

뽕 추출물의 세포독성 및 자궁 경부암 바이러스 암 유발인자 E6와 E7의 작용에 미치는 효과

조영식 · 정 욱 · 조정원 · 이경애 · 심정현
김광수 · 이홍수 · 심기승* · 윤도영
생명공학연구소, *한국식품개발연구소

The Effects of Rhus Extracts on The Cytotoxicity on Cancer Cells and E6 and E7 Oncogenes of Human Papillomavirus Type 16

Young-Sik Cho, Ok Joung, Cheong-Weon Cho, Kyung-Ae Lee,
Jung-Hyun Shim, Kwang-Soo Kim, Hong-Soo Lee,
Ki-Seung Seung* and Do-Young Yoon
Cellular Biology Lab, Korea Res. Institute of Bioscience and Biotechnology,
*Korea Food Research Institute

Abstract

Cervical cancer has been one of the leading causes of female death from cancer worldwide with about 500,000 deaths per year. A strong association between certain human papillomaviruses (HPV types 16 and 18) and cervical cancer has been well known. An extract of natural products, Rhus, has been used to investigate whether this agent has the ability of inhibiting the oncogenes E6 and E7 of HPV type 16. This Rhus inhibited the proliferation of human cervical cancer cell lines (C-33A, SiHa, Caski) and HaCaT keratinocytes in a dose response manner. *In vitro* binding assay and ELISA showed that Rhus inhibited the *in vitro* binding of E6 and E6AP which are essential for the binding and degradation of the tumor suppressor p53. In addition, Rhus inhibited the *in vitro* binding of E7 and Rb which essential tumor suppressor for the control of cell cycle. The level of mRNA for E6 was also decreased by Rhus while that of E7 mRNA was not changed. Our data suggested that Rhus inhibited the oncogenicity of E6 and E7 of HPV 16 type, thus can be used as a putative anti-HPV agent for the treatment of cervical carcinomas by HPV.

Key words: Rhus, HPV, E6, E7, E6AP

서 론

신약, 신약본초, 본초강목 등에 의하면 뽕(*Rhus Veniciflua*)은 인간의 건강에 있어 여러가지 기능성 효능을 갖고 있는 것으로서 항암 효과와 여러가지 제반 질환에 도움을 주는 것으로 잘 알려져 있다. 뽕은 위장에서는 소화제가 되고 간에서는 어혈약이 되어 염증을 다스리며 심장에서는 청혈제가 되어 제반 혈액 순환을 용이하게 할 뿐 더러 기생충 제거제로 사용되

기도 하며 여성들의 통경약으로서도 사용되는 것으로 알려져 있다⁽¹⁾. 그러나 현재까지 뽕 중에서도 토산 참뽕나무의 전액은 색소를 영구히 보존함에 있어 가장 우수한 성능을 지녔으므로 사람 몸의 색소를 보존하고 부패를 방지하며 온갖 질병을 다스리는데도 역시 최고의 양약이 된다고 한다. 그러나 현재까지는 뽕의 항암효과, 특히 본 연구에서 연구할 내용인 자궁암에 미치는 연구는 아직까지 전무한 상태이다. 따라서 뽕나무의 알려지 반응을 억제하기 위해 뽕나무 추출물(Rhus-I)에 여러 가지 능 특산물을 포함한 생약재를 첨가한 뽕나무 추출물(Rhus-II)을 이용, 여성의 사망 원인 암 중에서 1위로 알려진 자궁 경부암 바이러스⁽²⁾인 파피로마바이러스 암 유발인자 E6와 E7의 작용기전에 미치는 효과에 관한 연구의 필요성이 점증하여

Corresponding author : Do-Young Yoon, Cellular Biology Lab,
Korea Res. Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon
305-600, Korea
Tel: 82-42-860-4218
Fax: 82-42-860-4593
E-mail : dyoon@mail.kribb.re.kr

왔다.

암 발생원인 중에서는 세포성 암유전자(예: c-myc, ras 등)⁽³⁻⁴⁾와 바이러스성 암 유전자들(예: EBV, HPV, HBV 등)이 발견되었고 이들 유전자나 유전자 변이들 그리고 암 발생과의 관련성 및 기작에 관한 많은 연구 논문들이 발표되어 왔다⁽⁵⁻⁷⁾. 나아가 암 억제 유전자(예: p53, pRB 등) 그리고 세포주기조절인자(예: cyclins, cyclin dependent kinases, p21, p16 등)⁽⁸⁾와 암유전자 관련 세포의 신호전달기전 관련인자들(예: protein tyrosine kinase dependent pathway 등)⁽⁹⁾이 발견되어 암 발생 기작에 대한 분자수준에서의 해석들이 점차 구체적으로 이루어지고 있다. 한편 인체에 발생하는 전체 암의 15~20%가 바이러스와 연관되어 있는 것으로 이미 밝혀져 있어 원인 바이러스를 분리하거나 분리된 바이러스의 DNA로부터 단백질을 만들어 내어 백신으로 사용하거나 진단법에 이용하는 연구가 이루어지고 있다. 이들에 관한 연구는 종양바이러스에 의해 유도되는 암의 발암기작을 연구할 수 있을 뿐만 아니라 아직까지 그 주요원인을 모르는 타종 암에 대하여도 많은 정보를 제공할 수 있을 것이다. 일례로 SV40바이러스의 large T antigen과 HPV E6 단백질은 p53 단백질의 기능을 억제하고 있음이 밝혀졌는데⁽¹⁰⁾ 정상적으로 p53을 나타내는 세포에 HPV E6 발현을 유도하면 세포종식이 촉진되고 있음이 밝혀졌다⁽¹¹⁾. p53 단백질은 대부분의 암 조직에서 유전자 돌연변이에 의해 발현이 안되거나 그 기능이 상실되어 있으며 암의 종류에 따라 돌연변이의 형태도 각기 다름이 알려졌다. 이와 같이 p53의 돌연변이나 기능 상실은 암 발생과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되나 p53의 tumor suppressor로서의 기능이 어떻게 이루어지는가에 대한 기작이 상세히 밝혀져 있지 않다. 또한 E7발암 유전자는 E2F와 결합하고 있는 Rb를 인산화시켜 E2F가 유리되도록 함은 E2F에 의한 세포주기가 활성화되어 정상세포가 암화 되는데 중요한 역할을 한다⁽¹²⁾.

본 연구에서는 여성들의 통경약으로도 사용되는 옷이 자궁 경부암 바이러스인 파필로마바이러스 암 유발인자 E6와 E7의 작용을 억제하는 효과를 확인하고 항 바이러스, 암 활성능의 기작을 이해하기 위하여 이들 추출물의 자궁암 세포주에 대한 세포독성과 암을 일으키는 바이러스 발암유전자 E6와 E7의 작용에 미치는 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

옷

옷은 두 종류로 제조하여 실험에 사용하였는데, Rhus-

I은 옷나무(*Rhus Veniciflua*)와 옷나무 껍질을 혼합하여 (50 : 50) 증탕기에 넣고 105°C, 압력 1.5 kg/cm²에서 5 시간 동안 추출한 생옷 Sample(옷나무 분쇄된 것 500 g 과 옷껍질 500 g을 삼베 자루에 넣고 증탕기에 물 50 L를 넣은 후 삼베자루의 옷나무와 옷껍질을 함께 추출)은 다른 생약재료를 사용하지 않은 생옷을 말하며, Rhus-II는 알리지성 옷 성분을 제거한 옷 추출물로서, 옷나무와 옷 껍질을 같은 비율로 넣은 것 1kg에 나머지 생약재(인삼, 은행, 녹차, 생강, 사인, 감초, 백복령, 등의 부재료) 600 g을 넣어 알리지성 옷 성분을 제거한 옷 추출물을 나타낸 것이다⁽¹⁾. Rhus-I과 Rhus-II는 추출물 형태로 200 mg/mL 농도로 사용하였다.

E6, E6AP, E7, Rb발현 대장균주

E6와 E6-AP 발현 벡터 제조: 본 실험에서 사용되는 E6와 E6-AP는 pGEX 및 pET 벡터에서 발현되도록 제조하였다. E6는 HPV 함유 자궁경부암 세포로부터 추출한 RNA로부터 5'-GCG GCC GCC ACC ATG TTT CAG GAC CAC AG-3'(sense) and 5'-CTG CGG CCG CGA TTA CAG CTG GGT TTT CTC T-3'(antisense)의 primer를 사용하여 역전사 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하여 증폭하였다. PCR 산물을 pBluescript II KS(+)로 제조된 T-vector⁽¹³⁾에 옮긴 후 이 E6 유전자를 다시 제한효소 *BamH* I 과 *Sal* I로 절단하고 똑같은 효소로 절단한 pGEX4T-1과 pET28a벡터로 연결하였다. 또한 E6-AP는 중간 부분이 중복되는 2종류의 primer set(5'-AGA TCT ATG AAG CGA GCA GCT GCA AAG CAT CTA ATA-3'과 5'-CTC TAG CCG GAC AAG TGC ATC ATC TAT GAT-3', 5'-AGC GAG CTG ACA CTT CAG GAA CTT TTG GGA-3'과 5'-TTA CAG CAT GCC AAA TCC TTT GGC ATA CGT-3')를 사용하여 앞에서와 같은 방법으로 RT-PCR로 증폭하였다. 이 증폭된 산물을 pGEX4T-1과 pET28a에서 발현하였다⁽¹⁴⁾.

E7와 Rb 발현벡터 제조: E7 단백질은 histidine결합과 GST결합형태로 제조되었다. HPV 함유 자궁 경부암 세포인 CaSki의 RNA로부터 다음과 같은 primer(5'-CAC CAT GGC ATG GCA TGG AGA TAC ACCT-3'과 5'-TTA TGG TTT CTG AGA ACA-3')를 사용하여 RT-PCR를 수행 증폭하였다. 이 증폭산물을 T-vector에 연결하고 다시 *BamH* I과 *Sal* I로 절단하여 E7 유전자를 얻는다. 이를 같은 제한효소로 절단한 pGEX4T-1과 pET28a에 각각 연결하여 E7을 발현시켰다. E7과 결합하는데 이용되는 Rb 단백질은 Dr. Cho, YJ(Korea Institute of Science and Technology, Seoul,

Korea)로 부터 제공 받았는데 이는 pET 벡터에서 제조되었으며 용해성과 안정성을 증가시키기 위한 pocket domain을 포함한 아미노산 373에서928에 이르는 짧은 단백질이다.

제조합 단백질 대량생산 및 bead 에 부착: pET/Rb, pGEX 발현 벡터는 *E. coli*(DH5 α), pET28a 발현 벡터는 BL21(Δ DE3)에 transformation시키고 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside(IPTG) 첨가하고 18°C에서 12시간동안 단백질을 유도하였다. 숙주세균을 원심분리하여 얻었고 pGEX 및 pET/Rb 발현대장균은 phosphate-buffered saline(0.5% Triton X-100, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)와 10 μ g/mL의 aprotinin 함유) PBST에 pET28 발현 대장균은 용해완충액(50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl)에 현탁시키고 초음파 파쇄를 실시하였다. 이를 원심분리하고 상등액만을 취하여 결합 반응에 사용하였다. GST/E6, GST/E7, GST/E6-AP는 PBS 완충용액으로 미리 평형화시킨 GSH bead에 결합시키고 같은 완충용액으로 씻어 주었다. 또한 pET28a/E6, pET28/E7 과 pET28/E6-AP의 경우 Ni-NTA bead에 결합시키고 20 mM imidazole이 포함된 완충용액으로 3번 씻어낸 후 결합반응을 실시하였다.

자궁경부암세포주의 세포독성에 미치는 효과

DMEM/10% FBS에 유지시킨 자궁경부암세포주 C-33A, CaSki, SiHa와 keratinocyte세포 HaCaT를 96 well plate에 1 \times 10⁵/well씩 넣은 후 1일 동안 CO₂ incubator에 배양하였다. 새로운 배지로 갈아준 후 여러가지 농도로 희석시킨 Rhus I과 II를 처리한 후 20 시간 후 WST-1(Roche Diagnostic GmbH, Germany) 10 μ L를 첨가하여 1-3시간 이내에 450 nm에서 흡광도를 ELISA reader(Molecular Device, CA)로 측정하였다.

Bead GST E6AP와 His E6의 결합에 미치는 Rhus의 영향

GSH bead(Glutathione Sepharose™/4B, Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden)는 1 \times PBS buffer로 치환하여 사용하였으며, GST/E6AP(3.4 mg/mL) 상등액 1 mL에 GSH bead 300 μ L을 결합시켜 이를 Bead GST/E6AP로 사용하였다. Bead GST/E6AP와 His E6의 결합은 total volume을 1,200 μ L로 하여 실시하였다. 즉 0.5% Triton X-100 PBS buffer(PBST) 950 μ L에 Bead GST/E6AP 50 μ L과 His E6(8.2 μ g/mL) 상등액 200 μ L를 넣어 cold room에서 circling하여 1시간 동안 결

합시켰으며, 6000 rpm에서 3분간 centrifuge하여 상등액을 제거 후 PBST를 1.2 mL 넣고 다시 cold room에서 5분간 세척하였다. 이 세척단계는 3번 반복하였다(단, 모든 bead down 6000 rpm, 3분). 3번의 세척단계가 끝나면 상등액을 완전히 제거 후 증류수 40 μ L와 5X SDS sample buffer 10 μ L을 넣어 SDS-PAGE sample을 제조하였다. Rhus는 1/6 dilution하여 첨가하였다. 즉 PBST 750 μ L에 Bead GST/E6AP 50 μ L, His E6 상등액 200 μ L, Rhus 200 μ L(100 μ g/mL)을 넣어 결합시켰으며 결합 과정과 SDS-PAGE sample 제조 방법은 대조구(Bead GST/E6AP과 His E6결합)와 동일하게 실시하였다. Sample은 10 μ L씩 loading 하여 25 mA로 전기영동 후 Coomassie blue로 염색하였으며, Western은 15 μ L씩 loading한 gel을 Immobilon-P membrane으로 transfer한 후 HPV 16-E6(N-17) antibody(goat polyclonal IgG, Santa Cruze Biotechnology, Santa Cruz, CA)을 1차 처리하고 Anti-goat IgG(H+L)- alkaline phosphatase(Sigma)를 2차처리하여 확인하였다.

꽃이 Bead GST E7과 pET/Rb 결합에 미치는 영향

Bead GST/E7의 제조에 사용된 Bead GSH는 전향복에서 제조한 Bead를 사용하였으며, GST/E7(13.9 mg/mL) 상등액 500 μ L에 GSH bead 500 μ L을 결합시켜 이를 Bead GST/E7으로 사용하였다. Bead GST/E7과 pET/Rb의 결합 Assay는 PBST를 Total Volum을 1200 μ L로 하여 Bead GST/E7은 각각 40 μ L, pET/Rb (6.9 mg/mL)는 100 μ L로 첨가하였으며, Rhus(100 μ g/mL)는 1/6로 dilution하여 즉 200 μ L를 첨가하여 결합시켰는데 결합 과정과 SDS-PAGE sample 제조 방법은 Yang 등⁽⁵⁾의 방법과 동일하게 실시하였다. 3번의 wash가 끝나면 상등액을 완전히 제거 후 증류수 50 μ L와 5 \times SDS sample buffer 12 μ L을 넣어 SDS-PAGE sample을 제조하였다. Sample은 10 μ L씩 loading 하여 25 mA로 전기영동 후 staining 하였으며, Western은 15 μ L씩 loading하여 전기영동을 실시한 gel을 Immobilon-P membrane으로 transfer한 후 anti-Rb antibody(Ab-6) (Oncogene, Cambridge, MA) (monoclonal mouse IgG, 100 μ g/mL)를 1차 처리하고 anti-mouse IgG(r-chain specific) alkaline phosphate conjugate(Sigma-Aldrich Chem. GmbH)를 2차 처리하여 확인하였다.

E6, E6AP 결합을 이용한 ELISA에 미치는 Rhus의 영향

E6AP를 Maxisorb 96-well plate에 4 μ g/mL로

coating한 후 PBS/3% skimmed milk로 2시간 동안 blocking하였다. PBST로 3번 세척 후 pET28a/E6 and pGEX/E6로부터 얻은 E6 상등액ematants를 PBS로 32 배 희석한 것을 100 μ L/well씩 넣어 1시간 실온에서 반응시켰다. E6AP에 결합한E6는 goat anti-E6(N-17) antibody와 horseradish phosphatase-conjugated anti-goat IgG(Sigma)를 계속 처리한 후 PBST로 세척하고 기질용액 [4 mg o-phenylenediamine, 5 μ L 37% H₂O₂ per 10 mL of 0.1 M citrate buffer, pH 5.1] 100 μ L를 넣고 반응시킨 후 2.5 N sulfuric acid로 반응을 정지시킨 후 490 nm에서 ELISA reader(Molecular Devices, Hercules, CA)로 측정하였다.

GST/E7, Rb 결합을 이용한 ELISA에 미치는 Rhus의 영향

6X His E7를 Maxisorb 96-well plate에 4 μ g/mL로 coating한 후 PBS/3% skimmed milk로 2시간 동안 blocking하였다. PBST로 3번 세척 후 pET28a/Rb 로부터 얻은 Rb 상등액ematants를 PBS로 8배 희석한 것을 100 μ L/well씩 넣어 1시간 실온에서 반응시켰다. E7에 결합한 Rb는 murine anti-E7 antibody와 horseradish phosphatase-conjugated anti-mouse IgG(Sigma)를 계속 처리한 후 PBST로 세척하고 기질용액 [4 mg o-phenylenediamine, 5 μ L 37% H₂O₂ per 10 mL of 0.1 M citrate buffer, pH 5.1] 100 μ L를 넣고 반응시킨 후 2.5 N sulfuric acid로 반응을 정지시킨 후 490 nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

Rhus에 의한 HPV E6, E7 oncogene의 mRNA level에 미치는 영향

DMEM/10% FBS에 유지시킨 HPV 16 genome을 지니고 있는 자궁경부암세포주 CaSki를 100 mm petridish에 5×10^5 /10 mL씩 넣은 후 1일 동안 CO₂ incubator에 배양하였다. 새로운 배지로 갈아준 후 800 배 농도로 희석시킨 Rhus I과 II를 처리한 20시간 후 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. E6 primers는 5'-GCGGCCCGCCACCATGTTTCAGGACCACAG-3'(sense), 5'-CTGCGGCCGCGATTACAGCTGGGT TTTCTCT-3'(antisense)와 같이 하였으며, E7 primers는 5'-GCGGCCCGCCACCATGGCATGGCATGGAGATACA CCT-3'(sense), 5'-AGGCGGCCGCGATTATGTTTCTGAGAACA-3'(antisense)로 하였다. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)은 RT-PCR kit (Stratagene)를 이용하여 수행하였다. 즉, cDNA는 50 μ L 반응액 [5 μ L 10X first-strand buffer, 1 μ L RNase

block ribonuclease inhibitor(40 U/ μ L), 2 μ L 100 mM dNTPs, 1 μ L MMLV-RT (50U/ μ L)]을 37°C에서 1시간 반응시켜 얻은 다음, primer와 함께 증합반응을 계속 시켜(30 cycles: 1 min at 95°C, 1 min at 57°C and 1 min 30 sec at 72°C) PCR products를 얻어 1% agarose gel로 확인하였다. β -actin primer는 다음과 같았다: 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3' (sense), 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'(antisense).

결과 및 고찰

자궁경부암세포주의 세포독성에 미치는 효과

자궁경부암 세포주 C-33A, Caski, SiHa와 HaCaT keratinocytes에 Rhus I, II를 희석배율 1000배 까지 처리한 결과 Caski 세포주에서 800배부터 가장 민감한 세포독성을 보여 세포의 성장이 급격하게 감소하는 것을 볼 수 있었다. 자궁경부암 세포주 중에서도 HPV가 아닌 다른 원인에 의해 암 세포화된 C-33A의 경우

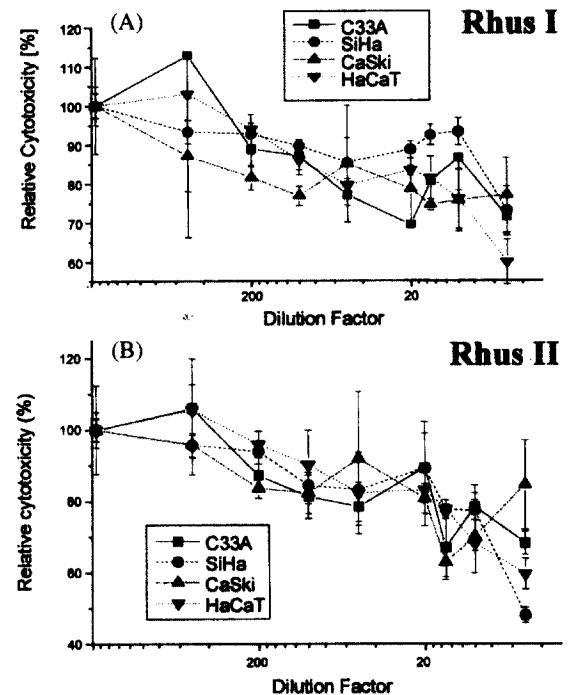


Fig. 1. The cytotoxicity of Rhus I (A) and Rhus II (B) on cervical carcinomas and HaCaT.

Cells seeded at a density of 1×10^4 on 96 well were treated with either Rhus I and Rhus II diluted serially. Twenty four hrs after incubation, cytotoxic effects of Rhus I and Rhus II were determined by WST-1 reagent as described in Materials and Methods.

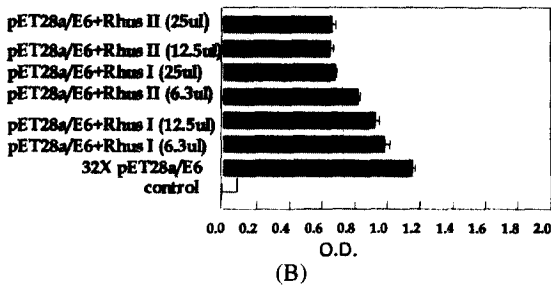


Fig. 2. The effect of Rhus- I and Rhus- II on the *in vitro* bindings of E6AP and E6 (A) and ELISA based on the binding of E6 and E6AP (B).

(A) Either Rhus-I or Rhus-II was incubated with the binding mixture containing E6 and bead-immobilized E6-AP in binding buffer. To investigate the inhibitory effect of Rhus-I and Rhus-II, E6 bound to E6AP was determined by immunoblot assay using antibody which specifically recognized E6. lane1, His E6 1/10 input; lane 2, His E6 extract, 200 μ L; lanes 3-4, His-E6 extract, 200 μ L along with either Rhus I or Rhus II diluted ; lane 5, Marker. (B) For ELISA, E6AP was coated on the 96 well plates overnight and blocked with 3% milk in PBS for 2 hr at room temperature. Serial dilutions of E6 lysates were incubated for 1 hr, followed by anti-E6 antibody and secondary IgG-HRP. The bound enzyme was detected by using ELISA reader after adding substrate.

800배에서도 세포독성이 나타나지 않았으나 500배 이상의 농도에서는 모든 세포주들의 성장이 거의 멈추어 졌다(Fig. 1). Rhus II 에 비해 Rhus I의 세포독성이 강했고 HPV 유전자를 60-600 copy를 내포하고있는 CaSki 세포주에서 가장 두드러졌다. Rhus I의 세포독성은 CaSki, SiHa, HaCaT, C-33A 순으로 영향을 받았다. 이와 같은 결과는 간암 유래 세포인 HepG2 cell 에 있어 Rhus I과 II를 0.5 mg/well 첨가시 약 80%의 간암세포 성장억제 효과가 있었으며, 대장암 유래세포인 WiDr에서는 0.2 mg/well 첨가시 50-70%의 대장암 성장억제 효과가 있었다고 보고한 바와 유사했다⁽¹⁵⁾. 또한 한국산 울나무의 수액에서 추출한 울의 주성분인 urushiols이 4 μ g/mL의 농도에서 50%의 성장을 억제하고 세포 특이적으로 작용한다⁽¹⁵⁻¹⁶⁾. HPV type 16 과 18의 E6/E7은 human genital keratinocytes 의 효율

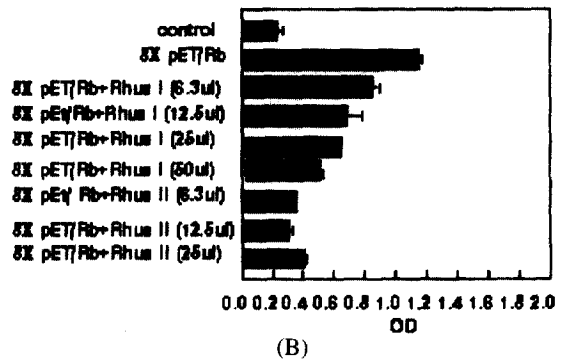


Fig. 3. The effect of Rhus-I and Rhus-II on the *in vitro* binding of GST/E7 and Rb (A), and ELISA based on the binding of Rb to E7 (B).

(A) Either Rhus-I or Rhus-II diluted 1/6 was incubated with the binding mixture containing Rb and bead-immobilized E7 in the binding buffer. To investigate the inhibitory effect of Rhus-I and Rhus-II, -E7-bound Rb was determined by immunoblot assay using antibody which specifically recognize Rb. Lane 1, Rb 1/10 input; lane 2, Rb, 200 μ L; lane 3-4, Rb, 200 μ L along with either Rhus I or Rhus II diluted. Either Rhus I or Rhus II was incubated with binding mixture, respectively; 5 lane 5, Marker. (B) For ELISA, E7 was coated on the 96 well plates overnight and blocked with 3% milk in PBS for 2 hr at room temperature. Serial dilutions of Rb lysates were incubated for 1 hr, followed by anti-Rb antibody and secondary IgG-HRP. The bound enzyme was detected by using ELISA reader after adding substrate.

적인 immortalization에 밀접한 관련이 있다⁽¹⁷⁾. Fig. 1 에서 보듯이 HPV 양성 세포주에 Rhus의 효과가 가장 높았기 때문에 HPV의 2개의 발암유전자인 E6 및 E7 와 세포 내의 단백질 즉 E6-AP 및 Rb의 결합 및 그들의 발현 조절에 Rhus가 미치는 영향을 조사했다.

Rhus가 E6AP와 E6의 결합에 미치는 영향

Rhus가 E6AP와 E6의 결합에 미치는 영향을 보기위해 *in vitro* 결합과 ELISA를 수행한 결과 Rhus가 E6AP와 E6의 결합을 농도 의존적으로 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). Fig. 2에 나타난 Western 결과

(A)는 Rhus I과 II를 전체농도의 약 16.7%를 첨가 하고 E6AP와 E6를 *in vitro* 결합 시켰을 때 유의적으로 억제함을 나타낸다. ELISA에서도 *in vitro* 결합의 결과와 마찬가지로 총 150 μ L중 Rhus I과 II를 25 μ L(약 16.7%)를 첨가하였을 때 억제효과를 나타내었다. 한편 한가지 Rhus I과 Rhus II끼리 비교하였을 때 *in vitro* 결합과 ELISA에서 동일하게 Rhus II가 더욱 현저한 효과를 나타내었다는 것인데 Rhus II가 알러지성 물질을 제거한 것이라는 것은 더욱 더 흥미롭고 긍정적인 결과라 생각된다.

Rhus가 E7과 Rb의 결합에 미치는 영향

Rhus가 E7과 Rb의 결합에 미치는 영향을 보기위해 *in vitro* 결합과 ELISA를 수행한 결과 Rhus가 E7과 Rb의 결합을 농도 의존적으로 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). Fig. 3의 A에서 볼 수 있듯이 *in vitro* 결합에서는 Rhus를 1.25%(15 μ L) 이상 첨가 하였을 때 확실한 억제효과를 나타내었고, B의 ELISA에서는 *in vitro* 결합처럼 확실한 억제효과를 나타낸 것은 아니지만 유의성 있는 억제효과를 볼 수 있었다. 또한 Rhus I과 Rhus II끼리 비교하였을 때 *in vitro* 결합과 ELISA에서 동일하게 Rhus II가 억제효과를 나타내었는데 E6AP와 His E6의 *in vitro* 결합과 ELISA보다는 약하지만 결합 억제효과를 나타내었다. Rhus의 자궁 경부암의 독성 및 E7의 결합능을 억제하는 정확한 기작은 알려지지 않았다. E6 단백질은 Cys-X2-Cys-X29-Cys-X2-Cys zinc-finger 구조를 가지고 있고 이구조의 유지 는 이 단백질의 기능에 필수적이다. 최근에 이 구조로부터 결합된 Zn를 방출하거나 결합부위를 불활성화 시킴으로써 E6를 대상으로 하는 새로운 항암제를 검색하는 방법이 시도되었다⁽¹⁸⁾. E7단백질도 E6와 같이 Zn-finger 구조를 가지고 있어 Rhus가 Zn-finger구조로부터 Zn를 방출하거나 구조를 불활성 할 수도 있을 것이라 추정할 수 있다. 그러나 Rhus의 화학적 구조라든지 작용은 아직 보고된 바 없어 억제효과의 기전은 앞으로 더 연구해야 할 과제이다.

Rhus가 HPV oncogene E6, E7 mRNA level에 미치는 영향

Rhus가 E6, E7 mRNA에 미치는 영향을 보기위해 RT-PCR을 수행한 결과 Rhus가 HPV oncogene인 E6와 E7의 mRNA를 저해하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). Fig. 4로 CaSki Cells에서도 800배로 Rhus를 처리 하였을 때 mRNA level이 저해됨을 확인할 수 있었다. 결론적으로 옷(Rhus)은 E6의 전사를 감소시키고 또한

Fig. 4. The effect of Rhus on the expression level of HPV E6 (A) and E7 (B) mRNA in cervical carcinoma CaSki cells.

Cells at a confluence of 80% were treated with Rhus I diluted 1:20 and Rhus II diluted 1:10 and 1:20. 18 hr after incubation, total RNAs was extracted from CaSki cells and their expression levels of E6 and E7 were examined by RT-PCR using specific primer for E6 or E7 as described in Materials and Methods.

E6-E6AP 및 E7-Rb 결합반응을 방해함으로써 세포의 불멸화에 필요한 세포내의 단백질의 변화를 억제함으로써 HPV 양성인 자궁경부암 세포에 특이적으로 독성을 나타낼 수 있다. 옷에 어떤 성분이 또 어떤 인자가 이런 기작을 일으키는지에 관한 체계적이고 과학적인 연구는 아직 시행되고 있지 아니하다. 최근 임목옥종연구소의 연구결과에 의하면 옷나무는 열처리해 얻은 화철의 주요 성분인 urushiol로부터 흰쥐 유래 혈액암세포, 인체유래 폐암세포 및 위암세포의 성장을 억제하는 효과가 뛰어난 MU2라는 성분을 분리하였다고 보고하였다. 또한 이 성분은 알러지를 일으키지 않을 뿐 아니라 항암 효과 이외에도 강한 항산화 작용 및 숙취해소기능을 가지는 약제로서의 가능성이 크다고 보고하였다⁽¹⁶⁾. 이런 결과로 보아 urushiol의 활성을 억제한 Rhus II에는 E6 발암유전자의 작용을 억제하는 항암 효과성분이 들어 있는 것으로 사료되며, 이들 항암 성분의 분리 정제 및 임상시험이 더욱 요구된다.

요 약

자궁 경부암은 매년 약 50만명 정도씩 사망하는 여성의 치명적인 사망원인의 하나이다. 인두유종 바이러스(HPV) 16형 및 18형과 자궁 경부암과의 긴밀한 관련성은 잘 알려져 있다. 옷 추출물 Rhus가 HPV 16형의 E6, E7 발암 유전자를 억제하는지 여부를 측정하

였다. 이 Rhus는 자궁 경부암 세포주(C-33A, SiHa, Caski)와 HaCaT keratinocytes의 분열은 농도 의존적으로 억제하였다. *In vitro* binding assay와 효소면역측정법에 의하면 Rhus가 암 억제인자인 p53과 결합하여 분해 시키는데 필수적인 E6와 E6AP와의 결합을 억제할 뿐더러 암 억제인자 Rb와 E7과의 결합을 억제하였다. RT-PCR에 의하면 Rhus에 의해 E6 mRNA의 level이 감소하였으나 E7 mRNA는 변하지 않았음을 보여주었다. 이들 결과에 의하면 Rhus가 HPV 16형의 E6와 E7의 발암성을 억제함을 보여 주므로 HPV에 의해 유도된 자궁 경부암의 치료에 유효할 것으로 사료되어 좀 더 자세한 *in vitro* 실험 등이 요구된다.

문 헌

- Lee, S.J. ToehaeBonchogangmok, Komoonsa, Seoul (1987).
- Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J.C. and Howley, P.M. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 5523-5527 (1991).
- Isfort, R.J., Codyk, D.B., Lovell, G. and Doersen, C.J. Analysis of oncogenes, tumor suppressor genes, auto-crine growth-factor production, and differentiation state of human osteosarcoma cell lines. *Mol. Carcinog.* 14: 170-178 (1995).
- Yang, X., Nakao, Y., Pater, M.M., Tang, S.C. and Pater, A. Expression of cellular genes in HPV16-immortalized and cigarette smoke condensate-transformed human endocervical cells. *J Cell Biochem.* 66: 309-321 (1977).
- Yang, X., Sham, J.S., Ng, M.H., Tsao, S.W., Zhang, D. and Cao, L. LMP1 of epstein-barr virus induces proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts and cooperatively transforms the cells with a p16-insensitive CDK4 oncogene. *J Virol.* 74: 883-891 (2000).
- Garbe, J., Wong, M., Wigington, D., Yaswen, P. and Stampfer, M.R. Viral oncogenes accelerate conversion to immortality of cultured conditionally immortal human mammary epithelial cells. *Oncogene* 18: 2169-2180 (1999).
- Henkler, F.F. and Koshy, R. Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis. *J Viral Hepat.* 3: 109-121 (1996).
- Shackney, S.E. and Shankey, T.V. Cell cycle models for molecular biology and molecular oncology: exploring new dimensions. *Cytometry* 35: 97-116 (1999).
- Reddy, K.B., Keshamouni, V.G. and Chen, Y.Q. The level of tyrosine kinase activity regulates the expression of p21/WAF1 in cancer cells. *Int J Oncol.* 15: 301-306 (1999).
- Tommasino, M. and Crawford, L. Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. *Bioessays* 17: 509-518 (1995).
- Woodworth, C.D., Cheng, S., Simpson, S., Hamacher, L., Chow, L.T., Broker, T.R. and DiPaolo, J.A. Recombinant retroviruses encoding human papillomavirus type 18 E6 and E7 genes stimulate proliferation and delay differentiation of human keratinocytes early after infection. *Oncogene* 7: 619-626 (1992).
- Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K. and Harlow, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-7 (1989).
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. and Collins, F.S. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 19: 1154 (1990).
- Cho, Y.S., Cho, C.W., Joung, O., Lee, K.A., Shim, J.H., Park, S.N. and Yoon, D.Y. Development of screening system for drugs against human papillomavirus-associated cervical cancer: based on E6-E6AP binding. *Antiviral Res* 47: 199-206 (2000).
- Seong, K.S., Yoon, C.S., Kim, Y.J., Han, C.K., Kim, Y.B., Ha, T.Y. and Jee, J.R. A Study on the development of fast foods on Rhus-Chicken and Rhus-Duck. Ministry of Agriculture and Forestry, p4-42 (1998).
- Hong, D.H., Han, S.B., Lee, C.W., Park, S.H., Jeon, Y.J., Kim, M.J., Kwak, S.S. and Kim, H.M. Cytotoxicity of urushiols isolated from sap of Korean lacquer tree. *Arch Pharm Res.* 22: 638-641 (1999).
- Pei, X.F. The human papillomavirus E6/E7 genes induce discordant changes in the expression of cell growth regulatory proteins. *Carcinogenesis* 17: 1395-1041 (1996).
- Beerheide, W., Bernard, H.W., Tan, Y.J., Ganesan, A., Rice, W.G. and Ting, A.E. Potential Drugs Against Cervical Cancer: Zinc-Ejecting Inhibitors of the Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 1211-1220, (1999).

(2000년 2월 29일 접수)