

원저

## Cobrotoxin이 전립선 암세포 NF- $\kappa$ B 활성화에 미치는 영향

채상진 · 송호섭

경원대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

#### The Effects of Cobrotoxin on NF- $\kappa$ B Activation in Human Prostatic Cancer Cell Line(PC-3)

Chae Sang-jin and Song Ho-seub

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 cobrotoxin on the prostatic cancer cell line(PC-3).

**Methods** : After the treatment of PC-3 cells with cobrotoxin, we performed fluorescence microscope, MTT assay, Western blotting, Flow cytometry, PAGE electrophoresis and Surface plasmon resonance analysis to identify NF- $\kappa$ B, the change of calcium and NO.

**Results** : 1. The expression of NF- $\kappa$ B was decreased at 1nM and was decreased significantly at 2, 4, 8nM.

2. I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B inhibitor, was decreased significantly at 8nM and p-I $\kappa$ B $\alpha$ , phosphorylation of I $\kappa$ B, was decreased significantly at all concentrations of cobrotoxin.

3. The expressions of p50 and p65 were decreased significantly and dose-dependently at 1, 2, 4, 8nM.

4. The expression of p53 was increased significantly at 1, 2, 4, 8nM.

5. The calcium concentration in cell wasn't changed at 1, 2, 4, 8nM, but was increased dose-dependently at 30, 70, 130, 250nM comparing with lower dose of cobrotoxin.

6. The NO concentration in cell was increased significantly at 1, 2, 4, 8nM.

7. In immunochemical staining, we found that cobrotoxin-immunochemical complex move into intracellular space dose-dependently.

· 접수 : 2005년 7월 14일 · 수정 : 2005년 9월 10일 · 채택 : 2005년 9월 10일

· 교신저자 : 송호섭, 서울시 송파구 송파동 20-8 경원대 부속한방병원 침구과  
Tel. 02-425-3456 E-mail : hssong70@kyungwon.ac.kr

**Conclusion** : These results indicate that cobrotoxin has anti-cancer effects by inducing apoptosis.

**Key words** : Prostatic Cancer Cell Line, Cobrotoxin, NF-κB

## I. 緒 論

현대 문명의 발달과 더불어 각종 종양의 발생빈도가 현저하게 높아지고 있어 산업화된 선진국가에서는 매년 암으로 사망하는 빈도가 心脈管系 질환과 함께 증가하고 있는 추세이다<sup>1-2)</sup>.

암은 腫瘍<sup>3-4)</sup>, 癰疽<sup>3-4)</sup>, 腫毒<sup>3-4)</sup>, 積聚<sup>3-4)</sup>, 癥瘕<sup>3-4)</sup>, 瘰癧<sup>3-4)</sup>, 陰瘡<sup>3-4)</sup>, 癭瘤<sup>3-4)</sup>, 肺癰<sup>3-4)</sup>, 痰壅<sup>3-4)</sup>, 疝癖<sup>3-4)</sup>, 石癰<sup>3-4)</sup>, 石疽<sup>3-4)</sup>, 疔疽<sup>3-4)</sup>, 疔膈<sup>3-4)</sup> 등의 범주에 해당하며, 그 병리기전은 經絡瘀阻 臟腑失調 氣滯瘀血 痰結濕聚 熱毒內醞 氣血虧虛<sup>6)</sup> 등이고, 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 등이 활용되고 있다<sup>2,7)</sup> 서양의학적 치료법으로는 외과적 수술, 방사선요법, 화학요법, 면역요법 등이 사용되고 있는데<sup>8)</sup> 이러한 치료법은 암종에 따른 감수성 차이, 치료후 예후 불량, 재발 및 합병증 등의 부작용이 발생되는 것으로 보고되고 있으므로 이를 극복하기 위해 임상에서 한약과 항암제의 병용투여 및 한약을 이용한 체질개선이 시도되고 있고, 韓藥<sup>5)</sup>, 鍼<sup>9-10)</sup>, 봉약침을 포함한 다양한 藥鍼<sup>11-14)</sup> 등을 이용한 抗腫瘍免疫學적<sup>11-12)</sup> 및 抗腫瘍遺傳子적 실험연구<sup>13-14)</sup> 가 지속적으로 시행되어지고 있다<sup>15-16)</sup>.

또한, 최근에 독성이 있는 천연 peptide가 암 세포의 세포사멸(apoptosis)과 분화에 미치는 영향에 대한 연구보고가 있는데<sup>16-19)</sup>, 그 중 특히, 蜂毒의 항암효과에 대한 연구에서 Allen DH 들<sup>20)</sup>이 봉독의 성분 중 Apamin이 tumor를 억제하는데 상관이 있다고 보고하였으며, Wood MW 들<sup>21)</sup>은 봉독의 성분 중 Phospholipase A2가 tumor를 억제하는데 상관이 있다고 보고하였고, 박<sup>14)</sup>은 봉독성분 전체를 이용해 DNA합성에 관련된 세포분열억제 및 apoptosis유발과 각각에 관련된 유전자의 변화를 관찰해 항암효과가 있음을 발표하였으며, 권<sup>22)</sup>은 봉독 성분중 Apamin과 Phospholipase A2에서 항암효과가 있음을 발표하였다.

Cobrotoxin(Vipera lebetina turanica)은 Turkmenistan과 같은 중앙아시아에 주로 서식하는 뱀의 독으로 한

그룹의 기본 펩타이드들과 12개의 이황화결합을 가진 235개 아미노산 들로 구성된 중요한 factor V activator로 구성되어 있다<sup>23)</sup>.

factor V activator는 혈액응고에 중요한 역할을 하며, nicotinic acetylcholine receptor와의 결합력이 강하다<sup>24-25)</sup>고 하였는데 순환기계나 중추신경계에 영향을 미치고, cysteine 잔기를 가진 다른 분자와도 높은 결합력을 나타내어 분자의 생물학적 활성 변화에 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다.

이에 저자는 봉독보다 독성과 다른 분자와의 결합력이 강한 cobrotoxin을 이용하여 항암효과를 알아보고자 전립선암세포인 PC-3 cell에 cobrotoxin을 처리한 후, NF-κB, 칼슘과 NO의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### 1) 시약

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

#### 2) 시료

Cobrotoxin은 V. lebetina Turanica (Russia Academy, tashkent in Uzbekistan) [sigma社, 美國]에서 구입하였고 蒸溜水에 희석하여 사용하였다.

#### 3) 기기

Liquid scintillation counter(model LS 3801, USA), image analyser (Mitsubishi electric Co., Japan), FACS calibur flow cytometer(Becton Dickinson, NJ), Delta Scan System(Photon technology international; Prinston, NJ, USA), ELISA(Sunrise, Austria), Luminometer(LB 69P WinGlow, Germany),

Spectrometry(Spectra MAX plus, CA USA), Gel dryer(Model 583 Gel dryer, CA USA), Centrifuge (HA-1000-3, KOREA), CO<sub>2</sub> incubator(MCO-17AIC, JAPAN), flow cytometer (Coulter사) BIACORE 2000 and CM5 sensor chip BIACORE AB (Uppsala, Sweden)이다.

## 2. 방법

### 1) 시료 조제

Cobrotoxin을 3차 증류수로 희석하여 0.1, 0.5 및 1.0  $\mu$ g/ml 농도로 나누어 사용하였다.

### 2) 세포주 배양 및 세포내 유전자 주입

PC-3를  $2 \times 10^5$  cells로 penicillin (100U/ml), streptomycin (100mg/ml) 및 10% heat inactivated FBS가 포함된 DMEM 배지에 배양하였다. 세포가 90% 이상 배지에 차면 세포에 plasmid를 lipofectamine을 이용하여 세포 내로 도입 시킨다. Transfection을 위하여 DNA-lipofectamine을 준비하였다. 이때 조성은 2,000 complexes로 다음과 같았다. Dilute NF-B-luc plasmid DNA (0.8g) 및 -gal plasmid DNA (0.2g)를 Opti-MEM I Reduced Serum Medium without serum (or other medium without serum) 50 $\mu$ l에 넣어 섞었다. Lipofectamin 2000 사용 전 Opti-MEM I Medium (or other medium without serum) 50 $\mu$ l에 Lipofectamine 2,000 3 $\mu$ l를 섞어 실온에서 배양. 이때 DNA를 섞어주었다. 5분간 배양하여 [DNA with the diluted Lipofectamine 2,000(total volume; 100 $\mu$ l)] 섞고 20분간 실온에서 방치하여 DNA-Lipofectamine 2,000 복합체를 형성하였다. (DNA-Lipofectamine. 2,000 complexes는 실온에서 6시간 동안 안정하였음).

Optimem serum-free medium으로 well을 잘 닦고 DNA-Lipofectamine 2,000 complexes 100 $\mu$ l/well을 각 well에 넣어 가볍게 흔들어서 transfection 시켰다. 이때 NF-B-Luciferase reporter를 비교군으로 사용하였다. 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> incubator 에서 24-48시간 배양 후 transfection 시켰다. transfection 24시간 후 48시간 더 배양하고 LPS(1.0 $\mu$ g/ml) 및 sample (inhibitors) 처리하였다.

### 3) 군 분류

#### (1) 정상군(Normal group)

정상군은 PC-3세포에 아무 처리도 하지 않았다.

#### (2) 실험군(Treatment group)

실험군은 PC-3세포 cobrotoxin을 0.1 0.5, 및 1.0 $\mu$ g/ml를 각각 처리하였다.

## 4) Cobrotoxin이 NF- $\kappa$ B에 미치는 영향

### (1) 시료준비 및 정량측정

핵추출물은 이미 보고된 방법을 약간 변형하여 배양된 astrocytes 세포를 사용하여 분리하였다. 배양된 세포를 PBS로 2회 세척한 후 4 $^{\circ}$ C에서 10,000g로 5분간 원심 분리하여 PBS를 제거하였다. 세포는 10mM HEPES (pH 7.9), 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM dithiothreitol (DTT), 0.2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)로 구성된 완충액 A를 400 $\mu$ l 넣어 vortex하고 10분간 ice에서 보관한 후 4 $^{\circ}$ C에서 25,000g로 6분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 상층액은 버리고 얻어진 침전물은 20mM HEPES (pH 7.9), 420mM NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 20% (v/v) glycerol, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF로 구성된 차가운 완충액 C를 100 $\mu$ l 넣어 vortex하고 ice에서 20분간 보관한 후 4 $^{\circ}$ C에서 25,000g로 6분간 원심 분리하여 상층액 95 $\mu$ l를 취해 이 용액을 분주하여 -70 $^{\circ}$ C에 저장하였다. 최종추출물의 단백질양은 Bio-rad protein assay kit를 사용하여 측정하였다. 단백질양의 측정방법은 다음과 같았다. 1.46mg/ml bovine plasma gamma globulin stock standard를 샘플에 사용한 희석용액으로 희석하여 신선한 단백질 standard를 준비하였다. 단백질 표준품과 준비한 시료를 각각 10 $\mu$ l씩 96well microplate 에 넣고 단백질 정량을 위하여 Bio-rad protein dye reagent를 200 $\mu$ l 씩 혼합하여 5분 동안 반응시킨 후 ELISA plate reader에서 595nm로 흡광도를 측정하여 표준품에 대한 정량곡선에 대입하여 시료의 단백질 정량 값을 산출하였다.

### (2) Oligonucleotide Probe 제조

핵추출물과 NF- $\kappa$ B oligonucleotide의 결합정도를 알아보기 위해 EMSA를 수행하였다. DNA결합부위에 대한 NF- $\kappa$ B oligonucleotide (promega, catalog E3291)는 NF- $\kappa$ B DNA결합부위에 대한 consensus sequence인 -GGGGACTTTC-가 포함되어있는 이

증가된 oligonucleotide로서 Promega에서 구입하였다. AP-1 및 NF- $\kappa$ B oligonucleotide probe를 만들기 위해서는 1.5ml 소형 원심분리용 튜브에 이중가닥 oligonucleotide (5ng) 3 $\mu$ l와 10 $\times$  polypolynucleotide kinase buffer 2.5 $\mu$ l, 100 $\mu$ Ci [ $\gamma$ -32P]ATP를 혼합한 후 추가적으로 증류수를 넣어 최종 부피가 25 $\mu$ l가 되도록 하고 이 혼합액에 1 $\mu$ l의 T4 kinase (5unit)를 최종적으로 넣어주었고 혼합액이 들어있는 튜브를 반응이 일어나도록 37 $^{\circ}$ C에서 45분간 방치하였다. 반응을 시킨 후 50mM Tris/HCl (pH 7.5)을 넣어서 50 $\mu$ l의 부피가 되도록 oligonucleotide가 들어있는 혼합액을 희석하였다. Sephadex G-50이 들어있는 Nick column (Pharmacia Biotech)을 가지고 NF- $\kappa$ B oligonucleotide probe를 순수 정제하는데 정제방법은 다음과 같았다. column안에 있는 용액을 버린 후, equilibration buffer인 10mM Tris-HCl (pH 7.5)로 한번 세척하고 column을 지지대에 부착한 후, 대략 3ml의 equilibration buffer를 사용하여 gel을 균질화 하였다. Equilibration buffer가 gel bed에 완전히 흡수된 후, NF- $\kappa$ B oligonucleotide 반응용액 50 $\mu$ l를 column에 넣어주었고 추가적으로 400 $\mu$ l buffer용액을 넣은 다음 gel bed로 들어가게 하였다. Oligonucleotide probe 용액을 받기 위해 column 아래 부분에 tube를 설치한 후, 추가로 400 $\mu$ l를 더 넣어주어 방사선 표지된 oligonucleotide 용액을 정제하였다. 정제된 oligonucleotide 용액 1 $\mu$ l를 피펫팅하여 2ml의 scintillation cocktail용액이 들어있는 vial에 넣어 scintillation counter(Packard Instrument Co., USA)를 사용하여 oligonucleotide probe의 radioactivity를 측정하였다.

### (3) PAGE 전기영동

Oligonucleotide probe의 결합반응을 하기 위하여 5 $\mu$ l의 완충액 [10mM Tris(pH 7.5), 100mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 0.1 $\mu$ g/ml poly dI-dC, 0.1 $\mu$ g/ml bovine serum albumin]과 5 $\mu$ g의 핵 추출물을 혼합한 후 이 혼합액을 15분간 4 $^{\circ}$ C에서 미리 반응시켰다. 그 다음에 [ $\gamma$ -32P] ATP로 표지된 100,000cpm의 oligonucleotide probe를 넣어주고 증류수로 혼합액의 최종부피를 25 $\mu$ l로 한 후 상온에서 20분 동안 방치하여 혼합액을 반응시켰다. NF- $\kappa$ B의 결합 능력을 알아보기 위한 EMSA를 수행하기 위하여 위에서 얻은 oligonucleotide 반응액에 2 $\mu$ l 0.1%(w/v) bromophenol blue dye를 넣어서 전기영동에 사용하였다. 10ml의 polyacrylamide:bis (30%:0.8%

w/v)와 38.4ml의 증류수 그리고 5 $\times$  TBE (500mM Tris pH 8.0, 450mM borate, 5mM EDTA) 2.5ml를 혼합한 용액에 시험당일 제조된 10%(w/v) ammonium persulfate 0.5ml과 TEMED 25 $\mu$ l를 부가 혼합하여 6% non-denaturing gel을 조제한 다음, 깨끗이 세척한 후 조립된 전기영동 유리판에 용액을 부어 gel을 형성하였다. 전기영동 buffer는 0.25 $\times$  TBE buffer를 사용하고, 전기영동 gel은 150V로 1시간동안 prerunning한 후, bromophenol blue dye가 함유된 반응액과 혼합하여 loading하고 150V로 전기영동 하였다. Competition (specific and non specific) assay와 NF- $\kappa$ B 구성 unit인 p65 및 p50의 antibodies를 이용하여 super shift 효과를 토대로 NF- $\kappa$ B DNA-protein band를 확인하였다.

전기영동이 끝난 gel은 3M filter paper에 polyacrylamide gel을 올려놓고 slab gel dryer(Hoffer Scientific Co. SE-1160)로 80 $^{\circ}$ C에서 1시간 건조시킨 후 -70 $^{\circ}$ C에서 감광시켰다. 하루 후 감광된 X-ray film (Kodak Bio-Max film)을 현상하여 NF- $\kappa$ B 결합능의 활성도를 확인하였다.

### 5) Luciferase Assay

1 volumes의 water를 1 volume of 5 $\times$  lysis buffer에 넣어 사용 전 실온에 equilibrate 1 $\times$  lysis buffer를 만들었다. 배양세포의 배지를 버리고 PBS로 씻고 1 $\times$  lysis buffer를 넣은 후 (e.g., 400l/60mm culture dish, 900l/100mm culture dish or 20l per well of a 96-well plate)세포를 떼어냈다. 얼음속의 microcentrifuge tube에 세포를 넣고 12,000g에서 15초간 원심분리 한 후 supernatant 또는 cell lysate 를 70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. well당 20l의 cell lysate를 넣은 plate를 injector와 같이 luminomete에 설치하고 injector 통하여 well 당 100 $\mu$ l의 luciferase assay reagent 넣고 10초간 빛의 강도를 측정하였다.

### 6) Surface plasmon resonance analysis (표면 플라즈몬 편광 분석법)

BIACORE 본체를 켜고 Control software를 작동시킨 후, BIACORE의 syringe에 연결되어 있는 두 개의 tube를 HBS buffer가 들어 있는 bottle에 넣어 준다. Sensor chip case의 상단에 있는 화살표의 방향을 보면서 insert part에 넣어 sensor chip (CM-dextran)을 장착한다. EDC (ethyl-N-(dimethylaminopropyl)

carbodiimide)와 NHS (N-hydroxysuccimide)를 1 : 1 (EDC 50 l 와 NHS 50 l) 로 섞어서 sensor chip 위에 흘려주어 칩 표면을 활성화 시킨다. sensor chip이 활성화가 되면 Chip 에 p50 를 coupling 시켜주는데,은 HBS buffer에 녹이거나 희석시키는 것이 좋으며, 최종농도는 10-200 g/ml로 맞추도록 한다. p50의 경우 200 g/ml을 사용하였으며, injection 하였을 때RU 값이 2000정도 올라가면 binding 이 잘된 것이라 볼 수 있다. 1M ethanolamine, pH 8.5을 이용하여 sensor chip 표면을 고정화 시키고, melittin 과 bee venom을 125-2000 nM (2000 nM, 1000 nM, 500 nM, 250125 nM) 범위가 되도록 HBS buffer로 희석하여 sensor chip 위에 흘려준다. Melittin 과 bee venom injection 이 끝난 후 결합된 p50 와 melittin 또는 bee venom을 인위적으로 분리하는 과정으로 이때는 protein 의 성질에 따라 pH를 조정하여 사용하는데, melittin 과 bee venom 경우에는 50 mM NaOH pH12를 사용하였다. 생성된 데이터는 sensorgram이라는 형태로 표시되며 단위는 Resonance Unit혹은 Response Unit(RU)를 사용하는데, 1000RU의 변화는 1ng/mm<sup>2</sup>의 질량의 변화를 의미한다. The BIACORE 2000 system 을 이용하였다. 그래프의 Kinetics analysis 는BIAevaluation 3.0 software (BIACORE AB, 5-75450, Uppsala, Sweden)를 이용하였다.

#### 7) 세포내 cobrotoxin의 uptake 시험

1M sodium bicarbonate 0.5 mL 에 2 mg/mL melittin 을 넣은 후 1M sodium bicarbonate 50 L 를 첨가하여 pH를 맞춘다. Room temperature에서

reactive dye가 들어 있는 vial에 protein solution을 넣은 후, vial안에 들어 있는 magnetic stir bar를 이용하여 Room temperature에서 1시간 동안 충분히 녹인다. Labeling 된 protein 을 column에 흘려준 후 elution buffer를 흘려주어 분리한다. Raw 264.7 (0.5x 10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup>) 을 chamber slide (Lab-Tak II chamber slider system, Nalge Nunc Int., Naperville, IL, USA) 에 37C, 5% CO<sub>2</sub> 에서 24 시간 배양한 후, Alexa Fluor 488 dye 을 붙인 melittin 을 각 chamber 에 5, 10 mg/ml농도별로 처리한 후 37C, 5% CO<sub>2</sub> 에서 24시간 동안 배양한다. 배지를 버리고 4% paraformaldehyde 200 ml 을 각 chamber에 넣어 실온에서 1 시간 동안 고정화 시킨 후 360 oil 을 이용하여 Confocal laser scanning microscope (dual wavelength scan, MRC1024, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 로 immunofluorescence images를 촬영한다.

#### 8) 통계 처리

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

### III. 結 果

#### 1. Cobrotoxin이 NF- $\kappa$ B에 미치는 영향

##### 1) Cobrotoxin의 농도에 따른 NF- $\kappa$ B 발현에 미치는 영향(Fig. 1)

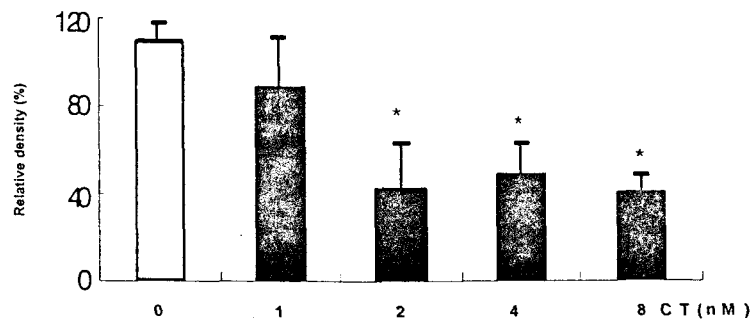


Fig. 1. Effect of cobrotoxin in the activation of NF- $\kappa$ B in PC-3 cells.

Values are mean±SD of three experiment with triplicates.

\*: significantly different from control.

2) Cobrotoxin의 농도에 따른 IκBa에 미치는 영향(Fig. 2)

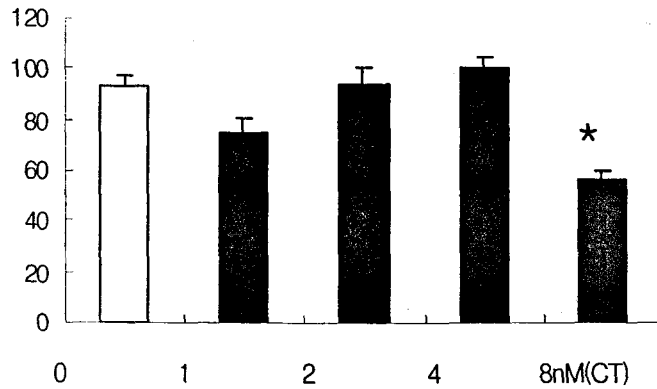


Fig. 2. Effect of cobrotoxin in the activation of IκBa in PC-3 cells. Values are mean±SD of three experiment with triplicates. \*: significantly different from control.

3) Cobrotoxin의 농도에 따른 p-IκBa에 미치는 영향(Fig. 3)

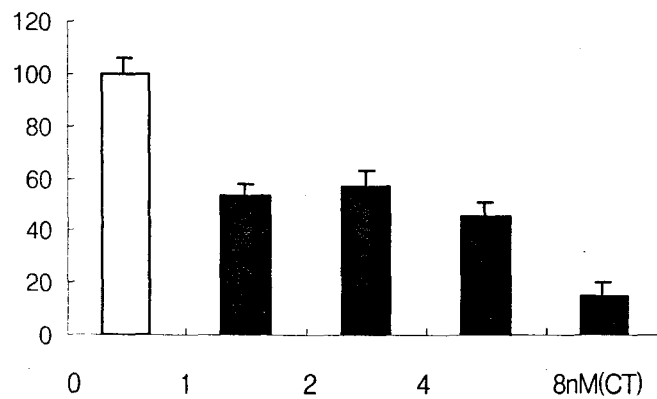


Fig. 3. Effect of cobrotoxin in the activation of p-IκBa in PC-3 cells. Values are mean±SD of three experiment with triplicates. \*: significantly different from control.

4) Cobrotoxin의 농도에 따른 p50에 미치는 영향(Fig. 4)

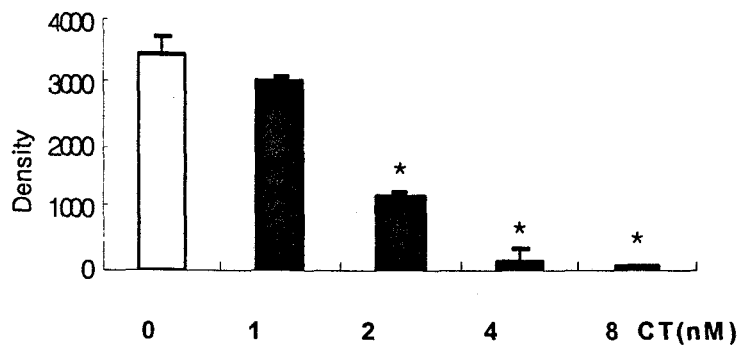


Fig. 4. Effect of cobrotoxin in the activation of p50 in PC-3 cells. Values are mean±SD of three experiment with triplicates. \*: significantly different from control.

5) Cobrotoxin의 농도에 따른 p65에 미치는 영향(Fig. 5)

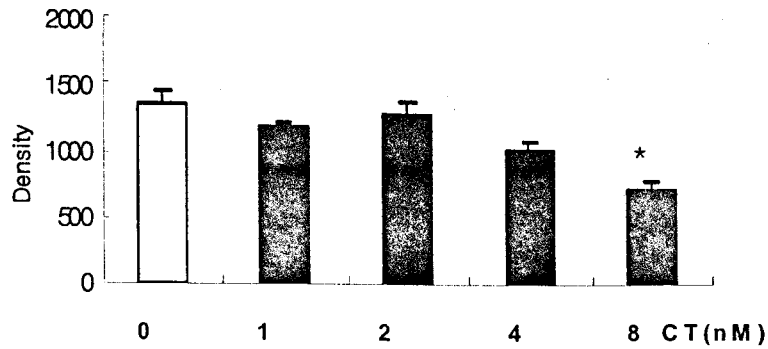


Fig. 5. Effect of cobrotoxin in the activation of p65 in PC-3 cells. Values are mean $\pm$ SD of three experiment with triplicates. \*: significantly different from control.

2. Cobrotoxin이 p53의 발현에 미치는 영향(Fig. 6)

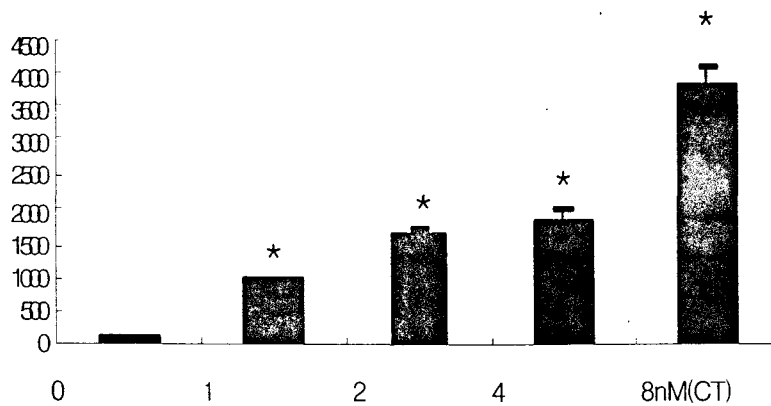


Fig. 6. Effect of cobrotoxin in the activation of p53 in PC-3 cells. Values are mean $\pm$ SD of three experiment with triplicates. \*: significantly different from control.

3. Cobrotoxin의 세포내 칼슘에 미치는 영향(Fig. 7, 8)

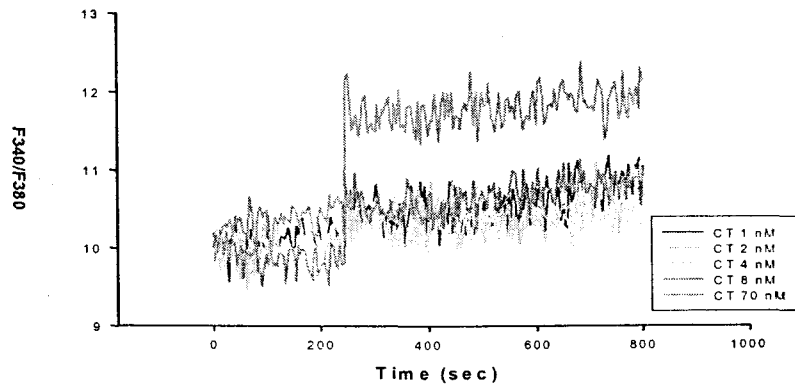


Fig. 7. Effect of lower doses of cobrotoxin in intracellular calcium level in PC-3 cells.

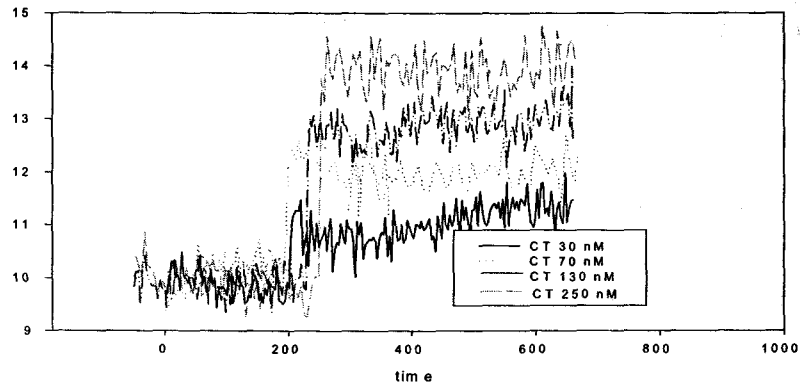


Fig. 8. Effect of higher doses of cobrotoxin in intracellular calcium level in PC-3 cells.

4. Cobrotoxin의 세포내 NO 생성에 미치는 영향(Fig. 9)

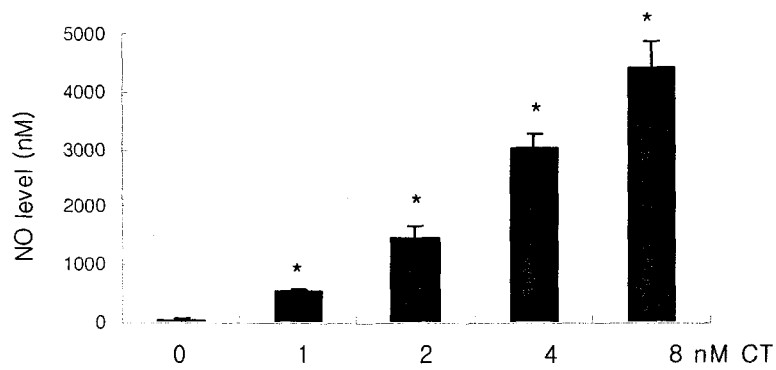


Fig. 9. Inducible effect of cobrotoxin on NO level in PC-3 cells. Values are mean±SD of three experiment with duplicates. \*: significantly different from control.

5. Cobrotoxin의 PC-3 세포내 흡수(Fig. 10)

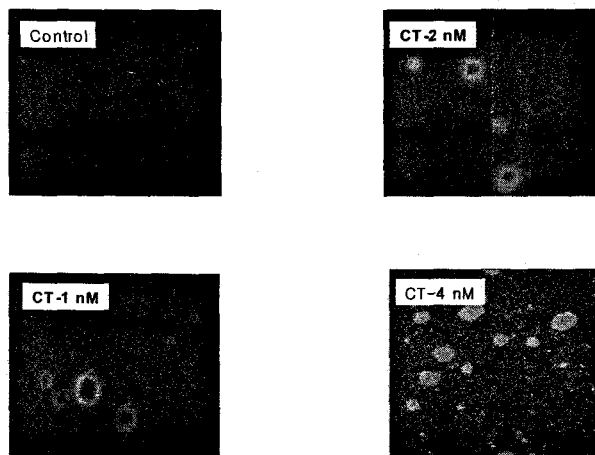


Fig. 10. Uptake of cobrotoxin into PC-3 cells.



## IV. 考 察

癌은 東醫學의 문헌상으로 良性 腫瘍과 惡性 腫瘍을 구체적인 증후표현에 근거한 病變의 발전과정으로 분류할 수 있었고, 腫瘍<sup>3-4)</sup>, 癰疽<sup>3-4)</sup>, 腫毒<sup>3-4)</sup>, 積聚<sup>3-4)</sup>, 癥瘕<sup>3-4)</sup>, 癌<sup>3-4)</sup>, 陰瘡<sup>3-4)</sup>, 癭瘤<sup>3-4)</sup>, 肺癰<sup>3-4)</sup>, 痰壅<sup>3-4)</sup>, 痰癖<sup>3-4)</sup>, 石癰<sup>3-4)</sup>, 石疽<sup>3-4)</sup>, 疔疽<sup>3-4)</sup>, 疔疔<sup>3-4)</sup> 등의 調査에 良性과 惡性 腫瘍이 포함된 命名으로 理解된다.

일반적으로 암(cancer)라 지칭되는 것은 惡性 腫瘍을 말한다.

韓醫學에서 腫瘍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<sup>2)</sup> 등의 原因에 의하여 개체의 臟腑機能失調 및 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<sup>6)</sup> 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한다<sup>26)</sup>.

治法은 清熱解鬱, 軟結散結, 活血化瘀, 去濕解毒 및 扶正培本법 등이 活用되고 있다<sup>27)</sup>. 서양의학적 치료법으로는 外科적 수술, 방사선요법, 화학요법, 면역요법 등이 사용되고 있는데<sup>8)</sup> 이러한 치료법은 암종에 따른 감수성 차이, 치료후 예후 불량, 재발 및 합병증 등의 부작용이 발생하는 것으로 보고되고 있으므로 이를 극복하기 위해 임상에서 한약과 항암제의 병용 투여 및 한약을 이용한 체질개선이 시도되고 있고, 한약<sup>5)</sup>, 침<sup>9-10)</sup>, 봉약침을 포함한 다양한 약침<sup>11-14)</sup> 등을 이용한 抗腫瘍免疫學적<sup>11-12)</sup> 및 抗腫瘍遺傳子적 실험 연구<sup>13-14)</sup> 가 지속적으로 시행되어지고 있다<sup>15)</sup>.

또한, 최근에 독성이 있는 천연 peptide가 암 세포의 세포사멸(apoptosis)과 분화에 미치는 영향에 대한 연구보고가 있는데<sup>16-19)</sup>, 그 중 특히, 蜂毒의 항암효과에 대한 연구에서 Allen DH 들<sup>20)</sup>이 蜂毒의 성분 중 Apamin이 tumor를 억제하는데 상관이 있다고 보고 하였으며, Wood MW들<sup>21)</sup>은 蜂毒의 성분 중 Phospholipase A2가 tumor를 억제하는데 상관이 있다고 보고하였고, 박<sup>14)</sup>은 蜂毒성분 전체를 이용해 DNA합성에 관련된 세포분열억제 및 apoptosis유발과 각각에 관련된 유전자의 변화를 관찰해 항암효과가 있음을 발표하였으며, 권<sup>22)</sup>은 蜂毒 성분중 Apamin과 Phospholipase A2에서 항암효과가 있음을 발표하였다.

Cobrotoxin(*Vipera lebetina turanica*)은 Turkmenistan

과 같은 중앙아시아에 주로 서식하는 뱀의 독으로 한 그룹의 기본 펩타이드들과 12개의 이황화결합을 가진 235개 아미노산 들로 구성된 중요한 factor V activator로 구성되어 있다<sup>23)</sup>.

factor V activator는 혈액응고에 중요한 역할을 하며, nicotinic acetylcholine receptor와의 결합력이 강하다<sup>24-25)</sup>고 하였는데 순환기계나 중추신경계에 영향을 미치고, cysteine 잔기를 가진 다른 분자와도 높은 결합력을 나타내어 분자의 생물학적 활성 변화에 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다.

이에 저자는 蝮毒보다 독성과 다른 분자와의 결합력이 강한 cobrotoxin을 이용하여 항암효과를 알아보고자 암세포인 PC-3 cell에 cobrotoxin을 처리한 후, NF- $\kappa$ B, 칼슘과 NO의 변화를 관찰하였다.

NF- $\kappa$ B는 세포내에서 다양한 생리활동을 하는데 세포사조절과 관련해서는 논란이 계속되고 있다<sup>27)</sup>. 일련의 연구를 통해 볼 때, 세포와 자극제가 다른 조건에서 이 핵전사요소가 활성화되거나 비활성화 되느냐에 따라서 세포가 더 잘 살수도 있고 세포사를 당하기도 한다<sup>28)</sup>.

Cobrotoxin이 전사인자인 NF- $\kappa$ B에 미치는 영향을 알아보기 위해 cobrotoxin의 농도에 따른 변화를 보면, cobrotoxin의 농도가 높아짐에 따라 NF- $\kappa$ B의 활성은 감소함을 알 수 있다.

PC 3-cell에서 NF- $\kappa$ B inhibitor인 I $\kappa$ B와 그것이 인산화되어 떨어져나온 p-I $\kappa$ Ba의 농도를 확인한 결과 I $\kappa$ Ba는 8  $\mu$ M에서 유의하게 감소했으며, p-I $\kappa$ Ba는 모든 농도의 cobrotoxin에서 유의하게 감소하였다.

NF- $\kappa$ B를 이루는 p50과 p65도 모든 농도에서 유의하게 감소하였다.

본 연구에서 PC-3세포는 cobrotoxin의 낮은 농도(1nM)에서는 세포사 억제 factor로 작용하는데 고농도의 cobrotoxin은 용량 의존적으로 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제함으로써 세포사를 유도하는 것으로 판단된다. 이는 NF- $\kappa$ B를 활성화하기 위하여 유리되는 NF- $\kappa$ B 조절 억제 단백질인 I $\kappa$ B의 유리가 억제됨을 통하여도 증명되었고 NF- $\kappa$ B를 구성하는 p50 및 p65의 핵안으로의 이행억제를 통하여서도 증명되었다. 이는 염증성세포에서 유도물질에 의하여 활성화된 NF- $\kappa$ B를 cobrotoxin이 억제한 연구와 일치하는데 이 연구에서는 NF- $\kappa$ B의 subunit인 p50 및 NF- $\kappa$ B를 활성화시키는 효소인 IKK와 cobrotoxin이 강하게 결합하여 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하는 것으로 관찰되었다. 특히 주목한 것은 IKKa의 경우는 세포주기를 조절하는 cyclin

을 조절하는 것으로 알려져 있어<sup>29)</sup> cobrotoxin이 IKKs와 결합하여 IKKa의 불활성화가 이루어진다면 세포주기를 파괴할 수 있어 이 부분의 연구가 관심을 끌 것으로 판단된다.

p53는 세포가 손상을 받아 세포사를 유도할 때 발현되는 세포사 조절 단백질의 하나로 이 발현이 증가하면 세포사가 유도되는 것으로 판단되는데 본 연구에서도 cobrotoxin을 처리하면 농도 의존적으로 세포사 유도경향과 유사한 경향으로 증가함을 관찰하였다.

칼슘과 NO는 일반적으로 세포의 중요한 생리작용을 나타내는 물질이면서 신호전달인자이며 약간의 상승치는 NF- $\kappa$ B를 활성화하는 것으로 알려졌으나, 고농도의 유리는 Akt 및 MAP kinase와 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하며 세포사를 유도하는 대표적 물질들이다<sup>30-32)</sup>.

세포내 칼슘농도의 증가는 여러 가지 세포내 변화를 초래하는데, 세포내의 과도한 칼슘증가는 세포의 구성물질들을 파괴하고 세포사 관련 단백질들을 활성화시키며 미토콘드리아에서 세포사 유전자 발현을 증가시키고 세포내 NO의 합성을 촉진시켜 세포가 죽음에 이르게 한다.

Cobrotoxin이 세포내 칼슘의 증가에 의하여 세포사를 유도하는지를 알아보기 위하여 PC-3세포에 다른 실험에 사용한 농도의 cobrotoxin을 처리하고 세포내 칼슘의 변화를 확인한 결과에서는 세포내 칼슘이 변화하지 않았으나 9배 정도의 고농도를 처리한 농도에서는 세포내 칼슘의 농도가 크게 증가함을 관찰할 수 있었다. 이를 더 자세히 관찰하기 위하여 cobrotoxin의 농도를 30-250 nM수준으로 처리시 용량 의존적으로 칼슘이 증가함을 관찰 하였다.

세포내 NO의 농도도 칼슘농도의 증가와 마찬가지로 여러가지 세포내 변화를 초래하는데, 세포의 구성물질들을 파괴하고 세포사 관련 단백질들을 활성화시키며 미토콘드리아에서 세포사 유전자 발현을 증가시켜 세포가 죽음에 이르게 한다.

Cobrotoxin이 세포내 NO증가를 통하여 세포사를 유도하는지를 알아보기 위하여 세포내 NO의 변화를 확인한 결과, 1, 2, 4 및 8nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.

Cobrotoxin의 낮은 농도 (세포사를 일으키는 농도에서는 칼슘의 농도가 증가하지 않음)에 의하여 상승하는 NO 수준에 의하여 세포내 칼슘의 상승치를 더욱 높여줄 수 있으며 이들은 서로 상호작용으로 세포

사를 일으키는 밝혀졌는데 이들은 미토콘드리아를 파괴하여 세포막 전위차를 상승시키며 이곳의 Bax를 활성화시키고 Bcl-2의 억제를 초래한다. 따라서 Cobrotoxin의 일정농도 처리는 이들 두 물질의 상호작용을 극대화시킬 것으로 보여지며, 이를 통하여 세포사를 유발시킬 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해보면, 일정수준(pico 또는 nano molar 수준)의 cobrotoxin이 prostate cancer cell에서 NF- $\kappa$ B의 활성을 감소시켜, 세포사멸을 유도하여 항암 효과가 있음을 확인할 수 있었고 치료제로 사용할 가능성이 있다고 판단된다.

앞으로 cobrotoxin이 나타내는 항암 효과에 대한 생체연구의 뒷받침 및 안전성에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료되며, cobrotoxin의 항암 효과를 실제 임상에 활용할 수 있게 되기를 기대한다.

## V. 結 論

Cobrotoxin의 항암효과를 알아보기 위하여 암세포인 PC-3 cell에 cobrotoxin을 처리한 후,

NF- $\kappa$ B, 칼슘과 NO의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Cobrotoxin이 전사인자인 NF- $\kappa$ B에 미치는 영향을 알아보기 위해, cobrotoxin의 농도에 따른 변화를 살펴본 결과 1nM의 cobrotoxin 처리군은 정상군에 비하여 NF- $\kappa$ B의 활성이 감소하였고, 2, 4, 8nM의 cobrotoxin 처리군에서는 정상군에 비하여 NF- $\kappa$ B 활성의 유의한 감소를 나타내었다.
2. PC 3-cell에서 NF- $\kappa$ B inhibitor인 I $\kappa$ B와 그것이 인산화되어 떨어져나온 p-I $\kappa$ Ba의 농도를 확인한 결과 I $\kappa$ Ba는 8  $\mu$ M에서 유의하게 감소했으며, p-I $\kappa$ Ba는 모든 농도의 cobrotoxin에서 유의하게 감소하였다.
3. NF- $\kappa$ B를 이루는 p50과 p65를 살펴본 결과 1, 2, 4 및 8nM의 cobrotoxin 처리군 모두에서 농도의존적으로 유의하게 감소하였다.
4. 세포사조절 단백질의 하나인 p53의 발현은 1, 2, 4 및 8nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.

5. 세포사 관련 단백질 유전자를 발현시키고 세포사를 유도하는 칼슘의 세포내 변동을 살펴본 결과, 1, 2, 4 및 8nM의 저농도 cobrotoxin 처리군에서 세포내 칼슘 농도의 유의한 변동을 나타내지 않았고, 70nM의 cobrotoxin 처리군에서 세포내 칼슘 농도는 8nM의 cobrotoxin 처리군에 비하여 증가를 나타내었다. 고농도인 30, 70, 130 및 250 nM의 cobrotoxin 처리군의 세포내 칼슘 농도는 저농도 cobrotoxin 처리군에 비하여 cobrotoxin의 농도 의존적인 증가를 나타내었다.
6. Cobrotoxin이 세포내 NO증가를 통하여 세포사를 유도하는지를 알아보기 위하여 세포내 NO의 변화를 확인한 결과, 1, 2, 4 및 8nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.
7. Cobrotoxin이 세포내에는 흡수되어 세포의 성장을 억제하는 등의 생물학적 효과를 나타내는지를 알아보기 위하여 cobrotoxin에 형광 표식물질을 부착시키고 이것이 세포내로 이동하는지를 확인한 결과 cobrotoxin의 형광 부합체가 농도에 따라 점점 강하게 세포내로 이동하는 것을 알 수 있었다.

8. 白泰鉉. 반하백출천마탕과 반하백출천마탕가감방의 항암효과와 면역반응에 대한 실험적 연구. 대한한방종양학회지. 1995 ; 1(1) : 446-466.
9. Maxwell Macmillan. Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A. and Taylor, P. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 18th, 1991 : 1202.
10. Hersh, E.M. and Ereish, E.J.. In Methods in Cancer Research. New York : Academic Press. 1986 : 335.
11. 權奇祿 外. 봉독약침자극이 3-MCA 유발 上皮腫에 대한 항암 및 면역반응에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1997 ; 14(2) : 157-172.
12. 이종률, 채병윤. 3-MCA 유발상피종에 대한 海藻玉?탕과 昆布의 항종양효과와 면역반응에 미치는 영향. 동의학회지. 1998 ; 2(1) : 1-28.
13. 박찬열. 약침용 봉독이 흑색종 세포에 미치는 항암효과에 대한 분자생물학적 연구. 경희대한 의학 박사학위논문. 2000.
14. 박찬열, 서정철, 최도영, 안병철. 봉독약침의 항암효과에 대한 분자생물학적 연구. 대한약침학회지. 2000 ; 3(1) : 1-19.
15. 서민호, 백원기. 세포주기조절과 apoptosis. 계명의대논문집. 1996 ; 15(4) : 381-393.
16. 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 activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells. Cancer Res. 2001 ; 61 : 497-503.
17. Gregory, J. M., and Julie, C. H. PPAR- $\gamma$  agonists : therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. TIPS 2000 ; 21 : 469-474
18. Evan, D. R., and Bruce, M. S. PPAR- $\gamma$  : A nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. J. Biol. Chem. 2001.
19. Tsubouchi, Y., Sano, H., Kawahito, Y., Mukai, S., Yamada, R., Kohno, M., ichiro, K., Hla, T., and Kondo, M. Inhibition of Human Lung Cancer Cell Growth by the Peroxisome

## VI. 參考文獻

1. 권영현. 국내에서 자생하는 항암효과가 있는 식물에 대한 고찰. 대전대학교한의학연구소 논문집. 1998 ; 6(2) : 447.
2. 孟琳升. 中國治癌大成. 북경 : 북경과학기술출판사. 1995 : 18-19.
3. 申天浩. 癌瘤治研究. 서울 : 정보사. 1984 : 25-29,31-38.
4. 許在淑. 위암치험례. 대한한의학회지. 1964 ; 2(8) : 35-36.
5. 金德鎬. 靈山慈花 仙鶴草 瓦松이 암세포 감수성에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1987 ; 3(1) : 99-115.
6. 催昇勳. 동의종양학. 서울 : 행림서원. 1995 : 19-24.
7. 錢伯文. 腫瘤的辨證施治. 중국 : 상해과학기술출판사. 1980 : 1-10.

- Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Agonists through induction of Apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000 ; 270 : 400-405.
20. Allen DH, Lepple-Wienhues A, Cahalan MD. Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *J Member Biol.* 1997 ; 155(1) : 27-34.
  21. Beatty BG, Qi S, Pienkowska M, Herbrick JA, Scheil T, Zhang AM, Kola I, Scherer SW, Seth A. Chromosomal localization of phospholipase A2 activating protein, an Ets2 target gene to 9p21. *Genomics.* 1999 ; 62(3) : 529-32.
  22. 권도희, 이재동, 최도영. 약침용 봉독성분 중 Apamin, Melittin의 항암작용. *대한침구학회지.* 2001 ; 18(1) : 139-145.
  23. Siigur, E., Aaspollu, A., and Siigur, J. *Gene* 2001 ; 263 : 199-203.
  24. Servent, D., Winckler, D. V, Hu, H.Y., Kessler, P., Drevet, P., Bertrand, D., and Menez, A. *J.Biol. Chem.* 1997 ; 39 : 24279-86.
  25. Conroy, W.G., Saedi, M.S., and Lindstrom, J. *J. Biol. Chem.* 1990 ; 35 : 21642-51.
  26. 田炳旭, 柳逢夏, 朴東源, 柳基遠. 종양의 병인병리에 대한 문헌적 고찰. *대한합방중약학회지.* 1995 ; 1(1) : 29-54.
  27. Bentires-Alj, M., Dejardin, E., Viatour, P., Lint, C. V., Froesch, B., Reed, J. C., Merville, M. P., and Bours, V. Inhibition of the NF- $\kappa$ B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene* 2001 ; 20 : 2850-2813.
  28. Bentires-Alj M, Dejardin E, Viatour P, Lint C V, Froesch B, Reed J C, Merville M P, and Bours V Inhibition of the NF- $\kappa$ B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene* 2001 ; 20 : 2850-2813.
  29. Aggarwal BB. Nuclear factor- $\kappa$ B : the enemy within *Cancer Cell.* 2004 ; 6(3) : 203-8.
  30. Albanese C, Wu K, D'Amico M, Jarrett C, Joyce D, Hughes J, Hulit J, Sakamaki T, Fu M, Ben-Ze'ev A, Bromberg JF, Lamberti C, Verma U, Gaynor RB, Byers SW, Pestell RG. IKK $\alpha$  regulates mitogenic signaling through transcriptional induction of cyclin D1 via Tcf. *Mol Biol Cell.* 2003 ; 14(2) : 585-99.
  31. Mackeigan J P, Collins T S, and Ting Y P J MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 38953-38956.
  32. Goillot E, Raingeaud J, Ranger A, Tepper R I, Davis R J, Harlow E, and Sanchez I Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci* 1997 ; 94 : 3302-3307.