

Adenovirus type 12에 의해 유발된 Transformation에 미치는 Caffeine의 영향

서울대학교 의과대학 미생물학교실
최 성 배

=Abstracts=

Effect of Caffeine on Transformation Induced by Adenovirus type 12 Sung-Bae Choi

Department of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University

Adenovirus group consists of over 100 related viruses which have been isolated from respiratory or gastro-intestinal tract of primate, cattle, dog and mice. Approximately 40 serologic types of adenovirus producing a variety of human respiratory and conjunctival infections were identified. Adenoviruses are icosahedral virions containing double-stranded linear DNA. They are 70nm to 90nm in diameter and each of capsid is composed of 252 capsomeres. Several numbers 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 Hormone on replication of adenovirus(9) has been carried out. The present report represents a continuation of previous study. To obtain evidence concerning the effect of caffeine on the transformation, investigation of adenovirus type 12 of this group was undertaken. For practical consideration it was desirable to investigation of the effect of caffeine on the adenovirus type 12-induced transformation in L cell. Results were as follows;

1. Adenovirus type 12-induced transformation was inhibited in the presence of caffeine.
2. Yields of adenovirus type 12 in L cell were slightly inhibited by treatment of caffeine.

Key Words: Adenovirus, Transformation, Caffeine.

서 론

Adenovirus는 그간 분리된 100개 이상의 sero-type중 40 serotype이상이 사람에게 감염을 일으키고 있다.

이 바이러스는 20면체(Icosahedron)로서 감염 세포의 핵내에서 증식되고 바이러스 직경이 70-90nm가 되며 252개의 capsomeres로 된 capsid를 가지고 있고 4개(A, B, C, P)의 보체결합항원을 내포하고 있으며 핵심은 linear, double-stranded DNA로 되고 있다.

사람에서 Adenovirus가 감염되면 급성인두염, 기관지염, 결막염을 일으킨다. 또한, 별로 증상없이 편도선이나 위장관 감염이 흔히 나타난다.

어떤 바이러스주들은 사람의 호흡기 질환과 관련되고 있으며 이런 바이러스들(type 12, 18, 31)을 어린 Hamster에 접종했을 때 악성종양을 형성할 수 있다. 이 바이러스의 특성은 많은 양의 보체결합항원을 형성하는데 비하여 비교적 낮은 바이러스 적정치(virus titer)를 나타낸다.

Adenovirus type 1, 2, 5들은 외과적으로 제거된 tonsil이나 Adenoid에서 발견되었고 소아의 산발적인 증상이 약한 호흡기 질환(sporadic mild

respiratory illness)과 관련이 되고 있다.

그간의 연구들은 Adenovirus로 감염된 세포의 핵내에서 일어나는 세포성변화 [1,2]나 생물학적 특성 [3,4] 들이었다. 지난번 연구 [9] 에서 non-oncogenic virus인 Adenovirus type 1, 2, 4, 6들의 증식에 미치는 Hormone의 영향을 연구하여 보고 하였다.

본 연구에서는 oncogenic virus인 Adenovirus type 12의 transformation에 미치는 caffeine의 영향을 연구하기 위하여 L292세포를 배양후 Adenovirus type 12로 접종하고 caffeine으로 처리하여 transformed clone형성에 미치는 영향을 연구 검토하였다.

실험재료 및 방법

1. 바이러스

본 실험에 Adenovirus type 12가 사용되었다.

2. 세포배양

L929세포 (이후 L세포로 약함) 와 HeLa세포가 사용되었고 전 방법 [5-9]와 같이 배양되었고 L세포는 transformation용이었고 HeLa세포는 L세포 접종후 바이러스 적정 (virus titration)용으로 사용되었다.

세포배양액은 modified Eagles minimal essential media에 10% 가열비동화된 우혈청과 Penicillin G (1000,000u/liter)와 dihydro-streptomycin sulfate (100mg/liter)를 가하여 사용하였다.

3. 바이러스 적정 (virus infectivity titration)

바이러스 적정은 B.S.S.로 3번 세척한 HeLa세포를 사용하여 전 방법 [5,6,8]과 같이 HeLa세포의 50% (혹은 그 이상)정도가 세포병변 (cytopathic effect)이 왔을 때 감염되었다고 판단 하였다.

Infectivity titer의 endpoint는 접종된 실험관에서 반이상이 감염되었을 때 계단회석된 바이러스의 최고 회석배수로 산정 되었다.

4. Caffeine처리

바이러스 접종후 3-4시간에 해당 농도의 caffeine (10^2M , 10^3M , 10^4M)을 가하였다.

5. Transformation assay

바이러스 접종후 4일간 incubation후 새로운 배지액으로 교환하였다.L세포 배양후 약 20시간에 trypsinize하여 1×10^6 cell/ml의 농도로 하여 동일량의 10^9 PFU/ml을 포함한 바이러스액을 가하였다. 그후 37°C에서 1시간 둔 다음 300cell을 petridish에 분주하고 3-4일 후 세포배양 배지를 교환하였다. 2-3주 후 배양 후 transformed clone을 산정 하였다.

실험 성적

실험 1

Adenovirus type 12에 의한 transformation에 미치는 caffeine의 농도 변화의 영향 배양된 L세포에 Adenovirus type 12 접종후 caffeine을 처리하여 시간적 경과에 따르는 transformed clone을 산정한 성적으로 Table 1에서 보는 바와 같이 caffeine처리가 처리하지 않은 것보다 현저히 transformed clone형성이 억제되었다. Caffeine의 농도가 높은 10^2M 가 10^3M 이나 10^4M 보다 현저히 더 억제되었다.

실험 2

Adenovirus type 12에 의한 transformation에 미치는 caffeine 처리 시간적 변화의 영향 배양된 L세포에 바이러스 접종후 여러 시간적 변화에 따르는 caffeine 처리가 transformed clone형성에 미치는 영향을 검토한 성적으로 Table 2에서 보는 바와 같이 바이러스 접종 후 여러날 caffeine 처리한 군이 처리되지 않은 대조보다 현저히 clone형성이 더 억제되었다. caffeine 처리 일수가 길어 질수록 점진적으로 clone형성이 억제되었다. 그러나 9일 후는 별로 영향이 없었다.

또한 바이러스 접종 3일 전에 caffeine처리한 대조에서는 caffeine처리하지 않은 대조와 비교 시 다소 억제되긴 하였으나 접종후에 처리한 것보다 현저한 차이가 없었다.

Table 1. Effect of caffeine on adenovirus type 12-induced transformation

Caffeine treatment	Average No. of clones per plate	Percent of control
Untreated control	63	100
Caffeine 10^2 M	19	30
Caffeine 10^3 M	41	65
Caffeine 10^4 M	48	76

Table 2. Effect of caffeine on adenovirus type 12-induced transformation at various times after infection

Caffeine present (d)	No. of transformed clones per plate
None	56
-3- 0	42
0- 3	23
0- 6	20
0- 9	15
0-12	12
0-15	10
0-18	11
15-18	54

Table 3. Yields of adenovirus type 12 from L cells in presence and absence of Caffeine

Hours after incubation	Virus titers	
	Without Caffeine	Presence of Caffeine
Input	1.6	1.6
24	1.8	1.7
48	2.2	2.1
96	2.5	2.3
120	2.7	2.5

실험 3

Adenovirus type 12생성에 미치는 caffeine의 영향 L세포 배양후 Adenovirus type 12 접종후 caffeine으로 처리한 시간적 변화에 따라서 바이러스 생성 (virus yield)을 관찰한 성적으로 HeLa세포를 사용하여 적정 (titration)되었다.

Table 3에서 보는 바와 같이 L세포에서 바이러스치 (virus titer)는 caffeine처리한 것과 처리하지 않은 대조 모두 전반적으로 낮았다.

그러나 caffeine처리한 것이 처리하지 않은 대조보다 virus titer가 다소 더 억제되었다.

고 찰

최근 Adenovirus는 사람에게 관련된 것만으로 40 serotype이상이 구분되고 있다. 사람에게 Adenovirus가 감염되면 급성인두염, 기관지염, 결막염 등을 일으킨다. 편도선이나 위장관염이 증상 없이 일어나기도 한다. 몇몇 바이러스들은 사람

의 호흡기 질환과 관련되고 어린 Hamster에 접종 시 악성종양을 형성할 수도 있다.

Adenovirus type 12를 Hamster에 접종후 종양을 형성한 이래 Adenovirus가 종양 바이러스의 model로서 여러 학자들에 의해서 연구되어 왔다. 그러나 첫 번째 난관은 적정 (titration)방법이었다. 측정하였으나 낮은 바이러스치 (low titer)를 나타냈다.

증식성 세포 (productive cell)에서는 다소 높은 바이러스치를 나타냈으나 비증식성 세포 (non-productive cell)에서 더욱 낮은 적정치를 나타냈다.

본 연구는 전 연구 [9]에 이어서 Adenovirus (종양 바이러스)의 transformation에 미치는 caffeine의 영향에 대한 연구를 시행한 것이다.

실험 1에서는 transformation에 미치는 caffeine의 영향을 검토하기 위하여 시행한 실험으로 caffeine에 의해서 처리된 것이 대조에 비하여 현저히 transformed clone형성이 억제되었다.

실험 2에서는 Adenovirus type 12 접종후 caffeine처리 했을 때 3, 6, 9일 경과에 따라 더 억제되었다. 그러나 9일 후에는 caffeine의 억제력이 약화되었다. 일면 Adenovirus type 12 접종 전에 caffeine처리한 것은 대조와 비교시 transformed clone형성 억제에 별로 큰 영향을 주지 못하였다. 또한 Adenovirus type 12 접종후 15일부터 caffeine을 가하여 18일까지 처리한 것은 caffeine이 transformed clone형성에 영향을 주지 못하였다.

실험 3에서 Adenovirus type 12생성에 대한 실험으로 전 보고 [2]에서 논의한 것 같이 비증식성 세포 (L cell)에서 낮은 바이러스치 (low virus titer)를 나타냈다. Caffeine처리한 것이 처리하지 않은 대조보다 근소하게 더 억제되었다.

본 실험을 종합적으로 논의하면 Adenovirus type 12에 의한 transformation이 caffeine에 의해서 억제되었다.

억제 효과에 대하여 현재의 실험으로 단언키 어려우나 우선 독성 효과 (Toxic effect)를 고려할 수 있으며 두번째 흡착 (Adsorption), 통과 (Penetration), 탈각피 (Uncoating)등에 영향을 고려할 수 있고 다음에 전사 (Transcription), 번역 (Translation)에 영향 내지 DNA, Protein의 형성에 영향을 들 수 있다.

그 외 유력시되는 것이 viral DNA가 Host cell genome에 integrate되는 것을 caffeine이 억제하거나 또는 DNA repair의 interference나 viral gene ac-

tivation의 방지에 기인하여 transformed clone형성이 억제되는 것으로 사려된다. 그러나 아직 확실한 기전은 설명하기 어려웠다.

전 보고 [9]에서 Hormone (Estradiol-17)이 비증양 바이러스 (Adenovirus type 1, 4, 6)의 증식을 억제하였음을 보고하였고 본 실험에서는 증양 바이러스 (Adenovirus type 12)에 의한 transformed clone형성을 caffeine이 억제하였음을 보고하는 것이다.

결 론

증양 바이러스인 Adenovirus type 12를 비증식성 세포 (non-productive cell)인 L929 cell에 접종한 후 caffeine의 함량 및 시간별로 처리하여 transformed clone형성에 미치는 영향을 검토한 성적으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Adenovirus type 12에 의한 L세포에서 transformed clone형성은 Caffeine을 처리 함으로써 대조보다 더 억제되었다.

2) L세포에 Adenovirus type 12를 접종후 caffeine으로 시간별로 처리했을 때 9일 까지 점진적으로 억제력이 증가되었으나 그후 억제력이 약화되었다.

3) 비증식성 세포인 L세포에서 Adenovirus type 12의 생성은 낮은 적정치를 나타 냈다. 그러나 caffeine으로 처리했을 때 처리하지 않은 대조보다 근소하게 더 억제되었다.

REFERENCES

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 and cytochemical studies of HeLa cells infected with adenovirus. J Exper Med 105: 195-214, 1957.
3. Fisher TN, Ginsberg H: Accumulation of organic and 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 adenovirus 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 in ocula of adenovirus. Korea J Virol 19: 165-168, 1989.
9. Choi SB: Effect of Hormone on Replication of adenovirus, Korea J. Virol., 20: 123-126, 1990.