

The hepatitis B virus X protein induced fibrosis in Huh7 cells

Moa Son · Sanggyu Park · Moonjae Cho* 

간암세포주 Huh7에서 Hepatitis B virus X protein에 의한 간섬유화

손모아 · 박상규 · 조문제*

Received: 23 October 2015 / Accepted: 4 November 2015 / Published Online: 31 March 2016
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2016

Abstract Hepatitis B virus infection can cause hepatic fibrosis leading to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. However the mechanism remains poorly understood. In this study, we found that Hepatitis B virus X-protein (HBx) increases vimentin, fibronectin, slug, snail and NOX4 expression. Because NOX4-mediated reactive oxygen species can increase slug and snail, which can induce fibrosis, HBx may be a key regulator of hepatic fibrosis development via NOX4 induction.

Keywords hepatic fibrosis · hepatitis B virus X protein · NADPH oxidase

간섬유화(Hepatic fibrosis)는 만성적인 간 손상 후에 간의 상처 치료 반응으로써, 세포외기질의 과도한 축적으로 정의될 수 있다. 간섬유화는 간경변증, 간부전, 간세포암을 유발하며 사망에

까지 이르게 한다. 말기 간섬유화 즉, 간경변증은 대부분이 간암으로 발전이 되며 세계적으로 높은 질병률과 사망률을 보인다. 이와 같은 만성 간 질환의 대부분이 간섬유화로부터 시작됨에 따라 만성 간 질환의 치료에 있어 간섬유화의 치료는 매우 중요하다(Albanis와 Friedman, 2001). 간섬유화의 초기 단계에서, 간 내의 콜라겐(collagen), 파이브로넥틴(fibronectin), 엘라스틴(elastin) 등과 같은 세포외기질이 정상 간에 비해 6배 증가하게 되는데, 이 과정을 주도하는 것이 간성상세포(hepatic stellate cell, HSC)이다. 휴지상태의 HSC가 여러 자극에 의해 활성화 상태인 근섬유모세포 유사 표현형(myofibroblast-like phenotype)으로 전환되면서 세포외기질의 합성이 증가하게 된다. 간섬유화를 유도하는 또 다른 메커니즘에서는 활성산소가 중요한 역할을 한다. 정상적인 간에서는 생성된 활성산소를 제거하는 항산화 시스템이 작동하지만, 만성 간 질환의 상태에서는 항산화 활성이 감소할 뿐만 아니라 활성산소 생성이 증가하여 산화스트레스가 발생이 되고 그 결과 HSCs의 활성화를 유도된다. 최근 들어 NADPH oxidase (NOX)가 간섬유화에서 핵심적인 중재자로 인식 되고 있다. NOX는 산화스트레스를 생성하고 HSCs, 쿠퍼 세포(Kupffer cell), 대식세포(macrophage)를 활성화함으로써 간 손상과 간 섬유화를 조절한다(De Minicis와 Brenner, 2007).

간섬유화를 일으키는 요인 중 하나인 B형 간염 바이러스(hepatitis B virus, HBV)는 전세계적으로 약 20억명이 감염되어 있고 3억 6천여명이 만성 B형 간염 상태이며, 매년 50-70만명의 사망자를 발생시킨다. 또한 간경변증의 삼분의 일, 간세포암의 절반이 만성 B형 간염에 의한 것이라는 보고가 있다(Shepard 등, 2006). B형 간염 바이러스에서 발견되는 Hepatitis B X (HBx) 단백질은 감염 초기 단계 시 바이러스 생명 주기, 바이러스 유전자 복제에 필수적인 역할을 하고 있다(Yang 등, 2012). 그러나 B형 간염 바이러스가 간섬유화를 유도하는 자세한 기전은 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 B형 간염 바이러스 특히 HBx가 간섬유화를 유도하는 메커니즘을 관찰하고자 하였다.

M. Son
Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, SARI, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

S. Park
Division of Life & Environmental Science, Daegu University, Daegu 38453, Republic of Korea

M. Cho
Department of Biochemistry and Institute of Medical Science, School of Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

*Corresponding author (M. Cho: moonjcho@jejunu.ac.kr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

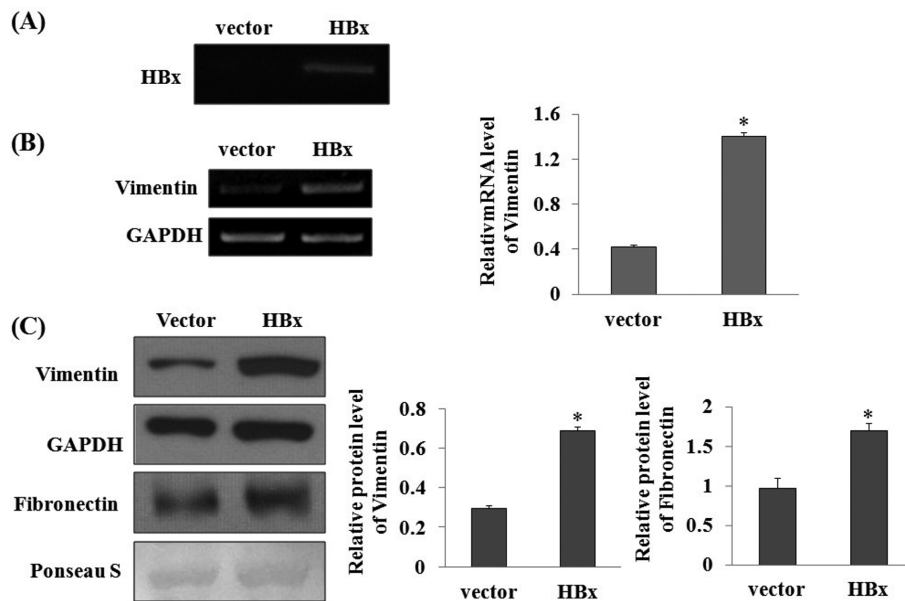


Fig. 1 Effects of expression of HBx on hepatic fibrosis in Huh7 cells. Huh7 cells were transfected with pcDNA3.0 empty vector plasmid (10 μ g) or pcDNA3.0-HBx plasmid (10 μ g) for 48 h. (A) The mRNA level of HBx in Huh7 cells after transfection was measured by RT-PCR. (B) The mRNA level of vimentin in Huh7 cells after transfection was measured by RT-PCR. The relative level of mRNA was obtained by normalization to GAPDH. (C) The protein levels of vimentin and fibronectin in Huh7 cells were measured by western blot. The relative levels of vimentin and fibronectin protein were obtained by normalization to GAPDH and ponceau S staining respectively. Values are mean \pm SD. * p < 0.5 compared with vector control.

실험에 사용된 세포는 인간 간암세포주 Huh7으로 10% fetal bovine serum이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. Huh7 세포에 HBx를 형질전환하기 위해서 HBx 유전자를 함유하는 재조합 pGEM 플라스미드를 송병철 박사님(Jeju University, Jeju, Korea)으로부터 제공받았다. 제공받은 재조합 플라스미드를 XhoI과 EcoRI의 인식 부위를 함유하는 프라이머를 이용하여 HBx 유전자 절편(gene fragment)을 PCR을 통해 증폭하였다. 이후 pcDNA3.0 vector로 HBx-expressing 재조합 플라스미드 pcDNA3.0-HBx 플라스미드를 생성하여 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 제조사의 지시에 따라 형질전환을 시행하였다.

형질전환 48시간 후에 TRIzol 용액을 500 μ L를 가해 4°C에서 교반기에 30분간 반응시킨 후 scraper로 RNA를 걷어 microtube에 chloroform과 함께 넣어주고 10분 간 실온에서 방치하였다. 그리고 원심 분리하여 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 이소프로필알콜을 가하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 다시 원심 분리하였다. 원심 분리 후 상층액을 버리고 침전물에 70% 알코올을 가하여 원심 분리하는 과정을 2번 반복 수행하였다. 상층액을 버리고 침전물을 공기 중에서 건조한 후 DEPC 용액으로 침전물을 현탁시킨 후 1/50로 희석하여 정량 하였다. 정량 결과를 통해 2 μ g의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 -20°C에 냉동보관하며 사용하였으며 증합효소 연쇄반응에 이용하였다.

단백질 추출은 마찬가지로 형질전환 48시간 경과 후 RiPA buffer (50 mM Tris-HCl of pH 8.1, 150 mM NaCl, 1% v/v NP-40, 0.5% w/v sodium deoxycholate, 0.1% w/v sodium dodecyl sulphate and protease inhibitor)를 가하여 4°C에서 30분간 방치한 후 scraper로 세포를 걷었다. 용해된 세포를 초음

파 분해한 후 원심 분리하여 단백질을 분리하였다. Bicinchoninic acid assay를 통해 단백질을 정량하고 SDS-polyacrylamide gels에서 크기 별로 분리하여 polyvinylidene difluoride membrane에 옮긴 다음 일차 항체를 4°C에서 O/N (overnight)으로 반응시켰다. TBS-Tween 용액으로 세척 후 이차항체와 상온에서 1시간 반응시킨 후 앞과 동일한 방법으로 1시간 동안 세척하였다. ECL detection kit (Biosesang, Seongnam, Korea) 용액과 반응시켜 필름에 감광하여 결과를 확인하였다.

HBx는 바이러스 감염 초기 단계에서 유전자 복제에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 B형 간염 바이러스와 관련된 질병과 hepatocellular carcinoma 발병에 핵심적인 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 B형 간염 바이러스에서 발견되는 HBx 단백질이 간염유화 발병에 어떤 역할을 하는지 알아보기 위하여 HBx를 발현하도록 세포를 형질 전환하여 실험을 수행하였다. 먼저 vector 10 μ g/mL를 형질 전환한 대조군(vector)과 HBx 10 μ g/mL를 형질 전환한 실험군(HBx)에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 HBx mRNA 발현을 확인하였다. 실험 결과 대조군에서는 HBx mRNA가 발현되지 않았고 실험군에서 발현된 것을 통해 형질전환이 정상적으로 이루어졌음을 확인하였다(Fig. 1A). B형 간염 바이러스에 감염되어 간염유화가 진행된 환자에서 fibrotic marker인 vimentin과 fibronectin이 증가된 것을 관찰할 수 있다(Zhang 등, 2014). 이 현상이 HBV의 HBx에 의한 것인지를 알아보기 위해 HBx를 형질전환시킨 후 vimentin과 fibronectin의 mRNA 및 단백질 발현을 확인하였다(Fig. 1B, C). Vimentin은 type intermediate filament 단백질로 세포이동(cell migration), 부착(adhesion) 등을 유도하며 간염유화에서 HSC가 활성화가 되어 있는 동안 발현된다고 알려져 있다(Vassiliadis 등, 2012). Fibronectin은 간염유화 과정에서 중요한 세포외기질 중 하나이다. 실험 결과, HBx를 형질전환시킨

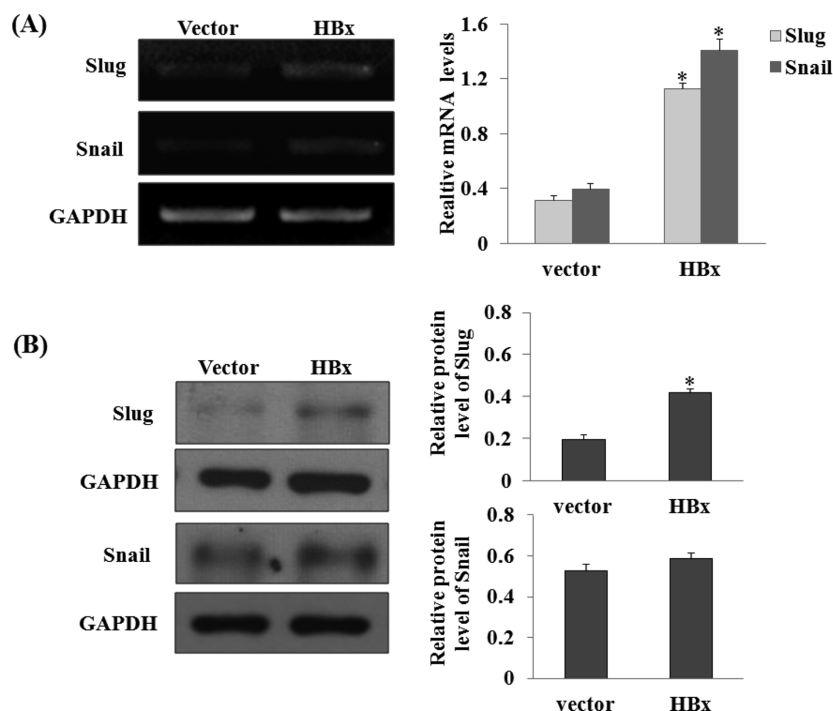


Fig. 2 HBx increases snail and slug expression in Huh7 cells. Huh7 cells were transfected with pcDNA3.0 empty vector plasmid (10 µg) or pcDNA3.0-HBx plasmid (10 µg) for 48 h and analyzed by RT-PCR and western blot. (A) The mRNA levels of snail and slug in Huh7 cells after transfection. The relative levels of mRNA were obtained by normalization to GAPDH. (B) The protein levels of slug and snail after transfection were measured by western blot. The relative levels of proteins were obtained by normalization to GAPDH. Values are mean ± SD. **p* < 0.5 compared with vector control.

실험군에서 대조군과 비교하여 vimentin의 mRNA와 단백질 모두 증가된 것을 관찰할 수 있었으며, fibronectin 또한 증가된 단백질 발현양을 관찰할 수 있었다. 이 결과를 통해 HBx가 형질전환된 Huh7 세포에서 간섬유화가 진행되는 것을 확인할 수 있었다.

HBx에 의한 섬유화가 어떠한 과정을 거쳐 이루어지는지를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 상피-간엽전환(Epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)은 상피 세포(epithelial cell)가 침윤능력과 전이능력을 가지는 세포로 바뀌는 과정이다. EMT가 간조직에서 발생이 될 때는 간에 손상이나 염증이 발생하였을 경우이다. 간세포가 EMT를 통해 간엽세포로 분화된 후 다시 간엽-상피 전환을 거치면서 재생이 일어나 손상이 회복된다. 그러나 그 손상이나 염증이 과도한 경우 기질 재형성이 유발되어 간섬유화가 발생하게 된다.(Park 등, 2010). 따라서 간섬유화의 원인이 되는 EMT의 핵심조절자인 전사인자 snail (snai1)과 slug (snai2)의 mRNA와 단백질 발현을 확인하였다(Fig. 2). 그 결과 slug는 mRNA와 단백질 모두 대조군에 비해 유의적으로 증가한 것을 관찰할 수 있었으며 snail은 mRNA 수준에서는 실험군에서 유의적 차이가 있게 증가하였지만 단백질 수준에서는 유의적 차이 없이 미세한 증가를 보였다. Slug에 의한 vimentin의 조절은 여러 논문 의해 보고 되어왔다(Virtakoivu 등, 2015). 따라서 HBx에 의한 vimentin의 증가는 snail보다는 slug를 통해 조절된 것이라 사료된다.

최근 들어 ROS가 세포 증식, 분화, 이동과 같은 다양한 세포 과정에 관여한다는 내용의 논문이 많이 발표되고 있다. ROS가 섬유화와 암에서의 어떠한 역할을 하는지는 잘 알려져 있

며, EMT와 관련이 있다는 사실 또한 계속해서 밝혀지고 있다 (Novo와 Parola, 2008). NOX는 다양한 자극에 의해 ROS를 발생하는 효소로, 간 내에서 NOX system에 의해 발생하는 산화스트레스는 여러 가지 간질환과 간섬유화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(De Minicis와 Brenner, 2007). NOX4는 ROS를 생성하고 근섬유아세포(myofibroblast)의 활성화를 조절하여 폐와 신장의 섬유화에 중요한 역할을 한다(Jiang 등, 2014). 이에 snail과 slug의 증가가 ROS와 관련되어 있는지를 알아보기 위해 NADPH oxidase의 발현을 확인하였다. 그 결과 HBx가 형질전환된 실험군에서 NOX4가 mRNA와 단백질 수준 모두에서 대조군에 비해 증가된 것을 확인할 수 있었고 또 다른 NADPH oxidase인 NOX2는 NOX4와는 달리 HBx에 의한 증가를 보이지 않았다(Fig. 3).

NOX4는 간 내에서 주로 간세포, 간성상세포(stellate cell), 내피세포(endothelial cell)에 주로 발현되어 있으며, C형 간염에서 증가되어 있는 것이 밝혀지고 있다. NOX4에 의해 생성되는 주된 ROS가 과산화수소(hydrogen oxide, H₂O₂)임을 밝힌 논문 (Serrander 등, 2007)과 HBx에 의해 H₂O₂가 생성이 됐다는 보고(Ha와 Yu, 2010)는 본 연구에서 HBx에 의해 증가된 NOX4 결과와 상응하였다. 최근 연구들에 따르면 NOX4가 전섬유화 반응(profibrotic response)에 중심적인 역할을 한다는 사실이 밝혀지고 있다. NOX4를 억제하였을 때 TGF-β의 표적 유전자인 fibronectin, collagen I, α-smooth muscle actin 등의 발현이 억제되는 것을 확인하였고, 쥐 심장 섬유아세포에서 TGF-β에 의한 콜라겐 합성과 섬유아세포 분화가 초과산화물과 과산화수소의 억제제인 EUK-134나 NOX4의 dominant negative form를

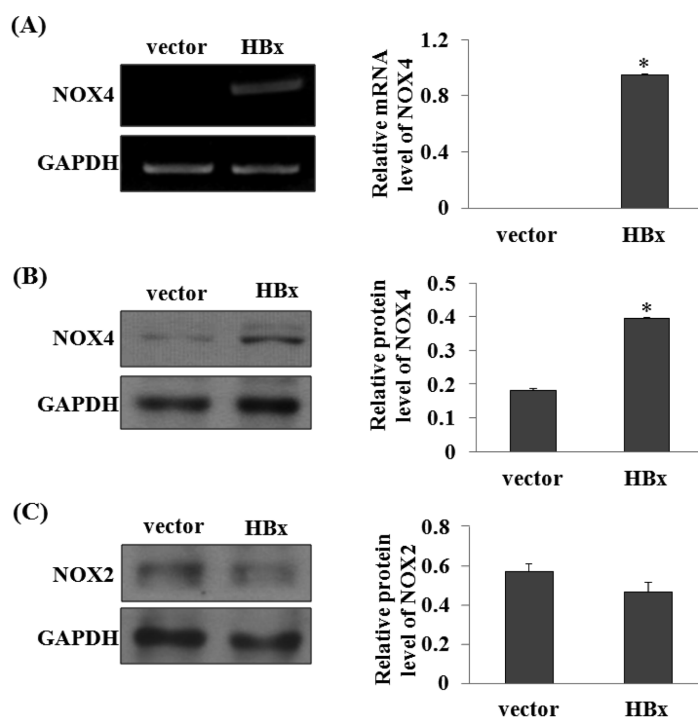


Fig. 3 HBx induces NOX4 expression in Huh7 cells. Huh7 cells were transfected with pcDNA3.0 empty vector plasmid (10 μ g) or pcDNA3.0-HBx plasmid (10 μ g) for 48 h and analyzed by RT-PCR and western blot. (A) The level of NOX4 mRNA was measured by RT-PCR after transfection with 10 μ g DNA plasmid. NOX4 protein (B) and NOX2 (C) were analyzed after transfection with 10 μ g DNA plasmid by Western blot. The relative levels of mRNA and proteins were obtained by normalization to GAPDH. Values are mean \pm SD. * p < 0.5 compared with vector control.

처리하였을 때 억제되는 것을 확인하였다. 이러한 TGF- β 에 의한 콜라겐 발현에 NOX4의 조절 영향은 신장, 폐와 더불어 간성상세포에서도 발견이 되고 있다. 또 다른 논문에서 의하면 NOX1과 NOX4의 억제제인 GKT-136901에 의해 담관 결찰(bile duct ligation)에 의한 간섬유화가 억제되는 것을 확인하였다(Jiang 등, 2014).

HBx에 의해 증가된 것이 관찰된 slug와 snail은 TGF- β 매개의 EMT의 핵심 조절인자이다. HBx에 의해 TGF- β 가 유도된 보고가 있으며(Guo 등, 2009), 더 나아가 NOX4에 의한 TGF- β 가 EMT를 조절한다는 여러 논문들이 발표되고 있다. Hiraga 등 (2013)은 췌장암 세포에서 NOX4에 의한 ROS가 TGF- β 를 매개로 한 EMT를 조절하는 것을 확인하였고(Hiraga 등, 2013), Boudreau 등 (2012)은 유방 상피 세포에서 NOX4에 의해 생성된 ROS가 TGF- β 에 의한 EMT에 중요한 역할을 한다고 보고하였다(Boudreau 등, 2012). 이에 또 Nam 등(2010)은 NOX1과 NOX4에 의해 생성된 ROS와 HGF와 TGF- β 를 동시에 처리한 인간 각질 형성세포(keratinocyte)의 세포 이동의 관계를 보고하였다(Nam 등, 2010). ROS가 snail과 slug를 유도하고 그 결과 vimentin이 증가하고 E-cadherin이 감소한다는 보고와 더불어 종합하여 보면(Kim과 Cho, 2014), HBx에 의해 NOX4의 발현이 증가되고 그 결과 TGF- β 를 유도되고, 이에 따라 snail, slug가 증가하여 EMT가 발생하여 간섬유화가 유도되는 것이라 예상할 수 있다. 추가적인 연구를 통해 정확한 기전을 규명하면 B형 간염에 의한 간섬유화 및 간질환의 치료법에 기반이 될 수 있으리라 생각된다.

초 록

B형 간염 바이러스는 간경변증과 간세포암의 원인이 되는 간섬유화를 유발한다. 하지만 현재까지 그와 관련한 자세한 메커니즘은 밝혀지지 않았기에 본 연구에서 이를 알아보고자 하였다. 실험 결과, B형 간염 바이러스에서 발현되는 HBx 단백질에 의해 vimentin, fibronectin, slug, snail, NOX4가 증가되는 것을 확인하였다. NOX4에 의한 활성산소가 snail, slug 발현을 유도하고 섬유화 과정을 촉진할 수 있기 때문에 NOX4의 발현을 유도하는 HBx가 간섬유화를 조절, 유도하는 것을 확인하였다.

Keywords 간섬유화 · B형 간염 바이러스 X 단백질 · NADPH oxidase

감사의 글 본 연구는 2015년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었음.

References

- Albanis E and Friedman SL (2001) Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 5, 315,34, v-vi.
- Boudreau HE, Casterline BW, Rada B, Korzeniowska A, and Leto TL (2012) Nox4 involvement in TGF-beta and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and migration of breast epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 53, 1489–99.
- De Minicis S and Brenner DA (2007) NOX in liver fibrosis. *Arch Biochem*

- Biophys* **462**, 266–72.
- Guo GH, Tan DM, Zhu PA, and Liu F (2009) Hepatitis B virus X protein promotes proliferation and upregulates TGF-beta1 and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX-2. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **8**, 59–64.
- Ha HL and Yu DY (2010) HBx-induced reactive oxygen species activates hepatocellular carcinogenesis via dysregulation of PTEN/Akt pathway. *World J Gastroenterol* **16**, 4932–7.
- Hiraga R, Kato M, Miyagawa S, and Kamata T (2013) Nox4-derived ROS signaling contributes to TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* **33**, 4431–8.
- Jiang F, Liu GS, Dusting GJ, and Chan EC (2014) NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF-beta-mediated fibrotic responses. *Redox Biol* **2**, 267–72.
- Kim YM and Cho M (2014) Activation of NADPH oxidase subunit NCF4 induces ROS-mediated EMT signaling in HeLa cells. *Cell Signal* **26**, 784–96.
- Nam HJ, Park YY, Yoon G, Cho H, and Lee JH (2010) Co-treatment with hepatocyte growth factor and TGF-beta1 enhances migration of HaCaT cells through NADPH oxidase-dependent ROS generation. *Exp Mol Med* **42**, 270–9.
- Novo E and Parola M (2008) Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis & Tissue Repair* **1**, 5.
- Park SM, Kim SM, and Han JH (2010) The role of epithelial-mesenchymal transition in the gastroenterology. *Korean J Gastroenterol* **56**, 69–77.
- Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O et al. (2007) NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J* **406**, 105–14.
- Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, and Bell BP (2006) Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev* **28**, 112–25.
- Vassiliadis E, Oliveira CP, Alvares-da-Silva MR, Zhang C, Carrilho FJ, Stefano JT et al. (2012) Circulating levels of citrullinated and MMP-degraded vimentin (VICM) in liver fibrosis related pathology. *Am J Transl Res* **4**, 403–14.
- Virtakoivu R, Mai A, Mattila E, De Franceschi N, Imanishi SY, Corthals G et al. (2015) Vimentin-ERK Signaling Uncouples Slug Gene Regulatory Function. *Cancer Res* **75**, 2349–62.
- Yang C, Song B, and Cho M (2012) A Natural Mutation of the Hepatitis B Virus X Gene Affects Cell Cycle Progression and Apoptosis in Huh7 Cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **55**, 229-36.
- Zhang M, Wang F, Chong Y, Tai Q, Zhao Q, Zheng Y et al. (2014) Liver myofibroblasts from hepatitis B related liver failure patients may regulate natural killer cell function via PGE2. *J Transl Med* **12**, 308,014-0308-9.