

## 한탄바이러스의 섬유아세포 감염에 대한 Integrin 항체의 억제 효과

영남대학교 의과대학 미생물학교실

박호선 · 김기득 · 김성광

### 서 론

한탄바이러스는 Bunyaviridae의 한탄바이러스 속에 속하는 기본형 바이러스로 급성 열성 질환인 신증후출혈열의 병원체이다. 신증후출혈열의 주소견인 출혈과 신부전이 발생하는 병리 기전은 맥관계의 취약성, 혈소판의 기능 부전, 범발성혈관내 응고증, 면역복합체의 작용 및 요독증 등이 주목되었고, 특히 혈관내피세포의 손상에 의한 혈관 투과성의 증가 및 혈액응고계의 변화가 중요한 요소로 작용한다고 보고되었다(이정상, 1985; 이호왕 등 1985; 정상인 등, 1996). 급성 신부전이 일어나는 기전으로는 신모세혈관의 손상에 의해 발생한 간질성 부종으로 세뇨관과 세뇨관 주위의 혈관이 압박을 받아 꺾이고 무뇨가 발생한다는 가설, 신세뇨관의 괴사가 그 원인이라는 가설, 저혈압이나 쇼크가 신기능을 악화시킨다는 가설 등이 있으나 아직까지 확실한 병리 기전은 밝혀지지 않았다.

이와 같이 신증후출혈열의 병리 기전에 대한 연구가 부진한 이유는 사람과 동일한 증상을 나타내는 동물 모델이 개발되지 않았기 때문이며 현재는 배양된 세포를 이용하여 병리 현상을 연구하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 한탄바이러스를 배양세포에서 증식시키고자 할 때는 주로 African

monkey kidney 세포주인 VeroE6와, 사람의 폐암세포주인 A549 등이 널리 사용되고 있으며, 사람의 혈관내피세포, T 임파구, 폐섬유아세포, 신장암세포, 간암세포 및 Mongolian gerbil fibroblasts (이하 MGF) 등에서도 한탄바이러스가 잘 증식한다고 보고되고 있다(김혜숙 등, 1991; Pensiero 등, 1992; 박호선 등, 1993; 김근호 등, 1995; 정상인 등, 1996).

신증후출혈열 환자의 신장 부검 소견상 신세뇨관의 괴사나 신세뇨관 간질내의 임파구 침윤이 특징적으로 나타나고, 최근 미국에서 발생하고 있는 한탄바이러스 속의 Sin Nombre 바이러스가 유발하는 hantavirus pulmonary syndrome의 부검 소견에도 폐수종 및 폐간질에 임파구 침윤이 특징적으로 나타난다(이은주 등, 1991; Hjelle 등, 1994). 이러한 사실로 미루어 볼 때 한탄바이러스에 의한 병리 기전은 혈관내피세포외에도 혈관밖의 조직, 즉 신세뇨관 간질이나 폐간질에 한탄바이러스가 감염되어 염증을 일으키는 과정에서 혈관내피세포 사이로의 염증 세포의 이동 및 심한 혈관의 유출이 관여하고 있다고 생각된다. 신세뇨관 간질이나 폐간질은 결합 조직으로, 이를 구성하는 중요한 세포는 섬유아세포이며, 섬유아세포는 콜라겐이나 fibronectin과 같은 세포의 기질을 합성 분비하여 조직을 지지하게 할 뿐 아니라 조직 손상시

에는 손상된 부위로 이동하여 세포의 기질을 분비함으로써 상처 치유에 관여한다고 보고되었다(Alberts 등, 1994). 한탄바이러스는 *in vitro*에서 사람의 폐 섬유아세포 및 여러 동물의 섬유아세포에 잘 감염되는 것으로 밝혀졌다(박호선 등, 1993; 박호선 등, 1996). 따라서 한탄바이러스에 의한 병리 기전은 혈관내피세포 및 혈관벽의 결합조직의 감염에 의한 손상 및 치유 과정에 의한다고 생각되고 있다.

Integrin은 세포 표면에 존재하는 세포 부착인자로 분자량이 120 내지 180kD의  $\alpha$  subunit와 90 내지 110kD의  $\beta$  subunit로 구성된 heterodimeric membrane glycoprotein으로 현재까지 20여 종류가 알려져 있다(Hynes, 1992). Integrin은 세포와 세포 외 기질간의 부착 및 세포와 세포 사이의 부착에 관여하여 개체 발생시 세포의 이동, 혈소판의 응집, 백혈구와 임파구의 혈관외 이동, 상처 치유 및 종양세포의 전이 등에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Hynes, 1987; Hynes, 1992).

백혈구의 경우 13종의 integrin이 발견되었으며 이 중 6종의 integrin이 염증반응시 백혈구와 혈관내피세포의 상호작용에 중요한 기능을 한다고 알려져 있다(Mariano, 1994). 최근에는 바이러스와 integrin에 대한 연구가 진행되어 여러 종류의 integrin들이 바이러스의 수용체로 사용되거나 바이러스의 세포 감염을 증진시키는데 작용하며 특히 cytomegalovirus는 세포의 integrin 발현을 저하시킨다고 보고되었다(Bergelson 등, 1992; Bai 등, 1994; Warren 등, 1994; Shuang 등, 1996).

신증후출혈열의 주된 병변은 혈관내피세포외에 섬유아세포가 많이 존재하는 신세뇨관 간질과 폐 간질부위이며 한탄바이러스가 *in vitro*에서 섬유아세포에 잘 감염되는 점에 착안하여, 이 연구에서는 섬유아세포 표면에 존재하는 fibronectin 수용체인  $\alpha_5\beta_1$  integrin이 한탄바이러스의 감염 및 증식에 미치는 영향을  $\alpha_5$  integrin,  $\beta_1$  integrin 및  $\alpha_5\beta_1$

integrin에 대한 항체 처리시 한탄바이러스의 증식에 대한 효과를 관찰함으로써 알아보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 및 세포배양

Mongolian gerbil fibroblasts는 목암생명공학연구원으로부터 분양 받아 사용하였으며 chicken embryo fibroblasts (이하 CEF)는 11일째의 수정란으로부터 계태아를 얻어 초대배양하여 사용하였다. VeroE6 세포(ATCC CRL-1586)는 ATCC에서 구입하여 사용하였다. 증식용 배지로 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum, Gibco BRL, NY)과 0.2%의 sodium bicarbonate가 함유된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco BRL, NY)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. CEF의 초대배양을 위하여 계태아의 머리, 날개, 다리 및 내장을 제거한 후 몸통만을 인산완충용액으로 3회 세척한 다음 가위로 잘게 썰어 자기봉이 들어있는 멸균된 비이커에 넣고 0.25% 트립신을 첨가하여 실온에서 30분간 교반하였다. 효소의 작용을 중지시키기 위하여 우태아 혈청이 10% 함유된 증식용 배지를 첨가하고 세포를 정치시킨 다음 200 mesh의 스테인레스 그물망을 통과시켰다. 그물망을 통과한 세포들을 120g로 5분간 원심하여 상층액을 제거한 후 증식용 배지로 재부유한 다음 25cm<sup>2</sup>의 세포배양 플라스크에 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 24시간 후 신선한 증식용 배지로 갈아 준 다음 3내지 4일마다 계대 배양하여 사용하였다.

### 2. 바이러스의 배양

한탄바이러스 ROK 84-105주를 아산생명과학 연구소로부터 분양 받아 사용하였다. VeroE6 세포를 75cm<sup>2</sup>의 세포배양 플라스크에 2x10<sup>6</sup> cell로 심

고 3일 후 단층이 형성된 세포를 인산완충용액으로 세척한 후 바이러스를 0.01 multiplicity of infection(MOI)으로 접종하여 1시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 흡착시켰다. 흡착이 끝난 후 바이러스 용액을 제거하고 2% 우태아 혈청이 첨가된 유지용 DMEM으로 배양하였다. 7일 후 배양액을 수거한 다음 1,730g에서 30분간 원침하여 세포 부유물을 제거하고 상층액을 0.5ml씩 분주하여 -70°C에 보관하면서 stock 바이러스로 사용하였다.

### 3. Fibronectin의 발현 관찰

배양된 CEF 및 MGF에서 세포의 기질로 존재하는 fibronectin을 확인하기 위하여 cellular fibronectin에 대한 단일클론 항체(Sigma, St. Louis, MO)를 사용하여 간접면역형광항체법으로 관찰하였다. 세포배양 플라스크에서 증식된 CEF와 MGF를 트립신을 처리하여 떨어뜨린 후 세포수가 5x10<sup>4</sup> cells/ml이 되도록 재부유하여 14 well slide (HTC, Celine)에 40µl/well씩 분주하여 18시간 배양하였다. Well slide에 배양된 세포들을 인산완충용액으로 1회 세척하고 아세톤으로 10분간 고정된 다음 fibronectin에 대한 단일클론 항체(Sigma, St. Louis, MO)를 400배 희석하여 20µl/well씩 세포위에 점적하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 인산완충용액으로 2회 세척하고 FITC conjugated goat anti-mouse IgM을 128배 희석하여 37°C에서 45분간 반응시킨 후 인산완충용액으로 2회, 증류수로 1회 세척한 다음 건조하고 봉입제로 봉입 후 형광현미경(Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

### 4. 한탄바이러스의 감염확인

#### 4-1. 간접면역형광항체법에 의한 확인

CEF 및 MGF 1x10<sup>6</sup> 세포를 25cm<sup>2</sup> 배양 플라스크에 각각 분주하여 3일간 배양한 다음 한탄바이-

러스 0.01 MOI를 접종하여 60분간 흡착시켰다. 흡착이 끝난 후 인산완충용액으로 1회 세척하고 DMEM에 우태아 혈청이 2% 함유된 유지용 배지로 갈아 주었다. 5일간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 배양한 후 트립신을 처리하여 떨어뜨린 후 세포수가 5x10<sup>4</sup> cells/ml이 되도록 재부유하여 14 well slide (HTC, Celine)에 40 µl/well씩 분주하여 18시간 배양하였다. Well slide에 배양된 세포들을 인산완충용액으로 1회 세척하고 아세톤으로 10분간 고정된 다음 FITC-conjugated anti-hantaan monoclonal antibody(녹십자, 경기도)를 20µl/well씩 세포위에 점적하고 37°C에서 1시간 반응시켜 직접면역형광항체법으로 바이러스 단백을 염색하여 형광현미경으로 바이러스의 감염 유무를 확인하였다.

#### 4-2. Western blot에 의한 한탄바이러스 단백질 확인

CEF 및 MGF 세포에 한탄바이러스를 0.01 MOI로 접종하여 7일간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양 후, 배양용액을 수거하여 1,730g에서 30분간 원침하여 세포부유물을 제거하고 상층액을 Western blot의 재료로 사용하였다. 이를 sample buffer와 섞어 5분간 끓인 후 7.5% Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel에서 125V로 60분간 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 30V로 2시간 동안 전이하였다. 10% skim milk에 anti-hantaan rabbit polyclonal serum을 100배 희석하여 37°C에서 90분간 반응 시키고, 0.1% tween 20이 함유된 인산완충용액(PBST)으로 4회 세척 후 anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (Sigma, St. Louis, MO)를 10% skim milk에 500배 희석하여 37°C에서 90분간 반응시키고 PBST로 6회 세척한 다음 1% CoCl<sub>2</sub>가 함유된 0.05% diaminobenzi-dine (Sigma, St. Louis, MO)에 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 발색을 실시하여 배양액 내 바이러스 단백질의 유무를 관찰하였다. 양성 대조 바이러스로는 마우스뇌에서 증식된 한탄바이러스를 포르말린 처리하여 불활화시킨 용액을 사용하였다.

### 5. Integrin 항체의 전처치 및 바이러스 접종

Fibronectin 수용체인  $\alpha_5\beta_1$  integrin이 한탄바이러스 감염 및 증식에 미치는 영향을 파악하고자  $\alpha_5\beta_1$  integrin,  $\alpha_5$  integrin 혹은  $\beta_1$  integrin에 대한 항체를 한탄바이러스 접종전에 MGF 및 CEF 세포에 처리하였다. MGF 및 CEF 세포를  $2 \times 10^5$  cells/ml로 희석하여 24 well plate에 1.5 ml/well로 분주한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3일간 배양한 후 Mg<sup>2+</sup>이 첨가된 인산완충용액으로 2회 세척하고 50배 희석된 항체들을 100 $\mu$ l/well로 첨가하여 37°C에서 30분간 반응 시켰다. 반응이 끝난 후 항체를 제거하고 Mg<sup>2+</sup>이 첨가된 인산완충용액으로 2회 세척하고 stock용 바이러스를 유지용 배지로 200배 희석하여 100 $\mu$ l/well로 접종하여 37°C에서 1시간 동안 흡착시킨 다음 다시 인산완충용액으로 1회 세척하고 유지용 배지를 넣어 5일간 배양하였다. 5일 후 배양 용액을 수거하여 1,730g에서 30분간 원심하여 세포 부유물을 제거하고 상층액을 바이러스 역가 측정에 사용하였다. 각각의 실험은 2회 반복 실시하였다.

### 6. 한탄바이러스 역가 측정

바이러스 역가는 한탄바이러스의 nucleocapsid 단백질 N 단백질의 양을 측정하는 sandwich antigen capture enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)법과, 감염력이 있는 virion의 양을 측정하는 focus forming unit를 병행하여 측정하였다. ELISA plate는 한탄바이러스에 대한 단일클론 항체(녹십자, 경기도)를 코팅용 완충액으로 희석하여 immunomodule (Nunc, Denmark)에 100 $\mu$ l/well로 분주한 다음 실온에서 18시간 동안 반응시켜 제작하였다. 코팅 후 코팅 용액을 제거하고 세척 완충액으로 3회 세척하고 시료를 100 $\mu$ l/well로 분주하여 37°C에서 45분간 반응시킨 다음 세척 완충액으로 3회 세척한 후 horseradish peroxidase

conjugated hantaan monoclonal antibody (녹십자, 경기도)를 사용하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 세척 완충액으로 3회 세척한 후 ABTS (KPL, Gaithersburg, MD)와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 발색을 실시하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하여 바이러스의 역가를 측정하였다.

바이러스 focus forming unit (FFU)의 측정은 Tanishita 등의 방법 (Ocuno 등, 1979; Tanishita 등, 1984)을 변형하여 사용하였다. VeroE6 세포를  $2 \times 10^5$  cells/ml로 희석하여 96 well plate에 100 $\mu$ l/well로 분주한 다음 3일간 배양한 후 Mg<sup>2+</sup>이 첨가된 인산완충용액으로 2회 세척하고 유지용 배지로 5단계 희석된 바이러스 용액을 50 $\mu$ l/well로 접종하여 1시간 동안 흡착시켰다. 흡착 후 바이러스 용액을 제거하고 Mg<sup>2+</sup>이 첨가된 인산완충용액으로 1회 세척하고, 2X DMEM과 1.6% carboxymethyl-cellulose (Sigma, St. Louis, MO)의 동량 혼합용액에 우태아 혈청을 5%로 첨가하여 200 $\mu$ l/well로 증첨하여 배양하였다. 8일 후 증충 배지를 제거하고 세척 완충용액으로 3회 세척한 다음 메탄올과 포르말린을 10:1의 비율로 섞은 고정액으로 10분간 실온에서 세포를 고정하였다. 세척 완충액으로 3회 세척하고 비특이적인 반응을 감소시키기 위하여 정상 토끼 혈청을 인산완충용액으로 50배 희석한 blocking buffer를 100 $\mu$ l/well로 점적 하여 30분간 실온에 방치하였다. 일차 항체로는 anti-hantaan rabbit polyclonal serum을 인산완충용액으로 100배 희석하여 50 $\mu$ l/well로 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응 시켰다. 반응이 끝난 후 항체를 제거하고 세척 완충액으로 3회 세척 후 goat anti-rabbit IgG (Sigma, St. Louis, MO)를 인산완충용액으로 50배 희석하여 50  $\mu$ l/well로 첨가하였다. 실온에서 45분간 반응시킨 다음 세척 완충액으로 3회 세척하고 peroxidase-anti-peroxidase (PAP) complex (Sigma, St. Louis, MO)를 100배 희석하여

실온에서 30분간 반응시켰다. 세척 완충액으로 3회 세척하고 0.05% diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO)과 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 발색을 실시하여 바이러스가 증식되어 형성된 focus의 숫자를 광학현미경으로 세어 바이러스의 역가를 측정하였다.

## 성 적

### 1. 한탄바이러스의 감염 확인

CEF와 MGF에 한탄바이러스를 감염 시킨 후 5일째 세포를 수거하여 well slide에서 18시간 배양 후 FITC-conjugated anti-hantaan monoclonal antibody를 사용하여 직접면역형광항체법으로 한탄바이러스의 감염 유무를 관찰한 결과 CEF와 MGF에서 모두 한탄바이러스에 양성으로 나타났으며 CEF 보다는 MGF에서 더 많은 바이러스 항원을 관찰할 수 있었다(그림 1). CEF와 MGF에서 한탄바이러스를 감염 시킨 후 7일간 배양한 배양액으로 Western blot을 실시한 결과 두 세포 배양액에서 모두 한탄바이러스의 N protein인 46kD의 band를 확인할 수 있었다(그림 2).

### 2. Fibronectin의 발현 확인

CEF와 MGF의 세포의 기질로 fibronectin이 존재하는가를 확인하기 위하여 cellular fibronectin에 대한 항체를 사용하여 간접면역형광항체법을 실시하였다. 두 세포에서 모두 세포 사이사이에 그물망처럼 존재하는 fibronectin을 관찰 할 수 있었으며 따라서 CEF와 MGF는 풍부한 fibronectin 세포외 기질에 부착하고 있음이 관찰되었다(그림 3).

### 3. Integrin 항체 전처치에 따른 한탄바이러스의 역가 변화

CEF에서  $\alpha_5\beta_1$  integrin에 대한 항체를 처리한 후 바이러스를 접종한 다음 5일 후 배양액으로 배출

된 바이러스의 역가를 측정된 결과, 항체를 처리하지 않은 대조군에 비하여 ELISA로 측정된 한탄바이러스의 N protein의 양은 32.6% (그림 4, 표 1), focus forming unit (FFU)로 측정된 virion의 양은 26.8%로 감소하여 두 결과에서 거의 동일한 수준으로 감소됨을 확인하였다(그림 5, 표 1).

MGF에서는  $\alpha_5$  integrin,  $\beta_1$  integrin 및  $\alpha_5\beta_1$  integrin에 대한 항체를 처리한 군은 대조군에 비하여 ELISA로는 65.2%, 60.3% 및 72.5%로 각각 감소하였고(그림 6, 표 2), FFU로 측정된 결과는 26.5%, 29.4% 및 28.8%로(그림 7, 표 2) 감소하였다.

Table 1. Comparison of virus titers according to the treatment of anti- $\alpha_5\beta_1$  integrin antibody in chicken embryo fibroblasts

Anti-integrin Ab	Virus titers by	
	EIA/0.1ml (%)	FFU $\times 10^3$ /ml (%)
anti- $\alpha_5\beta_1$	23.8 $\pm$ 1.5 (32.6)	4.7 $\pm$ 3.9 (26.8)
no treatment	73.0 $\pm$ 2.2 (100)	17.5 $\pm$ 10.6 (100)

Table 2. Comparison of virus titers according to the treatment of anti-integrin antibodies in Mongolian gerbil fibroblasts

Anti-integrin Ab	Virus titers by	
	EIA/0.1ml (%)	FFU $\times 10^4$ /ml (%)
anti- $\alpha_5$	48.6 $\pm$ 1.7 (65.2)	41.1 $\pm$ 27.7 (26.5)
anti- $\beta_1$	44.5 $\pm$ 2.0 (59.7)	45.6 $\pm$ 15.9 (29.4)
anti- $\alpha_5\beta_1$	54.1 $\pm$ 0.4 (72.6)	44.6 $\pm$ 9.2 (28.7)
no treatment	74.5 $\pm$ 0.9 (100)	155.0 $\pm$ 21.2 (100)

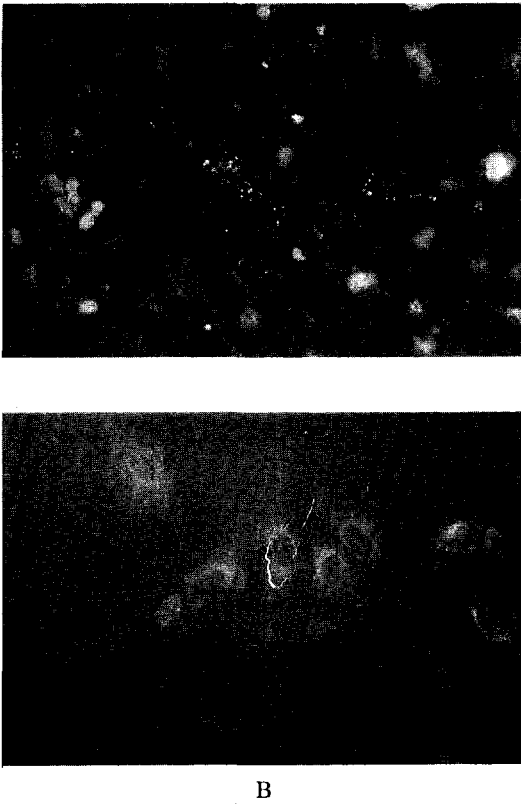


Fig. 1. Immunofluorescence photomicrographs of chicken embryo fibroblasts(A) and Mongolian gerbil fibroblasts(B) infected with Hantaan virus. The discrete intracytoplasmic fine granules are viral antigens on 5 days after inoculation(x200).

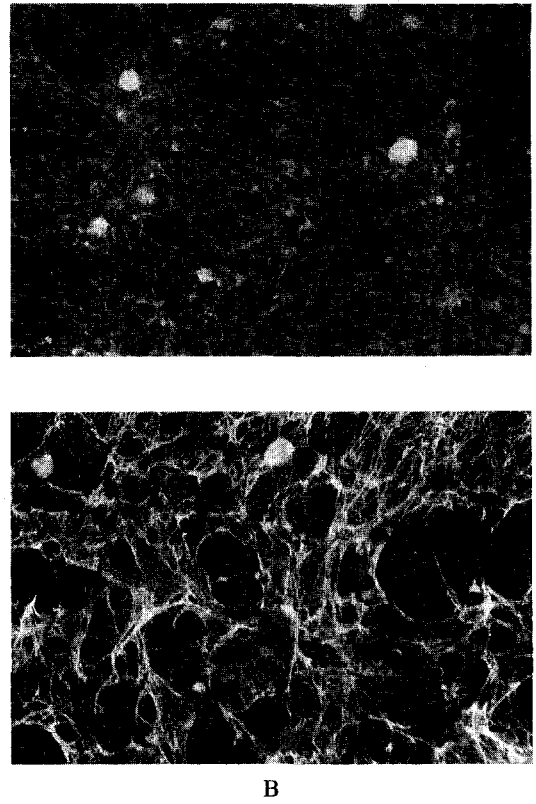


Fig. 3. Immunofluorescence photomicrographs of fibronectin matrix on cultured chicken embryo fibroblasts(A) and Mongolian gerbil fibroblasts (B). Fibrillar matrix of fibronectin surround the cells of a confluent layer of fibroblasts(x200).

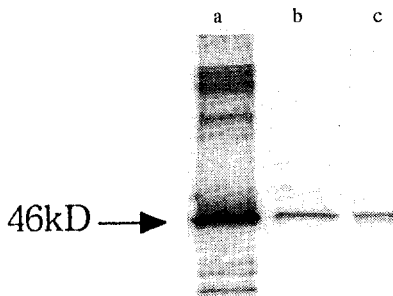


Fig. 2. Western blot analysis of Hantaan virus nucleocapsid(N) protein. lane a: purified suckling mouse brain emulsion infected with hantaan virus, lane b: culture supernatant of Mongolian gerbil fibroblasts infected with Hantaan virus, lane c: culture supernatant of chicken embryo fibroblasts infected with Hantaan virus.

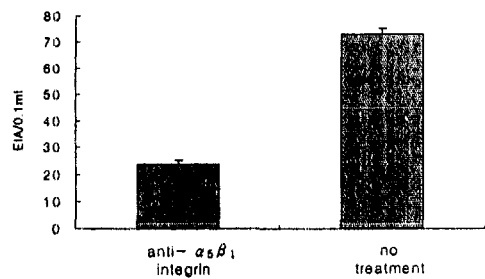


Fig. 4. Comparison of EIA virus titers according to the treatment of anti- $\alpha_5\beta_1$  integrin antibody in chicken embryo fibroblasts.

고 찰

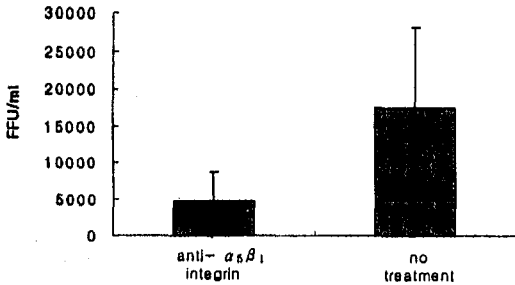


Fig. 5. Comparison of FFU virus titers according to the treatment of anti- $\alpha_5\beta_1$  integrin antibody in chicken embryo fibroblasts.

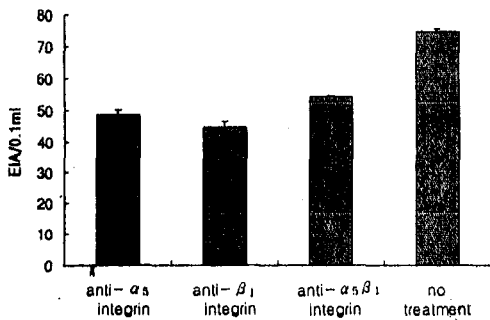


Fig. 6. Comparison of ELA virus titers according to the treatment of anti-integrin antibodies in Mongolian gerbil fibroblasts.

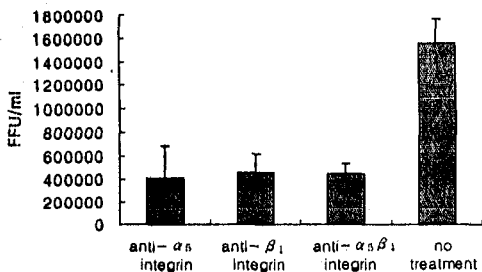


Fig. 7. Comparison of FFU virus titers according to the treatment of anti-integrin antibodies in Mongolian gerbil fibroblasts.

한탄바이러스는 신증후출혈열의 병원체로 세동맥 및 모세혈관 등 혈관계를 광범위하게 침범하여 여러 기관의 기능 장애를 초래하며 임상적으로 출혈성 경향 및 급성 신부전을 특징으로 하는 질환을 유발한다. 한탄바이러스에 의한 출혈성 경향의 병리 기전은 밝혀져 있지 않으나 백관계의 취약성, 혈소판의 감소 및 기능 부전, 혈액응고 인자의 변화, 범발성혈관내용고증, 항원-항체 복합체의 작용 및 요독증 자체의 영향 등이 그 기전으로 주목되었고(이정상, 1985), 그 중 혈관내피세포의 손상에 의한 혈관 투과성의 증가 및 혈액응고계의 변화가 중요한 요소로 작용된다고 알려져 있다(정상인 등, 1996). 특히 한탄바이러스가 혈관내피세포에 감염되며 혈관내피세포의 세포 부착분자들의 발현에 영향을 미친다는 보고는 바이러스가 직접 혈관내피세포에 영향을 주어 염증세포들의 침윤 및 이동이 가능하다는 것을 시사하는 소견이라고 생각된다(정상인 등, 1996).

신증후출혈열 환자의 부검 소견에서 혈관내피세포의 손상, 출혈 및 혈관계의 부종 등은 관찰되나 혈관염의 소견은 보고된 바 없으며, 신장에서는 심한 부종과 울혈이 관찰되고 현미경적 소견으로는 사구체는 대부분 정상이나 mesangium의 증식, PAS 양성 물질의 침착 등이 보이며, 신세뇨관의 피사와 수질의 출혈 및 신세뇨관 간질내의 염증세포의 침윤이 보고되었다(최진수 등, 1973). 또한 한탄바이러스 속의 Sin Nombre 바이러스가 유발하는 hantavirus pulmonary syndrome의 부검 소견에도 폐수종 및 폐간질에 임파구의 침윤이 특징적으로 나타난다(Hjelle 등, 1994).

이러한 사실로 미루어 볼 때 혈관벽의 조직 즉 신세뇨관 간질이나 폐간질에 한탄바이러스가 감염되어 염증을 일으키는 과정에서 혈관내피세포

사이로의 염증 세포의 이동 및 심한 혈관의 유출이 가능하리라 생각된다. 신세뇨관 간질이나 폐간질을 이루는 대부분의 세포는 섬유아세포이며 한탄바이러스는 *in vitro*에서 사람의 폐섬유아세포 및 여러 동물의 섬유아세포에 잘 감염된다. 따라서 한탄바이러스에 의한 병리 기전은 혈관내피세포 및 혈관벽의 결체조직의 감염에 의한 손상 및 치유과정에 의해 유발되리라 예상된다.

섬유아세포가 분비하는 세포의 기질은 크게 collagen, proteoglycan 및 glycoproteins으로 구분할 수 있는데 fibronectin은 그 중 glycoprotein에 속하는 세포의 기질이다. Fibronectin은 220 내지 250kD의 분자량을 가진 두개의 subunit가 disulfide bond로 연결된 dimer 형태를 이루는 당단백으로 체내에서 두가지의 형태, 즉 체액내에 존재하는 수용성 형태와 세포의 기질 및 기저막에 존재하는 불용성인 형태로 존재한다. 정상적인 생리적 조건하에서 fibronectin은 발생과정 중 세포의 부착, 세포 골격의 편성, 세포의 이동 등에 관여하며 혈액 응고시 혈액 응고 효소에 대한 기질로 작용하고 (Hynes, 1990) 조직 손상시에는 과량의 fibronectin이 분비되어 상처 치유에 관여한다. 혈장내에 존재하는 fibronectin (plasma fibronectin)은 주로 간세포에 의하여 합성 분비되며 세포의 기질로 존재하는 fibronectin (cellular fibronectin)은 섬유아세포, 혈관내피세포 및 신장의 혈관사이세포 등이 생산한다고 알려져 있다(Amrani 등, 1985; Birdwell 등, 1978; Foidart 등, 1980; Tamkun과 Hynes, 1983; Yamada 등, 1977). 수용성 fibronectin은 혈장, 양수, 활액 등에 정상적으로 존재하며 불용성인 fibronectin은 폐, 간, 소장 등의 여러 장기의 간질이나 기저막의 성분으로 존재한다.

Plasma fibronectin은 혈액응고 효소의 기질로 작용하고 혈소판에는 fibronectin에 대한 수용체가 존재하여 혈소판과 fibrin 응괴 형성에 합류되어 혈

액 응고 및 혈전 형성에 관여한다(Hynes, 1990). 또한 plasma fibronectin은 비특이적 opsonin으로써 monocyte와 macrophage의 phagocytic activity를 증가시킨다고 알려졌다(Scheld 등, 1985). 세포 표면에 존재하는 fibronectin은 staphylococcus, streptococcus 및 *Treponema pallidum* 등의 병원성 세균과 *Candida albicans*와 같은 진균이 숙주 세포에 부착하여 질병을 유발하는데 관여하며 특히 병원성이 강한 균일수록 강한 부착성을 가지며 또한 influenza A, parainfluenza 및 mumps 바이러스들의 외피 당단백이 fibronectin에 부착하며 이는 바이러스와 세포의 부착 및 opsonization에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Scheld 등, 1985; Brown, 1986; Babu 등, 1983; Fitzgerald 와 Repesh, 1985; Ryden 등, 1983; Skerl 등, 1984; Julkunen 등, 1983).

Fibronectin에 대한 세포의 수용체로는 여러 종류의 integrin이 존재하나 대표적인 수용체는  $\alpha_5\beta_1$  integrin이며  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin들도 fibronectin을 배위자로 사용한다고 한다(Hynes, 1992).

세포표면에 존재하는 부착분자에는 크게 selectin family, immunoglobulin superfamily 및 integrin family에 속하는 물질들로 구분된다. Selectin family에 속하는 물질로는 L-selectin, E-selectin 및 P-selectin 등이 있고 immunoglobulin superfamily에 속하는 부착 물질로는 intercellular adhesion molecule(ICAM), vascular cell adhesion molecule(VCAM), platelet endothelial cell adhesion molecule(PECAM) 및 neural cell adhesion molecule(NCAM) 등이 있고, integrin family는 약 20여종의 integrin이 알려졌다.

Integrin family의 여러 물질들은 종류에 따라 존재하는 세포의 종류가 다르며 백혈구, 섬유아세포, 상피세포 및 혈소판 등에 존재하는 것으로 보고되었다(Mariano, 1994). Integrin의 extracellular domain은 세포의 기질과 부착하고 cytoplasmic



domain은 세포내 골격 단백질인 talin이나  $\alpha$ -actinin과 연결되어 세포의 형태 변화 및 이동에 관여하고 tyrosine phosphorylation이나 protein kinase C 등을 통하여 여러 종류의 유전자 발현을 조절하는 secondary messenger의 역할을 한다(Martin, 1994).

현재까지 밝혀진 integrin과 바이러스와의 관계로는 vitronectin에 대한 수용체인  $\alpha_5\beta_1$  integrin은 Adenovirus type 12의 수용체로 작용하며,  $\alpha_5\beta_1$ 와  $\alpha_3\beta_1$  integrin은 Adenovirus 2의 수용체는 아니지만 Adenovirus 2의 internalization을 증가시킨다고 하였고, collagen과 laminin의 수용체인 VLA-2( $\alpha_2\beta_1$  integrin)은 Echovirus 1의 수용체로 보고되었다(Bai 등, 1994; Bergelson 등, 1992; Wickham 등, 1993). Human cytomegalovirus로 감염된 섬유아세포에서는  $\alpha_1\beta_1$  integrin의 발현이 저하되어 laminin과 collagen IV에 부착하는 능력이 감소하며, 감염된 세포의 형태학적 변화를 초래함이 알려져 있다(Warren 등, 1994).

이 실험에서는 배양된 세포를 이용하여 한탄바이러스의 병리 기전을 이해하고자 하였다. 그 첫 단계로써 한탄바이러스에 감염이 잘되는 섬유아세포를 이용하여 섬유아세포 표면에 존재하는 fibronectin에 대한 수용체인  $\alpha_5\beta_1$  integrin을 차단하는 경우 한탄바이러스 감염에 어떠한 영향을 미치는가를 확인하고자 하였다.  $\alpha_5\beta_1$  integrin에 대한 항체를 계태아 섬유아세포에 처리 후 한탄바이러스를 감염 시킨 결과 5일 후  $\alpha_5\beta_1$  integrin에 대한 항체를 처리하지 않은 대조군에 비하여 배양액 내 바이러스의 N 단백질(EIA titer)은 32.6%, virion 양(FFU titer)은 26.8%로 감소함을 확인하였고(표 1), MGF에서는 바이러스의 N 단백질과 virion 양이  $\alpha_5$  integrin 처리시 65.2%, 26.5%로,  $\beta_1$  integrin 처리시 59.7%, 29.4%로 감소하였고  $\alpha_5\beta_1$  integrin 처리시 72.6%, 28.7%로 각각 감소하였음을 확인하였다(표 2). 즉  $\alpha_5$  subunit에 대한 항체와  $\beta_1$

subunit에 대한 항체를 각각 처리하여도  $\alpha_5\beta_1$  integrin에 대한 항체를 처리하였을 때와 유사한 정도로 바이러스의 역가가 감소함을 확인하여 한 subunit 만이 항체에 의하여 차단되어도 두 subunit가 모두 차단된 것과 동일한 효과를 나타냄을 관찰하였다.

이러한 결과는 바이러스의 역가 감소가 바이러스 감염 초기에 항체에 의하여 차단된  $\alpha_5\beta_1$  integrin을 통하여 세포내로 침입하지 못하였기 때문이거나,  $\alpha_5\beta_1$  integrin 차단에 의한 세포내 환경의 변화로 인하여 바이러스의 증식이 억제되었기 때문으로 생각된다.

## 요 약

사람과 동일한 증상을 나타내는 동물 모델이 없는 신증후출혈열의 병리 기전을 이해하기 위하여 *in vitro* culture system을 이용하였다. 신증후출혈열의 주된 병변이 혈관내피세포외에 섬유아세포가 많이 존재하는 신세뇨관 간질 및 폐간질임을 기초로 하여 계태아와 Mongolian gerbil의 섬유아세포에서 fibronectin에 대한 수용체인  $\alpha_5\beta_1$  integrin에 대한 항체를 처리하여 한탄바이러스 감염에 대한 영향을 관찰하였다. 초대 배양하여 사용한 계태아 섬유아세포 및 MGF 모두 한탄바이러스가 잘 감염되었으나 계태아 섬유아세포에 비하여 MGF에서 바이러스의 증식이 더 우수하였다. 계태아 섬유아세포와 MGF에서  $\alpha_5\beta_1$  integrin에 대한 항체 처리 5일 후 바이러스의 N 단백질의 역가는 항체를 처리하지 않은 대조군에 비하여 각각 32.6%, 72.6%로, virion의 역가는 26.8%, 28.7%로 감소하여 두 세포에서 모두 감염력을 가진 바이러스의 양은 거의 동일하게 감소 되었다. 또한  $\alpha_5$  subunit와  $\beta_1$  subunit에 대한 항체를 MGF 세포에 처리한 후 바

이러스의 N단백의 역가는 65.2%, 59.7%로  $\alpha_5\beta_1$  integrin에 대한 항체 처리하였을 때(72.6%)와 거의 유사하게 감소하였고 감염력을 가진 바이러스의 양도 26.5%, 29.4%로 감소하여  $\alpha_5\beta_1$  integrin에 대한 항체 처리시 (28.7%)와 거의 유사하게 감소하였다.

이러한 결과는  $\alpha_5\beta_1$  integrin이 한탄바이러스에 대한 수용체로서 작용할 가능성을 시사하였으며 또다른 기전으로는  $\alpha_5\beta_1$  integrin의 차단에 의한 이차적인 영향으로 한탄바이러스의 증식에 커다란 영향을 미치는 것을 생각할 수 있었다.

### 참고문헌

- 김근호, 오윤규, 이서진, 안규리, 김성권, 박재갑, 이정상: 여러가지 세포주에서의 한탄바이러스 증식 양상. 대한미생물학회지 30: 189-201, 1995.
- 김혜숙, 박송용, 황규계: 사람 T-lymphoid 세포주에 대한 Hantaan virus의 감수성 및 증식에 관한 연구. 대한바이러스학회지 21: 119-126, 1991.
- 박호선, 황규계, 전복환, 김혜숙, 박송용: 사람과 기니피 세포주들에 대한 한탄 바이러스의 감수성 및 증식. 대한바이러스학회지 23: 79-84, 1993.
- 박호선, 최 윤, 김성광: Mongolian gerbil fibroblasts를 이용한 한탄바이러스의 배양 및 간접면역형광항체법의 항원 세포로서의 효용성. 대한미생물학회지 31: 573-580, 1996.
- 이은주, 김용섭, 권현민, 권영주, 조원용, 김형규, 원남희: 신증후출혈열에서 신장조직 검사의 임상적 의의. 대한내과학회잡지 40: 642-652, 1991.
- 이정상: 한국형출혈열 -신증출혈열-. 인제의학 6: 23-36, 1985.
- 이호왕, 이평우, 성인화, 안인숙, 양상기, 민현기: 신증후출혈열 환자 조직중의 면역복합체 증명. 대한바이러스학회지 15: 65-72, 1985.
- 정상인, 신성일, 김기정, 강응택, 유석희, 최철순, 양용태: 한탄바이러스 감염 내피세포에서 부착 분자의 발현(II) -In situ hybridization-. 대한바이러스학회지 26: 47-58, 1996.
- 최진수, 김도진, 김용일: 유행성출혈열의 신생검에 관한 연구. 대한내과학회잡지 16: 761-771, 1973.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Robert K, Watson JD: Differentiated Cells and the Maintenance of Tissues, In Molecular biology of the cell. 3rd ed, Garland Pub, New York, 1994, pp 1179-1180.
- Amrani DL, Falk MJ, Mosesson MW: Studies of fibronectin synthesized by cultured chick hepatocytes. Exp Cell Res 160: 171-183, 1985.
- Babu JP, Simpson WA, Courtney HS, Beachey EH: Interaction of human plasma fibronectin with cariogenic and non-cariogenic oral streptococci. Infect Immun 41: 162-168, 1983.
- Bai M, Campisi L, Freimuth P: Vitronectin receptor antibodies inhibit infection of HeLa and A549 cells by Adenovirus type 12 but not by Adenovirus type 2. J Virol 68: 5925-5932, 1994.
- Bergelson JM, Shepley MP, Chan BMC, Hemler ME, Finberg RW: Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for Echovirus 1. Science 255: 1718-1720, 1992.
- Birdwell CR, Brasier AR, Taylor LA: Identification, localization and role of fibronectin in cultured bovine endothelial cells. Proc Natl Acad Sci 75: 3273-3277, 1978.
- Brown EJ: The role of extracellular matrix proteins in the control of phagocytosis. J Leukocyte Biol 39: 579-591, 1986.
- Fitzgerald TJ, Repesh LA: Interaction of fibronectin with *Treponema pallidum*. Genitourin Med 61: 147-155, 1985.

- Foidart JM, Foidart JB, Mahieu PR: Synthesis of collagen and fibronectin by glomerular cells in culture. *Renal Physiol* 3: 183-192, 1980.
- Hjelle B, Jenison S, Torrez-Martinez N, Yamada T, Nolte K, Zumwalt R, MacInnes K et al.: A novel Hantavirus associated with an outbreak of fatal respiratory disease in the southwestern United States: Evolutionary relationships to known Hantaviruses. *J Virol* 68: 592-596, 1994.
- Hynes RO: Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549-554, 1987.
- Hynes RO: *Fibronectin*. Springer-Verlag, New York, 1990, pp 335-348.
- Hynes RO: Integrins: Versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25, 1992.
- Julkunen I, Hautanen A, Keski-Oja J: Interaction of viral envelope glycoproteins with fibronectin. *Infect Immun* 40: 876-881, 1983.
- Mariano J Elices: Leukocyte integrins. In Cheresch DA, Mecham RP: *Integrins: Molecular and biological responses to the extracellular matrix*. Academic Press, San Diego, 1994, pp 163-194.
- Martin A. Schwartz: Integrins as signal transducing receptors. In Cheresch DA, Mecham RP: *Integrins: Molecular and biological responses to the extracellular matrix*. Academic Press, San Diego, 1994, pp 33-47.
- Ocuno Y, Fukunaga T, Srisupaluck S, Fukai K: A modified PAP(Peroxidase-anti-peroxidase) staining technique using sera from patients with Dengue hemorrhagic fever(DHF): 4 step PAP staining technique. *Biken J* 22: 131-135, 1979.
- Pensiero MN, Sharefkin JB, Dieffenbach CW, Hay J: Hantaan virus infection of human endothelial cells. *J Virol* 66: 5929-5936, 1992.
- Ryden C, Rubin K, Speziale P, Hook M, Lindberg M, Wadstrom T: Fibronectin receptors from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 258: 3396, 1983.
- Scheld WM, Strunk RW, Balian G, Calderone RA: Microbial adhesion to fibronectin in vitro correlates with production of endocarditis in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med* 180: 474-482, 1985.
- Shuang H, Tetsuji K, Yoshikazu T, Zaverio MR, Gren RN: Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells. *J Virol* 70: 4502-4508, 1996.
- Skerl KG, Calderone RA, Segal E, Sreevalsan T, Scheld WM: In vitro binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. *Can J Microbiol* 30: 221-227, 1984.
- Tamkun JW, Hynes RO: Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *J Biol Chem* 258: 4641-4647, 1983.
- Tanishita O, Takahash Y, Okuno Y, Yamanish K, Takahashi M: Evaluation of focus reduction neutralization test with peroxidase-anti-peroxidase staining technique for hemorrhagic fever with renal syndrome virus. *J Clin Microbiol* 20: 1213, 1984.
- Warren AP, Owens CN, Borysiewicz LK, Patel K: Down-regulation of integrin $\alpha_1/\beta_1$  expression and association with cell rounding in human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J Gen Virol* 75: 3319-3325, 1994.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR: Integrin  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  promote Adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73: 309-319, 1993.
- Yamada KM, Schlessinger DH, Kennedy DW, Pastan I: Characterization of major fibroblast cell surface glycoprotein. *Biochemistry* 16: 5552-5559, 1977.

— Abstract —

## The Suppressive Effects of Integrin Antibodies on the Infection of Hantaan Virus in Fibroblasts

Ho Sun Park, Ki Duk Kim, Sung Kwang Kim

*Department of Microbiology  
College of Medicine, Yeungnam University  
Taegu, Korea*

Pathophysiological mechanism of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is not fully understood. Major clinical findings of HFRS patients are widespread hemorrhage, acute renal failure and shock. Basic lesion is vascular injury with microvascular hemorrhage and relatively little inflammation. According to autopsy findings, renal medulla shows focal hemorrhage, tubular necrosis and interstitial mononuclear infiltrates.

The predominant cell type in the renal and pulmonary interstitium is a fibroblast and it participates in the healing process at the injury site by secreting a large amount of extracellular matrix proteins. Cultured human lung fibroblasts and Mongolian gerbil fibroblasts were known to be good host cells for the hantaan virus. It is possible that not only the endothelial cell but also the fibroblast is a target of Hantaan virus and the fibroblast might be involved in the pathogenesis and the healing process in HFRS.

Integrins are adhesion molecules, and act as receptors for many extracellular matrix proteins. Recently, there are many reports that cell surface integrins influence on some viral infections or reversely viruses influence on the expression of integrins. The  $\alpha_3\beta_1$  integrin is a major receptor for the fibronectin which is an important extracellular matrix protein secreted by fibroblasts. In this study, the role of  $\alpha_3\beta_1$  integrin in the infection of Hantaan virus was examined by using anti- $\alpha_3\beta_1$  integrin, anti- $\alpha_5$  integrin and anti- $\beta_1$  integrin antibodies in chicken embryo fibroblasts (CEF) and Mongolian gerbil fibroblasts(MGF). The treatment of anti- $\alpha_3\beta_1$  integrin antibody in CEF reduced the virion titers 26.8% and the amount of nucleocapsid N protein 32.6% when compared with control CEF. When MGF were treated with anti- $\alpha_5$ , anti- $\beta_1$  and anti- $\alpha_3\beta_1$  integrin antibodies, virion titers were reduced by 26.5%, 29.4% and 28.7% and the amount of nucleocapsid N protein were reduced by 65.2%, 59.7% and 72.6%.

These results suggested that  $\alpha_3\beta_1$  integrin might act as a receptor for the Hantaan virus or blocking of  $\alpha_3\beta_1$  integrin influences on the viral replication in CEF and MGF. It is also possible that the blocking of only one subunit of integrin represents similar results in that of whole molecule.

Key Words: Hantaan virus, Integrin, Fibronectin receptor