

항이디오타입 항체가 하이브리도마 세포의 항DNA 항체 생산에 미치는 영향

아주대학교 의과대학 미생물학교실¹, 연세대학교 의과대학 미생물학교실²

박 선¹ · 김형일¹ · 이미리나¹ · 김영태¹ · 윤정구¹ · 김주덕²

=Abstract=

Effect of Anti-idiotypic Antibody on Anti-DNA Antibody Production by Hybridoma Cells

Sun Park¹, Hyung-Il Kim¹, Millina Lee¹, Young Tai Kim¹, Jung Koo Youn¹
and Joo-Deuk Kim²

Department of Microbiology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea¹,
Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-749, Korea²

Anti-idiotypic antibody (anti-id Ab) which recognizes idiotope in the variable region of immunoglobulin (Ig) can regulate Ab production by B cells *in vivo* and *in vitro*. Although it has been reported that anti-id Ab can suppress IgM production by lymphocytes or hybridoma cells without suppression of cell proliferation, the regulatory mechanism of anti-id Ab is not completely understood.

We studied the effects of anti-id Ab on the production of IgG class anti-DNA Ab by hybridoma cells, on the proliferation of cells, and on the transcription levels of Ig genes. In contrast to suppressive effect of anti-id Ab on the production of IgM previously reported by others, stimulatory effects of anti-id Ab on the production of IgG by hybridoma cells as well as the proliferation of these cells were observed. However, little effect of anti-id Ab on the transcription levels of Ig genes was observed.

These results suggest that anti-id Ab can increase Ab production by stimulation of cell proliferation. Furthermore, these results suggest that the effect of anti-id Ab on the production of Ab may be determined by the difference in class of Ab produced by hybridoma cells following the treatment with anti-id Ab.

Key Words: Anti-idiotypic antibody, Isotype, Ab production

서 론

항이디오타입 항체는 면역글로불린 (Ig) 가변부의 항원결정기를 인지하는 항체이다. 항이디오타입 항체는 이디오토프 (idiotope)에 특이하게 면역 반응을 조절할 수 있다고 보고되어 있는 바, 그룹

A streptococcus로 면역하면 A5A 이디오타입 항체를 많이 생산한다고 알려진 A/J 마우스에 항 A5A 이디오타입 항체를 미리 주사한 후 그룹 A streptococcus를 주사하면 A5A 이디오타입 항체 생산이 감소하였으며¹⁾, BALB/c 마우스에 T15 이디오타입 항체에 대한 항이디오타입 항체를 주사하면 T15 이디오타입 항체 생산 세포의 수가

감소하였고²⁾, BALB/c 마우스에 항이디오타입 항체를 주사한 후 dextran을 면역하면 항이디오타입 항체가 인지하는 항dextran 항체의 생산이 감소되었다고 한다³⁾. 사람에서도 항이디오타입 항체가 항체 생산을 조절하는 것이 관찰되었는데 tetanus toxoid (TT)로 면역한 사람에서 생긴 항 TT 항체에 대한 자가항이디오타입 항체가 항 TT 항체 생산을 억제한다고 하였다^{4,5)}. 또한 전신성 홍반성 루프스 (systemic lupus erythematosus) 환자의 혈청에서는 항DNA 항체에 대한 항이디오타입 항체가 발견될 때 항DNA 항체가 낮아지는 것이 밝혀짐으로써 항이디오타입 항체가 자가면역 질환이 있는 사람에서 자가항체의 생산을 조절할 수 있다고 하였다⁶⁾. 한편, 정상인의 혈장 IgG에는 항DNA 항체에 대한 항이디오타입 항체가 있기 때문에 정상인의 혈장 IgG가 전신성 홍반성 루프스 환자에서 항DNA 항체의 생산을 억제할 수 있다고 하였다⁷⁾. 항DNA 항체에 대한 항이디오타입 항체가 전신성 홍반성 루프스 질환 모델 마우스에서도 항DNA 항체를 감소시켰다고 보고되었다^{8,9)}.

항이디오타입 항체가 시험관내에서도 항체 생산을 억제할 수 있는데, 항이디오타입 항체에 의하여 B 림프종 환자의 말초 혈액 B 세포의 항체 생산이 억제되었고¹⁰⁾, 항이디오타입 항체로 MOPC104E 골수종 세포, 하이브리도마 세포 또는 말초 혈액 단핵구를 처리하면 항체 생산 세포의 수가 감소하였다고 한다^{11~13)}.

한편 항이디오타입 항체가 마우스에서 항체 생산을 증가시키며^{14,15)} 시험관내에서 B 세포의 항체 생산을 증가시킨다는 보고도 있다¹⁶⁾. 항이디오타입 항체가 항체 생산을 증가시키는 조건과 억제시키는 조건은 아직 잘 밝혀져 있지 않으나 항이디오타입 항체에 의해 항체 생산이 증가된 보고와 억제된 보고간에는 사용한 항이디오타입 항체의 농도와 B 세포의 활성 상태 또는 마우스에게 항이디오타입 항체를 주사한 방법에 차이가 있다^{14~16)}.

항이디오타입 항체가 항체 생산을 조절하는 기전으로는 B 세포의 항원수용체를 차단하거나 이디오타입에 특이한 억제 T림프구를 유도하는 것으로 받아들여지고 있다^{1,17~19)}. 항이디오타입 항체가 B 세포의 항원 수용체에 결합함으로써 항체 생산을 조절하는 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 항체 생산의 조절은 항체 생산 세포

의 증식, 항체 합성 또는 분비 과정을 조절함으로써 일어날 수 있는데, 항이디오타입 항체가 항체 생산 세포의 증식에 미치는 영향은 보고에 따라 다르다. 항이디오타입 항체에 의하여 하이브리도마 세포의 증식은 억제되지 않았으나¹²⁾, 골수종 세포의 증식이 억제되었고¹¹⁾ 사람의 백혈병 B 세포의 증식은 증가하는 경향을 보였다²⁰⁾. 항이디오타입 항체에 의하여 하이브리도마 세포의 증식이 억제되지 않았으나 하이브리도마 세포의 항체 생산이 감소하였으므로 항이디오타입 항체가 세포 증식을 조절함으로써 항체 생산을 조절하지 않는다고 하였다¹²⁾. 한편 항이디오타입 항체가 림프종 B 세포의 항체 생산량과 세포질내 항체량을 모두 감소시켰으므로 항체의 분비 과정을 억제하지 않는다고 하였다¹⁰⁾.

본 연구에서는 항이디오타입 항체가 항체 생산을 조절하는 기전에 대해 알아보려고 항이디오타입 항체로 IgG class의 항DNA 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 처리하여 항체 생산과 세포 증식 및 Ig 유전자의 전사수준을 측정하였다. 그 결과 항이디오타입 항체가 하이브리도마 세포의 항DNA 항체 생산과 세포 증식을 증가시키는 반면, Ig 유전자의 전사 수준에는 유의한 영향을 미치지 않는 것을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 항DNA 항체의 검사

ELISA 방법으로 항DNA 항체의 역가를 검사하였다. Calf thymus DNA (Sigma, St.Louis, MO, USA) 5 µg/ml가 들어있는 인산완충식염수 (PBS, pH 7.4)를 microtiter plate (Dynatech, Chantilly, Virginia, USA)의 각 well에 0.1ml씩 넣고 실온에서 1시간 정치한 후 0.1% PBS-Tween (PBST)용액으로 씻은 다음 1% 우혈청 알부민 (Sigma, St.Louis, MO, USA)이 들어있는 PBST용액을 넣고 한시간 동안 실온에 정치하였다. 각 well을 비운 후 검사하고자 하는 마우스의 혈청 또는 세포 배양액을 넣고 다시 한시간 동안 정치하였다. 이후 PBST로 각 well을 씻고 alkaline phosphatase가 결합된 마우스 Ig에 대한 항체 (Sigma, St.Louis, MO, USA)를 넣고 한시간 반응시킨 다음 각 well에 1mg/ml의 p-nitrophenyl phosphate disodium (Sigma, St. Louis, MO, USA)용액을 0.1ml씩 넣고 반응시켜 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. 항DNA 항체를 합성하는 하이브리도마 세포의 생산

MRL-*lpr/lpr* 마우스는 자연적으로 항DNA 항체가 생기며 생후 20주가 지나면 혈청내 항DNA 항체가 매우 높게 된다²¹⁾. 항DNA 항체가 1:1000이상인 5개월령의 female MRL-*lpr/lpr* 마우스에서 비장을 적출하여 분리한 림프구를 polyethylene glycol (Sigma, St.Louis, MO, USA)을 이용하여 골수종 세포 X63Ag8.653와 융합시켰다. 하이브리도마 세포를 선택적으로 증식시키기 위해 0.1 mM hypoxanthin, 0.4 μ M aminopterin, 16 μ M thymidine이 들어있는 배양액으로 배양하였다. 이후 ELISA를 시행하여 항DNA 항체를 만드는 하이브리도마 세포를 선택하고 클로닝하였다. 항DNA 항체의 isotype은 ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping Kit II (Pierce, Rockford, Illinois, USA)를 이용하여 밝혔다. 이 연구에서는 IgG3의 항DNA 항체를 생산하는 2B8 세포를 선택하여 사용하였다.

3. 단일클론성 항DNA 항체의 정제와 F(ab)₂ 제조

2B8 세포가 생산하는 항DNA 항체는 ssDNA-agarose column (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제한 항DNA 항체를 ELISA와 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로써 확인하였다.

2B8 세포가 생산한 항DNA 항체를 pepsin (Sigma, St.Louis, MO, USA)으로 가수분해한 후 Staphylococcal protein A column을 통과시키고, 투석막 (MW cut off: 50000)을 이용하여 PBS에 투석하여 Fc부분을 제거하였다. 이를 환원시킨 조건에서 12.5% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 후 silver 염색하여 F(ab)₂를 확인하였다.

4. 항이디오타입 항체의 생산과 정제

하이브리도마 2B8 세포가 생산한 항DNA 항체의 F(ab)₂ (1mg/ml) 0.5ml과 동량의 complete Freund's adjuvant를 섞어 토끼의 대퇴근에 주사하였다. 이후 2B8 세포가 생산한 항DNA 항체의 F(ab)₂ (1mg/ml) 0.5ml과 동량의 incomplete Freund's adjuvant를 섞어 토끼의 대퇴근에 삼주간격으로 2회 추가접종하였다. 일주일 후 토끼의 혈액을 뽑아 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 ammonium

sulfate로 침전시켜 얻은 Ig을 마우스의 Ig이 결합된 sepharose column을 수차례 통과시킴으로써 마우스 Ig의 불변부위에 결합하는 항체를 제거하였다. 마우스의 Ig이 결합된 sepharose column은 활성 CNBr sepharose (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden)와 C57BL/6 마우스 Ig을 이용하여 만들었다.

항이디오타입 항체가 2B8 세포가 생산한 항DNA 항체의 이디오토프에 특이하게 반응하는지 알아보고자 2B8 세포가 생산한 항DNA 항체의 F(ab)₂, C57BL/6 마우스의 Ig, MRL-*lpr/lpr* 마우스의 Ig에 대한 ELISA를 시행하였다. 항이디오타입 항체에 항allotype 항체가 있는지 알아보고자 사용한 MRL-*lpr/lpr* 마우스의 Ig은 ssDNA column을 통과시켜 항이디오타입 항체가 교차반응을 보일 수 있는 항DNA 항체를 제거한 다음 사용하였다.

5. 항이디오타입 항체가 2B8 하이브리도마 세포의 항체 생산에 미치는 영향

세포농도 5×10^4 /ml의 2B8 세포 부유액을 24 well plate의 각 well에 1 ml씩 넣고 항이디오타입 항체 또는 정상 토끼 Ig을 2.5 μ g/ml, 10 μ g/ml 또는 40 μ g/ml씩 첨가하고 48시간 또는 68시간 동안 배양하였다. 이때 각 배양 조건마다 duplication하였다. 대조군으로 사용한 정상 토끼 Ig은 2B8 세포가 생산한 항DNA 항체로 면역하기전에 토끼에서 미리 혈액을 뽑아 ammonium sulfate로 침전시켜 얻은 Ig을 사용하였다. 배양시작 48시간 또는 68시간 후 배양액을 수거하여 각 배양액으로 ELISA를 시행하여 배양액내 항DNA 항체량을 측정하였다.

위의 방법으로 항이디오타입 항체로 처리한 2B8 세포를 RPMI 1640으로 2회 세척한 다음 이 2B8 세포부유액 (세포 농도 5×10^3 /ml) 0.1ml과 0.7% 한천용액 0.9ml, Staphylococcal protein A가 결합된 면양적혈구 0.05ml를 잘 혼합하여 1.4% 한천용액으로 코팅한 dish에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 두시간 동안 정치하였다. 여기에 마우스 Ig에 대한 항체와 기니피 혈청을 차례로 가한 다음 생성된 플라크 수를 측정하였다.

6. 항이디오타입 항체가 2B8 하이브리도마 세포의 증식에 미치는 영향

2B8 세포부유액 (세포농도 5×10^4 /ml)을 96 well round bottom plate의 각 well에 100 μ l씩 넣고, 항

이디오타입 항체 또는 대조군으로 사용한 정상 토끼 Ig을 5에서와 같은 농도로 첨가하였다. 각 배양 조건은 triplication하였다. 37℃ 5% CO₂ 하에서 일정 시간 배양한 다음 각 well에 [³H]thymidine (6.7 Ci/mmole, New England Nuclear, Boston, MA, USA)을 1 μCi씩 첨가하였다. 이를 37℃ 5% CO₂ 하에서 18시간 더 배양한 다음 수확 (harvest) 하여 scintillation counter (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden)로 방사능을 측정하였다.

7. 항이디오타입 항체가 Ig 유전자의 전사에 미치는 영향

(1) 2B8 하이브리도마 세포의 총 RNA의 추출

2B8 세포 배양액에 항이디오타입 항체 또는 정상 토끼 Ig을 각각 40 μg/ml씩 넣은 후 1시간, 6시간, 24시간, 48시간, 68시간 배양하였다. 이후 세포를 모아 PBS로 세척한 후 acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform을 이용한 방법으로 세포 총 RNA를 얻었다.

(2) Probe의 방사선 표지

Cκ probe (5'-TGGAAGATGGATACAGTTGGTGCAGCATC)와 Igγ3 probe (5'-GGGTTCCAGTTAGAGCTGGTATCAGTGTCTTG)는 T4 polynucleotide kinase (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden)와 [³²P]ATP (>5000 Ci/mmole Amersham, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 end labeling을 하였고, GAPDH probe는 prime-a-gene labeling system (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 [³²P]dATP (>5000 Ci/mmole, Amersham)로 표지하였다. 표지 반응 후 Sephadex G-25 column chromatography방법으로 표지되지 않은 유리의 [³²P]ATP 혹은 [³²P]dATP를 제거하였다.

(3) Northern blot analysis

(1)의 방법으로 분리한 총 RNA 10 μg 또는 15 μg을 전기영동하였다. Capillary transfer법으로 nylon membrane에 옮겨진 RNA를 UV로 고정시키고 hybridization을 시행하였다. Nylon membrane을 prehybridization-용액 [6x SSC, 10mM sodium phosphate monobasic, 1mM EDTA, 0.5% SDS, 1% BSA, 0.1mg/ml salmon sperm DNA]에 넣고 50℃에서 4시간 이상 반응시킨다음, 방사성 동위원소로 표지한 Cκ, 또는 Igγ3 probe가 100ng (specific activity > 2x10⁸cpm/μg)이 포함된 hybridization-용액 (prehybridization-용액과 조성이 같음)에서 50℃에 18시간 이상 반응시켰다. Hybridization후 nylon

Fig. 1. SDS-PAGE of anti-DNA Ab produced by 2B8 hybridoma cells and its F(ab')₂.

membrane을 6x SSC, 0.1% SDS용액으로 실온에서 5분씩 2회, 52℃에서 15분씩 2회 세척하였다.

GAPDH probe로 hybridization을 한 경우 nylon membrane을 prehybridization 용액 (0.2mM sodium phosphate dibasic, 14mM H₃PO₄, 0.8mM EDTA, 1% BSA, 5% SDS, 0.25mg/ml salmon sperm DNA, 30% formamide)에 넣고 58℃에서 4시간 이상 반응시킨다음 probe가 포함된 hybridization 용액 (prehybridization-용액 100ml에 polyvinyl pyrrolidone 6g을 넣은 용액)에서 58℃에 18시간 이상 반응시켰다. Hybridization후 nylon membrane은 2x SSC, 0.5% SDS용액으로 실온에서 5분, 2x SSC, 0.1% SDS용액으로 실온에서 15분, 0.1x SSC, 0.5% SDS용액으로 63℃에서 30분씩 2회, 0.1x SSC, 0.5% SDS 용액으로 63℃에서 15분 세척하고, 실온의 0.1x SSC용액으로 세척하였다.

세척이 끝난 membrane을 -70℃에서 Hyperfilm (Amersham)에 노출시켜 autoradiography를 시행한 후 현상하였다. 각 band의 강도는 laser scanning densitometer와 Adobe photoshop 3.0과 NIH Image 1.44 program을 이용하여 측정 비교하였다.

8. 통계 처리

실험군과 대조군의 실험 성적간에 유의한 차이가 있는가는 Student paired-t test 또는 Wilcoxon signed rank test를 사용하여 분석하였다.

결 과

1. 하이브리도마 2B8 세포가 생산한 항DNA 항체에 특이한 항이디오타입 항체의 생산

2B8 세포가 생산한 항DNA 항체를 pepsin으로 가수분해하여 F(ab')₂를 만들고 이를 전기영동하여 정제가 잘 되었는지 확인하였다 (Fig. 1). 항 DNA 항체는 분자량 50kDa의 중쇄와 25kDa의 경

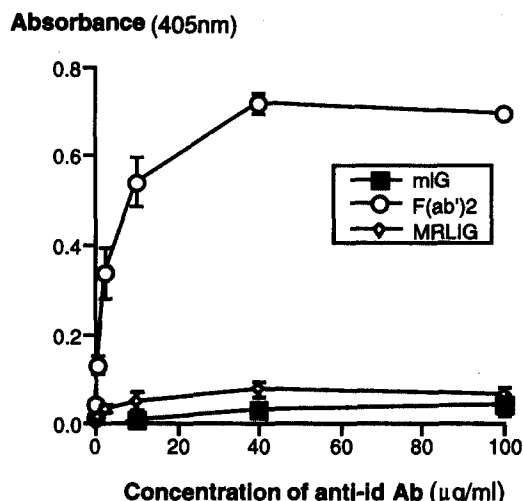


Fig. 2. Reaction of polyclonal anti-id Ab to F(ab')₂ of anti-DNA Ab produced by 2B8 hybridoma cells. The binding activities of anti-id Ab to C57BL/6 mouse Ig (mIG, 10 µg/ml), F(ab')₂ of anti-DNA Ab produced by 2B8 cells (F(ab')₂, 5 µg/ml), or MRL-*lpr/lpr* mouse Ig (MRLIG, 10 µg/ml) was assessed by ELISA at various concentrations of anti-id Ab.

쇄 band를 보이며 F(ab')₂는 25kDa의 band만을 보여 정제가 잘 되었음을 확인할 수 있었다.

2B8 세포가 생산한 항DNA 항체의 F(ab')₂로 면역하여 얻은 토끼의 항이디오타입 항체가 면역시킨 F(ab')₂의 이디오프에 특이하게 반응하는지 알아보려고 ELISA를 시행하였다 (Fig. 2). 항이디오타입 항체는 2B8 세포가 생산한 항DNA 항체의 F(ab')₂와 잘 반응하며, C57BL/6 마우스의 Ig과 MRL-*lpr/lpr* 마우스의 Ig에는 잘 반응하지 않으므로 항이디오타입 항체에서 면역시킨 F(ab')₂의 C_{H1} 또는 C_L에 결합하는 항체가 제거된 것을 보여주었다. 농도 1.25 µg/ml 이상에서 항이디오타입 항체가 검출되며 농도 40 µg/ml 이상에서는 항이디오타입 항체의 농도 증가에 따른 흡광도의 증가를 볼 수 없었다.

2. 항이디오타입 항체가 2B8 하이브리도마 세포의 항체 생산에 미치는 영향

하이브리도마 2B8 세포가 항DNA 항체를 생산하는 최적 조건을 정하고자 세포 농도를 달리하여 배양한 2B8 세포의 배양액으로 ELISA를 시행하여 2B8 세포가 생산한 항DNA 항체량을 흡광도로써 비교하였다 (Fig. 3). 세포 농도 5x10⁴/ml로 배양을 시작한 조건에서 2B8 세포의 2일 배양액

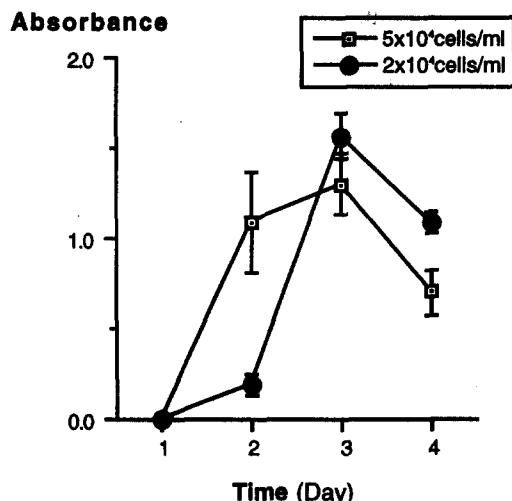


Fig. 3. Anti-DNA Ab production by 2B8 hybridoma cells. 2B8 cells were cultured for 4 days and anti-DNA Ab level in culture medium at each time point was assessed by ELISA.

과 3일 배양액의 흡광도가 높았으며 4일 배양한 배양액의 흡광도가 떨어진 것은 생산된 항체량이 적은 것이 아니라 ELISA에 사용한 항원보다 배양액내 항체의 양이 과다하였기 때문인 것으로 생각된다. 이때 세포의 viability가 2일 배양 후 95%, 3일 배양 후 60%, 4일 배양 후 10%내외이었으므로 이후 세포 농도 5x10⁴/ml로 2일과 3일 배양하면서 실험하였다.

2B8 세포의 배양액에 항이디오타입 항체와 대조군으로 정상 토끼 Ig을 넣고 배양한 후 2B8 세포가 생산한 총 항체 생산량을 ELISA로 비교하였다 (Fig. 4). 이때 배양액내 항이디오타입 항체는 흡광도에 영향을 미치지 않았으며 정상 토끼 Ig은 40 µg/ml의 농도에서 흡광도를 약간 감소시켰으나 (미발표) 실험 성적의 분석에 영향을 미칠 정도는 아니었다. 각 배양액내의 항체량은 standard curve (2B8 세포가 생산한 항DNA 항체의 농도에 따른 흡광도 변화에 의해 얻음)를 이용하여 계산하였다. 항이디오타입 항체가 48시간 동안 2B8 세포의 항체 생산에 미치는 영향은 2회 실험되었고, 68시간 동안 2B8 세포의 항체 생산에 미치는 영향은 6회 실험되었으며, Fig. 4는 그 중 대표적인 결과이다. 항이디오타입 항체 2.5 µg/ml을 넣고 48시간 배양한 2B8 세포의 항DNA 항체 생산량은 0.98±0.14µg/ml이었고, 같은 농도의 정상 토끼 Ig을 넣고 배양했을 때의 항체 생산량은 0.72±0.03µg/ml이었으며, 항이디오타입 항

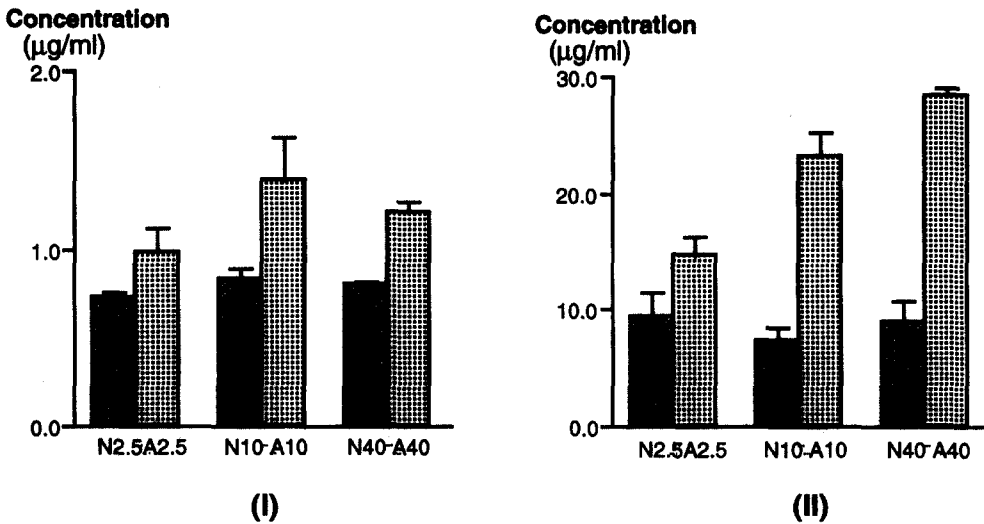


Fig. 4. Effect of anti-id Ab on the production of Ab by 2B8 cells. 2B8 cells (5×10^4 /ml) were cultured for 48hr (I) or 68hr (II) in the presence of anti-id Ab (A) or control normal rabbit Ig (N) at the concentrations, 2.5 µg/ml, 10 µg/ml or 40 µg/ml respectively. Anti-DNA Ab levels in each culture media were assessed by ELISA. Mean concentrations of Ab in the culture media of 2B8 cells in the absence of Ig were 1.110 ± 0.26 µg/ml for 48hr-culture and 9.73 ± 1.13 µg/ml for 68hr-culture.

Table 1. Effect of anti-id Ab on reverse plaque formation by 2B8 cells

Hours of cultivation	Con of Ig ^a (µg/ml)	No. of reverse PFC/500 cells ^b		Stimulation index ^c
		Control Ig	Anti-id Ab	
48	2.5	120.0 ± 9.9	148.0 ± 7.1	1.23
	10	150.0 ± 9.2	152.5 ± 10.6	1.02
	40	161.0	189.5 ± 6.4	1.18
	-	144.5 ± 3.5		
68	2.5	88.5 ± 0.7	99.5 ± 7.8	1.12
	10	90.0 ± 9.9	101.5 ± 10.6	1.13
	40	108.0 ± 18.4	102.5 ± 3.5	0.95
	-	121.5 ± 7.8		

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

b: Mean ± SD

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

No. of reverse PFC in the presence of control Ig

2B8 cells (5×10^4 /ml) were cultured in the presence of control normal rabbit Ig or anti-id Ab. After 48 or 68 hour-culture, cells were harvested and reverse plaque forming cell (PFC) assay was performed.

체 10 µg/ml을 넣고 배양했을 때의 항체 생산량은 1.38 ± 0.24 µg/ml, 10 µg/ml의 정상 토끼 Ig을 넣어 배양했을 때의 항체 생산량은 0.82 ± 0.06 µg/ml이었으며, 항이디오타입 항체 40 µg/ml을 넣고 배양했을 때의 항체 생산량은 1.20 ± 0.07 µg/ml, 40 µg/ml의 정상 토끼 Ig을 넣어 배양했을 때의

항체 생산량은 0.79 ± 0.02 µg/ml이므로서 항이디오타입 항체를 넣고 배양한 2B8 세포의 항체 생산량이 대조군에 비해 유의하게 더 많았다 (Wilcoxon signed rank test 검정시 $p < 0.05$). 항이디오타입 항체 2.5 µg/ml, 10 µg/ml, 또는 40 µg/ml를 넣고 68시간 배양한 2B8 세포의 항체 생산량은 각

EFFECT OF ANTI-IDIOTYPE ANTIBODY

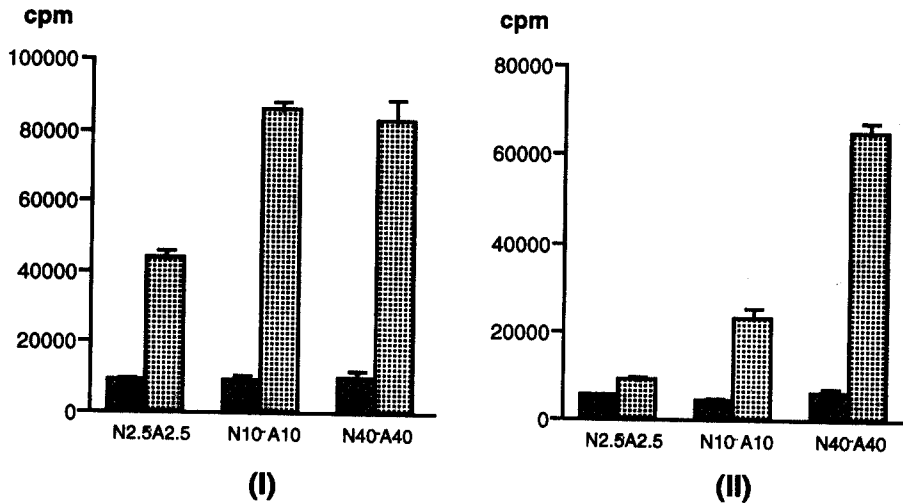


Fig. 5. Effect of anti-id Ab on the proliferation of 2B8 cells. 2B8 cells (5×10^4 /ml) were cultured in the presence of anti-id Ab (A) or control normal rabbit Ig (N) at the concentrations of 2.5 μ g/ml, 10 μ g/ml, or 40 μ g/ml respectively. Cultures were incubated for 48hr (I) or 68hr (II), pulsed with 1 μ Ci of 3 H-thymidine. Cell proliferations were determined by 3 H-thymidine uptake over the final 18 hours of the culture. Mean uptakes of 2B8 cells is the medium only were 12378.8 ± 1803.6 cpm for 48hr-culture and 9375.8 ± 1955.9 cpm for 68hr-culture.

각 $14.60 \pm 1.55 \mu\text{g/ml}$, $23.17 \pm 2.12 \mu\text{g/ml}$, $28.41 \pm 0.66 \mu\text{g/ml}$ 이었고, 이 때 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 또는 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 정상 토끼 Ig을 넣어 배양했을 때의 항체 생산량은 각각 $9.47 \pm 2.04 \mu\text{g/ml}$, $7.29 \pm 1.11 \mu\text{g/ml}$, $8.92 \pm 1.90 \mu\text{g/ml}$ 으로서 항이디오타입 항체가 2B8 세포의 항체 생산량을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다 (Student paired t-test에 의해 $p < 0.05$).

항이디오타입 항체가 2B8 세포의 항체 생산 세포수에 미치는 영향을 보고자 역플라크 형성 세포 정량법을 시행하였다 (Table 1). 각 실험은 3회 이상 반복되었으며 Table 1은 Fig. 4의 실험에서 항이디오타입 항체 또는 정상 토끼 Ig으로 처리된 2B8 세포를 이용한 결과이다. 배양 시간에 관계없이 항이디오타입 항체로 처리한 2B8 세포가 만드는 플라크수는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.

3. 항이디오타입 항체가 2B8 하이브리도마 세포의 증식에 미치는 영향

항이디오타입 항체가 2B8 세포의 증식에 미치는 영향을 보고자 ^3H thymidine uptake법을 시행하였다 (Fig. 5). 각 조건에서 triplicate하였으며, Fig. 5는 4회 이상의 반복 실험중 대표적인 경우이다. 항이디오타입 항체를 넣고 48시간 배양한 2B8 세포의 ^3H thymidine uptake의 평균 cpm값은 항

이디오타입 항체 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 43571.8 ± 2601.8 , 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 85760.4 ± 2102.4 , 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 82590.3 ± 6153.5 이었으며 이때 각 농도의 대조군의 평균 cpm값은 각각 8678.3 ± 1167.0 , 8914.5 ± 1763.3 , 9662.3 ± 2700.5 으로서 항이디오타입 항체 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 2B8 세포의 평균 cpm값이 대조군에 비해 약 5배, 항이디오타입 항체 10 $\mu\text{g/ml}$ 또는 40 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 2B8 세포의 평균 cpm값이 대조군에 약 9배 높았다. 항이디오타입 항체를 넣고 68시간 배양한 2B8 세포의 ^3H thymidine uptake의 평균 cpm값은 항이디오타입 항체 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 9217.4 ± 187.9 , 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 22894.4 ± 2134.0 , 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 64808.7 ± 2286.8 이었으며 이때 각 농도의 대조군의 평균 cpm값은 각각 5251.4 ± 258.2 , 4496.2 ± 504.5 , 6081.5 ± 1324.9 으로서 항이디오타입 항체를 처리한 2B8 세포의 평균 cpm값은 대조군에 비해 항이디오타입 항체 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 또는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 2배, 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 10배 높았다. 이러한 차이는 모두 Wilcoxon signed rank test 검정시 통계학적으로 유의하였다 ($p < 0.05$).

Fig. 6. Effect of anti-id Ab on the Ig gene expression in 2B8 cells. (I) Northern blot. RNA from 2B8 cells incubated with anti-id Ab (A) or control normal rabbit Ig (N) at the concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was hybridized with probe specific for Ig γ 3, Ig κ (C κ) or GAPDH. (II) Densitometric analysis of the Ig γ 3 and C κ specific bands shown in panel I. Relative intensity was the ratio of mean density of Ig γ 3 or C κ hybridized band/mean density of GAPDH hybridized band.

4. 항이디오타입 항체가 2B8 하이브리도마 세포의 Ig 유전자의 전사에 미치는 영향

항이디오타입 항체가 2B8 세포의 Ig 유전자의 전사 수준에 미치는 영향을 보고자 Northern blot analysis를 시행하였다 (Fig. 6). 항체 생산 증가 및 세포 증식 촉진을 가장 현저하게 일으킨 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 항이디오타입 항체로 2B8 세포를 1시간, 6시간, 24시간, 48시간 또는 68시간 동안 처리한 후 각 시점에서 2B8 세포의 Ig 유전자의 전사 수준을 측정하였다. 그 결과 Ig 증쇄와 경쇄 유

전자 모두 48시간 처리한 시점에서의 전사 수준이 다른 시점에서의 전사 수준보다 낮은 경향을 보였으나, 각 시점에서 항이디오타입 항체로 처리한 2B8 세포의 Ig 유전자의 전사 수준은 대조군의 Ig 유전자의 전사 수준과 차이를 보이지 않았다.

고 찰

항이디오타입 항체는 이디오타입 항체를 생산하는 B 세포의 항원수용체에 결합하여 항체 생

산을 조절할 수 있음이 밝혀져 있으나^{18,19}, 그 구체적인 기전에 대해서는 확실히 알려지지 않았다. 항이디오타입 항체는 항체 생산 과정- Ig 유전자의 전사, 번역, 분비- 또는 B 세포의 증식을 조절함으로써 항체 생산을 조절할 것으로 생각된다. 항이디오타입 항체가 세포증식에 미치는 영향은 보고에 따라 다르며, 항이디오타입 항체가 항체 생산에 미치는 영향과 상관성을 보이지 않는다는 보고도 있으므로, 항이디오타입 항체에 의한 세포 증식의 조절은 항이디오타입 항체의 항체 생산 조절에 있어 주된 기전이 아닐 것으로 예상된다^{12,20}. 한편 항이디오타입 항체가 항체의 분비 과정에 작용하지 않는다는 보고도 있다¹⁰.

본 연구에서는 항이디오타입 항체가 B 세포의 항체 생산을 조절하는 기전에 대해 알아보고자 항이디오타입 항체가 항DNA 항체를 생산하는 하이브리도마 2B8 세포의 항체 생산과 세포증식 및 Ig 유전자의 전사수준에 미치는 영향을 관찰하였다. 항이디오타입 항체는 대조군으로 사용한 정상 토끼 Ig에 비해 2B8 세포의 항DNA 항체 생산을 의의있게 증가시켰다. 이때 2.5 µg/ml, 10 µg/ml 또는 40 µg/ml 농도의 항이디오타입 항체로 2B8 세포를 2일 처리한 경우 약 1.5배 항체 생산이 증가되었고, 2.5 µg/ml의 항이디오타입 항체로 3일 처리한 경우에도 약 1.5배 항체 생산이 증가되었으나 10 µg/ml 또는 40 µg/ml의 항이디오타입 항체로 3일 처리한 경우 약 3.2배 항체 생산이 증가하였다. 이는 본 실험 조건하에서 2일간 최대로 항체 생산을 증가시키는데 충분한 항이디오타입 항체의 농도는 2.5 µg/ml이며, 3일간 최대로 항체 생산을 증가시키는데 충분한 항이디오타입 항체의 농도는 10 µg/ml임을 의미한다.

항이디오타입 항체는 2B8 세포의 역플라크 형성 세포수에 영향을 미치지 않았다. 즉 본 실험 조건에서 플라크를 형성할 수 있는 정도로 항체를 생산하는 2B8 세포수의 비가 20~40%로서 실험군과 대조군간에 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과는 항이디오타입 항체에 의한 총 항체 생산량의 증가 (ELISA에서 관찰된 결과)를 항이디오타입 항체가 2B8 세포의 플라크 형성 세포수에 미치는 영향으로 설명할 수 없음을 의미하며, 항이디오타입 항체가 2B8 세포의 항체 합성 또는 분비를 유의하게 증가시키지 않을 것을 시사한다. 한편 하이브리도마 세포임에도 불구하고 플

라크 형성 세포수가 전체 세포의 40% 미만인 것은 2B8 세포가 동조배양되지 않았기 때문으로 설명될 수 있으며, 이러한 결과는 하이브리도마 세포의 항체 생산과 분비가 세포 주기 (cell cycle)와 밀접한 관계를 보인다는 보고²²에 부합하는 결과이다.

항이디오타입 항체는 2B8 세포의 증식을 촉진시켰는데, 2.5 µg/ml의 항이디오타입 항체로 2B8 세포를 2일 처리한 경우에 약 5배, 10 µg/ml 또는 40 µg/ml 농도의 항이디오타입 항체로 2일 처리한 경우 각 9배, 2.5 µg/ml 또는 10 µg/ml의 항이디오타입 항체로 3일 처리한 경우 2배, 40 µg/ml의 항이디오타입 항체로 3일 처리한 경우 10배 세포의 증식이 증가되었다. 이는 본 실험 조건하에서 2일에 최대 세포 증식을 유도하는 항이디오타입 항체 농도가 10 µg/ml이며, 3일에는 세포수가 증가함으로써 최대 세포 증식을 유도하는 항이디오타입 항체 농도가 40 µg/ml 이상으로 증가되었음을 의미한다. 항이디오타입 항체에 의한 2B8 세포의 증식 촉진은 항이디오타입 항체에 의한 2B8 세포의 항체 생산의 증가를 설명할 수 있다고 생각된다. 즉 항이디오타입 항체에 의하여 2B8 세포의 증식이 촉진됨으로써 전체 세포수가 증가하고, 따라서 플라크 형성 세포수의 비는 일정하지만 전체 플라크 형성 세포수는 증가함으로써 항체 생산이 증가한 것으로 설명할 수 있다.

항이디오타입 항체는 2B8 세포의 Ig 유전자의 전사 수준에 영향을 미치지 않았다. 본 연구에서 2B8 세포의 항체 합성 과정중 Ig 유전자의 전사 이후 단계에 미치는 항이디오타입 항체의 영향은 조사되지 않았으나, 항이디오타입 항체가 2B8 세포의 역플라크 형성 세포수 및 Ig 유전자의 전사에 영향을 미치지 않았으므로 본 실험 조건하에서 항이디오타입 항체는 2B8 세포의 항체 합성에 영향을 미치지 않는 것 같다.

이상의 결과는 지금까지 항이디오타입 항체가 항체 생산을 억제하였다는 많은 보고와 상이하다^{10~12,23,24}. 항이디오타입 항체는 높은 농도에서는 항체 생산을 억제하고, 낮은 농도에서는 항체 생산을 억제하지 않고 오히려 촉진시킨다는 보고도 있으나^{14~16} 본 실험에서 낮은 농도의 항이디오타입 항체를 이용하였기 때문에 항체 생산이 증가하였을 가능성은 높지 않다. 왜냐하면 본 실험과 유사한 방법으로 실험하여 항체 생산의 억

제를 관찰한 보고¹⁰⁾와 비교할 때 본 실험 조건의 항이디오타입 항체의 농도가 낮은 농도는 아니었다고 생각되며 예비실험에서 (미발표) 100 µg/ml의 항이디오타입 항체도 항체 생산을 촉진시켰기 때문이다.

항이디오타입 항체에 의하여 항체 생산이 억제되었던 연구와 본 연구에서 사용한 세포가 서로 다르므로 세포의 차이에 의하여 항이디오타입 항체에 의한 항체 생산 조절 현상이 다르게 나타났을 가능성이 높다. 이전 연구에서 사용한 세포는 류마티스양 인자를 생산하는 B림프종 세포, dextran에 대한 항체를 생산하는 MOPC104E 골수종 세포, 항DNA 항체를 생산하는 사람 하이브리도마 세포, 항DNA 항체 또는 항fluorescein 항체를 생산하는 마우스의 하이브리도마 세포로서 모두 다르다^{10~12,23,24)}. 또한 이러한 세포와 본 실험에 사용한 세포는 정상 B 세포가 아니며, 세포막에 발현되는 분자를 비롯한 특성이 조사되지도 않았다. 그러므로 이들 세포와 2B8 세포간의 어떤 차이가 이들 세포와 2B8 세포에 있어서 항체 생산 또는 세포증식에 미친 항이디오타입 항체의 서로 다른 영향을 설명할 수 있는지 알기 어렵다. 그러나, 본 실험에서 항이디오타입 항체에 의해 항체 생산이 증가한 2B8 세포는 IgG를 생산하는 세포인데, 이전의 보고에서 항이디오타입 항체에 의해 항체 생산이 억제되었던 세포들은 모두 IgM을 생산하는 세포이다. 또한 본 연구에서 결과를 보이지는 않았으나 IgM class의 항DNA 항체를 생산하는 2F6 하이브리도마 세포를 40 µg/ml의 항이디오타입 항체로 2일 또는 3일 처리한 결과 대조군에 비해 항체 생산이 의의있게 감소하는 반면 세포 증식이 억제되지 않음을 관찰하였다. 그러므로, 항이디오타입 항체에 의한 항체 생산 조절이 항이디오타입 항체로 처리한 세포가 생산하는 항체의 isotype과 밀접한 관련이 있을 가능성이 있다. 이러한 가능성은 최근 IgG2a class의 항DNA 항체를 생산하는 하이브리도마 세포에서 항이디오타입 항체에 의하여 항체 생산 세포수가 증가되었던 보고에서 제기된 바 있다²⁵⁾. 항이디오타입 항체처럼 B 세포의 항원수용체에 결합하여 B 세포의 활성을 조절하는 항Ig 항체도 IgM 생산을 억제하는데 반해 IgG 생산을 억제하지 못하였다는 보고도 이를 뒷받침할 수 있다고 생각한다²⁶⁾. IgM과 IgG는 세포질내 domain에 차이가 있으므로 IgM 또는 IgG의 교차

결합에 의해 일어나는 세포내 신호전달과 B 세포 반응에 차이가 있을 수 있으며 이와 관련된 연구 결과가 보고되고 있다^{27,28)}. B 세포에서 IgM과 IgG가 서로 다른 반응을 유도할 수 있는가에 대한 해답은 본 실험결과를 이해하는데 도움이 되리라 기대된다.

본 연구에서 항이디오타입 항체는 세포 증식을 촉진시킴으로써 IgG class의 항DNA 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 항체 생산을 증가시켰다. 종래 보고와 비교할때 이 연구 결과는 항체 생산에 미치는 항이디오타입 항체의 영향이 B 세포가 생산하는 항체의 isotype에 따라 다르게 나타날 수 있는지 확인하는 연구의 필요성을 제기한다.

참 고 문 헌

- 1) Eichmann K: Idiotype suppression. I. Influence of the dose and of the effector functions of anti-idiotypic antibody on the production of an idiotype. *Eur J Immunol* 4: 296-302, 1974.
- 2) Augustin A, Cosenza H: Expression of new idiotypes following neonatal idiotype suppression of a dominant clone. *Eur J Immunol* 6: 497-501, 1974.
- 3) Stohrer R, Lee MC, Kearney JF: Analysis of the anti-alpha 1 leads to 3 dextran response with monoclonal anti-idiotypic antibodies. *J Immunol* 131: 1375-1379, 1983.
- 4) Geha RS: Presence of auto-anti-idiotypic antibody during the normal human immune response to tetanus toxoid antigen. *J Immunol* 129: 139-144, 1982.
- 5) Geha RS: Presence of circulating anti-idiotypic-bearing cells after booster immunization with tetanus toxoid (TT) and inhibition of anti-TT antibody synthesis by auto-anti-idiotypic antibody. *J Immunol* 130: 1634-1639, 1983.
- 6) Zouali M, 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 Paris* 134C: 377-391, 1983.
- 7) Evans M, Abdou NI: *In vitro* modulation of an-

EFFECT OF ANTI-IDIOTYPE ANTIBODY

- ti-DNA secreting peripheral blood mononuclear cells of lupus patients by anti-idiotypic antibody of pooled human intravenous immune globulin. *Lupus* 2: 371-375, 1993.
- 8) Hahn BH, Ebling FM: Suppression of murine lupus nephritis by administration of an anti-idiotypic antibody to anti-DNA. *J Immunol* 132: 187-190, 1984.
 - 9) Mahana W, Guilbert B, Avrameas S: Suppression of anti-DNA antibody production in MRL mice by treatment with anti-idiotypic antibodies. *Clin Exp Immunol* 70: 538-545, 1987.
 - 10) Koopman WJ, Schrohenloher RE, Barton JC, Greenleaf EC: Suppression of in vitro monoclonal human rheumatoid factor synthesis by anti-idiotypic antibody. *J Clin Invest* 72: 1410-1419, 1983.
 - 11) Kodama K, Ghanta VK, Hiramoto RN, Stohrer RC, Kearney JF: *In vitro* effect of monoclonal anti-idiotypic antibodies (anti-M104E) on MOPC-104E myeloma cells. *Cancer Res* 46: 1250-1254, 1986.
 - 12) Kim YT, Puntillo E, DeBlasio T, Weksler ME, Siskind GW: Regulation of antibody production by hybridoma cultures. I. Anti-idiotypic antibody-mediated down-regulation of anti-DNA antibody production by hybridoma cells. *Cell Immunol* 105: 65-74, 1987.
 - 13) Epstein A, Greenberg M, Diamond B, Grayzel AI: Suppression of anti-DNA antibody synthesis *in vitro* by a cross-reactive anti-idiotypic antibody. *J Clin Invest* 79: 997-1000, 1987.
 - 14) Hiernaux J, Bona C, Baker PJ: Neonatal treatment with low doses of anti-idiotypic antibody leads to the expression of a silent clone. *J Exp Med* 153: 1004-1008, 1981.
 - 15) Bona CA, Heber KE, Paul WE: Idiotypic-anti-idiotypic regulation. I. Immunization with a levan-binding myeloma protein leads to the appearance of auto-anti-(anti-idiotypic) antibodies and to the activation of silent clones. *J Exp Med* 153: 951-967, 1981.
 - 16) Shenk RR, Weissberger HZ, Dickler HB: Anti-idiotypic stimulation of antigen-specific antigen-independent antibody responses *in vitro*. *J Immunol* 132: 2709-2714, 1984.
 - 17) Eichmann K: Idiotypic suppression. II. Amplification of a suppressor T cell with anti-idiotypic activity. *Eur J Immunol* 5: 511-517, 1975.
 - 18) Eichmann K, Coutinho A, Melchers F: Absolute frequencies of lipopolysaccharide-reactive B cells producing A5A idiotypic in unprimed, streptococcal A carbohydrate-primed, anti-A5A idiotypic-sensitized and anti-A5A idiotypic-suppressed A/J mice. *J Exp Med* 146: 1436-1449, 1977.
 - 19) Eichmann K: Expression and function of idiotypes on lymphocytes. *Adv Immunol* 26: 195-254, 1978.
 - 20) DeRie MA, Van Lier RAW, Imholz MJM, Schumacher TNM, Van Schijndel GMW, Miedema F: Requirements for induction of activation and proliferation of human B cells analysed with anti-idiotypic monoclonal antibodies. *Scand J Immunol* 30: 249-257, 1989.
 - 21) Theofilopoulos A, Dixon FJ: Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 37: 269-390, 1985.
 - 22) Kromenaker SJ, Srien F: Effect of lactic acid on the kinetics of growth and antibody production in a murine hybridoma: secretion patterns during the cell cycle. *J Biotech* 34: 13-34, 1994.
 - 23) Boyd AW, Schrader JW: Mechanism of effector cell blockade-IV. Induction by monoclonal anti- μ or anti-idiotypic antibody, role of secreted IgM and mechanism of decreased secretion. *Mol Immunol* 21: 119-126, 1984.
 - 24) Blank M, Manosroi J, Tomer Y, Manosroi A, Kopolovic J, Charcon-Polak S, Shoenfeld Y: Suppression of experimental systemic lupus erythematosus (SLE) with specific anti-idiotypic antibody-saporin conjugate. *Clin Exp Immunol* 98: 434-441, 1994.
 - 25) 박 선, 박정수, 김형일, 주민경, 장영주, 윤정구, 김영태: Anti-idiotypic 항체가 hybridoma 세포의 anti-DNA 항체 합성을 조절하는 기전. *아주의학* 제1권 123-132, 1996.
 - 26) Andersson J, Bullock WW, Melchers F: Inhibition of mitogenic stimulation of mouse lymphocytes by anti-idiotypic antibodies. *J Immunol* 132: 2709-2714, 1984.

- phocytes by anti-mouse immunoglobulin antibodies. I. Mode of action. *Eur J Immunol* 4: 715-722, 1974.
- 27) Leung DTM, Loh TT, Lim PL: The antigen-specific immunoglobulin G receptor is more sensitive to stimulation than the IgM receptor in transfected B cells. *Mol Immunol* 31: 343-349, 1994.
- 28) Roifman CM, Mills CB, Stevart D, Cheung RK, Grinstein S, Gelfand EW: Response of human B cells to different anti-immunoglobulin isotypes: absence of a correlation between early activation events and cell proliferation. *Eur J Immunol* 17: 1737-1742, 1987.
-