정맥마취제가 사람 거대세포 바이러스 감염에 미치는 영향

울산대학교 의과대학 강릉아산병원 마취통증의학과, 건국대학교 의과대학 *마취통증의학교실 및 † 미생물학교실

박희진 · 김혜경 · 임정애* · 우남식* · 이예철* · 박경희† · 이승현† · 장원종† · 최연주†

The Effects of Intravenous Anesthetics on Human Cytomegalovirus Infection

Hi Jin Park, M.D., Hae Kyung Kim, M.D., Jeong Aae Lim, M.D.*, Nam Sik Woo, M.D.*, Ye Chul Lee, M.D.*, Kyung Hee Park, M.D., Ph.D.†, Seung Hyun Lee, M.D., Ph.D.†, Won Jong Jang, Ph.D.†, and Yeon Joo Choi, Ph.D.†

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Gangnung Asan Hospital, College of Medicine, Ulsan University, Gangnung; *Department of Anesthesiology and Pain Medicine, † Department of Microbiology, College of Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea

Background: Reactivation of human cytomegalovirus (HCMV) from latency is a frequent complication of organ transplantation, and the molecular mechanism by which this occurs is unknown. Previous studies have shown that allogeneic transplantation combined with immunosuppression may be required to achieve complete reactivation in vivo and many anesthetics have wide range immunomodulatory properties. HCMV infection of endothelial cells plays an important role in the establishment of latency and persistence, which appears critical for the maintenance of HCMV within the host.

Methods: We compared the effects of intravenous anaesthetics (propofol, thiopental, and ketamine) on the susceptibility of endothelial cells to HCMV infection by indirect immunofluorescent assay at 48 hour postinfection and we also have investigated the time course of luciferase gene expression in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) infected with recombinant HCMV.

Results: Treatment with anesthetics after HCMV strain Towne inoculation did not increase HUVEC susceptibility to HCMV infection by indirect immunofluorescent assay. Treatment of HUVEC with propofol, thiopental, and ketamine after the recombinant virus inoculation had no significant effects on the level of the late genes expression.

Conclusions: Intravenous anesthetics (propofol, thiopental, and ketamine) did not increase the susceptibility of endothelial cells to HCMV infection at plasma concentrations. Further studies are required to evaluate higher anesthetic concentration which may increases the susceptibility of HUVEC to HCMV infection without cell destruction. (Korean J Anesthesiol 2004; 47: 409~18)

Key Words: endothelial cells, human cytomegalovirus, infectivity of HCMV, intravenous anesthetics.

서 론

인간을 숙주로 하는 사람거대세포바이러스(human cytomegalovirus, HCMV)는 후천성면역결핍 환자나 장기이식 수여자, 항암요법을 받는 환자처럼 면역기능이 저하된 사람에게 전신 감염 또는 폐렴 등으로 치명적 결과를 초래하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ HCMV 감염의 유발원인은 감염된 공여자에 의한 바이러스의 전달이나 기존에 수여자가 보유하

던 바이러스의 재활성화에 의한 것으로 구분된다. 이와 같은 현상을 설명하는 대표적인 기전으로는 숙주의 면역능력이 떨어지면 HCMV의 재활성 억제기전이 변화하는 것이다. Engstrand 등은²⁾ 숙주의 면역체계 중에서 HCMV pp65 항원을 인지하는 CD8+ 세포독성 T 세포가 HCMV 재활성 억제에 관여하는 것을 밝혔다. 또 다른 기전으로는 HCMV가 대식세포 혹은 내피세포 등에 존재하다가 특별한 자극에 의해 재활성된다는 것이다. 최근 Hummel 등은³⁾ 신장이식 연구를 통하여 장기이식이 tumor necrosis factor (TNF)와 interleukin-2 (IL-2) 및 interferon-gamma (IFN-γ) 발현을 증가시키고, 또한 NF-κB를 활성화시킨다는 것을 밝혔으며, 그 결과 HCMV의 극초기 단백질(immediate early gene)발현이 유도된다고 보고하였다.

일반적인 수술에 사용하는 마취제가 인체에 미치는 영향에 대한 연구는 그 안전성을 중심으로 진행되어 왔다. 하지

논문접수일 : 2004년 5월 6일

책임저자 : 김혜경, 강릉시 사천면 방동리

강릉아산병원 마취통증의학과, 우편번호: 210-711

Tel: 033-610-3401, Fax: 033-641-8180

E-mail: hae@gnah.co.kr

박사학위 논문임.

만 최근에는 마취제가 면역기능의 변화를 가져온다는 보고들이 점차 늘어나고 있다.⁴⁾ Tait 등은⁵⁾ 실험용 쥐를 halothane 혹은 ketamine으로 마취시킨 이후 influenza A virus를 감염시킨 경우 ketamine 보다 halothane으로 마취한 쥐에서 바이러스에 의한 증상이 심하지 않은 것을 보고하였다. 그들은 halothane이 폐포의 면역세포들의 국소적 동원(local recruitment)을 억제하여 influenza viral pneumonitis를 완화시킨 것으로 추정했다. Mobert 등은⁶⁾ halothane, isoflurane, 혹은 sevoflurane이 인간 제대정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)에 neutrophil이 부착하는 것을 억제하여 염증기능을 저하시킴을 밝혔으며 Sheffield 등은⁷⁾ 피부 감염에 대한 저항력이 isoflurane으로 마취시킨 guinea pig의 경우에 저하됨을 보고하였다. Kotani 등은⁸⁾ isoflurane 혹은 propofol로 마취를 하고 수술 후 시간별로 폐포를 세척하고 폐포대식세포를 회수하여 분석한 결과 식작용(phagocytosis) 기능과 살균(microbicidal) 기능이 저하되었음을 보고하였다. 이외에도 많은 연구자들이 마취제가 일시적으로 면역기능을 저하하는 것을 보고하고 있다.⁹⁻¹¹⁾ Pro-inflammatory cytokine들은 정상적인 경우 혈장 내에서 존재하지 않거나 미량 존재한다. 또한 anti-inflammatory cytokine들의 작용으로 항상성을 유지한다.¹²⁾ 보고에 의하면 마취제가 pro-inflammatory cytokine들의 분비를 촉진하여 면역기능에 영향을 미친다고 밝혀졌다. Haefner-Cavaillon 등은¹³⁾ lymphocyte를 배양하면서 propofol을 첨가한 경우 IFN- γ 의 분비가 증가한다는 것을 보고하였다. Rossano 등은¹⁴⁾ propofol이 IL-1 α 의 분비를 촉진하며, ketamine이 IL-6의 분비를 촉진한다는 것을 보고하였다. 또한 이들은 propofol, ketamine 그리고 thiopental 등을 처리한 경우 단핵세포에서 TNF의 분비가 증가한다는 것도 밝혔다. Kotani 등은¹⁵⁾ isoflurane 혹은 propofol을 이용한 마취가 폐포대식세포에서 IL-8 및 IFN- γ 의 유전자발현을 증가시킨다고 보고하였다. 이외에도 마취제가 여러 cytokine들의 분비를 촉진한다는 것이 보고되고 있다.¹⁶⁾

HCMV가 잠복하는 장소로 가장 잘 알려진 세포는 말초 혈액의 대식세포이며, 최근에는 내피세포가 HCMV의 또 다른 잠복 및 상주감염이 되는 세포로서 주목 받고 있다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 여러 가지 임상적인 증거들로서 HCMV에 혈청학적으로 양성소견을 보이는 장기이식 환자를 생검한 결과 HCMV가 뚜렷한 세포병변을 나타내지 않으면서 내피세포에 존재하는 것이 발견되었다.¹⁷⁾ 따라서 최근에 많은 연구자들이 HCMV 잠복감염 기전을 밝히기 위해 내피세포를 연구하고 있다.

이상과 같은 보고들을 토대로 본 실험에서는 장기이식 후의 HCMV 재활성이 면역억제제뿐만 아니라 마취제의 영향으로 유발될 수 있다는 가설을 세우고 이를 증명하기 위하여 다음과 같은 실험을 시행하였다. 우선 내피세포에 HCMV를 감염시키고, 이후에 마취제를 함유한 배지로 내피

세포를 배양하였다. 일정시간이 지난 다음에 극초기 단백질 및 말기 단백질의 발현 정도를 측정하여 마취제가 HCMV 감염에 미치는 영향에 대하여 관찰하였다.

대상 및 방법

바이러스

본 실험에서 사용한 HCMV는 미국 Johns Hopkins 대학 약리 및 분자과학교실에서 분양받아 사용하였다. HCMV Towne/pp28-Luc는 HCMV의 유전자 중 하나인 UL99 (pp28을 발현시키는 유전자)바로 뒤에 luciferase를 발현시키는 유전자를 삽입한 재조합 바이러스이다. HCMV Towne/Pol-Luc는 HCMV polymerase를 발현시키는 유전자 바로 뒤에 luciferase를 발현시키는 유전자를 삽입한 재조합 바이러스다. HCMV stock을 제조하기 위하여 사람 섬유아세포(human foreskin fibroblast cell, HFF)를 사용하였다. HFF 세포를 이용한 plaque assay로 plaque forming unit/ml (PFU/ml)을 결정하였다.

세포주

HFF 세포는 미국 Johns Hopkins 대학 약리 및 분자과학교실에서 분양받았으며 HUVEC는 Clonetics사(Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 HUVEC이 내피세포의 특성을 갖고 있는지를 확인하기 위하여 세포의 형태를 확인하였으며, 내피세포의 특징적인 표지 항원인 von-Willebrand's factor (vWF)가 세포에 발현되는지를 간접면역형광항체법(indirect immunofluorescence assay, IFA)으로 확인하였다.

마취제

본 실험에서 사용한 마취제 propofol은 동국제약에서, ketamine은 한국유나이티드제약에서 구입하여 사용하였고, thiopental은 중외제약에서 구입하여 사용하였다.

항체

사람 거대세포바이러스 극초기 단백질 1 (IE1)에 대한 단세포균항체 6E1과 극초기 단백질 2 (IE2)에 대한 단세포균항체 12E2를 Vancouver Biotech사(Vancouver, British Columbia, Canada)에서 구입하여 사용하였다. HCMV IE1에 대한 polyclonal antibody는 Johns Hopkins 대학 약리 및 분자과학 교실에서 분양 받아 사용하였다. vWF에 대한 단세포균항체는 DAKO (clone EBM 11, mouse IgG1, Carpinteria, CA, USA)사에서 구입하였다.

간접면역형광항체법

바이러스 감염을 확인하기 위하여 다음과 같이 간접면역

형광항체법을 실시하였다. HFF세포 혹은 HUVEC을 4 well chamber slide에 2×10^4 개가 되도록 첨가하여 18시간 배양하였다. 바이러스를 희석하여 multiplicity of infection (MOI) 5 혹은 MOI 10이 되도록 바이러스를 감염시켰다. 한 시간 후에 바이러스액을 제거하고 우태아혈청이 포함된 배지에 정맥마취제를 첨가하여 24시간 동안 배양한 후에 새로운 배지로 갈아주었다. 감염 48시간 경과 후 슬라이드를 차가운 메탄올에 고정시키고 바이러스에 대한 혹은 vWF에 대한 항체를 인산완충식염수에 희석하여 첨가하고 습윤한 용기 안에 넣어 37°C에서 한 시간 반응시켰다. 인산완충식염수에 세척한 후 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)와 anti-fading agent를 함유한 mounting media (Vectershield, Vector Laboratories, Inc., Calif, USA)를 침적하고 형광현미경(BH-6, Olympus, Japan; Leitz Dialux 20 EB epifluorescence microscope)에서 100배, 200배 혹은 400배 배율로 관찰하였다.

Luciferase assay

세포를 well 당 5×10^4 개가 되도록 24 wells cluster plates에 첨가한 후 18시간 후에 재조합 HCMV Towne/pp28-Luc와 Towne/Pol-luc를 MOI 5 혹은 MOI 10으로 감염시켰다. 1시간 후 바이러스액을 제거하고 정맥마취제를 포함한 배지를 첨가하여 24시간 배양하였다. 감염 후 일정시간이 경과하면, 세포를 인산완충식염수로 3회 수세한 후 harvest buffer (250 mM Tris-Cl, 1 mM DTT, pH7.9)에 부유시켜 수확한 후 -70°C에 보관하였다. 세포의 얼림과 녹임을 3회 반복한 후 파쇄하고 원심분리하여 세포 성분을 제거한 후 상청액 100 μ l를 reaction buffer A (25 mM glycyl-glycine pH 7.8, 15 mM MgSO₄, 5 mM ATP and 4 mM EGTA) 350 μ l가 들어있는 5 ml tube에 첨가하여 약 20분 간 실온에서 반응시켰다. LUMAT LB 9507 luminometer (Berthold Technology, Germany) chamber안에서 이 반응액에 reaction buffer B 100 μ l를 첨가하고 5초간 photon의 발생정도를 측정하여 relative light units (RLU)을 구하였다.

Plaque assay

바이러스 배양액 내의 감염능력이 있는 HCMV를 계수하기 위해 다음과 같이 플라크 분석을 실시하였다. 단층 배양된 HFF세포에 희석한 바이러스 원액을 분주하여 1시간 동안 감염시키고 37°C에서 배양하였다. 저배율 현미경(stereo-microscope, Citoval-2, Carl Zeiss, Germany)으로 플라크를 계수하였다. 희석 농도당 2개 well의 플라크 수를 세어 평균한 뒤 희석 배수대로 교정하여 원액의 PFU/ml을 구했다.

통계처리 및 결과분석

실험성적은 RLU 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었고, 독립표

본 t-test를 이용하여 통계분석을 실시하였고 $P < 0.05$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 보았다. 통계처리 및 결과분석은 Sigmaplot 2000 (for Window Ver. 6.00, SPSS Inc. Illinois, USA)을 이용하였다.

결 과

바이러스 stock 제조

HCMV Towne stock은 3×10^6 PFU/ml이었고, Towne/pp28-Luc stock은 1×10^6 PFU/ml, Towne/Pol-Luc stock은 1.3×10^6 PFU/ml이었다. 본 실험의 모든 과정에서 이들 바이러스 stock을 사용하였다.

내피세포 확인

HUVEC에 HCMV를 감염시킨 후 HCMV IE1에 대한 항체와 vWF에 대한 항체를 이용한 이중 염색으로 간접면역형광항체법을 실시한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1A에서처럼 모든 세포들이 vWF를 발현하는 것이 확인되어 본 실험에서 사용한 세포들이 모두 내피세포임을 증명할 수 있었다. Fig. 1B에서 대부분의 세포가 vWF를 발현하고, 화살표가 가리키는 곳은 vWF 발현이 억제되고 있는 것이 보였다. Fig. 1C에서는 동일한 위치의 화살표가 가리키는 곳에 HCMV IE1이 발현되고 있음을 확인하였다. 또한 DAPI로 핵을 염색하여 세포의 존재를 확인한 결과, HCMV IE1이 발현된 곳만 vWF의 발현이 감소되는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에 사용한 HUVEC이 다른 세포의 흡입이 없고, 내피세포의 특성을 잃어버리지 않은 세포임을 확인하였다.

HCMV 감염 확인

HCMV가 HFF혹은 HUVEC에 감염되는 것은 HCMV IE1 항원에 대한 항체를 사용한 간접면역형광항체법으로 확인하였다. 동일한 조건에서 MOI 5로 HFF세포와 HUVEC에 HCMV를 감염시키고, 48시간이 경과한 후에 감염정도를 확인한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. HFF의 대부분의 세포가 HCMV에 감염되어 IE1 항원을 발현하는 것을 확인하였다. 한편 HUVEC에 대한 감염률은 현저히 떨어져 HCMV에 감염된 세포는 약 0.1% 미만인 것으로 나타났다(Fig. 2B).

정맥 마취제의 영향

간접면역형광항체법을 이용하여 정맥마취제가 HCMV 감염에 미치는 영향을 다음과 같이 확인하였다. HCMV Towne을 HUVEC에 MOI 5로 감염을 시킨 후 각각의 마취제를 일반적으로 사용하는 농도와 그 농도의 100배에 해당하는 농도를 함유한 배지로 37°C, 5% CO₂ 존재 하에서 배양하였다.

Fig. 1. Triple-label immunofluorescence staining of HCMV in HUVEC, passage 5 (magnification, $\times 400$). To ensure the purity of endothelial cells, HUVEC were stained for the presence of vWF. As shown in (A). All of the cells displayed the presence of vWF (fluorescein; green). HUVEC was infected with HCMV strain Towne at MOI of 5 and stained with anti-IE1 monoclonal antibody at 48 hours postinfection. Two arrows indicate HUVEC infected with HCMV. As shown in (B, C) the two infected cells lost vWF signal (fluorescein; green) and expressed IE1 nucleus antigen (rhodamine; red). (D) demonstrates DAPI staining of HUVEC nucleus (blue).

감염된 세포를 고정시키고 간접면역형광항체법으로 HCMV IE1의 발현 유무를 형광현미경으로 100배 및 400배 배율에서 관찰하였다. 세포 4,000개를 계수하여 이중 양성반응을 보인 세포 수를 백분율로 계산해서 감염능을 나타내었다. 이 실험에서 양성대조군으로 sodium butyrate을 10 μ g/ml 농도로 첨가하였으며 약 4% 정도의 세포가 감염된 것을 확인하였다. propofol을 5 μ g/ml와 0.5 mg/ml씩 처리하여 각각 0.125% 및 0.1% 세포가 감염된 것을 확인하였다. thiopental

경우 20 μ g/ml를 처리한 경우 감염능이 0.1%였고, 2 mg/ml 농도로 처리하였을 때 0.075%가 감염되었다. ketamine을 3 μ g/ml 농도로 처리하였을 때 0.05%가 감염되었으며 0.3 mg/ml 농도로 처리했을 때 0.075%의 세포가 감염된 것을 확인하였다. 이상과 같은 결과에서 마취제가 HCMV의 HUVEC 감염에 미치는 영향은 유의성이 없는 것으로 확인되었다(Table 1). 또한 propofol을 제외한 정맥마취제들은 100배 농도에서 세포의 생육에 영향을 미치는 것을 관찰할 수 있었다.

Fig. 2. Double-label immunofluorescent staining of HCMV on HFF cells and HUVEC (magnification, $\times 200$). Expression of viral IE antigen (UL122/123) was detected by indirect immunofluorescence staining 48 h after infection of the cells with HCMV strain Towne at MOI of 5. The nucleus of the cells were detected by DAPI staining. As shown in (A, C) $> 80\%$ of the HFF cells displayed an IE antigen (fluorescein; green, DAPI; blue). (B, D) $< 0.1\%$ of the HUVEC expressed an IE antigen.

재조합 HCMV Towne/Pol-Luc를 이용한 마취제의 영향은 감염 후 24시간이 경과하였을 때 propofol을 $5\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 세포와 처리를 하지 않은 세포에서 발현되는 polymerase의 양이 매우 적어 차이가 없었다(Fig. 3A). 감염 72시간이 경과한 후에는 propofol을 처리한 세포에서 발현되는 polymerase 양($\text{RLU } 9,272 \pm 145$)이 처리를 하지 않은 세포에서 발현되는 양($\text{RLU } 9,043 \pm 82$)보다 높게 나타났으나 유의할 만한 차이가 없었다. 감염 후 96시간 및 168시간이

경과한 후에도 처리한 세포($\text{RLU } 16,881 \pm 491.5$ 및 $6,693.5 \pm 141$)가 처리하지 않은 세포($\text{RLU } 16,309 \pm 1,943$ 및 $5,726.5 \pm 918$)보다 발현양이 많았으나 유의한 차이는 없었다. 감염 후 24시간이 경과하였을 때 thiopental ($20\mu\text{g/ml}$)을 처리한 세포와 처리를 하지 않은 세포에서 발현되는 polymerase의 양이 매우 적어 차이가 많이 나지 않았다(Fig. 3B). 감염 72시간 경과 후 thiopental을 처리한 세포에서 발현되는 polymerase 양($\text{RLU } 7,350 \pm 724$)이 처리하지 않은

세포에서 발현되는 양(RLU $9,043 \pm 82$)보다 적게 발현되었으나 유의할 만한 차이는 없었다(P value, 0.1458). 감염 후 96시간 및 168시간이 경과한 후도 thiopental을 처리한 세포에서 발현되는 polymerase 양이 처리하지 않은 세포에서 발현되는 양 보다 적었으나 역시 유의할 만한 차이는 없었다.

Table 1. The Frequency of HCMV Infection in HUVEC after Treatment with Various Intravenous Anesthetics at Plasma Concentrations and 100 times This Concentrations

I.V. anesthetics	Plasma concentration	100 times plasma concentration
Propofol	5*/4,000 [†] (0.125%)	4/4,000 (0.1%)
Thiopental	4/4,000 (0.1%)	3/4,000 (0.075%)
Ketamine	2/4,000 (0.05%)	3/4,000 (0.075%)
Normal control	3/4,000 (0.075%)	
NaB [‡] treatment	163/4,000 (4.0%)	

*: HCMV IE1 positive cells were detected by IFA with anti-IE1 antibody at 48 h post-infection, [†]: Total 4,000 cells were counted, [‡]: Sodium butyrate.

Ketamine을 처리한 세포에서 감염 초기에는 낮은 수준의 polymerase 발현이 있었고, 72시간 후에는 ketamine (3 μ g/ml)을 처리한 세포에서 발현되는 polymerase 양(RLU $8,372 \pm 423.5$)이 처리하지 않은 세포에서 발현되는 양(RLU $9,043 \pm 82$)보다 약간 적었지만 유의성은 없었다. 또한 96시간 및 168시간이 경과한 때에도 역시 처리한 세포에서 처리하지 않은 세포보다 polymerase 발현양이 평균값 기준 7.5% 및 17.4% 감소하는 것을 확인하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 3C).

재조합 HCMV Towne/pp28-Luc을 이용한 마취제의 영향은 감염 후 24시간이 경과하였을 때 세포에서 발현되는 pp28의 양이 적어 propofol (5 μ g/ml)을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 비교할 수 없었다(Fig. 4A). 감염 후 72시간이 경과하였을 때 propofol을 처리한 세포에서 발현되는 pp28의 양(RLU $42,088 \pm 11,004$)이 처리하지 않은 세포(RLU $41,453.5 \pm 3,368.5$)보다 적었고, 감염 후 96시간에는 처리한 세포의 발현량(RLU $129,429 \pm 19,615$)이 처리하지 않은 경우(RLU $137,429 \pm 6,571.5$)보다 적었다. 감염 후 168시간이 경과하였을 때 처리한 세포에서 발현되는 pp28 양(RLU $151,967 \pm 10,322.5$)이 처리 안 한 세포에서 발현되

Fig. 3. Time course of luciferase gene expression in HUVEC treated with various intravenous anesthetics at plasma concentrations. HUVEC were infected with HCMV Towne/Pol-Luc coding for the luciferase gene under the control of the viral polymerase promoter at MOI of 5. The cells were treated with 5 μ g/ml of propofol (A), 20 μ g/ml of thiopental (B), and 3 μ g/ml of ketamine (C) for 24 h. The cells were harvested at 24, 72, 96, and 168 h postinfection. Luciferase activities were determined for the cell lysates. The results shown are mean $\pm$ SE of two experiments performed in duplicate. The white bar means data from the cells infected with HCMV and treated with anesthetics and the black bar means data from untreated cells.

Fig. 4. Time course of luciferase gene expression in HUVEC treated with various intravenous anesthetics at plasma concentrations. HUVEC were infected with HCMV Towne/pp28-Luc coding for the luciferase gene under the control of the viral polymerase promoter at MOI of 5. The cells were treated with 5µg/ml of propofol (A), 20µg/ml of thiopental (B), and 3µg/ml of ketamine (C) for 24 h. The cells were harvested at 24, 72, 96, and 168 h postinfection. Luciferase activities were determined for the cell lysates. The results shown are mean $\pm$ SE of two experiments performed in duplicate. The white bar means data from the cells infected with HCMV and treated with anesthetics and the black bar means data from untreated cells.

는 양(RLU $145,509 \pm 10,949$)과 비교하여 높게 나타났다. 그러나 이들 모든 차이는 유의성이 없는 것으로 확인되었다. 감염 초기 thiopental (20µg/ml)을 처리한 세포와 처리를 하지 않은 세포에서 발현되는 pp28의 양이 매우 적어 차이가 많이 나지 않았다(Fig. 4B). 감염 후 72시간이 경과하였을 때 thiopental을 처리한 세포에서 발현되는 pp28의 양(RLU $51,982 \pm 10,374.5$)이 처리하지 않은 양(RLU $41,453.5 \pm 3,368.5$)보다 약 25% 많았으나 유의성은 없었다. 감염 96시간 후 처리한 경우(RLU $144,808.5 \pm 5,755$)가 처리하지 않은 경우(RLU $137,429 \pm 6,571.5$)보다 많았고, 168시간이 경과한 때에는 처리한 세포에서 발현되는 pp28양(RLU $137,399 \pm 6,499.5$)이 처리 안 한 세포에서 발현되는 양(RLU $145,509 \pm 10,949$)과 비교해서 적게 나타났다. 이들 모든 차이는 유의성이 없는 것으로 확인되었다. ketamine (3µg/ml)을 처리한 세포에서 감염 초기 낮은 수준의 pp28 발현이 있었고(Fig. 4C), 72시간이 경과하였을 때 ketamine (3µg/ml)을 처리한 세포에서 발현되는 pp28의 양(RLU $29,749 \pm 7,856$)이 처리하지 않은 양(RLU $41,453.5 \pm 3,368.5$)보다 28.3% 적었고, 감염 후 96시간에는 처리한 경우(RLU $140,752.5 \pm$

5,685)가 처리하지 않은 경우(RLU $137,429 \pm 6,751.5$)보다 6.4% 많았다. 감염 후 168시간이 경과한 때에는 처리한 세포에서 발현되는 pp28 양(RLU $136,154 \pm 2,310$)이 처리하지 않은 세포에서 발현되는 양(RLU $145,509 \pm 10,949$)과 비교해서 낮게(6.5%) 나타났다. 이들 모든 차이는 유의성이 없는 것으로 확인되었다.

고 찰

Immunohistochemical analysis를 통하여 장기가 HCMV에 감염될 경우 내피세포가 주요 표적이 되는 것이 확인되었다.^{20,21)} 또한 내피세포에 감염된 HCMV가 혈액세포로 옮겨 갈수 있음이 세포배양을 이용한 실험에서 입증되어 내피세포가 HCMV를 퍼뜨리는데 중요한 역할을 할 것으로 여겨지고 있다.²²⁾ 혈관 내피세포는 HCMV 급성 감염에 관련된 것뿐만 아니라 바이러스가 잠복하는 장소로서 오랫동안 추정되어 왔다.²³⁻²⁶⁾ 본 연구에서 HCMV가 내피세포에 감염되는 것에 대한 정맥 마취제들의 영향을 살펴보았다. 각각의 정맥마취제를 임상에서 사용하는 농도와 그 농도의 100배

를 사용한 결과 100배 농도에서는 propofol을 제외한 정맥마취제들이 세포를 괴사시키는 결과를 얻었다. 따라서 본 실험에서는 마취제를 세포 생육에 영향을 주지 않는 임상에서 사용하는 농도로 처리하여 실험하였다.

내피세포에 HCMV strain Towne를 감염시킨 후 propofol, thiopental 그리고 ketamine을 각각 처리한 다음 48시간 후에 간접면역형광항체법으로 IE1 혹은 IE2의 발현정도를 측정하여 HCMV 감염에 미치는 영향을 조사하였다. 정맥마취제를 처리하지 않은 대조군에서 0.075%의 세포가 감염된 것이 관찰되었고, 정맥마취제를 처리한 경우에도 0.05-0.125%의 세포가 감염된 것이 관찰되어 유의할 만한 영향이 없음을 확인할 수 있었다. 또한 내피세포에 재조합 HCMV를 감염시키고 정맥마취제를 처리한 후 early gene product (polymerase)와 late gene product (pp28, tegument protein)의 생산량을 luciferase activity로 측정하여 마취제의 영향을 조사하였다. 24시간이 경과하였을 때는 마취제를 처리한 경우나 처리하지 않은 경우에 모두 생산량이 극히 낮아 마취제의 영향을 확인할 수 없었다. 한편 72시간 이후에는 감염된 세포에서 HCMV polymerase와 pp28을 발현하는 것이 확인되었다. 그러나 HCMV는 감수성이 가장 높은 세포인 HFF 세포에 감염된 경우, 감염 후 4-6시간이면 HCMV IE1 혹은 IE2를 발현하고, 12-24시간이면 polymerase와 pp28을 생성하는 것이 관찰되었다. 따라서 위의 결과들은 많은 보고자들이 기술한 내용과 같이²⁶⁻³⁰⁾ 내피세포에서 HCMV의 감염률이 매우 낮으며, 또한 유전자 발현이 상당히 지연되고 있음을 시사하였다.

장기이식을 한 이후 약 1개월에서 6개월 사이에 HCMV의 재활성으로 인한 여러 가지 질환이 일어나고 있다. 현재까지 이러한 현상의 주원인은 장기이식 후 투여하는 면역억제제에 기인한 것으로 추정하고 있다. 근래에 들어 Tebourbi 등은³¹⁾ FVB/N mouse에 cyclohexamide를 처리하고, murine CMV를 감염시킨 후 대조군과 비교하여 감염 정도가 심하여 지는 것을 입증하였다. 하지만 그 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않고 있다.

1916년부터 현재까지 마취제가 인체의 면역체계에 영향을 줄 수 있다는 연구들이 계속 진행되어 오고 있다.¹⁶⁾ O'Donnell 등은³²⁾ propofol과 thiopental이 임상적인 농도에서 neutrophils polarization을 감소시킬 수 있음을 입증했고, Pirttikanges 등은³³⁾ propofol이 위중한 환자에 있어 B 림프구 증식을 억제한다는 것을 밝혔으며, 또한 propofol과 thiopental로 마취하는 것이 림프구의 sub-population에 영향을 준다는 것을 밝혔다.³⁴⁾ Davidson과 Boom은³⁵⁾ 정맥주사용 마취제들, 즉 propofol, thiopental, 그리고 ketamine을 사용하여 다형핵 백혈구의 기능에 미치는 영향을 조사한 결과 thiopental과 ketamine을 일반적인 사용량의 100배로 처리하였을 때 다형

핵 백혈구의 기능이 저하 될 수 있음을 밝혔다. 따라서 이와 같이 마취제가 인체의 면역기능을 억제하면서 HCMV의 재활성을 유도할 가능성이 있음을 시사한다.

Sodium butyrate를 비롯해 sodium hexanoate, sodium propionate 등의 약제를 HCMV가 감염된 내피세포에 처리함으로써 감염률이 높아진다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다.^{30,36,37)} Radsak 등은³⁶⁾ HUVEC에 HCMV를 감염시킨 후 sodium butyrate를 처리한 경우 감염률이 증가된다는 것을 확인하였으며, 감염 전에 HUVEC에 sodium butyrate를 처리하는 것은 감염률에 변화를 주지 않는 것으로 보고하였다. Wu 등은³⁰⁾ HUVEC에 HCMV를 감염시킨 후 sodium butyrate를 처리한 경우 감염률이 증가하며, Radsak 등의 결과와는 다르게 HUVEC에 sodium butyrate를 24시간 동안 전 처리한 후 HCMV를 감염시킨 경우에도 HCMV 감염률이 증가될 수 있음을 밝혔다. 본 연구에서는 HUVEC에 HCMV를 감염시킨 후 정맥마취제를 함유한 배지로 세포를 24시간 배양한 후 정맥마취제를 포함하지 않은 새 배지로 교환하여 계속 배양하였다. 그 결과 HCMV가 감염된 내피세포에 각각 propofol, thiopental, ketamine을 처리한 세포에서 감염 후 72시간이 경과하였을 때 정맥마취제를 처리하지 않은 세포와 비교하여 HCMV polymerase와 pp28의 발현양에 유의한 차이가 없었다. 또한 감염후 96시간이 경과하였을 때에도 발현양에 유의한 차이가 없었다. 간접면역형광항체법으로 감염 후 48시간이 경과되었을 때에 HCMV IE1 혹은 IE2의 발현을 비교한 결과, sodium butyrate를 처리한 것이 처리하지 않은 것과 비교해서 감염률이 약 54배 정도 증가하였지만, 정맥 마취제를 처리한 세포에서는 유의할 만한 변화가 없었다. 하지만 위의 결과는 sodium butyrate 경우 여러 연구자들의 보고에 의한 최적화된 농도(10 mM)를 사용한 것이고 정맥마취제들은 임상에서 안전한 농도로 판명된 농도를 사용한 것이기 때문에 정맥마취제의 영향을 정확히 비교하기는 어렵다.

정맥마취제들이 HCMV 감염에 미친 영향을 연구하기 위해서는 기존에 잘 알려져 있는 물질을 모델로 하는 것이 좋다. Sodium butyrate가 여러 가지 세포에서 HCMV를 비롯한 herpes virus의 감염을 증대시킨다고 알려져 있다.^{30,36-40)} 현재까지는 sodium butyrate가 IE promoter를 활성화시킨다는 것이 가장 유력한 작용기전으로 알려져 있다. Prosch 등은⁴¹⁾ TNF- α 가 HCMV의 major immediate early (MIE) enhancer/promoter의 활동을 증가시킨다는 결과를 얻었다. TNF- α 의 이 작용은 PK-C가 관련된 신호전달도입경로에 의해 전사요소인 NF- κ B를 자극하여 얻어지는 것으로 설명하고 이러한 일련의 과정의 결과로 HCMV가 TNF- α 에 의해 재활성된다는 결론을 내렸다. Wu 등은³⁰⁾ sodium butyrate가 존재할 때 오히려 HCMV IE1의 발현이 억제되며, 제거를 하고 난

이후부터 IE1의 발현이 시작됨을 밝혀내었다.

지금까지 알려진 마취제가 세포에 미치는 영향을 살펴보면 다음과 같다. Kotani 등은¹⁵⁾ propofol과 isoflurane으로 마취한 후 채취한 폐포 대식세포에서 전구염증성 cytokine들이 2-10배 증가하고, IL-8과 IFN- γ 가 1.5-3배 증가한다는 것을 확인하였다. Hill 등은⁴²⁾ ketamine이 H9c2 세포에서 cAMP의 축적을 가져오며, TNF- α 나 IFN에 의해 감소된 cAMP를 다시 축적시키는 것을 밝혔다. Jimi 등은⁴³⁾ 혈관간(mesangial) 세포를 ketamine으로 72시간 처리한 후 TNF- α , IL-1, 그리고 IL-6로 유도된 혈관간세포의 증식이 억제됨을 밝혔다. Brand 등은⁴⁴⁾ fentanyl, thiopental, 그리고 isoflurane 등으로 마취한 경우 IFN- γ , IFN- α , TNF- α , 그리고 soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R)의 양이 감소하는 것을 관찰하였다. 이상과 같이 마취제는 세포 내에서 여러 가지 변화를 유발한다. 이와 같은 변화 중 그 어떤 것이 HCMV 감염을 촉진하거나 재활성을 유발할 것으로 생각된다.

결론적으로 임상용량의 정맥마취제 propofol, thiopental, 및 ketamine은 HCMV 극초기 단백질 발현 및 말기단백 발현의 발현 정도에서 마취제를 처리하지 않았을 때와 유의한 차이가 없었으며 HCMV 감염률을 유의하게 증가시키지 않았다. 따라서 본 연구에서 실험한 정맥마취제는 임상에서 정상적으로 사용하였을 때, HCMV의 감염 및 재발현과는 무관한 것으로 생각된다. 향후 정맥마취제의 HCMV 감염에 대한 안정성을 연구하려면, 본 연구에서 사용한 정맥마취제와 함께 임상에서 사용하는 다른 정맥마취제를 포함하여, 임상농도 및 세포 활성에 영향을 미치지 않는 한도 내의 고농도에서의 안정성을 확인하여야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Burak KW, Kremers WK, Batts KP, Wiesner RH, Rosen CB, Razonable RR, et al: Impact of cytomegalovirus infection, year of transplantation, and donor age on outcome after liver transplantation for hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8: 362-9.
- Engstrand M, Tournay C, Peyrat MA, Eriksson BM, Wadstrom J, Wirgart BZ, et al: Characterization of CMV pp65-specific CD8+ T lymphocytes using MHC tetramers in kidney transplant patients and healthy participants. *Transplantation* 2000; 169: 2243-50.
- Hummel M, Zhang Z, Yan S, DePlaen I, Golia P, Varghese T, et al: Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes *in vivo*: a model for reactivation from latency. *J Virol* 2001; 75: 4814-22.
- Walton B: Effects of anaesthesia and surgery on immune status. *Br J Anaesth* 1979; 51: 37-43.
- Tait A, Davidson BA, Johnson KJ, Remick DG, Knight PR: Halothane inhibits the intraalveolar recruitment of neutrophils, lymphocytes, and macrophages in response to influenza virus infection in mice. *Anesth Analg* 1993; 76: 1106-13.
- Mobert J, Zahler S, Becker BF, Conzen PF: Inhibition of neutrophil activation by volatile anesthetics decreases adhesion to cultured human endothelial cells. *Anesthesiology* 1999; 90: 1372-81.
- Sheffield CW, Sessler DI, Hunt TK: Mild hypothermia during isoflurane anesthesia decreases resistance to *E. coli* dermal infection in guinea pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* 1994; 38: 201-5.
- Kotani N, Hashimoto H, Sessler DI, Kikuchi A, Suzuki A, Takahashi S, et al: Intraoperative modulation of alveolar macrophage function during isoflurane and propofol anesthesia. 1998; 89: 1125-32.
- Cooper AB, Sharpe MD: Bacterial meningitis and cauda equina syndrome after epidural steroid injections. *Can J Anaesth* 1996; 43: 471-4.
- Frohlich D, Rothe G, Schwall B, Schmid P, Schmitz G, Taeger K, et al: Effect of volatile anaesthetics on human neutrophil oxidative response to the bacterial peptide FMLP. *Br J Anaesth* 1997; 78: 718-23.
- Frohlich D, Rothe G, Wittmann S, Schmitz G, Schmid P, Taeger K, et al: Nitrous Oxide impairs the neutrophil oxidative response. *Anesthesiology* 1998; 88: 1291-90.
- Miller LC, Lynch EA, Isa S, Logan JW, Dinarello CA, Steere AC: Balance of synovial fluid IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist and recovery from Lyme arthritis. *Lancet* 1993; 341: 146-8.
- Haeflner-Cavaillon N, Roussellier N, Ponzio O, Carreno MP, Laude M, Carpentier A, et al: Induction of interleukin-1 production in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 98: 1100-6.
- Rossano F, Tufano R, Cipollaro de L'Ero G, Servillo G, Baroni A, Tufano MA: Anesthetic agents induce human mononuclear leucocytes to release cytokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992; 14: 439-50.
- Kotani N, Hashimoto H, Sessler DI, Yasuda T, Ebina T, Muraok M, et al: Expression of genes for proinflammatory cytokines in alveolar macrophages during propofol and isoflurane anesthesia. *Anesth Analg* 1999; 89: 1250-6.
- McBride WT, Armstrong MA, McBride SJ: Immunomodulation: an important concept in modern anaesthesia. *Anaesthesia* 1996; 51: 465-73.
- Myerson D, Hackman RC, Nelson JA, Ward DC, McDougall JK: Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus. *Hum Pathol* 1984; 15: 430-9.
- Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G: Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 1995; 76: 741-50.
- Toorkey CB, Carrigan DR: Immunohistochemical detection of an immediate early antigen of human cytomegalovirus in normal tissues. *J Infect Dis* 1989; 160: 741-51.
- Sinzger C, Jahn G: Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 1996; 39: 302-19.
- Wiley CA, Nelson JA: Role of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus in AIDS encephalitis. *Am J Pathol* 1988; 133: 73-81.

22. Waldman WJ, Sneddon JM, Stephens RE, Roberts WH: Enhanced endothelial cytopathogenicity induced by a cytomegalovirus strain propagated in endothelial cells. *J Med Virol* 1989; 28: 223-30.
23. Craighead JE: Pulmonary cytomegalovirus infection in the adult. *Am J Pathol* 1971;63: 487-504.
24. Goodman MD, Porter DD: Cytomegalovirus vasculitis with fatal colonic hemorrhage. *Arch Pathol* 1973; 96: 281-4.
25. Vogel FS: Enhanced susceptibility of proliferating endothelium to salivary gland virus under naturally occurring and experimental conditions. *Am J Pathol* 1958; 34: 1069-79.
26. Friedman HM, Macarak EJ, MacGreger RR, Wolfe J, Kefalides NA: Virus infection of endothelial cells. *J Infect Dis* 1981; 143: 266-73.
27. Ho DD, Rota RT, Andrews CA, Hirsch MS: Replication of human cytomegalovirus in endothelial cells. *J Infect Dis* 1984; 150: 956-7.
28. Smiley ML, Mar EC, Huang ES: Cytomegalovirus infection and viral transformation of human endothelial cells. *J Med Virol* 1988; 25: 213-26.
29. Waldman WJ, Roberts WH, Davis HD, Williams MV, Sedmak DD, Stephens RE: Preservation of natural endothelial cytopathogenicity of cytomegalovirus by propagation in endothelial cells. *Arch Virol* 1991; 117: 143-64.
30. Wu QH, Ascensao J, Almeida G, Forman SJ, Shanley JD: The effect of short-chain fatty acids on the susceptibility of human umbilical vein endothelial cells to human cytomegalovirus infection. *J virol Meth* 1994; 47: 37-50.
31. Tebourbi L, Emile JF, Cerutti I: Cyclophosphamide- immunodepressed FVB/N mice: potentiating the effects of testicular cytomegalovirus infection. *Intervirol* 2002; 45: 119-24.
32. O'Donnell NG, McSharry CP, Wilkinson PC, Asbury AJ: Comparison of the inhibitory effect of propofol, thiopental and midazolam on neutrophil polarization in vitro in the presence or absence of human serum albumin. *Br J Anaesth* 1992; 69: 70-4.
33. Pirttikangas CO, Perttila J, Salo M: Propofol emulsion reduces proliferative responses of lymphocytes from intensive care patients. *Intensive Care Med* 1993; 19: 299-302.
34. Pirttikangas CO, Perttila J, Salo M, Vainio O, Liukko-sipi S: Propofol infusion anaesthesia and immune response in minor surgery. *Anaesthesia* 1994; 49: 13-6.
35. Davidson JA, Boom SJ: Comparison of the effects of four i.v. anaesthetic agents on polymorphonuclear leucocyte function. *Br J Anaesth* 1995; 74: 315-8.
36. Radsak K, Fuhrmann RP, Schneider D, Kollert A, Brucher KH, Drenckhahn D: Induction by sodium butyrate of cytomegalovirus replication in human endothelial cells. *Arch Virol* 1989; 107: 151-8.
37. Tanaka J, Sadanari H, Sato H, Fukuda S: Sodium butyrate-inducible replication of human cytomegalovirus in a human epithelial cell line. *Virology* 1991; 185: 271-80.
38. Ash RJ: Butyrate-induced reversal of herpes simplex virus restriction in neuroblastoma cells. *Virology* 1986; 155: 584-92.
39. Ginsburg E, Salomon D, Sreevalsan T, Freese E: Growth inhibition and morphological changes caused by lipophilic acids in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 2457-61.
40. Luka J, Kallin B, Klein G: Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology* 1979; 94: 228-31.
41. Prosch S, Staak K, Stein J, Liebenthal C, Stamminger T, Volk HD, et al: Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNF alpha is mediated via induction of NF-kappa B. *Virology* 1995; 208: 197-206.
42. Hill GE, Anderson JL, Lyden ER: Ketamine inhibits the proinflammatory cytokine-induced reduction of cardiac intracellular cAMP accumulation. *Anesth Analg* 1998; 87: 1015-9.
43. Jimi N, Segawa K, Minami K, Sata T, Shigematsu A: Inhibitory effect of the intravenous anesthetic, ketamine, on rat mesangial cell proliferation. *Anesth Analg* 1997; 84: 190-5.
44. Brand JM, Kirchner H, Poppe C, Schmucker P: The effects of general anesthesia on human peripheral immune cell distribution and cytokine production. *Clin Immunopathol* 1997; 83: 190-4.