

Vinblastine과 Vincristine의 1次 및 2次 細胞性 免疫反應에 미치는 影響

表 明 允

淑明女子大學校 藥學大學

Effects of Vinblastine and Vincristine on the Primary and Secondary Cell-mediated Immunity

Myoung-Yun Pyo

College of Pharmacy, Sook Myung Women's University, Seoul 140, Korea

Abstract—Effects of vinblastine(VLB) and vincristine(VCR) on cell-mediated immunity (CMI) were studied with the microcytotoxicity test(MCT) after normal or pre-sensitized Balb/c mice had been treated *in vivo* with a combination of two different doses of VLB or VCR(single dose of 20% and 60% LD₅₀, i.p.) at different times (from day -6 to day +4) plus allo-transplantation antigen(allo-TA, cells from C3H mice at day 0). The results were that LD₅₀ of VLB for female Balb/c mouse was 7.3mg/kg body weight (i.p.) and LD₅₀ of VCR was 4.3mg/kg body weight and that VLB and VCR acted as immunosuppressive agents on the primary CMI when administered after allo-TA (antigen-drug-phase), but showed no effect when administered prior to allo-TA(drug-antigen-phase). Change of doses of VLB and VCR(20% LD₅₀, 60% LD₅₀) caused quantitative or qualitative variations in the immunomodulating effects of these two drugs. Neither VLB nor VCR had any immunomodulating effect on the secondary CMI. Lastly, the results support that the four parameters (type of drug, sensitization status, time of drug treatment in relation to antigen injection, and drug dosis) are significant for the effects of the VLB and VCR on the CMI, and that VLB and VCR may inhibit the proliferation of antigen-stimulated T effector lymphocytes but not memory-cytotoxic T lymphocytes.

Keywords—vinblastine • vincristine • cell-mediated immunity • microcytotoxicity test • immunosuppression • immunostimulation

악성 종양 치료약으로 임상에서 사용되고 있는 Vinblastine(Velbe®, VLB)과 Vincristine(Lilly®, VCR)은 *Vinca rosea* L. (Apocynaceae)에서 추출된 indole-dihydroindole분자를 함유하는 vinca alkaloid로서 이들의 화학적 구조는 서로 매우 유사하다. 이 두 의약품은 세포분열의 중기 (metaphase)에서 그 분열을 저지시키고^{1,2)} 악성

종양세포 증식을 억제하는 등, 유사한 생물학적 작용을 나타내지만 다른 여러가지 생물학적 작용³⁾과 부작용을⁴⁾ 나타내기도 한다.

장기이식후 면역억제제로도 사용되는 악성종양치료제, 즉 cyclophosphamide⁵⁻⁸⁾, methotrexate⁹⁾, 6-thioguanine¹⁰⁾ 등에 대한 최근의 실험적 연구에서는 이들 의약품에 면역억제 작용과는

상반되는 작용, 즉 면역강화작용도 있는 것으로 보고 되고 있다.

Vinblastine¹¹⁻¹⁴과 vincristine^{11,12,15-17}에 대한 면역학적 연구 결과도 실험조건에 따라 체액성 면역반응(B cell) 또는 세포성 면역반응(T cell)을 억제 또는 강화시키거나 전혀 영향을 미치지 못하는 것으로 나타나고 있다. 그러나 이들 보고에서는 실험조건이 매우 다양하여 그 결과를 비교하기가 어렵고, 또 2차 면역반응에 대한 연구는 되어 있지 않은 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 실험동물들 동종이식 항원으로 1차 또는 2차 감작시킨 후 항원주사에 대한 VLB와 VCR투여시기, VLB와 VCR투여량을 변화시켜서 1차 또는 2차 세포성 면역반응에 미치는 영향을 체계적으로 규명하고자 하였으며, 몇가지 결론을 얻었기에 보고하고자 한다.

實驗方法

1. 실험 재료

0.1% glucose를 함유한 인삼염 완충액(GKN, pH 7.4), fetal calf serum(FCS, heat-inactivated, Seromed), penicillin-streptomycin(PS, Seromed), RPMI-1640(Seromed), 10% FCS와 1% L-glutamine 및 1% PS를 함유한 RPMI-1640용액(RPMI-FCS배양액), 10% trypsin, Vinblastine, VLB(Velbe®, E. Lilly GmbH), Vincristine, VCR(Lilly®, E. Lilly GmbH)를 사용하였다.

2. 실험 동물

실험군과 대조군으로 체중 22~30g, 2~3개월의 암컷 inbred strains Balb/c 마우스(주요 조직 적합성항원 유전자복합체, major histocompatibility complex, MHC: H-2^d)를 사용하였으며, 실험기간 중 고형사료와 물을 충분히 주었다.

3. 동종이식항원의 제조

실험동물에 대한 동종이식항원(allo-transplantation antigen, allo-TA)으로는 inbred strains C3H 마우스(MHC: H-2^k)의 비장, 흉선 및 림프절 세포를 혼화하여 살아 있는 세포수가 1ml당 1×10^8 이 되도록 GKN-완충액으로 희석하여 사용하였다.

4. 면역조치

실험군과 대조군을 1차 감작시킬 목적으로 동종이식항원(5×10^7 cells/0.5ml)을 day 0(의약품-항원 결합조치시의 항원 주사일)에 복강내 1회 주사하였고, 2차 면역조치시에도 1차 면역조치시와 같으나 day 0의 항원 주사전에 미리 1주일 간격으로 2회(day-17, day-10) 동종이식항원을 주사하였다.

5. 의약품주사액의 조제

Vinblastine 또는 vincristine을 mouse 체중 20g당 0.5ml 투여할 수 있도록 생리식염수에 용해시켜 30분 이내에 실험동물의 복강내 1회 주사하였다.

6. 의약품의 평균치사량(LD₅₀) 산출

Balb/c 마우스 6마리를 1군으로하여 투여량에 따라 vincristine은 6군(4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5mg/kg body weight), vinblastine은 3군(3.5, 4.5, 5.5mg/kg body weight)에 대해 복강내 1회 주사한 후 생사의 여부를 3주간 관찰하였다. LD₅₀의 산출은 Reed와 Muench의 방법¹⁸을 따랐다.

7. 의약품-항원 결합조치

의약품에 의한 1차 또는 2차 세포성 면역반응의 변화를 보기 위하여, 1차 또는 2차 감작된 실험군의 복강내에 항원 주사일(day 0)로부터 6일전(day -6)에서 항원 주사후 4일(day +4)까지의 기간내에서 의약품의 투여일을 변화시켜 가면서 LD₅₀의 20% 또는 60%에 해당하는 의약품의 양을 1회 투여하였다. 의약품을 투여하지 않고 단지 해당하는 면역조치만을 한 실험동물은 대조군으로 이용하였다.

8. 세포성 면역반응능 측정

Takasugi¹⁹ 등이 개발하여 Bröcker²⁰ 등이 변형시킨 미량 세포 독성시험(microcytotoxicity test, MCT)방법을 이용하였고, 모든 조작은 무균 상태로 행하여졌다. 즉 C3H 마우스로부터 적출한 15~18일 된 태아를 GKN-PS로 수세, trypsinization(0.25% trypsin, 25°C 7 min.), 원 침한 다음 4×10^6 fibroblasts/ml 되도록 RPMI-FCS 배양액으로 희석하여 계대조직배양(37°C, 5% CO₂)하였다. 이와 같이 배양된 embryonic C3H 마우스 fibroblasts를 최종적으로 Terasaki microtest plate에 점적하여 24h 배양한(37°C,

5% CO₂) 젓을 표적세포(target cells)로 사용하였다.

T-작용세포(T-effector cells)를 만들기 위하여 실험일에 실험군 및 대조군의 비장을 적출하였다. 적혈구를 제거하고 원침시킨 후 2.5×10⁷ lymphocytes/ml 되도록 RPMI-FCS로 희석하였다. 작용세포와 표적세포의 비율(E/T)이 8단계(4:1~500:1)가 되도록 RPMI-FCS로 농도를 조절한 작용세포를 배양된 표적세포에 접종, 48h 배양(37°C, 5% CO₂), 염색, 건조시켰다. 작용세포에 의한 표적세포의 특이적인 용해(specific lysis) 정도를 현미경으로 관찰하여 다음 수식에 의거 실험군 및 대조군의 세포성 면역반응을 측정 비교하였다.

specific lysis(%)

$$= \left(1 - \frac{\text{remaining target cells(experiment)}}{\text{target cells(control)}} \right) \times 100$$

結 果

1. Vinblastine과 Vincristine의 LD₅₀

암컷 Balb/c 마우스에 대한 VLB의 LD₅₀은 체중 1kg당 7.3mg이었다. 따라서 LD₅₀의 20%에 해당하는 양은 체중 1kg당 1.5mg, 60%에 해당하는 양은 체중 1kg당 4.4mg으로 하였다.

같은 방법으로 산출된 VCR의 LD₅₀은 체중 1kg당 4.3mg이었다. 따라서 LD₅₀의 20%에 해당하는 양은 체중 1kg당 0.9mg, 60%에 해당하는 양은 체중 1kg당 2.6mg으로 하였다.

2. T-effector cells의 세포성 면역반응의 kinetics

allo-TA로 1차 또는 2차 감작시킨 Balb/c 마우스의 비장을 day 0항원 주사후 3, 5, 7, 10, 18, 35일에 각각 적출하여 MCT실험 방법으로 표적세포의 특이적인 용해성을 측정함으로써 T-effector cell의 세포성 면역반응의 kinetics를 관찰하였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 1차 감작된 비장세포의 세포성 면역반응은 항원 주사후 3일째에는 아주 미약하게 나타났으나 그 후 급격히 상승하여 5일째에 최고점을 이루다가 다시 급격

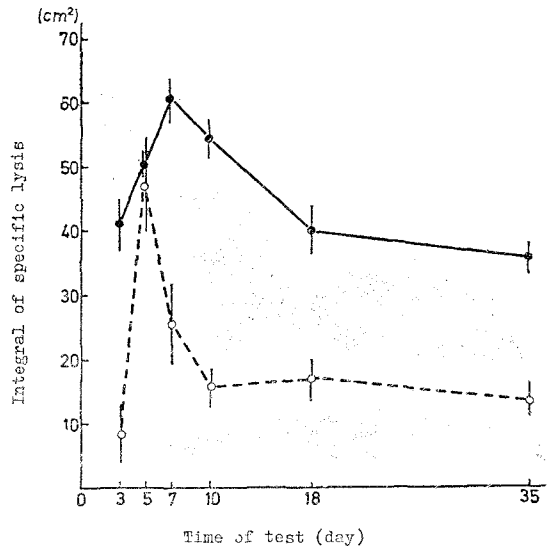


Fig. 1. Kinetics of cell-mediated immunity of spleen after primary and secondary sensitization.

○---○: Balb/c mice were injected i.p. once with allo-TA (5×10⁷ C3H cells) on day 0.

●—●: Balb/c mice were injected i.p. three times with allo-TA on day -17, -10 and 0.

Test of cell-mediated immunity in MCT.

The data represent mean and standard errors of 6 mice.

히 감소하기 시작하였다. 반면 2차 감작된 비장세포의 세포성 면역반응은 이미 3일째 상당히 높게 나타났고 7일째 최고점을 이루다가 그 후 서서히 감소하였다.

이 실험결과 1차 감작된 실험동물에 있어서는 day 0항원 주사후 5일째, 2차 감작된 실험동물에 있어서는 7일째에 MCT 실험을 하였다.

3. 1차 및 2차 세포성 면역반응에 대한 영향 1) Vinblastine

Fig. 2에서 보는 바와 같이 Balb/c 마우스에 VLB를 동종이식항원 주사전에(day -6~day -1), 또는 동시에(day 0) 투여한 결과 VLB의 투여량에 관계없이 1차 세포성 면역반응(primary cell-mediated reaction)에 뚜렷한 영향이 나타나지 않았다. 반면 항원 주사후(day +1~day +4)에 VLB투여하였을 때에는 1차 세포성 면역반응에 뚜렷한 면역조절작용이 나타났다. 그 면역조절작용은 VLB의 투여량에 따라 달라지는 것으로 보였다. 즉 LD₅₀의 60%에 해당하는 VLB를

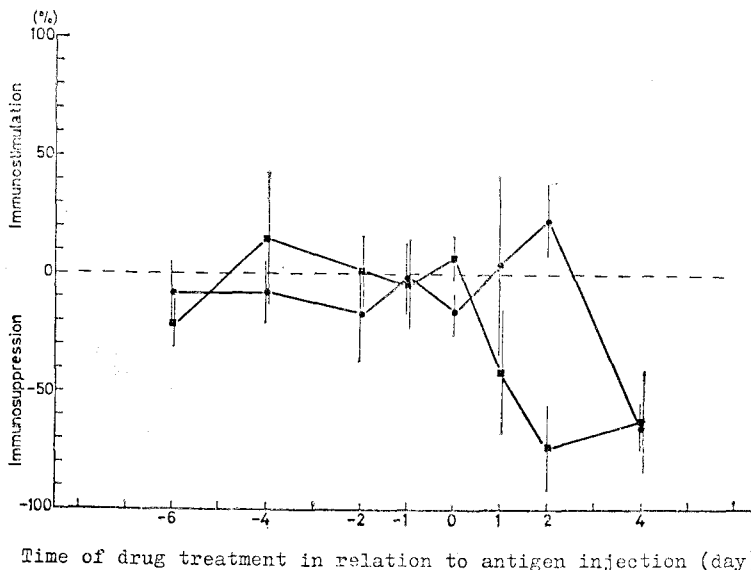


Fig. 2. Effect of VLB on the primary cell-mediated immunity in Balb/c mice. Immunostimulation and Immunosuppression (%) are represented in comparison with the control group.

Control group (---) : only allo-TA (5×10^7 C3H cells, i.p.) on day 0 in normal Balb/c mice.
 VLB/AG groups : 20% LD₅₀ (●—●) or 60% LD₅₀ (■—■) of VLB was injected i.p. in each case once on the indicated day in combination with allo-TA (day 0) in normal Balb/c mice.

MCT of spleen cells was done on day +5.

The data represent mean and standard errors of 6 mice.

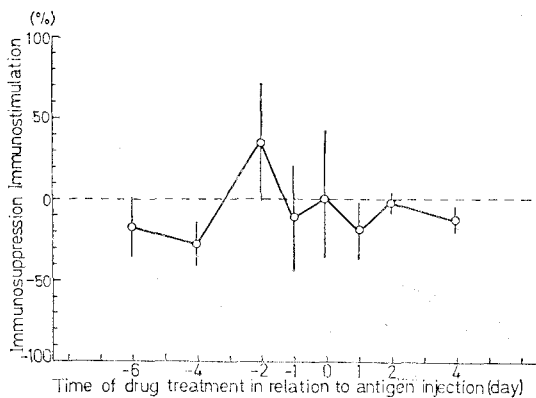


Fig. 3. Effect of VLB on the secondary cell-mediated immunity in Balb/c mice. Immunostimulation and immunosuppression (%) are represented in comparison with the control group.

Control group (---) : only allo-TA (5×10^7 C3H cells, i.p. day 0) in sensitized Balb/c mice (5×10^7 C3H cells, 2x i.p. day -17 and day -10).
 VLB/AG group (○—○) : 60% LD₅₀ of VLB was injected i.p. in each case once on the indicated day in combination with allo-TA (day 0) in sensitized Balb/c mice.

MCT of spleen cells was done on day +7.
 The data represent mean and standard errors of 6 mice.

투여하였을 때에는 뚜렷한 면역억제작용(day +1, day +2)을 나타내었으나, LD₅₀의 20% VLB을 투여하였을 때에는 영향을 미치지 않거나(day +1), 약한 면역강화작용(day +2)을 보였다. 그러나 VLB을 항원 주사후 4일째(day +4) 투여한 경우에는 투여량에 관계없이(20%, 60% LD₅₀) 1차 세포성 면역반응이 아주 강하게 억제되었다.

그러나 Fig. 3에서와 같이 VLB은 2차 세포성 면역반응에 대해서는 면역조절작용을 거의 나타내지 않았다. 즉 이미 감작된 Balb/c 마우스에 allo-TA 주사전(day -6~day -1), 동시에(day 0), 또는 주사후(day +1~day +4)에 VLB(60% LD₅₀)을 투여했을 경우, 대조군의 2차 세포성 면역반응은 뚜렷이 강화되거나 억제되지 않았다.

2) Vincristine

Fig. 4에서 보듯이 1차 세포성 면역반응에 대한 VCR의 조절작용은 VLB와 매우 유사하게 나타났다. 동종이식항원 주사전(day -6~day -1)에 실험군에 VCR을 투여했을 때에는, VCR의

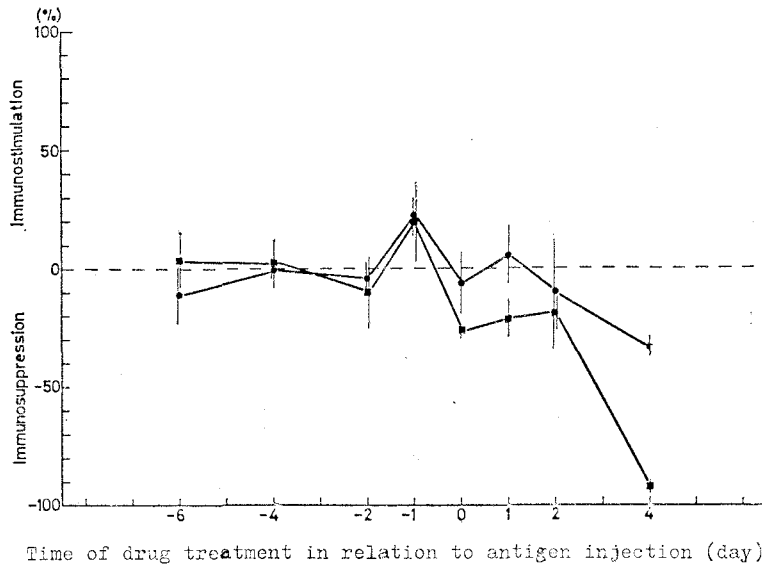


Fig. 4. Effect of VCR on the primary cell-mediated immunity in Balb/c mice. Immunostimulation and immunosuppression (%) are represented in comparison with the control group. Control group(---): only allo-TA (5×10^7 C3H cells, i.p.) on day 0 in normal Balb/c mice. VCR/AG groups: 20% LD₅₀(●—●) or 60% LD₅₀(■—■) of VCR was injected i.p. in each case once on the indicated day in combination with allo-TA (day 0) in normal Balb/c mice. MCT of spleen cells was done on day +5. The data represent mean and standard errors of 6 mice.

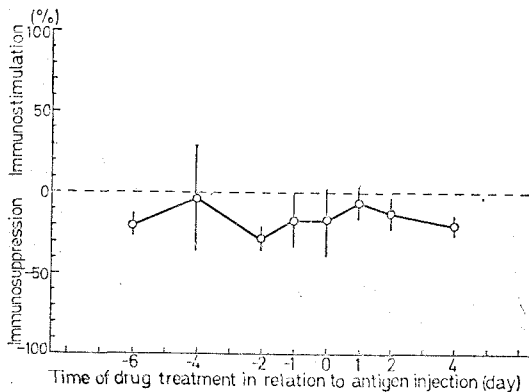


Fig. 5. Effect of VCR on the secondary cell-mediated immunity in Balb/c mice. Immunostimulation and immunosuppression (%) are represented in comparison with the control group. Control group(---): only allo-TA (5×10^7 C3H cells, i.p. day 0) in sensitized Balb/c mice (5×10^7 C3H cells, 2x i.p. day -17 and day -10). VCR/AG group (○—○): 60% LD₅₀ of VCR was injected i.p. in each case once on the indicated day in combination with allo-TA (day 0) in sensitized Balb/c mice. MCT of spleen cells was done on day +7. The data represent mean and standard errors of 6 mice.

투여량에 영향을 받지 않고 대조군과 거의 같은 1차 세포성 면역반응이 나타났다. 그러나 항원 주사와 동시(day 0), 또는 주사 후(day +1~ day +4)에 VCR을 투여했을 때에는 투여량에 따라 조절작용이 다르게 나타났다. 즉 day 0, day +1, 또는 day +2에 LD₅₀의 20%에 해당하는 VCR을 투여한 실험군의 1차 세포성 면역반응은 대조군과 거의 같았으나, LD₅₀의 60%에 해당하는 VCR을 투여했을 때에는 약한 면역억제작용을 볼 수 있었다. 또 day +4에 VCR을 투여했을 때에는 LD₅₀의 20% 경우 약한 면역억제작용을, LD₅₀의 60% 경우에는 매우 강한 면역억제작용을 나타내었다.

그러나 Fig. 5에서 보는 바와 같이 2차 감작된 마우스의 세포성 면역반응에는 사실상 뚜렷한 면역조절이 나타나지 않았다. 즉 미리 감작시킨 마우스에 allo-TA 주사전, 동시, 또는 주사후에 VCR(60% LD₅₀)을 투여한 실험군의 2차 세포성 면역반응은 대조군에 비해 약하게 억제되었거나 거의 차이가 없었다.

考 察

화학적 구조가 매우 유사한 VLB와 VCR은 동종이식항원에 의해 일어나는 마우스의 1차 및 2차 세포성 면역반응에 거의 비슷한 면역조절작용을 나타내었다.

이들의 약품이 1차 세포성 면역반응에 미치는 영향에는 항원 주사와 약품 투여간의 시간적 관계가 중요한 변수로 작용하는 것으로 보인다. VLB나 VCR을 1차 감작된 마우스에 약품-항원-상(drug-antigen-phase, DA-phase)으로 결합조치했을 때에는 유의성 있는 면역조절기능이 나타나지 않았다. 그러나 항원-약품-상(antigen-drug-phase, AD-phase)으로 결합조치했을 때는 세포성 면역반응을 억제시켰다. 1차 세포성 면역반응에서와는 달리, 2차 세포성 면역반응에는 이 시간적 관계의 인자가 크게 영향을 미치지 않았다.

항원 주사후 약품 투여(AD-phase)시에 나타나는 T-effector cell reactivity의 억제기전에 대해서는 cyclophosphamide(CY)의 실험결과를 기초로한 두 가설이 제시되어 있다. 그 하나는 항원 주사후 투여된 CY는 항원 자극으로 활발해진 T-effector cell 및 그 전구세포에 작용하여 결국 T-effector cell을 제거 또는 봉쇄함으로써 세포성 면역반응을 억제시킨다는 설²¹⁾(Turk and Parker, 1979)이고, 다른 하나는 항원 주사후 투여된 CY는 T-regulator cell인 T-suppressor cell을 활성화 내지 강화시켜 precursor-cytotoxic T-lymphocytes(CTL)가 active-CTL로 되는 것을 저해함으로써 세포성 면역반응을 억제시킨다는 설²²⁾(Bonavida, 1977)이다.

본 연구에서 관찰된 VLB와 VCR의 항원 후 면역억제작용이 두 가설중 어느 것을 뒷받침하는 것인지는 명확히 확인되지는 않았다. 다만 VLB와 VCR이 mitose-spindel의 생성에 관여하는 microtubuli의 단백질과 결합하여 mitose의 metaphase에 작용한다는 점^{23,24)}을 고려할 때, 항원 후 투여된 VLB나 VCR이 항원 자극으로 활발한 유사분열사이클중에 있는 T-effector cell 또는 그 전구세포에 직접 작용하여 T-effector

cell이 봉쇄 또는 제거됨으로써 세포성 면역반응이 억제되었다고 보는 것이 타당할 것으로 사료된다.

또한 실험동물의 감작상태가 세포성 면역반응에 대한 약품의 조절작용에 중요한 변수로 작용하는 것으로 밝혀졌다. 즉 1차 감작된 마우스의 경우 DA-phase로 결합조치했을 때에는 세포성 면역반응에 대한 영향이 나타나지 않으나 AD-phase결합조치시에는 억제시키는 반응프로필이 나타났다. 한편 2차 감작된 마우스의 경우에는 DA-phase와 마찬가지로 AD-phase 결합조치에서도 유의성 있는 면역조절작용이 없는 반응프로필을 보였다. Webb와 Winkelstein²⁵⁾에 의하면 일단 memory lymphocytes의 population이 생성되거나면 immunologic memory를 제거한다는 것은 거의 불가능하다고 한다. 따라서 항원 주사전 미리 행해진 감작에 의해 생성된 memory-CTL에는 VLB나 VCR이 작용하지 못하여 2차 세포성 면역반응에 뚜렷한 영향을 미치지 못하는 것으로 생각할 수 있다.

VLB와 VCR을 AD-phase결합조치했을 때 나타나는 1차 세포성 면역억제현상은 VLB와 VCR의 투여량에 따라 정성적 또는 정량적으로 변화였다. 약품을 다량 투여했을 때 나타난 면역억제작용이 소량 투여시에는 면역강화작용으로 바뀌는 현상이 보고^{17,26)}되고는 있으나 어떠한 기전에 의한 것인지는 아직 잘 알려져 있지 않다.

結 論

1. 암컷 Balb/c 마우스에 대한 Vinblastine(VLB)의 LD₅₀는 체중 1kg당 7.3mg(i.p.), Vincristine(VCR)의 LD₅₀는 체중 1kg당 4.3mg(i.p.)이었다.

2. 항원과 VLB 또는 VCR투여의 시간적 관계가 1차 세포성 면역반응에 대한 조절작용에 중요한 인자였다. 즉 약품을 항원 주사전에 투여(DA-phase)했을 때에는 1차 세포성 면역반응을 변화시키지 못했으나, 항원주사후에(AD-phase) 투여했을 때에는 면역억제작용을 나타내었다.

3. VLB와 VCR의 면역조절작용은 VLB, VCR

의 투여량 변화(20% LD₅₀, 60% LD₅₀)에 의해 정성적 또는 정량적으로 변화였다.

4. 2차 세포성 면역반응에는 VLB와 VCR이 모두 투여시간에 관계없이 조절작용을 나타내지 않았다.

VLB와 VCR의 T cell 반응에 대한 작용은 매우 유사하며 항원으로 자극된 T-effector lymphocyte의 proliferation을 저해하고 memory-cytotoxic T lymphocyte에는 영향을 미치지 못하는 것으로 보인다.

〈1986년 6월 17일 접수 : 7월 15일 수리〉

文 獻

- Creasey, W.A.: in *Antineoplastic and immunosuppressive agents, Handb. Exp. Pharmacol.* XXXVIII/2, p. 684, Springer-Verlag, Berlin, (1975).
- Cardinali, G., and Enein, M.A.: *Blood* **21**, 102 (1963).
- Ulrichs, K.: *Diss., Math.-Nat. Fak. Univ. Kiel* (1977).
- Sieber, S.M., Mead, J.A.R., and Adamson, R.H.: *Cancer Treat Rep.* **60**, 1127 (1976).
- Turk, J.L., Parker, D., and Poulter, L.W.: *Immunology* **23**, 493 (1972b).
- Müller-Ruchholtz, W.: *Arzeim.-Forsch.* **24**, 1160 (1974).
- Röllinghoff, M., Starzinski-Powitz, A., Pfizenmaier, K., and Wagner, H.: *J. Exp. Med.* **145** (1977).
- Asherson, G.L., Perera, M.A.C.C., and Thomas, W.R.: *Immunology* **36**, 449 (1979).
- Orbach-Arbouys, S., and Marianella-Castes, B.: *Immunology* **36**, 265 (1979).
- Van Dijk, H., and Voermans, G.A.G.M.: *Immunology* **34**, 1077 (1977).
- Aisenberg, A.C.: *Nature* **200**, 484 (1963).
- Berenbaum, M.C.: *Immunology* **36**, 355 (1979).
- Cottney, J., Bruin, J., and Lewis, A.J.: *Agents and Actions* **10**, 378 (1980a).
- Cottney, J., Bruin, J., and Lewis, A.J.: *Agents and Actions* **10**, 48 (1980b).
- Gaal, D., and Nowotny, A.: *Cancer Immunol. Immunother.* **6**, 9 (1979).
- Goto, M., Mitsuoka, A., Sugiyama, M., and Kitano, M.: *J. Exp. Med.* **154**, 204 (1981).
- Batrocci, A., Riccardi, C., and Bonmassar, E.: *J. Immunopharmacol.* **2**, 61 (1980).
- Reed, L.J., and Muench, H.: *Amer. J. Hyg.* **27**, 493 (1938).
- Takasugi, M., and Klein, E.: *Transplantation* **9**, 219 (1970).
- Bröcker, E.B., Kuhlencordt, K.M., and Müller-Ruchholtz, W.: *Int. Arch. Allergy appl. Immun.* **53**, 234 (1977).
- Turk, J.L., and Parker, D.: *J. Immunopharmacol.* **1**, 127 (1979).
- Bonavida, B.: *J. Immunol.* **119**, 1530 (1977).
- Malawista, S.E., Bensch, K.G., and Sato, H.: *Science* **160**, 770 (1968).
- George, P., Journey, L.J., and Goldstein, M.N.: *J. Nat. Cancer Inst.* **35**, 355 (1965).
- Webb, D.R., and Winkelstein, A.: in *Basic & Clinical Immunology*, p. 313, Lange Medical Publications, Los Atlos (1980).
- Kerckhaert, J.A., Hofhuis, F.M., and Willers, J.M.: *Cell. Immunol.* **29**, 232 (1977).