

## Human 백혈병 세포에 대한 비타민 D<sub>3</sub> 유도체의 항암효과 및 Human 임파구의 면역기능에 대한 비타민 D<sub>3</sub> 유도체의 역할

정 수 자

부산여자전문대학 식품영양과

### Anticancer Effects of Vitamin D<sub>3</sub> Analog on Human Leukemic Cell Line(U937) and Role of Vitamin D<sub>3</sub> Analog on Immune Function of Human Peripheral Blood Lymphocytes

Soo-Ja Jung

Dept. of Food and Nutrition, Pusan Women's Junior College, Pusan 614-734, Korea

#### Abstract

This study describes the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>[1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, calcitriol] analog, 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> on proliferation and differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U937. This paper also describes the effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> on  $\gamma$ -interferon(IFN- $\gamma$ ) synthesis by phytohemagglutinin-activated peripheral blood lymphocytes(PBLs). In the present investigation, 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> was compared to the natural metabolite of vitamin D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> was more potent than 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for inhibition of proliferation and induction of differentiation of U937 cells. Its effects on inhibition of proliferation was about 30-fold more potent than 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. On induction of differentiation as measured by nonspecific esterase (NSE) activity and morphologic change, this analog morphologically and functionally differentiated U937 cells to monocyte-macrophage phenotype showing a decrease of N/C ratio in Giemsa staining and the increase of adherence ability of surface. After 3 days in culture, a more significant suppression of IFN- $\gamma$  synthesis by PBLs was achieved with 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> than with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. The effects of this analog on suppression of IFN- $\gamma$  synthesis was a dose-dependent manner, with peak activity at 10<sup>-7</sup>M. The strong direct effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> on cell proliferation and cell differentiation, make this compound an interesting candidate for clinical studies for several types of malignancies, and the effects on suppression of IFN- $\gamma$  synthesis provide the further evidence for a role of 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> in immunoregulation.

**Key words:** 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>, U937 leukemia cell differentiation, IFN- $\gamma$  synthesis

#### 서 론

Steroid hormone인 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>[1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, calcitriol]는 비타민 D<sub>3</sub>의 활성대사 물질로써 체내의 칼슘대사에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 왔으나(1) 최근에는 면역계의 조절에 중요한 역할을 하는 호르몬임이 밝혀지고 있다. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 관련된 생물학적 기능은 정상조혈세포와 악성조혈세포의 성장과 분화조절 및 이들 세포에 대해 다양한 생리적 기능을 나타내고 있음이 확인되었다(2). 이 호르몬의 본래의 작용기관인 뼈, 소장 및 콩팥 등에 대해서는 nongenomic 영향을 나타내나 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 세포작용의 대부분은 세포내 수용체[vitamin D receptor(VDR)]에

의해 조절되어지며 이 수용체는 호르몬과 높은 친화력으로 결합한다(3). 호르몬-수용체 복합체는 이 복합체와 반응하는 세포의 특이한 유전자의 전사(transcription)를 조절하므로써 생물적 기능을 나타낸다.

조혈세포(hematopoietic cells)의 분화에 대한 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 영향에 관한 연구에서 U937 cells(human monoblastic leukemia cell line)과 HL-60 cells(human promyelocytic leukemia cell line)은 liquid culture에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의해 세포성장이 저해되고 monocyte/macrophage로 분화되어지며(4-6) 세포분화에 따른 c-myc(7), c-fos(8) 및 c-fms(9) 등의 proto-oncogene의 발현이 mRNA level에서 저해되었다. 한편 쥐에 골수성 백혈병 세포를 접종시킨 뒤 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>를 투여한

결과 쥐의 생명기간이 연장되었다는 *in vivo*에서의 연구보고도 있다(10). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 수용체가 함유된 monocytes와 mitogen으로 활성화된 T임파구는 이 호르몬의 표적세포이다. Monocyte는 이 호르몬에 의해 macrophage로 분화가 촉진되며(11) antigen presentation에 있어서의 monocyte의 기능이 향상된다. 한편 mitogen으로 활성화된 T임파구에는 VDR이 발현되며(12) 이 호르몬은 T임파구에 대해 cyclosporin A와 같이 면역억제 물질로 작용한다(13). 또한 최근에는 T임파구의 활성화와 분화에 관여하며, B임파구와 monocyte에서 생성되는 interleukin 12(IL-12)의 생성이 억제됨이 확인되었다(14).

이와같이 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 악성조혈세포에 대해 증식억제 및 분화촉진 효과가 있으며 정상조혈세포에 대해서는 여러 가지 cytokine의 생성조절을 통해 면역조절 호르몬으로써의 다양한 생물학적 기능을 나타내고 있음이 확인되었다. 현재는 이러한 비타민 D<sub>3</sub> 화합물에 관한 다양한 연구결과를 이용하여 임상에 직접활용하고자 하는 노력이 시도되고 있으나 *in vitro*와 *in vivo*에서의 연구에서 얻은 효과에 상응하는 농도의 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 이의 유도체를 preleukemia 환자와 건선질환( psoriasis)자에게 투여한 결과 preleukemia 환자에게는 항암효과가(15), 건선질환자에게는 건선피부의 일부가 정상세포로 분화되는 효과(16)가 각각 나타났으나 환자가 hypercalcemia를 유발하여 지속적인 투여는 불가능하였다. 따라서 이러한 임상적 이용 한계성을 극복하기 위해 비타민 D<sub>3</sub> 화합물의 투여와 관련되어 나타나는 hypercalcemia와 hypercalcinuria 등의 부작용이 낮으면서 효과의 특이성이 큰 새로운 비타민 D<sub>3</sub> 유도체의 개발에 관심이 집중되고 있다(17-19).

본 연구는 이러한 목적으로 개발한 비타민 D<sub>3</sub> 유도체의 항암효과와 면역조절기능을 대조군인 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 비교 검토하고자 한다. 먼저 항암효과에 관한 연구에서는 세포분화에 관한 model로써 많이 이용되는 백혈병 세포인 U937 세포(human histiocytic lymphoma cell line)에 대한 이 화합물의 증식억제 및 분화촉진 효과를 검토하였으며, 분화 연구에서는 세포의 조직학적, 형태학적 변화를 관찰하였다. 또한 이 화합물의 면역조절기능을 확인하기 위해 normal human peripheral blood에서 분리된 임파구에 의한 interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )생성에 대한 유도체의 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 세포배양

U937세포를 ATCC(Rockville, MD, USA)에서 구

입하여 10% fetal calf serum(FCS: Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% penicillin/streptomycin이 혼합된 RPMI 1640 배지(Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 부유 배양하였으며 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건을 유지하였다. 한편 건강한 성인으로부터 채혈한 혈액에서 Ficoll Hypaque(Histopaque: Sigma, St. Louis, MO, USA) density gradient(1.077g/ml)에 의해 peripheral blood mononuclear cells(PBMC)을 분리하였다. PBMC를 plastic 배양기에서 6시간 동안 배양하여 배양기에 부착하는 대부분의 monocyte를 제거하여 peripheral blood lymphocytes(PBLs)를 얻었으며 Wright-Giemsa 염색과 nonspecific acid esterase 염색에서 nonadherent mononuclear cells은 3% 이하만이 macrophage를 나타내었고 대부분은 lymphocyte morphology를 나타내었다. 분리한 PBLs를 24-well plates에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 10% fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지에서 1×10<sup>6</sup>cells/ml 세포 농도로 조절하여 배양하였고 배양 초기에 mitogen으로 6 $\mu$ g/ml의 phytohemagglutinin-p(PHA-p)를 넣어 배양하였다.

### 비타민 D<sub>3</sub> 화합물

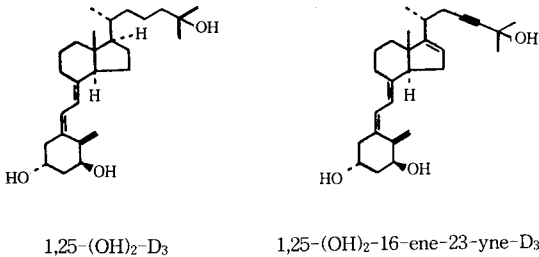
본 실험에서 사용한 비타민 D<sub>3</sub> 화합물은 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 이의 유도체인 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>로써 (Fig. 1), 10<sup>-3</sup>M 농도로 무수에탄올에 녹여서 -20°C에 보관한 후 실험시작 직전에 FCS가 함유되지 않은 RPMI 1640 배지에 희석시켜 사용하였다. 배양액에 함유된 에탄올의 농도는 0.1%가 넘지 않았으며 이 농도는 세포 성장에 영향을 주지 않았다. 사용한 화합물은 Dr. Uskokovic(Hoffman La Roche Inc., Nutley, NJ)으로부터 연구용으로 기증받아서 사용하였다.

### 세포성장 관찰

10% FCS와 여러 가지 농도(10<sup>-11</sup>M~10<sup>-7</sup>M)의 비타민 D<sub>3</sub> 화합물이 함유된 RPMI 1640 배지에 1×10<sup>5</sup>cells/ml의 농도로 U937 세포를 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 4일간 배양한 후 살아있는 세포수를 trypan blue로 측정하였다. 결과는 한 실험당 duplicate로 3번 실험한 결과를 평균하였으며 세포성장률은 대조군의 성장에 대한 백분율로써 나타내었다.

### 세포분화 관찰

비타민 D<sub>3</sub> 화합물에 의한 U937 세포의 분화는  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase[nonspecific esterase(NSE)]



**Fig. 1.** Structures and chemical names of vitamin D<sub>3</sub> compounds evaluated in this investigation ("Ene" and "yne" refer a double bond and a triple bond, respectively).

발현유무의 세포화학적 분석, morphology변화(20) 및 배양기에 부착하는 세포수의 관찰 등으로 확인하였다. 세포를 10% FCS와 농도를 달리한 비타민 D<sub>3</sub> 화합물 ( $10^{-11}$ M~ $10^{-7}$ M)이 함유된 RPMI 1640배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 4일간 배양한 후 세포를 PBS로 씻은 다음 cytocentrifuge에 의해 세포를 슬라이드에 고정시켜서 일부는 Wright Giemsa/Giemsa염색을 하여 morphology 변화를 관찰하였고 일부는 NSE 발현 유무에 이용하였다. 즉 NSE 활성 확인을 위해서 슬라이드를 citrate-acetone-formaldehyde용액(25:65:8)에 넣어서 상온에서 30초간 세포를 고정시킨 다음 1ml fast blue BB염기용액, 1ml sodium nitrite용액, 37°C의 40ml 증류수, 5ml trizmal용액 pH 7.6, 1ml  $\alpha$ -naphthyl acetate 용액의 혼합액에 슬라이드를 넣어 37°C에서 30분간 빛을 차단하여 반응시킨 후 hematoxillin용액에서 2분간 염색하여 관찰하였다. 한편 U937세포가 monocyte/macrophage로 분화하게 되면 위족(pseudopodia)를 만들어서 배양기에 부착하게 되며 배양말기에 부착하는 세포의 수를 관찰하여 분화유무를 확인하였다.

#### IFN- $\gamma$ 측정

정상인의 혈액에서 분리한 peripheral blood lymphocyte(PBLs)를  $1 \times 10^6$ cells/ml 농도로 24-well plates에서 PHA(6 $\mu$ g/ml)과 비타민 D<sub>3</sub> 화합물( $10^{-11}$ M~ $10^{-7}$ M)을 넣어 3일간 배양한 후 배양액을 원심분리하여 상층액을 -20°C 이하에 보관하여 IFN- $\gamma$  측정에 이용하였으며 IFN- $\gamma$  측정은 enzyme-linked immunoadsorbent assay(ELISA) kits(R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. 즉 IFN- $\gamma$ 에 특이한 murine monoclonal antibody와 polyclonal antibody를 사용하여 sandwich enzyme immunoassay방법에 의해 IFN- $\gamma$ 를 450nm에서 microtiter plate reader로 측정한다.

## 결과 및 고찰

### U937 세포에 대한 비타민 D<sub>3</sub> 유도체의 성장저해 효과

여러종류의 malignant cell line(4,5), 정상적인 monocyte/macrophage(21), 활성화된 T 임파구(21) 등에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 수용체의 발견으로 비타민 D 내분비계와 면역계의 상호관련에 관한 연구가 시작되었으며 지금까지 알려진 이 호르몬의 생물학적 기능이상으로 정상 및 악성조직 세포의 성장과 분화조절을 포함한 광범위한 생리적 기능을 가진 면역계의 조절 호르몬임이 확인되었다. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 여러 가지 증식성 질병(proliferative disease)의 치료에 효과가 있는 것으로 생각되었으나 실제로 환자에게 투여한 결과 hypercalcemia, hypercalcinuria 및 신장, 심장, 정맥 등에 석회침착을 야기시키는 부작용으로 임상연구에서의 이용이 제한되었다.

따라서 지금은 세포증식과 분화조절에 대한 효과를 가지면서 칼슘대사에 대한 활성이 낮은 새로운 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 유도체의 개발에 관심이 집중되고 있다. 본 연구는 이러한 목적으로 개발한 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 유도체인 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>를 이용하여 조혈세포 분화에 대한 연구를 하는 모델로써 많이 이용되는 U937 세포(human monoblastic leukemia cell line)에 대한 증식억제와 분화촉진 효과를 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 비교 검토하였다.

U937 세포에 대한 비타민 D<sub>3</sub> 유도체의 성장저해 효과는 Fig. 2와 같다. U937 세포증식 기간 중 doubling time는 30~32시간이었으며  $1 \times 10^5$ cells/ml의 세포 농도로 시작하여 4~5일 이내에 최대 세포 농도를 나타내었다. 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>는 실험 전 농도구간 ( $10^{-11}$ M~ $10^{-7}$ M)에서 control culture(배양액에 비타민 D<sub>3</sub> 화합물을 넣지 않는 경우)에 비해 상당한 저해효과를 나타내고 있으며 특히  $10^{-8}$ M과  $10^{-7}$ M의 농도에서 control culture에 비해 각각 83%, 95%의 성장저해 효과를 나타내고 있다. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>도 전 농도구간( $10^{-11}$ M~ $10^{-7}$ M)에서 저해효과를 나타내고 있으며 이는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 U937 세포성장에 저해 효과가 있음을 밝힌 Olsson 등(6)의 연구결과와도 일치한다. 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>는 50%의 저해효과를 얻는데 필요한 농도(ED<sub>50</sub>)가  $0.8 \times 10^{-9}$ M이며(Table 1), 이는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의  $25 \times 10^{-9}$ M에 비해 약 30배의 성장저해 효과가 있음을 보여준다. 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 구조와 비교하여 16번과 17번 탄소 사이에는 2중 결합이, 23번과 24번 탄소 사이에는 3중 결합이 추가되

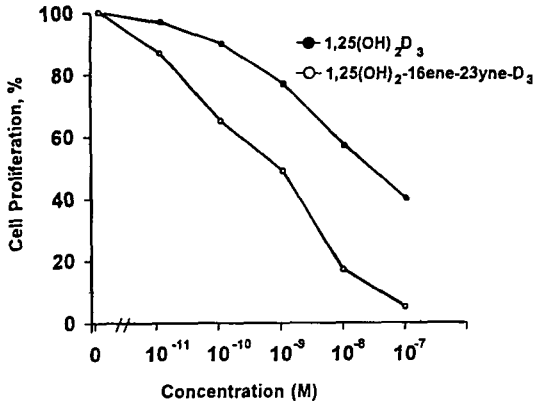


Fig. 2. Dose-response of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> on cellular proliferation of U937 cells. U937 cells were seeded at 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml and cultured for 4 days in the presence of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (●-●) or 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> (○-○). After 4 days, cells were assayed for the number and % cell proliferation was expressed as the percentage of the control culture. Each point represents the mean of three experiments with duplicate dishes. Control culture contains 4.5 × 10<sup>5</sup> ± 1.1 × 10<sup>5</sup> (±SD) cells/ml.

Table 1. Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> on cellular proliferation of U937 cells

Vitamin D compounds	Inhibition of cellular proliferation ED <sub>50</sub> (× 10 <sup>9</sup> mol/L)
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	25
1,25(OH) <sub>2</sub> -16ene-23yne-D <sub>3</sub>	0.8

ED<sub>50</sub> represents effective dose achieving 50% response (ED<sub>50</sub>) calculated from dose-response curve shown on Fig. 2.

어 있으며 이러한 구조의 수정이 세포성장 저해효과와 상관성이 있는 것으로 생각된다. 이는 HL-60 cell (human promyelocytic leukemia cell line)의 clonal growth 저해효과에 있어서 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>가 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 비해 훨씬 효과가 크다는 Jung 등(22)의 연구 결과와도 일치한다.

U937 세포분화에 대한 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> 영향

사람의 골수성 간 세포(human myeloid stem cell)가 macrophage로 분화할 때와 마찬가지로 U937 세포가 monocyte/macrophage로 분화할 때 세포형태 변화와 함께 nonspecific esterase(NSE) 발현을 한다. 본 연구에서도 U937 세포분화에 대한 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>의 효과를 검토하기 위해 NSE 활성, 세포형태

변화 및 배양 말기에 세포가 위축을 형성하여 배양기에 부착하는 세포수의 확인 등을 관찰하였으며 그 결과는 Fig. 3, Fig. 4 및 Table 2와 같다. Fig. 3은 비타민 D<sub>3</sub> 화합물에 의한 U937세포의 nonspecific esterase 염색 결과를 나타내고 있으며 분화된 세포는 강한 dark red color를 띄게된다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>는 U937 세포를 monocyte/macrophage와 유사한 세포로 분화시키며 분화효과는 농도 의존형으로 나타나고 있다. 특히 10<sup>-9</sup>M 농도에서는 70%

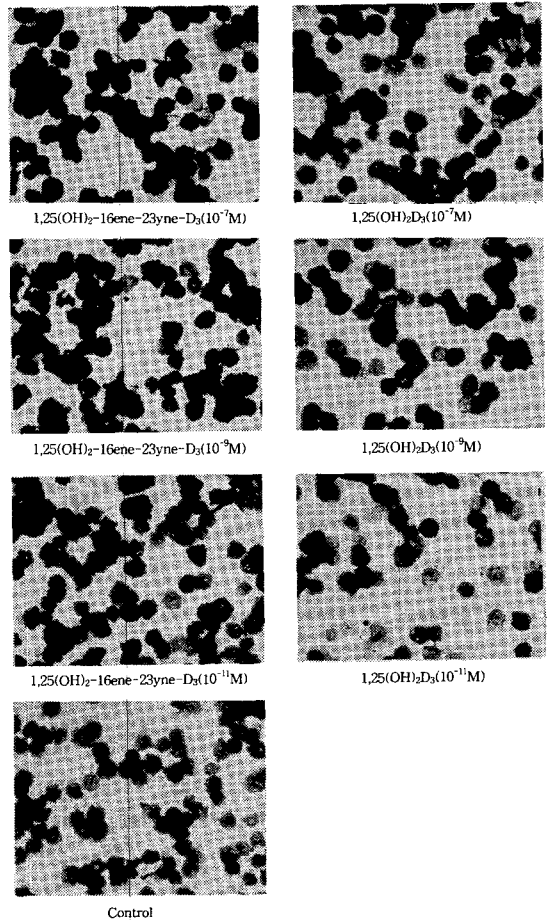
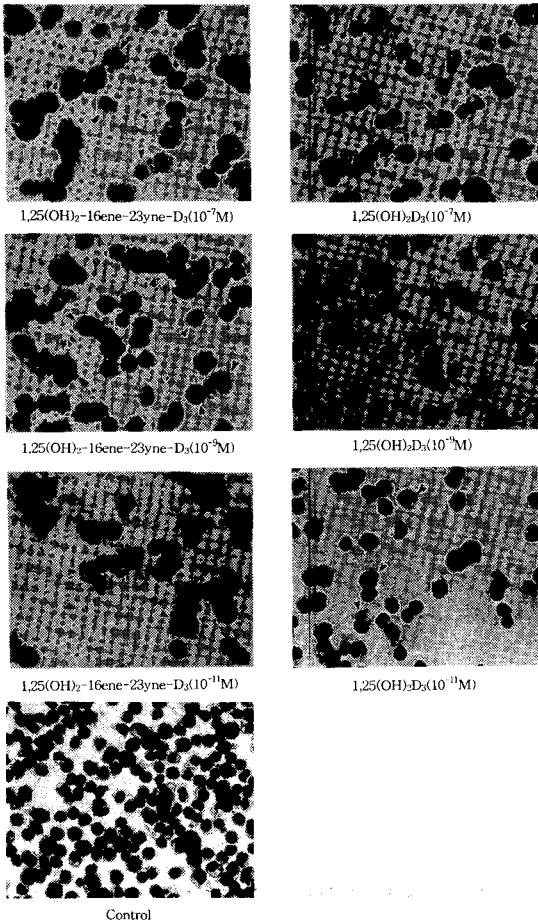


Fig. 3. Level of the nonspecific esterase in U937 cells differentiated by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> in a dose dependent fashion.

U937 cells(10<sup>5</sup>cells/ml) in RPMI 1640 with 10% FCS were cultured for 4 day in the presence of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (10<sup>-11</sup>M~10<sup>-7</sup>M) or 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> (10<sup>-11</sup>M~10<sup>-7</sup>M). At the end of culture, cells were stained for nonspecific esterase(NSE) activity as a maker of cell differentiation. The differentiated cells were intensely stained to dark red color indicating mature macrophage, and the induction of differentiation of U937 cells by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub> was dose dependent. Control cells have less than 7% of NSE-positive cells(×200).



**Fig. 4.** Morphologic changes of the U937 cells induced by  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  and  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ . Cells ( $10^5$  cells/ml) in RPMI 1640 with 10% FCS were cultured for 4 day in the presence of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $10^{-11}\text{M} \sim 10^{-7}\text{M}$ ) or  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$  ( $10^{-11}\text{M} \sim 10^{-7}\text{M}$ ). Cells were washed in PBS, cytocentrifuged and fixed in methanol and stained with Giemsa for 10min. The smooth and small form of undifferentiated cells were transformed to the ruffled large form (indicated by arrow), and showed decreased N/C ratio in Giemsa staining ( $\times 200$ ).

이상,  $10^{-7}\text{M}$  농도에서는 90% 이상의 분화효과를 보여주고 있다.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  도 전 농도구간( $10^{-11}\text{M} \sim 10^{-7}\text{M}$ )에서 농도 의존형의 분화효과를 나타내며  $10^{-7}\text{M}$  농도에서는 약 50% 이상의 세포가 분화되어 있음을 알 수 있다(Fig. 3에 나타난 결과 분석에 의한 것임). 대조군(배양액에 비타민 D<sub>3</sub> 화합물을 넣지 않는 경우)에서는 약 7% 이하의 세포만이 macrophage와 유사한 세포로 분화되어 있음을 알 수 있다.

한편 분화에 따른 세포형태 변화는 Fig. 4와 같다. 배양 4일 후 cytopsin한 세포의 Wright Giemsa 염색결

**Table 2.** Appearance of adherent U937 cells in the culture flasks

Vitamin D compounds	Adherence of U937 cells $10^5$ cells per culture	
Control	$0.05 \pm 0.03$	
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	$10^{-11}\text{M}$	$0.07 \pm 0.03$
	$10^{-10}\text{M}$	$0.18 \pm 0.08$
	$10^{-9}\text{M}$	$0.46 \pm 0.18$
	$10^{-8}\text{M}$	$0.76 \pm 0.28$
	$10^{-7}\text{M}$	$1.34 \pm 0.50$
$1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$	$10^{-11}\text{M}$	$0.32 \pm 0.11$
	$10^{-10}\text{M}$	$0.41 \pm 0.16$
	$10^{-9}\text{M}$	$1.16 \pm 0.35$
	$10^{-8}\text{M}$	$1.86 \pm 0.51$
	$10^{-7}\text{M}$	$2.57 \pm 0.80$

U937 cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/ml and cultured for 4 days in the presence of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  or  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ . At the end of culture adherent cells were counted. Values represent the mean  $\pm$  SD of three experiments.

과는 세포 원형질막의 ruffling 현상이 나타나며 N/C비(nuclear/cytoplasmic ratio)가 감소하면서 비분화 세포에 비해 세포의 크기가 커진 것을 알 수 있다(Fig. 4). 세포의 형태학적 변화에서도  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ 에 의한 U937 세포의 분화가  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 에 비해 뚜렷이 나타나고 있다. 분화에 따른 세포의 조직학적, 형태학적 변화와 더불어서 배양 말기에는 위족(pseudopodia)을 만들어서 배양접시에 세포가 부착하게 되며 비타민 D<sub>3</sub> 화합물을 첨가한 농도에 따라 부착하는 세포수가 점차 많아지는 것을 확인 할 수 있으며(Table 2)  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ 를 첨가한 배양기에서는  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 를 첨가한 배양기보다 부착하는 세포수가 훨씬 많음을 확인 할 수 있다. 따라서 이러한 연구결과로  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ 가 U937 세포를 형태학적으로, 또는 기능적으로 monocyte/macrophage로 분화시킴을 알 수 있으며 분화효과는  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 에 비해 훨씬 탁월하며 이는 U937 세포성장 저해효과에 있어서  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 보다 훨씬 높은 것으로 나타난 앞의 연구결과와도 일치한다.

이와같이 본 연구결과에 의해  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ 의 U937 세포에 대한 증식억제와 분화촉진 효과는  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 에 비해 훨씬 큰 것으로 나타나고 있다.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  독성은 intestinal calcium absorption(ICA)과 bone calcium mobilization(BCM)에 의한 hypercalcemia의 유발이다. Zhou 등(23)에 의한 닭을 모델로 한 연구에서 이 유도체는  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 에 비해 ICA는 약 30배 이하의 활성을, BCM의 경우 약 50배 이하의 활성을 나타낸 것으로 보고되고 있다.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 는

세포내의  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  수용체(vitamin D receptor: VDR)와 결합하여 영향을 나타내며 이 receptor-ligand 복합체는 비타민 D 반응물질(vitamin D response element: VDRE)내의 gene expression을 조절한다. 따라서 비타민  $\text{D}_3$  유도체는 이 수용체와의 친화력에 따라 생물학적 활성이 달라지게 된다. Jung 등(22)의 연구에 의하면  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ 는 이 수용체와의 친화력이  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 와 보다 약간 낮은 것으로 밝혀지고 있다. 또한 혈장 운반단백질(vitamin D binding protein: DBP)과 비타민  $\text{D}_3$  화합물과의 친화력도 화합물의 생물학적 활성을 나타내는 요소이다. 역시 Jung 등(22)에 의해  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ 는  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 에 비해 DBP와의 친화력이 훨씬 낮음이 보고되고 있으며 이는 더 많은 유리상태의  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ 가 세포와 결합할 수 있음을 말해준다. 비타민  $\text{D}_3$ 의 모체인  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 와 비교하여 VDR과의 친화력은 약간 낮은 반면 DBP와의 결합력이 아주 낮다는 것은 이 화합물의 target tissue에 대한 이용가능성이 증대되는 것을 의미한다.

$1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ 에 대한 본 연구결과와 더불어서 현재까지 진행되어진 연구결과를 바탕으로 하여 세포분화에 대한 비타민  $\text{D}_3$ -seco-steroid 화합물의 정확한 신호전달경로를 좀 더 자세히 밝히면 pre-leukemia, 건선질환 등이 포함된 여러형태의 질병 및 류마티스성 관절염과 같은 자가면역질환의 임상적 치료제로서 이 화합물의 이용이 가능하리라 생각되며 또한 hypercalcemia를 유발하지 않으면서 항암효과의 특이성이 큰 새로운 비타민  $\text{D}_3$  유도체의 개발을 위한 지속적인 노력이 필요하다고 생각된다.

#### Peripheral blood lymphocyte에 의한 IFN- $\gamma$ 생성에 미치는 비타민 $\text{D}_3$ 유도체의 영향

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 는 여러 가지 면역반응에 영향을 준다. 특히 활성화된 peripheral blood lymphocytes(PBLs)에서  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  수용체의 발견으로(12,21) PBLs은  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 의 표적세포로서의 연구가 활발히 진행 중이다. 이 호르몬은 T 림파구의 증식억제(13) 및 림파구에 의한 IFN- $\gamma$  등의 cytokine 생성을 억제하는(24) 면역억제호르몬으로 알려져 있다.

본 연구에서도 면역기능에 대한  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ 의 영향을 검토하기 위해 PHA로 활성화된 PBLs에 의한 IFN- $\gamma$  생성에 대한 이 화합물의 효과를 모체인  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 와 비교 검토하고자 하였다. 사람에게 있어서 IFN- $\gamma$ 는 항원이나 mitogen(phytohemagglutinin, concanavalin A) 등에 의해 활성화된 T 림파구

에 의해 생성되는 cytokine으로, monocytic cells에 대해 HLA class II molecules 발현촉진(25) 및 면역 globulin G(IgG)에 대한 친화력이 큰 수용체의 발현촉진(26) 등을 통하여 면역반응에 다양한 영향을 나타내며 monocyte에 대해 T 림파구의 활성화에 필수적인 interleukin 2(IL-2) 수용체의 발현을 조절한다(27).

건강한 성인 3인으로 부터 채혈한 혈액에서 분리된 PBLs에 의한 IFN- $\gamma$  생성에 대한 비타민  $\text{D}_3$  화합물의 영향은 Fig. 5와 같다. PHA로 활성화되지 않은 PBLs에서는 거의 IFN- $\gamma$ 이 생성되지 않았다. 비타민  $\text{D}_3$  화합물에 의한 IFN- $\gamma$  생성저하는 거의 농도 의존적으로 나타났으며 대조군(배양액에  $6\mu\text{g/ml}$ 의 PHA만 넣은 배양기)에 비해  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ 는 전 농도 구간( $10^{-11}\text{M} \sim 10^{-7}\text{M}$ )에서 IFN- $\gamma$  생성을 저하시켰으며 특히  $10^{-7}\text{M}$  농도에서는 control culture에 비해 11%의 IFN- $\gamma$  생성을 보여주고 있다. 또한  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 도 전 농도구간( $10^{-11}\text{M} \sim 10^{-7}\text{M}$ )에서 control culture에 비해 IFN- $\gamma$  생성을 저하시켰고  $10^{-7}\text{M}$  농도에서는 26%의 생성을 나타내고 있다.  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ 는 모체인  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 와 비교하여 전 농도구간에서 IFN- $\gamma$  생성 억제효과가 크다는 것을 알 수 있다.

IFN- $\gamma$ 은 monocyte 표면분화지표(HLA class II molecules)에 대한 강력한 유도물질로써 알려져 있다. 한편  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 는 T 림파구에서의 IFN- $\gamma$  생성을 저하시키며 또한 IFN- $\gamma$ 으로 유도된 HLA class II mol-

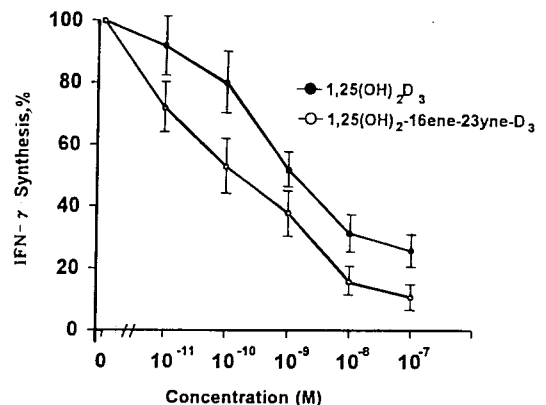


Fig. 5. IFN- $\gamma$  synthesis by PBLs: vitamin  $\text{D}_3$  compounds dose-response.

PBLs( $1 \times 10^6$  cells/ml) were cultured for 3 days with PHA( $6\mu\text{g/ml}$ ) and various concentrations( $10^{-11}\text{M} \sim 10^{-7}\text{M}$ ) of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (●-●) or  $1,25(\text{OH})_2-16\text{ene}-23\text{yne}-\text{D}_3$ (○-○). The curve represents the means  $\pm$  SD of three experiments with PBLs from three healthy donors(duplicate incubations for each point). IFN- $\gamma$  control values(only PHA) were 280, 150, and 230pg/ml, respectively, for donors 1-3.

ecules의 발현을 향상시키는 효과가 있다. 이와같이 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의해 임파구에서의 IFN- $\gamma$  생성이 현저히 감소됨에도 불구하고 이론적인 기대치와는 달리 monocyte에 대해 IFN- $\gamma$ 에 유도된 HLA class II molecules 유전자의 전사를 증가시키는 효과는, 이 두반응에 대한 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 전혀 다른 별개의 영향을 나타내는 것으로 보여지며 앞으로는 이에 대한 정확한 연구가 필요하다고 생각되어진다.

본 연구에서 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>가 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 비해 IFN- $\gamma$  생성저해 효과가 크다는 것이 확인되어 앞으로는 이 유도체를 이용하여 면역반응에서의 또 다른 영향을 검토하는 것이 필요하며, 이러한 연구결과에 따라 자가면역질환, 건선질환, preleukemia, 이식조직(transplants)에서의 거부반응 등 여러질병에 효과적인 면역반응을 나타나게 하는데 있어서 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>는 비타민 D<sub>3</sub>의 활성형인 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>[1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, calcitriol]의 유도체로서 이 유도체의 항암효과를 검토하기 위해 U937 세포(human histiocytic lymphoma cell line)에 대한 증식억제와 분화촉진 효과를 검토하였다. 한편 이 유도체의 면역조절기능을 확인하기 위해 phytohemagglutinin(PHA)에 의해 활성화된 peripheral blood lymphocytes(PBLs)에 의한 IFN- $\gamma$  생성에 대한 이 유도체의 영향을 검토하였다. 본 연구에서 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>는 모체인 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 비교 검토하였다. U937 세포에 대한 증식억제와 분화촉진에 관한 연구에서 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 비해 강한 효과가 있음이 확인되었다. 특히 세포의 증식억제에 관한 연구에서 이 유도체는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 비해 약 30배의 강한 효과가 있었으며, nonspecific esterase (NSE)활성으로 측정된 세포의 분화촉진 효과도 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 보다 탁월하였다. 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>로 처리된 U937 세포는 N/C비 감소, 배양 말기에 부착하는 세포수의 증가 등의 현상을 나타내면서 분화에 따른 세포형태 변화를 뚜렷이 보여주고 있다. 배양 3일 후 PHA로 활성화된 PBLs에 의한 IFN- $\gamma$  생성저하는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 비해 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23yne-D<sub>3</sub>에 의해 뚜렷이 나타났다. PBLs에 의한 IFN- $\gamma$  생성저하는 이 유도체에 의해 농도 의존적으로 나타났으며 특히 10<sup>-7</sup>M에서는 대조군(배양액에 PHA만 넣어 배양한 세포)에 비해 11% 정도의 IFN- $\gamma$  생성을 보여주고 있다. 이와같이 본 연구에서 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-23 yne-D<sub>3</sub>는

U937 세포에 대한 증식억제와 분화촉진에 강한 효과를 나타내고 있으며 또한 PBLs에 의한 IFN- $\gamma$  생성억제에도 강한 작용을 나타내고 있음이 확인됨에 따라 이 화합물은 백혈병 환자나 건선(psoriasis) 등의 여러 가지 악성질환에 대한 임상연구의 활용에 어느정도 기여하리라 생각되며, 또한 본 연구의 결과는 면역조절작용에서 이 화합물의 역할을 밝히는 근거가 되리라 생각한다.

## 감사의 글

본 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Norman, A. W., Roth, J. and Orch, L. : The vitamin endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors, and biological response. *Endocrine Rev.*, **3**, 331(1982)
2. Pols, H. A. P., Birkenhager, J. C., Foekens, J. A. and Van Leeuwen, J. P. T. M. : Vitamin D: A modulator of cell proliferation and differentiation. *J. Steroid Biochem.*, **37**, 873(1990)
3. Pike, J. W. : Vitamin D receptor: Structure and function in transcription. *Annu. Rev. Nutr.*, **11**, 189(1991)
4. Mangelsdorf, D. J., Koeffler, H. P., Donaldson, L. A., Pike, J. W. and Haussler, M. R. : 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induced differentiation in a human promyelocytic leukemia cell line(HL-60): receptor-mediated maturation to macrophage-like cells. *J. Cell Biol.*, **98**, 391(1984)
5. Tanaka, H., Abe, E., Miyaura, C., Kuribayashi, T., Konno, K., Nishii, Y. and Suda, T. : Alpha,25-dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukemia cell line(HL-60). The presence of a cytosol receptor and induction of differentiation. *Biochem. J.*, **204**, 713(1984)
6. Olsson, I., Gullberg, U., Ivhed, I. and Nilsson, K. : Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line, U-937 by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Cancer Res.*, **43**, 5862(1983)
7. Simpson, R. U., Hsu, T., Begley, D. A., Mitchell, B. S. and Alizadeh, B. N. : Transcriptional regulation of the *c-myc* protooncogene by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in HL-60 promyelocytic leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, **262**, 4104(1987)
8. Brelvi, Z. S. and Studzinski, G. P. : Changes in the expression of oncogenes encoding nuclear phosphoproteins but not-c-Ha-ras have a relationship to monocytic differentiation of HL-60 cells. *J. Cell Biol.*, **102**, 2234 (1986)
9. Scariban, E., Mitchell, T. and Kufe, D. : Expression of the *c-fms* protooncogene during human monocytic differentiation. *Nature*, **316**, 64(1985)
10. Honma, Y., Hozumi, M., Abe, E., Konno, K. and Fukushima, M. : 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and alpha-

- hydroxyvitamin D<sub>3</sub> prolong survival time of mice inoculated with myeloid leukemia cells. *Pro. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 201(1983)
11. Provvedini, D. M., Deffos, L. T. and Manolagas, S. C. : 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> promotes *in vivo* morphological and enzymatic changes in normal human monocytes consistent with their differentiation into macrophage. *Bone*, **7**, 23(1986)
  12. Provvedini, D. M., Tsoukas, C. D., Deffos, L. J. and Manolagas, S. C. : 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors in human leukocytes. *Science*, **221**, 1181(1983)
  13. Rigby, W. F. C., Denome, S. and Fanger, M. W. : Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> : specific inhibition at the level of messenger RNA. *J. Clin. Invest.*, **79**, 1659(1987)
  14. Lemire, J. M., Beck, L., Faherty, D., Gately, M. and Spiegelberg, H. : 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibited the production of IL-12 by human monocyte and B cells. *FASEB J.*, **8**, A745(1994)
  15. Richard, C., Mazo, E., Cuadrado, M. A. and Zubizarreta, A. : Treatment of myelodysplastic syndrome with 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Am. J. Hemat.*, **23**, 175(1986)
  16. Morimoto, K., Yoshikawa, Y., Kozuka, Y., Kitano, S., Imanaka, K., Fukuo, E. K. and Kumahara, Y. : An open study of vitamin D<sub>3</sub> treatment in psoriasis vulgaris. *Br. J. Derm.*, **115**, 421(1986)
  17. Bikle, D. D. : Vitamin D: new actions, new analogs, new therapeutic potential. *Endocrine Rev.*, **13**, 765(1992)
  18. Nakatsuka, Y., Katsumata, T., Nagata, A., Murakawa, S. and Mori, H. : Biological potency of a fluorinated vitamin D analogs in hypoparathyroidism. *Bone and Mineral*, **16**, 73(1992)
  19. Nishii, Y., Sato, K. and Kobayashi, T. : The development of vitamin D analogues for the treatment of osteoporosis. *Osteoporosis Inter.(suppl. 1)*, S190-S193 (1993)
  20. Yam, L. T. and Crosby, W. H. : Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.*, **55**, 283(1971)
  21. Bhalla, A. K., Amento, E. P., Clemens, T. L., Holick, M. F. and Krane, S. M. : Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocyte and induction in T lymphocyte following activation. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **57**, 1308(1983)
  22. Jung, S. J., Lee, Y. Y., Pakkala, S., Vos Sven De, Elstner, E., Norman A. W., Green, J., Uskokovic, M. and Koeffler, H. P. : 1,25(OH)<sub>2</sub>-16ene-vitamin D<sub>3</sub> is a potent antileukemic agent with low potential to cause hypercalcemia. *Leukemia Res.*, **18**, 453(1994)
  23. Zhou, J., Norman, A. W., Lubbert, M., Collins, E. D., Uskokovic, M. R. and Koeffler, H. P. : Novel vitamin D analogs that modulate leukemic cell growth and differentiation with little effects on either intestinal calcium absorption and bone calcium mobilization. *Blood*, **74**, 82(1989)
  24. Reichel, H., Koeffler, H. P., Tobler, A. and Norman, A. W. : 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits  $\gamma$ -interferon synthesis by normal human peripheral blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 3385(1987)
  25. Virelizier, J. L., Perze, N., Arenzana-Seisdedos, F. and Devos, R. : Pure interferon gamma enhances HLA class II antigens on human monocytic cell lines. *Eur. J. Immunol.*, **14**, 106(1984)
  26. Guyre, P. M., Morganelly, P. M. and Miller, R. : Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.*, **72**, 393(1983)
  27. Holter, W., Grunow, R., Stockinger, H. and Knapp, W. : Recombinant interferon- $\gamma$  induces interleukin-2 receptors on human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.*, **136**, 2171(1986)

(1997년 10월 31일 접수)