

## 마우스에서 자외선 조사에 의해 유도된 종양세포에 대한 Interleukin-2의 항암효과

권 오 덕<sup>1</sup>

전북대학교 수의과대학, 생체안전성연구소

### Effect of Interleukin-2 on Antitumor Response Against Ultraviolet Radiation-Induced Fibrosarcoma in Mice

Oh-deog Kwon<sup>1</sup>

Bio-Safety Research Institute, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

**Abstract :** Recombinant interleukin-2 (IL-2) has demonstrated as an antineoplastic agent in mice and human, but the relatively low response rates observed in clinical trials. Therefore, the present study was undertaken in order to evaluate therapeutic activities of IL-2 for the establishment of therapeutic applications. At the onset of the experiment, normal C3H/HeN mice were injected with  $3 \times 10^6$  RD-995 tumor cells, murine ultraviolet radiation-induced fibrosarcoma, subcutaneously. Beginning on day 25, experimental groups were treated with a 5-day course of IL-2 (subcutaneous injection of 30,000 IU every 12 hours for 5 days). The result of this experiment revealed that RD-995 tumor grew progressively in control mice. Subcutaneous IL-2 therapy decreased tumor growth until day 23, then the tumor grew progressively. No significant difference in the survival of IL-2 treated mice were observed compared with the control mice.

**Key words :** interleukin-2, RD-995 tumor, antitumor effect, mice

## 서 론

현재까지 알려진 종양의 치료법에는 수술요법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법 등이 있으며, 이 중 수술요법과 방사선요법은 종양의 병기(stage)가 낮아 병소가 제한되어 있을 경우에 주로 사용되는 치료법이다<sup>30</sup>. 반면, 화학요법과 면역요법은 일반적으로 병기가 높은 진행된 종양의 치료에 사용되지만, 화학요법에 내성을 나타내는 진행된 종양의 경우에는 화학요법제 치료가 거의 도움이 되지 못하며 이러한 경우에는 면역요법 중의 하나인 Interleukin-2 (IL-2)의 치료가 널리 사용되고 있다<sup>22,25,30</sup>. IL-2는 T-세포, B-세포, natural killer (NK) 세포 및 lymphokine-activated killer (LAK) 세포와 같은 면역세포를 활성화시키며, 일단 자극을 받은 면역세포는 종양세포를 찾아내 이를 파괴함으로써 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>2,3,6,7,12,18,20,24,27,28</sup>. 고농도의 IL-2를 사용하여 림프구를 시험관내에서 활성화시키면 거의 모든 종양세포주와 신선절제한 종양세포들에 대해 세포독성을 나타낸다<sup>15</sup>. 이러한 연구결과를 기초로 하여 IL-2는 진행된 신세포암과 악성흑색종과 같은 일반적인 항암요법이나 방사선요

법으로는 거의 치료효과를 기대할 수 없는 환자들의 치료에 널리 사용되고 있으며<sup>4,6,16</sup>, 실제로 5-10%에서는 완전반응을 나타내는 것으로 보고되고 있다<sup>22,30</sup>. 이와 같이 IL-2는 진행된 종양뿐만 아니라 다른 치료를 시행하여 이미 병소 확인이 불가능할 정도의 완전반응을 보인 환자에서 보조요법으로 사용하려는 임상적 시도가 확산되고 있으나, IL-2의 독성 효과와 치료에 대한 지포가 적기 때문에 현재까지는 종양의 치료에 제한적으로만 사용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 IL-2가 자외선 조사에 의해 유도된 종양세포<sup>13,23</sup>에 미치는 항암효과를 밝힘으로써 IL-2의 임상적 적용에 이용할 수 있는 기초적 자료를 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN)에서 분양받은 6-8주령의 C3H/HeN 암컷 마우스를 각 군당 5마리씩 2개군(아무런 처치를 하지 않은 대조군 및 IL-2 30,000 IU 투여군)으로 나누었다.

### 종양세포

C3H/HeN 마우스에서 자외선 조사에 의해 유도된 RD-995 종양세포주<sup>13,23</sup>를 생체 종양조직에서 신선 절제한 후 clean bench 하에서 약 1 mm 정도 크기의 조직편으로 만든 다음

이 논문은 2001년 전북대학교 생체안전성연구소 학술연구비의 일부 지원으로 이루어졌음(CNU-BSRI No. 2001-08)

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : odkwon@chonbuk.ac.kr

0.1% collagenase와 0.1% neutral protease가 함유된 20 ml 의 Hank's balanced salt solution 속에 넣고 상온에서 3시간 동안 막대자석을 이용하여 교반하면서 single cell suspension을 만들었다<sup>19</sup>. Single cell suspension은 medium을 사용하여 3회 세척 후  $1.5 \times 10^7$  cells/ml의 농도로 만들었다. 이 종양 suspension을 1마리당 0.2 ml ( $3 \times 10^6$  cells)씩 피하주사 한 후 0.4-0.8 cm<sup>2</sup>의 표면적을 갖는 종양으로 성장했을 때 IL-2 치료를 시작하였다.

**IL-2 투여**

IL-2 투여군에는 RD-995 종양세포주를 마우스에 이식한 후 25일째 (종양의 크기가 0.4-0.8 cm<sup>2</sup> 정도로 성장)부터 human rIL-2 {Chiron corporation(Emeryville, CA)} 30,000 IU를 1일 2회씩 5일간 피하주사 하였다.

**종양의 크기 측정**

첫 IL-2 투여 후 2-4일 간격으로 Calipers를 이용하여 종양의 표면적(가로×세로)을 측정한 후, IL-2 투여 직전의 종양 크기와 비교하여 증가율을 계산하였다.

**통계처리**

통계 프로그램 SPSS 8.0을 이용하여 one way Anova를 실시하였다.

**결 과**

**IL-2 투여가 종양세포의 성장에 미치는 영향**

첫 IL-2 투여 후 2-4일 간격으로 종양의 크기를 측정한 후 IL-2 투여 직전의 종양 크기와 비교하여 증가율을 환산한 결과, 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 종양크기의 증가율이 점차 증가하기 시작하여 4일째에는 31.4%, 14일째에는 115.1%, 23일째에는 168.6%, 35일째에는 313.9%, 44일째에는 656.9%를 나타내어 평균 236.6%의 증가율을 나타내었다. 반면, 30,000 IU의 IL-2를 투여한 군에서는 4일째에 7.2%, 14일째에 57.4%, 23일째에 105.4%의 증가율을 나타내어 대조군에 비하여 종양크기의 증가율이 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 이 이후에는 종양크기의 증가율이 빨라져 35일째에는 329.7%, 44일째에는 683.2%를 나타내었으며, 전체적으로는 평균 210.8%의 증가율을 나타내어 대조군과 비교하여 유의한 차이가 인정되지 않았다(Fig 1). 따라서 44일째 이후에는 종양크기의 측정을 중단하고 폐사할 때까지 생존율을 구하였다.

**IL-2 투여가 마우스의 생존율에 미치는 영향**

아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 RD-995 종양세포 이식 후 86일째에 80%, 94일째에 60%, 110일째에 40%, 111일째에 20%의 생존율을 그리고 112일째에는 모두 폐사하였다. IL-2 30,000 IU를 피하로 투여한 군에서는 RD-995 종양세포 이식 후 81일째에 80%, 83일째에 60%, 106일째

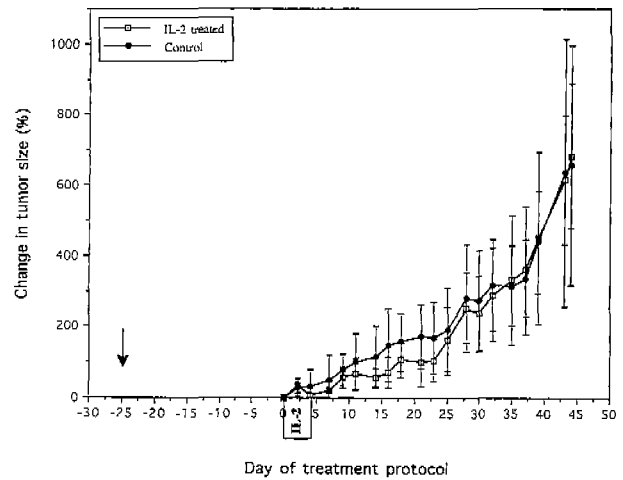


Fig 1. Evaluation of therapeutic effects of interleukin-2 (IL-2) on subcutaneous RD-995 tumor bearing mice. Two experimental groups (untreated control and 30,000 IU IL-2 subcutaneous injection groups) of five C3H/HeN mice were established in mouse cages. All mice were injected with  $3 \times 10^6$  RD-995 tumor cells subcutaneously on day -25 (filled arrow). The duration of the IL-2 treatment is shown along the x axis. The results are expressed mean change in tumor size (%)  $\pm$ SD.

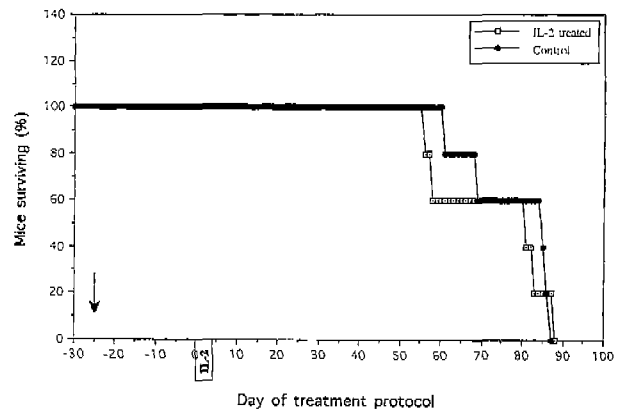


Fig 2. Survival of the mice was evaluated to establish therapeutic activity of interleukin-2 (IL-2) against subcutaneous RD-995 tumor bearing mice. Two experimental groups (untreated control and 30,000 IU IL-2 subcutaneous injection groups) of five C3H/HeN mice were established in mouse cages. All mice were injected with  $3 \times 10^6$  RD-995 tumor cells subcutaneously on day -25 (filled arrow). The duration of the IL-2 treatment is shown along the x axis.

에 40%, 108일째에 20%의 생존율을 그리고 113일째에는 모두 폐사하여 대조군과 비교하여 유의한 차이가 인정되지 않았다(Fig 2).

**고 찰**

IL-2는 활성화된 T 림프구에서 주로 생산되는 cytokine으

로 T-세포, B-림프구, natural killer 세포, lymphokine-activated killer 세포, 단구, 대식구 등의 성장과 분화에 중요한 역할을 할뿐만 아니라<sup>15,17,20,24</sup>, 또한 이들 면역세포를 활성화시켜 항암효과를 나타낸다고 보고되고 있다<sup>5,8-11,14,20-25</sup>. 실제로 IL-2를 전이성 흑색종과 신세포암 환자에 사용할 경우 15-33%에서 치료반응이 증명되었으며, 5-10%에서는 완전반응을 나타내는 것으로 보고되고 있다<sup>22,30</sup>. 본 실험에서는 C3H/HeN 마우스에 자외선 조사에 의해 유도된 RD-995 종양세포<sup>13,23</sup>를 피하에 이식한 후 종양의 크기가 0.4-0.8 cm<sup>2</sup> 정도로 성장했을 때인 25일째부터 human rIL-2 30,000 IU를 1일 2회씩 5일간 피하주사 하고 2-4일 간격으로 종양의 크기를 측정한 후 IL-2 투여 직전의 종양 크기와 비교하여 증가율을 측정하여 본 결과, 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 종양크기의 증가율이 점차 증가하기 시작하여 4일째에는 31.4%, 14일째에는 115.1%, 23일째에는 168.6%, 35일째에는 313.9%, 44일째에는 656.9%를 나타내어 평균 236.6%의 증가율을 나타내었다. 반면, 30,000 IU의 IL-2를 투여한 군에서는 4일째에 7.2%, 14일째에 57.4%, 23일째에 105.4%의 증가율을 나타내어 대조군에 비하여 종양크기의 증가율이 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 이 이후에는 종양크기의 증가율이 빨라져 35일째에는 329.7%, 44일째에는 683.2%를 나타내었으며, 전체적으로는 평균 210.8%의 증가율을 나타내어 대조군과 비교하여 유의한 차이가 인정되지 않았다. 이러한 결과는 IL-2 투여 후 적어도 23일째까지는 면역세포를 활성화시켜 종양세포에 세포독성효과를 나타낸 것<sup>3,16,17,21,22,25,26</sup>으로 생각되나, 종양세포를 완전히 억제시키지는 못하였다. 이는 권<sup>29</sup>이 Meth-A 종양세포를 이식한 마우스에 50,000-100,000 IU의 IL-2를 투여한 결과 종양세포의 증가율이 억제되었다고 한 보고와 대체로 유사하였으며, IL-2를 종양의 치료에 사용할 경우 독성효과 등<sup>20,23,24</sup>을 고려하여 일정 시간이 지난 후에는 다시 투여해야 함을 암시하고 있지만 정확한 투여 방법은 앞으로 더욱 규명되어야 할 것으로 생각된다.

또한 Yim 등<sup>28</sup>과 권<sup>29</sup>은 비교적 빨리 성장하는 Meth-A 종양세포를 마우스에 이식한 후 IL-2를 투여할 경우 nitric oxide (NO·) 산생을 증가시켜 마우스의 생존율을 증가시킨다고 보고하였다. 본 실험에서도 IL-2의 투여가 마우스의 생존율에 미치는 영향을 알아본 결과 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 RD-995 종양세포 이식 후 86일째에 80%, 94일째에 60%, 110일째에 40%, 111일째에 20%의 생존율을 그리고 112일째에는 모두 폐사하였다. IL-2 30,000 IU를 피하로 투여한 군에서는 RD-995 종양세포 이식 후 81일째에 80%, 83일째에 60%, 106일째에 40%, 108일째에 20%의 생존율을 그리고 113일째에는 모두 폐사하여 대조군과 비교하여 유의한 차이가 인정되지 않았다. 이러한 결과는 RD-995 종양세포는 Meth-A 종양세포에 비해 체내에서의 성장률이 느리고, 종양에 따라 IL-2에 대한 반응의 차이 때문으로 생각되지만, 정확한 기전은 앞으로 더욱 규명되어야 할 것이다.

## 결론

IL-2가 종양세포에 미치는 항암효과를 밝힘으로써 IL-2의 임상적 적용에 이용할 수 있는 기초적 자료를 제시하고자 C3H/HeN 마우스를 이용하여 자외선 조사에 의해 유도된 RD-995 종양세포를 피하에 이식한 후 25일째(종양의 크기가 0.4-0.8 cm<sup>2</sup> 정도로 성장)부터 human rIL-2 30,000 IU를 1일 2회씩 5일간 피하주사 하면서 대조군과 비교하여 종양세포의 성장에 미치는 영향을 관찰하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다. 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 종양의 크기가 빠르게 증가하였다. 반면, IL-2를 투여한 군에서는 IL-2 투여 후 23일째까지는 대조군에 비하여 종양 크기의 증가율이 감소하는 경향을 나타내었다. 마우스의 생존율은 IL-2 투여군과 대조군 사이에 유의한 차이가 인정되지 않았다.

## 참고문헌

- Anderson PM, Sorenson MA. Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2. *Clin Pharmacokinet* 1994; 27: 19-31.
- Blay JY, Favrot MC, Negrier S, Combaret V, Chouaib S, Mercatello A, Kaemmerlen P, Franks CR, Phillip T. Correlation between clinical response to interleukin-2 therapy and sustained production of tumor necrosis factor. *Cancer Res* 1990; 50: 2371-2374.
- Boccoli G, Masciulli R, Ruggeri EM, Carlini P, Giannella G, Montesoro E, Mastroberardino G, Isacchi G, Testa U, Calabresi F, et al. Adoptive immunotherapy of human cancer. The cytokine cascade and monocyte activation following high-dose interleukin-2 bolus treatment. *Cancer Res* 1990; 50: 5795-5800.
- Brandau S, Suttman H, Flad HD, Jocham D, Bohle A. Killing of Fas ligand-resistant renal carcinoma cells by interleukin-2- and BCG-activated effector cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49: 369-376.
- Cifone MG, D'Alo S, Parroni R, Millimaggi D, Biordi L, Martinotti S, Santoni A. Interleukin-2-activated rat natural killer cells express inducible nitric oxide synthase that contributes to cytotoxic function and interferon-gamma production. *Blood* 1999; 93: 3876-3884.
- Dutcher JP, Logan T, Gordon M, Sosman J, Weiss G, Margolin K, Plasse T, Mier J, Lotze M, Clark J, Atkins M. Phase II trial of interleukin 2, interferon alpha, and 5-fluorouracil in metastatic renal cell cancer: a cytokine working group study. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3442-3450.
- Gelmo BT, Palladino MA Jr, Jeffe HS, Espevik TP, Rayner AA. Circulating cytokines in patients with metastatic cancer treated with recombinant interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res* 1988; 48: 5864-5867.
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin C. Nitric oxide. A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 87-94.
- Hibbs JB Jr, Westenfelder C, Taintor RR, Vavrin Z, Kablitz C, Baranowski RL, Ward JH, Menloce RL, McMurry MP, Kushner JP, Samlowski WE. Evidence for cytokine inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving

- interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 1992; 89: 867-877.
10. Jansson OT, Morcos E, Brundin L, Bergerheim US, Adolfsson J, Wiklund NP. Nitric oxide synthase activity in human renal cell carcinoma. *J Urol* 1998; 160: 556-560.
  11. Jyothi MD, Khar A. Interleukin-2-induced nitric oxide synthase and nuclear factor-kappa B activity in activated natural killer cells and the production of interferon-gamma. *Scand J Immunol* 2000; 52: 148-155.
  12. Kasid A, Director EP, Rosenberg SA. Induction of endogenous cytokine mRNA in circulating peripheral blood mononuclear cells by IL-2 administration to cancer patients. *J Immunol* 1989; 143: 736-739.
  13. Kripke ML. Latency, histology, and antigenicity of tumors induced by ultraviolet light in three inbred mouse strains. *Cancer Res* 1977; 37: 1395-1400.
  14. Lee SG, Heo DS, Yoon SJ, Jee YS, Kang JO, Kim K, Kim CD, Sung MW, Kim NK. Effect of GM-CSF and IL-2 co-expression on the anti-tumor immune response. *Anticancer Res* 2000; 20: 2681-2686.
  15. Lotze MT, Grimm EA, Mazumder A, Strausser JI, Rosenberg SA. Lysis of fresh and cultured autologous tumor by human lymphocytes cultured in T-cell growth factor. *Cancer Res* 1981; 41: 4420-4425.
  16. Margolin KA. Interleukin-2 in the treatment of renal cancer. *Semin Oncol* 2000; 27: 194-203.
  17. Mertelsmann R, Welte K. Human interleukin-2 molecular biology, physiology and clinical possibilities. *Immunol* 1986; 172: 400-419.
  18. Mier JW, Vachino G, Van Der Meer JWM, Numerof RP, Adams S, Cannon JG, Bernheim HA, Atkins MB, Parkinson DR, Dinarello CA. Induction of circulating tumor necrosis factor (TNF a) as the mechanism for the febrile response to interleukin-2 (IL-2) in cancer patients. *J Clin Immunol* 1988; 8: 426-436.
  19. Papa MZ, Vetto JT, Ettinghausen SE, Mule JJ, Rosenberg SA. Effect of corticosteroid on the antitumor activity of lymphokine-activated killer cells and interleukin 2 in mice. *Cancer Res* 1986; 46: 5618-5623.
  20. Paul WE. T-cell derived cytokines and their receptors. In: *Fundamental immunology*, 3rd ed. New York: Raven Press. 1993: 763-800.
  21. Robak T. Biological properties and therapeutic use of interleukin 2 (IL-2). *Postepy Hig Med Dosw* 1995; 49: 367-393.
  22. Rosenberg SA, Lotze MT, Mule JJ. New approach to the immunotherapy of cancer using interleukin-2. *Ann Int Med* 1988; 108: 853-864.
  23. Samlowski WE, Yim CY, McGregor JR, Kwon OD, Gonzales S, Hibbs JB Jr. Effectiveness and toxicity of protracted nitric oxide synthesis inhibition during IL-2 treatment of mice. *J Immunother* 1995; 18:166-178.
  24. Thomson A. Interleukin-2. In: *The cytokine handbook*. London: Academic Press. 1991: 83-102.
  25. Whittington R, Faulds D. Interleukin-2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer. *Drugs* 1993; 46: 446-514.
  26. Yim CY, Bastian NR, Smith JC, Hibbs JB Jr, Samlowski WE. Macrophage nitric oxide synthesis delays progression of ultraviolet light induced murine skin cancers. *Cancer Res* 1993; 55: 5507-5511.
  27. Yim CY, Lee CW, Choi SM, Park SS, Lee SJ, Kim JH, Song JS, Yoo WH, Kwak JY, Sohn MH. Effects of nitric oxide (NO) synthesis inhibition on antitumor responses during interleukin-2 (IL-2) treatment of mice. *Korean J Intern Med* 1996; 11: 93-100.
  28. Yim CY, McGregor JR, Kwon OD, Bastian NR, Rees M, Mori M, Hibbs JB Jr, Samlowski WE. Nitric oxide synthesis contributes to IL-2-induced antitumor response against intraperitoneal Meth A tumor. *J Immunol* 1995; 155: 4382-4390.
  29. 권오덕. 마우스에서 Meth-A 종양세포에 대한 interleukin-2의 항암효과. *한국임상수의학회지* 2000; 17: 305-310.
  30. 해리슨내과학편찬위원회. *Harrison's 내과학*. 서울: 도서출판 정담. 1997: 1977-1993.