

삼백초 추출물의 자궁경부암세포 억제 효능

정연구 · 이해숙 · 이경애 · 정 옥 · 오원근 · 김광동 · 임종석 ·

문자영* · 조용권* · 박순희** · 윤도영#

한국생명공학연구원 세포생물학연구소, *창원대학교 보건 · 생화학과,

**한국식품의약품안전청 바이러스제제과

(Received May 30, 2002; Revised October 22, 2002)

The Efficacy of *Saururus chinensis* on Cervical Cancer Cells : The Inhibitory Effect on the Function of E6 and E7 Oncogenes of HPV Type 16

Yeon-Gu Chung, HaeSook Lee, Kyung-Ae Lee, Ok Joung, Won-Keun Oh, Kwang Dong Kim, Jong-Seok Lim, Ja-Young Moon*, Yong-Kweon Cho*, Sue-Nie Park** and Do-Young Yoon#

Laboratory of cell Biology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yuseong, P. O. Box 115, Taejeon 305-600, Korea

*Department of Biochem. and Health Science, Changwon National University, Sarim 9, Changwon 641-773, Korea.

**Department of Viral products, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea.

Abstract — Cervical cancer is one of the leading causes of female death from cancer worldwide with about 500,000 deaths per year. A strong association between certain human papilloma viruses (HPV type 16 and 18) and cervical cancer has been well known. An extract of *Saururus chinensis*, named as PE-46, has been used to investigate whether this agent has the ability of inhibiting the oncogenes E6 and E7 of HPV type 16. PE-46 inhibited the proliferation of human cervical cancer cell lines in a dose response manner. PE-46 also inhibited the *in vitro* binding of E6 and E6AP which are essential for the binding and degradation of the tumor suppressor p53. In addition, PE-46 inhibited the *in vitro* binding of E7 and Rb which is essential tumor suppressor for the control of cell cycle. The levels of mRNA for E6 and E7 were also decreased by PE-46. SiHa cells treated with PE-46 induced G0/G1 arrest, resulting in inhibition of growth. Our study showed that the PE-46 can inhibit the cervical carcinomas via both inhibition of bindings between oncogenes and tumor suppressors, and inhibition of G1 → S transition. PE-46 inhibited the oncogenicity of E6 and E7 of HPV 16 type, thus could be used as a putative modulating agent for the treatment of cervical carcinomas caused by HPV.

Keywords □ *Saururus Chinensis*, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), E6 and E7 oncogene

삼백초 (*Saururus chinensis*, 산림청 지정 제주도 특산 식물 제 177호)는 삼백초과 (saururaceae)에 속하는 다년생 초본으로 높이가 50~100cm이고, 뿌리에는 털이 났으며 줄기는 털이 없고 곧다. 잎은 홀잎이며 모양은 끝이 뾰족한 계란모양이다. 습지나 물가에 잘 자라고, 초여름에 잎이 파랗게 자라다가 꽃덜 잎 3개가 하얗게 변했다가 다시 초록색으로 되돌아오는 특이한 식물로 아주 강인하게 자라고 병충해가 없는 깨끗한 식물이다.^{1,2)} 삼백초는 예로부터 다양한 약효를 가지고 민간 약으로 널리 사용되어 왔으며 특히 부종, 이뇨, 소중, 해독, 등에 효과가 있는 것으로

알려져 있으며,^{3,4)} 최근 간 보호 작용,^{5,6)} 항암,⁷⁾ 진통작용⁸⁾ 및 뇌신경 세포 손상에 방어효과⁹⁾ 있는 것으로 보고되고 있다. 이와 같이 다양한 효과가 있는 것으로 알려진 삼백초는 현재 제주도에서 대량 재배되고 있다.

본 연구에는 식물추출물 (이하 *Saururus chinensis*, 일명: 삼백초)을 이용, 매년 여성의 사망 원인 암 중에서 1, 2위로 알려진 자궁경부암 바이러스¹⁰⁾인 파필로마바이러스 암유발인자 E6와 E7의 작용기전에 미치는 효과를 연구하였다. 암 발생원인 중에서는 세포성 암 유전자들 (예: c-myc, ras 등)^{11,12)}과 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.¹³⁻¹⁵⁾ 나아가 암 억제 유전자(예: p53, pRb 등)¹⁶⁾ 그리고 세포주기조절인자 (예: cyclins,

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-860-4218 (팩스) 042-860-4593
(E-mail) dyoon@kribb.re.kr

cyclin dependent kinases, p21, p16 등)와 암 유전자 관련 세포의 신호전달기전 관련인자들 (예: protein tyrosine kinase dependent pathway 등)¹⁷⁾이 발견되어 암 발생 기작에 대한 분자수준에서의 해석들이 점차 구체적으로 이루어지고 있다. 한편 인체에서 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 발암 기작을 연구할 수 있을 뿐만 아니라 아직까지 주요 원인이 밝혀지지 않은 타종 암에 대해 많은 정보를 제공할 수 있을 것이다. 일례로 SV40 바이러스의 large T antigen과 HPV E6 단백질은 p53 단백질의 기능을 억제하고 있음이 밝혀졌는데¹⁸⁾ 정상적으로 p53을 나타내는 세포에 HPV E6 발현을 유도하면 세포중식이 촉진되고 있음이 밝혀졌다.¹⁹⁾ 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 E7 발암 유전자는 E2F와 결합하고 있는 Rb를 인산화시켜 E2F가 유리되도록 함은 E2F에 의한 세포주기가 활성화되어 정상세포가 암화 되는데 중요한 역할을 한다.²⁰⁾ 본 연구에서는 삼백초 추출물 (*Saururus chinensis*)이 자궁경부암 바이러스인 파필로마 바이러스 암 유발인자 E6와 E7의 작용을 억제하는 효과를 확인하고 항 바이러스, 항암활성효과의 기작을 이해하기 위하여 이들 추출물의 자궁암 세포주에 대한 세포독성과 암을 일으키는 바이러스 발암유전자 E6와 E7의 작용에 미치는 효과를 조사하였다.

실험방법

***Saururus chinensis* - MeOH 삼백초 추출물(20 mg/ml)**은 한국생명공학연구원 부설 한국식물추출물은행에서 구입하여 실험에 이용하였다.

E6와 E6AP 발현 벡터 제조 - 본 실험에서 사용되는 E6와 E6AP는 pGEX 및 pET28a 벡터에서 발현되도록 제조하였다. E6는 HIV 함유 자궁경부암 세포로부터 추출한 RNA로부터 5'-GCG GCC ACC ATG TTT CAG GAC CAC AG-3'(sense) 와 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 산물은 pBluescript II KS(+)로 제조된 T-vector²¹⁾에 옮긴 후 이 E6 유전자를 다시 제한효소 *Bam*H I과 *Sal* I으로 절단하고 똑같은 효소로 절단한

pGEX4T-1과 pET28a 벡터에 연결하였다. 또한 E6AP는 가운데 부분이 중복되는 2 종류의 primer (5'-AGA TCT ATG AAG CGA GCA GCT GCA AA GCA TCT AAT A-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 산물은 cloning 벡터인 PCR[®] 2.1-TOPO에 연결하고 *Bgl* II와 *Eco*R I으로 절단한 다음, *Bam*H I과 *Eco*R I으로 절단한 pGEX4T-1에 cloning하였다. Histidine이 결합된 E6AP를 발현하기 위해 TOPO/E6AP를 *Bgl* II와 *Hind* III로 절단하고 pET28은 *Bam*H I과 *Hind* III로 절단하여 ligase로 조합하였다.²²⁾

E7과 Rb 발현 벡터 제조 - E7 단백질은 histidine결합과 GST 결합형태로 제조되었다. HPV 함유 자궁경부암 세포인 CaSki의 RNA로부터 다음과 같은 primer (5'-CAC CAT GGC ATG GCA TGG AGA TAC ACC T-3'과 5'-TTA TGG TTT CTG AGA ACA-3')를 사용하여 RT-PCR을 수행 증폭하였다. 이 증폭산물을 T-vector에 연결하고 다시 *Bam*H I과 *Sal* I으로 절단하여 E7 유전자를 획득하였다. 이를 같은 제한효소로 절단한 pGEX4T-1과 pET28a에 각각 연결하여 E7을 발현시켰다. E7과 결합하는데 이용되는 Rb 단백질은 pET 벡터에서 제조되었으며 용해성과 안정성을 증가시키기 위한 pocket domain을 포함한 아미노산 373에서 928에 이르는 N-말단이 제거된 짧은 단백질이다.²³⁾

제조합 단백질 대량생산 - pET/Rb 발현 벡터가 들어간 *E. coli* (DH5 α)와, pET28a/E6, pET28a/E7와 pET28a/E6AP가 들어간 *E. coli* (DE3)를 대량 배양하여 1 mM isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG)가 되게 첨가한 후 18°C에서 12 시간 동안 단백질을 유도하였다. 숙주세균은 원심분리하여 얻었고, 발현 대장균은 pH 8.0의 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole로 구성된 용해완충용액 (0.5 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride 과 10 μ g/ml의 aprotinin 함유)에 용해시키고 초음파 파쇄를 실시하였다. 이를 원심분리하고 상액만을 취하여 결합 반응에 사용하였다.

자궁경부암 세포주의 세포독성 - DMEM/10% FBS에 유지시킨 자궁경부암 세포주 C-33A, CaSki, SiHa와 keratinocyte세포 HaCaT을 96 well plate에 1 \times 10⁴/well씩 넣은 후 1 일 동안 CO₂ incubator에 배양하였다. 새로운 배지로 갈아주고 여러 가지 농도로 희석시킨 *Saururus chinensis*를 처리한 다음 24 시간 후 WST-1 reagent (Roche, Germany) 10 μ l를 첨가하여 1-3 시간 이내에 450-650 nm에서 흡광도를 ELISA reader (Molecular Device, CA)로 측정하였다.

ELISA를 이용한 E6-E6AP, E7-Rb binding assay - 분리 정제한 E6AP와 E7을 각각 다른 Maxisorb 96-well plate에 각각 10 μ g/ml과 4 μ g/ml로 coating한 후 PBS/3% skimmed milk로

2 시간 동안 blocking 하였다. PBST (phosphate-buffered saline 에 0.05% Tween 20)로 3 번 세척 후 PBST에 10 배 희석한 E6 lysate는 E6AP coating well에, PBST에 16 배 희석한 Rb lysate는 E7 coating well에 넣고, *Saururus chinensis*를 3.15, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 씩 되게 넣은 후 1 시간 실온에서 반응시켰다. E6AP에 결합한 E6는 mouse anti-E6 antibody 와 horseradish phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma) 를 처리하였고, E7에 결합한 Rb는 mouse anti-Rb antibody (Ab-6) (Oncogene) 와 horseradish phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma)를 처리하였다. 반응 후 PBST로 세척하고 기질용액 (4 mg o-phenylene-diamine, 5 μg 37% H_2O_2 per 10 ml of 0.1 M Citrate buffer, pH 5.0) 100 μl 를 넣고 5-10 분 반응시키고, 2.5 N sulfuric acid로 반응을 정지시킨 후 490 nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

***Saururus chinensis* 추출물 PE-46에 의한 HPV E6, E7 oncogene의 mRNA 발현에 미치는 영향** - DMEM/10% FBS에 유지시킨 HPV 16 genome을 지니고 있는 자궁경부암 세포주 SiHa를 100 mm petri dish에 $5 \times 10^5/10$ ml씩 넣은 후 1 일 동안 CO_2 incubator에 배양하였다. 새로운 배지로 갈아준 후 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석시킨 *Saururus chinensis*를 처리하고 20시간 후 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. E6 primers; 5'-GCG GCC GCC ACC ATG TTT CAG GAC CAC AG-3' (sense), 5'-CTG CGG CCG CGA TTA CAG CTG GGT TTT CTCT-3' (antisense), E7 primers; 5'-GCG GCC GCC ACC ATG GCA TGG CAT GGA GAT ACA CCT-3' (sense), 5'-AGG CGG CCG CGA TTA TGG TTT CTG AGA ACA-3' (antisense). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)은 RT-PCR kit (Stratagene)를 이용하여 수행하였다. 즉, cDNA는 25 μl 반응액 [2.5 μl 10X first-strand buffer, 2 μl 100 mM dNTPs, 0.15 μl MMLV-RT (50 U/l), 2 μl RNA, 16.35 μl 증류수]을 37°C에서 1 시간 반응시켜 얻은 다음, primer 와 함께 중합반응을 계속시켜 (94°C에 1 분, 60°C에 1 분, 그리고 72°C에서 1 분 30 초 반응을 30 번 반복) PCR products를 얻어 1% agarose gel로 확인하였다. 동량의 RNA 사용 여부를 확인하기 위해, house keeping gene인 GAPDH을 측정하고자 GAPDH primer를 다음과 같이 사용하였다; 5'-AGA ACA TCA CAT CAG GAT TCC TAGG-3' (sense), 5'-CTA GTA TGC CCT GAG CCT GAG-3' (antisense).

***Saururus chinensis* 추출물 PE-46에 의한 p53 tumor suppressor의 mRNA 및 단백질의 발현에 미치는 영향** - 전 항에서 기술한 바와 같이 PE-46을 처리한 SiHa 세포에서 total RNA 및 단백질을 추출하여 RT-PCR 및 Western blot을 수행하였다. p53 primers; 5'-CGT-GAG-CGC-TTC-GAG-ATG-TTC-C-3' (sense), 5'-TGG-GAA-GGG-ACA-GAA-GAT-GAC-AGG-3'

(antisense). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)은 RT-PCR kit (Stratagene)를 이용, 전 항에서 기술한 바와 같이 동일하게 수행하였다. p53 발현 단백질을 측정하기 위해, PE-46을 처리한 SiHa 세포에서 단백질을 추출한 후, 12% SDS-PAGE로 전기영동한 후, PVDF membrane으로 transfer하였다. 3% skimmed milk를 함유한 PBS로 1: 500 배 희석시킨 p53특이항체 (monoclonal anti-p53 antibody, Ab-6, Oncogene, Boston, MA)를 1 시간 처리한 후 0.05% Tween-20을 함유한 PBS (PBST)로 3 번 세척한 후 anti mouse IgG-Alkaline phosphatase conjugate (Sigma, St. Louis, MI)를 45 분 반응시켰다. PBST로 충분히 3 번 세척한 후, 발색시약 NBT/BCIP (Bio Rad Lab)를 넣어 발색시켰다.

***Saururus chinensis* 추출물 PE-46가 cell cycle에 미치는 영향** - DMEM/10% FBS에 유지시킨 HPV 16 genome을 지니고 있는 자궁경부암 세포주 SiHa를 100 mm petri dish에 $5 \times 10^5/10$ ml씩 넣은 후 1 일 동안 CO_2 incubator에 배양하였다. 새로운 배지로 갈아준 후 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 *Saururus chinensis*를 처리한 다음 24 시간 후 trypsin을 처리하여 세포를 수확하였다. 수확한 세포를 PBS (phosphate-buffered saline)로 2번 세척하고 70% EtOH 1 ml로 -20°C 에서 12 시간 고정하고 난 후 PBS로 2 번 세척하였다. 세포주기 분포는 PI (propidium iodide)로 DNA를 염색한 후 FACS 분석을 사용하여 DNA content를 측정하였다.

실험결과 및 고찰

자궁경부암 세포주의 세포독성 - 자궁경부암 세포주 C-33A, CaSki, SiHa와 keratinocyte세포 HaCaT에 *Saururus chinensis*를 농도별 800 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 결과 CaSki 와 SiHa 에서는 농도 의존적으로 민감한 세포독성을 보여 세포의 성장이 현저하게 감소하는 것을 볼 수 있었다. 자궁경부암 세포주 중에서도 HPV가 아닌 다른 원인에 의해 암세포화된 C-33A 와 keratinocyte HaCaT 에서는 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1). 이는 *Saururus chinensis*에 존재하는 특이인자가 HPV virus genome을 지니고 있는 CaSki 와 SiHa cell의 성장을 억제하는 것으로 생각된다. HPV type 16과 18의 E6/E7은 human genital keratinocyte의 효율적인 불멸화 (immortalization)와 밀접한 관련이 있다.²⁴⁾ Fig. 1에서 보듯이 HPV 양성 세포주에 *Saururus chinensis*의 효과가 가장 높았기 때문에 HPV의 2개의 발암유전자인 E6와 E7의 세포내 단백질, 즉 E6AP 및 Rb의 결합 및 그들의 발현 조절에 미치는 영향을 조사했다 (Fig. 1).

***Saururus chinensis* 추출물 PE-46가 E6AP와 E6의 binding에 미치는 영향** - *Saururus chinensis*가 E6AP와 E6의 결합에 미치는 영향을 보기 위해 ELISA를 수행한 결과 *Saururus chinensis*가 E6AP와 E6의 결합을 농도 의존

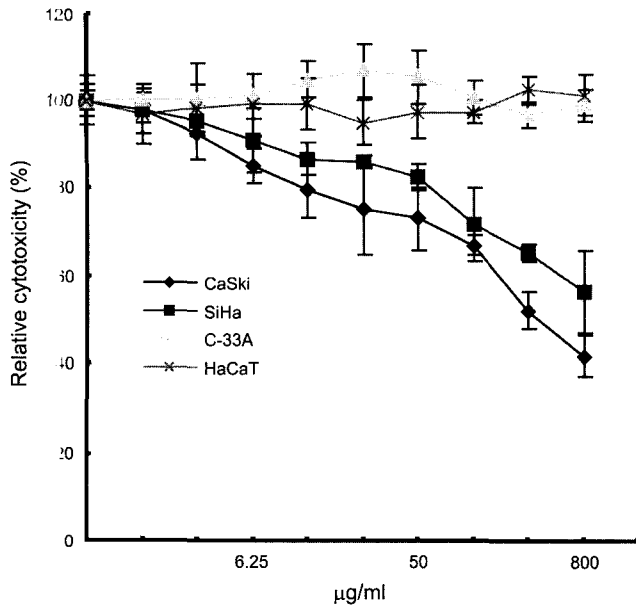


Fig. 1 – The cytotoxic effect of *Saururus chinensis* (PE-46) on cervical carcinomas and HaCaT keratinocyte cells. Cells seeded at a density of 1×10^5 on 96-well were treated with either *Saururus chinensis* extracts at the given dilution factors in final volume of 100 μ l DMEM media and were then allowed to incubate for 24 hrs. The cytotoxicity of *Saururus chinensis* was determined by WST-1 reagent as described in Materials and Method, and expressed as relative percentage to untreated control.

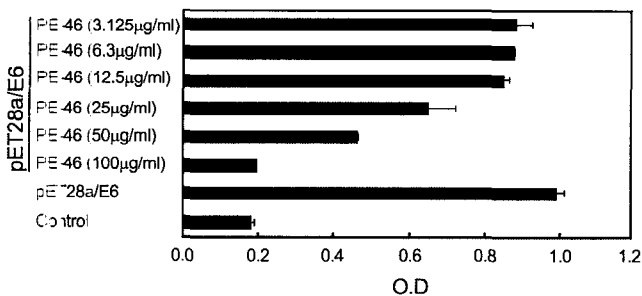


Fig. 2 – The effect of *Saururus chinensis* (PE-46) on the ELISA based on the binding of E6AP and E6. E6AP was coated on the 96 well plates and blocked with 3% milk-PBS. Then serial dilutions of E6 lysates were incubated for 1 hr. After washing with PBST, anti-E6 antibody was added, followed by horseradish peroxidase conjugated to secondary antibody. The bound enzyme activity was detected by ELISA reader after adding substrate.

적으로 억제하였다 (Fig. 2). 이 경우 *Saururus chinensis*를 약 100 μ g/ml 첨가하였을 때 확실한 억제효과를 나타내었다. E6 단백질은 Cys-X2-Cys-X29-Cys zinc-finger 구조를 가지고 있고, 이 구조의 유지에 이 단백질의 기능에 필수적이다. 최근 이 구조로부터 결합된 Zn^{2+} 를 방출하거나 결합부위를 불활성화 시킴으로써 E6를 대상으로 하는 새로운 항암제를 검색하는 방법이 시

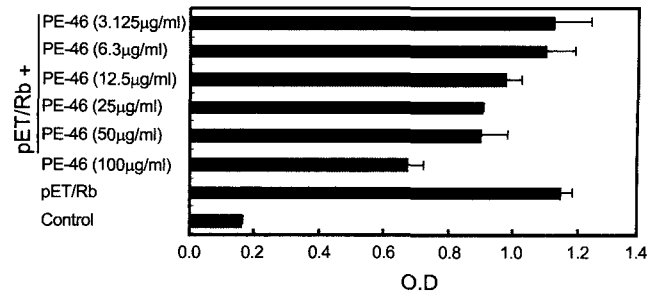


Fig. 3 – The effect of *Saururus chinensis* (PE-46) on the ELISA based on the binding of E7 and Rb. E7 was coated on the 96 well plates and blocked with 3% skimmed milk-PBS. Then serial dilutions of Rb lysates were incubated for 1 hr. After washing with PBST, anti-Rb antibody was added, followed by horseradish peroxidase conjugated to secondary antibody. The bound enzyme activity was detected by ELISA reader after adding substrate.

도되었다.²⁵⁾ E7 단백질도 E6와 같이 zinc-finger 구조를 가지고 있어 *Saururus chinensis*가 zinc-finger 구조로부터 Zn^{2+} 를 방출하거나 구조를 불활성 할 수도 있을 것으로 사료된다.

***Saururus chinensis* 추출물 PE-46가 E7과 Rb의 결합에 미치는 영향** – *Saururus chinensis*가 E7과 Rb의 결합에 미치는 영향을 보기 위해 ELISA를 수행한 결과 *Saururus chinensis*가 E7과 Rb의 결합을 농도 의존적으로 억제하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3). 이때 *Saururus chinensis*를 100 μ g/ml 첨가하였을 때 ELISA에서 현저한 억제효과를 나타내었다 (Fig. 3)

***Saururus chinensis* 추출물 PE-46가 HPV oncogene E6, E7 mRNA level에 미치는 영향** – *Saururus chinensis*가 E6와 E7 mRNA의 발현에 미치는 영향을 보기 위해 RT-PCR을 수행하였다 (Fig. 4). Fig. 4에서 나타내듯이 처리하지 않은 세포에 비교해 *Saururus chinensis*를 처리한 세포에서는 HPV oncogene 인 E6와 E7의 mRNA level이 저해됨을 확인할 수 있었다. 결론적으로 *Saururus chinensis*는 E6와 E7의 전사를 감소시키고 또한 E6-E6AP 및 E7-Rb 결합반응을 방해하여 세포의 불멸화에 필요한 세포내의 단백질의 변화를 억제함으로써 HPV 양성인 자궁경부암 세포에 특이적으로 독성을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

***Saururus chinensis* 추출물 PE-46에 의한 p53 tumor suppressor의 mRNA 및 단백질의 발현에 미치는 영향** – *Saururus chinensis* 추출물 PE-46를 처리한 세포에서는 HPV oncogene인 E6와 E7의 mRNA level이 저해되었으므로 (Fig. 4), PE-46을 처리한 SiHa 세포에서 total RNA 및 단백질을 추출하여 p53 level에도 영향을 미치는지 RT-PCR 및 Western blot로 확인하였다. RT-PCR 및 Western blot 결과 모두 PE-46 처리 시, p53 발현에는 별 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 이 결과 PE-46는 p53과 무관하게 E6 oncogene level을 억제하

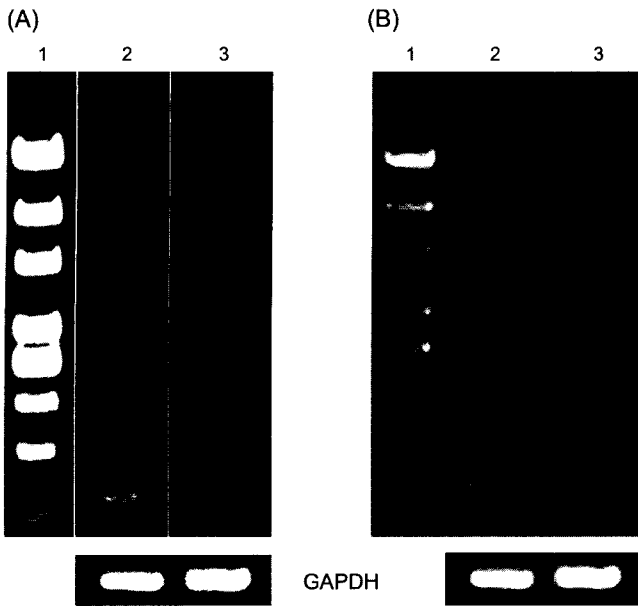


Fig. 4 – The effect of *Saururus chinensis* (PE-46) on the expression level of HPV E6 (A) and E7 (B) mRNA in cervical carcinoma SiHa cells. Cells at a confluence of 80% were treated with *Saururus chinensis* diluted 40 $\mu\text{g/ml}$, 18 hr after incubation. Total RNAs was extracted from SiHa cells after overnight incubation and their expression levels of E6 and E7 were examined by RT-PCR using specific primers for E6 and E7 as described in Materials and Methods. Lane 1. Marker (1kb ladder), 2. Untreated, 3. *Saururus chinensis* (PE-46).

는 것으로 사료되었다.

*Saururus chinensis*추출물 PE-46가 세포주기에 미치는 영

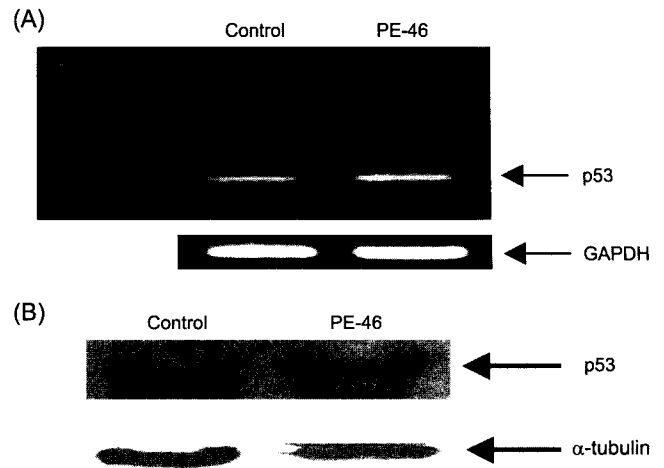


Fig. 5 – The effect of *Saururus chinensis* (PE-46) on the expression of p53 mRNA (A) and protein (B) in cervical carcinoma SiHa cells. Cells at a confluence of 80% were treated with *Saururus chinensis*. Total RNAs and proteins were extracted from SiHa cells after overnight incubation and their expression levels of p53 were examined by RT-PCR and Western blot as described in Materials and Methods.

향 – *Saururus chinensis* 추출물 PE-46가 세포주기에 미치는 영향을 보기 위해 *Saururus chinensis*를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포 (DMEM/10% FBS에서 유지)의 세포주기 분포는 DNA를 PI (propidium iodide)로 염색한 후 FACS 분석으로 비교하였다 (Fig. 6). *Saururus chinensis*를 처리한 세포에서는 S-phase 상태의 세포가 18.77% 이었고, 반면에 세포주기의 G₀/G₁-phase 상태의 세포가 68.94% 이었다 (Fig. 4). 대조적으로 처리하지 않

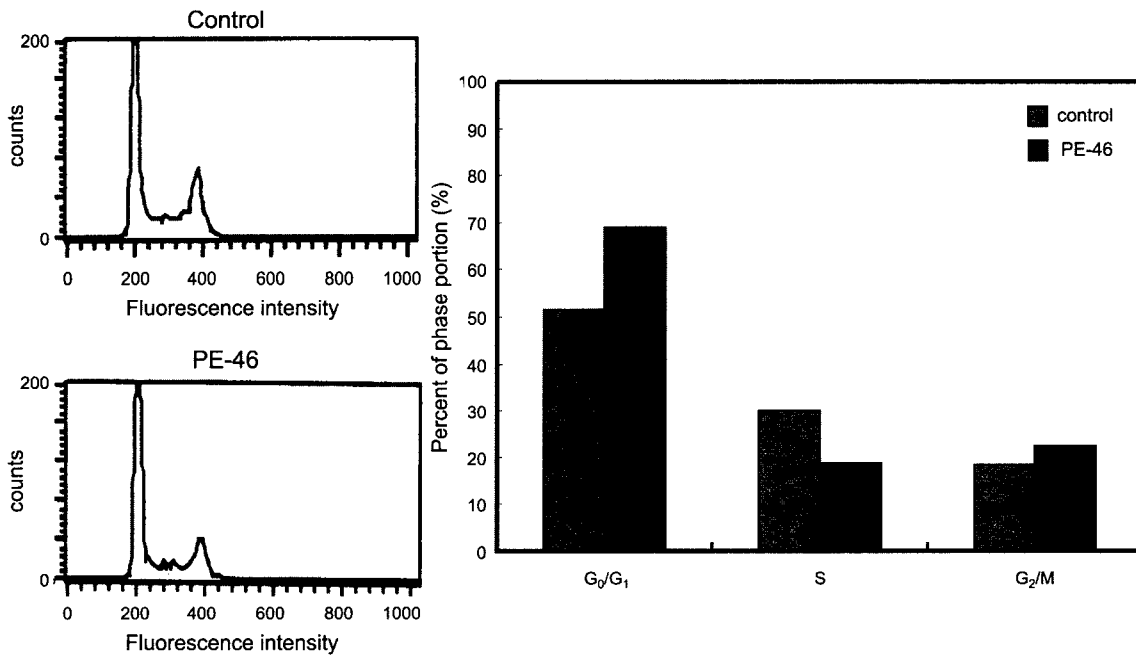


Fig. 6 – The effect of *Saururus chinensis* (PE-46) on the phase of the cell cycle. Cervical carcinoma SiHa cells were incubated with *Saururus chinensis* for 24 hr and harvested for FACS analysis. Cell cycle distribution was determined by propidium iodide staining of DNA.

은 세포에서는 30.02% 와 51.48%가 각각 S와 G0/G1-phase 이었다. 이러한 결과는 *Saururus chinensis*가 HPV oncogene인 E6와 E7과 Rb의 결합을 저해해 tumor suppressor의 기능을 회복시킴으로써 E2F 전사인자의 활성을 조절하여 세포주기의 정상적인 진행을 지연하는 것으로 사료된다.

결 론

자궁경부암은 매년 약 50만 명 정도씩 사망하는 여성의 치명적인 사망 원인의 하나이다. 인두유종바이러스(HPV) 16형 및 18형과 자궁경부암과의 긴밀한 관련성은 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 식물추출물, 일명 삼백초 (*Saururus chinensis*)가 HPV 16형의 E6, E7 발암유전자의 기능 및 발현을 억제하는지 여부를 평가하였다. 이 *Saururus chinensis*는 자궁경부암 세포주 (C-33A, SiHa, CaSki)와 HaCaT keratinocytes의 증식을 농도 의존적으로 억제하였다. ELISA (효소면역측정법)결과, *Saururus chinensis*가 암억제인자인 p53과 결합하여 분해시키는데 필수적인 E6와 E6AP와의 결합을 억제할 뿐만 아니라 암 억제인자 Rb와 E7과의 결합을 억제하였다. RT-PCR에 의한 실험결과는 *Saururus chinensis*에 의해 E6와 E7 mRNA의 level이 감소하였음을 보여 주었다. FACS 분석에 의하면 정상세포의 세포주기 진행에 비교하여 볼 때 *Saururus chinensis*를 처리한 세포는 세포주기의 진행이 지연되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *Saururus chinensis*를 처리했을 때 정상세포에 비해 G0/G1-phase 상태의 세포가 많이 존재한다는 것을 보여주며, E6와 E6AP 그리고 E7과 Rb가 결합을 저해해 p53과 Rb의 정상적인 기능을 하게 하여 E2F 전사인자의 활성을 조절하여 세포주기의 정상적인 진행을 지연하는 것으로 생각된다. 본 실험에 의하면 p53의 발현에는 변화가 없는 것으로 나타나 (Fig. 5), p53과 무관하게 E6 발암유전자의 발현을 억제하는 것으로 사료된다. 따라서 이들 결과가 의하면 *Saururus chinensis*가 HPV 16형의 E6와 E7의 발암성을 억제하는 것으로 사료되기 때문에 HPV에 의해 유도된 자궁경부암의 치료에 유효할 것으로 기대됨으로 좀 더 자세한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험 등이 요구된다.

감사의 말씀

이 연구는 과기부 분자과학 프로그램 (M1-0106-00-0078)의 도움을 받아 수행한 결과이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 이창복 : 대한식물도감, 향문사, 서울. p.252 (1979).
- 2) 이재길 : 원색 천연약물 대사전(하), 남산당, 서울, p174 (1984).

- 3) 新文豊 出判公司 : 新編 中藥大辭典(中), 臺北. p. 174 (1984).
- 4) Hsu, H, Y. Chen, Y, P. Shen, S, J. Hsu, C, S. Chen, C, C. and Chang, H, C: Oriental Materia Medica, Oriental healing arts institute, Long Beach, P. 308 (1986).
- 5) Sung, S. H., Lee, E. J., Cho, J. H., Kim, H. S and Kim, Y. C. : Sauchinone, a lignan from *Saururus chinensis*, attenuates CCl₄-induced toxicity in primary cultures of rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 666 (2000).
- 6) Sung, S. H. and Kim, Y. C. : Hepatoprotective diastomeric lignans from *Saururus chinensis* herbs. *J. Nat. Prod.* **63**, 1019 (2000).
- 7) Park, S. K., Oh, G. J., Bae, C. I., Kim, H. J., Han, W. S., Chung, S. G. and Cho, E. W. : Studies on the cytotoxic constituent of *Saururus chinensis* (Lour.) Baill. *Yakhak Hoeji*, **41**, 704 (1997).
- 8) Park, S. K., Oh, G. J., Kim, H. T., Kim, H. J., Chung, S. G. and Cho, E. H. : Analgesic constituent from the herba of *Saururus chinensis* (Lour.) Baill. *Yakhak Hoeji*, **42**, 238 (1998).
- 9) Wie, M. B. : Protective effects of *Opuntia ficus-Indica* and *Saururus chinensis* on free radical-induced neuronal injury in mouse cortical cell cultures. *Yakhak Hoeji*, **44**, 613 (2000).
- 10) 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 (1991).
- 11) Isfort, R. J., Cody, D. B., Lovell, G. and Doersen, C. J. Analysis of oncogenes, tumor suppressor genes, autocrine growth-factor production, and differentiation state of human osteosarcoma cell lines. *Mol. Carcinog.* **14**, 170 (1999).
- 12) 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 (1997).
- 13) Yang, X., Sham, J. S., Ng, M. H., Tsao, S. W., Zhang, D., S. W. L 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 (2000).
- 14) 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 (1999).
- 15) Henkler, F. F. and Koshy, R. Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis. *J. Viral Hepat.* **3**, 10 (1996).
- 16) Shackney, S. E. and Shankey, T. V. Cell cycle models for molecular biology and molecular oncology: exploring new dimensions. *Cytometry* **35**, 97 (1999).
- 17) 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 (1999).
- 18) Tommasino, M. and Crawford, L. Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. *BioEssays* **17**, 509 (1995).
- 19) 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 (1992).
- 20) 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 (1989).
- 21) 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**(5), 1154 (1990).
- 22) Cho, Y. S., Cho, C. W., Joung, O., Lee, K. A., Park, S. N. and Yoon, D. Y. Development of screening systems for drugs against human papillomavirus-associated cervical cancer: based on E6-E6AP binding. *Antiviral Res.* **47**, 199 (2000).
- 23) Cho, Y. S., Cho, C. W., Kang, J. O., Cho, M. J., Lee, K. A., Shim, J. H., Kwon, D. H., Choe, Y. K., Park, S. N. and Yoon, D. Y. Development of a screening system for drugs against human papillomavirus-associated cervical cancer: based on E7-Rb binding. *J. Biochem. Mol. Biol.* **34**, 80 (2001).
- 24) Pei, X. F. The human papillomavirus E6/E7 genes induce discordant changes in the expression of cell growth regulatory proteins. *Carcinogenesis* **17**, 1395 (1996).
- 25) Beerheide, W., Bernard, H. U., 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. *J. Natl. Cancer Institute*, **91**(14), 1211 (1999).