

Interferon-gamma (IFN- γ)의 신세포암 세포주에 대한 직접 세포독성 조사

Direct Cytotoxicity of Interferon-gamma (IFN- γ) on Renal Cell Carcinoma Cell Line

Jae Sik Yoon,¹ Soo Jung Yoon,¹ Min Ho Suh,² Seong Il Suh,²
Won Ki Baek,² Young Sun Lee,¹ Jong Wook Park,¹ Sung Joon Lee¹

From the Departments of Urology, Immunology,¹ and Microbiology,²
School of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea

Purpose: Interferon-gamma (IFN- γ), a cytokine mediating cellular immune responses, has been reported to have antiproliferative and cytotoxic effects on tumor cells in vitro. IFN- γ is also capable of enhancing immune responses against tumor cells by increasing the expression of MHC class I and II molecules and tumor markers on cell surfaces. The present study focuses on the direct antitumor effects of IFN- γ on Renca cell line.

Materials and Methods: Direct antiproliferative and cytotoxic effects of IFN- γ were investigated in Renca cells by viable cell count using Trypan blue dye exclusion. BrdU cell proliferation ELISA and LDH cytotoxicity detection assays were performed in order to determine which effect was dominant by the IFN- γ treatment. DNA fragmentation assay showed that IFN- γ induced apoptotic cell death in Renca.

Results: The number of Renca cells attached to the culture plates reached only 61.5% that of untreated cells on the second day of incubation with 150U/ml of IFN- γ . Renca detachment began to increase after six days of culture. Trypan Blue dye exclusion showed the attached or detached cell populations mostly comprised of live or dead cells, respectively. It was observed that IFN- γ had a dose-dependent antiproliferative effect on Renca. Cytotoxicity measured by LDH secretion into the culture supernatant was not prominent, but assay for DNA fragmentation revealed apoptosis-associated nucleosomal ladders in IFN- γ -treated Renca.

Conclusions: These results indicate that IFN- γ by playing antiproliferative roles in early phase and inducing apoptosis-mediated cell death in the later phase could perform direct inhibitory effects on the Renca cell line.

(Korean J Urol 2000; 41: 587~93)

Key Words: IFN- γ , Proliferation, Cytotoxicity, Apoptosis

서 론

Interferon-gamma (IFN- γ)는 활성화된 T 세포와 natural killer 세포에서 분비되는 cytokine으로서 대식세포를 활성화시키는 등 세포성 면역반응을 매개하는 물질이다. 또한 암세포에 작용하여 세포의 증식을 억제하고 직접적인 세포독성을 나타내거나 apoptosis를 유도하며,^{1,4} 암세포의 class I 및 class II MHC 분자의

대한비뇨기과학회지
제41권 제5호 2000년

계명대학교 의과대학 비뇨기과
학교실, 면역학교실,¹ 미생물학
교실²

윤재식·윤수정¹·서민호²
서성일²·백원기²·이영선¹
박종욱¹·이성준

접수일자 : 1999년 12월 22일
체택일자 : 2000년 3월 28일

교신저자 : 이성준
계명대학교 의과대학
비뇨기과학교실
대구시 중구 동산동
194 ☎ 700-712
전 화 : 053) 250-7645
e-mail : sjlee@dsmc.
or.kr

표현을 증가시키거나^{2,5} 암관련 항원의 발현을 증가시켜⁶ 암세포에 대한 면역반응을 증가시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 한편, 신세포암 (renal cell carcinoma)은 방사선 치료나 항암화학요법제에 매우 저항성이 높은 암이며, IFN- α , IFN- γ , 또는 interleukin-2 (IL-2)와 같은 면역치료에 진행암의 20% 미만이 반응하는 정도이다.⁷⁻¹⁰ IFN- α 와 IFN- γ 를 함께 사용하므로써 in vitro에서 BALB/c 생쥐의 신세포암 세포주인 Renca (renal cell adenocarcinoma) 세포의 증식을 억제하고 in

vivo에서 Renca 종양의 생성을 억제한 보고가 있으며,¹ Nonomura 등¹¹은 인간 신세포암 세포주인 OUR-10 세포에서 IFN- γ 에 의해 Fas 항원 매개성 apoptosis에 대한 감수성이 증가하는 것으로 보고하였다. 신세포암 세포주인 Renca 및 OUR-10을 비롯하여 결장암,¹² 폴육종,¹³ 백혈병¹⁴ 암세포주 등의 다양한 세포에서 IFN- γ , IFN- α 및 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)의 단독 또는 병합 사용에 의하여 세포사가 유발될 뿐만 아니라, Fas 항원 매개성 apoptosis에 대한 감수성이 높아지는 것으로 알려져 있다.

최근에 난치성 질병의 치료 및 예방을 위한 면역요법 및 DNA 백신요법 연구에 있어서 사이토카인을 많이 활용하고 있다.¹⁵⁻¹⁷ 사이토카인을 사용하는 목적은 주로 암항원이나 병원균에 대한 면역성을 증가시키는 것으로 생각된다. 상기한 보고들¹⁶로 보아 IFN- γ 도 종양의 면역학적 치료 및 유전자치료에 사용될 가능성이 있다고 생각되며, 특히 IFN- γ 유전자의 종양 조직 내의 이입은 암세포에서 MHC 분자 및 암관련 항원의 발현을 증가시킴으로서 항종양 특이면역성을 유발시킬 가능성과, 유발된 특이 면역세포에 의한 암세포의 Fas-매개성 세포사가 증가될 가능성이 있다고 생각된다. 또 IFN- γ 가 직접 세포독성이 있을 시 직접적으로 암성장을 억제시키는 효과를 보일 수 있다. 그러나 너무 강한 직접 세포독성 효과는 오히려 상기한 바와 같은 생체 내에서의 항종양 특이면역성 유발성을 감소시킬 수도 있다고 생각된다. 따라서 IFN- γ 를 항암 면역요법제로 사용하기 위해서는 이 사이토카인의 면역증강 효과에 대한 연구와 더불어 세포독성 기전 및 시간별 작용효과에 대한 충분한 자료가 필요하다고 생각된다. 본 연구에서는 IFN- γ 가 BALB/c 생쥐의 신세포암에서 유래한 Renca 세포주의 부착성, 직접 세포사 및 중식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다음의 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 조건

생쥐의 신세포암에서 유래한 Renca 세포주는 10% FBS와 antibiotic-antimycotic을 함유한 RPMI1640 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C의 조건하에서 유지하고 배양하였으며, Renca 세포의 계대배양에는 0.05% Trypsin-0.2% EDTA를 이용하여 세포를 탈부착시킨 뒤 다시 상기한 배지에 세포를 회석하여 배양하였다. 세포배양에 사용된 상기 시약은 모두 GibcoBRL Co. (NY, USA)에서 구입하였다. Renca 세포에 대한 IFN- γ 의 영향을 알아보기 위하여 IFN- γ (R&D Co., MN, USA)를 25-300 U/ml의 농도로 RPMI1640 배지에 회석하여 1-

8일간 세포를 처리하였다.

2. Renca 세포수 산정

150 U/ml의 IFN- γ 가 함유된 RPMI1640 배지에서 Renca 세포를 배양하면서 2일 간격으로 세포 배양용 접시의 바닥에 부착되어 자라는 세포와 부착되지 못하고 부유하는 세포를 모아 세포수 산정을 실시하였다.

3. BrdU cell proliferation ELISA

IFN- γ 를 처리한 Renca 세포를 대상으로 BrdU cell proliferation ELISA (Boehringer Mannheim Co., Germany)를 실시하였다. Renca 세포를 96-well plate (Coming Co., USA)에 3x10⁴ 및 6x10⁴/well 되도록 분주하고 각각 0, 75, 150, 및 300 U/ml의 IFN- γ 가 함유된 배지에서 48시간 배양한 후 BrdU labeling 용액을 가하여 2시간 동안 반응시켰다. 배지를 제거하고 FixDenat 용액으로 세포를 고정하고 DNA를 denaturation 사킨 후 peroxidase가 결합된 anti-BrdU 항체를 사용하여 DNA 합성과정에 사용된 pyrimidine analogue인 BrdU를 염색하였다. Peroxidase의 기질액인 tetramethylbenzidine 을 가하여 발색시킨 후 반응정지액을 가하고 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. LDH cytotoxicity detection assay

Renca 세포막 손상에 의하여 배지로 분비되는 LDH의 양을 측정하는 LDH cytotoxicity detection assay (Boehringer Mannheim Co., Germany)를 시행하였다. Renca를 96-well plate에 분주하고 각각 0, 25, 50, 및 100 U/ml의 IFN- γ 가 함유된 배지에서 0-120시간 동안 배양하였다. 세포배양 상충액을 새로운 96-well plate로 옮긴 후 assay kit 내에 포함된 diaphorase/NAD+, iodo-tetrazolium chloride 및 sodium lactate가 함유된 혼합액을 가하여 30분간 반응시킨 후 반응정지액을 가하고 490nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 백분율을 측정하기 위하여 각 실험마다 IFN- γ 가 포함되지 않은 배지에서 배양한 low control군과, 2% tritonX-100 (Sigma chemical Co., MO, USA)이 함유된 배지에서 배양한 high control군을 포함시켰다. 세포독성 백분율은 [Abs₄₉₀(실험군)-Abs₄₉₀(low control)]/Abs₄₉₀(high control)-Abs₄₉₀(low control)]의 공식에 의거하여 계산하였다.

5. DNA 분절 형성 검사

Renca 세포에 150 U/ml의 IFN- γ 를 각각 48, 72, 그리고 96시간 동안 처리한 후 배양한 5x10⁵개의 Renca 세포를 1.5ml microtube로 옮긴 후 phosphate-buffered saline (PBS)로 3회 세척하였으며, 원심분리하여 PBS를 제거하고 20μl의 lysis buffer (20mM EDTA, 100mM Tris

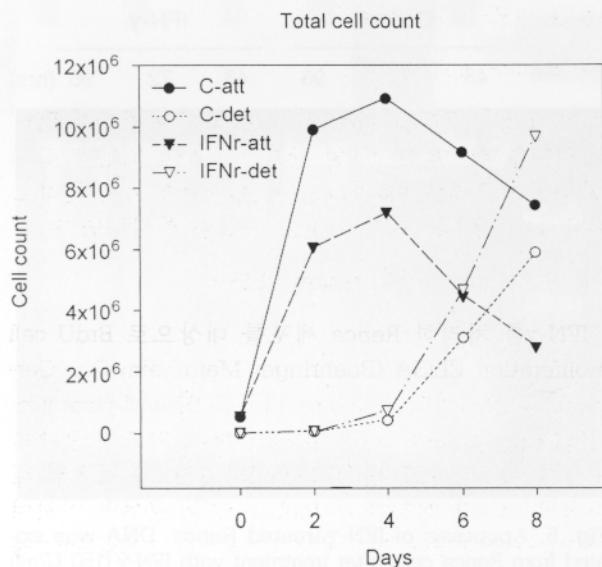


Fig. 1. Effect of IFN- γ on Renca cell count. Renca cells were treated with 150 U/ml of IFN- γ (C, control, untreated Renca; IFN- γ , Renca cells treated with IFN- γ), and attached (●, ▼), or detached (○, ▽) cells from the culture plate were collected and counted every other day for 8 days.

(pH 8.0), 0.8% sodium lauryl sarcosine)를 가하여 세포를 용해시켰다. 여기에 2 μ l의 RNase A (5mg/ml, Boehringer Mannheim Co., Germany)를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시키고, 다시 20 μ l의 proteinase K (10mg/ml, Boehringer Mannheim Co., Germany)를 가하여 50°C에서 일주야 반응시켜 DNA를 분리하였다. DNA 분절 형성 여부는 Renca 세포에서 분리한 DNA를 2% agarose (Promega, WI, USA) gel 상에서 35V로 전기영동 시킨 후 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator 상에서 관찰하였다.

결 과

1. IFN- γ 가 Renca 세포 성장에 미치는 영향

Renca 세포에 대한 IFN- γ 의 직접적인 작용을 알아보기 위하여 Renca 세포를 150 U/ml 농도의 IFN- γ 가 함유된 배지에서 배양하면서 2일 간격으로 배양접시의 바닥에 부착된 세포와 부착되지 않은 세포를 모아서 세포수 산정을 실시하였다. 바닥에 부착된 세포의 경우에는 배양 2일째부터 세포수의 감소가 뚜렷이 나타났으며, 배양 2일, 4일 및 6일째 세포수는 각각 IFN- γ 를 처리하지 않은 군의 61.5%, 66.2% 및 48.9%였다. 배양접시의 바닥에 부착되지 못하고 부유하는 세포의 경우에는 배양 후 4일째까지는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으나, 배양 후기에는 IFN- γ 를 처리한 군에서

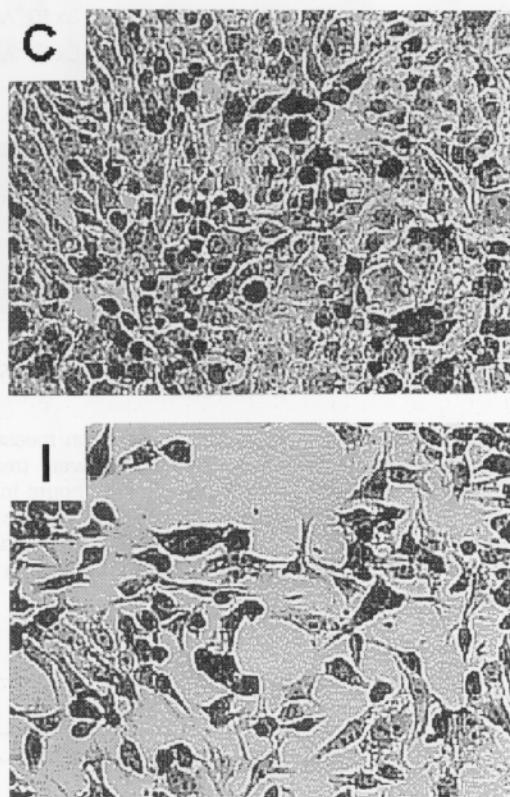


Fig. 2. Hematoxylin and eosin stain of Renca after 96 hours of IFN- γ treatment (C, control, untreated Renca; I, Renca cells treated with IFN- γ). Renca cells were cultured for 96 hours in the presence of 150 U/ml of IFN- γ .

부유한 세포수가 급격하게 증가하였다. 배양 6일 및 8일째 IFN- γ 를 처리한 군에서 부유된 총 세포수는 각각 4.6×10^6 및 9.7×10^6 cell로서 대조군에 비해 150% 및 164.9% 증가하였다 (Fig. 1). 세포수 산정시 세포를 trypan blue dye로 염색하여 세포의 생존 여부를 조사한 결과, 바닥에 부착한 세포의 대부분은 생존한 세포였으며, 부유한 세포는 대부분 죽은 세포임을 알 수 있었다. Fig. 2는 상기한 조건으로 Renca 세포를 4일간 배양한 후 관찰한 결과로서 대조군과 IFN- γ 를 처리한 군에서 세포의 형태적 차이는 없으나 배양접시 바닥에 부착된 세포의 수는 IFN- γ 를 처리한 군에서 현저히 적음을 보이고 있다.

2. IFN- γ 가 Renca 세포의 증식 및 손상에 미치는 영향

IFN- γ 가 Renca 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각 BrdU cell proliferation ELISA를 시행하였다. Microplate well에 6.25×10^4 cell/ml 및 3.125×10^4 cell/ml 농도의 세포부유액을 분주하고 IFN- γ 를 넣어 48시간 동안 배양한 결과, 대조군에서는 흡광도가

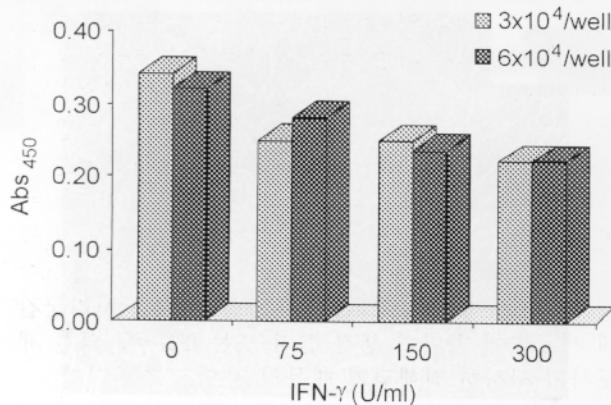


Fig. 3. Effect of IFN- γ on Renca cell proliferation measured by BrdU cell proliferation ELISA. Renca cells were treated with 0, 75, 150, and 300 U/ml of IFN- γ for 48 hours in 96-well plates. After labeling cells with BrdU for 2 hours, incorporated BrdU was detected by anti-BrdU-Peroxidase. Absorbance at 450nm (Abs₄₅₀) was measured using an ELISA reader.

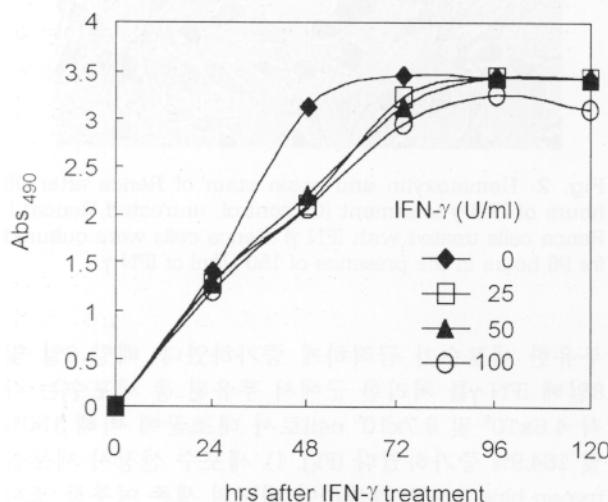


Fig. 4. Effect of IFN- γ on Renca cell death measured by LDH cytotoxicity detection assay. Renca cells were treated with 0, 25, 50, and 100 U/ml of IFN- γ for 0-120 hours. After indicated treatment times, cell-free culture supernatant was transferred to another 96-well plate, and LDH content was measured at 490nm (Abs₄₉₀) after adding tetrazolium, sodium lactate, and diaphorase/NAD⁺ reaction mixture included in the assay kit.¹⁸

0.356-0.37이었으나 75, 150 및 300 U/ml의 IFN- γ 를 처리한 경우 흡광도가 각각 0.317-0.278, 0.274-0.28, 0.259-0.253로 나타나 IFN- γ 농도가 증가함에 따라 Renca 세포의 증식은 비례적으로 억제되었다 (Fig. 3).

IFN- γ 가 세포 손상에 미치는 영향을 알아보기 위해 25-100 U/ml의 IFN- γ 를 Renca 세포에 0-120시간 동안 처리한 후에 Renca 세포에서 분비되는 LDH의 양을

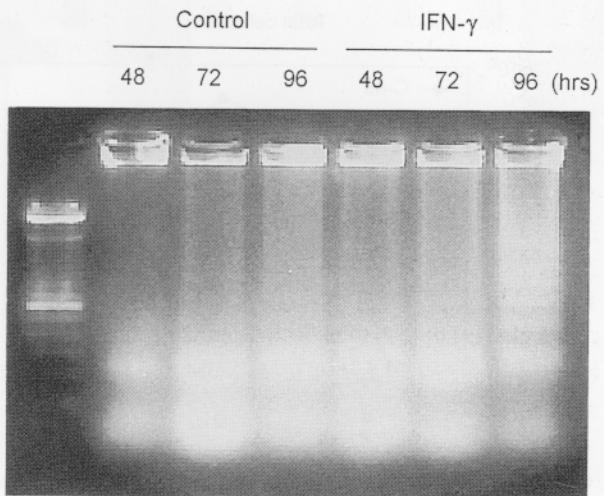


Fig. 5. Apoptosis of IFN- γ -treated Renca. DNA was isolated from Renca cells after treatment with IFN- γ (150 U/ml) for 48, 72, and 96 hours (IFN- γ), or cells untreated (Control). DNA fragmentation indicative of apoptosis was assessed after electrophoresis through 2% agarose gel.

LDH cytotoxicity detection assay 측정한 결과 IFN- γ 을 처리한 군과 처리하지 않은 군에서 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4).

3. IFN- γ 가 Renca 세포의 apoptosis에 미치는 영향

배양 후 6일째부터 나타나는 부유세포수의 증가가 Renca 세포의 apoptosis와 관련이 있는지를 알아보기 위하여 DNA 분절 형성 검사를 실시하였다 (Fig. 5). IFN- γ 를 처리하지 않은 군에서는 배양 후 96시간째 희미하게 DNA 분절이 관찰되었으며, IFN- γ 를 처리한 군에서는 72시간째부터 DNA 분절 형성이 시작되어 96시간째에는 뚜렷한 DNA 분절 형성을 관찰할 수 있었다.

고 찰

BALB/c 생쥐의 신세포암에서 유래한 Renca 세포주를 이용하여 IFN- γ 의 항암작용에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. BALB/c 생쥐 모델에서 IL-2 및 IL-12,¹⁸ FAA (flavone acetic acid)와 IL-2,¹⁹ IFN- α 와 IFN- γ ,¹ 또는 IL-12 단독으로²⁰ in vitro 또는 in vivo Renca를 억제할 수 있음이 증명되었고, IFN- γ 는 특히 IL-12 또는 FAA 등이 수행하는 항암작용을 매개하는 필수 물질의 하나로 간주되고 있다.^{1,21,22}

IFN- γ 나 IL-12 등의 사이토카인을 이용한 항암요법은 암에 대한 면역방어 능력의 복구가 주목적이다. 최근에는 항원 유전자를 이용한 DNA 백신요법이 개발

되고 있으며, 이런 연구에서 특이면역성을 증가시키는 보조요법으로서 사이토카인 유전자를 함께 전달시키는 연구가 많이 진행되고 있다. 사이토카인 유전자를 암세포에 전달하면 이 세포는 사이토카인을 스스로 만들어 면역계를 활성화 시키게 된다. 그러나 생산되는 cytokine이 자체 독성이 강하면 이 물질을 만드는 세포, 즉 사이토카인 플라스미드를 전달받은 세포는 면역계를 활성시키는 기능을 나타내기 전에 죽음으로서 기대하는 효과를 나타낼 수 없게 될 수 있다. 따라서 사이토카인의 세포독성에 대한 기전 연구는 이들을 항암면역요법제로 사용하기 위한 기초연구로서 중요하다.

본 연구에서는 BALB/c 생쥐의 신세포암 세포주인 Renca 세포를 대상으로 IFN- γ 의 직접 항암작용을 조사하였다. 먼저 IFN- γ 를 Renca 세포에 처리한 후 세포수를 측정한 연구에서 IFN- γ 를 처리한 경우에 있어서 배양 2일 및 4일째 세포 배양접시의 바닥에 부착된 세포의 수가 대조군에 비하여 훨씬 감소되었으나 배지에 부유된 세포수는 두 군간에 큰차이가 없는 것을 보아 배양 후 첫 4일간은 배지 내 영양분 등 세포 성장 환경은 양호하다고 생각되며, 이 시기에 IFN- γ 는 Renca 세포에 작용하여 초기에 세포의 증식을 억제한 것으로 생각된다. 이러한 결과는 Renca cell을 여러 농도의 IFN- γ 로 처리한 후 48시간까지 세포증식성을 분석한 BrdU cell proliferation ELISA 결과와 일치하였다.

배양 후 6-8일째에는 대조군 및 IFN- γ 처리군에서 배지에 부유되는 세포가 증가하여 배양 환경이 나빠지고 있음을 알 수 있다. 그러나 IFN- γ 를 처리한 군에 비해 대조군의 부착 세포 밀도가 높아 배지 영양분의 소모가 더 많음에도 불구하고 배지에 부유된 세포수는 대조군에 비해 IFN- γ 를 처리한 군이 더 많았다. 세포가 부유되는 원인은 세포가 죽었거나 또는 IFN- γ 처리에 의해 세포의 부착성이 감소되었기 때문일 수 있으나, trypan blue 염색소견에서 부유된 세포가 모두 염색되는 것으로 보아 세포 부착성 변화 보다는 IFN- γ 를 처리한 군에서 대조군에 비해 세포사가 더 빨리 진행되는 것으로 생각된다.

IFN- γ 를 처리한 경우에 배양 6일째부터 부유세포수가 증가하는 현상으로 보아 IFN- γ 가 Renca 세포에 대하여 직접적인 세포독성 작용을 나타낼 것으로 예측되어, 이러한 세포독성을 LDH assay와 DNA 분절 형성 검사를 실시하였다. LDH assay에서는 대조군과 IFN- γ 처리군간의 LDH 분비량에는 큰 차이가 없었으나, DNA 분절 형성 검사에서는 IFN- γ 처리에 의하여 Renca 세포에서 DNA 분절화가 진행되고 있음을 확인되었다. 이러한 사실은 IFN- γ 가 Fas 항원을 매개치 않고도 직접적으로 세포사를 유발할 수 있음을 나타낸다. 암세포의 Fas와 암을 인식하는 면역세포가 발

현하는 Fas ligand의 상호작용에 의한 세포사, 암세포의 암항원제시에 의한 특이 면역세포의 활성화와 암 인식기능의 복구 등을 항암기전으로서 매우 중요하나, IFN- γ 는 면역계 활성화 유발에 앞서 암세포에 직접 세포독성을 나타냄으로서 면역계에 의한 항암작용은 오히려 억제시킬 가능성이 있다고 생각된다. LDH assay에서 대조군과 IFN- γ 를 처리한 군에서 LDH 분비가 크게 차이나지 않은 원인은 IFN- γ 에 의하여 세포증식이 억제되어 축소하는 well에서 대조군과 IFN- γ 처리군간에 세포수에 차이가 생긴 결과 또는 IFN- γ 에 의한 세포사가 서서히 진행되기 때문인 것으로 추정된다.

현재까지 진행성 또는 전이성 신세포암을 치료하기 위하여 IFN- α 또는 IFN- γ 단독, IFN- α + IFN- γ , IFN- α + IL-2 등^{9,23-28} 여러 종류의 면역치료가 시도되어 왔으나, 치료법의 종류에 따라 20% 전후의 response rate를 나타낼 뿐 실제로 신세포암의 치료에 효과적인 치료법은 아직 없는 실정이다. 그러나 IFN- γ 는 MHC의 발현 증가,⁵ 암항원 발현증가² 및 T 세포 매개성 면역반응의 증가를 유발할 수 있는 사이토카인으로서 암치료에 활용가능성이 높다고 생각된다. IFN- γ 를 암치료에 사용하는 목적은 주로 항암면역성을 증가시키는 것이다. Sayers 등¹은 IFN- α 와 소량의 IFN- γ 를 함께 사용함으로써 Renca 세포의 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 것으로 보고하였는데, 이것은 IFN- α (100-1000 U/ml) 또는 IFN- γ (1-10 U/ml) 자체의 항증식 효과보다 훨씬 증가된 것으로 IFN- α 와 IFN- γ 간에 synergistic 효과가 있음을 제시하고 있으며, 실제로 이러한 효과가 athymic 생쥐에서는 유도되지 않고, euthymic 생쥐에서만 관찰되는 것으로 보아 IFN- γ 가 T-림프구 매개성 면역반응을 자극할 것으로 생각하였다. 본 실험에서는 이보다 과량의 IFN- γ 를 사용하였을 때 배양 초기에는 암세포의 증식 억제 효과를 보이며, 배양 후기에는 Fas 회로를 거치지 않고 직접적으로 apoptosis를 유발하였다. 이러한 결과는 과량의 IFN- γ 의 사용은 항암면역성의 증가보다는 독성작용이 강할 수 있음을 나타낸다. Sin 등¹⁶은 IFN- γ 를 유발하는 IL-12 plasmid를 DNA 백신과 같이 투여할 시 마우스 당 40 μ g 보다는 20 μ g의 IL-12 plasmid를 투여했을 시 DNA 백신에 대한 효과가 현저히 증가하였음을 보고하였다. 따라서 Sayers 등,¹ Sin 등¹⁶ 및 본 실험의 결과로 볼 때 항암면역성 증대를 위해 IFN- γ 단백질을 사용할 경우 투여량에 대한 적절한 조절이 필요하며, IFN- γ 유전자나 IFN- γ 유도성 유전자를 체내에 전달하는 경우 세포 내에서 과량의 IFN- γ 가 생산되는 것을 조절 또는 통제할 필요가 있다고 생각한다.

결 론

IFN- γ 가 Renca 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시험관 내에서 배양한 Renca 세포에 IFN- γ 를 처리하여 세포수 산정을 시행한 결과 대조군에 비하여 배양 초기에는 세포수의 증가가 적으며, 배양 후 기에는 배지에 부유되며 trypan blue에 염색되는 세포수가 많아졌다. BrdU cell proliferation ELISA 검사에서 도 IFN- γ 를 처리한 군의 세포증식이 대조군에 비해 감소함을 나타내었다. IFN- γ 가 세포사를 유발하는가를 알아보기 위해 LDH cytotoxicity detection assay를 실시한 결과 IFN- γ 처리군과 대조군간에 배지에 방출된 LDH량은 큰 차이가 없었으나, DNA 분절 형성 검사에서는 IFN- γ 처리 후 96시간 때에 뚜렷한 DNA 분절이 나타남을 관찰하였다.

결론적으로 고농도의 IFN- γ 는 Renca 세포에 대하여 초기에는 항증식 효과를 가지며, 후기에는 apoptosis 유도를 통한 세포사를 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 이상의 결과로 보아 향후 IFN- γ 를 이용한 면역요법 또는 유전자 요법 연구에 있어서 IFN- γ 의 사용량을 조절함으로서 직접 세포독성을 줄이고 면역보강기능은 증가시키는 방안이 고려되어야 한다고 생각한다.

REFERENCES

- Sayers TJ, Wiltzout TA, McCormick K, Husted C, Wiltrout RH. Antitumor effects of α -interferon and γ -interferon on a murine renal cancer (Renca) in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1990; 50: 5414-20.
- Hillman GG, Puri RK, Kukuruga MA, Pontes JE, Haes GP. Growth and major histocompatibility antigen expression regulation by IL-4, interferon-gamma (IFN-gamma) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) on human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 476-83.
- Hall S, Hsieh TC, Ng CY, Mallouh C, Wu JM. Control of renal carcinoma TC-1 growth, cyclin/kinase and nm 23 expression by IFN-gamma and TGF-beta. *Anticancer Res* 1996; 16: 1755-8.
- Knupfer MM, Poppenborg H, Van Gool S, Domula M, Wolff JE. Interferon-gamma inhibits proliferation and adhesion of T98G human malignant glioma cells in vitro. *Klin Padiatr* 1997; 209: 271-4.
- Weber JS, Rosenberg SA. Modulation of murine tumor major histocompatibility antigen by cytokines in vivo and in vitro. *Cancer Res* 1988; 48: 5818-24.
- Greiner JW, Guadagni F, Noguchi P, Pestka S, Colcher D, Fisher PB, et al. Recombinant interferon enhances monoclonal antibody-targeting of carcinoma lesions in vivo. *Science* 1987; 235: 895-8.
- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Cheng AE, Avis FP, Leitman S, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987; 316: 889-97.
- Itoh K, Platsoucas CD, Balch CM. Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. Activation by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor. *J Exp Med* 1988; 168: 1419-41.
- Swanson DA, Quesada JR. Interferon therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Semin Surg Oncol* 1988; 4: 174-7.
- Gitlitz BJ, Belldegrun A, Figlin RA. Immunotherapy and gene therapy. *Semin Urol Oncol* 1996; 14: 237-43.
- Nonomura N, Miki T, Yokoyama M, Imazu T, Takada T, Takeuchi S, et al. Fas/APO-1-mediated apoptosis of human renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 945-51.
- von Reyher U, Strater J, Kittstein W, Gschwendt M, Krammer PH, Moller P. Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1998; 58: 526-34.
- Fellenberg J, Mau H, Scheuerpflug C, Ewerbeck V, Debatin KM. Modulation of resistance to anti-APO-1-induced apoptosis in osteosarcoma cells by cytokines. *Int J Cancer* 1997; 72: 536-42.
- Tamura T, Ueda S, Yoshida M, Matsuzaki M, Mohri H, Okubo T. Interferon-gamma induces ICE gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 21-6.
- Sin JI, Kim JJ, Arnold RL, Shroff KE, McCallus D, Pachuk C, McElhiney SP, Wolf MW, Pompa-de Bruin SJ, Higgins TJ, Ciccarelli RB, Weiner DB. IL-12 gene as a DNA vaccine adjuvant in a herpes mouse model: IL-12 enhances Th1-type CD4+ T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus-2 challenge. *J Immunol* 1999; 162: 2912-21.
- Kim JJ, Simbiri KA, Sin JI, Dang K, Oh J, Dentchev T, Lee D, Nottingham LK, Chalian AA, McCallus D, Ciccarelli R, Agadjanyan MG, Weiner DB. Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV. *J Interferon*

- Cytokine Res 1999; 19: 77-84.
- 17. Sin JI, Kim JJ, Ugen KE, Ciccarelli RB, Higgins TJ, Weiner DB. Enhancement of protective humoral (Th2) and cell-mediated (Th1) immune responses against herpes simplex virus-2 through co-delivery of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression cassettes. Eur J Immunol 1998; 28: 3530-40.
 - 18. Wigginton JM, Kornschlies KL, Back TC, Franco JL, Brunda MJ, Wiltzout RH. Administration of interleukin 12 with pulse interleukin 2 and the rapid and complete eradication of murine renal carcinoma. J Natl Cancer Inst 1996; 88: 38-43.
 - 19. Hornung RL, Back TC, Zaharko DS, Urba WJ, Longo DL, Wiltzout RH. Augmentation of natural killer activity, induction of IFN and development of tumor immunity during the successful treatment of established murine renal cancer using flavone acetic acid and IL-2. J Immunol 1988; 141: 3671-9.
 - 20. Brunda MJ, Luistro L, Warrier RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, et al. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. J Exp Med 1993; 178: 1223-30.
 - 21. Tannenbaum CS, Wicker N, Armstrong D, Tubbs R, Finke J, Bukowsky RM, et al. Cytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL-12. J Immunol 1996; 156: 693-9.
 - 22. Brunda MJ, Luistro L, Hendrzak JA, Fountoulakis M, Garotta G, Gately MK. Role of interferon-gamma in mediating the antitumor efficacy of interleukin-12. J Immunother Emphasis Tumor Immunol 1995; 17: 71-7.
 - 23. De Mulder PH, Oosterhof G, Bouffioux C, van Oosterom AT, Vermeylen K, Sylvester R. EORTC (30885) randomised phase III study with recombinant interferon alpha and recombinant interferon alpha and gamma in patients with advanced renal cell carcinoma. The EORTC Genitourinary Group. Br J Cancer 1995; 71: 371-5.
 - 24. Naito S, Yasumasu T, Kumazawa J, Hiratsuka Y, Sakamoto K, Iguchi A, et al. Treatment of advanced renal cell carcinoma with a combination of interferon alpha and gamma. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 1995; 86: 1346-52.
 - 25. Canobbio L, Miglietta L, Boccardo F. Medical treatment of advanced renal cell carcinoma: present options and future directions. Cancer Treat Rev 1996; 22: 85-104.
 - 26. Lummen G, Goepel M, Molhoff S, Hinke A, Otto T, Rubben H. Phase II study of interferon-gamma versus interleukin-2 and interferon-alpha 2b in metastatic renal cell carcinoma. J Urol 1996; 155: 455-8.