

한탄바이러스 감염 내피세포에서 부착분자의 발현 (II) -In Situ Hybridization-

¹중앙대학교 의과대학 미생물학교실 및 ²내과학교실

정상인¹ · 신성일¹ · 김기정¹ · 강응택² · 유석희² · 최철순¹ · 양용태¹

=Abstract=

Expression of Some Adhesion Molecules on the Cultured Endothelial Cells of Human Umbilical Vein Infected with Hantaan Virus

Sang-In Chung¹, Sung-Il Shin¹, Ki-Jeong Kim¹, Eung-Taek Kang², Suk-Hee Yu²,
Chul-Soon Choi¹ and Yong-Tae Yang¹

¹Department of Microbiology and ²Internal Medicine, Chung-Ang University,
College of Medicine

Histopathological vascular changes in hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) caused by Hantaan virus include increased vascular permeability, disseminated intravascular coagulation, thrombocytopenia and changes in coagulation activity. Although vascular endothelial cells of main target organs such as kidney infected with Hantaan virus are not damaged but swelling of endothelial cells, perivascular exudates and infiltration of mononuclear cells and fresh interstitial hemorrhages are common. However, the pathogenesis of cell infiltration and hemorrhages around vascular endothelial cells are not well understood.

Some endothelial cell molecules or vascular adhesins that acts as adhesion molecules for leukocyte are expressed on endothelial cells close to site of inflammation. However, whether the expression of endothelial adhesion molecules such as vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule (ICAM-1) and endothelial leukocyte adhesion molecule (ELAM) on vascular endothelial cells are increased by infection with Hantaan virus has not been studied.

In this study, the relationship between the expression of VCAM-1, ICAM-1 and ELAM and adhesion of mononuclear cells on endothelial cells of human blood vessels infected with Hantaan virus was investigated. The endothelial cells of umbilical vein was passaged three times in culture medium and the monolayered cells were infected with 10^5 pfu/ml of Hantaan virus grown in Vero E6 cell cultures. The multiplication of virus in cultured endothelial cells was monitored by immunohistochemistry and the expression of adhesion molecules was demonstrated by immunohistochemistry using monoclonal antibodies against VCAM-1, ICAM-1 and ELAM. And in situ hybriditation against ICAM-1 was also performed.

The endothelial adhesion molecules, VCAM and ICAM, were expressed after 6 hours postinfection, respectively, and their expressions lasted for 72 hours. Similar expression of VCAM and ICAM appeared on endothelial cells by infection with virus, but the expression of ELAM was not recognized up to 72 hours postinfection. Microscopically, it was noted that many mononuclear cells adhered

이 연구는 1995년도 교육부 기초의학 학술연구과제 지원에 의하여 수행되었음.

on endothelial cells infected with viruses. In an electronmicroscopic study, the transendothelial migration of mononuclear cells was observed on monolayered endothelial cells infected with virus.

This results suggested that the endothelial adhesion molecules, particularly VCAM and ICAM, might be expressed on endothelial cells by infection with Hantaan virus and these molecules play a key role in the adhesion and extravasation of inflammatory cells around blood vessels.

Key Words: Hantaan virus, umbilical endothelial cell, adhesion molecule, In situ hybridization

서 론

신증후출혈열의 기본적인 병변은 전신혈관의 손상, 혈액성분의 혈관의 유출, 각 장기의 기능 장애 및 범발성 혈관내응고증 등이다. 그러나, 신증후출혈열 환자의 인체내 바이러스의 분포나 발열, 속, 출혈증상, 급성신부전, 뇌하수체 기능 부전증 등의 임상상에 대한 병태기전은 명확하지 않다. 지금까지의 연구에 의하면 신증후출혈열의 기본적인 병태기전은 혈관투과성의 증가가 포함된 전신맥관계병변으로 생각되어지고 있다 [1, 2, 3].

신증후출혈열 환자의 부검소견에서 혈관내피 세포가 손상되고 또한 혈관벽의 부종과 맥관구조의 파괴가 관찰되었다. 혈관계의 이상이 신증후출혈열의 환자에서 나타나고, 신증후출혈열로 사망한 환자의 뇌, 폐, 심장, 간, 신장의 작은 혈관 내피세포에서 한탄바이러스 형광항원이 발견되었다고 보고되었다. 이런 연구결과들을 유추하여보면, 신증후출혈열에서 혈관손상의 원인으로 바이러스에 의한 직접적인 효과도 생각할 수 있다. 더구나, 배양된 사람혈관내피세포 (이하 '내피세포')에서 한탄바이러스를 증식시킬 수 있었다는 연구결과가 한탄바이러스에 의한 직접적인 손상을 의심케하는 증거라고 사료된다 [4].

신증후출혈열의 병태기전에 면역학적 기전이 관여한다는 가능성은 면역복합체가 환자 혈청, 적혈구와 혈소판의 표면, 사구체, 피부모세혈관, 소변에서 발견되었다는 실험결과가 뒷받침한다 [5, 6]. 보체활성화는 아주 심한 혈관 손상을 보이는 중증환자에서 강력하게 나타났다고 밝혀졌다. 보체활성화는 저혈압기에 가장 강하는데, 이 시기는 면역복합체가 가장 많이 형성되었고, 혈관누출 (leak)이 가장 심할때이다. 보체활성화와

혈소판과 염증세포로부터 촉진인자 (triggering factor)의 유리에 의해 면역복합체가 신증후출혈열의 중요증상인 혈관손상에 관여할 것으로 추측하였다 [7]. 그러나, 신증후출혈열과 전형적인 면역복합체 질환과는 차이점이 있는데, 여러 장기에서 단핵구의 침윤은 관찰되지만 혈관주위에 침윤은 없다는 점이다 [8, 9]. 또 호중성구도 침윤이 없다. 즉, 염증세포의 침윤이 없이 혈관계의 이상을 초래한다는 것은 멀리 있는 중간매개 물질의 생산에 의한 것으로 추정하였다.

한편, 혈관염을 포함하여 여러가지 염증질환의 연구에 의하면, 혈액내 염증세포, 특히 단핵구가 염증부위 및 장기들에 모이는 것으로 알려져 있다. 이들 세포들에 의하여 여러 이차적 반응과 염증반응의 확산이 일어나기 위해서는 염증세포가 특정부위 및 장기에 친화성을 보여야 할 것으로 생각된다. 신증후출혈열 환자의 병리소견에서 신장이나 뇌등의 특정장기에 병변이 집중되는 현상은 염증세포가 이들 특정장기에 국한하여 침윤되는 것에 의한다고 생각할 수 있다. 이때 신증후출혈열의 병리조직소견에서 주로 관찰되는 단핵구 침윤은 여러 부착분자들의 작용에 의한다고 생각한다. 따라서 이러한 기전으로 바이러스에 감염된 혈관내피세포나 단핵구 표면에 부착분자 (adhesion molecules) 및 이들에 대한 수용체가 새로 발현되거나 발현정도가 증가할 것으로 추정된다. 염증반응은 혈관내피에 존재하는 부착분자와 순환중인 백혈구와의 상호작용에 의해 시작된다고 알려져 있다. 이런 혈관 부착분자 (vascular adhesion molecules, VCAMS)는 혈중의 백혈구를 못움직이게 하고 감염조직이나 염증발생부위로 모이게 하는 첫과정에 중요작용을 한다 [10].

VCAMS는 동종이식 거부반응, 조직재관류에 의한 손상등과 같은 염증반응뿐만 아니라, 암세포 침투 및 전이, 바이러스 감염등의 병리학적인

상태에서 세포간의 반응에 중요한 역할을 한다고 생각되고 있다 [11, 12, 13, 14]. 지금까지 알려진 세포간 상호작용에 관여하는 부착분자들은 크게 4종류로 분류되는데 이중 혈관 내피세포에서 발현되는 것으로 intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)으로써 이들의 생화학적 구조가 밝혀졌다 [10, 15, 16, 17]. ICAM-1은 많은 종류의 세포에서 발견되며, 혈관내피세포에서의 발현은 IL-1, TNF- α , INF- α 에 의하여 증강된다 [14, 18, 19]. ELAM-1은 cytokine으로 처리한 내피세포 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)에서 발현되며, 역시 IL-1과 TNF- α 에 의하여 발현이 증강된다 [20]. 림프구와 다른 세포와의 부착은 주로 VCAM-1에 의하여 매개된다. ICAM-1이나 ELAM-1에 의하여 다형핵구가 영향을 받는다. VCAM-1이 림프구 유도에 중요한 작용을 한다는 증거는 첫째, 염증반응에 관여하는 IL-1, TNF- α 에 의해 신속히 표현되고, 48-72시간을 지속한다는 것이다. 이는 지연형 과민반응때 나타나는 단핵구침윤 (infiltration)을 관찰할 수 있다 [21]. 둘째는 cytokines 처리 내피세포나 염증부위에서 ICAM-1과 ELAM-1이 존재하고, 세째로 사람 관절낭 (synovium)에서 림프구에 선택적인 VCAMs가 존재하며 이때 림프구가 염증이 있는 혈관에만 부착하고, 정상적인 혈관에는 부착하지 않았다는 연구결과로 미루어보아 [22] VCAM-1이 염증부위에서 림프구의 유도에 중요한 작용을 한다는 것을 뒷받침한다. 그리고, ICAM-1과 LFA-1, CD11a/CD18은 세포간 상호작용을 증강시키는 역할을 수행하는 세포표면에 존재하는 adhesion receptor이다. 세포간 작용에는 T림프구의 항원특이적 반응과 내피세포에 백혈구의 부착, 백혈구의 염증부위로의 이동등은 이들분자를 매개로 한 세포상호작용에 의한다 [19, 23, 24, 25].

신증후출혈열에서 임상적, 병리학적으로 특정 장기 즉, 신장, 일부 중추신경계에 선택적 손상을 일으키며 관찰되는 조직학적 소견은 주로 단핵구 침윤이 특징적이며, 다형핵구나 혈관내 혈전 형성등이 흔하지 않은 점은 단핵구가 병태기전에 중요한 역할을 한다는 가능성을 시사해준다. 또한 단핵구와 침범되는 장기간에 상호관계

가 이루어질 것으로 생각된다. 신증후출혈열에서 침범되는 특정 장기들의 조직학적 특징, 선택적 침범 및 손상에 여러 부착분자의 발현이 중요하게 관여할 것으로 추정되어 이를 규명하기 위해 본 연구를 수행하였다. 즉, 신증후출혈열에서 나타나는 혈관내피세포 이상과 출혈증상등에 근거하여 혈관내피세포에서 발현되는 부착분자중에 중요한 ICAM-1, VCAM-1, ELAM을 선택하였다. 연구방법으로는 사람제대 정맥내피세포를 분리배양하고 한탄바이러스를 접종한 후에 한탄바이러스에 감염된 내피세포의 단핵구 부착실험을 실시하고, 염증세포의 부착에 관여하는 것으로 알려진 VCAM, ICAM, ELAM 등의 부착분자 발현을 한탄바이러스 감염후의 경과시간에 따라 면역조직학적 방법 및 *in situ* hybridization으로 확인하였다. 그리고, 전자현미경을 이용하여 내피세포사이로의 단핵구 이동을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 한탄바이러스

이 연구에서는 한탄바이러스 76-118 주를 사용하였으며, 이는 국립보건원으로부터 분양받았다. 한탄바이러스는 Vero E6세포를 이용하여 Vero E6 세포에 증식시켜 실험에 사용할 때까지 -70 °C에 보관하였다.

2. 세포배양

내피세포의 분리 및 배양은 Jaffe의 방법 [26]에 따랐다. 출생직후 신생아의 제대를 무균적으로 태반의 배출과 동시에 20 cm 길이로 분리하여 Hartman 용액으로 세척하고 차게한 cord buffer로 다시 세척하였다. 결찰흔적을 모두 제거하고 제대정맥내로 rubber Nelaton catheter를 손상없이 집어넣고 cord buffer를 100 ml 정도 관류시켜 제대정맥내에 남아있는 혈액을 씻어내었다. 이 도관을 통해 0.2% collagenase 용액을 제대정맥내로 팽윤되도록 밀어넣고 결찰한 다음, 37°C에서 15내지 20분간 정치하였다. 제대정맥 내용물을 압력차이로 배액시키고, 이에 30 ml의 cord buffer를 관류시켜 함께 모아서 250 xg로 10분간 원심시켰다. 이 세포침전물을 20 ml의 20% 우태혈청 함유 Medium 199에 부유시켜 다시 원심시켰다. 상층액을 제거하고 세포침전물에 10내지 15 ml의 20% 우태혈청 함유 Medium 199 (2 mM,

L-glutamine, 75 ug/mL, endothelial cell growth supplement, 5U/ml, heparin를 첨가)에 부유시켜 3개의 25 cm² 배양용기에 분주하고 5% CO₂하에서 배양하였다. 12-18시간후에 배양액을 갈아주어 부착되지 않은 세포와 적혈구를 제거하였다. 3-4일 간격으로 배양액을 갈아주며, 계대배양은 0.01% EDTA- 0.1% collagenase 용액을 사용하여 7 - 10 일 간격으로 1:2 - 1:3 비율로 나누어 시행하였다.

배양된 세포가 내피세포 유래인 것을 확인하기 위하여 세포에 존재하는 von Willebrand Factor (vWF)를 검사하는 방법을 이용하였다. 배양된 내피세포에서 vWF 보유여부를 간접형광항체법을 이용하여 확인하였다 [26].

3. 내피세포에 한탄바이러스의 감염

실험에 사용한 한탄바이러스 76-118주는 감염 역가가 10⁵ pfu/ml 이었으며, 내피세포의 감염에는 바이러스 용액을 100 배 희석하여 접종하였다. 즉, 단층배양된 24 well plate 를 M199 배지로 2 회 세척하고 well 마다 바이러스액 0.1 mL 씩을 분주한후 간헐적으로 흔들어주면서 37°C에서 90 분간 내피세포에 흡착시켰다. 남은 바이러스용액을 흡인하여 제거하고 10 % 우태아혈청 함유 Medium 199 배지를 well당 2 mL 씩 분주하고 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다.

바이러스 접종후 1, 2, 3, 4, 5, 7일째에 한탄바이러스에 대한 단클론항체를 이용한 면역조직화학법을 실시하였다. 바이러스 감염 여부는 바이러스 접종후 1, 3, 5, 9일째에 한탄바이러스에 대한 단클론항체를 이용한 면역조직화학방법으로 확인하였다. 면역조직화학법은 BioGenex 제품 (alkaline phosphatase, Supersensitive MultiLink)를 구입하여 실시하였다.

4. 단핵구의 분리 및 부착 관찰

건강인의 말초혈액으로부터 단핵구의 분리는 아래와 같은 방법 (Becton Dickinson Procedure)으로 실시하였다. 즉, 정맥혈을 80 mL 채혈하여 heparin 처리된 tube 에 넣고 2 배의 HBSS 용액을 더하여 잘 섞었다. 50 mL 원심분리관에 Ficoll-Hypaque 15 mL 을 넣고 위에 30 mL 의 정맥혈 희석액을 밀의 Ficoll-Hypaque와 혼합되지 않도록 조심해서 넣었다. 상온에서 400 g 로 20 분간 원침시킨 후 Ficoll-Hypaque-plasma 층 사이에 생긴 단핵구층을 pasteur pipette로 흡인하여 40 mL

의 HBSS 에 희석하였다. 다시 상온에서 400 g 로 20 분간 원침시킨 후 상층액은 버리고 침전된 세포를 다시 HBSS에 부유시킨 후 300 g 로 5 분간 원침하여 혈소판을 제거시켰다. 상층액을 버리고 침전된 세포를 진탕하여 10 mL의 PMEM 에 희석한다. 세포생존율은 Ethidium bromide and acridine orange 법으로 확인하며 90 % 이상 생존율이 확인될 때만 사용하였다. 단핵구 용액을 내피세포가 단층배양된 배양용기에 10×10⁶ 개가 들어가도록 더해주고 2시간동안 37°C에서 정치 후 현미경으로 부착된 것을 관찰하였다. 또한 transwell plate에 단층으로 형성된 내피세포층에 단핵구를 넣어 24시간후에 2% glutaraldehyde 용액으로 4시간 고정시켜 OsO₄로 염색하여 투시전자현미경으로 단핵구의 이동을 관찰하였다.

5. ICAM-1, VCAM, ELAM의 발현 관찰 및 in situ hybridization

단층배양된 내피세포를 준비하고 한탄바이러스를 접종후에 시간경과별로 ICAM, VCAM, ELAM에 대한 단클론항체 (Immunotech)을 1: 50배 희석하여 면역조직화학법을 실시하였다. 또 ICAM-1 digoxigenin labelled probe를 이용하여 in situ hybridization을 실시하였다. 즉, 단층배양된 내피세포에 한탄바이러스 접종후에 일정시간이 지나고 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 모아서 원심분리를 하였다. 인산완충액으로 1500 rpm으로 5분간 원침시키고 상층액을 버렸다. 이에 2% paraformaldehyde를 넣고 부유시켜서 30분간 상온에서 고정하였다. 인산완충액으로 세척하고, 세포농도가 2×10⁶ /ml 되도록 하여 silane coated slide에 얹고 37°C에서 1시간동안 건조시켰다. 인산완충액으로 세척후에 DEPC 용액으로 세척하여 prehybridization/hybridization 용액으로 slide를 덮었다. 1시간후에 털어버리고 probe가 포함된 hybridization 용액 (200 ng/ ml)을 얹고 37°C에서 18시간 반응시켰다. 용액을 제거후에 4배 SSC/30% formamide, 2배 SSC/30% formamide, 최종적으로 0.2배 SSC/30% formamide 용액에 37°C에서 5분간 2회씩 세척하였다. 0.1% Triton X-100을 포함한 Tris 완충액에 slide를 넣고 15분간 세척하였다. antidigoxigenin/AP conjugate를 30분간 반응시키고 발색시약을 첨가하였다. 증류수에 세척하고 0.1% malachite green에 60초간 반응시켜 건조후에 관찰하였다.

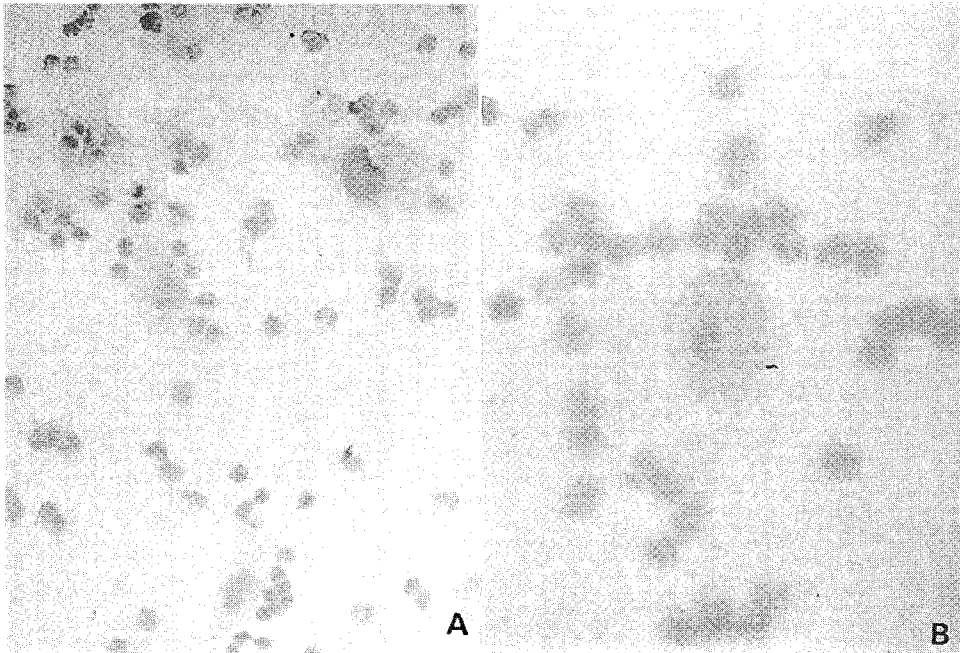


Fig. 1. Attachment of mononuclear cells onto human umbilical vein endothelial cells infected with Hantaan virus. A: 100X, B: 400X, HE staining.

Table 1. Comparison of mononuclear cells adherence rate on endothelial cells infected with Hantaan virus and on uninfected endothelial cells

Treatment	Adherence rate(%)	
	Uninfected endothelium	Infected endothelium
Monocyte only	17	36
Addition of specific Ab	23	61

결 과

1. 한탄바이러스 감염 제대정맥세포에 단핵구의 부착

배양된 내피세포에 한탄바이러스 접종 후 2일째에 단핵구/거식세포를 함께 넣고 대조실험으로 바이러스를 접종치 않은 내피세포와 부착 정도를 비교하였다. 그 결과, 한탄바이러스 접종 내피세포에 3-20개의 단핵구/거식세포가 부착함을 관찰되었으며 (Fig. 1), 한탄바이러스를 감염시키지 않은 대조군보다 2배이상의 단핵구 부착율을 나타냈다. 또 신증후출혈열 회복기 환자 혈청을 추가했을때, 단핵구 부착율은 유의하게 증

강되었다 (Table 1).

또, 단층배양된 내피세포에 한탄바이러스 접종후 단핵구를 부착시킨다음 24시간에 전자현미경 표본으로 제작하여 관찰한 결과, 부착된 세포는 이미 내피세포사이로 이동하였음을 알았다 (Fig. 2).

2. 한탄바이러스 감염 내피세포에서 Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)의 발현

한탄바이러스 접종후 내피세포에서 6, 48, 72 시간째에 면역조직화학법으로 ICAM-1의 발현을 관찰한 결과, 바이러스 접종 6시간째부터 ICAM-1의 발현을 관찰할 수 있었으며, 72시간까지 그 발현이 지속됨을 알았다 (Fig. 3-A, B, C). 그러나, 면역조직화학법에 의해서 시간경과에 따른 발현 정도의 차이는 인정되지 않았다.

3. 한탄바이러스 감염 내피세포에서 Vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1)의 발현

한탄바이러스 접종후 내피세포에서 6, 48, 72 시간째에 면역조직화학법으로 VCAM-1의 발현을 관찰한 결과, 바이러스 접종 6시간째부터 VCAM-1의 발현을 관찰할 수 있었으며, 72시간까지 그 발현이 지속되었다 (Fig. 4-A, B, C). 그

러나, 면역조직화학법에 의해서 시간경과에 따른 발현정도의 차이는 인정되지 않았다. 또한, ICAM과 비교할때 그 발현정도에 차이가 없었다.

4. 한탄바이러스 감염 내피세포에서 Endothelial leukocyte adhesion molecule (ELAM)의 발현

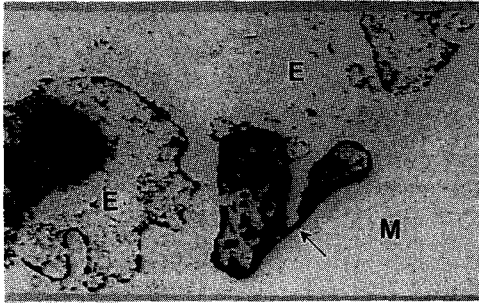


Fig. 2. Transendothelial migration of mononuclear cell. Visually confluent monolayers of endothelial cells of human umbilical vein were grown on transwell membrane and infected with Hantaan virus 76-118. In cross section, the monocytes migrated beneath the monolayer, and migrated cell (arrow) was seen with protruding pseudopod through to the endothelial cells. E: endothelial cell, M: transwell membrane.

한탄바이러스 접종후 내피세포에서 6, 48, 72 시간째에 면역조직화학법으로 ELAM의 발현을 관찰한 결과, 관찰기간 동안 ELAM의 발현을 인지할 수 없었다 (Fig. 5).

5. In situ hybridization에 의한 ICAM-1 발현 조사

한탄 바이러스 접종 후 내피세포에서 8.48시간에 in situ hybridization으로 ICAM-1의 발현을 조사한 결과 접종 8시간째에 강한 양성반응을 보여 내피세포에 ICAM-1 mRNA가 존재함을 알 수 있었다. 48시간째에도 반응은 강력하게 유지되었다. 반면에 열처리 한탄 바이러스를 접종한 대조군에서는 반응이 상대적으로 미약하였다 (Fig. 6).

고 찰

지금까지의 연구에 의하면 신증후출혈열의 기본적인 병태기전은 전신맥관계 병변으로 인한 혈관투과성의 증가로 여겨지고 있다. 그리고, 신증후출혈열의 병원체인 한탄바이러스 감염시 혈관내피세포의 기능적 변화가 발병기전에 중요한 역할을 할 것으로 추측하고 있다. 신증후출혈열

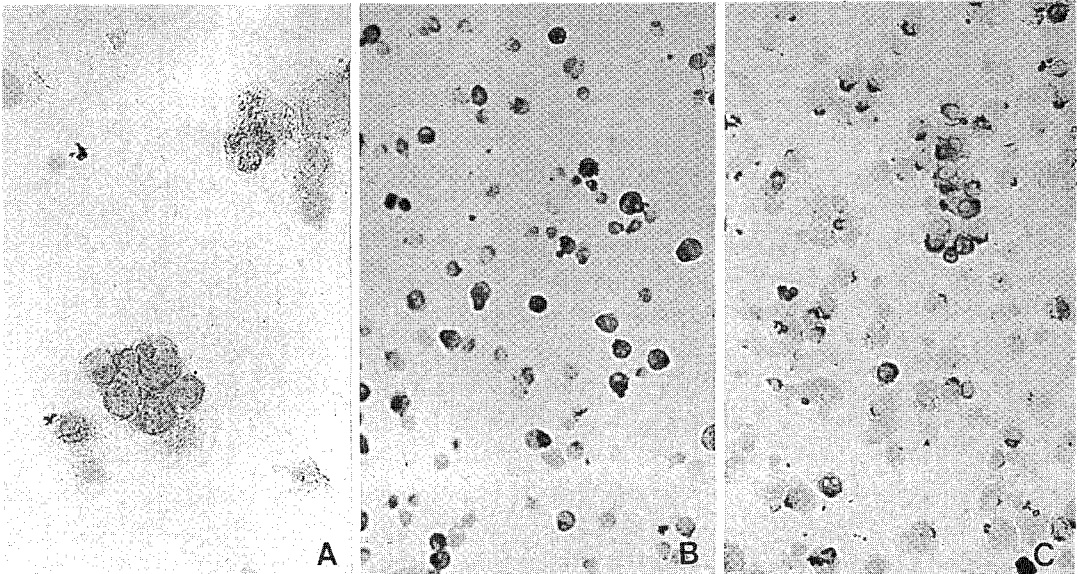


Fig. 3. Demonstration of ICAM-1 expression on the endothelial cells infected with Hantaan virus by immunohistochemistry using monoclonal antibody against ICAM-1. Brown pigmentation of cells indicate expression of ICAM-1. A: 6 hours postinfection, B: 48 hours postinfection, C: 72 hours post infection(original magnification, $\times 200$).

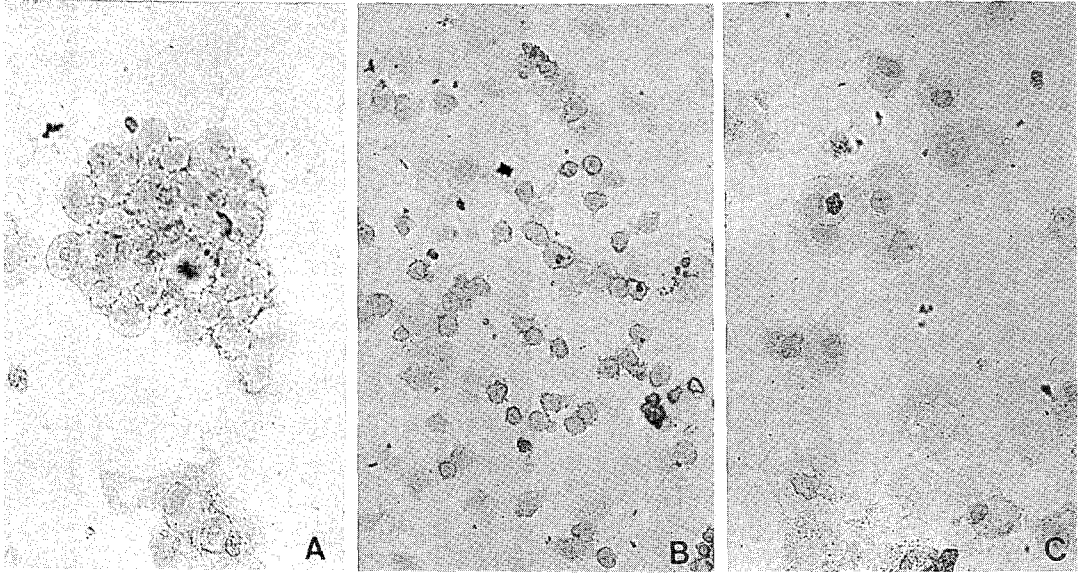


Fig. 4. Demonstration of VCAM-1 expression on the endothelial cells infected with Hantaan virus by immunohistochemistry using monoclonal antibody against VCAM-1. **A:** 6 hours postinfection, **B:** 48 hours postinfection, **C:** 72 hours post infection (original magnification, $\times 200$).

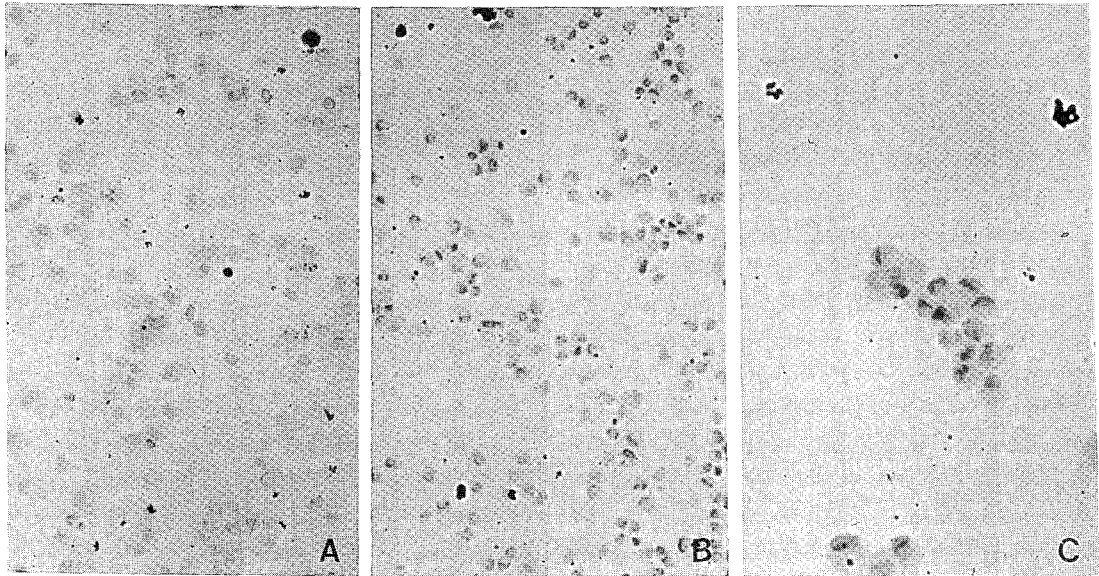


Fig. 5. Negative expression of ELAM on the endothelial cells infected with Hantaan virus. **A:** 6 hours postinfection, **B:** 48 hours postinfection, **C:** 72 hours post infection (original magnification, $\times 200$).

환자의 부검소견상 혈관내피세포가 손상되고 또한 혈관벽의 부종과 맥관구조의 파괴가 관찰되었다 [27]. 또한 신증후출혈열증 nephropathia epidemica에서도 혈관내피세포의 구조적 변화가 전자현미경을 사용하여 관찰되었다 [28]. 임상적으

로도 병초기에 점상출혈이 관찰되고 지혈대 (tourniquet) 시험이 양성이며 후복막강내 연조직의 심한 부종과 출혈 등이 관찰되어 모세혈관이 손상되었음을 알 수 있고 [8, 9, 29, 30], 검사소견상 혈장 factor VIII:Ag, kinin 계의 활성화도가 증가

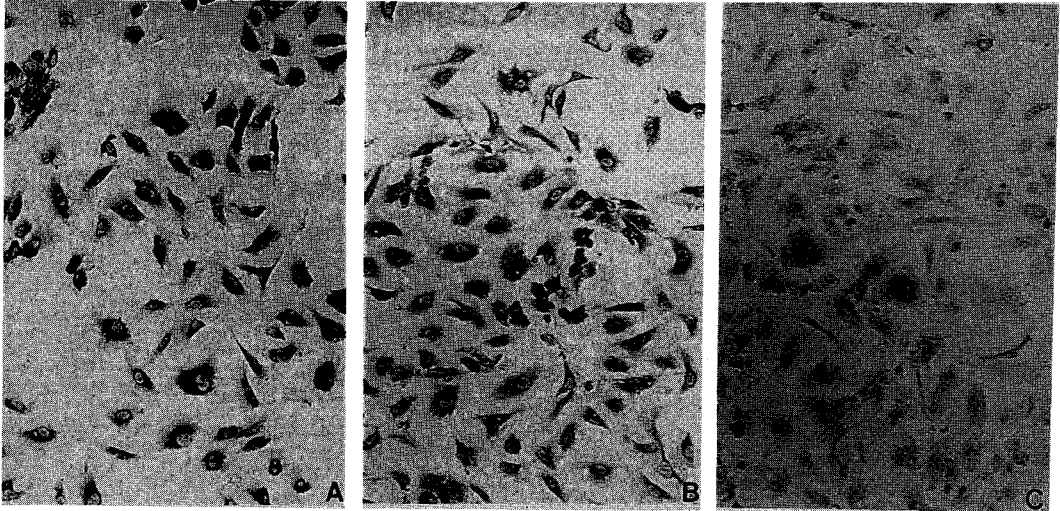


Fig. 6. *In situ* hybridization for ICAM-1 mRNA. The cells were infected with Hantaan virus. *In situ* hybridization was performed at 8 hr and 24 hr postinfection. Digoxigenin labelled probe for ICAM-1 was used. Most of the cells showed strong reaction. **A:** 8 hours postinfection, **B:** 48 hours postinfection, **C:** control cells inoculated with inactivated virus.

하며 [31], angiotensin converting enzyme (ACE) 의 활성도도 감소하였다는 [32, 33] 연구성적들은 병태생리에 혈관내피세포가 관여할 가능성을 뒷받침한다. 한탄바이러스가 사람의 제대정맥내피세포 배양세포주에 감염되고 증식함이 보고되었고, 이 연구결과를 이용하여 신증후출혈열의 병태기전을 규명하는 연구가 진행되었다 [4, 34].

이 실험에서 배양한 세포가 혈관내피세포임을 확인하기 위하여 vWF에 대한 간접형광항체법을 실시하였다. 그 결과 핵주위에 많은 과립형의 형광항원들을 관찰할 수 있었고, 이것은 vWF로서 인정되어 본 실험에 사용된 배양세포가 혈관내피세포 유래임을 알았다. 그리고, 내피세포에서 한탄바이러스의 증식을 확인하는 과정을 거쳤다. 한탄바이러스 접종후 7일째에 내피세포에서 한탄바이러스에 대한 단클론항체를 이용하여 면역조직화학법으로 바이러스항원을 조사한 결과, 세포질내 과립성 항원을 관찰하였다. 즉, 배양된 내피세포에서 한탄바이러스가 증식하였음을 확인하였다.

항원에 대한 방어와 조직손상을 일으키는 숙주반응에서 백혈구의 이동은 매우 중요한 역할을 한다 [35]. 백혈구의 이동은 면역반응이나 염증반응 외에도 림프구 순환시에도 일어나는 것으로 알려져 있다. 백혈구이동의 첫 단계는 혈관벽에 백혈구의 부착이다 [36].

이 연구에서도 한탄바이러스 감염 내피세포의 기능적 변화를 관찰하여 신증후출혈열의 병태기전을 이해하기 위하여 염증세포와의 관계를 실험하였다. 한탄바이러스가 증식한 내피세포에 사람 말초혈액 단핵구 부착실험을 실시하여 한탄바이러스 감염 내피세포에 말초혈액유래 단핵구의 부착이 증강되는 것을 확인하였다. 단핵구의 부착이 증강된 것은 한탄바이러스 감염으로 인한 내피세포표면에 바이러스항원의 출현때문으로 생각하였다. 이 연구에서 더 이상의 명확한 규명을 하지는 못하였다. 그러나 단순포진바이러스 감염 내피세포에 대한 연구에서 단순포진바이러스의 당단백 E가 내피세포 표면에 표현되고 이것이 Fc receptor 기능을 한다고 보고한 연구결과와 비교해 볼때 한탄바이러스 항원의 출현으로 내피세포에 단핵구의 부착이 증강된다는 가능성이 타당하다고 여겨졌다 [37]. 결과적으로 내피세포에 염증세포의 부착으로 이들 세포에서 유리되는 효소들에 의해 내피세포의 손상이 일어날 수 있다고 생각하였다.

신증후출혈열의 병리소견은 신세뇨관 피사와 함께 주로 CD8⁺ 림프구로 구성된 염증세포들의 신세뇨관간질내 침윤이 특징적이다. 그러나, 신세뇨관 간질에 단핵구의 선택적인 침윤, 적혈구의 혈관의 유출등의 시간적 단계나 병태기전이 아직은 명확하지 않다. 이 실험에서 한탄바이러

스가 증식한 내피세포에 사람 말초혈액 단핵구 부착실험을 실시하여 한탄바이러스 감염 내피세포에 단핵구의 부착이 증강되는 것을 확인하였다. 따라서, 내피세포와 단핵구간의 상호작용이 있음을 추측할 수 있었다. 그러나, 부착된 단핵구가 어떤 종류인지를 실험하지 못하였다.

여러가지 원인에 의한 염증반응은 혈관주위에 다양한 염증세포의 침윤을 동반하며 이러한 염증세포가 체내의 염증부위를 인식하고 혈관내피세포를 통과하여 조직의 간질로 침윤되는 기전은 아직 알려져 있지 않지만, 내피세포와 염증세포의 세포표면에 발현되는 여러 분자들에 의한다고 생각되어지고 있다.

부착분자들의 작용강도는 여러가지 항체를 이용한 실험에서 밝혀졌는데, VCAM-1 분자가 일차적으로 림프구의 부착에 관여하며 이차적으로 ELAM-1, ICAM-1등이 추가부착에 관여하는 것으로 알려졌다.

이 실험에서도 한탄바이러스 감염 내피세포에서 VCAM, ELAM, ICAM의 발현 여부를 조사한 결과, VCAM과 ICAM의 발현이 관찰되었고, 그 발현은 바이러스 접종 72시간까지도 유지되었다. 이 결과는 일반적으로 염증이 진행되는 과정에서 부착분자가 발현되고 이들이 관여하여 염증부위로 림프구들이 이동된다는 여러 연구결과와 일치한다. 즉, 한탄바이러스 감염으로 내피세포에서 부착분자들의 발현이 증가되었음을 확인하였다. 다만, 시간경과에 따른 발현정도가 차이가 없어 이에 대한 의문이 과제로 남았다. 또한, 본 실험에서 ELAM의 발현이 거의 없었던 것은 바이러스병에서 다형핵백혈구보다 림프구의 역할이 중요하다는 일반적인 현상과 일치하는 성적이지만 추후 추사가 필요한 것으로 생각하였다.

혈액에서 순환중인 염증세포가 내피세포에 부착하면 내피세포를 통과하여 조직이나 염증부위로 이동하는 과정을 거치는데, 이 과정에는 내피세포에서 분비된 lipid mediator나 cytokine (platelet activating factor, GM-CSF, G-CSF, IL-3, IL-7, TNF, IL-8, MCP-1)들에 의하여 부착세포의 화학주성이 야기되는 것으로 주장되고 있다 [38]. 내피세포를 단층배양한 후 급성염증 상태를 일으켜서 호중구와의 관계를 조사한 결과, 호중구가 내피세포사이로 이동하여 단층배양된 내피세포 아래에 위치함을 관찰하였다 [39]. 이들

의 전자현미경적 관찰에 의하면 부착된 호중구가 내피세포의 세포막을 함몰시키며 위치하였고 두 내피세포사이로 위족 (pseudopod)을 끼워넣으면서 이동이 시작된다고 하였다. Smith *et al.* [40]은 내피세포를 배양후 호중구를 첨가한 실험을 한 결과, 3시간동안 IL-1이나 LPS로 처리한 내피세포층에서 호중구가 모양이 변하고 단층배양의 밑으로 이동하였음을 관찰하였다. 이때 대조실험군은 1%만이 이동하였고, 실험군에서는 35내지 78%의 세포가 이동하였다. Mooser *et al.* [41]도 내피세포를 polycarbonate filter에 배양후 IL-1이나 TNF로 자극을 주고 호중구를 첨가했을때 20 내지 40%의 세포가 내피세포층을 통과하여 아래쪽에 존재한다고 보고하였다. Furie와 McHugh [42]은 사람양수막 세포를 배양후 호중구의 이동을 확인하였다. IL-1이나 TNF- α 등은 호중구의 이동에는 직접적으로 관계가 없는 것으로 알려졌다. 대신에 이들 cytokine이 내피세포에 작용하여 내피세포가 호중구 이동을 활성화시킨다고 생각하고 있다 [43, 44].

이 실험에서 내피세포를 미세한 구멍이 뚫린 합성막 (Transwell plate)에 단층배양후 한탄바이러스를 접종하고 말초혈액 단핵구를 부착시킨 실험을 실시한 결과에서 단핵구가 단층배양된 내피세포사이로 이동하여 합성막위에 위치하고 있음을 관찰하였다. 이런 결과는 다른 실험들의 성적과 일치한다. 이 결과로부터 한탄바이러스 감염의 경우에도 비록 생체내 실험이 아닐지라도 염증세포가 염증부위로 이동한다는 일반적인 현상과 일치함을 알 수 있었다.

신중후출혈열에서 한탄바이러스가 인체에 감염시 혈관내피세포를 침범하여 여러 임상양상을 나타낸다고 생각하여, 한탄바이러스 감염 혈관내피세포가 항원제시세포로 작용하거나 cytokine을 매개로 한 일련의 항원항체 반응으로 ICAM, VCAM, ELAM 등의 부착분자들이 내피세포에 발현되어 특정장기에 병변을 유발하고 범발성혈관내 응고증의 기본병변을 시작할 것으로 가정하여 이를 규명하고자 이 실험을 하였다. 한탄바이러스 감염 내피세포에서 부착분자의 발현을 조사한 실험 결과에 의하면 ICAM-1과 VCAM-1은 내피세포에서 바이러스 감염 6시간째부터 발현되기 시작하여 관찰을 마친 72시간까지 발현됨을 확인하였다. 그러나, ELAM의 경우는 발현을 관찰할 수가 없었다. 이 성적은 신중후출혈열의

병리소견상 단핵구가 주로 침윤되고 다형핵구는 관찰할 수가 없었다는 연구결과와 일치하는 것으로 사료된다. 즉, ELAM의 역할은 주로 다형핵구와 관련된 것인데, 한탄바이러스 감염시 내피세포에서 이 ELAM의 발현이 이루어지지 않았고, 신증후출혈열의 병리소견에서 다형핵구의 침윤이 적었다는 사실과 연관지어 생각하면 타당한 결과라고 생각한다. 그러나, 이 연구에서는 시험관내 실험으로 얻어진 결과이기 때문에 ELAM의 발현이 이루어지지 않은 것에 대한 의문점이 생겼다. 즉, 생체 실험으로는 여러 cytokines의 작용등에 의해 ELAM의 발현이 이루어질 수 있다고 생각하였다. 다만, 본 실험의 결과를 보면 신증후출혈열 환자에서 ELAM의 발현은 VCAM, ICAM에 비하여 적을 것이라고 사료된다.

이 실험에서 ICAM과 VCAM의 발현을 바이러스 접종 6시간후에 관찰한 것은 바이러스의 흡착과정이 이미 90분을 경과하기때문에 급성형을 관찰하기에는 적합하지 않다고 생각하였기 때문이다. 따라서 지연형 연구에 중점을 두었다. 72시간후에도 ICAM, VCAM의 발현이 지속된 것이 다른 연구자들의 성적과 다르지만, 그 원인으로 실험재료, 실험조건 등의 차이로 생각하였다. 다만, 내피세포에서 ICAM을 발현하기 위한 mRNA에 대한 *in situ* hybridization 실험에서 감염 48시간까지 mRNA가 존재함을 알았다. 이로써 지연형 반응에 의한 부착분자의 발현을 확인하였다.

결 론

신증후출혈열의 기본적인 병태기전은 잘 알려져 있지 않지만, Hantaviruses에 의한 혈관내피 손상과 이에 따른 혈관투과성의 증가로 범발성 혈관내 응고증, 혈소판 감소증, 혈액응고 성향의 변화등이 나타난다. 병리학적으로 혈관의 파손이나 내피세포 구성성분의 변화없이 내피세포의 증창, 혈장과 적혈구의 혈관의 유출및 단핵구의 주된 침윤이 관찰된다. 이러한 단핵구의 침윤이 신증후출혈열에서 침범되는 특정장기에 국한되는 현상을 설명하기 위하여는 단핵구와 내피세포의 부착이 중요한 기전으로 추정된다.

본 연구에서는 신증후출혈열의 병태기전의 규명을 위하여 사람제대정맥 내피세포에 한탄바이

러스를 접종한 후에 염증및 면역학적 손상시 백혈구의 이동및 내피세포와의 부착에 중요한 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule (ICAM-1) 및 endothelial leukocyte adhesion molecule (ELAM)의 발현을 관찰하였다. 또한 말초혈액단핵구를 한탄바이러스 접종 내피세포 단층배양에 반응시켜 단핵구의 부착및 이동을 관찰하였다.

사람제대 정맥 내피세포를 분리하고 3-4회 계대배양하여 실험에 사용하였다. 한탄바이러스는 Vero E6세포에서 계대증인 것으로 감염역가가 10^5 pfu/ml인 것을 100배 희석하여 내피세포에 90분간 흡착시켰다. 내피세포에서 한탄바이러스의 증식은 접종 7일째에 면역조직화학법으로 염색하여 확인하였다.

한탄바이러스가 증식한 내피세포는 접종 6시간부터 72시간까지 모두 VCAM-1과 ICAM-1을 발현하였으며, 면역조직화학법에 의해 발현정도의 차이는 관찰할 수 없었다. ICAM-1에 대한 *in situ* hybridization으로 ICAM-1 mRNA의 존재를 확인할 수 있었다.

또한, 관찰기간동안 ELAM의 발현은 없었다. 말초혈액 단핵구가 한탄바이러스 접종 내피세포에 부착된 것을 광학현미경으로 관찰하였고, 전자현미경을 이용하여 단층배양된 내피세포사이로 이동하는 단핵구를 확인하였다.

이상의 결과들로 부착분자중 VCAM-1과 ICAM-1의 발현이 신증후출혈열의 병태기전중 단핵구의 부착및 혈관의 유출에 관여할 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. 고창순, 김원동, 이정상, 이문호: 한국형출혈열의 임상적관찰. 대한내과학회잡지 15:31-40, 1972.
2. 김성권, 표희정, 조보연, 이정상, 이문호: 한국형출혈열에서 혈청보체에 관한 연구. 대한내과학회잡지 21:943-951, 1978.
3. 정상인, 서정국, 강웅택, 유석희, 최철순, 양용태: 한탄바이러스가 사람제대 정맥내피세포 유래 세포주의 혈액응고에 미치는 영향. 대한바이러스학회지 22: 101-111, 1992.
4. Yanagihara R, Silverman DJ: Experimental infection of human vascular endothelial cells by

- pathogenic and nonpathogenic Hantaviruses. *Arch Virol* 111:281-286, 1989.
5. Park JS, Kim S, Lee JS, Lee M: Circulating immune complexes in Korean hemorrhagic fever-hemorrhagic fever with renal syndrome. *Seoul J Med* 26:143-153, 1986.
 6. Wang JR, Yang PZ, Wu Q, Tao S, Xu ZY, Dai ZY: The role of tissue immune complexes, complement activation and immunopathologic injury in the pathogenesis of epidemic hemorrhagic fever. *Chinese Med J* 99:21-26, 1986.
 7. Piessens WF: Immune complex disease, in *Medicine*, edited by Rubenstein E, 1987.8. Lukes RJ: The pathology of thirty-nine fatal cases of epidemic hemorrhagic fever. *Am J Med* 16:639-650, 1954.
 9. Steer A: Pathology of hemorrhagic fever -A comparison of the findings-1951 and 1952. *Am J Pathol* 31:201-221, 1955.
 10. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R: Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 51:1203-1211, 1989.
 11. Harlan JM: Leukocyte-endothelial interactions. *Blood*, 65:513-525, 1985.12. Wallis WJ, Harlan JM: Effector functions of endothelium in inflammatory and immunologic reactions. *Pathol Immunopathol Res* 5:73-103, 1986.
 13. Bevilacqua MP, Wheeler ME, Pober JS, Fiers W, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MAJr: Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion: regulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor. In *Leukocyte Emigration and its Sequelae*, H. Movat, ed. Basel Karger pp 79-93, 1987.
 14. Cotran RS, Pober JS. Endothelial activation: its role in inflammatory and immune reactions. pp. 335-347, Simionescu N, Simionescu M eds, *Endothelial Cell Biology*, Plenum Press, 1988.
 15. Simmons D, Makgoba MW, Seed B: ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* 331:624-627, 1988.
 16. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA: Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52:925-933, 1988.
 17. Beliacqua MP, Strengelin S, Gimbrone MAJr, Seed B: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243:1160-1165, 1989.
 18. Pober JS, Gimbrone MAJr, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA: Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 137:1893-1896, 1986.
 19. Dustin ML, Springer TA: Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* 107:321-331, 1988.
 20. Bevilacqua MP, Wheeler ME, Pober JS, Fiers W, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MAJr: Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9238-9242, 1987.
 21. Dvorak HF, Galli SJ, Dvorak AM: Expression of cell-mediated hypersensitivity in vivo-recent advances. *Int Rev Exp Pathol* 21:199-195, 1980.
 22. Jalkanen S, Steere AC, Fox RI, Butcher EC: A distinct endothelial cell recognition system that controls lymphocyte traffic into inflamed synovium. *Science* 233: 556-558, 1986.
 23. Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA: A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 137: 1270-1274, 1986.
 24. Marlin SD, Springer TA: Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51:813-819, 1987.
 25. Kishimoto TK, Larson RS, Corbi AL, Dustin

- ML, Staunton DE, Springer TA: The leukocyte integrins: LFA-1, Mac-1, and p150. 95. *Adv Immunol* 46:149-182, 1989.
26. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL: Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 52:2757-2764, 1973.
 27. Smorodintsev AA, KazbinsteV LI, Chudakov VG: Viral hemorrhagic fever. GIMIZ Gosudarstvennoe Izdatel'stvo Meditsinkoi Literatuy, Leningrad, 1963.
 28. Jokinen EJ, Lahdevirta J, Collan Y: Nephropathia epidemica: Immunohistochemical study of pathogenesis. *Clin Nephrol* 9:1-5, 1978.
 29. Kessler WH: Gross anatomic features found in 27 autopsies of epidemic hemorrhagic fever. *Ann Intern Med* 38:73-76, 1953.
 30. Hullinghorst RI, Steer A: Pathology of epidemic hemorrhagic fever. *Ann Intern Med* 38:77-101, 1953.
 31. 장연복, 박선양, 김성권, 김병국, 김웅진, 이문호: 한국형출혈열에서의 혈청보체에 관한 연구. *대한내과학회잡지* 22:878-879, 1979.
 32. 김순배, 양원석, 엄재호, 한진석, 김성권, 이정상: 한국형출혈열에서의 혈청 angiotensin converting enzyme 활성도의 변화. *대한신장학회지* 9:389-395, 1989.
 33. 김순배, 윤형진, 김윤구, 한진석, 김성권, 이정상: 급성신부전 환자에서 혈청 ACE 활성도의 변화. *대한신장학회잡지* 8:47-52, 1989.
 34. 강용택, 유석희, 정상인: 사람제대정맥내피세포의 한탄바이러스 감염. *대한내과학회잡지*, 44:613-622, 1993.
 35. Grant L: The sticking and emigration of white blood cells in inflammation, p205, Zweifach BW, Grant L, Mccluskey RT eds., *The Inflammatory Process*, Vol. II. Academic Press, New York., 1973.
 36. Wilkinson PC: Chemotaxis and Inflammation, p 90 and p183, 2nd ed., Churchill Livingstone, New York, 1982.
 37. Visser MR, Jacob HS, Goodman JL, McCarthy JB, Furcht LT, Vercellotti GM: Granulocyte mediated injury to Herpes simplex virus infected human endothelium. *Lab Invest* 60:296-304, 1989.
 38. Albelda SM, Smith CW, Ward PA: Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 8: 504-512, 1994.
 39. Beesley JE, Pearson JD, Hutchings A, Carleton JS, Gordon JL: Granulocyte migration through endothelium in culture. *J Cell Sci* 38:237-248, 1979.
 40. Smith CW, Roghlein R, Hughes BJ, Mariscalco MM, Schmalstieg FC, Anderson DCL Recognition and gransendothelial determinant from CD1-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J Clin Invest* 82:1746-1756, 1988.
 41. Moser R, Scheiffenbaum B, Groscurth P, Fehr J: Interleukin1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J Clin Invest* 83:444-455, 1989.
 42. Furie MB, McHugh DD: Migration of neutrophils acrsendta monolaters is stimulated by treatment of the monolayers with interleukin-1 or tumor necrosis factor alpha. *J Immunol* 143:3309-3317, 1989.
 43. Breviario F, Bertocchi F, Dejana E, Bussolino F: IL-1 induced adhesion of polymorphonuclear leukocytes to chltured human endothelial cells. role of platelet-activating factor. *J Immunol* 141: 3391-3397, 1988.
 44. Bussolino F, Camussi G, Baglioni C: Synthesis and release of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin 1 alpha. *J Biol Chem* 263:11856-11861, 1988.