

## 말초혈액 단핵구에서 3단계 PCR에 의한 B형 간염 바이러스 삽입 부위 탐색

<sup>1</sup>부산대학교 분자생물학과, <sup>2</sup>울산대학교 의과대학 내과학교실  
<sup>3</sup>서울대학교 약학대학 종합약학연구소

김우진<sup>1</sup> · 이세원<sup>1</sup> · 박능화<sup>1,2</sup> · 김규원<sup>3</sup>

### Detection and Sequence Analysis of DNA Flanking Integrated Hepatitis B Virus in Peripheral Blood Mononuclear Cells by Three-Step PCR

Woo Jean Kim<sup>1</sup>, Sae-Won Lee<sup>1</sup>, Neung-Hwa Park<sup>1,2</sup> and Kyu-Won Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine, University of Ulsan College of Medicine, Korea

<sup>3</sup>Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy,  
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Hepatitis B virus (HBV)-DNA insertion into the human genome was highly related with acute-or chronic- human disease. To diagnose the HBV-DNA, several methods have been introduced to investigate the viral integration site. However, these methods were so complex and expensive. Thereby we modified the rapid amplification of cDNA ends (RACE) into three-step PCR technique that can simply figure out the flanking region of viral integration sites. By using three-step PCR, we detected HBV-cellular DNA junctions in all 3 among 13 patients. The HBV flanking region was cytosine-rich or guanine-rich. The pyrimidine or cytosine-rich region was known as a suitable environment for acting of topoisomerase I that is related with HBV integration. The fact HBV integration into peripheral blood mononuclear cells (PBMC) showed one possibility that immune system will be damaged directly by HBV infection in PBMC. From these results, we suggest that three-step PCR is a useful method to figure out and characterize the viral integration sites including HBV integration sites.

**Key Words:** Hepatitis B virus, Peripheral blood mononuclear cells

### 서 론

급성 B형 간염은 HBsAg과 HBeAg이 혈중에서 사라지고, 방어 항체(protective antibody)인 anti-HBs가 형성되며, 상승되었던 간 효소치가 정상화

되면서 완전히 치유되는 것으로 알려져 왔다.<sup>1,2)</sup> 그러나 10<sup>-5</sup> pg의 미세한 DNA입자까지도 증폭하여 추출해 낼 수 있는 중합연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)법이 보편화된 후 이 방법에 의하여, 만성 간염에서 HBsAg이 사라진 환자의

혈청이나 세포 내에 여전히 B형 간염 바이러스 (hepatitis B virus; HBV) DNA가 남아 있는 것이 관찰되었다.<sup>3-5)</sup> 이러한 급성 간염환자의 경우는 90% 이상 회복이 가능하지만 만성 간염과 간경화 과정으로 발전하게 될 경우 2% 정도만 간기능이 정상화되는 것으로 보고된 바가 있다.<sup>6,7)</sup>

만성 B형 간염의 병태생리는, HBV에 의해서 감염된 간세포에 대하여 세포성 면역은 그 본래의 기능을 정상적으로 가동하고 있는 반면에 HBV의 완전한 제거에 필요한 anti-HBs를 생산하는 체액성 면역기능의 결함으로 요약될 수 있다.<sup>8-11)</sup> 이러한 면역체계의 이상 원인은 아직도 알려지지 않았으며, 단지 면역에 관여하는 세포의 비정상적인 활동으로 인하여 발생할 것으로만 추측되어지고 있다. 이와 다른 주장으로는, 만성 B형 간염환자의 말초혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)에 HBV가 감염되어 있기 때문이라는 것이다.<sup>12-14)</sup> 하지만 말초혈액 단핵구 세포에서의 감염 사실은 연구자들에 따라 2~100%로 다양하며, 말초혈액 단핵구 세포에서의 HBV 유전자 발현여부는 정확하게 밝혀진 바가 없다. 또한, 숙주 유전자 내에 바이러스 유전자의 삽입 부위를 증폭시키는 것이 정확한 검색을 위해서 필수적이지만, 현재까지 이를 수행할 수 있는 간단한 실험법 조차 확립되어 있지 않은 실정이다.

이러한 점에 착안을 하여, 저자들은 만성 간염환자의 혈액 내에서 면역 세포인 B-세포와 T-세포를 분리하여 HBV의 감염여부를 확인하고, HBV 유전자의 삽입 부위를 증폭시켜 검색할 수 있는 방법을 새롭게 찾고자 하였다.

환자의 혈액 내에서 분리할 수 있는 B-세포와 T-세포는 그 양이 극히 미량이며, 여기서 얻어지는 DNA 양도 극미량이다. 따라서 소량의 검체에서 적절한 염기서열을 증폭 분석할 수 있는 PCR 기법과 mRNA의 full-length를 증폭하는데 이용되어 온 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 기법을 응용한 three-step PCR 기법을, 본 실험에서는 알려져 있지 않은 바이러스 삽입 부위의 DNA를 증폭시키고자 새롭게 적용하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 말초혈액 단핵구 세포의 분리 및 DNA 추출

만성 간염환자로부터 추출한 헤파린 처리된 정맥혈에서 Ficoll-hypaque 경사 원침법을 이용하여 말초혈액 단핵구 세포를 분리하고 PBS로 3번 씻은 후에 TE 완충용액(Tris-ethylenediaminetetraacetate, pH 8.0) 1 ml에 섞어 -70°C에 보관하였다.<sup>15)</sup> DNA의 분리는 Yoff의 방법<sup>16)</sup>을 이용하였는데, 우선 -70°C에서 저장된 말초혈액 단핵구 세포를 PBS로 씻은 후 원심 분리하고 동량의 lysis buffer (0.01 M Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM NaCl, 0.5% SDS)를 섞어 세포를 파괴시킨 후 proteinase K 100µg/ml을 첨가하여 37°C에서 16시간 동안 서서히 흔들어 주었다. 이 산물에 동량의 buffer-equilibrated phenol (pH 8.0)로 1회, phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)으로 2회 처리하였다. 이후 동량의 chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1)로 1회 처리한 후 3.0 M sodium acetate를 첨가하고 ice-cold absolute ethanol로 처리하여 -20°C에서 12시간 두었다. 이 산물을 4°C에서 15,000 rpm으로 원심 분리하고 70% ice-cold ethanol로 씻은 후 DNA pellet을 상온에서 건조하여 TE buffer (pH 8.0)에 녹여 사용하였다.

### 2) 세포배양

인간 간암세포에서 분리되었고 HBV 유전자가 삽입되어 있는 SNU-368은 10%의 fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)을 함유하는 RPMI 1640 배지 (Gibco BRL)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다.<sup>17)</sup> 그리고, hepatoblastoma 유래의 HepG2 세포는 10%의 FBS (Gibco BRL)을 함유하는 MEM 배지(Gibco BRL)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다.

### 3) 중합연쇄반응과 Auto-sequencing

바이러스 감염여부를 확인하는 PCR을 수행함에 있어서의 반응 조건은 다음과 같다. B형 간염 바이러스 DNA의 증폭은 HBs 유전자에 특이성을 가지는 primer를 제작하여 사용하였다(Table 1). 준비된 검체 DNA 5µg을 2.5 U Taq polymerase

**Table 1.** Primers used for detection of HBV DNA integration in peripheral blood mononuclear cells

Designation	Sequences (5' to 3')	Location
P 1	GGGTCACCATATTCTTGGGA	2814~2833
P 2	AAGGCCTTGTAAAGTTGGCGA	1099~1118
HBV1	GTTGCATGGCAGACCACCGTGAAC	1603~1625
HBV2	ACTCTTGGA CTCTCCAGCAATGTCA	1662~1684
HBV3	GACCTTGAGGCACTACTTCAAAGAC	1692~1715
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGHIIGGGHIIGG	
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	

The viral sequence is numbered from the NCBI accession No. D00329. In AAP sequence, six I mean inosine.

(TaKaRa, Ex-Taq polymerase)와 10X PCR 완충용액, 200 $\mu$ M 각각의 dNTP, 그리고 sense와 anti-sense primer를 사용하여 반응을 수행하였다. 사용된 primer P1과 P2의 염기서열은 Table 1에 나타내었으며, 수행한 PCR의 반응조건은 다음과 같다. 먼저 DNA 가닥의 분리를 위하여 95°C에서 30초, primer와 주형의 결합을 위해 55°C에서 1분, 그리고 마지막 DNA 복제를 위해 72°C에서 2분의 순서로 35회 반복하여 반응을 수행하였다. PCR을 수행하여 바이러스의 감염여부는 1% agarose gel 상에서 전기영동 후 확인하였고, 감염이 된 검체에 한하여 HBV 특이성 염기 서열의 primer를 이용하여 auto-sequencing (ABI prism 377 model)을 통하여 다시 한번 확인하였다.

**4) Three-step PCR**

B형 간염 바이러스가 삽입된 부위를 증폭시키기 위하여, 세 번의 PCR을 수행하였으며, three-step PCR의 전반적인 실험방법 Fig. 1에 설명하였다.

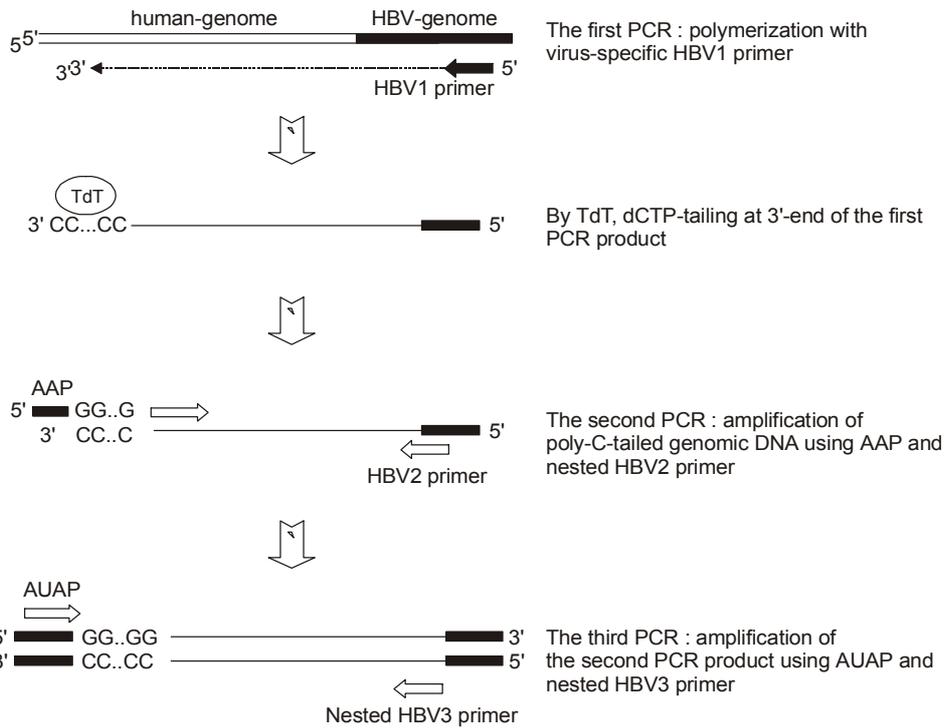
첫 번째 PCR 반응은, 3 $\mu$ g의 sample DNA를 2.5 U Taq polymerase (TaKaRa, Ex-Taq polymerase)와 10X PCR 완충용액, 200 $\mu$ M 각각의 dNTP, 그리고 20 pmol의 HBx 유전자 특이성을 가진 HBV1 primer 한 가지만을 사용하여 반응을 수행하였다. 첫 번째 PCR에서 사용한 primer의 염기서열과 이후의 PCR 반응에 사용된 primer염기서열은 Table 1에 나타내었으며, 수행한PCR의 반응조건은 다음과 같다. 먼저 DNA 가닥의 분리를 위하여 95°C에서 1분, primer와 주형의 결합을 위해 50°C에서 1

분, 그리고 72°C에서 마지막 DNA 복제를 위해 30초에서 2분의 다양한 조건으로 실시하였다. 위와 같은 순서로 30회 반복하여 반응을 수행하였다.

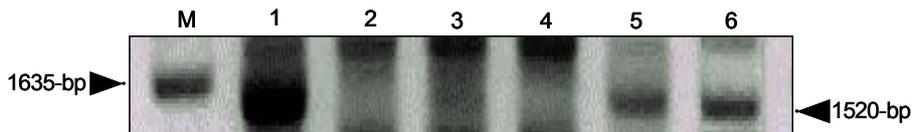
다음 과정으로, 첫 번째 PCR에서 제작된 산물의 3'-말단에 TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase, TaKaRa)를 이용하여 poly-dCTP를 접합시켰다. 앞에서 준비된 DNA로 두 번째 PCR을 수행하였다. Poly-dCTP를 접합시키는 방법은 5X 완충용액 5 $\mu$ l, 2 mM, dCTP 2.5 $\mu$ l, cDNA 10 $\mu$ l, 그리고 물로써 전체 24 $\mu$ l를 맞추었다. 이러한 조건으로 94°C에서 3분 후 4°C에서 안정화시키고, 여기에 TdT를 1 $\mu$ l 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 그리고, 다음 순서로 65°C에서 10분간 덩으로써 heat inactivation 과정을 수행하였다. 이러한 순서로 준비된 검체 DNA는 두 번째 PCR에 사용하였다.

두 번째 PCR 단계에서는, TdT처리한 2 $\mu$ g의 DNA를 2.5 U Taq polymerase (TaKaRa, Ex-Taq polymerase) 와 10X PCR 완충용액, 200 uM 각각의 dNTP, 그리고 각 10 pmol의 HBx 유전자 특이성을 가진 nested-HBV2 primer와 poly-dCTP 부위에 결합할 수 있는 Abridged Anchor Primer (AAP, TaKaRa)에 섞은 후 반응을 시켰다. 반응조건은, DNA 가닥의 분리를 위하여 95°C에서 1분, primer와 주형의 결합을 위해 50°C에서 1분, 그리고 마지막 DNA 복제를 위해 1분으로, 30회 반복하여 반응을 수행하였다.

마지막 세 번째 PCR은, 두 번째 PCR에서 제작된 산물을 주형으로 사용을 하였고, primer만이



**Fig. 1.** Three-step PCR: Strategy for amplifying unknown DNA flanking integrated HBV. In first PCR step, HBV-cellular DNA flanking region is elongated with only one HBV-specific primer HBV1. Detected single strand products by the first PCR should be attached the poly-dCTP by TdT. Poly-C tailed region furnishes the binding site of AAP (Abridged Anchor Primer). Poly-C tailed products are amplified by AAP and nested HBV-specific primer HBV2. And, by using the nested HBV-specific primer and AUAP (Abridged Universal Amplification Primer) in third PCR step, the HBV-cellular DNA junction fragment can be isolated from the non-specific amplification products.



**Fig. 2.** Detection of HBV in chronic hepatitis B patient's PBMCs. Lane M means a marker (1635 base pair) and lane 1 is SNU-368 sample (positive control). Lane 2 to lane 6 are chronic hepatitis B patient's samples. HBV genome was detected at 1520 base pair.

두번째 PCR과 다르고 그 외의 조건은 동일하게 수행하였다. 세 번째 PCR에서 사용된 primer는 HBV 특이성의 두 번째 nested-HBV3 primer와 Abridged Universal Amplification Primer (AUAP, TaKaRa)를 이용하였다. 확인된 band는 T-easy vector (Promega)에 삽입시킨 후 auto-sequencing을 실시하여 확인하였다.

## 결 과

### 1) 만성 간염환자 말초혈액 단핵구 세포에서 HBV 감염여부 탐색

전체 13명의 만성 간염환자로부터 획득한 혈액에서 말초혈액 단핵구 세포의 DNA를 분리하였다. 준비된 DNA를 B형 간염 바이러스 특이적인

염기 서열의 P1, P2 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 1520 base pair 크기에서 40대의 환자 1명과 50대의 환자 2명의 말초혈액 단핵구 세포 DNA에서 바이러스의 존재가 확인되었다(Fig. 2). 그러나 Fig. 2의 3번째 lane의 환자는 아주 희미하게 감지되었다. 감염여부의 확인은 1% agarose gel 상에서 실시하였고, 이를 확인하기 위하여 auto-sequencing을 실시하여, B형 간염 바이러스의 감염을 증명하였다. Fig. 2에서 첫 번째 lane의 SNU-368세포는 positive-대조군으로 하여, agarose gel 상에서 band를 확인하였고, HepG2 세포를 negative-대조군으로 사용한 실험에서는 예상한 대로 band

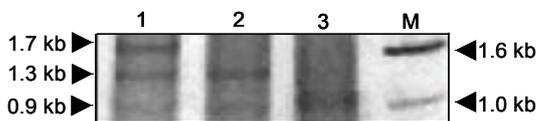
가 확인되지 않았다(data not shown).

### 2) Three-step PCR을 이용한 HBV 삽입 부위의 탐색

Three-step PCR기법에 대한 전반적인 사항은 Fig. 1에서 기술하였다.

만성 간염환자에서 획득한 DNA를 사용하여 바이러스 특이성 염기서열의 HBV1 primer로 첫 번째 PCR을 수행했다. 첫 번째 PCR에서 얻어지는 산물은 하나의 primer를 이용하기 때문에 증폭의 비율이 상당히 낮으며, 한 가닥의 형태로 합성이 된다. 이를 일반적인 PCR 기법처럼 두 종류의 primer를 이용하기 위해서 첫 번째 PCR 산물의 3'-말단에 poly-dCTP를 TdT를 이용하여 접합시켰다. 이 과정을 통하여 두 종류의 primer를 주형에 결합시켜 양말단에서의 증폭이 가능하게 되었다. 이렇게 준비된 산물로 두 번째 PCR을 수행하였다. 두 번째 PCR에서 사용된 primer는 바이러스 특이성 염기서열의 nested-HBV2 primer와 3'-말단에 poly-dCTP부위에 결합을 할 수 있는 AAP를 사용하여 DNA를 증폭시켰다.

마지막 세 번째 PCR 단계에서는 더욱 정확한 산물을 만들기 위해서 두 번째 PCR에서 증폭 제



**Fig. 3.** Amplification of HBV-human DNA junctions from PBMCs of chronic hepatitis B patients. The HBV-human DNA junction bands in lane 1, 2 and lane 3 are shown at the size of 1.7-kb, 1.3-kb, and 0.9-kb respectively. Lane M means a marker (1.6 and 1.0 kb).

**Table 2.** Nucleotide sequences of HBV-human DNA junctions found in peripheral blood mononuclear cells

TAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGATTAATGATCTTTGTACTA GGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTGCGCAC	AF043593 (1712 ~ 1794)
TAAAGACCGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGATTTATGTACTA GTCGACGCGTGGCCAATCGAATTCCCGCGGCCCATGGCGGCCGGGAGCAT	Patient-1
TAAGGACT= <u>GAGGAGTTGGGGGAGGAGATCAGGTTAAAGATTTATGTACTAG</u> TCGACGCGTGGCCACTACTCTTGGACTCTCCAGCAATGTCACCTGTTTGGAGCT	Patient-1
TAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGATTTTGTACTA GGAGGCTGAAGGCNTAAATTGGTCTGTTACGGTGGCCCGCCATGCAACCCC	Patient-2
TAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGATTTATGTACTA GGAGGCTGTAGGCATAAAATNGGTCTGTTACGGTGTCTGCCATGCAACCCC	Patient-3

The HBV wild type strain (GenBank accession no. AF043593 (1712~1794)) is shown at the top. Compared with the wild type HBV sequences, the different sequences were underlined. Solid words are HBV DNA sequences, and thin words are human sequences. Patient 1, patient 2 and patient 3 are chronic hepatitis B patients having HBV genome in their PBMCs.

작된 DNA 산물의 안쪽부분을 증폭시킬 수 있는 AUAP primer와 HBV 특이성 염기서열의 primer를 이용하여 더욱 실험의 정밀성을 높였다.

이러한 three-step PCR을 통하여 모두 1.7 kb, 1.3 kb, 그리고 0.9 kb 가량의 위치에서 band가 확인이 되었으며(Fig. 3), 이 3개의 band를 1% agarose gel에서 추출하여 T-easy vector에 삽입한 후, 이를 클로닝하였다.

Three-step PCR의 결과물으로써, 최종 실험대상으로 선택된 클론을 auto-sequencing을 실시하여 B형 간염 바이러스 삽입 부위를 살펴보았다. Table 2에서 보는 바와 같이, 확인된 클론 모두에서 바이러스의 삽입이 확인되었으며, 바이러스의 삽입 부위 근처는 cystein과 guanine이 아주 높은 비율로 된 염기 서열임이 확인되었다(Table 2). 또한 바이러스의 염기서열을 살펴볼 때, 4가지의 클론들에서 상호 일치하는 서열을 가지지는 않았다.

## 고 찰

본 실험은 만성 B형 간염의 특징인, HBV에 대하여 혈액내의 세포성 면역은 정상적으로 가동하고 있는 반면에 HBV의 완전한 제지에 필요한 anti-HBs를 생산하는 체액성 면역기능의 결함에 착안을 하여 면역세포 안으로의 HBV 감염이 이루어지고, 체액성 면역에 관계하는 유전자가 바이러스 유전자의 삽입으로 인하여 비정상화 될 것이라는 가설을 수립하고 수행하였다.<sup>8,9)</sup>

하지만, 실험을 수행함에 있어서 바이러스의 유전자만을 인지하는 작업은 어렵지 않으나, 주위의 알려지지 않은 숙주세포의 유전자도 함께 탐색하는 실험법은 정론화 되어 있는 것이 없는 실정이다. 이러한 취약점을 극복하기 위한 방법으로 본 저자들은 새로운 방법을 모색하게 되었다. 먼저 적은 양의 DNA를 증폭시켜야만 한다는 것과 알 수 없는 숙주 유전자의 염기서열을 동시에 탐색해야만 한다는 점을 고려하여 three-step PCR을 고안하여 수행하였다.

본 실험에서 적용한 three-step PCR기법은, vector를 이용한 삽입 등의 과정이 전혀 필요로 하지 않고, 소량의 sample과 짧은 시간 내에 오로지 PCR만을 이용하여 바이러스의 삽입 부위를 탐색할

수 있는 아주 효율적인 방법이라 할 수 있다.

Three-step PCR을 수행함에 있어서, 좀 더 PCR 효율을 높이기 위하여 만성 B형 간염환자로부터 획득한 DNA에 여러 가지 제한효소를 처리하여 절단하였다. 이 단계에서 사용된 제한효소는 HBV 유전자는 절단하지 않는 효소만을 선택하여 처리하였다. 이러한 작업과정을 수행함으로써, 한 가지 primer만을 사용하는 첫 번째 PCR을 실시할 때 polymerase에 의한 DNA합성이 무제한으로 합성되는 가능성을 줄이는 것이었다.

Three-step PCR을 거쳐 제작된 최종의 산물을 검색한 결과, HBV의 삽입 부위는 cystein과 guanine이 아주 많은 빈도로 나타나는 염기서열이었음을 확인하였다. Cystein과 guanine이 풍부한 염기서열은 topoisomerase I과 많은 연관이 있음이 이미 보고된 바가 있다.<sup>18)</sup> Topoisomerase I은 HBV가 숙주 세포 유전자 안으로 삽입되는 과정에 함께 역할을 하는 것으로 이미 보고된 바가 있으며,<sup>19)</sup> 이러한 점은 본 실험에서 밝혀낸 결과와 일치되는 것이다.

또한 원형의 HBV 유전자가 숙주 세포 유전자로의 삽입 과정에 있어서, HBV 유전자의 정확한 절단과 함께 이루어지는 것은 아닌 듯하다. 최근 보고에 따르면 숙주 세포 유전자로 HBV 유전자가 삽입될 때 절단되는 부위는 direct repeat I (DR I) 염기서열 부근이라는 보고가 있었다.<sup>19)</sup> 이러한 점은 본 연구 결과와 부합하지만 정확한 절단 부위를 가지지는 않는 것으로 사료된다. 물론 만성 간염환자의 세포에서 DNA를 획득하여 실험재료로 사용하였기 때문에 돌연변이가 일어났을 경우도 배제할 수는 없다. 이러한 점은, 만성 간염환자의 경우 바이러스의 유전자뿐만이 아니라 숙주 유전자 염기서열 또한 많은 돌연변이가 유발된다는 보고가 다수 있음에 근거한 것이다.<sup>20-22)</sup>

Three-step PCR을 이용하여 실험을 실시해 본 결과, 13명의 만성 B형 간염환자의 말초혈액 단핵구 세포에서 획득한 DNA 중에서 3명의 환자에서 HBV 감염이 확인되었고, 바이러스의 삽입부위는 cystein과 guanine이 아주 풍부한 염기서열로 되어 있음을 확인하였으며, 이러한 점들은 간염 바이러스가 간세포에만 침투하는 것이 아니라 면역세포에도 관여를 할 수 있음을 보여주는 또 하나의 결과라고 할 수 있다.

결론적으로, three-step PCR기법은 소량의 검체에서도 목표 염기서열을 손쉽게 증폭 탐색할 수 있는 매우 효율적인 실험 기법임이 증명되었다.

### 감사의 글

본 연구는 과학기술부 국가지정연구실 지원사업으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

- 1) Krugman S, Overby LR, Mushahwar IK, Ling CM, Frosner GG, Deinhardt F. Viral hepatitis, type B studies on natural history and prevention re-examed. *N Engl J Med* 1979; 300: 101-106.
- 2) Seo JH, Kim KW, Park BC. Different protein-binding patterns in the P3 promoter region of the human insuline-like growth factor II gene in the human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma tissues. *J Kor Med Sci* 1998; 13: 171-178.
- 3) Kaneko S, Stephen M, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1930-1933.
- 4) Blum HE, Liang TJ, Galun E, Wands JR. Persistence of hepatitis B viral DNA after serological recovery from hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1991; 14: 56-63.
- 5) Mason A, Yoffe B, Noonan C. Hepatitis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis B after HBsAg clearance. *Hepatology* 1992; 16: 36-41.
- 6) Rogers M, Davis GL. Serology of acute and chronic type B hepatitis. *Dig Dis* 1989; 7: 255-264.
- 7) 서동진. 한국인 만성 B형 간질환에서의 Delta감염률. *대한내과학회지* 1985; 29: 57-61.
- 8) Trevian A, Realdi G, Alberti A, Ongaro G, Pomarò E, Meliconi R. Core-antigen specific immunoglobulin G bound to the liver cell membrane in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1982; 82: 218-222.
- 9) Hanson RG, Dusheiko GM, Hoofnagle JH. *In vitro* synthesis of antibody to hepatitis B virus antigens. In: Chisari FV, ed. *Advances in hepatitis research*. New York: Masson, 1984: 123-133.
- 10) Seo JH, Kim KW, Park BC. Detection of HBxAg in liver tissues in patients with chronic active hepatitis C. *Korean Gastroenterol* 1998; 31(5): 639-650.
- 11) Lee SW, Lee YM, Bae SK, Murakami S, Yun YD, Kim KW. Human hepatitis B Virus X protein is a Possible Mediator of Hypoxia-Induced Angiogenesis in hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268(2): 456-461.
- 12) Pontisso P, Poon MC, Tillais P, Brechot C. Detection of hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. *Br Med J* 1984; 288: 1563-1566.
- 13) Wong F-H, Liaw YF, Hu C, Chao Y, Chang C, Pao CC. Analysis on the status of hepatitis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol Hepatol* 1993; 8: S75-79.
- 14) Laure E, Zagury O, Saimot AG, Gallo RC, Hahn BH, Brechot C. Hepatitis B virus DNA sequences in lymphoid cells from patients with AIDS and AIDS-related complex. *Science* 1985; 229: 561-563.
- 15) Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77-89.
- 16) Yoffe B, Noonan CA, Melnick JL, Hollinger FB. Hepatitis B virus DNA in mononuclear cells and analysis of cell subsets for the presence of replication intermediates of viral DNA. *J Infect Dis* 1986; 153: 471-477.
- 17) Park JG, Lee JH, Kang MS, Park KJ, Jeon YM, Lee HJ, Kwon HS, Park HS, Yeo KS, Lee KU, et al. Characterization of cell lines established from human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1995; 62(3): 276-282.
- 18) Konopka AJ. Compilation of DNA strand exchange sites for non-homologous recombination in somatic cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1739-1758.
- 19) Wang HP, Rogler CE. Topoisomerase-I mediated integration of hepadnavirus DNA *in vitro*. *J Virol* 1991; 65(5): 2381-2392.
- 20) Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2: 588-591.
- 21) Lok ASF, Akarca U, Greene S. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4077-4081.
- 22) 조성원, 이문성, 김진홍, 심찬섭, 문인걸, 한인권. Anti-Hbe 양성 만성 간염환자에서 Pre-core 유전자의 돌연 변이형 간염 바이러스의 관찰. *대한소화기병학회지* 1992; 24: 293-299.