

HCMV에 감염된 THP-1 세포에서 세포간 부착분자-1 발현 촉진물질의 방출

김미숙¹ · 이현아² · 이찬희^{1,2*}

¹충북대학교 자연과학대학 생명과학부, ²바이오연구소

다양한 염증 질환을 유발하는 사람세포거대바이러스(Human cytomegalovirus: HCMV)는 단핵구 세포주인 THP-1 세포에서 염증반응의 중요한 매개체인 세포간부착분자-1(intercellular adhesion molecule: ICAM-1) 발현을 촉진한다. ICAM-1 발현은 자외선으로 불활화시킨 HCMV (UV-HCMV)에 의해서도 촉진되므로 이 과정에 HCMV 유전자 발현은 꼭 필요하지는 않은 것 같다. HCMV에 감염된 THP-1 세포 배양액을 감염되지 않은 THP-1 세포에 처리하거나 공유하게 하였을 시 감염되지 않은 세포에서도 ICAM-1 발현이 증가하였다. 감염된 세포 배양액에 의한 ICAM-1 발현 증가는 NF- κ B 경로를 거친다. UV-HCMV에 감염된 세포의 배양액은 ICAM-1 발현을 촉진시키지 못하였다. 따라서 HCMV에 의한 THP-1 세포에서 ICAM-1 발현 증가는 바이러스 유전자 발현을 필요로 하지 않지만, 감염된 세포에서 ICAM-1 발현을 촉진하는 물질을 분비하는 과정에는 바이러스 유전자 발현이 필요한 것으로 생각된다.

Key words □ HCMV, ICAM-1, supernatant

세포간부착분자-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)은 염증반응을 일으키는 매개체로서 중요한 역할을 한다. 바이러스나 미생물 감염에 따른 염증 반응에서 혈액 내 혈구세포가 감염된 조직으로 이동해야 하는데 이 때 혈구세포와 혈관 내피세포 간의 결합이 필요하고, 이 때 ICAM-1이 중요한 역할을 한다(22). 사람세포거대바이러스(Human cytomegalovirus, HCMV)는 혈구세포에서 잠복감염하며(1, 29), 잠복감염으로부터의 재활성화는 폐렴, 각막염, 간염, 태반염 등 다양한 기관에서 염증반응을 유발한다(21). 따라서 HCMV와 염증반응과의 관계에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 HCMV가 혈관내피세포 등에 감염되어 ICAM-1 발현이 유도된다는 보고(13, 23, 25)를 바탕으로 본 연구진은 이전 논문에서는 HCMV가 단핵세포주인 THP-1에 감염되었을 때에도 ICAM-1이 증가한다는 것을 알아보고 여러 신호 전달 경로 중 NF- κ B (nuclear factor-kappa B)가 핵심적인 역할을 할 것이라고 예상하였다(12).

세포에 HCMV가 감염되어 염증반응의 초기 단계라 할 수 있는 ICAM-1의 발현 경로는 크게 세 가지로 나누어 예상할 수 있다. 첫 번째는 HCMV 유전자 발현이 감염된 세포의 ICAM-1 발현에 직접 영향을 주는 경우이다. HCMV에 감염된 세포의 ICAM-1 발현은 증가하였지만, 자외선으로 불활화시킨 바이러스나 cytokine이 포함되어 있다고 생각할 수 있는 감염된 세포 배양액은 ICAM-1 발현을 증가시켜 주지 못했기 때문에 HCMV 유전자 활성이 필요하다는 결론을 내릴 수 있다(3, 4, 5). 나아가 HCMV IE1 및 IE2 유전자를 transfection 시켰을 경우에도 ICAM-

1 발현이 증가하였으므로(3, 4), HCMV에 감염된 세포에서의 IE 유전자 발현이 ICAM-1 발현 증가의 직접적인 원인 될 수 있다는 것이다.

두 번째는 세포가 HCMV와의 물리적인 접촉으로 자극을 받아 염증반응을 일으키는 경우이다. 이에 대한 증거는 아직 보고된 바 없으나, HLA 발현을 비롯하여 많은 세포 반응에 HCMV 유전자 발현이 필요 없이 바이러스의 접촉만으로 이루어진다(9, 28). 마지막으로 HCMV에 의하여 ICAM-1이 발현 하는데 HCMV의 유전자 발현이나 접촉 뿐 아니라 HCMV에 감염된 세포에서 방출되는 여러 가지 물질에 의하여 간접적으로 ICAM-1이 발현 되는 경우도 있다. HCMV의 감염으로 인하여 cytokine이 방출되고 이렇게 방출된 cytokine이 세포에 자극을 주어 ICAM-1 발현을 촉진한다는 것이다(4, 7).

본 연구진은 HCMV에 감염된 단핵구 세포주인 THP-1에서 ICAM-1 발현이 증가한다고 밝힌 바 있으나(12), 그 경로가 어떠한지에 대해서는 아직 알려져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 감염성 바이러스, 자외선으로 유전자 발현을 없앤 UV-HCMV, 그리고 바이러스에 감염된 세포 배양액을 사용하여 THP-1 세포에서 HCMV 감염에 의한 ICAM-1 발현 촉진에 어떠한 경로가 관여하는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

세포와 바이러스

인체단핵구 세포의 대표적 실험모델인 THP-1 세포주(ATCC TIB-202)는 RPMI 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배지에 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum: FBS, Gibco BRL),

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-43-261-2304, Fax: 82-43-273-2451
E-mail: chlee@chungbuk.ac.kr

100 µg/ml 스트렙토마이신, 100 U/ml 페니실린 그리고 0.05 µM β-mercaptoethanol을 첨가한 배지로 배양하였다. 배양하는 동안 적절한 산성도를 유지시켜 주기 위해 37°C, 5% CO₂ 대기 하에서 배양하였다. 바이러스는 내피세포에서도 증식할 수 있도록 적응시킨 HCMV TB40/E주를 독일 Tubingen 대학의 Dr. Sinzger로부터 제공받아 사용하였으며, 이 바이러스의 배양 방법은 이전의 논문에서 기술한 바와 같다(12).

바이러스를 감염시키기 위해 먼저 세포의 수를 센 뒤 원심분리하여 배지를 제거하였다. 원하는 M.O.I. (multiplicity of infection)에 따라 바이러스 용액을 넣은 뒤 잘 섞어서 1시간 동안 37°C, 5% CO₂ 대기하의 배양기에서 감염시켰다. 바이러스를 감염시킨 후에는 바이러스액을 제거한 후 2%의 FBS를 넣은 RPMI 1640 배지로 유지시켰다.

ICAM-1 염색

바이러스가 감염되거나 감염되지 않은 THP-1 세포 2×10⁶개를 거두어 500×g에서 5분간 원심분리하여 모았다. PBS (인산완충염수, phosphate buffered saline, pH 7.4)에 3%의 농도로 희석된 포름알데히드로 상온에서 15분간 고정된 후에 500×g에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. PE-conjugated anti-CD54 (anti-ICAM-1, Santacruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 PBS에 1:100으로 희석한 용액으로 세포를 재현탁하여 4°C에서 30분간 반응시켜 염색하였다. 염색된 세포는 PBS로 두 번 세척하고 유세포 분석기(FACS Calibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 형광값을 분석하였다.

Trans-well 분석

바이러스에 감염된 세포 배양액이 바이러스에 감염되지 않은 THP-1 세포의 ICAM-1을 증가시키는지 알아보기 위해 trans-well insert (Corning Incorporated, Corning, NY, USA)를 이용하여 공동배양(co-culture) 하였다. Trans-well insert는 3 µm pore size, 24 well plate로 구성된 것이다. 바이러스에 감염된 THP-1 세포 5×10⁵개를 600 µl의 유지배지에 현탁하여 plate에 넣은 뒤, 같은 양의 감염되지 않은 세포를 100 µl 배지에 현탁하여 trans-well insert에 담은 뒤 plate에 넣어 주어서 바이러스에 감염된 세포 배양액을 공유하도록 하였다.

PCR 및 RT-PCR

HCMV의 유전자 발현을 확인하기 위하여 세포에 HCMV를 감염시키고 24시간 후에 세포를 수확하고 Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany)를 이용하여 세포 전체 RNA를 얻었다. 역전사 반응은 Sensiscript RT-Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용하였고 주형 RNA 5 µl, 0.5 mM dNTP, 1 µM random hexamer primer, 10 U RNase inhibitor (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea), 4 U Sensiscript RTase를 넣은 후 DEPC-treated water로 조성물의 최종 부피를 20 µl로 맞추었다. 이 혼합용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 93°C에서 5분간 반응하여 cDNA를 만들고 이를 주형으로 하여 PCR을 수

행하였다.

PCR에 이용한 primer는 UL123을 검출하는 것으로 그 서열은 다음과 같다: forward primer; 5'-GGTACTAGCGCTTGTATGATGACCA-3', reverse primer; 5'-TTCTCAGCCACAATTACTGAGGACAGAGGGA-3'. 위의 RT과정에서 합성된 cDNA를 5 µl를 넣고 10× Buffer 5 µl (최종농도: 10 mM Tris-HCl; pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂), 0.4 µM의 UL123 primer 쌍, 0.2 mM dNTP, 2.5 U *Taq* polymerase (iNtRON Biotechnology, Inc.)를 넣은 후에 최종부피를 50 µl로 맞추어 후 PCR을 수행하였다. PCR의 반응 조건은 94°C에서 3분간 denaturation 시키고 94°C 1분, 59°C 1분, 72°C 1분으로 30회 증폭하였으며, 최종적으로 72°C에서 10분간 extension 시간을 주었다. PCR로 증폭된 시료는 2% agarose gel을 이용하여 전기영동을 하고 ethidium bromide로 염색 후 UV-transilluminator를 통해 PCR 산물을 확인하였다.

통계분석

실험결과 분석은 평균과 편차를 이용하였고 표본집단간의 평균차이를 검정하는 분석방법으로 SPSS 프로그램(ver 7.5)을 이용하여 T-Test를 수행하였다. T-Test는 두 집단간의 평균이 통계적으로 유의한 차이를 보이는지 알아볼 때 사용되는 분석법으로 유의수준을 95%로 하였을 때 유의 확률값인 P값이 0.05보다 작으면 집단간의 차이성이 인정되는 것으로 판단하였다.

결 과

HCMV에 감염된 THP-1 세포에서 ICAM-1 발현 촉진 물질 분비

우리는 지난 연구에서 THP-1 세포에 HCMV를 감염시키면 세포 표면의 ICAM-1 발현이 증가한다는 것을 보고한 바 있다(12). HCMV 감염에 따라 THP-1 세포 표면의 ICAM-1 발현이 증가한 것은 바이러스 감염에 의한 직접적인 결과일 수도 있지만, 감염된 세포에서 분비한 물질에 의해 바이러스에 감염되지 않은 세포에서도 ICAM-1 발현이 증가할 수 있다. 이러한 가능성을 알아보기 위해 HCMV에 감염하고 24시간째에 THP-1 세포 배양액을 바이러스에 감염시키지 않은 THP-1 세포에 처리해 주고 ICAM-1 발현을 알아보았다. 그 결과 HCMV에 감염된 THP-1 세포배양액을 처리한 세포 표면에서의 ICAM-1 발현은 그렇지 않은 세포에 비해 현저하게 증가하였으며($P < 0.05$), 이는 감염시킨 바이러스 양에 비례함을 알 수 있었다(Fig. 1A). 이와 같은 세포배양액에 의한 ICAM-1 발현 증가가 미처 제거되지 못하고 배양액에 남아 있는 바이러스에 의한 효과인지 알아보기 위해 배양액 속의 HCMV 존재를 검사하였다. 먼저 바이러스에 감염한 세포배양액으로부터 DNA를 추출하여 HCMV UL123 유전자를 PCR법으로 검출을 시도해 본 결과 UL123 유전자가 검출되지 않았다(Fig. 1B). 또한 감염된 세포배양액을 HCMV에 감수성 세포인 HFF 세포에 접종하고 HCMV 의한 세포병변효과를 관찰한 결과 접종 3주일이 지나도록 어떠한 HCMV 세포병변효과는 관찰되지 않았다(자료 미제시). 이러한

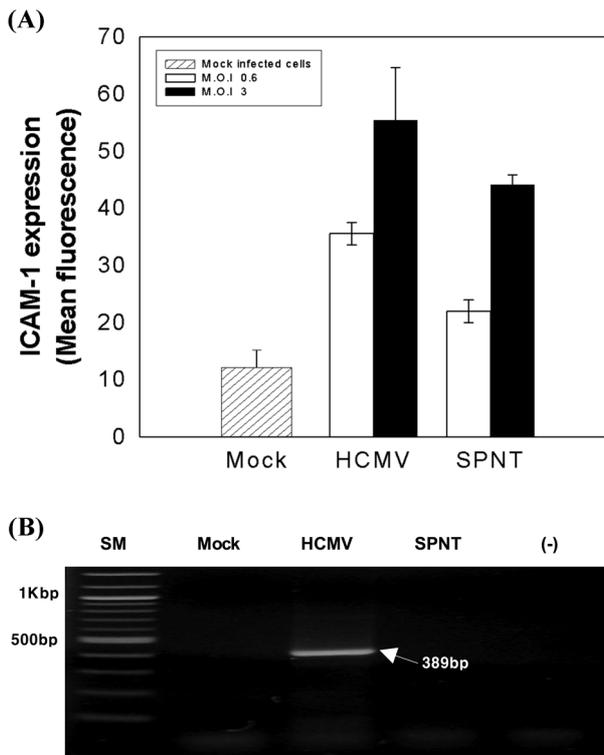


Fig. 1. Stimulation of ICAM-1 expression on THP-1 cell treated with culture supernatant (SPNT) of HCMV-infected THP-1 cells. (A) THP-1 cells were infected by HCMV TB40/E at M.O.I. 0.6 or 3. At 24 hr postinfection, SPNTs were saved and added to THP-1 cells naive to HCMV infection. Cells were harvested at 24 hr after SPNT treatment, stained with PE-conjugated anti-ICAM-1 antibody and analyzed by flow cytometry. For control experiments, mock- or HCMV-infected THP-1 cells were harvested at 24 hr postinfection, stained and analyzed by flow cytometry. (B) Contamination of HCMV in SPNT was examined by PCR. Mock, mock-infected cells; HCMV, HCMV-infected cells; SPNT, cells treated with infected cell culture supernatant.

결과는 HCMV에 감염된 THP-1 세포배양액을 처리한 세포 표면에서의 ICAM-1 발현 증가가 배양액에 오염되어 있는 HCMV에 의한 것이 아니라 감염된 세포에서 분비한 물질에 의한 것임을 시사해 주고 있다.

HCMV에 감염된 THP-1 세포로부터의 분비물에 의해 ICAM-1 발현이 증가하는 것을 살펴보기 위한 또 하나의 방법으로 감염된 세포와 감염되지 않은 세포는 직접 접촉을 하지 못하도록 세포 배양액은 자유롭게 이동할 수 있도록 trans-well insert를 사용한 공동 배양을 실시하였다. 재료 및 방법에서 전술한 방법대로 바이러스에 감염된 세포와 그렇지 않은 세포를 공동 배양하였다. 배양 24시간 후 insert를 제거하고 배양 접시에 있는 미감염 THP-1 세포를 수확하여 ICAM-1 발현을 알아보았다. 공동 배양한 미감염 세포(Co-Mock)에서의 ICAM-1 발현에 의한 mean fluorescence (MF)는 32.5±6.9로 단독 배양한 미감염 THP-1 세포(Mock)에서의 MF 11.3±3.4보다 현저하게 높았고, 이는 HCMV에 감염된 세포(Co-HCMV)에서의 MF(39.5±4.6)와 큰 차이가 없는 결과이다

Table 1. Stimulation of ICAM-1 expression in THP-1 cells co-cultured with HCMV-infected cells

Cells	Mean fluorescence (±SEM) ^c
Mock	11.3±3.4
Co-Mock ^a	32.5±6.9
Co-Virus ^b	39.5±4.6

^a Mock-infected cells in transwell co-culture

^b HCMV-infected cells in transwell co-culture

^c SEM: standard error of the mean

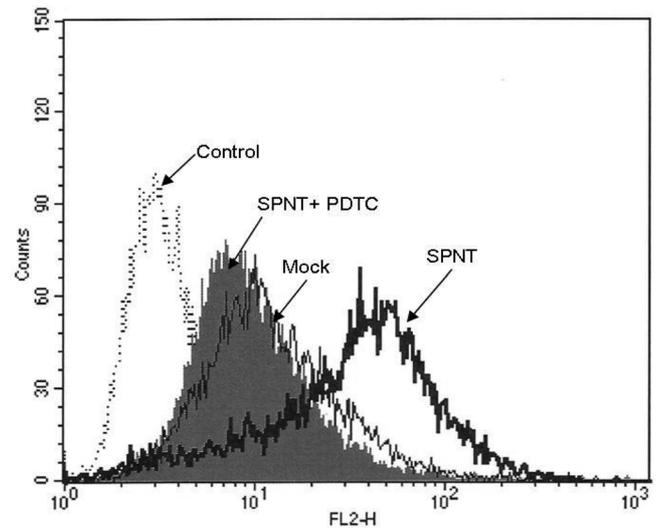


Fig. 2. Inhibition of SPNT-mediated stimulation of ICAM-1 expression by PDTC. THP-1 cells were incubated with SPNT in the presence or absence of NF-κB inhibitor PDTC (1 μM). Twenty four hr later cells were harvested and stained with PE-conjugated anti-ICAM-1 antibody and determined by flow cytometry. SPNT, supernatant obtained from HCMV-infected cells (M.O.I.=1) at 24 hr postinfection.

(Table 1). 이상의 결과에서 HCMV에 감염된 THP-1 세포에서 ICAM-1 발현을 증가시키는 물질을 분비한다는 결론을 내릴 수 있다.

이전의 보고에서 우리는 HCMV에 의한 THP-1 세포에서의 ICAM-1 발현 증가는 NF-κB 저해제인 PDTC (pyrolinedithiocarbamate)에 의해 억제되는 것을 보여주었고, 이는 HCMV 감염에 따른 ICAM-1 증가에 NF-κB 경로가 관여한다는 것을 의미한다 (12). 이에 본 연구에서는 HCMV에 감염된 세포에서 분비한 물질에 의한 ICAM-1 증가에 NF-κB 경로가 관여하는지 알아보고자 하였다. HCMV에 감염된지 24시간째의 THP-1 세포배양액을 정상 THP-1 세포에 1 μM PDTC와 함께 처리하고 24시간 후 세포를 수확하여 FACS 분석을 하였다. 감염된 세포배양액은 ICAM-1 발현 촉진 효과를 보인 반면 여기에 PDTC를 처리하면 ICAM-1 발현 촉진 효과가 사라진 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 따라서 HCMV에 감염된 세포에서 분비한 물질에 의한 ICAM-1 증가에 NF-κB 경로가 관여하는 것으로 생각된다.

THP-1 세포에서 UV-HCMV 감염에 따른 ICAM-1의 발현 유도

HCMV 감염에 따른 세포 반응 중 HLA class-I 발현, 인터페론 생성, RNASES 생성, PI3K 발현 등 다양한 반응이 HCMV 유전자 발현을 필요로 하지 않는 것으로 알려져 있다(9, 19, 26, 28, 30). 본 연구에서는 THP-1 세포에서 HCMV 감염에 따른 ICAM-1 발현 증가에 HCMV 유전자 발현이 필요하지 알아보기 위해 자외선으로 불활화시킨 HCMV (UV-HCMV)를 사용하였다. 1 J/cm²의 자외선으로 불활화시킨 UV-HCMV를 THP-1 세포에 감염시키고 시간에 따른 세포 표면의 ICAM-1 발현 정도를 알아본 결과 UV-HCMV는 감염성 바이러스에 비해 조금 약하기는 하나 HCMV에 감염시키지 않았을 때에 비해 THP-1 세포 표면의 ICAM-1 발현을 증가시켰다(Fig. 3A). 자외선에 의한 HCMV 불활화가 완전히 일어났는지 알아보기 위해 UV-HCMV를 세포에 감염시키고 UL123 유전자 발현을 RT-PCR 방법으로 알아본 결과 UV-HCMV에 감염된 HFF나 THP-1 세포에서는 HCMV 유전자 발현이 전혀 일어나지 않음을 알 수 있었다(Fig. 3B). 또한 UV-HCMV에 의한 세포병변 효과도 관찰되지 않았다(자료 미제시). 따라서 HCMV에 의한 THP-1 세포에서의 ICAM-1 발현 촉진에 HCMV 유전자 발현 이외의 다른 요인이 관여하는 것으로 생각된다.

Figure 3의 결과를 자세히 살펴보면, 감염 24시간째 관찰된

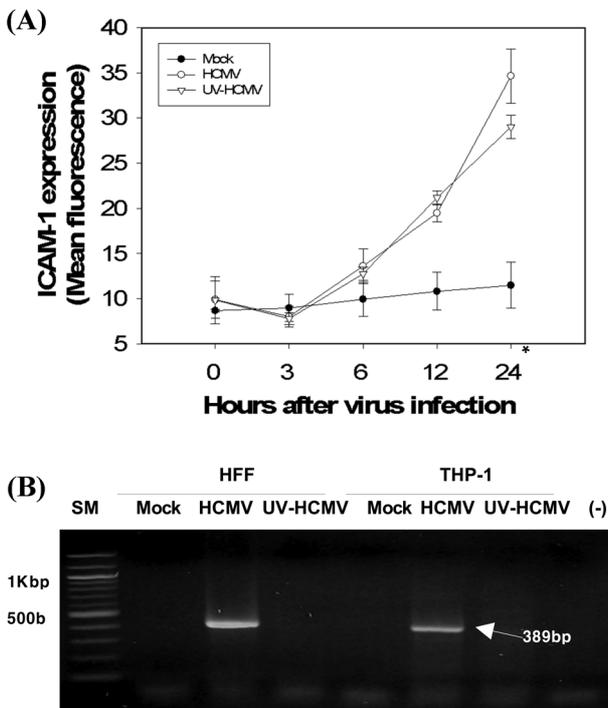


Fig. 3. Stimulation of ICAM-1 expression on THP-1 cell infected with UV-HCMV. (A) THP-1 cells were infected with HCMV or UV-HCMV (M.O.I.=1) and ICAM-1 expression was examined at indicated times after infection by flow cytometry. Statistical significance was indicated by an asterisk (*). (B) HCMV gene (UL123) expression was not observed in cells infected with UV-HCMV.

UV-HCMV에 감염된 THP-1 세포에서의 ICAM-1 발현 증가는 정상 HCMV에 의한 증가보다 통계적으로 유의하게 낮은 것을 알 수 있으며($P<0.05$), 이러한 차이는 반복적으로 관찰되었다. 그 이유가 감염된 THP-1 세포에서로부터 ICAM-1 발현촉진 물질 분비의 차이에 의한 것인지 알아보았다. 정상 HCMV가 감염된 THP-1 세포 배양액을 처리하였을 시에는 ICAM-1 발현이 증가한 반면, UV-HCMV가 감염된 THP-1 세포 배양액을 처리하였을 시에는 ICAM-1 발현 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 4). 이는 THP-1 세포에서로부터 ICAM-1 발현촉진 물질 분비에 HCMV 유전자 발현이 필요하다는 것을 의미한다.

고 찰

본 연구에서는 인체단핵세포주인 THP-1 세포에서 HCMV 감염에 따라 ICAM-1 발현이 증가하는데 HCMV 유전자 발현 외

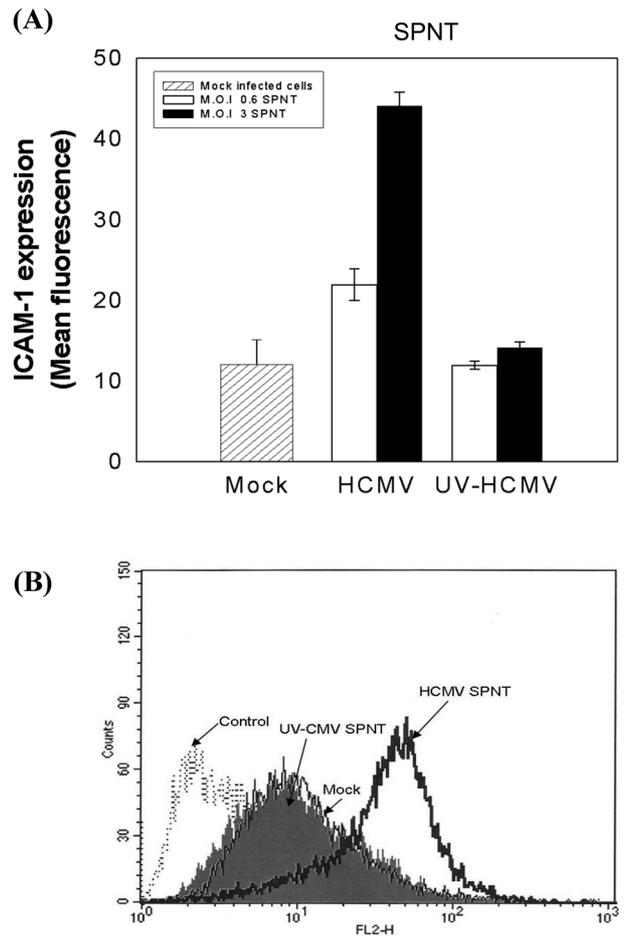


Fig. 4. SPNT obtained from THP-1 cells infected with UV-HCMV did not stimulate ICAM-1 expression. Cell were infected HCMV or UV-HCMV at M.O.I. of 0.6 or 3. (A) Infected cell culture supernatant (SPNT) were obtained at 24 hr postinfection and added to naive THP-1 cells. After 24 hr, cells were harvested and ICAM-1 expression was determined by flow cytometry. (B) Representative flow cytometrygram.

에도 다른 요인이 작용함을 알 수 있었다. 즉, 아직은 밝혀지지 않은 cytokine을 분비하여 인접한 감염되지 않은 세포의 ICAM-1 발현을 촉진시켜 주며, 이러한 cytokine의 분비에는 HCMV 유전자 발현이 필요하다는 것을 보여 주었다.

바이러스는 감염된 세포로부터 다양한 물질을 분비한다. HCMV와 같은 헤르페스바이러스과에 속하는 Herpes Simplex Virus (HSV)의 경우 UV-inactivated HSV를 감염 시켰을 때 macrophage에서 IL-28, IL-29, TNF- α , CCL5와 CXCL10 등의 mRNA 발현 수준이 HSV가 감염된 세포에 비하여 약화되고, TNF- α 와 CCL5의 단백질생성이 급격히 줄어든다는 보고가 있다(17). 또한 HSV의 DNA자체가 IL-6의 방출을 더 강하게 한다는 연구논문의 결과보고도 있다(10). HCMV에 감염된 세포에서는 interferon (IFN), TNF- α , interleukin (IL) 등 다양한 cytokine을 분비한다(2, 6, 8, 24). 우리는 HCMV에 감염된 HFF 세포에서 IL-1 β , IL-6, IFN- β 같은 cytokine을 분비함을 보고한 바 있다(16, 28). 본 연구에서는 HCMV에 감염된 THP-1 세포에서 분비한 cytokine이 ICAM-1 발현을 촉진시킨다는 증거를 제시하였지만 이 cytokine이 무엇인지는 현재 알 수 없다. ICAM-1 발현을 증가시킨다고 알려 있는 cytokine 중 TNF- β , IL-1 β , IFN- α , β , γ 등의 유전적 관련성을 RT-PCR로 알아본 예비실험 결과 전술한 cytokine 중 그 어떤 것도 HCMV에 감염된 THP-1 세포에서의 발현증가가 관찰되지 않았다(자료 미제시). 따라서 다른 cytokine의 가능성에 대해 알아보거나, 아니면 전사단계가 아닌 전사 이후 단계에서 관련성을 찾아보아야 할 것이며, 현재 이에 대한 연구를 진행 중에 있다.

특이하게도 HCMV에 감염된 세포에서 분비하는 cytokine들은 직접 또는 간접적으로 항바이러스 기능을 나타낸다. Interferon은 인근 세포에서 항바이러스 상태를 유도하며, IL-1 β 나 IL-6는 HLA class 1 분자 발현을 증가시킴으로써 cytotoxic T lymphocyte의 작용을 용이하게 한다(15, 16, 28). 본 연구에서는 cytokine이 정확하게 무엇인지는 밝히지 못하였지만 ICAM-1 발현을 증가시켜 줌으로써 염증 반응을 유도하여 바이러스 감염에 대응한다는 것을 알 수 있다. 염증반응은 외부의 침입자로부터 우리의 몸을 보호하기 위한 면역반응으로, ICAM-1은 세포의 이동에 관여함으로써 염증을 매개하는 중요한 역할을 담당하고 있다(11). THP-1과 같은 단핵세포는 HCMV의 주된 잠복감염 부위이며(1, 14, 18, 20, 29), 이들 세포는 염증반응시 혈액을 빠져 나가 조직에서 분화하여 대식 세포 등으로 분화하여 염증반응을 일으킨다(14, 20, 29). 이 과정에서 혈구세포와 혈관 내피세포간의 결합이 필요하게 되고, 따라서 HCMV 감염에 따라 ICAM-1과 같은 부착분자의 발현증가가 수반될 것이라 생각된다.

UV-HCMV는 자외선으로 유전자를 불활화시켰을 뿐 입자성은 그대로 지니고 있기 때문에 특정 반응에서 바이러스 유전자 발현이 필요하지 알아보는데 널리 사용되고 있다. 본 연구진은 이전에 UV-HCMV를 이용하여 HFF 세포에서의 IL-1 β , IL-6, IFN- β 같은 cytokine의 생성을 유도하고, 분비하는데 바이러스 유전자 발현이 없어도 가능하다는 것을 보고한 바 있다(15, 16, 28). 본 연구에서도 THP-1 세포에서 HCMV 유전자 발현 없이도 ICAM-1 발현이 증가되었다. 이와 같은 결과는 HCMV 감염에 따른

ICAM-1 발현 증가에 IE 유전자 같은 바이러스 유전자 발현이 필요하다는 기존의 보고(3, 4, 5)와는 다른 결과이다. 이와 같은 상반된 결과는 기존의 보고가 fibroblast, endothelial cell, 그리고 syncytiotrophoblast와 같은 기저 요구형 세포를 사용한 연구 결과인데 비해 본 연구에서는 부유성인 단핵세포를 사용하였기 때문이 아닌가 생각한다. 우리가 사용한 THP-1 세포와 유사한 인체 단핵세포의 부착성, 또는 이동성이 HCMV에 의해 촉진되며, 이 과정은 NF- κ B가 관여하는 ICAM-1 발현 증가와 관련 있다는 보고(26, 27)에서 UV-HCMV도 정상 바이러스처럼 ICAM-1 발현을 증가시킨다는 것을 보여 준 것은 본 연구 결과와 일치한다고 볼 수 있다.

본 연구에서 UV-HCMV의 감염에 의해서도 ICAM-1 발현이 증가하지만 HCMV에 감염되었을 때에 비해 24시간째에 통계적으로 유의하게 낮은 수준인 이유는 다음과 같이 설명된다. 즉, HCMV는 바이러스와 SPNT에 의한 ICAM-1 증가가 나타나고, UV-HCMV는 바이러스에 의한 ICAM-1 증가만을 보이는 것이다. UV-HCMV는 cytokine을 포함하는 SPNT를 만들지 못하기 때문이다. 결론적으로 HCMV에 감염된 THP-1 세포에서의 ICAM-1 발현 증가는 바이러스 유전자 발현이 없이도 가능하나, 감염된 세포로부터의 cytokine 분비는 HCMV 유전자 발현을 필요로 한다. 이 때 분비된 cytokine이 무엇이며, 어떠한 기전에 의해 ICAM-1 발현을 촉진하는지는 앞으로 더 연구해야 할 과제이다.

감사의 말

이 논문은 2006학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Bolovan-Fritts, C.A., E.S. Mocarski, and J.A. Wiedeman. 1999. Peripheral blood CD14(+) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood* 93, 394-398.
2. Boldogh, I., T.K. Bui, P. Szaniszló, W.A. Bresnahan, T. Albrecht, and T.K. Hughes. 1997. Novel activation of gamma-interferon in nonimmune cells during human cytomegalovirus replication. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215, 66-73.
3. Burns, L.J., J.C. Pooley, D.J. Walsh, G.M. Vercellotti, M.L. Weber, and A. Kovacs. 1999. Intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells is activated by cytomegalovirus immediate early proteins. *Transplantation* 67, 137-144.
4. Chan, G., M.F. Stinski, and L.J. Guilbert. 2004. Human cytomegalovirus-induced upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 on vilous syncytiotrophoblasts. *Biol. Reprod.* 71, 797-803.
5. Craigen, J.L. and J.E. Grundy. 1996. Cytomegalovirus induces up-regulation of LFA-3 (CD58) and ICAM-1 (CD54) is a direct viral effect that is not prevented by ganciclovir or foscarnet treatment. *Transplantation* 62, 1102-1108.
6. Craigen, J.L., K.L. Yong, N.J. Jordan, L.P. MacCormac, J. Westwick, A.N. Akbar, and J.E. Grundy. 1997. Human cytomegalovirus infection up-regulates interleukin-8 gene expression and

- stimulates neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 92, 138-145.
7. Dengler, T.J., M.J. Raftery, M. Werle, R. Zimmermann, and G. Schönrich. 2000. Cytomegalovirus infection of vascular cells induces expression of pro-inflammatory adhesion molecules by paracrine action of secreted interleukin-1 beta. *Transplantation* 69, 1160-1168.
 8. Duncombe, A.S., A. Meager, H.G. Prentice, J.E. Grundy, H.E. Heslop, A.V. Hoffbrand, and M.K. Brenner. 1990. Gamma-interferon and tumor necrosis factor production after bone marrow transplantation is augmented by exposure to marrow fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Blood* 76, 1046-1053.
 9. Fortunato, E.A., A.K. McElroy, I. Sanchez, and D.H. Spector. 2000. Exploitation of cellular regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol.* 8, 111-119.
 10. Hayashi, K., L.C. Hooper, M.S. Chin, C.N. Nagineni, B. Detrick, and J.J. Hooks. 2006. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) DNA and immune complex (HSV-1-human IgG) elicit vigorous interleukin 6 release from infected corneal cells via Toll-like receptors. *J. Gen. Virol.* 87, 2161-2169.
 11. Kevil, C.G., R.P. Patel, and D.C. Bullard. 2001. Essential role of ICAM-1 in mediating monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, 1442-1447.
 12. Kim, M.S., H.A. Yi, and C.H. Lee. 2008. Human cytomegalovirus induces intercellular adhesion molecule-1 expression in a monocytic cell line, THP-1. *J. Bacteriol. Virol.* 38, 39-46.
 13. Knight, D.A., W.J. Waldman, and D.D. Sedmak. 1999. Cytomegalovirus-mediated modulation of adhesion molecule expression by human arterial and microvascular endothelial cells. *Transplantation* 68, 1814-1818.
 14. Kondo, K., H. Kaneshima, and E.S. Mocarski. 1994. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11879-11883.
 15. Lee, G.C., B.H. Song, and C.H. Lee. 2001. Increase in the expression of human leukocyte antigen class I in human fibroblasts by soluble factors secreted from human cytomegalovirus-infected cells. *Mol. Cells* 11, 392-398.
 16. Lee, G.C., H.A. Yi, and C.H. Lee. 2006. Stimulation of interferon-beta gene expression by human cytomegalovirus via nuclear factor kappa B and phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Virus Res.* 171, 209-214.
 17. Melchjorsen, J., J. Sirén, I. Julkunen, S.R. Paludan, and S. Matikainen. 2006. Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF-kappaB and IRF-3. *J. Gen. Virol.* 87, 1099-1108.
 18. Mendelson, M., S. Monard, P. Sissons, and J. Sinclair. 1996. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.* 77, 3099-3102.
 19. Michelson, S., P. Dal Monte, D. Zipeto, B. Bodaghi, L. Laurent, E. Oberlin, F. Arenzana-Seisdedos, J.L. Virelizier, and M.P. Landini. 1997. Modulation of RANTES production by human cytomegalovirus infection of fibroblasts. *J. Virol.* 71, 6495-6500.
 20. Minton, E.J., C. Tysoe, J.H. Sinclair, and J.G. Sissons. 1994. Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow. *J. Virol.* 68, 4017-4021.
 21. Mocarski, Jr., E.S., T. Shenk, and R.F. Pass. 2007. Cytomegalovirus, p. 2701-2772. In D.M. Knipe and P.M. Howley (eds.), 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
 22. Munro, J.M. 1993. Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases. *Eur. Heart J.* 14 Suppl K, 72-77.
 23. Rahbar, A. and C. Soderberg-Naucler. 2005. Human cytomegalovirus infection of endothelial cells triggers platelet adhesion and aggregation. *J. Virol.* 79, 2211-2220.
 24. Rodriguez, J.E., T.R. Loeffle, and N.S. Swack. 1987. Beta interferon production in primed and unprimed cells infected with human cytomegalovirus. *Arch. Virol.* 94, 177-189.
 25. Sedmak, D.D., D.A. Knight, N.C. Vook, and J.W. Waldman. 1994. Divergent patterns of ELAM-1, ICAM-1, and VCAM-1 expression on cytomegalovirus-infected endothelial cells. *Transplantation* 58, 1379-1385.
 26. Smith, M.S., G.L. Bentz, P.M. Smith, E.R. Bivins, and A.D. Yurochko. 2004. HCMV activates PI(3)K in monocytes and promotes monocyte motility and transendothelial migration in a PI(3)K-dependent manner. *J. Leukoc. Biol.* 76, 65-76.
 27. Smith, M.S., E.R. Bivins-Smith, A.M. Tilley, G.L. Bentz, G. Chan, J. Minard, and A.D. Yurochko. 2007. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappaB in human cytomegalovirus-mediated monocyte diapedesis and adhesion: strategy for viral persistence. *J. Virol.* 81, 7683-7694.
 28. Song, B.H., G.C. Lee, M.S. Moon, Y.H. Cho, and C.H. Lee. 2001. Human cytomegalovirus binding to heparan sulfate proteoglycans on the cell surface and/or entry stimulates the expression of human leukocyte antigen class I. *J. Gen. Virol.* 82, 2405-2413.
 29. Taylor-Wiedeman, J., J.G. Sissons, L.K. Borysiewicz, and J.H. Sinclair. 1991. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 72, 2059-2064.
 30. Zhu, H., J.P. Cong, G. Mamtora, T. Gingeras, and T. Shenk. 1998. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14470-14475.

(Received May 26, 2008/Accepted June 19, 2008)

ABSTRACT : Secretion of Cytokine Stimulating Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression from THP-1 Cells Infected with Human Cytomegalovirus**Mi Suk Kim¹, Hyun Ah Yi², and Chan Hee Lee^{1,2*}** (¹School of Life Sciences, ²Biotechnology Research Institute, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Republic of Korea)

Human cytomegalovirus (HCMV) stimulates the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) on the surface of monocytic THP-1 cells. Stimulation of ICAM-1 did not require HCMV gene expression since UV-inactivated HCMV (UV-HCMV) was able to induce ICAM-1 expression. ICAM-1 expression was also stimulated in uninfected THP-1 cells which were fed with culture supernatant of HCMV-infected THP-1 cells. Co-culture experiment using trans-well insert supported that HCMV-infected THP-1 cells secreted some cytokine(s) stimulating ICAM-1 expression. The stimulation of ICAM-1 by HCMV-infected cell culture supernatant appears to involve NF- κ B pathway. Culture supernatant from THP-1 cells infected with UV-HCMV, whose gene expression was abrogated, failed to stimulate ICAM-1 expression on naive THP-1 cells. Thus, HCMV gene expression seems to be required in secretion of cytokine(s) stimulating ICAM-1 expression.