

활막 세포에서 HCV Core 단백질에 의한 Interleukin-8 발현 유도

¹가톨릭대학교 의과대학 의과학연구원 WHO협력 간염연구소, ²가톨릭대학교 의과대학 내과

왕진상¹ · 허원희¹ · 김소연¹ · 윤승규^{1,2}

Induction of Interleukin-8 Expression in Synovial Cell by Hepatitis C Virus Core Protein

Jin Sang Wang¹, Wonhee Her¹, So Yeon Kim¹ and Seung Kew Yoon^{1,2}

¹WHO Collaborating Center of Viral Hepatitis and ²Department of Internal Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic and systemic inflammatory disease that is characterized by invasive synovial hyperplasia, leading to progressive joint destruction. Recent studies have described that RA is caused by virus, bacteria or outside material. Approximately 2 to 20% of RA cases are reported to be associated with infected hepatitis C virus (HCV). However, the mechanisms underlying virus-induced RA are still unknown. Moreover, few molecular studies have addressed the inflammatory aspects of HCV-associated autoimmune RA. In this study, we aimed to determine whether or not another HCV core protein transactivates the IL-8 gene expression, prototypic chemokine, in synovial cell. **Methods:** To establish the HCV core expressing stable synovial cell line, pCI-neo-core, a plasmid encoding HCV core protein, were transfected to HIG-82 cell line that is an established cell line from rabbit periaricular soft tissue. We examined the morphological changes and cell cycle distribution of HIG-82 cells with expression of HCV core protein by inverted microscopy and flow cytometry analysis, respectively. Also, we determined the mRNA levels of Interleukin (IL)-6 and IL-8 related to the inflammation by RT-PCR and then analyzed regulation of IL-8 expression by the NF- κ B pathway. **Results:** Our study showed no significant differences in morphology and cell cycle between HIG-82 control cell line and HIG-82 expressing HCV core protein. However, expression of HCV core protein induces the IL-8 mRNA expression in HIG-82 core cells via activated NF- κ B pathway. **Conclusion:** These results suggest that HCV core protein can lead to enhanced IL-8 expression. Such a pro-inflammatory role may contribute to the etiologic pathogenesis in RA patients with HCV infection. (*Immune Network* 2006;6(1):20-26)

Key Words: Hepatitis C virus (HCV), rheumatoid arthritis (RA), cytokine, interleukin-8

서론

C형 간염바이러스(Hepatitis C virus, HCV)는 flaviviridae과에 속하는 양성 단일 가닥 RNA로 구성된 바이러스

책임저자 : 윤승규, 가톨릭대학교 의과학연구원 WHO협력
간염연구소

☎137-701, 서울시 서초구 반포4동 505번지

Tel: 02-590-2622, Fax: 02-536-9559

E-mail: yoonsk@catholic.ac.kr

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터연구(R11-2002-098-07002-0)
지원으로 수행되었음.

로(1,2), 전 세계적으로 약 1억 7천만 명이 HCV에 감염된 것으로 보고되었다(3). HCV 감염의 자연경과에서 감염 후 50~85%가 만성 간염으로 진행되어, 그 중 약 20%는 20년 이내에 간경변으로 진행되고, 간경변 중 일부가 간암으로 진행되어 사망에 이므로 임상적으로 심각한 바이러스 질환으로 인식되고 있다(4).

현재 HCV의 감염은 간뿐만 아니라 다른 기관의 질환과 연관되어 있는 경우가 보고되었는데, 예로 기관지 천식과 같은 만성 폐 질환(5)이나 만성 자가면역질환인 류마티스 관절염이 보고된 바 있다(6). 이들 질환 역시 만

성 염증이 그 원인이 되며, 류마티스 관절염은 그 발병 기작이 명확하게 규명되어 있지는 않지만 조직적 합성 항원으로 인한 유전적인 원인이나 바이러스나 세균 등의 외부 물질에 의해서 일어날 수 있다고 보고되었을 뿐 (7), HCV와 같은 바이러스에 의한 발병 기작에 대해서는 현재까지 밝혀진 바 없다. 하지만 현재 HCV 감염환자 중 류마티스 관절염을 수반하는 환자가 2~20%로 보고되고 있어, HCV가 자가면역질환인 류마티스 관절염의 병리기전에 연관되어 있을 가능성을 시사하고 있다(6,8).

HCV 감염으로 인한 만성 간질환은 간 조직 내 만성 염증이 수반됨으로써 이루어지는데, Hoshida들(9)은 HCV 감염 간질환의 혈청 내에서 여러 인터루킨 (Interleukin, IL)들을 측정하였는데, 측정된 IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 중 염증반응을 유도하는 IL-8의 발현이 가장 높게 나타났음을 보고하였고, 인터페론-알파 치료를 받았던 환자들 중 반응군이 비반응군보다 IL-8 발현량이 유의하게 감소되어 IL-8이 HCV에 의한 만성 염증의 병리기전에 중요한 역할을 할 것이라는 것을 제시하였다.

HCV를 구성하는 구조 단백질 core와 비구조단백인 NS3, NS4A, NS4B, NS5A 그리고 NS5B는 전사인자인 nuclear factor (NF)- κ B를 활성화시키는데 이 중 core 단백질이 NF- κ B를 가장 높게 활성화시키는 것으로 보고되었고, 이러한 NF- κ B의 활성화는 염증 유도과 면역 반응에 관계하는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α 그리고 인터페론-베타 등의 사이토카인 분비에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(10). 따라서 HCV의 감염에 의한 염증반응의 기작에 IL-8과 NF- κ B가 연관되어 있을 가능성이 있다는 것을 시사하고 있다. 이전 연구들에 따르면, HCV 감염 시 일어나는 면역 신호전달 조절은 HCV의 단백질 중에서도 주로 구조 단백질 core 단백질에 의해서 일어나는데, HCV core 단백질은 gC1q, TNFR1 그리고 Fas의 수용체의 결합에 의해서 신호 전달을 조절하고 있으며(11-13), 이들은 환자 혈액 내에 존재함으로써 혈액을 통해 간 이외의 다른 기관에서도 유사한 반응이 일어나고 있음을 보고하고 있다(14,15). 최근 인체 내 각 기관에서 HCV에 의한 면역반응 조절 반응을 연구하기 위하여, HCV core 단백질을 발현하는 기관 특이 세포주를 제작하여 IL-8과 같은 사이토카인의 역할과 이를 조절하는 신호전달 체계를 규명하고 있다(10,11,16).

본 연구에서는 만성 HCV 감염이 만성 염증질환을 수반하는 자가면역질환인 류마티스 관절염의 진행에 어떠한 영향을 미칠 수 있는지 알아보고자, 활막 세포에서 HCV core 단백질을 발현하는 영구세포주를 제작하여 IL-8의 발현을 유도하였고, 이러한 유도가 어떤 경로를 통해 조절되는지를 연구함으로써 HCV가 류마티스성 관절염의 병리기전에 관여함을 제시하였다.

재료 및 방법

세포배양. 활막 세포주인 HIG-82 (CRL-1832, American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 구입하여 Ham's F12 배지(Gibco, Grand Island, NY)에 2 mM L-glutamine (Gibco)과 10% 우태아혈청(FBS)을 첨가하여 배양하였다. **HIG-82 세포로의 HCV core 단백질 발현 플라스미드 도입(transfection) 및 선별(screening).** 포항공과대학교(성영철 교수)로부터 제공된 HCV core 단백질이 발현되는 플라스미드(pCI-neo-core)는 pCI-neo (promega, Madison, WI)에 HCV core 단백질(amino acid 1-191)이 암호화된 염기서열을 PCR로 증폭하여 만든 genotype 1b HCV cDNA를 삽입함으로써 제작되었다(17,18). HIG-82 세포주를 60 mm dish (nunc, Roskilde, Denmark)에 2.5×10^5 개의 세포를 배양한 후 Lipofectamine 6 μ l (Invitrogen)와 pCI-neo-core 2 μ g을 Ham's F12 배지 100 μ l에 넣어 섞은 후 Lipofectamine과 pCI-neo-core 복합체가 형성되도록 실온에서 30분 동안 방치하였다. HIG-82 세포가 배양된 dish에 FBS가 포함되지 않은 Ham's F12 배지로 수세한 후 Lipofectamine/pCI-neo-core 복합체를 세포가 배양된 dish에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양한 후 10% FBS가 포함된 Ham's F12 배지로 교환하였다. 이후 배양 12시간 후에 600 μ g/ml의 G418 (Duchefa, Haarlem, Netherlands)이 첨가된 Ham's F12 배지로 교환하여 배양 하였다. 60 mm dish에서 colony가 형성된 세포만을 48-well plate (Nunc) 각 well에 옮겨 배양하였으며 48-well plate에서 성장된 세포를 12-well plate (SPL, gyeonggi, Korea)에 옮겨 600 μ g/ml의 G418이 첨가된 배지에서 선별 배양하였다. 다시 60 mm dish를 거쳐 100 mm dish (SPL)로 계대 배양하면서 배지 내 200 g/ml의 G418 농도로 낮추어 선별배양한 후 Western blotting을 통해서 HCV core 단백질을 발현하는 2개의 세포주(HIG-82 core 6 및 HIG-82 core 8)를 확립하였다.

HIG-82 세포에서 HCV core 단백질 발현 확인. 확립된 영구 세포주인 HIG-82 core 6 및 -8에서 HCV core 단백질의 발현을 확인하기 위하여 Western blotting을 시행하였다. 배양된 세포를 수확한 다음 1 \times Protein sample 용액(50 mM Tris-Cl pH6.8, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, 100 mM β -mercaptoethanol, 100 mM DTT)으로 세포를 용해시킨 후 끓는 물에 5분 동안 중탕하였다. 가열 후 원심분리하여 세포 침전물을 걸러낸 후 상층액을 12% polyacrylamide SDS-PAGE에 전기영동하였다. 이어 Hybond-C nitrocellulose membrane (Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)에 옮긴 후 5% 탈지분말용액에서 1시간 동안 상온에서 blocking한 후, 토끼의 혈청에서 분리한 polyclonal 항체(19)(포항 공대 제공)를 1 : 1,000으로 희석하여 1차 anti-HCV core 항체로 사용하였

다. 다음 2시간 후 0.05%의 Tween 20 (Amresco, solon, Ohio)가 첨가된 TBS용액(Tris-buffered saline; 10mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl)으로 수세한 후, 2차 항체로 HRP (horseradish peroxidase)가 연결된 anti-rabbit IgG (Amersham)와 5% 탈지분말용액과 1 : 5,000으로 희석하여 1시간 동안 상온에서 반응하였다. TBS-T 용액으로 2시간 이상 수세한 후 Enhanced Chemiluminescent (ECL; Amersham)을 이용하여 AGFA X-ray blue film (AGFA Gevaert NV)에 10분 동안 노출시켰다.

HIG-82와 HIG-82 core 세포주의 형태학적 관찰 및 FACS 분석. HCV core를 발현하는 HIG-82 세포를 배양하면서 위상차 현미경을 이용하여 형태학적 변화를 관찰하였다. 또한 유세포 분석을 위하여 Propidium iodide (PI) (Pharmingen, San Diego, CA) 염색법을 이용하였다. 요약하면, 100 mm dish 에 2×10^5 개의 세포를 접종한 후 12시간 후 FBS를 첨가하지 않은 Ham's F12 배지서 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리한 후 4°C phosphate buffered saline (PBS)로 2회 수세하였다. 이어 70% 에탄올을 넣고 1시간 동안 얼음 속에서 고정시킨 후 1,200 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 세포를 얻은 후, 500µl의 PBS에 5µl의 PI와 RNase (100µg/ml)를 넣고 30분간 37°C에서 방치한 후, FACScalibur flow cytometer (Beacton Dickinson, San Jose, CA)를 이용하여 분석하였다.

HCV core 단백질에 의한 IL-8 싸이토카인 발현. HCV core 단백질을 발현하는 HIG-82 core 6 및 HIG-82 core 8와 대조군 세포주인 HIG-82에서 TRIZOL (Invitrogen, CA)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 1.5µg RNA와 1µl random primer (TaKaRa, Japan)를 혼합하여 65°C에서 5분간 방치한 후 0.2 mM dNTP, 2.5 mM Mg₂Cl, Reverse Transcriptase buffer, Reverse Transcriptase (Promega Im-Prom-II™)를 모두 넣고 42°C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 만들었다. IL-6, IL-8 그리고 β-actin의 발현을 측정하기 위한 primer는 다음과 같다: IL-6 sense: 5'-TCC GGA TGT ATC TCG AGC AC-3', antisense: 5'-CTA ACG CTC ATC TTC CTA GTT TCG-3'; IL-8 sense: 5'-GGC CGT AAT GGA AGT AAA CGT-3', antisense: 5'-GGA ACT CCT TGC TAA TAA GGC C-3'; β-Actin: sense: 5'-AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA CC-3' antisense: 5'-GAA GTC CAG GGC GAC GTA GCA C-3'. 이 primer들을 사용하여 94°C에서 45초, 55°C에서 1분, 72°C에서 45초씩 30회 PCR을 시행하였다.

HCV core 단백질 발현 HIG-82 영구 세포주에서 IkB-α 발현 조절. IL-8 유전자 발현을 조절하는 싸이토카인 중재 신호 전달계에서 HCV core 단백질 발현이 NF-κB 경로에 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 IkB-α 발현조절을 Western blotting을 통하여 확인하였다. HIG-82, HIG-82

core 6 및 HIG-82 core 8 세포들을 수확한 후 RIPA 용액 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF)을 사용하여 단백질을 추출한 다음 Bradford assay kit (Bio-RAD, Hercules, CA)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 각각 세포주의 단백질 20µg을 끓는 물에 5분간 중탕한 후, 12% polyacrylamide SDS-PAGE에 전기영동한 후, 1차 항체로 anti-IkB-α (Santa Cruz Biotechnology, CA)와 anti-α-actin (Sigma)을 이용하여 Western blotting을 시행하였다.

HIG-82 세포에 합성된 재조합 HCV core 단백질을 처리한 후 인터루킨과 IkB-α 발현의 변화. 재조합 HCV core protein은 *E.coli* BL21 (DE3)에 이입 후 배양하여 재조합 HCV core 단백질을 합성 및 정제하였다(20). 포항공대로부터 제공받은 재조합 HCV core 단백질을 HIG-82 세포에 처리하여 IL-6와 IL-8의 발현과 IkB-α 발현의 변화를 측정함으로써 세포 내에서 발현하는 HCV core 단백질에 의한 면역조절 반응과 차이가 없는가를 비교분석하였다. 100 mm dish에 2×10^5 세포를 배양한 후 12시간 뒤 FBS를 첨가하지 않은 Ham's F12 배지에 재조합 HCV core 단백질 2µg/ml을 넣어준 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 후 RT-PCR을 통한 싸이토카인의 발현과 Western blotting 방법을 사용하여 IkB-α 발현량을 관찰하였다.

또한 재조합 HCV core 단백질의 농도를 1, 2 그리고 4 µg/ml로 다르게 처리하여 24시간 동안 처리하여 dose-dependent하게 IL-8의 발현량을 증가시키는지 알아보려고 하였다.

결 과

확립된 HIG-82 영구 세포주에서 HCV core 단백질의 발현. HCV core 단백질이 발현되는 활막 세포주 확립을 위해서 pCI-neo-core 이입과 G418 선택배양을 통해 HCV core 단백질을 발현하는 활막 세포주를 제조하였다. 제조된 HIG-82 core 영구 세포주에서 HCV-core 단백질이 제대로 발현되는지를 확인하기 위해서 Western blotting을 시행

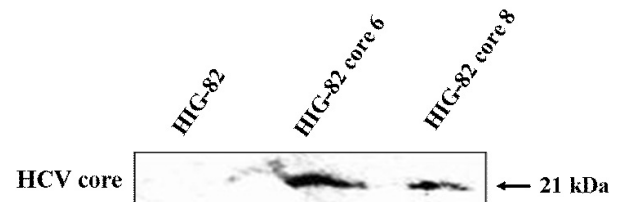


Figure 1. Expression of HCV-core protein by Western blot analysis. Immuno-reactive bands corresponding to 21 kDa were visualized in stable cell line expressing HCV core protein, HIG-82 core 6 & -8 but no band was observed in control cell line, HIG-82.

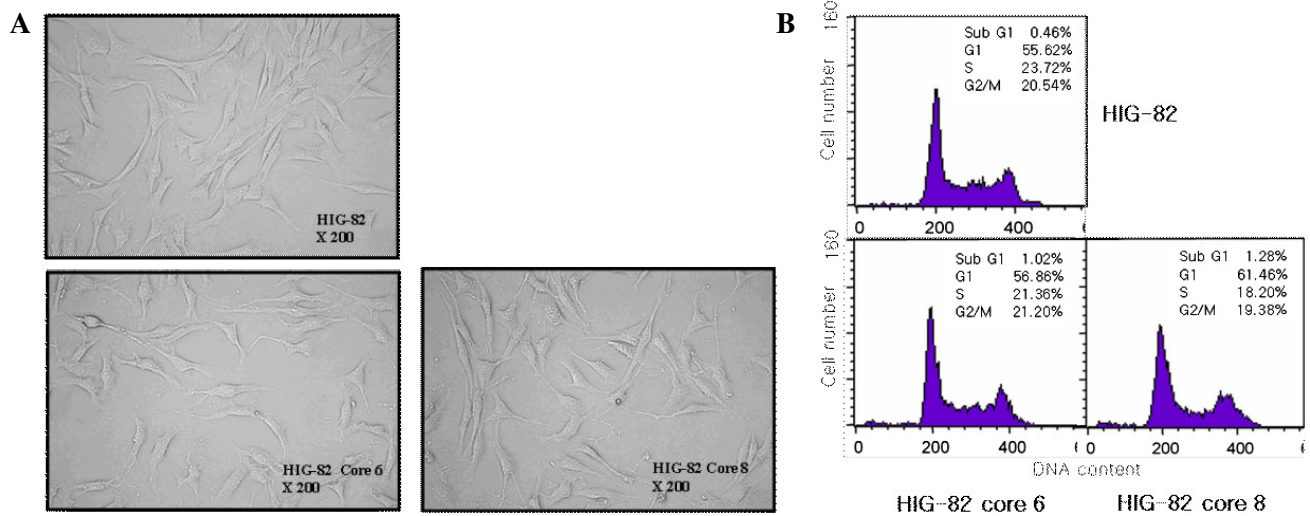


Figure 2. Morphologic analysis of stable cell line during subculture. No significant difference in morphology by inverted microscopy were found between HIG-82 and HIG-82 core 6 & -8 (A). In cell cycle distribution analysis by flow cytometry after subculture, no significant cell growth inhibition or apoptosis was observed in HIG-82 and HIG-82 core 6 & -8 (B).

한 결과, G418 선택배양으로 선별된 12개의 세포주 중에서 HIG-82 core 6, -8 및 -9번 세포주에서 HCV core 단백질 발현됨을 확인하였다(data not shown). 본 연구에서는 HCV core 단백질이 강하게 발현되는 HIG-82 core 6 및 -8 번을 선택하였으며, Fig. 1에서와 같이 HIG-82 core 6 및 -8번은 HCV core 단백질이 발현되었으며, 아무런 처리를 하지 않은 본래의 HIG-82 세포주인 음성 대조군에서는 발현되지 않았다. 이 결과 HCV core 단백질 발현 영구세포주가 확립되었음을 확인하였다(HIG-82 core 6 & -8).

HCV core 단백질의 발현이 세포사멸이나 성장에 미치는 영향 관찰. HCV core 단백질이 활막 세포에 세포 독성이나 세포 사멸 같은 영향을 미치는지 알아보기와 위상차 현미경을 통해서 먼저 형태학적 변화를 관찰하였다. 200배율로 관찰한 결과, 음성 대조군 HIG-82와 HCV core 단백질 발현 영구세포주인 HIG-82 core 6 및 -8번 세포주에서 세포 괴사나 세포 사멸 소견은 관찰되지 않았다(Fig. 2A). HCV core 단백질이 세포 성장에 영향을 미치는지 확인하기 위한 PI 염색을 통한 유세포 분석(FACS)을 실시하였다. FACS 결과 DNA content를 통한 세포사멸이나 세포성장 장애 등은 관찰되지 않았으며, 음성 대조군인 HIG-82나 HCV core 단백질 발현 HIG-82 core 6 및 -8번 세포주 모두 비슷한 DNA content를 보였다. 또한 세포배양 중에 HIG-82 core 6 및 -8번 세포주가 HIG-82 세포 특유의 형태를 가지지 못하거나 dish에 착상하지 못해 사멸되는 현상도 나타나지 않았다(data not shown). 따라서 HCV core 단백질은 HIG-82 세포에서 세포성장 억제나 세포사멸 등 세포 성장에 어떤 영향도 미치지 않음을 확인하였다.

HCV core 단백질에 의한 염증 사이토카인 발현. HCV 감

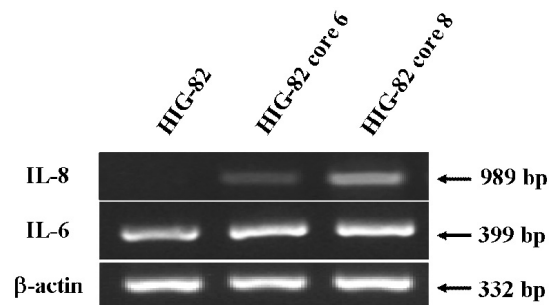


Figure 3. Effect of HCV core protein on the induction of IL-6 and IL-8 in stable cell line expressing HCV core protein. Total RNA was subject to RT-PCR for the determination of cytokine IL-6 and IL-8 gene expression. HCV core protein expressing stable cell line HIG-82 core 6 & -8 showed significantly induction of IL-8 gene expression compared to control cell line, HIG-82. However, there is no significant difference in IL-6 gene expression between HIG-82 and HIG-82 core 6 & -8. The sizes of the PCR products are shown in base pairs (bp).

염에 의한 만성 간질환이나 자가면역성 류마티스 관절염 등은 주로 염증 관련 사이토카인의 과발현과 연관성이 많으므로, HCV core 단백질에 의해서 염증 관련 사이토카인의 발현이 유도되는지 알아보기 위해서 HIG-82와 HCV core 단백질이 발현되는 HIG-82 core 6 및 -8 세포주에서 B세포와 T세포를 활성화하는 사이토카인인 IL-6와 화학주성물질로 염증 세포들을 유도하는 사이토카인인 IL-8의 mRNA 발현을 RT-PCR을 통해서 확인하였다. IL-6의 발현은 음성 대조군인 HIG-82 세포주와 HIG-82 core 6 및 -8 세포주에서 차이가 없었지만, IL-8의 발현은 HIG-82 세포주보다 HIG-82 core 6 및 -8 세포주에서 발현이 증가되어(Fig. 3), HCV core 단백질이 활막 세포 내에서

도 면역 신호 조절 단백질로 작용하고 있으며, 염증 반응 사이토카인인 IL-8의 발현을 증가시킴으로써 염증 반응을 활성화시킴을 알 수 있었다.

HCV core 단백질의 발현에 의한 NF- κ B 신호전달의 변화. 일반적으로 사이토카인 매개성 IL-8 유전자 발현 조절에서 I κ B- α 의 분해에 의한 NF- κ B 경로의 활성화는 IL-8 유전자 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 HCV core 단백질이 IL-8의 발현을 증강시켰기 때문에, 어떤 기작으로 일어나는지 알아보고자 I κ B- α 의 발현을 검사하였다. 본 연구 결과에서 HCV core 단백질을 발현하는 HIG-82 core 6 및 -8 세포주에서 I κ B- α 발현이 대조군인 HIG-82 세포주보다 상대적으로 낮아(Fig. 4), HCV core 단백질의 발현이 I κ B- α 를 분해함으로써 NF- κ B의 활성이 증가함을 추정할 수 있었으며, IL-8 사이토카인의 발현도 이 NF- κ B 경로의 활성화와 연관성이 있음을 확인하였다.

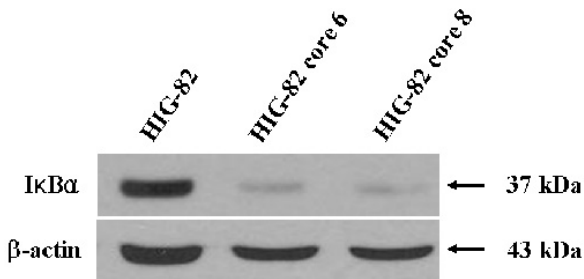


Figure 4. I κ B- α degradation by expression of HCV core protein. I κ B- α degradation was significantly increased in stable cell line expressing HCV core protein, HIG-82 core 6 & -8 compared to control cell line, HIG-82. This finding suggest that HCV core protein activate NF- κ B pathway via I κ B- α degradation.

활막 세포에 합성된 재조합 HCV core 단백을 처리한 후 인터루킨과 I κ B- α 발현의 변화. HCV core 단백을 세포 밖에서 처리하였을 때 활막 세포 내 인터루킨과 I κ B- α 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 활막 세포에 재조합된 HCV core 단백질 (2 μ g/ml)을 처리하여 IL-8의 mRNA와 I κ B- α 발현을 관찰한 결과 CV core 단백을 처리한 HIG-82 세포주에서 IL-6 mRNA의 발현은 차이가 없었으며, IL-8의 mRNA의 발현이 증가되었고 I κ B- α 분해 또한 증가되었다(Fig. 5). 재조합 HCV core 단백질에 의해서 Dose-dependent하게 IL-8의 발현량이 증가하는지 알아보려고 하는 실험에서 core 단백질의 농도가 높아짐에 따라서 IL-8의 발현 또한 증가함을 나타내었다(Fig. 6). 이 결과는 세포 내에서 발현하는 HCV core 단백질이나 세포 밖에서 처리한 HCV core 단백질이 IL-8과 I κ B- α 발현에 미치는 영향이 동일함을 나타내므로 HCV core 단백질이 활막 세포의 어떤 수용체를 통해서 영향을 미쳤음을

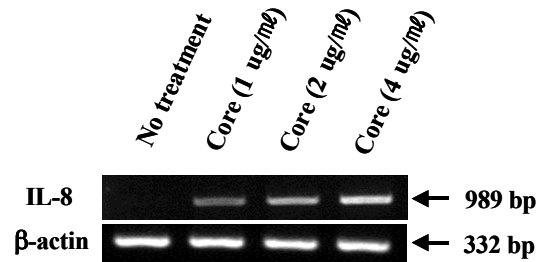


Figure 6. Dose-dependent increase in IL-8 expression by of recombinant HCV core protein. HIG-82 were subjected to no treatment or treatment with recombinant HCV core protein 1 μ g/ml, 2 μ g/ml and 4 μ g/ml concentrations and incubation for 24 h. RNA isolated and reverse transcribed, and IL-8 detected using IL-8 specific primers or β -actin primers.

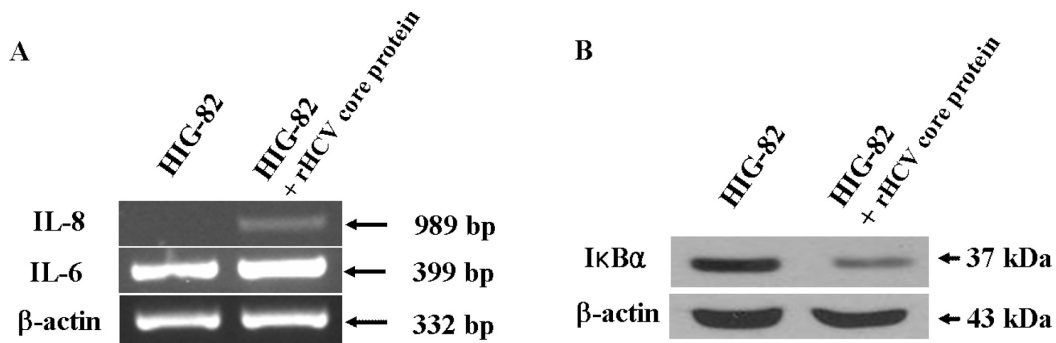


Figure 5. Effect of recombinant HCV core protein on the induction of IL-6 and IL-8 gene expression and on degradation of I κ B- α . (A) Following incubation of HIG-82 with or without recombinant HCV core protein (2 μ g/ml), total RNA was subject to RT-PCR for the determination of cytokine gene expression. IL-8 mRNA expression was induced in HIG-82 cells treated with recombinant HCV core protein whereas no IL-8 expression was found in HIG-82 cells without recombinant HCV core protein. In addition, no significant difference in IL-6 mRNA expression between HIG-82 with and without recombinant HCV core protein. (B) Western blot analysis for I κ B- α degradation in HIG-82 cells treated with or without recombinant HCV core protein (2 μ g/ml) was performed. I κ B- α was significantly degraded in HIG-82 cells treated with recombinant HCV core protein compared to HIG-82 cells not treated recombinant HCV core protein.

시사하고 있다.

고 찰

류마티스 관절염은 바이러스나 세균 등의 외부 물질에 의해 촉발될 수 있다고 알려졌으나(7) 바이러스 특히 HCV에 의한 발병기전은 명확하지 않아 바이러스에 의한 류마티스 관절염의 발병이나 악화에 대한 경로를 이해할 수 없어 치료에 어려움이 있다. HCV 감염환자 중에서 류마티스 관절염을 수반하는 경우가 종종 발생되며(6), HCV의 감염이 간세포에서 만성 염증을 수반하는 것이 활막 세포 내에서 만성적으로 염증성을 보이는 류마티스 관절염과 염증성 병태생리 측면에서 유사한 점이 인정되어, 여러 연구자들이 HCV core 단백질의 발현과 염증성 특정 면역신호 전달계의 조절을 규명하였다(11-13). HCV core 단백질은 간세포주에서 세포성장과 세포사멸을 억제하거나 이와 반대의 영향을 미치는 세포신호조절 물질로 알려져 있으며(11-13), 몸속의 혈액에서도 단백질로 존재하며 혈관을 통해서 이동함으로써(14) 다른 기관에 영향을 미친다고 보고되었다(5,6). 이러한 HCV core 단백질이 세포 내로 들어가는 경로로 LDL 수용체와 gC1q 수용체가 유력시되고 있으며(12,21), 활막 세포는 gC1q 수용체를 가지고 있기 때문에(22) HCV core 단백질이 들어갈 수 있다는 가능성이 있다는 가정 하에 본 연구를 수행하였으며, 저자들의 실험 결과(Fig. 3~5)를 비교 분석해보면 HCV core 단백질이 세포 밖에서도 활막 내 어떠한 수용체를 통해 세포에 영향을 미쳤음을 확인할 수 있었다.

HCV core 단백질과 염증 관련 사이토카인인 IL-8과 연관된 연구는 간암세포주인 Huh-7 (9) 세포주와 자궁암세포주인 HeLa 세포주(10)에서 보고된 바 있다. 특히, HCV core 단백질의 도메인 2, 3번의 염기의 서열을 바꾸어 암호화된 단백질의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시켰을 때 IL-8의 발현 정도를 관찰한 실험에서 HCV core 단백질의 변환이 IL-8의 발현에 영향을 미치는 것으로 나타났으며(9), 이것은 HCV core 단백질이 IL-8의 발현과 밀접한 관계가 있다는 것을 증명한 연구라 생각된다. 또한 HCV 감염환자에서 인터페론을 치료한 후 반응과 비반응군에서의 혈청 내 사이토카인치를 측정한 결과 반응군에서 IL-8의 발현이 현저하게 줄어들었으며, 비반응군에서는 오히려 IL-8치가 증가되는 경향을 보여 IL-8과 HCV와 연관성이 높음을 시사하였다(9). 또 다른 임상 연구에서도 IL-8이 만성 HCV 감염 병리기전에 중요한 역할을 한다고 보고하였다(23). 이처럼 HCV core 단백질은 IL-8의 발현에 promoter의 작용을 하며, 발현된 IL-8은 만성 염증 반응에 중요한 작용을 한다는 것이 간세포주뿐만(9) 아니라 본 연구에 사용된 활막 세포에서도 유사한 소견을 보여 HCV와 관련된 류마티스 관절염의 병태생리를 이해하는 데 중요한 정보가 될 수 있으리라 기대된다.

IL-8을 발현하는 염증 반응의 경로는 크게 p38 (24), JNK (25) 그리고 NF- κ B (10)의 경로 등 세 가지가 알려져 있다. 이 중에서 HCV core 단백질에 의한 IL-8의 발현 경로는 p38과 NF- κ B 경로에 대해서 알려져 있으며, 활막 세포의 경우 TNF- α 와 IL-1 β 등의 물질에 의해서 NF- κ B가 활성화 되며, 이 경로를 통해서 염증 반응이 일어나게 된다(26). 따라서 본 연구에서도 IL-8의 발현이 NF- κ B 경로를 통해서 일어날 것이라는 가정 하에, NF- κ B의 활성화를 I κ B- α 분해를 통해서 알아보았는데 저자들의 가정과 같이 HCV core 단백질이 I κ B- α 경로를 통해서 IL-8의 발현을 조절한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4, 5B). 이는 HCV core 단백질을 발현할 수 있는 플라스미드를 자궁암 세포주인 HeLa 세포주나 Huh-7 간세포주에 이입하여 HCV core 단백질을 발현시켜 세포에 영향을 관찰하였을 때나 마찬가지로 I κ B- α 의 활성화를 보여 주고 있어(9,10), 본 실험 결과의 예상을 뒷받침해 주었다. 또한 활막 세포에서 I κ B- α 의 활성화 경로를 통해 염증 반응을 유도하는 사이토카인으로 IL-6와 IL-8이 있으나(27), HCV 감염된 인터페론 치료 환자에서 보듯이 HCV core는 IL-8에만 영향을 주었으며(9), 본 연구에서도 마찬가지로 IL-6의 발현 유도에는 변화가 없었고 IL-8의 발현에만 영향을 미침을 보여 주었다(Fig. 3, 5A). 또한 IL-8의 발현량이 제조된 HCV core 단백질의 dose-dependent하게 증가되었으므로(Fig. 6), IL-8의 발현이 HCV core 단백질에 의한 영향임을 증명해 주었다. 따라서 혈액 내의 HCV의 copy수가 높을수록 활막 세포에 강한 염증반응을 유도하여 관절염을 더욱 악화시킬 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

본 연구는 HCV core 단백질에 의한 염증 관련 사이토카인의 발현을 HCV core가 발현되도록 제조된 플라스미드를 활막 세포에 이입하여 발현시킨 HCV core 단백질의 면역 신호 조절 작용을 관찰하였으며, 활막 세포에서도 HCV core 단백질이 NF- κ B의 활성화 경로를 통해서 IL-8의 발현을 유도함을 증명하였다. 류마티스 관절염에서 염증반응은 병을 발전시키는 중요한 요소로 작용하고 있으며, NF- κ B의 활성화를 통한 IL-8의 발현이 중요한 경로로서 밝혀져 있다(28). 이러한 이유로 류마티스 관절염의 치료를 위해서 NF- κ B의 활성화 경로를 차단하여 IL-8의 발현을 억제하는 것이 중요한 치료법으로 대두되고 있으며 이런 경로를 차단하는 물질이 연구 중에 있다(29). 따라서 HCV 감염과 류마티스 관절염이 동반된 환자에서 HCV core 단백질이 NF- κ B의 활성화를 통해 IL-8의 발현을 증가시킴으로써 류마티스 관절염이 악화될 수 있을 것이라는 것을 시사하고 있다. 따라서 이러한 환자에서는 류마티스 관절염에 대한 치료보다 HCV 제균요법이 선행되어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구결과 HCV core 단백질은 활막 세포에서 NF- κ B 경로를 활성화시켜 IL-8의 발현을 유도함을

증명하였고, 이러한 병태생리의 규명은 HCV 감염과 류마티스 관절염이 동반된 환자에서 치료 전략을 세우고 새로운 치료제를 개발하는 데 중요한 정보를 제공할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244;359-362, 1989
2. Miller RH, Purcell RH: Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 87;2057-2061, 1990
3. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat* 6;35-47, 1999
4. Seeff LB: Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36;S35-S46, 2002
5. Kanazawa H, Hirata K, Yoshikawa J: Accelerated decline of lung function in COPD patients with chronic hepatitis C virus infection: a preliminary study based on small numbers of patients. *Chest* 123;596-599, 2003
6. Rosner I, Rozenbaum M, Toubi E, Kessel A, Naschitz JE, Zuckerman E: The case for hepatitis C arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 33;375-387, 2004
7. Leirisalo-Repo M: Early arthritis and infection. *Curr Opin Rheumatol* 17;433-439, 2005
8. Zuckerman E, Yeshurun D, Rosner I: Management of hepatitis C virus-related arthritis. *BioDrugs* 15;573-584, 2001
9. Hoshida Y, Kato N, Yoshida H, Wang Y, Tanaka M, Goto T, Otsuka M, Taniguchi H, Moriyama M, Imazeki F, Yokosuka O, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M: Hepatitis C virus core protein and hepatitis activity are associated through transactivation of interleukin-8. *J Infect Dis* 192;266-275, 2005
10. Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M: Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 32;405-412, 2000
11. Moorman JP, Prayther D, McVay D, Hahn YS, Hahn CS: The C-terminal region of hepatitis C core protein is required for Fas-ligand independent apoptosis in Jurkat cells by facilitating Fas oligomerization. *Virology* 312;320-329, 2003
12. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS: Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 106;1239-1249, 2000
13. Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai MM: Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 72;3691-3697, 1998
14. Masalova OV, Atanadze SN, Samokhvalov EI, Petrakova NV, Kalinina TI, Smirnov VD, Khudyakov YE, Fields HA, Kushch AA: Detection of hepatitis C virus core protein circulating within different virus particle populations. *J Med Virol* 55;1-6, 1998
15. Sene D, Limal N, Cacoub P: Hepatitis C virus-associated extrahepatic manifestations. *Metab Brain Dis* 19;357-381, 2004
16. Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Otsuka M, Maeda S, Kato J, Omata M: Hepatitis C virus core protein activates nuclear factor kappa B-dependent signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factor. *J Biol Chem* 276;16399-16405, 2001
17. Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC: Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 72;3060-3065, 1998
18. Cho YG, Yoon JW, Jang KL, Kim CM, Sung YC: Full genome cloning and nucleotide sequence analysis of hepatitis C virus from sera of chronic hepatitis patients in Korea. *Mol Cells* 3;195-202, 1993
19. Park SH, Yang SH, Lee CG, Youn JW, Chang J, Sung YC: Efficient induction of T helper 1 CD4+ T-cell responses to hepatitis C virus core and E2 by a DNA prime-adenovirus boost. *Vaccine* 21;4555-4564, 2003
20. Lee CH, Choi YH, Yang SH, Lee CW, Ha SJ, Sung YC: Hepatitis C virus core protein inhibits interleukin 12 and nitric oxide production from activated macrophages. *Virology* 279;271-279, 2001
21. Nahmias Y, Casali M, Barbe L, Berthiaume F, Yarmush ML: Liver endothelial cells promote LDL-R expression and the uptake of HCV-like particles in primary rat and human hepatocytes. *Hepatology* 43;257-265, 2006
22. Khalkhali-Ellis Z, Bulla GA, Schlesinger LS, Kirschmann DA, Moore TL, Hendrix MJ: C1q-containing immune complexes purified from sera of juvenile rheumatoid arthritis patients mediate IL-8 production by human synoviocytes: role of C1q receptors. *J Immunol* 163;4612-4620, 1999
23. Shimoda K, Begum NA, Shibuta K, Mori M, Bonkovsky HL, Banner BF, Barnard GF: Interleukin-8 and hIRH (SDF1-alpha/PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 28;108-115, 1998
24. Moorman JP, Fitzgerald SM, Prayther DC, Lee SA, Chi DS, Krishnaswamy G: Induction of p38- and gC1qR-dependent IL-8 expression in pulmonary fibroblasts by soluble hepatitis C core protein. *Respir Res* 6;105, 2005
25. Shrivastava A, Manna SK, Ray R, Aggarwal BB: Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *J Virol* 72;9722-9728, 1998
26. Granet C, Maslinski W, Miossec P: Increased AP-1 and NF-kappaB activation and recruitment with the combination of the proinflammatory cytokines IL-1beta, tumor necrosis factor alpha and IL-17 in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 6;R190-R198, 2004
27. Sweeney SE, Firestein GS: Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 36;372-378, 2004
28. Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU, Kim HY: IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Res Ther* 6;R120-R128, 2004
29. Kohno M, Aikawa Y, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Yamada R, Kawahito Y, Inoue K, Kusaka Y, Kondo M, Sano H: Related Articles: Inhibitory effect of T-614 on tumor necrosis factor-alpha induced cytokine production and nuclear factor-kappaB activation in cultured human synovial cells. *J Rheumatol* 28;2591-2596, 2001