

## 생쥐 대식세포의 감염균 치사활성과 종양 치사활성에 미치는 Polyamine 생합성 억제의 영향

이준백 · 정노팔

연세대학교 이과대학 생물학과

생쥐 대식세포의 감염균 치사활성 및 종양 치사활성에 미치는 polyamine 생합성억제의 영향을 알아보기 위하여 ornithine decarboxylase의 억제제인  $\alpha$ -difluoromethylornithine(DFMO)과 S-adenosylmethionine decarboxylase의 억제제인 methylglyoxal bis(guanylhydrazone)(MGBG)을 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 처리하였다.

대식세포의 감염균 치사활성의 지표로서 화학발광(chemiluminescence)과 nitroblue tetrazolium(NBT)의 환원정도를 측정된 결과, 염증유발물질인 thioglycollate(TG)와 세균의 세포내독소인 lipopolysaccharide(LPS)를 주사하거나 BCG를 감염시킨 후 측정된 화학발광의 수준은 TG, LPS, BCG의 순으로 증가하였다. 그러나 이러한 화학발광의 수준은 DFMO를 경구투여하였을 때 전체적으로 감소하였고, 이 세포에 의한 NBT 환원정도 또한 DFMO와 MGBG의 *in vitro* 처리에 의하여 감소되었다.

한편 BCG로 활성화시킨 대식세포의 종양 괴사인자분비에 의한 종양치사 및 종양세포와의 부착에 의한 직접적 치사정도를 측정된 결과, polyamine 생합성억제제의 처리농도를 증가시키에 따라 그 정도는 감소하였지만, 외부에서 polyamine인 putrescine을 처리 하였을 때 회복되었다.

위의 결과로부터 대식세포내의 polyamine 생합성은 이 세포의 최적활성화 과정에 필요한 것으로 생각된다.

**KEY WORDS:** Macrophage activation, Chemiluminescence, Tumoricidal activity, Polyamine depletion

동물의 면역체계는 체액성 면역과 세포성 면역으로 대별되는데, 세포성 면역의 구성세포인 대식세포(macrophage)는 감염균과 종양세포를 치사시키는 주효세포(effector cell)로 작용하고(Adams and Hamilton, 1984), 체액성 면역에서도 항원제공세포(antigen presenting cell)로 작용하는 면역계의 주요세포이다(Unanue, 1984).

대식세포는 골수에서 생성된 후, 여러 기관 및 장기로 이동하여 상주 대식세포(resident macrophage)로 된 뒤, 항원의 침입에 자극을 받아 활성화된다(Krahenbuhl *et al.*, 1977). 이 때 활성화된 대식세포는 형태적인 변화와 함께 기능적인 변화가 일어나서 감염균과 종양세포를 치사시킬 수 있는 능력을 얻게 된다. 대식세포가 이러한

능력을 발휘할 때에는 높은 수준의 세포성 화학발광(chemiluminescence)을 나타낸다. 이러한 발광은 항원의 자극에 의한 세포호흡의 촉진으로 인하여 포도당 대사과정 중에 생성되는  $O_2^-$  (superoxide anion),  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$  (hydroxyl radical)와 같은 활성형 산소(reactive oxygen)의 매개체에서 비롯된다(Cheson *et al.*, 1976). 이러한 활성형 산소의 생성정도는 대식세포의 활성정도와 밀접한 관계가 있으므로 대식세포 활성의 지표가 된다(Murry and Cohn, 1979; Hamilton and Adams, 1987). 한편 대식세포는 종양세포에 대하여 항 종양단백질인 cytolytic protease나 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)를 분비하는데, 이러한 물질의 분비는 항원 또는 lipopoly-

saccharide(LPS) 등의 자극으로 유도되며, 같은 면역계의 구성세포인 T-세포에서 분비되는 IFN- $\gamma$ 에 의하여 더욱 강화되어 나타난다(Carswell *et al.*, 1974; Ostrove *et al.*, 1979).

한편 polyamine인 putrescine, spermidine, spermine은 세포분화 및 성장에 밀접한 관련이 있는 물질로 알려져 있는데(Heby, 1981; Tabor and Tabor, 1984), 동물세포에서 polyamine의 생리적 역할에 관한 연구는 이 물질의 생합성 억제제를 이용하여 진행되어 왔다. 이러한 polyamine의 생합성 억제제 중에서  $\alpha$ -difluoromethylornithine(DFMO)은 polyamine생합성 과정의 속도 제한효소인 ornithine decarboxylase(ODC)에 비가역적으로 작용하여 세포내 putrescine과 spermidine의 수준을 급속히 감소시켜서 *in vitro*와 *in vivo*에서 세포의 성장을 억제하며(Janne and Morris, 1984; Kimnich *et al.*, 1975; Mamont *et al.*, 1978; Luk *et al.*, 1981; Sunkara *et al.*, 1980), 종양의 성장과 전이(metastasis)도 억제한다고 보고되어 있다(Bartholeyn, 1983; Sunkara *et al.*, 1982). 또한 polyamine생합성 억제제 중에서 methylglyoxal bis(guanylhydrazone)(MGBG)은 polyamine생합성의 다른 경로에 관여하는 S-adenosylmethionine decarboxylase의 활성을 억제, 세포내 spermidine생합성을 감소시켜서 세포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다(Luk *et al.*, 1981; Tabor and Tabor, 1984).

따라서 본 실험에서는 이 두가지 polyamine생합성 억제제의 효과를 이용하여 대식세포의 활성화와 polyamine의 상관관계를 밝히고자, polyamine생합성 억제제의 처리하에서 감염균 치사활성의 지표가 되는 대식세포의 화학발광측정과 함께 부수적으로 nitroblue tetrazolium(NBT) test를 수행하였으며, 대식세포에 의한 TNF 분비 및 종양치사의 정도가 polyamine생합성 억제제의 처리에 의하여 어떠한 영향을 받는지 알아 보았다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

#### (1) 실험동물

표준사료로 사육하여 생후 8-10주가 된 체중  $25 \pm 4$  g의 C57BL/6J계 생쥐를 암·수 구별없이 사용하였다.

#### (2) 시약

대식세포의 유도 및 활성화물질로는 thioglycollate(Difco), lipopolysaccharide(Sigma), BCG(대한결핵협회 결핵연구원 제조)를 사용하였고, 화학발광 측정시약으로는 luminol(Sigma)을 사용하였으며, 대식세포의 자극물질로서 zymosan(Sigma)을 사용하였다. polyamine의 생합성 억제제로는 Merrell Dow Research Institute로부터 기증받은 DFMO와 MGBG(Sigma)를 단독 또는 복합적으로 사용하였다.

### 실험방법

#### (1) 대식세포의 분리 및 배양

대식세포는 Smith 등(1980)의 방법을 이용하여 생쥐의 복강으로부터 얻었다. 세포의 수를 배양액 1 ml 당  $1 \times 10^6$ 개가 되도록 한 후에,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  항온항습조에서 2시간 동안 배양하여 대식세포를 배양용기(96-well culture plate)에 부착시키고, PBS(pH 7.3)로 2-3회 세척하여 배양용기에 부착되지 않은 세포들을 제거하였다. 이러한 과정들은 무균조건하에서 수행하였다. 대식세포의 배양액은 0.14%의 sodium bicarbonate, 100 U/ml의 penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin, 25 mM의 HEPES를 첨가하고, 5%의 열불활성화 fetal bovine serum으로 보강시킨 RPMI 1640배지를 사용하였다.

#### (2) 표적세포의 배양

표적세포인 L929세포(murine-transformed fibroblast cell line)는 연세대학교 의과대학 미생물학 연구실로부터 분양받아 배양하였다. 이 세포

는 대식세포와 TNF에 의한 세포독성을 측정하고자 할 때, trypsinization으로 배양용기에서 회수한 다음 세포수를 계수하여 96-well culture plate에 well당  $4 \times 10^4$ 개의 세포를 넣어서 4시간 이상 배양하여 배양용기에 부착시켰다. 이때 사용한 배양액은 대식세포의 배양액과 동일한 조성을 가지는 RPMI 1640배양액을 사용하였다.

### (3) 시약처리

thioglycollate는 증류수에 3% 용액으로 만들어서 멸균한 후 2 ml를 복강주사하였고, LPS는 생리식염수 1 ml당 60  $\mu$ g을 함유하게 만들어서 멸균한 후 0.5 ml를 복강주사하였는데, 생쥐를 희생시키기 4-5일 전에 각각 실행하였다. BCG는 생리식염수에 1 mg/ml로 하여 생쥐를 희생시키기 15일 전 복강에 주사하였다.

DFMO는 경구투여시 식수에 2%가 되도록 만들어서 실험동물을 희생시키기 전에 6-8일간 처리하였으며, 주사로 투여할 경우에는 실험동물을 희생시키기 18시간 전에 10 mg/ml의 주사액으로 만들어서 6시간마다 3회에 걸쳐서 복강주사하였다. DFMO를 시험관내에 처리할 경우에는 0.05 mM, 0.5 mM, 5 mM의 농도를 가지는 배양액을 만들어서 18-21시간동안 배양함으로써 처리하였다. MGBG는 8  $\mu$ M 농도의 배양액을 준비하여 18-21시간 동안 처리하였다. DFMO와 MGBG는 단독 또는 복합처리하였다. putrescine은 6.25  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M의 농도로 들어가도록 배양액을 만들어서 각 농도의 DFMO와 함께 복합 또는 단독으로 처리하였다.

### (4) Zymosan의 처리

Zymosan은 대식세포의 탐식작용을 촉진시키기 위하여 다음과 같은 방법으로 옹소닌작용(opsonification)을 거쳐서 대식세포에 처리하였다. 먼저 25 mg의 zymosan을 10 ml의 PBS에 부유시킨 뒤, 90°C의 중탕기에서 30분 동안 중탕시킨 후, 생쥐의 혈청 2 ml와 섞어준 다음 30분 동안 상온에 놓아 두었다. 그 후 이 부유액을  $200 \times$  g에서 10분간 원심분리하고 침강물을 얻어서 5배

의 PBS에 부유시켰다. 이것을 다시 원심분리하여 침강물을 2 ml의 PBS에 다시 부유시킨 뒤 사용하기 전까지 냉동보관하였다. 이렇게 만들어진 옹소닌화 zymosan은 화학발광과 nitroblue tetrazolium(NBT) 환원 검사에 대식세포 자극물질로 사용하였다.

### (5) 화학발광의 측정

$1 \times 10^5$ 개의 대식세포를 발광(luminescence) 측정용 1회용 cuvette(12  $\times$  47 mm)에 넣어 2시간 동안 배양하여 cuvette벽에 부착시켰다. 그 후 측정하고자할 때 cuvette의 내부를 PBS로 세척하고 여기에 40  $\mu$ M의 luminol과 5.5 mM의 glucose를 갖는 2 ml의 PBS를 넣어준 후, 옹소닌화 zymosan 1.25 mg/100  $\mu$ l을 처리하고 37°C에서 10분간 배양한 후에, cuvette으로부터 나오는 빛은 luminometer(MONOLIGHT 2001, All Co. U.S.A.)를 이용하여 10초간 적분한 광량을 얻었다.

### (6) NBT 환원 검사

이 검사는 Wilson 등(1980)의 방법을 이용하였다.

### (7) 종양괴사인자의 분비측정과 종양치사활성 측정

대식세포의 배양액 또는 대식세포를 L929세포와 함께 배양한 후 Ruff와 Gifford(1980)의 방법을 응용하여 측정하였다.

## 결 과

### *in vivo*에 DFMO투여가 대식세포의 화학발광에 미치는 영향

정상적인 대식세포에 비하여 thioglycollate주사를 거쳐서 얻은 세포는 약 5배, LPS주사를 거쳐서 얻은 세포는 약 9배 그리고 BCG주사를 거쳐서 얻은 세포는 약 90배 정도의 화학발광값을 나타내었지만 하나하나의 대식세포 활성물질을 주사하고 DFMO를 6일간 처리한 경우, 정상적인

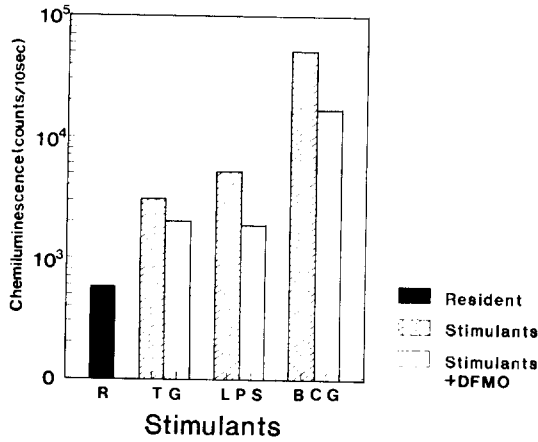


Fig. 1. Effects of polyamine depletion *in vivo* by DFMO on chemiluminescence of macrophage.

대식세포에 비하여 각각 3.5배, 3.2배, 29배 정도의 화학발광값을 나타내었다(Fig. 1).

대식세포에 의한 NBT 환원에 미치는 DFMO와 MGBG의 영향

Polyamine생합성 억제제를 처리하지 않은 경우 89%의 대식세포가 NBT를 환원시키는 것으로 나타났고, 5 mM의 DFMO만을 처리한 경우 87%의 세포가 NBT를 환원시키는 것으로 나타났으며, 8 μM의 MGBG를 처리한 경우 73%의 세포가 NBT를 환원시키는 것으로 나타났다. 그리고 DFMO(5 mM)와 MGBG(8 μM)를 복합처리한 경우 70%의 세포가 NBT를 환원시키는 것으로 나타났다(Table 1).

DFMO처리가 BCG로 활성화시킨 대식세포의 TNF분비에 미치는 영향

대식세포에 DFMO를 처리하지 않고 얻은 배양액은 L929세포에 처리하였을 때 L929세포의 생존율은 약 18% 감소하였고, 0.05 mM, 0.5 mM, 5 mM의 DFMO를 처리한 경우에는 각각 17%, 11%, 9% 감소하였다(Table 2).

Table 1. Qualitative NBT reduction by thioglycollate-elicited macrophage.

Treatments <sup>a</sup>	Percent of cell with precipitated formazan 30 min after ingestion of opsonified zymosan <sup>b</sup>
Medium alone	89 ± 4
DFMO (5 mM)	87 ± 5
MGBG (8 μM)	73 ± 8
DFMO (5 mM) + MGBG (8 μM)	70 ± 7

<sup>a</sup>Percent of macrophages with intracellular zymosan stained in blue-black by formazan precipitation; <sup>b</sup>Thioglycollate-elicited macrophages were cultivated in medium alone or medium plus inhibitors in the indicated concentrations for 24 hr.

Table 2. Effect of polyamine depletion by DFMO on BCG-activated macrophage TNF production.

Cell treatment <sup>a</sup> DFMO (mM)	L929 viability after exposure to culture supernatants <sup>b</sup>	
	O.D.	% viability
Control <sup>c</sup>	0.561 ± 0.027	100.00
0.00	0.457 ± 0.026	81.84
0.05	0.464 ± 0.025	82.84 <sup>d</sup>
0.50	0.497 ± 0.039	88.70 <sup>d</sup>
5.00	0.507 ± 0.033	90.41 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>BCG-activated macrophages (2 × 10<sup>5</sup> cells/well) were cultivated with various concentrations of DFMO for 16-21 hrs, and after this cultivation, macrophage cultured plates were washed with sterilized PBS (pH 7.3). After additional cultivation for 24 hr, the supernatants (100 μl) of macrophage cultured media were added to L929 tumour cells; <sup>b</sup>The activity of TNF was monitored by L929 viability using photometric method; <sup>c</sup>Medium alone; <sup>d</sup>P-value; Not significant; <sup>e</sup>P < 0.01.

DFMO를 처리한 BCG-활성화 대식세포의 TNF 분비에 미치는 외부 putrescine의 영향

생체내에 DFMO를 처리하여 polyamine을 고갈시킨 BCG-활성화 대식세포를 24시간 배양하여 그 배양액을 L929세포에 처리하였을 때, 이 세포의 생존율은 거의 감소하지 않았다. 그러나 대식세포의 putrescine을 농도별로 처리하여 24시간

**Table 3.** Exogenous putrescine reverses the effect of polyamine depletion *in vivo* by DFMO on TNF production of BCG-activation macrophage.

Treatments <sup>a</sup>	L929 viability after exposure to culture supernatants <sup>b</sup>	
	O.D.	% Viability
DFMO Putrescine ( $\mu$ M)		
Control <sup>c</sup>	0.561 $\pm$ 0.027	100.00
+ 0.00	0.550 $\pm$ 0.018	98.19
+ 6.25	0.526 $\pm$ 0.012	93.78 <sup>d</sup>
+ 12.50	0.502 $\pm$ 0.013	89.54 <sup>d</sup>
+ 25.00	0.474 $\pm$ 0.031	84.16 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Mice were injected I.P with 1 ml of DFMO (6 mg/ml in PBS), 3 times at every 6 hr before killing mouse. BCG-activated macrophages ( $2 \times 10^5$  cells/well) were cultivated with various concentrations of putrescine for 16-18 hrs; <sup>b</sup>See Table 2; <sup>c</sup>Medium alone; <sup>d</sup>P < 0.01.

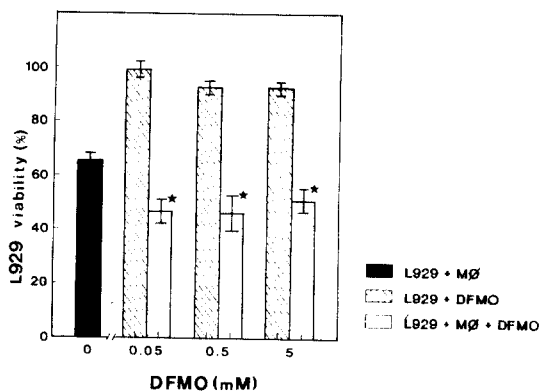
배양한 후 그 배양액을 L929세포에 처리하였을 때 L929세포의 생존율은, putrescine의 농도가 6.25  $\mu$ M일 때 6%, 12.5  $\mu$ M일 때 10%, 25  $\mu$ M일 때 16% 정도 감소하였다(Table 3).

**BCG-활성화 대식세포의 종양치사활성에 미치는 DFMO의 영향**

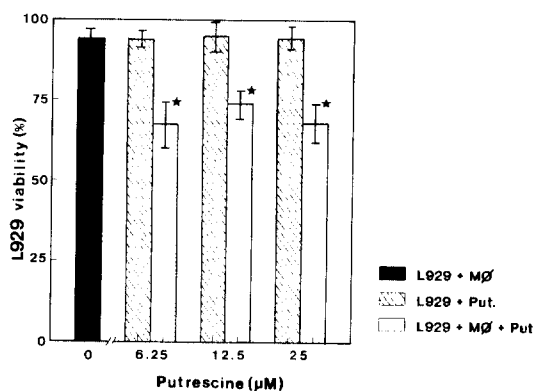
L929세포를 배양한 후 BCG-활성화 대식세포를 첨가하여 24시간동안 함께 배양하였을 때, L929세포의 생존율은 대조구에 비하여 약 32% 감소하였고, 대식세포에 DFMO를 처리한 경우의 생존율은 0.05 mM일 때 54%, 0.5 mM일 때 54%, 5 mM일 때 49% 감소하였다(Fig. 2).

**DFMO를 처리한 BCG-활성화 대식세포의 종양치사활성에 미치는 외부 putrescine의 영향**

DFMO처리로 polyamine을 감소시킨 대식세포를 L929세포와 함께 배양하였을 때 L929세포의 생존율은 거의 감소하지 않았지만(약 7%), putrescine을 함께 처리하였을 때 생존율은 6.25  $\mu$ M의 농도에서 26%, 12.5  $\mu$ M의 농도에서 21% 그리고 25  $\mu$ M의 농도에서 25% 감소하였다(Fig. 3).



**Fig. 2.** Effect of polyamine depletion *in vitro* by DFMO on BCG-activated macrophage tumoricidal activity. Mice were injected I.P. with  $4 \times 10^6$  viable BCG. Two weeks later, animals were sacrificed. Macrophages were isolated by peritoneal lavage. L929 tumor cells and macrophages were treated with DFMO of various concentrations for 24 hr. Data are expressed as a percentage of L929 cell viability as determined by photometric method. Data are from one of three similar experiments (mean  $\pm$  SD for six determinations). In the case of addition of macrophage, experimental cytotoxicity was more than 30%. ★: p < 0.01.



**Fig. 3.** Exogenous putrescine reverses the effect of polyamine depletion *in vivo* by DFMO on BCG-activated macrophage tumoricidal activity. Mice were treated with BCG and DFMO as described in Figure 2 and Table 3, respectively. Macrophages were treated with putrescine of indicated concentrations for 24 hr. Data are expressed as a percentage of L929 + putrescine, experimental cytotoxicity was less than 6%. ★: p < 0.01.

## 고 찰

대식세포의 화학발광은 항 세균작용, 특히 탐식작용(phagocytosis)이 일어날 때 볼 수 있다. 즉 탐식작용시 만들어지는  $O_2^-$  (superoxide anion),  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$  (hydroxyl radical) 등이 첨가해 준 기질인 luminol과 반응하고, 이 반응에서 산화된 기질이 여기상태에서 바닥상태로 복귀되면서 그 에너지 차에 의하여 빛이 나오는 것이다. 이 빛의 생성정도는 대식세포의 활성화 정도에 관련되어 있다(Hamilton and Adams, 1987). 본 실험에서는 아무런 자극없이 분리한 복강 상주대식세포의 화학발광을 측정된 결과, 그 값은 극히 낮은 것으로 나타났다. 그리고 thioglycollate를 처리하였을 때의 화학발광 값은 상주대식세포에 비하여 큰 폭으로 증가하였다. 또한 LPS와 BCG를 이용하여 대식세포의 활성을 유도하였을 때, 그 값은 더욱 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 동일한 물질을 처리하여  $O_2^-$ 의 분비정도를 측정된 Richard 등(1978)의 보고와 일치하는 것이다. 그러나 동일한 물질을 처리하고 DFMO를 경구투여하였을 때 화학발광 값은 앞의 결과에 비하여 감소된 것으로 나타났다(Fig. 1). 또한 대식세포가 분비하는  $O_2^-$ 은 NBT를 환원시키는 것으로 알려져 있고, NBT환원정도 또한 대식세포 활성의 지표가 된다. 그래서 polyamine생합성 억제제가  $O_2^-$ 만의 분비능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DFMO와 MGBG를 단독 또는 복합적으로 처리한 결과, DFMO보다는 MGBG에 의하여 NBT환원이 더욱 억제되었으며, 각각의 단독 처리에 비하여 복합처리가 NBT환원을 더욱 억제시켰다. 이러한 결과로 보아 세포내 polyamine은 대식세포에 의한 활성형 산소 매개체의 생성과정과 관련이 있는 것으로 생각된다.

활성화된 대식세포는 여러 종류의 단백질을 합성하고 분비할 수 있는 능력을 갖게 되며, 분비되는 단백질 중에는 종양세포에 대하여 세포독성을 나타내거나 세포증식의 억제효과를 나타내는 종양괴사인자가 존재한다(Adams and Nathan,

1983; Ruddle, 1987; Rubin *et al.*, 1988). 본 실험에서는 BCG를 이용하여 대식세포의 활성을 유도시켰다. 그 후 대식세포에 DFMO를 처리하여 종양괴사인자의 분비정도를 측정된 결과, DFMO의 처리농도를 증가시킬수록 종양괴사인자의 분비가 감소하는 것으로 나타났다(Table 2). 그리고 BCG-활성화 대식세포의 종양치사활성 또한 DFMO의 처리로 감소하는 것을 볼 수 있었지만, putrescine을 첨가하여 배양하였을 때 이러한 감소는 다시 회복되었다(Table 3). 따라서 polyamine은 대식세포내 단백질 합성, 특히 종양괴사인자의 합성 및 분비에 중요한 역할을 하리라고 생각된다.

한편 L929세포에 BCG-활성화 대식세포를 함께 배양하여 대식세포를 L929세포에 부착시킨 뒤, 2-3회의 세척과정을 거쳐서 부착되지 않은 대식세포를 제거한 후 종양치사도를 측정된 결과, DFMO를 처리하지 않았을 때 약 30%의 L929세포가 치사된 반면, DFMO를 처리하였을 때는 30% 이상으로 증가되었다(Fig. 2). 이것은 DFMO에 의한 영향을 대식세포와 L929세포가 공통적으로 받겠지만, DFMO에 의한 종양세포 증식억제효과와 대식세포로부터 분비되는 cytolytic protease의 작용이 상호 복합적으로 작용하여 L929세포의 치사율을 높힌 것으로 생각된다.

DFMO를 *in vivo*에 전처리한 후에 Fig. 2의 실험과 동일한 과정으로 측정된 종양 치사정도는 아주 낮았지만(약 7%), putrescine의 처리로 증가되었다(Fig. 3). 이러한 결과로부터, DFMO처리에 의한 대식세포의 활성감소는 세포내 polyamine의 감소에 기인하는 것으로 생각할 수 있고, 활성화된 대식세포가 종양세포와 부착하여 세포독성을 나타낼 때에도 polyamine이 요구된다고 생각된다.

앞으로 대식세포의 활성화 과정중에 내생 polyamine의 변화를 살펴봄으로써 대식세포의 활성화와 polyamine의 좁다 직접적인 관계를 밝히고, 대식세포의 활성화에 따르는 polyamine수송체의 변화물 밝히기 위한 연구가 진행되어야 할

것이다.

### 참고문헌

- Adams, D. O. and T. A. Hamilton, 1984. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* **2**: 283-318.
- Adams, D. O. and C. F. Nathan, 1983. Molecular mechanisms operative in cytolysis of tumor cells by activated macrophages. *Immunol.* **2**: 208.
- Bartholeyn, S. J., 1983. Treatment of metastatic Lewis lung carcinoma with LD- $\alpha$ -difluoromethylornithine. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **19**: 567-572.
- Carswell, E. A., Lerman, S. P., and J. M. Chapman 1974. Proliferative response to tumor cells of T-derived lymphoid cells from normal mice. *Int. J. Cancer.* **14**: 808-816.
- Cheson, B. D., R. L. Christensen, R. Sperrinf, B. E. Kohler, and B. M. Babior, 1976. The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. *J. Clin. Invest.* **58**: 789-796.
- Hamilton, T. A. and D. O. Adams, 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunology today* **8**: 151.
- Heby, O., 1981. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* **19**: 1-20.
- Janne, J. and D. Morris, 1984. Inhibition of S-adenosylmethionine decarboxylase and diamine oxidase activities by analogues of methylglyoxal bis and their lymphocyte activation. *Biochem. J.* **218**: 947.
- Kimmich, G. A., J. Randles, and J. S. Brand, 1975. Assay of picomole amounts of ATP, ADP, and AMP using the luciferase enzyme system. *Anal. Biochem.* **69**: 187-206.
- Krahenbuhl, J. L., L. H. Lambert Jr., and J. S. Remington, 1977. Effect of *Comeybacterium parvum* treatment and *Toxoplasma gondii* infection on macrophage-mediated cytostasis of tumor target cells. *Immunol.* **31**: 837.
- Luk, G. D., G. Goodwin., L. J. Marton, and S. B. Baylin, 1981. Polyamines are necessary for the survival of human small-cell lung carcinoma in culture. *Proc. Nat'l. Sci. U.S.A.* **78**: 2355-2358.
- Mamont, P. S., M. C. Duchesne, J. Grove, and P. Bey, 1978. Anti-proliferative properties of DL- $\alpha$ -difluoromethylornithine decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**: 58-66.
- Murray, H. W. and Z. A. Cohn, 1979. Macrophage oxygen-dependent anti-microbicidal activity III. Enhanced oxidative metabolism as an expression of macrophage activation. *J. Exp. Med.* **152**: 1596-1609.
- Ostrove, J. M. and G. E., Gifford, 1979. Stimulation of RNA synthesis in L929 cells by rabbit tumor necrosis factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **160**: 354-358.
- Richard, B. J. Jr, C. A. Godzik, and Z. A. Chon, 1978. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophage. *J. Exp. Med.* **147**: 115.
- Rubin, B. Y., S. L. Anderson, R. M. Lunn, N. K. Recharadson, G. R. Helleman, L. J. Smith, and L. J. Old, 1988. Tumor necrosis factor and IFN induce a common set proteins. *J. Immunol.* **141**: 1180.
- Ruddle, N. H., 1987. Tumor necrosis factor and related cytotoxines. *Immunol. Today* **8**: 129.
- Ruff, M. R. and G. E. Gifford, 1980. Purification and Physico-chemical characterization of rabbit tumor necrosis factor. *J. Immunol.* **125**: 1671-1677.
- Smith, R. L., N. H. Junt, J. E. Merritt, T. Evans, and M. J. Weidemann, 1980. Cyclic nucleotide metabolism and reactive oxygen production by macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**: 1079-1087.
- Sunkara, P. S., Rao, P. N., Nishiokak., and S. Ramakrishna, 1980. Inhibition of polyamine biosynthesis by  $\alpha$ -difluoromethylornithine potentiates the cytotoxic effects of arabinosyl cytosine in Hela cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**: 423-430.
- Sunkara, P. S., N. J. Prakash, A. L. Rosenberger, A. C. Hagan, P. J. Lachmann, and G. D. Mayer, 1982. Potentiation of antitumor and antimetastatic activities of  $\alpha$ -difluoromethylornithine by IFN inducers. *Cancer Res.* **44**: 2799-2802.
- Tabor, C. W. and M. Tabor, 1984. Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 749-790.
- Unanue, E. R., 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Ann. Rev. Immunol.* **2**: 395-427.
- Wilson, C. B., Van Tsai, and J. S. Remington, 1980. Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages; Possible mechanism for survival of intracellular pathogens. *J. Exp. Med.* **151**: 328-346.

(Accepted January 14, 1991)

---

**Effect of Polyamine Biosynthesis Inhibition on the Microbicidal and  
Tumoricidal Activities in Mouse Macrophage**

Jun-Back Lee and Noh-Pal Jung (Department of Biology,  
College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea)

The objective of this experiment was to examine the effect of polyamine depletion by polyamine biosynthesis inhibitors on microbicidal activity and tumoricidal activity in mouse macrophages.  $\alpha$ -Difluoromethylornithine (DFMO), inhibitor of putrescine and spermidine biosynthesis, treatment *in vivo* for 6-8 days reduced chemiluminescence levels in thioglycollate-, lipopolysaccharide (LPS)-, and BCG-treated mouse macrophages. An DFMO treatment *in vitro* inhibited production of tumor necrosis factor (TNF), in dose-dependent manner, and tumoricidal activity by macrophages. The effect of polyamine depletion by DFMO on TNF production and tumoricidal activity could be reversed by the addition of exogenous putrescine. These results indicated that the observed effect of DFMO on macrophage activities were mediated through inhibition of polyamines, and must be required for optimal activities of macrophages.