

Anti-idiotypic 항체가 Hybridoma 세포의 Anti-DNA 항체 합성을 조절하는 기전

*아주대학교 의과대학 미생물학교실 및 †아주대학교 의료원 의과학연구소 면역학연구실

박 선* · 박정수* · 김형일* · 주민경*
장 영 주* · 윤 정 구** · 김 영 태**

Regulatory Mechanism of Anti-Idiotypic Antibody on Anti-DNA Ab Production of Hybridoma Cells

Sun Park*, Jeong Soo Park[†], Hyung-Il Kim*, Min-keong Choo*,
Young-Ju Jang[†], Jung Koo Youn and Young Tai Kim

*Department of Microbiology Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

[†]Laboratory of Immunology Institute for Medical Sciences Ajou University, Suwon, Korea

The regulatory mechanism of anti-idiotypic antibody(anti-id Ab) in the immune response is not fully understood. It has been reported that anti-id Ab suppresses Ab production of lymphocytes or hybridoma cells in vitro, but it does not affect the proliferation of cells or Ab secretion. We investigated whether or not polyclonal anti-id Ab regulates the production of anti-DNA Ab(IgG2a) in hybridoma cells. In addition, the effects of anti-id Ab on the proliferation of cells and on the transcription levels of Ig genes were studied to elucidate the cellular and molecular mechanisms for regulation of anti-DNA Ab production in hybridoma cells. The treatment of hybridoma cells with anti-id Ab resulted in an increase in the number of cells producing anti-DNA Ab. However, there was no significant difference in the proliferation rate and mRNA levels of Ig genes between hybridoma cells treated with anti-id Ab, and those treated with normal rabbit serum. These results and our previous data suggest that the number of hybridoma cells producing anti-DNA Ab by anti-id Ab is not directly related with the rate of proliferation of the cells. Furthermore, it appears that the number of hybridoma cells producing IgG class anti-DNA Ab is increased by anti-id Ab, whereas the number of hybridoma cells producing IgM class anti-DNA Ab is down-regulated by anti-id Ab.

Key Words: Anti-idiotypic antibody, Regulation, Ig gene mRNA

서 론

1. 연구 배경

Jerne에 의해서 제창된 idio-type-anti-idio-type network은 특정 항원에 대하여 항체가 만들어질 경우 뒤이어 그 항체를 인지하는 anti-idiotypic(id) 항체가 만들어져서 이

*본 연구는 아주대학교 교내 연구비, 1995년도 한국 과학 재단의 핵심과제 연구비 및 1994년도 대한의학협회의 기초 의학 진흥기금 보조금의 지원으로 수행되었음.

저자연락처: 김영태, (442-749) 경기도 수원시 팔달구 원천 동 산 5번지, 아주대학교 의과대학 미생물학교실, Tel (0331) 219-5072

들이 면역반응의 조절에 참여한다는 학설이다¹. Anti-id 항체가 정상면역반응을 어떻게 조절하는지에 대하여는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았으나 anti-id 항체가 병의 원인이 되는 표적항체를 중화시키거나, 억제 T 림프구를 유도하거나, B 림프구의 표면 면역글로불린이나 T 림프구의 idiotope에 결합하는 등의 다양한 방법으로 항체 생산을 조절할 수 있다고 한다².

생체내에서만뿐만 아니라 시험관내(in vitro)에서 anti-id 항체가 항체 생산을 조절할 수 있다는 실험 결과는 많이 보고되어 있다. 선행된 연구결과 다클론(polyclonal) 혹은 단클론(monoclonal) anti-id 항체가 사람의 말초혈액에서 분리된 단핵세포 또는 변형된 B 세포 클론에서

항체 생성을 억제하였고, 마우스의 비장세포나 하이브리도마 세포에 anti-id 항체를 처리하였을 때에도 이들 세포의 항체 생성량이 감소하였다³⁻⁸. 그러므로 anti-id 항체는 B 림프구에 직접 작용하여 항체 생산을 조절할 수 있다고 생각된다.

Anti-id 항체가 시험관내에서 단핵세포 또는 하이브리도마 세포의 항체 생산을 억제할 때 이들 세포의 증식에는 영향을 미치지 않았으므로 anti-id 항체의 항체 생산 조절은 항체 생산 세포의 수적감소를 통해 일어나지 않으리라 생각된다⁷. 또한 anti-id 항체는 면역글로불린의 분비를 억제하지 않았으므로 anti-id 항체의 항체 생산 억제는 면역글로불린의 합성을 억제함으로써 이루어질 것이라고 하였다³.

B 세포에 어떤 처리를 가하여 B 세포의 증식과 무관하게 항체 합성이 조절되는 경우 항체 합성의 여러 단계 중 항체 유전자의 전사 단계에서 항체 합성의 조절이 일어났다는 보고가 있다. LPS에 의하여 활성화된 B 림프구에 B 림프구의 항원 수용체에 대한 면역글로불린을 처리하면 B 세포의 증식에는 변화가 없으나 항체 생성량은 감소되었고, 이때 분비형 면역글로불린의 전사수준이 감소하였다^{9,10}. 비특이적 자극인 ferritin의 처리도 B 림프구의 증식은 억제하지 않으나 항체 생성은 감소시키면서 면역글로불린의 중쇄 유전자의 mRNA 수준을 감소시켰다¹¹.

Id-anti-id network은 몇가지 자가면역질환의 병인기전을 설명하는 가설로 제시되고 있으며, anti-id 항체 혹은 anti-id 항체를 이용한 immunotoxin을 제조하여 자가면역 질환을 치료하려는 노력이 진행되고 있다.

Anti-DNA 항체를 비롯한 자가항체가 특징적이며 임상 경과에 변동이 심한 전신성 홍반성 루프스(SLE)의 유발 및 질병 경과에 자가 항원에 대한 면역반응을 억제할 수 있는 id-anti-id network이 관여하리라는 견해가 있다¹². 즉 SLE 환자의 혈청에서 증상이 악화된 시기에는 anti-DNA 자가항체가 높으나 증상이 완화된 시기에는 anti-DNA 항체가 떨어지면서 anti-DNA 항체에 대한 anti-id 항체를 발견할 수 있었으므로 자가항체가 높은 시기에 증상이 심해지고 이후 이 자가항체에 대한 anti-id 항체가 생성되면서 자가 항체 생성이 억제되어 회복기에 들어가게 된다고 설명한다¹³. 마우스에 anti-DNA 항체를 주사하면 SLE와 혈청학적 및 임상적으로 유사한 질병을 유도할 수 있는데 이는 anti-DNA 항체에 의하여 anti-id 항체가 생기고 이 anti-id 항체에 의하여 anti-anti-id 항체가 생기며 이 anti-anti-id 항체 중 DNA에 반응하는 항체에 의하여 증상이 발현된다고 한

다. 또한 anti-DNA에 대한 anti-id 항체를 마우스에 주사하였을 때에도 이에 대한 anti-id 항체가 생기고 이 anti-id 항체는 DNA를 인지하여 SLE가 유발된다¹⁴.

Anti-DNA 항체는 SLE의 경과와 상관관계가 높고, DNA와 면역 복합체를 이루어 신장에 침윤되므로써 보체 활성화에 의한 조직 손상을 초래하며 신장염을 일으키므로 anti-DNA 항체의 생성 조절은 SLE 치료의 기본이 된다. Anti-DNA 항체에 대한 anti-id 항체 또는 anti-id 항체에 독소를 결합시킨 immunotoxin이 시험관내에서 혹은 SLE 모델 마우스에서 anti-DNA 항체의 생성을 조절하고 질병의 진행을 억제하는 효과가 있음이 보고되어 있다^{6,15,16}. 치료 효과를 설명하는 기전이 밝혀지기전부터 정상인의 혈장에서 수집한 polyspecific IgG(IVIg)를 자가 면역질환의 치료에 이용하고 있는데 IVIg에 의한 임상적 호전은 IVIg내에 존재하는 anti-id 항체의 자가항체생성의 억제에 의한 것으로 생각되고 있다. IVIg의 F(ab')₂로 만든 친화성 칼럼(affinity column)에 DNA를 비롯한 여러 자가 항원을 인지하는 사람의 자가항체가 결합한다는 사실이 이를 뒷받침한다¹⁷⁻¹⁹.

2. 연구목적

이 연구는 자가항체를 생산하는 B 림프구의 조절을 장기적인 목표로 삼아 하이브리도마가 만드는 anti-DNA 항체에 대한 anti-id 항체를 만들어 anti-id 항체가 하이브리도마에 직접 작용하여 항체 생산을 조절함을 확인하고 이때 anti-id 항체의 항체 생성 조절이 면역글로불린 유전자의 전사 단계에서 일어나는가 알아보고자 하였다.

연구 재료 및 방법

1. 재 료

1) **Hybridoma:** Anti-DNA 항체를 생산하는 hybridoma H241(아주대 의과학 연구소 면역학 연구실의 장영주선생님 제공)을 사용하여 실험하였다.

2) **Probe:** C γ 의 probe는 IgG isotype간의 핵산염기 서열(DNA sequence)의 상동성(homology)이 높은 부분을 oligonucleotide로 만들어 사용하였고, I γ chain 유전자의 probe는 마우스 strain간 핵산염기 서열의 상동성이 높은 부분을 oligonucleotide로 만들어 사용하였다. 사용한 probe의 핵산 염기서열은 다음과 같다.

C γ probe:

5'-TGGATAGACTGATGGGGGTGTTGTTTTGGC

C κ probe:

5'-TGGGAAGATGGATACAGTTGGTGCAGCATC

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자에 대한 probe(아주의대 미생물학교실 이미리나 선생님 제공)는 전기영동한 RNA의 양을 비교하기 위해 사용하였다.

2. 방법

1) **Anti-DNA 항체의 정제:** H241의 배양액 1000 ml을 ssDNA-agarose column(Gibo BRL)을 통과시켜 anti-DNA 항체가 DNA에 결합하도록 한 후 700 mM NaCl로 용출(elution)하였다. 용출된 anti-DNA 항체를 PBS에 dialysis한 후 280 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다. 정제된 항체는 Enzyme-linked immunosorbant assay(ELISA)와 SDS-PAGE로써 확인하였다.

2) **ELISA:** Calf thymus DNA(Sigma) 5 μ g/ml가 들어 있는 인산 완충식염수(PBS, pH7.4)를 microtiter plate의 각 well에 0.1 ml씩 넣고 실온에서 1시간 정치한 후 0.1% PBS-Tween(PBST) 용액으로 씻은 다음 1% bovine serum albumin(BSA)이 들어있는 PBST 용액 0.1 ml를 넣었다. 이를 한 시간동안 실온에 정치한 후 검사하고자 하는 hybridoma 배양액을 각 well에 0.1 ml씩 넣고 실온에 정치하였다. 한시간 후 이를 PBST로 씻은 다음, alkaline phosphatase가 결합된 rabbit anti-mouse immunoglobulin(Ig) 용액을 well당 0.1 ml씩 넣고 한 시간동안 실온에서 정치한 후 PBST로 3회, TBST(Trizma base 1.2 g/l, sodium chloride 8.8 g/l, 0.1% Tween)로 1회 세척하였다. 각 well당 0.1 ml *p*-nitrophenyl phosphate, disodium (1 mg/ml)을 넣고 실온 또는 4 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) **Anti-id 항체의 제조:** 정제된 1 mg/ml 농도의 anti-DNA 항체 0.5 ml과 동량의 complete Freund's adjuvant를 섞어 토끼의 대퇴근에 주사한 다음, 3주 후, 1 mg/ml 농도의 anti-DNA 항체 0.5 ml과 동량의 incomplete Freund's adjuvant를 섞어 토끼에 추가면역하였다. 일주일 후 토끼의 혈액을 뽑아 혈청을 분리하고 여기에 동량의 포화 ammonium sulfate 용액을 가하고 밤새 정치시킴으로써 면역글로불린을 침전시켰다. 이를 3000 \times g에서 30분 원심분리하여 얻은 침사를 PBS에 용해시킨 다음 ammonium sulfate를 제거하기 위하여 PBS에 dialysis 시켰다. 마우스 면역글로불린의 불변부위에 결합하는 항체를 제거하기 위하여 정상 C57B1/6의 면역글로불린을 결합시킨 sepharose 4B 친화성 칼럼을 다음과 같이 만들었다. 활성화된 CNBr sepharose (Phar-

macia) 2 g을 1 mM HCl(pH2)에 넣어 swelling시킨 후 150 ml의 1 mM HCl(pH2)로 세척하였다. 여기에 ammonium sulfate 침전법으로 분리한 2.29 mg/ml 농도의 정상마우스 면역글로불린 12 ml을 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 정치하였다. 이를 250 \times g로 10분간 원심분리한 후 상청액을 버리고 coupling buffer로 2회 세척하였다. Coupling efficiency는 99.7%였다. 여기에 1 M ethanalamine(pH8.0)을 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 5시간 정치하여 sepharose의 잔존 활성기를 제거한 후 0.5 M NaCl, 0.1 M acetate buffer(pH4.0)와 0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl(pH8.0)으로 번갈아가며 3차례씩 세척하였다. 이를 지름 1 cm의 칼럼에 채워넣고 PBS로 세척한 다음 위에서 얻은 토끼의 anti-H241 항체(4 mg/ml)를 0.7 ml/min의 속도로 통과시켰다. 칼럼을 PBS로 세척하고 결합된 항체를 glycine HCl buffer(pH2.3)로 용출한 후, 칼럼을 재생(regeneration)하기 위하여 칼럼의 10배 부피의 0.5 M NaCl, 0.1 M acetate buffer(pH4.5)과 0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH8.5)를 교대로 3회씩 흘려 세척하였다. 재생된 칼럼에 정상 마우스 면역글로불린에 결합하지 않고 칼럼을 통과한 anti-H241항체를 위의 방법으로 2회 더 통과시켜 anti-id 항체를 분리하였다.

Anti-id 항체가 마우스의 면역글로불린의 불변부위를 인지하지 않고 H241의 anti-DNA 항체만을 인지하는가는 ELISA로 확인하였다. Microtiter plate(Costar)에 coating하는 항원으로는 정상 마우스 면역글로불린과 H241의 anti-DNA 항체를 이용하였다. 각 항원을 carbonate-bicarbonate buffer(pH9.4)로 10 μ g/ml 농도로 조정한 후 well당 0.1 ml씩 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 정치하였다. 이를 PBST로 씻은 다음 각 well에 1% BSA가 들어있는 PBST 0.1 ml를 넣었다. 이를 한 시간동안 실온에 정치한 후 각 well에 anti-id 항체를 0.1 ml씩 넣고 실온에 정치하였다. 한시간 후 이를 PBST로 씻은 다음, alkaline phosphatase가 결합된 goat anti-rabbit Ig 용액을 well 당 0.1 ml씩 넣고 한 시간 동안 실온에서 정치한 후 PBST로 3회, 0.1% TBST로 1회 세척하였다. 각 well당 0.1 ml *p*-nitrophenyl phosphate, disodium(1 mg/ml)을 넣고 실온 또는 4 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) **Anti-id 항체가 항체 합성에 미치는 영향:** Hybridoma H241을 RPMI 1640으로 2회 세척하고 세포배양액으로 세포농도를 1 \times 10⁵/ml로 조정한 후 24 well plate에 well당 1 ml씩 넣고 각 well에 anti-id 항체 또는 정상 토끼 면역글로불린을 2.5 μ g/ml, 10 μ g/ml 또는 40 μ g/ml씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂하에서 2일간 배양하였

다. 각 농도 조건은 duplication하였다. 각 well의 배양액으로 ELISA를 시행하였고, 각 well에서 얻은 세포는 RPMI 1640으로 세척한 후 역플라크 형성 세포 정량법(reverse plaque forming cell assay)을 시행하였다.

역플라크 형성 세포 정량법을 간단히 기술하면 다음과 같다. Agarose 용액(1%)과 동량의 2배 농도의 RPMI 1640을 섞어 만든 0.5% agarose 0.5 ml에 chromium chloride를 사용하여 Staphylococcus의 A 단백질을 결합시킨 면양적혈구 0.05 ml과 H241(세포 농도 10^5 /ml) 0.05 ml을 넣고 혼합하였다. 이를 0.1% agarose가 미리 코팅된 슬라이드에 부어 고르게 편 후 37°C에서 한시간 동안 정치하였다. 여기에 토끼에서 얻은 마우스 면역글로불린을 인지하는 항체를 가하고 다시 37°C에서 한시간동안 정치한 다음 기니픽 혈청(정제된 보체대용)을 가하였다. 이를 37°C에서 한시간 동안 정치한 다음 생성된 플라크 수를 측정하였다.

5) Anti-id 항체가 하이브리도마의 증식에 미치는 영향: 하이브리도마 H241(세포농도 1×10^5 /ml)을 96 well round bottom plate의 각 well에 100 μ l씩 넣고, anti-id 항체 또는 정상 토끼 면역글로불린을 위의 4에서와 같은 농도로 첨가하였다. 이를 37°C 5% CO₂하에서 2일간 배양한 다음, harvest하기 18시간 전에 각 well에 [³H]-thymidine(sp. act. 1.67 Ci/m mole)을 1 μ Ci씩 첨가하였다. 이를 harvest하여 scintillation counter(Pharmacia)로 방사능을 측정하였다.

6) Anti-id 항체가 면역글로불린 유전자의 전사율에 미치는 영향

(1) H241 세포에서 mRNA의 추출: H241(세포농도 1×10^5 /ml)을 75 cm² flask에 15 ml씩 넣고 anti-id 항체 또는 정상 토끼 면역글로불린을 2.5 μ g/ml 또는 10 μ g/ml씩 넣은 후 37°C 5% CO₂하에서 배양하였다. 이틀 후 세포를 모아 PBS로 세척한 후 D용액 [4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate(pH 7.0) 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol] 1 ml을 넣고 세포를 균질화(homogenize)하였다. 여기에 2M sodium acetate(pH4)를 0.1 ml, phenol 1 ml, chloroform과 isoamyl alcohol의 49 : 1 혼합액 0.2 ml를 넣은 후 잘 섞은 다음 얼음에 15분간 정치하였다. 이를 4°C에서 10,000 \times g로 20분간 원심분리한 후 수용성 상층부를 새 tube에 옮기고 에틸 알코올 2 ml과 섞어 영하 70도에서 30분 이상 정치하였다. 이를 10,000 \times g로 20분간 원심분리하여 얻은 RNA침사를 75% 에틸 알코올로 세척하여 말린 후 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 물로 녹이고 정량

하였다.

(2) Probe의 방사선 표지: Oligonucleotide는 T4 polynucleotide kinase(Pharmacia/LKB, Piscataway, NJ)와 [³²P]ATP를 이용하여 end labeling을 하였고, GAPDH probe는 prime-a-gene labeling system(Promega)를 이용하여 [³²P]dATP(>5000 Ci/mM, Amersham, Arlington Heights, IL, USA)로 표지하였다. 표지 반응후 Sephadex G-25 column chromatography 방법으로 표지되지 않은 유리의 [³²P]ATP 혹은 [³²P]dATP를 제거하였다.

(3) Northern hybridization: (1)의 방법으로 분리하여 말린 총 RNA 10 μ g 또는 15 μ g을 sample buffer[48% formamide, 6.4% formaldehyde, 20 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA(pH8.0), 0.3 mg/ml ethidium bromide, 5.3% glycerol, 5.3% saturated bromophenol blue] 5 μ l에 녹인후 2분간 끓였다. 이를 1.75% formaldehyde가 포함된 1% agarose gel에서 4 volts/cm로 1시간 동안 30분 동안 전기영동한 후 capillary transfer법으로 nylon membrane에 옮겼다. Nylon membrane에 옮겨진 RNA는 UV cross linker하에서 고정시키고 hybridization을 시행하였다.

면역글로불린의 mRNA에 대한 probe로 hybridization을 시행할 경우 nylon membrane을 prehybridization용액 [6 \times SSC, 10 mM sodium phosphate monobasic, 1 mM EDTA, 0.5% SDS, 1% BSA, 0.1 mg/ml salmon sperm DNA]에 넣고 50°C에서 4시간 이상 반응시켰다. Hybridization은 2의 방법으로 방사성 동위원소로 표지한 probe가 100 ng(specific activity> 2×10^6 cpm/ μ g)이 포함된 hybridization용액(prehybridization 용액과 조성이 같음)에서 50°C에 18시간 이상 반응시켰다. hybridization후 nylon membrane은 세척용액[6 \times SSC, 0.1% SDS]으로 실온에서 5분씩 2회, 52°C에서 15분씩 2회 세척하였다.

GAPDH probe로 hybridization을 시행할 경우 prehybridization은 nylon membrane을 prehybridization 용액(0.2 mM sodium phosphate dibasic, 14 mM H₃PO₄, 0.8 mM EDTA, 1% BSA, 5% SDS, 0.25 mg/ml salmon sperm DNA, 30% formamide)에 넣고 58°C에서 4시간 이상 반응시켰다. Hybridization은 방사선 표지된 probe가 포함된 hybridization 용액(0.2 mM sodium phosphate dibasic, 14 mM H₃PO₄, 0.8 mM EDTA, 1% BSA, 5% SDS, 0.1 mg/ml salmon sperm DNA, 30% formamide, 6% polyvinyl pyrrolidone)에서 58°C에 18시간 이상 반응시켰다. Hybridization후 nylon membrane은 2 \times SSC, 0.5% SDS 용액으로 실온에서 5분 2 \times SSC, 0.1% SDS 용액으로 실온에서 15분, 0.1 \times SSC, 0.5% SDS 용액으로 63°C

에서 30분씩 2회, 0.1×SSC, 0.5% SDS용액으로 63℃에서 15분 세척하고, 실온의 0.1×SSC 용액으로 세척하였다.

세척이 끝난 membrane을 -70℃에서 X-ray film에 수시간에서 수일간 노출시켜 자가방사기록법(autoradiography)을 시행한 후 현상하였다. 각 band의 강도는 laser scanning densitometer(Molecular dynamics)를 이용하여 측정 비교하였다.

결 과

1. Anti-id항체의 분리

하이브리도마 H241이 만드는 anti-DNA 항체를 토끼에 면역하여 얻은 anti-H241 Ig에서 정상마우스 면역글로불린의 불변부위에 결합하는 항체를 제거하므로써 anti-id 항체를 분리하였다(Fig. 1). ELISA 결과 정상 마우스의 면역글로불린이 결합된 친화성 칼럼을 통과시키지 않은 anti-H241 Ig은 H241 항체뿐만 아니라 정상 마우스 면역글로불린과도 반응하여 흡광도가 높은 것을 확인하였다. 반면, 정상 마우스의 면역글로불린이 결합된 친화성 칼럼을 3회 통과시켜 얻은 anti-id항체는 20 µg/ml의 농도 범위에서 정상 마우스 면역글로불린과는 결합하지 않으나 H241이 생산한 항체와는 반응하며, 이 반응은 anti-id 항체의 농도에 비례하여 흡광도가 높아짐을 관찰하였다.

2. Anti-id 항체가 하이브리도마의 항체 생산에 미치는 영향

하이브리도마 H241에 anti-id 항체를 처리하는 적당한 조건을 정하기 위하여 H241의 세포수 및 배양 시간에 따른 항체 생산량을 비교하였다(Fig. 2). 세포 농도 2.5 × 10⁴/ml, 5 × 10⁴/ml, 1 × 10⁵/ml, 2 × 10⁵/ml, 5 × 10⁵/ml로 시작하여 3일간 배양하면서 24시간 마다 얻은 배양액으로 ELISA를 시행하였다. 항체 생산량은 세포 농도에 비례하여 증가하였고, 세포수 1 × 10⁵/ml, 2 × 10⁵/ml, 5 × 10⁵/ml로 배양을 시작한 경우 배양 2일째 흡광도가 가장 높았다. 세포 농도 5 × 10⁵/ml로 배양을 시작한 경우 배양 2일째 세포의 viability가 50% 미만이었으므로, northern blot 시행을 고려하여 세포 농도 1 × 10⁵/ml로 2일간 배양하면서 anti-id를 처리하기로 하였다.

ELISA로써 anti-id 항체의 존재하에 하이브리도마 H241이 생산하는 항체의 양을 정상 토끼 면역글로불린의 존재하에 H241이 생산하는 항체의 양과 비교하였다(Fig. 3). H241 세포(1 × 10⁵/ml)의 배지에 anti-id 항체 또

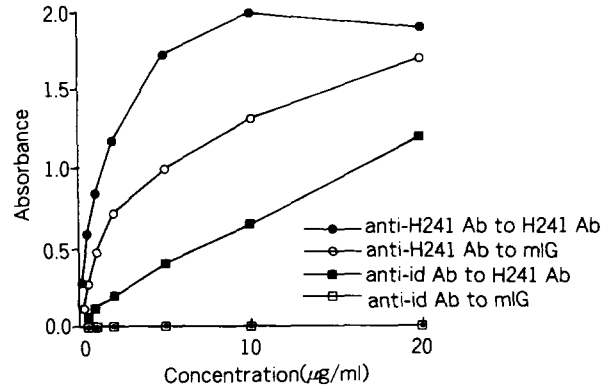


Fig. 1. Purification of anti-id Ab. Anti-id Ab was purified from anti-H241 Ab of H241 Ab-immunized rabbit by passing through normal mouse Ig coupled sepharose column. The binding activities of anti-id Ab and anti-H241 Ab to H241 Ab or normal mouse Ig(mIg) was examined by ELISA at various concentrations of anti-id Ab or anti-H241 Ab. Anti-H241 Ab reacts with both H241 and mIg, but purified anti-id Ab reacts only with H241 Ab.

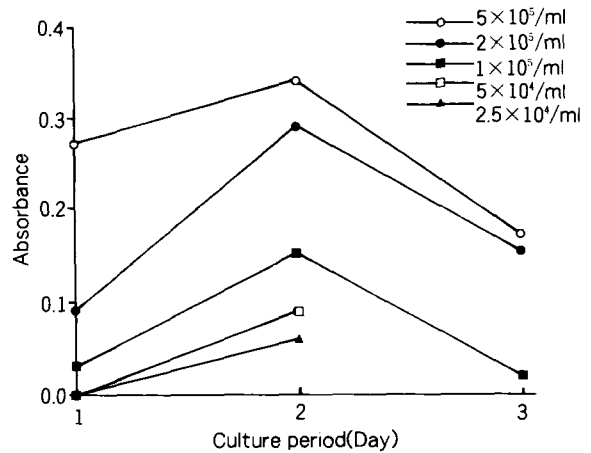


Fig. 2. Antibody titer produced by H241 hybridoma cells. H241 cells were cultured in 24 well plate for 3 days at various cell concentrations. Anti-DNA Ab level in each culture media at the end of culture period was measured by ELISA.

는 정상 토끼 면역글로불린을 각각 2.5 µg/ml, 10 µg/ml 또는 40 µg/ml의 농도로 넣고 2일간 배양한 배지로 ELISA를 시행한 결과 anti-id 항체의 존재하에 H241이 생산한 항체의 양은 대조군과 비교하여 유의있는 차이를 보이지 않았으며 반복된 실험에서도 동일한 결과를 보였다(P>0.05). 이때 생성된 anti-DNA 항체의 양을 항

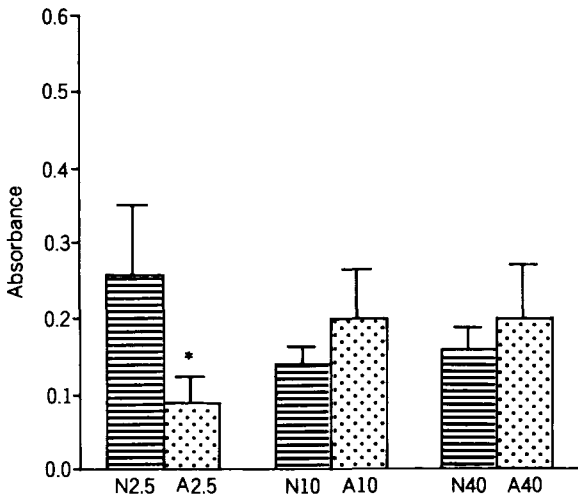


Fig. 3. Effect of anti-id Ab on Ab production by H241 hybridoma cells. H241 cells(1×10^5 /ml) were cultured in the presence of anti-id Ab(A) or control normal rabbit Ig(N) at the concentrations, 2.5 µg/ml, 10 µg/ml, or 40 µg/ml respectively. Each conditions were duplicated. After 2 days anti-DNA Ab level in each culture medium was assessed by ELISA. Mean absorbance of culture media of H241 cells in the absence of anti-id Ab and control normal rabbit Ig was 0.18 ± 0.031 . * $p=0.08$

체 농도에 따른 흡광도의 표준 곡선에 비교하여 정량적으로 측정하여 비교하지는 않았다.

Anti-id 항체의 처리가 하이브리도마 H241의 항체 생성에 미치는 영향을 역플라크 형성 세포정량법으로 조사하였다(Table 1). H241 세포(1×10^5 /ml)의 배지에 anti-id 항체 또는 정상 토끼 면역글로불린을 각각 2.5 µg/ml, 10 µg/ml 또는 40 µg/ml의 농도로 넣고 2일간 배양한 후 H241 세포를 모아 역플라크 형성 세포 정량법을 시행하였다. Anti-id 항체를 처리한 H241 세포는 정상 토끼 면역글로불린을 처리한 H241 세포에 비하여 항체를 생성하는 세포의 수가 2배 이상 증가하였고, anti-id 항체의 농도가 증가할 수록 항체를 생산하는 H241 세포의 수가 증가하는 경향을 보였다.

3. Anti-id 항체가 하이브리도마의 증식에 미치는 영향

Anti-id 항체가 H241 세포의 증식에 영향을 미침으로써 항체 생성량을 조절할 수 있는지 알아보기 위하여 농도의 anti-id 항체 또는 정상 토끼 면역글로불린을 처리한 H241 세포(1×10^5 /ml)의 증식을 [3 H]thymidine uptake로 측정하였다(Fig. 4). Anti-id 항체를 처리한 H241의 증식은 정상 토끼 면역글로불린을 처리한 경우

Table 1. Effect of anti-id Ab on reverse plaque formation by H241 cells

Concentration ^a (µg/ml)	No. of reverse PFC/ 10^5 cells ^b		Stimulation index ^c
	Control Ig	Anti-id Ab	
2.5	4600 ± 1979.9	10200	2.2
10	3500 ± 141.4	12800 ± 565.7	3.7
40	4200 ± 1414.2	14600 ± 848.5	3.5

a: concentration of control normal rabbit Ig or anti-id Ab

b: mean \pm SD

No. of reverse PFC in the presence of anti-id Ab

c:

No. of reverse PFC in the presence of control Ig

H241 cells(1×10^5 /ml) were cultured in the presence of control normal rabbit Ig or anti-Id Ab. After 2 day-culture, cells were collected and reverse plaque forming cell(PFC) assays were performed. PFCs of control culture(no treatment) were 5500 ± 989.9 .

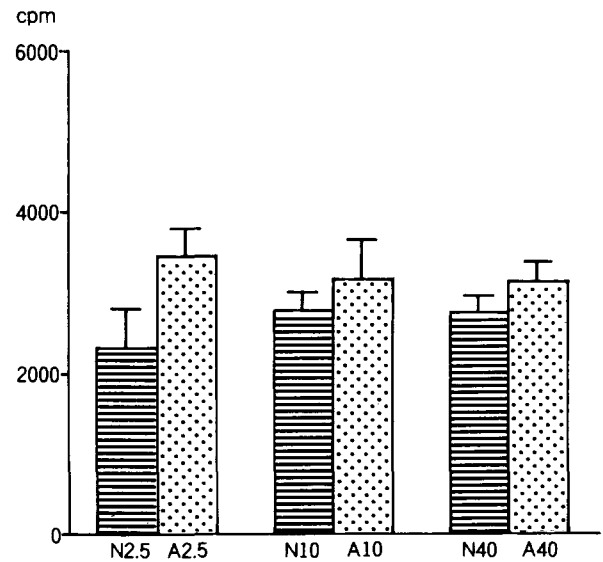


Fig. 4. Effect of anti-id Ab on proliferation of H241 hybridoma cells. H241 cells(1×10^5 /ml) were cultured in the presence of anti-id Ab(A) or control normal rabbit Ig(N) at the concentrations of 2.5 µg/ml, 10 µg/ml, or 40 µg/ml respectively. Each conditions were triplicated. After 30 hour-culture, 1 µCi [3 H]-thymidine was added. After additional 18 hour-culture, cells were harvested and [3 H]-thymidine uptake was counted. Mean uptake of H241 cells in the medium only was 2165.6 ± 365.7 .

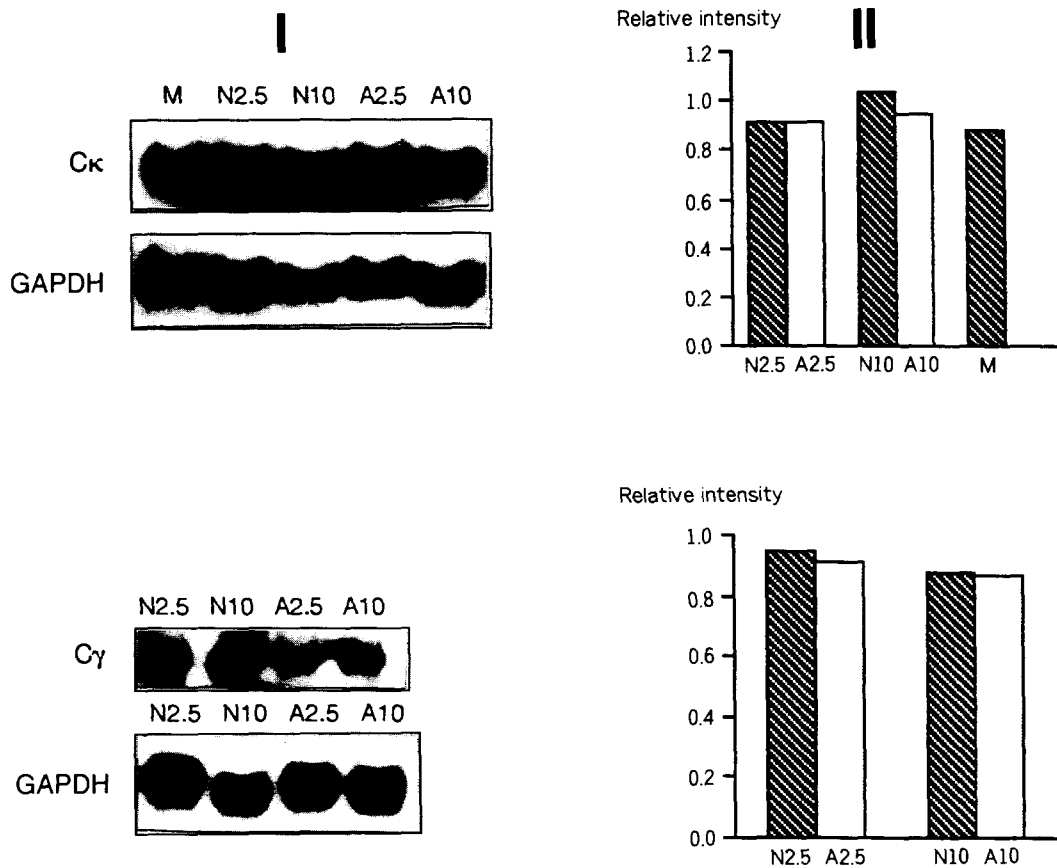


Fig. 5. Effect of anti-id Ab on the Ig gene expression in H241 hybridoma cells. (I) Northern hybridization of RNA from H241 cells incubated with medium alone(M), with anti-id Ab(A) or control normal rabbit Ig(N) at the concentrations of at 2.5 μ g/ml or 10 μ g/ml, for 2 days was performed using oligonucleotide probe specific for Ig γ (C γ) or Ig κ (C κ). (II) Densitometric analysis of the C γ and C κ specific bands shown in panel I. Relative intensity was the ratio of mean density of C γ or C κ hybridized band/mean density of GAPDH hybridized band at each concentration.

와 비교하여 차이를 보이지 않았으며, anti-id 항체 또는 정상 토끼 면역글로불린의 처리 농도에 따른 H241 세포 증식의 차이도 관찰되지 않았다.

4. Anti-id 항체가 면역글로불린 유전자의 전사율에 미치는 영향

Anti-id 항체의 처리에 의한 하이브리도마 H241의 항체 생산의 변화가 면역글로불린 유전자의 전사율의 차이에서 비롯된 것인지 알아보하고자 anti-id 항체 또는 정상 토끼 면역글로불린을 각각 2.5 μ g/ml, 10 μ g/ml 또는 40 μ g/ml의 농도로 2일간 처리한 H241 세포에서 RNA를 추출하여 northern hybridization을 시행하였다(Fig. 5). Anti-id 항체를 처리한 H241 세포에서 면역글로불린의 경쇄 및 중쇄 유전자의 전사율은 정상 토끼 면역글로불린을 처리한 H241 세포에서의 면역글로불린의 경쇄

및 중쇄 유전자의 전사율과 차이를 보이지 않았다.

고 찰

Anti-id 항체가 생체 및 시험관내(in vitro)에서 항체 생산을 조절할 수 있으며, 변형된 B 림프구나 하이브리도마 세포에서 직접 작용하여 항체 생산을 억제할 수 있음이 보고되어 있다³⁻⁸. 그러나 anti-id 항체가 하이브리도마 혹은 림프구의 증식에는 영향을 미치지 않았으므로 anti-id 항체의 항체 생산 조절은 세포의 증식을 억제하는 방법으로 이루어지지 않는 것 같다⁷. Anti-id 항체가 면역글로불린의 분비 단계에서는 작용하지 않는다³고 보고된 바 있어 이 실험에서는 anti-id 항체가 면역글로불린의 합성과정에 영향을 미치는지 알아보자 하였다.

우선 하이브리도마 H241이 만드는 항체에 대한 anti-id 항체가 H241의 항체생산에 미치는 영향을 ELISA와 역플라크 형성 세포 정량법을 이용하여 살펴 보았다. 그 결과 ELISA로서는 anti-id 항체가 H241의 항체생산에 미치는 영향을 관찰할 수 없었으나, 역플라크 형성 세포 정량법상 anti-id 항체가 H241의 항체를 생산하는 세포의 수를 증가시키는 결과를 얻었다. ELISA로 anti-id 항체의 항체 생산 촉진을 볼 수 없었던 원인은 H241이 실제 생산한 항체량을 ELISA로는 정확히 측정할 수 없었기 때문인 것으로 생각된다. 즉 H241이 생산한 항체가 배지에 처리한 anti-id 항체와 결합함으로써 항원 DNA와의 친화력(affinity)이 떨어졌거나 또는 anti-id 항체가 항원과 경쟁적으로 작용하여 H241의 항체와 결합함으로써 H241의 항체가 항원과 적게 반응하여 실제 H241이 생산한 항체량에 비하여 흡광도가 증가하지 않았을 가능성이 있다. 또는 ELISA와 역플라크 형성 세포 정량법이 측정하는 현상이 다르므로 서로 일치하지 않는 결과를 보일수도 있다고 생각한다. 즉 ELISA는 하이브리도마 H241이 2일간 생성한 항체의 총양을 측정하는 방법이고 역플라크 형성세포 정량법은 검사하는 순간의 항체 생성세포의 수를 측정하는 방법이기 때문이다. 앞선 연구 중 ELISA로써 anti-id 항체가 하이브리도마의 항체 생산에 미치는 영향을 관찰할 수 있었던 논문은 이 실험과 직접 비교하기 어려운 점이 있다. 이 실험과 유사한 방법을 사용한 연구에서는 anti-id 항체를 처리한 후 하이브리도마를 세척하여 다시 배양한 배지에서의 항체 생산량을 측정하였으며 단클론성 anti-id 항체를 사용하였기 때문이다⁶⁻⁸. 역플라크 형성세포 정량법에 의하면 이 실험에서는 anti-id 항체의 농도를 anti-id 항체를 분리한 혈청의 부피에서 계산되는 희석 배수로 표시하였기 때문에 anti-id 항체의 농도를 비교할 수 없고 또 다른 연구에서는 anti-id 항체를 처리한 후 하이브리도마를 세척하여 다시 배양한 배지에서의 항체 생산량을 측정하였으며 단클론성 anti-id 항체를 사용하였기 때문이다⁷⁻⁸. 역플라크 형성 세포 정량법에 의하면 이 실험에서는 anti-id 항체가 항체 생산 세포의 수를 증가 시켰으며 이는 단클론 혹은 다클론 anti-id 항체가 하이브리도마의 항체 생산 세포 수를 감소시킨다는 선행된 보고에 반하는 결과이다. 이러한 결과는 사용한 하이브리도마의 차이 또는 하이브리도마에 처리한 anti-id 항체의 농도 및 특성에 따른 차이에 기인한다고 해석할 수 있다. 이 실험에서 사용한 anti-id 항체는 id 항체의 불변부위에 결합하는 항체를 제거하는 과정에서 id항체와 동일한 allotype의 마우

스 면역글로불린을 사용하지 못했으므로 anti-allotype 항체가 제거되지 않았을 가능성이 높다.

Anti-id 항체의 항체 생산 조절은 처리한 anti-id 항체의 양뿐만 아니라 anti-id 항체가 작용한 B 림프구의 분화단계(differential stage)에 의하여 다르게 나타날 것이라는 가설이 제기되어 왔다. 다클론성 및 단클론성 anti-id 항체를 처리하여 항체생산의 억제를 관찰한 논문은 IgM을 생산하는 하이브리도마를 사용하였고⁵⁻⁷, 이 실험에서는 IgG2a를 생산하는 하이브리도마를 사용하여 실험하였다. 따라서 IgG2a를 생산하는 H241이 anti-id 항체에 의하여 항체 생산이 촉진되는 현상은 IgM을 생산하는 하이브리도마와 H241의 분화정도가 다르기 때문에 나타난다는 설명이 가능하다. 그러나 이를 뒷받침하기 위해서는 이 실험에서 사용한 anti-id 항체의 농도보다 더 낮은 농도와 더 높은 농도의 anti-id 항체를 처리하였을 때 H241의 항체 생산에 미치는 영향을 조사하는 실험이 선행되어야 할 것이다. 또한 다클론성뿐만 아니라 단클론성 anti-id 항체를 이용하여 여러 isotype의 항체를 생산하는 하이브리도마의 항체생산에 미치는 영향을 비교하는 실험이 뒤따라야 할 것이다.

Anti-id 항체에 의하여 하이브리도마의 항체 생산이 조절되는 기전을 밝히기 위하여 anti-id 항체가 하이브리도마의 증식에 미치는 영향과 Ig 유전자의 전사율에 미치는 영향을 조사하였다. Anti-id 항체에 의하여 H241에서 항체를 생산하는 세포의 수가 증가됨에도 불구하고 H241의 증식속도가 변하지 않았다. 이는 anti-id 항체가 하이브리도마 또는 림프구의 항체생산은 조절하나 이들 세포의 증식에 관여하지 않는다는 종래의 보고를 다시 한번 확인하는 결과이며 anti-id 항체의 항체 생산 조절은 하이브리도마의 증식을 조절하므로써 이루어지는 것이 아님을 의미한다.

이전의 보고에서 anti-id 항체가 Ig의 분비에는 영향을 미치지 않는다고 하였으므로 anti-id 항체가 Ig의 합성과정을 조절하리라 예상하여 anti-id 항체를 처리한 후 Ig의 합성과 밀접한 연관이 있는 Ig mRNA의 양을 northern hybridization을 이용하여 측정해 보았다. 그 결과 H241에서 anti-id 항체에 의한 Ig 유전자의 전사율은 대조군과 차이를 보이지 않았다. 이는 anti-id 항체 처리에 의한 Ig mRNA의 양의 변화를 관찰한 시점이 anti-id 항체가 면역글로불린 유전자의 전사에 미치는 효과를 관찰하기에 부적절하였기 때문이거나, northern hybridization이 분별할 수 있는 mRNA양의 변화보다 anti-id 항체 처리에 의한 Ig mRNA의 양의 변화가 적었기 때

문에 나타난 결과로 해석될 수 있다. 또는 anti-id 항체에 의한 항체 생산의 조절은 항체 생산 과정 중 Ig 유전자의 전사단계 이후의 단계에서 일어남을 의미할 수도 있다. 이를 명확히 하기 위하여 앞으로 anti-id 항체의 처리시간에 따른 면역글로불린 유전자의 전사수준을 측정하고, anti-id 항체가 전사 후 해독단계에 영향을 미치는지 연구할 필요가 있다고 생각된다.

결 론

Anti-id Ab가 B 세포에 직접 작용하여 항체 생산을 조절하는 기전을 알아보기 위하여 anti-DNA 항체(IgG2a)를 생산하는 하이브리도마에 anti-id Ab를 처리하고 하이브리도마세포의 항체 생산과 증식, 면역글로불린 유전자의 mRNA의 양을 적량적으로 측정하였다. Anti-id 항체를 처리하였을 때 항체를 생산하는 하이브리도마의 세포수가 증가하였으나, 하이브리도마 세포의 증식 속도와 면역글로불린 유전자의 mRNA 양에는 유의있는 변화가 없었다. 따라서 anti-id 항체의 항체 생산 조절은 하이브리도마의 증식의 조절 또는 항체 합성 과정 중 면역글로불린 유전자의 전사 단계에서의 조절로써 이루어지지 않는 것 같다. 한편 anti-id 항체가 IgM을 생산하는 하이브리도마 세포의 항체 생산을 억제하고 항체 생산 세포수를 억제하였던 이전의 실험과 비교할 때 앞으로 anti-id 항체가 항체 생산세포수에 미치는 영향이 id 항체를 생산하는 B 세포의 분화 단계에 의하여 결정될 수 있는지 연구할 필요가 있다고 생각된다.

감사의 말씀

GAPDH probe를 제공해 주시고 실험방법에 있어 많은 자문을 주신 아주대학교 미생물학교실의 이미리나 선생님과 세포 배양액을 공급해 준 아주대학교 미생물학교실의 지영진 선생님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Jerne NK: Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol(Paris)* 125C: 373-389, 1974
2. Paul WE: *Fundamental Immunology*. 3rd ed. New York, Raven Press, pp887-902, 1993
3. Koopman WJ, Schrohenloher RE, Barton JC and Greenleaf EC: Suppression of in vitro monoclonal human rheumatoid factor synthesis by antiidiotypic antibody. *J Clin Invest* 72:

- 1410-1419, 1983
4. Epstein A, Greenberg M, Diamond B and Grayzel AI: Suppression of anti-DNA antibody synthesis in vitro by a cross-reactive antiidiotypic antibody. *J Clin Invest* 70: 997-1000, 1987
5. Bitoh S, Fujimoto S, Yamamoto H: Evidence for idiotype- and antiidiotypic B-B cellular interaction with the use of cloned antiidiotypic B cell line. *J Immunol* 144: 2046-2052, 1990
6. Blank M, Manospoi J, Tomer Y, Manospoi A, Kopolovic J, Charcon-Polak S and Shoenfeld Y: Suppression of experimental systemic lupus erythematosus(SLE) with specific anti-idiotypic antibody-saporin conjugate. *Clin Exp Immunol* 98: 434-441, 1994
7. Young Tai K, Emily P, Tony D, Marc EW and Gregory WS: Regulation of antibody production by hybridoma cultures. *Cellular Immunol* 105: 65-74, 1987
8. Sugishima H and Minoda M: Effect of anti-idiotypic antibody on production of anti-DNA antibodies by splenocytes in lupus prone mice. *Alerugi* 40: 711-718, 1991
9. Moore BB, Ariizumi K, Tucker PW and Yuan Dorothy: Transcriptional analysis of inhibition of lipopolysaccharide response by anti-IgM. *J Immunol* 150: 3366-3374, 1993
10. Anderson CC, Cairans E, Rudofsky UH and Sinclair NR STC: Defective antigen-receptor-mediated regulation of immunoglobulin production in B cells from autoimmune strains of mice. *Cellular Immunol* 164: 141-149, 1995
11. Keiko M, Fumimaro O, and Shigeru M: H- and L-rich ferritins suppress antibody production, but not proliferation, of human B lymphocytes in vitro. *Blood* 83: 737-743, 1994
12. Abdou NI, Wall H, Lindsley HB, Halsey JF and Suzuki T: Network theory in autoimmunity. In vitro suppression of serum anti-DNA antibody binding to DNA by anti-idiotypic antibody in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 67: 1297-1304, 1981
13. Zouali M and Eyquem A: Idiotype/antiidiotypic interactions in systemic lupus erythematosus. Demonstration of oscillary levels of anti-DNA autoantibodies and reciprocal antiidiotypic activity in a single patient. *Ann Immunol Inst Pasteur* 134C: 377-391, 1983
14. Mendlovic S, Fricke H, Shoenfeld Y and Mozes E: The role of anti-idiotypic antibodies in the induction of experimental systemic lupus erythematosus in mice. *Eur J Immunol* 19: 729-734, 1989
15. Takeshi S, Tai M, Osamu T, Eilich T, Yasushi O, Yoshio K, Nakao I and Kaoru Y: Selective elimination of anti-DNA antibody-producing cells by antiidiotypic antibody conjugated with neocarzinostatin. *J Clin Invest* 77: 1382-1386, 1986
16. Mahana W, Brigitte G and Avrameas S: Suppression of anti-DNA antibody production in MRL mice by treatment with anti-idiotypic antibodies. *Clin Exp Immunol* 70: 538-545, 1987

17. Evans M, Abdou NI: In vitro modulation of anti-DNA secreting peripheral blood mononuclear cells of lupus patients by anti-idiotypic antibody of pooled human intravenous immunoglobulin. *Lupus* 2: 371-375, 1993
 18. Evans MJ, Suenaga R and Abdou NI: Detection and purification of anti-idiotypic antibody against anti-DNA in intravenous immune globulin. *J Clin Immunol* 11: 291-295, 1991
 19. Dietrich G and Kazatchkine MD: Normal immunoglobulin G(IgG) for therapeutic use(intravenous Ig) contain antiidiotypic specificities against an immunodominant, disease-associated, cross-reactive idiotype of human anti-thyroglobulin autoantibodies. *J Clin Invest* 85: 620-625, 1990
-