



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

# 초 록

## HBx 매개 간염에서의 P2X7 수용체의 역할

B형 간염을 일으키는 B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus)는 여러 경로를 통해 급성 및 만성 간염을 일으키며 그 중 일부 환자군에서 간경변 및 간암으로 진행되는 것이 알려져 있다.

B형 간염 바이러스에 감염되었을 때 만들어지는 단백질인 HBx(Hepatitis B virus X protein)는 다양한 단백질들과의 상호작용을 통하여 염증을 일으켜 간 손상을 촉진하며, 이는 염증반응을 일으킨다고 알려져있다. 그러나, 이 과정에서 치료타겟에 관한 연구는 제한적인 실정이다.

본 논문에서는 B형간염이 원인인 인간 간암조직 및 HBx 과발현 마우스(HBx transgenic mouse) 간 조직과 특히 간 실질세포인 hepatocyte에서 P2X7의 발현이 증가되었음에 착안하여 P2X7 수용체 신호가 간에서의 염증 진행과 세포사멸에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

HBx 과발현 마우스는 12~15주령 정도부터 간염이 발생하는 것이 알려져 있다. 또한 같은 주령에서 야생형(Wild type, WT)에 비해 HBx 과발현 마우스에게서 P2X7 수용체의 발현이 증가되었음을 확인하였기에 그 역할을 규명하기 위하여 P2X7 길항제를 이용한 투여 모델을 설계하였다. 그 결과, HBx 과발현 마우스 군에서는 야생형에 비하여 염증성 군집(inflammation foci)이 현저히 증가하였고 지방간과 핵의 돌연변이(nuclei pelomorphism)가 관찰되었으며, P2X7 길항제인 LDD1295를 복강투여한 결과 염증성 군집의 억제만이 관찰되었다. 이는 HBx 기원 지방간이나 전암 상태의 진행과는 무관하게 P2X7이 염증반응에 관여한다는 사실을 시사한다.

또한, HBx 과발현 마우스의 간조직에서는 P2X7이 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 염증 반응과 관련있는 단백질 염증복합체(inflammasome)의 구성요소인 ASC, NLRP3 뿐만 아니라 그

최종산물인 인터류킨-1 베타(IL-1 $\beta$ )의 증가가 확인되었다. 그리고 이 모든 발현의 증가가 P2X7 길항제에 의해 유의적으로 감소하였다. 이를 통해 P2X7 수용체의 억제에 의해 염증이 억제될 수 있음을 확인되었다.

Hepatocyte에서 단백질 발현을 확인해본 결과, HBx 과발현 마우스의 간세포에서 대조군에 비해 P2X7의 발현이 증가되어 있음을 확인하였다. 간세포에서의 P2X7과 단백질 염증복합체의 관련성을 규명하기 위하여 P2X7의 리간드로 알려진 ATP 단독 혹은 Toll유사수용체4(Toll-like receptor4, TLR4)의 리간드인 lipopolysaccharide(LPS)와 ATP를 함께 처리했다. 그 결과 HBx 과발현 마우스에서 분리한 간세포(primary hepatocyte)에서 단백질 염증복합체의 구성요소인 NLRP3와 ASC가 HBx 과발현 마우스에서 증가되어 있었지만 배지를 80배 농축한 시료를 활용하여 ELISA 분석 시 인터류킨-1 베타(IL-1 $\beta$ )의 생성 및 분비가 관찰되었으나 실험군과의 유의미한 차이는 없었다.

마우스에서 분리한 간세포에 ATP를 처리한 후 배양액을 마우스 monocyte(J774A.1)와 공동배양한 결과 HBx 과발현 간세포의 배양액과 공동배양한 마우스 monocyte에서 NLRP3 inflammasome 경로 구성요소들의 발현이 증가하였으며 그 배양액에서 인터류킨-1 베타의 생성이 증가함을 확인하였다.

HBx 과발현 마우스의 간조직에서 증가한 P2X7과 그 하위 신호인 단백질 염증복합체 및 인터류킨-1 베타는 P2X7 길항제에 의하여 억제되며 이는 간세포 단독의 효과가 아닌 간 내에 존재하는 면역세포인 macrophage(kupffer cell) 등과의 상호작용을 통해 일어나는 것으로 보인다. 상기 연구결과들을 고려 시 본 논문은 P2X7이 HBV 유래 감염의 예방 및 치료를 위한 신규 타겟으로 작용할 수 있음을 제시한다.

주요어: HBx, P2X7, inflammasome, IL-1 $\beta$ , ATP

학번: 2013-23451

# 목 차

List of Abbreviations .....	4
List of Figures .....	5
List of Tables .....	6
I. 서 론 .....	7
II. 실험 방법 .....	9
III. 실험 결과 .....	15
IV. 참고 문헌 .....	37

## List of Abbreviations

HBV	Hepatitis B virus
HBx	Hepatitis B virus X protein
P2X7	P2X purinoceptor 7
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HBx TG mice	HBx-overexpressing transgenic mice
I.P	Intraperitoneal
Pro-IL-1 $\beta$	Pro-interleukin-1 beta
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
$\beta$ -actin	Beta actin
ATP	Adenosine triphosphate
LPS	Lipopolysaccharide
ND	Not detected
n.s	not significant
mpk	miligram per kilogram

## List of Figures

- Figure 1** Increased expression of P2X7 in liver tissue of HBx transgenic mouse, liver hepatitis and liver cancer patient
- Figure 2** Change in liver of HBx transgenic mouse and inhibition of inflammation through P2X7 antagonist
- Figure 3** Increased expression of P2X7 and NLRP3 inflammasome in HBx transgenic mouse and decreased expression via P2X7 antagonist
- Figure 4** Increased expression of P2X7, inflammasome and detection of IL-1 $\beta$  secretion in primary cultured hepatocyte from HBx transgenic mouse
- Figure 5** Change in expression of components of inflammasome pathway and increased secretion of IL-1 $\beta$  in HBx overexpressed monocyte from mouse

## List of Tables

Supplementary figure 1. Expression of inflammasome complex components (NLRP3, ASC and caspase-1) in alcoholic hepatitis patients

Supplementary table 1. Serological test [ALT(U/L), AST(U/L), lactate dehydrogenase(LDH), total bilirubin(mg/dl), and direct bilirubin(mg/dl)], body weight and liver weight in HBx-TG hepatitis model

## I. 서론

B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV) 감염은 전세계적으로 3억 5천만명 이상의 사람들에게 영향을 미치며 간질환, 간암, 그리고 사망에 이르게까지 하는 주요한 원인으로 알려져 있다. 이로 인해 새로운 HBV 치료제들이 만들어졌지만, 최근에 개발된 약물들조차 평생 동안 복용해야 하는 경우가 많아 새로운 치료법의 개발이 필요한 실정이다(Bhattacharya and Thio, 2010).

B형 간염 바이러스는 3.2kbp 크기의 부분적 이중가닥을 가진 이완형 환상 DNA(partially double stranded relaxed circular DNA(rcDNA))를 가지며 간세포에 감염되어 비구조적 단백질인 HBx(hepatitis B virus X protein)을 만들어낸다.(Lucifora et al., 2011) HBx는 세포 내에서 다양한 단백질과의 상호작용을 통해 세포 내에서 일어나는 많은 과정들에 관여하며 변화를 일으킨다(Benhenda et al., 2009).

세포 표면에 존재하는 nucleotide 수용체인 P2 수용체는(Ralevic and Burnstock, 1998) 대사성 수용체(metabotropic receptor)인 P2Y와 이온성 수용체(ionotropic receptor)인 P2X로 나뉘며 그 중 P2X는 ATP를 ligand로 한다. P2X family 중 하나인 P2X7은 염증 반응과 관련된 세포들에 존재하며 또한 이온들의 투과(permeabilization)에 의한 싸이토카인의 분비에 관여한다(Khakh and North, 2006).



간에서 P2X7은 macrophage인 kupffer cell에서 발현해 아세트아미노펜에 의해 나타나는 독성(APAP)과 연관되어 있으며(Hoque et al., 2012) 산화적 스트레스에 의한 비알콜성 지방간염(NASH)의 진행에도 관여하고(Chatterjee and Das, 2015) 간 조직의 손상이나 비감염성 염증에 의한 호중구의 유입에 관여한다(McDonald, 2011).

한편, 병적 상황에서 만들어지는 고농도의 ATP는 P2X7과 결합해 단백질 염증복합체인 NLRP3 inflammasome을 활성화시킨다(Riteau et al., 2012). 이 과정에서 첫 신호에 의해 전구체인 pro-IL-1 $\beta$ 가 만들어지며 두번째 신호에 의해 최종 산물인 인터류킨-1 베타(IL-1 $\beta$ )가 만들어져(Di Virgilio, 2007) 염증 반응에 관여한다(Church et al., 2008).

하지만 HBV에 의해 유도되는 간염, 간경화나 간암에 있어 P2X7에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않으며, 특히 HBx과 매개된 간염에서 P2X7의 역할은 밝혀져 있지 않다. 본 논문에서는 HBx가 과발현된 간에서 P2X7의 발현의 증가를 인간과 마우스의 간 조직에서 확인하였다. 또한 HBx 과발현 마우스의 간조직과 1차배양 간세포에서 P2X7과 더불어 inflammasome의 활성화와 인터류킨-1 베타의 발현 증가를 밝혔다. 간 조직에서 증가된 inflammasome의 구성요소와 인터류킨-1 베타의 발현이 P2X7 길항제에 의해 억제되었으며 그 기전이 간세포 자체에 의한 것이 아닌, 간 내에 존재하는 다른 면역세포와의 상호작용을 통하여 나타나는 것을 규명하였다. 이를 통하여 P2X7은 HBx에 매개성 간염 진행에 관여하는 수용체임을 보였으며, P2X7을 B형 간염 치료의 신규 타겟으로 제시하고자 한다.

## II. 실험 방법

### 1. 시약 및 항체

Lipopolysaccharide(LPS), Adenosine triphosphate(ATP), human 및 mouse  $\beta$ -actin 항체는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. human HBx 항체 (western blot)은 BioVendor R&D(Brno, Czech Republic)에서 구입하였다. horseradish peroxidase(HRP)-conjugated anti-rabbit, anti-mouse 항체는 Cell signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Mouse 및 human P2X7 항체, mouse IL-1 $\beta$  항체는 Abcam(Cambridge, UK)에서 구입하였다. mouse NLRP3 항체, mouse ASC 항체는 Adipogen(San Diego, USA)에서 구입하였다. Mouse 및 human GAPDH 항체는 Merck milipore(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

### 2. 실험 동물

wild type 마우스로 사용한 C57BL/6N마우스는 중앙실험동물(Seoul, Korea)과 영바이오(Sungnam, Korea)에서 구입하였다. HBx-TG 마우스는 한국생명공학연구원 유대열 교수 연구팀으로부터 제공받았다. HBx-TG 마우스 genotype은 다음과 같은 primer로 판별하였다: 5' - GAAAACACACTCACTGTTTCAGAGTT - 3' (HBx-TG PCR, forward), 5' - GTAAGCCGCTTTCTCTTATGC - 3' (HBx-TG PCR, reverse).

### 3. 세포 배양

J774A.1 세포주는 한국세포주은행에서 구입받았다. 마우스 단핵세포주(J774A.1)는 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 5mM HEPES와 10nM dexamethasone을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 37°C에 5% CO<sub>2</sub>를 포함하는 인큐베이터에서 배양하였다.

### 4. 인간 간 조직 검체

B형간염 기원 간암환자 간암 조직과 주변 정상 조직 검체는 조선대학교 병원(Gwangju, South Korea)에서 외과적 수술에 의한 암 제거 수술을 받은 간암 환자로부터 기증받아 사용하였다. 모든 환자의 동의서를 받았으며 IRB 승인을 획득하였다. (CHOSUN 2013-04-005) 이를 2 ml의 cell lysis buffer에 homogenization 시킨 후 western blotting을 수행하였다.

### 5. Primary Hepatocytes and mouse monocytes coculture 실험

Wild type 마우스와 HBx-TG 마우스에서 분리한 일차배양 간세포를 collagen이 코팅된 6 well plate에  $7 \times 10^5$  cells/well로 4시간 배양한 후 serum을 제거한 배지로 overnight incubation(14~16시간)하였다. 이후 그 배지를 상온에서 원심분리(200g, 5min)하여 mouse monocytes에 처리하여 36시간 후에 harvest하였다. 일차배양 간세포에 ATP를 처리한

경우 overnight incubation 후, ATP를 처리하고 24시간 incubation한 배지를 상온에서 원심분리하여 mouse monocytes에 처리하였다.

## 6. 일차 배양 간세포(primary hepatocytes) 분리

12~15주령 C57BL/6N 마우스에서 Zoletil과 Rumpon을 생리식염수에 희석한 마취제로 마취한 후, 24G 크기의 catheter를 간의 portal vein에 cannulation 하였다. 그 후 HBSS 배지(Life Technologies, Grand Island, NY)에 0.5mM의 ethylene glycol tetraacetic acid(EGTA)와 25mM의 HEPES를 넣어 만든 washing media를 이용해 2ml/min의 속도로 시작해 4ml/min의 속도까지 올리며 perfusion 한 후, DMEM(low glucose) 배지에 1%의 penicillin/streptomycin과 15mM의 HEPES로 만든 digestion media에 1mg/ml의 농도로 Collagenase from Clostridium histolyticum(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 녹여 만든 배지로 digestion 하였다. 이렇게 digestion 된 간을 20ml digestion media 속에서 찢은 후, 나온 세포들을 DMEM(high glucose) 배지에 10%의 FBS, 1% penicillin/streptomycin, 15mM HEPES와 10nM dexamethasone으로 만든 isolation media로 3번 워싱(100G, 3min, 4°C)하여 일차배양 간세포를 제외한 세포들을 걸러냈다. 그 후 일차배양 간세포를 isolation media에서 1시간 동안 37°C에 5% CO<sub>2</sub>를 포함하는 인큐베이터에서 배양한 다음, DMEM(low glucose) 배지에 1% penicillin/streptomycin, 5mM HEPES과 10nM의 dexamethasone을 포함해 만든 culture media로 1회 워싱 후, culture media에 10%의

FBS를 포함해 만든 배지를 넣어 4시간 동안 incubation 하였다. 이후 다시 culture media로 1회 워싱 후 serum이 없는 culture media로 배지를 바꾸어 배양하였다.

## 7. 면역화학적 분석 (western blot analysis)

세포의 배지를 제거 한 후 1XPBS로 워싱한 후 700  $\mu$ l의 PBS로 세포를 긁어 원심 분리한 후(5000g, 5 min) 상층액을 제거하여 phosphatase inhibitor(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 proteinase inhibitor(Roche, Basel, Switzerland)를 포함하고 있는 radio immune precipitation assay(RIPA) buffer(iNtRON biotechnology, Gyeonggi-do, Korea) 혹은 cell lysis buffer를 사용하여 세포를 용해시켰다. 10분(for RIPA buffer) 또는 1시간(for cell lysis buffer) 동안 얼음 위에서 용해시킨 후 원심 분리(13000g, 15 min)해 나온 상층액을 전 세포 추출액으로 하여 단백질 농도를 Bradford 정량법을 이용하였다. 각 샘플을 8-15% 사이의 전기영동 겔에 로딩 하였고 nitrocellulose membrane 0.45  $\mu$  filter(GE healthcare Life Sciences, Chalfont, Buckinghamshire, UK)로 transfer하였다(190min, 40V). 멤브레인을 5% skim milk(BD Biosciences, San Jose, CA)로 1시간 동안 인큐베이션 한 후 선택된 1차 항체를 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 하였고 HRP-conjugated 2차 항체를 사용하였다. 이를 enhanced chemiluminescence(ECL) system reagent(EMD Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여 LAS3000-mini(Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 측정하였다.

## 8. HBx 유래 간염 동물 실험

4주령 C57BL6/N female HBx-TG 마우스와 wild type 마우스를 각각 두 군으로 나누어 각각 한 군에 polyethylene glycol(PEG) 400과 생리식염수를 2:3 비율로 섞어 만든 vehicle을 5 ml/kg 투여 용량으로 1주일에 세 번씩 10주간 복강 내 투여를 하였고, 동일한 양의 vehicle에 P2X7길항제인 LDD1295를 역시 각각 한 군에 1주일에 세 번씩 10주간 복강 내 투여를 하였다. 간이 일정하게 잘려서 조직학적 분석을 위하여 formalin(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 고정하였으며, 단백질 및 mRNA 분리 단계를 각각 거쳤다.

## 9. 효소 결합 면역 흡착 분석 (ELISA analysis)

일차배양 간세포의 배지를 취한 후, 그 배지를 Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units(Merck milipore, Darmstadt, Germany)를 이용하여 80배 농축(3134G, 45min, 4℃)하여 나온 농축액을 mouse IL-1 $\beta$  ELISA kit(Enzo life sciences, New York, USA)를 이용하여 측정하였다.

## 10. 조직병리학적 분석 (histopathological analysis)

간 조직 절편을 formalin으로 고정한 후, H&E 염색을 한 sample들을 전북대학교 수의과대학 김범석 교수 연구팀에 의뢰해 inflammation foci, fatty change 및 nuclei pelomorphism을 측정하였다.

## 11. 통계처리 방법 (statistical analysis)

densitometric analysis는 multiguage software (Fujifilm, Tokyo, Japan)과 Image J 1.46r을 이용하여 수행되었다. 그룹간의 유의성 검정은 student' s t-test를 이용하였다. 통계학적 유의성은  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ 을 기준으로 표기하였다.

### Ⅲ. 실험 결과

#### 1. 인간과 마우스 간 조직에서의 P2X7 발현 증가

간 질환과 P2X7 상관성 규명을 위한 GEO analysis 분석 결과, 인간 알코올성 간염 환자의 간 내의 P2X7 mRNA 발현이 정상 간 내의 P2X7 mRNA 발현보다 약간 높아져 있음을 확인하였다(Fig 1A). 그리하여 P2X7의 발현 변화를 인간 간 조직에서 확인하고자 하였고, 그 결과 HBV에 감염되어 간암이 발생한 환자에게서 P2X7과 HBV에 의해 만들어지는 단백질인 HBx 모두의 단백질 발현이 정상 조직에 비해 종양 조직에서 증가되어 있음을 확인하였다(Fig 1B). 또한 HBx가 과발현된 마우스(HBx transgenic mouse, HBx-TG 마우스)는 주령수가 증가함에 따라 간염이 발생하고 간암에까지 이르는 것이 알려져 있다(Kim et al., 1991). 그렇기에 다양한 주령의 마우스에서 확인해본 결과, Wild type mice에 비해 HBx transgenic mice의 간 조직에서 P2X7의 단백질 발현이 증가되어 있음이 관찰되었다(Fig 1C). 이러한 결과는 간염 및 간암과 같은 간질환을 가진 인간이나 마우스 모두에게서 P2X7의 발현이 증가하게 되고, 특히 HBV 기원 인간 간암환자와 HBx transgenic mice에서 모두 HBx 단백질의 발현이 증가해 있기에 P2X7과 HBx가 상관관계를 가질 수 있음을 시사한다.



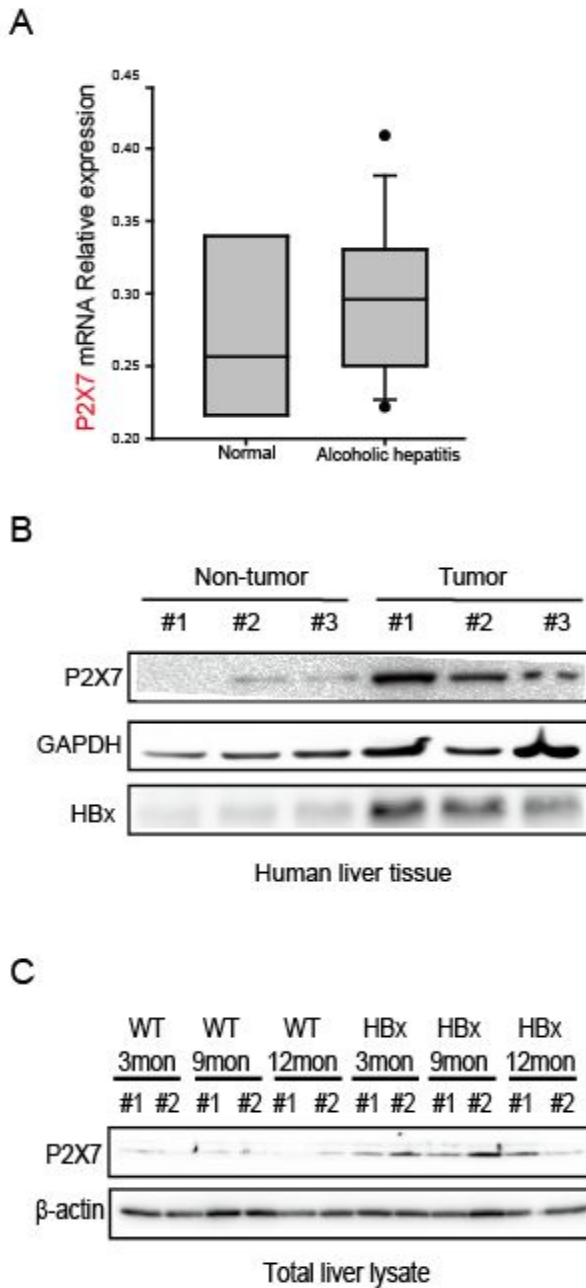


Figure1. Increased expression of P2X7 in liver tissue of HBx transgenic mouse, liver hepatitis and liver cancer patient  
 (A) P2X7 mRNA expression (normalized by  $\beta$ -actin expression) was higher in human alcoholic hepatitis liver(n=15) compared to

human normal liver(n=6), Data was collected from GEO DataSet Cluster Analysis

([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS4389:207091\\_at](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS4389:207091_at))

(B) P2X7 and HBx protein expression in homogenized human liver samples (normal liver region (n=3) and liver cancer region (n=3) from HCC patients). Human P2X7 and HBx protein expression was determined by western blot.

(C) P2X7 protein expression in homogenized liver samples from 3, 9, 12 month old wild type and HBx transgenic mice (n=2). Mouse P2X7 protein expression was determined by western blot.

## 2. HBx-TG 마우스 간에서의 변화와 P2X7 길항제에 의한 염증의 억제

HBx 발현의 증가가 P2X7을 경유하는 염증 신호와 연관이 있는지를 규명하기 위하여 4주령의 HBx-TG 마우스에 P2X7 길항제를 10주간 20 mg/kg으로 처리한 후 염증의 진행 정도를 평가하였다. 실험에는 과거 선행연구를 통해 복강 내 투여의 PK 데이터가 확보된 P2X7 길항제인 LDD1295(Park et al., 2015)를 사용하였다. 추가로 혈청 alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST), lactate dehydrogenase(LDH), total bilirubin(T-BIL), direct bilirubin(D-BIL) 과 체중 및 간 무게를 측정하였다(Supplementary table 1).

HBx-TG 마우스에서 병리학적 분석 결과 간 실질조직에서 염증으로 인한 호중구 및 단핵구의 침윤과 간세포 내 세포질에서의 지방의 축적 및 전암 상태라 할 수 있는 핵의 돌연변이가 관찰되었다(Figure 2B). 그리고 이 중에서 LDD1295에 의해 지방간이나 핵의 돌연변이의 억제효과는 나타나지 않았으나(data not shown) 염증성 군집의 수는 통계적으로 유의미하게 억제되었다(Figure 2C). 이는 P2X7 수용체의 억제가 HBx에 의해 나타나는 간염을 억제할 수 있음을 시사한다.

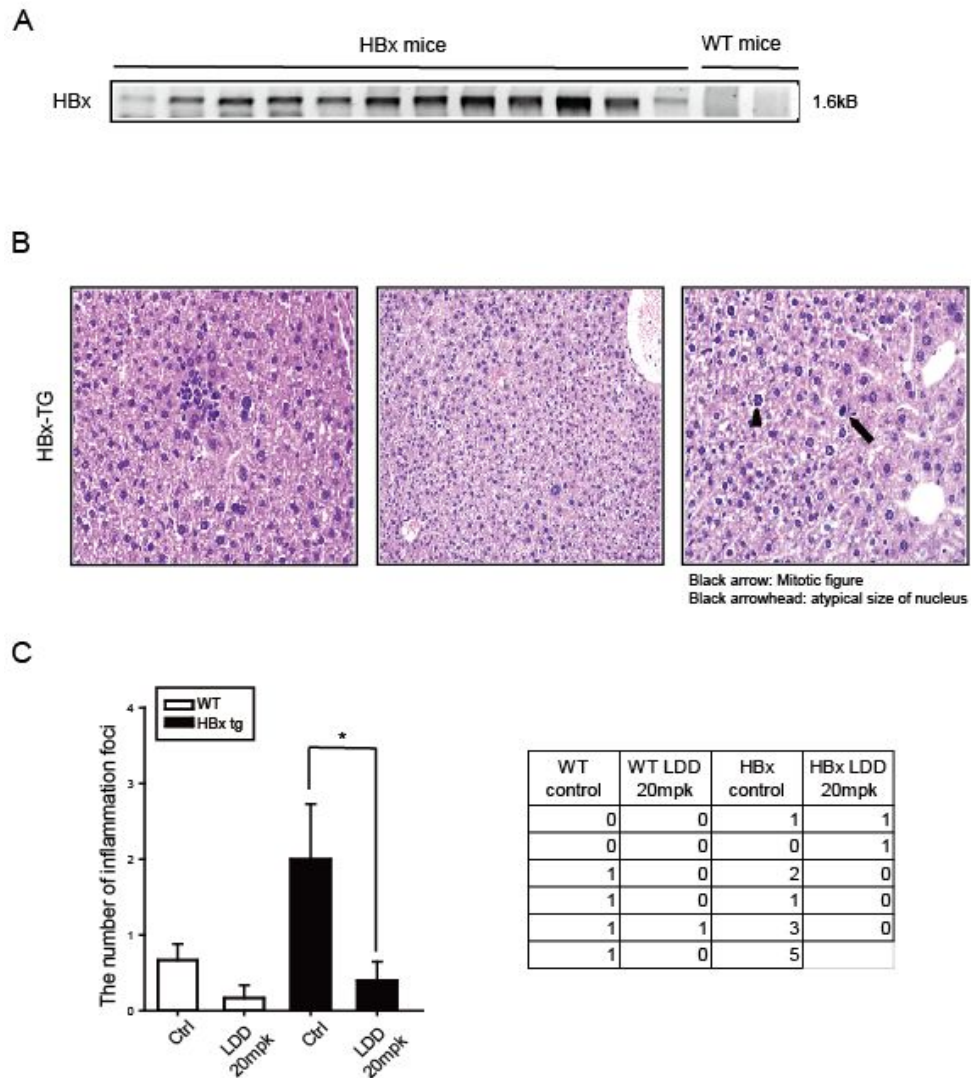


Figure2. Change in liver of HBx transgenic mouse and inhibition of inflammation through P2X7 antagonist

(A) HBx gene expression in HBx transgenic mice (HBx-TG) and wild type mice. DNA samples were obtained from tail lysates.

(B) Representative H&E staining result in liver from 3 month old HBx transgenic mouse (Infiltration of inflammatory cell, Development of fatty liver and nuclei pleomorphism)

(C) Inhibitory effect of P2X7 antagonist on the development of inflammation foci (the number of inflammation foci (0~5). The scoring was performed by a certified pathologist in a blinded fashion.

### 3. HBx-TG 마우스에서 P2X7를 경유하는 단백질 염증복합체 경로에 의한 염증반응 변화

HBx-TG 마우스에서의 P2X7 길항제에 의한 염증 억제 효과의 기전을 규명하기 위하여 P2X7과 깊은 연관성을 가진 NLRP3 inflammasome 경로를 확인하였다. 그 결과 HBx-TG 마우스의 간조직에서 P2X7과 단백질 염증복합체(inflammasome)의 구성 요소인 NLRP3와 ASC의 단백질 발현이 증가하였을 뿐만 아니라 NLRP3 inflammasome 경로의 priming signal에 의해 만들어지는 pro-IL-1 $\beta$ 의 발현도 증가하였고, 최종 산물인 IL-1 $\beta$  또한 발현이 증가하였다. 그리고 이러한 모든 발현의 증가가 LDD1295를 투여한 군에서 억제되는 것이 확인되었다(Figure 3A). 이 모든 결과는 통계적으로 유의미한 차이를 보였다(Figure 3B). 그러나 이들 지표 이외에 간염 시에 증가한다고 알려진 IL-6와 COX-2(Cheng et al., 2004; Lee et al., 1998)의 단백질 및 RNA 발현을 확인해보았으나 유의미한 결과를 얻지 못하였다. 이는 HBx에 의해 유도된 간염이 P2X7를 경유해 만들어진 싸이토카인인 IL-1 $\beta$ 에 의존적으로 야기될 수 있으며 그러한 염증반응이 P2X7 길항제에 의해 억제될 수 있음을 시사한다.

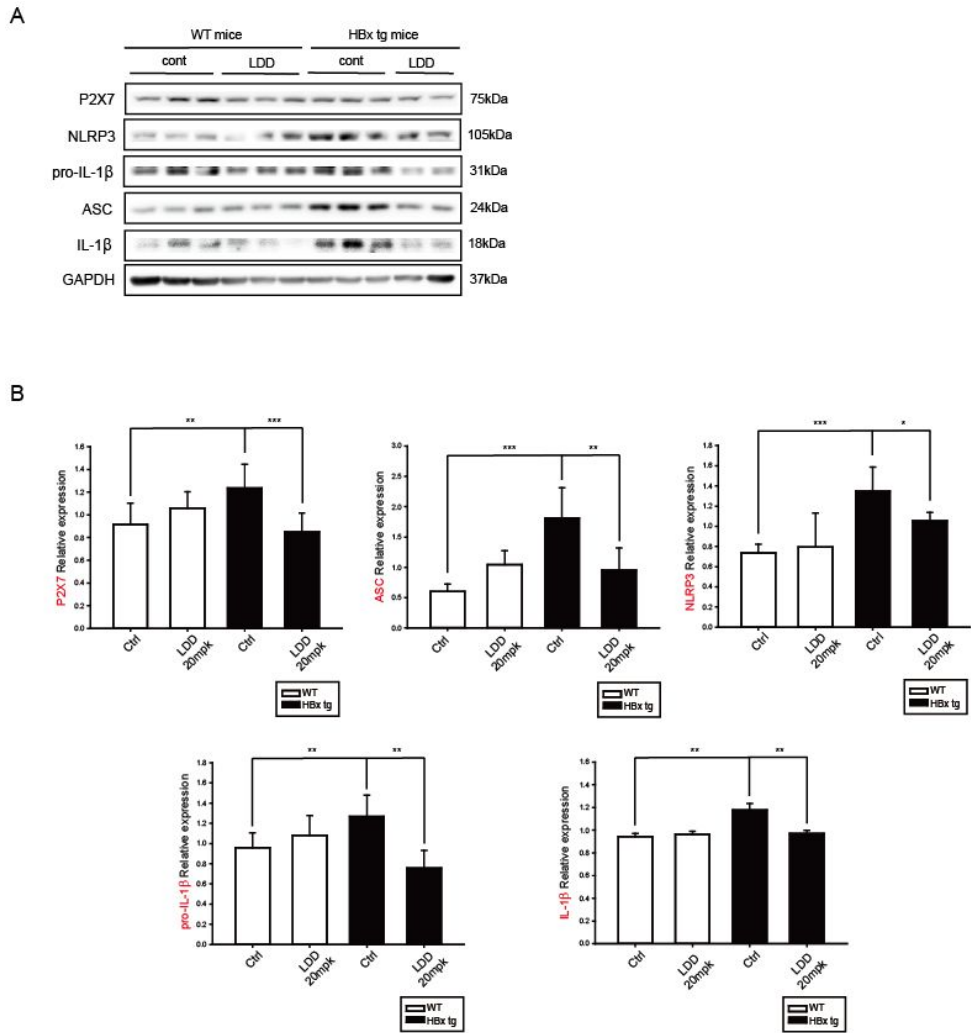


Figure 3. Increased expression of P2X7 and NLRP3 inflammasome in HBx transgenic mouse and decreased expression via P2X7 antagonist

(A) P2X7, NLRP3, ASC, pro-IL-1 $\beta$ , and IL-1 $\beta$  protein expression were measured by western blot analyses in wild type and HBx-TG mice treated with vehicle or LDD1295(20 mg/kg, 3 times intraperitoneal injection a week for 10 weeks)

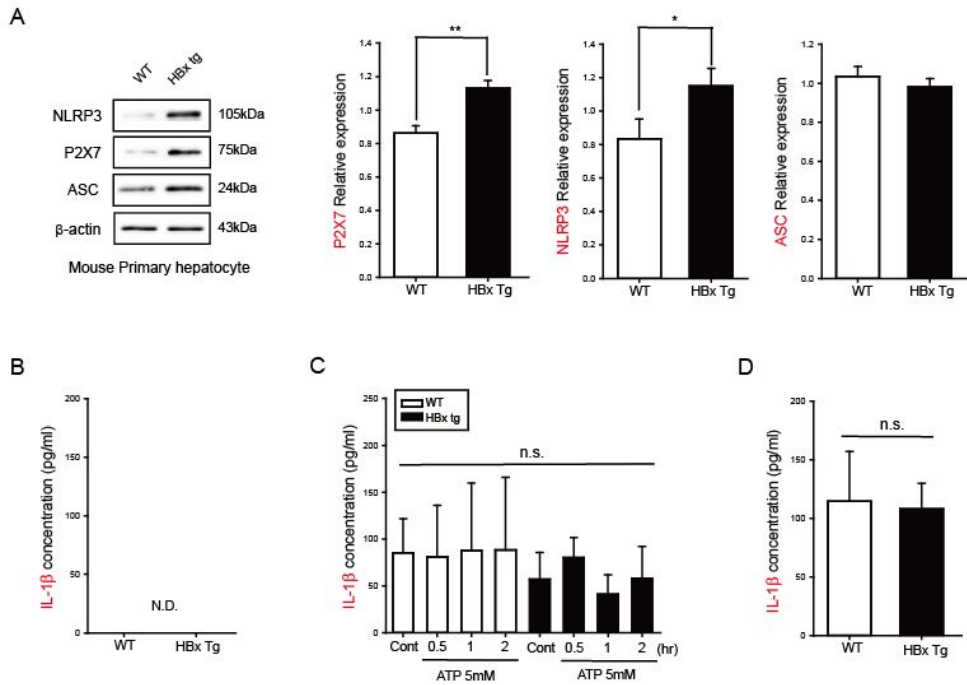
(B) P2X7, NLRP3, ASC, pro-IL-1 $\beta$ , and IL-1 $\beta$  protein expression

were assessed by scanning densitometry. Significant versus wild type group and LDD administrated group.\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001



#### 4. HBx-TG 마우스 간세포에서의 단백질 염증복합체의 역할

간 내에서의 P2X7 억제에 의한 염증 억제의 자세한 기전을 규명하기 위해 B형 간염 바이러스에 감염 시 HBx가 간세포 내에서만 생성된다 (Bouchard and Schneider, 2004)는 점에 착안해 간세포에서의 P2X7 및 염증복합체의 발현을 확인하였다. 그 결과, 흥미롭게도 HBx-TG 마우스의 1차배양 간세포(primary hepatocyte)에서 P2X7 뿐만 아니라 염증복합체의 구성요소인 NLRP3의 발현이 증가되어 있었다(Figure 4A). 따라서 간세포의 배양액을 80배 농축하여 NLRP3 inflammasome 경로의 최종산물이자 실질적으로 염증에 관여하는 IL-1 $\beta$ 의 분비를 ELISA 분석을 통해 확인하였지만 검출되지 않았다(Figure 4B). 그리하여 NLRP3 inflammasome 경로의 활성화를 위해 ATP를 과량(5mM)으로 처리하거나 (Figure 4C), priming 조건인 LPS를 전처리(0.5ug/ml)하고 ATP를 처리(1mM)했을 때 (Figure 4C) 모두 IL-1 $\beta$ 의 분비는 확인되었으나 그 양은 wild type(WT) 마우스에 비해 유의미한 차이를 보이지 않았다. 이는 간에서의 IL-1 $\beta$ 에 의한 염증 효과가 간세포 자체에 의한 것이 아님을 의미한다.



**Figure 4. Increased expression of P2X7, inflammasome and detection of IL-1 $\beta$  secretion in primary cultured hepatocyte from HBx transgenic mouse**

(A) P2X7, NLRP3 and ASC protein expression in WT and HBx-TG mice primary hepatocytes were determined by western blot. The analysis was conducted by a densitometer, significant versus WT, \*P<0.05, \*\*P<0.01

(B) IL-1 $\beta$  secretion shown by ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) analysis in media of primary hepatocyte which was 80 times concentrated, N.D.,not detected.

(C) IL-1 $\beta$  secretion shown by ELISA analysis in 80 times concentrated media of primary hepatocyte treated with 5mM ATP for

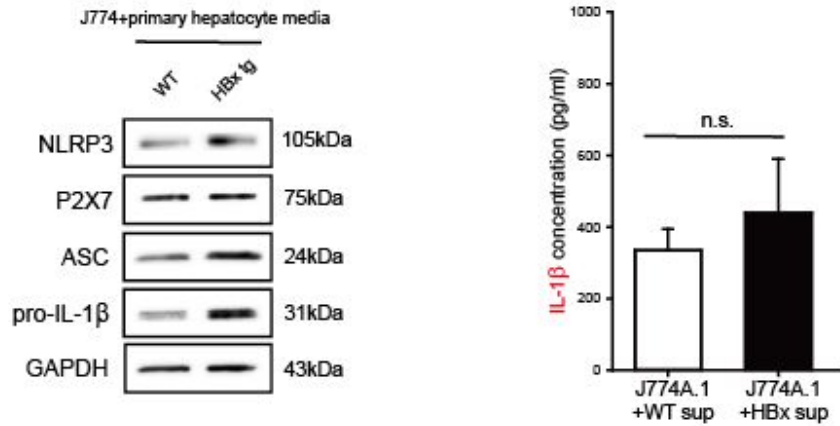
0.5, 1, 2 hours from WT and HBx-TG mice, n.s., not significant

(D) IL-1 $\beta$  secretion shown by ELISA analysis in 80 times concentrated media of primary hepatocyte treated with 1mM ATP for 24 hours after 0.5ug/ml treatment of LPS for 1 hour from WT and HBx-TG mice, n.s., not significant.

## 5. HBx-TG 마우스에서의 간세포와 Kupffer cell에 의한 간염의 진행

간 내에 존재하는 macrophage인 Kupffer cell에 P2X7의 발현이 나타난다는 보고(Toki et al., 2015)에 착안해 간 내에서 HBx에 매개되어 일어나는 염증이 간세포에서 생성된 mediator가 kupffer cell에 영향을 미친 것인지를 확인하였다. Kupffer cell을 실험적으로 대신 할 수 있는 마우스 monocyte인 J774A.1 세포의 배양액을 마우스에서 분리한 1차배양 간세포의 배양액으로 교체한 결과, P2X7이나 NLRP3 염증복합체 경로 구성요소들의 단백질 발현이나 IL-1 $\beta$ 의 분비가 유의미한 차이를 보이지 않았다(Figure 5A). 그렇기에 1차배양 간세포의 P2X7을 경유하는 염증복합체를 활성화시키는 조건으로 ATP 1mM을 12시간 동안 처리한 후 그 배양액을 J774A.1 세포에 옮겨 실험을 진행하였다. HBx 과발현 마우스 간세포에 ATP를 처리한 배양액으로 배양된 J774A.1 세포에서 WT 마우스의 간세포에 ATP를 처리한 배양액으로 배양했을 때보다 염증복합체를 구성하는 NLRP3와 pro-IL-1 $\beta$ 의 단백질 발현이 증가하였고 또한 IL-1 $\beta$ 의 분비가 증가하였다(Figure 5B). 결과적으로 HBx에 의해 야기된 간염은 간세포가 Kupffer cell 에 영향을 미쳐 진행된다는 것을 의미한다.

A



B

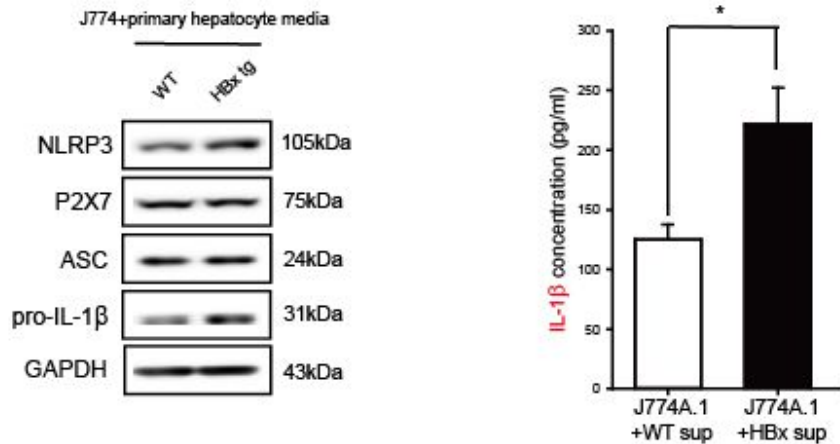


Figure 5. Change in expression of components of inflammasome pathway and increased secretion of IL-1β in HBx overexpressed monocyte from mouse

(A) P2X7, NLRP3, ASC and pro-IL-1β protein expression in cell lysate (left panel) and IL-1β secretion in media (right panel) of mouse monocytes after treating media from WT and HBx-TG mice primary hepatocytes, n.s., not significant.

(B) P2X7, NLRP3, ASC and pro-IL-1 $\beta$  protein expression in cell lysate (left panel) and IL-1 $\beta$  secretion in media (right panel) of mouse monocytes after treating media from WT and HBx-TG mice primary hepatocytes treated with 1 mM ATP for 12 hours, \*P<0.05.

## IV. 고찰 및 결론

본 논문에서는 HBx 단백질과 P2X7 수용체가 모두 염증과 관련되어 있다는 점에 착안하여, HBx를 매개로 한 간염에 있어 신규 타겟으로 P2X7을 제시하였다.

HBx에 대한 연구는 계속 진행되고 있지만 그 정확한 역할 및 기능에 대해서는 알려져 있지 않은 실정이다. 정상 간이 B형 간염 바이러스에 감염되면 HBx와 같은 단백질을 만들어내고 이것에 장기간 노출되면 만성 간염을 거쳐 간암에까지 이르게 된다(Neuveut et al., 2010). Tu H 연구팀의 2001년 보고에 따르면 HBx의 돌연변이에서는 정상 HBx가 가진 Ras와 Myc 같은 염증 관련 전사 인자를 활성화시키는 기능이 사라졌다(Tu et al., 2001). 다만 이 HBx의 돌연변이가 HBV 감염에 의한 간암 발생에 있어 어떠한 역할을 하는지는 명확하지 않은데 이는 염증 관련 전사 인자들이 염증 발생에 있어 어떠한 단계에서 세포의 형질전환(cellular transformation)에 관여하는지가 알려져 있지 않기 때문이다. 종양 발생에 있어 HBx의 역할에 대한 연구는 다양한 세포와 동물을 통해 이뤄지고 있는데, 그 결과에 대한 논란은 지속되고 있다. Gottlob K 연구팀에 따르면 마우스 세포주인 NIH3T3과 Rev-2 세포에서 HBx는 형질변환에 관여하며(Gottlob et al., 1998) 그 기전이 HBx가 Ras와 협력해 진행된다는 보고(Kim et al., 2001)가 있지만, 이와 대조적으로 다른 oncogene에 의해 발생하는 형질변환을 억제한다는 연구 결과(Kim et al., 1998) 또한 존재하는 실정이다. 형질전환

마우스(transgenic mouse)에서도 진행된 종양 발생에 대한 연구 결과 역시 대조적인데, 그 이유는 HBx의 발현이 다양한 프로모터 염기 서열에 의해 조절받기 때문으로 생각된다(Koike, 2002).

한편 P2X7은 파골세포(osteoclasts) 나 기도세포(airway cells)와 같은 다양한 세포(Ke et al., 2003; Ma et al., 2006), 나 폐, 뇌나 침샘 등 다양한 기관(Sim et al., 2004) 및 뉴런 (Wang et al., 2004) 등에서 발현되어 다양한 질병에 관여하며, 특히 면역 세포에서 많이 발현(Labasi et al., 2002)되어 면역 반응에 깊이 관여한다(Chen and Brosnan, 2006).

본 연구는 HBx에 의해 매개된 간염에 있어 P2X7의 역할에 대해 주목하였다. 알려진 대로(Emmett et al., 2008), 인간 및 마우스의 간에서 모두 P2X7의 발현이 나타났으며, 특히 실제 만성 B형간염에 의해 유래된 간암 환자의 간암 조직에서 P2X7의 발현이 정상 간 조직에 비해 증가해 있었다(Fig 1B). 또한 알코올성 간염 환자의 간에서 역시 P2X7의 발현이 정상인의 간에 비해 약간 증가했으며(Fig 1A), P2X7와 연관되어 염증 반응에 관여하는 inflammasome complex의 구성요소들인 NLRP3, ASC, caspase-1 모두 증가해 있었다(supplementary figure 1). HBx 과발현 마우스의 다양한 주령수에서 역시 동일한 결과를 확인하였다(Fig 1C). 이를 바탕으로 HBx와 P2X7과의 연관성을 확인하기 위하여 *in vivo* 모델을 사용하여 P2X7 길항제에 의한 HBx-TG 마우스 군에서의 염증 억제효과를 확인하였다. HBx-TG 마우스는 기존 보고(Chung et al., 2014)와 마찬가지로 3개월 정도의 주령수에서 지방간 생성, 염증 발생에 의한 호중구 및 단핵구의 침윤과 전암 상태라고 할 수 있는 핵의



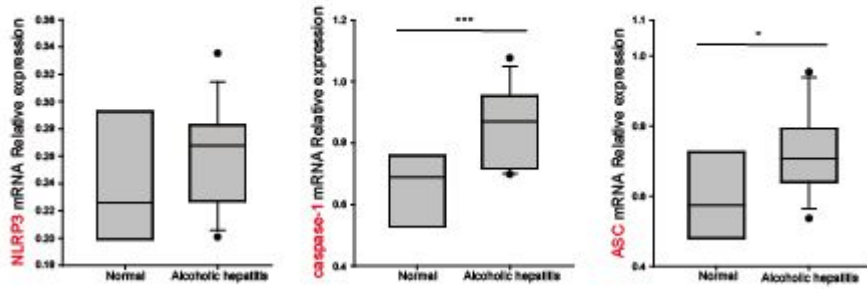
돌연변이가 관찰되었다(Fig 2B). 이렇게 발생한 세포의 형질변환은 P2X7 길항제를 사용했을 때 지방간이나 핵의 돌연변이의 생성에는 영향을 미치지 않았지만, 염증을 억제해 면역 세포의 침윤에 의해 발생하는 염증성 균집의 수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다(Fig 2C). 이는 P2X7의 억제가 HBV 감염에 의해 만들어지는 HBx에 의해 야기되는 염증 반응을 억제함을 시사한다. 이를 바탕으로 앞서 언급했던 P2X7을 경유하는 대표적인 염증 반응 경로인 NLRP3 inflammasome 경로를 통하여 그 기전을 확인하였다. 간에 inflammasome complex가 존재함은 기존에 보고되어 있었다(Szabo and Csak, 2012). 하지만 본 연구는 HBx의 발현이 증가된 상태에서 간에서의 P2X7과 inflammasome을 구성하는 요소인 NLRP3, ASC의 발현이 증가됨을 최초로 규명하였다(Fig 3A, B). 또한 NLRP3 inflammasome 경로의 priming signal에 의해 만들어지는 전구체 형태인 pro-IL-1 $\beta$ 와 최종 산물인 IL-1 $\beta$ 의 발현 또한 증가됨을 보였다. 이러한 발현의 증가는 P2X7 길항제인 LDD1295에 의해 통계적으로 유의미한 감소를 보였으며, 이를 통해 HBx에 의해 야기된 감염의 진행을 P2X7의 억제를 통해 늦출 수 있음을 예상할 수 있다. 하지만 HBx에 의해 염증 인자인 IL-6와 COX-2가 활성화 및 조절된다는 보고(Cheng et al., 2004; Lee et al., 1998)와 다르게 본 연구에서는 두 인자들의 유의미한 차이를 확인하지 못하였다. 이는 HBx-TG 마우스는 암컷에서 종양 발생이 더 적다는 연구 결과(Kim et al., 1991)를 토대로 염증 반응의 진행이 수컷에 비해 더 적게 일어났기 때문이라고 추측할 수 있다.

추가적으로 간에서의 염증 반응에 있어 P2X7의 역할을 1차배양 간세포에서 확인하였다. 그 결과, 흥미롭게도 HBx가 과발현된 간 조직에서 증가되어 있던 P2X7의 발현이 HBx-TG 마우스에서 분리한 1차배양 간세포에서도 증가되어 있었고, inflammasome의 구성요소인 NLRP3 역시 통계적으로 유의미하게 증가되어 있었다(Fig 4A). 이를 토대로 실질적으로 염증에 관여하는 IL-1 $\beta$ 의 분비를 간세포의 배양액을 80배 농축하여 확인하였으나 검출되지 않았기 때문에(Fig 4B), P2X7의 ligand인 ATP를 과량으로 처리하거나 NLRP3 inflammasome 경로의 priming 조건(Grahames et al., 1999)인 LPS를 전처리한 후 ATP를 처리한 후 마찬가지로 농축한 결과 IL-1 $\beta$ 가 검출되었으나 그 양은 매우 소량이었고 wild type 마우스에서 분리한 1차배양 간세포의 배양액과 유의미한 차이를 보이지 않았다(Fig 4C, D). 이는 비록 HBx-TG 마우스의 간세포에서 wild type 마우스에 비해 P2X7과 NLRP3의 발현이 높긴 하지만 그 양은 미미한 수준이고 IL-1 $\beta$ 의 전구체인 pro-IL-1 $\beta$ 의 발현이 큰 차이를 보이지 않았기 때문이라고 예상된다. 간 내에는 실질세포인 간세포 (hepatocyte) 외에도 비실질세포가 존재하는데, 그 중에서도 macrophage인 Kupffer cell은 면역 반응에 주요한 역할을 한다. 그렇기에 간세포와 Kupffer cell 간의 상호작용에 주목하였다. HBx-TG 마우스에서 분리한 간세포의 배양액을 Kupffer cell을 실험적으로 대신할 수 있는 마우스 monocytes에 공동배양한 결과, P2X7 뿐만 아니라 NLRP3 inflammasome 경로의 구성요소들의 발현이 wild type 마우스에서 분리한 간세포를 공동배양했을 때와 거의 차이를 보이지 않았고 농축한

배양액에서도 IL-1 $\beta$  또한 검출되었지만 유의미한 차이를 보이지 않았다(Fig 5A). 그렇기 때문에 마우스에서 분리한 간세포에 ATP를 처리한 후 공동배양을 진행한 결과, P2X7의 발현에는 거의 차이가 없었지만 NLRP3와 pro-IL-1 $\beta$ 의 단백질 발현이 증가되었고 최종 산물인 IL-1 $\beta$ 이 통계적으로 유의미한 차이를 보였다(Fig 5B). 기존 보고(Dinarello, 2006)에 따르면 macrophage에서 분비된 IL-1 $\beta$ 는 각종 염증 반응에 관여하며, Negash AA 연구팀의 연구 결과 HCV 감염으로 인한 간질환에서 역시 IL-1 $\beta$ 이 만들어져 염증 반응에 관여하는 것이 알려져 있다(Negash et al., 2013). 이를 통해 HBV 감염에서 IL-1 $\beta$ 의 역할을 예상해볼 수 있으며, 특히 HBx에 의해 발현이 증가하는 P2X7이 주요한 역할을 할 가능성이 존재한다. 이와 같이 HBx 매개 감염에 있어 간세포의 P2X7을 경유하는 mediator에 의한 Kupffer cell의 역할을 규명하기 위해 실제 마우스에서 Kupffer cell을 분리하여 공동배양을 통한 IL-1 $\beta$ 의 분비량의 차이를 확인하는 ELISA 분석과, HBx 과발현 마우스의 간세포의 배양액과 공동배양한 마우스 monocytes에서 증가한 IL-1 $\beta$ 의 분비가 P2X7 길항제에 의해 억제되는지에 대한 연구 또한 진행되고 있으며, 이는 본 연구 결과에 더욱 확실한 증거를 제공해 줄 것이다. 간세포에서 분비되어 Kupffer cell에 영향을 미치는 mediator에 대한 연구와 IL-1 $\beta$ 가 HBx 매개 감염 이후 간암에 이르기까지 어떠한 역할을 하는지에 대한 연구는 추후 보강되어야 할 것이다.

Supplementary figure 1. Expression of inflammasome complex components (NLRP3, ASC and caspase-1) in alcoholic hepatitis patients

Supplementary figure 1.



Significant versus normal liver samples, \*P<0.05, \*\*\*<P<0.001

Supplementary table 1. Serological test [ALT(U/L), AST(U/L), lactate dehydrogenase(LDH), total bilirubin(mg/dl), and direct bilirubin(mg/dl)], body weight and liver weight in HBx–TG mice hepatitis model

Group	GPT(U/L)	GOT(U/L)	LDH(U/L)	TBIL(mg/dl)	DBIL(mg/dl)
WT control	23.7±3.9	80.8±13.1	357.5±48.3	0.5±0.1	0.2±0.1
WT LDD 20mpk	22.3±4.6	100.8±43.9	396.3±56.3	0.7±0.1	0.3±0.2
HBx control	29.8±11.2	80.5±27.7	305.8±57.4	0.7±0.1	0.2±0.0
HBx LDD 20mpk	25.2±7.4	110.4±35.7	427.4±121.2	0.7±0.1	0.2±0.0

Group	Weight(g)	
	Body	Liver
WT control	23.4±1.6	0.9±0.1
WT LDD 20mpk	24.8±2.5	0.9±0.1
HBx control	21.2±0.9	1.0±0.1
HBx LDD 20mpk	21.2±0.7	1.1±0.1

#### IV. 참고 문헌

Benhenda, S., Cougot, D., Buendia, M.-A., and Neuveut, C. (2009). Chapter 4 Hepatitis B Virus X Protein. *103*, 75-109.

Bhattacharya, D., and Thio, C.L. (2010). Review of hepatitis B therapeutics. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* *51*, 1201-1208.

Bouchard, M.J., and Schneider, R.J. (2004). The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *Journal of virology* *78*, 12725-12734.

Chatterjee, S., and Das, S. (2015). P2X7 receptor as a key player in oxidative stress-driven cell fate in nonalcoholic steatohepatitis. *Oxidative medicine and cellular longevity* *2015*, 172493.

Chen, L., and Brosnan, C.F. (2006). Regulation of Immune Response by P2X<sub>7</sub> Receptor. *26*, 499-513.

Cheng, A.S., Chan, H.L., Leung, W.K., To, K.F., Go, M.Y., Chan, J.Y., Liew, C.T., and Sung, J.J. (2004). Expression of HBx and COX-2 in chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: implication of HBx in upregulation of COX-2. *Modern pathology* *17*, 1169-1179.

Chung, T.-W., Kim, S.-J., Choi, H.-J., Song, K.-H., Jin, U.-H., Yu, D.-Y., Seong, J.-K., Kim, J.-G., Kim, K.-J., and Ko, J.-H. (2014). Hepatitis B virus X protein specially regulates the sialyl lewis a synthesis among glycosylation events for metastasis. *Molecular cancer* *13*, 1-12.

Church, L.D., Cook, G.P., and McDermott, M.F. (2008). Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nature clinical practice Rheumatology* *4*, 34-42.

Di Virgilio, F. (2007). Liaisons dangereuses: P2X<sub>7</sub> and the inflammasome. *Trends in pharmacological sciences* *28*, 465-472.

Dinarello, C.A. (2006). Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *The American journal of clinical nutrition* *83*, 447S-455S.

Emmett, D.S., Feranchak, A., Kilic, G., Puljak, L., Miller, B., Dolovcak, S., McWilliams, R., Doctor, R.B., and Fitz, J.G. (2008). Characterization of ionotropic purinergic receptors in hepatocytes. *Hepatology* *47*, 698-705.

Gottlob, K., Pagano, S., Levrero, M., and Graessmann, A. (1998). Hepatitis B virus X protein transcription activation domains are neither required nor sufficient for cell transformation. *Cancer research* *58*, 3566-3570.

Grahames, C., Michel, A., Chessell, I., and Humphrey, P. (1999). Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1 $\alpha$  release in human monocytes. *British journal of pharmacology* *127*, 1915-1921.

Hoque, R., Sohail, M.A., Salhanick, S., Malik, A.F., Ghani, A., Robson, S.C., and Mehal, W.Z. (2012). P2X<sub>7</sub> receptor-mediated purinergic signaling promotes liver injury in acetaminophen hepatotoxicity in mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* *302*, G1171-1179.

Ke, H.Z., Qi, H., Weidema, A.F., Zhang, Q., Panupinthu, N., Crawford, D.T., Grasser, W.A., Paralkar, V.M., Li, M., and Audoly, L.P. (2003). Deletion of the P2X<sub>7</sub> nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Molecular Endocrinology* *17*, 1356-1367.

Khakh, B.S., and North, R.A. (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* *442*, 527-532.

Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., and Jay, G. (1991). HBx

gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* *351*, 317-320.

Kim, H., Lee, H., and Yun, Y. (1998). X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *The Journal of biological chemistry* *273*, 381-385.

Kim, Y.C., Song, K.S., Yoon, G., Nam, M.J., and Ryu, W.S. (2001). Activated ras oncogene collaborates with HBx gene of hepatitis B virus to transform cells by suppressing HBx-mediated apoptosis. *Oncogene* *20*, 16-23.

Koike, K. (2002). Hepatocarcinogenesis in hepatitis viral infection: lessons from transgenic mouse studies. *Journal of gastroenterology* *37 Suppl 13*, 55-64.

Labasi, J.M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M.M., Brissette, W., Wicks, J.R., Audoly, L., and Gabel, C.A. (2002). Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *The Journal of Immunology* *168*, 6436-6445.

Lee, Y., Park, U.-S., Choi, I., Yoon, S.K., Park, Y.M., and Lee, Y.I. (1998). Human interleukin 6 gene is activated by hepatitis B virus-X protein in human hepatoma cells. *Clinical Cancer Research* *4*, 1711-1717.

Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F., Hantz, O., and Protzer, U. (2011). Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *Journal of hepatology* *55*, 996-1003.

Ma, W., Korngreen, A., Weil, S., Cohen, E.B.T., Priel, A., Kuzin, L., and Silberberg, S.D. (2006). Pore properties and pharmacological features of the P2X receptor channel in airway ciliated cells. *The Journal of physiology* *571*, 503-517.



McDonald, B. (2011). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation (October, pg 362, 2010). *Science* *331*, 1517-1517.

Negash, A.A., Ramos, H.J., Crochet, N., Lau, D., Doehle, B., Papic, N., Delker, D.A., Jo, J., Bertolotti, A., and Hagedorn, C.H. (2013). IL-1beta production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathog* *9*, e1003330.

Neuveut, C., Wei, Y., and Buendia, M.A. (2010). Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *Journal of hepatology* *52*, 594-604.

Park, J.H., Lee, G.E., Lee, S.D., Hien, T.T., Kim, S., Yang, J.W., Cho, J.H., Ko, H., Lim, S.C., Kim, Y.G., *et al.* (2015). Discovery of novel 2,5-dioximidazolidine-based P2X<sub>7</sub> receptor antagonists as constrained analogues of KN62. *Journal of medicinal chemistry* *58*, 2114-2134.

Ralevic, V., and Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews* *50*, 413-492.

Riteau, N., Baron, L., Villeret, B., Guillou, N., Savigny, F., Ryffel, B., Rassendren, F., Le Bert, M., Gombault, A., and Couillin, I. (2012). ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell death & disease* *3*, e403.

Sim, J.A., Young, M.T., Sung, H.-Y., North, R.A., and Surprenant, A. (2004). Reanalysis of P2X<sub>7</sub> receptor expression in rodent brain. *The Journal of neuroscience* *24*, 6307-6314.

Szabo, G., and Csak, T. (2012). Inflammasomes in liver diseases. *Journal of hepatology* *57*, 642-654.

Toki, Y., Takenouchi, T., Harada, H., Tanuma, S., Kitani, H., Kojima, S., and Tsukimoto, M. (2015). Extracellular ATP induces P2X<sub>7</sub> receptor

activation in mouse Kupffer cells, leading to release of IL-1beta, HMGB1, and PGE2, decreased MHC class I expression and necrotic cell death. *Biochemical and biophysical research communications* *458*, 771-776.

Tu, H., Bonura, C., Giannini, C., Mouly, H., Soussan, P., Kew, M., Paterlini-Brechot, P., Brechot, C., and Kremsdorf, D. (2001). Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer research* *61*, 7803-7810.

Wang, X., Arcuino, G., Takano, T., Lin, J., Peng, W.G., Wan, P., Li, P., Xu, Q., Liu, Q.S., and Goldman, S.A. (2004). P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nature medicine* *10*, 821-827.

## Abstract

# Role of P2X7 receptor in HBx-mediated hepatitis

Kihoon Ko

College of Pharmacy, Pharmacology

The graduate school

Seoul National University

Hepatitis B virus causes acute and chronic hepatitis through various ways, and in some patients, it can lead to liver cirrhosis and liver cancer. Protein known as HBx (hepatitis B virus X protein) is produced in the event of Hepatitis B virus infection and HBx interacts with other proteins and accelerates liver damage and inflammation. However, treatment tool for targeting HBx is still limited.

In comparison to healthy liver tissues and wild-type mice, P2X7 expression was obviously increased in the liver tissues from both hepatitis B virus-mediated liver cancer patients and HBx transgenic mice. From the results, I tried to clarify the role of P2X7 receptor in progress of liver inflammation and apoptosis in HBx-transgenic mice. Hepatitis is known to appear in 12 to 15 weeks old HBx transgenic mouse. I found out that the protein level of P2X7 receptor was increased in HBx transgenic mouse compared to same aged wild type mouse. In the liver samples of HBx transgenic mice showed a significant number of inflammation foci than wild type,

Fatty liver and nuclei pelomorphism was observed in liver tissues from HBx-transgenic mice. Intraperitoneal injection with a P2X7 antagonist, LDD1295 significantly decreased the number of inflammation foci. Thus, irrelevant from HBx-induced fatty liver and progression of precancerous condition, P2X7 seems to participate in liver inflammation process. Components of inflammasome which is related to inflammation that P2X7 takes part in, such as ASC, NLRP3 and end product IL-1 $\beta$ , increased in liver tissue from HBx transgenic mice compared to wild-type mice. Moreover, P2X7 antagonist significantly decreased expression of all inflammasome components. These results imply that HBx-induced liver inflammation can be suppressed by inhibiting P2X7 receptor. Interestingly, P2X7 protein level was increased in primary hepatocyte isolated from HBx transgenic mice compared to those from wild type mice. In order to discover the relevance between P2X7 and inflammasome activation in hepatocyte, ATP, an endogenous P2X7 ligand and Toll-like receptor (TLR4) ligand lipopolysaccharide (LPS) were individually or simultaneously treated in primary hepatocytes. Protein expression of NLRP3 and ASC were up-regulated in primary hepatocyte originated from HBx transgenic mice. However, when I performed ELISA by using 80-times concentrated media samples, IL-1 $\beta$  secretion in HBx-overexpressing hepatocytes was not significantly different from

wild-type hepatocytes. Protein expression of inflammasome components and secretion of IL-1 $\beta$  were up-regulated in mouse monocytes cultured with HBx-overexpressing hepatocytes media treated with ATP. Expression of P2X7 and its down-stream signaling factor inflammasome components and IL-1 $\beta$ , which were increased in liver tissue of HBx transgenic mouse, is inhibited by P2X7 antagonist and it seems to be related to interaction between hepatocytes and immune cells like macrophage known as Kupffer cell in liver rather than effect hepatocytes alone. According to these findings, We can suggest that P2X7 is a novel target in prevention and treatment for HBV mediated hepatitis.

Key words : HBx, P2X7, inflammasome, IL-1 $\beta$ , ATP