

원 저

## 蜂藥鍼液이 RAW 264.7 세포의 COX-2, P38, ERK 및 JNK에 미치는 影響

沈載永\* · 趙顯徹\*\* · 李成魯\* · 金基鉉\*

\*경원대학교 한의과대학 침구학교실 · \*\*경원대학교 한의과대학 재활의학과교실

### The Effects of Bee Venom on COX-2, P38, ERK and JNK in RAW 264.7 Cells

Jae-Young Sim\* · Hyun-Chol Jo\*\* · Seong-No Lee\* · 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

**Objective :** The purpose of this study was to investigate the effect of Bee Venom on the lipopolysaccharide(LPS), sodium nitroprusside(SNP), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced expressions of cyclooxygenase-2(COX-2), p38, jun N-terminal Kinase(JNK) and extra-signal response kinase(ERK) in RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line.

**Method :** The expressions of COX-2, p38, JNK and ERK were determined by western blotting with corresponding antibodies.

**Results :**

1. The 0.5, 1 and 5  $\mu$ g/ml of bee venom inhibited significantly LPS and SNP-induced expression of COX-2 compared with control, respectively. The 0.5, 1 and 5  $\mu$ g/ml of bee venom inhibited insignificantly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced expression of COX-2 compared with control, respectively.
2. The 0.5, 1 and 5  $\mu$ g/ml of bee venom inhibited significantly LPS, SNP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced expression of p38 compared with control, respectively.
3. The 1 and 5  $\mu$ g/ml of bee venom inhibited significantly SNP-induced expression of JNK compared with control, respectively. All of bee venom inhibited insignificantly LPS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced expression of JNK compared with control, respectively.
4. The 5  $\mu$ g/ml of bee venom inhibited significantly SNP-induced expression of ERK, the 0.5  $\mu$ g/ml of bee venom increased significantly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced expression of ERK compared with control. The 0.5, 1 and 5  $\mu$ g/ml of bee venom inhibited insignificantly LPS-induced expression of ERK compared with control, respectively.

**Key words :** Bee venom, COX-2, P38, ERK, JNK, RAW 264.7 cell, LPS, SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 1. 緒 論

蜂藥鍼療法은 꿀벌(Apis mellifera ligustica)의 毒囊에

있는 蜂毒을 추출 가공하여 질병과 有關한 穴位나 部位에 注入하여 鍼灸 治療와 蜂藥鍼液의 生화학적 물질이 人體에 미치는 藥理 作用을 疾病 治療에 利用하는 藥鍼療法의 하나이다.<sup>1,2)</sup>

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고 祛風除濕, 止疼痛, 補益精氣, 消腫降壓하여<sup>3)</sup> 鎮痛, 消炎<sup>3,7)</sup>, 鎮痙<sup>8)</sup>, 抗癌<sup>9,13)</sup>, 免疫 增強<sup>14,17)</sup>, 循環促進, 抗菌, 放射能抵抗性<sup>2)</sup> 作用을 나타

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

낸다.

최근 蜂藥鍼을 이용한 임상적 연구로 關節炎<sup>18-20)</sup>, 腰椎間板脫出症<sup>21,22)</sup>, 胸·腰椎壓迫骨折<sup>23)</sup>, 足噤痛<sup>24)</sup>에 유효함이 보고 되었고, 蜂藥鍼液의 실험적 연구로 關節炎<sup>25-27)</sup>, 關節炎 滑液細胞<sup>28,29)</sup>, 細胞活性<sup>30-32)</sup>, 神經芽細胞腫<sup>33)</sup>, 黑色腫<sup>34)</sup>, 細胞毒性<sup>34-36)</sup>에 미치는 영향 등이 보고 되어 있으며, 細胞消滅, 炎症 및 痛症에 關聯한 기전<sup>37)</sup>에 대하여 연구가 진행되고 있지만 부족한 실정이다.

이에 연구자는 蜂藥鍼液의 細胞消滅 및 炎症에 有效한 效果에 대한 기전 연구를 위하여 RAW 264.7 세포에 lipopolysaccharide(LPS), sodium nitro prusside(SNP), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 cyclooxygenase-2(COX-2), p38 kinase(p38), jun N-terminal Kinase(JNK) 및 extra-signal response kinase(ERK)의 變動에 蜂藥鍼液이 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고 하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### 1) 시약

LPS 1 µg/ml, SNP 200 µM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM, 기타 細胞培養과 western blotting 試藥 등은 연구용으로 적합한 것들을 사용하였다.

#### 2) 시료

乾燥 粉末 蜂毒[乳蜜蜂毒(蜂), 韓國]을 사용하였다.

#### 3) 기기

Immage analyser(Mitsubishi electric Co., Japan), FACS calibur flow cytometer (Becton Dickinson, NJ), Delta Scan System(Photon technology international; Prinston, NJ, USA) 등이다.

## 2. 방법

### 1) 시료 조제

粉末 蜂毒을 3차 증류수로 희석하여 0.5, 1 및 5 µg/ml 농도로 나누어 蜂藥鍼液으로 사용하였다.

### 2) 세포주 배양

Murine macrophage RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum(FBS), 4 mM L-glutamine 과 100 units/ml의 streptomycin과 penicillin이 포함된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 3) 군 분류

#### (1) 정상군(Normal Group)

정상군은 RAW 264.7 세포에 아무 처리도 하지 않은 군이다.

#### (2) 대조군(Control Group)

대조군은 RAW 264.7 세포에 각각 LPS 1 µg/ml, SNP 200 µM 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM을 처리한 군이다.

#### (3) 실험군(Treatment group)

실험군은 RAW 264.7 세포에 蜂藥鍼液 5 µg/ml를 처리한 군과 LPS 1 µg/ml, SNP 200 µM 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM 각각에 蜂藥鍼液 0.5, 1 및 5 µg/ml를 처리한 군으로 구분하였다.

#### 4) 蜂藥鍼液이 LPS, SNP와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 COX-2, P38, JNK 및 ERK 발현에 미치는 영향

Western blotting<sup>41,42)</sup>을 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<sup>6</sup>으로 세포를 깔고 24시간 뒤에 scraper로 잘 긁어서 세포를 모은 뒤 800 rpm에서 원심 분리하였다. 상층액은 버리고 cold PBS로 세척한 뒤 蜂藥鍼液의 양에 따라 50 µl에서 100 µl까지 lysis

buffer[tris HCl(ph 8.0) 50 mM, NaCl 150 mM, 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  $\mu$ g/ml, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.1 mM]를 넣고 4°C를 유지하여 3시간에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이때 반응하는 초기 한 시간 동안 10분마다 꺼내서 외륜시켰다. 용해가 끝나면 4°C, 14,000 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 주입하였다. 4 ml씩 주입하여 윗부분 2 cm지점까지만 주입하고, 주입한 다음 표면을 고르게 하기 위하여 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 빛을 쬐는데, 퇴적 겔은 굳 으면서 부피가 줄어들기 때문에 충분히 넘칠 듯이 부었다. 30분 후 퇴적 겔이 건조되면 빛을 빼고 D.W.로 세척한 후 유리판 그대로 조립하였다. 조립한 유리판을 chamber에 장착하고 running buffer(10×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  $\mu$ l, protein양이 약 30-50  $\mu$ g정도 되는 sample 10-20  $\mu$ l를 장착하고, 띠가 낮은 volt에서 정교하게 전개되도록 40-50 volt로 약 30분 동안 가동하였다. Stacking gel의 전개가 끝나면 80~100 volt로 약 2시간 30분 정도 분리 겔을 전개시켰다.

(3) 전이

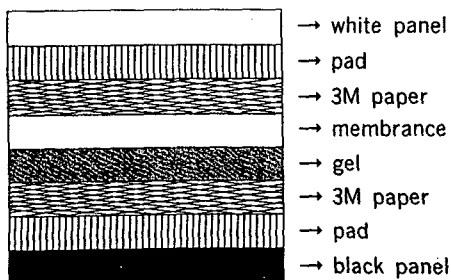


Fig. 1. Transfer Sandwich in Western Blotting

겔 크기의 nitrocellulose membrane 1장, 3M paper 2장을 준비한 후 tray에 ㉔PBS, ㉕transfer buffer (tris base 3.03g, glycine 14.63g, methanol 200 ml) ㉖staining solution (coomassie blue staining solution) 을 준비하였다. Membrane은 미리 물에 적셔놓고 ㉔에 3M paper와 겔, ㉕에 membrane, ㉖에 겔을 넣고 30분 동안 흔든 후 ㉔의 3M paper와 gel을 ㉕로 옮기고, transfer sandwich를 조립하였다. Chamber에 sandwich를 끼우고 얼음통을 넣고 transfer buffer 를 붓는데, black panel은 음극, white panel은 양극으로 하였고, 실온에서 80 volt 로 1시간 30분간 전이시켰다.

(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) 일차항체에서의 배양

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) 이차항체에서의 배양

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, 집게 등을 준비하고 편평한 판에 미리 랩을 씌워 놓고, membrane의 물기를 제거하여 판 위에 올린 후, ECL 용액을 1, 2를 1 : 1 비율로 섞어 membrane에 뿌리고 골고루 용액을 묻힌 다음 1분간 반응시킨 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 fixer

에 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 광학농도계를 이용하여 相對濃度를 각각 측정 비교하였다.

5) 통계 처리

모든 실험값은 평균값±표준편차로 하였고, 통계학적 유의성은 ANOVA test 후 대조군과 실험군의 비교는 tukey 방법에 의해 P<0.05인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

III. 成 績

1. 蜂藥鍼液이 COX-2 발현에 미치는 영향

1) LPS로 유도된 COX-2 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향

蜂藥鍼液이 LPS로 유도된 COX-2 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS 투여와 蜂藥鍼液을 각각 0.5, 1 및 5 µg/ml 처리군은 대조군에 비하여 유의한(p<0.05) 감소를 보였다(fig. 2., Tab. I.).

2) SNP로 유도된 COX-2 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향

蜂藥鍼液이 SNP로 유도된 COX-2 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, SNP와 蜂藥鍼液을 각각 0.5, 1 및 5 µg/ml 처리군은 대조군에 비하여 유의한(p<0.05) 감소를 보였다(fig. 3., Tab. II.).

Table 1. The Effects of Bee Venom on the LPS induced COX-2 Expression

Group (µg/ml)	Relative Density (% of Control)
Normal	21.75±3.50
Control	99.75±7.04
Bee Venom 5	82.75±12.74
LPS 1.0 + Bee Venom 0.5	39.75±9.01*
LPS 1.0 + Bee Venom 1.0	48.75±12.04*
LPS 1.0 + Bee Venom 5.0	16.25±3.03*

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 1.0 µg/ml LPS. The values are the mean± standard deviation of four experiments. \*: P<0.05 Statistical significance compared with control.

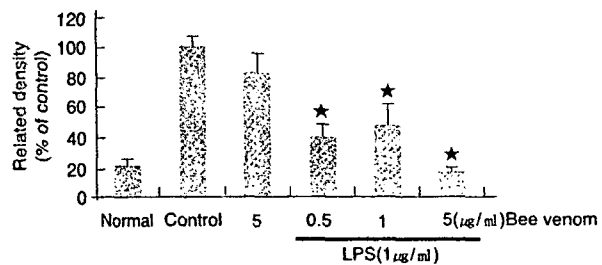


Fig. 2. The Effects of Bee Venom on LPS-Induced Expression of COX-2 in Cultured RAW 264.7 Cells \*: P<0.05 Statistical significance compared with control

Table 2. The Effects of Bee Venom on the SNP induced COX-2 Expression

Group (µg/ml)	Relative Density (% of Control)
Normal	12.25±5.72
Control	102.75±13.31
Bee Venom 5	36.50±17.04*
SNP 200 µM + Bee Venom 0.5	19.50±6.54*
SNP 200 µM + Bee Venom 1.0	10.25±7.46*
SNP 200 µM + Bee Venom 5.0	24.50±11.37*

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 200 µM SNP. The values are the mean± standard deviation of four experiments. \*: P<0.05 Statistical significance compared with control.

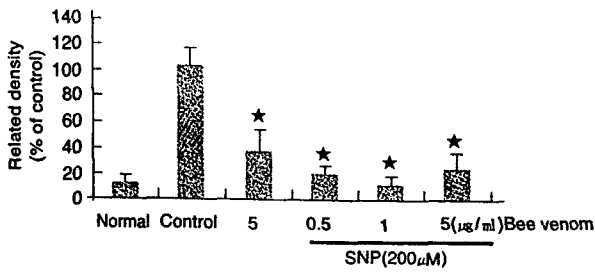


Fig. 3. The Effects of Bee Venom on SNP-Induced Expression of COX-2 in Cultured RAW 264.7 Cells \*: P<0.05 Statistical significance compared with control

3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 COX-2 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향

蜂藥鍼液이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 COX-2 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 蜂藥鍼液을 각각 0.5, 1 및 5 µg/ml 처리군은 대조군에 비하여 유의한 변동을 보이지 않았다(fig. 4., Tab. III.).

Table 3. The Effects of Bee Venom on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced COX-2 Expression

Group (µg/ml)	Relative Density (% of Control)
Normal	5.00 ± 4.42
Control	100.25 ± 6.10
Bee Venom 5	97.75 ± 14.77
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM + Bee Venom 0.5	133.00 ± 19.79
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM + Bee Venom 1.0	87.50 ± 12.76
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM + Bee Venom 5.0	101.75 ± 8.87

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The values are the mean ± standard deviation of four experiments.

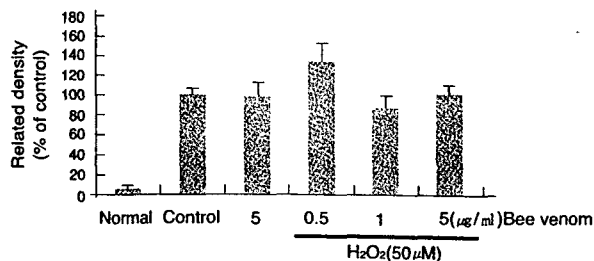


Fig. 4. The Effects of Bee Venom on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Expression of COX-2 in Cultured RAW 264.7 Cells

2. 蜂藥鍼液이 P38 발현에 미치는 영향

1) LPS로 유도된 P38 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향

蜂藥鍼液이 LPS로 유도된 p38 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS와 蜂藥鍼液 0.5, 1 및 5 µg/ml 투여군은 대조군에 비하여 유의하게(P<0.05) 감소하였다(fig. 5., Tab. IV.).

Table 4. The Effects of Bee Venom on the LPS induced P38 Expression

Group (µg/ml)	Relative Density (% of Control)
Normal	5.00 ± 4.42
Control	84.00 ± 42.85
Bee Venom 5	35.75 ± 8.81*
LPS 1.0 + Bee Venom 0.5	8.50 ± 8.32*
LPS 1.0 + Bee Venom 1.0	3.25 ± 4.55*
LPS 1.0 + Bee Venom 5.0	2.50 ± 4.33*

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 1.0 µg/µl LPS. The values are the means ± standard deviation of four experiments. \*:P<0.05 Statistical significance compared with control.

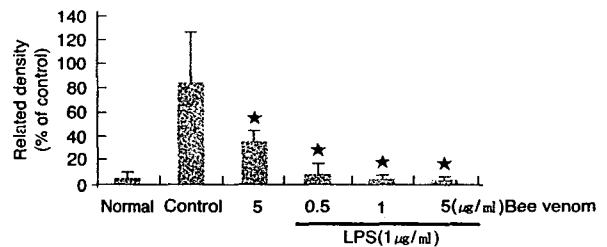


Fig. 5. The Effects of Each Bee Venom on LPS-Induced Expression of P38 in Cultured RAW 264.7 Cells \*:P<0.05 Statistical significance compared with control

2) SNP로 유도된 P38 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향

蜂藥鍼液이 SNP로 유도된 p38 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, SNP와 蜂藥鍼液을 각각 0.5, 1 및 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군은 대조군에 비하여 유의한( $p < 0.05$ ) 감소를 보였다(fig. 6., Tab. V.).

Table 5. The Effects of Bee Venom on the SNP induced P38 Expression

Group ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Relative Density (% of Control)
Normal	10.50 $\pm$ 6.58
Control	103.75 $\pm$ 4.44
Bee Venom 5	64.25 $\pm$ 15.66
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 0.5	14.75 $\pm$ 9.78*
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 1.0	13.00 $\pm$ 8.46*
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 5.0	7.50 $\pm$ 4.56*

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 200  $\mu\text{M}$  SNP. The values are the mean  $\pm$  standard deviation of four experiments. \*:  $P < 0.05$  Statistical significance compared with control.

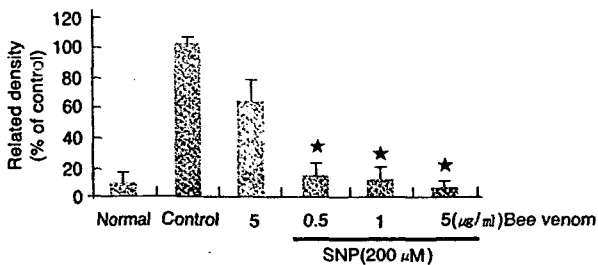


Fig. 6. The Effects of Bee Venom on SNP-Induced Expression of P38 in Cultured RAW 264.7 Cells \*:  $P < 0.05$  Statistical significance compared with control

3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 P38 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향

蜂藥鍼液이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 p38 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 蜂藥鍼液을 각각 0.5, 1 및 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군은 대조군에 비하여 유의한( $p < 0.05$ ) 변동을 보였다(fig. 7., Tab. VI.).

Table 6. The Effects of Bee Venom on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced P38 Expression

Group ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Relative Density (% of Control)
Normal	9.00 $\pm$ 4.85
Control	111.75 $\pm$ 11.48
Bee Venom 5	25.50 $\pm$ 9.71*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 0.5	31.00 $\pm$ 7.07*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 1.0	50.75 $\pm$ 8.95*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 5.0	37.25 $\pm$ 8.04*

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The values are the mean  $\pm$  standard deviation of four experiments. \*:  $P < 0.05$  Statistical significance compared with control.

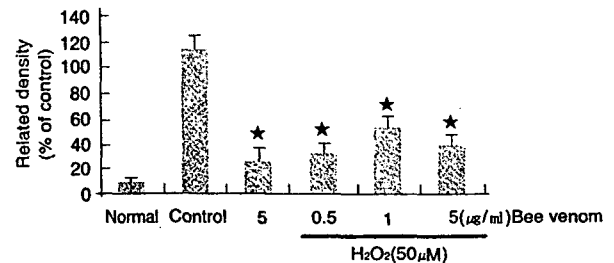


Fig. 7. The Effects of Bee Venom on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Induced Expression of P38 in Cultured RAW 264.7 Cells \*:  $P < 0.05$  Statistical significance compared with control

### 3. 蜂藥鍼液이 JNK 발현에 미치는 영향

#### 1) LPS로 유도된 JNK 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향

蜂藥鍼液이 LPS로 유도된 JNK 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS와 蜂藥鍼液 0.5, 1 및 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군은 대조군에 비하여 유의한 감소를 보이지 않았다 (fig. 8., Tab. VII.).

Table 7. The Effects of Bee Venom on the LPS induced JNK Expression

Group ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Relative Density (% of Control)
Normal	17.75 $\pm$ 4.09
Control	101.00 $\pm$ 9.08
Bee Venom 5	80.75 $\pm$ 8.73
LPS 1.0 + Bee Venom 0.5	87.50 $\pm$ 6.58
LPS 1.0 + Bee Venom 1.0	96.00 $\pm$ 10.70
LPS 1.0 + Bee Venom 5.0	110.00 $\pm$ 8.57

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS. The values are the mean  $\pm$  standard deviation of four experiments.

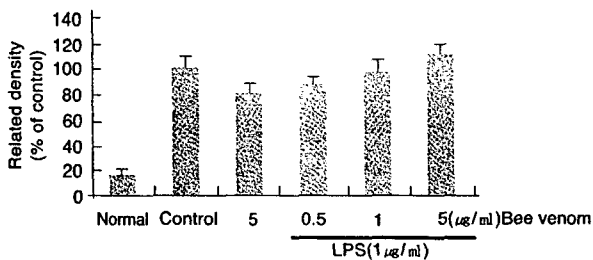


Fig. 8. The Effects of Bee Venom on LPS-Induced Expression of JNK in Cultured RAW 264.7 Cells

#### 2) SNP로 유도된 JNK 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향

蜂藥鍼液이 SNP로 유도된 JNK 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, SNP와 蜂藥鍼液을 각각 1 및 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군은 대조군에 비하여 유의한( $p < 0.05$ ) 감소를 보였다 (fig. 9., Tab. VIII.).

Table 8. The Effects of Bee Venom on the SNP induced JNK Expression

Group ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Relative Density (% of Control)
Normal	101.25 $\pm$ 8.79
Control	73.00 $\pm$ 15.60
Bee Venom 5	51.00 $\pm$ 9.27
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 0.5	39.75 $\pm$ 18.93
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 1.0	16.75 $\pm$ 12.44*
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 5.0	9.25 $\pm$ 9.42*

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 200  $\mu\text{M}$  SNP. The values are the mean  $\pm$  standard deviation of four experiments. \*:  $P < 0.05$  Statistical significance compared with control.

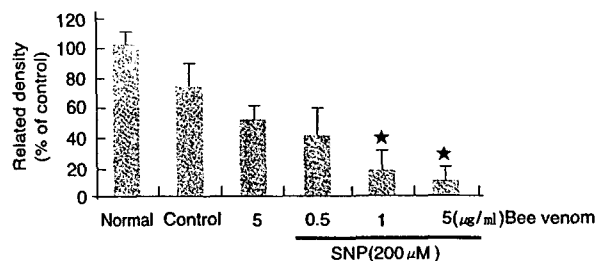


Fig. 9. The Effects of Bee Venom on SNP-Induced Expression of JNK in Cultured RAW 264.7 Cells \*:  $P < 0.05$  Statistical significance compared with control

3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 JNK 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향

蜂藥鍼液이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 JNK 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 蜂藥鍼液을 각각 0.5, 1 및 5 µg/ml 처리군은 대조군에 비하여 유의한 변동을 보이지 않았다(fig. 10., Tab. IX.).

Table 9. The Effects of Bee Venom on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced JNK Expression

Group (µg/ml)	Relative Density (% of Control)
Normal	38.00 ± 17.01
Control	80.25 ± 12.68
Bee Venom 5	80.75 ± 8.73
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM + Bee Venom 0.5	102.50 ± 15.34
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM + Bee Venom 1.0	87.25 ± 7.33
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM + Bee Venom 5.0	72.75 ± 23.01

RAW 264.7 were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The values are the mean ± standard deviation of four experiments.

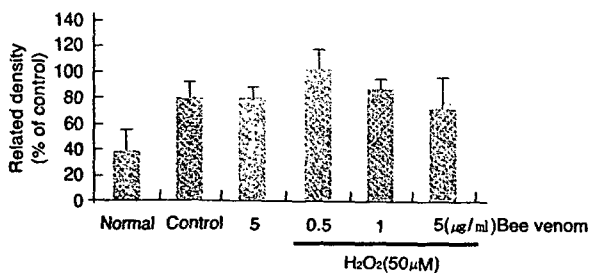


Fig. 10. The Effects of Bee Venom on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Induced Expression of JNK in Cultured RAW 264.7 Cells

4. 蜂藥鍼液이 ERK 발현에 미치는 영향

1) LPS로 유도된 ERK 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향

蜂藥鍼液이 LPS로 유도된 ERK 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS와 蜂藥鍼液 0.5, 1 및 5 µg/ml 투여군은 대조군에 비하여 유의한 감소를 보이지 않았다(fig. 11., Tab. X.).

Table 10. The Effects of Bee Venom on the LPS induced ERK Expression

Group (µg/ml)	Relative Density (% of Control)
Normal	17.75 ± 4.09
Control	111.25 ± 11.05
Bee Venom 5	88.25 ± 10.26
LPS 1.0 + Bee Venom 0.5	96.75 ± 12.15
LPS 1.0 + Bee Venom 1.0	96.00 ± 10.70
LPS 1.0 + Bee Venom 5.0	96.75 ± 9.39

RAW 264.7 were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 1.0 µg/ml LPS. The values are the means ± standard deviation of four experiments.

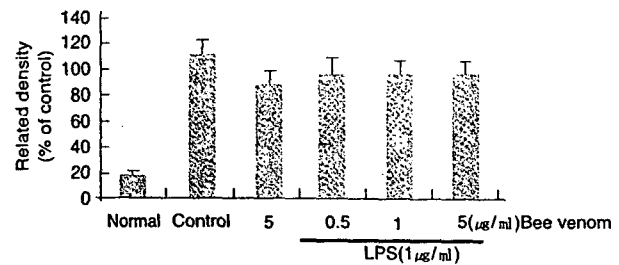


Fig. 11. The Effects of Each Bee Venom on LPS- Induced Expression of ERK in Cultured RAW 264.7 Cells



2) SNP로 유도된 ERK 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향

蜂藥鍼液이 SNP로 유도된 ERK 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, SNP와 蜂藥鍼液을 5 µg/ml 처리군은 대조군에 비하여 유의한(p<0.05) 감소를 보였다(fig. 12., Tab. XI.).

Table 11. The Effects of Bee Venom on the SNP induced ERK Expression

Group (µg/ml)	Relative Density (% of Control)
Normal	18.25 ± 9.23
Control	100.50 ± 8.32
Bee Venom 5	51.00 ± 9.27*
SNP 200 µM + Bee Venom 0.5	84.75 ± 11.12
SNP 200 µM + Bee Venom 1.0	98.75 ± 8.87
SNP 200 µM + Bee Venom 5.0	63.25 ± 8.61*

RAW 264.7 were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 200 µM SNP. The values are the mean ± standard deviation of four experiments. \*: P<0.05 Statistical significance compared with control.

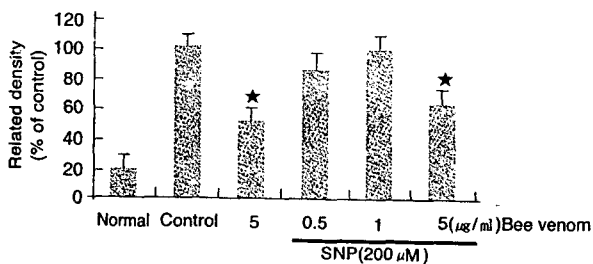


Fig. 12. The Effects of Bee Venom on SNP- Induced Expression of ERK in Cultured RAW 264.7 Cells \*: P<0.05 Statistical significance compared with control

3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 ERK 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향

蜂藥鍼液이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 ERK 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 蜂藥鍼液을 0.5 µg/ml 처리군은 대조군에 비하여 유의한(p<0.05) 증가를 보였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 蜂藥鍼液을 1 및 5 µg/ml 처리군은 대조군에 비하는 증가하는 경향을 보였다(fig. 13, Tab. XII.).

Table 10. The Effects of Bee Venom on the LPS induced ERK Expression

Group (µg/ml)	Relative Density (% of Control)
Normal	18.25 ± 9.23
Control	31.00 ± 14.37
Bee Venom 5	51.00 ± 9.27
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50µM + Bee Venom 0.5	95.50 ± 18.03*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM + Bee Venom 1.0	70.50 ± 9.86
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM + Bee Venom 5.0	63.25 ± 8.61

RAW 264.7 were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The values are the mean ± standard deviation of four experiments. \*: P<0.05 Statistical significance compared with control.

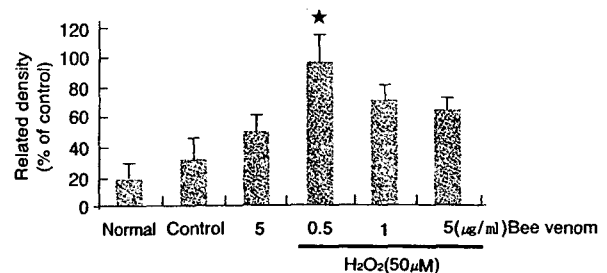


Fig. 13. The Effects of Bee Venom on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Induced Expression of ERK in Cultured RAW 264.7 Cells \*: P<0.05 Statistical significance compared with controls

### IV. 考 察

蜂藥鍼療法은 蜂毒을 일정한 방법으로 추출 가공하여 침치료 처방에 따른 穴位, 壓痛點 혹은 體表의 陽性反應點에 주입함으로써 刺鍼 效果와 蜂毒의 물리적·약리학적 효과를 동시에 이용하는 치료법이다. 이는 인체의 음양기혈을 조절하여 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하고 방어하는 藥鍼療法의 하나로, 2천여 년 전부터 임상에서 각종 질환에 응용하여 왔다<sup>52</sup>.

蜂毒의 成分은 enzymes, polypeptides, non peptide components로 구성되어 있다<sup>53-55</sup>. 이 중 enzymes의 주요 성분은 phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)와 hyaluronidase 등이 있고, poly 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 있으며, Non peptide components는 histamine, dopamine, noradrenaline 등으로 구성되어 있다<sup>55-57</sup>.

최근 蜂藥鍼을 이용한 임상적 연구로 왕<sup>58</sup> 및 김<sup>59</sup>은 膝關節炎, 황<sup>20</sup>은 류마티드 關節炎, 이<sup>21</sup> 및 배<sup>22</sup>는 腰椎間板脫出症, 김<sup>23</sup>은 胸·腰椎壓迫骨折, 김<sup>24</sup>은 足蹠痛, 황<sup>50</sup>은 두피 지루피부염에 蜂藥鍼이 유효함을 보고하였다. 실험적 연구로 김<sup>25</sup>, 이<sup>26</sup> 및 김<sup>27</sup>은 關節炎, 한<sup>28</sup>과 이<sup>29</sup>는 關節炎 滑液細胞, 임<sup>30</sup>, 정<sup>31</sup> 및 이<sup>32</sup>는 細胞活性, 이<sup>33</sup>의 신경아세포종, 오<sup>13</sup>의 흑색종에 蜂藥鍼液이 유효함을 보고하였고, 박<sup>34</sup>과 이<sup>35,36</sup>는 세포독성에 대하여 보고하였다. 그리고 봉약침의 이러한 임상적, 실험적 유효성과 더불어 세포소멸과 염증 등에 미치는 효과에 대한 기전 연구로 정<sup>37</sup>의 유전자 발현, 송<sup>38</sup>의 NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IL-1과 하<sup>39</sup>의 PLA<sub>2</sub>, COX-2, iNOS, AA, PG의 변동에 봉약침액이 관련됨을 보고하고 있지만 지속적으로 연구가 진행되어야 과제이다.

일반적으로 세포에 LPS, SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 다른 자극에 의해 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), interleukin-6(IL-6) 같은 염증성 cytokine이 분비되어 nuclear factor kappa-B (NF-kB), inducible nitric oxide synthetase (iNOS), TNF- $\alpha$ , cyclooxygenase-1(COX-1), cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현 등에 관련되어 세포소멸 및 염증을 유발하게 되는 것으로 알려져 있다<sup>40</sup>.

TNF와 IL-1은 NF-kB에 의해 합성이 조절된다. 또한

NF-kB 활성화는 염증반응에 관여하는 COX-2 및 산화적 손상에 관여하는 NO 등을 생성하는 iNOS의 발현과 직접적으로 관련되어 있다고 알려져 있다<sup>41</sup>). 또한 NF-kB의 활성이 증가되면 COX-2의 활성화에 의해 염증반응을 증가시킴으로써 세포소멸을 유발함을 보여준다<sup>40</sup>.

세포소멸에 관여되는 물질로는 jun N-terminal Kinase(JNK), extra-signal response kinase (ERK) 및 p38 kinase로 이루어져 있는 mitogen- activated protein(MAP) kinase가 포함되어 있다고 알려져 있다<sup>42-44</sup>). MAP kinase 신호전달계는 세포가 외부의 환경변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보를 세포질 및 세포핵 내부로 전달하는 과정에 관여하는 대표적인 신호전달계이다. 특히 세포의 성장, 발생, 분화, 사멸 등의 조절기전에 관여한다고 알려져 있다<sup>45</sup>.

Mammalian cell의 MAP kinase 신호전달계의 군에는 ERK와 JNKs/SAPK(stress-activated protein kinase) 그리고 p38/HOG가 속한다<sup>46</sup>.

최근에는 세포소멸과 염증에 관련하여 JNK와 p38 MAP kinase보다는 ERK/MAP kinase pathway에 관한 연구가 많이 진행되고 있으며, 실제로 세포주에서 항암제가 MAP kinase/ERK Pathway를 통하여 세포소멸을 유발한다고 보고되고 있다<sup>47-51</sup>.

봉약침액이 세포소멸과 염증에 관련되는 물질들에 영향을 줄 수 있는 기전은 아래 도식으로 표현할 수 있다(fig 14).

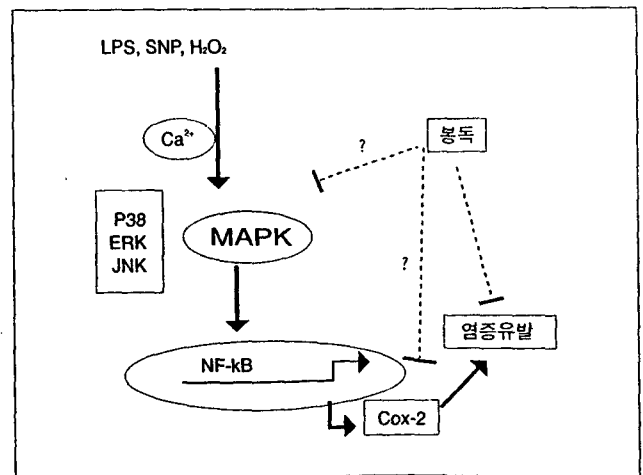


Fig. 14. The Pathway of Inflammation related with COX-2, MAP kinase and Bee Venom

이와 같이 봉약침액은 jun N-terminal kinase (JNK), extra-signal response kinase (ERK) 및 p38 kinase로 이루어지는 mitogen-activated protein kinase(MAPK)와 COX-2에 관련이 있을 것으로 추정되었다.

이에 연구자는 蜂藥鍼液이 염증과 세포소멸을 저항하는 효과에 대한 기전 연구를 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS, SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 염증을 유도하고, 蜂藥鍼液을 처리하여 염증과 細胞消滅의 指標 중의 하나인 COX-2, p38, JNK 및 ERK를 관찰하였다.

COX-2 발현은 대조군에 비하여 LPS와 봉약침액 0.5, 1 및 5 µg/ml 처리군과 SNP와 봉약침액 0.5, 1 및 5 µg/ml 처리군에서 유의한 감소를 보였지만 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 蜂藥鍼液 0.5, 1 및 5 µg/ml 처리군에서는 유의한 변동을 보이지 않았다. 이는 LPS와 SNP에 의한 COX-2의 발현을 봉약침액이 억제할 수 있음을 보여주는 것으로 하60)가 LPS로 유도된 COX-2의 상승을 봉약침액으로 감소시켰다고 보고한 것과 상동하는 결과이다.

P38 발현은 대조군에 비하여 LPS와 봉약침액 0.5, 1 및 5 µg/ml 처리군, SNP와 봉약침액 0.5, 1 및 5 µg/ml 처리군, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 蜂藥鍼液 0.5, 1 및 5 µg/ml 처리군에서 유의한 감소를 나타내었다. 이는 LPS, SNP 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유발된 p38의 상승이 봉약침액으로 감소됨을 보여주는 것이다.

JNK 발현은 SNP와 봉약침액 1 및 5 µg/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였고, LPS 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 봉약침액을 처리한 군에서는 대조군에 비하여 유의한 변동을 보이지 않고 비슷한 농도를 나타내었다.

ERK 발현은 SNP와 봉약침액 5 µg/ml 처리군은 대조군에 비하여 유의한 감소를, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 봉약침액 0.5 µg/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였고, LPS와 봉약침액을 처리한 군에서는 대조군에 비하여 유의한 변동을 보이지 않았다. 이 결과는 LPS로 유도된 ERK의 증가는 대조군과 유사한 농도를, SNP로 유도된 ERK는 봉약침액의 일부 처리군에서 유의한 감소를, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 ERK는 유의한 증가를 보여 일정한 방향으로 세포소멸이나 염증을 저항에 영향을 준다고 볼 수는 없다.

이상으로 보아, 이 연구는 LPS, SNP 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 COX-2, p38, JNK, ERK의 상승이 蜂藥鍼液으로 감소됨을 보여 주는 것으로 판단된다. 이는 봉약침액이 세포소멸이나 염증 등에 대항하는 효과에 대한 일부 기전을 입증한 것으로 향후 지속적인 연구가 필요하리라

생각된다.

## V. 結 論

蜂藥鍼液의 炎症 및 細胞消滅 등에 미치는 영향을 究明하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS, SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 염증을 유도하고, 蜂藥鍼液을 처리하여 炎症과 細胞消滅의 指標로 관련되는 COX-2, p38, JNK 및 ERK의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. COX-2 발현은 LPS와 SNP를 각각 봉약침액 0.5, 1 및 5 µg/ml 처리군에서 유의한 감소를 보였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 봉약침액 0.5, 1 및 5 µg/ml 처리군에서 유의한 변동을 보이지 않았다.
2. P38 발현은 LPS, SNP 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 각각에 봉약침액 0.5, 1 및 5 µg/ml을 처리한 모든 군에서 유의한 감소를 나타내었다.
3. JNK 발현은 SNP와 봉약침액 1 및 5 µg/ml 처리군에서 유의한 감소를 보였고, LPS 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 봉약침액을 처리한 군에서는 유의한 변동을 보이지 않았다.
4. ERK 발현은 SNP와 봉약침액 5 µg/ml 처리군은 유의한 감소를, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 봉약침액 0.5 µg/ml 처리군에서 유의한 증가를 보였고, LPS와 봉약침액을 처리한 군에서는 유의한 변동을 보이지 않았다.

## 參 考 文 獻

1. 권기록, 고흥균, 김창환. 蜂針에 대한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1994; 11(1): 159-171
2. 고흥균, 권기록, 인창식. 봉독약침요법. 서울: 경희대학교 출판국. 2003; 105-162, 214.
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): 283-292.
4. 도원석, 장준혁, 김경호 외 2인. 蜂毒療法이 鼠의 膝關節 炎症性 浮腫에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1995; 12(1): 211-220.

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 抗炎作用에 관한 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1998; 15(1): 317-329.
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): 157-169.
8. 공현숙, 고흥균, 김창환. 蜂針毒療法이 抗癌擊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): 101-115
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): 129-145.
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(2): 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): 1766-1772
15. 권기록, 고흥균. 蜂藥鍼療法의 免疫反應에 관한 臨床的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2000; 17(1): 169-174.
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 대한 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 대한 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. 이재동, 김지훈. 요추간판탈출증 환자 22례에 대한 봉독약침 치료의 요통평가 지수를 이용한 임상고찰. 대한한의학회지. 1999; 20(2): 200-207
22. 배은정, 조현열, 진재도 외 7인. 蜂毒藥鍼並行治療한 腰椎間板脫出症 患者의 臨床 考察. 대한침구학회지. 2002; 19(1): 54-64
23. 김기현, 이성노, 송호섭 외 6인. 蜂藥鍼 治療를 並行한 胸?腰椎壓迫骨折 患者의 臨床的 考察. 대한침구학회지. 2002; 19(6): 35-48
24. 김기현, 안광현, 황현서 외 5인. 足蹠痛에 蜂藥鍼療法이 미치는 影響. 대한침구학회지. 2002; 19(5): 149-160
25. 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.
26. 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.
27. 김민정, 박상동, 이아람 외 3인. 쥐의 Collagen 유발 관절염의 활액에서 단백질분해효소의 활성 및 유리기 손상에 미치는 봉독약침의 억제효과. 대한침구학회지. 2002; 19(5): 161-175
28. 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.
29. 이운섭, 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.
30. 임윤경. 족삼리 봉독약침자극이 Formalin-induced Pain Behavior 및 척수내 Fos 양성반응 신경세포의 활성에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 2000.
31. 정선희. 봉독약침이 Writhing Reflex 및 척수내 통증 관련 신경세포의 활성에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 2000.
32. 이승훈, 서정철, 한상원 외 5인. 蜂藥鍼液이 細胞活性에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2002; 19(5): 57-

33. 이정훈, 진재도, 한상원 외 3인. Bee Venom 및 Melittin 藥鍼液이 神經麻痺物質을 處置한 神經芽細胞腫의 細胞死에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2002; 19(1): 189-202
34. 박원, 김용석, 고희균. 蜂毒 藥鍼液의 細胞毒性에 關한 研究. 대한침구학회지. 2002; 19(2): 65-77
35. 이종석, 고희균, 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): 177-195.
36. 이종석, 고희균, 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): 227-252.
37. 정혜윤. 蜂毒 藥鍼液이 炎症 및 痛症 關聯 遺傳子 發現에 미치는 影響. 경희대학교 대학원 박사학위 논문. 2002.
38. Yu C. Huang, Jih H. Guh, Zhi J. Cheng 외 5人. Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophages by 7HQ derivatives. European J. of Pharmacology. 2001; 418: 133-139
39. 吳宰昊. 알츠하이머 질환과 관련된 신경세포 손상 기전 및 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2의 신경세포 보호효과에 관한 연구. 부경대학교 대학원 박사학위논문. 2002.
40. 김세중. 免疫學. 서울: 高麗醫學. 1994; 263-264.
41. Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H.. 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF- $\kappa$ B signaling pathway. Proc. Natl. Acad. U.S.A. 2000; 97(9): 4844-4849
42. Leppa, S., Saffrich, R., Ansorge, W., Bohmann, D.. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC-12 cell differentiation. EMBO J. 1998; 17: 4404-4413.
43. Ye, J.M., Doyle, P.J., Iglesias, M.A., Watson, D.G., Cooney, G.J. and Kraegen, E.w.. Peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR) -alpha activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats: comparison with PPAR-gamma activation. Diabetes 2001; 50: 411-417.
44. Furukawa, K., Guo, Q., Schellenberg, G.D. and Mattson, M.P.. Presenilin-1 mutation alters NGF-induced neurite outgrowth, calcium homeostasis, and transcription factor(AP-1) activation in PC12 cells. J. Neurosci. Res. 1998; 52: 618-624.
45. Guise, S., Braguer, D., Carles, G., Delacourte, A., Briand, C.. Hyper phosphorylation of tau is mediated by ERK activation during anticancer drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. J. Neurosci. Res. 2001; 63: 257-267.
46. Zi, X. and Agarwal, R.. Modulation of mitogen-activated protein kinase activation and cell cycle regulators by the potent skin cancer preventive agent silymarin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999; 263: 528-536.
47. Nacy, J.L., Yaxiong, David, G.C., and Daniel, M.D. Neuronal apoptosis resulting from high doses of the isolavone genistein: role for calcium and P42-44 mitogen-activated protein kinase. JPET. 2001; 299, 67-75.
48. Ding, Q., Wang, Q., Evers, B.M.. Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001; 284: 282-288.
49. Dai, Y., Yu, C., Singh, V., Tang, L., Wang, Z., McInistry, R., Dent, P., and Grant, S.. Pharmacological inhibitors of the mitogen-activated protein kinase(MAPK) kinase/MAPK cascade interact synergistically with UCN- 01 to induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human leukemia cells. Cancer Res. 2001; 61: 5106-5115.
50. Mackeigan, J.P., Collins, T.S., and Ting, Y.P.J., MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. J. Biol. Chem.. 2000; 275: 38953-38956.
51. Yu, W., Liao, Q.Y., Hantah, F.M., Sanders, B.G., and Kline, K.. Activation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase but not p38 mitogen-activated protein kinases is required for RRR-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells. Cancer Res. 2001; 61: 6569-6576.
52. 인창식, 고희균. 蜂毒療法에 대한 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.
53. 임종국. 鍼灸治療學. 서울; 集文堂. 1983: 226-227, 545-599.

54. 上海中醫學院. 鍼灸學. 香港; 商務印書館. 1990: 333-334.
55. E. Habermann. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In *Venomous Animals and their Venoms*. Academic Press. 1971; 3: 61.
56. E.S. Assem, G. Atkinson. Histamine release by MCDP(401), A peptide from the venom of the honey bee, *brit. Pharmacol.* 1973; 337-338.
57. 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): 436-442.
58. 황민섭, 윤종화, 김갑성 외 1인. 봉약침요법으로 치료한 두피 지루피부염에 대한 임상적 고찰. *대한침구학회지.* 2002; 19(6): 24-34.
59. 송정렬. 蜂藥鍼液이 NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IL-1에 미치는 影響. 경원대학교 대학원 석사학위논문. 2002.
60. 하성중. 蜂藥鍼液이 PLA2, COX-2, iNOS, AA 및 PG에 미치는 影響. 경원대학교 대학원 석사학위논문. 2002.