

암세포 배양 및 배양 암세포를 이용한 대장-직장암 환자의 능동 면역 치료

—대장암 환자에서 말초혈액 임파구의 임파구아형 분포 및 세포독성—

가톨릭대학 의학부 외과학교실

장석균 · 박일영 · 강래성 · 주상용

— Abstract —

The Natural Cytotoxicity and Subpopulation of Peripheral Blood Lymphocytes in Colon Cancer Patients

Suk Kyun Chang, M.D., Il Young Park, M.D., Rae Sung Kang, M.D. and Sang Yong Choo, M.D.

Department of Surgery, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Depression of general immune reactivity has been well documented in patients with colorectal cancer as well as in patients with other types of solid tumors. Several tests of general immune function including lymphocyte levels and subpopulation and lymphocyte function assays with mitogens and antigens have shown depressed but different degree with different stage of disease.

The main effector of immune surveillance against cancer have been considered to be sensitized T lymphocyte and activated macrophages. Recently there has been increasing recognition that natural cell-mediated cytotoxicity is potentially an important antitumor mechanism especially recurrences, metastasis and prognosis. But there was a little investigation about the relation of natural killer (NK) activity, lymphocyte subpopulation, helper to suppressor ratio with clinical stage of disease, serum CEA level or differentiation.

In order to study the relation between lymphocyte subpopulation or stimulated or non-stimulated natural cytotoxicity and stage of disease, serum CEA levels, differentiation of cancer, the patients were divided into four groups: normal healthy person (10) (control, group 1), 10 colon cancer patients of stage II (group 2), 10 colon cancer patients of stage III (group 3), 10 colon cancer patients of stage IV (group 4). Authors investigated the distribution of CD4, CD8 and NK cells, natural cytotoxicity against K_{562} , SBA cultured cancer cells, CD4 to CD8 ratio, K_{562} cytotoxicity to NK cells and serum CEA levels.

The results obtained were as follows:

- 1) The peripheral blood lymphocytes count was significantly decreased only in group 4 ($1,742 \pm 847 / \text{mm}^3$) compare to control ($2,578 \pm 878 / \text{mm}^3$).
- 2) The natural cytotoxicity against K_{562} cells were significantly decreased in group 2 ($32.5 \pm 13.9\%$) ($p < 0.05$) and group 4 ($30.9 \pm 11.7\%$) than that of control (43.8 ± 4.8). But there were no significant differences in natural cytotoxicity against SBA cells.
- 3) The natural cytotoxicity against K_{562} of interleukin-2 stimulated lymphocyte was significantly increased than that of non-stimulated lymphocytes ($43.8 \pm 4.8\%$ and $26.1 \pm 2.1\%$) in both of control ($83.6 \pm 3.8\%$) and stage IV patients group ($77.1 \pm 4.6\%$) ($p < 0.001$). Also the natural cytotoxicity against

포독성은 대조군에 비하여 약간 감소하였으나 통계적 의의는 없었는데 CD4 세포는 현저하게 감소하였고 ($p < 0.01$) CD8 세포는 현저하게 증가하여 ($p < 0.05$) CD4/CD8 비가 대조군에 비하여 현저하게 감소한 반면 NK 세포가 증가하여 높은 세포독성을 나타낸 것으로 생각된다. Balsari등²¹⁾이나 London등¹⁴⁾은 비활동증인 NK 세포는 자가 암세포나 이종 암세포에 의해 자극되어 활성도가 증가한다고 하였는데 제 3군은 임파선의 암전이가 있는 군으로 전이 암세포가 NK 세포를 자극하여 작용하였을 것으로 추측된다.

그러나 같은 종류의 배양 암세포인 SBA 세포에 대한 세포독성을 보면 제 2, 3 및 4군에서 모두 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. Taksaugi등²¹⁾은 암세포에 감작되지 않은 정상인의 임파구는 배양 암세포에 대한 세포 매개성 세포 독성이 약하다고 하였는데 즉 자연 세포독성에는 NK 세포에 의한 것과 세포파괴성 T-세포에 의한 것이 있는데 SBA 세포는 NK 세포에 예민하지 않으므로 환자군에서 증가한 것이 아니라 정상대조군에서 낮은 세포독성을 나타낸 것으로 생각된다.

이러한 NK 세포성 또는 세포파괴성 T-세포에 의한 세포독성은 임파구를 자가암세포나 이종 암세포 또는 interleukin-2 자극으로 증가시킬 수 있다고 하였는데^{5,7,13,24,25)} 저자들의 실험에서 보면 Fig. 2에서 보는 바와 같이 정상대조군이나 진행된 stage IV의 환자에서도 interleukin-2 자극에 의하여 K_{562} 세포나 SBA 세포에서도 세포독성이 자극전의 세포독성에 비하여 현저하게 증가하여 ($p < 0.001$) NK 세포독성이나 세포파괴성 T-세포에 의한 세포독성을 증가시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다. 즉 대장암 환자에서는 진행되었을 경우에도 자연 세포독성이 잠재해 있으므로 면역 치료나 자극에 의하여 면역반응을 증가시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

Roder등¹⁸⁾은 NK 세포가 표적세포에 작용할 때는 형태학적으로 직접 접촉이 필수적이라고 하였으며 Bonavida와 Wright¹⁹⁾는 NK 세포나 세포파괴성 T-세포 모두 표적세포와 접촉, 파괴프로그램 진행, 암세포 용해의 순서를 경과한다고 하였다. 저자들의 실험에서 보면 비자극 임파구의 표적세포 접촉보다도 interleukin-2 자극 임파구의 접촉이 많고 그에 따른 세포독성이 증가하는 것으로 보아 직접 접촉이 선행되어야 한다는 것을 알 수 있었다. 또한 Tanaka등²²⁾이 기술한 바와 같이 암환

자에서는 NK 세포와 표적세포간의 접촉능력이 부족하여 세포독성 저하의 원인이라고 할 수 있겠다.

Wanebo등³⁰⁾은 혈청 CEA는 병의 진행정도가 클수록 그 빈도와 양이 증가한다고 하였는데 저자들의 실험에서도 stage II(제 2군)에서 30%, stage III(제 3군)에서 40%, stage IV(제 4군)에서 60%의 양성율(5 ng/ml 이상)을 보였으며 전체적으로 43%의 양성율을 보여 진단보다는 재발이나 예후 측정에 도움이 되리라고 생각한다. 한편 저자들은 CEA 양성여부에 따른 세포독성, CD4/CD8비 및 K_{562} /NK비를 비교하여 보았으나 혈청 CEA 양에 따른 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

조직의 분화도에 따른 세포독성, 임파구수, CD4/CD8비 및 K_{562} /NK 비를 보면 분화암에서는 K_{562} 에 대한 세포독성이 현저하게 감소하였으나 ($p < 0.05$) 그 이외에는 대조군과 차이가 없었다. 중등도 분화암 역시 K_{562} 에 대한 세포독성만 현저하게 감소하였다 ($p < 0.001$). 그러나 미분화암에서는 임파구수와 CD4/CD8비가 대조군에 비하여 현저하게 감소하였고 세포독성에는 차이가 없었으나 예수가 적어 앞으로 더 많은 조사와 연구가 필요할 것으로 생각된다.

맺 음 말

저자들은 대장암 환자에서 병의 진행정도, 혈청 CEA 양 또는 조직 분화도에 따른 임파구의 아형분포와 비율, 임파구 또는 interleukin-2 자극임파구의 K_{562} 세포와 SBA 배양 암세포에 대한 임파구 세포독성과의 관계를 알아 보고자 정상인 10명, 대장암 환자 30명의 말초혈액 임파구를 분리하여 임파구 항원에 대한 모노클로날 항체를 이용하여 CD4, CD8, CD16 세포 분포와 비율, ^{51}Cr -release 검사에 의한 자연세포독성과 interleukin-2 자극 세포독성 및 혈청 CEA를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 말초혈액 임파구수는 stage IV 환자군에서만, $1,742 \pm 847/mm^3$ 로 대조군($2,578 \pm 878/mm^3$)에 비하여 유의있게 감소하였다 ($p < 0.05$).

2) K_{562} 세포에 대한 세포독성을 보면 stage II 환자군($32.5 \pm 13.9\%$)과 stage IV 환자군($30.9 \pm 11.7\%$)에서 정상대조군($43.8 \pm 4.8\%$)에 비하여 유의한 감소를 나타냈다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$). 그러나 SBA 세포에 대한 세포독성은 각군 모두 대조군과 유의한 차이가 없었

다.

3) Interleukin-2 자극 임파구에 의한 K_{562} 세포독성은 대조군에서 $83.6 \pm 3.8\%$ 로 비자극 대조군($43.8 \pm 4.8\%$)에 비하여 현저하게 증가하였으며($p < 0.001$), stage IV 환자군에서도 $77.1 \pm 4.6\%$ 로 비자극 환자군($26.1 \pm 2.1\%$)보다 현저하게 증가하였다($p < 0.001$). 대조군과 환자군 사이에도 유의있는 차이가 있었다. 한편 SBA 세포에 대한 세포독성도 대조군에서 $63.7 \pm 5.4\%$ 로 비자극 대조군($31.3 \pm 4.7\%$)에 비하여 현저하게 증가하였으며 환자군에서도($53.8 \pm 5.5\%$) 비자극 환자군($30.9 \pm 1.8\%$)보다 현저하게 증가하여 잠재한 면역능을 나타내고 있다.

4) 임파구 아형 CD4, CD8, CD16 세포의 분포를 보면 stage II 환자군에서 모두 약간 감소하고 stage IV 환자군에서 CD4, CD16의 감소 CD8의 증가를 보였지만 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 stage III 환자군에서는 CD4가 $35.1 \pm 16.1\%$ 로 대조군($52.6 \pm 8.7\%$)에 비하여 현저하게 감소하였으며($p < 0.01$), CD8은 $36.6 \pm 15.4\%$ 로 대조군($30.3 \pm 5.2\%$)에 비하여 유의있게 증가하였다($p < 0.05$).

5) CD4/CD8비를 보면 stage III 환자군에서 0.93 ± 0.52 로 대조군(1.97 ± 0.44)에 비하여 현저하게 감소하였으나($p < 0.01$) 제2, 4군에서는 대조군과 차이가 없었다.

K_{562} /CD16 비를 보면 stage II 환자군에서는 대조군과 비슷하였으며 제3, 4군에서 약간 감소하였지만 통계적 유의성이 없었다.

6) 혈청 CEA는 43%에서 5 ng/ml 이상의 양성을 나타냈으며 병이 진행될수록 높은 양성과 양을 나타냈다. 그러나 세포독성 CD4/CD8 또는 K_{562} /CD16 비는 혈청 CEA양과는 유의있는 관계를 나타내지 않았다.

7) 조직 분화도에 의한 차이를 보면 K_{562} 세포독성은 중등도 분화암에서 $29.2 \pm 2.8\%$ 로 대조군에 비하여 현저하게 감소하였으나 SBA 세포에 대한 세포독성은 분화도에 따른 차이가 없었다.

이상의 결과로 보아 대장암 환자에서는 NK 세포에 의한 자연 세포독성은 감소하지만 세포독성 T-세포에 의한 세포독성은 감소하지 않으며 두가지의 세포독성은 interleukin-2에 의하여 항진될 수 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 임파구 아형 분포와 비율은 NK 세포는 모두 약간 증가하지만 임파절 전이가 있는 환자에서 보조

T-세포의 감소와 억제 T-세포의 증가가 유의있게 나타난다는 것을 알 수 있었다. 그러나 혈청 CEA와 세포독성, 임파구 아형분포 및 비율과는 유의한 관계가 없었다.

REFERENCES

- 1) Balaram P, Vasudevan DM: Quantitation of Fc receptor-bearing T-lymphocytes (TG and TM) in oral cancer. *Cancer* 52:1837, 1983
- 2) Balsari A, Fossati G, Taramelli D, Tona G, Delia D, Giardini R, Parmiani G: Allostimulation of patients' lymphocytes generates both T and NK-like cells cytotoxic for autologous melanoma. *Br J Cancer* 52:73, 1985
- 3) Berendt MJ, North RJ: T-cell mediated suppression of antitumor immunity. *J Exp Med* 151:69, 1980
- 4) Bonavida B, Wright SC: Multistage model of natural killer cell-mediated cytotoxicity involving NKCF as soluble cytotoxic mediators. *Adv Cancer Res* 49:169, 1987
- 5) 장석균, 송영택, 주상용 : 정상인에서 말초혈액 임파구의 자연파괴세포 분리 및 자연 세포파괴능 측정. *대한암학회지* 18:1, 1987
- 6) Fast L, Hansen JA, Newman W: Evidence for T cell nature and heterogeneity within natural killer (NK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) effectors: A comparison with cytolytic T lymphocytes (CTL) *J Immunol* 127:448, 1986
- 7) Grimm EA, Vose BM, Chum EW, Wilson DJ, Lotze MT, Rayner AA, Rosenberg SA: The human mixed lymphocyte-tumor cell interaction test: I. Positive autologous lymphocyte proliferative responses can be stimulated by tumor cell as well as by cells from normal tissues. *Cancer Immunol Immunother* 17:83, 1984
- 8) 한동률, 장석균, 주상용 : 대장-직장암 환자에서 SBA 대장암 세포에 대한 혈청항체 및 임파구 기능. *대장항문학회지* 5(1):11, 1989
- 9) Herberman RB, Ortaldo JR: Natural killer cells: Their role in defenses against disease. *Science* 214:24, 1981
- 10) Kaplan MS, Mino FO, Summerfeld KB, Lundak RL: Phytohemagglutinin-stimulated immune response. *Arch Surg* 110:1217, 1975
- 11) Karavodin LM, Giuliano AE, Golub SH: T lymphocyte subsets in patients with malignant

- melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 11:251, 1981
- 12) Kim US: *Lymphocyte counts in colon cancer patients. J Surg Oncol* 8:257, 1976
 - 13) Kimura H, Yamaguchi Y, Fujisawa T: *Cytotoxicity of autologous and allogenic lymphocytes against cultured human lung cancer cells: optimal conditions for the production of cytotoxic lymphocytes. Gann* 75:1006, 1984
 - 14) London L, Perussia B, Trinchieri G: *Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: expression of surface activation antigens. J Immunol* 134:718, 1985
 - 15) Lurie BB, Bull D, Zamchek N: *Diagnosis and prognosis in colon cancer based on profile of immune reactivity. J Natl Cancer Inst* 54:319, 1975
 - 16) Manousos ON, Economou J, Pathouli CH: *Disturbance of cell mediated immunity in patients with carcinoma of colon and rectum. Gut* 14:739, 1973
 - 17) Pross HF, Baines MG: *Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. 1. The effect of malignant disease. Int J Cancer* 18:593, 1976
 - 18) Roder JC, Kiessling R, Biberfeld P, Anderson B: *Target-effector interaction in the natural killer cell system: II. The isolation of NK cells and studies on the mechanism of killing. J Immunol* 121:2509, 1978
 - 19) Saranath D, Mukhopadhyaya R, Rao RS, Fakhri AR, Gangal SG: *Cell-mediated immune status in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. Cancer* 56:1062, 1985
 - 20) Steihauer EH, Doyle AT, Reed J, Kadish AS: *Defective natural cytotoxicity in patients with cancer: Normal number of effector cell but decreased recycling capacity in patients with advanced disease. J Immunol* 129:2255, 1982
 - 21) Takasugi M, Mickey MR, Terasaki PI: *Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. Cancer Res* 33:2898, 1973
 - 22) Tanaka N, Hashimoto T, Matsui T, Ohida J, Ono M, Orita K: *Natural cytotoxic reactivity of peripheral blood lymphocytes from digestive tract cancer patients against a colon cancer cell line and virus-infected Hela cells. Gann* 74:419, 1983
 - 23) Tartter PI, Steinberg B, Barron DM, Martinelli G: *The prognostic significance of natural killer cytotoxicity in patients with colorectal cancer. Arch Surg* 122:1264, 1987
 - 24) Vose BM: *Activation of lymphocyte anti-tumor response in man. Toward an understanding of effector cell heterogeneity? Cancer Immunol Immunother* 17:73, 1984
 - 25) Vose BM, Gallagher P, Moor M, Schofield PF: *Specific and nonspecific lymphocyte cytotoxicity in colon carcinoma. Br J Cancer* 44:846, 1981
 - 26) Wanebo HJ: *A review of immunologic reactivity in patients with colorectal cancer. In Neoplasms of the colon, rectum and anus, ed, Sterns MW Jr, p 169. A Wiley Medical Publication, 1980*
 - 27) Wanebo HJ, Moo YJ, Strong EW, Oettgen HO: *T-cell deficiency in patient with squamous cell cancer of the head and neck. Am J Surg* 130:445, 1975
 - 28) Wanebo HJ, Pace R, Hargett S, Katz D, Sando J: *Production of and response to interleukin-2 in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. Cancer* 57:656, 1986
 - 29) Wanebo HJ, Rao B, Attiyeh F, Pinsky C, Middleman P, Sterna M: *Immune reactivity in patients with colorectal cancer: Assessment of biologic risk by immunoparameter. Cancer* 46:1254, 1980
 - 30) Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM: *Preoperative carcinoembryonic antigen levels as a prognostic indicator in colorectal cancer. N Engl J Med* 299, 448, 1978

cell인 CD8 (cluster differentaion 8, 이하 CD8 세포) 및 natural killer cell인 CD16 (cluster differentiation 16, 이하 NK세포)를 구분하여 염색 측정하였다.

염색은 간접 면역형광 염색법을 이용하여 모노클로날 항체는 Anti-Leu-3A (CD4), Anti-Leu-2A (CD8), Anti-Leu-11B (CD16)(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, U.S.A.)를 사용하고 이차항체는 Fluorescence conjugated goat anit-mouse Ig (Becton Dckinosom Immunocytometry Systems, U.S.A., 이하 GAM-Ig FITC)를 사용하였다.

냉동 보관하였던 임파구는 37°C에서 빨리 녹여 RPMI-1649-FBS에 부유시켜 37°C 5% CO₂ 배양기에서 1시간 동안 보온시켜 유착성 대식세포나 단핵세포를 제거시킨 후 사용하였다.

(2) 면역형광 염색 : 6 ml 시험관(Falcon round bottom tube, U.S.A.)에 20 μl의 각 모노클로날 항체시약과 2×10⁷/ml의 임파구 50 μl를 넣고 서서히 혼합하여 빛에 노출되지 않도록 냉장고에서 30분간 방치한다. 2 ml의 phosphate buffered saline (Flow lab., U.S.A., 이하 PBS)으로 1회 세척한 후 이차항체인 GAM-Ig FITC 20 μl를 넣고 30분간 냉장고에서 보온한 후 PBS로 2회 원심세척한다. 50 μl 정도 남도록 상층액을 제거하고 PBS로 희석한 30% glycerol을 20 μl를 넣는다. 잘 흔들어 섞은 다음 슬라이드에 10 μl의 용액을 떨어뜨리고 덮개유리로 덮은 후 2분간 방치한 후 형광 현미경으로 양성 임파구를 계산하였다. 대조 슬라이드는 임파구 부유액과 이차항체만을 검사한 것으로 하였다.

현미경 관독은 Mercury lamp 형광현미경(Nikon Co., Japan)을 이용하였으며 오차를 줄이기 위하여 한 사람이 관독하였다. 양성 임파구 계산은 200개의 임파구를 세고 양성임파구에서 대조 슬라이드에서 양성인 임파구수를 뺀 나머지를 백분율로 계산하였다. 각 %는 CD4, CD8, CD16에 대한 백분율로 환산하여 표시하였다.

(3) CD8 세포에 대한 CD4 세포의 비율 및 NK 세포에 대한 K₅₆₂ 세포독성의 비율 : Suppressor cell에 대한 helper cell의 비율을 계산하고 CD4/CD8로 표시하였다. NK 세포의 활성도를 알아보기로 K₅₆₂에 대한 세포 파괴능을 CD16 세포(%)로 나누어 계산하고 K₅₆₂/NK로 표시하였다.

7) K₅₆₂나 SBA에 대한 세포독성은 각 환자마다 3회씩 측정하여 평균을 내고 다시 10명에 대한 평균과 오차를 계산하였으며 임파구 아형분포는 200개의 임파구 계산을 2회씩 하였으며 다시 10명의 평균과 오차를 계산하였다. 통계적 유의성은 student t-test에 의한 P값을 계산하여 표시하였다.

8) 모든 측정치는 실험에 대한 비교 관찰과 함께 혈청 CEA치에 의한 비교 및 조직 분화도에 따라 분화(well differentiated, 16명), 중등도 분화(moderately differentiated, 11명), 미분화(poorly differentiated, 3명)로 나누어 비교관찰하였다.

결 과

1) 말초혈액 임파구수

정상대조군의 임파구수는 2,578±878/mm³로 약간씩 감소하였으나 통계적 의의는 없었다. 그러나 제 4 군에서는 1,742±847/mm³로 대조군에 비하여 유의있게 감소하였다(Table 1) (p<0.05).

2) 혈청 CEA 양성을 및 K₅₆₂, SBA에 대한 세포독성과 CD4/CD8, K₅₆₂/NK의 비교

정상 대조군에서의 혈청 CEA는 모두 음성이었으며 환자 30명중 13명에서 양성을 나타내어 43%의 양성율을 나타냈으며 각군별로 나누어 보면 제 2 군에서는 30%, 제 3 군에서는 40%, 제 4 군에서는 60%의 양성율을 나타내어 병이 진행될수록 높은 양성율을 나타냈다

Table 1. The lymphocyte counts and cytotoxicity to K₅₆₂ and SBA cultured cancer cells in colon cancer patients (Mean ± SD)

Groups (10)	Lymphocyte counts/mm ³	Cytotoxicity (%)	
		K ₅₆₂	SBA
Control	2,578±878	43.8± 4.8	31.3±4.7
2	2,020±483	32.5±13.9*	30.8±4.4
3	1,958±675	37.7±16.0	29.4±3.9
4	1,742±847*	30.9±11.7**	31.0±2.3

* : p < 0.05

** : p < 0.01

() : number of samples

K₅₆₂ : erythroleukemic cell line

SBA : cultured colon cancer cell line

(6.9 ng/ml~174.5 ng/ml의 CEA치).

CEA 양성환자(13명)와 음성환자(17명)에서의 세포독성을 비교하여 보면 K₅₆₂에 대한 세포독성은 양성환자에서 33.9±14.1%, 음성환자에서 33.6±13.9%로 유의한 차이가 없었으며 SBA에 대한 세포독성은 양성환자 29.9%, 음성환자 30.7±4.2%로 차이가 없었다. 또한 CD4, CD8과 K₅₆₂/NK도 양성환자 1.48±0.95와 2.51±1.29, 음성환자 1.67±0.65와 3.42±1.74로 유의한 차이가 없었다(Table 2).

3) 임파구, IL-2 자극 임파구의 세포독성 및 형태학적 관찰

(1) 임파구의 세포독성 : 정상대조군에서 임파구의 K₅₆₂에 대한 세포독성은 43.8±4.8%, SBA에 대한 세포독성은 31.3±4.7%였다.

임파구의 K₅₆₂에 대한 세포독성을 보면 제 2군에서는 32.5±13.9%로 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으 며(p<0.05), 제 4군에서도 30.9±11.7%로 현저하게 감소하였으나(p<0.01) 제 3군에서는 37.7±16.0%로 대조군에 비하여 감소하였으나 통계적인 의의는 없었다. 또한 환자군 사이에는 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

임파구의 SBA 세포에 대한 세포독성을 보면 제 2군에서 30.8±4.4%, 제 3군에서 29.4±3.9%, 제 4군에서 31.0±2.3%로 대조군과 비슷한 수치들 보여 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1).

(2) IL-2 자극 임파구의 세포독성 : 정상대조군의 IL-2 자극 임파구의 세포독성을 보면 K₅₆₂ 세포에 대하여는 83.6±3.8%, SBA세포에 대하여는 63.7±5.4%로 임파구 세포독성에 비하여 현저하게 증가하였으며

Table 2. The lymphocyte cytotoxicity against K₅₆₂ and SBA cancer cells, helper to suppressor cell ratio and cytotoxicity to NK cell ratio by serum carcinoembryonic antigen level in colon cancer patients (Mean ± SD)

@ serum CEA level	Cytotoxicity (%)		* CD4 / CD8 ratio	* K ₅₆₂ /NK ratio
	K ₅₆₂	SBA		
CEA positive (> 5ng/ml) (13)	33.9 ± 14.1	29.9 ± 2.8	1.48 ± 0.95	2.51 ± 1.29
CEA negative (< 5ng/ml) (17)	33.6 ± 13.9	30.7 ± 4.2	1.67 ± 0.65	3.42 ± 1.74

@ : carcinoembryonic antigen
 # : helper to suppressor / cytotoxic cell ratio (CD4/CD8)
 * : cytotoxicity against K₅₆₂ cells to NK cell ratio
 () : number of samples

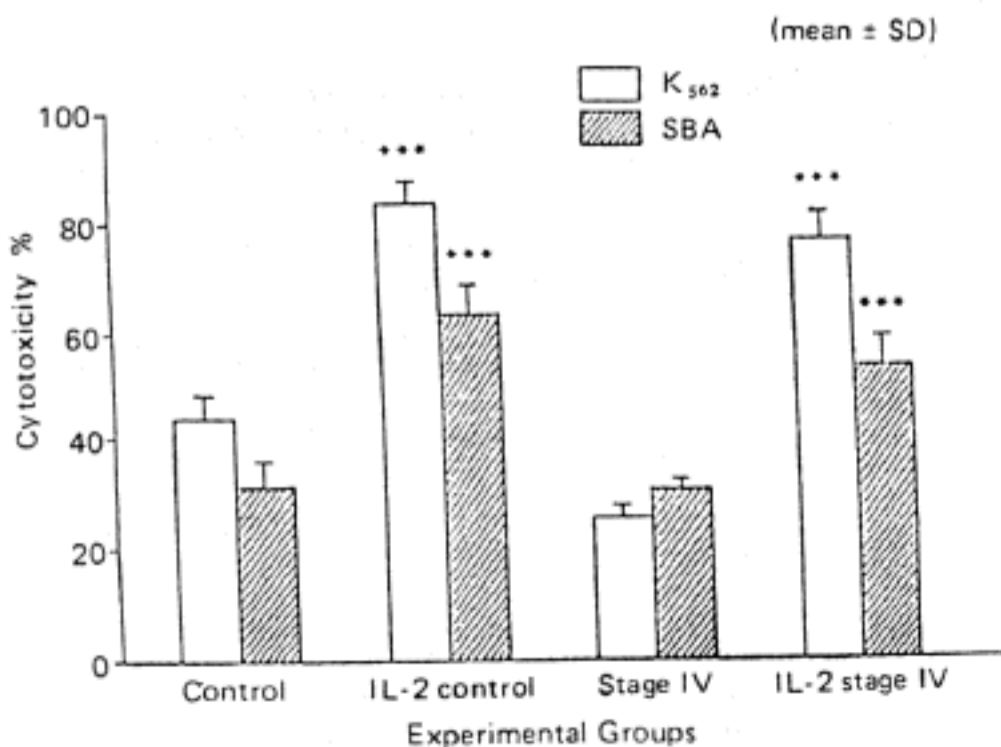


Fig. 1. The cytotoxicity of interleukin-2 stimulated lymphocyte against K₅₆₂ and SBA cancer cells in healthy person and stage IV colon cancer patients.

*** : p<0.001

K₅₆₂ : erythroleukemic cell line

SBA : cultured colon cancer cell line

IL-2 : interleukin-2

($p < 0.001$), stage IV 환자에서의 IL-2 자극 임파구의 세포독성도 K_{562} 세포에는 $77.1 \pm 4.6\%$, SBA 세포에는 $53.8 \pm 5.5\%$ 를 나타내어 임파구 세포독성($K_{562} = 26.1 \pm 2.1\%$, SBA = $30.9 \pm 1.8\%$)에 비하여 현저하게 증가하였으나($p < 0.001$) 정상대조군의 IL-2 자극 임파구의 세포독성보다는 증가율이 적었다(Fig. 1).

(3) 형태학적 관찰 : 위상차 현미경에 의한 임파구의 표적세포에 대한 세포파괴형태를 보면 표적세포에 임파구가 직접 접촉되어 세포가 파괴되는 것을 관찰할 수 있

으며 이 접촉정도는 비자극 임파구에(Fig. 4) 비하여 IL-2 자극 임파구에서 더욱 증가되어 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 5).

4) 임파구아형 CD4, CD8, NK 세포의 분포 변화 및 CD4/CD8, K_{562} /NK 비율

(1) CD4, CD8 및 NK 세포의 분포변화 : 형광 현미경 상 CD4 세포는 중간 내지는 소임파구의 크기로 밝기는 중간 정도에 양성세포가 많았으며(Fig. 6) CD8세포는

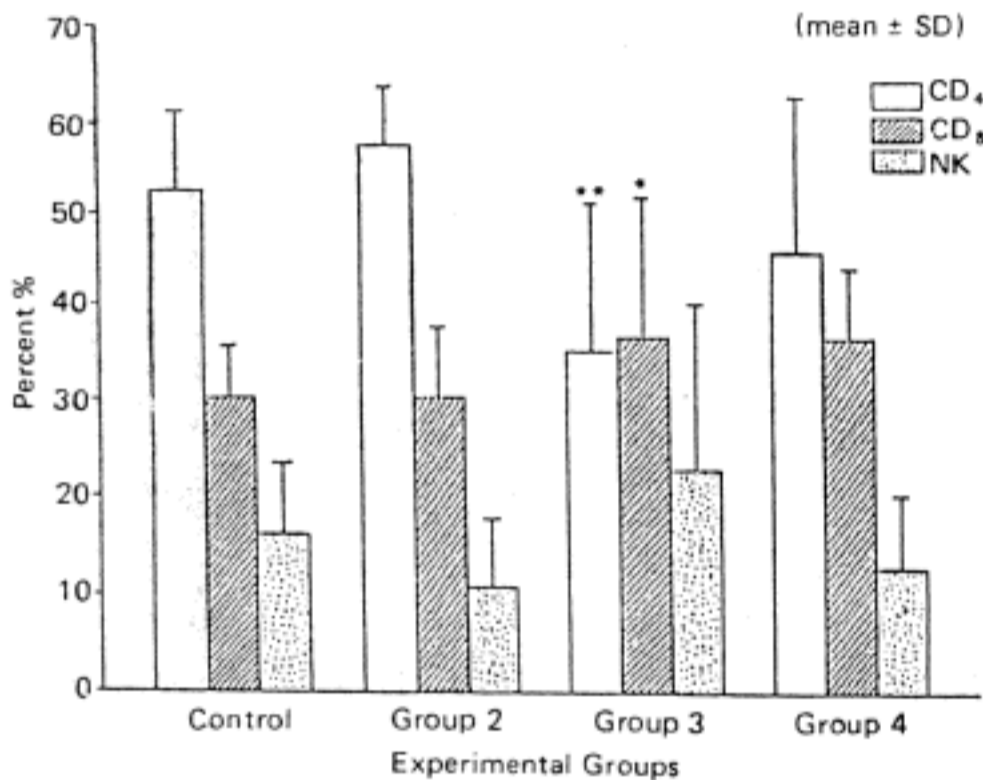


Fig. 2. The distribution of lymphocyte subpopulation (CD4, CD8, CD16) of peripheral blood in colon cancer patients.
 * $p < 0.05$
 ** $p < 0.01$
 CD₄ : cluster differentiation 4, helper T cell
 CD₈ : cluster differentiation 8, suppressor/cytotoxic T cell
 CD₁₆ : cluster differentiation 16, natural killer cell

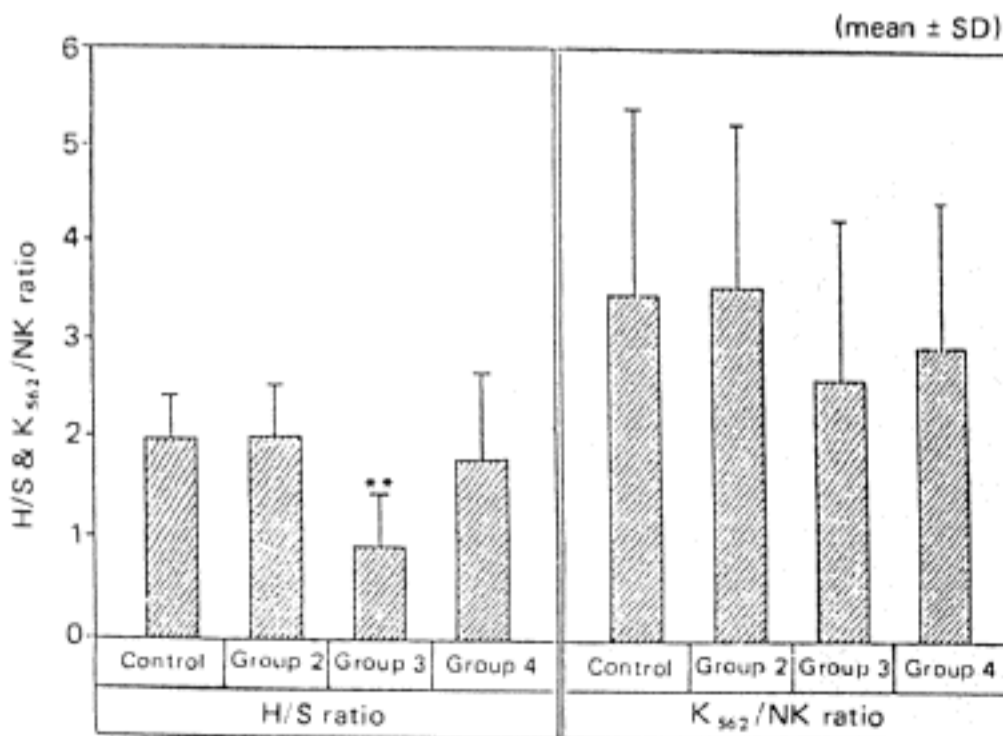


Fig. 3. The H/S ratio and K_{562} cytotoxicity to CD₁₆ cell ratio of peripheral blood lymphocytes in colon cancer patients.
 ** $p < 0.05$
 H/S : helper to suppressor T cell ratio

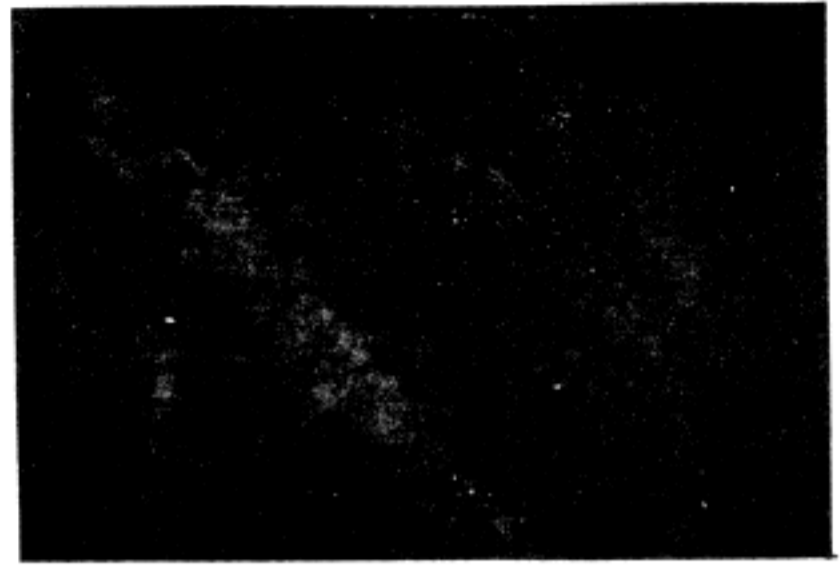
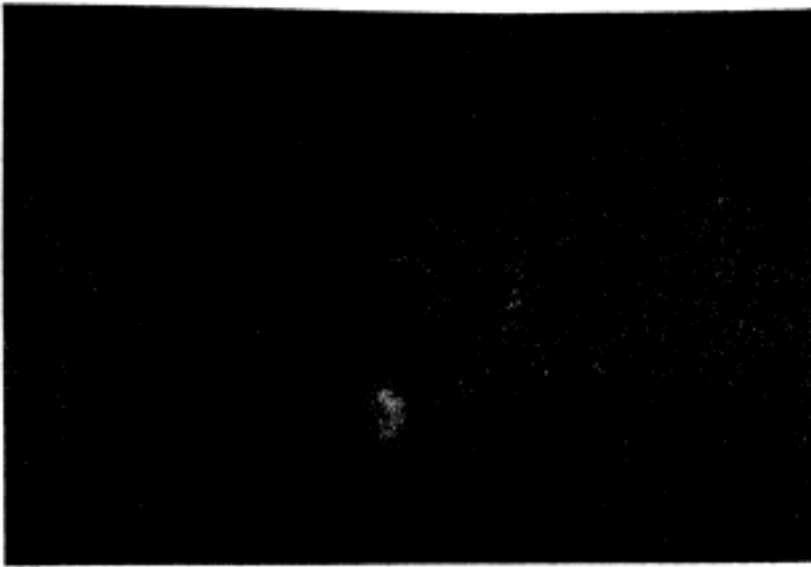


Fig. 4a. Photomicroscopic finding of lymphocyte cytotoxicity test to K₅₆₂ cells in control group showing target-lymphocyte contact (arrow) in small number. Phase-contrast microscope, ×100.

Fig. 4b. Photomicroscopic findings of lymphocyte cytotoxicity test to SBA cells in group 2 showing relatively separated target-lymphocyte. Phase-contrast microscope, ×100.

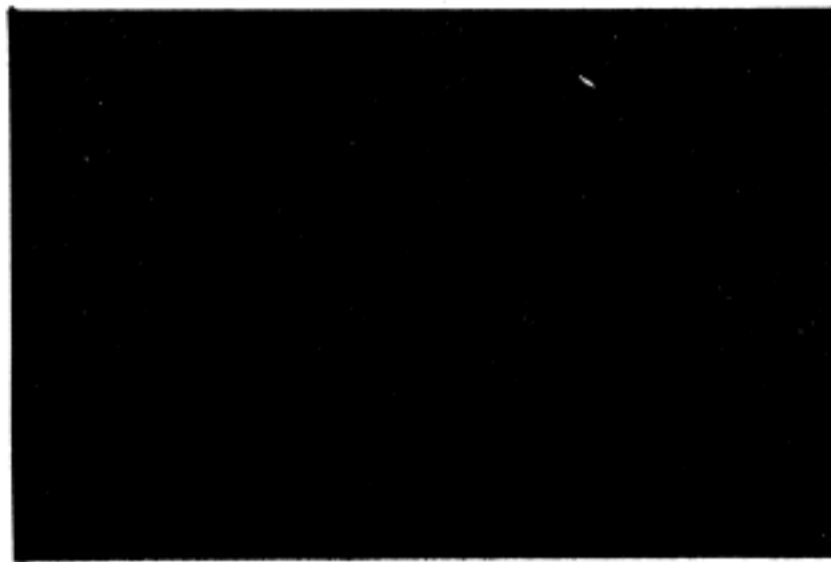


Fig. 5a. Photomicroscopic findings of IL-2 stimulated lymphocyte cytotoxicity test to K₅₆₂ cells in control group showing many and strong target-lymphocyte contact (arrow). Phase-contrast microscope, ×100.

Fig. 5b. Photomicroscopic findings of IL-2 stimulated lymphocyte cytotoxicity test to SBA cells in group 2 showing many but less strong target-lymphocyte contact (arrow) than Fig. 5a. Phase-contrast microscope, ×100.



Fig. 6. Fluorescence microscopic findings of indirect immunofluorescence staining with anti-leu-3A in group 2 patient showing small to medium sized lymphocyte (arrow) stained in high CD₄ positive with moderate brightness. Fluorescence microscope, ×200.

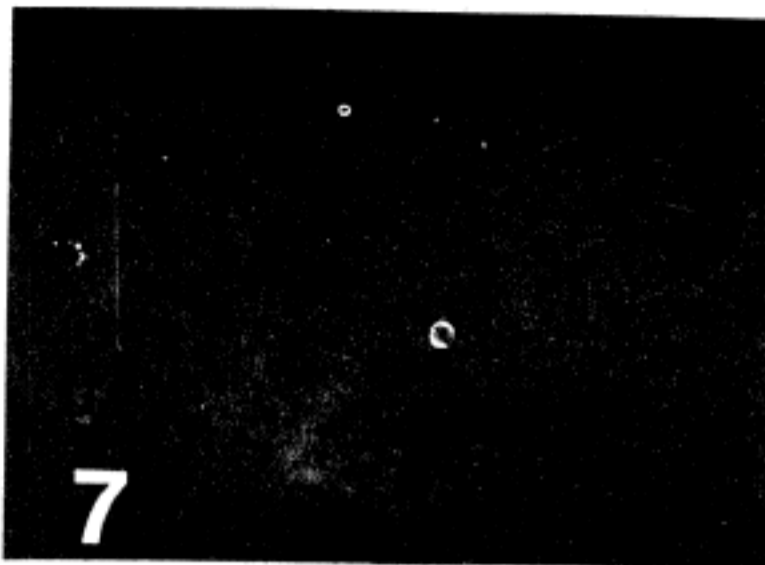


Fig. 7. Fluorescence microscopic findings of indirect immunofluorescence staining with anti-leu-2A in control group showing medium sized lymphocyte (arrow) brightly stained in low CD₁₆ positive. Fluorescence microscope. ×200.



Fig. 8. Fluorescence microscopic findings of indirect immunofluorescence staining with anti-leu-11B in group 3 patient showing relatively large and less brightly stained lymphocyte (arrow) in low CD₁₆ positive. fluorescence microscope. ×200.

Table 3. The lymphocyte counts, cytotoxicity to K₅₆₂ and SBA cancer cell, helper to suppressor cell ratio and cytotoxicity against K₅₆₂ cell to NK cell ratio by cell differentiation in colon cancer patients (Mean ± SD)

Cancer cell differentiation	Lymphocyte counts/mm ³	@ CD4/CD8	# K ₅₆₂ /NK	Cytotoxicity (%)	
				K ₅₆₂	SBA
Control (10)	2,578 ± 878	1.97 ± 0.44	3.45 ± 1.95	43.8 ± 4.8	31.3 ± 4.7
Well (16)	1,964 ± 585	1.87 ± 0.62	3.03 ± 1.63	34.9 ± 14.4	31.1 ± 4.1
Moderate (11)	2,072 ± 504	1.54 ± 0.64	3.09 ± 1.73	27.2 ± 7.2 ^{***}	29.2 ± 2.8
Poor (3)	1,495 ± 502 [*]	0.78 ± 0.23	2.42 ± 1.71	41.5 ± 16.7	29.5 ± 3.9

@ : helper to suppressor/cytotoxic cell ratio
 # : cytotoxicity against K₅₆₂ cell to NK cell ratio
 * : p < 0.05
 ** : p < 0.01
 *** : p < 0.001
 () : number of samples

중임과구의 크기로 CD4세포 보다 밝은 형광을 나타냈다 (Fig. 7). CD16 세포는 단핵구 같이 세포가 크고 두세 개의 세포가 모여 있는 형태로 중간정도의 형광을 나타냈다 (Fig. 8).

정상대조군에서 helper T cell인 CD4는 52.6 ± 8.7%, suppressor/cytotoxic T cell인 CD8은 3.3 ± 5.1% 그리고 NK 세포는 16.0 ± 7.6%를 나타냈다. 제 2군에서 보면 CD4 57.9 ± 6.0%, CD8 30.3 ± 7.4%, CD16 10.8 ± 6.9%로 CD16이 약간 감소하였지만 정상대조군과 비슷한 수치를 나타내어 의의있는 차이를 보이

지 않았다. 제 4군에서도 CD4 45.8 ± 17.1%, CD8 33.3 ± 10.3%, CD16 2.7 ± 7.5%를 나타내어 CD4와 NK가 감소하였고 CD8이 약간 증가하였지만 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 제 3군에서는 CD4가 35.1 ± 16.1%로 대조군에 비하여 의의있게 감소하였으며 (p < 0.01) CD8은 36.6 ± 15.4%로 대조군에 비하여 의의있게 증가하였다 (p < 0.05). 그러나 CD16 세포는 22.8 ± 17.2%로 증가하였지만 통계적 의의는 없었다 (Fig. 2).

(2) CD4/CD8, K₅₆₂/NK 비 : 정상대조군에서의

CD4/CD8은 1.97 ± 0.44 , K_{562}/NK 는 3.45 ± 1.95 였다.

먼저 CD4/CD8을 보면 제 2군에서는 2.01 ± 0.51 제 4군에서는 1.80 ± 0.86 으로 대조군과 유의한 차이가 없었으나 제 3군에서는 0.93 ± 0.52 로 顯著하게 감소하였다 ($p < 0.01$).

K_{562}/NK 를 보면 제 2군에서 3.53 ± 1.69 로 대조군과 비슷하였으며 제 3, 4군에서 2.61 ± 1.64 , 2.94 ± 1.49 로 감소하였지만 통계적 의의는 없었다 (Fig. 3).

5) 암세포 분화도에 따른 임파구수, 세포독성, CD4/CD8 및 K_{562}/NK 비

임파구수를 보면 분화 및 중등도 분화암에서는 $1.964 \pm 585/mm^3$, $2.072 \pm 504/mm^3$ 로 대조군 ($2.578 \pm 878/mm^3$)에 비하여 감소하였으나 통계적 의의가 없었지만 미분화 암에서는 $1.495 \pm 502/mm^3$ 로 의의있게 감소하였다 ($p < 0.05$).

세포독성을 보면 분화암에서 $34.9 \pm 14.4\%$ ($p < 0.05$), 중등도 분화암에서 $27.2 \pm 7.2\%$ 로 대조군 ($43.8 \pm 4.8\%$)에 비하여 의의있게 감소하였으나 미분화 암에서는 $41.5 \pm 16.7\%$ 로 차이가 없었다. 반면 SBA 세포에 대하여는 분화암 $31.1 \pm 4.1\%$, 중등도 분화암 $29.2 \pm 2.8\%$, 미분화암 $29.5 \pm 3.9\%$ 로 대조군 ($31.3 \pm 4.7\%$)과 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 3).

CD4/CD8을 보면 분화암에서 1.87 ± 0.62 로 대조군 (1.97 ± 0.44)과 비슷하였으며 중등도 분화암에서는 1.54 ± 0.64 로 감소하였지만 통계적 유의성이 없었다. 그러나 미분화암에서는 0.78 ± 0.28 로 현저하게 감소하였다 ($p < 0.001$).

K_{562}/NK 를 보면 분화 및 중등도 분화암에서는 3.03 ± 1.63 , 3.09 ± 1.73 으로 대조군 3.45 ± 1.95 과 비슷하였으며 미분화암에서는 2.42 ± 1.71 로 감소하였지만 통계적 의의는 없었다 (Table 3).

고 안

대장암 환자에서도 다른 암환자에서와 같이 일반적인 면역반응이 저하되어 있다는 것은 잘 알려져 있다^{15,20}.

경질성 암종에서 제일 크게 억제되어 있다는 두경부 편평상피암에서는 T-세포의 결여가 있는데 병의 진행 정도에 따라 면역저하 정도가 다르고²¹ 구강 편평상피암에

서는 NK 활성도나 ADCC (antibody dependent cytotoxicity, 이하 ADCC)가 정상범위였으며 임파구의 감소만 있었다고 하였는데¹⁹ 대장암 환자에서도 임파구의 감소, mitogen에 의한 blastogenesis 감소등이 진행된 경우에 나타나고 국한된 병소인 경우 차이는 없다는 등^{10,22} 암의 종류와 진행 정도에 면역반응의 차이가 있다.

이러한 면역 반응은 체액매개성과 세포 매개성 면역으로 나눌 수 있다. 이중 세포 매개성 면역은 주로 T세포와 NK 세포에 의해 변화되는데 항암면역은 T세포 중 suppressor T세포가 증가하면 감소한다든가³ 위장관 암환자의 임파구의 NK 세포 활성도는 정상인보다 약간 낮으며 NK 세포가 작용하는데는 NK세포가 표적세포와 직접 작용하여야 한다^{18,23}는 등의 보고가 있다.

또한 대장 및 직장암환자에서는 말초혈액 임파구의 NK 세포수가 적고 세포독성이 현저하게 감소되어 있다고 하였다²⁴. 이러한 NK 세포가 증가하면 세포독성도 증가하게 되는데, 반대로 감소하는 경우는 suppressor/cytotoxic T-세포가 증가하기 때문이다. 또는 NK 세포는 여러 형태를 갖는데 세포수가 증가하면서 세포독성이 적으면 세포독성이 없는 NK-전구세포가 많기 때문이라고 할 수 있다²⁵. 그러나 비율을 측정하여 본 결과 병의 진행이나 예후등에는 관련이 없고 임파구의 자극 정도는 감소되어 있다고 하였다.

저자들의 실험에서 보면 임파구수는 제 4군에서 대조군에 비하여 의의있게 ($p < 0.05$) 감소하였지만 Kim¹²의 보고에 의하면 $1,000/mm^3$ 이상이면 생존율에는 영향을 미치는 정도가 아니라고 하겠다.

병의 진행 정도를 TNM stage 별로 나누어 비교한 대장암 환자의 세포독성과 임파구 아형 분포 및 비율을 보면 제 2군에서 NK 세포에 특히 예민하게 반응한다는 K_{562} 세포에 대한 세포독성을 보면 대조군에 비하여 의의있게 감소하였는데 CD4 세포와 CD8 세포는 대조군과 비슷하였으며 CD4/CD8 비도 대조군과 차이가 없어 통계적 의의는 없으나 대조군보다 감소한 NK 세포에 의한 세포독성의 감소라고 하겠다. 제 4군에서는 제 2군보다 더욱 감소한 세포 파괴능을 보였는데 ($p < 0.01$) 통계적 의의는 없지만 CD4 세포와 NK 세포의 감소, CD8 세포의 증가에 의한 감소라고 볼 수 있다. 특히 NK 세포의 활성도라고 할 수 있는 K_{562}/NK 비가 감소되어 있는 것을 알 수 있다. 한편 제 3군에서는 K_{562} 에 대한 세