

Original Articles

황련 열수추출물을 처치한 인간 대장암 세포 SNU-81에서의 단백질 발현 변화

유태모^{1*}, 김병수^{1*}, 유병철², 유화승^{3**}

1. 대전대학교 한의과대학
2. 국립암센터 연구소
3. 대전대학교 둔산한방병원 동서암센터

Received : 09. 02-14

Revised : 09. 02-20

Accepted : 09. 02-22

Key Words:

Coptis japonica, Colon cancer, Proteome, 2-DE, MALDI-MS

Monitoring the Change of Protein Expression in Human Colon Cancer Cell SNU-81 treated with the Water-Extract of *Coptis japonica*

Byung-Soo Kim^{1*}, Tae-Mo Yoo^{1*}, Byong-Chul Yoo², Hwa-Seung Yoo^{3**}

1. College of Oriental Medicine, Daejeon University
2. Research Institute, National Cancer Center
3. East-West Cancer Center, Dunsan Oriental Medical Hospital, Daejeon University

ABSTRACT

Background : Anticancer effects of herbal medicine have been reported in various types of cancer, but the systematic approaches to explain molecular mechanism(s) are not established yet.

Objective : To find the anticancer-effect and mechanism(s) of Water Extract of *Coptis japonica* (WECJ) colon cancer cell (SNU-81).

Methods : We first selected 11 herbals, and anti-cancer effects of water-extracts from those herbals have been tested in human colon cancer cell line, SNU-81. Among the tested herbals, the WECJ significantly reduced proliferation of SNU-81. To establish a basis of understanding for anti-cancer mechanism, whole proteins have been obtained from SNU-81 harvested at 48 and 96 hrs after the treatment of WECJ, protein expression has been profiled by 2DE-based proteomic approach.

Results : Various changes of the protein expression have been monitored, and most frequent dysregulation was found in the molecular chaperons including heat shock protein 90-alpha (Hsp90-alpha), 14-3-3 protein epsilon, T-complex protein 1 subunit alpha, protein disulfide-isomerase A3, and calreticulin. Interestingly, proliferation-associated protein 2G4 has been up-regulated, and it suggests the possible effect of *Coptis japonica* on ErbB3-regulated signal transduction pathway and growth control of human colon cancer cells.

Conclusion : Based upon the present findings, the further study will focus on monitoring various cancer survival factors after artificial regulation of the proteins identified, and it would be the basis for the understanding of the *Coptis japonica* anti-cancer effect(s) at the molecular level.

I. 서론

한약에 의한 다양한 암세포에 대한 면역증강과 항암효과에 널리 연구되어 왔다¹⁾. 하지만 한약의 구체적인 작용에 대한 분자생물학적 메커니즘은 명확히 설명되지 않고 있다.

특히 황련(*Coptis japonica*)은 한의학에서 열을 내리고 습을 제거하는 효능으로 이질과 황달 치료에 이용하였

으며, 왕성한 화기와 체내의 독성물질을 제거함으로써 유행성 열병, 오저, 인후염 치료에 사용되었다²⁾. 한약은 광범위한 항균효과와 항생효과를 가지고 있다. 또한 항암제로서도 임상에서 응용되고 있다. 신생 혈관 형성의 억제로 설명되는 항암효과는 최근에 밝혀지고 있지만, 그럼에도 불구하고 황련의 항암효과를 설명하기 위한 메커니즘에

* Correspondence to: Hwa-Seung Yoo, East-west Cancer Center, Dunsan Oriental Hospital of Daejeon University, 1136 Dunsan-dong, Seo-Gu, Daejeon, Rep. of Korea
Tel:82-42-470-9132, Fax: 82-42-470-9006, E-mail: altyhs@dju.ac.kr

** These authors contributed equally to this work.

대한 연구는 부족하다. 비록 현재의 연구는 황련이 암의 성장과 신생혈관생성을 억제함을 보여주고 있지만, 이것의 항암제로서의 가치와 세포 메커니즘은 여전히 제한적이다³⁾.

생명과학의 발전에서 새로운 시대(포스트-게놈 시대)가 인간 게놈 프로젝트 이후 열렸다. 이 시대에 Proteomics 연구는 유전자에 의한 단백질의 생물학적 기능의 비밀을 밝히고 있다. 그리고 이러한 것들은 생명공학의 추진 및 응용 프로그램에서의 정확성과 효율성에 기여할 것이다. Proteomics 기술은 세포 또는 전체 조직의 기능, 조직, 다양성 그리고 역동적 다양성을 동시에 연구하는데 적용될 수 있다. 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. 최근의 발전에 결합하여 다차원 액체 색채분석(크로마토그래피), 자유유동 전기이동법과 모세관 전기영동-분리기법을 기반으로 한약을 수백 혹은 수천 개의 구성성분으로 나눌 수 있게 되었다⁴⁾. 세포와 분자측면에서 전통 동양의학의 복잡한 기전을 이해하는데 있어서 Proteomics의 도움은 전통 한의학을 현대화 및 국제화하는데 큰 의미가 있다⁵⁾. 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 해주었다⁶⁾.

본 연구에서는 한약의 항암효과를 분자생물학적 메커니즘을 통해 이해하기 위하여, 임상에서 대장암에 많이 활용되며 항암 효과가 있을 것으로 추정되는 한약재 수종의 열수 추출물을 인간 대장암세포 SNU-81에 처리하여 MTT assay를 진행한 결과, SNU-81의 성장을 가장 유의하게

감소시키는 효과를 보인 황련의 열수추출물(Water Extract of Coptis japonica, WECJ)을 연구대상으로 선정하였다. WECJ의 대장암 세포주에 대한 항암 메커니즘을 파악하기 위하여 처리 후 48시간, 96시간 이후의 SNU-81 세포의 단백질을 2-DE를 실시한 후, 변화된 단백질 발현을 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

2.1. 재료

황련(*Coptis japonica*, 수율 17.5%)을 대전대학교 둔산한방병원에서 구입하여 동결 건조시켰다. 동결 건조시킨 각 한약재를 10mg/ml의 농도로 PBS에 용해시킨 후 3,000 RPM으로 3분간 원심 분리시켜 상층액 1ml를 추출하여 냉장 보관시켰다. 인간 대장암 세포 SNU-81은 Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)에서 제공된 것으로 37°C, 5%, CO₂의 환경에서 r10배지를 이용하여 75cm² 플라스크에 담아 배양시켰다. Berberine sulfate는 씨그마 알드리치코리아에서 구매하였다.

2.2. 3- [4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay

96 well plate의 각각의 well에 1 × 10⁴개의 SNU-81 세포를 배양액과 함께 총 180μl가 되도록 하여 분주한 후 세포들의 부착을 위해서 24시간 동안 배양기에서 배양하였다. 그 후 각각의 한약재 추출물 (1,000μg/ml)을 각 well에 20μl씩 처리했으며, 8개 well은 대조군으로 사용하였다. shaking table을 이용하여 150 RPM, 5분간 섞은 후 45시간, 93시간 동안 배양기(37°C)에 넣어 배양하였다. 이후 MTT solution을 5mg/ml의 농도로 PBS에 희석시켜 각 well당 20μl씩 처리한 후 shaker를 이용하여 150 RPM, 5분간 섞어주었다. 3시간 동안 배양기 (37°C)에 넣어둔 후 450 × g (중력가속도 ≈ 9.8 m/s²)으로 5분간 원심 분리시켰다. 배양액을 Suction하고 200μl의 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

십여 종의 한약재의 유효한 세포 독성 효과를 알아보기 위하여 각 한약재 추출액을 1, 10mg/ml의 농도로 처리한 후 그 결과를 확인하였다. 두 번째 MTT assay는 그 중 유의미한 효과를 나타낸 황련 추출액 (Water-extract of *Coptis japonica*, WECJ)을 처리하여 농도별 (10, 100, 1,000 $\mu\text{g/ml}$) 세포 독성을 확인하였다. 또한 황련의 주요 성분으로 암세포에 세포 독성을 나타낸다고 알려진 Berberine (1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$)과 주요 항암제인 5-FU (2 μl)를 혼합하고, WECJ (1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$)와 5-FU (2 μl) 또한 혼합 처리하여 각각의 synergistic effect를 확인하였다.

2.3. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

일차 Isoelectric focusing (IEF)를 위하여 0.15mg의 단백질 샘플을 13cm immobilized (pH 3-10) nonlinear gradient strips (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에 적용시켜 상온에서 IEF를 시행하였다. IEF 조건은 50V에서 8,000V까지 도달하는데 8시간이 걸리게 하였으며, 이후 8,000V에서 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 이용하여 24시간 동안 염색한 후 deionized water를 이용하여 염색을 제거하였다.

염색된 이차원 젤은 스캔하여 컴퓨터에 저장하였으며, 질량 분석을 위한 소프트웨어는 Melanie 4 software (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland)가 사용되었다. 이상 발현된 단백질들은 matrix-associated 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 50ng trypsin (Promega, Madison, WI)을 함유한 3nmol/l Tris-HCL (pH 8.8)를 이용하여 reswelling하고 15분 후에 3 μl 의 물을 추가하였다. 제조된 시료 1microliter를 건조된 매트릭스 스팟에 적하하였다. 매트릭스는 15mg nitrocellulose (Bio-Rad) 와 20 μg alpha-cyano-4-hydroxycinnamic

acid (Sigma) 가 1ml acetone/isopropanol (1:1, v/v)에 녹여져 있는 성분으로 구성되어 있다.

MALDI-MS 분석은 QSTAR XL Hybrid liquid chromatography/tandem mass spectrometry system (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 20kV의 전압으로 행해졌다. 단백질 검색은 SWISS-PROT database에서 검색하였다.

III. 결과

3.1. WECJ의 농도별 SNU-81 인간 대장암 세포주에 독성 효과

WECJ를 10, 100, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 SNU-81 세포주의 생존율을 관찰하였다. 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의한 세포독성 효과가 나타났다 (Fig. 1).

3.2. Berberine, WECJ의 5-FU와의 synergistic effect에 의한 농도별 SNU-81 인간 대장암 세포주에 독성 효과

실험 결과 WECJ과 5-FU와의 유의한 synergistic effect는 발견되지 않았다. 또한 Berberine과의 유의한 synergistic effect 역시 발견되지 않았으며, 다만 Berberine과 5-FU 혼합 처리한 결과가 WECJ와 5-FU를 혼합 처리했을 때보다 세포 독성 효과가 적은 것으로 나타났다 (Fig. 2).

3.3. 2-DE에 의한 이미지 분석

WECJ의 세포 독성 효과가 어떠한 molecules에 작용하고 있는지 확인하기 위하여 2-DE를 진행하여 이미지를 분석하였다. Fig 3.은 아무런 처리를 하지 않은 대조군, WECJ 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 후 48시간 경과, WECJ 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 후 96시간이 경과된 실험군을 비교한 이미지이다. 대조군과 시험군의 2-DE를 통하여 얻은 이미지를 분석하여 변화가 있는 spot들이 발견되었다. 이 spot들을 추출하여 MALDI-MS를 시행하였다. 그 결과 Table 1.과 같은 단백질들로 판명되었다. 다양한 단백질의 변화가 발견되었는데, 특히 많은 변화를 일으킨 단백질은 Heat shock protein 90-alpha (Hsp 90-alpha), 14-3-3 protein epsilon, T-complex protein 1 subunit alpha, Protein disulfide-isomerase A3, and Calreticulin을 포함한 molecular chaperon 계열의

단백질들의 발현이 증가되었다는 것을 알 수 있었다. 또한 Proliferation-associated protein 2G4의 발현이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

IV. 고찰

한약은 수세기 동안 발전과 적용을 거듭하면서 다양한 질병을 치료해옴으로써 그 효과가 입증되었다. 특히 만성 소모성 질환과 대사성 질환, 면역성 질환에 있어서 예방과 치료 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다. 그러나 한약은 복잡한 화학 성분들의 작용 기전이 명확히 밝혀지지 않아 그 효과에 대한 인식이 저조한 실정이다. 하지만 Proteomics는 한약의 작용 기전에 대해 새로운 관점으로 접근할 수 있는 방법으로 최근 들어 한약 연구에 널리 이용되고 있다. 한약이 작용하는 target molecules는 Proteomics를 통해서 식별이 가능해졌고, 그를 통해서 해당 질환의 치료를 가능케 하는 생물학적 신호 전달 경로를 연구할 수 있게 되었다. 현재 보고된 바에 의하면 한약으로 구성된 처방전이 US-FDA가 치료 방법이 없다고 결론지은 간경화 말기에도 치료 효과가 있는 것으로 판명되었다. 그리하여 Proteomics를 이용하여 이 약물의 target molecules를 추적한 결과 치료에 있어서 중요한 작용을 하는 몇 가지 critical molecules가 있는 것을 밝힐 수 있었다. 이 critical molecules는 향후 신약 개발과 유전자 치료의 주요 target으로써 큰 가치를 지니고 있다⁷⁾.

이러한 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 유도의 효과를 나타내는 것으로도 밝혀져 있다⁸⁾.

많은 한약재 중에서도 황련(*Coptis japonica*)은 특히 항암 효과가 우수한 것으로 알려져 수세기 동안 동북아시아에서 악성종양 치료를 목적으로 널리 이용되어져 왔다. 이러한 황련의 주요 구성 성분인 Berberine은 human hepatoma Hep G2 cells에서 GR receptors의 발현을 억제하고⁹⁾, 인간 대장암 세포에서 COX-2의 전사 작용을 방해함으로써 항암 효과가 나타난다는 연구 결과가 보고되었다¹⁰⁾. 또한 WECJ는 SNU-668 인간 위암 세포에서

caspase3의 작용을 통하여 apoptosis를 유발하는 효과를 나타낸다고 알려져 있으며¹¹⁾, 인간 유방암 세포에서 에스트로젠 리셉터 저해제의 항암 효과를 증진시킨다는 보고가 있었다¹²⁾.

이처럼 황련이 암세포에 유효한 항암 효과가 있는 것으로 보고된 바, 이번 연구는 인간 대장암세포 SNU-81에 대한 황련의 성장억제효과와 현대의학에서 사용되고 있는 항암제(5-FU)와의 synergistic effect의 가능성, 그리고 분자생물학적 메커니즘을 밝히기 위해 실시하였다.

1, 10mg/ml의 농도에서 WECJ는 현재 항암제로서 통용되고 있는 다른 한약재들에 비해 SNU-81에 뛰어난 세포독성을 보였기에, WECJ를 선별하여 10, 100, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 로 다시 농도를 세분화하여 진행한 MTT assay에서도 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 SNU-81의 생존율이 대조군에 비해 약 59.2%로 감소하는 결과를 얻을 수 있었다.

황련의 주요 색소 성분이자 약물성분인 Berberine과 WECJ를 각각 5-FU와 같이 SNU-81에 처리한 결과에서는 Berberine과 WECJ 모두 5-FU와의 synergistic effect는 나타나지 않았다.

다음으로, 황련의 SNU-81에 대한 성장 억제효과에 대한 메커니즘을 밝히기 위해 WECJ를 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 SNU-81에 처리하여 48시간, 96시간 후의 단백질 변화를 2-DE 이미지 분석을 통해 확인하였다. 2-DE는 1차 IEF를 통하여 같은 등전점을 가지는 단백질을 분류하고, 두 번째로 분자량에 따라 분리함으로써 전체 단백질의 변화를 한 번에 비교하고 차이가 나는 단백질이 무엇인지를 알 수 있는 방법이다.

대조군과 WECJ 처리 후 48시간, 96시간에 보인 spot을 찾아 MALDI-MS로 확인한 결과 Heat shock protein 90-alpha (HSP 90-alpha), 14-3-3 protein epsilon, T-complex protein 1 subunit alpha, Protein disulfide-isomerase A3, 그리고 Calreticulin을 포함한 molecular chaperon 계열 단백질들의 발현이 증가되었으며, 특히 proliferation-associated protein 2G4의 발현이 증가하였다.

여러 molecular chaperon들이 관찰이 되었는데 첫 번째로 Heat shock protein (HSP)은 온도가 상승하거나 또는 다른 스트레스가 작용하는 상황에 세포가 노출되었을 때, 발현하는 단백질이다¹³⁾. HSP는 각각의 molecular weight에 따라 HSP 60, HSP 70, HSP 90으로 표현되며¹⁴⁾, 이 중 HSP 90이 WECJ를 처리한 SNU-81에서 나타났다. HSP는 감염, 세포에 독소로서 작용하는 물질에

의 노출, 기아, hypoxia, 수분 결핍과 같은 스트레스 상황에서 발현이 증가하며¹⁵⁾, partially unfolded proteins을 안정화되도록 도와, 단백질이 세포막을 통과하여 세포 안으로 들어갈 수 있도록 돕는 molecular chaperon의 역할을 한다¹⁶⁻¹⁷⁾. HSP 90은 다양한 종류의 oncogene products와 cell-signaling molecules의 key regulator로서, 스트레스로 인한 세포 손상을 막기 위해 세포의 안정화를 위해 핵심적인 역할을 하는 단백질이다. 방사선요법과 화학요법으로 HSP 90을 억제함으로써 암의 치료효과를 얻을 수 있다¹⁸⁾. 두 번째로 14-3-3 protein은 비특이적이며, 도처에 편재하여 나타나는 단백질 군으로 7개의 isoform (beta, epsilon, gamma, eta, theta, sigma, and zeta)이 밝혀졌다. 200개가 넘는 target molecules를 가지며 대사 조절, cell cycle, apoptosis, protein trafficking, transcription, stress responses, malignant transformations 등 일련의 단계적인 반응에 관여한다¹⁹⁾. 세 번째, T-complex protein 1 subunit alpha는 아직 molecular target은 밝혀지지 않았지만, 진핵생물의 cytosol에서 새롭게 전사된 단백질을 folding하고, actin과 tubulin의 생합성에 관여하는 molecular chaperone이다²⁰⁻²¹⁾. 네 번째로 Protein disulfide-isomerase A3은 endoplasmic reticulum에 존재하여 단백질에서 -s-s- bond의 재배열을 촉진하는 역할을 한다²²⁾. 마찬가지로 molecular chaperon 중의 하나인 Calreticulin은 misfolded proteins에 결합하여, 이들이 Endoplasmic reticulum에서 Golgi apparatus로 나가는 것을 방해한다. 그리고 세포 핵에서도 발견되는 것으로 보아, 세포 전사의 조절에도 일정한 역할을 한다는 것을 알 수 있다²³⁾. Calreticulin의 pre-apoptotic exposure는 항암 치료에서 나타나는 항암면역 반응 중 하나라고 밝혀져 있다²⁴⁾.

proliferation-associated protein 2G4가 촉진되었다는 것을 통해 WECJ가 대장암세포에 대해 ErbB3-regulated signal transduction pathway와 growth control에 관여하여, 암세포의 성장을 조절할 수 있다는 가능성을 확인하였다²⁵⁾.

이상의 결과로부터 앞으로의 연구는 molecular level에서 WECJ의 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 대장암 세포 SNU-81에 투여된 WECJ의 항암 효과를 알아보기 위하여 진행되었으며 결과는 다음과 같다.

1. WECJ는 SNU-81의 성장을 저해하는 유효한 효과를 지니고 있었다.

2. SNU-81에서의 5-FU와 WECJ, 5-FU와 Berberine 혼합물 투여는 synergistic effect를 나타내지 않았다.

3. WECJ는 Heat shock protein 90-alpha (HSP 90-alpha), 14-3-3 protein epsilon, T-complex protein 1 subunit alpha, Protein disulfide-isomerase A3, 그리고 Calreticulin와 같은 다양한 molecular chaperon의 발현을 조절함으로써 단백질의 결합과 배열에 관여함을 알 수 있었다.

4. Proliferation-associated protein 2G4의 발현이 촉진된 것으로 보아 WECJ는 SNU-81의 signal transduction pathway와 growth control에 관여하여 SNU-81의 성장에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

이상에서 WECJ는 SNU-81의 성장을 억제하여 항암 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Koo, H.N., H.J. Jeong, I.Y. Choi, H.J. An, P.D. Moon, S.J. Kim, S.Y. Jee, J.Y. Um, S.H. Hong, S.S. Shin, D.C. Yang, Y.S. Seo and H.M. Kim. Mountain grown ginseng induces apoptosis in HL-60 cells and its mechanism have little relation with TNF-alpha production. *Am. J. Chin. Med.* 2007;35:169-182.
2. M. Ou. Chinese-English manual of common-used traditional medicine, Guangdong Science and Technology Publishing House, Guangzhou, 548-549, 1992.
3. Wang S, Zheng Z, Weng Y, Yu Y, Zhang D, Fan W, Dai R, Hu Z. Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. *Life Sci*, 2004;74(20):2467-2478,
4. Gao, M., C. Deng, S. Lin, F. Hu, J. Tang, N. Yao and X. Zhang. Recent developments and contributions from Chinese scientists in multi-dimensional separations for proteomics and traditional Chinese medicines. *J. Sep. Sci.* 2007;30:785-791.
5. Wen, J.K. and M. Han. Application of genomics and proteomics in study of traditional Chinese medicine. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2004;2:323-325.
6. Cho WC. Application of proteomics in Chinese medicine research. *Am J Chin Med.* 2007;35(6):911-922
7. Kang YJ. Herbogenomics: from traditional Chinese medicine to novel therapeutics. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(9):1059-1065.
8. Liu CB, Chen AH, Ding YJ, Jin HY, Seow-Choen F. The role of traditional Chinese medicine in colorectal cancer treatment. *Tech Coloproctol.* 2008 Mar;12(1):1-6; discussion 6.
9. Chi CW, Chang YF, Chao TW, Chiang SH, P'eng FK, Lui WY, Liu TY. Flowcytometric analysis of the effect of berberine on the expression of glucocorticoid receptors in human hepatoma Hep G2 cells. *Life Sci.* 1994;54(26):2099-2107.
10. Fukuda K, Hibiya Y, Mutoh M, Koshiji M, Akao S, Fujiwara H. Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 1999 Aug;66(2):227-233.
11. Park HJ, Kim YJ, Leem K, Park SJ, Seo JC, Kim HK, Chung JH. Coptis japonica root extract induces apoptosis through caspase3 activation in SNU-668 human gastric cancer cells. *Phytother Res.* 2005 Mar;19(3):189-192.
12. Liu J, He C, Zhou K, Wang J, Kang JX. Coptis extracts enhance the anticancer effect of estrogen receptor antagonists on human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jan;378(2):174-178.
13. De Maio A. "Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams". *Shock (Augusta, Ga.)* 11 (1): 1-12. 1999
14. Li Z, Srivastava P. Heat-shock proteins. *Current protocols in immunology.* edited by John E. Coligan et al. Appendix 1: Appendix 1T, 2004.
15. Santoro MG. h Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical pharmacology* 2000;59(1):55-63.
16. Walter S, Buchner J. Molecular chaperones cellular machines for protein folding. *Angewandte Chemie (International ed. In English).* 2002;41(7):1098-1113,
17. Borges JC, Ramos CH. Protein folding assisted by chaperones. *Protein and peptide letters.* 2005;12(3):257-261.
18. Ito A, Saito H, Mitobe K, Minamiya Y, Takahashi N, Maruyama K, Motoyama S, Katayose Y, Ogawa JI. Inhibition of heat shock protein 90 sensitizes melanoma cells to thermosensitive ferromagnetic particle-mediated hyperthermia with low Curie temperature. *Cancer Sci.* 2009 Jan 14.[Epub ahead of print]

19. Shankardas J, Senchyna M, Dimitrijevič SD. Presence and distribution of 14-3-3 proteins in human ocular surface tissues. *Mol Vis*. 2008;14:2604-15. Epub 2008 Dec 31.
20. [Http://www.uniprot.org/uniprot/P17987](http://www.uniprot.org/uniprot/P17987)
21. Yaffe MB, Farr GW, Miklos D, Horwich AL, Sternlicht ML, Sternlicht H. TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature*. 1992 Jul 16;358(6383):245-248.
22. [Http://rat.embl.de/rat/P115/P11598.htm](http://rat.embl.de/rat/P115/P11598.htm)
23. [Http://en.wikipedia.org/wiki/Calreticulin](http://en.wikipedia.org/wiki/Calreticulin)
24. Kepp O, Tesniere A, Schlemmer F, Michaud M, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis*. 2009 Jan 15. [Epub ahead of print]
25. [Http://expasy.org/uniprot/P50580](http://expasy.org/uniprot/P50580)

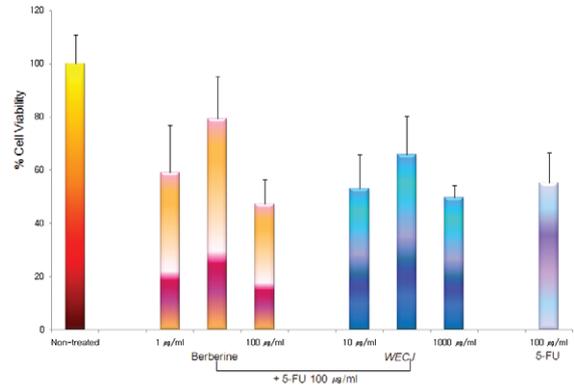


Fig. 2. Viability SNU-81 in the presence of WECJ, 5-FU and Berberine [The major constituent of *Coptis japonica*]. SNU-81 cells (1×10^4) were seeded into 96 well plate and cultured for 24 h. The cells were treated with Berberine (1, 100 µg/ml) and 5-FU (100 µg/ml). Another cells were treated with WECJ (Water-extract of *Coptis japonica* 1, 100 µg/ml) and 5-FU (100 µg/ml). There was no significant synergistic effect in the two experiments compared with those treated with 5-FU only.

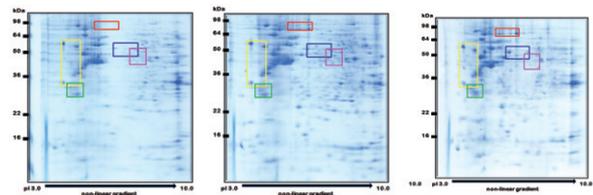


Fig. 3. Image analysis by Two-dimensional gel electrophoresis. Various changes of the protein expression in boxes have been monitored.
 A. Non-treated SNU-81
 B. 48 hours after treatment of WECJ
 C. 96 hours after treatment of WECJ

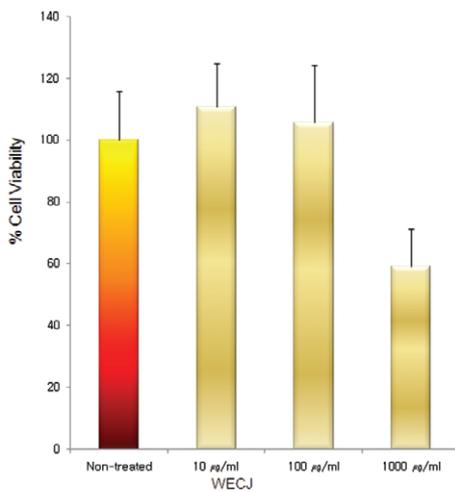


Fig. 1. Viability of SNU-81 in the presence of 10, 100, 1,000 µg/ml concentration of WECJ. SNU-81 cells (1×10^4) were seeded into 96 well plate and cultured for 24 h. The cells were treated with WECJ [Water-extract of *Coptis japonica* 10, 100, 1,000 µg/ml].

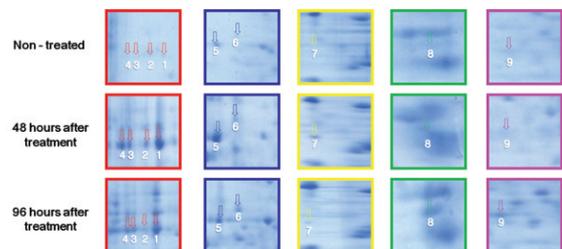


Fig. 4. Comparison of non-treated and 48 h after treatment, 96 h after treatment's expanded image of protein expression in gel. No. 1-4 are Heat shock protein 90-alpha (HSP 90-alpha). No. 5 is Protein disulfide-isomerase A3. No. 6 is T-complex protein 1 subunit alpha. No. 7 is Calreticulin. No. 8 is 14-3-3 protein epsilon. No. 9 is Proliferation-associated protein 2G4.

Table 1. Changed protein expression in SNU-81 treated with WECJ

No.	Protein Accession No.	Full name of Protein	protein Expression ^{a)}		Function	Mr(Da)	pI observed	MALDI-MS	
			48 h	96 h				Peptide matched	Protein Score
1	P07900	Heat Shock protein 90 alpha (HSP 90-alpha)	Up	Up	Molecular chaperone	84660	6.5	15	109
2	P07900	Heat Shock protein 90 alpha (HSP 90-alpha)	Up	Up	Molecular chaperone	84660	6.3	15	136
3	P07900	Heat Shock protein 90 alpha (HSP 90-alpha)	Up	Up	Molecular chaperone	84660	6.1	15	54
4	P07900	Heat Shock protein 90 alpha (HSP 90-alpha)	Up	Up	Molecular chaperone	84660	6	15	70
5	P30101	protein disulfide-isomerase A3	Up	Up	Rearrangement of s-s-bonds	56782	6.3	15	172
6	P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	NC ^{b)}	Up	Molecular chaperone	60344	6.8	15	62
7	P27797	calreticulin	Up	Up	control Molecular calcium binding chaperone	48142	4	16	126
8	P62258	14-3-3 protein epsilon	Up	Up	Molecular chaperone	29174	4.5	15	186
9	Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4	Up	Up	ERBB3-regulated signal transduction pathway	43787	7.2	10	59

a) Protein Expression : The expression compared to control

b) NC : Not Changed