

중양피사인자 세포독성에서 항산화제의 효과

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소

이혁표¹, 유철규, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수

= Abstract =

The Effect of Antioxidants on Tumor Necrosis Factor Cytotoxicity

Hyuk Pyo Lee, M.D., Chul Gyu Yoo, M.D., Choon Taek Lee, M.D.,
Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D.

*Department of Internal Medicine, College of Medicine and Lung Institute,
Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea*

Background : Tumor necrosis factor(TNF) has been considered as an important candidate for cancer gene therapy based on its potent anti-tumor activity. The mechanisms of TNF cytotoxicity are not clearly understood and some has reported that reactive oxygen species(ROS) might be associated with them, but there is controversy about antioxidant effect on TNF cytotoxicity.

This study was designed to compare the TNF cytotoxicity after antioxidant pretreatment with that of control to evaluate the role of ROS in the mechanism of TNF cytotoxicity.

Method : We compared the TNF cytotoxicities to WEHI164(murine fibrosarcoma cell line) and ME180(human cervix cancer cell line) after antioxidant pretreatment with those of control by MTT(dimethylthiazolyl-diphenyltetrazolium bromide) assay.

Results : In the control group, the TNF cytotoxicities were $92.2 \pm 2.8\%$ (WEHI164) and $59.9 \pm 7.0\%$ (ME180). In the TMTU(tetramethyl thiourea) pretreatment group, those were $91.4 \pm 3.7\%$ and $74.6 \pm 7.0\%$. In the PMZ(promethazine) pretreatment group, those were $90.2 \pm 2.5\%$ and $62.5 \pm 5.7\%$. In the BHT(butylated hydroxytoluene) pretreatment group, those were $93.2 \pm 1.3\%$ and $66.3 \pm 6.1\%$. So there was no reduction in TNF cytotoxicity after antioxidants pretreatment.

Conclusion : The ROS may not have major role in the mechanisms of TNF cytotoxicity. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 46 : 636-644)

Key words : Tumor necrosis factor(TNF), Cytotoxicity, Mechanism, Antioxidant, WEHI164, ME180.

¹현재는 인제대학교 의과대학 내과학교실 근무

서 론

사망원인중 암이 차지하는 비율은 꾸준히 상승하고 있으며¹⁾ 그 발병 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만 밝혀야 할 부분이 많이 남아있는 상태이다. 암의 치료면에서 수술과 방사선 치료와 함께 항암화학요법이 시행되어 왔으나 전통적인 항암화학요법은 전신독성과 항암제에 내성을 가진 암세포가 선택적으로 자라나게 되는 한계점이 있다. 암의 치료에 있어 새로운 방법으로 주목받고 있는 것이 유전자요법으로²⁾, 종양괴사인자는 중요한 대상 cytokine 중 하나이다³⁾.

BCG(bacillus Calmette-Guerin)로 전처치한 생쥐에 내독소(endotoxin)를 준 뒤 얻은 혈청에서 종양의 괴사를 유도하는 물질이 발견되어 종양괴사인자(tumor necrosis factor : TNF)로 명명된⁴⁾ 이래, TNF가 여러 암세포에 대해서 생체 내외에서 세포독성을 보임이 알려졌고^{5,6)} 이런 성질을 이용하여 암을 치료하려는 시도는 전신적으로 쓸 때는 짧은 반감기와 심각한 부작용으로 현실적으로 불가능하다는 것이 밝혀졌다⁷⁾. 이것을 극복하기 위해 암이 있는 국소에만 작용하게 할 목적으로 분자 생물학적 방법을 이용하여 사람의 TNF 유전자를 retrovirus를 vector로 이용하여 여러 cell line에 이입시키는 것이 가능하게 되었다⁸⁾.

여러 가지 종양세포들의 TNF에 대한 반응은 다양하여, 어떤 세포는 pM의 농도에 수 시간만 노출되어도 사멸하는데 비해 인체 종양세포들은 흔히 TNF에 내성을 보이며, 감수성인 세포들도 세포 종류나 actinomycin D같은 대사 억제제의 유무에 따라 apoptosis와 necrosis로 반응이 나뉘어지는데 그 기전은 밝혀져있지 않다⁹⁾.

과거의 연구에서 TNF 유전자를 이입받은 세포는 TNF의 세포독성에 대한 감수성에 변화를 일으켜 TNF에 감수성이 있던 세포도 TNF에 내성을 보인다는 것이 증명되었으며^{10,11)}, 그 과정에 미지의 유전자의 전사과정을 수반한 어떤 방어적 단백질이 관여할 것이라는 시사가 있었으나¹²⁾ 그것이 무엇인지 구체적인 기전은 밝혀져 있지 않은 상태이다. 이러한 내성의

기전을 밝히는 것은 일반적인 종양생물학의 이해를 넓히기 위해서 뿐만 아니라 효과적인 cytokine을 이용한 항암 유전자요법을 위해서도 매우 중요한 과제라 생각되는 바이다.

호기성(aerobic) 생물체는 생체에너지를 얻는 대사 과정에서 superoxide anion(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical ($HO \cdot$) 등 반응성 산소기(reactive oxygen species)가 중간 대사물로 생기게되는데 이것들이 경로를 이탈하게 되면 생명 활동에 필수적인 여러 가지 거대분자들(단백질, DNA, 지질, 탄수화물 등)에 산화성 손상(oxidative damage)을 주게 되며 이 때문에 자신이 손상을 받기도 하지만 면역세포들은 이것을 이용하여 자신을 외부의 적들로부터 보호하는데 이용하기도 한다^{13,14)}. 이러한 산화성 손상에 대비하기 위해 생명체들은 여러 가지 항산화 보호 장치를 구비하고 있는데 크게 항산화효소(antioxidant enzymes)와 저분자 항산화제(small molecule antioxidants)로 나눌 수 있고, 항산화효소에는 superoxide dismutase(SOD), catalase, peroxidase가 있고 주로 세포내에 존재하며 저분자 항산화제는 주로 세포외에 존재하며 지용성 항산화제와 수용성 항산화제로 나누기도 한다¹⁵⁾.

한편 TNF 유전자를 이입받은 세포의 TNF에 대한 획득내성의 기전 뿐만 아니라 TNF의 세포독성의 기전 및 세포 종류에 따른 TNF 감수성 차이의 원인도 아직 확실하게 밝혀져 있지는 않은 상태로, 저산소 환경에서는 TNF의 세포독성이 감소하고^{16,17)}, 역으로 실험동물에서 기관지내로 TNF를 미리 주면 차후의 고농도 산소에 의한 산소독성이 감소한다는 보고¹⁸⁾가 있어 TNF의 세포독성의 기전에 산소기(oxygen radical)가 중요할 것으로 생각되고 있지만 항산화제를 이용하여 TNF 세포독성의 변화를 관찰한 연구에서는 다양한 결과를 보고하고 있어^{19,20)} 그 역할에 있어 의문이 제기되고 있다.

본 연구는 TNF의 종양세포에 대한 세포독성의 기전 중 반응성 산소기의 역할을 관찰하고자 수행되었다.

즉, 반응성 산소기가 TNF의 종양세포에 대한 세포 독성의 주요한 기전이라는 가설하에 이것을 증명하는 방법으로 TNF 감수성 종양세포에 여러 가지 항산화제를 전처치한 후의 TNF의 세포독성이 감소하는지를 대조군과 비교하였다.

대상 및 방법

1. 대상 세포주

이 실험에는 TNF에 비교적 감수성을 보이는 2가지의 인체 및 생쥐 기원의 암세포주, 즉 생쥐 섬유육종 세포주(murine fibrosarcoma cell line)인 WEHI164 세포주(ATCC CRL #1751)와 인체 경부암 세포주(human cervix cancer cell line)인 ME180 세포주(ATCC HTB #33)를 사용하였다. 각 세포주는 미국 국립보건원(NIH)에서 얻었다.

2. 세포 배양

1) 배지 만들기

3차 증류수 1L에 RPMI-1640 분말을 넣고 자석 bar로 잘 용해되게 젖고 NaHCO₃ 2.2g을 첨가한 후, 최종농도로 sodium penicillin G 10,000U/ml, streptomycin 10mg/ml가 되게 항생제를 넣는다. 2-4시간 용해되게 둔 다음 HCl로 pH를 7.2정도로 맞추고 0.22 μ m filter를 통과시켜 무균상태로 만든다. 우태혈청(fetal bovine serum)을 65°C에서 1시간 비동화시킨 것을 배지에 10%가 되게 첨가한다.

2) 세포 녹이기

액체질소통에 얼려 보관된 세포를 꺼내어 실온에서 녹인 후 바닥 면적 25cm² 배양용 플라스크에 넣고 준비된 RPMI-1640배지 5-10ml를 추가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 하루동안 배양하고 다음날 배지를 새 것으로 교환한다.

3) 계대배양

37°C, CO₂ 배양기에서 배양하는 동안 매일 도립현미경(inverted microscope)으로 세포를 관찰하여 플라스크의 바닥을 거의 채울 정도로 세포가 자라나면, 배지를 피펫으로 뽑아버리고 배지와 거의 같은 양의 calcium과 magnesium이 없는 phosphated buffered saline(이하 PBS로 약함)으로 세포를 한 번 세척하여 버린후 trypsin-EDTA 원액을 5-10방울 떨어뜨려 2-5분간 37°C에서 작용시켜 세포들이 플라스크의 바닥에서 잘 떨어지게 한다. 세포가 알알이 떨어져 2/3 정도의 세포가 움직이면 우태혈청을 포함하는 배지를 넣어 trypsin 작용을 중단시키고 세포의 부유액을 피펫을 여러번 통과시켜 잘 분리한 후 그 중 일부를 새 플라스크에 넣고 새 배지로 적당히 희석하여 다시 배양한다.

남은 세포는 냉동 보관을 원하면 냉동용 배지(10%의 dimethyl sulfoxide와 50%의 우태혈청을 함유한 RPMI-1640배지) 1 ml에 농축시켜 냉동용 vial에 넣어 분당 1°C 정도로 얼려나가 액체질소통에 넣는다.

4) 세포수 세기

계대배양에서처럼 세포를 처리하여 알알이 떨어뜨린 후, 부유세포 100 μ l 와 trypan blue 100 μ l 를 잘 섞어 hemocytometer에서 정방형 구역안의 세포를 세고 그 수에 20,000을 곱하면 실제 부유액의 ml당 세포수를 구할 수 있다.

3. 각 세포주의 TNF 세포독성 측정 : MTT assay

각 세포주를 96 well plate에 well당 10⁴세포씩 심은 후 12시간 배양하고 TNF(Genzyme사, recombinant human TNF- α)를 최종농도가 각각 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml이 되도록 well에 첨가한 것과 첨가하지 않은 대조군을 나누어 36시간 추가 배양한 다음 2mg/ml 농도의 MTT(dimethylthiazolyl-

diphenyltetrazolium bromide, Sigma사) 용액을 well당 50 μ l 씩 넣고 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양한다. 이것을 200g에 10분 원침하여 상층액을 버리고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 well당 150 μ l 넣어 15분간 흔들어 섞고 하루밤 배양하여 microplate 판독기(Molecular Device사, Thermo-max)로 540nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포독성(cytotoxicity)은 다음과 같이 구하였다.

$$\text{cytotoxicity}(\%) = \left(1 - \frac{\text{optical density with TNF}}{\text{optical density without TNF}} \right) \times 100$$

4. 적절한 항산화제 농도 결정

항산화제 자체도 고농도에서는 세포독성을 보일 수 있으므로 강한 세포독성을 보이지 않는 농도에서 실험을 수행하기 위해 각 농도별로 세포독성 정도를 MTT assay를 이용하여 측정하였다.

실험한 항산화제의 종류와 농도는 다음과 같다.

- 1) TMTU(tetramethyl thiourea, Sigma사)
0 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1,000 μ M
- 2) PMZ(promethazine, Sigma사)
0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M
- 3) BHT(butylated hydroxytoluene, Sigma사)
0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M

5. 항산화제의 TNF에 의한 세포독성에 대한 효과 측정

두 가지 세포주를 항산화제를 처리할 것과 처리하지 않을 것을 나누어 5개씩 96 well plate에 well당 10⁴ 세포를 심은 후 12시간 배양하고 TNF(Genzyme사, recombinant human TNF- α)를 최종농도가 10ng/ml이 되도록 첨가하고 항산화제를 처리할 것은 각 항산화제를 정해진 농도(TMTU 100 μ M, PMZ 10 μ M, BHT 10 μ M)로 첨가하여 36시간 추가 배양한 다음 MTT assay를 하여 세포독성을 측

정하였다.

6. 자료분석

본 논문의 자료는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며 각 군간의 비교는 SPSS(statistical package for social science) 통계프로그램을 사용하여 비모수적 기법인 Wilcoxon rank sum test로 하였다.

결 과

1. 각 세포주의 TNF 세포독성(Fig. 1)

WEHI164 세포는 TNF 농도 1 ng/ml에서는 2.9 \pm 4.1%, 10ng/ml에서는 71.2 \pm 0.9%, 100ng/ml에서는 82.9 \pm 0.7%의 세포독성을 보여 TNF의 농도에 따라 세포독성이 증가함을 보여주었다.

ME180 세포는 TNF 농도 1 ng/ml에서는 13.7 \pm 6.3%, 10ng/ml에서는 44.5 \pm 1.3%, 100ng/ml에서는 55.8 \pm 1.5%의 세포독성을 보여 역시 TNF의 농도에 따라 세포독성이 증가하나, WEHI164 세포 보다는 세포독성이 덜하여 TNF에 대해 상대적으로 덜 감수성임을 보여주었다.

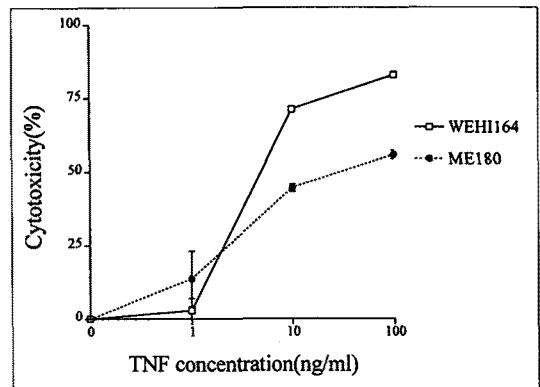


Fig. 1. TNF cytotoxicities to WEHI 164 and ME180 increase with TNF concentration.

Table 1. The cytotoxicities of antioxidants on WEHI164 cell

Concentration	TMTU	PMZ	BHT
0 μ M	0%	0%	0%
1 μ M	ND	5.0 \pm 4.1%	-7.1 \pm 4.5%
10 μ M	-1.2 \pm 3.2%	8.6 \pm 7.2%	-5.3 \pm 3.2%
100 μ M	-3.7 \pm 5.1%	69.2 \pm 10.5%	10.1 \pm 5.6%
1,000 μ M	13.7 \pm 3.7%	ND	ND

TMTU : tetramethyl thiourea PMZ : promethazine
 BHT : butylated hydroxytoluene ND : not done

Table 2. The cytotoxicity of antioxidants on ME180 cell

Concentration	TMTU	PMZ	BHT
0 μ M	0%	0%	0%
1 μ M	ND	1.7 \pm 3.4%	-7.6 \pm 3.5%
10 μ M	-7.8 \pm 4.7%	-4.9 \pm 2.1%	-1.7 \pm 5.2%
100 μ M	2.6 \pm 5.8%	39.5 \pm 7.4%	31.5 \pm 7.9%
1,000 μ M	22.2 \pm 7.6%	ND	ND

TMTU : tetramethyl thiourea PMZ : promethazine
 BHT : butylated hydroxytoluene ND : not done

2. 각 항산화제의 농도에 따른 세포독성 (Table 1, 2)

각 항산화제는 고농도에서는 그 자체가 세포독성을 보였으며, 세포독성이 10%를 넘지 않는 범위에서 가장 높은 농도를 다음의 실험에 사용하였다.

3. TNF에 의한 세포독성에 대한 항산화제의 효과 (Fig. 2)

TMTU 100 μ M, PMZ 10 μ M, BHT 10 μ M의 농도로 처리한 결과 WEHI164 세포는 모두에서 대조군과 세포독성에 유의한 차이가 없었고, ME180 세포는 TMTU에서는 오히려 세포독성이 증가하였고 나머지는 유의한 차이가 없었다.

고 찰

Tumor Necrosis Factor는 1975년 생쥐를 BCG로

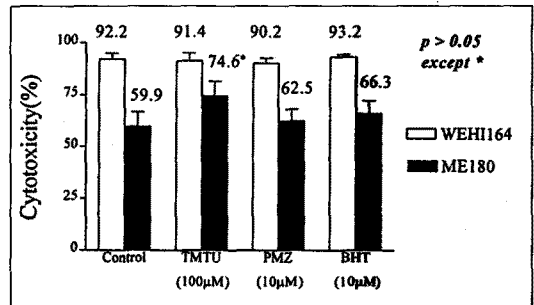


Fig. 2. The effect of antioxidants on TNF cytotoxicity.

전처치한 다음 내독소를 주어서 얻은 생쥐의 혈청에서 발견한 이래⁴⁾, 여러 암세포에 생체 내 (in vivo)에서는 출혈성 피사를 일으키고, 생체 외 (in vitro)에서는 cytolysis를 보임이 밝혀져 있다^{5,6)}. 그러나, 이런 TNF의 암세포에 대한 세포독성을 인체에 응용하기에는 문제점이 있다. 즉, TNF가 효과적인 항암 효과를 나타낼 수 있는 용량은 400-500 μ g/kg/day이지만

TNF의 전신 독성 때문에 5 µg/kg/day 이상으로 인체내에 투여할 수 없다⁷⁾. 이런 TNF의 전신 독성을 피하면서 TNF의 효과를 나타내게 하기 위하여, TNF 유전자를 암세포주에 이입시키고 발현시켜서 암세포 주위에서만 TNF의 농도를 높게 유지하는 방법이 시도되었다²¹⁾. 이런 시도 중, 생체 외(in vitro) 실험의 경우 기대한 바와는 달리, TNF에 감수성이 있어서 TNF에 의해 죽던 모세포가 TNF 유전자가 암세포주에 이입되고 나서는 TNF의 세포독성에 내성을 보인다는 연구 결과가 보고되고 있고²²⁾, 유전자의 전사(transcription) 과정을 차단하는 것으로 알려진 actinomycin D를 처리하면 다시 TNF에 대한 감수성을 회복하는 것을 확인함으로써 이 획득내성에는 어떤 방어단백질의 de novo 합성에 의한 것이라는 과거의 연구가 있었다¹²⁾.

MnSOD cDNA 이입 연구를 한 Wong 등은 MnSOD가 TNF 세포독성에 대한 내성에 필수적인 요소라고 주장한 바 있지만²³⁾ 생쥐의 변성된 섬유아세포주의 TNF에 감수성과 내성을 띄는 subclone들을 가지고 연구했던 Boss 등은 TNF에 대한 내성과 MnSOD mRNA 발현과는 연관관계를 발견하지 못하였다고 보고하였고²⁴⁾, Fujii 등의 연구에서 TNF나 IL-1β 등 여러 물질로 세포들을 자극하였을 때 TNF에 내성을 보이는 세포는 MnSOD mRNA 발현의 증가가 유도되었으나 TNF에 감수성을 보이는 세포는 증가가 유도되지 않았다고 보고하였다²⁵⁾. 또 과거의 저자들의 연구에서 자연 상태에서 TNF에 감수성인 WEHI164와 ME180세포는 모세포에 TNF를 처리해도 MnSOD mRNA 발현이 기저 상태보다 증가하지 않았을 뿐만 아니라 TNF 유전자를 이입한 세포주에서도 TNF 처리와 관계없이 MnSOD mRNA 발현이 변화가 없었고, 자연 상태에서 TNF에 내성을 보이는 NCI-H2058과 A549세포는 모세포에 TNF를 처리할 때나 TNF 유전자를 이입한 것 모두에서 MnSOD mRNA 발현이 크게 증가하여 MnSOD가 TNF 유전자 이입후의 TNF에 대한 획득내성과는 무관하고 자연 상태의 내성에만 관계가 된다고 결론지은

바 있으며²⁶⁾, 전술한 Wong 등의 연구 자체에서도 MnSOD의 level과 TNF에 대한 감수성은 정확히 비례하지 않아 MnSOD 이외의 다른 방어 단백질이 같이 관여할 가능성을 시사하였었다²³⁾.

TNF의 세포독성에 반응성 산소기가 관계된다는 보고는 많이 있어, 저산소 환경에서나 hydrogen peroxide에 오래 노출된 후에는 TNF의 세포독성이 감소하고^{16,17)}, 실험동물에 내독소를 전처치하거나 기관내로 TNF를 미리 주면 차후의 고농도의 산소에 의한 산소독성이 감소한다는 보고^{27,28)}가 있고, 직접적으로 종양세포에 TNF를 주면 oxidized glutathion, malonyl dialdehyde 등 산화성 세포 손상의 산물이 증가한다는 보고^{16,28,29)}도 있다. 그러나 항산화제를 써서 TNF의 세포독성에 대한 영향을 평가한 연구들에서는 butylated hydroxytoluene, deferoxamine 등 일부가 제한적 감소를 보였고, DMSO 등은 서로 상반되는 결과를, 나머지 들은 부정적인 결과를 보였다^{16,20)}.

본 연구에서 사용한 세가지 항산화제(TMTU, PMZ, BHT)는 모두 TNF에 감수성인 종양세포(WEHI164, ME180)에 대한 TNF의 세포독성을 감소시키지 못하였다.

저자들의 MnSOD연구에서도 자연상태의 종양세포의 TNF에 대한 감수성 여부에 따라 MnSOD mRNA 발현에는 차이가 있어 반응성 산소기가 TNF 세포독성에 관계할 것이라는 추측을 하였으나 항산화제 효과를 측정한 본 실험의 결과로는 이를 뒷받침하지 못하였다. 그렇지만 반응성 산소기가 TNF 세포독성에 연관되어 증가하는 것으로 나타난 연구가 많아 반응성 산소기가 TNF 세포독성에 무관하다고 단정짓기는 어려울 것으로 생각되며 가능성이 있는 추론으로는 1) 반응성 산소기가 일부 TNF 세포독성을 매개하나 다른 경로도 많이 관계되어 한가지의 항산화제만으로는 세포독성에 영향을 주지 못했다는 가설과 2) 반응성 산소기가 TNF 세포독성을 매개하는 것이 아니라 다른 경로에 의해 세포독성은 일어나고 이에 의해 세포가 손상되는 과정에서 2차적으로 반응성 산소기가 발생된다는 가설이 있을 수 있겠다.

따라서 TNF의 세포독성에 관계될 수 있는 반응성 산소기 이외의 다른 경로(예를 들면 핵내 신호전달 경로를 통한 것 등)에 대한 추가적인 연구가 필요하다 하겠다.

요 약

연구배경 :

종양괴사인자(tumor necrosis factor ; TNF)는 다양한 생물학적 기능을 가지고 있는바, 그 중 생체 외에서 증명된 뚜렷한 항암 효과로 말미암아 최근 항암 유전자요법의 중요한 대상으로 관심을 모으고 있다. 그러나 TNF의 세포독성의 기전에 대해서는 확실히 밝혀진 바가 없고 반응성 산소기가 관여할 것임을 시사하는 연구들이 있었으나, 항산화제에 의해서 TNF의 세포독성이 감소되는 지에 대해서는 상충되는 결과가 있었다.

본 연구는 TNF의 세포독성의 기전에서 반응성 산소기의 역할을 알아보기 위해 TNF 감수성 종양세포에 여러 가지 항산화제를 전처치한 후의 TNF 세포독성이 감소하는 지를 대조군과 비교하였다.

방 법 :

TNF에 비교적 감수성을 보이는 세포주인 WEHI164 (murine fibrosarcoma cell line)와 ME180 (human cervix cancer cell line)을 배양하여 각각 3가지 항산화제로 전처치한 것과 대조군을 TNF 10ng/ml로 세포독성을 유도하고 그 정도를 MTT (dimethylthiazolyl-diphenyltetrazolium bromide) assay를 이용하여 세포독성 정도를 측정 비교하였다.

결 과 :

항산화제를 전처치하지 않은 대조군에서는 WEHI164 세포와 ME180 세포가 각각 92.2±2.8%와 59.9±7.0%의 세포독성을 보였고, TMTU를 전처치한 군은 각각 91.4±3.7%와 74.6±7.0%, PMZ을 전처치한 군은 90.2±2.5%와 62.5±5.7%, BHT을 전처치한 군은 93.2±1.3%와 66.3±6.1%로 세포독성의 유의한 감소는 없었다.

결 론 :

종양세포에 대한 TNF의 세포독성은 항산화제에 의해 감소되지 않으며 따라서 TNF의 세포독성은 반응성 산소기에 의한 것이 주된 기전은 아니라고 판단된다.

참 고 문 헌

1. Miller RA, Ries LA, Hankey BF : Cancer statistics Review 1973-1990. Bethesda, MD, US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 93-2789, 1993
2. Hanania EG, Kavanagh J, Hortobagyi G, Giles R, Champlin R, Deisseroth AB : Recent advances in the application of gene therapy to human disease. *Am J Med* 99 : 537, 1995
3. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K : Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor infiltrating lymphocytes mediated by retroviral gene transduction. *New Engl J Med* 323 : 570, 1990
4. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B : An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72 : 3666, 1975
5. Matthews N : Tumor necrosis factor from the rabbit. *Br J Cancer* 38 : 310, 1978
6. Sargarm B, Aggarwell BB, Hass PE : Recombinant human tumor necrosis factor- α : effect on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230 : 943, 1985
7. Chapman PB, Lester TJ, Casper ES, Gabrilove JL : Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 5 : 1942, 1987
8. Varmus HE : Form and function of retroviral provirus. *Science* 216 : 812, 1982
9. Larrick JW, Wright SC : Cytotoxic mechanism

- of tumor necrosis factor- α FASEB J 4 : 3215, 1990
10. 오연목, 박계영, 정만표, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 한용철 : Retroviral vector를 이용한 TNF- α 유전자의 이입이 암세포의 종양괴사인자(TNF) 감수성에 미치는 효과. 결핵 및 호흡기질환 41 : 87, 1994
 11. Vanhaesebroeck B, Decoster E, Ostade XV : Expression of an exogenous tumor necrosis factor(TNF) gene in TNF-sensitive cell lines confers resistance to TNF-mediated cell lysis. J Immunol 148 : 2785, 1992
 12. 이혁표, 오연목, 유철규, 김영환, 심영수, 한성구 : 암세포에서 retroviral vector를 이용한 종양괴사인자 유전자 이입후 획득된 종양괴사인자 내성의 기전. 결핵 및 호흡기질환 44 : 547, 1997
 13. Kehre JP, Smith CV : Free radicals in biology : sources, reactivities and roles in the etiology of human diseases, In Frei B(Ed.) Natural antioxidants in human health and disease. p25, Orlando, FL, Academic Press, 1994
 14. Halliwell B : Reactive oxygen species in living systems : source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med 91(suppl 3C) : 14S, 1991
 15. Frei B : Reactive oxygen species and antioxidant vitamins : mechanisms of action. Am J Med 97(suppl 3A) : 5S, 1994
 16. Matthews N, Neale ML, Jackson SK, Stark JM : Tumor cell killing by tumor necrosis factor : inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. Immunology 62 : 153, 1987
 17. Park YM, Anderson RL, Spitz DR, Hahn GM : Hypoxia and resistance to hydrogen peroxide confer resistance to tumor necrosis factor in murine L929 cells. Radiation Research 131 : 162, 1992
 18. Tsan MF, Wite JE, Santana TA, Lee CY : Tracheal insufflation of TNF protects rats against oxygen toxicity. J Appl Physiol 68 : 1211, 1990
 19. Masuda A, Longo DL, Kobayashi Y, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K : Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. FASEB J 2 : 3087, 1988
 20. Watanabe N, Niitsu Y, Neda H, Sone H, Yamauchi N, Maeda M, Urushizaki I : Cytocidal mechanisms of TNF : effects of lysosomal enzyme and hydroxyl radical inhibition on cytotoxicity. Immunopharmacol Immunotoxicol 10 : 109, 1988
 21. Anderson WF : Human gene therapy. Science 256 : 808, 1992
 22. Han SK, Brody SL, Crystal RG : Suppression of in vivo tumorigenicity of human lung cancer cells by retrovirus-mediated transfer of human tumor necrosis factor- α cDNA. Am J Respir Cell Mol Biol 11 : 270, 1993
 23. Wong GHW, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV : Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. Cell 58 : 923, 1989
 24. Boss JM, Laster SM, Gooding LR : Sensitivity to TNF-mediated cytolysis is unrelated to MnSOD mRNA levels among transformed mouse fibroblasts. Immunology 73 : 309, 1991
 25. Fujii J, Taniguchi N : Phorbol ester induces manganese-superoxide dismutase in tumor necrosis factor-resistant cells. J Biol Chem 166 : 23142, 1991
 26. 이혁표, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수 : TNF에 대한 내성획득에서 MnSOD의 역할에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환 44 : 1353,

1997

27. Berg JT, Alloson RC, Prasad R, Taylor AE :
Endotoxin protection of rats from pulmonary oxygen toxicity : possible cytokine involvement. *J Appl Physiol* 68 : 549, 1990
28. Yamauchi N, Kuriyama H, Watanabe N, Neda H, Maeda M, Niitsu Y : Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro. *Cancer Res* 49 : 1671, 1989
29. Zimmerman RJ, Chan A, Leadon SA : Oxidative damage in murine tumor cells treated in vitro by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 49 : 1644, 1989