

원저

蜂毒藥鍼이 C57BL mouse의 黑色腫에 미치는 영향

오기남 · 이재동 · 박동석

경희대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effects of Bee Venom Therapy on Melanoma of C57BL Mouse

Gi-Nam, Oh · Jae-Dong, Lee · Dong-seok, Park

Department of Oriental Medicine Graduate School, Kyung-Hee University

Objective : This study was designed to investigate the anti-cancer effects of bee venom on melanoma in C57BL mice.

Materials and Methods : For the induction of melanoma, C57BL mice were treated by DMBA(7, 12-dimethylbenz[a]anthracene). Each group of C57BL mouse was treated with DMBA 50 μ g, 75 μ g, 100 μ g respectively once a week for 15 weeks. Tumor generation in each group of 10 mice was observed. Cumulative curves were showed in the density and frequency of skin tumor generation. To know the effects of pre-treatment of bee venom on tumor generation by DMBA treatment(frequency of tumor generation), Each group of C57BL mouse was pretreated and treated with bee venom 5 μ l, 25 μ l, 50 μ l respectively once a week for 3 weeks, whereafter each mouse was treated with DMBA 100 μ g once a week for 15 weeks.

Results and Conclusion :

- (1) There was chemotherapeutic effect, but not chemopreventive effect.
- (2) Cpp32 activity was increased by 50 μ l bee venom treatment.
- (3) Bee venom treatment inhibited expression of cell-cycle regulating, growth-promoting genes such as c-Jun, c-Fos, and Cyclin D1, and increased tumor suppressors p53 and p21/Waf1.
- (4) Bee venom treatment activated expression of a representative apoptosis-inducing gene Bax

Key words : bee venom, anti-cancer effect, apoptosis, melanoma

· 접수 : 2002년 3월 3일 · 수정 : 3월 11일 · 채택 : 2002년 3월 18일
· 교신저자 : 박동석, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 부속 한방병원 침구과(Tel. 02-958-9206)
E-mail : Dspark49@yahoo.co.kr

I. 서론

皮膚에 발생하는 惡性腫瘍은 生活環境이 變化됨에 따라 각종 유해물질이나 자외선에 노출될 기회가 많아지면서 급속도로 增加하고 있으며, 早期에 적절한 治療를 하지 않게 되면 内部臟器로 轉移되어 致命的이 된다¹⁾.

皮膚에 발생하는 惡性腫瘍 중 黑色腫은 韓醫學에서는 鬮花瘡, 石疽, 失榮, 癌發, 黑疔 등과 유사하며²⁾ 이에 대한 抗腫瘍効果에 대한 研究가 進行되고 있다.^{2,3,4,5)} 免疫力를 증강시켜 암세포의 성장을 억제하는 腫瘍免疫療法에 관한 연구로 榆⁶⁾는 陽和湯이, 배⁷⁾는 魚腥草藥鍼이 黑色腫에 대한 抗腫瘍效果 및 免疫反應에 미치는 영향을 보고하였다.

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고, 祛風除濕, 止疼痛, 解痙平喘, 消腫降壓하는 效能이 있으며⁸⁾ 蜂毒藥鍼은 鎮痛消炎^{9,10,11,12)}, 鎮痙¹³⁾, 免疫機能增強^{14,15,16)} 作用 및 抗癌作用^{14,17,18,19,20,21)}이 있는 것으로 보고되고 있다. 蜂毒藥鍼의 抗腫瘍效果에 대한 연구는 蜂毒 전체나 蜂毒成分의 일부를 이용하여 면역학적 연구와 세포유전자적 연구가 진행되고 있다. 權 등¹⁴⁾은 免疫學的인 연구로 상피종에 대한 蜂毒藥鍼의 抗腫瘍效果를 보고하였고, 세포유전자적인 연구로 차 등¹⁷⁾은 黑色腫에 대한 蜂毒藥鍼의 抗腫瘍效果와 분자생물학적인 기전을 보고하였으며, 權 등¹⁹⁾과 김 등¹⁸⁾은 蜂毒成分中 일부를 선택하여 연구결과를 보고하였다. 이와 같은 연구는 대부분 in vitro에서 수행하였을 뿐 in vivo에서의 연구는 충분하게 수행되지 않았다.

이에 著者는 蜂毒藥鍼이 C57BL mouse의 黑色腫에 대한 항종양효과와 분자생물학적인 기전을 in vivo에서 알아보기 위하여 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)를 투여하

여 黑色腫을 유발 前과 後에 각각 蜂毒藥鍼을 시행한 후 종양의 성장억제효과를 분석하고 ap-optosis와 細胞週期關聯 遺傳子 mRNA 發顯에 대한 定量的 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) 分析을 시행하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

A. 材料 및 動物

1. 材料

西洋種 꿀벌(Apis mellifera)을 改良育種한 이탈리아 벌에서 採集한 蜂毒(Bee Venom, 유밀농원蜂毒산업주식회사, 한국)을 使用하였다.

2. 動物

體重 40g내외의 C57BL系 雄性 mouse (대한 實驗동물센터, 한국)를 各 群당 10~30 마리씩 配定하고, 固形飼料(주삼양유지사료, pellet)와 물을 實驗期間 동안 充分히 供給하여 자유롭게 섭취하도록 하면서, 2주동안 實驗室 環境(24±2℃)에 適應시켰다.

B. 方法

1. 蜂毒藥鍼液 準備

蜂毒(Bee Venom, 유밀농원봉독산업주식회사, 한국)은 3차 증류수로 稀釋하여 1:100의 濃度로 準備하였다.

2. 黑色腫의 誘發

C57BL mouse 배부에 있는 털을 제거하고 acetone에 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) (Sigma, St Louis, MO)를 용해시켜 1.0 mg/ml 濃度로 제조한 후 背部皮膚에 50,

75 및 100 μg 을 주 2회씩 15주간 국소적으로 (3cm x 2cm) micropipet tip을 利用하여 골고루 塗布시켜 黑色腫을 誘發시켰다.

3. 黑色腫발생 예방효과

蜂毒藥鍼이 DMBA에 의해 誘發된 黑色腫의 發生을 豫防하는 效果가 있는지를 알아보기 위하여 실험군은 아무런 처치를 하지 않은 대조군과 蜂毒주입량에 따른 5, 25 및 50 μl 蜂毒藥鍼군으로 설정하였다. 蜂毒藥鍼은 DMBA 塗布 3주전부터 一定한 時刻(월요일 오후 2시경)에 주 1회에 걸쳐 各各 3回 mouse의 背部皮膚에 약침주입기로 주입하였다. 蜂毒藥鍼後 顯著하게 活動性이 低下된 mouse는 實驗對象에서 除外하였으며, 活動性이나 먹이 攝取 等に 있어 특별한 異常徵候를 보이지 않는 10마리를 各 注入量別 最終 實驗對象으로 選定하였다. 50 μl 蜂毒藥鍼群은 5 μl 및 25 μl 蜂毒藥鍼群에 비해 약침후 48時間까지 活動性이 低下된 mouse의 數가 많았으며 약침후 72時間內에 2例가 死亡하였다. 그러나 약침후 72時間 以後에는 他群과 比較하여 特異한 異常徵候를 보이는 mouse는 觀察되지 않았으며 他群과 마찬가지로 正常的인 活動性을 보이는 10例를 實驗對象으로 最終選定하였다. 蜂毒藥鍼의 黑色腫 발생 예방효과는 腫瘍의 發生頻도와 發生密度를 調査하여 判정하였다.

4. 黑色腫 성장억제효과

蜂毒藥鍼이 DMBA에 의해 誘發된 黑色腫의 成長을 抑制하는 效果가 있는지를 알아보기 위하여 DMBA 100 μg 을 도포하여 腫瘍發生이 觀察되기 始作하는 6주째보다 2주 전에 (DMBA 塗布 4주 후) 蜂毒藥鍼液을 5, 25 및 50 μl 로 一定한 時刻(월요일 오후 2시경)에 주 1회씩 11주간 DMBA 塗布 3일전에 mouse의 背部皮膚에 약침

주입기로 주입하였다. 蜂毒藥鍼의 黑色腫 성장억제효과는 腫瘍의 發生頻도와 發生密度를 調査하여 判정하였다.

5. 黑色腫 치료효과

蜂毒藥鍼이 DMBA에 의해 誘發된 黑色腫을 死滅시키는 效果가 있는지를 알아보기 위하여 10주간 DMBA 100 μg 을 도포하여 發生된 20개의 個別腫瘍을 對象으로 蜂毒藥鍼液을 5, 25 및 50 μl 로 주 1회씩 2주간 腫瘍組織의 隣接部位(腫瘍 左側 약 0.5cm 皮膚組織)에 약침주입기로 주입한 後 중앙조직의 직경을 측정하여 腫瘍의 死滅與否를 調査하였다.

6. Apoptosis의 分析

1) Caspase-3 activity의 分析

蜂毒藥鍼液의 投與로 인한 腫瘍組織 縮少가 蜂毒藥鍼液의 apoptosis誘發效果에 의한 것인 지를 分析하기 위하여 apoptosis signal을 傳達하는 細胞내 蛋白質素의 하나인 Cpp32 活性度를 測定하였다. 實驗은 蜂毒藥鍼을 실시하지 않은 對照群의 중앙 5例와 50 μl 蜂毒藥鍼群의 腫瘍 5例를 對象으로 하였다. Caspase-3의 activity는 c-caspase-3의 tetrapeptide p-nitroanilide (pNA) substrate인 Ac-DEVD-pNA를 利用하여 ELISA로 測定하였다. Caspase-3의 tetrapeptide inhibitor인 Ac-DEVD-CHO와 Ac-DEVD-pNA는 Calbiochem(La jolla, CA, USA)으로부터 購入하였다. 實驗은 20 μl 의 cell lysates를 100 μM 의 Ac-DEVD-pNA를 包含한 180 μl 의 reaction buffer(100mM HEPES, pH 7.5, 20% glycerol, 5mM DTT, and 0.5mM EDTA)와 혼합한 뒤 96-well microtiter plates(Nune Vanguard, Neptune, NJ, USA)를 利用하여 37°C에서 培養한 後 mi-

croting plate reader(Molecular Devices Inc. Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 吸光度 405 nm로 每 10분마다 monitoring하였다.

2) Apoptosis 關聯 遺傳子 發顯分析

(1) Total cellular RNA의 抽出

Total cellular RNA는 腫瘍組織으로부터 single-step method에 의해 抽出하였다. 0.1M 濃度の 2-mercaptoethanol을 添加한 GSS solution(250g의 guanidine isothiocyanate, 17.6 ml의 0.75M sodium citrate, 26.4ml의 10% sarkosyl 그리고 293ml의 3次 蒸溜水)으로 solution D를 만들었다. 분쇄한 組織細胞에 500 μ l solution D와 2M의 50 μ l sodium acetate (pH 4.0)를 添加한 후 vortexing하였다. 500 μ l water-saturated phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)을 混合하여 20 秒간 vortexing한 後 15分間 얼음에서 放置하였다. 20分間 15000g에 遠心分離한 後 上層液에 1000 μ l cold isopropanol을 混合하여 -70℃에서 24時間동안 貯藏한 後 沈澱시켰다. RNA를 20分間 15000g에 遠心分離한 後 RNA pellets을 100% ethanol과 70% ethanol로 洗滌하였다. RNA를 30 μ l의 RNase-free water에 溶解시켰다. 抽出된 RNA의 濃度は 吸光度 260nm과 280nm에서 spectrophotometric measurement (Schimadzu Scientific Instruments, Inc., Concord, CA, USA)로 測定하였으며, optical density(260/280)의 比率 1.0을 40 μ g/ml RNA로 세팅하여 濃度を 決定하였다.

(2) cDNA의 合成

抽出된 1 μ g의 RNA는 MoMuLV(Gibco)과 random hexamer primers를 사용하여 20 μ l cDNA로 逆轉寫하였다. 1 μ g의 抽出된 RNA를 2

μ l의 reverse transcriptase buffer, 1 μ l의 random hexamer(10 pM), 1 μ l의 MoMuLV-RT (10 U/ μ l), 1 μ l의 dNTP(10 pM), 그리고 0.5 μ l의 RNase inhibitor와 混合하였다. 이 混合物은 23℃에서 15分間, 42℃에서 1時間 그리고 95℃에서 5分間 培養하였다. 各各의 RNA로부터 얻어진 2개의 分離된 cDNA는 1:4 또는 1:8로 sterile H₂O로 稀釋하여 PCR 反應에 利用하였다.

(3) RT-PCR 施行

遺傳子 發顯에 대한 定量的 分析을 위하여 cycle numbers(21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, and 42 cycles)를 增加시키면서 連續적으로 稀釋된 cDNAs (1:0, 1:2, 1:4, and 1:8)에 對한 PCR을 施行하였다. 各各의 cycle은 95℃로 1分間의 denaturation, 58-62℃로 45秒間 annealing, 그리고 72℃에서 1分間의 polymerization으로 構成하였다. 50 μ l의 PCR 反應에서 12.5-25ng의 cDNA는 26-34 cycle을 施行하는 동안 housekeeping standard GAPDH을 包含한 모든 遺傳子들의 增幅이 大수적으로 增加함이 確認되었다. Apoptosis 關聯 遺傳子의 發顯分析을 위해 본 實驗에서 사용한 primer들은 Table I에 정리된 바와 같으며 구체적인 PCR 조건은 아래의 ①, ②, ③에 기술하였다. RT-PCR 產生物은 1時間동안 110 volts로 2% agarose gels(FMC, Rockland, ME)을 利用하여 分離하였다. Agarose gels는 30分間 ethidium bromide(0.5 μ g/ml of 1 X TBE)로 染色한 後 15分間 1X TBE로 脫色하였다. PCR 產生物은 紫外線을 利用하여 可視化한 後 寫眞撮影하였다. 寫眞影像의 陰影이 깨끗해지도록 蒸溜水에 적시고 나서 乾燥시켰다. Unspliced RNA 또는 genomic DNA의 PCR 產生物과 spliced mRNA

의 PCR 產生物의 鑑別을 위하여 3'과 5' primer 는 적어도 하나의 intron에 의해 分離되어 各各 다른 exons에 놓여지도록 製作하였다. 各各의 遺傳子 增幅에 대한 RT-PCR의 特異性은 biotinylated internal oligonucleotides를 利用한 Southern probing analysis로 確認하였다.

① 各 cDNA를 對象으로 다음과 같이 試料를 混合하였다.

10X amplification buffer	10.0 μ l
Mixture of dNTP(10pM)	2.0 μ l
Primer1 (10pM)	1.0 μ l
Primer2 (10pM)	1.0 μ l
Template cDNA	1.0 μ l
rTaq polymerase	0.4 μ l
H2O	84.6 μ l

② 다음의 條件으로 36-40 cycles의 PCR反應을 施行하였다.

- First cycle	
Denaturation	5 min at 94 $^{\circ}$ C
Annealing	1 min at 59 $^{\circ}$ C
Polymerization	1 min at 72 $^{\circ}$ C
- Subsequent cycle (34 cycles)	
Denaturation	1 min at 94 $^{\circ}$ C
Annealing	1 min at 59 $^{\circ}$ C
Polymerization	1 min at 72 $^{\circ}$ C
- Last cycle	
Denaturation	1 min at 94 $^{\circ}$ C
Annealing	1 min at 59 $^{\circ}$ C
Polymerization	10 min at 72 $^{\circ}$ C

③ PCR products는 2% agarose gel에서 100V, 10분간 전기영동한 후 densitometer를 利用하여 各 band의 밝기를 分析하였으며 GA-PDH에 대한 target 遺傳子의 상대적인 값을 利用하여 정량화를 施行하였다.

(4) RT-PCR 產生物의 Densitometric An-

alysis 遺傳子 發顯에 대한 定量化는 ethidium bromide-stained gels을 laser densitometry로 scanning하여 얻었다. Signal intensity의 測定은 IBM 互換 컴퓨터에서 Molecular Analyst program(version 2.0)을 利用하여 laser densitometer(Bio-Rad)로 實行하였다. RT-PCR 產生物 寫眞影像의 陰影調節部는 持續적으로 scanning하고, 背景의 intensity를 減算한 후 housekeeping gene(GAPDH)의 intensity에 대한 各各의 遺傳子 發顯 intensity의 比率을 計算함으로써 遺傳子의 發顯을 定量化하였다. 各各의 준비된 cDNA는 最少 2회의 定量的 RT-PCR을 反復 施行하였다.

7. 定量的 RT-PCR에 의한 細胞 週期 關聯 遺傳子 發顯分析

蜂毒藥鍼液이 細胞週期調節 遺傳子 發顯에 미치는 影響을 分析하기 위하여 quantitative RT-PCR을 施行하였다. 對照群 및 50 μ l 蜂毒藥鍼群 各 2例로부터 RNA를 抽出하고 이로부터 cDNA를 合成한 後 觀察하고자 하는 遺傳子에 特異的인 primer를 利用하여 PCR을 施行하였다. PCR products는 전기영동을 통하여 確認하고 遺傳子 發顯量은 laser densitometer를 利用하여 定量化하였다. 먼저 蜂毒藥鍼液의 細胞增殖抑制效果와 遺傳子 發顯과의 相關性을 把握하기 위하여 細胞分裂週期の 促進을 誘導함으로써 腫瘍細胞의 增殖을 促進하는 것으로 잘 알려진 c-Fos, c-Jun, c-Myc, Cyclin D1 遺傳子와 細胞分裂을 抑制함으로써 腫瘍의 成長을 抑制하는 p53, p21/Waf1 遺傳子의 發顯이 蜂毒藥鍼液의 投與후에 變化하는 지를 分析했다. 細胞 週期 關聯 遺傳子 mRNA 發顯에 對한 定量的 RT-PCR 分析은 apoptosis 關聯 遺傳子 mRNA 發顯에 대한 定量的 RT-PCR 分析과 같은 方法으로 施行하였

으며 사용된 oligonucleotide primers와 seq- uences primers는 Table I 과 같다.

8. 統計處理

實驗結果 각 군의 統計는 SPSS를 이용하여 분산분석법에 의한 분산비를 통하여 각 군 사이의 평균치 차이에 대한 유의성을 검정한 후, 黑色腫 치료효과에 대한 것은 Bonferroni test로 통계처리 하였으며, Cpp32 활성분석에 대한 것은 Student's T test로 통계처리하였다.

Table I. Oligonucleotide Primers for Quantitative RT-PCR Analysis

Genes	Primer	Sequences (5' to 3')	Orientation
Internal Control			
GAPDH	F	GAACGAGAGTCCGAGATTCG	Sense
	R	TTAGCACAGCATGACGATAT	Antisense
Apoptosis			
Bcl-2	F	AGGACTTATCGAGCTTAAAT	Sense
	R	GTGGCCTAGCACTCAGTTAG	Antisense
Bcl-XL	F	GGACTCTGGAATCACATGAA	Sense
	R	GGACTGCATGCTACTCGCAT	Antisense
Bax	F	AGAGCGCTTTACGCTCTGAC	Sense
	R	TTTACGACTTAAGCAACTCG	Antisense
Cell Cycle			
c-Jun	F	GGGCTACCACTCGTTTCATT	Sense
	R	GCTAACTTTAACCTGHACTION	Antisense
c-Fos	F	GACCCATATGATTGTAAG	Sense
	R	TTACTGACTCTGCTTTGATC	Antisense
c-Myc	F	AGTTTCCACGAGTCATGAGA	Sense
	R	CCATTTGCTACATCCCATC	Antisense
CyclinD1	F	GTTACCCGCTGCTACCTTGA	Sense
	R	TTAGCTCTCGATTGGATCTC	Antisense
p53	F	ACACATCGGCACCCTCGATC	Sense
	R	CACATCGGGATCGAGGACCT	Antisense
p21/Waf1	F	CCACGCTCGTATGCCAATCG	Sense
	R	GGTATCTATCTACAGACGT	Antisense

III. 성적

1. DMBA에 의한 黑色腫의 發生

DMBA 塗布後 종양의 발생시기와 빈도 및 밀

도는 DMBA 100 μg에서 6주후부터 가장 빠르고 높게 나타나 용량 의존적 黑色腫 발생양상이 관찰되었다(Table II).

Table II. Melanoma of C57BL Mouse induced by DMBA

	Volume of DMBA applied			
	0 μg	50 μg	75 μg	100 μg
No. of DMBA applied mice	10	10	10	10
Initial tumorigenesis time(week)	-	9	7	6
Frequency of tumorigenesis	0	4/10 (40%)	8/10 (80%)	10/10 (100%)
Density of tumorigenesis(average)	0	5/4(1.25)	11/8(1.38)	15/10(1.50)

2. 蜂毒藥鍼 전처치가 黑色腫 발생에 미치는 효과

腫瘍의 發生頻도와 發生密度를 調査한 結果 蜂毒藥鍼液의 前處置는 DMBA에 依한 黑色腫의 發生을 豫防하는 效果가 없는 것으로 觀察되었다 (Fig. 1, Fig. 2).

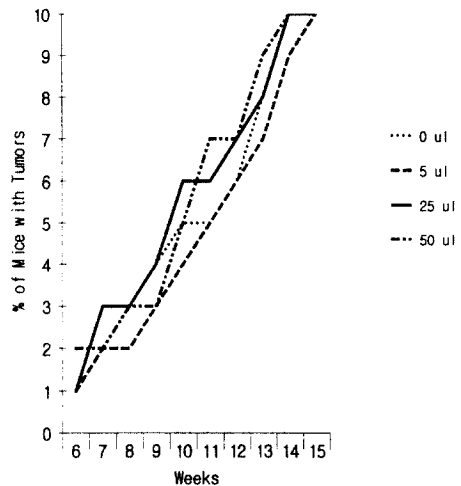


Fig. 1. Effect of Bee Venom pretreatment on the melanoma frequency by DMBA

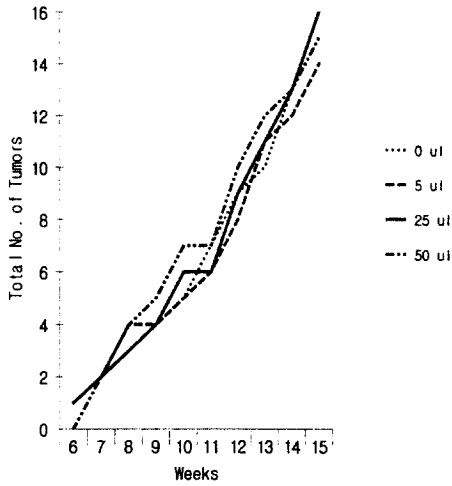


Fig. 2. Effect of Bee Venom pretreatment on the melanoma density generation by DMBA

3. 蜂毒藥鍼이 黑色腫 성장억제에 미치는 효과

腫瘍의 發生頻度와 發生密度를 調査한 結果 蜂毒藥鍼이 DMBA에 의한 黑色腫의 成長을 抑制하는 效果가 있는 것으로 觀察되었으며 그 效果는

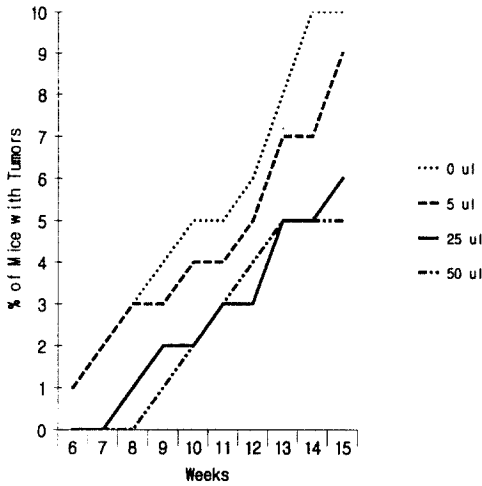


Fig. 3. Effect of Bee Venom pretreatment on the melanoma growth by DMBA (frequency of melanoma)

5 μ l 投與群보다 25 및 50 μ l 投與群에서 보다 현저하게 觀察되었다(Fig.3, Fig.4).

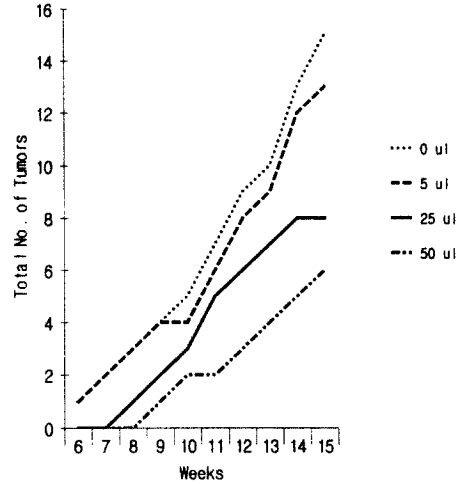


Fig. 4. Effect of Bee Venom pretreatment on the melanoma growth by DMBA (density of melanoma)

4. 蜂毒藥鍼의 黑色腫 治療 效果

蜂毒藥鍼을 실시하지 않은 대조군의 境遇 黑色腫의 直径이 0.67 ± 0.14 cm로 측정되었으나, 5 μ l 蜂毒藥鍼군의 경우 黑色腫의 直径은 0.43 ± 0.07 cm, 25 μ l 蜂毒藥鍼군은 0.27 ± 0.04 cm, 50 μ l 蜂毒藥鍼군은 0.24 ± 0.06 cm로 대조군에 비하여 각각 유의성($P < 0.01$, $P < 0.0001$ 및 $P < 0.001$) 있게 감소하였다(Table III).

Table III. Reduction of Tumor Size by Bee Venom Treatment

Treatment	Melanoma mass (diameter; cm)
No treatment of bee venom	0.67 ± 0.14
Bee venom 5 μ l treatment	$0.43 \pm 0.07^*$
Bee venom 25 μ l treatment	$0.27 \pm 0.04^{**}$
Bee venom 50 μ l treatment	$0.24 \pm 0.06^{**}$

Values are means \pm standard deviation. Multiple comparisons against no treatment group were made by ANOVA

followed by bonferroni test(*p<0.01, **p<0.0001).

5. Apoptosis 분석

1) Cpp32 activity 분석

蜂毒藥鍼을 실시하지 않은 對照群 5例와 50 μ l 蜂毒藥鍼群의 腫瘍 5例를 對象으로 Cpp32 activity를 측정 한 결과, 50 μ l 蜂毒藥鍼群의 Cpp32 활성(0.77 \pm 0.06, 0.77 \pm 0.04)은 對照群의 Cpp32 활성(0.45 \pm 0.07, 0.46 \pm 0.06)에 比하여 유의하게 상승(p<0.001)하였다(Table IV).

Table IV. Increased Cpp32 Activity by Bee Venom Treatment

	Cpp32 Activity	
	Experiment 1	Experiment 2
No treatment of Bee Venom	0.45 \pm 0.07	0.46 \pm 0.06
Bee Venom 50 μ l treatment	0.77 \pm 0.06*	0.77 \pm 0.04*

Values are means \pm standard deviation. Statistical analysis was done by student t-test between no treatment group and bee venom 50 μ l treatment group(*p<0.0001).

2) Apoptosis 關聯 遺傳子 發顯分析

蜂毒藥鍼이 apoptosis를 抑制하는 Bcl-2와 Bcl-XL 遺傳子の 發顯에는 變化가 觀察되지 않았으나 apoptosis를 促進하는 代表的인 遺傳子인 Bax의 發顯에는 대조군에 比하여 增加되었다(Table V, Fig. 5).

Table V. Quantitative RT-PCR Analysis of the Expression of Apoptosis Regulating Genes

Genes	Control		Bee venom treatment	
	Melanoma	Melanom	Melanoma	Melanoma
	1	a 2	16	17
Bcl-2	1.15	1.18	1.09	1.16
Bcl-XL	1.07	1.12	1.11	1.20
Bax	1.06	1.18	1.95	1.98

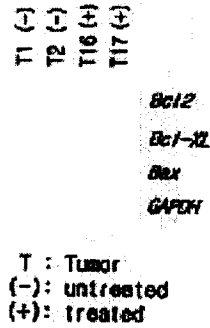


Fig. 5. Quantitative RT-PCR analysis of apoptosis-related genes

6. 細胞週期 關聯 遺傳子 發顯分析

細胞分裂週期를 促進함으로써 腫瘍細胞의 增殖을 促進하는 것으로 알려진 c-Fos, c-Jun, c-Myc, Cyclin D1 遺傳子和 細胞分裂을 抑制함으로써 腫瘍의 成長을 抑制하는 p53, p21/Waf1 遺傳子の 發顯이 蜂毒藥鍼 후 어떻게 變化하는지를 알아본 結果 對照群에 比하여 蜂毒藥鍼群에서는 細胞分裂을 促進하는 것으로 알려진 c-Jun, c-Fos, Cyclin D1, 遺傳子の 發顯減少와 腫瘍抑制 遺傳子로 알려진 p53과 p53 機能의 媒介者로서 細胞分裂 抑制機能을 가진 p21/Waf1 遺傳子の 發顯 增加가 觀察되었다(Table VI, Fig. 6).

Table VI. Quantitative RT-PCR Analysis of the Expression of Cell-cycle Regulating Genes

Genes	Control		Bee venom treatment	
	Melanoma	Melanom	Melanoma	Melanoma
	1	a 2	16	17
c-Jun	1.04	1.09	0.76	0.68
c-Fos	1.32	1.27	0.88	0.90
c-Myc	0.93	1.05	0.95	0.98
CyclinD1	1.11	1.25	0.58	0.63
p53	0.89	0.77	1.56	1.43
p21/Waf1	0.62	0.58	1.22	1.19

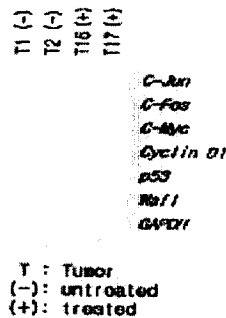


Fig. 6 Quantitative RT-PCR analysis of cell cycle-related genes

IV. 고찰

全體 惡性腫瘍 中 皮膚에 發生하는 腫瘍이 차지하는 比率이 2.4~4.4%로 增加하는 趨勢를 보이고 있으며²²⁾, 특히 惡性 黑色腫에 의한 死亡은 肺癌을 除外한 다른 癌에 比하여 빠른 速度로 增加하고 있다²³⁾. 黑色腫은 臨床組織學的으로 惡性黑字, 表在擴大型 黑色腫, 結節型 黑色腫, 末端黑字性 黑色腫로 分類한다^{1,24,25)}. 惡性 黑色腫은 멜라닌色素을 만들어내는 皮膚細胞 또는 모반細胞가 惡性化된 腫瘍으로 發生部位는 발바닥, 안면, 종아리, 손발톱, 체간, 손바닥, 팔 順이며 眼部, 鼻腔, 肛門, 直腸, 食道, 外陰部 등의 粘膜에서도 發生한다²⁶⁾.

發生原因은 大部分 紫外線 過多露出이나 發癌性 化學物質과 密接한 關聯이 있는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. 이러한 現象은 오존(O₃)濃度の 減少로 地上에 到達하는 有害 紫外線이 增加하고 있고 生活의 풍요로움 속에 餘暇時間의 大部分을

햇볕에 露出된 狀態로 지내는 境遇가 많아졌으며 더불어 産業化에 따른 環境汚染으로 發癌性 化學物質에 接觸되는 頻度가 높아진 데에서 起因하는 것으로 推定되고 있다²⁸⁾. 또한 平素에 慢性的인 刺戟을 많이 받는 부위, 옷과 스치는 부위, 외상을 입은 부위 등에 誘發되는 外的인 刺戟도 危險因子 中の 하나라고 생각되어지고 있다^{29,30)}.

악성 黑色腫의 惡性度を 規定하는 基準으로 核分裂의 存在, 림프구나 形質細胞로 된 炎症反應, 表皮眞皮 境界活性和 黑色腫으로 破壞되어 眞皮間質이 消失된 것 등을 들 수 있다^{1,24)}. Clark³¹⁾는 黑色腫의 侵犯程度를 5개의 水準으로 分類하여 豫候 判定에 利用하였으며 最近에는 侵犯程度를 表皮顆粒層부터의 mm 單位로 測定하여 stage I (皮膚에 局限), stage II (局所림프절) 및 stage III (遠隔轉移)로 나뉘는 Breslow의 分類法¹⁾이 많이 利用되고 있다.

治療는 早期에 發見하고 早期에 手術하여 크게, 完全히 切除하는 것이 가장 重要하며 侵犯程度에 따라 1~3cm程度로 切除하는 것이 最近의 趨勢이다¹⁾. 抗癌劑를 使用한 化學療法은 DTIC (decarbazine)가 가장 많이 使用되나 效果的이지 못하다. 림프구 등을 使用한 免疫療法은 아직 實驗段階로 BCG를 黑色腫病變에 注射하거나 活性化된 killer細胞와 IL-2를 使用하기도 한다. 放射線療法도 큰 效果는 없고 骨이나 神經系에 轉移된 境遇에 症狀의 輕減을 위해 利用하는 程度이다^{1,24,25,28,29)}.

東洋醫學에서 皮膚에 發生한 腫瘍이나 炎症에 대한 것은 주로 黧花瘡, 石疽, 失榮, 癌發, 黑疔 등으로 表現했고^{4,32)}, 最近에는 新生物疾患에 대하여 瘤로 表現하고 있다.^{2,4)}

癌의 病因은 氣滯血虛와 肺, 脾, 腎 등 臟腑의 機能失調등으로 말미암아 생긴 痰이 凝結되어 塊를 形成하여 發生되며 治法은 健脾, 益氣, 養陰,

補血시키는 扶正法과 行氣, 化痰, 化痰, 清熱解毒, 軟堅散結시키는 祛邪法으로 나누어 初期에는 攻法爲主, 中期에는 攻補兼治, 末期에는 扶正爲主로 治療한다^{2,4)}고 하였다.

피부에 발생하는 종양에 대한 서양의학적 치료법은¹⁾, 生體에 대한 副作用, 正常細胞에 대한 毒性作用이 問題點으로 提起되고 있으므로 韓藥과 抗癌劑의 併用 投與 및 體質改善 방법이 試圖되고 있다^{3,4,22)}.

人體의 臟腑機能이 均衡을 이루고 있고 陰陽이 調和로우면 健康하다는 韓醫學의 見解는 腫瘍免疫學 및 腫瘍遺傳學에서 밝히고 있는 癌의 發生과 成長에 있어서 免疫反應 및 apoptosis의 役割과 類似性을 갖고 있다. 免疫監視機能이라는 一種의 個體防禦能力이 弱화되어서 癌細胞화된 非正常細胞의 破壞除去作用을 못하게 되어 正常細胞가 가진 細胞增殖 調節機能을 잃고 非正常的으로 成長하게 된다. 따라서 韓藥 및 鍼灸의 抗癌效果에 대한 研究가 活發하게 이루어지고 있으며^{2,3,4,5)}, 또한 藥鍼³³⁾과 蜂藥藥鍼에 대한 抗腫瘍免疫學的^{14,16,34)} 및 抗腫瘍遺傳子的¹⁹⁾ 實驗研究가 持續的으로 施行되고 있다.

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고, 祛風除濕, 止疼痛, 解痙平喘, 消腫降壓하는 效能이 있으며⁸⁾ 蜂毒構成成分의 作用과 機轉^{18,19,21)}, 蜂毒의 過敏性과 毒性³⁵⁾, 抗痙攣¹³⁾, 捻挫³⁶⁾, 關節炎³⁷⁾, 消炎鎮痛^{9,10,11,12)}, 單純疱疹³⁸⁾, 多發性硬化證³⁹⁾, 免疫療法^{14,16)}, 抗腫瘍^{14,17,18,19,20,21)} 등의 疾病治療에 대한 研究가 報告되었다.

蜂毒의 抗癌效果에 대하여 Allen DH 등²⁰⁾은 蜂毒成分 중 apamin의 항암효과를 報告하였으며 Beatty BG 등⁴⁰⁾은 蜂毒成分 중 phospholipase A2의 항암효과를 報告한 반면 Gerst JE 등²¹⁾은 蜂毒의 成分中 melittin이 adenylate cyclase를 抑制함으로 인한 항암효과가 있다고 報告하였다.

權 등¹⁴⁾은 蜂毒藥鍼이 3-MCA 誘發 上皮腫에 對한 免疫學的 方向에서의 抗癌效果를 報告하였고, 朴 등¹⁷⁾은 蜂毒成分全體를 利用해서 DNA合成에 關聯된 細胞分裂抑制 및 apoptosis誘發과 各各에 關聯된 遺傳子의 變化를 觀察해 抗癌效果를 報告하였으며, 權 등¹⁹⁾은 蜂毒의 有效成分中 apamin, melittin 및 phospholipase A2를 사용하여 DNA合成에 關聯된 細胞分裂抑制 및 apoptosis誘發과 各各에 關聯된 遺傳子의 變化를 觀察하여 黑色腫에 대한 抗癌效果가 있음을 보고하였으며, 金 등¹⁸⁾은 apamin이 投與濃度가 增加함에 따라 細胞增殖 및 DNA合成이 抑制되며 Erk1/2의 phosphorylation을 抑制함으로써 惡性腫瘍細胞의 MAPK 信號傳達系를 遮斷하는 機能이 있으며 이는 發癌遺傳子인 CyclinD1, c-Fos, c-Jun 등의 發顯 抑制를 誘導하기 때문이라고 報告하였다. 蜂毒藥鍼의 항종양효과에 대한 연구는 蜂毒 전체나 蜂毒성분의 일부를 이용하여 면역학적 연구와 세포유전자적 연구가 進行되고 있으나 이와 같은 연구의 대부분은 in vitro에서 수행하였을 뿐 in vivo에서의 연구는 충분히 접하지 못하였다.

이에 著者는 C57BL mouse에 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)를 도포하여 黑色腫을 誘發시킴으로써 蜂毒藥鍼의 항종양효과와 기전을 in vivo에서 알아보고자 黑色腫을 유발 前과 後에 각각 蜂毒藥鍼을 시행한 후 종양의 성장억제 효과를 분석하고 apoptosis와 細胞分裂週關聯 遺傳子 mRNA 發顯에 대한 定量的 RT-PCR分析을 하였다.

DMBA 塗布後 黑色腫의 발생시기와 빈도 및 밀도는 DMBA 100 μg에서 6주후부터 가장 빠르고 높게 나타나 용량 의존적 黑色腫 발생양상이 관찰되었다.

蜂毒藥鍼이 黑色腫 發生을 豫防하는 지를 分析

하기 위해 DMBA 100 μ g 處理群에 蜂毒藥鍼液 5, 25 및 50 μ l을 前處置한 結果 蜂毒藥鍼은 黑色腫의 發生을 豫防하는 效果가 없는 것으로 나타났다.

蜂毒藥鍼이 黑色腫 成長을 抑制하는 效果를 分析한 結果 蜂毒藥鍼은 DMBA에 의한 黑色腫의 成長을 抑制하는 效果가 있는 것으로 나타났으며 그 效果는 5 μ l 蜂毒藥鍼群보다 25 μ l 및 50 μ l 蜂毒藥鍼에서 보다 현저하게 나타났다.

蜂毒藥鍼의 黑色腫 治療效果를 分析하기 위해 腫瘍의 死滅與否를 調査한 結果 대조군의 黑色腫 직경에 비해, 蜂毒藥鍼군의 黑色腫 直경이 유의하게 감소하여 蜂毒藥鍼이 黑色腫 치료효과가 있음이 觀察되었다.

蜂毒藥鍼으로 腫瘍組織이 縮少된 것이 apoptosis 誘發效果에 의한 것인 지를 알아보기 위하여 apoptosis signal을 傳達하는 細胞내 蛋白酶素의 하나인 Cpp32 활성도를 ELISA를 利用하여 測定한 結果, 50 μ l 蜂毒藥鍼群의 Cpp32 활성이 對照群에 比하여 有意하게 증가되었다. 이는 박 등¹⁷⁾이 invitro에서 蜂毒藥鍼 1.0 μ l/ml 이상의 용량을 투여하면 Cpp32 활성이 對照群에 比하여 有意하게 증가한 결과와 일치한다.

蜂毒藥鍼으로 인한 腫瘍크기의 縮少 및 Cpp32 activity의 增加는 蜂毒藥鍼이 이 두 細胞學的 現象을 調節하는 遺傳子의 發顯에 影響을 미침으로서 일어날 可能性을 示唆하는 것으로 蜂毒藥鍼이 apoptosis 및 細胞週期調節 遺傳子의 發顯에 미치는 影響을 알아보기 위하여 定量적 RT-PCR을 施行하였다. 蜂毒藥鍼이 腫瘍發生을 促進하며 apoptosis를 抑制하는 Bcl-2와 Bcl-XL 遺傳子의 發顯에는 變化가 觀察되지 않은 반면 apoptosis를 促進하여 腫瘍發生을 抑制하는 Bax의 發顯은 대조군에 比하여 增加되었다. 한편 박 등¹⁷⁾의 invitro에서의 연구에서는 Bax의 發顯은

대조군에 比하여 增加하고 Bcl-2와 Bcl-XL 遺傳子의 發顯은 감소하여 Bax의 발현에만 일치한 결과를 보였다.

또한 蜂毒藥鍼은 細胞分裂을 促進하는 것으로 잘 알려진 c-Jun, c-Fos, Cyclin D1, 遺傳子의 發顯을 減少시키며 腫瘍抑制 遺傳子로 잘 알려진 p53과 p53 機能의 媒介者로서 細胞分裂 抑制機能을 가진 p21/Waf1 遺傳子의 發顯을 增加시켰다. 한편 박 등¹⁷⁾의 invitro에서의 연구에서는 p21/Waf1 遺傳子의 發顯은 증가하였고 c-Fos, Cyclin D1, 遺傳子의 發顯은 減少하였으며 c-Jun은 有意한 變化가 없었다.

以上の 結果를 綜合하면 蜂毒藥鍼은 Cpp32의 活性化를 통하여 腫瘍組織細胞의 apoptosis를 誘發하며 이러한 活發한 apoptosis 및 細胞分裂 抑制機能을 통하여 腫瘍細胞의 死滅과 腫瘍組織의 縮少를 誘導한다고 判定되며 앞으로 이에 대한 구체적인 研究가 지속적으로 進行되어야 될 것으로 思慮된다.

V. 結 論

蜂毒藥鍼이 C57BL mouse의 黑色腫에 대한 抗腫瘍효과와 分子생물학적 기전을 in vivo 에서 알아보기 위하여 黑色腫을 유발하기 前과 後에 각각 蜂毒藥鍼을 시행한 후 腫瘍의 성장억제효과를 분석하고 apoptosis와 細胞週期關聯 遺傳子 mRNA 發顯에 대한 定量的 RT-PCR分析을 施行하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 蜂毒藥鍼 前處置는 DMBA에 의한 黑色腫 發生豫防效果가 없었다.
2. 蜂毒藥鍼은 DMBA에 의한 黑色腫의 成長을 抑制하는 效果가 있었으며, 5 μ l 蜂毒藥鍼群 보다

25 μ l 및 50 μ l 蜂毒藥鍼群에서 현저하게 나타났다.

3. 蜂毒藥鍼은 DMBA로 유발된 黑色腫의 직경을 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰다.

4. 蜂毒藥鍼에 의한 Cpp32 activity는 대조군에 비하여 유의하게 상승되었다.

5. 蜂毒藥鍼群은 대조군에 비하여 Bax 유전자의 發顯을 증가시켰다.

6. 蜂毒藥鍼群은 對照群에 비하여 c-Jun, c-Fos 및 Cyclin D1 遺傳子의 發顯을 減少시켰고, p21/Waf1 遺傳子의 發顯을 增加시켰다.

VI. 참고문헌

- 1) 大韓皮膚科學會 教科書 編纂委員會. 皮膚科學 改正3판. 서울:여문각. 1994:452-456.
- 2) 潘敏求. 中華腫瘤治療大成. 河北:河北科學技術出版社. 1995:9-112.
- 3) 蔡禹錫. 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 관한 文獻的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1990;11(2): 54-91.
- 4) 崔昇勳. 韓醫學의 腫瘍에 對한 認識과 病理論. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1995;1(1):11-28.
- 5) Xiaoguang C, Hongyan L, Xiaohong L, Zhaodi F, Yan L, Lihua T, Rui H. Cancer chemopreventive and therapeutic activities of red ginseng. J Ethnopharmacol. 1998;60(1):71-78.
- 6) 유혜정. 陽和湯의 B16黑色腫 암모델에 대한 항종양효과 및 면역반응에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 2000.
- 7) 배원영. 魚腥草藥鍼이 B16黑色腫 암모델에 대한 항종양효과 및 면역반응에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 2001.
- 8) 金文昊. 蜂毒療法과 蜂鍼療法. 서울:韓國教育企劃. 1992:20-37, 41-42, 67-64, 104-112, 134-149, 171-176.
- 9) 高炯均. 蜂毒鍼療法이 抗炎, 鎮痛 및 解熱에 미치는 效能에 관한 實驗的 研究. 大韓韓醫學會誌. 1992;13(1):283-292.
- 10) 金利和, 李栽東, 盧植, 閔炳一. 頤氣에서 合谷穴 蜂毒藥鍼刺戟에 依한 開口反射의 反應. 大韓韓醫學會誌, 1999;20(1):106-112.
- 11) 都垣錫, 張峻赫, 金慶鎬, 尹鍾和, 金甲成. 蜂毒療法이 頤氣의 膝關節 炎症性 浮腫에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1995;12(1):211-220.
- 12) 趙光浩, 李栽東, 朴東錫, 安秉哲. Jaw Opening Reflex 및 RT-PCR을 利用한 蜂毒의 鎮痛效果. 大韓藥鍼學會誌. 2000;3(1):35-52.
- 13) 孔賢淑, 高炯均, 金昌煥. 蜂毒療法이 抗癌에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1993;10(1):159-165.
- 14) 權奇祿, 高炯均, 金昌煥, 姜成吉, 朴英培, 金容爽. 蜂毒藥鍼刺戟이 3-MCA 誘發 上皮腫에 對한 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1997;14(2):157-172.
- 15) 權奇祿, 高炯均. 蜂毒療法의 免疫反應에 관한 臨床的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2000;17(1):169-174.
- 16) 이경희, 김창환, 강성길, 고희균. 產地別 蜂毒液藥鍼刺戟이 免疫機能低下에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2000;17(4):28-40.

- 17) 박찬열, 서정철, 최도영, 안병철. 蜂毒藥鍼의 抗癌效果에 대한 分子生物學的 研究. 大韓藥鍼學會誌. 2000;3(1):1-19.
- 18) 김운미, 이재동, 박동석. 藥鍼用 蜂毒成分中 Apamin의 항암효과와 MAP-Kinase 信號傳達體系에 관한 研究. 2001;18(4):101-115.
- 19) 권도희, 이재동, 최도영. 藥鍼用 蜂毒成分中 apamin, Melittin 의 抗癌作用. 大韓鍼灸學會誌. 2001;18(1):129-145.
- 20) Allen DH, Lepple-Wienhues A, Cahalan MD. Ion channel phenotype of melanoma cell lines. J Membr Biol. 1997;155(1):27-34.
- 21) Gerst JE, Salomon Y. Inhibition by Melittin and fluphenazine of melanotropin receptor function and adenylate cyclase in M2R melanoma cell membranes. Endocrinology. 1987;121(5):1766-72.
- 22) 공현식, 류봉하, 박동원, 류기원. 韓國韓醫學의 腫瘍研究에 對한 現況. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1995;1(1):55-81.
- 23) 統計廳. 19大分類에 의한 死因構造, 死亡原因 統計年報. 서울:1997;16:21-25.
- 24) Evans G, Manson PN. Review and current perspectives of cutaneous malignant melanoma. J Am Coll Surg. 1994;178:523-540.
- 25) Hoffman S, Yohn J, Robinson W. Melanoma: Clinical characteristics. Hosp Pract. 1994;29(6):37-50.
- 26) Austoker J. Melanoma: Prevention and early diagnosis. Br Med J. 1994;308:1682-1686.
- 27) 서울대학교 의과대학. 腫瘍學. 서울:서울대학교출판부. 1990:1-3, 91-95, 126.
- 28) 임명규. 皮膚扁平上皮癌의 原因疾患에 관한 臨床的 考察. 大韓皮膚科學會誌. 1996;34(1):85-92.
- 29) NIH Consensus Conference. Early Melanoma. JAMA. 1992;268:1314-1319.
- 30) Walton RG. Recognition and importance of precursor lesions in the diagnosis of early cutaneous malignant melanoma. Int J Dermatol. 1994;33:302-307.
- 31) Mihm MC Jr, Clark WH Jr, From L. The Clinical diagnosis classification and histogenic concepts of the early stages of cutaneous malignant melanomas. N Engl J Med. 1971;13:284(19)1078-1082.
- 32) 洪元植. 精校黃帝內經素問, 서울:東洋醫學研究院. 1981:36-49, 102-108, 213-220, 249-252.
- 33) 大韓藥鍼學會. 藥鍼療法施術指針書. 서울:한성인쇄. 1999:185-202.
- 34) 이종률, 채병윤. 3-MCA 誘發 上皮腫에 對한 海藻玉壺湯과 昆布의 抗腫瘍 效果와 免疫反應에 미치는 影響. 東醫學會誌. 1998;2(1):1-28.
- 35) 이종석, 고흥균, 김창환. 藥鍼用 蜂毒液의 安全性 評價에 關한 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1994;11(1):177-195.
- 36) 權奇祿. 蜂藥鍼療法의 檢控에 關한 臨床的 研究. 大韓藥鍼學會誌. 1999;16(2):1-6.
- 37) Millward-Sadler SJ, Wright MO, Davies LW, Nuki G, Salter DM.

- Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2000;43(9):2091-2099.
- 38) Yasin B, Pang M, Turner JS, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI, Wagar EA. Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000; 19(3):187-194.
- 39) Branas P, Jordan R, Fry-Smith A, Burls A, Hyde C. Treatments for fatigue in multiple sclerosis: a rapid and systematic review. *Health Technol Assess*. 2000;4(27):1-61.
- 40) Beatty BG, Qi S, Pienkowska M, Herbrich JA, Scheidl T, Zhang ZM, Kola I, Scherer SW, Seth A: Chromosomal localization of phospholipase A2 activating protein, an Ets2 target gene, to 9p21. *Genomics*. 1999;15;62(3):529-32.