大韓바이러스學會誌: 第26卷 第1號 1996
J. of Kor. Soc. of Virology, Vol. 26, No. 1, 1996

신경세포에서의 Human Cytomegalovirus 증식과 이에 따른 세포내 유리칼슘 농도 변화

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

강 경 희 · 이 찬 희

=Abstract=

Human Cytomegalovirus Replication and Ca^{2+} Response in Human Cell Lines of Neuronal Origin

Kyung Hee Kang and Chan Hee Lee

Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

Human cytomegalovirus (HCMV) replication and Ca^{2+} response in human cell lines of neuronal origin were investigated. SK-N-SH (neuroblastoma cells) and A172 cells (glioblastoma cells) were used. SK-N-SH cells were permissive for HCMV multiplication with a delay of one day compared to virus multiplication in human embryo lung (HEL) cells. The delay of HCMV multiplication in SK-N-SH cells appeared to be correlated with a delay in the Ca^{2+} response. The cytoplasmic free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) began to increase at 12 h p.i. in HCMV-infected SK-N-SH cells, while $[Ca^{2+}]_i$ increase in HCMV-infected HEL cells was observed as early as 3 h p.i. On the whole, the level of the increase in $[Ca^{2+}]_i$ in SK-N-SH cells was about 30% of that in HEL cells. On the other hand, in A172 cells infected with HCMV, neither production of infectious virus nor detectable increase in $[Ca^{2+}]_i$ was observed. Treatment with TPA of HCMV-infected SK-N-SH cells resulted in $[Ca^{2+}]_i$ increase at 6 h. p.i. The stimulatory effect of TPA on HCMV- induced $[Ca^{2+}]_i$ increase continued until 12 h p.i., but TPA failed to stimulate the Ca^{2+} response in SK-N-SH cells at 24 h p.i., suggesting that the effect of TPA had disappeared in SK-N-SH cells at that time point. In conclusion, SK-N-SH cells are permissive for HCMV replication and the delay in Ca^{2+} response may be a consequence of the lower responsiveness of SK-N-SH cells than HEL cells to HCMV infection.

Key Words: HCMV, human neuroblastoma cells, Ca^{2+}

서 론

Human cytomegalovirus (HCMV)는 전통적으로 태아의 중추신경계에 감염하여 cytomegalic inclusion disease (CID)의 증세를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 태아의 중추신경계 감염은 가장 흔하게는 microcephaly를 유발시키며, 그 외에도 periventricular calcification, hydrocephalus 등 여러 형태의 성장 장애를 일으킨다 [1]. 태아상태에서 HCMV에 감염되어 출생하는 신생아는 미국의 경우 전체 신생아의 약 1% 정도 되는 것으로 추산되고 있으며, 이 중 약 5%는 CID 증세를 가지고, 5% 정도는 다른 증세를 가지고 태어나며, 나머지 90% 정도는 뚜렷한 임상적 증세가 없다 [2]. HCMV 감염증상을 가지고 태어나는 신생

아에게서 가장 뚜렷하게 나타나는 임상적 소견은 시각, 청각 장애와 같은 중추신경계통의 질환이다. 태아 상태에서 HCMV에 감염되어 태어난 신생아의 60% 정도는 심각한 청각 장애를 보이며 이들의 80% 이상은 3 살이 되기 전에 청각을 잃어버리게 된다 [2,3,4]. 한편 임상적 증세가 없이 HCMV에 감염되어 태어나는 아이들의 상당수에서도 차후에 청각장애, 지능저하 등 여러 형태의 중추신경계통의 신경성 질환이 나타나는 것을 볼 수 있다. 이러한 경우에는 HCMV가 신경조직에 잠복해 있다가 신체조건이 바뀜에 따라 질병을 일으킨다고 생각된다.

최근 후천성면역결핍증 (AIDS)이 만연됨에 따라 AIDS 환자에서 나타나는 각종 바이러스성, 세균성, 곰팡이성 질병원들이 주목을 받고 있다. HCMV는 AIDS 환자에서 재발감염 또는 초기감염하여 치명적인 결과를 초래할 수 있는데, 많은 환자의 경우 glial cell, 또는 neuronal cell에서 HCMV의 DNA 존재 또는 유전자 발현의 증거가 제시되고 있다 [5,6,7]. 따라서 HCMV와 신경세포와는 밀접한 관계가 있으나 아직 신경세포에 HCMV가 감염되었을 때 어떤 유전자가 발현하며, 유전자 발현에 미치는 인자, 또는 HCMV의 감염에 따른 신경세포의 변화 등에 대하여는 잘 알려져 있지 않다.

신경세포가 그 기능을 수행하는데 칼슘 이온이 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있는 사실이다. 한편 HCMV에 감염된 세포에서 세포내 유리 칼슘의 농도 변화가 따르고, 이는 HCMV 유전자 발현과 밀접한 관계를 가지고 있음이 이미 보고된 바 있다 [8,9,10]. Nokta 등은 감수성 세포인 HEF (human embryo fibroblast) 세포에서 HCMV 감염 후 급격한 칼슘의 유입이 일어나고, 이어서 지속적인 세포내 유리 칼슘 농도 ($[Ca^{2+}]_i$)의 증가가 관찰되는 것을 보고하였다 [8]. 본 연구실에서도 비슷한 결과가 관찰되었으며, 이러한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가는 HCMV 즉시초기 유전자 발현을 촉진시켜 주었다 [9]. 반면 칼슘 유입 억제제는 HCMV 즉시초기 유전자 발현을 억제하였다 [11]. 나아가 HCMV 즉시초기 유전자는 다시 $[Ca^{2+}]_i$ 증가를 유도하였다 [10]. 따라서 HCMV의 증식, 또는 유전자 발현과 칼슘은 서로 연관이 있으며, 칼슘이 중요한 역할을 하는 신경세포에 HCMV가 감염할 경우 바이러스의 증식과 유전자 발현은 어떤 형태이건 칼슘이온에 의한 조절을 받을 것이라고 예상된다. 이러한 관점에서 본 연구는 HCMV, 신경세포, 그리고 칼슘의 관계를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

세포 및 바이러스

본 연구를 위해 사용된 세포 중 HCMV 증식과 감염성 바이러스의 정량을 위해서 human embryo lung (HEL) 세포를 사용하였다. HEL 세포의 배양에는 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 Eagle's minimum essential medium (EMEM)을 사용하여 37℃ CO_2 배양기에서 배양하였다. 인체 신경암세포로 human neuroblastoma 세포인 SK-N-SH 세포와 human glioblastoma 세포인 A172 세포는 서울대 의대의 한국세포주은행에서 분양받았다. 이들 신경암세포는 RPMI 배지에 10% FBS를 첨가하여 5% CO_2 존재하에서 배양하였다.

모든 실험에 사용된 바이러스는 HCMV strain AD169이며, 이 바이러스는 University of Texas Medical Branch (Galveston, TX, U.S.A.)의 Dr. T. Albrecht로 부터 얻었다. HCMV stock을 얻기 위해서 80cm^2 세포배양용 플라스크에서 자란 HEL 세포의 단층에 약 0.01-0.05 plaque forming unit (PFU)/cell로 바이러스를 접종하고 15 분 간격으로 가볍게 흔들어 주어 37℃에서 1 시간 동안 흡착시켰다. 바이러스 감염 4-5 일 후 세포변병효과가 어느 정도 나타나면 배지를 신선한 유지배지로 갈아주고 바이러스 감염 8-10 일 후 수확하였다. 바이러스는 플라스크 자체를 -70℃에 얼린 뒤 37℃에서 녹여 단세포화한 후 1 분 30 초 동안 초음파분쇄하였다. 이를 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 상층액은 50 ml 원심분리관에 넣고 pellet은 전체 부피의 십분의 일로 재현탁하여 다시 초음파분쇄하였다. 이렇게 얻은 바이러스 stock은 혼합기로 잘 섞은 후 2 ml 또는 5 ml씩 나누어 넣고 -70℃에 보관하였다.

감염성 바이러스의 생성

신경암세포에서의 HCMV의 증식여부는 Leighton tube에서 자란 세포단층에서의 감염성이 있는 바이러스를 정량함으로써 결정하였다. 세포단층에 m.o.i. (multiplicity of infection)가 1-3 PFU/cell이 되게 바이러스를 접종시켰다. 바이러스의 흡착 (37℃에서 1 시간)이 끝난 96 시간 뒤에 -75℃

에 얼림으로써 바이러스의 증식을 중단시켰다. 바이러스는 두 차례에 걸친 얼림과 녹임 후, 30초의 초음파분쇄에 의해 수확하였다. 감염성 바이러스의 정량은 plaque assay에 의해 실행하였다.

Plaque assay

바이러스를 상온에서 10진 희석하여 0.2 ml을 35 mm 페트리디쉬에 배양한 HEL 세포 단층에 접종한 후 37℃에서 1 시간 동안 흡착시킨 다음 바이러스를 제거하고 1차 overlay medium을 넣었다. Overlay medium은 EMEM에 2% FBS, 0.25% agarose, 40 μg/ml gentamycin, 1 μg/ml fungizone을 넣어 사용하였다. 바이러스를 감염한 후 7 일이 지나면 다시 overlay medium을 만들어 1차 overlay medium 위에 넣어 주었다. 2차 overlay medium을 넣은지 7 일 후 10 % formalin으로 세포를 고정했다. 24 시간 후 overlay medium을 제거하고 0.03 % methylene blue로 염색하여 해부 현미경으로 plaque의 수를 세었다.

세포내 유리 칼슘 농도의 측정

HCMV에 감염시킨 세포나 여러 가지 약제를 처리해준 세포에서의 유리 칼슘 농도를 측정하기 위해 사용하는 fluorescent indicator로는 Fura-2/AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)을 사용하였다. 바이러스나 약제를 처리한지 적절한 시간이 지난 뒤 칼슘이 없는 D-PBS (일 리터 당 KCl 0.2 g, KH_2PO_4 0.2 g, NaCl 8 g, Na_2HPO_4 1.14 g, pH 7.4)로 세포단층을 두번 씻어준 다음 Fura-2/AM을 loading buffer (10 mM Hepes, pH 7.4, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM glucose, 10 mM sodium pyruvate)에 3 μM이 되게 처리하여 40 분간 반응시켰다. 이렇게 하여 Fura 2/AM을 세포내로 유입시킨 후, 트립신 처리에 의해 세포를 수확한 뒤, D-PBS로 두번 씻어준 다음 fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan; model F-3000)로 형광의 정도를 측정하였다. Excitation과 emission 파장은 각각 340 nm와 500 nm로 하였다.

Plasmid

HCMV 즉시초기 유전자 발현에 의한 세포내 유리 칼슘 농도 변화를 알아보기 위해 사용한 plasmid DNA는 pEQ273, pEQ326, pEQ276로 이들은 각각 HCMV의 즉시초기 유전자 중 MIE1, MIE2, 그리고 MIE1+2를 발현하는 것으로 서울대학교 유전공학연구소의 김 선영 교수로부터 구했다. 이들 plasmid를 증폭하기 위해서 *E. coli* JM 109에 형질전환시켰으며, 여기서 얻은 형질전환균으로부터의 DNA 추출은 alkaline lysis 방법을 변형하여 사용하였다. 형질전환균주를 항생제가 포함된 Luria-Bertani 배지 (LB 배지: 1 리터 당 tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g)에서 배양한 후에, 원심분리하여 균체를 수확하였다. 용액 I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0), 용액 II (0.2 N NaOH, 1% SDS), 그리고 용액 III (5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, 증류수 28.5 ml)를 순차적으로 첨가하여 박테리아를 파괴시킨 후, isopropanol로 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)로 녹인 뒤 여기에 $CsCl_2$와 EtBr을 첨가하고 45,000 rpm에서 48 시간 원심분리한 후 isopropanol로 EtBr을 제거하고 $CsCl_2$는 투석에 의해 제거하여 -20℃에 보관하였다.

Transfection

Plasmid DNA의 세포내 도입은 Lipofectamine (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)을 사용한 lipofection 방법을 이용하였다. 세포를 배양한지 하루 후 세포가 약 80%의 confluency를 보이게 되면 Lipofectamine 3 μl와 DNA 1 μg을 섞은 복합체를 세포에 넣어주었다. 이를 37℃ CO_2 배양기에서 5 시간 동안 배양하고, 10% FBS를 포함하는 배지를 넣어 주었다. DNA를 넣은 24 시간 후에 또 다시 10% FBS를 포함하는 배지로 갈아 주고, 이 후 24 시간이 지난 뒤 앞의 방법으로 Fura-2에 의한 형광값을 측정하였다.

결 과

인체 신경암세포에서의 **HCMV** 증식

HCMV가 인체 신경암세포에서도 성공적으로 증식할 수 있는지 알아보기 위하여 neuroblastoma 세포주인 SK-N-SH 세포와 미분화된 glioblastoma 세포주인 A 172세포에 HCMV를 감염시키고 24 시간 간격으로 수확되는 바이러스의 양을 정량하였다. 실험 결과를 대조하기 위하여 HCMV의 정상숙주세포인 HEL 세포에서의 HCMV 생성도

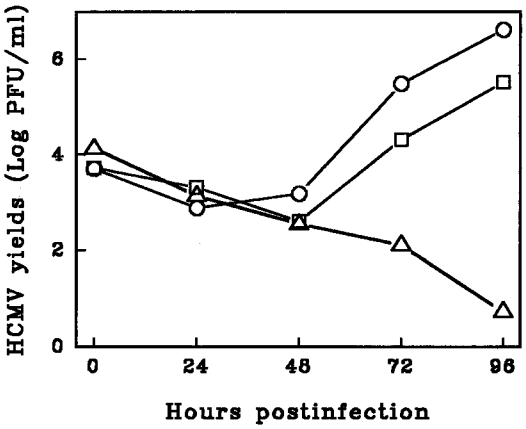

Figure 1. One-step growth curves of HCMV in SK-N-SH, A172 or HEL cells. Confluent monolayers of the cells grown in Leighton tubes were infected with HCMV (strain AD169) at m.o.i. of 1 PFU/cell. Infectious virus titers were determined at the times indicated by plaque assay. (○), HEL cells; (□), SK-N-SH cells; (△), A172 cells.

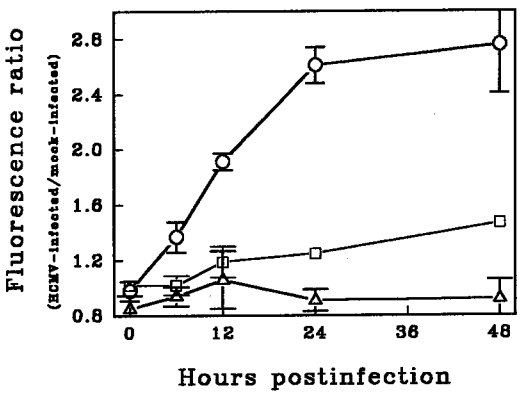

Figure 2. Changes in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration following HCMV infection of SK-N-SH, A172 and HEL cells. Cells grown to confluency in 35 mm dishes were infected or mock infected with HCMV at m.o.i. of 1 PFU/cell. At the indicated time points after, cells were loaded with Fura-2/AM (3 μM), and the Fura-2 fluorescence was measured as described in Materials and Methods. (○), HEL cells; (□), SK-N-SH cells; (△), A172 cells.

같이 알아보았다. Figure 1에 나타낸 실험 결과에서 볼 수 있는 바와 같이 HEL 세포에서는 바이러스 감염 48 시간 부터 감염성 바이러스 생성이 관찰되었으나, SK-N-SH 세포에서는 바이러스 감염 72 시간이 지난 후부터 감염성 바이러스가 검출되었다. 이 때 SK-N-SH 세포에서의 감염성 바이러스의 수치는 HEL 세포에서 증식된 바이러스 양의 약 10%에 해당하는 양이다. 반면, A 172세포에서는 바이러스가 전혀 증식하지 못했으며 72 시간 후부터는 감염성 바이러스의 수가 오히려 감소하였다 (Fig. 1). 따라서 SK-N-SH 세포는 바이러스의 생성 시기나 양이 HEL 세포와 약간의 차이가 있으나 HCMV가 감염하여 증식할 수 있는 숙주 세포라는 것을 알 수 있으며 A 172 세포는 SK-N-SH 세포와 같은 brain-derived cell line이지만 HCMV의 증식을 제한하는 세포임을 알 수 있다.

신경 암세포에서 HCMV 감염과 세포내 유리 칼슘의 변화

HCMV가 SK-N-SH 세포에서 성공적으로 증식했다는 것은 HEL 세포에서 보고된, 바이러스 감염 후에 일어나는 여러 세포 생리학적 환경의 변화 역시 수반될 수 있다는 가능성을 보여준다. 그리하여 우선 HEL 세포에서 보이는 칼슘 농도의 변화가 SK-N-SH 세포에서도 일어나는지를 조사하였다. HCMV를 감염시키고 각 지정된 시간에 Fura-2 형광 값에 의한 세포내 유리 칼슘 농도의 변화를 알아보았다. 바이러스 감염 후 6 시간까지는 변화가 없었으나, 12, 24 시간에는 Fura-2 형광 값이 각각 17, 24%의 증가, 48 시간에는 45%의 증가를 보였다 (Fig. 2). 이것은 HCMV 감염에 의한 HEL 세포에서의 Fura-2 형광 값의 증가량의 약 30%에 미치는 수준이며 SK-N-SH 세포에서의 낮은 바이러스 수율을 고려하면 충분히 예상할 수 있는 결과라고 생각된다. 반면 A172 세포에서는 HCMV 감염에 따른 칼슘 농도의 변화가 바이러스 감염 96 시간까지 관찰되지 않았으며, 바이러스 감염에 의한 세포 병변 효과도 전혀 관찰되지 않았다. 이 사실은 세포 내에서의 HCMV의 증식 여부가 칼슘 농도의 증가와 직접적으로 관련되어 있음을 보여준다.

감수성 세포인 HEL 세포에서는 HCMV 유전자 발현이 직접적으로 세포내 유리 칼슘을 증가시키는데 관여하는 것으로 보고되었다 [10]. 앞의 두 실험 결과 SK-N-SH 세포에서도 HEL 세포에서와 같이 HCMV의 증식이 일어나며, 세포내 유리 칼슘 농도도 시기적으로 지연되기는 하나 증가하는 것을 알았다. 이러한 결과를 토대로 하여 HCMV의 즉시초기 유전자를 세포에 도입시키고 이것이 세포내 유리 칼슘의 농도를 변화시

Table 1. Effect of TPA on cytosolic free calcium concentration in HCMV-infected SK-N-SH cells

TPA (nM)	Fluorescence intensity (±S.E.M.)[1]		Ratio[2]
	Mock-infected	HCMV-infected	
0	49.4±5.87	48.2±6.27	0.98
1	52.0±6.54	54.4±0.54	1.05
10	46.2±4.74	66.5±4.28	1.44
100	47.9±9.71	62.0±1.30	1.29

1. Measured at 6 h p. i.
2. Fluorecence in HCMV-infected cells / Fluorecnece in mock-infected cells

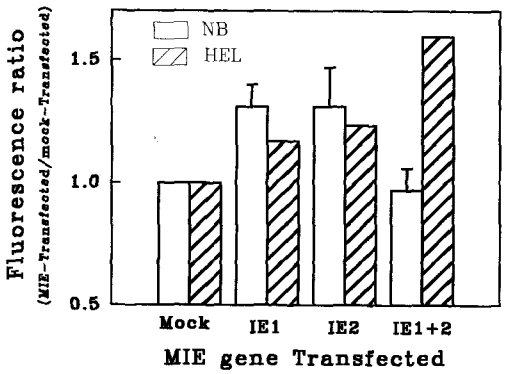

Figure 3. Effect of HCMV major immediate early gene transfection on the cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in SK-N-SH cells. SK-N-SH cell monolayers grown in 35 mm dishes were transfected with plasmid DNAs containing HCMV major IE genes using Lipofectamine (Gibco BRL). Mock-transfected cells received plasmid DNA containing only the promoter region of the major IE gene. Transfection and the Fura-2 fluorescence measurement were performed as described in Materials and Methods. HEL: human embryo lung cells, NB: SK-N-SH cells.

킬 수 있는지 알아보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 pEQ326 (MIE1)과 pEQ273 (MIE2)을 도입한 경우에서는 Fura-2 형광 값에 있어 약 30% 정도의 증가를 보였으나 pEQ276 (MIE1+MIE2)을 도입시킨 세포에서는 큰 변화가 없었다. 완전한 유전자가 도입된 세포에서 오히려 아무 변화가 없었다는 사실은 이 세포에서는 두 종류의 즉시초기 유전자 (MIE1, MIE2)가 서로 상호 작용하는데 문제가 있다는 가능성을 보여준다.

HCMV 감염에 따른 세포내 유리 칼슘의 변화에 대한 TPA의 영향

HCMV가 세포내 신호 전이 체계에 영향을 주고 그와 관련된 인자들의 세포내 농도를 변화시킨다는 사실은 이미 보고된 바 있다. 그 중에서도 특히 중요한 것이 세포내 유리 칼슘 [8, 9]과 cAMP [12]의 농도이다. 이러한 사실을 바탕으로 protein kinase C 활성제인 TPA를 처리하여 이것이 HCMV 감염에 따른 세포의 유리 칼슘 농도의 변화에 어떻게 영향을 주는지 알아보았다. 우선 HCMV를 감염시킨 SK-N-SH 세포에 TPA를 여러 농도로 처리한 후 세포내 유리 칼슘이 거의 변하지 않는 바이러스 감염 후 6 시간 째의 칼슘 변화를 알아보았다. TPA를 처리하지 않은 세포에서는 예상한 바와 같이 Fura-2 형광 값이 변화하지 않은 반면, TPA를 10 nM, 100 nM 처리한 세포에서는 각각 44%, 29%의 증가를 보였다 (Table 1). 다음으로는 HCMV 감염 후 지속적으로 TPA를 처리하였을 때 TPA가 바이러스에 의한 지속적인 칼슘의 증가에 어떤 영향을 미칠 것인지를 알아보았다. 이를 위해 TPA (10 nM)를 처리하고 바이러스 감염 후 각 시간대에 TPA를 처리해 주지 않은 세포와 비교하여 Fura-2 형광 값의 변화 정도를 분석하였다 (Fig. 4). 실험 결과, 감염 후 6 시간에 TPA를 처리해 주지 않은 세포에서는 바이러스 감염에 의해 Fura-2 형광 값이 전혀 증가하지 않은데 비해 TPA 처리에 의해 25%가 증가했으며, 12 시간 후에는 TPA 처리에 의해 바이러스 감염에 의한 Fura-2 형광 값의 증가가 32%에서 70%로 그 폭이 커졌다. 그리고 감염 24 시간에는 바이러스 감염에 의해 Fura-2 형광 값이 67% 증가하였으나 TPA 처리에 의해 증가폭이 더 커지지는 않았다. 이는 이미 바이러스 감염에 의해 이미 충분한 양의 칼슘 농도의 증가가 유도되었을 경우에는 그와 더불어 다른 신호전이 체계의 활성화로 인해 PKC 활성제로 넣어준 TPA가 영향을 주지 못했기 때문이라고 생각된다.

고 찰

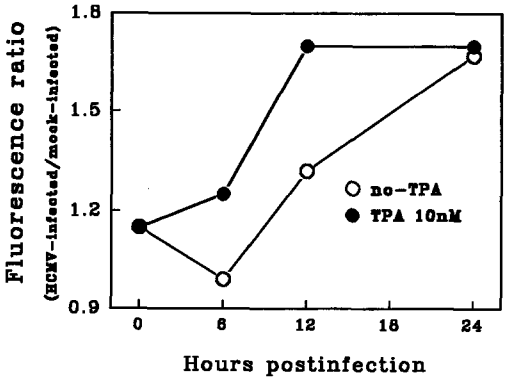

Figure 4. Effect of TPA on HCMV-induced increase in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in SK-N-SH cells. SK-N-SH cell monolayers grown in 35 mm dishes were infected or mock infected with HCMV at m.o.i. of 1 PFU/cell and 10 nM of TPA was added. Fura-2 fluorescence was measured at indicated time points after virus infection.

임상적으로, HCMV는 중추신경계의 모든 세포에 감염할 수 있는 것으로 알려져 있으며 [5, 13] 이것은 신생아와 면역결핍증 환자에서 보이는 신경 질환과 밀접한 관련이 있으리라 생각된다. 그러나 뇌 조직에서 HCMV의 항원 발현은 없는 것으로 보고되었고 단지 HCMV DNA의 존재 유무만 *in situ hybridization*과 PCR 기법에 의해 확인되었다 [5,14]. 비록 뇌 조직에서의 HCMV 증식에 대한 직접적인 증거가 없다 할지라도 brain-derived 세포를 사용한 실험은 HCMV의 증식 가능성을 입증해 준다 [15]. 최근에는 neuroblastoma와 HCMV가 직접적으로 연관되어 있음이 관찰되었으며 [16] 이들 결과는 신경세포에서의 HCMV 복제 가능성을 시사해 주고 있다. 우리의 실험 결과도 신경세포에서의 HCMV 증식 가능성을 입증해 주는 한편 이들 세포의 기원에 따라 HCMV의 증식 여부가 결정되는 것임을 보여준다. 본 연구 결과와 유사하게 Jault 등은 SK-N-SH 세포나 U373-MG (astrocytoma/glioblastoma) 세포에서는 HCMV의 증식과 유전자 발현이 일어나지만 A172세포에서는 HCMV 유전자 발현이 제한된다는 사실을 보고하였다 [17]. 그러나 아직까지는 A172세포에서 HCMV의 유전자 발현이나 증식이 일어나지 않는 이유가 바이러스가 세포 안으로 들어가는 못해서인지 아니면 바이러스 증식에 필요한 세포 인자가 부족해서인지는 확실하게 밝혀지지 않았다.

HCMV의 증식과 유전자 발현, 특히 즉시초기 유전자 발현은 세포내 유리칼슘 농도와 밀접한 관계가 있다 [9,10,11]. HCMV 증식이 일어나는 SK-N-SH 세포에서 HCMV 감염에 따라 세포내 유리 칼슘 농도가 증가하며, 반면 HCMV 증식이 일어나지 않는 A172 세포에서는 칼슘 농도의 증가가 관찰되지 않는다는 본 연구 결과는 HCMV 증식과 칼슘 사이의 중요성을 다시 한 번 보여주고 있다고 생각된다. 여기서 한 가지 관심을 끄는 것은 HCMV 감염 후 6 시간에 HEL 세포에서는 30% 정도의 Fura-2 형광 값의 증가를 보이는 반면, SK-N-SH 세포에서는 전혀 증가하지 않았다는 사실이다. 이것은 아마도 세포내 미세 환경의 차이라고 생각된다. 즉, SK-N-SH 세포와 HEL 세포에 존재하는 인자들의 차이가 HCMV에 의한 세포의 반응을 지연시키기 때문일 것이라고 여겨진다. 비록 반응의 지연과 낮은 수치의 변화이기는 하지만 바이러스의 증식에 따라 세포내 유리 칼슘의 양이 증가한다는 것은 흥미로운 사실이다.

SK-N-SH세포에서 HCMV의 증식이나 칼슘 농도의 증가가 늦어지는 것은 HCMV의 유전자 발현의 효율이나 시기가 정상 숙주 세포인 HEL 세포와 다르기 때문이라는 가능성을 알아보기 위해 두 세포에 HCMV를 감염시키고 즉시초기 유전자 산물에 대해 western blot을 수행하였고 그 결과 SK-N-SH세포에서는 즉시초기 유전자 생성 시기가 HEL 세포에 비해 늦어짐을 확인할 수 있었다 (data not shown). 이는 SK-N-SH 세포에서 HCMV의 증식이 늦어지거나 칼슘 반응이 늦어지는 것은 유전자 발현이 지연되거나 또는 그 효율성이 낮기 때문이라는 사실을 보여준다. 신경암세포에서 HCMV의 어떤 초기 유전자 발현이 결손 된다는 보고가 있지만 우리의 실험에서는 HCMV의 즉시초기 유전자 산물인 72, 86 kd에 대한 항체를 사용했기 때문에 그 외 다른 종류의 초기 유전자 산물에 대해서는 알아보지 못했다.

SK-N-SH 세포에서 HCMV의 증식이나 초기 유전자 발현 시기가 모두 늦어진다는 점을 고려하면 즉시초기 유전자 도입 후 칼슘의 변화가 일어나는 시기 또한 늦어질 수 있으므로 즉시초기 유전자를 도입시킨 후 HEL 세포에서 칼슘의 증가가 일어나는 42 시간 이후에 어떠한 변화가 일어나는지 알아보았다. 실험 결과 유전자 도입 후 96 시간까지도 아무런 변화가 감지되지 않았다

(data not shown). 그러므로 현재까지는 즉시초기 유전자의 발현 시기가 늦어지기 때문에 세포의 칼슘 농도의 증가가 지연된다기 보다는 즉시초기 유전자에 대한 세포의 반응, 즉 칼슘 대사와 관련된 경로의 활성이 늦어지기 때문이라는 생각이 더 타당성이 있다. 이러한 가능성을 알아보기 위해 칼슘대사를 촉진할 수 있는 TPA를 사용하여 보았다. 그 결과 적은 수준의 칼슘 농도 증가를 보이는 SK-N-SH 세포에서 TPA 처리에 의해 칼슘 농도의 증가의 폭이 커진다는 흥미로운 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 본 연구 결과를 볼 때 SK-N-SH 세포에서는 바이러스 감염에 따른 신호 전이 체계, 그 중에서도 특히 protein kinase C의 활성이 낮아서 칼슘 증가가 지연되었을 것이라고 생각할 수 있다. 다른 종류의 neuroblastoma cell line에서 TPA는 칼슘 통로의 활성제 역할을 하는 것으로 보고되어 있으며 [18], TPA가 neuroblastoma에 미치는 영향에 대한 또 다른 보고에서는 TPA가 neuroblastoma cell에서 neurite의 성장을 저해한다는 사실을 보여준다 [19]. 그러므로 우리의 실험에서 TPA 처리에 의해 칼슘 농도가 증가되었다는 사실이 TPA의 어떤 효과에 의한 결과인지는 더 연구가 필요하며 protein kinase의 활성과 관련된 여러 약제를 사용으로 바이러스의 수율과 세포의 반응을 규명해 나가면 SK-N-SH 세포와 HEL 세포의 바이러스 감염에 의한 세포 생리학적 차이가 어떠한지 알 수 있을 것이다.

결 론

인체 신경암세포에 HCMV를 감염시켜 바이러스의 증식과 세포내 유리 칼슘 농도 변화를 알아본 결과 다음과 같은 결론을 내릴 수 있다.

1. 인체 신경암세포 중 SK-N-SH 세포에서는 HCMV의 증식과 세포내 유리 칼슘 농도의증가가 관찰되는 반면, A172 세포에서는 바이러스의 증식 및 칼슘 농도 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 세포의 기원에 따라 HCMV 감염에 대한 반응이 다른 것을 알 수 있다.

2. SK-N-SH 세포에서의 칼슘 농도 증가는 HEL 세포에 비해 늦고, 그 증가폭이 낮았다. 이는 즉시초기 유전자 발현에 의한 세포내 유리 칼슘 농도 증가 양상이 HEL 세포에서와 다른 것과 관계가 있으리라고 생각된다.

3. Protein kinase C 활성제인 TPA는 HCMV에 감염된 SK-N-SH 세포에서의 유리칼슘 농도 증가를 촉진시켜주었다.

사 사

이 논문은 1994년도 한국 학술진흥재단의 공모과제연구비 (자유공모과제)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Alford CA, Britt WJ: Cytomegalovirus, in Virology (Fields BN, Knipe DM, eds) pp 1981-2010. Raven Press, 1990.
2. Pass RF, Stagno S, Meyers GJ, Alford CA: Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow-ups. Pediatrics 66: 758-762, 1980.
3. Stagno S, Pass RF, Dworski ME, Britt WJ, Alford CA: Congenital and perinatal cytomegalovirus infection: clinical characteristics and pathogenic factors. Birth Defects: Original Articles Series 20: 65-85, 1984.
4. Britt WJ: Infections associated with human cytomegalovirus, *in* Herpesvirus Infections (Glaser T, Jones JF, eds) pp 59-116, Marcel Dekker, Inc., 1994.
5. Wiley CA, Schrier RD, Denaro FJ, Nelson JA, Lampert PW, Oldstone MBA: Localization of cytomegalovirus proteins and genome during fulminant central nervous system infection in an AIDS patient. J Neuropathol Exp Neurol 45: 127-139, 1986.
6. Nelson JA, Reynolds-Kohler C, Oldstone MBA, Wiley CA: HIV and HCMV coinfect brain cells in patients with AIDS. Virology 165: 286-290, 1988.
7. Belec L, Gray F, Mikol J, Scaravilli F, Mhiri C, Sobel A, Poirier J: Cytomegalovirus (CMV) encephalomyeloradiculitis and human immunodeficiency virus (HIV) encephalitis: presence of HIV and CMV co-infected multinucleated giant cells. Acta Neuropathol 81: 99-104, 1990.
8. Nokta M, Eaton D, Steinsland OS, Albrecht T:

Calcium response in cytomegalovirus-infected fibroblasts of human origin. Virology 157: 259-267, 1987.

9. Kang KH, Yoo CH, Lee CH: Increased cytosolic free calcium concentration following HCMV infection of human embryo lung cells. Mol Cells 3: 319-325, 1993.
10. Kang KH, Lee CH: Effect of human cytomegalovirus immediate early gene expression on cytosolic free calcium concentration. Mol Cells 5: 629-633, 1995.
11. Lee CH, Yoon JH, Kang KH: Protein kinases in human cytomegalovirus infection and gene expression. Mol Cells 4: 481-485, 1994.
12. Lee CH, Steinsland OS, Albrecht T: Increased cyclic AMP levels in human fibroblast cells infected with human cytomegalovirus. Mol Cells 3: 47-52, 1993.
13. Holland NR, Power C, Mathews VP, Glass JD, Forman M, McArthur JC: Cytomegalovirus encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Neurology 44: 507-514, 1994.
14. Schmidbauer M, Budka H, Ulrich W, Ambros P: Cytomegalovirus (CMV) disease of the brain in AIDS and connatal infection: A comparative study by histology, immunocytochemistry and in situ DNA hybridization. Acta Neuropathol 79:286-293, 1989.
15. Poland SD, Costello P, Dekaban GA, Rice GPA: Cytomegalovirus in the brain: in vitro infection of human brain derived cells. J Infect Dis 162: 1252-1262, 1990.
16. Nigro G, Schiavetti A, Booth JC, Clerico A, Dominici C, Krzysztofiak A, Castello M: Cytomegalovirus-associated stage 4S neuroblastoma relapsed stage 4. Med Ped Oncol 24: 200-203, 1995.
17. Jault FM, Spector SA, Spector DH: The effect of cytomegalovirus on human immunodificiency virus replication in brain-derived cells correlate with permissiveness of the cells for each virus. J Virol 68: 959-973, 1994.
18. Reeve HL, Vaughan PF, Peers C: Enhancement of Ca^{2+} channel currents in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells by phorbol esters with and without activation of protein kinase C. Eur J Physiol 429: 729-737, 1995.
19. Shea TB, Cressman CM, Spencer MJ, Beermann ML, Nixon RA: Enhancement of neurite outgrowth following calpain inhibition is mediated by protein kinase C. J Neurochem 65: 517-527, 1995.