

# IgA Isotype Switching 연구를 위한 마우스 B Lymphoma Cell (CH12F3-2A)의 특성 연구

<sup>1</sup>강원대학교 자연대학 미생물학과, <sup>2</sup>혈관연구센터, <sup>3</sup>한림대학교 의과대학 생화학교실

장영생<sup>1</sup> · 최서현<sup>1</sup> · 박석래<sup>1</sup> · 김현아<sup>1</sup> · 박재봉<sup>3</sup> · 김평현<sup>1,2</sup>

## Characterization of Mouse B Lymphoma Cells (CH12F3-2A) for the Study of IgA Isotype Switching

Young-Saeng Jang<sup>1</sup>, Seo-Hyeun Choi<sup>1</sup>, Seok-Rae Park<sup>1</sup>, Hyun-A Kim<sup>1</sup>, Jae-Bong Park<sup>3</sup> and Pyeung-Hyeun Kim<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kangwon National University, <sup>2</sup>Vascular System Research Center, Kangwon National University, <sup>3</sup>Department of Biochemistry, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon, S. Korea

### ABSTRACT

**Background:** It is well known that IgA isotype switching is induced by TGF- $\beta$ 1. LPS-activated mouse normal B cells well differentiate into IgA secreting plasma cells under the influence of TGF- $\beta$ 1. Nevertheless, there are lots of difficulties in studying normal B cells in detail because it is not simple to obtain highly purified B cells, showing low reproducibility and transfection efficacy, moreover impossible to keep continuous culture. To overcome these obstacles, it is desperately needed to develop B cell line which acts like normal B cells. In the present study, we investigated whether CH12F3-2A lymphoma cells are appropriate for studying IgA isotype switching event. **Methods:** CH12F3-2A B cell line was treated with LPS and TGF- $\beta$ 1, then levels of germ-line (GL) transcripts were measured by RT-PCR, and GL $\alpha$  promoter activity was measured by luciferase assay. In addition, membrane IgA (mIgA) expression and IgA secretion were determined by FACS and ELISA, respectively. **Results:** TGF- $\beta$ 1, regardless of the presence of LPS, increased level of GL $\alpha$  transcripts but not GL $\gamma$ 2b transcripts. However, IgA secretion was increased dramatically by co-stimulation of LPS and TGF- $\beta$ 1. Both mIgA and IgA secretion in the presence of TGF- $\beta$ 1 were further increased by over-expression of Smad3/4. Finally, GL $\alpha$  promoter activity was increased by TGF- $\beta$ 1. **Conclusion:** CH12F3-2A cell line acts quite similarly to the normal B cells which have been previously reported regarding IgA expression. Thus, CH12F3-2A lymphoma cell line appears to be adequate for the investigation of the mechanism(s) of IgA isotype switching at the cellular and molecular levels. (*Immune Network* 2004;4(4):216-223)

**Key Words:** LPS, TGF- $\beta$ 1, IgA, isotype switching, CH12F3-2A, Smad

### 서 론

IgA 항체는 내장을 비롯한 점막면역에서 최초의 방어를 담당하는 중요한 항체이다. Transforming growth factor-

$\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)은 IgA 항체 합성을 자극하는 가장 강력한 cytokine으로 알려져 있다(1-3). 성숙한 B cell이 항원의 자극과 함께 TGF- $\beta$ 1의 영향을 받으면 Ig germ line  $\alpha$  transcripts를 발현하며(4) 곧바로 Ig heavy chain VDJ 유전자와  $\alpha$  constant 유전자 간의 재조합이 일어나는데 이 과정을 IgA class switching recombination (CSR)이라 부른다. 계속하여 B cell은 분화되어 일시적으로 세포표면에 IgA (membrane IgA, 이하 mIgA)를 발현하고, 최종적으로 plasma cell로 분화되어 IgA 항체를 분비한다. 정상적인

책임저자 : 김평현, 강원대학교 자연대학 미생물학과  
☎ 200-701, 강원도 춘천시 효자 2동 192-1  
Tel: 033-250-8546, Fax: 033-241-4627  
E-mail: phkim@kangwon.ac.kr

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2003-000-10568-0) 지원으로 수행되었음.

로 항체의 분비를 마친 plasma cell은 수명을 다하고 죽는다.

TGF- $\beta$ 1이 IgA CSR을 유도한다는 연구는 주로 정상적인 B cell에 대해 행해져 왔는데 정상적인 B cell을 대상으로 하는 연구는 다음과 같은 근본적인 어려움과 한계가 있다. 첫째, B cell의 계대 배양이 불가능하여 반복적인 실험을 수행하기 어렵다. 둘째, transfection과 같은 유전자 도입이 어려워 분자생물학적인 분석에 한계가 있다. 마지막으로, 분화 단계에 따른 세포주기를 조절하기 어려워 유전자 발현과 분화 단계의 관계를 정확하게 분석하기 어렵다. 이러한 문제점을 극복하고자 B lymphoma 세포주를 개발하고 있으나 아직까지 IgA CSR을 연구하는데 적합한 세포주가 없는 실정이다. Honjo 그룹은 CH12F3 lymphoma 세포주가 TGF- $\beta$ 1에 대한 반응성이 좋아 IgA 발현이 쉽게 유도된다고 보고한 바 있다(5).

본 연구에서는 CH12F3의 subclone인 CH12F3-2A B lymphoma 세포주가 IgA CSR의 기작을 연구하는데 적합한지를 구체적으로 조사하였다. 이 세포주는 TGF- $\beta$ 1에 대한 germ line  $\alpha$  transcripts의 발현과 단백질 수준에서의 IgA 항체 합성도가 좋았고 transfection과 promoter reporter 분석 등에도 적합하였다. 이상과 같은 이 세포주의 특성은 정상적인 B cell에서 일어나는 분화 기작을 연구하는데, 특히 IgA isotype switching 기작을 연구하는데 적합함을 보여준다.

## 재료 및 방법

**세포주와 세포배양.** CH12F3-2A는 murine B lymphoma cell line으로 Dr. T. Honjo (Osaka University, Japan)로부터 제공받았다(5). 세포배양액으로 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 unit/ml) 및 streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 혼합 용액(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA), 2 mM L-glutamin (Sigma), 5 mM HEPES (Sigma), 50 $\mu$ M의 2-mercaptoethanol (Sigma)을 함유한 RPMI 1640 (Sigma)을 0.22 $\mu$ m 크기의 filter로 여과하여 사용하였으며, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 95% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 사람 재조합 TGF- $\beta$ 1은 R&D system (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 1 mg/ml BSA가 포함된 4 mM HCl buffer에 희석하여 사용하였다.

**Expression plasmid의 준비.** pcDNA3에 subclone된 Smad3 (6), Smad4 (7)는 Dr. Masahiro Kawabata, (The Cancer Institute, Tokyo, Japan)로부터 기증받았으며, luciferase assay를 위한 GLa promoter는 Stavnezer 교수 (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA. USA)로부터 기증받았다.

**B lymphoma cell line의 transfection.** 대상 세포 ( $3 \times 10^7$ )를 FBS와 항생제가 들어가지 않은 RPMI-1640 배지 800

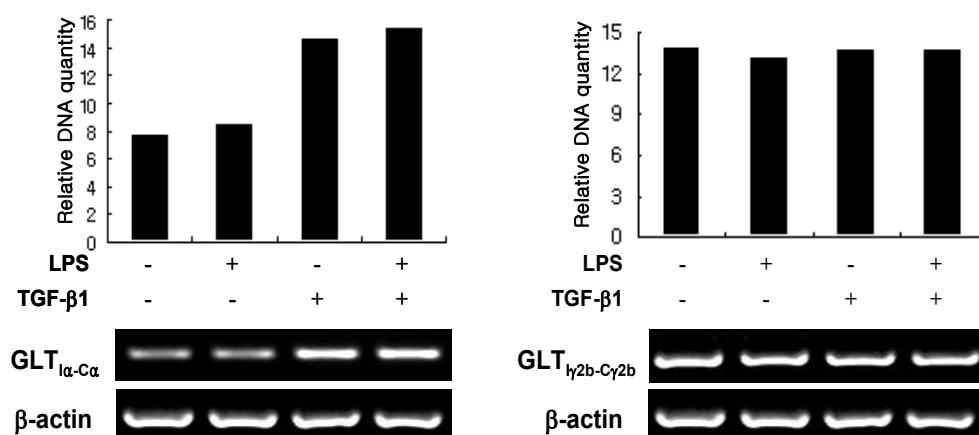
$\mu$ l를 넣고 plasmid DNA를 각각 15 $\mu$ g (경우에 따라 Ca는 30 $\mu$ g, pCMV5 $\beta$ -gal은 5 $\mu$ g)를 첨가한 후 Gene-pulser cuvette (Gap: 0.4 cm)로 옮긴 후 Gene pulser II (Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 950  $\mu$ F, 320 V로 transfection하였다. 세포를 상온에 15분간 정지시킨 후 10% FBS를 포함하는 RPMI-1640 배지에 희석한 후에 TGF- $\beta$ 1을 1 ng/ml로 하여 배지에 첨가한 후, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 95% 습도가 유지되는 배양기에서 16시간에서 48시간 배양하였다.

**Isotype specific ELISA.** 배양한 세포의 상등액을 얻어, isotype specific ELISA (8)를 수행하여 합성된 항체의 양을 정량하였다. Sodium bicarbonate buffer (pH 9.2)에 anti-mouse isotype specific antibody를 희석 (IgA 1.2 $\mu$ g/ $\mu$ l, IgG2b 5 $\mu$ g/ $\mu$ l, IgG1 1.2 $\mu$ g/ $\mu$ l, IgG3 1.2 $\mu$ g/ $\mu$ l, IgM 1.2 $\mu$ g/ $\mu$ l, IgG2a 1.2 $\mu$ g/ $\mu$ l)하여 96-U bottomed polyvinyl plate (Falcon, Becton Dickinson & Co., Oxnard, CA)에 coating한 후 4°C에서 overnight시켰다. 0.01M PBS + 0.05% Tween 20 (PBST)로 세 번 세척한 후 1% gelatin 100 $\mu$ l로 37°C에서 1시간 동안 blocking시켰다. 다시 PBST로 세 번 세척한 후, 세포 배양 상등액과 standard protein을 0.5% gelatin에 희석하여 well당 50 $\mu$ l씩 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBST로 세 번 세척한 후, 0.5% gelatin에 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (Southern Biotechnology, Birmingham, AL., USA)를 희석하여 well당 50 $\mu$ l를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 세 번, 3차 증류수로 두 번 세척한 후, 기질인 0.2 mM 2,2-azino-bis (3-ethyl-benzthiazolin)-6-sulfonic acid (ABTS)를 50 $\mu$ l를 넣고 약 10~15 분간 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

**Luciferase reporter assay.** Transfection 후 16시간 배양한 세포를 0.01 M PBS로 두 번 씻어준 후 Triton X - 100 buffer를 처리하여 세포를 lysis 시켰다. 600 g로 15분 동안 원심분리하여 상등액을 얻은 후 assay 수행하기 전까지 -70°C에서 보관하였다. 동량의 sample에 luciferin substrate solution을 첨가하여 luminometer (MDC-Lmax)를 이용하여 luciferase activity를 측정하였다. transfection 효율을 표준화하기 위해 이미 기술된 방법에 따라  $\beta$ -gal assay를 수행하였다(9).

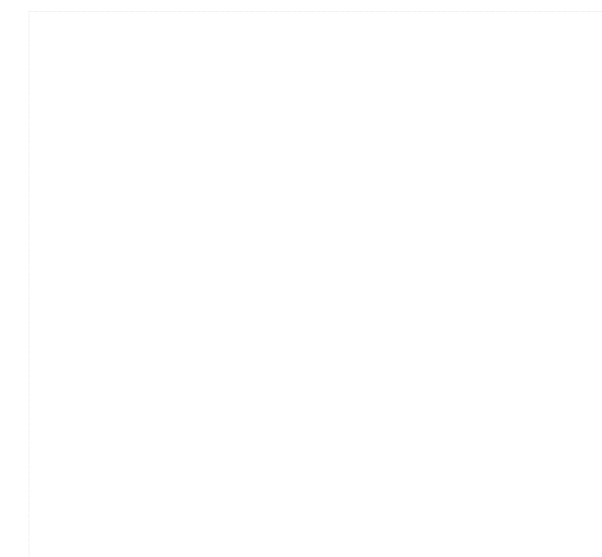
**FACS 분석.** 배양된 세포를 600 g에서 5분간 원심분리한 후,  $1 \times 10^6$  세포를 DME 200 $\mu$ l에 현탁하였다. FITC-conjugated goat anti-mouse IgA (1 mg/ml, Becton Dickinson, San Jose, CA)를 얼음에서 30분간 반응시키고 DME로 씻어주었다. 1% formalin과 0.01 M PBS로 세포를 고정된 뒤 FACS (BD model FACScan)로 측정하였다.

**RT-PCR을 이용한 germ-line transcripts (GLT)의 발현 조사.** 배양된 세포 ( $0.5 \sim 1 \times 10^7$ )는 TRIzol (Invitrogen,



**Figure 1.** Effects of LPS and TGF- $\beta$ 1 on the GL $\alpha$  and GL $\gamma$ 2b transcription. CH12F3-2A B lymphoma cells were cultured with LPS (2.5 $\mu$ g/ml) and TGF- $\beta$ 1 (0.2 ng/ml) for 1 day. Levels of endogenous GL $\alpha$  transcripts (GLT<sub>I $\alpha$ -C $\alpha$</sub> ) and GL $\gamma$ 2b transcripts (GLT<sub>I $\gamma$ 2b-C $\gamma$ 2b</sub>) were measured by RT-PCR and Scion image analysis (shared NIH software).

Gaithersburg, MD, USA)을 사용하여 RNA를 분리하였다. 준비된 각 RNA 1 $\mu$ g를 10 mM의 Tris, 50 mM의 MgCl<sub>2</sub>, 각각 1 mM의 dATP, dCTP, dGTP와 dTTP, 20 U의 RNasin (ribonuclease inhibitor; Promega, Wisconsin, USA), 0.1 $\mu$ g의 oligo(dT)<sub>15</sub> (Boehringer Mannheim, Switzerland)과 50 U M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen)를 포함하는 buffer 20 $\mu$ l가 담긴 PCR tube에 넣고 37°C에서 1시간 동안 reverse transcription시킨 후 95°C에서 10분 동안 heat-inactivation하고 4°C에서 안정화시켰다. Germ-line  $\alpha$  transcripts (GLT<sub>I $\alpha$ -C $\alpha$</sub> )와 germ-line  $\gamma$ 2b transcripts (GLT<sub>I $\gamma$ 2b-C $\gamma$ 2b</sub>)를 측정하기 위한 primer는 다음과 같다. GLT<sub>I $\alpha$ -C $\alpha$</sub> : sense, (5-CTACCATAGGGAAGATAGCCT-3); antisense, (5-TAATCGTGAATCAGGCAG-3); product size, 207 bp. GLT<sub>I $\gamma$ 2b-C $\gamma$ 2b</sub>: sense, (5-GGGAGAGCACTGGGCCTT-3); antisense, (5-AGTCACTGACTCAGGGAA-3); product size, 318 bp.  $\beta$ -actin: sense, (5-CATGTTTGAGACCTTCAACA CCCC-3); antisense, (5-GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTA G-3); product size, 320 bp. RT가 끝난 cDNA products를 PCR buffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 각각 200 $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP와 dTTP)에 넣고 specific 5' and 3' primer를 각각 25 pmol의 농도로 넣은 후 PCR을 수행하였고 'Hot start PCR' 방법을 이용하였다. 94°C에서 45초 간 denaturation, 55°C에서 45초 간 annealing, 72°C에서 2분 간 extension하여 35~40 cycle을 수행하였다. Negative control로는 cDNA synthesis 수행시 RNA를 넣지 않은 sample을 사용하였다. PCR product는 2% agarose gel 상에서 확인하였다. PCR products 10 $\mu$ l와 load buffer 2 $\mu$ l을 혼합하고 Forever 100 bp Ladder Personalizer (see-gene, USA)를 size marker로 사용하였으며 0.5 $\times$  Tris-boric acid-EDTA buffer가 담긴 전기영동 장치에서 10ml agarose gel당 0.5 $\mu$ l의 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에 70 V에서 30~60분 동안 전기영동하였다.



**Figure 2.** Flow cytometric analysis of CH12F3-2A stimulated with LPS and TGF- $\beta$ 1. CH12F3-2A B lymphoma cells were cultured with LPS (12.5 $\mu$ g/ml) and TGF- $\beta$ 1 (0.5 ng/ml) for 3 days, and stained with PE-labeled anti-mouse IgM and FITC-labeled anti-mouse IgA.

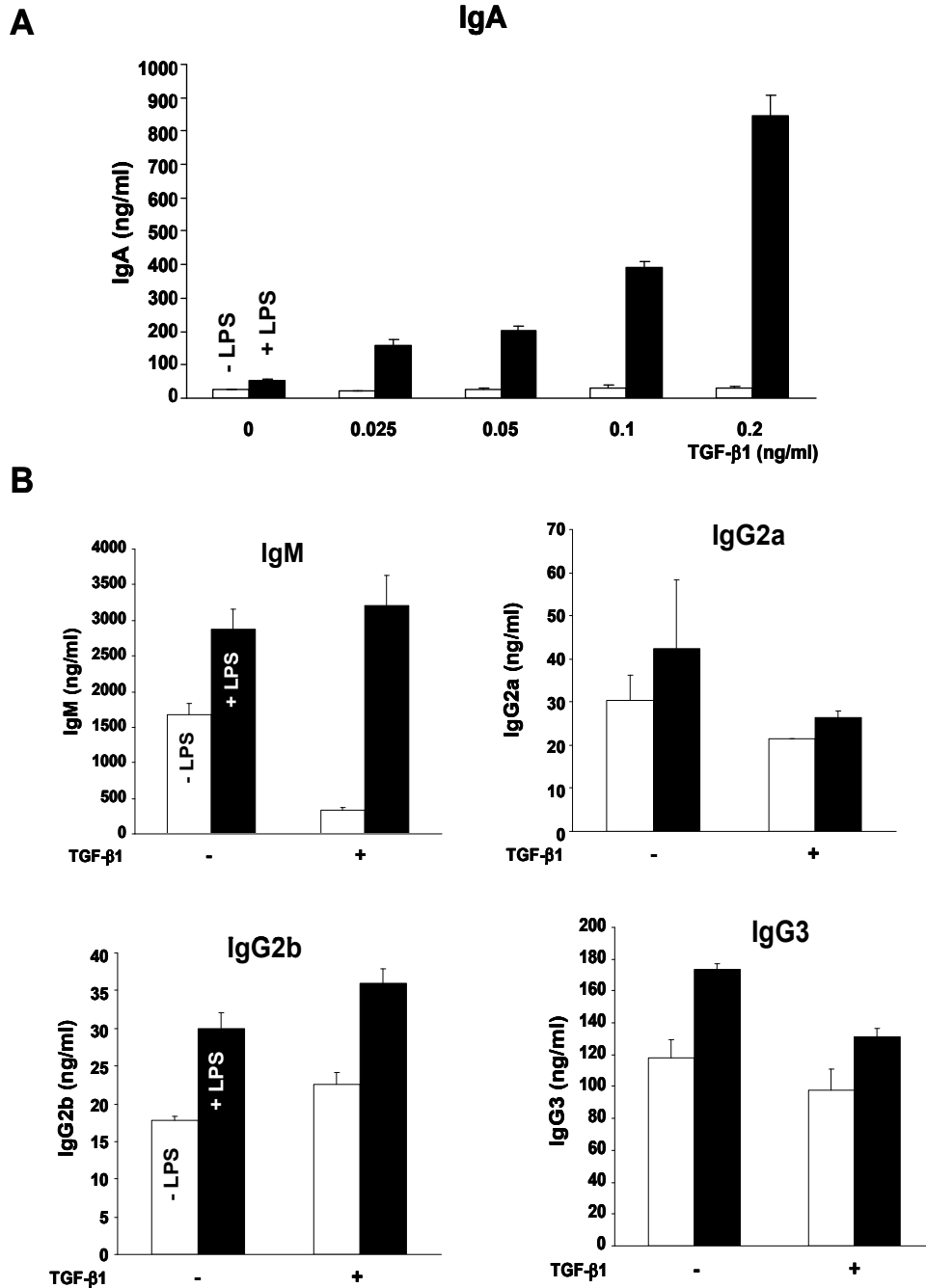
## 결 과

**GL $\alpha$ 와 GL $\gamma$ 2b 전사에 미치는 LPS와 TGF- $\beta$ 1의 영향.** TGF- $\beta$ 1은 IgA class switching을 유도하며 LPS로 자극시킨 BALB/c 마우스 B cell에서 IgG2b의 분비를 선택적으로 증가시킨다(10,11). 본 연구에서는 B cell 세포주의 일종인 CH12F3-2A (5)에서 DNA수준에서의 IgA와 IgG2b CSR이 일어나기 전 단계에서 나타나는 germ-line  $\alpha$  transcripts (GLT<sub>I $\alpha$ -C $\alpha$</sub> )와 germ-line  $\gamma$ 2b transcripts (GLT<sub>I $\gamma$ 2b-C $\gamma$ 2b</sub>)의 발현에 대한 LPS와 TGF- $\beta$ 1의 영향을 알아보았다. 세포를 LPS (2.5 $\mu$ g/ml)와 TGF- $\beta$ 1 (0.2 ng/ml)으로 자극시켜 1일 배양한 뒤 RT-PCR을 수행하였다. LPS는 GLT<sub>I $\alpha$ -C $\alpha$</sub> 의 발현에 영향을 주지 않았지만, TGF- $\beta$ 1은 약 2배 정도 증가시켰다. LPS와 TGF- $\beta$ 1이 동시에

존재한 조건에서도 LPS는  $GLT_{I\alpha-C\alpha}$ 의 전사에 영향을 미치지 않았다(Fig. 1). 한편 LPS와 TGF- $\beta$ 1은  $GLT_{I\gamma 2b-C\gamma 2b}$ 의 발현에 대해 어떤 영향도 보이지 않았다(Fig. 1).

**IgA 발현에 대한 LPS와 TGF- $\beta$ 1의 영향.** CH12F3-2A 세포를 LPS (12.5 $\mu$ g/ml)와 TGF- $\beta$ 1 (0.5 ng/ml)으로 자극

현을 측정하였다. LPS로 자극한 경우  $mIgM^+/mIgA^+$  dual positive 세포는 2% 정도 증가하였다. 그러나  $mIgA^+$  single positive 세포의 증가는 미미하였다. 한편 TGF- $\beta$ 1 단독으로 처리한 경우도  $mIgM^+/mIgA^+$  dual positive 세포는 4% 정도 증가하였으나  $mIgA^+$  single positive 세포



**Figure 3.** Effects of TGF- $\beta$ 1 on the secretion of Ig isotypes. (A) CH12F3-2A B lymphoma cells were stimulated with LPS (2.5 $\mu$ g/ml) and TGF- $\beta$ 1 as indicated. (B) 2.5 $\mu$ g/ml of LPS and 0.2 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 were used. After 3 days of culture, supernatants were collected and production of IgA, IgM, IgG2a, IgG2b and IgG3 were determined by isotype-specific ELISA. Data are means $\pm$ SEM of triplicate cultures.

시켜 3일간 배양한 뒤 FACSscan을 이용하여 mIgA의 발

현의 증가는 관찰되지 않았다. 그러나, LPS와 TGF- $\beta$ 1이

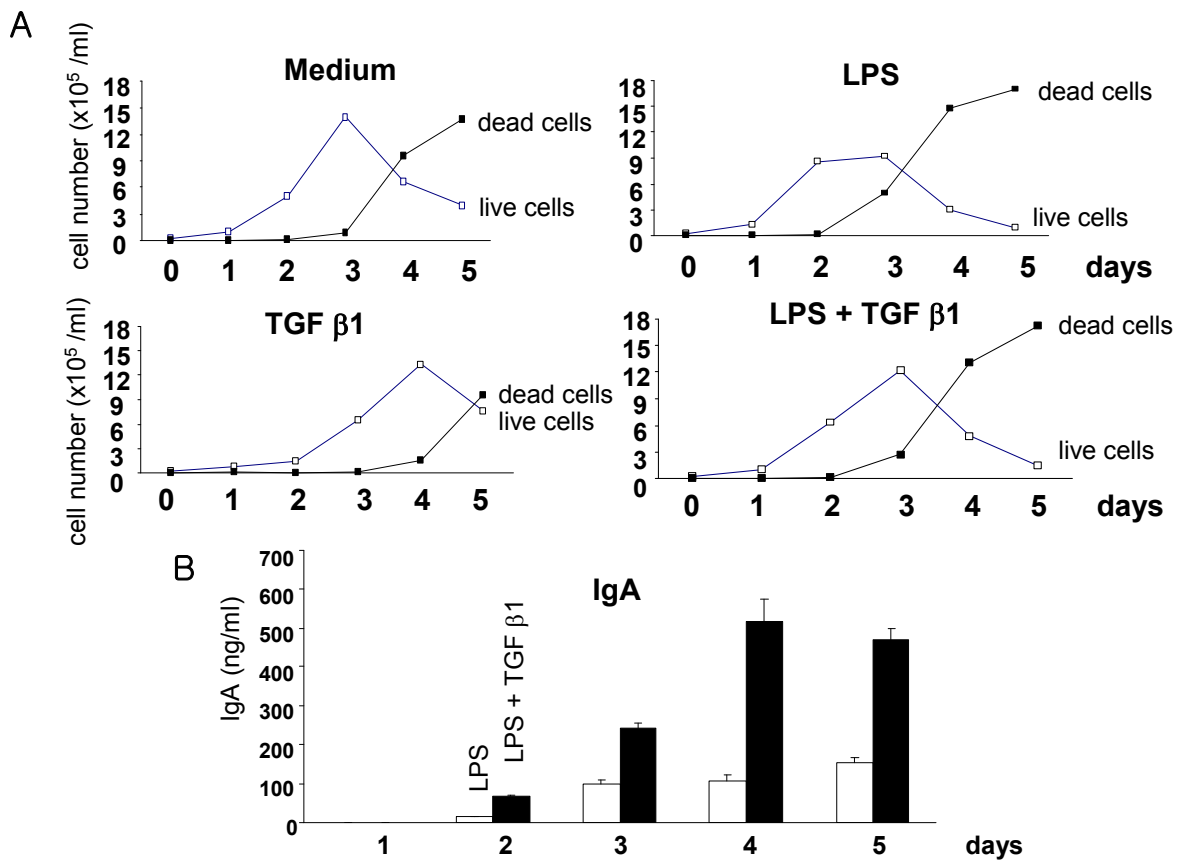
함께 존재하는 경우에는  $mIgM^+/mIgA^+$  dual positive 세포가 TGF- $\beta$ 1 단독 조건보다 약 2% 감소한 반면  $mIgA^+$  single positive 세포수가 약 5% 정도로 현격히 증가하였다. 이상의 결과는  $mIgA$  발현에 LPS와 TGF- $\beta$ 1이 요구되며  $mIgA$ 로의 switching은  $mIgM^+/mIgA^+$ 의 중간단계를 통해 이루어짐을 시사한다(Fig. 2).

다음 단계에서는 항체 분비에 미치는 LPS와 TGF- $\beta$ 1의 영향을 ELISA를 통해 조사하였다.  $mIgA$ 의 경우와 유사하게 IgA 분비는 LPS와 TGF- $\beta$ 1이 동시에 존재할 때 관찰되었다. 이 때 TGF- $\beta$ 1의 농도가 증가할수록 IgA 합성량이 증가하였다(Fig. 3A). 이 중에서 2.5  $\mu$ g/ml의 LPS와 0.2 ng/ml의 TGF- $\beta$ 1으로 자극한 상등액에 대해 IgM, IgG2a, IgG2b, IgG3의 분비량을 조사한 결과, LPS 처리 조건에서 IgM과 IgG2b의 분비량은 약간 증가하였으며 IgG3와 IgG2a의 분비량은 감소하였다(Fig. 3B).

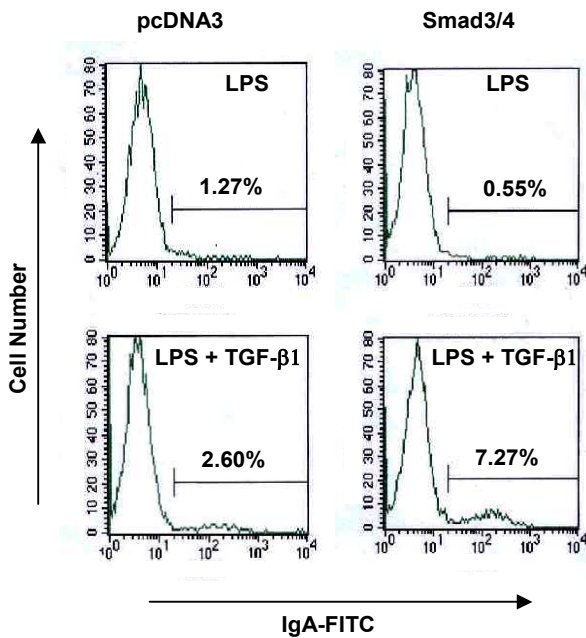
**배양시간에 따른 세포의 증식과 IgA 합성의 변화.** 세포의 증식과 IgA 항체 합성간의 역학 관계를 알아보기 위하여 CH12F3-2A에 LPS와 TGF- $\beta$ 1을 처리한 후 5일까

지 배양하였다. 하루마다 CH12F3-2A의 증식을 조사하고 배양 상등액에 대해 합성량을 측정하였다. LPS로 처리한 경우 배양 이틀째에서 medium 조건보다 세포수가 두 배로 증가하였으나 반대로 TGF- $\beta$ 1은 배양 이틀째에 medium 조건보다 2배 정도 세포수를 감소시켰다. 한편, LPS와 TGF- $\beta$ 1이 동시에 존재할 때는 LPS가 처리된 경우보다는 느리게, 그러나 TGF- $\beta$ 1이 처리된 경우보다는 빠르게 증식하였다. 이러한 증식 양상은 아무런 처리를 하지 않은 경우와 유사하였다(Fig. 4A). 그러나 IgA 합성량은 LPS와 TGF- $\beta$ 1이 존재하는 경우에 현격히 증가하였고 배양 4일째 최대에 이르렀다(Fig. 4B). 이와 같은 결과는 그 기작을 알 수는 없지만 LPS의 증식 촉진 효과와 TGF- $\beta$ 1의 증식 억제 효과가 IgA 합성을 증가시키는데 기여함을 시사한다.

**IgA 발현에 대한 Smad3와 Smad4의 영향.** 정상적인 spleen B cell에서의 TGF- $\beta$ 1 신호전달에 관여하는 Smad protein의 역할이 잘 알려져 있기 때문에 본 실험에서는



**Figure 4.** Effects of LPS and TGF- $\beta$ 1 on the kinetics of growth and IgA production. (A) CH12F3-2A B lymphoma cells were stimulated with LPS (2.5  $\mu$ g/ml) and TGF- $\beta$ 1 (0.2 ng/ml). Viable and dead cells were enumerated by trypan blue exclusion at the indicated days. (B) B lymphoma cells were cultured with LPS (2.5  $\mu$ g/ml) and TGF- $\beta$ 1 (0.2 ng/ml) for the indicated days. Supernatant were collected and production of IgA were determined by isotype-specific ELISA. Data are means  $\pm$  SEM of triplicate cultures.

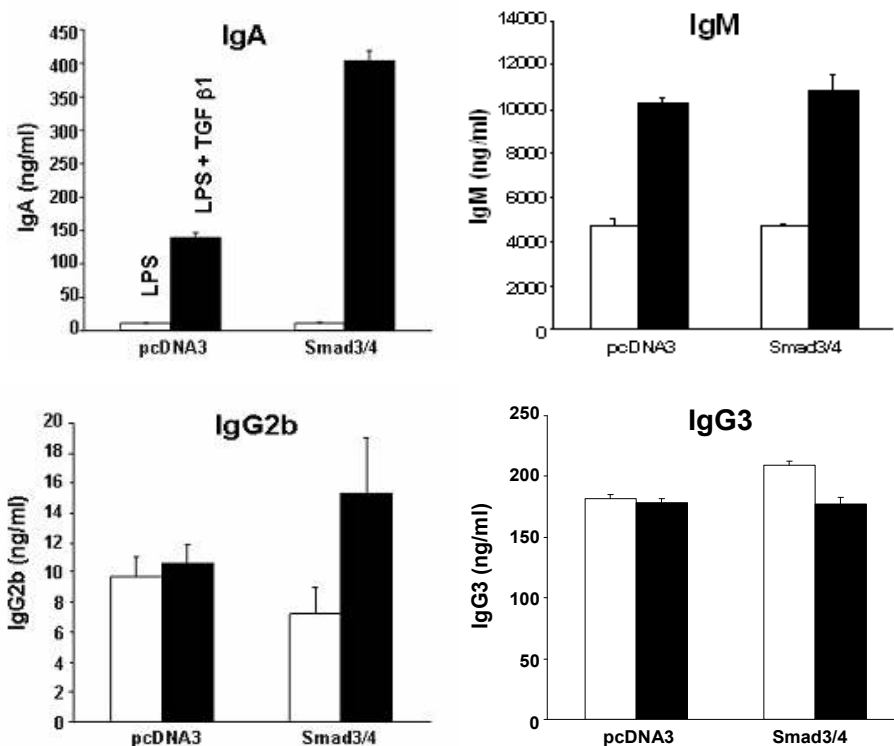


**Figure 5.** Flow cytometric analysis of CH12F3-2A transfected with Smad3/4 under the influence of LPS and TGF- $\beta$ 1. CH12F3-2A B lymphoma cells were transfected with expression plasmid encoding Smad3 (15 $\mu$ g) and Smad4 (15 $\mu$ g) or empty vector pcDNA3 (30 $\mu$ g) by electroporation. Cells were then cultured with LPS (12.5 $\mu$ g/ml) and TGF- $\beta$ 1 (0.5 ng/ml) for 2 days, and cells were stained with FITC-labeled anti-mouse IgA.

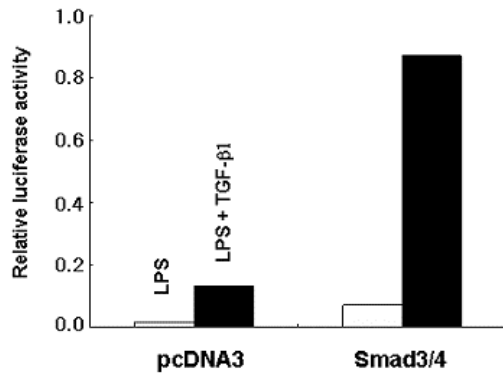
LPS로 자극된 CH12F3-2A에서 Smad3/4가 TGF- $\beta$ 1에 의한 IgA의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. surface IgA는 TGF- $\beta$ 1에 의해 2배 정도 증가하였고 Smad3/4가 과발현되었을 때 3배 정도 더 증가하였다. pcDNA3의 LPS 조건에서 1.27%였던 mIgA 발현이 TGF- $\beta$ 1에 의해 2.6%로 증가하였으며, Smad3/4 조건에서는 7.27%로 급등하였다(Fig. 5).

다음으로 LPS로 자극된 CH12F3-2A에서 과발현된 Smad3/4가 TGF- $\beta$ 1에 의한 항체 분비에 미치는 영향을 조사하였다. LPS가 존재할 때 TGF- $\beta$ 1은 IgA와 IgG2b의 분비량을 증가시켰으며 항체 분비는 Smad3/4의 과발현에 의해 더욱 증가하였다. IgM의 분비량도 TGF- $\beta$ 1에 의해 약간 증가하였지만 Smad3/4에 의한 효과는 보이지 않았다. IgG3의 분비량은 TGF- $\beta$ 1과 Smad3/4에 의한 효과가 거의 없었다(Fig. 6). 이상의 결과는 CH12F3-2A 세포주가 정상적인 B cell과 유사하게 TGF- $\beta$ 1과 Smad3/4에 반응함을 나타낸다.

**GLa promoter의 활성화에 대한 Smad3/4의 영향.** GLa promoter의 활성화에 대한 Smad3/4의 영향을 알아보고자 luciferase reporter assay를 수행하였다. LPS만으로 자극시킨 조건에 비해 LPS와 TGF- $\beta$ 1으로 동시에 자극시킨 조건에서 GLa promoter 활성화는 약 8배 증가하였으며, 이 조건에 Smad3/4를 과발현시켰을 때는 5배 정도 더 증가하였다(Fig. 7). 이상의 결과는 CH12F3-2A에서 GLa에



**Figure 6.** Effects of over-expressed Smad3/4 on Ig secretion by CH12F3-2A. CH12F3-2A B lymphoma cells were transfected with expression plasmid encoding Smad3 (15 $\mu$ g) and Smad4 (15 $\mu$ g) or empty vector pcDNA3 (30 $\mu$ g) by electroporation. After 16 hours of incubation, cells ( $1 \times 10^5$ /ml) were stimulated with LPS (2.5, 12.5 $\mu$ g/ml) and TGF- $\beta$ 1 (0.5 ng/ml). After 3 days of culture, supernatant were collected and production of IgA, IgM, IgG3 and IgG2b were determined by isotype-specific ELISA. Data are means  $\pm$  SEM of triplicate cultures.



**Figure 7.** Effect of over-expressed Smad3/4 on GLA promoter activity. CH12F3-2A B lymphoma cells were transfected with expression plasmid encoding Smad3 (15 $\mu$ g) and Smad4 (15 $\mu$ g) or empty vector pcDNA3 (30 $\mu$ g) and GLA Luc reporter (30 $\mu$ g) by electroporation. And then cells were cultured with LPS (12.5  $\mu$ g/ml) and TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml). After 16 hours, luciferase activity determined. Transfection efficiency was normalized to  $\beta$ -gal activity.

대한 TGF- $\beta$ 1의 유도 효과가 Smad3/4에 의해 매개됨을 보여준다.

## 고 찰

본 연구에서는 CH12F3-2A B 세포주에서 IgA 발현 및 GLT<sub>Ia-C $\alpha$</sub> , GLT<sub>I $\gamma$ 2b-C $\gamma$ 2b</sub> 발현에 대한 LPS, TGF- $\beta$ 1과 Smad3/4의 영향을 조사하였다. 세포주의 전반적인 특징은 본 실험실에서 이미 보고한 정상적인 마우스 spleen B cell과 유사하였다(12,13). Honjo 그룹에 따르면 TGF- $\beta$ 1은 CH12F3에 처리되었을 때 mIgA<sup>+</sup>로의 switching되는 빈도가 예외적으로 높은 것으로 밝혀진 바 있다(5). 본 연구에서는 같은 조건에서 mIgA 발현 정도가 Honjo 그룹이 보고한 정도보다는 낮았지만 LPS와 TGF- $\beta$ 1에 의해 뚜렷하게 발현이 증가하였다. 흥미롭게도 LPS는 mIgM과 mIgA를 동시에 발현하는 세포수를 증가시켰고, 이 때 TGF- $\beta$ 1은 이 세포군으로부터 mIgA만을 발현하도록 유도하였다. 이와 같은 현상은 정상적인 B cell에서는 관찰하기 쉽지 않은 현상으로 앞으로 이 현상이 갖는 의미에 대해 심도있는 연구가 요구된다.

본 연구에서 CH12F3-2A B 세포주의 경우 LPS와 TGF- $\beta$ 1의 효과를 크게 3가지로, 즉 증식, IgA, IgG2b 발현에 미치는 영향으로 구분하여 살펴보고자 한다. 먼저 증식에 대한 LPS와 TGF- $\beta$ 1의 영향은 이미 본 연구진이 보고한 바와 유사하게 나타났다(1). 이러한 결과는 LPS는 증식을 촉진하는 역할을, TGF- $\beta$ 1은 증식을 지연시키는 효과를 보이는 현상으로 다른 연구자들의 보고와도 일치한다. 다음으로 IgA 발현에 대한 LPS와 TGF- $\beta$ 1의 효과도 이미 보고된 정상 B cell의 경우와 일치한다. 즉, germ line  $\alpha$ 의 발현, mIgA 발현, IgA 분비 등 그 동안

본 연구진이 보고한 연구 결과들과 잘 부합한다(1,12,13). 외견상 CH12F3-2A B 세포주는 IgA CSR 현상을 연구하는데 적절하다고 여겨진다. 그러나, 이 세포주에서 IgG2b 발현에 대한 TGF- $\beta$ 1의 영향은 이미 보고된 정상적인 B cell의 경우와는 다른 양상이다. 정상적인 B cell에서 TGF- $\beta$ 1은 GL $\gamma$ 2b 전사를 증가시키고 IgG2b 합성량도 증가시킨다고 알려져 있다. 본인의 실험실에서는 최근에 GL $\gamma$ 2b promoter를 클로닝하여 TGF- $\beta$ 1과 신호전달물질인 Smad 분자가 GL $\gamma$ 2b 전사를 증가시킴을 확인하였다(14). 그런데 본 실험 결과를 보면 TGF- $\beta$ 1이 GL $\gamma$ 2b 전사와 IgG2b 분비에 미치는 영향은 미미하였다. 이 결과는 CH12F3-2A B 세포주가 정상세포와는 다른 분화의 단계나 비정상적인 상태에 있음을 시사한다. 또한 실험결과를 제시하지 않았지만 CH12F3-2A B 세포주는 LPS로 자극한 경우에도 IgG1을 전혀 분비하지 않았다. 이러한 현상도 정상적인 성숙한 B cell과 구분되는 특징이다. 종합하여 보면 CH12F3-2A B lymphoma 세포주는 초기단계의 mature B cell (resting stage) 분화단계를 약간 지난 단계에 머물러 있는 것으로 보인다. 즉 어느 정도의 편향성을 갖고 있으나 Ig CSR은 본격적으로 시작하지 않은 단계에 머문 것으로 보인다.

결론적으로, CH12F3-2A B 세포주는 TGF- $\beta$ 1에 대한 germ line  $\alpha$  transcripts의 발현도, 단백질 수준에서의 IgA 항체 합성도가 좋았고 transfection과 promoter reporter 분석에 적합하였다. 따라서 CH12F3-2A B 세포주는 IgA CSR 현상을 구체적으로 연구하는데 부합한다. 다만, 정상적인 B cell이 갖고 있는 특징이 일부 결핍되어 있으므로 최종적인 결론을 내릴 때는 부가적으로 정상적인 B cell에서도 중복 실험이 필요할 것이다.

## 감사의 글

일부 실험은 강원대학교 공동실험실습관 장비를 사용하여 수행하였음.

## 참 고 문 헌

1. Kim PH, Kagnoff MF: Transforming growth factor beta 1 increases IgA isotype switching at the clonal level. *J Immunol* 145;3773-3778, 1990
2. Coffman RL, Lebman DA, Shrader B: Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* 170;1039-1044, 1989
3. Sonoda E, Matsumoto R, Hitoshi Y, Ishii T, Sugimoto M, Araki S, et al: Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med* 170;1415-1420, 1989
4. Stavnezer J, Radcliffe G, Lin YC, Nietupski J, Berggren L, Sitia R, et al: Immunoglobulin heavy-chain switching may be directed by prior induction of transcripts from constant-region genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85;7704-7708, 1988
5. Nakamura M, Kondo S, Sugai M, Nazarea M, Imamura S, Honjo T: High frequency class switching of an IgM+ B

- lymphoma clone CH12F3 to IgA+ cells. *Int Immunol* 8; 193-201, 1996
  6. Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R: Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* 383;168-172, 1996
  7. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, et al: DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271; 350-353, 1996
  8. Murray PD, McKenzie DT, Swain SL, Kagnoff MF: Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J Immunol* 139;2669-2674, 1987
  9. Kim BC, Kim JH: Role of Rac GTPase in the nuclear signaling by EGF. *FEBS Lett* 407;7-12, 1997
  10. Sonoda E, Hitoshi Y, Yamaguchi N, Ishii T, Tominaga A, Araki S, et al: Differential regulation of IgA production by TGF-beta and IL-5: TGF-beta induces surface IgA-positive cells bearing IL-5 receptor, whereas IL-5 promotes their survival and maturation into IgA-secreting cells. *Cell Immunol* 140;158-172, 1992
  11. McIntyre TM, Klinman DR, Rothman P, Lugo M, Dasch JR, Mond JJ, et al: Transforming growth factor beta 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. *J Exp Med* 177;1031-1037, 1993
  12. Park SR, Lee JH, Kim PH: Smad3 and Smad4 mediate transforming growth factor-beta1-induced IgA expression in murine B lymphocytes. *Eur J Immunol* 31;1706-1715, 2001
  13. Park SR, Lee EK, Kim BC, Kim PH: p300 cooperates with Smad3/4 and Runx3 in TGFbeta1-induced IgA isotype expression. *Eur J Immunol* 33;3386-3392, 2003
  14. Park SR, Seo GY, Choi AJ, Stavnezer J, Kim PH: Analysis of transforming growth factor- $\beta$ 1-induced Ig germ-line  $\gamma$  2b transcription and its implication for IgA isotype switching. *Eur J Immunol* 35;In press, 2005
-