

원저

蜂毒 藥鍼液이 炎症 및 痛症 關聯 遺傳子 發現에 미치는 影響

정혜윤 · 고흥균

경희대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The effects of Honey Bee Venom for Aqua-acupuncture on Expression of Genes Related with Inflammation and Pain

Hye-Yoon, Jeong · Hyung-Kyun, Koh

Department of Acupuncture & Moxibustion,
College of Oriental Medicine, Kyun-Hee University

Objective : To study anti-inflammatory, analgesic effect and molecular biological mechanism of honey bee venom for aqua-acupuncture, human mast cell line(HMC-1) and human glioma cell line(HS683) were treated with bee venom.

Methods : Cell viability of bee venom was tested by 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. To explore whether anti-inflammatory, analgesic effects of bee venom are associated with the control of gene expression, quantitative RT-PCR analysis of inflammation and pain related genes was performed.

Results : The MTT assay demonstrated that cell viability was not decreased by treatment with 10-9 ug/ml bee venom in comparison with 10-2, 10-3, 10-4, 10-5, 10-6, 10-7, 10-8, 10-9, 10-10 and 10-11 ug/ml. sPLA2 and COX-1 were down-regulated by treatment with 10-9 ug/ml bee venom in HS683 Cell line in comparison with control. COX-2 was up-regulated by treatment with 10-9 ug/ml bee venom in HS683 Cell line and HSP-2 was up-regulated by treatment with 10-9 ug/ml bee venom in HMC-1 Cell line in comparison with control. sPLA2, COX-1 and COX-2 showed no significant

- 접수 : 2002년 3월 24일 · 수정 : 5월 7일 · 채택 : 2002년 5월 18일
- 교신저자 : 고흥균, 서울시 동대문구 회기동 1번지, 경희대학교 한의과 대학 침구학 교실
(Tel. 02-958-9194) E-mail : koh5795@chollian.net

regulation in HMC-1 Cell line and cPLA2 also showed no significant regulation in both HMC-1 and HS683 Cell line between control and bee venom treated group.

Key words : Bee Venom, Inflammation, Aqua-acupuncture, pain, Gene

I. 緒 論

蜂毒藥鍼療法이란 經絡學說의 원리에 의하여 꿀벌의 독낭에 들어있는 蜂毒을 추출, 가공한 후 질병과 유관한 부위 및 穴位에 주입함으로써 자침 효과와 蜂毒의 생화학적 藥理作用을 동시에 이용하여 생체의 機能을 조정하고 병리상태를 개선시켜 疾患을 치료하거나 예방하는 新鍼療法の 일종이다.

1990年代 以後 國內에서 蜂毒藥鍼에 關한 研究가 활발히 進行되고 있어 鎮痛,¹⁾ 消炎, 鎮痙, 安定性 檢査, 免疫機能 增強作用²⁾ 등이 報告되었고, 外國에서는 Barbara와 Habermann 등에 의해 蜂毒의 生化學的 成分 및 藥理作用 등이 報告되었다. 최근에도 蜂毒에 關한 실험을 통하여 항종양 효과^{3, 4)}가 보고되었고, 실험기기가 발달함에 따라 그 성분도 더 자세히 밝혀지고 있다.^{5, 6)} 특히 통증이나 염증과 관련된 蜂毒의 연구로는 Jaw Opening Reflex,⁷⁾ Writhing reflex,⁹⁾ 脊髓內¹⁰⁾ 또는 대뇌피질의 단백질에 미치는 影響⁸⁾ 등으로 세포 수준이나 RNA 단계가 아닌 동물실험 위주로 많이 진행되어 왔다. 임상에서도 蜂毒약침은 퇴행성 관절염¹¹⁾같은 통증 관련 질환 위주로 많이 응용되고 있으며 이에 대한 임상 보고^{12, 13, 14)}도 꾸준히 증가하고 있다. 이와 같이 임상에서 활용되고 있는 각종 蜂毒 약침액의 효능에 관해서는 실험적 연구가 있었으나 아직까지 蜂毒의 세포 수준에서의 연구 보고가 많지 않고 또

한 蜂毒의 통증 및 염증 관련 유전자들에 대한 연구가 적은 실정이다.

인간 게놈프로젝트가 1990년부터 진행되어 2001년 전세계에 발표된 후, 현재 유전자 연구는 암, 유전병, 만성질환, 약재내성 등을 진단하고 검색하는데 활용되고 있다. HLA B-27은 강직성척추염의 진단에 이용되는 대표적인 유전자이다. 그러나 현재까지 대단위 연구과제가 암에 대한 연구로 치우쳐 있어 C-fos유전자에 대한 연구^{9, 10)}가 있었으나 유전자와 통증과의 상관관계는 상대적으로 심도 있게 연구되지 않았다. 향후 사람에 호발하는 질환으로 암, 정신계 질환, 심혈관계 질환 뿐만 아니라 면역성 질환이나 통증 관련 질환에도 유전학적 연구가 많이 활용되리라고 예상되고 있다.

이에 저자는 蜂毒 약침액이 통증이나 염증 관련 유전자에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 세포주 실험을 통하여 확인하고자 하였다. 따라서 본 실험에서는 2개의 세포주, 즉 human mast cell line (HMC-1, 비만 세포주)과 human glioma cell line (HS683, 교종 세포주)를 선정하여 蜂毒 약침액을 처치한 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 反應實驗을 施行하여 細胞活性度의 變化를 관찰한 후, 여러 가지 염증 및 통증 관련 遺傳子의 mRNA 發顯 樣相을 관찰하기 위해 RNA를 추출하고 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 利用하여 分析하였던 바 有意한 結果를 얻었기에 이를 報告하는 바이다.

II. 實驗

1. 實驗 재료

1) 세포주

실험에 사용한 human mast cell line(HMC-1)은 사람 비만 세포주로 mast cell leukemia 환자로 부터 유래되었으며, c-kit 수용체를 발현하며 IgE에 대한 FcεRI이 결핍된 세포주로 염증과 알러지 실험에 유용한 세포주이다. 또한 human glioma cell line(HS683)은 신경계 질환 관련 연구에 있어 매우 유용한 세포주이며 서울대학교 세포주 은행에서 구입하였다.

2) 시약

배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM), fetal bovine serum(FBS) 등은 GibcoBRL (USA)에서 구입하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)은 Roche(Germany)에서, reverse transcriptase은 Promega(USA), RNazol B는 Tel-Test(USA)에서 구입하였고, 일반 시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

2. 實驗방법

1) 세포배양

실험에 사용한 HMC-1은 10% FBS가 포함된 IMDM 용액에, HS683은 10% FBS가 포함된 DMEM 용액에 배양하고 두 세포주 모두 5% CO₂, 95% 공기, 37℃ 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였고, 배양액은 2일마다 교환하였다.

2) 실험용 봉독의 처치

실험에 사용한 봉독은 crude honey bee venom으로 Sigma(USA)에서 구입하여 使用하였으며 실험 목적에 따라 加 工한 乾燥蜂毒에 증류수로 농도별로 희석하여 사용하였다. 먼저 플라스크의 約 50~60% 面積을 차지하도록 細胞를 培養하였다.

본 연구에서는 우선 HMC-1과 HS683에서 봉독의 세포 독성이 있는 농도를 알아보고자 각각의 실험군에서 봉독을 최종 농도가 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹ ug/ml가 되도록 24시간 동안 처치하고 대조군에서는 봉독을 처치하지 않았다.

3) MTT-based cytotoxicity assay

봉독의 각 세포주에 대한 농도에 따른 세포독성을 측정하기 위하여, 세포배양에서 생존하는 세포의 수를 측정하는 방법으로 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 작용을 이용한 MTT 실험을 하였다. ELISA reader로 595nm에서 측정한 흡광도(optical density, 이하 OD)의 값은 살아있는 세포의 수를 반영하며 세포 독성의 판정은 다음의 산출식에 따라 % viability로 나타났다.

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

MTT assay 방법은 회사의 protocol을 따랐다. 먼저 각 세포를 96 well plate (Corning, USA)에 well당 2×10⁴의 세포수가 되도록 분주하고 배양액 100 ul를 첨가하였다. 검액으로 봉독을 24시간동안 농도별로 처치하였고 봉독을 처치하지 않은 세포군을 대조군으로 하였다. 그 후 각 well에 MTT labeling reagent 용액을 10 ul 가하여 빛에 노출되지 않게 알루미늄 호일로 덮은 후 4시간 동안 배양하였다. Solubilization solution을 100 ul 첨가한

후 24 시간 배양 후 ELISA reader (Bio-Tek, USA)로 595 nm에서 측정하였다. 대조군의 세포활성도는 산출식에 의해 100%로 산출하였다.

4) RNA 분리

HMC-1과 HS683 세포를 homogenization시키기 위하여 약 10^7 세포에 RNazol B 0.5 ml를 첨가하였다. Chloroform을 1/10 volume을 가하고 15초 동안 잘 혼합한 다음 얼음에 5분간 방치하였다. 12,000 x g에서 15분 동안 원심분리하고 상층액을 취하여 같은 양의 isopropanol을 가한 후 4°C에서 15분간 방치하였다. 12,000 x g에서 15분 동안 원심분리 한 후 total RNA를 추출하였다. RNA 농도의 측정은 260/280 흡광도로 측정하였다. 필요한 경우 DNA를 제거하기 위하여 DNase-1을 처리하였다.

5) RT-PCR(reversetranscription-polymerase chain reaction)

세포로부터 total RNA를 분리하고, 분리한 RNA에 reverse transcriptase(역전사효소)를 넣어 cDNA를 만든 후, 필요한 유전자 cDNA의 일부분을 증폭하기 위한 primer를 이용하여 PCR을 시행하여 cDNA의 일부를 대량으로 증폭하였다. 실험방법은 total RNA 1 ug에 oligo dT primer 또는 random hexamer를 2 ul 넣어 65°C에서 10분간 반응시킨 후에, AMV 역전사효소 1 ul, RNasin 1 ul, 10 mM dNTP 5 ul, 10 x buffer 4 ul, 50 mM MgCl₂ 및 탈이온수를 첨가하여 총 용량을 40 ul로 하여 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 형성케 하였다. PCR은 PCR 자동화기계(Perkin Elmer 9600)에서 template로 희석한 cDNA 1 ul, Taq polymerase 2 unit, 2.5 mM dNTP 1 ul, sense primer 10 pmole 1 ul, antisense primer 10 pmole 1 ul, 10 x buffer 3 ul 및 탈이온수를 첨

가하여 총 30 ul로 하며, 94°C에서 5분간 1회, 94°C에서 30초, 54°C - 63°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 반응시키고, 72°C에서 5분간 1회 시행한 후 1-2% 한천 겔에서 전기 영동하였다. 또한 필요한 경우 85°C에서 RNA만 반응하는 원리를 이용한 mRNA Selective PCR kit (TaKaRa, Japan)를 사용하였고, PCR의 최적 온도 조건을 결정하기 위하여 gradient PCR system(Eppendorf, Germany)을 이용하였다. Internal standard(house keeping gene)로는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자 cDNA의 일부분을 같은 방법으로 증폭하였다. 염증 및 통증 관련 유전자는 40-45회 증폭하였으며 GAPDH 유전자는 24회 증폭하여 유전자 발현정도를 보정하였다. 또한 genomic DNA나 다른 spliced mRNA가 증폭되는 현상을 방지하기 위하여 적어도 1개의 intron이 포함하게 하였다.

6) 염증 및 통증 관련 遺傳子의 primer 고안

본 실험에서는 염증 및 통증 관련 遺傳子로서 secretory phospholipase A2 (sPLA2), cytosolic phospholipase A2 (cPLA2), cyclooxygenase-1 (COX-1), cyclooxygenase-2 (COX-2), human substance P-1 (HSP-1), human substance P-2 (HSP-2) 등 6종을 관찰하였으며 각각의 primer는 Genbank에 등록된 염기서열을 참고하여 제작하였다.

7) 통계학적 분석

모든 실험값은 평균값±표준오차(mean±standard error)로 하고, 통계학적 분석은 SAS(Statistic Analysis System) program을 이용하였고, Student's t-test를 실시하여 각 군간의 통계학적 유의성을 검정하였다.

III. 實驗成績

1. MTT 세포 독성 實驗

1) Human mast cell line(HMC-1)에서 봉독의 세포 활성에 미치는 효과

HMC-1 세포주에 24시간 동안 봉독을 농도별로 처리한 결과 10^{-2} ug/ml에서는 $88.7 \pm 3.5\%$, 10^{-3} ug/ml에서는 $84.5 \pm 4.7\%$, 10^{-4} ug/ml에서는 $87.8 \pm 3.9\%$, 10^{-5} ug/ml에서는 $81.6 \pm 4.1\%$, 10^{-6} ug/ml에서는 $89.4 \pm 3.8\%$, 10^{-7} ug/ml에서는 $87.4 \pm 5.2\%$, 10^{-8} ug/ml에서는 $91.8 \pm 4.9\%$, 10^{-9} ug/ml에서는 $98.4 \pm 5.3\%$, 10^{-10} ug/ml에서는 $97.6 \pm 4.4\%$, 10^{-11} ug/ml에서는 $95.4 \pm 5.2\%$ 의 세포 활성도를 나타냈다.

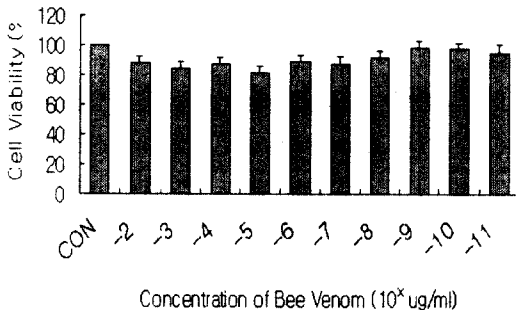


Figure 1. The Effect of Various Concentrations of Crude Honey Bee Venom on Cell Viability of Human Mast Cell Line(HMC-1) for 24 hours.

2) Human glioma cell line(HS683)에서 봉독의 세포 활성에 미치는 효과

HS683 세포주에 24시간 동안 봉독을 농도별로 처리한 결과 10^{-2} ug/ml에서는 $89.7 \pm 2.4\%$, 10^{-3} ug/ml에서는 $81.5 \pm 5.6\%$, 10^{-4} ug/ml에서는 $86.8 \pm 4.2\%$, 10^{-5} ug/ml에서는 $86.7 \pm 2.8\%$, 10^{-6} ug/ml에서는 $86.2 \pm 2.1\%$, 10^{-7} ug/ml에서는 86.8

$\pm 5.9\%$, 10^{-8} ug/ml에서는 $90.7 \pm 3.8\%$, 10^{-9} ug/ml에서는 $99.5 \pm 4.1\%$, 10^{-10} ug/ml에서는 $100.5 \pm 3.6\%$, 10^{-11} ug/ml에서는 $89.4 \pm 4.9\%$ 의 세포 활성도를 나타냈다.

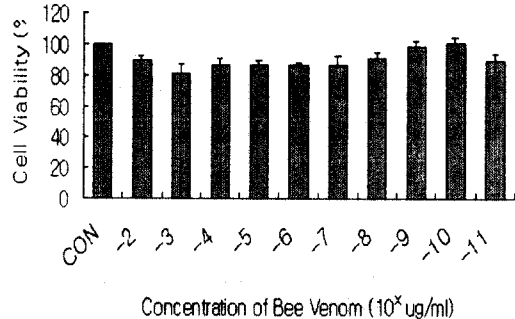


Figure 2. The Effect of Various Concentrations of Crude Honey Bee Venom on Cell Viability of Human Glioma Cell Line(HS683) for 24 hours.

2. 염증 및 통증 관련 遺傳子 mRNA의 발현

봉독의 염증 및 통증 관련 遺傳子에 대한 효과들을 관찰하기 위해 배양세포에 봉독을 처리한 후 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 봉독의 농도는 MTT 실험결과상 세포독성을 유발하지 않는 농도가 되도록 10^{-9} ug/ml으로 선정하였다.

1) sPLA2, cPLA2 mRNA의 발현

sPLA2의 경우 human mast cell line(HMC-1)에서는 대조군과 봉독처리군 모두 강하게 발현되었으나 유의한 차이는 없었다. Human glioma cell line(HS683)에서는 대조군에서는 강하게 발현되었으나 봉독처리군에서는 거의 발현되지 않을 정도로 억제되었다(Figure 3).

HMC-1	HS683
대조군 10^9	대조군 10^9



Figure 3. Expression of sPLA2 mRNA in HMC-1 and HS683 cells.

cPLA2의 경우 HMC-1와 HS683 모두 대조군과 봉독처치군에서 거의 발현되지 않았다.

2) COX-1, COX-2 mRNA의 발현

COX-1의 경우 HMC-1에서는 대조군과 봉독처치군 모두 발현되었으나 특별한 차이는 없었다. HS683에서는 대조군에서 발현되었으나 봉독처치군에서는 발현이 억제되었다(Figure 4).

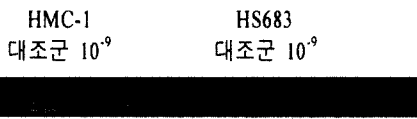


Figure 4. Expression of COX-1 mRNA in HMC-1 and HS683 cells.

COX-2의 경우 HMC-1에서는 대조군과 봉독처치군 모두 발현되지 않았다. HS683에서는 대조군에서는 발현되지 않았으나 봉독처치군에서는 발현되었다(Figure 5).

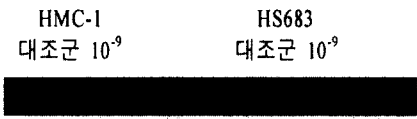


Figure 5. Expression of COX-2 mRNA in HMC-1 and HS683 cells.

3) HSP-1, HSP-2 mRNA의 발현

HSP-1의 경우 HMC-1과 HS683 모두 대조군과 봉독처치군에서 각 isoform들이 미약하게 발현되었으나 각 isoform들의 발현은 비교하기 어려웠다.

HSP-2의 경우 HMC-1에서는 대조군에서는 약하게 발현되었으나 봉독처치군에서는 발현이 증가되었다. HS683에서는 대조군과 봉독처치군 모두 발현되었으나 유의한 차이가 없었다(Figure 6).

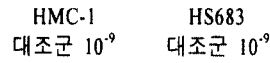


Figure 6. Expression of HSP-2 mRNA in HMC-1 and HS683 cells.

VI. 考 察

蜂毒이란 꿀벌의 毒囊에 들어있는 약 40여 가지의 有效成分으로 構成된 物質로 炎症, 알러지 등을 誘發하는 作用이 있으나 臨床에서는 鎮痛, 解熱, 消炎, 鎮痙 및 免疫 增強 등의 效能이 있는 것으로 알려져 있다. 蜂毒의 成分은 크게 peptide components, non peptide components, enzymes으로 構成되어 있다. Peptide components는 Freeze-dried venom의 약 50%를 構成하고 있으며, 主要成分으로는 apamin, MCD peptide, melittin 등이 있다.

이에 著者は human mast cell line(HMC-1, 비만 세포주)과 human glioma cell line(HS683, 교종 세포주)을 선정하여 蜂毒 藥鍼液을 處理한 後, MTT 反應實驗을 한 결과 10⁻⁹ ug/ml 봉독농도에서 세포활성도의 감소가 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 또한 봉독 약침이 진통작용에 있어서 어떤 영향을 미치는지와 그 기전을 分子生物學적으로 分析하고자 염증 및 통증에 關聯한다고 알려진 여러 關聯 遺傳子의 mRNA 發顯 樣相을 관찰하기 위해 RT-PCR을 利用하여 分析하였다.

염증이 일어나는 과정은 감염성 물질(infectious agents), 허혈(ischemia), 항원-항체 반응, 열 또는 다른 신체적인 상처 등과 같은 수많은 자극에 의하여 유도되는 일련의 반응을 수반한다. 염증반응에는 홍반(erythema), 부종(edema), 압통

(tenderness), 통증 등의 임상증상이 나타나며 각각의 다른 기전에 의해 매개되는 명확한 세 단계로 일어나게 된다. 첫째, 국소적인 혈관확장(vasodilatation)과 모세혈관 투과성 증가가 특징인 급성, 일과성 단계(acute transient phase), 둘째, 백혈구(leukocytes)와 식세포성 세포(phagocytic cells)의 침윤이 특징인 지연성, 아급성 단계(delayed, subacute phase), 셋째, 조직변성(tissue degeneration)과 섬유화(fibrosis)가 일어나는 만성, 증식성 단계(chronic proliferative phase)로 일어난다. 그 외 많은 다른 기전들이 염증반응의 과정에 수반된다.¹⁸⁾ 염증 소견 중 redness와 heat는 혈류량의 증가 때문이고, swelling은 vascular permeability의 증가 때문이며, pain은 primary afferent nerve fibers의 activation과 sensitization 때문이다.

통증은 매우 복잡하고 사적인 현상이다. 통증이란 추상적이고 주관적인 개념으로 개인적이고 사적인 통감, 현재 또는 임박한 조직손상을 알려주는 유해한 자극, 인체가 손상 받지 않게 보호하려는 반응 형태를 포함한다. 여러가지 사회, 심리적 요인이 통증에 영향을 미치고 통증경험이 매우 주관적이며 또한 임상적 통증을 타당하게 측정하는 도구가 부족하기 때문에 통증을 한마디로 정의하기란 어려운 일이다. 사람이 pain에 반응하는 정도는 매우 다르다. 이는 brain 자체의 pain control system (analgesia system)이 pain signal input을 suppressing하는 능력에서 오는 것이다.¹⁹⁾

염증 및 통증에 관여한다고 알려진 prostaglandin이 생성되는 기전은 세포내 calcium을 증가시키면 phospholipase A2를 활성화시켜 세포막의 인지질(phospholipid)로부터 arachidonic acid를 생산하고 이러한 세포내 arachidonic acid는 cyclooxygenase(COX)에 의하여 prostaglandin을 생산한다. Phospholipase A2는 인간에게 염증성 질병을 유발시키는 효소로 알려져 있어 이의 효과적인 저해제는 치료제로 개발될 수 있다.

Phospholipase A2는 membrane에 존재하는 phospholipid의 sn-2 acyl ester 결합을 가수분해하여 free fatty acid와 lysophospholipid를 생성하는 효소로서 생체 내에서 다양한 생리작용에 관여하고 있다. Phospholipase A2의 분해 산물인 lysophospholipid는 platelet-activating factor(PAF)의 전구물질이며, free fatty acid중에서 arachidonic acid는 세포내에서 COX와 lipoyxygenase의 작용을 받아 prostaglandin, thromboxane, leukotriene으로 변환되며 이러한 eicosanoid들은 배란, 혈소판 응집, 신장 수분평형 및 면역작용 등을 포함하는 다양한 생리기작에 관여한다.

Phospholipase A2는 생체내에서 크게 분비형(secretory form)과 세포질형(cytosolic form)으로 나누어지며, 또한 calcium에 의해 효소활성이 영향을 받는 성질에 따라 calcium dependent phospholipase A2와 calcium independent phospholipase A2로 나누어진다. cPLA2(cytosolic phospholipase A2)는 85-110 kD의 분자량을 가지며 인산화에 의하여 활성화되고 세포질내 칼슘 농도의 상승에 따라 세포막으로부터 부착되어 arachidonic acid를 유리한다. cPLA2는 sn-2 위치에 arachidonic acid를 포함한 기질에서 10배 정도 더 높은 친화력을 가지기 때문에 prostaglandin 합성을 포함하는 반응 촉진제에 의한 신호 전달 과정에 중요한 역할을 할 것으로 생각하고 있다. sPLA2(secretory phospholipase A2)는 14-17 kD의 작은 분자량을 가지고 있으면서 활성화를 위하여 mM 수준의 칼슘 농도를 요하며 sn-2 위치에 선택도가 뚜렷한 cPLA2와는 달리 sn-2 이외의 위치에 결합된 arachidonic acid도 유리시키는 specific activity가 보다 강력한 isoform이다.

Prostaglandin은 통증과 염증에 관여, 위장관계 점막에서 세포보호, 신장 혈류량과 기능 유지, 그리고 신체의 평형 유지 등에 매우 중요한 역할을 한다.²⁰⁾ PGE2(prostaglandin E2)는 COX 활성화에 따른 주요

산물로서 염증 질환, 자가면역질환, 그리고 종양성 질환의 병리에서 중요한 역할을 하며, 특히 염증 반응의 중요한 매개물질로 작용한다.²¹⁾ 비스테로이드성 소염제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, 이하 NSAIDs)는 COX를 억제함으로써 소염과 진통 효과를 보인다고 보고한 이후 그 작용기전에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. COX는 arachidonic acid를 불안정한 중간물(intermediate)인 PGG2(prostaglandin G2)와 PGH2(prostaglandin H2)로 변환시키며, 이 효소는 현재 COX-1과 COX-2의 두 가지 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다.²²⁾ COX-1(cyclooxygenase type 1; constitutive form)은 조직의 구성 요소이며 위장관계를 포함한 조직에 산재한다. 각 조직에서 혈류(vascular flow)의 유지, 세포분화(cell division), 점액(mucus)과 중탄산염(bicarbonate)의 생성 등에 관여하는 국소적인 prostaglandin의 양을 조절한다. 이러한 COX-1의 활성을 NSAIDs가 저해함으로써 통증은 억제하지만 위장관과 신장의 부작용 및 항혈소판 작용(antiplatelet activity)이 나타난다. 반면에 COX-2는 뇌와 신장에서 주로 발견되며 일부 염증성 세포(inflammatory cells)에서도 발견되고, 특히 염증부위에서 유도된다. 그 염증부위에서 고농도의 prostaglandin은 염증과 통증의 매개물질로서 중요한 역할을 한다. COX-1은 염증부위에서 거의 유도되지 않으므로 COX-1의 억제작용은 거의 없는 선택적인 COX-2 저해제를 고안하게 되었다. 선택적인 COX-2 저해제는 염증과 통증을 감소시킬 수 있는 반면에 COX-1에는 영향을 끼치지 않기 때문에 위장관계에는 안전한 것으로 제시된다.²³⁾ 현재 사용되는 거의 대부분의 NSAIDs는 COX-1과 COX-2를 비선택적으로 억제하거나 또는 구성요소인 COX-1에 약간의 선택성을 갖고 있는 제제들이다.¹⁹⁾ NSAIDs는 가장 흔히 처방되는 제제 중의 하나이지만, 이 NSAIDs의 사용으로 인하여 부작용이 빈번하게 발생한다. 따라서, NSAIDs의 항염증 효

과 및 진통 효과와는 비슷한 효능을 가지면서도 이러한 NSAIDs에서 흔히 나타나는 위장관 부작용은 없는 선택적인 COX type 2 저해제(selective inhibitors of COX-2)가 이미 개발되어 임상에 사용되고 있다.

Substance P(SP)는 11개의 아미노산으로 이루어진 물질로 여러 기관(타액선, 기관지, 이자, 신장, 방광, 전립선)과 신경계에 널리 분포하며, 타액의 분비와 장의 운동, 근육과 지방조직에서의 혈관이완 작용을 할 뿐 만 아니라 신경전달 물질로서 작용한다. SP는 중추신경계에서 여러 생리학적 기능을 하는 신경에서 발견되며, 말초신경계에서 C-fiber의 중추와 말초돌기에서 모두 발견된다. 한편 SP를 국부에 주입하면 혈관이완과 혈관의 투과성이 증가되고 급성염증에서 발견되는 조직의 변화가 수반되는데, 이러한 변화는 SP가 단핵구와 중성구를 자극하여 염증의 매개물질을 분비하게 하여 나타나는 결과임이 확인되었다. SP는 유해수용성 impulse의 매개체이며 동통 전도의 주요한 신경펩타이드로서 만성 염증 부위를 지배하는 감각신경에서 고농도로 발견되며 통각과민증을 유발하는 유해자극에 의해 그 분비가 증가되어 있는 것으로 알려져 있다. 면역조직화학적 연구에 의하면 SP가 척수와 뇌간의 일부 무수성 일차 감각신경세포에 존재하는 것이 확인되었다. 또한 이들 감각신경의 자극은 척수로부터 SP의 유리를 일으키며 척수에 SP를 가했을 때 흥분되는 세포는 동통 유발 자극에 의해 흥분되는 신경세포이다. 동통유발 자극은 특이적으로 무수 감각신경섬유를 활성화함이 알려져 있다. 그러므로 동통유발 자극에 대해 반응하는 무수 신경섬유에서 유리되는 흥분성 신경전도 물질이 SP라고 생각할 수 있다. 아편양 펩타이드는 SP의 방출을 억제하거나 이 물질의 시냅스 후 작용을 억제하여 진통 효과를 나타낸다.

以上的實驗結果에서 봉독이 염증 및 통증 억제에 임상에서 좋은 효과를 나타내는 것은 이와 관련된 sPLA2, COX-1의 mRNA를 발현을 억제시키는 것과 관련되며, 봉독의 임상적 진통효과는 이러한 유전자 발현의 조절과 관계 있을 것으로 사료된다. 다만 통증유발과 관련된 HSP-2, COX-2의 발현이 증가된 것은 봉독 약침을 주입할 때 느끼는 초기 통증과 관련될 것으로 보이나 더 깊은 연구가 필요하다고 사료된다. 그 외 sPLA2, COX-1 유전자는 HMC-1 세포군의 경우, cPLA2 유전자는 HMC-1, HS683 세포군의 경우, COX-2 유전자는 HMC-1 세포군의 경우, HSP-2 유전자는 HS683 세포군의 경우 등에서는 대조군과 봉독치치군 사이에 일관되고 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었고, HSP-1 유전자는 모든 세포군의 경우에 발현양상이 뚜렷하지 않았다.

그러므로 이러한 蜂毒 藥鍼液이 HMC-1과 HS683에 있어서 炎症 및 痛症 關聯 遺傳子 發現에 미치는 影響의 연구 결과는 임상에서 봉독 약침액을 염증 및 통증 환자에게 시술함으로써 치료를 피할 수 있는 기초적인 자료로 제공될 것이다. 또한 본 실험 결과가 봉독에 의한 말초성 통증과 중추성 통증의 제어 기전 연구에 기초가 될 것으로 사료된다.

V. 結論

蜂毒藥鍼液이 염증 및 통증 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HS683과 HMC-1을 蜂毒으로 處理한 後, MTT 反應實驗을 통하여 細胞活性度를 測定하였고, 염증 및 통증 關聯 遺傳子 mRNA의 定量的 RT-PCR을 施行하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MTT 반응실험 결과, 세포활성도가 가장 높은

10^{-9} ug/ml의 봉독 농도를 선정하였다.

2. sPLA2, COX-1 유전자는 HS683세포군에서 대조군에 비해 봉독치치군에서 발현이 감소 하였다.

3. COX-2 유전자는 HS683 세포군에서, HSP-2 유전자는 HMC-1 세포군에서 대조군에 비해 봉독치치군에서 발현이 증가하였다.

4. sPLA2, COX-1, COX-2 유전자는 HMC-1 세포군에서, HSP-2 유전자는 HS683세포군에서, cPLA2, HSP-1 유전자는 HMC-1, HS683세포군에서 대조군과 봉독치치군 사이에 유의한 차이가 없었다.

VI. 參考 文獻

1. 金利和, 李栽東, 盧植, 閔炳一. 흰쥐에서 合谷穴 蜂毒藥鍼刺戟에 의한 開口反射의 反應. 大韓韓醫學會誌. 1999;20(1):106-112.
2. 李京姬, 金昌煥, 姜成吉, 高炯均. 産地別 蜂毒液藥鍼刺戟이 면역기능저하에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2000;17(4):28-40.
3. 朴贊烈 外. 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.
4. 권도희, 이재동, 최도영. 약침용 봉독성분 중 Apamin, Melittin의 항암작용. 대한침구학회지. 2001.
5. 이진선, 권기록, 최호영. HPLC를 이용한 봉독 약침의주요성분에관한연구. 大韓鍼灸學會誌. 2000;17(4):120-129.
6. 이진선, 권기록, 이승배. 전기영동법을 이용한 봉독약침의 주요성분에 관한 연구. 大韓藥鍼學會誌. 2000;3(2):153-168.
7. 趙廣鎬, 이재동, 박동석, 안병철. Jaw Opening Reflex 및 RT-PCR을 이용한 봉독의 진통효과. 大韓藥鍼學會誌. 2000;3(1):

- 35-51.
8. 윤형석, 이재동. 蜂毒藥鍼 자극이 흰쥐 대뇌 피질의 뇌신경 전달물질에 미치는 영향. 大韓藥鍼學會誌. 2001;4(1):85-98.
 9. 鄭善喜, 고희균, 박동석, 이운호. 蜂毒藥鍼이 Writhing reflex 및 脊髓內痛症關聯神經細胞의 活性에 미치는 影響. 大韓藥鍼學會誌. 2000;3(1):101-118.
 10. 鄭善喜, 이재동, 고희균, 안병철, 최도영, 박동석. 蜂毒藥鍼이 脊髓內痛症關聯 神經細胞의 活性에 미치는 影響. 大韓藥鍼學會誌. 2000;17(2):153-168.
 11. 왕오호, 안규범, 임진강, 장형석. 退行性 膝關節炎의 蜂毒藥鍼 治療效果에 대한 臨床的 觀察. 大韓藥鍼學會誌. 2001;18(3): 35-47.
 12. 金志勳, 李栽東. 膝關節炎에 대한 蜂毒 藥鍼의 臨床的 考察. 大韓藥鍼學會誌. 1999;16(3):25-37.
 13. 김영호, 육태한, 송범용, 이동호. 蜂藥針을 이용한 진행성 근위축증 환자 1례에 對한 症例 報告. 大韓藥鍼學會誌. 2000;3(1): 119-140.
 14. 權奇祿, 高炯均. 捻挫 後遺症에 對한 蜂藥鍼 療法の臨床應用. 大韓藥鍼學會誌. 1999;2(1): 1-11.
 15. Lai J-P, Douglas SD, Zhao M, Ho WZ. Quantification of substance P mRNA in human mononuclear phagocytes and lymphocytes using a mimic-based RT-PCR. J Immunol Methods. 1999;230(1-2):149-157.
 16. Grauerholz BL, Jacobson JD, Handler MS, Millington WR. Detection of Pro-Opiomelanocortin mRNA in Human and Rat Caudal Medulla by RT-PCR. Peptides. 1998;19(5):939-948.
 17. 인창식, 고희균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록. 마왕퇴의서의 봉독요법 2예. 大韓藥鍼學會誌. 1998;15(1):143-147.
 18. Insel PA. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman JG, et al., eds. The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. USA: McGraw-Hill. 1996:617-624.
 19. 대한통증학회. 통증의학. 서울. 군자출판사. 2000;8-26.
 20. Cryer B, Dubois A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase—a review. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 1998;56(5-6):341- 361.
 21. Horton JK, Williams AS, Smith-Phillips Z, Martin RC, O'Beirne G: Intracellular measurement of prostaglandin E2: effect of anti-inflammatory drugs cyclooxygenase activity and prostanoid expression. Anal Biochem. 1999;271 (1): 18-28.
 22. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J. 1998;12(12): 1063-73.
 23. Kaufmann WE, Andreasson KI, Isakson PC, Worley PF. Cyclooxygenases and the central nervous system. Prostaglandins. 1997;54(3):601-24.
 24. Bjarnason I, Macpherson A, Rotman H, Schupp J, Hayllar J. A randomized, double-blind, crossover comparative endoscopy study on the gastroduodenal tolerability of a highly specific cyclooxygenase-2 inhibitor, flosulide, and naproxen. Scand J Gastroenterol. 1997; 32(2):126-30.
 25. Cameron A. Selective COX-2 inhibitors gather speed. Inpharma. 1998;1122:9-10.