

## 암유발 생쥐에서 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 사이토카인 생산에 미치는 인도메타신의 영향

채 병 숙<sup>#</sup>

우석대학교 이공대학

(Received September 24, 2001; Revised November 1, 2001)

### Effect of Indomethacin on the Lipopolysaccharide-induced Production of Cytokines in Tumor-bearing Mice

Byeong Suk Chae<sup>#</sup>

College of Science and Engineering, Woosuk University, Samrae-Up, Jeonbuk, 565-701, Korea

**Abstract** — Indomethacin is well known as a prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> synthetase inhibitor, which has anti-pyretic and anti-inflammatory effects and reduces the risk of cancer. Growing tumors greatly induce hypersensitive responses to lipopolysaccharide (LPS). Thus, this study was investigated the effect of indomethacin on the LPS-induced production of cytokines in sarcoma-bearing ICR mice. Indomethacin at doses of 5 mg/kg was administered orally 30 minutes before *i.p.* injection of LPS (8 mg/kg) 5 times for 7 days. LPS remarkably increased tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-1 $\beta$ , levels in both serum and splenic supernatants compared with those in controls, while indomethacin significantly reduced the LPS-increased levels of IL-1 $\beta$ , in both serum and supernatants. LPS significantly enhanced IL-2 levels in serum and interferon (IFN)- $\gamma$  levels in supernatants, whereas indomethacin did not affect the LPS-increased levels of IL-2 and IFN- $\gamma$ . These data, therefore, indicate that indomethacin may attenuate the pathogenesis of IL-1 $\beta$ , induced by LPS and maintain the tumoricidal cellular immune effects by LPS-increased production of IL-2 and IFN- $\gamma$  in tumor-bearing state.

**Keywords** □ Indomethacin, lipopolysaccharide, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , tumor-bearing mouse

암환자는 감염에 대한 저항력이 저하되어 있으며, 암성장에 따른 macrophage의 accessory cell 능력 저하 및 Th(helper T) cell로부터 유도된 면역증강 요소에 대한 반응성 저하 등 비정상적 면역생물학적 반응을 유발하는데, 이런 면역능의 변화에는 PGE<sub>2</sub>가 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2)</sup> 암이 성장함에 따라 monocyte/macrophage로부터 PGE<sub>2</sub> 생산이 증가되므로써 T cell 증식,<sup>3)</sup> natural killer(NK) cell 농도 및 lymphokine-activated killer(LAK) cell 기능<sup>4)</sup> 등이 억제되고 암의 전이성이 증가된다고 하

였다.<sup>5)</sup>

Indomethacin은 해열 및 항염작용을 갖는 비스테로이드성 PGE<sub>2</sub> 합성차단제로써,<sup>6)</sup> 암환자의 통증을 감소시키며 암 성장 및 전이성 억제, 생존기간 연장 등의 효과를 나타냈다.<sup>7-9)</sup> Indomethacin은 *in vivo*와 *in vitro*에서 암에 의해 억제된 NK cell 활성화, lymphocyte blastogenesis 및 LAK cell 활성화 등을 상승시켜 암의 전이를 억제하였고,<sup>10-12)</sup> 또한 폐암환자에서 indomethacin은 phytohaemagglutinin(PHA) 자극에 대한 림파구의 반응을 촉진하였으며,<sup>13)</sup> 유방암환자에서 indomethacin은 mononuclear cell로부터 interferon (IFN)- $\gamma$  유리를 증가시키는 것으로 나타났다.<sup>14)</sup>

LPS는 그람음성균의 세포벽에 있는 내독소로써 암 진행상태에서 높은 병리적 과민증을 유발시켜 치사율

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 063-290-1426 (팩스) 063-290-1424  
(E-mail) cbse@core.woosuk.ac.kr

을 높이는 것으로 나타났다.<sup>15)</sup> 또한 LPS는 T cell 비 의존성적 항원으로 작용하며, *in vitro*에서 trinitrophenyl-SRBC에 대한 Th cell의 활성을 억제하고,<sup>16)</sup> human aveolar macrophage 및 monocyte에서 IL-2에 의해 유도되는 LAK cell을 현저히 억제시켰으나,<sup>17)</sup> macrophage의 활성을 촉진하고 암에 대한 용혈성괴사 작용을 갖는 TNF- $\alpha$ 를 현저히 유도하기 때문에 LPS에 의해 유도되는 항암효과에 대해 연구가 진행되어 왔다.<sup>18)</sup> 그런데 LPS로 인해 나타나는 병리적 현상은 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 와 같은 proinflammatory cytokine 과다생산이 원인인 것으로 나타났으며 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 병리적 효과는 PGE<sub>2</sub> 생산과도 유관한 것으로 알려졌다.<sup>19,20)</sup> 더구나 LPS는 정상상태보다 암진행상태에서 식욕 억제, 발열반응, PGE<sub>2</sub> 생산 등을 더욱 증가시켰고, 또한 치사효과를 현저히 상승시켰고, 암조직으로부터 PGE<sub>2</sub> 생산을 증가시켰으며,<sup>15,21,22)</sup> monocyte의 TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> 및 IL-10 생산을 증가시키는 것으로 보고되었다.<sup>23,24)</sup>

LPS에 의해 유도되는 cytokine 생산에 있어서 indomethacin의 영향에 대한 연구에 의하면, indomethacin은 LPS, IL-1 $\beta$  및 IL-8 등에 의해 유도된 열을 떨어뜨렸으며,<sup>20)</sup> *in vitro*에서 LPS에 의해 현저히 증가된 macrophage의 PGE<sub>2</sub> 생산을 완전히 억제시켰고,<sup>25)</sup> *in vivo*에서 TNF- $\alpha$ 로 인한 치사효과의 저하는 물론 고열, 혈당농도의 변화, 산성증 및 기타 증상 등의 발현을 방지하였다.<sup>26,27)</sup> 또한 indomethacin은 패혈증이 있는 흰쥐에서 PGE<sub>2</sub>에 의해 억제된 T cell 활성을 회복시켰다.<sup>28)</sup>

이상의 연구에 의하면, indomethacin은 PGE<sub>2</sub>의 합성을 차단하므로써 암에 대한 보호효과 및 LPS에 의해 유도된 proinflammatory cytokine 과량생산에 대한 차단효과가 있지만, 암진행상태에서 감염으로 인한 병리적 과민증을 높이고 septic shock에 따른 치사율을 높이는 원인이 되고있는 LPS의 cytokine 변화유도에 대한 indomethacin의 효과에 대해서 연구된 바가 없다. 따라서 암유발상태에서 LPS에 의한 병리적 염증반응의 주 역할을 하는 proinflammatory cytokine인 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  유리와 항암에 대한 면역반응에 있어서 중요한 역할을 하는 IL-2 및 IFN- $\gamma$ 의 생산에 미치는 indomethacin의 영향을 관찰한 바 유의한 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## 실험방법

**실험동물** - 생후 6주령 체중 17~21 g의 수컷 ICR 생쥐를 대한실험동물센터(충북 음성 소재)에서 분양받아 사판사료(제일사료 제품: 조단백질 22.5%이상, 조지방 35%이상, 조섬유 7.5%이하, 조회분 10.0%이하, 칼슘 0.7%이상)로 1주간 급식시켜 적응시킨 후 10마리를 1군으로 하고, sarcoma 180( $1 \times 10^5$  cells/mouse)은 약물투여 10일 전에 복강에 이식시켜 약물투여 전에 털의 상태가 나쁘고 복부가 충분히 부풀어 올라 있음을 확인하였으며, 정상생쥐 1군(normal)과 sarcoma 180이 이식된 4군(control, LPS단독투여군, indomethacin단독투여군 및 indomethacin과 LPS병용투여군)으로 나누어 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도 50~60%로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 7일간 사육하였다.

**Lipopolysaccharide(LPS)용액의 조제 및 투여** - LPS(*Escherichia coli* Serotype 0127: B8, Sigma Co., Ltd., U.S.A.)를 주사용 생리식염수에 용해시켜 체중 kg당 8 mg을 2일 투약 후 1일 휴약식으로 7일간 5회 일정한 시기에 체중 20 g당 0.2 ml의 투약량이 되도록 농도를 조절하여 복강내 주사하므로써 염증의 간헐적 지속상태를 유도하였고, 정상군과 대조군은 약물을 제외한 주사용 생리식염수를 같은 방법으로 투여하였다.

**Indomethacin용액의 조제 및 투여** - Indomethacin(Sigma Co., St. Louis, MO, U.S.A.)을 주사용 생리식염수에 용해시켜 체중 kg당 5 mg을 LPS 투여 30분전에 LPS투여와 같은 방법으로 복강내 주사하였다.

**항원조제** - 면양적혈구(sheep red blood cells: SRBC)를 사용하였는데, 그 방법은 응성면양의 경동맥으로부터 heparin처리한 주사기로 혈액을 취한 후 동량의 Alserver's 완충액(pH 6.1)을 가하여 4°C에서 보존하여 2주일 이내에 사용하였다. 보존중인 SRBC를 사용할 때에는 사용 직전 phosphate-buffered saline(이하 PBS: Gibco Lab. Co., Grand Island, N.Y., U.S.A., pH 7.4)로 3회 원심 세척한 후 적절한 농도로 Hanks' balanced salt solution(이하 HBSS: Gibco Lab. Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)에 부유시켜 사용하였다.

**면역** - 원심세척한 SRBC를 Reed 등<sup>29)</sup>의 방법을 참고하여 HBSS에  $1 \times 10^8$  cells/ml의 농도로 부유시키고, 그 부유액 0.1 ml( $1 \times 10^7$  cells)를 각 실험 4일전

에 생쥐의 꼬리 정맥에 주사하여 면역을 유도하였다.

**혈청의 분리** - 마지막 약물투여 3시간 후 생쥐의 심장에서 혈액을 채취하여 실온에서 2시간 동안 응고시킨 후, 2000×g에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 -70°C에서 보존하여 사용하였다.

**비장세포 부유액의 조제 및 cytokine의 유도** - 약물이 투여되었던 정상군 및 암이식 생쥐군으로부터 비장을 무균적으로 적출하여 minimum essential medium (MEM: Gibco Lab. Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)으로 조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh로 여과하여 큰 세포덩어리를 제거하였으며, 4°C 400×g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거 후 37°C의 0.83%(w/v) ammonium chloride 용액에 부유시켜 3분간 정지하여 적혈구를 용해시켰다. 이 비장세포 부유액은 한냉 PBS로 4°C에서 3회 원심분리 후, 비장세포수  $1 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 RPMI-1640 complete medium (10% fetal bovine serum, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml streptomycin, 1 mM HEPES buffer 및 2 mM sodium pyruvate 함유)에 부유시켰다. 또한 매 실험때 마다 비장세포의 생존을 검사를 trypan blue exclusion method로 다음과 같이 실시하였다. 시험관에 0.3 ml의 세포부유액을 넣은 후 0.1 ml의 trypan blue dye용액을 가하여 5분 경과 시킨 다음, 백혈구 계산판에서 무색인 생세포와 적색으로 염색된 사세포 수를 측정한 후 그 백분율을 계산하였다.

비장세포 부유액 100 µl( $1 \times 10^6$  cells/ml)을 96 well plate에 분주하고, TNF-α 및 IL-1β의 생산을 유도하기 위하여 RPMI-1640 complete medium에 녹인 최종농도 1 µg/ml인 LPS(*Escherichia coli* Serotype 026: B6, Sigma Co., Ltd., U.S.A.)를 mitogen으로 사용하였고, IL-2 및 IFN-γ의 생산을 유도하기 위해서는 최종농도 1.8 µg/ml인 concanavalin A(Con A: Sigma Co., Ltd., U.S.A.)로 자극하였다. 그런 다음 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator(Forma, U.S.A.)에 24시간 배양하였으며 상층액을 취하여 사용하기 직전까지 -70°C에 저장하였다.

**Cytokine의 측정** - 혈청 및 비장세포 배양액 중 cytokine의 농도는 ELISA kit(R & D systems Inc., M.N., U.S.A.)를 이용하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 실시하였고, ELISA microplate reader(Molecular Devices Co., Ltd., U.S.A.)를 사용하여 450 nm에서 2배수로 흡광도를 측

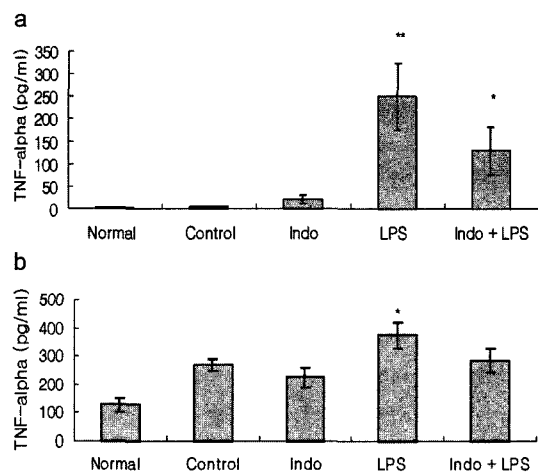
정하여 각 결과는 ml당 picogram 단위에서 정량하였다.

**통계학적 분석** - 모든 자료는 means ± standard error(S.E.)로 나타냈으며, 유의성 검사는 students' t-test로 행하였다.

### 실험결과

Sarcoma 180 cell을 이식시킨 ICR 생쥐에 있어서 LPS에 의해 유도된 혈청 및 비장세포 배양액 중에서 proinflammatory cytokine 생산 및 비장세포 배양액 중 lymphokine의 생산에 미치는 indomethacin의 영향을 관찰하였다.

**LPS에 의해서 유도된 TNF-α 생산에 미치는 indomethacin의 영향** - 암유발 생쥐대조군의 TNF-α



**Fig. 1** - Inhibitory effect of indomethacin on LPS-induced production of TNF-α in tumor-bearing mice. All mice except normal group were transplanted with sarcoma 180 cells ( $1 \times 10^5$  cells/mouse) by *i.p.* injection 10 days before material administration. Indomethacin (Indo) at 5 mg/kg was administered *i.p.* 30 minute before *i.p.* injection of LPS (8 mg/kg) 5 times for 7 days and normal mice were given vehicle. Mice were immunized *i.u.* with SRBC ( $1 \times 10^7$  cells) 4 day prior to each measurement. The blood was collected from mice 3hrs after administration of the last LPS. The splenic supernatants were harvested 24 hrs post stimulating with mitogen LPS. Cytokine levels in serum (a) and splenic supernatants (b) were obtained using ELISA. Each value represents the mean ± S.E. of 10 mice.

\*P<0.05 and \*\*P<0.01: Significantly different from the value in control mice.

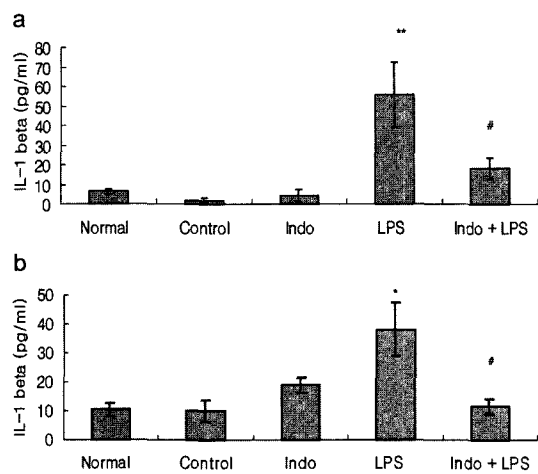
농도는 정상군에 비해 비장세포 배양액에서 유의성 있게 증가되었으며, 혈청에서는 유의성 없는 증가를 보여주었다. 암유발 생쥐의 혈청에서 TNF- $\alpha$  농도는 대조군이  $3.75 \pm 1.89$  pg/ml인데 비해 LPS단독투여군은  $249.75 \pm 74.56$  pg/ml로 평균 66배까지 유의성 있게 증가되었고, indomethacin단독투여군은 약간 증가되었다. Indomethacin과 LPS병용투여군은 TNF- $\alpha$  농도가  $129 \pm 53.13$  pg/ml로 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었으나 LPS 단독투여군에 비해 유의성 없게 감소되었다(Fig. 1a).

또한 암유발 생쥐의 비장세포 배양액에서, TNF- $\alpha$  농도는 대조군이  $268.12 \pm 22.36$  pg/ml인데 비해 LPS 단독투여군이  $375.46 \pm 45.11$  pg/ml로 평균 40%까지 유의성 있게 증가되었으나, indomethacin단독투여군은 약간 감소되었다. Indomethacin과 LPS병용투여군은 TNF- $\alpha$  농도가  $286.88 \pm 42.51$  pg/ml로 대조군에 비해 유의성 없게 증가되었으나, LPS단독투여군에 비해서는 유의성 없게 감소되었다(Fig. 1b).

**LPS에 의해서 유도된 IL-1 $\beta$  생산에 미치는 Indomethacin의 영향** - 암유발 생쥐대조군의 혈청 중 IL-1 $\beta$ 의 농도는 정상군에 비해 약간 저하되었으나 비장세포 배양액에서는 거의 차이를 보이지 않았다. 암유발 생쥐의 혈청에서, IL-1 $\beta$  농도가 대조군이  $1.79 \pm 1.31$  pg/ml인데 비해 LPS단독투여군은  $55.71 \pm 16.98$  pg/ml로 평균 30배까지 유의성 있게 증가하였고, indomethacin단독투여군은 약간 증가되었다. Indomethacin과 LPS병용투여군은 대조군에 비해 IL-1 $\beta$ 의 농도가  $18.21 \pm 5.50$  pg/ml로 유의성 없게 증가되었으나 LPS단독투여군에 비해서는 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 2a).

암유발 생쥐의 비장세포 배양액에서 IL-1 $\beta$ 의 농도는 대조군이  $9.97 \pm 3.57$  pg/ml인데 비해 LPS단독투여군은  $38.10 \pm 9.14$  pg/ml로 평균 2.8배까지 유의성 있게 증가되었으며, indomethacin단독투여군은 약간 증가되었다. Indomethacin과 LPS 병용투여군은 IL-1 $\beta$  농도가  $11.61 \pm 2.60$  pg/ml로 대조군에 비해 약간 증가되었으나 LPS단독투여군에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2b).

**LPS에 의해서 유도된 IL-2 생산에 미치는 Indomethacin의 영향** - 암유발 생쥐대조군의 혈청 중 IL-2 농도는 정상군에 비해 유의성 없게 감소되었다. 암유발 생쥐들 중에서 보여준 결과에 의하면, 혈청에

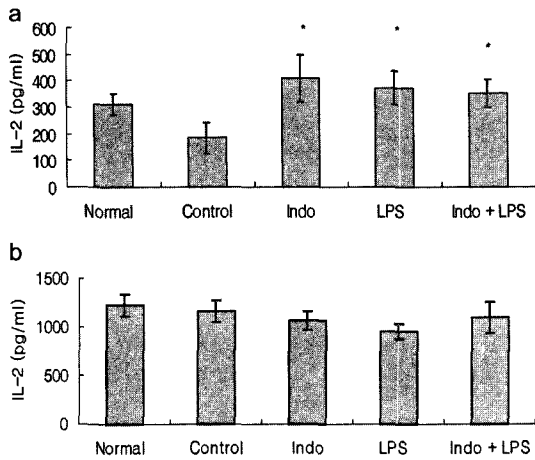


**Fig. 2** - Inhibitory effect of indomethacin on LPS-induced production of IL-1 $\beta$  in tumor-bearing mice. The blood was collected from mice 3hrs after administration of the last LPS. The splenic supernatants were harvested 24 hrs post stimulating with mitogen LPS. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 10 mice. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. \*P<0.05 and \*\*P<0.01: Significantly different from the value in control mice. #P<0.05: Significantly different from the value in LPS treatment mice.

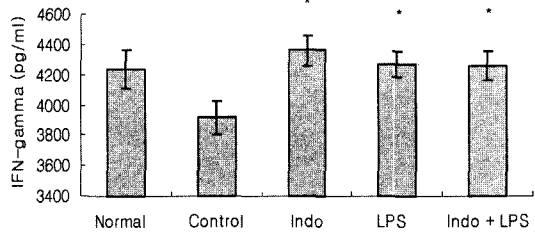
서의 IL-2 농도는 대조군( $185 \pm 59.74$  pg/ml)에 비해 LPS단독투여군 및 indomethacin단독투여군은 각각  $375 \pm 63.55$  pg/ml 및  $411 \pm 88.97$  pg/ml로 유의성 있게 증가하였다. Indomethacin과 LPS병용투여군은 IL-2 농도가  $353 \pm 53.06$  pg/ml로 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었지만, LPS단독투여군에 비해 거의 변화되지 않았다(Fig. 3a). 암유발 생쥐대조군의 비장세포 배양액 중 IL-2 농도는 정상군에 비해 변화가 없었다. 비장세포 배양액의 IL-2 농도는 대조군( $1,163 \pm 108$  pg/ml)에 비해 LPS단독투여군과 indomethacin 단독투여군은 각각  $953 \pm 75$  pg/ml 및  $1,065 \pm 101$  pg/ml로 유의성 없게 감소되었다. Indomethacin과 LPS병용투여군은 IL-2 농도가  $1,103 \pm 160$  pg/ml로 대조군에 비해 거의 변화가 없었으나 LPS단독투여군에 비해 유의성 없게 증가되었다(Fig. 3b).

**LPS에 의해서 유도된 IFN- $\gamma$  생산에 미치는 Indomethacin의 영향** - 암유발 생쥐대조군의 비장세포 배양액 중에서 IFN- $\gamma$  농도는 정상군이  $4,240 \pm 126$  pg/ml인데 비해  $3,917 \pm 111$  pg/ml로 유의성 없게

고 찰



**Fig. 3** – Effect of indomethacin on LPS-induced production of IL-2 in tumor-bearing mice. The blood was collected from mice 24hrs after administration of the last LPS. Splenic supernatants were harvested 24hrs after being stimulated by Con A. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 10 mice. Other legends and methods are the same as in Fig. 1.  
\*P<0.05: Significantly different from the value in control mice.



**Fig. 4** – Effect of indomethacin on LPS-induced production of IFN- $\gamma$  in tumor-bearing mice. Splenic supernatants were harvested 24hrs after being stimulated by Con A. IFN- $\gamma$  levels in supernatants were obtained using ELISA. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 10 mice. Other legends and methods are the same as in Fig. 1.  
\*P<0.05: Significantly different from the value in control mice.

감소되었다. LPS단독투여군은  $4,273 \pm 88$  pg/m<sup>2</sup>이고, indomethacin단독투여군은  $4,363 \pm 102$  pg/m<sup>2</sup>으로 정상군의 결과와 거의 같은 수준으로 유의성 있게 증가되었다. Indomethacin과 LPS병용투여군은 IFN- $\gamma$  농도가  $4,265 \pm 96$  pg/m<sup>2</sup>으로 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었으나, LPS단독투여군에 비해 변화가 없었다(Fig. 4).

암유발 ICR생쥐에서 LPS에 의해 유도된 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 와 같은 proinflammatory cytokine과 세포성 면역반응에 중요한 역할을 하는 IL-2 및 IFN- $\gamma$  생산에 미치는 indomethacin의 영향에 대하여 실시한 실험결과에 대한 고찰은 다음과 같다. 본 실험에 사용된 indomethacin의 용량은 흰쥐에서 LPS로 인해 유도되는 발열반응에 indomethacin 5 mg/kg 복강주사로 효과가 있었다는 Zampronio 등<sup>20)</sup>의 보고를 참고로 하여 결정하였다.

LPS에 의해 생산되는 TNF- $\alpha$ 는 면역조절 및 중양의 용혈성괴사작용을 갖으나, 과량생산에 따른 여러 병태 생리적 현상을 유발하는 것으로 잘 알려져 있다.<sup>30)</sup> 또한 LPS는 정상상태보다 암을 이식시킨 상태에서 TNF- $\alpha$  생산이 증가되었으며,<sup>31)</sup> Alleva 등<sup>3)</sup>은 비록 TNF- $\alpha$ 가 T cell 증식을 증가시키는 것으로 알려져 있지만 암으로 인해 유도된 macrophage의 TNF- $\alpha$  합성 증가는 PGE<sub>2</sub> 생산에 의해 T cell 증식을 억제한다고 보고하였다. 본 실험에서 TNF- $\alpha$  생산은 혈청 및 비장세포 배양액에서 정상상태보다 암 진행상태에서 약간의 증가가 있었으며, LPS에 의해 현저하게 증가된 TNF- $\alpha$  농도는 indomethacin에 의해 약간 저하됨을 보여주었다(Fig. 1). Indomethacin은 TNF- $\alpha$  농도를 저하시켜 TNF- $\alpha$ 의 치사작용을 감소시키고 고열, 혈당의 변화, acidosis 등 TNF- $\alpha$ 의 독성에 대해 보호효과를 갖으며,<sup>26,32)</sup> 이런 indomethacin의 TNF- $\alpha$ 에 대한 보호효과는 순환계 중의 TNF- $\alpha$  및 PGE<sub>2</sub>의 높은 농도를 저하시키는 것과 유관한 것으로 보고되었다.<sup>27)</sup> 따라서 암유발 생쥐에서 indomethacin은 LPS로 유도되는 TNF- $\alpha$ 의 과량생산을 억제하여 TNF- $\alpha$ 로 인한 여러 병리적 현상을 감소시키겠지만 유의성이 없는 감소를 보인 것으로 보아, LPS에 의한 TNF- $\alpha$  생산이 전적으로 PGE<sub>2</sub>에 의존적이지 않으며 T cell 반응 등 면역증진효과와 관련된 TNF- $\alpha$  생산은 indomethacin의 PGE<sub>2</sub> 합성 차단효과에 의해 억제되지 않을 것으로 사료되며, 보다 명확한 기전을 위한 많은 연구가 요구된다.

IL-1 $\beta$ 는 LPS에 의해 강력히 유도되는 proinflammatory cytokine으로써, 고열을 유발하고 septic shock에서 TNF- $\alpha$ 의 치사효과를 더 강화시킨다.<sup>33)</sup> 암 환자에서 IL-1 $\beta$ 의 생산저하는 암환자의 monocyte

suppressor cell 활성의 증가와 유관한 것으로 나타났다.<sup>34)</sup> 본 실험에서 암유발 생쥐대조군에서의 IL-1 $\beta$  농도는 정상군에 비해 약간 저하되었으며, indomethacin은 LPS에 의해 현저히 증가된 암유발 생쥐의 혈청 및 비장세포에서의 IL-1 $\beta$  생산을 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 2). 이는 LPS에 의한 고열은 IL-1 $\beta$ 에 의해 중재되어 PGE<sub>2</sub>에 의해 일어나며 indomethacin은 LPS와 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도되는 발열 및 위장관운동 저하 등을 차단한다는 보고<sup>20,21)</sup>로 미루어, 암유발 상태에서 indomethacin이 LPS에 의해 현저히 유도된 IL-1 $\beta$  생산을 저하시켜 고열 등 IL-1 $\beta$ 로 인해 유발되는 병리적 효과를 차단할 것으로 사료된다.

IL-2는 T cell의 증식 및 기능 활성화에 필수적인 요소로서, IL-2 고농도에 의해 암을 용해시킬 수 있는 LAK cell의 수를 증가시키며, NK cell 활성화와 여러 cytokine을 생산하여 cytolytic activity를 증진시켜 항암효과를 갖는다.<sup>35)</sup> 본 실험에서 IL-2 농도가 정상군에 비해 암유발 생쥐의 혈청에서는 약간 감소되었으나 암유발 생쥐의 비장세포 배양액에서는 거의 변화가 없었다. 또한 IL-2 혈중농도는 정상군에 비해 암유발 생쥐대조군에서 감소되었고, LPS와 indomethacin은 각각 암유발 생쥐의 IL-2 혈중농도를 유의성 있게 증가시켰지만, indomethacin은 LPS에 의해 증가된 IL-2 농도에 거의 변화를 일으키지 않았다(Fig. 3a). 그런데 비해 비장세포 배양액에서 LPS와 indomethacin은 각각 대조군에 비해 IL-2 농도를 유의성 없이 감소시켰지만 indomethacin은 LPS에 의해 유도된 IL-2 농도를 유의성 없이 상승시킨 것으로 나타났다(Fig. 3b). 암이 성장함에 따라 macrophage 활성이 감소되고 macrophage로부터 PGE<sub>2</sub> 생산이 증가되므로써 T cell 증식이 억제되지만,<sup>3)</sup> indomethacin은 상처난 동물에서 PGE<sub>2</sub>에 의해서 억제된 T cell의 활성 및 IL-2 생산을 회복시켰고,<sup>28)</sup> 또한 폐암환자에서도 PHA 자극에 대한 림파구의 반응을 촉진시키는 것으로 나타났다.<sup>13)</sup> 한편 LPS는 Th 1 cytokine을 생산하는 림파구의 능력을 저하시키지만, 암 상태에서 monocyte 존재하에서는 Th cell을 자극하는 것으로 나타났다.<sup>36)</sup> 따라서 암 진행상태에서 LPS는 비장세포에 풍부한 lymphocyte보다 혈청에 보다 풍부한 monocyte를 활성화시켜 monocyte 의존적인 antigen presenting function을 통해 Th cell 기능을 회복시키므로써 IL-2의 혈청농도를 증가시켰다고 사료되며, indomethacin

은 PGE<sub>2</sub>로 인해 억제된 Th cell 기능을 회복시켜 IL-2 생산을 증가시키는데 이런 효과는 antigen presenting cell (APC)의 활성 의존적으로 Th cell의 기능을 회복하기 때문에 indomethacin은 비장세포 배양액에서 IL-2 생산에 영향을 주지못하였으나 혈청에서는 증가시킨 것으로 사료된다. 그러나 indomethacin이 LPS에 의해 유도된 IL-2 생산에 영향을 미치지 못한 것으로 보아 monocyte 의존적인 Th cell의 기능에 대한 LPS의 활성화 작용에 indomethacin의 PGE<sub>2</sub>의 합성 차단효과가 유의성 있게 상승효과를 유도하지 못하는 것으로 사료되며 이에 대한 명확한 기전을 위해 많은 연구가 요구된다.

IFN- $\gamma$ 는 강력한 macrophage 활성화제로써 NK cell의 세포독성을 증가시키는 것을 포함하여 암세포를 인식하고 암 성장을 억제하는 면역체계를 자극하므로써 암에 대한 면역방어작용을 갖는데 중요한 역할을 한다.<sup>37)</sup> 암이 진행됨에 따라 IFN- $\gamma$  생산이 감소되고,<sup>38)</sup> 암 환자에서 NK cell은 점차적으로 불활성화되며 monocyte로부터 PGE<sub>2</sub>의 생산이 증가되므로써 NK cell 농도 및 LAK cell 기능 등이 억제되는 것으로 나타났다.<sup>14)</sup> 본 연구에서 IFN- $\gamma$  농도는 정상군에 비해 암유발 생쥐대조군의 비장세포 배양액에서 약간 감소되었고, indomethacin과 LPS병용투여는 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰으나 LPS 단독투여에 비해서는 거의 영향이 없었다(Fig. 4). Indomethacin은 암진행상태에서 NK cell의 암에 대한 세포독성을 증가시키고 IFN- $\gamma$  유리를 증가시켜 암의 전이성을 차단하였으며,<sup>9,12,39)</sup> 감염된 생쥐에서 LPS에 의해 유도되는 IFN- $\gamma$  생산을 증가시켰으나 PGE<sub>2</sub>로 인해 그 효과가 저하되는 것으로 나타났다.<sup>40)</sup> 또한 LPS에 의해 생산되는 IFN- $\gamma$ 는 주로 NK cell에서 유래되고 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 가 NK cell 활성을 증진시키는데 관여하였다고 보고되었다.<sup>41,42)</sup> 따라서 암 진행상태에서 LPS에 의해 유도된 IFN- $\gamma$  생산은 T cell 비의존적으로 NK cell 활성화에 의해 이루어지며, 이 NK cell 활성화에 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 가 관여하는데, indomethacin이 PGE<sub>2</sub> 합성을 차단하여 IFN- $\gamma$  생산을 촉진하는 작용이 있음에도 불구하고 LPS에 의해 증가된 IFN- $\gamma$  생산에 indomethacin이 영향을 미치지 못한 것은 LPS로 인해 유도된 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 생산이 indomethacin에 의해 억제되므로써 이 억제작용이 LPS 및 indomethacin의 NK cell 활성화효과와 길항적으로 작용하였기 때문일 것으로 사료된다.

**결 론**

암유발 ICR생쥐에서 LPS에 의해 유도된 cytokine 생산에 미치는 indomethacin의 영향에 관한 실험 결과는 다음과 같다.

1. Indomethacin은 암유발 생쥐의 혈청 및 비장세포 배양액에서 대조군에 비해 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  농도를 유의성 없이 증감시켰으나, LPS에 의해 현저히 증가된 IL-1 $\beta$  농도는 유의성 있게 감소시켰다.

2. Indomethacin은 암유발 생쥐에서 대조군에 비해 IL-2의 혈중농도를 유의성 있게 증가시켰으나, LPS에 의해 유의성 있게 증가된 IL-2의 혈중농도에는 영향을 주지 않았다.

3. Indomethacin은 암유발 생쥐에서 대조군에 비해 비장세포 배양액의 IFN- $\gamma$  농도를 유의성 있게 증가시켰으나, LPS에 의해 유의성 있게 증가된 비장세포 배양액의 IFN- $\gamma$  농도에는 영향을 주지 않았다.

이상의 연구결과, 암진행상태에서 indomethacin은 LPS에 의한 IL-1 $\beta$  생산을 유의성 있게 차단하여 고열 등 병리적 효과를 저하시키며, LPS에 의해 유의성 있게 증가된 IL-2 및 IFN- $\gamma$  생산을 유지시켜 항암효과에 있어서 유효한 세포성 면역기능을 유도할 것으로 사료된다.

**감사의 말씀**

본 연구는 우석대학교 학술연구비에 의하여 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

**문 헌**

1) Walker, T. M., Yurochko, A. D., Burger, C. J. and Elgert, K. D. : Ia-macrophage and cytokine networks contribute to tumor-induced suppression of CD4+ autoreactive T cells. *Immunol. Invest.* **22**(3), 169 (1993).  
 2) Yurochko, A. D., Burger, C. J. and Elger, K. D. : Tumor modulation of autoreactivity: decreased macrophage and autoreactive T cell interactions. *Cell Immunol.* **127**(1), 105 (1990).  
 3) Alleva, D. G., Burger, C. J. and Elgert, K. D. : Tumor-induced macrophage tumor necrosis factor-alpha

production suppresses autoreactive T cell proliferation. *Immunobiology* **188**(4-5), 430 (1993).  
 4) Baxevanis, C. N., Reclus, G. J., Gritzapis, A. D., Dedousis, G. V., Missitzis, I. and Papamichail, M. : Elevated prostaglandin E<sub>2</sub> production by monocytes is responsible for the depressed levels of natural killer and lymphokine-activated killer cell function in patients with breast cancer. *Cancer* **72**(2), 491 (1993).  
 5) Chouaib, S., Welte, K., Mertelsmann, R. and Dupont, B. : Prostaglandin E<sub>2</sub> acts at two distinct pathways of T lymphocyte activation: inhibition of interleukin 2 production and down-regulation of transferrin receptor expression. *J. Immunol.* **135**, 1172 (1985).  
 6) Mitchell, J. A. and Warner, T. D. : Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br. J. pharmacol.* **128**, 1121 (1999).  
 7) Morecki, S., Yacovlev, E., Gelfand, Y., Trembovler, V., Shohami, E. and Slavin, S. : Induction of antitumor immunity by indomethacin. *Cancer Immunol. Immunother.* **48**(11), 613 (2000).  
 8) Sandstrom, R., Gelin, J. and Lundholm, K. : The effect of indomethacin on food and water intake, motor activity, and survival in tumor-bearing rats. *Eur. J. Cancer* **26**, 811 (1990).  
 9) Fulton, A. M. : Inhibition of experimental metastasis with indomethacin: role of macrophages and natural killer cells. *Prostaglandins* **35**(3), 413 (1988).  
 10) Koyama, H., Narisawa, T., Kodama, M., Ishikawa, K., Kusaka, H., Yamazaki, Y. and Koyama, K. : Potent effects of the prostaglandin synthesis inhibitor indomethacin on the cellular immune response in gastrointestinal cancer patients. *Nippon Gan Chiryu Gakkai Shi* **24**(5), 1027 (1989).  
 11) Wang, Z., Chen, Y., Zheng, R., Qin, D., Chen, X., Wang, Y. and Liu, G. : *In vitro* effects of prostaglandin E<sub>2</sub> or indomethacin on the proliferation of lymphokine-activated killer cells and their cytotoxicity against bladder tumor cells in patients with bladder cancer. *Prostaglandins* **54**(5), 769 (1997).  
 12) Bigda, J. and Mysliwski, A. : Indomethacin inhibits kidney metastasis in bomirsi melanoma-bearing hamsters, and modulates natural killer cytotoxic activity of tumor hosts *in vivo* and *in vitro*.

- Anticancer Res.* **18**(5A), 3549 (1998).
- 13) Maca, R. D., Burford, J. G. and Taylor, R. T. : The effects of indomethacin and interleukin-2 on the proliferation of lymphocytes from patients with lung cancer. *J. Clin. Immunol.* **5**(3), 158 (1985).
  - 14) Wasserman, J., Petrini, B., Wolk, G., Vedin, I., Glas, U., Blomgren, H., Ekre, H. P. and Strannegard, O. : Cytokine release from mononuclear cells in patients irradiated for breast cancer. *Anticancer Res.* **11**(1), 461 (1991).
  - 15) Bartholeyns, J., Freudenberg, M. and Galanos, C. : Growing tumors induce hypersensitivity to endotoxin and tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* **55**(9), 2230 (1987).
  - 16) Uchiyama, T. and Jacobs, D. M. : Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharide (LPS); Multifocal effects of LPS-induced suppression of the primary antibody response to a T-dependent antigen. *J. Immunol.* **121**, 2340 (1978).
  - 17) Sone, S., Utsugi, T., Nii, A. and Ogura, T. : Effects of human alveolar macrophages on the induction of lymphokine (IL 2)-activated killer cells. *J. Immunol.* **139**(1), 29 (1987).
  - 18) Cameron, D. J. and Churchill, W. H. : Cytotoxicity of human macrophages for tumor cells: enhancement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J. Immunol.* **124**(2) 708 (1980).
  - 19) Long, N. C., Otterness, I., Kunkel, S. L., Vander, A. J. and Kluger, J. : Roles of interleukin 1 $\beta$  and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. *Am. J. Physiol.* **28**, 724 (1990).
  - 20) Zampronio, A. R., Sliva, C. A., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H., Pela, I. R. and Souza, G. E. : Indomethacin blocks the febrile response induced by interleukin-8 in rabbits. *Am. J. Physiol.* (3U8) **269**(6 Pt 2), 1469 (1995).
  - 21) Gelin, J., Moldawer, L. L., Lonroth, C., Sherry, B., Chizzonite, R. and Lundholm, K. : Role of endogenous tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 for experimental tumor growth and development of cancer cachexia. *Cancer Res.* **51**, 415 (1991).
  - 22) Grossie, V. B. Jr. and Mailman, D. : Influence of the Ward colon tumor on the host response to endotoxin. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **123**(4), 189 (1997).
  - 23) Nara, K., Odagiri, H., Fujii, M., Yamanaka, Y., Yokoyama, M., Morita, T., Sasaki, M., Koi, M. and Abo, T. : Increased production of tumor necrosis factor and prostaglandin E<sub>2</sub> by monocytes in cancer patients and its unique modulation by their plasma. *Cancer Immunol. Immunother.* **25**(2) 126 (1987).
  - 24) Menetrier-Caux, C., Bain, C., Favrot, M. C., Duc, A. and Blay, J. Y. : Renal cell carcinoma induces interleukin 10 and prostaglandin E<sub>2</sub> production by monocytes. *Br. J. Cancer* **79**(1), 119 (1999).
  - 25) Kurland, J. I. and Bockman, R. : Prostaglandin E production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* **147**, 952 (1978).
  - 26) Kettelhut, I. C., Fiers, W. and Goldberg, A. L. : The toxic effects of tumor necrosis factor *in vivo* and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4273 (1987).
  - 27) Perkins, D. J. and Kniss, D. A. : Tumor necrosis factor-alpha promotes sustained cyclooxygenase-2 expression: attenuation by dexamethasone and NSAIDs. *Prostaglandins* **54**(4), 727 (1997).
  - 28) Choudhry, M. A., Ahmad, S. and Sayeed, M. M. : Role of Ca<sup>2+</sup> in prostaglandin E<sub>2</sub>-induced T-lymphocyte proliferative suppression in sepsis. *Infect. Immun.* **63**(8), 3101 (1995).
  - 29) Reed, N. D., Crowle, P. K. and Ha, T. : Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationships in immuno-deficient animals. *B. Sordeted. Karger Baselip.* p. 184 (1984).
  - 30) Old, L. J. : Tumour necrosis factor. *Science*, **230**, 630 (1985).
  - 31) Sherry, B. A., Gelin, J., Fong, Y., Marano, M., Wei, H., Cerami, A., Lowry, S. F., Lundholm, K. G. and Moldawer, L. L. : Anticachectin/tumor necrosis factor  $\alpha$  antibodies attenuate development of cachexia in tumor models. *FASEB J.* **3**, 1956 (1989).
  - 32) Huang, W. T., Lin, M. T. and Won, S. J. : Staphylococcal enterotoxin A-induced fever is associated with increased circulating levels of cytokines in rabbits. *Infect. Immun.* **65**(7), 2656 (1997).
  - 33) Waage, A. and Espevik, T. : Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor  $\alpha$ /cachectin in mice. *J. Exp. Med.* **167**, 1987 (1988).



- 34) Savary, C. V., Lotzova, E. and Klostergaard, J. : Interleukin-2 -activated large granular lymphocytes: cytotoxic efficiency and mechanism of killing of tumor cell lines. *Immunol. Lett.* **21**, 145 (1989)
- 35) Commes, T., Klein, B., Jourdan, M. and Bataille, R. : Production of interleukin 2 in multiple myeloma. *Clin. Exp. Immunol.* **63**(3), 533 (1986).
- 36) Mattern, T., Thanhauser, A., Reiling, N., Toellner, K. M., Duchrow, M., Kusumoto, S., Rietschel, E. T., Ernst, M., Brade H. and Flad, H. D. : Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. *J. Immunol.* **153**(7), 2996 (1994).
- 37) Onozaki, K., Matsushima, K., Kleinerman, E. S., Saito, T and Oppenheim, J. J. : Role of interleukin 1 in promoting human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. *J. Immunol.* **135**(1) 314 (1985).
- 38) Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J. and Schreiber, R. D., Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN- $\gamma$  receptors. *Immunity*, **1**, 447 (1994).
- 39) Yamamoto, N., Zou, J. P., Li, X. F., Takenaka, H., Noda, S., Fujii, T., Ono, S., Kobayashi, Y., Mukaida, N. and Matsushima, K. : Regulatory mechanisms for production of IFN-gamma and TNF by antitumor T cells or macrophages in the tumor-bearing state. *J. Immunol.* **154**, 2281 (1995).
- 40) Okamura, H., Wada, M., Nagata, K., Tamura, T. and Shoji, K. : Induction of murine gamma interferon production by lipopolysaccharide and interleukin-2 in Propionibacterium acnes-induced peritoneal exudate cells. *Infect. Immun.* (GO7) **55**(2), 335 (1987).
- 41) Dinarello, C. A. : Biology of interleukin-1. *FASEB J.* **2**, 108 (1988).
- 42) Ostensen, M. E., Thiele, D. L. and Lipsky, P. E. : Tumor necrosis factor enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J. Immunol.* **138**, 4185 (1987).