

## 무균성 뇌막염 환자의 말초혈액 림프구의 Apoptosis에 관한 연구

분당 제생병원 소아과, 연세대학교 의과대학 소아과학교실\*

김 현 영 · 김 동 수\*

### Apoptosis of Peripheral Mononuclear Cells in Patients with Aseptic Meningitis

Hyun Young Kim, M.D. and Dong Soo Kim, M.D.\*

Department of Pediatrics, Pundang Jesaeng General Hospital, Yonsei University,  
College of Medicine, Seoul, Korea

**Background :** The object of this study was to evaluate apoptosis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with aseptic meningitis and to determine whether Fas-FasL system is involved in inducing apoptosis.

**Methods :** Twenty-six patients diagnosed as aseptic meningitis, 10 patients with fever due to upper respiratory tract infection, and 10 healthy children were included in the study. Peripheral mononuclear cells were isolated and after 5h, 24h, 48h incubation, cells were stained with Annexin V and Propidium Iodide and were analyzed with FACScan flowcytometer. The serum levels of soluble Fas were measured by using ELISA. mRNA expression of FasL was evaluated with RT-PCR.

**Results :** The mean rate of early apoptosis of PBMC in the patient group after 24 hr incubation was higher than that of the control groups. The mean rate

of total apoptosis in the patient group was higher than that in the normal control group ( $P < 0.01$ ) but was not different from the febrile control group. The mean rates of early and total apoptosis at 48 hours in the patient group were significantly higher than those of the other two control groups ( $P < 0.01$ ). The mean levels of soluble Fas in the subacute stage of the disease were higher than those of in the acute stage of the disease ( $P < 0.05$ ). mRNA of PBMC of the patient group in the acute stage of the disease all expressed FasL.

**Conclusion :** The decrease of peripheral lymphocytes in patients with aseptic meningitis may be caused by upregulated apoptosis and Fas-FasL may be involved in inducing apoptosis.

**Key Words :** Aseptic meningitis, Apoptosis, Fas-FasL

#### 서 론

세포의 apoptosis는 우리 몸의 homeostasis를 유지하기 위하여 필요하며 apoptosis의 적절한 조절은 정상 생리 반응으로 인체내에서 꼭 필요한 현상이다. 하지만 그것이 과다하거나 혹은 부족하게 반응할 때 병변이 발생한다<sup>1)</sup>. 바이러스 감염과 림프구의 apoptosis에 관한 연구는 많이 이루어져 왔으나, 모든 바이러스가 인체에 감염시 똑같은 경로의 apoptosis

과정을 거치는 것이 아니라 지금까지 발견된 몇몇 바이러스들의 apoptosis의 행태는 공통점도 있으나 바이러스 종류에 따라 다른 것으로 나타났다. 본 연구에서는 echovirus30이 원인 바이러스로 밝혀진 1997년 여름에 유행한 무균성 뇌막염 환자에서 말초 혈액 림프구의 면역학적 변화에 관해 알아보려고 하였다. 무균성 뇌막염은 급성으로 발병하여 고열, 두통, 뇌막 자극 증상이 나타나며, 뇌척수액 소견상 균체가 발견되지 않으면서 비교적 짧고 경한 임상 경과를 나타내는 질환이며 이들의 급성기 말초 혈액 림프구의 수는 절대적으로 감소되어 있다. 본 연구는 이것이 말초 혈액 림프구의 apoptosis증가에 의한 것인지 알아보려고 하였고, 또한 Fas-FasL (Fas ligand)체계가 이 질환에서의 apoptosis에 관여하는지

접수: 1998년 9월 17일, 승인: 1998년 11월 9일  
교신저자: 김현영. 분당제생병원 소아과  
Tel: 0342)779-0278, Fax: 0342)779-0894  
E-mail: khy621@dmc.or.kr

에 관해서도 조사하여, 무균성 뇌막염 시 면역학적 병리 기전을 알아보고자 하였다.

**대상 및 방법**

**1. 대상 환자 및 대조군**

1997년 6월부터 7월까지 연세대학교 의료원 소아과에서 척수액 검사 결과 무균성 뇌막염으로 진단된 26명의 환아를 대상으로 하였으며, 대조군은 발열 대조군으로 무균성 뇌막염이 아닌 상기도 감염에 의한 발열을 주소로 응급실에 내원한 환자 10명과 정상 대조군으로 감염 및 면역 질환이 없는 정상 환자 10명을 대상으로 하였다.

**2. 백혈구 수 및 림프구 백분율**

백혈구 수는 coulter STKS를 이용하여 측정하였고, 림프구는 슬라이드를 제작하여 Wright 염색하여 그 수를 측정하여 백분율을 구하였다.

**3. 말초혈액구의 분리, 배양과 림프구 표면 표식자 분석**

헤파린 처리한 말초 혈액을 정맥에서 채취하여 동량의 RPMI1640배지와 잘 혼합한 후 Ficoll을 이용하여 분리하였다. 분리된 단핵구에 CD3, CD4, CD8, CD19 분자에 해당되는 단클론 항체(Becton Dickins, San Jose, CA) 각 10  $\mu$ L를 넣고 30분간 반응시킨 후 0.1% bovine serum albumin이 포함된 PBS로 1회 세척한 후 0.5% paraformaldehyde로 고정시키고 5,000~20,000세포를 FACStar(Beckton Kickinson, San Jose, CA)로 분석하였다 분리한 단핵구 일부는 우태아 10%의 혈청이 함유된 RPMI1640배지 1 mL당  $5 \times 10^5$ 정도의 세포를 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다.

**4. Apoptosis의 평가**

**1) Annexin V 와 Propidium Iodide 염색**

단핵구를 배양하면서 5시간, 24시간 및 48시간에 세포들을 얻어서 FITC가 부착된 Annexin V와 PE(phycoerythrin)가 부착된 Propidium Iodide로 염색한 후 15분간 배양 후 FACScan flow cytometry로 분석하였다. 각각 10,000개의 세포를 읽은 후, Annexin V만 염색되어진 세포는 초기 apoptosis로 Annexin V와 PI가 동시에 염색되어진 세포는 말기 apoptosis로 판독하여 초기 apoptosis 및 초기와 말기를 합한 총 apoptosis율을 구하였고, 세포 크기와 과립성 상태에 따라 소수 포함된 적혈구는 제외시켜 판독하였다.

**2) DNA fragmentation**

24시간째  $4 \times 10^6$ 개의 세포를 분리하여 PBS로 2회 세척후 세포층을 분리하여 lysis buffer(5 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH8) 250  $\mu$ L와 TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 250  $\mu$ L를 넣어 세포를 용해시킨 후 13,000 rpm에 15분간 원심 분리하여 상층액을 새 microfuge tube에 담은 후 5M NaCl 30  $\mu$ l와 100% 에탄올 1 mL를 넣어 -20°C에 하룻밤동안 냉동시켰다. 그 후 13,000 rpm, 15분간 원심 분리 후 상층액을 버리고 침전물을 20-25 분간 말린 후 TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 20  $\mu$ L에 녹여 1.8% agarose gel에 60 mA, 70 volt로 running 시킨 후 ethidium bromide에 염색시켜 apoptosis시에 나타나는 사다리모양의 띠들이 관찰되는 지를 살펴보았다.

**5. 혈청 분리 및 soluble Fas의 효소 결합 면역 측정법**

무균성 뇌막염으로 진단된 11명의 환자에서 입원한 당일인 급성기와 치료 시작후 4~5일이 경과한 아급성기에 혈액을 채취하여 즉시 4°C에서 원심분리하여 혈청을 분리후 -70°C에 냉동 보관하였다. 효소 결합 면역 측정법은 Medical and Biological laboratories(Nagoya, Japan)사의 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 간단히 요약하면 anti-Fas antibody를 carbonate-bicarbonate buffer에 희석하여 ELISA plate에 넣고 부착시킨 후 0.05%(vol/vol) tween 20이 함유된 인산 완충 용액 (PBST, pH 7.4)으로 세척하여 부착되지 않은 항원을 제거하고 5%(vol/vol) normal goat serum이 함유된 PBST (PBST-NGS)로 여백을 차단하였다. 그후 환자의 혈청을 넣고 반응시킨 후 PBST로 세척하고 다시 희석한 peroxidase-conjugated anti-Fas antibody를 넣고 반응시켰다. 여기에 o-phenylenediamine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 기질용액을 넣고 반응시킨 후 2.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 정지시켜 흡광도를 측정하였다.

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

RNeasy Mini Kit(Qiagen, Santa Claris, CA)를 이용하여 total RNA를 분리한 후, total RNA 9  $\mu$ g에 random hexamer(Pharmacia, Uppsala, Sweden) 0.1 O.D.와 M-MLV reverse transcriptase(Gibco BRL, Grand Island, NY) 200U를 이용하여 cDNA를 만든후, 0.5 ml microfuge tube에 cDNA 2.5  $\mu$ L에 10X Reaction buffer 2.5  $\mu$ L, 5mM dNTP 2  $\mu$ L, Taq DNA polymerase 0.5  $\mu$ L와 FasL의 경우 primer 1(5'-ATGTTTCAGCTCTTCCACCTACAGAAGGA-3')와 primer2(5'-CAGAGAGAGCTCAGATACGTTGAC-3'), internal control로 이용한  $\beta$ -actin의 경우에 5'-CGTGGGCCGCC

TAGGCACCA-3'와 5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'의 염기서열을 가지는 oligonucleotide 각각 1 μL씩과 증류수를 넣어 모두 25 μL의 양이 되게 한 후 PCR을 시행하였다. PCR은 94 °C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분의 조건으로 FasL는 35주기, β-actin은 22주기를 시행하여 1.5% agrose gel에서 전기 영동한 후 PCR 산물을 확인하였다.

7. 통계적 처리

급성기 및 아급성기 soluble Fas의 수치 비교는 t-test를 사용하였으며, 백혈구 분석 및 apoptosis율의 비교는 ANOVA를 사용하였으며 P<0.05를 의미있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 말초 혈액 백혈구의 분석

환자군 및 발열대조군, 정상대조군의 백혈구 평균은 각각 11,043±5,441/mm<sup>3</sup>, 4,312±1,055/mm<sup>3</sup>, 8,240±2,150/mm<sup>3</sup>였

으며, 이중 림프구의 빈도는 각각 24.0±16.6%, 56.1±12.1%, 60.1±11.5%로 환자군에서 정상대조군보다 감소하였으며 (P<0.05), 표현형에 따른 변화는 CD3, CD8, CD19는 각군간에 차이를 나타내지 않았으나, CD4의 평균은 각각 31.7±7.1%, 42.7±3.9%, 43.1±5.2%로 환자군에서 정상대조군보다 감소하였다 (P<0.05)(Table 1).

2. 말초 혈액 단핵구에서의 apoptosis의 평가

정상 소아와 무균성 뇌막염 환자의 말초 단핵구를 24시

Table 1. Peripheral Blood Picture of Patients

	Aseptic meningitis	Febrile control	Normal control
WBC count/mm <sup>3</sup>	11,043 ± 5,441	4,321 ± 1,055	8,240 ± 2,150
Lymphocytes(%)	24.0 ± 16.6*	56.1 ± 12.1	60.1 ± 11.5
CD3	60.8 ± 10.2	56.8 ± 8.3	62.9 ± 9.5
CD4	31.7 ± 7.1*	42.7 ± 3.9	43.1 ± 5.1
CD8	29.5 ± 5.2	19.5 ± 2.1	18.1 ± 2.5
CD19	25.5 ± 7.4	15.7 ± 2.1	15.1 ± 3.5

Total 5,000 to 20,000 cells were analyzed.  
\*P<0.05 compared to normal controls

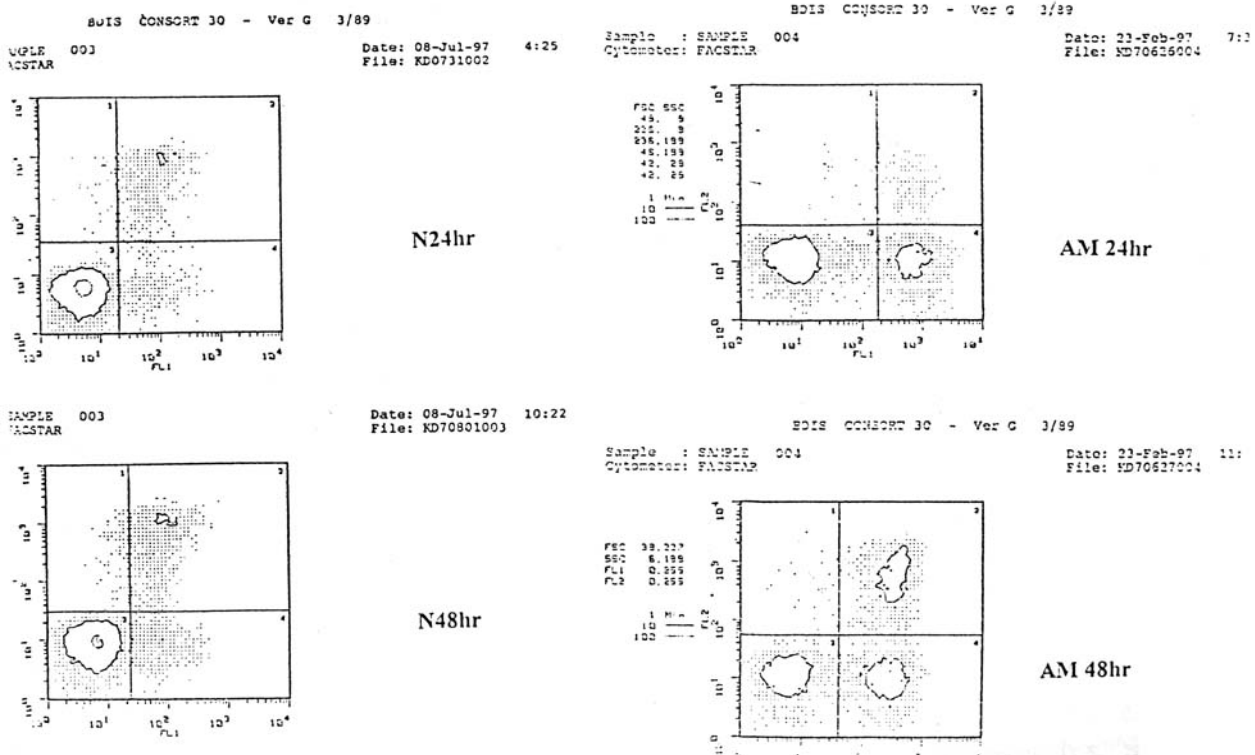


Figure 1. Evaluation of apoptosis in a patient with acute stage of aseptic meningitis and a normal control (N) by Annexin V and PI with cultured peripheral mononuclear cells in 24 hours and 48 hours.

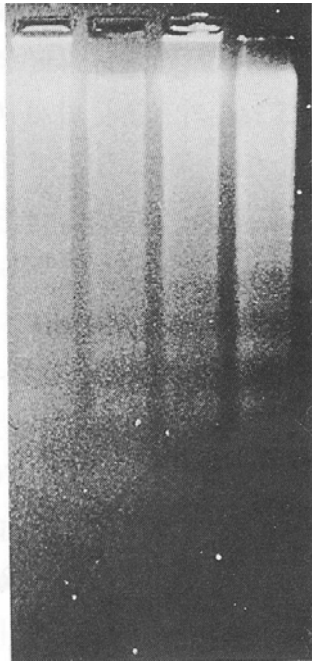


Figure 2. Serial changes of early apoptosis measured by Annexin V (\*\* $P < 0.01$ , compared to normal controls).

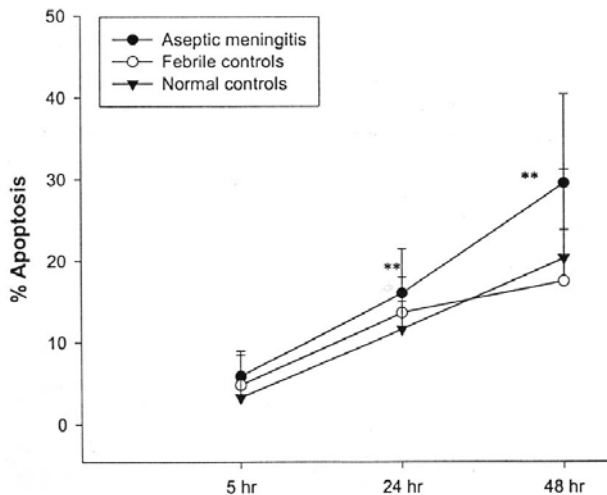


Figure 3. Serial changes of total apoptosis measured by Annexin V & PI (\*\* $P < 0.01$ , compared to normal controls)

간 및 48시간 배양 후 Annexin V와 PI로 염색 후 FACScan으로 분석한 대표적인 그림을 보여주고 있다(Figure 1).

말초단핵구에서의 apoptosis의 평가는 Annexin V만 염색된 초기 apoptosis율과, PI 염색도 같이 된 말기 apoptosis세포군도 포함한 총 apoptosis율로 나누어 살펴본 결과, 5시간 배양 후 초기 및 총 apoptosis율은 각각 환자군이  $4.7 \pm 3.4\%$ ,  $5.9 \pm 3.1\%$ , 정상대조군이  $1.3 \pm 0.5\%$ ,  $3.3 \pm 2.5\%$ , 발열대조군이  $3.0 \pm 2.1\%$ ,  $4.8 \pm 3.6\%$ 로 초기 apoptosis율은 환자군

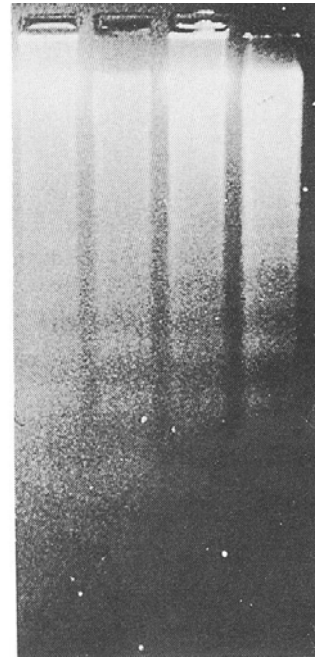


Figure 4. Typical DNA laddering pattern of the 24 hr cultured lymphocytes from 4 different patients with aseptic meningitis.

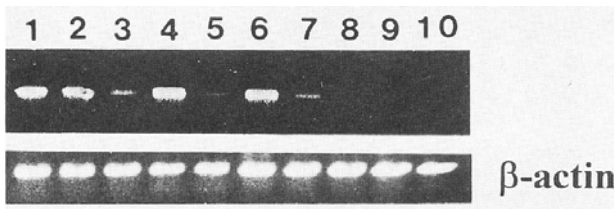
이 두 대조군보다 모두 높았고( $P < 0.01$ ), 총 apoptosis율은 세 군간에 유의한 차이가 없었다. 24시간 배양 후 초기 및 총 apoptosis율은 각각 환자군이  $10.7 \pm 5.9\%$ ,  $16.1 \pm 5.8\%$ , 정상대조군이  $5.5 \pm 1.7\%$ ,  $11.6 \pm 3.4\%$ , 발열대조군이  $5.8 \pm 2.7\%$ ,  $13.6 \pm 4.4\%$ 로 초기 apoptosis율은 환자군이 정상대조군( $P < 0.01$ )과 발열대조군( $P < 0.05$ )보다 높았고, 총 apoptosis율은 환자군이 정상대조군보다 높았으나( $P < 0.01$ ), 발열대조군과는 유의한 차이를 보이지 않았다. 48시간 배양 후 환자군의 초기 apoptosis율은  $17.0 \pm 9.1\%$ 로 정상대조군( $9.2 \pm 1.8\%$ ) 및 발열대조군( $5.8 \pm 2.1\%$ )보다 모두 높았으며( $P < 0.01$ ), 총 apoptosis율도  $29.5 \pm 10.8\%$ 로 정상대조군( $20.3 \pm 2.7\%$ )와 발열대조군( $17.5 \pm 6.2\%$ )보다 모두 높았다( $P < 0.01$ )(Figure 2, 3). 4명의 환자의 말초 단핵구 DNA를 추출하여 gel running한 결과 4개의 lane 모두에서 DNA fragmentation이 관찰되었다(Figure 4)

### 3. FasL mRNA의 발현

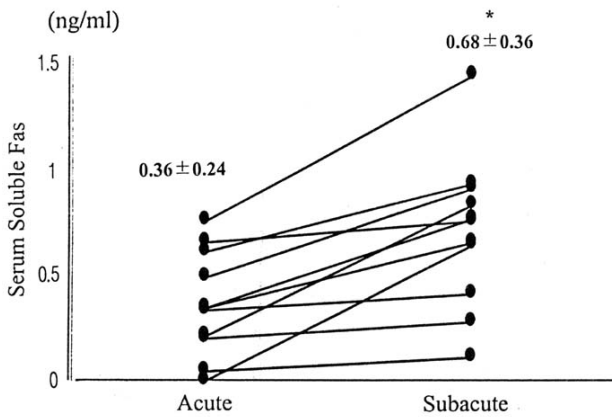
뇌막염 급성기 환자 모두에서 FasL가 발현되었고, 발열대조군과 정상 소아군에서는 한명도 발현되지 않았다(Figure 5).

### 4. 급성기 및 아급성기의 혈청 soluble Fas의 측정

환자군의 soluble fas의 수치는 급성기가  $0.36 \pm 0.24$  ng/



**Figure 5.** Fas-L expression of the peripheral lymphocytes from the 7 different patients with aseptic meningitis during the acute phase of disease (lane 1-7), 2 febrile controls (lane 8-9), and a normal control (lane 10).



**Figure 6.** Serial changes of serum soluble Fas in acute and subacute phase of aseptic meningitis (\* $P < 0.05$ ).

mL, 아급성기가  $0.69 \pm 0.36$  ng/mL로 아급성기가 급성기보다 높았다( $P < 0.05$ )(Figure 6).

**고찰**

Apoptosis는 더 이상 우리몸에서 필요가 없어지거나 손상을 받은 세포를 제거하여줌으로써 우리몸의 항상성 유지에 크게 기여하는데, 생리적 현상으로는 우리몸의 발생과정이나 건강세포의 교체, 내분비에 의한 세포의 위축, 면역계에 작용한다. 그 중 면역계에서의 apoptosis의 역할은 자가반응성 림프구와 면역반응이 일어난 후 과다하게 증식된 세포의 제거와 세포매개성 세포독성에 관여함으로써 우리몸의 정상적인 면역 반응 체계를 형성하는 데에 기여한다. 하지만 어떠한 원인에 적절한 apoptosis의 균형이 깨어질때에 여러 병변이 발생하게 된다<sup>1)</sup>. 예를 들어 자가 반응을 일으키는 면역세포가 적절히 사멸되지 않고 계속 남아 반응을 일으킬 때 자가 면역 질환이 발생되며, HIV(human immunodeficiency virus) 감염시에는 CD4+ T세포가 과다하게 사멸을 일으키게되어 CD4+ T세포에 대한 세포 매개 면역 반응이

소실되어 HIV의 만성 감염이 가능하게 된다<sup>2)</sup>.

이전에는 바이러스 감염시 바이러스가 세포의 transcription 및 translation 경로를 활성화시키고 세포의 막을 파괴시킴으로써 세포를 죽인다고 가정하여 왔었으나, 최근에는 그런 과정외에도 많은 바이러스들이 자살 계획을 활성화시켜 계획 세포사(programmed cell death) 즉, apoptosis의 과정을 통하여 세포를 죽이는 것으로 알려졌다. 이렇게 우리몸에서 바이러스가 감염된 세포의 apoptosis가 일어나는 것은 바이러스가 확산하는 것을 방지하기 위한 숙주의 방어기전이다. 즉, virus 감염 후 세포성 혹은 체액성 면역 반응이 생기기 전에 바이러스에 감염된 세포를 apoptosis 시킴으로써 바이러스의 증식을 방해하고, progeny 바이러스를 형성하여 주위 세포로까지 이행하는 것을 막기 위함이다<sup>3)</sup>. Herpesviruses<sup>4)</sup>, Adenoviruses<sup>5)</sup>, Poxoviruses<sup>6)</sup>, Baculoviruses<sup>7)</sup>, Orthomyxoviruses<sup>8)</sup>, Togaviruses<sup>9)</sup>, 그리고 Piconaviruses<sup>10)</sup>가 배양된 세포에서 apoptosis를 유발하는 것이 발견되었다. 이에 대하여 현재까지 발견된 몇 종류의 바이러스는 감염 시 apoptosis를 억제시키는 물질을 만들어 감염된 세포의 apoptosis를 억제하여 바이러스가 충분히 증식할 수 있는 기회를 제공시킨다. 세포 독성 T 세포도 세포표면에 MHC class I 분자와 함께 바이러스 peptide를 표현하는 세포를 감지하여 죽임으로써 바이러스의 확산을 억제한다. 지금까지 알려진 바이러스의 apoptosis 억제인자로는 bcl-2와 구조 및 기능이 유사한 adenovirus의 Eb1 19K<sup>11)</sup>와 apoptosis 유도 물질인 p53과 결합하여 p53을 파괴시키는 Eb1 55K<sup>12)</sup>, 또 bcl-2와 비슷한 물질로는 Epstein-Barr 바이러스의 BHRF-1<sup>13)</sup>, Herpesvirus saimiri의 ORF16<sup>14)</sup>, Human herpes virus 8의 KS bcl-2<sup>15)</sup> 및 African swine fever virus의 5-HL<sup>16)</sup>이 있으며 bcl-2와 유사하지 않은 baculovirus의 p35<sup>17)</sup> 및 IAP(inhibitor of apoptosis gene)<sup>18)</sup>가 있고, cowpoxvirus의 crmA(cytokine response modifier)<sup>19)</sup>는 serpin족의 protease inhibitor로 사멸 주효분자인 ICE(interleukin 1  $\beta$  converting enzyme)를 억제한다. ICE는 cystein protease로 선충류인 Caenorhabditis elegans의 발생과정중 계획세포사를 유발시키는 ced-3와 유사한 apoptosis 주효분자이다<sup>20)</sup>. 이밖에 cytomegalovirus의 IE1, IE2<sup>21)</sup>와 Rabbit poxvirus의 SPI-1<sup>6)</sup>과 Vaccinia virus의 E3L<sup>22)</sup>등이 있다.

반면 adenovirus를 포함한 몇몇 바이러스는 직접적으로 apoptosis를 유발하는 물질을 만들거나 혹은 간접적으로 숙주의 거대분자 합성을 억제함으로써 세포의 apoptosis를 촉진시켜 증식을 도모하는데 그 기전은 세포의 apoptosis가 일어나기 전 replication cycle을 끝마친 후 감염된 세포의

apoptosis 경로를 활성화시켜 apoptosis가 일어나게 하고, 증식을 마친 바이러스는 apoptosis가 일어난 세포밖을 빠져나오게 된다. 바이러스 감염에 의한 apoptosis의 유발이 숙주에게 해가되는 다른 한가지 기전은 재생이 불가능한 세포의 apoptosis를 유발하는 경우인데, 그 예로 Sindbis 바이러스 감염의 경우 신경 세포의 일부분이 apoptosis됨으로써 치명적인 신경 장애를 일으킨다<sup>23)</sup>. 감염시 apoptosis를 촉진시키는 물질로 밝혀진 것은 adenovirus의 E1A와 ADP(adenovirus death protein)<sup>24)</sup>, chicken anemia virus의 VP3/apoptin<sup>25)</sup>, reovirus의  $\sigma 1$ <sup>26)</sup>, HIV의 gp120<sup>27)</sup>과 Tat<sup>28)</sup>, Sindbis virus의 E2<sup>23)</sup>와 baculovirus의 IE-1<sup>29)</sup>이 있다.

Fas(APO-1, CD95)는 TNF- $\alpha$  family에 속하는 물질로 림프구나 상피세포 등 기능적인 수용체를 가지고 있는 세포에서 Fas ligand와 결합하여 apoptosis를 유발하며 T세포 수용체에 대한 보조 자극인자로도 작용한다<sup>30)</sup>. 면역계에 있어 Fas 및 Fas ligand에 의한 apoptosis는 흉선에서의 T 세포 선택, 면역 반응의 감쇠 및 T 세포에 의한 세포 독성에 관여한다<sup>31, 32)</sup>. Fas/FasL 체계는 바이러스 감염 후 apoptosis 유발에도 중요한 역할을 하는데, influenza시 Fas/FasL 체계에 의해 유도된 세포의 apoptosis가 influenza 바이러스를 죽이는 데에 중요한 역할을 하는 것이 밝혀졌으며<sup>8)</sup>, HIV 감염에서도 HIV-1 Tat protein이 FasL의 표현을 증가시켜 T 세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 밝혀졌다<sup>33)</sup>. 바이러스 감염 후 Fas에 의한 세포의 apoptosis에 관해서는 hepatitis B<sup>34)</sup>를 포함한 다른 바이러스 감염에서도 많이 연구되었다.

본 연구의 대상인 무균성 뇌막염 환자의 척수액에서 분리된 바이러스는 echovirus 30으로 enterovirus의 apoptosis에 관한 보고는 아직 없었는데, 본 연구 결과 감염시 말초 단핵구의 apoptosis가 증가되는 것으로 보아 아직 apoptosis를 억제하는 물질은 없을 것으로 사료되며 apoptosis의 유발요인은 mRNA에서 FasL가 발현된 것으로 보아 Fas/FasL 체계에 의한 것으로 생각된다. 그러므로, Table 1에서와 같이 무균성 뇌막염 환자의 급성기 말초 혈액 림프구의 수가 정상 대조군이나 발열대조군보다 현저하게 떨어진 것은 이들 림프구의 apoptosis가 증가함에 따라 나타난 현상임을 알 수 있었고, 특히 CD4+ T 세포가 가장 많이 apoptosis가 일어남을 추정할 수 있었다.

Fas는 크게 membraneous Fas와 soluble Fas의 두가지 형태로 나뉘는데, soluble Fas는 Fas mRNA의 variant로 exon의 deletion으로 인한 transmembrane domain의 부족으로 soluble, secreted form으로 발현되어지게 된다<sup>35)</sup>. 전신성 홍반성 낭창, 류마티스성 관절염과 같은 자가 면역 질환에서

는 이러한 soluble Fas가 증가됨이 밝혀졌다<sup>36)</sup>. Soluble Fas는 FasL를 중화시킴으로써 Fas/FasL 체계에 의한 apoptosis를 억제하는 역할을 하게 되는데, 자가 면역 질환에서의 이 물질의 역할은 자가 반응성 림프구가 적절히 apoptosis되는 것을 억제하는 것인데 자가 면역 질환 이외에도 HIV 감염이나 HTLV type-1 감염시에도 soluble Fas가 증가된다고 보고하였으며<sup>37)</sup>, 그외에도 혈액 종양 질환에서도 증가되는 것이 발견되었다. 본 연구에서 뇌막염 환자의 아급성기때가 급성기때보다 soluble Fas의 수치가 증가되었는데, 이 결과는 뇌막염의 급성기 때에는 활성화된 림프구 혹은 감염된 림프구의 apoptosis가 Fas/FasL 체계에 의해 활발히 진행되다가, 아급성기가 되면서 급성기의 대량적으로 증가된 림프구의 apoptosis를 정상화가 되기 위한 과정으로 soluble Fas가 증가되는 것이 아닌가 추정할 수는 있었지만, 정확히 soluble Fas의 증가가 이 질환의 경과나 병리기전에 어떻게 작용하는지는 더 연구해야 할 과제이다. 더불어 아급성기 및 회복기에서의 apoptosis의 변화 양상도 비교 분석을 하여야 soluble Fas가 apoptosis에 어떤 영향을 미치는지 파악할 수 있을 것이다.

급성기에 증가된 apoptosis가 과연 어느 세포에서 가장 활발히 일어나는지 알아보려고 Annexin V와 몇가지 림프구 표현형의 monoclonal Ab를 이중염색하여 실험한 결과 apoptosis과정에 있는 세포들은 표현형의 monoclonal Ab가 잘 염색되지 않아 평가를 하기 힘들었고 또한 표현형에 따라 세포를 분리하고자 하면 그 과정 자체가 자극이 되어 apoptosis를 유발시킬 수 있으므로 정확한 평가를 기대하기 힘들었다. 다만 말초 혈액에서의 입원 당시 표현형에 따른 림프구의 분포를 볼 때 CD4+ T 세포가 가장 많이 감소되어 있었으므로 CD4+ T세포가 주로 apoptosis가 일어났을 것으로 추정할 수 있었다.

결론적으로 echovirus에 의한 전신적 감염시 림프구의 apoptosis는 증가됨을 알 수 있었고, 이것은 Fas-Fas ligand 체계에 의해 이루어 질 것으로 사료되었다. 다른 몇 바이러스들에서 발견된 바이러스 자체가 스스로의 생존을 위해 만들어내는 apoptosis 억제 인자는 echovirus에서는 아직 존재하지 않을 것으로 추정된다. 반대로 echovirus가 apoptosis를 증가시키는 물질을 만들어내거나 혹은 간접적으로 숙주에 작용하여 apoptosis를 증가시키는 지에 관해서는 앞으로 연구해 보아야 할 것이며, T세포를 표현형에 따라 분리하여 apoptosis의 정도를 평가할 수 있는 방법도 연구하여 어떠한 표현형의 림프구가 주로 apoptosis 되는지 살펴봐야 할 것이다. 또한 Fas 및 Fas ligand의 mRNA에서의 표현도 림프구

의 표현형에 따라 분리하여 조사하여 본다면 echovirus 감염 시 더 정확한 면역학적 방어기전을 밝혀내는데에 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

**목적** : 무균성 뇌막염 환자의 말초혈액에서는 정상 소아에 비해 현저한 림프구의 감소 소견을 관찰할 수 있는데, 이 현상이 림프구의 apoptosis 증가에 의한 것인지 알아보고자 하였고, 또한 이러한 apoptosis의 증가가 Fas/Fas ligand 체계와 관계가 있는지 알아보려고 하였다.

**대상 및 방법** : 척수액 검사 결과 무균성 뇌막염으로 진단된 26명의 환자와 급성 상기도 감염에 의해 발열이 있는 환자 10명과 정상 소아 10명을 대상으로 하여 말초 단핵구를 분리 후 10% FBS가 함유된 RPMI 1640배지에 각각 5시간, 24시간 및 48시간 배양 후 세포를 분리하여 Annexin V와 PI(Propidium iodide)로 염색하여 flowcytometry 분석법으로 apoptosis를 평가하였다. Soluble Fas의 수치는 급성기 및 아급성기때의 혈청을 분리하여 ELISA법으로 측정하였으며, 모든 대상환자에서 말초 혈액 단핵구의 total RNA 분리 후 RT-PCR을 시행하여 Fas ligand의 표현을 살펴보았다.

**결과** : 5시간 배양 후 말초단핵구의 초기 apoptosis율은 환자군이 두 대조군보다 높았으나( $P < 0.01$ ), 총 apoptosis율은 차이가 나지 않았다. 24시간 배양 후 초기 apoptosis율은 환자군이 정상 및 발열 대조군보다 높았으나( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 총 apoptosis율은 환자군이 정상대조군보다는 높았고( $P < 0.01$ ), 발열대조군과는 차이를 나타내지 않았다. 48시간 배양 후 환자군의 초기 및 총 apoptosis율은 두 대조군보다 모두 크게 증가되어 있었다( $P < 0.01$ ). 환자군의 soluble Fas의 수치는 아급성기가 급성기보다 높았으며( $P < 0.05$ ), 급성기 뇌막염 환자의 말초 단핵구의 mRNA에서 FasL가 모두 표현되었다.

**결론** : 무균성 뇌막염 환자의 말초 혈액 림프구는 급성기시 apoptosis가 증가됨으로 인하여 급격히 감소함을 알 수 있었고, 이런 apoptosis의 증가는 Fas/Fas ligand 체계가 관여하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 보건 의료기술 협동 과제 연구비 지원에 의해 지원되었음.

참 고 문 헌

- 1) Thompson CB: *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science* 267:1456-1462, 1995
- 2) 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* 185:829-839, 1991
- 3) Vaux DL: *Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. Proc Natl Acad Sci USA* 90:786-789, 1993
- 4) 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* 69:4769-4775, 1995
- 5) White E: *Regulation of apoptosis by the transforming genes of the DNA tumor virus adenovirus. Proc Soc Exp Biol Med* 204:30-39, 1993
- 6) Brooks MA, Ali AN, Turner PC, Moyer RW: *A rabbitpox virus serpin gene controls host range by inhibiting apoptosis in restrictive cells. J Virology* 69:7688-7698, 1995
- 7) Clem RJ, Fechtmeier M, Miller LK: *Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. Science* 254:1388-1390, 1991
- 8) Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N, Evans D: *Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. Virology* 68:3667-3673, 1994
- 9) 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* 91:5202-5206, 1994
- 10) Tolskaya EA, Romanova LI, Kolesnikova MS, Ivannikova TA, Smirnova EA, Raikhlin NT, *et al.*: *Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. J Virol* 69:1181-1189, 1995
- 11) White E, Sabbatini P, Debbas M, Wold WS, Kusher DL, Gooding LR: *The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. Mol Cell Biol* 12:2570-2580, 1992
- 12) Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E: *The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. Proc Natl Acad Sci USA* 89:7742-7746, 1992
- 13) 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 90:8479-8483, 1993
- 14) 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 71:4118-4122, 1997
- 15) 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 94:690-694, 1997
- 16) Afonso CL, Neilan JG, Kutish GF, Rock DL : *An African swine fever virus Bcl-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death.* J Virol 70:4858-4863, 1996
- 17) 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 269:1885-1888, 1995
- 18) 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 83:1243-1252, 1995
- 19) Dobbstein M, Shenk T : *Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product.* J Virol 70:6479-6485, 1996
- 20) Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, *et al.* : *Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme.* Science 256:97-100, 1992
- 21) Zhu H, Shen Y, Shenk T : *Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis.* J Virol 69:7960-7970, 1995
- 22) Lee SB, Esteban M : *The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis.* Virology 199:491-496, 1994
- 23) Meyer ME, Gronemeyer H, Turcotte B, Bocquel MT, Tasset D, Chambon P : *Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function.* Cell 57:433-442, 1989
- 24) 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 70:2296-2306, 1996
- 25) Noteborn MH, Todd D, Verschuere CA, de Gouw HW, Curran WL, Veldkamp S *et al.* : *A single chicken anemia virus protein induces apoptosis.* J Virol 68:346-351, 1994
- 26) 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 69:6972-6979, 1995
- 27) Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, Pardee AB : *Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein.* Science 268:429-431, 1995
- 28) 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 Virology 68:3374-3379, 1994
- 29) Prikhod'ko EA, Miller LK : *Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE1.* Virology 70:7116-7124, 1996
- 30) 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 66:233-243, 1991
- 31) 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 1:131-136, 1994
- 32) 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 76:969-976, 1994
- 33) 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 84:2622-2631, 1994
- 34) Mita E, Hayashi N, Iio S, Takehara T, Hijioka T, Kasahara A, Fusamoto H *et al.* : *Role of Fas ligand in apoptosis induced by hepatitis C virus infection.* Biochem Biophys Res Commun 204:468-474, 1994
- 35) Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kidfer MC *et al.* : *Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule.* Science 263:1759-1762, 1994
- 36) Jodo S, Kobayashi S, Kayagaki N, Ogura N, Feng Y, Amasaki Y *et al.* : *Serum levels of soluble Fas/APO (CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases.* Clin Exp Immunol 107:89-95, 1997
- 37) Kamihira S, Yamada Y, Hiragata Y, Yamaguchi T, Izumikawa K, Matsuo Y *et al.* : *Serum levels of soluble Fas/APO-1 receptor in human retroviral infection and associated diseases.* Intern Med 36:166-170, 1997