

蜂藥鍼液이 PLA₂, COX-2, iNOS, AA 및 PG에 미치는 影響에 關한 研究

河聲鍾 · 李成魯 · 趙顯徹* · 金基鉉

경원대학교 한의과대학 침구학교실 *경원대학교 한의과 대학 한방재활의학과 교실

The Effects of Bee Venom on PLA₂, COX-2, iNOS, AA and PG in RAW 264.7 Cells

Seang-Jong Ha · Seong-No Lee · Hyun-chul Jo* · Kee-Hyun Kim

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Kyung-won University

*Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Won University

Objectives : The purpose of this study was to investigate the effect of Bee Venom on the lipopolysaccharide-induced expression phospholipase A₂, cyclooxygenase-2 and inducible nitrogen oxide synthase, and the generation of arachidonic acid, prostaglandin D₂ and E₂ in RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line.

Methods : The expression of phospholipase A₂, cyclooxygenase and inducible nitrogen oxide synthase was determined by western blotting with corresponding antibodies, and the generation of arachidonic acid, prostaglandin D₂ and E₂ was assayed by ELISA method in RAW 264.7 cells. The non-toxic concentrations (0.1 to 5 µg/ml) of bee venom determined by MTT assay, were used in this study.

Results :

1. Bee venom inhibited lipopolysaccharide-induced expression of phospholipase A₂ in a dose dependent manner after 48 hours treatment.
2. Bee venom inhibited lipopolysaccharide-induced expression of cyclooxygenase-2 in a dose dependent manner after 24 and 48 hours treatment.
3. Bee venom inhibited lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitrogen oxidesynthase in a dose dependent manner after 48 hours treatment.
4. The generation of arachidonic acid, prostaglandin D₂ and E₂ was not much affected by the treatment of bee venom on the lipopolysaccharide-induced generation of arachidonic acid, prostaglandin D₂ and E₂ in RAW 264.7 cells.

Key words : Bee Venom, Toxic, PLA₂, COX-2, iNOS, AA, PGD₂, PGE₂, RAW 264.7 Cell

* 교신저자 : 김기현, 서울시 송파구 송파동 20-8
경원대부속한방병원 침구과
(Tel. 02-425-3456, Email : keehyun1@hanafos.com)

1. 緒 論

蜂藥鍼療法은 꿀벌(*Apis mellifera ligustica*)의 毒囊에 있는 蜂毒을 추출 가공하여 질병과 유관한 部位나 穴位에 주입하는 鍼灸治療와 蜂毒의 生化學的 特異 物質이 인체에 미치는 藥理作用을 질병 치료에 이용하는 新鍼療法의 일종이다.¹²⁾

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고 祛風除濕, 止疼痛, 解癢平喘, 消腫降壓하는 효능이 있어¹⁾ 鎮痛, 消炎, 解熱,^{3,7)} 鎮痙,⁸⁾ 抗癌,⁹⁻¹³⁾ 免疫 增強¹⁴⁻¹⁷⁾ 作用을 나타내고 있다.

최근 蜂藥鍼을 이용한 임상적 연구로 膝關節炎^{18,19)}, 류마티드 關節炎²⁰⁾에 유효함이 보고되었다.

실험적 연구로서 콜라겐유도 關節炎²¹⁾, 實驗的 急慢性 關節炎²²⁾, 關節炎 滑液細胞²³⁾, 류머티스 關節炎 滑液細胞²⁴⁾ 등에 미치는 영향이 보고되었고, 蜂藥鍼液의 細胞 毒性²⁵⁻²⁷⁾에 관한 연구가 보고되었으나, 蜂藥鍼液의 安全性과 有效性의 機轉에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

이에 연구자는 蜂藥鍼液의 염증 및 독성에 대해 연구하기 위해 RAW 264.7 cell에 lipopolysaccharide (LPS)로 염증을 유도하고, 蜂藥鍼液을 처리하여 炎症指標인 phospholipase A2(PLA2), cyclooxygenase-2(COX-2), inducible nitrogen oxide synthase (iNOS) 발현과 arachidonic acid(AA), prostaglandin D2(PGD2), prostaglandin E2(PGE2) 생성에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 시약

MTT NO assay kit(Sigma-aldrich co., USA), COX-2, PLA2, iNOS anti-bodies (Santa Cruz Biotechnology, USA), PGE2, D2(Cayman Chemical社, USA), AA(Chrono-Log Co., USA), ³[H] AA(NEN Life Science Products, USA), WST-1 assay kit (Beringer, Germany), immobilon-P membrane (Amersham, USA) 등이다. 기타 細胞培養과 western blotting 試藥 등은

연구용에 적합한 것들을 사용하였다.

2) 시료

乾燥 粉末 蜂毒[乳蜜蜂毒(蜂), 韓國]을 蒸溜水에 희석하여 사용하였다.

3) 기기

Liquid scintillation counter(model LS 3801, USA), image analyser (Mitsubishi electric Cor., Japan), ELISA reader(Molecular Device, CA), FACS calibur flow cytometer(Becton Dickinson, NJ) 등이다.

2. 방법

1) 시료 조제

粉末 蜂毒을 3차 증류수로 희석하여 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 나누어 蜂藥鍼液으로 사용하였다.

2) 세포주 배양

Murine macrophage RAW 264.7 cell은 10% FBS(fetal bovine serum), 4 mM L-glutamine 과 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, penicillin이 포함된 DMEM(dulbecco's modified eagle's medium)배지로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양했다.

3) 군 분류

(1) 정상군(Normal group)

정상군은 RAW 264.7 cell에 아무 처리도 하지 않았다.

(2) 대조군(Control group)

대조군은 RAW 264.7 cell에 LPS를 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였다.

(3) 실험군(Treatment group)

실험군은 RAW 264.7 cell에 indomethacin 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$, 蜂藥鍼液 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였다.

4) MTT Assay를 이용한 細胞毒性 실험

蜂藥鍼液의 濃度에 따른 細胞毒性을 측정하기 위하여 세포 배양에서 생존하는 세포의 수를 측정하는 방

법인 MTT assay 실험을 시행하였다. 먼저 RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/ml 농도로 96-multiwell plate의 각 well에 200 μ l씩 분주하고 2시간 배양하여 세포를 부착한 후 새로운 배지로 교환하고 MTT를 PBS에 2mg/ml가 되도록 녹여 냉장고에 보관하여 사용하였다. 蜂藥鍼液을 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50 μ g/ml 농도별로 처리하고 세포를 24시간 동안 배양한 후 각 well에 MTT시약(2mg/ml in PBS)을 50 μ l씩 처리하고 4시간 더 배양하여 상등액을 버린 후 DMSO 150 μ l를 넣고 잘 섞어 주었다. 살아있는 세포에서 mitochondria의 succinyl dehydrogenase를 이용하여 yellow-MTT를 비수용성인 자주색 formazan으로 환원한 다음 formazan의 發色을 540nm 吸光度로 ELISA reader를 통해 측정하였다. ELISA reader로 측정한 吸光度(optical density) 값은 살아있는 세포 수를 반영하며, 細胞毒性 판정은 다음 산출식에 따라 viability(% control)로 나타내었다.

$$\text{Viability}(\% \text{ control}) = \frac{\text{實驗群의 吸光度}}{\text{對照群의 吸光度}} \times 100$$

5) 蜂藥鍼液이 PLA2, COX-2와 iNOS 발현에 미치는 영향

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

(1) 시료 준비

100mm dish에 1×10^6 으로 세포를 깔고 24시간 뒤에 scraper로 잘 긁어서 세포를 모은 뒤 800rpm에서 원심 분리하였다. 위 상층액은 버리고 cold PBS로 세척한 뒤 蜂藥鍼液의 양에 따라 50 μ l에서 100 μ l까지 lysis buffer[tris Hcl(ph 8.0) 50mM, Nacl 150mM, sodium azide 0.02%, SDS 0.2%, igapel 630(or NP 40) 1%, NaF 100 mM(0.5%), PMSF 1 mM, sodium deoxycolate 0.5%, aprotinin 50 μ g/ml, EDTA 0.5mM, EGTA 0.1 mM]를 넣고 4 $^{\circ}$ C를 유지하여 3시간에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이 때 반응하는 초기 한 시간 동안 10분마다 꺼내서 와룬시켰다. 용해가 끝나면 4 $^{\circ}$ C, 14000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 모아 bio rad protein assay 방법으로 단백질을 정량하여 동량으로 나누어 전기영동하였다.

(2) 전기영동

겔을 만들 유리판을 EtOH로 세척하고 유리판을 고정 한 후 원하는 농도에 따라 분리 겔을 제조하여 주입 하였다. 4 ml씩 주입하여 윗부분 2cm 지점까지만 주입 하고, 주입 후 표면을 고르게 하기 위해 isopropanol 몇 방울을 떨어뜨렸다. 약 40분 정도 분리 겔을 건조한 후 isopropanol을 버리고 D.W.로 세척하고 유리판 사이의 물기를 3M paper로 제거하였다. 퇴적 겔을 제조한 다음 유리판 윗부분에 주입하고 빗을 꽂는데, 퇴적 겔은 굳으면서 부피가 줄어들기 때문에 충분히 넘칠 듯이 부었다. 30분 후 퇴적 겔이 건조되면 빗을 빼고 D.W.로 세척한 후 유리판 그대로 조립하였다. 조립한 유리판을 chamber에 장착하고 running buffer(10 \times stock: tris base 30.3g, glycine 144g, SDS 10g)를 부었다. Well에 있는 찌꺼기를 주사기로 제거한 후 protein marker(bio-rad prestained SDS-page standards, high range 161-0309) 5-10 μ l, protein양이 약 30-50 μ g 정도 되는 sample 10-20 μ l를 장착하고, 띠가 낮은 volt에서 정교하게 전개되도록 40-50 volt로 약 30분 동안 가동 하였다. Stacking gel의 전개가 끝나면 80~100 volt로 약 2시간 30분 정도 분리 겔을 전개시켰다.

(3) 전이

겔 크기의 nitrocellulose membrane 1장, 3M paper 2장을 준비한 후 tray에 ㉔PBS, ㉕transfer buffer(tris base 3.03g, glycine 14.63g, methanol 200ml) ㉖staining solution(coomassie blue staining solution)을 준비하였다.

Membrane은 미리 물에 적서놓고 ㉔에 3M paper와 겔, ㉕에 membrane, ㉖에 겔을 넣고 30분 동안 흔든 후 ㉔의 3M paper와 겔을 ㉕로 옮기고, transfer sandwich를 조립하였다. Chamber에 sandwich를 끼우고 얼음 통을 넣고 transfer buffer를 붓는데, black panel은 음극, white panel은 양극으로 하였고, 실온에서 80 volt 로 1시간 30분간 전이시켰다(Fig. 1).

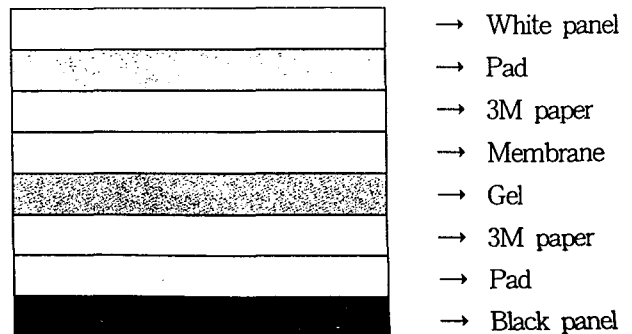


Fig. 1. Transfer Sandwich in Westen Blotting.

(4) 차단

전이된 membrane을 TBS-T 용액(0.05% tween -20, 150 mM NaCl, 10 mM tris pH8.0)으로 세척한 후 약간 물기를 제거하고 TBS-T 용액 속에서 5% skin milk로 약 2시간 동안 遮斷하였고 TBS-T 용액으로 여러 번 세척하였다.

(5) 일차항체에서 배양(COX-2 goat polyclonal IgG, santa cruz biotechnology)

TBS-T 용액 속에서 3% skin milk에 희석된 일차항체 (COX-2 goat polyclonal IgG, santa cruz biotechnology) 용액을 만들고 차단된 membrane을 일차항체에서 3시간 동안 흔들고 TBS-T 용액으로 5분씩 3번 세척하였다.

(6) 이차항체에서 배양(Anti-mouse Ig, horseadish peroxidase)

TBS-T 용액 속에서 3% skin milk에 희석된 이차항체 용액을 만들고 차단된 membrane을 이차항체에서 1시간 동안 흔들 후, TBS-T 용액으로 5분씩 3번 세척하였다.

(7) 현상

Developer(kodak), fixer(kodak), ECL detection reagent(amersham pharmacia biotechnology), ECL film, poly glove, cassette, blue tip, 1 ml pipet, ECL 반응 tube, tissue, clean wrap, membrane, membrane 놓을 판, timer, 집개 등을 준비하고 편평한 판에 미리 랩을 씌워 놓고, mambrane의 물기를 제거하여 판 위에 올린 후, ECL 용액을 1, 2를 1 : 1 비율로 섞어 membrane에 뿌리고 골고루 용액을 묻힌 다음 1분간 반응시켰다. 약 1분 후 ECL 용액을 충분히 제거하고 그 위에 랩을 씌웠다. Film을 cassette에 올려 놓고 membrane 판을 5분에서 10분 정도 film에 찍었다. Developer는 검은 띠가 확실해지면 건지고 fixer에 오래 동안 담근 후 흔들어 주고 흐르는 물로 씻어 말렸다.

(8) 겔 건조

겔을 착색용액으로 약 30분간 착색하고 탈색용액(30% methanol, 10% acetic acid)으로 충분히 탈색하였다. 겔의 물기를 조금 제거하고 3M paper에 겔을 놓은 다음 glycerol을 겔 위에 골고루 펴 발랐다. OHP film을 덮고 80 °C에서 4시간 이상 건조하였다.

(9) 광학농도계 측정

현상한 film에 구획을 정하고 광학농도계(densitometer)를 이용하여 相對濃度(relative density)를 각각 측정 비교하였다.

6) 蜂藥鉞液이 AA와 PGD2, PGE2 생성에 미치는 영향.

(1) 전처리(Pretreatment)

RAW 264.7 cells(1×10⁶ cells/dish)에 표시된 [³H]arachidonic acid(0.4 μCi/dish)을 1μg/ml LPS로 자극한 직후 0.5, 1 및 5μg/ml 농도로 蜂藥鉞液을 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후, 가운데 있는 지질을 ethyl acetate로 추출하고 ethyl acetate/ isooctane/acetic acid/H₂O 용매로 silica gel G plate의 TLC상에서 분리하였다. PGD₂와 PGE₂에 해당하는 곳을 얻어 방사성 동위원소를 liquid scintillation counting으로 측정하였다.

(2) 후처리(After Treatment)

RAW 264.7 cells(1×10⁶ cells/dish)에 표시된 [³H]arachidonic acid(0.4 μCi/dish)을 1μg/ml LPS로 자극하고 24시간 후에 0.5, 1 및 5μg/ml 농도로 蜂藥鉞液을 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후, 가운데 있는 지질을 ethyl acetate로 추출하고 ethyl acetate/isooctane/acetic acid/H₂O 용매로 silica gel G plate의 TLC상에서 분리하였다. PGD₂와 PGE₂에 해당하는 곳을 얻어 방사성 동위원소를 liquid scintillation counting으로 측정하였다.

7) 통계 처리

모든 실험값은 평균값±표준오차(mean±standard error)로 하였고, 통계학적 분석은 sigma state (SPSS, USA) program을 이용하였다. 통계학적 유의성은 ANOVA test 후 대조군과 실험군의 비교는 bonferroni t-test에 의해 P<0.05인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

III. 成 績

1. MTT Assay를 이용한 細胞毒性 실험

蜂藥鍼液의 細胞毒性을 연구하기 위하여 MTT assay 를 이용하여 蜂藥鍼液을 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도별로 실험한 결과 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 細胞毒性이 없 어 본 실험에서는 각각 0.1, 0.5, 1 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 蜂藥鍼液을 취하였다(Fig. 2).

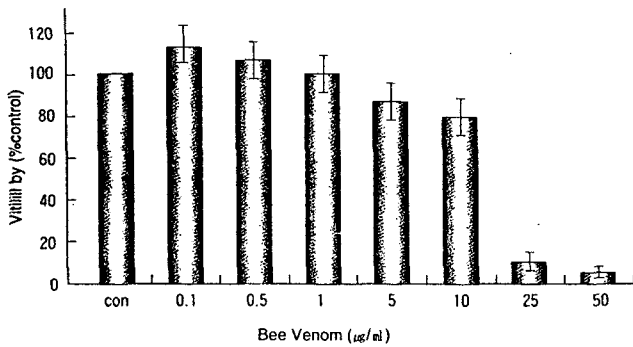


Fig. 2. The Effects of Bee Venom on Cytotoxicity by MTT Assay. The Non-toxic Concentrations (0.1 to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of Bee Venom Were Used in this Study.

2. 蜂藥鍼液이 PLA2 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 AA 생성을 촉진시키는 酵素인 PLA2 발 현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 24시간 후 蜂藥鍼液 0.5, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 대조군에 비해 PLA2 발현 이 감소하였고, 蜂藥鍼液 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 증가하 였는데 이는 indomethacin과 유사한 경향이였다(Fig. 3., Tab. I.). 48시간 후에는 모든 실험군이 대조군에 비해 PLA2 발현이 유의하게 감소하였다($P < 0.05$)(Fig. 4, Tab. II.).

Tab. 1. Relative Density of PLA2 Expression after 24 hours.

GROUP ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Density (%) PLA2 (24 h)
Normal	20.85 \pm 17.04
Control	33.63 \pm 02.47
LPS 0.1 + Indomethacin 0.1	116.01 \pm 12.39
LPS 0.1 + Bee Venom 0.5	16.04 \pm 04.89
LPS 0.1 + Bee Venom 1	31.09 \pm 14.71
LPS 0.1 + Bee Venom 5	101.61 \pm 38.57

RAW 264.7 cells were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS. The values are the means \pm S.E. of three experiments with triplicate of each experiments.

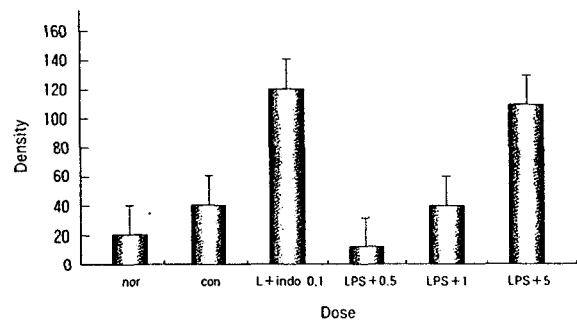


Fig. 3. The Effects of Bee Venom on the LPS-Induced Expression of PLA2 after 24 hours Treatment in Cultured RAW 264.7 Cells.

Tab. 2. Relative Density of PLA2 Expression after 48 hours.

GROUP ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Density (%) PLA2 (48 h)
Normal	75.57 \pm 23.75
Control	297.27 \pm 69.15
LPS 0.1 + Indomethacin 0.1	172.85 \pm 48.44
LPS 0.1 + Indomethacin 1	130.82 \pm 36.02
LPS 0.1 + Bee Venom 0.5	85.57 \pm 24.32 *
LPS 0.1 + Bee Venom 1	100.53 \pm 40.22 *
LPS 0.1 + Bee Venom 5	105.42 \pm 48.37 *

RAW 264.7 cells were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ LPS. The values are the means \pm S.E. of seven experiments with triplicate of each experiments. (*P < 0.05) Statistical Significance Compared with Control.

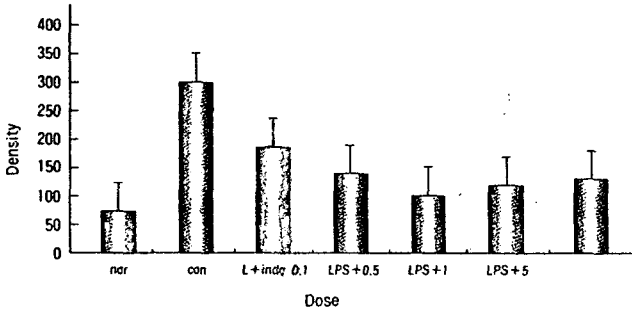


Fig. 4. The Effects of Bee Venom on the LPS-Induced Expression of PLA₂ after 48 hours Treatment in Cultured RAW 264.7 Cells. *P < 0.05 Statistical Significance Compared with Control.

3. 蜂藥鍼液이 COX-2 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 炎症 媒介 物質 중 하나인 PG 생성을 촉진시키는 酵素인 COX-2 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 모든 실험군은 대조군에 비해 COX-2 발현이 유의하게 감소하였고(P < 0.05). (Fig. 5-6., Tab. III-IV), 48시간 후에는 蜂藥鍼液 처리군이 indomethacin 처리군보다 효과적이었다(Fig. 6., Tab. IV).

Tab. 3. Relative Density of COX-2 Expression after 24 hours.

GROUP ($\mu\text{g/ml}$)	Density (%) COX-2 (24 h)
Normal	3.26 \pm 01.69
Control	145.44 \pm 17.99
LPS 0.1 + Bee Venom 0.5	65.16 \pm 15.82 *
LPS 0.1 + Bee Venom 1	70.10 \pm 18.95 *
LPS 0.1 + Bee Venom 5	53.85 \pm 17.22 *

RAW 264.7 cells were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control

was treated with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ LPS. The values are the means \pm S.E. of three experiments with triplicate of each experiments. (*P < 0.05) Statistical Significance Compared with Control.

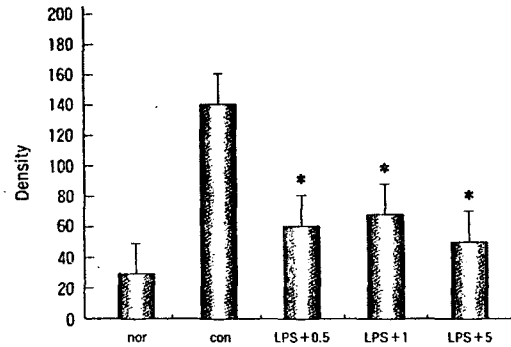


Fig. 5. The Effects of Bee Venom on the LPS-Induced Expression of COX-2 after 24 hours Treatment in Cultured RAW 264.7 Cells. (*P < 0.05) Statistical Significance Compared with Control.

Tab. 4. Relative Density of COX-2 Expression after 48 hours.

GROUP ($\mu\text{g/ml}$)	Density (%) COX-2 (48 h)
Normal	29.55 \pm 17.64
Control	246.73 \pm 36.30
LPS 0.1 + Indomethacin 0.1	203.11 \pm 28.87
LPS 0.1 + Indomethacin 1	161.79 \pm 42.67
LPS 0.1 + Bee Venom 0.5	49.63 \pm 28.83 *
LPS 0.1 + Bee Venom 1	51.30 \pm 32.57 *
LPS 0.1 + Bee Venom 5	27.55 \pm 19.04 *

RAW 264.7 cells were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ LPS. The values are the means \pm S.E. of three experiments with triplicate of each experiments. (*P < 0.05) Statistical Significance Compared with Control.

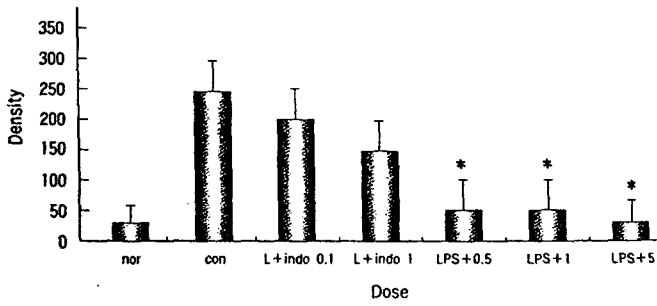


Fig. 6. The Effects of Bee Venom on the LPS-Induced Expression of COX-2 after 48 hours Treatment in Cultured RAW 264.7 Cells. (*P < 0.05) Statistical Significance Compared with Control.

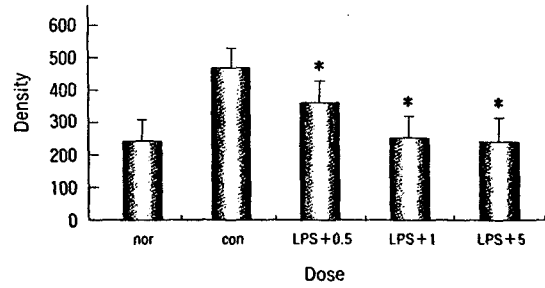


Fig. 7. The Effects of Bee Venom on the LPS-Induced Expression of iNOS after 48 hours Treatment in Cultured RAW 264.7 Cells. (*P < 0.05) Statistical Significance Compared with Control.

4. 蜂藥鍼液이 iNOS 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 NO 생성을 촉진시키는 酵素인 iNOS 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 48시간 후에 실험군은 대조군에 비해 iNOS 발현이 농도의존적으로 유의하게 감소하였다(P < 0.05)(Fig. 7, Tab.V).

Tab. 5. Relative Density of iNOS Expression after 48 hours.

GROUP (µg/ml)	Density (%) iNOS (48 h)
Normal	232.33 ± 124.20
Control	433.68 ± 103.56
LPS 0.1 + Bee Venom 0.5	327.89 ± 99.24 *
LPS 0.1 + Bee Venom 1	266.10 ± 102.18 *
LPS 0.1 + Bee Venom 5	256.89 ± 110.93 *

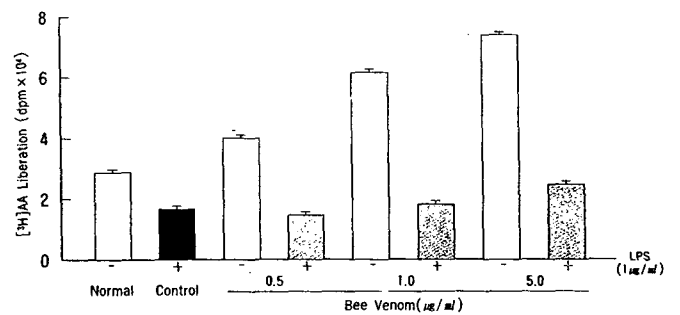
RAW 264.7 cells were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 0.1 µg/ml LPS. The values are the means ± S.E. of three experiments with triplicate of each experiments. (*P < 0.05) Statistical Significance Compared with Control.

5. 蜂藥鍼液이 AA와 PGD₂, PGE₂ 생성에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 炎症 媒介 物質인 PGD₂, PGE₂와 그 前驅 物質인 AA 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과는 다음과 같다.

전처리한 경우, 실험군은 대조군에 비해 AA 생성은 거의 차이가 없었고 PGD₂와 PGE₂ 생성은 증가하였다(Fig. 8).

후처리한 경우, 실험군은 대조군에 비해 AA 생성은 증가하였고, PGD₂ 생성은 감소하였으며, PGE₂ 생성은 蜂藥鍼液 0.5, 1.0µg/ml 처리군에서는 증가하였고 蜂藥鍼液 5.0µg/ml 처리군에서는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 9).



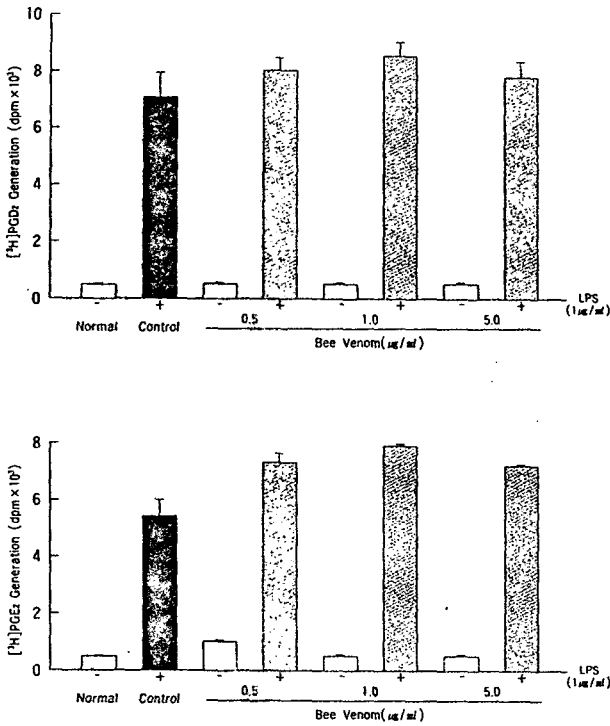


Fig. 8. The Effects of Pretreated Bee Venom on the LPS-Induced Generation of AA, PGD₂ and PGE₂ in Cultured RAW 264.7 Cells as Described in the Method and Materials. Normal was not treated and control was treated with 1 µg/ml LPS.

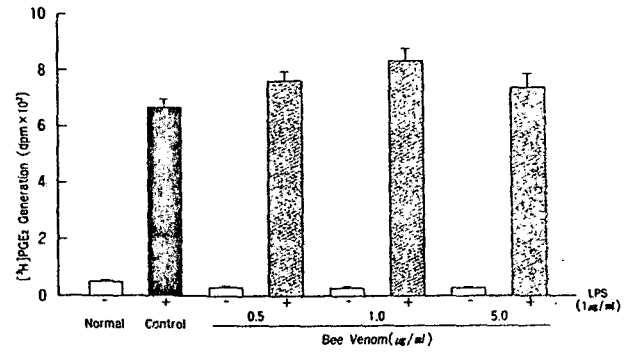
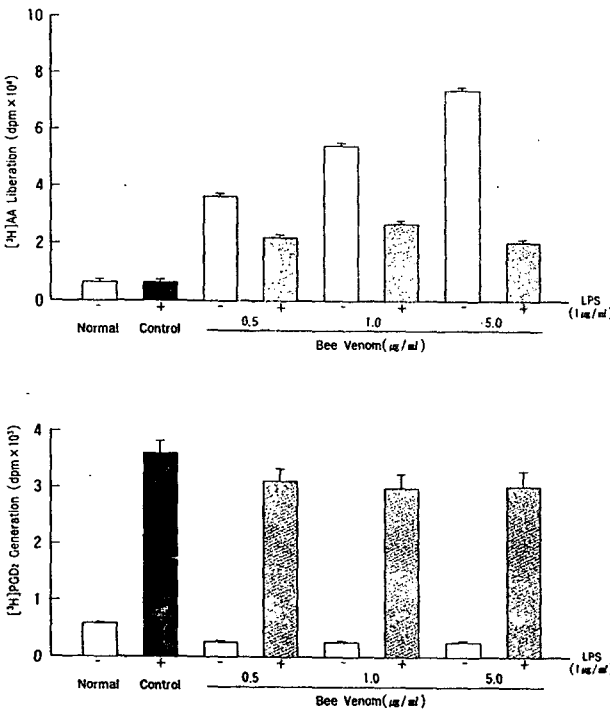


Fig. 9. The Effects of After Treated Bee Venom on the LPS-Induced Generation of AA, PGD₂ and PGE₂ in Cultured RAW 264.7 Cells as Described in the Method and Materials. Normal was not treated and control was treated with 1 µg/ml LPS.

IV. 考 察

일반적으로 炎症 및 痛症에 関여한다고 알려진 PG가 생성되는 機轉은 LPS 또는 다른 자극에 의해 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor (TNF), interleukin-6(IL-6) 같은 炎症성 cytokine이 분비되면 PLA₂가 活性化되고 PLA₂에 의해 세포막의 phospholipid에서 AA가 분비되고 세포내 AA는 COX에 의해 PG로 변환된다²⁸⁾.

PLA₂는 세포막에 존재하는 phospholipid의 sn-2 acyl ester 결합을 가수분해하여 free fatty acid와 lysophospholipid를 생성하는 酵素이다²⁹⁾. Lysophospholipid는 platelet-activating factor(PAF)의 前驅物質이며, free fatty acid 중에서 AA는 세포내에서 COX와 lipooxygenase(LOX)의 작용을 받아 PG, thromboxane, leukotrience으로 변환되는데 이들은 排卵, 血小板凝集, 腎水分平衡, 免疫作用 등을 포함하는 다양한 생리 기전에 関여한다³⁰⁾.

COX는 AA를 PG로 변환시키는 酵素로 현재 COX-1과 COX-2 두 가지 형태로 존재하는데³¹⁾, COX-1은 주로 胃나 腎臟에서 발현되고⁴²⁾, COX-2는 주로 腦, 腎臟, 炎症性細胞에서 발현된다^{32,43)}.

PG는 痛症과 炎症에 関여되고 胃腸管係 粘膜에서 細胞保護, 腎血流量과 機能維持 그리고 身體의 平衡

維持 등에 매우 중요한 역할을 하는데, 그 중 PGE₂는 COX 활성화에 따른 주요 산물로서 炎症, 自家免疫 및 腫瘍性 疾患의 病理에서 중요한 역할을 하고³⁰⁾, 특히 炎症 反應의 중요한 媒介物質로 작용한다³⁰⁾.

현재 사용되는 NSAIDs는 대부분 COX-1과 COX-2를 비선택적으로 억제하거나 COX-1에 선택성이 약간 있는 제제들로써, 통증은 억제하지만 胃腸管과 腎臟의 부작용 및 抗血小板 作用(antiplatelet activity)이 나타난다³⁰⁾. 최근 소염진통 효과는 NSAIDs와 비슷하면서도 흔히 나타나는 胃腸管 出血과 같은 부작용이 없는 선택적인 COX-2 저해제가 개발되었는데, COX-2 계열의 소염진통제는 PG의 분비를 차단함으로써 炎症뿐만 아니라 腫瘍의 증식을 억제하는 것으로 밝혀져 최근 COX-2 활성화 억제를 통한 抗癌 作用도 활발히 연구되고 있다³⁰⁾.

蜂藥鍼療法은 經絡學說의 원리에 의하여 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 추출 가공하여 직접 질병과 유관한 穴位, 壓痛點 혹은 體表의 陽性反應點에 주입함으로써 刺鍼 效果와 蜂毒의 生化學的 效果를 동시에 이용한 것이다. 이는 생체의 기능을 조절하고 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하고 방어하는 藥鍼療法의 일종¹²⁾으로, 일찍이 2천여 년 전부터 임상에서 각종 동통질환 등에 응용하였다³⁰⁾.

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고 祛風除濕, 止疼痛, 解痙平喘, 消腫降壓하는 효능이 있어¹⁾ 鎮痛, 消炎, 解熱,³⁻⁷⁾ 鎮痙,⁸⁾ 抗癌,⁹⁻¹³⁾ 免疫 增強¹⁴⁻¹⁷⁾ 作用을 나타내고 있다.

蜂毒의 成分은 enzymes, peptides, non peptide components로 구성되어 있다³⁷⁻³⁹⁾. 이 중 enzymes의 주요 성분은 PLA₂와 hyaluronidase 등이 있고, peptides는 乾燥 蜂毒의 약 50%를 구성하고 있으며 melittin, apamin, MCD peptide 등이 있는데, 그 중 melittin은 蜂毒의 주성분으로 溶血, 酵素, 抗炎 作用이 있다. Apamin과 MCD peptide는 免疫機能을 증가시키고 鎮痛, 消炎 效果를 나타내며, 白血球의 食作用을 억제하고, 血漿의 纖維化를 저하하는 효능이 있다. Non peptide components는 histamine, dopamine, noradrenaline 등으로 구성되어 있다³⁹⁻⁴¹⁾.

최근 蜂藥鍼을 이용한 임상적 연구로서 膝關節炎¹⁸⁾⁹⁾, 류마티드 關節炎²⁰⁾에 유효함이 보고되었다.

실험적 연구로서 콜라겐유도 關節炎²¹⁾, 實驗的 急慢性 關節炎²²⁾, 關節炎 滑液細胞²³⁾, 류머티스 關節炎 滑液細胞²⁴⁾ 등에 미치는 영향이 보고되었고, 蜂藥鍼液의 細胞

毒性²⁵⁻²⁷⁾에 관한 연구가 보고되었으나, 蜂藥鍼液의 安全性和 有效性의 機轉에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

이에 연구자는 蜂藥鍼液의 염증 및 독성에 대해 연구하기 위하여 RAW 264.7 cell에 LPS로 염증을 유도하고, 蜂藥鍼液을 처리하여 炎症指標인 PLA₂, COX-2, iNOS 발현과 AA, PGD₂, PGE₂ 생성에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

蜂藥鍼液의 細胞毒性을 연구하기 위하여 MTT assay를 이용하여 蜂藥鍼液을 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50μg/ml 농도별로 실험을 한 결과 10μg/ml까지 細胞毒性이 없어 본 실험에서는 각각 0.1, 0.5, 1 및 5μg/ml 농도의 蜂藥鍼液을 취하였다.

蜂藥鍼液이 AA 생성을 촉진시키는 酵素인 PLA₂ 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 24시간 후 蜂藥鍼液 0.5, 1μg/ml 처리군에서는 대조군에 비해 PLA₂ 발현이 감소하였고, 蜂藥鍼液 5μg/ml 처리군에서는 증가하였는데 이는 indomethacin과 유사한 경향이였다. 48시간 후에는 모든 실험군이 대조군에 비해 PLA₂ 발현이 유의하게 감소하였다.

蜂藥鍼液이 炎症 媒介 物質 중의 하나인 PG 생성을 촉진시키는 酵素인 COX-2 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 모든 실험군은 대조군에 비해 COX-2 발현이 유의하게 감소하였고, 48시간 후에는 蜂藥鍼液 처리군이 indomethacin 처리군보다 효과적이었다.

蜂藥鍼液이 NO 생성을 촉진시키는 酵素인 iNOS 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 48시간 후에 실험군은 대조군에 비해 iNOS 발현이 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다.

蜂藥鍼液이 炎症 媒介 物質인 PGD₂, PGE₂와 그 前驅 物質인 AA 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과는 다음과 같다.

전처리한 경우, 실험군은 대조군에 비해 AA 생성은 거의 차이가 없었고 PGD₂와 PGE₂ 생성은 증가하였다.

후처리한 경우, 실험군은 대조군에 비해 AA 생성은 증가하였고, PGD₂ 생성은 감소하였으며, PGE₂ 생성은 蜂藥鍼液 0.5, 1.0μg/ml 처리군에서는 증가하였고 蜂藥鍼液 5.0μg/ml 처리군에서는 감소하는 경향을 보였다.

이상으로 보아, 蜂藥鍼液이 PLA₂, COX-2, iNOS와 같은 炎症 媒介 物質 생성을 촉진하는 酵素에 대한 강력한 억제 작용은 확인되었고, 蜂藥鍼液이 炎症 媒介 物

質 중 하나인 PG와 그 前驅 物質인 AA 생성 억제에 미치는 영향에 관한 더 진행된 연구가 필요할 것으로 사려된다. 그리고 PG와 AA 생성과 관련된 다른 媒介 物質들이 미치는 영향에 관한 추가 실험과 연구를 지속적으로 해야 할 것으로 사려된다.

V. 結 論

蜂藥鍼液의 염증 및 독성에 대해 연구하기 위하여 RAW 264.7 cell에 LPS로 염증을 유도하고, 蜂藥鍼液을 처리하여 炎症指標인 PLA₂, COX-2, iNOS 발현과 AA, PGD₂, PGE₂ 생성에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PLA₂는 24시간 후 蜂藥鍼液 0.5, 1 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비해 감소하였고, 蜂藥鍼液 5 μ g/ml 처리군에서는 증가하였는데 이는 indomethacin과 유사한 경향이였다. 48시간 후에는 모든 실험군이 대조군에 비해 PLA₂ 발현이 유의하게 감소하였다.
2. COX-2는 모든 실험군이 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 48시간 후에는 蜂藥鍼液 처리군이 indomethacin 처리군보다 효과적이였다.
3. iNOS는 48시간 후에 실험군이 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다.
4. AA, PGD₂, PGE₂는 전처리한 경우 실험군이 대조군에 비해 AA는 거의 차이가 없었고 PGD₂와 PGE₂는 증가하였다. 후처리한 경우 실험군이 대조군에 비해 AA는 증가하였고, PGD₂는 감소하였으며, PGE₂는 蜂藥鍼液 0.5, 1.0 μ g/ml 처리군에서 증가하였고 蜂藥鍼液 5.0 μ g/ml 처리군에서 감소하는 경향을 보였다.

參 考 文 獻

1. 김문호. 蜂毒療法과 蜂針療法. 서울: 韓國敎育企劃. 1992; 20-37, 41-2, 64-7, 104-12.
2. 권기록, 고흥균, 김창환. 蜂針에 대한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1994; 11(1): 159-171
3. 고흥균. 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): 283-92.
4. 도원석, 장준혁, 김경호 외 2인. 蜂毒療法이 關節의 膝關節 炎症性 浮腫에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1995; 12(1): 211-20.
5. 권기록, 고흥균. 蜂毒藥鍼療法이 抗炎, 鎮痛作用에 미치는 效能에 관한 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1998; 15(2): 97-103.
6. 김지영, 고흥균, 김용섭 외 3인. 蜂毒藥鍼療法의 抗炎症 作用에 관한 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1998; 15(1): 317-29.
7. 도원석, 김경호, 김갑성. 柳根皮 桂枝 牛膝 蜂毒 및 牛黃 熊膽 麝香 複合製劑 藥鍼이 mouse의 LPS 誘發 關節炎의 血液學的 變化에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2001; 18(1): 157-69.
8. 공현숙, 고흥균, 김창환. 蜂針毒療法이 抗癌變에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1993; 10(1):159- 165
9. 권기록, 고흥균, 김창환 외 3인. 蜂毒藥鍼刺戟이 3-MCA 誘發 上皮腫에 대한 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1997; 14(2): 157-172.
10. 박찬열, 서정철, 최도영 외 1인. 蜂毒藥鍼의 抗癌 效果에 대한 分子生物學的 研究. 大韓藥鍼學會誌. 2000; 3(1): 1-19.
11. 김윤미, 이재동, 박동석. 藥鍼用 蜂毒成分 中 apamin의 抗癌效果와 MAP-Kinase 神毫傳達體系에 대한 研究. 2001; 18(4): 101-15.
12. 권도희, 이재동, 최도영. 藥鍼用 蜂毒成分 中 apamin, Melittin의 抗癌作用. 大韓鍼灸學會誌. 2001; 18(1): 129-45.
13. 오기남, 이재동, 박동석. 蜂毒藥鍼이 C57BL mouse의 黑色腫에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2002; 19(4): 78-91.
14. J.E. Gerst, Y. Salomon. Inhibition by Melittin and fluphenazine of melanotropin receptor function and adenylate cyclase in M2R melanoma cell

- membranes. *Endocrinology*. 1987; 121(5): 1766-72.
15. 권기록, 고흥균. 蜂藥鍼療法の 免疫反應에 關한 臨床的 研究. *大韓鍼灸學會誌*. 2000; 17(1): 169-74.
 16. 이승덕, 김갑성. 牛膝 및 蜂毒藥鍼이 생쥐의 LPS 誘發 關節炎의 細胞性 免疫反應에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌*. 1999; 16(3): 287-315.
 17. 이경희, 김창환, 강성길 외 1인. 山地別 蜂毒液藥鍼刺戟이 免疫機能低下에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌*. 2000; 17(4): 28-40.
 18. 왕오호, 안규범, 임진강 외 1인. 退行性 膝關節炎의 蜂毒藥鍼 治療效果에 對한 臨床的 考察. *大韓鍼灸學會誌*. 2001; 18(3): 35-47.
 19. 김지훈, 이재동. 膝關節炎에 對한 蜂毒藥鍼의 臨床的 考察. *大韓鍼灸學會誌*. 1999; 16(3): 25-36.
 20. 황유진, 이건목, 황우준 외 5인. 蜂藥鍼을 이용한 류마티드 關節炎의 臨床的 研究. *大韓鍼灸學會誌*. 2001; 18(5): 33-42.
 21. 김태우, 최도영, 이재동. 蜂毒藥鍼이 제2형 콜라겐 誘導 關節炎에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌*. 2002; 19(4): 92-104.
 22. 이재웅. 蜂藥鍼이 實驗的 急慢性 關節炎에 미치는 效果와 機轉 研究. 暎園大學校 韓醫科大學 碩士學位論文. 2002.
 23. 한상원, 박기현, 정태영 외 1인. 蜂毒 및 Melittin 藥鍼液이 關節炎 滑液細胞에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌*. 2002; 19(4): 74-88.
 24. 이윤섭, 서정철, 이승우 외 1인. 國産蜂毒 및 精製 蜂毒藥鍼液이 류머티스 關節炎 滑液細胞에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌*. 2002; 19(4): 28-38.
 25. 박원, 김용석, 고흥균. 蜂毒 藥鍼液의 細胞毒性에 關한 研究. *大韓鍼灸學會誌*. 2002; 19(4): 65-77.
 26. 이종석, 고흥균, 김창환. 藥鍼用 蜂毒液의 急性毒性에 關한 研究. *大韓鍼灸學會誌*. 1994; 11(1): 177-95.
 27. 이종석, 고흥균, 김창환. 藥鍼用 蜂毒液의 局所毒性試驗에 關한 研究. *大韓鍼灸學會誌*. 1995; 16(1): 227-52.
 28. 김세중. 免疫學. 서울; 高麗醫學. 1994; 263-264.
 29. I. Kudo, M. Murakami, S. Hara, K. Inoue. Mammalian non-pancreatic phospholipases A2. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1170(3): 217-31.
 30. W.J. Buhl, L.M. Eisenlohr, U. Gehring. Phospholipase A2 in human placental serum. *Prostaglandins*. 1997; 53(3): 139-52.
 31. R.N. Dubios, S.B. Abramson, L. Crofford, R.A. Gupta, L.S. Simon, L.B. Van De Putte, P.E. Lipsty. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASWB J*. 1998; 12(12): 1063-73.
 32. S.Y. Choi, H. Ha, K.T. Kim. Capsaicin inhibits platelet activating factor-induced cytosolic Ca²⁺ increase and superoxide production. *J. Immunol*. 2000; 165: 3992-98.
 33. B. Cryer, A. Dubois. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase-a review. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 1998; 56(5-6): 341-61.
 34. J.K. Horton, A.S. Williams, Z. Smith-Phillips, R.C. Martin, G. O' Beirne. Intracellular measurement of prostaglandin E2 : effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression. *Anal Biochem*. 1999; 271(1): 18-28.
 35. A. Cameron. Selective COX-2 inhibitors gather speed. *Inpharma* 1998; 1122: 9-10.
 36. 인창식, 고흥균. 蜂毒療法에 對한 韓醫學 最初의 文獻紀錄: 마왕퇴의서의 蜂毒療法2例. *大韓鍼灸學會誌*. 1998; 15(1): 143-7.
 37. 임종국. 鍼灸治療學. 서울; 集文堂. 1983: 226-7, 545-99.
 38. 上海中醫學院. 鍼灸學. 香港; 商務印書館. 1990: 333-4.
 39. E. Habermann. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In *Venomous Animals and their Venoms*. Academic Press, 1971; 3: 61.
 40. E.S. Assem, G. Atkinson. Histamine release by MCDP (401), A peptide from the venom of the honey bee, *brit. Pharmacol*. 1973; 337-8.
 41. S.S. Saini, J.W. Peterson, A.K. Chopra. Melittin binds to secretory phospholipase A2 and inhibits its enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 238(2): 436-42.
 42. H. Tannenbaum, P. Davis, A.S. Russell. An evidence-based approach to prescribing NSAIDs in musculoskeletal disease: A canadian consensus.

Can Med Assoc J. 1996; 155(1) 77-88.

43. W.E. Kaufmann, K.I. Andreasson, P.C. Isakson, P.F. Worley. Cyclooxygenases and the central nervous system. Prostaglandins. 1997; 54(3): 601-24.
44. R. Ishii, M. Horie, K. Saito, M. Arisawa, S. Kitanaka. Inhibitory effects of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus* on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, activated by lipopolysaccharide and interferon- γ . *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001; 1568: 74-82.