

원저

蜂毒藥鍼液이 비만세포주의 CD/cytokine 遺傳子 發現에 미치는 影響

이용경 · 강성길 · 고흥균

경희대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Microarray Analysis of CD/cytokine Gene Expression in Human Mast Cell treated with Bee Venom

Lee Woong-kyung, Kang Sung-keel and Koh Hyung-kyun

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

Objective : Bee Venom(BV) has been used for various kinds of inflammatory or painful conditions in Oriental Medicine clinics, and there publishes reports on its therapeutic effects and the probable mechanism of those therapeutic effects, where CDs and cytokines plays important role. This study investigated the influences of bee venom on the expressions of CDs and cytokines of HMC cell line

Methods : In this study we analysed the expression profile of HMC cell line treated with BV of 10-2ug/ml in relation to that of HMC cell line treated with vehicle by way of CD/cytokine microarray hybridization with 342 genes on it.

Results : There were no upregulated genes by more than 3 fold, while there showed some downregulated genes by less than 1/3 fold as follows: colony stimulating factor 2, CD122, IL-7, CD112, TNF-alpha, CD138, CD166, TGFbetaR2, CD42b, CD62L, CD111, interleukin 10 receptor alpha, colony stimulating factor 1(macrophage), CD38 antigen(p45), CD121a, CD33 antigen(gp67), colony stimulating factor 1 receptor, B cell linker protein (SLP65) mRNA, CD94, alanyl(membrane) aminopeptidase, immunoglobulin(CD79A) binding protein 1, CD205, CD241, CD 207, CDw121b, integrin alpha L(CD11a), integrin beta 1(CD29), CD91, CD42b.

- 접수 : 2003년 8월 25일 · 수정 : 2003년 9월 4일 · 채택 : 2003년 9월 20일
· 교신저자 : 고흥균, 서울특별시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 부속한방병원 침구과
Tel. 02-958-9194 E-mail : koh5795@chollian.net

Conclusions : Bee venom treatment induced downregulation of some CD's or cytokines including TNF- α , IL-1R with its possible implication in an antiinflammatory action of BV. Further research on expression profile changes induced by BV treatment is expected.

Key words : Bee Venom, Human Mast Cell, Microarray, TNF alpha, IL-1R

I. 緒 論

봉독약침요법은 최근 그 임상적 연구범위가 더욱 넓어지고 있으며 특히 관절염 등 염증성, 동통성 질환에서 광범위하게 응용되고 있다¹⁾. 봉독은 효소성분으로 phospholipase A2, hyaluronidase, acid phosphomonoesterase, α -D-glucosidase, lysophospholipase 등이 있으며, 펩티드 성분으로는 melittin, apamin, MCD peptide 등이 있고, 기타 유기성분으로 histamine, dopamine, noradrenaline 등의 주요 성분이 있다.

비만세포는 면역·염증반응에서 중요한 역할을 하며 특히 염증관련 cytokine을 분비함으로써 주요 염증성 질환의 병리발생에 큰 의의를 지닌다.

근래의 봉독에 대한 분자생물학적, 세포형태학적 연구로 신경아세포종의 세포사에 미치는 영향을 유전자발현을 통하여 분석한 보고²⁾, 흑색종세포의 apoptosis와 세포주기관련 유전자발현에 미치는 영향³⁾, 활액세포의 세포활성, 증식, 유전자발현에 미치는 영향⁴⁾, 류마티스관절염 활액세포에 대한 영향을 세포형태학적 분석과 세포주기와 유전자발현 분석으로 관찰한 보고⁵⁾, 염증 및 통증 관련 유전자 발현에 미치는 영향⁶⁾, 봉독약침액이 교세포주, 신경아세포주, 비만세포주의 세포활성에 미치는 영향에 대한 연구⁷⁾와 임상연구로서 요추간판탈출증에 대한 보고⁸⁾ 등이 있다.

최근에는 유전자 발현에 관한 정보를 연구하는 방법으로서 기존의 개별 유전자 발현을 몇몇씩 관찰 하던 방법에 비하여 microarray를 이용함으로써 대량의 유전자 발현 정보를 한꺼번에 평가하는 방법이 시도되고 있다.

이에 저자는 봉독약침의 작용기전과 임상적 활용 범위에 도움이 될 수 있도록 봉독약침액이 비만세포의 CD/cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 microarray를 통하여 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 세포주

본 실험에는 사람 비만세포주(HMC-1)를 이용하였다. HMC-1(human mast cell line)은 leukemia 환자로부터 유래되었으며⁹⁾, c-kit 수용체를 발현하고 IgE에 대한 Fc ϵ RI이 결핍된 세포로, 주로 염증과 알러지 실험에 유용한 세포주이다.

2) 시약 및 기구

① 배양액

Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM), fetal bovine serum(FBS) 등은 GibcoBRL(USA)

에서 구입했다. 100ug/ml penicillin and 100ug/ml streptomycin도 GibcoBRL(USA)을 사용하였다.

② 봉독

Crude bee venom을 Sigma(USA)에서 구입하였다.

③ 세포독성 시험용 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)는 Roche(Germany)에서 구입하였다.

④ RNA 추출과 reverse transcription, microarray 실험용 시약

RNAzol B는 Tel-Test(USA)를 사용하였고, Human Cot-1 DNA, Ribonuclease Inhibitor, Superscript II reverse transcriptase는 GibcoBRL(USA)에서 구입했다. poly(dA), oligo(dT), dNTP 등은 Pharmacia, Cy3-dUTP, Cy5-dUTP 등은 Amersham 제품을 사용하였다.

기타 일반 시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

⑤ 기구

Hybridization cassette은 Telechem에서 구입하였다. Microarray chip(Crea Hi380-DC101)은 CreaGene Co.(한국) 제품을 사용하였다. Confocal laser-scanning microscope Scan Array 5000은 Affimetrix(USA)를 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

실험에 사용한 HMC는 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin이 포함된 IMDM 용액에 배양하였다. 5% CO₂, 95% 공기, 37℃ 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하고, 배양액은 주 3회, 2~3일마다 교환하였다.

2) 독성 시험

생존하는 세포의 수를 측정하는 방법은 살아있는

세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 작용을 이용한 MTT 실험을 하였다. ELISA reader(Bio-Tek, 미국)로 595nm에서 측정된 흡광도(optical density, 이하 OD)의 값은 살아있는 세포의 수를 반영하며 세포 독성의 판정은 다음의 산출식에 따라 % viability로 나타내었다.

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

먼저 비만세포를 96well plate (Corning, USA)에 well당 배양액 100 ul에 5×10⁴개의 세포수가 되도록 serum free 배양액에 분주하고 검액으로서 crude bee venom의 최종 농도가 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹, 1, 10ug/ml이 되도록 처치하여 2시간 동안 incubation하고, vehicle을 처치한 세포군을 대조군으로 하였다. 각 well에 MTT labeling reagent 용액을 10ul씩 가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 solubilization solution을 각 well에 100ul씩 첨가하여 배양기에 20시간 유지시키고 ELISA reader로 690nm를 참고치로 하여 595nm에서 측정하였다.

모든 실험값은 mean±standard deviation으로 하고, 통계학적 분석은 SPSS for windows 8.0 program을 이용하였다. Student's t-test를 실시하여 각 군간의 통계학적 유의성을 검정하였다 (α=0.05).

3) 봉독약침액의 처치

실험군에는 독성실험을 거쳐 독성이 없는 농도로 나타난 것 중 중간값에 해당하는 10⁻²ug/ml 봉독을 처치하고,^{6),10)} 대조군에는 동량의 vehicle을 처치하였다. 2시간이 지난 후 각각 RNA를 추출하여 Fluorescence probe 합성 과정을 밟았다.

4) RNA의 추출

봉독 혹은 vehicle을 처치한 실험군과 대조군 각각에서 원심분리기를 이용하여 세포를 harvest하여 상층액을 제거하고 다시 세포를 suspension하였다. 세포 10^7 개당 2ml의 RNazol을 사용하여 lysis시키고 상온에서 10분간 방치하였다. 세포 10^7 개당 0.2ml의 chloroform을 첨가하여 15초간 흔들어 잘 섞어준 후 5분간 상온에서 방치하였다. 4°C 에서 $12000\times\text{g}$ 로 15분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube로 옮겨 동량의 isopropanol을 첨가하고 10분간 상온에서 방치하였다. 다시 4°C 에서 $12000\times\text{g}$ 로 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 80% 에탄올 1ml을 첨가하여 원심분리하였다. 에탄올을 제거하고 적당량의 DEPC-DDW를 첨가하고 녹여 total RNA를 준비하였다.

5) Fluorescence probe의 합성

총 RNA 100ug(total)인 22ul를 500ug/ml의 oligo dT 2ul와 혼합하여 70°C 에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 방치하였다. 이 반응액에 5X reaction buffer 10ul, 10X dNTP(즉 5mM d(ACG)TP와 2mM TTP) 5ul, fluorescent nucleotide(대조군은 1mM Cy3-dUTP, 실험군은 1mM Cy5-dUTP) 2ul, 1.5ul RNAsin, 2.5ul의 superscript II reverse transcriptase(200 U/ul) 등을 첨가하여 37°C 에서 2시간 반응시켰다. 이후 이 반응액에 3N NaOH 6ul를 첨가하고 65°C 에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거하고, 다시 1M Tris-HCl(pH 7.5) 20ul, 1N HCl 12ul를 첨가하여 NaOH를 중화시켰다. 이 반응액을 Biospin 6 column에 옮겨 $1000\times\text{g}$ 로 4분간 원심분리하고, Microcon 30 tube로 옮겨 $12000\times\text{g}$ 로 3분간 다시 원심분리하였다.

6) Microarray Hybridization

형광물질과의 결합반응을 준비하기 위해 prehy-

bridization buffer인 6X SSC, 0.2% SDS, 5X Denhardt's solution, 1mg/ml salmon sperm solution 등을 microarray에 떨어뜨리고 22mm \times 22mm의 cover glass로 덮어 glue로 봉합한 후 2시간 동안 상온에서 방치하였다. 이후 봉합을 열고 2X SSC, 0.2X SSC로 세척하고 50ml 튜브에서 3000 rpm, 2분간 원심분리하였다. fluorescence probe 28.2ul, poly(dA) (4mg/ml in TE) 1ul, yeast tRNA (4mg/ml) 1ul, human Cot I DNA(Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA) (10mg/ml) 1ul, 10% SDS 0.8ul, 20 x SSC 8ul를 혼합하여 99°C 에서 5분간 방치하였다. 실온에서 5분간 방치한 후 반응액은 $12000\times\text{g}$ 로 2분간 원심분리하고 이어서 microarray에 점적하여 microarray를 62°C 에서 overnight 반응시켰다. hybridization된 microarray는 $1\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 용액으로 세척하였다. $0.1\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 용액으로 50°C 에서 10분간 세척한 후 이어서 $0.1\times\text{SSC}$ 용액으로 10분간 다시 세척하였다.

7) Scanning and Data analysis

Hybridization이 끝난 microarray는 confocal laser-scanning microscope(Scan Array 5000)으로 scan하여 영상을 얻었다. Cy3(GHeNe laser)는 543nm에서, Cy5(RHeNe laser)는 632nm를 사용하였다. ImaGene과 ScanAnalyze를 이용하여 각각의 spot에 대한 data를 저장한 후 median값을 사용하여 각 spot의 pixel intensity에서 local background intensity를 감하고 microarray상의 house-keeping gene의 intensity 값을 이용하여 녹색과 적색 파장에서의 두 형광영상을 normalization한 후 처치군과 대조군 사이에서 각 microarray상의 각 gene의 발현 정도에 대한 ratio(Cy5/Cy3)를 얻었다. 대조군에 비하여 처치군의 신호강도가 3배 이상 혹은 1/3배 이하인 것을 유의한 차이가 있는 것으로 보았다^{11,12)}.

III. 成 績

1. 세포 독성시험 결과

대조군(100.0±12.0%)에 비하여 봉독처리군은 농도별로 10⁻⁵ug/ml, 10⁻⁴ug/ml, 10⁻³ug/ml, 10⁻²ug/ml, 10⁻¹ug/ml, 1ug/ml 및 10ug/ml에서는 각각 92.3±6.2%, 88.1±6.8%, 86.3±5.5%, 87.1±6.5%, 101.3±10.7% 103.8±15.5% 및 53.5±1.8%의 세포활성도를 나타내 10ug/ml 처리군은 대조군에 비하여 유의한 차이를 보였으나(p<0.01) 다른 세포군은 유의한 차이를 보이지 않았다<Fig. 1>. 독성시험 결과 독성이 없는 것으로 확인된 농도 중 중간값에 해당하는 10⁻²ug/ml로 봉독을 처리하여 RNA를 추출하였다.

2. Microarray에서의 hybridization 양상

HMC cDNA microarray에 fluorescence hybridization된 영상은 <Fig. 2>와 같다. 적색은 Cy3, 녹색은 Cy5에 의한 형광영상이다. 적색과 녹색은 처치군과 대조군에서 유전자 발현에 차이가 현저한 것을 의미하며, 황색은 두 군에서 유전자 발현에 큰 차이가 없는 것을 나타내었다.

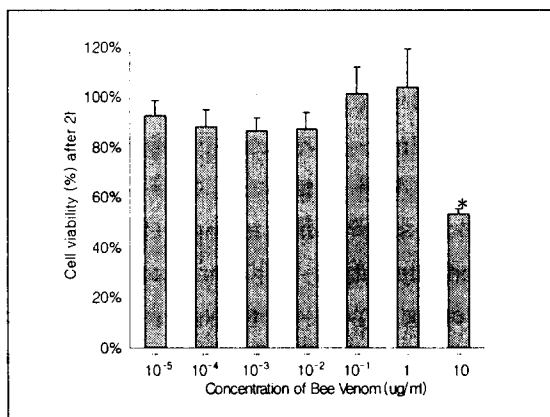


Fig. 1. The effect of various concentrations of crude bee venom on cell viability of mast cell line for 2 hour.

* significantly decreased cell viability(p<0.01)

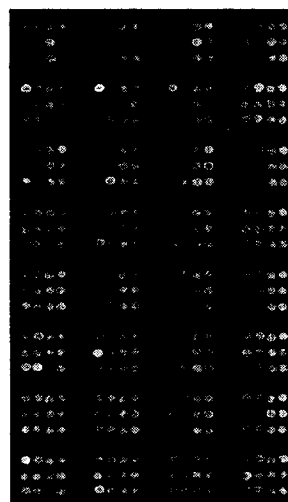


Fig. 2. Two-color image of an HMC-1 cDNA microarray.

The array consists of PCR-amplified cDNA clones printed on glass; the diameter of each spot is 500 μm. A sample mixture consisting of Cy3- labelled mRNA from untreated cells and Cy5- labelled mRNA from EGCG-treated cells was added. After scanning for each fluorescent dye false colour images(red for Cy3, green for Cy5) were super- imposed. Yellow dots represent genes that show no change in expression. The hybridized microarray was scanned with the confocal laser scanner Scan Array 5000(General Scanning) at 543nm(Cy3, GHeNe laser) and 632nm(Cy5, RHeNe laser). Two independent experiments were performed.

색은 Cy5에 의한 형광영상이다. 적색과 녹색은 처치군과 대조군에서 유전자 발현에 차이가 현저한 것을 의미하며, 황색은 두 군에서 유전자 발현에 큰 차이가 없는 것을 나타내었다.

3. 봉독약침액 처치시 발현이 항진된 CD/cytokine 유전자

대조군에 비하여 처치군의 신호강도가 3배 이상인 것을 유의한 것으로 했을 때^{11),12)} 비만세포에 봉독 처치시 대조군에 비하여 유의하게 발현이 항진되

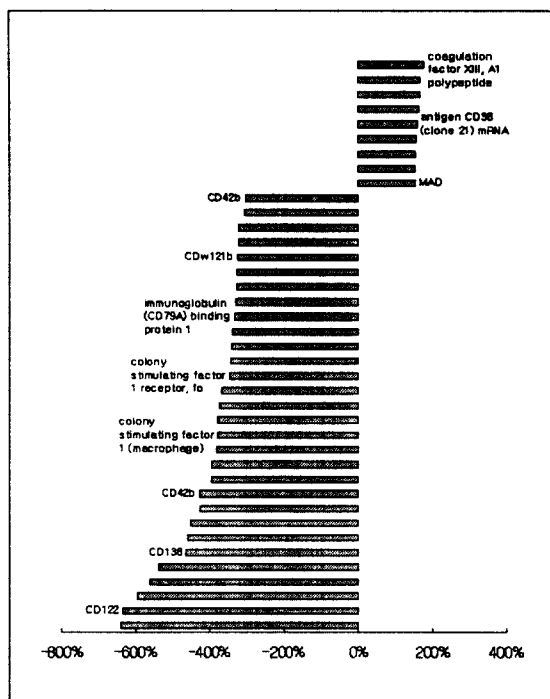


Figure 3. Relative expression ratios of Bee Venom treated

HMC-1 cells with vehicle treated HMC-1 cells. The genes in the upper part are upregulated by more than 150%(table I), while the genes in the lower part are downregulated by less than 33%(table II), that is, upregulated in the vehicle treated HMC-1 cells by more than 300%. Detailed lists of upregulated or down-regulated genes are provided in table I and table II.

는 CD/cytokine 유전자는 관찰되지 않았다. 다만, 150%~180% 범위로 발현이 항진되는 유전자로는 순서대로 MAD(mothers against decapentaplegic Drosophila), GTP-binding protein(NGB) mRNA, CD246, transferrin, antigen CD36(clone 21) mRNA, IL-2R gamma, CD25, single-stranded DNA-binding protein(SSBP), coagulation factor XIII, A1 polypeptide 등이 있었다<Fig. 3, Table I>.

Table I. Genes upregulated in Bee Venom-treated HMC-1 cells

Gene	ID	Normalized Ratio of Medians
MAD (mothers against decapentaplegic, Dr)	hak286	1.520633
GTP-binding protein (NGB), mRNA	hak316	1.531719
CD246	hak176	1.537094
transferrin	hak248	1.560186
antigen CD36 (clone 21) mRNA	hak276	1.588969
IL-2Rgamma	hak262	1.633367
CD25	Ahn8	1.667744
single-stranded DNA-binding protein(SSB)	hak338	1.670145
coagulation factor XIII, A1 polypeptide	hak306	1.798942

ID is the name given to each gene in the Stanford Genome Database.

Cy3-labelled mRNA came from vehicle treated HMC-1 cells and Cy5-labelled mRNA from Bee Venom treated HMC-1 cells. Normalized ratios of medians were calculated as fluorescent intensity of Cy5 over that of Cy3 and the ratios more than 0.33 are shown in this table.

4. 봉독약침액 처치시 발현이 저하된 CD/cytokine 유전자

대조군에 비하여 처치군의 신호강도가 1/3배 이하인 것을 유의한 것으로 했을 때 비만세포에 봉독 처치시 대조군에 비하여 유의하게 발현이 저하되는 CD/cytokine 유전자는 대조군에 비하여 15%~33%의 발현을 보인 유전자로 순서대로 colony stimulating factor 2, CD122, IL-7, CD112, TNF-alpha, CD138, CD166, TGFbetaR2, CD42b, CD 62L, CD111, interleukin 10 receptor alpha, co-

Table II. Genes downregulated in Bee Venom-treated HMC-1 cells

Gene	ID	Normalized Ratio of Medians
colony stimulating factor 2 (granulocyte)	kribb7	0.156053
CD122	hak90	0.157731
IL-7	hak267	0.167974
CD112	hak120	0.178427
TNF-alpha	hak255	0.185695
CD138	hak101	0.215706
no match (Crea7)		0.218636
CD166	hak116	0.221455
TGFbetaR2	hak257	0.234322
CD42b	hak66	0.234603
CD62L	hak74	0.252085
CD111	hak119	0.253119
interleukin 10 receptor, alpha	kribb121	0.262593
colony stimulating factor 1 (macrophage)	kribb98	0.265479
CD38 antigen (p45)	kribb71	0.26558
CD121a	hak88	0.268034
CD33 antigen (gp67)	kribb31	0.273076
colony stimulating factor 1 receptor, fo	kribb84	0.289828
B cell linker protein(SLP65), mRNA	hak279	0.290634
CD94	Ahn33	0.292577
alanyl (membrane) aminopeptidase (aminop)	kribb1	0.296377
immunoglobulin (CD79A) binding protein 1	kribb19	0.300105
CD205	hak143	0.303723
CD241	hak174	0.305033
CD207	hak145	0.305362
CDw121b	hak89	0.309016
integrin, alpha L (antigen) CD11A (p180),	kribb20	0.310767
integrin, beta 1 (fibronectin receptor)	kribb38	0.311232
CD91	hak81	0.326429
CD42b	hak66	0.330585

ID is the name given to each gene in the Stanford Genome Database.

Cy3-labelled mRNA came from vehicle treated HMC-1 cells and Cy5-labelled mRNA from Bee Venom treated HMC-1 cells. Normalized ratios of medians were calculated as fluorescent intensity of Cy5 over that of Cy3 and the ratios more than 0.33 are shown in this table.

lony stimulating factor 1 (macrophage), CD38 antigen (p45), CD121a, CD33 antigen (gp67), colony stimulating factor 1 receptor, B cell linker protein (SLP65) mRNA, CD94, alanyl (membrane) aminopeptidase, immunoglobulin (CD79A) binding protein 1, CD205, CD241, CD207, CDw 121b, integrin alpha L (CD11a), integrin beta 1 (CD29), CD91, CD42b 등이 있었다 (Fig. 3, Table II).

IV. 考 察

봉독은 補益精氣, 補腎壯陽, 祛風濕의 효능으로¹³⁾ 扶正祛邪를 통해 효과를 발휘한다. 발기부전을¹⁴⁾ 비롯하여 기관지천식, 갑상선종, 일부 고혈압병, 류마티스, 膿腫 등에 봉독이 쓰이고 있으며¹⁵⁾, 소염, 진통^{16),17)}, 면역조절 작용^{18),19)} 등의 약리작용으로 임상적 활용범위가 점차 넓어지고 있는 추세이다²⁰⁾.

비만세포는 관절염의 병리발생에 있어서 핵심적 역할을 하는데, 류마티스성 관절염^{21),22)}이나 골관절염^{23),24)} 환자의 활액막 조직에서 비만세포가 매우 증가되어 있는 것이 알려져 있으며 관절염 환자의 활액에서 비만세포의 산물인 tryptase나 histamine이 발견된다는 것은^{16),25)} 병변부의 관절에서 비만세포가 활성화되어 있다는 것을 시사한다. 비만세포는 염증과 조직 재구성에 있어서 일련의 강력한 매개물질들을 분비할 수 있는데, protease, histamine, heparin, eicosanoid 등 여러 cytokine이 이에 해당된다. 류마티스 관절염의 활액막에는 여러 cytokine들이 존재하며 이들은 세포 사이의 연락을 매개하면서 염증세포와 면역세포를 관절로 끌어들이고 이들 세포를 활성화하여 여기로부터 조직을 파괴하는 물질들이 분비되도록 하는데 염증유발성 cytokine인 Interleukin-1 (IL-1)과 TNF- α 는 관절염의 병리에 있어서

중요한 역할을 한다.

Microarray 기술은 DNA sequencing, 변이 분석, 새로운 유전자 발견²⁶⁾, 유전자 발현 분석 등의 분야에 활용되어 왔다. 유전자 발현의 연구에 있어서 microarray를 이용하면 많이 존재하는 mRNA를 관찰함으로써 유전자 발현을 신속히 정량적으로 평가할 수 있으며 특히 수많은 유전자를 동시에 측정할 수 있다는 장점이 있다. mRNA는 DNA로부터 직접 전사되어 나오므로 mRNA는 유전자의 발현양상을 반영하게 된다. 이렇게 수많은 유전자를 동시에 정량적으로 평가함으로써 생리적 혹은 병리적 과정에 대해 보다 다각도의 정확한 정보를 얻을 수 있게 되었다. 즉 microarray는 수천 또는 수 만개의 유전자에 대해 그 발현을 동시에 관찰할 수 있도록 하는 기술로 응용성이 매우 넓으며 동시에 수천~1만개 수준의 유전자 해석이 가능해졌고 기존의 단일 유전자 연구 방법과 비교할 수 없는 매우 큰 장점을 지니고 있다^{27),28)}.

봉독이 비만세포주의 CD/cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 우선 비만세포주에 MTT assay를 시행하여 세포활성도의 변화를 관찰하였다. 그 결과 10ug/ml 처치군은 대조군에 비하여 유의한 세포활성도의 저하를 보였으나($p < 0.01$) 다른 처치군에서는 세포활성도가 유의하게 저하되지 않았다. 실험군에는 독성이 없는 농도의 봉독으로 자극을 주기 위해 10^{-2} ug/ml로 처치하였고 대조군은 봉독을 처치하지 않았다. 그리고 대조군과 실험군의 CD/cytokine 유전자 발현강도의 차이를 관찰하였다.

본 연구에서는 CD/cytokine 유전자 342개의 발현양상을 동시에 측정할 수 있는 microarray를 가지고 비만세포가 독성이 없는 강도의 봉독액(10^{-2} ug/ml)의 자극을 받았을 때 유전자 발현의 프로파일은 변하는 양상을 관찰하고 대조군에 비하여 처치군의 신호강도가 3배 이상 혹은 1/3배 이하인 것을 유의한 것으로 판단한 결과 봉독약침액 처치시 유의하게

발현이 증가하는 유전자는 관찰되지 않았으며 유의하게 발현이 감소하는 유전자는 colony stimulating factor 2, CD122, IL-7, CD112, TNF-alpha, CD138, CD166, TGFbetaR2, CD42b, CD62L, CD111, interleukin 10 receptor alpha, colony stimulating factor 1(macrophage), CD38 antigen(p45), CD121a, CD33 antigen(gp67), colony stimulating factor 1 receptor, B cell linker protein(SLP65) mRNA, CD94, alanyl(membrane) aminopeptidase, immunoglobulin (CD79A) binding protein 1, CD205, CD241, CD207, CDw121b, integrin alpha L(CD11a), integrin beta 1(CD29), CD91, CD42b 등이 관찰되었다.

TNF alpha는 관절염, 감염, 악성종양 등 많은 질환의 병리에서 중요한 역할을 하는 염증성 cytokine이며, 특히 관절염에서 TNF alpha는 collagen 합성을 억제하고 prostaglandin 합성을 유도하며 결합조직에서의 colony stimulating factor 생산을 자극하고 prostaglandin은 관절염에서의 동통과 관절종창 등 증상과 관련이 있다. 연골세포 등에서 reactive oxygen species의 생산을 통해 apoptosis를 유발한다.^{29,30)} TGF beta는 연골과 골의 발달과 재생에 있어서 중요한 cytokine이며 TGF beta의 활동성은 receptor에 의해 조절된다^{31,32)}.

integrin은 heterodimeric α/β 세포표면 유착 수용체로 세포가 세포외기질(extracellular matrix ECM)이나 혹은 다른 세포와 상호작용하는 것을 매개한다. integrin α subunit은 긴 세포의 구역 중 대략 60개의 잔기로 구성된 7개의 homologous domain을 N-terminal 구역에 가진 transmembrane glycoprotein이며, integrin β subunit은 큰 세포외 domain에 3결으로 반복된 cysteine이 풍부한 구역과 100~200 아미노산의 매우 보존성이 강한 구역을 가진 transmembrane glycoprotein이다³³⁾. integrin beta 1은 epithelial-mesenchymal inter-

action에서 중요한 역할을 한다³⁴⁾. integrin LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1)의 alpha L subunit은 CD11a라고도 하며 임파구, 과립구, 단핵구, 대식세포 등에서 발현되고 CD54 (ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1), CD102(ICAM-2), CD50(ICAM-3)에 결합한다³⁵⁾. CAM(cell adhesion molecule)의 상호작용은 면역 반응과 염증반응에서 중추적인 역할을 하며 LFA-1은 integrin type CAM이며 주로 백혈구의 이동과 혈관의 유출에 주로 관여하며 근래에는 이것의 길항제를 염증과 자가면역반응을 조절하는 방법으로 연구개발하고 있다³⁶⁾.

CD121a는 IL-1R type I 이라고도 하며 흉선세포, T 세포에서 많이 발현하여 type I interleukin-1 receptor로 작용하여 IL-1 α 와 IL-1 β 와 결합한다. CDw121b는 IL-1R type II라고도 하며 B 세포, 대식세포, 단핵구 등에서 많이 발현하여 type II interleukin-1 receptor로 작용하여 IL-1 α 와 IL-1 β 와 결합한다. CD122는 IL-2R β 라고도 하는데, 자연살해세포, 안정기 T세포 아형, 일부 B세포계열에서 발견되며 IL-2 receptor β chain으로 기능한다³⁵⁾. IL-1 β 는 염증성 cytokine으로 염증반응을 활성화하고 증식을 촉진하고 단백질 분해효소를 통해 기질을 변화시킨다. 관절에서 IL-1 β 발현이 올라가면 활액세포에서의 염증반응과 분해과정이 촉진되고 류마티스 관절염이 악화되며, 관절 연골세포에서 IL-1 β 의 발현이 항진되면 autocrine gene 발현을 촉진하여 골관절염의 병리가 악화된다고 알려져 있다³⁷⁾. 특히 IL-1은 류마티스 관절염 환자에서 상승되어 있으며 collagen을 파괴하는 MMP를 유도한다³⁸⁾.

관절염에서 TNF alpha는 주로 임파구에서 생산되며 TNF alpha의 활성을 억제하는 치료는 질환을 완화시킬 수 있으며²⁹⁾ IL-1 receptor antagonist는 관절염 동물모델에서 염증과 조직파괴를 효과적

으로 억제하는 것으로 알려져 있다³⁷⁾. IL-1이나 TNF가 각각의 receptor에 결합하면 복합적인 연쇄반응이 활성화되어 I- κ B가 인산화되고 NF- κ B가 이로부터 분비되어 다양한 cytokine, adhesion molecule, acute phase reactants, I- κ B, p50, c-rel, cyclooxygenase-2 등 NF- κ B response element가 있는 유전자의 전사를 활성화시킨다. iNOS나 MMP(matrix metalloproteinase) 등이 유도되기 위해서는 이 경로가 활성화되어야 한다³⁰⁾. IL-1과 TNF alpha는 MMP의 전사를 촉진하며 aggrecan이나 collagen type II와 같은 matrix component의 합성을 억제하여 관절염 등의 병리에서 연골이 파괴되는 과정에 관여한다³⁹⁾.

IL-7은 pre-B cell과 pre-T cell의 성장에 관여한다. IL-10은 T세포, 대식세포 등에서 대식세포 기능을 강하게 억제시킨다³⁵⁾. IL-10은 류마티스 환자의 관절 대식세포/단핵구 혹은 말초혈액 임파구에서 분비되는 항염증성 cytokine이다⁴⁰⁾. IL-10은 처음에 cytokine synthesis inhibitory factor라고도 불렀는데, T helper 1 cell에 의한 IFN γ 생산을 억제하기 때문이며, IFN α , TNF α , IL-12의 자극으로 단핵구에서 분비되고 IFN γ , IL-4, IL-10에 의해 억제된다⁴¹⁾.

CD는 cluster of differentiation의 약자이며 세포 표면 성장분화 항원을 단세포군항체 집단을 이용해 명명하는 방법이다. CD 42b는 혈소판에 많이 분포하여 혈소판 유착에 관여하며⁴²⁾, CD62L은 B세포, T세포, 단핵구, 자연살해세포 등에서 백혈구유착분자(leukocyte adhesion molecule)로 작용하고 CD34에 결합하며 내피에서의 회전 상호작용을 매개한다. CD91은 단핵구, 그리고 많은 non-hematopoietic cell에서 α 2-macroglobulin receptor로 작용하며 CD 94는 T 세포 아형, 자연살해세포에서 발견된다. CD166은 활성 T세포, 흉선내피, 섬유아세포, 신경원 등에서 발견되며 CD6에 대한 ligand로서 integrin

neurite extension에 관여한다³⁵⁾.

Colony stimulating factor(CSF)는 만성 염증성 자가면역 질환에 관여하고 있을 것으로 생각되고 있으며 또한 치료대상으로 활용될 수 있다⁴³⁾. 류마티스 환자의 활액세포에서 생산되는 G-CSF는 염증성 cytokine에 의해 자극되며 류마티스 환자의 관절염 증을 악화시키는데에 관여한다⁴⁴⁾. 본 실험에서는 CSF1, CSF2, CSF receptor가 봉독에 의해 유의하게 발현이 억제되는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합하면 이번 microarray 분석에서 봉독약침액 자극에 의해 TNF alpha와 IL-1 receptor가 유의하게 억제되는 것으로 나타났는데, 이것은 관절염 등 각종 염증질환에 사용되어 온 봉독약침액의 임상적 효용¹⁾이나, 봉독과 melittin이 Raw 264.7 cell에서 iNOS, COX II의 발현을 강하게 억제하였다는 등의 기존 보고⁴⁾와 함께 봉독약침액의 소염진통 작용을 시사하는 중요한 결과라고 할 수 있다. CSF나 그 receptor에 대한 억제작용도 염증반응이나 자가면역반응 및 다양한 CD, interleukin 등 cytokine에 대한 연구도 필요하리라고 사료된다.

V. 結 論

봉독약침의 작용기전과 임상적 활용을 위하여 봉독약침액이 비만세포의 CD/cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 microarray를 통해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MTT 세포활성 시험결과 crude bee venom을 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 및 10ug/ml 농도로 2시간 처치했을 때 10ug/ml 처치군은 대조군에 비하여 유의한 세포활성의 감소를 보였으나, 다른 세포군은 유의성이 없었다.

2. CD/cytokine microarray 분석상 비만세포에 봉독 처치시 대조군에 비하여 유의하게 발현이 항진되는 CD/cytokine 유전자는 관찰되지 않았다.

3. CD/cytokine microarray 분석상 비만세포에 봉독 처치시 대조군에 비하여 유의하게 발현이 저하되는 CD/cytokine 유전자는 colony stimulating factor 2, CD122, IL-7, CD112, TNF-alpha, CD138, CD166, TGFbetaR2, CD42b, CD62L, CD111, interleukin 10 receptor alpha, colony stimulating factor 1(macrophage), CD38 antigen(p45), CD121a, CD33 antigen(gp67), colony stimulating factor 1 receptor, B cell linker protein(SLP65) mRNA, CD94, alanyl(membrane) aminopeptidase, immunoglobulin(CD79A) binding protein 1, CD205, CD241, CD207, CDw121b, integrin alpha L(CD11a), integrin beta 1(CD29), CD91, CD42b 등이 있었다.

IV. 參 考 文 獻

1. 이재동. 봉독요법-임상활용방법을 중심으로. 대한한의학회지. 2000 ; 21(3) : 3-8.
2. 이정훈, 진재도, 이승우, 한상원, 김상태, 신준식. Bee venom 및 Melittin 약침액이 신경 마비물질을 처치한 신경아세포종의 세포사에 미치는 영향. 대한침구학회지 2002 ; 19(1) : 189-202.
3. 오기남, 이재동, 박동석. 봉독약침이 C57BL mouse의 흑색종에 미치는 영향. 대한침구학회지 2002 ; 19(2) : 78-91.
4. 한상원, 박기현, 정태영, 서정철. 봉독 및 Melittin 약침액이 관절염 활액세포에 미치는 영향.

- 대한침구학회지 2002 ; 19(4) : 74-88.
5. 이윤섭, 서정철, 이승우, 한상원. 국산봉독 및 정제 봉독약침액이 류머티스관절염 활액세포에 미치는 영향. 대한침구학회지 2002 ; 19(2) : 28-38.
 6. 정혜윤, 고희균. 봉독 약침액이 염증 및 통증 관련 유전자 발현에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(3) : 41-50.
 7. 이승훈, 이봉효, 이경민, 조현열, 김영옥, 방재선, 서정철, 한상원. 봉독약침액이 세포활성에 미치는 영향. 대한침구학회지 2002 ; 19(5) : 57-72.
 8. 배은정, 조현열, 진재도, 신민규, 한상균, 양기영, 황규정, 신영일, 이현, 이병렬. 봉독약침 병행치료한 요추간판탈출증환자의 임상고찰. 대한침구학회지 2002 ; 19(1) : 54-64.
 9. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. Leukemia Res. 1988 ; 12 : 345-355.
 10. 박원, 김용석, 고희균. 봉독 약침액의 세포독성에 관한 연구. 대한침구학회지. 2002 ; 19(2) : 65-77.
 11. Han X, Amar S. Identification of genes differentially expressed in cultured human periodontal ligament fibroblasts vs. human gingival fibroblasts by DNA microarray analysis. J Dent Res 2002 ; 81(6) : 399-405.
 12. Welling DB, Lasak JM, Akhmametyeva E, Ghaheri B, Chang LS. cDNA microarray analysis of vestibular schwannomas. Otol Neurotol 2002 ; 23(5) : 736-48.
 13. 고희균. 봉침요법. 경희대학교 한의학연구소 회보. 1997 ; 1 : 3-6.
 14. Simics M. Bee Venom. Richmond, B.C. : Apitronic publishing. 1994 : 21.
 15. 인창식, 고희균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록 : 마왕퇴의서의 봉독요법 2례. 대한침구학회지. 1998 ; 15(1) : 143-147.
 16. Broadman J. Bee venom therapy. Silver Spring : Health resources press. 1997 : 38-45.
 17. Kaal J. Natural medicine from honey bees. Amsterdam : Kaal' s printing house. 1991 : 45.
 18. 강승범, 고희균, 김창환. 봉독침자극이 생쥐의 면역기능에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1996 ; 17(1) : 234-46.
 19. 이홍석, 김용석, 박영배, 고희균, 김창환, 강성길. 봉독약침자극이 Methotrexate로 유발된 생쥐의 면역기능 저하에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1998 ; 21(1) : 347-59.
 20. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 上海:上海科學技術出版社. 1986 : 2480.
 21. Crisp AJ, Chapman CM, Kirkham SE, Schiller AL, Krane SM. Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1984 ; 27 : 845-851.
 22. Wynne-Roberts CR, Anderson CH, Turano AM, Baron M. Light-and electron-microscopic findings of juvenile rheumatoid arthritis synovium : comparison with normal juvenile synovium. Semin. Arthritis Rheum. 1978 ; 7 : 287-302.
 23. Buckley MG, Gallagher PJ, Walls AF. Mast cell subpopulations in the synovial tissue of patients with osteoarthritis : selective increase in numbers of tryptase-positive, chymase-negative mast cells. J Pathol.

- 1998 ; 186 : 67-74.
24. Godfrey HP, Ilardi C, Engber W, Graziano FM. Quantitation of human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 1984 ; 27 : 852-856.
 25. Renoux M, Hilliquin P, Galoppin L, Florentin I, Menkes CJ. Release of mast cell mediators and nitrites into knee joint fluid in osteoarthritis-comparison with articular chondrocalcinosis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1996;4:175-179.
 26. Stuhlmeier B, Ungethüm U, Scholze S, Martinez L, Backhaus M, Kraetsch H-G, Kinne RW, Burmester G-R. Identification of known and novel genes in activated monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000 ; 43 : 775-790.
 27. 유대열, 송창우, 유영춘, 박승용. 계놈기능연구 프로토콜. 서울 : 월드사이언스. 2001 : 25, 35.
 28. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning.* New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001 : A10. 2.
 29. Ah-Kim H, Zhang X, Islam S, Sofi JI, Glickberg Y, Malemud CJ, Moskowitz RW, Haqqi TM. Tumor necrosis factor α enhances the expression of hydroxylase, cytoplasmic antipeptidase-2 and a dual specific kinase TTK in human chondrocyte-like cells. *Cytokine* 2000 ; 12 : 142-150.
 30. Berenbaum F. Proinflammatory cytokines, prostaglandins, and the chondrocyte : mechanisms of intracellular activation. *Joint Bone Spine* 2000 ; 67 : 561-4.
 31. Bonewald LF, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J Cell Biochem* 1994 ; 55 : 350-7.
 32. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair : IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 1996 ; 19 Suppl 1 : 1s-2s.
 33. Luque A, Sánchez-Madrid F, Cabañas. Functional regulation of the human integrin VLA-1 (CD49a/CD29) by divalent cations and stimulatory β 1 antibodies. *FEBS Letters* 1994 ; 346 : 278-284.
 34. Chuong CM. The making of a feather : homeoproteins, retinoids and adhesion molecules. *Bioessays* 1993 ; 15 : 513-521.
 35. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. *Immunobiology* 4th ed. London : Current Biology publication. 1999 : 579-590.
 36. Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev* 2002 ; 22(2) : 146-67.
 37. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1 β . *Arthritis Research* 2001 ; 3 : 381-388.
 38. Koshy PJT, Lundy CJ, Rowan AD, Porter S, Edwards DR, Hogan A, Clark IM, Cawston TE. The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M. *Arthritis Rheum* 2002 ; 46 :

- 961-967.
39. Ding GJF, Schmidt JA, Goldring MB, Boltz Jr RC, Lark MW. Interleukin-1(IL-1) and tumor necrosis factor-alpha(TNF α) mediated nuclear translocation of nuclear factor κ Bp65(NF κ Bp65) in immortalized human chondrocytes. Bone 1995;17(6):591.
40. Foey AD, Feldmann M, Brennan FM. CD40 ligation induces macrophage IL-10 and TNF-alpha production: differential use of the PI3K and p42/44 MAPK-pathways. Cytokine2001; 16: 131-42.
41. Bonder CS, Davies KVL, Liu X, Hertzog PJ, Woodcock JM, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Endogenous interferon- α production by differentiation human monocytes regulates expression and function of the IL-2/IL-4 receptor γ chain. Cytokine 2002; 17(4): 187-196.
42. 김세중. 면역학. 서울: 고려의학. 1994: 25-29.
43. Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Hamilton JA. The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. J Leukoc Biol2000; 68: 144-50.
44. Nakamura H, Ueki Y, Sakito S, Matsumoto K, Yano M, Miyake S, Tominaga T, Tominaga M, Eguchi K. High serum and synovial fluid granulocyte colony stimulating factor(G-CSF) concentrations in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol2000; 18: 713-8.