

수직 감염된 B형 간염 바이러스 Promoter 유전자의 변이 분석

고려대학교 의과대학원 소아과학교실, ¹연세대학교 문리대 생명과학과

이충원 · 한영나 · 이정화 · 이광철 · 하영미¹

Sequence Variations of Hepatitis B Virus Promotor Regions in Vertically Transmitted Mother-child Pairs

Choong Won Lee, M.D., Young Na Han, M.D., Jung Hwa Lee, M.D.
Kwang Chul Lee, M.D. and Young Mee Ha¹

Department of Pediatrics, Korea University School of Medicine,
¹Department of Life Science, Yonsei University

Hepatitis B viral infection which affect about 10% of Korean population manifests asymptomatic carrier, chronic hepatitis and liver cirrhosis and even associates with hepatocellular carcinoma. Clinical manifestations induced by hepatitis B virus vary depending on the degree of immune response by cytotoxic T cells against viral epitope-presenting liver cells. Since hepatitis B virus presents high rate of mutaton that might change the presented epitope and eventually alter immune response, viral mutations, especially in promoters and enhancers, have an important implication in hepatic inflammation and viral replication. To identify mutations related to the hepatic inflammation, we investigated sequence variations of hepatitis B viral promotor regions in the presence or absence of symptoms in hepatitis B carriers. For this, sera from persistently hepatitis B virus-infected mother-child pairs were collected. After PCR amplification of all hepatitis B viral promoters (C promoter, S1 promoter, S2/S promoter, X promoter) using serum DNA from each pair, viral promoters were sequenced by automatic sequencer and then sequence data were analyzed by ClustalW.

In most cases, the dominant type of maternal virus was transmitted to the child. However, in some children, some new host specific viral variants could be observed in Cp, S1p and S2/Sp. The mutations in C promoter did not seem to be vertically transmitted but arose in new host independently after the wild type had been transmitted. Enhancer I containing X promoter revealed high host specific variations as has been reported before. Two S promoters, S1p and S2/Sp, have shown some point mutations in children, but no deletion mutations were detected as in chronic

접수 : 2002년 2월 15일, 승인 : 2002년 3월 7일

책임저자 : 이광철, 136-705, 서울시 성북구 안암동 126-1, 고려대학교 의과대학 소아과학교실

Tel: 02-920-5279, Fax: 02-922-7476, E-mail: YH951637@chollian.net

hepatitis patients in whom deletion mutations are frequently found. In conclusion, the children with the vertically transmitted hepatitis B virus mostly retain the dominant type virus that had been transmitted. However, host specific variants tended to accumulate over time, possibly as clinical symptoms develop. (*Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 5: 39~50)

Key Words: Hepatitis B virus, Promoter, Mutation, Vertical transmission

서 론

세계 인구의 약 5%, 우리나라 인구의 약 8~12%를 이환하고 있는 B형 간염 바이러스는 무증상 보유자에서부터 만성 간염, 간경변, 지속적인 바이러스 증식에 의한 원발성 간암 등의 다양한 임상 양상을 보인다^{1,2)}. B형 간염 바이러스에 의한 만성 간염의 발병이나 지속적인 감염은 바이러스의 변이와 이에 대한 면역학적 반응에 의해 좌우되게 되는데 B형 간염 바이러스 감염이 있을 때의 간손상은 B형 간염 바이러스 자체에 의해서보다는 B형 간염 바이러스에 감염된 간세포를 세포독성 림프구가 공격하면서 일어나게 되며^{3,4)} 이 때 세포독성 림프구가 간세포를 공격하는 정도는 간세포가 표현하는 B형 간염 바이러스의 항원 결정기에 따라 달라지게 된다. B형 간염 바이러스에서는 매년 $1\sim3\times10^5$ 의 높은 확률로 유전자 변이가 일어나고 있는데⁵⁾ 이러한 유전자 변이에 의해 표현되는 항원 단백질의 구조가 변하게 되면 간세포에 의해 표현되는 항원 결정기의 변화가 오게 되고 이는 세포독성 림프구가 얼마나 효과적으로 간세포를 공격할 수 있는지를 좌우하게 되어 최종적으로 환자에서 염증성 증상이 나타나는 정도를 좌우하게 된다.

B형 간염 바이러스의 유전자 변이가 바이러스 유전자의 표현 양상에 영향을 주고 이에 대한 개체의 면역학적 반응을 변화시키는 것이 가능함에 따라 바이러스 유전자의 변이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. B형 간염 바이러스의 genome은 7개의 유전자를 가지고 있는데 이들은 pre-C,

C, pre-S1, pre-S2, S, P, X이고 4개의 promoter (Cp, S1p, S2/Sp, Xp)에 의해 조절된다. 이 중 C promoter (Cp)는 3.5 kb의 mRNA 전사를 조절하는데 전사된 mRNA는 pregenome으로서 C (HBc Ag), pre-C (HBc Ag), polymerase 단백질의 주형이 되며 Cp 자체는 X 단백질의 주형에 포함된다. 또 S1 promoter (S1p)는 pre-S1 단백질의 전사를 조절하는 이외에 그 자신이 polymerase 단백질의 주형에 포함되며, S2/S promoter (S2/Sp)는 pre-S2와 S 단백질의 전사를 조절하는 이외에 그 자신이 polymerase와 S 단백질 주형의 일부분이 된다. 마지막으로 Xp는 X 유전자의 전사를 조절하며 polymerase의 주형에 포함된다⁶⁾. 이들 4개의 promoter는 2개의 enhancer에 의해 활성화되는데 enhancer I은 Xp 내에, enhancer II는 Cp 내에 위치하고 있다. promoter와 enhancer에 의해 바이러스 복제와 바이러스 단백질의 표현이 조절되므로 이 부위의 변이는 간세포에 의한 바이러스 항원 결정기의 표현을 변화시킴으로써 이에 대한 생체의 면역반응에 특히 영향을 줄 것으로 생각된다. 그 한 예로서 Cp 내의 염기 서열 1762번 adenine의 thymine (A→T) 변이와 1764번 guanine의 adenine (G→A) 변이는 만성 간염 환자의 90% 이상에서 발견되는데 이는 pre-C 단백질의 발현을 억제함으로써 바이러스의 생성과 배출을 촉진하고 그 결과 혈청내 바이러스의 양이 증가한다는 보고가 있었다^{7,8)}.

우리나라에서 특히 문제가 되는 것은 높은 B형 간염 보유에 의해 B형 간염 보유 어머니에서 태어난 아기의 수직 감염이다. 최근 출생 직후의 높은 예방접종률에도 불구하고 어머니가 HBsAg 양성인

경우 70~90%에서 수직 감염이 일어나고 이들의 약 90%가 만성 보유 상태가 되는 반면⁹⁾ HBeAg 음성의 어머니인 경우 10~20%에서만 수직 감염이 일어나서¹⁰⁾ HBeAg의 존재가 바이러스의 감염이나 염증의 지속과 연관이 있음을 알 수 있다. HBeAg 유전자는 pre-C로서 Cp의 조절을 받는데 Cp 유전자의 변이와 만성 간염과의 연관성은 이미 많은 연구에서 확인된 바 있다^{11~14)}. 그러나 이러한 수직 감염시의 HBeAg 존재와 간염의 연관성과는 반대로 HBeAg이 없는 것이 오히려 전격성 간염과 연관될 수도 있는데¹⁵⁾ precore 유전자 변이 중 염기서열 1896번 guanine이 adenine (G→A)으로 변이된 경우에는 이로 인해 stop codon이 만들어지면서 C 유전자의 표현이 되지 않고 HBeAg이 음성으로 나타나게 되지만 실제 바이러스의 증식은 계속됨으로써 심한 만성 간염을 앓게 된다는 것이다¹⁶⁾. 따라서 HBeAg의 존재만으로 B형 간염을 예측할 수 없고 HBeAg 양성으로 수직 감염된 어머니와 아이의 쌍에서도 간염 발병은 다양하여 다른 B형 간염 바이러스 단백질의 표현에 관여하는 유전자 변이의 역할에 대해 연구할 필요가 있게 되었다.

Promoter의 유전자 변이가 간염의 지속 여부에 중요할 것으로 생각되나 과거 많은 연구는 주로

특정 promoter에 국한됨으로써 promoter 간의 다양한 유전자 변이가 비교되지 못한 점이 있다. 따라서 HBeAg 양성의 수직 감염쌍에서 증상의 유무에 따른 각 promoter의 유전자 변이를 비교 분석한다면 pre-C와 Cp의 유전자 변이에 더하여 바이러스의 지속이나 염증성 반응에 영향을 줄 수 있는 다른 의미있는 유전자 변이를 발굴할 수도 있을 것이다. 이에 본 연구에서는 바이러스 변이에 의한 감염과 감염의 지속 정도에 영향을 주는 유전자 변이를 알아보기 위하여 수직 감염된 어머니와 아이의 쌍에서 만성 간염이 있는 경우와 보균자의 경우를 분류하여 혈청내 B형 간염 바이러스의 4개 모든 promoter 유전자의 변이를 증상과 연관지어 분석하였다.

대상 및 방법

본 연구 대상으로 수직 감염으로 추정되는 어머니와 아이의 쌍 중에서 aspartate aminotransferase (AST)/alanine aminotransferase (ALT) 값에 따라 정상군과 만성 간염군으로 나누어 각 3쌍씩 6쌍을 선택하였다. 출산 당시 어머니들과 아이들은 모두 HBeAg 양성이고 #6 어머니는 최근 치료에 의해 HBeAg 음성으로 전환된 경우이다(Table 1). B형

Table 1. The Clinical Characteristics of Mother-Child Pairs

Patient No.	Age	HBsAg	HBeAg	Viral DNA (pg/mL)	AST/ALT
1 Child	3	+	+	NA*	37/34
Mother		+	+	878.5	37/25
2 Child	3	+	+	114.6	24/30
Mother		+	+	6000	13/17
3 Child	14	+	+	1419	47/54
Mother		+	+	4576	21/10
4 Child	11	+	+	74.6	63/82
Mother		+	+	720	32/13
5 Child	6	+	+	380.8	76/105
Mother		+	+	NA*	125/151
6 Child	11	+	+	50.5	94/137
Mother		+	-†	NA*	34/25

NA*: Not available, -†: recent seroconversion

간염 바이러스는 4개의 promoter가 바이러스 단백질과 바이러스의 복제 정도를 관장하므로 각각의 대상 혈청에서 B형 간염 바이러스의 DNA를 추출한 후 바이러스의 4개 promoter를 모두 PCR로 증폭하였고 이들에서 각각 4개씩 클론하여 분석하였다.

1. B형 간염 바이러스의 DNA 추출

간기능에 따라 정상군과 만성 간염군으로 나눈 각 쌍으로부터 혈청을 채취하여 바이러스 DNA를 분리하였다. 분리 방법은 0.5 ml의 혈청에 proteinase K, SDS, EDTA를 최종 농도가 0.5 mg/ml, 0.5 %, 5 mM 되도록 첨가하여 56°C에서 2시간 incubation한 후 phenol 추출과 phenol-chloroform 추출을 거쳐 3 M sodium acetate로 ethanol 침전시켰고 침전된 DNA는 70% ethanol로 씻은 후 20 microL의 TE에 녹여 이중 1 microL를 PCR amplification에 사용하였다.

2. B형 간염 바이러스 DNA의 PCR 증폭

환자의 혈청 0.5 ml로부터 분리된 DNA 20 microL 중 1 microL를 각각의 hepatitis B viral promoter의 PCR 증폭에 사용하였다. PCR 반응의 총

volume은 20 microL로서 DNA template 1 microL, Taq polymerase buffer (supplied with Taq polymerase), Taq polymerase 1.6 U, 200 microM의 각각의 dNTP, 8 pmole의 각각의 primer pair를 포함한 것이다. B형 간염 바이러스 promoter의 증폭에 사용된 primer의 서열은 다음과 같다.

Cp YML-5: 5'-ccaccaggtctgcccagggtcta-3'(nt. 1628-1652);
3p-4: 5'-tccaaattctttataggggtcaatg-3'(1930-1906);
S1p 5p-3: 5'-gacaaaggcattaaccgtattatcc-3'(2682-2707);
3p-5: 5'-gaggattgggaacagaagattcgt-3'(2911-2887);
S2/Sp 5p-4: 5'-gattgggactcaaccccaacag-3'(2971-2994);
3p-1: 5'-gaaaaacccgcctggaacacag-3'(214-191);
Xp 5p-1: 5'-gtatgtcaaagaattgtgggtctttg-3'(985-1011);
3p-2: 5'-acgtaacaaaggacgtcccgcg-3'(1430-1407).

3. B형 간염 바이러스 promoter의 cloning과 염기서열 분석

PCR 증폭된 B형 간염 바이러스 DNA를 polyacrylamide gel 전기영동하여 분리하였다. 각 환자에서 증폭된 다양한 크기의 viral DNA들을 모두 gel

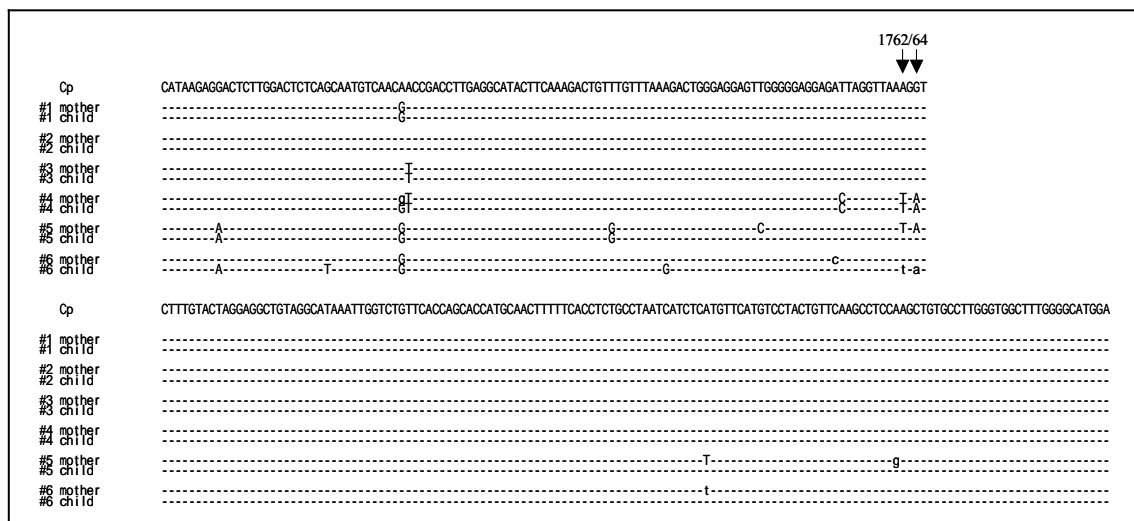


Fig. 1. The comparison of the dominant sequences of mother-child pair in C promoter regions. Shown letters indicate the sequences different from those of wild type; Capital letters for the dominant sequences more than 3 out of 4 clones and small letters for the same sequences 2 out of 4 clone.

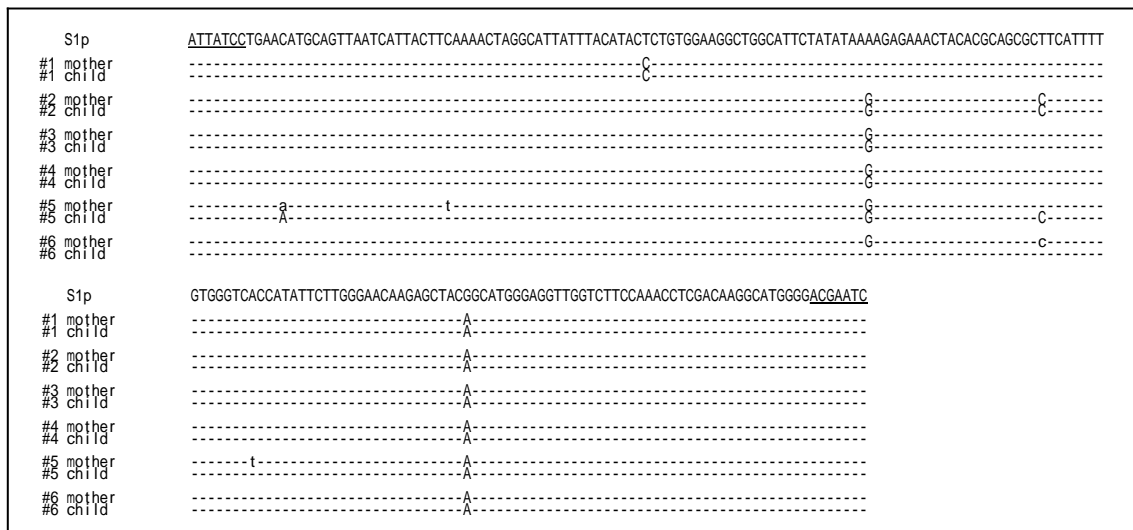


Fig. 2. The comparison of the dominant sequences of mother-child pair in S1 promoter regions.

에서 잘라내어 TE (10 mM Tris, pH 7.0, 1 mM EDTA)로 녹여낸 후 pGEM-T plasmid vector (Promega, USA)에 클로닝하였다. 각각의 promoter에서 4개씩의 clone을 골라낸 후 BigDye terminator cyclic sequencing reaction kit을 사용하여 ABI PRISM™ 자동 염기서열 분석기에서 염기서열을 결정하고 ClustalW를 사용하여 염기서열을 분석하였다.

결 과

1. 수직 감염 쌍에서 B형 간염 바이러스 각 promoter의 비교

Fig. 2~4에서는 각 대상에서 발견되는 우월형을 비교하였다. Fig에서 보는 바와 같이 어머니와 아이들에서 발견되는 바이러스는 수직 감염으로 각각의 감염쌍에서 보이는 우월형은 거의 일치하고 있음을 볼 수 있다. 그러나 #6쌍의 경우 S1p에서는 어머니와 아이의 바이러스 염기 서열이 거의 일치하나 Cp에서는 어머니와는 상이한 여러 변이가 아이에서 발견되고 있다. 수직 감염이 아닐 가능성도 있으나 S1p 염기 서열이 유사한 것으로 보아 개체 특유의 변이형이 자리를 잡고 있는 것으로 보인다. 다른 쌍에서도 #6쌍과 같이 많은 수는 아니나 어

머니와 다른 아이의 바이러스형이 존재함을 볼 수 있었다.

2. 어머니의 우월형과 아이에서의 변이형의 비교

Table 2에서 어머니와는 다른 변이된 특정 염기가 4개의 클론 중 몇 개나 존재하는지를 조사하여 특정 변이가 소아의 개체내 상대적인 우세를 획득하는 정도를 알아보려고 하였다. 어머니의 혈청내 바이러스 또한 다양한 변이형이 존재하므로(data not shown) 어머니의 우월형이 주로 소아들에게 감염되었다는 가정하에(또한 위의 조사에서 간접적으로 시사된 바 있다) 이를 기준으로 소아들에서 일어나는 변이의 정도를 비교하였다. #5와 #6의 쌍에서는 어머니의 Xp와 S2/Sp가 증폭되지 못하여 소아 자신의 우월형을 비교 대상으로 하였다. 도표 2에서 정상 AST/ALT 값을 가진 #1과 #2 아이에서 가장 적은 염기의 변화가 관찰되었고(S1p 예외) 전체적으로는 Cp와 S2/Sp에서 AST/ALT 값이 높을수록 변이가 많이 발생함을 볼 수 있으나 조사대상의 수가 적어서 일관된 현상으로 추정하기는 어려워 보인다. 그러나 #5와 #6 아이의 Cp 부위는 어머니와 전혀 다른 염기가 특이하게 발생 정착하고

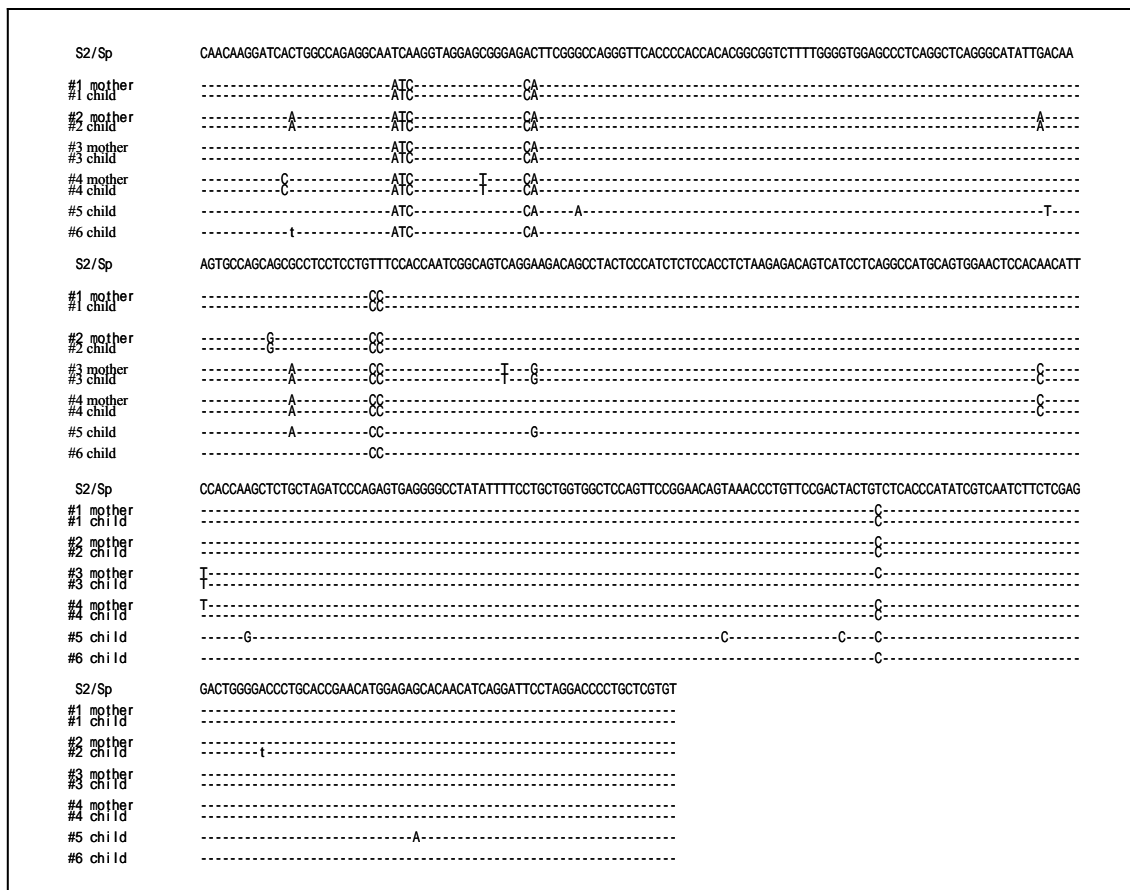


Fig. 3. The comparison of the dominant sequences of mother-child pair in S2/S promoter regions. Those of No. 5 and 6 mothers were not amplified.

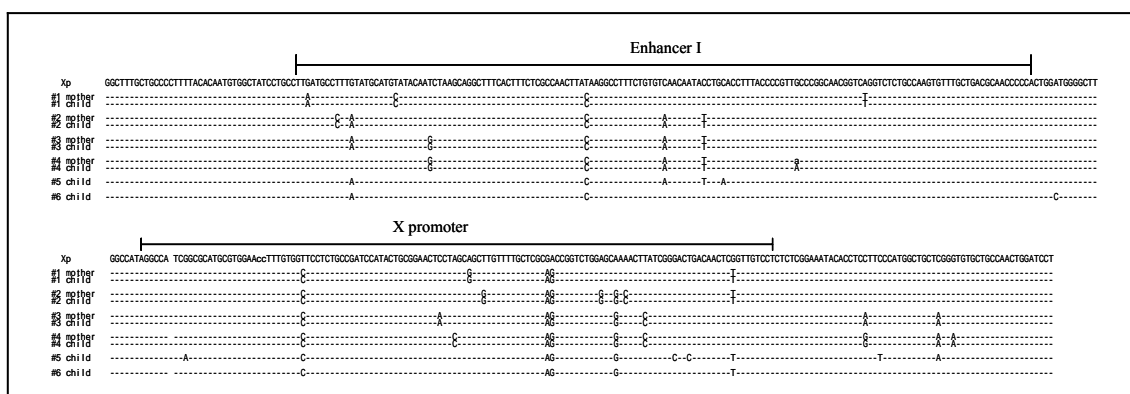


Fig. 4. The comparison of the dominant sequences of mother-child pair in X promoter regions. Those of No. 5 and 6 mothers were not amplified.

있으며 모든 promoter에서 높은 변이를 보여 주었다. 한편 B형 간염 바이러스의 promoter 부위는 promoter일 뿐 아니라 다른 단백질의 주형으로 사용되므로 promoter의 변이는 또한 다른 단백질의 변이를 가져올 수 있는데 아이들에서 바이러스 유전자 염기의 변이는 대부분의 경우에서 아미노산의 변이 또한 가져온 것을 보여준다(Table 2의 () 속 숫자 참조).

3. Cp 변이의 수직이동

현재 B형 간염 바이러스에 의한 만성 간염 환자

에서 특징적으로 발견되는 변이 중의 하나가 간세포 특이 전사인자 HNF4의 결합부위인 1762/64변이와 결손변이이다(Fig. 5). 본 연구대상 쌍의 조사에서 이러한 변이형의 존재와 발병이 항상 일치하고 있지는 않았는데 예를 들어 #3 아이는 정상 AST/ALT 값을 가지고 있었으나 4 클론 중 3 클론에서 결손변이를 가지고 있고 #5 아이는 높은 AST/ALT 값을 가지고 있으나 HNF4 결합부위의 변이가 전혀 발견되지 않았다(Table 3). 그러나 특이한 점은 이러한 만성형 바이러스 변이형이 수직 감염으로 이동하는 비율이 적다는 것이다. #5 어머니

Table 2. Number of Base Changes in Four Promoter Regions of the Children

Patient No	Cp				Xp	S1p				S2/Sp			
	1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4
1	1 (0)	0	0	0	4 (3)	0	0	0	0	2 (2:0)	0	0	0
2	2 (1)	0	0	0	1 (0)	8 (8)	0	0	0	2 (2:2)	1 (0:1)	0	0
3	0	0	1 (del)	0	6 (5)	3 (1)	0	0	0	5 (4:4)	0	0	1 (0:1)
4	0	0	0	0	1 (0)	0	0	0	0	4 (4:2)	0	0	1 (0:0)
5	1 (1)	0	0	4 (3)	[1 (1)]*	0	[2 (1)]*	0	1 (0)	[3 (1:3)]*	0	0	0
6	0	2 (2)	0	3 (3)	[5 (2)]*	3 (3)	0	0	0	[5 (4:4)]*	[1 (0:0)]*	0	0

Numbers indicate the number of point mutations that are appeared only once in all 4 clones in each child.

()* indicates the number of point mutations compared with their own dominant type.

The numbers in parenthesis indicate the number of amino acid changes deduced from the coding sequences of the respective genes.

(;) indicates the number of polymerase and S1 protein amino acid changes.

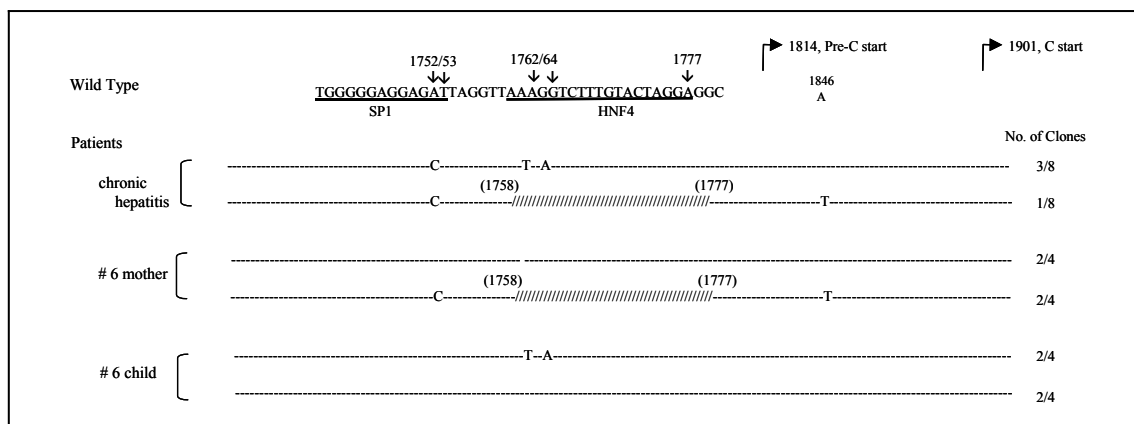


Fig. 5. The comparison of C promoter sequences of No. 6 pair with those of chronic hepatitis.

니는 4개 클론 모두에서 1762/64 변이를 가지고 있었으나 수직 감염되지 않았고 #6 어머니는 2개 클론에서 결손변이가 있었지만 수직 감염되지 않았다. 반면 #6 아이에서는 어머니에서 존재하지 않던 1762/64 변이가 발생하였다.

4. S1 및 S2/S promoter의 변이와 결손변이의 이동

만성 간염 환자에서는 Xp를 제외한 모든 promoter에서 높은 비율로 결손변이가 나타나는 것으로

Table 3. The Mother-Child Transmission of HNF4-Binding Site Sequences

	#1m*	#1	#2m*	#2	#3m*	#3	#4m*	#4	#5m*	#5	#6m*	#6
1762/1764 Mutations	-	-	-	-	-	-	4/4	4/4	4/4	-	-	2/4
Deletion	-	-	1/4 (1764~1771)	-	-	3/4 (1758~1771)	-	-	-	2/4	-	-

The # numbers indicate the children shown in table 1 and m * indicates the respective mothers. The number of clones in total 4 clones are shown. The positions of deletion mutations are shown in parenthesis ().

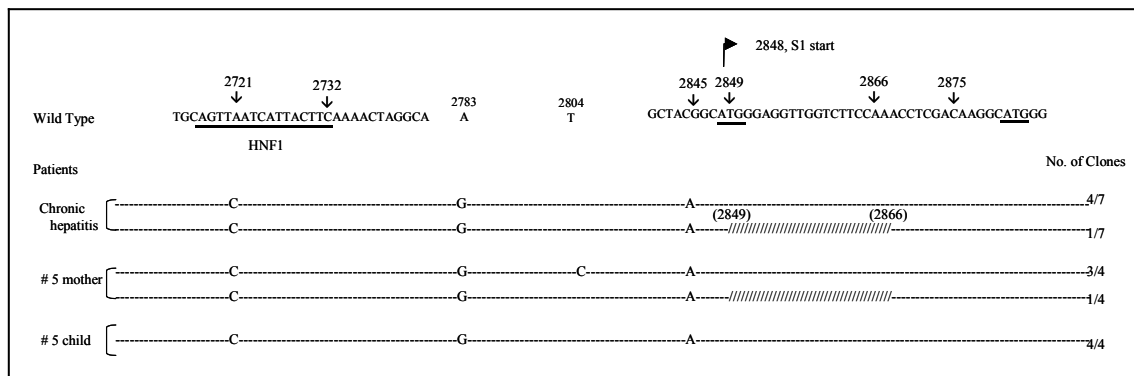


Fig. 6. The comparison of S1 promoter sequences of No. 5 pair with those of chronic hepatitis.

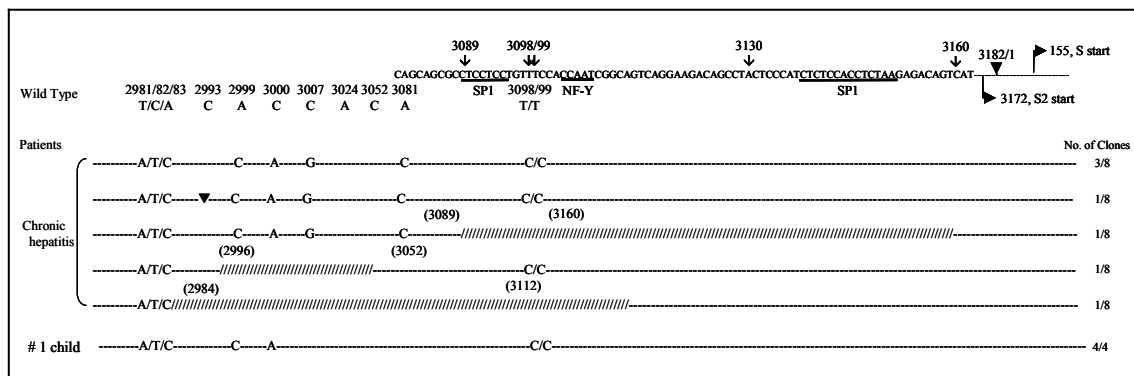


Fig. 7. The comparison of S2/S promoter sequences of No. 1 child with those of chronic hepatitis.

알려져 있다. Cp의 결손변이형은 수직 감염으로 잘 이동하지 않는 것으로 보이는데 이는 또한 S1p에서도 관찰되었고 결손변이 이외의 다른 특이 변이형은 관찰되지 않았다(Fig. 6). S2/Sp의 경우 만성 간염환자에서 보이는 중요한 전사인자 결합부위의 다양한 결손변이가 비교적 낮은 정도의 감염이 지속되는 아이들에게서도 발견되지 않았으며 전사인자 결합부위의 변이도 관찰되지 않았다(Fig. 7).

5. Xp의 변이

아이들에서 다양한 Xp의 변이가 관찰되고 있는데 Xp의 길이를 고려하면 다른 promoter와 비교하여 상대적으로 많은 변이를 가지고 있지는 않다(Table 2). 또한 어떤 변이도 우월하지는 않았고 Fig. 4에서 보여주지는 않았으나 현재 알려진 전사인자 결합부위를 결정적으로 변화시키는 변이는 발견되지 않았다.

고 찰

B형 간염 바이러스에 의한 만성 간염의 발병과 지속적 감염은 면역학적인 문제와 바이러스 자체의 변이에 의해 크게 좌우되는데 B형 간염 바이러스의 경우 변이 발생률이 높으며 체내에 오래 존재하면서 변이가 누적되는 것으로 알려져 있다. 특히 수직 감염은 국내에서 B형 간염 바이러스에 의한 만성 간염의 원인이며 치유가 매우 어려운데 본 연구에서는 바이러스 변이에 의한 감염과 감염의 지속여부를 알아보기 위하여 수직 감염시 모태에서 자손으로 감염되는 바이러스의 변이형을 분석하였다.

수직 감염시 어머니와 아이들에서 발견되는 바이러스의 우월형은 거의 일치하여서 어머니의 우월형이 주로 아이에게로 수직 이동하는 것으로 보인다. 그러나 #6쌍의 경우 S1p에서는 어머니와 아이의 바이러스 염기 서열이 거의 일치하지만 Cp에서는 어머니와 상이한 여러 변이가 아이에서 발견되고 있고 다른 쌍에서도 #6쌍과 같이 많은 수는

아니나 어머니와 다른 아이의 바이러스형이 존재함을 볼 수 있어서 이들이 수직 감염이 아닐 가능성도 있다. 그러나 S1p 염기 서열이 거의 유사한 것으로 보아 수직 감염된 후 아이에서 개체 특유의 변이형이 발생하고 이들이 우월형으로 자리를 잡고 있을 가능성이 보다 크며, 이 경우 #6 아이에서 AST/ALT 값이 매우 높고 현재 병리현상이 지속적으로 유지되고 있어서 개체 특유의 변이형 정착과 질병이 연관될 가능성을 간접적으로 추정하게 한다. 또한 B형 간염 바이러스의 promoter는 promoter일 뿐 아니라 다른 단백질의 코딩부위이므로 promoter의 염기 변이는 promoter 기능의 변화뿐 아니라 아미노산의 변이에 의한 바이러스의 기능의 변화나 면역반응을 도피하는 바이러스 변이일 수도 있다. 본 연구에서 각 promoter 염기의 변이는 대부분의 경우에서 아미노산 역시 변이시키는 것을 볼 수 있었는데 이는 바이러스의 변이가 promoter의 기능 변화뿐 아니라 단백질 변화와 이로 인한 면역작용으로부터의 도피 현상을 초래할 수 있음을 시사한다.

현재 B형 간염 바이러스에 의한 만성 간염 환자에서 특이적으로 발견되는 것은 간세포 특이 전사인자인 HNF4 결합부위의 1762/64 변이와 결손변이이다^{8,16-22}). 현재 이 부위의 변이가 만성 간염의 발병이나 유지에 관여하는지의 여부는 알려진 바 없으므로 이 부위의 변이를 수직 감염으로 획득하였을 경우 질병의 발병과 지속이 연관되는지를 살펴볼 필요가 있는데 본 연구에서는 HNF4 결합부위 변이형의 존재와 발병이 항상 일치하고 있지는 않았다. Table 3에서 #3 아이는 정상 AST/ALT 값을 가지고 있었으나 75%에서 결손변이를 가지고 있고 #5 아이는 높은 AST/ALT 값을 가지고 있으나 HNF4 결합부위의 변이가 전혀 발견되지 않았다. 또한 #5 어머니는 100%에서 1762/64 변이를 가지고 있었으나 아이에게는 없었고 #6 어머니는 50%에서 결손변이가 있었지만 아이에게 없었으며 반면 #6 아이에서는 어머니에서 존재하지 않던 1762/64 변이가 발생하여 이러한 만성형 바이러스 변이형이 수직 감염으로 이동하는 비율이 적음을

보여 주고 있다. 아이에서 어머니의 만성형 바이러스 변이형이 보이지 않는 이유로 생각할 수 있는 것은 아이에게 이러한 변이형이 수직 감염되지 않아서일 수도 있지만 또 다른 가능성으로는 감염이 일어난 시기는 환자의 나이만큼 전이므로 이 시기에 어머니가 간내 염증 반응이 없는 면역 관용기 (immune tolerance phase)에 있었다면 어머니의 혈중 바이러스는 변이형보다는 야생형일 가능성이 높고 따라서 이러한 야생형이 수직 감염되게 되면 아이에서는 야생형의 바이러스가 존재할 것이고 현재는 어머니가 간내 염증반응이 활발한 면역 제어기 (immune clearance phase)를 맞아 변이형이 검출되고 있을 가능성이 있다.

만성 간염 환자에서는 Xp를 제외한 모든 promoter에서 높은 비율로 결손변이가 나타나는 것으로 알려져 있는데^{19,23,24} 수직 감염에서 Cp의 결손변이형은 잘 이동하지 않았고 이는 또한 S1p에서도 관찰되었으며 이전 연구에서와 마찬가지로 결손변이 이외의 다른 특이 변이형이 S1p에서 관찰되지는 않았다. S2/Sp의 경우 만성 간염 환자에서는 중요한 전사인자 결합부위가 전반적으로 결손되는 다양한 변이가 많이 발견되는데 이러한 결손변이는 비교적 낮은 정도의 감염이 지속되는 아이들에게서도 발견되지 않았고 전사인자 결합부위의 변이도 관찰되지 않아서 S1p 및 S2/Sp 부위의 변이는 비교적 감염이 깊이 진행된 후에 발생하는 것으로 생각된다.

본 연구에 의하면, 수직 감염 시 모태의 주된 바이러스형이 아이에게 감염되는 것으로 보인다. 아이에서 어머니의 만성형 바이러스 변이가 보이는 경우는 적고 결손되지 않은 정상형에 가까운 바이러스가 주된 바이러스형으로 보이는데 이는 어머니의 만성형 바이러스가 수직 감염은 되었으나 정상형에 가까운 바이러스 형이 새로운 숙주(수직감염된 아이)에서 상대적으로 우세하게 증폭하여 감염을 정착시켰을 가능성과, 출산 당시에 어머니가 면역 관용기에 있음으로써 야생형의 바이러스가 수직 감염되었고 이후 어머니는 면역 제어기에 있음으로써 현재는 만성형의 바이러스 변이를 보이

고 있을 가능성도 있다. 또한 본 연구에서 일반적으로 높은 AST/ALT 값을 가진 아이에서 많은 변이가 발견되었기는 하나 발병의 원인을 바이러스의 변이에 한정하여 설명할 수는 없어 보인다. 다만 모태의 바이러스가 정착한 후 숙주 특이 변이형 바이러스가 새로이 발생하고 이의 우위적 증폭과 질병의 발병이 연관됨을 볼 수 있었다. 이전의 만성 간염 환자 연구에서 발견되었던 다양한 결손변이가 관찰되지 않는 것으로 보아 이러한 결손변이는 비교적 감염이 깊이 진행된 후에 발생하는 것으로 보여진다. 그러나 결손변이와 Cp내의 1762/64 변이는 만성 간염과 깊은 연관이 있고 상대적으로 AST/ALT 값이 높은 소아에서도 많이 발견되고 있으므로 질병의 진행과 연관하여 참조할 필요가 있겠다. 본 연구의 결과로서 바이러스 변이형의 발생과 B형 간염질환과의 연관성을 정확하게 추정할 수는 없으나 전사인자 결합부위의 빈번한 변이와 수직 감염 후 새로운 숙주에서의 개체 특이성 변이 발생, 그리고 이들이 우월형으로 정착되는 등의 반응은 바이러스 단백질의 발현 정도와 숙주의 HLA 등의 환경에 따른 병리의 연관성을 시사하고 있으며 앞으로 이에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

B형 간염 바이러스에 의한 만성 간염의 발병과 지속적 감염은 면역학적인 문제와 바이러스 자체의 변이에 의해 크게 좌우되는데 B형 간염 바이러스의 경우 변이 발생률이 높으며 체내에 오래 존재하면서 변이가 누적되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 바이러스 변이에 의한 감염과 감염의 지속 정도에 영향을 주는 유전자 변이를 알아보기 위하여 수직 감염된 어머니와 아이의 쌍에서 만성 간염이 있는 경우와 보건자의 경우를 분류하여 혈청내 B형 간염 바이러스의 4개 모든 promoter 유전자의 변이를 증상과 연관지어 분석함으로써 바이러스 유전자 변이를 분석한 결과, 수직 감염시 모태의 주된 바이러스형이 소아에게 감염되는 것으

로 보였으며 이 때 Cp의 개체 내 변이형의 정착은 병리현상과의 연관성을 제시하지만 Cp 내의 변이와 결손변이를 보이는 만성형 바이러스는 수직 감염과는 연관이 적은 것으로 보였고 S1p 및 S2/Sp의 결손변이를 보이는 만성형 바이러스는 수직 감염과 연관이 적은 것으로 보였다.

결론적으로 높은 AST/ALT를 보이는 아이에서 많은 바이러스 유전자 변이가 발견되기는 하나 발병의 원인을 바이러스의 변이에만 한정하여 설명할 수는 없었으며 어머니의 바이러스가 정착한 후 아이 특이 변이형 바이러스가 새로이 발생하고 이들이 우위적으로 증폭되면서 질병의 발병이 연관되는 것 같다.

참 고 문 헌

- Maynard JE, Hepatitis B: global importance and need for control. *Vaccine* 1990; 8(Suppl):18S-20S; discussion 21S-23S.
- Hoofnagle JH, Shafritz DA, Popper H. Chronic type B hepatitis and the "healthy" HBsAg carrier state. *Hepatology* 1987;7:758-63.
- Ferrari C, Penna A, Bertolotti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, et al. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1990;15:145:3442-9.
- Chu CM, Shyu WC, Kuo RW, Liaw YF. HLA class I antigen display on hepatocyte membrane in chronic hepatitis B virus infection: its role in the pathogenesis of chronic type B hepatitis. *Hepatology* 1988;8:712-7.
- Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn J Exp Med* 1987;57:231-6.
- Zakim D, Boyer TD. *Hepatology*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1996;1151-5.
- Li J, Buckwold VE, Hon MW, Ou JH. Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. *J Virol* 1999; 73:1239-44.
- Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 1996;70:5845-51.
- Shimizu H, Mitsuda T, Fujita S, Yokota S. Perinatal hepatitis B virus infection caused by antihepatitis B e positive maternal mononuclear cells. *Arch Dis Child* 1991;66:718-21.
- Ruiz-Moreno M, Camps T, Aguado JG, Porres JC, Oliva H, Bartolome J, et al. Serological and histological follow up of chronic hepatitis B infection. *Arch Dis Child* 1989;64:1165-9.
- Mayerat C, Mantegani A, Spertini F, Frei PC. Mutations in the basal core promoter and precore/core gene of hepatitis B virus in patients with chronic active but not acute hepatitis B. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:871-8.
- Gerner P, Lausch E, Friedt M, Tratzmuller R, Spangenberg C, Wirth S. Hepatitis B virus core promoter mutations in children with multiple anti-HBe/HBeAg reactivations result in enhanced promoter activity. *J Med Virol* 1999;59:415-23.
- Friedt M, Gerner P, Lausch E, Trubel H, Zabel B, Wirth S. Mutations in the basic core promoter and the precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999;29:1252-8.
- Kurosaki M, Enomoto N, Asahina Y, Sakuma I, Ikeda T, Tozuka S, et al. Mutations in the core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1996;49:115-23.
- Sato S, Suzuki K, Akahane Y, Akamatsu K, Akiyama K, Yunomura K, et al. Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann Intern Med* 1995;122:241-8.
- Baumert TF, Marrone A, Vergalla J, Liang TJ. Naturally occurring mutations define a novel function of the hepatitis B virus core promoter in core protein expression. *J Virol* 1998;72:6785-95.
- Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ. Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J Clin Invest* 1996;98: 2268-76.
- Horikita M, Itoh S, Yamamoto K, Shibayama T, Tsuda F, Okamoto H, et al. Differences in the entire nucleotide sequence between hepatitis B virus genomes from carriers positive for antibody to hepatitis

- B e antigen with and without active disease. *J Med Virol* 1994;44:96-103.
- 19) Ha-Lee YM, Lee J, Pyun H, Kim Y, Sohn J, Cho YJ, Kim Y. Sequence variations of hepatitis B virus promoter regions in persistently infected patients. *Arch Virol* 2001;146:279-92.
- 20) Kanai K, Kako M, Aikawa T, Hino K, Tsubouchi H, Takehira Y, et al. Core promoter mutations of hepatitis B virus for the response to interferon in e antigen-positive chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:2150-156.
- 21) Moriyama K. Reduced antigen production by hepatitis B virus harbouring nucleotide deletions in the overlapping X gene and precore-core promoter. *J Gen Virol* 1997;78:1479-86.
- 22) Takahashi K, Akahane Y, Hino K, Ohta Y, Mishiro S. Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol* 1998;143:2313-26.
- 23) Chen WN, Oon CJ. Mutations and deletions in core promoter and precore stop codon in relation to viral replication and liver damage in Singaporean hepatitis B virus carriers. *Eur J Clin Invest* 2000;30:787-92.
- 24) Laskus T, Rakela J, Tong MJ, Nowicki MJ, Mosley JW, Persing DH. Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletions in the core promoter region. *J Hepatol* 1994;20:837-41.
-