

인체단핵세포주 THP-1세포에서 Human Cytomegalovirus의 잠복감염과 재활성화

윤상임¹ · 문명숙¹ · 이찬희^{1,2*}

¹충북대학교 자연과학대학 생명과학부, ²충북대학교 유전공학연구소

Human cytomegalovirus (HCMV)의 잠복감염으로부터의 재활성화는 면역기능이 저하된 사람에게 높은 치사율을 가져오며, 재활성화 기전의 규명은 매우 중요한 연구과제의 하나이다. HCMV의 잠복감염 부위 중 하나라고 생각되고 있는 인체단핵세포에 대한 HCMV의 영향을 알아보기 위해 여러 분화 단계에 있는 THP-1과 HL-60 세포에 HCMV를 감염시킨 후 생존 세포의 수와 형태적 변화를 살펴보았다. HL-60 세포가 HCMV 감염에 의해 세포 생존이나 형태에 큰 영향을 받지 않는 반면, 좀 더 분화된 세포인 THP-1은 HCMV 감염에 의해 생존 세포의 수가 감소하였고, 형태적 변화도 나타났다. 이러한 형태적 변화는 세포의 응집력의 증가에 의한 것으로 HCMV 감염에 따른 THP-1 세포 표면의 CD11b 발현 증가와 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다. THP-1 세포에 HCMV를 감염시킨 후 잠복감염이 이루어진 것을 확인하고, 세포 분화 유도제인 TPA와 hydrocortisone을 처리하였을 경우 바이러스가 재활성화하여 증식하는지 알아보았다. 바이러스 감염 2일째에 분화시킨 THP-1 세포에서는 분화 5일째부터 다량의 바이러스가 검출되었고, 감염 17일째 분화시킨 세포에서는 분화 후 15일째부터 바이러스가 검출됨을 관찰하였다. 이는 HCMV를 THP-1 세포에 감염 후 분화를 시키면 잠복감염해 있던 HCMV가 재활성화 되는 것이라 생각되고, 잠복해 있던 시간이 길어질수록 바이러스의 재활성화 정도는 지연된다는 것을 의미한다.

Key words □ human cytomegalovirus, latency, monocyte, reactivation

Human cytomegalovirus (HCMV)는 beta-herpesvirus로서 인체에 감염하였을 때 다양한 질병을 일으키는데 이는 주로 인체의 면역기능이 아직 성숙하기 전인 태어나 신생아인 경우에 심각한 질병을 일으킨다. 그러나 많은 경우 바이러스는 명확한 임상적인 질병을 나타내지 않고 체내에 잠복감염을 하게 된다. 잠복으로부터의 재발감염은 장기이식, 면역결핍증 환자 등과 같이 면역기능이 약화되었을 때 치명적인 결과를 초래할 수 있다. 따라서 어떠한 요인이 잠복감염으로부터 HCMV를 활성화시켜 재발 감염에 이르게 하는지에 대한 연구는 HCMV의 병리 기작에 대한 중요한 부분을 차지하고 있다.

PBMC (peripheral blood monocyte)는 HCMV가 잠복해 있는 중요한 부위로(13,14,18,22), 이곳으로부터의 HCMV의 재활성화는 혈구세포의 감염을 통해 심각한 면역억제 현상을 나타낼 수 있다. 따라서 PBMC가 HCMV의 잠복부위로 중요하게 인식되고 있다. 하지만 PBMC는 아주 짧은 기간 동안만 혈액을 순환하고 곧 조직 속으로 침투해 들어가기 때문에 순환하는 기간에 HCMV에 감염된다고는 생각하기 어렵다. HCMV가 잠복해 있는 장소로 골수의 가능성이 제시되었고(9,10), PBMC가 골수에서 분화 발생하는 과정에 PBMC 전구체 단계에서 HCMV에 감염된다는 제안이 있었다(15,21). 그러나 이들 세포에서는 HCMV 유전

자 발현이 일어나지 않고, 혹시 있다 해도 초기 유전자에 국한된다. 이러한 monocyte에서부터 어떻게 HCMV의 재활성화가 이루어지는지 알아보기 위해 다양한 방법으로 monocyte 또는 macrophage의 분화 및 활성화가 시도되었다. LPS를 처리한 monocyte에서 HCMV IE 유전자 발현과 함께 백혈구 증식 억제 효과가 관찰되었으며, TPA (phorbol 12-myristate 13-acetate)와 hydrocortisone을 함께 처리한 monocyte는 macrophage로 분화하면서 HCMV MIE 유전자 발현이 유도되었다(8,19,20). 따라서 monocyte에서의 HCMV 유전자 발현은 macrophage로의 분화를 필요로 한다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 단순히 HCMV에 대한 항체를 가지고 있는, 그러나 임상적 소견은 보이지 않은 건강한 사람에게서 분리한 PBMC에서 바이러스의 DNA는 분리할 수 있으나 감염성 바이러스는 분리할 수 없었다는 이전의 보고들과 일치한다.

이상과 같은 연구를 위해서는 지속적으로 인체로부터 PBMC를 얻고 이를 분류하는 작업을 거쳐야 하는 등 방법이 까다로우며 또 이러한 실험들로부터 균일한 결과를 얻기 힘들다. 이런 단점을 극복하기 위한 방법으로 하나의 실험 모델로써 이용되고 있는 것이 단핵세포주이다. 비록 인체에서 갓 분리해 낸 PBMC로부터 분화시킨 macrophage와 동일하진 않을지라도 TPA나 hydrocortisone 등을 처리하면 macrophage와 유사한 형태적, 기능적 특성을 나타낸다. 이러한 인체단핵세포주 중의 하나인 THP-1 세포를 이용하여 TPA를 처리하였을 때 HCMV의 유전자 발현과 바이러스의 생성을 관찰하였다(19,21). 따라서 단핵세포주에서 세

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

포 특이 인자에 의한 HCMV 유전자의 발현은 세포의 분화와 분명히 관련이 있을 것이라고 추정된다.

본 연구에서는 실험에 손쉽게 사용할 수 있는 인체 단핵세포주인 THP-1과 HL-60 세포를 이용하여 HCMV를 감염시켰을 때 일어나는 세포생물학적인 변화를 보고자 하였으며, HCMV의 잠복감염으로부터 재발감염에 대한 기전을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

세포

본 연구를 위해 인체단핵세포주인 THP-1과 HL-60 세포를 사용했다. RPMI 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 첨가한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. HCMV의 증식을 위한 감수성세포로는 human foreskin fibroblast (HFF) 세포를 사용하였다. 세포의 배양은 10% FBS를 첨가한 Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 사용하였다.

바이러스

바이러스는 HCMV strain Towne을 사용하였다. 감염성 HCMV stock을 얻기 위해 세포 배양용 100 mm 접시에 배양한 HFF 세포 단층에 0.01~0.05 plaque forming unit (pfu)/ml를 접종시킨 후 15분 간격으로 가볍게 흔들어 주어 37°C에서 1시간 동안 흡착시켰다. 바이러스 감염 4~5일 후 세포병변효과가 어느 정도 나타나면 배지를 갈아주고 바이러스를 감염 8~10 일 후에 수확하였다. 세포를 모아 원심분리하여 상층액은 50 ml 원심분리관에 넣고 pellet은 전체 부피의 1/10로 재현탁하여 액체 질소에 2회 얼림과 녹임을 반복하여 초음파 분쇄한 후 다시 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이렇게 얻은 바이러스 stock은 혼합기로 잘 섞은 후 1~2 ml로 나누어 넣고 -70°C에 보관하였다.

바이러스 정량법은 가장 널리 사용되고 비교적 정확한 plaque assay를 이용하였다. 위에서 얻은 바이러스를 상온에서 10진 희석하여 10⁻³부터 10⁻⁵의 바이러스 희석액을 세포 배양용 35 mm 접시에서 배양한 HFF 세포 단층에 접종한 후 1시간 동안 흡착시킨 다음 바이러스를 제거하고 1차 overlay medium (2% FBS, 0.37% NaHCO₃, 0.25% agarose, 100 µg/ml streptomycin, 1 µg/ml amphotericin B가 함유된 DMEM)을 첨가하였다. 바이러스를 감염시키고 7일이 지난 후 같은 조성의 overlay medium을 1차 overlay medium 위에 넣어 주었다. 2차 overlay medium을 넣은 지 7일 정도 후에 10% formalin으로 6시간 세포를 고정하였다. Formalin과 overlay medium을 제거하고 0.03% methylene blue로 염색하여 해부현미경 하에서 plaque의 수를 세었다.

생존 세포수의 결정

세포의 증식을 관찰하기 위해서 살아있는 세포 수와 죽은 세포 수를 측정하기 위해 가장 일반적인 방법인 trypan blue exclusion assay를 사용하였다. 세포 배양 후 2일 마다 0.4% trypan blue (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)에 1:10 희석

하였다. 살아있는 세포는 trypan blue를 흡수하지 않으므로 현미경하에서 밝은 광채를 띠는 반면 죽은 세포는 세포막 파괴에 의해 trypan blue가 침투되므로 파란색으로 보이게 되는 원리를 이용하여 현미경 하에서 세포계수기로 세었다.

세포 형태 관찰

세포의 모양 변화를 보기 위해서 살아 있는 세포로 들어가 형광을 내는 물질인 calcein-AM (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)을 사용하였다. 세포 배양 접시 바닥에 cover slip을 깔고 세포를 넣은 후 TPA (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)와 hydrocortisone (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 처리하거나, HCMV를 감염시켜 배양한 후 1:200 희석한 Calcein-AM을 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 처리하고 PBS로 5분씩 3회 씻어 주었다. 그리고 바닥에 붙은 세포는 PBS/glycerol 혼합액을 넣고 cover slip을 덮은 뒤 테두리를 봉하였다. 반면 부유세포는 일정량을 취하여 slide glass 위에 놓은 후 cover slip으로 덮은 후 관찰하였다. 형광 현미경 (BX50F-3; Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) 하에서 관찰하여 결과를 분석한 후 confocal microscope (MRC 1024; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 적절한 부위를 촬영하여 Confocal Assistant, ver 4.02 프로그램 (Bio-Rad Laboratories)으로 분석하였다.

유세포분석

HCMV에 감염되었거나 감염되지 않은 THP-1 세포를 모아 PBS로 씻어주었다. Trypan blue를 이용하여 생존 세포의 수를 결정한 뒤, 10⁵ 세포를 microcentrifuge tube로 옮기고 700 rpm으로 3분간 원심분리한 뒤 90 µl의 PBS로 재현탁시켰다. 여기에 phycoerythrin (PE)이 부착된 인체 CD11b 분자에 대한 단클론 항체 10 µl를 넣고 30분간 실온에서 배양하였다. PBS 1 µl를 첨가하여 씻어준 뒤 원심분리에 의해 세포를 모았다. 다시 PBS 200 µl를 넣어 재현탁한 뒤 10⁴ 세포를 유세포분석기 (Becton-Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.)로 분석하였다.

X-gal staining

HFF 세포를 배양한 후 SV40 초기 유전자 promotor에 의해 작동하는 β-galactosidase 유전자를 가지는 재조합 바이러스인 HCMV/SV2-β-gal을 감염시켰다. 바이러스를 감염시킨 후 2일 후에 배지를 제거한 다음 PBS로 1회 씻어주고, 2% paraformaldehyde를 1시간 동안 처리하여 세포를 고정하였다. 세포 고정액을 제거하고 PBS로 빠르게 한번 씻어 준 후, 10분 동안 PBS를 넣어주었다. 다시 PBS를 제거한 후 한번 더 씻어주었다. 그리고 X-gal 용액 (0.2 M K₃Fe(CN)₆, 0.2 M K₄Fe(CN)₆, 1 M MgCl₂, 40 µg/ml in dimethyl formaldehyde)을 넣어주었고 세포 배양기에서 반응시켰다. 4~6시간 후에 파란색으로 염색된 세포를 관찰하였다. THP-1 세포의 경우에는 HCMV/SV2-β-gal로 감염시킨지 2일 후에 배양된 HFF세포에 넣어 주어 동시배양을 하였다. 배양액에는 TPA 50 nM 과 hydrocortisone 10 µM이 되게 해주었다. 동시배양을 한지 7일과 10일 후에 X-gal staining을 하여

바이러스에 감염된 THP-1 세포를 알아보았다.

결과 및 고찰

HCMV 감염이 THP-1 세포와 HL-60 세포에 미치는 영향

HCMV가 세포에 미치는 영향을 세포 증식 능력 면에서 알아보기 위해서 THP-1 세포와 HL-60 세포에 각각 감염시켰다. 감염 후 2일째부터 2일간의 간격으로 세포의 수가 변화하는지를 trypan blue exclusion assay를 통해 관찰하였다. 그 결과 HL-60 세포에서는 바이러스에 감염되지 않은 세포 및 감염된 세포에서 7일째까지 세포수가 증가하다가 이후 감소하는 양상이 관찰되었다(Fig. 1). 반면 THP-1 세포에서는 감염되지 않은 정상적인 경우 감염 13일째까지 꾸준히 세포 수가 증가하는 반면 HCMV에 감염된 THP-1 세포는 감염 7일째까지는 감염되지 않은 세포와 비슷하게 증식하다가 이후부터 세포의 수가 급격히 감소하여 감염 13일째에는 생존 세포가 거의 없어진 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

Monocyte/macrophage 분화단계에서 granulocyte monocyte progenitor의 단계에 있는 HL-60 세포의 경우 HCMV의 감염이 세포의 증식에 어떠한 영향을 끼치지 않는 것으로 관찰된 반면, 이보다 monocyte 단계에 더 가까운 THP-1 세포에서는 HCMV의 감염이 감염 후 7일째부터 세포의 증식을 억제하는 것으로 관찰되었다. 이는 좀 더 분화된 THP-1 세포에서만 HCMV 감염에 대한 반응이 있음을 의미한다.

HL-60 세포의 수가 7일째까지 지속적으로 증가하다가 이후 급격히 감소하는 이유는 빠른 세포 분열로 인하여 세포의 수가 증가하여 배양액에 존재하는 성장인자와 같은 영양 물질이 고갈되어 능동적 세포사, 즉 apoptosis가 진행되고(10,23), 이후 괴사가 나타나 완전 사멸한 것으로 생각된다. THP-1 세포는 HL-60 보다 증식 속도가 느리기 때문에 세포 과잉에 의한 사멸은 크게

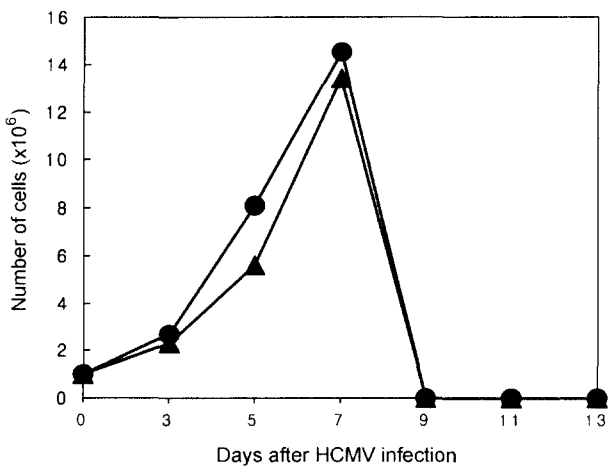


Fig. 1. Effect of HCMV on HL-60 cell proliferation. HL-60 cells were infected or mock-infected with HCMV, and the number of viable cells were counted every two days by trypan blue exclusion assay. (●), mock-infected; (▲), HCMV-infected. The data are representatives of three separate experiment.

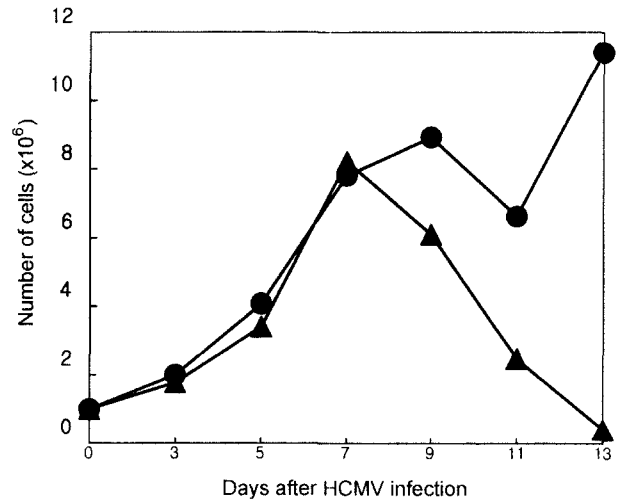


Fig. 2. Effect of HCMV on THP-1 cell proliferation. THP-1 cells were infected or mock-infected with HCMV, and the number of viable cells were counted by trypan blue exclusion assay. (●), mock-infected; (▲), HCMV-infected. The data are representatives of three separate experiment.

나타나지 않았으나 HCMV 감염에 의해 세포사멸이 증가하였다. 그 이유는 아마도 HCMV 감염에 의해 apoptosis가 유도되기 때문인 것으로 생각된다. 최근 본 연구실의 실험 결과에 의하면 HL-60 세포는 HCMV 감염에 의해 apoptosis에 영향을 받지 않지만, THP-1 세포의 apoptosis는 크게 증가하는 것으로 나타났다. 세포는 바이러스의 감염에 대한 방어 기작의 하나로 apoptosis를 유도하는 것으로 설명될 수 있다.(1,4,23). HL-60 세포는 HCMV에 감염되어도 바이러스 유전자 발현이 나타나지 않지만, THP-1 세포의 경우에는 감염 후 TPA와 같은 분화 유도제에 의해 HCMV 유전자 발현이 나타난다(8). 따라서 HCMV 감염에 대해 HL-60 세포는 apoptosis를 유도할 필요가 없으나 THP-1 세포는 apoptosis를 유도함으로써 다른 세포를 보호할 필요가 있다. 이러한 차이가 두 세포의 분화 단계의 차이에 의한 것인지, 아니면 HCMV 유전자 발현을 억제하는 cellular negative factor(11,19,20)에 의한 차이인지는 확실하지 않다.

HCMV에 감염된 세포의 형태 변화와 CD11b의 발현

HCMV의 감염이 THP-1 세포의 모양에 끼치는 영향을 알아보기 위해 형광염료(Calcein-AM)를 이용하여 염색한 후 관찰하였다. 감염되지 않은 THP-1 세포는 동그란 원래의 형태를 유지하며 세포배양액에 부유하며 자라는 것이 관찰된 반면 (Fig. 3A) HCMV에 감염된 세포는 서로 뭉쳐 응집체를 형성하는 양상을 보여주고 있으며 (Fig. 3B), 배양용기 바닥에 붙어 자라는 세포도 관찰되었다 (Fig. 3C).

HCMV에 감염된 THP-1 세포의 응집력이 증가하고 또한 배양용기 바닥에 부착되는 성질을 가지게 되는 것은 매우 중요한 의미를 지닌다. PBMC는 HCMV에 감염될 수 있으나 HCMV 증식은 일어나지 않는다. 감염성 바이러스의 생성은 mitogen에 의해 활성화된 T cell에 의해 분화되었을 때 관찰된다(6,7). 본 연

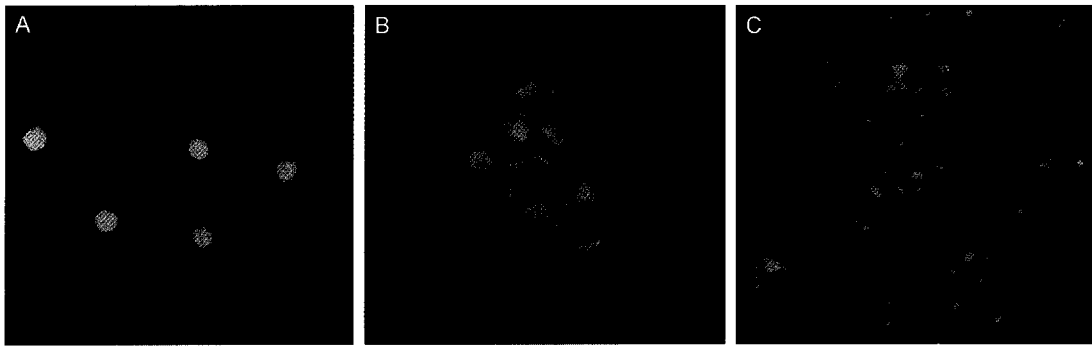


Fig. 3. Morphological change of THP-1 cells following HCMV infection. A, Mock-infected cells. B, C, HCMV-infected cells. (B; aggregated form, C; adhesive form).

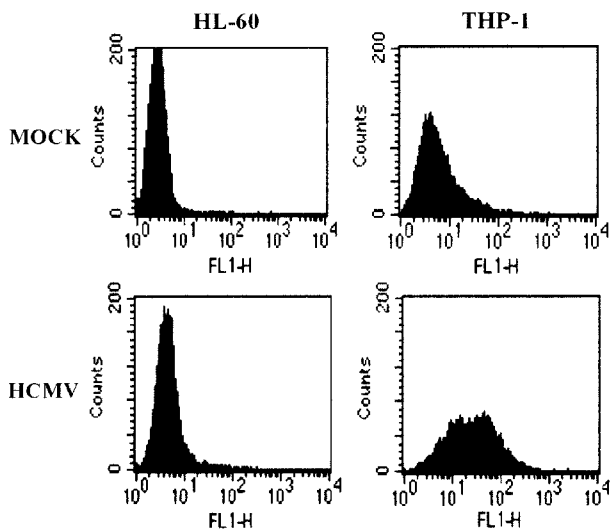


Fig. 4. Effect of HCMV on CD11b expression of monocytes. HL-60 or THP-1 cells were infected with HCMV and cells were harvested 4 days after infection. Cells were washed with PBS, reacted with PE-conjugated monoclonal antibody to CD11b and analyzed by flow cytometer.

구에서는 HCMV 감염에 의해 형태의 변화가 나타난 THP-1 세포는 monocyte에서 macrophage로의 분화 과정에 있는 세포와 비슷한 모습을 보여준다. HCMV 증식을 허용하는 단계는 아니라 할지라도, 향후 다른 인자에 의해 더 분화되면 HCMV 증식도 가능하게 할 것이라는 것을 시사해 준다.

Monocyte/macrophage의 응집은 세포표면에 존재하는 adhesion molecule인 CD11b와 밀접한 관계가 있다. 이에 다음 실험에서는 HCMV 감염 후 THP-1 세포의 CD11b 발현이 증가하였는지 살펴보았다. THP-1과 HL-60 세포에 바이러스를 감염시키고 4일째에 세포를 수확하여 CD11b에 대한 단클론 항체를 이용하여 유세포 분석기로 분석하였다 (Fig. 4). HL-60 세포에서의 CD11b 발현은 HCMV 감염에 의해 별다른 변화를 보이지 않았으나 THP-1 세포에서의 CD11b 발현은 HCMV 감염에 의해 크게 증가하였다. 이와 같은 결과는 THP-1 세포의 응집력 및 바닥 부착력의 증가가 CD11b 발현 증가와 관련이

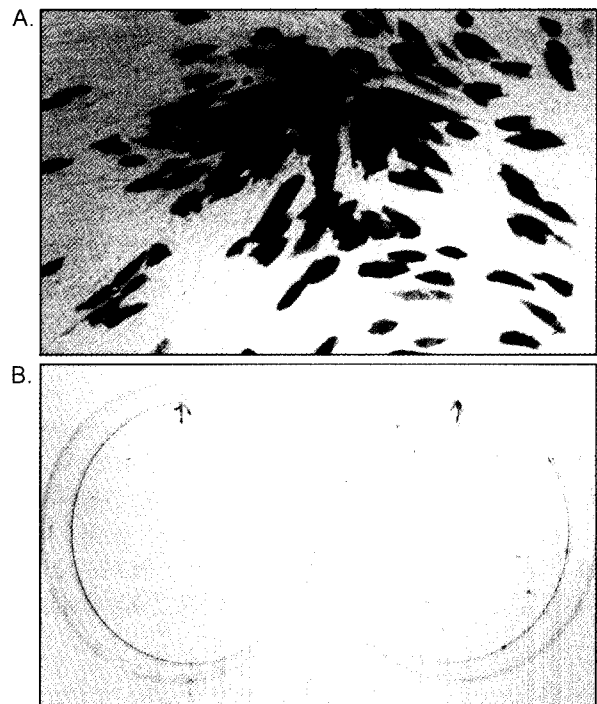


Fig. 5. HCMV was present in latently-infected THP-1 cells. Cells (A; HFF, B; THP-1) were infected with HCMV/SV2-β-gal recombinant virus and X-gal assay was performed. A, Blue plaque form HFF cells infected with HCMV/SV2-β-gal. B, Blue plaque in HFF cells co-cultivated with THP-1 cells infected with HCMV/SV2-β-gal.

있을 것이라는 점을 시사한다.

THP-1 세포에서의 HCMV의 잠복감염

THP-1 세포에 HCMV가 잠복감염을 하는지를 알아보기 위해 THP-1 세포에 바이러스를 감염시키고 2일이 지난 후에 배양액을 원심분리하여 상등액 4 ml를 취하여 -70°C에 보관하였다. 52일까지 계속하여 5일 간격으로 약 4 ml 정도의 배양액을 취하는 것을 반복하였다. 이렇게 보관한 배양액을 HCMV 감수성 세포인 HFF에 넣어주어 상등액에 바이러스의 존재 여부를 plaque assay를 통해 알아보았다. 그 결과 어떠한 배양액에서도 plaque을 생성하지 못하였다(data not shown).

이 결과로부터 감염된 THP-1 세포의 배양액에서 바이러스가 검출되지 않았다고 해서 잠복감염이 이루어졌는지 알 수는 없으므로, THP-1 세포 내에 바이러스가 감염되어 존재하는지 알아보고자 하였다. 이를 위해 SV40의 초기유전자 promotor 뒤에 β -galactosidase 유전자를 가지고 있는 HCMV/SV2- β -gal이라는 유전자 재조합 바이러스를 사용했다. HCMV/SV2- β -gal 바이러스는 세포에 감염하였을 경우 X-gal을 처리해 주면 감염된 세포만이 선택적으로 파란색을 띠게 되므로 감염의 여부와 정도를 쉽게 알 수 있다. HFF 세포를 배양한 후 HCMV/SV2- β -gal 바이러스를 감염시켰다. 감염 후 2일 정도 후에 X-gal을 처리해 주니 6시간만에 파란색을 가진 세포가 보였다 (Fig. 5A). THP-1 세포에 HCMV/SV2- β -gal 바이러스를 감염시키고 2일, 4일, 그리고 7일 후 X-gal을 처리하여 주었을 경우 염색되는 세포를 관찰할 수 없었다. 그 이유는 아마도 분화되지 않은 THP-1 세포에서는 HCMV 유전자뿐만 아니라(8) SV40 유전자 발현도 일어나지 않기 때문이라고 생각된다. 그러나 비감수성 세포도 감수성 세포와 혼합 배양하면 비감수성 세포내의 바이러스가 활성화되는 경우가 많이 있기 때문에 THP-1 세포에 HCMV/SV2- β -gal 바이러스를 감염시키고 2일 후에 HFF 세포에 넣어 동시배양을 하였다. 그 결과 동시 배양 후 7일과 10일 후에 파란색의 plaque이 관찰되었다(Fig. 4B).

이상의 실험 결과로부터 HCMV는 THP-1 세포에서 증식할 수는 없지만 THP-1 세포에 감염을 한다고 생각된다. 이것은 HCMV가 THP-1 세포에 잠복감염을 한다는 것을 간접적으로 보여주는 결과이다.

잠복감염된 THP-1 세포로부터의 재발감염

잠복감염상태의 HCMV가 재발감염을 하는지의 여부를 알아보기 위해 HCMV를 THP-1 세포에 감염시킨 후 5일 간격으로 세포를 취하여 TPA 50 nM과 hydrocortisone 10 μM을 처리하여 분화를 유도한 뒤에 바이러스의 재활성화를 알아보았다. HFF를 이

용한 plaque assay 결과 바이러스 감염 2일 후에 분화 유도제를 처리하였을 때에는 분화 5일째부터 바이러스가 검출되었고, 감염 후 7일에 분화를 유도한 경우에는 분화시킨지 10일째부터, 감염 12일에 분화시켰을 경우에는 분화유도 후 15일째부터 바이러스가 검출되는 것을 관찰하였다. 바이러스를 감염시킨지 17일 또는 22일째에 분화를 유도하였을 경우에는 모두 분화시킨지 20일째부터 바이러스가 검출되었다(Table 1).

위와 같은 결과는 HCMV 감염 후 세포가 분화되었을 경우 재활성화가 되어 바이러스 증식이 일어났고, HCMV 감염기간 후 분화유도제를 처리해 준 시간이 지연될수록 HCMV가 재활성화 되어 나오는 기간이 오래 걸린다는 것을 의미한다. 지금까지 보고된 바에 의하면 분화유도제 등에 의해 분화를 먼저 시킨 단핵 세포에 HCMV가 감염되어 증식한다고 보고되어져 있으나, 본 연구의 결과는 HCMV가 먼저 감염된 후에 세포가 분화되었을 경우에도 HCMV가 재활성화 되어 증식이 일어날 수도 있다는 가능성을 제시한다.

현재까지 보고된 바에 따르면 TPA는 HCMV에 대한 감수성 세포뿐만 아니라 비감수성 세포에서도 HCMV를 감염시켰을 경우 MIE 유전자 발현을 자극한다고 보고되어져 있다(3,5). 이는 HCMV MIE 유전자의 promotor/enhancer 부위에 위치하는 AP-1 motif (TGACTCA)에 TPA가 다른 전사과정이나 신호전이 과정의 요소들과 반응하여 직접 또는 간접적으로 자극하는 것으로 알려져 있다(5,16,17). 이러한 일체단핵세포주인 THP-1 세포 등을 이용한 기초적인 연구는 앞으로의 연구에 대한 배경을 제공하는데 기여할 것이다.

감사의 글

본 연구는 충북대학교 보건의료생명과학 지방대학특성화사업단(97-R-L-4)과 과학기술부의 분자과학 연구사업(98-J03-02-02-A-05)의 연구비지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Everett, H. and G. McFadden. 1999. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol.* 7, 160-165.
2. Fish, K.N., A.S. Depto, A.V. Moses, W. Britt, and J.A. Nelson. 1995. Growth kinetics of human cytomegalovirus are altered in monocyte-derived macrophage. *J. Virol.* 69, 3737-3743.
3. Forbes, B.A., C.A. Bonville, and N.L. Dock. 1989. The effects of a promoter of cell differentiation and selected hormones on human cytomegalovirus infection using an *in vitro* system. *J. Infect. Dis.* 162, 39-45.
4. Haecker, G. and D.L. Vaux. 1994. Viral, worm and radical implication for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* 19, 99-100
5. Hunninghake, G.W., M.M. Monick, B. Liu, and M.F. Stinski. 1989. The promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus responds to T-lymphocyte stimulation and contains functional cyclic AMP response elements. *J. Virol.* 63, 3026-3033.
6. Ibanez, C.E., R. Schrier, P. Ghazal, C. Wiley, and J.A. Nelson. 1991. Human cytomegalovirus productively infects primary dif-

Table 1. Recovery of infectious virus form THP-1 cells latently infected with HCMV

Samples harvested at	TPA and hydrocortisone treated at (d.p.i.*)				
	2	7	12	17	22
7 d.p.i.	14				
12 d.p.i.	4	0			
17 d.p.i.	13	1	0		
22 d.p.i.	17	1	0	0	
27 d.p.i.	14	3	3	0	0
32 d.p.i.	1	7	3	0	0
37 d.p.i.	2	3	2	3	0
42 d.p.i.	0	1	0	3	1
47 d.p.i.	0	0	0	2	3
52 d.p.i.	0	1	0	1	2

* d.p.i.(day post infection)

- differentiated macrophages. *J. Virol.* 65, 6581-6588.
7. Lathey, J.L. and S.A. Spector. 1991. Unrestricted replication of human cytomegalovirus in hydrocortisone-treated macrophages. *J. Virol.* 65, 6371-6375.
 8. Lee, C.H., G.C. Lee, Y.J. Chan, C.J. Chiou, J.H. Ahn, and G.G. Hayward. 1999. Factor affecting human cytomegalovirus gene expression in human monocyte cell lines. *Mol. Cells.* 9, 37-44.
 9. Maciejewski, J.P., E.E. Bruening, R.E. Donahue, R.E. Mocarski, and S.C. St. Jeor. 1992. Infection of hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus. *Blood* 80, 170-178.
 10. Martin, S.J., D.R. Green, and T.G. Cotter. 1994. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.* 19, 26-30.
 11. Meier, J.L., and M.F. Stinski. 1997. Effect of a modulator deletion on transcription of the human cytomegalovirus major immediate-early genes in infected undifferentiated and differentiated cells. *J. Virol.* 71, 1246-1255.
 12. Minton E.J., C. Tysoe, J.H. Sinclair, and J.G.P. Sissons. 1994. Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow. *J. Virol.* 68, 4017-4021.
 13. Myers, J.D. 1986. Infection in bone marrow transplant recipients. *Am. J. Med.* 81, 27-38.
 14. Nelson, J.A., J.W. Gnann, and P. Ghazal. 1990. Regulation and tissue-specific expression of human cytomegalovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154, 19-156.
 15. Nelson, J.A. and M. Groudine. 1986. Transcriptional regulation of the human cytomegalovirus major immediately-early gene is associated with induction of DNase I-hypersensitive sites. *Mol. Cell. Biol.* 6, 452-461.
 16. Niller, H.H. and L.Hennighausen. 1990. Phytohemagglutinin-induced activity of cyclic AMP (cAMP) response elements from cytomegalovirus is reduced by cyclosporine and synergistically enhanced by cAMP. *J. Virol.* 64, 2388-2391.
 17. Sambucetti, L.C., J.M. Cherrington, G.W. Wilkinson, and E.S. Mocarski. 1989. NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a transactivator and by T cell stimulation. *EMBO J.* 8, 4251-4258.
 18. Scott, D.M., B.C. Rodger, C. Freeke, J. Buiters, and J.G.P. Sissons. 1989. Human cytomegalovirus and monocytes: limited infection and negligible immunosuppression in normal mononuclear cells infected in vitro with mycoplasma free strains. *J. Gen. Virol.* 70, 658-694.
 19. Sinclair, J.H., J. Baillie, L.A. Byrant, J.A. Taylor-Wiedeman, and J.G.P. Sissons. 1992. Repression of human cytomegalovirus immediate early gene expression in a monocytic cell line. *J. Gen. Virol.* 73, 433-4350.
 20. Stein, J., H. Volk, C. Libenthal, D.H. Kruger, and S. Prosch. 1993. Tumour necrosis factor α stimulates the activity of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 49, 190-191.
 21. Taylor-Wiedeman, J.A., J.G.P. Sissons, L.K. Borysiewicz, and J.H. Sinclair. 1991. Monocytes are a major site of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 72, 2059-2064.
 22. Tegtmeier, G.E. 1989. Posttransfusion cytomegalovirus infections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 113, 236-245.
 23. Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

(Received February 15, 2001/Accepted March 30, 2001)

ABSTRACT: Latent Infection and Reactivation of Human Cytomegalovirus from Human Monocyte THP-1 Cells

Sang-Im Youn¹, Myung-Sook Moon¹, and Chan-Hee Lee^{1,2*}(¹Division of Life Sciences, College of Natural Sciences, and ²Research Institute for Genetic Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Reactivation of human cytomegalovirus (HCMV) from latency is often fatal to immunocompromised individuals. To understand the effect of HCMV on human monocytes where HCMV establishes latency, two human monocyte cell lines at different stages in differentiation, THP-1 and HL-60 were infected with HCMV. While the viability and morphology of HL-60 cells were not significantly affected by HCMV, the viability of THP-1 cells was dramatically decreased by HCMV infection. THP-1 cells infected with HCMV became aggregated and adhered to the surface of culture dishes, probably due to the increased expression of adherence molecules CD11b on the surface of the infected THP-1 cells. THP-1 cells established a latent HCMV infection were induced to differentiate by treatment with TPA and hydrocortisone. Recovery of infectious HCMV from the culture supernatant of differentiated THP-1 cells was dependent on the time of induction of differentiation after HCMV infection. Thus, in vitro model of reactivation of HCMV from latently-infected monocytes was established.