

## 방광암세포주에서 IFN- $\gamma$ 의 효과

연세대학교 의과대학 비뇨기과학교실, 미생물학교실

박동수 · 이정림\* · 박전한\* · 이진무 · 김세종\*

= Abstract =

### Effects of IFN- $\gamma$ on Human Bladder Tumor Cell Lines

Dong Soo Park, Jung Lim Lee\*, Jeon Han Park\*, Jin Moo Lee and Se Jong Kim\*

From the Departments of Urology and Microbiology\*, Yonsei University  
 College of Medicine, Seoul, Korea

The purpose of this study is to analyze the effects of IFN- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ ) on HLA-DR and ICAM-1(intercellular adhesion molecule 1) expression, a measure of cancer progression. We uses human bladder tumor cell lines of RT4(GI) and T24(GIII), a part of each type of cultured cells were treated by 200U/ml IFN- $\gamma$  and divided into 3 groups(24-hour, 48-hour, 72-hour) according to the time after the IFN- $\gamma$  treatment. Each cell was then indirectly immunofluorescence stained and analyzed using the Fluorescence Activated Cell Sorter(FACS).

We founded that bladder cancer cells, when they are not treated by IFN- $\gamma$ , do not seem to show much HLA-DR constitutive expression. When bladder cancer cells are treated by IFN- $\gamma$ , the effects of IFN- $\gamma$  on HLA-DR expression rate seem to depend on the degree of differentiation of bladder cancer cells: well-differentiated bladder cancer cell shows higher HLA-DR expression rate when it is treated by IFN- $\gamma$ , while poorly-differentiated bladder cancer cell does not show much changes in HLA-DR expression rate even after it is treated by IFN- $\gamma$ . Bladder cancer cells of higher degree of malignancy show higher ICAM-1 constitutive expression rate and enhanced expression by IFN- $\gamma$ .

**Key Words:** Bladder tumor, IFN- $\gamma$ , HLA-DR, ICAM-1.

## 서 론

IFN- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ )는 세포분화와 관련된 새로운 표면 분자 또는 수용체의 출현을 유도한다. 즉, 주요조직복합체 Class I 및 II 항원, ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1) 등의 접합물질의 발현을 증강시킨다<sup>1,2</sup>.

암의 진행상태를 나타내는 지표가 될 수 있는 이러한 암세포 표면분자들은 IFN- $\gamma$ 등의 각종 cytokine 및 면역자극에 의해 발현이 조절되고, 이들 세포표면분자들의 발현 정도와 이들의 cytokine에 대한 감수성등은 암세포와 숙주면역체제간의 상호작용에 있어서 중요한 역할을 담당할 것으로 생각된다. 따라서 예후

에 차이를 나타내는 동종의 암세포를 대상으로 세포 표면분자들을 조사하고 cytokine에 의한 반응정도의 차이를 조사하는 것은 암의 진행과정에 대한 분자생물학적 기전을 이해하는 데 도움이 될 것이다.

## 재료 및 방법

American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)으로부터 구입한 RT4 (GI)와 T24(GIII) 세포주(Table. 1)를 녹인 후 McCoy's 5a 배지에 10% 우태아혈청(FBS: fetal bovine serum)과 페니실린 120mg/l 및 스트렙토마이신 270mg/l을 첨가하여 여러 개의 조직배양 플라스크에서 배양하고 단층(Fig. 1)이상에 도달했을 때, 아무런 자극을

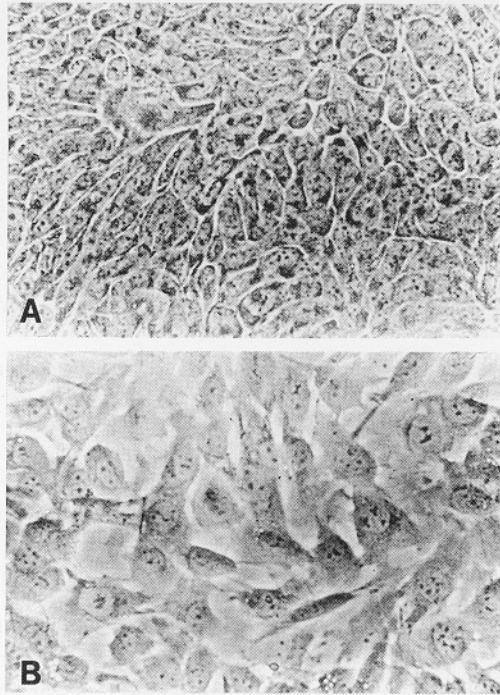


Fig. 1. The cells of RT4 cell line monolayered were cultured small and compactly A) the cells of T24 cell line showed the shape large and polygonal B).  $\times 240$

Table 1. Cell line characteristics

Cell line	Grade	Cytopathology
RT4	GI	Well-differentiated transitional cells, possible papilloma
T24	GIII	Epidermoid transitional cell carcinoma

가하지 않은 상태와 200U/ml의 IFN- $\gamma$ 로 처리한 후 24시간, 48시간, 72시간 경과한 상태에서 trypsin/EDTA로 세포를 떼어 간접면역형광법으로 염색을 시행하였다. 즉, HLA-DR에 대한 단클론 항체 B8.12.2 (mouse IgG2b kappa)와 ICAM-1에 대한 단클론 항체 84H10 (mouse IgG1)으로 얼음판에서 30분간 반응시킨 후 인산완충용액(PBS: phosphate buffered saline)으로 3회 세척하고 FITC(Fluorescein isothiocyanate)가 부착된 goat anti-mouse IgG를 첨가하고 차광상태의 얼음판에서 30분간 반응시킨 후 인산완충용액으로 3회 세척하고 1ml의 인산완충용액에 부유시켜 Fluorescence activated cell sorter(FACS: Becton Dickinson, Mountainview, CA)를 이용하여 결과를 분석하였다.

## 결 과

RT4 및 T24 두개의 세포주 모두에서 HLA-DR의 무자극 상태에서의 발현은 미약했으며(각각 2.4%, 0.6%), RT4에서는 IFN- $\gamma$  처리 후 시간이 경과할수록 HLA-DR의 발현이 증가한 반면 T24에서는 변화가 없었다. 또한 RT4에서의 HLA-DR의 발현정도를 볼 때 IFN- $\gamma$ 처리 후 48시간에 많은 증가를 나타냈다(Fig. 2).

한편 T24의 IFN- $\gamma$ 에 대한 반응이 없어서 IFN- $\gamma$ 의 용량을 0, 200, 500, 1,000 U/ml로 처리해본 결과 HLA-DR 발현의 커다란 변화는 관찰할 수 없었다(각각 0.9%, 1.9%, 5.7%, 10.4%)(Fig. 3).

RT4에서의 ICAM-1의 무자극 상태에서의 발현율은 0.5%로 미약한 반면 T24에서는 79.2%의 발현율을 나타냈으며, RT4에서 IFN- $\gamma$  처리 후 ICAM-1의 발현은 미약했으나, T24에서는 시간이 경과할수록 발현율이 약간씩 증가하였고 발현 강도는 48시간에 많이 증가한 소견을 보였다(Fig. 4).

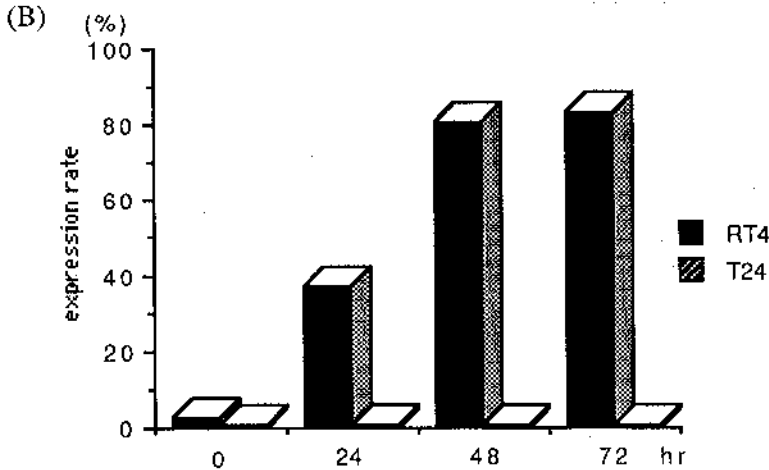
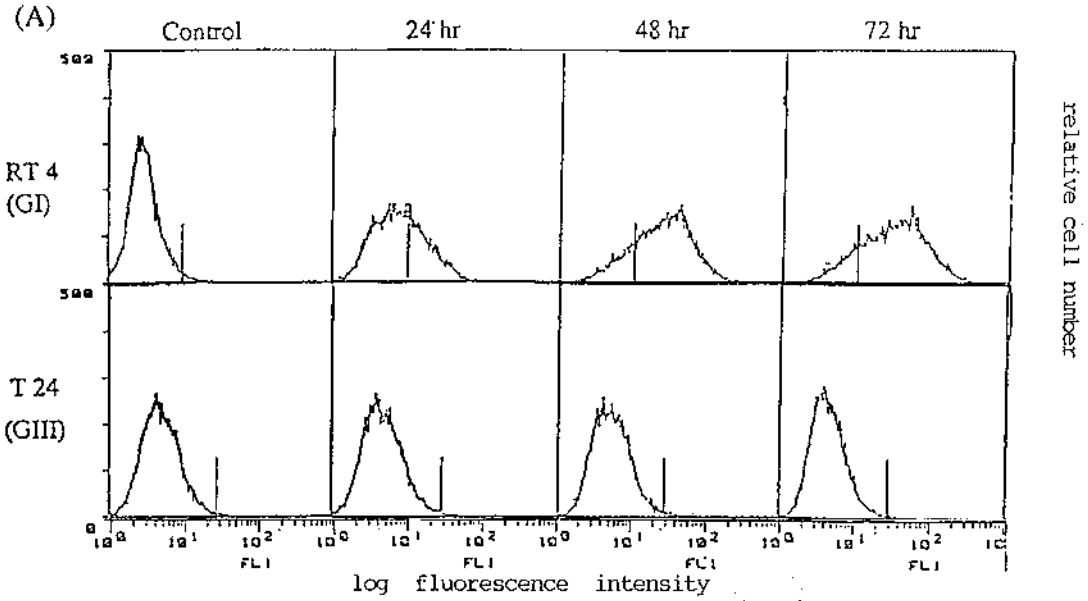


Fig. 2. Modulation of HLA-DR expression on RT4 and T24 bladder tumor cell lines. Bladder tumor cells were treated with 200U/ml of IFN- $\gamma$  for various duration and evaluated by FACS analysis (A). HLA-DR expression rate (B).

### 고 안

IFN- $\gamma$ 는 자극을 받은 T림프구에 의해서 생산되며 자연살세포에서도 생산된다. IFN은 세포막수용체에 결합함으로써 작용을 나타낸다. IFN- $\gamma$ 는 세포분화와 관련된 새로운 세포표면 표식자 또는 수용체의 출현을 유도한다. 여러 종류의 세포에서 IFN- $\gamma$ 에 의한 HLA-DR의 발현은 명백한 면역학적 연관성과 면역조절 역할을 시사한다고 하였다. IFN- $\gamma$ 의 효과는

면역계에 관여하지 않는 세포에서도 나타난다. 즉, 항세포효과를 나타낼 수 있는데 이러한 항세포효과는 억제작용을 나타낸다고 하기 보다는 새로운 유전자의 활성화 등의 자극적인 효과로 나타난다. 이렇듯 종양세포에서 cytokine의 두 가지의 주요 효과는 직접적인 항증식작용과 면역계와 종양세포의 상호작용에서 역할을 하는 분자를 조정하는 작용이다.

방광암세포 표면분자의 연구중에서 HLA-DR은 Prescott등<sup>4</sup>이 HLA-DR음성인 표재성 방광암 환자를 BCG로 방광내 주입요법을 시

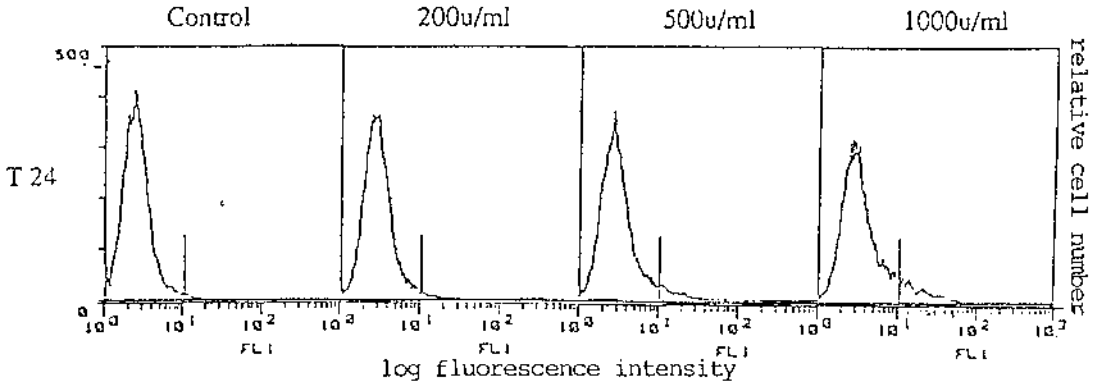


Fig. 3. Modulation of HLA-DR expression on T24 bladder tumor cell line. Bladder tumor cells were treated with 200, 500, and 1,000 U/ml of IFN- $\gamma$  for 48 hours and evaluated by FACS analysis.

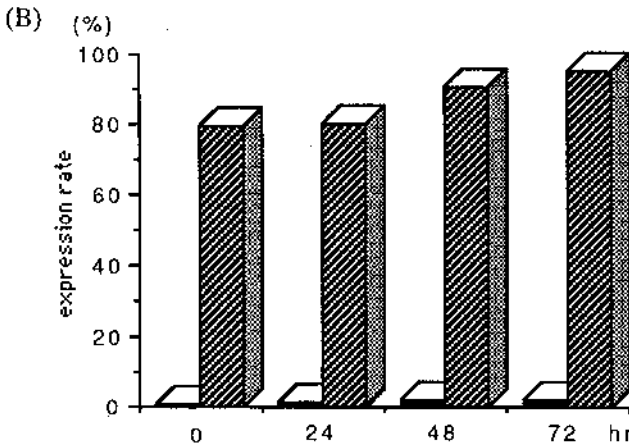
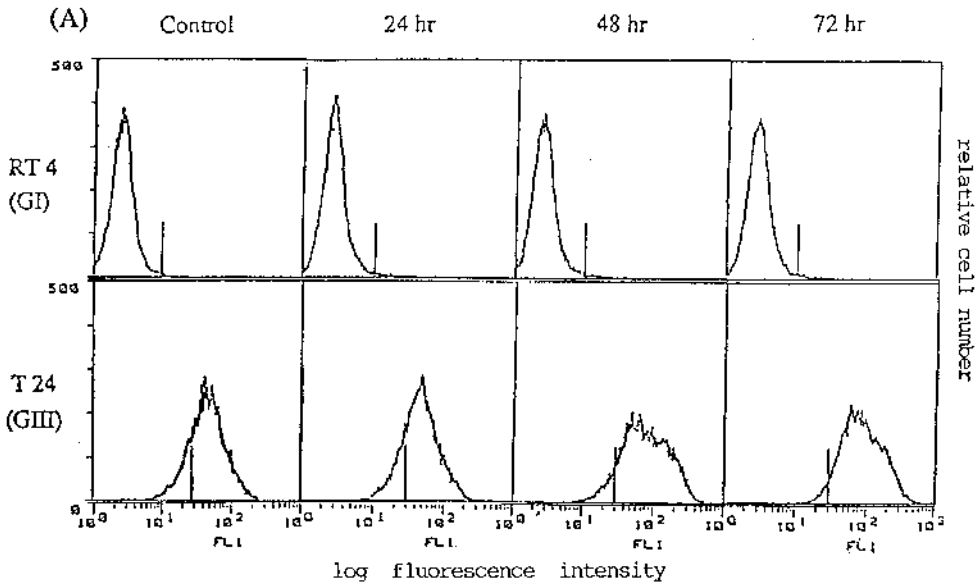


Fig. 4. Modulation of ICAM-1 expression on RT4 and T24 bladder tumor cell lines. A) bladder tumor cells were treated with 200U/ml of IFN- $\gamma$  for various duration and evaluated by FACS analysis. B) ICAM-1 expression rate.

행한 후에 HLA-DR양성으로 변하는 것을 관찰하였고 그후 이들<sup>5</sup>은 BCG치료 후 소변에서 IFN- $\gamma$ 를 발견하고 BCG의 치료효과 중의 하나에 IFN- $\gamma$ 가 관여하며 방광암에서 IFN- $\gamma$ 가 HLA-DR의 발현을 유도한다고 하였다. 또한 Hawkyard등<sup>6</sup>은 GI의 방광암세포의 20%에서 HLA-DR이 무자극상태에서 발현을 하고 IFN- $\gamma$ 의 처리 농도와 시간에 비례하여 HLA-DR의 발현이 증가하였다고 보고하였다.

세포간 접합물질(ICAM: intercellular adhesion molecule)은 Johnson등<sup>7</sup>이 악성흑색종의 전이능과 관련된 흑색종관련항원(melanoma associated antigen)중 89KD의 세포표면당단백인 P3.58항원을 규명하였다. ICAM-1은 정상조직에서는 혈관내피세포, 림프절배종심, 조직 대식세포에 존재하고 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 에 의해 조절될 수 있다. ICAM-1은 lymphocyte function associated antigen-1(LFA-1)의 배위자로서 작용하여 중앙조직에 침윤된 백혈구와 접촉하는 다른 형태의 세포를 받아들여 중앙세포들 간의 유착을 감소시킬 수 있고 중앙세포들의 해리를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 특히 ICAM-1은 전이능이 강한 세포주에서 IFN- $\gamma$ 조정의 효과가 큰 것으로 되어있다. 한편 ICAM-1분자는 방광암의 면역세포매개에 의한 용해과정에서 표적인식물질로서 작용한다는 보고가 있다<sup>8</sup>.

방광암의 예후인자로서 가장 중요한 것은 암의 병기와 조직학적 분화도인데 이중에서 조직학적 분화도는 표재성방광암에서 침윤성방광암으로 진행하는데 관여하는 인자 중 가장 중요한 것이며<sup>9</sup>, 침윤성방광암에서도 중요한 의의를 갖는다<sup>10</sup>.

본 연구에서는 방광암의 예후 예측에 가장 좋은 척도 중의 하나인 조직학적분화도를 중심으로 이것의 차이가 있는 세포주를 이용하여 IFN- $\gamma$ 에 의한 세포표면분자의 발현 양상을 관찰하였다.

본 연구에서의 결과를 볼 때 암세포의 상태를 나타낼 수 있는 조직학적분화도가 다른 세포주에서는 IFN- $\gamma$ 에 의한 각종 표식자의 발현 유도정도가 다를 수 있고 이러한 표식자들이 암세포의 성격을 반영하는 것들 중의 하나가 될 수 있다고 하겠다. 즉, HLA-DR의 발현정도는 RT4 세포주에서는 IFN- $\gamma$ 의 농도와 처리시간에 따라서 발현이 증가하지만 T24 세포주에서는 IFN- $\gamma$ 에 전혀 반응하

지 않았다. 또한 ICAM-1의 발현정도는 RT4 세포주에서는 미약한 상태였고 T24 세포주에서는 IFN- $\gamma$ 로 자극하기 전부터 많이 발현되었고 IFN- $\gamma$ 로 자극한 후 48시간에는 발현강도가 매우 증가한 결과들을 보여 세포주들 간에 차이를 관찰할 수 있었다.

## 결론

본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. RT4 및 T24 방광암세포에서는 HLA-DR의 무자극 상태의 발현은 나타나지 않았다.
2. IFN- $\gamma$ 자극 후 HLA-DR은 고분화 방광암세포에서 잘 발현되었고 저분화 방광암세포에서는 발현되지 않았다.
3. 저분화 방광암세포에서는 ICAM-1발현이 잘되며 IFN- $\gamma$ 에 의해 그 정도가 증가되었다. 숙주면역학적 관점에서 볼 때 방광암세포 표면에서 HLA class II 항원의 발현정도를 측정함으로써 표재성방광암의 재발 성향을 예측하는데 도움을 줄 수 있고, 또한 ICAM-1의 발현정도를 측정함으로써 침윤성방광암의 전이능을 예측하는데 도움이 될 것으로 생각되며 이러한 항원들은 IFN- $\gamma$ 에 의해서 발현이 유도되므로 암세포의 잠재능을 예견하는데 IFN- $\gamma$ 를 사용할 수 있다고 하겠다.

## REFERENCES

1. Trinchieri G, Perussia B. Immune interferon: A pleiotrophic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today* 1985;6:131-6.
2. Rothlein R, Czakowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by proinflammatory cytokines. *J Immunol* 1988;141:1665-9.
3. Kim SJ, Kim NS, Lee JL. Effect of cytokines on the expression of cell adhesion molecule and on the adhesion of melanoma cells to endothelial cells. *J Kor Med Sci* 1993;8:41-52.
4. Prescott S, James K, Busuttill A, Hargreave TB, Chisholm GD, Smyth JF. HLA-DR expression by high grade superficial bladder cancer treated by BCG. *Br J Urol*

- 1989;63:264-9.
5. Prescott S, James K, Busuttil A, Hargreave TB, Chisholm GD. Radioimmunoassay detection of gamma interferon in the urine after intravesical BCG therapy. *J Urol* 1990;144:1248-51.
  6. Hawkyard S, James K, Prescott S, Jackson AM, Ritchie AWS, Smyth JF, et al. The effects of recombinant human interferon-gamma on a panel of human bladder cancer cell lines. *J Urol* 1991;145:1078-81.
  7. Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwable W, Riethmuller G. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:641-4.
  8. Esuvaranathan K, Jackson AM, Alexandrov A, James K. The expression of ICAM-1 & ICAM-2 in bladder cells. *J Urol* 1993;149(4)(Suppl):271A.
  9. Torti FM, Lum BL, Aston D, Mackenzie N, Faysel M, Shortliffe LD, et al. Superficial bladder cancer: The primacy of grade in the development of invasive disease. *J Clin Oncol* 1987;5:125-30.
  10. 박동수, 이진무, 이영태. 방광의 침윤성 및 전이성 이행상피세포암의 예후인자. *대한비뇨학회지* 1989;30:135-42.
-