대부종콜포회지 제9권 제4호 1998
Vol. 9, No. 4, Dec., 1998

외인성 에스트로젠에 의한 자궁경부암 세포의 성장과 HPV 유전자 조절*

가톨릭대학교 의과대학 산부인과학 교실
김찬주 · 엄수종 · 박태철 · 박종섭 · 이진우 · 이준모 · 김승조 · 남궁성은

=Abstract=

Regulation of cell growth and HPV genes by exogenous estrogen in cervical cancer cells

Chan Joo Kim, Soo Jong Um, Tae Chul Park, Jong Sup Park, Jin Woo Lee, Jun Mo Lee, Seung Jo Kim, Sung Eun Namkoong.
Department of Obstetrics & Gynecology, Catholic University Medical College, Catholic University Graduate School Seoul, Korea

Backgrounds: Human papillomavirus (HPV) infection is known as the major causative phenomenon in the development of cervical cancer. E6 and E7 proteins of oncogenic HPV types can play critical roles in immortalization and malignant transformation of cervical epithelial cells. From the previous epidemiologic data, long term use of oral contraceptives may be one of the risk factor for cervical cancer.

Purpose: Investigation of estrogenic and anti-estrogenic effects on the proliferation of cervical cancer cells and gene expression of HPV under the regulation of HPV upstream regulatory region (URR) would help to explain the role of estradiol in HPV-associated pathogenesis of cervical cancer.

Methods: Cervical cancer cells (HeLa, CaSki and C33A) were cultured in vitro in the presence of 17β-estradiol or tamoxifen and the numbers of cells were directly counted to observe the growth stimulatory or suppressive effect of the treatment. The correlation between the growth regulatory effect and HPV E6/E7 gene expression was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The estrogenic effect on the promoter activity of HPV URR was further confirmed by transient co-transfection assays, which were conducted in C33A cells using the HPV-18 URR-CAT reporter plasmid. Supplemental effect of estrogen receptor on the URR promoter activity was also evaluated. To analyze the growth suppressive function at the higher concentration of estradiol or tamoxifen in HeLa cells, DNA fragmentation assay was performed.

Results: The proliferation of HeLa and CaSki cells was stimulated by estradiol at the concentration of physiological level ($\leq$ 1 X 10-6M), reaching maximal growth at 0.5 X 10-6M. At concentration of 0.1 X 10-6M, tamoxifen also stimulated the proliferation of HeLa and CaSki cells. In contrast to HPV-positive cervical cells, C33A cells were not influenced to cell proliferation by addition of estradiol at the physiological level, indicating that HPV might play role in growth stimulatory effect of estrogen or tamoxifen. Interestingly, the proliferation of HeLa cells was totally suppressed by estradiol and tamoxifen at the higher concentration

* 본 논문의 연구는 기톨릭 대학교 의과대학 부속 의정부 성모 병원 임상의학 연구비 (1997)로 수행된 것임.

(5 and 10 X 10-6M), whereas those of CaSki and C33A cellswere not responded and little suppressed at the concentration, respectively. The levels of HPV-18 E6 and E7 mRNA were significantly increased after treatment of 0.5 X 10-6M estradiol as determined by RT-PCR. Furthermore, transient transfection experiments using the URR-CAT reporter plasmid indicated that the increased expression of HPV E6/E7 genes was related with the growth stimulatory effect of estradiol and tamoxifen. In addition, co-transfection of estrogen receptor (ER) leads to an over 4-fold increase in CAT activity after treatment of estradiol or tamoxifen with 0.5 X 10-6M. When estradiol or tamoxifen was treated at the concentration over 5 X 10-6M for 96 hr, a typical DNA ladder, a indicative of apoptosis, was observed in HeLa cells. However, DNA ladder was not detected in C33A cells of which growth was some suppressed under same concentration of estradiol.

Conclusion: At the physiological levels, estradiol stimulated the growth of HPV-positive cervical cancer cells and tamoxifen also did at the concentration of 0.1 X 10-6M. The increased expression of HPV E6/E7 at the physiologic levels appeared to be related with the growth stimulation of HPV-positive cervical cancer cells. Growth suppression observed at the higher concentration (5 and 10 X 10-6M) might be a indicative of apoptosis shown by DNA fragmentation assay in HeLa cells. Taken together, these data suggested that the concentration of estradiol ($\leq$ 1 X 10-6M) could be a risk-factor in HPV-mediated cerivcal carcinogenesis.

Key Words : HPV, E6/E7, estrogen, tamoxifen, CAT, URR, apoptosis.

I. 서 론

자궁경부암은 한국 여성에서 제일 흔한 암이며[1], 자궁경부암의 90% 이상에서 인유두종 바이러스 (HPV, human papillomavirus) DNA가 발견되어 HPV 감염이 주된 발생 원인으로 알려져 있다[2-4]. HPV-16과 HPV-18은 자궁경부암을 유발시킬 수 있는 생화학적 특성을 갖고 있는 고위험군 바이러스이며, 이는 바이러스의 특정 부분인 E6, E7 단백질이 p53과 Rb1와 같은 종양억제 단백질을 불활성화시켜 세포주기의 조절기능을 파괴시킴으로써 암화 변형이 일어나기 때문이다[5-6]. HPV E6, E7 유전자는 자궁 경부암 세포에서 전사와 발현이 증가되어 있으며, 생성된 E6와 E7 단백의 양은 질환의 발생과 관계가 있다고 볼 수 있다[7]. E6-E7 유전자의 발현을 조절하는 부위 (promoter)를 포함하고 있는 HPV upstream regulatory region (URR)의 활성 조절은 NFI, AP-1 등과 같은 전사 활성인자가 URR 내 결합부위에 붙어 일어난다. 이들 세포 내 인자 중 AP-1은 HPV-16/18 enhancer에 작용하는 필수적인 전사인자로 알려져 있다[8-9].

임신중 condyloma의 발생이 흔하다는 보고와 가임기 여성에서 피임제의 사용이 자궁경부암의 유발과 연관이 있다는 연구에 의해 estrogen (17β-estrodiol, 또는 간략히 estradiol)이 HPV 관련성 종양에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다[10-12]. HPV-16 양성인 SiHa 와 CaSki 세포에서 estradiol이 E6, E7의 발현을 전사수준에서 증폭시키며[13], HeLa cell에서 transient transfection으로 HPV-16 URR을 포함한 reporter plasmid를 넣어 준 뒤 17β-estradiol을 처리하였을 때 URR의 활성도가 2 3 배 증가된다는 보고에서 estradiol이 HPV URR의 활성도를 조절하는 것이 알려져 있다[14]. 이와 같은 estradiol에 의한 HPV URR 활성의 조절 기전은 다른 연구 결과들을 통해서 볼 때, estradiol과 결합하는 ER (estrogen receptor)이 AP-1 family의 한 요소인 c-Jun과 결합하여 HPV-URR을 활성화시킬 것으로 생각이 된다[15-16].

이에 본 연구에서는 외인성 estrogen의 영향으로 나타나는 자궁경부암 세포의 성장과 HPV 유전자의 조절 상태를 관찰하기 위하여 고위험 바이러스인 HPV-16과 HPV-18을 함유한 자궁경부암 세포주 CaSki, HeLa와 HPV를 함유하지 않는 C33A 자궁경부암 세포주에서 estrogen과 antiestrogen인 tamoxifen

을 처리하여 자궁경부암 세포의 증식에 미치는 효과를 조사하였고, estrogen 처리에 의한 HPV E6, E7 유전자의 발현 변화를 조사하였으며, estrogen과 tamoxifen에 의한 HPV-URR의 활성화 정도를 측정하였다. 한편, 높은 농도의 estrogen 또는 tamoxifen이 세포증식에 미치는 영향을 분석하고 그 억제 기전으로서 apoptosis의 유무를 DNA fragmentation 실험을 통해 확인하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 세포주의 배양과 estradiol, tamoxifen의 처리

17β-estradiol과 tamoxifen에 의한 성장 촉진 또는 억제 효과를 보기 위하여 HPV를 보유한 CaSki (HPV-16), HeLa (HPV-18) 세포주와 HPV가 없는 C33A 세포주를 10% FBS (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)가 추가된 phenol red-free Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) 배지에서 배양하였다. 17β-estradiol과 tamoxifen (Sigma Chemical Co. St Louis, MO)은 100 mM stock solution으로 DMSO (Sigma Chemical Co.)에 녹여 -20 oC에서 보관하였다. 약제 처리에 의한 각각의 암 세포주에서 시간에 따른 세포 증식과 억제 효과를 보기 위하여 6-well plate에 각 암세포주를 7 X 104 cells/well로 넣고 37°C에서 6 시간 동안 배양시킨 후에 다양한 농도의 17β-estradiol과 tamoxifen (0.1, 1, 5, 10 X 10-6M)을 처리하였으며, 5 7 일 동안 배양하였다. 날짜 별로 배지에 부유하지 않고 부착된 살아있는 세포만을 trypsinization에 의해 모은 뒤 hemocytometer로 그 숫자를 측정하였다. 각 세포주에서 각각 3 well에서 실험한 평균값으로 최종 결과를 정하였다.

2. RNA 분리와 E6와 E7 유전자의 역전사 중합효소연쇄반응

HeLa 2 X 105 세포를 10 cm dish에서 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서estradiol 또는 tamoxifen을 첨가하여 배양하였다. 3 일째에 세포의 RNA를 RNeasy Total RNA Purification kit (Qiagen, Germany)로 추출하였다. 역전사 중합효소연쇄반응 (RT-PCR)은 추출한 20 ng의 RNA를 200 μM dNTPs, 400 nM 5' & 3' primers, AMV reverse transcriptase-high fidelity DNA polymerase mixture를 사용하였다 (Titan One Tube RT-PCR System; Boerhinger Mannheim, Germany). HPV-18 E6와 E7 PCR primer의 염기 서열은 다음과 같았다.

E6 : 5'-ATGGCGCGCTTTGAGGAT-3'
5'-TTATACTTGTGTTTCTCTGCG-3'
E7 : 5'-ATGCATGGACCTAAGGCAA-3'
5'-TTACTGCTGGGATGCACAC-3'.

GAPDH primers (Gibco BRL)는 사용된 RNA의 양에 대한 정상 대조의 기준으로 사용하였다. 역전사 반응은 50°C에서 30 분간 하였고, 얻어진 cDNA는 94°C에서 2분간 변성시켰다. 중합 반응은 94°C에서 30 초간 변성 (denaturation), 56°C에서 45 초 정렬 (annealing), 68°C에서 1 분간 연장 (extension)의 과정을 25 회 반복시킨 후에, 68°C에서 7 분간 추가로 연장하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동시키고, ethidium bromide 염색으로 관찰하였다. DNA 오염을 배제하기 위한 음성대조군으로 역전사를 시행하지 않은 RNA 추출물에서 PCR을 시행하였다.

3. Transient transfection과 CAT assay을 이용한 estradiol에 의한 HPV-URR의 활성 변화 측정

CaPO4/DNA precipitation 방법으로 세포에 transfection하였다. 실험에 사용된 estrogen receptor (ER) expression vector는 Dr. Pierre Chanbon (Strasbourg, Paris)에게서 제공받았다. HPV-18 URR-CAT reporter plasmid는 PCR로 HPV-18 URR을 증폭한 후 pBLCAT8+ vector에 cloning하여 제조하였다. SV40-driven β-gal internal control plasmid를 포함시킨 ER expression plasmid와 URR-CAT expression vector가 포함된 전체 6 μg의 DNA로 침전체를 만들었다. 10% FBS가 함유된 phenol red-free DMEM 배양액에서 C33A 세포를 60 mm dish에서 5 시간 배양 후에 해당 DNA로 만든 침전체를 transient trasnfection하였다. 하룻밤 동안 반응시키고, 다음날 세척한 후 estradiol 또는 tamoxifen 0.5 X 10-6M을 처리한 후 24 시간 동안 추가 반응시켰다. 세포는 차가운 PBS로 2 번 세척하고, 100 μl의 0.25 M Tris-HCl (pH 7.6)에 풀어서 3 차례 해동 과정을 반복하였다. 원심 분리

는 4℃에서 10 분간 12,000 rpm으로 시행하였고, 단백질의 정량은 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA) 방법으로 측정하였다. β-Galactosidase 측정은 일반적으로 사용되는 방법으로 하였고, CAT 농도의 측정은 CAT ELISA로 하였다 (Boerhinger Mannheim). 각 실험의 CAT 농도의 표준화는 β-gal 값에 따라서 교정하였으며, 적어도 3 차례 이상 반복된 실험을 시행하여 결정하였다.

4. DNA fragmentation 분석을 통한 apoptosis의 확인

2 X 105 HeLa 세포와 C33A를 37℃에서 6 시간 동안 배양시킨 후에 17β-estradiol과 tamoxifen 1, 5, 10 X 10-6M을 처리하였다. 12 시간, 36 시간, 96 시간이 경과한 후에 세포를 모아서 lysis buffer [0.5% SDS, 0.1 M NaCl, 100 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)]로 용해시키고, proteinase K (Sigma)를 0.5 M 농도로 넣고 55℃에서 4 시간 동안 반응시켰다. Phenol (buffer saturated; Amresco Inc. Solon, OH)을 섞은 후 4℃ 12K rpm에서 원심 분리한 뒤 상층액만을 분리한다. phenol/chloroform/isoamyl alchol을 넣고 다시 원심분리하여 상층액만을 모은다. 0.3 M 농도의 sodium acetate (pH 7.0)와 100% ethanol을 가하여 -20℃에서 하룻밤 침전시킨 뒤, 그 침전물을 말린다. 침전물에 70% alcohol과 RNase A (Sigma)를 처리하여 37℃에서 1 시간 동안 둔다. DNA를 TE buffer [10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 1 mM EDTA]에 최종 용해 시킨다. 용액의 흡광도를 측정한 뒤 5-10 μg의 DNA를 0.5 μg/ml ethidium bromide를 가진 1.8% agarose gel에 전기 영동한 뒤 자외선 시야 하에서 확인하였다.

5. 통계 분석

약제 처리에 의한 각각의 암세포주의 세포 증식과 억제 효과를 약제 처리를 하지 않은 대조군과의 비교는 Kruskal-Wallis test로 하였으며, 통계 분석에서 P-value가 0.05 이하일 때 통계적 의의가 있는 것으로 하였다.

III. 결 과

1. Estrogen과 anti-estrogen에 의한 자궁경부암 세포주들의 성장

Estradiol과 tamoxifen을 HPV를 함유하고 있는 자궁경부암 세포주인 HeLa와 CaSki 세포, HPV를 함유하고 있지 않는 C33A 자궁경부암 세포주에 단독 또는 복합 처리하여 이들 약제에 의하여 세포 증식이 영향을 받는지를 5 7 일 동안 배양한 후 살아있는 세포를 직접 측정하였다.

각 세포주에 estradiol을 처리하였을 때 HPV DNA를 함유하지 않는 세포주인 C33A는 대조군에 비하여 배양 5 일째에 estradiol 0.1 X 10-6M, 0.5 X 10-6M과 1 X 10-6M 농도에서 세포주의 증식에 큰 영향이 없었다. 5 X 10-6M과 10 X 10-6M의 고농도 estrogen 처리에 의해서 C33A 세포는 세포 증식이 46%, 79% 씩 억제된 것이 관찰되었다 (Figure 1a, Figure 3). HPV-16을 가지고 있는 CaSki 자궁경부암 세포주와 HPV-18을 함유하는 HeLa 세포주는 배양 5 일째에 estradiol 0.1 X 10-6M 처리 시에는 세포 증식이 대조군에 비하여 43%, 59% 증가되어 있었으며, 0.5 X 10-6M에서는 58%, 60% 증가되었다. CaSki와 HeLa 세포주에 estradiol 5 X 10-6M을 처리하였을 때에는 대조군에 비하여 세포 증식이 18%, 74%로 유의하게 억제되었다(Fig. 1b, 2a, Fig 3)(P < 0.05).

Anti-estrogen인 tamoxifen을 HeLa 자궁경부암 세

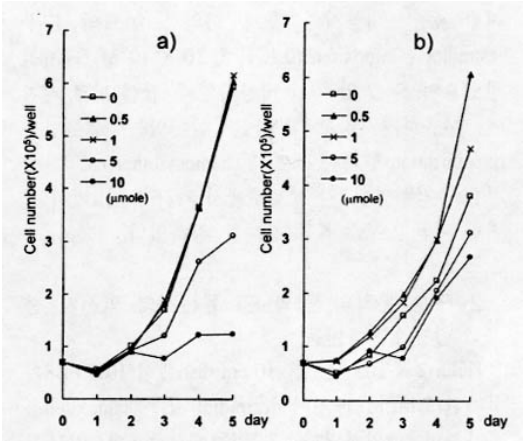

Fig 1. The effect of estradiol alone in C33A(a) and CaSki(b) cells. A comparison of the growth curves in the presence of various concentration of estradiol.

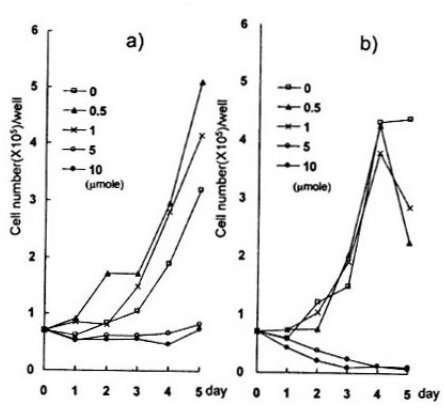

Fig 2. The effect of estradiol(a) and the effect of tamoxifen(b) in HeLa cells. A comparison of the growth curves in the presence of various concentration of estradiol and tamoxifen.

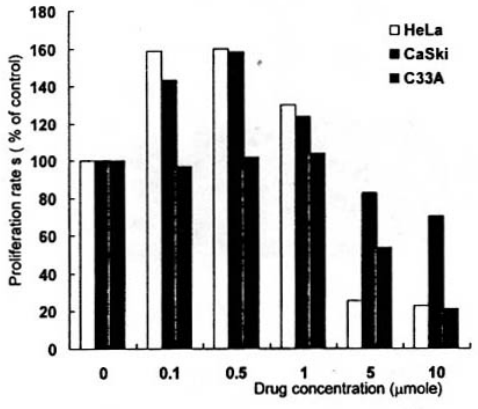

Fig 3. The effect of estradiol on the proliferation of HeLa, CaSki, C33A. A comparison of the proliferation rates in the presence of various concentration of estradiol at 5 day

포주에 처리하였을 때 배양 5 **일째에** tamoxifen 0.1 X 10-6M **처리 시에는 세포 증식이 대조군에 비하여** 25% **증가되었다**. Tamoxifen 0.5 X 10-6M**과** 5 X 10-6M **처리한 경우에 세포 증식이** 49%, 98% **억제되어** tamoxifen**의 농도에 따른 세포수의 차이가 관찰이 되었다** ($P < 0.05$)(Fig 2b, Fig. 4).

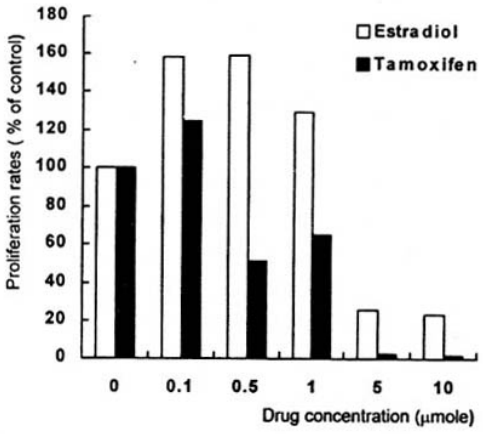

Fig 4. The effect of estradiol and tamoxifen on proliferation of HeLa cell. A comparison of the proliferation rates in the presence of various concentration of estradiol and tamoxifen at 5 day

2. Estrogen **처리에 의한** HPV E6, E7 **유전자의 발현**

HeLa **자궁경부암 세포의 배양액에** 0.5 μM estradiol**을 처리한 후** RT-PCR**로** HPV-18 E6/E7 **유전자의 발현정도를 분석하였다**. Estradiol**을 처리한 세포에서** HPV-18 E6/E7 mRNA**의 양을** GAPDH mRNA**와 상대적으로 비교하였더니** estradiol**을 처리한 경우가 대조군에 비교하여** E6**와** E7 **유전자의 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었다** (Fig 5).

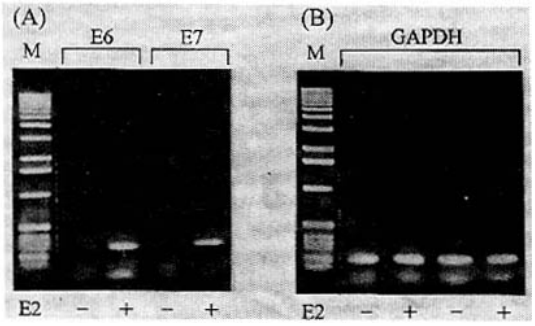

Fig 5. RT-PCR analysis of HPV-18 E6 and E7 mRNA. HPV-18-positive HeLa cells were grown in DMEN in the absence or presence of 0.5 mM of estradiol, E2(A). After grown for 3 days, RT-PCR was carries out and PCR products were separated by electrophoresis and visualized with ethidium bromide. GAPHDH primers were used for normalization of loaded RNA(B).

3. Estrogen과 Anti-estrogen에 의한 HPV-URR의 활성 변화 측정

Estrogen에 의한 HPV-18 E6/E7 mRNA 발현의 증가가 HPV-URR 활성 변화에 의한 결과임을 분자생물학적으로 증명하기 위하여 SV40-driven β-gal internal control plasmid를 포함시킨 ER expression vector와 URR-CAT reporter plasmid DNA를 C33A 세포에 transfection시켜서 promoter 활성을 CAT assay로 확인하였다. URR-CAT reporter plasmid만을 transfection시킨 경우 0.5 X 10-6M estradiol이나 tamoxifen에 의한 CAT 표현의 증가는 약간 관찰되었다. ER expression vector와 URR-CAT reporter DNA를 co-transfection시켰을 때 CAT 표현이 약 3배 정도 증가하였고, estradiol을 처리하였을 때 4.8배, tamoxifen을 처리하였을 때 4.7 배 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 6).

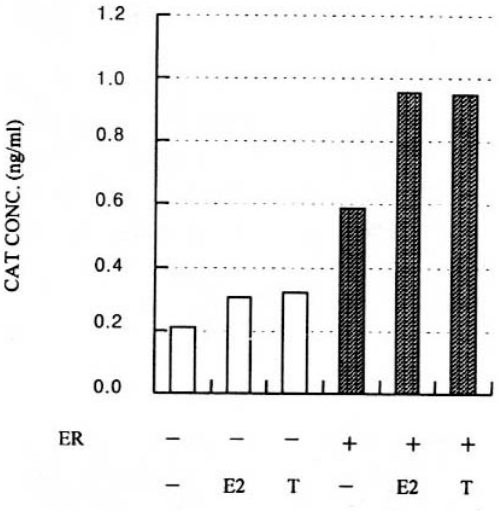

Fig 6. Estradiol-dependent activation of HPV URR. Transient transfections were performed in C33A cervical cancer cell line using HPV-18 URR-CAT reporter plasmid and ER expression vector in the absence or presence of estradiol(0.5 mM). After transfections, cells were harvested and extracted for the determination of protein concentration and b-galactosidase activity. b-Galactosidase activity was normalized for CAT assay. CAT activity was determined by CAT ELISA.

4. DNA fragmentation 분석을 통한 apoptosis의 확인

HeLa 세포에 estradiol을 1 X 10-6M을 처리한 경우에는 96 시간이 경과한 뒤에도 apoptosis의 특이한 DNA ladder가 보이지 않았으나, 10 X 10-6M의 estradiol을 처리한 경우에는 36 시간 경과한 뒤 DNA ladder가 나타났으며, 5 X 10-6M estradiol을 처리한 경우에는 96 시간 경과한 뒤에 DNA ladder가 나타났다(Fig. 7). 따라서, 고농도의 estradiol 투여에 의한 HeLa 세포수의 감소는 apoptosis에 의한 것 임을 알 수 있었다. 한편, HPV-음성인 C33A 세포에 estradiol을 고농도로 처리한 경우에는 96 시간이 경과한 뒤에도 특이한 DNA ladder가 보이지 않아서 앞서 관찰한 약간의 세포수 감소는 apoptosis가 아닌 세포 독성효과 (cytotoxic effect) 때문인 것으로 추정된다(Fig. 8).

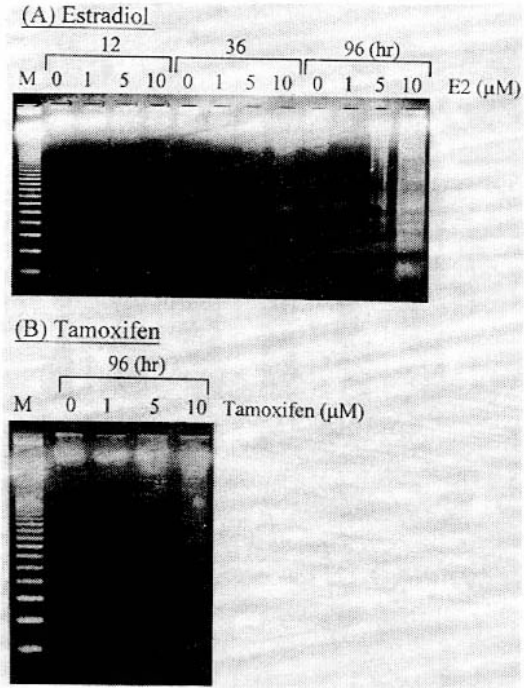

Fig 7. Estradiol(E2) and tamoxifen induce apoptosis in HPV-18/HeLa cells. HeLa cells were grown in the absence or presence of estradiol(A) or tamoxifen(B). Typical DNA ladder, an indicative of apoptosis, was visualized by staining with eithidium bromide.

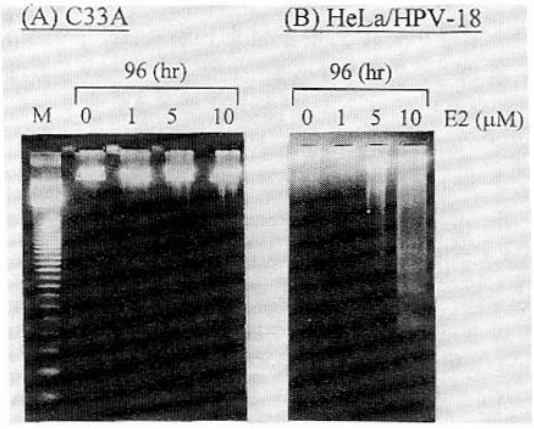

Fig 8. No apoptosis induced by estradiol(E2) in HPV-negative cervical cancer cells, C33A. C33A cells were grown in the absence or presence of estradiol(A). DNA ladder generated in HeLa cells(B) was shown again for comparison(from Fig 7.).

Ⅳ. 고 찰

수많은 생물학적, 역학적 연구를 통하여 자궁경부암의 발생에 인유두종 바이러스 (HPV)의 감염이 주된 원인으로 밝혀지고 있으며, 특히 HPV-16과 HPV-18은 실제로 자궁경부암 조직의 70% 이상에서 발견되는 고위험 바이러스이다[2,4,17]. 고위험 HPV의 E7 단백질의 발현은 종양억제인자 단백질인 pRb를 불활성화시키며, E6 단백질은 p53 단백질과 결합하여 p53의 빠른 분해를 일으켜서 이들을 불활성화시킨다[17-18]. HPV-16과 HPV-18의 E6와 E7 유전자의 발현은 이를 조절하는 부위 (promoter)를 포함하고 있는 HPV upstream regulatory region (URR) 부분의 전사 활성 조절에 의하게 된다.

역학적 조사에 의하면 특이한 HLA 아형, 면역 억제 현상, 여성 호르몬의 사용과 흡연 등의 여러 인자가 자궁경부암의 암화 과정에서 보조적 인자로 작용할 것으로 추정되고 있다[19-21]. 특히 경구 피임약의 사용 기간과 HPV 감염에 의한 CIN의 진행 정도와 자궁경부암의 발생에는 밀접한 상관 관계가 있다고 알려져 있으며, 임신중에 HPV의 발견 빈도가 높다는 사실에서 여성 호르몬은 자궁경부암의 위험 인자로 인식되고 있으나[10-12], 이에 대한 반대 의견도 있다[22].

Estrogen은 ER (estrogen receptor)과의 결합을 통해 작용하는데, estrogen과 결합으로 활성화된 ER은 핵내에서 표적 유전자의 promoter에 있는 cis-activating DNA response element와 결합하여 전사에 의한 이들 유전자의 발현을 조절한다[23,24]. HeLa 자궁경부암 세포에 transient transfection으로 HPV-16 URR을 포함한 reporter plasmid를 넣어 준 뒤 10^{-7} M의 17β-estradiol을 처리하여 URR의 활성도가 2 3 배 증가됨이 보고되어 E6/E7의 발현 증가가 예상되었다[14]. 이와 같은 estradiol에 의한 HPV-URR의 활성 조절 기능은 URR에 ER의 결합부위가 없기 때문에 아직 작용 기전이 확실하지는 않다. Estrogen 반응성 조직에서 17β-estradiol에 의해 암유전자인 c-Fos의 전사가 자극을 받는다는 보고에서 AP-1에 의해 estradiol의 작용이 중개될 가능성이 제시되고 있다[25]. AP-1은 c-Fos, c-Jun의 암유전자로 이루어져서 전사활성 인자로서 작용하며, 이들이 과잉 발현된 HT-3 자궁경부암 세포에서 HPV-16의 P97 enhancer/promoter의 활성을 3배 이상 증가시켜, HPV와 연관된 종양의 암화 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며[26], estradiol에 의한 HPV URR의 활성 기전은 estradiol과 결합하는 ER이 AP-1 family의 한 요소인 c-Jun과 결합하여 HPV-URR을 활성화시킬 것으로 예상된다[15,16].

Estrogen은 유방암이나 자궁내막암에서 암 세포의 증식을 촉진시키는 것으로 알려져 있는데, 생리적 농도에서는 유방암 세포의 증식을 촉진시킨다. 그러나 고농도의 estrogen은 일부 ER 양성인 유방암 세포에서 성장 억제를 일으킨다 즉 유방암 세포인 MCF-7 cell에서 estradiol 용량 증가는 이중적인 반응을 보여서 17β-estradiol과 diethylstilbesterol 1 X 10^{-8}M에서는 세포 증식을 자극하며, 1 X 10^{-6}M 이상의 농도에서는 세포 증식의 억제가 일어났다[27,28]. HPV-16에 의해 불멸화된 foreskin keratinocyte에 0.1 X 10^{-6}M estradiol을 투여하여 4 주 후 관찰하였더니 대조군에 비하여 부착-비의존성 성장 (anchorage-independent growth)이 잘 일어났으며, estradiol 대사에 의한 16α-hydroxyestrone에 의해 가장 잘 일어났다. Estrogen은 비생식기의 keratinocyte에도 영향을 미치는데, 17β-estradiol의 투여시 0.3 X 10^{-9} M의 낮

은 농도에서는 세포의 증식을 자극하였으나, 3 X 10-9 M에서 3 X 10-7M의 농도에서는 세포의 수를 감소시켰다[29].

본 연구에서도 estradiol을 처리하였을 때 HeLa와 CaSki 세포주는 배양 5 일째에 estradiol 1 X 10-6M 농도까지는 세포 증식이 증가되었으며, 5 X 10-6M 이상의 고농도에서는 세포 증식이 억제되었다. HPV DNA를 함유하지 않는 세포주인 C33A는 estradiol 농도에 따른 세포주의 증식이 큰 영향을 받지 않았으며, 5 X 10-6M 이상의 고농도 처리시에는 약간의 세포 증식이 억제됨이 관찰되었다. 이는 HPV 유전자에 대한 estrogen의 영향으로 자궁 경부암세포의 성장이 촉진되거나 억제되었으라라고 예상할 수 있다. 본 연구에서 HeLa 세포의 배양액에 estradiol을 처리하면 대조군에 비교하여 E6, E7 유전자의 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었다. HPV를 함유하지 않는 C33A 자궁경부암 세포에서 estradiol에 의해 HPV URR 활성도의 증가를 알아 보았으나, 대조군인 URR-CAT reporter plasmid만을 transfection 시킨 경우에 비하여 estradiol이나 tamoxifen에 의한 CAT의 표현 증가는 없었다. 그러나, ER expression vector와 URR-CAT reporter DNA를 C33A 세포에 co-transfection시켰을 때 CAT 표현이 3 배 정도 증가하였고, estradiol을 처리하였을 때는 4.8 배, tamoxifen을 처리하였을 때 4.7 배 증가되어 estradiol에 의한 HPV-URR의 활성도 증가는 ER의 중개에 의함을 알 수 있었고, HPV-16과 HPV-18의 E6, E7 유전자의 발현 증가는 URR의 활성 증가 때문임을 짐작할 수 있었다.

항 estrogen 제제인 tamoxifen은 estrogen 자극에 의한 종양 세포의 성장을 지연시키기 때문에 과거부터 화학치료제나 유방암 환자의 예방적 치료제로서 널리 쓰였었다[30,31]. 이의 작용 기전은 ER과의 결합에 경쟁적으로 작용하여 estrogen의 활성을 방해하며, ER과 결합한 tamoxifen은 ERE (estrogen responsive element)를 통한 유전자의 전사를 억제한다고 알려져 있다[32,33]. 그러나 tamoxifen은 자궁 내막조직에서는 estrogen-like ligand로 작용하면서, 오히려 자궁내막암의 위험을 올리며, ER 양성인 유방암 세포주 MCF-7에서 tamoxifen과 그 대사 물질인 4-hydroxytamoxifen은 PR과 collagenase 등과 같은 estrogen에 의해 조절받는 유전자들의 발현을 더욱 증가시킨다[34]. Tamoxifen이 estrogen agonist로 작용하는 기전은 AP-1 site를 포함한 collagenase promoter를 활성화시키며, 이 경우 ER과 c-Jun 단백질간의 직접적인 결합에 의해 AP-1이 활성화되는 기전이 제시되고 있다[15,16]. ER-α와 결합한 17 β-estradiol은 ERE 위치에서 유전자의 전사를 활성화시키며, ER-β와 결합한 17 β-estradiol은 전사를 억제한다. ER은 또한 AP-1 enhancer element를 통한 유전자 전사를 중개하는데, tamoxifen은 AP-1 위치에서 ER-β와 결합하여 강력한 전사활성인자로 작용한다[35]. Tamoxifen은 ER 양성인 자궁내막암 세포주에서 1 X 10-8 M의 저농도에서는 세포의 증식 효과가 정점에 달하였다가 1 X 10-8 M보다 높은 농도에서는 감소하였다[36]. 본 실험은 자궁경부암 세포에서 시행한 결과로서 tamoxifen을 HeLa 세포주에 처리하였을 때 배양 5 일째에 저농도인 tamoxifen 0.1 μM 처리시에는 세포 증식이 증가되었으나, 5 X 10-6 M 이상의 농도에서는 세포 증식이 억제되었다. Hwang 등의 실험에 의하면 ER 음성인 자궁경부암 세포주인 SFR에 tamoxifen을 투여한 경우 농도에 따라 두가지 반응을 보였다[37]. 1 X 10-9 M에서 1 X 10-10 M의 낮은 농도로 처리하였을 때 이들 세포 증식의 증가와 SFR 세포내에 융합된 HPV-16 mRNA의 양과 E7 단백의 양이 증가하는 것이 관찰되었고, 1 X 10-6 M과 1 X 10-7 M에서는 억제 효과를 보였다. 이러한 tamoxifen의 효과는 약제 처리시 SFR 세포내에 융합된 HPV-16의 mRNA와 E7 단백질의 발현 증가로 밝혀졌다. HPV-16의 E6, E7 단백질은 세포 주기를 파괴하며 성장 중지와 apoptosis를 방해하며, E6, E7의 지속적인 발현은 DNA 손상후 p53-유도성 G1 arrest를 억제한다[38]. Apoptosis에 대한 HPV 암유전자 단백질의 효과는 아직 완전히 설명되지 않고 있다. 배양된 fibroblast에서 E7 단백질의 발현은 apoptosis를 증가시키며, E6이 동시에 발현되는 경우는 억제된다[39]. 유방암 세포를 이용한 연구에서 DNA 손상에 대해 p53와 p21/WAF-1 단백질이 없는 경우에 E6는 apoptosis를 증가시켰으나[40], 변이성 p53을 가지는 영구 불멸화된 상피세포에 HPV-16 E6, E7을 이입시킨 경우 apoptosis의 정도는 HPV에 감염이 안된 상피세포에서 일어나는 apoptosis보다 현저하게 감소되었다[41]. 고용량의 estrogen을 mutant p53을 가지는 자궁내막암 세포주에 투여하였을 경우에 세포의 증

식과 apoptosis에 영향을 미친다. 즉, estradiol을 1 X 10-6M의 농도로 첨가하여 2 주간 배양한 결과 용량 의존성으로 암세포의 증식 억제가 관찰되었으며, Go/G1 fraction의 증가와, S-phase fraction의 감소가 관찰되었다. Apoptosis 억제 단백질인 bcl-2는 2 주간의 배양에서는 변화가 없었으나 6 개월간의 장시간 배양에서는 유의하게 감소하였다42). 이와 비교하여 본 논문에서는 자궁경부암 세포가 자궁내막암 세포에 비하여 estrogen에 의한 성장 조절 효과에서 민감하지 않은 것을 관찰 할 수 있었고, 자궁경부암 세포와 자궁내막암 세포에 대한 estrogen의 농도는 적어도 100 배 이상에서 차이가 있음을 알 수 있었다. HeLa 세포에 17-β estradiol을 5 X 10-6 M과 10 X 10-6 M의 고농도로 처리한 경우에는 대조군에 비하여 96 시간 경과한 뒤에 유의하게 세포 증식이 억제되었으며, apoptosis의 특이한 DNA ladder를 보이고 있었다. C33A 세포에서는 세포 숫자는 감소되었지만 DNA ladder는 관찰되지 않아서, 고농도의 estrogen 처리에 의한 apoptosis 현상에 HPV 유전자가 관여됨을 짐작할 수 있었다.

이와 같이 estrogen에 의한 자궁경부암 세포 성장의 증가를 나타내는 작용 기전이 약제에 의한 HPV URR 활성도의 증가와 이에 따른 E6, E7 유전자의 증가와 밀접한 관련이 있다는 가설을 증명할 수 있었다. 또한, 고농도의 estrogen에 의한 HeLa 세포주의 apoptosis 현상은 추후의 분자생물학적 연구를 통하여 더욱 자세하게 규명될 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 연구는 여성 호르몬과 연관된 부인과 종양들의 발암 기전에서의 estrogen의 역할을 규명할 수 있고, estrogen에 의한 종양 세포 주기의 진행과 중지에 대한 효과와 생명과학적 현상에 대한 폭 넓은 지식을 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 임상적인 측면에서는 중년 여성에서 재발을 고려해야 하는 자궁경부암 환자에서 치료후 폐경기 치료에 필요한 estrogen 사용 여부에 대한 과학적인 배경을 제공할 수 있고, 고농도 estrogen 투여로 나타나는 apoptosis의 유도를 통하여 항암 호르몬 치료의 새로운 방법도 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

자궁경부암의 고위험 바이러스인 HPV-16과 HPV-18을 가지고 있는 CaSki, HeLa 자궁경부암 세포주와 HPV를 함유하지 않는 C33A 자궁경부암 세포주의 성장 조절에 대한 estrogen의 영향은 차이가 있었다. 1 X 10-6M 이하 농도의 estrogen에 대하여 HeLa와 CaSki 세포에서는 대조군에 비하여 세포의 증식이 더욱 증가되었으나, C33A 세포는 estrogen에 대한 영향을 받지 않았다. 저농도인 0.1 X 10-6M 이하 농도의 tamoxifen은 HeLa 세포주의 증식을 증가시켰다. Estrogen 5 X 10-6M 이상과 tamoxifen 0.5 X 10-6M 이상의 농도에서는 세 종류 자궁경부암 세포주에서 모두 대조군에 비하여 세포 증식이 억제되었다. Estrogen을 투여하여 HeLa 자궁경부암 세포의 증식을 촉진되면서 HPV-18 E6/E7 유전자의 발현이 대조군에 비하여 증가되는 것이 RT-PCR에 의해 확인되었다. Estrogen과 tamoxifen에 의하여 estrogen receptor (ER)이 존재하는 경우 HPV URR의 활성화 정도가 estrogen에 의하여 증가되어 이들 약제의 효과가 ER을 경유하여 HPV URR 활성에 영향을 주었음을 알 수 있었다. Estrogen은 HPV 양성인 HeLa, CaSki 자궁경부암 세포의 성장과 E6, E7 유전자의 전사를 증가시키는 효과가 있었다. 또한 estrogen은 HPV-URR CAT 활성도를 증가시켜서 HPV와 관련된 자궁경부암 세포주의 성장 촉진 기전은 HPV URR이 estrogen의 활성이 나타나는 목표임을 알 수 있었다. HeLa 세포에 17β-estradiol을 5 ηM을 처리한 경우에는 96 시간이 경과한 뒤에 apoptosis의 특이한 DNA ladder가 나타나서, 고농도 estrogen 투여에 의한 HeLa 세포수의 감소가 apoptosis에 의한 것임을 알 수 있었다.

이와 같이 estrogen에 의한 자궁경부암 세포 성장의 증가를 나타내는 작용 기전은 HPV URR 활성도의 증가와 이에 따른 E6, E7 유전자의 증가와 밀접한 관련이 있으며, 고농도의 estrogen에 의한 HeLa 세포주의 apoptosis 현상은 추후의 분자생물학적 연구를 통하여 더욱 자세하게 규명될 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 연구는 여성 호르몬과 연관된 부인과 종양들의 발암 기전에서의 estrogen의 역할을 규명할 수 있고, estrogen에 의한 종양 세포 주기의 진행과 중지에 대한 효과와 생명과학적 현상에 대한 폭 넓은 지식을 제공할 수도 있을 것으로 생각된다.

-References-

1. 보건복지부 발표. 한국인의 암 발생 통계 자료: 1995.
2. Park JS, Hwang ES, Park SN, Ahn HK, Um SJ, Kim CJ, Kim SJ, Namkoong SE. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. Gynecol Oncol 1997;65(1):121-9.
3. Gissmann L, Boshart M, Durst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H. Presence of human papillomavirus in genital tumors: J Invest Dermatol. 1984;83: 26-8.
4. Lorincz AT, Reid R, Jensen AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human Papillomavirus infection of the cervix :Relative risk association of 15 common anogenital types: Obstet Gynecol. 1992;79:328-37.
5. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The HPV-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product: Science. 1989;234:934-7.
6. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 protein with p53: Science. 1990;248:76-9.
7. Higgins GD, Uzelin DM, Phillips GE, McEvoy P, Martin R, Burrel CJ. Transscription patterns of humans papillomavirus type 16 in genital intra-epithelial neoplasia: evidence for promoter usage within the E7 open reading frame during epithelial differentiation: J Gen Virol. 1992;73:2047-57.
8. Chan WK, Chong T, Bernhard HU, Klock G. Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus-16 is stimulated by tumor promotors through AP1 binding sites: Nucleic Acids Res. 1990;18:763-9.
9. Cripe TP, Alderborn A, Anderson RD, Parkkinen S, Bergman P, Hasugen TH, Pettersson U, Turek LP. Transcriptional activation of the human papillomavirus-16 P97 promoter by an 88-nucleotide enhancer containing distinct cell-dependent and AP1-responsive modules: New Biologist. 1990;2:450-63.
10. Hildesheim A, Reeves WC, Brinten LA, Lavery C, Brebes H, De La Gvardia ME, Goday J, Rawis WE. Association of oral contraceptive use and HPV in invasive cervical cancers: Int J cancer. 1990;45(50):860-4.
11. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective: International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst 1995;7:87(11):796-802.
12. Fife K, Katz BP, Roush J, Handy VD, Brown DR. Cancer associated HPV types are selectively increased in the cervix of women in the 1st trimester of pregnancy: Am J Obstet Gynecol 1996;174:1487-93.
13. Mitrani-Rosenbaum S, Tsvieli R, Tur-Kaspa R. Oestrogen stimulates differential transcription of human papillomavirus type 16 in SiHa cervical carcinoma cells: J Gen Virol. 1989;70 (Pt 8):2227-32
14. Chen YH, Huang LH, Chen TM. Differential effects of progestins and estrogens on long control regions of human papillomavirus types 16 and 18: Biochem Biophys Res Commun. 1996;224(3):651-9.
15. Sukovich DA, Mukherjee R, Benfield PA. A novel cell-specific mechanism for estrogen receptor mediated gene activation in the absence of an strogen-responsive element: Mol Cell Biol 1994;14:7134-43.
16. Webb P, Lopez GN, Ubt RM, Kushner PJ. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway : potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens: Mol Endocrinol1995;9:443-56.
17. zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understanding the role of viruses in human cancers: Cancer Res 1989;49:4677-81.
18. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. E6 encoded by human papilomavirus types 16 & 18 promotes the degradation of p53: Cell 1991;63:1129-36.
19. Benton EC, Arends MJ, 4th ed, Papillomavirus reviews: current research on papillomaviruses. Leeds: Leeds University Press. 1996;271-9.
20. Khare S, Tang SC, Pater MM. et al. Cofactors with HPV in reviews: current research on papillomavirus. Leeds: Leeds University Press, 1996;239-46.
21. Arends MJ, Benton EC, McLaren KM, Stark LA, Hunter JA, Bird CC. Renal allograft recipients with high susceptibility to cutaneous malignancyhave an increased prevalence of human papillomavirus DNA in skin tumours and a greater risk of anogenital malignancy: Br J Cancer 1997;75(5):722-8.
22. Rohan T, Mann V, Mclanghlin J, Harnish DG, YuH, Smith D, DaVVSR, Shie RM, Rawls W. PCR-detected genital papiilomavirus infection: prevalence and association with risk factors for cervical cancer: Int J Cancer 1991;49:856-60.
23. Beato M. Gene regulation by steroid hormones: Cell 1989;56:335-44.
24. Tsai MJ, O'Malley BW: Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members: Annu Rev Biochem 1994;63:451-68.
25. Weisz A, Rosales R. Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor: Nucleic Acids Res 1990;18(17):5097-106.
26. Nurnberg W, Artuc M, Vorbrueggen G, Kalkbrenner F, Moelling K, Czarnetzki BM, Schadendorf D. Nuclear proto-oncogene products transactivate the human papillomavirus type 16 promoter: Br J Cancer 1995;71(5):1018-24.
27. Lippman M, Bolan G, Huff K. The effects of estrogen and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in longterm tissue culture: Cancer Res 1976;36:4595-601.
28. Reddel RR, Sutherland RL. Effects of pharmacological concentrations of estrogens on proliferation and cell cycle kinetics of human breast cancer cell lines in vitro: Cancer Res 1987;47:5323-9.
29. Urano R, Sakabe K, Seiki K, Ohkido M. Female sex hormone stimulates cultured human keratinocyte proliferation and its RNA- and protein-synthetic activities: J Dermatol Sci 1995;9(3):176-84.
30. Pearson OH, Manni A, Arafah BM. Antiestrogen treatment of cancer: an overview: Cancer Res 1982;42:3424-9.
31. Levin E, Tomchinsky S, Lopez S. Displacement by tamoxifen of the estradiol-estrogen receptor binding: a functional assay for breast cancer studies: J Steroid Biochem Mol Biol 1990;37:681-6.
32. Katzenellenbogen BS, Miller MA, Mullick A, Sheen YY. Antiestrogen action in breast cancer cells Modulation of proliferation and protein synthesis, and interaction with estrogen receptors and additional antiestrogen binding sites: Breast Cancer Res Treat 1985;5:231-43.
33. Jordan VC, Murphy CS. Endocrine pharmacology of antiestrogens as antitumor agents: Endocr Rev 1990;11:578-610.
34. Westley B, May FE, Brown MC, Krust A, Chambon P, Lippman ME, Rochefort H. Effects of antiestrogen on the estrogen-regulated pS2 RNA and the 52 and 160-kilodalton proteins in MCF-7 cells and two tamoxifen-rsistant sublines: J Biol Chem 1984;259:10030-5.
35. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ER alpha and ER beta at AP1 sites: Science 1997;277(5331):1508-10.
36. Hochner Celnikier D, Greenfield C, Finci Yeheskel Z, Milwidsky A, Gutman A, Goldman-Wohl D, Yagel S, Mayer M. Tamoxifen exerts oestrogen-agonistic effects on proliferation and plasminogen activation, but not on gelatinase activity, glycogen metabolism and p53 protein expression, in cultures of oestrogen-responsive human endometrial adenocarcinoma cells: Mol Human Reprod 1997;3(12):1019-27.
37. Hwang JY, Lin BY, Tang FM, Yu WC. Tamoxifen stimulates human papillomavirus type 16 gene expression and cell proliferation in a cervical cancer cell line: Cancer Res 1992;15:52(24):6848-52.
38. Kessis TD, Williams BO, Jacks T, Hedrick L, Kastan MB, Cho KR. p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein: Proc Natl Acad Sci USA 1994;91(12): 5320-4.
39. White AE, Livanos EM, Tlsty TD. Differential disruption of genomic intergrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins: Genes Dev 1994;8:666-77.
40. Xu C, Meikrantz W, Schlegel R, Sager R The human papilloma virus

16E6 gene sensitizes human mammary epithelial cells to apoptosis induced by DNA damage: Proc Natl Acad Sci USA 1995;92(17):7829-33.
41. Magal SS, Jackman A, Pei XF, Schlegel R. Sherman L. Induction of apoptosis in human keratinocytes containing mutated p53 alleles and its inhibition by both the E6 and E7 oncoproteins: Int J Cancer 1998;5:75(1):96-104.
42. Karlsson L, Delle U, Horvath G. Short- and long-term oestradiol treatment inhibits growth and alters expression of p21WAF1/Cip1 in an endometrial adenocarcinoma cell line lacking functional p53: Eur J Cancer 1997;33(13): 2252-7.