

## Sarcoma 180 이식마우스에서 Interleukin-2, 4, 10의 변화

고신대학교 의학부 미생물학교실, <sup>1</sup>동의대학교 미생물학과, <sup>2</sup>부산대학교 식품영양학과

이 원 기 · 김 광 혁 · 정 영 기<sup>1</sup> · 박 건 영<sup>2</sup>

### Changes of Interleukin-2, 4, 10 in Sarcoma 180-transplanted Mice

Won Ki Lee, Kwang Hyuk Kim, Yong Kee Jeong<sup>1</sup>, and Kun Young Park<sup>2</sup>

*Department of Microbiology, Medical College, Kosin University, Pusan 602-702, Korea*

<sup>1</sup>*Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea*

<sup>2</sup>*Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University,  
Pusan 609-735, Korea*

Experiments were undertaken to investigate the effect of cancer cell, sarcoma 180 (S 180) on production of interleukin(IL)-2, 4, and 10 in BALB/c mice. Splenocytes of normal mice were incubated with S 180 cells. The culture supernatants were collected at 2, 4, 6, 24, and 72 hr and assessed for IL-2, 4, and IL-10 production by enzyme-linked immunosorbent assay. The production of IL-2 in the culture supernatant of adherent cells exposed with S 180 was not detected, but it increased at 24 and 72 hr in culture with non-adherent or whole splenocyte. The production of IL-4 in the culture supernatant of S 180, adherent, non-adherent, or whole splenocyte was detected, but by co-culture with S 180 it showed significant increase at 72 hr. Also, the production of IL-10 in the culture supernatant of S 180, adherent, non-adherent, or whole splenocytes was detected. By exposure with S 180 it increased to 10-80 times in comparison with the control. Normal mice were transplanted with S 180 into peritoneum. Sera and peritoneal fluids(PF) were collected at 2, 4, 6, and 24 hr. The production of IL-2 in sera was not detected, but in PF it was a little. The production of IL-4 in sera or PF was detected, but it showed the significant decrease in comparison with the control. The production of IL-10 in sera was detected in transplantation or control group, and it increased in transplantation group. The production of IL-10 in PF showed the increase at 24 hr. By exposure of S 180 tumor cells in immuno-competent cells or transplantation with S 180 into mouse, IL-4 decreased in sera and PF, but IL-10 showed the remarkable increase in the culture supernatant of splenocytes and in the sera. These data suggest that the unbalanced conditions such as suppression of IL-4 production and overproduction of IL-10 *in vivo* may be responsible for dysfunction of immune system.

**Key Words:** Mouse, Sarcoma 180, Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-10

## 서 론

Interleukin-2 (IL-2)는 항원이나 mitogen으로 활성화된 림프구에서 주로 생성되는 15~19 KD의 당단백으로 133개의 아미노산으로 이루어져 있다.<sup>18)</sup> IL-2는 원래 림프구 혼합배양이나 T세포 mitogen으로 자극시킨 말초혈액 림프구 배양 상층 액에 존재하는 T세포성장인자(T-cell growth factor, TCGF)로서 기술되었으며 기능시험 결과 T세포성장을 증진시키는 것으로 밝혀졌고 이 TCGF는 thymocyte stimulation factor (TSF), thymocyte mitogenesis factor (TMF), T cell replacing factor (TRF), killer helper factor (KHF)와 동일한 cytokine이었다.<sup>7,15)</sup> IL-2는 T세포 중에서도 주로 T helper 1 (Th1)세포에 의해서 생성되고 있으며 T helper 2 (Th2)세포가 생성하는 IL-4나 IL-10에 의해서 영향을 크게 받는다. IL-2에 의해서 활성화된 림프구는 major histocompatibility complex (MHC)비구속성 항종양활성을 획득함으로써 lymphokine-activated killer (LAK)세포라 부르는 세포를 생성시키고 있으며 IL-2 단독이나 LAK세포와의 병용요법이 각종 진행암 환자를 대상으로 연구되었었다. 이들 IL-2/LAK 요법은 일부 급성 골수성 백혈병(acute myelocytic leukemia, AML)이나 림프종 등에서도 유효성이 인정되고 있다. 또한 백혈병의 골수이식 후 재발 증례에서도 유효한 것으로 보고되고 있다. 부작용으로서는 부정맥, 심근허혈, 혈소판감소, 발열이 나타나고 있지만 그 원인으로서는 IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 생성유도가 고려되고 있다. 최근에는 자기종양에 특이적으로 반응할 가능성이 시사되고 있는 종양침윤 T세포(tumor infiltrated lymphocyte, TIL)나 세포장해성 T세포(cytotoxic T lymphocyte, CTL)를 이용하는 치료법의 개발도 행해지고 있다. IL-2로 활성화시킨 TIL에 TNF 등의 항 종양효과를 나타내는 사이토카인 유전자를 도입시켜 항 종양활성을 증강시킨다든지, IL-2유전자를 종양세포에 도입시켜 환자에 투여함으로써 환자체내의 항 종양면역활성을 높이는 암 백신요법이 주목되고 있다. 후자의 경우, 종양세포로부터 생성된 IL-2에 의해서 국소 LAK세포의 유도, IFN- $\gamma$ 나 TNF의 방출, 종양 특이적 CTL의 활성화 등이 이루어져 이들이 전신을 순환하면서 잔존암세포를 공격하는 효과가 기대되고 있다.<sup>3,4,9)</sup>

IL-4는 129개의 아미노산으로 이루어진 분자량 15~19 KD의 당단백이다. IL-4는 phorbol myristate acetate (PMA)로 자극시킨 EL-4 thymoma세포주 배양 상층 액에서 발견된 cytokine으로서 B세포를 분화 증식시키기 때문에 B Cell Growth Factor (BCGF)로 불렸으며 또한 T세포의 분화증식에도 관여하고 있다. IL-4는 B세포 반응을 조절하는 T세포나 mast cell, 그리고 활성화된 basophil에서 생성되고 있다. 혈액질환에 대한 임상응용과 함께 항종양효과, 항이식편거절반응, 항graft-versus-host disease (GVHD)효과가 주목되고 있다. 백혈병세포에 대한 작용으로서는 여러 가지 보고가 있지만 그 증식을 자극하는 경우와 억제하는 경우가 보고되고 있고, 다른 사이토카인과의 상호작용이 중요한 것으로 생각되고 있다. AML의 일부, 만성 골수단구성 백혈병, Ph1 양성 급성 림프성 백혈병에 있어서 IL-4가 이들 백혈병세포의 증식을 억제한다는 보고도 있다. IL-4유전자를 종양세포에 도입시켜 환자에 주입하면 IL-2와 마찬가지로 항 종양효과를 나타내는데, 그 기전으로서 국소 호산구의 현저한 침윤이 있게 되어 종양이 파괴된다든지 종양 특이적 CTL이 유도되기 때문인 것으로 생각되고 있다. 또한 IL-4는 human immunodeficiency virus (HIV)환자에서 병의 진행과 함께 증가되는 Th2형 CD4양성세포를 분화 증식시킨다는 것이 알려지고 있다. IFN- $\gamma$ 는 Th2세포의 증식을 저해하는 반면에 IL-4나 IL-10은 Th1 세포의 cytokine생성을 저해한다.<sup>10,11,19)</sup>

IL-10은 분자량 35-40KD의 단 이량체 당 단백질로서 각각 160개의 아미노산으로 구성되어 있다. IL-10은 쥐의 Th2세포에서 생성되어 Th1세포의 cytokine생성을 저해하는 인자로서 알려짐으로서 cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF)라는 이름을 갖게 되었다. IL-10은 대식세포를 개입하여 Th1 세포유래의 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 와 같은 cytokine 생성을 저해할 뿐만 아니라 단구 유래의 cytokine 생성을 저해한다. IL-10은 nuclear factor kappa B의 활성화를 저해하고 class II MHC 발현을 하향 조절함으로써 단구의 항원제시능을 저해한다. 각종 염증성질환의 치료응용이 고려되고 있고 Burkitt림프종에서의 이상생성이 보고되고 있다. HIV환자에서는 Th2세포가 증가하고 있으며 Burkitt림프종을 수반하는 예에서는 림프종세포자신으로부터 IL-10이 생성되고 있다는 보고가 있다.<sup>2,17)</sup>

본 실험에서는 마우스의 비장세포에 암세포인

Sarcoma 180을 노출시키거나 마우스의 복강 내로 암세포를 이식시켰을 때 생성되어 나타나는 interleukin-2, 4, 10을 정량 분석하여 암세포존재하의 면역반응을 cytokine 생성차원에서 이해해 보고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 1) 실험동물

암컷 BALB/c 마우스로서 생후 8주 내외, 체중 25 g 내외의 것을 구입하여 실험에 사용하였다.

#### 2) 복수암세포

Sarcoma 180 세포는 한국생명공학센터에서 구입하여 BALB/c 마우스의 복강내에 일주일 간격으로 암세포 부유액( $1 \times 10^6$  cells/ml) 1 ml씩을 접종하여 계대 배양하면서 수거한 암세포를 사용하였다.

#### 3) 마우스 비장세포의 분리

마우스 비장세포의 분리는 경부를 탈구하여 희생시킨 마우스로부터 비장을 무균 적으로 적출하여 4°C의 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.)으로 2회 세척하였다. 이를 직경 60 mm의 조직배양용 접시(Costar, Cambridge, MA, U.S.A.)에 옮기고 다시 신선한 HBSS를 가한 후 핀셋으로 가볍게 문질러 비장세포를 유리시켰다. 이 세포 부유액을 15 ml 원심관(Falcon, Oxnard, U.S.A.)에 옮긴 후 2~3분 동안 실온에 방치한 다음 세포 부유액의 상층액을 새로운 15 ml 원심관에 옮겼다. 이 세포를 200×g 에서 5~10분 원침한 후 HBSS로 1회 원침 세척한 다음 증류수와 10배 농축 phosphate buffered saline (PBS)를 이용하여 혼합된 적혈구를 용해시킨 후 HBSS로 2회 원침 세척하여 사용하였다.

#### 4) 비장세포배양 상층액의 준비

비장세포배양 상층액의 준비는 미리 준비된 비장세포 부유액을 10%가 되게 소 태아혈청을 첨가한 RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.) 배지 (complete 10% FCS RPMI 1640)로 ml 당  $2 \times 10^6$  세포가 되도록 조절하여, 24 wells tissue culture plate (Costar, Cambridge, MA, U.S.A.)에 1 ml씩 분주하여 2시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 방치시킨 후 부착된 세포(adherent cell)를 제외한 나머지 비 부착

성 세포(non-adherent cell)를 이웃 well에 옮겼다. 부착세포가 존재하는 well에는 다시 배지를 1 ml씩 분주하였다. 부착성세포와 비 부착성세포가 공존하는 세포 (whole cell)부유액 또한 1 ml씩 분주하였다. 분주가 완료된 각 well에는  $1 \times 10^4$ 개(10 μl)의 sarcoma 180 세포를 가하였다. 대조군으로서는 sarcoma 180 세포를 작용시키지 않은 각각의 비장세포만을 배양하였다. 배양시간은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2, 4, 6, 24, 72시간으로 하였다. 각각의 일정시간 배양이 끝난 후 전량 배양액을 수거한 다음 300×g에서 10분간, 10,000×g에서 30분간 원침시킨 후 그 상층액을 수거하여 배양 상층액의 IL-2, IL-4, IL-10의 생성을 정량하였다.

#### 5) Sarcoma 180 이식 마우스로부터의 시료준비

Sarcoma 180 세포를 PBS에 부유시킨 세포 부유액 ( $1 \times 10^6$ /ml) 1 ml씩을 마우스 복강 내에 주사하고 2, 4, 6, 24시간 경과시킨 후 각 시간대 별 마우스 군으로부터 혈액과 복강 액을 수거하기 위하여 먼저 에틸로 마취시킨 마우스 심장으로 부터 혈액을 취하였다. 취해진 마우스 혈액은 충분한 시간 응고시킨 후 혈청을 분리하였다. 혈액을 취하고 난 후 마우스의 복강 내로 PBS를 5 ml 씩 주사하여 수회 마싸지한 후 복강 액을 수거하였다. 이상과 같이 수거된 혈청과 복강 액을 IL-2, IL-4, IL-10의 생성 측정을 위한 시료로 하였다. 대조 군으로서는 암세포가 주사되지 않은 정상마우스의 혈청과 복강 액을 이용하였으며 각 군 당 마우스의 수는 10마리씩으로 하였다.

#### 6) IL-2,4,10의 측정

Interleukin-2,4,10의 측정은 Mouse IL-2,4,10 ELISA kit (Genzyme, Cambridge, U.S.A.)을 이용하였다. Optical density는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, U.S.A.)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

### 결 과

마우스비장세포에 S180세포를 노출시켜 혼합 배양했을 때 비장세포의 부착성에 따른 세포의 종류 및 배양시간에 따라 배양 상층액 내에 유출되어 나타나는 IL-2생성양상은 다음과 같다. 먼저 S180세포만의 배

**Table 1.** IL-2 production in mouse splenocytes cultured with sarcoma 180 cells (pg/ml)

Cells	Times				
	2hr	4hr	6hr	24hr	72hr
AD+S180	ND	ND	ND	ND	ND
NAD+S180	ND	ND	ND	2.28±1.07	23.88±0.53**
W+S180	ND	ND	ND	10.99±0.54**	29.94±1.61*
AD	ND	ND	ND	ND	ND
NAD	ND	ND	ND	ND	3.42±2.68
W	ND	ND	ND	3.04±2.14	17.81±5.90
S180	ND	ND	ND	ND	ND

Splenocytes were cultivated with sarcoma 180 cells for various times in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. Adherent (AD) and non-adherent (NAD) cells were separated from whole (W) cells after 2 hr incubation at 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator. Culture supernatant was harvested after each incubation time and assayed for IL-2. Data are mean±SD. Triplicate culture supernatants were pooled and assayed in duplicate. ND, not detected.

\*: P<0.05 compared with control, W group.

\*\* : P<0.01 compared with controls, NAD and W group each.

**Table 2.** IL-4 production in mouse splenocytes cultured with sarcoma 180 cells (pg/ml)

Cells	Times				
	2hr	4hr	6hr	24hr	72hr
AD+S180	7.77±0.74	4.32±0.25*	6.56±2.45	4.00±1.75	6.57±0.49**
NAD+S180	6.74±1.22	9.15±2.19	7.26±1.46	2.25±1.22	11.75±0.49**
W+S180	8.12±0.25	4.84±2.94	8.46±1.22	4.30±0.28	13.13±0.49*
AD	8.46±1.22	7.60±1.46	4.32±0.25	2.42±0.98	2.59±0.24
NAD	7.08±0.24	6.22±1.46	9.33±1.46	2.59±0.24	6.74±0.25
W	8.64±1.46	5.01±0.74	7.60±0.49	4.49±1.47	6.91±1.95
S180	3.61±0.22	3.11±0.49	2.08±1.46	4.14±0.98	10.88±3.66

Splenocytes were cultivated with sarcoma 180 cells for various times in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. Adherent (AD) and non-adherent (NAD) cells were separated from whole (W) cells after 2 hr incubation at 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator. Culture supernatant was harvested after each incubation time and assayed for IL-4. Data are mean±SD. Triplicate culture supernatants were pooled and assayed in duplicate.

\*: P<0.05 compared with controls, AD and W group each.

\*\* : P<0.01 compared with controls, AD and NAD group each.

양, 부착성(adherent, AD)세포만의 배양, AD세포에 S180세포를 추가하여 배양한 경우에는 IL-2가 검출되지 않았다. 그러나 비부착성(non-adherent, NAD)세포만의 배양에서는 72시간째에 3.42 pg/ml로서 반응을 보였으며 NAD에 S180을 추가하여 배양하면 24시간째부터 나타나기 시작하여 72시간째에는 NAD군에 비하여 유의한 상승을 보이고 있다. AD와 NAD를 모두 포함하는 전체비장(whole, W)세포 군에서는 24시간째에 생성되기 시작하여 72시간째에 증가되어 나타났으며

W군에 S180을 추가하였을 때 24, 72시간 모두 W군보다 증가를 나타내어 유의성을 보였다(Table 1).

마우스비장세포배양에 S180세포를 노출시켜 배양했을 때 비장세포의 부착성에 따른 세포의 종류 및 배양 시간에 따라 배양 상층액 내에 유출되어 나타나는 IL-4 생성양상은 다음과 같다.

S180세포만의 배양에서도 전 시간대에서 검출되었으며 배양 6시간째에 약간 감소하였으나 24시간째부터는 다시 증가하기 시작하여 72시간째에는 24시간째보

**Table 3.** IL-10 production in mouse splenocytes cultured with sarcoma 180 cells (pg/ml)

Cells	Times				
	2hr	4hr	6hr	24hr	72hr
AD+S180	8.09±3.81	13.82±0.47**	15.17±3.33	46.51±2.86**	150.64±8.10**
NAD+S180	10.79±0.96	10.27±0.72	17.86±0.48**	318.47±12.86**	1,000.89±42.89**
W+S180	13.48±1.91	18.87±1.91*	24.94±0.96**	581.33±17.63**	1,495.27±4.29**
AD	11.46±1.91	9.44±0.96	12.47±1.43	10.79±1.90	14.16±0.96
NAD	8.09±2.86	9.77±1.43	10.46±1.42	12.47±0.48	18.88±0.96
W	11.12±1.43	13.93±0.64	9.78±2.38	14.16±0.96	18.54±6.20
S180	10.79±1.90	8.43±0.47	9.78±0.47	11.80±0.47	10.79±0.96

Splenocytes were cultivated with sarcoma 180 cells for various times in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. Adherent (AD) and non-adherent (NAD) cells were separated from whole (W) cells after 2 hr incubation at 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator. Culture supernatant was harvested after each incubation time and assayed for IL-10. Data are mean±SD. Triplicate culture supernatants were pooled and assayed in duplicate.

\*: P<0.05 compared with control, W group.

\*\* : P<0.01 compared with controls, AD, NAD, and W group each.

**Table 4.** IL-2 production in BALB/c mice ip injected with sarcoma 180 cells (pg/ml)

Specimens	Times				
	2hr	4hr	6hr	24hr	Control
Serum	ND	ND	ND	ND	ND
PF	4.55±4.29	3.41±0.54	ND	3.42±2.68	ND

Mice were ip injected with sarcoma 180 cells (1×10<sup>6</sup> cells). After each time blood was collected from heart and peritoneal fluid (PF) was washed with PBS. Specimens from 5 mice were pooled and assayed in duplicate for IL-2. Data are mean±SD.

ND, not detected.

다 2배 이상 증가하였다. AD세포만의 배양에서는 배양 초기인 2시간째에 8.46 pg/ml로서 가장 높게 나타났으며 시간이 경과되면서 점점 감소되었다. NAD세포만의 배양에서는 6시간째에 정점을 나타냈고 그 이후에는 감소하였다. W세포만의 배양에서는 시간이 경과되면서 증가와 감소가 반복되는 파도형 생성양상을 보였다. AD세포에 S180세포를 추가하여 배양한 경우에는 배양 4시간째에 AD세포만의 배양 때보다 유의하게 감소를 보였지만 시간이 경과되면서 다시 증가하면서 72시간째에는 유의하게 증가를 보였다. NAD세포나 W세포에 S180세포를 추가하여 배양한 경우에도 배양 72시간째에 유의한 증가를 보였다(Table 2).

마우스비장세포에 S180세포를 작용시켜 배양했을 때 비장세포의 부착성에 따른 세포의 종류 및 배양시

간에 따라 배양 상층액 내에 유출되어 나타나는 IL-10 생성양상은 다음과 같다. S180세포만의 배양에서도 IL-4생성 때와 마찬가지로 전 시간대에서 검출되었으나 생성량은 모두 비슷하였다. AD세포만의 배양에서는 배양 72시간째에 14.16 pg/ml로서 가장 높게 나타났으며 NAD세포 및 W세포만의 배양에서도 72시간째에 가장 높게 나타났다. AD, NAD, W세포 각각에 S180세포를 추가하여 배양한 경우에는 배양시간이 길어지면 증가폭이 커졌으며 72시간째에는 10배에서 80배 수준까지 현저한 증가를 보였다(Table 3).

마우스 복강 내에 S180세포를 이식시킨 후 혈액과 복강액 내에 나타나는 IL-2의 생성량을 측정하기 위하여 이식 2, 4, 6, 24시간 후 마우스의 혈청과 복강액을 실험하여 얻은 결과는 다음과 같다. 혈청 내에서는 대

**Table 5.** IL-4 production in BALB/c mice ip injected with sarcoma 180 cells (pg/ml)

Specimens	Times				
	2hr	4hr	6hr	24hr	Control
Serum	38.34±1.44	9.33±1.49**	12.10±2.40**	7.26±1.44**	46.62±10.27
PF	8.46±0.24	2.77±0.49*	2.94±0.25*	5.36±1.22	6.22±1.46

Mice were ip injected with sarcoma 180 cells ( $1 \times 10^6$  cells). After each time blood was collected from heart and peritoneal fluid (PF) was washed with PBS. Specimens from 5 mice were pooled and assayed in duplicate for IL-4. Data are mean±SD.

\*: P<0.05 compared with control.

\*\* : P<0.01 compared with control.

**Table 6.** IL-10 production in BALB/c mice ip injected with sarcoma 180 cells (pg/ml)

Specimens	Times				
	2hr	4hr	6hr	24hr	Control
Serum	24.39±0.21**	12.15±5.73	47.15±9.55**	26.28±8.57	14.16±2.89
PF	13.48±0.95	14.83±1.91	11.80±2.38	14.16±1.90	13.15±0.47

Mice were ip injected with sarcoma 180 cells ( $1 \times 10^6$  cells). After each time blood was collected from heart and peritoneal fluid (PF) was washed with PBS. Specimens from 5 mice were pooled and assayed in duplicate for IL-10. Data are mean±SD.

\*\* : P<0.01 compared with control.

조군 및 이식군 모두 검출되지 않았다. 복강액(peritoneal fluid, PF)에서는 대조군에서 검출되지 않았으나 이식군에서 2시간째에 4.55 pg/ml을 나타냈으며 4시간째에 감소하다가 6시간째에는 검출되지 않았고 24시간째에 3.42 pg/ml을 나타냈다(Table 4).

마우스 복강 내에 S180세포를 이식시킨 후 혈액과 복강액 내에 나타나는 IL-4의 생성량을 측정하기 위하여 이식 2, 4, 6, 24시간 후 마우스의 혈청과 복강액을 실험하여 얻은 결과는 다음과 같다. 혈청 내에서는 대조군 및 이식군 모두에서 검출되었으며 대조군에서는 46.62 pg/ml을 나타냄에 비하여 이식군에서는 4, 6, 24시간에서 각각 9.33, 12.10, 7.26 pg/ml으로서 유의한 감소를 나타냈다. 복강액(PF)에서는 대조군에서 6.22 pg/ml을 나타냈고 2시간째에서는 8.46 pg/ml로 상승하였으나 시간이 경과되면서 감소를 보여 4, 6시간째에서는 2.77, 2.94 pg/ml로서 유의한 감소를 나타냈다(Table 5).

마우스 복강 내에 S180세포를 이식시킨 후 혈액과 복강액 내에 나타나는 IL-10의 생성량을 측정하기 위

하여 이식 2, 4, 6, 24시간 후 마우스의 혈청과 복강액을 실험하여 얻은 결과는 다음과 같다. 혈청 내에서는 대조군 및 이식군 모두에서 검출되었으며 대조군에서 14.16 pg/ml을 나타냄에 비하여 이식군 2, 4, 6, 24시간에서 각각 24.39, 12.15, 47.15, 26.28 pg/ml로 나타났으나 유의한 증가는 2, 6시간째에서 나타났다. 복강액(PF)에서는 대조군에서 13.15 pg/ml을 나타냈고 이식군의 6시간째에서 11.80 pg/ml로 감소하다가 24시간째에는 14.16 pg/ml로 증가를 보였다(Table 6).

### 고 찰

악성종양환자에서 사이토카인은 암의 증식이나 전이뿐만 아니라 병의 상태에 깊게 관여하고 있다. 즉, 각종 사이토카인은 암의 발생과 증식, 암 조직의 형성, 인접장기로의 침윤, 원거리에 있는 장기로의 전이라든지, 항암제 등의 치료에 있어서 저항성발현 등에 직접적 관계를 갖고 있다. 또한 과잉으로 생성된 사이토카인은 암 숙주에서 면역 및 조혈부전, 대사이상 등의 종

양수반증후군이라는 특징적인 병태 발현에 관여하고 있다.

Morgan등(1976)이 phytohemagglutinin (PHA)으로 자극시킨 사람 림프구의 배양 상층액 존재 하에 T림프구를 장기 배양할 수 있었음을 보고함으로써 PHA 배양 상층액 중에는 T림프구의 증식을 선택적으로 촉진시키는 가용성인자가 존재한다는 것이 밝혀졌다. 이 인자는 T cell growth factor (TCGF)로 호칭되었으며 그 후 여러 가지 다른 이름들로 밝혀진 인자들과 동일 물질로 동정되면서 IL-2로 새로운 이름을 갖게 되었다. 현재까지 알려진 IL-2의 생물학적 작용으로서는 항원 특이적 killer 세포(CTL)의 증식 및 분화, NK세포의 증식과 그 활성의 증강, lymphokine-activated killer (LAK)세포의 유도, 인터페론-감마(interferon- $\gamma$ , IL- $\gamma$ ) 생성의 증강, 림포톡신(lymphotoxin, LT)이나 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)생성의 증강, B세포의 증식과 분화 등이 알려져 있다. CTL, NK, LAK는 모두 종양에 대한 면역저항성에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있는 세포이다. 따라서 IL-2는 생체의 항 종양작용에 있어 지대한 역할을 하고 있는 것으로 밝혀지고 있다.<sup>6,12,16)</sup>

IL-4가 항 종양작용을 나타낸다는 보고가 있다. Tepper등(1989)은 IL-4유전자를 종양세포에 도입시켜 고농도의 IL-4를 생성하는 세포주를 만들었다. 이 세포주를 여러 종양세포와 혼합하여 누드마우스의 피하에 주입한 다음 종양의 발육상태를 관찰한 결과 IL-4생성세포와 종양세포를 혼합한 경우의 종양 생착 빈도는 plasmacytoma, mammary adenocarcinoma, Abelson virus transformed Balb/c 3T3 fibroblast에서는 0이었고, 그 외 종양의 경우에도 종양괴소의 크기가 IL-4생성세포를 포함하지 않은 경우와 비교하면 약 3%이었다. 이러한 실험결과는 IL-4가 분명히 항 종양성을 나타냄을 의미한다 하겠다.

IL-10은 Th2세포에 의해서 생성되면서 Th1세포의 기능을 저해하는 사이토카인을 탐색하던 과정에서 발견되었다. 즉, Th2세포를 Th1세포, 항원제시세포(antigen-presenting cell, APC), 그리고 항원과 혼합 배양시켰을 때 사이토카인의 생성을 저해시키는 능력을 가진 배양 상층액이 발견된 것이다. 이러한 저해능의 효과는 Th1세포에 대하여 특이적 이었으며 이런 인자를 가리켜 사이토카인 생성저해인자(cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF)라 명명하였다. 이후

여러 가지 면역화학적, 생화학적 분석시험이 이루어지게 되었으며 Moore등에 의해서 인터루킨-10으로 새로운 이름을 갖게 된 것이다. IL-10의 주기능으로 대식세포에 있어서는 사이토카인 및 NO생성저해, Th1세포에 대하여 APC기능저해가 나타나며, NK세포에서의 사이토카인 생성저해, T세포에서는 Th1세포나 CD8세포에 의한 사이토카인 생성저해, B세포에서는 세포증식, 항체분비, MHC class II발현의 증가, 비만세포에서는 세포증식, protease발현의 증가, 생체에서 지연형 과민반응의 저해 등이 알려지고 있다.<sup>1,5,8,14)</sup>

본 실험에서는 상기와 같은 기능을 가진 IL-2, IL-4, IL-10이 마우스의 비장세포에 암세포인 Sarcoma 180 (S 180)세포를 노출시키거나 마우스의 복강 내로 암세포를 이식시켰을 때 어떻게 나타나는지 그 생성량을 정량 분석하여 암세포존재하의 면역반응을 cytokine 생성차원에서 관찰하고자 하였다.

마우스비장세포에 S180세포를 작용시켜 혼합 배양했을 때 비장세포의 부착성에 따른 세포의 종류 및 배양시간에 따라 배양 상층액 내에 유출되어 나타나는 IL-2생성양상은 S180세포만의 배양, 부착성(adherent, AD)세포만의 배양, AD세포에 S180세포를 추가하여 배양한 경우에는 IL-2가 검출되지 않았으나 비부착성(non-adherent, NAD)세포만의 배양에서는 72시간째에 미량이나마 생성하였으며 NAD나 AD와 NAD를 모두 포함하는 전체비장(whole, W)세포군에 S180을 추가하여 배양하면 24시간째부터 생성하기 시작하여 72시간째에는 각각의 대조군에 비하여 유의한 증가를 보이고 있다. 이러한 결과로부터 AD세포의 경우는 S180에 노출되더라도 IL-2생성에는 아무런 변화를 보이지 않으나 NAD세포와 W세포는 S180세포에 노출되면 초기 IL-2생성 시간의 단축과 그 생성량의 증가를 보임으로서 IL-2생성에 있어서의 면역반응은 이루어진다고 볼 수 있다.

IL-4생성은 S180세포만의 배양에서도 전 시간대에서 검출되고 시간이 지나면서 그 양이 증가됨으로서 S180세포와 같은 암세포에서 생성되는 IL-4는 생체내 면역반응에 영향을 끼치게 될 것이며 IL-4가 항암성을 나타낸다는 보고에 비쳐 봤을 때 흥미로운 일이다. AD나 NAD세포만의 배양에서는 배양초기보다 배양시간이 경과되면서 점점 감소되었고 W세포만의 배양에서는 시간이 경과되면서 증가와 감소가 반복되는 생성양상을 보였으나 AD, NAD, W세포에 S180세포를 추가하

여 배양한 경우에는 배양 후기에 유의한 증가를 보이고 있다. 따라서 S180세포에 노출된 비장세포의 IL-4생성 또한 면역반응에 미칠 영향이 예상된다.

IL-10생성은 S180세포만의 배양에서도 전 시간대에서 검출되었으며 AD세포, NAD세포, W세포만의 배양에서도 나타났으나 AD, NAD, W세포 각각에 S180세포를 추가하여 배양한 경우에는 배양시간이 길어지면서 증가폭이 커져 대조군보다 10배에서 80배 수준까지 높은 증가를 보이고 있다. 이러한 증가는 IL-2나 IL-4의 증가와 비교했을 때 큰 차이를 보인 결과로서 IL-10이 가지고 있는 사이토카인 생성억제기능을 고려하면 면역반응에 지대한 영향을 미칠 것으로 생각된다.

마우스 복강 내에 S180세포이식 후 IL-2의 생성은 혈청 내에서 대조군 및 이식군 모두 검출되지 않았으며, 복강액에서는 대조군에서 검출되지 않았으나 이식군에서 미량이나마 나타나고 있다. 혈액 내에서의 IL-2검색은 IL-2분해물질에 의한 분해작용 등으로 검출되지 않은 것으로 생각되며 복강액에서 검출되는 것으로 보아서는 복강 내 세포가 S180세포에 반응하여 IL-2를 생성하고 있음을 시사한다.

마우스 복강 내에 S180세포이식 후 IL-4의 생성은 혈청 내 혹은 복강액에서 대조군 및 이식군 모두 검출되었으며 대조군에 비하여 이식군에서 유의한 감소를 나타냈다. 이러한 결과는 *in vitro*와 *in vivo*시험의 뚜렷한 차이를 보인 것으로서 일정세포에 암세포를 노출시킨 경우에는 증가를 보였지만 생체라는 총체적인 조건에 암세포를 노출시켰을 때에는 감소를 보인 것이다. 따라서 생체는 S180세포에 노출됨으로서 IL-4의 감소를 가져왔고 IL-4에 의한 면역반응의 기능저하가 예견된다.

마우스 복강 내에 S180세포이식 후 IL-10의 생성은 혈청 내에서 대조군 및 이식군 모두 검출되었고 대조군보다 증가를 보임으로서 시험관배양실험과 유사한 결과를 보였으나 그 증가폭은 차이가 있었다. 복강액에서도 24시간째에는 증가를 보였다. 미량으로도 효과를 나타내는 사이토카인의 일반적 특성을 생각했을 때 생체에서의 이와 같은 IL-10증가효과는 그 다음 면역반응에 상당한 영향을 줄 것으로 생각된다.

본 실험을 통하여 암세포가 면역담당세포에 노출시키거나 암세포를 생체에 이식시켰을 때 생성되어 나타나는 여러 가지 사이토카인 중 IL-2, IL-4, IL-10의 생성을 비교 검토한 결과 IL-4의 생체 내 감소에 비하여

IL-10은 배양 및 생체에서 높은 증가를 나타냈다. IL-4의 항암 관련 기능을 비롯한 여러 기능을 감안한다면 유전학적인 방법에 의해서 암 숙주의 감소된 IL-4생성능을 회복시키거나 그렇지 않으면 재 조합 IL-4를 직접 투여하는 방법 등이 기대된다. 과다한 IL-10의 생성은 그 다음 주요 사이토카인 생성억제라고 하는 면역불균형상태를 유발하기 때문에 과잉의 IL-10을 차단할 수 있는 방법의 도입이 요망된다. 더불어 이러한 결과가 암 치료에 응용되기 위하여서는 암세포 존재 하에서 이들 사이토카인을 정상화시켰을 때의 암세포의 증식을 비롯한 여러 생물학적 실험이 뒷받침되어야 하리라고 생각한다.

## 결 론

본 실험에서는 마우스의 비장세포에 암세포인 Sarcoma 180 (S 180)세포를 노출시키거나 마우스의 복강 내로 암세포를 이식시켰을 때 나타나는 IL-2, IL-4, IL-10을 정량 분석하여 암세포존재하의 면역반응을 cytokine 생성차원에서 관찰하고자 하였다.

마우스비장세포에 S180세포를 노출시켜 혼합 배양하였을 때 비장세포 중의 부착성세포의 경우는 S180에 노출되더라도 IL-2생성에는 아무런 변화를 보이지 않으나 비부착성세포와 전체비장세포는 S180세포에 노출되면 배양초기에서부터 IL-2가 생성되었으며 시간이 경과되면서 생성량의 증가를 보였다.

IL-4생성은 S180세포만의 배양에서도 생성되었으며 부착성세포나 비부착성세포만의 배양에서는 배양초기보다 배양시간이 경과되면서 점점 감소되었고 전체비장세포만의 배양에서는 시간이 경과되면서 증가와 감소가 반복되는 생성양상을 보였으나 부착성세포나 비부착성세포 또는 전체비장세포에 S180세포를 추가하여 배양한 경우에는 배양후기에 유의한 증가를 보였다.

IL-10생성은 S180세포만의 배양에서도 전 시간대에서 생성되었으며 부착성세포나 비부착성세포 또는 전체비장세포만의 배양에서도 생성되었으나 부착성세포나 비부착성세포 또는 전체비장세포들의 각각에 S180세포를 추가하여 배양한 경우에는 배양시간이 길어지면서 증가폭이 커져 대조군보다 10배에서 80배 수준까지 현저한 증가를 보였다.

마우스 복강 내에 S180세포이식 후 IL-2의 생성은

혈청 내에서 검출되지 않았으며 복강액에서는 미량 나타났다. IL-4의 생성은 혈청 내 혹은 복강액에서 모두 검출되었으며 대조군에 비하여 이식군에서 유의한 감소를 나타냈다. 따라서 생체는 S180세포에 노출됨으로써 IL-4감소를 가져왔고 IL-4에 의한 면역반응의 기능 저하가 예견된다. IL-10의 생성은 혈청 내에서 대조군 및 이식군 모두 검출되었고 대조군보다 증가를 보임으로서 시험관배양실험과 유사한 결과를 보였다. 복강액에서도 24시간째에는 증가를 보였다. 생체에서의 이와 같은 IL-10증가효과는 그 다음 면역반응에 상당한 영향을 줄 것으로 생각된다.

### 참고 문헌

- 1) de Waal Malefyt R, Jhaanen H, Spits MG, Roncarolo A, te Velde C, Figdor K, Johnson R, Kastelein H, Yssel JE, deVries. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174: 915-924.
- 2) Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell: IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-2095.
- 3) Grim EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine activated killer cell phenomenon. I. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1982; 155: 1823-1841.
- 4) Herbermann RB. Interleukin-2 therapy of human cancer: Potential benefits versus toxicity. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1-4.
- 5) Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin-10. *Immunol Today* 1992; 13: 198-200.
- 6) Lindemann A, Brossart P, Hoffken K, Flabhove M, Voliotis D, Diehl V, Hecker G, Wagner H, Mertel-smann R. Immunomodulatory effects of ultra-low-dose interleukin-2 in cancer patients: a phase-IB study. *Cancer Immunol Immunother* 1993; 37: 307-315.
- 7) Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo RC. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976; 193: 1007-1008.
- 8) Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunol Today* 1991; 12A: 49-53.
- 9) Ortaldo JR, Manson A, Overton R. Lymphokine-activated killer cells: Analysis of progenitors and effectors. *J Exp Med* 1986; 164: 1193-1205.
- 10) Paul WE. Interleukin 4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Nature* 1991; 77: 1859-1863.
- 11) Peschel C, Green I, Ohara J, Paul WE. Role of B cell stimulatory factor 1/interleukin 4 in clonal proliferation of B cells. *J Immunol* 1987; 139: 3338-3347.
- 12) Rakhmilevich AL, North RJ. Elimination of CD4<sup>+</sup> T cells in mice bearing an advanced sarcoma augments the antitumor action of interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 1994; 38: 107-112.
- 13) Romagnani S. Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today* 1992; 13: 379-381.
- 14) Romagnani S. Biology of human Th1 and Th2 cells. *J Clin Immunol* 1995; 15: 121-129.
- 15) Ruscetti FW, Morgan DA, Gallo RC. Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro. *J Immunol* 1977; 119: 131-138.
- 16) Shiiba K, Suzuki R, Kawakami K, Ohuchin A, Kumagai K. Interleukin 2-activated killer cells: generation in collaboration with interferon  $\gamma$  and its suppression in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 1986; 21: 119-128.
- 17) Suda T, O'garra A, MacNeil I, Fisher M, Bond M, Zlotnik A. Identification of a novel thymocyte growth-promoting factor derived from B cell lymphomas. *Cell Immunol* 1990; 129: 228-240.
- 18) Taniguchi T, Matsui T, Fujita M, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, Hamuro J. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 1983; 302: 305-310.
- 19) Tepper RI, Pattengale PK, Leder P. Murine interleukin 4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* 1989; 57: 503-512.
- 20) van der Poll T, Jansen J, Levi M, ten Cate H, ten Cate JW, van Deventer SJH. Regulation of interleukin 10 release by tumor necrosis factor- $\alpha$  in humans and chimpanzees. *J Exp Med* 1994; 180: 1985-1988.