

## 인진에서 분리한 3,5-di-O-Caffeoylquinic acid가 자궁경부암 바이러스 발암단백질의 기능에 미치는 영향

백태웅 · 이경애 · 안민정 · 주혜경 · 조민철 · 강정우 · 김희서 · 심정현 · 이희구 ·  
오현철 · 안종석 · 조용권<sup>1</sup> · 명평근<sup>2</sup> · 윤도영\*

한국생명공학연구원 세포생물학연구소, <sup>1</sup>창원대학교 보건생화학과, <sup>2</sup>충남대학교 약학과

## Effects of 3,5-di-O-Caffeoylquinic acid from *Artemisia scoparia* Waldstein et Kitamura on the Function of HPV 16 Oncoproteins

Tae-Woong Baek, Kyung-Ae Lee, Min-Jung Ahn, Hae-Kyung Joo, Min-Chul Cho,  
Jung-Woo Kang, Hee-Seo Kim, Jung-Hyun Shim, Hee-Gu Lee, Hyun-Cheol Oh,  
Jong-Seok Ahn, Yong-Kweon Cho<sup>1</sup>, Pyung-Keun Myung<sup>2</sup>, and Do-Young Yoon\*

Laboratory of Cell Biology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-600, Korea,

<sup>1</sup>Department of Healthscience and Biochemistry, Changwon National University,

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

**Abstract** – Cervical cancer is one of the leading causes of female death. Viral oncoproteins E6 and E7 are selectively retained and expressed in carcinoma cells infected with HPV (Human papillomavirus) type 16. The HPV is cooperated in immortalization and transformation of primary keratinocyte. E6 and E7 oncoproteins interfere the functions of tumor suppressor proteins p53 and retinoblastoma protein (pRb), respectively. Among a lots of natural products, *Artemisia scoparia* Waldstein et Kitamura has inhibitory effects on the binding between E6 oncoprotein and tumor suppressor p53, or the binding between E6 and E6 associated protein (E6AP), an E3 ubiquitin-protein ligase. HPV oncoprotein inhibitors from *Artemisia scoparia* W. were isolated by solvent partition and column chromatography (Silica gel, RP-18) and the inhibitory compounds were finally purified by HPLC using an ELISA screening system based on the binding between E6 and E6AP. The aim of this study is to identify the structure of inhibitory compounds and to investigate whether these compounds have inhibitory effects on the functions of E6 oncoprotein. We investigated whether 3,5-di-O-caffeoylquinic acid (DCQA) extracted from *Artemisia scoparia* W. could inhibit the function of E6 oncoprotein. DCQA inhibited the *in vitro* binding of E6 and E6AP which are essential for the binding and degradation of the tumor suppressor p53 and also inhibited the proliferation of human cervical cancer cell lines (SiHa and CaSKi) in a dose response manner. These results suggest that DCQA inhibited the function of E6 oncoprotein, suggesting that it can be used as a potential drug for the treatment of cervical cancers infected with HPV.

**Key words** – Human papilloma virus (HPV), *Artemisia scoparia* Waldstein et Kitamura, E6AP, E6, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid

Human papilloma virus(HPV)는 몇몇 악성 종양과 관계 있는 작은 크기의 epitheliotropic DNA virus이다. 60종이 넘는 HPV가 존재하며 이들은 다양한 임상적 병반을 유발한다.<sup>1)</sup> 이중 약 20여종의 HPV가 생식기 기관의 병반과 관계가 있으며 이러한 것들에 의한 감염은 자궁경부, 피부, 구

강, 그리고 다른 생식기 암을 유발한다. 여성에서 자궁경부 암을 유발하는 대부분의 원인이 HPV와 연관이 있으며 HPV 감염 여성들 중 최소 90% 이상이 고위험군 HPV인 HPV-16과 HPV-18형에 의해 질병이 유발된다. 이러한 고위험군의 HPV형은 높은 수준의 이형성(dysplasias)과 공격적인 암화로 진행된다. HPV는 원형의 2중 나선 DNA 형태이고 크기는 약 8 kb이며 8개의 유전자를 암호화한다. E6와 E7 등의 바이러스 단백질들은 단독으로 형질전환의 특성을 가지

\*교신저자(E-mail) : dyoon@kribb.re.kr  
(FAX) : 042-860-4593

며 암화에 중요한 역할을 한다. 이러한 단백질들은 자궁경부암 세포주에서 선택적으로 유지되고 발현되며, 세포막간 신호전달, 세포주기 조절, 세포 형질전환, primary keratinocyte의 분열화, 염색체 불안정화 등의 다양한 기능을 한다.<sup>2)</sup> E6와 E7은 각기 158 aa와 98 aa의 크기를 가지며 형질전환의 능력을 가지고 있어 중요한 세포내 단백질의 활성을 조절하여 세포성장과 분화를 조절하게 되는데 이전 연구에서 E6와 E7 단백질은 각기 항암 단백질인 p53과 pRb와 특이적인 관계가 있다고 알려졌다.<sup>3)</sup> pRb와 p53은 모두 세포주기에서 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>과 G<sub>1</sub>-S phase 사이의 전환을 억제하는 조절자로 알려져 있는데 이러한 상호 작용은 세포 분열화를 유도하는 중요한 기작이다. 이것은 발암 단백질이 actin cytoskeleton을 붕괴시켜 세포의 형질변환을 일으키는 것으로 생각된다.<sup>4)</sup> 항암 단백질인 p53은 세포주기, 전사, 그리고 apoptosis에 중요한 조절자로 사람에서 암 발생 원인의 대다수는 p53의 구조적 변이와 내인성 세포 단백질 기전(endogenous cellular protein mechanism)의 기능적 비활성화에 기인한다. E6는 p53과 E6-associated protein (E6AP)와 함께 복합체를 형성하는데, 그 결과 ubiquitin pathway에 의해 p53의 분해를 일으킨다.<sup>5,6)</sup>

인진의 학명은 *Artemisia scoparia* Waldstein et Kitamura라 불리며 약리성분으로는 피넨, 마르젠, 캄펜, 보르네올, 류온 등의 정유성분이 있으며 청열이습(淸熱利濕), 배석이담(排石利膽), 발한이뇨(發汗利尿), 관격화담(寬膈化痰), 사간열(瀉肝熱), 소간울(疏肝鬱), 제제황(除諸黃), 구복(久服), 익기(益氣), 경신(輕身), 열색(悅色), 장년(長年) 특히 여성 질병에 좋다고 하여 민간에서는 산후하혈·자궁출혈 등에도 흔히 사용 되어진다.<sup>7,9)</sup>

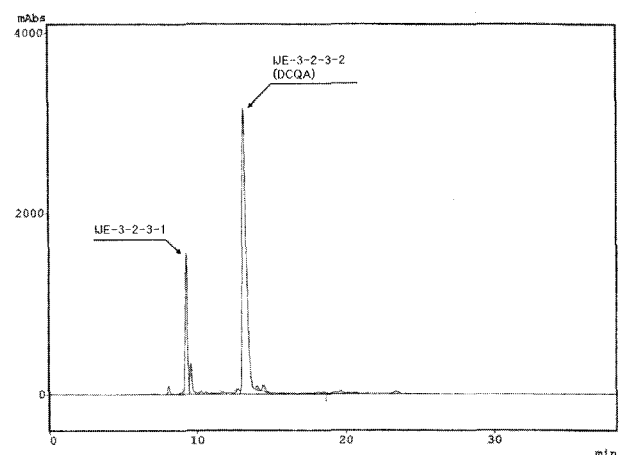
본 연구에서는 위에서 설명한 바와 같이 박하의 항암작용에 중점을 두어 HPV에서 발현되는 여러 가지 발암 단백질 중 E6와 E7를 이용하여 ELISA(효소면역측정법) 시스템을 확립하고 인진에서 추출된 물질(3,5-di-O-caffeoylquinic acid, DCQA)을 처리하여 항암 단백질의 작용을 억제함으로써 자궁경부암의 기능이 억제되는 것을 확인하고자 하였다.

## 실험 방법

**인진으로 부터 발암 단백질 결합 저해 물질(DCQA)의 분리** - 본 실험의 생약재료인 인진은 일신약품(주) (Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 건조된 생약재료를 실온에서 메탄올을 이용하여 3일간 추출한 후 n-hexane, ethyl acetate, n-butanol을 사용하여 용매분획을 실시하였고 이중 ethyl acetate 층을 대상으로 실험을 진행하였다. 용매 분획하여 추출된 ethyl acetate 추출물 300 mg을 역상 open column chromatography(RP-18 Φ 25~40 μm, 30 g, Merck)를 이용해 100% 물 조건에서 100% 메탄올 조건으로 10%

씩 메탄올 함량 (v/v)을 높여주며 gradient로 용매조건을 변화시켰다. 이렇게 얻어진 분획물 (446.6 mg)은 다시 역상 open column chromatography (RP-18 Φ 25~40 μm, 30 g, Merck, 60% 메탄올로 용출)를 실시하였고 여기서 얻어진 분획물 (256.9 mg, 60% 메탄올로 용출)을 Sephadex LH-20 open column chromatography (Sephadex LH-20, Φ 25~100 μm, Sigma)를 이용해 메탄올 : 에틸아세테이트 = 1 : 1의 용매조건에서 용출된 분획을 받아내었다. 용출된 분획 (51.1 mg)은 HPLC(YMC J'sphere ODS-H80, Φ 150×20 nm, Japan)를 실시하여 30% acetonitrile (in 0.01% formic acid) 조건에서 9분대와 13분대에 254 nm의 UV 흡수 피크 두 개를 얻어내었고 이를 각기 IJE-3-2-3-1 (7.1 mg)과 IJE-3-2-3-2(24.3 mg)라 하였다 (Fig. 1). 얻어진 두 개의 피크를 발암 단백질 (E6, E7)과 항암단백질 (p53, Rb) 간의 결합반응에 근거한 ELISA 방법으로 활성을 측정된 결과 IJE-3-2-3-1과 IJE-3-2-3-2 모두 E6AP-E6와 E7-Rb에서 효과를 나타내었다. IJE-3-2-3-1은 양이 부족하여 구조분석이 힘들었고 IJE-3-2-3-2는 분자식을 규명하기 위해 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR을 실시하였고 분자량 분석을 위해서는 positive FAB-mass 분석을 실시하여 데이터베이스 조회 결과 3,5-di-O-caffeoylquinic acid 임을 확인하였다.

**E6와 E6AP 발현벡터의 제조** - E6와 E6AP는 pET vector (Novagen, Darmstadt, Germany)에서 발현되는데 E6 RNA는 HPV 16(+) CaSki와 같은 자궁경부암 세포주에서 RNA isolation kit (Easy blue, iNTRON Biotechnology Co, Seoul, Korea)를 이용하여 분리하였다. Total RNA는 Primer sets : 5-GCG GCC GCC ACC ATG TTT CAG CAC AG-3 (sense)와 5-CTG CGG CCG CGA TTA CAG CTG GGT TTT



**Fig. 1.** HPLC profile of the isolated DCQA from *Artemisia scoparia* Waldstein et Kitamura. column; Shiseido CAPCAELL PAK C-18 (Φ10 nm×250 nm) mobile phase; 30% acetonitrile (in 0.01% formic acid), detector; UV detector (254 nm), flow rate; 2.0 ml/min.

CTC T-3 (antisense)를 이용하여 RT-PCR에 의해 증폭시켜 얻었다. 이 PCR product를 T-vector<sup>10)</sup>인 pBluescript II KS(+) (Stratagene, La Jolla, CA)에 삽입시켰고 PCR product가 삽입된 T-vector는 *Bam* HI과 *Sal* I 제한효소로 자르고 같은 제한효소로 잘려진 pET 28a(5369bp) (Novagen, Darmstadt, Germany) vector에 삽입시켰다. E6AP는 2개의 primer sets : 5-AGA TCT ATG AAG CGA GCA GCT GCA GCT GCA AAG CAT CTA ATA-3 (sense)와 5-CTC TAG CCG GAC AAG TGC ATC ATC TAT GAT-3 (antisense) 그리고 5-AGC GAG CTG ACA CTT CAG GAA CTT TTG GGA-3 (sense)와 5-TTA CAG CAT GCC AAA TCC TTT GGC ATA CGT-3 (antisense)로부터 RNA를 증폭하여 얻었다. E6AP는 사이즈가 매우 크기 때문에 전체 E6AP의 중간 부분이 겹치는 두개의 primer를 이용하였다. 전자의 경우 E6AP-a 후자를 E6AP-b로 하였다. 각각의 크기는 1.6 kb와 1.4 kb이지만 E6AP-a와 E6AP-b를 절단 후 연결시키면 결과적으로 2.6kb의 크기를 가지게 된다. Histidine이 결합된 E6AP를 발현하기 위해서 PCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO/E6AP vector를 *Bgl* II와 *Hind* III로 자르고 잘려진 DNA를 *Bam* HI, *Hind* III로 잘려진 pET28 vector에 삽입시켰다.<sup>11,12)</sup>

**E7과 pRb 발현벡터의 제조** - E7 발암단백질은 pET (Novagen, Darmstadt, Germany) vector에서 얻었는데 total RNA는 HPV(+)<sup>13)</sup>인 CaSki 세포주에서 RNA isolation kit (Easy-Blue, iNtRON biotechnology Co)를 이용하여 분리하였다. E7 oncogene은 5-CAC CAT GGC ATG GCA TGG AGA TAC ACC T-3 (sense)와 5-TTA TGG TTT CTG AGA ACA-3 (antisense)로 구성된 한 쌍의 primer를 이용하여 RT-PCR에 의해 증폭시켜 만들었고 만들어진 PCR product는 T-vector인 pBluescriptII KS(+) (Stratagene, La Jolla, CA)에 삽입시켰다. 삽입된 T-vector는 각기 *Bam* HI과 *Sal* I 제한효소로 절단하였고 각기 fragment는 동일한 제한효소로 절단되어진 pET28a (Novagen, Darmstadt, Germany) vector에 삽입시켰다. E7과 결합하는데 이용되는 Rb 단백질은 pET vector에서 제조되었으며 용해성과 안정성을 증가시키기 위한 pocket domain을 포함하는 아미노산 373에서 928에 이르는 N-말단이 제거된 짧은 단백질이다.<sup>13)</sup>

**제조합 단백질의 과발현 및 대량생산** - 만들어진 E6, E6AP, E7, Rb, p53의 제조합 벡터 시스템은 대장균에서 발현되도록 하였는데 pET 벡터는 *E. coli* (DH5 $\alpha$ )에 삽입시키고 pET28a는 BL21 (DE3)에 삽입하여 발현시켰다. 형질 전환 대장균주는 1 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)와 함께 18°C에서 하룻밤 동안 배양하여 단백질 생성을 유도하였고 생성된 단백질은 원심 분리시켜 회수하였다. pET 발현 대장균주를 용해시키기 위해 0.5% Triton X-100이 함유된 PBS buffer를 이용하였고 여기에 0.5 mM PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride, serine proteinase

inhibitor)와 aprotinin (10  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 사용하였다. pET28a 발현 대장균주는 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 300 mM NaCl이 함유된 buffer (pH 8.0)와 역시 0.5 mM PMSF와 aprotinin을 첨가하여 사용하였다. 용해액에 용해된 대장균주는 초음파 파쇄를 실시하여 4°C에서 10,000 rpm, 10분간 원심분리 후 상등액을 취해서 결합반응에 이용하였다.

**제조합 단백질의 분리 정제** - E6, E6AP, E7, Rb, p53의 제조합 단백질 중 pET28a/E6, pET28a/E6AP, pET28a/E7은 ELISA 결합반응에 이용하기 위해 정제 한 후 Maxisorb 96-well plate (Nunc, Rochester, NY)에 4  $\mu$ g/ml의 농도로 coating한 후 사용하는데 배양한 대장균주를 초음파 파쇄 후 4°C에서 10,000 rpm, 10분간 원심 분리하여 상등액만을 취하고 이를 Ni<sup>2+</sup>-NTA bead (Peptron Inc, Daejeon, Korea)에 결합시키고 20 mM imidazole이 포함된 용해 완충용액으로 3번 세척하였다. 결합된 단백질은 250 mM imidazole로 용출하여 사용하였다.

**발암 단백질과 항암 단백질 간의 결합을 이용한 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)** - 분리된 제조합 단백질들 중 6 $\times$ His- tagged protein인 E6, E7, E6AP를 Ni<sup>2+</sup>-NTA bead와 imidazole로 정제한 후 Maxisorb 96-well plate (Nunc, Rochester, NY)에 각기 4  $\mu$ g/ml의 농도로 코팅한 뒤 PBS/3% 탈지분유로 2시간 동안 코팅된 plate를 blocking시키고 역시 PBST로 5번 세척하였다. 샘플을 50  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 후 E6 발암단백질이 코팅된 plate에는 PBST로 20배 희석한 p53 lysate를 E6AP가 코팅된 plate에는 PBST로 15배 희석한 E6와 PBST로 20배 희석한 p53을 각기 처리하고 E7이 코팅된 plate에는 PBST로 5배 희석한 Rb lysate를 처리하고 1시간동안 반응시킨 후 PBST로 5번 세척하였다. 반응 후 E6가 코팅된 plate에는 PBST로 1000배 희석한 mouse anti-p53 antibody (Ab6, CAL Biochem, Darmstadt, Germany)를 넣어주고 E6AP가 코팅된 plate에는 PBST로 5배 희석한 E6 항체를 분비하는 hybridoma 배양액과 1000배 희석한 mouse anti-p53 antibody (Ab6, CAL Biochem, Darmstadt, Germany)를 각기 처리하고 E7이 코팅된 plate에는 PBST로 1000배 희석한 mouse anti-Rb antibody (Ab6, CAL Biochem, Darmstadt, Germany)를 처리하고 1시간 반응시킨 후 역시 PBST로 5번 세척하였다. 여기에 2차 항체로 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (Sigma, St. Louis, MO)를 처리하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 PBST로 5번 세척한 뒤 기질용액 (0.1M citrate buffer (pH 5.0) 5ml에 2 mg *o*-phenylenediamine, 2.5  $\mu$ l 37% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 넣고 발색을 유도한 후 2.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 발색을 정지시키고 490 nm에 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 흡광도를 측정하였다.

**Sulforhodamine B (SRB) assay를 이용한 세포독성 검사** - SRB assay는 세포 내 모든 단백질이 염색되는 원리에

기초하여 cell viability와 세포증식 여부를 정량적으로 확인할 수 있는 colorimetric assay이다. 본 논문에서는 HPV를 함유하지 않은 자궁경부암 세포주 C33A와 HPV를 함유한 자궁경부암 세포인 CaSKi, SiHa, HeLa, 정상적인 keratinocyte 세포주인 HaCaT을 이용하여 실험하였다. 이 중 HPV(+) 자궁경부암 세포주인 SiHa, CaSKi 와 HeLa는 American Type Culture Collection (Rockville, MD)에서 구입하여 사용하였다.

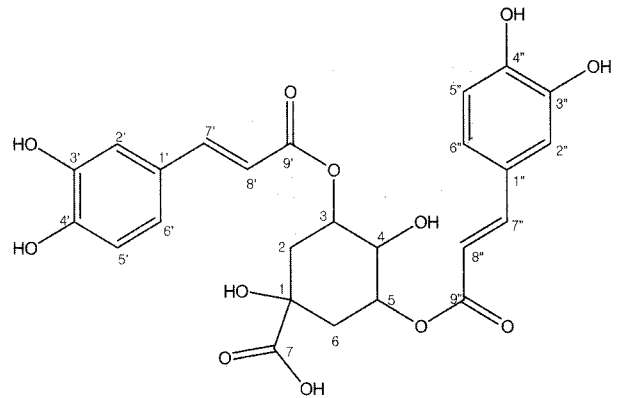
이 세포주들은 100 U/ml penicillin-streptomycine, 25 ng/ml amphotericin B 그리고 10% FBS이 포함된 DMEM을 이용하여 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 37°C로 배양하였다. 배양된 세포주들은 96 well plate에 well 당 1×10<sup>5</sup>의 농도로 seed하고 24시간 배양한 뒤 다양한 농도로 샘플을 처리하였다. 샘플 처리 후 24시간 동안 세포 성장 정도를 확인하며 배양한 후 96 well plate에 있는 배양액은 버리고 PBS로 1번 세척하였다. 10% TCA를 well 당 100 μl씩 넣고 -20°C에서 10분간 방치한 뒤 역시 PBS로 2번 세척하고 여기에 0.4% SRB 용액 (1% acetic acid에 0.4% SRB를 녹임) (Sigma, St. Louis, MO)을 well당 100 μl씩 넣어서 30분간 방치한다. 1% acetic acid로 5번 세척 후 96 well plate에 남아있는 acetic acid를 완전히 건조시킨 후 10 mM Trizma base (Sigma)를 역시 well 당 100 μl씩 넣고 10분간 방치 후 562 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

**통계처리** - One-way analysis of variance (ANOVA)을 적용하여 triplicate으로 3 번 반복 실험한 결과로 평균값±SD로 표시하였다.

**실험결과 및 고찰**

**DCQA의 물리 화학적 특성과 구조** - 인진의 메탄올 추출물로부터 분리한 DCQA는 흰색의 분말형태이었고 메탄올, 아세톤, DMSO에는 용해되었지만 물에는 잘 용해되지 않았다. Positive FAB-mass spectrometry 분석을 이용하여 DCQA의 분자량이 517임을 확인하였고 이를 토대로 화합물의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum 분석을 통해 분자식이 C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>임을 확인하였다. RP-18 TLC에서는 60% 메탄올 조건에서 0.51의 Rf value를 나타내었다. 본 화합물의 화학구조를 규명하기 위해 <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR을 측정한 결과 아래와 같은 spectral data를 보였다.

<sup>1</sup>H-NMR - (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.48 (1H, d, J=16.0 Hz, H-7), 7.46 (1H, d, J=16.0 Hz, H-7''), 7.05 (1H, d, J=2.0 Hz, H-2'), 7.03 (1H, d, J=2.0 Hz, H-2''), 7.00 (1H, dd, J=8.1, 2.0 Hz, H-6'), 6.97 (1H, dd, J=8.1, 2.0 Hz, H-6''), 6.76 (1H, d, J=8.1 Hz, H-5'), 6.22 (1H, d, J=16.0 Hz, H-8'), 5.27 (1H, m, H-5), 5.16 (1H, m, H-3), 3.72 (1H, dd, J=H-4), 2.11 (1H, dd, J=H-2<sub>a</sub>), 1.94 (1H, dd, J=H-6<sub>a</sub>), 1.81



**Fig. 2.** Chemical structure of 3,5-di-O-caffeoylquinic acid.

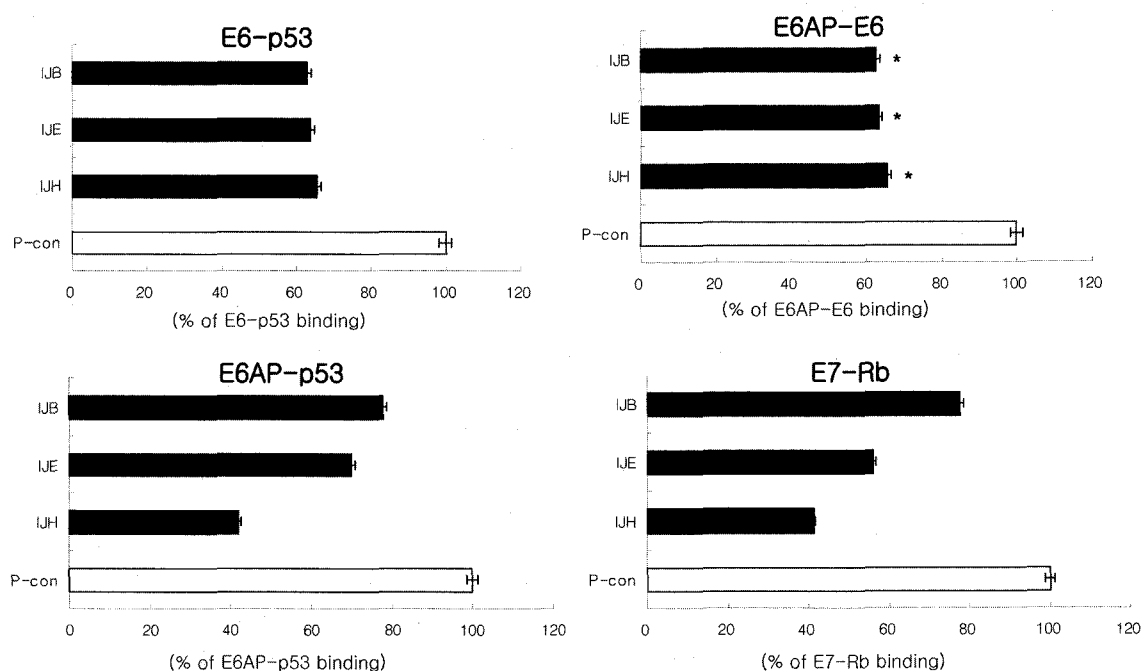
(1H, dd, J=H-6<sub>b</sub>), 1.76 (1H, dd, J=H-2<sub>b</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR - (300 MHz DMSO-d<sub>6</sub>): δ80.0 (C-1), 35.9 (C-2), 72.5 (C-3), 69.9 (C-4), 71.1 (C-5), 38.8 (C-6), 175.0 (C-7), 125.5 (C-19), 114.3 (C-29), 145.4 (C-3'), 148.1 (C-4'), 115.4 (C-5'), 120.9 (C-6'), 144.2 (C-7'), 114.4 (C-8'), 165.9 (C-9'), 125.4 (C-1''), 114.3 (C-2''), 145.8 (C-3''), 148.4 (C-4''), 115.4 (C-5''), 120.9 (C-6''), 144.2 (C-7''), 114.4 (C-8''), 165.6 (C-9'').

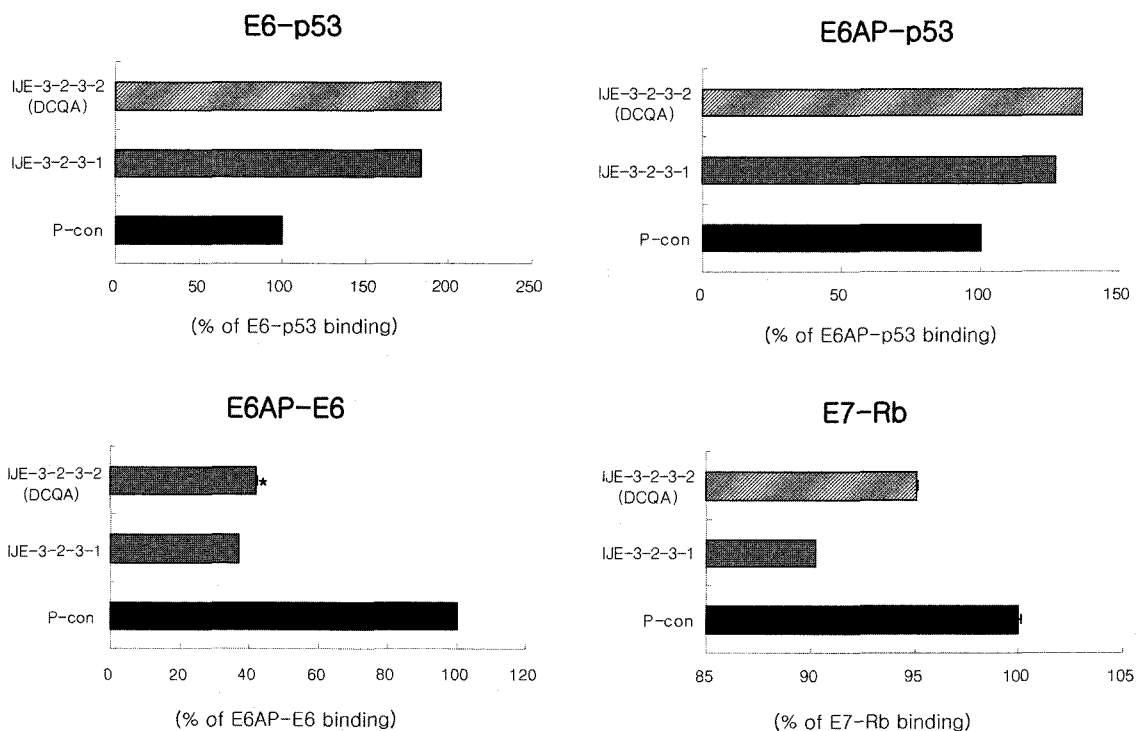
화합물의 <sup>13</sup>C-NMR data는 위의 <sup>1</sup>H-NMR data에서 예상 되어진 화합물내의 부분 구조에 대한 정보를 확인하여 주었으며 특히 관측된 분자량 (MW=516)과 연계하여 화합물의 분자식이 C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>임을 확인하였다. 이상의 결과를 토대로 database 조사를 실시하였고 분리된 화합물이 cyclohexa- necarboxylic acid에 두 분자의 caffeic acid가 결합된 형태인 3,5-di-O-caffeoylquinic acid임을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).<sup>14-19)</sup>

**DCQA가 발암단백질과 항암단백질의 결합에 미치는 영향** - 서론에서 언급한 바와 같이 E6와 E6AP 간의 결합은 정상세포의 기능을 저해하고 항암성 유지에 영향을 주어 세포 불멸화를 유도하게 된다. 인진 메탄올 추출물을 용매 분획하여 E6-p53, E6AP-p53, E6AP-E6, E7-Rb 4가지의 결합 반응에 근거한 ELISA를 실시하였다 (Fig. 3). E6AP-P53와 E7-Rb 결합반응에서 3가지 분획 중 n-hexane층에서는 약 60%정도 저해 되었고 E6-P53, E6AP-P53 결합반응은 3가지 분획이 모두 거의 40%정도 결합반응을 억제 하였다. 이 중 n-hexane층은 <sup>1</sup>H-NMR 결과 지방산의 비율이 높아 EtOAc층을 택해서 분리를 진행하였는데 EtOAc층의 경우 E6AP-E6 결합보다는 E7-Rb 결합에 특이적으로 저해효과를 보였다 (Fig. 3). 그러나 마지막 분리과정이었던 HPLC를 통한 분리과정 후에는 두 번째 피크인 DCQA가 E7-Rb 결합 보다는 약 60% 정도의 결합저해를 보이는 E6AP-E6의 결합 이 더 특이적인 저해효과가 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

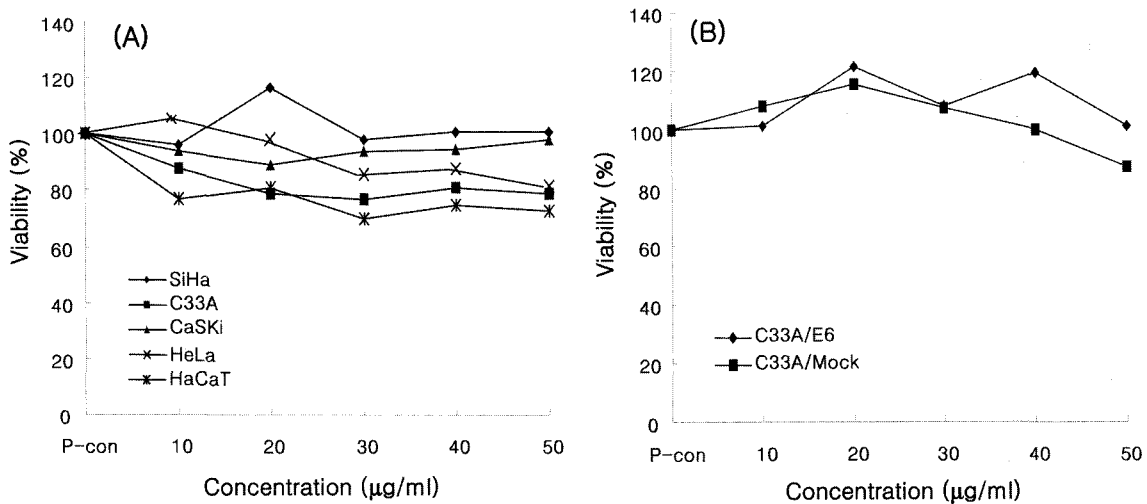
**DCQA을 이용한 암세포의 성장저해 측정** - HPV E6와



**Fig. 3.** The effects of extract of solvent partition on the ELISAs based on the bindings between oncoproteins and tumor suppressors. *Artemisia scoparia Waldstein et Kitamura* (500 g of dry weight) were extracted with MeOH and concentrated to aqueous phase in vacuo. The aqueous residue was adjusted to partitioned with n-hexane (IJH), EtOAc (IJE), and n-BuOH (IJB). In ELISAs based on bindings between E6 and p53, E6AP and p53, and E7 and pRb, inhibition value was shown at 50 µg/ml. IJE blocked the binding between E6AP and E6. The values are shown as mean ± S.D. from triplicates. P<0.05 compared to control.



**Fig. 4.** The effects of IJE-3-2-3-1 and IJE-3-2-3-2 (DCQA) on the ELISAs based on the bindings between oncoproteins E6 and E6AP. In ELISAs based on bindings of E6 and p53, E6AP and p53, and E7 and pRb, inhibition value was shown at 50 µg/ml. DCQA blocked by about 60% the binding between E6AP and E6 oncoprotein. The values are shown as mean ± S.D. from triplicates. \*significantly different from control (P<0.01).



**Fig. 5.** The cytotoxic effect of DCQA on cervical carcinoma cells. Cells (A; cervical carcinoma cells, B; E6-transfected C33A and mock control) were seeded in 96-well plate at concentration of  $1 \times 10^5/ml$ . After incubation for a day, DCQA was treated in a dose response manner and followed by incubation for 24 hour. Then 10% TCA was dispensed into these plate for fixations. After 0.4% SRB staining, the absorbance was measured by an ELISA reader at 562 nm. The viability was shown in cervical carcinoma cell lines, SiHa, C33A, HeLa and CaSki.. No specific inhibition of cell proliferation was observed at normal human keratinocyte. All the values are shown as mean  $\pm$  S.D. from three independent experiments with similar results.

E7 oncoprotein은 HPV 16, 18 type 세포주에서 중요한 발병 인자이다. 따라서 E6나 E7의 작용을 방해하면 효과적으로 자궁경부암 세포주의 성장저해나 세포 사멸을 유도할 수 있다. 특히 E6 항암단백질의 저해제로 예상되어지는 DCQA는 HPV 16형과 관련된 악성종양의 성장을 방해하리라 예상되어졌다. 본 논문에서는 간단한 ELISA 방법을 통해 E6AP-E6의 단백질 결합저해를 확인하였고 SRB assay를 통해 HPV(+) 세포주들의 성장에 DCQA가 어떤 영향을 주는지를 확인하였다. HPV 16형인 SiHa, CaSki 세포주와 HPV 18형인 HeLa 그리고 정상 세포주인 HaCaT을 이용하여 SRB assay를 실시한 결과 예상과는 달리 HaCaT keratinocyte나 HPV함유하지 않은 C33A 세포주가 더 민감한 반응을 하고 그 외 자궁경부암 세포주인 SiHa나 CaSki에는 영향을 나타내지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 5-A). 이 결과에 대한 확인 실험을 위해 정상세포주인 C33A에 E6 oncogene이 삽입되어 있는 C33A/E6와 oncogene이 제외된 vector만을 포함하고 있는 세포주인 Mock control을 이용하여 SRB assay를 실시하였다. 똑같은 양의 샘플을 처리하고 24시간 후 흡광도를 측정된 결과 앞의 결과와 마찬가지로 E6 발현세포주보다 vector control 세포주에서 샘플에 대해 민감한 반응을 나타내지는 않는 것으로 확인이 되었다 (Fig. 5-B). 추가적인 실험으로 위에서 언급한 세포주들에 샘플을 처리하였을 때 세포내 p53 pathway에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 Western blot을 실시하여 p53 단백질 발현 레벨을 측정된 결과 위의 5가지 세포에서 p53의 발현레벨이 차이가 없는 것으로 확인되었다 (자료는 제시하지 않음).

## 결론

자궁경부암은 전 세계적으로 암에 의한 여성 사망원인 2위를 차지하고 있으며, 개발도상국에서는 사망 원인 1위의 질병이다. 세계보건기구(WHO)가 최근 추정한 바에 따르면 매년 자궁경부암으로 진단받는 여성은 51만 명에 이르며, 28만 8천여 명이 사망한다고 한다.<sup>20)</sup> 이에 자궁경부암을 유발하는 주된 원인이 되는 HPV의 증식저해 물질을 탐색하기 위해 인진 추출물을 column chromatography와 HPLC 등을 이용하여 분리를 실행하였고 이를 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR spectra를 통해 수소와 탄소의 위치를 확인하였다 데이터베이스 조사를 실시한 결과 분리되어진 물질이 cyclohexanecarboxylic acid의 3번과 5번 위치에 두 분자의 caffeic acid가 결합된 형태인 3, 5-di-O-caffeoylquinic acid (DCQA)임을 확인하였다. DCQA는 흰색의 분말 상태로 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR spectral data를 통해 화합물의 분자식이 C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>임을 확인하였으며 positive FAB-mass spectrometry 분석을 통해 분자량이 516임을 확인하였다. 인진에서 분리된 DCQA는 약 80% 이상의 순도를 가지고 있었으며 ELISA상에서 E6와 E6AP간의 결합에 대해 약 60% 이상의 저해를 보였으나 세포의 성장 저해 정도를 확인할 수 있는 SRB assay를 실시한 결과 자궁경부암 세포주에는 영향을 미치지 않았다. ELISA 실험결과를 바탕으로 DCQA가 E6 발암단백질에 영향을 미치는지 알아보기 위해 E6 발현 세포주를 이용한 SRB assay 결과 역시 위의 결과와 마찬가지로 DCQA가 E6 transfectant에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Western blot 결과에서 역시 p53 발현레벨이 변화하지 않는 것으로 보아 DCQA는 E6 발암 단백질의 기능에 영향을 미치지 않거나 E6 발암 단백질의 기능에 영향을 준다고 하여도 p53에 의존된 경로를 통해 자궁경부암 세포주의 성장을 조절하는 것이 아니라 p53과 무관한 경로를 통해 세포에 작용하는 것으로 사료되어진다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 DCQA는 E6 발암단백질에 영향을 미치지 않거나 혹은 영향을 미치더라도 E6와 관계된 p53 경로에 의존하지는 않는 것으로 사료된다. 그러나 ELISA 결과에서 보는 바와 같이 E6AP와 E6 사이의 결합을 저해하는 재현성 있는 결과를 나타내었고 이를 바탕으로 자궁경부암 세포주에서 다른 발암 억제경로에 대한 심도 있는 추가 연구가 이루어져야 할 것으로 생각됨으로 좀 더 자세한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험 등이 요구되어진다.

### 감사의 말씀

본 연구는 과기부 (M103KD010034-03K0401-03410)와 경남도 생명공학산업화과제에서 지원 받아 수행된 결과입니다.

### 인용문헌

- Hubbert, N. L., Sedman, S. A. and Schiller, J. T. (1992) Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human Keratinocyte. *J. Virol.* **66**: 6237.
- zur Hausen, H. and de Villiers, E. M. (1996) Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**: 802.
- Scheffner, M. K., Munger, K., Byrne, J. C., and Howley, P. M. (1991) The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 5523.
- Woodworth, C. D., Cheng, S., Simpson, S., Hamacher, L., Chow, L. T., Broker, T. R. and DiPaolo, J. A. (1992) 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.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M. and Howley, P. M. (1994) Identification of human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6AP-dependent of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 8797.
- Sherman, L., Jackman, A., Itzhaki, H., Stoppler, M. C., Koval, D. and Schlegel, M. (1997) Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6 oncoprotein : role of p53 inactivation. *Virology.* **237**: 296.
- <http://www.koriz.com>
- Huang, K. C. (1999) The pharmacology of Chinese herbs II, CRC press.
- Michael, M. G., Christopher, H. and Roy, U. AHPA Safety and Labeling Guidelines Subcommittee.
- Huibregtse, J., Scheffner, M. and Howley, P. M. (1993) Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell Biol.* **16**: 775.
- Huibregtse, J., Scheffner, M. and Howley, P. M. (1993) Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol. Cell Biol.* **16**: 4918.
- Cho, Y. S., Cho, C. W. and Yoon, D. Y. (2001) Development of a screening system for drugs against human papillomavirus-associated cervical cancer: based on E7-Rb binding. *J. Biochem. Mol. Biol.* **34**: 80.
- Cho, Y. S., Cho, C. W., and Yoon, D. Y. (2000) Development of screening system for drugs against human papillomavirus-associated cervical cancer: based on E6-E6AP binding. *Antiviral Res.* **47**: 199.
- Ma, C. M., Norio, N., and Masao, H. (2001) Inhibitory effects on HIV-1 protease of tri-p-coumaroylspermidine from *Artemisia caruifolia* and related amides. *Chem. Pharm. Bull.* **49**: 915.
- Carnata, A., Heitzb, A., Fraisea, D., Carnata, A. P., and Lamaison, J. L. (2000) Major dicaffeoylquinic acids from *Artemisia ulgaris*. *Fitoterapia.* **71**: 587.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Guillermo, S. H., BURILLO, J. S., and Codina, C. (2004) Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Waste. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 1890.
- Peng, L. Y., Mei, S. X., Jiang, B., Zhou, H. and Sun, H. D. (2000) Constituents from *Lonicera japonica*. *Fitoterapia.* **71**: 713.
- Azuma, K., Nakayama, M., Koshioka, M., Ippoushi, K., Yamaguchi, Y., Kohata, K., Yamauchi, Y., Ito, H., and Higashio, H. (1999) Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L.. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 3963.
- Yoshihiro, C., Hiroshi, O., Mayumi O. K., Tadahiro, N. and Tojiro, T. (1996) Structural Identification of Two Antioxidant quinic acid derivatives from garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). *J. Agric. Food Chem.* **44**: 2037.
- Data on File. (2004) GSK Biologicals. Rixensart. Belgium.

(2004년 12월 1일 접수)