

山藥의 항산화 작용에 대한 단백질체 분석 연구

*동국대학교 한의과대학 부인과학교실, **동국대학교 자연과학대학 생물학과
양정민*, 이지형**, 성정석**, 김동일*

ABSTRACT

Proteomic Approach to Study the Antioxidant Activities of *Dioscoreae Rhizoma* on HeLa Cells

Jeong-Min Yang*, Ji-Hyung Lee**, Jung-Suk Sung**, Dong-II Kim*.

*Dept. of Ob&Gy, College of oriental Medicine, Donggguk University

**Dept. of Biology. College of Science, Dongguk University

Purpose: This study was examined to verify the anti-oxidative effect of *Dioscoreae Rhizoma* on HeLa cells by proteomic approach.

Methods: Aqueous extract was used to treat HeLa cell with different concentrations treated with water or MeOH extract of *Dioscoreae Rhizoma*. HeLa cells were co-treated with H₂O₂ and *Dioscoreae Rhizoma* extracts. Proteomics was done to identify, characterize, and quantitate proteins expressed in HeLa cells treated by H₂O₂ and *Dioscoreae Rhizoma*.

Results: When HeLa cells were Co-treated with H₂O₂ and *Dioscoreae batatas* extracts, 16 proteins identified by 2-DE and MALDI-TOF mass spectrometry and database search. PRDX, HSP27 was major proteins of antioxidant effect by *Dioscoreae batatas*.

Conclusion: Our results suggest that *Dioscoreae Rhizoma* extracts induce antioxidant effects by regulating proteins such as PRDX, HSP27.

Key Words: *Dioscoreae Rhizoma*, HeLa cell, antioxidant, Proteomics, 2-DE

I. 서 론

생명공학 분야 및 약물학적 연구에 근래에 많이 쓰여지고 있는 단백질체분석(Proteomics)은 세포 혹은 조직에서 전반적으로 유전자들로부터 발현되는 각 단백질들이 어떻게 발현되며 그리고 어떤 변화를 보여주는지를 연구하는 방법을 말한다. 이러한 단백질체분석을 통해 얻게 되는 정보들은 기존의 유전자 연구를 통하여 얻은 정보들을 보완해주면서 실질적인 세포내의 주된 기능을 담당하는 단백질들의 동적인 변화를 파악할 수 있게 해주기 때문에 이를 통해 다양한 분야의 후속 연구에 사용할 수 있는 많은 파급효과를 기대할 수 있게 된다. 특히 항암연구와 같은 질환연구나 신약개발과 같은 부분에서 단백질체 분석을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁾. 그러나 단백질체 분석을 이용한 한약 및 한의학적 치료에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없는 상황이다.

山藥(*Dioscoreae Rhizoma*)은 마과에 속한 多年生草本인 마(*Dioscorea batatas* Thunberg) 또는 참마(*Dioscorea japonica* Thunberg)의 뿌리줄기를 건조하여 사용하는 약재로,味甘性溫하고 健脾, 補肺, 固腎, 益精의 효능이 있다²⁾. 山藥이나 山藥의 주요 성분들의 약리작용으로는 혈당 강하 효과³⁾, 콜레스테롤 저하작용⁴⁾, 비만 조절⁵⁾, 山藥의 주요 성분인 methyl protodioscin, methyl protoneogracillin, gracillin, dioscin 등의 인간암세포에 대한 항종양효과⁶⁻⁸⁾, 면역조절효과⁹⁾, phospholipase A₂ 저해작용¹⁰⁾, 항진균성/세포독성의 활성, 골다공증 억제효과¹¹⁾ 등이 보고되고 있다.

최근 전 등¹²⁾은 山藥이 농도에 따라 HeLa cell의 증식과 감소를 동시에 유발하는 효과가 있으며, 항산화 작용을 통한 세포보호기능이 있음을 보고하였다. 남 등¹³⁾은 신경세포주인 PC12 cell에서 山藥이 H₂O₂의 작용에 대한 항산화 작용을 나타냄을 보고하였고, 김¹⁴⁾은 생식세포의 일종인 GC-1 spg cell에서의 山藥의 항산화효과를 보고하였다. 그러나 산화적 스트레스에 대한 山藥의 항산화 효과가 세포내의 어떠한 대사과정을 통하여 나타나는지 아직 명확히 밝혀지지 않은 상태이다.

이에 본 연구에서는 HeLa cell에 H₂O₂로 유발된 산화적 스트레스에 대한 山藥의 보호작용기전을 규명하기 위하여 HeLa cell에서 발현되는 단백질을 분석하고 정량하는 단백질체분석을 시행하였다. 이와 같은 일련의 실험을 통하여 얻어진 결과를 이 논문을 통해 발표하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 추출물의 제조

규격 한약품인 山藥(*Dioscorea batatas* Thunberg)은 동국대학교 한방병원(Ilsan, Korea)을 통해 구입한 후 정선하여 사용하였다. 50 g의 한약재를 각각 2시간동안 열수추출과 메탄올추출로 각각 추출하여 AVANTEC TOYO #2 filter로 여과하여 불용성 성분은 제거하고 분말로 냉동건조 하였다. 추출물을 PBS에 녹여 희석한 후에 pH 7로 조정하고 0.25 μm 필터(Nalgene, USA)로 소독하여 -20℃에서 보관하였다.

2. 세포배양

HeLa cell은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. HeLa cell은 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin, nonessential amino acids, 1.0 mM sodium pyruvate, 10% FBS가 포함된 minimal essential medium (MEM) (Welgene, Korea) 배지로 37°C, 95% air/ 5% CO₂가 유지되는 incubator에서 배양하였다.

3. Sample preparation for 2-Dimensional gel Electrophoresis(2-DE)

배양된 세포들은 washing buffer (10 mM Tris (pH 8.0), 5 mM magnesium acetate)로 세정하고 차가운 상태로 8 M urea, 4% CHAPS, 40 mM Tris-base and 0.5 mM PMSF에 30분간 용해하였다. 세포들을 20000 × g로 30분간 원심분리하고 상층부에 단백질이 농축된 것을 Bradford protein assay에 의해 분석하였다.

4. 2-DE

2-DE는 Amersham Biosciences IPGphor IEF와 Bio-rad PROTEAN® II ± xi Cell electrophoresis units를 이용하여 시행하였다. 500 µg의 세포단백질을 350 µl의 rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% NP-40, 20 mM DTT, 0.5% IPG buffer (Amersham Biosciences))와 혼합하고 미리 준비한 18cm IPG strip (pH 3-10 NL)에서 20V에서 15시간 동안 rehydration하였다. IEF를 50 V에서 3시간, 500 V와 1000 V에서 1시간씩, 그리고 8000 V에서 6시간씩 순차적으로 증가시키면서 총 50 kWh 시행하였다.

IEF과정을 거친 strip들을 1% DTT (w/v) 가 포함된 equilibration buffers (6 M urea, 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 30% glycerol, 2% SDS)에서 한번, 2.5% iodoacetamide (w/v)가 포함된 equilibration buffers에서 다시 한 번 반응시켜 1.5 mm 두께의 12% polyacrylamide gel에서 SDS-PAGE를 시행하였다.

5. Silver staining

Gel의 silver staining은 PlusOne Silver Staining Kit (Amersham Bioscience)을 이용하여 시행하였다. Gel은 40% ethanol과 10% acetic acid에서 밤새 고정시키고 0.2% sodium thiosulfate에서 2시간동안 배양하여 민감도를 높였다. 3차 증류수로 15분간 3회 세정하여, 2.5% silver nitrate buffer에서 2시간동안 염색하고 2.5% sodium carbonate와 0.2% formaldehyde buffer에서 발색하였다. 충분한 강도로 염색이 된 상태에서 1.46% EDTA-Na₂ solution을 이용하여 발색을 멈추고 3차 증류수에서 5분간 3회 세정하였다.

6. Image acquisition and analysis

Gel의 spot분석은 the Image Master 2D Platinum software version 5.0 (Amersham Biosciences)을 이용하였다. Image spot들을 탐지하여, 맞추어보고, 직접 편집하였다. 각 spot들의 강도에 대한 측정은 background subtraction과 total spot volume normalization을 통해 시행하였다.

7. In-gel digestion

Protein spots는 Gharahdaghi F 등¹⁵⁾

이 서술한 방법대로 gel에서 잘라내고 trypsin으로 분해하였다. silver-stained protein을 탈염하기 위해 물에 녹여 미리 준비한 30 mM potassium ferricyanide와 100 mM sodium thiosulfate의 두가지 buffer를 1:1로 섞은 용액 50 μ l를 첨가하고 vortexing 하였다. 갈색이 사라질 때까지 위 과정을 반복한 다음, 증류수로 3회 행구어 반응을 중지시키고 acetonitrile을 넣고 반복적으로 탈수시켜 gel이 불투명한 흰색이 되게 하여 진공원심분리기에서 30분간 건조시켰다. 100 mM DTT가 첨가된 100 mM NH_4HCO_3 을 넣고 56°C에서 1시간동안 gel을 분해하였다. 실온에서 식혀서 DTT 용액을 같은 양의 55 mM iodoacetamide가 첨가된 100 mM NH_4HCO_3 으로 실온 암조건에서 45분간 반응시키고, 100 μ l의 100 mM NH_4HCO_3 를 첨가하고 10 분후에 acetonitrile을 첨가하여 탈수시켜 상등액을 버리고 진공원심분리기에서 완전히 말렸다.

Gel 조각들을 4°C에서 digestion buffer(50 mM NH_4HCO_3 and 10 ng/ μ l of trypsin (Promega, USA))에 45분간 불리고 10 μ l 50 mM NH_4HCO_3 를 첨가하고 효소가 분해되도록 37°C에서 밤새 유지시켰다.

8. MALDI-TOF mass spectrometric analysis and database search

추출한 spot에 대한 분석은 서울대학교 농업생명과학대학 농생명과학공동기기센터(NICEM)에 의뢰하여 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied

Biosystems Inc, Germany)을 이용하여 분석하였다. 분석된 결과는 단백질 지문 감식법(PMF: peptide mass fingerprinting)의 과정을 거쳐 Mascot(www.matrixscience.com) 사이트를 통하여 추정되는 단백질을 확인하였다.

III. 결 과

1. HeLa cell에서 H_2O_2 단독투여와 H_2O_2 , 山藥의 병용 투여 간의 2D-gel Electrophoresis의 차이

HeLa cell에 H_2O_2 를 처리한 상태와 H_2O_2 와 山藥을 동시에 처리한 상태에서의 세포내의 단백질체 합성의 변화를 확인하기 위해 단백질체 분석을 시행하였다. 우선 각각 처리된 세포를 가지고 2D-gel Electrophoresis를 시행한 후 영상분석 프로그램을 이용하여 두 gel에 나타난 단백질 spot의 차이를 비교, 분석하였다(Fig. 1). ImageMaster 2D Platinum program을 이용하여 확인한 결과 H_2O_2 만을 처리한 HeLa cell의 gel에서는 960개의 spot이 확인되었고 H_2O_2 와 山藥을 동시에 처리한 HeLa cell의 gel에서는 832개의 spot이 확인되었으며, 두 gel에서 matching되는 spot의 개수는 571개로 matching 비율은 63.73%였다.

두 gel에서 matching이 된 spot들 중에서 유의한 정도의 변화가 나타난 16여개의 spot을 선택하여 각각 임의의 번호를 부여하고 그 강도의 변화를 확인하였다(Fig. 2). 각 spot의 단백질체 생성량의 변화가 0.26배 정도로 감소한 경우에서부터 최대 15배 정도까지 나타난 경우도 있었다.

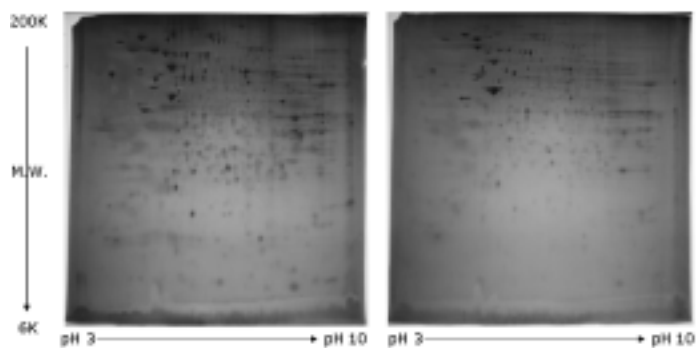
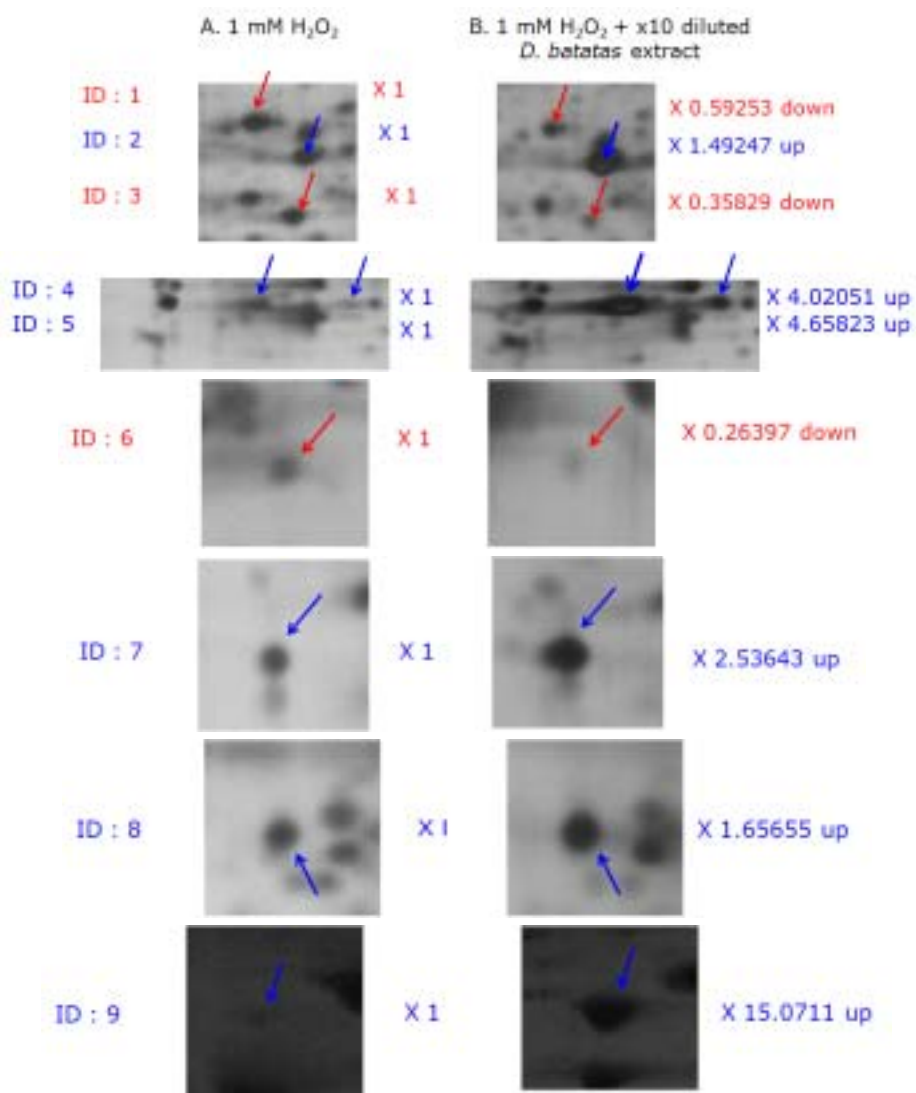


Fig. 1. An overview of the master 2-D gel images for total soluble proteins of HeLa cell. HeLa cell treated with 1 mM H₂O₂ (A) and 1 mM H₂O₂ and 10-fold diluted *D. batatas* extract (B).



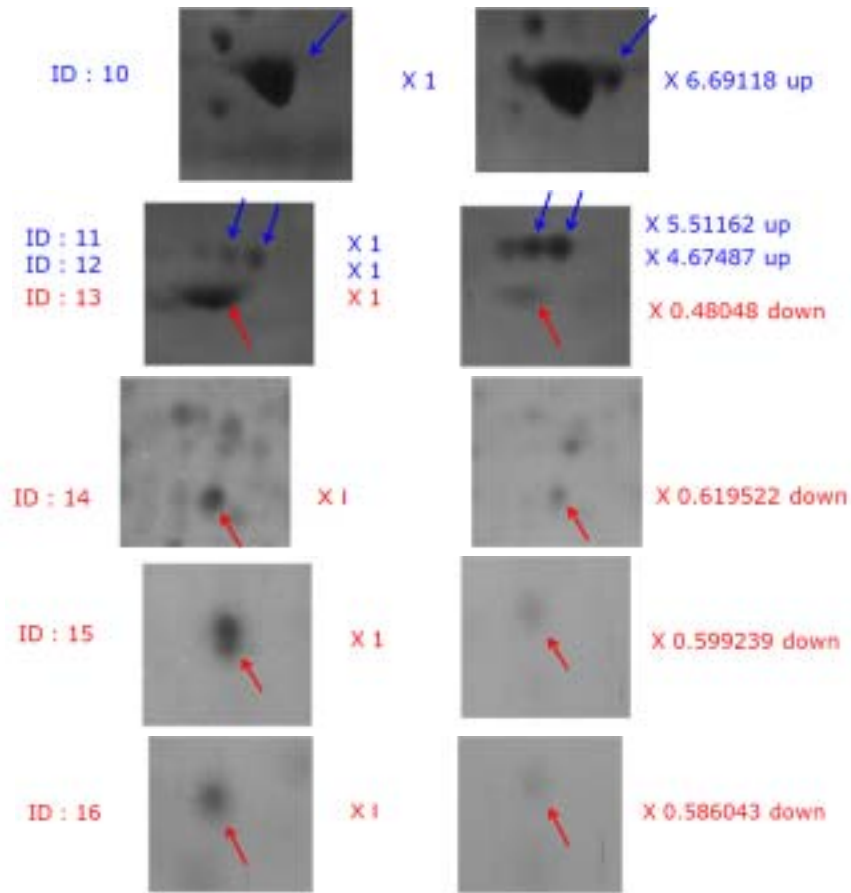


Fig. 2. Detailed alteration of the master 2-D gel images for soluble proteins of HeLa cell extracts.

HeLa cells treated with 1 mM H₂O₂ (A) and 1 mM H₂O₂ and 10-fold diluted *D. batatas* extract (B). (ID : protein spot number, × : fold)

2. 변화된 각 spot들에 대한 단백질 변화 분석

각각의 spot들을 추출하여 MALDI-TOF을 통하여 분석한 후 단백질 지문감식법 (PMF: peptide mass fingerprinting)을 시행하였다(Fig. 3).

Fig. 3과 같이 PMF를 통하여 분석된 각 spot들의 결과에 의해 일정정도 이상 발현된 단백질들을 Mascot(www.matrixscience.com) 사이트를 통하여 database 검색으로 분석·확인하였다. 최종적으로 확인된 단백질의 종류는

Table 1, Table 2에서 보는 바와 같이 16종이었다.

16종의 단백질 중 HeLa cell에 H₂O₂만을 처리한 대조군보다 山藥을 함께 처리한 실험군에서 단백질 발현이 증가한 (Up-regulation) 단백질들은 Heat shock protein 27 (HSP27), Peroxiredoxin 1 (PRDX1), HCG2038743, Hypothetical protein, Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MAPK4), Mirror-image polydactyly 1 (MIPOL1), Beta actin (ACTB), Cell-division-cycle-like kinase

2 (CLK2P), BRCA1-associated RING domain protein (BARD1)의 9종이었다 (Table 1). 그리고 단백질 발현이 감소한 (Down-regulation) 단백질들은 Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29), Peroxiredoxin 3 (PRDX3), Chain A, Crystal Structure

Of Native Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), Nucleophosmin (NPM), Pyrophosphatase (inorganic) 2 (PPA2), Immunoglobulin mu heavy chain (IGHM), phosphofructokinase (PFK)의 7종이었다 (Table 2).

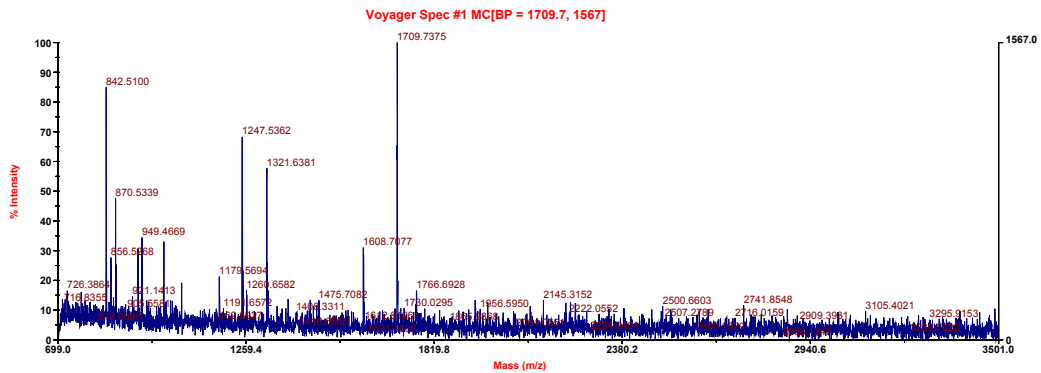


Fig. 3. The MALDI-TOF peptide mass fingerprinting of spot (ID :1).

Table 1. The up-regulated protein identification List after 2-DE followed by MALDI-TOF MS analysis.

Spot#	Protein identified (symbol)	NCBIInr	pI	MW(D)	#pept	Cov%	Score	E-value
2	Heat shock protein 27 (HSP27)	AAA62175	7.83	22313	5	29	67	0.038
4	Peroxiredoxin 1 (PRDX1)	CAI13096	6.41	18964	7	39	99	2.40E-05
5	HCG2038743	EAW70378	11.28	14368	3	18	35	65
7	Hypothetical protein	CAB70757	6.03	36885	3	7	33	1.10E+02
8	Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MAPK4)	EAW89973	8.28	43359	4	18	45	5.8
9	Mirror-image polydactyly 1 (MIPOL1)	AAH35870	6.15	30256	4	22	30	1.90E+02
10	Beta actin (ACTB)	AAH12854	5.55	40194	12	47	108	3.10E-06
11	Cell-division-cycle-like kinase 2 (CLK2P)	AAH22025	9.2	56545	10	16	41	1.50E+01
12	BRCA1-associated RING domain protein (BARD1)	AAB99978	8.95	86524	9	9	47	3.6

Table 2. The down-regulated protein identification List after 2-DE followed by MALDI-TOF MS analysis.

Spot#	Protein identified (symbol)	NCBIInr	pI	MW(D)	#pept	Cov%	Score	E-value
1	Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29)	EAW97992	9.28	29410	7	38	83	0.00097
3	Peroxiredoxin 3 (PRDX3)	EAW49398	6.06	11101	3	31	50	1.8
6	Chain A, Crystal Structure Of Native Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1)	1B3K_A	6.75	42705	4	9	52	1.2
13	Nucleophosmin (NPM)	EAW61448	4.8	31823	9	36	107	3.90E-06
14	Pyrophosphatase (inorganic) 2 (PPA2)	EAX06181	5.55	29239	5	17	44	8.2
15	Immunoglobulin mu heavy chain (IGHM)	AAV39830	6.78	22404	3	13	32	1.10E+02
16	phosphofructokinase (PFK)	EAW57973	7.55	81723	6	6	45	6.7

IV. 고 찰

인체에 대해 산화작용을 유발하는 ROS는 superoxide radical($-O_2$), hydrogen peroxide(H_2O_2) 및 hydroxyl radical ($-OH$) 등의 종류가 있으며, 정상적인 세포대사의 부산물로서 세포 기능에 직접적으로 영향을 주는 유해물질이다. 그런데 ROS는 모든 호기성 유기체에서 생산되며, 세포의 성장과 산화-환원 반응에 작용하는 신호전달체계에 필수불가결한 것이기도 하다. 그러므로 ROS는 생리적으로는 apoptosis의 과정에서 중요한 요소로 작용된다^{16,17}. 그러나 만약 ROS가 과도하게 생성되면 산화과정과 같은 치명적인 반응을 유발하여 세포의 생존에 중요한 세포 구조를 파괴하게 된다¹⁸. 산화물질은 화학적으로 DNA, 지질 그리고 단백질들과 같은 ROS의 표적이 되는 거대 분자(macromolecule)를 화학적으로 쉽게 수식(modification)할 수

있는 능력을 가진다. 또한 적은 양의 산화물질은 신호전달기전을 일으키기 때문에, 초기 암을 비롯한 다양한 질병뿐만 아니라 노화의 유발에 관여하기도 한다¹⁹⁻²².

山藥(*Dioscoreae Rhizoma*)은 마과에 속한 多年生草本인 마(*Dioscorea batatas* Thunberg) 또는 참마(*Dioscorea japonica* Thunberg)의 뿌리줄기를 건조하여 사용하는 약재이다². 山藥은 『神農本草經』에 “性溫味甘無毒 主傷中, 補虛, 除寒熱邪氣, 補中益氣力, 長肌肉, 久服耳目聰明”이라고 수록되어 있다²³. 『東醫寶鑑』에서는 補虛勞, 羸瘦, 充五藏, 益氣力, 長肌肉, 強筋骨하며 또한 開達心孔安神長志하는 작용을 한다고 하였으며²⁴ 清代의 『本草備要』에서는 ‘補不足, 清虛熱, 益腸胃, 潤肌膚, 化痰涎, 止瀉痢하고 虛損勞傷, 健忘, 遺精을 治하며 生으로 癰瘡에 塗布하면 腫硬을 消한다’라고 하였다²⁵. 근래 부인과 임상 영역에서는

强腎固精의 효능을 이용하여 생식내분비 계통의 각종 질환과 절박유산의 범주에 속하는 胎動胎漏에 安胎의 목적으로 상용하고 있다²⁶⁾.

山藥의 약용성분으로는 saponin, dioscin, mucin, allatonin, cholin, diosgenin, batatasine, amylose, tannin등을 함유하고 있다²⁷⁾. 현재까지 보고된 주요 기능은 혈당 강하 작용, 콜레스테롤 저하작용, 비만 조절, 山藥의 주요 성분인 methyl protodioscin, methyl protoneogracillin, gracillin, dioscin 등의 인간암세포에 대한 항종양효과, 면역조절효과, phospholipase A2 저해작용, 항진균성/세포독성의 활성화, 골다공증 억제 효과 등이 있다³⁻¹¹⁾. 남 등¹³⁾은 신경세포주인 PC12 cell에서 山藥이 H₂O₂의 작용에 대한 항산화 작용을 나타냄을 보고하였고 김¹⁴⁾은 생식세포의 일종인 GC-1 spg cell에서의 山藥의 항산화효과를 보고하였다.

최근 山藥의 HeLa cell에 대한 효과에 대한 연구결과¹²⁾에서는 山藥을 단독 투여하였을 때 HeLa cell의 생존율을 저하시킴으로써 항종양효과가 나타나는 것을 확인하였다. 그런데 山藥을 대표적인 항암제인 NCS, 대표적인 ROS인 H₂O₂와 각각 동시 투여하였을 때에는 고농도에서는 항암효과를 증가시키는 결과를 나타냈지만, 낮은 농도에서는 NCS나 H₂O₂로 인한 HeLa cell의 apoptosis를 완화하였다. 또한 이러한 山藥의 항암제가 apoptosis를 일으키는 것에 대한 완화작용의 기전을 확인하고자 Caspase-3, Bcl-2, PARP, p53등의 발현의 변화를 확인함으로써 항산화과정이 이러한 효과를 일으키는 데 중요한 역할을 하는 것을 보고하였다.

본 연구에서는 이러한 결과를 바탕으로 山藥의 항산화 작용의 세포내 발현과정을 밝히기 위하여 단백질체 분석을 통하여 HeLa cell 내에서의 단백질생성 변화를 확인하였다. 단백질체분석(Proteomics)은 항암화학요법과 같은 어떤 상태 하에서 세포나 조직 또는 기관 내에서 발현되는 단백질을 분석하고 정량하는 연구기법이다^{28,29)}. 단백질체분석을 통하여 변화가 확인된 단백질은 향후 유용한 약물작용 목표로서 특성화가 가능하며 전반적인 단백질 변화분석을 통하여 약물작용기전을 이해하는 중요한 정보를 얻을 수 있다³⁰⁾. 단백질체 분석은 2-DE와 MALDI analysis의 두과정을 거치게 된다. 2-DE는 세포나 조직등으로부터 다양한 단백질 성분들을 추출해내기 위해 널리 쓰이는 방법으로 단백질들을 두가지 특성에 따라 두 단계의 과정을 거치게 된다. 첫 번째 단계는 isoelectric focusing (IEF)라는 단계로 단백질들을 각각의 전위(pI)에 따라 분리하는 단계이며, 두 번째 단계는 SDS-PAGE를 시행하여 단백질들을 각각의 분자량에 따라 분리하는 단계이다. MALDI analysis는 이렇게 분리된 단백질들을 필요에 따라 부분적으로 레이저를 이용하여 용해하여 내어 단백질의 구성성분과 농도를 분석하는 방법이다.

이번 연구에서는 HeLa cell에 H₂O₂를 처리하였을 때와 H₂O₂와 山藥을 함께 처리하였을 때의 세포내의 단백질체 생성의 차이점을 확인하기 위해 단백질체 분석을 시행하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 2DE를 시행하여 얻은 두개의 gel을 비교해 보았을 때 양측의 차이를 확인할 수 있었으며 분석프로그램을 통

하여 16여개의 유의한 농도차이를 보이는 단백질 spot들을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 이 spot들을 임의로 번호를 부여하고 spot들을 추출하여 단백질체 성분분석을 시행하였다.

각 spot들에서 MALDI-TOF를 통하여 분석한 결과를 단백질 지문감식법 (PMF)(Fig. 3)을 거쳐 database 검색을 위하여 Mascot (www.matrixscience.com) 사이트의 검색 program을 통하여 추정되는 단백질을 검색하였다. 확인된 각각의 단백질은 Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29), Heat shock protein 27 (HSP27), Peroxiredoxin 3 (PRDX3), Peroxiredoxin 1 (PRDX1), HCG2038743, Chain A, Crystal Structure Of Native Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), Hypothetical protein, Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MAPK4), Mirror-image polydactyly 1 (MIPOL1), Beta actin (ACTB), Cell-division-cycle-like kinase 2 (CLK2P), BRCA1-associated RING domain protein (BARD1), Nucleophosmin (NPM), Pyrophosphatase (inorganic) 2 (PPA2), Immunoglobulin mu heavy chain (IGHM), phosphofructokinase (PFK)의 16종으로 확인되었다(Table 1, 2). Fig. 8에서 제시한 spot들 이외에도 영상분석에서 어느 정도 변화를 나타낸 spot들이 더 있었으나 MALDI-TOF 분석과 database를 통한 단백질체 검색상에서 유의한 결과를 나타내지 않았다.

16종의 단백질 중 HeLa cell에 H₂O₂만을 처리한 대조군보다 山藥을 함께 처리한 실험군에서 단백질 발현이 증가한 (Up-regulation) 단백질들은 Heat shock protein 27 (HSP27), Peroxiredoxin 1

(PRDX1), HCG2038743, Hypothetical protein, Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MAPK4), Mirror-image polydactyly 1 (MIPOL1), Beta actin (ACTB), Cell-division-cycle-like kinase 2 (CLK2P), BRCA1-associated RING domain protein (BARD1)의 9종이었다 (Table 1). 그리고 단백질 발현이 감소한 (Down-regulation) 단백질들은 Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29), Peroxiredoxin 3 (PRDX3), Chain A, Crystal Structure Of Native Plasminogen Activator Inhibitor-1(PAI-1), Nucleophosmin(NPM), Pyrophosphatase (inorganic) 2 (PPA2), Immunoglobulin mu heavy chain (IGHM), phosphofructokinase (PFK)의 7종이었다(Table 2).

분석된 16개의 단백질 중에서 PRDX3와 PRDX1은 직접적으로 H₂O₂에 의해 생성되는 세포내 ROS를 제거해주는 항산화 작용의 가장 중요한 단백질이다³¹⁾. 세포내에는 여러 종류의 PRDX가 존재하며 미토콘드리아, 세포핵, 세포질을 보호하는 작용을 하고 있다³²⁾. PRDX의 다른 이름은 Thioredoxin peroxidase라고 하여 Thioredoxin을 통해 세포내 ROS의 농도증가를 억제하는데 PRDX3는 미토콘드리아에서만 존재하며 미토콘드리아를 산화적 스트레스로부터 보호하고 PRDX1은 핵과 세포질에서 모두 존재하는데 특히 세포핵에서 ROS를 줄여주어서 산화적 손상으로부터 세포핵을 보호해 주는 작용이 있다^{33,34)}. 본 연구에서 HeLa cell에 H₂O₂만을 처리하였을 때와 비교하여 H₂O₂와 山藥을 함께 처리하였을 때 PRDX3은 감소하고 PRDX1은 증가하는 결과를 보여주었다. H₂O₂가 세포

독성을 나타내는 주요한 경로가 미토콘드리아 경로를 통하여 apoptosis를 일으키는 것임을 생각해 볼 때 H₂O₂만을 처리하였을 때 PRDX3이 발현된 것은 미토콘드리아의 손상을 막기 위한 HeLa cell의 자체적인 반응으로 보인다^{35,36}. 山藥의 처리로 PRDX1이 증가한 결과는 PRDX1의 활성화로 H₂O₂의 산화적 스트레스로부터 세포의 성장 및 분열에 중추적인 역할을 하는 세포핵을 보호하기 위한 것으로 볼 수 있다. 이는 PRDX1이 대표적인 항산화물질로 알려진 셀레늄을 통한 항산화작용보다 H₂O₂에 의한 손상에 대하여 더 효과적인 보호작용을 한다는 기존 연구를 참고해 볼 때³⁷ PRDX1의 활성화가 山藥의 항산화작용을 일으키는 주요한 기전으로 볼 수 있을 것이다.

HSP는 고온이나, 저산소/허혈상태 그리고 산화적 스트레스와 같은 외부 자극에 대하여 방어작용을 하는 단백질들이다³⁸. HSP27은 p38, JNK등과 같은 mitogen activated protein kinase들에 의해 일어나는 apoptosis를 억제하는 작용을 한다. 그리고 HSP는 thioredoxin의 작용을 통하여 세포내의 ROS의 생성을 감소시키기 때문에 이러한 기전으로 HSP27 분비의 증가가 대표적인 항암제인 paclitaxel로 인한 세포의 apoptosis를 억제한다^{39,40}. 이러한 기존의 연구들을 통하여 볼 때 H₂O₂와 山藥을 함께 처리하였을 때 HSP27의 분비의 증가는 HSP27이 山藥의 항산화 작용의 주요한 경로라는 것을 알 수 있다.

위에서 언급한 PRDX1, PRDX3, HSP27은 산화적 스트레스에 직접적으로 반응하는 환원관련 효소로서 여러 가지

암세포 주에서 H₂O₂의 산화적 스트레스에 반응하는 여러 단백질로 PRDX와 HSP27 등이 확인되었던 이전의 연구결과⁴¹⁻⁴³와 부합하는 결과이다. 그러므로 이러한 단백질들이 H₂O₂의 산화적 스트레스로부터 HeLa cell을 보호해주는 山藥의 항산화 효능의 가장 주요한 작용기전으로 생각된다.

ERp29는 Endoplasmic reticulum 즉 소포체에서 분비되는 단백질로서 단백질을 펴주거나(unfolding) 운반해주는(escort) 기능을 가지고 있다⁴⁴. 피부 기저세포암 세포에서 증가하는 것을 확인할 수 있으며⁴⁵, 산화적 스트레스에 소포체가 노출되었을 경우 발현이 증가되며 대표적인 환원작용을 가진 thioredoxin의 환원작용이 불활성화 된 형태라고 알려져 있다^{46,47}. 이러한 연구 결과들을 볼 때 H₂O₂를 처리하였을 때 ERp29의 발현이 증가되었다가 山藥을 함께 처리하였을 때 발현이 감소하는 것은 山藥의 항산화작용을 통하여 소포체에 대한 산화적 스트레스가 감소하였음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

PAI-1은 Extracellular matrix(ECM)의 조절에 중요한 역할을 하는 단백질로 PAI-1의 발현이 증가하면 폐섬유증과 같은 다양한 섬유성 질환을 유발하게 된다. H₂O₂와 같은 ROS에 의해 PAI-1의 발현이 증가하는 것으로 밝혀졌으나 그 자세한 기전은 명확하지 않다⁴⁸. HeLa cell에서 H₂O₂에 의해 발현되는 PAI-1이 H₂O₂와 山藥을 함께 처리하였을 때 감소하는 것은 山藥의 항산화작용을 증명해주는 결과라 할 수 있다.

ACTB는 세포의 운동성, 형태, 탐식성 등의 여러 기능에 주요한 역할을 하는

actin의 한 종류로서 actin은 actin filaments로 중합되어 기능하게 된다. HeLa cell을 이용한 연구에서 ACTB의 발현을 억제시켰을 때 HeLa cell에서는 cofilin이라는 actin 결합 단백질을 불활성화 시킴으로 actin구조의 변화를 초래하여 세포의 여러 기능을 저하시키는 결과를 나타내었다⁴⁹. 대표적으로 ACTB가 감소되면 세포막에 수포를 형성하는 변화를 초래하여 apoptosis가 일어나기 쉽게 된다⁵⁰. H₂O₂와 山藥을 함께 처리하였을 때 ACTB의 발현이 증가하는 것은 H₂O₂의 세포독성에 의해 손상된 세포구조가 재활성화 되기 위한 반응으로 볼 수 있으므로 山藥의 항산화 작용에 대한 간접적인 증거로 볼 수 있을 것이다.

CLK2P는 *Caenorhabditis elegans*라는 선충에서 유전적 변이에 대하여 연구가 많이 진행되던 단백질이다. CLK2P는 세포막의 기능을 조절하며 세포의 항상성을 유지하는데 단백질로 인체 세포에서 CLK2P의 발현이 증가하면 세포주기의 길이가 짧아지고 CLK2P를 억제하면 cell cycle arrest가 일어나게 된다. 그러나 이러한 세포 성장 및 분화를 촉진하는 작용 외에도 CLK2P가 세포를 산화적 스트레스에 의해 유발된 apoptosis에 민감하게 만들어준다는 사실이 확인되었다⁵¹. H₂O₂와 山藥을 함께 처리하였을 때 CLK2P의 발현의 증가는 산화적 스트레스에 대한 손상이 山藥의 항산화작용에 의해 방지되고 있음을 보여준다. 다만 CLK2P의 증가가 산화적 스트레스에 의한 apoptosis에 대한 민감성을 증가시키는 작용을 하므로 항암작용에도 어느 정도 관여할 것으로 보이므로 추후

연구가 더 필요하다.

PFK는 당분해 대사를 조절해주는 단백질로 알려져 있다. 정상적인 세포의 경우 당분해 과정보다는 인산화과정을 통하여 에너지 대사가 일어나게 되지만 HeLa cell과 같은 종양세포에서는 당분해 대사에 에너지 대사를 많이 의존하고 있다. PFK는 당대사의 비율을 조절하는 단백질로서 PFK의 발현이 증가하는 것은 당대사의 비율을 낮추고 HeLa cell에서 세포활성을 줄이고, 세포주기 지연 및 apoptosis를 일으키게 된다⁵². 이러한 PFK의 발현이 H₂O₂와 山藥을 함께 처리하였을 때 감소한 것은 HeLa cell의 생존율을 증가시킨 것으로 산화적 스트레스에 대한 보호효과의 결과로 보인다.

MAPK4, BARD1, NPM 등의 세가지 단백질은 모두 DNA 손상에 대하여 apoptosis를 일으키는 항암기전과 관련된 단백질이다. MAPK4는 외부 자극에 대하여 p38이나 JNK와 같은 MAPK계열의 단백들을 활성화하여 세포의 apoptosis를 일으키는 단백질이다⁵³. BARD1은 BRCA-1과 함께 작용하며 DNA손상에 대하여 유전자 전사를 억제하는 항암인자로 p53의 발현과도 관련이 있다⁵⁴. NPM은 p53의 안정화와 활성화에 관여하여 외부 자극시 세포를 apoptosis가 일어나게 만드는 항암인자로 알려져 있지만 발암인자로의 기능도 알려져 있어서 명확한 작용기전이 밝혀져 있지 않다⁵⁵. 본 연구에서 H₂O₂와 山藥을 함께 처리하였을 때 MAPK4와 BARD1은 발현이 증가하였지만 NPM은 발현이 감소하였다. 이는 천연물인 山藥이 단일 성분이 아닌 복합성분이기 때문인 것으로 보이며 半枝蓮과 함께 투여한 결과를 함께

생각해보면 山藥이 항산화를 통한 세포 보호작용 이외에도 항암작용도 일정부분 가지고 있는 것으로 생각해 볼 수 있다.

그 외에 HCG2038743, Hypothetical protein, MIPOL1, PPA2, IGHM 등의 단백질은 아직 그 작용기전이 명확히 밝혀져 있지 않다. MIPOL1의 경우 사지 기형인 다지증에서 많이 발현되는 것으로 알려져 있고⁵⁶⁾, PPA2의 경우에는 MAPK와 관련되어 있고 세포내의 여러 가지 대사에 관여하지만 명확한 기능이 밝혀져 있지 않다⁵⁷⁾. IGHM의 경우 유사한 형태인 Ig alpha heavy chain의 경우 세포 증식을 유발하고 특히 암세포의 증식능력을 증진시키는 것으로 알려져 있으나 IGHM의 경우 아직 연구가 되지 않은 상태다⁵⁸⁾. HCG2038743이나 Hypothetical protein의 경우도 아직 작용을 알 수 없는 단백질이다⁵⁹⁾.

이처럼 2DE와 MALDI-TOF 및 데이터베이스 검색을 통해 확인된 단백질 16종의 기능을 확인함으로써 山藥의 항산화 작용에 대한 검토한 결과 山藥은 PRDX1, PRDX3, HSP27과 같은 세포의 산화적 스트레스를 직접 줄여주는 환원작용 관련 단백질들의 활성과 관련하여 항산화 작용을 나타내는 것을 알 수 있었고 ERp29, PAI-1, ACTB, CLK2P, PFK 등의 활성변화를 통해서도 山藥의 항산화작용을 간접적으로 확인할 수 있었다. MAPK4, BARD1, NPM 등의 항암관련 단백질의 발현에서는 상반되는 결과를 보임으로서 천연물인 山藥의 항암기능에 대한 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 사료된다. 아직 작용기전을 알 수 없었던 단백질들의 기능에 대한 연구와 다른 세포조직에서의 추가적인

山藥의 항산화 기능 연구, 특히 山藥이 다용되고 있는 부인과 분야인 불임, 안태에 대해서 배아세포에 대한 山藥의 항산화 연구 등이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

HeLa cell에 H₂O₂를 통한 산화적 스트레스와 함께 山藥을 동시 처리하여 단백질체의 변화를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

H₂O₂만을 처리한 HeLa cell과 H₂O₂와 山藥을 동시 처리한 HeLa cell의 세포내 생성된 단백질체 분석을 시행한 결과, 16종의 단백질 변화를 확인하였으며 H₂O₂의 산화적 스트레스에 대한 항산화 작용이 PRDX1, PRDX3, HSP27 등의 산화환원관련 단백질들의 발현조절을 통하여 일어나는 것으로 확인하였다.

추후 기능이 아직 알려지지 않은 단백질에 대한 기능 분석과 다른 세포주를 이용한 山藥의 세포보호 효과에 대한 연구를 통하여 山藥의 항산화 작용에 대한 더 많은 정보를 확인할 수 있을 것으로 생각되며, 산약 이외의 다른 한약의 작용기전에 대한 연구에도 단백질체 분석이 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

□ 투 고 일 : 2008년 4월 25일

□ 심 사 일 : 2008년 4월 29일

□ 심사완료일 : 2008년 5월 10일

참고문헌

1. 이도희 등. 프로테오믹스 연구의 최근 동향 및 전망. 충남대학교 생물공학연구소 생물공학연구지. 2006;12(1):21-30.
2. 전국한외과대학 본초학교실. 본초학. 서울: 영림사. 1995;537.
3. McAnuff MA. et al. Hypoglycemic effects of steroidal saponins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoides*. Food Chem Toxicol. 2005;43(11):1667-1672.
4. Chen H. et al. Effects of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica* Thunb var. *pseudojaponica* Yamamoto) on upper gut function and lipid metabolism in Balb/c mice. Nutrition. 2003;19(7-8):646-651.
5. Kwon CS et al. Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. Biosci Biotechnol Biochem. 2003;67(7):1451-1456.
6. Hu K, Yao X. The cytotoxicity of methyl protodioscin against human cancer cell lines in vitro. Cancer Invest. 2003;21(3):389-393.
7. Hu K, Yao X. The cytotoxicity of methyl protoneograccillin (NSC-698793) and gracillin (NSC-698787), two steroidal saponins from the rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, against human cancer cells in vitro. Phytother Res. 2003;17(6):620-626.
8. Jing Cai. et al. Apoptosis induced by dioscin in Hela cells. Bio. Pharm. Bull. 2002;25(2):193-196.
9. Choi EM, Koo SJ, Hwang JK. Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). J Ethnopharmacol. 2004;91(1):1-6.
10. Kim MJ et al. Methanol extract of *Dioscoreae Rhizoma* inhibits pro-inflammatory cytokines and mediators in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. Int Immunopharmacol. 2004;4(12):1489-1497.
11. Yin J. et al. Antiosteoporotic activity of the water extract of *Dioscorea spongiosa*. Biol Pharm Bull. 2004;27(4):583-586.
12. 전영준 등. 山藥의 Hela cell 분화에 미치는 영향과 항산화효과에 대한 연구. 대한한방부인과학회지. 2007;20(2):139-154.
13. 남주영 등. 安胎에 활용되는 山藥의 신경세포주에 대한 안전성 및 항산화 효과에 대한 연구. 대한한방부인과학회지. 2006;19(4):61-76.
14. 김산용. 山藥의 GC-1 spg cell에 대한 항산화효과. 서울; 경희대학교 대학원. 2006.
15. Gharahdaghi F et al. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. Electrophoresis. 1999;20(3):601-605.
16. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2000;29:323-333.
17. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunol Today. 1994;15:7-10.

18. Fang J, Nakamura H, Iyer AK. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target.* 2007;15(7):475-486
19. Finkel T. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 2000;476:52-54.
20. Muller I et al. Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin-apoptosis and oxidative DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;230:254-257.
21. Devary Y et al. The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src Tyrosine kinases. *1992;71:1081-1091.*
22. Bender K et al. UV-induced signal transduction. *J Photochem Photobiol.* 1997;37:1-17.
23. 임진석. 本經疎證. 서울: 아티전. 1998;79.
24. 許俊. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂. 1998;1182.
25. 楊東喜. 本草備要解析. 서울: 醫聖堂. 1993;491.
26. 김성란, 정진홍, 유동열. 安奠二天湯을 중심으로 한 胎漏 및 胎動不安의 文獻的 考察. 大田大學校韓醫學研究所 論文集. 1998;7(1):607-624.
27. 김호철. 한약약리학. 서울: 집문당. 2001;432.
28. He QY, Chiu JF. Proteomics in biomarker discovery and drug development. *J Cell Biochem.* 2003; 89(5):868-886.
29. Wang Y, Chiu JF, He QY. Proteomics approach to illustrate drug action mechanisms. *Curr Drug Discov Technol.* 2006;3(3):199-209.
30. Ying Wang et al. Proteomic approach to study the cytotoxicity of dioscin (saponin) *Proteomics.* 2006;6:2422-2432.
31. Woo, H. A. et al. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science.* 2003;300:653-656.
32. Banmeyer, I. et al. Human mitochondrial peroxiredoxin 5 protects from mitochondrial DNA damages induced by hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 2005;579:2327-2333.
33. Jason M. et al. Nuclear and cytoplasmic peroxiredoxin-1 differentially regulate NF- κ B activities. *Free Radical Biology & Medicine.* 2007;43:282-288.
34. Rhee, S. G. Chae, H. Z. Kim, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 2005;38:1543-1552.
35. Singh M, Sharma H, Singh N. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion.* 2007;7(6):367-373.
36. Sudit S. et al. Defective mitochondrial peroxiredoxin-3 results in sensitivity to oxidative stress in Fanconi anemia. *The Journal of Cell Biology.* 2006;175(2):225-235.
37. Margareta I. et al. Thioredoxin Peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) Is Increased in Thioredoxin-1 Transfected Cells and Results in Enhanced Protection against Apoptosis Caused

- by Hydrogen Peroxide but Not by Other Agents Including Dexamethasone, Etoposide, and Doxorubicin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001;392(1):103-109.
38. Jun Hye Kwon et al. Protective effect of heat shock protein 27 using protein transduction domain mediated delivery on ischemia/reperfusion heart injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;363:399-404.
39. Shao Chin Lee et al. Dominant negative Rac1 attenuates paclitaxel-induced apoptosis in human melanoma cells through upregulation of heat shock protein 27: A functional proteomic analysis. *Proteomics*. 2007;7(22):4112-4122.
40. Zhang Y, Shen X. Heat shock protein 27 protects L929 cells from cisplatin-induced apoptosis by enhancing Akt activation and abating suppression of thioredoxin reductase activity. *Clin Cancer Res*. 2007;13(10):2855-2864.
41. Baty JW, Hampton MB, Winterbourn CC. Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells. *Biochem J*. 2005;389(3):785-795.
42. Seong JK et al. Proteomic analysis of the cellular proteins induced by adaptive concentrations of hydrogen peroxide in human U937 cells. *Exp Mol Med*. 2002;34(5):374-378.
43. Ha MK et al. Proteomic analysis of the proteins expressed by hydrogen peroxide treated cultured human dermal microvascular endothelial cells. *Proteomics*. 2005;5(6):1507-1519.
44. Rainey-Barger EK, Mkrtchian S, Tsai B. Dimerization of ERp29, a PDI-like protein, is essential for its diverse functions. *Mol Biol Cell*. 2007;18(4):1253-1260.
45. Cheretis C et al. Expression of ERp29, an endoplasmic reticulum secretion factor in basal-cell carcinoma. *Am J Dermatopathol*. 2006;28(5):410-412.
46. Mkrtchian S, Sandalova T. ERp29, an unusual redox-inactive member of the thioredoxin family. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(3-4):325-337.
47. Paul Dowling et al. Proteomic screening of glucose-responsive and glucose non-responsive MIN-6 beta cells reveals differential expression of proteins involved in protein folding secretion and oxidative stress. *Proteomics*. 2006;6:6578-6587.
48. Liu RM. Oxidative Stress, Plasminogen Activator Inhibitor 1, and Lung Fibrosis. *Antioxid Redox Signal*. 2007;2:303-319
49. Ning Liu et al. Actin Deficiency Induces Cofilin Phosphorylation: Proteome Analysis of HeLa Cells After β -Actin Gene Silencing. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2007;64:110-120.
50. Harborth J. et al. Identification of essential genes in cultured mammalian

- cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci.* 2001;114:4557-4565.
51. Jiang N. et al. Human CLK2 links cell cycle progression, apoptosis, and telomere length regulation. *J Biol Chem.* 2003;278(24):21678-21684.
52. Calvo MN. et al. PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Lett.* 2006;580(13):3308-3314.
53. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer. *Oncogene.* 2007; 26(22):3172-3184.
54. Kim HS. et al. DNA damage-induced BARD1 phosphorylation is critical for the inhibition of messenger RNA processing by BRCA1/BARD1 complex. *Cancer Res.* 2006;66(9):4561-4565.
55. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(7):493-505.
56. Kondoh S. et al. A novel gene is disrupted at a 14q13 breakpoint of t(2;14) in a patient with mirror-image polydactyly of hands and feet. *J Hum Genet.* 2002;47(3):136-139.
57. Takahashi K, Inuzuka M, Ingi T. Cellular signaling mediated by calphoglin-induced activation of IPP and PGM. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325(1):203-214.
58. Zheng H. et al. Immunoglobulin alpha heavy chain derived from human epithelial cancer cells promotes the access of S phase and growth of cancer cells. *Cell Biol Int.* 2007;31(1):82-87.
59. De Jesus JB. et al. Application of two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for proteomic analysis of the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *J Mass Spectrom.* 2007;42(11):1463-1473.