 26. Priyanka Pophali , Mark Litzow. What Is the Best Daunorubicin Dose and Schedule for Acute Myeloid Leukemia Induction?. Curr Treat Options Oncol. 2017 Jan;18(1):3.
- 27. Suqin Lv, Aihua Li, Haijuan Wu, and Xiaoli Wang. Observation of clinical efficacy and toxic and side effects of pirarubicin combined with cytarabine on acute myeloid leukemia. Oncol Lett. 2019 Mar; 17(3): 3411–3417.
- 28. Eisuke Kobayashi, Yoichi Naito, Naofumi Asano, Aiko Maejima, Makoto Endo, Shunji Takahashi, Yasunori Megumi, and Akira Kawai. Interim results of a real-world observational study of eribulin in soft tissue sarcoma including rare subtypes. Jpn J Clin Oncol. 2019 Oct; 49(10): 938–946.
- 29. Gevorg Tamamyan, MD, MSc, PhD, Tapan Kadia, MD, Farhad Ravandi, MD, Gautam Borthakur, MD, Jorge Cortes, MD, Elias Jabbour, MD, Naval Daver, MD, Maro Ohanian, DO, Hagop Kantarjian, MD, and Marina Konopleva, MD, PhD. Frontline treatment of acute myeloid leukemia in adults. Crit Rev Oncol Hematol. Author manuscript; available in PMC 2018 Feb 1.Published in final edited form as: Crit Rev Oncol Hematol. 2017 Feb; 110: 20–34.

영 문 요 약

Background: Acute myeloid leukemia is a hematological malignant tumor in which bone marrow cells, which are progenitor cells in the early stage of myelogenous leukocyte differentiation, accumulate in an undifferentiated state and proliferate abnormally. Cytarabine and anthracycline-based anticancer drugs are used as the main treatment, but 50~70% of patients experience recurrence. Eribulin is a drug used to treat metastatic breast cancer and liposarcoma. It is a natural compound obtained from halichondrin B extracted and isolated with a marine sponge. Its effect on acute myeloid leukemia is not yet known. In this study, the efficacy of eribulin in acute myeloid leukemia cells was evaluated and the signaling mechanism was studied.

Method: After eribulin was treated with HL60, a cell line for acute myeloid leukemia, cell viability and cell death were confirmed using MTS Assay and Annexin V staining. The pathway in which apoptosis occurs was confirmed by Caspase expression and activity and mitochondrial membrane potential through DiOC₆(3) staining. Propidium iodide (PI) staining was used to confirm the change in the cell cycle. The expression of proteins related to cell death was confirmed through Western blot assay, and the expression levels of various surface antigens, which are markers related to the differentiation and maturation of blood cells, were confirmed.

Result: When eribulin was treated at different concentrations in HL60, it was confirmed that the cell viability decreased as the concentration of eribulin was arranged, and the proportion of cells in which apoptosis occurred was confirmed that the presence of eribulin concentration increased. Later, in an experiment to confirm the pathway of apoptosis, it was confirmed that the Caspase activity increased as the concentration of eribulin increased and the mitochondrial membrane potential decreased. As a result of checking the cell cycle, it was confirmed that the G2/M phase was stopped in eribulin, and the expression of the related protein was also regulated by eribulin. In addition, when the level of expression of several surface antigens, which are markers

related to the differentiation and maturation of blood cells, was confirmed, the expression increased as the concentration of eribulin increased.

Conclusion: It has been confirmed that eribulin induces the differentiation and maturation of immature cells in acute myeloid leukemia cells, inhibits cell proliferation, and finally leads to apoptosis, so it may be used as a new therapeutic agent.

keyword: Acute myeloid leukemia, Eribulin, Cell death, Differentiation