

단순포진 바이러스 감염이 배양한 혈관 내피세포의 Tissue Factor 및 Thrombomodulin 생성에 미치는 영향

이 광 훈^{1,2} · 방 동 식¹ · 최 현 주¹ · 이 원 재³ · 김 유 찬⁴ · 이 성 낙⁵

연세대학교 의과대학 피부과학교실¹, 면역질환 연구소², 임상의학연구센터 면역학연구실³,
단국대학교 의과대학 피부과학교실⁴, 아주대학교 의과대학 피부과학교실⁵

Regulation of Tissue Factor and Thrombomodulin on Cultured Human Dermal Microvascular Endothelial Cells by Herpes Simplex Virus Infection

Kwang Hoon Lee^{1,2}, Dongsik Bang¹, Hyun-Joo Choi¹, Won Jae Lee³, You-Chan Kim⁴, and Sungnack Lee⁵

*Department of Dermatology¹, Institute for Immunology and Immunological Diseases²,
and Laboratory of Immunology, Medical Research Center³, Yonsei University College of Medicine, Seoul,
Departments of Dermatology, Dankook University College of Medicine⁴, Cheonan,
Ajou University School of Medicine⁵, Suwon, Korea*

Herpes simplex virus (HSV) causes oropharyngeal herpes simplex, genital herpes and keratoconjunctivitis. HSV-infected endothelial cells is a model for vascular injury and possibly the development of atherosclerosis, erythema multiforme, or Behçet's disease. In this study, we infected cultured human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) with HSV. We then measured coagulation factors associated with fibrinogen accumulation, such as tissue factor and thrombomodulin, in cell lysates and culture supernatants from HSV-1-infected HDMEC to observe whether HSV-1 virus induce a pro-coagulant activity in cultured HDMEC. Thereafter, we compared the results with those of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Following the treatment of HSV-1 on cultured HDMEC, the cytopathic effect was observed after 24 hours of incubation and increased until 48 hours of incubation. The expression of tissue factor antigen on HDMEC was induced 4 hours after the treatment of HSV-1. The levels of tissue factor in cell lysates was increased 4 hours after the treatment of HSV-1 to cultured HDMEC and HUVEC, virtually no tissue factor was found in culture supernatants. The maximal levels of tissue factor antigen was found at 16 hours after the treatment of HSV-1 in HDMEC, and 4 hours after the treatment of HSV-1 in HUVEC. The levels of thrombomodulin in cell lysates decreased 4 hours after the treatment of HSV-1 to cultured HDMEC and HUVEC when compared to pretreatment levels. IL-1 α and TNF α were observed at 16 hours of incubation after the treatment of HSV-1 on cultured HDMEC. These data suggest that HSV-1 induce a procoagulant activity in both HDMEC and HUVEC. IL-1 α or TNF α which is produced by HSV infection may play a role in the induction of tissue factor and reduction of thrombomodulin.

Key words : Herpes virus, Endothelial cells, Tissue factor, Thrombomodulin, Coagulation, Cytokines

* 이 연구는 1996년도 한국과학재단 핵심전문 연구비(961-0707-057-2)의 지원으로 수행되었음.

저자연락처 : 이 광 훈, (120-752) 서울시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 피부과학교실, Tel. (02)361-5720 / Fax. (02)393-9157

서론

단순포진 바이러스(Herpes simplex virus: HSV)는 안면-구강 단순포진, 각막염, 재발성 구순포진 및 음부포진 등의 다양한 임상증상을 나타낸다^{1,2}. 또한 HSV 감염은 재발성 구강 궤양, 다형홍반 혹은 베체트병 등 혈관염이 주된 병리조직학적 소견을 갖는 질환들과 동맥경화증의 유발에도 관여하는 것으로 시사되어 왔다^{3,4}.

혈관 내피세포는 혈관의 가장 내측에 단층으로 배열된 고도의 활동성 세포로서 혈관강내의 세포 및 비세포성분과 항상 일차적으로 접촉 있음으로써 다양한 생물학적 반응에 필수적인 역할을 한다^{5,9}. 혈관 내피세포는 혈액의 항상성 유지에 중요한 역할을 하며 울혈(hemostasis) 및 응고 현상을 조절하는 기능을 갖고 있다. 정상상태에서는 비혈전형성 표면을 유지하나, 어떤 자극이나 손상을 받으면 혈액응고 현상을 유발시킨다¹⁰. 혈관 내피세포는 혈관에 대한 울혈 균형의 유지에 필수적인 혈소판 및 수종의 단백질을 조절한다.

Tissue factor는 47kDa의 막성 당단백으로 세포표면에 전 응고 활성(procoagulant activity)을 개시하는데 필수적인 factor VII, factor VIIa에 대한 수용체나 보조인자로 작용한다^{11,12}. 일반적으로 tissue factor는 혈관 내피세포에는 발현되지 않으나 조직손상에 의해 혈관 내피세포가 파괴되면, 평상시 혈관내 factor VII과 tissue factor를 분리해 주는 물리적 장벽이 파괴되고 factorVII-tissue factor 복합체가 형성될 수 있다. Thrombomodulin은 혈관 내피세포의 특이 수용체로서 트롬빈(thrombin)과 복합체를 형성한 후 protein C를 빠르게 활성화하여 혈액응고기전에 관여하는 활성화된 보조 인자들을 파괴하므로써 트롬빈 형성을 억제한다¹³.

배양한 인체 제대정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cells: HUVEC)에 HSV를 감염시키면, 내피세포 표면에 prothrombinase 복합체의 형성을 촉진시켜 전 혈전상태로 되게 되고, 트롬빈에 의해 활성화된 HSV에 감염된 내피세포에 대해 유착도가 증가된다¹⁴⁻¹⁶. 전신적으로 확산된 HSV 감염증에서는 혈관내피세포에서 HSV가 발견되며, 일부 HSV 감염증 병변에서는 백혈구 파쇄성 혈관염의 소견을 보인다. 즉 섬유소 등의 침착과 함께 다핵구가 HSV에 감염된 내피세포에 유착하여 혈관손상을 유도함이 관찰된 바 있다¹⁷. 이외에도 HSV 감염은 내피세포에 당단백의 발현을 유도하여 트롬빈 형성을 증가시키며¹⁸, plasminogen activator를 감소시켜 더욱 응고 작용을 촉진시킨다는 보고도 있다¹⁹. 또한 HSV 감염시 분비되는 것으로 알려진 tumor necrosis factor (TNF)는 intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin, vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)

을 항진시킬 뿐 아니라 혈관 내피세포에서 tissue factor-like 전 응고 활성을 유도하는 작용을 하는 것으로 보고된 바 있다²⁰.

HSV 감염 후 발생하는 혈관염과 혈전형성기전을 규명하기 위한 기초 연구로서 본 연구에서는 HSV감염이 배양한 혈관 내피세포의 응고현상 조절 기능에 미치는 영향을 관찰하고자 배양한 인체진피 미세혈관 내피세포(human dermal microvascular endothelial cells : HDMEC)와 HUVEC에 HSV를 감염시킨 후 면역형광 유량 세포계산 분석(immunofluorescence flow cytometric analysis)과 효소 면역 표지법(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)으로 섬유소 측정에 관여하는 요소들인 tissue factor와 thrombomodulin을 측정 비교하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 배양

아프리카 녹색원숭이 신장에서 유래된 세포주인 Vero 세포(American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, U.S.A.) CCL 81을 숙주세포로 이용하였다. 세포배양을 위한 배지는 10% 우태아 혈청(Gibco Laboratories, Grand Island, NY, U.S.A.)을 포함하는 minimum essential media (MEM)를 사용하였고, 시험관내에 Vero 세포가 자랐을 때 제1형 HSV(HSV-1)KOS 균주(Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka, Japan)를 접종한 후 세포변성 효과가 나타나 점차 커져 숙주세포가 용해될 때까지 증식시킨 다음, 용균반점법(plaque forming assay)을 통하여 바이러스 숫자를 확인하여 사용하였다. 융합된 HDMEC 단층을 세포 1개당 10 plaque forming units (PFU)의 비율로 HSV-1을 감염시켰다. HSV-1에 대한 대조군으로 56 °C의 열로 30분간 처리하여 불활성화시킨 HSV-1과 국립보건원으로부터 공여받은 제2형 HSV (HSV-2) G 균주(ATCC VR-734)를 사용하였다.

2. HDMEC과 HUVEC의 분리배양

신생아 포피로부터 종전의 방법에 따라 HDMEC을 분리하였다^{8,21}. 신생아 포피를 3 mm 크기의 소절편으로 잘게 잘라 0.03% trypsin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MD, U.S.A.) 및 1% ethylenediamine tetracetic acid(Sigma)가 함유된 phosphate-buffered saline으로 37°C에서 10분간 처리한 후 scapel blade 옆면을 이용하여 각각의 소절편을 눌러 절단면으로부터 미세혈관편이 빠져 나오도록 하였다. Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 혼합된 35% Percoll

(Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) 용액을 원침관에 넣고 4°C, 30,000×g에서 10분간 원침하여 밀도구배를 만든 다음 상단에 미세혈관편이 함유된 용액 1 ml를 가한 후 400×g로 실온에서 15분간 원침시켰다. 밀도 1.048 g/ml 이하의 분획(원침시킨 후 나타나는 중간의 백색층)을 다른 원침관에 옮기고 HBSS로 채워 400×g로 실온에서 15분간 다시 원침시킨 후 그 침전물을 미리 gelatin (Sigma)을 처리한 조직 배양용기에 넣고 epidermal growth factor 1 ng/ml (Clonetics Corp., San Diego, CA, U.S.A.), hydrocortisone acetate 1 mg/ml (Sigma), dibutyryl cyclic AMP 5×10^{-5} M (Sigma), glutamine (Sigma) 2×10^{-9} M, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml, amphotericin B 250 mg/ml (Sigma), 30% 인체 AB혈청이 함유된 endothelial basal media (Clonetics Corp, San Diego, CA, U.S.A.)로 37°C, CO₂항온기에서 배양하였다. 배양용기에 부착된 후 역위상차 현미경(inverted phase contrast microscope)하에서 내피세포외의 다른 세포들을 멸균 소독된 25계지 주사침으로 제거하였다. 형태학적 검사 및 면역형광검사를 시행하여 배양된 세포가 순수함을 확인한 후 2-6 계대의 HDMEC을 실험에 사용하였다.

신선한 제대로부터 종전에 기술한 방법²²에 따라 collagenase (Worthington Biochemical Co., Freehold, NJ, U.S.A.) 처리에 의해 HUVEC을 분리하였다. 분리한 HUVEC을 endothelial cell growth supplement 50 µg/ml (Biomedical Technologies, Stoughton, MA, U.S.A.), glutamine 2×10^{-9} M (Sigma), penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml, amphotericin B 250 µg/ml (Sigma), heparin 50 µg/ml (Sigma) 및 20% 우태아 혈청 (Gibco)이 첨가된 Medium 199 (Gibco) 배지에서 배양하였다.

형태학적 검증은 역위상차 현미경으로 평가하였으며, von Willebrand's factor (vWF)의 발현은 면역형광검사로 평가하였다. 세포배양 슬라이드 (Lab Tek[®] Chamber, Miles Lab., Naperville, IL, U.S.A.)에서 배양된 HDMEC을 100% 메탄올로 영하 20°C에서 10분간 고정시킨 후 1:40으로 희석한 rabbit anti-human vWF (anti-factor VIII-associated antigen, Behring Diagnostics, La Jolla, CA, U.S.A.)를 넣고 30분간 반응시킨 다음 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma)와 30분간 반응시키고, 면역형광 현미경으로 관찰하였다.

3. HSV-1의 세포독성 실험

배양한 HDMEC 단층에 HSV-1을 감염시킨 후 1시간, 4시간, 16시간, 24시간, 48시간 후에 H & E 염색을 시행하여

HSV-1에 의한 세포변성 효과를 관찰하였다. 동시에 배양한 HDMEC 단층을 HSV-1에 감염시킨 후 동위원소 ⁵¹Cr (Dupont, Boston, MA, U.S.A.)을 부착시키고 1시간, 4시간, 16시간, 24시간, 48시간 후에 부유 상층액을 수집하여 방사선 감마 측정기로 수집된 가검물로부터 방출되는 방사선량을 측정하였다.

4. HSV에 감염된 혈관 내피세포에서 tissue factor와 thrombomodulin 측정

HDMEC 단층에 HSV, 열로 불활성화시킨 HSV, IL-1 α , TNF α 등을 적정시간 처치한 후 배양하였다. 각 well의 배양상층액을 모아 사용시까지 영하 70°C에서 보관하였다. 남아있는 HDMEC 단층을 EDTA/trypsin 처리하여 수집한 다음 차가운 0.2% BSA가 함유된 Hepes-buffer를 넣고 영하 70°C와 37°C에 3회 번갈아 가며 노출시켜 (freeze-thaw method) 원심분리 후 상층액을 모아 HDMEC 세포 용해액을 준비하였다. Tissue factor와 thrombomodulin을 배양 상층액과 세포 용해액에서 측정하였다.

Tissue factor를 Imubind[®] Tissue Factor ELISA kit (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다. Kit 내의 각 well에 tissue factor 표준용액(0, 50, 100, 200, 500, 1000 pg/ml)과 상기에 기술한 대로 준비한 배양 상층액과 세포 용해액을 각각 1:20과 1:5로 희석한 가검물을 넣고 4°C에서 16시간 배양하였다. Kit내의 세척완충용액으로 4회 세척 후 각 well에 1차 항체를 100 µl 씩 넣고 실온에서 1시간 반응시키고 세척 후 효소가 붙어있는 2차 항체를 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 4회 세척 후 기질과 반응시켰다. 0.5 M H₂SO₄ 50 µl 씩을 떨어뜨려 반응을 중지시킨 후 ELISA 판독기 (Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA, U.S.A.)로 450 nm에서 판독하였다. 표준용액으로 표준곡선을 만든 다음 방정식을 구해 각 well의 양을 환산하였다.

Thrombomodulin을 Asserachrom Thrombomodulin[®] (Diagnostica Stago, France) kit를 사용하여 측정하였다. Kit내의 각 well에 thrombomodulin 표준용액(0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ng/ml)과 상기에 기술한 대로 준비한 배양 상층액과 세포 용해액을 각각 1:20과 1:5로 희석한 다음 가검물을 200 µl 씩 넣고 실온에서 2시간 반응시킨 후 5회 세척하였다. 배합체가 붙은 항체를 넣은 후 실온에서 2시간 반응시킨 후 5회 세척한 다음 기질과 반응시켰다. 3 M H₂SO₄ 50 µl 씩을 떨어뜨려 반응을 중지시킨 후 ELISA 판독기 (Dynatech)로 492 nm에서 판독하였다. 표준용액으로 표준곡선을 만든 다음 방정식을 구해 각 well의 양을 환산하였다.

5. Thrombomodulin 유전자에 대한 semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

1) 역 전사(Reverse Transcription)

HSV를 적정시간 감염시킨 HDMEC으로부터 RNA를 분리하였다. RNA 농도를 측정된 다음 5µg의 total RNA를 65°C에서 3분간 가열 후, 1 mM dNTP, 1.6 ng random primer를 포함한 50 mM Tris-Cl, pH 8.3, 75 mM KCl, 1 mM DTT 완충용액 50 µl에서 400 Unit의 M-MLV reverse transcriptase를 이용하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 여기에서 생성된 single strand cDNA 1 µl를 semi-quantitative PCR 분석에 사용하였다.

2) Thrombomodulin의 oligonucleotide primer

β-actin sense : 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'
β-actin antisense: 5'-GTCCTTAATGTACGCACGATTTC-3'

Thrombomodulin sense : 5'-GGCTACATCTGGACGACG-3'
Thrombomodulin antisense: 5'-TCCGCACGTGCTGCAGCAC-3'

Thrombomodulin sense (nested PCR): 5'-CATCTGCACGGACATCGAC-3'
Thrombomodulin antisense (nested PCR): 5'-GAGATGCCTATGAGCAAG-3'

3) Semi-quantitative PCR

PCR은 25 µl의 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1 µM의 sense와 antisense primer, 1 µl의 위에서 합성된 cDNA를 포함한 용액에 1.25 Unit의 Tag polymerase를 첨가한 후 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초의 PCR 조건에서 사람 thrombomodulin의 경우 35 주기, beta-actin의 경우 27 주기 동안 반응시켰다. 사람 thrombomodulin의 경우는 2차 PCR (nested PCR)을 같은 조건에서 1 µl의 1차 PCR 산물을 이용하여 27 주기 동안 반응하였다. PCR 반응물(10 µl)은 1% ethidium bromide-agarose 겔에 전기영동하여 띠의 명암도를 비교 분석하였다.

6. HDMEC 배양 상청액에서 IL-1α 및 TNFα 측정

IL-1α 및 TNFα의 측정은 Quantikine™ human IL-1α 혹은 TNFα immunoassay kit (R&D Systems, Minneapolis, AN, U.S.A.)를 이용하여 시행하였다. TNFα에 대한 단클론 항체가 처리된 조직 배양용기에 well당 분석 희석용액 50 µl 씩 가하고 표준 용액과 HSV-1을 처치한 후 수집한 HDMEC

배양 상청액을 각각 200 µl씩 가한 다음 실온에서 2시간 반응시킨 후 3회 세척하였다. Horseradish peroxidase가 부착된 IL-1α 혹은 TNFα에 대한 단클론항체를 각각 200 µl씩 가한 후 실온에서 1시간 반응시키고 3회 세척하였다. 기질로서 12.5ml의 hydrogen peroxide와 12.5 ml의 tetramethylbenzidine을 사용 15분전 혼합한 후 각 well에 200 µl 씩 넣은 후 실온에서 20분간 반응시켰다. 2N sulfuric acid 50 µl 씩을 떨어뜨려 반응을 중지시키고 ELISA 판독기 (Dynatech)로 450 nm에서 각 well에서 발현되는 광학밀도를 각각 측정하였다. 농도를 알고 있는 표준 용액의 광학밀도와 농도를 log/log 값으로 환산한 후 선상 회귀 분석법으로 얻은 표준 곡선을 이용하여 HDMEC 배양 상청액에서 IL-1α 및 TNFα의 농도를 산정하였다.

7. 통계처리

검사결과와 유의성은 윌콕슨 부호 순위 검정 (Wilcoxon signed rank test) 및 반복 측정된 자료의 분산분석 (repeated measure of analysis of variance)으로 검증하였고 p값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. Vero 세포 배양조건

10% 우태아 혈청을 포함하는 MEM 배지에서 방추형 모양의 Vero 세포를 관찰할 수 있었으며, Vero 세포에 10⁵ PFU의 HSV-1 처치 후 용균반점이 형성된 전형적인 세포변성 효과를 관찰할 수 있었다.

2. HDMEC에 대한 HSV-1의 세포독성 효과

HSV-1 처치시간에 따른 HDMEC의 H & E 염색 소견상 감염 24시간 후부터 세포변성 효과를 나타냈으며 48시간 후 까지 증가하였다. ⁵¹Cr이 부착된 HDMEC에 HSV-1 처치 후 부유 상청액의 방출되는 방사선의 양을 측정된 결과 처치 전에 비해 처치 16시간까지는 뚜렷한 세포독성이 관찰되지 않았으나 처치 24시간 후 24%로 통계학적으로 유의한 세포독성을 관찰하였으며 48시간 후에도 42.9%로 더욱 증가하였다.

3. HSV-1 감염에 의한 HDMEC 표면 tissue factor 항원의 발현 변화

HDMEC에 10⁵ PFU의 HSV를 첨가하고 4시간 배양한 후 HDMEC 표면 tissue factor 항원의 발현이 소량 유도되었다.

HSV-2 처치 후에도 tissue factor 항원의 발현이 유도되었다 (Fig. 1). HSV-1을 처치하고 16시간 배양한 후에도 배양 4시간에 비해 tissue factor 항원의 뚜렷한 변화를 관찰할 수 없었다. 면역형광 유량 세포분석에서 자극하지 않은 HDMEC에 비해 HSV-1 처치 후 28.2%의 세포에서 tissue factor 항원의 발현을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

4. HSV-1 감염에 의한 혈관내피세포 배양 상청액 및 세포 용해액내 tissue factor 항원 변화

HSV-1 감염 후 HDMEC의 세포 용해액내 tissue factor 항원의 양이 처치 전 34.93 pg/ml에서 127.18 pg/ml로 뚜렷이 증가하였으며, IL-1 α 및 TNF α 처치 후에도 각각 116.11 pg/ml, 132.29 pg/ml로 증가하였다. 그러나 배양 상청액에서는 HSV-1 처치 전후에 거의 tissue factor 항원의 발현을 관찰할 수 없었다 (Table 1). ELISA 검사상 10⁵ PFU의 HSV-1

처치 4시간 후에 HDMEC 세포 용해액에서 tissue factor 항원의 양이 유의하게 증가하였다. IL-1 α , TNF α 의 처치 후에도 증가하였으나 열로 불활성화시킨 HSV-1을 처치시에는 유의한 변화가 없었다. 이러한 증가양상은 HUVEC에서도 동일하였다 (Fig. 3). 배양 상청액에서는 HDMEC과 HUVEC

Table 1. Induction of tissue factor antigen in cell lysates and culture supernatants of HSV-1-infected HDMEC

Group	Supernatants	Lysates
Control	0.91 \pm 0.66	34.93 \pm 4.58
HSV-1	2.49 \pm 0.55	127.18 \pm 30.68*
IL-1 α	1.57 \pm 0.75	116.11 \pm 10.44*
TNF α	2.30 \pm 0.8	132.29 \pm 7.74*

HDMEC were treated with HSV-1(10⁵ PFU), IL-1 α (100 U/ml), TNF α (100 U/ml) for 4 hr and tissue factor antigen was assessed by ELISA. Data are presented as mean \pm SD, * p<0.05 vs untreated HDMEC

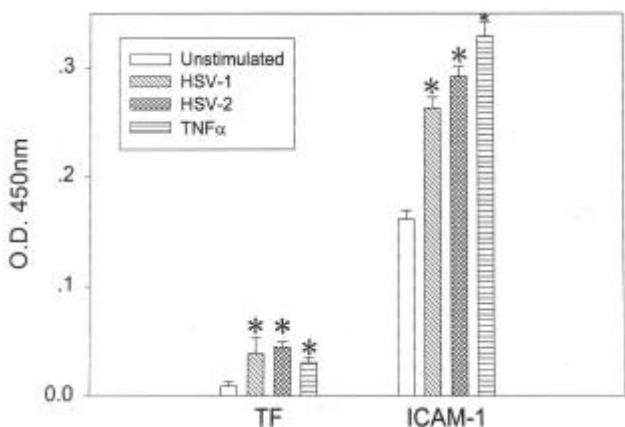


Fig. 1. Regulation of the expression of tissue factor and ICAM-1 on HDMEC by herpesviruses. HDMEC were treated with HSV-1, HSV-2, or TNF α for 4 hr and tissue factor and ICAM-1 expression was assessed by ELISA. Data are presented as mean \pm SD, * p<0.05 vs untreated HDMEC

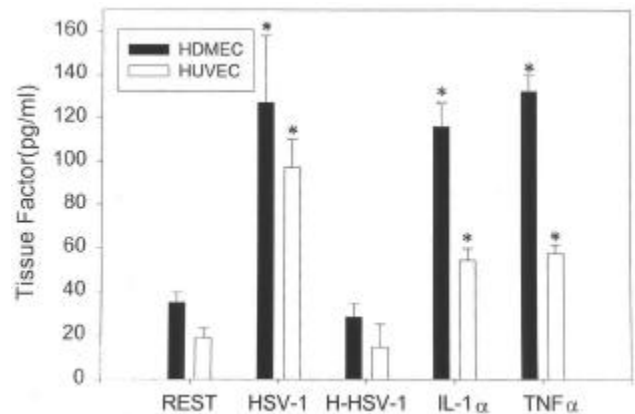


Fig. 3. Effect of HSV-1 on the induction of tissue factor antigen in cell lysates of HDMEC and HUVEC. HDMEC and HUVEC were treated with HSV-1(10⁵ PFU), heat-inactivated HSV-1(H-HSV-1), IL-1 α (100 U/ml) or TNF α (100 U/ml) for 4 hr and lysates were obtained by freeze-thaw method. Total amount of tissue factor antigen was measured by ELISA. Data are presented as mean \pm SD, * p<0.05 vs untreated HDMEC

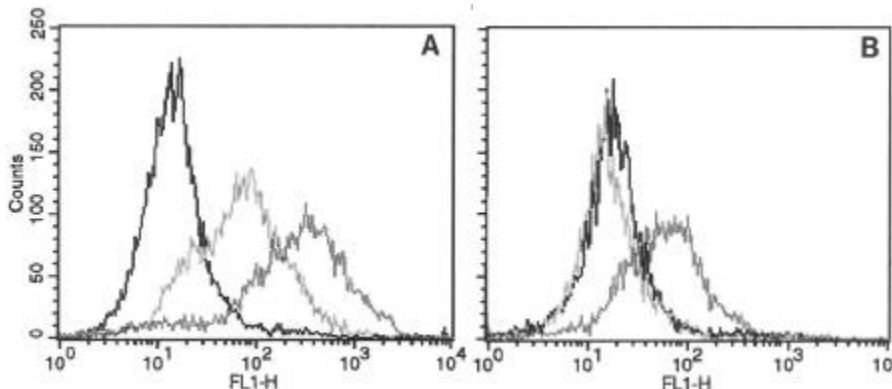


Fig. 2. Immunofluorescence flow cytometric analysis of the expression of tissue factor and ICAM-1 on HSV-1 infected HDMEC. HDMEC were treated with HSV-1(10⁵ PFU) for 4 hr and ICAM-1 (A) and tissue factor (B) expression were analyzed by FACStar. black line: control using irrelevant antibody, green line: unstimulated HDMEC, red line: HSV-1-treated HDMEC

모두에서 tissue factor 항원을 거의 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

HUVEC 세포 용해액에서 HSV-1 처치 후 배양시간에 따른 tissue factor 항원의 변화를 보면 10^5 PFU의 HSV-1 처치 4시간 후에 처치 전 18.71 pg/ml에 비해 97.18 pg/ml로 최대치에 달하였다가 16시간 후에 75.37 pg/ml, 24시간 후에 45.24 pg/ml로 차츰 감소하였다. 반면 HDMEC 세포 용해액에서는 처치 전 34.93 pg/ml에서 HSV-1 처치 4시간 후에 127.18 pg/ml, 16시간 후에 188.41 pg/ml로 최대치에 달하였다가 24시간 후에는 67.65 pg/ml로 감소되는 양상을 보여 HUVEC에 비해 tissue factor 생성량이 약간 많았고 또한 다소 늦게 생성되는 경향을 보였다(Fig. 5). 배양 상청액에서의 처치시간에 따른 변화는 너무 소량이라 큰 의미는 없었으나, HDMEC 및 HUVEC 모두에서 처치 4시간 후에 최대치를 보였다(Fig. 6).

5. HSV-1 감염에 의한 혈관 내피세포 배양 상청액 및 세포 용해액내 thrombomodulin 항원 변화

자극하지 않은 HDMEC 세포 용해액에서 검출되는 thrombomodulin 항원의 양은 매우 적었다. ELISA 검사상 10^5 PFU의 HSV-1 처치 4시간 후에 HDMEC 세포 용해액에서 thrombomodulin 항원의 양이 유의하게 감소하였다. IL-1 α 와 TNF α 의 처치 후에도 약간 감소하였고, HUVEC에서도 동일한 양상을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다. 열로 불활성

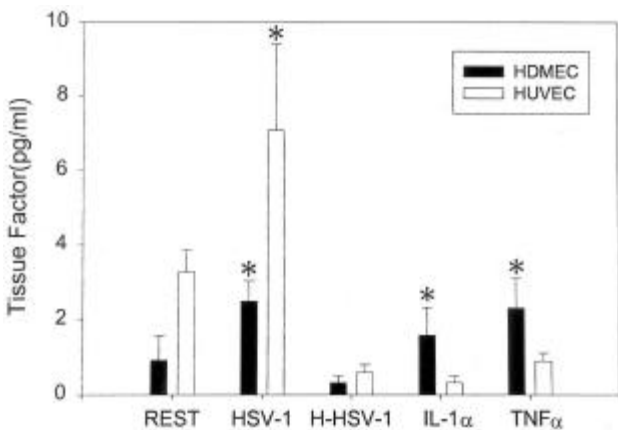


Fig. 4. Effect of HSV-1 on the induction of tissue factor antigen in culture supernatants of HDMEC and HUVEC. HDMEC and HUVEC were treated with HSV-1 (10^5 PFU), heat-inactivated HSV-1 (H-HSV-1), IL-1 α (100 U/ml) or TNF α (100 U/ml) for 4 hr and supernatants were harvested. Total amount of tissue factor antigen was measured by ELISA. Data are presented as mean \pm SD, * $p < 0.05$ vs untreated HDMEC

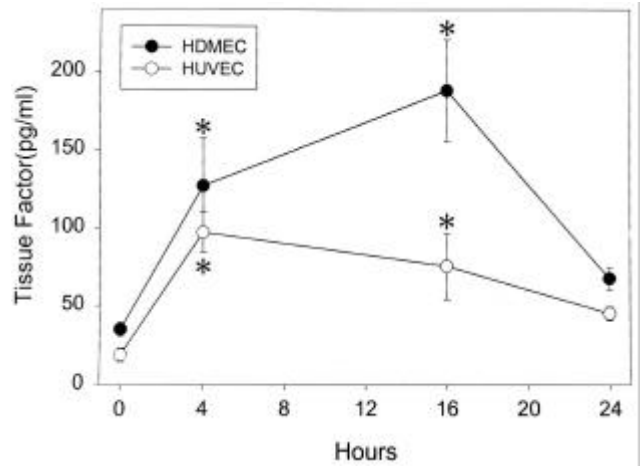


Fig. 5. Time course of HSV-1-induced tissue factor antigen in cell lysates of HDMEC and HUVEC. Following the treatment of HSV-1 (10^5 PFU) on HDMEC and HUVEC, total amount of tissue factor antigen was measured by ELISA after 4, 16 and 24 hr of incubation. Data are presented as mean \pm SD, * $p < 0.05$ vs untreated HDMEC

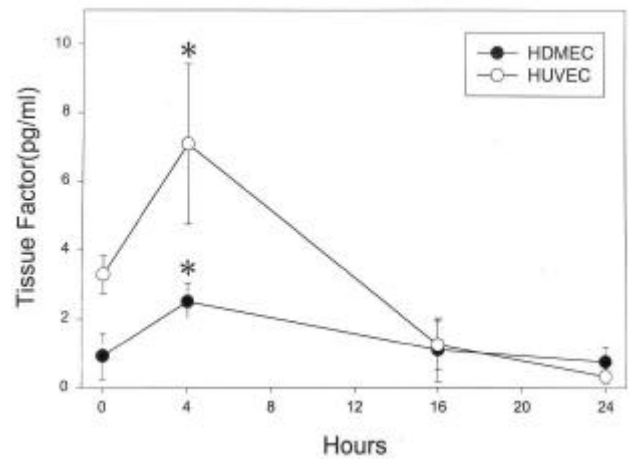


Fig. 6. Time course of HSV-1-induced tissue factor antigen in culture supernatants of HDMEC and HUVEC. Following the treatment of HSV-1 (10^5 PFU) on HDMEC and HUVEC, total amount of tissue factor antigen was measured by ELISA after 4, 16 and 24 hr of incubation. Data are presented as mean \pm SD, * $p < 0.05$ vs untreated HDMEC

화 시킨 HSV-1을 처치시에는 유의한 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 7). 배양 상청액에서는 HDMEC과 HUVEC 모두에서 thrombomodulin 항원의 생성을 관찰할 수 없었다(Fig. 8).

HDMEC과 HUVEC 세포 용해액에서 HSV-1 처치 후 배양 시간에 따른 thrombomodulin 항원의 변화를 보면 HSV-1 처치 전 12.21 ng/ml, 12.3 ng/ml에서 10^5 PFU의 HSV-1 처치 4시간 후에 각각 10.5 ng/ml, 7.6 ng/ml로 최저치에 달하였다가 16시

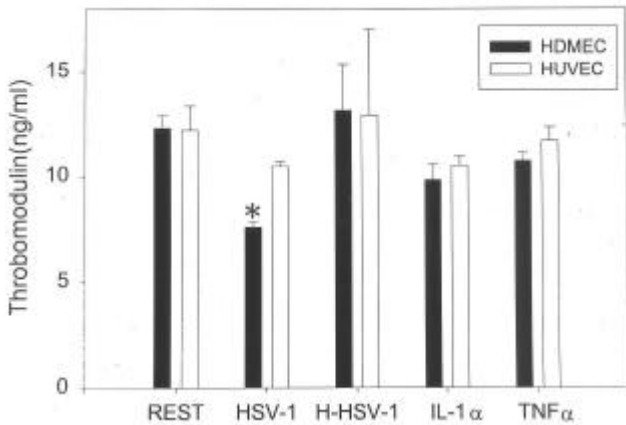


Fig. 7. Effect of HSV-1 on the induction of thrombomodulin antigen in cell lysates of HDMEC and HUVEC. HDMEC and HUVEC were treated with HSV-1 (10^5 PFU), heat-inactivated HSV-1 (H-HSV-1), IL-1 α (100 U/ml) or TNF α (100 U/ml) for 4 hr and lysates were obtained by freeze-thaw method. Total amount of thrombomodulin antigen was measured by ELISA. Data are presented as mean \pm SD, * p<0.05 vs untreated HDMEC

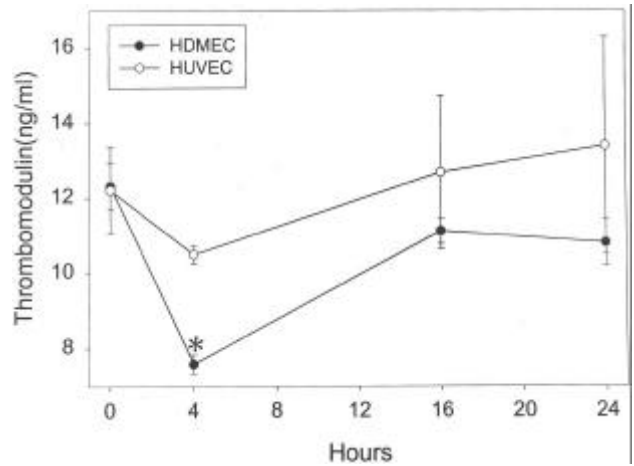


Fig. 9. Time course of HSV-1-induced thrombomodulin antigen in cell lysates of HDMEC and HUVEC. Following the treatment of HSV-1 (10^5 PFU) on HDMEC and HUVEC, total amount of thrombomodulin antigen was measured by ELISA after 4, 16 and 24 hr of incubation. Data are presented as mean \pm SD, * p<0.05 vs untreated HDMEC

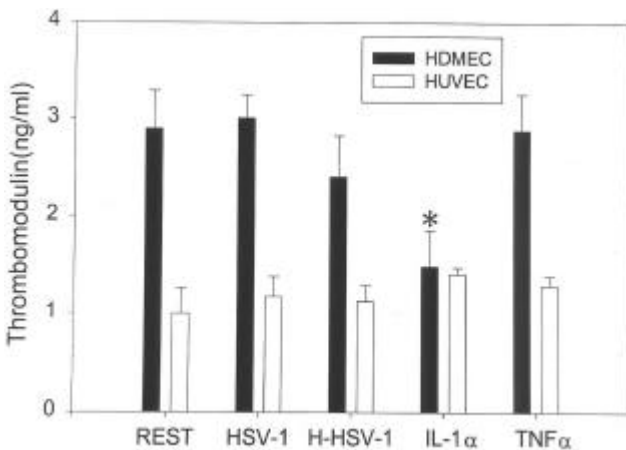


Fig. 8. Effect of HSV-1 on the induction of thrombomodulin antigen in culture supernatants of HDMEC and HUVEC. HDMEC and HUVEC were treated with HSV-1 (10^5 PFU), heat-inactivated HSV-1 (H-HSV-1), IL-1 α (100 U/ml) or TNF α (100 U/ml) for 4 hr and supernatants were harvested. Total amount of thrombomodulin antigen was measured by ELISA. Data are presented as mean \pm SD, * p<0.05 vs untreated HDMEC

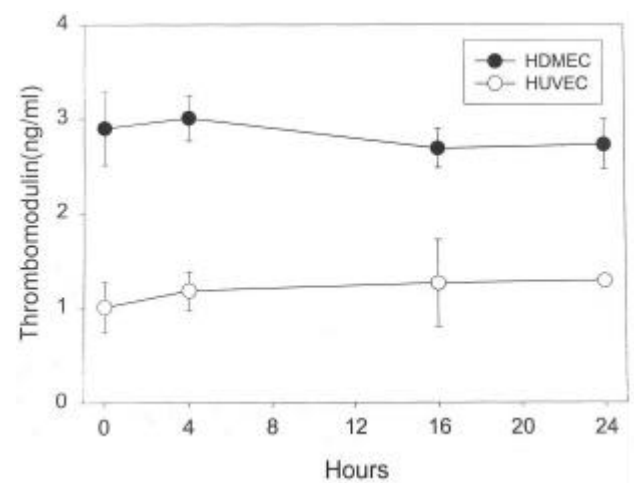


Fig. 10. Time course of HSV-1-induced thrombomodulin antigen in culture supernatants of HDMEC and HUVEC. Following the treatment of HSV-1 (10^5 PFU) on HDMEC and HUVEC, total amount of thrombomodulin antigen was measured by ELISA after 4, 16 and 24 hr of incubation. Data are presented as mean \pm SD, * p<0.05 vs untreated HDMEC

간 후에 12.7 ng/ml, 11.1 ng/ml로 정상치로 환원하였다(Fig. 9). 배양 상청액에서의 처치시간에 따른 thrombomodulin 항원 발현상 유의한 감소를 관찰할 수 없었다(Fig. 10).

6. Thrombomodulin 유전자에 대한 RT-PCR 결과

HSV-1 처치 전, 처치 후 1시간 배양한, 처치 후 4시간 배

양한, 열처리로 비활성화한 HSV-1을 처치한 HDMEC에서 thrombomodulin 유전자에 대한 RT-PCR을 시행한 결과, 모든 lane에서 동일한 200 bp 크기의 DNA분절을 보였으며, 처치 전에 비해 모든 처치군에서 발현의 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 11).

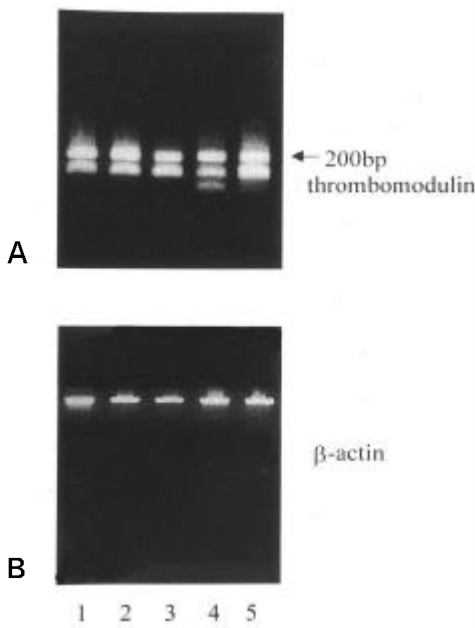


Fig. 11. Analysis of RT-PCR product of thrombomodulin in HSV-1-infected HDMEC. (A) thrombomodulin mRNA, (B) β -actin mRNA. lane 1: Unstimulated HDMEC, lane 2: lipopolysaccharide stimulation for 1hr, lane 3: heat-inactivated HSV-1-treatment for 1hr, lane 4: HSV-1-treatment for 1hr, lane 5: HSV-1-treatment for 4hr.

7. HSV-1 처치 후 HDMEC 배양 상청액에서 IL-1 α 및 TNF α 의 농도

HSV-1 처치 후 HDMEC 배양 상청액에서 검출된 IL-1 α 의 농도는 배양 16시간 후 15.33 ± 2.08 pg/ml, TNF α 도 배양 16시간 후 HDMEC 배양 상청액에서 32.14 ± 0.77 pg/ml로 검출되었다(Table 2).

Table 2. Induction of IL-1 α and TNF α in culture supernatants of HDMEC by HSV-1 infection

Group	IL-1 α	TNF α
Unstimulated	0.11 \pm 0.13	0.78 \pm 0.37
HSV-1-stimulated		
0	0.09 \pm 0.04	1.04 \pm 0.59
1hr	0.07 \pm 0.04	2.63 \pm 1.56
4hr	0.08 \pm 0.4	2.65 \pm 0.73
16hr	15.33 \pm 2.08	32.14 \pm 0.77*
24hr	0.12 \pm 0.09	1.49 \pm 1.35

Data are presented as mean \pm SD, * p<0.05 vs untreated HDMEC unit: pg/ml

고 찰

혈관 내피세포는 혈액의 항상성 유지에 중요한 역할을 하며 울혈 및 응고 현상을 조절하는 기능을 갖고 있다. 정상상태에서는 비혈전형성 표면을 유지하나, 어떤 자극이나 손상을 받으면 혈액응고 현상을 유발시킨다. Tissue factor는 47 kDa의 막성 당단백으로 세포표면에 전응고 활성을 개시하는데 필수적인 factor VII, factor VIIa에 대한 수용체나 보조인자로 작용한다^{11,12}. 또한 factor IX을 활성화하므로써 내인성 경로를 통해 factor X를 활성화하는 것으로 알려져 있다²³. Tissue factor 및 factor VII, VIIa 생분자 복합체는 제한성 단백질 분해에 의해 factor IX 및 X을 활성화하고 결국 트롬빈 생성과 섬유소 생성을 유발하여, 울혈 및 혈전형성에 중요한 역할을 한다. 따라서 tissue factor의 발현 조절은 이러한 평형을 유지하는데 필수적이다. Tissue factor의 발현을 조절하는 인자로서 IL-1, TNF 등의 사이토카인, endotoxin, 항체, 면역복합체 및 혈전 등이 알려져 있다²⁴⁻²⁸.

일반적으로 tissue factor는 혈관 내피세포에는 없다. 그러나 조직손상에 의해 혈관 내피세포가 파괴되면, 평상시 혈관 내 factor VII과 tissue factor를 분리해 주는 물리적 장벽이 파괴되고 factor VII/tissue factor 복합체가 형성될 수 있다. 배양한 혈관내피세포에 HSV를 감염시키면 내피세포 표면에 트롬빈 전구물 복합체의 형성을 촉진시켜 전 혈전상태로 되게 되고, thrombin에 의해 자극된 혈소판은 HSV에 감염된 내피세포에 대해 유착도가 증가되며^{14,15}, HUVEC 표면의 tissue factor 활성도가 항진되고, thrombomodulin 발현이 감소되므로 결국 혈액 응고작용을 촉진시킨다¹⁶. 이러한 연구들은 대부분 배양한 HUVEC을 이용하여 측정되었다. 본 연구의 착안점은 HSV-1에 감염된 미세혈관 내피세포인 HDMEC이 종전의 HUVEC을 이용한 실험결과와 동일하게 혈액응고작용에 관여하는지를 관찰하는 것이다. 최근의 보고에 따르면 HSV-1 감염 후 배양한 HUVEC에서 전응고 상태가 관찰되었고 이러한 현상은 tissue factor의 발현 의존성 양상을 보였다¹⁶. 따라서 본 연구에서는 tissue factor의 발현 양상을 세포표면, 배양상청액, 세포용해액 등에서 측정 비교하였다.

Tissue factor의 발현은 HDMEC 표면에서 면역형광유량검사에서만 관찰되었고 ELISA 검사에서는 소량의 증가를 보였다. 또한 세포 용해액에서 현저히 높게 발현되었다. TNF α 등의 자극에 의해 유발된 혈관내피세포의 tissue factor 발현 분포는 상층부보다는 주로 세포막의 기저부나 측면의 세포 표에서 발현되는 것으로 보고되었으며²⁹, 세포 표면 발현에 비해 세포 용해액에서 수배 높은 tissue factor 활성도를

관찰하고 세포밖보다는 세포내에 더 많은 tissue factor가 존재함을 시사하였다³⁰. 본 연구에서 보여준 면역형광 유량세포분석상 tissue factor의 발현이 관찰되었음에도 ELISA검사에서는 미약하게 발현된 것은 상기의 보고들과 일치하는 결과로 생각된다. HSV-1 감염 후 증가된 tissue factor 항원의 발현정도는 HUVEC에 비해 HDMEC에서 2배정도 높았으나, 이는 배양한 세포간의 차이가 있을 수 있기 때문에 절대적인 결과는 아닐 것으로 생각한다. HSV-1 감염 배양시간에 따른 tissue factor의 발현 양상은 HUVEC에 비해 HDMEC에서 약간 지연적 경향을 나타내었다.

Thrombomodulin은 혈관 내피세포의 특이 수용체로서 트롬빈과 복합체를 형성한 후 protein C를 빠르게 활성화하여 혈액응고기전에 관여하는 활성화된 보조인자들을 파괴함으로써 트롬빈 형성을 억제한다¹³. 혈관내피세포에 HSV-1을 감염시키면 thrombomodulin 항원이 감소하고 protein C 활성이 억제되어 감염된 혈관내피세포 부위에 혈전 형성을 촉진하고 단핵구의 부착을 증가시키는 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서 HDMEC과 HUVEC 모두의 세포 용해액에서 thrombomodulin 항원의 발현은 매우 미약하였지만 HUVEC에 비해 HDMEC에서 HSV-1 감염 4시간 후에 thrombomodulin 항원의 뚜렷한 발현감소를 관찰할 수 있었다. RT-PCR 분석에서는 thrombomodulin DNA의 변화를 관찰하지 못하였다.

본 연구에서 HSV-1 감염 후 4시간 이내에 HDMEC에서 전응고 현상과 상관된 tissue factor 항원의 증가와 thrombomodulin 항원의 발현 감소를 관찰하였다. 이러한 결과는 본 연구에서도 확인한 바와 같이 HSV-1 감염 후 HDMEC으로부터 IL-1 α , TNF α 가 생성되고, 이들 사이토카인에 의해 HDMEC tissue factor 항원의 발현이 유도되고 thrombomodulin 항원의 발현이 감소될 것으로 사료된다.

베체트병의 병인은 확실치 밝혀져 있지 않으나 HSV가 발병에 관여한다는 증거로서 베체트병 환자의 타액과 순환 림프구에서 HSV-1 DNA가 각각 검출된 바 있으며^{31,32}, 베체트병 환자의 말초혈액에서 채취하여 배양한 후 phytohaemagglutinin으로 자극된 림프구내에서는 HSV-1이 자라지 않았으나 정상인의 말초혈액에서 채취된 림프구내에서는 HSV-1이 증식되었다³³. 또한 *in vitro*에서 HSV-1으로 자극된 베체트병 환자의 CD4+ 및 CD8+림프구가 정상 세포나 mumps virus 항원이 부착된 세포가 아닌 HSV-1 항원이 부착된 세포만을 파괴하여 HSV-1 특이한 세포독성을 통한 세포매개면역이 보고되었다³⁴. HSV-1 감염이 직접적으로 혈관내피세포 기능에 영향을 미쳐 전응고 활성도를 유발할 수 있음을 보여주어 이러한 결과는 베체트병에서 흔한 피부증상인 혈

전염의 유발기전을 밝히는데 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 생각한다. 또한 HSV-1이 원인으로 의심되는 다형홍반, 홍역 바이러스가 원인으로 최근 제시되고 있는 Crohn씨 병, HSV-1 또는 cytomegalovirus를 하나의 유발인자로서 보고되고 있는 동맥경화증 등의 질환에서도 발병 기전을 밝히는데 도움이 될 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Highet AS, Kurtz J. *Viral infections*. In: Champion RH, Burton JL, Ebling FJG, eds. *Textbook of dermatology*. 5th ed. London:Blackwell Scientific Publications, 1992;879-85
2. Crumpacker CS, Gulick RM. *Herpes simplex*. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, et al, eds. *Dermatology in general medicine*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc., 1993;2531-43
3. Straus SE, Rooney JF, Sever JL, et al. *Herpes simplex virus infection:biology, treatment, and prevention*. Ann Intern Med 1985;103:404-12
4. Denman AM, Hylton W, Pelton BK, et al. *The viral etiology of Behcet's syndrome*. In: Lehner T, Barnes CG, eds. Recent Advances in Behcet's Disease. Congress and Symposium Series No. 103. London: Royal Society of Medicine Services, 1986;23-36
5. Pober J. *Cytokine-mediated activation of vascular endothelium*. Am J Pathol 1988;133: 426-33
6. Berg EL, Goldstein LA, Jutila MA, et al. *Homing receptors and vascular addressins : cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic*. Immunol Rev 1989;108:5-18
7. Rice GE, Bevilacqua MP. *An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion*. Science 1989;246:1303-6
8. Springer TA. *Adhesion receptors of the immune system*. Nature 1990;346:425-34
9. Lee KH, Lawley TJ, Xu Y, Swerlick RA. *VCAM-1, ELAM-1, and ICAM-1-independent adhesion of melanoma cells to cultured human dermal microvascular endothelial cells*. J Invest Dermatol 1992;98:79-85
10. Savage COS, Cooke SP. *The role of the endothelium in systemic vasculitis*. J Autoimmunity 1993;6:237-49
11. Rapaport SI. *Regulation of the tissue factor pathway*. Ann New York Acad Sci 1991;614: 51-62
12. Nemerson Y. *Tissue factor and hemostasis*. Blood 1988; 71:1-8
13. Esmon CT. *The regulation of natural anticoagulant pathways*. Science 235:1348-52
14. Benditt EP, Barrett T, McDougall JK. *Viruses in the etiology of atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci USA 1983;80:6386-9

15. Visser MR, Tracy PB, Vercellotti GM, et al. *Enhanced thrombin generation and platelet binding on herpes simplex virus-infected endothelium*. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85: 8227-30
16. Key NS, Vercellotti GM, Winkelmann JC, et al. *Infection of vascular endothelial cells with herpes simplex virus enhances tissue factor activity and reduces thrombomodulin expression*. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:7095-9
17. Friedman HM, Macarak EJ, MacGregor RR, Wolfe J, Kefalides NA. *Virus infection of endothelial cells*. J Infect Dis 1981;143:266-73
18. Etigin OR, Silverstein RL, Friedman HM, Hajjar DP. *Viral activation of the coagulation cascade: Molecular interaction at the surface of infected endothelial cells*. Cell 1990;61:657-62
19. Bok RA, Jacob HS, Balla J, et al. *Herpes simplex virus decrease endothelial cell plasminogen activator inhibitor*. Thromb Haemost 1993;69:253-8
20. Wakefield PE, James WD, Samlaska CP, Meltzer MS. *Tumor necrosis factor*. J Am Acad Dermatol 1991;24:675-85
21. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. *Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures*. J Cell Biol 1988;107:1589-98
22. Jaffe EA, Nachman RI, Becker CG, Minick CR. *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphology and immunological criteria*. J Clin Invest 52:2745-2756, 1973
23. Qsterud B, Rapaport SI. *Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: Additional pathway for initiating blood coagulation*. Proc Nat Acad Sci 1977;74:5260-4
24. Colucci M, Balconi G, Lorenzet R, et al. *Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin*. J Clin Invest 1983;71:1893-6
25. Brox JH, Osterud B, Bjorklid E, Fenton JW. *Production and availability of thromboplastin in endothelial cells: The effects of thrombin, endotoxin and platelets*. Br J Haematol 1984;57: 23.9-46
26. Galdal KS, Lyberg T, Evensen SA, Nilsen E, Prydz H. *Thrombin induces thromboplastin synthesis in cultured vascular endothelial cells*. Thromb Haemost 1985;54:373-8
27. Bevilacqua MP, Poher JS, Manjeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. *Interleukin 1(IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells*. J Exp Med 1984;160:618-23
28. Nawroth PP, Stern DM. *Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor*. J Exp Med 1986;163:740-5
29. Mulder AB, Hegge-Papign KSM, Magiels CPZ, et al. *Tumor necrosis factor α -induced endothelial tissue factor is located on the cell surface rather than in the subendothelial matrix*. Blood 1994;84:1559-66
30. Andoh K, Pettersen KS, Filion-Myklebust C, Prydz H. *Observations on the cell biology of tissue factor in endothelial cells*. Thromb Haemost 1990;63:298-302
31. Bonass WA, Stewart JA, Chamberlain MA, Halliburton IW. *Molecular studies in Behcet's disease*. In: Lehner T, Barnes CG, eds. Recent advances in Behcet's disease. London: Royal Society of Medicine, 1986:37-54
32. Lee E-S, Lee S, Bang D, Cho YH, Sohn S. *Detection of herpes simplex virus DNA by polymerase chain reaction in saliva of patients with Behcet's disease*. In: Godeau P, Wechsler B, ed. The 6th International Conference on Behcet's Disease, Paris:Elsevier Science Publishers B.V., 1993:83-6
33. Denman AM, Fialkow PJ, Pelton BK, et al. *Lymphocyte abnormalities in Behcet's syndrome*. Clin Exp Immunol 1980;42:175-82
34. Hamzaoui K, Kahan A, Ayed K, Hamza M. *Cytotoxic T cells against herpes simplex virus in Behcet's disease*. Clin Exp Immunol 1990;81:390-5