

## 마우스 Hepa-1c1c7 세포주에서 B형 간염 바이러스에 의한 tumor necrosis factor- $\alpha$ 의 발현 유도

예성수\* · 장원희<sup>1</sup> · 양영일<sup>1,2</sup> · 이연재<sup>3</sup> · 김미성<sup>1</sup> · 석대현 · 박영홍 · 백계형<sup>1</sup>

인제대학교 의과대학 생화학교실, <sup>1</sup>백인제임상의학연구소, <sup>2</sup>병리학교실, <sup>3</sup>내과학교실

Received December 6, 2004 / Accepted January 13, 2005

**Hepatitis B Virus-Induced TNF- $\alpha$  Expression in Hepa-1c1c7 Mouse Hepatoma Cell Line.** Sung Su Yea\*, Won Hee Jang<sup>1</sup>, Young-Il Yang<sup>1,2</sup>, Youn Jae Lee<sup>3</sup>, Mi Seong Kim<sup>1</sup>, Dae-Hyun Seog, Yeong-Hong Park and Kye-Hyung Paik<sup>1</sup>. Department of Biochemistry, <sup>1</sup>Paik Institute for Clinical Research, <sup>2</sup>Department of Pathology, <sup>3</sup>Department of Internal Medicine, College of Medicine, Inje University, Busan 614-735, Korea - Infection with hepatitis B virus (HBV) is a major health problem worldwide. Although a tremendous amount has been known about HBV, there have been obstacles in the study of HBV due to the narrow host range of HBV limited to humans and primates. In the present study, we investigated the susceptibility to HBV infection of mouse hepatoma cell line, Hepa-1c1c7. In addition, based on that human hepatocytes infected by HBV increase the expression of the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$ , the inducibility of TNF- $\alpha$  expression by HBV in the cells was determined. HBV surface antigen (HBsAg) secretion was measured by the microparticle enzyme immunoassay and steady state mRNA expression was analyzed by quantitative competitive RT-PCR. Transient transfection of Hepa-1c1c7 cells with HBV expression vector resulted in a dose-dependent induction of TNF- $\alpha$  expression. Infection of Hepa-1c1c7 cells with the serum of HBV carrier also increased TNF- $\alpha$  mRNA expression. Both in the transfected and infected cells, HBV mRNA was expressed and significant HBsAg secretion was detected. There was no significant variation in  $\beta$ -actin mRNA expression by HBV. These results demonstrate that HBV is infectious to Hepa-1c1c7 *in vitro* and the viral infection induces TNF- $\alpha$  expression, which suggests that Hepa-1c1c7, a mouse hepatoma cell line, may be a possible model system for analysis of various molecular aspects of HBV infection.

**Key words** – HBV, TNF- $\alpha$ , Hepa-1c1c7

B형 간염 바이러스(HBV)는 사람에게서 급성 및 만성 간염을 일으키며, 간경변증과 간암의 주된 원인의 하나로 알려져 있다[3]. 전 세계적으로 3억 명에 달하는 사람들이 HBV에 감염되어 있으며, 매년 백만 명 이상이 HBV 감염과 직접적으로 연관된 질환에 의해 사망하고 있다[18]. HBV는 작은 DNA 바이러스인 hepadnaviruses family의 하나로, RNA 중간체의 역전사 과정을 통하여 세포 내에서 복제된다[25]. 성숙된 바이러스 게놈은 부분적인 이중나선구조이며, 느슨한 고리모양 구조(relaxed circular)인 3.2-kb의 DNA 분자이다. 이 바이러스 게놈은 S/preS, C/preC, P 그리고 X 유전자에 대한 4개의 open reading frame (ORF)들을 가지고 있으며, 그로부터 각각 외피 기능의 표면항원(HBsAg), nucleocapsid 기능의 core 항원(HBcAg), 역전사 및 DNA 중합효소 기능의 polymerase 그리고 transactivator 기능을 하는 X 단백질들이 만들어진다.

HBV에 의한 감염은 인간과 침팬지와 같은 영장류에서만 특이하게 나타나는 숙주 선택성과 간세포에서만 영향이 나타나는 조직 선택성이 있다고 알려져 있고, 이러한 특성은

HBV 연구에 있어서 주된 장애요인이 되어왔다[11,17]. 따라서 HBV와 관련된 간질환의 다양한 병리학적 연구는 비용과 공급에 제약이 따르는 영장류를 이용하는 대신, 주로 HBV와 밀접한 관련이 있는 hepadnavirus인 오리 간염 바이러스(DHBV)와 마멋류 간염 바이러스(WHBV)를 이용하여 각각의 숙주에서 이루어져 왔다[27,28]. 그러나 이러한 바이러스들과 HBV와의 차이로 인한 연구의 한계가 따르게 되며, 결과적으로 만성 B형 간염에 대한 소형 실험동물 모델의 정립은 쉽지 않은 상태이다. 이에 대한 새로운 연구 방법으로서 HBV 형질전환 실험동물을 이용한 연구가 이루어지고 있으나, 바이러스-숙주 간 번역학적 상호관계의 측면에서 볼 때 얻을 수 있는 정보가 제한적이다[5,23]. 그리고 HBV의 감염이나 복제에 대한 연구를 위한 효율적인 시험관내 시스템의 부재 또한 연구의 제약이다. 이러한 연구모델의 한계를 극복하기 위하여 인간의 간에서 유래된 세포들을 이용한 세포배양 시스템이 이용되었다. 시험관내 HBV 감염의 연구는 주로 인간 간세포종에서 유래된 세포주인 HepG2 세포를 이용하여 이루어졌다[2,21]. 이것은 HBV DNA가 없으며, 분화된 인간 간세포와 매우 유사한 특성을 갖는다는 점에서 시험관내 HBV 유전자의 발현에 대한 연구에 널리 이용되어져 왔으며, 또한 HBV에 의한 시험관내 감염이 이루어진다는 보고도

**\*Corresponding author**

Tel : +82-51-890-6892, Fax : +82-51-894-5801

E-mail : ssyea@inje.ac.kr

있다[2]. 그 외에도 HepG2 세포에서 transfection을 통하여 이 세포주에 HBV 게놈을 안정적으로 영구 삽입한 HepG2 2.2.15 세포주도 많이 사용되어지고 있다[21].

이러한 관점에서 우리는 HBV 연구에 대한 작은 실험동물 모델로서의 마우스에 대한 가능성 연구의 일환으로서 그에 준하는 시험관내 시스템에 대한 연구를 수행하였으며, 본 논문에서는 마우스 간암 세포주인 Hepa-1c1c7 세포에서의 HBV의 감염성을 알아보았다. 또한, 만성 B형 간염환자의 간세포 뿐만 아니라 일시적으로 또는 안정적으로 transfection 된 인간 간암 세포주인 HepG2 세포에서 염증성 사이토카인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )가 발현된다는 사실에 근거하여[16], Hepa-1c1c7세포에서의 HBV에 의한 TNF- $\alpha$  유전자 발현의 유도에 대하여 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 세포배양

본 실험에서 사용된 시약들 중 Williams' E 배지와 우태혈청(fetal bovine serum; FBS)은 GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였으며, 그 외의 특별하게 언급하지 않은 시약들은 모두 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 마우스 간암 세포주인 Hepa-1c1c7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 그리고 10% 우태혈청이 포함된 William's E 배지에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### HBV transfection과 infection

야생형 B형 간염 바이러스 게놈(adw-type HBV)을 가진 pAM6 플라스미드는 ATCC에서 구입하였으며, DNA 염기서열을 확인하여 발견된 2137-nt 부위의 손실된 부분을 site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 복원시킨 후, HBV 게놈의 1.3배 길이의 게놈(1.3-eq HBV genome)을 만들어 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입한 pcDNA3 벡터에 클로닝하여 재조합 HBV 발현 벡터를 제조하였다. 재조합 HBV 발현 벡터의 세포내 도입(transfection)은 lipofectin 방법을 이용하여 수행하였다. 기술된 농도의 재조합 HBV 발현 벡터를 lipofectin 용액 20  $\mu$ l 그리고 무혈청 배지 400  $\mu$ l와 섞어 상온에서 2시간 방치한 후, 3.6 ml의 무혈청 배지를 가해 희석하였다. 이 혼합물을 30~50% confluency의 농도로 60-mm 접시에서 배양된 Hepa-1c1c7 세포에 가하여 18 시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후, Hank's balanced salt solution (HBSS)로 5회 세척한 다음 10% 우태혈청을 함유한 Williams' E 배지 4 ml을 가하여 배양하였다. HBV 감염 실험은 HBV 비리온(virion)을 포함하고 있는 만성 B형 간염환자의 혈청

을 이용하여 수행하였다. Hepa-1c1c7 세포를 30~50% confluency의 농도로 60-mm 접시에서 배양한 후, 무혈청 배지와 주어진 농도의 환자 혈청을 섞어서 6 시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후, HBSS로 5회 세척한 다음 10% 우태혈청을 함유한 Williams' E 배지 4 ml을 가하여 배양하였다. 세포내 도입 및 감염 후의 세포와 세포배양 상층액은 기술된 시간 후에 따로 모아서 각각 mRNA와 HBsAg을 검출하는데 사용하였다.

### Quantitative competitive RT-PCR

전체 RNA는 TRI Reagent를 사용하여 Chomczynski의 방법으로 분리하였다[7]. HBV, TNF- $\alpha$ , cytochrome P450 1A1 (CYP1A1),  $\beta$ -actin의 mRNA 발현은 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 측정하였다. 각 유전자들에 대한 특이적인 primer로는 HBV에 대한 forward primer로 5'-CGATCCATACTGCGGAAGTC-3', reverse primer로 5'-GGAGGCTTGAACAGTAGGAC-3'를 사용하였고, TNF- $\alpha$ 에 대한 forward primer로 5'-ACTAGTGGTGCCAGCCGATGGGTTG-3', reverse primer로 5'-GTGGGGGCTGGGTAGAGAATGGATG-3'를 사용하였고, CYP1A1에 대한 forward primer로 5'-GCCAATGTCCAGCTGTCAGA-3', reverse primer로 5'-GATGGTGAAGGGGACGAAGG-3'를 사용하였고, b-actin에 대한 forward primer로 5'-GTATCCTGACCCTGAAGTACCCCA-3', reverse primer로 5'-AGGATGGCGTGAGGGAGAGCAT-3'를 사용하였다. TNF- $\alpha$  mRNA를 정량하기 위하여 위의 TNF- $\alpha$ 에 특이적인 primer 결합 부위들을 포함하는 재조합 DNA TNF- $\alpha$  internal standards (IS)를 만들어 quantitative/competitive RT-PCR을 수행하였다[12,30]. 전체 RNA는 oligo (dT)<sub>15</sub>를 primer로 사용하여 cDNA로 만든 후, PCR 완충액, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U of Taq DNA polymerase, 재조합 DNA IS와 각각 6 pmol의 primer들로 이루어진 PCR 혼합혼합물을 가하였다. 시료들은 5분간 94 $^{\circ}$ C로 변성시킨 다음, 94 $^{\circ}$ C, 30초; 59 $^{\circ}$ C, 30초; 72 $^{\circ}$ C, 30초의 과정을 30회 반복하였고, 마지막으로 5분간 72 $^{\circ}$ C에서 처리하였다. PCR 결과물은 8% polyacrylamide 겔 전기영동과 ethidium bromide 염색으로 확인하였다. 시료의 RNA로부터 증폭된 PCR 산물은 370-bp의 길이를 가졌으며, 재조합 IS로부터 증폭된 경우에는 324-bp 길이의 PCR 산물이 얻어졌다. TNF- $\alpha$  mRNA의 농도는 겔 상에서 각 PCR 산물들의 농도를 측정 한 후 TNF- $\alpha$ 와 IS에 대한 PCR 산물의 농도비율을 구하여 표준 곡선에 외삽하여 정량하였다.

### Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA)

1.3-eq HBV genome을 세포내 도입시킨 경우와 HBV 혈청으로 감염시킨 Hepa-1c1c7 세포로부터 얻은 세포배양액에서 HBV의 표면항원인 HBsAg을 검출하기 위하여 Abbott

IMx HBsAg assay system (Abbott Laboratories, IL, USA)을 이용하여 MEIA를 수행하였고, 신호 대 잡음비(S/N ratio)가 2.0 이상인 경우를 HBV 양성으로서 반응성이 있다고 평가하였다.

**통계분석**

각각의 실험에 있어서 각각의 비교군에 대하여 평균값±표준오차(SE)를 계산하였다. 대조군에 대한 유의성은 Dunnett의 two-tailed *t*-test를 수행하여 평가하였다[9].

**결 과**

Hepa-1c1c7 세포는 재조합 HBV 발현 벡터인 1.3-eq HBV genome 5 µg을 세포내 도입시킨 경우와 10%의 HBV 보균자의 혈청으로 감염시킨 경우, 그리고 아무것도 처리하지 않은 경우에 대하여 세포 및 세포배양액을 취하여 분석에 이용하였다. 세포로부터 RNA를 분리하여 HBV, TNF-α, CYP1A1, 그리고 b-actin 유전자에 대해 특이적인 primer들을 사용한 RT-PCR을 수행하여 각 유전자에 대한 mRNA의 발현 여부를 결정하였으며, 세포배양액은 Abbott IMx system을 이용하여 microparticle immunoassay를 수행하여 HBsAg의 발현 및 분비양상을 측정하였다(Fig. 1). 동량의 RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 1.3-eq HBV genome이 세포내 도입된 Hepa-1c1c7세포에서 대조군으로 사용된 b-actin mRNA의 발현에는 영향이 없었던 반면, HBV mRNA의 발현이 이루어지고 있음을 알 수 있었다. 또한 HBV 혈청으로 감염시킨 Hepa-1c1c7 세포에서도 미약하나마 HBV mRNA가 존재한다는 사실을 알 수 있었다. 한편, 1.3-eq HBV genome을 세포내 도입시킨 경우와 HBV 혈청으로 감염시킨 경우 모두 세포 내에서의 TNF-α mRNA의 발현이 유도되었다. HBV가 처리된 경우, 세포 내부에서의 mRNA 발현과 더불어 HBsAg을 의미 있게 분비하는 결과도 나타났다(S/N ratio > 2.0).

HBV에 의한 TNF-α mRNA 발현을 정량적으로 분석하기 위하여 TNF-α PCR의 대상이 되는 부위에서 중간부분이 빠진 DNA internal standard를 이용하여 competitive/quantitative RT-PCR을 수행하였다. Fig. 2는 다양한 농도의 internal standard를 이용하여 TNF-α PCR 산물(370-bp)과 internal standard PCR 산물(324-bp)과의 농도비율을 이용한 표준곡선(R<sup>2</sup>=0.974)을 보여주며(panel A), 이 표준곡선에 대하여 각 시료에 있어서의 TNF-α와 internal standard의 PCR 산물들의 농도비를 외삽하여 구한 TNF-α mRNA의 양을 보여주고 있다(panel B). 이 결과는 정성적 분석과 마찬가지로 정량적 분석 역시 HBV에 의하여 TNF-α mRNA의 발현이 유도된다는 것을 보여주었다.

HBV의 농도에 따른 세포내 도입의 영향을 측정하기 위하여 HBV 발현 벡터인 1.3-eq HBV genome 1 µg과 10 µg을

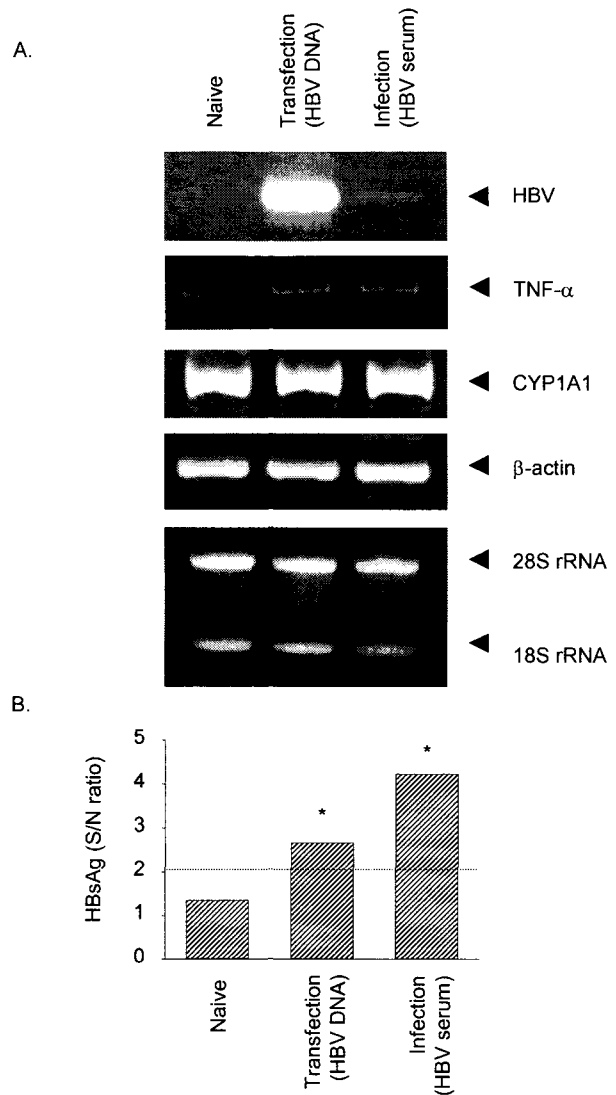


Fig. 1. Effect of HBV on mouse hepatoma Hepa-1c1c7 cells. Hepa-1c1c7 cells were transiently transfected with 5 µg of HBV expression vector or inoculated with 10% serum of HBV carrier. After transfection and infection, the cells were washed and cultured in new media for 36 hr at 37°C. (A) Total RNA was isolated and determined for HBV, TNF-α, CYP1A1, and b-actin mRNA expression by RT-PCR. (B) Supernatant was harvested and analyzed for HBsAg secretion by MEIA. An asterisk denotes HBsAg-positive response that signal/noise (S/N) value is equal to or greater than 2.0.

Hepa-1c1c7 세포내로 도입시킨 결과 세포에서는 TNF-α mRNA의 발현이 사용한 HBV DNA의 농도에 비례하여 증가하는 양상을 보였으며, 이 때 HBsAg의 발현 및 분비 역시 농도의존적으로 증가하는 양상을 보여 주었다(Fig. 3). HBV 혈청을 이용한 감염의 경우에도 사용 혈청의 농도와 HBsAg의 분비와의 상관관계를 측정된 결과, HBsAg의 분비는 HBV 혈청 0.1%에서는 영향이 없었으나, 1%부터 농도에 비례하여 증가

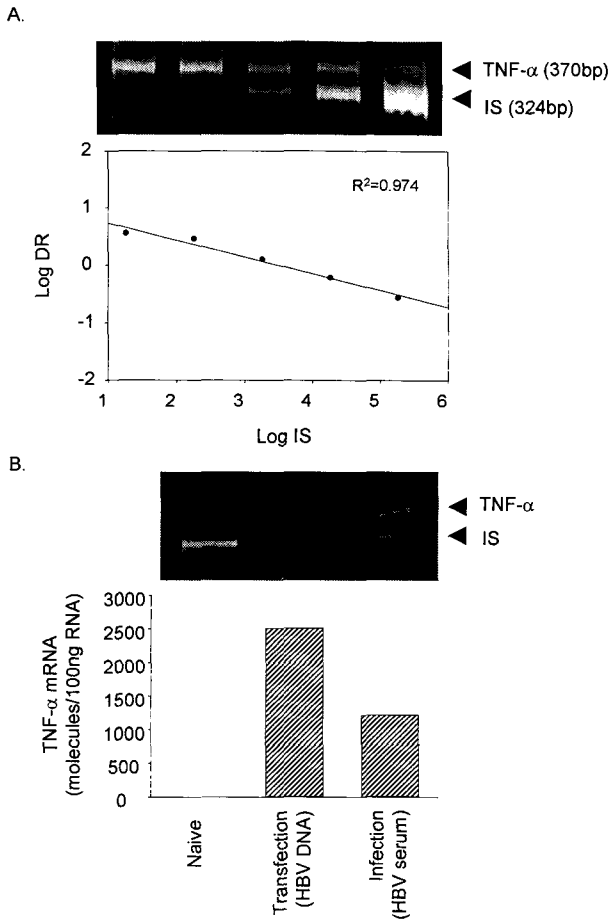


Fig. 2. Quantitative competitive RT-PCR for TNF-a mRNA in HBV-transfected and HBV-infected Hepa-1c1c7 cells. (A) Representative quantitative competitive RT-PCR gel and standard curve of TNF-a mRNA using five internal standard (IS) DNA dilutions from  $1 \times 10^{17}$  to  $1 \times 10^{13}$  M. Standard curve represented the relationship between the IS concentration and TNF-a/IS dose ratio (DR). (B) Quantitation of HBV-induced TNF-a mRNA by competition with IS.

하는 경향을 보여주었다(Fig. 4). HBV 감염 후 시간에 따른 변화로서, TNF-a mRNA 발현은 감염 후 2일까지는 발현이 유도되었으며 그 후로는 원상태로 회복되었고, HBsAg 또한 초기에 분비가 이루어진 후 더 이상의 변화는 보이지 않았다(Fig. 5).

### 고 찰

HBV 감염과 복제는 인간과 몇몇 영장류, macaca, 그리고 tupaia와 같은 종에 특이적이며, 그리고 간세포에 특이적이라는 것이 알려져 있다[11,17]. 따라서 지금까지 많은 HBV 연구가 이루어져 왔으나, 시험관내에서 바이러스가 세포를 효율적으로 감염시킬 수 없었다는 것과 엄격한 숙주 특이성

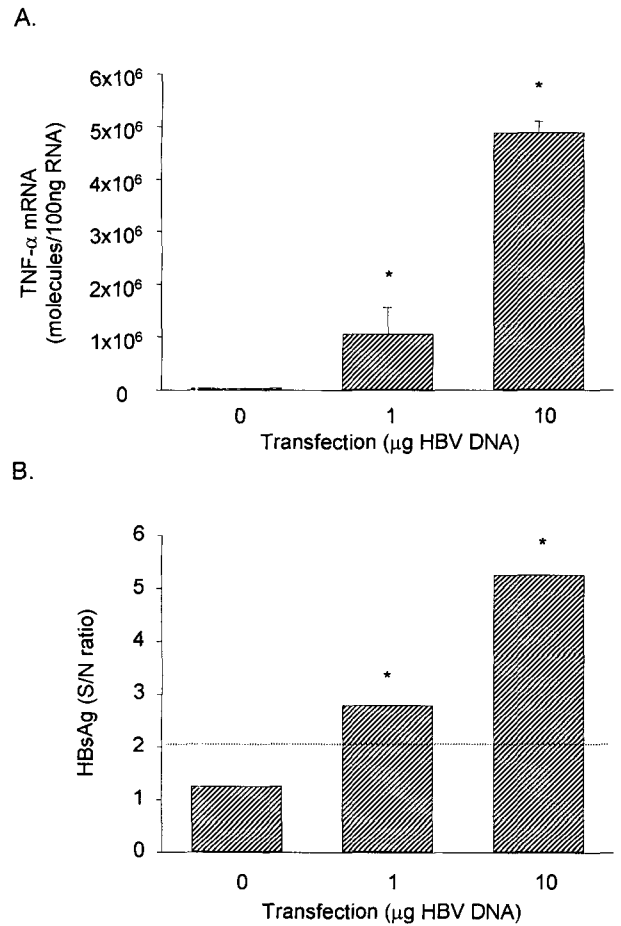


Fig. 3. Dose-related effect of HBV transfection into Hepa-1c1c7 cells. Hepa-1c1c7 cells were transiently transfected with indicated concentrations of HBV expression vector for 16 hr. Then the cells were washed and cultured in new media for 36 hr at 37°C. (A) Total RNA was isolated and determined for TNF-a mRNA expression by quantitative competitive RT-PCR. All standard curve  $R^2$  values were greater than 0.95 for all of the treatment groups. Each bar represents the molecules of TNF-a per 100 ng of RNA calculated from the standard curve, and represents the average from two experiments. An asterisk denotes a response that is significantly different from the control group as determined by Dunnett's two-tailed *t*-test ( $p < 0.05$ ). (B) Supernatant was harvested and analyzed for HBsAg secretion by MEIA. An asterisk denotes HBsAg-positive response that signal/noise (S/N) value is equal to or greater than 2.0.

으로 기인한 가용한 실험동물 모델 시스템의 부재라는 제약이 있기 때문에 간염 바이러스에 대한 연구의 많은 내용들은 주로 HBV와 관련성 있는 hepadnaviruses인 오리 간염 바이러스(DHBV)나 마멋류 간염 바이러스(WHBV)들을 이용한 연구에 의해서 밝혀져 왔다. 그러나 오리와 같은 조류 간염 바이러스는 시험관내 감염이 가능하다는 면에서는 장점이

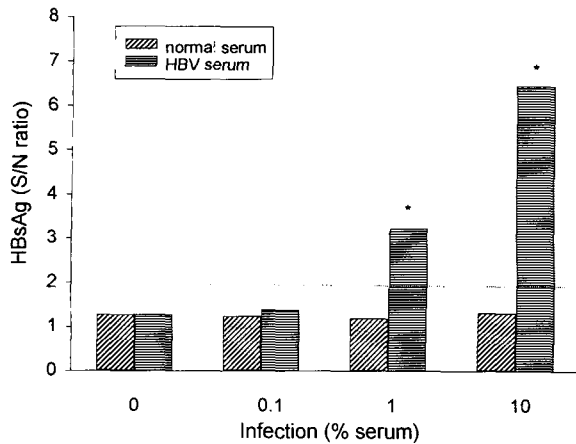


Fig. 4. Dose-related effect of HBV infected to Hepa-1c1c7 cells. Hepa-1c1c7 cells were inoculated with indicated percentages of normal healthy serum or HBV serum for 6 hr. Then the cells were washed and cultured in new media for 36 hr at 37°C. Supernatant was harvested and analyzed for HBsAg secretion by MEIA using Abbott IMx system. An asterisk denotes HBsAg-positive response that signal/noise (S/N) value is equal to or greater than 2.0.

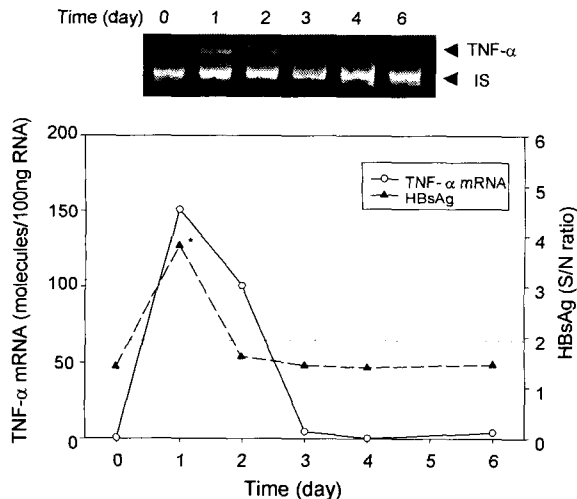


Fig. 5. Time-related effect of HBV infected to Hepa-1c1c7 cells. Hepa-1c1c7 cells were inoculated with 1% serum of HBV carrier. After 16 hr incubation, the cells were washed and cultured in new media which were changed everyday for indicated time periods at 37°C. Total RNA was isolated and determined for TNF- $\alpha$  mRNA expression by quantitative/competitive RT-PCR. Supernatant was harvested and analyzed for HBsAg secretion by MEIA. An asterisk denotes HBsAg-positive response that signal/noise (S/N) value is equal to or greater than 2.0.

있으나 X 유전자를 발현하지 않으며, WHBV는 동물 모델 시스템에서 생체내 연구를 할 수 있는 반면, HBV와는 유전자 발현 중 전사과정에서 주된 차이를 보인다는 단점들이 보고

되어져 있다[8,24,27,28]. 최근에는 HBV 유전자를 이용한 형질전환 마우스의 개발이나 HBV를 생산할 수 있는 인간 중앙세포주들의 이소성 이식술을 통한 면역결핍 마우스를 만드는 연구들이 수행되기도 하였다[5,23]. 본 연구 또한 이러한 HBV 연구에 대한 모델 시스템으로서 마우스를 이용하려는 많은 시도의 일환으로서 수행되었다. Lipofectin 방법을 사용하여 세포내로 도입된 HBV에 의해 HBV mRNA 및 HBsAg 발현이 이루어진 것은 인간 HBV의 유전자 발현 기전이 마우스 세포인 Hepa-1c1c7 세포에서도 정상적으로 이루어졌다는 사실을 의미하였다. 세포 외부에서 처리된 HBV에 의한 감염 시에도 세포 내부에서 HBV mRNA 발현이 이루어졌다는 결과는 인간 HBV의 자연 숙주가 아닌 마우스 세포인 Hepa-1c1c7 세포에서도 HBV 감염이 가능하다는 사실을 보여주었다. 또한 세포내 도입과 감염을 이용한 Hepa-1c1c7 세포에 대한 HBV의 처리는 결과적으로 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  유전자의 발현을 유도하였다. 이러한 결과들은 마우스 간암 세포주인 Hepa-1c1c7 세포가 HBV 연구에 대한 시험관내 모델로서 가능하다는 것을 보여준다.

HBV 감염과 복제의 숙주 및 조직 특이성은 세포 표면에서의 바이러스 수용체의 발현 여부, 수용체에 흡착 후의 세포 침투, 그리고 세포 내에서 바이러스의 복제에 필요한 세포 내 인자들의 존재 유무 등에 의해 결정된다고 할 수 있다[11,17]. 그런데, HBV 게놈의 tandem dimer를 포함한 재조합 DNA를 이용하여 랫드 간암 세포주의 세포내 도입 시 HBV 생성이 유도된다는 연구결과와 형질전환 마우스의 간세포에서 HBV의 이중 교차 복제가 이루어졌다는 결과들은 HBV 감염 및 숙주 특이성을 결정짓는 것은 간세포에의 바이러스의 흡착 및 침투 단계임을 의미한다[15,22]. HBV에 대한 많은 분자생물학적 정보에도 불구하고, 지금까지도 HBV의 자연 숙주인 인간 간세포에서의 흡착 및 침투에 대해서 잘 알려지지 않았다. 단지 인간 간세포의 세포막에 대한 바이러스의 결합이 중요한 초기 단계로 간주되어지고 있고, 이때 HBV의 외피 단백질인 HBsAg이 중요한 역할을 하는 것으로 제시되고 있다. 이러한 일종의 리간드와 수용체간의 결합에 관여하는 것으로 알려진 세포의 수용체들로는 인간 annexin V와 carboxypeptidase D (gp180) 및 asialoglycoprotein 수용체 등 여러 물질들이 제시되고 있다[26,29,31]. 마우스에서 유래된 세포인 Hepa-1c1c7 세포에서의 HBV 감염에 의한 효과가 나타난다는 것은 이 세포에서도 이러한 수용체들이 존재할 가능성을 시사하며, 이에 대해서는 보다 심층적인 연구가 필요하다.

HBV에 의하여 유도되는 TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인의 발현은 숙주와 바이러스의 관점에 따라서 이중적인 의미를 갖고 있다. HBV와 같은 바이러스 감염에 대한 숙주의 방어 기작에 있어서 TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인들은 항바이러스 역할을 한다. 일반적으로 HBV 감염에 대한 바이러스의 제거는

cytolytic T lymphocyte (CTL)의 역할이 매우 중요하지만, CTL은 감염된 세포를 직접 인식하여야 세포를 사멸시키는 기능을 수행하게 된다[6]. 그러나  $10^8$ 개 미만으로 추산되는 HBV에 특이적인 CTL과 이것이 인식해야할 약  $10^{11}$ 개의 간 세포간의 숫자적인 차이 및 실질기관인 간의 구조적인 제약 때문에 직접적인 인식을 통한 감염된 세포의 제거가 쉽게 이루어지지 않기 때문에 사이토카인의 역할은 필수적이다 [1,14]. HBV에 의해 유도되는 TNF-a는 생체내에서와 시험관 내에서 모두 HBV 복제를 억제한다고 알려져 있으며, 또한 폭넓은 하향효과들을 야기한다[13]. TNF-a는 직접 세포의 기질 분해 효소를 활성화하거나 간접적으로 화학주성인자들의 국소적인 생산을 유도하여 백혈구의 침투를 유발하고, 세포의 성장이나 세포사멸(apoptosis)까지도 유발한다[4]. 한편, 바이러스의 경우에는 사이토카인 발현의 조절이 숙주의 면역방어로부터 벗어나는 기작으로 이용될 수도 있다[20]. HBV는 림프구도 감염시킬 수 있으므로, HBV에 특이적인 면역반응에 의한 이러한 세포들의 세포사멸은 클론 결실을 유도하여 HBV에 대한 면역관용의 결과를 유발할 수 있으며, 이러한 현상은 만성감염 환자들의 말초혈 단핵세포에서의 세포사멸이 증가하였다는 보고와 부합한다[19]. 그러나 HBV에 특이적인 세포의 클론 결실에 관한 자세한 연구는 아직 수행되어져 있지 않다. HBV에 의한 TNF-a 발현의 유도는 X 단백질에 의하여 전사단계에서 조절된다는 사실이 알려져 있으며[16], X 단백질은 다른 사이토카인들의 발현 및 그에 관련된 세포 내 신호전달체계에 깊이 관여한다고 알려져 있다[10]. 이러한 점에서 Hepa-1c1c7 세포에서의 HBV에 의한 TNF-a의 발현의 변화 역시 HBx에 의해 일어날 가능성이 있으며, 이러한 점들에 대해서는 계속 연구되어야 할 것이다.

## 요 약

B형 간염 바이러스(HBV)에 의한 감염은 인류의 보건에 대단히 중요한 문제이며, 따라서 HBV에 대한 많은 연구가 수행되어져 왔다. 그러나 HBV 연구에 있어서의 주된 장애요인은 그 감염이 사람과 일부 영장류에 국한된다는 점이다. 본 연구에서는 마우스 간암 세포주인 Hepa-1c1c7 세포를 이용하여 HBV의 감염성 및 그에 따른 염증성 사이토카인인 TNF-a의 발현의 변화를 측정하였다. HBV의 표면항원(HBsAg) 분비는 microparticle enzyme immunoassay를 사용하여 측정하였고, TNF-a mRNA 발현 측정에는 quantitative competitive RT-PCR 방법을 사용하였다. HBV 발현 벡터를 Hepa-1c1c7 세포에 도입시켰을 경우뿐만 아니라 HBV 비리온을 갖고 있는 혈청을 사용하여 Hepa-1c1c7 세포를 감염시켰을 때에도 HBV mRNA 발현 및 HBsAg 분비가 측정되었다. 또한 두 상황 모두에서 TNF-a mRNA 발현이 증가됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 사람과 영장류에 특이적인 HBV가 마우스 간암

세포주인 Hepa-1c1c7 세포도 감염시킬 수 있다는 가능성을 제시한다. 또한 마우스 기원의 Hepa-1c1c7 세포에서도 HBV의 유전자 발현에 필요한 여러 인자들이 존재하며, TNF-a와 같은 사이토카인 유전자 발현을 조절하는 세포 내 기전에 HBV가 영향을 미친다고 할 수 있다. 따라서 마우스 간암 세포주인 Hepa-1c1c7 세포는 HBV 연구를 위한 시험관내 모델로서 사용되어질 수 있을 것으로 보인다.

## 감사의 글

본 논문은 2001년도 인제대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Ando K., L. G. Guidotti, A. Cerny, T. Ishikawa and F. V. Chisari. 1994. CTL access to tissue antigen is restricted in vivo. *J. Immunol.* **153**, 482-488.
2. Bchini R, F. Capel, C. Daugey, S. Dubanchet and M. Petit. 1990. In vitro infection of human hepatoma (Hep-G2) cells with hepatitis B virus. *J. Virol.* **64**, 3025-3032.
3. Beasley R. P., L. Y. Hwang, C. C. Lin and C. S. Chien. 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* **2**, 1129-1133.
4. Bradham C. A., J. Plumpe, M. P. Manns, D. A. Brenner and C. Trautwein. 1998. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am. J. Physiol.* **275**, G387-392.
5. Chisari F. V. 1996. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **206**, 149-173.
6. Chisari F. V. and C. Ferrari. 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 29-60.
7. Chomczynski P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**, 532-537.
8. Di Q., J. Summers, J. B. Burch and W. S. Mason. 1997. Major differences between WHV and HBV in the regulation of transcription. *Virology* **229**, 25-35.
9. Dunnett C. W. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* **50**, 1096-1121.
10. Feitelson M. A. and L-X. Duan. 1997. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am. J. Pathol.* **150**, 1141-1157.
11. Ganem D. and H. E. Varmus. 1987. The molecular biology of hepatitis B viruses. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 651-693.
12. Gilliland G., S. Perrin and H. Bunn. 1990. Competitive

- PCR for quantitation of mRNA, pp. 60-66, In: Innis, M. A. (eds.), PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Inc. San Deigo.
13. Guidotti L. G., K. Ando, M. V. Hobbs, T. Ishikawa, L. Runkel, R. D. Schreiber and F. V. Chisari. 1994. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3764-3768.
  14. Guidotti L. G. and F. V. Chisari. 1996. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 478-483.
  15. Guidotti L. G., B. Matzke, J. Schaller and F. V. Chisari. 1995. High level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.* **69**, 6158-6169.
  16. Lara-Pezzi E, P. L. Majano, M. Gomez-Gonzalo, C. Garcia-Monzon, R. Moreno-Otero, M. Levrero and M. Lopez-Cabrera. 1998. The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor alpha gene expression in hepatocytes. *Hepatology* **28**, 1013-1021.
  17. Leenders W. P. J., K. Hertogs, H. Moshage and S. H. Yap. 1992. Host and tissue tropism of hepatitis B virus. *Liver* **12**, 51-55.
  18. London W. and A. Evans. 1996. The epidemiology of hepatitis viruses B, C and D. *Clin. Lab. Med.* **16**, 252-271.
  19. Nakamura K., K. Yuh, S. Sugyo, H. Shijo, N. Kimura and M. Okumura. 1996. Apoptosis observed in peripheral T lymphocytes from patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **111**, 156-164.
  20. Ploegh H. L. 1998. Viral strategies of immune evasion. *Science* **280**, 248-253.
  21. Sells M. A., M. L. Chen and G. Acs. 1987. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1005-1009.
  22. Shih C. H., L. S. Li, S. Roychoudhury and M. H. Ho. 1989. In vitro propagation of human hepatitis B virus in a rat hepatoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6323-6327.
  23. Shouval D., L. M. Reid, P. R. Chakraborty, M. Ruiz-Opazo, R. Morecki, M. A. Gerber, S. M. Thung and D. A. Shafritz. 1981. Tumorigenicity in nude mice of a human hepatoma cell line containing hepatitis B virus DNA. *Cancer Res.* **41**, 1342-1350.
  24. Sprengel R., C. Kuhn, H. Will and H. Schaller. 1985. Comparative sequence analysis of duck and human hepatitis B virus genomes. *J. Med. Virol.* **15**, 323-333.
  25. Summers J. and W. S. Mason. 1982. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* **29**, 403-415.
  26. Treichel U., K. H. Meyer zum Buschenfelde, H. P. Dienes and G. Gerken. 1997. Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch. Virol.* **142**, 493-498.
  27. Tuttleman J. S., J. C. Pugh and J. W. Summers. 1986. In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. *J. Virol.* **58**, 17-25.
  28. Tyler G. V., R. L. Snyder and J. Summers. 1986. Experimental infection of the woodchuck (*Marmota monax*) with woodchuck hepatitis virus. *Lab. Invest.* **55**, 51-55.
  29. Urban S., C. Schwarz, U. C. Marx, H. Zentgraf, H. Schaller and G. Multhaup. 2000. Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction. *EMBO J.* **19**, 1217-1227.
  30. Vanden Heuvel J, F. Tyson and D. Bell. 1993. Construction of recombinant RNA templates for use as internal standards in quantitative RT-PCR. *Biotechniques* **14**, 395-398.
  31. Walker J. H., C. M. Boustead, J. J. Koster, M. Bewley and D. A. Waller. 1992. Annexin V, a calcium-dependent phospholipid-binding protein. *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 828-833.