

## 인체폐암세포에서 봉독에 의한 prostaglandin E<sub>2</sub> 생성 및 telomerase 활성 저하

김중환<sup>1,2\*</sup>황원덕<sup>2</sup>김병우<sup>2</sup>최영현<sup>1,2\*</sup>

동의대학교 한의과대학 신개내과학교실, <sup>1</sup>생화학교실, <sup>2</sup>대학원 바이오품질제어학과(BK 21 program)  
<sup>2</sup>블루바이오 소재개발센터 및 자연과학대학 응용생명학과

Received March 2, 2009 / Accepted April 15, 2009

**Bee Venom-induced Growth Inhibition of Human Lung Cancer Cells was Associated with Inhibition of Prostaglandin E<sub>2</sub> Production and Telomerase Activity.** Jong-Hwan Kim, Won-Deuk Hwang, Byung-Woo Kim<sup>2</sup>, and Yung Hyun Choi<sup>1,2\*</sup>. *Departments of Internal Medicine and <sup>1</sup>Biochemistry, College of Oriental Medicine, <sup>1</sup>Department of Biomaterial Control (BK21 program), Graduate School, <sup>2</sup>Blue-Bio Industry RIC and <sup>2</sup>Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Sciences, Dong-Eui University, Busan 614-052* - In modern oriental medicine, bee venom therapy is being used for aqua-acupuncture to relieve pain and to cure inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and gout. Bee venom therapy has been processed and reported in many experimental studies, with regard to its effects on pain alleviation, anti-inflammation, removal of fever, anti-convulsion, suppression of tumor and immunity strengthening, etc., however, its mechanism of action, molecular targeting on prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production and telomere length regulation in human cancer remains unclear. In this study, we investigated the effect of bee venom on the levels of cyclooxygenases (COXs) and telomere regulatory components of A549 human lung cancer cells. Bee venom-induced anti-proliferative effects of A549 cells were associated with the inhibition of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) as well as human telomerase RNA (hTR), transcription factor c-myc and the activity of telomerase. In addition, bee venom treatment markedly decreased the levels of COX-2 mRNA and protein expression without significant changes in the expression of COX-1, which was correlated with a decrease in PGE<sub>2</sub> synthesis. Taken together, these findings provide important new insights into the possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of bee venom.

**Key words :** Bee venom, prostaglandin E<sub>2</sub>, telomerase

### 서 론

꿀벌의 독낭(毒囊)에 들어있는 봉독(蜂毒, bee venom)은 염증(炎症) 및 알러지 등을 유발할 수도 있지만, 진통 및 소염의 효능이 탁월한 것으로 알려져 있는 약 40여 가지의 유효성분으로 구성된 물질이다. 오랫동안 봉독의 임상적 적용을 위하여 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, Bee venom herbal acupuncture)이 주로 활용되고 있다[7,10]. 즉 봉독약침요법은 봉독을 질병과 관련한 부위나 혈위에 주입함으로써 자침(刺鍼) 효과와 봉독의 생화학적 특이물질이 인체에 미치는 약리작용을 동시에 이용하는 치료요법의 일종이다. 봉독의 성분은 크게 peptide components, non peptide components, enzymes 등으로 구성되어 있다[7]. 그 중 peptide components는 freeze-dried venom의 약 50%를 구성하

고 있으며, 주요 성분으로는 melittin, apamin, mast cell degranulating peptide 등이 있다[3,17]. 봉독에 관한 연구는 1990년대 이후부터 활발히 진행되고 있으며, 항암효과를 포함한 다양한 생리 및 약리 작용에 관한 기전이 점차 알려지고 있다.

최근 bee venom의 항암작용 가능성이 대두되면서 다양한 인체암세포를 대상으로 봉독을 포함한 봉독의 구성성분의 암세포 증식 억제기전의 연구가 활발히 진행되고 있다 [1,5,10,12,13,15,20-22]. 또한 암의 발생과 진행뿐만 아니라 염증 반응의 주요 지표인 cyclooxygenase-2 (COX-2) 활성 저해 효과에 대한 보고가 부분적으로 이루어지고 있으나 [2,8,9] 봉독 자체에 대한 항암활성의 분자생물학적 기전에 관하여 아직까지 정확하게 알려진 바는 없다. 따라서 본 연구에서는 선행연구들에 의해 관찰된 봉독의 항암작용에 관한 추가적인 작용 기전을 조사하기 위하여 봉독에 의한 인체 폐암세포의 생존을 저하와 연관된 COX-2의 발현 조절과 연관된 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성 및 염색체 말단에 존재하는 telomere의 조절인자와 telomerase의 활성에 미치는 봉독의 영향에 관하여 A549 인체폐암세포를 대상으로 조사하였다.

\*Corresponding author

Tel : +82-51-850-8649, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 봉독은 Sigma Chemical Co. (St. Luis, MO, USA)에서 구입하였고 mRNA 분석을 위하여 Bioneer (Taejeon, Korea)에서 구입한 primer는 Table 1에 나타난 바와 같다. 단백질 발현 분석을 위하여 사용된 항체는 CalBiochem (San Diego, CA, USA), 및 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. PGE<sub>2</sub>의 생성량의 측정은 Amersham Corp.의 enzyme immunoassay (EIA) kit를 사용하였으며, telomerase 활성의 측정은 polymerase chain reaction (PCR)에 기초를 둔 면역반응분석법[PCR-based telomeric repeat amplification protocol (TRAP) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)]을 이용하였고 이를 위한 kit는 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)에서 구입하였다.

### 암세포의 배양

실험에 사용한 A549 폐암세포는 생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며 90%의 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건 하에서 배양하였다. 봉독은 3차 증류수에 희석하여 stock 용액으로 제조한 뒤 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였으며,

봉독처리에 따른 암세포의 형태변화는 독립현미경 하에서 관찰하였다.

### MTT assay를 이용한 세포 성장억제 조사

세포배양용 6 well plate에 well 당 1×10<sup>5</sup>개의 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 봉독을 배지에 희석·처리 48시간 후 배지를 제거하고 0.5 mg/μl tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma)를 처리하였다. 3시간 후 MTT를 제거하고 DMSO를 이용하여 well에 생성된 formazin을 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 3회 실시하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

### Reverse transcription (RT)-PCR 분석

준비된 A549 세포들에 TRIzol B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리·정량한 후, ONE-STEP RT-PCR PreMix (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Korea)를 이용하여 2 μg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이들 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자(Table 1)를 PCR로 증폭하였으며, housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr)로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

### 단백질의 분리, 전기영동 및 Western blotting

정상 및 봉독이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR

Gene name		Sequence
hTERT	Sence	5'-AGC-CAG-TCT-CAC-CTT-CAA-CC-3'
	Antisence	5'-GTT-CTT-CCA-AAC-TTG-CTG-ATG-3'
TEP-1	Sence	5'-TCA-AGC-CAA-ACC-TGA-ATC-TGA-G-3'
	Antisence	5'-CCC-CGA-GTG-AAT-CTT-TCT-ACG-C-3'
hTR	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'
Sp-1	Sence	5'-ACA GGT GAG VTT GAC CTC AC-3'
	Antisence	5'-GTT GGT TTG CAC CTG GTA TG-3'
COX-1	Sence	5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CTT-3'
	Antisence	5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3'
COX-2	Sence	5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3'
	Antisence	5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

기영동으로 분리하였다. 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)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 양을 분석하였다.

**Telomerase 활성 측정**

정상 및 봉독이 처리된 배지에서 배양된 세포들을 모아 200  $\mu$ l lysis reagent에  $1 \times 10^6$ 개의 세포를 섞어서 30분간 얼음 위에서 lysis를 실시하였다. TRAP 반응을 위하여 2 mg의 단백질이 함유된 2  $\mu$ l의 세포 추출액을 25  $\mu$ l의 reaction mixture에 혼합 후, 증류수를 첨가하여 최종 volume이 50  $\mu$ l가 되도록 하였다. PCR은 primer elongation (25°C에서 30분간), telomerase inactivation (94°C에서 5분간), product amplification (94°C에서 30초, 50°C에서 30초 및 72°C에서 90초를 30 cycles)의 순서로 진행이 되었으며, 이를 이용하여 hybridization과 ELISA reaction 반응을 시켰다.

**Prostaglandin E2의 측정**

봉독 처리에 따른 PGE<sub>2</sub> 생성량의 변화를 조사하기 위하여 준비된 세포를 96-well plate에 well 당 160  $\mu$ l의 배지에  $10^4$  cell/well 정도로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 봉독을 농도별로 배지에 희석하여 처리하였다. 이때 마지막 배지의 양을 모두 180  $\mu$ l로 통일시켰다. 48시간 후 배지에 2.5%의 dodecyltrimethylammonium bromide가 함유된 buffer를 20  $\mu$ l 첨가하여 총 배지의 양이 200  $\mu$ l 되게 한 후 lysis가 잘 일어나도록 pipetting을 수회 실시하였다. 상온에 약 10분간 incubation 한 후 trypan blue를 이용하여 암세포의 수를 계수하였다. 약 50  $\mu$ l의 lysate를 취하여 kit에 준한 protocol에 따라 EIA를 실시한 후 450 nm의 파장에서 얻어진 값을 기준으로 PGE<sub>2</sub>의 양을 추정하였다.

**결과 및 고찰**

**A549 폐암세포의 증식에 미치는 봉독의 영향**

봉독에 의한 A549 폐암세포에서 PGE<sub>2</sub> 생성 및 telomerase 활성 변화 연관 실험의 수행을 위한 조건 설정을 위하여, 48시간 동안 다양한 농도의 봉독을 처리한 후 MTT assay 및 형태적 변화 관찰을 실시한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 봉독 처리 농도의 증가에 따라 A549 세포의 형태변형 증가와 증식이 억제되어 4  $\mu$ g/ml 및 5  $\mu$ g/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 각각 약 70% 및 90% 이상의 증식억제 효과를 보였으며, 이는 다른 종류의 암세포에 나타난 선행연구의 결과들과 유사하였다[5,13,15,20-22]. 또한 이러한 봉독의 A549 세포 증식억제 효과가 세포주기 교란 및 apoptosis

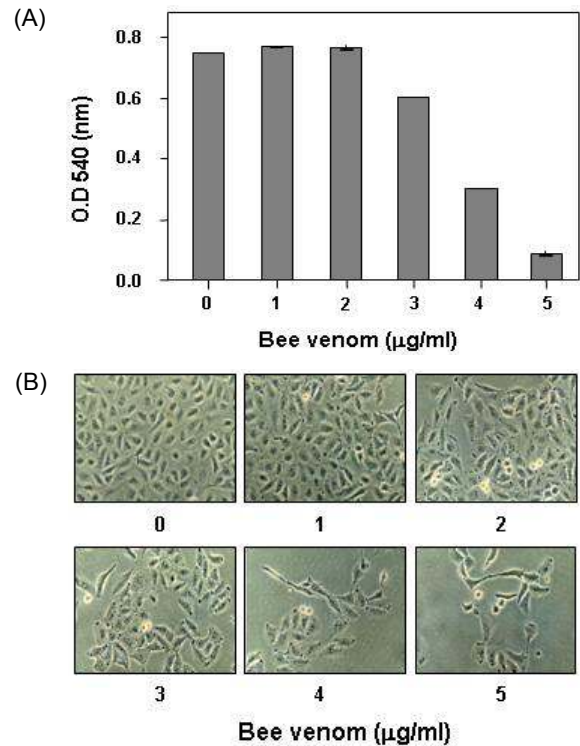


Fig. 1. Growth inhibition and morphological changes of A549 human lung cancer cells after treatment with bee venom. Cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells per 60-mm plate, and incubated for 24 hr. The cells were treated with various concentrations of bee venom for 48 hr. (A) The growth inhibition was measured by the metabolic-dye-based MTT assay. Results are expressed as the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. (B) Exponentially growing A549 cells were incubated with various concentrations of bee venom for 48 hr. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

유발과 연관성이 있는지를 조사한 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 본 실험의 조건에서 봉독의 농도 증가에 따른 세포주기 특이적 arrest 유발은 관찰할 수 없었으나 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도가 다소 증가되어 apoptosis 유발에 동반되었음을 알 수 있었다.

**A549 세포에서 PGE2의 생성에 미치는 봉독의 영향**

Prostaglandin (PG)는 세포의 분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀진 바 있으며[6,19], PG의 합성에서 크게 2가지 COX isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하고 있다. 그러나 COX-2는 다양한 성장인자, cytokines, 종양 촉진인자들 등의 자극에 의해 발현이 유도되어 세포 증식을 촉진하고 apoptosis를 억제하며 세포의 유동성 및 부착성을 강화시킴으로서 각종 퇴행성 질환의 발병과

Table 2. Effect of bee venom on the progression of the cell cycle in A549 human lung cancer cells

Dose (mg/ml)	% of cells			
	Sub G1	G1	S	G2/M
0	0.91	57.05	23.03	19.43
1	1.74	55.91	22.86	19.85
2	1.87	55.17	22.05	21.58
3	2.24	57.66	16.32	24.25
4	2.83	55.93	19.51	22.20
5	4.97	55.72	17.54	22.31

The cells were treated with bee venom for 48 hr, collected, fixed, and stained with PI for flow cytometry analysis. Data are presented as the mean values obtained from three independent experiments.

진행에 중요한 역할을 한다[6,19]. 선행 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2가 높은 발현을 유지하는 것이 apoptosis에 대한 저항성 획득과 염증반응과 연관된 세포의 암화에 밀접한 관련이 있을 것으로 보고되어 진 바 있으며[18], COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고, COX-2의 선택적 억제제에 의한 angiogenesis와 종양형성 억제 등의 결과에서 COX-2의 선택적 조절에 의한 암 예방 및 항암전략이 대두되고 있다.

따라서 봉독 처리에 의한 A549 세포의 증식억제가 COX-2의 발현 저하 및 PG의 생성 변화와의 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 COX-1 및 -2의 발현 변화를 RT-PCR 및 Western blotting 방법으로 조사하였다. Fig. 2A 및 B의 결과에서 알 수 있듯이 COX-1의 mRNA 및 단백질 발현에는 봉독의 처리가 큰 영향을 미치지 못하였으나, COX-2의 경우 전사 및 번역 수준 모두에서 봉독 처리 농도의 증가에 따라 점차적인 발현의 감소를 보여주었다. 이러한 봉독에 의한 COX-2의 선택적 발현 저하가 PG 중, PGE<sub>2</sub>의 생성 저하와 연관성이 있는

지를 조사하기 위하여 PGE<sub>2</sub>의 생성에 미치는 봉독의 영향을 조사한 결과는 Fig. 2C에 나타난 바와 같다. Fig. 2C에 나타난 바와 같이 A549 세포에서 봉독 처리의 농도가 증가할수록 PGE<sub>2</sub>의 생성이 매우 감소되었으며, PGE<sub>2</sub>의 생성 감소 경향성은 COX-2의 발현 저하와 유사한 경향성을 보여주었다. 따라서 봉독 처리에 의한 A549 세포의 증식 억제에는 PGE<sub>2</sub>의 생성 저하와 연관성이 있으며 이는 COX-2의 선택적 발현 억제에 의한 것임을 알 수 있었다.

#### Telomere 조절인자들의 발현에 미치는 봉독의 영향

Telomere는 진핵세포의 염색체 말단 부위에 존재하는 repeat sequences [(TTAGGG)<sub>n</sub>]로 이루어져 있고, 이러한 반복 구조의 형성 및 유지에 필수적으로 관여하는 효소가 telomerase이다[16]. 대부분의 정상 체세포는 telomerase의 활성이 없기 때문에 세포가 분열할수록 telomere의 길이는 짧아지게 되지만, 암세포의 90% 이상에서는 telomerase의 catalytic subunit 단백질을 coding하는 human telomerase reverse transcriptase (hTERT)가 과발현으로 높은 telomerase의 활성을 나타내고 있다. 따라서 telomerase 활성 변화는 노화, 혈관신생 및 면역계질환 등에서 뿐 만 아니라 암의 발생과 진행과도 밀접한 연관성이 있으며, 암의 진단과 진행의 정도를 나타내는 지표로 사용되고 있다[11,16]. 노화 조절의 측면에서 telomere의 소실은 염색체의 안정성 소실을 야기하는 것으로[14]. 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 있어 activator 또는 repressor로 작용할 수 있다[4,16]. 따라서 암세포에서 높은 활성을 지니는 telomerase의 활성을 선택적으로 억제함으로써 암세포의 성장과 분열을 억제하고자하는 시도는 새로운 항암제 개발을 위한 표적이 되고 있다.

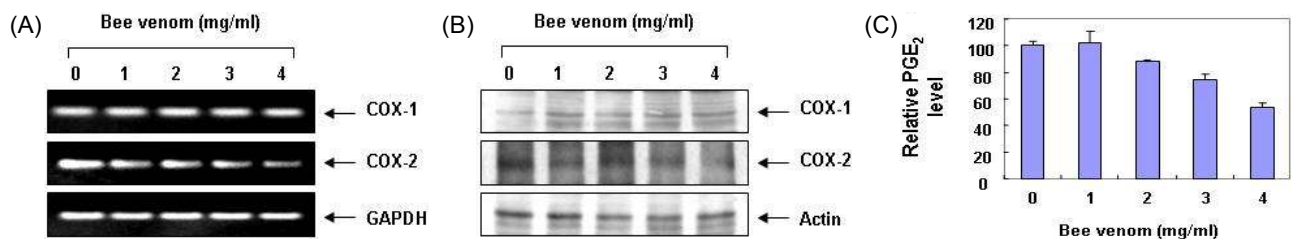


Fig. 2. Inhibition of COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> production by bee venom treatment in A549 human lung cancer cells. (A) After 48 hr incubation with bee venom, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with COX-1 and COX-2 primers, and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were grown under the same conditions as (A) and lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-COX-1 and anti-COX-2 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (C) The cells were treated with the indicated concentrations of bee venom for 48 hr and collected. The PGE<sub>2</sub> accumulation in the medium was determined by an EIA kit as described in materials and methods. Results are expressed as the means±S.E. of three independent experiments.

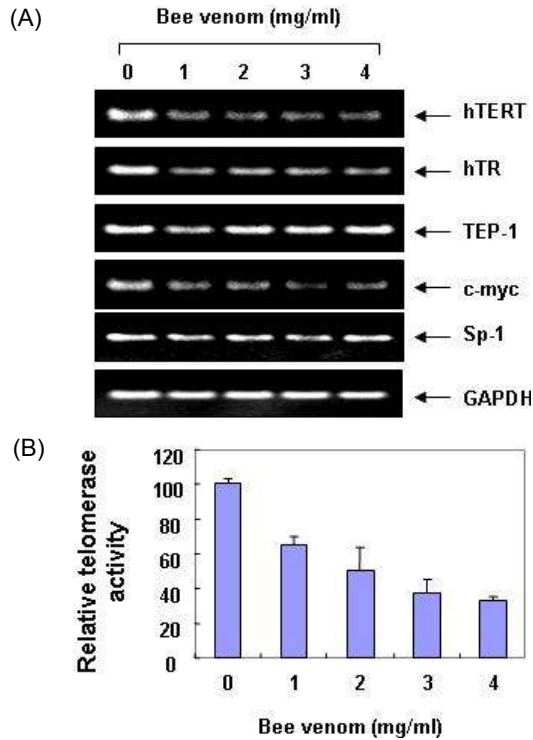


Fig. 3. Effects of bee venom treatment on the levels of telomere regulatory genes in A549 human lung cancer cells. (A) After 48 hr incubation with bee venom, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with the indicated primers, and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-hTERT antibody. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (C) After 48 hr incubation with bee venom, telomerase activity of cells was measured using a TRAP-ELISA kit as indicated in the protocol. Results are expressed as the means±S.E. of three independent experiments.

봉독 처리에 의한 A549 세포의 증식억제가 telomere 조절 인자들의 발현 변화와 어떤 연관성을 지니는지를 조사하기 위하여 telomere 길이에 조절에 가장 중요한 역할을 하는 3가지 유전자[hTERT, human telomerase RNA (hTR) 및 telomerase-associated protein (TEP)-1]와 특히 hTERT의 발현 조절에 관여하는 두 가지 전사조절인자(c-myc 및 Sp-1)의 발현에 미치는 봉독의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 봉독이 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 A549 세포들을 대상으로 RT-PCR을 실시하였다. Fig. 3A의 결과에서 알 수 있듯이 봉독의 처리 농도 증가에 따라 조사된 유전자 중 hTERT, hTR 및 c-myc의 mRNA 발현이 매우 감소되는 경향성을 보여 주었

으나, TEP-1 및 Sp-1의 발현에는 큰 변화가 없었다. 이러한 telomere 조절인자들의 발현 변화는 telomere 길이 조절에 직접적으로 중요한 조절 역할을 하는 telomerase 효소의 활성 변화와 연관성이 있을 것으로 추정되므로 이를 확인하기 위하여 TRAP-ELISA를 통하여 봉독이 처리된 A549 세포의 telomerase 효소 활성의 변화 여부를 조사하였다. Fig. 3B의 결과에서 알 수 있듯이 봉독 처리된 배지에서 자란 A549 세포의 telomerase 활성은 봉독의 처리 농도가 증가될수록 매우 감소되는 경향성을 보여주어 봉독에 의한 A549 세포의 증식 억제가 telomerase 활성 저하와 연관성을 지니며, 이는 hTERT, hTR 및 c-myc과 같은 telomere 조절 인자들의 발현 변화와 연관되어 있음을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 봉독의 처리에 따른 A549 폐암세포의 증식 억제에서 PGE<sub>2</sub> 생성 및 telomerase 활성의 변화 관련성을 조사하였다. A549 세포의 증식은 봉독 처리에 의하여 유의적으로 감소되었으며, 이는 apoptosis 유발과 연관성이 있음을 알 수 있었다. 봉독 처리 농도의 증가에 따라 COX-2의 발현이 전사 및 번역 수준에서 모두 감소되었으며 이에 따른 PGE<sub>2</sub>의 생성이 현저하게 감소되었으나, COX-1의 발현에는 큰 변화가 없었다. 또한 봉독 처리에 따라 telomere 조절인자들 중, hTERT, hTR 및 c-myc의 발현이 억제되었으며, telomerase의 활성도 매우 감소되었다. 본 연구의 결과는 PGE<sub>2</sub> 생성과 telomerase 활성 저하가 봉독의 항암 작용 표적분자로서 작용될 수 있음을 보여준다.

감사의 글

이 연구는 지식경제부·부산광역시 지원 지역혁신센터사업 동의대학교 블루바이오 소재 개발 및 실용화 지원 센터 (RIC08-06-07) 지원에 의하여 이루어진 결과입니다.

References

- Ahn, C. B., C. W. Im, C. H. Kim, H. M. Youn, K. J. Jang, C. H. Song, and Y. H. Choi. 2004. 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.
- Ahn, C. B., C. W. Im, H. M. Youn, S. J. Park, and Y. H. Choi. 2003. 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.
- Assem, E. S. and G. Atkinson. 1973. Histamine release by MCDP (401), a peptide from the venom of the honey bee.



- Bri. Pharmacol.* **48**, 337-338.
4. Cerni, C. 2000. Telomeres, telomerase, and myc. An update, *Mutat. Res.* **462**, 31-47.
  5. Choi, Y. H. 2005. Anti-proliferative effects of bee venom through induction of Bax and Cdk inhibitor p21WAF1/CIP1 in human lung carcinoma cells. *Kor. J. Oriental Physiol. Pathol.* **19**, 167-173.
  6. Giercksky, K. E. 2001. COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **15**, 821-833.
  7. Habermann, E. 1971. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In *venomous animals and their venoms*. pp. 3-61, Academic Press.
  8. Hwang, D. Y., H. H. Kim, C. J. Kim, and E. H. Kim. 2003. Bee venom induces apoptosis and inhibits COX-2 in human osteosarcoma cell line MG-63. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* **20**, 63-74.
  9. Jang, M. H., M. C. Shin, S. Lim, S. M. Han, H. J. Park, I. Shin, J. S. Lee, K. A. Kim, E. H. Kim, and C. J. Kim. 2003. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. *J. Pharmacol.* **91**, 95-104.
  10. Kwon, K. R., H. K. Hoh, and C. H. Kim. 1994. 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.
  11. Kyo, S. and M. Inoue. 2002. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 688-697.
  12. Martikainen, P., K. Nyman, and T. J. Nevalainen. 1993. Toxic effects of human pancreatic and snake and bee venom phospholipases A2 on MCF-7 cells in culture. *Toxicon* **31**, 835-843.
  13. Moon, D. O., S. Y. Park, M. S. Heo, K. C. Kim, C. Park, W. S. Ko, Y. H. Choi, and G. Y. Kim. 2006. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *Int. Immunopharmacol.* **6**, 1796-1807.
  14. Narayan, S., A. S. Jaiswal, A. S. Multani, and S. Pathak. 2001. DNA damage-induced cell cycle checkpoints involve both p53-dependent and -independent pathways: role of telomere repeat binding factor 2. *Br. J. Cancer* **85**, 898-901.
  15. Orsolić, N., L. Sver, S. Verstovsek, S. Terzić, and I. Basić. 2003. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo* by bee venom. *Toxicon* **41**, 861-870.
  16. Poole, J. C., L. G. Andrews, and T. O. Tollefsbol. 2001. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* **269**, 1-12.
  17. Spoerri, P. E. 1973. Apamin from bee venom. *Neurobiology* **3**, 207-214.
  18. Surh, Y. J., K. S. Chun, H. H. Cha, S. S. Han, Y. S. Keum, K. K. Park, and S. S. Lee. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat. Res.* **480-481**, 243-268.
  19. Thun, M. J., S. J. Henley, and C. Patrono. 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 252-266.
  20. Tu, W. C., C. C. Wu, H. L. Hsieh, C. Y. Chen, and S. L. Hsu. 2008. Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicon* **52**, 318-329.
  21. Woo, H. J., H. J. Kim, S. H. Hong, S. H. Hong, B. T. Choi, Y. T. Lee, D. I. Park, and Y. H. Choi. 2007. Induction of apoptosis by bee venom in A549 human lung epithelial cancer cells through modulation of Bcl-2 and IAP family and activation of caspases. *J. Life Sci.* **17**, 1596-1600.
  22. Yeo, S. W., J. C. Seo, Y. H. Choi, and K. J. Jang. 2003. 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.