

## Lewis Lung Carcinoma(LLC) 이식 생쥐에 있어서 천연운지 단백질 다당체(Copolang)의 면역조절활성

문창규\* · 임철홍 · 목명수 · 양경미 · 한혜승 · 최재영\*

서울대학교 약학대학, \*광동제약 중앙연구소

(Received January 5, 1993)

### Immunomodulating Activities of Copolang, a Proteopolysaccharide from *Coriolus versicolor* in Lewis Lung Carcinoma (LLC) Bearing mice

Chang-Kiu Moon\*, Cheol-Hong Lim, Myung-Soo Mock, Kyung-Mee Yang,  
Hye-Seung Han and Jae-Young Choi\*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

\*Kwang Dong Pharmaceutical Co. Ltd., Central Research Institute, Seoul 152-053, Korea

**Abstract**—Immune functions of mice bearing Lewis Lung Carcinoma (LLC) were significantly suppressed when evaluated with mitogen responsiveness, IL-2 production and non-specific suppressor activity. Based on these immunosuppressive characteristics of LLC bearing mice, immunomodulating activities of Copolang were investigated in this model. After 15 days of LLC inoculation, Copolang was intraperitoneally administered for 7 consecutive days with doses of 20 or 200 mg/kg. Immune functions were evaluated 3 days after the final administration of Copolang. The results showed that the growth of LLC solid tumor was not inhibited by Copolang. But, mitogens-induced proliferation, IL-2 production and responsiveness to recombinant IL-2 of splenocytes were significantly augmented by the treatment of Copolang. However suppressor cell activity was not affected by Copolang. These results indicate that Copolang expresses potent immunomodulating activities through the augmentations of IL-2 production and responsiveness to recombinant IL-2, which have been generally known to be suppressed in tumor bearing mice, without affecting the growth of tumor.

**Keywords** □ Copolang, *Coriolus versicolor*, immunomodulator, Lewis Lung Carcinoma (LLC), mitogen induced splenocyte proliferation, IL-2 release, responsiveness to recombinant IL-2, nonspecific suppressor activity.

암이 증식함에 따라 mitogen에 대한 비장세포의 분열능 및 NK-cell 활성 등 면역기능이 전반적으로 저하되는 것으로 보고되어 왔다.<sup>1-4)</sup> 담암 생쥐에 있어서 면역반응 저하현상을 설명하기 위한 많은 연구들이 수행되어 왔으며 항암면역반응을 억제하는 다양한 형태의 종양유도 억제기전들이 알려져 있다.<sup>5-7)</sup> 최근에는 담암 생쥐에 있어서 T-cell 활성화 과정에 관여하는 IL-1 생성부전,<sup>8)</sup> IL-2 생성부전,<sup>9)</sup> IL-2 rece-

ptor 발현부전<sup>10-11)</sup> 및 혈중 soluble IL-2 receptor 증가<sup>12)</sup> 등이 종양상태의 면역부전의 주요인자들로 거론되고 있다. 암상태에서 저하된 면역활성을 증가 시킴으로써 암 치료 효과를 재고시키는 면역조절제의 개발에 관한 연구가 현재 활발히 진행되고 있으며 면역조절 효과가 확인되어 임상시험을 실시하고 있거나 실제 활용되고 있는 면역조절제들도 있다.<sup>13-14)</sup> Cyclophosphamide, adriamycin, bleomycin 등 항암제와 indomethacin 등 prostaglandin 합성억제제, BCG, *Corinebacterium parvum* 등 bacteria 추출물, 그리고

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

Lentinan, PSK 및 천연물로부터 분리한 polysaccharide 등이 이에 속하는 물질들이다.<sup>5)</sup>

저자 등은 천연 구름버섯으로부터 추출하여 분자량 5000 이상으로 분획한 단백다당류(이하 Copolang이라 칭함)의 면역조절활성에 대한 기초적인 검색시험을 allogeneic tumor system인 sarcoma-180으로 유도한 암상태의 CBA 생쥐를 대상으로 실시한 결과, Copolang은 지연형 과민반응과 NK-cell 활성화는 증가시키나 B-cell 및 macrophage에는 영향을 미치지 않는다는 사실을 확인하고 Copolang의 항암활성은 T-cell의 활성증가에 기인하며, B-cell 및 macrophage 활성화는 무관한 것으로 추정된다는 보고를 한 바 있다.<sup>16)</sup> 한편 조 등은 EL-4 syngeneic tumor system을 이용한 연구결과에서 Copolang이 비장세포의 저하된 NK-cell 및 cytotoxic T Lymphocyte(CTL) 활성을 증가시키는 것으로 보고하였는데<sup>17)</sup> Maccubbin 등은 EL-4 model에서 비장세포 활성화하는 prostaglandin을 다량 분비하는 EL-4가 비장으로 전이하는 특성에 기인하며, 비장세포 자체 활성 저하에 의한 것이 아니라고 보고함으로써<sup>13)</sup> EL-4 tumor system을 이용한 항암 면역시험의 한계성을 지적하고 있다.

따라서 본 연구에서는 C57BL/6 생쥐의 syngeneic tumor model이며, 근육주사시 폐에는 전이나 비장으로는 전이하지 않는 암종인 Lewis Lung Carcinoma (이하 LLC라 칭함)를 선택하였으며, LLC 이식 생쥐의 T 세포성 면역기능에 미치는 Copolang의 효과를 검정하기 위하여, LLC 이식 생쥐에서의 mitogen에 대하여 저하된 분열능을 보이는 비장세포 활성화에 미치는 Copolang(구름버섯 단백 다당류 중 분자량 5,000 이상의 분획)과 Copolang-P (구름버섯의 총 단백다당류 분획)의 영향을 검토하고 그 기전을 알아보기 위하여 IL-2 생성능, IL-2에 대한 반응성 및 비특이적 suppressor-cell 활성화에 미치는 영향을 검색하였다.

### 실험방법

**실험 동물의 선택 및 사육조건**—8주된 수컷 C57BL/6 생쥐를 구입하여 1주간 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 인공 조명에 의해 조명 시간을 아침 7시부터 저녁 7시까지 12시간으로 조정하였고 실온은  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는  $55 \pm 5\%$ 로 조절하였다. 급수는 수도수를

사용하였으며 사료와 급수는 제한하지 않았다.

**C57BL/6 생쥐의 담암상태 유도 및 시료의 투여**—LLC 암세포(ATCC)를 in vitro에서 계대 배양한 후 trypsin-EDTA (Gibco)를 처리하여 조제된  $1 \times 10^6/\text{ml}$  암세포 부유액 0.1 ml를 생쥐의 오른쪽 대퇴부에 근육 주사하여 이식하였다. 이식 15일 후, 이식 부위의 tumor mass의 지름이 10~15 mm인 생쥐만을 선택하여 일주일간 Copolang(구름버섯 단백 다당류 중 분자량 5000 이상의 분획) 및 Copolang-P(구름버섯의 총 단백다당류 분획)(20 mg/kg, 200 mg/kg)를 복강 투여하였다. 투여 종료 3일 후, 이식 부위의 tumor mass를 측정하고 비장을 무균적으로 적출하여 면역활성 측정실험에 사용하였다.

**비장세포 현탁액의 조제**<sup>19)</sup>—3마리의 C57BL/6 생쥐로부터 얻은 비장을 느슨한 homogenizer tube에 넣고 teflon pestle을 이용하여 비장세포를 유리시키고 hypotonic shock으로 적혈구를 용혈 제거시킨 다음 trypan blue exclusion test를 행하여 Cell을 계측하고  $8 \times 10^6/\text{ml}$ 로 조정하여 빙육상에 보관하였다.

**Mitogen 유도 임파구 분열능의 측정**<sup>20)</sup>—96 well flat bottomed culture plate (Falcon)에  $4 \times 10^6$  cell/ml의 비장세포 현탁액 50  $\mu\text{l}$ 와 적정농도로 조제한 concanavalin A (ConA, Sigma, type III), phytohemagglutinin (PHA, Gibco), lipopolysaccharide (LPS, Gibco)를 각각 50  $\mu\text{l}$ 를 가하고 K-10 배지를 추가하여 총 200  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 44시간 배양한 후 <sup>3</sup>H-thymidine (6.7 Ci/mmol, NEN) 25  $\mu\text{l}$  (0.5  $\mu\text{Ci}/\text{well}$ )를 가한 다음 다시 18시간 배양하고 titerk cell harvester (Flow)를 이용하여 배양된 세포를 glass filter (Flow)에 수득하였다. Scintillation cocktail (PPO 5g, POPOP 100 mg, toluene 1L) 5 ml와 glass filter를 vial에 가한 다음  $\beta$ -Counter (LKB)를 이용하여 방사선량(cpm)을 측정하였다.

**IL-2 생성능의 측정**<sup>21)</sup>—RPMI 1640 (Sigma)배지에, 0.2% sodium bicarbonate (Sigma), 10 mM HEPES (Sigma), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  penicillin and streptomycin (Gibco), 0.1 mM NEAA (Gibco), 50  $\mu\text{M}$  2-ME (Sigma)를 첨가하여 이를 K-0 배지라 칭하고 여기에 조제한 비장세포 현탁액 ( $8 \times 10^6$  cell/ml) 1 ml와 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ConA (Sigma Type III) 50  $\mu\text{l}$ 를 24 well flat bottomed plate (Falcon)에 가한 다음 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 17시간 배양한 후 원심분리하여 상층액을 취하고 냉동

보관한 후 IL-2 활성 측정에 사용하였다.

배양액 중 IL-2 활성의 측정은 high affinity receptor를 가진 CTLL-2를 이용하여 실시하였다. 10% FBS (Gibco)를 포함한 K-0 배지에 조제된  $2 \times 10^5$ /ml CTLL-2 세포현탁액 1 ml, 250 U/ml IL-2 1 ml, 배지 2 ml를 25 cm<sup>2</sup> T/C bottle에 가하고, 72시간 동안 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하여 얻었다. 배양액중에 잔류하는 IL-2를 제거하기 위해 10% FBS (Gibco)를 포함한 K-0 배지로 3회 세척하고  $1 \times 10^5$  CTLL/ml로 조정하였다. 96 well round bottomed culture plate (Flow)에 CTLL 50  $\mu$ l와 recombinant IL-2 ( $1.2 \times 10^4$  U/mg, KIST) 또는 위에서 취한 IL-2 상층액 50  $\mu$ l를 가한 후, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하고 <sup>3</sup>H-thymidine (6.7 Ci/mmol NEW)을 25  $\mu$ l (1.0  $\mu$ C/well) 가한 후 다시 24시간 동안 배양하였다. Titertek harvester (Flow)를 이용하여 glass filter (Flow)에 배양 세포를 수득하고 방사선량을 측정하였다. 배양액중의 IL-2 활성의 산출은 방사선량(cpm)으로 나타내었다.

**Recombinant IL-2에 대한 비장세포의 반응성 측정<sup>22)</sup>**— 96 well flat bottomed culture plate에 10% FBS를 포함한 K-0 배지로 조제한  $4 \times 10^6$  cell/ml 비장세포 현탁액 50  $\mu$ l와 recombinant IL-2 100  $\mu$ l를 가한 후 배지를 가하여 총 용량을 200  $\mu$ l로 하고 120시간 배양하였다. 이후 <sup>3</sup>H-thymidine을 가하고 다시 6시간 배양한 후 배양세포를 수득하고 방사선량을 측정하였다.

**Suppressor cell 활성의 측정<sup>23)</sup>**— K-0 배지로 조제한 비장세포 현탁액  $1.6 \times 10^7$ /ml 0.5 mg/ml mitomycin-C (Sigma) 50  $\mu$ l를 가하여 40분간 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 3회 세척하여 mitomycin-C를 제거하고  $4 \times 10^6$  cell/ml로 조정하여 Suppressor-cell로 사용하였다. 96 well flat bottomed culture plate에 정상 비장세포 ( $4 \times 10^6$ /ml) 50  $\mu$ l, 20  $\mu$ l/ml ConA 50  $\mu$ l 및 mitomycin-C를 처리한 Suppressor-cell 50  $\mu$ l를 가하여 총 200  $\mu$ l가 되도록 하였다. 44시간 배양 후 <sup>3</sup>H-thymidine을 가하고 18시간 더 배양하여 DNA 합성 능력을 측정하였다.

**통계분석**— 실험결과는 평균 $\pm$ SE로 표시하였다. 유의성 검정은 Student's T test를 이용하여 분석하였으며,  $p < 0.01$  이하의 경우에 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 실험결과 및 고찰

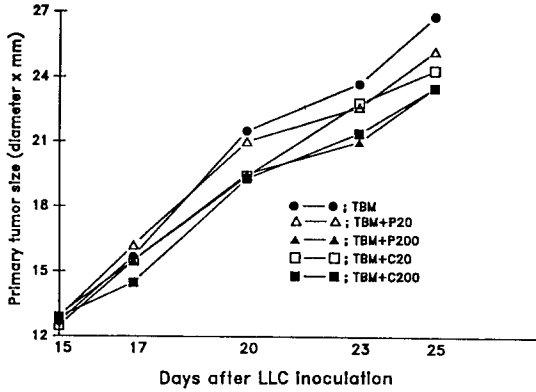
암상태에서는 mitogen에 대한 임파구 분열능 저하, suppressor T-cell 활성의 항진, IL-1 생성능의 결함,<sup>8)</sup> IL-2 생성<sup>9)</sup> 및 IL-2 수용체 발현의 결함<sup>10-12)</sup> 등 면역조절 기전의 이상에 의한 면역부전이 보고되고 있다. 따라서 암상태의 면역부전을 개선 치료하는 면역조절제의 개발에 대한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다.<sup>13-15)</sup>

저자 등<sup>16)</sup>은 천연 구름버섯에서 추출한 단백질 Copolang의 항암성 및 면역조절활성에 대한 예비적인 검색 실험을 allogeneic tumor system인 sarcoma-180으로 유도한 암상태의 생쥐를 대상으로 실시한 결과 Copolang은 지연형과민반응과 NK-cell활성은 증가시키나 B-cell 및 macrophage에는 영향을 미치지 못하는 것으로 관찰되어 Copolang은 B-cell 및 macrophage 활성화에 유의할만한 영향을 미치지 않으면서 T-cell 기능활성을 증가시킴으로써 항암 활성을 나타내는 것으로 추정하였다. 이와 같은 실험 결과를 기초로하여 LLC syngenic tumor system인 LLC 이식 생쥐에 있어서 항암 및 면역활성에 미치는 Copolang과 Copolang-P의 영향을 검토하였다.

Copolang과 Copolang-P를 7일간 복강투여한 결과 LLC 이식 24일된 생쥐에 있어서 이식부위의 tumor mass에는 변화가 없었다(Fig. 1). 또한 LLC는 이식 14일 이후부터 폐로 전이하여 폐에 전이암을 형성하였다. Copolang의 전이 억제 효과를 검색하기 위해서 폐의 무게를 측정하였던 바 Copolang과 Copolang-P는 LLC 이식 24일 후의 이식 생쥐의 폐의 무게에 영향을 미치지 않았다(data는 제시하지 않음). 이러한 결과는 저자 등의 보고와<sup>16)</sup> L1210과 P388 tumor system을 이용한 조등<sup>17)</sup>의 보고와 일치하였다. 따라서 Copolang은 LLC syngenic tumor system에서도 고형암 성장저지나 항전이 효과없이 담암상태에서 저하된 T-cell 활성을 회복시킬 것이라 추정되었다.

LLC 이식 생쥐의 T-cell 면역기능의 변화를 검색하기 위해 LLC 이식 생쥐의 비장 세포의 mitogen에 대한 분열능, IL-2 생성능, recombinant IL-2에 대한 비장세포의 반응성 및 suppressor cell 활성을 관찰하였다.

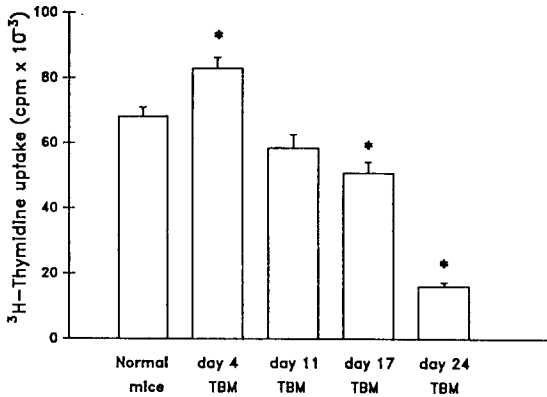
우선 LLC 이식 생쥐에 있어서 점진적인 종양 증



**Fig. 1**—Effects of copolang and copolang-p on the growth of tumor in LLC bearing C57BL/6 male mice.

TBM: Tumor bearing mice, TBM+P20: Tumor bearing mice administered with 20 mg/kg Copolang-P, TBM+P200: Tumor bearing mice administered with 200 mg/kg Copolang-P, TBM+C20: Tumor bearing mice administered with 20 mg/kg Copolang, TBM+C200: Tumor bearing mice administered with 200 mg/kg Copolang.

Mean± S.E. from group of 3 mice.

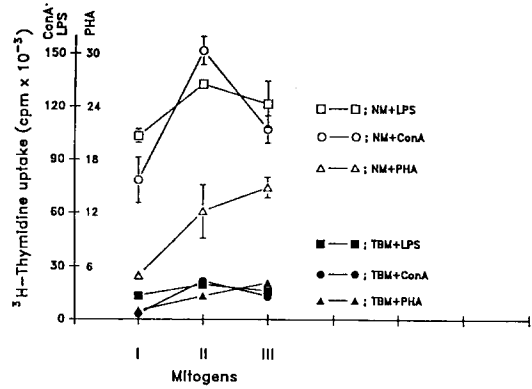


**Fig. 2**—Effects of progressive tumor mass on ConA-induced proliferation of splenocytes from LLC bearing C57BL/6 male mice.

TBM: Tumor bearing mice, Mean± S.E. from group of 3 mice.

\*P<0.01 compared to normal control.

식이 분열능에 미치는 영향을 검토하여 Fig.2에 나타내었다. LLC 이식 4일 후에는 정상 생쥐보다 오



**Fig. 3**—Effects of mitogen doses on proliferation of splenocytes from day 24 LLC bearing C57BL/6 male mice.

TBM: Tumor bearing mice, Mean± S.E. from group of 3 mice, I: ConA 3µg/ml, PHA 1/200 dil, LPS 40 µg/ml, II ConA 10µg/ml, PHA 1/100 dil, LPS 80 µg/ml, III: ConA 40µg/ml, PHA 1/50 dil, LPS 160 µg/ml.

히려 증가하였으며 이식 17일 후부터 감소하기 시작하여 이식 24일에는 정상 생쥐의 23%로 감소하였다. LLC 이식 생쥐에 있어서 임파구의 분열능의 저하가 비장세포의 mitogen에 대한 반응성이 변화하여 나타난 결과인가의 여부를 확인하기 위하여 LLC 이식 후 24일된 생쥐의 비장세포를 얻어 mitogen의 농도를 달리하여 비장세포의 분열능을 검토하였다. 그 결과 Fig.3에 나타낸 바와 같이 정상 생쥐에서는 ConA 10 µg/ml, PHA 1/50dil., LPS 80 µg/ml에서 최적 반응을 나타내지만, LLC 이식 생쥐의 비장세포는 mitogen의 종류와 농도에 관계없이 정상 생쥐에 비해 현저히 저하되는 것으로 관찰되었다.

LLC 이식 생쥐에 있어서 T-cell mitogen에 대해 비장세포가 낮은 반응성을 나타내는 이러한 결과는 LLC 이식 생쥐에 있어서 T-cell 활성화의 결함에 기인할지도 모른다는 가능성을 시사한다. 따라서 저자들은 그 가능성을 검토하고자 T-cell 활성화에 중요한 역할을 하는 IL-2 활성, IL-2에 대한 비장세포의 반응 및 suppressor cell 활성을 검토하였다.<sup>8-12)</sup>

LLC 이식 생쥐에 있어서 비장세포의 IL-2 생성능에 미치는 영향을 검색하기 위하여 10 µg/ml ConA 존 채하에서 18시간 배양하여 배양액 중의 IL-2 함량을

**Table I**—Effects of progressive tumor mass on IL-2 production of splenocytes from LLC bearing C57BL/6 male mice.

Group	<sup>3</sup> H-Thymidine incorporation (cpm × 10 <sup>-3</sup> )
Normal control	103.90 ± 3.06
TBM day 14	113.50 ± 7.70
TBM day 11	102.67 ± 6.65
TBM day 18	80.26 ± 5.34*
TBM day 24	45.04 ± 1.31*

#TBM: Tumor bearing mice.

Representative mean ± S.E. from 3 separate triplicate cultures.

Responsiveness (cpm) of CTLL to standard IL-2 (U/ml): 0; 9197 ± 222, 0.125; 20980 ± 279, 0.5; 48888 ± 1366, 2; 130280 ± 2453, 8; 164256 ± 2409, 32; 176407 ± 1105.

\* P &lt; 0.01 compared to normal control.

**Table II**—Time course of IL-2 production of splenocytes from day 24 LLC bearing C57BL/6 male mice.

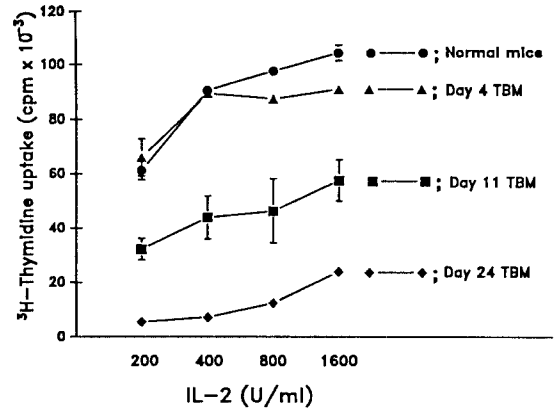
Culture time (Hour)	<sup>3</sup> H-Thymidine incorporation (cpm × 10 <sup>-3</sup> )	
	Normal control	TBM control
3	28.70 ± 1.64	12.78 ± 2.56
7	50.25 ± 2.23	9.46 ± 0.44
11	90.46 ± 11.07	21.61 ± 1.90
14	103.90 ± 4.75	26.92 ± 2.43
17	100.80 ± 8.73	28.76 ± 1.13
21	57.19 ± 5.88	37.47 ± 1.99
24	57.86 ± 2.00	24.64 ± 1.42

#Tumor bearing mice.

Representative mean ± S.E. from 3 separate triplicate cultures.

Responsiveness (cpm) of CTLL to standard IL-2 (U/ml): 0; 9197 ± 222, 0.125; 20980 ± 279, 0.5; 48888 ± 1366, 2; 130280 ± 2453, 8; 164156 ± 2409, 32; 176407 ± 1105.

측정하였다. 그 결과 Table I에 제시된 바와 같이 LLC 이식 생쥐에 있어서 비장세포의 IL-2 생성능의 경시 변화는 비장세포 분열능과 유사한 경향을 보였으며 이식 24일에는 정상 생쥐의 43%로 감소하였다. LLC 이식 생쥐의 비장세포를 얻어 배양시간을 달리하여 IL-2 생성능을 검토하였다. 그 결과 Table II에 나타낸 바와 같이 정상 생쥐뿐만 아니라 LLC 이식 생쥐에

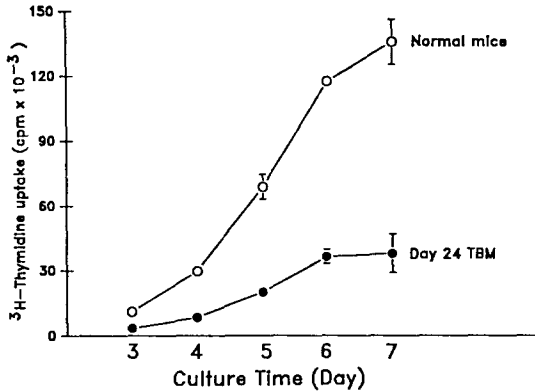
**Fig. 4**—Effects of progressive tumor growth on responsiveness of splenocytes from LLC bearing C57BL/6 male mice, to recombinant IL-2.

TBM: Tumor bearing mice, Mean ± S.E. from group of 3 mice.

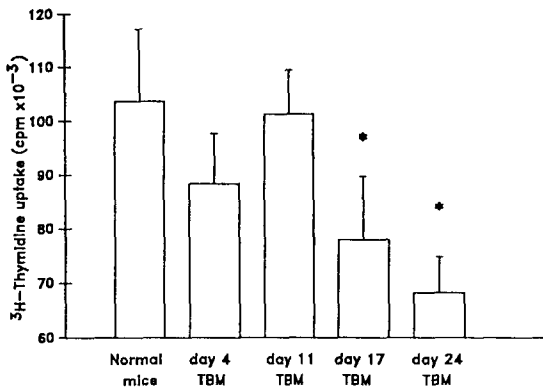
있어서도 최적의 IL-2 생성은 배양 후 11~17 시간에 나타났으며 배양시간에 관계없이 정상 생쥐에 비해 현저히 저하되는 것으로 관찰되었다.

LLC 이식 생쥐에 있어서 점진적인 LLC 증식에 따른 recombinant IL-2에 대한 비장세포의 반응성의 경시변화는 Fig. 4에 나타내었다. recombinant IL-2에 대한 비장 세포의 반응성은 이식 4일 이후부터 감소하기 시작하여 이식 24일 이후에는 정상 생쥐의 15% 이하로 저하되었으며, LLC 이식 생쥐에 있어서 비장세포의 recombinant IL-2에 대한 반응성이 배양시간에 따라 변화하는지의 여부를 확인하기 위하여 LLC 이식 후 24일된 생쥐의 비장세포를 얻어 배양시간을 달리하여 IL-2에 대한 반응성을 검토하였다. 그 결과 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 정상 생쥐뿐만 아니라 LLC 이식 생쥐에 있어서 최적의 IL-2에 대한 반응성은 배양 7일 후에 나타났으며 배양시간에 관계없이 정상 생쥐에 비해 현저히 저하되는 것으로 관찰되었다.

Holen 등<sup>10</sup>은 최근 methylcholanthrene으로 유도한 syngeneic tumor를 이식한 C57BL/6 생쥐에서 ConA 반응성이 저하됨을 발견하고 ConA에 대한 반응성 저하는 tumor 이식 상태에서의 비장세포의 recombinant IL-2에 대한 반응성의 저하 및 IL-2 수용체 중 분자량 55,000의 IL-2 수용체의 mRNA 합성의 결함에 기인한다고 보고하였다.



**Fig. 5**—Time course of responsiveness of splenocytes from day 24 LLC bearing C57BL/6 male mice, to recombinant IL-2.  
TBM: Tumor bearing mice, Mean±S.E. from group of 3 mice.



**Fig. 6**—Effects of progressive tumor mass on nonspecific suppressor-cell activity of splenocytes from LLC bearing C57BL/6 male mice.  
TBM: Tumor bearing mice, Mean±S.E. from group of 3 mice.  
\*P<0.01 compared to normal control.

이상의 결과로 추측해 볼 때 LLC 이식 생쥐에 있어서도 mitogen에 대한 비장세포 반응성 저하는 IL-2 생성 저하 및 IL-2에 대한 반응성 저하 그리고 T-cell 활성화 과정의 결함에 기인한다고 사료된다. 그런데 암상태의 비장세포 배양액 중에는 soluble IL-2<sup>12)</sup> 수용체가 증가되어 T-cell 활성화에 필요한 IL-2 함량을 감소시킨다고 보고되어 왔다. 따라서 배양액 중 IL-2 함량 저하가 IL-2 생성 기전의 결함에 의한

**Table III**—Effects of Copolang and Copolang-p on lymphocyte proliferation in LLC bearing C57BL/6 mice (ConA 10 µg/ml, PHA 1/50 dilution, LPS 80 µg/ml).

Group	<sup>3</sup> H-Thymidine incorporation (cpm×10 <sup>-3</sup> )		
	ConA	PHA	LPS
Normal mice	93.01±5.36	14.83±1.03	47.70±0.99
TBM control	14.48±0.72	4.17±0.32	8.35±0.70
TBM+P20	17.70±0.93	4.82±0.53	10.55±1.28
TBM+P200	10.09±0.32	4.05±0.55	7.41±0.44
TBM+C20	19.38±0.94	7.21±0.42	11.14±1.05
TBM+C200	6.17±0.31	3.34±0.42	6.92±0.99

#TBM: Tumor bearing mice, P20: 20 mg/kg of Copolang-P, P200: 200 mg/kg of Copolang-P, C20: 20 mg/kg of Copolang, C200: 200 mg/kg of Copolang.  
Representitive mean±S.E. from 3 separate triplicate cultures.

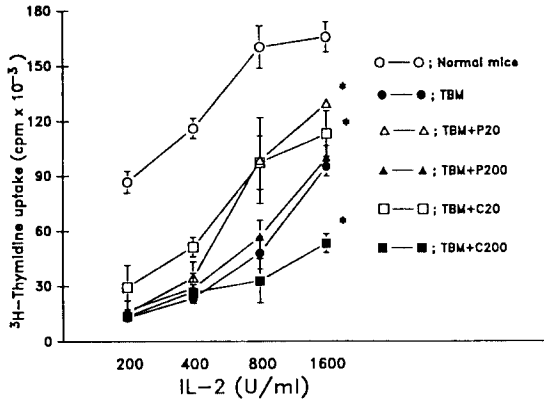
것인지 IL-2는 정상적으로 분비되나 soluble IL-2 수용체와 결합하여 T-cell 활성화에 필요한 IL-2 함량이 감소되는지는 알 수 없다.

LLC 이식 생쥐에 있어서 비장세포의 suppressor 활성의 경시 변화를 검색하기 위하여 비장세포를 mitomycin-C 처리하여 정상 비장세포의 ConA에 의한 분열능의 억제 정도를 검토하였다.<sup>23)</sup> 그 결과 Fig. 6에 표시된 바와 같이 LLC 이식 생쥐에 있어서 비장세포의 suppressor 활성은 이식 17일 후 현저히 항진되는 것으로 관찰되었다.

LLC 이식 생쥐에 있어서 이식 4일 후에 면역 기능이 정상 생쥐보다 오히려 증가하는 현상은 LLC 이식 초기에 담암 생체의 임파구가 LLC를 항원으로 인식하여 면역활성이 증가하기 때문인 것으로 사료되며,<sup>17)</sup> 이식 18일 이후에는 본 연구에서 선택된 정상 생쥐에 비하여 저하되는 것으로 관찰되었는데 이러한 결과는 EL-4 모델,<sup>18)</sup> MOPC-315 모델<sup>26)</sup> 등 다양한 암실험 모델에서 관찰되는 일반적인 현상이다.

이상의 시험 내용을 근거로하여 LLC 이식 24일된 생쥐에서 Copolang의 면역조절 활성을 검토하였다. Copolang은 LLC 이식 생쥐의 면역기능이 저하되는 것으로 관찰된 이식 15일 이후부터 7일간 복강 투여 하였으며 투여 종료 3일 후에 비장을 적출하여 비장 세포현탁액을 조제하였다.

Table III은 LLC 이식 생쥐에서 비장세포의 mito-

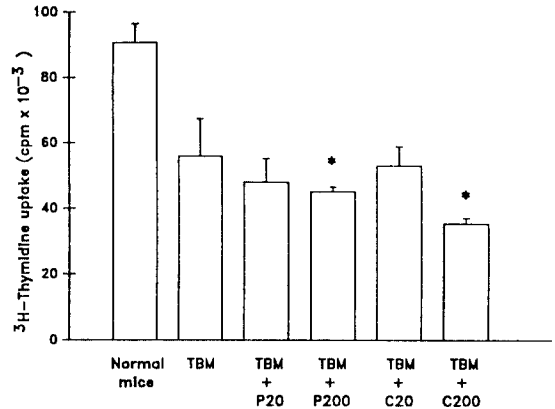


**Fig. 7**—Effects of Copolang and Copolang-p on responsiveness of splenocytes from day 24 LLC bearing C57BL/6 male mice, to recombinant IL-2.

TBM: Tumor bearing mice, TBM+P20: Tumor bearing mice administered with 20 mg/kg Copolang-P, TBM+P200: Tumor bearing mice administered with 200 mg/kg Copolang-P, TBM+C20: Tumor bearing mice administered with 20 mg/kg Copolang, TBM+C200: Tumor bearing mice administered with 200 mg/kg Copolang.

gen에 대한 분열능에 미치는 Coplang과 Copolang-P의 영향을 나타낸다. LLC 이식 생쥐로부터 얻은 비장세포의 10  $\mu$ g/ml ConA, 1/50 diluted PHA 및 80  $\mu$ g/ml LPS에 대한 분열능은 정상 생쥐에 비해 16%, 28%, 18%로 저하되었으나 LLC 이식 생쥐에 Copolang 20 mg/kg을 투여한 경우 담압 상태에 비해 각각 20%, 48%, 23%씩 증가되었으며 동일용량의 Copolang-P도 ConA와 LPS에 대해서는 유사한 수준의 항진 효과를 보였다. 그러나 고용량인 200 mg/kg 투여는 오히려 비장세포 분열능을 감소시켰다. 일반적으로 담압상태에서는 mitogen에 의한 분열능의 저하는 IL-2 생성 및 IL-2 수용체 발현 결함에 기인하므로<sup>8-12)</sup> Copolang이 IL-2와 IL-2 수용체 발현을 증가시키므로서 비장세포 분열능을 회복시키는지의 여부를 확인하기 위해 LLC 이식 생쥐에 저하된 IL-2 생성능과, 비장세포의 recombinant IL-2에 대한 반응성을 측정하여 간접적으로 IL-2 수용체 발현능에 미치는 Coplang의 효과를 검토하였다.

LLC 이식 생쥐의 임파구에서 유리되는 IL-2의 양은



**Fig. 8**—Effects of Copolang and Copolang-p on nonspecific suppressor activity of splenocytes from day 24 LLC bearing C57BL/6 mice.

TBM: Tumor bearing mice, TBM+P20: Tumor bearing mice administered with 20 mg/kg Copolang-P, TBM+P200: Tumor bearing mice administered with 200 mg/kg Copolang-P, TBM+C20: Tumor bearing mice administered with 20 mg/kg Copolang, TBM+C200: Tumor bearing mice administered with 200 mg/kg Copolang.

Mean  $\pm$  S.E. from group of 3 mice

\*P<0.01 compared to tumor control.

정상 생쥐의 약 30% 정도로 저하되나 LLC 이식 생쥐에 20 mg/kg Copolang을 투여한 결과 LLC 이식 생쥐에 비해 96% 증가하였으며(Table IV), LLC 이식 생쥐에서 비장세포의 800 U/ml recombinant IL-2에 대한 반응성이 정상 생쥐의 30%로 저하되나 LLC 이식 생쥐에 20 mg/kg Copolang을 투여한 결과 LLC 이식 생쥐에 비해 100% 증가되었다(Fig. 7). LLC 이식 생쥐에 20 mg/kg Copolang-P를 투여한 경우에도 유사한 경향을 나타냈으나, 200 mg/kg 투여시에는 오히려 감소하였다. Suppressor cell 활성에 대한 Copolang의 효과를 측정된 결과, Fig. 8에 나타난 바와 같이 Copolang은 suppressor cell 활성에 영향을 주지 못하였다.

Copolang과 Copolang-P를 LLC 이식 생쥐에 투여시 동일 용량(20 mg/kg)에서는 임파구 분열능과 IL-2 수용체 발현능은 유사한 수준의 항진효과를 보였으나, IL-2 생성능 항진효과는 Copolang이 Copolang-P에 비해 다소 높은 것으로 관찰되었다.

**Table IV**—Effects of Copolang and Copolang-P on IL-2 production of splenocytes from day 24 LLC bearing C57BL/6 male mice.

Group	<sup>3</sup> H-Thymidine incorporation (cpm × 10 <sup>-3</sup> )
Normal control	105.80 ± 6.76
TBM control	31.12 ± 0.65
TBM + P20	41.03 ± 3.15*
TBM + P200	34.52 ± 1.32
TBM + C20	50.62 ± 4.18
TBM + C200	28.17 ± 1.26

# TBM: Tumor bearing mice, P20: 20 mg/kg of Copolang-P, P200: 200 mg/kg of Copolang-P, C20: 20 mg/kg of Copolang, C200: 200 mg/kg of Copolang.

Representative mean ± S.E. from 3 separate triplicate cultures.

Responsiveness (cpm) of CTLL to standard IL-2 (U/ml): 0; 9197 ± 222, 0.125; 20980 ± 279, 0.5; 48888 ± 1366, 2; 130280 ± 2453, 8; 164156 ± 2409, 32; 176407 ± 1105.

\* P < 0.01 compared to tumor control.

IL-2는 helper T 임파구에서 유리되는 T-cell growth factor로서 항원이나 mitogen으로 자극시킬 때 생성되고 NK세포 활성화,<sup>27)</sup> cytotoxic T 임파구 활성화<sup>28)</sup> 등 T cell 활성화에 중심적 역할을 하며 IL-2에 의해 활성화된 임파구는 다양한 암종을 억제한다는 보고<sup>29)</sup>에 따라 현재 IL-2는 임상적으로 암치료에 응용되고 있다.<sup>30-33)</sup> 이러한 사실들을 고려할 때 Copolang이 IL-2 생성 및 IL-2 수용체 발현능을 효과적으로 향진시키는 것으로 확인된 이상의 결과는 Copolang이 담암 생체에서 저하된 면역기능 특히 저하된 T-cell 기능을 활성화시킴으로써 암치료에 유효하게 활용될 수 있음을 시사한다.

## 문 헌

- Guillou, P. F.: The immunological status of the cancer patients. *Curr. Opinion Immunol.* **1**, 913-6 (1989/1990).
- Hirai, N. and Hattori, N.: Immunodeficiency and cancer patients. *Adv. Med (Japan).* **135**, 817-23 (1985).
- North, R. J.: Downregulation of the antitumor immune response. *Adv. Cancer Res.* **45**, 1-43 (1985).
- Ting, C. C., Rodrigue, D., Ting, R. C., Wivel, N. and Collins, M. J.: Suppression of T-cell-mediated immunity by tumor cells. *Int. J. Cancer.* **24**, 644-655 (1979).
- Kirchner, H., Chused, T. M., Herverman, R. B., Holden, H. T. and Lavrin, D. H.: Evidence of suppressor cell activity in spleens of mice bearing primary tumors induced by the Molony sarcoma virus. *J. Exp. Med.* **139**, 1472-1487 (1974).
- Fujimoto, S., Greene, M. I. and Sehon, A. H.: Regulation of the immune response to tumor antigens. II. The nature of immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *J. Immunol.* **116**, 800-806 (1976).
- Takei, F., Levy, J. G. and Kilburn, D. G.: Characterization of suppressor cells in mice bearing syngeneic mastocytoma. *J. Immunol.* **118**, 412-417 (1977).
- Holan, V. and Lipoldova, M.: IL-2 production by immunologically hyporeactive tumor bearing mice. *Brit. J. Cancer* **61**, 667-70 (1990).
- Bubenik, J., Kieler, J., Tromholt, B., Hermann, G. and Jandlova, T.: Defect in lectin-induced IL-2 production by peripheral blood lymphocyte of patients with invasive urinary bladder carcinoma. *Immunol. Lett.* **18**, 115 (1988).
- Holan, V. and Lipoldova, M.: Tumor bearing animals synthesize a decrease level of mRNA for the inducible 55,000 MW IL-2 receptor. *Immunol.* **69**, 626-8 (1990).
- Holan, V. and Lipoldova, M.: Low responsiveness of spleen cells from tumor bearing mice to recombinant IL-1 and IL-2. Impaired expression of IL-2 receptors. *Int. J. Cancer* **45m** 798-800 (1990).
- Marino, P., Cuno, M., Preatoni, A., Cori, P., Rosti, A., Frotini, L. and Cicard, M.: Increased levels of soluble IL-2 receptors in serum of patients with lung cancer. *Brit. J. Cancer* **61**, 434-5 (1990).
- Kenneth, A. F.: Biological Response Modifiers; The new immunotherapy. *Cancer Res.* **49**, 1621-39 (1989).
- Amery, W. K.: Cancer immunotherapy: Some critical comments regarding immunological monitoring. *Int. J. Immunopharmacol.* **3**, 339-48 (1981).



- 15) Fenichel, R. L. and Chirigos, M. A.: *Immune Modulating Agent and Their Mechanisms*. Marchal Decker (1984).
- 16) Moon, C. K., Lee, S. H., Mock, M. S. and Kim, D. O.: Antitumor activity of the polysaccharide fraction (Copolang) from *Coriolus versicolor* and its effects on the murine immune function. *Yakhak Hoeji* **31**, 126 (1987).
- 17) Jo, S. K., Kim, S. H. and Yun, T. K.: Effects of copolang on murine immune function and antitumor activity. *J. Kor. Cancer Assoc.*, **19**, 28 (1987).
- 18) Maccubbin, D. L., Mace, K. F., Ehrke, M. J. and Mihich, E.: Modification of host antitumor defence mechanisms in mice by progressively growing tumor. *Cancer Reserch* **49**, 4216 (1989).
- 19) Mishell, B. B. and Shiigi, S. M.: *Selected methodes in Cellular Immunology*, p. 3-27 (1980).
- 20) Mishell, B. B. and Shiigi, S. M.: *Selected methodes in Cellular Immunology*, p. 153-67 (1980).
- 21) Gearing, A. J. H., Johnstone, A. P. and Thorpe, R.: Production and assay of the interleukins. *J. Immunol. Methol.* **83**, 1-27 (1985).
- 22) Spitz, M., Gearing, A., Callus, M.: Spitz, L. and Thorpe, R.: IL-2 in vivo; Production of and response to IL-2 in lymphoorgans undergoing a primary immune response to heterologous RBC. *Immunol.* **54**, 527 (1985).
- 23) Young, M. R. and Young, M. E.: Effects of fish oil and corn oil diets on rostaglandin dependent and myelopoiesis associated immune suppressor mechanisms of mice bearing metastatic LLC tumor. *Cancer Res.* **49**, 1931 (1989).
- 24) Oldham, R.: Biotherapy; The 4th Modality of Cancer Treatment. *J. Cell. Physiol.* (Suppl.) **4**, 91-99 (1986).
- 25) North, R. J. and Bursuker, I.: Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. *J. Exp. Med.* **159**, 1295 (1984).
- 26) Qing-Wei, Y. and Margalite, B. M.: Cyclophosphamide-induced appearance of immunopotentiating T-cells in the spleens of mice bearing a large MOPC-315 tumor. *Cancer Res.* **44**, 3873-79 (1984).
- 27) Heney, C. S.: Interleukin 2 augments natural killer activity. *Nature* **291**, 335 (1981).
- 28) Erard, F.: Interleukin 2 is both necessary and sufficient for the growth and differentiation of lectin-stimulated cytotoxic T lymphocyte precursors. *J. Immunol.* **341**, 1644 (1985).
- 29) Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z. and Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural-killer resistant fresh solid tumor by interleukin-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* **155**, 1923-1843 (1982).
- 30) Steven, A. R.: The adaptive immunotherapy of cancer using the transfer of activated lymphoid cells and interleukin-2. *Sem. Oncol.* **13**, 200-206 (1986).
- 31) Rosenberg, S. A., Mule, J. J., Spiess, P. J., Reichert, C. M. and Schwarz, S. L.: Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant IL-2. *J. Exp. Med.* **161**, 1169-88 (1985).
- 32) Smith, K. A.: Interleukin 2: inception, impact and implication. *Science* **240**, 1169-1176 (1988).
- 33) Oliver, R. T. D.: The clinical potential of IL-2. *Brit. J. Cancer* **58**, 405-9 (1988).