

국내 HIV-1 분리주에 대한 zidovudine의 저항성 연구

¹국립보건원 바이러스질환부 번역결핵연구실, ²고려대학교 생물학과 대학원
남정구^{1,2} · 강 춘¹ · 이주실¹ · 이홍래^{1,2} · 신동윤¹ · 박용근² · 신영오¹

=Abstract=

Study on the Zidovudine Resistance of HIV-1 Isolated Strains in Korea

Jeong-Gu Nam^{1,2}, Chun Kang¹, Joo-Shil Lee¹, Hong-Rae Lee^{1,2}, Dong-Yun Shin¹,
Yong-Keun Park¹ and Yung-Oh Shin¹

¹Center for AIDS Research, Department of Viral Disease, National Institute of Health,
Seoul 122-701, ²Department of Biology, the Graduated School, Korea University,
Seoul 136-701, Korea

To examine AZT resistance of HIV-1 isolates from AZT treated or untreated Korean, several biological characteristics such as syncytium formation, HIV-1 reverse transcriptase activity and the p24 antigen production in MT-2 cells infected with 4 HIV-1 isolates were determined. As controls, we tested HIV-1 HTLV-III_B and pre-drug isolate as AZT susceptible strains, in addition to HIV-1 RTMC/MT-2 and post-drug isolate as AZT resistant strains. When the inoculum size of HIV-1 was 300 TCID₅₀/well and 100 TCID₅₀/well, the AZT susceptibility of AZT untreated HIV-1 isolates 8806 and 9571 were similar to that of HIV-1 HTLV-III_B and AZT-susceptible HIV-1 strains. When we evaluated AZT resistance of isolates HIV-1 8812 and 9113 treated with AZT for 36 months by observation of syncytium formation, HIV-1 8812 showed resistance similar to that of HIV-1 RTMC/MT-2 strain forming syncytium up to AZT 1µg/ml, and HIV-1 9113 showed resistance identical with that of AZT-resistant HIV-1 strain which formed syncytium up to AZT 10 µg/ml. Especially, when we evaluated AZT resistance by HIV-1 reverse transcriptase activity and the p24 antigen production, HIV-1 isolates 8812 and 9113 showed much higher resistance (>10 - 200 fold) compared with HIV-1 RTMC/MT-2 and AZT-resistant HIV-1 strain.

Key Words: AZT resistance, Syncytium formation, HIV-1 reverse transcriptase, HIV-1 p24 antigen

서 론

1985년 국내에서 첫 Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) 환자가 발견된 이후에 Human Immunodeficiency Virus (HIV) 감염자 및 AIDS 환자는 국내외적으로 계속 증가하여 1996년 중반에 세계보건기구에 보고된 AIDS 환자는 1,393,649명

으로서 이는 작년 같은 시기와 비교하여 볼 때 19%가 증가된 숫자이다 [1]. 그러나 성인 및 소아를 합한 실제 HIV 감염자 추정치는 이 보다 많은 770만명의 환자를 포함하여 약 2,800만명으로 보고 있다. 국내에서는 1996년 12월 말 총 623명의 HIV 감염자가 확인되었으며 (보건복지부 보도자료, 1997년 1월), 1996년 중에 102명의 신규 감염자가 확인되었다. 1996년의 신규감염자 발견은

1995년의 108명에 비하여 약간 감소되었으나, 국내 HIV 감염자 수가 과거 10여년간 계속 증가하여 왔음을 감안할 때 [2], 발견된 신규감염자 수 증가의 둔화는 일시적일 가능성을 배제할 수 없다. 또한 발견되는 신규감염자 수가 감소된 이후에도 실제적인 감염자 수는 수년간 지속되는 역학상의 특징을 고려해 볼 때 국내에서의 감염자 증가 추세는 수년간 지속될 것으로 전망된다.

이러한 HIV 감염자 및 AIDS 환자의 증가에 따라 이들에 대한 치료의 중요성이 증대되며 효과적인 치료를 위하여서는 국내 유행주의 병원성과 치료제에 대한 감수성의 규명이 필요하다.

Mitsuya 등은 AIDS에 대한 치료제를 탐색하던 중 여러 후보 물질 중에서 zidovudine (AZT)이 실험관내에서 HIV에 대한 저지작용을 나타내는 사실을 확인하였다 [3]. AZT의 임상시험 결과, 치료받지 않은 군에 비하여 치료받은 군에서 생존율과 기회성 감염의 발생율이 현저한 차이를 보임에 따라 1987년에 미국 FDA에서 치료약으로 허가되어 1차 선택약으로 사용해 오고 있다 [4,5].

그러나 1989년에 Larder 등은 AIDS 환자로부터 분리한 HIV가 AZT에 대하여 저항성을 보이는 것을 확인하였다 [6]. 이들은 감염자로부터 분리한 바이러스 46주에 대하여 plaque 감소시험 방법 (plaque reduction assay)으로 감수성 여부를 결정하였다. AZT를 투여받지 않은 HIV 감염자로부터 분리된 바이러스주는 AZT에 대해 저항성을 보이지 않았지만, 6개월 이상 AZT를 투여받은 감염자의 대부분이 AZT에 저항성을 보일 뿐만 아니라 일부는 100배 정도의 저항성이 있음을 보고하였다.

AZT 뿐만 아니라 근래 didanosine (ddI), zalcitabine (ddC), stavudine (d4T) 및 lamivudine (3TC) 등 reverse transcriptase inhibitor가 90년대 초에 허가되었으며 saquinavir, indinavir sulfate 및 zidovudine 등의 protease inhibitor가 90년대 중반에 허가되어 단독 혹은 병용투여가 증가되고 있다. AZT 이외의 quinosalines 역시 저항성이 나타나는 유전자의 부위는 다르지만 저항성이 존재함을 보고하고 있어 [7], 다양하게 사용되고 있는 AIDS 치료물질 대부분이 지속적인 사용에 의해 이들에 대한 저항성주가 출현할 것으로 추정된다. 또한 동일 물질도 사용기간, 사용량 [8] 및 단독 혹은 복합투여 등의 투여방법에 따라서 저항성주의 출현 빈도, 저항성 정도에 차이가 있을 것으로

예상된다. 우리나라에서도 AZT를 치료제로 투여하고 있으며 국내 HIV 감염자 중 절반 이상이 AZT 투여 경력이 있으므로 효과적인 치료를 위해서는 국내 HIV 유행주의 AZT 등 치료물질에 대한 저항성을 규명할 필요가 있다.

저항성을 파악하기 위하여서는 HIV-1 분리주에 대하여 plaque 감소 방법, HIV-1 reverse transcriptase 활성 측정 방법, HIV-1 p24 항원 측정 방법에 의하여 AZT에 대한 표현형의 변화와 역전사효소 coding 부위에 대한 염기서열을 분석하여 어느 부위에서 point mutation이 일어났는가를 확인하는 유전형의 규명이 필요하다.

본 연구에서는 국내 HIV 분리주 중 AZT를 투여한 군과 AZT를 투여하지 않은 군을 선택하여 이들로부터 분리된 HIV-1 4주와 대조군으로 HIV-1 wild type인 HTLV-III_B, AZT에 대해 저항성이 존재한다고 보고된 HIV-1 RTMC/MT-2주와 동일한 대상에서 AZT 투여 전후에 분리한 AZT-susceptible HIV-1주 및 AZT-resistant HIV-1주를 비교 분석하여 AZT에 대한 저항성을 표현형으로 시험한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

1. 대상군

국내 HIV 감염자/AIDS 환자를 대상으로 하여 HIV 분리를 시도하였다. AZT를 복용한 2명과 AZT를 복용하지 않은 2명의 국내 HIV 감염자/AIDS 환자의 임상자료와 이들로부터 분리된 HIV-1 분리주의 성상은 Table 1과 같다. 그리고 HIV-1 표준주인 HTLV-III_B, AZT에 대해 저항성이 존재한다고 보고된 HIV-1 RTMC/MT-2주, AZT를 투여하기전에 분리된 AZT-susceptible HIV-1주 및 AZT를 투여한 후에 분리된 AZT-resistant HIV-1주를 대상으로 하였다.

2. HIV 분리 및 배양

HIV 분리용 배지로는 10%의 human interleukin (IL)-2 (Boehringer Mannheim, Bernd Meyer, Ottweiler, Germany), 3 units/ml의 sheep anti-human α -interferon (Boehringer Mannheim) 및 4 μ g/ml의 hydrocortisone (Sigma, St. Louis, MO)이 첨가되고 10% FCS (fetal calf serum)이 함유된 RPMI-1640 (IL-2 배지)을 사용하였다. Lymphocyte 분리배지인 histopaque-1077 (Sigma)을 사용하여 HIV 감염

자/AIDS 환자의 혈액에서 PBMC (peripheral blood mononuclear cells)를 분리하여 phytohemagglutinin (PHA)-p로 48시간 동안 activation시킨 정상인 PBMC 2×10^6 개와 20일 동안 coculture하였다. 배양 상층액 및 세포를 7일에 1회씩 취하고 신선한 IL-2 배지로 교환하여 계대하였다. HIV-1의 증식은 p24 항원의 생성을 HIV-1 p24 antigen detection ELISA로 확인하였으며, 배양세포의 일부를 HIV-1 감염에 의해 syncytium을 형성하는 MT-2 세포와 coculture하였다.

3. 세포주 및 배양

HIV-1 분리주의 병원성 및 AZT 저항성을 분석하기 위하여 MT-2 세포주를 사용하였다. Human T cell line인 MT-2 세포는 HTLV-I을 가지고 있으며, HIV-1 감염에 의해 다핵거대세포 (multinucleate giant cell)를 형성하는 세포로서 일본 NIH로부터 분양받아 국립보건원 면역결핍연구실에서 계대 배양하였다. 이 세포들은 10% FCS와 penicillin (100 units/ml)-streptomycin (100 µg/ml) 및 L-glutamine (2 mM/ml)이 첨가된 RPMI-1640 (GIBCO)배지를 사용하여 3~4일에 한 번씩 계대하여 $3.0 \sim 4.0 \times 10^5$ cells/ml 수준으로 유지 배양하였다.

4. 바이러스주 및 배양

HIV-1 표준주인 HTLV-IIIb는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받았으며, AZT에 대해 저항성이 존재한다고 보고된 HIV-1 RTMC/MT-2주와 AZT를 투여하기전에 분리된 AZT-susceptible HIV-1주 및 AZT를 투여한 후에 분리된 AZT-resistant HIV-1주는 미국 NIH AIDS Research and Reference Reagent Program을 통하여 분양 받았으며, 국내 HIV-1 분리주 중에서 MT-2 세포에서 syncytium을 형성하는 4개의 HIV-1 분리주를 MT-2 세포에 증식시켜 본 실험에 사용하였다. 사용 바이러스에 대한 역가를 결정하기 위하여 well 당 3×10^4 개의 MT-2 세포를 96 well culture plate에 넣고 HIV를 10-fold 희석하여 37°C, 5% CO₂ 보습 인큐베이터에서 4일간 배양하여 syncytium 형성여부를 도립현미경으로 관찰하여 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)를 구하였다.

5. MT-2 세포에 대한 AZT의 세포독성

AZT에 의한 세포독성은 well당 3×10^4 개의 MT-2 세포를 96 well culture plate에 넣은 후, AZT를 농도별로 2-fold 희석하여 각각 첨가한 다음 37°C, 5% CO₂ 보습 인큐베이터에서 4일간 배양하고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay로 50% cytotoxic dose (CD₅₀)를 산출하였다.

MTT assay는 기존에 상품화되어 있는 MTT cell proliferation kit I (Boehringer Mannheim)을 사용하였다. 96 well culture plate에 농도별로 희석된 AZT와 MT-2 세포 배양 상층액 100 µl씩을 제거한 후, 각 well에 10 µl의 MTT labelling reagent (final concentration 0.5 mg/ml)를 첨가하였다. Microshaker를 사용하여 부드럽게 흔들여 준 후 37°C, 5% CO₂ 보습 인큐베이터에서 4시간 동안 정치시켰다. 각 well에 100 µl의 solubilization solution (10% SDS in 0.01 M HCl)을 첨가하여 형성된 짙은 청색의 결정체인 formazan을 완전히 녹인 후에 ELISA reader로 흡광도 (test wavelength 550 nm, reference wavelength 690 nm)를 측정하였다.

6. AZT 저항성 시험

(1) Syncytium 형성 관찰

국내 HIV-1 분리주와 표준주에 대한 AZT 저항성 시험을 위하여 well 당 3×10^4 개의 MT-2 세포를 96 well culture plate에 넣고, HIV-1을 well 당 300 TCID₅₀와 100 TCID₅₀로 각 well에 접종한 후, AZT를 100 µg/ml에서 0.001 µg/ml까지 10-fold 희석하여 각각의 well에 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 보습 인큐베이터에서 4일간 배양하여 syncytium 형성여부를 도립현미경으로 관찰하였고, 배양상층액에 존재하는 HIV-1을 reverse transcriptase assay와 p24 antigen detection ELISA에 의해 정량하였다.

(2) 역전사효소 활성 시험

AZT 저항성 시험을 수행한 후 배양 상층액에 존재하는 HIV-1을 정량하기 위하여 reverse transcriptase assay는 non-radioactive Reverse transcriptase kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 시험하였다.

배양상층액을 원심튜브에 수거한 후 4°C에서 2,500 rpm으로 10분 동안 원심하여, 상층액을 새로운 원심튜브에 옮겼다. 그리고 4°C에서 15,000 rpm으로 10분 동안 원심하여 다시 새로운 원심튜브에 옮긴 후, ml당 500 µl의 30% PEG-6000/1.2M

Table 1. Clinical data and biological phenotype of 4 HIV-1 isolates

Code	Sex	Time of AZT administration (months)	Number of CD4+ T lymphocytes/ μ l	History of opportunistic infection	Syncytium induction in MT-2 cells
8812	F	36	49	Tb	SI
9113	M	36	302	PCP	SI
8806	F	0	ND	Sepsis	SI
9571	M	0	20	Tb	SI

SI, syncytium inducing; Tb, Tuberculosis; PCP, *Pneumocystis carinii* pneumonia; ND, not done.

NaCl을 첨가하여 잘 혼합하여 4℃에서 overnight 시켰다. PEG로 농축한 시료를 4℃에서 15,000 rpm으로 10분 동안 원심한 후 상층액을 버리고 침전물을 40 μ l의 lysis buffer로 녹여 실온에서 30분 동안 정치시켰다. 또한 reverse transcriptase의 양을 표준화하기 위하여 양성대조인 HIV-1 reverse transcriptase를 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.625, 0 ng/well이 되도록 lysis buffer로 희석하였다. 준비된 각각의 시료에 poly (A) · oligo (dT)₁₅가 포함되어 있는 20 μ l의 reaction mixture를 첨가하여 37℃ 보습인큐베이터에서 1시간 동안 reverse transcriptase 반응을 시켰다. Streptavidin이 코팅된 microtiter plate (MTP) module을 준비하여 reverse transcriptase 반응이 끝난 시료 60 μ l를 MTP module에 옮기고 cover foil로 덮은 다음 37℃ 보습인큐베이터에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척액으로 5회 세척한 후, 200 μ l의 anti-digoxigenin-peroxidase conjugate (200 mU/ml)을 각 well에 넣고, aluminium foil로 덮은 다음 37℃ 보습인큐베이터에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 세척액으로 5회 세척한 후, peroxidase substrate인 ABTS[®]를 200 μ l씩 각 well에 넣은 후, 어두운 곳에서 10~30분 동안 green color로 변할때까지 반응시켜서 ELISA reader로 흡광도 (test wavelength 405 nm, reference wavelength 490 nm)를 측정하였다.

(3) p24 항원 정량

AZT 저항성 시험을 수행한 후 배양 상층액에 존재하는 HIV-1을 정량하기 위하여 p24 antigen detection ELISA는 HIV-1 p24 antigen ELISA test system (Coulter, Miami, FL)을 이용하여 시험하였다.

배양상층액을 원심튜브에 수거한 후 4℃에서 2,500 rpm으로 10분 동안 원심하여, 상층액을 새로운 원심튜브에 옮겼다. 그리고 4℃에서 15,000 rpm으로 10분 동안 원심하여 -20℃에 보관한 배양상층액을 PBS로 100배 희석하여 본 실험에 이용하였다.

Table 2. Determination of AZT cytotoxicity in MT-2 cell line by MTT assay

AZT concentration (μ g/ml)	O.D. (550/690nm)	Cell viability (%)
400	0.227	26.4
200	0.424	49.2
100	0.641	74.4
50	0.753	87.5
25	0.798	92.7
12.5	0.817	94.9
6.25	0.822	95.5
3.125	0.827	96.1
1.5625	0.827	96.1
Cell control	0.861	100.0

HIV-1 p24 antigen에 대한 murine monoclonal antibody가 코팅된 microwell plate에 시료와 음성대조, HIV-1 p24의 농도가 100, 50, 25, 12.5, 0 pg/ml로 희석한 양성대조를 200 μ l씩 넣었다. 그리고 각 well에 20 μ l의 lysis buffer를 넣은 다음 cover foil로 덮어 37℃ 보습인큐베이터에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척액으로 6회 세척한 후, 200 μ l의 anti-HIV-1 (human) biotin reagent를 넣고 cover foil로 덮어 37℃ 보습인큐베이터에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척액으로 6회 세척한 후, 200 μ l의 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 넣고 cover foil로 덮어 37℃ 보습인큐베이터에서 30분 동안 반응시켰다. 세척액으로 6회 세척한 후, 200 μ l의 tetramethylbenzidine substrate를 넣고 cover foil로 덮어 어두운 곳에서 30분 동안 반응시키고, 50 μ l의 4N sulfuric acid를 넣어 ELISA reader로 흡광도 (test wavelength 450 nm, reference wavelength 562 nm)를 측정하였다.

결과 및 성적

1. MT-2 세포에 대한 AZT의 세포독성

HIV-1 표준주 및 분리주에 대한 AZT 저항성

Table 3. Comparison of AZT resistance of HTLV-III_B and HIV-1 strains in MT-2 cell line by syncytium formation observation

HIV-1 strains	Virus replication of HIV-1 strains by AZT concentration (μg/ml)													
	300 TCID ₅₀ /well							100 TCID ₅₀ /well						
	VC	0.001	0.01	0.1	1	10	100	VC	0.001	0.01	0.1	1	10	100
HTLV-III _B	3+	3+	2+	±	-	-	2+	3+	3+	+	-	-	-	3+
8812	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3+	3+	+	+	+	-	+
9113	3+	3+	2+	+	+	±	2+	3+	3+	+	+	+	+	+
8806	3+	3+	2+	-	-	-	+	3+	3+	+	-	-	-	+
9571	3+	3+	2+	±	-	-	+	3+	3+	±	-	-	-	±
RTMC/MT-2	3+	3+	3+	2+	+	+	+	3+	3+	3+	2+	+	-	+
AZT-susceptible	3+	3+	2+	±	-	-	+	3+	3+	+	-	-	-	+
AZT-resistant	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2	3+	3+	3+	3+	2+	2+	+

Note. VC, virus control; -, no syncytium formation by postinfection day 4; ±, syncytium-like cell; +, 1-3 syncytium formation; 2+, 4-10 syncytium formation; 3+, more than 11 syncytium formation; ND, not done.

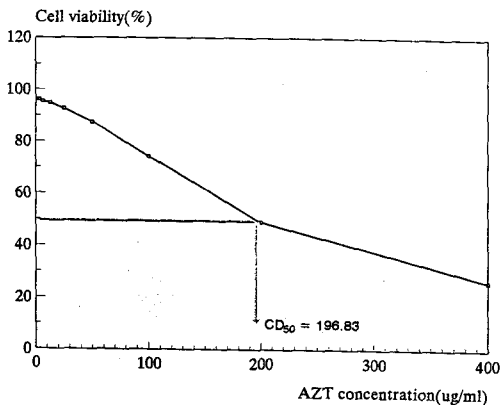


Fig. 1. Cytotoxicity of AZT in MT-2 cell line by MTT assay.

실험을 위해 AZT에 대한 세포독성을 MT-2 세포를 사용하여 MTT assay로 평가하였다. Table 2와 Fig. 1에서 보는 바와 같이 MT-2 세포에서 AZT의 CD₅₀는 196.83 μg/ml로 측정되었다.

2. AZT에 대한 저항성

(1) Syncytium 형성 관찰에 의한 평가

HIV-1 표준주 및 국내 분리주에 대한 AZT 저항성을 AZT 농도와 300 TCID₅₀/well 및 100 TCID₅₀/well의 HIV-1 접종량에 따른 HIV-1의 증식 차이를 syncytium 형성여부로 조사하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 AZT 저항성이 이미 입증된 RTMC/MT-2주와 AZT-resistant HIV-1주는 300 TCID₅₀/well에서는 AZT 10 μg/ml, 100 TCID₅₀/well에서는 각각 AZT 1 μg/ml과 10 μg/ml까지 syncytium이 형성되었다. 또한 AZT를 36개월 동안 복용한

국내 HIV-1 분리주인 8812는 100 TCID₅₀/well에서 AZT 1 μg/ml까지 syncytium을 형성하였으며, 9113은 300과 100 TCID₅₀/well에서는 AZT 10 μg/ml까지 syncytium을 형성하여 AZT에 대한 저항성이 있음을 보여주었다. HTLV-III_B와 AZT를 복용하지 않은 국내 HIV-1 분리주 9571과 AZT-susceptible HIV-1주는 300 TCID₅₀/well에서는 AZT 0.1 μg/ml, 100 TCID₅₀/well에서는 AZT 0.01 μg/ml까지 syncytium을 형성하여 AZT에 의해 HIV-1의 복제가 억제되는 감수성을 보였다. 그리고, 8806은 300 TCID₅₀/well과 100 TCID₅₀/well에서 AZT 0.01 μg/ml까지 syncytium을 형성하여 HIV-1 표준주보다 AZT에 대한 감수성이 더 크게 나타났다. 또한 AZT 100 μg/ml에서 HIV-1의 접종량에 관계없이 syncytium이 형성된 것이 특이하였다.

(2) HIV-1 reverse transcriptase에 의한 평가

HIV-1 표준주 및 분리주에 대한 AZT 저항성을 HIV-1 reverse transcriptase의 양으로 평가하였다. 정확한 정량을 위해 양성대조로 사용한 HIV-1 reverse transcriptase의 농도와 흡광도간의 standard curve를 그리고, 이를 근거로 하여 다음과 같은 식을 구하였다.

$$O.D. = 3.8736 \times \text{HIV-1 reverse transcriptase (ng/well)} + 0.0761 \text{ (Regression value is 0.9989.)}$$

HIV-1 표준주 및 분리주의 AZT에 대한 저항성은 inhibition rate[1-(test O.D. / virus control O.D.) × 100%]를 산출한 후, 50%의 저해농도 (50% of inhibitory concentration, IC₅₀)를 구하였다. HIV-1을 well 당 300 TCID₅₀를 접종하였을 때 Table 4 및 Fig. 2에서 보는 바와 같이 표준주인 HTLV-III_B

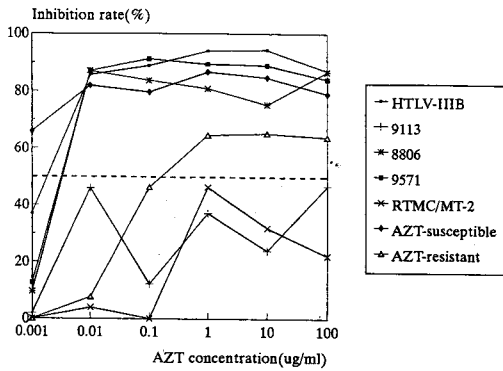


Fig. 2. Comparison of AZT resistance of HTLV-III B and HIV-1 strains in MT-2 cell line by reverse transcriptase. HIV-1 was used at the titer of 300 TCID₅₀/well. IC₅₀ (μg/ml) of HTLV-III B, 9113, 8806, 9571, HIV-1 RTMC/MT-2, AZT-susceptible HIV-1, and AZT-resistant HIV-1 was 0.0034, more than 100.0, 0.0057, 0.0055, more than 100.0, less than 0.001, and 0.28, respectively. Dot line means 50% of inhibition rate.

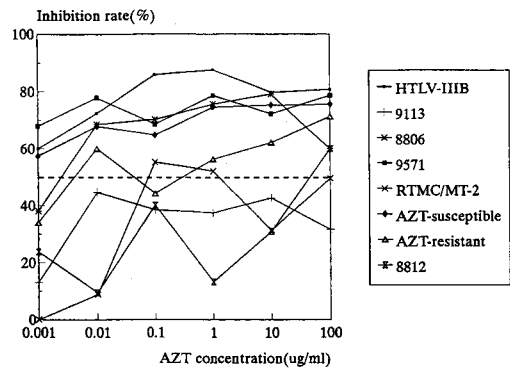


Fig. 3. Comparison of AZT resistance of HTLV-III B and HIV-1 strains in MT-2 cell line by reverse transcriptase. HIV-1 was used at the titer of 100 TCID₅₀/well. IC₅₀ (μg/ml) of HTLV-III B, 9113, 8806, 9571, HIV-1 RTMC/MT-2, AZT-susceptible HIV-1, AZT-resistant HIV-1, and 8812 was less than 0.001, more than 100.0, 0.0045, less than 0.001, 0.090, less than 0.001, 0.54 and 68.97, respectively. Dot line means 50% of inhibition rate.

Table 4. Comparison of AZT resistance of HTLV-III B and HIV-1 strains in MT-2 cell line by reverse transcriptase assay

HIV-1 strains	50% of inhibitory concentration (IC ₅₀ , μg/ml)	
	300 TCID ₅₀ /well	100 TCID ₅₀ /well
HTLV-III B	0.0034	< 0.001
8812	ND	68.97
9113	> 100.0	> 100.0
8806	0.0057	0.0045
9571	0.0055	< 0.001
RTMC/MT-2	> 100.0	0.090
AZT-susceptible	< 0.001	< 0.001
AZT-resistant	0.28	0.54

Note. ND, not done.

는 IC₅₀가 0.0034 μg/ml로 AZT에 대하여 HIV-1의 복제가 저해되어 감수성이 있음을 보여주고 있다. AZT 저항성주인 RTMC/MT-2주와 국내 HIV-1 분리주 중 AZT를 36개월 복용한 9113은 IC₅₀가 100.0 μg/ml 이상으로 AZT에 대한 저항성이 표준주인 HTLV-III B에 비해 약 29,400배 이상 높게 나타났다. 또한 AZT-susceptible HIV-1주는 IC₅₀는 0.001 μg/ml 이하로 AZT에 대해 감수성이 매우 높았으나, AZT-resistant HIV-1주는 IC₅₀가 0.28 μg/ml로 표준주에 비해 AZT에 대한 저항성이 약 82배 정도 높은 결과를 보였다. AZT를 복용한 경험이 없는 국내 HIV-1 분리주 8806과 9571은

IC₅₀가 각각 0.0057, 0.0055 μg/ml로 AZT에 대한 감수성을 나타내었다.

HIV-1을 well 당 100 TCID₅₀를 접종하였을 때 Table 4 및 Fig. 3에서 보는 바와 같이 표준주인 HTLV-III B는 IC₅₀가 0.001 μg/ml 이하로 AZT에 대해 HIV-1의 복제가 저해되었음을 보였다. AZT 저항성주인 RTMC/MT-2주와 AZT-resistant HIV-1주의 IC₅₀는 각각 0.090, 0.54 μg/ml로 표준주보다 AZT에 대한 저항성이 약 90배와 540배 높게 나타났으며, 국내 HIV-1 분리주 중에서 AZT를 36개월 복용한 8812와 9113의 IC₅₀는 68.97과 100.0 μg/ml 이상으로 AZT에 대한 저항성이 표준주에 비해 각각 약 69,000배와 100,000배 이상 높은 결과를 보였다. AZT를 복용하지 않는 국내 HIV 분리주인 8806과 9571은 IC₅₀가 각각 0.0045와 0.001 μg/ml 이하로 AZT에 대한 감수성을 보여주었고, AZT-susceptible HIV-1주는 IC₅₀가 0.001 μg/ml 이하로 AZT에 대한 감수성이 매우 큰 것으로 나타났다.

(3) HIV-1 p24 항원정량에 의한 평가

HIV-1 표준주 및 분리주에 대한 AZT 저항성을 HIV-1 p24 antigen의 양으로 평가하였다. 정확한 정량을 위해 양성대조로 사용한 HIV-1 p24 antigen의 농도와 흡광도간의 standard curve를 그리고, 이를 근거로 하여 다음과 같은 식을 구하였다.

$$\text{O.D.} = 0.0193 \times \text{HIV-1 p24 antigen (pg/well)} +$$

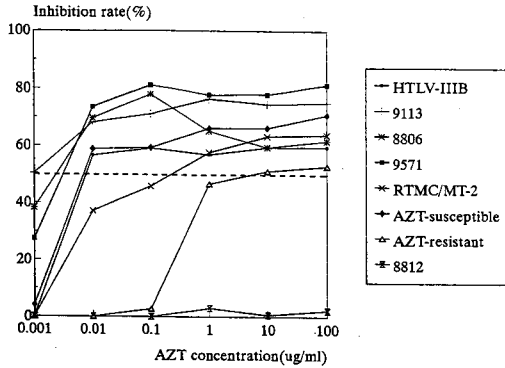


Fig. 4. Comparison of AZT resistance of HTLV-III B and HIV-1 strains in MT-2 cell line by p24 antigen detection ELISA. HIV-1 was used at the titer of TCID₅₀/well. IC₅₀ (μg/ml) of HTLV-III B, 9113, 8806, 9571, HIV-1 RTMC/MT-2, AZT-susceptible HIV-1, AZT-resistant HIV-1, and 8812 was 0.0089, more than 100.0, 0.001, 0.0044, 0.0054, 0.41, 0.0086 and 7.55, respectively. Dot line means 50% of inhibition rate.

0.0769 (Regression value is 0.9987.)

HIV-1를 well 당 100 TCID₅₀를 접종하였을 때 Table 5 및 Fig. 4에서 보는 바와 같이 표준주인 HTLV-III B는 IC₅₀가 0.0089 μg/ml로 AZT에 의해 HIV-1의 복제가 매우 저해되어 감수성이 있음을 보여주고 있다. AZT 저항성주인 RTMC/MT-2와 AZT-resistant HIV-1주는 IC₅₀가 0.41과 7.55 μg/ml로 AZT에 대한 저항성이 표준주보다 약 46배와 850배 높게 나타났다. 국내 HIV-1 분리주 중 AZT를 36개월 복용한 8812는 IC₅₀가 100.0 μg/ml 이상으로 AZT에 대한 저항성이 표준주보다 약 11,000배 이상 높게 나타났으나, 9113은 IC₅₀가 약 0.001 μg/ml로 AZT에 대해 감수성이 표준주인 HTLV-III B 보다 높게 나타났다. 그리고 AZT를 복용하지 않는 국내 HIV-1 분리주인 8806, 9571과 AZT-susceptible HIV-1주는 IC₅₀가 각각 0.0044, 0.0054 및 0.0086 μg/ml으로 AZT에 대해 HIV-1 표준주와 유사하게 감수성을 나타내었다.

고 찰

1987년 AIDS 혹은 ARC 상태의 성인에게 zidovudine (AZT)을 투여한 결과 생존기간이 더 길어지고 기회성 감염이 감소함에 근거하여 미국 FDA로부터 AZT가 치료제로 승인을 받았다 [5]. AZT는 위에 언급한 효과 외에 HIV-1 감염이 진전된 환자에 있어 CD4+ 림프구 수를 증가시키고

Table 5. Comparison of AZT resistance of HTLV-III B and HIV-1 strains in MT-2 cell line by HIV-1 p24 antigen detection ELISA

HIV-1 strains	50% of inhibitory concentration (IC ₅₀ , μg/ml)	
	100 TCID ₅₀ /well	
HTLV-III B	0.0089	
8812	> 100.0	
9113	0.001	
8806	0.0044	
9571	0.0054	
RTMC/MT-2	0.41	
AZT-susceptible	0.0086	
AZT-resistant	7.55	

혈청내의 p24 항원의 양과 감염능력이 있는 HIV-1의 역가를 감소시켰다. 또한 증상이 심하지 않은 경우와 CD4+ 림프구 수가 500개/μl인 무증상자에 있어 질병의 진전을 늦추는 것이 알려지기도 하였다. AZT의 초기 임상 시험결과가 1989년에 발표되자 AIDS 치료제로 더욱 널리 사용되었다. 그러나 1989년 Larder 등에 의해 AZT에 대한 저항성을 가지는 HIV가 처음 보고되었으며 [6], 그들은 AZT에 대한 감수성을 plaque reduction assay에 의해 측정하였는데 6개월 이상 AZT를 복용한 환자의 분리주에서 저항성을 확인하였다. 국내에서는 1991년부터 HIV-1 감염자의 CD4+ T 림프구가 혈액 1 μl 당 500개 이하로 감소할 경우 AZT 투여를 시작하였다. 현재 국내의 AZT 투여 대상자는 약 300명 정도로 이들 중에서의 AZT 저항성 바이러스의 출현이 충분히 예견되어, 본 연구에서는 AZT를 복용하지 않은 감염자로부터 분리된 HIV-1 2주와 AZT 복용자에서 분리한 HIV-1 2주에 대하여 AZT 저항성을 조사하였다. AZT 저항성을 확인하기 위하여 대조 바이러스로 HTLV-III B를 AZT 감수성 바이러스로, AZT 저항성 바이러스로는 HIV-1 RTMC/MT-2주를 사용하였다. 또한 미국 NIH AIDS Research and Reference Reagent Program으로부터 분양 받은 동일 대상의 AZT 투여 전에 분리된 AZT-susceptible HIV-1주와 AZT 투여 후에 분리된 AZT-resistant HIV-1주를 대조로 사용하여 실험의 유의성을 높이고자 하였다.

AZT 저항성 측정을 위해 MT-2와 MT-4 세포에서 AZT의 세포독성을 조사한 결과 Fig. 1에서와 같이 MT-2 세포에서는 CD₅₀가 196.83 μg/ml, MT-4 세포에서는 CD₅₀가 3.56 μg/ml (data not

shown)으로 나타났다. 이것으로 보아 MT-2 세포가 MT-4 세포보다 AZT에 대한 내성이 강한 것을 알 수 있었다.

AZT 저항성을 측정하기 위해 syncytium 형성을 배양 4일만에 관찰하였을 때 (Table 3), AZT 저항성 HIV-1 대조 바이러스인 HIV-1 RTMC/MT-2주와 AZT-resistant HIV-1주는 접종량이 300 TCID₅₀/well에서는 실험에 사용한 AZT 농도 전구간인 0.001 µg/ml부터 10 µg/ml까지, 그리고 100 TCID₅₀/well에서는 1 µg/ml까지 syncytium을 형성하여 AZT에 대해 저항성이 있음이 확인되었다. HTLV-IIIb와 AZT-susceptible HIV-1주는 접종량이 300 TCID₅₀/well에서는 0.1 µg/ml까지, 그리고 100 TCID₅₀/well에서는 0.01 µg/ml까지 syncytium을 형성하여 AZT에 대한 감수성을 나타내었다. 대조 바이러스의 AZT 저항성과 나타난 실험 결과를 비교한 결과 본 실험의 체계가 AZT에 대한 저항성을 판별가능함을 확인하였다. 국내 HIV-1 분리주 중 AZT를 36개월 동안 복용한 8812와 9113은 AZT 농도 전구간인 0.001 µg/ml부터 10 µg/ml까지 syncytium을 형성하여 AZT에 대한 저항성을 나타내었으며, AZT에 노출되지 않은 분리주 8806과 9671은 0.01 µg/ml까지 syncytium을 형성하여 AZT에 대해 감수성이 있음을 보였다. Syncytium 형성 관찰 시험에서 특이한 것은 AZT 100 µg/ml에서 syncytium이 형성되었다는 사실이다. 이론적으로는 약제의 농도가 높을수록 세포독성은 높아지고, 약제에 의한 바이러스의 억제능력이 강해지나 Table 2에서 보는 바와 같이 AZT 100 µg/ml에서는 MT-2 세포의 viability가 74.4%이므로 약간의 세포독성이 존재한다. 이와 같이 세포독성을 일으키는 농도중 특정 농도에서는 역으로 세포를 활성화시키므로 바이러스 감염으로 인해 바이러스가 복제될 수 있어서 syncytium 형성이 가능하리라고 추정되지만, Fig. 2, 3, 4의 결과 역전사효소 활성과 p24 항원량은 전혀 감지 되지 않아 이 구간에서 HIV-1의 증식이 있었던 것은 아님을 알 수 있다.

HIV-1 reverse transcriptase assay에 의해 AZT에 대한 저항성을 측정하였다. Table 4와 Fig. 2에서 보는 바와 같이 HIV-1 접종량이 300 TCID₅₀/well 일 때, HTLV-IIIb와 AZT-susceptible HIV-1주의 IC₅₀는 각각 0.0034 µg/ml과 0.001 µg/ml 이하였다. 여기에 비해 이미 AZT에 대해 저항성이 존재함이 입증된 HIV-1 RTMC/MT-2주와 AZT-resistant

HIV-1주는 IC₅₀가 100.0 µg/ml 이상과 0.28 µg/ml로서 HTLV-IIIb에 비해 약 29,400배 이상과 약 82배로 저항성이 존재함을 알 수 있다. 국내 HIV-1 분리주 중 AZT를 36개월 복용한 9113은 IC₅₀가 100.0 µg/ml 이상으로 HTLV-IIIb에 비해 약 29,400배 이상 존재함을 알 수 있고, HIV-1 분리주 중 AZT를 복용하지 않은 8806과 9571은 IC₅₀가 HTLV-IIIb와 유사하여 AZT에 대해 감수성이 있음을 알 수 있었다. Table 4와 Fig. 3에서 보는 바와 같이 HIV-1 접종량이 100 TCID₅₀/well일 때, HTLV-IIIb와 AZT-susceptible HIV-1주는 IC₅₀가 서로 유사하여 0.001 µg/ml 이하의 IC₅₀이었으며, HIV-1 RTMC/MT-2주와 AZT-resistant HIV-1주는 IC₅₀가 각각 0.090 µg/ml과 0.54 µg/ml로서 HTLV-IIIb에 비해 약 90 및 540배 이상 저항성이 존재함을 알 수 있었다. 국내 HIV-1 분리주 중 AZT를 36개월 복용한 8812와 9113의 IC₅₀ 역시 68.97과 100.0 µg/ml 이상으로 HTLV-IIIb에 비해 약 69,000 및 100,000배 이상의 저항성이 높음을 알 수 있었고, HIV-1 분리주 중 AZT를 복용하지 않은 8806과 9571은 AZT에 대해 감수성이 있음을 알 수 있었다.

p24 antigen detection ELISA에 의해 AZT에 대한 저항성을 평가하였을 때, Table 5와 Fig. 4에서 보는 바와 같이 HIV-1 접종량이 100 TCID₅₀/well일 경우 HIV-1 표준주인 HTLV-IIIb, AZT-susceptible HIV-1주 및 HIV-1 분리주 중 AZT를 복용하지 않은 8806과 9571의 IC₅₀는 각각 0.0089, 0.0086, 0.0044, 0.0054 µg/ml로 AZT에 대한 감수성을 보였다. 이에 비해 HIV-1 RTMC/MT-2주와 AZT-resistant HIV-1주는 IC₅₀가 0.41과 7.55 µg/ml로서 HTLV-IIIb에 비해 약 46 및 850배의 저항성이 존재함을 알 수 있었다. 그리고 HIV-1 분리주 중 AZT를 36개월 복용한 8812는 IC₅₀가 100.0 µg/ml 이상으로 HIV-1 표준주 보다 약 11,000배 이상 AZT에 대한 저항성이 존재함을 알 수 있었으나, 9113은 IC₅₀가 약 0.001 µg/ml로 AZT에 대해 전혀 저항성이 없는 것으로 나타났다. 여기에서 9113과 같은 경우는 syncytium 형성 관찰과 HIV-1 reverse transcriptase assay에서는 AZT에 대한 저항성이 매우 높았으므로, 이 결과가 무엇을 의미하는지는 HIV-1 9113의 유전적 성상 분석이 수행되어야 밝혀질 것으로 생각된다.

Erice는 plaque reduction assay 결과 IC₅₀이 1 µM (≒0.267 µg/ml) 이상일 경우 AZT에 대한 저항성

을 가졌다고 하였는데 [9], 본 연구 결과 국내 HIV-1 분리주의 IC₅₀을 살펴보면 syncytium 형성의 경우와 reverse transcriptase assay 및 p24 antigen detection ELISA 결과 0.267 µg/ml 이상일 경우 AZT에 대한 저항성이 있다고 나타나 다른 연구에서 제시된 기준과 일치함을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 특이한 사항은 AZT에 내성을 보이는 국내 HIV-1 분리주가 현재까지 밝혀진 AZT 내성주 [10-12]에 비해 저항성이 약 10에서 200배 이상 강하다는 점이다. 이러한 현상은 gag 유전자내에 돌연변이가 여러 부위에서 일어날 수록 저항성이 증가하는 것으로 설명이 가능하나 그 이외의 다른 요인에 의한 가능성도 배제할 수 없다. 따라서 이들 국내 AZT 내성 분리주의 유전적 성상이 밝혀지고 그 원인을 찾는다면 앞으로 AZT 외에도 ddI, ddC 등 nucleoside analogue 계열의 약제 내성 [13-16] 뿐만아니라 protease inhibitor에 대한 약제 내성 [17-18]을 이해하는데 폭넓게 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

국내 HIV-1 분리주의 zidovudine (AZT)에 대한 저항성을 *in vitro*에서 표현되는 biological phenotype의 차이로 구분하기 위하여 HIV-1 wild type인 HTLV-IIIb와 AZT 내성주인 HIV-1 RTMC/MT-2주를 각각 음성 및 양성 대조로 하였으며, 또 다른 대조 시험으로 HIV-1 감염자로부터 AZT 복용전과 복용후 분리된 HIV-1 분리주를 사용하였다.

1. MT-2 세포에서 바이러스 양을 300 TCID₅₀/well과 100 TCID₅₀/well로 달리하여 접종한 후 4일간 배양하면서 syncytium 형성, HIV-1 역전사 효소 활성, HIV-1 p24 항원 생성량 등을 조사하였을 때, 국내 HIV-1 분리주 중에서 AZT를 복용하지 않은 감염자로부터 분리된 HIV-1 8806과 9571은 대조군으로 사용한 HIV-1 wild type인 HTLV-IIIb주와 AZT 복용전에 분리된 AZT-susceptible HIV-1주와 비슷한 정도로 감수성을 나타내었다.

2. 국내 HIV-1 분리주 중에서 36개월 동안 AZT를 복용한 감염자로부터 분리한 HIV-1 8812와 9113의 AZT 저항성을 syncytium 형성 유무로 조사하였을 때, 8812는 HIV-1 RTMC/MT-2주와 비슷하게 AZT 1 µg/ml까지 syncytium을 형성하였

고, 9113은 AZT-resistant HIV-1주와 동일하게 AZT 10 µg/ml까지 syncytium을 형성하여 AZT에 대한 저항성을 나타냈다.

3. AZT 저항성을 HIV-1 역전사효소 활성과 p24 항원 생성양으로 평가하였을 때에는 AZT를 복용한 국내 HIV-1 감염자로부터 분리한 8812와 9113은 AZT 저항성주로 밝혀진 HIV-1 RTMC/MT-2와 AZT-resistant HIV-1주에 비해 약 10배에서 200배 이상 AZT에 대한 저항성이 강한 것으로 나타나 이들에 대한 유전적 성상분석이 필요하다.

참 고 문 헌

1. WHO Weekly epidemiological record 71: 205-212, 1996.
2. Shin Yung O, Jang Yung S, Hur Sook J, Kee Mee K, Kim Sung S, Choi Byeung S, Choi Min H, Cheon Won K, Chae Kwon S, Lee Young J: Seroepidemiological and Immunological study on human immunodeficiency virus (HIV) infection in Korea. The Report of National Institute of Health 31: 212-222, 1994.
3. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furma PA, St Clair MH, Nusinoff Lehrman S, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW, Broder S: 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 82: 7096-7100, 1985.
4. Fischl MA, Richman DD, Hansen N: The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection. A double blind placebocontrolled trial. Ann Intern Med 112: 727-737, 1990.
5. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH: The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A doubleblind placebocontrolled trial. N Engl J Med 317: 185-191, 1987.
6. Larder BA, Darby G, Richman DD: HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. Science 243: 1731-

- 1734, 1989.
7. Kellam P, Boucher CA, Tijnagel J-GH, Larder BA: Zidovudine treatment results in the selection of human immunodeficiency virus type 1 variants whose genotypes confer increasing levels of drug resistance. *J Gen Virol* 75: 341-351, 1994.
 8. Balzarini J, Karlsson A, Perez-Perez M-J, Camarasa M-J, De Clercq E: Knowing-out concentrations of HIV-1 specific inhibitors completely suppress HIV-1 infections and prevent the emergence of drug-resistant virus. *Virology* 196: 576-585, 1993.
 9. Erice A, Balfour HH: Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to antiretroviral agents: A review. *Clinical Infectious Disease* 18: 149-156, 1994.
 10. Larder BA, Coates KE, Kemp SD: Zidovudine-resistant human immunodeficiency virus selected by passage in cell culture. *J Virol* 65: 5232-5236, 1991.
 11. Larder BA, Kemp SD: Multiple mutation in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 246: 1155-1158, 1989.
 12. Kellam P, Boucher CA, Larder BA: Fifth mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1934-1938, 1992.
 13. St Clair MH, Martin JL, Tudor WG, et al: Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 253: 1557-1559, 1991.
 14. Gu Z, Gao Q, Li X, Parniak MA, Wainberg MA: Novel mutation in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene that encodes cross-resistance to 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxycytidine. *J Virol* 66: 7128-7135, 1992.
 15. Zhang D, Caliendo AM, Eron JJ, Devore KM, Kaplan JC, Hirsch MS, D'Aquila RT: Resistance to 2',3'-dideoxycytidine conferred by a mutation in codon 65 of the HIV-1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 282-287, 1994.
 16. Fitzgibbon JE, Howell RM, Habertzell CA, Sperber SJ, Gocke DJ, Dubin DT: Human immunodeficiency virus type 1 pol gene mutations which caused susceptibility to 2',3'-dideoxycytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 153-157, 1992.
 17. Kaplan AH, Michael SF, Wehbie RS, Knigge MF, Paul DA, Everitt L, Kempf DJ, Norbeck DW, Erickson JW, Swanstrom R: Selection of multiple human immunodeficiency virus type 1 variants that encode viral protease with decreased sensitivity to an inhibitor of viral protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5597-5601, 1994.
 18. Tisdale M, Myers R, Parry NR, Oliver N, Machera B, Blair E: Comprehensive analysis of HIV-1 variants individually selected for resistance to six HIV protease inhibitor. *Third International Workshop on HIV Drug Resistance, Kauai, Hawaii, USA, 1994.*