

Ursolic acid에 의한 자궁 경부암 세포주에서 항증식, 항바이러스 작용 기전 분석

가톨릭대학교 의과대학교 산부인과학교실, *세종대학교 생명공학과
이근호 · 임은경 · 윤주희 · 엄수중* · 남궁성은 · 박종섭

Antiproliferative and Antiviral Mechanism of Ursolic Acid in Cervical Carcinoma Cell Lines

Keun Ho Lee, M.D., Eun Kyoung Yim, M.S., Joo Hee Yoon, M.D., Soo Jong Um, Ph.D.*,
Sung Eun Namkoong, M.D., Jong Sup Park, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, The Catholic University of Korea,
**Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University, Seoul, Korea*

Objective : Ursolic acid which has been used as a herb medication, was reported for anti-cancer and anti-inflammatory effects. We tried to analyze the anti-proliferative and anti-viral effects of ursolic acid in Human papillomavirus (HPV) associated cervical carcinoma cell lines.

Methods : We treated ursolic acid or dexamethasone to cervical carcinoma cell lines. We carried out MTT assay to observe the anti-proliferative effects and tried to find out the characteristics of apoptosis by DNA fragmentation, DAPI staining and FACS analysis. By means of western blotting, we investigated proteins related with apoptosis. After treating of ursolic acid, we used RT-PCR for the expression of HPV E6 and E7 gene to observe the anti-viral effects. Through proteomics analysis including two-dimensional electrophoresis (2DE) and matrix-associated laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), we found the interaction between cell cycle regulatory factor and apoptosis related protein, and also demonstrated anti-cancer and anti-viral mechanism.

Results : While the growth of HPV-positive cervical carcinoma cell lines (HeLa, CaSki, SiHa) is suppressed by ursolic acid in a dose- and time-dependent manner, that of HPV-negative cervical carcinoma cell line (C33A) did not have any inhibitory effects on proliferation. As we increased the concentrations of ursolic acid in HeLa cell, the typical characteristics of apoptosis were noted in DNA fragmentation, DAPI staining and FACS analysis. The expression of Fas protein was induced and caspase-8, caspase-3 and PARP proteins changed into cleaved forms after treating ursolic acid. HPV-18 E6/E7 gene expression decreased after treating ursolic acid in HeLa cells, but the levels of p53 and Rb proteins did not changed. Total 30 spots were detected by proteomics analysis, along with 20 up-regulated, 6 down-regulated and 4 unknown protein were founded.

Conclusion : These results suggest that ursolic acid inhibit the cell proliferation through apoptosis in HPV-associated cervical carcinoma cell lines. The apoptotic mechanism of ursolic acid in HeLa cells might be through the signal pathway "Fas→caspase-8→PARP". In addition, the antiviral effect of ursolic acid through suppression of HPV E6/E7 gene expression would contribute to growth inhibition in HeLa cells. These results suggest that ursolic acid could be useful for an effective anticancer drug in treatment of HPV-associated cervical neoplasia.

Key Words : Ursolic acid, Human papillomavirus, Cervical cancer, Apoptosis

서 론

자궁경부암은 한국 여성에게 흔한 암이며, 인유두종 바이러스(human papillomavirus: HPV) 감염에 의해 자궁경부 세포에서 악성화된 변형이 유발되어 발생하는 것으로 알려져 있다. HPV가 암을 유발하는 기전은 발암 유전자의 산물인 E6, E7 단백질이 각각 p53과 Rb와 같은 종양 억제 단백질을 불활성화시켜서 세포 주기의 조절 기능을 파괴함으로써 유도된다.^{1,2}

Ursolic acid는 항종양, 항염, 항균, 항바이러스 효과를 갖고 있으며, 종양 세포에서는 세포 주기 정지(cell cycle arrest)와 세포 고사(apoptosis)를 유도하며, 종양 세포의 분화도 유도하는 것으로 알려져 있으며,^{3,4} 또한 바이러스와 관련하여 Galactosamine은 hepatitis virus를 자극하여 간의 손상을 초래하여 uridylylate nucleotide의 합성을 분열시키는데, ursolic acid를 투여하면 RNA의 정상적인 합성이 일어나며 바이러스부터 간을 보호하는 기능을 가진다.⁵ 또한, ursolic acid는 matrix metalloproteinase의 발현을 제어하여 종양 침윤과 전이를 억제함을 보여 주었다.⁶ 이와 같이 항암, 항바이러스 효과를 갖는다고 알려진 ursolic acid의 연구 결과를 참조할 때, HPV 감염과 관련되어 발생하는 자궁경부암 세포에서도 항암, 항바이러스 효과가 있을 가능성이 있으나, 아직 자궁경부암 세포에 대한 연구는 보고되었던 바 없었다.

본 연구에서는 ursolic acid가 HPV에 의하여 유발되는 자궁경부암 세포의 성장을 억제시키는 항 증식 효과를 조사하고, HPV E6, E7 발암 유전자의 표현에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한, ursolic acid와 구조적으로 유사한 pentacyclic triterpenoid 성분인 dexamethasone을 자궁경부암 세포에 처리하여 ursolic acid와의 차이점을 비교하였다.

연구 대상 및 방법

1. 세포 증식 억제 분석(cell proliferation assay)

실험군으로 사용한 세포주는 HPV-16을 함유한 SiHa, CaSki 자궁경부암 세포주, HPV-18을 함유한 HeLa 자궁경부암 세포주, 음성 대조군으로는 HPV가 없는 C33A 자궁경부암 세포주를 이용하였다. 96-well에 2×10^3 개의 세포를 넣은 후 24시간 후에 ursolic acid (Sigma, St. Louis, MO)와 대조군으로

dexamethasone (Sigma, St. Louis, MO)을 처리하였다. 약제 처리 농도는 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M로 5일 동안 배양하면서 약제처리하지 않은 정상 대조군과 비교하고자 37°C, 5% CO₂ 상태에서 4시간 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay를 시행하였고, ELISA reader로 550 nm에서 cell viability를 측정하였다. 정상대조군은 약제를 첨가하지 않은 0.01% DMSO 배양액을 사용하였다.

2. DAPI 염색(fluorescence microscopic examination)

자궁경부암 세포주를 6-well plate에 넣은 후 농도별(1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M)로 ursolic acid와 dexamethasone을 투여하였다. 72시간 후 70% ethanol로 고정하고, DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride) 용액을 넣어서 자외선에 형광현미경으로 세포의 모양을 관찰하였다.

3. DNA 분절 분석(DNA fragmentation assay)

6 well plate에 세포주를 넣고 24시간 경과 후 다른 농도에서 약제 처리(0, 5, 10, 15 μ M)를 시행하였다. 약제 처리 3일 후에 세포를 모아서 700 μ l 용해 완충액(500 mM Tris, 100 mM EDTA, 0.5% SDS)와 17.5 μ l proteinase K (20 mg/ml)를 첨가한 후 phenol 용액 700 μ l을 첨가하여 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 상층액을 취하여 phenol 추출을 한 번 더 반복하였다. 상층액과 3 M NaOAc (pH 7.0, 상층액의 1/10 μ l)을 첨가한 후 -20°C에서 30분간 두었다가 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 70% ethanol로 세척하여 건조시키고 100 μ l TE buffer에 RNase A를 넣고 pellet을 녹였다. 추출한 DNA를 정량하고, 1.8% agarose gel로 전기영동후 자외선 시야에서 DNA ladder를 관찰하였다.

4. 세포주기 분석(FACS analysis)

Ursolic acid를 농도별(0, 5, 10, 15, 20 μ M)로 처리한 3일 후에 세포를 모아서 차가운 70% ethanol을 떨어뜨려 고정시키고 4°C에서 밤새 보관하였다. 상층액을 제거하고 500 μ l의 washing buffer와 RNase A (10 mg/ml)을 첨가하고 PI (propidium iodide, 100 μ g/ml in PBS)를 첨가하여 fluorescence activated cell sorter (FACS; Becton Dickinson, San Jose, CA)로 DNA 함량을 비교하

였다.

5. HPV E6/E7에 대한 RT-PCR

RNA 분리와 역전사 중합 반응을 위하여 HeLa 세포 주를 6 well plate에 넣어 배양하고, 24시간 후 약제를 처리하였다. 3일간 배양 후 세포의 RNA를 RNeasy Total RNA purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 추출하였다. HPV-18 E6/E7 mRNA 증폭을 위하여 역전사 중합효소연쇄반응으로 추출한 50 ng RNA를 200 μ M dNTPs, 100 pmol sense/antisense primers, AMV reverse transcriptase-high fidelity DNA polymerase mixture로 반응시켜 합성한 cDNA를 사용하였다(Titan One Tube RT-PCR system: Boehringer Mannheim, Germany). GAPDH primer (Life Technologies, Grand Island, NY)는 사용한 총 RNA양에 대한 정상 대조군으로 사용하였다. 역전사 반응은 50℃에서 30분간 반응하고, 94℃에서 30초 변성하고, 52℃에서 30초 정렬, 68℃에서 1분 연장 과정을 35회 반복시킨 후에 최종적으로 68℃에서 7분간 연장시켰다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 100 V로 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후 관찰하였다.

6. 단백질 분석(Western blot hybridization)

100 mm cell culture dish에 HeLa 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM (Dublecco's modified Eagle's medium)에서 ursolic acid와 dexamethasone을 농도별(0, 5, 10, 15 μ M)로 처리한 후 72시간 배양하였다. 세포 분쇄물을 SDS-PAGE하고, ECL nitrocellulose membrane (Amersham Life Science, UK)에 옮기고, blocking 용액(5% skim milk in 25 mM Tris-Cl, pH 8.0, 125 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 반응시켰다. 1차 항체인 anti-Fas Ab (Santa Cruz Biotechnology, CA)를 1:500, anti-caspase-8 Ab (Oncogene, Boston, MA)를 1:100, anti-caspase-3 Ab (Calbiochem, LA Jolla, CA)를 1:2000, anti-PARP Ab (Santa Cruz Biothechnology)를 1:300으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체는 peroxidase-conjugated mouse, rabbit anti-Ig G (Amersham Life Science)를 1:5000으로 희석하여 이용하여 40분 동안 반응시켜서 10분간 4번 세척하고 ECL Hyperfilm (Amersham Life Science)으로 노출하여 확인하였다.

7. 2DE (two-dimensional gel electrophoresis)

IEF (isoelectroic focusing)을 위해 IPG strip holder에 시료를 넣고, IPG strip (Amersham Life Science)을 시료위에 올려놓은 후 DryStrip CoverFluid (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 위에 얹어 20℃에서 12시간 이상 rehydration 시키고, 100 V, 0.5시간; 300 V, 0.5시간; 600 V, 0.5시간; 1,000 V, 0.5시간; 3,000 V, 0.5시간; 6,000 V, 8시간 동안 isoelectrofocusing을 수행하였다. 이후에 SDS-PAGE (second dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 용액과 맞추기 위해 equilibration buffer (6 M Urea, 2% SDS, 1X SDS running buffer, 20% glycerol, 5 mM TBP, 2.5% acrylamide)로 처리하였다. Second dimension으로 옮겨 SDS-PAGE 상에서 5 mM 1시간, 10 mM 16시간 동안 분자량에 따라 분리한 후, silver stain plus kit (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 단백질 spot을 검출하였다. Bio-Rad Scanner를 사용하여 gel의 이미지를 디지털화시킨 후, PDQuest 6.2.1 software (Bio-Rad)를 이용하여 spot을 검출하였다.

8. Protein identification & MALDI-TOF-MS

Silver stain으로 염색한 단백질들 중 원하는 부위를 destaining한 후, 56℃에서 1시간 동안 10 mM DTT/25 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 8.0) 처리하였다. 4℃에서 10분간 원심분리한 후 gel에 55 mM iodoacetamide/25 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 8.0)를 처리하여 상온에서 30분간 반응시켰다. Speed-Vac을 사용하여 1시간 동안 건조시킨 후, trypsin solution (10 μ g/ml in 25 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0)을 처리하여 37℃에서 12-14시간 동안 반응시켰다. Trypsin digestion 후, gel을 제외한 상등액을 모두 수거하여 Speed-Vac으로 완전히 말리고, 50% acetonitrile/0.1% TFA buffer에 녹인 matrix와 시료를 섞어 target probe에 loading하였다. target probe상의 시료가 건조되면, MALDI-TOF-MS에 장치하여, 표준 peptide를 측정하여 질량 교정을 수행하고, 시료를 분석하였다. 얻어진 질량값을 근거로 database에 등록되어 있는 단백질을 찾아 동정하였다.

결 과

1. Ursolic acid에 의한 세포 성장 억제

Ursolic acid의 세포 성장 억제를 농도별로 살펴보았을 때, 농도에 의존적으로 세포 성장이 억제되는 것을

관찰하였다. HPV가 있는 자궁경부암 세포주에서는 15 μ M에서 60%의 성장 억제를 보였으며, 3일째부터 세포 성장이 억제되기 시작하여 5일째 되는 날까지 성장 억제가 관찰되었으나, HPV가 없는 C33A 자궁경부암 세포주는 변화가 없었다(Fig. 1). Dexamethasone을 처리한 경우는 HPV가 있는 자궁경부암 세포와 HPV가 없는 세포에서 모두 약제 농도와 상관없이 성장 억제 효과가 없었다(data not shown).

2. DAPI 염색을 통한 apoptosis 확인

Ursolic acid 처리시 세포 성장의 억제 효과가 apoptosis 유도에 기인한 것으로 추측하여 apoptosis를 형태학적인 확인하기 위해 DAPI 염색으로 HeLa 세포의 핵을 관찰하였다. DMSO를 처리한 정상 대조군에서는 녹색을 띠는 정상 세포의 모습을 관찰할 수 있었다. Ursolic acid의 농도가 증가함에 따라 비례 의존적으로 chromatin condensation, apoptotic body의 형성, 핵의 fragmentation의 증가를 발견할 수 있었다. 그러나 dexamethasone을 처리한 세포는 apoptosis의 형태적인 특징을 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

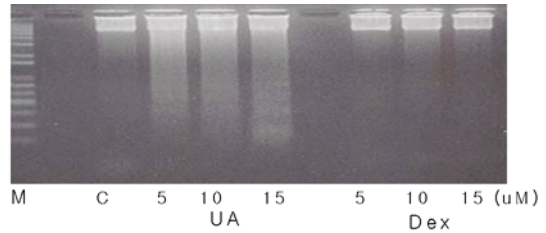


Fig. 2. Dose-dependent effect on DNA fragmentation by ursolic acid in HeLa cells. Lane M represents DNA marker (UA: ursolic acid, DEX: dexamethasone).

3. DNA fragmentation의 확인

HPV-18을 함유한 HeLa 자궁경부암 세포에 ursolic acid를 투여하였을 때 DNA 분절 현상이 관찰되는지 보기 위해 genomic DNA를 분리하여 agarose gel 전기영동에서 DNA 분절이 나타나는지 확인하였다. Dexamethasone을 처리한 경우에는 DNA ladder가 나타나지 않았으며, ursolic acid는 투여된 농도의 증가에 따라 DNA 분절이 많아지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

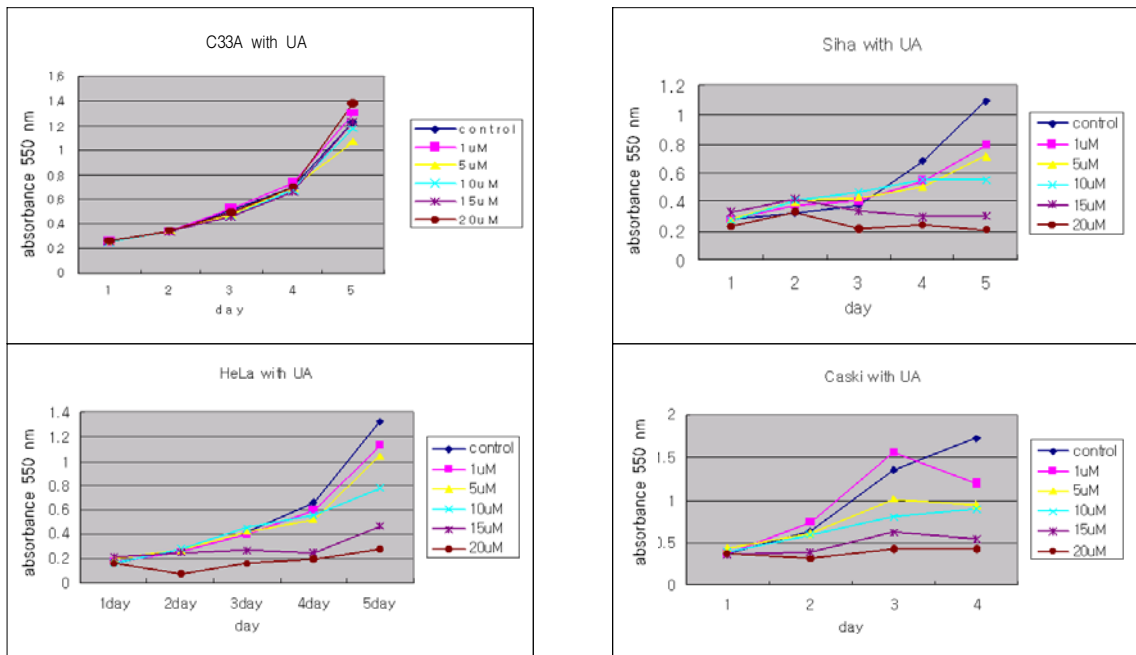


Fig. 1. Dose-dependent, anti-proliferative effect of ursolic acid on growth of cervical carcinoma cells measured by MTT assay (UA: ursolic acid).

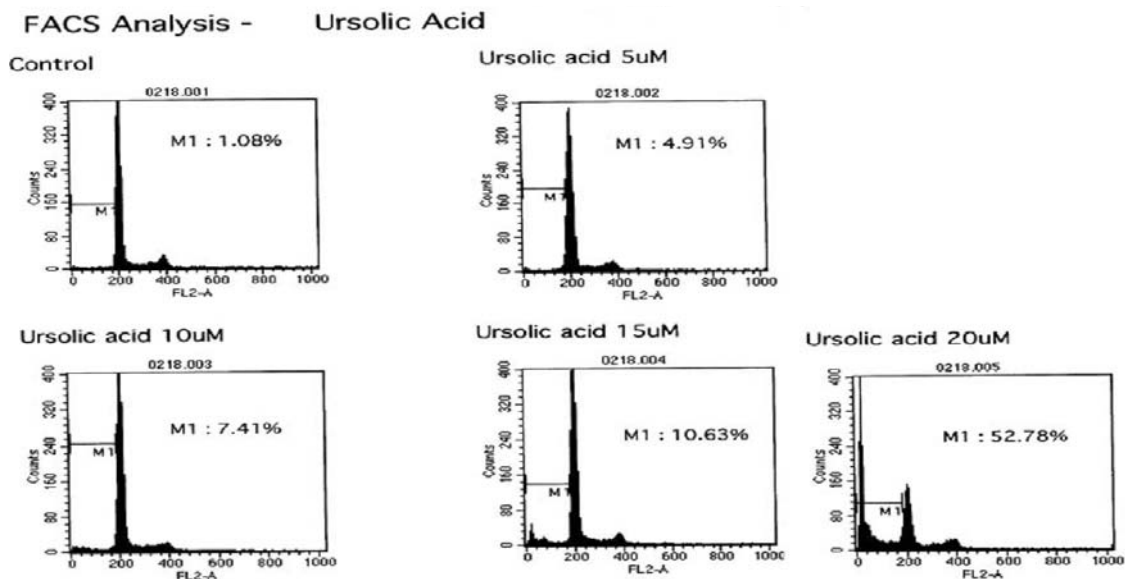


Fig. 3. FACS analysis of HeLa cells treated by ursolic acid. M1 (%) represents portion of Sub G1 phase, suggestive DNA fragmentation by apoptosis (hypodiploid DNA).

4. FACS 분석으로 apoptosis의 확인

Apoptosis의 정도를 정량화하기 위해 HeLa 세포에서 FACS 분석을 실시하였다. sub G1 시기의 DNA 양을 M1 값으로 표시하였다. Ursolic acid를 처리한 HeLa 세포는 농도의 증가에 의존적으로 Sub G1의 DNA 양이 증가하였으며, 20 μ M 농도에서는 50% 이상 관찰되었다(Fig. 4). 그러나 dexamethason을 처리한 경우는 농도와 무관하게 변화가 없었으며, 대조군과 비슷한 DNA양을 보였다.

5. Ursolic acid에 의한 HPV E6/E7 유전자 발현 억제
E6/E7 유전자의 발현 정도를 알아보기 위하여 HPV-18 양성인 HeLa 세포주에 ursolic acid와 dexamethasone을 농도별(1, 5, 10, 15 μ M)로 처리하여 RT-PCR을 수행하였다. Ursolic acid 20 μ M 처리시 세포가 거의 죽어서 RNA를 분리할 수 없었으며, E6/E7 mRNA 발현은 ursolic acid의 농도에 의존적으로 감소함을 볼 수 있으며, dexamethasone은 농도와 무관하게 mRNA 발현의 변화는 없었다(Fig. 5).

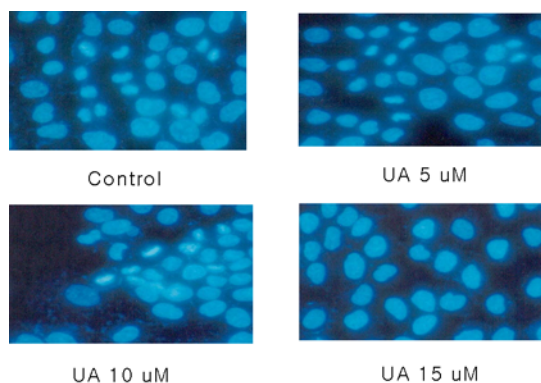


Fig. 4. Nuclear morphology of DAPI stained HeLa cells was examined by fluorescence microscopy. HeLa cells were treated for 48 hours with different concentrations of ursolic acid. DMSO treatment was used as control.

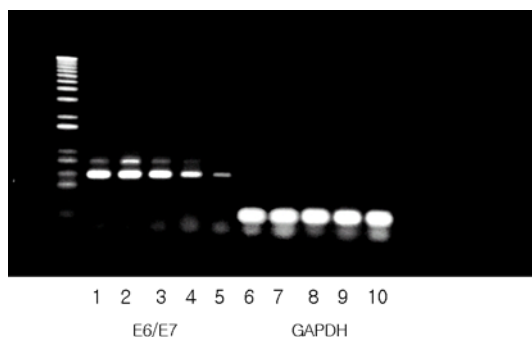


Fig. 5. HPV-18 E6/E7 mRNA was measured by RT-PCR. HPV-18 E6/E7 expression was serially diminished as increasing concentration of ursolic acid in HeLa cells. GAPDH was used as control (1 and 6-Control; 2 and 7-UA (1 μ M); 3 and 8-UA (5 μ M); 4 and 9-UA (10 μ M); 5 and 10-UA (15 μ M)).

6. Western blotting

HeLa 세포주에 ursolic acid를 처리하여 Fas 단백질의 발현 변화를 관찰한 결과 DMSO를 처리한 정상 대조군에 비하여 발현이 증가됨을 관찰하였다. 또한, caspase-8, caspase-3와 PARP proform 단백질은 ursolic acid로 처리한 후에 점차적으로 감소하면서 절단된 형태의 단백질이 증가하는 것을 보였다. 한편 HPV E6, E7과 관련 되어있는 p53, Rb 단백질 변화는 없었으며, ursolic acid의 농도와 무관하게 일정하게 나타났다 (Fig. 6).

7. Proteomics analysis

HeLa 세포주에 DMSO로 처리한 control과 ursolic acid로 처리한 2DE gel의 spot을 image analysis software로 분석하였다. 60 ug의 시료를 넣은 후 pH 3-10에서 분리된 map에서 ursolic acid를 처리하였을 때 총 30개의 spot의 변화를 관찰하였는데 20개는 증가된 spot을 보였고(i.e. caspase-7 precursor, TANK, CDK5, TRAF family associated NF-kB activator, GRP78, Calpain 11, Plasminogen activator inhibitor-1 precursor, Sin3 associated-polypeptide p18, TNF receptor superfamily number 6 precursor, B cell receptor-associated protein, Guanine nucleotide-binding protein 등) 6개는 down-regulated spot으로 나타났고(i.e. Matrix metalloproteinase-17 precursor (MMP17), Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase

1A, Apolipoprotein A-IV precursor, proline-serine-treonine-phosphatase-interacting protein 2 등), 4개는 unknown spot을 보였다(Fig. 7).

고 찰

Ursolic acid는 *Eribotrya japonica*, *Rosmarinus officinalis* and *Glechoma hederaceae* 같은 약용 식물로부터 추출되어지는 pentacyclic triterpene acid 이다.^{3,4,7} 여러 종양에서 ursolic acid 처리로 인한 분자생물학적 항암 기점을 연구하였으나, 아직까지 자궁경부암 세포에서는 그 연구가 이루어지지 않았다.

자궁경부암은 HPV에 의해 감염되고 암 유발 단백질인 E6, E7이 발현되며 E6는 p53 단백질과 결합하여 단백질 분해과정을 통해 p53을 분해하고, E7은 탈 인산화된 pRb와 결합하여 E2F와 반응을 방해함으로써 세포내 두 종류의 암 억제 단백질의 작용을 불활성화시키는 것이 주된 발암 기전으로 알려져 있다.^{1,2}

본 연구에서는 자궁경부암세포에서 ursolic acid에 의한 세포 성장 억제 작용과 HPV의 E6와 E7 유전자의 발현을 억제하는지 여부를 규명하여 항바이러스 효과에 대한 분석을 시행하였으며, ursolic acid와 구조가 비슷한 glucocorticoid인 dexamethasone에 의한 작용 효과와 비교하였다. Ursolic acid를 HPV 양성 세포와 음성 세포에 처리한 후, 세포의 성장 효과를 관찰하였더니, HPV 양성 세포에서는 HPV 음성 세포에 비하여

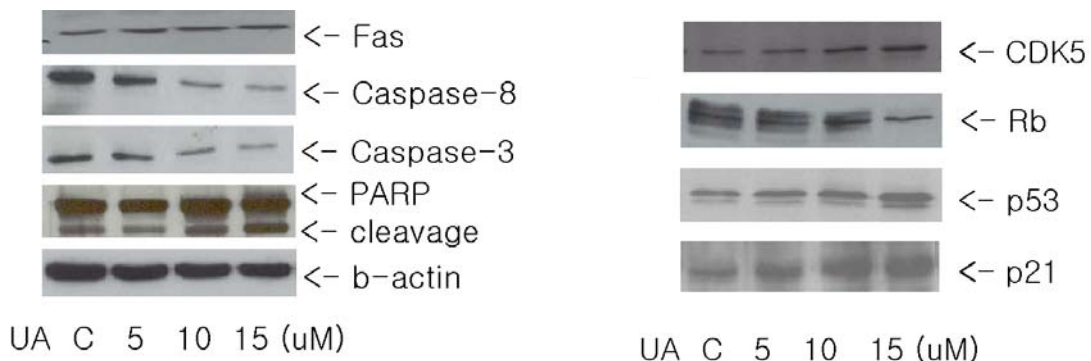
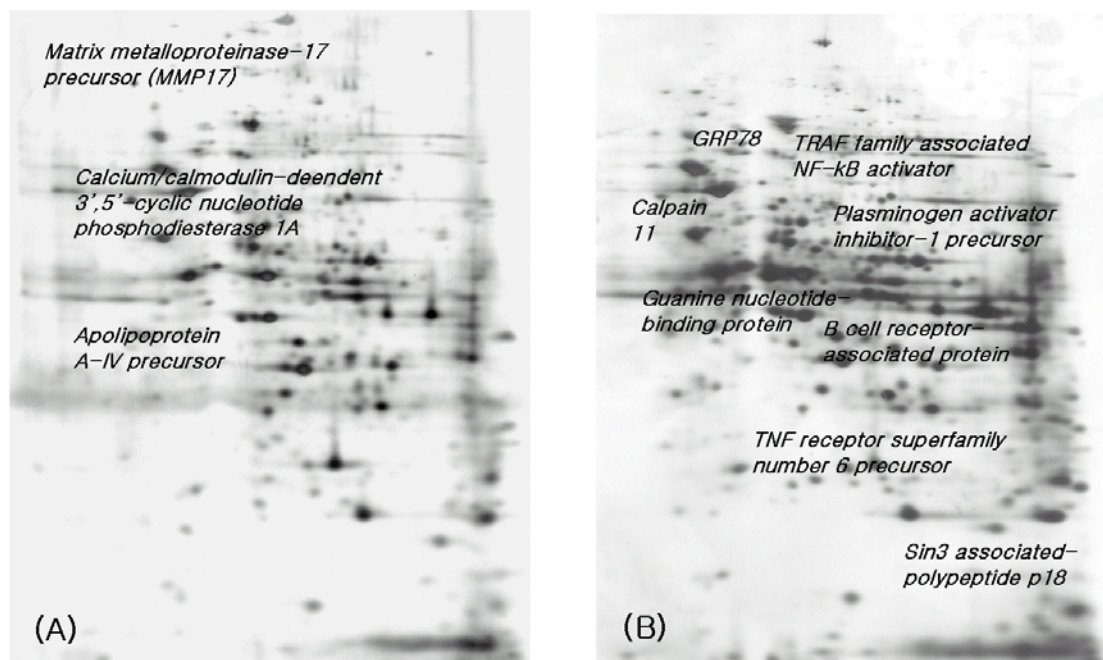


Fig. 6. HeLa cells were treated with 5, 10, and 15 μM ursolic acid. In Western blotting, the levels of Fas, caspase-8, -3, PARP, cdk5, Rb, p53, and p21 protein were variably changed by treatment of ursolic acid. β-actin was used as normalize protein loading.



HeLa (control)

HeLa treated with UA

Fig. 7. Down-regulated proteins (A) and Up-regulated proteins (B) were detected in 2DE after treatment with ursolic acid in HeLa cells.

시간과 농도에 비례한 억제 효과를 나타내었다. Ursolic acid를 처리하였을 때 농도별로 HPV E6/E7의 발현이 확연히 감소하는 것을 확인하였다. Ursolic acid는 Raji 세포에서 TPA를 유도하는 Epstein-Barr virus를 억제하고, 쥐의 피부에서 TPA를 유도하는 종양 축진을 억제하며, AP-1 전사 인자를 표적하는 항바이러스 작용과 관련이 되어 있다고 알려져 있다.^{3,4}

본 연구에서도 ursolic acid에 의하여 HPV URR (upstream regulatory region)의 AP-1 전사 인자를 표적할 것이라고 예상하여 AP-1 부위를 가진 TRE-tk-CAT reporter plasmid를 사용한 transfection assay를 수행하였으나, ursolic acid의 HPV URR에 대한 직접적인 억제 현상은 관찰할 수 없었다. 한편, 항바이러스와 관련하여 ursolic acid는 hepatitis 바이러스로부터 단백질 합성을 증가하여 간을 보호하고, 세포막을 안정화하며 free radical을 생성하는 독성을 억제한다는 보고가 있었다.⁵ HepG 2 세포나 전립선 상피세포에서는 ursolic acid에 의한 apoptosis 현상을 관찰할 수 있었으나 p53 발현에는 영향이 없었다.^{8,9} 본 연구에서는 자궁경부암 세포에서 ursolic acid 투여에 의하여 HPV

E6, E7의 발현이 감소되었음에도 불구하고 p53과 Rb의 발현 수준에는 영향이 없었다.

본 연구에서 관찰한 바와 같이 dexamethasone 투여에 의하여 자궁경부암 세포는 성장이 촉진되었으며, 이는 이미 보고된 바와 같이 HPV URR에 위치한 GRE (Glucocorticoid Response Element) 전사인자에 대한 직접적인 반응 결과라고 생각된다.¹⁰ Ursolic acid가 glucocorticoid 계통이므로 glucocorticoid와 관련하여 HT1080 human fibrosarcoma 세포에서 ursolic acid는 glucocorticoid receptor의 핵의 전좌 (nuclear translocation)를 자극함으로써 MMP-9 억제를 유도하고, 전좌된 glucocorticoid receptor는 MMP-9 promotor region의 2-O-tetradecanoul-phorbol-acetate responsible element로 AP-1의 활성화하는 기능을 down-modulating 한다.⁶ Ursolic acid가 glucocorticoid receptor를 통하는 과정을 연구하기 위하여 TRE-tk-CAT이나 17 mer TATA CAT plasmid를 사용하여 transfection assay를 실시하였으나, CAT의 활성도를 관찰할 수 없었다(data not shown).

자궁경부암 세포주인 HeLa 세포주에 ursolic acid를

처리하여 apoptosis의 전형적인 특징인 DNA 분절, chromatin 응축을 관찰하였고, caspase 3, caspase 8, PARP의 절단 현상을 단백질 수준에서 확인할 수 있었다. 전립선 상피 세포에서도 ursolic acid의 농도에 의존적으로 성장이 억제되었으며, apoptosis의 특징인 chromatin의 응축과 DNA 분절 양상을 관찰할 수 있었다.⁸ HeLa 세포주에서 ursolic acid에 의한 apoptosis 기전은 p53, Bax, Bcl의 발현과는 관련이 없으면서 apoptotic protein의 억제자인 c-IAPs family의 down-regulation을 통해 caspase (-1, 3, 8, 9)를 활성화시켜서 PARP, β -Catenin, Rad51 같은 target 단백질을 절단하는 과정을 통하여 발생하는 것으로 생각되어진다.

Ursolic acid가 resting macrophage에서 NO와 TNF- α 의 방출(release)을 유도하였다는 보고가 있었다.¹¹ 이에 TNF와 연관된 신호 전달 경로의 가능성을 추측하여 Fas의 발현 정도를 관찰해 보니 대조군 세포에 비하여 ursolic acid를 처리한 자궁경부암 세포에서 더욱 증가함을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 Ursolic acid가 p53, Rb 단백질과는 연관이 없으면서 독립적으로 Fas 경로를 통해 apoptosis가 일어나는 것으로 추정하게 한다. HPV E7의 Rb-independent pathway로서 apoptosis와 연관된 새로운 기전에 대한 연구는 아직까지 밝혀진 바 없으며, HPV E6의 p53-independent pathway로서 HPV E6 단백질은 TNF R1과 직접 결합하며, TNF R1/TNF R1 homodimer와 관련된 TNF death domain의 반응은 E6의 존재하에서는 감소하므로, 자궁경부암 세포에서 ursolic acid에 의한 apoptosis 현상은 p53, Rb와는 독립적으로 TNF와 관련되어 있을 가능성을 생각하게 한다.¹²

결론적으로 자궁경부암 세포에 ursolic acid를 투여하면 세포 증식 억제가 apoptosis에 의해 일어나며, “Fas→caspase-8→caspase-3” or “?→cdk5→caspase-3→PARP”의 신호 전달 경로에 의한 기전이며, HPV E6/E7의 발현 저하로 인한 항바이러스 효과도 기여할 것으로 사료된다. 이와 같은 연구 결과는 HPV 감염과 연관된 자궁경부의 종양성 질환에서 ursolic acid에 의한 항증식, 항바이러스 기전을 이해하는데 도움을 주었으며, 효과적인 약제로서 사용 가능성을 제시하였다.

참고문헌

- 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.
- Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 with tumor suppressor gene products. *Cancer Surv* 1992; 12: 197-217.
- Tokuda H, Ohigashi H, Koshimizu K, Ito Y. Inhibitory effect of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Letter* 1986; 33: 279-85.
- Huang MT, Ho CT, Wang ZY, Ferraro T, Lou YR, Stauber K, et al. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents camosol and ursolic acid. *Cancer Res* 1994; 54: 701-8.
- Binduja S, Visen PKS, Dayal R, Agarwal DP, Patnaik GK. Protective action of ursolic acid against chemical induced hepato-toxicity in rats. *Indian J Pharm* 1996; 28: 232-9.
- Cha HJ, Park MT, Chung HY, Kim ND, Sato H, Seiki M, et al. Ursolic acid-induced down-regulation of MMP gene is mediated through the nuclear translocation of glucocorticoid receptor in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Oncogene* 1998; 616: 771-8.
- Ohigashi H, Takamura H, Koshimizu H, Tokuda H, Ito Y. Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein-Barr virus activation: ursolic acid and oleanolic acid form an anti-inflammatory chinese medicinal plants, *Glechoma hederaceae* L. *Cancer Lett* 1986; 30: 143-51.
- Choi YH, Baek JH, Yoo MA, Chung HY, Kim ND, Kim KW. Induction of apoptosis by Ursolic acid through activation of caspase and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int J Oncol* 2000; 17: 565-71.
- Kim DK, Baek JH, Kang CM, Yoo MA, Sung JW, Chung HY, et al. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *Int J Cancer* 2000; 87: 629-39.
- Khare S, Kumar KU, Tang SC, Pater MM, Pater A. Up-regulation of hormone response of human papillomavirus type 16 expression and increased DNA-protein binding by consensus mutations of viral glucocorticoid response elements. *J Med Virol* 1996; 50: 254-62.
- You HJ, Choi CY, Kim JY, Park SJ, Hahm KS, Jeong HG. Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor- κ B activation in the resting macrophages. *FEBS Lett* 2001; 509: 156-60.
- Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 21730-9.

1. zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understanding the role of viruses in human

국문초록

목적 : 동양의 전통적인 약제로 사용되고 있는 ursolic acid는 항암, 항염증 효과가 있다고 알려져 있다. 본 연구는 ursolic acid의 자궁경부암 세포주에 대한 증식 억제와 HPV에 관련된 항바이러스 효과를 관찰하고자 하였다.

연구 방법 : Ursolic acid와 Dexamethasone을 자궁경부암 세포주에 처리한 후 세포 증식 억제 효과를 관찰하기 위하여 MTT assay를 시행하였으며, DNA fragmentation, DAPI staining과 FACS 분석을 통해 apoptosis의 특징을 관찰하였으며, apoptosis와 연관된 단백질들로 western blotting을 시행하였다. 또한, 항바이러스 효과를 관찰하기 위하여 HPV E6, E7의 발현 정도를 RT-PCR로 분석하였다.

결과 : Ursolic acid를 HPV가 함유된 자궁경부암 세포주(HeLa, CaSki, SiHa)에 투여하면 농도와 시간에 의존적으로 비례하여 세포증식이 억제되었으나, HPV를 함유하지 않은 자궁경부암 세포주(C33A)에서는 세포 증식억제 효과는 없었다. HeLa 세포주에서 ursolic acid의 농도를 증가시키면 따라 apoptosis의 특징을 보여주는 DNA fragmentation, DAPI staining, FACS 분석 소견이 뚜렷하게 나타났으며, western blotting을 통하여 Fsa 단백질의 발현이 유도되고, caspase-8, caspase-3, PARP 단백질이 절단됨을 관찰할 수 있었다. HeLa 세포에 ursolic acid를 처리함에 따라 HPV-18 E6, E7 유전자 발현이 감소되었으나, p53과 Rb 단백질의 변화는 관찰할 수 없었다.

결론 : 자궁경부암 세포에 ursolic acid를 투여하면 세포증식 억제가 apoptosis에 의하여 일어나며, HPV E6/E7의 발현저하로 인한 항바이러스 효과도 기여할 것으로 사료된다. 이 연구 결과는 ursolic acid에 의한 항증식, 항바이러스 기전을 이해하는데 도움을 주었으며, 효과적인 약제로서의 사용 가능성을 제시하였다.

중심 단어 : Ursolic acid, HPV, 자궁경부암, Apoptosis