동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 19. No. 3, 2008

蜂毒이 Glioma Cell에 미치는 效果

이주연, 김인자, 최방섭, 김근우, 구병수
동국대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effects of Bee Venom on Glioma Cells

Joo-Yeon Lee, In-Ja Kim, Bang-Seob Choi, Geun-Woo Kim, Byung-Soo Koo
Dept. of Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Dongguk University

Objective : Bee venom (BV) has been used for the treatment of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and relief of pain in Oriental medicine. The two main components of BV are melittin and phospholipase A2 (PLA2). Of these, melittin, the major active ingredient of BV, has been reported to induce apoptosis and to possess anti tumor effects. Several studies have established that the agents inducing apoptosis in target organs suppress tumorigenesis. As the other component, PLA2 has been reported to induce neurite outgrowth in PC12 cells. However, there was no report about proliferative effect of BV in neuronal cells. In order to examine the effect of BV on glioma cell, human glioma cell line, U87 was used.

Methods : Analysis of proliferation was confirmed by MTT assay. BV increased cell number through dose and duration dependent manner and these effects are apparent at a concentration of 10 ug/ml. To observe which signaling molecules will be activated by BV, phosphorylation of Akt, MAPK, PYK2 or CREB were examined by Western blot analysis. To study the long term effect of BV in U87 cells, the image of cells treated with BV for 4 days were obtained.

Results : The phosphorylation levels of PYK2 and Akt were increased at 5 min after addition of 10 ug/ml of BV and sustained to 2 hours. On the other hand, phosphorylation of MAPK and CREB were increased at 5 min, maximum at 10 min, and returned to 30 min. These imply that BV may activate two different signaling pathways, PYK2/Akt and MAPK/CREB. BV treated cells showed increased neurite number and length.

Conclusion : These results propose that BV may induce differentiation as well as proliferation of U87 cells through the activation of PYK2/Akt and MAPK/CREB.

Key Words : Bee venom, Glioma cell, Western blot

투고일 : 10/7 수정일 : 11/5 채택일 : 11/10
* 교신저자 : 구병수 주소 : 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 동국대학교 일산한방병원 신경정신과
Tel : 031-961-9140 Fax : 031-961-9009 E-mail : koobs@dongguk.ac.kr

Ⅰ. 緖 論

여러 질환에 대한 한의학적 치료방법으로 蜂毒藥鍼이 많이 사용되고 있다[1]. 蜂毒藥鍼은 꿀벌의 毒囊에 들어 있는 蜂毒을 추출, 가공하여 질병과 유관한 부위 및 穴位에 주입함으로써 자극효과와 蜂毒의 생화학적 약리작용을 동시에 이용한 것이다[2].

여러 염증질환의 치료에 관한 실험[3,4] 및 봉독의 성분, 약리작용, 독성 등에 관한 연구가 현재 미국, 중국, 러시아, 북유럽 등과 국내에서 활발히 이루어지고 있다[5]. 봉독의 효능에 관한 기존연구에서는 주로 근육통, 근염, 섬유근염, 근막장애통증증후군, 급성 및 만성 관절염, 통풍, 신경통, 편두통, 류마티즘, 관절염, 연조직과 골조직의 만성 외과적 염증, 홍채염, 피부염에 대하여 우수한 효과가 있다고 보고되어 있다[3].

한편, 신경교종 세포는 뇌에 발생하는 악성종양으로서 원발성뇌종양의 약 50%를 차지한다. 일반적으로 이 종양은 주변의 뇌로 퍼져가며, 정상적인 뇌와의 경계가 명확하지 않아 수술로 전부 적출하는 것은 어려우므로, 보통 재발을 예방하기 위해서 수술 후에 방사선요법이나 화학요법 등이 필요하다[6,7].

현재까지 신경교종 세포에 관하여 한의학적으로 이루어진 연구는 胡桃 약침의 신경교종 세포 유발 저산소증 방어효과에 대한 보고[8] 및 鬱金을 이용한 신경교종 등의 항암효과에 대한 동물실험 연구 보고[9] 등이 있었으나, 蜂毒을 이용한 신경교종 세포의 반응연구는 없었다.

이에 蜂毒이 신경교종 세포에 미치는 효과를 알아보기 위해, 蜂毒 원분말 희석액을 배양 신경교종 세포에 투여한 뒤 MTT assay 및 Western blot의 방법을 사용한 결과 유효한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實驗材料 및 方法

1. 재료

1) 봉독(Bee Venom : 이하 BV)

봉독은 미국산 이탈리아 꿀벌 마른봉독 1g을 200ml의 식염수에 녹여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 사람의 glioma 세포주 (U87)로 ATCC 에서 구입을 하였다. 세포는 37℃, 5% CO2 incubator에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, USA) 을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100unit/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. Trypsin-EDTA(Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2-3일 마다 교환하여 주었다.

2) 세포의 배양

Human glioma cells, U87 세포의 배양액은 DMEM + FBS 10%의(v/v) + PS 1%(v/v)을 사용하였으며 직경 100nm 둥근 플레이트를 사용하여 세포를 증식을 하였다. Conflunence가 80%가 되었을때 trypsin (0.5/100ml, 최종농도)으로 세포를 회수한 후에 플레이트 당 1 x 10^6개씩 배양하였다. 세포배양조건이 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 대개 2-3일 정도씩 소요되었다.

3) 세포생존율도 측정

MTT (tetrazolium3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) assay는 Sladowski의 방법을 따라 행 하였다 [10]. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolum을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 세포의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT formazan의 흡광도는 580nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 산화환원력을 반영한다 [11].

MTT assay는 우선 24 well plate에 glioma U87 세포($5x10^3$cells/well)를 12시간 배양한 후 FBS를 첨가하지 않은 serum free medium (Invitrogen)으로 교환하여 4시간동안 안정화시키고, 1, 2, 5 및 10 ug/ml 농도로 봉독을 첨가하여 24시간 배양을 하였다. 그리고 MTT 2mg/ml를 넣고, incubator에서 4시간 배양한 후 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma)로 용해시켜 580nm의 파장에서 microplate reader (Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.

세포생존율(Cell Viability, %)은 다음과 같이 정의를 하였다. 정산군의 값을 control로 하고 이때의 O.D. 값을 세포의 생존도가 100% 라고 정의하고, 나머지 군을 측정한 O.D. 값을 상대치로 환산을 하였다.

Cell Viability = (측정치 / control 군)

4) Western blot

Western blot 분석법은 앞서 언급된 이론과 관련하여 시행되었다[7]. 모든 세포 용해질들은 표본 완충제(62.5 mmol/1 Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol) 내에 boiling cell에 의해 만들어졌다. 단백질 정량은 bicinchoninic acid (BCA, Pierce)법을 사용하였다. 정량된 단백질 시료 50 ug을 4-12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gradient gel (Invitrogen) 전기 영동법 (SDS-PAGE)으로 분리되었고, nitrocellulose paper (Amersham) 로 옮졌다. 단백질이 옮겨진 막을 Ponceau-S로 염색하여 단백질이 완전하게 옮겨졌음을 확인하고 0.1 % Tween 20을 포함하는 Tris-buffered saline (TBS-T) 로 씻은 후 5% 탈지분유 액으로 30분 이상 blocking 하였다. 항 인산화 Akt (anti phospho-Akt, Ser473) 및 anti-Akt 항체 (Cell signaling tech.) 와 함께 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후 막을 TBS-T에서 10분씩 3회 세척한 후 blot을 2차 항체와 함께 1시간 반응시켰다.

2차 항체 반응 뒤 막을 씻고 enhanced chemiluminiscence system (ECL, Pierce)으로 원하는 단백질을 가시화 하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 image 장비 (LAS-3000, Fuji)을 이용하였다.

5) 영상분석

봉독을 처리한 세포를 광학 현미경 (Leica DMI 6000B)과 카메라(Leica DFC 480) 및 image analysis program (Leica Q Win V3)을 이용하였으며 배율은 100배로 관찰하였다.

Ⅲ. 成　績

1. 봉독이 신경교종 세포의 생존에 미치는 영향

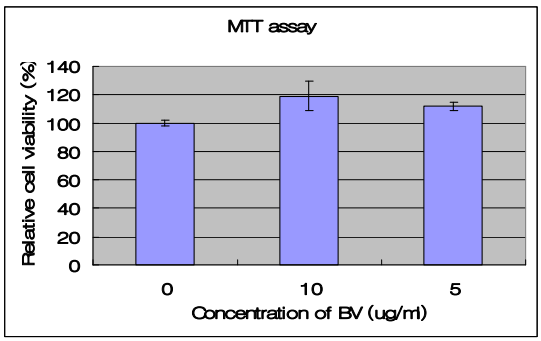
봉독을 Table 1에서와 같이 희석한 후 신경교종 세포에 처리 후 24시간이 지난 뒤에 세포 생존율을 관찰하기 위해 MTT assay법을 시행하였다. Table 1 및 Figure 1에서 보는바와 같이 10 ug/ml과 5ug/ml 의 봉독이 농도

의존적으로 세포 생존율을 증가시켰다.

Table1. The Effects of Bee Venom on Glioma Cell Viability.

Concentration of BV	cell viability (%)
0 ug/ml	100
10 ug/ml	119
5 ug/ml	112

Fig. 1. Dose dependent cytotoxicity effect of BV essential oil in U87 cells.



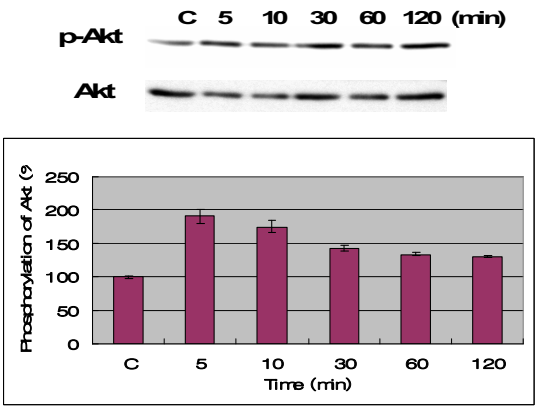
2. Western blot

봉독에 의한 세포 증식의 기전을 알아보기 위해 세포내 신호단백질 중 세포 증식 및 생존에 중요한 역할을 하는 MAPK와 Akt의 활성정도를 항 인산화 특이항체를 이용하여 면역불롯을 시행하였다. 봉독의 농도는 10 ug/ml로 처리하였고 시간별로 5, 10, 30, 60, 120분 후에 세포를 용해시켰다. 봉독에 의한 MAPK의 활성화는 봉독 처리 후 빠른 시간인 5분부터 증가하기 시작하여 10분까지 지속되다가 30분에는 기저치로 되돌아 왔다 (Fig. 3). 이에 반해 Akt의 활성화는 5분에 최고치에 이르렀다가 점차 감소하기 시작하여 120분까지는 지속되었다 (Fig. 2).

그 다음으로 MAPK와 Akt의 상위 조절인자를 찾기 위해 세포내 칼슘 유입에 의해 활성이 조절된다는 PYK2의 활성화 정도를 인산화 특이 항체를 이용하여 관찰하였다. 봉독을 처리한 후 5분부터 증가하기 시작하여 시간이 지나면 점차 감소하지만 2시간까지 인산화가 지속되었다 (Fig. 4). 이러한 활성화 패턴 결과는 위의 Akt의 활성화 패턴과 일치한다. 따라서 Akt의 상위 조절인자로 PYK2일 가능성이 높음을 제시한다.

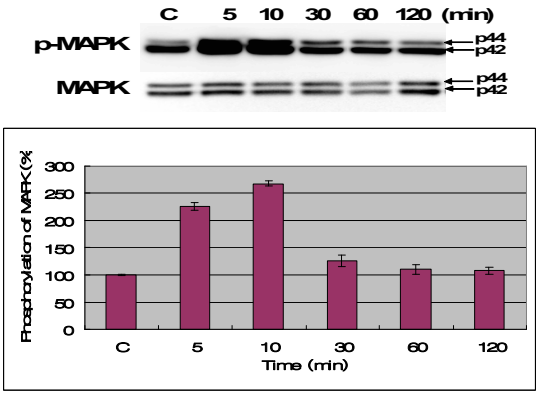
이상의 결과는 봉독이 세포내 칼슘 유입을 증가시켜 일련의 신호전달 단백질을 활성화 시켰음을 제시한다. 따라서 MAPK의 down stream 신호전달 단백질로 전사인자 CREB의 활성화를 관찰하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 봉독에 의한 CREB의 인산화도 5분에 최고치에 이르렀으며 10분까지는 지속되다가 30분에는 기저치로 되돌아왔다. 이러한 결과는 앞의 봉독에 의한 MAPK의 활성 패턴과 유사하며 봉독에 의해 활성화된 MAPK가 CREB의 인산화를 유도하였음을 시사한다.

Fig. 2. Bee venom induces Akt phosphorylation in U87 cells.



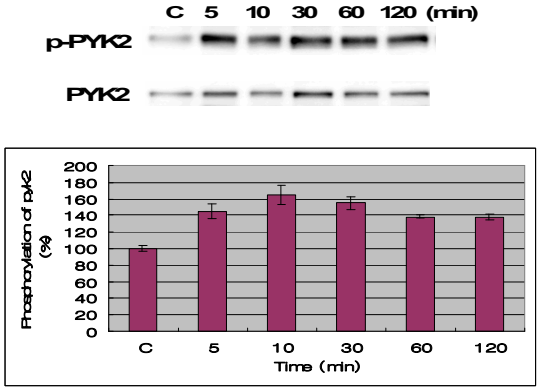
Glioma cells were seeded in 6 well plates and were stimulated with 10 ug/ml of bee venom for 5, 10, 30, 60 or 120 min in DMEM. After that, whole cell lysates were electrophoresed in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-Akt or Akt antibody. The intensity of phosphorylation and total Akt bands were quantitated by densitometric analysis, and the amounts of phosphorylated Akt were normalized versus total Akt. The data represent the means ± S.E. of three independent experiments. C: Unstimulated U-87 cells.

Fig. 3. Bee venom induces MAPKs phosphorylation in U87 cells.



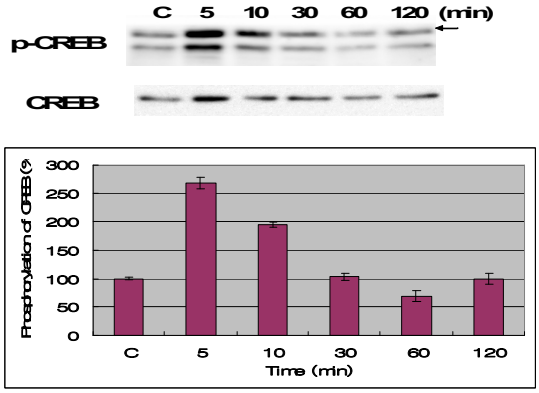
Glioma cells were seeded in 6 well plates and were stimulated with 10 ug/ml of bee venom for 5, 10, 30, 60 or 120 min in DMEM. After that, whole cell lysates were electrophoresed in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-MAPK or MAPK antibody. The intensity of phosphorylation and total MAPK bands were quantitated by densitometric analysis, and the amounts of phosphorylated MAPK were normalized versus total MAPK. The data represent the means ± S.E. of three independent experiments. C: Unstimulated U-87 cells.

Fig. 4. Bee venom induces PYK2 phosphorylation in U87 cells.



Glioma cells were seeded in 6 well plates and were stimulated with 10 ug/ml of bee venom for 5, 10, 30, 60 or 120 min in DMEM. After that, whole cell lysates were electrophoresed in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-PYK2 or PYK2 antibody. The intensity of phosphorylation and total PYK2 bands were quantitated by densitometric analysis, and the amounts of phosphorylated PYK2 were normalized versus total PYK2. The data represent the means ± S.E. of three independent experiments. C: Unstimulated U-87 cells.

Fig. 5. Bee venom induces CREB phosphorylation in U87 cells.



Glioma cells were seeded in 6 well plates and were stimulated with 10 ug/ml of bee venom for 5, 10, 30, 60 or 120 min in DMEM. After that, whole cell lysates were electrophoresed in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-CREB or CREB antibody. The intensity of phosphorylation and total CREB bands were quantitated by densitometric analysis, and the amounts of phosphorylated CREB were normalized versus total CREB. The data represent the means ± S.E. of three independent experiments. C: Unstimulated U-87 cells.

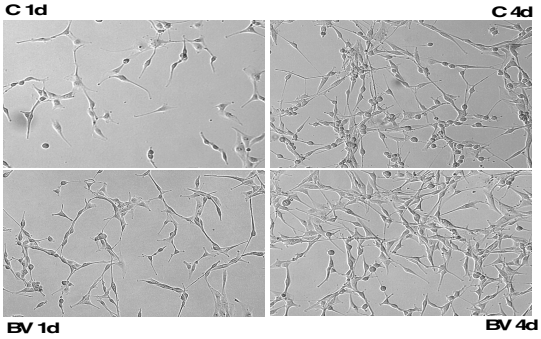
3. 세포사진

봉독에 의한 glioma 세포의 증식을 관찰하기 위해 10 ug/ml의 농도로 처리한 후 1일과 4일에 세포 사진을 찍어 관찰하였다.

Fig. 6에서 보는 바와 같이 봉독을 처리한 세포는 아무 처리도 하지 않은 세포에 비해 1일과 4일 모두에서 세포수가 증가됨을 관찰할 수 있었으며 특이한 점은 4일째 처리한 세포에서 대조군에 비해 모양이 길쭉한 세포의 수도 같이 증가하였을 관찰하였다.

이는 세포가 증식뿐만 아니라 분화에도 봉독이 관여한다는 단서를 제공한다.

Fig. 6. Cell images of bee venom-treated U87 cells.



The live cell image were obtained at 1 day or 4 days after no treatment (upper panel : C1d, C4d), 10 ug/ml of bee venom treatment (lower panel : BV1d, BV4d)
C:control, d:day

Ⅳ. 考　察

蜂毒은 꿀벌의 毒囊에 들어 있는 약 40여가지의 유효성분으로 구성된 물질로, 염증, 알러지 등을 유발하는 작용이 있으나, 진통과 소염의 효능이 있는 것으로 알려져 있고[3], 한국을 비롯한 중국, 루마니아, 불가리아, 러시아 및 미국 등에서 임상에 사용하고 있다[1].

봉독의 성분은 크게 peptide components, non peptide components, enzymes로 구성되어 있다[12]. Peptide components는 freeze-dried venom의 약 50%를 구성하고 있으며, 주요 성분으로는 apamine, MCD peptide, melittin 등이 있다[13].

봉독의 性味는 大熱有毒 辛甘鹹하며[14], 補益精氣 除中益氣 通經活絡 消腫排膿 淸熱凉血의 效能[15]과 祛風除濕 止疼痛 解痙平喘 消腫降壓의 效能[16,17]이 있다.

봉독은 약 2000년 전부터 민간요법의 하나로 관절염, 통풍 등의 제질환에 응용되었고[5], 봉독을 질병치료에 사용한 기원은 기원전 168년 매장된 馬王堆醫書의 <養生方>과 <雜療方>에서 각1례씩 치료에 응용한 기록이 있다[15].

근대에 들어서는 1870년대 영국의 Dr. Rucumkis의 "봉독의 RA 및 Gout에 대한 효과" 및 1988년 Dr. Philp의 "봉침과 RA의 특이적 관계에 대한 보고"에서 시작되었다고 할 수 있다[18].

2000년부터 현재까지의 봉독 관련 학위논문 중 효능 실험에 관련된 33편의 논문 중에서 소염 · 진통작용에 관련된 논문이 15편, 면역작용에 관련된 논문이 5편으로 대부분을 차지하였고, 이는 봉독 관련 연구의 경향을 보여준다.

이처럼 임상에서 봉독의 효과를 입증하는 논문뿐만 아니라 세포주에서 봉독에 관한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 봉독이 세포주에 미치는 연구에 관해 살펴보면 봉독과 봉독의 주 성분인 melittin이 Akt의 활성을 저해함으로 vascular smooth muscle cell 의 증식을 억제하는 효과가 알려져 있으며[19], 신장암 (renal cancer cell line), 폐암 (lung cancer) 및 간암세포 (hepatoma cell line)의 증식을 억제하고 세포사멸을 유도함으로 항암효과가 있는 것으로 보고되었다[20-22]. 또한 봉독의 성분이 항균작용을 한다는 보고도 있다[23]. 신경세포에서 봉독에 대한 연구를 보면 분화된 신경암세포 (neuroblastoma)에서 봉독의 성분인 apamin을 5 ug/ml의 농도로 처리했을 때 24시간 내에 세포가 죽는 것을 관찰하였다[24]. 이상의 연구는 대부분이 봉독이 암세포를 죽이는 효과를 나타내는 것으로 결론지어질 수 있다. 그러나 본 연구에서는 신경교종 세포를 사용하여 봉독의 효과를 연구하였다.

신경교종은 신경교세포의 발육분화의 모든 단계에 존재하는 세포로 이루어지는 종양으로[25],종양을 구성하는 세포의 형태에 따라 성상세포종 (가장 악성인 교모세포종을 포함하면

원발성뇌종양의 25%정도를 차지), 핍지교세포종(원발성뇌종양의 약2.5%), 상의종(약2.5%), 맥락총 유두종(약0.5%), 수모세포종(약2.8%) 등으로 분류된다[6,7]. 신경교는 1854년에 Virchow가 신경조직의 지지구조를 호칭한 술어로 , 변화한 외배엽성분으로 이루어지는 미세한 망상조직이며, 신경교세포는 대교세포(macroglia,astroglia), 핍돌기교세포(oligodendroglia) 및 소교세포(microglia)의 3종으로 구별된다[25].

신경교종 세포를 사용하여 봉독의 효과를 연구한 결과, 10 ug/ml와 5 ug/ml에서 세포사멸은 관찰되지 않았으며 세포의 증식과 분화가 같이 유도됨을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 rat Pheochromocytoma PC 12 세포에서 봉독의 성분중에 하나인 secretory phospholipase A2가 분화를 유도하였다는 보고가 일치한다[26]. 따라서 이상의 결과는 봉독의 효과가 세포마다 차이를 나타내거나 봉독의 성분에 따라 서로 다른 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다. 본 연구에서도 봉독을 장기간 처리 하였을 때 세포 모양이 변화함을 관찰할 수 있었는데 이는 봉독의 성분이 세포분화를 유도함였음을 시사한다.

CREB은 ATF-1, CREM, c-Jun을 포함하는 pZIP family에 속하며 이러한 전사인자는 그들의 leucine zipper domains을 통해 homo-나 heterodimers를 형성하고 palindromic response element인 CRE에 결합하여 여러 가지 세포내 반응을 매개한다[27]. 세포내 cyclic AMP (cAMP) 양의 증가에 의해 활성화 되는 PKA(protein kinase A)는 CREB의 133번 Ser을 인산화한다. 또한 Ser-133의 인산화는 TFIIB와 결합할 수 있는 CREB-binding 단백질(CBP)과의 결합을 증가시켜 전사 활성을 유도한다[28].

CREB의 인산화를 유발하는 인자로는 PKA 뿐만 아니라 Ca^{2+}의 세포내 유입으로 인해 활성화되는 CaM 카이네이스 II과 CaM 카이네이스 IV가 있다. 이러한 CaM 카이네이스 활성화에는 CaM이 결합해야 하는데, 세포내 calcium 유입시 CaM 이 핵내로 이동하여 CaM 카이네이스를 활성화시켜 CREB의 133번 Ser을 인산화할 수 있다고 입증되었다 [29]. 또한 90-kDa의 ribosomal S6 카이네이스도 CREB을 인산화시킨다고 보고되었다[30]. 본 연구에서는 봉독의 성분인 melittin이 세포내 칼슘 유입을 증가시키는 것으로 알려져 있으므로 봉독에 의한 전사인자 CREB 의 활성이 칼슘유입에 의해 이루어졌음을 시사한다.

PYK2는 focal adhesion kinase (FAK)와 유사한 단백질로 그 이름은 prolin-rich tyrosine kinase에서 기원하였으며 칼슘에 의해 활성이 조절되는 이온채널과 밀접한 관계가 있으며 down stream 신호전달 단백질로 MAPK가 가장 잘 알려져 있으나[31] 최근에는 PI3K를 통한 Akt의 활성경로도 보고되었다[32]. 본 연구에서도 봉독에 의한 PYK2의 활성화 패턴이 MAPK와는 일치하지 않았으며 오히려 Akt의 활성화 패턴과 일치하였다. 따라서 본 연구에서 봉독에 의한 Akt의 활성화는 PYK2의 활성화에 의해 유도되었음을 시사한다.

본 연구에서 봉독에 의한 신경교종 세포의 효과를 관찰하였을 때 세포 증식 뿐만 아니라 봉독을 처리한 후 4일까지 오래기간 배양 하였을 때 세포의 모양 또한 변한 것을 알 수 있었다 (Fig. 5). 또한 신경세포에서 분화와 밀접한 관련이 있는 단백질로 Akt의 활성도 증가하였다. 따라서 이러한 결과는 봉독이 신경세포의 증식뿐만 아니라 신경세포 분화에도 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

봉독이 신경교종 세포의 증식 및 분화를 유도할 때 어떤 신호전달 체계를 사용하는지를 관찰하기 위해 세포 증식에 가장 대표적인 단

백질인 mitogen activated protein kinase (MAPK)의 활성화정도를 인산화특이 항체를 사용하여 관찰한 결과 MAPK의 활성이 증가하였다. 또한 세포 생존 및 분화에 중요한 역할을 하는 단백질인 Akt의 활성도 증가를 보였다. 이는 봉독의 의한 세포 생존 및 증식을 뒷받침하는 결과이다. 또한 봉독의 성분인 melittin은 칼슘과 결합하는 calmodulin단백질의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다[33]. 본 연구에서도 봉독처리에 의해 칼슘의 유입과 관련된 단백질로 PYK2와 CREB의 활성화를 관찰하였다. 따라서 이 같은 결과는 봉독이 신경교종 세포의 칼슘 유입을 증가시켜 세포 증식을 유도했음을 시사한다.

봉독에 의한 전사인자 CREB의 활성화 패턴은 MAPK의 활성화 패턴과 일치하였는 데 이러한 결과는 봉독에 의해 활성화된 MAPK가 CREB의 활성을 유도했음을 시사한다. 또한 PYK2의 활성화 패턴과 MAPK의 활성화 패턴은 일치하지 않았으므로 봉독에 의한 MAPK의 활성화에 PYK2 이외에 또 다른 상위 조절인자가 관여할 수 있음을 시사한다.

이상의 결과를 종합하면 봉독에 의해 신경교종 세포의 증식 및 분화가 유도되었으며 그 신호전달 체계로는 PYK2를 통한 Akt의 활성화 pathway와 MAPK를 통한 CREB의 활성화 pathway로 나누어 볼 수 있다. 따라서 봉독에 의해 활성이 증가되는 두 가지 신호전달 체계 (PYK2/Akt, MAPK/CREB) 가 있음을 시사하며 이 두 가지 신호전달을 통한 세포의 효과가 무엇이며 각각 봉독의 어떤 성분에 의한 것인가에 관한 추후 연구가 필요하다. 또한 이러한 결과는 신경세포의 증식 및 분화유도에 봉독이 치료제로 쓰일 수 있는 가능성을 제시한다.

Ⅴ. 結　論

1. 봉독이 농도 의존적으로 신경교종세포의 세포생존율을 증가 시켰다.

2. Akt와 PYK2 의 활성화는 봉독 처리 후 5분에 최고치에 이르렀다가 점차 감소하기 시작하여 120분까지는 지속되었다 .

3. MAPK와 CREB의 활성화는 봉독 처리 후 빠른 시간인 5분부터 증가하기 시작하여 10분까지 지속되다가 30분에는 기저치로 되돌아 왔다.

4. 사진 관찰결과 세포수와 길쭉한 모양의 세포수가 증가하였으며, 이는 세포가 증식뿐만 아니라 분화에도 봉독이 관여한다는 단서를 제공한다.

5. 봉독에 의해 신경교종 세포의 증식 및 분화가 유도되었다.

6. 세포의 증식 및 분화의 신호전달 체계는 PYK2를 통한 Akt의 활성화 pathway와 MAPK를 통한 CREB의 활성화 pathway로 나누어 볼 수 있다. 따라서 봉독에 의해 활성이 증가되는 두 가지 신호전달 체계 (PYK2/Akt, MAPK/CREB) 가 있음을 시사한다.

7. 두 가지 신호전달을 통한 세포의 효과가 무엇이며 각각 봉독의 어떤 성분에 의한 것인가에 관한 추후 연구가 필요하다.

이러한 결과로 볼 때 신경세포의 증식 및 분화유도에 봉독이 치료제로 쓰일 수 있는 가능성을 제시한다.

참 고 문 헌

1. 정인태, 백용현, 박동석, 최도영. 봉독약침이 Collagen 유발 관절염에 미치는 진통효과 및 그 기전 연구. 대한침구학회지. 2005;22(1):99-108.
2. 김용석, 박영배, 김지영, 김창환, 강성길, 고형균. 봉독약침요법의 항염증 작용에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 1998;15(1):317-331.
3. 김문호. 봉독요법과 봉침요법. 서울:한국교육기획. 1992:20, 37, 110.
4. Kang SS., Pak SC., Choi SH. The effect of whole bee venom on arthritis. Am J Chin Med. 2002;30(1):73-80.
5. 이홍석, 이재동, 고형균. 최근 10년간 국내의 봉독 관련 연구에 대한 고찰. 대한침구학회지. 2003;20(3):154-165.
6. 이광우. 임상신경학 3판. 서울:고려의학. 2002:598-599.
7. 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울:대한신경외과학회. 2001:171-176.
8. Youn HM, Heo JY, Ahn CB. Effect of Juglans sinensis Dode extract on chemical hypoxia-induced cell injury in human glioma cells. 대한침구학회지. 2003;20(2):173-183.
9. 박상현. 울금의 폐암, 자궁암, 신경교종 및 전립선암에 대한 항암효과 연구. 경희대 대학원 박사학위논문. 2006.
10. Sladowski D, Steer SL, Clothier RH, Balls M. An improved MTT assay. J. Immunol. Methods. 1993;157:203-207.
11. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SL. A critical assessment of the use of microulture tetazolium assays to measure cell growth and function. Growth regul. 1995;5:69-84.
12. Habermann E. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In Venomous Animals and their Venoms. Academic Press. 1971: 3-61.
13. Assem ES, Atkinson G. Histamine release by MCDP(401), a peptide from the venom of the honey bee. Bri J Pharmacol. 1973;48(2):337-8.
14. 권기록. 봉침에 대한 고찰. 대한침구학회지. 1994;11(1):160.
15. 인창식, 고형균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌: 마왕퇴의서의 봉독요법 2례. 대한침구학회지. 1998;15(1):143-7.
16. 郭國華. 臨床中藥辭典. 長沙:湖南科學技術出版社. 1994:543-4.
17. 李文瑞. 中藥別名辭典. 北京:中國科學技術出版社. 1994:1079.
18. 성은찬. 난치병의 봉침요법. 서울:전국농업기술자협회 출판부. 1958:48, 59, 166, 228.
19. Son DJ, Ha SJ, Song HS, Lim Y, Yun YP, Lee JW, Moon DC, Park YH, Park BS, Song MJ, Hong JT. Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor-kappaB and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. J Pharmacol Exp Ther. 2006;317(2):627-634.
20. Hu H, Chen D, Li Y, Zhang X. Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/c nude mice in-vivo. J Pharm Pharmacol. 2006;58(1):83-9.
21. Putz T, Ramoner R, Gander H, Rahm A,

Bartsch G, Bernardo K, Ramsay S, Thurnher M. Bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol - homologues cooperatively disrupt membrane integrity, abrogate signal transduction and inhibit proliferation of renal cancer cells. Cancer Immunol Immunother. 2006.

22. Jang MH, Shin MC, Lim S, Han SM, Park HJ, Shin I, Lee JS, Kim KA, Kim EH, Kim CJ. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. J Pharmacol Sci. 2003;91(2):95-104.
23. Sato H, Feix JB. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. Biochim Biophys Acta. 2006;1758(9):1245-1256.
24. Nakashima S, Ikeno Y, Yokoyama T, Kuwana M, Bolchi A, Ottonello S, Kitamoto K, Arioka M. Secretory phospholipases A2 induce neurite outgrowth in PC12 cells. Biochem J. 2003;376(3):655-666.
25. 김기령 등. SOOMOONSA'S ENGLISH-KOREAN MEDICAL DICTIONARY. 서울:수문사. 1985: 862, 1376-13777.
26. Shaposhnikova VV, Egorova MV, Kudryavtsev AA, Levitman MKh, Korystov YuN. The effect of melittin on proliferation and death of thymocytes. FEBS Lett. 1997;410(2-3):285-288.
27. Ghosh A, Greenberg ME. Calcium signaling in neurons. molecular mechanisms and cellular consequences. Science. 1995;268:239-247.
28. Chrivia JC, Kwok RPS, Lamb N. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. Nature. 1993;365:855-859.
29. Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. Nature. 1998;392(6672):198-202.
30. Rivera VM, Miranti CK, Misra RP, Ginty DD, Chen RH, Blenis J, Greenberg ME. A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. Mol Cell Biol. 1993;13:6260-6273.
31. Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. Nature. 1995;376(6543):737-745.
32. Basile JR, Afkhami T, Gutkind JS. Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. Mol Cell Biol. 2005;25(16):6889-6898.
33. Gonzalez L, Nekrassov V, Castell A, Sitges M. Characterization of melittin effects in synaptosomes. Neurochem Res. 1997;22(2):189-199.
34. Lee SY, Park HS, Lee SJ, Choi MU Melittin exerts multiple effects on the release of free fatty acids from L1210 cells: lack of selective activation of phospholipase A2 by melittin. Arch

Biochem Biophys. 2001;389(1):56-57.
35. Burdick AD, Ivnitski-Steele ID, Lauer FT, Burchiel SW. Pyk2 mediates anti-apoptotic Akt signaling in response to benzo[a]pyrene diol epoxide (BPDE) in mammary epithelial cells. Carcinogenesis. 2006;27(11):2331-2340.
36. Spoerri PE. Changes induced by apamin from bee venom on differentiated mouse neuroblastomacells in culture Acta Anat (Basel). 1983;117(4):346-354.
37. Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bächinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. Nature. 1994;370:223-226.