대한침구학회지 제18권 제4호(2001년 8월)
The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society

원 저

藥鍼用 蜂毒成分 中 Apamin의 抗癌效果와 MAP-Kinase 신호전달체계에 관한 硏究

김윤미 · 이재동 · 박동석

경희대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Anti-Cancer Effect of Apamin in Bee-Venom on Melanoma cell line SK-MEL-2 and Inhibitory Effect on the MAP-Kinase Signal Pathway

Youn-Mi, Kim · Jae-Dong, Lee · Dong-Seok, Park

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Objective : To characterize the antitumorigenic potential of Apamin, one of the major components of bee venom, its effects on cell proliferation and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction pathway were characterized using the human melanoma cell line SK-MEL-2.

Methods & Results : Cell counting analysis for cell death demonstrated that consistent with a previous results, SK-MEL-2 cells treated with 0.5 - 2.0 μg/ml of Apamin showed no recognizable cytotoxic effect whereas detectable induction of cell death was identified at concentrations over 5.0 μg/ml. [3H]thymidine incorporation assay for cell proliferation demonstrated that DNA replication of SK-MEL-2 cells is inhibited by Apamin in a dose- and time-dependent manner. To explore whether Apamin-induced growth suppression is associated with the MAPK signaling pathway, phosphorylation of Erk, a function mediator of MAPK growth-stimulating signal, was examined Western blot assay using a phospho-specific Erk1/2 antibody. A significant increase of Erk1/2 phosphorylation level was observed in Apamin-treated cells compared with untreated control cells. Qantitative RT-PCR analysis revealed that Apamin inhibit expression of MAPK downstream genes such as c-Jun, c-Fos, and cyclin D1 but not expression of MAPK pathway component genes including Ha-Ras, c-Raf-1, MEK1, and Erk.

Conclusion : It is strongly suggested that the antitumorigenic activity of Apamin might result in part from its inhibitory effect on the MAPK signaling pathway in human melanoma cells SK-MEL-2.

key words : Bee venom, Apamin, Anti-cancer effect, MAP-Kinase signal pathway

· 접수 : 6월 28일 · 수정 : 7월 12일 · 채택 : 7월 21일

· 교신저자 : 박동석, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 부속 한방병원 침구과(Tel : 02-958-9206)
E-mail : Dspark49@yahoo.co.kr

Ⅰ. 서 론

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 이용되어왔다. 현재는 봉독에 관한 연구가 국내외에서 활발히 이루어지고 있다. 外國에서는 봉독 성분에 따른 작용과 기전[1], 봉독의 과민성과 독성[2], 면역요법[3] 및 관절염[4]·단순포진[5]·다발성 경화증[6]·종양[7),8]등의 질병 치료 등에 대한 연구가 보고되었고, 국내에서는 蜂毒을 이용한 藥鍼에 관하여 硏究가 활발히 進行되고 있어 鎭痛[9], 消炎[10], 鎭痙[11], 免疫機能 增强作用[12], 抗癌效果[13),14] 등이 報告되었다.

특히 봉독의 항암효과에 대한 연구는 外國에서는 Allen DH 等[7]은 蜂毒의 成分 중 Apamin이 tumor를 억제하는데 相關이 있다고 報告하였으며, Wood MW 等[8),15]은 蜂毒의 成分 중 Phospholipase A2가 tumor를 억제하는데 相關이 있다고 報告한 반면 Gerst JE 等[16),17]은 蜂毒의 成分 중 Melittin이 tumor promoter로 作用한다고 報告하였다.

國內에서는 박[14]이 봉독성분 전체를 이용해서 DNA합성에 관련된 세포분열억제 및 apoptosis유발과 각각에 관련된 유전자의 변화를 관찰해 항암효과를 연구 발표하였고, 권[18]은 봉독 성분의 Apamin, Melittin, Phospholipase A2 중에서 특히 Apamin과 Phospholipase A2에서 항암효과가 있음을 발표하였다.

이에 저자는 봉독의 항암 효과를 나타내는 성분이 암 유전자 발현 경로로 알려진 MAP Kinase signal pathway의 어느 부분에 영향을 미쳐서 항암효과를 발휘하는지를 알아보기 위하여 약침용 봉독 성분 중 항암효과의 주성분의 하나로 밝혀진 Apamin을 선택하여 人體 黑色腫 細胞에 투여한 後, cell counting analysis를 이용하여 Apamin의 투여 농도에 따른 세포증식의 변화를 관찰하였으며, Apamin에 의한 人體 黑色腫 細胞의 증식억제가 Apamin이 人體 黑色腫 細胞의 DNA 복제를 직접적으로 억제함으로써 유도되는 것인지를 확인하기 위하여 [^{3}H]thymidine release assay를 시행하였고, Western blot analysis를 시행하여 Erk 단백질의 phosphorylation을 분석하여 Apamin이 Erk 단백질의 활성화를 억제하는지 여부를 관찰하였으며, Apamin에 의한 Mitogen-activated Protein Kinase(MAPK) 신호전달계 억제작용을 보다 구체적으로 분석하기 위하여 Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)을 이용하여 세포분열주기, MAPK 신호전달체계 관련 유전자발현 및 MAPK 신호전달 체계 활성화에 의하여 발현이 촉진되는 세포주기관련 유전자 발현을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실 험

1. 세포배양

人體의 黑色腫 細胞株 SK-MEL-2는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockvelle, MD)에서 구입하여 DMEM(Dulbecco's Mininum Essential Medium) 배지 90%와 fetal bovine serum 10% 혼합배지를 이용하여 5%의 CO_2 상태가 유지되는 37℃ incubator에서 배양하였다.

2. 배양세포에 대한 약물의 처리

본 실험에 사용한 Apamin은 Bee venom으로부터 추출된 것을 Calbiochem 사로부터 구입하여 사용하였다. 약물은 3차 증류수로 녹인 후 세포배양액을 이용하여 최종 처리농도(0.5~10.0 μg/ml)로

희석하였으며 약 1 x 10^5개의 배양 SK-MEL-2 세포에 각각 6, 12, 24 및 48시간 동안 처리한 후 0.1% trypsin으로 세포를 회수하여 protein, DNA, RNA를 추출하였다.

3. 세포분열주기 분석

1) Cell Counting Analysis

세포증식에 미치는 Apamin의 영향을 조사하기 위하여 Apamin 처리농도에 따른 세포증식의 변화를 cell counting을 통해 분석하였다. SK-MEL-2 세포를 2 x 10^4 cells/well로 24-well multiplates에 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지로 12시간 동안 배양하였다. Apamin을 0.0~10.0 μg/ml의 농도로 12시간 처리한 후 PBS로 세척하였고 약제처리 24, 48 및 72시간 후에 세포의 수를 hemocytometer를 이용하여 counting하였다.

2) [^{3}H]thymidine Incorporation Assay

세포의 DNA 복제에 미치는 약물의 영향을 조사하기 위하여 [^{3}H]thymidine Incorporation Assay를 시행하였다. SK-MEL-2 세포를 2 x 10^4 cells/well로 24-well multiplates에 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지로 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 serum-free 배지로 교환함과 동시에 약물을 농도별로 처리하였다. 약물처리 20시간 후에 1.0 Ci/ml의 [^{3}H]thymidine (Amersham, Arlington Heights, IL)를 4시간 동안 pulse-labeling 하였고 DNA 내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양은 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다. 처리시간에 따른 효과를 분석하기 위하여 Apamin 1.0 μg/ml을 12, 24, 48 및 72 시간 처리한 투여군에 대하여 [^{3}H]thymidine incorporation assay를 수행하였다.

4. Erk 단백질의 Phosphorylation 분석-Western Blot Analysis

Erk 단백의 phosphorylation 분석을 위하여 Western Blot Analysis를 시행하였다. 세포를 20 mM Tris (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton, 2.5mM sodium phosphate, 1mM β-glycerolphosphate, 1 mM Na_3VO_4, 1 μg/ml leupeptin, 1 mM PMSF로 이루어진 완충용액에 용해시켰다. 세포가 용해된 용액을 원심분리하여 정제하였고 20 μg의 total protein을 Laemmli 완충용액에 첨가하였으며 10%의 SDS-polyacrylamide gel을 전기영동을 위하여 첨가하였다. Erk1/2의 Phosphorylation은 Erk1/2 항체(Promega Corp., Madison, WI)를 이용한 immunoblot에 의해 나타나게 된다. 항체의 결합은 horseradish peroxidase와 결합된 이차 항체를 사용한, 조영된 화학적 발광현상(Amersham Pharmacia Biotech)을 통하여 알 수 있게 된다. 이것이 잘 나타나게 하기 위하여 항체가 결합된 immunoblot을 50°C에서 60분 동안 stripping buffer (0.2 M glycine (pH 2.2), 0.1% SDS, 1% Tween-20)에서 배양하였다.

5. Quantitative RT-PCR을 이용한 유전자 발현의 분석[19),20)]

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, 17.6㎖의 0.75M sodium citrate, 26.4㎖의 10% sarkosyl 그리고 293㎖의 3次 蒸溜水)에 0.1M 濃度의 2-mercaptoethanol을 添加하여 만들었다. 培養 後 回收된 細胞들에 500$\mu\ell$ solution D와 2M의 50$\mu\ell$ sodium acetate(pH 4.0)를 添加한 후 vortexing 하였다. 500$\mu\ell$ 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 후 上層液에 1000㎕ cold isopropanol을 混合하여 -70℃에서 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㎕의 RNase-free water에 溶解시켰다. 抽出된 RNA의 濃度는 吸光度 260㎚과 280㎚에서 spectrophotometric measurement(Schimadzu Scientific Instruments, Inc., Concord, CA, USA)로 測定하며, optical density(260/280)의 比率 1.0을 40㎍/㎖ RNA로 세팅하여 濃度를 決定하였다.

2) cDNA의 合成

抽出된 1㎍의 RNA는 MoMuLV(Gibco)과 random hexamer primers를 使用하여 20㎕ cDNA로 逆轉寫 시켰다. 1㎍의 抽出된 RNA를 2㎕의 reverse transcriptase buffer, 1㎕의 random hexamer(10 pM), 1㎕의 MoMuLV-RT (10U/㎕), 1㎕의 dNTP (10 pM), 그리고 0.5㎕의 RNase inhibitor와 混合하였다. 이 混合物은 23℃에서 15分間, 42℃에서 1時間 그리고 95℃에서 5分間 培養하였다. 各各의 RNA로부터 얻어진 2개의 分離된 cDNA는 1:4 또는 1:8로 sterile H20로 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 cD

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

Genes	Primer	Sequences (5' to 3')	Orientation
Ha-Ras	EK367	AGGAGACCCTGTAGGAGGACC	Sense
	R	GCGTCAGGAGAGCAGCACACA	Antisense
Raf-1	S	TGGCTCCCTCAGGTTTAAGAA	Sense
	AS	GAAATCTACTTGAAGTTCTTC	Antisense
Mek1	1	GCCTAGCGAACATTACGACCT	Sense
	2	AAGTCCCATGCCGATGCTGGG	Antisense
Erk1	1	TTACAAGATCGTTAGCTAACA	Sense
	2	ACATATAGGGTAGCTTTACGG	Antisense
c-Jun	F	GGGCTACCACTCGTTTCATT	Sense
	R	GCTAACTTTAACCTGHACTG	Antisense
c-Fos	F	GACCCTATATGATTGTAAAG	Sense
	R	TTACTGACTCTGCTTTGATC	Antisense
c-Myc	F	AGTTTCCACGAGTCATGAGA	Sense
	R	CCATTTGCTACATTCCCATC	Antisense
Cyclin D1	F	GTTCACCGCTGCTACCTTGA	Sense
	R	TTAGCTCTCGATTGGATCTC	Antisense
GAPDH	F	GAACGAGAGTCCGAGATTCG	Sense
	R	TTAGCACAGCATGACGATAT	Antisense

NAs (1:0, 1:2, 1:4, and 1:8)에 對한 PCR을 施行하였다. 各各의 cycle은 95℃로 1分間의 de-naturation, 58~62℃로 45秒間 annealing, 그리고 72℃에서 1分間의 polymerization으로 構成하였다. 50㎕의 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 産生物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 ㎍/㎖ 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 oli-gonucleotides를 利用한 Southern probing an-alysis로 確認하였다(Table 1).

4)RT-PCR 産生物의 Densitometric Analysis

遺傳子 發顯에 대한 定量化는 ethidium br-omide-stained gels을 laser densitometry로 s-canning하여 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 持續的으로 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 2回의 定量的 RT-PCR을 反復 施行하였다.

5) Quantitative RT-PCR

① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10X amplification buffer	10.0 ㎕
Mixture of dNTP (10pM)	2.0 ㎕
GAPDH primer 1 (10pM)	1.0 ㎕
GAPDH primer 2 (10pM)	1.0 ㎕
Template cDNA	1.0 ㎕
rTaq polymerase	0.4 ㎕
H_2O	84.6 ㎕

② GAPDH primer를 이용하여 다음의 조건으로 36 cycles PCR반응을 시행하였다.

First cycle	
Annealing	1 min at 59℃
Denaturation	5 min at 94℃
Polymerization	1 min at 72℃
Subsequent cycle (34 cycles)	
Denaturation	1 min at 94℃
Annealing	1 min at 59℃
Polymerization	1 min at 72℃
Last cycle	
Denaturation	1 min at 94℃
Annealing	1 min at 59℃
Polymerization	10 min at 72℃

③ PCR products는 2% agarose gel에서 100V, 10분간 전기영동한 후 densitometer를 이용하여 각 band의 밝기를 분석하였으며 GAPDH에 대한 target 유전자의 상대적인 값을 이용하여 정량화를 시행하였다.

Ⅲ. 성 적

1. Apamin이 人體 黑色腫 細胞株 SK-MEL-2의 세포증식에 미치는 영향

Apamin은 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 및 10.0㎍/ml의 농도로 12시간동안 처리하였으며 약물처리 24, 48 및 72시간 후에 세포의 수를 비교 관찰한 결과, Apamin 처리농도에 비례하는 SK-MEL-2의 세포 증식억제가 관찰되었다. Apamin 5.0 및 10.0㎍/ml 처리군에서는 약물의 독성에 기인한 것으로 추측되는 세포사 (cell death)가 발견되었으나 0.5~2.0㎍/ml 처리군에서는 세포사가 관찰되지 않았다(Table 2).

Table 2. Analysis of the Effect of Apamin on Propergation of the SK-MEL-2 Cells(x 10^4 cells/well)

		24	48	72 (hrs)
Control	Exp. 1	2.45	3.68	6.88
	Exp. 2	2.61	3.77	6.96
Apamin (㎍/ml)				
0.5	Exp. 1	2.39	3.55	6.80
	Exp. 2	2.42	3.52	6.77
1.0	Exp. 1	2.37	3.41	6.60
	Exp. 2	2.35	3.44	6.52
2.0	Exp. 1	2.26	3.21	5.65
	Exp. 2	2.31	3.36	5.73
5.0	Exp. 1	2.18	2.69	4.35
	Exp. 2	2.22	2.66	4.44
10.0	Exp. 1	2.05	2.40	3.19
	Exp. 2	2.09	2.56	3.27

2. Apamin이 SK-MEL-2 細胞의 DNA 복제에 미치는 영향

약제의 처리농도는 세포독성을 유발하지 않는 0.5~2.0 ㎍/㎖ 범위로 정하였다. 약제는 총 24시간 동안 처리하였으며 세포회수 4시간 전에 [^{3}H]thymidine을 투여하였고 DNA내에 incorporation된 [^{3}H]thymidine의 양을 분석하였으며, 이와 함께 처리시간에 따른 세포증식 억제효과를 분석하기 위해 1.0㎍/㎖ 농도로 12, 24, 48 및 72 시간 처리한 후 [^{3}H]thymidine incorporation된 [^{3}H]thymidine의 양을 약제를 처리하지 않은 대조군과 비교한 결과, SK-MEL-2 세포의 DNA 합성은 Apamin의 투여농도 및 투여시간에 비례하는 감소를 보여주었다(Table 3, Table 4).

Table 3. The Suppression of DNA Replication of the SK-MEL-2 Cells According to the Concentration of Apamin

Apamin(㎍/㎖)	0.0	0.5	1.0	2.0
Exp. 1	49100	47800	45500	42000
Exp. 2	48300	46400	45100	41300

Table 4. The Suppression of DNA Duplication of the SK-MEL-2 Cells According to the Exposure Time to Apamin

Apamin(1.0 ㎍/㎖)		12	24	48	72(hrs)
Exp. 1	Control	48900	49100	48600	48800
	Treated	48800	47600	42000	36500
Exp. 2	Control	47900	47800	48200	47900
	Treated	48000	47000	42400	36100

3. Apamin이 MAPK 신호전달체계의 활성에 미치는 영향

Apamin 처리에 의하여 Erk1/2의 phosphorylation이 변화하는지의 유무를 대조군과 비교

분석하여 세포증식의 억제가 뚜렷하게 관찰된 Apamin 2.0㎍/ml 처리군을 대상으로 분석을 수행하였으며 Erk1/2 phosphorylation은 phospho-specific E를 antibody로 사용하였다. Apamin의 투여는 Erk1/2의 phosphorylation을 현저하게 억제함이 관찰되었으며 Erk1/2 phosphorylation의 감소는 Apamin 처리 10분 후부터 관찰되기 시작하여 처리 1시간 후까지 지속적으로 관찰되었다 (Figure 1).

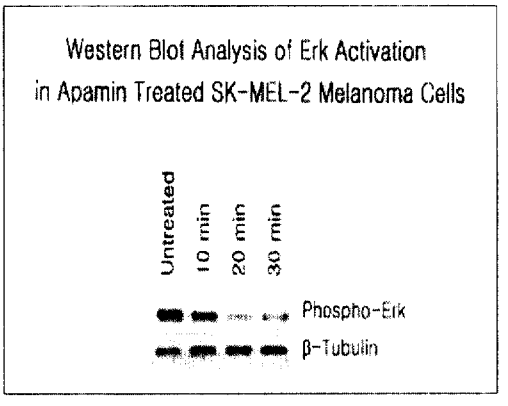

Figure 1. Western blot analysis of Erk1/2 activation(phosphrylation)

4. Apamin이 MAPK 신호전달계 관련 유전자 발현에 미치는 영향

Apamin은 MAPK 신호전달계의 구성유전자인 Ha-Ras, Raf-1, MEK1, Erk 유전자의 발현에는 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었으나 MAPK 신호전달계의 활성화에 의하여 그 발현이 촉진되는 것으로 알려진 cyclin D1, c-Fos, c-Jun 유전자의 발현을 현저하게 감소시킴이 관찰되었다 (Table 5 및 6, Figure 2 및 3).

Table 5. Quantitative RT-PCR analysis of the MAPK pathway genes

Genes		0	12	24(hrs)
Ha-Ras	Exp. 1	1.00	1.04	1.02
	Exp. 2	1.00	1.03	0.99
Raf-1	Exp. 1	1.00	0.97	1.03
	Exp. 2	1.00	0.99	1.03
MEK1	Exp. 1	1.00	1.01	0.98
	Exp. 2	1.00	0.95	0.99
Erk	Exp. 1	1.00	1.04	1.02
	Exp. 2	1.00	0.97	1.04

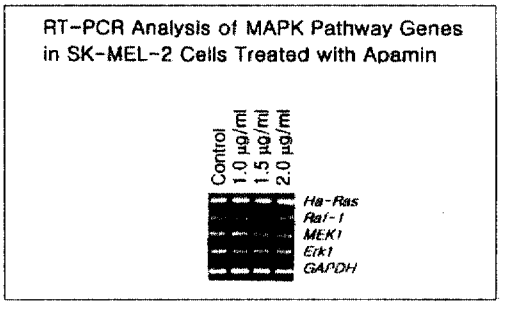

Figure 2. Quantitative RT-PCR analysis of the MAPK pathway genes 1:4 diluted cDNA prepared from untreated control and Apamin-treated SK-MEL-2 cells was subjected to PCR amplification of the MAPK pathway genes (Ha-Ras, c-Raf-1, MEK1, Erk). Ten μl of PCR products was resolved on a 2% agarose gel and its 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.

Table 6. Quantitative RT-PCR analysis of the MAPK target genes

Genes		0	12	24(hrs)
c-Jun	Exp. 1	1.00	0.79	0.52
	Exp. 2	1.00	0.69	0.54
c-Fos	Exp. 1	1.00	0.70	0.46
	Exp. 2	1.00	0.65	0.52
Cyclin D1	Exp. 1	1.00	0.81	0.62
	Exp. 2	1.00	0.77	0.59

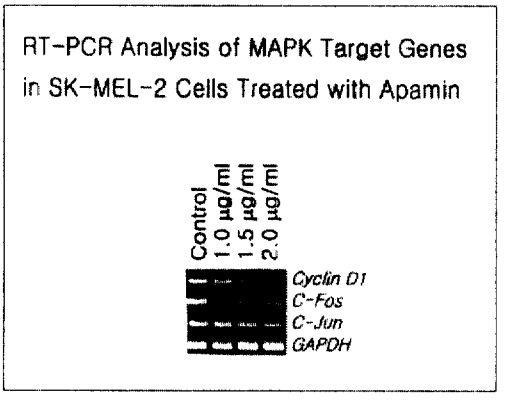

Figure 3. Quantitative RT-PCR analysis of the MAPK target genes 1:4 diluted cDNA prepared from untreated control and Apamin-treated SK-MEL-2 cells was subjected to PCR amplification of the MAPK pathway downstream genes (c-Fos, c-Jun, cyclin D1). Ten μl of PCR products was resolved on a 2% agarose gel 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.

Ⅳ. 고 찰

우리나라에서 1997년 통계청이 발표한 질병사인 분류통계에 의하면 연간 5만명 이상이 암으로 인해 사망하여 전체 사망원인의 2위를 차지하고 있다[21]. 피부암은 전체 암 중에서 2~4%를 차지하고 있으며[21], 피부암은 基底細胞癌, 扁平上皮細胞癌, 惡性黑色腫 등으로 나눌 수 있다[22),23]. 서양의 역학조사에 의하면 黑色腫의 발생빈도가 최근 10년 사이에 2배정도 증가하고 있다. 가장 높은 발병률을 보이는 호주에서는 매년 10만명당 40명에서 黑色腫이 발생된다고 한다[24]. 최근 백인에게서 피부 흑색종은 드문 종양이 아니며, 2000년에는 90명 중 1명 정도로 黑色腫의 발생을 추측하고 있다. 30~49세의 남자에게 黑色腫은 고환암에 이어 두 번째로 많은 암이고 50-59세에는 방광암, 폐암, 직장암 다음으로 많이 발생한다. 따라서 피부 原發 黑色腫은 젊은 층 혹은 중년에 호발하는 질환이며, 1976년에서 1987년까지 原發 黑色腫에 의한 평균 사망률은 1년에 남자는 3%, 여자는 1%의 비율로 증가하였다[23]. 우리나라에서는 黑色腫에 대한 전국적인 통계조사가 없으나 서양보다는 발병률이 낮으며 발생양상에도 차이가 있다[24].

黑色腫의 발생 기전은 확실치 않으나 유전적 요인과 자외선 노출과 같은 환경적 요인으로 대별할 수 있다[24]. 약 30%의 黑色腫은 이미 존재하던 멜라닌 세포성 병변에서 생기고 70%는 정상 피부에서 생긴다. 특히 선천성 모반세포성 모반이나 이형성 모반에서의 黑色腫 발생 빈도는 높다. 거의 대부분의 黑色腫은 방사성 성장기(radial growth phase)를 보이고 그 후에 수직성 성장기(vertical growth phase)가 뒤따른다. 방사성 성장기에는 거의 표피내(intraepidermal), 침습전(preinvasive) 혹은 최소 침습(minimally invasive) 성장을 보이고, 수직성 성장기에는 진피로 침범하여 전이의 통로가 되는 혈관 근처까지 이를 수 있다. 黑色腫은 증식성의 惡性 멜라닌 세포를 가지므로 대개의 경우 멜라닌 색소를 만들어서 방사성 성장기의 침습전 黑色腫에서도 그 색깔에 의해 임상적으로 발견될 수 있다[23]. 피부에 발생하는 黑色腫은 가려움증이나 통증같은 자각증상이 없으며 평범한 검은 반점으로 보이므로 정확한 진단을 위해서는 육안 관찰이 중요한데, 비대칭성(Asymmetry), 불규칙한 경계(Border irregularity), 색조의 다양함(Color variegation)과 직경(Diameter)이 0.6cm 이상인 경우에 대해 관찰한다[24].

惡性 黑色腫에 대한 치료는 조기진단과 완전 절제가 치료의 근본이다. 방사선 치료도 큰 효과는 없고 골이나 신경계에 전이된 경우에 증상의 경감을 위해 이용하는 정도이다. 면역 요법은 아직 실험단

계로 BCG를 黑色腫 병변에 주사하거나 인터페론, 활성화된 killer 세포와 IL-2를 사용하기도 한다[24].

惡性 黑色腫의 면역학적 측면을 보면, 면역감시와 숙주반응의 두 가지 측면에서 고려해 볼 수 있는데, 惡性 黑色腫에 대한 면역감시기전은 惡性 黑色腫의 발생을 완벽하게 저지하지는 못하기 때문에 이러한 감시기전의 역할은 계속 의문시되고 있다. 반면, 이미 발생한 惡性 黑色腫에 대한 면역반응, 특히 세포매개성 면역반응에 대하여는 최근에 많은 것이 밝혀졌다. 이러한 지식을 바탕으로 惡性 黑色腫에서 실험단계이기는 하나, 여러 방법의 면역치료가 시도되고 있다. 惡性 黑色腫은 종양에 대한 환자의 면역반응을 증강시키는 실험적 치료방법, 즉 면역요법이 통상적인 화학요법보다 생존을 증가시키는 데 더 효과적인 것이 입증된 질환이다. 최근의 면역요법은 종양의 항원제시 능력과 세포독성 림프구의 활동을 증강시키는 데 초점을 두고 있다[25].

韓醫學에서는 黑色腫과 같은 피부암에 대하여 翻花瘡, 石疽, 黑疔, 失榮, 癌發 등으로 표현하고 있으며[26], 韓藥[27),28),29] 및 鍼[12),13),14]의 抗癌效果에 대하여 많은 硏究가 이루어지고 있다.

蜂毒療法은 기원전부터 인체의 질병치료에 이용되어 온 치료법으로서, 현재는 蜂毒에 관한 연구가 국내외에서 활발히 이루어지고 있으며, 특히 봉독성분의 항암효과에 대해서 많은 관심이 모아지고 있다.

蜂毒은 性味가 苦, 辛, 平, 有毒하고, 祛風除濕, 止疼痛, 解痙平喘, 消腫降壓하는 효능이 있어 류마티스관절염, 급만성관절염, 좌골신경통, 통풍, 근육통, 편두통, 기관지천식, 과민성비염, 결절성홍반, 담마진, 갑상선기능항진 및 고혈압 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[30].

蜂毒이란 꿀벌의 毒囊에 들어있는 約 40여 가지의 有效成分으로 構成된 物質이며, 蜂毒의 成分은 크게 peptide components, non peptide components, enzymes으로 構成되어 있다[31]. Peptide components는 Freeze-dried venom의 約 50%를 構成하고 있으며, 主要成分으로는 Melittin, Apamin 등이 있다[32),33].

Apamin은 신경계에 작용하는 peptide로서 calcium-potassium의 결합에 변화를 주어 중추신경 및 말초신경에 영향을 미친다. 過量(0.5㎖/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 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 유발한다[7]. Melittin과 Apamin은 cortisone분비를 증가시켜 소염효과를 나타내고 시상하부에 serotonine의 증가를 유도하며 면역체계를 억제하는 특성을 갖고 있는데, 봉독의 인체 면역기능에 대한 기전은 아직 연구 중에 있다.

봉독의 항암 효과에 대한 연구로, 국내에서는 박[14]이 봉독성분 전체를 이용해서 항암효과의 기전으로 인정되어지는 최근의 이론에 따라 DNA합성에 관련된 세포분열억제 및 apoptosis유발과 각각에 관련된 유전자의 변화를 관찰해 항암 효과를 연구 발표하였으며, 권[18]이 봉독 성분 중 Apamin, Melittin, Phospholipase A2 세 가지를 이용해 봉독의 항암 효과는 특히 Apamin과 Phospholipase A2가 주성분으로 작용함을 발표하였다.

이에 저자는 봉독의 항암 효과를 나타내는 성분이 암 유전자 발현 경로로 알려진 MAP Kinase signal pathway의 어느 부분에 영향을 미쳐서 항암효과를 발휘하는지를 알아보기 위하여 약침용 봉독성분 중 항암 효과의 주성분의 하나로 밝혀진 Apamin을 선택하여 人體 黑色腫 細胞에 투여한 후, cell counting analysis를 이용하여 Apamin의

투여 농도에 따른 세포증식의 변화를 관찰하였으며, Apamin에 의한 人體 黑色腫 細胞의 증식억제가 Apamin이 人體 黑色腫 細胞의 DNA 복제를 직접적으로 억제함으로써 유도되는 것인지를 확인하기 위하여 [^{3}H]thymidine release assay를 시행하였고, Western Blot Analysis를 시행하여 Erk 단백질의 phosphorylation을 분석하여 Apamin이 Erk 단백질의 활성화를 억제하는지 여부를 관찰하였으며, Apamin에 의한 MAPK 신호전달계 억제작용을 보다 구체적으로 분석하기 위하여 Quantitative RT-PCR을 이용하여 세포분열주기, MAPK 신호전달체계 관련 유전자발현 및 MAPK 신호전달 체계 활성화에 의하여 발현이 촉진되는 세포주기관련 유전자 발현을 분석하였다.

세포의 분열증식은 생명체의 가장 중요한 현상이며 세포의 무절제한 분열은 신생물 등의 질환을 유발하여 또한 생명을 위협한다. 세포는 분열 증식할 때에 DNA의 합성이 필요하므로 DNA의 합성을 억제하면 암세포의 증식이 억제되어 기본적인 항암효과가 있음을 의미한다.

따라서 Apamin의 항암 효과에 대한 분석을 위하여 SK-MEL-2 人體 黑色腫 細胞의 세포증식에 미치는 Apamin의 영향을 cell counting analysis를 이용하여 조사하고, Apamin이 DNA replication을 억제하는 기능이 있는지의 유무를 [^{3}H]thymidine incorporation assay를 이용하여 분석하였다.

그 결과 Apamin의 처리 농도에 비례하는 SK-MEL-2 세포의 세포증식억제가 관찰되었고, 박[14]과 권[18]의 MTT반응 실험결과에서 관찰된 바와 같이 Apamin 5.0 및 10.0μg/ml 처리군에서는 약물의 독성에 기인한 것으로 추측되는 세포사(cell death)가 발견되었으나 0.5~2.0μg/ml 처리군에서는 세포사가 관찰되지 않았다. 따라서 세포활성의 현저한 저하나 독성에 인한 세포사가 유발되지 않는 0.5~2.0μg/ml 농도군에서 Apamin 처리 농도에 비례하는 세포증식의 저하가 관찰된 것은 Apamin이 人體 黑色腫 細胞의 세포증식을 직접적으로 억제하는 작용을 하고 있음을 시사하는 것으로 판단된다.

또한, SK-MEL-2 세포의 DNA 합성능은 Apamin의 투여농도 및 투여시간에 비례하여 DNA replication이 억제되는 것으로 관찰되었다.

암 유전자의 발현을 위한 신호전달체계는 Ras, Raf-1, Mek, Erk1/2로 구성되며, 이러한 일련의 신호전달체계를 Mitogen-activated Protein Kinase(MAPK) Pathway라고 한다. 세포막의 수용체에서 발생한 신호에 의해 Ras 단백질이 활성화되는데, 이 Ras 단백질의 활성은 GTP와 GDP의 결합에 의하여 결정된다. Growth factor나 cytokine이 수용체와 결합하면 그 신호가 Ras 단백질에 전달되어 GDP가 GTP로 치환되어 활성화된다. GTP가 결합하여 활성화된 Ras 단백질은 이어 Ras 단백질의 downstream에 존재하는 Raf kinase, MAP kinase kinase (Mek), MAP kinase (Erk) 등의 kinase cascade를 연속적으로 활성화시켜 수용체의 tyrosine kinase 활성을 serine/threonine kinase의 활성으로 바꾼다. 이어 이 정보는 fos, jun, myc과 같은 transcription factor의 발현을 유도하여 세포의 증식과 성장 및 분화를 일으키게 된다. 이러한 일련의 신호전달체계에서 세포막에 있는 Ras 단백질이 growth factor나 cytokine 등의 신호전달을 On-Off 시키는 molecular switch로써 중요한 역할을 담당하고 있다는 것을 알 수 있다. 만약 Ras gene에 변이가 발생하여 자체의 GTPase 활성이 소실되거나 GAP과의 작용이 방해받게 되어 GTP가 결합한 Ras 단백질의 양이 비정상적으로 증가하게 되면 growth signal의 이상이 생겨 암으로 발전하게 된다. Ras 단백질의 종양원성 변이종들은 이러한 GTPase 작용에 이상이 초래된 경우들이다[34].

Raf 단백질의 활성화는 이 단백질의 tyrosine,

serine, threonine residue에의 인산화를 동반한다. Receptor tyrosine kinase들에 의한 직접적인 인산화 또는 이들 receptor들에 의해 조절되는 단백질 인산화 효소들에 의한 인산화가 Raf 활성화의 기전으로 알려져 있다. 후자의 경우 small GTP-결합 단백질인 Ras가 Raf의 활성화에 관여한다. Ras는 GTP와 결합하고 있을 때 활성이 있으며 GDP와 결합하고 있으면 그 활성을 잃는다. GTP와의 결합으로 활성화된 Ras는 세포질 내의 비활성 상태의 Raf를 세포막으로 이동시켜서 인산화(phosphorylation)가 일어날 수 있게 한다. 그러므로 Ras의 역할은 Raf를 활성 효소들 주위로 불러모아 그곳에서 인산화에 의한 활성화가 일어날 수 있게 해주는 데 있다[35].

Raf에 도달한 신호는 Raf/Mek/MAPK로 이어지는 신호전달체계를 통하여 핵으로 전해진다. 이러한 신호전달 경로에는 일련의 kinase들이 종으로 배열되어 신호를 전달하게 되는데 이는 세포의 성장과 분화에 필수적인 역할을 수행한다[35].

Raf의 substrate는 또 다른 Ser/Thr specific protein kinase인 MAP kinase kinase (Mek)이다. Mek는 Raf에 의해 활성화된 후 다시 또 다른 Ser/Thr specific protein kinase인 MAP kinase (MAPK)를 활성시키며 이렇게 활성화된 MAPK는 궁극적으로 핵 내부의 trascription factor들을 활성화시켜서 각종 신호에 따른 특정 유전인자의 발현을 촉진시킴으로써 세포막으로부터의 신호에 대한 세포의 반응이 궁극적으로 나타나게 한다. 이 과정에서 Raf와 Mek는 각각의 substrate에 대해 매우 높은 specificity를 보여준다. 이들 세 효소들이 cytoplasmic kinase cascade라고 알려진 신호전달체계를 형성하는데 이 체계는 여러 가지 세포들에서 세포의 성장에 필요한 신호를 전달하는데 매우 중요한 역할을 수행한다. 이러한 세포질내의 신호전달 체계와 세포막의 receptor들을 연결시켜주는 방법 중에 많은 receptor들이 이용하는 방법으로 Ras를 통하는 경로가 있는 것이다[35].

Mek와 Erk도 이와 같이 차례로 phosphorylation됨으로써 활성화됨이 알려져 있다.

Apamin이 MAPK 신호전달체계의 최후 단백질인 Erk1/2 단백질의 활성화에 관여하는지를 알아보기 위하여 Western Blot Analysis에 의한 Erk 단백질의 phosphorylation을 분석한 결과, Apamin 투여 후 Erk1/2의 phosphorylation이 감소함이 발견되었다. 이러한 결과는 Apamin에 의한 SK-MEL-2 세포증식억제가 대표적인 발암유도신호전달체계인 MAPK 신호전달체계에 대한 억제를 통하여 유도되고 있음을 강하게 시사하는 것으로 판단된다.

외적상해에 의한 세포사 즉 괴사에 대한 하나의 대조적 개념으로서 나타난 apoptosis는 내적 환경 규제에 의한 programmed cell death로서 구분하는 경향이었으나 apoptosis의 유발점이 세포 외부에도 있음이 밝혀지고 수많은 자극 특히 항암제나 방사선조차 apoptosis를 유발하는 것이 알려졌다. Apoptosis는 배태발육, 면역 및 신경계발달, 그리고 종양퇴행과 같은 생체 내 여러 가지 다양한 생리 및 병리학적 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[36],[37],[38].

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 세포고사체로 되어 실질세포나 대식세포에 의해 탐식되고 분해되어 부서지게 된다[37].

세포주기 조절에 관여하는 유전자들로는 c-jun, c-myc, c-fos, cyclin D1, CDK4, cdc-2, p53, p21, RB1, p16 등이 있고 그 중에서도 G1기에서 S기로 이행되도록 결정하는 과정인 G1 checkpoint 조절에 대한 분자생물학적 연구가 대단히 활발히 진행되고 있다[37].

c-jun은 c-fos 遺傳子와 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[39].

c-fos는 스스로는 AP-1 site에 附着하지 않고 jun 蛋白과 協同的으로 DNA에 附着하며 G1期에서 S期로 넘어가는 것을 促進한다[39].

myc family에는 c-myc, n-myc, l-myc이 있는데 이들 遺傳子의 突然變異는 많은 人間의 腫瘍에서 報告된 바 있다[40]. 다른 helix-loop-helix transactivator들과 더불어 c-myc단백질이 p53유전자 promoter와 결합하여 이를 활성화시키는 것으로 보아 아마 c-myc-p53 system은 세포주기 조절에서 negative feedback loop을 이루고 있는 것이 아닐까 추측된다[38].

Cyclin D class(D1, D2, D3)는 retinoblastoma gene의 燐酸化에 重要한 역할을 하고 mammalian cell에서는 G1期의 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[40].

이상에서 살펴본 바와 같이 c-fos, c-jun, c-myc, cyclin D1 등은 세포분열주기의 촉진을 유도함으로서 종양세포의 증식을 촉진하는 것으로 잘 알려져 있다.

Apamin이 항암 효과를 나타내는 기전이 MAPK 신호전달체계를 구성하는 Ras, Raf-1, Mek, Erk1/2의 유전자발현 억제와 관련이 있는지를 알아보기 위하여 Quantitative RT-PCR을 이용한 MAPK 신호전달체계 관련 유전자발현 분석을 시행한 결과, Apamin 투여 후 MAPK 신호전달체계를 구성하는 Ras, Raf-1, Mek, Erk1/2의 유전자 발현에는 변화가 관찰되지 않았다.

Apamin의 人體 黑色腫 細胞株에 대한 세포증식 억제와 DNA 복제 억제 효과에 기초하여 Apamin에 의한 이러한 세포학적 현상이 유전자의 발현의 변화에 영향을 미치는지 여부를 파악하기 위하여 Quantitative RT-PCR을 통한 유전자발현 분석을 수행한 결과, Apamin을 투여한 후 세포분열을 촉진하는 것으로 잘 알려진 c-jun, c-fos, cyclin D1 유전자의 발현이 모두 감소함이 발견되었다. 이들 유전자 발현 변화는 투여한 약제의 처리 시간에 비례하였다.

이러한 결과를 종합하면 Apamin은 MAPK 신호전달계 구성 유전자 자체의 발현에는 영향을 미치지 않으나 MAPK 신호전달계 활성화의 기능적 매개자인 Erk1/2의 phosphorylation을 저하시킴으로서 MAPK 신호전달계를 단백질 수준에서 억제하는 것으로 이해되며 이로 인하여 MAPK 신호전달계에 의하여 그 발현이 촉진되는 cyclin D1, c-Fos, c-Jun 유전자의 발현이 Apamin에 의하여 저하되는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해보면, Apamin을 투여한 黑色腫 細胞로부터 세포증식억제효과 및 DNA 복제 억제 효과를 관찰하여 Apamin의 항암 효과를 확인할 수 있었으며, Apamin의 이러한 항암 효과의 발현 기전은 대표적인 종양촉진신호전달체계인 MAPK pathway의 차단에 의한 세포증식의 억제와 밀접한 관련이 있는 것으로 추측된다.

앞으로 봉독 약침이 나타내는 항암 효과에 대한 생체 연구의 뒷받침 및 봉독 약침의 성분 중 항암 효과가 있는 것으로 알려진 성분이 정상 세포에 미치는 영향에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료되며, 봉독의 항암 효과를 실제 임상에 활용할 수 있게 되기를 기대한다.

V. 결 론

봉독의 항암 효과를 나타내는 성분이 암 유전자 발현 경로의 어느 부분에서 항암효과를 발휘하는지를 알아보기 위하여 약침용 봉독성분 중 Apamin을 선택하여 人體 黑色腫 細胞에 투여한 후, Apamin의 투여 농도에 따른 세포증식의 변화를 관찰하였으며, Apamin에 의한 人體 黑色腫 細胞의 증식억제가 Apamin이 人體 黑色腫 細胞의 DNA 복제를 직접적으로 억제함으로써 유도되는지를 관찰하였고, Erk 단백질의 phosphorylation을 분석하여 Apamin이 Erk 단백질의 활성화를 억제하는지 여부를 관찰하였으며, Apamin에 의한 MAPK 신호전달계 억제작용을 보다 구체적으로 분석하기 위하여 세포분열주기 및 MAPK 신호전달체계 관련 유전자발현 및 MAPK 신호전달 체계 활성화에 의하여 발현이 촉진되는 세포주기관련 유전자 발현을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 人體 黑色腫 細胞株 SK-MEL-2의 세포증식을 분석한 결과 Apamin의 투여 농도에 따른 세포증식의 억제가 확인되었다.

2. 人體 黑色腫 細胞株 SK-MEL-2의 DNA 합성을 분석한 결과 Apamin 투여 농도 및 투여 시간에 비례하는 DNA 합성 억제가 관찰되었다.

3. Apamin은 Erk1/2의 phosphorylation을 억제함으로써 악성 종양세포의 MAPK 신호전달계를 차단하는 기능이 있었다.

4. Apamin은 MAPK 신호전달계를 구성하는 Ras, Raf-1, Mek, Erk1/2의 유전자 발현에는 직접적인 영향을 미치지 않았다.

5. Apamin에 의한 MAPK 신호전달계의 억제는 MAPK에 의해 발현이 촉진되는 발암유전자 Cyclin D1, c-Fos, c-Jun 등의 발현억제를 유도하였다.

VI. 참고문헌

1. Deregnaucourt C, Schrevel J. Bee venom phospholipase A2 induces stage-specific growth arrest of theintraerythrocytic Plasmodium falciparum via modifications of human serumcomponents. J Biol Chem. 2000;Sep 14
2. Aalberse RC. Structural biology of allergens. J Allergy Clin Immunol. 2000;106(2):228-38.
3. 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 Eyp Allergy. 1995;25(9):828-38.
4. Millward-Sadler SJ, Wright MO, Davies LW, Nuki G, Salter DM. Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecanand matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but notosteoarthritic, human articular chondrocytes. Arthritis Rheum. 2000;43(9):2091-9.
5. 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 byhost-defense peptides. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19(3):187-94.

6. 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. 2000;4 (27):1-61.
7. Allen DH, Lepple-Wienhues A, Cahalan MD. Ion channel phenotype of melanoma cell lines. J Membr Biol. 1997;155 (1):27-34.
8. Beatty BG, Qi S, Pienkowska M, Herbrick JA, Scheidl T, Zhang ZM, Kola I,Scherer SW, Seth A. Chromosomal localization of phospholipase A2 activating protein, an Ets2 targetgene, to 9p21. Genomics. 1999;62(3):529-32.
9. 윤형석, 김용석, 이재동. 통증 관련 봉독 연구에 대한 고찰. 대한약침학회지. 2000;3(1): 156-169.
10. 都垣錫, 張埈赫, 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. 1995;12(1): 211-220.
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. 大韓韓醫學會誌. 1999;20(1):106-112.
12. 權奇祿, 高炯均. 봉약침요법의 면역반응에 관한 임상적 연구. 大韓鍼灸學會誌. 2000;17 (1):169-174.
13. 權奇祿, 高炯均, 金容奭, 朴英培, 金昌煥, 姜成吉. 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. 1997;14(2):157-172.
14. 박찬열, 서정철, 최도영, 안병철. 봉독약침의 항암효과에 대한 분자생물학적 연구. 대한약침학회지. 2000;3(1):1-19.
15. Daniele JJ, Bianco ID, Delgado C, Carrillo DB, Fidelio GD. Anew phospholipase A2 isoform isolated from Bothrops neuwiedii(Yarara chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. Toxicon. 1997; 35(8):1205-15.
16. Gerst JE, Salomon Y. Inhibition by Melittin and fluphenazine of melanotropin receptor function andadenylate cyclase in M2R melanoma cell membranes. Endocrinology. 1987;121(5):1766-72.
17. Shin SY, Lee MK, Kim KL, Hahm KS. Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptidesderived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. J Pept Res. 1997;50(4):279-85.
18. 권도희, 이재동, 최도영. 藥鍼用 蜂毒成分 中 Apamin, Melittin의 항암작용. 大韓鍼灸學會誌. 2001;18(1):129-145.
19. Ferre F.. Quantitative or semi-Quantitative PCR : reality versus myth, PCR Methods and Applications. 1992;2:1-9.
20. Wang A. M. W., Doyle M. V., and Mark D. F.. Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989;86(24):9717-9721.
21. 統計廳. 19大分類에 의한 死因構造, 死亡原

因統計年報. 16. 서울: 1997:21-25.
22. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회: 피부과학. 개정3판, 서울:여문각. 1994:452-456.
23. 피부과학원색도감편찬위원회편(Thomas B. Fitzpatrick 외 저). 피부과학원색도감. 서울:도서출판 정담. 1999:180-207.
24. 대한피부과학회 간행위원회. 피부과학. 개정4판. 서울:여문각. 2001:542-547.
25. 은희철 외. 피부면역학. 서울:서울대학교출판부. 1999:108-110.
26. 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. 1998;2(1):1-28.
27. 공현식, 류봉하, 박동원, 류기원. 韓國韓醫學의 腫瘍硏究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. 1995;1(1):55-81.
28. 채우석. 면역질환의 한방개념과 치료에 관한 문헌적 고찰. 大韓韓醫學會誌. 1990;11(2):54-91.
29. 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. 1995;1(1):11-28.
30. 朱文鋒. 實用中醫辭典. 陝西:陝西科學技術出版社. 1992:402.
31. Habermann E.. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In Venomous Animals and their Venoms. Academic Press. 1971;3:61.
32. 이진선, 권기록, 최호영. HPLC를 이용한 봉약침의 주요성분에 관한 연구. 大韓鍼灸學會誌. 2000;17(4):120-129.
33. Assen E. SK. et al. A peptide from the venom of the Honey Bee. Brit. Pharmscol. 1973;337-338.
34. 전병학. Ras Oncogene 연구의 최신 동향과 문제점. 대한 생화학·분자생물학회지. 1996;4(4):19-21.
35. 이종은. Raf 암유전자, 대한 생화학·분자생물학회지. 1996;4(4):22-24.
36. 서민호, 백원기. 세포주기조절과 apoptosis. 계명의대논문집. 1996;15(4):381-393.
37. 서민호, 서성일. 질병발생과 치료에 있어서의 apoptosis의 역할. 계명의대논문집. 1996;15(4) : 394-406.
38. 정성민. 세포고사. 臨床耳鼻. 1996;7(1):77-92.
39. Geoffrey M. Cooper. Oncogenes 2nd ed., Jones and Bartlett. 1995:260-267
40. Sherr C. J. D-type cyclins, Trends. Biol. Sci,. 1995;20(5):187-190.