

## C형 간질환에서 C형 간염 바이러스 유전자형의 분포

아주대학교 의과대학 소화기내과학교실 및 순천향대학교 의과대학 내과학교실\*

조성원 · 함기백 · 김진홍 · 이상인 · 심찬섭\*

### Genotype Distribution of Hepatitis C Virus in Patients with Liver Disease

Sung Won Cho, Ki Baik Hahm, Jin Hong Kim  
Sang In Lee and Chan Sup Shim\*

Department of Gastroenterology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea  
Department of Internal Medicine\*, Soon Chun Hyang University School of Medicine, Seoul, Korea

It has been suggested that different genotypes have different clinical outcomes with regard to disease severity and response to interferon treatment. We studied the distribution of hepatitis C virus genotypes in 29 patients with liver disease by polymerase chain reaction with capsid - specific primers. Hepatitis C virus genotype 1b(II) was present in 15 patients(51.7%), and 2a(III) in 6(20.6%). Five patients(17.2%) had evidence of dual infection(type 1b(II) and type 2a(III)). Three patients were untypable by the method used. These data showed that two genotypes, type 1b(II) and 2a(III) account for most cases in our cohort of patients with a relatively higher frequency of type1b(II).

**Key Words:** Hepatitis C virus, Genotype, Type-specific primer, Polymerase chain reaction, Liver disease

## 서 론

C형 간염 바이러스(이하 HCV)는 single-stranded RNA 바이러스로서 수혈후 그리고 산재성 비A비B형 간염의 주된 원인이다<sup>1</sup>. C형 간염 바이러스는 증식과정에 변이가 생길 수 있고<sup>2</sup>, 숙주의 면역반응에 의하여 변이가 생겨<sup>3</sup> C형 간염바이러스 유전자에 다양한 염기서열이 나타난다. 염기서열의 변이는 특이한 형태로 나타나므로 유전자형으로 구분할 수 있다<sup>4</sup>. 유전자형은 지역에 따라 다양하게 분포하는 것으로 알려져 있다<sup>5</sup>. 유전자형에 따라 임상적 예후, 인터페론 치료반응에 차이가 있다<sup>6</sup>. 연구들은 C형 간염바이러스에 의한 간질환에서 C형간염 바이러스의 유전자형의 분포를 규명하기 위하여 본연구를 시행하였다.

저자연락처: 조성원, (442-749) 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5, 아주대학교병원 소화기내과, Tel (0331) 219-6939

## 연구대상 및 방법

### 1. 대 상

29명의 C형 간질환 환자를 대상으로 하였다. 급성간염 5예, 만성간염 19예, 간경변증 4예, 간세포암 1예였다. 모든 예에서 HCV 항체 양성이었으며 병력, 간기능 검사, 간초음파검사, 간조직검사를 이용하여 진단하였다.

### 2. 방 법

1) HCV 항체의 측정: 혈청 HCV항체는 Abbott사 (Chicago,IL)의 Kit(HCV EIA 2nd generation)을 이용하여 제조사의 지시방법에 따라 측정하였다.

### 2) HCV 유전자형의 측정

(1) 검체 채취: 정맥혈을 채혈한 후 혈청을 분리하여 -70℃에서 검사 전까지 보관하였다.

(2) **혈청 RNA의 검출**; RT-PCR을 위한 혈청 RNA추출은 AGPC법<sup>7</sup>으로 시행하였다. 즉 solution D 450  $\mu$ l에 혈청 100  $\mu$ l를 가하고 2M sodium acetate 50  $\mu$ l 추가한 후 10초간 진탕하였다. phenol 500  $\mu$ l를 가하고 진탕한 후 chloroform-isoamyl alcohol(49 : 1) 100  $\mu$ l를 가하고 10초간 섞은 후 얼음에서 10초간 방치하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 10,000 g에서 원심분리한 후 상층액을 채취하고 상층액에 500  $\mu$ l isopropanol을 추가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치하였다. 20분 간 원심 분리한 후 solution D 150  $\mu$ l를 가하여 1시간 방치한 후 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 원심 분리하여 형성된 침전물에 75% ethanol를 가하고 원심 분리 후 침전물을 건조시킨 후 물 20  $\mu$ l로 녹였다.

(3) **PCR을 위한 primer의 합성**<sup>8</sup>; RT-PCR에 이용된 primer는 HCV의 C gene부위의 염기서열에서 택하였다. No.256과 No.186은 universal primer이며 No.104, No.132, No.133, No.134, No.135는 type specific primer로 이용하였다. DNA 합성기(Model 391 PCR-Mat, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 primer를 합성하였다(Table 1).

(4) **역전사(Rreverse transcription)의 시행**; 양성 선형 HCV RNA를 검출하기 위하여 중합효소 연쇄반응(PCR)의 시행 전에 혈청 HCV RNA를 역전사시켰다<sup>9</sup>. 즉 혈청 RNA 10  $\mu$ l를 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 200단위의 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(BRL), 20단위 RNase inhibitor(Promega Corp.), 1  $\mu$ l 10mM dNTP, 4  $\mu$ l 5 x Buffer, 2  $\mu$ l 0.1 M DTT, 50 pmol의 external antisense primer(No.186), 물을 혼합하여 20  $\mu$ l로 만든 후 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 방치하고 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓인 후 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

(5) **PCR의 시행**; HCV유전자형을 측정하기 위하여 type-specific primer로 PCR을 시행하는 Okamoto의 방법을 이용하였다<sup>8</sup>. HCV를 증폭하기 위하여 external

primer 쌍(No. 256, No.186)으로 PCR을 시행하였다. 즉 20  $\mu$ l cDNA, 2.5단위 Taq DNA polymerase(Promega), 16  $\mu$ l의 1.25mM dNTP, external primer 쌍 각각 50 pmol, 10  $\mu$ l의 10 x Buffer, 10  $\mu$ l의 25mM MgCl<sub>2</sub>에 물을 추가하여 100  $\mu$ l로 만든 후 thermal cycler에서 94 $^{\circ}$ C 1분, 55 $^{\circ}$ C 1분30초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분의 반복과정을 30회 시행하였다. HCV의 유전자형을 알기 위하여 Nested PCR을 시행하였다. 즉 PCR 산물 5  $\mu$ l, No. 104 primer와 primer mix(No.132, No.133, No.134, No.135)(Table 1)의 50pmol, 2.5 단위 Taq DNA polymerase를 상기 PCR용액

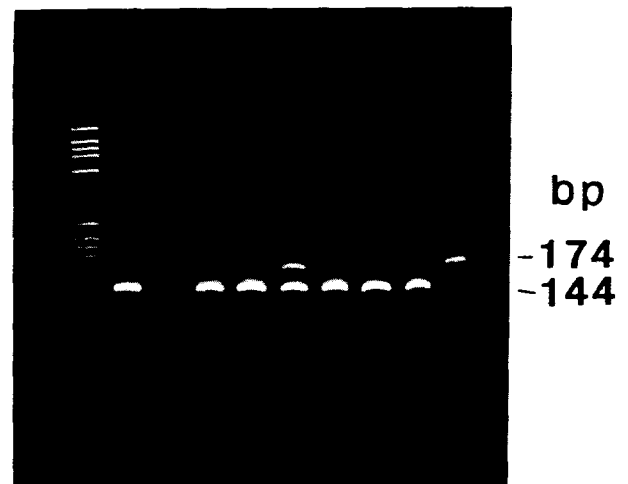


Fig. 1. HCV typing by PCR using a mixture of four type specific primers.

Table 1. Oligonucleotides used as PCR primers

Primers	Polarity	Sequence(5' to 3')	Nucleotide position
No. 256	+	CGCGCGACTAGGAAGACTTC	139-158
No. 186	-	ATGTACCCCATGAGGTCGGC	391-410
No. 104	+	AGGAAGACTTCCGAGCGGTC	148-167
No. 132	-	TGCCCTTGGGGATAGGCTGAC	185-204
No. 133	-	GAGCCATCCTGCCCACCCCA	272-291
No. 134	-	CCAAGAGGGACGGGAACCTC	302-321
No. 135	-	ACCCTCGTTTCCGTACAGAG	251-270

Table 2. Genotyping results of hepatitis C virus

Patients	Sample Number	HCV Genotype					
		1a(I),	1b(II),	2a(III)	2b(IV)	Mixed (1b/2a)	ND <sup>a</sup>
AH <sup>b</sup>	5	0	3	0	0	1	1
CH	19	0	9	5	0	4	1
LC	4	0	3	0	0	0	1
HCC	1	0	0	1	0	0	0
	29	0	15(51.7%)	6(20.6%)	0	5(17.2%)	3(10.3%)

<sup>a</sup>ND, Not determined, <sup>b</sup>AH, Acute hepatitis; CH, Chronic hepatitis; LC, Liver cirrhosis; HCC, Hepatocellular carcinoma

에 혼합한 후 94℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 1분 30초의 반복과정을 30회 시행하였다. Nested PCR에서 No 104와 No. 132의 반응으로 생긴 57bp의 DNA는 Type 1a(I), No. 104와 No. 133의 반응으로 생긴 144bp의 DNA는 type 1b(II), No.104와 No. 134의 반응으로 생긴 174 bp의 DNA는 type 2a(III), No. 104와 No. 135의 반응으로 생긴 123bp의 DNA는 type 2b(IV)이므로 PCR산물의 크기로 HCV의 유전자형을 결정할 수 있다. 증폭된 DNA를 polyacrylamide gel에서 전기 영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에 DNA band를 확인하였다 (Fig. 1).

## 결 과

29예의 C형 간질환 환자에서 1b(II)형은 15예(51.7%) (급성간염 3예, 만성간염 9예, 간경변증 3예)에서 관찰되었으며, 2a(III) 형은 6예(20.6%) (만성간염 5예, 간세포암 1예)에서 관찰되었다. 1a(I)형과 2b(IV)형은 관찰할 수 없었다. 1b(II)형과 2a(III)형이 함께 관찰된 예는 5예 (17.2%) (급성간염 1예, 만성간염 4예)이었다 (Fig. 1). 3예 (10.3%)에서는 5'-UTR부위의 primer로 HCV RNA가 관찰되었으나<sup>10</sup> type specific primer로는 관찰할 수 없었다 (Table 2).

## 고 찰

HCV는 flaviviridae 종에 속하는 RNA 바이러스이다. 바이러스 증식에 필요한 reverse transcriptase는 proof-reading repair-enzyme의 활성도 부족으로 변이가 발생한다<sup>2</sup>. 또한 숙주의 면역반응을 피하기 위하여 유전자에 변이가 발생한다<sup>3</sup>. HCV는 매년 위치당  $1 \sim 2 \times 10^3$  nt율로 변이가 발생한다<sup>11</sup>. 그러므로 HCV는 생체내에서 다소 상이한 유전자를 가진 HCV의 혼합상태(Quasispecies)로 존재한다.

HCV 유전자형의 여러가지 분류법이 제시되고 있다. 유전자형은 바이러스 유전자 염기서열의 상동성에 근거하여 분류한다. 같은 유전자형에서 염기서열에 차이는 12% 이내이나 다른 유전자형 사이에서는 20% 이상에서 염기서열의 차이가 있다<sup>12,13</sup>. Okamoto 등은 core부위 염기서열의 차이에 근거하여 I, II, III, IV, V형으로 분류하였다. Enomoto 등<sup>14</sup>은 NS5 부위 염기서열 차이에 근거하여 PT, K1, K2a, K2b형으로 분류하였다. Simmonds 등<sup>4</sup>은 HCV 유전자형을 6가지(1, 2, 3, 4, 5, 6)로 분류하였고 전체적으로 11개의 subtype(1a, 1b, 1c, 2a,

2b, 2c, 3a, 3b, 4a, 5a, 6a) 으로 분류하여 1a형은 I, PT형과 1b는 II, K, 2a는 III, K2a, 2b는 IV, K2b, 3a는 V형과 동일하다. HCV 유전자 형은 Simmonds의 분류법으로 통일되어 사용되고 있다<sup>4</sup>.

HCV 유전자형은 지역에 따라 차이가 있다. 일본에서는 1b(K1)형 77.7%, 2a(K2a)형 16.5% 2b(K2b)형이 5.0% 이었고 1a(PT)형은 0.8%로 1b형이 2a형에 비하여 흔하고 1a형은 드물다<sup>5</sup>. 중국의 Lanzhou지방에서는 1b(II)형이 35%, 2a(III)형이 40%로 1b와 2a형이 대부분을 차지하며 1b와 2a형이 유사하게 분포하였고 1a(I)형은 관찰할 수 없었다<sup>15</sup>. 미국에서는 1a형과 1b형이 35%와 37%로 대부분을 차지하였으며 비슷한 율로 관찰되었다. 2a와 2b는 각각 6%, 4%이었다<sup>16</sup>. 프랑스와 이태리에서는 1b(II)형이 61.8%로 가장 흔하고 1a(I)형이 10.0%이었으며 2a(III)와 2b(IV)는 드물게 관찰되었다<sup>6</sup>. 본 연구에서는 1b(II)형이 51.7%, 2a(III)형이 20.6%이었으며 1a(I)와 2b(IV)형은 관찰되지 않아 일본과 비슷한 분포를 관찰하였다. Kim 등<sup>17</sup>의 연구에서도 1b(II)형이 60%, 2a(III)형이 33%로 본 연구와 유사한 결과를 보고하였다.

HCV의 유전자형을 구분하기 위하여 여러종류의 방법들이 이용되고 있다. 염기서열을 직접 측정하는 방법이 가장 정확한 방법이지만 많은 수의 검체에서 측정하기에는 어려움이 있다. 본 연구에서는 Okamoto의 방법<sup>8</sup>인 type-specific oligonucleotide primer를 이용하였다. Okamoto의 방법을 이용할 때 유전자형의 혼합감염이 약 22%까지 다른 방법에 비하여 높다고 한다<sup>18</sup>. Okamoto의 방법을 이용한 연구에서는 Okamoto 등<sup>8</sup>은 256예 중 4예(1.5%)의 혼합감염을 보고하였으며 Silini 등<sup>19</sup>은 11%에서 관찰하였고 Wu 등<sup>15</sup>은 20%에서 관찰하였다. 본 연구에서는 17.2%에서 혼합감염을 관찰하였으나 직접염기서열을 분석한 Kim 등<sup>17</sup>의 연구에서는 혼합감염이 관찰되지 않았다. 혼합감염율을 알기 위해서는 여러가지 방법을 이용하여 비교해 볼 필요가 있다.

HCV 유전자형은 시간이 경과함에 따라 변화할 수 있다. Noursbaum 등<sup>6</sup>의 보고에서는 1b형은 병력이 길수록 그리고 연령이 증가할수록 증가한다고 하며, 연구대상자에서 1b형의 빈도는 시간이 경과함에 따라 점차 감소한다고 하였다. 연령에 따라 HCV에 감염되는 경로에 차이가 있다. Mahaney 등<sup>10</sup>의 보고에서는 경주 약물복용자에 비하여 수혈후 감염된 예에서 1b형이 빈번하게 관찰하여 감염경로가 고령에서 1b형이 증가하는 이유의 하나로 설명되고 있다. 또한 유전자형의 측정방법에 따라 유전자형은 다소 차이가 있을 수 있다. Okamoto의 방법과 LIPA법을 비교한 연구에서 Okamoto법으로 1a(I),

1b(II), 3a(V)는 정확하게 측정할 수 있으나 2a(III)의 측정에 이용되는 primer에는 변이가 혼하여 2a(III)의 측정에는 어려울 경우가 드물게 있음을 보고하였다<sup>20</sup>. 이러한 결과로 볼때 HCV 유전자형의 빈도를 알기 위해서는 많은 검체가 필요하고, 연령 및 감염경로, 측정방법을 고려해야 할 것이다.

HCV의 유전자형에 따라 임상상, 예후, 인터페론에 대한 반응의 차이여부를 규명하기 위한 연구가 많이 시행되었다. 1b형은 다른 유전자형에 비하여 간경변증과 밀접한 관계가 있으며 인터페론의 치료에 반응이 낮은 것으로 보고되었다<sup>6</sup>. 이러한 현상에 대한 기전은 자세히 규명되어 있지 않다. HCV의 5'-UTR부위의 101번과 332번의 염기 사이에 internal ribosomal entry site element가 존재하며 이 구조는 HCV의 translation 조절에 관여한다<sup>21</sup>. Poliovirus에서 translation이 시작되기 위해서는 transacting factor인 57-Kd cytoplasmic DNA-binding protein과의 반응이 필요하다<sup>22</sup>. Picorna encephalomyocarditis virus에서는 transacting factor인 nuclear pyrimidine tract-binding protein이 5'-UTR에 부착하는 것으로 보고되어 있다<sup>23</sup>. 그러므로 HCV 5'-UTR의 염기변화는 transacting factor에 부착되는 능력에 영향을 미치므로 유전자형에 따라 바이러스 translation 조절에 따른 항원의 발현에 차이가 초래될 수 있다. 우리나라에 가장 흔한 1b형이 불량한 예후를 초래 할수 있다는 보고는 우리나라 C형 간질환환자의 관리에 중요한 의의가 있으므로 유전자형이 간질환의 예후에 미치는 영향에 대한 역할이 정확히 규명되어야 할 것이다.

## 결 론

C형간염 바이러스는 유전자형에 따라 임상상, 예후, 인터페론 반응에 차이가 있다. C형 간질환 환자에서 C형 간염 바이러스의 유전자형을 알기위하여 Okamoto의 방법인 type-specific oligonucleotide primer를 이용하여 29예의 환자 혈액에서 C형간염 바이러스 유전자형을 관찰하였다.

1b(II)형은 15예(51.7%)에서 관찰되었고 2a(III)형은 6예(20.6%)에서 관찰되었다. 1a(I)형과 2b(IV)형은 관찰할 수 없었다. 1b(II)형과 2a(III)형의 혼합감염은 5예(17.2%)이었으며 3예(10.3%)에서는 유전자형을 결정할 수 없었다.

결론적으로 우리나라에서는 대부분의 C형 간질환 환자가 1b(II)형과 2a(III)형에 감염되어 있으며 1b(II)형이 2a(III)형에 비하여 흔하였다. 1a(I)형과 2b(IV)형은 우리

나라에서 드물 것으로 생각되었다.

## 참 고 문 헌

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW and Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362, 1989
2. Domingo E, Sabo D, Tanichi T and Weissmann C: Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population, *Cell* 13: 735-44, 1978
3. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ and Saracco G: Evidence for immune selection of hepatitis C virus(HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89: 3468-72, 1992
4. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW and Brechot C: A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes[Letter] *HEPATOLOGY* 19: 1321-4, 1994
5. Takada N, Takase S, Takada A and Date T: Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *J Hepatol* 17: 277-83, 1993
6. Noursbaum JB, Pol S, Nalpas B, Landais P, Berthelot P and Brechot C: Hepatitis C virus type 1b(II) infection in France and Italy. *Ann Intern Med* 122: 161-168, 1995
7. Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-9, 1987
8. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y and Tanaka T: Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 73: 673-679, 1992
9. Kawasaki ES: Amplification of RNA. In *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications.* M. Innis, D. Geifand, J. Sininsky, and T. white, editors. Academic Press Inc, San Diego p21, 1990
10. 조성원, 이준성, 이문성, 김진홍, 심찬섭 및 이희발: 비A 비B형 만성간염 환자의 혈청에서 C형 간염 바이러스 RNA의 검출. *대한소화기병학회지* 25: 946-951, 1993
11. Ogata N, Alter HJ, Miller RH and Purcell RH: Nucleotide sequence and mutation rate of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 88: 3392-3396, 1991
12. Okamoto H, Kurai K, Okada S, Yamamoto K, Lizuka H and Tanaka T: Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 188: 331-41, 1992
13. Bukh J, Purcell RH and Miller BH: At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative

- E1 gene of isolates collected worldwide. Proc Natl Acad Sci U.S.A 90: 8234-8, 1993
14. Enomoto N, Takada A, Nakao T, Date T: There are two major types of hepatitis C virus in Japan. Biophys Biophys Res Commun 170: 1021-5, 1990
  15. Wu RR, Mizokami M, Lau JYN, Ohno T, Fang ZX, Ohba K, Wu XS, Hata A, Sasaki M and Iino S: Seroprevalence of hepatitis C virus infection and its genotype in Lanzhou, West China. Journal of Medical Virology 45: 174-178, 1995
  16. Mahaney K, Tedeschi V, Maertens G, Di Bisceglie AM, Vergalla J, Hoofnagle JH, Sallie R: Genotypic analysis of the hepatitis C virus in American patients. HEPATOLOGY 20: 1405-1411, 1994
  17. Kim CJ, Shin KS, Kim WY, Lim DS, Yoon SK, Park YM, Kim BS, Jang SK and Cho MJ: Genotype distribution and comparison of the putative envelope region of hepatitis C Virus from Korean patients. Journal of Medical Virology 46: 380-386, 1995
  18. Lau J, Davis G, Ohno T, Mizoguchi N, Perrillo R and Lindsay K: Application of hepatitis C virus(HCV) subtyping in chronic hepatitis C in the United States[Abstract] HEPATOLOGY 18: 149, 1993
  19. Silini E, Bono F, Cividini A, Cerino A, Maccabruni A, Tinelli C, Bruno S, Bellobuono A and Mondelli MU: Molecular epidemiology of hepatitis C Virus infection among intravenous drug users. J Hepatol 22: 691-695, 1995
  20. Giannini C, Thiers V, Noursbaum JB, Stuyver L, Martens G and Brechot C: Comparative analysis of two assays for genotyping hepatitis C virus based on genotype-specific primers or probes. J Hepatol 23: 246-253, 1995
  21. Tsukiyama KK, Iizuka N, Kohara M and Nomoto A: Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. J Virol 66: 1476-1483, 1992
  22. Hellen CU, Pestova TV, Litterst M and Wimmer E: The cellular polypeptide p57(pyrimidine tract-binding protein) binds to multiple sites in the polivirus 5' nontranslated region. J Virol 68: 914-950, 1994
  23. Hellen CU, Witherell GW, Schmid M, Shin SH, Pestova TV, Gil A and Wimmer E: A cytoplasmic 57-kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. Proc Natl Acad Sci USA 90: 7642-7646, 1993
-