Journal of Life Science 2007 Vol. 17. No. 11. 1596~1600 ©JLS / ISSN 1225-9918

- 단 보 -

Bcl-2 및 IAP family의 발현 변화와 caspase 활성을 통한 봉독의 인체폐암세포 apoptosis 유도

우현주 · 김현중 · 홍수현 · 홍상훈 · 최병태[1] · 이용태 · 박동일 · 최영현*

동의대학교 한의과대학 한의학과, [1]부산대학교 한의학전문대학원

Received September 20, 2007 / Accepted October 25, 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. Hyun Joo Woo, Hyun Joong Kim, Su Hyun Hong, Sang Hoon Hong, Byung Tae Choi[1], Yong Tae Lee, Dong Il Park and Yung Hyun Choi*. *Department of Oriental Medicine, Dong-Eui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea; [1]Department of Anatomy, Pusan National University Graduate School of Oriental Medicine, Busan 609-735, Korea* - Bee venom is used to treat inflammatory diseases in Korean traditional medicine and has been known to inhibit proliferation and induce apoptosis in cancer cells. However, the molecular mechanisms involved in bee venom-induced apoptosis are still uncharacterized in human lung cancer cells. In the present study, we investigated the effects of bee venom on the apoptosis of A549 human lung epithelial cancer cells. Treatment of bee venom inhibited the cell viability and induced apoptosis in a concentration-dependent manner as measured by hemocytometer counts, fluorescence microscopy and flow cytometry analysis. Bee venom-induced apoptosis in A549 cells was associated with a marked inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 expression without significant changes in the levels of Bax and Bcl-xL. Bee venom treatment also inhibited the levels of IAP family members such as cIAP-1 and cIAP-2 and induced the proteolytic activation of caspase-3 and caspase-9. Although further studies are needed, the present results suggest that apoptotic signals evoked by bee vemon in A549 cancer cells may converge caspases activation through a down-regulation of Bcl-2 rather than an up-regulation of Bax. These findings provide important insights into the possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of bee vemon in human cancer cells.

Key words : Bee venom, A549, apoptosis, Bcl-2, caspase

서 론

봉독(蜂毒, bee venom)은 꿀벌의 독낭(毒囊)에 들어있는 약 40여 가지의 유효성분으로 구성된 물질로 염증 및 알러지 등을 유발하지만, 임상적 결과에 의하면 진통, 소염의 효능이 탁월한 것으로 알려져 있다. 한방에서 전통적으로 봉침을 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)이 주로 활용되고 있다. 즉 봉독약침요법은 봉독을 질병과 유관한 부위나 혈위에 주입함으로써 자침(刺鍼) 효과와 봉독의 생화학적 특이물질이 인체에 미치는 약리작용을 동시에 이용하는 치료요법의 일종이다[6,9]. 봉독 성분은 크게 peptide components, non peptide components, enzymes 등으로 구성되어 있다[6]. 그중 peptide components는 freeze-dried venom의 약 50%를 구성하고 있으며, 주요 성분으로는 melittin, apamin, phospholipase A2 등이 있다[3,17]. 봉독에 관한 연구는 1990년대 이후부터 실험연구가 진행되기 시작하였으며, 항암효과를 포함한 다양한 생리 및 약리 작용에 관한 기전이 점차 알려지고 있다. 봉독에 포함된 성분 중 melittin은 가장 특징적인 주성분으로서 26개의 amino acid로 구성된 polypeptide로서 phospholipase A2 및 D의 activator로 널리 알려져 있다[14,15].

최근 봉독 성분의 항암작용 가능성이 대두되면서 인체 망막아종세포[19], 신경아세포종[10], 흑색종세포[[8], 유방암세포[21], 폐암세포[1] 등을 포함한 몇 가지 *in vitro* 세포주에서 봉독 에 의한 암세포 증식의 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음이 보고된 바 있으나 구체적인 분자생물학적 기전은 확실하게 밝혀진 바가 없다. 본 연구실에서는 최근 인체혈구암세포에서 봉독에 의한 apoptosis 유발에 ERK 및 Akt의 활성 저하를 통하여 일어남을 보고한 바 있다[11]. 본 연구에서는 봉독에 의한 인체암세포의 apoptosis 관련 부가적인 기전의 연구 수행을 위하여 A549 폐암세포주를 선별하여 봉독 처리에 따른 apoptosis 조절 관련 유전자들의 발현 및 활성변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 A549 인체 폐암세포는 생명공학연구소(KRIBB, Teajeon, Korea)에서 분주 받아 사용하였으며, Park 등[12]의 방법에 준하여 배양하였다. 봉독은 Sigma Chemical

*Corresponding author
Tel : +82-51-850-8649, Fax : +82-51-853-4036
E-mail : choiyh@deu.ac.kr

Co. (St. Luis, MO, USA)에서 구입하였으며, 3차 증류수에 희석하여 사용하였다. 봉독 처리에 따른 A549 세포의 생존율을 조사하기 위하여 세포배양용 6 well plate에 A549 폐암세포를 2 × 10^4개/ml 정도를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, 적정 농도의 봉독을 처리하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 trypan blue 염색 후 도립현미경 하에서 살아있는 세포의 수를 측정하였다. Apoptosis 여부의 확인을 위한 핵의 형태적 변화 관찰을 위해 준비된 세포를 모은 다음 formaldehyde 용액으로 고정하고, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액으로 15분 정도 염색시킨 후, 형광 현미경을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰하였다. 봉독의 처리에 따른 세포주기 분포도 변화를 조사하기 위하여 준비된 세포를 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시킨 다음 DNA flow cytometry (Becton Dickinson)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 분석하였다.

전사 및 번역 수준에서 몇 가지 유전자의 발현 변화 관찰을 위하여 Woo 등[20]의 방법에 준하여 RT-PCR 및 Western blot 분석을 실시하였다. 즉 준비된 세포에 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 처리하여 total RNA를 분리·정량한 후, 해당 유전자들의 primer (Table 1)와 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 이용하여 PCR을 실시하여 1% agarose gel로 100 V에서 전기영동을 하였다. DNA 분리가 끝난 gel을 ethidium bromide (EtBr)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다. 또한 해당 유전자들의 단백질 수준에서의 발현 차이 분석을 위하여 총 단백질을 분리·정량한 후, SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하고, 분리된 단백질을 함유한 gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 준비된 membrane에 해당 단백질의 1차 항체를 적정시간 처리하고 2차 항체를 사용하여 반응시킨 후, enhanced chemiluminoesence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시켰다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham에서 구입하였다. 봉독 처리에 의한 caspase-3 및 caspase-9의 정량적 활성 비교를 위해서는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA) 및 caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA을 각각의 기질로 사용하여 분석하였다[20].

결과 및 고찰

봉독에 의한 A549 세포의 생존율 억제 및 apoptosis 유발

A549 인체 폐암세포의 생존율에 미치는 봉독의 영향을 알아보기 위하여 실험방법에서 서술한 것처럼 A549 세포에 봉독을 48시간 동안 처리한 후, trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 살아있는 세포의 수를 계수하였다. 비록 인체백혈병세포에 비하여 봉독에 대한 감수성이 A549 폐암세포에서 다소 낮으나[11], Fig. 1A에 나타낸 바와 같이 처리된 봉독의 농도가 증가될수록 A549 세포의 생존율은 매우 감소되었는데, 4.0 μg/ml 처리군 의 경우 대조군에 비하여 약 40% 정도의 세포 생존율 감소가 관찰되었으며, 5.0 μg/ml 처리군에서 살아있는 세포가 25% 미만 정도임을 알 수 있었다. 이러한 봉독 처리에 의한 A549 세포의 생존율 저하가 apoptosis 유발과 상관성이 있는지를 조사하기 위하여 DAPI staining을 실시하여 핵의 형태를 조사하였다. Fig. 1B에 나타낸 바와

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
GAPDH	Sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
Bax	Sense	5'-ATG GAC GGG TCC GGG GAG-3'
	Antisense	5'-TCA GCC CAT CTT CTT CCA-3'
Bcl-2	Sense	5'-CAG CTG CAC CTG ACG-3'
	Antisense	5'-GCT GGG TAG GTG CAT-3'
Bcl-X_L	Sense	5'-CAG CTG CAC CTG ACG-3'
	Antisense	5'-GCT GGG TAG GTG CAT-3'
cIAP-1	Sense	5'-TGA GCA TGC AGA CAC ATG C-3'
	Antisense	5'-TGA CGG ATG AAC TCC TGT CC-3'
cIAP-2	Sense	5'-CAG AAT TGG CAA GAG CTG G-3'
	Antisense	5'-CAC TTG CAA GCT GCT CAG G-3'

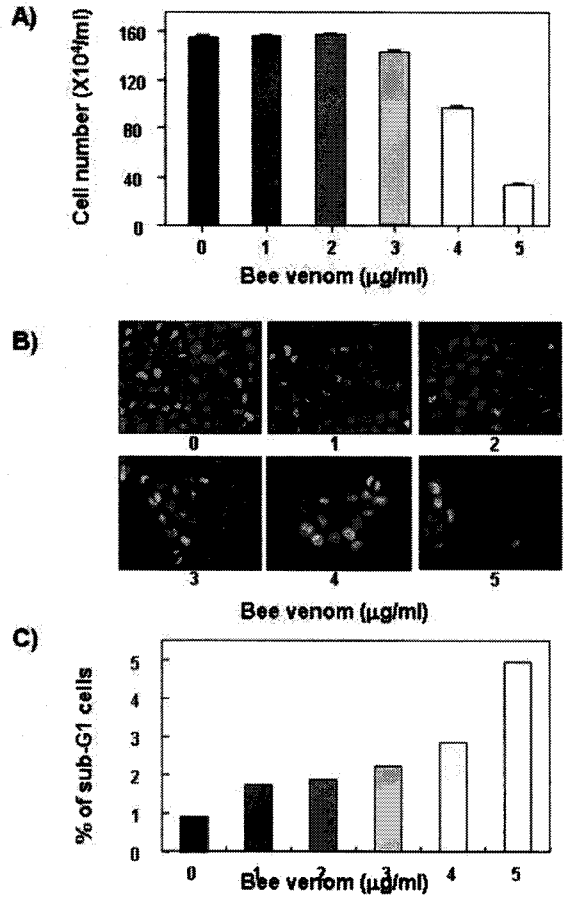

Fig. 1. Inhibition of cell viability and induction of apoptosis by bee venom in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were seeded as described in materials and methods, and the viable cells were counted after bee venom treatment for 48 hr. The data shown are means ± SD of three independent experiments. (B) Cells were treated with bee venom for 48 hr, fixed and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400. (C) Cells were incubated with bee venom for 48 hr and then analyzed by flow cytometry as described in materials and methods. Results are expressed as means ± SD of from three separate experiments.

같이 봉독이 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 A549 세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 봉독이 처리된 세포의 경우, 염색질 응축(chromatin condensation)에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body의 출현이 봉독 처리 농도 의존적 증가되었다. 이는 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단에 의한 DNA 단편화의 결과[5]이므로 봉독의 처리에 의한 암세포의 생존율 저하는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. 따라서 봉독 처리에 따른 A549 세포의 apoptosis 유발 정도를 정량적으로 비교 평가하기 위하여 동일한 조건으로 배양된 세포들을 대상으로 flow cytometry 분석을 통한 세포주기의 sub-G1기에 해당되는 세포들의 빈도를 조사한 결과는 Fig. 1C에 나타낸 바와 같다.

Bcl-2 family에 속하는 유전자의 발현에 미치는 봉독의 영향

Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 인자들은 apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있는데, 그 중 Bcl-2와 Bcl-xL은 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 대표적인 pro-apoptotic 분자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다. Anti-apoptotic 분자와 pro-apoptotic 분자는 서로 dimer의 형태로 존재하여 균형을 유지하고 있지만 이러한 균형이 깨어지게 되면 mitochondria로부터의 cytochrome *c*를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성화를 통하여 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다[4,13]. 따라서 A549 세포에서 봉독 처리에 의한 apoptosis 유발에 이들 유전자가 관련되어 있는지의 여부를 RT-PCR 및 Western blot 분석법으로 조사한 결과는 Fig. 2의

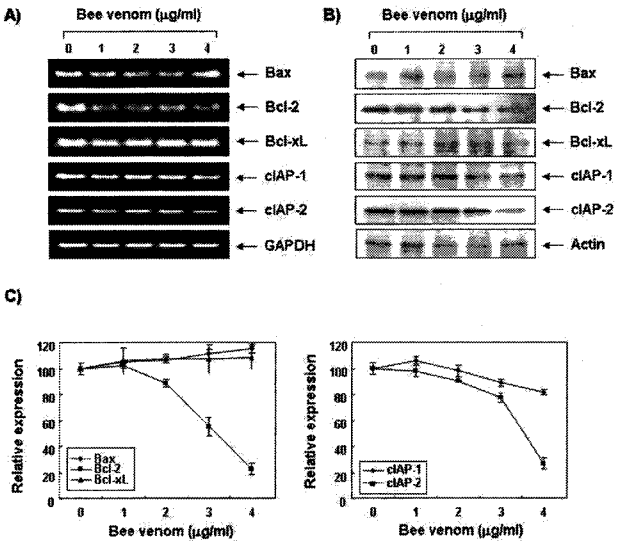

Fig. 2. Effects of bee venom treatment on the mRNA and protein levels of Bcl-2 and IAP family in A549 cells. (A) After 48 h incubation with bee venom, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in an 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control and protein levels were normalized against actin (C).

좌측에 나타낸 바와 같다. 인체 백혈병세포에서와는 달리 [11] A549 세포에서 Bax 및 Bcl-xL 유전자의 발현은 봉독 처리에 의하여 유의적인 변화는 관찰되지 않았으나, Bcl-2의 경우는 봉독의 처리에 따라 매우 감소되어 5.0 μg/mll 처리군의 경우 단백질 수준에서 80% 이상의 감소 효과를 보였다. 따라서 A549 세포에서 봉독 처리에 의한 apoptosis의 유발에 Bcl-2 family가 중요한 역할을 하고 있으며, Bcl-xL의 감소나 Bax의 증가보다는 Bcl-2의 발현 감소에 따른 Bax의 상대적 발현 증가로 인한 apoptosis 유발 관련 인자들의 활성화가 이루어지고 있음을 시사하여 주는 것이다.

IAP family에 속하는 유전자의 발현에 미치는 봉독의 영향

Apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중 inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family에 속하는 여러 유전자 산물은 곤충세포에서 바이러스 감염에 의한 apoptosis를 억제하기 위한 baculoviral 단백질 군들로서 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지니는 것으로, caspases와 직접적인 결합을 통하여 그들의 활성을 억제함으로서 apoptosis 유발을 막을 수 있는 것으로 밝혀져 있다[7,16]. 따라서 봉독 처리에 의한 A549 세포의 apoptosis 유발에 IAP family에 속하는 주요 인자들의 발현 변화를 조사한 결과는 Fig. 2의 우측에 나타낸 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 봉독 처리에 따른 조사된 2가지 IAP family의 유전자 발현은 봉독 처리군에서 처리 농도가 증가될수록 감소되었음을 알 수 있는데, 특히 cIAP-1 보다는 cIAP-2의 발현이 현저하게 감소되었으며, 이는 인체 백혈병 세포를 대상으로 조사된 선행연구 결과에서와 유사한 경향성임을 알 수 있었다[11].

Caspase-3 및 caspase-9의 활성에 미치는 봉독의 영향

Caspase protease는 apoptosis 유발에 중심적인 조절인자로서 작용하는데, 이 효소들은 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재하다가 Bcl-2 family와 같은 apoptosis 유도를 활성화 시키는 신호에 의해 mitochondria로부터 유리된 cytochrome *c*에 의하여 활성화된 protease로 전환되어 직접 또는 간접적으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다[2,18]. 따라서 caspases의 활성화는 apoptosis의 유발에 대한 증거가 될 수 있다는 것이 많은 선행연구 등에서 검증되어 왔다. 지금까지 알려진 caspases 중 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3 및 caspase-9의 발현 및 *in vitro* 활성에 미치는 봉독의 영향을 조사하였다. Fig. 3A의 결과에서 알 수 있듯이 비활성형인 pro-caspase-3 및 pro-caspase-9의 발현이 처리된 봉독의 농도가 증가될수록 점차 감소됨을 알 수 있었다. 또한 DEVD-pNA 및 LEHD-pNA를 기질로 한 *in vitro* 활성 결과에서도 조사된 두 caspase 모두 최고 농도에서 5-6배의 활성 증가를 보여 비활성형 caspase의

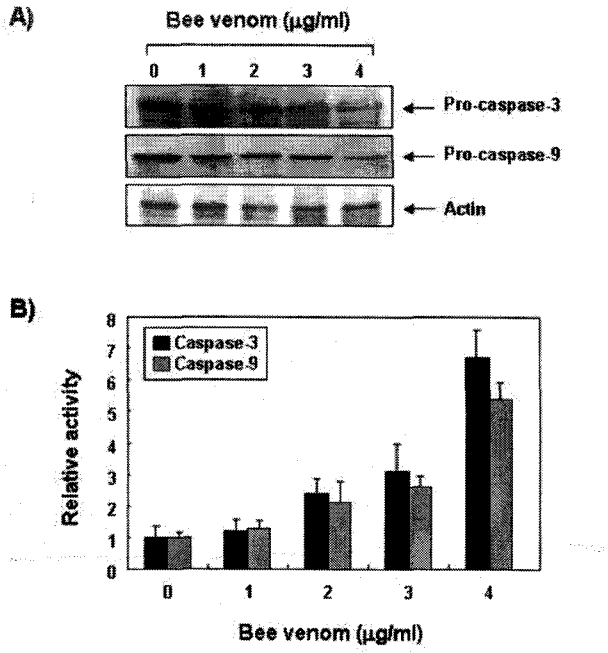

Fig. 3. Proteolytic activation of caspase-3 and caspase-9 by bee venom treatment in A549 cells. (A) The cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-caspase-3 and anti-caspase-9 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) After 48 h incubation with bee venom, aliquots (150 μg protein) were incubated with substrates, DEVD-pNA and LEHD-pNA for *in vitro* caspase-3 and caspase-9 activity, respectively, at 37 ℃ for 3 hr. The released fluorescent products were measured. Results are expressed as the means ± S.E. of three independent experiments.

발현 감소와 일치된 결과를 보여주었다. 이러한 결과 역시 선행 연구의 결과를 잘 뒷받침하여 주는 것으로서[11], 봉독에 의한 A549 폐암세포를 포함한 암세포에서의 apoptosis 유발은 Bcl-xL 및 IAP family의 감소에 따른 caspases의 활성화가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서 봉독의 apoptosis 유도에 의한 항암기전 효능을 A549 인체폐암세포를 대상으로 조사하였으며, apoptosis 유발에 관여할 것으로 예상되는 중요한 유전자들의 발현 및 활성에 미치는 봉독의 영향을 조사하였다. A549 세포의 생존율은 봉독의 처리 농도 증가에 따라 강력하게 억제되었으며, 이는 염색질 응축 현상을 동반한 apoptosis 유발에 의한 것임을 알 수 있었다. 봉독 처리에 의한 apoptosis 유발은 Bax 및 Bcl-xL의 발현 변화 없이 Bcl-2의 발현 감소에 따른

상대적인 Bax의 발현 증가와 IAP family에 속하는 인자들의 발현 감소 및 caspase의 활성화와 연관성이 있었다.

감사의 글

본 논문은 2007년도 동의대학교 교내연구비(2007A0081) 지원으로 이루어졌음.

참 고 문 헌

1. 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.
2. Allen, R. T., M. W. Cluck and D. K. Agrawal. 1998. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol. Life Sci.* **54,** 427-445.
3. 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. Donovan, M. and T. G. Cotter. 2004. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* **1644,** 133-147.
5. Evans, V. G. 1993. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* **17,** 461-476.
6. Habermann, E. 1971. *Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In venomous animals and their venoms.* pp. 3-61, Academic Press. New York.
7. Holcik, M., H. Gibson and R. G. Korneluk. 2001. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* **6,** 253-261.
8. Kwon, D. H., J. D. Lee and D. Y. Choi. 2001. The study of anti-cancer effects of Bee venom for aqua-acupuncture. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* **18,** 129-145.
9. Kwon, K. R., H. K. Hoh and C. H. Kim. 1994. The study of the introduction of Bee venom acupuncture, biochemistry and pharmachology have been obtained the following results. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* **11,** 159-171.
10. Lee, J. H., J. D. Jin, S. W. Lee, S. W. Han, S. T. Kim and J. S. Shin. 2002. The effect of Bee Venom and melittin herbal acupuncture solution to apoptosis in NG pretreated neuroblastoma cell line. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* **19,** 189-202.
11. 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.
12. Park, D. I., J. H. Lee, S. K. Moon, C. H. Kim, Y. T. Lee, J. Cheong, B. T. Choi and Y. H. Choi. 2005. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by aqueous extract from *Platycodon grandiflorum* in human lung carcinoma cells. *Pharmacol. Res.* **51,** 437-443.
13. Rosse, T., R. Olivier, L. Monney, M. Rager, S. Conus, I. Fellay, B. Jansen and C. Borner. 1998. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome *c*. *Nature* **391,** 496-499.
14. Saini, S. S., A. K. Chopra and J. W. Peterson. 1999. Melittin activates endogenous phospholipase D during cytolysis of human monocytic leukemia cells. *Toxicon* **37,** 1605-1619.
15. Sakamoto, T., W. T. Repasky, K. Uchida, A. Hirata and F. Hirata. 1996. Modulation of cell death pathways to apoptosis and necrosis of H2O2-treated rat thymocytes by lipocortin I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220,** 643-647.
16. Salvesen, G. S. and C. S. Duckett. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3,** 401-410.
17. Spoerri, P. E. 1973. Apamin from bee venom. *Neurobiology* **3,** 207-214.
18. Vegran, F., R. Boidot, C. Oudin, J. M. Riedinger and S. Lizard-Nacol. 2005. Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance. *Bull. Cancer* **92,** 219-26.
19. Vento, R., N. D'Alessandro, M. Giuliano, M. Lauricella, M. Carabillo and G. Tesoriere. 2000. Induction of apoptosis by arachidonic acid in human retinoblastoma Y79 cells: involvement of oxidative stress. *Exp. Eye Res.* **70,** 503-517.
20. Woo, H. J., S. J. Lee, B. T. Choi, Y. M. Park and Y. H. Choi. 2007. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, in human leukemic U937 cells. *Exp. Mol. Pathol.* **82,** 77-84.
21. Yeo, S. W., S. J. Chul, 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.