

마우스에 있어서 Interleukin-2의 투여방법이 Meth-A 종양세포에 대한 항암효과에 미치는 영향

권오덕¹
전북대학교 수의과대학

Effect of Interleukin-2 Administration Route 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) has been demonstrated as an antineoplastic agent in mice and human, and the route of administration is important to IL-2-induced therapeutic responses. Therefore, the current experiment was undertaken to clarify the effect of IL-2 administration route 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. Beginning on day 7, experimental groups were treated with a 5-day course of IL-2 (intraperitoneal or subcutaneous injection of 30,000 IU 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 significantly tumor growth and prolonged survival, compared with control mice. Subcutaneous IL-2 treatment decreased significantly tumor growth until day 11 and tumor cells grew progressively thereafter, but mice in this group survived longer than control mice.

Key words : interleukin-2, intraperitoneal, subcutaneous, antitumor effect, mice

서 론

Interleukin-2 (IL-2)는 T-세포, B-세포, natural killer (NK) 세포 및 lymphokine-activated killer (LAK) 세포와 같은 면역세포를 활성화시켜서 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다^{3,4,7,9,14,19,20,27,29,30}. IL-2는 다양한 면역계 세포의 수용체와 결합하여 면역세포를 활성화시켜 그 효과를 발휘하지만^{20,27}, 신장을 통해 빨리 배설되기 때문에 면역세포의 증식과 세포독성을 발휘하도록 적당한 농도를 유지하기 위해서는 투여경로가 중요하다고 알려져 있다^{1,2,8,15,21,25,26}. Anderson과 Sorenson¹은 IL-2를 정맥으로 투여했을 경우 분포 반감기는 12분 정도이고 제거 반감기는 40-80분으로 매우 빠르게 배설될 뿐만 아니라 부작용이 심하기 때문에 사용이 상당히 제한적이며, IL-2를 피하나 근육으로 투여했을 경우는 생체 이용률이 약 30% 정도로 낮은 단점이 있다고 보고하였다. 반면, LeBel 등¹⁵과

Piscitelli 등²¹은 IL-2를 피하투여할 경우 정맥투여에 비해 독성과 효과면에서 차이가 없으며, 흡수도 잘 된다고 보고하였다. 한편, Anderson과 Sorenson¹ 및 Freedman 등⁸은 IL-2를 복강내로 투여할 경우 배설속도가 그다지 빠르지 않기 때문에 복강내의 농도는 비교적 높게 유지된다고 하였으며, Schroeder 등²⁵은 IL-2의 복강내 투여시 복강내 면역세포들을 자극한다고 보고하였다. 이와 같이 IL-2는 치료에 대한 지표가 연구자에 따라 다양하고 또한 그 독성효과 때문에 현재까지는 종양의 치료에 제한적으로만 사용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 IL-2의 투여방법이 항암효과에 미치는 영향에 대해 알아보고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물

Harlan Sprague-Dawley(Indianapolis, IN)에서 분양 받은 6-8주령의 BALB/c 암컷 마우스 15마리를 사용

¹Corresponding author.

하였다. IL-2의 투여방법에 따른 항암효과의 차이를 알아보기 위해 각 군당 5마리씩 3개 군(대조군, IL-2 30,000 IU 복강내 투여군, IL-2 30,000 IU 피하 투여군)으로 나누었다.

종양세포

BALB/c 마우스에 syngeneic tumor cell line (methylcholanthrene에 의해 유도된 fibrosarcoma)인 Meth-A 종양세포주⁵를 BALB/c 마우스의 복강내에서 계대배양한 것을 사용하였다. BALB/c 마우스에 Meth-A 종양세포 5×10^6 cells/mouse를 피하에 이식하였다.

IL-2 투여

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

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 투여방법에 따른 종양세포의 성장률

첫 IL-2 투여 후 2-4일 간격으로 종양의 크기를 측정한 후 IL-2 투여 직전의 종양크기와 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, IL-2 30,000 IU를 복강내로 투여한 군에서는 4일째에 44.6%의 증가율을 나타내기 시작하여 22일째에는 467.7%의 증가율을 나타내어, 평균 증가율이 227.6%로서 대조군과 비교하여 종양크기의 증가율이 유의하게 감소되었다($p < 0.05$). IL-2 30,000 IU를 피하로 투여한 군에서는 4일째에 44.1%의 증가율을 나타내기 시작하여 11일째에는 200.0%의 증가율을 나타내어, 평균 증가율이 108.5%로서 대조군에 비

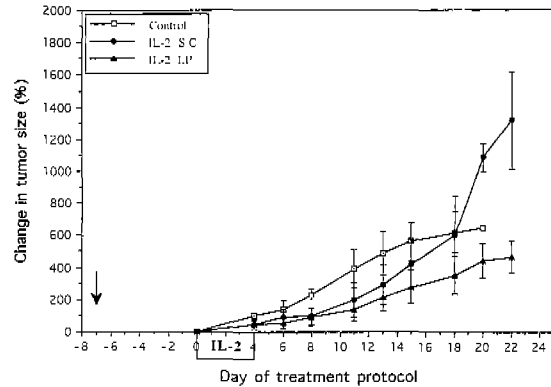


Fig 1. Evaluation of the tumor response to different injection routes of IL-2 in the treatment of subcutaneous Meth-A tumor. Three experimental groups (untreated control, 30,000 IU IL-2 intraperitoneal injection, 30,000 IU IL-2 subcutaneous injection groups) of five BALB/c mice were established in mouse cages. All mice were injected with 5×10^6 Meth-A tumor cells subcutaneously on day -7 (filled arrow). IL-2 therapy was begun on day 0. The results are expressed mean change in tumor size (%) \pm SD.

하여 유의한 증가율의 감소($p < 0.05$)가 인정되었으나, 이 이후에는 종양크기의 증가율이 점차 증가하여 18일 이후에는 대조군에 비해서도 빠른 증가율을 나타내었다(Fig 1).

IL-2 투여방법에 따른 생존율

아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 Meth-A 종양세포 이식 후 13일에서 22일까지는 60%의 생존율을, 25일째에는 40%의 생존율을, 27일째에는 20%의 생존율을 그리고 29일째에는 모두 폐사하였다. 반면, IL-2 30,000 IU를 피하로 투여한 군에서는 Meth-A 종양세포 이식 후 25일째부터 29일째까지 80%의 생존율을 나타내었다. IL-2 30,000 IU를 복강내로 투여한 군에서는 Meth-A 종양세포 이식 후 25일째부터 27일째까지는 80%의 생존율을, 29일째까지는 60%의 생존율을 나타내었다(Fig 2).

고 찰

IL-2는 1975년 골수유래의 T-세포 성장촉진인자로 발견된 이후²⁷ 그 생물학적 활성이 T-세포 뿐만 아니라 B-림프구, NK 세포, LAK 세포, 단구, 대식구 등의 성장과 분화에도 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며^{17,18,20,27}, 또한 이들 면역세포를 활성화시켜 항암효과

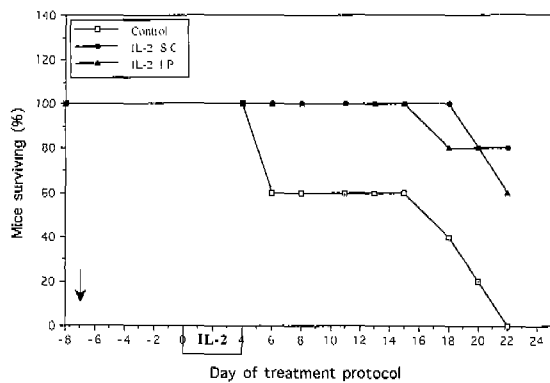


Fig 2. Evaluation of survival times in mice injected with IL-2 through different routes against subcutaneous Meth-A tumor. Three experimental groups (untreated control, 30,000 IU IL-2 intraperitoneal injection, 30,000 IU IL-2 subcutaneous injection groups) of five BALB/c mice were established in mouse cages. All mice were injected with 5×10^6 Meth-A tumor cells subcutaneously on day -7 (filled arrow). IL-2 therapy was begun on day 0.

를 나타낸다고 보고되고 있다^{6,10,11,12,13,16,20,22,23,24,27,28}. 그러나 IL-2의 독성효과와 치료에 대한 지표가 적기 때문에 현재까지는 종양의 치료에 제한적으로만 사용되고 있다¹. 뿐만 아니라 IL-2는 신장을 통해 빨리 배설되기 때문에 면역세포의 증식과 세포독성을 발휘하도록 적당한 농도를 유지하기 위해서는 투여경로가 중요하다고 하였다^{1,2,8,15,21,25,26}. 본 실험에서는 BALB/c 마우스에 Meth-A 종양세포를 피하에 이식한 후 7일째부터 IL-2 30,000 IU를 1일 2회씩 5일간 복강내 및 피하주사하고 종양크기의 증가율을 측정하여 본 결과, 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 평균 396.7%의 높은 증가율을 나타내어 매우 빠르게 종양의 크기가 증가하였다. 반면, IL-2 30,000 IU를 복강내로 투여한 군에서는 종양세포 크기의 증가율이 평균 227.6%를 나타내어 대조군과 비교하여 종양세포 크기의 증가율이 유의하게 낮았다. 이러한 결과는 Schroder 등²⁵이 암 환자에 IL-2를 복강내로 투여한 결과 복강내 면역세포를 자극할 뿐만 아니라 큰 부작용도 없었다고 한 보고와 일치하는 것으로 해석된다. 또한 IL-2를 복강내로 주사할 경우 정맥주사나 피하주사에 비해 복강내에 장기간 높은 농도를 유지^{1,8,25}할 뿐만 아니라, 전신적으로도 서서히 흡수되어 피하종양과 같이 다른 부위에 존재하는 종양세포에도 우수한 항암효과를 발휘하는 것으로 생각된다. 반면, IL-2 30,000 IU를 피하로 주사한 군에서는 11일째까지는

종양크기의 평균 증가율이 108.5%로서 대조군에 비하여 유의한 감소가 인정되었으나, 이 이후에는 종양 크기의 증가율이 점차 증가하여 18일 이후에는 대조군에 비해서도 빠른 증가율을 나타내었다. 이러한 결과는 복강내 주사에 비해 피하주사가 빨리 배설^{1,8,25}되기 때문인 것으로 생각된다.

IL-2의 투여방법에 따른 생존율의 변화에 있어서는, 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 Meth-A 종양세포 이식 후 13일에서 22일까지는 60%, 25일째에는 40%, 27일째에는 20%의 생존율을 나타내었으며, 29일째에는 모두 폐사하였다. 반면, IL-2 30,000 IU를 피하로 투여한 군에서는 Meth-A 종양세포 이식 후 25일째부터 29일째까지 80%의 생존율을 나타내었으며, 복강내로 주사한 군에서는 25일째부터 27일째까지 80%, 29일째에는 60%의 생존율을 나타내었다. 이와 같이 IL-2 처치군에서의 생존율이 대조군에 비해 증가한 것은 IL-2가 면역세포를 활성화시켜 종양세포에 세포독성 효과를 나타낸다는 선인들의 보고^{6,10,13,16}와 대체로 일치하는 것으로 생각되지만, 정확한 기전은 앞으로 더욱 규명되어야 할 것이다.

결론

IL-2의 투여방법에 따른 항암효과를 알아보기 위하여 BALB/c 마우스를 이용하여 syngeneic tumor cell line인 Meth-A 종양세포를 피하에 이식한 후 7일째부터 IL-2 30,000 IU를 1일 2회씩 5일간 복강내 또는 피하주사 하면서 대조군과 비교하여 종양세포의 성장에 미치는 영향을 관찰하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다. 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 매우 빠르게 종양의 크기가 증가하였다. 반면, IL-2 30,000 IU를 복강내로 주사한 군에서는 대조군과 비교하여 유의하게 종양크기의 증가율이 감소되었다. IL-2 30,000 IU를 피하로 주사한 군에서는 11일째까지는 종양크기의 증가율이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으나, 이 이후에는 종양크기의 증가율이 높게 나타났다. 마우스 생존율은 IL-2를 복강내 또는 피하주사한 두 군 모두에서 대조군에 비해 높게 나타났다.

참고문헌

- Anderson PM, Sorenson MA. Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2. Clin Pharmacokinet 1994; 27: 19-31.
- Banks RE, Forbes MA, Hallam S, Jenkins A, Wadhwa

- M, Dilger P, Meager A, Thorpe R, Bowmer CJ, Joffe JK, Patel P, Johnson PW, Selby PJ. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with subcutaneous interleukin 2: evidence for non-renal clearance of cytokines. *Br J Cancer* 1997; 75: 1842-1848.
3. 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.
 4. 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.
 5. Borberg H, Octgen 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. Freedman RS, Gibbons JA, Giedlin M, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Edwards CL, Carrasco CH, Nash MA, Platsoucas CD. Immunopharmacology and cytokine production of a low-dose schedule of intraperitoneally administered human recombinant interleukin-2 in patients with advanced epithelial ovarian carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996; 19: 443-451.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. LeBel CP, Langlois L, Bell DP, Young JD, Kenney WC, Payne BJ, Sendelbach LE, Wong LC. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacotoxic profiles of recombinant-methionyl human interleukin-2[alanine-125] (r-metHuIL-2[ala-125]) following intravenous and subcutaneous administration in rats. *Hum Exp Toxicol* 1995; 14 :909-915.
 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 JJ, 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. Mertelsmann R, Welte K. Human interleukin-2 molecular biology, physiology and clinical possibilities. *Immunol* 1986; 172: 400-419.
 19. 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 α) as the mechanism for the febrile response to interleukin-2 (IL-2) in cancer patients. *J Clin Immunol* 1988; 8: 426-436.
 20. Paul WE. T-cell-derived cytokines and their receptors. In: *Fundamental immunology*, 3rd ed. New York: Raven Press. 1993: 763-800.
 21. Piscitelli SC, Wells MJ, Metcalf JA, Baseler M, Stevens R, Davey RT Jr. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous interleukin-2 in HIV-infected patients. *Pharmacother* 1996; 16: 754-759.
 22. Robak T. Biological properties and therapeutic use of interleukin 2 (IL-2). *Postepy Hig Med Dosw* 1995; 49: 367-393.
 23. Rosenberg SA, Lotze MT, Mule JJ. New approach to the immunotherapy of cancer using interleukin-2. *Ann Int Med* 1988; 108: 853-964.

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. Schroder W, Schwulera U, Lissner R, Bender HG. Animal experiment, pharmacokinetic and clinical studies of intraperitoneal therapy with interleukin-2 (nIL-2) in patients with ovarian carcinoma. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 1995; 35 1: 46-52.
26. Tang ZM, Liu XW, Xu LP, Shan CW, Song QS. Pharmacokinetics and tissue distribution of human recombinant interleukin-2 in mice. *Chung Kuo Yao Li Hsuch Pao* 1994; 15: 51-56.
27. Thomson A. Interleukin-2. In: *The cytokine handbook*, London: Academic Press. 1991: 82-102.
28. Whittington R, Faulds D. Interleukin-2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer. *Drugs* 1993; 46: 446-514.
29. 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.
30. 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.