

## 귀전우, 백화사설초, 와송 추출물을 처치한 난소암과 자궁경부암 세포에서의 단백질 발현 변화

김경순<sup>1</sup>, 예성철<sup>2</sup>, 유병철<sup>2</sup>, 조종관<sup>1</sup>, 이연월<sup>1</sup>, 유화승<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>대전대학교 둔산한방병원 동서암센터, <sup>2</sup>국립암센터 연구소

---

### Altered Protein Expression in Ovarian and Cervical Cancer Cells by the Treatment of Extracts from *Euonymus alatus Sieb*, *Oldenlandia diffusa (Willd.) Roxburgh*, and *Orostachys japonicus A. Berger*

Kyung-soon Kim<sup>1</sup>, Sung-chul Yea<sup>2</sup>, Byong-chul Yoo<sup>2</sup>, Chong-kwan Cho<sup>1</sup>, Yeon-weol Lee<sup>1</sup>, Hwa-seung Yoo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>East-West Cancer Center, Dunsan Oriental Medical Hospital, Dae-Jeon University

<sup>2</sup>Research Institute, National Cancer Center

#### ABSTRACT

**Background** : Despite recent advances in cancer management, prognosis of ovarian cancer is poor. Anticancer effects of herbal medicine, such as *Euonymus alatus Sieb*, *Oldenlandia diffusa (Willd.) Roxburgh*, and *Orostachys japonicus A. Berger*, have been reported in treatment of ovarian and cervical cancers, but the systematic approaches to explain their molecular mechanism(s) have not yet been established.

**Objectives** : To establish a basis of understanding for anti-cancer mechanisms of herbal medicine, we profiled protein expression in human ovarian and cervical cancer cells treated with the extracts from *Euonymus alatus Sieb*, *Oldenlandia diffusa (Willd.) Roxburgh* and *Orostachys japonicus A. Berger*.

**Methods** : Human ovarian cancer cell line NIH:OVCAR-3, and human cervical cancer cell line HeLa were employed in the present study. Whole protein was obtained from the cells harvested at 48 hours after the treatment with herbal water-extract, and analyzed by 2DE-based proteomic approach.

**Results** : Various changes of protein expression induced by the herbal treatment were monitored : down-regulation of molecular chaperone (calreticulin variant), glycolytic enzymes (D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and alpha-enolase), RNA processing molecules (hnRNP A2/B1), and antioxidant protein (peroxiredoxin 1).

**Conclusions** : Repression of glycolysis has been accepted as the mechanism to increase anticancer reagent's effect. Thus, down-regulation of glycolytic enzymes by the herbal extracts suggested a possible synergistic effect of herbs in the presence of platinum-based therapeutics. In further study, as well as the synergistic effect of the herbs, it has to be further validated whether artificial regulation of hnRNP A2/B1 in ovarian cancer cells affects various cancer survival factors, since RNA processing can be interrupted by deranged expression of hnRNP subtypes, and it results in an inhibition of cancer cell growth.

**Key words** : *Euonymus alatus Sieb*, *Oldenlandia diffusa (Willd.) Roxburgh*, *Orostachys japonicus A. Berger*, HeLa, NIH:OVCAR-3

---

· 교신저자: Hwa-seung Yoo 1136 Dunsan-dong, Seo-Gu, Daejeon,  
Rep. of Korea  
East-west Cancer Center, Dunsan Oriental Hospital  
of Dae-Jeon University  
TEL: 82-42-470-9132 FAX: 82-42-470-9006  
E-mail: altyhs@dju.kr

## 1. 서론

한약에 의한 다양한 암세포에 대한 면역증강과 항암효과는 널리 연구되어 왔으나 한약의 구체적인 작용에 대한 분자생물학적 메커니즘은 명확히 설명되지 않고 있다.

한약은 광범위한 항균효과와 항생효과를 가지고 있다. 또한 항암제로서도 임상에서 응용되고 있다. 신생 혈관 형성의 억제로 설명되는 항암효과는 최근에 밝혀지고 있지만, 그럼에도 불구하고 귀전우, 백화사설초, 외송의 항암효과를 설명하기 위한 메커니즘에 대한 연구는 부족하다. 비록 현재의 연구는 이들이 암의 성장과 신생혈관생성을 억제함을 보여주고 있지만, 이것의 항암제로서의 가치와 세포 메커니즘은 여전히 제한적이다<sup>1-3</sup>.

생명체가 가지고 있는 전체 유전자의 염기서열과 이들 유전자들이 코딩하고 있는 단백질들의 1차 구조인 아미노산 배열을 해독하고 여러 생체 시스템이나 질환 등에서 보여주는 유전자상의 변화와 이상을 전체 유전체 단위에서 연구하는 것을 유전체학이라고 할 때, 세포 혹은 조직에서 전반적으로 유전자들로부터 발현되는 각 단백질들이 어떻게 발현되며 어떤 변화를 보여주는지를 연구하는 분야를 가장 기본적인 의미에서의 단백질체학(프로테오믹스)라고 말할 수 있다. 이 프로테오믹스는 기존에 수행되어 오던 단백질 연구의 한 방향을 좀 더 확대 발전시킨 개념으로 생각하는 것이 타당하다. 현재는 일반적으로 이차원 전기영동(2-DE)을 이용하여 전체 세포 혹은 조직에 존재하는 여러 단백질을 겔상에 분리하고 여기서 얻어진 결과를 가지고 데이터베이스를 구축하는 연구들을 포괄적인 의미에서 프로테오믹스라고 한다<sup>4</sup>.

환자의 체액 시료를 분석하는 경우에는 체액 내 과량으로 존재하는 알부민이나 transferrin 등의 단백질로 인해 2-dimensional gel 전기영동 분석이 용이하지 않으며, 또한 현재의 기술로는 최신의 질량 분석기를 사용하고서도 여러 단백질의 각종 전사

후 모식(posttranslational modification, PTM)을 정확히 분석하기 어려운 실정이다. 이런 기술적인 어려움 때문에 현재까지 개발된 2-dimensional gel 전기영동 분석을 이용한 프로테오믹스 기술은 실제 환자의 검체에서 여러 단백질의 변화를 동정하는데는 적당하지 않으며, 아직 연구 차원에서 특정 질병에서 변화하는 새로운 단백을 발굴하거나 기존에 알려진 단백질의 알려지지 않은 새로운 PTM을 규명하는 데 주로 사용되고 있다. 따라서 실제 임상에서 얻을 수 있는 소량의 시료를 가지고 많은 종류의 단백질의 정량 및 변형의 유무를 측정하려면 단백질 변형의 종류와 정도를 짧은 시간에 한번의 검사로 분석할 수 있는 단백질 칩(protein chip)을 이용하여야 한다. 단백질 칩은 2D gel 전기영동 분석과 함께 프로테오믹스 기술의 가장 중요한 분야로 활용되고 있는데, 항원, 항체 또는 전사 인자(transcription factors)를 칩 표면에 고정시켜서 대단위로 스크리닝을 하거나 표적 분자(biomarker) 인식을 하는데 사용한다<sup>5</sup>.

Proteomics의 통합 접근 방식은 전통 한약의 전체적 개념과 관행에 있어 맥락을 같이하고 있다. Proteomics 기술을 통해서 전통 동양의학의 표적 분자 작용을 확인하고 새로운 활성 구성요소를 분리하거나 특정화 할 수 있을 뿐만 아니라 한약의 독성 물질을 분석하는데 사용될 수가 있다. 세포와 분자측면에서 전통 동양의학의 복잡한 기전을 이해하는데 있어서 Proteomics의 도움은 전통 한의학을 현대화 및 국제화하는데 큰 의미가 있다<sup>6</sup>. 여러 단백질이 한약의 반응과 독성에 일정한 역할을 하고 있기 때문에 찾고자 하는 단백질을 찾는 것을 더 어렵게 만들었지만 최신의 Proteomics 기술을 통해 적절한 단백질을 찾을 수 있게 되었다. 이 기술은 개개인에서 약물에 관여하는 변이주 단백질을 찾을 수 있도록 해주는 Pharmacoproteomics이라는 새로운 분야를 열었다. Pharmacoproteomics은 환자 개개인의 다른 점을 보여줄 수 있는 기능적 설명으로 해석할 수 있다. 여러 형질을 갖는 병을

Proteomics를 기반으로 분석하는 것은 타겟을 치료하기 위한 요법을 환자 소그룹의 특정 마커에 적용할 수 있도록 해준다. 뿐만 아니라 Pharmacoproteomics 분석은 병에 걸릴 수 있는 단백질을 알아내므로 향후 새 약물의 target으로 삼을 수 있다. 이 모든 것이 개개인에 적용 가능한 한약물 발견 및 병 예방에 새로운 방법론을 제기할 수 있게 해주었다<sup>7</sup>.

본 연구에서는 한약의 항암효과를 분자생물학적 메커니즘을 통해 이해하기 위하여, 임상에서 난소암 및 자궁경부암에 많이 활용되며 항암 효과가 있을 것으로 추정되는 한약재 세가지(귀전우, 백화사설초, 외송)의 추출물을 인간 난소암세포 NIH: OVCAR-3와 자궁경부암세포 HeLa에 처리하여 진행하였으며 각 한약재의 난소암 및 자궁경부암 세포주에 대한 항암 메커니즘을 파악하기 위하여 각각의 농도를 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1,000 µg/ml로 처리한 이후의 세포 활성도를 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

귀전우(*Euonymus alatus Sieb.*), 백화사설초(*Oldenlandia diffusa (Willd.) Roxburgh.*), 외송(*Orostachys japonicus A. Berger*)을 대전대학교 산한방병원에서 구입하여 동결 건조시켰다. 동결 건조시킨 각 한약재를 10 mg/ml의 농도로 PBS에 용해시킨 후 3,000 RPM으로 3분간 원심 분리시켜 상층액 1 ml를 추출하여 냉장 보관시켰다. 인간 난소암 세포 NIH:OVCAR-3와 인간 자궁경부암 세포 HeLa은 Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)에서 제공된 것으로 37°C, 5%, CO<sub>2</sub>의 환경에서 r10 배지를 이용하여 75 cm<sup>2</sup> 플라스크에 담아 배양시켰다. Berberine sulfate는 씨그마 알드리치코리아에서 구매하였다.

### 2. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay

96well plate의 각각의 well에 1×10<sup>4</sup> 개의 NIH: OVCAR-3, HeLa 세포를 배양액과 함께 총 180 µl가 되도록 하여 분주한 후 세포들의 부착을 위해서 24시간 동안 배양기에서 배양하였다. 그 후 각각의 한약재 추출물(1,000 µg/ml)을 각 well에 20 µl씩 처리하였다. shaking table을 이용하여 150 RPM, 5분간 섞은 후 45시간, 93시간 동안 배양기(37°C)에 넣어 배양하였다. 이후 MTT solution을 5 mg/ml의 농도로 PBS에 희석시켜 각 well당 20 µl씩 처리한 후 shaker를 이용하여 150 RPM, 5분간 섞어주었다. 3시간 동안 배양기(37°C)에 넣어 둔 후 450×g (중력가속도=9.8 m/s<sup>2</sup>)으로 5분간 원심 분리시켰다. 배양액을 Suction하고 200 µl의 DMSO를 이용하여 환원된 formazan을 녹인 후 빛 흡수를 차단시킨 채로 shaker를 이용하여 150 RPM에 10분간 잘 섞어준 후 Multiwell spectrometer (Bio-Tek instruments Inc., Burlington, VT)를 이용하여 540 nm로 흡광도를 측정하였다.

총 두 번의 MTT assay가 시행되었다. 첫 번째 실험은 세 종의 한약재의 유효한 세포 활성 효과를 알아보기 위하여 각 한약재 추출액을 NIH: OVCAR-3 세포와 HeLa 세포 처리한 후 그 결과를 확인하였다. 두 번째 MTT assay는 각 세종의 한약재 추출액을 처리하여 농도별(10, 100, 1,000 µg/ml) 세포 활성도를 확인하였다.

### 3. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

일차 Isoelectric focusing(IEF)를 위하여 0.15의 단백질 샘플을 13 cm immobilized(pH 3-10) nonlinear gradient strips(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에 적용시켜 상온에서 IEF를 시행하였다. IEF 조건은 50 V에서 8,000 V까지 도달하는데 8시간이 걸리게 하였으며, 이후 8,000 V에서 1시간 동안 수행하였다. 2-DE는 12% polyacrylamide gels (chemicals from Serva, Heidelberg, Germany and Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하였으며, Colloidal Coomassie Blue(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용

하여 24시간 동안 염색한 후 deionized water를 이용하여 염색을 제거하였다.

염색된 이차원 젤은 스캔하여 컴퓨터에 저장하였으며, 2-DE gel 이미지는 Melanie 4 software(Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland)를 사용하여 분석하였고, 이상 발현된 단백질들은 matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectroscopy (MALDI-MS)를 통하여 분석되었다.

MALDI-MS 분석을 위하여 젤 spot을 추출하여 50% acetonitrile 0.1 mol/l Ammonium Bicarbonate를 이용하여 세척 후 speedvac evaporator에 넣어서 건조시켰다. 건조된 젤 조각은 50 ng trypsin(Promega, Madison, WI)을 함유한 25 mmol/l Sodium Bicarbonate(pH 8.8)를 이용하여 reswelling하고 하루 뒤, 0.5 microliter를 acetone/ethanol(1:2, v/v)에 녹여져 있는 동일 볼륨의 alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid(Sigma)와 섞어 MALDI-target 에 적하하였다.

MALDI-MS 분석은 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 행해졌으며, 단백질 검색은 SWISS-PROT database에서 검색하였다.

### III. 결 과

#### 1. 2-DE에 의한 이미지 분석

귀전우, 백화사설초, 외송 추출물 각각의 세포 활성 효과가 어떠한 molecules에 작용하고 있는지

확인하기 위하여 2-DE를 진행하여 이미지를 분석하였다. Fig. 1A, Fig. 3A는 아무런 처리를 하지 않은 대조군, 각각 귀전우, 백화사설초, 외송 추출물을 처치한 실험군을 비교한 이미지이다. 대조군과 시험군의 2-DE를 통하여 얻은 이미지를 분석하여 변화가 있는 spot들이 발견되었다. 이 spot들을 추출하여 MALDI-MS를 시행하였다. 그 결과 Fig. 1B, Fig. 3B와 같은 단백질들로 판명되었다. 다양한 단백질의 변화가 발견되었는데, HeLa 세포주에서는 calreticulin variant, D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 단백질들의 발현이, NIH:OVCAR-3 세포주에서는 Alpha-enolase, hnRNP A2/hnRNP B1, peroxiredoxin 1 단백질들의 발현 변화가 있었음을 확인할 수 있었다. 또한 HeLa 세포에 세 약물을 처치한 결과 p38의 활성도를 증가시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

#### 2. 귀전우, 백화사설초, 외송의 농도별 HeLa 및 NIH:OVCAR-3 인간암세포주에 독성 효과

귀전우, 백화사설초, 외송을 10, 100, 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처치한 HeLa 및 NIH:OVCAR-3 세포주의 생존율을 관찰하였다. 세 약물 모두 대조군과 비교하여 유의한 세포활성 감소 효과를 나타내었으며, 특히 외송은 두 세포주에서 모두 농도 의존적으로 유의한 세포활성 감소 효과를 나타냈다. 반면 귀전우, 백화사설초는 명확한 농도 의존적 효과를 보이지 않았다(Fig. 4).

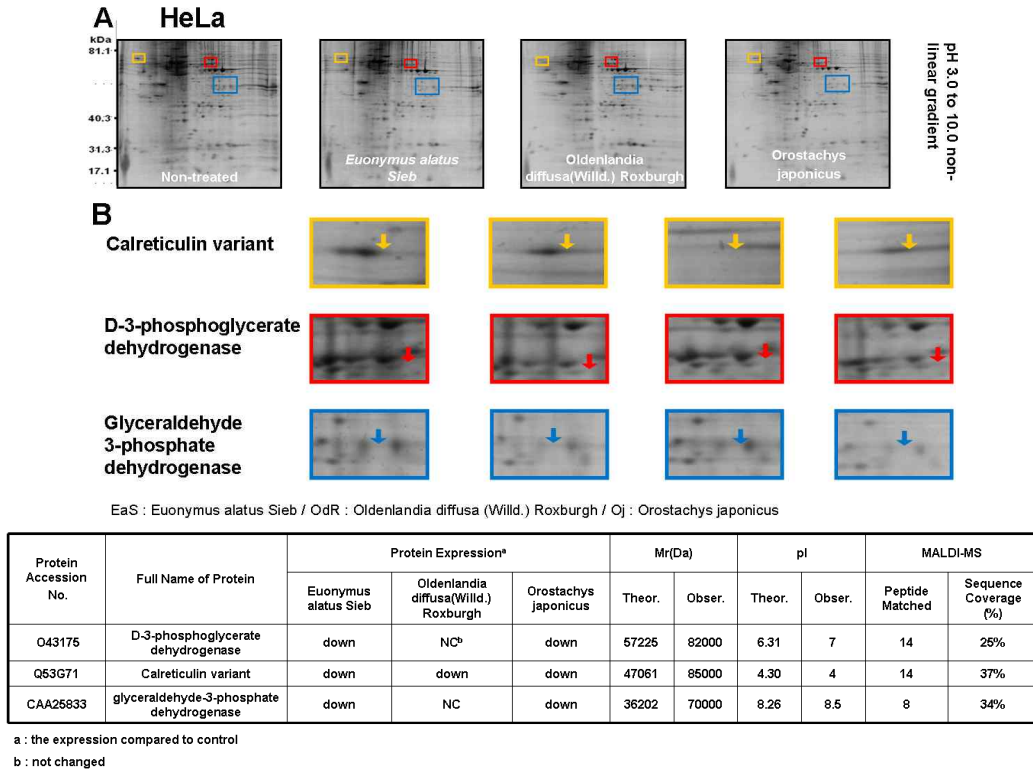


Fig. 1. Altered protein expression in human cervical cancer cell line HeLa treated with three different herbs.

(A) Typical pattern of 2-DE images of proteomes extracted from HeLa cells after non- or herbal treatment. (B) Enlarged 2-DE images demonstrating dysregulation expression of three proteins after herbal treatment. Three proteins indicated in the enlarged images were identified by MALDI-TOF analysis as shown in the table.

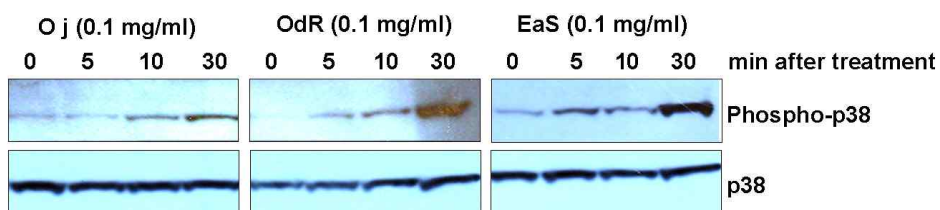


Fig. 2. Activation of p38 after treatment of herbs in HeLa cells. All three herbs significantly increased phosphorylation level of p38 at 30 min after treatment.

- \* Oj : *Orostachys japonicus* A. Berger
- \* OdR : *Oldenlandia diffusa* (Willd.) Roxburgh
- \* EaS : *Euonymus alatus* Sieb

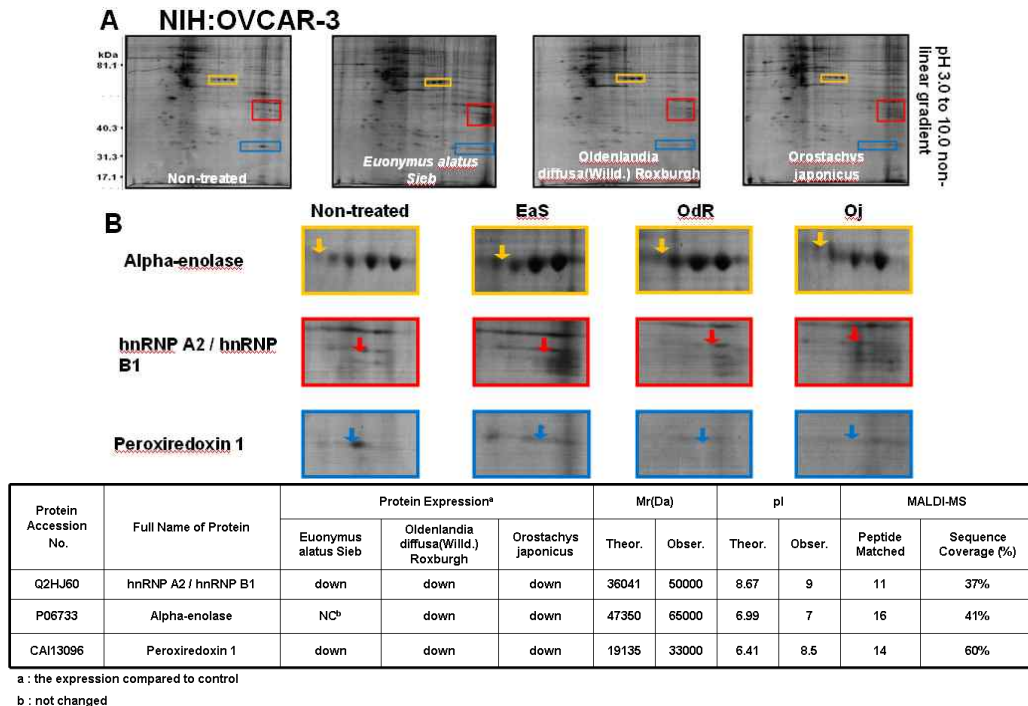


Fig. 3. Altered protein expression in human ovarian cancer cell line NIH:OVCAR-3 treated with three different herbs.

(A) Typical pattern of 2-DE images of proteomes extracted from NIH:OVCAR-3 cells after non- or herbal treatment. (B) Enlarged 2-DE images demonstrating dysregulation expression of three proteins after herbal treatment. Three proteins indicated in the enlarged images were identified by MALDI-TOF analysis as shown in the table.

\* Oj : *Orostachys japonicus* A. Berger  
\* OdR : *Oldenlandia diffusa* (Willd.) Roxburgh  
\* Eas : *Euonymus alatus* Sieb

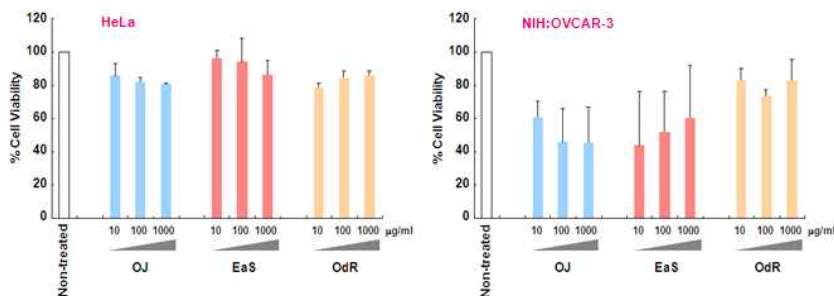


Fig. 4. Viability of human cervical (HeLa) and ovarian (NIH:OVCAR-3) cancer cell lines in the presence of three different herbs.

OJ reduced the proliferation rate of both HeLa and NIH:OVCAR-3 in a dose-dependent manner, however such decrease was not clearly induced by other two herbs.

\* Oj : *Orostachys japonicus* A. Berger  
\* OdR : *Oldenlandia diffusa* (Willd.) Roxburgh  
\* Eas : *Euonymus alatus* Sieb

#### IV. 고찰

한약은 만성 소모성 질환, 대사성 질환, 면역성 질환 등의 다양한 질병을 치료하여 그 임상적 효과가 뛰어남에도 불구하고 복잡한 화학 성분들의 작용 기전이 명확히 밝혀지지 않아 그 효과에 대한 인식이 저조한 실정이다. 그러나 최근 Proteomics를 이용한 연구가 한약의 작용 기전에 대해 새로운 관점으로 접근할 수 있는 방법으로 널리 이용되고 있다. Proteomics 기술을 통해 전통 동양의학의 표적 분자 작용을 확인하고 새로운 활성 구성요소를 분리하거나 특정화할 수 있을 뿐만 아니라 한약의 독성 물질을 분석하는데 사용할 수 있게 되었다. 또한 한약이 작용하는 target molecules의 식별이 가능해졌고, 그를 통해서 해당 질환의 치료를 가능케 하는 생물학적 신호 전달 경로를 연구할 수 있게 되었다. 이를 이용하여 약물의 target molecules를 추적한 결과 치료에 있어서 중요한 작용을 하는 몇 가지 critical molecules가 있음을 밝힐 수 있게 되었으며, 이러한 critical molecules는 향후 신약 개발과 유전자 치료의 주요 target으로써 큰 가치를 지니고 있다<sup>8</sup>.

한약의 효과는 대장암의 치료에 있어서도 뛰어난 효과를 발휘한다고 보고되어 있다. 대장암 치료에 있어서도 한약의 단독 투여, 항암제와의 병용 투여 모두 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 외과적 수술 이후 합병증 예방에도 좋은 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다. 분자생물학적인 연구를 통해서도 한약은 세포 분열을 억제와 apoptosis 유도 효과의 효과를 나타내는 것으로도 밝혀져 있다<sup>9</sup>.

많은 한약재 중에서도 귀전우(*Euonymus alatus Sieb.*), 백화사설초(*Oldenlandia diffusa (Willd.) Roxburgh*), 와송(*Orostachys japonicus A. Berger*)은 특히 항암 효과가 우수한 것으로 알려져 수세기 동안 동북아시아에서 악성종양 치료를 목적으로 널리 이용되어져 왔다<sup>1-3,10</sup>.

이처럼 각 한약물이 암세포에 유효한 항암 효과

가 있는 것으로 보고된 바, 이번 연구는 인간 난소 암세포 및 자궁경부암세포에 대한 귀전우, 백화사설초, 와송의 성장억제효과와 분자생물학적 메커니즘을 밝히기 위해 실시하였다.

귀전우, 백화사설초, 와송 추출물 각각의 세포 활성 효과가 어떠한 molecules에 작용하고 있는지 확인하기 위하여 2-DE를 진행하여 이미지를 분석하였다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군, 각각 귀전우, 백화사설초, 와송 추출물을 처리한 실험군을 비교한 이미지에서 대조군과 시험군의 2-DE를 통하여 얻은 이미지를 분석하여 변화가 있는 spot들이 발견되었으며, 이 spot들을 추출하여 MALDI-MS를 시행한 결과 다양한 단백질의 변화가 있었음을 확인할 수 있었다.

또한 귀전우, 백화사설초, 와송을 10, 100, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 HeLa 및 NIH:OVCAR-3 세포주의 생존율을 관찰하였는데, 각 세포주는 모든 농도에서 유의한 세포활성감소 효과가 나타났다.

대조군과 각각의 세 약물을 처리한 후에 보인 spot을 찾아 MALDI-MS로 확인한 결과 HeLa 세포주에서는 calreticulin variant, D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 단백질들의 발현이, NIH:OVCAR-3 세포주에서는 Alpha-enolase, hnRNP A2/hnRNP B1, peroxiredoxin 1의 발현 변화가 나타났다.

Molecular chaperon 중의 하나인 Calreticulin (CRT)은 misfolded proteins에 결합하여, 이들이 Endoplasmic reticulum에서 Golgi apparatus로 나가는 것을 방해한다. 그리고 세포핵에서도 발견되는 것으로 보아, 세포 전사의 조절에도 일정한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 많은 종류의 암세포들이 CRT를 발현하고 있다는 것을 알 수 있는데, CRT는 탐식 대식세포에게 탐식 촉진신호(pro-phagocytic signal)를 보내 암세포를 탐식하여 파괴하는 것을 촉진한다<sup>11-13</sup>. Calreticulin의 pre-apoptotic exposure는 항암 치료에서 나타나는 항암 면역 반응 중 하나라고 밝혀져 있다<sup>14</sup>.

암세포는 60-90%가 산소가 충분히 있어도 호기성 해당과정을 통해 에너지를 얻게 되는데(Warburg 효과), 그 기전은 pseudo-oncogene인 HIF(hypoxia-induced factor)가 발현되면 Substrate level phosphorylation 기전 관여효소(Glycolytic enzyme) 등에 의해 호기성 해당과정 발동하여 이로 인해 당분이 필요하게 된다. D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase는 스트레스유발 당-에너지대사를 활성화시켜 암세포단백합성 및 세포분열을 촉진시킴으로써 암줄기세포에서의 발암작용을 나타낸다<sup>15-17</sup>.

해당계 효소인 Enolase는  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  3종류의 subunits 조합으로 구성된 2량체 구조를 가지며, 그 중  $\alpha\gamma$  및  $\beta\gamma$ 형의 Enolase는 주로 신경세포나 축삭 돌기에 존재하기 때문에, 신경 특이 Enolase(NSE)라고 부르고 있다. 최근 NSE는 각 장기에 분포하는 신경 내분비 세포에도 존재가 확인되어, 그것의 종양인 APU Doma나 이와 유사한 성격을 띠는 연막세포형의 폐 소세포암, 신경막 세포종의 유용한 Marker로 활용되고 있다. 또한, 혈소판, 적혈구, 임파구 등에도 분포되어 있으며 혈중에서 높은 수치를 보이는 폐포 세포암, 신경아 세포종과 같은 악성 질환의 검색이나 수술 및 치료 후의 경과 관찰에 유용하다<sup>18-20</sup>.

Heterogeneous nuclear ribonuclearproteins(hnRNPs)는 nucleic acid-binding protein으로 DNA 복구, telomere 조절, 유전자 재생과 연관된다. 따라서 p53, K-ras 돌연변이 등과 함께 hnRN PA2/B1의 발현을 암의 조기진단법으로 이용할 수 있는 것이다<sup>21-22</sup>.

Peroxiredoxin 1(PRDX 1)은 Dioscorea batatas에 의한 산화방지 효과로 인한 주요 단백질로써 항산화효과를 야기한다. 난소암 및 폐암 등의 암세포에서 항산화 단백질인 PRDX-1 수치가 높은 것은 암세포가 생존과 성장을 유지하기 위해 항산화제의 발현을 유도한다는 것이 확인되었다<sup>23-25</sup>.

HeLa 세포에 귀전우, 백화사설초, 외송 추출물

을 처치한 결과, 암세포의 세포 활성화와 억제 반응성에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고된 ERK, AKT 등의 주요 신호 전달 물질의 활성화는 변화를 보이지 않았으나(data not shown), p38의 활성화는 세 약물 처치에 의해 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 즉, 세 가지 약물에 의한 세포내의 단백질의 양적 발현의 변화(Fig. 1)와는 다르게 p38 활성화도의 증가는 HeLa 세포 증식 억제에 p38이 중심 물질로서 관여할 수 있음을 시사한다.

이상의 결과로부터 앞으로의 연구는 molecular level에서 귀전우(*Euonymus alatus Sieb*), 백화사설초(*Oldenlandia diffusa (Willd.) Roxburgh*), 외송(*Orostachys japonicus A. Berger*)의 항암효과를 이해하는 것을 기초로, 치료적 가치를 가지는 단백질 조절을 밝힌 후 다양한 cancer survival factors를 관찰, 추적하는 것에 초점이 맞춰져야 할 것으로 사료되는 바이다.

## V. 결론

본 연구는 인간 난소암세포 NIH:OVCAR-3와 자궁경부암세포 HeLa에 투여된 귀전우(*Euonymus alatus Sieb*), 백화사설초(*Oldenlandia diffusa (Willd.) Roxburgh*), 외송(*Orostachys japonicus A. Berger*)의 단백질 발현 변화를 알아보기 위하여 진행되었으며 결과는 다음과 같다.

1. 귀전우, 백화사설초, 외송은 HeLa 세포주에서는 calreticulin variant, D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 단백질과 같은 다양한 molecular chaperone의 발현을 조절함으로써 단백질의 결합과 배열에 관여함을 알 수 있었다.
2. 세 약물의 처치는 HeLa 세포에서 p38의 인산화 레벨을 증가시킴을 알 수 있었다.
3. NIH:OVCAR-3 세포주에서는 Alpha-enolase, hnRNP A2/hnRNP B1, peroxiredoxin 1의 발현



이 상태 유지 또는 감소되는 것으로 보아 signal transduction pathway와 growth control에 관여하여 암세포의 성장에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

4. 세 약물을 10, 100, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 HeLa 및 NIH:OVCAR-3 세포주는 각각 모든 농도에서 유의하게 세포활성 감소가 있음을 알 수 있었다.

이상에서 귀전우, 백화사설초, 와송은 HeLa, NIH:OVCAR-3 세포주에서 다양한 단백질 발현을 유발하는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 기반으로 세 약물의 항암 메커니즘 규명에 대한 발판을 마련할 수 있을 것이다.

### 참고문헌

1. Lee SK, Hwang JY, Song JH, Jo JR, Kim MJ, Kim ME, et al. Inhibitory activity of *Euonymus alatus* against alpha-glucosidase in vitro and in vivo. *Nutr Res Pract*. 2007;1(3):184-8.
2. Hwang JS, Kwon HK, Lee CK, Jeon WK, Ko BS, Im SH. Development of T Cell Immunomodulators from Natural Products. *Research Focus on Natural Products and the Body's Immune and Inflammatory*. 2007:253-73.
3. Ryu DS, Baek GO, Kim EY, Kim KH, Lee DS. Effects of polysaccharides derived from *Orostachys japonicus* A. Berger on induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *BMB Rep*. 2010; 43(11):750-5.
4. Sandra T, Hwee TT, Maxey CC. Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics*. 2008;8(19):3924-32.
5. Ryu WJ, Choi CH. Application of Proteomics and Protein Chip Analysis in the Diagnosis of Neurodegenerative Disorders. *J Korean Neurol Assoc*. 2003;21(6):584-99.
6. Wen JK, Han M. Application of genomics and proteomics in study of traditional Chinese medicine. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2004;2(5):323-5.
7. Cho WC. Application of proteomics in Chinese medicine research. *Am J Chin Med*. 2007;35(6):911-22.
8. Kang YJ. Herbogenomics: from traditional Chinese medicine to novel therapeutics. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(9):1059-65.
9. Liu CB, Chen AH, Ding YJ, Jin HY, Seow-Choen F. The role of traditional Chinese medicine in colorectal cancer treatment. *Tech Coloproctol*. 2008;12(1):1-6.
10. Yoon JS, Seo JC, Han SW. Pinelliae Rhizoma herbal-acupuncture solution induced apoptosis in human cervical cancer cells, SNU-17. *Am J Chin Med*. 2006;34(3):401-8.
11. Can CY, Han Y, Ren YS, Wang YL. Apoptotic B16-F1 cells coated with recombinant calreticulin mediated anti-tumor immune response in mice. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2010;22(4):253-9.
12. Kepp O, Tesniere A, Zitvogel L, Kroemer G. The immunogenicity of tumor cell death. *Curr Opin Oncol*. 2009;21(1):71-6.
13. Chen CN, Chang CC, Su TE, Hsu WM, Jeng YM, Ho MC, et al. Identification of calreticulin as a prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16(2):524-33.
14. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman DC, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EBMO J*

- 2009;28(5):578-90.
15. Lucia C, Michela DM, Andrea U, Cristiano F, Maria BDi, Giovanni S, et al. Comparative Proteomic Analysis of Paclitaxel Sensitive A2780 Epithelial Ovarian Cancer Cell Line and Its Resistant Counterpart A2780TC1 by 2D-DIGE: The Role of ERp57. *J. Proteome Res.* 2009;8(4):1902-12.
  16. Wei W, Chunlan Y, Tieer G, Zhanghui C, Xianghong L, Penelope JD, et al. Nuclear proteome analysis of cisplatin-treated HeLa cells. *Muta Res.* 2010; 691(2):1-8.
  17. Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JF, Kunjithapatham R, Buijs M, Vossen JA, Tchernyshyov I, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death. *Anticancer Res.* 2009;29(12):4909-18.
  18. Shih NY, Lai HL, Chang GC, Lin HC, Wu YC, Liu JM, et al. Anti-alpha -enolase autoantibodies are down-regulated in advanced cancer patients. *Jpn J Clin Oncol.* 2010;40(7):663-9.
  19. Yu Z, Willmarth NE, Zhou J, Katiyar S, Wang M, Liu Y, et al. MicroRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling. *Cell Biology.* 2010;107(18):8231-36.
  20. Valera VA, Li-Ning-T E, Walter BA, Roberts DD, Linehan WM, Merino MJ. Protein expression profiling in the spectrum of renal cell carcinomas. *J Cancer.* 2010;1:184-96.
  21. Guha M, Pan H, Fang JK, Avadhani NG. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 is a common transcriptional coactivator in the nuclear transcription response to mitochondrial respiratory stress. *Mol Biol Cell.* 2009;20(18):4107-19.
  22. Markus HH, Gunter S. A Common Pathway for All Autoimmune Diseases? The Unholy Alliance of Environment, Cell Death and Nucleic Acids. *Current Immunology Reviews.* 2009;5:69-88.
  23. Wang X, He S, Sun JM, Delcuve GP, Davie JR. Selective association of peroxiredoxin 1 with genomic DNA and COX-2 upstream promoter elements in estrogen receptor negative breast cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2010;21(17):2987-95.
  24. Chhipa RR, Lee KS, Onate S, Wu Y, Ip C. Prx1 enhances androgen receptor function in prostate cancer cells by increasing receptor affinity to dihydrotestosterone. *Mol Cancer Res.* 2009;7(9):1543-52.
  25. Joshi G, Aluise CD, Cole MP, Sultana R, Pierce WM, Vore M, et al. Alterations in brain antioxidant enzymes and redox proteomic identification of oxidized brain proteins induced by the anti-cancer drug adriamycin: implications for oxidative stress-mediated chemobrain. *Neuroscience.* 2010;166(3):796-807.