Korean Journal of Obstetrics and Gynecology
Vol. 53 No. 1 January 2010

SiHa 자궁경부암 세포주에서 인유두종바이러스 16형 E6/E7 siRNA에 의한 세포성장 억제 비교

가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실[1], 가톨릭의과학연구원[2]

박세현[1] · 박병준[1] · 김용욱[1] · 노덕영[1]
김태응[1] · 정재근[1] · 배수미[2] · 안웅식[1]

Comparison of cell growth suppression in SiHa cervical carcinoma cell line by human papillomavirus type 16 E6/E7 siRNAs

Sae-Hyun Park, M.D.[1], Byung-Joon Park, M.D.[1], Yong-Wook Kim, M.D.[1],
Duck-Yeong Ro, M.D.[1], Tae-Eung Kim, M.D.[1], Jae-Keun Jung, M.D.[1],
Su-Mi Bae, Ph.D.[2], Woong-Shick Ahn, M.D., Ph.D.[1]

*Departments of [1]Obstetrics and Gynecology, [2]Catholic Research Institutes of Medical Science,
College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea*

Objective: Human cervical cancer is caused by the high-risk types of human papillomavirus (HPV) such as HPV16, which possess the E6 and E7 oncogenes, whose expressions are a prerequisite for cancer development. We performed this study to compare the efficacy of antitumor activity by HPV siRNA which silences only E6 or both E6/E7.

Methods: We transfected siRNA 377 (HPV16 E6 siRNA), siRNA 3 (HPV16 E6 siRNA), and siRNA 198 (HPV16 E7 siRNA) into SiHa cell line (siRNA 377 silences only E6, and siRNA 3 and siRNA 198 silence both E6 and E7). We experimented cell counts and morphologic changes 24 and 48 hours after transfection and expressions of HPV16 E6/E7 mRNA by RT-PCR.

Results: siRNA 377, siRNA 3, and siRNA 198 suppressed the cell growth. siRNA 3 and siRNA 198 were more potent than siRNA 377 in cell growth suppression. siRNA 377 knocked down the expression of E6 mRNA, and both siRNA 3 and siRNA 198 knocked down the expression of E6/E7 mRNA.

Conclusion: Our results suggest that simultaneous suppression of E6 and E7 was more potent than E6-specific suppression in cancer cell growth.

Key Words: Cervical cancer, Human papillomavirus, E6, E7, siRNA

접 수 일 : 2008. 5. 31.
채 택 일 : 2009. 11. 16.
교신저자 : 안웅식
E-mail : ahnlab1@catholic.ac.kr
* 본 과제는 학술진흥재단 협동연구지원 사업 (E00071)에 의해 지원되었습니다.

서 론

인유두종바이러스 (Human papillomavirus, HPV)는 자궁경부암을 포함한 다양한 종류의 암의 발달과 관련이 있으며,[1] 16 및 18 아형을 포함하는 고위험군 HPV는 자궁경부암 환자의 약 90% 이상에서 발견된다고 알려져 있다.[2,3] HPV의 E6와 E7 발암유전자는 자궁경부암의 발암

및 표현형 유지에 주요한 역할을 한다.[4] E6 단백질은 종양 억제 단백질인 p53의 발현을 불활성화시키고, E7 단백질은 세포주기조절 단백질인 pRb (retinoblastoma protein)를 인산화시켜 전사인자인 E2F를 방출시켜 cyclin E 등의 단백질 발현을 유도한다.[5-8] 따라서 HPV의 발암유전자인 E6와 E7의 발현을 억제하고자하는 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

식물과 동물의 전사 후 유전자 억제기전의 하나로 RNA 간섭작용 (RNA interference, RNAi)이 밝혀진 이래로 21~22개의 nucleotide로 이루어진 siRNA (small interfering RNA)를 이용하여 염기서열 특이적인 방법으로 mRNA를 붕괴시키는 연구가 많이 진행되고 있다. 특히 siRNA가 포유류의 세포에서 RNA 간섭작용을 보인다는 것이 밝혀진 이래 유전자의 기능을 밝혀내거나 치료를 위해서 수많은 연구가 진행되어 왔다.[9,10] Jiang과 Milner는 HPV16 양성인 세포주에서 E6와 E7의 siRNA의 투여가 각각의 유전자 발현을 저해했다고 보고하였다.[11] 그 이후 많은 siRNA를 이용한 HPV 연구가 있어 왔는데 최근 Yamato 등은 HPV18 양성인 세포주에서 E6만을 특이적으로 억제한 것이 E6와 E7을 동시에 억제하는 것보다 더 강력한 항암 효과를 유도하였다고 보고하였다.[12] 그러나 HPV16에 대하여서는 E6 유전자만을 억제하는 것과 E6와 E7 유전자를 동시에 억제하는 것에 대한 비교 연구는 아직 없다. 이에 본 연구는 이미 다른 연구자[13-15]의 실험에서 HPV16 E6와 E7 유전자에 대한 RNA 간섭작용이 입증된 siRNA만을 이용하여 E6 유전자만을 억제하는 것과 E6와 E7 유전자를 동시에 억제하는 것을 같은 조건에서 비교함으로써 보다 효율적인 방법을 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용한 자궁경부암 세포주는 야생형 p53 유전자를 가지고 있으며, HPV16 양성인 SiHa 세포주를 서울대학교 세포주 은행에서 분양받아 사용하였다. 세포주의 세포배양액은 Dulbecco's modified eagles medium (DMEM) (Gibco, Rockville, MD, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 0.37% sodium bicarbonate (Sigma, Spruce St. Louis, USA), 20 mM의 HEPES, 그리고 streptomycin/penicillin (Gibco)을 첨가하여 사용하였다. 세포주는 37℃, CO_2 배양기에서 배양하였다.

2. siRNA 제작

본 연구에 사용한 21 nt의 siRNA는 다른 연구자들의 연구[13-15]에서 효과가 증명된 3종류 - siRNA 377 (HPV16 E6 siRNA), siRNA 3 (HPV16 E6 siRNA), siRNA 198 (HPV16 E7 siRNA)-이며, siRNA oligomer는 화학적 합성을 주문 의뢰하였다 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Table 1).

3. 세포주에 siRNA 이입 (Transfection)

siRNA 이입 하루 전에 SiHa 세포주를 2×10^5 cells/3 mL로 6 well plate에 분주하였다. 이입하기 전에 siRNA duplex-Lipofectamine complex를 다음과 같이 준비하였다. 120 pmole의 siRNA와 lipofectamine 5 μL를 각각 250 μL의 Opti-MEM 배지로 희석하였고, 희석된 각각의

Table 1. Oligomer sequences used for gene silencing

Name	Position		Primer sequence	Size (bp)
siRNA 3	HPV16 E6 nt85-103	sense	5'-GAAUGUGUGUACUGCAAGCdTdT-3	21
		antisense	5'-GCUUGCAGUACACACAUUCdTdT-3'	
siRNA 198	HPV16 E7 nt773-791	sense	5'-GCACACACGUAGACAUUCGdTdT-3'	21
		antisense	5'-CGAAUGUCUACGUGUGUGCdTdT-3'	
siRNA 377	HPV16 E6 nt377-395	sense	5'-UACAACAAACCGUUGUGUGdTdT-3'	21
		antisense	5'-CACACAACGGUUUGUUGUAdTdT-3'	

용액을 섞고 20분 동안 실온에서 반응시켰다. 그 후 6 well plate에 500 μL의 siRNA duplex-Lipofectamine complex를 well당 500 μL씩 넣고, 4시간 후에 배지를 교환하였다. 이때 사용된 siRNA의 최종 농도는 각 50 nM이었고, 이입 후 24, 48시간 동안 배양시켰다.

4. siRNA 이입 후 세포성장 저해 확인 및 세포형태 변화 관찰

세포성장 저해 정도는 이입 24, 48시간 후에 각 well을 PBS 완충용액 (Gibco)으로 한 번 세척한 후 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco)로 세포를 떼어낸 후 0.04% Trypan Blue (Sigma)로 염색한 후 Hemocytometer (Tiefe Depth. Profondeur, Marienfeld, Germany)를 이용하여 세포수를 확인하였다. 또한 광학현미경을 이용하여 세포형태학적 변화를 관찰하였다.

5. siRNA에 의한 E6, E7 유전자 발현 저해 효과

이입 24, 48시간 후에 각 well을 PBS 완충용액으로 한 번 세척한 후에 TRI reagent (Invitrogen)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 Nano-drop을 이용하여 정량한 후 RNA gel에 전기영동하여 band를 확인하였다. 40 ng total RNA를 RTase (Invitrogen)를 사용하여 cDNA를 합성한 후, HPV16 E6, E7 유전자의 primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. cDNA 합성은 37℃ 50분, 70℃ 15분으로 수행하였다. PCR을 위한 oligonucleotide primer의 염기서열 (5′→3′)은 Table 2와 같이 합성하여 사용하였다. Primer 합성은 주문의뢰 (바이오니아, 충북, 한국)를 하였다.

6. siRNA에 의한 p53 단백질 발현에 대한 효과

이입 24, 48시간 후에 각 well을 PBS 완충용액으로 한 번 세척한 후에 lysis 완충액 (50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM EGTA pH 8.0)을 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bradford 방법으로 정량을 실시하였고, 40 μg의 단백질을 SDS-PAGE 샘플 버퍼 (150 mM Tris (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100)를 첨가하여 5분 동안 끓인 후 얼음에서 식혀 준비하였다. SDS-PAGE gel에서 30 mA/gel로 3시간 동안 전기영동하고, Hybond-ECL membrane (Amersham, Uppsala, Sweden)으로 옮겼다 (250 mA, 2시간 30분). p53의 단백질에 대한 항체 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA)를 사용하여 상온에서 4시간 반응시키고, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체 (Jackson Immunoresearch, Bar Harbor, MA, USA)를 1/5,000으로 농도로 희석하여 1시간 동안 반응시켰으며, 각 단계마다 TBS-T (Tris buffered saline with 0.1% Tween-20) 완충용액으로 세 번씩의 세척 과정을 반복했다. ECL 형광시약 (Amersham)으로 반응시킨 후, 필름 (Kodak)에 약 1분 동안 노출시킨 후 현상하였다.

결　과

1. siRNA 이입 후 세포성장 저해 효과

각각의 siRNA에 의한 세포성장 저해 효과를 확인한 결과, siRNA 3, siRNA 198, siRNA 377은 siRNA 이입 24, 48시간 후 universal siRNA를 이입시킨 대조군에 비해 각각 6.2%, 41.0%; 29.2%, 35.0%; 30.65, 19.1%의 세포성장 저해 효과를 확인 할 수 있었다 (Fig. 1). 특히 이입 48

Table 2. Primer sequences used for RT-PCR

Type	Primer sequence	Length (bp)
HPV16 E6	F 5'-GAG AAC TGC AAT GTT TCA GGA C-3'	396, 214
	R 5'-CCA CCG ACC CCT TAT ATT ATG G-3'	
HPV16 E7	F 5'-GCA ACC AGA GAC AAC TGA TCT CTA C-3'	200
	R 5'-GGT CTT CCA AAG TAC GAA TGT CTA CG-3'	

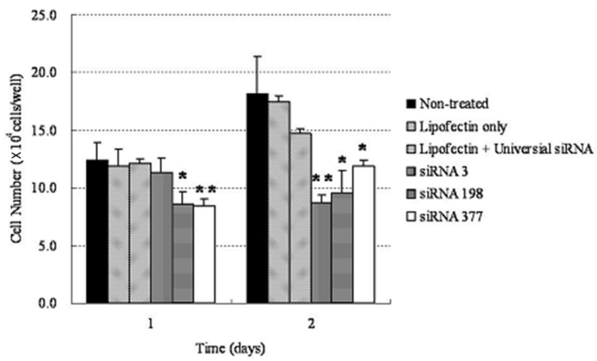

Fig. 1. Effects of siRNA on growth inhibition in SiHa cervical cancer cell line in vitro. Cells were transfected with universal siRNA, siRNA 3, siRNA 198 and siRNA 377 at 50 nM. Cells were trypsinized for direct cell counting after 24 and 48 hours. Cell growth inhibitions were compared with the universal siRNA control by *t*-test. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

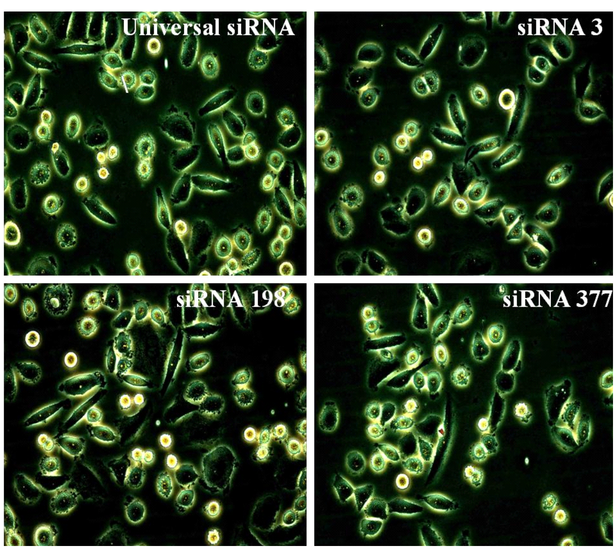

Fig. 2. siRNA-mediated morphological and numerical changes in SiHa cervical cancer cell line in vitro. Cells were transfected with universal siRNA, siRNA 3, siRNA 198 and siRNA 377 at 50 nM. Typical photographs were shown after 48 hours (×400 for all photographs).

시간 후 siRNA 3과 siRNA 198이 siRNA 377에 비해 세포 성장 저해 효과가 뚜렷하게 나타났다.

2. siRNA 이입 후 세포형태 변화 관찰

siRNA 3, siRNA 198, siRNA 377은 siRNA 이입 48시간 후에 광학현미경을 이용하여 세포형태 변화를 관찰하였다. universal siRNA를 이입시킨 대조군에 비해 siRNA 3, siRNA 198, siRNA 377을 이입시킨 세포주에서 세포막의 blebbing 현상 등 세포의 형태학적 변화와 더불어 세포수가 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 2).

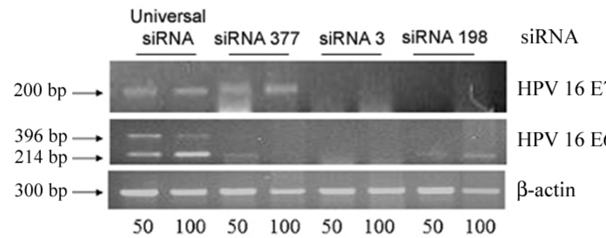

Fig. 3. RT-PCR analysis for expressions of the HPV16 E6, E7 and β-actin mRNA. Cells were transfected with universal siRNA, siRNA 377, siRNA 3 and siRNA 198 at 50 and 100 nM. RNA was extracted for RT-PCR after 48 hours.

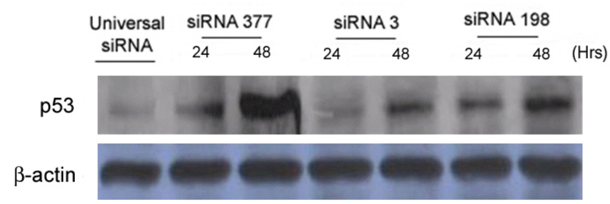

Fig. 4. Effects of siRNA on p53 expressions in SiHa cell line. Cells were transfected with universal siRNA, siRNA 377, siRNA 3 and siRNA 198 at 50 nM. Immunoblot analysis using specific p53 antibody was performed after 24 and 48 hours. The cells were collected and the extracts (40 μg) were run on 10% SDS-PAGE.

3. HPV16 E6, E7 siRNA의 유전자 발현 저해 효과 확인

각각의 siRNA에 의한 E6 또는 E7의 유전자 발현 저해 효과를 확인한 결과, siRNA 3, siRNA 198, siRNA 377은 siRNA 이입 48시간 후에 universal siRNA를 이입시킨 대조군에 비해 각각 E6 또는 E7의 발현이 저해되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). E6의 2종류의 밴드는 각각 E6 full transcript와 E6 splicer I ($E6^{*}I$)을 나타낸다. siRNA의 종류에 따라 각기 유전자 발현 양상이 서로 다름을 확인하였는데, siRNA 377은 E6 유전자 발현만을 저해하였고, siRNA 3과 siRNA 198은 E6 유전자와 E7 유전자 발현을 동시에 저해하였다. 특히 siRNA 3의 경우 이입 후 24시간째부터 E6 full transcript와 E6 splicer I ($E6^{*}I$)을 동시에 저해하는 것으로 나타났다.

4. HPV16 E6, E7 siRNA의 p53 단백질 발현 효과 확인

각각의 siRNA에 의한 p53의 유전자 발현 효과를 확인한 결과, siRNA 3, siRNA 198, siRNA 377 모두 siRNA 이입 후 24시간과 48시간 후에 universal siRNA를 이입시킨 대조군에 비해 p53의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

고 찰

대부분의 자궁경부암이 고위험군 HPV와 관련되어 있고[16] E6와 E7 발암유전자를 발현한다. 많은 연구에서 이들 발암유전자의 발현이 악성을 나타내는데 있어 필수적이라는 것이 증명되었다.[4] 그러므로 E6와 E7이 자궁경부암의 유전자 치료에 있어 이상적인 목표물로 여겨지고 있다. 이 두 가지 암 단백질은 암화과정에서 서로 다른 역할을 하는데 그들의 협력이 악성 변형에서 필수적이다.[4,17] E7은 일차적으로 변형을 일으키고 E6는 생체 내에서 암 진행을 맡고 있다.[18,19] E7은 Rb의 'pocket protein' family'를 포함하는 수많은 세포주기조절 단백질에 직접 결합하여 비활성화시킨다.[7,8] 그것에 의해 G1/S 이행과 DNA 합성에 요구되어진 유전자를 upregulation한다. E7에 의해 유도된 이상 증식과 반응하여 숙주 세포는 c-Myc, Bak, p53 같은 proapoptotic 유전자의 발현을 유도하는데[20] E6가 이들 단백질과 결합하여 세포사를 막는다.[21,22] 이러한 악성변형에 관련된 E6와 E7 유전자의 작용을 억제하는 것이 자궁경부암의 치료에 있어 주요 목표가 될 수 있다. 대표적인 고위험군인 HPV16과 HPV18의 E6와 E7 유전자를 억제하기 위한 여러 가지 시도들이 있어 왔다.

최근 siRNA를 이용한 RNA 간섭작용이 포유류의 수많은 유전자를 억제시키는 것이 보고되면서[9,10] 유전자의 기능을 연구하기 위해 siRNA가 이용되어 왔다. siRNA를 이용한 그와 같은 연구 외에도 또 하나의 siRNA의 잠재적인 적용 분야는 유전자 치료이다. Antisense oligo-DNA와 ribozyme이 유전자 치료를 위하여 이용되었고 이들이 발암유전자의 발현을 억제시켰다고 보고되었으나[23-26] 그 효과가 살아 있는 세포에서는 대부분 제한적이었다. siRNA의 이점은 antisense oligo-DNA와 ribozyme에 비하여 높은 효율로 세포 내로 들어가고 낮은 농도에서 유전자 억제를 하는 점이다. siRNA의 임상적인 적용을 위해서는 첫째로 HPV siRNA의 표적 서열을 정하는 것이 필요하다. HPV는 인간의 유전자와 서열의 상동성이 없기 때문에 E6와 E7 siRNA를 만드는 것은 최소한의 off-target 효과를 보일 수 있다. Jiang과 Milner[11]가 HPV16 양성인 세포주에서 siRNA에 의한 E6와 E7의 억제를 보고한 이래로 siRNA에 의한 E6와 E7의 발현 억제가 HPV16 양성인 자궁경부암 세포의 성장을 억제하였다는 보고들이 있어 왔다.[13] 본 연구에서는 HPV16 양성인 SiHa 자궁경부암 세포주를 사용하였다. SiHa 세포주는 염색체 내에 single copy의 HPV 유전자를 포함하고 야생형 p53과 Rb뿐만 아니라 E6와 E7 단백질을 표현한다.[26,27] 그러나 SiHa 세포 내에서 생성되는 E6와 E7에 단백질의 양이 너무 적어 이에 대한 직접적인 정량을 위한 유용한 항체가 없다고 알려져 있어 본 연구에서는 간접적으로 p53 단백질의 발현을 보았다.[11]

Jiang과 Milner[11]의 연구에서 HPV16 양성인 세포주에서 E6 유전자의 억제는 p53 단백질의 세포 내 침착을 일으켰으며 E7 유전자의 억제는 세포사를 일으켰다. 이에 그들은 E7 유전자가 치료의 표적이 된다고 제안하였다. 그러나 Butz 등은 HPV16과 HPV18 양성인 세포주들에서 E6 유전자에 대한 siRNA 적용으로 세포사를 일으켰다.[15] 그들은 E6에 대한 siRNA는 세포 내 E6 유전자의 작용을 효과적으로 억제하는 아주 좋은 방법이며 E6는 HPV 양성인 종양 및 이형증의 치료에 가장 유망한 표적이라고 결론지었다. Sima 등은 E6와 E7 유전자의 발현을 억제하는 HPV16 E7 shRNA (short hairpin RNA)를 이용하여 HPV16 양성인 세포주에서 두드러진 세포사를 유도하여 그 효과를 증명하였다.[28] Yoshinouchi 등[13]과 Tang 등[14]도 siRNA를 이용하여 HPV16 E6와 E7 유전자 발현의 억제에 따른 효과를 증명하였다. 그러나 HPV16에서 E6와 E7 유전자의 동시 억제와 한 유전자만의 억제에 대한 비교 연구는 아직 없다. HPV18에서의 비교 연구로는 Yamato 등이 E6만을 특이적으로 억제한 것이 E6와 E7을 동시에 억제하는 것보다 더 강력한 항암 효과를 유도하였다고 보고하였다.[12]

우리는 다른 연구자들의 연구에서 자궁경부암 세포주에 siRNA를 이입하였을 때 성장 억제가 확인된 세 종류의 siRNA를 같은 조건하에서 효과를 비교하였다. Butz 등[15]

의 연구에서 HPV16 양성인 SiHa 세포주에서 p53 단백질을 증가시키고 세포사를 유도하였으며 HPV 음성인 MCF-7 유방암 세포주 및 H1299 폐암 세포주에는 영향을 미치지 않았다고 밝혀진 siRNA 377 (HPV16 E6 siRNA)를 E6 유전자에 특이적으로 작용하는 siRNA로 사용하였다. Yoshinouchi 등[13]의 연구에서 SiHa 세포주에서 E6와 E7 mRNA를 감소시켰으며 p53의 핵 내 침착을 일으켰다고 밝혀진 siRNA 3 (HPV16 E6 siRNA)를 E6 siRNA이면서 E6와 E7 유전자에 동시에 작용하는 siRNA로 사용하였다. Tang 등[14]의 연구에서 HPV16 양성인 CaSKi와 SiHa 세포주에서 E6와 E7 유전자의 발현을 억제하였다고 밝혀진 siRNA 198 (HPV16 E7 siRNA)를 E7 siRNA이면서 E6와 E7 유전자에 동시에 작용하는 siRNA로 사용하였다. 우리는 E6 유전자에 특이적으로 작용하는 siRNA 377과 E6와 E7 유전자에 동시에 작용하는 siRNA 3과 siRNA 198을 SiHa 세포주에 이입시켰다. siRNA 377, siRNA 3, siRNA 198 모두 세포성장 저해 효과를 보였으며 E6 유전자에 특이적으로 작용하는 siRNA 377에 비해 E6와 E7 유전자에 동시에 작용하는 siRNA 3과 siRNA 198의 세포성장 억제 효과가 더 크게 나타났다 (Fig. 1, 2). 이와 같은 결과는 Yamato 등[12]이 HPV18 양성인 세포주에서 E6만을 특이적으로 억제하는 것이 E6와 E7을 동시에 억제하는 것보다 더 강력한 항암 효과를 유도하였다고 보고한 것과는 다른 양상의 결과이다. 본 연구는 HPV18이 아닌 HPV16에 대한 실험이므로 그 결과의 차이는 HPV 아형간의 차이에서 기인할 수도 있으며 향후 추가적인 연구가 필요할 것이다. 또한 각각의 siRNA를 이입 한 후 E6, E7의 유전자발현 및 p53 단백질 발현의 변화를 비교한 결과 E6 만을 특이적으로 저해하는 siRNA 377의 경우 E7 유전자의 발현 저해는 관찰 되지 않았으며, p53의 발현은 가장 높게 나타났다. E6와 E7을 동시에 저해하는 것으로 알려진 siRNA 3과 siRNA 198의 경우 E6와 E7의 유전자 발현의 저해와 동시에 p53발현의 증가를 관찰 할 수 있었다 (Fig. 3, 4). 특히 E6 유전자의 full transcript, splicer E6*I와 E7유전자를 완전히 억제한 siRNA 3의 경우, p53발현이 siRNA 377에 비해 적음에도 불구하고 세포 성장 저해 효과가 가장 큰 것으로 나타났다 (Fig. 3). 이는 자궁경부암 세포주의 효과적인 세포 성장 저해는 E6 발현 저해와 p53 발현 증가와 E7의 발현 저해에 의한 pRb의 조절에 의해 이루어짐을 추측할 수 있으며, 향후 siRNA 3를 이용한 pRb의 phosphorylation 조절에 관한 연구를 진행할 예정이다. 또한 E6 유전자는 alternative splicing이 일어나는 것으로 알려져 있으며, E6*I과 E6*II의 각각의 splicer의 다른 기능에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 특히 Kösel 등의 연구 결과에 의하면 정량 PCR 결과 high-grade cervical intraepithelial lesions에서 E6*I의 발현이 증가하는 것으로 보고되고 있다[29]. 본 연구 결과에서는 E6*I splicer만 관찰할 수 있었으며, 이입 후, 24시간째부터 splicer E6*I을 저해하는 siRNA 3의 경우 세포성장 저해 효과가 가장 크게 나타났다. 그러나 세포성장 저해 효과와 splicer E6*I의 저해와의 연관성을 추후 연구를 지속해야 할 것으로 사료된다.

최근 HPV 백신이 개발됨에 따라 자궁경부암을 예방하는데 있어서는 큰 진전을 이루었으나 아직 효과적인 치료 방법은 없는 상태이다. siRNA를 이용하여 HPV 및 자궁경부암을 치료하기 위한 여러 연구들이 있어 왔는데 siRNA의 효율적인 HPV 유전자 표적 설정이 필요하다. 본 연구에서는 다른 연구자의 실험에서 효과가 증명된 siRNA만을 이용하였는데 향후 우리 스스로 찾아내고 검증한 다른 종류의 siRNA를 비교하는 연구가 이번 연구를 뒷받침할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 HPV16의 E6 유전자만을 억제하는 것보다 E6와 E7 유전자를 동시에 억제하는 것이 더 큰 세포 성장 억제를 보였다. 이러한 결과는 향후 HPV 양성인 자궁경부암 연구에 있어 보다 유용한 표적을 설정하는데 도움이 될 것이다.

참고문헌

1. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2002; 2: 342-50.
2. Fen J, Yoshinouchi M, Nakamura K, Kodama J, Nasu Y, Yamato K, et al. Eradication of HPV post-surgical treatments, its correlation with specific types, types of surgery and the physical status. Oncol Rep 2004; 12: 375-9.
3. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 796-802.
4. zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol 1994; 186: 131-56.
5. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. Mol Cell Biol 1993; 13: 4918-27.
6. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. 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 1993; 13: 775-84.
7. Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. EMBO J 1989; 8: 4099-105.
8. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 1989; 243: 934-7.
9. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 2001; 411: 494-8.
10. Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. J Cell Sci 2001; 114 (Pt 24): 4557-65.
11. Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. Oncogene 2002; 21: 6041-8.
12. Yamato K, Fen J, Kobuchi H, Nasu Y, Yamada T, Nishihara T, et al. Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. Cancer Gene Ther 2006; 13: 234-41.
13. Yoshinouchi M, Yamada T, Kizaki M, Fen J, Koseki T, Ikeda Y, et al. In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. Mol Ther 2003; 8: 762-8.
14. Tang S, Tao M, McCoy JP Jr, Zheng ZM. Short-term induction and long-term suppression of HPV16 oncogene silencing by RNA interference in cervical cancer cells. Oncogene 2006; 25: 2094-104.
15. Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, Denk C, Scheffner M, Hoppe-Seyler F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. Oncogene 2003; 22: 5938-45.
16. de Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. J Virol 1989; 63: 4898-903.
17. von Knebel Doeberitz M, Oltersdorf T, Schwarz E, Gissmann L. Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. Cancer Res 1988; 48: 3780-6.
18. Scheffner M, Whitaker NJ. Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. Semin Cancer Biol 2003; 13: 59-67.
19. Song S, Liem A, Miller JA, Lambert PF. Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. Virology 2000; 267: 141-50.
20. Askew DS, Ashmun RA, Simmons BC, Cleveland JL. Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. Oncogene 1991; 6: 1915-22.
21. Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. J Gen Virol 1999; 80 (Pt 6): 1513-7.
22. Gross-Mesilaty S, Reinstein E, Bercovich B, Tobias KE, Schwartz AL, Kahana C, et al. Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 8058-63.
23. Steele C, Cowsert LM, Shillitoe EJ. Effects of human papillomavirus type 18-specific antisense oligonucleotides on the transformed phenotype of human carcinoma cell lines. Cancer Res 1993; 53 (10 Suppl): 2330-7.
24. Venturini F, Braspenning J, Homann M, Gissmann L, Sczakiel G. Kinetic selection of HPV 16 E6/E7-directed antisense nucleic acids: anti-proliferative effects on HPV 16-transformed cells. Nucleic Acids Res 1999; 27: 1585-92.
25. Alvarez-Salas LM, Cullinan AE, Siwkowski A, Hampel A, DiPaolo JA. Inhibition of HPV-16 E6/E7 immortalization of normal keratinocytes by hairpin ribozymes. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 1189-94.
26. Chen Z, Kamath P, Zhang S, St John L, Adler-Storthz K, Shillitoe EJ. Effects on tumor cells of ribozymes that cleave the RNA transcripts of human papillomavirus type 18. Cancer Gene Ther 1996; 3: 18-23.
27. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature 1985; 314: 111-4.
28. Sima N, Wang W, Kong D, Deng D, Xu Q, Zhou J, et al. RNA interference against HPV16 E7 oncogene leads to viral E6 and E7 suppression in cervical cancer cells and apoptosis via upregulation of Rb and p53. Apoptosis 2008; 13: 273-81.
29. Kösel S, Burggraf S, Engelhardt W, Olgemöller B. Increased levels of HPV16 E6*I transcripts in high-grade cervical cytology and histology (CIN II+) detected by rapid real-time RT-PCR amplification. Cytopathology 2007; 18: 290-9.

= 국문초록 =

목적: 인유두종바이러스 (Human papillomavirus, HPV)는 자궁경부암과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 인유두종바이러스 16형은 고위험군 바이러스로 분류된다. 인유두종바이러스 16형의 암 유전자 E6와 E7의 발현 저해에 따른 자궁경부암 세포주내의 발암 유전자 특이적 변화를 확인하고자 하였다.

연구 방법: 인유두종바이러스 16형을 발현하는 자궁경부암 SiHa 세포주에서 E6 유전자에 특이적으로 작용하는 인유두종바이러스 16형 E6 siRNA (siRNA 377)와 E6와 E7 유전자에 동시에 작용하는 인유두종바이러스 16형 E6 siRNA (siRNA 3)와 인유두종바이러스 16형 E7 siRNA (siRNA 198)를 사용하였다. 각각의 siRNA를 SiHa 세포주에 이입 (transfection)시킨 후, 24시간과 48시간 후에 세포수 및 세포형태의 변화를 관찰하였다. 또한 E6와 E7에 대한 RT-PCR을 실시하여 인유두종바이러스 16형 E6, E7 siRNA의 유전자 발현 저해 정도를 확인하였다.

결과: 3종류의 siRNA 모두 세포성장 저해 효과를 나타내었으며, siRNA 377에 비해 siRNA 3와 siRNA 198의 세포성장 억제 효과가 더 크게 나타났다. siRNA 377은 E6 mRNA만의 발현을 감소시켰고 siRNA 3과 siRNA 198은 E6와 E7 mRNA의 발현을 동시에 감소시켰다.

결론: 인유두종바이러스 16형이 감염된 자궁경부암 SiHa 세포주에서 E6 유전자만의 억제보다는 E6와 E7 유전자를 동시에 억제하는 것이 더 큰 세포 성장 억제를 보였다.

중심단어: 자궁경부암, 인유두종바이러스, E6, E7, siRNA