

## T 세포 접촉에 의한 단핵구 활성화에서 $\beta_2$ Integrin의 역할에 관한 면역화학적 연구

이석초 · 이 호 · 오귀옥\* · 김형섭

전북대학교 치과대학 치주과학교실

전북대학교 구강생체과학연구소

\*서울대학교 치학 연구소

### I. 서론

단핵구/대식세포와 T 임파구 사이의 상호작용은 특이적 체액성 또는 세포매개성 면역반응 및 비특이적 염증반응에서 중심적인 역할을 하므로 생체 면역 / 염증의 조절에 있어서 이들 세포간의 관계는 특별한 관심의 대상이 되어왔다<sup>1)</sup>. 항원에 의하여 면역반응이 유발(triggering)된 후 발생하는 일련의 폭포상 반응(cascade reaction)은 cytokine과 같은 수용성 인자 뿐 아니라 직접적인 세포접촉에 의한 세포 상호간 정보교환이 일어나는 두가지 기전에 의하여 이루어진다<sup>2)</sup>.

Jenkins 와 Johnson<sup>3)</sup>, Janeway와 Golstein<sup>4)</sup> 등에 의하면 항원제시 및 임파구 활성화와 같은 면역반응들은 단 한가지 종류의 수용기-ligand 상호작용에 의하야만 매개되는 것이 아니라, 많은 종류의 세포간 정보교환과 신호전달에 의하여 매개되는 소위 cross-talk의 과정인 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>. 예를 들어 T 세포는 T cell antigen receptor(TcR)를 통하여 항원제시세포의 major histocompatibility complex(MHC) peptide binding groove 에 결합된 항원을 인지하지만, 이 결합만으로는 T 세포의 활성화가 일어나지 않고 오히려 T 세포는 무감작(nergy) 상태에 빠지게 된다. 항원제시세포에 있는 MHC-peptide와의 결합에 의한 T 세포의 TcR cross-linking은 결과적으로

coreceptor들의 친화력을 상승시킴으로써 coreceptor와 그 ligand(counterreceptor)의 결합을 증가시키고 MHC-peptide와 TcR의 결합력을 더욱 증강시키게 된다. 이때 coreceptor들은 세포 결합을 돕는 것 외에 세포 활성화와 분화를 돕는 보조역할도 아울러 하므로 accessory receptor 또는 costimulatory receptor라고 불리우며<sup>6)</sup>, MHC-peptide/TcR 결합에 참여하는 costimulatory receptor의 종류와 결합강도에 따라 그에 따른 T 세포의 반응양상도 매우 달라지게 된다.

백혈구의 부착분자(adhesion molecule)는 B, T 세포의 발생과 선택을 포함하는 조혈과정에서 세포간 상호작용을 조정하며, 일차 임파양조직(primary lymphoid tissue)에서 생성된 장소로부터 임파구의 이동을 조절하고, 혈관으로부터 염증부위로의 이동을 위한 혈관외유출을 유도하며, 임파구의 귀환(homing)과 특정 임파양조직으로의 격리를 조절하고, 항원제시등 임파구의 상호작용 및 세포파괴를 위한 표적세포(target cell)와의 상호작용을 조절하며, 세포소멸을 조절함으로써 임파구의 운명을 결정하는 등, 임파구와 다른 백혈구의 거의 모든 행동양상을 담당하는 다기능의 세포표면 당단백질이다. 부착단백질은 단순히 세포간의 물리적 결합에만 관여하는 것이 아니라 예외없이 세포내 신호전달기능(inward signaling)을 가지고 있어, T-대식세포의 상

호작용에서는 CD2/Lymphocyte Function associated Antigen-3(LFA-3), Intercellular Adhesion Molecule-1(ICAM-1)/LFA-1 등의 부착단백질간 결합이 세포결합의 기능적 보조역할(costimulation)을 한다. 그러나 이외에 MHC II/CD4, 4-1BB/4-1BBL, CD27/B7, CD40/CD40L 등과 같은 costimulator receptor-ligand 들 간의 결합도 T-대식세포간 세포결합에 상당한 기여를 하므로, 순수한 의미의 부착단백질과 신호전달 수용기(signaling receptor)를 구분할 수는 없고 세포간 결합에 관계하는 모든 세포표면 당단백질을 넓은 의미에서 부착 수용기라고 보는 것이 타당하다<sup>7)</sup>.

T 세포는 효능기(effector) 세포를 활성화시키는 것으로 잘 알려져 있으며 그예로서는 B 세포 증식 및 항체 분비 유도 등이 있고, Clark, Ledbetter 등<sup>5)</sup>이 보고하였듯이 이러한 작용에도 역시 수용성 인자들 외에 세포간 직접접촉이 관여한다. T 세포가 대식세포의 효능기 기능을 유도하는 데에도 cytokine뿐 아니라 세포간 접촉에 의한 신호전달이 관계한다<sup>8-10)</sup>. 치주질환과 같은 만성 염증 병소에서는 거주(resident) 조직세포와 침윤세포간에 매우 긴밀한 간격을 유지하게 되므로 T 세포, 단핵구/대식세포, 대형핵백혈구 및 거주 조직세포 사이에는 수용성 인자뿐 아니라<sup>11)</sup>, 직접적인 세포간의 접촉에 의하여서도 상호 신호전달을 활발하게 하게 될 것으로 보인다. 이러한 가설은 T 세포가 수용성 인자를 유리할 뿐 아니라 직접적인 접촉에 의하여 혹은 두가지 방법 모두에 의하여 단핵구로 하여금 IL-1 $\beta$ , TNF 및 metalloproteinase 분비를 유도하게 된다는 보고들에서 확인되었다<sup>12-19)</sup>. 이 결과들은 직접적인 세포간 접촉을 통하여 T 세포가 주변의 단핵구/대식세포들에 대하여 내재적인 기염증성 기능(intrinsic proinflammatory function)을 나타낼 수 있다는 것을 의미한다. 단핵구/대식세포 외에도 고정된 T 세포가 세포간 결합에 의하여 상대 세포를 활성화시켰다고 보고된 또 다른 세포의 예로는 B 세포<sup>20-22)</sup>와 호중구<sup>23)</sup>가 있다. 따라서 T 세포는 다양한 염증세포들과 비특이적으로 직접 결합하여 이들 세포들에 기염증성 활성화를 일으키며, 이러한 기염증성 작용은 T 세포가 활성화될 때 세포표면에 발현되는 표면 당단백질(부착 단백질)을 매개로 하

여 일어나는 작용이라고 Li 등<sup>16)</sup>, Vey 등<sup>17)</sup>, 및 Isler 등<sup>13)</sup>은 보고하였으나, 어떠한 부착단백질이 이 역할을 담당하며 부착단백질과 그 ligand의 결합에 의하여 활성화되는 세포내 신호전달체계의 기전은 무엇인지에 관하여 아직 자세히 알려진 바 없었다.

본 실험에서는 첫째, 분화된 THP-1 세포가 T 세포와 반응하였을 때 변화하는 세포의 반응성 정도를 밝히기 위하여, 사람의 미분화 단핵구세포주인 THP-1 세포를 단핵구 분화물질로 알려져 있는 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 로 처리해서, 사람의 helper T 세포주인 HuT78과 동시배양하였을 때 THP-1이 분비하는 IL-1 $\beta$ 의 양을 ELISA로 정량분석하였다. 또한 둘째, 어느 세포표면 단백질분자가 HuT78에 대한 THP-1의 세포반응성을 매개하는가 밝히기 위하여, THP-1 세포를 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 로 처리한 후 세포표면 당단백질의 발현변화를 flow cytometry 법으로 측정하고, 그 변화를 HuT78에 대한 THP-1의 반응성 변화와 비교 분석하였다. 그 결과, 단핵구 분화가 T 세포에 의한 단핵구/대식세포의 기염증성 활성화에 미치는 영향과, 세포접촉에 의한 단핵구/대식세포의 기염증성 활성화를 매개하는 것으로 생각되는 세포표면 당단백질 분자에 관하여 정보를 얻게 되었으며, 앞으로 T 세포를 매개로 한 면역염증질환의 병인을 규명하고 치주질환의 예방과 치료에 응용하는데 본 실험결과를 이용할 수 있을 것으로 사료되어 이에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. THP-1 세포 준비

사람의 promyelocyte 세포주인 THP-1은 fetal calf serum 10%와 penicillin 및 streptomycin(Sigma)이 각각 100U/ml, 100 $\mu$ g/ml, 포함된 RPMI1640(Gibco) 배양액에서 5% CO $_2$ , 37 $^{\circ}$ C의 조건으로 배양하였다. 적당량의 1,25 dihydroxycholecalciferol [1,25(OH) $_2$ D $_3$ , Sigma], 혹은 human interferon-gamma(hIFN- $\gamma$ , Genzyme)를 필요 시간 동안 THP-1 세포에 적용시켜, HuT78과의 동시배양 혹은 세포표면 당단백질에

대한 flow cytometry에 이용하였다.

## 2. HuT78 세포 준비

사람의 T세포주인 HuT78은 THP-1과 동일한 배양액에서 배양하면서 phytohemagglutinin(PHA, 1 $\mu$ g/ml)과 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA, 5 ng/ml)로 48 시간 처리하였다. 그 후 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척하여 1% paraformaldehyde(PFA)/PBS로 4 $^{\circ}$ C에서 2 시간 고정하고, 다시 PBS로 3회 세척한 다음 THP-1과의 동시 배양에 이용할 때까지 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 이때 대조군으로서 약물 처리하지 않은 HuT78도 동일한 방법으로 고정하여 보관하였다.

## 3. THP-1 세포와 고정된 HuT78 세포의 동시 배양

1,25(OH) $_2$ D $_3$ , IFN- $\gamma$ 로 처리한, 혹은 처리하지 않은 THP-1 세포는 PBS로 2회 세척하여 배양액에 5 $\times$ 10 $^5$  cells/ml의 농도로 재부유하였다. PHA/TPA로 자극하여, 혹은 자극하지 않은 채로 PFA로 고정된 HuT78 세포를 4 $\times$ 10 $^6$ cells/ml의 농도로 배양액에 재부유하여 24 well culture plate에 200 $\mu$ l씩 분주한 다음, 위에서 준비된 THP-1을 200 $\mu$ l 첨가하였다. 이렇게 하여 형성된 THP-1과 HuT78의 최종 세포 비율은 1:8 이었다. 이를 적당 시간 동안 배양하여 그 상층액의 일부를 IL-1 $\beta$ 의 정량에 이용하였다.

## 4. IL-1 $\beta$ 분비량 측정을 위한 ELISA 분석

상층액으로 분비된 IL-1 $\beta$ 는 Sandwich ELISA법으로 정량하였다. 즉 0.2 M carbonate buffer(pH 9.6)에 20 $\mu$ g/ml 농도로 희석한 mouse anti-human(h)IL-1 $\beta$  단일클론항체(Genzyme)를 ELISA plate에 4 $^{\circ}$ C로 24 시간 coating 하고, 0.05% Tween 20/PBS로 5회 세척하여 1% bovine serum albumin(BSA)/PBS로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 block 하였다. Standard 로서 0 - 5ng/ml의 recombinant hIL-1 $\beta$ (Genzyme)를 적용시키거나, 시

료로서 얻어진 배양상층액을 well에 적용시켜 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 다음 세척액으로 5회 세척하였다. Rabbit anti-hIL-1 $\beta$ 항체(Genzyme)를 10 $\mu$ g/ml의 농도로 적용시켜 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고 5회 세척한 후, horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG 항체(Calbiochem) 1:1000을 적용시켜 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 다음 5회 세척하고, substrate로서 0.02% H $_2$ O $_2$ 가 포함된 완충액과 tetramethylbenzidine/DMF를 1:1로 혼합하여 각 well에 첨가한 후 10분간 실온에서 반응시켰다. 그후 1 M H $_2$ SO $_4$  실험 종료용액을 첨가하여 450 nm 파장에서 흡광도를 ELISA reader(BioRad)로 즉시 측정하였다. 각 실험은 duplicate로 시행하였으며 측정치 흡광도에서 blank의 흡광도를 제한 값을 이용하여 IL-1 $\beta$ 표준곡선으로부터 IL-1 $\beta$ 농도를 환산하였다.

## 5. 세포표면 당단백질 발현 측정을 위한 flow cytometry 분석

1,25(OH) $_2$ D $_3$ 로 처리한, 혹은 처리하지 않은 THP-1 세포를 PBS로 2회 세척하고 1% BSA/PBS(BSA/PBS)에 2 $\times$ 10 $^6$ /ml 농도로 재부유하였다. Microtube에 세포 재부유액 1 ml을 분주하여 원침시킨 후 상층액을 제거하고, 세포괴(cell pellet)에 mouse anti-HLA-DR,DQ,DP 단일클론 항체(Pharmingen), mouse anti-Mac-1 단일클론 항체(Pharmingen), 또는 mouse anti-ICAM-1 단일클론 항체(Pharmingen)를 1:100의 농도로 BSA/PBS 200 $\mu$ l에 희석하여 적용시켰다. 실온에서 tube를 회전시키면서 30분간 반응시킨 후 BSA/PBS로 1회 세척하고, fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG 항체(Pierce)를 1:200의 농도로 적용시켜 20분간 회전시키면서 실온에서 반응시켰다. BSA/PBS로 2회 세척한 후 세포를 1% PFA/1% BSA/PBS로 10분간 고정하고, 1회 세척하여 250 $\mu$ l의 BSA/PBS에 재부유한 다음 fluorescence activated cell sorter(FACStar, Beckton Dickinson)로 분석하였다.

## 6. 통계 처리

상관계수와 유의성 검증은 SigmaPlot® program을 이용하였다.

### III. 결과

#### 1. THP-1/HuT78 동시배양에 의한 THP-1 세포의 IL-1 $\beta$ 생산

HuT78과 THP-1 세포를 함께 배양하였을 때 THP-1 세포가 IL-1 $\beta$ 를 분비하는지 관찰하기 위하여 자극하지 않은 HuT78과 PHA/TPA로 자극한 HuT78을 PFA로 고정한 후 THP-1과의 동시배양을 실시한 결과, THP-1의 IL-1 $\beta$  분비량은 각각 833과 4336 ng/ml 으로서, 자극 받은 HuT78이 THP-1과 작용하였을 때 자극 받지 않은 것보다 5배의 IL-1 $\beta$  분비 증가를 나타내었다. THP-1이 없는 상태로 동일한 실험을 시행하였을 경우에는 HuT78이 자극 받았건, 받지 않았건 무관하게 IL-1 $\beta$ 분비가 거의 일어나지 않아서, 고정된 HuT78 자체는 IL-1 $\beta$ 를 분비하지 않음을 보여 주었다. HuT78 세포 대신, 자극 받은 HuT78의 배양상청액, 혹은 신선한 배양액을 THP-1에 첨가하였을 경우에도 IL-1 $\beta$ 분비가 거의 일어나지 않았으므로 THP-1

의 IL-1 $\beta$ 분비 증가가 HuT78의 배양액에 있을지도 모를 수용성 인자때문이 아니라 THP-1과 HuT78 세포 자체와의 직접적 상호작용임을 알 수 있었다(Table 1).

#### 2. 분화유도된 THP-1과 HuT78의 동시배양시 THP-1의 IL-1 $\beta$ 생산량

단핵구 분화/활성화 물질인 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 와 IFN- $\gamma$ 를 THP-1에 전처리한 후 THP-1과 HuT78을 함께 배양하였을 때 THP-1의 IL-1 $\beta$ 분비 양상을 관찰하여 본 결과(Figure 1), 10 $^{-8}$ M 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 를 4일간 처리한 THP-1의 경우 HuT78과 반응 하였을 때 가장 높은 IL-1 $\beta$ 분비를 보였다. 즉 자극 받지 않은 HuT78과 THP-1을 2, 24, 48시간 동시배양하였을 경우 대조군 THP-1에 비하여 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 를 전처리한 THP-1군에서 2시간에는 별 차이가 없었으나 24시간(3.35ng/ml), 48시간(4.21ng/ml) 동안 배양하면 대조군(24시간, 0.82ng/ml; 48시간, 0.87ng/ml)에 비하여 각각 4~5배 가량의 IL-1 $\beta$ 분비량 증가를 나타내었다. 그러나 500 U/ml의 IFN- $\gamma$ 를 3일간 전처리한 THP-1군에

Table 1. IL-1 $\beta$  production by THP-1 cells exposed to fixed HuT78 cells

HuT78 cells		THP-1 cells	(pg/ml)
+	-		
-	Medium	+	<100
-	Supernatant of stimulated HuT78	-	<100IL-1 $\beta$ production by THP-1
-	Supernatant of stimulated HuT78	+	<100
Unstimulated	-	-	<100
Unstimulated	-	+	833
Stimulated	-	-	<100
Stimulated	-	+	4336

HuT78 cells were stimulated for 48h with PHA(1 $\mu$ g/ml)/TPA(5ng/ml), fixed, and cultured at 37°C for 48h with or without THP-1 cells.

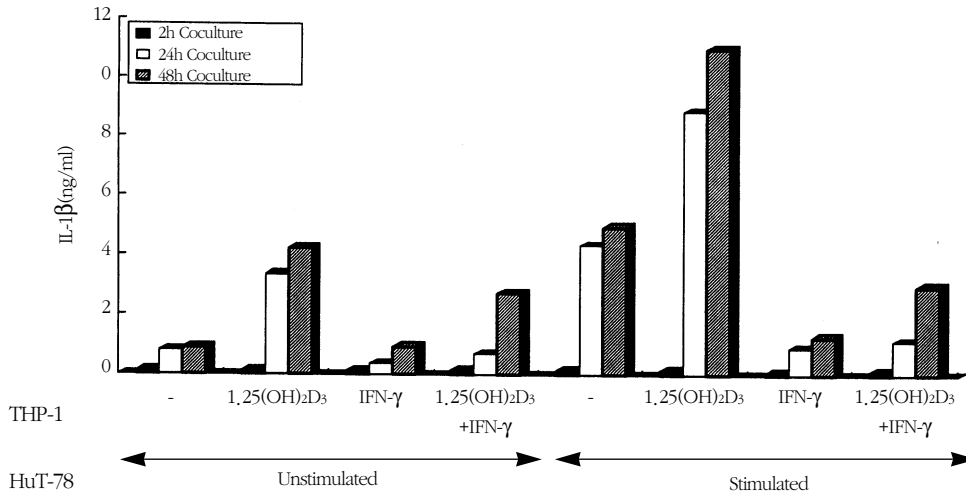


Figure 1. Effect of preincubation condition of THP-1 contact duration between THP-1 and HuT78, and stimulation condition of HuT78 on IL-1 $\beta$  production by THP-1 cells. THP-1 cells were untreated or pretreated with  $10^{-8}$ M 1,25(OH) $_2$ D $_3$  for 4 days, 500U/ml IFN- $\gamma$  for 3 days, or both(IFN- $\gamma$  was added at second day of 1,25(OH) $_2$ D $_3$  treatment). HuT78 cells were unstimulated or stimulated with PHA/TPA for 48h and fixed with 1% PFA. Supernatant was collected for IL-1 $\beta$  measurement after 2, 24 and 48h of THP-1/HuT78 coculture.

서는 대조군과 거의 유사하거나 적은 IL-1 $\beta$ 분비를 보였고(0.38, 0.93 ng/ml), 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 과 IFN- $\gamma$ 를 함께 전 처치한 THP-1군(0.72, 2.70ng/ml)에서는 1,25(OH) $_2$ D $_3$  단독 처리시 보다 오히려 적은 IL-1 $\beta$ 분비를 나타내었다. PHA/TPA로 자극받은 HuT78을 THP-1과 함께 배양하였을 경우에도 자극 받지 않은 HuT78의 경우와 전체적인 반응 양상은 비슷하였으나 분비된 IL-1 $\beta$ 의 양은 훨씬 많았다. 즉 대조군 THP-1의 경우에서 조차도 자극 받은 HuT78과 반응시키면 24, 48시간이 경과하였을 때 4.33, 4.92ng/ml의 높은 IL-1 $\beta$ 분비를 보였고, 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 로 전처치한 THP-1군의 경우는 자극 받지 않은 HuT78(3.35, 4.21ng/ml) 보다 자극 받은 HuT78(8.86, 10.95ng/ml)과의 반응시 약 2.6배 정도의 IL-1 $\beta$ 분비량을 보여 전체적으로 가장 높은 수치를 나타내었다. 따라서 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 로 분화된 THP-1의 경우 활성화된 HuT78 세포에 대한 높은 세포 반응성의 상승, 즉 IL-1 $\beta$ 분비량 증가를 관찰할 수 있었다.

### 3. HuT78과의 동시배양시 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 로 전

### 처리된 THP-1의 IL-1 $\beta$ 생산량 변화

1,25(OH) $_2$ D $_3$ 로 분화유도된 THP-1을 HuT78과 함께 배양하였을 때 IL-1 $\beta$ 분비량이 가장 높게 증가하였으므로, 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 의 전처리 기간과 농도에 따른 THP-1의 세포 반응성을 관찰한 결과,  $10^{-8}$ M 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 을 0, 1, 2, 3, 4일간 처리한 THP-1을 자극 받지 않은 HuT78과 동시배양하였을 때 THP-1은 각각 0.14, 0.34, 0.48, 0.48, 0.58 ng/ml의 IL-1 $\beta$ 를 분비하였고, 자극 받은 HuT78과 동시배양하였을 때는 0.52, 0.96, 1.24, 1.45, 및 1.68 ng/ml의 IL-1 $\beta$ 분비량을 나타내어 1,25(OH) $_2$ D $_3$  전처리 기간에 비례하여 THP-1의 IL-1 $\beta$ 분비량이 증가하였다(Figure 2). 또한 THP-1을 전처치한 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 의 농도를 0,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ M로 서로 달리하여 자극 받지 않은 HuT78과 함께 배양하였을 때 THP-1의 IL-1 $\beta$  분비량은 0.12, 0.15, 0.16, 0.53, 및 0.72 ng/ml이었으며, 자극 받은 HuT78과 동시배양하였을 경우에는 THP-1의 IL-1 $\beta$ 분비량이 0.20, 0.38, 0.38, 1.24, 및 1.84 ng/ml이어서 THP-1을 전처치한 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 의 농도에

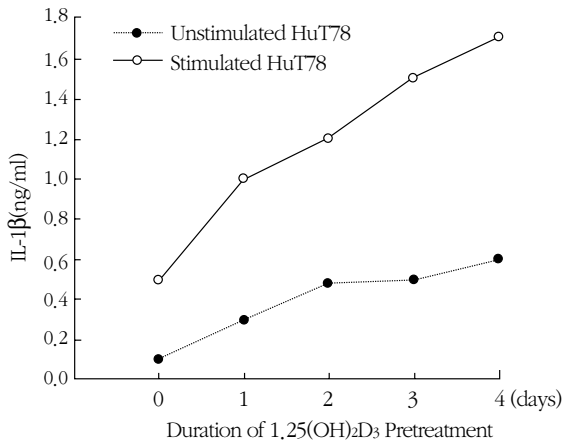


Figure 2. Time-dependent effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> pretreatment on IL-1β production by THP-1 cells in THP1/HuT78 coculture condition, THP-1 cells were pretreated with 10<sup>-8</sup>M 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for 0, 1, 2, 3, 4days, and cocultured with PFA-fixed stimulated or unstimulated HuT78 cells for 48h

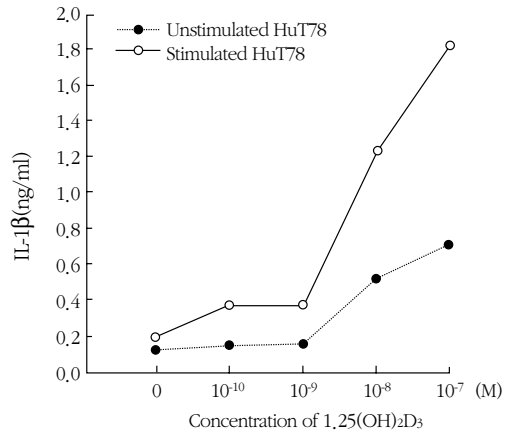


Figure 3. Dose-dependent effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> pretreatment on IL-1β production by THP-1 cells in THP-1/HuT78 coculture condition, THP-1 cells were pretreated with various concentration of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for 4days, and cocultured with PFA fixed stimulated or unstimulated HuT78 cells for 48h

비례하여 IL-1β분비량이 증가하였다(Figure 3). 따라서 THP-1은 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>를 처리한 기간과 농도에 비례하여 HuT78에 대한 세포 반응성이 증가하는 양상을 띠었다.

#### 4. THP-1의 세포표면 당단백질 발현에 미치는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 영향

단핵구/대식세포가 T세포에 항원을 제시할 때 가

장 중요한 분자인 HLA-D(MHC)와 costimulator 역할을 하는 부착수용기 ICAM-1, 및 백혈구 세포간 결합에 매우 중요한 역할을 하는 β<sub>2</sub> integrin family중 Mac-1을 선택하여 이들의 발현에 미치는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 영향을 flow cytometry 방법으로 관찰한 결과, THP-1을 10<sup>-8</sup>M 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>로 0~4일간 처리하면 THP-1 세포표면에 HLA-D(0 day, mean fluorescence intensity(MFI) 9.45; 1 day, -; 2 days, 9.34; 3 days, 9.27; 4 days, 9.23), ICAM-1(7.03; 7.16; 7.34;

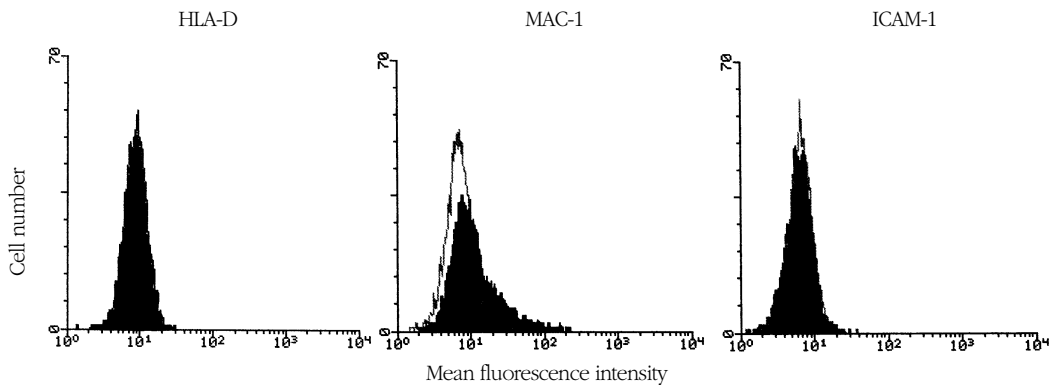


Figure 4. Histograms for HLA-D, Mac-1, and ICAM-1 expression on THP-1 after incubation with 10<sup>-8</sup>M of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for 0 day(open profile) and 4 days(solid profile).

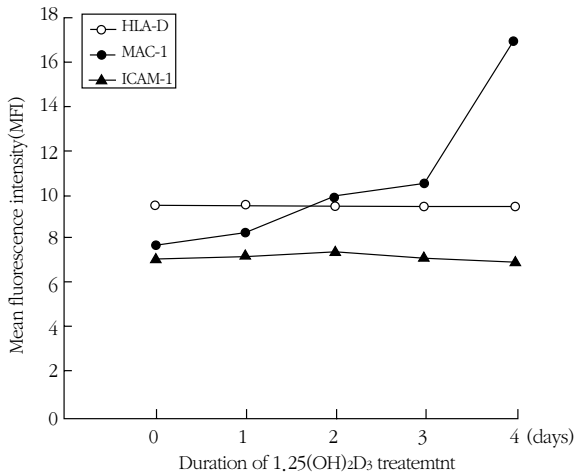


Figure 5. Time-dependent effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on the expression of surface glycoproteins of THP-1. THP-1 cells were treated with 10<sup>-8</sup>M 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for 0, 1, 2, 3, 4 days. Expression of HLA-D, Mac-1, and ICAM-1 was analyzed by flow cytometry.

6.97; 6.78)의 발현은 거의 변화가 없는 반면, Mac-1(7.59; 8.15; 9.70; 10.38; 16.76)은 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 처리 시간이 길어질수록 점차적으로 높은 발현을 나타내었다(Figure 4, 5). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 농도를 0~10<sup>-7</sup>M로 서로 달리하여 4일간 THP-1을 처리하였을 경우에도 HLA-D(0M, MFI 9.45; 10<sup>-10</sup>M, 9.11; 10<sup>-9</sup>M, 9.21; 10<sup>-8</sup>M, 8.83; 10<sup>-7</sup>M, 8.53)와 ICAM-1(7.03; 6.96; 6.88; 7.37; 9.04)로 농도별 차이가 거의 없었으며 다만 고농도(10<sup>-7</sup>M)의 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의하여 HLA-D는 발현이 약간 감소(10%)되었고 ICAM-1은 약간 증가(30%)되었으나 그 차이는 매우 미약하였던 반면, Mac-1(8배)의 발현 상승은 매우 현저하였다(Figure 6, 7).

따라서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 실험 대상이 되었던 THP-1의 세포표면 당단백질 중에서 β<sub>2</sub> integrin 인 Mac-1 분자의 발현을 처리기간 및 농도에 비례하여 상승시키는 작용을 나타내었다.

### 5. THP-1 세포의 HuT78에 대한 세포 반응성 (IL-1β생산)과 세포표면 당단백질 발현 정도 사이의 상관관계

다음에는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>로 전처치한 THP-1과 HuT78을 동시배양하여 얻은 THP-1의 IL-1β분비량(Figure 2,3)과, 동일한 방법으로 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>를 처리하여 얻은 THP-1의 세포표면 당단백질의 발현 정도(Figure 5, 7) 사이에 일정한 상관관계가 있는지를 관찰한 결과, PHA/TPA로 자극 받은, 혹은 받지 않은 HuT78과의 동시배양에 의한 THP-1의 IL-1β분비량(ng/ml)과 세포표면 당단백질의 발현(MFI) 사이의 상관관계수는 HLA-D(자극 받지 않은 HuT78 동시배양시, r<sub>1</sub><sup>2</sup> = 0.17, 자극 받은 HuT78 동시배양시 r<sub>2</sub><sup>2</sup> =

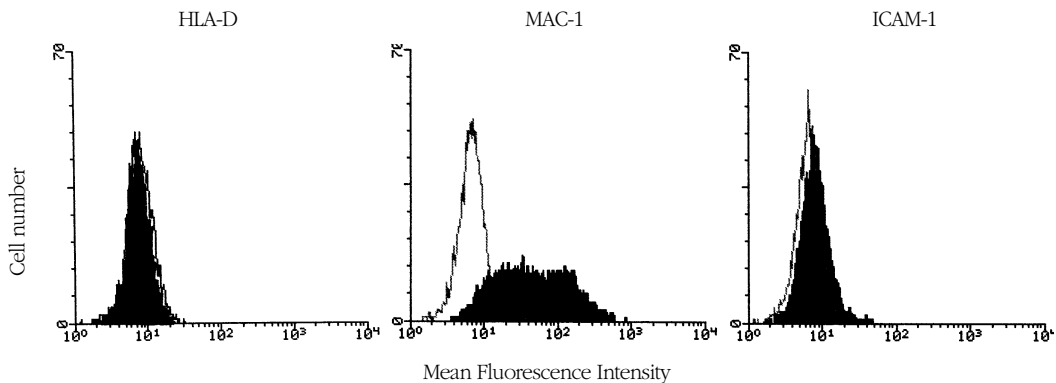


Table 6. Histograms for HLA-D, Mac-1, and ICAM-1 expression on THP-1 after incubation with 0 M(open profile) and 10<sup>-7</sup>M(solid profile) of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for 4 days

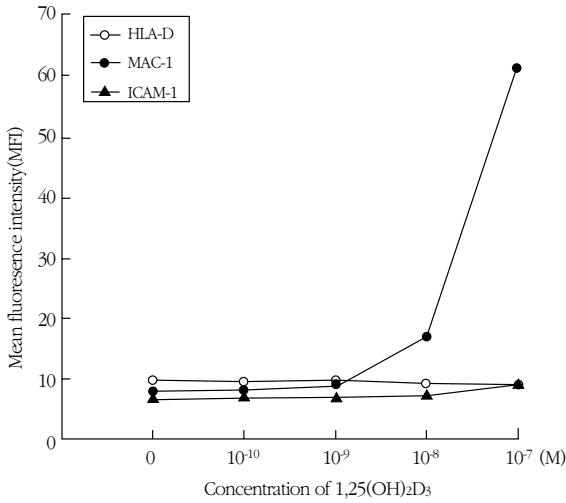


Figure 7. Dose-dependent effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on the expression of surface glycoproteins of THP-1. THP-1 cells were treated with various concentration of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for 4 days. Expression of HLA-D, Mac-1, and ICAM-1 was analyzed by flow cytometry.

0.09), ICAM-1( $r_1^2 = 0.08$ ,  $r_2^2 = 0.02$ )의 경우 매우 낮은 값을 나타내었으나, Mac-1( $r_1^2 = 0.65$ ,  $r_2^2 = 0.55$ )은 통계적으로 유의한( $P_1 < 0.01$ ,  $P_2 < 0.05$ ) 높은 상관관계를 나타내었다(Figure 8). 따라서 THP-1의 Mac-1 $\beta_2$  integrin 발현은 THP-1과 HuT78의 동시배양에 의하여 나타나는 기염증성 세포반응성(IL-1 $\beta$ 분비)과 매우 밀접한 상관관계가 있음이 관찰되었다.

## 6. 항-세포표면 당단백질 단일클론 항체의 세포 간 접촉 차단 효과

THP-1과 HuT78을 동시배양하였을 때 THP-1이 IL-1 $\beta$ 를 생산하는 반응이 THP-1의 Mac-1분자를 매개로 하는 세포간 직접 결합에 의한 것인지를 알아보기 위하여 세포표면 당단백질에 대한 특이적 단일클론 항체들을 THP-1에 미리 결합시켜 HuT78과 THP-1의 세포간 결합을 차단함으로써 과연 IL-1 $\beta$ 분

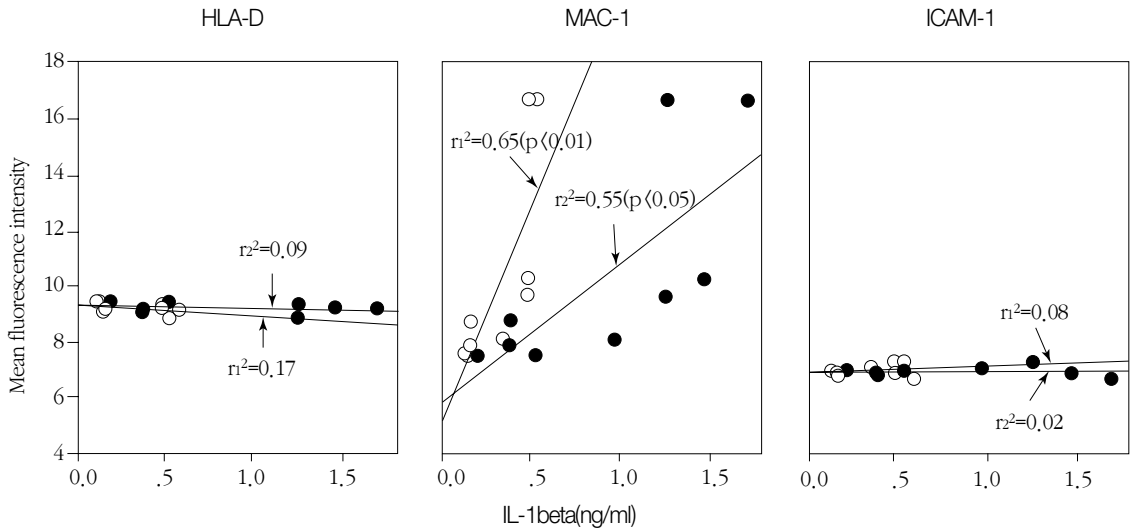


Figure 8. Correlation of IL-1 $\beta$  production by THP-1 cells upon coculture with fixed stimulated(closed circle) or unstimulated(open circle) HuT78 and surface glycoprotein expression of THP-1(N=8). Before flow cytometric analysis for surface glycoprotein determination or coculture with HuT78 for detection of IL-1 $\beta$  production, THP-1 cells of each samples were pretreated with various concentration of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for various durations  
 $r_1^2$ : correlation coefficient between glycoprotein expression and IL-1 $\beta$  production of THP-1 exposed to unstimulated HuT78  
 $r_2^2$ : correlation coefficient between glycoprotein expression and IL-1 $\beta$  production of THP-1 exposed to stimulated HuT78



Table 2. Effects of monoclonal antibodies on the production of IL-1 $\beta$  by THP-1 cells exposed to stimulated and fixed HuT78 cells

THP-1 <sup>a</sup> pretreatment	MAbs to cell surface <sup>b</sup> glycoproteins added	% Inhibition of <sup>c</sup> IL-1 $\beta$ production
-	mouse IgG	<5
	HLA-D	<5
	Mac-1	56
	ICAM-1	<5
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	mouse IgG	<5
	HLA-D	<5
	Mac-1	35
	ICAM-1	<5

<sup>a</sup> THP-1 cells were pretreated or not with 10<sup>-8</sup>M 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for 3 days before experiments.

<sup>b</sup> THP-1 cells were preincubated with monoclonal antibodies(1.5 $\mu$ g/ml) for 2h at 37 $^{\circ}$ C and cocultured with PHA/TPA-stimulated and fixed HuT78 cells for 48h.

<sup>c</sup> Results were expressed in percent inhibition compared with control values.

비량이 저하되는지를 관찰하였다. 특이적 단일클론 항체에 대한 대조군으로서 mouse IgG(mIgG)를 동량 사용하였다. mIgG, 항 HLA-D 항체, 및 항 ICAM-1 항체는 모두 5% 미만의 IL-1 $\beta$ 생산 감소를 나타내었으나 Mac-1은 THP-1을 전혀치하지 않은 경우, 56%, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>로 전처치한 경우, 35%의 IL-1 $\beta$ 생산량 감소를 나타내었다(Table 2). 따라서 실험대상이 되었던 세포표면 당단백질에 대한 항체중 항 Mac-1 항체가 T-단핵구/대식세포간 직접 접촉을 차단함으로써 THP-1의 기염증성 세포 반응성을 억제하는 효과가 가장 큰 것으로 관찰되었다.

#### IV. 고찰

본 연구 결과에 의하면, 단핵구/대식세포 분화물질로 잘 알려진 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>로 THP-1을 분화시키면 HuT78과 세포간 접촉을 하였을 때 THP-1의 기염증성 활성(IL-1 $\beta$  분비)이 매우 증가할 뿐 아니라,  $\beta$ <sub>2</sub> integrin 계 당단백질인 Mac-1(CD11b/CD18)의 THP-1 세포표면 발현이 상승되었으며, IL-1 $\beta$  분비량이 증가한 정도와 Mac-1의 발현 정도 사이에는 통계적으로 유의한 상관관계가 있음이 관찰되었다. 또한 항-Mac-1 항체로 THP-1/HuT78 세포간 접촉을 차단하

였을 때 THP-1의 IL-1 $\beta$ 분비량이 감소 되었으므로, T 세포가 단핵구/대식세포와 직접접촉하여 단핵구로 하여금 기염증성 활성화를 일으킬 때 단핵구의 Mac-1 분자는 그 매개역할을 하는 분자중 하나일 것으로 추정되었다.

단핵구의 분화/활성화 물질로 널리 알려져 있는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 혹은 IFN- $\gamma$ 가 단독으로 THP-1에 작용할 때에는 IL-1 $\beta$ 의 분비가 증가되지 않지만<sup>17,24</sup>, 이들 물질들은 THP-1을 크게 잠작시키는 효과가 있다. 즉 IFN- $\gamma$ 는 LPS에 대한 THP-1의 반응성을 증가시키며<sup>24</sup>, 한편으로 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 활성화된 T 세포에 대한 THP-1의 반응성을 증가시킴으로써<sup>17</sup>, 그 결과, LPS 또는 T 세포에 노출되었을 때 THP-1의 IL-1 $\beta$ 분비량이 증가하게 된다. 또한 IFN- $\gamma$ 는 THP-1 세포에 작용하여 항원제시의 중심분자인 MHC II와 그 costimulator 분자인 ICAM-1의 발현을 증가시키는 반면, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 이들 분자의 발현에는 변화 없이 CD14와 CD11b 같은 세포표면 당단백질 발현을 증가시킨다고 알려져 있다<sup>17,24</sup>. 이와 같은 결과는 IFN- $\gamma$ 와 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 단핵구의 분화와 성숙의 단계에서 서로 다른 역할을 담당하고 있음을 뜻한다. 즉 IFN- $\gamma$ 는 단핵구를 활성화 상태에 있게하여, 항원제시와 관련된 세포표면 단백질을 매개로 한 T 세포

와의 접촉을 증가시킴으로써 단핵구의 항원제시와 같은 동족성(cognate) 면역반응이 활성화되도록 유도하며, 그 결과 특이적 항원에 반응하는 T 임파구가 활성화되어 세포분화, 증식, 및 cytokine 분비 등의 반응이 일어나게 한다. 반면, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 항원제시와 같은 cognate 면역반응보다는 T 세포표면 부착 단백질과의 결합과 같은 비특이적 요소들을 통하여 noncognate 면역반응을 활성화시킴으로써, 기염증성 cytokine 분비, respiratory burst 등 단핵구의 기염증성 기능이 활발해질 수 있도록 단핵구를 분화시켜 성숙하게 하는데 관여한다고 여겨진다<sup>17)</sup>. 본 실험의 결과에서도 Vey 등<sup>17)</sup>의 결과와 마찬가지로 고정된 활성화 HuT78과 THP-1을 함께 배양하였을 때, THP-1을 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>로 전처리 한 경우 IL-1 $\beta$  분비량이 매우 증가된 반면, IFN- $\gamma$ 로 전처리한 경우에는 대조군과 차이가 없었다.

활성화된 T 세포가 세포간 직접 접촉에 의하여 상대세포를 활성화시키는 예는 단핵구/대식세포 외에도 B 세포<sup>20,21,25)</sup>, 호중구<sup>16)</sup>를 들 수 있으며, T 세포 뿐 아니라 암세포도 직접 접촉에 의하여 단핵구/대식세포를 활성화시켜 cytokine을 분비하게 한다<sup>22,26)</sup>. HuT78 세포의 subcellular fraction을 HuT78 세포 대신 이용하여 관찰해 본 결과, 단핵구를 자극하는 활성의 대부분이 세포막 부분에 존재한다는 것이 밝혀졌으며<sup>13,17)</sup>, trypsin으로 소화(digestion)하면 THP-1을 자극하는 능력이 소실된다는 것이 관찰되었다 (Isler 등, 1993). 또한 HuT78을 자극하기 전에 tunicamycin으로 전처리하면 THP-1으로 하여금 IL-1 $\beta$ 를 생산하게 하는 능력이 상실된다는 사실로부터, 매개 역할을 하는 분자가 25~35 kDa 분자량의 당단백질 임이 밝혀졌다.

T 세포와 단핵구가 직접적으로 접촉할 때, T 세포에 의한 단핵구의 기염증성 활성화를 매개할 것으로 추정되는 세포표면 부착단백질로는 CD69<sup>27)</sup>, CD2<sup>26)</sup>,  $\beta_2$  integrins<sup>17)</sup> 등이 있으나, 어느 분자의 경우에서도 이 분자들을 특이적 항체로 차단하였을 때 단핵구의 T 세포에 대한 반응성이 완전히 억제되었던 예가 없다. CD69 분자는 말초혈액의 T 세포가 자극을 받았을 때 매우 신속하게 발현 유도되며 항-CD69 항체로

T-단핵구 세포접촉을 차단하였을 때 IL-1 $\beta$ 분비량이 45~70% 감소하였지만 HuT78 세포에서는 말초혈액 T 세포에서와 같은 감소효과가 나타나지 않았다고 Hara 등<sup>27)</sup>이 보고하였다. CD2는 LFA-3 분자와 결합함으로써 단핵구의 IL-1 $\beta$ 생산 유도를 매개한다고 Webb 등<sup>26)</sup>은 보고하였지만, Dayer 등<sup>2)</sup>은 항-CD2 항체가 IL-1 $\beta$ 분비량을 15~25% 정도 밖에는 감소시키지 않았다고 하여, T-단핵구의 세포접촉에 의한 단핵구의 IL-1 $\beta$ 분비에 CD2가 어느 정도의 중요성을 가지고 관여하는지 현재로서는 알 수 없다. Integrin 당단백질 중  $\beta_1$  integrin계 당단백질이 공통적으로 지니고 있는  $\beta_1$  chain(CD29)은 IL-1 $\beta$ 분비에 전혀 무관한 것으로 보고되었으나<sup>28)</sup>,  $\beta_2$  integrin계 단백질인 CD11a, CD11b, CD11c는 각각의 항체로 세포간 결합을 차단하였을 때 IL-1 $\beta$ 분비량이 각각 ~35%, ~60%, ~50% 정도 감소한 결과를 나타내어,  $\beta_1$  integrin 보다는  $\beta_2$  integrin계 세포표면 단백질이 이 과정에 더 밀접한 관련이 있는 것으로 추정된다.

본 실험의 결과에서도 THP-1 세포의 Mac-1을 항체로 차단하였을 때 HuT78과 접촉한 THP-1의 IL-1 $\beta$  분비량이 56% 감소하여 Dayer 등<sup>2)</sup>의 실험결과(60%)와 매우 근사한 수치를 나타내었으나, 역시 완전히 억제하지는 못하였다. 완전히 억제하지 못한 이유로서는, T 세포의 Mac-1 ligand 인 ICAM-1이 결합하는 부위와, 본 실험에 사용했던 항-Mac-1 항체가 인지하는 Mac-1 분자의 epitope(구조를 알고 있는 항원 결정기)가 부분적으로만 일치하여, 항체의 결합 차단 효과가 100% 나타나지 못했을 가능성이 있고, 또 한가지 이유로 이 과정에 관여하는 부착분자가 Mac-1 이외에도 더 존재할 가능성도 있음을 배제할 수 없다. Dayer 등<sup>2)</sup>의 보고에서도 이미 밝혀졌듯이, 완전하지는 않으나 3종류의  $\beta_2$  integrin에 대한 항체 모두에 의하여 IL-1 $\beta$ 분비가 억제되었고, 또 항체의 조합을 이용하면 억제 효과가 더 커졌다는 것이 두 번째 이유에 대한 설명이 될 수 있을 것이다. 또 본 실험에서 THP-1을 10<sup>-8</sup>M 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>로 3일간 분화시킨 후에 항체에 의한 차단 실험을 반복하였을 때는 IL-1 $\beta$ 분비량이 35% 밖에 감소하지 않아, 분화시키지 않은 경우보다 세포결합 차단효과가 저하되

었다. 이는 THP-1 세포표면의 Mac-1 발현량이 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의하여 매우 증가되어서 항체의 차단 효과가 전체적으로 미흡하게 나타났거나, 아니면 Mac-1 이외에도 미지의 부착 단백질이 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의하여 크게 유도 발현되어 Mac-1보다 더욱 큰 비중으로 T-단핵구 세포 결합에 관여했을 가능성도 있다고 본다. 한편, THP-1의 IL-1 $\beta$ 생산물과 Mac-1 발현 정도의 상관관계를 보면(Figure 8), HuT78을 PHA/TPA로 자극한 경우가 자극하지 않은 경우보다 IL-1 $\beta$  분비량과 Mac-1 발현의 상관관계에 있어 통계적인 유의성이 적었다. 즉 T 세포도 자극을 받으면 많은 종류의 세포표면 단백질이 유도 발현되고, 이 중에 THP-1의 IL-1 $\beta$ 분비를 매개하는 미지의 분자들이 포함되어 있어 이들의 작용 때문에 Mac-1 발현 정도와의 상관관계에 있어 유의성이 저하될 수도 있었다고 본다.

Integrin은 매우 다양한 조직에서 발견되는 부착단백질의 한 종류로서  $\alpha$  chain과  $\beta$  chain의 heterodimer 형태로 존재한다. 현재 약 20 종류의 integrin이 발견 되었으며,  $\beta$  chain의 종류에 따라  $\beta_1$  integrin과  $\beta_2$  integrin으로 나뉜다.  $\beta_2$  integrin은 백혈구에서만 발현되며 3가지  $\alpha$  chain( $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_X$ ) 중의 한 가지 chain과  $\beta_2$  chain이 결합되어 LFA-1( $\alpha_L\beta_2$ , 또는 CD11a/CD18), Mac-1( $\alpha_M\beta_2$ , 또는 CD11b/CD18), 그리고 p150/95( $\alpha_X\beta_2$ , 또는 CD11c/CD18)의 3가지 분자가  $\beta_2$  integrin 계를 이루게 된다<sup>29</sup>. LFA-1은 백혈구와 혈관내피세포에 다량 발현되는 ICAM-1, ICAM-2, 및 ICAM-3 등과 receptor-counterreceptor 관계로 결합하며<sup>30</sup>, Mac-1은 ICAM-1, 세포외기질(extracellular matrix) 성분인 fibrinogen, 보체(complement) 성분인 C3bi, 그리고 세균의 LPS 등과 결합하고<sup>30,31</sup>, p150/95 또한 C3bi, fibrinogen과 결합한다<sup>32</sup>. 임상적으로  $\beta_2$  chain의 발현이 안되어 발생하는 질병인 백혈구 부착 결핍증(leukocyte adhesion deficiency, LAD) 환자에서 생명을 위태롭게 하는 면역 결핍 증상이 나타나는 것으로 미루어 전체 면역 기능에서  $\beta_2$  integrin이 얼마나 중요한 위치를 차지하고 있는지 알 수 있다<sup>33</sup>.

휴지기 상태의 백혈구는 constitutive 하게 비교적

많은 양의 integrin을 발현하지만 보통 불활성 상태로 존재하므로 ligand와 매우 약한 결합력으로 결합할 수 있다. 그러나 백혈구가 활성화되면 integrin 발현이 증가하는 것과는 무관하게, 수 분내에 매우 강한 결합력을 갖게된다<sup>34-36</sup>. 즉, 위치가 떨어져 있는 다른 수용기들이 활성화함에 따라 integrin 분자기능의 활성화가 유발되어 결과적으로 LFA-1(CD11a/CD18)과 같은 분자기능이 활성화된다<sup>37</sup>. 이 inside-out signaling은 integrin의 결합력을 증가시켜 integrin counterreceptor(ligand), 예를 들어, ICAM-1을 가지고 있는 백혈구나 혈관내피세포에 강하게 부착하도록 하며, 이러한 작용은 integrin의 숫자적 증가 없이도 일어날 수 있다<sup>38</sup>. T 세포의 항원 특이적 CD3/TcR complex나 B 세포의 면역글로블린 항원 수용기를 단일 클론 항체로 cross-linking 하면 LFA-1의 기능적 활성도 함께 증가하며<sup>34,36,39</sup>, 항원제시세포를 통하여 항원으로 T 세포를 자극하여도 integrin의 기능이 upregulation된다<sup>40,41</sup>. Integrin 기능의 upregulation을 유발하는 세포표면 단백질 분자로는, T 세포에서는 TcR, CD3, CD2, CD28, CD44, ICAM-3 등이 있고 B 세포에서는 HLA class II, 세포표면 면역글로블린, CD19, CD40 등이 알려져 있다<sup>29</sup>.

본 실험에 이용했던 HuT78과 같이 CD4<sup>+</sup> 표현형의 helper T 세포 뿐만 아니라, 정도의 차이는 있지만 표현형이나 cytokine 분비 양상과는 전혀 무관하게 모든 T 세포가 단핵구나 호중구와 같은 염증세포에 대하여 내재적 기염증성 능력을 갖추고 있다<sup>9,16,42,43</sup>. 본 연구결과를 토대로, 단핵구가 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의하여 분화되면, T-단핵구 noncognate 세포접촉에 의한 양방향성 신호전달 중에서 특히 T 세포에서 대식세포로의 신호전달을 통하여 단핵구/대식세포로 하여금 기염증성 효능기 작용을 활발하게 함으로써 면역/염증 반응이 더욱 효율적으로 일어나게 되며, 이러한 신호전달이 단핵구/대식세포 표면에 존재하는 Mac-1과 같은  $\beta_2$  integrin을 매개로 하여 일어난다는 것이 밝혀지게 되었지만, 이외에도 관여할 가능성이 있는 미지의 부착단백질들의 특성을 규명하고 이들 분자의 세포내 신호전달에 관한 분자수준의 기전을

밝히는 일이 앞으로 더 연구해야할 과제로 남아있다.

## V. 결론

분화된 THP-1 세포가 T 세포와 반응하였을 때 변화하는 세포의 반응성 정도를 밝히기 위하여, 사람의 미분화 단핵구세포주인 THP-1 세포를 단핵구 분화 물질로 알려져 있는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>로 처리해서, 사람의 helper T 세포주인 HuT78를 고정하여 동시배양하였을 때 THP-1이 분비하는 IL-1 $\beta$ 의 양을 ELISA로 정량분석하였다. 또한 어느 세포표면 단백질분자가 HuT78에 대한 THP-1의 세포 반응성을 매개하는가 밝히기 위하여, THP-1 세포를 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>로 처리한 후 HLA-D, Mac-1, ICAM-1과 같은 세포표면 당단백질의 발현변화를 flow cytometry 법으로 측정하고, 그 변화를 HuT78에 대한 THP-1의 반응성 변화(IL-1 $\beta$  생산량)와 비교 분석하여 다음의 결과를 얻었다.

1. THP-1세포는 고정된 HuT78 세포와 직접 접촉 함으로써 IL-1 $\beta$ 를 생산하였으며, PHA/TPA로 미리 자극 받은 HuT78세포가 자극 받지 않은 HuT78보다 세포 접촉시 THP-1의 IL-1 $\beta$  생산량을 5배 증가시켰다.
2. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>로 분화된 THP-1은 미분화상태의 THP-1에 비하여 HuT78과 접촉하였을 때 높은 IL-1 $\beta$  분비량의 상승을 나타내었다.
3. THP-1은 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>를 전처리한 기간과 농도에 비례하여 HuT78에 접촉하였을 때 분비되는 IL-1 $\beta$ 의 양이 증가하였다.
4. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 실험 대상이 되었던 THP-1의 세포표면 당단백질 중에서  $\beta_2$  integrin family 분자인 Mac-1분자의 발현을 처리기간 및 농도에 비례하여 증가시켰다.
5. THP-1과 HuT78의 동시배양에 의하여 분비되는 IL-1 $\beta$  양과 THP-1의 Mac-1 발현 사이에는 통계적으로 유의한 상관관계가 있었다.
6. 항 Mac-1 항체를 THP-1에 전처리 함으로써 THP-1과 HuT78의 동시배양에 의하여 분비되

는 IL-1 $\beta$ 의 양이 35~56% 감소되었다.

이상의 결과로부터 활성화한 T 세포가 단핵구와 직접 결합함으로써 단핵구에 대하여 기염증성 반응을 충분히 유도하기 위하여서는 단핵구의 분화가 선행되어야 하며, 이때 Mac-1 분자와 같은  $\beta_2$  integrin은 세포간 직접결합 및 기염증성 신호전달에 관여하는 부착단백질 수용기의 역할을 한다고 사료된다.

## VI. 참고문헌

1. Heinzlmann, M, Mercer-Jones, M.A., Gardner, S.A., Wilson, M.A., and Polk, H.C. Jr. : Bacterial cell wall products increase monocyte HLA-DR and ICAM-1 without affecting lymphocyte CD18 expression, *Cell. Immunol.* 176 : 127-134, 1997.
2. Dayer, J.-M., Isler, P., and Nicod, L.P. : Adhesion molecules and cytokine production, *Am. Rev. Respir. Dis.* 148 : 570-574, 1993.
3. Jenkins, M.K., and Johnson, J.G. : Molecules involved in T-cell costimulation, *Curr Opin Immunol* 5 : 361-367, 1993.
4. Janeway, C.J., and Golstein, P. : Lymphocyte activation and effector functions, Editorial overview. The role of cell surface molecules, *Curr Opin Immunol* 5 : 313-323, 1993.
5. Clark, E.A., and Ledbetter, J.A. : How B and T cells talk to each other, *Nature*, 367 : 425-428, 1994.
6. Swain, S.L., and Reth, M. : *Curr. Opin. Immunol.* 6 : 355, 1993.
7. Butcher, E.C. : Overview: cell adhesion receptors in the immune system. In Weir's Handbook of Experimental Immunology, 5th ed. Blackwell Science, 67 : 1-,67.7, 1996.
8. Stout, R.D., and Bottomly, K. : Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-producing(Th1) T cell clones: failure of IL-4

- producing(Th2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *J. Immunol.* 142 : 760-765, 1989.
9. Sypek, J.P., and Wyler, D.J. : Antileishmanial defense in macrophages triggered by tumor necrosis factor expressed on CD4 T lymphocyte plasma membrane. *J. Exp. Med.* 174 : 755-, 1991.
  10. Sypek, J.P., Matzilevich, M.M., and Wyler, D.J. : Th2 lymphocyte clone can activate macrophage antileishmanial defense by lymphokine-independent mechanism in vitro and can aiment parasite attribution in vivo. *Cell. Immunol.* 133 : 178-, 1991.
  11. Tormey, V.J., Faul, J., Leonard, C., Burke, C.M., Dilmech, A., and Poulter, L.W. : T-cell cytokines may control the balance of functionally distinct macrophage populations. *Immunology* 90 : 463-469, 1997.
  12. Dunlap, N.E., and Tilden, A.B. : T helper inducer(CD4<sup>+</sup>) cells prestimulated with PPD induce monocytes to produce interleukin-1 $\beta$ . *J. Leukoc. Biol.* 49 : 542-547, 1991.
  13. Isler, P., Vey, E., Zhang, J.H., and Dayer, J.M. : Cell surface glycoproteins expressed on activated human T-cells induce production of interleukin-1 $\beta$  by monocytic cells: a possible role of CD69. *Eur. Cytokine. Netw.* 4 : 15-23, 1993.
  14. Lacraz, S., Isler, P., Vey, E., Welgus, H.G., and Dayer, J.-M. : Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for the induction of metalloproteinase expression. *J. Biol. Chem.* 268 : 220-227, 1994.
  15. Landis, C.B., Friedman, M.L., Fisher, R.I., and Ellis, T.M. : Induction of human monocyte IL-1 mRNA and secretion during anti-CD3 mitogenesis requires two distinct T cell-derived signals. *J. Immunol.* 146 : 128-135, 1991.
  16. Li, J.-M., Isler, P., Dayer, J.-M., and Burger, D. : Contact-dependent stimulation of monocytic cells and neutrophils by stimulated human T-cell clones. *Immunology.* 84 : 571-576, 1995.
  17. Vey, E., Zhang, J.H., and Dayer, J.M. : IFN- $\gamma$  and 1,25(OH) $_2$ D $_3$  induce on THP-1 cells distinct patterns of cell surface antigen expression, cytokine production, and responsiveness to contact with activated T cells. *J. Immunol.* 149 : 2040-2046, 1992.
  18. Weaver, C.T. and Unanue, E.R. : T cell induction of membrane IL-1 on macrophages. *J. Immunol.* 137 : 3868-3873, 1986.
  19. Weaver, C.T., Duncan, L.M., and Unanue, E.R. : T cell induction of macrophage IL-1 during antigen presentation: characterization of a lymphokine mediator and comparison of Th1 and Th2 subsets. *J. Immunol.* 142 : 3469-3476, 1989.
  20. Gascan, H., Aversa, G.G., Gauchat, J.-F., van Vlasselaer, P., Roncarolo, M.-G., Yssel, H., Kehry, M., Spits, H., and de Vries, J.E. : Membranes of activated CD4<sup>+</sup>T cells expressing T cell receptor(TcR) $\alpha\beta$  or TcR  $\gamma\delta$  induce IgE synthesis by human B cells in the presence of interleukin-4. *Eur. J. Immunol.* 22 : 1133-1141, 1992.
  21. Noelle, R.J., Daum, J., Bartlett, W.C., McCann, J., and Shepherd, D.M. : Cognate interactions between helper T cells and B cells. V. Reconstitution of T helper cell function using purified plasma membranes from activated Th1 and Th2 T helper cells and lymphokines. *J. Immunol.* 146 : 1118-1124, 1991.
  22. Mannel, D.N., and Janicke, R. : Induction of monokine production by tumor cells. *Lymphokine Res* 8 : 257-261, 1989.
  23. Zhang, J.H., Ferrante, A., Arrigo, A.-P., and Dayer, J.-M. : Neutrophil stimulation and

- priming by direct contact with activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 148;177-181, 1992.
24. 최 병선, 오 귀옥, 김 형섭 : 세균내독소에 의한 단핵구의 MHC class II 분자와 integrin의 발현 및 cytokine 생산에 미치는 분화/활성화 유도 물질의 영향. 대한치주학회지, 1998. in Press
  25. Tohma, S., and Lipsky, P.E.: Analysis of the mechanism of T cell-dependent polyclonal activation of human B cells. *J Immunol* 146 : 2544-2552, 1991.
  26. Webb, D.S.A., Shimizu, Y., van Seventer, G.A., Shaw, S., and Gerrard, T.L. : LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science.* 249 : 1295-1297, 1990.
  27. Hara, T., Jung, L.K.L., Bjorndahl, J.M., and Fu, S.M. : Human T cells activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J. Exp. Med.* 164 : 1988-2005, 1986.
  28. Yurochko, A.D., Liu, D.Y., Eierman, D., and Haskill, S. : Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 9034-9038, 1992.
  29. Mobley, J.L., Romzek, N.C., and Shimizu, Y. : Integrin activation in lymphocyte adhesion. In Weir's Handbook of Experimental Immunology, 5th ed. Blackwell Science, 67.1-67.7, 1996.
  30. Springer, T.A. : Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration : The multistep paradigm. *Cell* 76 : 301-314, 1994.
  31. Hynes, R.O.: Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69 : 11-25, 1992.
  32. Postigo, A.A., Corbi, A.L., Sanchez-Madrid, F., and De Landazuri, M.O. : Regulated expression and function of CD11c/CD18 integrin on human B lymphocytes. Relation between attachment to fibrinogen and triggering of proliferation through CD11c/CD18. *J. Exp. Med.* 174 : 1313-1322, 1991.
  33. Anderson, D.C., and Springer, T.A. : Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Ann. Rev. Med.* 38 : 175-194, 1987.
  34. Dustin, M.L., and Springer, T.A. : T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341 : 619-624, 1989.
  35. Shimizu, Y., van Seventer, G.A., Horgan, K.J., and Shaw, S. : Roles of adhesion molecules in T cell recognition: fundamental similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in expression, binding, and costimulation. *Immunol. Rev.* 114 : 109-143, 1990.
  36. van Kooyk, Y., van de Wiel-van Kemenade, P., Weder, P., Kulipers, T.W., and Figdor, C.G. : Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 342 : 811-813, 1989.
  37. Hogg, N., and Landis, R.C. : *Curr. Opin. Immunol.* 5 : 313, 1993.
  38. Schwartz, M.A., Schaller, M.D., and Ginsberg, M.H. : *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11 : 549, 1995.
  39. Dang, L.H., and Rock, K.L. : Stimulation of B lymphocytes through surface Ig receptors induces LFA-1 and ICAM-1-dependent adhesion. *J. Immunol.* 146 : 3273-3279, 1991.
  40. Chan, B.M.C., Wong, J.G.P., Rao, A., and Hemler, M.E. : T cell receptor-dependent anti-

- gen-specific stimulation of a murine T cell clone induces a transient, VLA protein-mediated binding to extracellular matrix. *J. Immunol.* 147 : 398-404, 1991.
41. Hershkoviz, R., Cahalon, L., Miron, S., Alon, R., Sapir, T., Akiyama, S.K., Yamada, K.M., and Lider, O. : TNF- $\alpha$  associated with fibronectin enhances phobol myristate acetate- or antigen-mediated integrin-dependent adhesion of CD4<sup>+</sup> T cells via protein tyrosine phosphorylation. *J. Immunol.* 153 : 554-565, 1994.
42. Stout, R.D. : Macrophage activation by T cells. Cognate and noncognate signals. *Curr. Opin. Immunol.* 5 : 398, 1993.
43. Tao, X., and Stout, R. : T-cell mediated cognate signaling of nitric oxide production by macrophages. Requirements for macrophage activation by plasma membranes isolated from T cells. *Eur. J. Immunol.* 23 : 2916, 1993.

## Immunochemical study on the Role of $\beta_2$ Integrin in the Activation of Monocytes Upon Direct Contact with T Lymphocytes

Suck-Cho Lee, Ho Lee, Kwi-Ok Oh\*, Hyung-Seop Kim

Department of Periodontology and Research Institute of Oral Bio-Science,  
College of Dentistry, Chonbuk National University

\*Institute of Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

The modulation of leukocyte cell surface adhesion molecules may influence the development of cellular events that determine the course of the inflammatory process. Direct interaction between activated T cells and monocytes resulted in a large production of IL-1 $\beta$  by monocytes. In this reactions, adhesion molecules play an important part, yet the role of them in T-monocytes interaction remain unclear. This study was undertaken in an effort to elucidate, 1) the influence of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -induced differentiation on the monocyte responsiveness to direct contact with T lymphocytes, and 2) the role of adhesion molecules on the T-monocyte direct interaction. Initially, I observed that direct contact of monocyte cell line THP-1 with stimulated fixed T cell line HuT78 markedly induces IL-1 $\beta$  production by THP-1.

IL-1 $\beta$  production was higher when THP-1 had been previously exposed to 1,25(OH) $_2$ D $_3$  as compared to control, with  $\alpha$ -1,25(OH) $_2$ D $_3$  dose-dependent and exposure time-dependent manner. It was shown that 1,25(OH) $_2$ D $_3$  also increased the expression of  $\beta_2$  integrin adhesion receptor Mac-1(CD11b/CD18) dose- and time- dependently, but did not increase the expression of human leukocyte antigen-D(HLA-D) and intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1). The IL-1 $\beta$  producing activity of THP-1 cells correlated well with the ability to induce the Mac-1 expression on THP-1 surface. Monoclonal antibody raised against relevant cell surface glycoproteins on THP-1 were tested for their ability to block the response of THP-1 to T cells. Antibody to Mac-1 only partially blocked IL-1 $\beta$  production by THP-1, whereas antibodies to ICAM-1 and HLA-D did not.

These data indicate that regulation of Mac-1 expression on THP-1 cells can alter the responsiveness of these cells to contact by activated T cells, however other unknown structures on the THP-1 cells may be involved in this process also.