

간암세포주 HepG2 2.2.15에서 아만타딘/비페닐디메틸디카르복실레이트 복합제의 항 바이러스효과

주성수 · 원태준 · 이용진 · 황광우 · 이도익#
중앙대학교 약학대학

(Received January 6, 2005; Revised March 21, 2005)

Antiviral Effect of a Combination Therapy of Amantadine/Biphenyl Dimethyl Dicarboxylate in HepG2 2.2.15

Seong-Soo Joo, Tae-Joon Won Yong-Jin Lee, Kwang-Woo Hwang and Do-Ik Lee#
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — For decades, the demand for new antiviral strategies, especially in hepatitis, has increased markedly due to its devastating pathogenic outcome. In the present study, we examined the antiviral effect of the combination of amantadine and biphenyl dimethyl dicarboxylate (DDB) in HepG2 2.2.15, which is transfected with HBV DNA. The study demonstrated that the combination not the single treatment may have an anti-HBV effect through a synergism of antiviral, anti-inflammatory and cytoprotective activities in STAT1 α , 6-16 gene, and pro-inflammatory components such as nitric oxide and IL-1 β expression. In addition, hepatitis B surface and core gene expression were examined as a final end point for the anti-HBV activities, which was also significantly suppressed comparing to normal control ($p < 0.01$).

Keywords □ amantadine, DDB, hepatitis B surface gene, hepatitis B core gene, HepG2 2.2.15

Human hepatitis B virus(HBV) 및 hepatitis C virus(HCV)는 전 세계적으로 중요한 질병으로 분류되고 있으며, 이는 건강보균상태에서 난치성 간염 및 만성간염까지의 폭넓은 임상적 스펙트럼을 가지고 있기 때문이다.¹⁾ 그동안 많은 연구가 수행되었음에도 불구하고 수 십년간 사용되어온 인터페론을 대체할 만한 치료법이 없었던 것이 현실이었다. 그러나 근래에 들어와 HBV DNA polymerase 활성을 억제시켜 HBV의 복제증식을 억제하는 nucleoside analogue제제가 나오면서 인터페론에 비해 안전하고 효과적인 치료법으로 많은 바이러스 간염환자에게 희망을 주었으나, 이 제제 역시 돌연변이체에 대한 한계에 직면해 있다.^{2,3)} 최근 부각되고 있는 anti-HBV 요법으로서 adefovir dipivoxil (phosphonated acyclic purine nucleoside analog), L-FMAU (thymidine analog), FTC(deoxycytidine analog), 및 entecavir (carbocyclic deoxyguanosine analog) 등이 있으며,^{4,7)} 본 연구에

서는 항 바이러스제인 amantadine과 간염치료제인 DDB를 복합투여 시 나타나는 항 바이러스상승 효과를 탐색하고자 하였다. 일반적으로 amantadine은 human influenza A 감염의 예방 및 치료제로서 효과적이며,⁸⁾ 이와 같은 antiviral 작용기전은 확실히 규명되어 있지 않지만 바이러스의 uncoating을 저해하여 바이러스의 복제를 방지하는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 또한 오미자 (Schizandrae fructus)로부터 단리된 성분인 Schizandrin C의 합성제제인 DDB는 간의 지질과산화물을 억제시키고 마이크로솜 효소계에 중요한 cytochrome P-450계에 phenobarbital과 유사한 효소활성 유도작용을 나타내 독성물질의 불활성화를 유도하며, NF- κ B의 활성억제를 통해 항염작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 특히 동물 및 임상실험에서 간효소인 alanine aminotransferase(ALT)를 정상화시켜주는 효과를 가지며, 약물 특이적인 이 화학적변화는 없는 것으로 알려져 있다.^{11,12)} 따라서 본 연구는 분자생물학적인 방법(RT-PCR, western blot, ELISA, NO assay 등)을 통해 amantadine의 antiviral 효과와 DDB의 항염 및 세포보호효과로부터 나타내는 상승효과에 대한 기전을 규명하고자 하였으며, 간암세포주인 HepG2에 HBV gene을 도입(transfection)

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5608 (팩스) 02-820-5608
(E-mail) leedi@cau.ac.kr

하여 개발된 HepG2 2.2.15 세포주를 모델로 한 *in vitro* 실험을 통해 약물부작용의 문제점이 배제된 새로운 anti-HBV 복합처방의 가능성을 제시하고자 하였다.

실험재료 및 방법

Amantadine(Sigma-Aldrich, U.S.A.) 및 DDB(오리엔탈제약)는 각각 3차중류수, 아세트니트릴에 녹여 stock solution(10X)을 만들어 -20°C에 저장하였고, 실험 시 microfiltered 배양매지에 희석하여 세포에 대한 자극을 최소화하였다(최종농도 : interferon- α , 1000IU; amantadine, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; DDB, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). HBV *in vitro* 모델로서 HepG2 2.2.15(human hepatoblastoma cell line)을 사용하였으며, 10 mM HEPES, 5% fetal bovine serum(FBS), 100 IU/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 함유된 RPMI1640 배지에서 배양하여 실험에 사용하였다.

세포로부터 분리되는 nitric oxide(NO) 측정을 위해 modified griess reagent system(Sigma, U.S.A.)을 사용하였다. 즉 반응시간 종료 후 각 well의 배양액 50 μl 를 취해 96-well plate에 옮긴 후 동량의 griess 시약을 첨가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 비교분석하였다. RT-PCR(reverse transcriptase polymerase chain reaction) 분석을 위해 각 plate well(6-well)의 세포수가 1.5×10^5 개/ml이 되도록 분주하여 각 군마다 적정 농도의 약물을 전 처리하였으며, 반응시간 종료 후 약 1×10^7 개/ml의 세포로부터 Trizol[®] reagent(Life Technology, U.S.A.)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다.¹³⁾ PCR결과에 대한 internal control로서 GAPDH를 사용하였으며, 각 gene에 대한 primer sequence는 NCBI의 nucleotide를 인용하여 Fast PCR tool에서 조합되는 최적sequence를 선택하였다(HBcAg, sense: 5'-gga ccc tgc acc gaa cat gg-3, anti-sense: 5'-acg ccg cag aca cat cca gc-3 (253 bp); HBsAg, sense: 5'-gaa gca ccc aag tgt cct gg-3, anti-sense: 5'-aaa cgg act gag gcc cac tc-3(380 bp); 6~16 gene, sense: 5'-caa gct taa ccg ttt act cgc tgc tgt-3, anti-sense: 5'-tgc ggc cgc tgc tgg cta ctc ctc acc t-3(553 bp); IL-1 β , sense: 5'-tga agt gct cct tcc agg ac, anti-sense: 5'-tcc ttg agg ccc aag gcc ac(445 bp); GAPDH, sense: 5'-cca tca cca tct tcc agg ag-3, anti-sense: 5'-cct gct tca cca cct tct tg-3(576 bp)). 또한 단백질 분석을 위해 western blot을 수행하였다. 즉, cell lysate 으로부터 추출된 단백질 30 μg 을 10% SDS-PAGE로 분리 후 PVDF membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% nonfat dry milk/TBS-T로 실온에서 1시간 blocking 한 후 TBS-T에 희석된 anti-STAT1 α (Zymed, U.S.A.), anti-NF- κB /Rel-A(Delta Biolabs, U.S.A.)를 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 1차 항체 처리 후 anti-mouse 또는 anti-rabbit Ig-horse radish peroxidase (Zymed, U.S.A.) 2차 항체를 붙여 ECL(enhanced chemiluminescence luminogram) reagent(Amersham)로 반응시켜 필름에 노출하였다.

science luminogram) reagent(Amersham)로 반응시켜 필름에 노출하였다.

통계처리

결과분석은 GraphPad Prizm 4 software를 이용하여 $p < 0.05$ 일때 통계적 유의성이 있음을 인정하였고, PCR 및 western blot 결과의 분석은 gel/membrane band scanning 후 UVIDocMW program을 통해 band intensity의 상대비교 분석을 실시하였다.

실험결과 및 고찰

In vitro 간염모델인 HepG2 2.2.15 세포주에서 nitric oxide(NO) 생산과 genomic HBV DNA 발현과의 상관관계를 관찰하기 위해 Fig. 1에서 보이는 것처럼 각 약물을 동일한 조건 하에서 투여하여 5일간 반응시킨 후 griess reagent system을 이용하여 세포로부터 생산되어 방출된 NO 농도를 측정하였다. 급격한 NO 농도의 상승은 모든 군에서 관찰되지 않았으나 대조군에 비하여 amantadine/DDB(AD)군에서 유의한 상승수치($p < 0.05$)를 보였으며, 이는 interferon- α 군에 비해 약 2배 이상의 현격한 농도차이를 보였다. 이와 같은 NO 농도는 세포생존에 영향을 주지 않는 저 농도이나 항 바이러스제의 항바이러스 활성에 영향을 줄 수 있는 요소로 생각된다. 이와 같은 결과는 iNOS(inducible nitric oxide synthase)가 결핍된 HBV transgenic mice에서 interferon γ 의 항바이러스 효과가 NO-의존적으로 나타난다는 연구결과와 밀접한 관계가 있다.¹⁴⁾

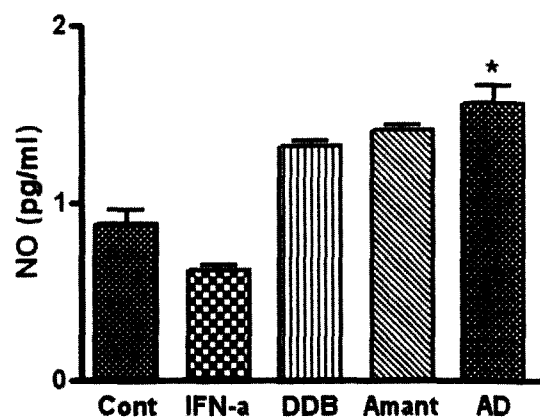


Fig. 1 - Comparison of nitric oxide (NO) production in culture media after five days of incubation with each experimental drug. NO increase was found in DDB, amantadine, and DDB/amantadine combination group compared to positive control (interferon-alpha). Cont. culture media, IFN- α . interferon- α , DDB. biphenyl dimethyl dicarboxylate, amant. amantadine, AD. amantadine+DDB. Values for nitric oxide are expressed as mean \pm SD for triplicate measurement. * $p < 0.05$ vs. control (t-test).

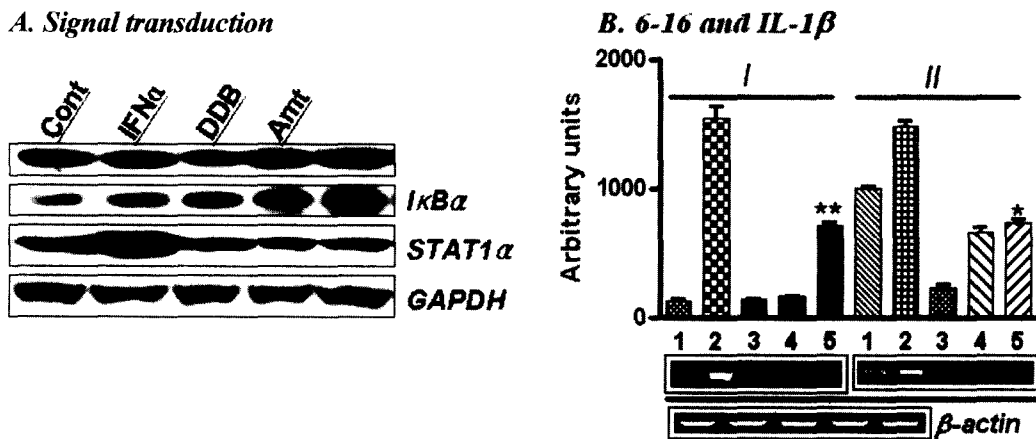


Fig. 2 – Signal transduction of IFN-dependent/-independent pathway and gene expression of 6-16 gene and IL-1 β . A. Western blots for NF- κ B (Rel-A, p65), *IkB α* , and *STAT1 α* . B. RT-PCR for 6-16 gene (I) and IL-1 β (II). Line 1, control; line 2, interferon- α ; line 3, DDB; line 4, amantadine; line 5, amantadine+DDB. **p<0.01 vs. resting HepG2 2.2.15 (control).

Interferon-의존적인 항바이러스효과는 *STAT1 α* 와 6-16 유전자의 발현이(i.e. *STAT1*-mediated IFN-inducible 6-16 mRNA) 주요 신호전달체계로 알려져 있다.^{15,16} 따라서 본 연구에서 AD combination이 IFN-의존적인 효과를 가지는지에 대한 실험을 실시하였으며, Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 즉, interferon의 marker인 *STAT1 α* 의 발현은 interferon 군에 비해 발현정도가 낮게 관찰되었으나 AD군에서 점차 발현의 정도가 강해지는 것으로 보아 두 약물의 시너지효과가 기대되며(Fig. 2A), 이러한 예측은 6-16유전자 발현에서 입증되었다(Fig. 2B). 또한 IFN-independent한 antiviral 효과의 가능성은 NO 농도의 증가와 함께(Fig. 1) IL-1 β expression에서 그 가능성을 입증하고 있다. 연구결과에 따르면 DDB군에서 IL-1 β 의 억제가 현저하게 나타났

으며 이는 대조군 및 IFN군에 비해 유의한 차이를 보이고 있다. 더불어 AD군에서 IL-1 β 의 발현정도가 resting cell line보다 유의한 수준의 억제를 보이고 있어 IFN 제거와의 차별적 효과가 기대 된다(Fig. 2B). 그러나 IL-1 β 가 IFN- α -induced antiviral activity를 감소시킨다는 연구¹⁷와 antiviral response를 유도한다는 결과¹⁸가 양립하고 있어 보다 다양한 연구가 필요하다. 또한 바이러스등과 같은 숙주세포의 감염에 의한 초기면역반응에 대한 NF- κ B의 역할이 중요하게 고려되고 있는데, 이는 NF- κ B activation이 HBV replication을 억제하기 때문이다.¹⁹ Fig. 2A에서 AD 처치 시 NF- κ B activation이 관찰되었으며, 이에 대한 upstream pathway인 *IkB α* 의 증가는 AD에 의한 NF- κ B modulation을 입증하는 결과로 생각된다.

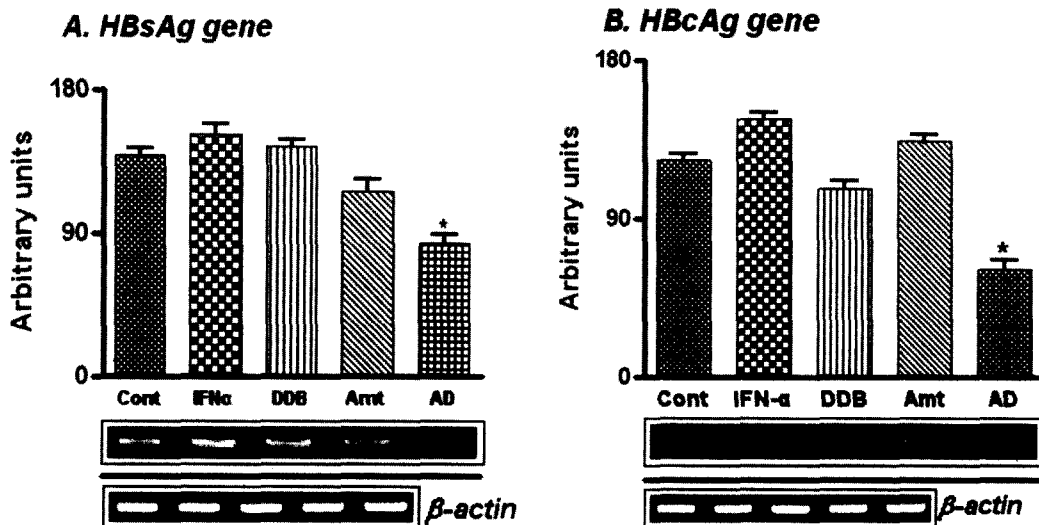


Fig. 3 – RT-PCR results of HBsAg (A) and HBcAg (B) mRNA levels in HepG2 2.2.15 cell line after 3-day treatment with each study agents. Relative levels for each band were assessed by scanning densitometry. A significant down-regulation of those genes was observed in AD combination treatment (p<0.05). *p<0.05 vs. resting HepG2 2.2.15 (control).

본 연구에서 최종적으로 관찰된 hepatitis B surface 유전자와 hepatitis core 유전자의 발현여부는 Fig. 3에 나타내었다. 두 유전자의 발현여부는 RT-PCR방법을 통해 수행되었으며, 결과에 대한 상대적 분석은 UVIDocMw Window version으로 실시하였다. Fig. 3에서 보이는 것처럼 AD 처치 시 각 단일처치군 대비 gene expression이 억제 되었으며($p < 0.05$) 이는 AD combination의 시너지 효과로 생각된다. 특히 HBcAg gene의 경우 DDB에 의한 유전자 발현억제가 관찰되었으며, amantadine과 병합 투여 시 그의 효과가 현저히 나타났다(Fig. 3B).

결 론

항바이러스제제의 개발은 약제의 안전성과 유효성을 포함하여 야 하며 동시에 gene mutation의 가능성이 배제되어야 한다. 과거로부터 사용되고 있는 interferon제제는 약제에 의한 부작용이 심하고 효과 또한 개체차가 심하게 나타나 사용에 제한성을 가지고 있으나,²⁰⁾ 최근 들어 nucleoside analogue 제제가 대체 약물로서 각광을 받아왔다. 그러나 이 약물 또한 치료중단 시 rebounding 및 mutant의 출현으로 이에 대한 보완 개선된 새로운 화학요법이 개발되고 있다. 따라서 본 연구는 항 인플루엔자 제제로 사용되어온 항바이러스제제인 amantadine과 간염치료/보조요법제로 사용되고 있는 DDB의 복합 처치 시 각 단일제의 특성에 의한 항바이러스 상승효과를 관찰하고자 하였다. 실험결과 예서와 같이 amantadine/DDB 복합 투여 시 hepatitis B surface 유전자 및 core 유전자의 발현이 억제됨을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 interferon-inducible antiviral 효과(STAT1(↑), 6-16 gene(↑)), NF- κ B activation/I κ B α (↑), IL-1 β (↓) 및 NO production(↑)의 복합적인 신호전달의 결과로 사료된다. 이와 같은 결과로 amantadine/DDB의 복합투여는 단일요법 자체의 효과와 더불어 항바이러스활성에 직접적인 영향을 주는 복합제로 개발이 가능할 것으로 판단되며 이러한 효과의 입증을 위해 *in vivo* model에서 보다 다양한 확인실험이 요구된다.

참고문헌

- 1) Hoofnagle, J. H. : Hepatitis C: The clinical spectrum of disease. *Hepatology* **26**, 15S (1997).
- 2) Wright, M., Main, J. and Thomas, H. C. : Drug-resistant viral hepatitis. *J. Infection*. **41**, 1 (2000).
- 3) Lai, C. L., Ratziu, V., Yuen, M.-F. and Poynard, T. : Viral hepatitis B. *Lancet* **362**, 2089 (2003).
- 4) Fisher, K., Cheng, Y. and Tyrrell, D. : The mutation in duck hepatitis B polymerase which confers resistance to lamivudine (β -L(-)-thiacytidine, 3TC) also confers cross-resistance to β -L-dideoxy-5-fluorocytidine. *Hepatology* **24**, A246 (1996).

- 5) Witcher, J. W., Bouldinot, F. D., Baldwin, B. H., Ascenzi, M. A., Tennant, B. C., Du, J. F. and Chu, C. K. : Pharmacokinetics of 1-(2-fluoro-5-methyl-beta-L-arabinofuranosyl) uracil in woodchucks. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2184 (1997).
- 6) Heathcote, E., Jeffers, L. and Wright, T. : Loss of serum HBV DNA and HBeAg seroconversion following short-term (12 weeks) adefovir dipivoxil therapy in chronic hepatitis B: two placebo-controlled phase II studies. *Hepatology* **28**, A620 (1998).
- 7) Yamanaka, G., Wilson, T., Innaimo, S., Bisacchi, G. S., Egli, P., Rinehart, J. K., Zahler, R. and Colonno, R. J. : Metabolic studies on BMS-200475, a new antiviral compound active against hepatitis B virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 190 (1999).
- 8) Oxford, J. S., Blasingam, B. S., Mann, A., Novelli, P. and Lambkin, R. : Treatment of epidemic and pandemic influenza with neuraminidase and M2 protein channel inhibitors. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**, 1 (2003).
- 9) Wang, C., Takeuchi, K., Pinto, L. and Lamb, R. A. : Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J. Virol.* **67**, 585 (1993).
- 10) Kang, K. W., Kim, Y. G., Kim, C. W. and Kim, S. G. : The anti-fibrogenic effect of a pharmaceutical composition of [5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione] (oltipraz) and dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate (DDB) *Arch. Pharm. Res.* **25**, 655 (2002).
- 11) Kim, J. H., Mun, Y. J., Chun, H. J., Jeon, K. S., Kim, Y. O. and Woo, W. H. : Effect of biphenyl dimethyl dicarboxylate on the humoral immunosuppression by ethanol. *Int. J. Immunother.* **22**, 906 (2000).
- 12) Huber, R., Hockenjos, B. and Blum, H. E. : DDB treatment of patients with chronic hepatitis. *Hepatology* **39**, 1732 (2004).
- 13) Joo, S. S., Won, T. J. and Lee, D. I. : Potential role of ursodeoxycholic acid in suppression of nuclear factor kappa B in microglial cell line (BV-2). *Arch. Pharm. Res.* **27**, 954 (2004).
- 14) Guidotti, L. G., McClary, H., Loudis, J. M. and Chisari, F. V. : Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J. Exp. Med.* **191**, 1247 (2000).
- 15) Ramana, C. V., Gil, M. P., Schreiber, R. D. and Stark, G. R. : STAT1-dependent and -independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. *Trends Immunol.* **23**, 96 (2002).
- 16) Khabar, K. S. A., al-Haj, L., al-Zoghaibi, F., Marie, M., Dhalla, M., Polyak, S. J. and Williams, B. R. G. : Expressed gene cluster associated with cellular sensitivity and resistance towards anti-viral and anti-proliferative actions of interferon. *J. Mol. Biol.* **342**, 833 (2004).
- 17) Bose, S., Kar, N., Maitra, R., DiDonato, J. A. and Banerjee, A. K. : Temporal activation of NF- κ B regulates an interferon-independent innate antiviral response against cytoplasmic

- RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10890 (2003).
- 18) Tian, Z., Shen, X., Feng, H. and Gao, B. : IL-1 β attenuates IFN- α β -induced antiviral activity and STAT1 activation in the liver: involvement of proteasome-dependent pathway. *J. Immunol.* **165**, 3959 (2000).
- 19) Biermer, M., Puro, R. and Schneider, R. J. : Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves distribution of capsid integrity through activation of NF- κ B. *J. Virol.* **77**, 4033 (2003).
- 20) Lee, W. M. : Hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1733 (1997).