

Macrophage Inflammatory Protein 1 α 가 T 세포성장 및 CD4, CD8 발현에 미치는 영향

전북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

최종선 · 김오환

EFFECTS OF MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEIN-1 α ON THE T CELL PROLIFERATION AND THE EXPRESSION OF CD4 AND CD8

Jong-Sun Choi, D. D. S., M. S. D., Oh-Whan Kim, D. D. S., M. S. D., Ph. D.

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry
Chonbuk National University*

Macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α is a cytokine which produces wide range of bioactivities such as proinflammatory, immunomodulatory, and hematopoietic modulatory actions. To determine whether MIP-1 α acts as a negative regulator on the functions of lymphocyte, [3 H]-thymidine incorporation test and flow cytometric analysis were performed by using human tonsil T cell, human peripheral blood T cell, and murine cytolytic T lymphocyte (CTL) line CTLL-2. The results were as follow.

- 1. When human tonsil T lymphocytes were stimulated with anti-CD3 monoclonal antibody (mAb), rate of T cell proliferation was about four times increased. 200ng/ml of MIP-1 α inhibited anti-CD3 mAb-mediated T cell growth as much as 60% ($P < 0.05$).*
- 2. The suppression of human peripheral T cell proliferation produced by MIP-1 α was dramatic, but variable among T cells derived from different individuals (40% ~ 90%).*
- 3. MIP-1 α inhibited the proliferation of murine CTL line CTLL-2 as much as 75% ($P < 0.001$).*
- 4. When the MIP-1 α was added to human peripheral T cell, cell proportion of CD4 $^+$ helper T cell and CD8 $^+$ CTL were not noticeably affected. The expression level of CD4, not of CD8, however, was down regulated by MIP-1 α treatment (27% ~ 82%).*

I. 서 론

감염, 혹은 이물질에 대한 생체방어는, 다양한 종류의 면역세포들과 이들이 분비하는 cytokine 이라고 불리는 단백질 hormone들의 communication에 의하여 복합하게 조절된다.

다발손상이나 화상시 cytokine들은 다른 염증 매개체들과 함께 국소 및 전신적 염증반응을 초래한다. 화상이나 손상 그 자체가 각종 염증매개체를 유도하여 염증세포를 생성시키며, 감염은 염증반응을 과도하게 증폭시킨다. 따라서 손상 및 이에 관련된 cytokine등 매개체의

기전을 밝혀 임상적으로 응용하기 위하여서는 분자생물학적 수준에서 이들의 기능을 이해하는 것이 필수적이다.

Cytokine은 일반적으로 다음과 같은 공통적 특징을 갖는것으로 알려져 있다. 첫째, cytokine은 면역의 effector과정에서 생산되어 면역 및 염증반응을 매개, 조절하며, 둘째, cytokine 분비는 단기간 동안 자기제어적 사건(self-limited event)으로서 이루어지고, 셋째, 각 cytokine은 다양한 세포형에서 생산될 뿐아니라, 넷째, 많은 종류의 세포들에 작용을 나타내는 이른바 pleiotropism현상을 나타낸다. 다섯째, 한 cytokine이 지니는 기능은 다른 여러 종류의 cytokine들에 의해서도 공통적으로 나타나는 경우가 허다하며(redundancy), 여섯째, 한 cytokine은 다른 cytokine의 합성에도 영향을 미쳐 면역 및 염증 반응의 positive 또는 negative regulation을 유발하기도 한다. 일곱째, cytokine은 다른 cytokine의 작용에 영향을 미쳐 길항하거나 상승작용(synergy), 혹은 첨가효과(additive effect)를 나타내기도하며, 여덟째, 표적세포의 표면 수용체에 결합하여 작용을 나타내며, 그중 여러 표적세포에 대하여는 세포분열을 조절하는 기능을 나타내기도 한다 (Abbas 등, 1991).

이러한 cytokine에 관한 연구가 본격적으로 이루어지기 시작한 것은 1980년대 이후 분자생물학적 발달에 힘입어, 각 cytokine분자의 expression과 cloning 및 이들 cytokine의 작용을 중화(neutralize)시키는 특이적인 monoclonal antibody(mAb)의 생산이 가능하게되면서 부터이다. 이에 따라 많은 종류의 cytokine들이 새로이 밝혀지게 되었고, 그중의 하나로서, 대식세포와 T 임파구에서 자극에 의하여 발현이 유도되는 macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α (Kwon과 Weissman, 1989; Wolpe 등, 1987)가 최근에 molecular cloning되어, 숙주 방어기전에서의 역할에 대한 연구가 활발히 시작되었다.

MIP-1 α 의 알려진 생물학적 활성으로는 native doublet MIP-1의 국소적 염증유도 작용 (Davatelis 등, 1988; Sherry 등, 1988; Wo-

lpe 등, 1987), 발열작용(Davatelis 등, 1989), neutrophil에 대한 화학주성작용(Wolpe 등, 1987)과 같은 기염증성(proinflammatory) 작용외에도 조혈기능 조절작용이 있다(Broxmeyer 등, 1990; Broxmeyer 등, 1989). 한편 recombinant(r) MIP-1 α 는 stem cell의 성장을 억제한다고 Broxmeyer 등(1990), 및 Graham 등(1990)은 보고하여, 항암제의 세포독성을 감소시켜 줄수있는 보조약물로서 MIP-1 α 는 대식세포를 활성화 시키며 (Fahey 등, 1992), CD8⁺ T 임파구에 화학주성을 나타내고 (Taub 등, 1993), 비장 T 임파구의 성장을 억제하며 (Zhou 등, 1993), cytolytic T lymphocyte (CTL) line인 CTLL-R8 세포 성장 속도를 늦추는 작용(Oh 등, 1991)이 있는것으로 보고 되어, 다양한 면역세포 line들에 MIP-1 α 수용체가 존재한다는것이 밝혀져 (Oh 등, 1993), MIP-1 α 가 이세포들에 활성을 나타냄을 시사하였다.

이러한 면역 조절기능중에서 MIP-1 α 의 T 임파구에 대한 억제능은, transforming growth factor(TGF)- β , interleukin-10(IL-10)등과 더불어 MIP-1 α 가 또 하나의 면역억제 cytokine 일지도 모른다는 가능성을 제시하는것으로서 매우 흥미로운 사실이다(Ding과 Shevach, 1992; Taga와 Tosato, 1992; Roszman 등, 1991; Laiho 등, 1990; Kehrl 등, 1986). 본 논문에서는 사람의 말초혈액 및 편도선에서 얻은 T 임파구와 CTL line을 이용하여, 이들 세포의 활성화에 의하여 유발된 성장에 대하여 MIP-1 α 가 미치는 영향을 관찰 하였으며, 항원 감지에 중요한 역할을 하는것으로 알려진 T 임파구 표면항원인 CD4와 CD8 분자의 발현에 대한 작용도 아울러 관찰함으로써, MIP-1 α 가 생체내에서 T 임파구 기능의 down regulator로서 작용하리라는 추론에 대하여 과학적 근거를 얻었기에 여기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포배양

Murine CTL line인 CTLL-2는 fetal calf se-

rum(FCS) 10%, penicillin 100u/ml, streptomycin 100µg/ml 및 IL-2 100u/ml이 포함된 RPMI 1640 media(Gibco)에서, 5% CO₂, 100% 습도의 조건으로 37°C 온도에서 배양 하였다.

2. 말초혈액 T 임파구 분리 및 편도선 T 임파구 분리

건강한 치과대학 2학년 남학생으로부터 20 ml의 말초혈액을 채취하여 heparin이 도포된 시험관에 담아 천천히 섞어 주었다. 50ml conical tube에 Histopaque 1077(Sigma) 20ml을 담고, 채취한 혈액을 이 위에 올려놓은 후, 실온에서 2000rpm으로 1시간 원심분리하여 Histopaque와 그 바로위의 임파구 층을 취하였다. 여기에 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)을 50ml tube 가득차도록 혼합하고, 800rpm으로 원심분리하여 Histopaque를 제거한 임파구를 얻었다. 800rpm으로 원심분리하여 Histopaque를 제거한 임파구를 얻었다. FCS 10%가 포함된 RPMI 1640을 cell수 $4-6 \times 10^6$ /ml 되게 cell pellet에 넣어 희석시켰다. 2% aminoethylisothiuronium bromide(Sigma)로 처리된 sheep RBC를 임파구와 동일 부피로 혼합하여, 37°C로 15분간 incubation함으로써, T 임파구만 rosette를 형성시키고 800 rpm으로 5분간 원침시켜 세포를 얼음속에 1시간 놓아두었다. pellet을 재부유시킨후 Histopaque 15ml위에 부유물 20ml을 조심스럽게 올려놓고, 실온에서 30분간 200rpm으로 원심분리하여 맨 밑의 red pellet을 취하였다. NH₄Cl Tris-buffer용액과 함께 20분간 37°C로 반응시켜 적혈구를 용해시킨다음, Hank's balanced salt solution (HBSS)을 tube 가득 첨가하여 2000 rpm으로 8분간 원심분리 하였다. HBSS로 세포를 1회 더 세척한후 RPMI 1640 10ml으로 cell pellet을 부유시킨 다음, 세포수를 측정하였다. 편도선 T 임파구는 편도선 절제시술시에 적출된 시료를 forcep을 이용하여 단일세포로 분리한 다음, 위와 동일한 방법으로 T 임파구를 분리하였다.

3. Anti-CD3 Monoclonal Antibody(mAb)에 의한 T 임파구 자극

Anti-CD3 mAb를 생산하는 clone 145-2C11 (Leo 등, 1987) 배양상청액은 Dr. E. C. Snow로부터 공여 받았다. 145-2C11 배양상청액을 microwell plate에 깔고 37°C에서 3시간 반응시켜, microwell plate 바닥에 anti-CD3 mAb를 immobilize 시켰다. Plate를 DPBS로 2회 세척한 후 사람의 T 임파구를 well당 $1-2 \times 10^5$ cell씩 첨가하여 24시간 배양하였다. MIP-1α 처리를 필요로 하는 군에서는, anti-CD3 mAb 자극 30분 전부터 MIP-1α 20, 혹은 200ng/ml을 첨가하여 반응시킨후에 anti-CD3 mAb 자극을 시작하였다. CTLL-2 cell line의 경우는 IL-2 첨가만으로 빠른 성장을 하므로, anti-CD3 mAb처리없이 200ng/ml MIP-1α 처리만 16시간 시행하였다.

4. [³H]-Thymidine Incorporation Test

Anti-CD3 mAb로 자극한, 혹은 자극하지 않은 실험대상자의 편도선 T 임파구, 혹은 말초혈액 T 임파구와 CTLL-2 cell은 정해진 기간 동안의 배양후, 1µCi/well의 [³H]-thymidine을 첨가하여 8시간 label 시켰다. 반응이 끝난 세포는 cell harvester로 harvest 한후, 세포내로 편입(incorporation)된 [³H]-thymidine의 양을 liquid scintillation counter로 측정하였다. 모든 실험은 triplicate로 시행하였다.

5. Flow Cytometric Analysis

사람 T 임파구의 subset을 측정하기 위하여 2가지 종류의 monoclonal antibody(mAb)로 염색하였다. 즉, fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD4 mAb는 CD4 분자와 결합하므로 helper/inducer T 임파구를 identify 하기 위하여 사용하였고, phycoerythrin(PE)-labeled anti-CD8 mAb는 CD8 분자와 결합하므로 suppressor/cytotoxic T 임파구를 identify 하기 위하여 사용하였다. 사용한 형광표지 mAb는 Becton Dickinson사 제품인 Simultest CD4/CD8이었다. 염색된 T 임파구는 FACS (Becton Dickinson)으로 분석하였다.

III. 성 적

사람의 편도선에서 취한 T 임파구의 성장속도는 anti-CD3 mAb로 자극을 가했을 경우, T 임파구내로 편입되어 들어간 방사능(tritium)의 양이 405 ± 158 에서 $1,608 \pm 353$ cpm으로 약 4배가량 증가하였으며, 200ng/ml의 MIP-1 α 를 투여함으로써 세포내로 편입된 방사능은 625 ± 67 cpm으로 다시 감소하여 통계적으로 유의한 차이를 보였고, 이것은 약 60%의 성장 억제 효과에 해당하였다(Table 1).

Table 2와 Fig. 1은 3명의 서로 다른 실험대상자로부터 얻은 말초혈액 T 임파구의 성장속도에 대한 MIP-1 α 의 작용을 관찰한 것으로서, MIP-1 α 의 용량 20ng/ml 투여시 200ng/ml과 거의 유사한 성장 억제 효과를 보였다. 또한

anti-CD3 mAb 자극에 의한 T 임파구 성장속도는 실험대상자마다 $1,094 \pm 145$, $1,237 \pm 218$, 307 ± 60 cpm등으로 매우 상이하였고, MIP-1 α 투여에 의한 성장억제도 40% (subject III)에서부터 90% 이상인(subject II)까지 그 정도가 서로 크게 상이하였다. 하지만 모든 실험대상자에서 MIP-1 α 를 투여한 경우와 투여하지 않은 경우의 차이는 통계적으로 유의한 수준이었으며, 특히 anti-CD3 mAb로 자극한 경우에는 실험대상자 3명 모두 $P < 0.001$ 의 높은 유의수준으로 MIP-1 α 의 성장억제 효과가 관찰되었다(Table 2).

Table 3는 murine CTL line인 CTLL-2의 성장속도에 대한 MIP-1 α 의 작용을 나타낸 것으로서, MIP-1 α 투여시 세포내 방사능 편입량이 $12,225 \pm 298$ 에서 $3,146 \pm 981$ cpm으로 감

Table 1. Inhibition of anti-CD3 mAb-mediated proliferation of human tonsil T cell by MIP-1 α

Anti-CD3 mAb treatment	MIP-1 α	[³ H]-thymidine incorporated(cpm)	P value
-	-	405 ± 158]]]
+	-	$1,608 \pm 353$	
+	200ng/ml	625 ± 67	

Data represent the mean \pm one SD of three independent tests.

Table 2. Inhibition of anti-CD3 mAb-mediated proliferation of human peripheral T cell by MIP-1 α

Subject	Anti-CD3 mAb Treatment	MIP-1 α	[³ H]-Thymidine incorporated(cpm)	P Value
I ⁺	+	-	$1,094 \pm 145$]]]
	+	200ng/ml	515 ± 100	
II ⁺⁺	-	-	964 ± 164]]]
	-	20ng/ml	169 ± 149	
	-	200ng/ml	174 ± 19	
	+	-	$1,237 \pm 218$]]]
	+	20ng/ml	122 ± 11	
	+	200ng/ml	90 ± 49	
III ⁺	+	-	307 ± 60]]]
	+	200ng/ml	118 ± 31	

Data represent the mean \pm one SD of six⁺ or three⁺⁺ independent

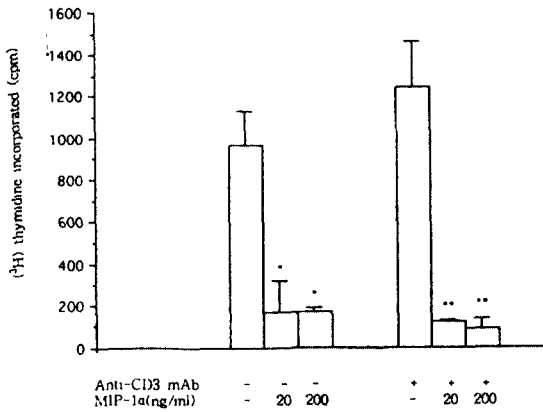


Fig 1. MIP-1 α -induced inhibition of proliferation of human peripheral T cell with or without anti-CD3 mAb treatment

* P<0.05
** P<0.001

Table 3. Inhibition of proliferation of cytolytic T cell line CTLL-2 by MIP-1 α

MIP-1 α	[³ H]-thymidine incorporated(cpm)	P value
-	12,225 \pm 298	<0.001
200ng/ml	3,146 \pm 981	

Data represent the mean \pm one SD of three independent tests.

소하여 약 75% 가량의 성장억제효과를 보였으며, 그 차이의 통계적 유의성은 매우 높았다 (P<0.001).

Fig. 2는 사람의 말초혈액 T 림파구에 fluorescence-labeled anti-CD4와 CD8으로 염색하여 two-color flow cytometric analysis한 대표적 histogram으로 Table 5의 subject II의 결과와

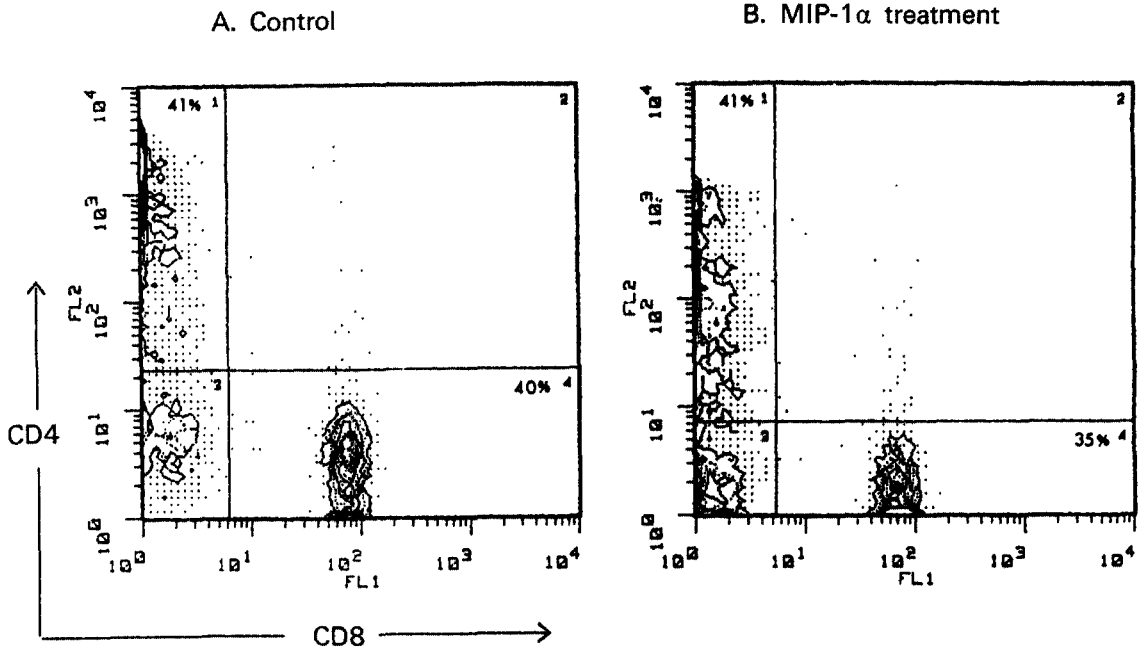


Fig 2. Two-color flow cytometric analysis showing the CD4, CD8 phenotype of human peripheral T cell.

1. CD4⁺CD8⁻, 2. CD4⁺CD8⁺, 3. CD4⁻CD8⁻, 4. CD4⁻CD8⁺

Mean fluorescence intensity (MFI) of CD4⁺CD8⁻ T cell subset of control and MIP-1 α -treated sample are 1,221 and 327, respectively. MFI of CD4⁻CD8⁺ T cell subset of control and MIP-1 α -treated sample are 78 and 71, respectively. The percentages in the corner of each histogram represent the proportion of cells that labeled above background levels.

Table 4. Effect of MIP-1 α on the T cell subset proportion of human peripheral T cell

Subject	MIP-1 α treatment	T cell subset proportion (Per cent)			
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁻
I	-	10.28	0.66	54.38	34.68
	+	9.16	0.80	57.36	32.68
II	-	18.16	0.58	40.94	40.32
	+	23.38	0.84	40.92	34.86
III	-	19.19	2.77	37.48	40.56
	+	13.07	2.48	40.53	43.92

Table 5. Flow cytometric analysis of CD4 or CD8 expression in human peripheral T cell

Subject	MIP-1 α treatment	CD4 ⁺ CD8 ⁻		CD4 ⁺ CD8 ⁺	
		MFI	% Control	MFI ^a	% Control ^b
I	-	1,142	-	68	-
	+	939	82.2	62	91.2
II	-	1,221	-	78	-
	+	327	26.8	71	91.0
III	-	1,094	-	59	-
	+	861	78.7	62	105.1

^aMFI : mean fluorescence intensity.

^bControl : $\frac{\text{MFI of MIP-1}\alpha\text{-treated sample}}{\text{MFI of untreated sample}} \times 100$

동일한 것이다. MIP-1 α 를 투여한 경우와 그렇지 않은 경우, CD4⁺CD8⁻ T cell subset은 각각 41, 41%, CD4⁺CD8⁺ T cell subset은 각각 40, 35%로서 별 차이가 없었다. 이러한 결과는 Table 4의 실험대상자 3명 모두의 경우에서 보듯이, 거의 비슷한 양상을 띄며 나머지 subset인 CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺ T 세포도 MIP-1 α 의 투여로 인하여 전체 비율의 변화가 거의 없었다. 그러나 세포당 anti-CD4, 또는 anti-CD8으로 염색된 정도를 나타내는 지수인 mean fluorescence intensity(MFI)를 비교한 결과를 Table 5에서 보면, CD4⁺CD8⁻ T cell subset의 경우, MIP-1 α 의 투여로 인하여 대조군의 82.2, 26.8, 78.87%로 각각 감소하였다. 역시 Fig. 2에서 CD4⁺CD8⁻ T cell subset을 나타내는 panel 1을 보면, Y축 높이로서 표시

되는 fluorescence의 정도가, MIP-1 α 투여시 현저히 낮아진 것이 관찰되었다. 반면에 CD4⁺CD8⁺ T cell subset은 MIP-1 α 투여로 뚜렷한 변화를 나타내지 않았다(Fig. 2의 panel 4, Table 5).

IV. 고 찰

본 논문의 결과에 의하면, 비장, 임파절과 함께 중요한 임파양 기관(lymphoid organ)의 하나인 편도선의 T 세포와 말초혈액 T 세포, 및 CTL line 모두에 대하여 공통적으로 MIP-1 α 는 뚜렷한 성장억제효과를 나타내었다. 이러한 결과는 비장 T 세포(Zhou 등, 1993)와 또다른 CTL line인 CTLL-R8(Oh 등, 1991)에서 MIP-1 α 가 억제효과를 나타냈던 다른 결

과와 일치하는 것으로서, source 및 기능과 무관하게 대부분의 T 임파구의 성장을 공통적으로 억제하는 것으로 추측된다. 이러한 T 임파구 성장 억제작용은, 부분적으로는, MIP-1 α 가 IL-2의 생산을 억제함으로써 유발된다고 Zhou 등 (1993)은 보고하였으며, IL-2 mRNA 수준과 IL-2 생산량을 MIP-1 α 가 80%까지 억제한다고 하였다. 최근에 Taga와 Tosato (1992)는 IL-10의 T 임파구 억제작용과 함께, 이 cytokine이 IL-2의 생산도 동시에 억제시킨다는 사실을 보고하였으며, 잘 알려진 T 임파구 억제성 cytokine인 TGF- β (Kehrl 등, 1986) 역시, IL-2 생산, 및 고친화성 IL-2 수용체 형성을 억제하는 것으로 보고되었다 (Roszman 등, 1991).

IL-2 억제작용을 통하여 cytokine들이 T 임파구의 성장을 down regulation 시키는 기전 이외에도 IL-10의 경우, T 임파구에 대한 대식세포의 costimulatory signal 제공능력을 선택적으로 억제시키는 것으로 알려졌다 (Ding과 Shevach, 1992). 또한 TGF- β 는 retinoblastoma 유전자 산물의 인산화 과정을 방해함으로써, cell cycle의 late G₁ phase에서 정지시키는 결과를 초래한다고 Laiho 등 (1990)은 보고하였다. Zhou 등 (1993)의 preliminary results에 의하면, anti-CD3 mAb로 자극한 T 임파구에 MIP-1 α 를 처리했을 때, MAP kinase의 인산화 감소, p56^{lck} autophosphorylation의 감소, diacylglycerol level 상승 등의 현상이 일어난다고 하였으나, T cell antigen receptor (TCR) occupancy와 costimulation, 둘중 어떤 현상에 의하여 유발된 생화학적 변화를 MIP-1 α 가 방해함으로써, T 임파구 성장억제 작용을 나타내는지 아직 잘 모른다. T 임파구의 negative regulation에 관계하는 이 cytokine의 작용기전과, 면역 반응에서 negative regulation이 지니는 의미를 이해하는데 지표가 될 유전자 및 생화학적 parameter를 찾는 일이 앞으로 행해야 할 중요한 과제중 하나이다.

T 임파구가 면역반응에서 행하는 중심적 기능들은, 직접적인 세포사이의 접촉에 의해서도 이루어지지만, 대부분은 T 임파구가 내는 lymphokine들을 포함한 cytokine들에 의하여 이루어진다.

따라서 면역반응의 양상은 그 반응에 참여하는 T 임파구가 어떠한 lymphokine을 분비하는가에 의하여 많은 부분이 좌우된다. T 임파구는 세포표면분자인 CD4와 CD8의 발현에 따라 2 subsets으로 나눌 수 있다. 즉 CD4를 표현하는 T 임파구(CD4⁺CD8⁻)는 주로 'helper' 기능을 가지고 있어 helper T lymphocyte (HTL)라고 불리우고, CD8을 표현하는 T 임파구(CD4⁺CD8⁻)는 cytotoxic 기능을 가지고 있어 cytolytic T lymphocyte (CTL)라고 불리운다.

CD4와 CD8분자는 T 임파구의 기능과도 관련이 있지만 major histocompatibility complex (MHC) 항원과도 밀접한 관계가 있다. 즉 CD4⁺ T 임파구는 class II MHC에만 제한되게 반응하며, CD8⁺ T 임파구는 class I MHC에만 제한되게 반응하는 특징을 나타낸다. CD4⁺ HTL은 분비된 lymphokine에 의하여 대부분의 기능들을 나타내며, CD8⁺ CTL은 HTL 보다는 lymphokine에 덜 의존하여 기능을 나타낸다. CD4⁺ T 임파구는 분비하는 lymphokine의 종류에 따라 두개의 subsets으로 다시 나뉜다. T_H1 cell은 IL-2와 gamma interferon (IFN- γ)을 분비하며, T_H2 cell은 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등을 분비하므로 (Mosmann과 Coffman, 1989), T_H1 cell은 delayed-type hypersensitivity를 매개하는 한편, T_H2 cell은 B 임파구에 대하여 효율적인 'help'를 제공한다 (Mosmann과 Coffman, 1989). In vivo에서 특정 CD4⁺ subset이 특별히 많이 출현한다는 것은, 면역반응의 양상에 심각하게 영향을 줄 수 있다는 의미가 된다. 예를 들어, 실험적으로 leishmania 감염을 일으킨 mouse에서 보면, 감염에 잘 이겨내는 mouse strain은 T_H1-type의 반응이 더 현저한 반면, 감염에 취약한 strain에서는 T_H2-type의 반응이 더 뚜렷하다 (Heinzel 등, 1989).

T 임파구에 대한 negative regulation도 subset에 따라 매우 상이하다. 즉, T_H1이 분비하는 IFN- γ 는 T_H2 cell의 세포성장을 억제하지만 lymphokine 생산능력은 억제하지 못하며, T_H1 cell에 대한 성장억제작용 또한 없으므로,

IFN- γ 는 T_H2 cell에 선택적인 성장억제 효과를 타나낸다고 볼수 있다(Fernandez-Botran 등, 1988 ; Gajewski와 Fitch, 1988)

또한 T_H2 cell이 분비하는 IL-10은 활성화된 T_H1 cell의 lymphokine 생산을 억제시킬 수 있으나, T_H2 cell에 대하여는 그러한 억제작용이 없다(Fiorentin 등, 1989). 그외의 subset에 따라 다른 negative regulation의 예로서는, 고농도의 항원에 의하여 T_H1과 CTL clone의 IL-2-induced proliferation이 억제되는 현상(Nau, 1988 ; Suzuki 등, 1988 ; Nau 등, 1987 ; Ceredig와 Corradin, 1986 ; Matis 등, 1983), 및 T_H1 clone이 IL-2에 미리 노출되면 항원에 대하여 반응을 하지않는 현상(Wilde 등, 1984) 등이 있다.

MIP-1 α 의 T 임파구에 대한 억제작용도 subset별로 다를수 있다고 추측되지만 현재의 결과로서는 확인하기 힘들다. 그러나 CD4⁺ T 임파구와 CD8⁺ T 임파구에 대한 화학주성효과 분석 결과에 의하면, MIP-1 α 는 활성화된 CD8⁺ T 임파구에만 선택적 화학주성효과를 나타내는 반면 MIP-1 β 는 활성화된 CD4⁺ T 임파구에만 선택적 화학주성효과를 나타낸다고 하여 (Taub 등, 1993), MIP-1 α 를 비롯한 몇가지 cytokine들이 염증부위에 적절한 T 임파구 subset들을 불러모으는 역할을 한다고 하였다. 본 실험의 결과에서도, CD4의 발현을 MIP-1 α 가 선택적으로 억제하였고 CD8에는 영향을 미치지 않은것으로 나타나, 역시 T 임파구 subset별로 differential한 반응을 보였으나, 그러나 결과의 정확한 의미는 현재로서는 알기가 힘들다. 다만, CD4⁺HTL은 CD4분자를 통하여 antigen presenting cell(APC)의 class II MHC 분자와 결합한 항원을 인지할 수 있으므로, CD4발현의 억제는 따라서 HTL의 항원인지능의 저하를 수반할수 있다고 추측된다. 이러한 사실은 class II MHC 분자의 항원결합 부위에 결합하는 endogenous peptide중 하나의 아미노산 서열이 MIP-1 α 의 일부구조와 똑같은 것파도 어떠한 연관성을 찾을 수 있다(Harris 등, 1933). MIP-1 α -derived peptide가 APC의 class II MHC 분자의 항원 결합부위에 결합하여, exogenous

antigenic peptide와 경쟁함으로써 T 임파구가 인지할수있는 항원의 양을 감소시켜, 결과적으로 CD4⁺HTL의 면역반응을 down regulation 시킨다고 볼수있다.

즉, MIP-1 α 는 CD4의 발현 감소와, class II MHC에 의한 항원 presentation 방해, 이 두 가지 작용을 통하여 HTL에 의한 면역반응 억제작용을 나타낸다고 볼수 있다.

MIP-1 α 는 T 임파구 및 B 임파구, 대식세포가 활성화할때 분비되는 cytokine 이므로, (Sherry와 Cerami, 1991 ; Kwon 등, 1989 ; Wolpe와 Cerami, 1989 ; Yamamura 등, 1989 ; Wolpe 등, 1988)이 cytokine의 면역억제 작용은 전체적으로 보아 면역반응 조절과 tolerance에 기여하는 매우 중요한 역할을 하리라 여겨지지만, 좀더 자세한 기전에 대한 설명은 signaling 및 signal transduction에 대한 분자생물학적 연구가 뒤따라야 가능하다고 본다.

V. 결 론

MIP-1 α 는 기염증성작용, 면역 및 조혈기능 조절작용 등의 광범위한 생물학적 활성을 갖고 있는 cytokine이다. T 임파구에 대한 MIP-1 α 의 영향을 관찰하고자, 사람의 말초혈액 T 임파구와, 사람의 편도선 T 임파구, 및 murine CTL line등을 이용하여 [³H]-thymidine 편입실험을 시행함으로써 세포성장속도에 미치는 MIP-1 α 의 영향을 관찰하였으며, flow cytometric analysis를 시행함으로써 T 임파구의 표면항원인 CD4 flow cytometric analysis를 시행함으로써 T 임파구의 표면항원인 CD4와 CD8의 발현에 미치는 영향도 아울러 관찰하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 편도선 T 임파구는, anti-CD3 mAb로 자극함으로써 성장속도가 4배 증가하였고, 여기에 MIP-1 α 200ng/ml처리시, 약 60%의 통계적으로 유의한 성장억제 효과를 나타내었다.
2. 말초혈액 T 임파구는, anti-CD3 mAb로 자극시, 성장속도가 사람마다 매우 상이하

였으며, MIP-1 α 투여에 의한 성장억제 효과도 40%에서 90%까지 사람마다 크게 차이가 있었으나, 모든 경우 통계적으로 유의한 수준의 억제 효과를 보였다.

3. Murine CTL line인 CTLL-2는, MIP-1 α 투여시 약 75%의 통계적으로 유의한 수준의 성장억제 효과를 보였다.
4. MIP-1 α 투여시, CD4⁺HTL 및 CD8⁺CTL의 세포비율은 거의 변화가 없었으나, 사람마다 약 27%에서 82%까지의 다양한 CD4⁺ 발현 억제 작용이 관찰되었으며, CD8⁺ 발현에 별 영향을 미치지 않았다.

참고문헌

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. : Cytokines. In : *Cellular and Molecular Immunology*. ed., Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S., Philadelphia, Saunders, 1991.
- Broxmeyer, H.E., Sherry, B., Lu, L., Cooper, S., Carow, C., Wolpe, S.D., and Cerami, A. : Myelopoietic enhancing effects of murine macrophage inflammatory proteins 1 and 2 on colony formation in vitro by murine and human bone marrow granulocyte/macrophage progenitor cells. *J. Exp. Med.* 170 : 1583, 1989.
- Broxmeyer, H.E., Sherry, B., Lu, L., Cooper, S., Oh, K.O., Tekamp-Olson, P., Kwon, B.S., and Cerami, A. : Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by one marrow myeloid progenitor cells. *Blood* 76 : 1110, 1990.
- Ceredig, R. and Corradin, G. : High antigen concentration inhibit T cell proliferation but not interleukin 2 production : examination of limiting dilution microcultures and T cell clones. *Eur. J. Immunol.* 16 : 30, 1986.
- Davatelis, G., Tekamp-Olson, P., Wolpe, S.D., Hermesen, K., Leudke Gallegos, C., Coit, D., Merryweather, J., and Cerami, A. : Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties. *J. Exp. Med.* 167 : 1939, 1988.
- Davatelis, G., Wolpe, S.D., Sherry, B., Dayer, J.M., Chicheportiche, R., and Cerami, A. : Macrophage inflammatory protein-1 : a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science* 243 : 1066, 1989.
- Ding, L. and Shevach, Z.N. : IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J. Immunol.* 148 : 3133, 1992.
- Dunlop, D.J., Wright, E.G., Lorimore, S., Graham, G.J., Holyoake, T., Kerr, D.J., Wolpe, S.D., and Pragnell, I.G. : Demonstration of stem cell inhibition and myeloprotective effects of SCI/rhMIP-1 α in vivo. *Blood* 79 : 2221, 1992.
- Fahey III, T.J., Tracey, K.J., Tekamp-Olson, P., Cousens, L.S., Jones, W.G., Shires, G.T., Cerami, A., and Sherry, B. : Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J. Immunol.* 148 : 2764, 1992.
- Fernandez-Botran, R., Sanders, V.M., Mosmann, T.R., and Vitetta, E.Sj. : Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 158 : 543, 1988.
- Fiorentino, D.f., Bond, M.W., and Mosmann, T.R. : Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor

- that inhibit cytokine production by Th 1 clones. *J. Exp. Med.* 170 : 2081, 1989.
- Gajewski, T.F. and Fitch, F.W. : Antiproliferative effect of IFN- γ in immune regulation. I. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine HTL clones. *J. Immunol.* 140 : 4245, 1988.
- Graham, G.J., Wright, E.G., Hewick, R., Wolpe, S.D., Wilkie, N.M., Donaldson, D., Lorimore, S., and Pragnell, I.B. : Identification and characterization of an inhibitor of haematopoietic stem cell proliferation. *Nature* 344 : 442, 1990.
- Harris, P.E., Maffei, A., Liu, Z., Colovai, I., Reed, E.F., Inghirami, G., and Suciufoca, N. : Naturally processed cytokine-derived peptide bound to HLA-class II molecules. *J. Immunol.* 151 : 5975, 1993.
- Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffman, R.L., and Locksley, R.M. : Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* 169 : 59, 1989.
- Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Spom, M.B., and Fauci, A.S. : Production of transforming growth factors β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 163 : 1037, 1986.
- Kwon, B.S., Kestler, D.P., Eshhar, Z., Oh, K.O., and Wakulchick, M. : Expression characteristics of two potential T cell mediator genes. *Cell. Immunol.* 121 : 414, 1989.
- Kwon, B.S. and Weissman, S.M. : cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 1963, 1989.
- Laiho, M., DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Livingston, D.M., and Massague, J. : Growth inhibition by TGF- β linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* 62 : 175, 1990.
- Leo, O., Foo, M., Sachs, D.H., Samelson, L.E., and Bluestone, J.A. : Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 1374, 1987.
- Matis, L.A., Glimcher, L.H., Paul, W.E., and Schwartz, R.H. : Magnitude of response of histocompatibility-restricted T-cell clones is a function of the product of the concentrations of antigen and Ia molecules. *Proc. Natl. Acad. USA* 80 : 6019, 1983.
- Maze, R., Shery, B., Kwon, B.S., Cerami, A., and Broxmeyer, H.E. : Myelosuppressive effects in vivo of purified recombinant murine macrophage inflammatory protein-1 α . *J. Immunol.* 149 : 1004, 1992.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. : TH1 and TH2 cells : Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7 : 145, 1989.
- Nau, G. : Regulation of interleukin 2-dependent proliferation of cloned murine T lymphocytes. Ph D thesis, Univ. Chicago. 185pp, 1988.
- Nau, G.J., Moldwin, R.L., Lancki, D.W., Kim, D.K., and Fitch, F.W. : Inhibition of IL 2-driven proliferation of murine T lymphocyte clones by supraoptimal levels of immobilized anti-T cell receptor monoclonal antibody. *J. Immunol.* 139 : 114, 1987.
- Oh, K.O., Jeong, S.R., Yu, K.R., Oh, H.J., Lee,

- D.W., Lee, S.H., Kwak, Y.H., Kim, H.S., and Kwon, B.S. : Receptor binding characteristics of macrophage inflammatory protein-1 α and -1 β . *J. oral Biol.* 17(2) : 93, 1993.
- Oh, K.O., Zhou, Z., Kim, K.K., Samanta, h., Fraser, M., Kim, Y.J., Broxmeyer, H.E., and Kwon, B.S. : Identification of cell surface receptors for murine macrophage inflammatory protein-1 α . *J. Immunol.* 147 : 2978, 1991.
- Roszman, T., Elliott, L., and Brooks, W. : Modulation of T cell function by gliomas. *Immunol. Today* 12 : 370, 1991.
- Sherry, B. and Cerami, A. : Small cytokine superfamily. *Curr. Opinion Immunol.* 3 : 56, 1991.
- Sherry, B., Tekamp-Olson, P., Gallegos, C., Bauer, D., Davatelis, G., Wolpe, S.D., Masiarz, F., Cort, D., and Cerami, A. : Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and, cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 β . *J. Exp. Me.* 168 : 2251, 1988.
- Suzuki, G., Kawakase, Y., Koyasu, s., Yahara, I., Kobayashi, Y., and Schwartz, R.H. : Antigen-induced suppression of the proliferative response of T cell clones. *J. Immunol.* 140 : 1359, 1988.
- Taga, K. and Tosato, G. : IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J. Immunol.* 140 : 1359, 1988.
- Taub, K. and Tosato, G. : IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-1 production. *J. Immunol.* 148 : 1143, 1992.
- Taub, D.D., Conlon, K., Loyd, A.R., Oppenheim, J.J., and Kelvin, D.J. : Preferential migration of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to MIP-1 α and MIP-1 β . *Science* 260 : 355, 1993.
- Wilde, D.B., Prystowsky, M.B., Ely, J.M., Vogel, S.N., Dialynas, D.P., and Fitch, F.W. : Antigen-reactive cloned helper T cells. II. Exposure of murine unresponsiveness to antigenic restimulation and inhibits lymphokine production after antigenic stimulation. *J. Immunol.* 133 : 636, 1984.
- Wolpe, S.D. and Cerami, A. : Macrophage inflammatory proteins 1 and 2 : members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J.* 3 : 2565, 1989.
- Wolpe, S.D., Davatelis, G., Sherry, B., Beutler, B., Hesse, D.G., Nguyen, H.T., Moldawer, L.L., Nathan, C.F., Lowry, S.F., and Cerami, A. : Macrophage secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J. Exp. Med.* 167 : 570, 1987.
- Wolpe, S.D., Davatelis, G., Sherry, B., Beutler, B., Hesse, D.G., Nguyen, H.T., Moldawer, L.L., Nathan, C.F., Lowry, S.F., and Cerami, A. : Macrophage secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J. Exp. Med.* 167 : 570, 1988.
- Ohmoto, S., Nomiyama, H., and Shimada, K. : Synthesis of a novel cytokine and its gene (LD 78) expression in hematopoietic fresh tumor cells and cell lines. *J. Clin. Invest.* 84 : 1707, 1989.
- Zhou, Z., Kim, Y.J., Pollok, K., Hurtado, J., Lee, J.K., Broxmeyer, H.F., and Kwon, B.S. : Macrophage inflammatory protein-1 α rapidly its receptors and inhibits the anti-CD3 mAb-mediated proliferation of T lymphocytes. *J. Immunol.* 151 : 4333, 1993.