

## 인체거대세포바이러스에 의한 인체 단핵구세포의 세포주기 저해

장소영 · 김미숙 · 이찬희\*  
충북대학교 자연과학대학 생명과학부

마이엘로이드 계열의 단핵세포는 인체세포거대바이러스(human cytomegalovirus, HCMV)의 잠복 부위로 알려져 있다. 다양한 세포에서 HCMV에 의한 세포주기의 촉진 또는 억제에 관한 연구는 많이 있었지만, 단핵세포에서의 연구는 거의 없는 상태이다. 이에 본 연구에서는 단핵세포에 HCMV가 감염되면 세포주기에 어떤 변화가 나타나는지 알아보려고 하였다. Propidium iodide를 이용한 유세포분석을 통한 세포주기 분석에서 HCMV에 감염된 THP-1 세포에서는 G0-G1기가 증가하고, 그 만큼 S기가 감소함을 보았다. 반면 HL-60 세포에서는 G0-G1기와 S기의 상대적인 비율에 큰 변화가 없었다. BrdU 유입 실험에서 THP-1 세포의 DNA 합성이 HCMV 감염에 의해 억제됨을 알 수 있었다. 세포주기의 G1기에서 S기로의 전환을 억제하는 p21 단백질은 HCMV에 감염된 THP-1 세포에서는 발현이 유도되었지만 HL-60 세포에서는 거의 발현이 되지 않았다. 따라서 HCMV는 promonocyte THP-1 세포에서 p21 단백질의 유도에 의해 세포주기를 G0-G1기에서 억류함에 따라 세포 증식을 억제하는 것으로 생각된다.

**Key words** □ cell cycle, human cytomegalovirus, monocytes

Human cytomegalovirus (HCMV)는 베타허피스바이러스에 속하며 숙주에 오랜 시간 잠복 감염하여 존재하는 것으로 알려져 있다. HCMV가 태어나 신생아 같이 면역력이 약한 사람에게 감염되면 치명적인 질병을 일으킬 수도 있지만, 대부분의 HCMV 감염은 비증상감염으로 나타난다. 일차 감염 후 HCMV는 체내에서 잠복해 있다가 후천성 면역결핍증이나 장기이식 환자와 같이 면역력이 약화된 경우에 재활성되어 생명을 위협하는 원인이 될 수 있다. HCMV가 인체 내에서 잠복 감염되는 부위로는 혈구세포와 내피세포 등이 있는데(7, 10), 특히 마이엘로이드(myeloid) 계열의 단핵세포는 잠복 감염된 바이러스 계놈의 전파에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(16, 17). HCMV가 잠복 감염된 단핵세포에서는 HCMV 유전자 발현이나 증식이 일어나지 않지만, 대식세포(macrophage)나 수지상세포(dendritic cell)로 분화되면 바이러스의 재활성화가 진행되어 HCMV가 증식하게 되고, 이는 HCMV에 의한 주된 질병 요인이다(16).

아데노바이러스나 SV40와 같은 다른 DNA 바이러스처럼 세포에서 HCMV가 증식할 때 정상적인 세포주기가 붕괴된다고 알려져 있다(2, 18). 초기 연구에서는 HCMV에 감염된 세포의 DNA 합성이 증진된다고 보고되었지만(1, 8), 이는 햄스터나 생쥐 세포와 같이 HCMV가 증식하지 못하는 비감수성 세포에서 관찰된 것이다. 이후 인체섬유아세포와 같이 HCMV의 완전한 증식이 이루어지는 감수성 세포에서 연구한 바에 의하면 HCMV는 증식하는 과정에서 정상적인 세포주기를 붕괴시켜 세포증식을 억제

하고 세포는 G1기, 또는 G2/M기에 머물게 된다(6, 11, 13). 다양한 세포에서 HCMV와 세포주기의 관계에 대한 연구가 있어 왔지만, 아직 HCMV가 잠복 감염하는 마이엘로이드 계열의 단핵세포에서의 연구는 거의 보고된 바 없다. 이에 우리는 마이엘로이드 계열의 단핵세포주 중 비교적 분화가 덜 된 CD34+ granulocyte/monocyte 전구체인 promyeloid 세포에 해당되는 HL-60 세포와 비교적 분화가 진행된 promonocyte에 해당되는 THP-1 세포를 이용하여 HCMV에 감염되었을 때 세포주기에 어떤 변화가 일어나는지 알아보려고 하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포 및 세포배양

본 연구를 위해 인체 마이엘로이드 계열의 단핵세포주인 HL-60(ATCC CCL-240)과 THP-1(ATCC TIB-202) 세포를 American Stock Culture Collection (USA)에서 구입하여 사용하였다. 이들 세포는 RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)과 100 µg/ml 스트렙토마이신, 100 U/ml 페니실린을 첨가한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다(14). 바이러스를 감염시키기 전에 세포의 상태를 동일하게 유지시키기 위해 HCMV를 감염시키기 전 2일 동안 2% FBS가 첨가된 유지배지에서 배양하였다.

#### 바이러스 감염

바이러스는 HCMV strain Towne을 사용하였다. 이 바이러스주는 1997년 미국 존스홉킨스 대학의 Hayward 교수로부터 분양받은 것이다. 감염성 HCMV stock을 얻기 위해 세포 배양용 100

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-43-261-2304, Fax: 82-43-273-2451  
E-mail: chlee@cbu.ac.kr

mm 접시에 배양한 인체섬유아세포 단층에 0.01~0.05 plaque forming unit (pfu)/ml로 접종시킨 후 15분 간격으로 가볍게 흔들어 주어 37°C에서 1시간 동안 흡착시켰다. 바이러스 감염 4~5일 후 세포병변효과가 나타나면 배지를 갈아주고 바이러스를 감염 8~10일 후에 수확하였다. 세포를 모아 원심분리하여 상층액은 50 ml 원심분리관에 넣고 세포 침전물은 전체 부피의 1/10로 재현탁하여 액체 질소에 2회 얼림과 녹임을 반복하여 세포를 깨고, 다시 3,000 rpm에서 원심분리하여 세포의 침전물을 제거한 상층액을 얻었다. 이것을 4°C, 15,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리하여 세포용해물이 포함된 상층액은 버리고, 침전된 바이러스는 FBS가 첨가되지 않은 배지로 재현탁하여 잘 섞은 후 -70°C에 1 ml씩 나누어 보관하여 사용하였다.

### 생존 세포수의 측정

세포의 증식 관찰을 위해 일반적으로 사용되는 trypan blue exclusion assay을 통해 살아있는 세포수를 측정하였다. 실험에 사용할 각 세포를 모은 뒤 세포가 잘 섞이도록 혼합한 후 0.4% trypan blue (Sigma-Aldrich, USA)에 1:10 희석하고 혈구계수기를 이용하여 현미경하에서 세었다. 살아있는 세포는 trypan blue를 흡수하지 않으므로 현미경하에서 밝은 광채를 띠는 반면 죽은 세포는 세포막 파괴에 의해 trypan blue가 침투되므로 파란색으로 염색되어 보이게 되는 원리를 이용하여 생존 세포수를 측정하였다.

### Propidium Iodide (PI) Staining

세포 주기를 분석하기 위해 Moon 등의 방법에 따라 DNA 염색시약인 propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich)로 염색하여 유세포 분석법(FACS)을 이용하였다(14). 배양된 세포를 감염 후 실험 조건 시간에 맞추어 세포를 수확하여 생존 세포수를 측정한 후  $3 \times 10^5$  세포를 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 침전된 세포를 PBS로 재현탁한 뒤 다시 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 침전된 세포를 200  $\mu$ l의 70% 에탄올로 -20°C에서 1시간 동안 처리하였다. 원심분리에 의해 에탄올을 제거하고 PBS로 씻어준 후 PI 염색시약[PBS; pH 7.4, 0.1% Triton X-100, 0.1 mM EDTA; pH 7.4, 0.05  $\mu$ g/ml RNase A (50 unit/ $\mu$ g), 50  $\mu$ g/ml PI] 200  $\mu$ l로 재현탁 시킨 뒤 1시간 동안 빛에 노출이 되지 않는 실온에서 염색하였다. 마지막으로 염색한 10의 세포를 유세포 분석기(FACS Calibur, Becton-Dickinson, USA)로 분석하였다.

### BrdU 유입 분석

S기의 대표적인 대사과정은 DNA 합성이므로 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 유입 분석을 통해 S기와 DNA 합성의 관계를 알아볼 수 있다. 이에 따라 S기의 DNA 합성 기간 동안의 세포 증식을 측정하기 위한 유세포 분석 방법으로, thymidine 유사체인 BrdU가 복제되는 DNA에 끼어 들어가는 정도를 알아보고자 하였다(19). 배양된 세포를 수확하기 전 1시간 동안 10  $\mu$ M BrdU (Invitrogen, USA)를 처리하였다. 세포를 수확하여 PBS에 희석된 3% 포름알데히드로 4°C에서 1시간 고정시킨 뒤, 원심분

리하고 1% Triton X-100을 실온에서 5분간 처리하였다. 다시 세포를 원심분리하여 수확한 뒤 PBS로 씻어주고, 4 N HCl을 10분간 실온에서 처리하여 DNA 이중가닥을 풀어준 뒤 원심분리하고 PBS로 씻어주었다. 실온에서 30분간 blocking 용액(30% FBS, 1% BSA, 0.01% Tween 20 in PBS)을 처리한 뒤 원심분리하였다. PBS에 100배 희석한 anti-BrdU mouse IgG (Molecular Probes, Inc, USA)를 30분간 4°C에서 반응시킨 다음 Fluorescein (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA)를 30분간 4°C에서 반응시켰다. 이를 PBS에 희석된 0.2% Tween 20으로 씻어 원심분리한 후 모아진 세포를 마지막으로 PBS 300  $\mu$ l로 희석하여 유세포 분석기로 분석하였다.

### Western blot 분석

G1기 세포 주기 저해의 중요 인자로 알려진 p21 단백질을 검출하기 위해 Western blot 분석법을 이용하였다.  $1 \times 10^6$ 의 세포를 수확한 뒤 PBS로 씻어주고, protease inhibitor가 포함된 NP-40 buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 500 mM Tris, pH 8.0)로 녹여 단백질을 추출하였다. 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취해 Bradford 방법으로 단백질 정량을 실시하였다. 단백질 100  $\mu$ g을 취해 15% SDS-PAGE gels에 전기영동하였고 PVDF membrane (Milipore, USA)에 전기이동 시켰다. 단백질이 옮겨진 membrane을 0.1% Tween 20이 포함된 PBS (PBS-T)로 가볍게 세척한 후 5% skim milk가 들어있는 PBS-T로 1시간 동안 상온에서 blocking 시켜주었다. 5% skim milk가 들어있는 PBS-T에 1:1,000으로 희석한 anti-human p21 mouse IgG (BD Pharmingen, Germany)를 2시간 동안 실온에서 처리하였다. PBS-T로 10분씩 두 번 세척하고, 다시 5% skim milk가 들어있는 PBS-T에 1:2,500으로 희석한 horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG (Promega, USA)를 1시간 동안 실온에서 반응시켜주었다. 항체 처리가 끝난 membrane을 PBS-T로 10분씩 세 번 세척한 후 ECL (enhanced chemiluminescence) system (Intron, Korea)으로 발광반응을 일으켜 X-ray 필름에 감광시켜 상을 확인하였다.

## 결 과

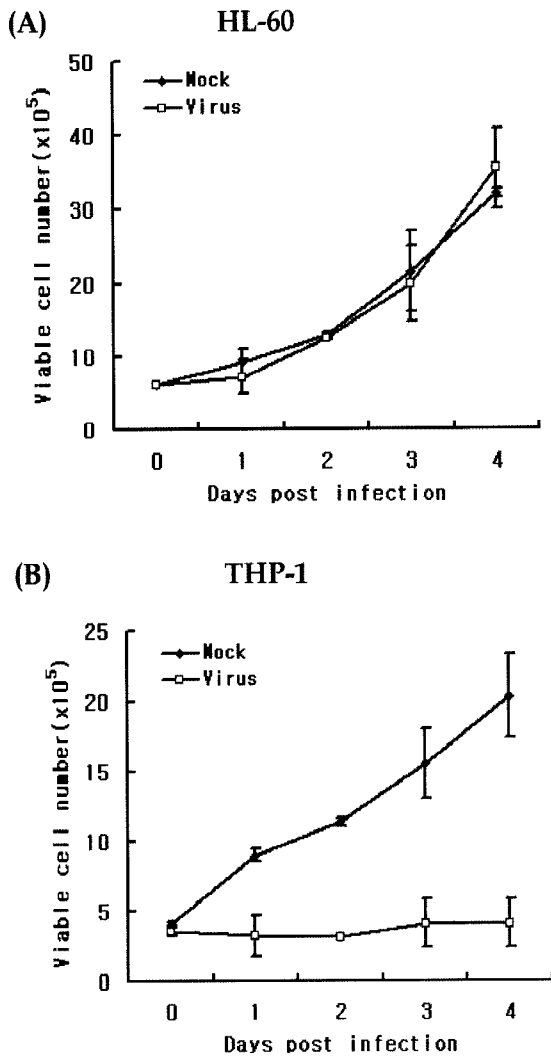
### HCMV 감염에 의한 세포 증식 억제

실험에 사용한 HL-60, THP-1 세포는 인체 마이엘로이드 계열의 단핵세포주로 THP-1 세포는 promonocyte이고, HL-60 세포는 promyeloid로 THP-1 세포가 더 분화된 상태이다. 세포의 잔여물이 제거된 HCMV를 HL-60, THP-1 세포에 각각 MOI (multiplicity of infection) 1로 감염시키고 4일 동안 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 24시간 마다 생존 세포수를 확인해 보았다. 그 결과 HL-60 세포는 바이러스를 감염시킨 세포의 수나 감염 시키지 않은 세포의 수에 큰 차이 없이 시간이 지남에 따라 증가하여 세포의 증식에 바이러스가 영향을 주지 않음을 알 수 있었다(Fig. 1A). 그러나 HCMV에 감염시키지 않은 THP-1 세포는

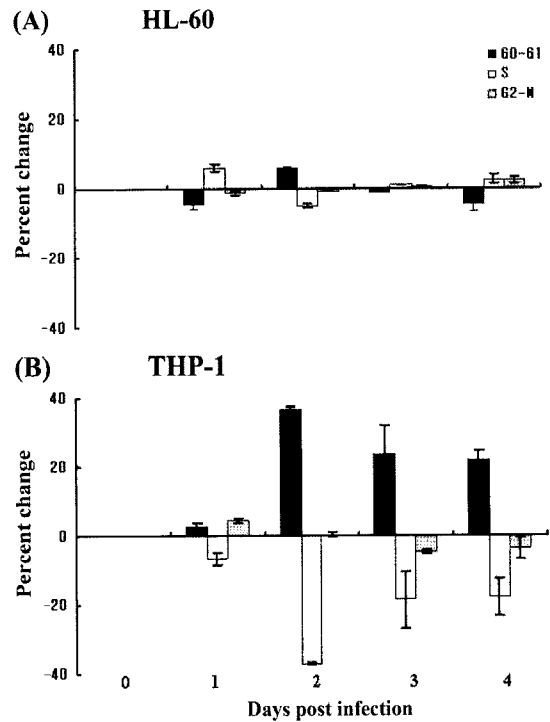
시간이 지남에 따라 세포의 수가 증가하였지만, 감염시킨 THP-1 세포는 감염 후 1일에서부터 4일까지 세포의 수가 거의 변화 없어 HCMV가 THP-1 세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 1B).

**HCMV 감염에 의한 세포주기 저해**

HCMV 감염에 의한 세포 증식 억제가 세포주기 저해와 연관성이 있는지 알아보기 위해 PI 염색을 통한 세포주기 분석을 수행하였다. HCMV에 의해 세포 증식이 영향을 받지 않은 HL-60 세포의 세포주기를 분석해 본 결과, 세포의 G0-G1기, S기, G2-M기의 비율은 감염 4일 동안 바이러스의 감염에 의해 크게 변화하지 않았다(Fig. 2A). HCMV 감염에 의해 세포 증식 억제가 관찰된 THP-1 세포에서는 HCMV 감염에 의한 G2-M기의 비율은 거의 변화가 없는 반면, 감염 1일째부터 G0-G1기의 비율의



**Fig. 1.** Inhibition of cell proliferation by HCMV infection in THP-1 cells, but not in HL-60 cells. Cells were infected or mock-infected with HCMV (strain Towne, MOI=1) and the number of viable cells were determine every 24 hr using trypan blue exclusion assay. (A) HL-60 cells. (B) THP-1 cells.



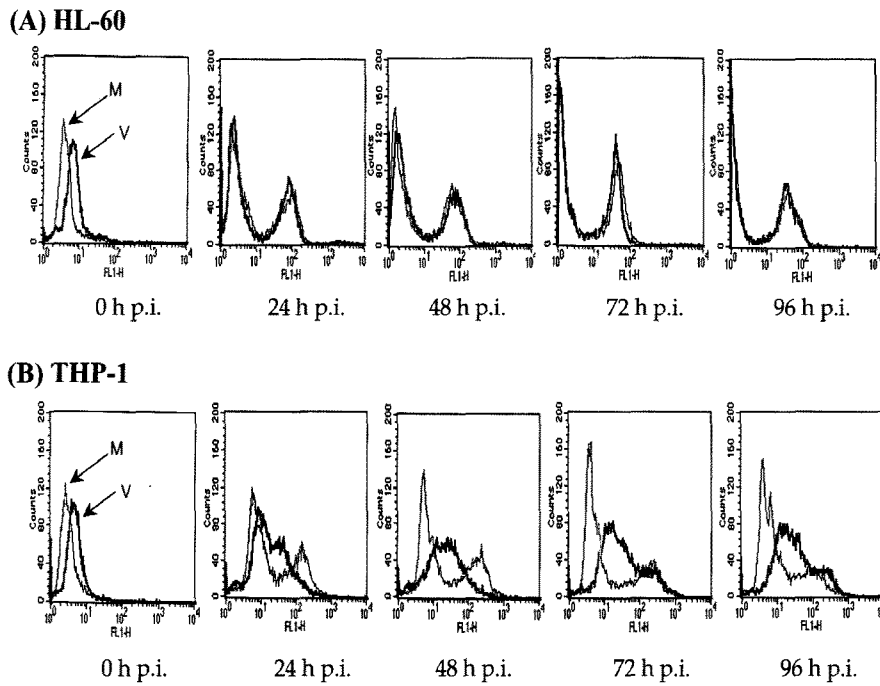
**Fig. 2.** Change of the relative proportion of cell cycle phases in cells infected with HCMV. Cells were infected or mock-infected with HCMV (strain Towne, MOI=1), and at every 24 hr cell cycle was analyzed by flow cytometry using propidium iodide. Data were presented as the change in the proportion of each phase of cell cycle in HCMV-infected cells relative to mock-infected cells. (A) HL-60 cells. (B) THP-1 cells.

증가와 S기 감소가 관찰되었고, 이는 감염 2일째 최대로 나타났으며, 이후 조금씩 감소하는 것이 관찰되었다(Fig. 2B). 또한 G0-G1기의 증가분과 S기의 감소분은 비슷하기 때문에 HCMV 감염에 의한 G0-G1기의 증가는 S기의 감소에 의한 것임을 추측할 수 있다.

**HCMV 감염에 의한 DNA 합성저해 및 p21 발현 촉진**

S기의 대표적인 대사과정인 DNA 합성은 HCMV 감염에 의해 어떤 영향을 받는지 알아보코자 하였다. HCMV에 감염되었거나 감염되지 않은 세포에 BrdU를 처리하고 매 24시간마다 수확하여 DNA에 끼어든 BrdU의 형광값을 측정하였다. HL-60 세포의 경우 감염 4일 동안 HCMV에 감염시키지 않은 세포와 감염시킨 세포 모두 비슷한 양상을 보이면서 DNA 합성에 변화가 없음을 알 수 있었다(Fig. 3A). 반면, THP-1 세포의 HCMV 감염에 의해 BrdU 형광값이 줄어드는 것이 관찰되어 DNA 합성이 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3B).

세포주기 저해를 조절하는데 중요한 역할을 하는 CDKs 중에 G1기에서 S기로 전환되는 과정을 저해하는 p21 유전자의 발현을 western blot 분석을 통해 알아보았다. HL-60 세포에서는 HCMV에 감염시킨 세포와 감염시키지 않은 세포 모두 p21은 발현되지 않았다. THP-1 세포는 바이러스를 감염시키지 않은 세포에서는 p21이 거의 발현되지 않았으나, HCMV 감염시킨 세포에



**Fig. 3.** Inhibition of DNA synthesis by HCMV infection. Cells were mock-infected or infected with HCMV (MOI=1). At every 24 hr, cells were harvested following treatment with 10  $\mu$ M BrdU for 1 hr. BrdU-incorporation assay supported that cell proliferation was inhibited in HCMV-infected THP-1 cells by inhibition of DNA synthesis. M (-), mock infected. V (-), virus infected.

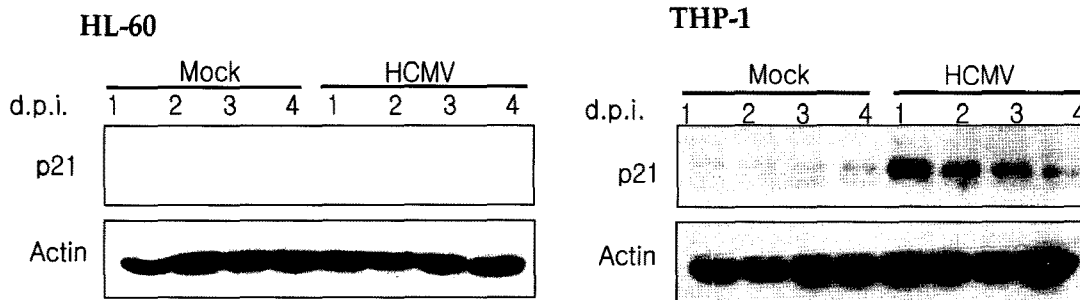
서 p21이 발현된 것을 볼 수 있었다. p21은 감염 후 1일째에 최대 발현되고 2일째부터 발현이 줄어드는 양상을 보였다(Fig. 4). 이는 앞(Fig. 2B)에서 관찰한 세포주기 전환의 억제가 바이러스 감염 1일째부터 나타나지만 2일째에 최대가 되고 이후 감소되는 양상에 비추어 볼 때, p21 발현이 세포주기 진행 억제 현상을 선행한다는 것을 알 수 있다. 또한 HCMV 감염이 후기로 진행됨에 따라 p21 발현이 줄어드는데 이는 세포주기 진행 억제 효과가 감염 후기로 갈수록 줄어드는 것과는 밀접한 관계가 있는 것으로 보인다.

**고 찰**

본 연구에서는 인체단핵 세포인 promonocyte THP-1,

promyeloid HL-60 세포에 HCMV를 감염시켰을 때 나타나는 세포의 증식 억제가 세포주기 저해 유도에 의해 발생할 수 있다는 것을 밝혔고, 이에 대해 두 세포주가 서로 다른 반응을 보인다는 것을 보여 주었다.

THP-1 세포는 HCMV 감염에 의해 세포 증식이 억제되었지만, HL-60 세포는 영향을 없었다. 그 이유로 THP-1 세포는 HCMV에 대해 부분적으로 감수성이 있지만 HL-60 세포는 HCMV 감염에 대한 감수성이 전혀 없는 것으로 설명이 가능하다. HL-60 세포에서는 HCMV 유전자 발현이나 증식이 전혀 일어나지 않지만, THP-1 세포에서는 매우 제한적이기는 하나 MIE (major immediate early) 유전자 발현과 증식이 일어난다(12, 14). TPA의 처리에 의해 분화시켰을 때 THP-1 세포에서의 HCMV 유전자 발현과 증식은 크게 증가한다(12). 따라서 THP-1 세포가 HCMV



**Fig. 4.** Stimulation of p21 expression by HCMV infection. Cells were infected or mock-infected with HCMV (strain Towne, MOI=1). Proteins were extracted at every 24 hr and subjected to western blot analysis for p21.

감염에 의해 증식이 억제되는 것은 HCMV의 유전자 발현 및 증식과 밀접한 관계가 있다.

세포 증식 억제는 세포주기의 진행 억제에 의해 나타날 수 있고, 이러한 세포주기 억제 역시 HL-60 세포가 아닌 THP-1 세포에서만 관찰되었다. 세포주기 분석을 통해 확인해 본 결과, HCMV에 감염된 THP-1 세포에서 GO-G1기가 증가하였고, 그 증가 분 만큼 S기가 감소하였다. S기의 감소는 새로운 DNA 합성 감소로 나타났다. 반면 G2-M기는 큰 변화가 없었다. 이로써 HCMV는 THP-1 세포에서 GO-G1기에서 S기로의 진행, 그리고 세포성 DNA 합성을 억제함으로써 세포주기를 억제하는 것으로 보인다. HCMV는 정상적인 세포주기를 무너뜨리며, 이를 위해 세포주기 진행에서 중요 역할을 하는 단백질을 조절하는 유전자들을 포함하고 있다(2, 3, 18). HCMV에 의한 세포 증식 및 세포주기 조절은 감염되는 세포의 종류에 따라 달리 나타난다. 햄스터 세포나 평활근세포와 같이 HCMV가 증식하지 못하는 비감수성 세포에서는 HCMV의 감염이 세포성 DNA 합성이나 세포 증식 촉진으로 나타난다(1, 18). 그러나 인체 섬유아세포와 같은 감수성 세포에서 HCMV는 세포 증식을 억제한다(6, 11, 13). 따라서 본 연구에서 밝힌 것처럼 감수성이 없는 HL-60 세포는 HCMV 감염에 의해 세포증식이나 세포주기의 변화를 보이지 않지만, 부분적으로 감수성 있는 THP-1 세포의 증식이나 세포주기 진행이 HCMV 감염에 의해 억제되는 것은 이전 연구들과 일치하는 결과이다.

세포주기 진행은 G1기에서 S기로의 전환과 G2기에서 M기로의 전환의 두 개의 주된 조절점을 가진다. 본 연구에서는 G1기에서 S기로의 전환이 억제되는 것을 보았는데 이는 세포성 DNA 합성 억제와도 연관이 있다. 섬유아세포를 사용한 연구에서도 HCMV에 의한 세포성 DNA 합성 억제와 G1기에서 S기로의 전환 억제가 보고된 바 있다(6, 13). G1기에서 S기로의 전환은 cyclin-dependent kinase (Cdk)의 인산화에 의해 조절될 수 있는데, p21은 강력한 Cdk 억제제로 Cdk-cyclin 복합체가 retinoblastoma (Rb) 단백질을 인산화시키는 것을 막아, Rb와 전핵세포 전사인자인 E2F의 결합이 유지되도록 도와 결국 세포주기 진행을 억제한다(5, 9, 15, 19). 인체 섬유아세포에서 HCMV MIE 유전자 산물인 MIE1-72kDa 단백질은 p53 전사를 활성화시키고, 이는 세포내 p21 발현을 증가시켜 G1기에서 S기로의 전환을 억제한다(4, 11). 본 연구진은 이전 연구에서 HCMV에 감염된 THP-1 세포에서 MIE 유전자가 발현됨을 관찰한 바 있었고(14), 본 연구에서도 HCMV 감염에 의해 THP-1 세포에서 p21 단백질 발현이 증가함을 관찰하였다. 반면, HL-60 세포에서는 HCMV MIE 유전자 발현이나 p21 발현이 촉진되지 않았고, 이에 따라 세포 증식 억제나 세포주기 진행 억제 현상도 관찰되지 않았다.

본 연구를 통해 HCMV 감염에 의해 THP-1 세포에서만 세포 증식 억제가 발생되고, 세포 증식 억제는 G1기에서 S기로의 전환 억제에 의하며, 이 때 p21이 관여함을 알 수 있었다. 이러한 특징은 대조적으로 사용된 잠복감염 모델인 HL-60을 통해서 구별이 되었으며, THP-1 세포가 HCMV 감염에 의한 세포 주기

저해를 관찰하기에 적합한 세포임을 알 수 있었다.

## 감사의 말

이 논문은 2007학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음

## 참고문헌

- Albrecht, T., M. Nachtigal, S.C. St Jeor, and F. Rapp. 1976. Induction of cellular DNA synthesis and increased mitotic activity in syrian hamster embryo cells abortively infected with human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 30, 167-177.
- Bain, M. and J. Sinclair. 2007. The S phase of the cell cycle and its perturbation by human cytomegalovirus. *Rev. Med. Virol.* 17, 423-434.
- Castillo, J.P. and T.F. Kowalik. 2004. HCMV infection: modulating the cell cycle and cell death. *Int. Rev. Immunol.* 23, 113-139.
- Castillo, J.P., F.M. Frame, H.A. Rogoff, M.T. Pickering, A.D. Yurochko, and T.F. Kowalik. 2005. Human cytomegalovirus IE1-72 activates ataxia telangiectasia mutated kinase and a p53/p21-mediated growth arrest response. *J. Virol.* 79, 11467-11475.
- Dotto, G.P. 2000. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim. Biophys. Acta* 1471, M43-M56.
- Dittmer, D. and E.S. Mocarski. 1997. Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition. *J. Virol.* 71, 1629-1634.
- Fish, K.N., S.G. Stenglein, C. Ibanez, and J.A. Nelson. 1995. Cytomegalovirus persistence in macrophages and endothelial cells. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 99, 34-40.
- Gonczol, E. and S.A. Plotkin. 1984. Cells infected with human cytomegalovirus release a factor(s) that stimulates cell DNA synthesis. *J. Gen. Virol.* 65, 1833-1837.
- Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S.J. Elledge. 1993. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Jarvis, M.A. and J.A. Nelson. 2002. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 403-407.
- Jault, F.M., J.M. Jault, F. Ruchti, E.A. Fortunato, C. Clark, J. Corbeil, D.D. Richman, and D.H. Spector. 1995. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J. Virol.* 69, 6697-6704.
- Lee, C.H., G.C. Lee, Y.J. Chan, C.J. Chiou, J.H. Ahn, and G.S. Hayward. 1999. Factors affecting human cytomegalovirus gene expression in human monocyte cell lines. *Mol. Cells* 9, 37-44.
- Lu, M. and T. Shenk. 1996. Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. *J. Virol.* 70, 8850-8857.
- Moon, M.S., G.C. Lee, J.H. Kim, H.A. Yi, Y.S. Bae, and C.H. Lee. 2003. Human cytomegalovirus induces apoptosis in promonocyte THP-1 cells but not in promyeloid HL-60 cells. *Virus Res.* 94, 67-77.
- Shiyanov, P., S. Bagchi, G. Adami, J. Kokontis, N. Hay, M. Arroyo, A. Morozov, and P. Raychaudhuri. 1996. p21 Disrupts the interaction between cdk2 and the E2F-p130 complex. *Mol. Cell. Biol.* 16, 737-744.
- Sinclair, J. and P. Sissons. 2006. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 87, 1763-1779.

17. Smith, M.S., G.L. Bentz, J.S. Alexander, and A.D. Yurochko. 2004. Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. *J. Virol.* 78, 4444-4453.
18. Swanton, C. and N. Jones. 2001. Strategies in subversion: de-regulation of the mammalian cell cycle by viral gene products. *Int. J. Exp. Pathol.* 82, 3-13.
19. Traore, K., M.A. Trush, M. George, Jr., E.W. Spannhake, W. Anderson, and A. Asseffa. 2005. Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. *Leuk. Res.* 29, 863-879.

(Received September 30, 2008/Accepted December 3, 2008)

---

**ABSTRACT : Cell Cycle Arrest in Human Monocyte Cell Line by Human Cytomegalovirus**

**So-Young Jang, Mi-Suk Kim, and Chan-Hee Lee\*** (School of Life Sciences, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Republic of Korea)

Monocytic cells in myeloid lineage are known for latent site of HCMV. Previous studies have suggested that HCMV regulates cell cycle progression in a variety of cells, but studies in monocytic cells are limited. In this study, we attempted to understand cell cycle changes after HCMV infection in the monocytic cell lines. Flow cytometric analyses using propidium iodide revealed that the proportion of G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> phase was increased and the proportion of S phase decreased in HCMV-infected THP-1 cells, but not in HL-60 cells. BrdU-incorporation assay supported that cell proliferation was inhibited in HCMV-infected THP-1 cells by inhibition of *de novo* DNA synthesis. Western blot analysis revealed that p21, inhibitor of cell cycle progression from G<sub>1</sub> phase to S phase, was induced in HCMV-infected THP-1 cells but not in HL-60 cells. Thus, HCMV inhibited cell proliferation by arresting the cell cycle at G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> phase through induction of p21 protein in promocytic THP-1 cells.