

원저

Bee Venom 및 Melittin 藥鍼液이 神經麻痺物質을 處置한 神經芽細胞腫의 細胞死에 미치는 影響

이정훈 · 진재도 · 이승우 · 한상원* · 김상태 · 신준식**

*경산대학교 한의과대학 침구학교실

**자생생명공학연구소

Abstract

The Effect of Bee Venom & melittin Herbal acupuncture solution to Apoptosis in NG pretreated neuroblastoma cell line

Jeong-Hoon, Lee · Jae-do, Jin · Seung-woo, Lee · Sang-Won, Han*
Sang-Tae, Kim · Jun-Shik, Shin**

*Department of Acupuncture & Moxibustion College of Oriental Medicine,
Kyung-San University

**Ja-Seng Research Institute of Biotechnology

Objective : This study is designed to investigate the effects of bee venom and melittin on cell death in neuroblastoma cell line after pretreatment with NG(nerve growth inhibitory substance)

Methods : It was evaluated by using MTT assay, morphological method, DNA fragmentation, flow cytometry, immunocytochemistry analysis, RT-PCR and Western blot.

Results : The MTT assay demonstrated that neuroblastoma cell viability was significantly inhibited dose-dependently by treatment with bee venom and melittin after pretreatment with NG in comparison with control. The morphological study and flow cytometry demonstrated that neuroblastoma cell showed apoptosis. DNA fragmentation showed DNA ladder below 1 Kbp. Immunocytochemistry assay demonstrated that Fos and MAPK were down-regulated. RT-PCR analysis demonstrated that Fos and MAPK was down-regulated. Western blot demonstrated that Fos and MAPK were down-regulated from 1 μ g/ml bee venom in neuroblastoma cell pretreated with NG.

- 접수 : 2001년 11월 3일 · 수정 : 12월 26일 · 채택 : 2002년 1월 8일
· 교신저자 : 한상원, 경북 구미시 송정동 458-7. 경산대학교부속 구미한방병원 침구과 (Tel. 054-450-7767)
E-mail : chimguhan@hanmail.net

Conclusion : These result suggests that bee venom and melittin after NG treatment have significant anti-cancer effect and further study is needed in vivo.

Key words : Bee Venom, melittin, Fos, MAPK, Neuroblastoma Cell Line

I. 서론

醫療技術의 눈부신 발전과 그에 따르는 醫療의 普遍化로 인하여 인류는 보다 다양한 醫療의 혜택을 누릴 수 있는 기회가 많아졌으나 인류의 平均年齡이 증가하고 생활환경이 예전과 달리 오염됨에 따라 새로운 질병들이 인류의 건강을 위협하고 있다. 그중 新生物에 의한 疾患, 특히 惡性腫瘍은 인류가 새로이 직면한 문제라 할 수 있다. 특히 神經芽細胞腫(neuroblastoma)은 小兒期에 보이는 흔한 惡性腫瘍 중의 하나로 백혈병, 중추신경계종양, 림프종 다음으로 빈도가 높다. 전체 小兒癌의 4~6%를 차지하며 치료가 힘든 腫瘍으로 알려져 있다¹⁾.

韓醫學의 癌을 癥瘕, 積聚, 噎膈, 反胃, 腸覃, 臟毒, 痞塊, 痰癰 등의 內臟性 癌과 翻花瘡, 石疽, 舌疽, 舌疔, 舌菌, 癭瘤, 石丁, 黑丁 등의 體表性 癌으로 표현하고 있다^{2,3)}. 이에 대한 治療方法은 韓醫學의 活血祛瘀, 化痰散結 등의 祛邪法과 健脾益氣, 養血滋陰 등의 扶正補虛法이 주류를 이루고 있다^{4,5)}.

그 외 여러 가지 방법이 개발되고 또한 새로운 시도들이 지속적으로 시행되고 있는데, 그 중 하나인 蜂毒藥鍼療法은 현재 상당히 주목받고 있는 治療方法 중의 하나이다.

蜂毒의 利用은 紀元前 2000년경의 이집트 파피루스 文書에 벌침이나 죽은 벌을 아픈 곳에 직접

마찰하여 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 살아있는 닭의 몸에 흡수시켜 이를 다시 인체의 피부에 도포하여 국소적인 마취의 효과를 利用한 것 등의 2例의 記錄이 실려 있다⁶⁾.

蜂毒은 벌 목 중에서 꿀벌과에 속하는 벌(Apis mellifera ligustica)의 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 있다⁷⁾. 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^{8,9)}, 消炎¹⁰⁾, 鎮痙¹¹⁾, 安定性 檢査¹²⁾, 免疫機能 增強作用¹³⁾ 등이 報告되었고, 外國에서는 Habermann^{14,15)} 등에 의해 蜂毒의 生化學的 成分 및 藥理作用 등이 報告되었다. 蜂毒藥鍼은 다양한 臨床 報告가 많이 되고는 있으나, 癌細胞株를 이용하여 蜂毒 및 melittin이 細胞死에 미치는 影響에 關한 研究는 거의 없는 실정이다.

이에 著者는 神經의 再生에 抑制機能을 가지는 것으로 알려진 神經麻痺物質(Nogo, NG) 處置 후에 蜂毒(Bee Venom) 및 melittin 藥鍼液을 이용하여 neuroblastoma cell인 SK-N-SH cell line에 미치는 영향을 5-diphenyl -tetrazolium bromide (MTT) assay 방법을 통한 세포 生存率 觀察, 形態學的 觀察, DNA fragmentation 分析, flow cytometry를 이용한 細胞週期の 分析, 免疫細胞化

學的 分析, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용한 mRNA 分析 및 Western blot 등을 통하여 觀察한 결과 有意性 이 있어 報告하는 바이다.

II. 실험

1. 材料

1) 試藥

RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, USA), penicillin and streptomycin, trypsin (Gibco BRL, USA), Ethanol (Merck, Germany), 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) phosphate-buffered saline (PBS)등이며 1차 항체인 anti-rabbit IgG Fos, anti-rabbit IgG MAPK, 2차 항체 FITC, Texas Red(Santa cruse, USA)이고 기타 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다.

2) 試料

蜂毒(100mg/ml) 및 melittin(1mg/ml)은 Sigma (USA)에서 구입하였다.

3) 機器

CO₂ incubator (VS-9108 MS, vision scientific Co. Korea), light microscope (Olympus, Japan), ELISA reader (enzyme-linked immunosorbent assay) (Hyperson, Promega, USA), Immunofluorescence microscope (Bio-Rad, USA), FACscan (Becton Dickinson, CA, USA) 등을 사용하였다.

2. 方法

1) 試料의 調製

본 실험에 사용된 蜂毒 및 melittin을 3차 증류수로 20mg/ml를 미리 조제하여 실험시 1, 5, 10 및 15µg/ml로 희석하여 사용하였다.

2) 實驗群의 分類

(1) 對照群(control group)

SK-N-SH cell lines의 神經芽細胞腫 細胞를 배양하면서 무혈청 배양배지만을 동량 처리하였다.

(2) 實驗群(treatment group)

배양한 神經芽細胞腫 細胞에 蜂毒 및 melittin 藥 液을 각각 1, 5, 10 및 15µg/ml로 처리하였다.

3) 細胞株의 培養

본 실험에 사용된 神經芽細胞腫 細胞는 자생생명공학연구소로부터 분양받은 細胞株에 神經麻痺物質인 nogo-A(NG)를 처리한 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma으로, 10% RPMI 배지에 penicillin (10units/ml)과 streptomycin(10mg/ml)을 첨가하여 flask에 배양하였다.

4) MTT assay를 이용한 細胞生存率 分析

96 microplate에 각 well마다 세포수를 달리하여 神經芽細胞腫 細胞를 분주한 다음 24시간 배양하여 각 well에 1, 5, 15 µg/ml를 선정하여 세포 증식도를 분석하였다. NG의 발현은 NG 발현 단백질인 lysate를 神經芽細胞腫 細胞에 전처리하여 유도하였다. 본 實驗에 사용한 MTT법은 Mosmann이 개발한 方法¹⁶⁾을 변형하여 실시하였다. 즉 96 well plate의 각 well에 5×10³cells/100µl를 넣고 37℃의 CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 蜂毒 및 melittin 藥液 농도별로 제조하여 각 well에 50µl씩을 넣고 37℃의 CO₂ incubator에 24시간 배양하였다. 배양액을 제거한 후 dPBS에 희석한 MTT용액(10mg/ml) 20µl를 각 well에 첨가하고 37℃에 4

시간 정도 방치한 다음 DMSO 50 μ l를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 약간 흔들어 주고 실온에서 30분 정치시켰다. 그 발색되는 정도를 파악하여 ELISA reader에서 흡광도 570nm에서 측정한 다음 對照群의 흡광도와 비교하여 細胞生存率(Inhibitory concentration₅₀, IC₅₀)은 對照群의 50%수준으로 癌細胞의 成長을 抑制하는 시료의 濃度(μ g/ml)에 대한 成長率 Y%로 환산하여 계산하였다.

$$Y(\%) = [(T-C_0) / (C-C_0)] \times 100$$

이때 T = 實驗群의 48시간 培養 후 평균 細胞數(cells/ml)

C = 對照群의 48시간 培養 후 평균 細胞數(cells/ml)

C₀ = 培養 시작시 평균 細胞數(cells/ml)

5) 細胞死의 形態學的 觀察

5% RPMI 배지, penicilin과 streptomycin이 함유된 배지에 10⁵ 세포를 60mm culture dish (Corning Incorporated, NY, USA)에 분주하고 37°C에서 24시간 배양하는데 蜂毒과 melittin 藥鍼液을 10 μ g/ml를 첨가하여 반응을 관찰하였다. 細胞死 觀察은 위상차 현미경(\times 200)으로 細胞死가 유도된 細胞를 촬영하여 조사하였다.

6) Flow cytometry를 이용한 細胞週期の 分析

NG를 처치한 SK-N-SH cell lines인 神經芽細胞腫 細胞를 10³세포수로 6 well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 對照群과 蜂毒 및 melittin 藥鍼液(10 μ g/ml)을 5시간 처치한 약물군을 PBS로 세척하고 trypsin을 처리하여 세포를 모아 1.5ml eppendorf tube에 넣어 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상청액을 제거한 후 100% EtOH를 1ml 첨가하여 고정하였다. 이때 propidium iodide 5 μ g/ml와 RNase를 혼합해서 준비하고 상기 고정된 세포를 원심분리하여 상청액을 제거한 다음 PBS로 다시 한번 세척한 동시에 고정된 細胞의 DNA에 염색시약을 첨가하여 37°C에서 30분간 항온조에서

가온시켰으며 propidium iodide로 염색한 세포는 호일에 밀봉하여 4°C에 보관하고 FACscan (Becton Dickson, CA)로 Flow cytometry analysis를 실시하였다.

7) DNA fragmentation 分析

NG로 처치한 神經芽細胞腫 細胞를 10³세포수로 6 well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 蜂毒과 melittin 藥鍼液을 처치하여 DNA fragmentation을 유도하는 정도를 파악하기 위해 세포용해액인 lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 μ l를 첨가한 후 30분간 얼음에 유지한 다음 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상청액을 취해 100% 에탄올을 가해 침전시켜 이를 proteinase K(100 μ g/ml)와 RNase (50 μ g/ml)가 함유된 dH₂O 35 μ l를 첨가하여 부유시켜 50°C에서 30분간 열을 가하였다. 이 용액을 2% agarose gel을 제조하여 전기영동을 실시한 다음 DNA fragmentation의 유무를 조사하였다.

8) 免疫細胞化學的 分析

蜂毒과 melittin 藥鍼液이 NG를 처치한 神經芽細胞腫 細胞에서 Fos와 MAPK 발현의 억제효과를 유도하는지 조사하기 위해 metanol을 세포 위에 떨어 뜨려 고정시킨 다음 PBS로 세척을 실시하였다. 1차 抗體인 Fos와 MAPK를 표지하여 4°C에서 1시간 정도 방치하고 2차 抗體인 FITC와 Texas Red를 표지하여 호일로 차광한 뒤 이를 1시간 정도 방치한 다음 형광 현미경에서 관찰하여 단백질이 발현되는 정도를 확인 관찰하여 보았다.

9) RT-PCR를 이용한 Fos, MAPK 및 β -actin mRNA 發顯 分析

NG를 처치한 神經芽細胞腫의 細胞死에 대해 藥鍼液이 전사수준에서 미치는 영향을 알아보기 위해 세포를 6 well plate에 10⁵ 세포수가 되게 분주한

후 적정 약물 농도가 되도록 가하여 세포를 1.5ml eppendorf tube에 모아서 15,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상청액을 제거하고 RNAzol 용액을 200 μ l를 첨가한 다음 chloroform 50 μ l를 가하고 조심스럽게 pipetting하여 세포를 lysis하고 이를 15,000rpm에서 4 $^{\circ}$ C하에 15분간 원심분리하여 total RNA를 회수하였다. 다음 isopropanol 동량을 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 침전시켜 75% EtOH로 한번 세척하여 건조시켰다. RNase free dH₂O를 20 μ l을 넣고 60 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열하여 녹인 다음 total RNA 5 μ l에 10mM dNTP 5 μ l, 25mM MgCl₂ 6 μ l, 10x RNA PCR buffer 5 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, AMV-Optimized Taq 1 μ l, AMV reverse Transcriptase XL 1 μ l, 50 pM specific primer (sense/ antisense) 1 μ l, RNase free dH₂O 26 μ l을 첨가하여 50 $^{\circ}$ C에서 20분간 역전사 반응을 실시하고, 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응을 정지시켜서 PCR을 실시하였다. 이 때 반응조건은 94 $^{\circ}$ C/1분, 55 $^{\circ}$ C/45초, 70 $^{\circ}$ C/60초에서 35 cycles을 진행시켜 70 $^{\circ}$ C에서 최종적으로 5분간 elongation 반응을 실시하여 종결한 후 PCR 산물을 1% agarose gel에 loading하여 marker를 기준으로 band의 유무를 확인하였다.

10) Western Blot을 이용한 Fos, MAPK 및 β -actin 단백질 발현 분석

배양세포에 蜂毒 藥液 10 μ g/ml을 처치한 세포를 lysis buffer로 처치하여 그 추출액 20 μ g을 polyacrylamide SDS gels에 용출한 후 Immobilon-P membrane(Amersham, USA)에 옮겨서 단백질의 발현을 확인하기 위해 enhanced chemiluminescence (ECL)로 발색시켜 확인하는데 Fos와 MAPK 및 β -actin(Santa Cruz, 1:1,000 희석)의 일차 항체를 표지하고 PBS로 세척한 다음 blocking 용액을 첨가하여 부반응을 제거하고 이차

항체인 Horseradish Peroxidase(HRP) conjugates 항체를 표지하고 발색정도를 확인하였다.

11) 統計處理

모든 실험값은 평균값 \pm 표준오차 (mean \pm standard error)로 하였고, 統計學的 分析은 SAS (Statistic Analysis system) program을 이용하였다. 對照群과 實驗群과의 비교는 Student's t-test에 의해 有意性을 검정하였으며, P<0.01인 경우에 有意性이 있는것으로 간주하였다.

III. 결과

1. MTT assay를 이용한 細胞生存率에 미치는 影響

NG를 처치한 神經芽細胞腫의 增殖抑制에 미치는 影響을 分析한 결과 ELISA reader에 나타난 흡광도 수치로 對照群의 경우를 100%로 환산하였을 때 蜂毒 藥液 1 μ g/ml는 22.8%, 5 μ g/ml는 2.6%, 15 μ g/ml는 -9.8%로 나타나, 저농도에서도 有意性(P<0.01)있는 증식 억제를 보였다. melittin 藥液의 경우 1 μ g/ml는 54.1%, 5 μ g/ml는 19.2%, 15 μ g/ml는 -8.6%로 나타나, 對照群보다 有意性(P<0.01)있게 증식을 억제하였다(Fig. 1).

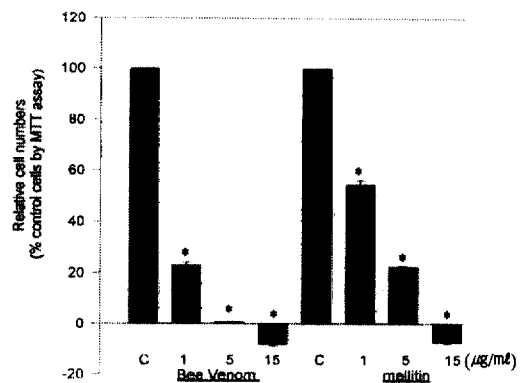


Fig. 1. Effects of Bee Venom and melittin herbal acupuncture solution on the SK-N-SH neuroblastoma cell lines pretreated with NG.

(Data represent means±S.E.(n=7). Analyzed for cell proliferation as described in material and methods.)

* : Statistically significant value(P<0.01) compared with control group.

C : Control group.

2. 細胞死의 形態學的 觀察

蜂毒과 melittin 藥鍼液을 NG로 전처치한 세포에 각각 10µg/ml를 6 well에 10⁵ cell수로 분주하여 하룻밤 배양한 神經芽細胞腫 細胞에 첨가하여 현미경으로 매시간 관찰하여 細胞死가 유도되는 양상을 관찰하여 6시간 후 細胞死를 유도하는 形態學的 變化인 apoptic body를 觀察할 수 있었다(Fig. 2).

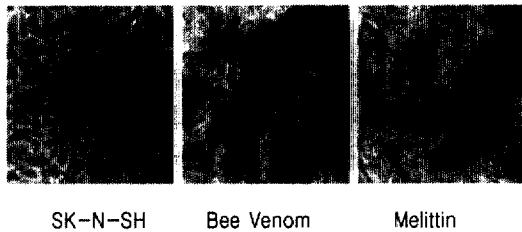


Fig 2. Mophological pattern of apoptic body of SK-N-SH cell lines neuroblastoma pretreated with NG following bee venom and melittin herbal acupuncture solution. (Arrows indicate apoptic body.)

3. Flow cytometry를 이용한 細胞週期에 미치는 影響

對照群의 경우 G₀/G₁단계는 55.7%, S단계는 13%, G₂/M단계는 21.3%로 나타나는데 반해, 蜂毒 藥鍼液群에서 G₀/G₁단계는 66.8%, S단계는 4.2%, G₂/M단계는 29%이었다. melittin 藥鍼液群에서 G₀/G₁단계는 71.7%, S단계는 6%, G₂/M단계는 22.3%로 나타났다(Fig. 3).

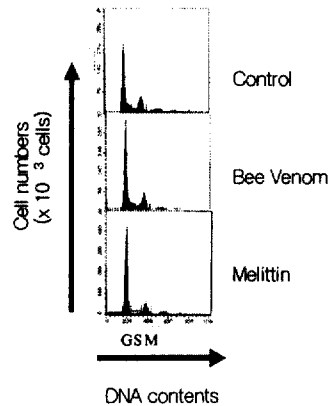


Fig. 3. Cell cycle pattern of flow cytometry of neuroblastoma cells pretreated with NG following bee venom and melittin herbal acupuncture solution.

G : interphase & first gap phase(G₀/G₁)

S : synthesis phase(S)

M : second gap phase & mitosis(G₂/M)

4. DNA fragmentation에 미치는 影響

對照群의 경우 2% agarose gel의 lane에 ladder가 보이지 않았지만, 蜂毒 藥鍼液 10µg/ml 처치시 가장 강한 ladder가 1 Kbp이하에서 보였고, melittin 藥鍼液 10µg/ml 처치시에도 ladder가 1 Kbp 이하에서 보였다(Fig. 4).

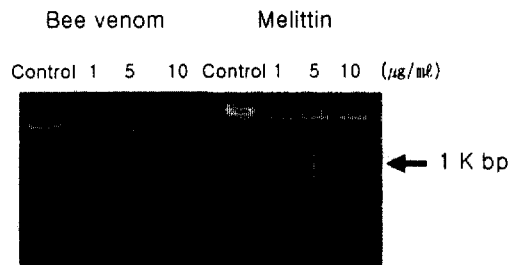


Fig. 4. DNA fragmentation pattern of neuroblastoma cell line pretreated with NG following bee venom and melittin herbal acupuncture solution.

5. Fos 와 MAPK 發顯에 미치는 免疫細胞化學的 影響

蜂毒과 melittin 藥鍼液이 NG로 전처치한 神經芽細胞腫 細胞에서 Fos 와 MAPK 發顯의 억제효과를 관찰한 결과 MAPK 단백질의 경우 對照群은 FITC의 녹색의 signal이 강하게 나타났으나, 蜂毒 및 melittin 藥鍼液群은 약하게 나타나거나 signal의 정도가 감소함을 알 수 있었다(Fig. 5). Fos 단백질은 對照群에서 Texas Red의 빨강색이 강하게 발현이 되는데 반해, 蜂毒 藥鍼液群에서는 발현이 억제되었고, melittin 藥鍼液群에서는 약하게 발현되었다(Fig. 6).

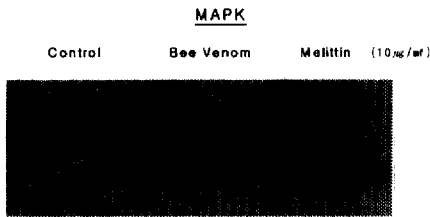


Fig. 5. Immunocytochemistry stain for MAPK in Control (left), bee venom(middle) and melittin(right) herbal acupuncture solution pretreated with NG. (Arrow denotes stain in the SK-N-SH neuroblastoma cell lines by NG treatment.)

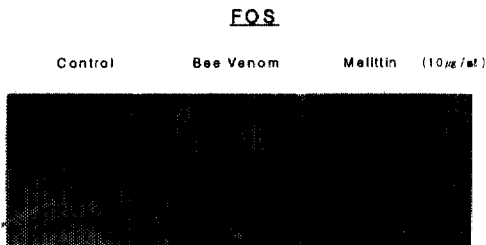


Fig. 6. Immunocytochemistry stain for Fos in Control (left), bee venom(middle) and melittin(right) herbal acupuncture solution pretreated with NG. (Arrow denotes stain in the SK-N-SH neuroblastoma cell lines by NG treatment.)

6. RT-PCR을 이용한 Fos, MAPK 및 β-actin mRNA의 發顯에 미치는 影響

蜂毒과 melittin 藥鍼液이 NG를 처치한 神經芽細胞腫 細胞에서 mRNA에 미치는 영향을 조사하기 위해 RT-PCR을 실시한 결과 對照群에서는 Fos와 MAPK의 mRNA가 발현됨을 알 수 있었다. Fos의 발현은 蜂毒 藥鍼液群의 경우는 1μg/ml에서 발현이 되고 있으나, 15μg/ml에서 강한 발현억제가 나타났으며, melittin 藥鍼液群에서도 蜂毒의 경우와 유사한 발현 양상을 나타내었다(Fig. 7). MAPK의 경우 蜂毒 藥鍼液群은 1μg/ml부터 강하게 발현이 억제되었지만, melittin 藥鍼液群은 15μg/ml에서 발현이 억제되었다. 한편 β-actin mRNA는 모든 群에서 일정하게 발현되었다(Fig. 7).

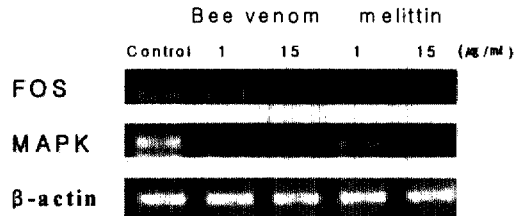


Fig. 7. RT-PCR analysis of total RNA from the SK-N-SH neuroblastoma cell lines pretreated with NG following bee venom and melittin herbal acupuncture solution. (Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR using oligonucleotides specific for Fos and MAPK mRNA. β-actin mRNA for standard transcript was used as control.)

7. Western Blot을 이용한 Fos, MAPK 및 β-actin 단백질 發顯에 미치는 影響

蜂毒 藥鍼液이 NG로 전처치한 神經芽細胞腫 細胞에서 Fos와 MAPK의 발현과 작용을 분석하기 위해 Western Blot을 시행한 결과 Fos와 MAPK는 모두 蜂毒 藥鍼液 1μg/ml부터 발현이 강하게 억제되는 것을 알 수 있었다. 한편 세포내 표준 단백질 β-actin은 이차항체인 Horseradish Peroxidase (HRP) conjugates 항체를 표지하고 발색정도를 확인한 결과 모든 實驗群에서 일정하게 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 8).

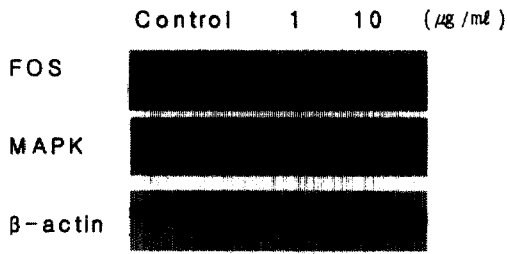


Fig. 8. Influence of Bee Venom on Fos and MAPK expression in neuroblastoma cells pretreated with NG following bee venom herbal acupuncture solution. (All cells were cultured in RPMI medium, lysate analyzed for Fos, MAPK and separated by 12% polyacrylamide SDS gels and transferred to Immobilon-P membrane. For detection of the protein they were stained with ECL into Horseradish Peroxidase(HRP) conjugates.)

IV. 考察

韓醫學에서 腫瘍에 대한 인식을 살펴보면 殷墟의 甲骨文에 ‘瘤’라는 병명이 처음으로 나타나고¹⁷⁾, 周禮에는 瘍醫라는 표현이 등장하면서 腫瘍에 대한 인식이 시작되었다고 할 수 있다¹⁸⁾. 《黃帝內經》^{19,20)}에서 “伏梁, 癥, 疝, 腸澼, 積聚”등으로 표현이 된 후에 積聚, 癥瘕, 癭瘤, 石瘕, 反胃, 癰疽, 腸覃, 噎膈, 癰, 巖, 岩, 疝瘕 등으로 범위가 확장되면서 현대적인 腫瘍과 유사한 인식을 하게 되었다²¹⁾.

腫瘍의 原因은 《靈樞》²⁰⁾ <刺節眞邪論>에서는 “虛邪之入於身也深, 寒與熱相搏, 久而內著”라 하여 正氣의 虛를 원인으로 보고 <五變篇>에서는 “皮膚薄而不澤 肉不堅而掉澤 如此則腸胃惡 惡則邪氣留止 積聚乃傷 脾胃之間 寒溫不次 邪氣稍至 蓄積留止 大聚乃起……津液血氣 腸胃之所生也 腸胃惡則 邪氣留止而成積聚 內傷腸胃之間 若在飲食之寒溫不次 邪氣稍之即蓄積”이라 해서 飲食內傷과 外感을 巢⁵⁾는 “積聚者 乃陰陽不和 臟腑虛弱 受于風邪 搏于臟腑之氣少爲也”라 하여 正氣虛와 外感風邪를 王²²⁾은 “憂

鬱傷肝 思慮傷脾 積想在心 所願不得志者 致經絡痞澀 聚結成核 初如豆大 漸者棋者”라 하고 陳²³⁾은 “乳岩由于憂思鬱結 所願不遂 肝脾氣逆 以致經絡阻塞 結積成核”이라해서 七情에 의해서도 유발이 된다고 보았다.

腫瘍의 치료법으로는 上海中醫學院²⁴⁾에서는 清熱解毒法, 化痰散結法, 活血化癥法, 扶正培本法을 활용하여 鬱熱化火, 毒火內盛, 痰凝聚結, 氣滯血瘀, 正虛 등으로 인한 腫瘍을 치료하고, 郁²⁵⁾은 清熱解毒法, 化痰祛濕法, 活血化癥法, 以毒攻毒法, 扶正培本法을 활용하여 邪熱壅盛, 痰凝濕聚, 瘀血, 癥積邪毒, 正氣虧虛 등으로 인한 腫瘍을 치료하며, 田^{26,27)}은 益氣健脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎, 하는 扶正法과 行氣理氣, 軟堅散結, 活血化癥, 通絡解毒, 疎利濕熱 등의 祛邪法 및 扶正法에 祛邪法을 加味한 扶正祛邪法의 3가지로 분류되는데 祛邪法과 扶正補虛法을 함께 적용하는 경향을 있음을 알 수 있다^{4,5)}.

神經芽細胞腫은 小兒期에 흔히 발생하는 小兒癌으로 백혈병, 中樞神經系腫瘍, 림프종의 다음으로 발생빈도가 높다. 주로 交感神經에서 발생하는 惡性腫瘍으로 副腎髓質이나 交感神經節에서 발생할 수 있다. 50%가량이 복강에서 발생하고 25%가 副腎髓質에서 기인하고 20%가량이 胸廓내에서 발생하며 전체의 75%가 5세미만의 小兒에서 관찰되며 때로는 출생시에 발생하기도 한다. 증상은 腹部腫塊, 四肢麻痺, 食慾不振, 泄瀉, 眼球回轉 등의 증상이 있고 환자의 약 10%에서 자연치유되는 경향이 있다¹⁾.

최근 癌으로 인한 死亡率이 제반 질환 중 首位를 차지하고 있으며 이 發生率 또한 증가하고 있는 추세로 이에 대한 치료법의 개발은 의학계의 가장 시급한 문제의 하나로 인식되고 있다. 현재 癌의 治療法으로 手術療法이나 放射線療法 및 化學療法이 발달하여 왔으나 어느 정도 한계에 도달하였고 새로운 치료법으로 제시되고 있는 免疫療法에 의학계는

큰 기대를 걸고 있다²⁸⁾.

최근에는 수천년 전부터 民間療法の 한 분야로 關節炎, 痛風, 등의 炎症性 疾患에 사용되어 온 蜂毒療法이 포유동물의 면역계를 자극하여 생체의 방어력을 증가시킨다고 보고되었다⁷⁾. 蜂毒藥鍼은 新鍼療法の 하나로 經絡學說의 원리에 의하여 蜂毒의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 추출하여 가공하거나 또는 봉침을 직접 질병에 유관한 穴位, 壓痛點 혹은 체표의 촉진으로 얻어진 陽性反應點에 주입하여 刺鍼效果 및 蜂毒의 生化學的 特異物質을 동시에 이용하여, 생체의 기능을 조정하고, 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하고 방어하는 것으로 최근들어 많은 관심을 끌게 되었다^{28,29)}. 蜂毒은 蜂毒의 毒囊에 들어있는 약 40여 가지의 유효성분으로 구성된 물질로 蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고, 臨床에서는 強壯, 鎮靜, 平喘, 祛風濕, 鎮痛, 解熱, 消炎, 鎮痙, 免疫增強 및 抗癌效果 등의 效能이 있으며 筋肉痛, 筋炎, 急慢性 關節炎, 神經痛, 痛風, 化膿性疾患, 高血壓, 류머티즘, 皮膚病, 腰痛, 打撲傷 등에 이용되고 있는 것으로 알려져 있다^{30,31)}.

蜂毒의 成分은 여러 가지가 있지만 peptide components, non peptide components, enzymes 으로 구분되어 있다¹⁵⁾. Enzyme은 phospholipase A₂, hyaluronidase, acid phosphomonoesterase, αD-glucosidase 및 lysophospholipase 등으로 구성되어 있고 peptide components는 freeze-dried venom의 약 50%를 구성하고 있으며, 주요성분으로는 apamin, MCD peptide, melittin, peptide401, secapin, tertiapin, protase inhibitor로 구성되어 있으며 non peptide component는 histamine, dopamine 및 noradrenaline으로 구성되어 있다^{14,32,33)}.

그 중에 melittin은 peptide component의 하나로, 총량 중 40~50%를 차지하는 성분으로서 26개의 amino acid로 구성된 活性 peptide이며 溶血作

用과 酵素作用을 하고 있다³²⁾. 溶血作用에서는 phospholipase A₂와 상승적으로 작용하여 서로의 활동성을 증가시켜 주며 酵素作用에서는 뇌하수체와 부신피질체계를 자극하여 catecholamine과 cortisone 분비를 촉진시킨다. 또한 phospholipase A₂의 세포막에 대한 간접적 분해작용으로 세포내부에 저장된 물질을 공격하며 특이한 mast cell에서 histamin을 방출시켜 末梢血管의 혈류를 증가시키며 독성성분을 확산시키는 작용을 도와준다. 그리고 活性 peptide로 세제처럼 강한 계면활성 작용이 있어 물과 기름 어디에도 모두 섞일 수 있는 친화성을 갖고 있으므로 다른 세포막에 대해서도 막의 透過性を 변화시키는 작용도 있다. 그 외에 蜂毒의 melittin이 토끼 신장의 근위세뇨관세포의 Ca⁺⁺ 흡수와 arachidonic acid 방출을 증가시킨다고 하였으며, melittin이 human monocytic leukemia cell의 세포용해과정에서 내인성 phospholipase D의 반응을 촉진한다고 하였다. 또한 血中分布가 낮을 때는 (0.5×10⁻¹⁰-0.5×10⁻¹¹g/ml)으로 blood viscosity를 감소시키고, 높을 때는 (0.5×10⁻⁵-0.5×10⁻⁶g/ml)으로 blood viscosity를 증가시키는 것을 현미경적 분석으로 확인할 수 있는데 이는 血液循環系 疾患에 대한 치료와 독성의 兩面性을 시사하는 바이며 大食細胞의 이동을 강하게 억제하고 lysosome 세포막을 안정시켜 炎症을 억제한다¹⁴⁾.

본 실험에서는 NG를 전처치한 경우 蜂毒 및 melittin 藥鍼液이 細胞死를 지연시키는지와 암 유전자 발현 억제의 기능을 제대로 발휘하는지를 알아보기 위해 神經芽細胞腫에 NG를 먼저 處置하였다. NG가 신경재생을 방해하는 것은 中樞神經系의 non-neuronal glial cells이나 oligodendrocytes 그리고 astrocytes에서 Schwab등이 dorsal root ganglion neurons으로 부터 그 가능성을 발견하였다³⁴⁾. NG는 reticulon family 4군에 해당하는 단백질

질로, myelin-associated proteins이고 proteoglycans으로 된 신경돌기 신장의 저해 기능을 가지며 myelin-associated 관련 G 단백질 계통으로 Nogo-A, Nogo-B, Nogo-C 3종류의 isoform으로 구성되어 있다^{35,36)}. 또한 oligodendrocytes에서 생성되고 myelin을 첨가시 정상적으로 신경돌기가 복구된다고 알려져 있으며 부상 입은 脊髓神經의 재생에 억제기능을 가진다³⁷⁾.

MTT assay 방법을 통해 蜂毒 및 melittin 藥鍼液이 NG를 처치한 신경아세포종의 증식억제에 미치는 영향을 분석한 결과 ELISA reader에서 나타난 흡광도 수치로써 對照群의 경우를 100%로 환산하였을 때, 蜂毒 1 μ g/ml 경우 22.8%, 5 μ g/ml 경우 2.6%, 15 μ g/ml 경우 -9.8%로 對照群보다 모두 저농도에서도 유의하게 증식을 억제하였다. melittin群의 경우 1 μ g/ml 경우 54.1%, 5 μ g/ml 경우 19.2%, 15 μ g/ml 경우 -8.6%로 對照群보다 유의하게 증식을 억제하였다. 여기서 melittin 藥鍼液은 蜂毒 藥鍼液보다 증식억제 활성이 떨어졌는데 이는 여러 가지 성분으로 이루어진 蜂毒의 복합작용이 단일성분의 melittin보다 뛰어난 의미를 시사하는 것이라 하겠다. 細胞死가 유도되는 形態學的인 관찰에서는 6시간 배양한 경우에 세포사를 유도하는 변화를 관찰할 수 있었다. 이 결과로 볼 때 蜂毒과 melittin 藥鍼液에는 癌細胞 增殖을 抑制하는 성분들이 함유되어 있는 것으로 생각된다.

細胞의 分裂增殖은 생명체의 가장 중요한 현상이나 세포의 무절제한 분열은 新生物 등의 질환을 유발하여 생명을 위협하게 된다. 이러한 세포의 분열 증식에는 細胞週期가 있고, 細胞週期는 DNA합성을 기준으로 구분하게 되는데 G₀期(interphase), G₁期(first gap phase), S期(synthesis phase), G₂期(second gap phase)의 間期와 mitosis(M期 또는 細胞分裂期)로 대별한다. G₀期는 세포가 증식을 휴지하고 있는 상태이고 G₁期는 세포내 인자가 증

식되며 세포의 크기가 증대되는 시기이다. S期는 細胞分裂을 위한 DNA의 합성이 이루어지는 시기이며, G₂期는 세포질의 인자가 증식되는 시기이고, M期는 핵분열과 세포질분열로 세포자체가 나누어지는 시기이다³⁸⁾.

細胞는 分裂增殖할 때에 DNA의 합성이 필요하므로 DNA의 합성을 抑制하면 암세포의 증식이 抑制되어 기본적인 抗癌效果가 있음을 의미한다. 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 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.

그 결과 對照群의 경우 G₀/G₁단계 55.7%, S단계 13%, G₂/M단계 21.3%로 나타났다. 이에 반해 蜂毒群에서는 G₀/G₁단계 66.8%, S단계 4.2%, G₂/M단계 29%이었고, melittin군에서는 G₀/G₁단계 71.7%, S단계는 6%, G₂/M단계 22.3%로 나타났다. 따라서 蜂毒과 melittin 藥鍼液 처치시 神經芽細胞腫에서 細胞死의 원인은 G₀/G₁단계에서 細胞週期の 진행이 정지되었기 때문이라고 생각할 수 있다.

蜂毒과 melittin 藥鍼液이 細胞死를 유도한다면 세포의 염색체에서 자가효소에 의해 200~400 염기쌍(base pair, bp)이 출현하는지를 분석할 필요가 있다. DNA fragmentation에 미치는 영향을 조사하여 본 결과 對照群의 경우 2% agarose gel의 lane에 ladder가 보이지 않았지만 蜂毒 藥鍼液 10 μ g/ml 처치시 가장 강한 ladder가 1Kbp 이하에 보였고 melittin 藥鍼液 10 μ g/ml 처치시에도 ladder가 1Kbp 이하에서 보였다. 이는 蜂毒과 melittin 藥鍼液이 神經芽細胞腫의 細胞死를 유도했음을 증명하는 것이다.

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 있다³⁹⁾. 이 중에서 c-fos는 세포분열을 촉진하며⁴⁰⁾ 세포분열週期の 促進을 유도함으로써 腫瘍細胞의 증식을 促進하므로 c-fos 遺傳子에 대해 관찰하였다. 또 癌 遺傳子의 발현을 위한 신호전달체계는 Ras, Raf-1, Mek, Erk1/2로 구성되며, 이러한 일련의 신호전달체계를 MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway라고 한다. 일련의 信號傳達體系에서 세포막에 있는 Ras 단백질이 growth factor나 cytokine 등의 신호전달을 on-off 시키는 molecular switch로서 중요한 역할을 담당하고 있는데 Ras 단백질의 정보는 fos, jun, myc과 같은 transcription factor의 발현을 유도하여 세포의 증식과 성장 및 분화를 일으키게 된다. 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 되는데⁴¹⁾ 蜂毒과 melittin 藥鍼液이 NG를 처치한 神經芽細胞腫 細胞에서 Fos와 MAPK 발현의 억제효과를 유도하는지 조사하기 위해 형광 현미경에서 관찰한 바 癌細胞에서 세포의 증식의 지표 단백질인 MAPK 단백질의 경우 對照群은 FITC의 녹색의 signal이 강하게 나타나는데 반해 蜂毒 및 melittin 藥鍼液 實驗群은 약하게 나타나거나 signal의 정도가 감소함을 알 수 있었다. 전사인자이면서 암유전자인 Fos 단백질은 세포의 전사를 촉진하며 Texas Red 표지시 빨강색상을 나타내는데 對照群에서 강하게 발현이 되었다. 이에 반해 蜂毒群에서는 발현이 억제되었고 melittin群에서는 약하게 발현되었다. 따라서 蜂毒과 melittin 藥鍼液은 Fos와 MAPK의 단백질의 발현을 억제하여 癌의 增殖을 막는다고 생각된다.

mRNA에 미치는 영향을 조사하기 위해 RT-PCR을 실시하였는데 對照群에서는 Fos와 MAPK

의 mRNA가 발현됨을 알 수 있었다. Fos의 발현은 蜂毒群의 경우 1 μ g/ml에서 발현이 되고 있으나, 15 μ g/ml에서부터 발현이 억제되는 것이 강하게 나타났으며, melittin群에서도 蜂毒群의 경우와 유사한 발현 양상을 나타내었다. MAPK의 경우 蜂毒群에서는 1 μ g/ml부터 강하게 발현이 억제되었지만, melittin群에서는 15 μ g/ml에서 발현이 억제되었다. 한편 β -actin mRNA는 對照群 및 實驗群에서 일정하게 발현되었다. 이는 蜂毒이 Fos와 MAPK의 세포사에 있어 전사수준에서 영향을 미치기 때문인 것으로 생각된다.

蜂毒이 NG 전처치한 神經芽細胞腫의 Fos와 MAPK의 발현과 작용을 분석하기 위해 Western Blot을 시행한 결과, Fos와 MAPK는 모두 1 μ g/ml부터 발현이 강하게 억제되는 것을 알 수 있었다. 한편 세포내 표준 단백질인 β -actin 은 이차항체인 HRP 항체를 표지하고 발색정도를 확인한 결과 모든 實驗群에서 일정하게 발현됨을 알 수 있었다. 이처럼 RT-PCR 결과 Fos는 15 μ g/ml의 蜂毒群에서 발현이 강하게 억제되었고 Western Blot에서는 1 μ g/ml에서부터 발현이 강하게 억제되었다. 이는 아마도 Fos의 경우 다른 경로로 외부의 신호전달경로를 거쳐 발현이 진행되고 있는 것으로 예측되어진다.

이상의 결과는 蜂毒과 melittin 藥鍼液이 癌細胞의 전사과정이나 단백질 합성과정을 억제하여 癌의 增殖을 抑制하는 성분이 있음을 시사하는 것이며, 神經芽細胞腫 細胞에 대해서는 有意性있게 작용하나 일반적인 단백질의 합성에는 영향을 미치지 않아서 선택적으로 癌細胞의 파괴에 관여하므로 抗癌治療에 적용할 수 있으리라 생각된다.

본 실험에서 蜂毒과 melittin 藥鍼液은 神經芽細胞腫 細胞에 神經麻痺物質인 NG를 전처치했음에도 불구하고 細胞死를 지연시키지 않고 癌細胞의 세포사 촉진 및 암유전자 발현억제의 기능을 충분히 발

회하고 있음을 알 수 있었다.

蜂毒이 원액 뿐만 아니라 단일성분인 melittin 藥鍼液에서도 세포활성 억제의 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 여기서 蜂毒 藥鍼液이 melittin 藥鍼液보다 더 효과가 큰 이유로는 蜂毒 藥鍼液 원액에는 melittin뿐만 아니라 apamin, MCD peptide 등 세포활성 억제와 관련된 성분이 함유되어 있기 때문으로 생각된다. 向後 蜂毒이 正常細胞에 미치는 影響과, 發癌과 관련된 다른 遺傳子에 미치는 效果를 알아보기 위한 추가적인 實驗 및 研究가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

蜂毒 및 melittin 藥鍼液을 이용하여 神經麻痺物質인 NG 처치 후 SK-N-SH neuroblastoma cell lines에 미치는 影響을 MTT assay 방법을 통한 細胞 生存率 觀察, 形態學的 觀察, DNA fragmentation 分析, flow cytometry를 이용한 細胞週期の 分析, 免疫細胞化學的 分析, RT-PCR을 이용한 mRNA 分析 및 Western Blot 등을 觀察한 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MTT assay로 細胞增殖에 미치는 影響을 分析한 결과 蜂毒 및 melittin 藥鍼液 實驗群 모두 對照群보다 용량의존적으로 有意性있게 억제하였다.

2. 蜂毒과 melittin 藥鍼液을 처치한 神經芽細胞腫을 6시간 培養 후 細胞死가 유도되는 形態學的 變化인 apoptic body가 觀察되었다.

3. Flow cytometry로 細胞週期를 分析한 결과 蜂毒 및 melittin 藥鍼液群에서의 細胞死는 G₀/G₁ 단계에서 진행이 정지된 것과 관련이 있었다.

4. DNA fragmentation 결과 蜂毒과 melittin 實驗群에서 모두 ladder가 1 Kbp이하에서 나타났다.

5. Fos와 MAPK를 免疫細胞化學的으로 分析한 결과 蜂毒과 melittin 藥鍼液에 의해 모두 抑制되었다.

6. RT-PCR 결과 Fos mRNA의 發顯은 蜂毒 및 melittin 藥鍼液群의 경우 15 μ g/ml에서 發顯이 抑制되었다. MAPK mRNA의 發顯은 蜂毒 藥鍼液 1 μ g/ml부터 강하게 抑制되었지만, melittin 藥鍼液은 15 μ g/ml에서 抑制되었다.

7. Western Blot을 통해 단백질의 發顯을 觀察한 결과 Fos와 MAPK는 모두 蜂毒 藥鍼液 1 μ g/ml부터 발현이 강하게 抑制되었다.

VI. 참고문헌

1. 洪彰義. 小兒科學. 서울. 대한교과서주식회사. 1989: 685-7.
2. 申天浩. 癌瘤防治研究. 서울. 新光文化社. 1984: 25-9, 31, 65, 89, 121, 159, 175, 193, 219, 235.
3. 洪元植. 現代中共의 癌治療. 서울. 英文社. 1980: 282, 304, 309, 320, 329.
4. 戴新民. 中醫免疫學. 啓業書局有限公司. 1982: 27-30.
5. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 昭人出版社. 臺中. 1980:21-2, 33-4.
6. 인창식, 고흥균. 蜂毒요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록. 마왕퇴의서의 蜂毒요법 2例. 大韓鍼灸學會誌. 1998;15(1):143-7.
7. 金文昊. 蜂毒療法과 蜂鍼療法. 한국 교육기획.

- 서울. 1992:20-37, 41-2, 67-4, 104-12, 134-49, 171-6.
8. 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. 1992;13(1):283-92.
 9. 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. 1999;20(1):106-12.
 10. 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. 1995;12(1):211-20.
 11. 孔賢淑, 高炯均, 金昌煥. 蜂毒療法이 抗痙攣에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1993;10(1):151-8.
 12. 이중석, 김재규, 고희균. 봉독의 치사량에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 1993;10(1):151-8.
 13. 李京姬, 金昌煥, 姜成吉, 高炯均. 產地別 蜂毒液藥鍼刺戟이 免疫機能低下에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2000;17(4):28-40.
 14. Barbara Rudolf. Chemistry and Pharmacology of Honey Bee Venom. Academic Press. 1986:329-402.
 15. Habermann E.. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In Venomous Animals and their Venoms, Academic Press, 1971:3:61.
 16. Mosmann T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Method 65:1983; (1):55-63.
 17. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울. 杏林書院. 1995:13-42.
 18. 方藥中. 實用中醫內科學. 上海. 上海科學技術出版社. 1986:621~8.
 19. 洪元植 編. 精校黃帝內經素問. 東洋醫學研究院. 1985:11, 124, 285.
 20. 洪元植 編. 精校黃帝內經靈樞. 東洋醫學研究院. 1985:211, 286, 317.
 21. 楊維桀 編. 黃帝內經素問靈樞譯解. 서울. 成輔社. 1980:41, 45, 97, 168, 243, 295-6, 347, 407, 469, 473, 557.
 22. 王肯堂. 六科證治準繩. 서울. 大星文化社. 1993:164.
 23. 陳實功. 外科正宗. 上海. 上海科學技術出版社. 1987:75, 78.
 24. 上海中醫學院 編. 實用中醫內科學. 上海. 上海科學技術出版社. 1986:621~35.
 25. 郁仁存 外. 癌症診治康復350問. 北京. 金盾出版社. 1989:98~105.
 26. 田炳旭. 癌腫의 病因病理에 대한 文獻的 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1995;1(1):83~101.
 27. 田炳旭. 癌에 대한 韓醫學的 認識 및 實驗的 研究에 관한 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1995;1(1):29~54.
 28. 權奇祿, 高炯均, 金昌煥. 蜂毒에 對한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1994;11(1):159-71.
 29. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(上, 下). 서울. 集文堂. 1994: 1457
 30. 朱文鋒. 實用中醫辭典. 陝西:陝西科學技術出版社. 1982:402.
 31. 陳維新 외. 蜂毒, 蜂peptide 抗炎鎮痛, 變凝原性 및 急性毒性的 比較. 한글판 中西醫 結合雜誌. 1993;4:45-8.
 32. Assem ES., Atkinson G. Histamine release by MCDP (401), a peptide from the venom of the honey bee. Brit.

- Pharmacol. 1973;337-8.
33. Spoerri, PE. Apamin from bee venom. *Neurobiology*. 1973;3:207-14.
34. Schwab ME, Thoenen H. Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J Neurosci*. 1985;5(9):2415-23.
35. Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature*. 1995;378(6556):498-501
36. Chisholm A, Tessier-Lavigne M. Conservation and divergence of axon guidance mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*. 1999;9(5):603-15.
37. Thallmair M, Metz GA, Z'Graggen WJ, Raineteau O, Kartje GL, Schwab ME. Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nat Neurosci*. 1998;1(2):124-31.
38. 서울대학교 의과대학. 세포생물학. 서울대학교 출판부. 1990;1-9, 63-5, 145-50.
39. 서민호, 서성일. 질병발생과 치료에 있어서의 apoptosis의 역할. 계명대의대논문집. 1996;15(4):394-406.
40. Geoffrey M. Cooper. *Oncogenes* 2nd ed., Jones and Bartlett. 1995:260-7.
41. Mehta PB, Robson CN, Neal DE, Leung HY. Keratinocyte growth factor activates p38 MAPK to induce stress fibre formation in human prostate DU145 cells. *Oncogene*. 2001;20(38): 5359-65.