

장바이러스에 의한 제대혈액 단핵구의 Apoptosis에 관한 연구

연세대학교 의과대학 소아과학교실

김 동 수

Apoptosis of Cord Blood Mononuclear Cells Infected with Enterovirus

Dong Soo Kim, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Purpose : To evaluate apoptosis of cord blood mononuclear cells(CBMC) infected with enterovirus.

Methods : Cord blood was obtained from 20 neonates which were delivered vaginally without any complications. Cord blood mononuclear cells(CBMC) were isolated, and after 24h and 48h incubation, cells were stained with Annexin V and Propidium Iodide and were analyzed with FACScan flowcytometer. CBMCs were also incubated with enterovirus and γ -INF. mRNA expression of FasL was evaluated with RT-PCR.

Results : The mean rate of apoptosis of CBMC 24 hr after culture with virus showed no definite increase compared to that of culture only group. The mean rate of apoptosis in the culture group with γ -INF was higher than that of culture with virus group ($P < 0.01$) but was not different from the group cultured with virus and γ -INF simultaneously. These findings were also seen in 48-hours-cultured groups. mRNA of CBMC of the groups cultured with γ -INF expressed FasL.

Conclusion : The upregulated apoptosis of peripheral lymphocytes in patients with aseptic meningitis may be not due to enterovirus infection directly, but due to some mediators such as γ -INF from immune cells released through enteroviral infection. (J Korean Pediatr Soc 1999;43:372-379)

Key Words : Apoptosis, Enterovirus, Fas-FasL

서 론

Apoptosis(고사)는 병리적인 괴사(necrosis)와는 달리 우리 몸의 homeostasis를 유지하기 위하여 필요하며, 이러한 고사의 적절한 조절은 체내의 정상 생리 반응으로서 필요한 현상이다. 하지만 이러한 고사가

필요 이상으로 과다하게 일어나거나 혹은 반대로 필요한 정도에 미치지 못할 정도로 부족하게 일어날 때 우리 몸 안에서 여러 가지 병변이 생기게 된다. 예를 들어 자가면역성질환같은 경우는 자가항원과 반응하는 면역세포의 고사가 잘 일어나지 않기 때문에 생기는 현상이고 후천성면역결핍증후군같은 경우는 필요 이상으로 면역세포의 고사가 일어나기 때문에 생기는 현상으로 알려져 있다¹⁾.

과거에는 바이러스 감염시 바이러스가 세포의 tran-

* 본 연구는 1998년도 보건 의료기술연구개발사업 연구비(HMP-97-P-0017)의 보조에 의하여 이루어졌음.

접수 : 1999년 5월 30일, 승인 : 1999년 8월 20일

책임저자 : 김동수, 연세대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : 02)361-5524 Fax : 02)393-9118

scription 및 translation 경로를 활성화시키고 세포의 막을 파괴시킴으로써 세포를 사멸시킨다고 알려져 왔었으나²⁻⁴⁾, 최근에는 그런 과정외에도 많은 바이러스들이 자살 계획을 활성화시켜 계획 세포사(programmed cell death) 즉, 고사의 과정을 통하여 세포를 사멸시키는 것으로 알려졌다⁵⁾. 이렇게 우리 몸에서 바이러스가 감염된 세포의 고사가 일어나는 것은 바이러스가 확산하는 것을 방지하기 위한 숙주의 방어기전이다. 즉, 바이러스 감염후 세포성 혹은 체액성 면역 반응이 생기기 전에 바이러스에 감염된 세포를 고사 시킴으로써 바이러스의 증식을 방해하고, progeny 바이러스를 형성하여 주위 세포로까지 이행하는 것을 막기 위함이다¹⁾.

바이러스 감염과 림프구의 고사에 관한 연구는 많이 이루어져 왔으나, 모든 바이러스가 인체에 감염시 똑같은 경로의 고사과정을 거치는 것이 아니라 지금까지 발견된 몇몇 바이러스들의 고사의 행태는 공통점도 있으나 바이러스 종류에 따라 다른 것으로 나타났다. 저자는 무균성 뇌막염환자에서 급성기 말초 혈액 림프구의 수가 절대적으로 감소되어 있는 것이 증가된 고사에 의한 것임을 보고 하였고, 또한 이러한 증가된 고사는 Fas-FasL(Fas ligand)계의 활성화에 의한 것임을 보고한 바가 있다⁶⁾. 본 연구에서는 이러한 증가된 고사가 바이러스 감염에 의한 것인지 아니면 바이러스 감염 이외의 인자에 의한 것인지를 알아보기 위하여, 바이러스에 노출된 적이 없는 제대혈액의 림프구를 얻어서 직접 바이러스를 첨가하여 감염을 일으켜 생체내에서 보이던 것과 같은 양상의 고사가 시험관 내에서도 관찰되는 지를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

연세의료원에 정상분만을 위하여 입원한 20명의 산모를 대상으로 하였다. 신생아는 모두 정상분만을 하였고 산모와 신생아는 산전 및 산후에 아무런 합병증이 없었다. 출생 직후 제대혈을 헤파린 처리하여 얻었다.

2. 제대혈내 단핵구의 분리 및 배양

헤파린 처리한 혈액을 제대정맥에서 채취하여 동량의 RPMI1640 배지와 잘 혼합한 후 Ficoll을 이용하여

분리하였다. 분리한 단핵구 일부는 10%의 우태아 혈청이 함유된 RPMI1640 배지 1mL당 5×10⁵ 정도의 세포를 넣어 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

3. 바이러스 및 γ-interferon (γ-INF)의 첨가

국립보건원에서 공급받은 echovirus 30을 TCID₅₀ 10^{2.3}되도록 배양된 세포에 넣었고, γ-INF는 LG사(서울, 한국)에서 제공받아 100IU/mL이 되도록 넣고 배양하였다.

4. 고사의 평가

1) Annexin V와 Propidium Iodide 염색

단핵구를 배양하면서 24시간 및 48시간에 세포들을 얻어서 FITC가 부착된 Annexin V와 phycoerythrin (PE)가 부착된 propidium iodide(PI)로 염색한 후 15분간 배양 후 FACScan flow cytometry로 분석하였다. 각각 10,000개의 세포를 읽은 후, Annexin V만 염색되어진 세포는 초기 고사로 Annexin V와 PI가 동시에 염색되어진 세포는 말기 고사로 판독하여 초기 고사 및 초기와 말기와 합한 총 고사율을 구하였고, 세포 크기와 과립성 상태에 따라 소수 포함된 적혈구는 제외시켜 판독하였다.

2) DNA fragmentation

FACS로 확인되는 고사를 더욱 확인하기 위하여 본 실험을 하였는데, 24시간째 4×10⁶개의 세포를 분리하여 PBS로 2회 세척후 세포층을 분리하여 lysis buffer (5mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 8) 250μL와 TE(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 250μL를 넣어 세포를 용해시킨 후 13,000rpm에 15분간 원심분리하여 상층액을 새 microfuge tube에 담은 후 5M NaCl 30μL와 100% 에탄올 1mL를 넣어 -20°C에 하룻밤 동안 냉동시켰다. 이것을 실온에서 녹인 후 13,000rpm, 15분간 원심 분리 후 상층액을 버리고 침전물을 20-25분간 말린 후 TE(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 20μL에 녹여 1.8% agarose gel에 60mA, 70volt로 running 시킨 후 ethidium bromide에 염색시켜 고사시에 나타나는 사다리모양의 띠들이 관찰되는지를 살펴보았다.

4. mRNA의 분리 및 RT-PCR을 이용한 Fas ligand의 발현 검사

고사의 기전을 알아보기 위하여 고사의 가장 흔한 경로인 Fas-Fas L계가 활성화 되는 지를 알아보았다.

RNeasy Mini Kit(Qiagen, Santa Claris, CA)를 이용하여 total RNA를 분리한 후, total RNA 9 μ g에 random hexamer(Pharmacia, Uppsala, Sweden) 0.1 O.D.와 M-MLV reverse transcriptase(Gibco BRL, Grand Island, NY) 200U를 이용하여 cDNA를 만든 후, 0.5mL microfuge tube에 cDNA 2.5 μ L에 10 X Reaction buffer 2.5 μ L, 5mM dNTP 2 μ L, Taq DNA polymerase 0.5 μ L와 FasL의 경우 primer 1(5'-ATGTTTCAGCTCTTCCACCTACAGAAGG A-3')와 primer 2(5'-CAGAGAGAGCTC AGATA-CGTTGAC-3'), internal control로 이용한 β -actin의 경우에 5'-CGTGGGCCG CCCTAGGGCACCA-3'와 5'-TTGGC CTTAGGGTTCAGGGGG-3'의 염기서열을 가지는 oligonucleotide 각각 1 μ L씩과 증류수를 넣어 모두 25 μ L의 양이 되게 한 후 PCR을 시행하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분의 조건으로 FasL는 35주기, β -actin은 22 주

기를 시행하여 1.5% agrose gel에서 전기 영동한 후 PCR산물을 확인하였다.

7. 통계적 처리

백혈구 분석 및 고사율의 비교는 ANOVA를 사용하였으며 $P < 0.05$ 를 의미있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 제대 혈액 단핵구에서의 고사의 평가

제대혈액 단핵구를 24시간 및 48시간 배양후 Annexin V와 PI로 염색 후 FACScan 으로 분석한 대표적인 그림을 보여주고 있다(Fig. 1). 그림 A와 D는 제대혈단핵구를 아무런 처치도 하지 않은 상태에서 고사를 보여주는 그림으로 약간의 고사를 보이나 그리 많은 고사의 증가는 보이지 않았고, 물론 24시간 배양한 경우(Fig. 1의 A)보다 48시간 배양한 경우(Fig. 1의

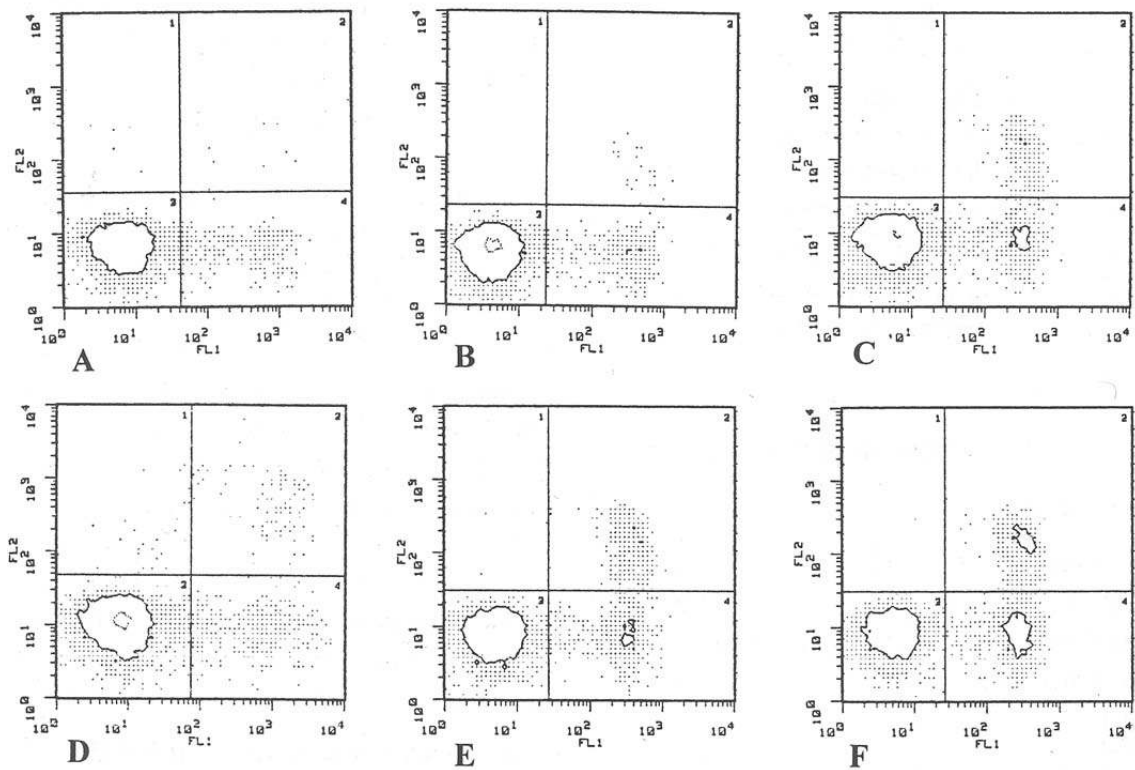


Fig. 1. FACS analysis of cultured cord blood mononuclear cells (A), cultured with echovirus 9 (B) and echovirus 9 with INF- γ (C) for 24 hours. FACS analysis of cultured cord blood mononuclear cells for 48 hours (D), cultured with echovirus 9 (E) and echovirus 9 with INF- γ (F) for 48 hours FL1; Annexin V, FL2; PI.

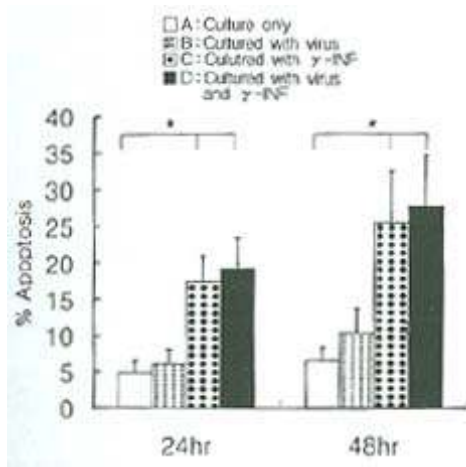


Fig. 2. % Apoptosis of the cultured cord blood mononuclear cells ($P < 0.01$).



Fig. 3. DNA laddering pattern of the 48 hr cultured cord blood mononuclear cells(CBMC). (A : cultured CBMC, B : cultured with virus, C : cultured with γ -INF, D : cultured with virus and γ -INF simultaneously)

D)가 약간의 증가를 보였다. 여기에 바이러스를 함께 감염시킨 경우는 세포고사율의 약간의 증가를 보였으나 기대했던 것 처럼 현저한 증가 소견은 관찰할 수가 없었다(Fig. 1의 B 및 E). 그러나 바이러스와 γ -INF를 함께 투여한 경우는 현저한 고사의 증가를 관찰할 수가 있었다(Fig. 1의 C 및 F).

말초단핵구에서의 고사의 평가는 Annexin V에 염색된 세포와 PI에 염색된 세포를 합한 것으로 하였다. 먼저 24시간 배양후 고사율은 4.9 \pm 1.7%였고 바이러스

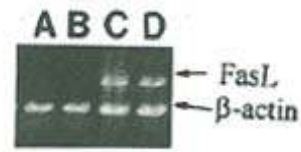


Fig. 4. FasL expression of the 48 hr cultured cord blood mononuclear cells(CBMC). (A : cultured CBMC, B : cultured with virus, C : cultured with γ -INF, D : cultured with virus and γ -INF simultaneously)

와 함께 배양한 세포를 보면 6.0 \pm 2.1%로 바이러스와 함께 배양한 세포에서 고사율의 의미있는 차이는 관찰할 수 없었다. 이와같은 현상은 48시간을 배양하여도 같은 소견을 보여서 6.5 \pm 1.8%를 보이고 바이러스와 함께 배양한 세포에서는 10.2 \pm 3.5%로 역시 두군간의 의미있는 차이를 볼 수가 없었다. 바이러스 감염시 증가될 수 있는 γ -INF를 첨가하여 관찰한 고사는 24시간 배양시 17.4 \pm 3.5%, 48시간 배양시 25.4 \pm 7.1%로 바이러스만 첨가하여 배양한 세포군에 비하여 의미있는 증가를 관찰할 수 있었다($P < 0.01$). 이번에는 바이러스와 γ -INF를 동시에 첨가하였을 때는 γ -INF만 첨가한 세포의 고사율과 의미있는 차이를 볼 수가 없었다(Fig. 2). 고사를 확인하기 위하여 γ -INF를 첨가하여 배양한 단핵구 DNA를 추출하여 gel running한 결과 DNA fragmentation이 관찰되었다(Fig. 3).

2. FasL mRNA의 발현

고사가 확인된 세포에서 Fas L가 발현되는 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

고 찰

고사는 우리 몸에서 더 이상 필요가 없거나, 손상을 받은 세포를 제거하여 주는 우리 몸안의 기전으로 숙주의 항상성 유지에 크게 기여하는데, 생리적으로는 우리 몸의 발생과정이나 건강한 세포의 교체, 내분비에 의한 세포의 위축, 그리고 면역계에 작용한다. 그중 면역계에서의 고사의 역할은 자가 반응성 림프구나, 면역반응이 일어난 후 과다하게 증식된 세포의 제거 그리고 세포 매개성 세포독성에 관여함으로써 우리 몸의 정상적인 면역 반응계를 형성하는 데에 기여한다¹⁾. 하지만 어떠한 원인으로 적절한 고사의 균형이 깨어질

때에 여러 병변이 발생하게 된다. 예를 들어 자가 반응을 일으키는 면역세포가 적절히 사멸되지 않고 계속 남아 반응을 일으킬 때 자가 면역 질환이 발생되며, human immunodeficiency virus(HIV)감염시에는 CD4+ T 세포가 과다하게 사멸을 일으키게 되어 CD4+ T 세포에 대한 세포 매개 면역 반응이 소실되어 HIV의 만성 감염이 가능하게 된다⁷⁾.

과거에는 바이러스 감염시 바이러스가 세포의 transcription 및 translation 경로를 활성화시키고 세포의 막을 파괴시킴으로써 세포를 사멸시킨다고 가정하여 왔으나, 최근에는 그런 과정 외에도 많은 바이러스들이 자살 계획을 활성화시켜 계획 세포사(programmed cell death) 즉, 고사의 과정을 통하여 세포를 사멸시키는 것으로 알려졌다⁵⁾. 이렇게 우리 몸에서 바이러스가 감염된 세포의 고사가 일어나는 것은 바이러스가 확산되어 숙주를 위협하게 하는 것을 방지하기 위한 숙주의 방어기전이다. 즉, 바이러스 감염후 세포성 혹은 체액성 면역 반응이 생기기 이전에 바이러스에 감염된 세포를 고사시킴으로써 바이러스의 증식을 방해하고, progeny 바이러스를 형성하여 주위 세포로까지 이행하는 것을 막기 위함이다¹⁾.

현재까지 herpesvirus⁸⁾, adenovirus⁹⁾, poxvirus¹⁰⁾, baculovirus¹¹⁾, orthomyxovirus¹²⁾, togavirus¹³⁾, 그리고 poliovirus¹⁴⁾가 배양된 세포에서 고사를 유발하는 것이 발견되었다. 이와 같은 고사에 대하여 바이러스는 생체내에서 생존하기 위한 반대작용으로 감염시 고사를 억제하는 기전이 발휘되어 바이러스가 충분히 증식할 수 있는 기회를 갖도록 하는 노력이 있음이 알려져 있다. 지금까지 알려진 바이러스의 고사 억제인자로는 bcl-2와 구조 및 기능이 유사한 adenovirus의 E1b 19 K¹⁵⁾와 apoptosis 유도 물질인 p53과 결합하여 p53을 파괴시키는 E1b 55K¹⁶⁾, 또 bcl-2와 비슷한 물질로는 Epstein-Barr 바이러스의 BHRF-1¹⁷⁾, herpesvirus saimiri의 ORF16¹⁸⁾, human herpes virus 8의 KS bcl-2¹⁹⁾ 및 african swine fever virus의 5-HL²⁰⁾이 있으며 bcl-2와 유사하지 않은 baculovirus의 p35²¹⁾ 및 inhibitor of apoptosis gene(IAP)²²⁾가 있고, cowpoxvirus의 cytokine response modifier(crmA)²³⁾는 serpin족의 protease inhibitor로 사멸 주요분자인 interleukin 1 β converting enzyme(ICE)를 억제한다. ICE는 cysteine protease로 선충류인 *Caenorhabditis elegans*의 발생과정중 계획세포사를 유발시키는 ced-3

와 유사한 고사 주요분자이다²⁴⁾. 그 외에도 cytomegalovirus의 IE1, IE2²⁵⁾와 rabbit poxvirus의 SPI-1과 vaccinia virus의 E3L²⁶⁾ 등이 있다.

바이러스 감염에 의한 고사의 유발이 숙주에게 해가 되는 다른 한가지 기전은 재생이 불가능한 세포의 고사를 유발하는 경우인데, 그 예로 sindbis 바이러스 감염의 경우 신경 세포의 일부분이 고사됨으로써 치명적인 신경 장애를 일으킨다²⁷⁾. 바이러스 감염시 고사를 촉진시키는 물질로 밝혀진 것은 adenovirus의 E1A와 adenovirus virus protein(ADP)²⁸⁾, chicken anemia virus의 VP3/apoptin²⁹⁾, reovirus의 $\sigma 1$ ³⁰⁾, HIV의 gp-120²⁾과 Tat³⁾, sindbis virus의 E2와 baculovirus의 IE-1⁴⁾이 있다.

무균성 뇌막염 환자의 급성기에 말초혈액 소견을 보면 림프구의 현저한 감소가 일어나는 것을 볼 수가 있고 이와같은 급성기 현상은 회복기가 되면 정상으로 회복된다. 저자는 이와 같은 급성기 말초혈액의 소견이 아마도 바이러스 혈증에 의한 고사의 증가로 초래되는 것이 아닌가하는 생각을 하게 되었다. 그래서 저자는 무균성 뇌막염환자에서 급성기 말초 혈액 림프구를 배양하면서 관찰한 결과 이와 같이 무균성뇌막염 환자 급성기에서 말초혈액 림프구의 수가 절대적으로 감소되어 있는 것이 증가된 고사에 의한 것임을 알았고, 또한 이러한 증가된 고사는 Fas-FasL(Fas ligand)계의 활성화에 의한 것임을 보고하였다⁶⁾. 본 연구에서는 이러한 증가된 고사가 바이러스 혈증이 있을 때, 림프구에 직접적인 바이러스 감염에 의해 초래되는 것인지, 아니면 바이러스 감염 이외의 인자, 예를 들어 바이러스 혈증시에 혈액 내에 증가될 수 있는 다양한 물질들, 말하자면 cytokines 등에 의한 것인지를 알아보기 위하여, 바이러스에 노출된 적이 없는 제대혈액의 림프구를 얻어서 직접 바이러스를 첨가하여 감염을 일으켜 생체 내에서 보이던 것과 같은 양상의 고사가 시험관 내에서도 관찰되는 지를 알아보고자 하였다.

결과에는 보여주지 않았으나 성인의 혈액을 얻어서 바이러스를 첨가한 결과 고사를 관찰할 수 있기 보다는 바이러스특이 클론들이 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 소견은 이미 성인에서는 바이러스에 감염이 되어 바이러스 특이 면역세포들이 혈중에 존재하고 있다는 것을 말하는 것이다. 그러므로 저자는 바이러스 특이 클론을 만들려는 것이 본 연구의 목표가 아니기 때문에 바이러스에 감염이 된 적이 없는 림프구

를 얻어서 실험에 사용하려 하였다. 가장 안전하게 바이러스에 감염된 적이 없는 림프구를 얻는 방법은 정상 분만을 통해서 태어난 신생아의 혈액임을 가정하고 제대혈액을 사용하기로 하였다.

먼저 바이러스를 첨가하지 않은 세포와 첨가한 세포를 배양하면서 고사를 측정할 결과 특별한 차이를 발견할 수가 없었다. 그리하여 이번에는 바이러스 감염시에 단핵구에서 생성될 수 있는 다양한 cytokines 중에서 T세포를 활성화 시키는 것으로 알려져 있는 γ -INF를 첨가하기로 하였다. 예상했던대로 제대혈액 림프구에 바이러스를 첨가하여 배양하면서 아울러 γ -INF를 첨가하였더니 의미있는 고사의 증가를 관찰할 수 있었다. 이러한 소견을 종합해보면 장바이러스 감염시 증가된 말초혈액의 고사는 바이러스 감염 자체에 의한 것이라기 보다는 바이러스 감염으로 초래되는 단핵구의 활성화 등에 의하여 분비되는 cytokines에 의하여 초래되는 것임을 알 수 있었다. 보고에 의하면 γ -INF는 림프구의 고사를 촉진하는 것으로 알려져 있고³¹⁾ 림프구 이외에도 간세포나 뇌의 astrocyte에서도 고사를 촉진하는 것으로 알려져 있다.^{32, 33)} 반대로 IL-6 같은 cytokine은 림프구의 고사를 억제하는 것으로 알려져 있고³⁴⁾ 또 중성백혈구의 고사를 억제하는 작용이 있음이 밝혀져 있다.³⁵⁾ 그러므로 본 연구에서 바이러스 감염과 동시에 γ -INF를 투여하였을 때 제대혈 단핵구의 고사가 증가하는 것은 이미 보고된 내용과도 일치하는 것이라고 할 수 있다.

Fas(APO-1, CD95)는 TNF- α family에 속하는 물질로 림프구나 상피세포 등 기능적인 수용체를 가지고 있는 세포에서 Fas ligand와 결합하여 고사를 유발하며 T세포 수용체에 대한 보조 자극인자로도 작용한다³⁶⁾. 면역계에 있어 Fas 및 Fas ligand에 의한 고사는 흉선에서의 T 세포선택, 면역 반응의 감쇠 및 T 세포에 의한 세포 독성에 관여한다^{37, 38)}. Fas/FasL 체계는 바이러스 감염후 고사유발에도 중요한 역할을 하는데, influenza시 Fas/FasL 체계에 의해 유도된 세포의 고사가 influenza 바이러스를 죽이는 데에 중요한 역할을 하는것이 밝혀졌으며¹²⁾, HIV 감염에서도 HIV-1 Tat protein이 FasL의 표현을 증가시켜 T 세포의 고사를 유도하는 것으로 밝혀졌다³⁹⁾. 바이러스 감염후 Fas에 의한 세포의 고사에 관해서는 hepatitis B를 포함한 다른 바이러스 감염에서도 많이 연구되었다⁴⁰⁾. 본 연구에서도 echovirus 30에 의한 고사는 mRNA에서

FasL가 발현된 것으로 보아 Fas/FasL 체계에 의한 것으로 생각된다.

결론적으로 echovirus에 의한 전신적 감염시 증가된 림프구의 고사는 바이러스 감염 자체에 의한 것이라기 보다는 바이러스 감염에 의하여 유도되는 cytokines과 같은 물질에 의하여 초래되는 것임을 알 수 있었고, 이것은 Fas-Fas ligand계에 의해 유도되는 것으로 사료되었다.

요 약

목적 : 무균성 뇌막염 환자의 말초혈액에서는 정상 소아에 비해 현저한 림프구의 감소 소견을 관찰할 수 있는데, 이 현상이 림프구의 고사증가에 의한 것이라는 것을 이미 보고하였다. 이번 연구에서는 이러한 증가된 고사가 바이러스감염 자체에 의한 것인지 아니면 바이러스감염에 의하여 유도되는 다른 물질에 의한 것인지를 알아보려고 하였다.

방법 : 정상분만된 정상 제대혈에서 단핵구를 분리 후 10% FBS가 함유된 RPMI 1640배지에 각각 24시간 및 48시간 배양후 세포를 분리하여 Annexin V와 PI(Propidium iodide)로 염색하여 flowcytometry 분석법으로 고사를 평가하였다. 아울러 배양된 단핵구에 echovirus 30와 γ -INF를 동시에 첨가하면서 고사의 증가를 관찰하였다. 또한 제대혈 단핵구의 total RNA를 분리한 후 RT-PCR을 시행하여 Fas ligand의 표현을 살펴보았다.

결과 : 24시간 배양후 고사율은 바이러스를 함께 배양하여도 증가하지는 않았으나 γ -INF를 첨가하고 배양한 세포에서는 의미있는 증가를 관찰할 수 있었다 ($P < 0.01$). 이러한 고사의 증가는 γ -INF과 바이러스를 동시에 첨가한다고 더 증가하지 않았다. 48시간 배양후 고사율은 24시간 배양시에 보이는 양상과 흡사하였다. 증가된 고사세포에서 DNA fragmentation을 관찰할 수 있었으며 mRNA에서 FasL가 표현되었다.

결론 : 무균성 뇌막염 환자의 말초 혈액 림프구에 증가된 고사는 바이러스감염 자체에 의한 것이라기 보다는 바이러스감염과 동반되어 생체내 세포에서 분비되는 물질, 대표적으로 γ -INF과 같은 물질에 의하여 증가되는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62.
- 2) Li CJ, Friedman C, Wang V, Metelev V, Pardee AB. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 1995;268:429-31.
- 3) Yamada T, Yamaoka S, Goto T, Nakai M, Tsujimoto Y, Hatanaka M. The human T-cell leukemia virus type I Tax protein induces apoptosis which is blocked by the Bcl-2 protein. *J Virol* 1994;68:3374-9.
- 4) Prikhod'ko EA, Miller LK. Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE1. *J Virol* 1996;70:7116-24.
- 5) Vaux DL. Toward an understanding the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:786-89.
- 6) 김현영, 김동수. 무균성 뇌막염 환자의 말초혈액 단핵구의 apoptosis에 관한 연구. *감염* 1999;31:9-16.
- 7) Laurent-Crawford AG, Krust B, Muller S, Riviere Y, Rey-Cuille MA, Bechet JM, et al. The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology* 1991;185:829-39.
- 8) Yoshida H, Sumichika H, Hamano S, He X, Minamishima Y, Kimura G, et al. Induction of apoptosis of T cells by infecting mice with murine cytomegalovirus. *J Virol* 1995;69:4769-75.
- 9) White E. Regulation of apoptosis by the transforming genes of the DNA tumor virus adenovirus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993;204:30-9.
- 10) Brooks MA, Ali AN, Turner PC, Moyer RW. A rabbitpox virus serpin gene controls host range by inhibiting apoptosis in restrictive cells. *J Virol* 1995;69:7688-98.
- 11) Clem RJ, Fechheimer M, Miller LK. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 1991;254:1388-90.
- 12) Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N, Evans D. Apoptosis: A mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *Virology* 1994;68:3667-73.
- 13) Ubol S, Tucker PC, Griffin DE, Hardwick JM. Neurovirulent strains of Alphavirus induce apoptosis in bcl-2-expressing cells: Role of a single amino acid change in the E2 glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5202-6.
- 14) Tolokaya EA, Romanova LI, Kolesnikova MS, Ivannikova TA, Smirnova EA, Raikhlin NT, et al. Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *J Virol* 1995;69:1181-9.
- 15) White E, Sabbatini P, Debbas M, Wold WS, Kushner DI, Gooding LR. The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 1992;12:2570-80.
- 16) Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kKa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7742-46.
- 17) Henderson S, Huen D, Rowe M, Dawson C, Johnson G, Rickinson A. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8479-83.
- 18) Nava VE, Cheng EH, Veluona M, Zou S, Clem RJ, Mayer ML et al. Herpesvirus saimiri encodes a functional homolog of the human bcl-2 oncogene. *J Virol* 1997;71:4118-22.
- 19) Cheng EH, Nicholas J, Bellows DS, Hayward GS, Guo HG, Reitz MS, et al. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:690-4.
- 20) Afonso CL, Neilan JG, Kutish GF, Rock DL. An African swine fever virus Bcl-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. *J Virol* 1996;70:4858-63.
- 21) Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, et al. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 1995;269:1885-8.
- 22) Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995;83:1243-52.
- 23) Dobbstein M, Shenk T. Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2(B13R) gene product. *J Virol* 1996;70:6479-85.
- 24) Cerretti DP, Kozolsky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1992;256:97-100.
- 25) Zhu H, Shen Y, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* 1995;69:7960-70.
- 26) Lee SB, Esteban M. The interferon-induced doublestranded RNA-activated protein kinase induces

- apoptosis. *Virology* 1994;199:491-6.
- 27) Meyer ME, Gronemeyer H, Turcotte B, Bocquel MT, Tasset D, Chambon P. Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 1989;57:433-42.
 - 28) Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WS. The adenovirus death protein(E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol* 1996;70:2296-306.
 - 29) Noteborn MH, Todd D, Verschuere CA, de Gauw HW, Curran WL, Veldkamp S, et al. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J Virol* 1994;68:346-51.
 - 30) Tyler KL, Squier MK, Rodgers SE, Schneider BE, Oberhaus SM, Grdina TA, et al. Differences in the capacity of reovirus strains to induce apoptosis are determined by the viral attachment protein sigma 1. *J Virol* 1995;69:6972-9.
 - 31) Allione A, Wells V, Forni G, Malluci L, Novelli F. Beta-galactoside-binding protein(betaGBP) alters the cell cycle, up-regulates expression of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor, and triggers IFN-gamma-mediated apoptosis of activated human lymphocytes. *J Immunol* 1998;161:2114-9.
 - 32) Koshiji M, Adachi Y, Sogo S, Taketani S, Oyaizu N, Than S, et al. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma(COLO201) by tumor necrosis factor-alpha(TNF-alpha) and/or interferon-gamma(IFN-gamma), resulting from down-modulation of Bcl-2 expression. *Clin Exp Immunol* 1998;111:211-8.
 - 33) Saas P, Boucraut J, Quiqerez AL, Schnuriger V, Perrin G, Desplat-Jego S, et al. CD95(Fas/Apo-1) as a receptor governing astrocyte apoptotic or inflammatory responses: A key role in brain inflammation? *J Immunol* 1999;162:2326-33.
 - 34) Ayroldi E, Zollo O, Cannarile L, D'Adamio F, Grohmann U, Delfino DV, et al. Interleukin-6(IL-6) prevents activation-induced cell death: IL-12-independent inhibition of Fas/FasL expression and cell death. *Blood* 1998;92:4212-9.
 - 35) Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC Jr, Carl VS, Peterson VN. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis. *Arch Surg* 1996;131:24-9.
 - 36) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;66:233-43.
 - 37) Lynch DH, Watson ML, Alderson MR, Baum PR, Miller RE, Tough T, et al. The mouse Fas-ligand gene is mutated in *gld* mice and is part of a TNF family gene cluster. *Immunity* 1994;1:131-6.
 - 38) Takahashi T, Tanaka M, Brennam CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994;76:969-76.
 - 39) Oyaizu N, McCloskey TW, Than S, Hu R, Kalyanaraman VS, Pahwa S. Cross-linking of CD4 molecules upregulates Fas antigen expression in lymphocytes by inducing interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha secretion. *Blood* 1994;84:2622-31.
 - 40) Mita E, Hayashi N, Iio S, Takehara T, Hijioka T, Kasahara A, et al. Role of Fas ligand in apoptosis induced by hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:468-74.