

원저

Bax의 발현증가 및 Caspase의 활성을 통한 봉독약침액 Melittin의 인체폐암세포 Apoptosis 유발에 관한 연구

안창범* · 임춘우* · 김철홍* · 윤현민* · 장경전* · 송춘호* · 최영현**

*동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

**생화학교실 및 한의학연구소

Abstract

Apoptotic Cell Death by Melittin through Induction of Bax and Activation of Caspase Proteases in Human Lung Carcinoma Cells

Ahn Chang-beohm*, Im Chun-woo*, Kim Cheol-hong*, Youn Hyoun-min*,
Jang Kyung-jeon*, Song Choon-ho* and Choi Yung-hyun**

*Department of Acupuncture and Moxibustion, Department of Biochemistry,

**Dong-eui University College of Oriental Medicine and Research Institute of
Oriental Medicine

Objective : To investigate the possible molecular mechanism (s) of melittin as a candidate of anti-cancer drug, we examined the effects of the compound on the growth of human lung carcinoma cell line A549.

- 접수 : 2004년 3월 11일 · 수정 : 2004년 3월 20일 · 채택 : 2004년 3월 22일
· 교신저자 : 안창범, 614-052 부산광역시 부산진구 양정동 산 45-1 동의대부속한방병원 침구과
Tel. 051-850-8611 E-mail : cbahn@deu.ac.kr

Methods : Growth inhibitory study, flow cytometry analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis, RT-PCR and in vitro caspases activity assay were performed.

Results : Melittin treatment declined the cell viability of A549 cells in a concentration-dependent manner, which was associated with induction of apoptotic cell death. Melittin treatment down-regulated the levels of Bcl-XS/L mRNA and protein expression of A549 cells, an anti-apoptotic gene, however, the those of Bax, a pro-apoptotic gene, were up-regulated. Melittin induced the proteolytic cleavage and activation of caspase-3 and caspase-9 protease in a dose-dependent manner without alteration of inhibitor of apoptosis proteins family and Akt expression. Western blot analysis and RT-PCR data revealed that the levels of tumor suppressor p53 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21 were also remained unchanged.

Conclusions : Taken together, these findings suggest that melittin-induced inhibition of human lung cancer cell growth is associated with the induction of apoptotic cell death via regulation of several major growth regulatory gene products, and melittin may have therapeutic potential in human lung cancer.

Key words : A549, melittin, apoptosis, Bax, caspase

I. 서 론

Apoptosis는 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체방어기전이란 점에서 necrosis와 구별된다¹⁻²⁾. 또한 apoptosis는 개체보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈이나 cyclin-dependent kinases (Cdks) 활성의 변화가 apoptotic cell death의 주원인이 될 수 있다³⁾. Apoptosis의 유발에 종양억제 유전자 p53이나, Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려

지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다⁴⁻⁵⁾. 따라서 최근 암세포에서의 apoptosis 조절관련 기전해석에 기초를 둔 항암제 개발이 많은 관심을 모으고 있다.

봉독(蜂毒)은 꿀벌의 독낭(毒囊)에 들어있는 약 40여 가지의 유효성분으로 구성된 물질로 염증(炎症) 및 알러지 등을 유발할 수도 있지만, 진통 및 소염의 효능이 탁월한 것으로 알려져 있다. 전통적으로는 봉침(蜂鍼)을 직접 인체에 자입(刺入)하는 방법을 사용하였으나, 최근에는 봉독을 추출·가공한 후 인체의 경혈(經穴)에 자입하는 봉독약침요법(蜂毒藥鍼療法)이 주로 활용되고 있다. 즉 봉독약침요법은 봉독을 질병과 유관한 부위나 혈위에 주입함으로

써 자침(刺鍼) 효과와 봉독의 생화학적 특이물질이 인체에 미치는 약리작용을 동시에 이용하는 치료요법의 일종이다⁶⁾. 봉독의 성분은 크게 peptide components, non peptide components, enzymes 등으로 구성되어 있다⁷⁾. 그중 peptide components는 freeze-dried venom의 약 50%를 구성하고 있으며, 주요 성분으로는 melittin, apamin, mast cell degranulating peptide 등이 있다⁸⁻⁹⁾. 봉독에 관한 연구는 1990년대 이후부터 활발히 진행되고 있으며, 항암효과를 포함한 다양한 생리 및 약리 작용에 관한 기전이 점차 알려지고 있다. 봉독에 포함된 성분 중 melittin은 가장 특징적인 주성분으로서 24개의 amino acid로 구성된 polypeptide로서 phospholipase A2 및 D의 activator로 널리 알려져 있다¹⁰⁻¹¹⁾. 최근 melittin의 항암작용 가능성이 대두되면서 인체 망막아종세포¹²⁾, 신경아세포종¹³⁾, 흑색종 세포¹⁴⁾, 유방암세포¹⁵⁾, 폐암세포¹⁶⁾ 등을 포함한 몇 가지 in vitro 세포주에서 melittin에 의한 암세포 증식의 억제체는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음이 보고된 바 있으나 구체적인 분자생물학적 기전에 관하여 아직까지 정확하게 알려진 바는 없다. 따라서 본 연구에서는 선행연구¹⁶⁾에 의해 관찰된 봉독의 구성성분 melittin의 항암작용에 관한 보다 정확한 작용 기전을 조사하기 위하여 melittin에 의한 인체 폐암세포의 생존을 저하와 연관된 apoptosis 유발에 관여하는 몇 가지 유전자 산물의 발현 변화를 조사하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 암세포배양 및 시료의 처리

본 연구에 사용된 A549 인체 폐암세포는 한

국생명공학연구소에서 분주 받아 사용하였으며, 90%의 RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS), 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 배지를 사용하였다. Melittin은 Sigma Chemical Co. (St. Luis, MO, USA)에서 구입하였으며, 3차 증류수에 희석하여 선행 방법에 준하여 처리하였다¹⁶⁾.

2. Hematocytometer를 이용한 생존율의 측정

세포배양용 6 well plate를 이용하여 plate당 2×10^4 개의 A549 암세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, melittin을 적정농도로 희석하여 처리하였다. 48시간 동안 melittin이 처리된 세포를 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 수세한 후, trypan blue (Gibco BRL, Gaithersburg, MA, USA)로 염색하였다. 이를 hematocytometer에 옮긴 후 위상차 현미경 ($\times 200$) 하에서 살아있는 세포의 수를 측정하여 대조군과 비교 분석하였다.

3. Flow cytometry 분석

정상 및 melittin이 함유된 배지에서 자란 암세포들을 PBS로 두세 번 씻어내고, 고정액 (70% ethyl alcohol, 0.5% Tween 20)을 첨가하여 4°C에서 고정시킨 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하고 4°C에서 1시간동안 염색하였다. 이를 다시 PBS로 두 번 씻어낸 후, DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram

을 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

4. 단백질의 분리, 전기영동 및 Western blotting

선행 방법에 준하여 정상 및 melittin이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다¹⁷⁾. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시킨 후, 특정 단백질에 대한 항체와 그에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 단백질의 발현정도를 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 horseradish

peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

5. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction 분석

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNAzol B(TEL-TEST, Inc., Texas, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, Choi et al.¹⁸⁾의 방법에 준하여 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 µg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다(Table 1). 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
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-XS/L	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
Bcl-2	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'

6. *In vitro* caspase-9 및 caspas-3의 활성 측정

Fluorometric assay에 의한 caspase-3 및 caspase-9의 *in vitro* 활성 측정을 위하여 사용된 kit는 CLONTECH Lab. (Palo Alto, CA, USA) 및 R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Germany)에서 각각 구입하였다. 활성 측정을 위하여 정상 및 melittin이 처리된 배지에서 72 시간 배양된 암세포를 모아서 ice-cold PBS로 2회 수세하고 준비된 buffer를 이용하여 lysis를 시켜 10,000 rpm으로 30분간 원심분리 시켰다. 대조군 및 melittin이 처리된 실험군에서 상층액을 모아 단백질의 양을 정량하고 동량을 fluorogenic peptide 기질이 함유된 extraction buffer에 혼합하였다¹⁸⁾. 이때 사용된 기질은 caspase-3의 경우는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이며, caspase-9의 경우는 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다. 준비된 plate를 37°C에서 2시간동안 incubation 시킨 후 VERSAmax tunable microplate reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

III. 결 과

1. 암세포의 생존에 미치는 melittin의 영향

준비된 melittin을 적정농도로 희석하여 48시간 동안 처리한 후 살아있는 세포의 수를 계수하여 melittin이 처리되지 않은 대조군과 비교한 결과는 Fig. 1A에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 처리된 melittin의 농도가

증가될수록 암세포의 생존율은 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었는데, 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 처리군의 경우 대조군에 비하여 약 20% 이상의 세포 생존율 감소가 관찰되었으며, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 이상에서 살아있는 세포는 20% 미만으로 나타났다.

2. Melittin 처리에 의한 apoptosis 유도

이상의 melittin 처리에 따른 암세포의 증식 억제현상이 apoptosis 유발과 상관성이 있는지를 조사하기 위하여 flow cytometry 분석에 의한 세포주기의 sub-G1기에 해당하는 세포군을 정량적으로 분석하였다. Fig. 1B의 결과에 나타났듯이 저농도 처리군(0.5 및 1.0 $\mu\text{g/ml}$)에서는 apoptosis에 의한 암세포의 사멸을 의미하는 sub-G1기에 해당하는 세포가 10% 미만이었으나, 2.0 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 대조군(2.8%)에 비하여 10배 이상 증가되어 sub-G1기에 해당하는 세포군의 빈도가 melittin 처리 농도 의존적으로 매우 증가하였음을 알 수 있었다.

3. Bcl-2 family의 발현에 미치는 melittin의 영향

상기의 결과들에서 알 수 있듯이 melittin이 함유된 배지에서 자란 폐암세포의 성장 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 melittin의 처리에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 먼저 Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 유전자 발현의 수준을 RT-PCR 및 Western blot analysis 방법으로 조사하였다. Fig. 2A는 mRNA 전사수준을 RT-PCR법으로 조사한 결과로서, apoptosis 유발 억제에 관여하는 Bcl-2

member에 속하는 Bcl-X_{SL}의 발현은 melittin의 처리에 따라 점차 감소하였으며, apoptosis 유도에 관여하는 Bax의 발현은 melittin 처리 농도 의존적으로 증가하였음을 알 수 있었다. 또한 Fig. 2B에 나타낸 단백질 발현의 정도에서도 RT-PCR의 결과에서와 유사한 경향성을 보여주었으나, Bcl-2 발현의 감소는 관찰할 수 없었다. 즉 melittin에 의한 apoptosis의 유발에는 apoptosis의 유발에 관여하는 Bax 유전자의 발현은 증가하였지만 apoptosis 유발 억제에 관여하는 유전자들의 발현은 상대적으로 감소되었음을 알 수 있었다.

4. Caspase의 발현 및 활성화에 미치는 melittin의 영향

다음은 지금까지 알려진 caspase protease 중 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3 및 caspase-9의 발현에 미치는 melittin의 영향을 조사하였다. Fig. 3의 결과에서 볼 수 있듯이 melittin의 처리에 의하여 불활성형인 pro-caspase-3 단백질의 발현은 melittin 처리 농도 의존적으로 감소되었으며, 활성형 caspase-3의 발현은 1.5 μg/ml 처리군까지 상대적으로 증가되었다. 이러한 현상을 caspase-9에서도 유사한 경향성을 보여 주었으나 뚜렷한 활성형의 단백질 발현 증가를 고농도 처리군에서 관찰하기는 어려웠다. 따라서 이들 Western blotting에 의한 결과를 재확인하기 위하여 *in vitro* 분석에 의한 caspase의 활성 정도를 직접 분석하였다. 이를 위하여 정상 및 melittin이 처리된 배지에서 48시간 배양된 암세포에서 농도별 동량의 단백질을 취하여 fluorogenic peptide 기질과 반응을 시켰다. Fig. 4의 결과에서 알 수 있듯이 melittin이 처리된 암세포에서는 처리 농도

의존적으로 caspase-3 및 caspase-9의 활성이 모두 증가되었음을 알 수 있었다. 즉 melittin의 처리에 의한 폐암세포의 apoptosis 유발은 Bcl-2 family의 발현 변화와 연관된 caspase의 활성화와 직접 관련이 있음을 알 수 있었다.

5. IAP family, Akt, p53 및 p21WAF1/CIP1의 발현에 미치는 melittin의 영향

다음은 caspase의 활성 조절인자인 inhibitor of apoptosis (IAP) family 및 세포 성장의 신호 전달계에서 중요한 survival factor로 잘 알려져 있는 Akt의 발현에 미치는 melittin의 영향을 조사하였다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 조사된 두 가지 IAP family 중 cIAP-2 만이 고농도 처리군에서 다소 감소되었을 뿐 cIAP-1, Akt 및 인산화형 Akt (p-Akt)의 발현에는 큰 영향이 없었다. 또한 melittin 처리에 의한 폐암세포의 증식억제에 따른 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 종양억제 유전자 및 Cdk inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어졌으며, 세포주기 전반에 걸쳐 매우 중요한 조절자 역할을 하는 p53 및 p21WAF1/CIP1의 전사 및 번역수준에서의 발현을 RT-PCR 및 Western blotting으로 조사하였다. Fig. 6의 결과에서 볼 수 있듯이 melittin 처리에 따른 암세포의 성장억제에 두 유전자의 전사 및 번역 수준 모두에서 별다른 차이점이 발견되지 않았다. 따라서 melittin 처리에 의한 apoptosis 유발과정에는 IAP family, Akt, p53 및 p21 등의 발현 변화와는 무관한 것 같지만 이에 관한 정확한 기전 해석에는 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

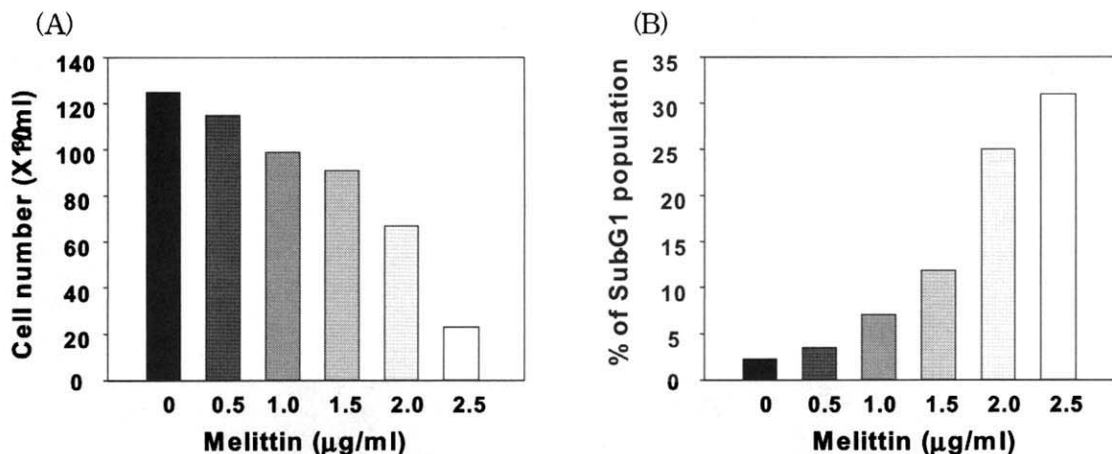


Fig. 1. (A) Inhibition of cell viability by melittin in A549 human lung carcinoma cells. Cells were seeded as described in materials and methods, and the viable cells were counted after melittin treatment for 48 h. Results are expressed as average from two separate experiments. (B) Increased sub-G1 population by melittin treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with melittin for 48 h and then analyzed by flow cytometry as described in materials and methods. Results are expressed as average from two separate experiments.

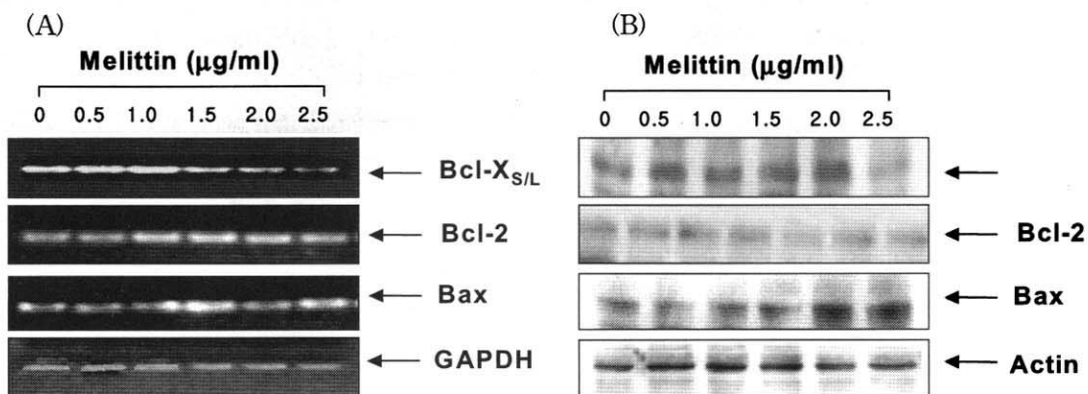


Fig. 2. Down-regulation of Bcl-X_{S/L} and induction of Bax expression by melittin in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with melittin for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using Bax, Bcl-X_{S/L} and Bcl-2 primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Total cellular proteins were isolated after treatment with melittin for 48 h and were separated by 12 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

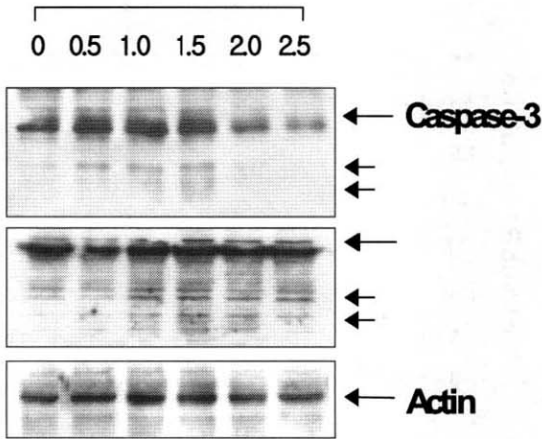


Fig. 3. Proteolytic degradation of caspase-3 and caspase-9 by melittin in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with melittin for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 12 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-caspase-3 and anti-caspase-9 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

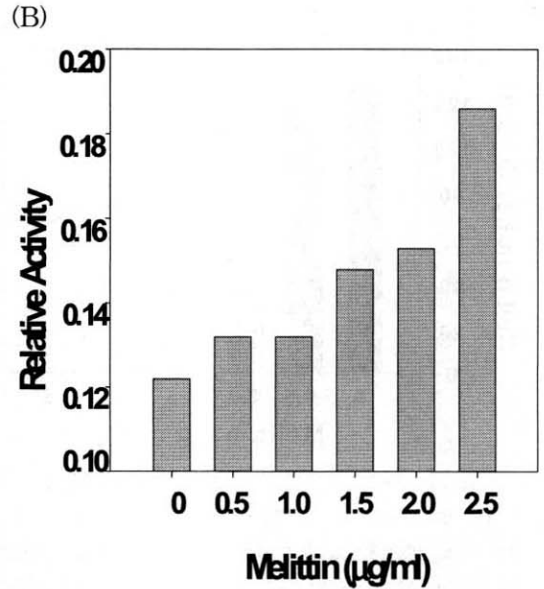
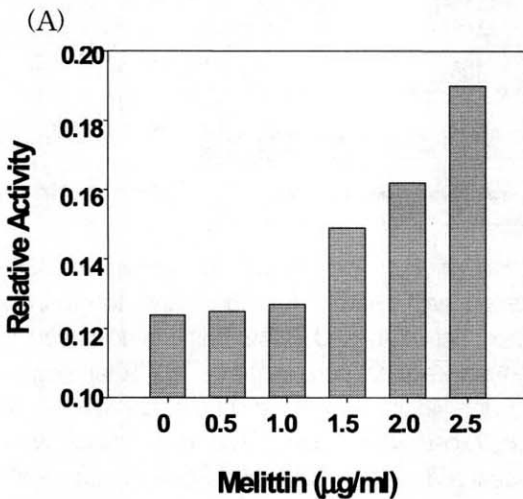
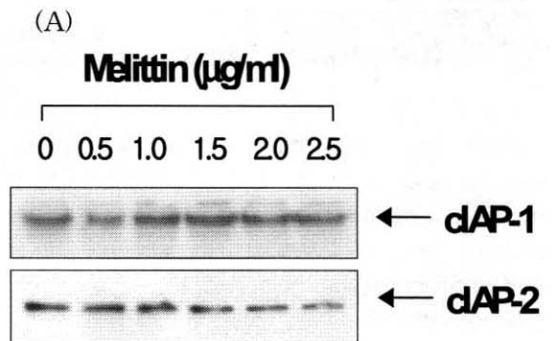


Fig. 4. Activation of caspase-3 and caspase-9 by melittin in A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with indicated concentrations of melittin for 48 h, collected and then lysed. Aliquots were incubated with DEVD-pNA (A) and LEHD-pNA (B) for caspase-3 and caspase-9 activity, respectively, at 37°C for 1 h. The released fluorescent products were measured. Data represent the mean of two independent experiments.



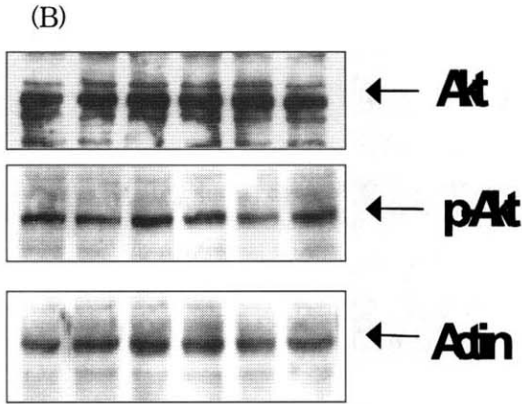


Fig. 5. Effects of melittin treatment on the levels of IAP family (A) and Akt (B) expression in A549 human lung carcinoma cells. A549 cells were incubated with various concentrations of melittin for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

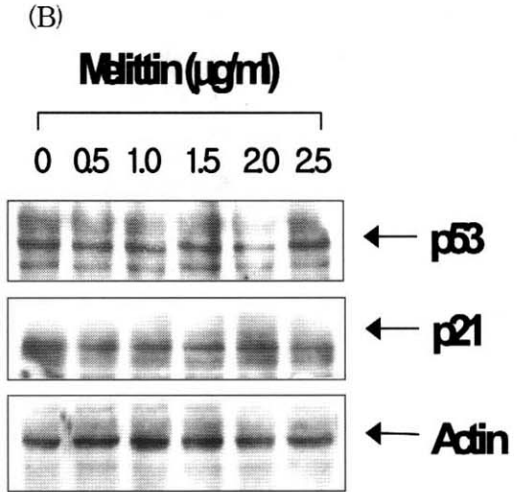
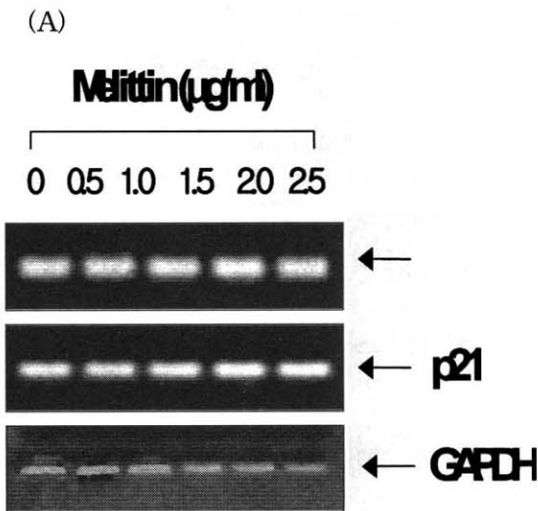


Fig. 6. Effects of melittin treatment on the levels of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 expression in A549 human lung carcinoma cells. (A) Total RNAs were isolated after melittin treatment for 48 h and RT-PCR was performed using Bax, Bcl-XS/L and Bcl-2 primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with melittin for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-p53 anti-p21 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control



IV. 고찰

본 연구에서는 인체 폐암세포의 성장에 미치는 봉독성분 melittin의 영향을 조사하기 위하여 재료 및 방법에서 서술한 것처럼 48시간

동안 서로 다른 농도의 melittin이 함유된 배지에서 자란 A549 암세포의 생존율을 먼저 조사하였다. Fig. 1A의 결과에서 알 수 있듯이 정상 배지에서 자란 암세포에 비하여 melittin이 함유된 배지에서 자란 암세포는 melittin 첨가 농도 의존적으로 생존율이 감소하였으며, 이는 MTT assay에 의한 선행연구의 결과와 매우 유사하였다¹⁶⁾. 아울러 flow cytometry 분석에 의한 apoptosis 유발 세포군에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도 역시 melittin 처리 농도 의존적으로 증가되어 melittin 처리에 따른 암세포의 증식 억제는 apoptosis 유발과 직접적인 연관이 있음을 알 수 있었다(Fig. 1B).

다음은 melittin의 처리에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 가장 대표적인 유전자인 Bcl-2 family에 속하는 유전자의 발현을 조사하였다. 그중 Bcl-2 member는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax member에 속하는 인자들은 pro-apoptotic 분자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다^{4-5,19)}. 이들은 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제 유전자인 p53, cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다^{5,20-21)}. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다^{4-5,20)}. Fig. 2A는 다양한 농도의 melittin이 함유된 배지에서 배양된 암세포를 대상으로 mRNA 전사수준을 RT-PCR법으로 조사한 결과로서, 조사된 유전자 중 Bcl-XS/L mRNA는 melittin 처리농도 의존적으로 다소 발현이 감소되었다, 그러나 Bax mRNA의 경우는 melittin

처리에 따라 발현이 증가됨을 알 수 있었으며, 이와 유사한 결과는 단백질 발현의 수준에서도 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 즉 melittin에 의한 A549 폐암세포의 apoptosis 유발에는 apoptosis를 억제하는 유전자의 발현이 감소되는 반면, apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 발현이 증가되었음을 알 수 있었다. 이러한 현상은 인체 유방암세포에서 bee venom에 의한 apoptosis의 유발 과정에서 관찰된 경우와 매우 유사한 결과였다¹⁵⁾.

한편 apoptosis 유발 경로에 또 다른 중요 조절인자로 작용하는 할 수 caspase protease family에 속하는 많은 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 존재하며, 이들의 활성화는 Bcl-2 family 발현의 정도에 의존적이다^{4-5,22)}. 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 protease로 전환되어 직·간접으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다. 따라서 지금까지 알려진 caspase 중, 초기 apoptosis의 유발과정에서 중요한 역할을 하는 caspase-9과 apoptosis가 유발된 세포에서 전체적으로 높은 활성도를 보여주는 caspase-3의 발현 정도를 정상 및 melittin이 처리된 배지에서 배양된 세포를 대상으로 비교 조사하였다. Fig. 3은 immunoblotting에 의한 결과로서, caspase-3의 경우 활성화된 형태로 관찰되려면 불활성 형태인 32 kDa의 상대적 발현이 줄어들거나 활성형인 17 및 19 kDa 분자량을 가지는 단백질이 검출되어야 한다. 본 실험의 결과에서 알 수 있듯이 활성화형인 저분자의 발현은 저 농도에서 다소 증가된 반면 비활성 band의 발현은 고농도에서 매우 감소되었다. Caspase-9의 경우 비활성형 band의 현저한 감소현상은 관찰할 수 없었으나 활성화형 band 발현의 정도

는 melittin 처리 농도 의존적으로 증가되었음을 알 수 있었다. Western blot analysis에 의한 caspase의 양적 변화와 연관된 caspase의 활성화 정도를 재확인하기 위하여 in vitro 분석법을 이용하여 melittin 처리에 의하여 caspase가 실제화 활성화가 되었는지를 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 melittin이 처리된 배지에서 배양된 암세포에서 농도별 동량의 단백질을 취하여 fluorogenic peptide 기질과 반응을 시켰다. Fig. 4의 결과에서 알 수 있듯이 melittin이 처리된 폐암세포에서는 처리 농도 의존적으로 caspase-3 및 caspase-9 모두가 활성이 증가되었음을 알 수 있었다. 한편 melittin에 의한 apoptosis 유발 관련 선행연구에서 poly(ADP-ribose) polymerase, b-catenin 및 phospholipase C- γ 1 단백질 등의 분해 현상을 관찰한 바 있었는데¹⁶⁾, 이들 단백질은 공통적으로 apoptosis 과정에서 활성화된 caspase 효소의 기질인 점²²⁻²⁷⁾을 고려해 볼 때, melittin에 의한 A549 세포에서의 apoptosis 유발에는 Bax의 상대적인 발현 증가와 연관된 caspase의 활성이 중요한 작용을 하는 것으로 추정할 수 있겠다.

그리고 apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중 최근 밝혀진 IAP family에 속하는 여러 유전자 산물은 곤충세포에서 바이러스 감염에 의한 apoptosis를 억제하기 위한 baculoviral 단백질 군들로서 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지닌다²⁸⁻²⁹⁾. 그리고 이들 중 몇 가지 IAP는 caspase와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있을 것으로 밝혀졌다²⁸⁻²⁹⁾. 그러나 Fig. 5A의 결과에서 알 수 있듯이 melittin이 처리된 폐암세포에서 조사된 두 종류의 IAP 단백질 중 cIAP-2 만이 고농도 처리군에서 다소 감소되었다. 따라서 melittin의 처리에 의한 apoptosis

의 유발은 IAP family 비의존적인 caspase의 활성화에 의한 것인지는 더 연구를 해야 할 필요가 있을 것으로 사료된다. 또한 serine/threonine kinase에 속하는 Akt는 세포 성장의 신호전달계에서 중요한 survival factor로 잘 알려져 있기 때문에 항암제에 의한 암세포의 apoptosis 유발에 주요 표적인자가 될 수 있으며³⁰⁾, Akt가 과발현 되었을 경우 항암제에 대한 내성이 생길 수 있는 것으로 보고된 바 있다³¹⁾. 특히 apoptosis 유발인자인 Bad는 Akt에 의하여 인산화될 수 있고, 이로 인한 Bcl-2와의 dimerization 형성이 억제되기 때문에 세포 성장을 촉진시킬 수 있다³²⁻³³⁾. Apoptosis에서 Akt의 활성화는 caspase-9에 의해서도 직접적으로 억제될 수 있으며³³⁾, IAP family에 의해서도 조절되므로 cisplatin과 같은 항암제의 처리는 IAP family 단백질의 발현을 억제하고 Akt의 분해를 촉진시켜 apoptosis를 유발한다. 그러나 이러한 현상은 약제 감수성 암세포에서만 가능하며, 약제 저항성 암세포에서는 apoptosis가 일어나지 않기 때문에 항암제에 의한 Akt의 발현 억제 유도는 caspase-9의 조절 하에서 생기는 암세포의 apoptosis 유발을 일으킬 수 있다³⁰⁻³⁴⁾. 따라서 melittin의 처리에 의한 A549 폐암세포의 apoptosis 유발에 Akt 신호전달 경로가 관여하는지의 여부를 조사하기 위하여 정상 및 melittin이 함유된 배지에서 자란 암세포를 대상으로 Akt 단백질 및 인산화된 Akt 단백질 (p-Akt)의 발현 정도를 측정하였지만, melittin의 처리에 의한 apoptosis 유발과정에서 Akt 단백질의 발현 변화 여부는 관찰할 수 없었다 (Fig. 5B). 상기 결과들에서 알 수 있듯이 melittin이 처리된 배지에서 자란 암세포의 apoptosis에 caspase protease의 활성화는 확실하게 일어나지만, IAP 및 Akt의 관여 정도는 미약한 것으

로 사료된다.

아울러 본 연구에서는 melittin의 처리에 의한 폐암세포의 생존을 저하가 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 부가적으로 조사하였다. 이를 위하여 현재까지 알려진 종양억제 유전자 중 가장 중요한 p53 및 세포주기의 G1기에서 S기로 전이에 중요한 역할을 하는 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 melittin의 영향을 조사하였다. Fig. 6의 결과에서 볼 수 있듯이 p53 및 p21 두 유전자의 발현은 melittin의 처리에 따라 큰 변화가 없었다. 특히 Cdk inhibitor인 p21은 p53의 발현 증가에 의하여 전사 수준이 조절될 수 있으며³⁶⁻³⁷⁾, 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자란 점에서 melittin의 처리에 의한 발현의 변화가 관찰되지 않는 점은 매우 흥미로운 결과라고 사료된다. 그러나 인체 유방암 세포에서 bee venom 처리에 의한 암세포 성장 억제에서 상기 두 유전자의 발현이 매우 증가되었다는 점¹⁵⁾과 비교해 볼 때, 본 연구의 결과만으로 melittin에 의한 폐암세포의 세포주기 교란에 관한 명확한 증거는 제시할 수 없으며, 세포주기 분석과 관련 유전자들의 활성 조사 등을 통한 후속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

이상의 결과에서 melittin에 의한 인체 폐암세포의 생존을 억제하는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었으며, apoptosis 유발에는 Bax 유전자의 상대적인 발현 증가에 의한 caspase의 활성화와 직접적인 연관성이 있음을 관찰할 수 있었다. 본 연구의 결과만으로 melittin의 항암작용 여부를 직접적으로 논하기에는 매우 어렵기 때문에 다양한 추가적인 실험이

필수적으로 수행되어야 할 것이며 본 연구의 결과는 향후 수행될 추가 실험을 위한 기초 자료로서 그 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

V. 결 론

최근 항암제로서의 사용 가능성이 제시되고 있는 봉독의 주요 성분 중에 하나인 melittin의 암세포 성장억제 기전을 해석하기 위하여 인체 폐암세포 A549 세포주를 대상으로 조사한 결과는 다음과 같다.

1. Melittin의 처리 농도 의존적으로 A549 폐암세포의 생존율은 현저하게 감소되었으며, 이는 apoptosis 유발과 연관성이 있었다.
2. Melittin 처리에 의하여 apoptosis 억제에 관여하는 Bcl-2 family 유전자중 Bcl-X_{S/L}의 mRNA 및 단백질의 발현은 감소되었으며, apoptosis 유발에 관여하는 Bax 유전자의 발현은 처리 농도 의존적으로 증가되었다.
3. Melittin 처리에 의한 A549 폐암세포의 apoptosis 유발은 IAPs의 발현 및 Akt 인산화 비의존적인 caspase-3 및 caspase-9의 활성화와 연관성이 있었다.
4. Melittin의 처리에 의한 폐암세포의 증식 억제 효과는 세포주기 조절에 중요한 역할을 하는 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현에는 큰 영향을 미치지 않았다.

이상의 결과에서 melittin에 의한 암세포의 생존을 저하는 apoptosis 조절에 중요한 유전자들의 선택적 발현 조절을 통한 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었으며, melittin은 항암제 개발 가능성이 매우 높은 물질중의 하나로서 지속적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각되어진다.

VI. 참고문헌

1. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol.* 1990 ; 136 : 593-608.
2. Evans VG. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int.* 1993 ; 17 : 461-76.
3. Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science.* 1994 ; 263 : 1143-5.
4. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997 ; 88 : 355-65.
5. Chiarugi V, Magnelli L, Basi G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res.* 1994 ; 40 : 603-12.
6. Kwon KR, Hoh HK, Kim CH. The study of the introduction of Bee venom acupuncture, biochemistry and pharmacology have been obtained the following results. *J Kor Acupuncture Moxibustion Soc.* 1994 ; 11 : 159-71.
7. Habermann E. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In *Venomous Animals and their Venoms.* Academic Press. 1971 : 3-61.
8. Assem ES, Atkinson G. Histamine release by MCDP (401), a peptide from the venom of the honey bee. *Bri Pharmacol.* 1973 ; 48 : 337-8.
9. Spoerri PE. Apamin from bee venom. *Neurobiology.* 1973 ; 3 : 207-14.
10. Sakamoto T, Repasky WT, Uchida K, Hirata A, Hirata F. Modulation of cell death pathways to apoptosis and necrosis of H₂O₂-treated rat thymocytes by lipocortin I. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 ; 220 : 643-7.
11. Saini SS, Chopra AK, Peterson JW. Melittin activates endogenous phospholipase D during cytolysis of human monocytic leukemia cells. *Toxicon.* 1999 ; 37 : 1605-19.
12. Vento R, D'Alessandro N, Giuliano M, Lauricella M, Carabillo M, Tesoriere G. Induction of apoptosis by arachidonic acid in human retinoblastoma Y79 cells: involvement of oxidative stress. *Exp Eye Res.* 2000 ; 70 : 503-17.
13. Lee JH, Jin JD, Lee SW, Han SW, Kim ST, Shin JS. The effect of bee venom and melittin herbal acupuncture solution to apoptosis in NG pretreated neuroblastoma cell line. *J Kor Acupuncture Moxibustion Soc.* 2002 ; 19 : 189-202.
14. Kwon DH, Lee JD, Choi DY. The study of anti-cancer effects of Bee venom for aqua-acupuncture. *J Kor Acupuncture Moxibustion Soc.* 2001 ; 18 : 129-45.

15. Yeo SW, Seo JC, Choi YH, Jang KJ. Induction of the growth inhibition and apoptosis by bee venom in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J Kor Acupuncture Moxibustion Soc.* 2003 ; 20 : 45-62.
16. Ahn CB, Im CW, Youn HM, Park SJ, Choi YH. Melittin-induced apoptosis is associated with inhibition of COX-2 and hTERT expression in human lung carcinoma A549 cells. *J Kor Acupuncture Moxibustion Soc.* 2003 ; 20 : 93-106.
17. Choi YH, Lee SJ, Nguyen P, Jang JS, Lee J, Wu ML, Takano E, Maki M, Henkart PA, Trepel JB. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J Biol Chem.* 1997 ; 272 : 28479-84.
18. Choi YH, Kong KR, Kim YA, Jung KO, Kil JH, Rhee SH, Park KY. Induction of Bax and activation of caspases during β -sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2003 ; 23 : 1657-61.
19. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993 ; 75 : 241-51.
20. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell.* 1993 ; 74 : 957-67.
21. Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature.* 1998 ; 391 : 496-9.
22. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995 ; 80 : 293-9.
23. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/ CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 1995 ; 81 : 801-9.
24. Fukuda K. Apoptosis-associated cleavage of β -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 ; 31 : 519-29.
25. Choi YH, Bae JH, Yoo MA, Chung HY, Kim ND, Kim KW. Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int J Oncol.* 2000 ; 17 : 565-71.
26. Myklebust JH, Blomhoff HK, Rusten LS, Stokke T, Smeland, E.B., Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.* 2002 ; 30 : 990-1000.
27. Bae SS, Perry DK, Oh YS, Choi JH, Galadari SH, Ghayur T, Ryu SH, Hannun YA, Suh PG. Proteolytic cleavage of phospholipase C-gamma during apoptosis in Molt-4 cells. *FASEB J.* 2000 ; 14 : 1083-92.
28. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 ; 3 : 401-10.

29. Holcik M, Gibson H, Korneluk RG. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis*. 2001 ; 6 : 253-61.
30. Neri LM, Borgatti P, Capitani S, Martelli AM. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim Biophys Acta*. 2002 ; 1584: 73-80.
31. Page C, Lin HJ, Jin Y, Castle VP, Nunez G, Huang M, Lin J. Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res*. 2000 ; 20 : 407-16.
32. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997 ; 91 : 231-41.
33. Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol*. 2000 ; 151 : 483-93.
34. Asselin E, Mills GB, Tsang BK. XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res*. 2001 ; 61 : 1862-8.
35. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995 ; 80 : 293-9.
36. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993 ; 75 : 805-16.
37. El-Deiry WS, Tokino T, Velculesco VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer EW, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 ; 75 : 817-25.