

## 고온에서 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스 작용과 2'-5'oligoadenylate synthetase 활성화 변화

연세대학교 의과대학 미생물학교실

주민경 · 이봉기 · 김세종

=Abstract=

### Effect of in vitro High Temperature on Antiviral Function of Interferon and 2'-5' Oligoadenylate Synthetase Activity

Min Kyung Chu, Bong Ki Lee and Se Jong Kim

Department of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University

In this report we performed plaque reduction test using HEP-2 cell and vesiculo-stomatitis virus(VSV) at 37°C and 39°C to examine the effect of high temperature on the antiviral activity of human IFN- $\gamma$ . And we measured the activity of 2-5A synthetase to determine the effect of high temperature on the 2-5A system of HEP-2 cells treated with IFN- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  at 39°C and at 37°C.

In the case of the treatment of HEP-2 cells with IFN- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  before VSV inoculation, the antiviral actions of IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were greater at 39°C than at 37°C. In the case of IFN- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  treatment after VSV inoculation, no antiviral action of IFN- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  was observed. Enhancement of 2-5A synthetase activities by IFN- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  were greater at 39°C than at 37°C.

From this study, it may be concluded that the antiviral action of IFN- $\gamma$  and the activity of the 2-5A system are enhanced by high temperature. It seems that enhancement of the 2-5A system activity at high temperature may contribute to the enhancement of antiviral action of IFN- $\gamma$ .

It is reported that different characters in 2-5A system activation by IFN- $\alpha$  or IFN- $\gamma$ . Thus the mechanisms of enhancement of 2-5A system activation by IFN- $\gamma$  at high temperature should be further studied.

Key Word : IFN, 2'-5' oligoadenylate system, High temperature.

### 서론

미생물 감염시 수반되는 체온상승은 대식세포를 포함한 여러 세포에서 생성되는 interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$  및 interferons(IFN)등의 내발열인자들이 체온조절중추인 시상하부에 작용하여 체온조절의 설정온도를 상승시켜 생체온도가 상승

하여 나타나는 현상이다<sup>5)</sup>.

고온(hyperthermia, 38-40°C)에서는 세포독성 T 림프구의 세포독작용이 증가하고<sup>12)</sup>, 대식세포의 탐식능력과 항종양작용 및 TNF생성능의 증가가 보고되고 있으며<sup>33)</sup>, B림프구에서 항체 생성능력이 증가한다<sup>26)</sup>. 또한 자연살(natural killer, NK)세포의 활성화 증가<sup>6)</sup>, 백혈구 이동능력의 증가<sup>17)</sup>, IFN- $\alpha$ 의 항바이러스작용과 항종양작용의 증가<sup>8)</sup>등이 보고되어 미생물감염에 의한 체온상승은 숙주 방어기전의 하나로 생각되고 있다<sup>20)</sup>.

IFN은 바이러스에 감염된 세포에서 생성되는 항바이러스작용을 가지는 물질로 처음 알려졌으나<sup>11)</sup>

Reprint request to : Min Kyung Chu, Department of Microbiology School of Medicine, Ajou University, 33-2 Woncheon dong, Paldal gu, Suwon, Korea 442-749.

항바이러스작용 이외에도 항종양작용, 정상세포 증식억제작용, 면역조절작용등의 다양한 작용을 가지는 물질이다<sup>21)</sup>. IFN은 생성하는 세포에 따라 바이러스에 감염된 백혈구에서 생성되는 IFN- $\alpha$ , 바이러스에 감염된 섬유아세포에서 생성되는 IFN- $\beta$  그리고 활성화된 T 림프구에서 생성되는 IFN- $\gamma$ 로 구분된다<sup>21)</sup>. IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\beta$ 는 세포에 작용하여 항바이러스 작용을 유도할 뿐만 아니라 MHC class I 분자의 발현과 자연살세포의 활성을 증가시켜 바이러스에 감염된 세포의 제거를 증가시키는등 주로 바이러스감염에 작용하며<sup>24)</sup>, IFN- $\gamma$ 는 MHC class II 분자의 발현을 유도하고 대식세포와 호중구를 활성화하며 림프구의 분화를 촉진시키는등 면역반응에 주로 작용한다<sup>21, 24)</sup>.

IFN의 항바이러스작용에는 2'-5' oligoadenylate (2-5A) system활성화가 중요한 기전으로 작용한다고 알려져 있다<sup>9, 10)</sup>. 2-5A system활성화는 IFN의 작용을 받은 세포의 세포질내에서 2-5A synthetase가 증가되어 ATP로부터 2-5A의 생성을 증가시키고 증가된 2-5A에 의해 2-5A dependent endonuclease인 RNase L을 활성화함으로써 일어난다<sup>32)</sup>. 활성화된 RNase L이 바이러스와 바이러스에 감염된 세포의 mRNA와 rRNA를 분해하여 바이러스와 세포의 증식을 억제하고 죽임으로써 항바이러스작용이 나타난다<sup>1, 10)</sup>.

IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\beta$ 에 의한 2-5A system 활성화는 작용 2시간후부터 활성화가 나타나기 시작하여 작용 8시간 이후에 최대의 활성화가 나타나나 IFN- $\gamma$ 에 의한 2-5A system 활성화는 작용 8시간후부터 나타나기 시작하여 작용 12시간 이후에 최대의 활성화가 나타난다고 한다<sup>3)</sup>. 또한 단백질 합성억제제인 cycloheximide를 작용시킨 세포에서 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\beta$ 에 의한 2-5A system활성화는 별다른 영향을 받지 않지만 IFN- $\gamma$ 에 의한 2-5A system활성화는 현저히 억제<sup>3)</sup>되는등 IFN- $\gamma$ 에 의한 2-5A system 활성화와 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\beta$ 에 의한 활성화는 다른 양상을 보인다.

사람 IFN- $\alpha$ 와 사람 IFN- $\beta$ 의 항바이러스작용은 고온에서 증가하며<sup>2, 28)</sup> 2-5A system활성화도 고온에서 증가한다고 보고되고 있다<sup>4)</sup>. 마우스 비장세포에서 poly(A)·poly(U)로 유도된 마우스 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용도 고온에서 증가한다는 보고는 있으나<sup>13)</sup> 아직 고온에서 사람 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스 작용에 대한 보고는 없다.

본 연구에서는 고온에서 사람 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용을 보기 위해 39℃와 37℃에서 플레이크감소

시험을 시행하였으며 2-5A system활성화는 2-5A synthetase에 의해 3H-ATP로 부터 생성된 2-5A의 방사전량으로 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

고온에서 사람 IFN- $\alpha$ (제일제당, 서울, 한국) 및 사람 IFN- $\gamma$ (Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.)의 항바이러스 작용과 2-5A synthetase 활성도 변화를 보기 위한 세포주는 사람 후두종양유래 세포주인 HEp-2세포주(ATCC CCL<sup>23)</sup>를 국립보건원 호흡기 병독과로부터 분양받아 사용하였다. 바이러스 배양을 위하여 원숭이 신장유래 세포주인 VERO(ATCC CRL15<sup>86)</sup>세포주를 사용하였다. HEp-2세포주 및 VERO세포주는 L-ylutamine 2mM, penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100mg/ml이 함유된 minimal essential media(MEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)(이하 기본배지)에 열비동화시킨 우태아혈청(Gibco BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)을 10%(vol/vol)되게 첨가(이하 완전배지)하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

### 2. 바이러스 및 바이러스배양

플레이크감소시험에는 vesiculo-stomatitis virus, Indiana strain (VSV, ATCC VR 1238)을 사용하였다. 바이러스의 배양은 단층을 이루게 배양한 VERO세포에 바이러스부유액을 접종하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 48시간 배양하였다. 현미경으로 50% 이상의 세포에서 세포병변효과를 확인한 후, 세포배양액을 2000rpm에서 15분간 원심하여 상청액을 분리하였다. 상청액을 분주하고 -70℃에 보관하여 이를 모든 플레이크감소시험에 사용하였다. 실험에 사용한 VSV바이러스액의 바이러스의 농도는 1.50±0.08×10<sup>7</sup>pfu/ml였다.

### 3. 플레이크감소시험

고온에서 사람 IFN- $\alpha$ 와 사람 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용 변화를 보기 위하여 플레이크감소시험을 다음과 같이 시행하였다<sup>2)</sup>.

HEp-2세포를 완전배지에서 5×10<sup>5</sup>cells/ml가 되게 조절하여 12 well culture plate(Corning, Corning, NY, U.S.A.)에 well당 1ml씩 넣고 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 배양하였다. 현미경으로 단층이 형성된 것을 확인한 후 배지를 제거하고 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 가 각각 10 IU/ml 또는 100 IU/ml로 함유된

완전배지를 가하여 37℃ 또는 39℃에서 12시간 배양하였다. 배지를 제거하고 -70℃에서 보관한 VSV 바이러스액을 완전배지로 10배씩 계단희석하여 well당 200ml를 넣고 1시간동안 정치하였다. 기본배지로 2회 세척하여 흡착되지 않은 바이러스를 제거한 후 완전배지를 넣고 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 더 배양하여 플레이트 생성을 유도하였다. 세포고정염색액(70% ethanol, 10% formalin, 5% acetic acid, 1% crystal violet)으로 세포를 고정, 염색하고 well당 플레이트 숫자가 30-100개의 범위로 생성된 희석배수의 플레이트를 현미경하에서 세어 pfu/ml을 결정하였다.

IFN 작용시기에 따른 항바이러스작용 변화를 보기 위하여 상기한 방법으로 배양하여 단층이 형성된 HEp-2세포의 배지를 제거하고 완전배지로 VSV 바이러스액을 10배씩 계단희석하여 well당 200ml를 넣고 1시간동안 정치하였다. 기본배지로 2회 세척한 후 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 가 각각 10 IU/ml 또는 100 IU/ml 함유된 완전배지를 가하여 37℃ 또는 39℃에서 12시간 배양하였다. 배지를 제거하고 완전배지를 넣고 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 더 배양하고 상기한 방법으로 pfu/ml을 결정하였다.

#### 4. 2'-5' oligoadenylate synthetase 활성도 측정

2-5A system 활성화를 보기 위해 2-5A synthetase 활성도를 다음과 같이 측정하였다<sup>29, 34</sup>.

HEp-2세포를 완전배지에서 5×10<sup>5</sup>cells/ml이 되게 조절하여 75cm<sup>2</sup> culture flask(Corning, Corning, NY, U.S.A.)에 15ml씩 넣고 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 배양하였다. 현미경으로 단층이 형성된 것을 확인하고 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 가 각각 10 IU/ml 또는 100 IU/ml로 함유된 완전배지를 넣고 37℃ 또는 39℃에서 12시간 배양하였다.

배양된 세포는 Ca<sup>++</sup> 및 Mg<sup>++</sup>를 함유하지 않은 인산완충용액 10ml로 2회 세척한 다음 인산완충용액 10ml을 넣고 rubber policeman을 사용하여 culture flask로 부터 세포를 떼어 세포부유액을 얻었다. 세포부유액을 2000rpm에서 5분간 원심한 후 상청액을 버리고 인산완충용액으로 재부유하여 세포수를 2×10<sup>6</sup>cells/ml로 조정하여 1.5ml conical tube(Corning, Corning, NY, U.S.A.)에 1ml씩 옮기고 2000rpm에서 15분간 원심하였다. 상청액을 제거하고 200ml의 세포용해완충액[20mM HEPES pH 7.6, 2mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 50mM KCl, 7mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol(vol/vol), 0.5% NP-40(vol/vol), leupeptin(Sigma, St. Louis, MO, U.S.

A.)을 넣고 얼음위에서 5분간 정치한 후 세포용해액을 4000rpm에서 15분간 원심분리하여 상청액을 -70℃에서 보관하고 이를 2'-5' oligoadenylate 합성에 사용하였다.

세포용해액의 단백질함량을 Bradford법<sup>30</sup>을 이용하여 결정하였다. 단백질함량을 1.2mg/ml로 조정한 세포용해액 200ml에 1mCi/ml의 <sup>3</sup>H-ATP(Amersham, Chalfont, England) 1ml와 400ml의 반응혼합용액[300mM HEPES, 75mM ATP, 15mM creatine phosphate(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), 0.48 mg/ml creatine phosphokinase(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), 0.15mg/ml Polyadenylic·polyuridylic acid[poly(I)·poly(C)](Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)]를 넣고 30℃에서 90분간 정치하여 2-5A를 합성하는 반응이 일어나도록 하고 90℃로 5분간 가열하여 반응을 정지시켰다.

반응을 정지시킨 혼합용액 6ml를 DEAE-cellulose paper disc DE81(Whatmann, Stonemaid, England)에 옮기고 건조시켰다. ATP 및 AMP를 제거하기 위하여 완충액(90mM KCl, 20mM Tris·HCl pH 7.6)으로 5회 세척하고 건조시킨 후 2-5A를 분리하기 위하여 완충액(350mM KCl, 20mM Tris·HCl pH 7.6)으로 5분간 정치하였다. 2-5A를 포함한 완충액과 scintillation gel(Lumac, Olen, Belgium)을 1:9(vol/vol)로 혼합하여 방사선량을  $\beta$ -counter로 측정하였다.

## 결 과

### 1. 고온에서 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용

온도에 따른 IFN- $\alpha$ 과 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용을 보기 위해 HEp-2세포를 37℃와 39℃에서 10 IU/ml 및 100 IU/ml의 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 12시간동안 처리하고 VSV를 접종하여 플레이트감소시험을 시행하였다.

37℃에서 10 IU/ml의 IFN- $\gamma$ 로 처리한 경우(2.40±0.08x10<sup>6</sup>pfu/ml)에는 IFN- $\gamma$ 로 처리하지 않은 경우(1.50±0.08x10<sup>7</sup>pfu/ml)에 비해 플레이트생성이 감소하였으며, 100 IU/ml로 농도를 증가하여 처리한 경우(1.30±1.00x10<sup>5</sup>pfu/ml)에는 플레이트생성이 더 많이 감소하였다(Table 1). IFN- $\alpha$  10 IU/ml로 처리한 경우(5.61±1.15x10<sup>6</sup>pfu/ml)에도 IFN- $\alpha$ 로 처리하지 않은 경우(1.50±0.08x10<sup>7</sup>pfu/ml)에 비해 플레이트생성이 감소하고 100 IU/ml로 처리한 경우(1.58±0.59x10<sup>5</sup>pfu/ml)에 더 많이 감소하였다(Table 2).

**Table 1.** Effect of high temperature on antiviral activity of IFN- $\gamma$ .

Antiviral activity of IFN- $\gamma$  was measured by plaque reduction test. HEp-2 cells were treated with IFN- $\gamma$  at 37°C or 39°C for 12hrs, inoculated with VSV and incubated at 37°C for 24hrs(VSV inoculation after IFN- $\gamma$  treatment). Or initially inoculated with VSV, treated with IFN- $\gamma$  at 37°C or 39°C for 12hrs and incubated at 39°C for 24hrs(VSV inoculation before IFN- $\gamma$  treatment)

IFN- $\gamma$ concentration	Virus plaque formation(PFU/ml)	
	(IU/ml)	39°C
0	$1.50 \pm 0.08 \times 10^7$	$1.54 \pm 0.20 \times 10^7$
VSV inoculation after IFN- $\gamma$ treatment		
10	$2.40 \pm 0.08 \times 10^6$	$1.43 \pm 0.08 \times 10^6$
100	$1.30 \pm 1.00 \times 10^5$	$0.93 \pm 0.60 \times 10^5$
VSV inoculation before IFN- $\gamma$ treatment		
10	$1.55 \pm 0.17 \times 10^7$	$1.50 \pm 0.26 \times 10^7$
100	$1.54 \pm 0.15 \times 10^7$	$1.55 \pm 0.23 \times 10^7$

**Table 2.** Effect of high temperature on antiviral activity of IFN- $\alpha$ . Antiviral activity of IFN- $\alpha$  were measured by plaque reduction test. Like plaque reduction test of IFN- $\gamma$  at HEp-2 cells were treated with IFN- $\alpha$  39°C or 37°C for 12hrs, inoculated with VSV and incubated at 37°C for 24hrs(VSV inoculation after IFN- $\alpha$  treatment). Or inoculated with VSV, treated with IFN- $\alpha$  at 37°C or 39°C for 12hrs and incubated at 39°C for 24hrs(VSV inoculation before IFN- $\alpha$  treatment)

IFN- $\alpha$ concentration	Virus plaque formation(PFU/ml)	
	(IU/ml)	39°C
0	$1.50 \pm 0.08 \times 10^7$	$1.54 \pm 0.20 \times 10^7$
VSV inoculation after IFN- $\alpha$ treatment		
10	$5.61 \pm 1.15 \times 10^6$	$2.48 \pm 0.53 \times 10^6$
100	$1.580 \pm 0.59 \times 10^5$	$1.32 \pm 0.38 \times 10^5$
VSV inoculation before IFN- $\alpha$ treatment		
10	$1.44 \pm 0.14 \times 10^7$	$1.54 \pm 0.22 \times 10^7$
100	$1.40 \pm 0.20 \times 10^7$	$1.31 \pm 0.22 \times 10^7$

39°C에서 IFN- $\gamma$  10 IU/ml( $1.43 \pm 0.36 \times 10^6$  pfu/ml)와 100 IU/ml ( $0.93 \pm 0.60 \times 10^5$  pfu/ml)로 처리한 경우에는 IFN- $\gamma$ 로 처리하지 않은 경우( $1.54 \pm 0.20 \times 10^7$  pfu/ml)에 비해 플라이크생성이 감소하였다(Table1). IFN- $\alpha$ 로 처리하지 않은 경우 ( $1.54 \pm 0.20 \times 10^7$  pfu/ml)에 비해 IFN- $\alpha$  10 IU/ml ( $2.48 \pm 0.53 \times 10^6$  pfu/ml)와 100 IU/ml( $1.32 \pm 0.38 \times 10^5$  pfu/ml)로 처리한 경우에도 플라이크생성이 감소하였다(Table 2).

39°C에서 HEp-2세포를 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 처

리하지 않고 배양한 경우( $1.54 \pm 0.20 \times 10^7$  pfu/ml)에는 37°C( $1.50 \pm 0.08 \times 10^7$  pfu/ml)에서 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 처리하지 않고 배양한 경우와 플라이크생성에 차이가 없었다(Table1). IFN- $\gamma$  10 IU/ml로 처리한 경우에는 37°C( $2.40 \pm 0.08 \times 10^6$  pfu/ml)에 비해 39°C( $1.43 \pm 0.36 \times 10^6$  pfu/ml)에서 플라이크생성이 감소하였으나 100 IU/ml로 처리한 경우에는 37°C ( $1.30 \pm 1.00 \times 10^5$  pfu/ml)와 39°C( $0.93 \pm 0.60 \times 10^5$  pfu/ml)의 차이는 없었다(Table1). IFN- $\alpha$  10 IU/ml로 처리한 경우에도 39°C( $2.48 \pm 0.53 \times 10^6$  pfu/ml)에서

37℃ ( $5.61 \pm 1.15 \times 10^6$  pfu/ml)에 비해 플라이크생성이 감소하였으나 100 IU/ml로 처리한 경우에는 39℃ ( $1.32 \pm 0.38 \times 10^5$  pfu/ml)와 37℃ ( $1.58 \pm 0.59 \times 10^5$  pfu/ml)의 플라이크생성에 차이가 없었다(Table 2).

IFN 처리시기에 따른 항바이러스작용의 변화를 보기 위하여 HEp-2세포에 VSV를 접종하고 37℃ 또는 39℃에서 10 IU/ml와 100 IU/ml의 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 12시간 처리(이하 후처리)하여 플라이크감소시험을 시행하였다.

37℃에서 HEp-2세포를 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 를 처리하지 않은 경우( $1.50 \pm 0.08 \times 10^7$  pfu/ml)와 IFN- $\gamma$  10 IU/ml( $1.55 \pm 0.17 \times 10^7$  pfu/ml), 100 IU/ml ( $1.54 \pm 0.15 \times 10^7$  pfu/ml)로 후처리한 경우, IFN- $\alpha$  10 IU/ml ( $1.44 \pm 0.14 \times 10^7$  pfu/ml), 100 IU/ml( $1.40 \pm 0.20 \times 10^7$  pfu/ml)로 후처리한 경우에 플라이크생성에 차이가 없었다(Table 1). 39℃에서도 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 처리하지 않은 경우 ( $1.54 \pm 0.20 \times 10^7$  pfu/ml)와 IFN- $\gamma$  10 IU/ml ( $1.50 \pm 0.26 \times 10^7$  pfu/ml), 100 IU/ml( $1.55 \pm 0.23 \times 10^7$  pfu/ml)로 처리한 경우, IFN- $\alpha$  10 IU/ml( $1.54 \pm 0.22 \times 10^7$  pfu/ml) 또는 100 IU/ml( $1.31 \pm 0.22 \times 10^7$  pfu/ml)로 처리한 경우간에 플라이크생성에 차이가 없었다(Table 2).

2. 고온에서 2'-5'oligoadenylate synthetase활성도 변화

IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 에 의해 HEp-2 세포질내에 생성된 2-5A synthetase에 의해 3H-ATP로부터 생성

된 2-5A의 방사선량(CPM)으로 2-5A synthetase 활성도를 측정하였다.

37℃에서 HEp-2세포를 IFN- $\gamma$ 로 처리하지 않은 경우 ( $152.3 \pm 25.5$  CPM)의 2-5A synthetase활성도에 비하여 IFN- $\gamma$  10 IU/ml로 처리한 경우( $622.8 \pm 80.5$  CPM)에 활성도가 증가하였으며 100 IU/ml로 농도를 증가하여 처리한 경우( $1414.8 \pm 63.3$  CPM)에 활성도가 더 많이 증가하였다(Fig. 1). IFN- $\alpha$  10 IU/ml ( $278.9 \pm 195.1$  CPM)로 처리한 경우에 IFN- $\alpha$ 로 처리하지 않은 경우( $152.3 \pm 25.5$  CPM)에 비해 활성도 증가하였으며(Fig. 2) 100 IU/ml로 처리할 경우( $2344.3 \pm 325.0$  CPM)에 활성도가 더 증가하였다.

39℃에서도 IFN- $\gamma$ 로 처리하지 않은 경우( $175.2 \pm 35.0$  CPM)에 비해 IFN- $\gamma$  10 IU/ml( $1217.5 \pm 180.3$  CPM) 및 100 IU/ml ( $1960.0 \pm 93.0$  CPM)로 처리한 경우에 활성도가 증가하였으며(Fig. 1) IFN- $\alpha$ 도 10 IU/ml ( $1105.7 \pm 145.5$  CPM)와 100 IU/ml ( $2104.3 \pm 225.6$  CPM)로 농도를 증가하여 처리할수록 활성도가 증가하였다(Fig. 2).

IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 처리하지 않은 경우에는 39℃( $175.2 \pm 35.0$  CPM)와 37℃( $152.3 \pm 25.5$  CPM)에서 활성도의 차이가 없었다(Fig. 1, Fig.2). IFN- $\gamma$  10 IU/ml로 처리한 경우에는 39℃( $1217.5 \pm 180.3$  CPM)에서 37℃( $622.8 \pm 80.5$  CPM)에 비해 활성도가 증가하였고, 100 IU/ml로 처리한 경우 ( $1960.3 \pm 93.0$  CPM)에도 37℃( $1414.8 \pm 63.3$  CPM)에 비해 39℃에서 활성도가 증가하였다(Fig.1). IFN- $\alpha$  10

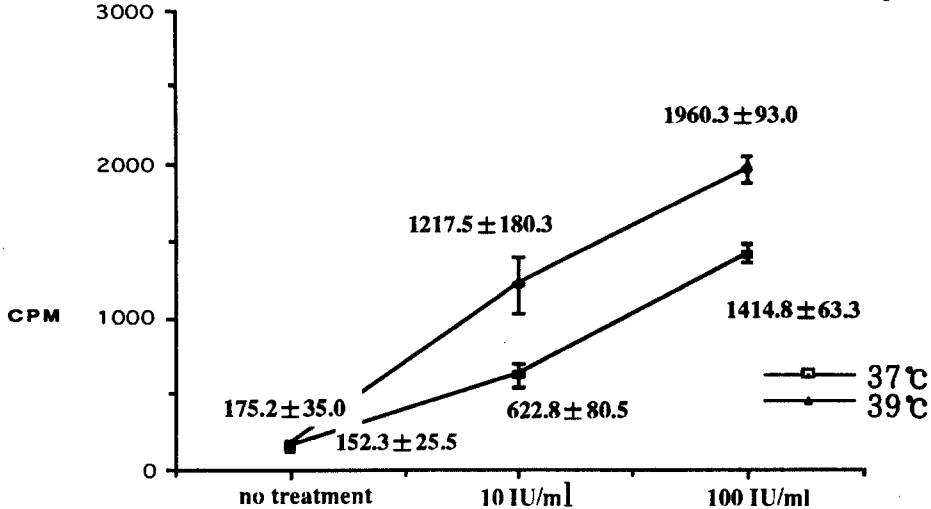


Fig. 1. Effect of high temperature on 2-5A synthetase activity induced by IFN- $\gamma$ . HEp-2 cell were treated with IFN- $\gamma$  at 37℃ or 39℃ for 12 hrs. 2-5A synthetase activities of HEp-2 cells were measured by the radioactivity(CPM) of produced  $^3$ H-2-5A from  $^3$ H-ATP. Higher 2-5A synthetase activities were observed by IFN- $\gamma$  treatment at 39℃ than at 37℃. Values represented mean  $\pm$  SD.

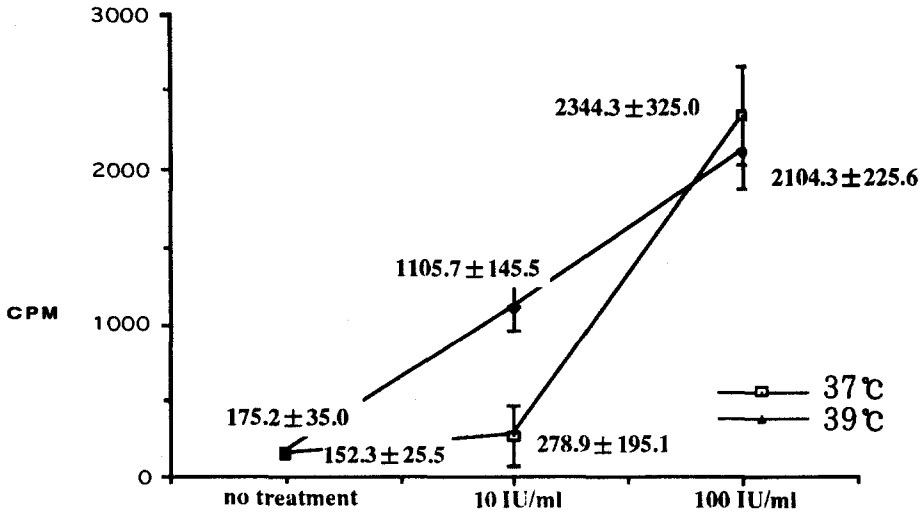


Fig. 2. Effect of high temperature on 2-5A synthetase activity induced by IFN- $\alpha$ . HEp-2 cell were treated with IFN- $\alpha$  at 37°C or 39°C for 12hrs. Like IFN- $\gamma$ , 2-5A synthetase activities of HEp-2 cells were measured by the radioactivity(CPM) of produced 2-5A. Values represented mean  $\pm$  SD.

IU/ml로 39°C에서 처리한 경우(1105.7 $\pm$ 145.5 CPM)에도 37°C(278.9 $\pm$ 195.1 CPM)에 비해 활성도가 증가하였으나 100 IU/ml로 처리한 경우에는 39°C(2104.3 $\pm$ 225.6 CPM)와 37°C(2344.3 $\pm$ 325.0 CPM)에서 활성도 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

### 고찰

IFN은 항바이러스작용, 항종양작용, 생체내 발열작용, 면역 조절작용등 생체내 다양한 생물학적 기능을 매개하는 물질이다<sup>21</sup>. IFN의 항바이러스작용은 IFN이 세포의 2-5A system을 활성화 하거나 eukaryotic initiation factor 2a(eIF2a)를 인산화시키는 등에 의해 나타난다<sup>10, 21, 23</sup>. 2-5A system 활성화는 IFN이 세포질내의 2-5A synthetase를 활성화하여 ATP로부터 2-5A의 생성을 증가시키고 증가된 2-5A에 의해 2-5A dependent endonuclease인 RNase L을 활성화하여 일어난다<sup>15, 22, 23</sup>. 활성화된 RNase L에 의해 바이러스와 바이러스에 감염된 세포의 mRNA와 rRNA를 분해하여 바이러스와 바이러스에 감염된 세포의 증식을 억제하고 죽임으로써 항바이러스작용을 나타낸다<sup>10, 22, 15</sup>. IFN에 의한 또 다른 항바이러스작용 기전인 eIF2a 인산화는 eIF2a에 특이적으로 작용하는 protein kinase가 IFN에 의해 활성화됨으로써 eIF2a가 인산화 됨으로써 바이러스와 바이러스에 감염된 세포의 단백질 합성을 억제하여 항바이러스작용이 나타난다<sup>7</sup>.

IFN의 발열작용은 IFN이 체온조절중추의 체온

조절 설정온도를 상승시켜 나타나는 현상이다<sup>19</sup>. IFN을 치료의 목적등으로 사용할 경우에도 많은 경우에 38°C-40°C정도의 발열이 관찰된다<sup>27</sup>. 사람 IFN- $\alpha$ 와 사람 IFN- $\beta$ 의 항바이러스작용이 37°C에 비해 38°C-40°C에서 증가<sup>4, 8</sup>하며, 마우스 태아 섬유아세포에서도 마우스 거대불입바이러스에 대한 마우스 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용이 37°C에 비해 39°C에서 증가한다고 보고되고 있다<sup>13</sup>.

본 연구에서는 고온에서 사람 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용을 보기 위해 HEp-2세포와 VSV를 사용하여 37°C와 39°C에서 플레이크 감소 시험을 시행하였다. 37°C에서 10 IU/ml과 100 IU/ml의 IFN- $\gamma$ 로 HEp-2세포를 12시간 처리하고 VSV를 접종한 플레이크 감소 시험에서 10 IU/ml의 IFN- $\gamma$ 로 처리한 경우에 IFN- $\gamma$ 로 처리하지 않은 경우에 비해 플레이크 생성이 감소하였으며, 100 IU/ml의 IFN- $\gamma$ 로 농도를 증가하여 처리할 경우에는 플레이크 생성이 더 많이 감소하였다. 37°C에서 IFN- $\alpha$  10 IU/ml와 100 IU/ml로 HEp-2세포를 처리하고 VSV를 접종한 경우에도 IFN- $\gamma$ 와 유사한 결과를 보여 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 가 HEp-2세포에서 VSV에 대한 항바이러스작용을 유도함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 HEp-2세포와 VSV를 사용하여 세포독성감소시험이나 바이러스생성감소시험으로 측정한 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용에 대한 다른 보고들<sup>18, 35</sup>과도 일치한다.

39°C에서 10 IU/ml의 IFN- $\gamma$ 로 HEp-2세포를 처리하고 VSV를 접종한 경우에 37°C에서 처리한 경우

에 비해 플레이트 생성이 감소하여 항바이러스작용의 증가를 알 수 있었으며 10 IU/ml의 IFN- $\alpha$ 로 처리한 경우에도 37°C에 비해 39°C에서 플레이트 생성이 감소하여 항바이러스작용 증가를 알 수 있었다. 그러나 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 처리하지 않고 39°C와 37°C에서 배양한 경우에는 온도에 따른 플레이트 생성의 차이가 없어 항바이러스작용에 고온에 의한 직접적인 영향은 없음을 할 수 있었다. 100 IU/ml의 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 HEp-2세포를 처리한 경우에는 39°C와 37°C에서 플레이트 생성에 차이가 없는 것은 100 IU/ml의 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 가 HEp-2세포에서 VSV의 증식을 충분히 억제하여 고온에서 IFN- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용 변화가 관찰되지 않은 것으로 생각된다. 이러한 결과는 100 IU/ml 이상의 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 처리한 경우의 항바이러스작용이 더 증가 하지 않는다는 보고<sup>14, 18)</sup>와도 일치한다.

IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 37°C에서 후처리한 플레이트 감소 시험에서 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 처리하지 않은 경우와 10 IU/ml과 100 IU/ml의 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 후처리한 경우에 플레이트 생성에 차이가 없어 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용을 관찰 할 수 없었다. 39°C에서도 10 IU/ml과 100 IU/ml의 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 후처리한 경우에는 37°C에서 처리한 경우와 플레이트 생성에 차이가 없어서 항바이러스작용의 차이를 관찰 할 수 없었으며, 고온에서의 항바이러스작용의 변화도 없는 것으로 생각된다.

사람 IFN- $\alpha$  와 IFN- $\beta$ 에 의한 2-5A system 활성화는 정상 생체온도에 비해 고온에서 증가한다. 이는 고온에서 2-5A synthetase mRNA가 선택적으로 안정하여 2-5A synthetase mRNA가 증가하고, 2-5A synthetase mRNA의 증가에 의해 2-5A synthetase가 증가하여 2-5A system의 활성화가 증가하는 것으로 설명되고 있다<sup>9)</sup>.

본 연구에서는 사람 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 에 의한 2-5A system 활성화를 관찰하기 위해 39°C와 37°C에서 10 IU/ml 또는 100 IU/ml의 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 12시간 처리한 HEp-2세포의 2-5A synthetase 활성도를 측정하였다. HEp-2세포를 37°C에서 10 IU/ml의 IFN- $\gamma$ 로 처리한 경우에 IFN- $\gamma$ 로 처리하지 않은 경우에 비해 2-5A synthetase 활성도가 증가하였으며, 100 IU/ml로 농도를 증가하여 처리하였을 때 2-5A synthetase 활성도가 더 증가하였다. IFN- $\alpha$ 로 37°C에서 처리한 경우에도 유사한 결과를 보여 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 에 의해 2-5A system이 활성화 되는

것을 알 수 있었으며 이러한 결과는 HEp-2세포에서 사람 IFN- $\alpha$ 와 사람 IFN- $\gamma$ 에 의한 2-5A system 활성화에 대한 다른 보고<sup>18)</sup>와도 일치한다.

HEp-2세포에서 IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  및 IFN- $\gamma$ 에 의해 VSV에 대한 항바이러스작용이 유도되나 vaccinia 바이러스에 대해서는 항바이러스작용이 유도되지 않으며<sup>31)</sup> MDBK 세포주에서는 VSV에 대한 항바이러스작용이 IFN- $\alpha$ 에 의해 유도되나 IFN- $\gamma$ 에 의해서는 유도되지 않는다<sup>35)</sup>. 또 HEC-1세포주에서는 IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  및 IFN- $\gamma$ 에 의해 VSV에 대한 항바이러스작용이 유도되지 않으나<sup>24)</sup> HeLa세포주, WISH세포주에서는 VSV에 대한 항바이러스작용이 유도되는 등<sup>3)</sup> IFN의 항바이러스작용은 IFN의 종류, 세포, 바이러스에 따라 다양한 양상을 보인다. 본 연구에서는 사람 IFN- $\alpha$ 와 사람 IFN- $\gamma$ 에 의해 항바이러스작용이 유도된다고 알려진 HEp-2세포주와 VSV를 사용하여 플레이트 감소 시험으로 사람 IFN- $\alpha$ 와 사람 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용을 확인 할 수 있었다.

고온에서 2-5A system 활성화를 보기 위한 실험에서 IFN- $\gamma$  10 IU/ml로 처리한 경우에 37°C에 비해 39°C에서 처리한 경우에 2-5 A synthetase 활성도가 증가하였으며, IFN- $\alpha$  10 IU/ml로 처리한 경우에도 37°C에 비해 39°C에서 2-5A synthetase 활성도가 증가하여 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 에 의한 2-5A system 활성도가 고온에서 증가함을 알 수 있었다. IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 처리하지 않고 배양한 경우에는 39°C와 37°C에서 2-5A synthetase 활성도의 차이가 없어서 2-5A system 활성화에 고온에 의한 직접적인 영향이 없음을 알 수 있었다. 100 IU/ml의 IFN- $\gamma$ 로 처리한 경우에는 37°C에 비해 39°C에서 2-5A synthetase 활성도가 증가하였으나 IFN- $\alpha$  100 IU/ml로 처리한 경우에는 37°C와 39°C에서 2-5A synthetase 활성도의 차이가 없었다. 100 IU/ml의 IFN- $\alpha$ 로 처리한 경우에는 2-5 A system 활성도가 거의 완전하게 일어나며 그 이상의 농도로 처리하여도 2-5A system 활성도가 증가하지 않는다고 보고되고 있으며<sup>16)</sup>, 본 연구에서 37°C에서 IFN- $\alpha$  100 IU/ml로 처리한 경우의 2-5A synthetase 활성도가 39°C에서 IFN- $\gamma$  100 IU/ml로 처리한 경우와 같은 정도로 활성화 되어 있는 결과로 보아 IFN- $\alpha$  100 IU/ml 처리만으로도 2-5A system 활성도가 완전히 일어나 39°C와 37°C에서 처리한 경우의 활성화 차이가 없는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 고온에서 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 에 의한 2-5A system 활성도가 모두 증가하였다. 그러나

IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 에 의한 2-5A system활성화는 활성화가 시작되는 시간, 최대의 활성화에 이르는 시간, cycloheximide에 의한 억제 유무 등에서 다른 양상을 보인다고 보고되고 있어<sup>3, 19, 35</sup> 고온에서 IFN- $\gamma$ 에 의한 2-5A system활성화 증가 기전에 대한 연구가 IFN- $\alpha$ 에 의한 활성화 증가 기전과 비교하여 더 진행되어야 할 것이다.

본 연구결과 IFN- $\gamma$ 로 HEp-2세포를 처리하고 VSV를 접종한 경우에 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용이 고온에서 증가하였다. HEp-2세포에서 IFN- $\gamma$ 에 의해 2-5A system활성화가 유도되었으며 고온에서 2-5A system활성화가 증가하는 결과로 보아 고온에서 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용 증가에 2-5A system활성화가 기여한다고 생각된다.

### 결 론

본 연구에서는 고온에서 사람 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용 및 그 기전을 알아보기 위한 목적으로 VSV와 HEp-2세포를 이용하여 37 $^{\circ}$ C 및 39 $^{\circ}$ C에서 플레이크감소시험을 시행하고 2-5A system활성을 2-5A synthetase 활성도로 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

37 $^{\circ}$ C 및 39 $^{\circ}$ C에서 IFN- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 로 HEp-2세포를 처리하고 VSV를 감염시킨 경우 플레이크수는 IFN- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  모두에서 농도에 비례하여 감소되었으며 그 억제효과는 39 $^{\circ}$ C에서 더 높았다. 이에 반하여 HEp-2세포에 VSV를 감염시키고 IFN- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 로 처리한 경우에는 플레이크수가 감소되지 않았으며 배양온도에 따른 차이를 관찰할 수 없었다.

HEp-2세포에서 2-5A synthetase활성도 비교에서는 IFN- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 로 처리한 경우에 모두 증가되었으며 그 증가 효과는 37 $^{\circ}$ C에 비해 39 $^{\circ}$ C에서 더 높았다.

이상의 결과에서 HEp-2세포에서 VSV에 대한 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용이 고온에서 증가되었으며 그 작용기전에 고온에서 IFN- $\gamma$ 처리에 따른 HEp-2세포의 2-5A synthetase 활성도 증가가 관여하리라고 생각된다. 고온에서 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 의 항바이러스작용 증가기전이 유사한 결과를 보이거나 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 에 의한 2-5A system활성화 양상이 다르다고 보고되고 있어 고온에서 IFN- $\gamma$ 에 의한 2-5A system활성화 증가 기전에 대한 연구를 더 진행하여야 할 것이다.

### 참 고 문 헌

- 1) Bagglioni C, Maroney PA: Mechanism of action of human interferons. *J Bio Chem* 255: 8390-8393, 1989.
- 2) Burleson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL: Viruses, properties & quantitation, in "Virology, A laboratory manual" eds. Burleson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL, p 39-118 (1992), Academic Press, San Diego.
- 3) Caplen HS, Gupta SL: Differential regulation of a cellular gene by interferon gamma and interferon-alpha. *J Biol Chem* 263:332-339, 1988.
- 4) Chang CC, Wu JM: Modulation of antiviral activity of interferon and 2'-5' oligoadenylate synthetase gene expression by mild hyperthermia (39. 5 $^{\circ}$ C) in cultured human cell. *J Biol Chem* 266:4605-4612, 1991.
- 5) Dinarello CA, Renter L, Wolff SM: The production of antibody against human leukocyte pyrogen. *J Clin Invest* 60: 465-472, 1977.
- 6) Downing JF, Taylor MW, Wei KM, Elozondo A: In vivo hyperthermia enhances plasma antiviral activity and stimulates peripheral lymphocytes for increasing synthesis of interferon-g. *J Interferon Res* 7: 185-193, 1987.
- 7) Dubois MF, Galabru J, Lebon P, Safer B, Hovanessian A: Reduced activity of the interferon-induced double-stranded RNA-dependent protein kinase during a heat shock stress. *J Biol Chem* 264: 12165-12171, 1989.
- 8) Heron I, Berg K: The actions of interferon are potentiated at elevated temperature. *Nature* 274: 508-510, 1978.
- 9) Higashi Y, Sokowa Y: Microinjection of interferon and 2'-5' oligoadenylate into mouse L cells and their effect on virus growth. *J Biochem (Tokyo)* 91: 2021-2028, 1982.
- 10) Hovanessian AG, Kerr IM: The 2'-5' oligoadenylate pppA2'-5'A2'-5'A synthetase and protein kinase from interferon-treated cells. *Eur J Biochem* 93: 515-526, 1979.
- 11) Issacs A, Lindermann J: Virus interference, I: The interferon. *Proc Royal Soc London, Ser B*



- 147:258-267, 1957.
- 12) Knox JD, Mitchel RE, Brown DL: Effect of hyperthermia on microtubule organization and cytotoxic activity of murine cytotoxic T lymphocyte. *Exp Cell Res* 194:275-283, 1991.
  - 13) Lee BK, Mohrman M, Odean MJ, Johnso AG, Morin A, de Paillette D: Polyadenylic polyuridylic acid-induced determinants of resistance to cytomegalovirus and their potentiation by hyperthermia. *J Immunotherapy* 12: 105-114, 1992.
  - 14) Lewis JA: Biological assays of interferons, in "Lymphokines and Interferons" eds. Clemens MJ, Morris AG, Gearing A, p73-87(1987), IRL press, New York.
  - 15) Martin EM, Birdsall JM, Brown RE, Kerr IM: Enzymatic synthesis, characterization and nuclear magnetic- resonance spectra of pppA<sub>2</sub>' p<sub>5</sub> A<sub>2</sub>'p<sub>5</sub> and related oligonucleotides: comparison with chemically synthesised material: *Eur J Biochem* 95:295-307, 1979.
  - 16) Mestan J, Brockhaus M, Kirchner H, Jacobse H: Antiviral activity of tumor necrosis factor. synergism with interferons and induction of oligo-2',5'- adenylyate synthetase. *J Gen Virol* 69:3113-3120, 1988.
  - 17) Nahas GG, Tannieres ML, Lennon JF: Direct measurement of leukocyte motility; Effect of pH and temperature. *Soc Exp Biol Med* 1328: 350-352, 1971.
  - 18) Naldini A, Carraro F, Fleischmann WR, Bocci V: Hypoxia enhances the antiviral activity of interferons. *J Interferon Res* 13:127-132, 1993.
  - 19) Ortaldo JR, Mantovani A, Hobbs D, Munhinstein M, Pestka MM: Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int J Cancer* 31:285- 289, 1983.
  - 20) Park MM, Norn NB, Endres S, Dinarello CA: The effect of whole body hyperthermia on human on the immune system cell activity of cancer patient. *Lymphokine Res* 9:213-223, 1990.
  - 21) Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE: Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem* 56:727-777, 1987.
  - 22) Pfeffer LM: Cellular effects of interferons. in "Mechanisms of Interferon Actions" eds. Pfeffer LM, p1-24(1987) CRC press, Boca Raton.
  - 23) Rubin BY, Gupta SL: Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and anti-proliferative agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5928-5932, 1980.
  - 24) Samuel CE: Interferon induction of the antiviral state: proteins induced by interferons and possible role in the antiviral mechanisms of interferon action, in "Mechanisms of Interferon Actions" eds. Pfeffer LM, p111-130(1987) CRC press, Boca Raton.
  - 25) Samuel CE, Knutson GS, Masters PS: Mechanism of interferon action. Ability of cloned human- alpha interferon to induce protein phosphorylation and inhibit virus replication is specified by host cell rather than the interferon subtypes. *J Interferon Res* 2:563-564, 1982.
  - 26) Sariran K, Nickerson DA: Enhancement of murine in vivo antibody formation by hyperthermia. *Cell Immunol* 74:306-312, 1982.
  - 27) Schiller JH, Storer B, Witt PL, Nelson B, Brown RR, Horisberg M: Biological and clinical effects of the combination of beta and gamma-interferons administered as 5-day continuous infusion. *Cancer Res* 50:4588-4594, 1990.
  - 28) Smith JB, Knowlton RP, Agarwal SS: Human leukocyte responses are enhanced by culture at 40°C. *J Immunol* 121:691-694, 1980.
  - 29) Stark GR, Brown RE, Kerr IM: Assay of (2'-5')oligoadenylate synthetase levels in cells and tissues: A convenient poly(I) · poly(C) paper-bound enzyme assay, in "Methods in Enzymology" eds. Pestrka S, p194-198(1981), London, England.
  - 30) Weiner GJ, Kaminski MS: Anti- idiotypic antibodies recognizing stable epitopes limit the emergence of idiotypic variants in a murine lymphoma. *J Immunol* 144:2436-2445, 1990.
  - 31) Whitaker-Dowling P, Youngner JS: Antiviral effects of interferons in different virus host cell systems. in "Mechanisms of Interferon Actions" eds. Pfeffer LM, p83-98(1987) CRC press, Boca Raton.

- 32) Wellis V, Mallucci L: Expression of the 2-5 A system during the cell cycle. *Exp Cell Res* 159: 27- 36, 1985.
  - 33) Yoshioka H, Koga S, Maeta M, Shimizu N, Hamazoe R, Murakami A: The influence of hyperthermia in vitro on the function of peritoneal macrophage in mice. *Jpn J Sg* 20: 119-122, 1990.
  - 34) Youn JK, Hovanessian AG, Riviere Y, Hue G, Lacour F: Enhancement of natural killer cell activity and 2-5 A synthetase in mice treated with polyadenylic · polyuridylic acid. *Cell Immunol* 79:298-308, 1983.
  - 35) Yousefi S, Escobar M, Gouldin CW: A practical cytopathic effect/dye -uptake interferon assay for routine use in the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol* 83: 735-740, 1985
-