

藥鍼用蜂毒液이 黑色腫細胞에 미치는 抗癌效果에 對한 分子生物學的 研究

朴贊烈* · 南相水* · 金昌煥* · 李栽東* · 姜成吉* · 李潤浩* · 安秉哲*

ABSTRACT

Molecular Biological Study of Anti-cancer Effects of Bee Venom on Human Melanoma Cell

Chan-Yol, Park* · Sang-Soo, Nam* · Chang-Hwan, Kim* · Jae-Dong, Lee*
Sung-Keel, Kang* · Yun-Ho, Lee* · Byoung-Choul, Ahn*

Dept. of Acupuncture & Moxibustion
Oriental Medical College, Kyung Hee University

To study anti-cancer effect and molecular biological mechanism of bee venom for aqua-acupuncture, the effects of bee venom on cell viability, apoptosis, and cell cycle were analyzed using MTT assay, tryphan blue assay, [³H]thymidine release assay, flow cytometric analysis, activity of caspase-3 protease activity assay, and immunocytometric analysis of PCNA. To explore whether anti-cancer effects of bee venom are associated with the transcriptional control of gene expression, quantitative RT-PCR analysis of apoptosis- and cell cycle-related genes was performed.

The obtained results are summarized as follows:

1. The MTT assay demonstrated that cell viability was decreased by bee venom in a dose-dependant manner.
2. Significant induction of apoptosis was identified using tryphan blue assay, [³H]thymidine release assay, and flow cytometric analysis of sub G₁ fraction.
3. In analysis of caspase-3 protease activity, the activity had increased significantly, in a dose-dependant manner.
4. Quantitative RT-PCR analysis of the apoptosis-related genes showed that Bcl-2 and Bcl-X_L were down-regulated whereas Bax was up-regulated by bee venom treatment.
5. In flow cytometric analysis of cell cycle and immunocytometric analysis of PCNA expression, cell numbers of G₁ phase was increased by a dose-dependant manner.
6. In quantitative RT-PCR analysis of the cell cycle-related genes, p21, p27, and p57 were increased, while Cyclin D1, CDK4, c-Myc, c-Fos, and Histone H3 were decreased. In contrast, there were no remarkable changes in expression levels of CDC2 and c-Jun.

Key words : bee venom, anti-cancer effect, cell cycle, molecular biology.

* 경희대학교 한의과대학 침구학교실

I. 結 論

蜂毒이란 꿀벌의 毒囊에 들어있는 約 40여 가지의 有效成分으로 構成된 物質로 炎症, 알러지 등을 誘發하는 作用이 있으나 臨床에서는 鎮痛, 解熱, 消炎, 鎮痙 및 免疫 增強 등의 效能이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁾

蜂毒의 利用은 紀元前 2000년경의 이집트 파피루스 文書에 벌침이나 죽은 벌을 아픈 곳에 직접 비벼 治療했다는 記錄이 남아 있고, 紀元前 168년에 埋葬된 中國 長沙 馬王堆 3號 漢墓에서 出土된 醫書에서도 蜂毒을 利用한 2例의 記錄이 실려있다.¹⁶⁾ 傳統的으로 蜂鍼을 直接 人體에 刺入하는 方法을 使用하였으나, 最近에는 蜂毒을 抽出하여 加工한 後 注射器를 利用하여 人體의 經穴에 刺入하는 蜂毒藥鍼療法이 主로 活用되고 있다. 1990年代 以後 國內에서 蜂毒藥鍼에 關한 研究가 활발히 進行되고 있어 鎮痛,^{6,11)} 消炎,¹²⁾ 鎮痙,⁷⁾ 安定性 檢査,¹⁴⁾ 免疫機能 增強作用¹³⁾ 등이 報告되었고, 外國에서는 Habermann^{19,20,22,23,40)} 등에 의해 蜂毒의 生化學的 成分 및 藥理作用 등이 報告되었다.

1997年 統計廳이 發表한 疾病死因分類統計에 의하면 年間 50,000명 以上이 癌으로 因해 死亡하여 全體 死亡原因에서 2位를 차지하고 있다.⁴⁾ 皮膚癌은 全體 癌 중에서 2-4%를 차지하고 있으며, 黑色腫은 皮膚癌의 一種으로²⁾ 韓醫學에서는 石疽, 黑疔, 失榮, 그리고 翻花瘡 등의 用語가 이에 該當한다.¹⁵⁾

全世界的으로 癌의 治療에 대한 수많은 研究가 進行되고 있고, 韓醫學에서도 韓藥이 가진 抗癌效果에 대한 研究가 활발하게 이루어지고 있으며,⁸⁾ 最近 權은 上皮腫에 대한 蜂毒藥鍼刺戟이 抗癌效果와 免疫系에 有意한 效果를 나타냄을 報告한 바 있다.¹⁰⁾

이에 著者는 臨床的으로 蜂毒藥鍼의 活用 範圍를 넓히기 위해, 蜂毒의 抗癌效果 與否와 그 分子生物學的 機轉을 알아보고자 人體 黑色腫 細

胞에 蜂毒을 處理한 後, MTT 反應實驗을 施行하여 細胞活性度의 變化를 檢討하였으며, tryphan blue assay, [³H]thymidine release assay 및 sub G₁ apoptotic fraction의 flow cytometric analysis를 施行하여 apoptosis 여부를 檢索하였다. 蜂毒에 의하여 誘導되는 apoptosis의 分子生物學的 機轉을 分析하고자 caspase-3 protease의 activity의 變化有無를 測定하였으며, apoptosis 關聯 遺傳子의 mRNA 發顯 樣相을 定量的 RT-PCR을 利用하여 分析하였다. 아울러 蜂毒이 細胞 週期에 미치는 影響을 알아보고자 flow cytometric analysis, PCNA 發顯에 對한 immunocytometric analysis 및 細胞 週期 關聯 遺傳子의 mRNA 發顯 樣相을 定量的 RT-PCR을 利用하여 分析하였던 바 有意한 結果를 얻었기에 이를 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 蜂毒의 準備

蜂毒은 microchip을 利用한 電磁氣 發生裝置로 꿀벌의 蜂囊을 刺戟하여 採集한 다음, 加工한 乾燥蜂毒 0.1g을 生理食鹽水 3000ml에 稀釋하여 使用하였다.⁵⁾

2. 細胞培養

人體 黑色腫 細胞柱, SK-MEL-2는, ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)로부터 購入하였으며, 10%의 FBS(fetal bovine serum, Gibco, Gland Island, NY, USA)을 混合한 RPMI-1640 (Rosewell Park Memorial Institute 1640, Gibco, Gland Island, NY, USA) 培養液에서 培養하였다. 細胞들은 5%의 CO₂ 狀態가 維持되는 37℃ incubator에서 培養하였다.

3. 蜂毒의 處置

플라스크의 約 50-60% 面積을 차지하도록 黑色腫 細胞를 培養한 後 0 (control), 0.5, 1, 2, 5, 및 10 μ l/ml의 蜂毒으로 處理하였다. 處理를 마치고 6, 12, 24, 48 時間이 지난 後 細胞의 活性度, apoptosis, 細胞增殖, 그리고 遺傳子의 發顯을 分析하기 위하여 trypsin-EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid Dipotassium Salt)를 使用하여 細胞들을 回收하였다.

III. 實 驗

1. MTT 反應實驗

1) MTT 溶液製作 및 處理

5mg/ml의 MTT를 PBS(phosphate buffer saline)에 녹여 pH 7.5로 맞추는 後 0.22 μ m의 filter로 濾過하여 stock solution을 만들어 4 $^{\circ}$ C에서 貯藏하였다. 그 후 1x10⁴개의 細胞를 包含하고 있는 100 μ l의 cell suspension에 10 μ l의 MTT stock solution을 添加하였다.

2) 酵素反應과 免疫螢光測定

MTT stock solution에 cell suspension을 添加한 狀態로 37 $^{\circ}$ C에서 3時間 保存한 後 100 μ l의 0.04M HCl in absolute isopropanol을 各各의 well에 넣고 잘 混合하여 blue formazan crystals을 完全히 溶解시켰다. 酵素의 溶解가 끝난 뒤 570nm에서 ELISA reader (enzyme linked immunosorbent assay reader, Titertek multiscan, USA)로 OD(optical density)를 測定하였다.

2. Apoptosis 檢索

1) Trypan Blue Exclusion에 의한 檢索

光學顯微鏡을 利用한 apoptosis의 觀察을 위하여 trypan blue 染色을 施行하였다. 細胞를 800rpm으로 遠心分離하여 回收한 後 4 $^{\circ}$ C의 PBS로 5x10⁵ cells/ml가 되도록 稀釋하였다. 0.5ml의 稀釋 細胞들을 slide에 吸着시킨 後 trypan blue 溶液을 添加하여 染色하였다. Trypan blue로 染色되는 細胞와 染色되지 않는 細胞를 光學顯微鏡으로 觀察하여 그 數를 測定하였다.

2) [³H]thymidine Release Assay에 의한 檢索

Apoptosis의 檢索은 다음과 같이 세 段階로 施行하였다. 細胞를 6개의 well plates에 2x10⁴ cells/well의 密度로 培養한 後 10% FBS가 包含된 培養液에서 24時間동안 維持시켰다. 24時間이 지난 後 細胞를 PBS로 2回 洗滌하였고, 1% FBS가 包含된 培養液에서 多樣한 用量的 蜂毒을 添加하였다. 1 μ Ci/ml의 [³H]thymidine(Amersham)으로 4時間동안 細胞를 pulse-label한 後 total 또는 released radioactivity를 liquid scintillation counter를 利用하여 測定하였다. Apoptosis의 誘導는 total [³H]thymidine에 對한 released [³H]thymidine의 相對的인 量에 의해 決定하였다. 蜂毒에 의한 apoptosis의 誘導는 實驗群의 [³H]thymidine 상대값을 對照群과 比較함으로써 判斷하였다.

3) Sub G₁ Apoptotic Fraction의 Flow Cytometric Analysis

Apoptotic cell death의 DNA 含量에 對한 flow cytometric analysis를 利用하여 深化된 分析을 하였다. Apoptosis 過程에서 chromosomal DNAs는 작은 DNA 分節로 나누어지고 작은 膜構造에 들어가 apoptotic body라 불리어지는 小細胞가 된다. 이러한 apoptotic body의 DNA 含量은 正常的인 細胞週期상의 G₁期 細胞들의 2N

보다 적게 되어 sub G₁期로 分類되며 DNA 含量에 대한 flow cytometric analysis에서 檢索될 수 있다. 細胞를 蜂毒으로 處理하여 細胞의 DNA 含量을 flow cytometry를 使用하여 檢索하였다.

3. Apoptosis의 分析

1) Caspase-3 Protease Activity의 分析

Caspase-3 protease의 activity는 caspase-3의 tetrapeptide p-nitroanilide (pNA) substrate인 Ac-DEVD-pNA를 利用하여 colorimetric assay로 測定하였다. Caspase-3의 tetrapeptide inhibitor인 Ac-DEVD-CHO와 Ac-DEVD-pNA는 Calbiochem(La jolla, CA, USA)으로부터 購入하였다. 實驗은 20 μ l의 cell lysates와 100 μ M의 Ac-DEVD-pNA를 包含한 180 μ l의 reaction buffer(100mM HEPES, pH 7.5, 20% glycerol, 5mM DTT, and 0.5mM EDTA)로 培養하여 96-well microtiter plates(Nune Vangaard, Neptune, NJ, USA)에서 實行하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 培養한 後 microtiter plate reader(Molecular Devices Inc. Sunnyvale, CA, USA)를 使用하여 吸光度 405nm로 每 10分마다 monitoring하였다.

2) Apoptosis 關聯 遺傳子 mRNA 發顯에 對한 定量的 RT-PCR 分析

(1) Total Cellular RNA의 抽出

Total cellular RNA는 培養된 細胞로부터 single-step method에 의해 抽出되었다.²⁶⁾ 0.1M 濃度の 2-mercaptoethanol을 添加한 GSS solution (250g의 guanidine isothiocyanate, 17.6 ml의 0.75M sodium citrate, 26.4ml의 10% sarkosyl 그리고 293ml의 3次 蒸溜水)으로 solution D를 만들었다. 培養 後 回收된 細胞들에 500 μ l solution D와 2M의 50 μ l sodium acetate(pH 4.0)를 添加한 後 vortexing하였다.

500 μ l water-saturated phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)을 混合하여 20秒간 vortexing한 後 15分間 얼음에서 放置하였다. 20分間 15000g로 遠心分離한 後 上層液에 1000 μ l cold isopropanol을 混合하여 -70 $^{\circ}$ C에서 24時間동안 貯藏한 後 沈澱시켰다. RNA를 20分間 15000g로 遠心分離한 後 RNA pellets을 100% ethanol과 70% ethanol로 洗滌하였다. RNA를 30 μ l의 RNase-free water에 溶解시켰다. 抽出된 RNA의 濃度는 吸光度 260nm과 280nm에서 spectrophotometric measurement (Schimadzu Scientific Instruments, Inc., Concord, CA, USA)로 測定하였으며, optical density(260/280)의 比率 1.0을 40 μ g/ml RNA로 세팅하여 濃度를 決定하였다.

(2) cDNA의 合成

抽出된 1 μ g의 RNA는 MoMuLV(Gibco)과 random hexamer primers를 使用하여 20 μ l cDNA로 逆轉寫하였다. 1 μ g의 抽出된 RNA를 2 μ l의 reverse transcriptase buffer, 1 μ l의 random hexamer(10 pM), 1 μ l의 MoMuLV-RT (10 U/ μ l), 1 μ l의 dNTP(10 pM), 그리고 0.5 μ l의 RNase inhibitor와 混合하였다. 이 混合物은 23 $^{\circ}$ C에서 15分間, 42 $^{\circ}$ C에서 1時間 그리고 95 $^{\circ}$ C에서 5分間 培養되었다. 各各의 RNA로부터 얻어진 2개의 分離된 cDNA는 1:4 또는 1:8로 sterile H₂O로 稀釋하여 PCR 反應에 利用하였다.

(3) RT-PCR 施行

遺傳子 發顯에 對한 定量的 分析을 위하여 cycle numbers(21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, and 42 cycles)를 增加시키면서 連續적으로 稀釋된 cDNAs (1:0, 1:2, 1:4, and 1:8)에 對한 PCR을 施行하였다. 各各의 cycle은 95 $^{\circ}$ C로 1分間의 denaturation, 58-62 $^{\circ}$ C로 45秒間 annealing, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1分間의 polymerization으로 構成하

었다. 50 μ l의 PCR 反應에서 12.5-25ng의 cDNA는 26-34 cycle을 施行하는 동안 housekeeping standard GAPDH을 包含한 모든 遺傳子들의 增幅이 대수적으로 增加함이 確認되었다. RT-PCR 產生物은 1時間동안 110 volts로 2% Agarose gels(FMC, Rockland, ME)을 利用하여 分離하였다. Agarose gels는 30分間 ethidium bromide(0.5 μ g/ml of 1 X TBE)로 染色한 後 15分間 1X TBE로 脫色하였다. PCR 產生物은 紫外線을 利用하여 可視化한 後 寫眞撮影하였다. 寫眞影像의 陰影이 깨끗해지도록 蒸溜水에 적시고 나서 乾燥시켰다. 使用된 oligonucleotide primers와 sequences primers는 Table 1에 整理하였다. Unspliced RNA 또는 genomic DNA의 PCR 產生物과 spliced mRNA의 PCR 產生物의 鑑別을 위하여 3'과 5' primer는 적어도 하나의 intron에 의해 分離되어 各各 다른 exons에 놓여지도록 製作하였다. 各各의 遺傳子 增幅에 대한 RT-PCR의 特異성은 biotinylated internal oligonucleotides를 利用한 Southern probing analysis로 確認하였다²⁵⁾.

(4) RT-PCR 產生物의 Densitometric Analysis

遺傳子 發顯에 대한 定量化는 ethidium bromide-stained gels을 laser densitometry로 scanning하여 얻어졌다. Signal intensity의 測定은 IBM 互換 컴퓨터에서 Molecular Analyst program(version 2.0)을 利用하여 laser densitometer(Bio-Rad)로 實行되었다. RT-PCR 產生物 寫眞影像의 陰影調節部는 持續적으로 scanning되었고, 背景의 intensity를 減算한 후 housekeeping gene(GAPDH)의 intensity에 대한 各各의 遺傳子 發顯 intensity의 比率을 計算함으로써 遺傳子の 發顯을 定量化하였다. 各各의 준비된 cDNA는 最少 2회의 定量的 RT-PCR을 反復 施行하였다.

4. 細胞 週期에 미치는 影響

1) 細胞 週期에 對한 Flow Cytometric Analysis

細胞를 PBS로 2回 洗滌한 後 4℃의 차가운 70% ethanol로 1時間동안 固定하였다. 分析하기 前에 ethanol을 除去한 後 100 μ g/ml의 propidium iodide와 1mg/ml의 RNase를 包含한 1.5ml의 PBS에 현탁시켰다. 37℃에서 2時間 동안 培養한 後 PBS로 재현탁시켰다. 細胞들은 FACS Caliber Cellquest program (Becton Dickinson)을 利用하여 分析하였다.

2) PCNA 發顯에 對한 Immunocytometric Analysis

細胞 增殖의 標識者인 PCNA의 發顯을 immunocytometry를 利用하여 分析하였다. PBS로 2回 洗滌한 1×10^7 개의 細胞에 FBS 0.1%를 含有한 100ml의 PBS를 添加하였다. Pycoerythrin이 결합된 DNA monoclonal antibody 20 μ l를 添加한 後 4℃에서 1時間 동안 培養하였다. 70% ethanol로 30分間 固定하였고, PBS로 2回 洗滌한 細胞를 immunocytometry software program of FACScan (Becton Dickinson)을 利用하여 分析하였다.

3) 細胞 週期 關聯 遺傳子 mRNA 發顯에 對한 定量的 RT-PCR 分析

細胞 週期 關聯 遺傳子 mRNA 發顯에 對한 定量的 RT-PCR 分析은 apoptosis 關聯 遺傳子 mRNA 發顯에 대한 定量的 RT-PCR 分析과 같은 方法으로 施行하였으며 使用된 oligonucleotide primers와 sequences primers는 Table 2에 整理하였다.

Table 1. Oligonucleotide Primers used for a Quantitative RT-PCR Analysis of Apoptosis-related Gene Expression (All sequences are listed 5' to 3')

Gene	Primer	Sequences	Orientation
GAPDH	2	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	sense
	3	GACCATGAGAAGTATGACAACAGC	antisense
Caspase-3	1	CGGGATCCATGGAGAACACTGAAAACCTC	sense
	2	CGGAATTCGTGATAAAAAATAGAGTT	antisense
Bcl-2	1	AGGAGACCATCGCGTAGTGAATC	sense
	2	CATGTGCGACGGAAACCTGGAGA	antisense
Bcl-XL	1	AGTCAGTTCGGTATTCAGGATAA	sense
	2	AAGTCCTCGAATGCCAGATCCTA	antisense
Bax	1	TTCAGTCGTCGATGGCTAGGATC	sense
	2	AATCAAGCCTGGACCTCACTACC	antisense

Table 2. Oligonucleotide Primers used for a Quantitative RT-PCR Analysis of Cell Cycle-related Gene Expression (All sequences are listed 5' to 3')

Gene	Primer	Sequences	Orientation
GAPDH	2	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	sense
	3	GACCATGAGAAGTATGACAACAGC	antisense
PCNA	1	CACCTGTAGCTCTGATCGACCG	sense
	2	CATCGCCTCGAAAACCTCAGTCT	antisense
p21/Waf1	SC05	AGCTGGGCGCGGATTCGCCGAG	sense
	SC04	AGGCTTCCTGTGAGCGGGCCTTTG	antisense
p27/KIP1	1	ATGCCGTACAGTCGATCCTGATC	sense
	2	TCGATCGTACTTGACTGGACAG	antisense
p57/KIP2	1	AATACTGAATCGCTAAGTGACTA	sense
	2	GCTCGATCAAATCGATCGCTATC	antisense
CDK4	1	ACGCTACTTGCTACGCTCACAGC	sense
	2	TTACGCAATCTATCGTAATCTT	antisense
Histone H3	1	ATGGCTCGTACAAAGCAGAC	sense
	2	ATGCGGCGGGCCAGCTGGATGTC	antisense
Cyclin D1	1	TCTAAGATGAAGGAGACCATC	sense
	2	GCGGTAGTAGGACAGGAAGTTGTTG	antisense
Cdc2	1	CTAACTATGGAAGATTATAC	sense
	2	GAGATATAACCTGGAATCCT	antisense
c-Myc	1	GATTCTCTGCTCTCCTCGACGGAG	sense
	2	GCGCTGCGTAGTTGTGCTGATGTG	antisense
c-Fos	1	TTACTACCACTCACCCGCACTC	sense
	2	TGGAGTGTATCAGTCAGCTCCCTC	antisense
c-Jun	1	GACATGACAATCGGGTCCATCG	sense
	2	ACACAGCTCAAGATCGCTACTG	antisense

IV. 成績

1. MTT 反應實驗 結果

蜂毒이 人體 黑色腫 細胞 活性度에 미치는 影響을 알아보기 위한 MTT 反應實驗을 施行한 結果 1.0 μ l/ml 以上の 用量을 處理한 實驗群은 對照群에 比하여 處理 用量에 比例하여 統計學的으로 有意한 活性度の 減少를 觀察할 수 있었다.(Table 3)

Table 3. The Effect of Bee Venom on Human Melanoma Cell Viability in MTT Assay

Dose(μ l/ml)	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Mean
Control	0.276	0.178	0.245	0.233 \pm SD
0.5	0.261	0.154	0.252	0.2223 \pm SD
1.0	0.141	0.133	0.174	0.1493 \pm SD
2.0	0.138	0.119	0.116	0.1243 \pm SD
5.0	0.101	0.094	0.100	0.0983 \pm SD
10.0	0.093	0.076	0.062	0.177 \pm SD

2. Apoptosis 檢索 結果

蜂毒으로 處理한 黑色腫 細胞에서의 cell death가 apoptosis에 의한 것임을 알아보고자 蜂毒 0, 0.5, 1, 2, 5, 및 10 μ l/ml을 5x10⁶ cells에 48時間 處理한 後 apoptosis의 誘發을 Tryphan blue exclusion assay로 檢索하였고(Table 4), 24 時間 培養한 2x10⁴ cells에 蜂毒 0, 0.5, 1, 2, 5, 및 10 μ l/ml을 24時間 處理한 後 [³H]thymidine release assay를 施行하여 檢査(Table 5)한 結果 各各의 實驗群에서 用量에 比例하여 apoptosis에 의해 cell death가 增加함을 觀察 할 수 있었다. 아울러 蜂毒液 0, 0.5, 1, 2, 및 5 μ l/ml을 5 X 10⁶ cells에 24時間 處理한 後 apoptosis의 誘發을 flow cytometry를 利用하여 分析한 結果 用量에 比例하여 sub G₁ fraction이 增加함을 觀察 할 수

있었다.(Table 6, Fig 1)

Table 4. The Effect of Bee Venom on Apoptotic Cell Death of Human Melanoma Cell in Tryphan Blue Exclusion Assay (dead cells/2000 cells)

Dose(μ l/ml)	Exp.1	Exp.2	Exp.3
Control	466	501	397
0.5	922	782	889
1.0	1177	1168	1072
2.0	1378	1512	1587
5.0	1687	1700	1712
10.0	1856	1892	1899

Table 5. The Effect of Bee Venom on Apoptotic Cell Death of Human Melanoma Cell in [³H]thymidine Release Assay (release/total CPM)

Dose(μ l/ml)	Exp.1	Exp.2	Exp.3
Control	0.315	0.288	0.328
0.5	0.409	0.389	0.480
1.0	0.513	0.512	0.542
2.0	0.743	0.744	0.715
5.0	0.899	0.843	0.877
10.0	0.948	0.923	0.932

Table 6. Flow Cytometric Analysis of Apoptotic Sub G₁ Fraction following Bee Venom Treatment (Percent distribution of Sub G₁ cells)

Dose(μ l/ml)	Exp.1	Exp.2
Control	9.4	3.7
0.5	11.9	14.1
1.0	22.2	21.2
2.0	29.6	31.3
5.0	39.9	39.4

3. Apoptosis 分析 結果

蜂毒이 apoptosis에 미치는 影響을 알아보고

자 施行한 caspase-3 protease activity에 대한 분석에서 1.0ml 以上の 用量으로 處理한 實驗群 부터는 處理 用量에 比例하여 統計學的으로 有意한 caspase-3 protease의 activity를 增加를 觀察할 수 있었다.(Table 7) 이에 對한 機轉을 보다 細密히 알아보고자 定量的 RT-PCR을 利用하여 apoptosis 關聯 遺傳子의 mRNA의 發顯을 分析한 結果 apoptosis inhibitor인 Bcl-2와 Bcl-X_L은 減少하였고, apoptosis promotor인 Bax는 增加하였다.(Table 8, Fig 2)

Table 7. The Effect of Bee Venom on Activity of Caspase-3 Protease

Dose(μl/ml)	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Mean
Control	0.689	0.612	0.655	0.652±SD
0.5	0.711	0.690	0.732	0.711±SD
1.0	0.862	0.883	0.892	0.879±SD
2.0	1.215	1.126	1.198	1.1797±SD
5.0	1.789	1.781	1.902	1.824±SD

Table 8. Quantitative RT-PCR Analysis of mRNA Expression of Apoptosis- related Genes following treatment of Bee Venom

Gene	Caspase-3	Bcl-2	Bcl-X _L	Bax
Control	1.00	1.00	1.00	1.00
1.0	1.22	0.79	0.82	1.17
2.0	1.68	0.45	0.58	1.52
5.0	1.82	0.23	0.19	1.63

4. 細胞 週期에 미치는 影響에 對한 檢査 結果

蜂毒이 細胞 週期에 미치는 影響을 알아보고자 蜂毒을 黑色腫 細胞에 處理하고 72時間이 지난 後에 flow cytometry로 分析한 結果 蜂毒의 用量에 比例하여 G₁期의 細胞는 增加하였고 S期와 G₂/M期는 減少함을 보였다.(Table 9, Fig. 3) 또한 G₁期에서 S期 사이에 그 發顯이 增加하여

細胞 週期 過程에 標識者로 利用되는 PCNA를 immunocytometric analysis를 利用하여 分析한 結果 用量에 比例하여 PCNA 發顯이 減少함을 觀察할 수 있었다.(Table 10) 이에 對한 機轉을 더 細密히 알아보고자 定量的 RT-PCR을 利用하여 細胞 週期 關聯 遺傳子의 mRNA의 發顯을 分析한 結果 G₁期에서 S期로의 移行을 抑制하는 inhibitor인 p21, p27, p57은 增加하였으며, G₁期에서 S期로 넘어가는 것을 促進하는 promotor이자 oncogene인 Cyclin D1, CDK4, c-Myc, c-Fos, Histone H3은 有意性 있게 減少하였다. CDC2와 c-Jun의 發顯은 뚜렷한 變動이 觀察되지 않았다.(Table 11, Fig 4)

Table 9. Flow Cytometric analysis of Cell Cycle Progression following treatment of Bee Venom

(Percent distribution of cells in each phase of the cell cycle)

Dose(μl/ml)	G ₁	S	G ₂ /M
Control	45.1	37.5	17.4
1.0	66.2	21.2	12.6
2.0	69.6	21.1	9.3
5.0	84.9	10.4	4.7

Table 10. Immunocytometric Analysis of PCNA Expression following treatment of Bee Venom

Dose(μl/ml)	Exp.1	Exp.2	Exp.3
Control	1.00	1.00	1.00
1.0	0.88	0.93	0.96
2.0	0.82	0.77	0.74
5.0	0.62	0.56	0.61

Table 11. Quantitative RT-PCR Analysis of mRNA Expression of Cell Cycle- related Genes following treatment of Bee Venom

Gene	Control	1.0	2.0	5.0
PCNA	1.00	0.83	0.63	0.60
p21/Waf1	1.00	1.14	0.95	1.02
p27/KIP1	1.00	1.11	1.03	0.97
p57/KIP2	1.00	0.89	1.06	1.05
CDK4	1.00	0.89	0.86	0.63
Histone H3	1.00	0.90	0.71	0.52
Cyclin D1	1.00	0.85	0.75	0.56
CDC2	1.00	1.15	1.08	0.93
c-Myc	1.00	0.79	0.39	0.33
c-Fos	1.00	1.02	1.32	1.67
c-Jun	1.00	0.92	0.98	1.19

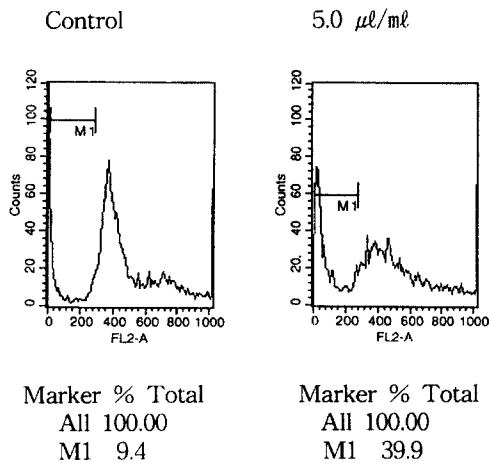


Fig. 1. Flow Cytometric Analysis of Bee Venom-induced Apoptosis of SK-MEL-2

SK-MEL-2 cells were treated with 5.0 $\mu\text{l/ml}$ of bee venom (3000:1) for 24 hours. Cells were fixed in 70% cold ethanol and resuspended in 1.5 ml PBS containing propidium iodide (100 $\mu\text{g/ml}$) and RNase (1 mg/ml). After incubation for 2 hours at 37°C, the cells were resuspended in PBS. The cells were analyzed by FACS Caliber Cellquest program (Becton Dickinson).

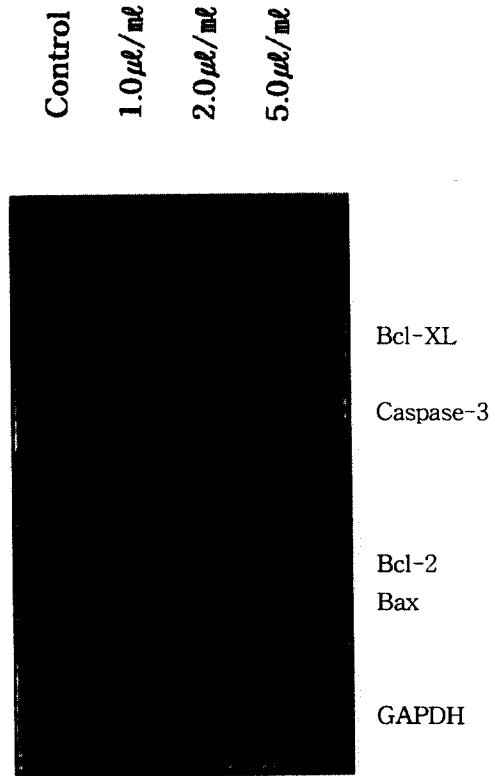


Fig. 2. A Quantitative RT-PCR Analysis of Apoptosis Related Gene Expression

one μg of total cellular RNA extracted from bee venom-treated SK-MEL-2 cells were converted to cDNA by reverse transcription and 1:4 diluted cDNA was subjected to PCR amplification of Caspase-3, Bcl-2, Bcl-XL, Bax, and an internal control gene, GAPDH. Ten μl of PCR products was resolved on a 2% agarose gel and its band intensities were scanned using a densitometry. The expression levels of each gene were determined as expression ratio, which were adjusted by intensities of GAPDH expression.

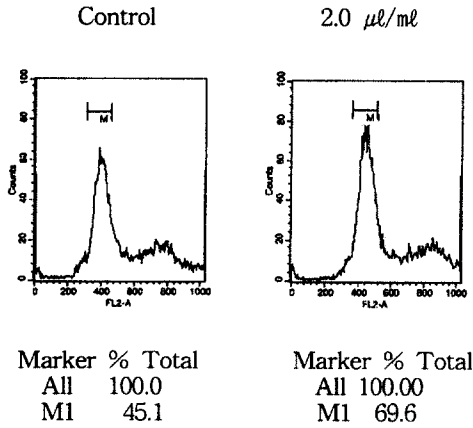


Fig. 3. Flow Cytometric Analysis of Bee Venom-treated Cell Cycle

Untreated control and bee venom (2.0 µl/ml, 72 hours)-treated SK-MEL-2 cells were fixed in 70% cold ethanol and resuspended in 1.5 ml PBS containing propidium iodide (100 µg/ml) and RNase (1 mg/ml). After incubation for 2 hours at 37 °C, the cells were resuspended in PBS. The cells were analyzed using FACS Caliber Cellquest program (Becton Dickinson).

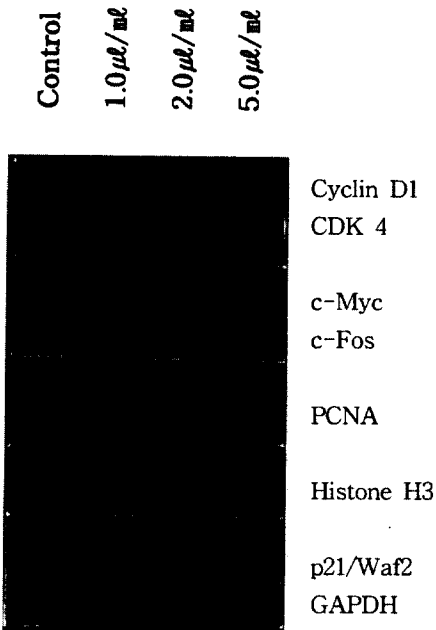


Fig. 4. A Quantitative RT-PCR Analysis of Cell Cycle Related Gene Expression

one µg of total cellular RNA extracted from bee venom-treated SK-MEL-2 cells were converted to cDNA by reverse transcription and 1:4 diluted cDNA was subjected to PCR amplification of cell cycle-related genes including p21/Waf1, Cyclin D1, CDK4, c-Jun, c-Fos, PCNA, and an internal control gene, GAPDH. Ten µl of PCR products was resolved on a 2% agarose gel and its band intensities were scanned using a densitometry. The expression levels of each gene were determined as expression ratio, which were adjusted by intensities of GAPDH expression.

V. 考 察

蜂毒이란 꿀벌의 毒囊에 들어있는 약 40여 가지의 有效成分으로 構成된 物質로 炎症, 알러지 등을 誘發하는 作用이 있으나 臨床에서는 鎮痛, 解熱, 消炎, 鎮痙 및 免疫 增強 等の 效能이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁾

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고, 祛風除濕, 止疼痛, 解痙平喘, 消腫降壓하는 效能이 있어 류마티스關節炎, 急慢性關節炎, 坐骨神經痛, 痛風, 筋肉痛, 偏頭痛, 氣管支喘息, 過敏性鼻炎, 結節性紅斑, 蕁麻疹, 甲狀腺機能亢進, 및 高血壓 等に 效果가 있는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾

蜂毒의 成分은 크게 Enzymes, Peptide components, Non peptide components로 構成되어 있으며,²²⁾ 이중 Enzymes의 主要成分으로는 Phospholipase A2와 Hyaluronidase를 들 수 있다.²⁰⁾

Enzymes 중 Phospholipase A2는 間接的 分解 酵素로 作用하여 Phospholipid의 細胞膜을 分解하고, 다른 細胞膜 融解酵素의 作用을 誘導함으로 脂肪酸의 分解에 最初의 連鎖反應을 誘導하는 物質이 된다. Hyaluronidase는 細胞膜의 가장 表

層에 자리잡고 있는 mucopolysaccharide의 構成成分인 Hyaluronic acid를 加水分解하는데 觸媒로 作用하여 蜂毒의 擴散을 도와준다.

Peptide components는 Freeze-dried venom의 約 50%를 構成하고 있으며, 主要成分으로는 Mellitin, Apamin, MCD peptide를 들 수 있고, 이들은 蜂毒의 特性을 說明하는데 큰 역할을 하고 있다. 그 중에서 가장 많이 分布하는 Mellitin (40-50%)은 26개의 amino acid로 構成된 活性 peptide로 크게 溶血作用과 酵素作用을 하고 있다.^{23,40)}

또한 血中分布가 낮을 때는 (0.5×10^{-10} - 0.5×10^{-11} g/ml)으로 Blood Viscosity를 減少시키고, 높을 때는 (0.5×10^{-5} - 0.5×10^{-6} g/ml)으로 Blood Viscosity를 增加시키는 것을 顯微鏡的 分析으로 確認 할 수 있는데 이는 血液 循環系疾患에 治療의이면서 毒性的인 兩面性을 지니고 있다. 또한 大食細胞의 移動을 強하게 抑制하며 lysosome 細胞膜을 安定시켜 炎症을 抑制한다. Apamin은 神經系에 作用하며 過量한 量 (0.5ml/100g)을 血管內에 注入하면 Skeletal muscle에 痙攣을 誘發하고, 더 많은 量을 注入하면 呼吸不全을 일으켜 死亡하게 된다(LD₅₀=4mg/100mg).

MCD peptide는 Mast cell의 溶解와 Histamine 擴散을 增加시키는 作用이 있어, 喘息, 發熱 等の Allergy誘發에 關與한다고 報告되었다. Apamin과 MCD peptide는 細胞免疫學的 實驗과 動物實驗에서 腦下垂體와 副腎皮質을 興奮시켜 免疫機能을 增加시키고 Prostaglandin E가 Prostaglandin으로 合成되는 것을 抑制하여 鎮痛, 消炎效果를 나타내며, 巨核細胞의 移動을 抑制하고, 血漿蛋白質의 變性を 抑制하며, 白血球의 食作用을 抑制하고, 血漿의 纖維化를 低下시키는 效能이 立證되었다.

Non peptide components의 主要成分¹⁹⁾은 Histamine, Dopamine, Noradrenaline으로 構成되어 있는데, Histamine은 한 마리의 벌에 約 1.8-2.0 μ g이 含有되어 있으며 副交感神經 興奮劑인 Acetylcoline과 類似한 作用을 한다. 즉, 平滑筋과 氣管支 및 胃腸管을 收縮시키고 毛細血管을

擴張시켜 血壓降下를 招來하며, 體內的 Histamine受用體와 結合하여 Allergy를 誘發한다고 믿어진다. 이에 過敏反應을 일으킬 경우 抗 Histamine劑의 服用이나 脫感作療法이 必要하게 된다(LD₅₀=27mg/100mg).

Dopamine은 Norepinephrine의 前驅物質로서 廣範圍한 生理的 作用을 하며, Noradrenaline은 α, β 受用體에 作用하여 血管收縮作用과 出血防止, 炎症의 腫脹分泌를 減少시키고 有害한 藥物의 吸收도 減少시킨다.

蜂毒은 數千年前부터 諸般 疼痛 및 炎症性 疾患에 廣範圍하게 使用되어져 왔으며 이에 대한 記錄이 紀元前 2000年경의 이집트의 파피루스 文書나 中國에서 發見된 紀元前 168年の 馬王堆醫書에도 있었다.¹⁶⁾ 近代的인 論文은 1858年 프랑스의 Desjardins가 最初로 류마티스性 疾患에 應用한 結果를 發表한 것을 始作으로 하여,¹¹⁾ 1968年 Habermann E.²²⁾는 蜂毒의 生化學的 成分에 대해 報告하였으며, 以後로 各 成分들의 效能, 作用, 및 알러지 反應에 대한 많은 實驗 및 臨床論文이 發表되었다. 癌과 聯關된 論文으로는 Belleveau 등이 免疫體系를 刺戟해서 癌細胞의 生成을 抑制하였다는 報告를 하였으며,¹¹⁾ 最近의 論文에서 Pippia³⁶⁾ 등은 蜂毒의 成分 중 mellitin이 tumor promoter로 作用한다고 報告하였고, Higuchi M³⁰⁾ 등은 蜂毒의 成分 중 phospholipase A2가 tumor necrosis factor와 相關이 있다고 報告하였다. 國內에서는 最近 權¹⁰⁾이 蜂毒藥鍼이 抗癌作用을 가지고 있음을 報告한 바 있다.

癌은 傳染性 疾患이 基本的으로 解決된 國家에서 心腦血管系 疾患과 더불어 死亡原因의 1, 2位를 차지하는 주요한 疾病으로¹⁷⁾ 統計廳에서 發表한 1997年度 死亡原因의 資料를 보면 全體 死亡原因 중 2位를 차지하며 年間 50,000명 以上이 癌으로 死亡하고 있다고 한다.⁴⁾

黑色腫은 皮膚癌의 一種으로 皮膚癌은 人體에서 發生하는 全體 癌中에서 2.4-4.4%를 차지하고 있으며,²⁾ 韓醫學에서는 石疽, 黑疔, 失榮, 翻花瘡 등이 皮膚癌에 屬한다.^{15,17)}

이에 著者는 臨床的으로 蜂毒藥鍼의 活用 範圍

를 넓히기 위해, 蜂毒의 抗癌效果 與否와 그 分子生物學的 機轉을 알아보고자 人體 黑色腫 細胞에 蜂毒을 處理한 後, MTT 反應實驗을 施行하여 細胞活性度의 變化를 檢討하였으며, tryphan blue assay, [³H]thymidine release assay 및 sub G₁ apoptotic fraction의 flow cytometric analysis를 施行하여 apoptosis 여부를 檢索하였다. 蜂毒에 의하여 誘導되는 apoptosis의 分子生物學的 機轉을 分析하고자 caspase-3 protease의 activity의 變化有無를 測定하였으며, apoptosis 關聯 遺傳子의 mRNA 發顯 樣相을 定量的 RT-PCR을 利用하여 分析하였다. 아울러 蜂毒이 細胞 週期에 미치는 影響을 알아보고자 flow cytometric analysis, PCNA 發顯에 對한 immunocytometric analysis 및 細胞 週期 關聯 遺傳子의 mRNA 發顯 樣相을 定量的 RT-PCR을 利用하여 分析하였다.

MTT 反應實驗은 細胞의 活性度를 測定하는 方法으로 1983年 Mosmann³⁵⁾에 의해 처음 試圖 되었으며, 1986年 Cole²⁷⁾과 1988年 Alley 等에 의해 使用되기 始作하여 最近 널리 普及되었다. MTT는 3-[4,5- imethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; Thiazolyl blue이며, 100mg, 250mg, 500mg 등 多樣한 用量的 yellow water-soluble tetrazolium 染色으로 細胞의 活性度에 따라 MTT- formazan의 量이 달라지며 이를 適切한 溶媒에 作用시킨 後 spectrophotometer로 읽어내어 細胞의 生存能力을 測定한다.

蜂毒이 人體 黑色腫 細胞 活性度에 미치는 影響을 알아보기 위한 MTT 反應實驗을 施行한 結果 1.0 μ l/ml 以上の 用量的으로 處理한 實驗群은 對照群에 比하여 處理 用量的에 比例하여 統計學的으로 有意한 活性度의 減少를 觀察할 수 있었다. 이는 蜂毒이 人體 黑色腫 細胞의 活性를 낮추는 效果가 있음을 보이는 것이며, 특히 5.0 μ l/ml과 10.0 μ l/ml 實驗群에서는 對照群에 比해 50% 以下の 活性度 減少를 보여 매우 강한 活性 抑制 作用이 있음을 보였다.

Apoptosis(programmed cell death, PCD)^{32,45)}는

1972년 Kerr에 의해 定立된 概念으로 異常 細胞를 除去하여 多細胞 生物의 發生過程과 恒常性 維持에 重要な 역할을 한다. 生體構造의 形成, 不必要한 組織이나 異常 細胞의 除去, 細胞數의 調節 等이 apoptosis를 통해 일어난다. 藥物이나 毒性 物質 等의 外部의 刺戟으로 因하여 發生하는 細胞의 죽음인 壞死가 일어나 죽는 細胞는 부피가 커지면서 결국에는 細胞가 터지고, 밖으로 분출된 細胞質에 의해 炎症反應을 일으키는 반면, apoptosis에서는 細胞內 器官들이 保存된 狀態로 炎症을 同伴하지 않으면서 細胞 부피의 縮小, 細胞膜의 突出, membrane-bound apoptotic body의 形成, 核 染色質의 濃縮, DNA의 단편화 등이 일어나고, 죽은 細胞는 이웃 細胞의 大食作用에 의해 사라지게 된다. 또한 apoptosis는 能動的인 細胞死의 形態로 病理的 狀況에만 局限되지 않고 mitosis와 相互 牽制하여 定常 細胞數를 調節한다. 一般的으로 apoptosis는 細胞의 生存과 관계가 깊은 成長 因子가 除去된 후에 發生한다.

蜂毒으로 處理한 黑色腫 細胞에서의 cell death가 apoptosis에 의한 것임을 알아보고자, tryphan blue exclusion assay와 [³H]thymidine release assay를 施行하여 檢査한 結果 各 實驗群에서 處理 用量的에 比例하여 apoptosis에 의한 cell death가 增加함을 보였다. 아울러 flow cytometry를 利用하여 分析한 結果 處理 用量的에 比例하여 sub G₁ fraction이 增加함을 보였다. 이는 蜂毒의 作用에 의하여 黑色腫 細胞에 apoptosis가 일어난 것임을 確認시켜주는 것이다.

Caspase-3(Cpp32, Apopain, Yama)³³⁾는 Teresa 등에 의해 처음 報告된 32KD의 分子量을 가진 putative cysteine protease이다. Caspase-3의 免疫反應은 hepatocyte, bone marrow, bronchial epithelium, collecting duct, medulla, 그리고 cartilage의 chondrocyte에서 높았다. Caspase-3가 缺乏된 쥐의 腦에서는 apoptosis가 誘發되지 않아서 caspase-3는 apoptosis에 重要な 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

Bcl-2 family는 apoptosis를 抑制하는 Bcl-2,

Bcl-X_L, Mcl-1, A1과 apoptosis를促進시키는 Bcl-X_S, Bax, Bak, Bad, Bid로構成되어 있는데 그生化學的 作用은 아직不確實하다. Bcl-2 Family는 homodimers와 heterodimers의 두形態로存在하며後者は Bcl-2/Bax와 같이 apoptosis抑制遺傳子와促進遺傳子の結合形態를 나타낸다.

Bcl-2 遺傳子³¹⁾는分子量 26KD의 protein으로서 apoptosis過程의重要遺傳子인 Caspase-3의活性를저지하는作用이있다. Bcl-2의 overexpression은 tumor cell apoptosis의完成을阻害한다. 따라서 non Hodgkin's lymphoma, AML(acute myelogenous leukemia), prostate cancer 및 neuroblastoma에서의 Bcl-2의發顯은 좋지 않은豫後와 낮은治療反應을 나타낸다.

Bax⁴¹⁾는分子量 21KD의 단백질로 tumor suppressor로作用하여 p53 mediated apoptosis를刺戟시키며 chemotherapy로誘發된 apoptosis에서도增加한다.

大部分의 Bcl-2와 Bax는 heterodimer의形態로存在하는데 서로相對的인 protein으로 Bcl-2가 apoptosis를抑制하는 반면 Bax는 apoptosis를促進하는機能이있다. 만일 single Bax가活性化되면 apoptosis를促進하여 cell death가늘어나고 single Bcl-2가活性化되면 apoptosis를抑制하여 cell death가줄어들게되는 것이다. 따라서 Bcl-2나 Bax의 single form인 homodimer가늘어나게되면 apoptosis의 signal이되는 것이다.

Bcl-X⁴²⁾는 Bcl-2 gene family의 새로운一員으로 주로 neural tissue에 많이分布하며細胞週期の G₁期에서 cell-cycle-dependent regulation作用을한다. 사람에게 있어서 Bcl-X는 Bcl-X_L과 Bcl-X_S의 두가지分野로 mRNA의種이區別되는데 lymphoid cell에서의 apoptosis를 modulation하는機能을 가진 것으로 생각된다. 특히 Bcl-X_L은 Bcl-2와類似하게作用하는점이明確하여 그機能上 IL-3 依存性 hematopoietic cell line에서 apoptosis를阻害한다.

RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)^{28,43)}은傳統的으로特定遺傳子の

RNA 分析에使用된 Northern blotting의問題點을克復하는方法이다. 기존 Northern blotting의短點인 1개遺傳子分析에 5~10 μ g의 RNA를必要로한다는점과同位元素의使用이必須的이라는問題點을解決한方法으로微量(1 μ g以下)의 RNA만으로도特定遺傳子の分析이可能하기 때문에敏感度가뛰어나며,同位元素의使用이必要하지않다는점 때문에最近大部分의分子生物學的研究에使用되어지고 있다. 그러나細胞 또는組織속에存在하는核酸의 template가 100萬培以上으로增幅된다는사실로인하여定量分析은 PCR施行 후에 그產生物의電氣泳動上的 DNA-band의強度만으로結果를서로比較할수없는短點은繼續的으로가지고 있다. 따라서最近에는標準 RNA를이용하여 한試驗管에서逆轉寫가 일어나게 한後 그 cDNA를 차례로稀釋하고各各을 PCR로增幅하여映像密度計(densitometer)로서定量化하는方法등을利用하여 mRNA 定量方法을確立하여短點을補完하였다.

蜂毒이 apoptosis에 미치는影響을알아보고자施行한 caspase-3 protease activity에 대한分析에서 1.0 μ l/ml 以上の實驗群부터는處理用量에比例하여對照群에 비해統計學的으로有意한 caspase-3 protease의 activity를增加를觀察할수있었다. 이는蜂毒이 apoptosis를誘發하는데影響을 미치는 것임을 보이는 것이다. 이에對한機轉을 더細密히알아보고자定量的 RT-PCR을利用하여 apoptosis 關聯遺傳子の mRNA의發顯을分析한結果 apoptosis inhibitor인 Bcl-2와 Bcl-X_L은減少하였고, apoptosis promotor인 Bax는增加하였다.

PCNA(proliferating cell nuclear antigen)³⁴⁾는 SLE 患者의血清에서自家抗體로서 처음發見되었고, 36KD의分子量을가지고있는 DNA polymerase-delta의補助蛋白으로 DNA 合成과細胞增殖에密接하게關聯되어 있다. 주로細胞週期の G₁後期에 나타나 S期에最高에到達하였다가 G₂ 및 M期에 점차減少하는 것으로알려져있으며 이와 같은特性으로 cyclin으로 불리기도

한다.

p21 단백질⁴⁶⁾은 Waf1, Cap20, Cip1, Sdi1 등으로도 불리며,老化된 세포에서 그 양이 증가하므로 세포분열을 억제하는 것으로 알려져 있다. p21 유전자 발현은 p53이 p21의 promoter site에 결합하여 증가시키는 p53 의존적 경로와 이와 무관한 p53 비 의존적 경로에 의해 조절됨이 최근 밝혀지고 있다. 정상적인 세포에서 p21은 4개의 복합체로 발견되는데 Cyclin, CDK, PCNA와 결합물을 이루고 있다. p21은 세포週기의 G₁기에서 중요한 역할을 하는 CDK의 inhibitor로 작용하며, DNA polymerase를 억제하여 G₁ 休止期로誘導한다. 따라서 p21은 損傷된 DNA를 monitor 하는 G₁ check point에 必須적인 단백질이다.

p27 단백질²⁹⁾은 Kip1으로도 불리며 CDK inhibitor의 하나로 세포의 成長을 억제하는 기능이 있다. 腫瘍에서 p27의 mutation은 흔하지 않다. p27의 level은 단백질의 轉移와 分解 사이에서 posttranscriptional level에서 調節된다.

p57 단백질⁴⁴⁾은 Kip2로도 불리며 CDK inhibitor의 하나로 人體 染色體 11p15.5에 位置하는 腫瘍抑制유전자로 乳房癌, 膀胱癌, 肺癌, 卵巢癌, 腎臟癌, 辜丸癌에서 發見된다. p57의 C 末端에서의 혼란이 세포 成長 調節의 失敗를 誘發하는 것으로 推定되어진다. p27과 p57은 p21 family에 屬한다.

CDK(Cyclin-dependent kinase)⁴⁾ 유전자²⁴⁾는 Cyclin D와 결합하여 G₁기에서 S기로 進行하는데 關與하는 유전자이다. c-Myc의 刺戟을 받아 Cyclin D-CDK4 복합체가 作用을 하여 G₁기에서 S기로의 進行을 促進시킨다.

Histone H3³⁾는 眞核細胞의 核內 DNA와 결합하고 있는 鹽基性 단백질인 Histone의 하나로 G₂기에서 染色體 凝縮에 중요한 역할을 하는 단백질이다. Histone H1은 가장 크며 進化的 變異가 많으나 H3와 H4는 進化 過程에서 序列 變動을 보여주지 않는다.

Cyclin D class(D1, D2, D3)³⁹⁾는 retinoblastoma gene의 磷酸化에 중요한 역할을 하고 mammalian cell에서는 G₁기의 律速因子로

作用한다. Cyclin D1은 CDK4, CDK6를 活性化시키고 G₁기에서 S기로의 세포週기를 進行시킨다. 따라서 Cyclin D1은 PCNA, p21, p27, CDK4, Cak 등과 서로 合成하거나 抑制하면서 세포週기의 G₁기에서 S기로의 段階를 調整한다.

Cdc2 유전자³⁷⁾는 세포週기 중에 주로 M기를 調節하는 유전자이다. 원래는 分열효모의 세포週기 유전자群의 하나인 Cdc2를 指稱하였지만 最近에는 사람의 眞核細胞에서도 發見되었다. 分子量 34KD의 단백질 磷酸化酵素를 code하고 있으며, N 末端 근방에는 16아미노산으로 이루어진 保存配列이 있어서 PSTAIRE라고 불리운다. Cdc2 단백질의 發顯을 위해서는 cyclin B와의 복합체를 形成하고 CDC kinase에 의해 M기를 制御한다. CDC kinase의 活性化는 S기에서 M기로 넘어감을 뜻하고 CDC kinase의 不活性化는 M기에서 終結됨을 意味한다.

Myc family²¹⁾에는 c-Myc, n-Myc, L-Myc이 있는데 이들 유전자의 突然變異는 많은 人間の 腫瘍에서 報告된 바 있다. 1983년 c-Myc 유전자가 各種 成長 因子에 의해 活性化가 된다는 報告가 있었고, 1990년 Myc 단백질이 HLH 構造를 가지는 轉寫因子의 DNA binding sequence와 恰似한 CACGTG에 特異적으로 附着한다는 것이 밝혀졌다. Myc 단백질은 homodimer를 正常的 條件에서 形成하지 않으며 Max라는 단백질과 heterodimer를 形成하여 유전자의 轉寫 活性化를 誘發한다. c-Myc은 닭에서 myeloma를 일으키는 avian myelocytomatosis virus 29에서 分離된 v-Myc와 같은 유전자이다.

c-Fos²¹⁾는 55KD의 分子量을 가진 유전자로 1983년 마우스에서 osteosarcoma를 일으키는 FBJ murine osteogenic sarcoma virus에서 分離된 v-Fos 유전자와 같은 것이다. Fos 단백질은 스스로는 AP-1 site에 附着하지 않으며 Jun 단백질과 協同적으로 DNA에 附着한다. 이들 단백질은 leucine-zipper 構造를 가지고 있는데 이들 構造의 leucine side chain 間의 hydrophobic interaction에 의해 dimerization이 이루어진다. G₁기에서 S기로 넘어가는 것을 促進한다.

c-Jun²¹⁾은 39KD의 분자량을 가진 遺傳子로 1987年 닭에서 fibrosarcoma를 誘發하는 avian sarcoma virus 17에서 分離된 v-Jun 遺傳子와 같은 것이다. c-Fos 遺傳子와 같이 AP-1 轉寫因子를 形成하여 downstream gene의 調節에 關與한다. G₁期에서 S期로 넘어가는 것을 促進한다.

蜂毒이 細胞 週期에 미치는 影響을 알아보고자 蜂毒을 黑色腫 細胞에 處理하고 72時間 지난 後에 flow cytometry로 分析한 結果 蜂毒의 處理 用量에 比例하여 G₁期の 細胞는 增加하였고 S期와 G₂/M期는 減少함을 보였다. 이는 蜂毒이 癌 細胞를 G₁期에 머무르게 하여 細胞 分裂을 抑制함을 보이는 것이다. 또한 G₁期에서 S期 사이 그 發顯이 增加하여 細胞 週期 過程에 標識者로 利用되는 PCNA를 immunocytometric analysis를 利用 分析한 結果 用量에 比例하여 PCNA의 發顯이 減少함을 보였으며 이 또한 蜂毒이 G₁期에서 細胞 分裂을 抑制함을 보이는 것이다. 이에 對한 機轉을 더 細密히 알아보고자 定量的 RT-PCR을 利用하여 細胞 週期 關聯 遺傳子의 mRNA의 發顯을 分析한 結果 G₁期에서 S期로의 이행을 抑制하는 inhibitor인 p21, p27, p57은 增加하였으며, G₁期에서 S期로 넘어가는 것을 促進하는 promotor이자 oncogene인 Cyclin D1, CDK4, c-Myc, c-Fos, Histone H3은 有意性 있게 減少하였다. CDC2와 c-Jun의 發顯은 뚜렷한 變動이 없었다. 이러한 結果는 蜂毒이 細胞週期の G₁期에 影響을 미쳐 細胞의 增殖을 抑制하는 作用이 있음을 나타내는 것이다.

以上의 實驗 結果에서 MTT 反應實驗 結果 蜂毒은 癌細胞의 活性도를 낮추었으며, tryphan blue assay, [³H]thymidine release assay, 및 flow cytometric analysis of sub G₁ fraction의 結果 蜂毒에 의한 細胞의 死滅은 apoptosis에 의함을 確認하였고, caspase-3 protease의 activity의 變化有無를 測定한 結果 蜂毒이 activity를 增加하게 하여 apoptosis를 促進함을 確認하였다. Apoptosis 關聯 遺傳子의 mRNA 發顯에 對한 定量的 RT-PCR 檢査에서 apoptosis inhibitor인 Bcl-2와 Bcl-X_L은 減少하였고, apoptosis

promotor인 Bax는 增加함은 注目할만한 結果이다. 細胞週期에 對한 flow cytometric analysis에서 G₁期가 處理 用量에 比例하여 增加하였고, 細胞 增殖에 關與하는 PCNA 發顯에 對한 immunocytometric analysis에서 減少함을 보여 癌細胞의 增殖을 G₁期에서 抑制함을 보였다. 細胞 週期 關聯 遺傳子의 mRNA 發顯에 對한 定量的 RT-PCR 檢査에서 細胞 分裂의 inhibitor인 p21, p27, p57은 增加하였고, promotor이자 oncogene인 Cyclin D1, CDK4, c-Myc, c-Fos, Histone H3은 減少하였다. CDC2와 c-Jun의 發顯은 뚜렷한 變動이 없었다. 따라서 蜂毒은 癌細胞에 apoptosis를 誘發하고 細胞分裂을 抑制하여 抗癌作用을 가지고 있음이 認定되었다. 向後 生體에서의 抗癌作用 및 定常細胞에 미치는 影響과, 適切한 濃度 및 用量을 알아내는 追加의 實驗 및 研究가 必要할 것으로 思慮된다.

VI. 結 論

藥鍼用 蜂毒의 抗癌效果와 그 分子生物學的 機轉을 알아보고자 人體 黑色腫 細胞를 蜂毒으로 處理한 後, MTT 反應實驗을 통하여 細胞活性도를 測定하였고, apoptosis의 檢査를 위해 tryphan blue assay, [³H]thymidine release assay, 및 sub G₁ apoptotic fraction의 flow cytometric analysis를 施行하였으며, apoptosis의 機轉에 對해 分析하고자 caspase-3 protease의 activity의 變化有無의 測定과 apoptosis 關聯 遺傳子 mRNA의 定量的 RT-PCR을 施行하였다. 아울러 細胞 週期에 미치는 影響을 알아보고자 flow cytometric analysis, PCNA 發顯에 對한 immunocytometric analysis 및 細胞 週期 關聯 遺傳子 mRNA의 定量的 RT-PCR을 施行하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MTT 反應實驗의 結果 1.0μl/ml 以上の 用量을 投與한 實驗群부터는 投與用量 增加에 따라

黑色腫細胞의 活性度가 有意하게 減少하였다.

2. Tryphan blue assay, [³H]thymidine release assay 및 sub G₁ fraction의 flow cytometric analysis 結果 各 實驗群에서 apoptosis가 投與 用量 增加에 따라 有意하게 增加하였다.

3. Caspase-3 protease의 activity의 變化有無를 測定한 結果 1.0μl/ml 以上の 用量을 投與한 實驗群부터는 投與 用量增加에 따라 activity가 有意하게 增加하였다.

4. Apoptosis 關聯 遺傳子 mRNA 發顯에 對한 定量的 RT-PCR 檢査에서는 Bcl-2와 Bcl-X_L은 減少하였고, Bax는 增加하였다.

5. Flow cytometric analysis 및 PCNA 發顯에 對한 immunocytometric analysis 結果 G₁期가 投與 用量 增加에 따라 有意하게 增加하였다.

6. 細胞 週期 關聯 遺傳子 mRNA 發顯에 對한 定量的 RT-PCR 檢査에서는 p21, p27, p57은 增加하였으며, Cyclin D1, CDK4, c-Myc, c-Fos, Histone H3은 有意性 있게 減少하였으나, CDC2와 c-Jun은 有意한 變化가 없었다.

VII. 參考文獻

1. 金文昊 : 蜂毒療法과 蜂鍼療法, 서울, 한국 교육기획, pp.20-37, 41-42, 67-64, 104-112, 134-149, 171-176, 1992.
2. 대한 피부과학회 교과서 편찬위원회 : 피부과학 개정3판, 서울, 여문각, pp.452-456, 1994.
3. 李淵台, 李鍾三, 朴龍根, 尹京河 譯 : 遺傳子의 分子生物學, 서울, 探求堂, pp.362-363, 1986.
4. 統計廳 : 19大分類에 의한 死因構造, 死亡原因統計年報, 서울, 16:21-25, 1997.
5. 崔大鳳 : 養蜂協會報, 한국양봉협회, 서울, 12월호, 1986.
6. 高炯均 : 蜂毒鍼療法이 抗炎, 鎮痛 및 解熱에 미치는 效能에 관한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, 第13卷, 第1號, pp.283-292, 1992.
7. 孔賢淑, 高炯均, 金昌煥 : 蜂鍼毒療法이 抗癌學에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 第10卷, 第1號, pp.159-165, 1993.
8. 公현식, 류봉하, 박동원, 류기원 : 韓國韓醫學의 腫瘍研究에 對한 現況, (1980年 以後의 雜誌에 報告된 論文을 中心으로), 大韓韓方腫瘍學會誌, 第1卷, 第1號, pp.55-81, 1995.
9. 權奇祿, 高炯均, 金昌煥 : 蜂鍼에 對한 考察, 大韓鍼灸學會誌, 第11卷, 第1號, pp.159-171, 1994.
10. 權奇祿 外 : 蜂毒藥鍼刺戟이 3-MCA 誘發 上皮腫에 對한 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 第14卷, 第2號, pp.157-172, 1997.
11. 金利和, 李栽東, 盧植, 閔炳一 : 흰쥐에서 合谷穴 蜂毒藥針刺戟에 依한 開口反射의 反應, 서울, 大韓韓醫學會誌, 第20卷, 第1號, pp.106-112, 1999.
12. 都垣錫, 張竣赫, 金慶鎬, 尹鍾和, 金甲成 : 蜂毒療法이 흰쥐의 膝關節 炎症性 浮腫에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 第12卷, 第1號, pp.211-220, 1995.
13. 李京姬 : 産地別 蜂毒液藥鍼刺戟이 免疫機能 低下에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士學位論文, 1999.
14. 李宗錫 外 : 藥鍼用 蜂毒液의 安全性 評價에 關한 研究, 大韓鍼灸學會誌, 第11卷, 第1號, pp.177-198, 1994.
15. 이종률, 채병윤 : 3-MCA 誘發 上皮腫에 對한 海藻玉壺湯과 昆布의 抗腫瘍 效果와 免疫反應에 미치는 影響, 東醫學會誌, 第2卷, 第1號, pp.1-28, 1998.
16. 인창식 고흥균 : 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록: 마왕퇴의서의 봉독요법 2예, 大韓鍼灸學會誌, 第15卷, 第1號, pp.143-147, 1998.
17. 崔昇勳 : 韓醫學의 腫瘍에 對한 認識과 病理論, 大韓韓方腫瘍學會誌, 第1卷, 第1號, pp.11-28, 1995.
18. 朱文鋒 : 實用 中醫辭典, 陝西, 陝西科學技術出版社, p.402, 1992.

19. Assem ES., Atkinson G. : Histamine release by MCDP (401), a peptide from the venom of the honey bee, *Brit. Pharmacol.*, pp.337-338, 1973.
20. Barbara Rudolf : *Chemistry and Pharmacology of Honey Bee Venom*, Academic Press, pp.329-402, 1986.
21. Geoffrey M. Cooper : *Oncogenes 2nd ed.*, Jones and Bartlett, pp.260-267, 1995.
22. Habermann E. : Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In *Venomous Animals and their Venoms*, Academic Press, 3:61, 1971.
23. Assen E. SK. et al : A peptide from the venom of the Honey Bee, *Brit. Pharmcol.*, pp.337-338, 1973.
24. Benassi MS. et al : Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma, *Int. J. Cancer*, Vol. 84, No. 5, pp.489-493, 1999.
25. Chi S-G. et al : frequent expressed transition mutations p53 in prostate. *J. Natl. Cancer Inst.* 86:926-933, 1994.
26. Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159, 1987.
27. Cole S. P. : Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay, *Cancer chemother Pharmacology*, Vol. 17, No. 3, pp.259-263, 1986.
28. Ferre F. : Quantitative or semi-quantitative PCR : reality versus myth, *PCR Methods and Applications*, Vol. 2, pp.1-9, 1992.
29. Fredersdorf S. et al : High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, No. 12, pp.6380-6385, 1997.
30. Higuchi M, et al. : Damage to mitochondrial respiration chain is related to phospholipase A2 activation caused by tumor necrosis factor, *J. Immunother.*, 12(1): pp.41-9, 1992.
31. Ikeda H. et al : Bcl-2 Oncoprotein Expression and apoptosis in neuroblastoma, *Journal of Pediatric surgery*, Vol. 30, No. 6, pp.805-808, 1995.
32. Jacobson M. D., Weil M. and Raff M. C. : Programmed cell death in animal development, *Cell*, Vol. 88, pp.347-354, 1997.
33. Krajewska M. et al : Immunohistochemical Analysis of in Vivo Patterns of Expression of CPP32(Caspase-3), a Cell Death Protease, *Can Res.*, Vol. 57, pp.1605-1613, 1997.
34. Mayer A. et al : The prognostic significance of the proliferating nuclear antigen, epidermal growth factor receptor and mdr gene expression in colorectal cancer, *Cancer*, Vol. 71, No. 15, pp.2554-2460, 1993.
35. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunologic methods*, Vol. 65, No. 1-2, pp.55-63, 1983.
36. Pippia P., Sciola L., Meloni MA., Barni S., Tilloca G. : Cell adhesion in rat fibroblasts: effect of tumor promoters, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 65(5), pp.453-460, 1989.
37. Pockwinse S. M. et al : Cell cycle independent interaction of CDC2 with the centrosome, which is associated with the nuclear matrix-intermediate filament

- scaffold, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94, No. 7, pp.3022-3027, 1997.
38. Rader K., Wildfeuer A., Wintersberger F., Bossinger P. : Characterization of bee venom and its main components by high performance liquid chromatography, Joun. of Chromatography, 408:341-348, 1987.
 39. Sherr C. J. : D-type cyclins, Trends. Biol. Sci., Vol. 20, No. 5, pp.187-190, 1995.
 40. Spoerri, PE. : Apamin from bee venom, Neurobiology, 3:207-214, 1973.
 41. Strobel T., Swanson L., Korsmeter S., and Cannistra S. A. : Bax enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.93, pp.14094-14099, 1996.
 42. Tu Y. et al : Upregulated Expression of Bcl-2 in multiple myeloma cells induced by exposure to Doxorubicin, Etoposide, and Hydrogen peroxide, Blood, Vol. 88, No. 5, pp.1805-1812, 1996.
 43. Wang A. M. W., Doyle M. V., and Mark D. F. : Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, No. 24, pp.9717-9721, 1989.
 44. Watanabe H. et al : Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 requires binding to proliferating cell nuclear antigen, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. Vol. 95, No. 4, pp.1392-1397, 1998.
 45. Wyllie A. H. : Apoptosis, Br. J. Cancer, Vol. 67, pp.205-208, 1994.
 46. Xing Y. et al : p21 is a universal inhibitor of cyclin kinase, Nature, Vol. 366, pp.701-704,1993.