

## 생기액(生肌液)의 세포독성 및 자궁경부암 바이러스 (HPV 16 type) 암 유발인자 E6와 E7의 작용에 미치는 효과

정 옥 · 조 영식 · 조정원 · 이경애 · 심정현 · 조민철 · 이홍수 ·  
염영일 · 김상범\* · 박순희\*\* · 윤도영#

생명공학연구소, \*SB 식품의학연구소, \*\*식품의약품 안전청 생물학평가부 바이러스 제제과  
(Received March 31, 2000)

## The Effects of Somatid on the Cytotoxicity of Cancer Cells and Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncogenes

Ok Joung, Young-Sik Cho, Cheong-Weon Cho, Kyung-Ae Lee, Jung-Hyun Shim,  
Min-Chul Cho, Hong-Soo Lee, Young-IL Yeom, Sang-Bom Kim\*,  
Sue Nie Park\*\* and Do-Young Yoon#

Cellular Biology Lab, Korea Res. Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea  
\*SB Research Institute, ShinYoung Dong 176-4, JongRo Gu, Seoul 110-010, Korea  
\*\*Department of Viral Products, KFDA, #5, Nokbun-dong, Eunpyung-gu, 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 types 16 and 18) and cervical cancer has been well known. An extract of natural products, named as Somatid, has been used to investigate whether this agent has the ability of inhibiting the oncogenes E6 and E7 of HPV type 16. This Somatid 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 Somatid inhibited the *in vitro* binding of E6 and E6AP which are essential for the binding and degradation of the tumor suppressor p53. In addition, Somatid 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 Somatid. Our data suggested that Somatid 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 caused by HPV.

**Keywords** □ *In vitro* binding assay, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), E6 oncogene.

천연물에는 인체에 유익한 여러 물질들이 산재하고 있다. 예를 들면 백반(카리명반 : 황산알루미늄카복  $K_2SO \cdot Al_2(SO_4)_3(24H_2O)$ 은 녹 · 흑 · 홍반이 있는데 동의보감에는 무독하며 창과 창상을 주치하는 의약품 뿐만 아니라, 염색, 안료, 정수제, 식품첨가물 등에 대한 효과를 기술하고 있다.<sup>1)</sup> 본 연구에서는 대추, 감초, 복숭아씨, 백반, 맥반석, 규조토 등과 같은 여러가지

천연물질들의 혼합 추출물(이하 Somatid, 일명, 생기액)을 이용, 매년 여성의 사망 원인 암 중에서 1, 2위로 알려진 자궁경부암 바이러스<sup>2)</sup>인 파필로마바이러스 암 유발인자 E6와 E7의 작용기전에 미치는 효과를 연구 하였다.

암 발생원인 중에서는 세포성 암 유전자(예: c-myc, ras 등)<sup>3,4)</sup>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.<sup>5-7)</sup> 나아가 암 억제 유전자(예

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 82-42-860-4218 (팩스) 82-42-860-4593

: p53, pRB 등) 그리고 세포주기조절인자(예: cyclins, cyclin dependent kinases, p21, p16 등)<sup>8)</sup>와 암 유전자 관련 세포의 신호전달기전 관련인자들(예: protein tyrosine kinase dependent pathway 등)<sup>9)</sup>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 발암 기작을 연구할 수 있을 뿐만 아니라 아직까지 그 주요원인을 모르는 타종 암에 대하여도 많은 정보를 제공할 수 있을 것이다. 일례로 SV40 바이러스의 large T antigen과 HPV E6 단백질은 p53 단백질의 기능을 억제하고 있음이 밝혀졌는데<sup>10)</sup> 정상적으로 p53을 나타내는 세포에 HPV E6 발현을 유도하면 세포증식이 촉진되고 있음이 밝혀졌다.<sup>11)</sup> 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.<sup>12)</sup> 본 연구에서는 천연물질들의 혼합 추출물(Somatid)이 자궁 경부암 바이러스인 파필로마바이러스 암 유발인자 E6와 E7의 작용을 억제하는 효과를 확인하고 항 바이러스, 항 암활성능의 기작을 이해하기 위하여 이들 추출물의 자궁암 세포주에 대한 세포독성과 암을 일으키는 바이러스 발암유전자 E6와 E7의 작용에 미치는 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

**Somatid(生肌液 : 일명; 생기액)** - 공기 풍부한 맥반석, 제오라이트, 규조토 등을 1:1:1로 섞은 다음, 깨끗한 물로 세척하여 원석 등이 지니고 있는 결정수를 300°C 고열로 볶아 이상물질을 제거하고 더 많은 공

기를 부여한 다음, 세척 후 실온에서 건조 시킨 후 300 mesh 분말로 하여 백반을 1% 첨가하였다. 껍질을 제거한 복숭아 씨(도인) 0.1%, 대추(산조인) 0.1%를 분쇄한 다음 감초10%와 같이 100°C로 20 분간 가열 후 얼음에 냉각하여 여과포로 여과하였다. 이 여과 용액에 앞서 제조한 분말을 넣고 죽상으로 반죽한 다음 건조기에 넣어 수분을 증발시키고 고형물질만 남는 분말로 하여 놓았다. 이 물질을 3차에 걸쳐 끓여서 연미색 또는 담황색 상태의 엽과 같은 상태에서 다시 냉각 시킨 뒤 주정(술)에 수장 시키고 건조 시킨 뒤 고형물을 석구(맷돌)로 분쇄하여 분말로 한 뒤 열판에 뿌려 놓고 용점의 온도 120°C~135°C까지 올린 후 여기에 분말을 뿌려서 접착이 되도록 하였다. 이 상태를 반복하여 고형물을 만든다. 이 고형물을 냉각 시킨 뒤 음 건조(그늘 건조)시키고 증류수에 담궈 두어 생기액(100 mg/ml)으로 이용하였다.

## E6, E6AP, E7, Rb 발현 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<sup>13)</sup>에 옮긴 후 이 E6 유전자를 다시 제한효소 Bam HI와 Sal I로 절단하고 똑같은 효소로 절단한 pGEX4T-1과 pET28a 벡터로 연결하였다. 또한 E6-AP는 가운데 부분이 중복되는 2종류의 primer(5'-AGA TCTATGAAGCGAGCAGCTGCAAAGCATCTAAT A-3'과 5'-CTCTAGCCGACAAGTGCATCATCTAT GAT-3', 5'-AGCGAGCTGACACTTCAGGAACCTTTGGGA-3'과 5'-TTACAGCATGCCAAATCCTTTGGCAT-ACGT-3')를 사용하여 앞에서와 같은 방법으로 RT-PCR로 증폭하였다. 이 증폭된 산물은 cloning 벡터인 PCR<sup>®</sup>2.1-TOPO에 연결하고 Bgl II와 Eco RI로 절단하고 Bam HI와 Eco RI로 절단한 pGEX4T-1에 cloning하였다. Histidine이 결합된 E6-AP를 발현하기 위해 TOPO/E6-AP를 Bgl II와 Hind III로 절단하고 pET28은 Bam HI와 Hind III로 절단하여 ligase로

조합하였다.<sup>14)</sup>

**E7와 Rb 발현벡터 제조** - E7 단백질은 histidine 결합과 GST결합형태로 제조되었다. HPV 함유 자궁경 부암 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-PCR를 수행 증폭하였다. 이 증폭산 물을 T-vector<sup>13)</sup>에 연결하고 다시 Bam HI과 Sal I 으로 절단하여 E7유전자를 얻는다. 이를 같은 제한효 소로 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 pET벡터에서 제조되었으며 용해성과 안정성을 증가시키기 위한 pocket domain을 포함한 아미노산 373에서 928에 이르는 N-말단이 제거된 짧은 단백질이다.

**재조합 단백질 대량생산 및 bead에 부착** - pET/Rb, pGEX 발현 벡터는 *E. Coli*(DH5α)에, pET28a 발현 벡터는 *E. Coli*(DE3)에 transformation시키고 1 mM isoprophyl-β-D-thiogalactopyranoside(IPTG)첨가하고 18°C에서 12 시간동안 단백질을 유도하였다. 숙주세균 을 원심분리하여 얻었고 pGEX 및 pET/Rb 발현대장 균은 PBST(phosphate-buffered saline에 0.5% Triton X-100, 0.5 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF) 과 10 μg/ml의 aprotinin 함유)에 pET28 발현 대장 균은 용해완충용액(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 8.0)에 현탁시키고 초음파 파쇄를 실시하였다. 이를 원심분리하고 상등액 만을 취하여 결합 반응에 사용하였다. GST/E6, GST/E7, GST/E6-AP는 PBS 완 충용액으로 미리 평형화 시킨 GSH bead에 결합시키고 같은 완충용액으로 씻어 주었다. 또한 pET28a/E6, pET28/E7과 pET28/E6-AP의 경우 Ni-NTA bead (Peptron Inc., Taejon, Korea)에 결합시키고 20 mM imidazole이 포함된 완충용액으로 3번 씻어낸 후 결합 반응을 실시 하였다.

**자궁경부암세포주의 세포독성** - DMEM/10% FBS에 유지시킨 자궁경부암세포주C-33A, CaSki, SiHa와 keratinocyte세포 HaCaT를 96 well plate에 1×10<sup>5</sup>/well씩 넣은 후 1일 동안 CO<sub>2</sub> incubator에 배양하였다. 새로운 배지로 갈아준 후 여러가지 농도로 희석시킨 Somatid를 처리한 후 20시간 후 WST-1(Berlinger Mannheim, Germany) 10 μl를 첨가하여 1-3시간

이내에 450 nm에서 흡광도를 ELISA reader(Molecular Device, CA)로 측정하였다.

**Bead GST E6AP와 His E6의 binding에 미치는 Somatid의 영향** - GSH bead(Glutathione Sepharose™4B, Pharmacia Biotech, Sweden)는 1X PBS buffer로 치환하여 사용하였으며, GST/E6AP(3.4 μg/ml) 상등액 1 ml에 GSH bead 300 μl을 결합시켜 이를 Bead GST/E6AP로 사용하였다. Bead GST/E6AP와 His E6의 binding은 반응액을 1200 μl로 하여 실시하였다. 즉 PBST 950 μl에 Bead GST/E6AP 50 μl과 His E6(8.2 μg/ml) 상등액 200 μl를 넣어 저온실에서 회전 시키면서 1시간 동안 결합시켰 으며, 6000 rpm에서 3분간 원심분리하여 상등액을 제거 후 PBST를 1.2 ml 넣고 다시 저온실에서 5분간 세척하였다. 이 세척단계는 3번 반복하였다. 3번의 세 척단계가 끝나면 상등액을 완전히 제거 후 증류수 40 μl와 5X SDS sample buffer 10 μl을 넣어 SDS-PAGE sample을 제조하였다. Somatid(100 mg/ml)는 1/6 희석하여 첨가하였다. 즉 PBST 750 μl에 Bead GST/ E6AP 50 μl, His E6 상등액 200 μl, Somatid 200 μl(원액농도 100 mg/ml)을 넣어 결합시켰으며 결합과정과 SDS-PAGE sample 제조 방법은 Yang 등<sup>5)</sup>의 방법과 동일하게 실시하였다. Sample은 10 μl씩 loading 하여 25 mA로 전기영동 후 staining하였으며, Western blot은 15 μl씩 loading한 gel을 PVDF mem- brane으로 transfer한 후 HPV 16-E6(N-17) antibody (goat antibody, Santa Cruze Biotechnology, Santa Cruze, CA)을 1차 처리하고 anti-goat IgG(H+L)-alkaline phosphate(Sigma)를 2차 처리 하여 확인하였다.

**Somatid의 농도 구배에 의한 Bead GST E7과 pET/Rb 결합에 미치는 영향** - Bead GST/E7의 제조 에 사용된 Bead GSH는 Yang 등<sup>5)</sup>의 방법에서 제조 한 Bead를 사용하였으며, GST/E7(13.9 μg/ml) 상등 액 500 μl에 GSH bead 500 μl을 결합시켜 이를 Bead GST/E7으로 사용하였다. Bead GST E7과 pET/Rb의 binding Assay는 PBST 반응액을 1200 μl로 하여 Bead GST/E7은 각각 40 μl, pET/Rb (6.9 μg/ml)는 100 μl로 첨가하였으며, Somatid(100 mg/ml)는 5 μl(0.42%), 10 μl(0.83%), 15 μl(1.25%), 20 μl(1.67%), 50 μl(4.17%)를 첨가하여 결합시켰는데 결합과정과 SDS-PAGE sample 제조 방법은 Yang 등<sup>5)</sup>

의 방법과 동일하게 실시하였다. 3번의 세척단계가 끝나면 상등액을 완전히 제거 후 증류수 50  $\mu$ l와 5X SDS sample buffer 12  $\mu$ l를 넣어 SDS-PAGE sample 을 제조하였다. Sample은 10  $\mu$ l씩 loading 하여 25 mA로 전기영동 후 staining하였으며, Western은 15  $\mu$ l씩 loading하여 전기영동을 실시한 gel을 PVDF membrane(Millipore, Bedford, MA)으로 transfer한 후 monoclonal anti-Rb(Ab-6) antibody(Oncogene, Cambridge, MA) (1  $\mu$ g/ml)를 1차 처리하고 anti-mouse IgG( $\gamma$ -chain specific)-alkaline phosphate conjugate(Sigma)를 2차 처리 하여 확인하였다.

**E6, E6AP 결합을 이용한 ELISA에 미치는 Somatid의 영향** - E6AP를 Maxisorb 96-well plate에 4  $\mu$ g/ml로 coating한 후 PBS/3% skimmed milk로 2 시간 동안 blocking하였다. PBST로 3번 세척 후 pET28a/E6와 pGEX/E6로부터 얻은 E6 상등액을 PBS로 32배 희석한 것을 100  $\mu$ l/well씩 넣어 1 시간 실온에서 반응시켰다. E6AP에 결합한 E6는 goat anti-E6(N-17) antibody(Santa Cruz Biotechnology)와 horseradish phosphatase-conjugated anti-goat IgG(Sigma)를 계속 처리한 후 PBST로 세척하고 기질용액 [4 mg *o*-phenylenediamine, 5  $\mu$ l 37% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 10 ml of 0.1 M Citrate buffer, pH 5.1] 100  $\mu$ l를 넣고 반응시킨 후 2.5 N sulfuric acid로 반응을 정지시킨 후 490 nm에서 ELISA reader(Molecular Devices, Hercules, CA)로 측정하였다.

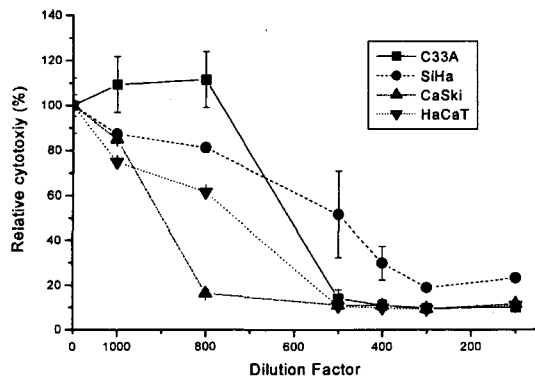
**E7, Rb 결합을 이용한 ELISA에 미치는 Somatid의 영향** - 6xHis E7를 Maxisorb 96-well plate에 4  $\mu$ g/ml로 coating한 후 PBS/3% skimmed milk로 2 시간 동안 blocking하였다. PBST로 3번 세척 후 pET28a/Rb로부터 얻은 Rb 상등액을 PBS로 8배 희석한 것을 100  $\mu$ l/well씩 넣어 1 시간 실온에서 반응시켰다. E7에 결합한 Rb는 mouse anti-Rb antibody(Ab-6) (Oncogene) (0.1  $\mu$ g/ml)와 horseradish phosphatase-conjugated anti-mouse IgG(Sigma)를 계속 처리한 후 PBST로 세척하고 기질용액 [4 mg *o*-phenylenediamine, 5  $\mu$ l 37% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 10 ml of 0.1M citrate buffer, pH 5.1] 100  $\mu$ l를 넣고 반응시킨 후 2.5 N sulfuric acid로 반응을 정지시킨 후 490 nm에서 ELISA reader(Molecular Devices, Hercules, CA)로 측정하였다.

**Somatid에 의한 HPV E6, E7 oncogene의**

**mRNA level에 미치는 영향** - DMEM/10% FBS에 유지시킨 HPV 16 genome을 지니고 있는 자궁경부암 세포주 CaSki를 100 mm petri dish에 5 $\times$ 10<sup>5</sup>/10 ml씩 넣은 후 1일 동안 CO<sub>2</sub> incubator에 배양하였다. 새로운 배지로 갈아준 후 800배 농도로 희석시킨 Somatid를 처리한 후 20시간후 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 50  $\mu$ l 반응액 [5  $\mu$ l 10X first-strand buffer, 1  $\mu$ l RNase block ribonuclease inhibitor(40U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l 100 mM dNTPs, 1  $\mu$ l MMLV-RT(50U/l), 5  $\mu$ l RNA, 36  $\mu$ l 증류수]을 37°C에서 1 시간 반응시켜 얻은 다음, primer와 함께 중합반응을 계속시켜(95°C에 1분, 57°C에 1분, 그리고 72°C에서 1분 30초 반응을 30번 반복) PCR products를 얻어 1% agarose gel로 확인하였다. 동량의 RNA사용 여부를 확인하기 위해, house keeping gene인  $\beta$ -actin을 측정하고자  $\beta$ -actin primer를 다음과 같이 사용하였다: 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3' (sense), 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'(antisense).

## 실험결과 및 고찰

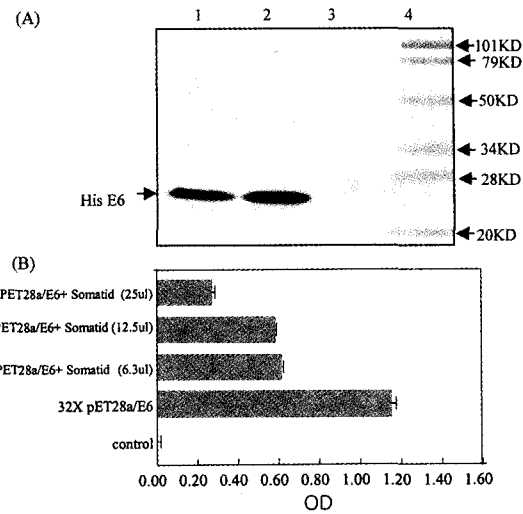
**자궁경부암세포주의 세포독성** - 자궁경부암 세포주 C-33A, CaSki, SiHa와 HaCaT keratinocytes에 Somatid를 희석배율 1000배 까지 처리한 결과 CaSki 세포주에서 800배부터 가장 민감한 세포독성을 보여 세포의 성장이 급격하게 감소하는 것을 볼 수 있었다. 자궁경부암 세포주 중에서도 HPV가 아닌 다른 원인에 의해 암 세포화된 C-33A의 경우 800 배에서도 세포독성이 나타나지 않았으나 500배 이상의 농도에서는 모든 세포주들의 성장이 거의 멈추어 졌다(Fig. 1). 이는 Somatid에 존재하는 특이인자가 HPV virus genome을 지니고 있는 CaSki, SiHa와 HaCaT cell의



**Fig. 1** – The cytotoxicity of Somatid on cervical carcinomas and HaCaT. Cells seeded at a density of  $1 \times 10^5$  on 96-well were treated with either Somatid extracts at the given dilution factors in a final volume of  $100 \mu\text{l}$  DME media and were then allowed to incubate for 24 hrs. The cytotoxicity of Somatid was determined by WST-1 reagent as described in Materials and Method, and expressed as relative percentage to untreated control.

성장을 억제하는 것으로 생각되며 특히 16 type인 CaSki에 대한 Somatid의 민감한 성장억제 효과는 SiHa와 HaCaT과 차별성을 두고 연구가 더 이루어져야 되리라 사료된다. HPV type 16과 18의 E6/E7은 human genital Keratinocytes의 효율적인 immortalization에 밀접한 관련이 있다.<sup>15)</sup> Fig. 1에서 보듯이 HPV 양성 세포주에 Somatid의 효과가 가장 높았기 때문에 HPV의 2개의 발암유전자인 E6 및 E7와 세포 내의 단백질 즉 E6-AP 및 Rb의 결합 및 그들의 발현 조절에 Somatid가 미치는 영향을 조사했다.

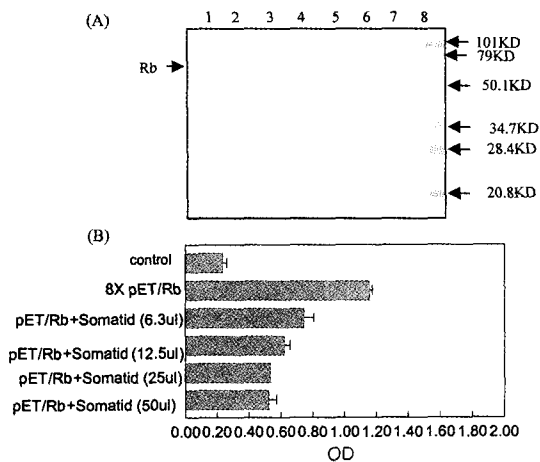
**Somatid가 E6AP와 E6의 binding에 미치는 영향** – Somatid가 E6AP와 E6의 결합에 미치는 영향을 보기 위해 *in vitro* binding과 ELISA를 수행한 결과 Somatid가 E6AP와 E6의 결합을 농도 의존적으로 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). Fig. 2에 나타난 Western blot 결과(A)는 Somatid를 전체농도의 약 16.7%를 첨가 하고 E6AP와 E6를 결합시켰을 때 유의적으로 억제함을 나타낸다. B에서도 A와 마찬가지로 반응액  $150 \mu\text{l}$ 중 Somatid를  $25 \mu\text{l}$ (약 16.7%)를 첨가하였을 때 현저한 억제효과를 나타내었다. E6 단백질은 Cys-X2-Cys-X29-Cys-X2-Cys zinc-finger 구조를 가지고 있고, 이 구조의 유지는 이 단백질의 기능



**Fig. 2** – The effect of Somatid on the *in vitro* bindings of E6AP and E6 (A) and ELISA based on the binding of E6 and E6AP (B). To investigate the inhibitory effect of Somatid extracts, E6-AP immobilized on resins was incubated with E6 (lane 2) in the presence (lane 3) or absence of Somatid finally diluted 1:60. E6 bound to E6AP was determined by immunoblot assay using antibody which specifically recognized E6. Upper and lower panels represent Coomassie blue staining and immunoblotting, respectively. (lane 1, His E6 in put lane 4, Marker)

에 필수적이다. 최근에 이 구조로부터 결합된  $\text{Zn}^{2+}$ 를 방출하거나 결합부위를 불활성화 시킴으로써 E6를 대상으로 하는 새로운 항암제를 검색하는 방법이 시도되었다.<sup>16)</sup> E7단백질도 E6와 같이 Zinc-finger 구조를 가지고 있어 Somatid가 Zinc-finger구조로부터  $\text{Zn}^{2+}$ 를 방출하거나 구조를 불활성 할 수도 있을 것으로 사료된다. 그러나 Somatid의 화학적 구조나 작용은 아직 보고된 바 없어 억제효과의 기전은 앞으로 더 연구해야 할 과제이다.

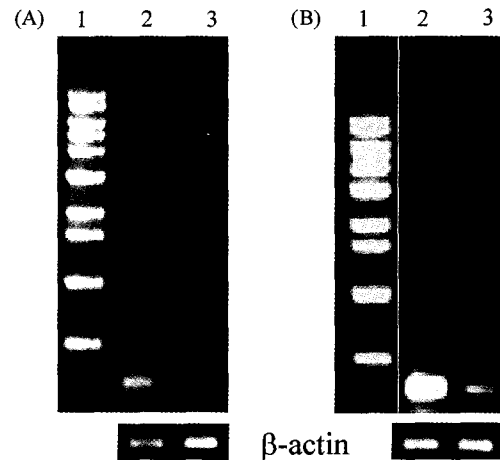
**Somatid가 E7과 Rb의 결합에 미치는 영향** – Somatid가 E7과 Rb의 결합에 미치는 영향을 보기 위해 *in vitro* binding과 ELISA를 수행한 결과 Somatid가 E7과 Rb의 결합을 농도 의존적으로 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). Fig. 3의 A에 의하면 *in vitro* binding에서는 Somatid를 1.25%(15  $\mu\text{l}$ ) 이상 첨가 하였을 때 확실한 억제효과를 나타내었고, B의 ELISA에서는 *in vitro* binding처럼 확실한 억제효과를 나타낸 것은 아니지만 유의성 있는 억제효과를 볼 수 있었다.



**Fig. 3** – The effect of Somatid on the *in vitro* binding of GST E7 and Rb (A), and ELISA based on the binding of Rb and E7 (B). To investigate the inhibitory effect of Somatid extracts, E7 immobilized on resins was incubated with Rb in the presence or absence of Somatid finally diluted to 1:60 in 1.2 ml of binding buffer. E7-bound Rb was determined by immunoblot assay using antibody which specifically recognized Rb. (A) Upper and lower panels represent Coomassie blue staining and immunoblotting, respectively. Lane 1, Rb 1/10 input, lane 2; Rb, 200  $\mu$ l; lane 3-7, Rb 200  $\mu$ l along with increasing doses of 5, 10, 15, 20 and 50  $\mu$ l of Somatid extracts; lane 4, Marker. (B) E7 was coated on the 96 well plates and blocked with 3% 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.

**Somatid가 HPV oncogene E6, E7 mRNA level에 미치는 영향** – Somatid가 E6, E7 mRNA에 미치는 영향을 보기 위해 RT-PCR을 수행한 결과 Somatid가 HPV oncogene인 E6와 E7의 mRNA를 저해하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). CaSki Cells에서 800배로 Somatid를 처리 하였을 때 mRNA level이 저해됨을 확인 할 수 있었다.

결론적으로 Somatid는 E6 및 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 있다.



**Fig. 4** – The effect of Somatid 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 Somatid diluted 1:400. 18 hr after incubation, Total RNAs was extracted from CaSki 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. 1. Marker (1 kb ladder), 2. untreated, 3. Somatid

## 결 론

자궁경부암은 매년 약 50만명 정도씩 사망하는 여성의 치명적인 사망 원인의 하나이다. 인두유종 바이러스(HPV) 16형 및 18형과 자궁경부암과의 긴밀한 관련성은 잘 알려져 있다. 천연물혼합추출물 일명 생기액(Somatid)이 HPV 16형의 E6, E7 발암유전자를 억제하는지 여부를 측정하였다. 이 Somatid는 자궁경부암 세포주(C-33A, SiHa, CaSki)와 HaCaT keratinocytes의 분열은 농도 의존적으로 억제하였다. *In vitro* binding assay와 ELISA(효소면역측정법)에 의하면 Somatid가 암 억제인자인 p53과 결합하여 분해시키는데 필수적인 E6와 E6AP와의 결합도 억제할 뿐더러 암억제인자 Rb와 E7과의 결합을 억제하였다. RT-PCR에 의하면 Somatid에 의해 E6와 E7 mRNA의 level이 감소하였음을 보여 주었다. 이들 결과에 의하면 Somatid가 HPV 16형의 E6와 E7의 발암성을 억제함을 보여 주므로 HPV에 의해 유도된 자궁경부암의 치료에 유효할 것으로 사료되어 좀 더 자세한 *in vitro* 및 *in*

*vivo* 실험 등이 요구된다.

### 감사의 말씀

이 연구는 과기부의 분자 의과학(98-J03-02-02-A-03)과 국제 공동 과제(I03-008)로 부터 지원을 받아 실행하였다.

### 문 헌

- 1) 李 時珍 著. : 圖解本草綱目. 고문사, 서울 (1987).
- 2) 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).
- 3) 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 (1995).
- 4) 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 (1977).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) Henkler, F. F. and Koshy, R. : Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis. *J. Viral Hepat.*, **3**, 109 (1996).
- 8) Shackney, S. E. and Shankey, T. V. : Cell cycle models for molecular biology and molecular oncology : exploring new dimensions. *Cytometry*, **35**, 97 (1999).
- 9) 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).
- 10) Tommasino, M. and Crawford, L. : Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. *Bioessays*, **17**, 509 (1995).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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-E6-AP binding. *Antiviral Res.*, in press (2000).
- 15) Pei, X. F. : The human papillomavirus E6/E7 genes induce discordant changes in the expression of cell growth regulatory proteins. *Carcinogenesis*, **17**, 1395 (1996).
- 16) 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).