

Mitomycin-C, Cisplatin, Vinblastine이 마우스 자연살해세포 활성에 미치는 영향

고신대학교 의과대학 비뇨기과학교실, ¹미생물학교실, ²부산대학교 식품영양학과

강헌중 · 김광혁¹ · 류현열 · 박건영²

Effects of Mitomycin-C, Cisplatin, and Vinblastine on Natural Killer Cell Activity in Mice

Heon Joong Kang, Kwang Hyuk Kim¹, Hyun Yul Rhew,
and Kun-Young Park²

Departments of Urology, ¹Microbiology, Kosin Medical College, Kosin University
Pusan 602-702, Korea, ²Department of Food Science and Nutrition,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Natural killer (NK) cells play a central role in immune surveillance against tumors and viral infection. In this study, we investigated the effect of various clinically used chemotherapeutic agents on NK cell activity. Splenic mononuclear cells from healthy normal mice, C57BL/6, were tested for their cytotoxic activity *in vitro* in the presence of mitomycin C, cisplatin, and vinblastine used for treatment of urologic tumors. Also, normal mice were intravenously injected with these agents for *in vivo* tests. Using MTT assay, natural killer (NK) cell-mediated growth inhibition of tumor cell was measured in normal and agents-exposed groups. Non-adherent splenocytes of normal or agents-exposed groups were cultured with Yac-1 cells at two different effector/target (E/T) cell ratios of 200/1 and 100/1 in an assay volume of 0.2 ml. After the optical density of culture wells containing MTT solution was measured at a wavelength of 540 nm, the percentage of dead cells relative to the control target cell number was calculated. Mitomycin-C and cisplatin suppressed the NK activity of mouse splenic mononuclear cells *in vitro*, whereas vinblastine enhanced or suppressed its activity according to doses with showing enhancement at 1.0 and 10.0 µg and suppression at 0.1 µg. In mice injected with these agents, mitomycin-C and cisplatin enhanced the NK activity by twice injections, vinblastine by once and three times injections. In contrast, its activity was suppressed by once injection with mitomycin-C or cisplatin, and by twice injections with vinblastine. Therefore, the NK cell activity by exposure with anti-tumor agents shows differences according to kinds and doses of drug, and injection number *in vivo*. It was concluded that vinblastine had a higher effectiveness than mitomycin-C or cisplatin by showing augmentation of NK cell activity both *in vitro* and *in vivo*.

Key Words: Natural killer cell activity, Cisplatin, Mitomycin-C, Vinblastine, C57BL/6 mouse

서 론

암환자에 대하여 세포독성을 발휘하는 약제투여의 일차적인 치료목적은 직접적으로 암세포에 손상을 주는데 있지만 이러한 약제들이 숙주의 방어기전에 상당한 영향을 끼칠 가능성이 있다.¹⁻⁷⁾ 실제로 일부 약제는 면역 억제 능력을 발휘하기도 하고 어떤 약제들은 숙주저항을 증강시키는 면역조절활성을 보이기도 한다. 약제의 농도에 따라서는 면역에 관계하고 있는 특정세포의 기능을 항진시키면서 항암적 세포독성에는 아무런 저해를 나타내지 않는 경우들도 연구 보고되고 있다.⁸⁾ 근래에는 항암제에 biological response modifier(BRM)을 조합하여 치료에 응용하기도 한다.⁹⁾ 항암제가 면역조절효과를 가지고 있다는 사실은 Mihich⁵⁾에 의해서 처음 보고된 이래로 이러한 약제들의 항암작용과 면역반응 조절에 대한 많은 보고들이 나타나게 되었다.¹⁰⁻²⁷⁾

일반적으로 항원에 대한 반응은 반응세포의 대사적 변화, 특이세포의 분화와 증식, 이들 세포와 이들 세포들이 생성하는 산물과의 반응, 표적물과 작용자 사이의 반응 등의 현상들에 의해서 나타나는 결과이다. 항암제와 표적세포와의 상호반응은 항암제와 표적세포의 생화학적 특성에 근거하여 특이적이라 할 수 있으며 실제 여러 가지 관여인자들의 복합작용은 약제의 선택성에 기초하고 있다. 따라서 이들 약제들은 독특한 방법으로 면역관련세포들에 영향을 미치게 될 것이다.

자연살해(natural killer, NK)세포는 large granular lymphocytes (LGLs)로서 특정의 암세포나 바이러스에 감염된 세포 등을 파괴하며 종양의 형성이나 바이러스 감염에 대한 숙주방어에 관여할 뿐만 아니라 체액성 면역이나 조절작용을 조절하고 있다.^{28,29)} 대다수의 NK 세포가 CD16과 CD56과 같은 세포 표면항원을 발현하고 있다. LGLs는 사람 말초혈액 림프구의 5~10%를 점유하고 있고 최소한 그 70%가 NK활성을 나타내고 있다.³⁰⁾ NK세포의 활성화는 대조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC)와는 비 의존적으로 작용하여 방어적 항암면역에서 큰 역할을 담당하게 된다.^{31,32)} NK세포에 대한 모노클론항체로 NK세포를 제거시킨 동물은 암세포 성장을 억제할 수 없음이 동물 실험 결과 밝혀졌고 NK세포활성에 대하여 interferon이나 interleukin-2와 같은 면역활성 물질이 증강작용을

나타낸다는 것 또한 밝혀졌다.³³⁻³⁸⁾ Lymphokine-activated killer (LAK)세포는 바로 NK세포가 활성화되어 나타난 결과로 보고되고 있다.³⁹⁻⁴¹⁾ 그러나 항암제와 NK세포활성에 관한 보고는 아직 지극히 미흡한 실정이다.

본 실험에서는 항암제 중에서 비뇨기계 암종치료에 많이 사용되고 있는 mitomycin C, cisplatin, vinblastine을 선택하여 암세포에 대한 세포성 방어능의 하나를 나타내는 자연살해세포(natural killer cell, NK)활성에 미치는 효과를 보고자 하였다. 본 실험을 통하여 암치료 목적의 항암제들이 세포성 면역계의 NK 세포에 미치는 영향을 관찰함으로써 암세포 제어에 관계하는 작용자 세포 가운데 중요한 위치를 차지하고 있는 NK세포의 기능변화를 탐색하고자 한다.

재료 및 방법

1) 표적세포의 준비

NK세포에 대한 표적세포(target cell, TC)로서는 마우스 T lymphoma 유래의 세포주인 Yac-1세포를 25 cm² 플라스틱 후라스크(Falcon, Oxnard, U.S.A.)에서 10% 우태아혈청(fetal calf serum, FCS, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 2 mM L-glutamine (Gibco, Grand Island, U.S.A.), 100 IU/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B (Gibco, Grand Island, U.S.A.)를 포함시킨 RPMI 1640 배지(complete RPMI 1640)로 부유 배양시켜 유지하였다.

2) 마우스 비장세포의 분리

마우스(C57BL/6) 비장세포의 분리는 경부를 탈구하여 희생시킨 마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하여 4°C의 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco, Grand Island, U.S.A.)으로 2회 세척하였다. 이를 직경 60 mm의 조직배양용 접시(Costar, Cambridge, 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 300 g에서 5~10분 원심한 후 HBSS로 1회 원심 세척한 다음 혼재되어 있는 적혈구를

tris-buffered 0.87% NH₄Cl용액으로 3분간 처리한 후 HBSS로 2회 원심 세척하여 사용하였다.

3) 작동세포의 준비

(1) 정상 마우스의 작동세포: 마우스에서 분리된 비장세포 부유액 내에 포함된 플라스틱 부착성세포를 제거하기 위하여 마우스 비장세포를 complete RPMI 1640배지에 부유시킨 다음 배양기에 1시간 동안 정치하였다. 시간이 경과된 후 non-adherent cell만을 수거하여 작동세포(effector cells, EC)로 사용하였다.

(2) 시료의 *in vitro* 노출: 마우스 비장세포로부터 non-adherent cell만을 수거하여 2×10⁶ 세포/ml로 세포농도를 조절한 다음 세포 부유액 ml당 PBS에 녹인 mitomycin-C (한국유나이티드제약, 한국), cisplatin (보령제약, 한국), vinblastine (한국유나이티드제약, 한국)을 0.1, 1.0, 10.0 µg 되게 가하여 2시간 동안 노출시켰다. 시간이 경과된 후 세포를 PBS로 3회 원심 세척하여 EC로 사용하였다.

(3) 시료의 *in vivo* 노출: 약제를 마우스 복강내로 투여시킨 후 비장을 분리하여 비장세포 부유액을 준비하는 과정은 상기와 동일하였다. 시료의 투여량은 마우스 당 mitomycin C 14 µg, cisplatin 14 µg, vinblastine 2.5 µg으로 하여 꼬리정맥에 투여하였으며 1, 2, 3회 투여 군으로 나누어 1회 투여 군은 1일에, 2회 투여 군은 1일과 3일에, 3회 투여 군은 1일, 3일, 5일에 시료를 투여하였다. 비장의 분리는 7일에 시행하였다. 대조군 및 각 시험군의 마우스 수는 10마리씩으로 하였다.

4) 세포성장 저해시험

Effector/target cell ratio (E/T ratio)는 200 : 1과 100 : 1로 하였다. 96 wells microplate를 사용하여 well당 TC의 수를 1,000개씩 분주(50 µl)한 다음 EC를 상기한 비율에 준하여 중첩 분주(50 µl)하였다. 대조군으로는 각 세포농도의 EC만의 배양, TC만의 배양 그리고 배지만의 배양 well들을 준비하였다. 사용배지로는 complete RPMI 1640배지에 2-mercaptoethanol, 10⁻⁵ M을 추가하여 사용하였다. 각각의 시험은 triplicate로 시행하였다. 분주가 완료된 plate는 5% CO₂, 37°C 그리고 충분한 습도가 유지되고 있는 배양기에 4일 동안 배양하였다. 4일 배양 후에 plate의 각 well에 MTT (PBS 1 ml 당 5 mg의 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium

bromide)액 10 µg씩을 적하하고 4.5시간 추가 배양하였다. 시간이 경과된 후 10% SDS-0.02M HCl액 25 µl씩을 well에 적하하여 실온과 암실조건에서 하룻밤 방치하였다. Optical density (OD)는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, U.S.A.)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. OD에서 나타난 수치로부터 % dead cell (% D)은 다음과 같은 식으로부터 산출되었다.

$$\% D = \left(1 - \frac{OD_{\text{effector+target}} - OD_{\text{effector}}}{OD_{\text{target}} - OD_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

5) 통계학적 분석

실험성적은 평균 또는 평균±표준편차로 나타냈으며 각 군간의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하고 P값이 0.05 미만일 때 유의 있는 차로 간주하였다.

결 과

1) *In vitro* 시료노출에 따른 마우스의 NK세포활성

정상마우스의 비장세포에 mitomycin C를 노출시킨 후 나타나는 NK세포활성은 비노출군인 대조군에 비하여 감소를 보임으로서 *in vitro*에서의 시료노출에 의한 NK세포활성의 저하를 나타냈다. 즉, NK세포활성은 E/T ratio 200/1에서 ml당 시료를 0.1, 1.0, 10.0 µg 작용시켰을 때 각각 29.93, 30.69, 23.29%를 나타낸 반면 대조군에서는 44.46%를 나타냈다. E/T ratio 100/1에서는 같은 dose에 의해서 0.62, 13.15, 15.89%를 나타낼 때 대조군에서는 21.92%를 나타냈다(P<0.01)(Fig. 1).

정상마우스의 비장세포에 cisplatin을 노출시킨 후 나타나는 NK세포활성은 비노출군인 대조군에 비하여 감소를 보임으로서 *in vitro*에서의 시료노출에 의한 NK세포활성의 저하를 나타냈다. 즉, NK세포활성은 E/T ratio 200/1에서 ml당 시료를 0.1, 1.0, 10.0 µg 작용시켰을 때 각각 34.86, 25.96, 25.55%를 나타낸 반면 대조군에서는 44.46%를 나타냈다. E/T ratio 100/1에서는 같은 dose에 의해서 9.38, 13.42, 4.39%를 나타낼 때 대조군에서는 21.92%를 나타냈다(P

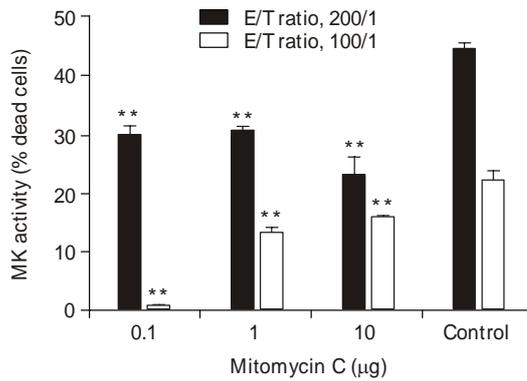


Fig. 1. NK cell mediated cytotoxicity in mitomycin-C-exposed effector cells at the effector/target cell ratio of 200/1 and 100/1. Values shown are means±standard deviations for triplicate cultures, which were assayed in duplicate. **P<0.01 compared with control.

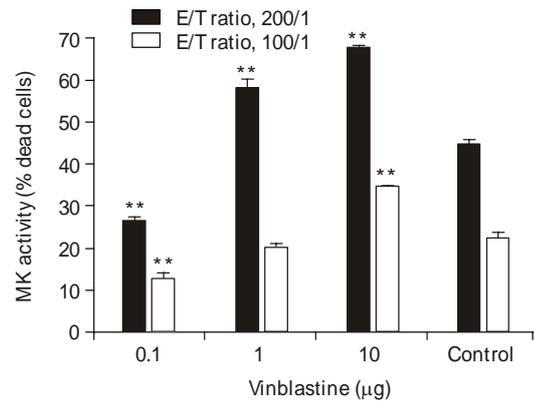


Fig. 3. NK cell mediated cytotoxicity in vinblastine-exposed effector cells at the effector/target cell ratio of 200/1 and 100/1. Values shown are means±standard deviations for triplicate cultures, which were assayed in duplicate. **P<0.01 compared with control.

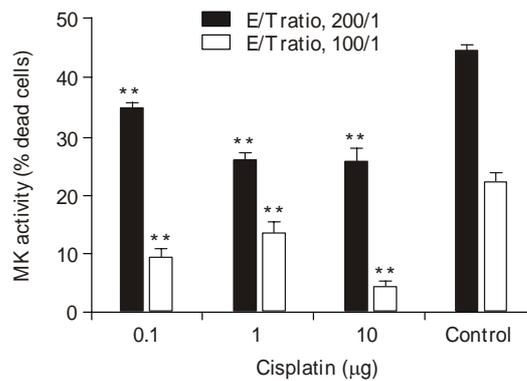


Fig. 2. NK cell mediated cytotoxicity in cisplatin-exposed effector cells at the effector/target cell ratio of 200/1 and 100/1. Values shown are means±standard deviations for triplicate cultures, which were assayed in duplicate. **P<0.01 compared with control.

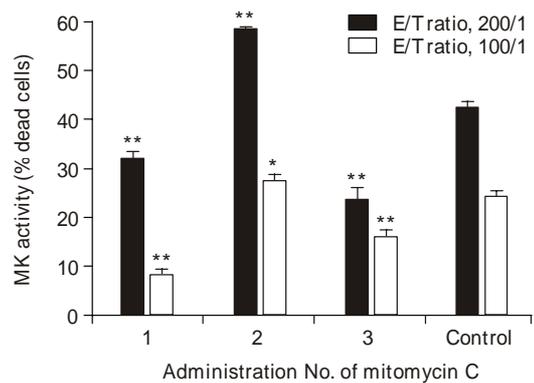


Fig. 4. NK cell mediated cytotoxicity in mitomycin-C-exposed mice at the effector/target cell ratio of 200/1 and 100/1. Mice were i.v. injected with 14 µg of mitomycin-C. Value shown are means±standard deviations for triplicate cultures, which were assayed in duplicates. *P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

<0.01)(Fig. 2).

정상마우스의 비장세포에 vinblastine을 노출시킨 후 나타나는 NK세포활성은 dose에 따라 비 노출군인 대조군에 비하여 증가 혹은 감소를 보임으로서 *in vitro*에서의 시료노출에 의한 NK세포활성이 mitomycin C와 cisplatin과는 다른 양상을 보였다. 즉, NK세포활성은 E/T ratio 200/1에서 ml당 시료를 0.1, 1.0, 10.0 µg 작용시켰을 때 각각 26.37, 57.94, 67.61%를 나타낸 반면 대조군에서는 44.46%를 나타냈다. 100/1의 E/T

ratio에서는 같은 dose에 의해서 12.67, 20.00, 34.32%를 나타낼 때 대조군에서는 21.92%를 나타냈다(P<0.01)(Fig. 3).

2) *In vivo* 시료노출에 따른 마우스의 NK세포활성

*In vivo*시험에서 정상마우스의 꼬리 정맥내로 mitomycin C액을 주사한 후에 분리된 비장세포가 나

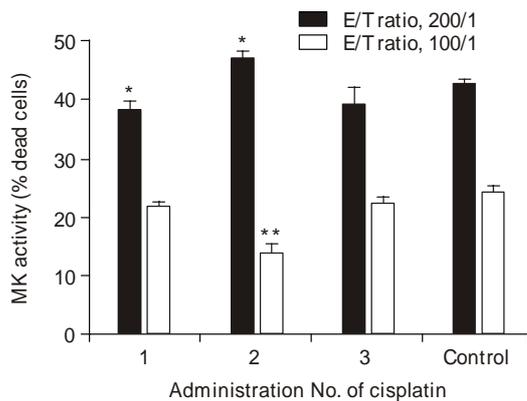


Fig. 5. NK cell mediated cytotoxicity in cisplatin-exposed mice at the effector/target cell ratio of 200/1 and 100/1. Mice were i.v. injected with 14 µg of cisplatin. Value shown are means±standard deviations for triplicate cultures, which were assayed in duplicates. *P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

타내는 NK세포활성은 시료의 노출빈도에 따른 차이를 보기 위하여 1회, 2회, 3회 투여 군으로 나누어 시험하였다. 대조군에서도 시료군과 마찬가지로 PBS만을 시료의 노출빈도와 맞게 투여하여 시험하였다. 먼저, E/T ratio 200/1에서 mitomycin C, 14 µg을 1, 2, 3회 투여한 군에서는 대조군, 42.65%에 비하여 32.18, 58.44, 23.54%를 나타냄으로서 2회 투여 군에서는 활성의 증가를 보였다. 100/1 E/T ratio에서는 8.30, 27.49, 15.92%를 보임으로서 마찬가지로 2회 투여 군에서 대조군의 24.08%보다 증가하였다(Fig. 4).

정상마우스의 정맥내로 cisplatin액을 주사한 후에 분리된 비장세포가 나타내는 NK세포활성은 E/T ratio 200/1에서 cisplatin, 14 µg을 1, 2, 3회 투여한 군에서는 대조군, 42.65%에 비하여 38.37, 47.21, 39.25%를 나타냄으로서 2회 투여군에서는 활성의 증가를 보였다. E/T ratio 100/1에서는 21.84, 13.74, 22.30%를 보임으로서 대조군의 24.08%보다 모두 감소하였다(Fig. 5).

정상마우스의 정맥 내로 vinblastine액을 주사한 후에 분리된 비장세포가 나타내는 NK세포활성은 E/T ratio 200/1에서 vinblastine, 2.5 µg을 1, 2, 3회 투여한 군에서는 대조군, 42.65%에 비하여 48.58, 28.10, 71.16%를 나타냄으로서 1회와 3회 투여 군에서 활성의 증가를 보였다. E/T ratio 100/1에서는 23.74,

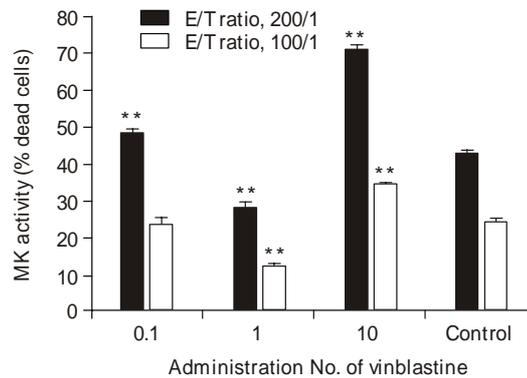


Fig. 6. NK cell mediated cytotoxicity in vinblastine-exposed mice at the effector/target cell ratio of 200/1 and 100/1. Mice were i.v. injected with 2.5 µg of vinblastine. Value shown are means±standard deviations for triplicate cultures, which were assayed in duplicates. **P<0.01 compared with control.

12.38, 34.49%를 보임으로서 대조군의 24.08%보다 3회 투여군에서 활성의 증가를 보였다(Fig. 6).

고 찰

자연살해(natural killer, NK)세포는 암 마우스에서 암 세포에 대한 특이적 세포독성 T림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)활성을 측정하는 과정에서 우연히 발견된 세포이다. 즉, 대조로서 사용된 면역시킴지 않은 정상마우스에서도 암세포 살해효과를 나타내는 현상을 발견함으로써 비 특이적으로 암세포를 살해하는 세포의 존재를 인지하게 된 것이다. NK세포는 바이러스나 세포내 기생세균의 감염초기에 그 활성은 IFN-α, IFN-γ, IL-12와 같은 cytokine들에 의해서 자극 받게 된다. 바이러스 감염 중에서 이러한 cytokine들은 신속히 생성됨으로서 NK활성곡선의 peak와 시간적으로 유사하며 NK세포는 세포독성 T세포(cytotoxic T cell)가 기능성 CTL로의 증식과 분화가 이루어지기 전에 방어 의 일선을 맡게 된다. NK세포는 CTL과 유사한 과정으로 바이러스 감염세포나 암세포를 살해한다. NK세포의 세포질에는 perforin과 granzyme을 포함하는 여러 개의 granule들을 함유하고 있다. NK세포가 표적세포에 부착된 다음에는 perforin과 granzyme이 방출되는 탈과립(degranulation)이 일어난다. 방출된 perforin은 CTL에서 처럼 표적세포에 pore를 형성시킨다. 또한

NK세포는 apoptosis에 의한 표적세포파괴를 유도하기도 한다. CTL과는 다른 NK세포의 특징으로서는 첫째, 항원 특이적인 T-cell receptor (TCR)나 CD3을 발현하지 않는다는 것이며, 둘째, NK세포의 표적세포 인식에 MHC와는 관련을 갖지 않는다는 것이다.^{29,31,32,42-45)}

Xu등⁴⁶⁾은 fibrosarcoma를 이식시킨 쥐에 bleomycin을 투여한 후 이 항암제가 나타내는 면역학적 역할을 관찰하기 위하여 암세포와 림프구를 혼합 배양하였다. 이들은 여기에서 나온 결과로서 bleomycin에 의해서 세포 증개성 항종양 면역반응에 관여하는 T-림프구에 아무런 영향을 주지 않고 종양 특이적인 T-억제세포를 제거할 수 있음을 제의한 바 있다. Crum등⁴⁷⁾은 임상시험 보고서에서 cisplatin을 낮은 양으로 투여했을 때에는 면역조절작용을 나타내고 BRM과 혼합하여 사용하였을 때는 그 효과가 뚜렷하였으나 높은 양의 cisplatin과 BRM을 혼합 투여하였을 때는 면역조절작용이 소멸될 수 있음을 지적한 바 있다. Bodenheimer등⁴⁸⁾은 쥐의 Kupffer세포에 미치는 mitomycin-C의 효과를 본 실험에서 mitomycin-C처리군에서 Kupffer세포의 식균작용, C3b 수용체 결합능, 라이즈효소활성이 저하되어 나타남으로서 일반적 숙주방어능에 문제가 야기될 수 있음을 보고한 바 있다. Arinaga등⁴⁹⁾은 암환자 정맥내로 cisplatin을 투여한 후 환자의 말초혈 단핵구를 분리하여 lymphokine-activated killer (LAK)활성을 측정하였다. 그 결과 말초 단핵구의 LAK활성능이 유의하게 증가되는 것을 발견하였으며 단구의 TNF-alpha생성이 약 투여 군에서 증가되는 것을 볼 수 있었다. Kouchi등⁵⁰⁾은 마우스에 cisplatin을 투여했을 때 비장의 B 림프구보다 T 림프구의 기능이 더욱 저해됨으로서 T 림프구에 대한 면역억제효과가 더 크게 나타남을 보고하였다.

본 실험에서는 비뇨기 계 암 증 치료에 많이 사용되고 있는 mitomycin C, cisplatin, vinblastine이 암세포에 대한 세포성 방어능을 나타내는 자연살해세포 (natural killer cell, NK)활성에 미치는 효과를 보기 위하여 마우스의 비장세포나 마우스의 정맥 내로 본 약제를 처리한 후 NK세포의 활성변화를 탐색하고자 하였다.

정상마우스의 비장세포에 mitomycin C를 노출시켰을 때 NK세포활성의 감소를 나타냈다. 따라서 Bodenheimer등⁴⁸⁾이 보고한 쥐 대식세포의 활성의 감소 뿐만 아니라 *in vitro*에서 NK세포도 그 활성이 감소

됨을 알 수 있다. 정상마우스의 비장세포에 cisplatin을 노출시켰을 때도 NK세포활성의 감소를 나타냈다. Cisplatin을 NK세포에 직접 노출시킴으로서 세포의 활성화에 영향을 미친 것으로 보인다. 정상마우스의 비장세포에 vinblastine을 노출시켰을 때는 dose에 따라 증가 혹은 감소를 보였다. 즉, 1.0 µg 이상을 작용시켰을 때 활성의 증가효과를 보이게 되고 0.1 µg 이하에서는 오히려 그 활성이 감소하였다. 이는 약제의 노출량에 따라 면역반응이 달라질 수 있음을 보인 것이다. 이러한 결과는 약제의 투여량에 따라 실제 작용 자 세포의 활성화에 미치는 효과를 보여준 것으로서 낮은 투여량에서는 원래 NK세포가 갖고있는 활성화에 간섭으로 작용하지만 약제의 농도가 일정농도 이상이 되어야만 NK세포 활성을 증가시키는 것으로 봐서 이러한 약제의 경우는 적정수준의 투여 량 결정에 더욱 주의할 필요가 있다고 생각한다.

일정 dose 하에서 시료별 NK활성에 미치는 효과를 비교하면 NK활성저해효과가 0.1 µg을 작용시켰을 때 E/T ratio 200/1에서는 vinblastine, mitomycin C, cisplatin 순이었으나 E/T ratio 100/1에서는 mitomycin C, cisplatin, vinblastine 순이었다. 이는 작용자 세포의 수에 따라서도 약의 효과가 달라질 수 있음을 의미한다. 1.0 µg을 작용시켰을 때는 E/T ratio 200/1에서 vinblastine의 경우에서만 NK활성을 촉진시켰으며 cisplatin과 mitomycin C에 의해서는 활성이 감소되었으며 E/T ratio 100/1에서는 mitomycin C, cisplatin, vinblastine 순으로 감소되었다. 10.0 µg을 작용시켰을 때에도 E/T ratio 200/1에서 vinblastine의 경우에서만 NK활성이 증가되었으며 cisplatin과 mitomycin C에 의해서는 활성이 감소되었다. E/T ratio 100/1에서도 vinblastine의 경우에서만 NK활성이 증가되었으며 cisplatin, mitomycin C 순으로 감소되었다. 따라서 vinblastine의 경우, *in vitro*노출에 의해서 cisplatin, mitomycin C와는 다르게 NK활성이 증가됨을 알 수 있다. 따라서 항암 작용을 나타내는 약제가 표적이 되는 암세포를 직접적으로 저해시킬 수 있을 뿐만 아니라 숙주의 면역계에서 암세포에 대한 면역학적 살해기능을 갖는 NK세포의 활성을 증가시킬 수 있는 활성인자로서 작용할 수 있다면 암세포 방어차원에서 이중적 효과를 나타내게 될 것이다.

*In vivo*시험에서 정상마우스의 정맥 내로 mitomycin C맥을 주사한 후에 분리된 비장세포가 나타내

는 NK세포활성은 E/T ratio 200/1, mitomycin C, 2회 투여 군에서 활성의 증가를 보였으며 100/1 E/T ratio 에서도 2회 투여 군에서만 활성의 증가를 보이고 있다. 이는 약제의 투여빈도에 따라 면역반응의 차이가 나타날 수 있음을 의미한다. 마찬가지로 cisplatin을 주사했을 때도 E/T ratio 200/1, 2회 투여 군에서만 활성의 증가를 보이고 있다. 그러나 E/T ratio 100/1에서는 1, 2, 3회 모든 투여 군에서 감소를 보이고 있다. 이들과는 다르게 E/T ratio 200/1에서, vinblastine, 1회와 3회 투여 군에서 활성의 증가를 나타내고 있고 E/T ratio 100/1에서는 3회 투여 군에서만 활성의 증가를 보였다. 시험관내에서 림프구가 우위를 차지하고 있는 비장세포내의 NK세포에 약제를 작용시켰을 경우와 마우스 생체 내에 약제를 투여한 후의 NK활성치의 결과들이 서로 일치하지 않고 있다. 이는 생체내의 많은 환경적 인자(예, 약물대사, 조직세포, 호르몬 등)에 의해서 영향을 받아 나타난 결과로 판단됨으로서 *in vitro*결과와는 *in vivo*시험결과와는 상당히 다를 수 있음이 본 시험에서도 입증된 것이다.

마우스 투여 횟수에 따라 시료별 NK활성에 미치는 효과를 비교하면 1회 투여의 경우, E/T ratio 200/1에서 vinblastine의 투여 때만 NK활성이 촉진되었으며 mitomycin C와 cisplatin의 투여에 의해서는 활성이 감소되었다. 반대로 2회 투여 때는 E/T ratio 200/1에서 mitomycin C나 cisplatin는 그 활성을 증가시켰지만 vinblastine은 감소시켰다. 3회 투여의 경우, E/T ratio 200/1에서 다시 vinblastine의 투여에 의해서만 NK활성이 증가되었다. 따라서 1회 투여가 NK활성에 미치는 증가효과는 vinblastine에서만 나타났으며 2회 투여에 의한 증가효과는 mitomycin C나 cisplatin에 의해서 나타났고 3회 투여에 의한 증가효과는 다시 vinblastine에 의해서 나타나고 있다. 대체적으로 vinblastine은 *in vitro*에서 NK활성증강효과를 보였지만 *in vivo*에서도 다른 두 가지 약제에 비하여 NK활성증가효과 차원에 관한 한 더 우수한 것으로 생각된다. 즉, DNA합성저해제로 작용하는 cisplatin이나 mitomycin-C보다 항세포분열제로 작용하는 vinblastine의 효과가 더 좋았다. 본 시험을 통하여 나타난 결과로부터 항암제의 종류에 따라서는 NK세포활성과 같은 면역반응에 악영향을 주게 됨을 알 수 있었으며 이와는 반대로 NK세포활성을 증가시키는 경우도 볼 수 있었다. 따라서 면역반응에 악영향을 초래할 경우에는 이것을 보완할 수 있는 방법

이 도입되어야 할 것이다. 즉 BRM과 같은 면역증강물질을 함께 투여시킴으로서 저하된 면역기능을 회복시켜가면서 암세포를 제어하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

결 론

비뇨기계 암종 치료에 사용되고 있는 mitomycin C, cisplatin, vinblastine이 암세포에 대한 세포성 방어능을 나타내는 자연살해세포(natural killer cell, NK)활성에 미치는 효과를 보기 위하여 마우스의 비장세포나 마우스의 정맥 내로 본 약제를 처리한 후 NK세포활성을 측정했을 때 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 정상마우스의 비장세포에 mitomycin C나 cisplatin을 노출시켰을 때 NK세포활성의 감소를 나타냈다. 그러나 vinblastine을 노출시켰을 때는 dose에 따라 증가 혹은 감소를 보였다. 즉, 1.0 μ g 이상을 작용시켰을 때 활성의 증가효과를 보였고 0.1 μ g 이하에서는 오히려 그 활성이 감소되었다. NK활성감소효과가 E/T ratio 200/1에서 시료 0.1 μ g을 작용시켰을 때 vinblastine, mitomycin C, cisplatin 순이었다. 1.0 혹은 10.0 μ g을 작용시켰을 때는 vinblastine만 NK활성을 증가시켰으며 cisplatin과 mitomycin C에 의해서는 활성이 감소되었다. 100/1 E/T ratio에서도 vinblastine, 10.0 μ g의 경우에서만 NK활성을 증가시켰으며 cisplatin, mitomycin C 순으로 감소되었다.

2) 정상마우스의 정맥내로 각각의 시료액을 주사한 후에 분리된 비장세포가 나타내는 NK세포활성은 mitomycin C이나 cisplatin, 각각 2회 투여 군에서 활성의 증가를 보였으며 vinblastine은 1회와 3회 투여군에서 활성의 증가를 나타냈다.

이와같이 항암제의 노출에 의한 NK세포활성은 약제의 종류, 노출량에 따라 반응이 달라질 수 있으며 *in vivo*에서의 투여횟수에 따라서도 달라짐을 알 수 있다. vinblastine의 경우, *in vitro*에서 NK활성증강효과를 보였지만 *in vivo*에서도 다른 두가지 약제에 비하여 NK활성증가효과를 보임으로서 NK활성화차원에서는 더 우수한 것으로 생각된다.

참고 문헌

- 1) Braun D, Harris JE. Modulation of the immune response by chemotherapy. *Pharmacol Ther* 1981; 14: 89-122.
- 2) Ehrke MJ, Mihich E. Effects of anticancer agents on immune responses. *Trends Pharmacol Sci* 1985; 6: 412-417.
- 3) Mihich E. Future perspectives for biological response modifiers: A viewpoint. *Semin Oncol* 1986; 13: 234-254.
- 4) Mastrangelo MJ, Berd D, Maguire HC Jr. The immunoaugmenting effects of cancer chemotherapeutic agents. *Semin Oncol* 1986; 13: 186-194.
- 5) Mihich E. Modification of tumor regression by immunologic means. *Cancer Res* 1969; 29: 2345-2352.
- 6) Mihich E. Immunosuppression in cancer therapeutics. *Transplant Proc* 1975; 7: 275-278.
- 7) Taniguchi M, Tada T. Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. IV. Effects of immunosuppressive drugs. *J Immunol* 1971; 107: 579-585.
- 8) Kerckhaert JA, Hofhuis FM, Willers JM. Effects of variation in time and dose of cyclophosphamide injection on delayed-type hypersensitivity and antibody formation. *Cell Immunol* 1977; 29: 232-237.
- 9) Maguire HC Jr, Ettore VL. Enhancement of dinitrochlorobenzene (DNCB) contact by cyclophosphamide in the guinea pig. *J Invest Dermatol* 1967; 48: 39-43.
- 10) Hunziger N. Effects of cyclophosphamide on contact eczema in guinea pigs. *Dermatologica* 1968; 136: 187-191.
- 11) Yoshida S, Nomoto K, Himeno K, Takeya K. Immune response to syngeneic or autologous testicular cells in mice. I. Augmented delayed food pad reaction in cyclophosphamide treated mice. *Clin Exp Immunol* 1979; 38: 211-217.
- 12) Polak L, Geleick H, Turk JL. Reversal of immunological tolerance to contact sensitization. *Immunology* 1975; 28: 939-942.
- 13) Polak L, Turk JL. Reversal of immunological tolerance by cyclophosphamide through inhibition of suppressor cell activity. *Nature* 1974; 249: 654-656.
- 14) Baldwin RW, Byers VS, Hannant D, Jones JA, Pimm MV, Price MR. Cellular interactions modulating host resistance to tumors. *Cancer Res* 1982; 42: 338-345.
- 15) Nomi S, Pellis NS, Kahan BD. Antigen specific therapy of experimental metastases. *Cancer* 1985; 55: 1296-1302.
- 16) Hengst JCD, Moky MB, Dray S. Importance of timing in cyclophosphamide therapy of MOPC-315 tumor-bearing mice. *Cancer Res* 1980; 40: 2135-2141.
- 17) Hengst JCD, Moky MB, Dray S. Cooperation between cyclophosphamide tumoricidal activity and host antitumor immunity in the cure of mice bearing large MOPC-315 tumors. *Cancer Res* 1981; 41: 2163-2167.
- 18) Tomazic V, Ehrke MJ, Mihich E. Modulation of the cytotoxic response against allogeneic tumor cells in culture by Adriamycin. *Cancer Res* 1980; 40: 2748-2755.
- 19) Tomazic V, Ehrke MJ, Mihich E. Augmentation of the development of immune responses of mice against allogeneic tumor cells after Adriamycin treatment. *Cancer Res* 1981; 41: 3370-3376.
- 20) Orsini F, Pavelic Z, Mihich E. Increased primary cell mediated immunity in culture subsequent to Adriamycin or daunorubicin treatment of spleen donor mice. *Cancer Res* 1977; 37: 1719-1726.
- 21) Mantovani A. In vitro and in vivo cytotoxicity of Adriamycin and daunomycin for murine macrophages. *Cancer Res* 1977; 37: 815-820.
- 22) Ehrke MJ, Cohen SA, Mihich E. Selective effects of Adriamycin on murine host defense systems. *Immunol Rev* 1982; 65: 54-78.
- 23) Ehrke MJ, Tomazic V, Ryoyama K, Cohen SA, Mihich E. Adriamycin induced immunomodulation: dependence upon time of administration. *Int J Immunopharmacol* 1983; 5: 43-48.
- 24) Haskill JS. Adriamycin-activated macrophages as tumor growth inhibitors. *Cancer Res* 1981; 41: 3852-3856.
- 25) Martin F, Caignard A, Olsson O, Jeannin JF, Leclerc A. Tumoricidal effect of macrophages exposed to Adriamycin in vivo or in vitro. *Cancer Res* 1982; 42: 3851-3855.
- 26) Salazar D, Cohen SA. Multiple tumoricidal effector mechanisms induced by Adriamycin. *Cancer Res* 1984; 44: 2561-2566.
- 27) Mace K, Mayhew E, Mihich E, Ehrke MJ. Alterations in murine host defense functions by Adriamycin, liposomes, or liposome-encapsulated Adriamycin. *Cancer Res* 1988; 48: 130-136.
- 28) 하윤문, 김광혁, 전무형, 우종설, 임수덕. 한국정상인 말초혈액 림파구의 Natural Killer (NK) 활성화에 관한 연구. 대한의학협회지 1981; 24: 503-508.
- 29) Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Im-*

- munol* 1989; 47: 187-375.
- 30) Antonelli P, Stewart II W, Dupont B. Distribution of natural killer activity in peripheral blood, cord blood, thymus, lymph nodes, and spleen and the effect of in vitro with interferon preparation. *Clin Immunol Immunopathol* 1981; 19: 161-169.
 - 31) Nouri AME, Hussain RF, Dos Santos AVL, Mansouri M, Oliver RTD. Intensity of class I antigen expression on human cell lines and its relevance to the efficiency of non-MHC-restricted killing. *Br J Cancer* 1993; 67: 1223-1228.
 - 32) Nouri AME, Mansouri M, Hussain RF, Dos Santos AVL, Oliver RTD. Super-sensitive epithelial cell line and colorimetric assay to replace the conventional K562 target and chromium release assay for assessment of non-MHC-restricted cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1995; 180: 63-68.
 - 33) Anderson TM, Ibayashi Y, Tokuda Y, Colquhoun SD, Carmack E, Golub SH. Effects of systemic recombinant interleukin-2 on natural killer and lymphokine activated killer activity of human tumor infiltrating lymphocytes. *Cancer Res* 1988; 48: 1180-1183.
 - 34) Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. *Immunol Today* 1989; 10: 299-304.
 - 35) Gidlund M, Orn A, Wigzell H, Senik A, Gresser I. Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature* 1987; 273: 759-761.
 - 36) Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer cell phenomenon: 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.
 - 37) Reynolds CW, Herberman RB. In vitro augmentation of rat natural killer cell activity. *J Immunol* 1981; 126: 1581-1585.
 - 38) Seaman WE, Sleisenger M, Eriksson E, Koo GC. Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK-1.1: Reduction in host defence against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J Immunol* 1987; 138: 4539-4544.
 - 39) Archimbaud E, Bally M, Dore J. Inducibility of lymphokine activated killer (LAK) cells in patients with myelogenous leukemia in complete remission and its clinical relevance. *Br J Haematol* 1991; 77: 328-334.
 - 40) Fries RU, Golub SH. Characteristics and mechanism of IFN-gamma-induced protection of human tumor cells from lysis by lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* 1988; 140: 3686-3693.
 - 41) Grim EA, Wilson DJ. The human lymphokine-activated killer cell system: V. Purified recombinant interleukin-2 activates cytotoxic lymphocytes which lyse both natural killer resistant autologous and tumors and tritrophenyl-modified autologous peripheral blood lymphocytes. *Cell Immunol* 1985; 94: 568-578.
 - 42) Ortaldo JR, Longo DL. Human natural lymphocyte effector cells: Definition, analysis of activity, and clinical effectiveness. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 999-1010.
 - 43) Oliver RTD, Nouri AME. T cell immune response to cancer in human and its relevance for immunodiagnosis and therapy. *Cancer Surveys* 1991; 13: 173-204.
 - 44) Weir DM. Natural Killer cells, Handbook of experimental immunology. 4th ed. Oxford: Blackwell scientific publications, 1986; 60.1
 - 45) Wright SC, Weitzen MS, Kahle R, Granger GA, Bonavida B. Studies on the mechanism of natural killer cytotoxicity: II. Coculture of human PBL with NK-sensitive of resistant cell lines stimulates release of natural killer cytotoxic factors (NKCF) selectively cytotoxic to NK-sensitive target cells. *J Immunol* 1983; 130: 2479-2483.
 - 46) Xu ZY, Hosokawa M, Morikawa K, Hatakeyama M, Kobayashi H. Overcoming suppression of antitumor immune reactivity in tumor-bearing rats by treatment with bleomycin. *Cancer Res* 1988; 48: 6658-6663.
 - 47) Crum ED. Effect of cisplatin upon expression of in vivo immune tumor resistance. *Cancer Immunol Immunother* 1993; 36: 18-24.
 - 48) Bodenheimer H Jr, Charland C, Leith J. Alteration of rat Kupffer cell function following mitomycin-C administration. *J Leukoc Biol* 1988; 43: 265-270.
 - 49) Arinaga S, Adachi M, Karimine N, Inoue H, Asoh T, Ueo H, Akiyoshi T. Enhanced induction of lymphokine-activated killer activity following a single dose of cisplatin in cancer patients. *Int J Immunopharmacol* 1994; 16: 519-524.
 - 50) Kouchi Y, Maeda Y, Ohuchida A, Ohsawa M. Immunotoxic effect of low dose cisplatin in mice. *J Toxicol Sci* 1996; 21: 227-233.