대한의생명과학회지: 제6권 제1호 2000
Korean J. Biomed. Lab. Sci.
Vol. 6, No. 1, p.19~28, March, 2000

Influenza Virus Type A 감염 MDCK 세포에 있어서 Glutathione S-transferase의 활성 변동

대구광역시 보건환경연구원 보건연구부 역학조사과, 계명대학교 공중보건학과*,
계명문화대학 식품과학과**

김병렬 · 박남표 · 윤종국*† · 전태원* · 이상일**

국문초록: 농도와 기간에 따른 바이러스 감염 및 항바이러스제인 amantadine 병행 첨가 시 Maddin-Darby canine kidney (MDCK) 세포 내의 free radical 해독계 효소인 glutathione S-transferase (GST)와 lactate dehydrogenase (LDH)의 활성 변동을 상호비교 관찰하였다. 바이러스에 감염된 MDCK 세포는 감염 3일 후 1 $TCID_{50}$ 군은 80% 이상, 10 $TCID_{50}$ 군은 거의 대부분의 단층세포가 탈락되는 병변 효과가 나타났다. Amantadine cytotoxic dose %가 증가함에 따라 MDCK 세포 내의 GST 및 LDH 활성은 농도에 따라 유의하게 감소되었고, 감염배지 내 LDH 활성은 대조군 보다 유의한 증가를 보였다. 인플루엔자 바이러스 type A 접종농도와 기간에 따른 MDCK 세포 내의 GST 및 LDH 활성은 1 및 10 $TCID_{50}$ 감염군에서 감염 3일 후부터 유의하게 감소되었고, 감염배지 내의 LDH 활성은 10배 이상 증가되었다. 인플루엔자 바이러스 type A 100 $TCID_{50}$ 감염과 amantadine 병행 첨가 시 GST 및 LDH 활성은 바이러스만 감염한 군 보다 MDCK 세포 내에서 대조군에 비하여 감소율이 낮았고, 감염배지 중 LDH 활성 역시 증가율이 낮았다. 또한 바이러스 감염 후 amantadine 90 μg/ml 첨가 시에 세포 내와 감염배지 중에서 가장 낮은 감소와 증가를 나타냈다.

서 론

세계 여러 지역에서 호흡기질환의 중요한 원인 바이러스 가운데 하나로 알려져 있는 인플루엔자 바이러스는 건강한 성인에게는 경미한 상기도감염증 정도만을 야기하나 노약자, 어린이, 만성질환자 및 심장질환자 등에게는 생명의 위험을 초래할 정도로 심한 급성 호흡기질환을 유발하기도 한다[26].

보통 성인의 경우 1년에 두세 번 정도 인플루엔자 바이러스에 감염되며, 이로 인해 유발되는 독감 그 자체보다는 합병증에 의한 피해가 더욱 심각하여, 1918~1919년에 "스페인 인플루엔자 바이러스" 감염에 의한 독감으로 2천만명 이상이 희생되었고, 미국의 경우에도 대유행 시 3만명 이상이 사망하였다는 보고[2]가 있다.

현재에도 지구상의 많은 사람들이 이들 호흡기 바이러스에 의해 야기되는 질병으로 고통받고 있으며, 이의 예방을 위한 백신의 접종이 시행되어 오고 있으나, 백신은 장기간 비축이 불가능하여 공급량이 부족할 뿐만 아니라 계란 알레르기 등으로 백신접종이 어려운 사람들도 있어 백신에 의한 예방접종을 보완한다는 차원에서 항바이러스 제제의 필요성이 요구되고 있다[11].

지금까지 A형 바이러스의 초기 감염치료에 널리 처방되어져오고 있는 amantadine과 rimantadine 등의 화학요법제[12,13,27]는 환각, 수면장애 등의 정신신경계 부작용과 구토, 식욕부진 등의 소화기계 부작용 등 및 고령자, 신질환자, 혈액투석 환자 등에 사용 시는 부작용을 경고하고 있으며, 특히 1세 미만의 영아에게는 예방 목적으로 권장되지 않는 것으로 보고[19]되고 있어 독성이 없으면서

*논 문 접 수 : 1999년 8월 16일
수정재접수 : 1999년 10월 20일
†별책 요청 저자: (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000번지, Tel: (053) 580-5230, Fax: (053) 580-5164, E-mail: jky446@kmucc.keimyung.ac.kr

도 탁월한 예방과 치료 효과를 나타내는 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스제의 개발은 아직도 만족할 만한 수준에 이르지 못하고 있는 실정에 있다.

Glutathione S-transferase (GST)는 독성물질의 해독과정에 관여하는 효소[4,15,16]로서 주로 동물조직 세포 내에 다량함유[16] 되어 있으며, 체내에서 생성되어진 free radical인 친전자성 물질 (electrophilic compounds)[6,28]을 glutathione과 포합 시킴으로서 무독화 시키는 것[9]으로 알려져 있다. 또한 GST는 다가 불포화지방산으로부터 생성되어진 과산화지질을 대응하는 지질 alcohol로 전환시킴으로서 생체를 oxidative stress로부터 보호해 주는 것으로 보고[5,22,23]되고 있으나 아직까지 인플루엔자 바이러스 감염 시 그 변동에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 개의 신장에서 분리 배양되어 인플루엔자 바이러스의 분리 검출에 주로 이용[1] 되고 있는 인플루엔자 감수성 세포인 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 세포를 대상으로 하여 인플루엔자 바이러스 type A 감염 시 및 항바이러스제로 이용되고 있는 amantadine 투여 시 생체 내 해독계 (detoxification pathways) 효소의 일종인 GST의 활성 변동과 세포병변현상을 형태학적으로 관찰함과 동시에 세포독성의 정도를 확인할 수 있는 lactate dehydrogenase (LDH) 활성 변동을 상호비교 검토함으로써 인플루엔자 바이러스 감염 환자 및 항바이러스제 처치 환자에 있어서 독성물질 노출 시에 건강장해 예방을 위한 기초자료를 제시코자 한다.

재료 및 방법

1. 세포 및 바이러스주

1) 숙주세포

Maddin-Darby canine kidney (MDCK) 계대 세포주를 국립보건원으로부터 분양받아 증식하여 사용하였다. 세포배양액은 Eagles minimum essential medium (EMEM, Sigma) 90 ml에 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma) 0.22% sodium bicarbonate (Sigma), penicillin (10,000 unit/ml)/streptomycin (10 mg/ml) 1 ml 당 0.1 ml, nystatine (2,500 unit/ml) 1 ml 당 0.0025 ml를 사용하였다.

2) 바이러스주

실험에 이용한 바이러스는 미국 center for disease (CDC)로부터 분양받은 A/Taiwan/1/86 (H_1N_1) 주를 국립보건원에서 분양받아 사용하였다.

3) 바이러스 증식

바이러스들은 specific pathogen free (SPF) 수정계란 (embryonated hen's egg)을 10일간 37℃ 부란기에서 부화시킨 후 장뇨막 (chorioallantoic sac)에 바이러스를 0.2 ml 접종 후 37℃에서 3일간 증식시킨 후 4℃에서 18~24시간 보관한 후 바이러스가 들어있는 장뇨액을 캐필러리 피펫으로 추출하여 4℃, 8,000×g에서 10분간 3회에 걸쳐 원심분리 후 상층액을 0.45 μm filter로 여과하여 사용하였다[20]. 세포접종액은 EMEM 95 ml에 MEM vitamin 5 ml, glucose sol. (45%, Sigma) 0.2 ml, 0.22% sodium bicarbonate, penicillin (10,000 unit/ml)/streptomycin (10 mg/ml) 1 ml 당 0.1 ml, nystatine (2,500 unit/ml) 1 ml 당 0.0025 ml, trypsin (crystalized) 2.0 μg을 사용하였다.

2. 바이러스의 역가 측정

SPF 수정계란의 장뇨액에서 증식된 바이러스의 역가를 hemagglutination assay (HA)로 실시하여 1:480의 역가를 얻어 본 실험에 사용하였다.

HA의 측정 방법은 microtitration plate에 바이러스 시료를 2배 연속 희석하여 50 μl씩 투여한 후 PBS로 씻은 0.5% chicken RBC 용액을 50 μl 가하여 바이러스와 응집이 일어나도록 하였다. 상온에서 60분 동안 반응시킨 후 음성대조군과 비교하여 응집역가를 측정하였다.

3. 50% Tissue culture infective dose ($TCID_{50}$) 측정

인플루엔자 분리 방법의 바이러스 검출력 (detectability)을 알아보기 위하여 감수성 세포인 MDCK에서의 $TCID_{50}$을 측정하였다.

SPF 수정계란의 장뇨액에서의 역가를 최종농도 1 HA unit/0.1 ml가 되도록 희석한 후 이를 다시 10배 연속 희석하여 96 well plate에서 monolayer을 형성한 MDCK 세포에 접종하여 일어나는 현상을 Reed와 Muench의 방법[24]에 따라 측정하였다.

4. Amantadine의 세포독성

Well 당 2.0×10^4개의 MDCK 세포가 첨가된 96 well plate를 3일간 배양 후 amantadine · HCl (Sigma)을 접종액 최종농도 ml 당 1.0 mg으로 2배 연속 희석하여 96 well plate에 각각 첨가한 다음

37℃, 5% CO_2 보습 인큐베이터에서 5일간 배양하고 Mosmann의 방법[21]에 준해 조제된 MTT assay에 의한 cell proliferation kit를 사용하여 cytotoxic dose (CD)를 측정[7,10,29]하였다.

5. 세포주의 처리와 효소액의 조제

3일 배양된 MDCK 세포에 접종용 배양액만 처리한 대조군, amantadine 첨가군, 바이러스 감염군, 바이러스 감염 후 amantadine 첨가군 등으로 분리하였다. Amantadine 첨가군은 cell CD 25, 50, 75%를 결정하여 세포접종액으로 희석 후 첨가시켜 5일간 배양하고 사용하였으며, 바이러스 감염군은 0.1, 1, 10 $TCID_{50}$를 결정하여 접종액에 부유하여 1, 2, 3 및 5일 간격으로 접종하였다. 바이러스 감염 후 amantadine 첨가군은 바이러스 100 $TCID_{50}$ 접종 후 amantadine 농도별로 처리하여 3일간 감염시켰다. 각 군의 효소 시료는 단층세포 분획과 접종액 분획을 사용하였으며 단층세포 분획은 cell scrapers를 사용하여 수집된 세포를 0.25 M sucrose 용액 (2 mg/flask)으로 부유시켜 freezing & thawing하여 세포를 파괴한 후 효소액으로 사용하였다.

6. 효소활성도 측정

1) Glutathione S-transferase (GST) 활성도 측정

GST의 활성도 측정은 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione을 기질로 하여 25℃에서 10분간 반응시키는 동안 생성된 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate 양을 340 nm에서 측정하는 Habig 등의 방법[9]에 준하였다. 활성도 단위는 효소 반응액 중에 함유된 단백 1 mg이 1분 동안 반응하여 생성시킨 conjugate의 양을 nmole로 표시하였다.

2) Lactate dehydrogenase (LDH) 활성도 측정

LDH의 활성도 측정은 기질인 lactate를 탈수소시켜 pyruvate를 생성하는데 이때 보효소 NAD가 NADH로 환원되고 1-methoxy-5-methyl phenazinium methylsulfate 존재하에 37℃ 10분간 반응 시 nitrotetrazolium blue를 환원시켜 deformazan의 색조를 비색정량하는 Babson과 Phillips 방법[3]에 준해 제조된 kit (LDH-Lq, 아산제약)를 사용하였다. 활성도 단위는 Wroblewski 단위[30]로 표시하였다.

7. 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등의 방법[18]에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

8. 바이러스 증식과정 관찰

배양 3일 후 세포단층을 이룬 플라스크에 type A 바이러스를 0.1, 1, 10 $TCID_{50}$ 농도별로 감염시켜 3일간 배양하고 바이러스에 감염된 세포의 변화를 도립현미경으로 관찰하였다.

한편 얻어진 실험 성적들의 평균치 중 상호비교가 필요한 경우에는 student's t-검정법[25]으로 하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결 과

1. $TCID_{50}$ 측정

1 HA unit의 A/Taiwan/1/86 (H_1N_1) 바이러스를 분리에 이용되는 방법에 따라 MDCK 세포에 접종시킨 결과 $1.78\pm0.5\times10^6$/ml $TCID_{50}$ (n=5) 값을 얻었다.

2. Amantadine의 세포독성 농도

화학요법제인 amantadine · HCl을 단층을 이룬 MDCK 세포에 첨가 3일 후의 세포독성 농도를 관찰한 값은 Table 1과 같다.

정상세포에 대한 amantadine의 25% 세포독성은 145 μg/ml, 50% 세포독성은 212 μg/ml, 75% 세포독성은 321 μg/ml로 나타났다.

3. MDCK 세포에 감염시킨 인플루엔자 바이러스의 증식과정 관찰

장뇨액에서 분리된 인플루엔자 바이러스를 0.1, 1, 10 $TCID_{50}$ 농도별로 MDCK 세포에 감염시켜 3일간 배양하면서 도립현미경으로 증식과정을 관

Table 1. Cytotoxic effects of amantadine · HCl in MDCK cells

Group	CD 25%[1)]	CD 50%	CD 75%
Amantadine · HCl (μg/ml)	145 (126~163)	212 (202~221)	321 (308~334)

The assay procedure was described in the experimental methods. Data are expressed as mean of 3 separate experiments, with ranges given in parenthesis. [1)] *Cytotoxic dose; the dose required to reduced cell viability by percent, as determined by the MTT method.*

찰하였다 (Fig. 1).

바이러스 감염 1일 경과 후에는 모든 실험군에서 특이한 세포병변현상을 관찰할 수 없었으나, 36시간 경과 후부터는 10 $TCID_{50}$ 감염군에서, 2일째는 1 $TCID_{50}$ 감염군에서 부분적으로 플라스크로부터 세포가 분리되었으며, 3일 경과 후에는 정상대조군에서는 거의 변화가 없었으나, 반면에 0.1 $TCID_{50}$ 감염군은 섬유아세포의 모양이 변형되었

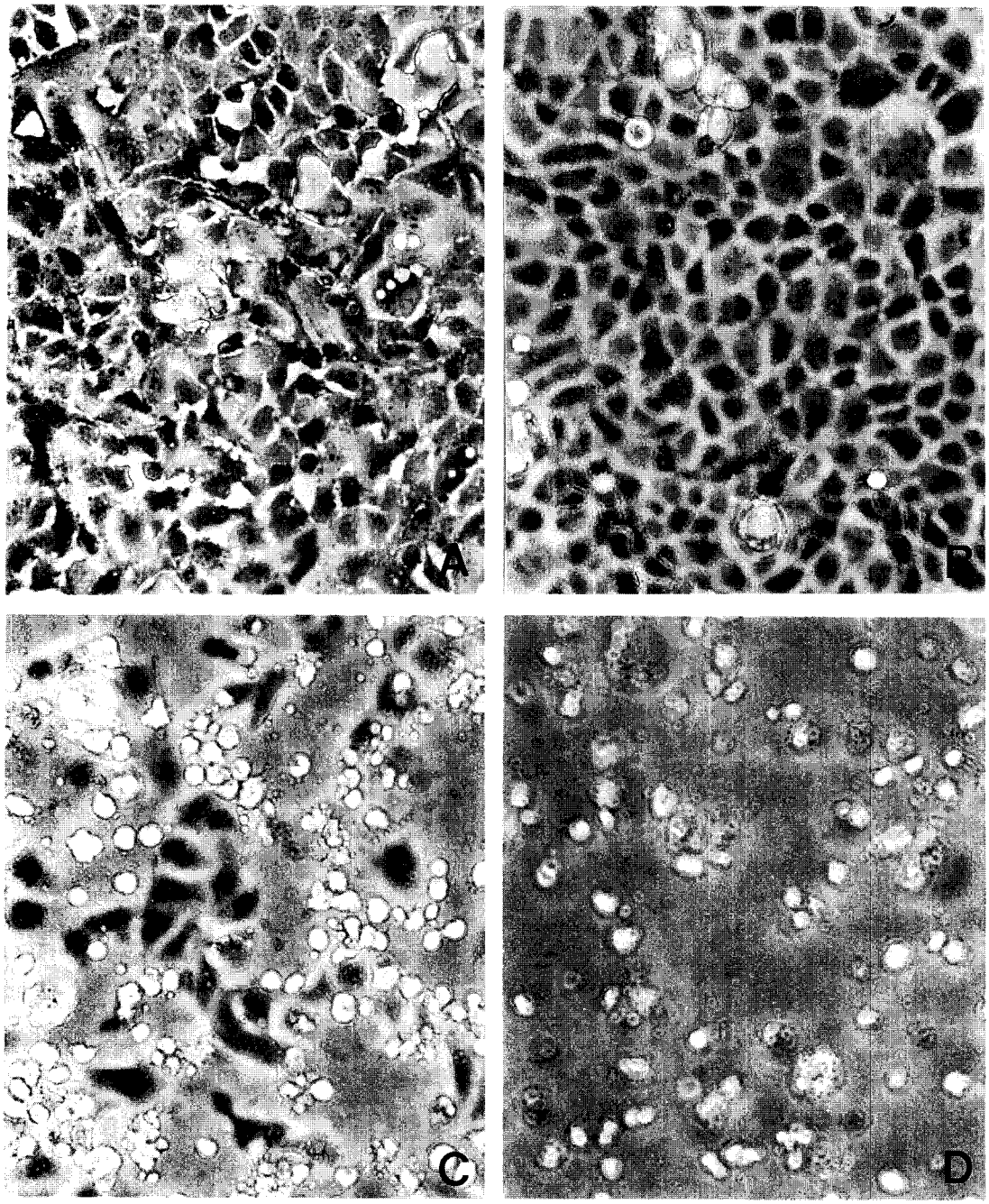

Fig. 1. Micrographs of MDCK cells infected with Influenza virus type A (H1N1). Normal MDCK cells (**A**), 0.1 $TCID_{50}$ (**B**), 1 $TCID_{50}$ (**C**), 10 $TCID_{50}$ (**D**) treated with influenza virus for 3 day at 37℃. (× 200)

Table 2. Dose response for amantadine on the monolayer and medium fraction glutathione S-transferase (GST) and lactate dehydrogenase (LDH) activities in MDCK cells

Group	GST (nmoles/min/mg protein)		LDH (Wroblewski unit)	
	Monolayer F.	Medium F.	Monolayer F.	Medium F.
Control	228.72± 6.93	54.93±8.43	1501.03±34.71	11.33±0.83
CD[1] 25%	199.87±11.91	52.70±7.44	973.34±22.82***	16.67±1.25*
50%	168.86±15.68*	52.64±4.68	860.05±41.54***	23.00±2.13**
75%	144.18± 6.40***	52.14±4.79	605.76±25.21***	25.67±1.76**

The assay procedure was described in the experimental methods. Data are expressed as mean±S.E. for 3 separate experiments. [1] Cytotoxic dose of amantadine treated MDCK cell. Significantly different from the control (*; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$)

Table 3. Changes of the glutathione S-transferase (GST) and lactate dehydrogenase (LDH) activities in MDCK cells treated with influenza virus type A

Group		GST (nmoles/min/mg protein)		LDH (Wroblewski unit)	
		Monolayer F.	Medium F.	Monolayer F.	Medium F.
1 Day	Control	207.02±3.42	59.59±3.10	1451.32±14.41	9.33±1.20
	0.1 T[1]	212.63±5.96	59.98±2.70	1436.75±16.03	11.35±0.33
	1 T	207.76±0.82	59.69±2.31	1442.77± 7.06	9.00±0.58
	10 T	211.65±4.80	61.01±1.65	1420.02±13.17	12.33±1.37
2 Day	Control	210.25±3.05	55.11±2.07	1435.04±13.92	10.00±0.58
	0.1 T	203.35±8.26	56.95±3.04	1435.33± 8.52	9.12±0.72
	1 T	155.42±4.12***	47.12±1.24	1083.32±39.93**	28.67±4.16*
	10 T	139.85±4.30***	48.02±3.65	1049.71±28.64***	36.55±5.28**
3 Day	Control	211.19±8.35	48.77±6.14	1460.74±15.22	12.03± 2.52
	0.1 T	202.47±6.37	52.39±11.47	1396.21±22.37	17.38± 1.20
	1 T	153.16±5.41**	50.38±2.33	704.32±32.51***	105.47±11.06**
	10 T	142.06±9.60**	47.17±5.84	263.34± 9.43***	129.18± 8.72***
5 Day	Control	210.24±5.36	56.63±4.12	1194.03±11.65	10.67± 0.88
	0.1 T	179.78±4.58*	43.49±1.39	58.38± 5.62***	147.00±13.65***
	1 T	138.15±6.10***	43.09±9.35	22.25± 4.37***	179.67±16.15***
	10 T	140.16±4.93***	45.61±5.65	21.08± 3.32***	174.33±12.41***

The assay procedure was described in the experimental methods. Data are expressed as mean±S.E. for 3 separate experiments. [1] $TCID_{50}$ of influenza virus type A. Significantly different from the control (*; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$).

고, 1 $TCID_{50}$ 감염군은 80% 이상, 10 $TCID_{50}$ 감염군의 세포는 거의 대부분 세포가 플라스크로부터 탈락된 것을 관찰할 수 있었다.

4. Amantadine의 첨가농도에 따른 MDCK 세포내와 배양배지 중 GST 및 LDH 활성도 변동

Amantadine의 첨가농도를 달리하여 5일간 배양

Table 4. Changes of the glutathione S-transferase (GST) and lactate dehydrogenase (LDH) activities in amantadine treated MDCK cells preinfected with influenza virus type A

Group	GST (nmoles/min/mg protein)		LDH (Wroblewski unit)	
	Monolayer F.	Medium F.	Monolayer F.	Medium F.
Control	234.31±4.26	56.19±5.81	1440.73±21.05	12.00±1.53
100 T[1)]	139.71±4.51$^{***a)}$	49.25±3.75	55.76± 8.81$^{***a)}$	206.67±12.53$^{***a)}$
T + 10A[2)]	141.86±3.39$^{***a)}$	52.64±6.90	645.34±31.92$^{***a)}$	172.33±10.73$^{***a)}$
T + 20A	135.19±7.77$^{***a)}$	54.25±7.75	417.06±23.12$^{***a,b)}$	145.67±4.63$^{***a),*b)}$
T + 30A	144.70±6.72$^{***a)}$	45.38±6.63	465.38±31.13$^{***a,b)}$	126.33±5.24$^{***a),**b)}$
T + 40A	148.70±5.78$^{***a)}$	42.47±10.90	587.22±30.65$^{***a,b)}$	95.05±6.56$^{***a),**b)}$
T + 50A	157.28±1.80$^{***a),*b)}$	47.44±5.07	672.14±28.67$^{***a,b)}$	82.45±8.93$^{***a),**b)}$
T + 60A	162.73±4.45$^{***a),*b)}$	52.48±5.56	680.34±10.11$^{***a,b)}$	72.33±2.91$^{***a,b)}$
T + 70A	166.16±4.09$^{***a),*b)}$	48.56±2.06	694.56±12.29$^{***a,b)}$	55.35±8.41$^{***a,b)}$
T + 80A	158.70±5.03$^{***a),*b)}$	54.25±7.75	733.72±16.21$^{***a,b)}$	42.67±2.91$^{***a,b)}$
T + 90A	180.96±3.10$^{***a),**b)}$	49.67±10.27	825.08±16.66$^{***a,b)}$	22.33±2.33$^{**a),***b)}$
T + 100A	166.01±3.67$^{***a),*b)}$	44.98±4.49	807.72±24.85$^{***a,b)}$	26.67±2.41$^{**a),***b)}$

The assay procedure was described in the experimental methods. Data are expressed as mean±S.E. for 3 separate experiments. [1)] 100 $TCID_{50}$ of influenza virus type A. [2)] Amantadine dose (μg/ml) preinfected with 100 $TCID_{50}$ of influenza virus type A. [a)] Significantly different from the control, [b)] Significantly different from 100 $TCID_{50}$ of influenza virus type A. (*; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$)

한 각 군의 단층세포 내와 배양배지 중의 GST 및 LDH 활성도 변동을 나타낸 결과는 Table 2와 같다.

단층세포 내 CD 25%군의 GST 활성도는 대조군 보다 약간 감소되는 경향을 나타냈고 LDH 활성도는 35%의 유의한 ($p<0.001$) 감소를 보였으며, CD 50%와 75%군의 GST 활성도는 약 26% ($p<0.05$)와 37% ($p<0.001$), LDH 활성도는 약 43%와 60%의 유의한 ($p<0.001$) 감소를 나타냈다. 그리고 배양배지 중 GST 활성도는 각 군 상호간에 상이한 변동을 관찰할 수 없었으나 LDH 활성도는 CD 25, 50 및 75%군 모두에서 대조군과 비교해 약 32 ($p<0.05$), 51, 56%의 유의한 ($p<0.01$) 증가를 관찰했다.

5. 인플루엔자 바이러스 type A 감염농도 및 기간에 따른 MDCK 세포 내와 감염배지 중 GST 및 LDH 활성도 변동

인플루엔자 바이러스의 감염농도를 달리하면서 배양기간에 따른 MDCK 단층세포와 감염배지 중의 GST 및 LDH 활성도 변화를 관찰한 성적은 Table 3이다.

감염 1일째의 경우 바이러스 감염농도에 따른 단층세포 내와 감염배지 내의 GST 및 LDH 활성도는 대조군과 비교해 상이한 변동이 없었다. 감염 2일째, 단층세포 내의 GST 및 LDH 활성도는 대조군에 비하여 1 및 10 $TCID_{50}$ 군에서 약 20%와 30% 이상의 유의한 ($p<0.001$) 감소를 보였으며, 감염배지 내의 GST 활성도는 대조군과 감염군 모두 별다른 변화가 없었으나 LDH 활성도는 1 및 10 $TCID_{50}$ 군에서 약 3배 ($p<0.05$)와 4배 ($p<0.01$)의 유의한 증가를 나타냈다. 감염 3일째는 1, 10 $TCID_{50}$ 군에서 약 27, 33% ($p<0.01$)의 GST 활성도와 50% ($p<0.001$) 이상의 LDH 활성도가 단층세포 내에서 대조군에 비해 유의하게 감소되었으나 0.1 $TCID_{50}$ 군에서는 유의한 변동이 없었다. 그리고 감염배지 중 1 및 10 $TCID_{50}$ 군에서는 LDH 활성도가 약 9배 ($p<0.01$)와 11배 ($p<0.001$)의 현저한 증가를 나타냈다.

또한 감염 5일째 GST 활성도는 각 바이러스 감염군별로 약 14, 34 및 37%의 유의한 ($p<0.001$) 감소를, LDH 활성도는 약 20, 54 및 57배의 현저한 ($p<0.001$) 감소를 단층세포 내에서 보였으며, 감염배지 내의 LDH 활성도는 대조군 보다 바이러스

감염군 모두에서 10배 ($p<0.001$) 이상 증가됨을 관찰할 수 있었다.

6. 인플루엔자 바이러스 type A 감염 후 amantadine 첨가량 변화에 따른 MDCK 세포 내와 감염배지 중 GST 및 LDH 활성도에 미치는 영향

인플루엔자 바이러스 type A 100 $TCID_{50}$을 감염시킨 후 amantadine의 첨가량을 달리하여 배양시킨 3일 후 단층세포 및 플라스크 상층 감염배지 내 GST 및 LDH의 활성도를 관찰한 성적은 Table 4와 같다.

단층세포 내 바이러스 감염군은 대조군에 비하여 GST, LDH 활성도 모두 약 40%와 26배의 현저한 ($p<0.001$) 감소를 관찰할 수 있었으며 바이러스 감염 후 amantadine 첨가군은 첨가량 10~100 μg/ml에서 GST 활성도는 대조군 보다 유의하게 ($p<0.001$) 감소되었고 그 감소율은 90 μg/ml 첨가 시 약 23%로 가장 낮았으며, 바이러스 감염군 보다는 50 μg/ml부터 유의한 ($p<0.05$) 증가를 보였고, 90 μg/ml 첨가 시 가장 높은 증가 ($p<0.01$)를 보였다. 그리고 LDH 활성도는 바이러스 감염 후 amantadine 첨가군은 첨가량 10~100 μg/ml 모두에서 대조군 보다 유의하게 ($p<0.001$) 감소되었으나 바이러스만 감염한 군 보다는 현저히 ($p<0.001$) 증가됨을 관찰하였고 GST 활성도와 마찬가지로 첨가량 90 μg/ml에서 대조군 보다는 약 2배 감소, 바이러스 감염군 보다는 약 15배나 활성도가 증가되었다.

한편 감염배지 내 GST 활성도는 모든 군간에 유의한 변동을 관찰할 수 없었으나, LDH 활성도는 바이러스 감염군 및 바이러스 감염 후 amantadine 첨가군 모두 대조군에 비해 유의하게 ($p<0.001$) 증가되었으며, 바이러스 감염 후 amantadine 첨가군이 바이러스만 감염한 군 보다는 그 증가가 현저히 감소되었고, amantadine 첨가량 90 μg/ml에서 대조군에 비해 약 2배 정도 증가되었으나 바이러스만 감염한 군 보다는 약 9배 이상 감소됨이 관찰되었다.

고 찰

일반적으로 세포 손상은 내, 외인성 요인에 의하여 생성된 free radical 생성계와 해독계의 불균형에 의하여 야기되는 것으로 알려져 있다[8,17]. 이 연구는 인플루엔자 바이러스에 감염된 세포 및 항바이러스제인 amantadine을 동시 첨가한 세포에서 free radical 해독계에 관여하는 효소들 중 GST의 활성 변동을 관찰함과 동시에 세포파괴나 세포막의 투과성 항진 등으로 세포 외로 쉽게 유출되는 LDH의 활성[30]을 측정하여 상호비교 검토함으로써 바이러스 감염세포 및 항바이러스제로 인한 생체의 해독작용에 미치는 영향을 검토코자 하였다.

인플루엔자 바이러스에 노출된 MDCK 단층세포가 대부분이 탈락하는 병변을 나타내는 감염 3일 이상에서 단층세포를 수거해 glutathione S-transferase의 활성을 측정하였을 때, 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 이것은 GST가 생체 내에서 해독과정에 관여하고 있다는 보고들[4,15,16]을 고려해 볼 때, 바이러스에 감염된 세포에서는 독성물질의 해독작용이 억제되고 있음을 시사하고 있으며, 이로 인해 세포의 손상이 증가되어 바이러스 감염배지 내의 LDH 활성도 증가된 것으로 생각된다.

인플루엔자 바이러스 type A 항바이러스제인 amantadine을 MDCK 세포에 접종한 후 5일간 배양하였을 때, amantadine의 첨가농도를 증가시킬수록 비례하여 세포의 탈락현상이 증가되었고, 단층세포의 GST 활성은 정상 대조군에 비해 amantadine의 첨가농도가 증가할수록 반비례하여 유의하게 감소하였으며, LDH의 활성도 이와 유사하게 나타났다. 그리고 감염배지 내의 LDH의 활성이 amantadine 첨가농도에 비례해 유의하게 증가하고 있어 amatadine에 의한 세포독성이 나타나고 있음을 확인할 수가 있다.

한편, 인플루엔자 바이러스 감염과 동시에 amantadine을 첨가시켜 MDCK 세포를 3일간 배양하였을 때, 바이러스 증식으로 인하여 단층세포에서 유의하게 억제되던 GST의 활성이 amatadine의 첨가농도를 높일수록 비례하여 증가하고 있을 뿐만 아니라 LDH의 활성도 이와 유사하게 나타나고 있는 것은 항바이러스제인 amantadine에 의해 바이러스의 증식이 억제된 결과로 사료되며, 바이러스 감염배지 내의 LDH 활성도 amantadine 첨가농도에 따라 바이러스만 감염시킨 실험군에 비해 현저히 감소하고 있어 이를 뒷받침하고 있다. 그러나 세포 손상 시 세포막 외로 유출되어 혈중에 증가하는 것[14]으로 알려져 있는 GST는 본 실험에서 바이러스 감염배지 내의 활성을 검토하였을 때, 바이러스만 감염시킨 배지 내 및 amanta-

dine만 첨가시킨 배지 내 혹은 바이러스 감염과 동시에 amatadine을 첨가시켜 배양시킨 배지 내에서 모두 LDH의 경우와는 달리 별다른 변동이 나타나지 않았다. 이러한 사실은 바이러스 자체 혹은 바이러스에 감염된 세포로부터 유래된 물질 및 amantadine 자체가 GST의 활성을 억제시켜 나타난 것으로 사료되나 본 실험의 결과만으로는 설명할 수가 없다.

이상의 모든 실험 성적들과 문헌상의 지견을 종합해 볼 때, 생체의 해독작용은 바이러스 등과 같은 병원체에 감염됨으로써 상당한 영향이 나타날 것으로 사료되며, 또한 이의 치료 목적에 이용되고 있는 의약품의 경우에도 생체의 해독작용에 영향을 미치고 있어, 산업체에서 근로자들이 이러한 조건하에서 독성물질에 폭로시 심각한 건강장해를 초래할 수 있을 것으로 사료되어지며, 이 부분에 대해서는 추후 계속적인 연구 검토가 행해져야 할 것이다.

참 고 문 헌

1) 김주성, 박근용, 김영선, 안정배, 이민구, 이승, 박용근 (1993): 급성 호흡기바이러스 감염증에 관한 조사 연구. 국립보건원보, **30(1):** 122-130.

2) Aokerlind-Stopner B and Mufson MA (1992): Respiratory viruses in clinical virology mannual. pp. 243-249, Elsevier science publishing, New York.

3) Babson AL and Phillips GE (1965): A rapid colorimetric assay for serum lactic dehydrogenase. *Clinica Chimica Acta,* **12:** 210-215.

4) Boyland E and Chasseaud LF (1969): The rule of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol,* **32:** 173-219.

5) Burk RF, Nishiki K, Lawrence RA and Chance B (1978): Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver. *J Biol Chem,* **253(1):** 43-46.

6) Croci T and Willams GM (1985): Activities of several phase I and phase II xenobiotics biotransformation enzymes in cultured hepatocytes from male and female rats. *Biochem Pharmacal,* **34:** 3029-3055.

7) Denizot F and Lang R (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods,* **89(2):** 271-277.

8) Freeman BA and Crapo J (1982): Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest,* **47:** 412-426.

9) Habig WH, Pabist MJ and Jakoby WB (1974): Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem,* **249:** 7130-7139.

10) Hansen MB, Nielsen SE and Berg K (1989): Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods,* **119(2):** 203-210.

11) Hayden FG (1997): Antivirals for pandemic influenza. *J Infect Dis,* **176(1):** 56-61.

12) Hayden FG and Douglas RG (1990): Antiviral agents. pp. 370-393, Mandel GL eds., "Principles and practice of influenza disease", 3rd ed., Chrchil Livingstone, New York.

13) Hayden FG and Manto AS (1986): Oral rimantadine hydrochloride therapy of influenza H_3N_2 subtype infection in adults. *Antimicrobio Agents Chemother,* **29:** 39.

14) Igarashi T, Muramatsu H, Ohmori S, Ueno K, Kitagawa H and Satoh T (1988): Plasma glutathione S-transferase in carbontetrachloride treated rats and its association to hepatic cytosolic isozymes. *Jap J Pharmacol,* **46:** 211-216.

15) Jakoby WB (1978): The glutathione S-transferase: A group of multifunctional detoxication proteins. *Adv Enzymol,* **46:** 383-414.

16) Klassen CD and Fitzgerld TJ (1974): Metabolism and biliary excretion of ethacrynic acid. *J Pharmacol Exp Ther,* **191:** 548-556.

17) Leibovitz BE and Siegel BV (1980): Aspects of free radical reaction in biological system: Aging. *J Gerontol,* **35:** 45-56.

18) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem,* **193:** 265-275.

19) Manto AS and Arden NH (1992): Implications of viral resistance to amantadine in control of influenza A. *Clin Infect Dis,* **15:** 362-367.

20) Mogabgab WJ, Simson GZ and Green IJ (1955): Growth chracteristics and cytopathogenic effects of influenza A and B in cultures of human embryo tissues. *Proc Soc Exper Biol and Med,* **76:** 314-327.

21) Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods,* **65:** 55-63.

22) Prohaska JR and Ganther HE (1977): Glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferase purified from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun,* **76:** 437-445.

23) Reddy CC, Tu CPD, Burgess JR, Ho CY, Scholz RW and Massaro EJ (1981): Evidence for the occurence of selenium-independent glutathione peroxidase activity in rat liver microsome. *Biochem Biophys Res Commun,* **101:** 970-978.

24) Reed LJ and Muench HA (1938): A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg,* **27:** 493-497.

25) Schefler WC (1980): Statistics for the biological sciences, pp. 84-89. Addison-Wesley Publishing Co., Cambridge, MA.

26) Sweet C and Smith M (1980): Pathogenicity of influenza virus. *Microbiol Rev,* **44:** 303-330.

27) Thompson J, Fleet W, Lawrence E, Pierce E, Morris L and Wright P (1987): A comparison of acetaminophene and rimantadine in the treatment of influenza A infection in children. *J Med Virol,* **29:** 39.

28) Trush AM, Mimnaugh EG and Gram TE (1982): Activation of pharmacologic agents to radical intermediates: Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol,* **31:** 3335-3346.

29) Vistica DJ, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A and Boyd MR (1991): Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res,* **51(10):** 2515-2520.

30) Wroblewski F and La Due JS (1955): Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med,* **90:** 210.

=Abstract=

Changes of Glutathione S-transferase Activity in MDCK Cells with Influenza Virus Type A

Byung-Ryul Kim, Nam-Pyo Park, Chong-Guk Yoon*†, Tae-Won Jeon* and Sang-Il Lee**

Division of Epidemiology, Health Research Department, Public Health Environment Institute of Taegu
*Department of Public Health, College of Natural Science, Keimyung University**
*Department of Food Science, Keimyung College***

This study was performed to evaluate the activities of glutathione S-transferase (GST) and lactate dehydrogenase (LDH) in Maddin-Darby canine kidney (MDCK) cells infected with virus and/or treated with amantadine. On cell morphological findings, monolayer fractions in MDCK cells infected with virus were exfolated more than 80% in 1 $TCID_{50}$ group and that in 10 $TCID_{50}$ were completely exfolated after 3 days during infectious process. In proportion to the dose of amantadine, activities of GST and LDH of MDCK cells were significantly decreased and those of LDH in medium fraction were more significantly increased compared with control. According to in both dose and time of virus innoculation, activities of GST and LDH in MDCK cells were significantly decreased in 1 and 10 $TCID_{50}$ infected cells after 3 days. LDH activities in infectious medium were remarkably rised at 10 fold. In case of the cell line inoculated with type A 100 $TCID_{50}$ and additionally treated with amantadine, the decreasing rate to the control in activities of GST and LDH was lower than that in those in case of that infected with virus only. These results suggested that virus infection and amantadine treatment may effect the activity of the detoxicating enzyme in the target cells.

Key Words: Glutathione S-transferase, Lactate dehydrogenase, MDCK cell

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(1): 19-28, March, 2000]

† Corresponding author