

원저

전립선 암세포에 대한 Cobrotoxin의 抗癌 機轉 研究

채상진 · 송호섭

경원대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Study of anti-cancer mechanism with Cobrotoxin on Human prostatic cancer cell line (PC-3)

Chae Sang-jin and Song Ho-seup

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). The goal of study is to ascertain whether cobrotoxin inhibits the cell growth and cell cycle of PC-3, or the expression of relative genes and whether the regression of PC-3 cell growth is due to cell death or the expression of gene related to apoptosis.

Methods : After the treatment of Pc-3 cells with cobrotoxin, we performed 형광현미경, MTT assay, Western blotting, Flow cytometry, PAGE electrophoresis and Surface plasmon resonance analysis to identify the cell viability, cell death, apoptosis, the changes of cell cycle and the related protein, Adk, MAP kinase.

Results : 1. Compared with normal cell, the inhibition of cell growth reduced in proportion with the dose of cobrotoxin(0-16nM) in PC-3.

2. Cell viabilities of 0.1, 1, 4nM cobrotoxin treatment were decreased and those of 8, 16nM were decreased significantly.

3. S phase of cell cycle was decreased at the group of 1, 2, 4, 8, 16nM cobrotoxin, but M phase was increased at 0.1, 1, 2, 4, 8, 16nM cobrotoxin.

4. Cox-2 expression after cobrotoxin was peaked at 12hours and was decreased significantly after 6, 12, 24 hours.

· 접수 : 2005년 4월 29일 · 수정 : 2005년 5월 3일 · 채택 : 2005년 5월 14일
· 교신저자 : 송호섭, 서울시 송파구 송파동 20-8 경원대 부속한방병원 침구과
Tel. 02-425-3456 E-mail : hssong70@kyungwon.ac.kr

5. The expression of Cdk4 was decreased dose-dependently at 1, 2, 4, 8nM cobrotoxin and was decreased significantly at 4, 8nM. Cyclin D1 was decreased at 1, 2, 4, 8nM, and Cyclin E was not changed. Cyclin B was decreased at 1, 2, 4, 8nM dose-dependently and was decreased significantly at 2, 4, 8nM.

6. The expression of Akt was decreased at 1, 2, 4, 8nM dose-dependently and was decreased significantly at 2, 4, 8nM.

7. ERK was increased at 1, 2nM and decreased at 4, 8nM. p-ERK was increased at 1, 2, 4 nM, but decreased at 8nM. JNK and p-JNK were increased at 1, 4, 8 nM. p38 was increased at 2nM. p-p38 was increased at 1nM but decreased significantly at 2, 4, 8nM.

8. The nuclei of normal cells were stained round and homogenous in DAPI staining, but those of PC-3 were stained condense and splitted. Apoptosis was increased dose-dependently at 2, 4, 8, 16nM and increased significantly at 2, 4, 8, 16nM.

9. Bax wasn't changed at 1, 2, 4, 8nM and Bcl-2 was decreased significantly at 1, 2, 4, 8nM. Caspase 3 and 9 weren't changed at 1, 2, 4nM but were decreased significantly at 8nM.

Conclusion : These results indicate that cobrotoxin inhibits the growth of prostate cancer cells, has anti-cancer effects by inducing apoptosis.

Key words : Prostatic Cancer Cell Line, Cobrotoxin.

I. 緒 論

현대 문명의 발달과 더불어 각종 종양의 발생 빈도가 현저하게 높아지고 있어 산업화된 선진 국가에서는 매년 암으로 사망하는 빈도가 心脈管系 질환과 함께 증가하고 있는 추세이다¹⁻²⁾.

암은 腫瘍³⁻⁴⁾, 癰疽³⁻⁴⁾, 腫毒³⁻⁴⁾, 積聚³⁻⁴⁾, 癥瘕³⁻⁴⁾, 癥³⁻⁴⁾, 瘕³⁻⁴⁾, 陰瘡³⁻⁴⁾, 癭瘤³⁻⁴⁾, 肺癰³⁻⁴⁾, 痰壅³⁻⁴⁾, 痰癰³⁻⁴⁾, 石癰³⁻⁴⁾, 石疽³⁻⁴⁾, 疔疽³⁻⁴⁾, 疔膈³⁻⁴⁾ 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⁶⁾ 등이 고, 治法은 清熱解毒, 軟結散結, 活血化瘀, 去濕解毒 및 扶正培本法 등이 활용되고 있다^{2,7)} 서양 의학적 치료법으로는 외과적 수술, 방사선요법, 화학요법, 면역요법 등이 사용되고 있는데⁸⁾ 이러한 치료법은 암종에 따른 감수성 차이, 치료후 예후 불량, 재발 및 합병증 등의 부작용이 발생 되는 것으로 보고되고 있으므로 이를 극복하기 위해 임상에서 한약과 항암제의 병용투여 및 한약을 이용한 체질개선이 시도되고 있고, 韓藥⁹⁾, 鍼⁹⁻¹⁰⁾, 봉약침을 포함한 다양한 藥鍼¹¹⁻¹⁴⁾ 등을 이용한 抗腫瘍免疫學적¹¹⁻¹²⁾ 및 抗腫瘍遺傳子적

실험연구¹³⁻¹⁴⁾ 가 지속적으로 시행되어지고 있다¹⁵⁻¹⁶⁾

또한, 최근에 독성이 있는 천연 peptide가 암 세포의 세포사멸(apoptosis)과 분화에 미치는 영향에 대한 연구보고가 있는데¹⁶⁻¹⁹⁾, 그 중 특히, 蜂毒의 항암효과에 대한 연구에서 Allen DH 들²⁰⁾이 봉독의 성분 중 Apamin이 tumor를 억제하는데 상관이 있다고 보고하였으며, Wood MW 들²¹⁾은 봉독의 성분 중 Phospholipase A2가 tumor를 억제하는데 상관이 있다고 보고하였고, 박¹⁴⁾은 봉독성분 전체를 이용해 DNA합성에 관련된 세포분열억제 및 apoptosis유발과 각각에 관련된 유전자의 변화를 관찰해 항암효과가 있음을 발표하였으며, 권²²⁾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 있다²³⁾.

factor V activator는 혈액응고에 중요한 역할을 하며, nicotinic acetylcholine receptor와의 결

합력이 강하다²⁴⁻²⁵⁾고 하였는데 순환기계나 중추 신경계에 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 이용한 항암효과를 알아보하고자 전립선암세포인 PC-3 cell의 세포 성장을 cobrotoxin이 억제하는지, 이 효과가 세포 주기를 억제하고, 관여하는 유전자발현을 억제하는지와, PC 3-cell의 성장이 억제될 때 이는 세포를 죽이기 때문인지와 apoptosis와 관련된 유전자발현과 관련이 있는지를 살펴보고자 하였다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 시약

細胞培養과 western blotting 試藥 등은 연구 용에 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), CO2 incubator

(MCO-17AIC, JAPAN), flow cytometer (Coulter사) BIACORE 2000and CM5 sensor chip BIACORE AB (Uppsala, Sweden)이다.

2. 방법

1) 시료 조제

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

2) 세포주 배양 및 세포내 유전자 주입

PC-3를 2×10^5 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 μl 에 넣어 섞었다. Lipofectamin 2000 사용전 Opti-MEM I Medium (or other medium without serum) 50 μl 에 Lipofectamine 2,000 3 μl 를 섞어 실온에서 배양. 이때 DNA를 섞어주었다. 5분간 배양하여 [DNA with the diluted Lipofectamine 2,000 (total volume; 100 μl)] 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 $\mu\text{l}/\text{well}$ 을 각 well에 넣어 가볍게 흔들어서 transfection 시켰다. 이때 NF-B-Luciferase reporter를 비교군으로 사용하였다. 37 $^{\circ}\text{C}$ CO2 incubator 에서 24-48시간 배양 후 transfection 시켰다. transfection 24시간 후 48시간 더 배양하고 LPS(1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 sample (inhibitors)처리 하였다.

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각 처리하였다.

4) MTT Assay를 이용한 細胞活性 실험

MTT [tetrazolium salt 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]는 세포내로 흡수된 후, 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 formazan을 형성하는데 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하므로 세포의 생존율을 측정하는 방법으로 이용되고 있다. 96 well plate에 1×10^5 cells/ml의 세포를 100 μl 씩 파종하여, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 각 well당 새로운 배지 200 μl 씩 넣어준 후 MTT (thiazolyl blue, SIGMA Co.)를 2.0mg/ml의 농도로 준비하여 50 μl 씩 첨가하여 3시간에서 4시간 동안 반응을 시켰다. 각 well당 시험물질 220 μl 를 제거하고 보라색물질 30 μl 만 남긴 후 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 150 μl 첨가하여 microplate mixer상에서 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후 ELISA plate reader에서 540nm 흡광도로 optical density(O.D.)값을 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정한 값을 산출하였다(Propobitum iodide staining 방법에 의하여 실시함)

5) Apoptosis staining

세포를 60 mm dish에 2.0×10^5 cells/ml 로 24hr 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 배양기에서 배양후 세포를 수확하여 800rpm에서 5분간 원심분리후 상등액을 버리고 0.5~1 cm x 15 ml cone tube에 넣은 후 hypotonic solution (75mM KCl) 가하고 재차 800rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액을 버리고 Glacial acetic acid : Methanol (1 : 3)으로 두 번 고정한다. 그 후 fixer 5 ml씩 넣어주

고 다시 800rpm에서 5분간 원심분리후 Slide 위에 200~300 μl 정도로 slide 2~3개 정도에 나누어 건조시킨다. 이 slide 위에 DAPI staining solution 15 μl 를 관찰하고자하는 부분에 떨어뜨리고 cover glass를 씌워준다. 20분간 dark room에서 exposure시킨 후 형광현미경으로 관찰한다.

6) Cobrotoxin이 세포사 및 세포주기 단백질 발현에 미치는 영향

Western blotting을 이용하여 發色 정도를 분석하고, 현상한 film의 구획을 정한후 光學濃度計를 이용하여 相對濃度를 각각 측정 비교하였다.

(1) 시료준비 및 정량측정

원하는 물질의 처리가 끝나면 scriper로 세포를 모으고, 모은 세포를 담겨있던 배지와 함께 1,000rpm에서 원심분리 하여 상층액을 버린 뒤 2ml의 cold PBS로 두 번 세척하였다. 여기에 50mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.02% Sodium Azide, 0.2% SDS, PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Aprotinin 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$, Igapel 630 (또는 NP-40) 1%, NaF 100mM, Sodium Deoxychoate 0.5%, EDTA (Ethylendiamineetraacetic acid--Sigma E-4884) 0.5mM, EGTA (Ethylene glycol-bis(β -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid--sigma E-4378) 0.1 mM로 조성된 Lysis Buffer를 50~100 μl 를 가해 잘 vortex한 뒤 2시간 동안 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 용해시켰다. 반응이 끝나면 시료를 1.5ml tube에 담아 30초 동안 vortex 하고 4 $^{\circ}\text{C}$ 23,000 g에서 1시간 동안 원심분리 하였다. 원심분리 한 상층액만 취하였다. 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 (standard 희석배수 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5 mg/ml). 단백질 표준품과 준비한 시료를 각각 10 μl 씩 96well microplate 에 넣고 단백질 정량을 위하여 Bio-rad protein dye reagent를 200 μl 씩 혼합하여 5분 동안 반응시킨 후 ELISA plate

reader에서 595nm로 흡광도를 측정하여 표준품에 대한 정량곡선에 대입하여 시료의 단백질 정량 값을 산출하였다.

(2) Electrophoresis 및 transfer

정량이 된 단백질에 Lysis Buffer와 60mM Tris pH 6.8, 25% Glycerol, 2% SDS, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue로 조성된 5× sample buffer를 섞어 protein 양을 같게 한 후 100°C heat block에서 5분 동안 boiling 한 후, 잠깐 동안 원심분리 하여 시료를 모았다. Separating gel(12%)은 4ml의 polyacrylamide:bis (30%:0.8% w/v)와 6.9ml의 증류수 그리고 3.8ml의 1.5M Tris, pH 8.8과 10% SDS 150 μ l을 혼합한 용액에 시험당일 제조된 10%(w/v) ammonium persulfate 150 μ l와 TEMED 10 μ l를 부가 혼합하여 만든 다음, 깨끗이 세척하여 조립된 전기영동 유리판에 용액을 부어 gel를 형성하였다. Stacking gel(5%)은 670 μ l의 polyacrylamide:bis (30%:0.8% w/v)와 2.2ml의 증류수 그리고 1.0ml의 1.5 M Tris, pH 6.8과 10% SDS 40 μ l을 혼합한 용액에 시험당일 제조된 10% (w/v) ammonium persulfate 65 μ l와 TEMED 6.5 μ l를 부가 혼합하여 separating gel 위에 부어 완전한 gel을 형성하였다. 전기영동 Running buffer는 Tris base 30.3g, Glycine 144g, SDS 10g을 1ℓ에 녹여 10×stock을 만들었다. 정량한 단백질을 10-20 μ l를 loading하고 50~80volt로 약 20분간 running하고 stacking gel의 전계가 끝나면 100~120volt로 separating gel을 약 2시간 정도 전개시킨 후 transfer하였다. Transfer buffer의 조성은 1ℓ에 Tris base 3.03g, Glycine 14.63g, Methanol 200ml로 만들어서 Nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell, 0.45 μ m)로 실온에서 80volt로 1시간 10분간 transfer 하였다. Transfer가 끝난 gel은 staining solution(Coomassie Blue staining slon) 용액에 2시간 담가둔 후 destaining 용액으로 넘겨 남은 protein을 확인하였고, transfer된 membrane은 0.05% Tween-20, 150mM NaCl, 10mM Tris, pH 8.0으로 조성된 TBS-T 용액으로 washing한 후 약간 물기를 제거하고 TBS-T 용액으로 희석한 약 5% skim milk로 약 2시간

정도 blocking한 후 TBS-T 용액으로 여러 번 세척하였다.

(3) Western Blotting 및 ECL Detection

TBS-T 용액으로 희석한 3% skim milk에 1차 항체를 권장농도로 약 200~1,000배 희석하여 만든 용액에 blocking된 membrane을 담가두어 실온에서 2시간 정도 반응시킨 후, TBS-T 용액으로 10분마다 새로운 TBS-T 용액으로 갈아주면서 1시간 동안 세척하였다. Peroxydase가 부착되어 있으며 1차 항체와 반응하기에 적합한 2차 항체를 권장농도로 약 1,000~2,000배 희석하여 1차 항체와 결합한 membrane을 반응시킨 후 실온에서 1시간 정도 반응시키고 TBS-T 용액으로 10분간 3~5번 세척하였다. 편평한 판에 미리 wrap을 씌워 놓고, membrane의 물기를 제거한 후 판 위에 올렸다. ECL 용액 1(black), 2(white)를 1:1로 잘 섞어 membrane에 뿌려, 골고루 용액을 묻히고 1분 정도 반응시킨 후 ECL 용액을 충분히 제거하고 그 위에 wrap을 씌웠다. Film을 cassette에 올려놓고 membrane이 고정된 판을 일정 시간 film에 찍은 다음 developer에 담갔다. 어느 정도 film에 band가 나타나면 fixer로 옮겨 골고루 고정이 잘 되도록 흔들어서 고정시켰다. 고정이 끝나면 흐르는 물로 깨끗이 씻어 건조시키고 관찰하였다.

7) Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

직경이 100 mm의 petri dish에 1x10⁵/ml로 세포를 세어 10 ml씩 넣고 24시간 동안 배양한 후, 혈청이 없는 배지로 바꾸어 24시간을 배양하였다. serum starvation을 한 후, 혈청이 없는 배지에 cobrotoxin처리하여 24시간동안 반응시킨 후 scriper로 세포를 모아 PBS로 두 번 세척하고 1000 rpm 에서 원심 분리하여 침전물에 2 ml의 ice-cold 70% ethanol solution을 가하여 4°C에서 24시간 동안 고정하였다. 이때 Sample이 잘 풀어진 상태에 ethanol을 가해야 cell들이 monomer하게 잘 풀어진다. 원심 분리하여 ethanol solution을 제거한 후, 다시 PBS로 현탁하여 실온에서 5분간 방치 한 후 salt를 제거고 다시 원심 분리하여 1ml의 PBS로 현탁하여 10 μ g/ml RNase를 처리하고 37°C에서 20분간 반응

시킨다. 여기에 암실에서 PI (propidium iodide) 용액이 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 넣어 빛을 차단하고 37°C에서 3시간 정도 반응시켜 염색한 후 flow cytometer (Coulter사)를 이용하여 세포주기를 측정 분석하였다.

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 $P < 0.05$ 인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

III. 結 果

1. PC-3 cell line에서 cobrotoxin에 의한 세포 성장의 변화

1) 세포 형태적 분석

CT: 1nM

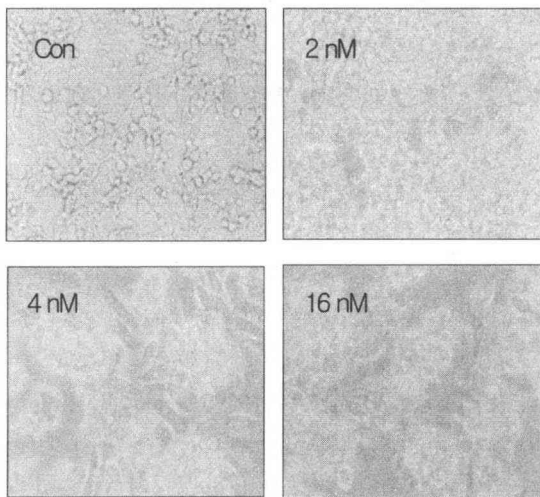


Fig. 1. Morphological Observation of PC-3 cells

Compared with Normal Cell, the Inhibition of Cell Growth reduced in Proportion with the Dose of Cobrotoxin in PC-3 cells

Representative Photography of Three separated Experiments with Duplicates

2) 세포 생존력 측정 (Cell viability assay)

(1) MTT assay

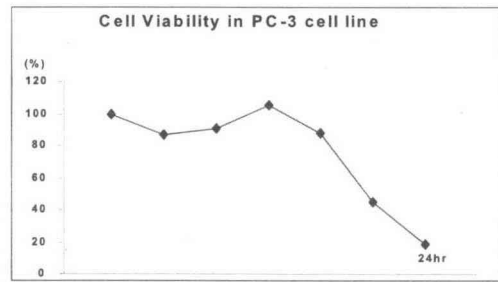


Fig. 2. Cell viability of prostate PC-3 cells after treatment with cobrotoxin.

Values are mean±SD of three experiment with triplicates.

*: significantly different from control.

2. PC 3-cell line에서 cobrotoxin에 의한 세포주기의 변화 및 apoptosis 관찰

1) Flow cytometry analysis

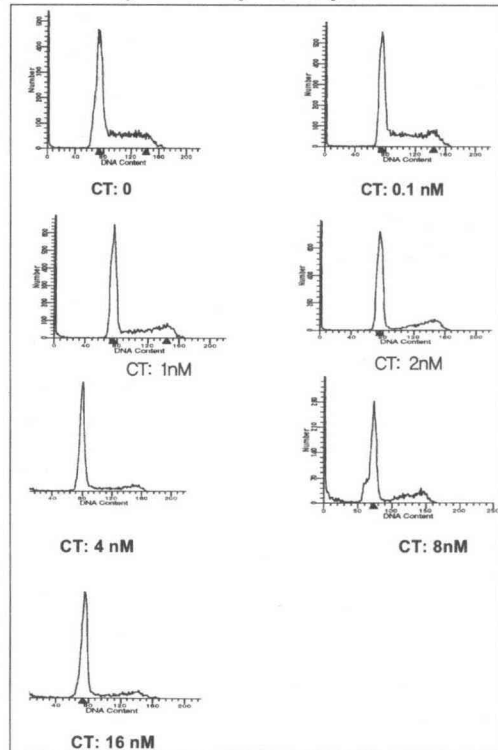


Fig. 3. Cell cycle alteration by cobrotoxin (0-16 nM) in the PC-3 cells after 24 hr culture.

CT 01, Ct 1, CT 2, CT 4, CT 8 and CT 16 showed 0.1, 1, 2, 4, 8 and 16nM of cobrotoxin

2) 세포주기 관련 분자들의 발현

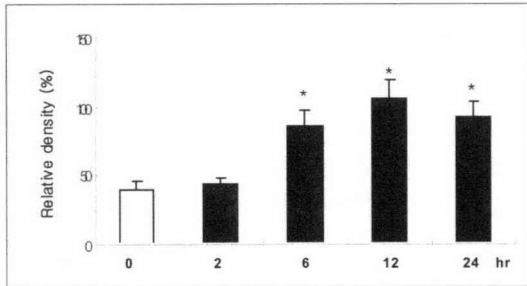


Fig. 4. Time course COX-2 expression in prostate cancer PC-3 cells

Values are mean±SD of three experiment with triplicates.

*: significantly different from control.

3) Cobrotoxin의 농도에 따른 세포조절 단백질에 미치는 영향

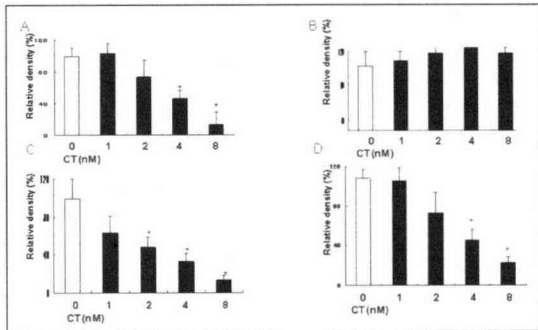


Fig.5. Effect of cobrotoxin on the expression of cell cycle regulated genes (A,Cdk4; B,cyclin E; C, Cyclin B1, D,Cyclin D1) in prostate PC-3 cells. Values are mean±SD of three experiment with triplicates.

*: P<0.05, significant different from control group

3. cobrotoxin의 농도에 따른 세포성장 단백질(Akt)에 미치는 영향

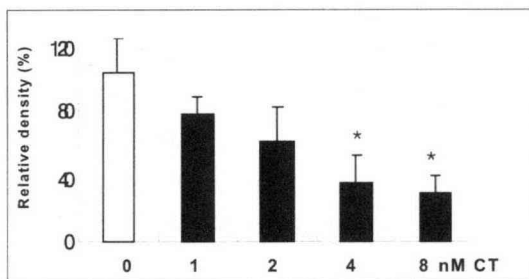


Fig. 6. Time course activation of NF-κB in prostate cancer PC-3 cells

after treatment of 1nM cobrotoxin. Values are mean±SD of three experiment with triplicates.

*: significantly different from control.

4. PC 3-cell line에서 cobrotoxin에 의한 세포주기 관련 MAP kinase의 발현

1) Cobrotoxin의 농도에 따른 세포주기 관련 MAP kinase의 발현에 미치는 영향

(1) ERK, JNK, p38에 미치는 영향

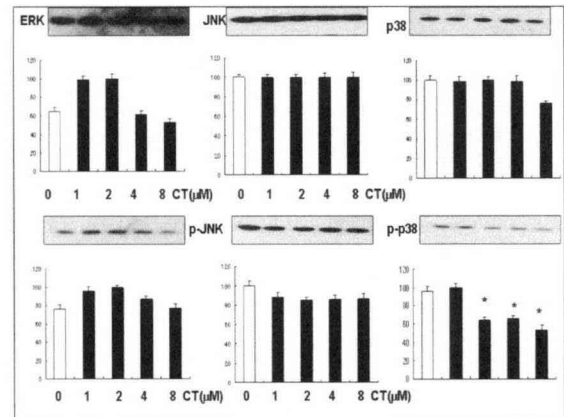


Fig. 7. Effect of cobrotoxin in the activation of MAP kinase family (ERK, JNK, p38)

Values are mean±SD of two experiments with duplicates

*:P<0.05, significant different from control group

5. PC-3 cell line에서 농도에 따른 cobrotoxin이 세포사멸에 미치는 영향

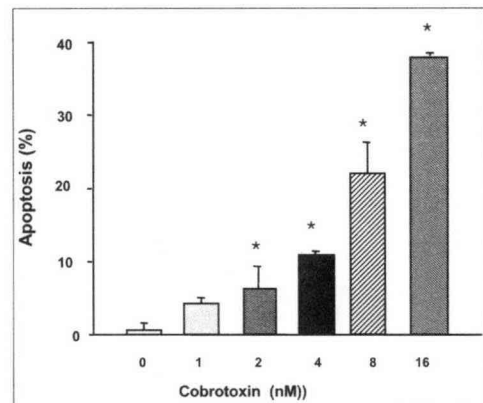


Fig. 8. PC-3 cell death after treatment of cobrotoxin (0-16nM) with DAPI staining. Values are mean±SD of three experiment with triplicates

*: significantly different from control.

6. 세포사멸 관련 유전자의 발현

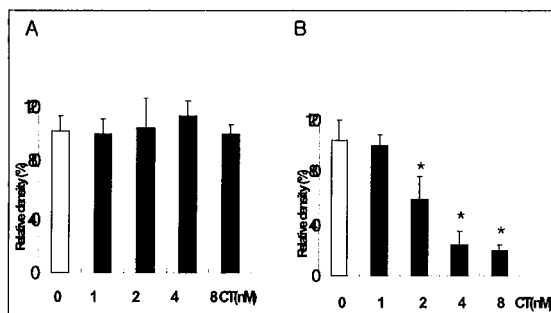


Fig. 9. Effect of cobrotoxin on the expression of apoptotic cell death related genes in prostate PC-3 cells (A, Bax B, Bcl-2)

Values are mean±SD of three experiment with duplicates

*: significantly different from control.

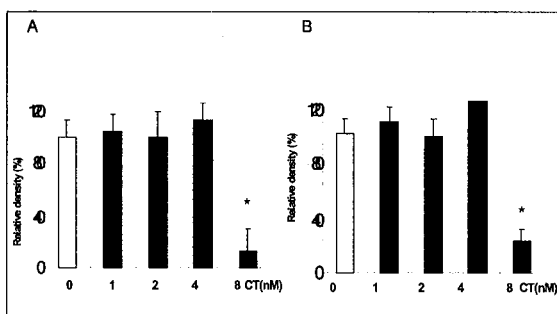


Fig. 10. Effect of cobrotoxin on the expression of apoptotic cell death related genes in prostate PC-3 cells (A, caspase-3; B, caspase-9). Values are mean±SD of three experiment with duplicates

*: significantly different from control.

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³⁻⁴⁾, 癰疽³⁻⁴⁾, 腫毒³⁻⁴⁾, 積聚³⁻⁴⁾, 癥瘕³⁻⁴⁾, 癩³⁻⁴⁾, 陰瘡³⁻⁴⁾, 癭瘤³⁻⁴⁾, 肺癰³⁻⁴⁾, 痰壅³⁻⁴⁾, 癰癧³⁻⁴⁾, 石癰³⁻⁴⁾, 石疽³⁻⁴⁾, 疔疽³⁻⁴⁾, 疔癰³⁻⁴⁾ 등의 調査에 良性과 惡性 腫瘍이 포

함된 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²⁾ 등의 원인에 의하여 介체의 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⁶⁾ 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한다²⁰⁾.

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 있다²⁷⁾. 서양의 학적 치료법으로는 外科적 수술, 방사선요법, 화학요법, 면역요법 등이 사용되고 있는데⁸⁾ 이러한 치료법은 암중에 따른 감수성 차이, 치료후 예후 불량, 재발 및 합병증 등의 부작용이 발생하는 것으로 보고되고 있으므로 이를 극복하기 위해 임상에서 한약과 항암제의 병용투여 및 한약을 이용한 체질개선이 시도되고 있고, 한약⁵⁾, 침⁹⁻¹⁰⁾, 봉약침을 포함한 다양한 약침¹¹⁻¹⁴⁾ 등을 이용한 抗腫瘍免疫學적¹¹⁻¹²⁾ 및 抗腫瘍遺傳子적 실험연구¹³⁻¹⁴⁾ 가 지속적으로 시행되어지고 있다¹⁵⁾.

또한, 최근에 독성이 있는 천연 peptide가 암세포의 세포사멸(apoptosis)과 분화에 미치는 영향에 대한 연구보고가 있는데¹⁶⁻¹⁹⁾, 그 중 특히, 蜂毒의 항암효과에 대한 연구에서 Allen DH 들²⁰⁾이 봉독의 성분 중 Apamin이 tumor를 억제하는데 상관이 있다고 보고하였으며, Wood MW 들²¹⁾은 봉독의 성분 중 Phospholipase A2가 tumor를 억제하는데 상관이 있다고 보고하였고, 박¹⁴⁾은 봉독성분 전체를 이용해 DNA합성에 관련된 세포분열억제 및 apoptosis유발과 각각에 관련된 유전자의 변화를 관찰해 항암효과가 있음을 발표하였으며, 권²²⁾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 있

다²³⁾.

factor V activator는 혈액응고에 중요한 역할을 하며, nicotinic acetylcholine receptor와의 결합력이 강하다²⁴⁻²⁵⁾고 하였는데 순환기계나 중추 신경계에 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 암세포인 PC-3 cell에 cobrotoxin을 처리한후, cell viability, cell death, apoptosis, cell cycle 및 관련단백질, Adk, 및 MAP kinase 관련 단백질의 변화를 관찰하였다.

본 연구 결과 cobrotoxin을 전립선 암세포에 용량 0-16 μ M까지 투여시 용량 의존적으로, 대조군에 비하여 모두 농도 의존적으로 세포들의 모양이 길쭉한 나선형 모양에서 둥글게 응축되는 모습으로 변화하였으며 고농도로 갈수록 세포들의 성장이 억제됨을 관찰 할 수 있었다. 이 세포의 성장억제는 세포주기 중 S phase에서 0.01nM cobrotoxin 처리군은 변함이 없지만, 1, 2, 4, 8 및 16 nM의 cobrotoxin 처리군에서는 정상군에 비해 감소를 나타내었다. G2-M phase에서 0.1, 1, 2, 4, 8 및 16nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 증가를 나타내었다. Cobrotoxin의 항암작용에 대한 구체적인 연구는 이루어지지 않았으나 본 연구에서 보듯이 세포주기를 파괴하는 작용이 세포성장의 억제와 관련이 있을 것으로 보여진다. 일반적으로 세포주기의 교란은 G0/G1²⁸⁻²⁹⁾에 세포가 과도하게 축적되어 S phase로 이행이 되지 않게 하거나 G2/M phase²⁹⁾에 과도하게 축적되어 분열이 이루어지지 않게 하는 특징이 일반적인 항암제의 한 phase에만 세포를 축적시키는 기전과 다르다고 할 수 있다.

세포주기에 관여하는 유전자들의 발현과 세포주기와의 관련성을 알아보기 위하여 cobrotoxin 처리후 Cox-2의 발현을 관찰하였다. Cox-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다²⁶⁾.

Cox-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 Cox-2 specific inhibitor에 의한 angiogenesis와 종양 형성의 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있다²⁷⁾.

본 실험에서 Cobrotoxin 처리후 Cox-2의 발현을 48시간 관찰한 결과 12시간에서 최대치를 이루었고, 6, 12 및 24시간후 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.

세포 분열은 세포주기 전환을 조절하는 요소(단백질 등)에 의해 조절되며(Nurse et al., 1994), DNA 복제를 위한 G1-S 시기와 세포 분열을 위한 G2-M 시기 등 세포분열 진행 여부를 결정하는 두 개의 checkpoint가 존재하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. Checkpoint에는 cyclin과 cyclin dependent kinase (cdk) 그리고 cdk inhibitor (CKI)가 관여하는데, cyclin D는 G1 시기 중간에 발현되어 오래 지속되며²⁹⁾, cyclin E는 G1 시기 말기에 발현되기 시작하여 G1-S에서 최대로 발현한다³⁰⁾. Cyclin D는 G1 시기 중간에 cdk4 또는 cdk6와 복합체를 형성하여 세포 주기에 관여하고 있으며, cyclin E는 G1-S 시기에서 cdk2와 복합체를 형성하여 G1 에서 S 시기로의 전환에 관여한다³¹⁾. Cyclin B는 S 시기에 발현되기 시작하여 G2/M로 세포가 이동하게 도와준다. 또한 cyclin B는 G2/M 시기에 cdc2와 복합체를 형성하여 작용한다³²⁻³⁶⁾. 이처럼 cyclin과 cdk는 여러 시기의 세포주기를 조절하는데 있어서 복합체를 형성한다³⁷⁾. 이렇게 세포들은 각각의 세포주기를 돌면서 분열을 하게 되는데 세포내외로부터 비정상적인 자극을 받게 되면 정상 세포주기를 이루지 못하고 세포주기의 어떤 한 부분에서 더 이상 진행을 하지 못하고 축적되는 현상을 나타내게 되는데 이런 상황이 회복이 되지 않는다면 세포는 죽게 되는 것이다.

본 실험에서 Cdk4는 cobrotoxin 1, 2, 4 및 8nM 처리군에서 정상군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였고, cobrotoxin 4, 8nM 처리군은 정상군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다. Cyclin D1은 cobrotoxin 1, 2, 4 및 8nM 처리군에서 정상군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였

다. Cyclin E는 cobrotoxin 1, 2, 4 및 8nM 처리군에서 정상군에 비해 큰 변화가 없었다. Cyclin B1은 cobrotoxin 1, 2, 4 및 8nM 처리군에서 정상군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였고, cobrotoxin 2, 4, 8nM 처리군은 정상군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.

세포가 세포주기별 분포의 변화를 초래한 현상과 각 주기별 관련 단백질의 변화와 연관성이 있으며, 이는 또한 Akt/p38 MAP kinase의 활성화 억제와 관련성이 있다고 판단된다. 세포성장의 억제가 세포사에 의한 것인지 또는 세포성장 억제제가 궁극적으로 세포사에 이르는지를 연구한 결과, cobrotoxin은 용량 의존적으로 세포사를 유도하였으며 이 세포사 유도는 세포사를 유도하는 유전자 (단백질) 발현과 연관성이 큰데 그 중에서 caspase3 및 9 과 p53의 발현과 밀접한 관계가 있어 보인다. 또한 이 세포사는 세포사를 억제하는 전사요소인 NF- κ B의 활성을 용량 의존적으로 억제하는데 기인한 것으로 보이며, 궁극적으로 NO나 calcium과 같은 세포내 신호달 물질의 과도한 유리가 주원인으로 판단된다.

세포사 조절 단백질의 발현 양상에서도 보듯이 cyclin E는 변화가 없지만 G2/M phase 축적과 관련한 B1 및 이를 조절하는 cdk4의 발현도 더불어 감소하였다. 따라서 G0/G1에 세포가 과도하게 축적되어 S phase로 이행이 되지 않게 하는 것보다는 G2/M phase에 축적되는 영향이 세포 성장억제에 더 큰 영향을 미친 것으로 판단된다. 세포의 성장억제는 또한 세포내 upstream의 신호전달에 의하여 영향을 받는데 이 신호전달은 cobrotoxin에 의한 전립선암세포의 성장억제는 Akt 및 MAP kinase family 중 p38 MAP kinase의 활성화억제에 의한 것으로 보여진다.

PC 3-cell에서 cobrotoxin의 농도에 비례해서 Akt는 감소했으며, 4 및 8 nM에서는 유의성이 있었다. 이는 cobrotoxin에 의하여 Akt가 감소함에 따라 세포의 성장을 조절하는 신호가 차단되고 Akt down stream 에 연결된 MAP kinase의 활성을 억제하는 경로를 통하여 세포의 성장을 억제하고 cell death가 증가함을 추론할 수 있다.

Mitogen-activated protein (MAP kinase) 신

호전달계는 세포가 외부의 환경변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보를 세포질 및 세포핵 내부로 전달하는 과정에 관여하는 대표적인 신호전달계이다. 특히 세포의 성장, 발생, 분화, 사멸 등의 조절기전에 관여한다³³⁾. 이 mammalian cell의 MAP kinase 신호전달계의 군에는 extracellular signal-regulated kinase인 ERK와 c-JUN amino-terminal kinase/stress-activated protein kinase인 JNKs/SAPK 그리고 p38/HOG가 이에 속한다³⁷⁾.

최근의 많은 연구들에서 MAP kinase의 세포 신호전달과 세포성장억제 또는 세포사와의 연관성을 주장하고 있으며 각기 다른 항암제들이 세포마다 다양하게 서로 다른 MAP family들이 활성화 되거나 억제됨을 보여주고 있다³⁸⁻³⁹⁾.

Cobrotoxin이 PC 3-cell line에서 MAP kinase 기전에 미치는 영향을 보기 위하여 ERK, JNK, p38 단백질의 발현과 이들의 인산화 (phosphorylated) 형태인 pERK, pJNK, p-p38들의 발현을 western blot 삭제됨 통하여 관찰하였다. 본 실험에서는 p-p38를 제외한 나머지 단백질에선 변화가 없었지만, p-p38에서는 2 μ M부터 유의성있게 감소하였다. 많은 연구결과들에 의하여 p-p38 MAP kinase의 활성화와 세포성장과는 유의성 있는 상관관계가 보고된 바 있는데 이를 고려해 볼 때 본 연구결과는 cobrotoxin이 p-p38을 감소시켜 MAP kinase를 inactivation시킴으로써 세포성장을 억제하는 것과 관련이 있을 것으로 판단된다.

PC 3-cells 성장의 억제 역시 세포사멸을 유도한 세포성장억제 인지를 알아보기 위해 DAPI staining을 통한 세포의 핵을 염색하여 그 모양을 관찰한 결과, 정상세포가 동글동글하고 균일한데 비하여 세포사멸이 일어난 세포는 핵이 응축되고, 여러 조각으로 나뉜 모습을 관찰할 수 있었다. 또한, 세포사멸을 살펴본 결과 1, 2, 4, 8 및 16 nM cobrotoxin 처리군에서 농도 의존적으로 세포사멸이 증가하였고, 2, 4, 8 및 16 nM의 cobrotoxin 처리군은 대조군에 비해 세포사멸이 유의한 증가를 나타내었다.

지금까지 알려지고 있는 세포사멸(apoptosis) 관련 유전자로 여러 가지가 있는데 그중 가장

먼저 알려진 유전자가 Bcl-2이다. Bcl-2는 사람의 림프종의 발생과 밀접하게 관련된 유전자로서 단백질의 분자량은 26 KDa이며 mitochondria의 외막, 소포체나 핵막에 위치하고 있으며 다른 암 유발 유전자와는 달리 세포 증식에는 관여하지 않고 세포의 생존을 조절하는 것으로 밝혀졌다⁴⁰. 이 외에 Bcl-2 family는 세포사멸 반응을 조절하는 주요한 규칙을 행하는 단백질로 여기에는 적어도 17가지 이상의 단백질이 속한다. 이들은 anti-apoptotic 단백질(Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Mcl-1)과 pro-apoptotic 단백질(Bax, Bak, Bok, bid, Hrk)로 나뉘며^{33,40} 이중 Bcl-2와 서로 반대작용을 하는 pro-apoptotic protein인 Bax는 Bcl-2와 복합체를 형성하여 서로를 조절하면서 세포내 반응을 전달하는 것으로 알려지고 있다³³. 또한 Bax는 세포내에서 세포사멸 관련 신호를 받게 되면 이 자극으로 인하여 mitochondria의 cytochrom C를 방출시켜 세포사멸 신호전달 단계 중 Bax 하위단계인 caspase family로 그 반응을 전달한다^{33,36-37,40}.

Caspase family는 다양한 자극에 의해 유도된 세포사멸에 필수적인 규칙을 행하는 유전자들로 이들은 크게 그 기능 면에 따라 두 군으로 나뉜다. 하나는 ICE group 인데 pro-inflammatory events에 관여하는 것으로 여기에는 caspase 1, 4, 5, 11, 그리고 13이 속한다. 또 다른 군으로는 CED-3관련 proteases로 이들은 세포사멸에 관여하며 caspase 2, 3, 6, 7, 8, 9, 그리고 10이 이에 속한다³⁵. Bax를 통하여 전달된 신호는 세포사멸에 관여하는 caspase 9 으로 전달되고 다시 이 신호는 세포사멸을 유도하는 마지막 단계인 caspase 3로 전달되어 세포사멸이 일어나게 된다. 특히 caspase 3는 세포의 회복에 필수적인 단백질로 이 회복시기에는 poly (ADP)-ribose polymerase와 DNA-dependant protein kinase 그리고 U-1 ribonucleoprotein들이 관여하게 된다. Caspase 3의 활성화는 이들 단백질들의 cleavage를 유도하며, 이들의 nuclear repair 기능을 수행하게 된다^{36,40}.

본 실험에서 Bax는 1, 2, 4 및 8nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 유의한 변동을 나타내지 않았다. Bcl-2는 1, 2, 4 및

8nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비해 농도 의존적으로 유의한 감소를 나타내었다.

Caspase 3과 9는 1, 2, 4nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 유의한 변동을 나타내지 않았으나, 8nM cobrotoxin 처리군에서는 유의한 감소를 나타내었다.

이는 pro-apoptotic gene인 Bax는 농도와 무관했지만, Bax의 하위단계인 caspase 3, 9는 cobrotoxin 4nM 까지 증가하였고 8nM에서는 유의하게 감소했고, anti-apoptotic gene 인 Bcl-2는 cobrotoxin 2nM부터 농도 의존적으로 그 발현이 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다.

세포사 관련 단백질 중에서 caspase의 활성화의 변화에서는 caspase 3 및 9이 4-8nM까지는 증가하다가 더 높은 농도에서는 감소하는 경향을 보여 세포사의 용량 의존력과는 고농도에서 관련성이 없어 보이나 이는 고농도에서 발현자체에 대한 억제에 의한 것으로 판단되며 caspase 3 및 9이 세포사와 직접 관련이 있다고 판단된다⁴¹. 즉 cobrotoxin 자체의 강한 세포사 유도 때문에 고농도에서는 caspase를 통한 세포사 유도보다는 다른 영향이 훨씬 크며, caspase 자체에도 cobrotoxin이 영향을 줄 수 있다. 다른 세포사 관련 단백질은 미토콘드리아나 (Bax, Bcl-2) 핵안 (p53)에 있어 cobrotoxin에 의하여 이차 신호전달과정에 의하여 활성화가 변화되지만, caspase는 cytosolso에 존재하기 때문에 cobrotoxin에 직접적으로 영향을 받을 수 있다고 본다. Bcl-2는 항세포사 단백질로 cobrotoxin에 의하여 용량 의존적으로 억제됨이 관찰되었는데 반하여 세포사에도 단백질인 Bax는 별 영향이 없음을 보여 주었다. 이는 cobrotoxin에 의하여 P53의 발현이 급격히 늘어나고 이것이 Bcl-2/Bax의 비례를⁴² 파괴하면서 caspase를 강하게 자극하기 때문에 너무 높은 농도에서는 caspase도 파괴되면서 세포사를 유도하는 것 같으며 낮은 농도의 cobrotoxin은 신호전달체계를 파괴시켜 연차적으로 caspase의 활성화에 의하여 세포구성물질을 파괴함으로써 세포사에 도달토록 하는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해보면, 일정수준 (pico 또는 nano molar 수준)의 cobrotoxin이 prostate

cancer cell의 성장을 억제하고, 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 처리한후

cell viability, cell death, apoptosis, cell cycle 및 관련단백질, Adk, 및 MAP kinase 관련 단백질의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PC-3 세포에 각각 cobrotoxin을 각각 0-16 nM까지 투여시 대조군에 비하여 모두 농도 의존적으로 세포들의 모양이 길쭉한 나선형 모양에서 둥글게 응축되는 모습으로 변화하였으며 고농도로 갈수록 세포들의 성장이 억제를 보였다.
2. MTT assay를 이용하여 세포 생존력을 측정 한 결과, 0.1, 1 및 4nM의 cobrotoxin 처리군은 정상군에 비하여 세포활성의 감소를 나타내었고, 8, 16nM의 cobrotoxin 처리군은 정상군에 비하여 세포활성의 유의한 감소를 보였다.
3. PC 3-cell에 cobrotoxin을 처리한후 FACS analysis를 통하여 세포주기를 측정 한 결과 세포주기 중 S phase에서 0.01nM cobrotoxin 처리군은 변함이 없지만, 1, 2, 4, 8 및 16 nM의 cobrotoxin 처리군에서는 정상군에 비해 감소를 보였다. G2-M phase에서 0.1, 1, 2, 4, 8 및 16nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 증가를 보였다.
4. Cobrotoxin 처리후 Cox-2의 발현을 48시간

관찰한 결과 12시간에서 최대치를 이루었고, 6, 12 및 24시간후에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.

5. G1 phase에서 활성을 이루는 Cdk4, cyclin D1의 발현을 살펴본 결과 Cdk4는 cobrotoxin 1, 2, 4 및 8nM 처리군에서 정상군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였고, cobrotoxin 4, 8nM 처리군은 정상군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.

Cyclin D1은 cobrotoxin 1, 2, 4 및 8nM 처리군에서 정상군에 비하여 농도의존적으로 감소하였다.

Cyclin E는 cobrotoxin 1, 2, 4 및 8nM 처리군에서 정상군에 비해 큰 변화가 없었다.

G2/M phase에 관여하는 단백질인 Cyclin B1은 cobrotoxin 1, 2, 4 및 8nM 처리군에서 정상군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였고, cobrotoxin 2, 4, 8nM 처리군은 정상군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.

6. 세포성장 단백질인 Akt의 발현을 살펴본 결과 1, 2, 4 및 8nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였고, 4, 8nM의 cobrotoxin 처리군은 정상군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.
7. MAP kinase에 관여하는 단백질인 ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p38, p-p38에 미치는 영향을 살펴본 결과, ERK은 1, 2nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 증가를, 4, 8nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 감소를 나타내었다. p-ERK은 1, 2, 4nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 증가를, 8nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 감소를 나타내었다. JNK와 p-JNK는 1, 2, 4 및 8nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 증가를 나타내었다. p38는 1, 4, 8nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 감소를, 2nM의 cobrotoxin 처리군에서는 정상군에 비하여 감소를 나타내었다. p-p38는 1nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 증가를, 2, 4, 8nM의 cobrotoxin 처리군에서는 정상군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.

8. PC 3-cells 성장의 억제 역시 세포사멸을 유도한 세포성장억제 인지를 알아보기 위해 DAPI staining을 통한 세포의 핵을 염색하여 그 모양을 관찰한 결과, 정상세포가 동글동글하고 균일한데 비하여 세포사멸이 일어난 세포는 핵이 응축되고, 여러 조각으로 나뉜 모습을 관찰할 수 있었다. 또한, 세포사멸을 살펴본 결과 1, 2, 4, 8 및 16 nM cobrotoxin 처 8nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 유의한 변동을 나타내지 않았다. Bcl-2는 1, 2, 4 및 8nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비해 농도 의존적으로 유의한 감소를 나타내었다.
9. 세포사멸 관련 유전자인 caspase family (caspase 3, 9)와 Bcl-2 family (Bcl-2, Bax), p53의 발현을 살펴본 결과, Bax는 1, 2, 4 및 Caspase 3과 9는 1, 2, 4nM의 cobrotoxin 처리군에서 정상군에 비하여 유의한 변동을 나타내지 않았으나, 8nM cobrotoxin 처리군에서는 유의한 감소를 나타내었다.

이상의 결과를 종합해보면, 일정수준(pico 또는 nano molar 수준)의 cobrotoxin이 prostate cancer cell의 성장을 억제하고, 세포사멸을 유도하여 항암 효과가 있음을 확인할 수 있었으며 향후 cobrotoxin의 항암 효과를 실제 임상에 활용할 수 있게 되기를 기대한다.

VI. 參考文獻

1. 권영현. 국내에서 자생하는 항암효과가 있는 식물에 대한 고찰. 대전대학교한의학연구소 논문집. 1998;6(2):447.
2. 孟琳升. 中國治癆大成. 북경:북경과학기술출판사. 1995:18-19.
3. 申天浩. 癆瘵治研究. 서울:성보사. 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. 동의중양학. 서울:행림서원. 1995: 19-24.
7. 錢伯文. 腫瘤的辨證施治. 중국:상해과학기술출판사. 1980:1-10.
8. 白泰鉉. 반하백출천마탕과 반하백출천마탕가 감방의 항암효과와 면역반응에 대한 실험적 연구. 대한한방중양학회지. 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. 경희대한의학 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 γ and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells. Cancer Res. 2001;61:497-503.
17. Gregory, J. M., and Julie, C. H. PPAR- γ agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. TIPS

- 2000;21:469-474.
18. Evan, D. R., and Bruce, M. S. PPAR- γ : 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 Proliferator-Activated Receptor- γ 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. Membr. 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 병인 병리에 대한 문헌적 고찰. *대한합방중약학회지.* 1995;1(1):29-54.
 27. 鬱仁在. *중국중양학(上冊).* 북경:북경과학출판사. 1984:11-19.
 28. Hsieh, T. C., and Wu, J. M. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp. Cell Res.* 1999;249:109-115.
 29. Herr, I., and Debatin, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001;98(9):2603-2614.
 30. Kim, T. I., Jin, S. H., Kim, W. H., Kang, E. H., Kim, K. J., Shin, Sung, K. J., and Kang, K. Prolonged activation of mitogen-activated protein kinase during NSAID-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Int. J. Colorectal Dis.* 2001;16:167-173.
 31. Zhang, Z., Huang, C., Li, J., Leonard, S. S., Lanciotti, R., Butterworth, L., and Shi, X. Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001;392:311-320.
 32. Wolter, F., Akoglu, B., Clausnitzer, A., and Stein, J. Downregulation of the cyclin D1/cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *Amer. Soci. Nutl. Sci.* 2001.
 33. Jiang, H., Chou, H. S., and Zhu, L. Requirement of cyclin E-cdk2 inhibition in p16INK4a-mediated growth suppression. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18(9):5284-5290.
 34. Taylor, W. R., DePrimo, S. E., Agarwal, A., Agarwal, M. L., Schönthal, A. H., Katula, K. S., and Stark, G. R. Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol. Biol. Cell.* 1999;10:3607-3622.
 35. Doostzadeh-Cizeron, J., Terry, N. H. A., and Goodrich, D. W. The nuclear death domain protein p84N5 activates a G2/M cell cycle checkpoint prior to the onset of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2001;276:1127-1132.
 36. Minemoto, Y., Gannon, J., Masutani, M., Nakagama, H., Sasagawa, T., Inoue, M., Masamune, Y., and Yamashita, K. Characterization of adriamycin-induced G2 arrest and its abrogation by caffeine in FL-arnion cells with or without p53. *Exp.*

- Cell. Res. 2001;262:37-48.
37. Morita, E., Kotaro, T., Hiroshi C., Hironobu A., Sato, H., Yaegashi, N., and Sugamura, K. Human parvovirus B19 induces cell cycle arrest at G2 phase with accumulation of mitotic cyclins. *J. Virol.* 2001;75 (16):7555-7563.
 38. Keelan J A, Sato T A, Marvin K W, Lander J, Gilmour R S, and Mitchell M D 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2), a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, induces apoptosis in JEG3 choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;262:579-585.
 39. Dai Y, Yu C, Singh V, Tang L, Wang Z, McInistry R, Dent P, and Grant S Pharmacological inhibitors of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase/MAPK cascade interact synergistically with UCN-01 to induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Res* 2001;61: 5106-5115.
 40. Shankar S L, Mani S, O'Guin K N, Kandimalla E R, Agrawal S, and Shafit-Zagardo B Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways. *J Neurochem* 2001; 79:426-436.
 41. Racke M M, Mosior M, Kovacevic S, Chang CH, Glasebrook A L, Roehm N W, and Na S Activation of caspase-3 alone is insufficient for apoptotic morphological changes in human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2002;80:1039-1048.
 42. Schwartz P S, and Waxman D J Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. *Mol Pharmacol* 2001;60:1268-1279.