

원저

## 蜂毒 藥鍼液의 細胞毒性에 關한 研究

박원 · 김용석 · 고흥균

경희대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

## The Study on the Cytotoxicity of Compounds of Bee Venom for Herb-Acupuncture

Won, Park · Yong-Suk, Kim · Hyung-Kyun, Koh

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

**Objective** : This study was undertaken to determine which compound of Bee Venom for herb-acupuncture has cytotoxicity on mouse mast cell line.

**Methods** : We compared crude bee venom and its compounds such as melittin, mast cell degranulating peptide (MCD peptide), apamin with control groups on cytotoxicity by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

**Results & Conclusion** : 1. Crude bee venom showed significant cytotoxic effect( $p < 0.01$ ) in 1 hour treatment with  $1\mu\text{g/ml}$  in comparison with control group in 1 hour treatment with low concentration of  $10\text{-}4\mu\text{g/ml}$ ,  $10\text{-}3\mu\text{g/ml}$ ,  $10\text{-}2\mu\text{g/ml}$ ,  $10\text{-}1\mu\text{g/ml}$  and  $1\mu\text{g/ml}$ , but it showed no significant cytotoxic effect in 6 hours treatment.

2. Melittin group showed no significant cytotoxic effect in comparison with control group in 1 and 6 hours treatment with low concentration of  $10\text{-}4\mu\text{g/ml}$ ,  $10\text{-}3\mu\text{g/ml}$ ,  $10\text{-}2\mu\text{g/ml}$ ,  $10\text{-}1\mu\text{g/ml}$  and  $1\mu\text{g/ml}$ .

3. MCD peptide and Apamin group showed no significant cytotoxic effect in comparison with control group in 1 and 6 hours treatment with low concentration of  $10\text{-}4\mu\text{g/ml}$ ,  $10\text{-}3\mu\text{g/ml}$ ,  $10\text{-}2\mu\text{g/ml}$ ,  $10\text{-}1\mu\text{g/ml}$  and  $1\mu\text{g/ml}$ .

4. Crude bee venom showed significant cytotoxic effect( $p < 0.01$ ) in 1 and 6 hours treatment in comparison with control group in 1 and 6 hours treatment with high concentration of  $10\mu\text{g/ml}$ ,  $20\mu\text{g/ml}$  and  $102\mu\text{g/ml}$ .

- 접수 : 2002년 2월 28일 · 수정 : 3월 13일 · 채택 : 2002년 3월 18일  
· 교신저자 : 고흥균, 서울시 동대문구 회기동 1번지, 경희대학교 한의과대학 침구학교실(Tel. 02-958-9194)  
E-mail : koh5795@chollian.net

5. Melittin group showed significant cytotoxic effect(p<0.01) in 1 hour treatment in comparison with control group in 1 hour treatment with high concentration of 10µg/ml, but it showed no significant cytotoxic effect in 6 hours treatment.

6. Crude bee venom and its compounds have more cytotoxic effect in 1 hour treatment than in 6 hours treatment. It means cytotoxicity tends to decrease according to the treatment time.

**Key words** : bee venom, cytotoxicity, melittin, MCD peptide, apamin, MTT assay

## I. 서론

蜂毒의 이용은 기원전 2000년경의 이집트 파피루스 文書에 벌침이나 죽은 벌을 아픈 곳에 직접 비벼 治療했다는 기록이 남아 있고, 기원전 168년에 埋葬된 中國 長沙 馬王堆 3號 漢墓에서 출토된 醫書에서도 蜂毒을 이용한 2例의 기록이 실려있다.<sup>1)</sup> 蜂毒이란 꿀벌의 毒囊에 들어있는 약 40여 가지의 有效成分으로 구성된 물질로 炎症, 알러지 등을 誘發하는 작용이 있으나, 臨床에서는 鎮痛, 消炎의 效能이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup>

傳統으로 蜂鍼을 직접 人體에 刺入하는 方法을 사용하였으나, 최근에는 蜂毒을 抽出하여 加工한 후 注射器를 이용하여 人體의 經穴에 刺入하는 蜂藥鍼 療法이 주로 활용되고 있다. 1990년대 이후 국내에서 蜂毒藥鍼에 관한 實驗 研究가 활발히 進行되고 있어 鎮痛,<sup>3,4)</sup> 消炎<sup>5)</sup>, 鎮痙<sup>6)</sup>, 安定性 檢査<sup>7)</sup>, 免疫機能 增強作用<sup>8)</sup> 등이 보고되었고, 外國에서는 Barbra<sup>9)</sup>와 Habermann<sup>10)</sup> 등에 의해 蜂毒의 生化學的 成分 및 藥理作用 등이 報告되었다.

蜂毒 藥鍼液의 毒性에 대한 연구로 동물에서의 蜂毒의 치사량<sup>7)</sup>, 급성독성<sup>11)</sup>, 항원성 및 발열성<sup>12)</sup> 등에 대한 보고가 있었고 또한 항암효과로 상피종과 흑색종 세포에 미치는 세포독성에 대하여 연구

된 결과가 있으나<sup>13,14)</sup> 비만 세포주에 대한 세포독성 평가는 보고되지 않았다. 뿐만 아니라 蜂毒의 성분별로 어느 성분의 蜂毒 약침액이 어떤 세포 독성이 있는지에 대한 연구도 매우 적은 실정이다.<sup>15)</sup>

이에 著者는 蜂毒 藥鍼液 중 어떠한 성분이 어느 농도에서 세포독성이 있는지 알아보기 위하여 crude bee venom과 蜂毒의 대표적 성분 중, melittin, mast cell degranulating peptide(MCD peptide), apamin 등을 선택하여 비만세포에 투여한 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 反應實驗을 시행하여 細胞活性度의 變化를 검토하였던 바 有意한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험방법

### 1. 실험재료

#### 1) 세포주

실험에 사용한 세포주는 생쥐 비만세포주(mouse mast cell line)로 염증 및 면역반응 연구에 있어서 매우 유용한 세포주이다.<sup>35),36)</sup>

#### 2) 시약

배양액 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), fetal bovine serum (FBS) 등은 Gibco

BRL(Gland Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Roche(Germany)에서 구입하였고, 일반 시약은 SIGMA(USA) 제품을 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 세포배양

비만세포의 배양은 10% FBS가 포함된 IMDM 용액에 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도, 37℃ 온도가 유지되는 세포배양기에서 배양하였고, 배양액은 2일마다 교환하였다.<sup>37),38)</sup>

### 2) 실험용 蜂毒의 준비

실험에 사용한 蜂毒의 성분은 melittin, MCD-peptide, apamin으로 하였는데 蜂毒의 성분 중에서 함유량이 높은 세 가지를 선정한 것이며, 실험 목적에 따라 加工한 乾燥蜂毒에 증류수로 농도별로 희석하여 사용하였고 crude bee venom과도 비교하였다. crude bee venom, apamin 및 melittin은 honey bee에서, MCD-peptide는 yellow hornet에서 추출한 것이며, 이상의 蜂毒 제제는 모두 SIGMA에서 구입하여 사용하였다.

### 3) 蜂毒의 처치

플라스크의 약 50~60% 면적을 차지하도록 細胞를 배양한 후 serum free 배양액에 아래와 같이 蜂毒으로 처리하고 1시간, 6시간 incubation한 후 細胞의 活性度를 분석하였다.<sup>39)</sup>

본 연구에서는 비만세포주에서 세포독성이 있는 농도를 알아보고자, crude bee venom, melittin, MCD peptide, apamin 모두 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-1</sup>, 1μg/ml이 되도록 처치하였고, 보다 고농도에서의 세포독성을 평가하기 위해 蜂毒 성분 중 큰 비중을 차지하는 melittin은 10μg/ml 농도로, crude

bee venom은 10, 20, 10<sup>2</sup>μg/ml 농도로 처치하였다.

### 4) MTT-based cytotoxicity assay

蜂毒의 성분별로 비만 세포주에 대한 농도에 따른 세포독성을 측정하기 위하여, 세포배양에서 생존하는 세포의 수를 측정하는 방법인 MTT실험을 시행하였다. MTT실험 방법은 살아있는 세포의 m-itochochdrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 작용을 이용하는 것으로, ELISA reader로 595nm에서 측정한 흡광도(optical density, 이하 OD)의 값은 살아있는 세포의 수를 반영하며, 세포 독성의 판정은 다음의 산출식에 따라 % viability로 나타낸다.

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

MTT assay 방법<sup>40)</sup>은 회사의 protocol을 따랐다. 먼저 비만세포를 96 well plate (Corning, USA)에 well당 배양액 100μl에 5×10<sup>4</sup>개의 세포수가 되도록 serum free 배양액에 분주하고 검액으로 蜂毒을 시간별, 농도별로 처치하여 incubation하였고, 蜂毒을 처치하지 않은 세포군을 대조군으로 하였다. 각 well에 MTT labeling reagent 용액을 10μl씩 가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 Solubilization solution을 각 well에 100μl씩 첨가한 후 배양기에 20시간 유치시킨 후 ELISA reader(Bio-Tek, USA)로 690nm를 참고치로 하여 595nm에서 측정하였다.

### 5) 통계학적 분석

모든 실험값은 평균값±표준오차(mean±standard error)로 하고, 통계학적 분석은 SAS(Statistical Analysis System) program을 이용하였다.

Student's t-test를 실시하여 각 군간의 통계학적 유의성을 검정하였으며 P 값이 0.05 미만인 경우에만 통계적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 1시간 처치시 蜂毒의 종류별 농도별 세포 독성

비만세포주에 1시간 동안 蜂毒을 종류별로 처치한 결과 대조군(100.0±12.0%)에 비해 crude bee venom 처치군은 10<sup>-4</sup> μg/ml에서는 95.0±4.8%, 10<sup>-3</sup> μg/ml에서는 93.7±5.0%, 10<sup>-2</sup> μg/ml에서는 100.4±8.9%, 10<sup>-1</sup> μg/ml에서는 104.7±6.9%, 1 μg/ml에서는 70.0±8.9%의 세포활성도를 나타냈으며 1 μg/ml 처치군은 대조군에 비해 유의한 차이를 보였으나(p<0.01) 다른 세포군은 유의한 차이를 보이지 않았다(Figure 1).

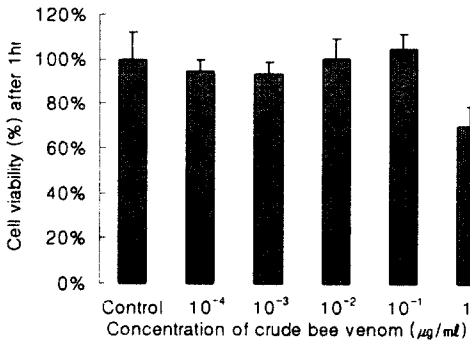


Figure 1. The effect of various concentrations of crude bee venom on cell viability of mast cell line for 1 hour.

\* significantly decreased cell viability(p<0.01)

Melittin 처치군은 10<sup>-4</sup> μg/ml에서는 89.8±3.6%, 10<sup>-3</sup> μg/ml에서는 90.7±2.8%, 10<sup>-2</sup> μg/ml에서는 91.9±4.0%, 10<sup>-1</sup> μg/ml에서는 95.0±5.7%, 1 μg/ml에서는 96.9±7.8%의 세포활성도를 나타냈으며 대

조군에 비해 유의한 차이는 없었다(Figure 2).

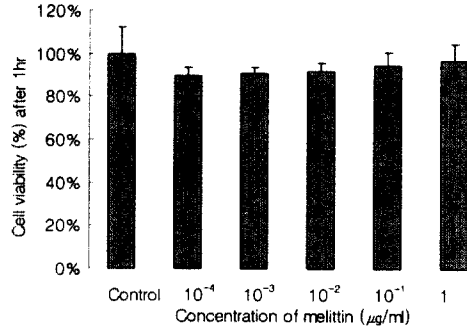


Figure 2. The effect of various concentrations of melittin on cell viability of mast cell line for 1 hour.

MCD peptide 처치군은 10<sup>-4</sup> μg/ml에서는 91.6±4.3%, 10<sup>-3</sup> μg/ml에서는 88.0±4.8%, 10<sup>-2</sup> μg/ml에서는 94.6±3.8%, 10<sup>-1</sup> μg/ml에서는 90.9±3.6%, 1 μg/ml에서는 93.8±6.1%의 세포활성도를 나타냈으며 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다(Figure 3).

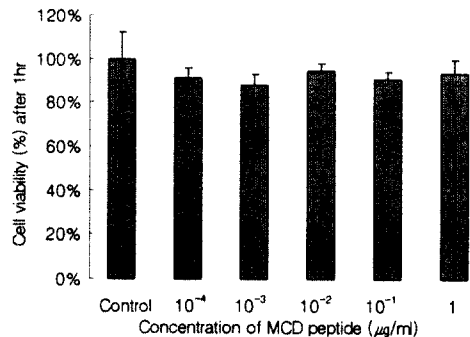


Figure 3. The effect of various concentrations of MCD peptide on cell viability of mast cell line for 1 hour.

Apamin 처치군은 10<sup>-4</sup> μg/ml에서는 87.6±6.4%, 10<sup>-3</sup> μg/ml에서는 88.3±6.3%, 10<sup>-2</sup> μg/ml에서는 87.8±2.3%, 10<sup>-1</sup> μg/ml에서는 88.2±2.8%, 1 μg/ml에서는 89.1±4.3%의 세포활성도를 나타냈으며 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다(Figure 4).

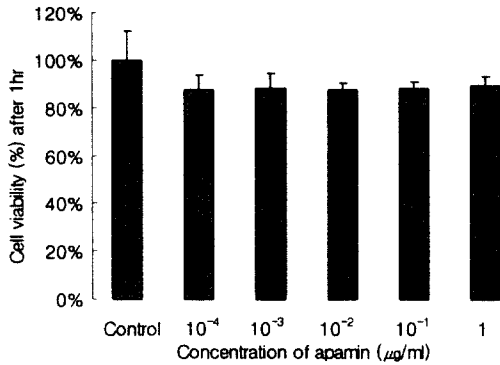


Figure 4. The effect of various concentrations of apamin on cell viability of mast cell line for 1 hour.

## 2. 6시간 처치시 蜂毒의 종류별 농도별 세포 독성

비만세포주에 6시간 동안 蜂毒을 종류별로 처치한 결과 대조군(100.0±14.0%)에 비해 crude bee venom 처치군은 10<sup>-4</sup>μg/ml에서는 103.1±10.5%, 10<sup>-3</sup>μg/ml에서는 103.9±11.3%, 10<sup>-2</sup>μg/ml에서는 110.1±2.0%, 10<sup>-1</sup>μg/ml에서는 115.1±5.8%, 1μg/ml에서는 95.7±5.3%의 세포활성도를 나타냈으며 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다(Figure 5).

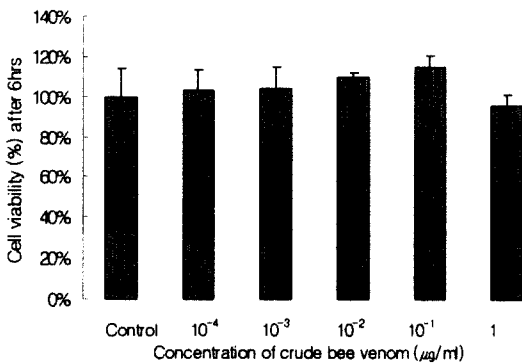


Figure 5. The effect of various concentrations of crude bee venom on cell viability of mast cell line for 6 hours.

Melittin 처치군은 10<sup>-4</sup>μg/ml에서는 103.7±4.2

%, 10<sup>-3</sup>μg/ml에서는 103.3±8.1%, 10<sup>-2</sup>μg/ml에서는 109.0±3.1%, 10<sup>-1</sup>μg/ml에서는 104.5±10.6%, 1μg/ml에서는 103.2±7.8%의 세포활성도를 나타냈으며 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다(Figure 6).

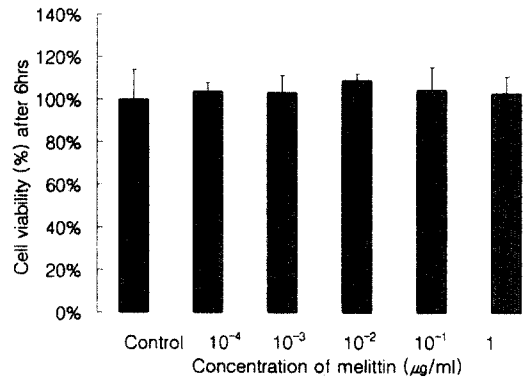


Figure 6. The effect of various concentrations of melittin on cell viability of mast cell line for 6 hours.

MCD peptide 처치군은 10<sup>-4</sup>μg/ml에서는 98.4±3.8%, 10<sup>-3</sup>μg/ml에서는 105.0±8.2%, 10<sup>-2</sup>μg/ml에서는 103.2±10.1%, 10<sup>-1</sup>μg/ml에서는 102.6±9.4%, 1μg/ml에서는 101.7±5.9%의 세포활성도를 나타냈으며 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다(Figure 7).

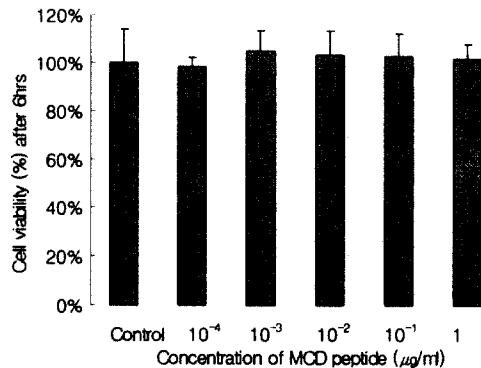


Figure 7. The effect of various concentrations of MCD peptide on cell viability of mast cell line for 6 hours.

Apamin 처치군은  $10^{-4}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $98.7\pm 3.4\%$ ,  $10^{-3}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $102.6\pm 11.3\%$ ,  $10^{-2}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $104.1\pm 9.1\%$ ,  $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $106.9\pm 3.3\%$ ,  $1\mu\text{g/ml}$ 에서는  $102.2\pm 10.1\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다(Figure 8).

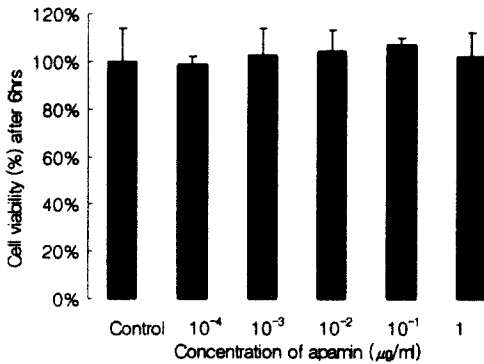


Figure 8. The effect of various concentrations of apamin on cell viability of mast cell line for 6 hours.

### 3. crude bee venom과 melittin의 고농도 1시간 처치시 세포독성

蜂毒의 고농도에서의 세포독성을 평가하기 위해 crude bee venom과 함께 蜂毒 성분 중 큰 비중을 차지하는 melittin에 대해 고농도 처치시험을 시행하였다. 비만세포주에 1시간동안 crude bee venom을 처치하

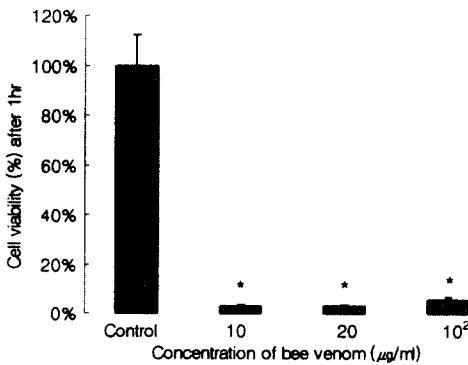


Figure 9. The effect of high concentrations of crude bee venom on cell viability of mast cell line for 1 hour.  
\* significantly decreased cell viability( $p<0.01$ )

여 관찰한 결과  $10\mu\text{g/ml}$ 에서는  $3.3\pm 0.3\%$ ,  $20\mu\text{g/ml}$ 에서는  $3.3\pm 0.6\%$ ,  $10^2\mu\text{g/ml}$ 에서는  $5.7\pm 1.1\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며 모두 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다( $p<0.01$ ) (Figure 9).

Melittin을 처치하여 관찰한 결과  $10\mu\text{g/ml}$ 에서는  $63.5\pm 13.8\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다( $p<0.01$ ) (Figure 10).

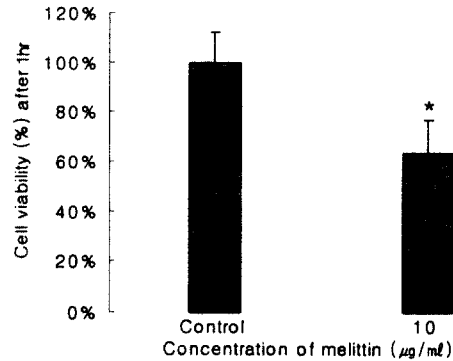


Figure 10. The effect of high concentration of melittin on cell viability of mast cell line for 1 hour.  
\* significantly decreased cell viability( $p<0.01$ )

### 4. crude bee venom과 melittin의 고농도 6시간 처치시 세포독성

蜂毒의 고농도에서의 세포독성을 평가하기 위해 비만세포주에 6시간동안 crude bee venom을 처치

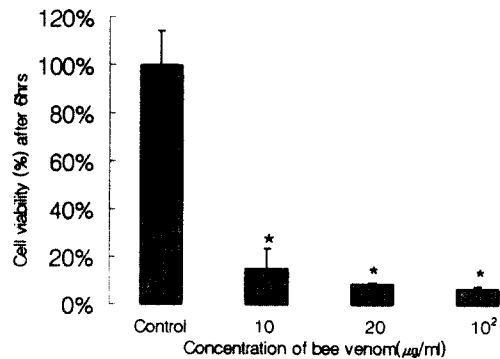


Figure 11. The effect of high concentration of crude bee venom on cell viability of mast cell line for 6 hours.  
\* significantly decreased cell viability( $p<0.01$ )

하여 관찰한 결과 10 $\mu$ g/ml에서는 15.1 $\pm$ 8.6%, 20  $\mu$ g/ml에서는 9.1 $\pm$ 0.4%, 10<sup>2</sup> $\mu$ g/ml에서는 7.0 $\pm$ 1.1 %의 세포활성도를 나타냈으며 모두 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다(p<0.01) (Figure 11).

Melittin을 처치하여 관찰한 결과 10 $\mu$ g/ml에서는 104.1 $\pm$ 3.2%의 세포활성도를 나타냈으며 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다(Figure 12).

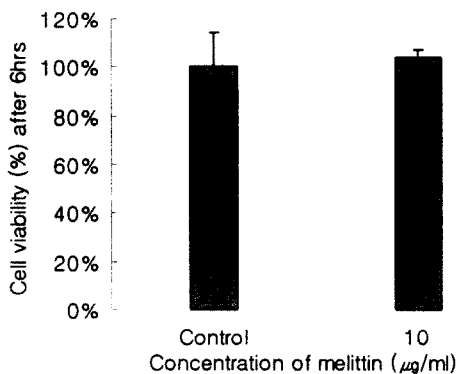


Figure 12. The effect of high concentration of melittin on cell viability of mast cell line for 6 hours.

### 5. 1시간 처치시와 6시간 처치시 세포활성의 차이

1시간 처치시의 세포활성과 6시간 처치시의 세포

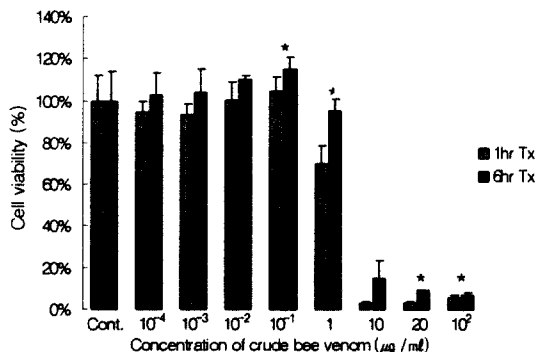


Figure13. The effect of various concentrations of crude bee venom on cell viability of mast cell line for 1 and 6 hour(s)

\* significantly increased cell viability(p<0.05)

활성을 비교해본 결과 6시간 처치시 crude bee venom의 10<sup>-1</sup>, 1, 20, 10<sup>2</sup> $\mu$ g/ml 처치군, melittin의 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup>, 1, 10 $\mu$ g/ml, MCD peptide의 10<sup>-4</sup> $\mu$ g/ml 처치군, apamin의 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-1</sup> $\mu$ g/ml 처치군은 1시간 처치시에 비해 유의하게(p<0.05) 세포활성이 증가하였고, 다른 처치군에서도 통계적 유의성은 없으나 전반적으로 세포활성이 증가하는 양상을 나타내었다.

## IV. 고찰

藥鍼療法은 新鍼療法의 하나로 經絡學說의 原理에 依據하여 精製한 各種 藥物을 有關한 穴位, 압痛 點에 주입하여 刺鍼 효과와 藥物 작용의 効果로서 經絡穴位를 激發하여 人體機能을 調整하고 病變組織의 病理狀態를 개선시켜 體內的 氣血을 通暢하고 疾病을 治療하는 것으로 최근 많은 관심을 끌게 되었다.<sup>16)</sup>

藥鍼療法 中 蜂藥鍼療法은 蜂毒을 추출 加工하여 疾病과 有關한 부위나 穴位에 주입함으로써 刺鍼 効果과 蜂毒의 生화학적 특이물질이 人體에 미치는 藥理作用을 동시에 이용하는 新鍼療法의 일종이다.<sup>17,18)</sup>

蜂毒의 성분은 크게 peptide components, non peptide components, enzymes으로 構成되어 있다.<sup>10)</sup> Peptide components는 freeze-dried venom의 약 50%를 構成하고 있으며, 주요성분으로는 apamin, MCD peptide, melittin 등이 있다.<sup>19,20)</sup> 蜂毒 藥鍼液의 毒性에 대한 연구로 동물에서의 蜂毒의 치사량<sup>7)</sup>, 急性毒性<sup>11,12)</sup>, 抗原性 및 發熱性<sup>13)</sup> 등에 대한 보고가 있었고 또한 筋肉細胞에 대한 毒性作用에 대한 보고도 있었으며<sup>21)</sup> 抗癌效果로서 黑色腫 細胞에 미치는 細胞毒性에 대하여 연구된 結果가 있으나<sup>14)</sup> 비만세포주에 대한 細胞毒性 평가는 보고되지 않았다. 또한 蜂毒의 성분별로 어느 성분

는 성분의 蜂毒 藥鍼液이 어떤 細胞毒性이 있는지에 대한 연구는 매우 적은 실정이다. 따라서 본 실험에서는 蜂毒의 성분별 細胞毒性 효과를 살펴 보기 위하여 crude bee venom, melittin, MCD P-peptide, apamin 등의 효능을 비교하여 보았다.

Melittin은 26개의 amino acid로 구성된 活性 peptide로 溶血作用과 酵素作用을 하고 있으며<sup>22)</sup> 건조蜂毒의 40~50%를 차지한다.<sup>23)</sup> 溶血作用에서는 phospholipase A2와 상승적으로 작용하여 서로의 活動성을 증가시켜 주며 酵素作用에서는 뇌하수체와 부신피질체계를 자극하여 catecholamine과 cortisone 분비를 촉진시킨다. Melittin은 phospholipase A2의 세포막에 대한 간접적 분해작용으로 세포내부에 저장된 물질을 공격한다. 또한 특이한 mast cell에서 histamine을 방출시켜 말초혈관의 血流을 증가시키며 독성성분을 확산시키는 작용을 도와준다. 또한 활성 peptide로 세제처럼 강한 계면 활성작용이 있고 물에도 기름에도 모두 섞일 수 있는 친화성을 갖고 있으므로 다른 세포막에 대해서도 막의 투과성을 변화시키는 작용도 있다.<sup>24)</sup> 그 외에 Han<sup>25)</sup>은 蜂毒의 melittin이 토끼 신장의 proximal tubule cell의 Ca(2+)흡수와 arachidonic acid의 방출을 증가시킨다고 하였으며, Saini<sup>26)</sup>는 melittin이 human monocytic leukemia cell의 세포용해과정에서 내인성 phospholipase D의 반응을 촉진한다고 하였다.

MCD peptide(mast cell degranulating peptide)는 비만세포 과립감소 펩타이드로 1966년 Fredholm에 의해서 분리되었고, 그 분자량은 2,588이다.<sup>2)</sup> mast cell은 즉시형 과민반응의 염증 작용에 있어서 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 다른 염증과 생리학적 과정의 조절에도 중요하게 관여하고 작용할 것이라는 많은 보고가 있다.<sup>27,28,29)</sup> 또한 다양한 해부학적 장소에 존재하는 비만세포와 탈과립의 변화들은 선천적, 특이적,

병리학적 면역반응에 관여하며, 지연 과민반응(delayed hypersensitivity reactions), inflammation in the rheumatoid synovium, inflammatory bowel diseases, fibrosis, autoimmune pathology, neoplasia 등의 다양한 질환에 관련되어 있다.<sup>29)</sup> 이 때 MCD-peptide는 prostaglandin 합성을 억제하는 능력이 있는 강력한 항염증제로 작용한다.<sup>2)</sup>

Apamin은 신경계에 작용하는 peptide로서 calcium-potassium의 결합에 변화를 주어 중추신경 및 말초신경에 영향을 미친다. 過量(0.5ml/100g)을 혈관내에 주입하면 skeletal muscle에 경련을 유발하고, 더 많은 量을 주입하면 呼吸不全을 일으키며 뇌혈관계의 방어기전을 뚫고 뇌의 단백질에 영향을 미쳐 혼수를 일으키고 死亡하게 된다(LD<sub>50</sub>=4mg/100mg).<sup>9)</sup> 그러나 apamin의 선택적 목표물과 신경계에 영향을 미치는 기전은 아직 밝혀지지 않았으며 말초신경계 또한 중추신경계의 영향과 비슷하여 평활근의 경련을 유발한다.<sup>30)</sup> Melittin과 apamin은 cortisone분비를 증가시켜 소염효과를 나타내고 시상하부에 serotonin의 증가를 유도하며 면역체계를 억제하는 특성을 갖고 있다. 그 외에 Lee<sup>31)</sup>는 apamin은 hypoxia로 유발된 depolarization을 제거한다고 하였으며, Kwicien<sup>32)</sup>은 apamin이 after-spike hyperpolarization을 강하게 감소시킨다고 하였고, Grissmer<sup>33)</sup>는 대부분의 K(Ca) channel이 apamin에 의해 매우 민감하게 차단된다고 하였다.

비만세포주에 1시간동안 蜂毒을 처치한 결과 대조군(100.0±12.0%)에 비해 蜂毒 원액 처치군은 10<sup>-4</sup>µg/ml에서는 95.0±4.8%, 10<sup>-3</sup>µg/ml에서는 93.7±5.0%, 10<sup>-2</sup>µg/ml에서는 100.4±8.9%, 10<sup>-1</sup>µg/ml에서는 104.7±6.9%, 1µg/ml에서는 70.0±8.9%의 세포활성도를 나타냈으며, 1µg/ml 처치군은 대조군에 비해 유의한 차이를 보였으나(p<0.01) 다



른 세포군은 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 Melittin 처치군은  $10^{-4}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $89.8\pm 3.6\%$ ,  $10^{-3}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $90.7\pm 2.8\%$ ,  $10^{-2}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $91.9\pm 4.0\%$ ,  $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $95.0\pm 5.7\%$ ,  $1\mu\text{g/ml}$ 에서는  $96.9\pm 7.8\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며, 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다. MCD peptide 처치군은  $10^{-4}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $91.6\pm 4.3\%$ ,  $10^{-3}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $88.0\pm 4.8\%$ ,  $10^{-2}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $94.6\pm 3.8\%$ ,  $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $90.9\pm 3.6\%$ ,  $1\mu\text{g/ml}$ 에서는  $93.8\pm 6.1\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며, 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다. Apamin 처치군은  $10^{-4}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $87.6\pm 6.4\%$ ,  $10^{-3}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $88.3\pm 6.3\%$ ,  $10^{-2}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $87.8\pm 2.3\%$ ,  $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $88.2\pm 2.8\%$ ,  $1\mu\text{g/ml}$ 에서는  $89.1\pm 4.3\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며, 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다.

비만세포주에 6시간 동안 蜂毒을 종류별로 처치한 결과 대조군( $100.0\pm 14.0\%$ )에 비해 蜂毒 원액 처치군은  $10^{-4}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $103.1\pm 10.5\%$ ,  $10^{-3}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $103.9\pm 11.3\%$ ,  $10^{-2}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $110.1\pm 2.0\%$ ,  $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $115.1\pm 5.8\%$ ,  $1\mu\text{g/ml}$ 에서는  $95.7\pm 5.3\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며, 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다. Melittin 처치군은  $10^{-4}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $103.7\pm 4.2\%$ ,  $10^{-3}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $103.3\pm 8.1\%$ ,  $10^{-2}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $109.0\pm 3.1\%$ ,  $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $104.5\pm 10.6\%$ ,  $1\mu\text{g/ml}$ 에서는  $103.2\pm 7.8\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며, 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다. MCD peptide 처치군은  $10^{-4}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $98.4\pm 3.8\%$ ,  $10^{-3}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $105.0\pm 8.2\%$ ,  $10^{-2}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $103.2\pm 10.1\%$ ,  $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $102.6\pm 9.4\%$ ,  $1\mu\text{g/ml}$ 에서는  $101.7\pm 5.9\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며, 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다. Apamin 처치군은  $10^{-4}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $98.7\pm 3.4\%$ ,  $10^{-3}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $102.6\pm 11.3\%$ ,  $10^{-2}\mu\text{g/ml}$ 에서는  $104.1\pm 9.1\%$ ,  $10^{-1}$

$\mu\text{g/ml}$ 에서는  $106.9\pm 3.3\%$ ,  $1\mu\text{g/ml}$ 에서는  $102.2\pm 10.1\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다.

위와 같이 蜂毒과 그 주요 성분이 비만세포주에 미치는 세포독성을 평가해본 결과, 배양액  $100\mu\text{l}$ 에  $5\times 10^4$ 개의 세포가 있는 상태에서  $10^{-4}\sim 1\mu\text{g/ml}$ 의 농도인 蜂毒 원액, melittin, MCD peptide, apamin 중 蜂毒 원액  $1\mu\text{g/ml}$  1시간 처치군을 제외하고는 대조군에 비해 유의한 활성감소를 보이지 않아서 세포독성이 강하지 않은 것으로 나타났다.

보다 고농도에서의 세포독성을 평가하기 위해 비만세포주에 1시간 동안 蜂毒 원액을 처치하여 관찰한 결과,  $10\mu\text{g/ml}$ 에서는  $3.3\pm 0.3\%$ ,  $20\mu\text{g/ml}$ 에서는  $3.3\pm 0.6\%$ ,  $10^2\mu\text{g/ml}$ 에서는  $5.7\pm 1.1\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며, 모두 대조군에 비해 유의한 차이를 보였고( $p<0.01$ ), melittin을 처치하여 관찰한 결과,  $10\mu\text{g/ml}$ 에서는  $63.5\pm 13.8\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며, 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다( $p<0.01$ ). 또한 6시간 처치시에 蜂毒 원액은,  $10\mu\text{g/ml}$ 에서는  $15.1\pm 8.6\%$ ,  $20\mu\text{g/ml}$ 에서는  $9.1\pm 0.4\%$ ,  $10^2\mu\text{g/ml}$ 에서는  $7.0\pm 1.1\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며, 모두 대조군에 비해 유의한 차이를 보였고( $p<0.01$ ), melittin을 처치하여 관찰한 결과  $10\mu\text{g/ml}$ 에서는  $104.1\pm 3.2\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며, 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다.

melittin은  $1\mu\text{g/ml}$ 에서는 유의한 세포독성이 없었으나  $10\mu\text{g/ml}$ 에서는 유의한 세포독성이 있는 것으로 나타나,  $2.42\mu\text{M}$  이하에서는 세포독성이 없다는 기존의 보고와<sup>34)</sup> 일치하는 양상으로 나타났다.

蜂毒의 melittin과 phospholipase A2를 생쥐에  $4\mu\text{g/g}$ 으로 투여하면 근육세포의 괴사를 일으킨다는 보고가 있었는데,<sup>21)</sup> 이번 연구에서도 蜂毒 원액과 melittin은 고농도에서 분명한 세포독성 작용을 나타냈다. 하지만 전반적으로 볼 때 1시간 처치시보다 6시간 처치시 세포활성이 증가하는 양상을 보여 蜂

毒 원액 혹은 그 성분의 세포독성이 장시간 지속되지 않는 것으로 나타났다.

蜂毒은 고농도에서는 분명한 세포독성을 가지며 이것은 蜂毒을 주입한 經穴의 국소적 세포괴사나 조직손상을 야기할 수 있으므로 임상에서 응용시 주의를 요한다고 하겠다. 하지만 본 연구에서는 독성이 오래 지속되지 않는 것으로 나타났으며, 실제로 蜂毒이 넓은 부위로 퍼져나가 저농도로 희석되는 경우에는 유의한 세포독성이 없을 것으로 보인다.

비만세포주에 MTT assay를 시행하여 검사한 결과 crude bee venom과 melittin은 10 $\mu$ g/ml 이상의 고농도에서는 유의한 細胞毒性을 가지는 것으로 나타났다. 한편 MCD peptide와 apamin은 1시간과 6시간 처치한 결과, 대조군에 비해 모두 유의성이 없는 것으로 나타났는데, 그 이유는 단일성분의 細胞毒性 효과보다 복합성분인 crude bee venom의 효과가 더 강하기 때문인 것으로 사려된다. 또 단일성분 중에서도 melittin은 다른 두 성분과는 달리 1시간 처치시에는 유의하게 세포활성이 감소했으나 6시간 처치시는 유의성이 없었던 것으로 보아, 단일성분 중에서도 복합물에 가까운 효과를 지닐 수 있으나, 이것의 정확한 기전에 대해서는 추후 심도깊은 논의가 필요할 것으로 보인다.

또한 전반적으로 蜂毒 및 각 성분은 1시간 처치시보다 6시간 처치시에 증가된 세포활성을 보여 細胞毒性이 오래 지속되지 않는 것으로 나타났다. 향후 生體에서의 細胞毒性 평가와, 적절한 농도 및 용량을 알아내는 추가적인 실험 및 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결론

蜂毒 藥鍼液 중 蜂毒의 성분별 細胞毒性 효과들

살펴 보기 위하여 crude bee venom, melittin, mast cell degranulating peptide(MCD peptide), apamin 등을 선택하여 비만세포주에 투여한 후, MTT 反應實驗을 시행하여 細胞活性度의 변화를 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 蜂毒원액을 10<sup>-4</sup> $\mu$ g/ml, 10<sup>-3</sup> $\mu$ g/ml, 10<sup>-2</sup> $\mu$ g/ml, 10<sup>-1</sup> $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 저농도로 1시간 처치시 1 $\mu$ g/ml에서 대조군에 비해 유의하게 세포활성이 감소하였으며(p<0.01), 6시간 처치시는 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다.

2. Melittin을 10<sup>-4</sup> $\mu$ g/ml, 10<sup>-3</sup> $\mu$ g/ml, 10<sup>-2</sup> $\mu$ g/ml, 10<sup>-1</sup> $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 저농도로 1시간과 6시간 처치한 결과 세포활성은 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다.

3. MCD peptide와 Apamin을 10<sup>-4</sup> $\mu$ g/ml, 10<sup>-3</sup> $\mu$ g/ml, 10<sup>-2</sup> $\mu$ g/ml, 10<sup>-1</sup> $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 저농도로 1시간과 6시간 처치한 결과 세포활성은 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다.

4. 蜂毒원액을 10 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml, 10<sup>2</sup> $\mu$ g/ml의 고농도로 1시간과 6시간 처치한 결과, 10 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml, 10<sup>2</sup> $\mu$ g/ml에서 모두 유의하게 세포활성이 감소하였다(p<0.01).

5. Melittin을 10 $\mu$ g/ml의 고농도로 1시간과 6시간 처치한 결과, 1시간 처치시에는 10 $\mu$ g/ml에서 대조군에 비해 유의하게 세포활성이 감소하였으나(p<0.01), 6시간 처치시에는 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다.

6. 蜂毒 및 각 성분은 1시간 처치시보다 6시간 처치시 증가된 세포활성을 보여 세포독성이 시간에

따라 감소하는 것으로 나타났다.

## VI. 참고문헌

1. 인창식, 고흥균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록: 마왕퇴의사의 蜂毒요법 2예. 대한침구학회지. 1998;15(1):143-147.
2. 金文昊. 蜂毒療法과 蜂鍼療法. 서울:한국 교육 기획. 1992:20-37, 41-42, 67-64, 104-112, 134-149, 171-176.
3. 高炯均. 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):283-292.
4. 金利和, 李栽東, 盧植, 閔炳一. 흰쥐에서 合谷穴 蜂毒藥鍼刺戟에 依한 開口反射의 反應. 大韓韓醫學會誌. 1999;20(1):106-112.
5. 都垣錫, 張竣赫, 金慶鎬, 尹鍾和, 金甲成. 蜂毒療法이 흰쥐의 膝關節 炎症性 浮腫에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1995;12(1): 211-220.
6. 孔賢淑, 高炯均, 金昌煥. 蜂毒療法이 抗座學에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1993;10(1): 159-165.
7. 이종석, 김재규, 고흥균. 봉독의 치사량에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 1993;10(1): 151-158.
8. 李京姬, 金昌煥, 姜成吉, 高炯均. 產地別 蜂毒液藥鍼刺戟이 免疫機能低下에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2000;17(4);28-40.
9. Barbara R. Chemistry and Pharmacology of Honey Bee Venom. Academic Press. 1986:329-402.
10. Habermann E. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In Venomous Animals and their Venoms. Academic Press. 1971;3:61.
11. 이종석, 고흥균, 김창환. 약침용 봉독액의 급성독성에 관한 연구. 대한침구학회지. 1994; 11(1):177-195.
12. 이종석, 김용석. 약침용 봉독액의 항원성시험 및 발열성시험에 관한 연구. 경희한의대논문집. 1995;12(2):123-134.
13. 권기록, 고흥균, 김용석, 박영배, 김창환, 강성길. 봉독약침 자극이 3 - MCA 유발 상피종에 대한 항암 및 면역 반응에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1997;14(2):151-159.
14. 박찬열, 남상수, 김창환, 이재동, 강성길, 이운호, 안병철. 약침용 봉독액이 흑색종 세포에 미치는 항암 효과에 대한 분자생물학적 연구. 대한침구학회지. 2000;17(2):169-186.
15. 권도희, 이재동, 최도영. 약침용 봉독 성분 중 apamin, melittin의 항암작용. 대한침구학회지. 2001;18(1):129-145.
16. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(上, 下). 서울:集文堂. 1994:1457.
17. 權奇祿, 高炯均, 金昌煥. 蜂鍼에 對한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1994;11(1):159-171.
18. 朱文鋒. 實用 中醫辭典. 陝西:陝西科學技術出版社. 1982:402.
19. Assem ES, Atkinson G. Histamine release by MCDP (401), a peptide from the venom of the honey bee. Brit. Pharmacol. 1973;337-338.
20. Spoerri, PE. Apamin from bee venom. Neurobiology. 1973;3:207-214.
21. Ownby CL, Powell JR, Jiang M-S, Fletcher JE. Melittin and phospholipase

- A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. *Toxicon*. 1997;35 (1):67-80.
22. Owen MD, Pfaff LA. Melittin synthesis in the venom system of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Toxicon*. 1995;33(9): 1181-1188.
  23. Budavari S. The merck index 12th ed. Merck & Co, inc. 1996:5861-5862.
  24. Gerst JE, Salomon Y. Inhibition by melittin and fluphenazine of melatonin receptor function and adenylate cyclase in M2R melanoma cell membranes. *Endocrinology*. 1987;121 (5):1766-1772.
  25. Han HJ, Lee JH, Park SH, Choi HJ, Yang IS, Mar WC, Kang SK, Lee HJ. Effect of bee venom and its melittin on apical transporters of renal proximal tubule cells. *Kidney Blood Press Res*. 2000;23(6):393-399.
  26. Saini SS, Chopra AK, Peterson JW. Melittin activates endogenous phospholipase D during cytolysis of human monocytic leukemia cells. *Toxicon*. 1999;37(11):1605-1619.
  27. Galli SJ. New approaches for the analysis of mast cell maturation, heterogeneity and function. *Federation Proc*. 1987;46: 1906-1914.
  28. Mekori YA, Zeidan Z. Mast cells in nonallergic immune responses in vivo. *Isr J Med Sci*. 1990;26:337-341.
  29. Metcalfe D, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev*. 1997;77(4):1033-1079.
  30. Allen DH, Lepple-Wienhues A, Cahalan MD. Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *J Membr Biol*. 1997;155(1): 27-34.
  31. Lee J, Lim W, Eun SY, Kim SJ, Kim J. Inhibition of apamin-sensitive K<sup>+</sup> current by hypoxia in adult rat adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch*. 2000; 439 (6):700-704.
  32. Kwiecień R, Robert C, Cannon R, Vignes S, Arnoux A, Kordon C, Hammond C. Endogenous pacemaker activity of rat tumour somatotrophs. *J Physiol*. 1998 ;508 (3):883-905.
  33. Grissmer S, Lewis RS, Cahalan MD. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human leukemic T cells. *J Gen Physiol*. 1992;99(1):63-84.
  34. Liu P, Davis P, Liu H, Krishnan TR. Evaluation of cytotoxicity and absorption enhancing effects of melittin—a novel absorption enhancer. *Eur J Pharm Biopharm*. 1999;48:85-87.
  35. Cho SH, Hartleroad JY, Oh CK. (S)-albuterol increases the production of histamine and IL-4 in mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;124(4) :478- 84.
  36. Ichikawa A. Molecular biology of prostaglandin receptor and L-histidine decarboxylase. *Yakugaku Zasshi*. 1999; 119 (9):637-53.
  37. Freshney RI. Culture of animal cells : a manual of basic technique. 3rd ed. New

- York:Wiley-Liss. 1994:287-307.
38. Vliagoftis H, Metcalfe DD. Characterization of adhesive interactions between mast cells and laminin isoforms : evidence of a principal role for alpha 6 integrin. *Immunology*. 1997;92(4): 553-60.
  39. Rizzo MT, Nguyen E, Aldo-Benson M, Lambeau G. Secreted phospholipase A (2) induces vascular endothelial cell migration. *Blood*. 2000;96(12):3809-15.
  40. Lomonte B, Gutierrez JM, Romero M, Nunez J, Tarkowski A, Hanson LA. An MTT-based method for the in vivo quantification of myotoxic activity of snake venoms and its neutralization by antibodies. *J Immunol Methods*. 1993; 161 (2): 231-7.