

# N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine에 의한 Adenovirus Type 12 Transformation의 증진

서울대학교 의과대학 미생물학교실

최 성 배

=Abstract=

## Enhancement of Adenovirus Type 12 Transformation by N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine

Sung-Bae Choi

Department of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University,  
Seoul 110-799, Korea

Adenoviruses are icosahedral virions containing double-stranded linear DNA. They are 70 nm to 90 nm in diameter and capsid is composed of 252 capsomeres. Several members of this group, including types commonly associated with respiratory disease in man, are capable of producing malignant tumors in young hamsters and a few types have been shown to be oncogenic in young rat. Previous report involving effect of caffeine on transformation induced by Adenovirus type 12 [9] has been carried out. The present report represents a continuation of previous study.

To obtain evidence concerning the effect of MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) on transformation, investigation of adenovirus type 12 of this group was undertaken. For practical consideration it was desirable to investigate the effect of MNNG on the adenovirus type 12-induced transformation in L cell.

Results were as following

1. Adeno virus type 12 induced transformation was enhanced in the presence of MNNG.
2. Yields of adeno type 12 virus in L cell were slightly inhibited by treatment of MNNG.

**Key Words:** Adenovirus type 12 transformation

## 서 론

Adenovirus는 직경이 70~90 nm되고 252개의 capsomere를 가진 20면체 (icosahedron)이고 핵심이 linear, double strand DNA로 되어 있으며 감염 세포의 핵내에서 증식되고 조립되며 세포의 파괴에 의해서 방출된다.

이 바이러스들은 viral capsid의 hexon complement를 수반하는 common group specific complement antigen을 가지고 있다.

사람에게서 Adenovirus가 감염되면 급성인두염, 기관지염, 결막염을 일으킨다. 또한 별로 증상 없이 편도선이나 위장관 감염이 흔히 나타난다.

어떤 바이러스 주들은 사람의 호흡기질환과 관련되어 있으며, 이런 바이러스들 (type 12, 18, 31)을 어린 hamster에 접종했을 때 악성종양을 형성할 수 있다.

이 바이러스의 특성은 많은 양의 보체결합 항원을 형성하는데 비하여 비교적 낮은 바이러스 역가 (virus titer)를 나타내고 있다.

Adenovirus type 1, 2, 5 들은 외과적으로 제거

된 편도나 아데노이드에서 발견되었고 소아의 산발적인 증상이 약한 호흡기질환 (sporadic mild respiratory illness)과 관련되고 있다.

그간의 연구들은 Adenovirus로 감염된 세포의 핵내에서 일어나는 세포성 변화 [1,2]나 생물학적특성 [3,4], Adenovirus의 transformation에 미치는 호르몬 및 카페인 등의 영향들을 연구 보고 하였다.

본 연구에서는 종양원성 바이러스인 Adenovirus type 12의 transformation에 미치는 영향을 연구하기 위하여 L292세포를 배양한후 Adenovirus type 12로 접종하고 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)로 처리하여 transformed clone 형성에 미치는 영향을 연구 검토 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 바이러스

Adenovirus type 12가 사용되었다.

### 2. 세포배양

L929 세포 (L세포)와 HeLa 세포가 사용되었고 전 방법 [5~9]과 같이 배양되었고 L세포는 transformation용으로 HeLa세포는 L세포 접종후 바이러스 역가측정 (virus titration)용으로 사용되었다. 세포배양액은 modified Eagles minimal essential media에 10% 가열 비동화된 우혈청과 penicillin G (1,000,000 U/l)와 dihydro-streptomycin sulfate (100 mg/l)를 가하여 사용하였다.

### 3. 바이러스 감염역가 측정 (virus infectivity titration)

바이러스 직정은 B.S.S.로 3번 세척한 HeLa세포를 사용하여 전 방법 [5,6,8]과 같이 HeLa세포

의 50% (혹은 그이상)정도가 세포병변 (cytopathic effect)이 왔을 때 감염되었다고 판단하였다.

Infectivity titer의 종말점은 접종된 실험판에서 반이상이 감염되었을 때 계단 희석된 바이러스의 최고 희석배수로 산정되었다.

### 4. M.N.N.G (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)처리

바이러스 접종후 1~4시간에 해당농도 (0.03, 0.3, 3.0 µg/dish)의 MNNG를 가하였다.

### 5. Transformation assay

바이러스 접종후 4일간 배양한 다음 새로운 배지액으로 교환하였다. L세포 배양후 약 20시간에 trypsin 처리를 하고,  $1 \times 10^6$  cell/ml의 농도로 하여 동일량의  $10^9$  PFU/ml을 포함한 바이러스액을 가하였다.

그후 37°C에서 1시간 둔 다음 300개의 세포를 petridish에 분주하고 3~4일후 세포배양 배지를 교환하였다. 2일전, 2일~10일 배양후 transformed clone을 산정하였다.

## 결과 및 성적

### 1. MNNG의 Adenovirus type 12 transformation에 미치는 영향

배양된 L세포에 Adenovirus type 12 접종후 MNNG를 처리하여 시간적 경과에 따르는 transformed clone을 산정한 성적으로 Table 1에서 보는 바와 같이 MNNG처리가 처리하지 않은 대조보다 transformed clone 형성이 증진되었다. MNNG의 농도가 높은 3.0 µg이 0.3 µg, 0.03 µg보다 현저히 더 증진되었다.

**Table 1.** Effect of MNNG on the efficiency of adenovirus type 12 transformation

Chemical	Concentration (µg/dish)	Total number of colonies <sup>a</sup>	Transformed foci <sup>b</sup>
None		263	4.2
MNNG	0.03	245	4.4
	0.3	233	11.3
	3.0	112	19.2

<sup>a</sup> Each of the five plates were seeded with 1000 cells, and colonies were counted in 7 to 8 days.

<sup>b</sup> Each figures represent the mean of transformed foci counted in 10 plates.

**Table 2.** Temporal effect of MNNG on adenovirus type 12 induced transformation after infection

MNNG present (days)	No. of transformed colonies per plate
none	4
2-0	5
0-2	5
0-4	7
0-6	8
0-8	10
0-10	11

**Table 3.** Yields of adenovirus type 12 from L cells with or without MNNG

Days after inoculation	Viurs titers	
	Without MNNG	Presence of MNNG
Input	1.4	1.4
1	1.7	1.5
2	2.4	2.2
3	2.7	2.5
4	2.9	2.7

### 2. Adenovirus type 12에 의한 transformation에 미치는 MNNG 처리시간의 영향

배양된 L세포에 바이러스 접종후 여러 시간적 변화에 따르는 MNNG 처리가 transformed clone 형성에 미치는 영향을 검토한 성적으로 Table 2에서 보는바와 같이 바이러스 접종후 여러날 MNNG 처리한 군이 처리되지 않는 대조보다 현저히 clone 형성이 더 증진되었다. MNNG 처리일수가 길어질수록 점진적으로 clone형성이 증진되었다. 그러나 8일후는 별로 영향이 없었다. 또한 바이러스 접종 2일전에 MNNG 처리한 데서는 처리하지 않는 대조와 비교하여 다소 증진되었으나 접종후 처리한것보다 현저한 차이가 없었다.

### 3. Adenovirus type 12 생성에 미치는 MNNG의 영향

L세포 배양후 Adenovirus type 12 접종후 MNNG로 처리한 시간적 변화에 따라서 바이러스 생성 (virus yield)을 관찰한 성적으로 HeLa세포를 사용하여 적정 (titration)하였다.

Table 3에서 보는바와 같이 L세포에서 바이러스치는 MNNG 처리 군이나 처리하지 않은 군이나 모두 전반적으로 낮았다.

그러나 MNNG 처리군이 처리하지 않은 대조보다 바이러스치가 다소 억제되었다.

## 고 찰

Adenovirus는 그간 분리된 100개 이상의 혈청형 중 40개 혈청형 이상이 사람에게 감염을 일으키고 있다. 사람에서 Adenovirus가 감염되면 급성인두염, 기관지염, 결막염을 일으킨다. 또한 별

증상없이 편도선이나 위장관 감염이 흔히 나타난다.

어떤 바이러스 주들은 사람의 호흡기질환과 관련이 있으며 이런 바이러스들 (type 12, 18, 31)을 신생 hamster에 접종했을 때 악성종양을 형성할수 있다. 이 바이러스의 특성은 많은 양의 보체결합항원을 형성하는데 비하여 비교적 낮은 바이러스 역가를 나타낸다. Adenovirus type 1, 2, 5 들은 외과적으로 제거된 편도나 아데노이드에서 발견되었고 소아의 산발적인 증상이 약한 호흡기질환 (sporadic mild respiratory illness)과 관련이 되고 있다. Adenovirus type 12를 hamster에 접종후 종양을 형성한 이래 Adenovirus가 종양 바이러스의 model로서 여러학자들에 의해서 연구되어 왔다. 그러나 첫번째 난관은 역가측정 (titration) 방법이였다. 측정은 되었으나 낮은 바이러스치를 나타냈다. 증식성세포 (productive cell)에서는 다소 높은 바이러스 역가를 나타냈으나 비 증식성세포 (non-productive cell)에서 더욱 낮은 역가를 나타냈다.

본 연구는 전연구 [9]에 이어서 Adenovirus type 12의 transformation에 미치는 MNNG의 영향에 대한 연구를 시행한 것이다. 본 실험에서 MNNG에 의한 Adenovirus type 12의 transformation의 증진에 대한 기전은 확실히 설명하기 어려우나 MNNG가 mutagen이며 critical target은 DNA로 사료된다. 따라서 cell DNA에서 유발된 lesion이 바이러스 유전자의 integration의 new site로 제공되기도 한다.

재언하면 본 연구에서 Adenovirus type 12의 transformation의 증진은 viral DNA의 영향에 기인한 것으로 사료된다. 따라서 mutation, chromosomal aberration과 viral transformation에 cell susceptibility의 induction의 관계들이 설명되어야 할 과제로 남아있는 것이다.

## 결 론

종양바이러스의 하나인 Adenovirus type 12를 비 증식성세포인 L929 cell에 접종한후 MNNG의 함량의 변화와 시간별로 처리하며 transformation clone형성에 미치는 영향을 검토한 성적으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Adenovirus type 12에 의한 L세포에서 transformed clone 형성은 MNNG로 처리함으로써 대조보다 더 증진되었다.

2. L세포에서 Adenovirus type 12를 접종후 MNNG로 시간별로 처리했을 때 8일까지 점진적으로 Transformed clone이 증진되었으나 그후 증진이 약화되었다.

3. 비 증식성세포인 L세포에서 Adenovirus type 12의 생성은 낮은 적정치를 나타냈다. 그러나 MNNG로 처리했을 때 처리하지 않은 대조보다 근소하게 더 억제되었다.

### 참 고 문 헌

1. Horford Co, Hamlin A, Parfer E, Van Ravenswaay T: Electron microscopy of HeLa cells infected with adenovirus. J Exper Med 104: 433-454, 1956.
2. Boyer GS, Leuchted barger C, Ginsberg HS: Cytological studies of HeLa cells infected with adenovirus. J Exper Med 105: 195-214, 1957.
3. Fisher TN, Ginsberg H: Accumulation of organic acid by HeLa cells infected with Type 4 Adenovirus. Pro Soc Exper Biol and Med 95: 47-51, 1957.
4. Levy HB, Rowe WP, Shell Baker LF, Hartly JW: Biochemical changes in HeLa cells associated with infection by type 2 adenovirus. Pro Soc Exper Biol and Med 96: 732-738, 1957.
5. Choi SB: A study on the sensitivity of various cell line to adenovirus infection. Korea J Virol 13: 43-46, 1983.
6. Choi SB: Production and Release of Adenoviurs and its Antigen. Korea J Virol 16: 147-150, 1986.
7. Choi SB: Stability of Adenoviruses by alternation of temperature and PH. Korea J Virol 17: 135-138, 1987.
8. Choi SB: The multiplication curves and cytopathic changes obtained with varing inocula of adenoviurs. Korea J virol 19: 165-168, 1989.
9. Choi SB: Effect of Caffeine on Transformation Induced by adenovirus type 12. Korea J Virol 26: 269-272, 1996.