

원 개

## Bee Venom 및 Melittin 藥鍼液이 神經芽細胞腫의 細胞死에 미치는 影響

강동철\* · 정태영\*\* · 서정철\* · 임성철\* · 한상원\*

\*경산대학교 부속한방병원 침구과 · \*\*제한동의학술원

### Abstract

## The Effects of Bee Venom & Melittin on Cell Death in Neuroblastoma Cell Line

Kang Dong-cheol\*, Jung Tae-young\*\*, Seo Jung-chul\*,  
Leem Seong-cheol\* and Han Sang-won\*

\*Department of Acupuncture & Moxibustion,  
College of Oriental Medicine, Kyung-San University  
\*\*Je-Han Oriental Medical Academy

**Objective :** This study was designed to analyze the effects of bee venom and melittin on cell death in neuroblastoma cell line.

**Methods :** MTT assay, morphologic method, DNA fragmenation, flow cytometry, immunocytochemistry analysis, RT-PCR and Western blot were performed.

**Results :** The obtained results are summarized as follows :

1. The MTT assay demonstrated that neuroblastoma cell viability was significantly inhibited dose-dependently by treatment with bee venom and melittin in comparison with control.
2. Cell culture demonstrated that control group proliferated highestly at the 5th day in comparison with the 4th day in bee venom and melittin group. And in bee venom and melittin group cell proliferation decreased 2.5 times than control group.
3. The morphologic study demonstrated that neuroblastoma cell showed apoptosis after treatment with bee venom and melittin for 6 hours using microscope.

· 접수 : 2003년 2월 18일 · 수정 : 2003년 3월 5일 · 채택 : 2003년 3월 22일  
· 교신저자 : 한상원, 대구시 수성구 상동 165 경산대학교 부속대구한방병원 침구과  
Tel. 053-770-2236 E-mail : chimguhan@hanmail.net

4. The Flow cytometry demonstrated that apoptosis of neuroblastoma cell treated with bee venom and melittin was related with stop of cell cycle in stage of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.
5. DNA fragmentation demonstrated that neuroblastoma cell treated with bee venom and melittin showed DNA ladder below 1 Kbp.
6. Immunocytochemistry assay demonstrated that Fos and MAPK which are related with cancer were down-regulated by treatment with bee venom and melittin.
7. RT-PCR analysis demonstrated that Fos and MAPK mRNA were transcribed. Fos was down-regulated from treatment with 5 µg/ml bee venom and MAPK was down-regulated from 1 µg/ml bee venom.
8. Western blot demonstrated that Fos was down-regulated from 1 µg/ml bee venom whereas MAPK was expressed by 1 µg/ml bee venom but down-regulated by 10 µg/ml bee venom.

**Conclusions :** We found that some cancer related genes were down-regulated by treatment with bee venom and melittin. Further study is needed for investigating the anti-cancer effect of bee venom and melittin.

**Key words :** Bee Venom, Melittin, Cell Death, Neuroblastoma Cell Line

## I. 緒 論

腫瘍은 組織의 자율적인 過剩 成長으로, 臨床 및 病理組織學的인 所見에 의하여 良性腫瘍과 惡性腫瘍으로 구분하며, 일반적으로 腫瘍이라 하면 대개 惡性腫瘍인 癌을 뜻한다<sup>1),2)</sup>. 특히 神經芽細胞腫(neuroblastoma)은 小兒期에 보이는 흔한 惡性腫瘍 중의 하나로 백혈병, 중추신경계 종양, 림프종 다음으로 빈도가 높다. 전체 小兒癌의 4~6%를 차지하며 치료가 힘든 腫瘍으로 알려져 있다<sup>3)</sup>.

韓醫學의 癌은 厥疝<sup>4)-7)</sup>, 石瘕<sup>4)-9)</sup>, 息賁<sup>4)-6)</sup>, 伏梁<sup>4)-6),9),10)</sup>, 積聚<sup>5),7)-9),11)-16)</sup>, 腸覃<sup>4)-6),9),11),13)</sup> 등의 異名이 있으며, 原因은 六淫外邪를 感受하는 外因, 七情內傷의 內因, 飲食失調와 過勞, 房勞過度의 不內外因으로 大別된다. 그 治法은 扶正法, 祛邪法 및 扶正祛邪法으로 분류<sup>17)</sup>하여 활용되고 있다. 최근 인간의 게놈지도가 밝혀지면서 癌에 대한 인간의 이해는 한발짝 다가서기 시작했다. 그럼에도 불

구하고 癌은 아직까지는 인간에게 있어 해결되지 않는 과제로 細胞內外的 分子物質에 의해 관여한다는 보고가 있으나 현재까지 뚜렷한 治療方法이 없는 실정이다<sup>18)-19)</sup>.

蜂毒이란 벌목 중에서 꿀벌과에 속하는 벌(Apis mellifera ligustica)의 毒囊에 들어있는 약 40여가지의 有效成分으로 構成된 物質로 臨床에서는 鎮痛, 解熱, 消炎, 鎮痙 및 免疫增強 등의 效能이 있는 것으로 알려져 있다<sup>20)</sup>.

傳統的으로 벌침을 直接 人體에 刺入하는 方法을 使用하였으나, 最近에는 蜂毒을 抽出하여 加工한後 注射器를 利用하여 人體의 經穴에 刺入하는 蜂藥鍼療法이 主로 活用되고 있다. 1990年代 以後 國內에서 蜂藥鍼에 關한 研究가 활발히 進行되고 있어 鎮痛<sup>21)-22)</sup>, 消炎<sup>23)</sup>, 鎮痙<sup>24)</sup>, 安定性 檢査<sup>25)</sup> 및 免疫機能 增強作用<sup>26)</sup> 등이 報告되었고, 外國에서는 Habermann<sup>27)-28)</sup> 등에 의해 蜂毒의 生化學的 成分 및 藥理作用 등이 報告되었다.

또한 蜂藥鍼療法의 臨床的인 效果가 많이 보고되고는 있으나, 蜂毒 및 melittin 藥液으로 神經芽細胞

胞腫의 細胞死에 미치는 影響에 대한 研究報告는 거의 접할 수 없는 실정이다.

이에 著者는 蜂毒(Bee Venom) 및 melittin 藥鍼液을 통해 神經芽細胞腫(neuroblastoma) 세포주인 SK-N-SH cell line에 미치는 影響을 5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) assay 方法을 통한 細胞生存率 觀察, 形態學的 觀察, DNA fragmentation 分析, flow cytometry를 이용한 細胞週期の 分析, 免疫細胞化學的 分析, reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 이용한 mRNA 分析 및 Western blot을 통한 단백질 발현을 관찰한 바 有意한 결과를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材料

#### 1) 試藥

RPMI 1640 medium, fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, USA), penicillin and streptomycin, trypsin(Gibco BRL, USA), Ethanol(Merck, Germany), 5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT, Sigma, USA) 등이며 1차 항체 anti-rabbit IgG Fos, anti-rabbit IgG MAPK, 2차 항체 FITC, Texas Red(Santa cruse, USA)이고, 기타 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다.

#### 2) 試料

蜂毒(100 mg) 및 melittin(1mg)은 Sigma(USA)에서 구입하였다.

#### 3) 機器

CO<sub>2</sub> incubator(VS-9108 MS, vision scientific

Co. Korea), light microscope(Olympus, Japan), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader(Hyperson, Promega, USA), immunofluorescence microscope(Bio-Rad, USA), FAC scan(Becton Dickinson, CA, USA) 등을 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) 試料의 調製

본 實驗에 사용된 蜂毒 및 melittin을 3차 중류수로 20mg/ml가 되게 미리 조제하여 실험시 1, 5, 10 및 15 $\mu$ g/ml로 희석하여 사용하였다.

### 2) 實驗群의 分類

#### ① 對照群(control group)

SK-N-SH cell lines의 neuroblastoma cell을 배양하면서 아무런 처치도 하지 않았다.

#### ② 實驗群(treatment group)

배양한 neuroblastoma cell에 蜂毒 및 melittin 藥鍼液을 각각 1, 5, 10, 15 $\mu$ g/ml로 처치하였다.

### 3) 細胞株의 배양

본 實驗에 사용된 神經芽細胞腫은 서울대학교 암연구소 한국 세포주 은행으로부터 분양받은 SK-N-SH cell lines인 neuroblastoma로 10% RPMI 배지에 penicillin(10 units/ml)/streptomycin(10mg/ml)을 첨가하여 flask에 배양하면서 본 實驗에 사용하였다.

### 4) MTT assay를 이용한 細胞生存率 分析

蜂毒 및 melittin 藥鍼液의 細胞死 效果를 관찰하기 위하여 96 microplate에 각 well마다 세포수를 달리하여 neuroblastoma 세포를 분주한 다음 24시간 배양하여 각 well에 1, 5, 15  $\mu$ g/ml를 선정하여 세포사를 분석하였다. 본 實驗에 사용한 MTT법은

Mosmann이 개발한 방법<sup>28)</sup>을 변형하여 실시하였다. 즉 96 well plate의 각 well에  $5 \times 10^3$  cells/100 $\mu$ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 후 蜂毒 및 melittin 藥液별로 제조하여 각 well에 50 $\mu$ l씩을 넣고 37 $^{\circ}$ C의 CO<sub>2</sub> incubator에 24시간 배양하였다. 배양액을 제거한 후 dPBS에 희석한 MT T 용액(10mg/ml) 20 $\mu$ l를 각 well에 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에 4시간 정도 방치한 다음 DMSO 50 $\mu$ l를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 약간 흔들여 주고 실온에서 30분 정치시켜 발색되는 정도를 파악한 다음 ELISA reader에서 흡광도 570nm에서 측정하였다. 對照群의 흡광도와 비교하여 細胞生存率(inhibitory concentration 50, IC<sub>50</sub>)은 對照群의 50% 수준으로 癌細胞의 성장을 억제하는 시료의 농도( $\mu$ g/ml)에 대한 成長率 Y(%)로 환산하여 계산하였다.

$$Y(\%) = \left[ \frac{T - C_0}{C - C_0} \right] \times 100$$

이때

T = 實驗群의 48시간 培養 후 평균 細胞數(cells/ml)  
 C = 對照群의 48시간 培養 후 평균 細胞數(cells/ml)  
 C<sub>0</sub> = 培養 시작시 평균 細胞數(cells/ml)

### 5) 細胞死의 形態學的 觀察

蜂毒 및 melittin 藥液으로 SK-N-SH cell lines인 神經芽細胞腫의 細胞死를 억제하는지 조사하기 위해 5% RPMI medium, penicilin / streptomycin을 함유한 배지에 10<sup>5</sup> 세포를 60mm culture dish(Corning Incorporated, NY, USA)에 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하는데 蜂毒 및 melittin 藥液 10 $\mu$ g/ml를 첨가하여 반응을 관찰하였다. 위상차 현미경( $\times 200$ )으로 細胞死가 유도된 細胞를 촬영하여 관찰하였다.

### 6) DNA fragmentation 分析

SK-N-SH cell lines인 神經芽細胞腫을 10<sup>3</sup> 세포수로 6 well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 蜂毒과 melittin 藥液을 用量別, 期間別로 DNA fragmentation를 유도하는 정도를 파악하기 위해 세포 용해액인 lysis buffer(10mm Tris-HCl, pH 7.5, 1mm EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 $\mu$ l를 첨가한 후 30분간 얼음에 유지한 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상청액을 취해 100% 에탄올을 가해 침전시켜 이를 proteinase K(100 $\mu$ g/ml)·RNase(50 $\mu$ g/ml)가 함유된 dH<sub>2</sub>O 35 $\mu$ l를 첨가하고 부유시켜 50 $^{\circ}$ C에서 30분간 열을 가하였다. 이 용액을 2% agarose gel을 제조하여 전기영동을 실시한 다음 DNA fragmentation의 유무를 조사하였다.

### 7) Flow cytometry를 이용한 細胞週期的 分析

SK-N-SH cell lines인 神經芽細胞腫을 10<sup>3</sup> 세포수로 6 well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 蜂毒 및 melittin 藥液(10  $\mu$ g/ml)을 5시간 처리한 實驗群과 對照群을 PBS로 세척하고 trypsin을 처리하였다. 세포를 1.5ml eppendorf tube에 넣은 다음 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상청액을 제거한 후 100% EtOH를 1ml 첨가하여 고정하였다. 이때 propidium iodide 5 $\mu$ g/ml와 RNase를 혼합해서 준비하고 상기 고정된 세포를 원심분리하여 상청액을 제거한 다음 PBS로 한번 세척하였다. 동시에 상기 고정된 세포의 DNA에 염색시약을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 항온조에서 가온시킨 다음 propidium iodide로 염색하고 호일에 밀봉하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하고 FAC scan으로 유세포 검색분석(Flow cytometry analysis)을 실시하였다.

### 8) Fos 및 MAPK 發顯에 미치는 免疫細胞化學的 分析

蜂毒과 melittin 藥液이 SK-N-SH cell lines 인 neuroblastoma에서 Fos와 Mitogen-activated Protein Kinase(MAPK) 발현의 억제효과를 유도 하는지 조사하기 위해 상기 방법과 동일하게 한 후 metanol을 세포 위에 떨어뜨려 고정시킨 다음 PBS 로 세척을 실시하였다. 1차 抗體인 Fos와 MAPK를 표지하여 4℃에서 1시간 정도 방치하고, 2차 抗體인 FITC와 Texas-Red를 표지하여 호일로 차광하여 이를 1시간 정도 방치한 다음 이를 형광 현미경에서 관찰하여 實驗群의 단백질이 發顯되는 정도를 觀察 하였다.

#### 9) RT-PCR을 이용한 Fos, MAPK 및 $\beta$ -actin mRNA 發顯 分析

蜂毒 藥液이 神經芽細胞腫에 대한 細胞死 效果를 전사수준에 미치는 影響을 알아보기 위해 세포를 6 well plate에  $10^5$  세포수가 되게 분주한 후 적정 藥液 농도가 되도록 가한 다음 세포를 1.5ml eppendorf tube에 모아서 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상청액을 제거하고 RNAzol 용액을 200 $\mu$ l를 첨가한 다음 chloroform 50 $\mu$ l를 가하고 조심스럽게 pipetting 하여 세포를 lysis하여 이를 15,000 rpm 4℃에서 15분간 원심분리한 후 total RNA를 회수하였다. 다음 isopropanol 동량을 넣고 4℃에서 15분간 침전시켜 75% EtOH로 한번 세척하여 건조시켰다. RNase free dH<sub>2</sub>O를 20 $\mu$ l을 넣고 60℃에서 30분간 가열하여 녹인 다음 total RNA 5 $\mu$ l에 10mm dNTP 5 $\mu$ l, 25mm mgCl<sub>2</sub> 6 $\mu$ l, 10x RNA PCR buffer 5 $\mu$ l, RNase inhibitor 1 $\mu$ l, AMV-Optimized Taq 1 $\mu$ l, AMV reverse Transcriptase XL 1 $\mu$ l, 50 pM specific primer(sense/antisense) 1 $\mu$ l, RNase free dH<sub>2</sub>O 26 $\mu$ l을 첨가하여 50℃에서 20분간 역전사 반응을 실시하고, 94℃에서 2분간 반응을 정지시켜서 PCR을 실시하였다. 이때 반응조건은 94℃/1min, 55℃/45sec, 70℃/60sec에서 35

cycles을 진행시켜 70℃에서 최종적으로 5분간 elongation 반응을 실시하여 종결한 후 PCR 산물을 1% agarose gel에 loading하여 marker를 기준으로 band의 유무를 확인하였다. Fos, MAPK 및  $\beta$ -actin mRNA 발현을 확인하여 전사 수준에서 저해효과를 分析하였다.

#### 10) Western Blot을 이용한 Fos, MAPK 및 $\beta$ -actin 단백질 發顯 分析

蜂毒 藥液 10 $\mu$ g/ml을 처리한 세포를 lysis buffer로 처리하여 그 추출액 20 $\mu$ g을 polyacrylamide SDS gels에 용출한 후 Immobilon-P membrane (Amersham, USA)에 옮겨서 단백질의 발현을 확인하기 위해 enhanced chemiluminescence(ECL)로 발색시켜 확인하는데 일차적으로 Fos와 MAPK 및  $\beta$ -actin(Santa Cruz, 1:1,000 희석) 1차 抗體를 표지하고 PBS로 세척한 다음 blocking 용액을 첨가하여 부반응을 제거하고 2차 抗體인 Horseradish Peroxidase(HRP) conjugates를 표지하여 발색정도를 확인하였다.

#### 11) 統計處理

모든 실험값은 평균값 $\pm$ 표준오차(mean $\pm$ standard error)로 하였고, 統計學的 分析은 SAS(Statistical Analysis System) program을 이용하였다. 對照群과 實驗群과의 比較는 Student's t-test에 의해 有意성을 검정하였으며, P<0.01인 경우에 有意성이 있는 것으로 간주하였다.

### III. 結 果

1. MTT assay를 이용한 用量別 細胞生存率에 미치는 影響

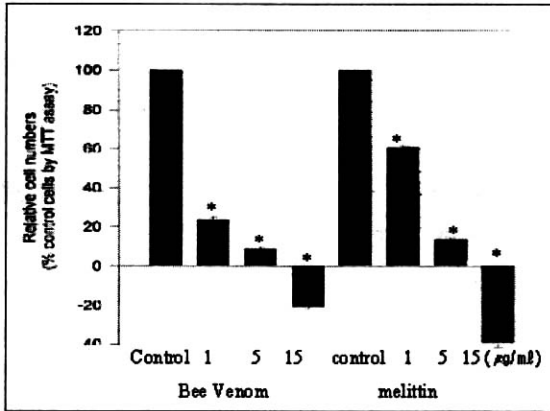


Fig. 1. Effects of Bee Venom and melittin on the SK-N-SH neuroblastoma cell lines.

\* : Statistically significant value compared with control group(P<0.01).

蜂毒 및 melittin 藥液이 用量別 增殖抑制에 미치는 影響을 分析한 結果 ELISA reader에서 나타난 흡광도 수치를 對照群 100%로 환산하였을 때 蜂毒藥液 1, 5 및 15µg/ml에서 각각 23.5, 9.8 및 -20.5%로 對照群보다 모든 蜂毒群에서 有意性(P<0.01) 있게 增殖을 抑制하였다. Melittin의 경우 1, 5 및 15µg/ml에서 각각 60.9, 13.8 및 -39.1%로 對照群보다 모든 melittin群에서 有意性(P<0.01) 있게 增殖을 抑制하였다<Fig. 1>.

## 2. MTT assay를 이용한 期間別 細胞生存率에 미치는 影響

MTT assay 방법을 통한 蜂毒 및 melittin 藥液이 期間別 增殖에 미치는 影響을 分析한 結果 對照群의 경우 배양일수가 5일째에서 78.2%로 가장 최고조에 도달하였지만 蜂毒 및 melittin 藥液群은 4일째에서 각각 29.7%, 20.5%로 최고조에 도달하였다. 세포 증식도로 볼 때 實驗群은 對照群과 비교시 약 2.5 배 정도 增殖이 減少하는 傾向을 나타내었다<Fig. 2>.

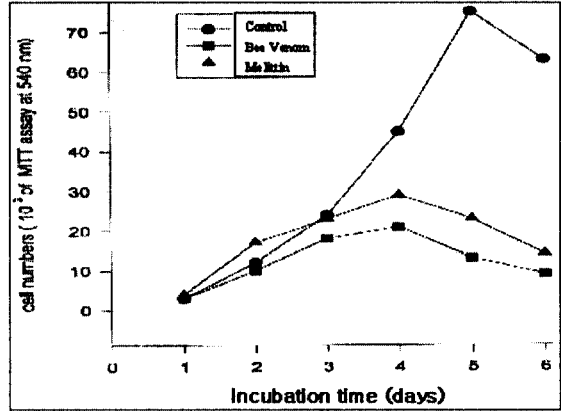


Fig. 2. Proliferation effects of Bee Venom and melittin on the SK-N-SH neuroblastoma cell lines.(Bee Venom and melittin was treated to SK-N-SH neuroblastoma cell lines. Analyzed for cell proliferation as described in Material and Methods. Statistically significant value compared with control group data by student's test.)

## 3. 細胞死의 形態學的 觀察

蜂毒 및 melittin 藥液을 각각 10µg/ml로 해서 6 well에 10<sup>5</sup> cell수로 분주하여 하룻밤 배양한 SK-N-SH cell lines인 神經芽細胞腫에 첨가하여 顯微鏡으로 매 시간 細胞死의 양상을 관찰한 바 6시간 배양한 경우에 細胞死를 유도하는 形態學的 變化인 apoptic body를 觀察할 수 있었다<Fig. 3>.

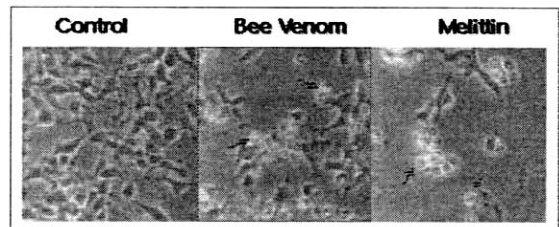


Fig. 3. Mophological pattern of apoptic body from SK-N-SH cell lines neuroblastoma by Bee Venom and melittin.(Arrows indicate apoptic body.)

#### 4. Flow cytometry를 이용한 細胞週期에 미치는 影響

細胞週기를 flow cytometry로 조사한 결과 對照群의 경우 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 단계에서는 53.7%, S단계는 15%이었으며, G<sub>2</sub>/M단계는 21.3%로 나타났는데 반해, 蜂毒 藥鍼液에서는 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 단계에서는 69.5%, S 단계는 4.5%이었으며, G<sub>2</sub>/M단계는 26%이었다.

Melittin 藥鍼液군에서는 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 단계에서는 75.7%, S단계는 3%이었으며, G<sub>2</sub>/M 단계는 20.3% 정도로 나타났다<Fig. 4>.

#### 5. DNA fragmentation에 미치는 影響

6 well에 미리 배양한 神經芽細胞腫에 蜂毒 및 melittin 藥鍼液 10 $\mu$ g/ml 가한 다음 細胞 DNA를 분리하여 DNA fragmentation를 조사해 본 결과 對照群의 경우 2% agarose gel의 lane에 ladder가

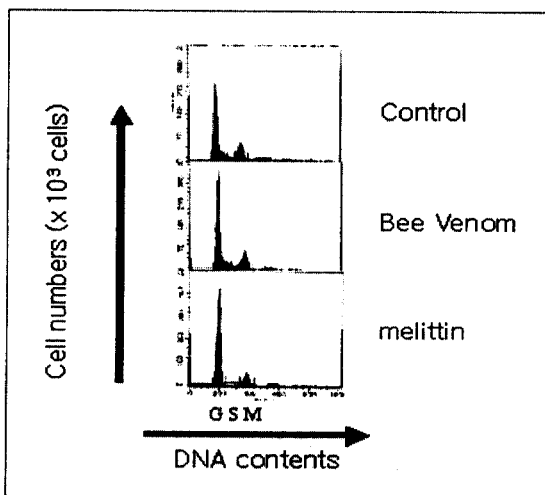


Fig. 4. Cell cycle pattern of flow cytometry of neuroblastoma cell with Bee Venom and melittin.

G : interphase & first gap phase(G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>)

S : synthesis phase(S)

M : second gap phase & mitosis(G<sub>2</sub>/M)

보이지 않았지만, 蜂毒 藥鍼液群에서 가장 강한 ladder가 1 Kbp 이하에 보였고, melittin 藥鍼液群에서도 ladder가 1 Kbp 이하에서 보였다<Fig. 5>.

#### 6. Fos 및 MAPK 發顯에 미치는 免疫細胞化學的 影響

Fos와 MAPK 發顯의 억제효과를 관찰한 바 MAPK는 對照群에서 Texas Red의 signal이 강하게 나타내는데 반해, 蜂毒과 melittin 藥鍼液群은 弱하게 나타나거나 signal의 정도가 감소함을 알 수 있었다<Fig. 6>.

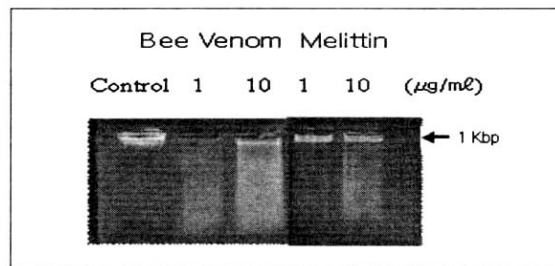


Fig. 5. DNA fragmentation pattern of neuroblastoma cell line by Bee Venom and melittin.

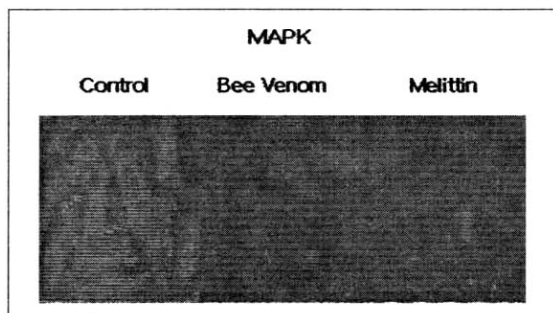


Fig. 6. Immunocytochemistry staining for MAPK in Control(left), Bee Venom(middle) and melittin(right). (Arrows denote staining of SK-N-SH neuroblastoma cell.)

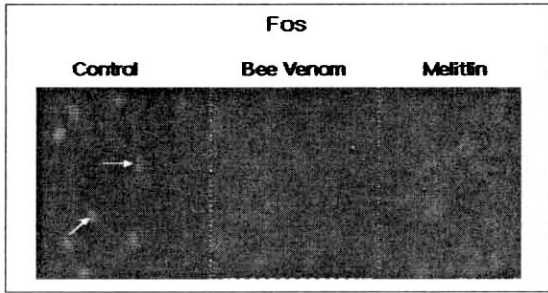


Fig. 7. Immunocytochemistry staining for Fos in Control(left), Bee Venom(middle) and melittin (right). (Arrows denote staining of SK-N-SH neuroblastoma cell.)

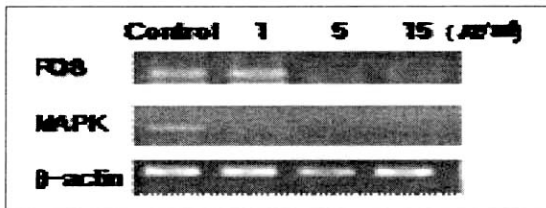


Fig. 8. RT-PCR analysis of total RNA from in the SK-N-SH neuroblastoma cell lines. (Subconfluent neuroblastoma cells were cultured in RPMI medium fetal bovine serum for 24 h. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR using oligonucleotides specific for Fos and MAPK mRNA. β-actin mRNA for standard transcript was used as control.)

Fos는 對照群에서 FITC의 green signal이 강하게 발현이 되었는데 반해, 蜂毒 藥鍼液群에서는 발현이 억제되었고 melittin 藥鍼液群에서는 弱하게 발현되었다<Fig. 7>.

### 7. RT-PCR을 이용한 Fos, MAPK 및 β-actin mRNA의 發顯에 미치는 影響

蜂毒 藥鍼液이 神經芽細胞腫에 대한 細胞死 효과를 전사수준에서 미치는 影響을 알아보기 위하여

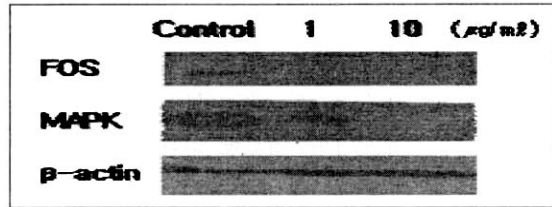


Fig. 9. Influence of Bee Venom on Fos and MAPK expression in neuroblastoma cells. (All cells were cultured in RPMI medium, lysate analyzed for Fos, MAPK and separated by 12% polyacrylamide SDS gels and transferred to Immobilon-P membrane. For detection of the protein they were stained with ECL into Horseradish Peroxidase(HRP) conjugates.)

RT-PCR를 실시한 결과 對照群에서 Fos와 MAPK의 mRNA가 발현되었다. 특히 Fos의 경우 1μg/ml에서는 발현이 되었으나, 5μg/ml부터 발현이 强하게 억제되었다. MAPK의 경우 1μg/ml부터 强하게 발현이 억제되었다. 그러나 β-actin mRNA는 모든 군에서 일정하게 발현되었다<Fig. 8>.

### 8. Western Blot을 이용한 Fos, MAPK 및 β-actin 단백질 발현에 미치는 影響

蜂毒 藥鍼液이 세포내 단백질의 발현과 작용에 미치는 영향을 분석하기 위해 Western Blot을 시행한 결과 Fos는 1μg/ml부터 발현이 强하게 억제되었다. 이에 비해 MAPK는 1μg/ml에서는 발현이 되고 10 μg/ml에서 발현이 억제되었다. 그러나 β-actin은 모든 實驗群에서 일정하게 발현되었다<Fig. 9>.

## IV. 考 察

腫瘍은 自律性を 가진 組織의 過剩한 發育으로 定



義<sup>1)</sup>되며, 細胞學的으로 非正常的인 細胞의 過多 增殖로 인하여 實質臟器, 有腔臟器 및 骨格, 皮膚組織 등에 非正常的인 組織을 形成하는 疾患이다<sup>30),31)</sup>. 臨床 및 病理組織學的인 所見에 의하여 良性腫瘍과 惡性腫瘍으로 구분하는데 惡性腫瘍은 신속히 成長하고 浸潤性 成長으로 주위의 正常組織을 破壞하고 體內的 각 부위로 擴散 및 轉移를 일으켜 發病者가 死亡에 이르게 하는 致命的인 疾病으로 일반적으로 腫瘍이라하면 대개 惡性腫瘍인 癌을 뜻한다<sup>2)</sup>. 이 중 神經芽細胞腫은 小兒期에 흔히 발생하는 小兒癌으로 백혈병, 中樞神經系腫瘍, 림프종의 다음으로 발생 빈도가 높다. 주로 交感神經에서 발생하는 惡性腫瘍으로 副腎髓質이나 交感神經節에서 발생할 수 있다. 50% 가량이 복강에서 발생하고 25%가 副腎髓質에서 기인하고 20% 가량이 胸廓내에서 발생하며 전체의 75%가 5세 미만의 小兒에서 관찰되며 때로는 출생시에 발생하기도 한다. 증상은 腹部腫塊, 四肢痲痺, 食慾不振, 泄瀉, 眼球回轉 등의 증상이 있고 환자의 약 10%에서 자연 치유되는 경향이 있다<sup>3)</sup>.

韓醫學的으로 腫瘍은 厥疝<sup>4)-7)</sup>, 石瘕<sup>4)-9)</sup>, 息賁<sup>4)-6)</sup>, 伏梁<sup>4)-6),9),10)</sup>, 積聚<sup>5),7)-9),11)-16)</sup>, 腸覃<sup>4)-6),9),11),13)</sup> 등의 범위에 포함시켜 현대 腫瘍의 개념과 유사하게 인식하였다. 腫瘍의 原因은 六淫에 의한 外因, 七情內傷의 內因, 飲食失調와 過勞, 房勞過度의 不內外因으로 大別된다<sup>17)</sup>. 腫瘍의 病機에 대하여 氣血瘀滯<sup>32)</sup>, 痰瘀凝結<sup>33)</sup>, 火毒內溫<sup>7)</sup>, 臟腑機能失調를 病機<sup>17)</sup>로 보았다. 그 治療法은 益氣健脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎하는 扶正法과 清熱解鬱, 祛濕解毒, 行氣理氣, 活血化瘀, 軟堅散結하는 祛邪法 및 두가지를 병용하는 扶正祛邪法의 3가지로 分類하여 活用되고 있다<sup>34)</sup>. 西洋醫學에서는 癌의 發生因子로 遺傳的 要因, 人種과 地理學的 要因, 免疫學的 因子 등의 內的因子와 化學的 發癌物質, 放射線, 腫瘍性 바이러스 등의 外的因子로 나누고 있으며<sup>1)</sup>, 그 治療方法으로 手術療法, 放射線療法, 化學療法, 免疫療法, 遺傳子療法

등이 있지만 手術과 化學療法, 放射線療法에는 각각의 한계나 문제점들이 있다.

蜂毒藥鍼은 經絡學說의 原理에 의하여 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 抽出하여, 加工하거나 또는 蜂鍼을 직접 疾病에 有關한 穴位, 壓痛點 혹은 體表의 觸診으로 얻어진 陽性反應點에 注入하여 刺鍼效果 및 生化학적 효과를 이용한 것이다<sup>35)</sup>.

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고, 臨床에서는 鎮痛, 解熱, 消炎, 鎮座, 免疫 增強 및 抗癌效果 등의 效能이 있는 것으로 알려져 있다<sup>35)</sup>.

蜂毒의 成分은 크게 peptide components, non peptide components, enzymes으로 構成되어 있다<sup>28)</sup>. Peptide components는 freeze-dried venom의 약 50%를 構成하고 있으며, 主要成分으로는 apamin, MCD peptide, melittin 등이 있다<sup>36)-37)</sup>.

Melittin은 26개의 amino acid로 構成된 活性 peptide로 溶血作用과 酵素作用을 하고 있다<sup>36)</sup>. 溶血作用에서는 phospholipase A<sub>2</sub>와 상승적으로 작용하여 서로의 활동성을 증가시켜 주며 효소작용에서는 뇌하수체와 부신피질체계를 자극하여 catecholamine과 cortisone 분비를 촉진시킨다. Melittin은 phospholipase A<sub>2</sub>의 세포막에 대한 간접적 분해작용으로 세포내부에 저장된 물질을 공격한다. 또한 특이한 mast cell에서 histamin을 방출시켜 말초혈관의 혈류를 증가시키며 독성성분을 확산시키는 작용을 도와준다. 또한 활성 peptide로 세척처럼 강한 계면활성작용이 있고 물이나 기름에 모두 섞일 수 있는 친화성을 갖고 있으므로 다른 세포막에 대해서도 막의 투과성을 변화시키는 작용도 있다.

蜂毒藥鍼의 臨床的인 효과가 많이 보고되고는 있으나, 腦腫瘍 癌細胞株를 이용한 연구보고는 매우 드문 편이므로, 이에 著者는 蜂毒 및 melittin 藥鍼液을 통해 神經芽細胞腫 細胞인 SK-N-SH cell line에 미치는 影響을 MTT assay를 통한 細胞生存率 分析, 形態學적 觀察, DNA fragmentation 分析, flow

cytometry를 이용한 細胞週期の 分析, 免疫細胞化學的 分析, RT-PCR을 이용한 mRNA 分析 및 Western Blot을 통하여 연구한 결과 다음과 같다.

MTT assay 방법을 통해 蜂毒 및 melittin 藥液이 神經芽細胞腫의 增殖抑制에 미치는 影響을 分析한 결과 ELISA reader에서 나타난 흡광도 수치는 대조군의 경우를 100%로 환산하였을 때, 蜂毒藥液 1 $\mu$ g/ml 경우는 23.5%, 5  $\mu$ g/ml인 경우 9.8%, 15 $\mu$ g/ml 경우는 -20.5%로 對照群보다 모두 저농도에서도 유의하게 증식을 억제하였다. Melittin의 경우 1 $\mu$ g/ml 경우는 60.9%, 5 $\mu$ g/ml인 경우 13.8%, 15  $\mu$ g/ml 경우는 -39.1%로 對照群보다 유의하게 증식을 억제하였다. 여기서 melittin은 蜂毒보다 증식억제 활성이 떨어졌는데 이는 여러가지 성분으로 이루어진 蜂毒의 복합작용이 단일성분의 melittin보다 뛰어난 것을 시사하는 것이라 하겠다.

蜂毒 및 melittin 藥液이 神經芽細胞腫의 增殖에 미치는 影響을 MTT assay 방법을 통해 분석한 결과 對照群의 경우 배양일수가 5일째에서 78.2%로 가장 최고조에 도달하였지만 蜂毒 및 melittin 藥液群은 4일째에 각각 29.7%, 20.5%로 최고조에 도달하였다. 세포 증식도로 볼 때 實驗群은 對照群과 비교시 약 2.5배 정도 增殖이 減少하는 경향을 나타내었다. 이는 蜂毒이 함유하고 있는 성분에 강한 세포 증식억제 능력이 있음을 시사한다.

蜂毒 및 melittin 藥液을 각각 10 $\mu$ g/ml로 해서, 6 well에 10<sup>5</sup> cell 수로 분주하여 하룻밤 배양한 SK-N-SH cell lines인 神經芽細胞腫 細胞에 첨가하여 현미경으로 매시간 細胞死의 양상을 관찰한 바, 6시간 배양한 경우에 細胞死를 유도하는 形態學的 變化를 관찰할 수 있었다. 이 결과로 볼 때 蜂毒 및 melittin 藥液에는 암세포 증식과 세포모양을 억제하는 성분들이 함유되어 있는 것으로 보여진다.

細胞의 分裂增殖은 생명체의 가장 중요한 현상이나 세포의 무절제한 분열은 新生物 등의 질환을 유

발하여 생명을 위협하게 된다. 이러한 세포의 분열 증식에는 細胞週期가 있고, 細胞週期는 DNA합성을 기준으로 구분하게 되는데 G<sub>0</sub>期(interphase), G<sub>1</sub>期(first gap phase), S期(synthesis phase), G<sub>2</sub>期(second gap phase)의 間期와 mitosis(M期 또는 細胞分裂期)로 대별한다. G<sub>0</sub>期는 세포가 증식을 휴지하고 있는 상태이고 G<sub>1</sub>期는 세포내 인자가 증식되며 세포의 크기가 증대되는 시기이다. S期는 細胞分裂을 위한 DNA의 합성이 이루어지는 시기이며, G<sub>2</sub>期는 세포질의 인자가 증식되는 시기이고, M期는 핵분열과 세포질분열로 세포자체가 나누어지는 시기이다<sup>36)</sup>. 蜂毒 및 melittin 藥液이 세포사를 유도한다면 세포 증식에 영향을 주므로 세포주기 중 어떤 단계에 영향을 미치는지 분석하기 위해 flow cytometry로 조사하여 본 결과 對照群의 경우 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 단계에서는 53.7%, S 단계는 15%이었으며 G<sub>2</sub>/M 단계는 21.3%로 나타났는데 반해 蜂毒群에서는 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 단계에서는 69.5%, S 단계는 4.5%이었으며 G<sub>2</sub>/M 단계는 26%이었다. melittin群에서는 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 단계에서는 75.7%, S 단계는 3%이었으며 G<sub>2</sub>/M 단계는 20.3% 정도로 나타났다. 따라서 蜂毒 및 melittin 藥液이 神經芽細胞腫에서 細胞死의 원인은 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 단계의 細胞週期 진행이 정지되었기 때문이라고 생각된다.

蜂毒 및 melittin 藥液이 細胞死를 유도한다면 세포의 염색체에 자가효소에 의해 200~400 염기쌍(bp : base pair)가 출현하는지를 분석할 필요가 있다. DNA fragmentation을 시행하여 본 결과 對照群의 경우 2% agarose gel의 lane에 ladder가 보이지 않았지만 蜂毒 10 $\mu$ g/ml시 가장 강한 ladder가 1 Kbp 이하에 보였고 melittin 藥液 10 $\mu$ g/ml에서도 ladder가 1 Kbp 이하에서 보였다. 이는 蜂毒 및 melittin 藥液이 神經芽細胞腫의 細胞死를 유도했음을 증명하는 것이다.

細胞週期 조절에 관여하는 遺傳子들로는 c-jun,

c-myc, c-fos, cyclin D1, CDK4, cdc-2, p53, p21, RB1, p16 등이 있다<sup>38)</sup>.

이중 細胞分裂週期の 促進을 유도함으로써 腫瘍細胞의 증식을 촉진하는 것으로 잘 알려진 것은 c-fos 遺傳子이다.

癌 遺傳子の 發顯을 위한 신호전달체계는 Ras, Raf-1, Mek, Erk1/2로 구성되며, 이러한 일련의 신호전달체계를 MAPK pathway라고 한다. 이러한 일련의 신호전달체계에서 세포막에 있는 Ras 단백질이 growth factor나 cytokine 등의 신호전달을 on-off 시키는 molecular switch으로써 중요한 역할을 담당하고 있다. 만약 Ras gene에 변이가 발생하여 자체의 GTPase 활성이 소실되거나 GAP와의 작용이 방해받게 되어 GTP가 결합한 Ras 단백질의 양이 비정상적으로 증가하게 되면 growth signal의 이상이 생겨 암으로 발전하게 된다<sup>39)~40)</sup>.

蜂毒 및 melittin 藥鍼液이 SK-N-SH neuroblastoma cell lines에서 Fos와 MAPK 발현의 억제효과를 유도하는지 조사하기 위해 免疫細胞化學的分析을 시행한 후 형광현미경에서 관찰한 바 암 세포 증식의 지표 단백질인 MAPK의 경우는 對照群에서 Texas Red의 빨강 색상 signal이 강하게 나타나는데 반해 蜂毒 및 melittin 藥鍼液群은 약하게 나타나거나 signal의 정도가 감소함을 알 수 있었다. 전사인자이면서 암유전자인 Fos 단백질의 양상은 FITC의 녹색색상을 나타내며 세포의 전사를 촉진하는데 對照群에서 強하게 발현이 되는데 반해, 蜂毒藥鍼液群에서는 거의 발현이 되지 않았고, melittin 藥鍼液群에서는 弱하게 발현되었다. 따라서 蜂毒 및 melittin 藥鍼液은 Fos와 MAPK 단백질의 발현을 억제하므로 癌의 증식을 억제한다고 생각된다.

Fos와 MAPK의 mRNA 발현에 蜂毒藥鍼液이 미치는 影響을 보기 위해 RT-PCR을 실시한 결과 對照群에서는 Fos와 MAPK의 mRNA가 발현됨을 알

수 있었다. 특히 Fos의 경우 1 $\mu$ g/ml에서 발현이 되고 있으나, 5 $\mu$ g/ml부터 발현이 強하게 억제되는 것으로 나타났다. MAPK의 경우 1 $\mu$ g/ml부터 強하게 발현이 억제되었다. 한편  $\beta$ -actin mRNA는 모든 群에서 일정하게 발현되었다. 이는 蜂毒이 Fos와 MAPK의 세포사 효과를 전사수준에서 影響을 미치기 때문인 것으로, 세포내 표준단백질에는 影響을 주지 않는 것으로 생각된다.

蜂毒藥鍼液이 세포내 단백질의 발현과 작용에 미치는 影響을 分析하기 위해 Western Blot을 시행한 결과 Fos는 1 $\mu$ g/ml부터 발현이 強하게 억제되는 것을 알 수 있었다. 이에 비해 MAPK는 1 $\mu$ g/ml에서 아직 발현이 되고 10 $\mu$ g/ml에서 발현이 억제되는 것으로 나타났다. 한편 세포내 표준단백질  $\beta$ -actin은 모든 實驗群에서 일정하게 발현됨을 알 수 있었다.

이와 같이 Fos와 MARK의 발현에 蜂毒藥鍼液이 미치는 影響을 알아보기 위하여 RT-PCR한 결과 Fos는 5 $\mu$ g/ml부터, MAPK는 1 $\mu$ g/ml부터 強하게 발현이 억제되었다. Western Blot에서 Fos가 1 $\mu$ g/ml부터 발현이 強하게 억제되었으나 MAPK는 1 $\mu$ g/ml에서 아직 발현이 되고 10 $\mu$ g/ml에서 발현이 억제된 것을 알 수 있다. 이는 아마도 MAPK의 경우 다른 경로로 외부의 신호전달경로를 거쳐 발현이 진행되고 있는 것으로 예측되어진다.

以上的 結果는 결국 蜂毒이 癌 蛋白質의 전사과정이나 蛋白質의 合成過程을 억제함으로써 癌의 增殖을 抑制하는 成分이 있음을 시사하는 것이며, 蜂毒은 神經芽細胞腫 細胞를 有意性있게 抑制하여 抗癌治療에 적용할 수 있으리라 생각된다. 또한 본 실험은 蜂毒이 원액 뿐만 아니라 단일성분인 melittin에서도 癌 細胞活性 抑制의 效果가 있음을 확인시켜 주었다.

이에 대해서는 향후 蜂毒이 正常細胞에 미치는 影響과 發癌과 관련된 다른 遺傳子에 미치는 效果

를 알아보기 위한 추가적인 實驗 및 研究가 持續的  
으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## V. 結 論

蜂毒 및 melittin 藥鍼液이 神經芽細胞腫에 미치  
는 影響을 MTT assay 방법을 통한 細胞生存率 分  
析, 形態學的 觀察, flow cytometry를 이용한 細胞  
週期の 分析, DNA fragmentation 分析, 免疫細胞  
化學的 分析, RT-PCR을 이용한 mRNA 分析 및  
Western Blot을 통한 단백질 발현을 觀察한 바 다  
음과 같은 結論을 얻었다.

1. MTT assay 방법을 통한 用量別 神經芽細胞  
腫의 細胞增殖에서 蜂毒 및 melittin 藥鍼液群 모두  
用量依存的으로 有意性 있게 抑制하였다.

2. MTT assay 방법을 통한 期間別 神經芽細胞  
腫의 細胞增殖에서 對照群은 배양일수가 5일째, 蜂  
毒 및 melittin 藥鍼液群은 4일째 최고조에 도달하  
였으며, 實驗群은 對照群과 비교시 약 2.5배 정도  
増殖이 抑制되었다.

3. 細胞死의 形態學的 變化인 apoptic body를 蜂  
毒 및 melittin 藥鍼液群에서 6시간 배양 후 觀察할  
수 있었다.

4. Flow cytometry로 細胞週期를 分析한 결과  
蜂毒 및 melittin 藥鍼液 群에서의 細胞死는 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>  
단계에서 進行이 停止된 것과 관련이 있었다.

5. DNA fragmentation를 시행한 결과 蜂毒 및  
melittin 藥鍼液群에서 모두 ladder가 1Kbp 이하

에서 나타났다.

6. 免疫細胞化學的 分析에서 Fos와 MAPK의 발  
현은 蜂毒 및 melittin 藥鍼液에 의해 모두 抑制되  
었다.

7. RT-PCR 결과 Fos와 MAPK mRNA의 발  
현은 각각 5 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml부터 强하게 억제되었다.

8. Western Blot에 의한 단백질 발현을 分析한  
결과 Fos는 1 $\mu$ g/ml부터 强하게 억제를 하였으나,  
MAPK는 1 $\mu$ g/ml에서 아직 발현이 되고 10 $\mu$ g/ml에  
서 발현이 억제되었다.

## IV. 參考文獻

1. 서울대학교 의과대학편. 종양학. 서울 : 서울대  
학교출판부. 1996 : 43-93.
2. 박찬열. 發癌原因에 대한 考察. 大韓鍼灸學會  
誌. 1999 ; 16(8) : 147-59.
3. 洪彰義. 小兒科學. 서울. 대한교과서주식회사.  
1989 : 685-7.
4. 張中植. 蔘茸湯이 S-180 대한 抗腫瘍效果和  
Cyclophamide로 誘發된 白鼠의 副作用 減少  
에 미치는 影響. 大田大學校大學院 碩士學位論  
文 1999 : 1-2, 19-21.
5. 金韓燮. 癌의 治法 治方 및 治療藥物에 관한  
文獻的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1989 ; 10(1)  
: 162-4.
6. 金尙勳. 紫菀이 抗癌作用 및 免疫反應에 미치  
는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1990 ; 13 : 318  
-24.

7. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울 : 東洋醫學研究員出版部. 1985 : 38, 1.4, 211, 249, 289, 331.
8. 李鍾賢. 鍼刺戟이 3-Methylcholanthrene으로 誘發된 實驗動物의 腫瘍發生抑制에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1989 ; 10(1) : 21-33.
9. 北京中醫學院. 韓醫學臨床病理. 서울 : 成輔社. 1983 : 563-6.
10. 楊繼洲. 鍼灸大成. 서울 : 大星文化社. 1984 : 14, 45-6, 92-3, 226, 228, 352, 376, 380, 407, 431.
11. 裴成植. 癌斗 豫防. 大韓韓醫學會誌. 1994 ; 6 : 302-4.
12. 買坤. 癌瘤防治研究. 서울 : 新光文化社. 1984 : 25-30.
13. 洪元植. 癌의 韓洋方併用治療에 대한 報告. 大韓韓醫學會誌. 1994 ; 4 : 297-301.
14. 王琦. 皇帝內經素問今釋. 서울 : 成輔社. 1983 : 146, 192, 227, 247.
15. 方藥中. 實用中醫內科學. 서울 : 一中社. 1988 : 921-3.
16. 崔旼燮. 水鍼療法에 관한 考察. 大韓韓醫學會誌. 1990 ; 11(1) : 325-6, 324-6.
17. 徐範錫. 豬苓藥鍼이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 免疫反應에 미치는 影響. 大田大學校 大學院 博士學位論文. 1995.
18. Benassi MS, Molendini L, Gamberi G, Razzini P, Sollazzo MR, Merli M, Asp J, Magagnoli G, Ballardelli A, Bertoni F, Picci P : Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma, *Int. J. Cancer*. 1999 ; 84(5) : 489-93.
19. Geoffrey M. Cooper. *Oncogenes* 2nd ed., Jones and Bartlett. 1995 : 260-67.
20. 金文昊. 蜂毒療法과 蜂鍼療法, 서울 : 한국 교육 기획. 1992 : 20-37, 41-42, 67-64, 104-112, 134-149, 171-176.
21. 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.
22. 金利和, 李栽東, 盧植, 閔炳一. 흰쥐에서 合谷穴 蜂毒藥針刺戟에 의한 開口反射의 反應, 서울, 大韓韓醫學會誌, 1999 ; 20(1) : 106-112.
23. 都垣錫, 張竣赫, 金慶鎬, 尹鍾和, 金甲成. 蜂毒療法이 흰쥐의 膝關節 炎症性 浮腫에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 1995 ; 12(1) : 211-220.
24. 孔賢淑, 高炯均, 金昌煥. 蜂毒療法이 抗座彎에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 1993 ; 10(1) : 159-165.
25. 이종석, 김재규, 고희균. 봉독의 치사량에 관한 실험적 연구. *대한침구학회지*. 1993 ; 10(1) : 151-158.
26. 李京姬, 金昌煥, 姜成吉, 高炯均 : 産地別 蜂毒液藥鍼刺戟이 免疫機能低下에 미치는 影響, *대한침구학회지*, 2000 ; 17(4) ; 28-40.
27. Barbara Rudolf. *Chemistry and Pharmacology of Honey Bee Venom*, Academic Press. 1986 : 329-402.
28. Habermann E. *Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms*. In *Venomous Animals and their Venoms*, Academic Press. 1971 ; 3 : 61.
29. Mosmann T, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Method*. 1983 ; 65(1) : 55-63.
30. 洪元植. 現代中共의 癌治療. 서울 : 英文社. 1984 : 81-94, 329-30, 361, 378-9, 381-2.

31. 김예희. 종양학. 서울 : 인제대학교출판부. 1994 : 235-41.
32. 陳言. 三因方. 臺北 : 臺聯國風出版社. 1978 : 3.
33. 朱震亨. 丹溪心法. 臺北. 五洲出版社. 1978 : 125.
34. 田炳旭. 癌에 대한 韓醫學的 認識 및 實驗的 研究에 관한 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1995 ; 1(1) : 29-54.
35. 朱文鋒. 實用 中醫辭典, 陝西 : 陝西科學技術出版社. 1982 : 402.
36. Assem ES., Atkinson G. Histamine release by MCDP (401), a peptide from the venom of the honey bee, Brit. Pharmacol. 1973 ; 337-8.
37. Spoerri, PE. Apamin from bee venom. Neurobiology. 1973 ; 3 : 207-14.
38. 서울대학교 의과대학. 세포생물학. 서울대학교 출판부. 1990 ; 1-9, 63-5, 145-50.
39. 전병학 : Ras Oncogene 연구의 최신 동향과 문제점, 대한 생화학·분자생물학회지, 4(4) : 19-21, 1996.
40. Mehta PB, Robson CN, Neal DE, Leung HY. Keratinocyte growth factor activates p38 MAPK to induce stress fibre formation in human prostate DU145 cells. Oncogene. 2001 ; 20(38) : 5359-65.