Immune Network Vol. 1, No. 2, 2001

표적세포의 Nitric oxide 합성이 LAK 세포의 세포독성에 대한 예민도에 미치는 영향

전북대학교 의과대학 내과학교실[1], 의과학 연구소[2]

박성일[1] · 박주형[1] · 이치국[1] · 김신재[1] · 최보금[1] · 곽재용[1,2] · 임창열[1,2]

Effect of target cell nitric oxide synthesis on the sensitivity to lymphokine-activated killer cell cytotoxicity

Sung Il Park[1], Ju Hyung Park[1], Chi Kug Lee[1], Shin Chae Kim[1], Bo Geum Choi[1], Jae Yong Kwak[1,2], Chang Yeol Yim[1,2]

Department of Internal Medicine[1] and Institute for Medical Sciences[2], Chonbuk National University Medical School, Chonju, Korea

Background: Nitric oxide (NO), a cytotoxic molecule is produced in various tissues including tumor cells during interleukin-2 (IL-2) therapy. Lymphokine-activated killer (LAK) cells are induced during IL-2 therapy, and have cytotoxic activity against tumor cells. The current study investigated the effects of NO synthesized in target cells or exposure of target cells to NO on the sensitivity of target cells to LAK cell cytotoxicity. **Methods:** Cytotoxicity was measured using 4 h chromium release assays. LAK cells which were induced by a 4 day incubation of BALB/c mouse splenocytes with IL-2 (6,000 IU/mL) were employed as effector cells. RD-995 skin tumor cells originated from a C3H/HeN mouse were employed as target cells. NO synthesis in target cells was induced by a 24 h incubation of RD-995 cells with IFN γ (25 U/mL), TNF (50 U/mL) and IL-1 (20 U/mL). S-nitrosyl acetylpenicillamine (SNAP), an NO donor, was used to expose target cells to NO. N^G-monomethyl-L-arginine (MLA) and carboxy-PTIO were added during cytotoxicity assays to inhibit NO synthesis, and to scavenge NO produced by target cells, respectively. **Results:** Sensitivity of NO-producing RD-995 cells to LAK cell cytotoxicity was decreased by addition of MLA and carboxy-PTIO during cytotoxicity assays. However, the two reagents had no effect on the sensitivity of non-NO-producing RD-995 cells. Pretreatment of RD-995 target cells with SNAP increased the sensitivity in comparison with untreated cells. **Conclusions:** Sensitivity of target cells to LAK cell cytotoxicity is increased by target cell NO synthesis or exposure to NO. Further studies are needed to evaluate whether these in vitro results have relevance to *in vivo* phenomena.

Key Words: IL-2, lymphocyte, cytotoxicity, nitric oxide, tumor

책임저자 : 임창열, 전북대학병원 내과의국,
561-712, 전북 전주시 덕진구 금암동 634-18,
Tel: 063-250-1682, Fax: 063-254-1609
E-mail: cyyim@moak.chonbuk.ac.kr

서 론

Nitric Oxide(NO)는 세포독성을 포함하여 다양한 생물학적 기능을 갖는 기체로 대식세포(1, 2), 혈관내피세

포(3), 호중구(4), 간세포(5), 신경세포(6, 7) 및 일부 종양세포(8) 등에서 생산된다. NO의 합성은 L-arginine을 기질로 사용하는 nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 합성되는데 크게 두 종류가 있다(9, 10). 한 종류는 세포내 Ca^{++}농도에 의해 조절되는 constitutive NOS (cNOS) 이고, 다른 한 종류는 세포내 Ca^{++}농도에 관계없이 IFN γ, TNF 및 IL-1 등의 cytokine 들에 의해 발현되는 inducible NOS (iNOS) 이다. cNOS에 의해 생성된 NO는 guanylate cyclase의 heme군에 부착되어 guanylate cyclase를 활성화시킨다(7). 이를 통해 cyclic GMP가 증가되어 세포간 혹은 세포내 신호전달에 관여하는데, 혈압조절 및 신경전달 등의 항상성을 유지하는 기능을 한다(11-14). 한편 iNOS는 대량의 NO를 생성하므로 guanylate cyclase를 지속적으로 활성화시켜 극심한 혈관이완을 초래하고 아울러 암세포를 포함한 주위조직에 세포독성을 나타낸다(1, 2). 일반적으로 iNOS의 발현은 면역반응의 활성시 유발된다(15, 16).

IL-2에 의해 활성화된 림프구인 lymphokine-activated killer (LAK) 세포는 시험관내에서 거의 모든 종양세포주와 신선절제한 종양세포들에 대해 세포독성을 나타낸다(17-20). 이를 기초로 항암화학요법에 잘 반응하지 않는 진행된 신세포암과 악성 흑색종 환자에게 IL-2치료를 시행하고 있다(21). 최근에는 고용량 항암화학요법과 조혈모세포이식을 실시한 다음, 미세잔존질환(minimal residual disease)을 치료하기 위한 목적으로도 사용된다(22). LAK 세포는 IL-2치료를 받는 환자의 체내에서도 유도되는데 IL-2 치료의 항암효과기전의 하나로 인식되고 있다(23). 그러나 이 환자들에게 IL-2를 투여하면 약 10-30%의 낮은 반응율을 보인다(24, 25). 따라서 LAK 세포 등의 항암효과기전을 자세히 규명하여 치료효과를 높이기 위한 방법을 개발해야 한다. IL-2 치료시에는 LAK 세포의 유도와 더불어 NO생성이 유발되는데 종양조직에서도 NO 생성이 동반된다(26, 27). 최근 마우스 종양모형을 이용한 연구에서 IL-2 치료시 생성되는 NO가 IL-2 치료의 항암효과기전으로 제시되었다(26).

본 연구에서는 표적 암세포가 NO를 생성하거나 NO에 노출되어 있을 경우 LAK 세포의 세포독성에 대한 표적세포의 예민도가 변화하는가를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

대한 실험동물 센타(대전, 한국)에서 분양 받은 6-8주령의 BALB/c 수컷 마우스를 이용하였다. 각 실험에서 동물의 연령과 성별을 일치시켜 시행하였으며 모든 실험은 2회 이상 반복하여 동일한 결과를 얻었다.

2. 효과세포(림포카인 활성 살해세포, lymphokine-activated killer 세포, LAK 세포)

BALB/c 마우스의 비장을 적출한 후 배지{10% 우태혈청 (HyClone Lab., Logan, UT), 100 U/mL penicillin G, 100 μg/mL streptomycin 및 5×10^{-5}M 2-mercaptoethanol 이 첨가된 RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY)}속에서 핀셋을 이용하여 단일세포 부유액으로 만든 다음 1회 세척 후 Tris-buffered 0.16 M ammonium chloride용액과 약 5분간 반응 시켜 적혈구를 파괴시켰다. 2회 세척 후 2×10^{6}세포/mL의 농도로 만들었다. 이 세포들에게 IL-2 (6,000 IU/mL, Chiron, Emeryville, CA)를 첨가하고 4일간 37℃, 5% CO_2, 습도 100%의 조건에서 배양하여 효과세포로 사용하였다.

3. 표적세포

C3H/HeN 마우스의 피부에서 자외선에 의해 발생된 RD-995 종양세포주(28)를 사용하였다. RD-995 세포는 5% 우태혈청, 100 U/mL penicillin G, 100 g/mL μ streptomycin 이 첨가된 RPMI 1640 배지를 이용하여 배양하였다. 배양용기로부터 세포를 수집할 경우에는 인산완충 식염수 (phosphate buffered saline, PBS)로 배양용기에 부착된 세포를 2회 세척한 후 trypsin-EDTA 용액 (Flow Laboratories, McLean, VA)에 약 5분간 노출시켜 세포를 분리한 다음 혈청이 포함된 배지로 2회 세척하여 수집하였다.

4. 표적세포의 NO 생성 유발

75 cm^2 배양용기에 단일층으로 confluent 하게 배양된 RD-995 세포에 interferon-γ (IFN γ, 25 U/mL, Sigma, St. Louis, MO), IL-1 (20 U/mL, Sigma) 및 tumor necrosis factor-α (TNF, 50 U/mL, Sigma)를 첨가하고

Table 1. Cytokine-induced nitrite production by RD-995 target cells

	No Cytokine	Cytokine
MLA experiment	1.2 μM	12.1 μM
C-PTIO experiment	0.9 μM	10.9 μM

Following a 24 h incubation of confluently grown RD-995 cells in the presence of IFN γ (10 U/mL), TNF (50 U/mL) and IL-1 (20 U/mL), nitrite production was measured in the cell-free culture supernatants. (Representative data from three experiments)
MLA: N^G-monomethyl-L-arginine,
C-PTIO: 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline -1-oxyl 3-oxide

24 시간 배양하여 NO생성을 유도하였다. NO 생성의 증거로 배양상층액의 nitrite농도를 측정하였다. 각 실험에서 이와 같은 방법으로 RD-995세포가 생성한 nitrite 양은 110-120 μM 정도였다(Table 1).

5. 표적세포에 S-nitrosyl acetylpenicillamine (SNAP)의 첨가

표적세포를 NO에 노출시키기 위하여 NO 방출물질인 SNAP을 0.5 mM 및 2 mM의 농도로 RD-995 (10^5/mL) 세포에 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후 배지로 3회 세척한 다음 세포독성 시험에 사용하였다.

6. Nitrite 측정

NO의 반감기가 수초-수십초 정도로 아주 짧기 때문에 NO를 직접 측정하는 것은 어려운 일이다(15, 16). 따라서 NO 의 안정된 대사산물인 nitrite를 NO 생성의 지표로 측정하였다. 세포배양 직후 배양액을 500×g로 5분간 원심하고 상층액을 수집하여 nitrite 측정의 시료로 삼았다. nitrite 측정은 Griess반응(29)을 변형시켜 측정했는데 먼저 96 well microtiter plate의 각 well에 50 μL의 시료를 담은 다음 1:1 (v:v) = 1% sulfanilamide in 30% acetic acid : 0.1% N(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in 60% acetic acid 용액을 첨가하여 5분간 상온에서 반응시켰다. 반응 후 발색정도를 570 nm에서 plate reader를 사용하여 관찰한 다음 nitrite 표준용액에서 관찰한 발색도와 비교하여 시료의 nitrite 농도를 계산하였다.

7. LAK세포의 암세포독성 측정

4시간 chromium 방출법을 이용하였다. 5×10^6개의 RD-995세포를 [51Cr] sodium chromate 0.1 mCi가 들어있는 0.1 mL의 PBS와 37℃에서 1시간동안 반응시킨 후 2회 세척하여 105 세포/mL 농도로 만들었다. 효과세포로 LAK 세포 (5×10^6 세포/mL)를 이용하였다. 96 well microtiter plate에 효과세포와 표적세포를 50:1, 25:1, 12.5:1, 6.25:1의 비율로 혼합하고 4시간 동안 배양하였다. 이때 대조군으로 spontaneous release 군은 표적세포 (10^4 세포/well)와 배지만으로 배양하며 total release 군은 표적세포 (10^4 세포/well)를 0.5% Triton X-100을 포함하는 배지와 배양하였다. 배양 후 microtiter plate를 400×g에서 5분간 원심한 뒤 0.1 mL의 상층액을 채취하여 상층액에 방출된 방사능을 gamma counter로 측정하였다. % cytotoxicity는 다음 공식에 의해 구하였다.

$$\%\ \text{cytotoxicity} = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{total release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

8. 세포독성 측정시 표적세포의 NO생성 억제 및 생성된 NO의 제거

세포독성 측정시 표적세포의 NO생성을 억제하기 위하여 nitric oxide synthase (NOS) 억제제인 N^G-monomethyl-L-arginine (MLA)를 62.5 μM 및 250 μM의 농도로 첨가하였다. 또한 표적세포에서 생성되는 NO를 제거하기 위하여 NO 청소물질인 2-(4- carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (carboxy-PTIO)를 150 nM 및 300 nM의 농도로 첨가하였다.

9. 통계처리

Student t-test를 사용하여 통계검정을 하였고 $p<0.05$ 때 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 표적세포의 NO 생성억제가 LAK세포의 세포독성에 미치는 영향

표적세포의 NO 생성을 억제하기 위하여 NOS억제제

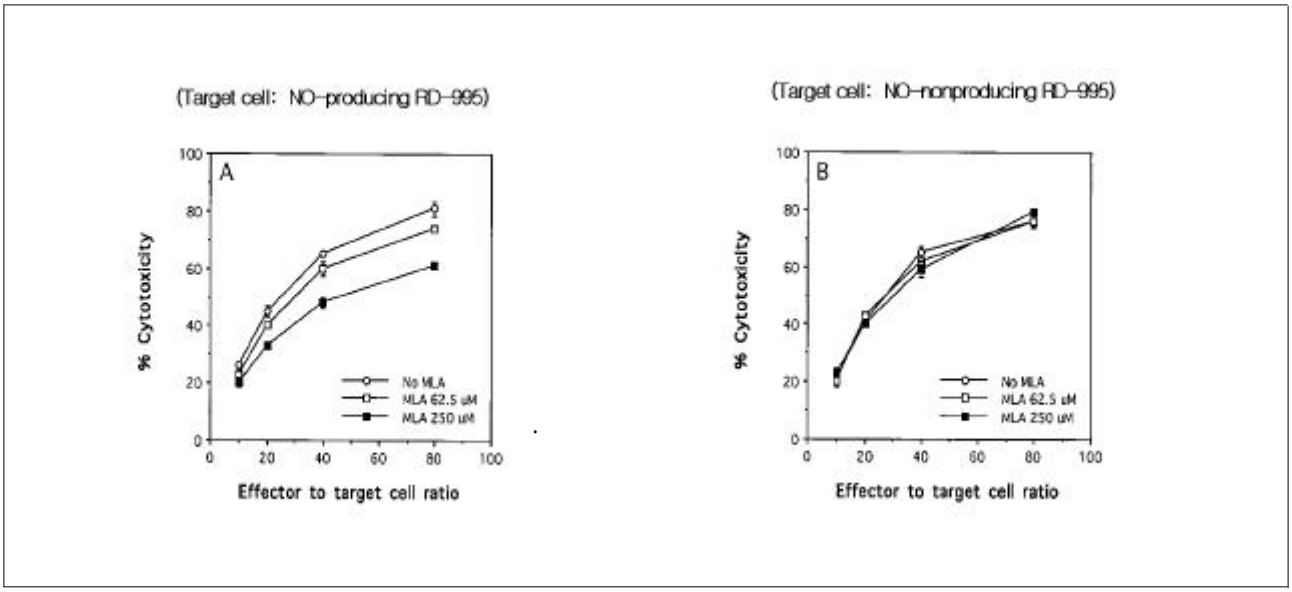

Fig. 1. Effect of inhibition of target cell NO synthesis on the sensitivity to LAK cell cytotoxicity. LAK cell cytotoxicity directed against NO-producing (A) and NO-nonproducing control (B) RD-995 target cells was measured in the presence or absence of NG-monomethyl-L-arginine (NOS inhibitor) using a 4 h chromium release assay. (mean ± SD of triplicate samples)

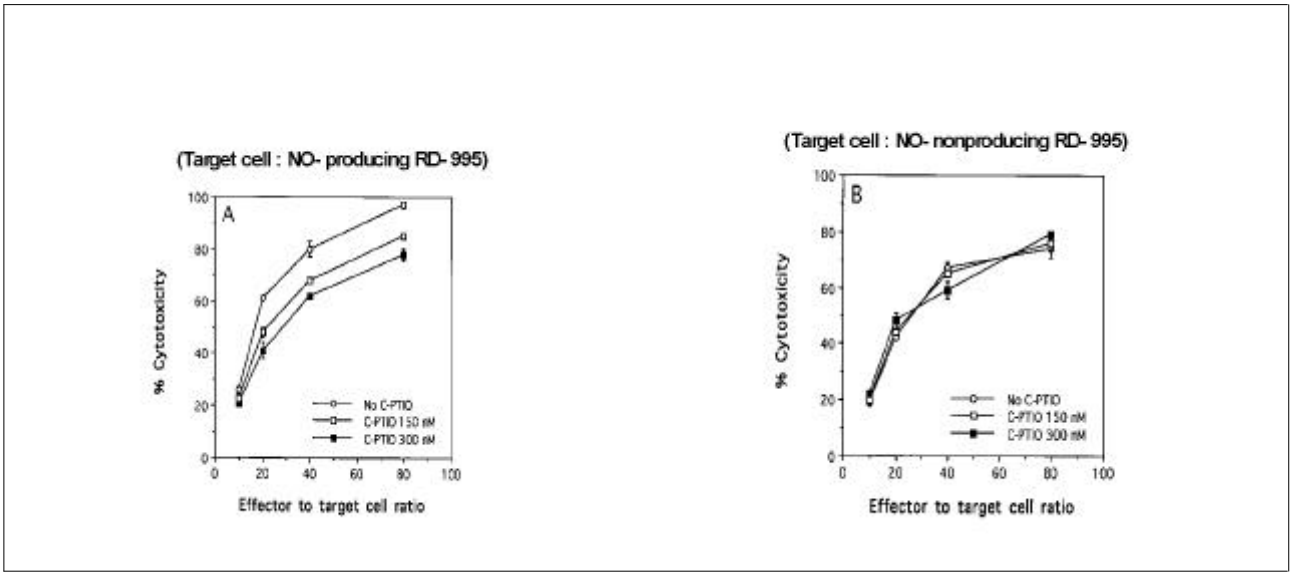

Fig. 2. Effect of scavenging of NO synthesized by target cells on the sensitivity to LAK cell cytotoxicity. LAK cell cytotoxicity directed against NO-producing (A) and NO-nonproducing control (B) RD-995 target cells was measured in the presence or absence of carboxy-PTIO (NO scavenger) using a 4 h chromium release assay. (mean ± SD of triplicate samples)

인 MLA를 0 μM, 62.5 μM 및 250 μM의 농도로 첨가하고 세포독성을 측정한 결과, 첨가된 MLA의 농도가 높을 수록 LAK 세포의 세포독성에 대한 RD-995 세포의 예민도가 감소하였다(Fig. 1A). 대조실험에서는 NO 생성이 유도되지 않았던 표적세포로 이용한 RD-995세포는 MLA를 첨가해도 LAK 세포의 세포독성에 대한 RD-995 세포의 예민도가 변화하지 않았다(Fig. 1B).

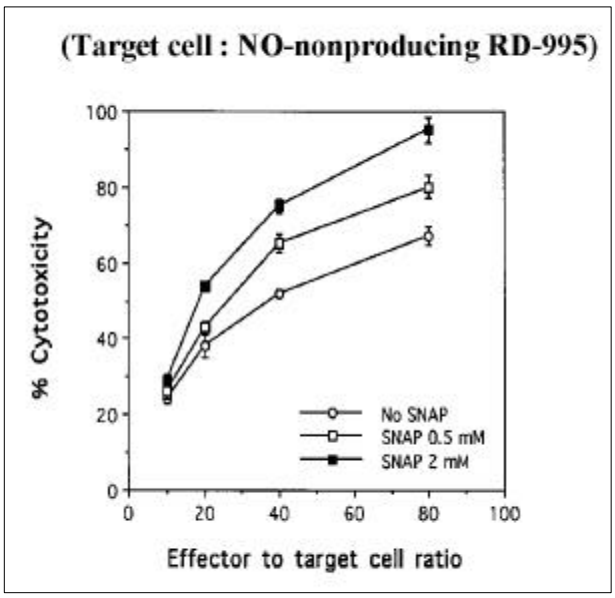

Fig. 3. Effect of pretreatment of target cells with an NO donor (SNAP) on the sensitivity to LAK cell cytotoxicity. LAK cell cytotoxicity directed against RD-995 target cells pretreated with SNAP was measured using a 4 h chromium release assay. (mean ± SD of triplicate samples)

2. 표적세포에서 생성된 NO의 제거가 LAK세포의 세포독성에 미치는 영향

표적세포에서 생성된 NO를 제거하기 위하여 NO 청소물질인 carboxy-PTIO를 0 nM, 150 nM 및 300 nM의 농도로 첨가하고 세포독성을 측정한 결과, 첨가된 carboxy-PTIO는 농도가 높을 수록 LAK 세포의 세포독성에 대한 RD-995 세포의 예민도가 감소하였다(Fig. 2A). 대조실험에서는 NO 생성이 유도되지 않았던 표적세포로 이용한 RD-995 세포는 carboxy-PTIO를 첨가해도 LAK 세포의 세포독성에 대한 RD-995 세포의 예민도가 변화하지 않았다(Fig. 2B).

3. 세포독성 시험 직전 표적세포가 NO에 노출된 경우 LAK세포의 세포독성 변화

세포독성 시험 전 RD-995 세포에 NO 방출물질인 SNAP을 0 mM, 0.5 mM 및 2 mM의 농도로 1 시간동안 노출시킨 다음 표적세포로 사용하여 LAK 세포의 세포독성을 측정한 결과, 첨가된 SNAP은 농도가 높을 수록 LAK 세포의 세포독성에 대한 RD-995 세포의 예민도가 증가하였다 (Fig. 3).

고 찰

활성 림프구가 종양세포에 세포독성을 나타내는 주요 기전은 표면 수용체(T세포 수용체, CD56, 면역글로블린 수용체) 및 부착분자(LFA-1, ICAMs, CD2, CD28, CD34, CD4, CD8)를 통해서 종양세포와 접촉될 때, 림프구에서 granzymes (serine protease들)와 cytolysin (perforin)을 유리하여 표적세포를 손상시켜 세포사를 유발하는 것이다(30, 31). 또한 림프구는 Fas 리간드를 통해 암세포의 Fas 수용체를 자극하여 세포사를 일으킨다(32, 33).

NO가 종양세포에 세포독성을 나타내는 주요 기전은 NO의 iron-sulfur 집합체에 대한 친화성으로 인한 iron-sulfur 구조를 가진 효소에 대한 억제효과이다(34). 이 기전에 의해 억제되는 효소로 알려진 것들은 Kreb's 회로의 aconitase, mitochondria 전자전달계의 complex I 효소 (NADH : ubiquinone oxidoreductase) 와 complex II 효소 (succinate : ubiquinone oxidoreductase) 등이다(35-37). NO가 이 효소들을 억제하므로써 세포의 산소이용과 에너지 발생을 저해하여 세포의 증식을 억제한다. NO에 의한 세포독성의 또 다른 기전은 ribonucleotide reductase의 활성억제에 의한 DNA 합성억제이다. NO는 이 효소의 tyrosyl residue나 non-heme Fe와 반응하여 효소활성을 억제한다(38). NO는 또한 DNA를 파괴할 수도 있다(39).

본 연구에서는 표적 암세포가 NO를 생성하거나 NO에 노출되어 있을 경우 LAK 세포의 세포독성에 대한 표적세포의 예민도가 변화하는가를 관찰하였다. 첫 번째 실험에서는 IFN γ, TNF 및 IL-1을 이용하여 표적세포에서 내인성 NO를 생성시킨 다음 세포독성을 측정하였다. 세포독성을 측정할 때 NOS 억제제인 MLA를 첨가하였다. 그 결과 MLA의 첨가시 세포독성이 감소하였다. 이는 표적세포의 NO생성이 LAK 세포의 세포독성에 대한 예민도를 증가시킴을 제시한다. NO 생성이 유도되지 않은 표적세포를 이용하여 세포독성을 측정한 경우에는 MLA를 첨가해도 세포독성에 대한 예민도가 변화하지 않았다. 이 결과는 MLA 첨가에 의한 표적세포의 세포독성에 대한 예민도 변화가 MLA의 직접작용에 의해 일어나는 것이 아니고 NO 생성억제를 통해 일어남을 시사한다. 두 번째 실험에서도 역시 IFN γ, TNF 및 IL-1을 이용하여 표적세포에서 내인성 NO를 생성시킨 다음 세포독성을 측정하였다. 세포독성을 측정할 때 NO 제거약

제인 carboxy-PTIO를 첨가하였다. carboxy-PTIO의 첨가는 세포독성을 감소시켰다. 이 결과 역시 표적세포의 NO생성이 LAK 세포의 세포독성에 대한 예민도를 증가시킴을 제시한다. NO 생성이 유도되지 않은 표적세포를 이용하여 세포독성을 측정한 경우에는 carboxy-PTIO를 첨가해도 세포독성에 대한 예민도가 변화하지 않았다. 이 결과는 carboxy-PTIO 첨가에 의한 표적세포의 세포독성에 대한 예민도 변화가 carboxy-PTIO의 직접작용에 의해 일어나는 것이 아니고 생성되는 NO의 제거를 통해 일어남을 시사한다. NO가 표적세포의 세포독성에 대한 예민도를 증가시킴을 재확인하기 위하여 세포독성 시험 전 RD-995 표적세포를 NO 방출물질인 SNAP에 노출시킨 다음 세포독성을 측정하였다. 표적세포의 SNAP에 대한 노출은 세포독성에 대한 예민도를 증가시켰다. 이 결과 역시 표적세포가 NO와 반응하면 세포독성에 대한 예민도가 증가함을 확인해 준다.

본 연구의 결과는 활성 림프구 세포독성기전과 NO에 의한 세포독성기전이 서로 협동하여 서로의 세포독성에 상승작용을 나타내거나 상가작용을 나타낼 것으로 생각된다. 세포독성이 증가되는 기전에 대해서는 추가 연구가 필요하다. 최근 활성 림프구가 암세포에 세포독성을 나타낼 때 림프구로부터 생성되는 cytokine들에 의해 암세포에서 NO가 생성되고 이 NO가 암세포 자체에 세포독성을 일으킨다는 보고가 있었는데(40), 이 것과 활성 림프구의 다른 세포독성 기전과의 상호관계도 더 밝혀져야 한다. 추가연구를 통하여 림프구의 세포독성기전을 더 자세히 규명하면 여러 질환의 면역치료에 효과적으로 응용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin C: Nitric oxide. A cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem Biophys Res Commun 157;87-94, 1988
2. Stuher DJ, Nathan CF: Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J Exp Med 169;1543-1555, 1989
3. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 327: 524-526, 1987.
4. Schmidt HHHW, Seifer R, Bohme E: Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B4. FEBS Lett 244; 357-360, 1989
5. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Holmann K, Simmons RL: Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products form Kupffer cells. J Exp Med 170;1769-1774, 1989
6. Bredt DS, Snyder SH: Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin requiring enzyme. Proc Natl Acad Sci U.S.A 87;682-685, 1990
7. Bredt DS, Snyder SH: A novel neuronal messenger. Neuron 8;8-11, 1992
8. Amber IJ, Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z: Cytokines induce an L-arginine-dependent effector system in nonmacrophage cells. J Leukoc Biol 44; 58-65, 1988
9. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature 351;714-718, 1991
10. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan CF: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. Science 256;225-228, 1992
11. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 333;664-666, 1988
12. Garthwaite J, Charles SI, Chess-Williams R: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. Nature 336; 385-388, 1988
13. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system. A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proc Natl Acad Sci U.S.A 86;5159-5162, 1989
14. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. Nature 347;768-770, 1990
15. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide:

a physiologic messenger. Ann Int Med 120;227-237, 1994

16. Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 329;2002-2012, 1993
17. Ellis TM, Creekmore SP, Mc Mannis JD, Braun DP, Harris JE, Fisher RI: Appearance and phenotypic characterization of circulating Leu-19+ cells in cancer patients receiving recombinant interleukin-2. Cancer Res 48;6597-6602, 1988
18. Rosenberg SA: Adoptive immunotherapy of cancer using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2. In Important Advances in Oncology 1986, Lippincott, Philadelphia, 1986
19. Itoh K, Tilden AB, Balch CM: Lysis of human solid tumor cells by lymphokine-activated natural killer cells. J Immunol 136;3910-3915, 1986
20. Grimm EA, Muul LM, Wilson DJ: The differential inhibitory effects exerted by cyclosporine and hydrocortisone on the activation of human cytotoxic lymphocytes by recombinant interleukin-2 versus allospecific CTL. Transplantation 39;537-540, 1985
21. Rosenberg SA, Lotze EA, Mule JJ: New approaches to the immunotherapy of cancer using interleukin-2. Ann Int Med 108;853-864, 1988
22. Rosenberg SA: The immunotherapy and gene therapy of cancer. J Clin Oncol 10;180-199, 1992
23. Ghosh AK, Dazzi H, Thatcher N, Moore M: Lack of correlation between peripheral blood lymphocyte-activated killer cell function and clinical response in patients with advanced malignant melanoma receiving recombinant interleukin 2. Int J Cancer 43;410-414, 1989
24. Rosenberg SA: Adoptive cellular therapy in patients with advanced cancer: An Update. Biol. Ther. Cancer 1; 1-15, 1991
25. Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE: Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. J A M A 271;907-913, 1994
26. 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 responses against intraperitoneal Meth A tumor. J Immunol 155;4382-4390, 1995
27. Hibbs JB Jr, Westenfelder C, Taintor RR, Vavrin Z, Kablitz C, Baranowski RL, Ward JH, Menlove 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 89;867-877, 1992
28. Daynes RA, Spellman CW, Woodward JD, Stewart DA: Studies into the transplantation biology of ultraviolet light-induced tumors. Transplantation 23;343-348, 1977
29. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem 126;131-138, 1982
30. Henkart PA, Hayes MP, Shiver JW: The granule exocytosis model for lymphocyte cytotoxicity and its relevance to target cell DNA breakdown. In Cytotoxic cells: recognition, effector function, generation and methods. Sitkovsky MV and Henkart PA, eds. Birkhauser, Boston, p.153-165, 1993
31. Podack ER: Perforin: Structure, function and regulation. Curr Top Microbiol Immunol 178;175-184, 1992
32. Suda T, Takahashi T, Golstein P: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell 75;1169-1178, 1993
33. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P: Fas involvement in Ca^{++}-independent T cell mediated cytotoxicity. J Exp Med 177;195-200, 1993
34. Bastian NR, Yim CY, Hibbs JB, Jr, Sarnlowski WE: Induction of iron derived EPR signals in murine cancers by nitric oxide; Evidence for multiple intracellular targets. J Biol Chem 269;5127-5131, 1994
35. Granger DL, Lehninger AL: Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. J Cell Biol 95;527-535, 1982
36. Drapier JC, Hibbs JB, Jr: Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells. Inhibition involves the iron-sulfur prosthetic group and is reversible. J Clin Invest 78;790-797, 1986
37. Drapier JC, Hibbs JB, Jr: Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage

effector cells. J Immunol 140;2829-2838, 1988
38. Kwon NS, Stuehr DJ, Nathan CF: Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. J Exp Med 174;761-767, 1991
39. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, Keefer LK: DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. Science 254;1001-1003, 1991
40. Kwak JY, Han MK, Choi KS, park IH, Sohn MH, Kim UH, McGregor JR, Samlowski WE, Yim CY: Cytokines secreted by lymphokine-activated killer cells induce endogenous nitric oxide synthesis and apoptosis in DLD-1 colon cancer cells. Cell Immunol 203;84-94, 2000

각 주

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(981-0707-068-2)**지원으로 수행되었음**.