



## HeLa 암세포주에 대한 국산 프로폴리스의 독성 효과 및 단백질 발현 변화

김성국, 우순옥\*, 한상미, 김세건, 방경원, 김효영, 최홍민, 문효정

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

## Cytotoxic Effect and Protein Expression by Korean Regional Propolis on HeLa Ovarian Cancer Cell Line

Sung-Kuk Kim, Soon Ok Woo\*, Sang Mi Han, Se Gun Kim, Kyung Won Bang, Hyo Young Kim, Hong Min Choi and Hyo Jung Moon

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea

### Abstract

We investigated the anti-tumor effects and molecular mechanism of Brazil, China and Korean regional propolis on HeLa ovarian cancer cell line. Each propolis extracts was prepared by ethanol extraction method. Cytotoxicity of propolis extracts was determined by EZ-cytox cell viability assay. To necessity of anti-tumor effect and molecular mechanism of propolis, we must be adjusting propolis concentration. Due to 100 µg/mL of propolis extract were reduced cell viability to less than 50%, we adjusted all of propolis concentration to 100 µg/mL. By Western blotting analysis, we confirmed that anti-tumor mechanism of Brazil, China and Korea regional propolis has significantly difference. All of propolis was activated apoptosis related molecules such as PARP, caspase-3. However, cell proliferation signaling molecules including Akt1, ERK and Bcl-2 were reduced the protein expression level. Especially, the expression of tumor suppressor protein p53 was significantly increased in propolis-treated group such as Gyeonggi, Chungbuk, Chungnam, Jeonbuk, Gyeongnam and China. The phosphorylation of Bax which as apoptosis indicator was appeared in propolis-treated group such as Gyeonggi, Gangwon, Chungnam, Gyeongbuk, China. In this results showed that the regional propolis has completely different mechanism in anti-tumor. Thus, propolis extracts may be useful source of functional materials on anti-cancer and it will be able to choose the suitable propolis for cancer therapy by analyzing individual characteristics.

### Keywords

Propolis, Anti-cancer, Cytotoxicity, Western blot, Apoptosis

## 서론

프로폴리스는 꿀벌이 자신들의 서식지인 벌집을 보호하기 위해서 나무, 꽃, 잎과 같은 다양한 수목에서 채취한 물질에 타액을 혼합하여 만드는 암갈색을 띠는 수지성 물질이다. 프로폴리스는 꿀벌이 알을 낳을 방을 얇게 코팅하여 무균실로 만들고, 벌통 내부의 잔해를 부패하지 않게 하기

위해 사용되며, 벌통 내부의 미생물 성장도 억제하는 것으로 알려져 있다(Ghisalberti, 1979; Greenaway *et al.*, 1990). 이런 특성으로 인해 민간에서는 기원전 300년경부터 상처 치료 등에 이용되어 왔다. 프로폴리스는 꿀벌이 수집하는 식물 수지의 종류와 계절의 특성에 영향을 받기 때문에 매우 다양한 구성물질을 함유하고 있다(Marcucci, 1995; Bankova *et al.*, 2000; Pietta *et al.*, 2002; Silici and Kutluca,

2005). 이 구성물들은 생물학적 가능성을 가진 플라보노이드와 폴리페놀 성분으로 주로 구성되어 있어 이들로 인해 다양한 생리활성 효과를 가진다(Bors *et al.*, 1990; Heim *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 2002). 다수의 연구에 의하면 이들 화합물로 인해 프로폴리스는 항균(Park *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 1999; Koo *et al.*, 2000), 항산화(Pascual *et al.*, 1994; Basnet *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 2000), 항바이러스(Marcucci, 1995; Kujumgiev *et al.*, 1999; Vynograd *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001), 면역조절(Wang *et al.*, 1993; Khayyal, 1993; Ledon *et al.*, 1997; Sforzin, 2007; Kim *et al.*, 2018) 그리고 항암(Scheller *et al.*, 1989; Marcucci, 1995; Kimoto *et al.*, 1998; Aso *et al.*, 2004) 등 다양한 생리활성 효과를 나타내고 있다.

프로폴리스를 이용하기 위해서는 꿀벌 서식지로부터 수집한 프로폴리스 원료로부터 밀랍, 왁스와 같은 불필요한 성분을 제거하고 순수한 프로폴리스만을 얻어내야 한다. 이 과정에서 프로폴리스 유효성분의 활성이 유지된 상태로 추출해야 하는데, 이를 효과적으로 추출하기 위해서 에탄올, 에테르, 글리콜 등의 용매를 이용한 추출법이 이용되고 있다(Woo *et al.*, 2015). 최근 용매로 추출하는 방식 외에 물로 추출하는 수용성 프로폴리스 추출법도 보고되고 있다(Nagai *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2005). 프로폴리스 성분의 활성이나 추출 수율에 대한 연구가 계속 진행되고 있으며, 아직까지는 에탄올 용매에 의한 추출법이 주를 이루고 있다.

위와 같이 추출된 프로폴리스는 현재 다양한 산업 및 의학 분야에 적용되고 있는데, 박테리아 및 곰팡이 생장 저해를 이용한 화장품 개발이 주를 이루고 있고(Lejeune *et al.*, 1988), 항산화 특성을 적용한 식품 보존과 부패 방지에도 이용되고 있다(Donadieu, 1979; Mizuno, 1989). 의학 분야에서는 내외과 분야에 가릴 것 없이 광범위하게 적용되고 있으며(Krell, 1996), 특히 최근에는 면역조절에 대한 프로폴리스의 특성이 연구되면서 항염증에 대한 프로폴리스의 기능적 효과가 분자 수준에서 조절되어짐이 밝혀졌다(Kim *et al.*, 2018).

암은 세계적으로 매년 약 7백만 명이 사망하는 대표적인 난치성 질병이다. 암은 발병할 시 전이에 의한 암세포의 체내 이동으로 인해 완치되기 어려운 질병이다. 현재 암을 치료하는 방식은 대표적으로 외과적 수술로 암 조직을 제거하는 방법이 있으며, 그 외에도 화학, 면역 그리고 방사선 치료 등을 병행하여 치료를 시도하고 있다(Birt *et al.*,

2001). 타 조직에 대한 전이 및 침윤성으로 대표되는 암은 치료뿐만 아니라 항암제와 같은 신약 개발에 있어서 주된 표적이 된다. 그러나 새로이 개발된 약물의 경우 부작용이 강하고 환자에 따라 동일한 조직에서 암이 발병된다 하더라도 환자의 신체 상태 및 경과도에 따라 약물의 작용이 다르게 나타날 수 있다. 또한 암 종에 따라서도 동일한 항암제를 적용할 수 없기 때문에 그 사용은 매우 제한적일 수 밖에 없다. 따라서 오늘날에는 치료에 의해 암에 의한 사망률을 줄이는 것 뿐 만이 아니라, 암 발병 자체를 막는 예방적 차원에서의 치료를 중시하고 있다(Waladkhani and Clemens, 1998; Orsolich and Basic, 2003; Pan *et al.*, 2005; Pan and Ho, 2008). “Chemoprevention”은 현대 의학에서 물질에 따른 암 예방의 중요성을 나타내는 것이며 이는 치료가 아닌 약리적 도입을 통해 암의 발병을 차단하기 위한 것으로서 자연에서 존재하는 천연물이나 화학적으로 합성된 약물을 통해 예방을 이루게 된다(Tsao *et al.*, 2004; Orsolich *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2007). 최근 인공적으로 합성된 약물에 의해서는 그 부작용이 보고되면서 천연물을 사용한 암 예방이 특별한 관심을 끌고 있다.

프로폴리스는 꿀벌에 의해 제조된 천연물로서 식이가 가능하고 성분들에 의한 가능성이 알려져 있기 때문에 주된 관심을 받고 있다(Burdock, 1998). 그러나 항암과 관련된 프로폴리스의 기능은 다른 연구들에서도 언급되어지고 있으나, 아직까지 항암과 관련된 구체적인 분자생물학적 메커니즘은 제대로 연구되어 있지 않은 실정이다. 특히 우리 나라는 지역별로 구성된 수목 생태계의 차이가 크기 때문에 각 지역에서 생산되는 프로폴리스의 기능에서도 차이가 발생한다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 생산되는 프로폴리스를 지역별로 구분하고 이를 HeLa 암 세포주에 적용하여 암세포주에 대한 독성효과를 확인하고 항암에 대한 단백질 발현 변화를 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 프로폴리스 수집

프로폴리스 시료는 국내 양봉 농가로부터 수집한 원료를 이용하였으며, 수집 지역은 경기, 강원, 충남, 충북, 전북, 전남, 경북, 경남, 제주의 국내 9개 지역과 브라질과 중국 2개국의 프로폴리스를 포함한 총 11개 지역의 프로폴

리스를 실험에 이용하였다.

## 2. 프로폴리스 추출

각 지역별 프로폴리스의 원괴 3 g을 정량하여 각각 30 mL의 80% 에탄올을 첨가하여 48시간 동안 실온에서 추출하였다. 추출물은 부직포로 1차 여과한 다음, Whatman No. 2 필터로 2차 여과하여 잔여물을 제거하였다. 각 지역별 추출물은 질소 농축 장치에서 1차 농축한 이후 감압 농축 장치에서 용매를 완전히 제거하였다. 농축된 지역별 프로폴리스의 수율을 측정하는 후, 에탄올을 100 mg/mL의 농도가 되도록 첨가하여 실험에 사용하였는데, 세포에 프로폴리스 추출물을 처리할 때는 0.2 µm의 syringe filter에 여과하여 무균 상태에서 사용하였다.

## 3. Media and Reagents

세포주 배양을 위한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)은 Gibco (U.S.A.)사의 배지를 구입하여 사용하였으며, fetal bovine serum (FBS, GenDEPOT, Korea)는 56°C에서 50분간 불활성화한 뒤 배지에 첨가하였다. 계대 배양시에 부착된 세포를 떼어내기 위해 사용한 trypsin은 Gibco사에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 평가를 위한 MTT solution은 EZ Cytox solution (두젠바이오, Korea)를 사용하였으며, Western blotting에 사용된 항체는 총 10종으로 다음의 Tables 1과 2에 표시하였다(Santacruz, USA).

## 4. HeLa 암세포주 배양

실험에 사용된 사람 자궁경부암 HeLa 세포주는 한국 세포주은행에서 보관 중인 세포를 분양 받아 계대 배양하여 사용하였다. 세포 배양은 DMEM 배지에 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin 항생제 용액(Gibco, U.S.A.)과 10%의 FBS를 첨가하여 사용하였으며, 세포는 37°C의 온도를 유지하고 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기(Sanyo, JAPAN)에서 배양하였다.

## 5. HeLa 암세포주에 대한 프로폴리스의 세포 독성 평가

HeLa 암세포주에 대한 프로폴리스 추출물의 세포 독성은 EZ-cytox MTT 평가법을 이용하였다. 프로폴리스 추출물은 기존 세포 면역성 평가에서 사용한 충북 지역의 프로폴리스를 선정하여 사용하였다(Kim *et al.*, 2018). HeLa

세포를 96-well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well로 접종한 뒤, 24시간 동안 배양시켰다. 배양된 세포에 프로폴리스 추출물을 농도 의존적(1, 5, 10, 25, 50, 100 그리고 250 µg/mL)으로 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. 프로폴리스 추출물에 대한 대조군으로서 세포에 DMEM (10% FBS) 배지만을 처리한 것과 용매에 대한 대조군으로 에탄올을 추출물과 똑같은 부피로 처리하였다. 24시간 배양 후 EZ-cytox 용액을 배지의 최종 부피 1/10로 처리하고 배양기에서 2시간 동안 반응시킨 후 microplate reader (SpectraMax M2, USA)를 이용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

## 6. Western blotting

각 지역별 프로폴리스 추출물에 의한 항암 기전을 확인하기 위해 Western blotting을 실시하였다. 100 mm cell culture plate에  $5 \times 10^5$ 으로 세포를 접종하고 24시간 동안 배양기에서 세포를 배양한 후, 각 지역별 프로폴리스를 100 µg/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 후 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 세포를 세척한 후, 200 µL의 nonidet P-40 (NP-40, GenDEPOT) lysis buffer를 첨가하여 세포 내 단백질을 추출하였다. 추출된 lysates은 bath sonicator에서 30초간 sonication하고, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만을 회수하였다. 회수된 lysates는 bicinchronic acid (BCA, GenDEPOT) 단백질 정량법으로 농도를 측정하고 20 µg의 단백질을 Western blot에 사용하였다. 5× SDS sample buffer (312.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 50% glycerol, 5% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue)와 cell lysates를 혼합한 뒤, 100°C에서 5분간 단백질을 denaturation시켰으며 이를 목적하는 단백질의 분자량에 따라 10% 또는 15% polyacrylamide gel에 loading하여 단백질을 전기영동하였다. 전개된 단백질은 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Whatman, USA)에 transfer한 다음, 2% non-fat dry milk (Bio-Rad, USA)로 실온에서 1시간 동안 반응시켜 항체의 비특이적 반응을 차단하였다. 1차 항체로는 PLC-γ1, PARP, Akt1, p53, ERK, Bcl-2, Caspase-3, Bax 그리고 cytochrome C를 각각 1 : 1,000의 희석 비율로 2% non-fat dry milk에 희석하여 overnight 반응시켰으며, GAPDH는 1 : 5,000으로 희석하여 마찬가지로 overnight 반응시켰다. 1차 항체 반응 후 1 tris-buffered saline Tween-20 (TBS-T) 용액으로 10

**Table 1.** List of Western blotting antibodies was related to cell proliferation and apoptosis

Protein	Abbreviation	MW (kDa)	Functions
Phospholipase C- $\gamma$ 1	PLC- $\gamma$ 1	155	Signal cascade initiation protein
Poly(ADP-ribose) polymerase	PARP	116, 89	DNA repair, programmed cell death
Protein kinase B	Akt1	60	Multicellular functions
Extracellular-signaling-regulated kinase	ERK	44/42	Protein kinase signaling molecule (Cell proliferation)
B-cell lymphoma 2	Bcl-2	26	Apoptotic/Anti-apoptotic
Caspase-3	Caspase-3	35, 19, 17	Apoptosis
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	37	Internal control

**Table 2.** List of Western blotting antibodies was related to functional activity of regional propolis

Protein	Abbreviation	MW (kDa)	Functions
p53	p53	53	Tumor suppressor protein
Bcl2-associated X protein	Bax	26	Apoptosis (Caspase activation)
Cytochrome C	Cyt C	15	Apoptosis mediator

**Table 3.** Yield of each regional propolis from Korea, Brazil and China

Region	GG	GW	CB	CN	JB	JN	GB	GN	JJ	BZ	CHI
Yeild (%)	23.3	23.3	36.7	23.3	33.3	46.7	36.7	30.0	23.3	40.0	40.0

\*GG: Gyeonggi, GW: Gangwon, CB: Chungbuk, CN: Chungnam, JB: Jeonbuk, JN: Jeonnam, GB: Gyeongbuk, GN: Gyeongnam, JJ: Jeju, BZ: Brazil, CHI: China

분간 3회 membrane을 washing하고, 1차 항체의 항원에 따라 secondary antibody로 goat anti-mouse-HRP와 goat anti-rabbit-HRP를 5% non-fat dry milk에 1 : 2,000으로 희석하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 이후, TBS-T buffer로 membrane을 10분간 3회 washing한 다음, ECL pico detection system (GenDEPOT)을 반응시켜 GelDoc으로 단백질 발현을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

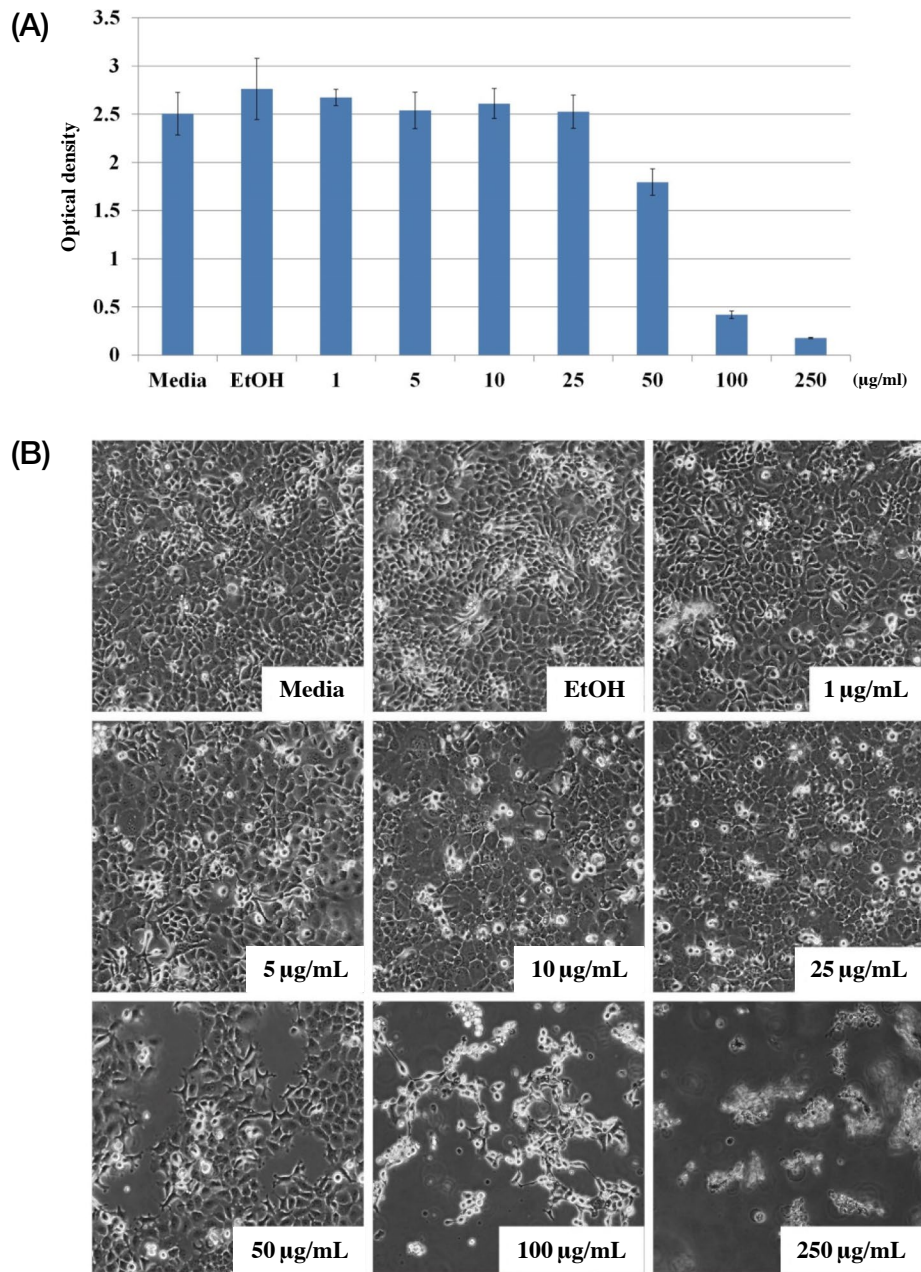
### 1. 프로폴리스 추출물의 수율

국내 9개 지역(경기, 강원, 충북, 충남, 전북, 전남, 경북, 경남, 제주)과 브라질, 중국 프로폴리스 원료를 각 3 g씩 정량하여 추출한 결과는 다음 Table 3과 같다.

### 2. HeLa 세포주에 대한 프로폴리스의 세포 독성 평가

국내 지역별로 추출한 프로폴리스와 브라질, 중국 프로폴리스가 HeLa 암세포주에 나타내는 LD<sub>50</sub> 값을 확인하기 위해 세포 독성 평가를 실시하였다. 프로폴리스를 처리하고 암세포 내에서의 단백질 변화를 확인하기 위해서

는 LD<sub>50</sub> 이하를 나타내는 농도 값을 설정해야 하며, 지역별로 수집한 프로폴리스들의 세포에 대한 효과를 확인할 수 있기 때문이다. 세포 독성 평가는 MTT assay를 응용한 EZ-cytox detection system으로 확인하였다. 세포 독성 평가는 전체 지역의 프로폴리스를 동일한 농도로 설정하여 시험하였다. 세포를 96-well plate에 1 × 10<sup>4</sup>/well로 접종한 후 24시간 후에 프로폴리스 추출물을 농도 의존적으로 처리하였다. 세포에 처리한 농도는 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 그리고 250 μg/mL로 처리하였으며, 처리 시간은 24시간 동안 이루어졌다. 각 지역별 프로폴리스는 25 μg/mL의 농도까지는 HeLa 세포주에 대해 프로폴리스가 독성을 나타내지 않았으나, 50 μg/mL의 농도에서는 프로폴리스의 세포 독성이 확인되었다. 그러나 약 70%의 세포가 아직도 생존해 있기 때문에 세포 독성을 나타내는 농도 기준에는 미치지 않았다. 그러나 100 μg/mL의 농도에서는 약 20%의 세포만이 생존하였고, 세포 사멸에 대한 단백질 변화를 확인하기에 적절한 것으로 확인되었다. 경기, 강원, 충북, 충남, 전북, 전남, 경북, 경남의 프로폴리스가 모두 동일한 농도에서 세포 독성을 나타냈고, 대표적으로 충북 지역의 프로폴리스 결과를 Fig. 1A에 나타냈다. 제주, 브라질 그리고 중국 프로폴리스의 경우에는 앞서 언급된 다른 지역에 비해 50 μg/mL의 농도에서 약 80%의 세포 생존을 보



**Fig. 1.** Cytotoxicity effect of propolis extracts on HeLa cells. (A) HeLa cells ( $1 \times 10^4$  cells/well) were incubated with complete medium containing propolis extracts. Propolis extracts were treated with dose-dependent on HeLa cells for 24 hr. Optical density value was measured by EZ-cytox detection system. (B) Morphology of HeLa cells treated with dose-dependent propolis extracts ( $\times 100$ ).

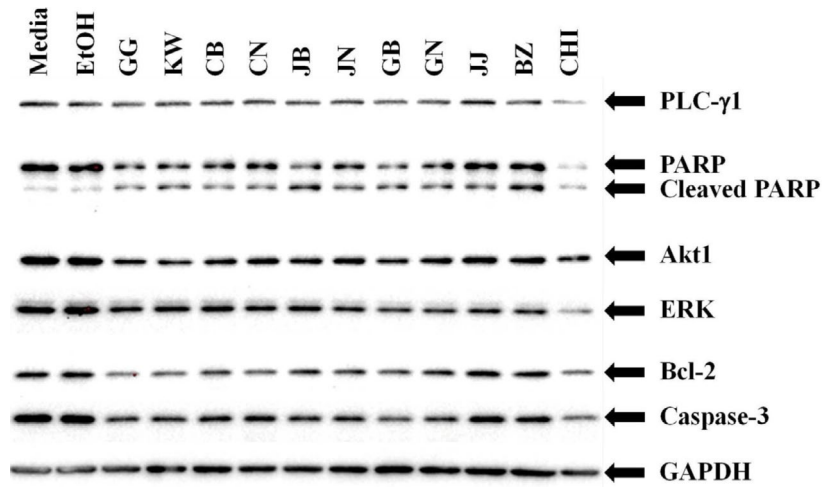
였으나, 100 µg/mL의 농도에서는 다른 지역과 마찬가지로 세포 독성을 나타냈다(Data not shown). Fig. 1B에서는 프로폴리스 독성 효과에 대한 세포 형태를 확인한 것으로서, MTT 평가법과 동일한 결과를 나타냈다.

이를 바탕으로 국내 지역별 프로폴리스와 브라질, 중국 프로폴리스 추출물을 모두 100 µg/mL의 농도로 세포에 처리한 뒤, 세포 내에서 일어나는 단백질 변화를 관찰하

고자 하였다.

### 3. 국산 지역별 프로폴리스 추출물 처리에 따른 단백질 발현 변화 확인

국산 지역별 프로폴리스 추출물과 브라질산, 중국산 프로폴리스 추출물의 처리가 세포 내 단백질 발현에 끼치는 영향을 Western blotting을 통해 확인하였다. 항암 기전



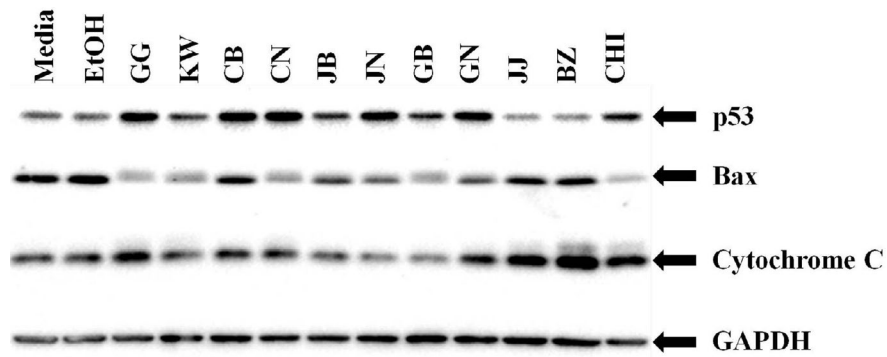
**Fig. 2.** Cell proliferation and apoptosis related protein expression effect of propolis extracts of Korean regions, Brazil and China. HeLa cells were treated with 100 µg/mL of various regional propolis. All of antibodies were diluted in 2% skim milk at 1 : 1,000 except GAPDH (1 : 5,000). GAPDH was housekeeping control for Western blotting.

과 관련된 세포 내 단백질 군은 크게 세포 분열에 관여하는 단백질 군과 세포 사멸에 관여하는 단백질 군으로 나눌 수 있는데, 각 군에 속한 단백질의 종류는 매우 다양하다. 명확한 분자 기전을 확인하여 프로폴리스가 항암에 연관된 세포 신호 전달을 알아내기 위해서는 각 군에 속하는 단백질 발현을 모두 확인해야 하지만 세포 내 모든 단백질을 확인할 수 없기 때문에 각각에 대표되는 단백질을 선정하여 확인하였다.

항체를 이용한 Western blotting 결과가 Fig. 2에 나와 있다. Media의 경우 아무 것도 처리하지 않은 배양액 상태의 세포에서 얻어진 결과이며, EtOH는 프로폴리스 추출 용매 대조군의 결과이다. 그림 2A에서는 세포 분열과 세포 사멸에 관련된 단백질들의 Western blotting 결과를 나타내었는데, PLC-γ1의 경우 대조군과 프로폴리스 처리 군에서 큰 차이는 발견되지 않았다. 이는 프로폴리스 처리가 암세포 내에서 발생하는 신호전달 초기 과정에는 큰 영향을 끼치지 않는 것을 의미한다. 그러나 중국산 프로폴리스를 처리했을 경우 PLC-γ1의 발현이 약해진 것을 볼 수가 있는데, 이는 다른 지역과 달리 중국산 프로폴리스는 세포의 신호 전달 초기 과정부터 관여하고 있는 것으로 볼 수 있다. 이는 PLC-γ1의 downstream 신호 과정에 속해 있는 ERK의 발현에서도 확인할 수 있다. 대조군에 비해 프로폴리스를 처리한 군에서 ERK의 발현이 국내산과 브라질산에서 감소함을 나타내고 있는데 이에 비해 중국산 프로폴리스는 단백질의 발현 감소가 상대적으로 더

높게 나타났다. 즉, 세포 분열에 관련된 ERK의 양이 감소하는데 그 중에서도 중국산 프로폴리스는 세포 신호 전달 초기에서 역할을 하는 PLC-γ1 경로를 매개하고 있는 것을 의미한다. 또 다른 세포 분열 단백질에 속하는 Akt1과 Bcl-2의 경우에도 프로폴리스를 처리한 군에서 발현이 감소됨을 볼 수 있다. 그러나 제주와 브라질산의 경우 발현 감소를 나타내지는 않았으며, 다른 지역 프로폴리스에서는 발현 감소가 비슷한 수준에서 나타났다. 이는 제주, 중국 그리고 브라질을 제외한 국내 지역의 프로폴리스가 다른 세포 신호 경로를 통해 암세포의 성장을 저해하는 것이며, 대부분의 프로폴리스가 암세포의 성장 저해에서 직접적으로 세포 발현에 관련된 단백질에 작용한다는 것을 의미하는 것이다.

또 다른 단백질 군에 해당하는 세포 사멸 단백질의 발현에서도 프로폴리스가 영향을 끼치고 있음을 알 수 있다. PARP의 경우 세포 사멸 현상이 발생하게 되면 116 kDa의 전구체 단백질이 분해되면서 89 kDa의 fragment를 생성하게 된다. Western blotting의 결과에서 볼 수 있듯이 대조군에서는 116 kDa의 전구체 단백질이 그대로 남아있는 반면 프로폴리스를 처리한 군에서는 116 kDa의 단백질의 양이 줄어들었고, 그에 따라 89 kDa의 fragment 단백질이 나타난 것을 볼 수 있다. 즉, 프로폴리스를 암세포에 처리하면서 세포 내 PARP 단백질의 cleavage를 발생시키고 이를 통해 세포 사멸을 일으키는 것으로 볼 수 있다. 이는 세포 apoptosis에 최종적이면서 직접적으로 관여



**Fig. 3.** Various regional propolis was regulated functional protein level were that related cancer. Western blotting analysis with cellular functional antibodies was that related cancer. Cell proliferation and apoptosis related protein expression effect of propolis extracts of Korean regions, Brazil and China. HeLa cells were treated with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of various regional propolis. All of antibodies were diluted in 2% skim milk at 1 : 1,000 except GAPDH (1 : 5,000). GAPDH was housekeeping control for Western blotting.

하는 caspase-3 단백질의 경우에서도 함께 확인할 수 있다. Caspase-3 역시 normal 상태에서는 35 kDa의 분자량을 가진 전구체 형태로 세포 내에서 존재하지만 세포 사멸 신호 발생시 19 또는 17 kDa의 분자량을 가진 fragment를 생성하면서 apoptosis를 발생시키는 것이다. Western blotting 결과에서는 fragment 단백질은 보이지 않지만 프로폴리스가 처리된 실험군에서는 35 kDa의 단백질 양이 줄어든 것을 확인할 수 있다. 이는 caspase-3 전구체 단백질이 cleavage되면서 세포 내에서 apoptosis가 발생한다는 것을 의미한다. 하지만 제주산과 브라질산 프로폴리스의 경우 cleavage되는 정도가 다른 지역의 프로폴리스에 비해 약하게 나타난 것을 알 수 있는데, 이는 두 지역의 프로폴리스 추출물이 세포 사멸에 대한 효과가 다른 지역의 프로폴리스보다 미약함을 알 수 있다.

그림 3에서는 국내 지역별 프로폴리스들이 암세포에 작용할 때 항암과 apoptosis에 연관된 기능적 단백질에 어떤 영향을 끼치는지에 대한 결과가 나와있다. p53의 경우 대표적인 tumor suppressor protein으로서 세포의 종양화에 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다. 기본적으로 암에서는 p53 단백질에서 돌연변이가 발생함으로 인해 세포가 종양화가 되며 암세포로 발전하는 것이다. 그러나 정상적인 p53은 종양 억제 역할을 가지고 있기 때문에 암에서는 매우 중요한 인자가 된다. 대조군에서는 p53의 단백질 발현이 낮게 나타나고 있는 반면 제주와 브라질산을 제외한 프로폴리스에서는 p53 단백질의 발현이 증가된 것이 나타났다. 이는 프로폴리스가 암세포에 대해서 p53 단백질 발현을 증가시켜 암세포의 정상화에 기여한다는 것을 의

미한다. 그러나 국내 지역별 프로폴리스를 비교한 결과 지역에 따라 채취한 프로폴리스 간에 차이가 발생했는데, 경기, 충북, 충남, 전남, 경남 지역의 경우 p53 단백질의 발현 양이 크게 증가함을 확인할 수 있다. 강원, 전북, 경북, 중국의 경우 대조군에 비해 p53 단백질의 발현이 증가는 되었지만 다른 지역에 비해 발현이 크지 않음을 알 수 있다.

Bax 단백질은 Bcl-2 family에 속하는 단백질로서 apoptosis의 주된 인자 중의 하나이다. Bax 단백질의 활성화를 통해 caspase-3의 활성화가 나타나며, 세포의 apoptosis를 이끌어 낸다. 이전까지 연구된 결과에서는 Bax 단백질의 발현양에 따라 세포의 apoptosis가 결정된다는 보고가 많았지만 최근 연구에서는 Bax 단백질의 phosphorylation이 신호 전달 과정에서 매우 중요한 요소가 된다는 것이 밝혀졌다. Fig. 3의 결과에서 보면 대조군과 충북, 제주 그리고 브라질에서는 Bax의 발현양에서도 큰 차가 없었고, 전북, 전남, 경남, 중국의 경우 오히려 Bax 발현이 줄어든 것을 볼 수 있다. 그러나 경기, 강원, 충남, 경북 지역의 프로폴리스를 처리한 결과는 Bax 단백질이 일부 shift되어 있음을 확인할 수 있다. 즉, 단백질의 phosphorylation이 일어나면서 분자량이 커지게 되어 Bax 단백질의 일부가 shift된 것이다. 이는 경기, 강원, 충남, 경북 지역의 프로폴리스가 apoptosis의 활성화를 가장 활발하게 일으킨다는 것으로 볼 수 있다.

대표적 전자 전달계 단백질인 cytochrome C는 미토콘드리아에서 superoxide와 hydrogen peroxide를 제거함으로써 항산화에서 중요한 역할을 담당한다. 또한 항산화 외에 감염이나 DNA 손상에 반응하여 apoptosis에서 중간 매개자 역할을 담당하고 있다. 그림 3에서 cytochrome C

항체로 blotting한 결과를 보면 경기, 제주, 브라질 그리고 중국산 프로폴리스를 처리했을 경우에는 cytochrome C의 발현양이 증가되어 있음을 확인할 수 있고, 그 중에서도 제주와 브라질산에서의 cytochrome C의 발현이 월등하게 증가됨을 볼 수 있다. 즉, 제주와 브라질산의 경우에는 프로폴리스가 암세포에 대해서 apoptosis를 일으킬 때 다른 지역의 프로폴리스와는 전혀 다른 경로를 통해 세포 사멸을 유도한다고 할 수 있다. 반면 경기 지역의 경우에는 cytochrome C가 증가되어 있지만 발현양이 대조군에 비해 크지 않은 것으로 보면 국내 타 지역의 프로폴리스와 유사한 경로를 통해 세포 사멸을 일으키는 것으로 볼 수 있다. Fig. 2와 Fig. 3에서의 GAPDH는 Western blotting 실험에서 단백질 정량에 대한 internal control이다.

## 적 요

꿀벌에 의해 생산되는 프로폴리스는 이미 항균, 항산화, 항염증, 항바이러스 그리고 항종양 등의 기능성으로 중요성이 증가하고 있으며, 인공적으로 생성된 화합물이 아닌 자연에서 얻어진 천연물이라는 점에서 특히 가치가 증가하고 있다. 그 중에서도 인류에게 대표적 난치병 질병 중의 하나인 암에 대한 항종양 특징은 화학적 예방 요법이라는 측면에서 중요성과 활용도가 주목받고 있다. 그러나 프로폴리스가 가지는 항종양 같은 현상적인 효과라든가 프로폴리스 구성 성분의 특징에 대해서만 연구가 이루어지고 있고, 암세포에서 나타나는 구체적인 분자 기전에 대해서는 아직까지도 연구가 미비한 상황이다. 본 연구에서는 암세포에 대해서 프로폴리스가 나타내는 구체적인 분자 기전을 제시함으로써 어떤 메커니즘으로 의해 프로폴리스가 항암에 대해 효과를 나타내는지 확인하고자 하였다. 암세포에 대해서 확실한 항암 효과를 보이기 위해서는 프로폴리스의 세포 사멸 농도를 확인하고 그 안에서 이루어지는 단백질 분자의 발현 양상 또는 분자 기능의 활성화 등을 기본적으로 확인해야 한다. 수많은 단백질들이 암세포의 성장 및 분화에 관여하고 있지만 현실적으로 세포 내부의 모든 단백질의 기능을 확인하기엔 불가능하기 때문에 세포의 분열과 사멸에 관련된 기본적인 단백질과 더불어 암에 관련된 단백질의 활성화 등은 반드시 확인해야 한다. 따라서 본 연구에서 제시된 결과를 보면 프로폴리스가 암세포에 대해서 항암 효과를 보이기 위해서는 100 µg/mL의

농도에서 비로소 세포 사멸 현상을 나타낼 수가 있으며, 그에 따라 암세포 내부의 수많은 단백질의 변화가 나타남을 알 수 있다. 특히 주목할 점은 국내의 지역에 따라 수집된 프로폴리스의 항암 효과가 암세포 내부에서 작용할 때는 큰 차이를 보인다는 것이다. 이것은 매우 중요한 결과로서 각 지역에 식재된 밀원수에 따라 프로폴리스의 구성 성분이 달라지는 것이며 그에 따라 프로폴리스의 기능성에 큰 차이를 나타낸다는 의미이다. 이는 프로폴리스가 가지는 기능에서 항암뿐만이 아니라 항염증, 항산화 그리고 항균 작용에서도 지역별로 구성된 식물상에 따라 기능성의 차이가 결정된다는 것이다. 역으로 추적해서 각 지역에서 나타난 프로폴리스의 기능성 차이를 확인하고 해당 지역의 식물상을 분석한다면 질병 또는 특정 기능성을 가진 프로폴리스를 생산할 수 있다는 의미가 될 것이다.

자궁경부암 세포에 대한 프로폴리스의 성장저해 효과는 확인했지만 아직도 확인해야 할 기전은 매우 다양하다. 세포는 내부의 신호 체계가 매우 복잡하고 단일 신호 체계가 아닌 다중 신호 체계를 가지고 있기 때문에, 프로폴리스에서 항암 효과가 나타난다고 하더라도 암세포는 다른 방향으로 anti-apoptotic signal을 생성할 수 있다. 따라서 다양한 신호 체계에 대한 암세포 내 단백질 발현에 대한 변화를 확인해야 하며, 추가로 단백질의 phosphorylation, acetylation, protein folding 그리고 mutation과 같은 기능성을 검증해야 한다. 이런 분석을 통해 프로폴리스의 구체적인 세포 신호 경로를 확인해야만 항암과 관련하여 약물을 제조할 때 손쉽게 표적 특이적인 신약 제조가 이루어질 수 있을 것이다. 특히 암은 조직별로 그 특성을 다르게 가질 수 있기 때문에 조직 특이적인 맞춤형 약제의 생산이 가능할 것이다. 따라서 본 연구에서 제시된 지역별 프로폴리스의 항암 분자 기전 분석에 더하여 해당 지역의 밀원수 분석 및 세포 내 단백질 변화 추적을 기반으로 앞으로 더 많은 종류의 암세포 저해 기전을 밝힌다면 대표적 양봉 산물인 프로폴리스를 이용한 특정 암에 대한 효과적인 항암제의 개발이 가능할 것으로 보여진다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다연구사업 (과제번호: PJ01387801)에 의해 수행되었다.



## 인용문헌

- Aso, K., S. Kanno, T. Tadano, S. Satoh and M. Ishikawa. 2004. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 727-730.
- Bankova, V. S., S. L. D. Castro and M. C. Marcucci. 2000. Propolis: Recent advances in chemistry and plan origin. *Apidologie* 31: 3-15.
- Basnet, P., T. Matsuno and R. Z. Neidlein. 1997. Potent free radical scavenging activity of propol isolated from Brazilian propolis. *Z. Naturforsch.* 52c: 828-833.
- Birt, D. F., S. Hendrich and W. Wang. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* 90: 157-177.
- Bors, W., W. Heller, C. Michel and M. Saran. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Meth. Enzymol.* 186: 343-355.
- Burdock, M. D. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 36: 347-363.
- Donadieu, Y. 1979. *La propolis*. Edition Malonie, Paris, France pp. 36.
- Ghisalberti, E. L. 1979. Propolis: a review. *Bee World* 60: 59-84.
- Greenaway, W., T. Scaysbrook and F. R. Whatley. 1990. The composition and plant origins of propolis. *Bee World* 71: 107-118.
- Heim, K. E., A. R. Tagliaferro and D. J. Bobilya. 2002. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationship. *J. Nutr. Biochem.* 13: 572-584.
- Hu, F., H. R. Hepburn, L. Yinghua, M. Chen, S. E. Radloff and S. Daya. 2005. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J. Ethnopharmacol.* 100: 276-283.
- Ito, J., F. R. Chang, H. K. Wang, Y. K. Park, M. Ikegaki and N. Kilgore. 2001. Anti-AIDS agents. 48 Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melifore-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *J. Nat. Prod.* 64: 1278-1281.
- Khayyal, M. T. 1993. Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract, *Drugs Experimental and Clinical Research* 19: 197-203.
- Kim, S. K., S. O. Woo, S. M. Han, S. G. Kim, K. W. Bang, H. R. Jang, H. J. Moon and H. J. Kim. 2018. Anti-inflammation effects of propolis extracts on Raw264.7 macrophage cells. *J. Apiculture* 33: 187-194.
- Kimoto, T., S. Arai, M. Kohguchi, Y. Nomura, M. J. Micallef and M. Kurimoto. 1998. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C nextracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev.* 22: 828-833.
- Koo, M. H., B. P. F. A. Gomes, P. L. Rosalen, G. M. B. Ambrosano, Y. K. Park and J. A. Cury. 2000. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica Montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology* 45: 141-148.
- Krell, R. 1996. Value-added products from beekeeping. FAO, Rome, Italy pp. 161-166.
- Kujumgiev, A., I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov and S. Popov. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 84: 329-339.
- Kwon, K. H., A. Barve, S. Yu, M. Huang and A. T. Kong. 2007. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. *Acta. Pharmacol. Sin.* 28: 1409-1421.
- Ledon, N., A. Casaco, R. Gonzalez, N. Merino, A. Gonzalez and Z. Tolon. 1997. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. *Acta Pharmacologica Sinica* 18: 274-276.
- Lejeune, B., A. Pourrat and H. Dehmouche. 1988. Propolis utilization en democosmetologie. *Parfums, Cosmetique, Aromes* 82: 73-77.
- Marcucci, M. C. 1995. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 83-99.
- Mizuno, M. 1989. Food packaging materials containing propolis as a preservative. Japanese Patent JP 01 243 974 [89 243 974]
- Moreno, M. I. N., M. I. Isla, N. G. Cudmani, M. A. Vattuone and A. R. Sampietro. 1999. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucuman, Argentina) propolis. *J. Ethnopharmacol.* 68: 97-102.
- Moreno, M. I. N., M. I. Isla, A. R. Sampietro and M. A. Vattuone. 2000. Comparason of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114.
- Nagai, T., R. Inoue, H. Inoue and N. Suzuki. 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chem.* 80: 29-33.
- Orsolic, N. and J. Basic. 2003. Immunomodulation of water-soluble derivate of propolis: a factor of antitumor reactivity. *Biol. Pharm. Bull.* 84: 265-273.
- Orsolic, N., L. Sver, S. Terzic and J. Basic. 2005. Peroral application of water-soluble derivate of propolis (WSPD) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumour activity. *Vet. Res. Commun.* 29: 575-593.
- Pan, M. H., C. S. Lai, P. C. Hsu and Y. J. Wang. 2005. Acacetin induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by activation of caspase cascades and production of reactive oxygen species. *J. Agric. Food Chem.* 53: 620-630.
- Pan, M. H. and C. T. Ho. 2008. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chem. Soc. Rev.* 37: 2558-2574.
- Park, Y. K., M. H. Koo, J. A. S. Abreu, M. Ikegaki, J. A. Cury and P. L. Rosalen. 1998. Antimicrobial activity of

- propolis on oral microorganisms. *Curr. Microbiol.* 36: 24-28.
- Pascual, C., R. Gonzales and R. G. Torricella. 1994. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J. Ethnopharmacol.* 41: 9-12.
- Pietta, P. G., R. Longo and A. Vanella. 2002. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73: S7-20.
- Russo, A., R. Longo and A. Vanella. 2002. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 73: S21-S29.
- Scheller, N., W. Krol, J. Swiacik, S. Owczarek, J. Gabrys and J. Shani. 1989. Antitumoral property of ethanolic extract of propolis (EEP) in mice-bearing Ehrlich carcinoma. *Z. Naturforsch.* 44C: 1063-1065.
- Sforcin, J. M. 2007. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 113: 1-14.
- Silici, S. and S. Kutluca. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J. Ethnopharmacology* 99: 69-73.
- Tsao, A. S., E. S. Kim and K. W. Hong. Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J. Clin.* 54: 150-180.
- Vynograd, N., I. Vynograd and Z. Sosnowski. 2000. A comparative multicenter study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine* 7: 1-6.
- Waladkhani, A. R. and M. R. Clemens. 1998. Effect of dietary phytochemicals on cancer development (review). *Int. J. Mol. Med.* 1: 747-753.
- Wang, L., S. Mineshita and I. Ga. 1993. Antiinflammatory effects of propolis. *Japanese J. Pharmacological Therapeutics* 24: 223-226.
- Woo, S. O., I. P. Hong and S. M. Han. 2015. Comparison of total flavonoids and phenolic contents of propolis collected in Korea. *J. Apiculture* 30: 293-298.