

마우스에서 Meth-A 종양세포에 대한 Interleukin-2의 항암효과

권오덕¹
전북대학교 수의과대학

Effect of Interleukin-2 on Antitumor Response Against Subcutaneous Meth-A Tumor in Mice

Oh-deog Kwon¹

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

Abstract : Recombinant interleukin-2 (IL-2) is a potent inductive stimulus for nitric oxide synthesis (NO \cdot) and has been demonstrated as an antineoplastic agent in mice and human. But it is not yet clear whether NO \cdot can contribute to IL-2-induced therapeutic responses. Therefore, the current experiment was undertaken to clarify the effect of IL-2 on antitumor response against subcutaneous Meth-A tumor in mice. At the beginning of each experiment, normal BALB/c mice were injected subcutaneously with 5×10^6 Meth-A tumor cells. Some mice were implanted with osmotic minipumps containing 225 μ l of 3.38 M N^o-monomethyl-L-arginine (MLA; an NOS inhibitor). Beginning on day 7, experimental groups were treated with a 5-day course of IL-2 (50,000 IU, 75,000 IU, 100,000 IU, 50,000 IU+MLA, 75,000 IU+MLA, 100,000 IU+MLA intraperitoneal injection every 12 hours for 5 days). The result of this experiment revealed that Meth-A tumor grew progressively in control mice. Intraperitoneal IL-2 treatment decreased tumor growth and prolonged survival, compared with control mice. But no significant differences among 50,000 IU, 75,000 IU and 100,000 IU of IL-2 treatment were observed. MLA administration prevented partially the decrease tumor growth and prolong survival of IL-2 treated mice compared with mice receiving IL-2 alone.

Key words : interleukin-2, Meth-A tumor, antitumor effect, mice

서 론

Interleukin-2(IL-2)는 활성화된 T 림프구에서 주로 생산되는 cytokine으로 세포성 면역을 수행하는데 중요한 역할¹⁹을 할뿐만 아니라, tumor necrosis factor (TNF), interferon-gamma(IFN γ), interleukin-1(IL-1) 및 interleukin-6(IL-6)를 포함해서 cytokine network를 유도하는데 있어서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{1,2,6,7,8,13,20}. 고농도의 IL-2를 사용하여 림프구를 시험관내에서 활성화시키면 거의 모든 종양세포주와 신선절제한 종양세포들에 대해 세포독성을 나타낸다¹⁷. 이러한 연구결과를 기초로 하여 IL-2는 진행된 신세포암과 악성흑색종과 같은 일반적인 항암요법이나 방사선요법으로는 거의 치료효과를 기대할 수 없는 환자들의 치료에 널리 사용되고 있으나, 단지 15-33%의 환자만이 치료효과를 얻을 수 있고, 완전반응

은 불과 5-15% 미만의 환자에서 나타나는 것으로 보고되고 있다²². 이와 같이 시험관에서의 연구결과와는 달리 IL-2의 임상 사용시 치료효과가 좋지 않은데 이에 대한 원인은 아직 밝혀지지 않고 있는 실정이다. 최근 Hibbs 등¹⁰은 IL-2 치료를 받는 환자에서 세포독성을 나타내는 nitric oxide(NO \cdot)의 함량이 증가된다고 보고하였으며, La Franiere와 Rosenberg¹⁴는 IL-2에 대한 종양세포의 반응은 IL-2의 투여량과 밀접한 관련이 있다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 IL-2의 투여량과 nitric oxide synthase(NOS) 억제제인 N^o-monomethyl-L-arginine(MLA)²⁶을 사용하여 NO 생성을 억제시킨 후 종양세포의 성장에 미치는 영향에 대해 규명하고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물

¹Corresponding author.

Harlan Sprague-Dawley(Indianapolis, IN)에서 분양 받은 6-8주령의 BALB/c 암컷 마우스 35마리를 사용하였다. IL-2의 투여량에 따른 항암효과를 알아보기 위해 각 군당 5마리씩 7개 군(아무런 처치를 하지 않은 대조군, IL-2 50,000 IU 단독 투여군, IL-2 75,000 IU 단독 투여군, IL-2 100,000 IU 단독 투여군, IL-2 50,000 IU+MLA 동시 투여군, IL-2 75,000 IU+MLA 동시 투여군, IL-2 100,000 IU+MLA 동시 투여군)으로 나누었다.

종양세포

BALB/c 마우스에 syngeneic tumor cell line(methylcholanthrene에 의해 유도된 fibrosarcoma)인 Meth-A 종양세포주³를 BALB/c 마우스의 복강내에서 계대배양한 것을 사용하였다. BALB/c 마우스에 Meth-A 종양세포 5×10^6 cells/mouse를 피하에 이식하였다.

IL-2 및 N^o-monomethyl-L-arginine(MLA) 투여

Meth-A 종양세포를 이식한 후 7일째부터 human rIL-2(Chiron corporation(Emeryville, CA))를 1일 2회씩 5일간 복강내로 주사하였다.

MLA 처치군은 IL-2 치료 24시간 전에 nitric oxide synthase(NOS) 억제제인 3.38 M MLA 225 μ l가 함유된 osmotic minipumps(model 2001; Alza Corporation, Palo Alto, CA)를 마우스의 피하조직에 이식하여 IL-2 치료에 의한 NO·생성을 억제하였다²⁶. 한번의 MLA pump 이식으로 그 효과는 8-9일간 지속된다²⁶. 따라서 pump는 7일 간격으로 새로운 것으로 바꾸어 이식하였다. 한편, IL-2 단독 투여군과 대조군은 MLA를 함유하지 않은 sham pump를 피하조직에 이식하였다.

종양의 크기 측정

첫 IL-2 투여 후 2-4일 간격으로 Calipers를 이용하여 종양의 크기(가로×세로)를 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 투여량이 종양세포의 성장에 미치는 영향

IL-2 투여량이 종양세포의 성장에 미치는 효과를 알아보기 위하여 Meth-A 종양세포를 이식한 후 7일째부터 IL-2를 용량별로 1일 2회 5일간 복강내 주사하였다. 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 4일째부터 96.7%의 증가율을 나타내기 시작하여 20일째에는 647.7%의 증가율을 나타내어 평균 396.7%의 높은 증가율로 매우 빠르게 종양의 크기가 증가하였다. 반면, 100,000 IU의 IL-2를 단독 투여한 군에서는 4일째에 28.3%의 증가율을 나타내기 시작하여 22일째에는 453.7%의 증가율을 나타내어 평균 170.8%의 증가율을 나타내었으나, 대조군에 비해서는 증가율이 현저히 저하되었다($p < 0.01$). 75,000 IU의 IL-2를 단독 투여한 군에서도 4일째에 39.3%의 증가율을 나타내기 시작하여 22일째에는 453.8%의 증가율을 나타내어 평균 186.6%의 증가율을 나타내었으나, 역시 대조군에 비해서는 증가율이 현저히 낮았다($p < 0.01$). 50,000 IU의 IL-2를 단독 투여한 군에서는 4일째에 21.8%의 증가율을 나타내기 시작하여 22일째에는 408.6%의 증가율을 나타내어 평균 171.1%의 증가율을 나타내었으나, 대조군에 비해서는 증가율이 낮았다($p < 0.05$). 그러나 IL-2 투여량에 따른 차이는 인정되지 않았다(Fig 1).

MLA가 IL-2 치료효과에 미치는 영향

IL-2의 투여에 의해 산생되는 NO·가 종양세포의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 IL-2 치료 24시간 전에 NOS 억제제인 MLA가 3.38 M이 함유된 osmotic minipumps를 마우스의 피하조직에 이식하여 IL-2 투여에 의한 NO·생성을 억제한 후 종양의 크기 증가율을 측정하였다. IL-2 100,000 IU와 MLA를 동시 투여한 군에서는 종양크기의 증가율이 4일째에 49.7%를 나타내어 MLA를 투여하지 않은 군의 28.3%에 비해 종양크기의 증가율이 다소 높았으나, 22일째에는 457.9%의 증가율을 나타내어 MLA를 투여하지 않은 군과 차이가 없었다. 그러나 전체적으로는 평균 185.6%의 증가율을 나타내어 아무런 처치를 하지 않은 대조군의 396.7%에 비해서는 증가율이 현저히 저하되었다($p < 0.01$). IL-2 75,000 IU와 MLA를 동시 투여한 군에서는 4일째에 39.1%의 증가율을 나타내기 시작하여 22일째에는 492.5%의 증가율을 나타내어, 평균 증가율이 187.1%로써 MLA를 투여하지 않은 군과 차이가 인정되지 않았으나, 대조군의

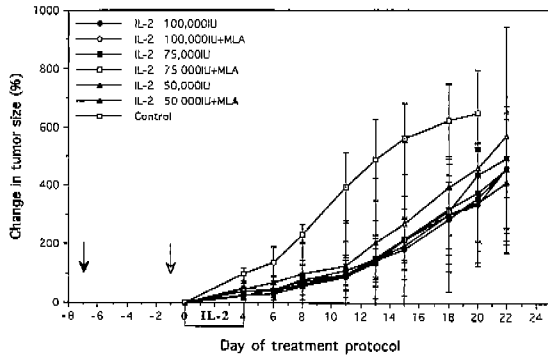


Fig 1. Evaluation of therapeutic effects of IL-2 on subcutaneous Meth-A tumor. Seven experimental groups (untreated control, 100,000 IU IL-2 therapy only, 75,000 IU IL-2 therapy only, 50,000 IU IL-2 therapy only, 100,000 IU IL-2/MLA therapy, 75,000 IU IL-2/MLA therapy and 50,000 IU IL-2/MLA therapy groups) of five BALB/c mice were established in mouse cages. All mice were injected with 5×10^6 Meth-A tumor cells subcutaneously on day-7 (filled arrow). Groups of mice assigned to receive MLA were implanted subcutaneously on day-1 with Alzet continuous-infusion pump (model 2001, Alza Corp.) containing 225 μ l of 3.38 M MLA (open arrow). Non-MLA-treated mice underwent anesthesia and sham pump implantation. IL-2 therapy was begun in the appropriate groups on day 0. The results are expressed mean change in tumor size (%) \pm SD.

396.7%에 비해서는 증가율이 현저히 감소하였다 ($p < 0.01$). 반면, IL-2 50,000 IU와 MLA를 동시에 투여한 군에서는 4일째에 44.7%의 증가율을 나타내기 시작하여 22일째에는 570.0%의 높은 증가율을 나타내었으며, 평균 증가율은 235.7%로써 MLA를 투여하지 않은 군의 171.1%에 비해 증가율이 높게 나타났으나 유의성은 인정되지 않았다. 또한 아무런 처치를 하지 않은 대조군의 평균 증가율 396.7%에 비해서도 낮은 경향을 나타내었으나 유의성은 인정되지 않았다(Fig 1).

IL-2의 투여량에 따른 생존율

아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 Meth-A 종양세포 이식 후 13일에서 22일 사이에는 60%의 생존율을, 25일째에는 40%의 생존율을, 27일째에는 20%의 생존율을 그리고 29일째에는 모두 폐사하였다. 반면, IL-2를 단독 투여한 모든 군 즉, 100,000 IU, 75,000 IU 및 50,000 IU의 IL-2를 단독 투여한 군에서는 종양세포 이식 후 29일째까지 100%의 생존율을 나타내었다(Fig 2).

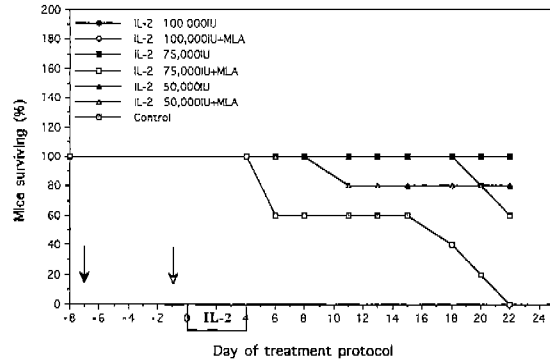


Fig 2. Survival time of the mice was evaluated to establish therapeutic activity of IL-2 against subcutaneous Meth-A tumor. Seven experimental groups (untreated control, 100,000 IU IL-2 therapy only, 75,000 IU IL-2 therapy only, 50,000 IU IL-2 therapy only, 100,000 IU IL-2/MLA therapy, 75,000 IU IL-2/MLA therapy and 50,000 IU IL-2/MLA therapy groups) of five BALB/c mice were established in mouse cages. All mice were injected with 5×10^6 Meth-A tumor cells subcutaneously on day-7 (filled arrow). Groups of mice assigned to receive MLA were implanted subcutaneously on day-1 with Alzet continuous-infusion pump (model 2001, Alza Corp.) containing 225 μ l of 3.38 M MLA (open arrow). Non-MLA-treated mice underwent anesthesia and sham pump implantation. IL-2 therapy was begun in the appropriate groups on day 0.

MLA가 생존율에 미치는 영향

MLA가 함유된 osmotic minipumps를 마우스의 피하조직에 이식한 군에서는 생존율에 차이를 나타내었다. 즉, IL-2 100,000 IU와 MLA를 동시에 투여한 군에서는 종양세포 이식 후 29일째까지 100%의 생존율을 나타낸 반면, IL-2 75,000 IU와 MLA를 동시에 투여한 군에서는 27일째에 80%, 29일째에는 60%의 생존율을 나타내었다. 또한 IL-2 50,000 IU와 MLA를 동시에 투여한 군에서는 종양세포 이식 후 18일째부터 29일째까지 80%의 생존율을 나타내었다(Fig 2).

고 찰

IL-2는 T-세포, B-세포, natural killer 세포 그리고 lymphokine-activated killer(LAK) 세포와 같은 면역세포를 활성화시켜 항암효과를 나타낸다고 보고되고 있으며^{5,9,12,15,16,21,25}, 실제로 신세포암과 악성흑색종 환자의 치료에 IL-2가 널리 사용되고 있다^{4,11,18,22}. 그러나 이러한 IL-2의 처치에 대한 종양세포의 반응은 IL-2의 투여량 및 투여회수와 밀접한 관련이 있다고 하

였다¹⁴. 본 실험에서는 BALB/c 마우스에 Meth-A 종양세포를 피하에 이식한 후 7일째부터 IL-2를 용량별로 1일 2회씩 5일간 복강내로 주사하고 종양크기의 증가율을 측정하여 본 결과, 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 평균 396.7%의 높은 증가율을 나타내어 매우 빠르게 종양의 크기가 증가하였다. 반면, IL-2를 100,000 IU, 75,000 IU 및 50,000 IU를 투여한 군에서는 종양세포 크기의 증가율이 각각 평균 170.8%, 186.6% 및 171.1%를 나타내어 대조군과 비교하여 종양세포 크기의 증가율이 현저히 낮았다. 그러나 La Freniere와 Rosenberg¹⁴가 보고한 투여량에 따른 유의한 차이는 인정되지 않았다. 또한, IL-2의 투여량에 따른 마우스의 생존율에 있어서도 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 Meth-A 종양세포 이식 후 13일에서 22일 사이에는 60%, 25일째에는 40%, 27일째에는 20%의 생존율을 그리고 29일째에는 모두 폐사하였다. 반면, IL-2를 단독 투여한 모든 군 즉, 100,000 IU, 75,000 IU 및 50,000 IU의 IL-2를 투여한 군에서는 종양세포 이식 후 29일째까지 100%의 생존율을 나타내었다. 이와 같이 IL-2 처치군이 대조군에 비해 생존율이 증가된 것은 IL-2가 면역세포를 활성화시켜 종양세포에 세포독성 효과를 나타낸다는 선인들의 보고^{5,9,12,14,15,16,21,25}와 대체로 일치하는 것으로 생각되지만, 정확한 기전은 앞으로 더욱 규명되어야 될 것이다.

한편, IL-2는 NO의 생성을 유도하여 종양세포에 세포독성 효과를 나타낸다고 보고되고 있지만^{9,24,25,28}, IL-2에 의해 생성된 NO는 IL-2치료의 효과세포로 알려진 LAK 세포에도 세포독성을 나타낼 수 있는 것으로도 보고되고 있어^{23,27}, IL-2에 의해 생성된 NO가 치료 효과에 미치는 영향에 대해서는 아직 확실히 밝혀져 있지 않은 실정이다. 본 실험에서는 IL-2의 투여에 의해 생성되는 NO가 종양세포의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 nitric oxide synthase 억제제인 N^ω-monomethyl-L-arginine이 3.38 M 함유된 osmotic minipumps를 마우스의 피하조직에 이식하여 NO 생성을 억제한 후 종양세포의 크기 증가율을 측정하여 본 결과, IL-2를 각각 100,000 IU 및 75,000 IU와 MLA를 동시에 투여한 군에서는 IL-2를 단독 투여한 군과의 차이가 인정되지 않았다. 반면, IL-2 50,000 IU와 MLA를 동시에 투여한 군에서는 종양 크기의 평균 증가율이 235.7%로서 50,000 IU의 IL-2를 단독 투여한 군의 평균 증가율 171.1%에 비해 높게 나타났다. 또한 아무런 처치를 하지 않은 대조군의 평

균 증가율 396.7%에 비해서도 낮게는 나타났으나 유의성은 인정되지 않았다. 마우스의 생존율은 IL-2를 단독 투여한 군과 비교할 때 MLA를 투여한 군에서 차이를 나타내었다. 즉, IL-2 100,000 IU와 MLA를 동시에 투여한 군에서는 종양세포 이식 후 29일째까지 100%의 생존율을 나타낸 반면, 75,000 IU의 IL-2와 MLA를 동시에 투여한 군에서는 27일째에 80%, 29일째에 60%의 생존율을 나타내었다. 또한 IL-2 50,000 IU와 MLA를 동시에 투여한 군에서는 종양세포 이식 후 18일째부터 29일째까지 80%의 생존율을 나타내었다. 이러한 결과는 MLA를 적정 용량의 IL-2와 동시에 투여할 경우에는 IL-2에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제하여 IL-2의 종양세포에 대한 독성효과를 감소시키는 것으로^{9,24,25,28} 추측되지만, 보다 정확한 기전은 앞으로 더욱 규명되어야 될 것으로 생각된다.

결론

IL-2가 항암효과에 미치는 영향을 알아보기 위해 BALB/c 마우스를 이용하여 syngeneic tumor cell line 인 Meth-A 세포를 피하에 이식한 후 IL-2의 투여량과 nitric oxide synthase 억제제인 N^ω-monomethyl-L-arginine(MLA)이 종양세포의 성장에 미치는 영향을 관찰하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다. 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 매우 빠르게 종양의 크기가 증가하였다. 반면, IL-2를 100,000 IU, 75,000 IU 및 50,000 IU를 투여한 군에서는 대조군과 비교하여 종양세포의 성장율이 현저히 낮았다. 그러나 투여량에 따른 차이는 인정되지 않았다. 또한, 마우스의 생존율에 있어서도 IL-2를 투여한 모든 군에서 높게 나타났다. IL-2 100,000 IU+MLA 및 IL-2 75,000 IU+MLA 군의 종양세포 성장율은 각각 IL-2를 단독 투여한 군과 차이가 인정되지 않았다. 반면, IL-2 50,000 IU+MLA 군에서는 IL-2를 단독 투여한 군에 비해 성장율이 높게 나타났으며, 아무런 처치를 하지 않은 대조군에 비해서도 유의성이 인정되지 않았다. IL-2 75,000 IU+MLA 및 IL-2 50,000 IU+MLA 군의 마우스 생존율은 각각 IL-2를 단독 투여한 군에 비해 낮게 나타났다.

참고문헌

1. 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.
2. 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.
 3. Borberg H, Ottgen HF, Choudry K, Beattie EJ. Inhibition of established transplants of chemically induced sarcomas in syngeneic mice by lymphocytes from immunized donors. *Int J Cancer* 1972; 10: 539.
 4. 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.
 5. Cifonc 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.
 6. 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.
 7. Fraker DL, Langstein HN, Norton JA. Passive immunization against tumor necrosis factor partially abrogates interleukin-2 toxicity. *J Exp Med* 1989; 170: 1015-1020.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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: 148-55.
 13. 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.
 14. La Freniere R, Rosenberg SA. Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Cancer Res* 1985; 45: 3735-3741.
 15. Leder GH, Oppenheim M, Rosenstein M, Shah N, Hoffman R, Lotze MT, Beger HG. Inhibition of nitric oxide synthesis does not improve interleukin-2-mediated antitumor effects in vivo. *Eur Surg Res* 1996; 28: 167-178.
 16. 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.
 17. Lotze MT, Grimm EA, Mazumder A, Strausser JL, Rosenberg SA. Lysis of fresh and cultured autologous tumor by human lymphocytes cultured in T-cell growth factor. *Cancer Res* 1981; 41: 4420-4425.
 18. Margolin KA. Interleukin-2 in the treatment of renal cancer. *Semin Oncol* 2000; 27: 194-203.
 19. Mertelsmann R, Welte K. Human interleukin-2 molecular biology, physiology and clinical possibilities. *Immunol* 1986; 172: 400-419.
 20. 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.
 21. Orucevic A, Lala PK. Effects of N(g)-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on interleukin-2-induced capillary leakage and antitumor responses in healthy and tumor-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 42: 38-46.
 22. Rosenberg SA, Lotze MT, Mule JJ. New approach to the immunotherapy of cancer using interleukin-2. *Ann Int Med* 1988; 108: 853-964.
 23. Samlowski WE, Yim CY, McGregor JR. Nitric oxide exposure inhibits induction of lymphokine-activated killer cells by inducing precursor apoptosis. *Nitric Oxide* 1998; 2: 45-56.
 24. 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.

25. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989; 169: 1543-1555.
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.