

# Bax 및 Cdk inhibitor p21WAF1/CIP1 발현 증가에 의한 bee venom의 A549 인체폐암세포 성장억제

최영현\*

동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 한방바이오연구센터

## Anti-proliferative Effects of Bee Venom through Induction of Bax and Cdk Inhibitor p21WAF1/CIP1 in Human Lung Carcinoma Cells

Yung Hyun Choi\*

Department of Biochemistry and Biomedical Research Center of Oriental Medicine, Dongeui University College of Oriental Medicine

To investigate the possible molecular mechanism (s) of bee venom as a candidate of anti-cancer drug, we examined the effects of the compound on the growth of human lung carcinoma cell line A549. Bee venom treatment declined the cell growth and viability of A549 cells in a concentration-dependent manner, which was associated with induction of apoptotic cell death. Bee venom down-regulated the levels of anti-apoptotic genes such as Bcl-2 and Bcl-XS/L, however, the levels of Bax, a pro-apoptotic gene, were up-regulated. Bee venom treatment induced not only tumor suppressor p53 but also cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 expression in a dose-dependent manner. Furthermore, bee venom treatment induced the down-regulation of telomerase reverse transcriptase mRNA and telomeric repeat binding factor expression of A549 cells, however, the levels of telomerase-associated protein-1 and c-myc were not affected. Taken together, these findings suggest that bee venom-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 bee venom may have therapeutic potential in human lung cancer.

Key words : Bee venom, apoptosis, Bax, p21, telomere

### 서론

Apoptosis에 의한 세포의 죽음은 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 개체의 생존을 위한 방어기전이란 점에서 necrosis와 구별된다<sup>1,2)</sup>. 즉 apoptosis는 개체 보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈이나 cyclin-dependent kinases (Cdks) 활성의 변화가 apoptotic cell death의 주원인이 될 수 있다<sup>3)</sup>. Apoptosis의 유발에 종양억제 유전자 p53이나, Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다<sup>4,5)</sup>. 따라서 최근 암세포에서의 apoptosis 조절관련 기전

해석에 기초를 둔 항암제 개발이 많은 관심을 모으고 있다.

蜂毒(Bee venom)은 꿀벌의 毒囊에 들어있는 약 40여 가지의 유효성분으로 구성된 물질로 炎症 및 알러지 등을 유발할 수도 있지만, 진통 및 소염의 효능이 탁월한 것으로 알려져 있다. 전통적으로는 蜂鍼을 직접 인체에 刺入하는 방법을 사용하였으나, 최근에는 蜂毒을 추출·가공한 후 인체의 經穴에 자입하는 蜂毒藥鍼療法(Bee venom herbal acupuncture)이 주로 활용되고 있다<sup>6-8)</sup>. 즉 蜂毒약침요법은 蜂毒을 질병과 유관한 부위나 혈위에 주입함으로써 刺鍼 효과와 蜂毒의 생화학적 특이물질이 인체에 미치는 약리작용을 동시에 이용하는 치료요법의 일종이다. 蜂毒의 성분은 크게 peptide components, non peptide components, enzymes 등으로 구성되어 있다<sup>9)</sup>. 그중 peptide components는 freeze-dried venom의 약 50%를 구성하고 있으며, 주요 성분으로는 melittin, apamin, mast cell degranulating peptide 등이 있다<sup>10,11)</sup>. 蜂毒에 관한 연구는 1990년대 이후부터 활발히 진행되고 있으며, 항암효과를 포함한 다양한 생리 및 약리 작용에 관한 기

\* 교신저자 : 최영현, 부산시 부산진구 양정동 산45-1 동의대학교 한의과대학

· E-mail : choiyh@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-7413

· 접수 : 2004/11/01 · 수정 : 2004/11/30 · 채택 : 2005/01/14

전이 점차 알려지고 있다.

최근 bee venom의 항암작용 가능성이 대두되면서 인체 망막아종세포<sup>12)</sup>, 신경아세포종<sup>13)</sup>, 흑색종세포<sup>14,15)</sup>, 유방암세포<sup>16-18)</sup>, 폐암세포<sup>19,21)</sup>, 골육종세포<sup>22)</sup> 등을 포함한 몇 가지 in vitro 세포주에서 bee venom 성분에 의한 암세포 증식의 억제기전의 연구가 수행된 바 있다. 대부분의 연구에서 bee venom 성분의 항암작용이 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되어지고 있으나 구체적인 분자생물학적 기전에 관하여 아직까지 정확하게 알려진 바는 없다. 따라서 본 연구에서는 선행연구들에 의해 관찰된 bee venom의 항암작용에 관한 추가적인 작용 기전을 조사하기 위하여 bee venom에 의한 인체 폐암세포의 생존율 저하와 연관된 apoptosis 유발에 관여하는 몇 가지 유전자 산물의 발현 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 암세포배양 및 bee venom의 처리

본 연구에 사용된 A549 인체 폐암세포는 한국생명공학연구소에서 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. Bee venom은 Sigma Chemical Co. (St. Luis, MO, USA)에서 구입하였으며, 3차 증류수에 희석하여 처리하였다.

### 2. MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

세포배양용 6 well plate에 well 당  $1 \times 10^5$ 개의 암세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 bee venom을 배지에 희석하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma) 시약을 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200  $\mu$ l씩 분주하고 3시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 100  $\mu$ l씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)으로 구하였다.

### 3. Hemacytometer를 이용한 생존율의 측정

세포배양용 6 well plate를 이용하여 well 당  $1 \times 10^5$ 개의 A549 암세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, bee venom을 적정농도로 희석하여 처리하였다. 48시간 동안 bee venom이 처리된 세포를 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 수세한 후, trypan blue (Gibco BRL)로 염색하였다. 이를 hemacytometer에 옮긴 후 위상차 현미경(x 200) 하에서 살아있는 세포의 수를 측정하여 대조군과 비교 분석하였다.

### 4. DAPI 염색을 통한 핵의 관찰

Bee venom의 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발 여부를

확인하기 위한 핵의 형태변화 관찰을 위하여 bee venom이 처리된 세포들을 PBS로 세척하고 3.7% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정시킨 후 형광 염색물질인 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 이용하여 10분간 염색하였다. 이들 세포를 다시 PBS로 2회 수세한 후 형광현미경을 이용하여 핵의 형태 변화를 정상군과 비교하였다.

### 5. Flow cytometry 분석

정상 및 bee venom이 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  $\mu$ g/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 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

### 6. 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.<sup>23)</sup>의 방법에 준하여 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2  $\mu$ g의 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
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'
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'
hTERT <sup>1</sup>	Sence	5'-AGC-CAG-TCT-CAC-CTT-CAA-CG-3'
	Antisence	5'-GTT-CTT-CCA-AAC-TTG-CTG-ATG-3'
hTEP-1 <sup>2</sup>	Sence	5'-TCA-AGC-CAA-ACC-TGA-ATC-TGA-G-3'
	Antisence	5'-CCC-CGA-GTG-AAT-CIT-TCT-ACG-C-3'
hTR <sup>3</sup>	Sence	5'-TCT-AAC-CCT-AAC-TGA-GAA-GGG-CGT-AG-3'
	Antisence	5'-GTT-TGC-TCT-AGA-ATG-AAC-GGT-GGA-AG-3'
c-myc	Sence	5'-AAG-ACT-CCA-GCG-CCT-TCT-CTC-3'
	Antisence	5'-GTT-TTC-CAA-CTC-CGG-GAT-CTG-3'
GAPDH <sup>4</sup>	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCC-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

1: telomerase reverse transcriptase, 2: telomerase associated protein, 3: telomeric repeat binding factor, 4: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

## 결 과

### 1. 폐암세포의 증식에 미치는 bee venom의 영향

준비된 bee venom을 인체 폐암세포 A549에 48시간 동안 처리한 후, MTT assay법에 준하여 bee venom 처리에 의한 폐암세포의 세포증식 억제 정도를 조사하였다. Fig. 1A에서 알 수 있듯이 저농도 처리군(2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서는 대조군에 비하여 큰 차이가 없었으나, bee venom 처리 농도가 증가될수록 흡광도는 더욱 감소되어 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서는 대조군에 비하여 60% 정도 감소되었으며, 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서 모두 10% 이하로 떨어졌다.

### 2. 폐암세포의 생존에 미치는 bee venom의 영향

다음은 폐암세포의 생존에 미치는 bee venom의 영향을 조사하기 위하여 준비된 bee venom을 적정농도로 희석하여 48시간 동안 처리한 후 살아있는 세포의 수를 계수하여 bee venom이 처리되지 않은 대조군과 비교한 결과는 Fig. 1B에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 처리된 bee venom의 농도가 증가될수록 A549 폐암세포의 생존율은 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었는데, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군의 경우 대조군에 비하여 약 17% 정도의 세포 생존율 감소가 관찰되었으며, 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군 이상에서 살아있는 세포는 빈도는 매우 감소되어 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서 생존율은 20% 이하로 나타났다. 이상의 결과에서 bee venom이 적정 농도 이상 처리된 배지에서 자란 암세포는 bee venom 처리농도 의존적으로 세포증식이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다.

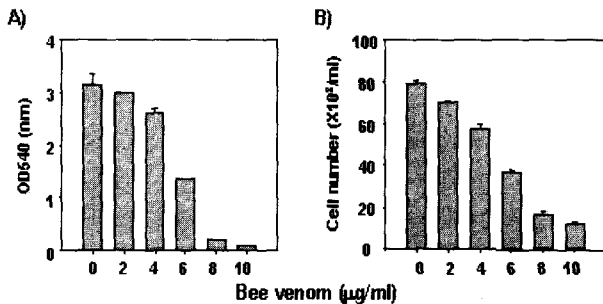


Fig. 1. Effects of bee venom on the cell growth of A549 human lung carcinoma cells. (A) Anti-proliferative effect of bee venom on the cell proliferation in A549 cells. Cells were seeded as described in materials and methods, and treated with various concentrations of bee venom. After 48 h incubation with bee venom, MTT assay was performed. Results are expressed as average from two separate experiments. (B) Inhibition of cell viability by bee venom in A549 cells. Cells were seeded as described in materials and methods, and the viable cells were counted after bee venom treatment for 48 h. Results are expressed as average from two separate experiments.

### 3. 인체 폐암세포의 형태 변형에 미치는 bee venom의 영향

Bee venom 처리에 의한 A549 폐암세포의 증식 억제와 연관된 암세포의 형태 변화 관찰을 위하여 다양한 농도 범위로 bee venom을 48시간 동안 처리한 후 위상차 현미경을 이용하여 정상 및 bee venom이 처리된 조건에서 배양된 폐암세포의 모양을 관찰하였다. Fig. 2A에서 볼 수 있듯이 bee venom의 농도 증가에 따른 세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 처리된 bee venom의 농도가 증가될수록 전체적으로 세포질이 응축되면서 배양접시의 바닥에 낚게 부착되는 듯한 모습을 보였다. 또한 세

포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분지를 이루기 시작하였고, 고농도 처리군에서는 많은 암세포들이 부착 능력이 상실되어 배지위로 부유하기 시작하였으며 배양 접시에 부착된 세포들도 심한 형태적 변이를 수반하였다.

### 4. Bee venom 처리에 의한 apoptotic body의 유도

이상의 bee venom의 처리에 따른 A549 폐암세포의 성장억제와 형태적 변형이 apoptosis 유발과 상관성이 있는지를 조사하기 위하여 핵의 형태적 변화를 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 bee venom이 처리된 배지에서 배양된 암세포를 고정시킨 후 DAPI 염색을 실시하여 형광현미경하에서 관찰한 결과는 Fig. 2B에 나타난 바와 같다. Fig. 2B에 나타난 바와 같이 bee venom이 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 bee venom이 처리된 암세포의 경우, 염색질 응축에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 bee venom 처리 농도 의존적으로 증가되었다.

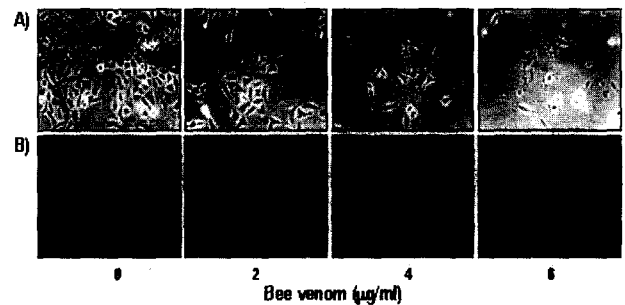


Fig. 2. Morphological changes in A549 human lung carcinoma cells following incubation with bee venom. (A) Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or bee venom for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200. (B) Induction of apoptotic bodies by bee venom treatment in A549 cells. Cells were treated with bee venom for 48 h, and fixed and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

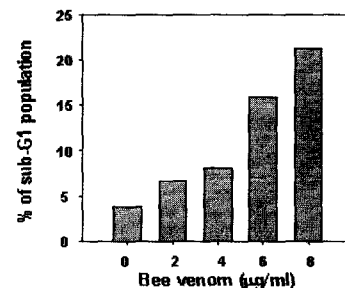


Fig. 3. Increased sub-G1 population by bee venom treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with bee venom for 48 h and then analyzed by flow cytometry as described in materials and methods. Results are expressed as average from two separate experiments.

### 5. Bee venom 처리에 의한 sub-G1기 세포의 증가

다음은 bee venom 처리에 따른 A549 폐암세포의 apoptosis 유발 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 flow cytometry에 의한 세포주기의 sub-G1기에 해당하는 세포군의 빈도를 조사하였다. Fig. 3의 결과에 나타내었듯이 저농도 처리군(2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서는 apoptosis에 의한 암세포의 사멸을 의미하는

sub-G1기에 해당하는 세포가 10% 미만이었으나, 6  $\mu\text{g/ml}$  및 8  $\mu\text{g/ml}$  처리군에서는 대조군(4.2%)에 비하여 약 4배 및 6배 이상 증가되어 sub-G1기에 해당하는 세포군의 빈도가 bee venom 처리 농도 의존적으로 매우 증가하였다.

6. Bcl-2 family의 발현에 미치는 bee venom의 영향

상기의 결과들에서 알 수 있듯이 bee venom이 함유된 배지에서 자란 폐암세포의 성장 억제에는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 bee venom의 처리에 의한 암세포의 성장억제 및 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 먼저 Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 유전자 발현의 정도에 미치는 bee venom의 영향을 RT-PCR법으로 조사하였다. Fig. 4A에 나타난 바와 같이, apoptosis 유도에 관여하는 Bax의 발현은 bee venom 처리 농도 의존적으로 매우 증가한 반면, apoptosis 유발 억제에 관여하는 Bcl-2 member의 Bcl-2 및 Bcl-X<sub>L</sub>/L의 발현은 bee venom의 처리에 따라 점차 감소하였다.

7. p53 및 p21WAF1/CIP1의 발현에 미치는 bee venom의 영향

다음은 bee venom 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 조사하였다. Fig. 4B의 RT-PCR 결과에서 볼 수 있듯이 bee venom의 처리에 따라 조사된 두 가지 유전자의 발현이 bee venom 처리 농도 의존적으로 매우 강하게 증가되었다.

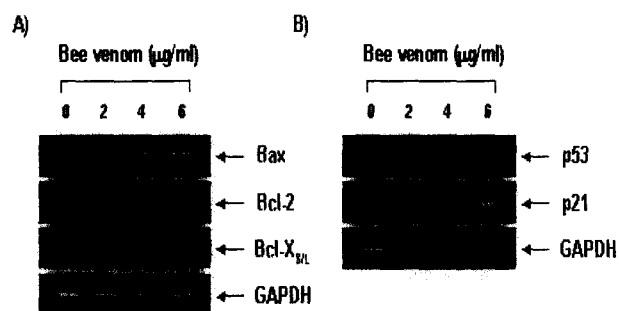


Fig. 4. Up-regulation of Bax and p21 expression by bee venom in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with bee venom for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using Bax, Bcl-X<sub>S</sub>/L, Bcl-2, p53 and p21 primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

8. Telomere 조절관련 인자들의 발현에 미치는 bee venom의 영향

다음은 bee venom의 처리에 의한 염색체의 말단에 존재하는 telomere의 조절과 관련이 있는 유전자의 발현에 미치는 bee venom의 영향을 조사하였다. Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이 bee venom의 처리에 의하여 hTERT 및 hTR 유전자의 전사수준이 bee venom 처리 농도 의존적으로 다소 감소되었으나, 또 다른 조절인자인 hTEP-1 및 hTERT의 전사조절에 중요한 역할을 하는 c-myc의 발현에는 큰 영향이 없었다.

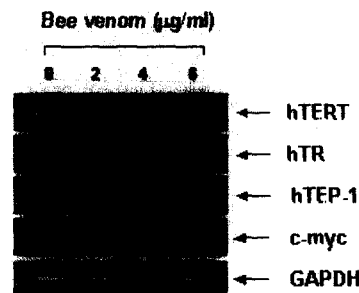


Fig. 5. Effects of bee venom on the levels of telomere-regulatory genes expression in A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with various concentrations of bee venom. After 48 h incubation, total RNAs were isolated, and RT-PCR was performed using indicated primers. The amplified PCR products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

고찰

A549 인체 폐암세포의 성장에 미치는 bee venom의 영향을 조사하기 위하여 48시간 동안 다양한 농도의 bee venom이 함유된 배지에서 자란 암세포의 증식 및 생존율을 조사하였다. Fig. 1의 결과에서 알 수 있듯이 정상 배지에서 자란 암세포에 비하여 bee venom이 함유된 배지에서 자란 암세포는 bee venom 첨가 농도 의존적으로 성장이 억제되었으며, 생존율도 감소하였다. 이는 암세포의 심한 형태적 변형과 관련이 있었으며 전형적인 apoptosis 유발시 관찰되는 chromatin condensation에 의한 apoptotic body의 출현도 bee venom 처리 농도 의존적으로 증가되었다(Fig. 2). 그리고 flow cytometry 분석에 의한 apoptosis 유발 세포군에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도 역시 bee venom 처리 농도 의존적으로 증가되어 bee venom 처리에 따른 암세포의 증식 억제는 apoptosis 유발과 직접적인 연관이 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). 최근 Jang et al.<sup>19)</sup>은 인체 폐암세포 NCI-H1299의 성장에 미치는 bee venom의 영향을 조사한 바 있는데, 그들의 MTT assay 결과에 의하면 10  $\mu\text{g/ml}$  bee venom 48 시간 처리에 의하여 대조군에 비하여 약 66% 성장 억제를 보인 바 있다. 즉 본 연구에서 얻어진 결과보다 다소 낮은 증식억제 경향성이 있었지만 각각의 실험에 사용된 bee venom의 종류 및 세포주에서 다소의 차이가 있으므로 직접적인 결과 비교는 어려우나, bee venom 처리에 따른 폐암세포의 증식억제 효과, 암세포의 심한 형태적 변형 및 apoptosis 유발에는 유사한 경향성이 있음을 알 수 있었다. 역시 bee venom의 종류 및 처리 시간의 차이점은 있었지만, 골육종세포주 MG-63 및 흑색세포종 SK-MEL-2에서도 bee venom의 효과는 상기의 결과들과 유사한 경향성이었음을 알 수 있었다<sup>15,22)</sup>.

다음은 bee venom의 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<sup>4,5,24)</sup>. 이들은 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제 유전자인 p53, cysteine-related protease인

caspase, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다<sup>5,24-26</sup>). 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>4,5,25</sup>). Fig. 4A는 다양한 농도의 bee venom이 함유된 배지에서 배양된 암세포를 대상으로 mRNA 전사수준을 RT-PCR법으로 조사한 결과로서, 조사된 유전자 중 apoptosis 억제에 관여하는 Bcl-2의 발현은 bee venom의 처리에 따라 매우 감소되었으나 Bcl-XS/L mRNA 발현은 bee venom 처리에 따라 큰 변화는 없었다. 그러나 apoptosis 유발에 관여하는 Bax의 경우는 bee venom의 처리 농도 증가에 따라 발현이 매우 증가됨을 알 수 있었다. 즉 A549 폐암세포에서 bee venom 처리에 의한 apoptosis 유발에는 apoptosis 억제 유전자의 발현 감소 및 apoptosis 유발 유전자 발현의 증가와 관련이 있음을 알 수 있었다. 이는 Jang et al.<sup>19</sup>)에 의한 NCI-H1299 폐암세포에서도 유사하게 관찰된 현상이었으며, 인체 MCF-7 유방암세포에서 bee venom에 의한 apoptosis의 유발 과정에서 관찰된 경우와 매우 유사한 결과였다<sup>18</sup>). 그리고 bee venom의 주성분 중 하나인 melittin에 의한 A549 폐암세포의 apoptosis 유발에서도 Bax의 발현 증가 및 Bcl-XS/L 발현의 감소 현상을 선행연구에서 관찰한 바 있다<sup>21</sup>).

다음은 bee venom의 처리에 의한 폐암세포의 생존을 저하가 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 부가적으로 조사하기 위하여 현재까지 알려진 종양억제 유전자 중 가장 중요한 p53 및 세포주기의 G1기에서 S기로 전이에 중요한 역할을 하는 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 bee venom의 영향을 조사하였다. Fig. 4B의 결과에서 볼 수 있듯이 p53 및 p21 두 유전자의 발현은 bee venom의 처리에 따라 모두 증가하였음을 알 수 있었다. Cdk inhibitor인 p21은 p53의 발현 증가에 의하여 전사 수준이 조절될 수 있으며<sup>27,29</sup>), 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자란 점에서 bee venom의 처리에 의하여 두 유전자가 동시에 발현이 증가되었다는 점은 매우 흥미로운 결과라고 사료된다. 그러나 동일 세포주에서 melittin의 처리에 의해서는 두 유전자의 발현 변화가 관찰되지 않았던 점<sup>21</sup>)은 bee venom의 성분 중에서 p53 및 p21의 발현 조절과 관련이 있는 다른 유효성분의 존재 가능성도 있다고 추정할 수 있다. 그러나 인체 유방암 MCF-7 세포에서는 bee venom 처리에 의한 암세포 성장 억제에서 상기 두 유전자의 발현이 매우 증가되었다는 점<sup>18</sup>)과 비교해 볼 때, bee venom에 의한 폐암세포의 세포주기 교란에 관한 명확한 증거 제시를 위하여 세포주기 분석과 관련 유전자들의 활성 조사 등을 통한 후속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

한편 telomere는 염색체의 말단 부위에 repeat sequences [(TTAGGG)<sub>n</sub>]로 이루어져 있으며, 이런 반복구조의 형성 및 유지에 관여하는 효소가 telomerase이다<sup>30-32</sup>). 정상 체세포에서는 telomerase의 활성이 없기 때문에 세포가 분열할수록 telomere의 길이는 짧아지게 되지만, 암세포의 90% 이상에서는 telomerase의 catalytic subunit 단백질을 coding하는 hTERT가 과발현되어 있고 이로 인한 높은 telomerase의 활성을 나타내고 있다. 따라

서 노화, 혈관신생 및 면역계질환 등에서 뿐 만 아니라 암의 발생과 진행도 이들과 밀접한 연관성이 있으며, 암의 진단과 진행의 정도를 나타내는 지표로 사용될 수 있음을 시사하여 준다<sup>30-32</sup>). 특히 암과 연관된 부분에서 telomerase의 활성은 hTERT 유전자의 발현 조절에 의한 것이고, hTERT 유전자의 promoter 부위에는 다른 유전자의 promoter 보다 훨씬 더 많은 전사조절인자의 결합부위를 보유하고 있다<sup>30,32</sup>). 이러한 중요성을 고려하여 bee venom의 처리에 의한 폐암세포의 증식 억제에 폐암세포 염색체 말단에 존재하는 telomere의 조절과 어떤 관계가 있는지를 조사하였다. Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이 bee venom의 처리에 의하여 hTERT 및 hTR 유전자의 전사수준이 매우 유의적으로 감소되었으나, 또 다른 조절인자인 hTERT-1 및 hTERT의 발현 조절에 중요한 인자에 해당하는 c-myc의 발현은 bee venom의 처리에 의하여 큰 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 동일 A549 세포에서 melittin의 처리에 의해서는 hTERT의 발현 감소에 따라 c-myc의 발현 역시 매우 크게 감소되었다는 점<sup>20</sup>)을 고려하면 이들과 연관된 bee venom의 성분에 따른 구체적인 연구가 더욱 절실히 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 bee venom에 의한 인체 폐암세포의 증식 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었으며, apoptosis 유발에는 Bcl-2 유전자의 발현 감소 및 Bax 유전자의 상대적인 발현 증가와 직접적인 연관성이 있음을 관찰할 수 있었다. 그리고 세포의 성장 조절에 중요한 역할을 하는 p53 및 p21의 발현 증가 및 telomere의 길이 조절과 관련이 있는 유전자의 발현 교란 역시 bee venom에 의한 암세포의 성장억제와 어느 정도 관련이 있는 것으로 추정되어진다. 그러나 본 연구의 결과만으로 bee venom의 항암작용 여부를 직접적으로 논하기에는 매우 어렵기 때문에 다양한 추가적인 실험이 필수적으로 수행되어야 할 것이며 본 연구의 결과는 향후 수행될 추가 실험을 위한 기초 자료로서 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

최근 항암제로서의 사용 가능성이 제시되고 있는 bee venom의 암세포 성장억제 기전을 해석하기 위하여 인체 폐암세포 A549 세포주를 대상으로 조사하였다. 그 결과 bee venom 처리 농도 의존적으로 A549 폐암세포의 생존율은 현저하게 감소되었으며, 이는 apoptosis 유발과 연관성이 있었다. 그리고 bee venom 처리에 의하여 apoptosis 억제에 관여하는 Bcl-2 및 Bcl-XS/L의 발현은 다소 감소되었으며, apoptosis 유발에 관여하는 Bax 유전자의 발현은 처리 농도 의존적으로 매우 증가되었다. 또한 bee venom 처리에 의한 A549 폐암세포의 apoptosis 유발과 연관된 암세포의 성장억제에는 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현 증가와 연관성이 있었다. Bee venom의 처리에 의하여 염색체 말단 telomere의 길이 조절에 중요한 역할을 하는 telomerase reverse transcriptase와 telomeric repeat binding factor의 발현은 감소하였으나 telomerase-associated protein-1 및 c-myc의 발현에는 영향을 주지 않았다. 이상의 결과

에서 bee venom에 의한 암세포의 생존을 저하는 apoptosis 조절에 중요한 유전자들의 선택적 발현 조절을 통한 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었으며, bee venom 함유성분은 항암제로서의 개발 가능성이 매우 높은 것으로 사료되며 지속적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각되어진다.

## 참고문헌

1. Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H., Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608, 1990.
2. Evans, V.G., Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* 17, 461-476, 1993.
3. Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W., Greenberg, A.H., Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 263, 1143-1145, 1994.
4. Nagata, S., Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365, 1997.
5. Chiarugi, V., Magnelli, L., Basi, G., Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 603-612, 1994.
6. 김문호. 봉독요법과 봉침요법. 서울: 한국교육기획, 1992, 95-103.
7. 이재동, 봉독요법-임상활용방법을 중심으로, 대한한의학회지, 21, 3-8, 2000.
8. Kwon, K.R., Hoh, H.K., Kim, C.H., The study of the introduction of bee venom acupuncture, biochemistry and pharmacology have been obtained the following results. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* 11, 159-171, 1994.
9. Habermann, E., Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In *Venomous Animals and their Venoms*. Academic Press. 1971:3-61.
10. Assem, E.S., Atkinson, G., Histamine release by MCDP (401), a peptide from the venom of the honey bee. *Bri. Pharmacol.* 48, 337-338, 1973.
11. Spoerri, P.E., Apamin from bee venom. *Neurobiology* 3, 207-214, 1973.
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.* 70, 503-517, 2000.
13. Lee, J.H., Jin, J.D., Lee, S.W., Han, S.W., Kim, S.T., Shin, J.S., The effect of bee venom and melittin herbal acupuncture solution to apoptosis in NG pretreated neuroblastoma cell line. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* 19, 189-202, 2000.
14. Kwon, D.H., Lee, J.D., Choi, D.Y., The study of anti-cancer effects of Bee venom for aqua-acupuncture. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* 18, 129-145, 2001.
15. Park, C.Y., Nam, S.S., Kim, C.H., Lee, J.D., Kang, S.K., Lee, Y.H., Ahn, B.C., Molecular biological study of anti-cancer effects of bee venom on human melanoma cell. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* 17, 169-186, 2000.
16. Martikainen, P., Nyman, K., Nevalainen, T.J., Toxic effects of human pancreatic and snake and bee venom phospholipases A2 on MCF-7 cells in culture. *Toxicon* 31, 835-843, 1993.
17. Orsolich, N., Sver, L., Verstovsek, S., Terzic, S., Basic, I., Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicon* 41, 861-870, 2003.
18. Yeo, S.W., Seo, J.C., Choi, Y.H., Jang, K.J., Induction of the growth inhibition and apoptosis by bee venom in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* 20, 45-62, 2003.
19. Jang, M.H., Shin, M.C., Lim, S., Han, S.M., Park, H.J., Shin, I., Lee, J.S., Kim, K.A., Kim, E.H., Kim, C.J., Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. *J. Pharmacol.* 91, 95-104, 2003.
20. Ahn, C.B., Im, C.W., Youn, H.M., Park, S.J., Choi, Y.H., Melittin-induced apoptosis is associated with inhibition of COX-2 and hTERT expression in human lung carcinoma A549 cells. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* 20, 93-106, 2003.
21. Ahn, C.B., Im, C.W., Kim, C.H., Youn, H.M., Jang, K.J., Song, C.H., Choi, Y.H., Apoptotic cell Death by melittin through induction of Bax and activation of caspase proteases in human lung carcinoma cells. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* 21, 41-55, 2004.
22. Hwang, D.Y., Kim, H.H., Kim, C.J., Kim, E.H., Bee venom induces apoptosis and inhibits COX-2 in human osteosarcoma cell line MG-63. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* 20, 63-74, 2003.
23. Choi, Y.H., Kong, K.R., Kim, Y.A., Jung, K.O., Kil, J.H., Rhee, S.H., Park, K.Y., Induction of Bax and activation of caspases during  $\beta$ -sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* 23, 1657-1661, 2003.
24. Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251, 1993.
25. Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E., p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957-967, 1993.
26. 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* 391, 496-499, 1998.
27. Miyashita, T., Reed, J.C., Tumor suppressor p53 is a direct

- transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299, 1995.
28. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J., The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816, 1993.
29. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculesco, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, E.W., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825, 1993.
30. Kyo, S. and Inoue, M., Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy. *Oncogene* 21, 688-697, 2002.
31. Poole, J.C., Andrews, L.G. and Tollefsbol, T.O., Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 269, 1-12, 2001.
32. Cerni, C., Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat. Res.* 462, 31-47, 2000.