

원저

전립선 암세포에 대한 蜂藥鍼液 및 Melittin 藥鍼液의 抗癌 機轉 研究

김경태 · 송호섭

경원대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Study of Anti-cancer Mechanism with Bee Venom and Melittin on Human Prostatic Cancer Cell

Kim Kyung-tae and Song Ho-Sueb

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

Objectives : The purpose of this study was to investigate the anti-cancer effect of Bee Venom and Melittin on the prostatic cancer cell(PC-3). The goal of study is to ascertain whether Bee Venom and Melittin inhibits the cell growth and cell cycle of PC-3, or the expression of relative genes and whether the regression of PC-3 cell growth is due to cell death or the expression of gene related to apoptosis.

Methods : After the treatment of Pc-3 cells with Bee Venom and Melittin, we performed Fluorescence microscope, MTT assay, Western blotting, Flow cytometry, PAGE electrophoresis and Surface plasmon resonance analysis to identify the cell viability, apoptosis and gene related to apoptosis.

Results : 1. Compared with Control cell, the inhibition of cell growth reduced in proportion with the dose of Bee Venom or Melittin(0~10 μ g/ml) in PC-3.

2. In PC-3, Cell viabilities of Bee Venom or Melittin treatment was decreased significantly.

3. The nuclei of Control cells were stained round and homogenous in DAPI staining, but those of PC-3 were stained condense and splitted.

4. In PC-3, apoptosis of Bee Venom or Melittin treatment was increased significantly.

5. Bax, Caspase-3 and PARP of Bee Venom or Melittin treatment was increased significantly and Bcl-2 of Bee Venom or Melittin treatment was decreased significantly. Caspase-9 of Bee venom treatment was increased significantly.

· 접수 : 2005년 9월 10일 · 수정 : 2005년 11월 18일 · 채택 : 2005년 11월 18일
· 교신저자 : 송호섭, 서울시 송파구 송파동 20-8 경원대학교 부속한방병원 침구과
Tel. 02-425-3456 E-mail : hssong70@kyungwon.ac.kr

Conclusion : These results indicate that Bee Venom and Melittin inhibits the growth of prostate cancer cells, has anti-cancer effects by inducing apoptosis. We wish that the anti-cancer effects of Bee Venom and Melittin are used to clinical cancer treatment.

Key words : Bee Venom, Melittin, Human prostatic cancer cell

I. 緒 論

전립선암은 전립선에서 발생하는 악성종양으로, 1995년에 남성암의 1.8 %였지만 2002년에는 3.0 %로 증가추세가 다른 암과 비교하여 가장 높은 암이다¹⁾.

전립선암의 증상은 배뇨 장애, 다뇨, 완전노저류, 복통, 둔통, 혈뇨 등이며, 기계적 폐쇄가 없이 배뇨 장애, 다뇨, 혹은 배뇨곤란을 보이는 40세 이상의 환자에서는 전립선 암을 의심해 볼 수 있다²⁾.

우리나라에서 전립선암의 발병율은 증가하는 추세이고, 선진국화된 식이 습관 등으로 인하여 더욱 높은 증가율이 예상되므로 전립선암의 발병과 치료에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

前立腺 癌細胞에 대한 연구에서 김³⁾과 이⁴⁾는 托裏消毒飲 抽出物이, 김⁵⁾과 황⁶⁾은 敗醬 抽出物이, 김⁷⁾과 강⁸⁾은 白芍藥 抽出物이 전립선암세포의 세포고사를 유도함을 보고하였다.

또한, 최근에 독성이 있는 천연 peptide가 암 세포의 세포사멸(apoptosis)과 분화에 미치는 영향에 대한 연구보고가 있는데⁹⁻¹¹⁾, 채¹²⁾는 cobrotoxin이 전립선암세포의 성장을 억제하고, 세포사멸을 유도하여 항암 효과가 있음을 발표하였다. 蜂毒의 항암효과에 대한 연구에서 Allen DH 등¹³⁾이 봉독의 성분 중 Apamin이 cancer cell을 억제하는데 상관이 있다고 보고하였다.

이에 연구자는 전립선암세포인 PC-3 cell의 세포 성장을 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液이 억제하는지와 이러한 성장억제의 기전이 세포괴사인지 apoptosis 관련유전자 발현과 상관성이 있는지를 살펴보고자 하였다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 시약

細胞培養과 western blotting 試藥은 연구용에 적합한 것들을 사용하였다.

2) 기기

Liquid scintillation counter(model LS 3801, USA), Luminometer(LB 69P WinGlow, Germany), Image analyser(Mitsubishi electric Co., Japan), Gel dryer (Model 583 Gel dryer, CA USA), Spectrometry(Spectra MAX plus, CA USA), ELISA(Sunrise, Austria), Centrifuge(HA-1000-3, KOREA), CO² incubator(MC O-17AIC, JAPAN)이다.

2. 방법

1) 시료 조제

Bee Venom(BV) 및 Melittin은 3차 증류수로 희석하여 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5 및 10 μ g/ml 농도로 나누어 사용하였다.

2) 세포주 배양

PC-3를 2 \times 10⁵cells로 penicillin(100U/ml), streptomycin (100mg/ml) 및 10% heat inactivated FBS가 포함된 DMEM 배지에 배양하였다. 37 $^{\circ}$ C CO₂ incubator 에서 24-48시간 배양하면서 약물처리 후 사용하였다.

3) 군 분류

(1) 대조군(Control Group)

대조군은 PC-3에 아무 처리도 하지 않았다.

(2) 실험군(Treatment Group)

실험군은 PC-3 BV 또는 melittin 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 및 10 μ g/ml를 각각 처리하였다.

4) MTT Assay를 이용한 세포생존실험

MTT [tetrazolium salt 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]는 세포내로 흡수된 후, 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 formazan을 형성하는데 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하므로 세포의 생존율을 측정하는 방법으로 이용되고 있다. 96 well plate에 1×10^5 cells/ml의 세포를 $100 \mu\text{l}$ 씩 파종하여, 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 각 well당 새로운 배지 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣어준 후 MTT(thiazolyl blue, SIGMA Co.)를 2.0 mg/ml 의 농도로 준비하여 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 3시간에서 4시간 동안 반응을 시켰다. 각 well당 시험물질 $220 \mu\text{l}$ 를 제거하고 보라색물질 $30 \mu\text{l}$ 만 남긴 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 $150 \mu\text{l}$ 첨가하여 microplate mixer상에서 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후 ELISA plate reader에서 540 nm 흡광도로 optical density(O.D.)값을 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정한 값을 산출하였다(Propobitum iodide staining 방법에 의하여 실시함).

5) Apoptosis staining

세포를 60 mm dish에 2.0×10^5 cells/ml 로 24hr 37°C , 5% CO_2 배양기에서 배양후 세포를 수확하여 800 rpm 에서 5분간 원심분리 후 상등액을 버리고 $0.5 \sim 1 \text{ cm} \times 15 \text{ ml}$ cone tube에 넣은 후 hypotonic solution(75 mM KCl)을 가하고 재차 800 rpm 에서 5분간 원심분리 후 상등액을 버리고 Glacial acetic acid :Me-ethanol(1 : 3)으로 두 번 고정한다. 그 후 fixer 5 ml 씩 넣어주고 다시 800 rpm 에서 5분간 원심분리 후 Slide 위에 $200 \sim 300 \mu\text{l}$ 정도로 slide 2~3개 정도에 나누어 건조시킨다. 이 slide 위에 DAPI staining solution $15 \mu\text{l}$ 를 관찰하고자하는 부분에 떨어뜨리고 cover glass를 씌워준다. 20분간 암실에서 노출시킨 후 형광현미경으로 관찰한다.

6) Bee Venom 또는 Melittin이 세포사 및 세포주기 단백질 발현에 미치는 영향

Western blotting을 이용하여 發色 정도를 분석하고, 현상한 film의 구획을 정한 후 光學濃度計를 이용하여 相對濃度를 각각 측정 비교하였다.

(1) 시료준비 및 정량측정

원하는 물질의 처리가 끝나면 scraper로 세포를 모으고, 모은 세포를 담겨있던 배지와 함께 1000 rpm 에서 원심분리 하여 상등액을 버린 뒤 2 ml 의 cold

PBS로 두 번 세척하였다. 여기에 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% Sodium Azide, 0.2% SDS, PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) $100 \mu\text{g/ml}$, Aprotinin $50 \mu\text{l/ml}$, Igapal 630 (또는 NP-40) 1% , NaF 100 mM , Sodium Deoxychoate 0.5% , EDTA(Ethylendiamineetraacetic acid--Sigma E-4884) 0.5 mM , EGTA [Ethylene glycol-bis(β -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid--sigma E-4378] 0.1 mM 로 조성된 Lysis Buffer를 $50 \sim 100 \mu\text{l}$ 를 가해 잘 vortex한 뒤 2시간 동안 4°C 에서 용해시켰다. 반응이 끝나면 시료를 1.5 ml tube에 담아 30 초 동안 vortex 하고 4°C $23,000 \text{ g}$ 에서 1시간 동안 원심분리 하였다. 원심분리 한 상등액만 취하였다. 최종추출물의 단백질양은 Bio-rad protein assay kit를 사용하여 측정하였다. 단백질양의 측정방법은 다음과 같았다. 1.46 mg/ml bovine plasma gamma globulin stock standard를 샘플에 사용한 희석용액으로 희석하여 신선한 단백질 standard를 준비하였다(standard 희석배수 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5 mg/ml). 단백질 표준품과 준비한 시료를 각각 $10 \mu\text{l}$ 씩 96 well microplate에 넣고 단백질 정량을 위하여 Bio-rad protein dye reagent를 $200 \mu\text{l}$ 씩 혼합하여 5분 동안 반응시킨 후 ELISA plate reader에서 595 nm 로 흡광도를 측정하여 표준품에 대한 정량곡선에 대입하여 시료의 단백질 정량 값을 산출하였다.

(2) Electrophoresis 및 transfer

정량이 된 단백질에 Lysis Buffer와 60 mM Tris pH 6.8, 25% Glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue로 조성된 $5 \times$ sample buffer를 섞어 protein 양을 같게 한 후 100°C heat block에서 5분 동안 boiling 한 후, 잠깐 동안 원심분리 하여 시료를 모았다. Separating gel(12%)은 4 ml 의 polyacrylamide:bis ($30\% : 0.8\%$ w/v)와 6.9 ml 의 증류수 그리고 3.8 ml 의 1.5 M Tris, pH 8.8과 10% SDS $150 \mu\text{l}$ 을 혼합한 용액에 시험당 일 제조된 10% (w/v) ammonium persulfate $150 \mu\text{l}$ 와 TEMED $10 \mu\text{l}$ 를 부가 혼합하여 만든 다음, 깨끗이 세척하여 조립된 전기영동 유리판에 용액을 부어

gel를 형성하였다. Stacking gel(5%)은 670 μ l의 polyacrylamide:bis(30% : 0.8% w/v)와 2.2ml의 증류수 그리고 1.0ml의 1.5 M Tris, pH 6.8과 10% SDS 40 μ l을 혼합한 용액에 시험당일 제조된 10%(w/v) ammonium persulfate 65 μ l와 TEMED 6.5 μ l를 부가 혼합하여 separating gel 위에 부어 완전한 gel을 형성하였다. 전기영동 Running buffer는 Tris base 30.3g, Glycine 144g, SDS 10g을 1l에 녹여 10 \times stock을 만들었다. 정량한 단백질을 10-20 μ l를 loading 하고 50~80volt로 약 20 분간 running하고 stacking gel의 전개가 끝나면 100~120volt로 separating gel을 약 2시간 정도 전개시킨 후 transfer하였다. Transfer buffer의 조성은 1l에 Tris base 3.03g, Glycine 14.63g, Methanol 200ml으로 만들어서 Nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell, 0.45 μ m)로 실온에서 80volt로 1시간 10분간 transfer하였다. Transfer가 끝난 gel은 staining solution (Coomassie Blue staining slon) 용액에 2 시간 담가 둔 후 destaining 용액으로 넘겨 남은 protein을 확인하였고, transfer된 membrane은 0.05% Tween-20, 150mM NaCl, 10mM Tris, pH 8.0으로 조성된 TBS-T 용액으로 washing한 후 약간 물기를 제거하고, TBS-T 용액으로 희석한 약 5% skim milk로 약 2시간 정도 blocking한 후 TBS-T 용액으로 여러 번 세척하였다.

(3) Western Blotting 및 ECL Detection

TBS-T 용액으로 희석한 3% skim milk에 1차 항체를 권장농도로 약 200~1,000배 희석하여 만든 용액에 blocking된 membrane을 담가두어 실온에서 2시간 정도 반응시킨 후, TBS-T 용액으로 10분마다 새로운 TBS-T 용액으로 갈아주면서 1시간 동안

세척하였다. Peroxydase가 부착되어 있으며 1차 항체와 반응하기에 적합한 2차 항체를 권장농도로 약 1,000~2,000배 희석하여 1차 항체와 결합한 membrane을 반응시킨 후 실온에서 1시간 정도 반응시키고, TBS-T 용액으로 10분간 3~5번 세척하였다. 편평한 판에 미리 wrap을 씌워 놓고, membrane의 물기를 제거한 후 판 위에 올렸다. ECL 용액 1(black), 2(white)를 1 : 1로 잘 섞어 membrane에 뿌려, 끌고 루 용액을 묻히고 1분 정도 반응시킨 후 ECL 용액을 충분히 제거하고, 그 위에 wrap을 씌웠다. Film을 cassette에 올려놓고 membrane이 고정된 판을 일정 시간 film에 찍은 다음 developer에 담갔다. 어느 정도 film에 band가 나타나면 fixer로 옮겨 끌고 루 고정이 잘 되도록 흔들어주며 고정시켰다. 고정이 끝나면 흐르는 물로 깨끗이 씻어 건조시키고 관찰하였다.

7) 통계 처리

모든 실험값은 평균값 \pm 표준편차로 하였고, 통계학적 분석은 sigma state program (SPSS, USA)을 이용하였다. 통계학적 유의성은 ANOVA test 후 대조군과 실험군의 비교는 tukey test에 의해 $P < 0.05$ 인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

III. 結 果

1. PC-3에서 蜂藥鍼液에 의한 세포 성장의 변화 관찰

1) 세포 형태적 분석

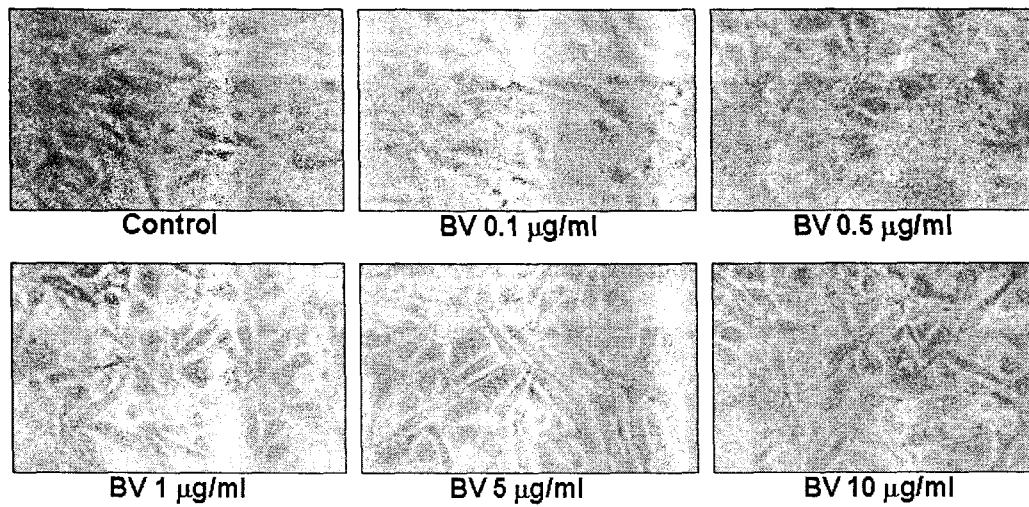


Fig. 1. Morphological observation of PC-3 cells compared with Control cell, the inhibition of cell growth reduced in proportion with the dose of Bee Venom in PC-3 cells
Representative photography of five separated experiments with duplicates

2) 세포 생존력 측정(Cell viability assay)

(1) MTT assay

Table 1. Cell viability of PC-3 cells after treatment with Bee Venom

Group	Cell Viability (%)			
	0hr	24hr	48hr	72hr
Control	100±1	100±1	100±7	100±8
BV 0.1µg/ml	89±6	91±8	84±7	79±4
BV 0.5µg/ml	89±7	83±9	76±6	71±2*
BV 1µg/ml	91±1	76±1	71±7*	66±1*
BV 5µg/ml	92±4	64±5*	61±1*	55±3*
BV 10µg/ml	89±7	54±2*	51±2*	48±4*

BV 0.1, BV 0.5, BV 1, BV 5 and BV 10 showed 0.1, 0.5, 1, 5, and 10 µg/ml of Bee Venom

Values are mean±SD of three experiment with triplicates

*: p<0.05, statistical significance compared with control

2. PC-3에서 Melittin 藥鍼液에 의한 세포 성장의 변화 관찰

1) 세포 형태적 분석

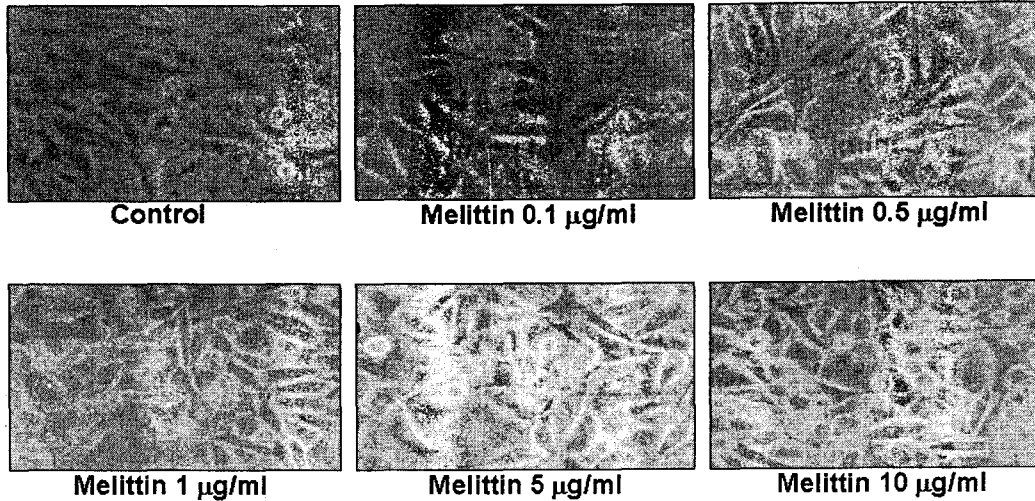


Fig. 2. Morphological observation of PC-3 cells compared with Control cell, the inhibition of cell growth reduced in proportion with the dose of Melittin in PC-3 cells
Representative photography of five separated experiments with duplicates.

2) 세포 생존력 측정 (Cell viability assay)

(1) MTT assay

Table 2. Cell viability of PC-3 cells after treatment with Melittin

Group	Cell Viability (%)			
	0hr	24hr	48hr	72hr
Control	100±6	100±4	100±3	100±6
Me 0.1µg/ml	92±7	93±6	84±7	81±8
Me 0.5µg/ml	93±1	86±1	82±7	77±6*
Me 1µg/ml	84±1	74±4*	70±6*	67±1*
Me 5µg/ml	88±4	65±5*	59±7*	53±4*
Me 10µg/ml	92±3	60±3*	59±1*	52±3*

Me 0.1, Me 0.5, Me 1, Me 5 and Me 10 showed 0.1, 0.5, 1, 5, and 10 µg/ml of Melittin

Values are mean±SD of three experiment with triplicates

*: p<0.05, statistical significance compared with control

3. PC-3에서 蜂藥鍼液에 의한 apoptosis 관찰

1) 세포 형태적 분석

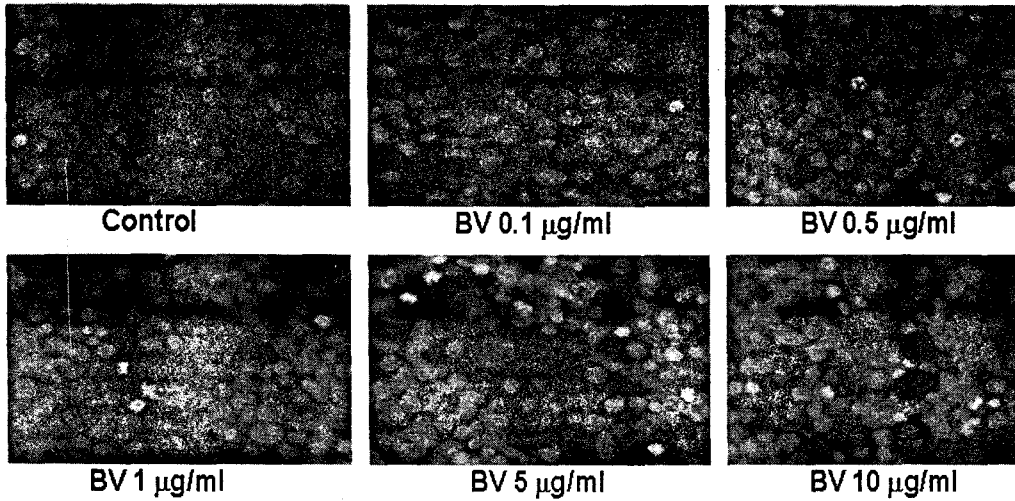


Fig. 3. Morphological observation of PC-3 cells after treatment with Bee Venom
Representative photography of five separated experiments with duplicates

2) 세포 사멸 염색(Apoptosis staining)

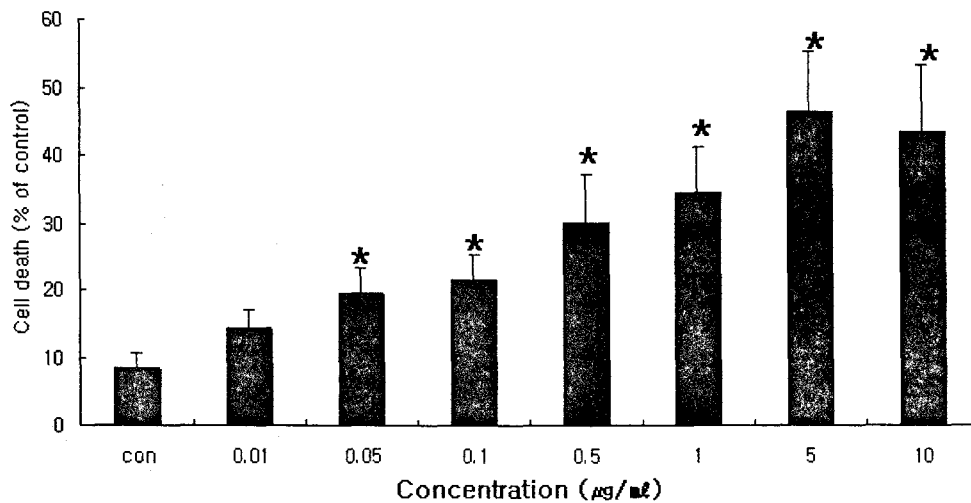


Fig. 4. Apoptotic cell death in PC-3 cells treated with Bee Venom
Cells were treated with various doses of Bee Venom for 24 hr
Data were expressed from two experiments with triplicates
*: $p < 0.05$, statistical significance compared with control

4. PC-3에서 Melittin 藥鍼液에 의한 apoptosis 관찰

1) 세포 형태적 분석

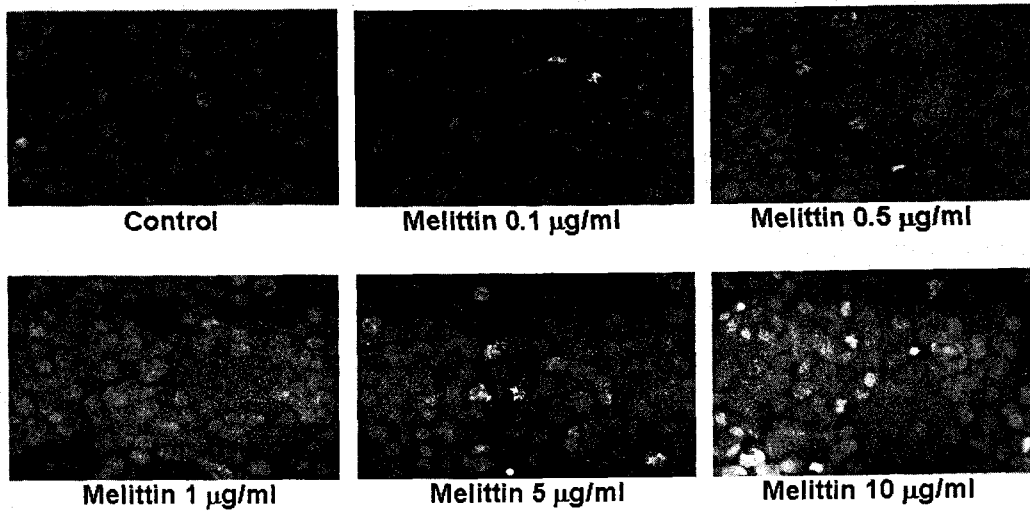


Fig. 5. Morphological observation of PC-3 cells after treatment with Melittin
Representative photography of six separated experiments with duplicates

2) 세포 사멸 염색(Apoptosis staining)

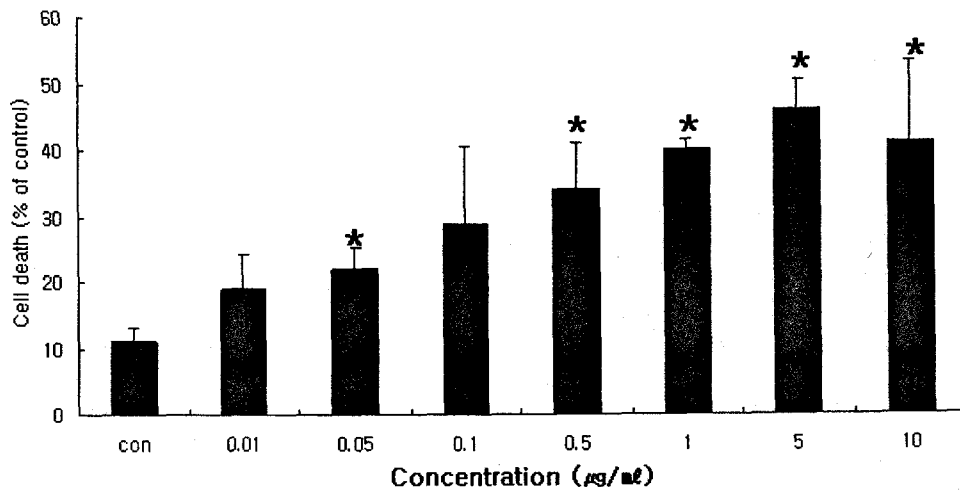


Fig. 6. Apoptotic cell death in PC-3 cells treated with Melittin
Cells were treated with various doses of Melittin for 24 hr
Data were expressed from two experiments with triplicates
*: p<0.05, statistical significance compared with control

5. PC-3에서 Apoptosis관련 유전자의 발현에 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液이 미치는 영향

1) Bcl-2, Bax, Caspase-9 그리고 Caspase-3에 미치는 영향

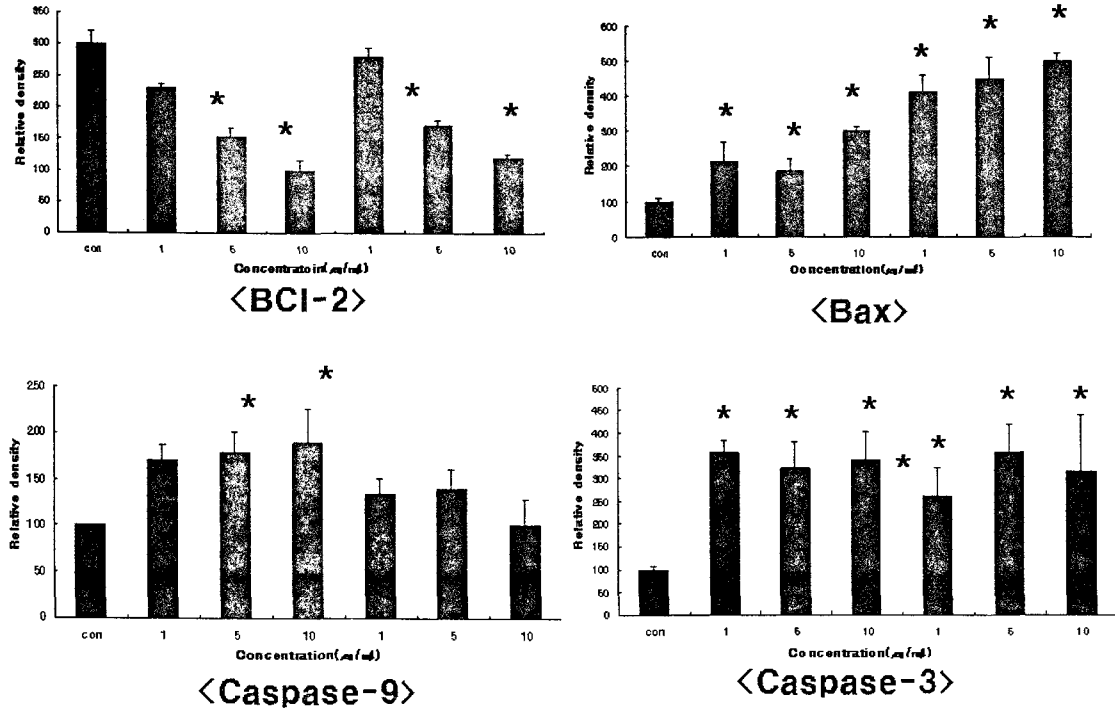


Fig. 7. Relative density of Bcl-2, Bax, Caspase-9 and Caspase-3 expression in PC-3 cells treated with Bee Venom or Melittin

Data were expressed from two experiments with triplicates

*: p<0.05, statistical significance compared with control

2) PARP에 미치는 영향

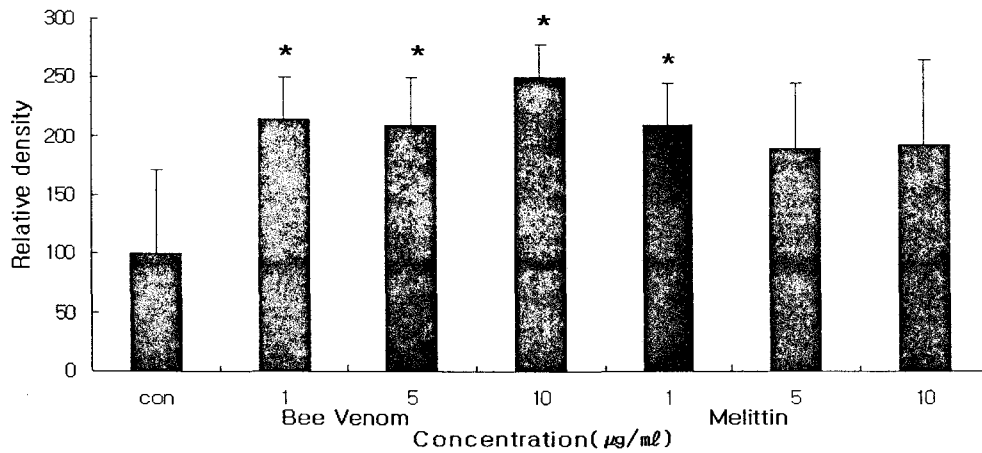


Fig. 8. Relative density of PARP expression in PC-3 cells treated with Bee Venom or Melittin

Data were expressed from two experiments with triplicates

*: p<0.05, statistical significance compared with control

IV. 考 察

腫瘍이란 조직의 자율적인 過剩的 成長이며 이것은 個體에 대해서 意義가 없거나 이롭지 않을뿐더러 정상조직에 대해서 破壞的인 것을 말한다¹⁴⁾.

腫瘍은 構成하는 細胞의 行動樣相에 따라 良性腫瘍(benign tumor)과 惡性腫瘍(malignant tumor)으로 나눌 수 있는데 일반적으로 癌(cancer)이라 指稱되는 것은 惡性腫瘍을 말한다¹⁴⁻¹⁵⁾.

韓醫學에서 癌은 腫瘍¹⁶⁻¹⁸⁾, 癰疽¹⁶⁻¹⁸⁾, 腫毒¹⁶⁻¹⁸⁾, 積聚¹⁶⁻¹⁸⁾, 癥瘕¹⁶⁻¹⁸⁾, 痞¹⁶⁻¹⁸⁾, 癭瘤¹⁶⁻¹⁸⁾, 肺癰¹⁶⁻¹⁸⁾, 痰壅¹⁶⁻¹⁸⁾, 疝瘕¹⁶⁻¹⁸⁾, 石癭¹⁶⁻¹⁸⁾, 石疽¹⁶⁻¹⁸⁾, 疔疽¹⁶⁻¹⁸⁾ 등의 범주에 해당된다.

韓醫學에서 癌은 風寒暑濕燥火의 外感六淫, 喜怒憂思悲恐驚 등의 七情內傷과 辛鹹, 甘苦, 煎炒, 酒濕 등의 飲食內傷 및 過勞 房勞過度의 不內外因¹⁹⁾ 등의 원인에 의하여 氣血不調로 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒蘊結, 正氣虛弱, 經絡瘀滯²⁰⁾ 등의 病理變化가 나타나고 이런 변화가 單獨 혹은 相互 錯雜되면서 氣機不通, 聚集日久하여 만성적인 腫瘍을 誘發한다²¹⁾.

治法은 清熱解鬱, 軟結散結, 活血化瘀, 去濕解毒 및 扶正培本法 등으로^{19,22)}, 실제 임상에서 한약과 항암제의 병용투여 및 한약을 이용한 체질개선이 시도되고 있고, 韓藥¹⁸⁾, 鍼灸²³⁾, 藥鍼²⁴⁾ 등을 이용한 실험 연구가 지속적으로 시행되어지고 있다²⁵⁾.

전립선암은 전립선에서 발생하는 악성종양으로, 1995년에 남성암의 1.8 %였지만 2002년에는 3.0 %로 증가추세가 다른 암과 비교하여 가장 높은 암이다¹⁾.

전립선암 발생 원인은 확실하지는 않으나, 대략 연령, 종족, 내분비 중 특히 성호르몬, 주위 환경 등에 의한다²⁶⁾.

前立腺癌은 초기에 국소적인 부위에 국한되어 나타나는 남성호르몬 의존형(androgen dependent)으로 존재하며 이에 대하여 남성호르몬 중지법(androgen ablation)의 치료를 시행하고 있으나²⁷⁾, 대부분의 남성호르몬 의존형 전립선암은 3년 이내에 남성호르몬 중지법에 반응하는 세포사멸(apoptosis)에 내성을 지니게 되어 남성호르몬 비의존형(androgen independent) 전립선암으로 진행하게 된다²⁸⁾.

蜂藥鍼療法은 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 추

출 가공하여 질병 치료와 관련된 穴位, 壓痛點 혹은 體表의 陽性反應點에 주입함으로써 鍼 效果와 蜂毒의 物理的, 藥理學的 效果를 동시에 이용한 것이다. 이는 생체의 기능을 조절하고 병리 상태를 개선시켜 질병을 치료하고 방어하는 藥鍼療法으로, 일찍이 2천여 년 전부터 임상에서 각종 질환 등에 응용하여 왔다²⁹⁾.

蜂毒의 成分은 enzymes, polypeptides, non peptide components로 구성되어 있다³⁰⁾. 이 중 enzymes의 주요 성분은 phospholipase A2(PLA2)와 hyaluronidase 등이 있고, poly peptides는 乾燥 蜂毒의 약 50%를 구성하고 있으며 melittin, apamin, MCD peptide 등이 있다³¹⁻³²⁾.

그 중 蜂毒의 주성분인 melittin은 분자량이 2,840이고 26개의 아미노산으로 구성된 polypeptide로 용혈작용과 효소작용이 있다. 관절에 대한 melittin의 작용을 보면 PLA2에 의해 phospholipid에서 만들어지는 염증 매개체의 전구물질인 arachidonic acid의 생성을 막는 작용³³⁾과 중성구에서 유래되며 염증의 전구물질인 arachidonic acid와 상호작용 하여 염증을 지속시키는 O2 생산을 차단함으로써 염증을 억제시키는 작용이 있다³⁴⁾.

蜂毒의 항암효과에 대한 연구에서 Allen DH 등¹³⁾이 봉독의 성분 중 Apamin이 cancer cell을 억제하는데 상관이 있다고 보고하였으며, 박³⁵⁾은 봉독성분 전체를 이용해 DNA합성에 관련된 세포분열억제 및 apoptosis유발과 각각에 관련된 유전자의 변화를 관찰해 항암효과가 있음을 발표하였으며, 권³⁶⁾은 봉독 성분중 Apamin과 Phospholipase A2에서 항암효과가 있음을 발표하였다. 또한, 최근에 독성이 있는 천연 peptide가 암 세포의 세포사멸(apoptosis)과 분화에 미치는 영향에 대한 연구보고가 있는데⁹⁻¹¹⁾, 채¹²⁾는 cobrotoxin이 전립선 암세포의 성장을 억제하고, 세포사멸을 유도하여 항암 효과가 있음을 발표하였다.

이에 연구자는 채¹²⁾의 연구에서 처럼, 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液의 항암효과를 알아보기 위해 전립선 암세포인 PC-3 cell에 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液을 처리한 후 cell viability, Cell death, apoptosis 관련 유전자 변화를 관찰하였다.

PC-3의 세포 생존력 측정에서 0.5 μg/ml 蜂藥鍼液 처리군에서는 72 시간에서 세포활성의 유의한 감소를 나타내었고, 1 μg/ml 蜂藥鍼液 처리군에서는 48, 72에서 세포 활성의 유의한 감소를 나타내었고,

5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂藥鹼液 처리군에서는 24, 48 및 72 시간에서 모두 세포활성의 유의한 감소를 나타내었다.

PC-3의 세포 생존력 측정에서 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Melittin 藥鹼液 처리군에서는 72 시간에서 세포활성의 유의한 감소를 나타내었고, 1, 5 및 10 $\mu\text{g/ml}$ Melittin 藥鹼液 처리군에서는 24, 48 및 72 시간에서 모두 세포활성의 유의한 감소를 나타내었다.

전립선 암세포 형태 변화 및 증식 억제 관찰에서 蜂藥鹼液과 Melittin 藥鹼液 처리에 의한 암세포의 전체적인 형태의 심한 변동과 증식의 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 시사하는 것으로, 이에 대한 증거를 제시하기 위하여 형광현미경을 이용한 암세포 핵 형태 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

PC-3 성장의 억제 역시 세포사멸을 유도한 세포 성장 억제 인지를 알아보기 위해 DAPI staining을 통한 세포의 핵을 염색하여 그 모양을 관찰한 결과, 정상세포에 비하여 세포사멸이 일어난 세포는 핵이 응축되고, 여러 조각으로 나뉜 모습을 관찰할 수 있었다.

PC-3의 세포사멸 염색 관찰에서 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂藥鹼液 처리군에서는 대조군에 비하여 모두 세포 사멸의 유의한 증가를 나타내었고, 0.05, 0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ Melittin 藥鹼液 처리군에서는 대조군에 비하여 모두 세포 사멸의 유의한 증가를 나타내었다.

이는 채¹²⁾ 보고에서와 같이, PC-3 성장의 억제도 세포사멸을 유도한 세포성장 억제임을 확인 하였다.

Apoptosis의 유발에 종양억제 유전자 p53이나, Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다³⁷⁾.

지금까지 알려지고 있는 세포사멸(apoptosis) 관련 유전자로 여러 가지가 있는데 그중 가장 먼저 알려진 유전자가 Bcl-2이다³⁷⁾. 이 외에 Bcl-2 family는 세포사멸 반응을 조절하는 주요한 규칙을 행하는 단백질로 여기에는 적어도 17가지 이상의 단백질이 속한다. 이들은 anti-apoptotic 단백질(Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Mcl-1)과 pro-apoptotic 단백질(Bax, Bak, Bok, bid, Hrk)로 나뉘며³⁸⁾ 이중 Bcl-2와 서로 반대 작용을 하는 pro-apoptotic protein인 Bax는 Bcl-2와 결합하여 bax-bcl2 heterodimer를 형성하는데 이것은 apoptosis를 억제한다. 또한 Bax는 세포내에서

세포사멸 관련 신호를 받게 되면 이 자극으로 인하여 mitochondria의 cytochrom C를 방출시켜 세포사멸 신호전달 단계 중 Bax 하위단계인 caspase family로 그 반응을 전달한다³⁸⁾.

Caspase family는 다양한 자극에 의해 유도된 세포사멸에 필수적인 규칙을 행하는 유전자들이다. Bax를 통하여 전달된 신호는 세포사멸에 관여하는 Caspase-9 으로 전달되고 다시 이 신호는 세포사멸을 유도하는 마지막 단계인 Caspase-3로 전달되어 세포사멸이 일어나게 된다. 특히 Caspase-3는 세포의 회복에 필수적인 단백질로 이 회복시기에는 poly(ADP)-ribose polymerase와 DNA-dependant protein kinase 그리고 U-1 ribonucleoprotein들이 관여하게 된다. Caspase 3의 활성화는 이들 단백질들의 cleavage를 유도하며, 이들의 nuclear repair 기능을 수행하게 된다³⁸⁻³⁹⁾.

PARP의 활성화는 뉴런 사멸의 기폭제로 알려져 있으며, 세포사멸 유도인자 (apoptosis-inducing factor) 인 AIF가 PARP로 인해 시작된 세포사멸과정에서 결정적인 역할을 한다. 과도한 DNA의 손상 및 PARP 활성화에 반응하여 신경세포의 미토콘드리아에서 만들어지는 AIF는 세포의 핵내로 들어가게 되면 즉각적으로 세포 유전물질의 붕괴를 일으킨다. AIF가 핵내로 들어가면 세포는 결국 사멸하게 된다⁴⁰⁾.

PC-3에서 Apoptosis 연관 유전자 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9, PARP에 대한 蜂藥鹼液과 Melittin 藥鹼液이 미치는 영향에 대한 실험에서는 다음과 같은 결과가 얻었다.

Bcl-2에 미치는 영향을 살펴본 결과 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂藥鹼液 처리군과 Melittin 藥鹼液 처리군에서 모두 유의한 감소($p < 0.05$)를 나타내었고, Bax는 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂藥鹼液과 Melittin 藥鹼液 처리군에서 모두 유의한 증가($P < 0.05$)를 나타내었다.

Caspase-9에 미치는 영향을 살펴본 결과 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂藥鹼液 처리군에서 모두 유의한 증가($P < 0.05$)를 나타내었고, Caspase-3 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂藥鹼液과 Melittin 藥鹼液 처리군에서 모두 유의한 증가($P < 0.05$)를 나타내었다.

PARP에 미치는 영향을 살펴본 결과 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂藥鹼液 처리군과 1 $\mu\text{g/ml}$ Melittin 藥鹼液 처리군에서 모두 유의한 증가($P < 0.05$)를 나타내었다.

이는 pro-apoptotic gene인 Bax는 蜂藥鹼液과 Melittin 藥鹼液 처리군에서 모두 농도 의존적으로 유의한 증가를 나타내었고, anti-apoptotic gene인

Bcl-2는 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液 처리군에서 모두 농도 의존적으로 감소가 나타내었으며, Bax의 하위단계로 세포사멸에 관여하는 Caspase-9는 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂藥鍼液 처리군에서 유의한 증가를 나타내었고, 세포사멸의 마지막 단계인 Caspase-3은 모든 농도에서 유의한 증가를 나타내어 모두 세포사멸의 유도를 시사하는 것으로 볼 수 있다. 또한, 세포 사멸의 기폭제로 알려진 PARP (poly(ADP-ribose) polymerase)는 蜂藥鍼液 처리군에서 모두 농도 의존적으로 유의한 증가를 나타내었고, 1 $\mu\text{g/ml}$ Melittin 藥鍼液 처리군에서 유의한 증가를 나타내어 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液이 세포사멸의 기폭제인 PARP를 증가시켜 세포사멸을 유도 시키는 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해보면, 일정수준 (pico 또는 nano molar 수준)의 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液이 전립선 암세포의 성장을 억제하고, 세포사멸을 유도하여 항암 효과가 있음을 확인할 수 있었고 치료제로 사용할 가능성이 있다고 판단된다.

앞으로 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液이 나타내는抗癌 效果에 대한 생체연구의 뒷받침 및 안전성에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료되며, 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液의抗癌 效果를 실제 임상에 활용할 수 있게 되기를 기대한다.

V. 結 論

蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液의 항암효과를 알아보고자 PC-3에 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液을 처리한 후 cell viability, Cell death, apoptosis 관련 유전자 발현을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PC-3 cell에 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液을 0~10 $\mu\text{g/ml}$ 투여시 대조군에 비하여 모두 용량 의존적으로 세포들의 모양이 길죽한 나선형 모양에서 둥글게 응축되는 모습으로 변하였으며, 고농도로 갈수록 세포들의 성장이 억제됨을 관찰할 수 있었다.
2. 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液 처리군은 모두 PC-3의 세포 생존률을 감소 시켰다.
3. PC-3 성장의 억제 역시 세포사멸을 유도한 세

포성장 억제 인지를 알아보기 위해 DAPI staining을 통한 세포의 핵을 염색하여 그 모양을 관찰한 결과, 정상세포에 비하여 세포사멸이 일어난 세포는 핵이 응축되고, 여러 조각으로 나뉜 모습을 관찰할 수 있었다.

4. 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液 처리군은 모두 PC-3의 세포사멸을 증가 시켰다.
5. Bax, Caspase-3 및 PARP는 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液 처리군에서 모두 유의한 증가를 나타내었으며, Bcl-2는 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液 처리군에서 유의한 감소를 나타내었다. Caspase-9는 蜂藥鍼液 처리군에서 유의한 증가를 나타내어, 모두 세포사멸을 유도하였다.

이상의 결과를 종합해보면, 일정수준 (pico 또는 nano molar 수준)의 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液이 전립선 암세포의 성장을 억제하고, 세포사멸을 유도하여 항암 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

VI. 參考文獻

1. 한국중양암등록사업, 제23차 연례보고서, 국립암센터, 보건복지부. 2002, p.14.
2. 해리슨 내과학 편찬위원회 편, 해리슨 내과학. 정담. 1997, p.2017.
3. 김영선. 전립선 암세포 LNCaP 세포에서 托裏消毒飲 추출물의 세포고사 유도 효과. 圓光大學校 韓醫科大學 碩士學位論文. 2003.
4. 이형재. 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포에서 托裏消毒飲 추출물의 세포고사 유도 효과. 圓光大學校 韓醫科大學 碩士學位論文. 2003.
5. 김인규. 전립선 암세포에서 敗醬 추출물의 세포고사 유도 효과. 동의생리병리학회지. 2004 ; 18(6).
6. 황태욱. 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포에서 敗醬 추출물의 세포고사 유도 효과. 동의생리병리학회지. 2004 ; 18(6).
7. 김경중. 白芍藥 추출물의 전립선 암세포 고사 유도 효과 및 기전 연구. 동의생리병리학회지. 2004 ; 18(6).
8. 강대근. 白芍藥 抽出物の PC-3 前立腺 癌細胞

- 枯死 誘導效果 및 機轉에 關한 研究. 圓光大學 校 韓醫科大學 博士學位論文. 2004.
9. Scott, B. S., Rajnish, A. G., Suzanne, M., Robert, W., William, E. B., Claus, S., Tom, C., James, P., Gregory, S. J., Thomas, M. W., Robert, J. M., Alan, R. B., and Raymond, N. D. 15S-hydroxyeicosatetraenoic acid actiates peroxisom proliferator-activated receptor γ and inhibits proliferation in PC-3 prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 2001 ; 61 : 497-503.
 10. Gregory, J. M., and Julie, C. H. PPAR- γ agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *TiPS* 2000 ; 21 : 469-474.
 11. Evan, D. R., and Bruce, M. S. PPAR- γ : A nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* 2001.
 12. 蔡相軫. 전립선 암세포에 대한 Cobrotoxin의 抗癌 機轉 研究. 暎園大學校 韓醫科大學 博士學位論文. 2004.
 13. Allen DH, Lepple-Wienhues A, Cahalan MD. Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *J Member Biol.* 1997 ; 155(1) : 27-34.
 14. 서울대학교, 의과대학: 종양학, 서울, 서울대학교 출판부. pp 1~3, 137~143, 225~234. 1992.
 15. 大韓醫學協會 分科學會 協議會: 癌의 診斷과 治療, 서울, 여문각, p. 3. 1992.
 16. 申天浩. 癌癥治研究. 서울 : 정보사. 1984 : 25-29, 31-38.
 17. 李珩九. 폐암에 관한 동서의학의 문헌적 고찰. 대한한의학회지. 1991 ; 12(2) : 52-65.
 18. 金德鎬. 靈山慈花 仙鶴草 瓦松이 암세포 감수성에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1987 ; 3(1) : 99-115.
 19. 孟琳升. 中國治癌大成. 北京:北京科學技術出版社. 1995 : 18-19.
 20. 催昇勳. 동의종양학. 서울:행림서원. 1995 : 19-24.
 21. 田炳旭, 柳逢夏, 朴東源, 柳基遠. 종양의 병인병리에 대한 문헌적 고찰. 대한합방중약학회지. 1995 ; 1(1) : 29-54.
 22. 錢伯文. 腫瘍的辨證施治. 中國:上海科學技術出版社. 1980 : 1-10.
 23. 郁仁存: 中醫腫瘤學 上冊, 北京, 北京科學出版社, pp. 1~11, 65~74, 82~90, 1983.
 24. 박찬열. 약침용 봉독이 흑색종 세포에 미치는 항암효과에 대한 분자생물학적 연구. 경희대한의학 박사학위논문. 2000.
 25. 서울대학교 의과대학. 세포생물학. 서울 : 서울대학교출판부. 1990 : 1-9, 63-65, 145-150.
 26. 김춘원. 병리학. 서울 : 신광출판사. 2003 : 298.
 27. Lu-Yao GL, McLerran D, Wasson J, Wennberg JE: An assessment of radical prostatectomy. Time trends, geographic variation, and outcomes. The Prostate Patient Outcomes Reseach Team. *JAMA*, 269(20) : 2633-6, 1993.
 28. Isaacs JT, Lundmo PI, Berges R, Martikainen P, Kyprianou N, English HF: Androgen Regulation of programmed death of Control and malignant prostatic cells. *J Androl*, 13(6) : 457-64, 1992.
 29. 인창식, 고흥균. 蜂毒療法에 대한 韓醫學 最初의 文獻紀錄: 馬王堆醫書의 蜂毒療法2例. 大韓鍼灸學會誌. 1998 ; 15(1) : 143-7.
 30. 임종국. 鍼灸治療學. 서울: 集文堂. 1983 ; 226-7, 545-99.
 31. 고흥균, 권기록, 인창식. 蜂毒약침요법. 경희대학교출판국. 2003 : 1-16, 48, 89-78, 215, 140-152.
 32. H. Tannenbaum, P. Davis, A.S. Russell. An evidence-based approach to prescribing NSAIDs in musculoskeletal disease: A canadian consensus. *Can Med Assoc J.* 1996 ; 155(1) 77-88.
 33. Saini SS, Peterson JW, Chopra AK. Melittin binds to secretory phospholipase A2 and inhibits its enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 ; 238(2) : 436-42.
 34. 의과대학 교수편. *Katzung's 임상약리학*. 서울 : 도서출판 한우리. 1998 ; 345-62, 655-6.
 35. 박찬열, 서정철, 최도영, 안병철. 봉독약침의 항암효과에 대한 분자생물학적 연구. 대한약침학회지. 2000 ; 3(1) : 1-19.
 36. 권도희, 이재동, 최도영. 약침용 봉독성분 중 Apamin, Melittin의 항암작용. 대한침구학회지. 2001 ; 18(1) : 139-145.
 37. Chiarugi V, Magnelli L, Basi G. Apoptosis

- and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res.* 1994 ; 40 : 603-13.
38. Shankar S L, Mani S, O'Guin K N, Kandimalla E R, Agrawal S, and Shafit-Zagardo B. Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and-dependent pathways. *J Neurochem* 2001 ; 79 : 426-436.
39. Minemoto, Y., Gannon, J., Masutani, M., Nakagama, H., Sasagawa, T., Inoue, M., Masamune, Y., and Yamashita, K. Characterization of adriamycin-induced G2 arrest and its abrogation by caffeine in FL-arnion cells with or without p53. *Exp. Cell. Res.* 2001 ; 262 : 37-48.
40. Seong-Woon Yu, Hongmin Wang, Marc F. Poitras, Carmen Coombs, William J. Bowers, Howard J. Federoff, Guy G. Poirier, Ted M. Dawson, and Valina L. Dawson. Science. Mediation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1-Dependent Cell Death by Apoptosis-Inducing Factor. 2002 ; 297 : 259-263.