

蜂藥鍼液이 NO, H₂O₂, IL-1에 미치는 影響에 關한 研究

宋政烈* · 李成魯* · 趙顯徹* · 金基鉉**

*경원대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

**경원대학교 한의과대학 침구학교실

The effects of Bee Venom on NO, H₂O₂ in Raw 264.7 cells and IL-1 in D10S cells

Jeong-Yeol Song* · Seong-No Lee* · Hyun-chul Jo* · Kee-Hyun Kim**

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

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

Objectives : The purpose of this study was to investigate the effects of Bee Venom on NO, H₂O₂ expression induced by LPS in Raw 264.7 cells as a murine macrophage cell line and on IL-1 expression induced by LPS in D10S cells.

Methods : The expression of NO was measured by MTT Assay and IL-1 by MTS Assay. The expression of H₂O₂ was measured as ROS level within the cell using by FACS analysis. The non-toxic concentration (from 0.1 μ g/ml to 5 μ g/ml) of Bee Venom was determined by MTT Assay.

Results : 1. Bee Venom inhibited the NO expression. The effective concentration of Bee Venom was 5 μ g/ml after 3 hours, 1 and 5 μ g/ml after 1 day and 2 days. The all concentration of Bee Venom inhibited the NO expression after 6, 12 hours and 3 days.
2. Bee Venom inhibited the H₂O₂ expression in a dose-dependent manner compared to the control.
3. Bee Venom could not significantly inhibit the IL-1 expression.

Key words : Bee Venom, NO, H₂O₂, IL-1, Raw 264.7 cell, D10S cell

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

I. 緒 論

蜂藥鍼療法은 꿀벌의 毒囊 蜂毒을 抽出, 加工하여 疾病과 有關한 部位 및 穴位에 注入함으로써 刺針效果와 蜂毒의 生化學的 特異物質이 人體에 미치는 藥理作用을 동시에 이용하여 生體機能을 調整하고 病理狀態를 개선시켜 疾病을 治療하고 예방하는 藥鍼療法의 一종이다¹⁾.

蜂毒의 性味는 苦·辛·平·大熱·有毒하고 enzyme, peptide, phylogically active amines, nonpeptide 등 分類되어 약 40여 가지의 性分으로 構成되어 있다²⁾. 蜂藥鍼療法은 藥鍼療法과 더불어 人體의 經穴에 物理的인 刺戟뿐만 아니라 化學的인 刺戟을 加한 治療法으로 痛症, 炎症性 疾患이나 류마티스 關節炎과 같은 自家免疫系 疾患에도 效果가 있는 것으로 報告되고 있다^{3,4)}.

최근 國內에서 蜂毒藥鍼에 관한 연구가 활발히 進行되고 있어 鎮痛⁵⁾, 消炎⁶⁾, 鎮痙⁷⁾, 安定性 檢査⁸⁾, 免疫機能 增強作用⁹⁾ 등이 보고되었고, 外國에서는 Habermann 等^{2,10,11)}에 의해 蜂毒의 生化學的 成分 및 藥理作用 등이 報告되었다.

蜂藥鍼液에 대한 臨床的 研究로는 王¹²⁾, 金 等¹³⁾이 膝關節炎에 대하여, 黃 等¹⁴⁾은 류마티드 關節炎에 대하여 그 有效性을 報告하였고, 實驗的 研究로는 都 等^{6,15)}이 膝關節의 炎症性 浮腫과 LPS 誘發 關節炎에 미치는 影響을, 李 等¹⁶⁾이 LPS 誘發 關節炎의 細胞免疫反應을 통해 蜂毒藥鍼의 有效性을 報告하였으나 蜂藥鍼液의 安全性과 有效性의 基전에 대한 研究가 未洽하다.

이에 研究者는 蜂藥鍼液이 Raw 264.7 細胞에서 細胞毒性 및 炎症媒介因子에 미치는 影響을 究明하기 위하여, LPS와 蜂藥鍼液을 濃度別로 處理하여 炎症을 誘導하는 媒介物質인 NO, H₂O₂, IL-1를 觀察한 바, 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 試藥

MTT NO assay kit (Sigma-aldrich社, USA), COX-2,

PLA₂, iNOS anti-odies (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA), PGE₂, PGD₂ (Cayman Chemical Co, USA), AA (Chrono-Log Co, USA), ³[H] AA (NEN Life Science Products, Inc, USA) 등을 使用하였고, 細胞培養과 western blotting 試藥 등은 研究用에 適合한 것들을 使用하였다.

2) 試料

乾燥 粉末 蜂毒[乳蜜蜂毒(주), 韓國]을 蒸溜水에 稀釋하여 使用하였다.

3) 機器

Liquid scintillation counter (model LS 3801, USA), Image analyser (Mitsubishi electric Cor, Japan), ELISA reader (Molecular Device, USA), FACS calibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA) 等이다.

2. 方法

1) 試料의 調製

乾燥 粉末 蜂毒을 3次 蒸溜水로 稀釋하여 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50 μ g/ml 濃度로 나누어 使用하였다.

2) 細胞 培養

Murine macrophage Raw 264.7 細胞는 10% FBS(fetal bovine serum), 4mM L-glutamine 과 100 μ g/ml의 streptomycin, penicillin이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 培養하였다.

3) 分類

(1) 對照群(Control group)

對照群은 NO, H₂O₂ 測定에서 raw 264.7 細胞를, IL-1 測定에서는 D10S 細胞를 利用하여 LPS만 處理하였다.

(2) 實驗群(Treatment group)

實驗群은 Raw 264.7 細胞 및 D10S 細胞에 LPS로 處理한 후, indomethacin 또는 蜂藥鍼液을 濃度別로 處理하였다.

4) MTT Assay를 移用한 細胞毒性 實驗

Raw 264.7 細胞를 1 \times 10⁶ cells/ml의 濃度로 하여 96-

multiwell plate의 각 well에 200 μ l씩 분주하고 2시간 培養하여 細胞를 附着시킨 후 새로운 배지로 교환한 다음 MTT를 PBS에 2mg/ml 가 되도록 녹여 냉장고에 保管하여 使用하였다. 蜂藥鹼液을 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50 μ g/ml 濃度別로 處理하고 細胞를 24시간 동안 培養한 後, 각 well에 MTT試藥(2mg/ml in PBS)을 50 μ l씩 處理한 다음, 4시간 더 培養하며 상등액을 버리고 150 μ l의 DMSO를 넣고 잘 섞어주었다. 살아있는 細胞를 mitochondria의 succinyl dehydrogenase에 의해 yellow-MTT를 비수용성인 purple formazan으로 환원시킨 다음, 이 formazan의 發色을 540nm에서 ELISA reader를 利用해 吸光度를 測定하였다.

ELISA reader로 測定한 吸光度의 값은 살아 있는 細胞의 數를 반영하며 細胞毒性的 判定은 다음 산출식을 따라 viability(% control)로 나타내었다.

$$\text{viability}(\% \text{ control}) = \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

5) Nitrite Assay

細胞 培養液 중에 存在하는 NO²⁻의 形態로서 Griess 試藥을 利用하여 測定하였다. 特異的 또는 非特異的 免疫 反應에 重要的 役割을 하는 것으로 알려진 NO는 細胞 培養液에서 NO²⁻와 NO³⁻의 形態로 蓄積된다. 細胞培養 上등액 100 μ l와 Griess 試藥 [0.1% N-(H-naphthyl)ethylenediamine · 2HCl, 1% sulfanilamide 5% conc. H₃PO₄ in H₂O] 100 μ l를 混合한 뒤, 96 well plates에서 10분 동안 反應을 살핀 다음 540nm에서 microplate reader로 吸光度를 測定하여 표준곡선은 NaNO₂를 段階的으로 稀釋하여 作成을 하였고, 培養液에 녹아 있는 NO²⁻ 량은 Green 등¹⁷⁾의 方法에 準하여 測定하였다. 測定時間은 0, 3, 6, 12 時間과 1, 2, 3 日, 총 7回 實施하였다.

6) H₂O₂ 測定

Raw 264.7 細胞를 37°C에서, LPS 및 蜂藥鹼液 0.5, 1, 1.5 및 5 μ g/ml로 10분동안 處理한 뒤 DCFH-DA 20 mM 및 H₂O₂ 250 mM을 각각 10분동안 處理한 다음 FACS analysis로 細胞內 ROS level를 測定하였다.

7) MTS Assay로 細胞 毒性的을 測定

HPV-containing cell lines을 96 well plate에 10⁴/well 씩

plating한 후, 24시간 뒤 봉약침액 1, 10, 50 및 100 μ g/ml로 處理하여 하루정도 反應시키고 MTS assay로 細胞 毒性的을 測定하였다.

8) D10S Assay

D10S 細胞를 2.5 \times 10⁴/well 씩 plating한 後, 5, 10, 15, 20 및 25 μ g/ml로 處理한 뒤 30분 동안 incubation한 다음, IL-1을 2 μ g/ml이 되게 處理하고, 48 時間동안 incubation 後, MTS assay로 測定하였다.

9) 統計 處理

모든 실험값은 평균값 \pm 표준오차(mean \pm standard error)로 하였고, 統計學的 分析은 Sigma state (SPSS, USA) program을 利用하였다. 통계학적 유의성은 ANOVA test 후 對照群과 實驗群의 비교는 Bonferroni t-test에 의해 P<0.05인 경우를 有意한 것으로 간주하였다.

III. 成績

1. 蜂毒의 液狀과 粉末의 毒性 比較

蜂毒 液狀과 粉末의 細胞毒性을 觀察하기 위하여 MTT assay를 利用하여 蜂毒液狀과 蜂毒粉末을 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度別로 實驗을 한 結果 별 차이가 없어서, 本 實驗에서는 蜂毒粉末을 稀釋하여 使用하였다.(Fig. 1.)

2. MTT Assay에 의한 細胞 毒性 實驗

蜂藥鍼液의 細胞毒性을 觀察하기 위해 MTT assay를 利用하여 蜂藥鍼液을 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度로 處理하여, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지는 細胞毒性이 나타나지 않음을 觀察할 수 있어, 本 實驗에서는 0.1, 0.5, 1, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 蜂藥鍼液을 취하였다.(Fig. 2.)

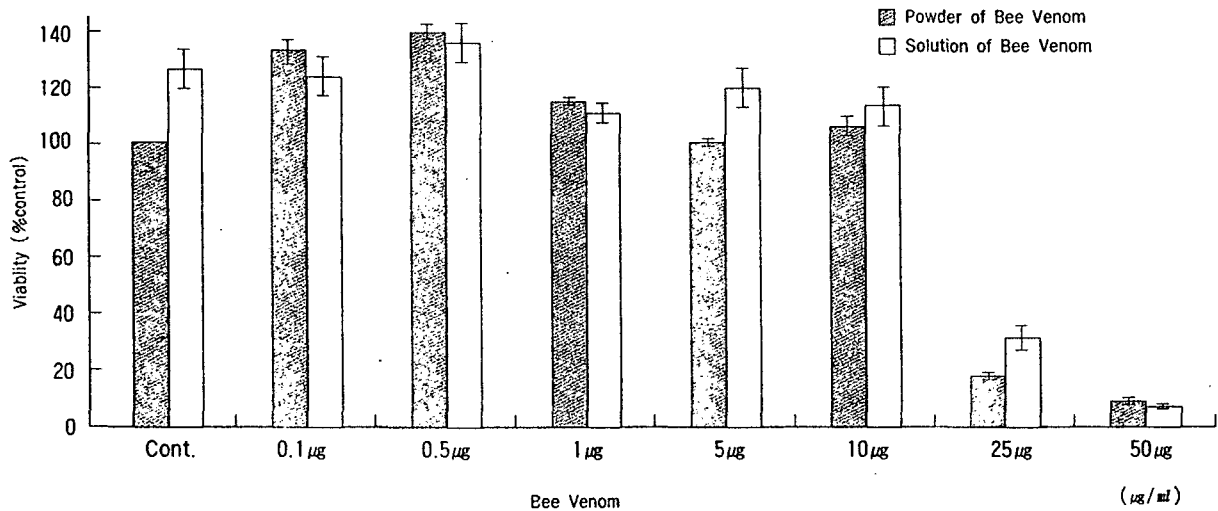


Fig. 1. This figure didn't shows the difference between the solution of bee venom and powder of Bce Venom.

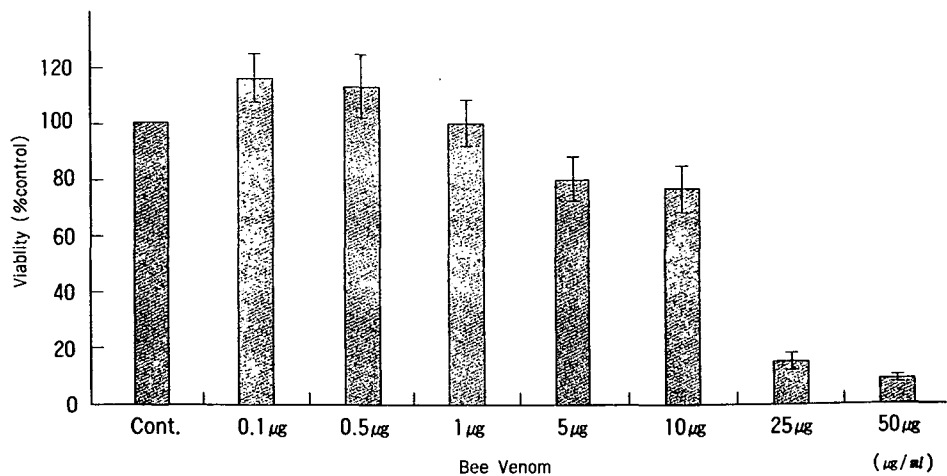


Fig. 2. This figure shows the effects of bee venom on cytotoxicity by MTT assay. The non-toxic concentrations(0.1 to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of Bee Venom were used in this study

3. 蜂藥鍼液이 時間別 NO 生成量에 미치는 影響

蜂藥鍼液의 時間別 NO 生成量에 미치는 影響을 알 아보기 위해서, 時間別, 濃度別로 變化시켜 實驗한 結果, 蜂藥鍼液 處理群이 3 時間에는 5 μ g/ml에서, 6, 12 時間, 3 日에는 全 試驗群에서, 1, 2 日에는 1, 5 μ g/ml 에서 對照群에 비하여 有意한 抑制를 보였다. (Table I-VI., Fig. 3-4.)

Table I . Relative Density of NO after 0 hour

GROUP (μ g/ml)	Density (%) Nitrite(0 h)
Control	2.74 \pm 0.16
LPS + Indomethancin 0.1	2.63 \pm 0.07
LPS + Indomethancin 1	2.87 \pm 0.29
LPS + Bee Venom 0.5	3.06 \pm 0.25
LPS + Bee Venom 1	2.97 \pm 0.20
LPS + Bee Venom 5	2.71 \pm 0.03

The values are the means \pm SE of six experiments with four of each experiment.

Table II . Relative Density of NO after 3 hours

GROUP (μ g/ml)	Density (%) Nitrite(3 h)
Control	3.40 \pm 0.08
LPS + Indomethancin 0.1	3.18 \pm 0.03
LPS + Indomethancin 1	3.38 \pm 0.05
LPS + Bee Venom 0.5	3.29 \pm 0.07
LPS + Bee Venom 1	3.34 \pm 0.09
LPS + Bee Venom 5	3.11 \pm 0.03*

The values are the means \pm SE of six experiments with four of each experiment. *P<0.05, Statistically significant VS control.

Table III . Relative Density of NO after 6 hours

GROUP (μ g/ml)	Density (%) Nitrite(6 h)
Control	5.21 \pm 0.10
LPS + Indomethancin 0.1	4.40 \pm 0.16***
LPS + Indomethancin 1	4.62 \pm 0.13*
LPS + Bee Venom 0.5	4.52 \pm 0.12**
LPS + Bee Venom 1	4.40 \pm 0.06***
LPS + Bee Venom 5	4.61 \pm 0.08**

The values are the means \pm SE of six experiments with four of each experiment. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, Statistically significant VS control.

Table IV . Relative Density of NO after 12 hours

GROUP (μ g/ml)	Density (%) Nitrite(12 h)
Control	13.52 \pm 0.17
LPS + Indomethancin 0.1	10.61 \pm 0.21***
LPS + Indomethancin 1	10.45 \pm 0.17***
LPS + Bee Venom 0.5	12.18 \pm 0.19***
LPS + Bee Venom 1	12.45 \pm 0.23**
LPS + Bee Venom 5	11.61 \pm 0.16***

The values are the means \pm SE of six experiments with four of each experiment. **P<0.01, ***P<0.001, Statistically significant VS control.

Table V . Relative Density of NO after 1 day

GROUP (μ g/ml)	Density (%) Nitrite(1 day)
Control	29.49 \pm 0.92
LPS + Bee Venom 0.5	26.80 \pm 0.84
LPS + Bee Venom 1	25.61 \pm 0.20*
LPS + Bee Venom 5	24.84 \pm 0.81**

The values are the means \pm SE of four experiments with four of each experiment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Statistically significant VS control.

Table VI. Relative Density of NO after 2 day

GROUP ($\mu\text{g/ml}$)	Density (%) Nitrite(2 day)
Control	33.74 \pm 0.37
LPS + Bee Venom 0.5	31.56 \pm 0.73
LPS + Bee Venom 1	29.74 \pm 0.93**
LPS + Bee Venom 5	28.36 \pm 0.53***

The values are the means \pm SE of four experiments with four of each experiment. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Statistically significant VS control.

Table VII. Relative Density of NO after 3 day

GROUP ($\mu\text{g/ml}$)	Density (%) Nitrite(3 day)
Control	42.09 \pm 0.50
LPS + Bee Venom 0.5	33.95 \pm 0.86***
LPS + Bee Venom 1	31.43 \pm 1.78***
LPS + Bee Venom 5	31.41 \pm 0.80***

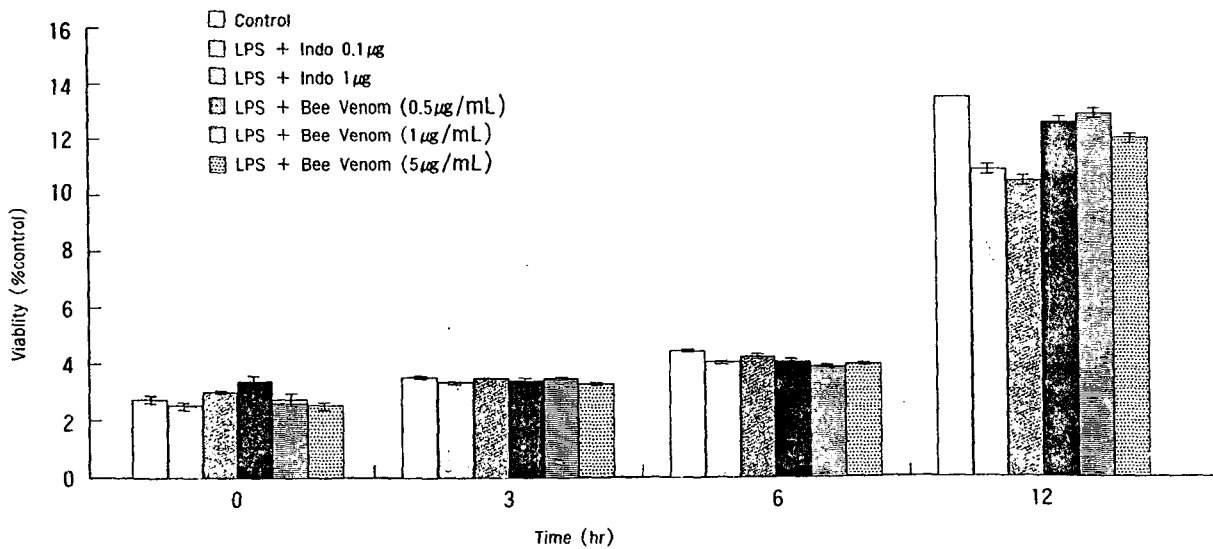


Fig. 3. The effects of Bee Venom on the LPS-induced expression of NO after 0,3,6,12 hr treatment in cultured Raw 264.7 cells

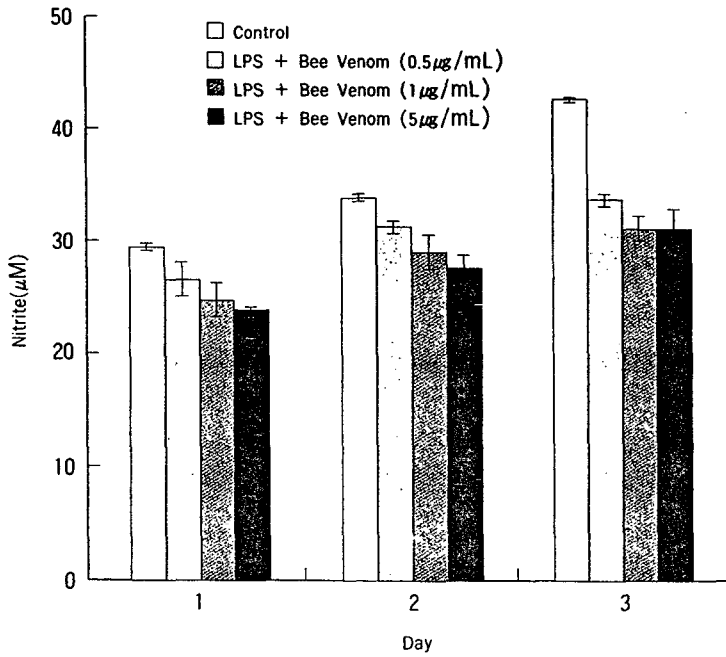


Fig. 4. The effects of Bee Venom on the LPS-induced expression of NO after 1,2,3 day Treatment in cultured Raw 264.7 cells.

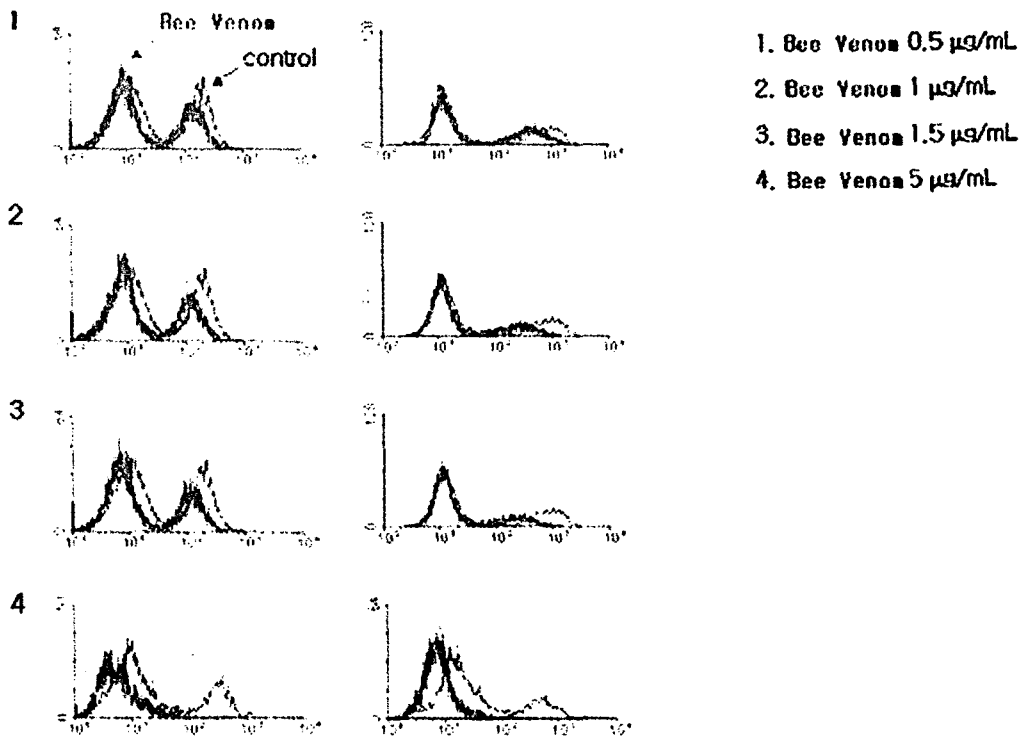


Fig. 5. The effects of Bee Venom on the LPS-induced expression of H₂O₂ in cultured RAW 264.7 cells. What the first peak moves the left, and the second peak lowers means the decrease of H₂O₂.

4. 蜂毒 處置後 時間別 H₂O₂ 測定

蜂藥鍼液의 時間別 H₂O₂ 生成量에 미치는 影響을 알아 보기 위해 濃度別로 變化시켜 實驗한 結果, 濃度 依存的으로 H₂O₂ 生成을 抑制하는 效果가 있었다. (Fig. 5.)

5. MTS Assay로 細胞 毒性을 測定

炎症媒介因子인 IL-1에 미치는 影響을 알아보기 위해 서, IL-1에 特定한 D10S 細胞에서 蜂藥鍼液의 影響을 研究하기 以前에 우선 MTS assay로 蜂藥鍼液의 細胞 毒性을 알아보기 위하여, 1, 10, 50 및 100 μ g/ml의 濃度의 變化를 주어 관찰한 바 細胞에는 毒性이 없음을 살 필 수 있었다. (Fig. 6.)

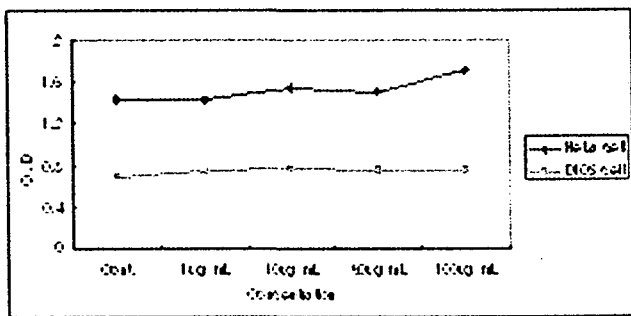


Fig. 6. The effects of Bee Venom on cytotoxicity by MTT assay. Bee venom on cytotoxicity does not effect all the D10S cells and Hera cells.

6. 蜂藥鍼液이 D10S 細胞에서 IL-1에 미치는 影響

蜂藥鍼液이 D10S 細胞에서 IL-1에 미치는 影響을 알아 보기 위해서, MTS assay를 利用하여 蜂藥鍼液을 5, 10, 15, 20, 및 25 μ g/ml의 濃度로 處理한 바, IL-1의 有意한 抑制效果가 없었다. (Fig. 7)

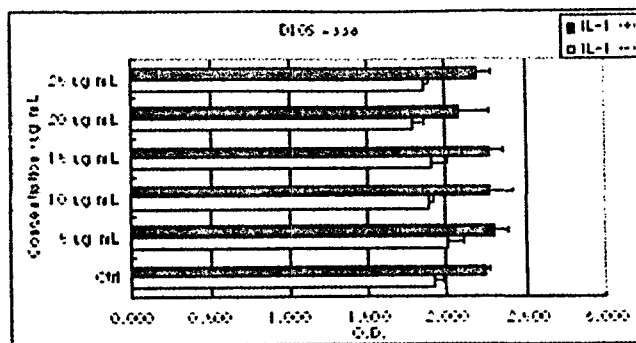


Fig. . The effects of Bee Venom on the LPS-induced expression of IL-1 in cultured D10S cells.

IV. 考 察

蜂藥鍼療法은 꿀벌의 毒囊에 들어 있는 蜂毒을 抽出, 加工하여 疾病과 有關한 部位 및 穴位에 注入함으로 써 刺鍼效果와 蜂毒의 生化學的 特異物質이 人體에 미치는 藥理作用을 同時에 利用하여 生體機能을 調整하고 病理狀態를 改善시켜 疾病을 治療하고 豫防하는 藥鍼療法의 일종이다¹⁾.

蜂毒의 利用은 紀元前 2000年경의 이집트 파피루스 文書에 벌침이나 죽은 벌을 아픈 곳에 직접 비벼 치료 했다는 기록이 남아 있고, 紀元前 168年에 매장된 中國 長沙 馬王堆 3號 漢墓에서 出土된 醫書에서도 蜂毒을 이용한 2例의 기록이 실려 있다²⁾.

蜂毒의 性味는 苦·辛·平·大熱·有毒하고 enzyme, peptide, phylogically active amines, nonpeptide 등 分類 되어 약 40여 가지의 性分으로 構成되어 있다³⁾. 蜂藥鍼療法은 藥鍼療法과 더불어 人體의 經穴에 物理的인 刺戟뿐만 아니라 化學的인 刺戟을 加한 治療法으로 痛症, 炎症性 疾患이나 류마티스 關節炎과 같은 自家 免疫系 疾患에도 效果가 있는 것으로 報告되고 있다^{3,4)}.

蜂藥鍼에 대한 研究는 Dr. Rucumkis의 蜂毒의 RA 및 gout에 대한 效果 및 Dr. Philp의 蜂鍼과 RA의 特異的 關係에 대하여⁵⁾, 李 等⁶⁾이 생쥐의 LPS 誘發 關節炎에 蜂毒藥鍼을 施術한 後 補助 T淋巴球, 細胞毒性 T淋巴球, 大食細胞, NK細胞, ICAM-1, VCAM-1, IL-1 β , IL-2R에 대한 細胞性 免疫反應의 結果를 比較하여 有

效性을, 都等¹⁵⁾은 LPS로 關節炎을 誘發시킨 mouse로 關節炎을 誘發시킨 mouse의 血液內 白血球數와 好中球, 림프구 및 單核球의 比率을, 黃等¹⁴⁾은 류마티드 關節炎 患者의 蜂毒治療 前後 CRP, ESR, RA factor와 患者의 滿足度, 改善指數의 測定比較를 통해 蜂毒藥鍼의 有效性을, 都等⁶⁾은 흰쥐의 膝關節 炎症性 浮腫에서 白血球數, 赤血球數, Hematocrit置, ASO titer를 報告하였다.

이에 研究者는 蜂藥鍼液이 Raw 細胞에서 細胞毒性 및 炎症媒介因子에 미치는 影響을 安全性과 有效性 側面에서 研究를 하기 위해, 蜂藥鍼液이 NO에 미치는 影響을 MTT assay로 分析, H2O2의 形成度 測定, D10S 細胞에서 IL-1에 미치는 影響을 MTS assay로 分析하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

NO는 腦虛血 상태에서 iNOS에 의해 生成되어 COX-2 活性을 促進시키는 物質로 腦虛血이나 關節炎에 있어 毒性을 가지고 IL-1/TNF에 의해 骨吸收에 關여한다²⁰⁾. 고수준의 NO는 骨골전구체 細胞死를 일으켜 骨吸收를 抑制하고 성숙한 破骨細胞의 活性을 저해하는 동시에 造骨細胞의 增殖을 抑制하는 作用을 하는데 關節炎이나 骨多孔症에서 많이 增加²⁰⁾하며 arginine에서 NO를 生成시키는 酸素인 iNOS 또한 關節炎에서 많이 增加되어 있다²¹⁾.

本 實驗에서 蜂藥鍼液이 血液內의 強力한 炎症 誘發原因인 NO의 合成을 抑制하는지 確認하기 위해 LPS를 投與하여 NO를 측정한 결과 蜂藥鍼液 處理群이 3時間에는 5 μg/ml에서, 6, 12時間, 3日에는 全 試驗群에서 1, 2日에는 1, 5 μg/ml에서 對照群에 비하여 有意한 抑制를 보였으며, 이는 아마도 NO의 形成과 關계되는 COX-2와 iNOS의 發顯에도 影響을 주는 것으로 思料된다.

H2O2는 細胞 培養液과 실제 體內에서 細胞 壞死를 誘發한다고 알려져 있으며, 過酸化 래디칼(super oxide radical)에 의한 酸化는 송과선에서 神經退化(neurodegeneration)에 重要한 因子가 될 수 있는 毒性 物質을 生成한다는 점이 報告되어 왔으나²²⁾, 기존의 報告는 過酸化物質에 의해 誘導된 細胞 壞死의 豫防에 대해서는 아무런 情報를 제공하지 못하였다²³⁾. 이는 發達의 正常的인 過程이고 發病과 關連된 細胞 壞死의 形態學的으로 特徵的인 樣相이며 自家免疫 障礙, 癌, 腦卒中和 腦退行性 疾患과 같은 여러가지 疾患의 病態生理에 關連되어 있다²⁴⁾.

Free radical은 電子를 充分히 채우고 있지 못하기 때문에 一般的으로 매우 反應性이 강한 化學 物質이며 H2O2, NO, super oxides 등과 같이 反應性이 강한 ROS는 正常 狀態에서도 作動하지만 老化, 癌, 虛血性 損傷과 關節炎, 알츠하이머病과 같은 다양한 疾患의 病因이라고 알려져 왔으며, free radical과 細胞 壞死의 關係는 多樣한 疾患의 病態生理學과 生理學的인 現象에서 매우 重要한 役割들을 遂行한다고 알려져 있다²⁵⁾.

本 實驗에서는 蜂藥鍼液이 apoptosis을 誘發시키는 H2O2의 形成을 억제하는지 확인하기 위해 Raw 細胞로 37°C에서 LPS 및 蜂藥鍼液을 0.5, 1, 1.5 및 5 μg/ml로 處理한 뒤 FACS analysis로 細胞內 ROS level를 測定하였는데, 蜂藥鍼液 濃度 依存的으로 減少하였음을 알 수 있었다.

IL-1(interlukin-1)은 cytokine의 代表的인 物質中 하나로서 주로 macrophage에서 生成되어 發熱과 炎症 등에 關여하며 IL-1α 와 IL-1β의 두가지 形態가 있고, T cell, B cell 같은 免疫 세포를 활성화시키고, 또한 好中球, lymphocyte, monocyte, fibroblast를 增殖시키고 滑膜의 collagenase 生産을 촉진시킴으로써 關節 軟骨의 破壞를 招來하여 류마티스 關節炎을 일으키는 重要한 媒介物質이다.

IL-1와 류마티스 關節炎의 關係는 軟骨 細胞에서 발현되는 ICAM-1이 IL-1을 비롯한 각종 cytokine에 의하여 發顯이 顯著히 增加되었다는 報告²⁶⁾, 關節炎 患者의 滑液에서 生物學的으로 活性化된 IL-1 類似 物質이 있었다는 報告²⁷⁾, 류마티드 關節炎 患者의 血液內에 IL-1의 量이 性狀에 비하여 有意하게 높아져 있었다는 報告²⁸⁾등으로 알 수 있다.

류마티스 關節炎에서 IL-1β는 癒着分子(ICAM-1, VCAM 等等)의 生成을 促進시켜 白血球의 細胞 浸潤을 增加시키며 T 淋巴球의 機能을 活性化시켜 關節炎이 發生된 關節軟骨의 組織을 損傷 破壞시키므로 IL-1β를 抑制 또는 遮斷하면 류마티스 關節炎이 好轉된다고 알려져 있다.

本 實驗에서는 蜂藥鍼液이 IL-1을 有意하게 抑制하는 效果가 보이지는 않았다.

이상으로 보아 蜂藥鍼液이 炎症媒介因子인 NO, H2O2의 形成을 抑制함을 알 수 있었고, IL-1의 抑制에는 有意한 效果를 나타내지 않았음을 알 수 있었고, 向後 蜂藥鍼液이 IL-4, IL-6 등 다른 炎症媒介因子에 미치는 效果를 알아보기 위한 追加的인 實驗과 研究가 持續

의으로 이루어져야 할 것으로 思慮된다.

V. 結 論

蜂藥鍼液이 Raw 264.7 細胞에서 細胞毒性 및 炎症媒介因子에 미치는 影響을 究明하기 위하여, LPS와 蜂藥鍼液을 濃度別로 處理하여 炎症을 誘導하는 媒介物質인 NO에 미치는 影響을 MTT assay로 分析, H₂O₂에 미치는 影響을 FACS analysis로 細胞內 ROS level를 測定, D10S 細胞에서 IL-1에 미치는 影響을 MTS assay로 分析하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. NO 觀察에서 蜂藥鍼液 處理群이 3 時間에는 5 μ g/ml에서, 6, 12 時間, 3 日에는 全 試驗群에서, 1, 2 日에는 1, 5 μ g/ml에서 對照群에 비하여 有意한 抑制를 보였다.
2. H₂O₂ 觀察에서 蜂藥鍼液 處理群은 對照群에 비하여 濃度 依存的으로 H₂O₂ 生成을 抑制하였다.
3. IL-1 觀察에서 蜂藥鍼液 處理群은 對照群에 비하여 有意한 抑制 效果를 보이지 않았다.

參 考 文 獻

1. 권기록. 봉침에 대한 고찰. 대한침구학회지. 1994;11(1):160.
2. Barbara Rudolf. Chemistry and Pharmacology of Honey Bee Venom. Academic Press. 1986:329-402.
3. 권기록. 봉독요법의 류마티스성 관절염 치료에 대한 임상적 연구. 전국한의학학술대회지. 1998: 130-131.
4. 권기록, 고희균. 염좌후유증에 대한 봉약침요법의 임상응용. 대한 약침 학회지. 1996;Vol2: No.1:1-12.
5. 고희균. 봉독침요법이 항염, 진통 및 해열에 미치는 효능에 관한 실험적 연구. 대한한의학학회지. 1992;13(1):283-292.
6. 도원석, 장준혁, 김경호 외 2인. 봉독요법이 흰쥐의

- 슬관절 염증성부종에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1995;12(1):211-220.
7. 공현숙, 고희균, 김창범. 봉침독 요법이 항경련에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1993;10(1): 159-165.
8. 이종석, 고희균, 김창환. 약침용 봉독액의 안전성 평가에 관한 연구. 대한침구학회지. 1994; 11(1):177-198.
9. 이경희. 산지별 봉독액 약침자극이 면역기능저하에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 1999.
10. Assem ES, Atkinson G. Histamine release by MCDP, a peptide from the venom of the honey bee. Brit. Pharmacol. 1973; 337-338.
11. Habermann E. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In Venomous Animals and their Venoms. Academic Press. 1971;3:61.
12. 왕오호, 안규범, 임진강 외 2인. 퇴행성 슬관절염의 봉독약침 치료효과에 대한 임상적 고찰. 대한침구학회지. 2001;18(3):35-47.
13. 김지훈, 이재동. 슬관절염에 대한 봉독약침의 임상적 고찰. 대한침구학회지. 1999;16(3):25- 36.
14. 황유진, 이견목, 황우준 외 5인. 봉약침을 이용한 류마티오이드 관절염의 임상적 연구. 대한침구학회지. 2001;18(5):33-42.
15. 도원석, 김경호, 김갑성. 유근피 계지 우슬 봉독 및 우황 응담 사향 복합제제 약침이 mouse의 LPS 유발 관절염의 혈액학적 변화에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001;18(1):157-69.
16. 이승덕, 김갑성. 우슬 및 봉독약침이 생쥐의 LPS 유발 관절염의 세포성 면역반응에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999;16(3):287-315.
17. Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. Science. 1981; Apr 3:212 (4490):56-8.
18. 인창식, 고희균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록:마왕퇴의서의 봉독요법 2예. 대한침구학회지. 1998;15(1):143-147.
19. 김지영, 고희균 외 4인. 봉독요법의 최신 연구 동향에 대한 고찰. 대한침구학회지. 1997;14(2).
20. van't Hof RJ, Hocking L, Wright PK 외 1인. Nitric oxide is a mediator of apoptosis in

- the rheumatoid joint. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39(9):1004-8.
21. Mapp PI, Klocke R, Walsh DA 외 4인. Localization of 3-nitrotyrosine to rheumatoid and normal synovium. *Arthritis Rheum*. 2001 ;44(7):1534-939.
22. Wrona MZ, Dryhurst G. Oxidation of serotonin by superoxide radical: implications to neurodegenerative brain disorders. *Chem Res Toxicol*. 1998;11:639-50.
23. Woodle ES, KulKarni S. Programmed cell death, Transplantation. 1996;66:681-91.
24. DiPietrantonio AM, Hsieh T, Wu JM. Activation of caspase-3 in HL-60 cells exposed to hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Comm*.
25. 서정철, 이재동, 박동석 외 7인. 자하거 약침액이 과산화수소로 유발된 송과선 세포의 apo- ptosis에 대한 보호효과. 대한침구학회지. 2001; 18(3):69-78.
26. 송관규 외. 배양된연골세포에서 각종 cytokine 과 성장인자가 β 1-integrin 및 ICAM-1의 발현에 미치는 영향. 대한류마티스학회지. 1995; 2(1):69-81.
27. Wood DD, Ihrie EJ, Dinarello CA 외 1인. Isolation of an interleukin-1 like factor from joint effusion. *Arthritis Rheum*. 1983;26:975.
28. Fontana A, Hengartner H, Weber E 외 3인. Interleukin-1 activity in the synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 1982;2:49.