

## Herpes Simplex Virus Type-1 (HSV-1) 감염에 따른 세포내 유리 $Ca^{2+}$ 농도의 변화

남윤정 · 이규철 · 이찬희\*

충북대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>1</sup>충북대학교 유전공학연구소

Herpes simplex virus type-1 (HSV-1)의 감염에 따른 세포내 유리 칼슘농도의 변화에 대한 실험을 수행한 결과, HSV-1이 Vero 세포에 감염한 후 4 시간째에 세포내 칼슘농도가 최대로 감소한 것을 알았으며 이러한 세포내 유리 칼슘농도의 감소는 감염성 바이러스의 양에 따라 커지며, 유전자 발현 억제제의 처리나 바이러스의 불활성화에 의해 극복되었다. 따라서 바이러스의 유전자발현이 세포내 유리 칼슘농도의 감소에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 또한 Vero 세포에 바이러스를 감염시키고 미세소관 안정제인 taxol을 처리하면 4 시간째의 세포내 유리 칼슘농도의 감소가 극복된다는 사실로부터 바이러스의 유전자 물질의 이동에는 미세소관이 관여한다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 실험 결과로부터 Vero 세포에서 HSV-1에 의해 유도되는 세포내 유리칼슘 농도의 감소는 HSV-1 증식과 밀접한 관계를 가진다고 생각된다.

Key words □ calcium, herpes simplex virus

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)의 유전자는 대략 150 kbp의 선형 이중 나선의 DNA로 구성되었으며(5), 약 80 여종의 단백질을 암호화하고 있다(24). 그리고 HSV-1 유전자는 발현되는 시기에 따라 즉시 초기 유전자들 (immediate early genes,  $\alpha$ -genes), 초기 유전자들 (early genes,  $\beta$ -genes), 그리고 후기 유전자들 (late genes,  $\gamma$ -genes)로 나눌 수 있으며 유전자 발현은 cascade 형태로 정확하게 조절된다(6). 바이러스가 세포 안에 들어가면 세포내의 여러 생리적 변화를 일으키며 이러한 변화는 바이러스의 증식에 매우 중요한 것으로 알려져 있다. 이와 같은 세포내의 생리변화는 휴지상태 ( $G_0$  상태)의 세포들이 여러 종류의 성장인자나 호르몬에 의해 활성화될 때 나타나는 다양한 세포생리 변화와 거의 흡사하다.

HSV-1은 다른 Herpesviridae에 속하는 바이러스의 공통적인 특징인 잠복감염(latent infection)을 한다. HSV-1은 인체의 상부에 주로 감염하며 피부계통의 질병을 일으키나, 경우에 따라서는 신경계통에 감염하여 치명적인 뇌막염을 일으키기도 한다. 또한 잠복성 감염으로부터의 재발감염은 특히 면역기능이 약화된 사람들에게 중요한 문제가 되고 있다. *In vivo*에서 HSV-1이 초기감염 후 잠복감염으로 바이러스의 생활사가 바뀌는 곳은 주로 신경계통의 세포들이다(29). 그런데 신경세포는 세포주위의 미세 환경변화를 인지하고 이에 대응하는 기작을 지니고 있으며 이런 현상은 신호전이 기작 중의 일부 현상으로 이해하고 있다. 즉 신경세포가 외부신호를 인식하고 그 결과로 신

경전달물질이 분비됨으로써 신경세포간의 신호전달이 되는데 이 때  $Ca^{2+}$ 이 이차전령물질로 작용하고 있다는 것이다(4). 따라서 본 연구는 *in vitro*에서 HSV-1이 감염된 세포에서 나타나는 생리현상 중 세포내 유리 칼슘 농도의 변화와 바이러스와의 관계를 알아보려고 하였고, 이는 바이러스에 의한 신경세포에서의 재활성화에 따르는 신경성 질환기작을 좀 더 이해하며 또한 신호전이계와의 관계를 알아보는 데도 도움이 될 것이라 생각한다.

### 재료 및 방법

#### 세포배양 및 배지

African green monkey kidney 세포인 Vero 세포를 본 실험에 사용하였고, 세포성장에는 Eagle's minimum essential medium (EMEM)에 10%의 newborn calf serum (NCS)과 0.075%의 sodium bicarbonate ( $NaHCO_3$ )를 첨가한 성장배지를 이용하여 75  $cm^2$  조직배양용 플라스크에서 배양하였다. 세포배양이 세포배양용 접시에서 이루어질 때에는 0.22%의 sodium bicarbonate가 함유된 EMEM을 사용하였으며 완전히 자란 세포는 세포단층을 유지하기 위하여 2% NCS가 함유된 유지배지를 사용하였다. 세포배양의 적절한 산성도를 유지시켜 주기 위해 5%의  $CO_2$  대기농도가 유지되도록  $CO_2$  배양기를 이용하였다.

#### 약제

본 연구에 사용한 약품 중 RNA 합성억제제인 cordycepin과 단백질 합성 억제제인 cycloheximide는 Sigma Chemica Co. (St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였다. 미세소관의 분해 과정에 영향을

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 043-261-2304, Fax: 043-273-2451  
E-mail: chlee@cbucc.chungbuk.ac.kr

미치는 taxol은 Molecular Probes (Eugene, U.S.A.)에서 구입하였다. 바이러스의 DNA 합성만 특이적으로 억제하는 acyclovir는 Burroughs Wellcome (Research Triangle Park, U.S.A.)으로부터 주사용 분말로 구입하였다.

### 바이러스

모든 실험에 사용된 바이러스는 HSV-1 strain McIntyre이며, 한국 화학 연구소 (대전)의 이 중교 박사로부터 얻었다. HSV-1 stock을 얻기 위해서 세포배양용 플라스크 (75 cm<sup>2</sup>의 배양면적: T75)에서 자란 Vero 세포의 단층에 약 0.01-0.05 plaque forming unit (pfu)/cell로 바이러스를 접종시키고 37°C에서 1 시간동안 흡착 후 바이러스를 제거한 뒤 유지배지를 첨가하여 배양하였다. 바이러스감염 2-3 일 후 플라스크 자체를 -65°C에서 얼려 바이러스의 증식을 멈추게 한 후 37°C에서 초음파분쇄를 하였다. 이렇게 얻은 바이러스 stock은 2 ml 또는 5 ml씩 나누어 표시하여 -65°C에 보관하였다.

### 플라크 (Plaque) 분석

바이러스를 상온에서 10진 희석하여 희석액 소량 (0.2 ml)을 35 mm 세포배양용 접시에 배양한 Vero 세포단층에 접종한 뒤, 37°C에서 1 시간 동안 흡착시킨 다음 overlay medium을 넣었다. Overlay medium은 EMEM에 2% NCS, 0.225% sodium bicarbonate, 1% carboxymethylcellulose (CMC), 40 µg/ml gentamycin (동신제약, 평택), 그리고 1 µg/ml Fungizone (Biological Ind., Israel)을 넣어준 것이다. 바이러스를 접종한지 24-36시간 후 10% 포르말린으로 세포를 고정시켰다. 다음날 overlay medium을 제거시킨 뒤 0.03% 메틸렌 블루로 염색하여 해부현미경으로 플라크의 수를 세었다.

### 감염성 바이러스의 생성

약제들에 의한 HSV-1의 증식 억제 효과는 면적이 대략 4 cm<sup>2</sup>인 Leighton tube에서 자란 Vero 세포단층에서 증식한 감염성 바이러스를 정량함으로써 결정하였다. Vero 세포단층에 MOI (multiplicity of infection)가 1-3 pfu/cell이 되게 바이러스를 접종시켰다. 바이러스의 흡착 (37°C에서 1 시간)이 끝난 후 약제를 적절한 농도로 유지배지에 섞어 넣어 주었다. 약제 첨가 24-36 시간 후 tube를 -65°C에 얼림으로써 바이러스의 증식을 중단시켰다. 바이러스는 37°C에서 녹인 후 30초 동안 초음파분쇄해서 수확하였다. 감염성 있는 바이러스의 정량은 플라크 분석에 의해 실행하였다.

### 세포내 유리 칼슘 농도 측정

HSV-1에 감염된 Vero 세포에서의 세포내 유리 칼슘 농도 (intracellular free calcium concentration: [Ca<sup>2+</sup>])를 측정하기 위해 형광지시제인 Fura-2/AM (Molecular Probes)을 사용하였다. 60 mm 세포배양용 접시에서 배양된 세포가 단층을 형성하게 되면 바이러스를 MOI가 3 pfu/cell이 되게 접종하고 1 시간 동안 흡착시킨 뒤 D-PBS (w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O)로 세척하고 2% NCS가 포함된 유지배지를 첨가

하였다. 이 때를 감염 후 0 시간으로 하여, 감염 후 0, 4, 8, 또는 12 시간이 지난 다음에 각각의 세포를 D-PBS로 세척한 뒤 Fura-2/AM을 0.5 ml의 loading buffer (10 mM Hepes, pH 7.4, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 10 mM sodium pyruvate, 0.02% Pluronic F-127)에 3 µM이 되게 넣어준 뒤 37°C에서 40분 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 트립신 처리에 의해 세포를 단세포화해서 수확한 뒤, 0.01%의 트립신 억제제(Sigma, U.S.A)가 포함된 loading buffer로 1회 세척했다(17). 그 다음에 정상적인 loading buffer로 2회 세척한 후 fluorescence spectrophotometer (Model F-3000, Hitachi, Tokyo, Japan)로 형광의 정도를 측정하여 세포내 유리 칼슘 농도를 알아보았다. Excitation과 emission 파장은 각각 340 nm와 500 nm를 사용하였다.

## 결 과

### HSV-1 감염에 따른 세포내 유리 칼슘농도의 변화

HSV-1이 Vero 세포에 감염한 후 세포내의 유리 칼슘농도가 어떻게 변하는지를 알아보기 위해 바이러스를 세포에 감염시키고 (MOI=3 pfu/cell), 형광칼슘지시제인 Fura-2/AM을 세포에 유입시킨 후 형광값을 측정하여 알아보았다. 바이러스 감염 후 0 시간에서 12 시간까지 4 시간 간격으로 형광값을 측정해서 바이러스가 감염되지 않은 세포 (mock-infected cell)의 형광값과 비교해 본 결과 바이러스 감염 후 4 시간째에 형광값이 약 25% 정도 감소하였고, 그 이외의 시간에서는 특별한 변화를 감지하지 못하였다(Table 1).

### HSV-1의 감염성과 세포내 유리 칼슘농도의 변화의 관계

Table 1에서 보는 바이러스의 감염에 의한 세포내 4 시간째의 칼슘농도의 급격한 감소현상이 정말 바이러스의 감염에 의한 결과인지 알아보기 위해 다음의 일련의 실험을 하였다. 먼저 바이러스를 자외선 조사와 55°C에서의 열처리에 의해 바이러스의 활성을 없애준 뒤, Vero 세포에 감염시키고 나서 4 시간째에 Fura-2/AM의 형광값에 의한 세포내 칼슘의 양을 측정하여 정상적인 바이러스를 감염시킨 것과 비교하여 보았다. 실험결과 정상적인

Table 1. The calcium response of Vero cells to HSV-1 infection

Hours postinfection	Fluorescence ± SD <sup>a</sup>		Ratio <sup>b</sup>
	Mock-infected	HSV-1-infected	
0	110.9 ± 1.04	104.8 ± 0.48	0.95
4	119.4 ± 0.69	85.9 ± 0.94	0.72
8	105.3 ± 0.65	103.4 ± 1.01	0.98
12	109.3 ± 0.45	112.9 ± 0.89	1.03

<sup>a</sup>Standard deviation.

<sup>b</sup>Fluorescence in HSV-1-infected cells/fluorescence in mock-infected cells.

Confluent Vero cells grown in 60 mm petri dishes were infected with HSV-1 at MOI of 3 pfu/cell. At selected time after infection, cells were loaded with Fura-2/AM (3 µM) and the fluorescence was measured.

**Table 2.** Effect of UV and heat treatment on intracellular free calcium concentration in HSV-1-infected Vero cells

Treatment	Fluorescence ± SD <sup>a</sup>	Ratio <sup>b</sup>	% of change
Mock	80.2 ± 0.31		
HSV	62.2 ± 0.63	0.78	
HSV/Heat <sup>c</sup>	76.5 ± 0.94	0.95	+17
HSV/UV <sup>d</sup>	82.9 ± 0.94	1.03	+25

<sup>a</sup>Standard deviation.

<sup>b</sup>Fluorescence, HSV-1/Mock-infected cells.

<sup>c</sup>Incubated for 1 hr at 55°C.

<sup>d</sup>Irradiated for 1 hr at 366 nm.

Vero cells grown in 60 mm petri dishes were infected with infectious HSV-1 (MOI=3 pfu/cell) or infected with UV- or heat-inactivated virus. At 4 hr p.i., cells were loaded with Fura-2/AM (3 μM) and the fluorescence was measured.

바이러스가 감염한 세포에서는 형광값이 22% 감소하였으나 불활성화된 바이러스의 경우에는 mock-infected 세포와 거의 비슷한 수준의 형광값을 나타냈다(Table 2). 즉, 불활성화된 바이러스는 세포내 유리 칼슘 농도의 변화에 별다른 영향을 미치지 못하였음을 알 수 있었다.

다음으로 바이러스 감염에 의한 세포내 유리 칼슘농도의 변화와 감염성 바이러스양과는 어떤 관계가 있는지를 알아보기 위해 감염성 있는 바이러스의 양을 MOI가 0에서부터 30까지 변화시켜 주어 Vero 세포에 감염시킨 뒤 칼슘농도의 감소폭이 제일 큰 4 시간째에 세포내 칼슘의 양을 측정하였다. MOI가 0.1에서 1, 3, 10으로 증가함에 따라 형광값은 3.2, 19.9, 27.8, 그리고 39.7%로 그 감소폭이 점점 커지는 것을 알 수 있었다(Table 3).

**HSV-1 유전자 발현과 세포내 유리 칼슘농도의 변화**

감염성 있는 바이러스에 의해서 세포내 유리 칼슘농도의 변화가 일어난다는 것을 앞의 여러 실험을 통해서 알아보았다. 다음으로 이런 변화가 단순히 바이러스와 세포와의 결합에 의한 것인지 아니면 바이러스 유전자의 발현과 관련이 있는 것인지를 알아보고자 하였다. 먼저 HSV-1의 세포내이동에 관여하는 미세소관의 분해과정을 억제하는 약제인 taxol을 바이러스 감염 후 유지배지에 섞어주고 난 뒤 4 시간째와 8 시간째에 세포내 유리 칼슘농도를 측정하였다. 실제로 약제처리에 의해 4 시간째에 나타나는 칼슘농도의 감소가 극복되었으며 8 시간째에도 정상적인

**Table 3.** Effect of different MOI on intracellular free calcium concentration in HSV-1-infected Vero cells

MOI	Fluorescence ± SD <sup>a</sup>	% of control	% of change
0	109.1 ± 1.12	100	
0.3	105.6 ± 1.24	96.8	-3.2
1	88.3 ± 2.52	80.1	-19.9
3	78.8 ± 0.71	72.2	-27.8
10	65.8 ± 2.37	60.3	-39.7

<sup>a</sup>Standard deviation.

Vero cells grown in 60 mm petri dishes were infected with HSV-1 at various of MOI. At 4 hr p.i., cells were loaded with Fura-2/AM (3 μM) and the fluorescence was measured.

**Table 5.** Effect of metabolic inhibitors on intracellular free calcium concentration in HSV-1-infected Vero cells

Treatment	Fluorescence ± SD <sup>a</sup>		Ratio <sup>b</sup>	% of change
	Mock-infected	HSV-1-infected		
None	119.8 ± 0.92	86.5 ± 1.39	0.72	
Cordycepin <sup>c</sup>	112.3 ± 3.18	113.6 ± 0.50	0.93	+21
Cycloheximide <sup>d</sup>	122.2 ± 0.85	118.7 ± 0.28	0.97	+25
Acyclovir <sup>e</sup>	113.8 ± 1.41	91.9 ± 3.47	0.81	+9

<sup>a</sup>Standard deviation.

<sup>b</sup>Fluorescence, HSV-1/Mock-infected cells.

<sup>c</sup>Inhibitor of RNA synthesis, 20 μg/ml.

<sup>d</sup>Inhibitor of protein synthesis, 10 μg/ml.

<sup>e</sup>Inhibitor of HSV-1 DNA synthesis, 0.225 μg/ml.

상태의 세포의 칼슘농도와 큰 차이가 없었다(Table 4). 그러므로 4 시간째 일어나는 칼슘농도의 최대감소는 바이러스의 유전자 발현과 밀접한 관련이 있다는 것을 알 수 있었다.

다음 단계로는 바이러스 감염 후 유전자 발현을 억제하는 약제를 처리해주고 4 시간째에 칼슘의 양을 측정하였다. 이 실험에 사용한 약제로는 RNA 합성을 억제하는 cordycepin, 단백질 합성 억제제인 cycloheximide, 그리고 바이러스의 thymidine kinase만을 특이하게 억제하는 acyclovir였다. Table 5에 나타낸 바와 같이 cordycepin 및 cycloheximide를 처리해준 경우에는 정상적인 바이러스에 의한 세포내 유리 칼슘농도의 감소효과가 거의 극복

**Table 4.** Effect of taxol on intracellular free calcium concentration in HSV-1-infected Vero cells

Hours postinfection	Treatment	Fluorescence ± SD <sup>a</sup>		Ratio <sup>b</sup>	% of change
		Mock-infected	HSV-1-infected		
4	None	145.8 ± 2.69	115.2 ± 1.27	0.80	
	Taxol <sup>c</sup>	132.0 ± 0.57	133.7 ± 0.57	1.01	+26
8	None	119.2 ± 5.02	117.5 ± 2.97	0.99	
	Taxol	116.2 ± 5.16	112.1 ± 1.98	0.97	-2

<sup>a</sup>Standard deviation.

<sup>b</sup>Fluorescence, HSV-1/Mock-infected cells.

<sup>c</sup>Concentration, 0.1 μM.

된 반면 acyclovir의 경우에는 약간의 감소효과를 극복하였다.

## 고 찰

외부의 자극에 대한 반응으로써 세포는 다양한 생리적 변화를 나타내며, 특히 1신호전이에 관여하는 이차전령물질인  $Ca^{2+}$ , cyclic nucleotide (cAMP, cGMP), diacylglycerol (DG)과 같은 인자들의 변화를 초래하고 이러한 변화현상들은 몇몇 특정한 바이러스, human cytomegalovirus (HCMV)에 감염된 세포에서 뚜렷이 나타나고 있으며 이 과정은 바이러스 자신이 증식하기에 보다 더 좋은 환경을 만들고자 하는 과정으로 이해되고 있다(1). 최근 들어 이런 관점에서 바이러스와 숙주세포와의 관계를 정립하고자 노력하였고 그 결과 많은 연구결과들이 많이 보고되었다. 특히 바이러스의 증식과  $Ca^{2+}$ 과의 상호관계에 의한 여러 현상들이 많이 보고되었다(10,16,21,25,27). 보통 herpes simplex virus type 1 (HSV-1)은 점막조직에서 일차감염 후에 신경세포인 dorsal root ganglia에서 잠복감염을 하다가, 신체의 생리적 변화, 예를 들면 스트레스나 면역기능 약화 등에 재발감염이 나타나게 된다. 신경세포에서의 기능상  $Ca^{2+}$ 이 매우 중요한 역할을 하고 있다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 따라서  $Ca^{2+}$ 에 영향을 받는 신경세포에서 잠복상태로 존재하다가 재발감염하는 HSV-1 역시  $Ca^{2+}$ 과 어떤 연관성이 있으리라 생각된다.

이러한 가능성을 검증해 보기 위해 HSV-1을 Vero 세포에 감염시킨 뒤 시간대별로 세포내 유리 칼슘농도를 측정해본 결과 일시적이지만 세포내 유리 칼슘농도가 급격히 감소하였음을 알 수 있었다. 그런데 HSV-1과 같은 허피스계통의 HCMV의 경우 사람의 fibroblast 세포에 감염하게 되면 세포 외부로부터의 칼슘의 유입을 촉진하고 결국에는 세포내 유리 칼슘농도를 증가시키며(22,27), HIV에 의해 유도된 T-cell의 hyporesponsiveness가  $Ca^{2+}$ 과 protein kinase C와 관련이 있다는 보고도 있으며(26), Epstein-Barr virus (EBV)가 감염된 B 림프구에서도 세포내 유리 칼슘농도가 증가되었다는 보고가 있다(11). 한편 Chinook salmon embryo (CHSE) 세포에 감염하는 Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)의 경우에는 세포내의 유리 칼슘농도가 감소된다는 보고도 있다(17). 이와 같이 여러 종류의 바이러스가 세포에 감염한 뒤 일어나는 세포내 유리 칼슘 농도의 변화는 일정하게 나타나는 것은 아니고 바이러스가 지니고 있는 특징에 의한 것이 아닌가 생각된다. 우선 HSV-1과 상반되는 HCMV는 감염된 세포의 DNA합성을 유도하고(33,34), *fos*, *myc*, 그리고 *jun*과 같은 세포내 proto-oncogene의 발현을 촉진하는(7) 등 세포의 활성화에 관여하는 대표적인 바이러스로 알려져 있다(3). 결국 세포의 활성화가 이루어지면 세포내의 유리 칼슘 농도가 증가되고 이런 과정을 HCMV가 야기하기 때문에 세포내 유리 칼슘 농도가 증가하였다고 생각된다. 그러나 대부분의 RNA 바이러스는 세포내 유전자 발현을 억제하는 것으로 알려져 있고 IPNV도 이런 작용에 영향을 미치므로 세포내 유리 칼슘농도가 감소한 것이라 할 수 있다. 그런데 HSV-1이 세포에 감염하면 HSV-1의 virion host shut-off (*vhs*) 유전자 산물에 의해 세포내의 DNA 합성이 멈추고(31), 단백질의 합성이 억제된다(19,30). 이런 현상은 HCMV에

의한 세포의 활성화와는 거리가 멀고 오히려 IPNV와 비슷하다. 따라서 HSV-1이 세포에 감염하면 세포내 유리 칼슘의 농도가 감소하는 것이 아닌가 생각되나 뚜렷한 증거는 없다.

한편 HSV-1의 유전자 발현 측면에서 본다면 다음과 같이 설명할 수 있다. Harbison 등(14)에 의하면 human immunodeficiency virus (HIV)의 LTR (long terminal repeat)의 발현이 verapamil을 처리해준 임파구세포에서 촉진된다고 하였다. 세포내 유리 칼슘농도가 변하게 되면 숙주세포내에 존재하고 있는 NF-kB (nuclear factor)의 바이러스 LTR 유전자의 promoter에 결합하는 능력이 향상되기 때문에 바이러스의 유전자 발현이 증진된다는 것이다. HSV-1 감염 후 4 시간째에 세포내 유리 칼슘농도가 감소하는데 이 때의 바이러스 유전자 발현은 초기 유전자가 발현되는 시기와 거의 비슷하다. 한편 Lec(20)에 의하면 칼슘 유입 억제제인 verapamil을 HSV-1 이 감염된 세포에 처리해 주면 바이러스의 증식이 억제된다고 하였다. 이와 같은 사실은 HSV-1의 세포 감염 후 세포내 유리 칼슘농도가 일시적인 감소 후 증가하는 과정에 영향을 끼쳤기 때문에 일어난 현상이라 설명할 수 있다. 결국 바이러스의 유전자 발현에 세포내 유리 칼슘 농도의 감소가 영향을 미치는 것이 아닌가 생각된다.

불활성화된 바이러스에서는 세포내 유리 칼슘 농도의 감소현상이 나타나지 않았는데 이것은 감염성 바이러스가 칼슘농도의 변화에 직접적으로 관여한다는 것을 알려주며, 감염성 바이러스 양이 증가할수록 세포내 유리 칼슘농도의 감소폭이 커진다는 본 연구의 결과가 이를 뒷받침한다. RNA 합성 억제제인 cordycepin과 cycloheximide는 바이러스 초반부의 유전자 발현을 효과적으로 억제하였기 때문에 바이러스의 유전자 발현이 이루어지지 않았고 그 결과 세포내 유리 칼슘 농도의 감소가 극복되었다고 생각되며 IPNV에서도 이와 비슷한 결과가 있다(17). 한편 acyclovir의 경우에는 바이러스의 DNA 복제가 감염 후반부에 일어나고 있기 때문에 초반부의 유전자 발현에 별다른 영향을 미치지 못했고 그 결과 세포내 유리 칼슘 농도의 감소 현상을 극복하지 못했으리라 생각되나 단정지어 말할 수는 없다. 왜냐하면 약제농도에 따른 세포내 유리 칼슘 농도의 변화를 알아보지 못했기 때문이다. 만일 약제의 농도가 증가한다 하더라도 세포내 유리 칼슘 농도의 감소현상이 극복되지 않는다면 acyclovir에 의한 9%의 형광값의 증가는 비특이적으로 일어나는 결과일 수도 있기 때문이다. 또한 Kristensson 등(18)과 Sodeik 등(32)의 보고에 따르면 HSV-1의 유전자 이동에 미세소관이 관여한다고 하였으며, 다른 종류의 바이러스 유전자 물질의 이동에도 세포골격이 관여한다는 보고가 있다(2,9,23). 미세소관은 계속적으로 합성 및 분해과정이 일어나고 있는데 만일 이 과정에 영향을 주면 바이러스의 유전자 물질이 제대로 핵내로 운반되지 않기 때문에 바이러스의 유전자 발현은 일어나지 않을 것이며, 따라서 HSV-1 감염에 따른 세포내 유리 칼슘농도의 변화가 일어나지 않을 것이라 생각되었다. Taxol 처리를 한 결과 세포내 유리 칼슘 농도의 변화가 없었다는 사실로부터 바이러스의 유전자 이동에 미세소관이 관여한다는 것을 증명할 수 있었다. 그러나 앞의 여러 가지 실험결과들을 종합해보면 바이러스의 유전자 발현과 세포내 유리 칼슘농도의 변화와는 밀접한 관련이 있는 것 같다.

HSV-1에 의한 세포내 유리 칼슘농도의 일시적인 감소하는 기작에 대해서는 확실히 알 수 없으나 몇 가지 추측할 수 있다. 일반적으로 세포내부의 칼슘농도를 감소시키는 기작에는 세포의 주위환경으로부터의 칼슘의 유입을 억제하는 경우, 세포막에 있는  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiporter나  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase의 활성화에 의해 세포내에 존재하는 칼슘이 외부로 방출되는 경우, 세포내 유리 칼슘이 소포체나 미토콘드리아 같은 세포내부의 칼슘저장소로 이동되는 경우(8), 그리고 바이러스의 특정 단백질이 세포내의 유리 칼슘과 결합하는 경우가 있다(12,16). 결국 HSV-1에 의한 세포내 유리 칼슘농도의 감소 기작을 보다 더 확실히 이해하기 위해서는 여러 가지의 실험들이 뒷받침되어야 하리라 생각된다.

### 참고문헌

- Albrecht, T., M.P. Fons, I. Boldogh, S. AbuBarker, C.Z. Deng, and D. Millinoff. 1991. Metabolic and cellular effects of human cytomegalovirus infection. *Transplant Proc.* 23 suppl 3, 48-55.
- Alexandra, M.A. and L.P. Daniel. 1992. Cleavage of bovine brain microtubule-associated protein-2 by human immunodeficiency virus proteinase. *J. Neurochem.* 59, 874-880.
- Alkon, D.L. and H. Rasmussen. 1988. A spatial temporal model of cell activation. *Science* 239, 998-1004.
- Augustine, G.J. and M.P. Charlton. 1987. Calcium action in synaptic transmitter release. *Ann. Rev. Neurosci.* 10, 633-693.
- Becker, Y., H. Dym and I. Sarov. 1968. Herpes simplex virus DNA. *Virology* 79, 292-301.
- Blair, E.D. and E.K. Wagner. 1986. A single regulatory region modulates both cis activation and trans activation of the herpes simplex virus VP5 promoter in transient-expression assays *in vivo*. *J. Virol.* 60, 460-469.
- Boldogh, I., S. AbuBakar, C.Z. Deng, and T. Albrecht. 1991. Transcriptional activation of cellular oncogenes *fos*, *jun*, *myc* by human cytomegalovirus. *J. Virol.* 65, 1568-1571.
- Carafoli, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 395-433.
- Dales, S. and Y. Chardonnet. 1974. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. *Virology* 56, 465-483.
- Dugas, B., J.F. Delfraissy, A. Calenda, M. Peuchmaur, C. Wallon, M.T. Rannou, and P. Galanaud. 1988. Activation and infection of B cells by Epstein-Barr virus: role of calcium mobilization and of protein kinase C translocation. *J. Immunol.* 141, 4344-4351.
- Dugas, B., J.M. Mencia-Huerta, P. Braquet, P. Galanaud, and J.F. Delfraissy. 1989. Extracellular but not intracellular calcium mobilization is required for Epstein-Barr-Virus-containing supernatant-induced B cell activation. *Eur. J. Immunol.* 19, 1867-1871.
- Eisenmann, G. and O. Alvarez. 1990. Structure and electivity of  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites in proteins: the 5-fold site in an icosahedral virus, p.283-299. In D. Pasu, and F. Bronner (eds.), calcium transport and intracellular calcium homeostasis. NATO ASI Series H48, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Foti, M., L. Cartier, V. Piguat, D.P. Lew, J.L. Carpentier, D. Trono, and K.H. Krause. 1999. The HIV Nef protein alters  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in myelomonocytic cells through SH3-mediated protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 274, 34765-34772.
- Harbison, M.A., S.Y. Kim, M.G. Jacqueline, and S.M. Hammer. 1991. Effect of the calcium channel blocker verapamil on human immunodeficiency virus type 1 replication in lymphoid cells. *J. Infect. Dis.* 164, 53-60.
- Hartshorn, K.L., M. Collamer, M. Auerbach, J.B. Myers, N. Pavlotsky, and A.I. Tauber. 1988. Effects of influenza A virus on human neutrophil calcium metabolism. *J. Immunol.* 141, 1295-1301.
- Hull, R. 1978. The stabilization of the particles of turnip rosette virus. III. Divalent cations. *Virology* 89, 418.
- Kang, K.H., K.S. Park, J.H. Yoon, and C.H. Lee. 1993. Calcium response of CHSE cells following infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Kor. Jour. Microbiol.* 31, 79-84.
- Kristensson, K., E. Lycke, M. Roytta, B. Svennerholm, and A. Vahlne. 1986. Neuritic transport of herpes simplex virus in rat sensory neurons in vitro. Effects of substances interacting with microtubular function and axonal flow [Nocodazole, Taxol and erythro-9-3-(2-hydroxyynonyl)adenine]. *J. Gen. Virol.* 67, 2023-2028.
- Kwong, B.S. and N. Frenkel. 1987. Herpes simplex virus-infected cells contain a function(s) that destabilizes both host and viral mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 1926-1930.
- Lee, C.H. 1986. Papaverine inhibition of human cytomegalovirus replication: Cellular and molecular mechanisms. Ph D. Dissertation, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, U.S.A.
- Li, B.Y., G.F. Qiao, H. Zhou, W.H. Li, Z.G. Huang, and L.W. Zhou. 1999. Cytosolic- $\text{Ca}^{2+}$  and coxsackievirus B3-induced apoptosis in cultured cardiomyocytes of rats. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao* 20, 395-399.
- Marcella, A.B., L.J. Gary, J.A. Natalie, and G.S. Worthen. 1998. Intracellular signaling by the chemokine receptor US28 during human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 72, 5535-5544.
- Margareta, M., D. Johanna, D. Laura, and D. Helena. 1990. Proteolytic cleavage of microtubule-associated proteins by retroviral proteinases. *J. Gen. Virol.* 71, 1985-1991.
- McGeoch, D.J., A. Dolan, S. Donald, and D.H.K. Breuer. 1986. Complete DNA sequence of the short repeat region in the genome of herpes simplex virus type I. *Nucleic Acids Res.* 14, 1727-1745.
- Nemerow, G.R. and N.R. Cooper. 1984. Infection of B lymphocytes by a human herpesvirus, Epstein-Barr virus, is blocked by calmodulin antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 4955-4959.
- Nokta, M.A., M.I. Hassan, J.A. Morgan, K.A. Loesch, and R.B. Pollard. 1994. Protein kinase C and intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$ : relationship to human immunodeficiency virus (HIV)-induced cellular hyporesponsiveness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 207, 284-291.
- Nokta, M., D. Eaton, O.S. Steinsland, and T. Albrecht. 1987.  $\text{Ca}^{2+}$  responses in cytomegalovirus-infected fibroblasts of human origin. *Virology* 157, 259-267.
- Nokta, M., M.P. Fons, D.C. Eaton, and T. Albrecht. 1988. Cytomegalovirus: Sodium entry and development of cytomegaly in human fibroblasts. *Virology* 164, 411-419.
- Price, R.W. 1985. Herpes simplex virus latency: adaptation to the peripheral nervous system II. *Cancer Invest.* 3, 389-403.
- Read, S.A. and N. Frenkel. 1983. Herpes simplex virus mutants defective in the virion associated shut-off of host polypeptide synthesis and exhibiting abnormal synthesis of (immediate early) viral polypeptides. *J. Virol.* 46, 498-512.
- Roizman, B. and P.R. Roane. 1964. Multiplication of herpes simplex virus. II. The relation between protein synthesis and the duplication of viral DNA in infected HEp-2 cells. *Virology* 22, 262-300.
- Sodeik, B., M.W. Ebersold, and A. Helenius. 1997. Microtubule-

- mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell. Biol.* 136, 1007-1021.
33. St. Jeor, S.C. and R. Hutt. 1977. Cell DNA synthesis as a function in the replication of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 37, 65-73.
34. St. Jeor, S.C., T. Albrecht, F.D. Funk, and F. Rapp. 1974. Stimulation of cellular DNA synthesis by human cytomegalovirus. *J. Virol.* 13, 353-362.

(Received September 6, 2000/Accepted October 11, 2000)

---

**ABSTRACT: The Change of Cytosolic Free Calcium Concentration Following Herpes Simplex Virus Type-1 (HSV-1) Infection**

**Youn-Jeong Nam<sup>1</sup>, Gyu-Cheol Lee<sup>1</sup>, and Chan-Hee Lee<sup>1,2\*</sup>**(<sup>1</sup>Division of Life Sciences, College of Natural Sciences, and <sup>2</sup>Research Institute for Genetic Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Infection of Vero cells with herpes simplex virus type-1 (HSV-1) resulted in a series of changes in intracellular free calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). A significant and maximal decrease  $[Ca^{2+}]_i$  was observed at 4 hours postinfection (hr p.i.) in HSV-1-infected in Vero cells. Inactivation of HSV-1 with UV irradiation and heat treatment abolished HSV-1-induced decrease in  $[Ca^{2+}]_i$  at 4 hr p.i. in Vero cells. And the degree of the decrease in  $[Ca^{2+}]_i$  was dependent on the amount of input virus. Taxol, which stabilizes the polymerization of microtubule blocked HSV-1-induced decrease in  $[Ca^{2+}]_i$  at 4 hr p.i., suggesting that microtubule may mediate the transport of HSV-1 nucleocapsid to the nucleus of infected cell. Treatment of HSV-1-infected Vero cells with metabolic inhibitors such as cycloheximide, cordycepin, or acyclovir partially reversed the decrease in  $[Ca^{2+}]_i$  at 4 hr p.i.. Thus, it is suggested that HSV-1 induced decrease in  $[Ca^{2+}]_i$  at 4 hr p.i. in Vero cells may play an important role in the multiplication of HSV-1.