

## 박하에서 분리한 Caffeic Acid Methyl Ester가 자궁경부암 바이러스 발암단백질 E6의 기능에 미치는 영향

백태웅 · 이경애 · 안민정 · 주혜경 · 오현철 · 안종석 · 조용권\* · 명평근\*\* · 윤도영#  
한국생명공학연구원 세포생물학연구소, \*창원대학교 보건생화학과, \*\*충남대학교 약학과  
(Received October 23, 2004; Revised November 19, 2004)

### Effects of Caffeic Acid Methyl Ester from *Mentha arvensis* Linne var. *piperascens* on Function of E6 Oncoprotein of HPV 16

Tae-Woong Baek, Kyung-Ae Lee, Min-Jung Ahn, Hae-Kyung Joo, Hyun-Cheol Oh, Jong-Seok Ahn, Yong-Kweon Cho\*, Pyung-Keun Myung\*\* and Do-Young Yoon#

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

\*Department of Healthscience and Biochemistry, Changwon National University,

\*\*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 papilloma virus) type 16 and cooperated in immortalization and transformation of primary keratinocyte. E6 and E7 oncoproteins interfere the functions of tumor suppressor proteins p53 and retinoblasoma protein (pRb), respectively. Among a lots of natural products, *Mentha arvensis* Linne var. *piperascens* have inhibitory effects on bindings between E6 oncoprotein and tumor suppressor p53, E3 ubiquitin-protein ligase (E6AP). HPV oncoprotein inhibitors from *Mentha piperita* L. were isolated by solvent partition and column chromatography (Silica gel, RP-18) and inhibitory compounds were finally purified by HPLC using an ELISA screening system based on 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 functions of E6 oncoprotein. We investigated whether caffeic acid methyl ester (CAM) extracted from *Mentha piperita* L. could inhibit the function of E6 oncoprotein. CAM 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 CAM 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.

**Keywords** □ Human papilloma virus (HPV), *Mentha arvensis* Linne var. *piperascens*, E6AP, E6 and Caffeic acid methyl ester

Human papillomavirus(HPV)는 몇몇 악성 종양과 관계있는 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, 구강, 그리고 다른 생식기 암을 유발한다. 여성에서 자궁경부암을 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. E6, E7 등의 바이러스 단백질들은 단독으로 형질전환의 특성을 가지며 암화에 중요한 역할을 한다. 이러한 단백질들은 자궁경부암 세포주에서 선택적으로 유지되고 발현되며, 세포막간 신호전달, 세포주기 조절, 세포 형질전환, primary keratinocyte의 불멸화, 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

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

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 불멸화를 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 조절자로서 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>

박하(peppermint)의 학명은 *Mentha arvensis Linne var. piperascens*라 불리며 약리성분으로는 menthol, l-limonene, ethylamylketone, menthofuran, α-pinene 등이 있으며 menthol의 약리학적 기능은 두통, 신경통, 소양증 등에 쓰이며 혈관중추에 억제적으로 작용하여 혈관의 이완을 가져오기 때문에 동양의 약에서는 가벼운 증풍에도 쓰인다.<sup>7-12)</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 박하에서 추출된 물질(caffeic acid methyl ester, CAM)을 처리하여 항암 단백질의 작용을 억제함으로써 자궁경부암의 기능이 억제되는 것을 확인하고자 하였다.

## 실험 방법

### 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 CTC T-3(antisense)를 이용하여 RT-PCR에 의해 증폭시켜 얻었다. 이 PCR product를 T-vector<sup>13)</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(5369 bp) (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 2.6 kb의 크기를 가지게 된다. histidine이 결합된 E6AP를 생산하기 위해서 PCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO/E6AP vector를 *Bgl*II와 *Hind*III로 자르고 잘려진 DNA를 *Bam*HI, *Hind*III로 잘려진 pET28 vector에 삽입시킨다.<sup>14,15)</sup>

### E7과 pRb 발현벡터의 제조

E7 발암단백질은 pET(Novagen, Darmstadt, Germany) vector에서 얻었는데 total RNA는 HPV(+ )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 pBluescript II 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>16)</sup>

### Overexpression과 재조합 단백질의 대량생산

만들어진 E6, E6AP, E7, Rb, p53의 재조합 벡터 시스템은 대장균에서 발현되도록 하였는데 pET 벡터는 *E. coli*(DH5α)에 삽입시키고 pET28a는 BL21(DE3)에 삽입하여 발현시켰다. 형질전환 대장균주는 1 mM IPTG(isopropyl-β-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 10 μg/ml aprotinin을 첨가하여 사용하였다. pET28a 발현 대장균주는 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 300 mM NaCl이 함유된 buffer와 역시 0.5 mM PMSF와 10 μg/ml aprotinin을 첨가하여 사용하였다. Lysis buffer에 용해된 대장균주는 초음파 파쇄를 실시하여 원심분리 후 상등액을 취해서 결합반응에 이용하였다.

### 재조합 단백질의 분리 정제

E6, E6AP, E7, Rb, p53의 재조합 단백질 중 pET28a/E6,

pET28a/E6AP, pET28a/E7은 ELSIA 결합반응에 이용하기 위해 정제 한 후 Maxisorb 96-well plate(Nunc, Rochester, NY)에 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 coating한 후 사용하는 데 배양한 대장균주를 초음파 파쇄 후 상등액을 취하고 이를  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA bead (Peptron Inc, Daejeon, Korea)에 결합시키고 20 mM imidazole이 포함된 용해완충용액으로 3번 세척하였다. 결합된 단백질은 250 mM imidazole로 용출하여 사용하였다.

#### 발암 단백질과 항암 단백질 간의 결합을 이용한 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

분리된 재조합 단백질들 중  $6\times\text{His}$ -tagged protein인 E6, E7, E6AP를  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA bead와 imidazole로 정제한 후 Maxisorb 96-well plate(Nunc, Rochester, NY)에 각기 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 코팅한 뒤 PBS/3% skimmed milk로 2시간 동안 코팅된 plate를 blocking시키고 역시 PBST로 5번 세척하였다. 샘플을 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 E6가 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 1시간 동안 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 분리하는 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 second antibody로 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated anti-mouse IgG(Sigma, St. Louis, MO)를 처리하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 PBST로 5번 세척한 뒤 기질용액(2 mg *o*-phenylene-diamine, 2.5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  per 5 ml of 0.1 M Citrate buffer, pH 5.0)을 넣고 발색을 유도한 후 2.5 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 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 파필로마 바이러스에 의해 발생하는 자궁경부암 세포인 CaSKi, SiHa, HeLa와 정상적인 keratinocyte 세포주인 HaCaT을 이용하여 실험하였다. 이 중 HPV(+) 자궁경부암 세포주인 SiHa, CaSKi와 HeLa는 American Type Culture Collection(Rockville, MD)에서 구입하

여 사용하였다.

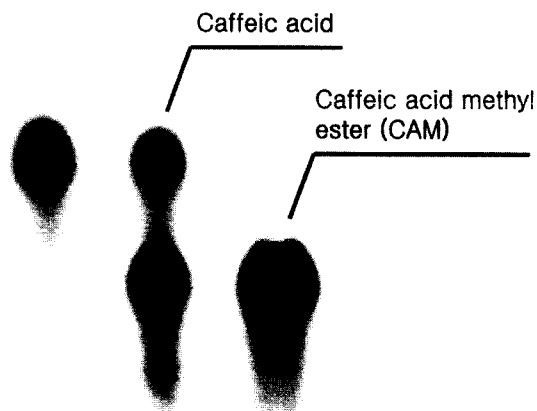
이 세포주들은 100 U/ml penicillin-streptomycin, 25 ng/ml amphotercine B 그리고 10% FBS이 포함된 DMEM을 이용하여 5%  $\text{CO}_2$ 가 유지되는 배양기에서 37°C로 배양하였다. 배양된 세포주들은 96 well plate에 well 당  $1\times 10^5$ 의 농도로 seed하고 24시간 배양한 뒤 다양한 농도로 샘플을 처리하였다. 샘플 처리 후 48시간 동안 세포 성장 정도를 확인하며 배양한 후 96 well plate에 있는 배양액은 버리고 PBS로 1번 세척하였다. 10% TCA를 well당 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 -20°C에서 10분간 방치한 뒤 역시 PBS로 2번 세척하고 여기에 0.4% SRB 용액(0.4% SRB in 1% acetic acid, sulforhodamine B, Sigma, St. Louis, MO)을 well당 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣어서 30분간 방치한다. 1% acetic acid로 5번 세척 후 96 well plate에 남아있는 acetic acid를 완전히 건조시킨 후 10 mM trizma base(Sigma, St. Louis, MO)를 역시 well당 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 10분 간 방치 후 562 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### 박하로 부터 발암 단백질 결합 저해 물질(CAM)의 분리

본 실험의 생약재료인 박하는 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 3 g을 역상 open column chromatography(RP-18  $\text{O}$  40~63  $\mu\text{m}$ , 150 g packing, Merck)를 이용해 100% 물 조건에서 100% 메탄올 조건으로 10%씩 메탄올 함량(v/v)을 높여주며 gradient로 용매조건을 변화시켰다. 이렇게 얻어진 분획물(1.2 g)은 다시 역상 open column chromatography(RP-18  $\text{O}$  40~63  $\mu\text{m}$ , 100 g packing, Merck, 50% 메탄올로 용출)를 실시하였고 여기서 얻어진 분획물(780 mg, 50%~60% methanol로 용출)을 silica open column chromatography(silica gel 60  $\text{O}$  15~40  $\mu\text{m}$ , 100 g packing, Merck)를 이용해 1% MeOH:EtOAc(in 0.05% formic acid)에서 1%씩 메탄올을 증가시키며 10%까지 받아내고 그 뒤로는 5%씩 증가시키며 30% 메탄올 용매조건까지 용출된 분획을 받아내었다. 용출된 분획(150 mg)은 다시 역상 open column chromatography를 실시하였으며 70% 메탄올에서 용출된 항암 단백질 결합저해 분획(23.7 mg)은 HPLC(Shiseido CAPCELL PAK MG 5  $\mu\text{m}$ ,  $\text{O}$  250 $\times$ 10 nm, Japan)를 사용하여 30% acetonitrile에서 59% acetonitrile로 35분간 gradient로 실시하여 20분대에서 254 nm의 UV 흡수 피크를 보이는 순도 80% 이상의 caffeic acid methyl ester(CAM)을 분리하였다.

#### CAM의 제조

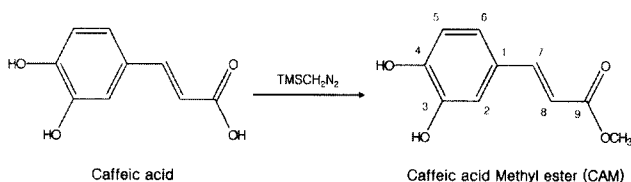
박하에서 분리된 CAM의 양은 추가적인 생화학적 실험을 진



1                      2                      3

**Fig. 1** – TLC of caffeic acid and caffeic acid methyl ester (CAM). 1) caffeic acid, Rf value: 0.72 at 70% MeOH, RP-18 TLC, 2) before HPLC prep, 3) CAM, Rf value: 0.56 at 70% MeOH, RP-18 TLC.

행하기에 충분하지 않아 부족한 CAM을 합성하여 나머지 실험을 진행하였다. 구입한 3,4-dihydroxycinnamic acid(caffeic acid, 97%, Aldrich)을 50 mg 취해서 1 ml 메탄올에 녹이고(trimethylsilyl) diazomethane(2.0 M in hexane, Aldrich)을 300  $\mu$ l을 첨가하여 12시간 동안 상온에서 교반한 후 RP-18 TLC로 확인한 결과 약 60% 정도의 caffeic acid에 메틸화가 진행된 것을 확인하였다(Fig. 1, 2). 나머지 약 40% 정도의 메틸화되지 않은 caffeic acid를 분리해내기 위해서 HPLC(YNC J'sphere ODS-H80, 150  $\times$  20 nm I.D., Japan)를 사용하였으며, 50% 메탄올 조건에서 용매전개를 실시하였을 때 254 nm에서 약 27분대에 UV 흡수를 보이는 피크를 얻었다. 얻어진 피크가 CAM인지 분자식을 규명하기 위해  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 실시하였고 분자량 분석을 위해서는 ESI-mass 분석을 통해 caffeic acid 반응물이 박하에서 분



**Fig. 2** – Methylation of caffeic acid. Caffeic acid (50 mg) was dissolved in 1 ml of MeOH. Then 300  $\mu$ l of 2 M (trimethylsilyl) diazomethane in hexane was added to the above mixture and the reaction was continued overnight.

**Table I** –  $^1\text{H-}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectral data of CAM (300 MHz, in  $\text{DMSO-}d_6$ )

Carbon no.	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , multiplicity)	$^1\text{H}$ ( $\delta$ , multiplicity, J in Hz)
1	125.5 (s)	-
2	114.8 (d)	7.06 (br)
3	145.1 (s)	-
4	145.6 (s)	-
5	115.8 (d)	6.77 (d; 7.2 Hz)
6	121.4 (d)	6.99 (d; 7.5 Hz)
7	148.5 (d)	6.26 (d; 15.9 Hz)
8	113.7 (d)	7.49 (d; 15.9 Hz)
9	167.0 (s)	-
9-OCH <sub>3</sub>	51.2 (CH <sub>3</sub> )(q)	3.65 (s)

리해낸 물질과 같은 구조와 분자량을 가지는 CAM임을 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$ 에 기초한 CAM의 spectral data는 Table I에 나타내었다.

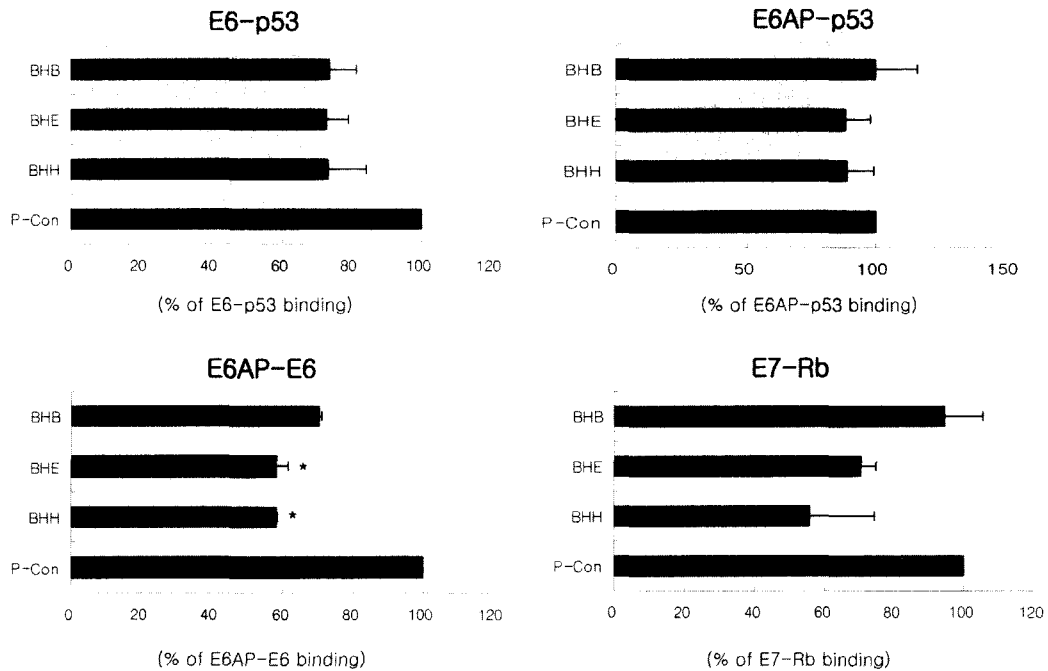
## 실험결과 및 고찰

### CAM의 물리 화학적 특성과 구조

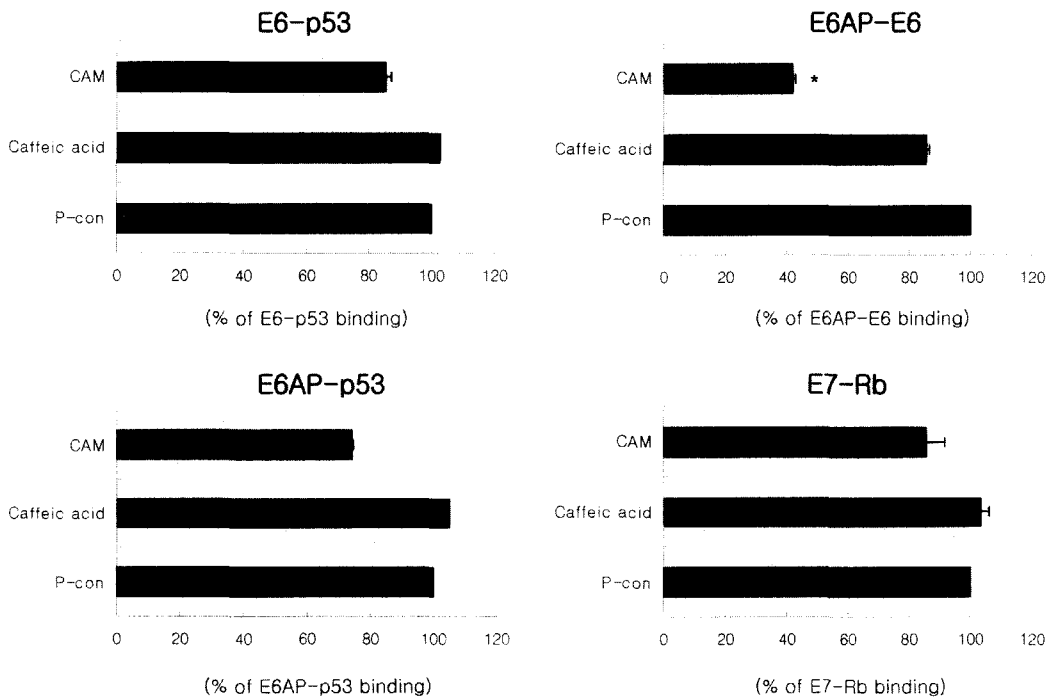
박하의 메탄올 추출물로부터 분리한 CAM은 진한 갈색의 분말형태이었고 메탄올, 아세톤, DMSO에는 용해되었지만 물에는 잘 용해되지 않았다. ESI-mass spectrometry 분석을 이용하여 CAM의 분자량이 194임을 확인하였고 이를 토대로 화합물의  $^{13}\text{C-NMR}$  분석을 통해 분자식이  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 임을 확인하였다. RP-18 TLC에서는 70% 메탄올 조건에서 0.56의 R<sub>f</sub> value를 나타내었다. 본 화합물의 화학구조를 규명하기 위해  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 및  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum을 측정하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 화합물은 carboxyl기의 alpha 및 beta 위치에 존재하는 이중결합의 proton에서 특징적으로 관찰되는 chemical shift(6.26, 7.49 ppm)가 존재하였으며 그 coupling constant(J=15.9 Hz)로부터 이중결합의 geometry가 trans임이 확인되었다. 또한 벤젠환 내에서 ortho 위치에 존재하는 두 종의 proton(6.66 ppm, 6.99 ppm) 및 6.99 ppm 피크에 대하여 meta 위치에 존재하는 proton 피크(7.06 ppm)가 관찰되었으며 methoxy기(3.65 ppm)의 존재도 확인되었다. 화합물의  $^{13}\text{C-NMR}$  data는 위의  $^1\text{H-NMR}$  data에서 예상되어진 화합물내의 부분 구조에 대한 정보를 확인하여 주었으며 특히 관측된 분자량(MW=194)와 연계하여 화합물의 분자식이  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 임을 확인하였다. 이상의 결과를 토대로 database 조사를 실시하였고 그 결과 분리된 화합물이 caffeic acid methyl ester임을 확인할 수 있었다.<sup>17-23)</sup>

### CAM이 ELSIA에 미치는 영향

서론에서 언급한 바와 같이 E6와 E6AP 간의 결합은 정상세포의 기능을 저해하고 항상성 유지에 영향을 주어 세포 불멸화를 유도하게 된다. 박하 메탄올 추출물을 용매 분획하여 E6-p53,



**Fig. 3** – The effects of extract of solvent partition on the ELISAs based on the bindings between oncoproteins and tumor suppressors. *M. arvensis* Linne var. *piperascens* (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 BHH), EtOAc (BHE) and n-BuOH (BHB). The inhibition value was shown at 50 µg/ml in ELISAs based on the bindings between E6 and p53, E6AP and p53, and E7 and pRb. These ELISA assays showed that BHE would had the ability to block the binding between E6AP and E6 oncoprotein. The values are shown as mean±S.D. from triplicates. *P*<0.05 compared to control.



**Fig. 4** – The effects of CAM and CA on the binding between oncoprotein E6 and E6AP. The inhibition value was shown at 50 mg/ml in ELISAs based on the bindings between E6 and p53, E6AP and p53, and E7 and pRb. These ELISA assays showed that CAM blocked the binding between E6AP and E6 oncoprotein. This result represents one of five experiments. The values are shown as mean±S.D. from triplicates. \*significantly different from control (*P*<0.01).

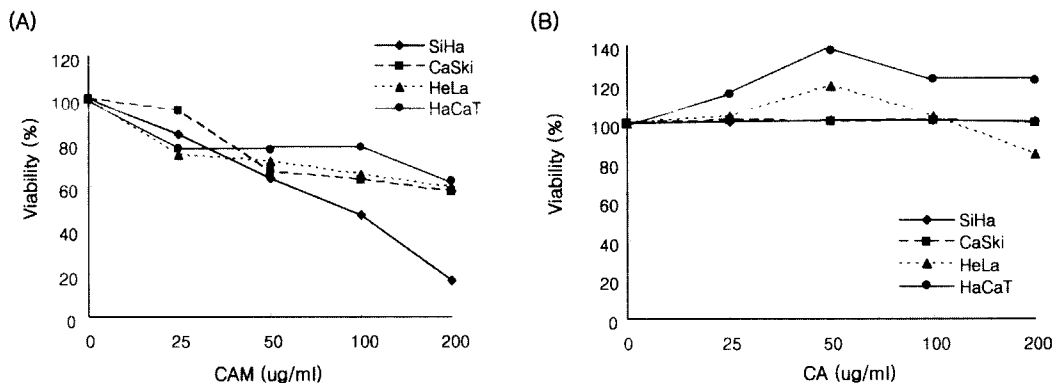


Fig. 5 - The cytotoxic effect of CAM and CA on cervical carcinoma cells. Cells were seeded in 96 well plate at concentration of  $1 \times 10^5$ /ml. After incubation for a day, CAM (A) or CA (B) was treated and followed by incubation for 24 hour, 10% TCA was dispensed into these plate for fixations. After 0.4% SRB staining, the absorbance was measured by an ELISA reader at 562 nm. The specific inhibition was shown in HPV 16(+) cervical carcinoma cell line SiHa and CaSki after treatment. 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.

E6AP-p53, E6AP-E6, E7-Rb 4가지의 ELISA를 실시하였다. 결과는 Fig. 3과 같이 E6AP-E6와 E7-Rb에서 결합반응 억제를 나타내었고 3가지 분획 중 hexane층과 EtOAc층에서 약 40%의 결합 억제를 나타내었다. 이중 EtOAc층을 택해서 분리를 진행하였는데 EtOAc층의 경우 E7-Rb 결합보다는 E6AP-E6 결합에 특이적으로 저해효과를 보였다. 마지막 분리과정이었던 HPLC를 통한 분리과정 후에도 ELISA 결과 다른 assay보다는 E6AP-E6 간의 결합에 특이적으로 반응을 하였고 그 중 2번째 분획이 약 35% 정도의 결합 저해효과가 있음을 확인하였다. 2번째 분획을 NMR과 ESI-mass 분석을 실시한 결과 caffeic acid의 9번 -OH 작용기가 -CH<sub>3</sub>로 치환된 형태인 caffeic acid methyl ester (CAM)임을 확인하였으며 Fig. 4에서와 같이 E6AP-E6의 결합에 기초한 ELISA에서 약 60%의 결합저해작용을 나타내었다.

#### CAM을 이용한 암세포의 성장저해 측정

HPV E6와 E7 oncoprotein은 HPV 16, 18 type 세포주에서 중요한 발병 인자이다. 따라서 E6와 E7의 작용을 방해하면 효과적으로 자궁경부암 세포주의 성장저해나 세포 사멸을 유도할 수 있다. E6와 E7 저해제로 예상되어지는 CAM은 HPV 16형과 관련된 악성종양의 성장을 방해하였다. 본 논문에서는 ELISA를 통해 E6AP-E6의 단백질 결합저해를 확인하였고 SRB assay를 통해 HPV(+) 세포주들의 성장에 CAM이 어떤 영향을 주는지를 확인하였다. HPV 16형인 SiHa, CaSki 세포주와 HPV 18형인 HeLa 그리고 정상 세포주인 HaCaT를 이용하여 SRB assay를 실시하였다. SiHa, CaSki, HeLa의 성장은 HPV가 발현하는 copies의 발현에 의존하므로 HPV(+) 세포주에서 HPV inhibitor는 세포성장을 저해하지만 HaCaT과 같은 정상 세포주에는 미치는 영향이 없거나 미비할 것으로 예상된다. 그러므로 CAM에

의한 E6AP와 E6의 결합저해는 E6가 세포상장에 중요한 영향을 미치는 HPV 16형과 같은 세포주의 성장을 저해할 것으로 예상되어진다. caffeic acid methyl ester(CAM)에 의한 세포성장저해는 Fig. 5(A)에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 SiHa(1~2 copies)와 CaSki(60~600 copies)같은 HPV 16형의 세포주는 약 25  $\mu$ g/ml 농도에서부터 성장저해를 보이기 시작했으며 CaSki의 경우 50  $\mu$ g/ml 농도까지는 성장저해를 보였지만 그 이후 농도에서는 세포생존율이 일정하게 유지되는 경향을 보였다. SiHa의 경우 200  $\mu$ g/ml의 농도 까지도 지속적인 성장저해를 보였으며 HPV 18형의 HeLa(50 copies)는 25  $\mu$ g/ml까지 성장저해를 보였으나 그 이후 농도에서는 영향이 미비하였다. 정상세포주인 HaCaT은 어느 정도 초기농도에서는 성장저해를 보였지만 그 이후 농도에서는 세포 생존율을 일정하게 유지하였다. Fig. 5(B)의 그림은 CAM을 메틸화하기 전의 물질인 caffeic acid(CA)를 함께 처리한 결과인데 여기서는 정상 세포주를 포함한 모든 세포주에서 별다른 영향을 보이지 않았다. 이는 ELISA의 경우와 같이 CAM이 정상 세포주에는 영향을 미치지 않지만 HPV 16형의 세포주에는 영향을 주며 특히 이 중 SiHa 세포주의 성장에 중요한 영향을 보이는 것을 알 수 있었다.

#### 결 론

박하 메탄을 추출물로부터 자궁경부암 바이러스가 생산하는 발암 단백질의 기능을 억제할 수 있는 물질을 분리하기 위해 open column chromatography와 HPLC를 실시하였고 분리된 물질을 <sup>1</sup>H-NMR spectrum과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum을 통해 수소와 탄소의 위치를 확인하여 데이터베이스 조사를 실시한 결과 분리되어진 물질이 caffeic acid의 9번 -OH기가 -OCH<sub>3</sub>로 치환되어

진 caffeic acid methyl ester(CAM)임을 확인하였다. CAM은 ELISA상에서 E6AP-E6 결합에 대해 약 60% 이상의 저해를 보였으며 세포 독성여부를 확인할 수 있는 SRB assay를 실시한 결과 SiHa와 CaSki 같은 HPV 16 형의 세포주의 성장을 저해하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과에 의하면 박하에서 분리되어진 CAM은 HPV 16형의 바이러스가 생산하는 E6 발암 단백질에 작용하여 암세포의 성장을 특이적으로 저해하는 것으로 생각되며 HPV에 의해 유도된 자궁경부암의 치료에 유효할 것으로 사료됨으로 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.

### 문헌

- 1) Hubbert, N. L., Sedman, S. A. and Schiller, J. T. : Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human Keratinocyte. *J. Virol.* **66**, 6237 (1992).
- 2) zur Hausen, H. and de Villiers, E. M. : Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 802 (1996).
- 3) Scheffner, M. K., 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. USA* **88**, 5523 (1991).
- 4) 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).
- 5) Scheffner, M., Huibregtse, J. M. and Howley, P. M. : Identification of human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6AP-dependent of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8797 (1994).
- 6) Sherman, L., Jackman, A., Itzhaki, H., Stoppler, M. C., Koval, D. and Schlegel, M. : Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6 oncoprotein : role of p53 inactivation. *Virology* **237**, 296 (1997).
- 7) 안덕균 : 원색한국본초도감, 교학사 (1998).
- 8) 이영노 : 원색한국식물도감, 교학사 (1998).
- 9) 이우철 : 원색한국기준식물도감, 아카데미서적 (1996).
- 10) 이창복 : 대한식물도감, 향문사 (1980).
- 11) 이휘재 : 한국식물도감, 문교부 (1961).
- 12) 박종희 : 상용약용식물도감, 신일상사 (2000).
- 13) Huibregtse, J., Scheffner, M. and Howley, P. M. : 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 (1993).
- 14) Huibregtse, J., Scheffner, M. and Howley, P. M. : Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol. Cell. Bio.* **16**, 4918 (1993).
- 15) Cho, Y. S., Cho, C. W. and Yoon, D. Y. : Development of a screening system for drug against human papillomavirus-associated cervical cancer : based on E7-Rb binding. *J. Biochem. Mol. Biol.* **34**, 80 (2001).
- 16) Cho, Y. S., Cho, C. W. and Yoon, D. Y. : Development of a screening system for drug against human papillomavirus-associated cervical cancer: based on E6-E6AP binding. *Antiviral. Res.* **47**, 199 (2000).
- 17) Tazaki, H., Kawabata, J. and Fujita, T. : Novel oxidative dimer from caffeic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 1185 (2003).
- 18) Takenaka, M., Yan, X., Ono, H., Yoshida, M., Nagata, T. and Nakanishi, T. : Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *J. Agric. Food. Chem.* **51**, 793 (2003).
- 19) Lim, E. K., Higgins, G.S., Li, Y. and Bowles, D. J. : Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose: glucosyltransferase is maintained in planta. *Biochem. J.* **373**, 987 (2003).
- 20) Hoeneisen, M., Alarcon, J., Aqueveque, P., Bittner, M., Becerra, J., Silva, M. and Jakupovic, J. : New caffeic acid esters from *Plazia daphnoides*. *Z. Naturforsch. [C]*. **58**, 39 (2003).
- 21) Gibbons, S. and Mathew, K. T. : A caffeic acid ester from *Halocnemum strobilaceum*. *Phytochemistry* **51**, 465 (1999).
- 22) Lee, H. K. : *In vitro* anticomplementary activity of phenylpropanoids from *agastache rugosa*. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**, 20 (1996).
- 23) Oh, S. O., Jung, K. Y. and Lee, H. K. : *In vitro* anticomplementary of phenylpropanoids from *agastache rugosa*. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**, 20 (1996).