

# Cytolytic T cell line CTLL - 2의 세포증식에 미치는 cytokine의 효과

전북대학교 치과대학 치주과학교실

\*전북대학교 치과대학 약리학교실

서양자 · 이인규 · 이진용 · 오귀옥\* · 김형섭

## I. 서 론

Cytolytic T lymphocyte(CTL)은 특이 항원을 표현하는 target cell을 죽이는 역할을 주된 기능으로 하는 T 세포의 한 subset으로서, 특히 virus 감염, acute allograft rejection 및 종양의 rejection등에서 중요한 effector 기능을 하고 있다<sup>1)</sup>. 대부분의 CTL은 세포 표면에 CD8 분자를 가지고 있으며, target 세포내에서 합성된 항원과 self class I MHC 분자의 결합된 complex 형태를 foreign peptide로 인지하여 세포를 용해시킨다.

치주질환은 세균감염질환으로서 세균감염에 의하여 trigger되는 숙주반응의 대부분은 면역반응이므로 면역세포, regulatory 세포표면항원 및 cytokine들의 역할에 관한 과학적 정보는 치주질환의 복잡한 병인론을 이해하는데 큰 도움을 준다. 치주병소 부근의 치은조직에 단핵구가 매우 많이 침윤되어 있고, Stouff등(1987)과 Johannessen 등(1990)에 의하면 대부분의 병소에서 T cell과 B cell이 지배적으로 많은 양이 발견되었지만 형질세포는 병소에 따라 발견되는 정도가 다양하다고 하였다. 또한 질병의 phase에 따라 동일환자의 동일 장소에서의 침윤염증세포 조성이 매우 다양하다는 사실은 치은조직에서의 면역반응의 dynamics를 반영해 준다고 Johannessen 등(1990)은 보고하였다<sup>2,3)</sup>.

1980년대 이후에 시행된 연구들에 의하면, 건강 조직 또는 말초혈액에 비하여 치주질환이 있는 조직에서 T-helper(Th)/T-suppressor, cytotoxic cell ratio가 감소되어 있음이 보고되었고<sup>4,5)</sup>, 심한 치주질환이 있는 AIDS 환자의 말초혈액뿐 아니라 치은 조직에서도 정상보다 적은 수의 CD4<sup>+</sup> Th cell과 높은

수의 CD8<sup>+</sup> T cell(CTL과 suppressor T)이 발견되었다고 Winkler와 Murray(1987)는 보고하였다<sup>6)</sup>. Taubman 등(1991)의 치근 연구에 의하면 치주질환조직의 CD4<sup>+</sup> cell중에서 많은 부분이 memory cell임이 밝혀지기도 하였으며<sup>7)</sup>, immunoglobulin과 항체형성에 대하여 대식세포는촉진효과를, 치은 CD8<sup>+</sup> cell은 억제효과를 나타낸다고 하였다. 또한 치주질환과 같이 만성적이고 episodic한 염증질환 형태를 나타내는 rheumatoid 관절염이나 전신 홍반성낭창(systemic lupus erythematosus)의 경우에서도 T cell subset의 비정상 비율이 나타난다고 하였다<sup>4)</sup>.

T cell이 분화할 때 cytokine은 특별한 subset의 T 세포로 분화되는 것을 조절하며 조직내로의 T cell migration 또한 cytokine에 의해 특별한 T cell subset이 선택된다. 예를 들어 pre-CTL이 CTL로 되기 위하여는 CD4<sup>+</sup> helper cell로부터 유리되는 cytokine이 필요하며, macrophage inflammatory protein-1β(MIP-1β)는 CD4<sup>+</sup> T cell에 대하여 화학주성을 나타내고 MIP-1α는 CD8<sup>+</sup> T cell에 대하여 같은 작용을 보인다고 Taub 등(1993)은 보고하였다<sup>8)</sup>, 따라서 치주질환을 비롯한 만성염증병소에서 T cell subset의 변화가 유도된 것은 이들 cytokine이 관계하기 때문이라 생각되며 cytokine들은 화학주성 및 세포분화에도 매우 다양한 생물학적 활성을 가지고 있는 바, 본 실험에서는 면역억제기능의 일부가 밝혀진 MIP-1α와 gamma-interferon(γ-IFN)이 CTL cell line인 CTLL-2 세포증장에 미치는 영향을 [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation test를 통하여 관찰하여 복잡한 면역계에서 CTL 활성이 어떻게 조절되는지를 살펴보았다.

## II. 실험재료 및 방법

### Cells.

CTLL-2는 IL-2 의존형 mouse cytolytic T cell line으로서 rIL-2(Boehringer-Manheim) 100 $\mu$ /ml, penicillin 100 $\mu$ /ml, streptomycin 100g/ml, glutamine 2mM, HEPES, pH 7.4 1mM, sodium pyruvate 1mM, 2-mercaptoethanol 50M, fetal calf serum(FCS, Hyclone) 10%가 포함된 RPMI1640(Gibco) 배양액에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다.

### Mouse spleen T 세포의 anti-CD3 단일항체 (mAb) 자극

Decapitation으로 희생시킨 mouse에서 무균적으로 fresh하게 적출한 spleen을 단일 세포로 분리하여 세포부유액을 만들었다. Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)로 2회 세척하고 RPMI1640에 FCS 10%, penicillin 100 $\mu$ /ml, streptomycin 100  $\mu$ g/ml가 첨가된 배양액에 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다. Spleen T 세포의 T cell antigen receptor(TCR)을 crosslinking 하므로써 T 세포를 활성화시키기 위하여 anti-TCR mAb를 사용하기도 하지만, 항원자극이 있을 때 자극신호가 TCR을 거쳐 인접한 CD3분자로 전달이 되어 T 세포 활성화가 일어나므로 anti-CD3 mAb 자극을 하여도 T 세포가 항원자극을 받는 것과 동일한 변화를 일으킬 수 있다. 본 실험에서는 anti-CD3 mAb를 배양 dish에 10 $\mu$ g/ml 농도가 되게하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 immobilize하였고 이렇게 준비된 anti-CD3 mAb coated dish에 splenocyte를 18시간 배양함으로써 spleen T 세포를 활성화시켰다. 배양이 끝난 후 1,000rpm으로 5분간 원

심분리하여 배양상청액을 분리하였고 이 배양상청액을 CTLL-2 세포증식에 관한 실험시에 사용하였다.

### CTLL-2 세포의 [<sup>3</sup>H]-Thymidine Incorporation

96 well plate에 well당 0.5-3.0 $\times$ 10<sup>5</sup>개의 CTLL-2 세포를 5% FCS가 포함된 RPMI1640 배양액 100  $\mu$ l에 부유하여 plating하였다. 여기에 recombinant (r) MIP-1 $\alpha$  200ng/ml,  $\gamma$ -IFN(Genzyme) 100 $\mu$ /ml 또는 농도의 rIL-2를 첨가하여 16시간 배양하였다. 대조군 well은 cytokine 대신 DPBS를 첨가하였다. 배양 후 [<sup>3</sup>H]-thymidine(NEN) 1 $\mu$ Ci/well을 첨가하여 8시간동안 표지시킨 후 cell harvester로 harvest하였다. DNA로 incorporation된 [<sup>3</sup>H]-thymidine은 liquid scintillation counter로 측정하였다.

Anti-CD3 mAb로 자극한 mouse splenocyte 배양상청액의 경우는, CTLL-2 배양을 IL-2가 포함되지 않은 배양액에 넣고 splenocyte 배양상청액을 첨가하여 38시간 배양하고 [<sup>3</sup>H]-thymidine pulse를 8시간 시행하였다.

## III. 실험 결과

### 1. MIP-1 $\alpha$ 와 $\beta$ -interferon의 CTLL-2 세포증식 억제효과

Table 1(ExpIII)과 Fig. 1에 의하면 MIP-1 $\alpha$ 와  $\gamma$ -IFN은 CTLL-2 세포의 증식에 대하여 대조군의 122, 252 $\pm$ 2110 cpm으로부터 각각 31,462 $\pm$ 6937 및 17, 209 $\pm$ 737 cpm으로 감소시켜 MIP-1 $\alpha$ 는 약 74%,  $\gamma$ -IFN은 약 86%의 세포증식 억제효과를 나타내었으며, 두 물질을 동시에 적용시켰을 경우는 9,291 $\pm$ 392

Table 1. Radioactivity incorporated into CTLL-2 cell treated with MIP-1 $\alpha$  and/or  $\gamma$ -interferon.

	Exp I(cpm)	Exp II(cpm)
DPBS	7,685	122, 252 $\pm$ 2, 110
MIP-1	3,743	31, 462 $\pm$ 6, 937 <sup>a</sup>
$\gamma$ -IFN	4,565	17, 209 $\pm$ 737 <sup>a</sup>
MIP-1 $\alpha$ + $\gamma$ -IFN	2,145	9, 291 $\pm$ 392 <sup>a</sup>

Mean $\pm$ S.E (n=3)

Exp I : CTLL-2 10<sup>5</sup> cell/well

Exp II : CTLL-2 3 $\times$ 10<sup>5</sup> cell/well

a : P<0.0001 when compared with DPBS control

cpm으로, 약 92%의 상승적 억제효과를 나타내었고 대조군에 대한 차이는 통계적으로 모두 유의하였다. 세포수를 줄여 동일하게 시행한 실험(Table 1의 ExpI)에서도 전체적으로 위의 결과와 유사한 경향을 나타내어 각각 51.3, 40.6, 72.1%의 감소를 보였다.

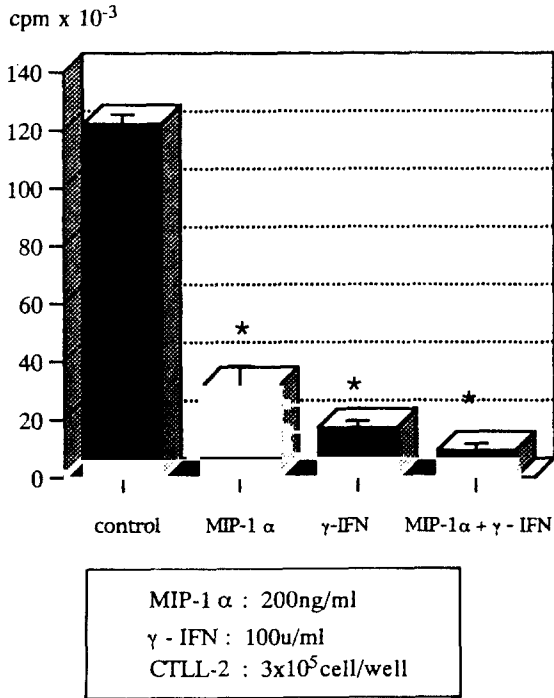


Fig. 1 Suppressive action of MIP-1 $\alpha$  and  $\gamma$ -interferon on CTLL-2 cell proliferation!  
\*P<0.0001 when compared with control

## 2. Mouse splenocyte 배양상청액의 CTLL-2 세포 증식효과

Table 2와 Fig. 2는 anti-CD3 mAb로 T cell antigen receptor(TCR)-CD3 complex의 CD3 분자를 cross-linking 시킴으로써, 항원자극을 받았을 때와 유사한

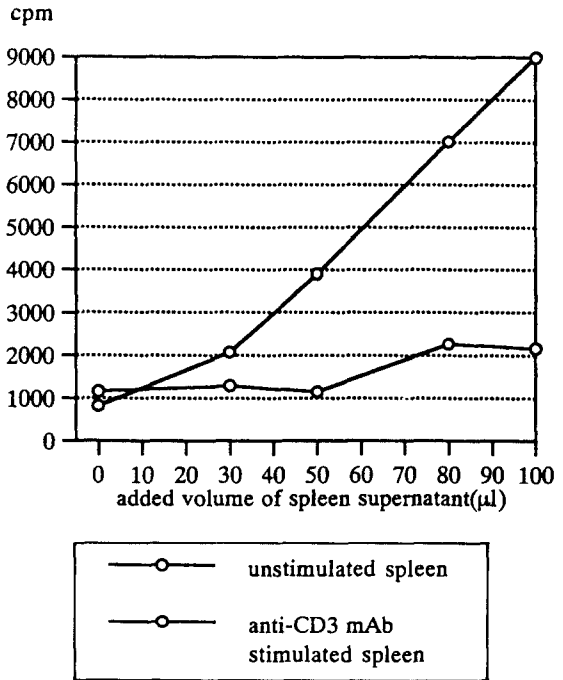


Fig. 2 Stimulatory effect of culture supernatnat of anti-CD3 mAb stimulated mouse splenocyte on the proliferation of CTLL-2.  
\* CTLL-2 :  $5 \times 10^4$  cell/well  
\* anti-CD3 mAb stimulation : 18hours

Table 2 Radioactivity incorporated into CTLL-2 cell treated with culture supernatant of unstimulated or anti-CD3 mAb stimulated mouse splenocyte.

volume( ml )	Added culture supernatant of mouse splenocyte	
	unstimulated(cpm)	Anti-CD3 mAb stimulated(cpm)
0	1156	818
30	1284	2069
50	1146	3905
80	2264	7016
100	2166	8990

• CTLL-2 :  $5 \times 10^4$  cell/well  
• anti-CD3 mAb stimulation : 18 hours

조건으로 mouse spleen T cell을 자극하여, 활성화된 T cell이 배양상청액으로 유리하는 cytokine들의 CTLL-2 세포증식에 관한 효과를 본 결과이다. 대조군(unstimulated splenocyte)의 배양상청액을 0에서 100ml까지 첨가했을 때 CTLL-2의 세포증식은 1156에서 2166 cpm까지 약 2배정의 증가효과를 보였으나 anti-CD3 mAb 자극 splenocyte의 배양상청액의 경우는 818에서 8990 cpm으로 약 10배 이상의 CTLL-2 세포증식 촉진효과를 보였다.

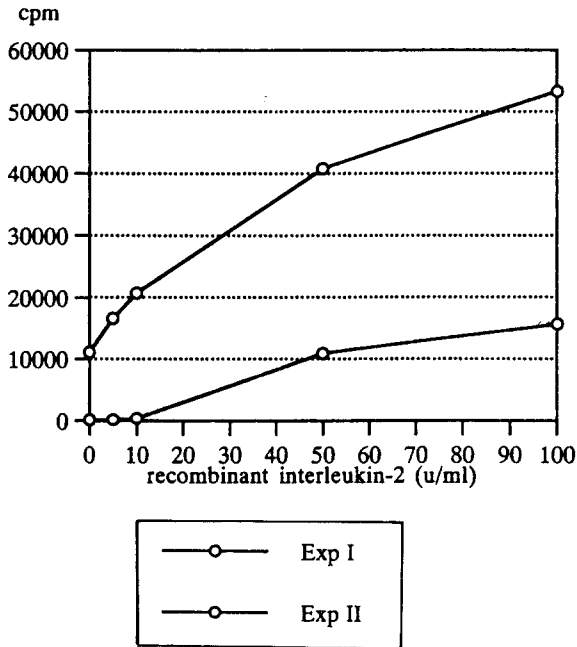


Fig. 3. IL-2 dependent proliferation of CTLL-2.  
 CTLL-2  $10^5$  cell/well,  $\gamma$ IL-2 16hours  
 CTLL-2  $5 \times 10^5$  cell/well,  $\gamma$ IL-2 16hours

### 3. CTLL-2 세포증식의 IL-2 의존성

Table 3와 Fig. 3은 CTLL-2 세포배양액에 0에서 100unit/ml의 rIL-2를 첨가하였을 때의 세포증식에 미치는 영향을 관찰한 것이다. rIL-2를 0-100unit/ml로 증가시키면서 ExpI에서는 약 100배, ExpII에서는 약 50배의 세포증식효과를 보였으며, rIL-2 0 unit/ml에서는 거의 세포증식이 되지 않는 결과를 나타내어 CTL-2의 세포증식은 IL-2 의존성이 있음을 보여주었다.

## IV. 총괄 및 고찰

본 실험에서 spleen 배양상청액에 의한 CTL 세포증식효과를 보면 anti-CD3 mAb로 자극한 spleen 배양상청액이 대조군보다 4배 이상의 높은 세포증식효과를 나타내었는데 이는 spleen T cell이 TCR-CD3 complex system을 통해 자극을 받으면 많은 cytokine을 분비하고 이들 cytokine, 특히 IL-2에 의하여 CTL의 성장이 촉진된 것으로 사료된다. CTL 세포성장이 IL-2 첨가에 대하여 매우 의존적으로 성장했던 본 실험내용 결과로부터 이에 대한 간접적인 증명을 할 수 있다(Table 3, Fig. 3).

MIP-1  $\alpha$ 와  $\gamma$ -IFN은 CTL 세포증식을 현저하게 억제하였으며 두 cytokine의 동시적용으로 상승적 억제작용을 나타내었다. 잘 알려진 T cell 억제 cytokine으로서는 Kehrl 등 (1986)은 transforming growth factor(TGF)- $\beta$ 를 Taga와 Tosato(1992) 등은 IL-10을 보고하였는데<sup>9,10</sup>, 이들의 T cell 억제작용은 IL-2 생산을 저하시킴으로써 나타난다고 하였고, 또 TGF- $\beta$ 의 경우는 high affinity IL-2 receptor형성도

Table 3 Radioactivity incorporated into CTLL-2 cell treated with various concentration of recombinant interleukin-2(rIL-2).

rIL-2(u/ml)	Exp I(cpm)	Exp II(cpm)
0	146	11,110
5	198	16,604
10	417	20,746
50	10,929	40,792
100	15,646	53,311

\* Exp I : CTLL-2  $5 \times 10^4$  cell/well, rIL-2 6 hours

\* Exp II :  $10^5$  cell/well, rIL-2 16 hours

억제한다고 알려졌다<sup>11)</sup>.  $\gamma$ -IFN은 *in vitro*에서 B cell 억제작용이 있음이 밝혀졌고, TGF-b와 함께  $\gamma$ -IFN은 suppressor T cell이 내는 중요 cytokine으로서 면역억제기능을 대표하고 있다고 하였다.

$\gamma$ -IFN은 antigen, mitogen 또는 anti-TCR mAb로 자극한 murine Th2 clone에 대하여 세포증식 억제 효과를 가지고 있지만 lymphokine 분비는 억제하지 않는다고 Gajewski와 Fitch(1988)는 보고하였고<sup>12)</sup>, IL-2 또는 IL-4에 의한 Th2 clone의 세포성장효과를 억제하기도 한다고 하였다<sup>13,14)</sup>.  $\gamma$ -IFN이 자극받은 Th2 cell로부터 lymphokine 분비를 억제하지는 못하지만 분비된 lymphokine들의 antagonist 효과를 방해하는데, 예를 들어 IL-3, IL-4 및 GM-CSF에 의해 골수세포가 증식되는 것을 차단하며<sup>12)</sup>, Coffman등(1988)과 Boom등(1988)은 IL-4에 의한 B cell의 분화를 억제하는 것으로 주장하였다.  $\gamma$ -IFN의 이러한 세포증식 억제작용의 기전은 잘 알려져 있지 않으나 Gajewski(unpublished observations)에 의하면,  $\gamma$ -IFN이 IL-4에 의하여 induction된 Proto-oncogene *c-fos*와 *c-myc*의 초기 발현을 억제하지는 못한다고 하였고, IL-1에 의한 IL-2 receptor 유도도 억제하지는 못한다고 하였다. 또한 세포내  $Ca^{++}$  농도의 농도증가도 일어나지 않는다고 하였다.

MIP-1 $\alpha$ 의 경우는 Oh등(1991)에 의하여 T cell 억제작용이 밝혀지면서<sup>17)</sup>, 최근에는 MIP-1 $\alpha$ 가 T cell의 IL-2 생산을 억제함으로써 spleen T cell의 세포증식을 차단하고 Zhou등(1993)은 발표하였다<sup>18)</sup>. 이러한 MIP-1 $\alpha$ 는 PMA나 ionomycin에 의해 유도된 T cell 증식에는 억제작용이 없고 오직 anti-CD3 mAb로 유도된 T cell 증식에만 억제작용을 나타낸다고 하여<sup>18)</sup>, 항원자극에 의한 T cell 증식과 같은 자연상태의 면역계에서 MIP-1가 중요한 negative regulator 역할을 하리라는 것을 시사한다. 위의 면역억제조절 cytokine들은 아마도 치주질환의 회복 또는 치유시기에 관계하는 것 같다고 Genco(1992)는 보고하였다<sup>1)</sup>.

T 임파구의 증식은 lymphokine 생산, cytolytic activity 등과 더불어 T 세포 활성화의 한 parameter이며, 동일 cytokine에 대하여 subset마다 서로 다른 반응을 보이는 것은 아마도 세포내 signal transduction system이 T cell subset에 따라 서로 상이하기 때문으로 생각된다. 또한 세포의 증식, lympho-

kine 생산, cytolytic activity의 현상이 cytokine에 의하여 항상 동시에 동일 방향으로 유도되지 않음이 밝혀진 바, T 세포활성화는 좀 더 specific하고 구체적인 현상을 표현하는 말로 바뀌어야하며, cytokine의 subset specific한 현상을 이해하기 위하여는 signal transduction 과정에 대한 연구가 뒤따라야할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

치주질환에 이환된 치주낭에서 가장 많이 발견되는 숙주세포인 다형핵 백혈구의 방어기능은 cytokine에 의하여 조절된다. 최근에 발견되어 생물학적 활성 연구가 활발히 이루어지고 있는 기염증성 cytokine인 MIP-1 $\alpha$ 와 MIP-1 $\beta$ 의 다형핵 백혈구의 항균작용에 대한 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MIP-1 $\alpha$ 는 사람의 말초혈액으로부터 분리된 다형핵 백혈구의 항균작용을 통계적으로 유의하게 항진시켰으며, 이 작용은 anti-MIP-1 $\alpha$  antibody로 완전 차단되었다.
2. MIP-1 $\beta$ 는 사람 다형핵 백혈구의 항균작용을 용량비례적으로 억제시켰으며 MIP-1 $\alpha$ 와는 상호 길항적으로 작용하였다.
3. 흰쥐의 다형핵 백혈구 항균작용도 MIP-1 $\alpha$ 에 의하여 통계적으로 유의한 항진효과를 보였고, MIP-1 $\beta$ 에 의하여 통계적으로 유의한 수준으로 억제되었다.
4. 분화유도된 promyelocytic cell line HL60는 매우 탁월한 항균작용을 나타내었으며 MIP-1 $\alpha$ 는 이를 항진시켰다.

## 참고문헌

1. Genco, R. J. : Host responses in periodontal disease : current concepts. J. Periodontol. 63 : 338, 1992.
2. Stouffi, E. D., Taubman, M. A., Ebersole, J. L., Smith, D. J. and Stashenko, P. P. : Phenotypic analysis of mononuclear cells recovered from healthy and diseased periodontal tissues. J. Clin. Immunol. 7 : 235, 1987.
3. Johannessen, A. C., Nilesen, R., Kristoffersen,

- T. and Knudsen, G. E. : Variation in the composition of gingival inflammatory cell infiltrates. *J. Clin. Periodontol.* 17 : 298, 1990.
4. Okada, H., Kida, T. and Yamagami, H. : Characterization of the immunocompetent cells in human advanced periodontitis. *J. Periodont. Res.* 17 : 472, 1982.
  5. Taubman, M. A., Stouff, E. D., Ebersole, J. L. and Smith, D. J. : Phenotypic studies of cells from periodontally diseased tissue. *J. Periodont. Res.* 19 : 587, 1984.
  6. Winkler, J. R. and Murray, P. A. : Periodontal disease. A potential intraoral expression of AIDS may be rapidly progressive periodontitis. *Canad. Dent. Assoc. J.* 15 : 20, 1987.
  7. Taubman, M. A., Wang, H. Y., Lundqvist, C. A., Seymour, G. J., Eastcott, J. W. and Smith, D. J. : The cellular basis of host responses in periodontal diseases. In : Hamada, S., Holt, S. C. and McGhee, J. R. *Periodontal Disease : Pathogens in Host Immune Responses.* Tokyo : Quintessence Publishing Ltd. 199, 1991.
  8. Taub, D. D., Conlon, K., Lloyd, A. R., Oppenheim, J. J. and Kelvin, D. J. : Preferential migration of activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in response to MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ . *Science* 260 : 355, 1993.
  9. Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M. B. and Fauci, A. S. : Production of transforming growth factor by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 163 : 1037, 1986.
  10. Taga, K. and Tosato, G. : IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J. Immunol.* 148 : 1143, 1992.
  11. Roszman, T., Elliott, L. and Brooks, w. : Modulation of T cell function by gliomas. *Immunol. Today* 12 : 370, 1991.
  12. Gajewski, T. F. and Fitch, F. W. : Antiproliferative effect of IFN- in immune regulation. I. IFN- $\gamma$  inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine HTL clones. *J. Immunol.* 140 : 4245, 1988.
  13. Gajewski, t. F., Goldwasser, E. and Fitch, F. W. : Antiproliferative effect of ING- $\gamma$  in immune regulation. II. INF- $\gamma$  inhibits the proliferation of murine bone marrow cells stimulated with IL-3, IL-4 or granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J. Immunol.* 141 : 2635, 1988.
  14. Fernandez-Botran, R., Sanders, V. M., Mösman, T. R. and Vitetta, E. S. : Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of Telper 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 168 : 543, 1988.
  15. Coffman, R. L., Seymour, B. W., Leman, D. A., Hiraki, D. D., Christiansen, J. A., Shrader, B. D., Bond, M. W. and Mosmann, T. R. : The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.* 102 : 5, 1988.
  16. Boom, W. H., Liano, d. and Abbas, A. K. : Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. II. Effects of interleukin 4-and 2-producing T cell clones on resting B cells. *J. Exp. Med.* 167 : 1350, 1988.
  17. Oh, K. O., Zhou, Z., Kim, K. K., Samanta, H., Fraser, M., Kim, Y. J., Broxmeyer, H. E. and Kwon, B. S. : Identification of cell surface receptors for murine macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ . *J. Immunol.* 147 : 2978, 1991.
  18. Zouch Z., Y. J., Pollok, K., Hurtado, J., Lee, J. K., Broxmeyer, H. E. and Kwon, B. S. : Macrophage inflammatory protein-1 rapidly modulates its receptors and inhibits the anti-CD3 mAb-mediated proliferation of T lymphocytes. *J. Immunol.* 151 : 4333, 1993.

## EFFECTS OF CYTOKINES ON THE CELL PROLIFERATION OF CYTOLYTIC T CELL LINE CTLL - 2

Yang-Ja Seo, In-Kyu Lee, Jin-Young Lee, Kwi-Ok Oh\*, Hyung-Seop Kim

*Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Chonbuk National University*

*\*Dept. of Pharmacology, College of Dentistry, Chonbuk National University*

Abnormalities of the T cell subsets have been detected in the immunologically mediated disease sites such as periodontal lesions which are attributable to the regulatory effect of cell differentiation and specific chemokinetic effect of various cytokines.

Macrophage Inflammatory protein(MIP)-1 $\alpha$  and gamma interferon( $\gamma$ -IFN) serve as important immunoregulatory molecules through which growth and differentiation of specific T cell subsets are known to be negatively regulated.

Murine cytolytic T cell line CTLL-2 were used to perform the [ $^3$ H]-thymidine incorporation test, by which we obtained more comprehensive view in regulatory actions of cytokines on the T cell subset proliferation.

1. rMIP- $\alpha$ (200ng/ml) and  $\gamma$ -IFN(100U/ml) appeared to suppress the proliferation rate to CTLL-2 by 74 and 86% respectively, and the suppressive action of two cytokines were synergistic.
2. Culture supernatant of anti-CD3 mAb-stimulated mouse splenocyte enhanced the proliferation rate of CTLL-2 up to 10-fold with dose-dependent manner. However, culture supernatant of unstimulated splenocyte showed only 2-fold increase in the proliferation rate.
3. CTLL-2 cell proliferation was strictly IL-2 dependent.