누에 분변으로부터 추출한
포르피린 유사체의 광활성에 의한
수포성 구내염 바이러스의 불활성화

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 승 진

누에 분변으로부터 추출한 포르피린 유사체의 광활성에 의한 수포성 구내염 바이러스의 불활성화

지도 이 원 영 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 승 진

김승진의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ **인**

심사위원 _____ **인**

심사위원 _____ **인**

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

이 논문이 나오기까지 연구자로서의 자세를 일깨워 주신 이원영 교수님께 크나큰 감사를 드립니다. 논문에 관하여 많은 조언과 지도를 해주신 박전한 교수님과 박광균 교수님께도 감사를 드립니다. 2년간의 대학원 생활동안 많은 지도를 해주신 미생물학교실 교수님들께도 감사를 드립니다. 또한 분자의학과로 처음 입학했을 때 많은 도움을 주신 이진성 교수님께도 감사드립니다. 어려울 때마다 조언을 주신 고시환 선생님, 미국에 계신 권대호 박사님, 윤주연 선생님께도 감사드립니다. 그리고 저에게 많은 도움과 격려를 해주신 우리 미생물학교실원 모두에게 감사드립니다.

저를 걱정해주고 제 고민을 들어주었던 친구들과 과와 동문 선배님들, 그리고 미술학원 선생님, 그리고 제가 사랑하는 모든 분들에게 감사드립니다.

마지막으로 제 논문이 나오기까지 항상 걱정과 사랑으로 절 지켜봐주신 부모님께 이 논문을 바칩니다.

저 자 씀

차 례

그림 차례

국문 요약

누에 분변으로부터 추출한 포르피린 유사체의 광활성에 의한 수포성 구내염 바이러스의 불활성화

누에 분변에서 추출된 포르피린 유사체(CpD)는 "광역동성 치료(Photodynamic therapy; PDT)"라 불리는 종양의 광화학 치료를 위한 광활성인자(photosensitizer)로 개발되었으며, 항레트로바이러스 제제의 역할을 할 수 있다고 보고되었다. 광역동성 치료와 같이 광역동성 항미생물 화학치료(photodynamic antimicrobial chemotherapy)는 광활성인자와 빛에 의해서 미생물에 산화적 손상을 주며, 특히 바이러스에 감염된 혈액산물들의 소독에 이용되고 있다. 광역동성 항미생물 화학치료는 *in vitro*에서 세균, 효모, 바이러스, 기생충을 억제하는 데 효과적인 것으로 알려져 있으나, 광역동성 치료만큼 널리 사용되고 있지 않다.

광활성인자의 광활성에 의한 지질막을 가진 바이러스들의 불활성화에 관한 기전은 완전하게 알려지지 않았다. 따라서 지질막을 가지고 있는 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus; VSV)를 CpD에 의한 광역동성 작용의 주요한 표적을 찾기 위한 모델로 사용하여, CpD의 항바이러스 효과를 확인하고, CpD에 의한 수포성 구내염 바이러스 광불활성화의 주요한 표적을 확인해보고자 하였다.

CpD에 의해 유도되어지는 VSV의 광불활성화에 대한 효과를 플라크 형성 측정법(plaque forming assay)을 사용하여 확인하였다. CpD는 농도에

비례하여 최대 7log까지 VSV를 불활성화시켜, 광활성화된 CpD 농도 15 60 μg/ml에서는 플라크가 형성되지 않았다. 세포내 바이러스 RNA를 RT-PCR을 통하여 확인하였고, 세포내 바이러스 RNA 합성능을 ^{3}H-urindine 흡착을 통하여 측정한 바, 광활성화된 CpD 30 μg/ml에서 세포내 바이러스 RNA가 검출되지 않았으며, 광활성화된 CpD 농도에 비례하여 바이러스 RNA 합성능이 감소되었다. CpD의 광역동성 작용에 의한 바이러스 단백질의 손상을 전기영동을 통하여 확인한 결과, M 단백질의 손상이 확인되었고, 젤 상단에 소실된 바이러스 단백질에 의한 밴드(cross-links)가 생성되었다. 또한 CpD와 빛을 처리한 후의 바이러스 RNA 중합 억제는 *in vitro* 전사 측정법을 이용하여 확인하였는데, 광활성화된 CpD 농도에 따라서 바이러스 RNA 전사가 감소되었다.

이러한 결과들로써 광활성화된 CpD는 VSV와 같은 지질막을 가진 바이러스를 불활성화시켜, 항바이러스 제제로서의 효과를 가지고 있으며, CpD에 의한 VSV 광불활성의 주요한 표적이 M 단백질과 바이러스 RNA나 바이러스 RNA 중합효소 또는 그 복합체임을 시사한다.

핵심되는 말 : 광역동성 항미생물 화학치료, 누에 분변 추출물(CpD), 수포성 구내염 바이러스, 광불활성화, 바이러스 불활성화 표적

누에 분변으로부터 추출한 포르피린 유사체의 광활성에 의한 수포성 구내염 바이러스의 불활성화

< 지도교수 이 원 영 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 승 진

Ⅰ. 서 론

광활성인자(photosensitizer)와 빛을 이용한 생명체의 불활성화는 1903년부터 알려지기 시작하였다[1]. 광역동성 작용(photodynamic action)은 광활성인자가 빛을 받아서 활성화되면서 일어나는 현상으로, 물리화학적 반응과 구별하여 생물학에서 광활성화에 의한 반응을 의미한다[2]. 이러한 광화학 반응에는 type Ⅰ 반응과 typeⅡ 반응으로 나눌 수 있는데, Type Ⅰ 반응은 활성화된 광활성인자로부터 나온 전자에 의해서 생성된 hydroxyl radical이 광활성인자에 근접한 생체분자나 목표에 작용하여 손상을 주는 것이다. TypeⅡ 반응은 빛을 받은 광활성인자가 singlet oxygen($^1O_2$)을 형성하여 생체분자에 손상을 주는 과정을 말한다[2]. Singlet oxygen은 생물계에서 짧은 시간(<0.04 microsecond) 생성되었다 소실되고, 그 반응 범위도 한정되어 있다(<0.02 ㎛)[3].

광역동성 작용을 생명체에 적용하여 특별한 파장의 빛에 의해 활성화되는 광활성인자를 이용한 종양의 광화학치료를 광역동성 치료(photodynamic

therapy; PDT)라고 한다[4]. 기초와 임상 연구결과들을 토대로 PDT는 종양 치료를 위한 효과적인 방법의 하나가 될 수 있다[4]. 1993년 이래로 캐나다, 네덜란드, 프랑스, 일본, 미국 등에서 상품화된 Photofrin®을 이용하여 초기와 진행기의 폐, 소화기, 생식기 종양을 가진 환자들에게 제한적으로 적용하고 있다[5, 6]. 그러나 Photofrin®의 피부 광독성 및 이용 파장(610 nm)의 문제가 보고되고 있기 때문에, 응용성이 개선된 새로운 광활성인자들이 임상적용을 위한 연구가 계속 진행되고 있다[5, 6].

한편, 광활성인자의 광역동성 작용을 항미생물 치료에 응용한 것을 광역동성 항미생물 화학치료(photodynamic antimicrobial chemotherapy; PACT)라고 한다[2]. PDT에 의한 종양치료는 현재 임상에서 실용화되고 있으나, 이에 비해 PACT는 아직 기초적 연구단계에 있다. PACT 역시 광활성인자와 특별한 파장의 빛을 이용하여 미생물을 불활성화시키는 광역동성 작용의 응용분야의 하나이다. 현재 PACT을 이용하여 *in vitro*에서 박테리아, 바이러스, 기생충 등을 제거하는 연구들이 수행 중에 있다[2]. 최근에 가장 대표적인 PACT의 이용은 바이러스에 오염된 혈액제제에서 바이러스를 불활성화시키는 연구에 중점을 두고 있으나, 아직은 임상에 적용되기까지는 더 많은 연구가 필요하다[7].

역사적으로 광활성인자가 항바이러스 효과를 가진다는 것이 처음으로 밝혀진 것은 Perdrau와 Todd에 의한 1933년의 보고이다[8]. 이후에 neutral red, methylene blue(MB), proflavin과 같은 heterotricyclic dye가 주로 항바이러스 효과에 연구되었으며[9-13], 그 대상으로 herpes simplex virus(HSV)에 의한 피부와 눈 병변에 제한적으로 사용되었다[12, 13]. 그러나 이러한 치료의

효과에 대해서는 논란이 되었고[13], 광활성작용에 의해 불활성화된 바이러스가 오히려 포유동물 세포를 암세포화시켰다는 보고도 있었다[14].

현재 다양한 종류의 광활성인자가 개발되어 바이러스 불활성화 목적으로 실험되고 있다. Hematoporphyrin derivatives(HpD), merocyanine 540, psoralen derivatives, aminomethyltrimethyl psoralen, aryl diol expoxide 등을 광활성인자로 하여, 혈액에 감염된 HSV, 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus; VSV), feline leukemia virus(FLV), B형 간염 바이러스(hepatitis B virus; HBV), non-A, non-B 간염 바이러스 등을 혈액 세포들의 손상없이 불활성화시킨다는 것이 보고되었다[7, 15-20].

광활성인자에 의한 바이러스 불활성화의 정확한 기전은 아직 완전히 알려지지 않았다. 그러나 MB, merocyanine 540, A1PcS$_4$ 등의 광활성인자는 지질막을 가진 바이러스나 박테리오페이지를 불활성화시키며, 특히 바이러스 게놈이 광활성인자의 주요한 표적임이 확인되었다[21, 22]. 또한, MB와 rose bengal은 Qβ 박테리오페이지에서 광활성인자로 작용하여 바이러스의 게놈에 손상을 주며, 특히, 바이러스 게놈에 8-oxo-7, 8-dihydroguanosine(8-oxoG)을 형성하기 때문이라고 보고되었다[23]. 또한 A1PcS$_4$는 VSV의 RNA-RNA 중합효소 복합체나 RNA 또는 RNA polymerase에 영향을 미치는데, 8-oxoG 형성이 바이러스의 불활성화에 중요한 역할을 한다고 보고되었다[24, 29]. 바이러스 막단백질 역시 바이러스 감염력 상실에 주요한 표적으로 생각되고 있다. 이는 대부분의 광불성인자들이 소수성의 특성을 가지고 있기 때문에, 세포막의 지질층에 소수성 결합(hydrophobic interation)을 하는 것처럼[2], 바이러스에 흡착되는 기전도 이와 유사할 것으로 생각되고 있다[3]. 실제로

HpD로 광불활성화된 바이러스는 증식 주기 중에 숙주세포 내로 들어가는 과정에 장애가 있었다[26]. 또한 HIV가 숙주세포에 감염되어 acidic endosome과 융합하는 과정에도 hypericin과 rose bengal이 작용하여 HIV와 endosome과의 융합을 억제하고, HIV의 합포체(syncytia)을 억제한다고 보고되었다[27]. 하지만 바이러스 불활성화의 주요한 표적은 광활성인자에 따라서 차이를 보였다[24, 28]

이에 본 연구에서는 새로운 광활성인자인 누에(silkworm; *Bombyx mori*)의 분변으로부터 추출된 CpD[29-31]를 이용한 PACT 실험을 하였다. CpD(CpD-A, B, C, D)의 기본적 화학 구조는 포르피린계와 유사하며, 포르피린과 유사한 광화학적 특성을 가지고 있다[30]. Singlet oxygen을 형성하고 630 670 nm에서 최대 흡광도를 나타내며, HpD보다 우수한 세포내 흡수율과 광세포독성능을 가지고 있다[29, 31]. 또한 *in vivo* 실험을 통하여 CpD가 쥐의 피하와 복강내 종양의 치료에도 효과적이라는 것이 확인되었다[32]. 또한 CpD-D는 Gross leukemia virus(GLV)의 역전사효소를 불활성화시켜 바이러스 감염력을 저해할 수 있음이 확인되어, CpD는 항레트로바이러스 제제로서의 역할을 할 수 있다는 가능성이 제시되었다[33].

본 연구에서 VSV를 표적으로 실험하였다. VSV는 지질막을 가지고 있는 *Rhabdoviridae*, *Vesicularvirus*에 속하며, 11,162 bp의 단일가닥 RNA를 게놈으로 가지고 있다. 세포질에서 복제가 이루어지는데, 세포막에 존재하는 phosphatidyl serine에 G 단백질이 결합하여 숙주세포 내로 들어가기 때문에 사람에서 곤충세포까지 다양한 숙주세포를 감염시킬 수 있다[34]. VSV는 HIV와 같은 바이러스들에 비하여 연구자에게 비교적 안전하고 광활성인자

에 의한 광역동성 작용에 민감하며, 다양한 종류의 광활성인자에 의한 불활성화 모델로 많이 연구되어졌기 때문에[24, 25], CpD의 바이러스 광불활성화 작용 기전을 연구하기에 비교적 적합한 바이러스 모델이라 할 수 있다.

현재까지 알려진 바이러스에 대한 광활성인자에 의한 주요한 표적은 바이러스 단백질, 바이러스 게놈, 바이러스 중합효소나 역전사효소가 보고되고 있다[21-26, 34-37]. CpD를 이용한 PACT 연구의 유일한 예는 CpD가 효과적인 항레트로바이러스 제제로서의 역할을 한다는 보고이며[33], 이상의 보고에서는 CpD가 바이러스에 어떻게 영향을 미치는지, 그리고 GLV가 아닌 다른 바이러스에는 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 연구되어진 적이 없다. 나아가 CpD에 의한 바이러스의 광불활성화에 대한 주요한 표적이 무엇인지에 대해서 전혀 밝혀진 사실이 없다. 따라서 실험에서는 우선 CpD의 항바이러스 효과를 플라크 형성 측정법(plaque forming assay)으로 확인하여, CpD에 의한 항 VSV 효과를 판정하였다. 세포내 바이러스 RNA와 세포내 RNA 합성능력의 변화를 측정하여, CpD에 의한 항 VSV 효과를 판정하였다. CpD에 의한 바이러스의 광불활성화에 주요한 표적을 확인하고자, 바이러스 단백질은 단백질 전기영동으로, 바이러스 RNA 중합 활성은 *in vitro* 전사 측정법(transcirption assay)을 이용하여 확인하였다. 광활성화된 CpD는 농도에 비례하여, VSV를 불활성시켰다. 플라크가 형성되지 않는 CpD 농도에서 세포내 바이러스 RNA가 검출되지 않았고, 세포내 바이러스 RNA 합성능은 CpD 농도에 따라 감소하였다. 또한 바이러스의 M 단백질이 소실되어 cross-links를 형성하였고, RNA 중합 활성 역시 CpD 농도에 따라 감소함을 확인할 수 있었다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 누에 분변 추출물(CpD) 준비

CpD는 누에 분변에서 아세톤에 용해되는 부분을 추출하여 준비하였다. 누에 분변을 질소를 이용하여 결정화시킨 후, 파쇄하여 빛을 차단한 상태로 보관하면서 사용하였다. 파쇄된 분말에 아세톤을 1:10(w/v)으로 첨가한 후 밤새도록 현탁하여 추출하고, 4℃에서 3,000 rpm으로 20분 원심분리한 후 상층액을 fume hood에서 건조시켰다. 이렇게 건조된 시료를 CpD라고 명명하였다. CpD를 정량하여 아세톤에 녹여 35 mg/ml로 만들어 -20℃에서 실험 전까지 보관하였다. 실험에서는 사용량에 맞추어 다시 아세톤으로 녹여 4℃에서 3,000 rpm으로 20분 원심분리한 후 상층액을 정량하여 사용하였다. 추출과정은 모두 빛이 차단된 상태에서 실시되었다.

2. 세포주 및 바이러스 배양

바이러스 배양 및 CpD를 이용한 VSV의 불활성화 관찰과 세포내 바이러스 RNA와 세포내 바이러스 RNA 합성능을 확인하기 위하여, Vero 세포주(CCL-81, ATCC, Manasses, VA, USA)와 A549 세포주(CCL-81, ATCC)를 사용하였다. 각 세포주는 Eagle's minimal essential medium(MEM, Gibco RBL)에 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco RBL,

Grand Island, NY, USA), penicillin(100 units/ml), streptomycin(100 μg /ml)을 첨가하여 배양하였다.

VSV(Indiana serotype, VR-1238 CAF, ATCC)는 75 T 배양플라스크에 단층세포(monolayer)로 배양된 Vero 세포주에 바이러스(약 2×10^{10} pfu)를 감염시키고, 24시간 후에 배양액을 3000 rpm에서 10분 원심분리하여 0.22 ㎛ syringe filter로 여과하였다. 여과된 바이러스 배양액을 1.5 ml 나 50 ml tube에 분주하여 사용 전까지 -70℃에서 보관하였다. 바이러스의 단백질 분석과 RNA 중합 활성을 측정하기 위해서 바이러스 배양액을 4℃에서 45,000 rpm으로 2시간 초원심분리하여 바이러스 입자를 분리하였다[38]. 이것을 phosphate-buffer saline(PBS, pH 7.4)에 현탁하여 Bradford 단백질 측정법(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 농도를 측정하였다[39].

3. VSV에 CpD 처리와 CpD 활성화를 위한 빛의 조사

CpD는 빛을 처리하기 전에 아세톤을 이용하여 1.875 μg/ml 60 μg/ml의 농도로 2배 계단희석하여 사용하였다. 바이러스 배양액과 농축액에 전체 부피당 아세톤이 5% 함유되게 희석된 각 농도의 CpD를 첨가한 후, 1시간 동안 37℃, 5% CO_2 배양기에서 흡착시켰다. 이렇게 CpD가 흡착된 바이러스 액에 빛이 120 mJ/cm^2 되게 조사하였다. 이 에너지량은 Laser power meter(Metrologic Instruments, Inc., Blackwood, NJ, USA)를 이용

하여 측정하였다. 이렇게 빛을 조사한 후에 2시간 동안 배양하여 각 실험에 이용하였다.

4. 플라크 형성 측정법(Plaque forming assay)

CpD에 의한 광역동성 작용에 의하여 VSV의 감염력이 상실되는지를 플라크 형성 측정법을 이용하여 확인하였다[40]. A549 세포주를 6 well culture plate에 2×10^5 세포/well로 분주하여 완전하게 단층세포로 배양하였다. 1.875 μg/ml 60 μg/ml의 농도로 2배 계단희석한 CpD만을 사용한 군과 각 CpD 농도를 VSV에 처리하고 10 분간 빛을 조사한 군을 실험군으로 하고, 빛, 아세톤, 아무런 처리를 하지 않은 VSV를 대조군으로 하였다. 사용한 VSV의 역가는 7×10^7 pfu/ml이었다. 대조군과 실험군을 MEM으로 10배 계단희석하여 A549 세포주에 37℃에서 1시간 동안 5% CO_2 배양기에서 감염시켰다. 바이러스액을 제거하고 MEM으로 2회 세척한 후, 가열하여 42℃에서 식힌 2% agarose 용액과 2 × MEM의 1:1의 혼합용액을 2 ml씩 well에 넣어서 상온에서 굳혔다. Plate를 37℃, 5% CO_2 배양기에서 2일간 배양하였다. Agarose를 제거한 후 세포를 PBS로 2회 세척하고, 2% paraformaldehyde로 15분간 고정하였다. 다시 PBS로 2회 세척하고 crystal violet 용액으로 염색하여 플라크를 확인하였다. 바이러스 역가는 희석배수와 플라크 수를 이용하여 결정하였다. 결과은 log 값으로 나타내었다.

5. RNA 분리, cDNA 합성, 역전사 효소-중합효소 연쇄 반응(reverse transcriptase-polymerase chain reation;RT-PCR)

CpD 광활성 후, 세포내 VSV RNA를 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 3.75, 7.5, 30 ㎍/ml 농도의 CpD만을 사용한 군과 각 CpD 농도를 VSV에 처리하고 10 분간 빛을 조사한 군을 실험군으로 하고, 아무런 처리를 하지 않은 VSV를 양성 대조군으로 사용하였다. 6 well plate에 단층세포로 자란 A549 세포주에 실험군과 대조군의 VSV를 2 × 10^3 pfu/well로 MEM으로 희석하여 37℃에서 1시간 동안 5% CO_2 배양기에서 감염시켰다. 바이러스 용액를 제거하고 MEM으로 2회 세척한 다음, 37℃에서 16시간 동안 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 총 RNA는 Trizol total RNA isolation reagent(Gibco-BRL)를 이용하여 분리하였다. 바이러스 cDNA를 합성하기 위하여 4 ㎍의 RNA를 100 ng/㎕의 random hexamer(Phamacia, Uppsala, Sweden) 4 ㎕, 10 m*M* dNTP(Promega, Medison, Wis, USA) 4 ㎕, M-MLV 5 × RT buffer 8 ㎕, 200 units/㎕ M-MLV RT(Promega) 1 ㎕에 diethyl pyrocarbonate로 처리된 증류수를 첨가하여 총 반응액을 40 ㎕로 맞추었다. 이 반응액을 42℃에서 1시간 반응시켜 cDNA를 제조한 후, 94℃에서 5분간 가열하여 역전사 효소를 불활성화시켰다.

PCR 반응은 Indiana serotype VSV의 G 단백질을 포함한 부분을 선택적으로 증폭할 수 있는 primer set(VSVINGP9, 10)를 이용하였다. 합성한 cDNA 3㎕를 주형으로 하여 AccuPower™ PreMix-Top(Roche Molecular System, Inc., Alameda, CA, USA)에 증류수 15 ㎕와 10 pmol/ml

VSVINGP9, 10을 각각 1 ㎕씩 넣어 PCR을 수행하였다. 반응 조건은 94℃에서 105초간 변성시킨 후, 94℃에서 15초, 56℃에서 30초를 주기로 35회 반응시켰고, 마지막으로 72℃에서 7분간 반응시켰다. 동일한 양의 RNA가 사용되었는지를 확인하기 위하여 β-actin mRNA의 발현정도를 확인하였다. AccuPower™ PreMix-Top(Roche Molecular System)을 이용하여 β-actin primer 각 1 ㎕씩, cDNA 3 ㎕, 증류수 15 ㎕를 넣어 반응시켰다. 94℃에서 5분간 변성시키고, 94℃에서 30초, 59℃에서 30초, 72℃에서 30초를 주기로 24회 반응시킨 다음에, 72℃에서 10분 반응시켰다. 사용된 primer의 염기서열은 다음과 같다. VSVINGP9: 5'-CAGCCTCTCGAACAACTA-3', VSVINGP10: 5'-GTCAGAATGCCAGGTTGT-3'. β-actin forward: 5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3', reverse: 5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'. 양성 대조군으로 사용한 VSV cDNA와 VSVINGP primer 서열, PCR 조건은 국립수의과학검역원, 해외전염병과에서 받아서 사용하였다.

6. A549 세포에서 VSV RNA 합성능 확인

3.75, 7.5, 30 ㎍/ml 농도의 CpD만을 사용한 군과 각 CpD 농도를 VSV에 처리하고 10 분간 빛을 조사한 군을 실험군으로 하고, 빛, 아세톤, 아무런 처리를 하지 않은 VSV를 대조군으로 하였다. 96 well plate에 단층 세포로 자란 A549 세포주에 실험군과 대조군의 VSV를 M.O.I=200으로 3

7℃에서 1시간 동안 5% CO_2 배양기에서 감염시켰다. A549 세포에서 VSV RNA 합성능은 Moor 등[24]과 Schlegel 등[41]이 사용했던 방법을 변형하여 사용하였다. 바이러스 액을 제거한 후, MEM으로 2회 세척하고 숙주 세포의 RNA 합성을 저해하기 위하여 actinomycin D(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 최종 농도가 5 μg/ml이 되게 하여 1시간동안 처리하였다[24, 41]. Actinomycin D를 첨가한 배양액을 제거하고, MEM으로 2회 세척한 다음에, well당 1 μCi가 되게 ^{3}H-uridine(20 Ci/mmol, NEN Life Scinece Products, Boston, MA, USA)을 첨가하고, 37℃에서 6시간 동안 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포에 0.25% trypsin-EDTA(Gibco BRL)를 10분간 처리하여 부유된 세포를 cell harvester를 이용하여, 4℃로 냉각시킨 10% trichloracetic acid(TCA)로 GF/C filter(Whatman, Maidstone, UK)에 흡착시켰다. GF/C filter를 2회 10% TCA로 세척하고 건조시켰다. 건조된 GF/C filter를 liquid scintillation counter로 GF/C filter에 흡착된 ^{3}H-uridine 양을 count per mintue(cpm)로 나타내었다.

7. VSV 단백질 분석

CpD의 광활성에 의한 VSV 단백질의 변화를 확인하고자, 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)[42]를 이용하여 확인하였다. 3.75, 7.5, 30 μg/ml 농도의 CpD만을 사용한 군과 각 CpD 농도를 VSV에 처리하고 10 분간 빛을 조사한 군을 실험군으로

하고, 빛, 아세톤, 아무런 처리를 하지 않은 VSV 농축액(각 5 μg)을 대조군으로 하였다. 각각의 바이러스 농축액을 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol 용액에 넣고 100℃에서 5분 동안 끓여서 변성시킨 후 120 V로 2시간 전기영동하였다. 전기영동 후, 젤을 1 mg/ml Coomassie brilliant blue R-250(Sigma) 용액으로 염색하여 VSV 단백질의 변화를 확인하였다.

8. *In vitro* 바이러스 RNA 중합 활성 측정

CpD 광활성에 의한 VSV RNA 중합 활성의 변화를 *in vitro* 전사 측정법으로 확인하였다[24]. 3.75, 7.5, 30 μg/ml 농도의 CpD에 10분간 빛을 조사한 VSV 농축액(각 20 μg)을 이용하여 측정하였다. 음성 대조군은 반응액에 PBS만을 첨가하였다. 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 4 mM dithiothreitol, 0.05% Trion X-100, 10 units RNase inhibitor(Boehringer Mannheim, Germany), 1 mM ATP, 1 mM GTP, 1 mM CTP, 0.1 mM UTP(Promega), 10 μCi ^{3}H-UTP(35 Ci/mmol, NEN Life Science Products)로 200 μℓ의 반응액을 만들었다. 30℃에서 3시간동안 반응시켰고, 반응액을 4℃로 냉각시킨 10% TCA로 GF/C filter (Whatman)에 침전·흡착시켰다. GF/C filter를 2회 10% TCA로 세척하고 건조시켜서 GF/C filter에 흡착된 ^{3}H-UTP를 liquid scintillation counter로 측정하였다. 측정결과는 cpm으로 나타내었다.

Ⅲ. 결 과

1. CpD 광역동성 작용에 의한 VSV 불활성화

광활성화된 CpD가 VSV를 불활성화시킬 수 있는 유용한 제제로서의 역할을 할 수 있는지를 알아보기 위해, VSV에 CpD를 농도별로 처리하고 120 mJ/cm^2의 빛을 조사하여, VSV의 세포독성 변화를 플라크 형성 측정법으로 확인하였다. CpD를 1.875 60 μg/ml의 농도로 2배 계단희석해서, 역가가 7 × 10^7 pfu/ml인 VSV에 CpD만을 사용한 군과 각 농도별로 CpD 처리후 10 분간 빛을 조사한 군을 비교하였고, VSV 단독, 빛, 아세톤에 의한 영향도 확인하였다. VSV 단독은 약 7log pfu를 보였고, CpD를 추출하기 위해 사용했던 용매인 아세톤이나 CpD의 활성화를 위해 조사했던 빛에 의해서도 VSV 단독으로 감염시켰을 때 나타나는 pfu와 차이가 없었다. 또한 CpD만을 단독으로 처리하고 빛을 차단했던 군 모두가 CpD 농도에 상관없이 pfu에 변화를 보이지 않았다(그림 1A). 그러나 CpD에 빛을 조사해서 광역동성 작용을 시킨 군에서는 CpD 농도에 따라서 pfu의 감소를 나타내었다. 1.875 μg/ml에서는 약 4log pfu를 나타내었고, 3.75 μg/ml에서는 약 2log pfu를, 7.5 μg/ml에서는 0.5log pfu를 각각 나타내었다. 특히, 15, 30, 60 μg/ml의 CpD 농도에서는 전혀 플라크를 관찰할 수 없었다(그림 1B). VSV에 3.75μg/ml과 30 μg/ml CpD만을 처리한 군과 빛을 처리한 군을 A549 세포에 감염시켜, 24시간 후 숙주세포의 형태학적 변화를 확인하였다. 플라크 형성 측정법의 결과와 마찬가지로 CpD만을 처리한 군은 VSV 단독 처리한 군과 같이 감염시키고 24시간 후에는 VSV에 감염된 대부분

의 세포들이 용해되었다. 광활성화된 CpD 3.75μg/ml에서는 CpD만을 처리한 군이나, VSV 단독 처리한 군보다 숙주세포가 용해되는 것이 감소되었다. 또한, 광활성화된 CpD 30μg/ml에서는 숙주세포에 VSV에 의한 세포용해가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 CpD가 농도에 비례하여 광역동성 작용에 의해 VSV의 감염력을 상실시킬 수 있음을 의미한다. 3.75, 7.5, 30 μg/ml의 CpD 농도에서 각각의 pfu 차이를 확연히 관찰할 수 있었기 때문에, 세가지 농도를 이용하여 다음 실험을 수행하였다.

2. CpD 광활성에 의한 세포내 VSV RNA 변화

CpD 광활성 후 세포내 VSV RNA를 VSV G 단백질을 암호화하고 있는 부분(VSV-G, 639 bp)을 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 6 well plate에 단층세포로 배양된 A549 세포에, VSV에 3.75, 7.5, 30 μg/ml의 CpD만을 처리한 군과 각 농도 별로 CpD를 처리한 후 10분간 빛을 조사한 군을 최종 2×10^3 pfu/well이 되게 1시간 감염시켜, 16시간동안 배양하여 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. VSV 단독 또는 CpD만을 처리한 군에서는 VSV-G RNA가 검출되었으며, 밴드 명암도(intensity)에도 커다란 차이가 없었다. 그러나 플라크 형성 측정법에서 보이는, CpD 농도에 비례하여 감염력이 상실되는 것과는 다르게 3.75, 7.5 μg/ml의 CpD와 빛을 처리한 군에서도 VSV RNA가 검출되었고, 밴드 명암도 역시 차이가 없었다. 그러나 VSV에 30 μg/ml의 CpD와 빛을 처리한 군에서 VSV-G RNA가 검출되지 않았다(그림 2). 이러한 결과는 30 μg/ml CpD에서 빛에 의한 광역동성

작용에 의해 불활성화된 VSV가 숙주세포 내로 감염되지 않았거나, 감염되어도 바이러스 게놈, 또는 RNA 중합효소가 손상되어 RNA를 복제할 수 없기 때문인 것으로 생각된다.

3. CpD 광역동성 작용에 의한 VSV의 세포내 RNA 합성능 변화

CpD의 광역동성 작용에 의해 숙주세포 내에서 VSV의 RNA 합성능 변화를 측정하고자, VSV에 CpD 단독, CpD와 빛, 아세톤 또는 빛만을 처리하였다. 양성 대조군은 VSV 단독으로 A549 세포에 감염시켰고, 음성 대조군은 세포에 바이러스를 감염시키지 않고 actinomycin D만을 처리하였다. 각각 처리한 VSV를 A549 세포에 감염시키고 actionmycin D를 처리하여 숙주세포의 RNA 합성을 저해시켜서 ^{3}H-uridine 흡착정도로 VSV의 세포내 RNA 합성능을 확인하였다. 앞의 실험 결과와 마찬가지로 VSV 단독, 빛이나 아세톤, 또는 각 농도의 CpD만을 처리한 군에서는 양성 대조군과 비교하여 ^{3}H-uridine 흡착정도에 차이가 없었다(그림 3A). 하지만 VSV에 3.75, 7.5, 30 μg/ml CpD와 빛을 조사한 군에서는 CpD 농도 따라서 ^{3}H-uridine 흡착이 감소되어 플라크가 전혀 생기지 않았던 30 μg/ml의 CpD 농도에서는 음성 대조군 정도의 ^{3}H-uridine이 흡착되었다(그림 3B). 이러한 결과는 CpD의 광역동성 작용에 의해 VSV의 감염력이 상실되어 VSV가 세포내로 감염되지 않았던지, 바이러스 게놈의 손상이나 바이러스 RNA-RNA 중합효소 복합체 또는 바이러스 RNA 중합효소의 손상에 기인된 것으로 생각된다.

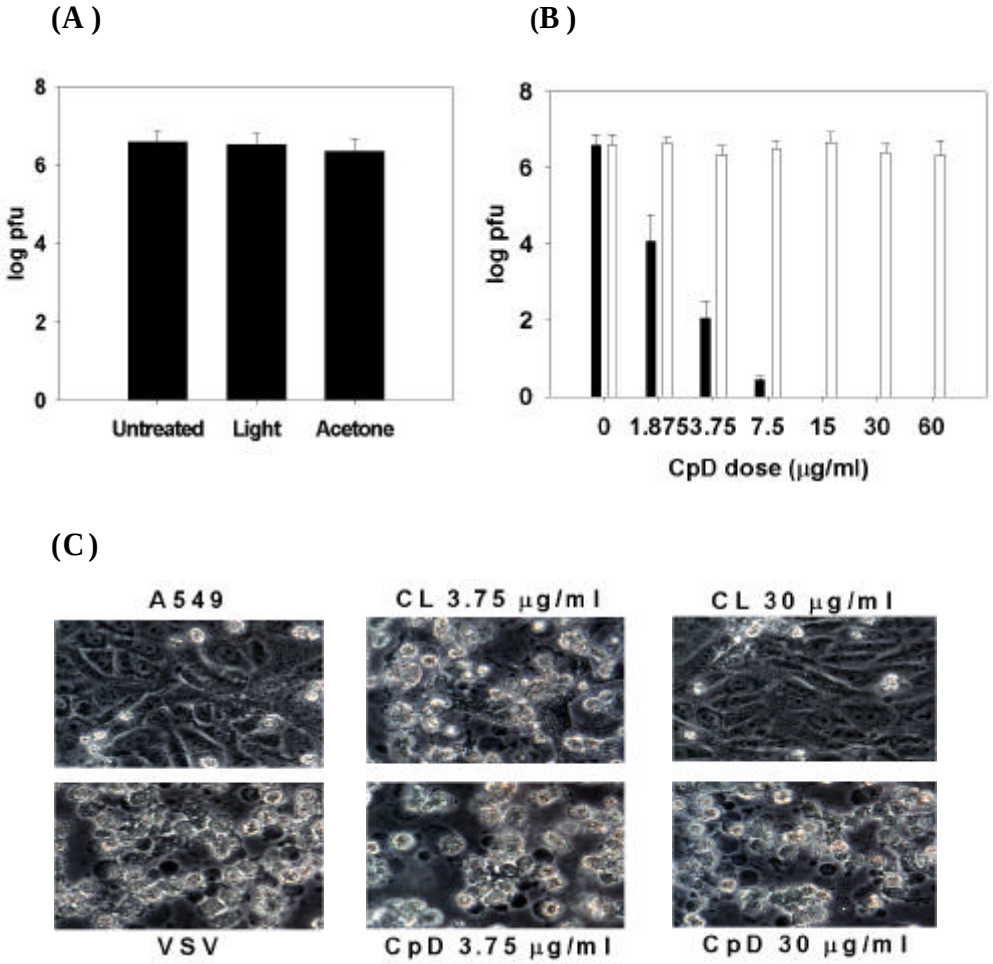

그림 1. CpD의 광역동성 작용에 의한 VSV 불활성화. (A) VSV 단독(untreated), 빛(light) 또는 acetone을 처리했을 때 VSV의 플라크 형성능을 측정하였다. (B) 각 농도의 CpD만 처리한 군(□)과 각 농도의 CpD와 빛을 처리한 군(■)에서 VSV의 감염력을 확인하였다. 사용한 CpD 농도는 1.875 60 μg/ml을 2배 계단희석하였다. 데이타는 서로 다른 세 실험의 평균값과 표준 편차로 나타내었다. (C) CpD의 광역동성 작용에 의해 불활성화된 VSV에 감염된 A549 세포의 형태를 위상차 현미경을 이용하여 확인하였다. VSV를 감염시키고, 24시간 후 세포가 용해되었다. CpD에 빛을 처리한 군(CL)에서는 숙주세포의 용해가 CpD 농도에 비례하여 억제되었다.

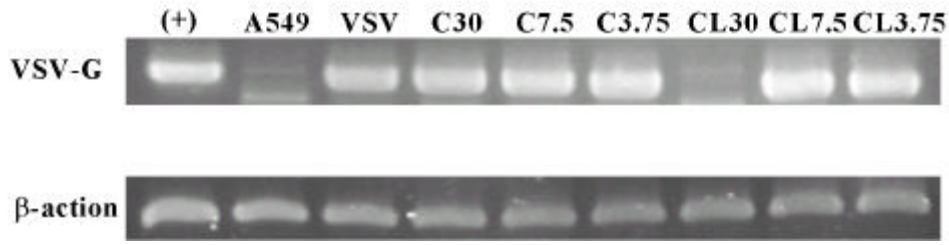

그림 2. CpD 광역동성 작용에 의한 세포내 VSV RNA 확인. VSV에 CpD 3.75, 7.5, 30 μg/ml과 빛을 처리한 실험군, 각 농도의 CpD만을 처리한 대조군을 A549 세포에 감염시켜 16시간 배양한 후 전체 RNA를 얻어서 RT-PCR을 수행하였다. (+)는 VSV cDNA를 나타내며, C는 CpD만을 처리한 대조군, CL은 CpD와 빛을 처리한 실험군을 나타낸다.

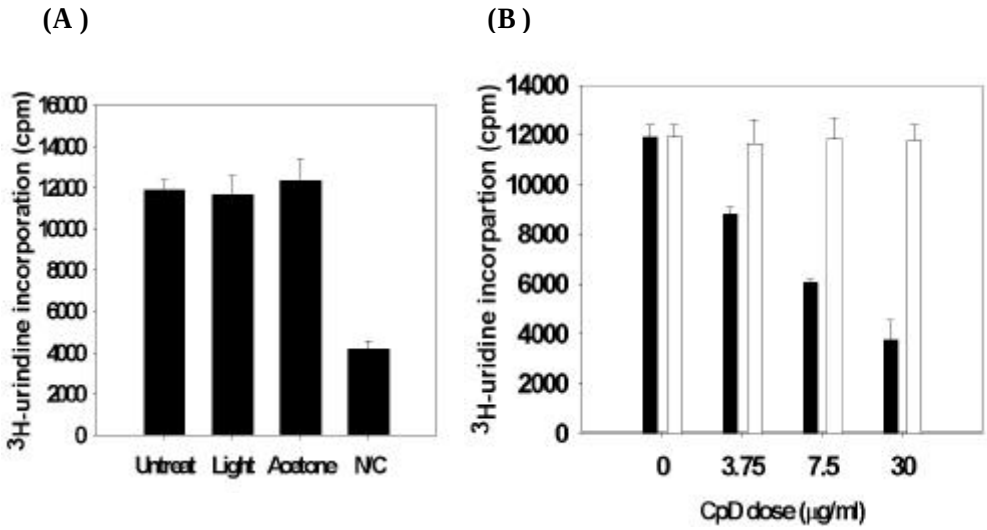

그림 3. CpD의 광역동성 작용에 의한 A459 세포내에서 VSV RNA 합성능 변화. 96 well에 A549 세포를 단층세포로 배양한 후, 각각 처리된 VSV를 M.O.I.=200이 되게 1시간 감염시켜 5 μg/ml actinomycin D를 1시간 처리한 다음에 세포내 ^{3}H-uridine 흡착량을 6시간후에 측정하였다. (A) VSV 단독(untreat)이나 빛(light), acetone 처리에 의한 세포내 VSV RNA 합성능을 확인하였다. N/C: 음성 대조군으로 actinomycin D만을 처리한 것이다. (B) 각 농도의 CpD만 처리한 군(□)과 각 농도의 CpD와 빛을 처리한 군(■)의 세포내 VSV RNA 합성능을 확인하였다. 데이타는 서로 다른 세 실험의 평균값과 표준 편차로 나타내었다.

4. CpD 광역동성 작용에 의한 VSV 불활성화의 주요한 표적

CpD 광역동성 작용에 의하여 VSV 감염력이 상실된 것을 플라크 형성법으로 확인하였다. 또한 세포내 VSV RNA와 세포내 VSV RNA 합성능 변화가 있음을 확인하였다. 이러한 결과들을 기초로 CpD가 광역동성 작용에 의해서 VSV를 불활성화시킬 때 주요한 표적이 무엇인지를 바이러스 단백질을 전기영동으로 분석하였고, 바이러스의 RNA 중합 활성 변화를 *in vitro* 전사 측정법을 이용하여 확인하였다.

(1) VSV 단백질의 변화

CpD 광역동성 작용에 의한 VSV 불활성화가 단백질의 손상에 기인한 것인지를 확인하기 위하여 바이러스를 초원심분리기로 농축하여, CpD 3.75, 7.5, 30 μg/ml만을 처리한 군과 빛을 같이 조사한 군, 빛이나 아세톤을 처리한 군을 SDS-PAGE를 이용하여 VSV의 단백질 변화 양상을 확인하였다. 아세톤이나 빛, CpD만을 단독으로 처리한 군에서는 바이러스 단백질의 변화를 관찰할 수 없어, 젤 가장 하단에서 부터 VSV의 M(matrix) 단백질, N(nucleocapsid) 단백질, G(glycoprotein) 단백질, L(RNA polymerase) 단백질이 확인되었다. CpD와 빛을 처리한 군에서 M 단백질을 확인할 수 없었으며, G 단백질이 약간 감소되는 경향을 보였다. 또한, CpD와 빛을 처리한 군에서는 젤 상단에는 대조군에서 보이지 않는 밴드(XL)가 나타났다(그림 3). 광활성인자의 광역동성 작용에 의해 손상된 단

백질이 cross-links를 형성하여 젤 상에서 가장 상단에 밴드를 형성한다는 Moor 등[24]의 보고를 미루어 보건대, 겔 상의 가장 상단에 의치한 밴드는 CpD의 광역동성 작용에 의해서 소실된 M 단백질이 일부 소실된 G 단백질과 또는 기타 바이러스 단백질과 cross-link를 형성한 것으로 생각된다.

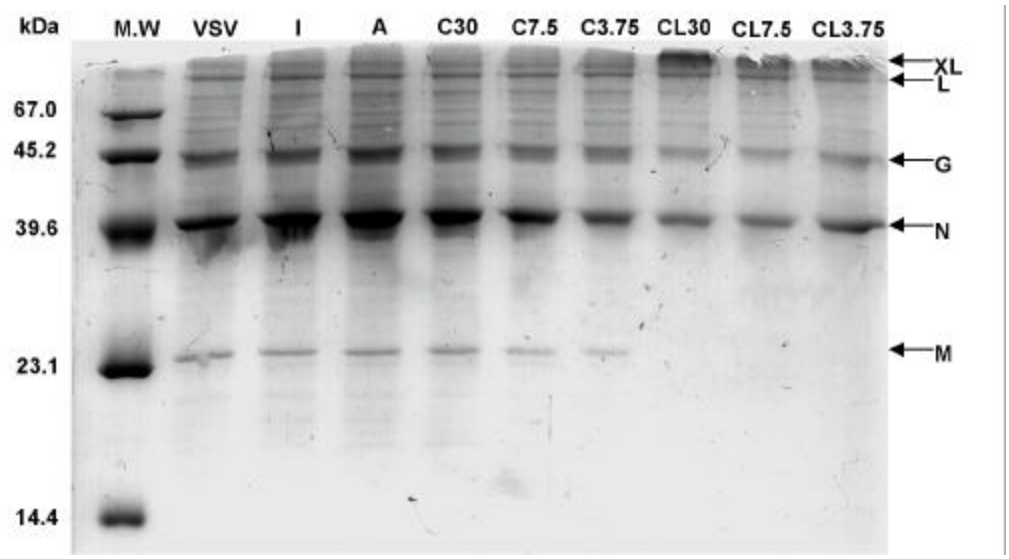

그림 4. CpD의 광역동성 작용에 의한 바이러스 단백질의 변화. 5 μg의 농축된 VSV에 빛(I), 아세톤(A), CpD 단독(C) 및 CpD와 빛을 처리한 군(CL)을 12% polyacrylamide 젤에서 전기영동하였다. 전기영동한 젤을 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하여 바이러스 단백질의 변화를 확인하였다. M.W: molecular weight marker; VSV: 수포성 구내염 바이러스; I: 빛 단독 처리; A: 아세톤 단독 처리; C: CpD만 처리; CL: CpD와 빛을 조사; CpD 농도: μg/ml; XL: cross-links; L: RNA polymaerase; G: 바이러스막 glycoprotein; N: nucleocapsid; M: matrix protein.

(2) CpD 광역동성 작용에 의한 *in vitro* 바이러스 RNA 중합활성

CpD 광역동성 작용에 의한 VSV 불활성화가 바이러스 게놈이나 RNA 중합효소에 영향을 주었는지 확인하기 위하여 *in vitro* 전사 측정법을 수행하였다. 본 실험에서는 20 μg의 바이러스 농축액에 3.75, 7.5, 30 μg/m의 CpD와 빛을 조사하여 실험을 실시하였다. 음성 대조군으로는 반응액에 PBS만을 넣어주었고, 양성 대조군은 아무런 처리도 하지 않은 바이러스 농축액을 이용하였다. 광활성화된 CpD의 농도가 증가할수록 바이러스 ^{3}H-UTP 흡착이 감소되었며(그림 5), 이는 CpD 농도에 비례하여 바이러스 RNA 중합이 감소한다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 CpD의 광활성에 의해 VSV의 RNA 게놈이나 RNA 중합효소 또는 RNA-RNA 중합효소 복합체가 손상되었음을 의미한다.

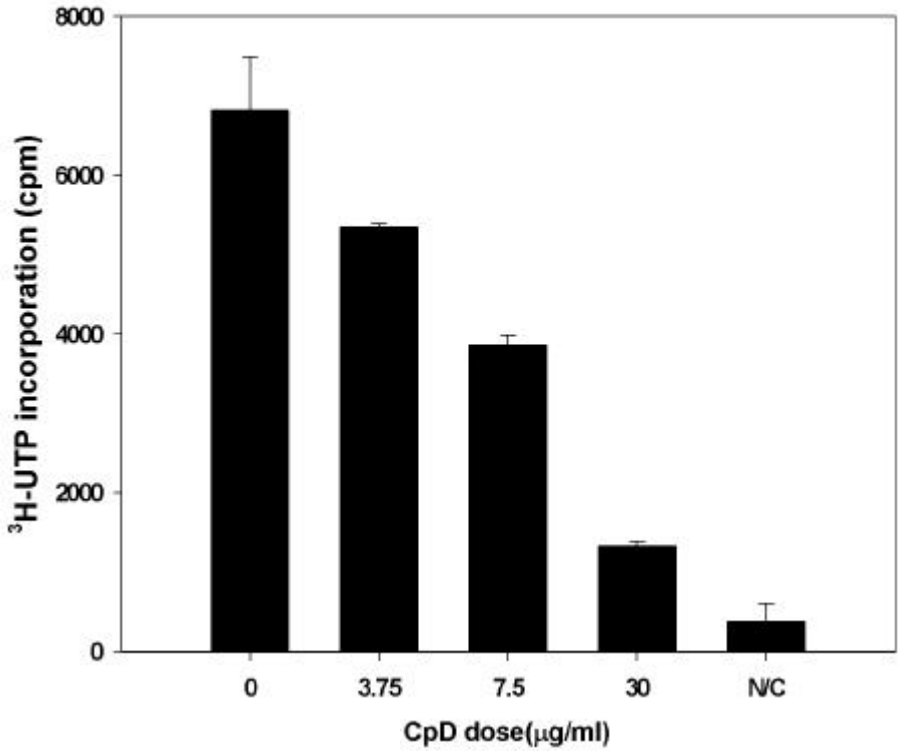

그림 5. CpD의 광역동성 작용에 의한 VSV RNA 중합 활성 변화. 20 μg의 VSV에 3.75, 7.5, 30 μg/ml의 CpD에 빛을 조사한 군에서 ^{3}H-UTP 흡착을 이용한 *in vitro* 전사 측정법을 이용하여 VSV RNA 중합 활성을 측정하였다. N/C는 VSV 대신에 PBS를 반응액에 넣은 음성 대조군이다. 데이타는 서로 다른 세 실험의 평균값과 표준 편차로 나타내었다.

Ⅳ. 고 찰

광활성인자는 현재 임상에서 제한적이긴 하지만, 일부 암환자들의 항암치료를 위해 이용되고 있다[2]. 또한 이러한 광활성인자가 바이러스를 포함하는 미생물을 제거할 수 있다는 것이 보고되고 있지만 아직도 그에 대한 연구는 미진한 실정이다[3].

광활성인자의 광역동성 작용을 이용하여 바이러스를 불활성화시키는 연구가 MB, A1PcS4, Pc4, merocyanine 540, rose bengal 등 다양한 광활성인자를 사용하여 연구되어 왔지만[21-27, 35], 광활성인자에 의한 바이러스 불활성화의 기전은 아직도 완전히 밝혀지지 않았다. 지질막을 가지지 않는 바이러스들이 광활성인자와 빛에 의한 광역동성 작용에 효과적이지 않기 때문에 바이러스의 지질막이 광활성인자의 표적으로 중요할 것이라고 생각되고 있다[39]. 또한 최근의 연구들을 통해서 바이러스의 게놈 역시도 광활성인자에 의해 손상을 받는다는 것이 보고되었다[23-25].

본 연구에서 사용한 광활성인자인 CpD는 건조된 누에의 분변에서 아세톤을 이용하여 추출한 것을 총칭하여 명명하였다. CpD는 포르피린계와 유사한 구조와 특성을 갖고 있으며[30], *in vivo*와 *in vitro* 실험을 통하여 종양 치료를 위한 항암제로서의 역할을 할 수 있다는 것이 보고되었다[32]. 또한 레트로바이러스인 마우스 GLV의 역전사효소를 억제시킨다는 것이 보고되었다[33]. 하지만 CpD에 의한 항바이러스 작용기작이나 CpD가 바이러스의 어느 부위에 영향을 미치는지에 대해서는 연구되지 않았다. 따라서 본

실험에서는 CpD의 항바이러스 제제로서의 기능을, 지질막을 가지고 있으며, 다양한 광활성인자를 사용한 바이러스 불활성화 연구에 사용된 VSV를 이용하여 확인하고, CpD의 광역동성 작용에 의한 바이러스 불활성화에 주요한 표적이 무엇인지를 바이러스 단백질, *in vitro* 바이러스 RNA 중합 활성 변화를 통하여 확인하였다.

CpD가 광역동성 작용에 의하여 바이러스를 불활성시킬 수 있는지 플라크 형성 측정법으로 확인하였다. CpD를 유기용매인 아세톤을 이용하여 추출하고 다시 아세톤에 희석하여 사용하였기 때문에, 아세톤에 의한 바이러스 불활성화 효과와 광역동 작용에 필요한 빛을 조사할 때 생기는 열에 의한 바이러스의 불활성화 효과가 있는지를 확인하였지만, 양성 대조군인 VSV 단독 처리군과 비교하여 차이가 없었다. 또한 CpD만을 단독으로 처리한 군에서도 pfu가 양성 대조군과 비교하여 아무런 변화도 없었다(그림 1A, 1B). 이것은 CpD가 빛이 없는 상태에서는 활성화되지 않아 VSV 감염력에 아무런 영향을 주지 않는다는 것을 의미한다. 하지만 CpD에 빛을 처리한 군에서는 바이러스의 pfu가 농도에 따라 감소하여 15 60 μg/ml CpD에서는 전혀 플라크를 관찰할 수 없었다(그림 1B). 3.75와 30 μg/ml의 CpD를 VSV에 처리한 후, 빛을 조사한 군과 조사하지 않은 군을 숙주세포에 감염시켜 24시간 후에 숙주세포 형태를 관찰하였다. 플라크 형성법의 결과와 마찬가지로, CpD 단독 처리군에서는 VSV 단독 처리군과 같이 VSV를 감염시키고, 24시간 후에는 대부분의 세포들이 용해되었다. 3.75 μg/ml CpD와 빛을 조사한 군에서는 숙주세포의 용해현상이 감소되었고, 30 μg/ml에서는 숙주세포의 용해현상이 관찰되지 않았다(그림 1C). 이러한 결과

는 CpD 광역동성 작용이 CpD 농도에 비례하여 VSV 감염력을 상실시킨다는 것을 의미한다. 따라서 CpD가 광역동성 작용에 VSV와 같은 지질막을 가진 바이러스에 대한 항바이러스 제제로 이용될 가능성을 시사한다.

광활성화된 CpD를 처리한 VSV를 감염시킨 A549 세포에서 세포내 VSV RNA를 RT-PCR로 확인하였다. 각 농도의 CpD만을 처리한 군과 각 농도의 CpD와 빛을 처리한 VSV를 A549 세포주에 감염시켰다. 플라크 형성 측정 실험과 마찬가지로 CpD만을 처리한 군에서는 VSV RNA가 검출되었다. 또한 CpD 3.75 μg/ml과 7.5 μg/ml에 빛을 처리한 군에서도 VSV RNA가 검출되었다. VSV RNA가 광활성화된 CpD 농도에 비례하여 감소되지 않았는데, 그 원인은 3.75 μg/ml과 7.5 μg/m을 처리한 군에서 감염력을 가지고 있는 바이러스들이 증식하였기 때문에 증식된 바이러스 RNA들이 총 RNA를 추출하는 과정에서 포함되었기 때문으로 생각된다. 이러한 것들을 배제하기 위해서 CpD와 빛을 처리한 VSV에서 바이러스 RNA를 직접 분리하여 확인할 필요가 있다. 그러나 CpD 30 μg/ml과 빛을 처리했을 때, VSV RNA를 검출할 수 없었다(그림 2).

광활성화된 CpD를 처리한 VSV를 감염시킨 A549 세포에서 세포내 바이러스 RNA 합성능을 세포내 침착된 ^{3}H-urindine 변화를 통하여 확인하였다. 플라크 형성 측정 실험의 결과와 같이, VSV에 아세톤이나 빛만을 처리한 군과 VSV만을 처리한 군에서 세포내 VSV RNA 합성능에서 차이를 보이지 않았다. 또한 CpD만을 처리한 군에서도 세포내 침착된 VSV RNA 합성능에 별다른 영향이 없었다. 그러나 각 농도의 CpD와 빛을 처리한 군에서는 세포내 VSV RNA 합성능이 CpD 농도에 비례하여 감소되었

다(그림 3). 이것은 CpD 광역동성 작용에 의해 세포내 바이러스 RNA 합성능이 저해되었음을 의미한다. 세포내 VSV RNA 검출과 세포내 VSV RNA 합성능의 결과들은 CpD의 광역동성 작용에 의해 VSV의 감염력이 상실과 연관되어 있는데, 몇 가지 의문이 제시된다. 우선 바이러스가 CpD의 광역동성 작용에 의해 감염력을 상실하여 세포에 VSV가 감염되지 않았는지, 또는 바이러스 게놈의 손상, 바이러스 RNA 중합효소의 손상 또는 바이러스 RNA-RNA 중합효소 복합체에 기인된 것인지 명확하지 않다. 그래서 그 원인을 확인하고자 CpD의 광역동성 작용에 의한 VSV 불활성화의 주요한 표적을 바이러스 단백질 분석과 *in vitro* 전사 측정법을 통하여 찾고자 하였다.

CpD의 광역동성 작용에 의한 VSV의 불활성화가 바이러스 단백질의 손상에 의한 것인지를 확인하였다. 전기영동에서 확인한 것은 M 단백질이 CpD의 광역동성 작용에 의해 소실되었으며, G 단백질 역시 약간 감소되는 경향을 보였다(그림 4). 젤의 가장 상단에 CpD와 빛을 처리한 군에서 밴드가 나타나는데, 이는 소실된 단백질들이 cross-linking되어 나타나는 것이 보고된 것으로[24] 미루어 보건대, 소실된 M 단백질과 G 단백질 또는 기타 바이러스 단백질의 cross-linking에 의해 젤의 상단에 밴드가 형성된 것으로 생각된다.

광활성인자에 따라서 바이러스 단백질의 변화는 차이를 보인다. 예를 들어, A1PcS$_4$의 경우에는 G 단백질이 가장 많이 손실되었으나[24], MB의 경우에는 바이러스 단백질에 아무런 변화 없이도 바이러스가 불활성화되었다[22]. 광활성인자의 광역동성 작용에 의해 발생되는 cross-link 역시 광활성인

자에 따라서 바이러스의 감염력 상실에 영향을 미치는 경우[27]와 그렇지 않은 경우가 있다[24]. 본 실험결과에서는 cross-link가 주로 M 단백질의 손상에 의해 생성된 것이기 때문에 바이러스의 불활성화에 중요하리라 생각된다.

VSV 지질막에 존재하는 G 단백질은 숙주세포막에 존재하는 phosphatidyl serine을 이용하여 숙주세포로 세포내이입(endocytosis)되기 때문에 바이러스가 숙주세포에 감염되는 데 중요한 역할을 한다[34]. 하지만 바이러스 G 단백질의 손상은 바이러스 감염력 상실에 중요하지 않다는 보고가 있다. 그 이유는 광활성인자에 의해 G 단백질이 완전히 소실되어도 cross-link된 단백질에 존재하는 G 단백질 부분이 바이러스가 숙주세포로 들어가는 역할을 할 수 있기 때문이다[24]. 본 실험에서는 G 단백질이 거의 손상되지 않았기 때문에, 광활성화된 CpD에 의해 불활성화된 VSV가 숙주세포로 들어가는 데에는 문제가 없을 것으로 생각된다.

VSV의 M 단백질은 바이러스의 총 단백질의 중요한 부분을 차지하고 있는 26 kDa의 당화되지 않은 단백질이다[45]. VSV의 M 단백질은 세 가지의 중요한 기능이 있다. 첫째, 바이러스의 조립(assembly)에 중요한 역할을 한다[46]. 둘째, 바이러스 전사를 조절한다[46, 47]. 셋째, VSV의 세포병인(cytopathogenesis)에 중요한 역할을 한다[48]. VSV가 숙주세포에 감염되면, 우선 세포의 RNA와 단백질 합성을 저해하고, 세포골격체(cytoskelecton)를 분해하여, 둥근 형태로 부유시키게 된다. 이런 상태에서 바이러스의 복제가 이루어지게 된다. 여기서 중요한 역할을 하는 것이 바로 M 단백질이다[46-48]. 따라서 CpD의 광역동성 작용에 의한 M 단백질의 손실은 VSV의 세

포변성 효과를 저해하게 되고, 또한 바이러스의 전사를 저해함으로서 바이러스를 불활성화시키는 것으로 생각된다.

CpD에 의한 광역동성 작용이 바이러스 RNA 중합에 영향을 미치는지를 바이러스 RNA를 주형으로 새롭게 합성된 RNA양을 *in vitro* 전사측정법을 통하여 확인하였다. 본 실험에서는 CpD와 빛을 처리한 군을 실험군으로 하고, 양성 대조군으로는 VSV 단독 처리한 것을, 음성 대조군으로는 반응액에 PBS를 넣어 사용하였다. VSV RNA 전사 역시 광활성화된 CpD의 농도에 비례한다는 것을 확인하였다(그림 5). 이러한 결과는 바이러스 RNA가 중합되는데 주형이 되는 바이러스 RNA와 RNA 중합효소에 의해 결정되기 때문에 CpD에 의해 바이러스가 불활성화되는 데, 바이러스 게놈이나 바이러스 RNA 중합효소가 영향을 줄 것으로 생각된다. 이는 CpD의 광역동성 작용에 의한 VSV 불활성화의 표적이 M 단백질 외에도 바이러스 게놈이나 바이러스 RNA 중합효소 또는 RNA-RNA 중합효소 복합체임을 의미한다.

광활성인자들은 산소가 존재하는 환경에서 빛에 의해 type Ⅰ 반응과 type Ⅱ 반응을 일으키게 된다. Type Ⅰ 반응은 자유전자(free radical)들이 생체분자에 영향을 주는 것으로, 이는 주로 peptide를 cross-link 시키거나 호흡연쇄(respiratory chain)에 산화·환원 반응을 일으켜 호흡을 저해한다[3]. Type Ⅱ 반응은 singlet oxygen에 의해 세포벽이나 세포막에 손상을 주고 바이러스 외피 단백질의 Tyr, Met, His를 산화시켜 바이러스의 감염력에 영향을 준다. 또한 세포내 효소나 바이러스 효소와 핵산 잔기, 그중에서도 guanosine에 영향을 주어 8-oxo-7,8-dihydroguanosine(8-oxoG)을 형성

하게 되고 이것은 돌연변이를 일으키거나 게놈 복제를 저해한다[3]. CpD 역시 singlet oxygen을 형성할 수 있기 때문에[28, 32] 바이러스 불활성화는 CpD가 빛에 의해 singlet oxygen을 형성하여 VSV의 감염력에 중요한 M 단백질이나 RNA 게놈 또는 RNA 중합효소 또는 RNA-RNA 중합효소 복합체에 영향을 준 것으로 생각된다.

항바이러스 화학요법은 소수의 바이러스 감염질환에서 사용되고 있지만[3], 아직도 숙주 손상을 최소화하면서 감염된 바이러스를 불활성화시킬 수 있는 방법에 관한 연구는 미진하다. 바이러스는 숙주세포의 대사과정을 이용하고 있어, 감염된 세포와 바이러스만을 선택적으로 제거할 수 있는 방법을 개발하는데 어려움이 있다. 특히, 다양한 진단법의 개발로 혈액의 안정성이 증가되고 있지만, HIV-1/2나 human HTLV-I/II와 같은 레트로바이러스와 HBV와 HCV 등에 의한 혈액구성물의 오염에 대한 위험이 여전히 존재하고 있다[49]. 더욱이 면역기능이 저하된 환자들의 수혈과정이 골수 이식에서 cytomegalovirus(CMV), parvovirus나 알려지지 않은 새로운 바이러스들에 의한 혈액구성물들의 오염이 중요한 문제가 되고 있다. 따라서 이러한 바이러스들을 제거할 수 있는 방법의 개발에 많은 관심이 모아지고 있다[50, 51]. 혈액에 오염된 바이러스를 제거하기 위해서는 정상세포에는 영향을 미치지 않으면서 바이러스와 바이러스가 감염된 세포내에 존재하는 바이러스를 파괴할 수 있어야 한다. 이처럼 CpD를 바이러스 감염질환이나 바이러스가 오염된 혈액의 소독에 이용하기 위한 연구가 필요하다. 이를 통하여 혈액제제의 소독이나 바이러스 감염질환의 치료에 CpD가 효과적으로 사용될 수 있을 것이다. 하지만 본 실험에서 사용한 VSV는 숙주

세포에 잠복 감염되지 않기 때문에 세포에 감염된 바이러스를 파괴 효과를 확인할 수 없었다. 따라서 CpD의 항바이러스 효과를 임상에 적용시키기 위해서는 세포내·외에 감염된 바이러스를 효과적으로 파괴할 수 있는 바이러스를 이용하여 적합한 조건을 찾아야 할 것으로 생각된다.

광활성화된 CpD는 농도에 비례하여 VSV를 불활성화시켰다. 플라크가 형성되지 않은 CpD 농도에서 세포내 VSV RNA가 검출되지 않았으며, 세포내 RNA 합성능 역시 CpD 농도에 따라 감소하였다. 또한 VSV M 단백질이 소실되어 젤 상단에 소실된 단백질의 cross-linking에 의한 밴드가 형성되었고, RNA 중합 활성 또한 CpD 농도에 따라 감소함을 확인하였다. 이상의 결과로 CpD는 지질막을 가진 바이러스에 대한 항바이러스 제제로 사용할 수 있으며, 광활성화된 CpD에 의한 VSV 불활성화의 표적은 M 단백질과 VSV RNA 게놈이나 VSV 중합효소 또는 RNA-RNA 중합효소 복합체임을 확인하였다.

CpD는 여러 성분이 혼합된 물질로 항바이러스 작용이나 세포 독성에 직접적으로 작용하는 성분이 무엇인지는 알 수 없다. 따라서 항바이러스 작용이나 세포 독성을 나타내는 성분의 분리가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 광활성인자에 의한 바이러스 불활성화의 모델인 VSV를 이용하여 CpD가 가지고 있는 항바이러스 효과를 플라크 형성 측정법, 세포내 VSV RNA 검출, 세포내 VSV RNA 합성능 변화를 통하여 확인하고, 불활성화 된다면 CpD에 의한 바이러스의 불활성화의 주요한 표적이 무엇인지를 바이러스 단백질의 변화, 바이러스 RNA 중합 활성 변화를 통하여 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CpD는 15 60 μg/ml의 농도에서 광역동성 작용에 의해 7log의 VSV를 불활성화시켰다.
2. CpD 30 μg/ml에서 CpD의 광역동성 작용에 의해 세포내 VSV RNA가 검출되지 않았다.
3. 세포내 VSV RNA 합성능이 광활성화된 CpD 농도에 따라 감소하였다.
4. VSV의 M 단백질이 CpD에의한 광역동성 작용에 의해 소실되었고, 소실된 단백질들이 cross-link를 형성하였다.
5. VSV 중합 활성이 광활성화된 CpD 농도에 따라서 감소하였다.

이상의 결과로 CpD는 지질막을 가진 바이러스에 대한 항바이러스 제제로서의 역할을 할 수 있으며, CpD에 의한 VSV 광불활성의 주요한 표적이 M 단백질과 RNA나 바이러스 RNA 중합효소 또는 RNA-RNA 중합효소 복합체임을 알 수 있다.

참고 문헌

1. Jesionek A, Tappeiner VH. Zur behandlung der hautcarcinome mit fluorescienden stoffen. Munch Med Wochschr 1903;47:2042.

2. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korebelik M *et. al.*. Photodynamic therapy. J Natl Cancer Inst 1998;90:889-905.

3. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy(PACT) J Antimicrob Chemother 1998;42:13-28.

4. Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. Photochem Photobiol 1991;53:549-53.

5. Gomer CJ. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. Photochem Photobiol 1991;54:1093-107.

6. Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and

clinical use. J Natl Cancer Inst 1993;85:443-56.

7. Matthews JL, Newman JT, Sogandores-Bernal F. Photodynamic therapy of viral contaminations with potential for blood banking applications. Transfusion 1988;28:81-3.

8. Perdrau JR, Todd C. Photodynamic action of methylene blue on certain viruses. Proc R Soc Lond (Biol) 1933;112:288-98.

9. Melnick JL, Wallis C. Photodynamic inactivation of herpes simplex virus: A status report. Ann N Y Acad Sci 1977;284:171-81.

10. Swartz H, Schnipper LE, Lewin AA, Crumpacker CS. Inactivation of herpes simplex virus with methylene blue, light and electricity. Proc Soc Exp Biol Med 1979;161:204-9.

11. Myers MM, OXman JC, Arndt K. Failure of neutral-red photodynamic activation in recurrent herpes simplex virus infection. N Eng J Med 1973;293:945-9.

12. Wallis C, Melick JL. Photodynamic inactivation of animal viruses. Photochem Photobiol 1965;4:159-70.

13. O'day DMBR, Jones BR, Poirer R, Illey S, Chrishioim I, Steie A, *et al.*. Proflavine photodynamic viral inactivation in herpes simplex keratitis. Am J Ophthalmol 1975;79:941-8.

14. Rapp F, Li YH, Jerkofsky M. Transformation of mammalian cells by DNA-containing viruses following photodynamic inactivation. Virol 1973;55:339-46

15. Prodouz KN. Effect of merocyanine 540 on platelet function and reduction of its antiviral activity by albumin[abstract]. Transfusion 1989;29(Suppl):42S.

16. Moroff G, Benade LE, Dabay M, George VM, Shumaker J, Dodd RY. Use of photochemical procedures to inactivate viruses in platelet suspensions[abstract]. Transfusion 1989;29(Suppl):9S.

17. Cole M, Stomberg R, Friedman L, Benade L, Shumarker J. Photochemical inactivation of virus in red cells[abstract]. Transfusion 1989;29(Suppl):42S.

18. Lin L, Wiesehahn GP, Morel PA, Corash L. Use of 8-methaoxy-psoralen and long-wavelength ultraviolet radiation for decontamination of platelet concentrates. Blood 1989;74:517-25.

19. Alter HJ, Creagan RP, Morel PA. Photochemical decontamination of blood components containing hepatitis B and non-A, non-B virus. Lancet 1988;2:1446-50.

20. Williams B, Horowiz B, Geacintov N, Valinsky JE. Inactivation of viruses in cellular blood products: studies on VSV, a marker lipid envelope virus[abstract]. Blood 1988;72(Suppl):287a.

21. Specht KG. The role of DNA damage in PM viral inactivation by methylene blue sensitization. Photochem Photobiol 1994;59:506-14.

22. Abe H, Wagner SJ. Analysis of viral DNA, protein and envelope damage after methylene blue, phthalocyanine derivative or merocyanine 540 photosensitization. Photochem Photobiol 1995;61:402-9.

23. Schneider JE, Philips JR, Pye Q, Maidt ML, Price S, Floyd RA. Methylene blue and rose bengal photoinactivation of RNA bacteriophages: comparative studies of 8-oxoguanine formation in isolated RNA. Arch Biochem Biophys 1993;31:91-7.

24. Moor AC, Wagenaars-van Gompel AE, Brand A, Dubbelman TM, VanStevenick J. Primary targets for photoinactivation of vesicular stomatitis virus by A1PcS$_4$ or Pc4 and red light. Photochem Photobiol 1997;65:465-70.

25. Moor AC, Wagenaars-van Gompel AE, Hermans RC, Meulen J, Smit J, Wilschut J. Inhibition of various steps in the replication cycle of vesicular stomatitis virus contributes to its photoinactivation by AlPcS$_4$ or Pc4 and red light. Photochem Photobiol 1999;63:353-9.

26. Schnipper L, Lewin A, Swartz M, Crumpacker C. Mechanisms of photodynamic inactivation of herpes simplex viruses. J Clin Invest 1980;65:432-8.

27. Lenard JA, Rabson A, Vanderoef R. Photodynamic inactivation of infectivity of human immunodeficiency virus and other enveloped viruses using hypericin and rose bengal: inhibition of fusion and syncytia formation. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:158-62.

28. Hiatt CW. Methods for photoinactivation of viruses. In Concepts in Radiation Cell Biology. New York: Academic Press; 1972. p.58-89.

29. Park JH. Photodynamic therapeutic effect of chloroporphyrin (Porphyrin A) on tumor cells[dissertation]. Seoul: Yonsei Univ.; 1988.

30. Choi GB. Targeting polymeric antitumor agents. Synthesis and characterization of alternating copolymers composed of dihydropyran derivatives and maleic anhydride containing porphyrins and 5-fluorouracil as pendent groups[dissertation]. Suwon, Aju Univ.; 1989.

31. Lee WY, Park YJ, Kim BS, Hahn MJ, Hahn BS. Chlorophyll derivatives(CpD) extracted from silk worm excreta are specifically cytotoxic to tumor cells in *vitro*. Yonsei Med J 1990;31:225-33.

32. Park YJ, Lee WY, Hahn BS, Hahn MJ, Roh JK, Kim BS. The effective use of chlorophyll derivatives(CpD) photodynamic therapy of ascites tumors in mice. J Kor Can Asso 1989;21:1-6.

33. Lee M, Lee WY. Anti-retroviral effect of chlorophyll derivatives (CpD-D) by photosensitization. Yonsei Med J 1990;31:339-46.

34. Schlegel R, Tralka TS, Willingham MC, Pastan I. Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidyl serine: Is phosphatidyl serine a VSV-binding site? Cell 1983;32:639-46.

35. Smetana Z, Mendelson E, Manor J, Van Lier JE, Ben-Hur E, Salzberg S *et al*. Photodynamic inactivation of herpes simplex viruses with phthalocyanine derivatives. J Photochem Photobiol 1994;22:37-43.

36. Munson SR, Fiel RJ. Hematoporphyrin-sensitized photodynamic inactivation of viral RNA dependent DNA polymerase. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1977;16:175-8.

37. Musser DA, Datta-Gupta N, Fiel RJ. Inhibition of DNA-dependent RNA synthesis by porphyrin photosensitization. Biochem Biophys Res Commun 1980;97:918-25.

38. Parker J, Ahrens PB, Ankel H. Antiviral effect of cyclopentenone prostaglandins on vesicular stomatitis virus replication. Antiviral Res 1995;26:83-96.

39. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-45.

40. Doddy RY, Moroff G, Wagner S, Dabay MH, Dorfman E, George V *et al*. Inactivation of viruses in platelet suspensions that retain their *in vitro* characteritics: comparison of psoralen-ultraviolet A and merocyanine 540-visible light and methods. Transfusion 1991;31:483-90.

41. Schlegel R, Willingham M, Pastan I. Monesin blocks endocytosis of vesicular stomatitis virus. Biochem Biophys Res Commun. 1981;102:992-8.

42. Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. J Mol Biol 1970;47:69-85.

43. Malik Z, Smetana Z, Mendelson E, Wagner P, Salzberg S, Ben-Hur E. Alteration in herpes simplex virus proteins following photodynamic treatment with phthalocyanines. Photochem Photobiol 1996;63:59S.

44. Thomas D, Mewcomb WW, Brown JC, Wall JS, Hainfield JF, Trus BL *et al.*. Mass and molecular composition of vesicular stomatitis virus: a scanning transmission electron microscopy analysis. J Virol 1985;54:598-607.

45. Wagner RR. Rhabdovirus Biology and Infection: an overview. In Wanger RR editors. The Rhabdoviruses. Plenum Publishing Corp. New York. 1987. p.9-74.

46. Carroll AR, Wagner RR. Role of the membrane (M) protein in endogenous inhibition of *in vitro* transcription by vesicular stomatitis virus. J Virol 1979;29:134-42.

47. Clinton GM, Little SP, Hagen FS, Huang AS. The matrix (M) protein of vesicular stomatitis virus regulates transcription. Cell 1978;15:1455-62.

48. Blondel BL, Rhodes RB, McKenzie M, Lyles DS. The role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. J Virol 1990;64:1716-25.

49. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. N Engl J Med 1996;334: 1685-90.

50. Ben-Hur E, Moor AC, Margolis-Nunno H, Gottlieb P, Zuk MM, Lustigman S *et al*.. The photodecontamination of cellular blood components: mechanisms and use of photosensitization transfusion medicine. Transfusion Med Rev 1996;X:15-22.

51. Prodouz KN, Fratantoni JC, Boone EJ, Bonner RF. Use of laser-UV for inactivation of virus in blood products. Blood 1987;70:589-592.

Abstract

Role of Porphyrin Derivatives from Silkworm Excreta in Inactivation of Vesicular Stomatitis Virus

Seung-Jin Kim

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Won-young Lee)

Efficacy of porphyrin derivatives from silkworm excreta(CpD) in photodynamic antimicrobial chemotherapy(PACT) was examined. Vesicular Stomatitis Virus(VSV), a lipid-enveloped virus, was used as a model virus to explore the primary targets for the photoinactivation by CpD with light(CpD-PACT). CpD was developed as a photosensitizer in photochemotherapy of cancer called "photodynamic therapy(PDT)" and a putative antiviral effect of CpD on Gross leukemia virus was also demonstrated in experimental CpD-PACT. PACT is widely used in disinfections of blood products, particularly for virus contamination. Like PDT, PACT also utilizes photosensitizers and visible or ultraviolet light in order to give oxidative damage to microbes. The antiviral effect of CpD-PACT on VSV is not studied. Thus, a study was designed to clarify the primary target for the photoinactivation by CpD on VSV.

The effects of CpD-PACT on VSV were scored by use of the

plaque forming unit(PFU) assays. Reduction in PFU by CpD inactivated VSV was exhibited in a dose-dependent manner. Complete loss of infectivity of the virus was scored when the virus was treated with a dose of 15 60 μg/ml of CpD. Synthesis of the viral RNA in host cells was comparatively assayed in assays of RT-PCR. The viral RNA was undetectable at a dose of 30 μg/ml CpD following the light irradiation. As expected, reduced viral RNA synthesis in the host cells determined by the incorporation of ^{3}H-uridine was correlated with the loss of infectivity in PFU assays. Direct effect of CpD-PACT on the level of M protein and the rate of RNA transcription of the VSV was examined to determine the immediate target molecules affected by the treatment. Gel electrophoresis for the level of M protein and an *in vitro* transcription assay employing ^{3}H-UTP for RNA transcription were employed. The results revealed an immediate decrease in M protein levels and a gradual decrease in RNA transcription in a dose-dependent manner following CpD-PACT. These results indicated that both of the M protein and the transcription machineries of the virus served as the target molecules for CpD-PACT.

As results, CpD is demonstrated to be a potential anti-VSV agent by damaging the matrix protein as well as transcription machineries involved. At present, differential effect of CpD-PACT on M protein, RNA, and RNA polymerase are not demonstrated.

Key Words : Photodynamic antimicrobial chemotherapy(PACT), extract of silkworm excreta(CpD), vesicular stomatitis virus(VSV), photoinactivation, primary target