

Inhibition of Transfer Infection of Epstein-Barr Virus to Epithelial Cells by Integrin $\beta 6$ siRNA

Su Yeon Kim and Suk Kyeong Lee*

Research Institute of Immunobiology, Department of Biomedical Sciences, College of Medicine, The Catholic University of Seoul, Korea

Epstein-Barr virus (EBV) establishes a latent infection in greater than 90% of the world's adult population and associates with various tumors. EBV primarily infects epithelial cells and B cell *in vivo*. Mechanism of EBV infection in B cells is known to involve binding of EBV glycoprotein gp350 to CD21 on B cell surface. Epithelial cells are infected with EBV even though most of epithelial cells do not express CD21. Recently, integrin $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ and $\alpha\beta 8$ on epithelial cells were reported to facilitate EBV infection by interacting with gHgL complex. We examined the expression profile of integrins known to be expressed on epithelial cells. Integrin $\alpha\beta 5$ and $\alpha\beta 6$, but not $\alpha\beta 8$ were detected in a gastric epithelial cell line, AGS. We then tested whether siRNAs specific to $\beta 6$ can inhibit EBV infection of epithelial cells. One among the four tested siRNAs significantly reduced $\beta 6$ expression and suppressed transfer infection of EBV to AGS cells. Our data suggest that siRNAs to integrins might be useful to control EBV infection to epithelial cells.

Key Words: Epstein-Barr virus, Integrin $\beta 6$, siRNA, Transfer infection, Epithelial cells

서 론

Epstein-Barr virus (EBV)는 감마허피스 바이러스로서 주로 B 세포를 감염하여 버키텀림프종, 호즈킨림프종 등의 림프종을 일으키는 것으로 알려져 있다 (1, 2). 또한 B 세포 이외에도 상피세포에 감염을 일으키며 비인강암과 위암 같은 상피세포암과의 연관성도 잘 알려져 있다 (3, 4).

EBV 감염은 타액을 통해 일어나며 잠재 감염을 나타내는 B 세포와 인후두 상피세포가 EBV 감염의 두 가지 주 표적세포이다. 그 중 인후두 상피세포가 감염성 EBV의 간헐적인 생산을 일으키는 주요 장소라고 알려져 있

다 (5).

EBV는 다양한 당단백질들을 발현하는데 이들이 EBV 감염 경로에서 중요한 역할을 수행하고 있다. B 세포의 경우 EBV의 주요 당단백질인 gp350과 보체의 수용체인 CD21의 상호 결합이 우선적으로 일어나며 뒤이어 EBV의 gp42가 B 세포 표면의 HLA class II 분자에 결합해 바이러스와 B 세포 표면이 더 가까워지게 된다. 최종적으로 EBV gHgL 복합체가 아직 정확히 밝혀지지 않은 다른 당단백질들의 도움을 받아 바이러스 외피와 세포막 간의 융합을 매개한다고 생각된다 (6, 7). 이처럼 B 세포 표면에 발현되는 CD21은 EBV 수용체로 작용한다는 것이 잘 알려져 있지만, 상피세포의 경우 일부 세포주에서 CD21이 소량 발현되었을 뿐 대부분의 EBV에 감염된 상피세포

Received: October 26, 2012/ Revised: November 5, 2012/ Accepted: November 7, 2012

*Corresponding author: Suk Kyeong Lee. Research Institute of Immunobiology, Department of Biomedical Sciences, College of Medicine, The Catholic University of Korea 505 Banpo-dong, Seocho-ku, Seoul, 137-701, Korea.

Phone: +82-2-2258-7480, Fax: +82-2-535-7481, e-mail: sukklee@catholic.ac.kr

**This work was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (MEST) (2009-0074118) and by grants from the Gyeonggi Regional Research Center (GRRRC) of the Catholic University of Korea [(GRRRC Catholic 2012-B05), RNA-based development of biopharmaceutical lead molecules].

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

주 및 상피조직에서 CD21의 발현이 없는 것으로 알려져 있다. 게다가 EBV에 의한 상피세포 감염은 gp42나 HLA class II 발현과도 무관하게 진행되는 것으로 보고되어, B 세포와는 달리 상피세포에서는 gHgL 복합체가 주로 작용하는 기전에 의해 EBV에 감염될 것이라 여겨진다 (8, 9). 또한, B 세포에서 생산된 EBV가 B 세포보다 상피세포로 감염이 더 잘 되고 상피세포에서 생산된 EBV가 상피세포보다 B 세포로 감염이 더 잘 된다고 알려져 있다 (6). 최근 상피세포 표면에 발현되는 인테그린(integrin) $\alpha\beta 6$ 와 $\alpha\beta 8$ 이 EBV gHgL과 결합하여 바이러스와 세포막 간의 융합을 촉진한다는 논문이 발표되었고 (10), 이후 인테그린 $\alpha\beta 5$ 도 막 융합을 촉진한다는 논문이 발표되었다 (11).

인테그린은 세포막에 박혀있는 단백질로 α subunit과 β subunit이 heterodimer를 이루고 있으며 구부러진 불활성화 형태로 존재하다가 리간드가 결합하면 곧게 뻗은 활성화 형태로 변하여 여러 신호전달경로를 활성화시킨다 (12, 13). 척추동물에는 18가지 유형의 α subunit과 8가지 유형의 β subunit이 다양한 조합을 이루어 존재하며, 현재까지 24종의 인테그린 heterodimer가 알려져 있다 (14). 그 중 인테그린 $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ (15), $\alpha 6\beta 4$ (16), $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$, $\alpha\beta 8$ (10)은 상피세포에서 발현한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 위암 상피세포주에 어떠한 인테그린이 발현되는지 조사하고, 높은 발현을 보이는 인테그린 $\beta 6$ 에 대한 siRNA를 사용하여 EBV 전이 감염이 억제되는지 확인하였다.

재료 및 방법

세포주 배양

EBV 음성 위암 상피 세포주인 AGS 세포주 (17)와 EBV 양성 세포주인 B95-8 세포주는 10% 우태아 혈청(Fetal Bovine Serum, Hyclone, Logan, USA), 항생제(penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 μ g/ml, Gibco, Grand Island, NY, USA) 그리고 fungizone (250 μ g/ml, Gibco)이 포함된 RPMI 1640 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 37°C, 5% CO₂가 유지되는 세포배양기에서 배양하였다. Dr. Richard Longnecker (Northwestern University)가 제공해 준 GFP를 발현하는 EBV 양성 세포주인 B95-8 EBfaV-GFP 세포주는 같은 조건의 RPMI 1640 배지에 G418 (700 μ g/ml, Gibco)을 첨가하여 배양하였다 (18).

항체

일차항체(primary antibody)로 rabbit anti-CD21 항체(Abcam, Cambridge, UK), goat anti- $\alpha 1$ 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), goat anti- $\alpha 2$ 항체(Santa Cruz), mouse anti- $\alpha 6$ 항체(Santa Cruz), rat anti- $\beta 4$ 항체(Santa Cruz), mouse anti- $\alpha\beta 3$ 항체(Millipore, Billerica, MA, USA), mouse anti- $\alpha\beta 5$ 항체(Millipore), mouse anti- $\alpha\beta 6$ 항체(Millipore), goat anti- $\beta 8$ 항체(Santa Cruz), sheep anti- $\beta 6$ 항체(R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다.

면역형광염색

AGS 세포주는 8 well slide chamber (Nunc, Roskilde, Denmark)에 배양하여 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 세척한 후 -20°C에 미리 넣어둔 100% 아세톤으로 고정시키고 PBS 용액으로 세 번 세척한 후 비면역 혈청으로 blocking 하였다. 그 다음 4°C에서 각 항체와 세포를 하루 반응시킨 후 PBS 용액으로 세 번 세척하였다. 최종적으로 세포는 Cy3로 표지된 2차 항체와 실온에서 1시간 반응시킨 후, 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI)가 포함되어 있는 mounting 용액을 처리하여 형광현미경(AX70, TR-62A02, Olympus, Tokyo, JAPAN)으로 확인하였다.

siRNA (small interfering RNA) transfection

인테그린 $\beta 6$ 에 대한 siRNA 4종류를 siDirect version 2.0 프로그램을 이용하여 서열을 정하고 합성하였다(제놀루션, 서울, 한국). AGS 세포주는 trypsin-EDTA (0.25%, Invitrogen)로 처리하여 수확하고 배양 용기에 접종한 직후에 인테그린 $\beta 6$ 에 대한 각각의 siRNA를 20 nM씩 G-fectin(제놀루션)과 섞어 세포주에 transfection 시킨 다음 48시간 동안 배양하였다.

바이러스 생산 및 전이 감염(Transfer infection)

B95-8 세포주와 B95-8 EBfaV-GFP 세포주가 바이러스를 생산하도록 TPA 20 ng/ml을 첨가한 배지로 48시간 배양하여 lytic cycle을 유도시켰다 (19). 이들 세포에 감마선을 조사하여 apoptosis를 유도시킴으로써 EBV가 서서히 방출될 수 있게 준비하였다. 인테그린 $\beta 6$ siRNA를 transfection 시킨 AGS 세포를 방사선이 조사된 B95-8 세포 또는 B95-8 EBfaV-GFP 세포와 함께 24시간 배양하여

EBV의 전이 감염을 유도하였다.

DNA 추출

24시간 동안 배양하여 EBV가 전이 감염된 AGS 세포주는 PBS 용액으로 여러 번 세척하여 B95-8 세포주가 제거된 것을 현미경 관찰로 확인한 후 다시 37°C에서 4일 간 더 배양하였다. 정량적인 중합효소 연쇄 반응을 하기 위하여 세포주를 수확하여 phenol-chloroform을 처리하여 DNA를 추출하였다.

Quantitative PCR

200 ng의 DNA를 주형으로 사용하여 EBNA-1 (EBV nuclear antigen-1) 특이 primer (forward 5'-GGATGCGATT-AAGGACCTTGTT-3', reverse 5'-AAAGCTGCACACAGT-CACCCT-3')와 TaqMan[®] probe (5'-TGACAAAGCCCGCT-CCTACCTGCAAT-3')를 이용하여 95°C에서 5분 반응 후 95°C에서 5초, 55°C에서 30초를 45회 반복하며 PCR 과정을 수행하였다.

Western blotting

각 siRNA를 transfection 시킨 세포주를 수확하여 NP-40 용해액으로 단백질을 추출하였다. 30 µg의 단백질을 8% polyacrylamide 겔에 전기영동 한 후 nitrocellulose membrane으로 transfer 하여 5% skim milk로 blocking 하고 sheep anti-integrin β6 항체와 반응시켰다. Horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 goat anti-sheep 항체로 반응시킨 후 ECL 용액을 처리하여 X-ray 필름에 감광시킨 후 현상하였다. 겔에 loading된 단백질 양이 유사한지 비교하기 위하여 β-actin 항체를 사용하였다. 같은 실험을 3회 반복하여 scrambled control siRNA를 처리했을 때의 β6 양에 대한 상대값을 구하고 평균과 표준편차도 계산하였다.

유세포 분석(FACS)

B95-8 EBfaV-GFP 세포주로부터 EBfaV-GFP가 전이 감염된 AGS 세포주는 PBS 용액으로 여러 번 세척하여 B95-8 EBfaV-GFP 세포주가 제거된 것을 현미경 관찰로 확인한 후 다시 37°C에서 4일 간 더 배양하였다. 그리고 trypsin-EDTA (0.25%, Invitrogen)로 처리하여 수확하고 PBS 용액으로 세척한 후 GFP의 발현을 유세포 분석기 (FACS Calibur, Beckon Dickinson, San Jose, CA, USA)로 확

인하였다.

결 과

AGS 세포에서 CD21 발현 확인

우선 실험에 사용된 AGS 세포에 EBV의 gp350/220 수용체로 작용하는 CD21이 발현되는지를 면역형광염색법으로 조사하였다. 기대했던 것과 같이 양성 대조군으로 사용한 B 세포인 BJAB과 Daudi 세포에서는 CD21이 검출되었지만 위암 상피세포인 AGS에서는 CD21 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 1).

AGS 세포에서 인테그린 발현 확인

AGS 세포에서 발현된다고 보고된 α1β1, α2β1, α6β4, αvβ3, αvβ5, αvβ6, αvβ8의 발현을 조사하기 위하여 면역형광염색법을 하였다. α1β1, α2β1, α6β4의 발현은 각각을 구성하는 인테그린의 subunit인 α1, α2, α6, β4에 대한 항체를 사용하여 조사하였다. 실험 결과 AGS 세포에서는 이들 인테그린 subunit의 발현이 확인되지 않았다. Dimer 형태의 인테그린에 특이적인 항체를 사용하여 실험한 결과, AGS 세포에서 αvβ3와 αvβ8 발현은 확인되지 않았고 αvβ5와 αvβ6는 잘 발현됨이 확인되었다(Fig. 2).

인테그린 β6에 대한 siRNA 처리 시 EBV의 전이 감염

AGS 세포에서 높은 발현을 보인 인테그린 αvβ6가 EBV 감염에 미치는 영향을 조사하기 위해 β6 발현을 억제시킬 수 있도록 siDirect version 2.0 프로그램을 사용하여 Fig. 3A에 표시된 것처럼 β6 서열에 상보적으로 결합하는 4가지의 siRNA를 디자인하고 주문 제작하였다 (Table 1). 각각의 siRNA를 AGS 세포에 transfection 시키고 인테그린 β6의 발현을 Western blot으로 비교한 결과 β6 #2 siRNA가 인테그린 β6의 발현을 60% 이상 감소시켰다(Fig. 3B, 3C).

β6가 EBV의 전이 감염에 미치는 영향

각각의 siRNA를 AGS 세포에 transfection 시킨 후 β6의 발현 억제가 EBV의 전이 감염에 미치는 영향을 비교하였다. 이를 위하여 우선 감염 몇 일 후에 감염 효율을 비교할 것인지 정하기 위한 다음과 같은 실험을 먼저 수행하였다. Lytic cycle을 유도시킨 B95-8 세포를 감마선 조사시킨 다음 AGS 세포를 함께 배양하며 전이 감염이 일어

나도록 하였다. 24시간 경과 후 PBS로 세포배양 용기의 바닥에 부착되어 자라는 AGS 세포를 3회 세척하여 부유 상태로 자라는 B95-8 세포를 제거하고 현미경으로 확인 하였다. AGS 세포를 2일, 4일, 6일 동안 더 배양한 다음 수집하여 DNA를 추출하고 EBNA-1에 대한 Taqman[®] probe를 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과 전이 감염시킨 후 4일 동안 더 배양하였을 때가 전이 감염 효율이 가장 높게 나타났다(Fig. 4A). 감염 2일 후보다 4일 후에 EBV titer가 높아 보이는 것은 EBV에 감염된 세포 일부가 증식하며 EBV 게놈도 복제되었기 때문으로 생각된다. 한편, 6일 동안 배양 후 EBV titer가 급격히 감소한 것은 AGS 세포를 배양 용기에 48시간 동안 부착 후 B95-8 세포와 24시간 동안 함께 배양하고 6일 동안 더 배양함으로써(즉, 총 9일 동안의 배양으로 인해) 세포가 사멸하기 시작했기 때문으로 생각된다(Fig. 4A).

따라서 이후의 실험은 lytic cycle을 유도시킨 B95-8 세포와 siRNA를 transfection 시킨 AGS 세포를 24시간 동안 함께 배양해 EBV 전이 감염을 시키고, B95-8 세포를 세

척한 후 4일간 더 배양한 다음 수집하여 DNA를 추출하고 real-time PCR을 수행하였다. EBV 감염 정도를 조사하기 위한 음성 대조군으로는 전이 감염시키지 않은 AGS 세포를 사용하였으며, 양성 대조군으로는 scramble control siRNA를 처리한 AGS 세포를 사용하였다. 실험 결과 $\beta 6$ #2 siRNA가 transfection된 경우에만 EBV 전이 감염이 scramble control siRNA를 사용한 경우에 비하여 통계적으로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4B). 얻어진 실험 결과를 다른 방법으로도 확인하기 위해, B95-8 세포주 대신 GFP를 발현하는 recombinant EBV에 감염된 EBfaV-GFP 세포를 사용하여 실험하였다. GFP를 발현하는 recombinant EBV에 감염된 AGS 세포를 정량하기 위해서 유세포 분석을 수행한 결과 $\beta 6$ #2 siRNA를 처리했을 때만 scramble control siRNA를 사용한 경우에 비하여 통계적으로 유의

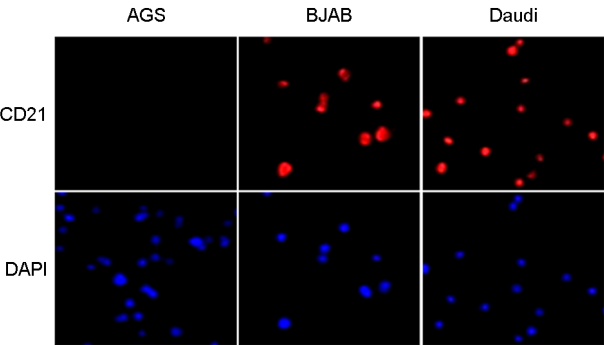


Figure 1. Detection of CD21 expression in AGS cells by immunofluorescence assay. AGS cells were stained with the anti-CD21 antibody and the Cy3-conjugated secondary antibody. The cells were then incubated DAPI to stain nuclei. BJAB and Daudi cells were used as positive controls for CD21 expression (200 \times magnification).

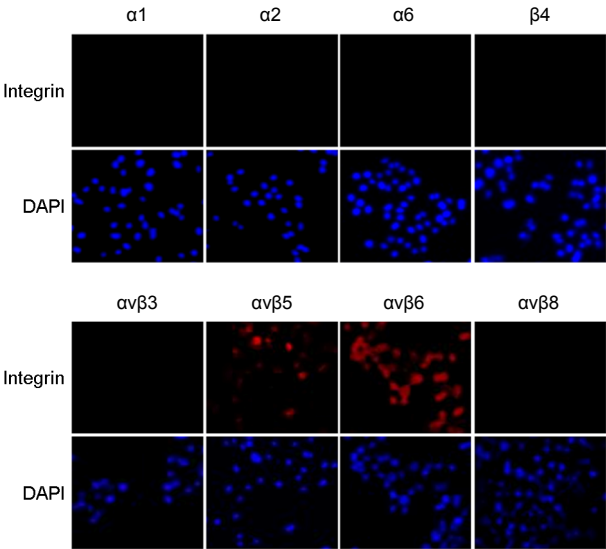


Figure 2. Detection of integrin expression in AGS cells by immunofluorescence assay. The cells were incubated with integrin $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 6$, $\beta 4$, $\alpha v \beta 3$, or $\alpha v \beta 8$ specific antibodies and then with the Cy3-conjugated secondary antibody. The cells were then incubated with DAPI to stain nuclei (200 \times magnification).

Table 1. siRNA sequence for integrin $\beta 6$

siRNA	Sense (5' - 3')	Antisense (5' - 3')
$\beta 6$ #1	CCAAGUAGAAAUACUAAAAUU	UUUAAGUAUUUCUACUUGGUU
$\beta 6$ #2	CCAUACUUCUGUUUACCUAUU	UAGGUAAACAGAAGUAUGGUU
$\beta 6$ #3	CAGAAAAUUUCUGCUAAUAUU	UAUUAGCAGAAAUUUUCUGUU
$\beta 6$ #4	GAAAUAGCUCUCACAUGAAAUU	UUUCAUGUGAGAGCAUUUCUU

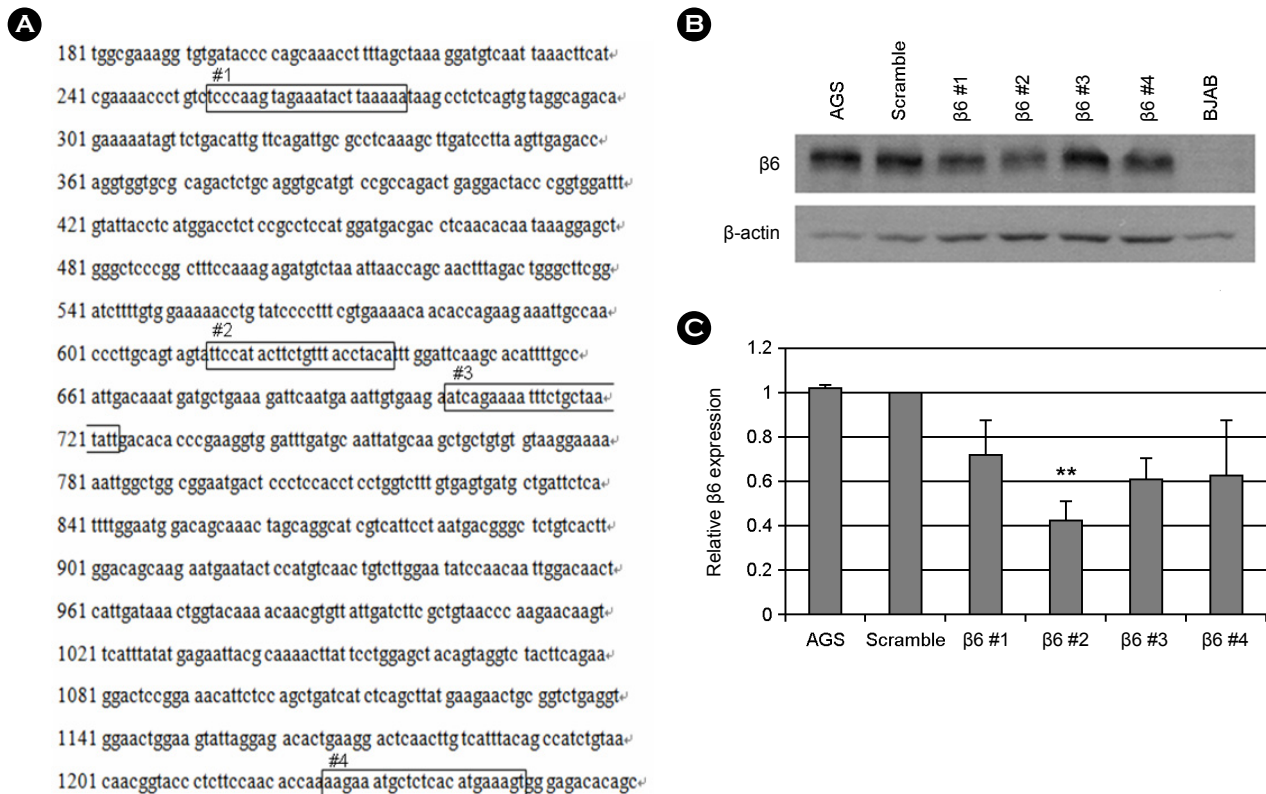


Figure 3. The effect of siRNAs on the expression of $\beta 6$. (A) Sequence of integrin $\beta 6$ (NCBI accession no. NM_000888). The sequences of four siRNAs used to down-regulate integrin $\beta 6$ are marked with boxes and numbers. (B) Expression of $\beta 6$ was analyzed by Western blot in the cells transfected with each siRNA. BJAB cells were used as a negative control. (C) Similar Western blot experiments shown in (B) were repeated three times. The relative expression levels of $\beta 6$ following each siRNA treatment compared with that of scrambled control siRNA treatment are shown as mean \pm SD. ** $p < 0.01$

성 있게 GFP의 발현이 감소하였다(Fig. 4C).

고 찰

EBV는 바이러스 envelope 단백질인 gp350과 B 세포 표면의 CD21 결합을 통해 감염이 시작되지만 (20) CD21을 발현하지 않는 상피세포는 B 세포와는 다른 경로인 gHgL의 작용에 의하여 감염이 일어날 것으로 추측되었다 (8, 9). B 세포로의 감염과는 달리, 상피세포로의 EBV 감염은 오히려 gp350을 발현하지 않는 EBV를 사용할 때 감염이 증가되는 것이 확인되었다 (21). 최근에 EBV의 gHgL이 상피세포의 인테그린 $\alpha\beta 6$, $\alpha\beta 8$ (10), $\alpha\beta 5$ (11)와 결합하여 막 간의 융합을 촉진한다고 발표되었다. 본 논문에서는 상피세포에서 발현된다고 보고된 여러 인테그린들의 발현을 AGS 세포에서 조사하였다. AGS 세포는 위암 상피세포로 실험에 널리 사용되고 있고, recombinant

EBV에 의해 감염될 수 있어서 (22, 17) EBV 감염에 필요한 세포 수용체를 비롯한 여러 factor들을 발현할 것으로 생각되어 본 실험에 사용하게 되었다. 상피세포에서 발현이 보고된 여러 인테그린들 중 AGS 세포에서는 $\alpha\beta 5$ 와 $\alpha\beta 6$ 만이 발현됨을 확인하였는데 이 둘은 모두 EBV gHgL과의 결합을 통하여 막 융합을 촉진시킨다고 알려진 인테그린이다.

이들 중 AGS 세포에서의 발현이 좀 더 뚜렷하게 관찰된 $\alpha\beta 6$ 가 EBV 감염에 관여하는지 조사하기 위해 $\beta 6$ 에 대한 4종의 siRNA를 주문 제작하여 실험한 결과 $\beta 6$ #2 siRNA만이 $\beta 6$ 의 발현을 유의성 있게 감소시키는 것을 확인하였다. 또한, $\beta 6$ 에 대한 각 siRNA를 AGS 세포주에 transfection 시킨 후 EBV로 전이 감염시킨 결과에서도 $\beta 6$ #2 siRNA만이 EBV 감염을 유의성 있게 억제하였다. 이는 EBV가 $\alpha\beta 6$ 를 이용하여 상피세포와의 융합을 촉진한다는 Chesnokova 등의 발표 내용과 일치한다 (10). 그들

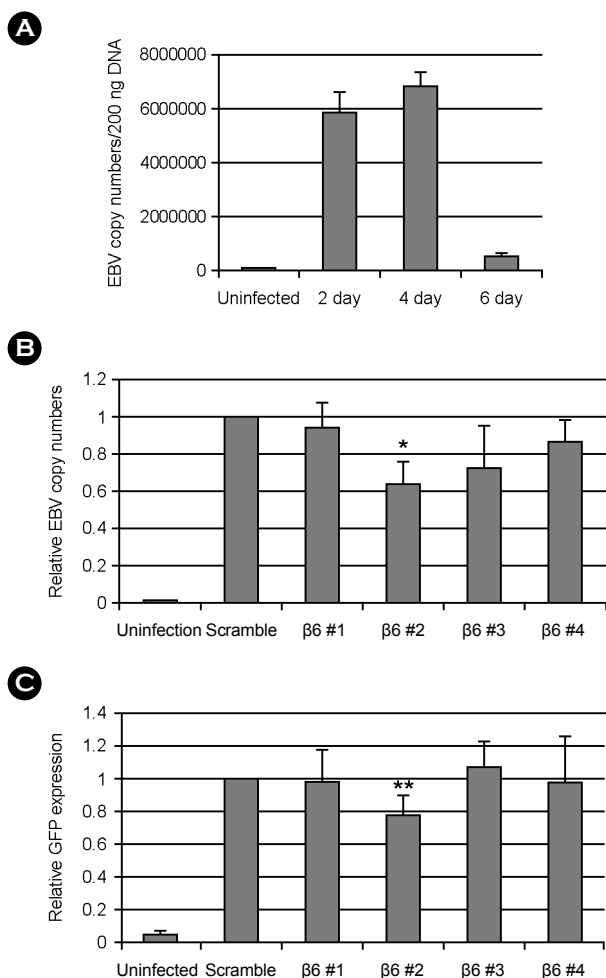


Figure 4. The effect of $\beta 6$ siRNA on EBV infection. (A) AGS cells were co-cultured with lytic cycle induced B95-8 cells for 24 h. After removing B95-8 cells by PBS wash, the infected AGS cells were then cultured for 2, 4, and 6 days further. The efficiency of transfer infection was assayed by QPCR for EBNA-1 sequence as described in the Methods. siRNA treated AGS cells were transfer infected with lytic cycle induced B95-8 cells (B) or B95-8 EBfaV-GFP cells (C). (B) EBV copy numbers were analyzed by QPCR for EBNA-1 sequence. (C) EBV infection was measured by FACS analysis of GFP expressing cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

은 EBV를 soluble 형태의 $\alpha\beta 6$ 나 $\alpha\beta 8$ 과 미리 반응시키면 CR2를 발현하도록 만든 SVKCR2 keratinocyte 세포에 대한 EBV 감염이 크게 억제됨을 보여주었다.

EBV 감염을 조사하기 위하여 EBNA-1에 특이적인 Taqman[®] probe와 primer로 QPCR을 한 결과와, EBV의 감염을 GFP 발현 정도로 확인할 수 있도록 B95-8 EBfaV-GFP 세포주를 이용하여 FACS로 확인한 두 결과가 유사하여 두 방법 모두 EBV 전이 감염 정도를 확인하는데

유용함을 알 수 있었다.

B 세포의 경우 EBV에 의한 감염이 비교적 용이하게 일어나서 lymphoblastoid cell line (LCL)을 형성하는 반면 (23) *in vitro*에서 상피세포를 EBV로 감염시키는 효율은 매우 낮은 것으로 알려져 있다 (24). 분리 정제된 EBV로 상피세포를 감염시키는 것보다, EBV에 감염된 B 세포를 상피세포와 함께 섞어 전이 감염시킬 때 감염이 더 잘 된다고 알려져 있으므로 (21) 본 실험에서는 인테그린 $\alpha\beta 6$ 가 EBV 감염에 미치는 영향을 조사하기 위하여 전이 감염 방법을 사용하였다.

본 실험에서 사용된 $\beta 6$ #1는 Zhao (25) 등이 AGS 세포에서 $\beta 6$ 발현을 효율적으로 저해한다고 보고한 바 있는 것과 동일한 siRNA이다. 그들의 결과에서 이 siRNA는 $\beta 6$ mRNA를 90% 이상 매우 효율적으로 감소시켰으나 $\beta 6$ 단백질은 그리 크게 감소시키지는 않았다. 이는 $\beta 6$ 단백질의 반감기가 길어 siRNA 처리에 의해 $\beta 6$ mRNA가 새로 만들어지지 못하여도 이미 만들어졌던 $\beta 6$ 단백질이 남아 있기 때문으로 생각된다. 같은 이유 때문에, 본 연구에서 siRNA에 의한 $\beta 6$ 단백질 발현 억제 효율이 최대 60% 정도로 비교적 낮게 나타난 것으로 생각된다.

지금까지 인테그린의 작용을 억제하여 상피세포에 대한 EBV 감염을 억제하는 시도나, EBV에 의한 상피세포 감염 억제를 위하여 인테그린에 대한 siRNA가 유용할 수 있음을 보여주는 연구 결과는 그 예를 찾기 어렵다.

따라서 본 연구 결과는 인테그린 $\alpha\beta 6$ 가 EBV에 의한 상피세포 감염에 관여함을 보여주는 직접적인 증거이며 EBV 연관 질환의 예방이나 완화를 위하여 인테그린 siRNA 활용 가능성을 좀 더 심층적으로 연구할 필요성을 뒷받침한다.

참 고 문 헌

- 1) Klein E. The complexity of the Epstein-Barr virus infection in humans. *Pathol Oncol Res* 1998;4:3-7.
- 2) Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.2397-446.
- 3) Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1992;140:769-74.
- 4) Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol Pathol* 2000;53:255-61.

- 5) Niedobitek G, Agathangelou A, Herbst H, Whitehead L, Wright DH, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* 1997;182:151-9.
- 6) Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus entry. *J Virol* 2007;81:7825-32.
- 7) Li Q, Spriggs MK, Kovats S, Turk SM, Comeau MR, Nepom B, *et al.* Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* 1997;71:4657-62.
- 8) Borza CM, Morgan AJ, Turk SM, Hutt-Fletcher LM. Use of gHgL for attachment of Epstein-Barr virus to epithelial cells compromises infection. *J Virol* 2004;78:5007-14.
- 9) Molesworth SJ, Lake CM, Borza CM, Turk SM, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J Virol* 2000;74:6324-32.
- 10) Chesnokova LS, Nishimura SL, Hutt-Fletcher LM. Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins alphavbeta6 or alphavbeta8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:20464-9.
- 11) Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM. Fusion of Epstein-Barr virus with epithelial cells can be triggered by $\alpha v\beta 5$ in addition to $\alpha v\beta 6$ and $\alpha v\beta 8$, and integrin binding triggers a conformational change in glycoproteins gHgL. *J Virol* 2011;85:13214-23.
- 12) Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-32.
- 13) Gilcrease MZ. Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett* 2007;247:1-25.
- 14) Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673-87.
- 15) Seo NS, Zeng CQ, Hyser JM, Utama B, Crawford SE, Kim KJ, *et al.* Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ are receptors for the rotavirus enterotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8811-8.
- 16) Fang IM, Yang CH, Yang CM, Chen MS. Overexpression of integrin $\alpha 6$ and $\beta 4$ enhances adhesion and proliferation of human retinal pigment epithelial cells on layers of porcine Bruch's membrane. *Exp Eye Res* 2009;88:12-21.
- 17) Yoshiyama H, Imai S, Shimizu N, Takada K. Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *J Virol* 1997;71:5688-91.
- 18) Speck P, Kline KA, Cheres P, Longnecker R. Epstein-Barr virus lacking latent membrane protein 2 immortalizes B cells with efficiency indistinguishable from that of wild-type virus. *J Gen Virol* 1999;80:2193-203.
- 19) Seo JS, Cho NY, Kim HR, Tsurumi T, Jang YS, Lee WK, *et al.* Cell cycle arrest and lytic induction of EBV-transformed B lymphoblastoid cells by a histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A. *Oncol Rep* 2008;19:93-8.
- 20) Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510-4.
- 21) Shannon-Lowe CD, Neuhierl B, Baldwin G, Rickinson AB, Delecluse HJ. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7065-70.
- 22) Shimizu N, Yoshiyama H, Takada K. Clonal propagation of Epstein-Barr virus (EBV) recombinants in EBV-negative Akata cells. *J Virol* 1996;70:7260-3.
- 23) Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fundamental Virology*. New York: Raven Press; 1996. p.1109-62.
- 24) Shapiro IM, Volsky DJ. Infection of normal human epithelial cells by Epstein-Barr virus. *Science* 1983;219:1225-8.
- 25) Zhao R, Liu XQ, Wu XP, Liu YF, Zhang ZY, Yang GY, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) enhances gastric carcinoma invasiveness via integrin $\alpha (v)\beta 6$. *Cancer Lett* 2010;287:150-6.