

원저

蜂毒藥鍼液에 의한 人體乳房癌細胞의 成長抑制 및 細胞死에 관한 研究

여성원 · 서정철* · 최영현 · 장경전

동의대학교 · 경산대학교* 한의과대학

Abstract

Induction of the Growth Inhibition and Apoptosis by Beevenom in Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells

Yeo Sung-won, Seo Jung-chul*, Choi Yung-hyun and Jang Kyung-jeon

College of Oriental Medicine,
Dong-Eui University, Kyung-San University*

Objective : To examine the effects of Beevenom on the cell proliferation of human breast carcinoma cell line MCF-7, we performed various experiments such as dose-dependent effect of Beevenom on cell proliferation and viability, morphological changes, and alterations of apoptosis/cell cycle-regulatory gene products.

Methods : Beevenom declined cell viability and proliferation of MCF-7 cells in a concentration-dependent manner. The anti-proliferative effect by Beevenom treatment in MCF-7 cells was associated with morphological changes such as membrane shrinking and cell rounding up.

Results : Beevenom induced apoptotic cell death in a concentration-dependent manner, which was associated with degradation of β -catenin, an apoptotic target protein. Beevenom induced the Bax expressions, a pro-apoptotic gene, both in protein and mRNA levels, however, the levels of Bcl- X_{SL} expression, an anti-apoptotic gene, were down-regulated in Beevenom-treated cells. Western blot analysis and RT-PCT data revealed that the levels of cyclin B1 protein and cyclin E mRNA were reduced by Beevenom treatment in MCF-7 cells, respectively, whereas the expression of tumor suppressor p53 and cyclin dependent kinase inhibitor p21 mRNA were markedly increased in a concentration-dependent fashion.

- 접수 : 2003년 3월 26일 · 수정 : 2003년 4월 15일 · 채택 : 2003년 5월 17일
· 교신저자 : 장경전, 부산광역시 진구 양정2동 산 45 동의대부속한방병원
Tel. 051-850-8612 E-mail : kjang@demc.or.kr

Conclusions : Taken together, these findings suggest that Beevenom-induced inhibition of human breast cancer cell proliferation is associated with the induction of apoptotic cell death and Beevenom may have therapeutic potential in human breast cancer.

Key words : Beevenom, apoptosis, cell viability, MCF-7, proliferation

I. 緒 論

세포주기 조절에 대한 기전 연구는 최근 아주 활발하게 이루어지고 있으며, 이는 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절된다. 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 cyclins에 의하여 cyclin-dependent kinases (Cdks)의 연속적인 활성화와 불활성이 결정되어진다¹⁾⁻³⁾.

먼저 Cdk4 및 Cdk6와 complex를 이루는 D-type cyclin은 G1기의 조절에 중요하며^{4),5)}, cyclin E는 Cdk2와 복합체를 이루면서 S기로의 전이에 중요한 역할을 담당하고 있다^{6),7)}. 특히 D-type cyclins는 retinoblastoma protein(pRb)의 인산화 조절과 이로 인한 G1/S 전이 및 DNA 합성 조절에 중요한 전사인자 E2Fs의 활성을 조절한다⁸⁾.

Cyclin A는 G1 후기에 발현을 시작하여 S기와 G2기 동안 발현이 증가되며 cyclin B1은 G2기에서 M기로의 전이를 조절하며, 각각은 Cdk2 및 Cdc2의 kinase 활성을 위한 양성 조절자로서 중요한 역할을 한다⁹⁾⁻¹²⁾. 한편 Cdks는 다양한 세포증식 억제 신호에 의해 유도되는 Cdk inhibitor에 의하여 그 활성이 억제되어지는데, 크게 두가지의 family로 분류 (INK4 및 CIP/KIP family)되어지고 있다^{13),14)}. 이들 중 Cdk2와 결합하면서 그들의 활성을 저해하는 것으로 알려진 CIP/KIP family에 속하는 p21 및

p27은 DNA 손상에 의한 종양 억제인자 p53에 의해 조절을 받으며^{15),16)}, 이는 세포주기 상 G1기에서 세포증식을 억제하는 세포주기와 연관된 가장 중요한 조절인자로 알려져 왔다^{1),17),18)}.

蜂毒이란 꿀벌의 毒囊에 들어있는 약 40여가지의 유효성분으로 구성된 물질로 炎症, 알러지 등을 유발하는 작용이 있으나, 임상에서는 鎮痛, 消炎의 효능이 있는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾.

국내에서 봉독약침에 관한 실험연구가 활발히 진행되고 있는데 鎮痛²⁰⁾, 消炎²¹⁾, 鎮痙²²⁾, 안정성 검사²³⁾, 면역기능 강화작용²⁴⁾ 등이 보고되었고, 외국에서는 Barbara²⁵⁾와 Habermann²⁶⁾ 등에 의해 봉독의 생화학적 성분 및 약리작용 등이 보고된 바 있다.

봉독약침액의 독성에 대한 연구로 동물에서의 봉독의 치사량²³⁾, 급성독성²⁷⁾, 항원성 및 발열성²⁸⁾ 등에 대한 보고가 있었고 또한 항암 효과로 상피종과 흑색종 세포에 미치는 세포독성에 대하여 연구된 결과가 있으나^{29),30)} 유방암 세포주에 대한 세포독성 평가는 보고된 바 없다.

이에 본 연구에서는 한방에서 광범위하게 사용되며 그 응용성이 매우 높을 것으로 생각되는 봉독이 인체 유방암세포 증식에 미치는 분자생물학적 영향을 알아보기 위하여 봉독 성분 중 Beevenom의 처리에 따른 유방암세포 성장률 및 생존율 억제, 이로 인한 형태적 변화 및 단백질 발현을 관찰하고 apoptosis 및 세포주기 조절과의 연관성을 가지는 유전자 산물의 발현 및 변화를 조사하여 유의성 있는 결과를

얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 시료준비

실험에 사용한 봉독약침액 성분인 Beevenom은 microchip을 이용한 전자기 발생장치로 꿀벌의 봉낭을 자극하여 채집한 다음 가공한 꿀벌의 건조봉독 1mg(유밀농원, 한국)을 생리식염수 10ml에 희석한 100 μ g/ml의 stock solution을 사용하여 0.001 μ g/ml, 0.01 μ g/ml, 0.1 μ g/ml 및 1 μ g/ml의 농도로 희석 처리하였다.

2. 암세포주 및 배양조건

실험에 사용한 MCF-7 인체 유방암세포(human breast carcinoma cells)는 생명공학연구소(KRIBB, Teajeon, Korea)에서 분주받아 사용하였으며, Choi 등³¹⁾의 방법에 준하여 암세포의 배양을 위해 90%의 DMEM 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin(Bio-fluids, Rockville, MD, USA)가 포함된 성장배지를 사용하여 배양하였다. 세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였으며, 성장배지의 교환은 매 48시간마다 해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA(Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포배양용 페트리 접시로 옮겨 배양하였다.

3. 약재의 처리

Beevenom의 처리를 위하여 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 세포배양용 페트리 접시로부터

부유시킨 다음 새로운 세포배양용 페트리 접시에 6 \times 10⁵개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시켰다. Beevenom의 처리는 세포에 처리하기 직전 배지에 희석하여 처리하였다.

4. Hematocytometer를 이용한 세포 생존률의 측정

세포배양용 6 well plate에 폐암세포를 2 \times 10⁴개/ml 정도를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 Beevenom을 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA 0.5ml를 처리하여 세포를 부유시킨 후 phosphate-buffered saline(PBS) 0.5ml을 가하여 세포를 모은 다음 세포 부유액과 0.5% trypan blue (Gibco BRL)를 동량으로 섞어 2분간 처리하였다. Pasteur pipette의 모세관 현상을 이용하여 세포를 hematocytometer에 옮긴 후 위상차 현미경을 이용하여 200배의 배율로 관찰하여 푸른색으로 염색된 세포를 죽은 세포로 추정하고 염색이 되지 않은 살아있는 세포의 수를 측정하였다³²⁾. 이에 따른 결과는 Sigma Plot 4.0 프로그램(SPSS Ins.)을 사용하여 분석하였다.

5. MTT Assay를 이용한 세포 성장의 측정

세포배양용 96 well plate에 유방암세포 2 \times 10⁴개/ml로 희석한 세포액을 100 μ l/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 Beevenom을 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt(MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 0.5 mg/ml 농도가 되게 희석하여 200 μ l씩 분주하고 3시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma)를 100 μ l씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인

후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다³²⁾. 측정은 모두 세번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)으로 구하였다.

6. 위상차 현미경을 이용한 세포형태의 관찰

세포배양용 페트리 접시에 세포를 6×10^5 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 Beevenom을 희석 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 위상차 현미경 (inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 Kodak 자동 카메라용 필름을 이용하여 사진을 촬영하였다.

7. SDS-polyacrylamide gel 전기영동

세포배양용 페트리 접시에 6×10^5 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 Beevenom을 처리하였다. 24시간까지 배양한 후, 세포를 PBS로 씻어내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer (250mM NaCl, 25mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM ethylenediamine-tetraacetic acid : EDTA pH 8.0, 1% NP-40, 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride ; PMSF, 1 M, 4-dithio-DL-threitol ; DTT, protease inhibitor cocktail, DW)를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 13,500 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다.

상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 동량으로 맞춘 다음 동량의 Laemmli sample buffer (β -mercaptoethanol 5%, Laemmli sample buffer 95%, Bio-Rad)을 섞어서 sample

을 만들었다. 이렇게 만든 sample을 동량으로 8%의 sodium dodesyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하여 Coomassie blue 염색용액 (Sigma)으로 20분간 염색한 다음 탈색용액 (500ml 기준 ; methanol 50ml, acetic acid 50ml, DW 400 ml)을 이용하여 탈색시켜 단백질 양상을 비교하였다.

8. DAPI Staining

세포배양용 6 well plate에 유방암세포를 2×10^4 개/ml 정도를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 Beevenom을 성장배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시킨 후 PBS를 가하여 세포를 모은 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하였다.

상층액은 버리고 세포만 남긴 다음 formaldehyde solution (Sigma)과 PBS를 1 : 9 비율로 섞은 fixing solution을 500 μ l 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 다시 1,000 rpm으로 5분간 원심분리를 하고 상층액을 버린 다음 PBS 200 μ l를 넣어서 충분히 섞은 후, 슬라이드글라스 위에 세포부유액을 80 μ l 정도를 떨어뜨린 다음 900rpm에서 5분간 cytospin하였다. Cytospin이 끝난 후 PBS로 2~3회 세척하고 PBS가 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco, Solon, Ohio, USA)을 떨어뜨린 후 상온에서 10분간 두었다. 다시 PBS로 2~3회 세척하고 PBS를 사용하여 2500 : 1로 희석된 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma)를 슬라이드 글라스 위에 적당량 떨어뜨린 다음 빛을 차단하여 15분간 상온에서 염색시켰다.

PBS로 DAPI solution을 충분히 씻어내고 증류수로 재빨리 세척한 다음 100% ethanol을 이용하여 탈수과정을 거친 슬라이드 글라스 위에 mounting solution 처리를 한 다음 형광 현미경 (Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 핵의 형태

변화를 관찰한 다음 AxioVision 프로그램을 이용하여 사진을 촬영하였다^{33),34)}.

9. RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)을 이용한 RNA 발현의 분석

정상 및 Beevenom이 들어있는 배지에서 24시간 동안 자란 암세포를 PBS로 씻어내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상층액을 버리고 세포만 모았다. 24시간 후 세포를 Disposable cell lifter (Fisher scientific)로 긁어서 50ml tube에 옮긴 후 1,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하였다.

Pellet에 PBS를 첨가하여 현탁한 다음 1,000rpm에서 5분간 원심분리를 한 후 pellet에 RNAzol B 1ml를 첨가하여 약하게 현탁을 하고 e-tube에 옮겨서 4℃에서 1시간 동안 세포를 용해시켰다. 여기에 chloroform 200μl를 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 5분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하여 무색의 상층액만을 400μl 취한 뒤 동량의 isopropanol을 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 15분 동안 방치시키고 14,000rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하여 얻은 pellet (RNA)에 75% ethanol(25% DEPC treated water, Nalgene) 500 μl를 넣어 15,000g에서 15분 동안 원심분리(4℃)하고 ethanol을 완전히 날린 후에 DEPC water 50μl를 넣어서 RNA를 용해하여 A260nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 함량을 계산하였다.

분리한 RNA에 oligo dT primer와 DEPC water를 넣고 65℃에서 10분 동안 반응시킨 후 실온에서 3분 동안 방치한 다음 10x buffer, 10mM dNTP, RNasin, AMV Reverse transcriptase, 50mM MgCl₂ 및 DEPC treated water를 넣고 42℃에서 1시간 동안 반응시켜서 RT product를 만들었다(반응에

필요한 각각의 시약은 Table 1 참조). 만들어진 RT product(template cDNA)에 2.5mM dNTP, 10x buffer, DEPC water, premixed primer(GenoTech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 polymerase chain reaction(PCR)을 행하였다(반응에 필요한 각각의 시약 사용 및 PCR의 조건은 Table 2 및 3 참조). 또 One-step RT-PCR PreMix(iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 실험하였을 경우에는 분리한 RNA에 iNtRON ONE-STEP RT-PCR PreMix, premixed primer 및 DEPC treated water를 넣고 RT-PCR을 행하였다(반응에 필요한 각각의 시약의 조성 및 RT-PCR의

Table 1. Reaction components of RT

| | |
|--------------------------------|-------------|
| Separated RNA | 2 μg (x μl) |
| Oligo dT primer | 2 μl |
| DEPC treated water | 8 μl - x μl |
| Total 10 μl | |
| 65℃, 10 min reaction | |
| 10x buffer | 5 μl |
| 10 mM dNTP | 5 μl |
| RNasin | 1 μl |
| AMV Reverse transcriptase | 1 μl |
| 50 mM MgCl ₂ | 5 μl |
| DEPC treated water | 23 μl |
| Total 50 μl | |
| 42℃, 1 h reaction (RT product) | |

Table 2. Reaction components of PCR

| | |
|--------------------|----------|
| Template cDNA | 8 μl |
| 10x buffer | 4 μl |
| 10 mM dNTP | 0.25 μl |
| Taq DNA polymerase | 0.2 μl |
| Premixed primer | 1 μl |
| DEPC treated water | 26.55 μl |
| Total 40 μl | |

Table 3. Condition of PCR

| Temperature (°C) | Time | No. of cycle |
|------------------|--------|--------------|
| 94 | 5 min | 1 |
| 94 | 30 sec | 50 |
| 58 | 30 sec | |
| 72 | 30 sec | |
| 72 | 5 min | 1 |
| 22 | hold | - |

조건은 Table 4, 5 및 6, 7 참조). PCR을 행하여 만들어진 DNA의 양을 확인하기 위하여 1x TAE buffer으로 1% agarose gel을 만들고 well에 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution(5x,

Table 4. Components of ONE-STEP RT-PCR PreMix

| Components of ONE-STEP RT-PCR PreMix |
|--------------------------------------|
| AMV Reverse transcriptase |
| RT-PCR duffer (10x) |
| dNTPs |
| Taq DNA polymerase |
| Stabilizing buffer |

Table 5. Reaction components for RT-PCR

| | |
|-------------------------------|-----------------------|
| iNtRON ONE-STEP RT-PCR PreMix | 8 μ l |
| Separated RNA | 2 μ g (x μ l) |
| premixed primer | 1 μ l |
| DEPC treated water | 20 - x μ l |
| Total 20 μ l | |

Table 6. Condition of PCR

| Temperature (°C) | Time | No. of cycle |
|------------------|--------|--------------|
| 45 | 30 min | 1 |
| 94 | 15 min | 1 |
| 94 | 5 min | 1 |
| 94 | 30 sec | 50 |
| 58 | 30 sec | |
| 72 | 30 sec | |
| 72 | 5 min | 1 |
| 22 | hold | - |

QUALITY BIO-LOGICAL, INC.)을 섞어서 loading 한 후 100V에서 전기영동을 하여 Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영을 하였다³²⁾.

Table 7. Gene-specific Primers for RT or One-step RT-PCR

| Gene name | Sequence | |
|----------------------|-----------|---------------------------------------|
| Cyclin A | Sence | 5'-TCC-AAG-AGG-ACC-AGG-AGA-ATA-TCA-3' |
| | Antisence | 5'-TCC-TCA-TGG-TAG-TCT-GGT-ACT-TCA-3' |
| Cyclin E | Sence | 5'-AGT-TCT-CGG-CTC-GCT-CCA-GGA-AGA-3' |
| | Antisence | 5'-TCT-TGT-GTC-GCC-ATA-TAC-CGG-TCA-3' |
| p53 | Sence | 5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3' |
| | Antisence | 5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3' |
| p21 | Sence | 5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3' |
| | Antisence | 5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3' |
| Bax | Sence | 5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3' |
| | Antisence | 5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3' |
| Bcl-X _{s/L} | Sence | 5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3' |
| | Antisence | 5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3' |
| GAPDH | Sence | 5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3' |
| | Antisence | 5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3' |

10. Western Blot Analysis

정상 및 Beevenom이 희석된 배지에서 24시간 동안 자란 세포들을 PBS로 씻어내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer를 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 13,500 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다.

상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약과 그 사용방법에 따라 동량으로 맞춘 다음 동량의 Laemmli sample buffer를 혼합하여 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane(Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T(0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 2시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분(5분간 3번) 정도 세척하였다.

1차 항체(PBS-T로 1:500 또는 1:1000으로 희석하여 사용)를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4℃에서 over night시킨 다음 PBS-T로 세척(15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체(PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척(10분간 3번, 5분간 3번) 하고 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양상을 비교 분석하였다^{31),32)}.

11. 항체 및 시약

Western bolt analysis를 위해 사용된 항체들은 Table 8에 나타내었으며 적정량을 희석하여 사용하

Table 8. Antibodies Used Present Study

| Antibody | Origin | Company |
|-----------------------|-------------------|--------------------------|
| β -Catenin | rabbit polyclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Actin | rabbit polyclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Bcl-X _{SL} | rabbit polyclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Bax | rabbit polyclonal | Calbiochem |
| Cyclin A | mouse monoclonal | Calbiochem |
| Cyclin B ₁ | mouse monoclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Cdk2 | rabbit polyclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Cdk4 | rabbit polyclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| p53 | mouse monoclonal | Calbiochem |

였다. Immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구하였다.

III. 結 果

1. 인체 유방암세포의 증식에 미치는 Beevenom의 영향

준비된 Beevenom 시료를 실험재료 및 방법에서 서술한 것처럼 24시간 동안 처리한 후, 살아있는 세포의 수를 계수하여 Beevenom이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 Fig. 1A에 나타내었다. 24시간 동안 정상 배지에서 자란 정상 MCF-7 인체 유방암세포의 수에 비하여 Beevenom이 함유된 배지에서는 Beevenom 첨가 농도 의존적으로 감소하였다. 즉

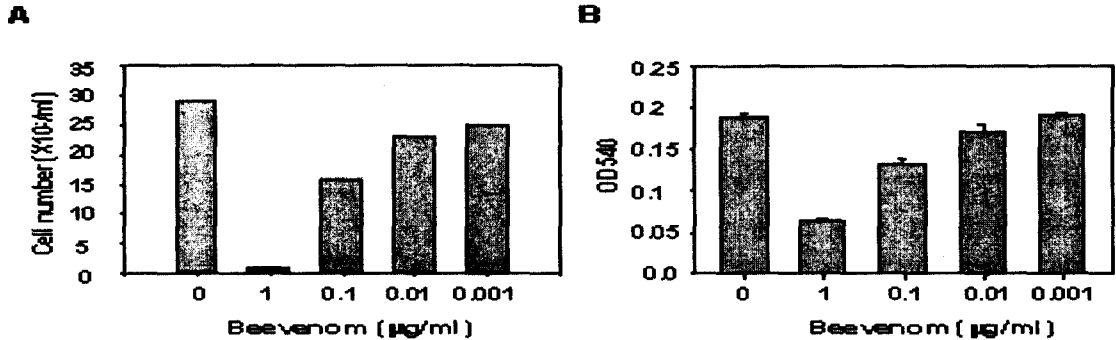


Fig. 1. Effect of Beevenom on the cell growth and viability in MCF-7 human breast carcinoma cells.

Cells were seeded as described in Materials and Methods, and treated with various concentrations of Beevenom for 24 h. (A) The viable cells were counted with hemacytometer. Results are expressed as percentage of the untreated control +/- SD obtained from three separate experiments. (B) MTT assay was performed after Beevenom treatment for 24 h. Results are expressed as percentage of the untreated control +/- SD obtained from three separate experiments.

0.1µg/ml 처리군의 경우 대조군에 비하여 40% 이상 세포성장이 억제되었으며, 1µg/ml 처리군에서는 살아있는 세포들을 거의 관찰할 수 없었다.

다음 Beevenom의 처리농도에 따른 암세포의 생존율을 MTT assay법으로 조사한 결과 MTT assay에 의한 경우에도 Beevenom 처리 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소되어 1µg/ml 처리군의 경우 대조군의 35% 수준으로 나타났다<Fig. 1B>.

2. Beevenom에 의한 인체 유방암세포의 형태변화

Beevenom 처리에 따른 암세포의 형태 변화 관찰을 위하여 다양한 농도 범위로 Beevenom을 24시간 동안 처리한 후 위상차 현미경을 이용하여 정상 및 Beevenom이 처리된 조건에서 배양된 암세포의 모양을 관찰하였다.

Fig. 2에서 볼 수 있듯이 Beevenom의 농도 증가에 따른 세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 저농도 처리군에서부터 이미 심한 형태적 변이를 동반하였다. 즉 0.001µg/ml 또는 0.01µg/ml 처리군에

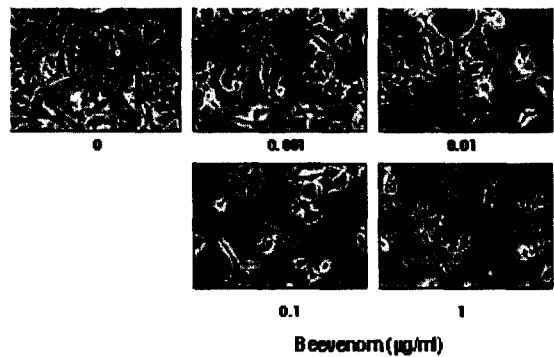


Fig. 2. Morphological changes in MCF-7 human breast carcinoma cells following incubation with Beevenom.

Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or Beevenom for 24 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

서의 경우 전체적으로 세포질이 응축되면서 세포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분지를 이루기 시작하였고, 고농도 처리군인 0.1µg/ml 또는 1µg/ml 처리군에서는 많은 암세포들이 부착 능력이 상실

되어 배지위로 부유하기 시작하였으며 배양 접시에 부착된 세포들도 심한 형태적 변이를 수반하였다.

3. Beevenom에 의한 인체 유방암세포의 Apoptosis 유도

Beevenom이 처리되지 않은 정상 유방암세포의 DAPI staining 후 결과는 Fig. 3A에서처럼 거의 모든 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 Beevenom이 처리된 암세포의 경우, 처리농도 의존적으로 비정상적인 세포의 출현이 증가되어 1 μ g/ml 처리군에서는 거의 모든 세포에서 염색질 응축(chromatin condensation)에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 있었다.

Beevenom에 의한 apoptosis의 유발을 생화학적

으로 증명하기 위하여 apoptosis 유발시 특이하게 분해가 일어나는 표적 단백질인 β -catenin의 발현에 미치는 Beevenom의 영향을 Western blot analysis로 조사하였다. Fig. 3B에서처럼 β -catenin의 발현은 Beevenom 처리농도가 증가될수록 감소되었으며 뚜렷하지는 않으나 농도 의존적으로 단편화 현상이 나타났다. 또한 Beevenom이 처리된 배지에서 자란 암세포의 전체 단백질의 발현 변화를 조사하기 위하여 10% SDS-polacrylamide gel로 전체 단백질을 전기영동으로 분리하였다. 분리가 끝난 gel을 Coomassie blue 염색액으로 염색하여 단백질의 발현 양상을 비교한 결과 Fig. 3C에서처럼 처리농도의 경과에 따라 전체적인 총 단백질의 발현양상은 크게 변화가 없었다.

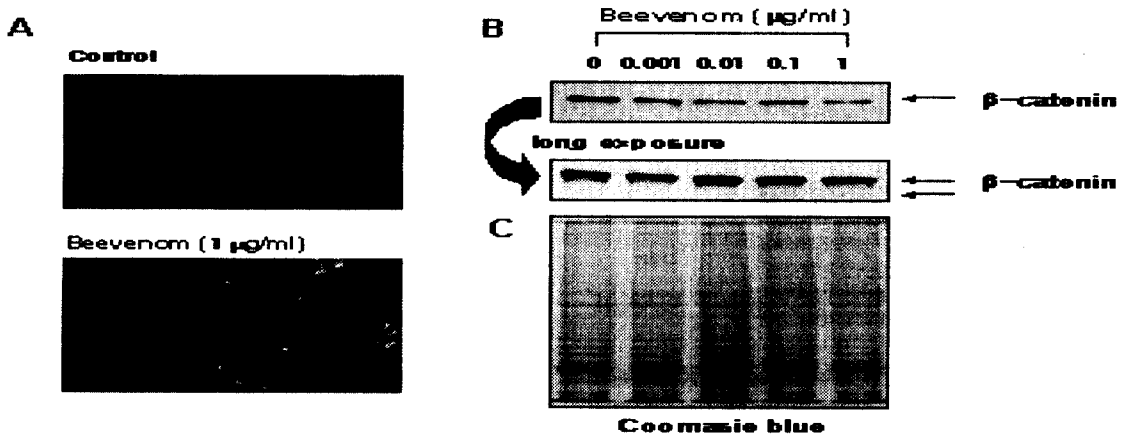


Fig. 3. Induction of apoptosis and degradation of β -catenin in Beevenom-treated MCF-7 cells.

(A) Induction of apoptotic cell death by Beevenom treatment in MCF-7 human breast carcinoma cells. Cells were treated with Beevenom for 24h, and fixed and then stained with DAPI. After 10min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification, X400. (B) Effect of Beevenom on the levels of β -catenin protein in MCF-7 cells. Cells were incubated with Beevenom for 24h, lysed and cellular proteins were separated by 6% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membrane was probed with the anti- β -catenin antibody. Proteins were visualized using ECL detection system. (C) Total protein patterns of MCF-7 cells after Beevenom treatment. Cells were treated with various concentrations of Beevenom and the whole-cell lysats were prepared after 24h. Proteins were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel and visualized by coomassie blue staining.

4. Beevenom에 의한 인체 유방암세포에서 Bax의 발현 증가

Beevenom에 의한 apoptosis에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 대표적인 유전자 산물인 Bcl-2/Bax family의 발현을 조사하였다. 먼저 Western blot analysis<Fig. 4A>에 의한 단백질의 발현에서 Bcl-X_{S/L}의 경우 Beevenom 처리에 의하여 큰 변화를 보이지 않았으나 RT-PCR 분석<Fig. 4B>에 의한 mRNA 발현 수준은 Beevenom 처리농도 의존적으로 감소되었다.

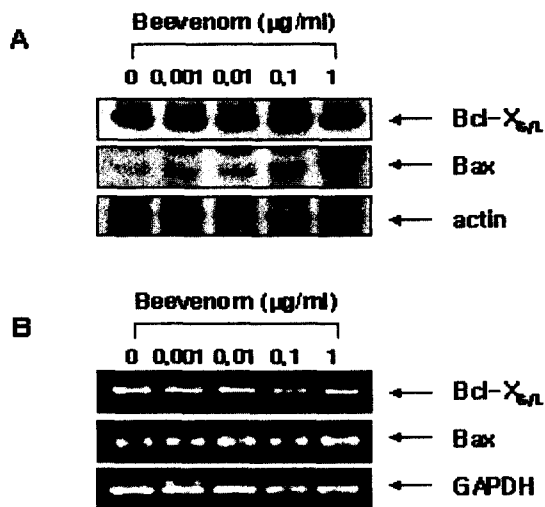


Fig. 4. Inhibition of Bcl-X_{S/L} and induction of Bax expression by Beevenom in MCF-7 human breast carcinoma cells.

(A) Cells were incubated with Beevenom for 24h, lysed and cellular proteins were separated by 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-Bcl-X_{S/L} and anti-Bax antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control. (B) Cells were incubated with Beevenom for 24h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using Bcl-X_{S/L} and Bax primers described in Materials and Methods. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) was used as a house-keeping control gene.

Bax의 경우는 Beevenom 처리에 의하여 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 농도 의존적으로 증가하였다.

5. 인체 유방암세포의 세포주기 조절인자에 미치는 Beevenom의 영향

Beevenom의 처리에 의한 유방암세포의 증식억제 및 apoptosis와 연관된 세포주기 조절인자의 발현 변화를 조사하여 Beevenom에 의한 암세포 증식억제기전을 검토하기 위하여 Beevenom에 의한 유방암세포의 세포주기 조절에 관련된 몇가지 유전자들

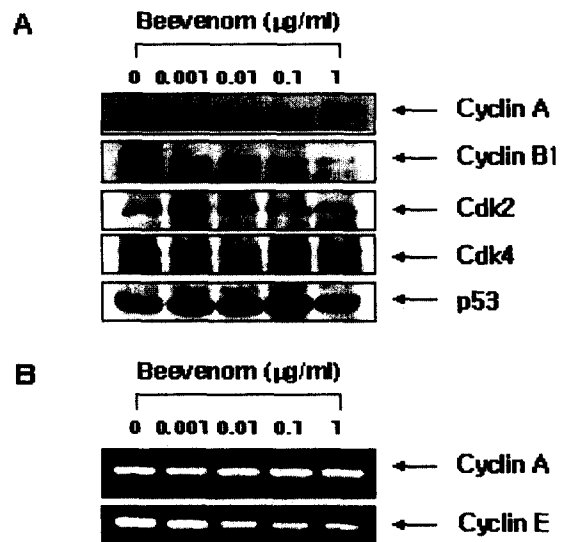


Fig. 5. Effect of Beevenom on the levels of regulatory gene products cell cycle in MCF-7 human breast carcinoma cells.

(A) Cells were incubated with various concentrations of Beevenom for 24h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-cyclin A, cyclin B1, -Cdk2, Cdk4 and p53 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. (B) Cells were incubated with Beevenom for 24 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using cyclin A and cyclin E primers described in Materials and Methods.

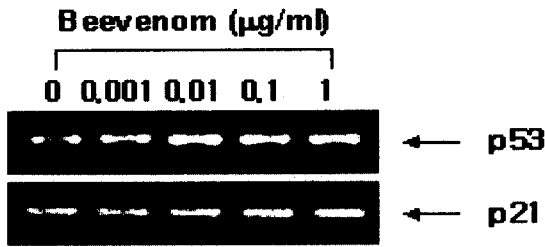


Fig. 6. Effect of Beevenom on the levels of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 mRNA in MCF-7 human breast carcinoma cells.

Cells were incubated with Beevenom for 24h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using cyclin A and cyclin E primers described in Materials and Methods.

의 발현 정도를 비교하였다. Fig. 5A의 결과에서처럼 Western blot analysis에서는 cyclin B1의 발현이 Beevenom 처리농도가 증가될수록 유의적으로 감소되었으나, cyclin A, Cdk2, 4 및 p53의 단백질 발현에는 큰 변화가 없었다. 또한 RT-PCR에 의한 전사 수준에서 조사된 cyclin E 발현의 감소도 관찰할 수 있었다(Fig. 5B).

Beevenom의 처리에 의한 유방암세포의 증식억제가 Cdk inhibitor의 발현과 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 p53 및 p21의 전사수준에서의 발현을 RT-PCR로 조사하였다. Fig. 6의 결과에서처럼 비록 Western blot analysis에서 중앙 억제 유전자 p53 단백질의 발현은 큰 변화가 없었지만 p53 및 Cdk inhibitor p21 모두 mRNA 수준에서 Beevenom의 처리에 의하여 발현이 증가되었다.

IV. 考 察

Apoptosis (programmed cell death)는 특이 발

생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절하에서 일어나는 정교한 인체방어기전이란 점에서 necrosis와 구별된다^{35),36)}. 또한 apoptosis는 개체보존 수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈이나 Cdk 활성화의 변화가 apoptotic cell death의 주원인이 될 수 있다³⁷⁾.

Apoptosis의 유발에 p53이나, Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있는데, Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 반면, Bax는 과발현 되었을 때 apoptosis를 유도한다³⁸⁾. 두 단백질은 서로 dimer를 형성하면서 cytochrome c와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 조절에 관여한다.

특히 DNA 손상에 의한 p53의 유도는 p21과 연관되어 세포주기 상 G1기에서의 세포증식 억제 뿐만 아니라 Bax 유전자를 활성화시키고 Bcl-2의 발현을 억제하면서 apoptosis에도 관여하는 것으로 알려지고 있다^{17),39)}. 또한 caspases라고 이름 붙여진 IC E/CED-like protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데^{35),40)}, 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related proteases로 되어 직접 또는 간접으로 세포내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다. 그러나 많은 경우에 apoptosis는 이러한 유전자들의 발현이나 세포주기 비의존적으로도 일어날 수 있다^{41),42)}.

藥鍼療法은 新鍼療法의 하나로 經絡學說의 원리에 의거하여 정제한 각종 약물을 유관한 穴位, 壓痛點에 주입하여 刺鍼效果和 藥物작용의 효과로서 經絡穴位를 자극하여 인체기능을 조정하고 病變組織의 병리상태를 개선시켜 체내의 氣血을 소통시키고 질병을 치료하는 것으로 최근 들어 많은 관심을 끌게 되었다⁴³⁾.

蜂毒의 이용은 기원전 2000년경의 이집트 파피루

스 문헌에 벌침이나 죽은 벌을 아픈 곳에 직접 비벼 치료했다는 기록이 남아있고, 기원전 168년에 매장된 중국 長沙 馬王堆 3號 漢墓에서 출토된 의서에서도 봉독을 이용한 2예의 기록이 실려 있고⁴⁴⁾, 약침요법 중 蜂毒藥鍼療法은 봉독을 추출 가공하여 질병과 유관한 부위나 혈위에 주입함으로써 刺鍼효과와 봉독의 생화학적 특이물질이 인체에 미치는 약리작용을 동시에 이용하는 치료요법의 일종이다^{43), 45)}.

봉독의 성분은 크게 peptide components, non peptide components, enzymes으로 구성되어 있다²⁶⁾. Peptide components는 freeze-dried venom의 약 50%를 구성하고 있으며, 주요 성분으로는 apamin, MCD peptide, melittin 등이 있다^{46), 47)}. 봉독 약침액의 독성에 대한 연구로 동물에서 봉독의 치사량²³⁾, 급성독성²⁷⁾, 항원성 및 발열성²⁸⁾ 등에 대한 보고가 있었고 또한 근육세포에 대한 독성작용에 관한 보고도 있었으며⁴⁸⁾, 항암효과로서 흑색종 세포에 미치는 세포독성에 대하여 연구된 결과가 있으나³⁰⁾ 암세포 성장의 억제 해결을 위한 분자생물학적 연구는 매우 미비한 편이다.

서구 여성들에서 가장 흔히 발견되는 유방암은 최근 국내에서도 지속적으로 환자 발병율 및 사망률이 증가되고 있다. 이에 따라 유방암의 발병기전에 대한 분자생물학적 연구가 활발히 진척되고 있는데 특히 암을 일으키는 원인으로 알려진 수십가지의 종양유전자에 이어 최근에는 암의 발생을 억제하는 것으로 생각되는 여러 종류의 암 억제 유전자가 밝혀지면서 유방암을 비롯한 각종 인체 암의 발병기전에 대한 이해가 넓어졌으며, 이를 이용한 암의 유전자 치료가 시도되고 있어 유방암 치료의 새로운 장이 열리고 있다.

본 연구에서는 봉독의 Beevenom 시료를 실험재료 및 방법에서 서술한 것처럼 24시간 동안 처리한 후, 살아있는 세포의 수를 계수하여 Beevenom이 처리되지 않은 대조군과 비교한 결과 24시간 동안 정

상 배지에서 자란 정상 MCF-7 인체 유방암세포의 수에 비하여 Beevenom이 함유된 배지에서는 Beevenom 첨가 농도 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 하나는 trypan blue 염색 후 hemacytometer를 이용한 살아있는 암세포의 수를 비교한 것이며, 또 하나는 세포내 mitochondria의 활성에 기준을 하여 측정된 방법³²⁾으로 비록 2가지 검사 방법에 따라 약간의 차이점은 있으나 이상의 결과들에서 Beevenom이 처리된 배지에서 자란 유방암세포는 처리농도 의존적으로 모두 정상적인 세포증식이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다.

다음은 Beevenom 처리에 따른 암세포의 형태 변화 관찰을 위하여 다양한 농도 범위로 Beevenom을 24시간 동안 처리한 후 위상차 현미경을 이용하여 정상 및 Beevenom이 처리된 조건에서 배양된 암세포의 모양을 관찰하였다. 그 결과 Beevenom의 농도 증가에 따른 세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 저농도 처리군에서부터 이미 심한 형태적 변이를 동반하였다. 이는 Beevenom 처리에 의한 암세포의 부착 능력 상실 및 암세포의 분화가 수반되었을 가능성을 의미하는 것으로 사료된다. 아울러 암세포의 형태적 변형 및 부착 능력 상실 등의 정도는 Beevenom 처리에 따른 생존율 감소와 잘 일치되는 결과였다.

이상의 유방암세포 증식 및 형태 변화의 관찰에서 Beevenom의 처리에 의한 암세포 증식의 억제는 암세포의 apoptosis 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 이에 대한 생화학적 증거를 제시하기 위하여 형광 현미경을 이용한 암세포의 핵 형태 변화를 관찰하였다. DAPI staining 결과 Fig. 3A에서 볼 수 있듯이 거의 모든 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 Beevenom이 처리된 암세포의 경우, 처리농도 의존적으로 비정상적인 세포의 출현이 증가되어 1 μ g/ml 처리군에서는 결과에서 알 수 있듯이 거의 모든 세포에서 염색질 응축(chroma-

tin condensation)에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body^{49),50)}를 관찰할 수 있었다.

또한 Beevenom에 의한 apoptosis의 유발을 생화학적으로 증명하기 위하여 apoptosis 유발시 특이하게 분해가 일어나는 표적 단백질인 β -catenin의 발현에 미치는 Beevenom의 영향을 Western blot analysis로 조사한 결과 β -catenin의 발현은 Beevenom 처리농도가 증가될수록 감소되었으며 뚜렷하지는 않으나 농도 의존적으로 단편화 현상을 관찰할 수 있었다.

Catenin family 단백질(α , β 및 γ)은 모든 세포에서 발현되는 세포질 단백질로서 E-cadherin과 결합하여 세포 연결기능에 중요한 역할을 한다^{51),52)}. 특히 β -catenin은 세포내 골격의 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다^{33),52),53)}. 정상 세포의 경우 β -catenin은 92 kDa의 분자량을 가지나 세포 유착성 apoptosis (adherent cell apoptosis)가 일어나면 62~72 kDa로 단편화가 일어난다^{33),54),55)}. 이러한 변화는 Beevenom에 의한 apoptosis 유발에서 암세포의 형태변화에서 관찰된 것과 같이 β -catenin의 발현 감소로 인한 세포 유착 소실과 밀접한 관계를 가진다고 할 수 있겠다<Fig. 3B>.

Beevenom이 처리된 배지에서 자란 암세포의 전체 단백질의 발현 변화를 조사하기 위하여 10% SDS-polacrylamide gel로 전체 단백질을 전기영동으로 분리하고 분리가 끝난 gel을 coomassie blue 염색액으로 염색하여 단백질의 발현 양상을 비교한 결과 처리농도에 따라 전체적인 총 단백질의 발현 양상은 크게 변화가 없었다. 이는 Beevenom 처리 후 단순히 단백질들의 분자량 차이에 기초를 둔 결과이므로 특정 단백질의 발현 변화를 조사하기 위해서는 2차원 전기영동에 의한 proteomics 연구를 통한 보다

정확한 단백질의 발현 양상을 파악해야 할 필요가 있을 것으로 사료된다<Fig. 3C>.

상기의 결과들에서 알 수 있듯이 Beevenom이 함유된 배지에서 자란 유방암세포의 성장 억제에는 β -catenin의 분해와 연관된 apoptosis와 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 Beevenom에 의한 apoptosis에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 대표적인 유전자 산물인 Bcl-2/Bax family의 발현을 조사하였다. 본 연구에서 조사된 Bcl-X_{SL}을 포함한 Bcl-2군에 속하는 유전자들은 anti-apoptotic 인자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 proapoptotic 분자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다^{38),40)}.

이들 두 유전자군들은 세포내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제 유전자인 p53, cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다^{38),42),56)}. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다^{56),57)}.

Fig. 4는 Beevenom이 24시간 동안 처리된 유방암세포에서 Bcl-X_{SL} 및 Bax 두 유전자의 mRNA 및 단백질 수준에서의 발현의 정도를 비교한 것이다. 먼저 Western blot analysis<Fig. 4A>에 의한 단백질의 발현에서 Bcl-X_{SL}의 경우 Beevenom 처리에 의하여 큰 변화를 보이지 않았으나 RT-PCR 분석<Fig. 4B>에 의한 mRNA 발현 수준은 Beevenom 처리 농도 의존적으로 감소됨을 알 수 있었다. Bax의 경우는 Beevenom 처리에 의하여 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 따라서 Beevenom에 의한 유방암 세포 MCF-7의 apoptosis 유발에는 Bax 유전자가 전사 및 번역 수준에서 관여함을 알 수 있었다.

다음은 Beevenom의 처리에 의한 유방암세포의 증식억제 및 apoptosis와 연관된 세포주기 조절인자

의 발현 변화를 조사하여 Beevenom에 의한 암세포 증식 억제기전을 검토하기 위하여 Beevenom에 의한 유방암세포의 세포주기 조절에 관련된 몇가지 유전자들의 발현 정도를 비교하였다.

Fig. 5A의 결과에서 볼 수 있듯이 Western blot analysis에 의한 몇가지 유전자들의 단백질 발현 조사에서는 cyclin B1의 발현이 Beevenom 처리농도가 증가될수록 유의적으로 감소되었으나, cyclin A, Cdk2, 4 및 p53의 단백질 발현에는 큰 변화가 없었다. 또한 RT-PCR에 의한 전사 수준에서 조사된 cyclin E 발현의 감소도 관찰할 수 있었다(Fig. 5B).

Cyclin E는 Cdk2와 복합체를 형성하면서 세포주기상 G1기에서 S기로의 전이에 중요한 역할을 담당하는 유전자이다^{6),7)}. 따라서 유방암세포에서 Beevenom에 의한 전사 수준에서의 cyclin E 발현 감소는 cyclin E와 complex를 이루면서 세포주기 진행에 관여하는 Cdk2 등의 kinase 활성을 감소시킬 수 있을 것으로 예측되기 때문에 매우 의미있는 결과로 사료된다.

Beevenom의 처리에 의한 유방암세포의 증식억제가 Cdk inhibitor의 발현과 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 Cdk inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어졌으며, G1기에서 S기로 전이에 중요한 역할을 하는 p53 및 p21의 전사수준에서의 발현을 RT-PCR로 조사하였다.

Fig. 6의 결과에서 볼 수 있듯이 비록 Western blot analysis의 결과에서 종양 억제 유전자 p53 단백질의 발현은 큰 변화가 없었지만 p53 및 Cdk inhibitor p21 모두 mRNA 수준에서 Beevenom의 처리에 의하여 발현이 증가되었다. 특히 p21은 p53의 발현 증가에 의하여 전사 수준이 조절될 수 있으며^{16)~18),39)}, 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자란 점에서 Beevenom에 의한 발현의 증가는 매우 의미있는 결과라고 사료

된다^{2),13),14),18)}.

그러나 본 연구의 결과만으로 Beevenom에 의한 유방암세포의 세포주기 교란에 관한 명확한 증거는 제시할 수 없으며, 세포주기 분석과 관련 유전자들의 kinase 활성도 검사 등을 통한 후속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

이상의 결과에서 Beevenom에 의한 인체 유방암세포의 성장억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었으며, Beevenom은 인체 암세포 성장억제를 유발할 수 있는 새로운 후보물질로서의 개발 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다.

V. 結 論

봉독약침액 Beevenom의 항암성 작용 검증을 위한 연구의 일환으로 인체 유방암세포주인 MCF-7 세포의 성장에 미치는 Beevenom의 영향을 조사한 결과 다음과 같다.

1. Beevenom의 처리농도 의존적으로 MCF-7 유방암세포의 생존율 및 성장률은 현저하게 감소되었으며, 이러한 암세포 성장억제 효과는 암세포의 심한 형태적 손상에 의한 부착력 상실과 연관이 있었다.

2. 이는 Beevenom에 의한 암세포의 apoptosis 유발과 연관이 있었으며, apoptosis에 의한 세포사에서 관찰되는 β -catenin 단백질의 발현저하 및 분해 현상도 관찰할 수 있었다.

3. Beevenom은 apoptosis를 유발하는데 관여하는 Bax 유전자의 발현을 전사 및 번역 수준에서 모두 증가시켰으며, apoptosis를 억제하는데 관여하는 Bcl-X_{SL} 유전자의 발현은 감소시켰다.

4. Western blot analysis 및 RT-PCT에 의한 세포주기 조절인자의 발현에 미치는 Beevenom의 영향을 조사한 결과, cyclin B1의 단백질과 cyclin E의 mRNA 발현이 특이적으로 억제되었다. 또한 종양억제 유전자인 p53과 cyclin dependent kinase inhibitor인 p21의 mRNA 발현이 Beevenom 처리 농도 의존적으로 증가되었음을 관찰할 수 있었다.

VI. 參考文獻

1. Choi, Y.H. and Choi, H.J. Significance of cell cycle and checkpoint control. *Kor. J. Life Sci.*, 2001 ; 11(4) : 362-370.
2. Sherr, C.J. The Pezcoller lecture : cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.*, 2000 ; 60(14) : 3689-3695.
3. Weinberg, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995 ; 81(3) : 323-330.
4. Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C.J. and Kato, J.Y. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1994 ; 14(3) : 2066-2076.
5. Meyerson, M. and Harlow, E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.* 1994 ; 14(3) : 2077-2086.
6. Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R. and Roberts, J.M. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*, 1992 ; 257(5077) : 1689-1694.
7. Ohtsubo, M. and Roberts, J.M. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science*, 1993 ; 259(5103) : 1908-1912.
8. Sherr, C.J. Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 1993 ; 73(6) : 1059-1065.
9. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. and Lamb, N.J. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, 1991 ; 67(6) : 1169-1179.
10. Guadagno, T.M., Ohtsubo, M., Roberts, J. M. and Assoian, R.K. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science*, 1993 ; 262(5139) : 1572-1575.
11. Walker, D.H. and Maller, J.L. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature*, 1991 ; 354(6351) : 314-317.
12. Brandeis, M. and Hunt, T. The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J.*, 1996 ; 15(19) : 5280-5289.
13. Elledge, S.J. and Harper, J.W. Cdk inhibitors : on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1994 ; 6(6) : 847-852.
14. Morgan, D.O. Principles of CDK regulation. *Nature*, 1995 ; 374(6518) : 131-134.
15. Gu, Y., Turck, C.W. and Morgan, D.O. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*,

- 1993 ; 366(6456) : 707-710.
16. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 1993 ; 75(4) : 805-816.
 17. El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., Wiman, K.G., Mercer, W. E., Kastan, M.B., Kohn, K.W., Elledge, S. J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.*, 1994 ; 54 (5) : 1169-1174.
 18. Xiong, Y., Hannon, G., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 1993 ; 366(6456) : 701-704.
 19. 金文昊. 蜂毒療法과 蜂鍼療法. 서울 : 한국교육기획. 1992 : 20-37, 41-42, 67-64, 104-112, 134-149, 171-176.
 20. 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) : 283-292.
 21. 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) : 211-220.
 22. 孔賢淑, 高炯均, 金昌煥. 蜂毒療法이 抗座攣에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1993 ; 10 (1) : 159-165.
 23. 이종석, 김재규, 고흥균. 봉독의 치사량에 관한 실험적 연구. 大韓鍼灸學會誌. 1993 ; 10 (1) : 151-158.
 24. 李京姬, 金昌煥, 姜成吉, 高炯均. 産地別 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.
 25. Barbara, R. *Chemistry and Pharmacology of Honey Bee Venom* Academic Press, 1986 : 329-402.
 26. Habermann, E. *Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms*. In *Venomous Animals and their Venoms*, Academic Press, 1971 : 3-61.
 27. 이종석, 고흥균, 김창환. 약침용 봉독액의 급성 독성에 관한 연구. 大韓鍼灸學會誌. 1994 ; 11 (1) : 177-195.
 28. 이종석, 김용석. 약침용 봉독액의 항원성시험 및 발열성시험에 관한 연구. 경희한의대논문집. 1995 ; 12(2) : 123-134.
 29. 권기록, 고흥균, 김용석, 박영배, 김창환, 강성길. 봉독약침 자극이 3-MCA 유발 상피종에 대한 항암 및 면역 반응에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 1997 ; 14(2) : 151-159.
 30. 박찬열, 남상수, 김창환, 이재동, 강성길, 이운호, 안병철. 약침용 봉독액이 흑색종 세포에 미치는 항암 효과에 대한 분자생물학적 연구. 大韓鍼灸學會誌. 2000 ; 17(2) : 169-186.
 31. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J. S., Lee, J., Wu, M., Takano, E., Maki, M., Henkart, P. and Trepel, J.B. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.*, 1997 ; 272(45) : 28479-28484.
 32. Choi, Y.H. Research technics for the cell cycle study. *Exp. Mol. Med.*, 2001 ; 33 : S 15-S36.
 33. Choi, Y.H., Bae, J.H., Yoo, M.A., Chung, H. Y., Kim, N.D. and Kim, K.W. Induction of apoptosis by ursolic acid through activation

- of caspases and down-regulation of c-IA Ps in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.*, 2000 ; 17(3) : 565-571.
34. Choi, Y.H., Im, E.O., Suh, H.S., Jin, Y. E., Lee, W.H., Yoo, Y.H., Kim, K.W. and Kim, N.D. Apoptotic activity of novel bile acid derivatives in human leukemic T cells through the activation of caspases. *Int. J. Oncol.*, 2001 ; 18(5) : 979-984.
35. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.*, 1993 ; 17(5) : 461-476.
36. Arends, M.J., Morris, R.G. and Wyllie, A. H. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.*, 1990 ; 136(3) : 593-608.
37. Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W. and Greenberg, A. H. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science*, 1994 ; 263(5150) : 1143-1145.
38. Chiarugi, V., Magnelli, L. and Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.*, 1994 ; 40() : 603-612.
39. Miyashita, T. and Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 1995 ; 80(2) : 293-299.
40. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997 ; 88(3) : 355-365.
41. Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D.A., OConnor, P.M. and Fornace, A.J., Jr. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene*, 1994 ; 9(12) : 3743-3751.
42. Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T. and Housman, D.E. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 1993 ; 74(6) : 957-967.
43. 權奇祿, 高炯均, 金昌煥. 蜂蟻에 對한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1994 ; 11(1) : 159-171.
44. 인창식 고형균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록 : 마왕퇴의서의 봉독요법 2예. 大韓鍼灸學會誌. 1998 ; 15(1) : 143-147.
45. 朱文鋒. 實用 中醫辭典, 陝西 : 陝西科學技術出版社. 1982 : 402.
46. Assem, E.S. and Atkinson, G. Histamine release by MCDP(401), a peptide from the venom of the honey bee. *Bri J Pharmacol*, 1973 ; 48(2) : 337P-338P.
47. Spoerri PE, Jentsch J, Glees P. Apamin from bee venom : effects of the neurotoxin on cultures of the embryonic mouse cortex. *Neurobiology*. 1973 ; 3(4) : 207-214.
48. Ownby, C.L., Powell, J.R., Jiang, M.S. and Fletcher, J.E. Melittin and phospholipase A 2 from bee(*apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle *in vivo*. *Toxicon*, 1997 ; 35(1) : 67-80.
49. Lieberthal, W., Koh, J.S. and Levine, J.S. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin. Nephrol.*, 1998 ; 18(5) : 505-518.
50. Zimmermann, K.C., Bonzon, C. and Green, D.R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, 2001 ; 92(1) : 57-70.
51. Johnson, J.P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis. Rev.*,

- 1999 ; 18(3) : 345-357.
52. Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N. and Pignatelli, M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.*, 2000 ; 87(8) : 992-1005.
53. Debruyne, P., Vermeulen, S. and Mareel, M. The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 1999 ; 62(4) : 393-402.
54. Fukuda, K. Apoptosis-associated cleavage of β -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1999 ; 31(3-4) : 519-529.
55. Steinhilber, U., Badock, V., Bauer, A., Behrens, J., Wittman-Liebold, B., Dorken, B. and Bommert, K. Apoptosis-induced cleavage of β -catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J. Biol. Chem.*, 2000 ; 275(21) : 16345-16353.
56. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. and Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 1998 ; 391(6666) : 496-499.
57. Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Millman, C.L. and Korsmeyer, S.J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 1993 ; 75(2) : 241-251.