

Epstein-Barr Virus 감염 Burkitt's Lymphoma 세포주에 Mitomycin C 처리 시 종양유전자 발현

염범우 · 박설희 · 김민경 · 김철환
김인선 · 이대일

고려대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2000년 11월 10일
게재승인 : 2001년 6월 1일

책임저자 : 염 범 우
우 152-105 서울시 구로구 구로동 80
고대구로병원 해부병리과
전화: 02-818-6870
Fax: 02-818-6239
E-mail: Yeom BW@kucn.korea.ac.kr

*본 연구는 고려대학교 의과대학 의과학연
구원 연구비의 지원으로 이루어졌음.

Expression of Cancer-Related Genes in Epstein Barr Virus-Infected Burkitt's Lymphoma Cell Line Treated with Mitomycin C

Bom Woo Yeom, Seol-Hee Park, Min Kyung Kim, Chul Hwan Kim, In Sun Kim
and Dale Lee

Department of Pathology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Background : Infection of Epstein Barr virus (EBV) into B cells drives the infected cells into the cell cycle and frequently results in lymphoblastoid cells. Mitomycin C inhibits DNA synthesis of epithelial cells as well as lymphoid cells by cross-linking with DNA. Many of the cancer cells have various pathways for escaping the responsiveness to the negative growth-regulatory effects of mitomycin C and gaining the immortalized property. The author performed a cell culture of an EBV infected Jijoye lymphoma cell line, and compared the cell cycle and cancer related genes between the mitomycin treated- and non-treated group. **Methods :** DNA and RNA were extracted from the Jijoye cells; and EBV nuclear antigen (EBNA)-1, 2 and latent membrane protein (LMP) of EBV and p53 and p21 mRNA analyse was performed. **Results :** Mitomycin C blocked G2/M phase, however, mitomycin did not affect the expression of EBNA-1, 2 and LMP. Mitomycin C also increased the p21 mRNA expression without p53 mRNA increase. **Conclusions :** Mitomycin C induces B cell apoptosis by blocking the G2/M phase and by increasing p21 mRNA independent to p53, which reveals the presence of an alternative pathway of p21 induction by mitomycin C in EBV positive lymphoma cells

Key Words : Epstein-Barr virus, Mitomycin C, p53, p21, Lymphoma cell

세포의 증식은 세포분열을 촉진하는 성장촉진인자와 분열을 억제하는 성장억제인자의 균형에 의해서 조절된다. 이러한 균형이 파괴되어 나타나는 대표적 질환이 악성종양이다. 종양유전자에 영향을 미치는 요인에는 바이러스 감염, 방사선 조사 및 각종 화학물질 등이 있다. 이 중에서도 바이러스 감염은 때로 과도한 세포의 증식을 초래하는 바, 이는 세포증식 기전이 촉진되거나 증식억제 기전이 억제 또는 소실되어 나타난 결과로 심한 경우 세포의 악성화를 초래할 수 있다.

Epstein Barr virus (EBV)는 gamma형 헤르페스 바이러스의 일종으로 이중 나선 DNA 바이러스로서 직경 150 nm, 길이 172 Kb이다. EBV는 전세계적으로 분포하고 있으며 전 인류의 90%가 감염되어 있다.¹ 특히 개발도상국에서는 생후 수 년 내에 증상 없이 감염되나 선진공업국에서는 청소년기에 감염되는

특징이 있다. EBV 감염에 의한 종양발생으로서는 대표적인 것으로 비인두암, 림프종, 백혈병 등이 있으나,²⁻⁴ 이들의 발생률은 EBV의 감염률에 비하면 절대적으로 낮은 편으로 이는 EBV의 어느 한 균주만이 종양을 유발시키거나 또는 EBV에 감염된 세포중 유전적 변화를 일으킨 것만이 악성화되기 때문인 것으로 이해된다.⁵ 이처럼 EBV가 다른 종양바이러스에 의해 암 발생비율이 적은 것은 이들이 숙주의 DNA에 삽입하지 않기 때문으로 알려져 있다. 즉 레트로바이러스 등은 바이러스 DNA를 숙주세포의 전구종양유전자에 삽입시키며, 그렇게 됨으로써 삽입성 돌연변이나 삽입된 바이러스의 비조절성 종양유전자에 의해 세포증식이 계속되기 때문에 악성 종양이 발생한다. 그러나 EBV는 숙주세포의 DNA에 삽입하지 않고, 바이러스 항원인 EBNA-1과 latent membrane protein (LMP)이 세포의 계속

적인 성장을 촉진시킴으로써 악성 종양을 발생시키는 것으로 추측된다. 그러나 그 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다.⁶ 최근 EBV의 종양발생기전을 밝히는 데 도움을 줄 수 있는 여러 증거가 발견되고 있다. 이 중 대표적인 것이 면역체계가 약화된 환자의 경우 EBV 감염이 잘되고 또한 악성 종양이 잘 발생한다는 것이다. 대표적인 것으로 후천성 면역결핍 환자, 골수이식 환자 및 성염색체 관련 림프증식성 병변을 갖는 가계에서 악성 림프종의 발생률이 높다는 점이다.⁷ 인체에 들어온 EBV는 림프구를 잘 침범하며 림프구내에서 증식한다고 한다. 이때 림프구도 형질전환을 하여 증식하게 된다. 따라서 면역력이 떨어진 사람에게 EBV가 침범하면 비정상적으로 증식하는 림프구의 세포막에 표현되는 각종 바이러스 관련항원을 면역체계가 인식하지 못함으로써 계속 증식하여 악성림프종이 발생하는 것으로 알려져 있다.⁸

p53 유전자는 세포 주기를 억제시키거나 세포자멸사를 유도하여 세포증식을 억제함으로써 종양발생을 억제한다고 한다. 따라서 EBV 감염에 의한 종양발생기전은 EBV가 p53 유전자 또는 다른 종류의 증식억제인자들의 기능을 억제시키거나 이들의 유전자를 돌연변이시켜 그 기능을 소실시킴으로써 종양발생을 유도하는 것은 아닌지에 대한 많은 연구가 있다. 실제 EBV항원의 일종인 BHRF-1 단백질은 bcl-2와 구조 및 기능이 동일하여 감염된 세포의 세포자멸사를 억제시킴으로써 세포의 악성화에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{9,10} 그러나 BHRF-1은 p53 유전자의 기능만을 억제하여 세포자멸사가 일어나는 것만을 방해함으로써 세포의 수명을 연장시킬 뿐, 세포증식에는 관여하지 않는 것으로 밝혀져 있다.¹¹ EBV와 p53 유전자를 포함한 각종 종양억제유전자와의 관계를 연구한 보고들에 의하면, 배양세포에 EBV를 감염시키면 EBV 항원의 일종인 EBNA-LP가 p53 단백질 및 pRB 단백질과 결합하는 것으로 알려져 있어^{12,13} EBV 항원이 어떠한 형태로든 p53 유전자 등을 포함한 종양억제유전자의 기능에 관여할 것으로 추측된다. p21은 cyclin/cdk를 억제함으로써 세포주기의 진행을 차단하는 단백질로 p53 유전자에 의해 유도된다. 즉 DNA 손상을 입은 세포는 우선 p53에 의해 검색되고, 이어서 p53에 의해 유도된 p21이 활성화되면서 세포내 cyclin/cdk를 억제시켜 세포를 G1주기에 묶어 두게 된다. 따라서 p53의 활성화를 검색하는 지표로서 p21을 흔히 이용하고 있다. Mitomycin (MMC)은 흔히 이용되는 항암제로 암세포의 DNA 합성을 방해하여 세포를 괴사시킴으로써 항암 기능을 발휘한다. 그러나 EBV 감염세포에서 MMC는 숙주세포의 DNA 합성을 억제시키거나 EBV DNA 합성을 억제시키지 않는다고 한다.¹⁴ 특히 MMC는 EBV 음성인 Burkitt 림프종 세포보다는 양성인 세포에 더 강한 세포독성 효과를 나타내는 것으로 알려져 있어 MMC의 약리 기전에 많은 관심이 일고 있다.¹⁵ 따라서 저자는 EBV 양성인 Jijoye 세포주를 배양한 후, 배양 12, 18, 24, 36, 48, 60 및 84시간에 MMC를 처리한 군과 처리하지 않은 군에서 세포증식정도와 세포주기검사를 시행하고, p53 유전자 mRNA

발현과 함께 p21 mRNA 및 단백질 발현변화를 비교하였다.

재료와 방법

세포 배양

Fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, U.S.A.)이 10% 농도로 첨가된 RPMI 배지(Sigma, St. Louis, U.S.A.)에 EBV가 감염되어 있는 Jijoye 세포를 2×10^5 cells/mL의 농도로 CO₂ 배양기에서 3-5일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

MMC 처리

배양한 세포를 5×10^5 cells/mL의 농도로 하여 10% FBS가 첨가된 RPMI 배지에서 MMC 30 μ M을 가하고 1시간 동안 배양하였다. RPMI 배지로 MMC 성분을 세척한 후, 다시 10% FBS가 첨가된 RPMI 배지로 바꾸어 12, 18, 24, 36, 48, 60, 84시간 동안 배양한 후 적정 세포수를 취하여 실험에 이용하였다. 대조군으로는 MMC를 첨가하지 않은 Jijoye 세포주를 처리군과 동일한 방법으로 배양, 처리한 후 실험에 이용하였다.

세포성장조사

위 과정으로 처리한 세포를 일정 시간마다 취하여 trypan blue로 염색 후, 염색되지 않은 살아 있는 세포수를 혈구계로 측정하였다.

세포주기 측정

각 처리 시간마다 세포 10^5 개를 취하여 citrate buffer (0.02 mM NP-40함유)를 5 mL 가하여 세척 후, 2 mL의 0.25% trypsin이 첨가된 citrate buffer를 가하고 37°C에서 3시간 동안 흔들면서 반응시켰다. 다시 citrate buffer를 가하고 2시간 계속 흔들어 주면서 반응시킨 다음, 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 완전히 제거한 후 0.5 mL citrate buffer를 가하고 vortex mixing 하였다. Propidium iodide (Beckton Dickinson, U.S.A.) 염색을 실시한 후, citrate buffer로 세척한 다음 FACScan (Beckton Dickinson, U.S.A.)으로 측정하였다.

역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 p53 및 p21 유전자의 mRNA 발현 조사

RNA분리

각 세포 10^6 을 취하여 Tri Reagent (MRC, U.S.A.)을 사용하여, 그 방법에서 기술한 대로 RNA를 분리하였다. 즉, 각 세

포 10^6 을 취하여 Tri Reagent 1 mL을 가해 강하게 vortex 혼합하여 실온에서 5분간 용해시켜 RNA를 노출시킨 후, 0.2 mL chloroform을 가한 후 실온에서 10분간 방치하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 RNA를 포함한 상층액만 취한 후 같은 양의 isopropanol을 가하여 실온에서 5분간 방치시킨 후, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전된 RNA pellet을 70% ethanol로 세척하였다. 상온에서 방치시켜 살짝 말린 후, DEPC를 처리한 3차 증류수 20 μ L에 녹여서 사용할 때까지 -70°C 에서 보관하였다.

cDNA 합성

분리한 RNA에 대한 cDNA 합성은 Behringer Mannheim사의 cDNA 합성 kit를 사용해서 그 방법에 의거하여 시행하였다. 요약하면, 1.6 μ g Oligo d(T), 1 mM dNTP, 5 mM MgCl_2 , 50 units RNase inhibitor, $10\times$ buffer, 20 units reverse transcriptase를 가하고 45°C 에서 45분간 반응시킨 다음, 95°C 에서 5분간 반응시켜 cDNA 합성을 중지시킨 후, 얼음 상에서 냉각시켜 -20°C 에서 냉동 보관하였다.

중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction: PCR)

증폭시킬 각 cDNA 2 μ L (약 400 ng), 0.2 mM dNTP, $10\times$ buffer, 10 pmols/ μ L primer, 2.5 U Taq polymerase를 가하여 25 μ L 되게 한 후, PCR thermal cycler (Perkin Elmer 2400)을 사용하여 94°C 에서 30초-1분, 57°C 에서 66°C 까지 25-30초, 72°C 에서 30초-1분간의 반응을 35회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물을 1.5% agarose gel 전기영동으로 확인하였다. PCR 양성 대조로 β -actin을 사용하였고, β -actin 발현에 대한 상대적인 발현 정도를 비교하였다. p53과 p21에 대한 유전자 서열과 예상 PCR 띠의 크기는 다음과 같다.

p53

exon 5 forward : 5' GGTTCCTGCTGGGCTTCTT 3'
reverse : 5' CATCGCTATCTGAGCAGCGCTC 3' 238 bp

exon 6-7 forward : 5' GTCTGGCCCTCCTCAGCAT 3'
reverse : 5' AAACACGCACCTCAAAGC 3' 264 bp

exon 8-9 forward : 5' TAATCTACTGGGACGGAACA 3'
reverse : 5' CGCATCTGAAGGGTGAAATA 3' 213 bp

p21

forward : 5' ATGTGGACCTGTCCTGTCTTG 3'
reverse : 5' AAGATGTAGAGCGGGCTTT 3' 230 bp

β -actin forward : 5' TGACGGGGTACCCACACTGTGCC 3'
reverse : 5' CTAGAACCATTGGGGTGGACGATG 3' 661 bp

Western blotting에 의한 p21 단백질 발현 조사

배양한 세포를 5×10^5 cells/mL의 농도로 하여 10% FBS (fetal bovine serum)가 첨가된 RPMI 배지에서 MMC 30 μ M

을 가하고 1시간 동안 배양하였다. RPMI 배지로 MMC 성분을 세척한 후, 다시 10% FBS가 첨가된 배지로 바꾸어 12, 24, 36, 48, 60시간 동안 배양한 다음 수확하여 lysis buffer [10 mL Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 5 mM EDTA, 5 mM Na-azide, 10 mM NaF, 1 mM Na-orthovanadate, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL pepstatin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]를 가하고 4°C 에서 2시간 처리하였다. 용해된 세포를 4°C , 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하고, 함유된 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준으로 하여 Bradford 방법으로 정량하였다. 각 시간마다 처리한 샘플에서 50 μ g의 단백질을 취하여 동량의 2X sample buffer (20% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 4% SDS, 125 mM Tris, pH 6.8, 0.1 mg bromophenolblue)를 가하고 100°C 에서 5분간 끓인 후 12% SDS-polyacrylamide gel로 120 V에서 1시간 전기영동하였다. 전기영동한 gel에 존재하는 단백질을 electroblotting 방법으로 nitrocellulose 막에 옮긴 다음 5% 탈지분유가 첨가된 TBST-Tween 0.1% (TBST) 용액에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 반응을 차단하였다. p21에 대한 항체는 mouse anti-p21 WAF1/Cip1 Ab-3 (Neo Markers, U.S.A.)를 사용하였으며 TBST 용액에 1:200으로 희석하여 막을 담그고 천천히 흔들면서 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 TBST 용액으로 3회 반복 세척하였다. 다시 horseradish peroxidase가 결합되어 있는 2차 항체를 1:1,500으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시키고 동일한 방법으로 세척하였다. ECL detection kit 용액(Amersham Life Science, U.S.A.)으로 막을 1분간 반응시킨 다음, 용액을 제거하고 Saran wrap으로 싸서 필름에 감광시켰다.

EBV의 EBNA-1, EBNA-2 및 LMP-1 유전자 조사

세포에서 DNA 분리

세포 5×10^6 에서 G'nome DNA Isolation kit (Bio 101, U.S.A.)를 사용하여 기술한 대로 DNA를 분리하였다. 요약하면 다음과 같다. 세포 5×10^6 당 lysis buffer 0.9 mL, RNase 25 μ L, cell denaturing buffer 50 μ L를 가하여 15분간 55°C 에서 반응시킨 다음, protease mix 25 μ L를 가하여 55°C 에서 밤새 반응시켰다. Salt-out mixture 250 μ L를 가해 salting out 시킨 후 상등액에 100% ethanol 6 mL을 가하여 1,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 DNA pellet을 살짝 말린 다음, TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) 50 μ L에 녹인 후 spectrophotometer로 DNA 농도를 측정하고 -20°C 에 보관하였다.

PCR 반응

증폭시킬 각 DNA 2 μ L에 0.2 mM dNTP, $10\times$ buffer, 10 pmols/ μ L primer, 2.5 U Taq polymerase를 가하여 25 μ L 되게 한 후, PCR thermal cycler (Perkin Elmer 2400,

U.S.A.)을 사용하여 EBNA-1은 94°C에서 40초, 55°C에서 40초, 72°C에서 40초간의 반응을 40회 반복 하고, EBNA-2는 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간의 반응을 30회 반복 하였다. 그리고 LMP-1은 94°C에서 40초, 59°C에서 40초, 72°C에서 40초간의 반응을 35회 반복하였다. 증폭된 PCR산물을 1.5% agarose gel 전기영동으로 확인하였다. EBNA-1, EBNA-2 및 LMP-1의 primer에 대한 유전자 서열 및 예상 때의 크기는 다음과 같다. 음성대조로는 DNA를 첨가하지 않고 반응시켜 사용하였다.

EBNA-1 : forward : 5' TGATAACCATGGACGAGGAC 3'
 reverse : 5' GCAGCCAATGCAACTTGGAC 3' : 138bp

EBNA-2 : forward : 5' AGGGATGCCTGGACGCAAGA 3'
 reverse : 5' TTGAAGGTATGTCCTAAGG 3' : 300 bp

LMP-1 : forward : 5' TTAGCTTAACGATTGCATAG 3'
 reverse : 5' CGTTAGTTCTCCATGACTGT 3' : 268 bp

결 과

세포증식

MMC를 30 μM 농도로 처리한 10% RPMI 배지에서 EBV가 감염된 *Jijoye* 세포주를 5×10⁵/mL 밀도로 배양했을 때 배양 12시간부터 성장이 억제되었고 처리시간이 길어질수록 처리하지 않은 대조군에 비해 성장속도가 감소되었다(Fig. 1).

세포주기

FACScan으로 세포주기를 분석해 본 결과 MMC를 처리한 경우는 처리하지 않은 경우에 비하여 배양시간이 길어질수록 S기가

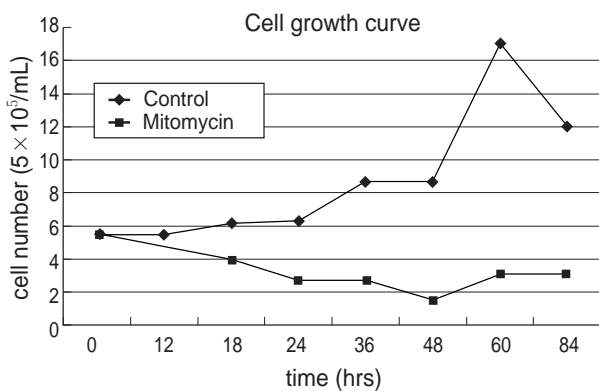


Fig. 1. The cell numbers are decreased in the mitomycin C-treated group compared to the control.

증가하는 반면 G2/M기는 차단되는 양상을 보였다(Fig. 2).

세포자멸사

Jijoye 세포주를 5×10⁵/mL 밀도로 12, 18, 24, 36, 48, 60, 84시간별로 5% CO₂ 배양기(37°C)에서 배양하였다. 동일 세포수를 취하여 총 genome DNA를 분리한 후 1.2% agarose gel 상에서 전기영동하여 DNA 분절이 일어나는지를 조사한 결과, mitomycin C를 처리한 후 12시간 이상 배양한 세포에서 부분적으로 세포자멸사가 일어났고 배양시간이 길어질수록 세포자멸사가 증가하였다(Fig. 3).

p53 mRNA 발현

MMC를 처리한 후 각 시간별로 *Jijoye* 세포주에서 RNA를 분리하여 RT-PCR 방법으로 p53 유전자 exon 5-9 부위의 mRNA 발현 정도를 β-actin의 발현 정도와 비교 분석한 결과, p53 exon 4-5 및 8-9의 발현 정도는 mitomycin C 처리군과 비처리군에서 큰 차이가 없었다(Fig. 4).

p21 mRNA 발현

p21 (WAF1/CIP1)의 발현 정도는 MMC를 처리군에서 비처리군에 비해 높은 농도로 p21 mRNA 발현이 유도되었으며 MMC 처리시간과는 무관하게 일정한 수준을 유지하였다(Fig. 5).

p21 단백질발현

p21 mRNA 발현보다는 p21 단백 발현이 늦게 유도되어 MMC 처리 36시간 이후에 MMC를 처리한 군이 처리하지 않은

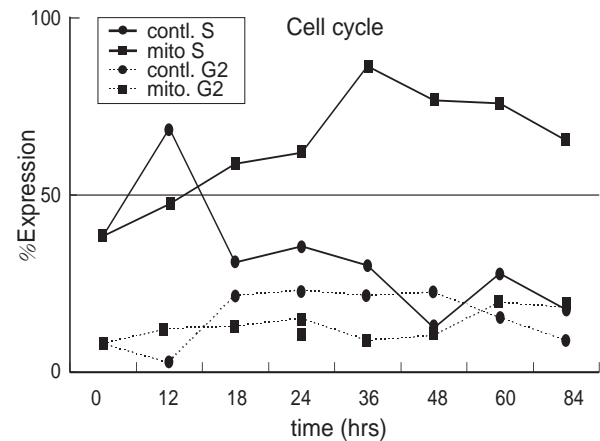


Fig. 2. Increased proportion of S phase and decreased G2/M phase in the Mitomycin C-treated group compared to the control group are noted.

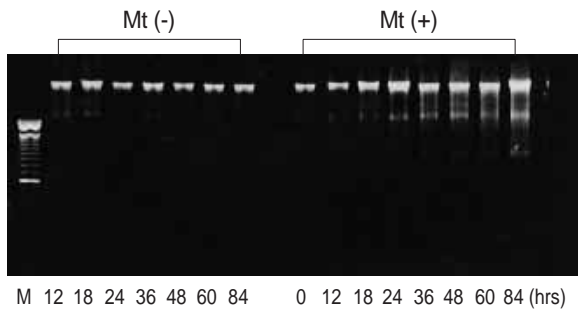


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from *Jijoye* cells in the mitomycin C-treated group shows ladder pattern of DNA fragment, especially after 12 hours. (M; 100 bp DNA ladder).

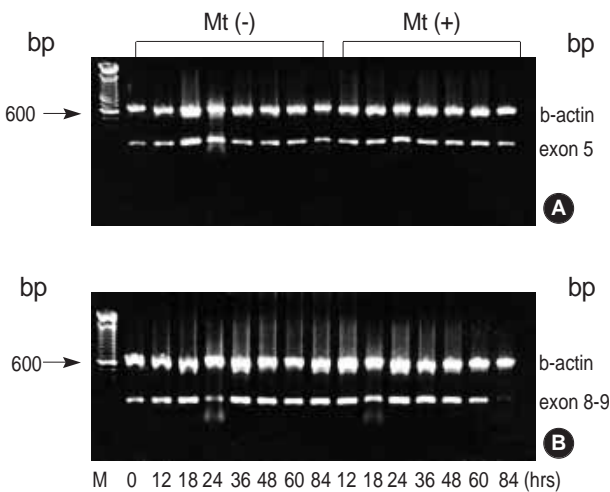


Fig. 4. Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of *p53* exon 5 (A), exon 8-9 (B) mRNA shows no differences between the control and mitomycin C-treated groups. (M; 100 bp DNA ladder).

군에 비해 높은 농도로 p21 단백질 발현이 유도되었다(Fig. 6).

EBNA-1, 2 및 LMP의 발현

MMC를 처리한 후, 동일한 수의 *Jijoye* 세포에서 DNA를 분리하여 EBV의 유전자인 *EBNA-1*, *EBNA-2* 및 *LMP-1*에 대한 primer를 사용하여 PCR을 한 결과 MMC를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우 모두에서 *EBNA-1*, -2 및 *LMP*의 발현 정도는 유사하였다.

고찰

EBV는 인체 T세포 백혈병 바이러스(human T cell leukemia virus), 인체 유두종 바이러스, B형 간염 바이러스 및 C형 간염 바이러스 등과 같이 인체에 종양을 유발하는 종양바

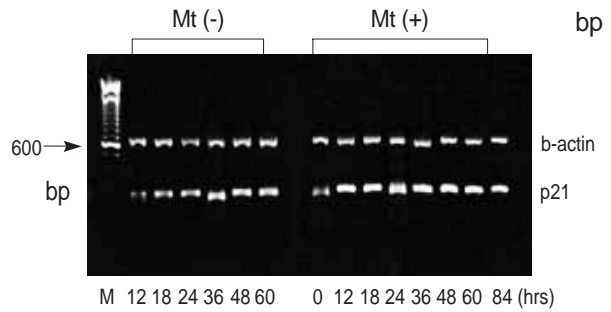


Fig. 5. Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of *p21* mRNA shows increased *p21* mRNA expression in the mitomycin C-treated group compared to the control. (M; 100 bp DNA ladder).

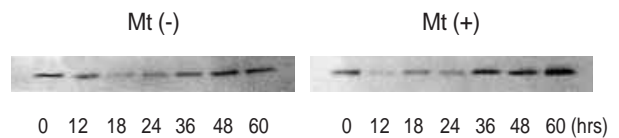


Fig. 6. Western blotting of p21 protein shows increased p21 protein expression in the mitomycin C-treated group compared to the control.

이러스의 일종으로 전 인류의 약 90%가 감염되어 있다고 한다. EBV는 인체의 구강 점막을 통하여 감염되며 침입한 바이러스는 구강점막의 상피세포나 점막하 림프조직에서 증식한다.¹⁶ EBV는 림프절을 포함한 각종 장기를 침범하여 다양한 악성 종양을 유발하나 이 중에서도 특히 Burkitt 림프종을 포함한 악성 림프종 이외에 위장과 타액선의 림프상피암종(lymphoepithelial carcinoma)의 발생에도 관여하는 것으로 알려졌다.¹⁷⁻¹⁹

EBV 감염에 의해 발생한 악성 림프종은 EBV 음성 림프종과 비교할 때 예후에서 차이가 있다고 한다. Okano는 EBV에 의해 악성화된 Burkitt 림프종 세포인 B7 세포주와 EBV 음성인 Ramos 세포주를 비교 실험한 결과, B7 세포계가 Ramos 세포계보다 배양액 내에서 더 빨리 증식하나 MMC를 포함한 핵과괴성 항암제 처리 시 쉽게 파괴되어 EBV 양성인 종양 세포가 음성인 세포보다 항암제 치료에 더욱 효과가 있음을 보고하였다.¹⁵ 이러한 결과는 EBV 존재 여부가 악성 림프종 치료에 영향을 줄을 의미하나 그 기전은 알려져 있지 않다. 또한 세포 표면에 표현되는 바이러스 항원이 세포의 증식과 소멸에 관여한다고 한다. 실제로 EBV 양성인 악성 림프종 세포와 림프모세포 간에는 세포 표면에 나타나는 각종 바이러스 항원에 차이가 있으며, 이들 항원이 면역세포에 의해 이중 단백질로 인정되면 면역세포에 의해 바이러스에 감염된 악성 림프종 세포는 증식에 제한을 받거나 파괴된다.²⁰

현재까지 밝혀진 수많은 종양유전자와 종양억제유전자 중에서도 *p53* 유전자는 인체종양발생에 가장 많이 관련되어 있는 유전자로 알려져 있다. 본래 *p53* 유전자는 세포증식 억제인자로 기능하나 *p53* 유전자의 돌연변이는 오히려 세포의 증식을 초래

한다고 한다. 본 실험에서는 강력한 항암제인 MMC를 투여한 군과 투여하지 않은 군에서 세포증식을 나타내는 각종 지표를 조사한 바, MMC 투여군이 비투여군에 비해 배양 12시간부터 세포수가 감소하기 시작하였고 세포자멸사는 증가하였다. 또한 세포주기는 MMC 처리군에서 S기가 증가하는 반면 G2/M기가 억제되었다. 또한 p53 유전자의 돌연변이나 p53 mRNA를 각각 PCR-SSCP와 RT-PCR법으로 조사한 바, MMC 처리군과 비처리군 모두에서 p53 유전자의 돌연변이를 발견할 수 없었으며 p53 mRNA도 MMC 처리군과 비처리군에서 차이를 발견할 수 없었다. 또한 MMC는 숙주세포의 DNA 합성은 억제시키나 EBV의 증식은 억제하지 않는 것으로 나타났다. 이것은 EBV가 유전자부체(episome)로 존재하면서 MMC의 DNA 합성억제기능을 회피할 수 있는 다른 기전을 가지고 있는 것으로 사료되나 그 기전은 밝혀지지 않고 있다. 이러한 성적은 Moar 등²¹이 EBV 감염세포주인 P3H3-1에서 MMC를 처리한 실험 결과와 유사하였다. MMC를 처리한 군과 비처리군에서 p53 mRNA의 차이가 없음에도 불구하고 두 군간에 세포자멸사의 차이가 있는 것은 MMC에 의해 유도된 세포자멸사가 p53 유전자의 역할에 의한 것이 아님을 알 수 있다. 본래 p53 유전자는 세포증식을 조절하는 역할을 하는 유전자로, 만약 세포자멸사나 세포증식억제가 p53 매개에 의하지 않았다면 다른 어떤 기전이 관여하는지를 밝힐 필요성이 있다. p53 유전자의 세포증식억제 기능은 활성화된 p53이 p21 유전자를 활성화시키고, 이어서 활성화된 p21이 단백질을 생성하여 세포증식을 억제한다고 한다. 따라서 p21 유전자의 활성화 여부를 규명하기 위하여 p21 mRNA를 RT-PCR법으로 조사한 바, MMC를 처리한 군에서는 배양 12시간부터 p21 mRNA가 강한 농도로 발현되었음에 반하여 MMC 비처리군에서는 변화가 없었음을 확인하였다. Sugiyama 등²²의 연구에 의하면 p53 결손 세포주에서 MMC 처리 시 p21 발현과 S기의 증가를 관찰하였다고 보고하고 있다. 따라서 이러한 실험결과는 p21의 발현이 p53 유전자에 의하지 않고 다른 기전에 의하여 활성화되었음을 의미하나 정확히 그 기전이 무엇인가는 본 실험만으로는 확인할 수 없었다.

이상의 실험결과 저자는 MMC가 EBV 양성인 Jijoye 세포의 증식을 억제하는 약리 기전은 크게 나누어 MMC가 Jijoye 세포의 세포주기 중 S기의 증가와 G2/M기를 억제하고, p53과는 무관하게 p21 mRNA의 활성화와 세포자멸사를 증가시킴으로써 세포증식을 억제함을 확인하였다. 그러나 앞으로 세포주기 관련 cyclin 및 cdk에 대해 조사하고 EBV 관련 단백질의 mRNA 발현 양상 변화를 조사하여야만 MMC에 의한 종양 세포 증식억제 기전을 정확히 규명할 수 있을 것으로 생각한다.

참고문헌

- Epstein MA, Barr YM. Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; 1: 252-5.
- Andersson-Anvret M, Forsby N, Klein G, Henle W. Relationship between the Epstein Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: correlated nucleic acid hybridization and histopathological examination. *Int J Cancer* 1977; 20: 486-94.
- Leyvraz S, Henle W, Chahinian AP, et al. Association of Epstein-Barr virus with thymic carcinoma. *N Eng J Med* 1985; 312: 1296-9.
- Hausen HZ, Schulte-Holthausen H, Klein G, et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt's tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 1970; 228: 1056-8.
- Kieff E, Dambaugh T, Heller M, et al. The biology and chemistry of Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* 1982; 146: 506-17.
- Kieff E, Wang F, Birkenbench M, et al. *Origins of Human Cancer: Molecular biology of lymphocyte transformation by Epstein-Barr virus*. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1991; 563-70.
- Purtilo DT, Sakamoto K, Barnabei V, et al. Epstein-Barr virus induced diseases in boys with the X-linked lymphoproliferative syndrom (XLP): update on studies of the registry. *Am J Med* 1982; 73: 49-56.
- Khanna R, Burrows SR, Moss DJ. Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Microbiol Rev* 1995; 59: 387-405.
- Khanim F, Dawson C, Meseda CA, Dawson J, Mackett M, Young LS. BHRF-1, a viral homologue of the Bcl-2 oncogene, is conserved at both the sequence and functional level in different Epstein-Barr virus isolates. *J General Virol* 1997; 78: 2987-99.
- Henderson S, Rowe M, Gregory C, et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991; 65: 1107-15.
- Jiwa NM, Oudejans JJ, Bai MC, et al. Expression of bcl-2 protein and transcription of the Epstein-Barr virus bcl-2 homologue BHRF-1 in Hodgkin's disease: implications for different pathogenic mechanisms. *Histopathology* 1995; 26: 547-53.
- Inman GJ, Farrel PJ. Epstein-Barr virus EBNA-LP and transcription regulation properties of pRB, p107, and p53 in transfection assays. *J General Virol* 1995; 76: 2141-9.
- Silins SL, Sculley TB. Burkitt's lymphoma cells are resistant to programmed cell death in the presence of the Epstein-Barr virus latent antigen EBNA-4. *Int J Cancer* 1995; 60: 65-72.
- Klein E, Ernberg I, Masucci MG, et al. T-cell response to B cells and Epstein Barr virus antigens in infectious mononucleosis. *Cancer Res* 1981; 41: 4210-5.
- Okano M. High susceptibility of an Epstein-Barr virus-converted Burkitt's lymphoma cell line to cytotoxic drugs. *Leuk Res* 1997; 21: 469-71.
- Miyashita EM, Yang B, Babcock GJ, Thorley-Lawson DA. Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a rest-

- ing B cell. *J Virol* 1997; 71: 4882-91.
17. Anagnostopoulos I, Herbst H, Niedobitek G, Stein H. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* 1989; 74: 810-6.
 18. Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1992; 140: 769-74.
 19. Kim KI, Kim YS, Kim HK, *et al.* The detection of Epstein-Barr virus in the lesions of salivary glands. *Pathol Res Pract* 1999; 195: 407-12.
 20. Masucci MG, Stam NG, Torsteinsdottir S, *et al.* Allele-specific down-regulation of MHC class I antigens in Burkitt's lymphoma lines. *Cell Immunol* 1989; 120: 396-400.
 21. Moar MH, Klein G. Effect of mitomycin C and hydroxyurea on the expression of the Epstein-Barr virus cycle following P3HR-1 superinfection. *Intervirology* 1980; 13: 178-85.
 22. Sugiyama K, Shimizu M, Akiyama T, *et al.* UCN-01 selectively enhances mitomycin C cytotoxicity in p53 defective cells which is mediated through S and/or G (2) checkpoint abrogation. *Int J Cancer* 2000; 85: 703-9.