

원저

藥鍼用 蜂毒成分 中 Apamin, Melittin의 抗癌作用

권도희 · 이재동 · 최도영

경희대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Study of Anti-cancer Effects of Bee Venom for Aqua-acupuncture

Kwon, Do-Hee · Lee, Jae-Dong · Choi, Do-Yong

Department of Acupuncture & Moxibustion
College of Oriental Medical, Kyung-Hee University

Objectives : To characterize the antitumorigenic potential of three representative bee venom components, Melittin, Apamin, and Phospholipase A2, their effects on cell proliferation and apoptosis of the human melanoma cell line SK-MEL-2 were analyzed using molecular biological approaches.

Methodes & Results : To determine the doses of the drugs that do not induce cytotoxic damage to this cell line, cell viability was examined by MTT assay. While SK-MEL-2 cells treated with 0.5 - 2.0 $\mu\text{g/ml}$ of each drug showed no recognizable cytotoxic effect, marked reductions of cell viability were detected at concentrations over 5.0 $\mu\text{g/ml}$. [3H]thymidine incorporation assay for cell proliferation demonstrated that DNA replication of SK-MEL-2 cells is inhibited by Apamin and Phospholipase A2 in a dose-dependent manner. Consistent with this result, the cells were accumulated at the G1 phase of the cell cycle after treatment with Apamin and Phospholipase A2, whereas no detectable change in cell proliferation was identified by Melittin treatment. In addition, tryphan blue exclusion and flow cytometric analyses showed that all of these drugs can trigger apoptotic cell death of SK-MEL-2, suggesting that Melittin, Apamin, and Phospholipase A2 have antitumorigenic potential through the suppression of cell growth and/or induction of apoptosis. Quantitative RT-PCR analysis revealed that Apamin and Phospholipase A2 inhibit expression of growth-promoting genes such as c-Jun, c-Fos, and Cyclin D1. Furthermore, Phospholipase A2 induced tumor suppressors p53 and p21/Waf1. In addition, all three drugs were found to activate expression of a representative apoptosis-inducing gene Bax while expression of

· 접수 : 1월 8일 · 수정 : 1월 15일 · 채택 : 1월 17일

· 교신저자 : 최도영, 서울시 동대문구 회기동1번지 경희대학교 한의과대학 부속한방병원 침구과(Tel. 02-958-9205)
E-mail : choi4532@unitel.co.kr

apoptosis-suppressing Bcl-2 and Bcl-XL genes was not changed. Taken together, this study strongly suggests that Melittin, Apamin, and Phospholipase A2 may have antitumorigenic activities, which are associated with its growth-inhibiting and/or apoptosis-inducing potentials.>

Key words : bee venom(Melittin, Apamin, Phospholipase A2), anti-cancer effect, cell cycle, apoptosis, molecular biology.

I. 서론

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 翻花瘡, 石疽, 黑疔, 失榮, 癆發 등으로 표현한다.¹⁹⁾

세계적으로 癌의 治療에 대해 많은 研究가 進行되고 있고, 韓醫學에서도 韓藥^{17),18)} 및 鍼^{5),6),10),15)}의 抗癌效果에 대한 研究가 활발하게 이루어지고 있는 실정이다.

蜂毒이란 꿀벌의 毒囊에 들어있는 約 40여 가지의 有效成分으로 構成된 物質로 기원전부터 인체의 질병치료에 利用되어왔으며 外國에서는 蜂毒 구성 成分의 作用과 기전^{24),27),28),30),31)}, 蜂毒의 과민성과 독성⁴¹⁾, 면역요법³³⁾ 및 관절염³⁴⁾, 단순포진⁴⁵⁾, 다발성 경화증²³⁾, 중양^{20),26),38)} 등의 질병치료 등에 대한 研究가 報告되었고, 國內에서는 蜂毒을 利用한 藥鍼에 관하여 研究가 활발히 進行되고 있어 鎮痛¹⁴⁾, 消炎⁹⁾, 鎮痙⁷⁾, 免疫機能 增強作用⁵⁾, 抗癌效果^{6),10),11)} 등이 報告되었다.

특히 蜂毒의 抗癌效果에 대한 研究는 國內에서는 權⁶⁾이 蜂毒成分 전체를 利用해서 면역학적 방향에서의 抗癌效果를 研究발표하였고, 朴^{10),11)}이 蜂毒成分 전체를 利用해서 抗癌效果의 기전으로 인정되어지는 최근의 이론에 따라 DNA합성에 관련된 細胞分裂抑制 및 apoptosis誘發과 각각에 관련된 遺傳

子의 變化를 관찰해 抗癌效果를 研究발표하였으며, 外國에서는 Gerst JE 等^{26),38)}은 蜂毒의 成分 중 Melittin이 tumor promoter로 作用한다고 報告하였고, Allen DH 等²⁰⁾은 蜂毒의 成分 중 Apamin이 tumor를 抑制하는데 相關이 있다고 報告하였으며, Wood MW 等^{32),42)}은 蜂毒의 成分 중 phospholipase A2가 tumor를 抑制하는데 相關이 있다고 報告하였다.

이에 著者는 蜂毒藥鍼液 중 어떠한 成分이 抗癌效果의 주성분으로 작용하는지를 알아보기 위하여 蜂毒의 대표적 成分 중 Melittin, Apamin, Phospholipase A2의 세가지를 선택하여 人體 黑色腫細胞에 투여한 後, MTT 反應實驗을 施行하여 細胞活性度의 變化를 檢討하고, [³H]thymidine release assay 및 flow cytometric analysis를 施行하여 細胞分裂週期에 대하여 分析하였으며 또한 tryphan blue assay 및 flow cytometric analysis를 施行하여 apoptosis에 대하여 分析한 後, 細胞分裂週期 및 apoptosis 關聯 遺傳子의 mRNA 發顯樣相을 定量的 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)을 利用하여 分析하였다.

II. 실험

1. 細胞培養

人體의 黑色腫 細胞柱 SK-MEL-2는 American type culture collection (ATCC, Rockville, MD) 에서 구입하여 Dulbecco's mininum essential medium(DMEM) 배지 90%와 fetal bovine serum 10% 혼합배지를 利用하여 5%의 CO₂ 상태가 유지되는 37°C incubator에서 배양하였다.

2. 藥物의 準備

Bee Venom으로부터 추출된 Melittin, Phospholipase A2는 Sigma사(St. Louis, MI)로부터, Apamin은 Calbiochem사(La Jolla, CA)로부터 각각 구입하여 3차 증류수로 희석시킨 후 사용하였다.

3. MTT 反應

1) MTT 溶液製作 및 처리

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazdium bromide; Thiazolyl blue(MTT) 5mg/ml을 phospholipase buffer saline(PBS)에 녹여 pH 7.5로 맞춘 후 0.22 μ m의 filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 그 후 1 × 10⁵개의 세포를 포함하고 있는 100 μ l의 cell suspension에 10 μ l의 MTT stock solution을 첨가하였다.

2) 효소반응과 면역형광측정

MTT stock solution에 cell suspension을 첨가한 상태로 37°C에서 3시간 보존한 후 100 μ l의 0.04M HCl in absolute isopropanol을 각각의 well에 잘 혼합하여 blue formazan crystals을 완전히 용해시켰다. 효소의 용해가 끝난 뒤 570nm에서 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) reader로 optical density(OD)를 측정하였다.

4. 細胞分裂週期 分析

1) [³H]thymidine Incorporation Assay

세포의 DNA 복제에 미치는 약물의 영향을 조사하기 위하여 [³H]thymidine Incorporation Assay를 시행하였다. SK-MEL-2 세포를 2 × 10⁴ cells/well로 24-well multiplates에 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지로 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 serum-free 배지로 교환함과 동시에 약제를 농도별로 처리하였다. 약물처리 20시간 후에 1.0 Ci/ml의 [³H]thymidine (Amersham, Arlington Heights, IL)를 4시간 동안 pulse-labeling 하였고 DNA 내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양은 liquid scintillation counter를 利用하여 측정하였다.

2) Flow Cytometric Analysis

cells pellete (5 × 10⁶)를 0.2ml PBS에 현탁시킨 후 2ml의 ice-cold 75%ethanol/25% PBS를 첨가하여 고정시켰다. PBS에 강력하게 재현탁시킨 후 100 μ g/ml RNase와 40 μ g/ml propidium iodide (PI)가 포함된 PBS에서 37°C로 30분간 배양한 후 세포를 회수하여 FACS Caliber cellquest program [Becton Dickinson] (FACScan)을 利用하여 DNA의 양을 定量하였다.

5. Apoptosis에 대한 分析

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 후 4°C의 PBS로 5 × 10⁵ 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) Flow Cytometry를 利用한 Sub G₁ Apoptotic Fraction의 分析
apoptotic cell death의 DNA 含量에 對한 flow cytometric analysis을 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 細胞週期上의 G₁期 細胞들의 2N보다 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.

6. Quantitative RT-PCR을 利用한 遺傳子 發顯의 分析

1) Total Cellular RNA의 抽出

total cellular RNA는 培養된 細胞로부터 single-step method에 의해 抽出하였다. RNA抽出을 위한 solution D는 GSS solution(250g의 guanidine isothiocyanate, 17.6ml의 0.75M sodium citrate, 26.4ml의 10% sarkosyl 그리고 293 ml의 3次 蒸溜水)에 0.1M 濃度の 2-mercaptoethanol을 添加하여 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 후 vortexing 하였다. 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 하였고 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. RNA는 30 μ l의 RNase-free water에 溶解시켰다. 抽出된 RNA의

濃度は 吸光度 260nm과 280nm에서 spectrophotometric measurement(Schimadzu Scientific Instruments, Inc., Concord, CA, USA)로 測定하며, optical density(260/280)의 比率 1.0을 40 μ g/ml RNA로 세팅하여 濃度を 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 시켰다. 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하였다. 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 대한 定量的 分析을 위하여 cycle numbers(21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, and 42 cycles)를 增加시키면서 連續的으로 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分間の denaturation, 58~62 $^{\circ}$ C로 45秒間 annealing, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1分間の polymerization으로 構成하였다. 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 大수적으로 增加함이 確認되었다(Table 1). 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 1 X TBE로 脫色하였다. PCR 産生物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. unspliced RNA 또는 genomic DNA의 PCR 産生物과 spliced mRNA의 PCR 産生物의 鑑別을 위하여 3'과 5' primer는 적어도 하나의 intron에 의해 分離되어 各各 다른 exons에 놓여지도록 製作한다. 各各의 遺傳子 增幅에 대한 RT-PCR의 特異性은 biotinylated internal oligonucleotides를 利用한 southern probing analysis로 確認하였다(Table 1).

Table 1. Oligonucleotide Primers used for a Quantitative RT-PCR Analysis

Genes	Primer	Sequences (5' to 3')	Orientation
GAPDH	F	GAACGAGAGTCCGAGATTCG	sense
	R	TTAGCACAGCATGACGATAT	antisense
c-jun	F	GGGCTACCACTCGITTCATT	sense
	R	GCTAACTTTAACCTGHACTG	antisense
c-fos	F	GACCCTATATGATTGTTAAAG	sense
	R	TTACTGACTCTGCTTTGATC	antisense
c-myc	F	AGTTCCACGAGTCATGAGA	sense
	R	CCATTTGCTACATCCCATC	antisense
cyclin D1	F	GTTCCACCGCTGCTACCTTGA	sense
	R	TTAGCTCTCGATTGGATCTC	antisense
CDK4	F	CCTACGCTTCAAAGAGAGTC	sense
	R	CCATAGCTAGGACATCTCTC	antisense
cdc2	F	CCGTTCGACCACGGAAATC	sense
	R	CCCAATCGGGTACTACATTA	antisense
p53	F	ACACATCGGCACCCTCGATC	sense
	R	CACATCGGGATCGAGGACCT	antisense
p21/Waf1	F	CCACGCTCGTATGCCAATCG	sense
	R	GGTATCTATCTTACAGACGT	antisense
RB1	F	TCTCCACACCTCTATTCTG	sense
	R	CTCATGCTTGATCGAGTCCCT	antisense
p16/INK4a	F	GGCTGCTCTATCTCTACAAT	sense
	R	CGAGACTCAGCATGGATCGA	antisense
bcl-2	F	AGGACTTATCGAGCTTAAAT	sense
	R	GTGGCCTAGCACTCAGTTAG	antisense
bcl-XL	F	GGACTCTGGAATCACATGAA	sense
	R	GGACTGCATGCTACTCGCAT	antisense
bax	F	AGAGCGCTTTACGCTCTGAC	sense
	R	TTTACGACTTAAAGCACTCG	antisense
bad	F	GCTTACGGCACCTAGCCTAA	sense
	R	TTCGTCAACTGCTAACCGTC	antisense

4) RT-PCR 産生物의 Densitometric Analysis
遺傳子 發顯에 대한 定量化는 ethidium bromide-stained gels을 laser densitometry로 scanning하여 얻었다. 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하였다. RT-PCR 産生物 寫眞影像의 陰影調節部는 持續적으로 scanning하고, 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의 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.

II. 성적

1. MTT 反應

Melittin, Apamin, Phospholipase A2투여군 모

Table 2. MTT Assay for Effects of Melittin, Apamin, Phospholipase A2 on Cellular Viability of SK-MEL-2 Cells

Treatment	Dose (μg/ml)	6 hours	12 hours	24 hours	48 hours
Melittin	0.0	0.523	0.531	0.529	0.525
	0.5	0.532	0.527	0.528	0.533
	1.0	0.525	0.533	0.535	0.531
	2.0	0.527	0.521	0.519	0.514
	5.0	0.517	0.507	0.498	0.475
	10.0	0.448	0.452	0.419	0.384
Apamin	0.0	0.534	0.528	0.526	0.532
	0.5	0.527	0.525	0.526	0.523
	1.0	0.528	0.523	0.527	0.519
	2.0	0.525	0.513	0.518	0.514
	5.0	0.497	0.476	0.452	0.422
	10.0	0.494	0.471	0.435	0.402
Phospholipase A2	0.0	0.529	0.526	0.528	0.522
	0.5	0.536	0.523	0.520	0.517
	1.0	0.524	0.529	0.524	0.519
	2.0	0.526	0.520	0.516	0.513
	5.0	0.501	0.496	0.481	0.457
10.0	0.505	0.475	0.461	0.442	

두의 경우에서 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 및 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우에는 뚜렷한 細胞活性的 減少가 관찰되지 않은 반면, 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도로 처리할 경우에는 細胞活性的 減少가 관찰되기 시작하였다. 특히 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 처리 6시간 후부터 細胞活性的의 현저한 減少가 관찰되었다. 본 실험결과를 토대로 이후 실험에 적용될 약물의 투여농도는 0.5~2.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위로 제한하였다(Table 2).

2. [³H]thymidine Incorporation Assay에 의한 細胞分裂週期 分析

SK-MEL-2세포의 DNA 합성능은 Apamin, Phospholipase A2 투여군에서는 투여농도에 비례하여 減少하였으나 Melittin 투여의 경우에는 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았다(Table 3).

Table 3. Inhibitory Effects of Melittin, Apamin, Phospholipase A2 on DNA Replication Synthesis using [³H]thymidine Incorporation Assay

Treatment	Exp.	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0 ($\mu\text{g/ml}$)
Melittin	1	46780	46590	46690	46800	47790
	2	46340	46540	46420	46390	46400
Apamin	1	47120	47220	46890	45120	44210
	2	46900	46880	46750	45140	44170
Phospholipase A2	1	46990	46920	46510	45210	44330
	2	47100	46980	46440	45380	44560

3. Flow Cytometric Analysis를 이용한 細胞分裂週期 分析

Apamin과 Phospholipase A2 투여군에서는 대조군에 비하여 G1期の 세포수는 增加하고 S期の 세포수는 減少함이 발견되어 뚜렷한 細胞分裂抑制가 관찰되었으나, Melittin 투여군에서는 뚜렷한 細胞分裂 抑制效果가 관찰되지 않았다(Table 4).

Table 4. Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle Progression

Treatment	Exp.	G1	S	G2/M(%)
Control	1	58.9	19.4	21.7
	2	59.2	18.9	21.9
Melittin	1	57.9	19.8	22.3
	2	59.3	17.9	22.8
Apamin	1	68.4	13.1	18.5
	2	69.2	12.9	17.9
Phospholipase A2	1	64.2	16.3	19.5
	2	65.2	16.9	17.9

4. Trypan Blue Exclusion에 의한 Apoptosis 誘發效果 分析

Melittin, Apamin, Phospholipase A2 투여군 모두에서 투여농도에 비례하여 apoptosis 誘發效果가 관찰되었으며 특히 Phospholipase A2 처리군에서 매우 현저한 apoptosis 誘發이 관찰되었다(Table 5).

Table 5. Detection of Apoptotic Cell Death by Trypan Blue Exclusion Assay (Numbers of apoptotic cells/Total 2000 cells)

Treatment	Exp.	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0 ($\mu\text{g/ml}$)
Melittin	1	89	95	102	118	142
	2	95	98	109	114	149
Apamin	1	84	93	112	120	159
	2	91	96	109	137	171
Phospholipase A2	1	88	107	121	162	216
	2	95	113	131	172	248

5. Flow Cytometric Analysis에 의한 Apoptosis 誘發效果 分析

Melittin, Apamin, Phospholipase A2 투여군 모두에서 apoptosis 誘發效果가 관찰되었으며 특히 Phospholipase A2 투여군에서 가장 현저한 apoptosis 誘發이 관찰되었다(Table 6).

Table 6. Flow Cytometric Analysis of Apoptosis-Inducing Activity

Treatment	Exp.	Sub G1(%)
Control	1	7.2
	2	8.5
Melittin	1	14.2
	2	15.7
Apamin	1	17.2
	2	19.8
Phospholipase A2	1	25.9
	2	31.4

6. Quantitative RT-PCR을 이용한 세포분열週期關聯 遺傳子發顯 分析

Apamin과 Phospholipase A2투여군에서 세포분열을促進하는 것으로 잘 알려진 c-jun, c-fos, cyclin D1 遺傳子の發顯이 모두減少함이 발견되었으며 그외의 遺傳子の發顯은 큰 변화를 보이지 않았다. 또한 Phospholipase A2 투여군의 경우에는 腫瘍抑制 遺傳子로 잘 알려진 p53과 p53 기능의 매개자로서 세포분열 抑制機能을 가진 p21

Table 7. Quantitative RT-PCR Analysis of Cell Cycle - Stimulating Gene Expression

Genes	Treatment	0 hour	12 hours	24 hours
c-jun	Melittin	1.00	1.05	1.02
	Apamin	1.00	0.82	0.75
	Phospholipase A2	1.00	0.77	0.64
c-fos	Melittin	1.00	0.97	1.06
	Apamin	1.00	0.89	0.79
c-myc	Phospholipase A2	1.00	0.86	0.74
	Melittin	1.00	1.03	1.03
	Apamin	1.00	0.98	0.99
cyclin D1	Phospholipase A2	1.00	1.02	0.96
	Melittin	1.00	1.07	1.02
	Apamin	1.00	0.74	0.71
CDK4	Phospholipase A2	1.00	0.64	0.52
	Melittin	1.00	1.05	1.04
	Apamin	1.00	0.96	1.05
cdc2	Phospholipase A2	1.00	1.02	0.99
	Melittin	1.00	1.06	1.02
	Apamin	1.00	0.96	0.98
Phospholipase A2	Melittin	1.00	1.04	0.96

/Waf1 遺傳子の發顯 增加가 관찰되었으며 그외의 遺傳子の發顯은 큰 변화를 보이지 않았다. 이들 遺傳子 發顯변화는 투여한 약제의 처리시간에 비례하였다(Table 7, 8).

Table 8. Quantitative RT-PCR Analysis of Cell Cycle-Inhibiting Gene Expression

Genes	Treatment	0 hour	12 hours	24 hours
p53	Melittin	1.00	1.02	0.97
	Apamin	1.00	1.00	0.96
	Phospholipase A2	1.00	1.74	1.98
p21/Waf1	Melittin	1.00	1.05	1.01
	Apamin	1.00	1.02	0.96
	Phospholipase A2	1.00	1.48	1.72
RB1	Melittin	1.00	1.02	0.96
	Apamin	1.00	0.98	0.95
p16/INK4a	Phospholipase A2	1.00	0.94	0.99
	Melittin	1.00	0.97	0.97
	Apamin	1.00	1.06	0.97
Phospholipase A2	Melittin	1.00	0.95	1.03

7. Quantitative RT-PCR을 이용한 Apoptosis 關聯 遺傳子發顯 分析

Melittin, Apamin, Phospholipase A2 투여군 모

Table 9. Quantitative RT-PCR Analysis of Apoptosis-Related Gene Expression

Genes	Treatment	0 hour	12 hours	24 hours
bcl-2	Melittin	1.00	1.06	1.01
	Apamin	1.00	0.96	1.03
	Phospholipase A2	1.00	0.97	1.04
bcl-XL	Melittin	1.00	0.99	1.02
	Apamin	1.00	1.05	1.04
	Phospholipase A2	1.00	0.96	0.99
bax	Melittin	1.00	1.27	1.39
	Apamin	1.00	1.36	1.48
bad	Phospholipase A2	1.00	1.96	2.56
	Melittin	1.00	1.01	0.95
	Apamin	1.00	0.97	0.99
Phospholipase A2	Melittin	1.00	1.03	1.01

두에서 apoptosis를 抑制하는 bcl-2와 bcl-XL 遺傳子의 發顯에는 변화가 관찰되지 않았다. 이에 반하여 apoptosis를 促進하는 대표적인 遺傳子인 bax의 發顯은 Melittin, Apamin, Phospholipase A2 투여군 모두에서 增加함이 발견되었고 bax 遺傳子 發顯의 增加는 Melittin과 Apamin A2 투여군에서는 대조군에 비하여 약 30~50%의 增加를 보인 반면 Phospholipase A2 투여군에서는 약 90~150%의 增加를 나타내었다. bax의 增加는 약물의 처리시간에 비례하는 增加를 나타내었다. bad 遺傳子의 發顯에는 변화가 관찰되지 않았다(Table 9).

IV. 고찰

國內外 報告에 따르면 皮膚惡性腫瘍은 增加하는 추세를 보이고 있다⁸⁾ 惡性 黑色腫에 의한 사망은 肺癌을 제외한 다른 癌에 비하여 빠른 속도로 增加하고 있다.^{11,4)}

최근 皮膚癌의 治療방법으로는 抗癌劑투여, 외과적 수술요법, 방사선요법, 화학요법, 면역요법 등이 활용되고 있으나²⁾, 生體에 대한 부작용, 정상세포에 대한 독성작용이 문제점으로 제기되고 있는 바 韓藥과 抗癌劑의 병용 투여 및 체질개선이 시도되고 있고^{17,18)} 韓藥劑 및 藥鍼, 蜂毒液藥鍼 등의 新鍼을 포함한 鍼灸療法에 대하여 抗腫瘍免疫學的^{6),15)} 및 抗腫瘍遺傳子的^{10),11)} 實驗研究가 지속적으로 시행되어지고 있다.^{3),12),14),20),26),30),31)}

人體의 臟腑機能이 均衡을 이루고 있고 陰陽이 調和로우면 건강하다는 韓醫學的 견해는 腫瘍免疫學 및 腫瘍遺傳學에서 밝히고 있는 癌의 발생과 성장에 있어서 면역반응 및 apoptosis의 역할과 유사성을 갖고 있다. 소위 면역감시기능이라는 일종의 개체방어능력이 弱化되어서 癌細胞化된 비정상세포

의 파괴제거작용을 못하게 되어 정상세포가 가진 세포증식 조절기능을 잃고 제멋대로 성장하게 된다.

蜂毒이란 꿀벌의 毒囊에 들어있는 약 40여 가지의 有效成分으로 構成된 物質로 蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고, 臨床에서는 鎮痛, 解熱, 消炎, 鎮痙, 免疫增強 및 抗癌效果 등의 效能이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁾

蜂毒의 成分은 크게 peptide components, non peptide components, enzymes으로 構成되어 있다. Peptide components는 Freeze-dried venom의 약 50%를 構成하고 있으며, 主要成分으로는 Melittin, Apamin 등이 있다.²¹⁾

그 중에서 가장 많이 分布하는 Melittin (40~50%)은 26개의 amino acid로 構成된 活性 peptide로 溶血作用과 酵素作用을 하고 있다.²¹⁾ 溶血作用에서는 Phospholipase A2와 상승적으로 작용하여 서로의 활동성을 增加시켜 주며 효소작용에서는 뇌하수체와 부신피질체계를 자극하여 catecholamine과 cortisone 분비를 促進시킨다. Melittin은 Phospholipase A2의 세포막에 대한 간접적 분해작용으로 세포내부에 저장된 물질을 공격한다. 또한 특이한 mast cell에서 histamin을 방출시켜 말초혈관의 혈류를 增加시키며 독성성분을 확산시키는 작용을 도와준다. histamin의 방출을 도와주는 것이 염증반응을 誘發할 수도 있으나 자연스런 항염증반응은 조직의 histamine level을 어느 정도 增加시켜야 그 시발점이 이루어지므로 반드시 필요약은 아니며 이것이 봉침으로 관절염이나 기타 질환에 오래동안 응용되어진 치료기전이 아닌가 하는 생각이 든다. 활성 peptide로 세계처럼 강한 계면활성작용이 있고 물에도 기름에도 모두 섞일 수 있는 친화성을 갖고 있으므로 다른 세포막에 대해서도 막의 투과성을 변화시키는 작용도 있다.²⁶⁾ 그 외에 Han HJ²⁸⁾는 蜂毒의 Melittin이 토끼 신장의 proximal tubule cell의 Ca(2+)흡수와 arac-

hidonic acid 방출을 증가시킨다고 하였으며, Saini SS⁴¹⁾는 Melittin이 human monocytic leukemia cell의 세포용해과정에서 내인성 phospholipase D의 반응을 촉진한다고 하였고, Shin SY³⁸⁾는 Melittin이 강력한 antibacteria, antimalarial 작용이 있으며 antitumor와 관련이 있다고 하였다.

Apamin은 신경계에 작용하는 peptide로서 calcium-potassium의 결합에 변화를 주어 중추신경 및 말초신경에 영향을 미친다. 過量한 量 (0.5ml/100g)을 血管內에 注入하면 skeletal muscle에 경련을 誘發하고, 더 많은 量을 注入하면 呼吸不全을 일으키며 뇌혈관계의 방어기전을 뚫고 뇌의 단백질에 영향을 미쳐 혼수를 일으키고 死亡하게 된다 (LD₅₀=4mg/100mg). 그러나 Apamin의 선택적 목표물과 신경계에 영향을 미치는 기전은 아직 밝혀지지 않았으며 말초신경계 또한 중추신경계의 영향과 비슷하여 평활근의 경련을 誘發한다.²⁰⁾ Melittin과 Apamin은 cortisone분비를 증가시켜 消炎效果를 나타내고 시상하부에 serotonin의 增加를 유도하며 면역체계를 抑制하는 특성을 갖고 있는데, 蜂毒의 인체 면역기능에 대한 기전은 아직 연구중에 있다. 그 외에 Lee J³¹⁾는 Apamin은 hypoxia로 誘發된 depolarization을 제거한다고 하였으며, Kw-iecien R³⁰⁾은 Apamin이 after-spike hyperpolarization을 강하게 減少시킨다고 하였고, Griesmer S²⁷⁾는 대부분의 K(Ca) channel이 Apamin에 의해 매우 민감하게 차단된다고 하였다.

Phospholipase A2는 蜂毒 enzymes의 主要成分으로 세포막 구성물질인 phospholipid의 2nd B부위에 결합하는 지방산을 가수분해하는 촉매효소로서 間接的 分解酵素로 작용하여 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. Phospholipase A2의 반응에 의해 형성된 산물은 강력한 세포막활성물질로서 모

든 세포를 둘러싸고 있는 지질의 이중구조에 영향을 미치고 또한 세포상호간의 작용을 가능케 한다. 이러한 생화학적 세포막구조의 파괴는 Phospholipase A2와 같은 효소에 의해 광범위하게 이루어지며 Phospholipase A2에 의해 형성된 phosphoglycerides는 계속 파괴되어 새로운 합성분자로 대체되어진다. Phospholipase A2는 세포막의 투과성을 증가시키고, 혈소판의 응집을 抑制하고 백혈구 및 내피세포의 작용을 변화시킨다.⁴⁶⁾ 그 외에 Deregnaucourt C²⁴⁾에 의하면 Phospholipase A2는 인간혈청의 구성을 조절하는 적혈구의 plasmodium falciparum의 특정단계의 성장을 정지시킨다고 하였으며, Nethery D³⁵⁾에 의하면 황격막의 mitochondria의 ROS(reactive oxygen species)의 형성은 Phospholipase A2에 의지한다고 하였고, Wu YL⁴³⁾에 의하면 TNF(종양괴사인자)에 의한 세포살의 Phospholipase A2의 활성화는 세포를 사망에 이르게 하는 경로에 신호를 보내는 중요한 요소라고 하였다.

이에 저자는 蜂毒藥液 중 어떠한 성분이 抗癌效果의 주성분으로 작용하는지를 알아보기 위하여 蜂毒의 대표적 성분 중 Melittin, Apamin, Phospholipase A2의 세가지를 선택하여 人體 黑色腫細胞에 투여한 후, MTT 反應實驗을 施行하여 細胞活性度의 變化를 檢討하였고, [³H]thymidine release assay 및 flow cytometric analysis를 施行하여 細胞分裂週期에 대하여 分析하였으며 또한 trypan blue assay 및 flow cytometric analysis를 施行하여 apoptosis에 대하여 分析한 후, 細胞分裂週期 및 apoptosis 關聯 遺傳子의 mRNA 發顯樣相을 定量的 RT-PCR을 利用하여 分析하였다.

MTT assay는 藥物의 과잉투여에 의하여 誘發될 수 있는 細胞毒性和 실험을 위한 적정 투여농도범위의 결정을 위하여 시행하였으며 細胞活性의 變化를 分析한 바, Melittin, Apamin, Phospholipase

A2투여군 모두에서, 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도로 처리할 경우 細胞活性的 減少가 관찰되기 시작하여 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 처리 6시간 후부터 細胞活性的 현저한 減少가 관찰되었다. 본 실험결과를 토대로 이후 약물의 細胞週期 및 apoptosis에 미치는 영향에 대한 실험에 적용될 약물의 투여농도는 약물의 毒性效果를 배제할 수 있는 0.5 ~ 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위로 제한하였다.

세포의 분열증식은 생명체의 가장 중요한 현상이며 세포의 무절제한 분열은 新生物 등의 질환을 誘發하여 또한 생명을 위협한다.

細胞週期는 DNA합성을 기준으로 구분하게 되며 G1期(first gap phase), S期(synthesis phase), G2期(second gap phase)의 interphase(간기)와 mitosis(M期 또는 細胞分裂기)로 대별한다. G1期는 세포내 인자가 증식되며 세포의 크기가 증대되는 시기이고, S期는 細胞分裂를 위한 DNA의 합성이 이루어 지는 시기이며, G2期는 세포질의 인자가 증식되는 시기이고, M期는 핵분열과 세포질분열로 세포자체가 나누어지는 시기이다.³⁾

세포는 분열증식할 때에 DNA의 합성이 필요하므로 DNA의 합성을 抑制하면 암세포의 증식이 抑制되어 기본적인 抗癌效果가 있음을 의미한다.

따라서 Melittin, Apamin, Phospholipase A2의 抗癌效果에 대한 分析을 위하여 SK-MEL-2 人體 黑色腫 細胞의 DNA replication을 抑制하는 기능이 있는지의 유무를 [³H]thymidine incorporation assay를 利用하여 分析한 바, SK-MEL-2 細胞의 DNA 합성능은 Apamin, Phospholipase A2의 투여에 의하여 減少하였으나 Melittin 투여의 경우에는 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았다. Apamin, Phospholipase A2를 투여했을 때에는 투여한 Apamin, Phospholipase A2의 농도가 增加할수록 DNA의 양은 減少되는 결과를 보여 Apamin, Phospholipase A2의 농도에 비례하여 DNA replication

이 抑制되는 것으로 관찰되었다.

또한 DNA의 합성이 시작되는 S期로 넘어가지 않도록 G1期에 머무르게 하는 것은 DNA의 합성을 抑制하여 기본적인 抗癌效果가 있는 것이므로 위에서 관찰된 Apamin, Phospholipase A2에 의한 DNA 合成抑制效果가 細胞分裂週期の 특정 단계를 조절함으로써 유도되는가를 확인하기 위하여 flow cytometry를 利用하여 細胞分裂週期에 대한 分析을 수행하였다.

Apamin과 Phospholipase A2가 투여된 세포의 경우 뚜렷한 細胞分裂 抑制가 관찰되었으며 G1期の 세포수는 增加하고 S期の 세포수는 減少함이 발견되었는데 Apamin 투여군에서 더욱 현저하였고, Melittin 투여군의 경우에는 뚜렷한 細胞分裂 抑制效果가 관찰되지 않았다.

위의 두 실험들을 종합할 때 Apamin과 Phospholipase A2는 SK-MEL-2 세포의 DNA 합성을 抑制함을 통하여 細胞分裂週期の 進行을 차단하는 效果가 있음이 관찰되었으며 細胞分裂週期中 주로 G1期에서 S期로의 細胞分裂 進行을 차단하는 效果가 있음이 확인되었다.

外的傷害에 의한 細胞死 즉 괴사에 대한 하나의 대조적 개념으로서 나타난 apoptosis는 內的 環境 規制에 의한 programmed cell death로서 구분하는 경향이었으나 apoptosis의 誘發점이 細胞外部에도 있음이 밝혀지고 수많은 자극 특히 抗癌劑나 방사선조차 apoptosis를 誘發하는 것이 알려졌다. apoptosis는 배태발육, 면역 및 신경계발달, 그리고 종양퇴행과 같은 생체내 여러가지 다양한 生理 및 病理學的 상태에서 흔히 관찰된다. 생체구조의 형성, 불필요한 조직이나 이상세포의 제거, 세포수의 조절 등이 apoptosis를 통해 일어나므로 apoptosis는 多細胞 生物의 發生過程과 恒常性 維持에 중요한 역할을 한다.^{13),16)} apoptotic cell death는 cytoskeletal disruption, cell shrinkage, membrane

blebing 등을 초래한다. DNA의 변성이 시작되어 핵의 이중쇄 DNA가 절단되어 염색질의 농축이 발생되고, 표면이 팽윤되어 방울처럼 보이지만 곧이어 조각들로 나뉘어져서 막으로 둘러싸인 細胞枯死體로 되어 실질세포나 대식세포에 의해 탐식되고 분해되어 부서지게 된다.¹³⁾

따라서 종양세포에 apoptosis를 誘發하면 종양세포의 증식을 抑制하여 抗癌效果를 갖게되므로 Melittin, Apamin, Phospholipase A2의 apoptosis 誘發效果 유무를 分析하기 위하여 tryphan blue exclusion assay를 利用하여 apoptosis가 일어난 세포의 수를 조사한 바, apoptosis 誘發은 Melittin, Apamin, Phospholipase A2 투여군에서 모두 관찰되었으며 특히 Phospholipase A2 투여군에서 매우 현저한 apoptosis 誘發이 관찰되었다. 또한 apoptosis의 誘發은 Melittin, Apamin, Phospholipase A2 투여군 모두에서 처리 농도에 비례하는 경향을 보여주었다.

apoptosis의 생화학적 관찰의 하나인 flow cystometry 방법은 apoptotic cell들의 세포막기능은 온전하여 propidium iodide를 투과시키지 않고 세포내효소 예컨대 esterase 효소활성이 소실하고 있다는 점을 利用하여 부유세포집단에서 apoptotic cells를 flow cystometry에 의하여 定量하는 검색법¹⁶⁾으로 apoptotic cell body는 기계안에서 하나의 세포로 입혀진다. 모든 세포는 DNA의 합성과 분열동안 2N과 4N값사이에서 반복하게 되나 apoptotic cell body는 DNA사슬이 부서졌으므로 하나의 세포의 DNA양이 정상적인 G1의 2N값보다 적으므로 sub G1이라 한다.

Melittin, Apamin, Phospholipase A2에 의한 세포사멸이 apoptosis에 의한 것인지를 보다 구체적으로 파악하기 위하여 apoptosis의 세포학적 증거가 되는 sub G1 세포의 발생유무를 flow cystometry를 利用하여 分析한 바, Phospholipase A2

투여군에서 가장 현저한 apoptosis 誘發이 관찰되었으며 Melittin, Apamin 투여군에서도 뚜렷한 apoptosis 誘發效果가 관찰되어 tryphan blue exclusion assay에서와 동일한 결과를 관찰할 수 있었다. sub G1 phase의 세포가 많을수록 apoptotic cell body가 많음을 의미하고 또한 apoptosis 誘發이 현저하였음을 의미하므로 抗癌效果가 있음을 알 수 있다.

細胞週期 조절에 관여하는 遺傳子들로는 c-jun, c-myc, c-fos, cyclin D1, CDK4, cdc-2, p53, p21, RB1, p16 등이 있고 그중에서도 G1期에서 S期로 이행되도록 결정하는 과정인 G1 checkpoint 조절에 대한 분자생물학적 연구가 대단히 활발히 진행되고 있다.¹³⁾

c-jun은 c-fos 遺傳子和 같이 AP-1 轉寫因子를 形成하여 downstream gene의 調節에 關與하여 G1期에서 S期로 넘어가는 것을 促進한다.²⁵⁾

c-fos는 스스로는 AP-1 site에 附着하지 않고 jun 蛋白과 協同적으로 DNA에 附着하며 G1期에서 S期로 넘어가는 것을 促進한다.²⁵⁾

myc family에는 c-myc, n-myc, l-myc이 있는데 이들 遺傳子の 突然變異는 많은 人間の 腫瘍에서 報告된 바 있다.²⁵⁾ 다른 helix-loop-helix transactivator들과 더불어 c-myc단백질이 p53 遺傳子 promoter와 결합하여 이를 활성화시키는 것으로 보아 아마 c-myc-p53 system은 細胞週期 調節에서 negative feedback loop을 이루고 있는 것이 아닐까 추측된다.¹⁶⁾

Cyclin D class(D1, D2, D3)는 retinoblastoma gene의 磷酸化에 重要な 역할을 하고 mammalian cell에서는 G1期の 律速因子로 作用한다. cyclin D1은 CDK4, CDK6를 活性化시키고 G1期에서 S期로의 細胞週期를 進行시킨다.³⁷⁾

CDK(Cyclin-dependent kinase) 4 遺傳子是 cyclin D와 結合하여 G1期에서 S期로 進行하는데

關與하는 遺傳子이다. c-myc의 刺戟을 받아 cyclin D-CDK4 複合體가 作用을 하여 G₁期에서 S期로의 進行을 促進시킨다.²²⁾

cdc2 遺傳子是 細胞週期 중에 주로 M期를 調節하는 遺傳子인데 CDC kinase가 活性化되면 S期에서 M期로 넘어가고 CDC kinase가 不活性化되면 M期에서 終結된다.³⁶⁾

p53 腫瘍抑制遺傳子の 단백질은 복제형 DNA의 합성시작 전에 細胞週期 進行을 정지시킬 수 있으며, 사람에게서 발생하는 많은 종양이 p53遺傳子の 변이 또는 결손을 갖고 있다(임상암의 약 50%). p53 抗癌蛋白質이 활성화되어 p21의 發顯을 促進하고 p21은 cyclin E-CDK2, cyclin D-CDK4 및 기타 CDK들을 抑制하므로써 RB의 인산화를 抑制하고 RB는 E2F등을 계속 抑制하여 그결과 세포는 G₁期에 정지하게 되어 더 이상의 DNA소실을 방지하게 된다.¹²⁾

p21 蛋白質은 Waf1등으로도 불리며, 老化된 細胞에서 그 量이 增加하므로 細胞分裂을 抑制하는 것으로 알려져 있다. 細胞週期の G₁期에서 重要한 역할을 하는 CDK의 inhibitor로 作用하며, DNA polymerase를 抑制하여 G₁ 休止期로 誘導하여 p21은 損傷된 DNA를 monitor하는 G₁ check point에 必須的인 蛋白質이다.⁴⁴⁾

RB는 세포가 G₁期에 머물게 하는 주역이며 최초로 발견된 抗癌遺傳子이다. 또한 RB가 細胞週期調節因子들을 매개하여 적절한 다단백질 복합체를 형성하여 G₁期를 정지시키므로 핵내에서 molecular matchmaker의 역할을 한다. 세포가 分化되기 위한 전제조건으로서 RB에 의한 세포의 G₁정지기가 필수적이며, 세포가 불가역적으로 G₁에 머물게 되는 老化에도 깊이 관여하고 있다.¹²⁾

세포의 주기를 정확히 조절하기 위해서 세포는 cyclin이나 CDK같은 positive regulator이외에도 p27, p15, p16, p21등의 CKI들을 가지고 있으며

이들 CKI의 작용은 적절한 細胞週期조절에 negative regulator로서 필수적인 인자들이다.¹²⁾

CKI중에서 p27은 세포내에서 항상 일정량으로 發顯되고 있는데, cyclin 혹은 cyclin-CDK복합체와 결합하여 CDK의 활성을 抑制함으로써 RB의 인산화를 抑制한다. mitogen의 자극으로 세포의 주기가 G₁에서 점차 S期로 진행됨에 따라 cyclin량이 계속 增加하여 상대적으로 p27은 희석되어 결국 CDK抑制效果가 사라지고 RB의 인산화 및 불활성화가 가속되어 E2F의 활성으로 S期로 進行된다.¹²⁾

RB의 인산화가 促進되면 주로 DNA합성에 관여하는 遺傳子の 發顯이 增加되고 특이하게도 p16의 發顯이 增加된다. 합성된 p16은 CDK와 결합하고 cyclin이 떨어져 분해되고 사라진다.¹²⁾

p15는 CDK와 결합하여 抑制하며, CDK를 p27로부터 격리시켜 p27이 cyclin-CDK에 집중적으로 결합하여 RB의 인산화가 抑制되어 세포는 E2F가 抑制되어 G₁期에 정지되게 된다.

자외선이나 화학물질, 기타 원인에 의해 세포의 DNA에 손상이 오게 되면 p53抗癌蛋白質의 작용으로 p21의 發顯이 促進되어 cyclin-CDK, CDK들을 抑制하여 RB의 인산화를 抑制하고 E2F를 抑制하여 세포는 G₁期에 정지하게 된다. 동시에 p53, GADD45등의 DNA수리 체계들에 의해 손상된 DNA가 복구되게 되며 복구가 끝나면 p21기능이 사라지고 세포는 S期로 넘어가게 된다.¹²⁾

이상과 같이 cyclin-CDK들과 E2F는 細胞週期の G₁/S이행을 促進시켜 세포의 분열증식을 促進시키고 p27, p21, p15, p16등의 CDK 抑制因子들은 cyclin-CDK들의 기능을 抑制시켜 RB로 하여금 세포를 G₁에 머물게 한다.¹²⁾

이상을 종합하면 細胞分裂週期の 促進을 유도함으로써 종양세포의 증식을 促進하는 것으로 잘 알려진 것은 c-fos, c-jun, c-myc, cyclin D1, CDK4, cdc2 遺傳子이며 細胞分裂을 抑制함으로써

종양의 성장을 억제하는 것은 p53, RB1, p21/Waf1, p16/INK4a 遺傳子이다.

細胞分裂抑制와 apoptosis 誘發效果가 관찰된 결과에 기초하여 본 약물에 의한 이러한 세포학적 현상이 遺傳子의 發顯의 변화에 의하여 야기될 가능성을 파악하기 위해 quantitative RT-PCR을 통한 遺傳子 發顯分析을 수행한 바, Apamin과 Phospholipase A2의 경우 細胞分裂을 促進하는 것으로 잘 알려진 c-jun, c-fos, cyclin D1 遺傳子의 發顯이 모두 減少함이 발견되었으며 그외의 遺傳子의 發顯은 큰 변화를 보이지 않았다. 이와 아울러 Phospholipase A2 투여군의 경우에는 腫瘍抑制 遺傳子로 잘 알려진 p53과 p53 기능의 매개자로서 細胞分裂抑制기능을 가진 p21/Waf1 遺傳子의 發顯 增加가 관찰되었으며 그외의 遺傳子의 發顯은 큰 변화를 보이지 않았다. 이들 遺傳子 發顯變化는 투여한 약제의 처리시간에 비례하였다.

apoptosis 유도인자들이 세포표면의 수용체와 결합한 후 신호가 세포내로 전달되면 apoptosis 유도 관련 특정 遺傳子 發顯이 增加되고 특히 단백질 합성이 增加되어 이 단백질들이 직접 간접으로 자신의 DNA를 파괴하여 apoptosis가 일어난다고 한다. 대부분의 세포가 생리적인 세포죽음을 억제하거나 增進시킬 수 있는 조절 단백질을 갖고 있으며 특정 세포에서 抑制劑나 增進劑의 대사의 상대적 비율에 의해 RNA와 단백질 합성을 정지하는 것이 apoptosis를 방해하는지 또는 유도하는지에 달려있다고 하겠다.¹⁶⁾ apoptosis와 관련된 遺傳子 및 蛋白質物은 bcl-2, bcl-X_L, bax, bad 등이 있다.¹⁶⁾

bcl-2 family는 apoptosis를 억제하는 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하고 homodimers와 heterodimers의 두 形態로 存在한다. bcl-2의 overexpression은 tumor cell apoptosis의 完成을

沮害한다.²⁹⁾

bax는 tumor suppressor로 作用하여 p53 mediated apoptosis를 刺戟시키며 chemotherapy로 誘發된 apoptosis에서도 增加한다.³⁹⁾ bax는 bcl-2와 결합하여 bax-bcl2 heterodimer를 형성하는데 이것은 apoptosis를 억제한다. 그러나 p53이 bax단백질을 增加시키게 되면 bax는 자기들끼리 결합하여 bax-bax homodimer를 형성하게 되며 이것은 bcl-2기능을 억제하여 apoptosis를 促進하게 되는 것이다.¹²⁾

bcl-X는 bcl-2 gene family의 새로운 一員으로 細胞 週期の G₁期에서 cell-cycle-dependent regulation 作用을 한다. 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.⁴⁰⁾

이상을 종합하면 apoptosis의 誘發을 억제하는 기능을 통하여 腫瘍發生을 促進하는 대표적인 遺傳子는 bcl-2, bcl-X_L이며, apoptosis의 誘發을 促進함으로써 腫瘍發生을 억제하는 대표적인 遺傳子는 bax, bad이다.

quantitative RT-PCR을 통해 apoptosis 조절에 관여하는 遺傳子의 發顯을 分析한 바, Melittin, Apamin, Phospholipase A2 투여군에서 모두 apoptosis를 억제하는 bcl-2와 bcl-X_L 遺傳子의 發顯에는 변화가 관찰되지 않았고, apoptosis를 促進하는 대표적인 遺傳子인 bax의 發顯은 Melittin, Apamin, Phospholipase A2 투여군 모두에서 增加함이 발견되었고 bax의 增加는 약물의 처리시간에 비례하는 增加를 나타내었으며 bad 遺傳子의 發顯에는 변화가 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 정리하면, Apamin과 Phospholipase A2는 SK-MEL-2 人體 黑色腫 細胞의 DNA 복제를 抑制함으로써 細胞分裂을 G₁期에서 抑制하는 기능이 확인된 반면 Melittin은 뚜렷한 細

胞分裂抑制 效果를 보이지 않았다. Melittin, Apamin, Phospholipase A2투여군 모두에서 SK-MEL-2 人體 黑色腫 細胞의 apoptosis를 誘發하는 기능이 있음이 확인되었는데 특히 Phospholipase A2의 apoptosis 誘發機能은 매우 현저하였으며 비록 세 약물 중 가장 약하였으나 Melittin의 apoptosis 誘發效果도 분명하게 관찰되었다. Apamin과 Phospholipase A2는 細胞分裂을 促進하는 發癌遺傳子 c-fos, c-jun, cyclin D1의 發顯을 減少시킴이 확인되었는데 특히 Phospholipase A2 투여군에서는 細胞分裂을 抑制하는 腫瘍抑制遺傳子 p53과 p21/Waf1 發顯의 뚜렷한 增加가 관찰되었고 또한Melittin, Apamin, Phospholipase A2 투여군 모두의 경우에서 apoptosis를 促進하는 bax 遺傳子の 發顯增加가 관찰되었다.

따라서 Melittin, Apamin, Phospholipase A2는 細胞分裂 抑制效果 및 apoptosis 誘發效果가 있으므로 기본적인 抗癌機能을 보유한 약물로 판단되며 각 약물의 遺傳子 發顯 調節效果와 연관된 현상이 강하게 시사되었다.

이상의 結果를 토대로 生體에 藥鍼을 처치하는 실험등의 더욱 자세한 研究가 나와 임상에서의 抗癌治療에 도움이 되기를 기대하는 바이다.

V. 결론

蜂毒藥鍼液 중 어떠한 성분이 抗癌效果의 주성분으로 작용하는지를 알아보기 위하여 蜂毒의 대표적 성분 중 Melittin, Apamin, Phospholipase A2의 세가지를 선택하여 人體 黑色腫 細胞에투여한 後, MTT 反應實驗을 施行하여 細胞活性度의 變化를 檢討하고, [³H]thymidine release assay 및 flow cytometric analysis를 施行하여 細胞分裂週期에 대하여 分析하였으며 또한 tryphan blue assay 및

flow cytometric analysis를 施行하여 apoptosis에 대하여 分析한 後, 細胞分裂週期 및 apoptosis 關聯 遺傳子の mRNA 發顯 樣相을 定量的 RT-PCR을 利用하여 分析하였다.

1. MTT assay 結果 Melittin, Apamin, Phospholipase A2투여군 모두에서 SK-MEL-2 人體 黑色腫 細胞에 대하여 0.5 ~ 2.0 μ g/ml의 농도에서는 細胞毒성을 보이지 않았다.

2. 細胞分裂抑制效果는 Apamin과 Phospholipase A2투여군에서는 대조군에 비하여 效果를 나타내었으나, Melittin투여군에서는 效果를 보이지 않았다.

3. Apoptosis 誘發效果는 Phospholipase A2, Apamin, Melittin투여군의 순으로 나타났다.

4. 遺傳子 發顯效果는 Apamin과 Phospholipase A2투여군에서는 細胞分裂을 促進하는 發癌遺傳子 c-fos, c-jun, cyclin D1의 發顯을 減少시키고 Phospholipase A2 투여군에서는 細胞分裂을 抑制하는 腫瘍抑制遺傳子 p53과 p21/Waf1 發顯의 뚜렷한 增加가 관찰되었다. 또한Melittin, Apamin, Phospholipase A2 투여군 모두의 경우에서 apoptosis를 促進하는 bax 遺傳子の 發顯增加가 관찰되었다.

VII. 참고문헌

1. 대한병리학회編 : 병리학. 서울. 高文社. pp11 33~1176. 1990
2. 서울대학교 의과대학: 종양학. 서울. 서울대학교출판부. pp1~3, 91~95, 126. 1990
3. 서울대학교 의과대학: 세포생물학. 서울대학교

- 출판부. pp1~9, 63~65, 145~150. 1990
4. 이증달: 기본 병리학. 서울. 고려의학. pp13~28. 1991
 5. 권奇祿, 高炯均: 봉약침요법의 면역반응에 관한 임상적 연구. 대한침구학회지. 17(1):169~174. 2000
 6. 권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. 14(2):157~172. 1997.
 7. 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. 20(1):106~112. 1999.
 8. 김진복 외: 피부과 외래환자의 통계적 관찰 (1981~1990). 대한피부과학회지. 34(3):366~374. 1996
 9. 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. 12(1):211~220. 1995.
 10. 박찬열: 약침용 蜂毒이 흑색종 세포에 미치는 抗癌效果에 대한 분자생물학적 연구. 경희대 한의학 박사학위논문. 2000
 11. 박찬열, 서정철, 최도영, 안병철: 봉독약침의 抗癌效果에 대한 분자생물학적 연구. 대한약침학회지. 3(1):1~19. 2000
 12. 서민호, 백원기: 세포주기조절과 apoptosis. 계명의대논문집. 15(4):381~393. 1996
 13. 서민호, 서성일: 질병발생과 치료에 있어서의 apoptosis의 역할. 계명의대논문집. 15(4):394~406. 1996
 14. 윤형석, 김용석, 이재동: 통증 관련 봉독연구에 대한 고찰. 대한약침학회지. 3(1):156~19. 2000
 15. 이증률, 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. 2(1):1~28. 1998.
 16. 정성민: 세포고사. 臨床耳鼻. 7(1):77~92. 1996
 17. 채우석: 면역질환의 한방개념과 치료에 관한 문헌적 고찰. 대한한의학회지. 11(2):54~91. 1990
 18. 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. 1(1):11~28. 1995.
 19. 朱文鋒: 實用中醫辭典. 陝西. 陝西科學技術出版社 pp402. 1992
 20. Allen DH, Lepple-Wienhues A, Cahalan MD : Ion channel phenotype of melanoma cell lines. J Membr Biol. Jan 1:155(1):27~34. 1997
 21. Assen E. SK. et al : A peptide from the venom of the Honey Bee, Brit. Pharmscol, pp.337~338. 1973.
 22. Benassi MS, Molendini L, Gamberi G, Ragazzini P, Sollazzo MR, Merli M, Asp J, Magagnoli G, Balladelli A, Bertoni F, Picci P: Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma. Int. J. Cancer. 84(5):489~493. 1999
 23. Branas P, Jordan R, Fry-Smith A, Burls A, Hyde C: Treatments for fatigue in multiple sclerosis : a rapid and systematic review. Health Technol Assess. 4(27):1~61. 2000
 24. Deregnacourt C, Schrevel J: Bee venom phospholipase A2 induces stage-specific growth arrest of the intra-erythrocytic Plasmodium falciparum via modifications of human serum compo-

- nents. *J Biol Chem* Sep 14. 2000
25. Geoffrey M. Cooper. *Oncogenes* 2nd ed., Jones and Bartlett. pp260~267. 1995
 26. Gerst JE, Salomon Y: Inhibition by Melittin and fluphenazine of melanotropin receptor function and adenylate cyclase in M2R melanoma cell membranes. *Endocrinology*. Nov;121(5):1766~72. 1987
 27. Grissmer S, Lewis RS, Cahalan MD: Ca²⁺-activated K⁺ channels in human leukemic T cells. *J Gen Physiol* Jan;99(1): 63~84. 1992
 28. Han HJ, Lee JH, Park SH, Choi HJ, Yang IS, Mar WC, Kang SK, Lee HJ: Effect of Bee Venom and Its Melittin on Apical Transporters of Renal Proximal Tubule Cells. *Kidney Blood Press Res*. 23(6):393~399. 2000
 29. Ikeda H., Hirato J., Matsuyama S., Suzuki N., Takahashi A., and Kuroiwa M.: Bcl-2 Oncoprotein Expression and apoptosis in neuroblastoma, *Journal of Pediatric surgery*, 30(6):805~808. 1995
 30. Kwicien R, Robert C, Cannon R, Vignes S, Arnoux A, Kordon C, Hammond C: Endogenous pacemaker activity of rat tumour somatotrophs. *J Physiol* May 1;508 (Pt 3):883~905. 1998
 31. Lee J, Lim W, Eun SY, Kim SJ, Kim J: Inhibition of apamin-sensitive K⁺ current by hypoxia in adult rat adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch* Apr;439(6):700~4. 2000
 32. Lo HH, Teichmann P, Furstenberger G, Gimenez-Conti I, Fischer SM: Suppression or elevation of cytosolic phospholipase A2 alters keratinocyte prostaglandin synthesis, growth, and apoptosis. *Cancer Res*. Oct 15;58(20):4624~31. 1998
 33. McHugh SM, et al: Bee Venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern; comparison of rush and conventional immunotherapy. *Clin Exp Allergy*, Sep, 25:9, 828~38. 1995
 34. Millward-Sadler SJ, Wright MO, Davies LW, Nuki G, Salter DM: Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. Sep;43(9):2091~9. 2000
 35. Nethery D, Callahan LA, Stofan D, Mattera R, DiMarco A, Supinski G: PLA(2) dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Appl Physiol* Jul;89(1):72~80. 2000
 36. Pockwinse S. M., Krockmalnic G., Dosey S. J., Nickerson J. N., Lian J. B., Wijnen A. J., Stein J. L., Stain G. S., and Penman S.: Cell cycle independent interaction of CDC2 with the centrosome, which is associated with the nuclear matrix-intermediate filament scaffold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94(7):3022~3027. 1997
 37. Sherr C. J. D-type cyclins, *Trends*.

- Biol. Sci., 20(5):187~190. 1995
38. Shin SY, Lee MK, Kim KL, Hahm KS: Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptid-
es derived from cecropin A-magainin 2
and cecropin A-melittin hybrid pe-
ptides. *J Pept Res* Oct;50(4):279~85.
1997
 39. 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.* 93:14094~14099.
1996
 40. Tu Y., Feng-hao Xu, Jin Liu, Versco R.,
Berenson J., Fady C., and Lichtanstein
A.: Upregulated Expression of Bcl-2 in
multiple myeloma cells induced by
exposure to Doxorubicin, Etoposide, and
Hydrogen peroxide, *Blood.* 88(5):1 80
5~1812. 1996
 41. von Garnier C, Astori M, Kettner A,
Dufour N, Heusser C, Corradin G, S-
pertini F: Allergen-derived long pe-
ptide immunotherapy down-regulates
specific IgE response and protects from
anaphylaxis. *Eur J Immunol.* Jun;30
(6):1638~45. 2000
 42. Wood MW, Segal JA, Mark RJ, Ogden
AM, Felder CC: Inflammatory cytokines
enhance muscarinic-mediated arachid-
onic acid release through p38 mitogen-
activated protein kinase in A2058 cells.
J Neurochem. May;74(5):2033~40. 20
00
 43. Wu YL, Jiang XR, Newland AC, Kelsey
SM: Failure to activate cytosolic phos-
p-holipase A2 causes TNF resistance
in human leukemic cells. *J Immunol* Jun
15;160(12):5929~35. 1998
 44. Xing Y., Hannon G. J., Zang H., Casso
D. Kobayashi R., and Beach D.: p21 is
a universal inhibitor of cyclin kinase.
Nature. 366:701~704. 1993
 45. Yasin B, Pang M, Turner JS, Cho Y,
Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI, Wagar
EA: Evaluation of the inactivation of
infectious Herpes simplex virus by host
-defense peptides. *Eur J Clin Microbiol
Infect Dis.* Mar;19(3):187~94. 2000
 46. Yuan Y, et al: An essential role for
lysophosphatidylcholine in the inhibition
of platelet aggregation by secretory
hospholipase A2. *Blood,* Dec 1.
86(11):4166~74. 1995