

蜂毒 추출액이 helper T cell 분화에 미치는 영향

고은정¹ · 남상수² · 홍무창¹ · 신민규¹ · 배현수^{1,3*}

1: 경희대학교 한의과대학 생리학교실, 2: 경희대학교 한의과대학 침구학교실, 3: 퓨리메드(주) 기업부설연구소

Modulation of Bee Venom on Th1/Th2 Cell Lineage Development

Eun Jung Ko¹, Sang Soo Nam², Moo Chang Hong¹, Min Kyu Shin¹, Hyun Su Bae^{1,3*}

1: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, KyungHee University, 2: Department of Acupuncture and Moxibustion, College of Oriental Medicine, KyungHee University, 3: Purimed R&D Institute

In this study, the immunological effect of a traditional Korea herbal acupuncture, that has been widely used for the treatment of various immunological disorders including inflammation in Korea, was examined in vitro and in vivo. In our previous study demonstrated that BV increased the expression of IFN- γ mRNA, that plays pivotal role in T cell response. This study was designated to evaluate the effect of BV on helper T cell development by monitoring Th1/Th2 specific cytokine secretion patterns in artificially induced Th1/Th2 polarized condition and in vivo. The results demonstrated that BV didn't have mitogenic effects on the unstimulated CD4+ T cell, but increased the CD4+ T cell proliferation upon activation with anti-CD3/CD28 antibody. The Th1 cells were over-populated dramatically in Th1 driven condition with BV treatment, while the Th2 cells were increased slightly in Th2 skewed condition. Furthermore, under Th1-skewed conditions, the level of IFN- γ was considerably increased with BV treatment. Besides, the expression of T-bet, a transcription factor that plays pivotal role in Th1 lineage programming, was increased with BV treatment. The expressions of IFN- γ and T-bet were also significantly increased in vivo. The results that Th1 specific cytokine secretion were considerably increased and Th2 specific cytokine secretion were not significantly changed in vitro and in vivo indicated that BV enhances Th1 lineage development. Therefore, these results suggest that BV might be desirable agent for correction of Th1 dominant pathological disorders.

Key words : Bee venom(BV), Th1/Th2, IFN- γ , IL-4, T-bet, GATA-3, inflammation

서 론

蜂毒 (Bee venom)은 꿀벌의 독낭에 들어 있는 투명한 액체를 추출, 가공하여 질병과 유관한 부위 및 혈위에 주입함으로써 자침 효과와 蜂毒의 생화학적 특이 물질이 인체에 미치는 약리작용을 동시에 이용된다¹⁾. 蜂毒은 기원전 2000년 전부터 통증 및 소염의 효과로 동·서양을 막론하고 사용되어져 왔으며 최근에는 한의학에서 蜂毒藥針療法이 치료의 목적으로 이용되고 있고²⁾, 蜂毒을 경혈에 투여할 경우 경혈자극효과, 蜂毒에 대한 생리적 반응, 溫灸와 유사한 온열작용이 나타나게 되며, 임상적으로 蜂毒은 补益精氣, 补腎壯陽, 祛風濕의 효능으로 면역반응의 한의학적 치료방법인 扶

正祛邪를 통해 그 효과를 발휘³⁾하는 것으로 알려져 있다.

면역계와 관련된 중요한 세포는 CD4+ T cell이며, 자아 major histocompatibility complex (MHC)와 결합된 동종 항원과의 결합에 의하여 분화가 결정된다. 이 과정에 분화에 결정적인 역할을 하는 것은 cytokine으로 주로 Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-12 (IL-12), Interferon- γ (IFN- γ) 등이 있다. 이들 cytokine의 영향으로 Naive CD4 T cell은 Th1 cell과 Th2 cell로 분화한다^{4,6)}. 이 분화 과정에서 과도한 증식은 병리적인 현상을 유발시켜 자가면역질환이나 알러지 질환을 발생케 한다. 여기에는 Th1/Th2 development가 중요한 역할을 하는데 Th1 cell이 과도하게 많아지면 류마티스 관절염, 루푸스와 같은 자가면역질환이 발생하며 Th2 cell이 과도하게 많아지면 기관지 천식, 알러지성 비염과 같은 알러지 질환이 발생하게 된다. Th1 cell의 분화에 관련된 cytokine은 IL-2, IL-12, IFN- γ 등이 있으며 전사인자로는 T-bet

* 고신저자 : 배현수, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학

· E-mail : hbae@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0323

· 접수 : 2004/08/02 · 수정 : 2004/09/01 · 채택 : 2004/09/30

이 있다. Th2 cell의 분화에 관련된 cytokine은 IL-4, IL-1 등이 있으며 전사인자로는 GATA-3가 있다. CD4+ T cell은 cytokine이나 항원의 자극에 의해 Th1 cell 및 Th2 cell로 분화되는 특성을 가지고 있다. 이 과정에서 Th1 cell에 비해 Th2 cell의 development가 증가되면 병리적으로 알러지, 기관지 천식, 만성 기관지염이 유발하게 된다. 반대로 Th1 cell이 Th2 cell에 비해 과도하게 성장하면 류마티스 관절염, 루푸스와 같은 자가면역질환이 발생한다. 이러한 이론적 기반 하에서 蜂毒은 면역계를 활성화시키고, 항염증, 세포용해, 신경독 효과, 항세균 및 항진균, 방사선 보호작용이 있는 것으로 알려졌으며, 실험적으로 항염, 소염, 진통, 해열, 活血, 항경련, 면역증강 등의 작용이 보고^{7,9)}되어 면역계 질환 및 이에 의한 통증 관련 위주로 많이 응용되고 있으며 이에 대한 임상보고도 꾸준히 증가하고 있다.

이와 같이 蜂毒의 연구가 면역질환 및 그에 관련된 통증의 연구에 집중되고 있음에도 불구하고 Specht 등¹⁰⁾이 murine spleen cell에서 IgE antibody activity를 높인다고 보고한 외에 면역능력의 강화에 핵심적인 helper T cell의 분화에 관련된 연구는 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 임상에서 적극적으로 활용되고 있는 蜂毒의 *in vitro*, *in vivo* 상 면역기능 조절능을 T cell, B cell 중심으로 확인하고, 동시에 helper T cell 분화에 관련된 cytokine에 대한 조절 능력을 확인하여 유의한 결과를 얻은 바 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 분류

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 8주된 BALB/c 雌性 마우스이며 멸균 상태로 관리되어 온 것을 샌타코 코리아(주)에서 구입하였다. 사료는 방사선 멸균 처리한 실험동물용 사료를 정도 산업(주)에서 구입하여 공급하였으며, 飲用水는 멸균처리 한 증류수를 사용하였다. 사료와 飲用水는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰다. 실험동물은 각각 대조군 (control group, con), 蜂毒 투여군 (Bee venom group, BV) 및 anti-CD3 투여군 (anti-CD3 group, anti-CD3)으로 분류하였다. 蜂毒 투여군은 Kwon의¹¹⁾ 방법에 따라 실험동물에 蜂毒을 1 mg/kg을 복강 내에 100 μl, 대조군은 100 μl PBS만을 주사하였으며, anti-CD3 투여군은 4 μg을 100 μl 주사하였다¹²⁾.

2. 재료

본 연구에서는 蜂毒 (Bee venom, Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.)을 구입하여 사용하였으며, 주사기는 1cc 1회용 주사기 (26 gage, Boin medica, Gumi, Korea)를 사용하였다. anti-CD3e (clone:145-2C11), anti-CD28 (clone:37.51), anti-mouse IL-4 (BVD4-1D11), anti-mouse IL-12 (C17.8), FITC-conjugated anti-CD4 antibody, recombinant mouse IL-4 (rIL-4), recombinant mouse IL-12 (rIL-12) 등은 BD Biosciences Pharmingen (San Diego, U.S.A.)에서 구입하였으며, Magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads, mouse IL-4 secretion assay

detection Kit, mouse IFN-γ secretion assay detection Kit 등은 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)에서 구입하였다. 세포배양을 위하여 사용된 media는 10% defined Fetal Bovine Serum (Hyclone, Logan, U.S.A.), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen Life Technologies, Rockville, U.S.A.) 10 mM HEPES (JRH Biosciences, Lenexa, U.S.A.), 11 mM sodium bicarbonate (JRH Bioscience)가 포함된 RPMI-1640 (Invitrogen Life Technologies)를 사용하였다.

3. 비장 임파구 준비

적출한 BALB/c 마우스의 비장을 멸균된 주사기로 파쇄 한 후 cell strainer (BD Biosciences Pharmingen)로 걸러내었다. 균질화된 비장세포에 적혈구 제거를 위하여 5 ml PharM Lyse (BD Biosciences Pharmingen)를 넣고 5분간 반응시킨다. Cell이 부유 되어있는 tube에 5 ml의 culture media를 첨가한 후 300 ×g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 남은 세포침전물은 1 ml의 media로 suspension 한 후 trypan blue로 염색하여 세포 수를 측정하였다.

4. CD4+ T cell 분리

비장임파구 1×10^7 cells/90 μl 농도당 10 μl의 magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads (Miltenyi Biotec)를 첨가하여 15 분간 4°C에서 반응한 후, 300 ×g에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 5 ml의 media로 세척하였다. 남은 세포침전물에 1×10^8 cells/500 μl의 농도가 되도록 media를 넣고 resuspension하였다. LS separation column (Miltenyi Biotec)을 varioMACS separator (Miltenyi Biotec)에 장치한 후 3 ml의 buffer (PBS with 2 mM EDTA and 0.5% BSA)로 column을 통과시키고 세포부유액을 column안으로 주입하였다. 세포부유액이 column을 통하여 빠져나가면 다시 2 ml의 buffer로 column을 3번 반복하였다. Column을 separator에서 분리해 낸 후 5 ml의 buffer를 넣고 plunger를 눌러서 CD4+ T cell을 elution하였다.

5. 생존률 및 증식능 측정

Mitogen으로 자극 받지 않은 비장 임파구의 생존율을 측정하기 위해 CellTiter® 96 TM AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, U.S.A.)의 protocol를 이용하여 CD4+ T cell을 분리 한 후 4×10^5 cells/ml의 농도로 100 μl씩 flat bottomed 96-well plate에 seeding 하였다. CD4+ T cell 가 seeding 된 plate에 蜂毒을 0, 0.01, 0.1, 1 및 10 μg/ml 농도로 첨가하고 10 μg/ml anti-CD3e (clone:145-2C11, BD Bioscience Pharmingen)가 coating된 plate에서 2 μg/ml anti-CD28 (clone:37.51, BD Bioscience Pharmingen)로 costimulation하였다. 이상의 혼합물을 48시간동안 37°C, 5% CO₂ incubator (Nuair, Plymouth, U.S.A.)에서 배양하였다.

6. CD4+ T cell을 Th1/Th2 cell으로 분화

10 μg/ml anti-CD3e가 coating된 12-well plates에 CD4+ T

cell을 2×10^6 cells/ml로 seeding 한 후 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD28로 costimulation하고, 蜂毒 0, 10 ng/ml의 농도에서 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. Th1 cell plate는 50 U rIL-2 (Sigma)- 10 ng/ml rIL-12, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-IL-4 (BD Biosciences Pharmingen)를 투여하고, Th2 cell plate에는 50 U rIL-2와 10 ng/ml rIL-4, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-IL-12 (BD Biosciences Pharmingen)를 첨가하여 배양하고 3일 후에 1:2로 split하였다. 48시간 후 cell을 PBS로 세척한 후 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD3e와 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD28로 restimulation한 후 24시간동안 배양하였다¹³⁾.

7. Th1/Th2 cell의 Secretion cytokine 측정¹⁴⁾

CD4+ T cell을 8.의 방법과 같이 분화하여 cell을 harvest하여 wash buffer (PBS/0.5% BSA/2 mM EDTA) 2 ml에 부유 시킨 후 300 ×g에서 5분간 원심분리 한 후 wash buffer로 2번 washing하였다. Cold medium를 세포 106개당 90 μl 가 되도록 cell pellet을 resuspension 하였다. Catch reagent (Miltenyi Biotec)를 cell 10⁶개당 20 μl 를 첨가하고 4°C에서 5분간 incubation하고 warm medium으로 cell 수가 10⁵개가 되도록 흐석하여 37°C에서 40분간 incubation 한다. Incubation 한 tube에 cold buffer 5 ml을 투여하고 300 ×g에서 10분간 원심 분리하고, 상층액을 제거 한 후 cold buffer를 cell 10⁶개당 90 μl 넣고 cell pellet을 resuspension하였다. 여기에 PE-conjugated Detection antibody, FITC-conjugated anti-CD4 antibody를 첨가 한 후 4°C에서 10분간 incubation하였다. Cold wash buffer로 2번 세척한 후 FACScan (BD biosciences Becton Dickinson, Franklin Lakes, U.S.A.)으로 분석하였다.

8. In vivo에서 T cell activation

1 mg/kg 蜂毒을 100 μl 씩 BALB/c mouse의 복강 내에 3일 동안 투여 한 후 4 μg anti-CD3 100 μl 를 미정맥에 주입하고 1시간 뒤에 비장을 적출 한 후 급속 냉동하여 -80°C에 보관하였다.

9. B cell과 T cell의 세포수 측정

8주령의 BALB/c female mice의 복강 내에 蜂毒 1 mg/kg을 100 μl 씩 3일 동안 투여한 후 비장 임파구를 분리한 다음 24-well plates에 1×10^6 cells/ml의 농도로 세포를 seeding하고 48시간동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 300 ×g에서 10분간 원심 분리하여 세포를 harvest한 후 cell pellet을 cold wash buffer (PBS, 0.1% NaN₃, 1% FBS)에 resuspension하였다. 여기에 FITC-conjugated anti-CD8, B220 antibody와 PE-conjugated anti-CD4, CD3 antibody를 첨가한 후 4°C에서 40분 동안 incubation하였다. Cold wash buffer로 2번 세척한 후 FACScan (BD biosciences Becton Dickinson)을 이용하여 분석하였다.

10. Real-time RT-PCR을 이용한 cytokine 발현 측정

1) Total RNA Isolation

CD4+ T cell을 분화한 Th1/Th2 cell과 蜂毒 1 mg/kg 100 μl 를 3일 동안 투여한 마우스의 spleen을 적출 하여 PBS로

washing하고 Trizol solution (Invitrogen Life Technologies)에 제조사의 protocol에 준하여 total RNA를 분리하였다. 세포침전물은 pellet pestle을 이용하여 균질화하였다. 균질화된 용액에 500 μl 의 Trizol solution을 첨가하고 가볍게 vortex한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 이 용액에 다시 100 μl 의 chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 3분간 반응시킨 다음 4°C에서 12,000 ×g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮기고 여기에 250 μl 의 Isopropanol을 첨가하여 10분간 실온에서 반응시켰다가 다시 4°C에서 12,000 ×g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 pellet을 500 μl 의 75% ethanol로 세척한 후 4°C에서 7,500 ×g로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 pellet을 건조하여 50 μl 의 diethyl pyrocarbonate (DEPC, Calbiochem, San Diego, U.S.A.) 처리 증류수에 RNA를 녹인 다음 spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc., Fullerton, U.S.A.)를 이용하여 정량 하였다.

2) cDNA의 합성

cDNA의 합성은 M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies)를 이용하였다. 2.5 μg 의 total RNA에 1.1 μl 의 10× DNase I Reaction buffer, 1 μl 의 1 Unit/ μl DNase I (Invitrogen Life Technologies)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수를 넣어 반응액이 11 μl 이 되게 한 후 실온에서 15분간 배양하여 오염되었을지 모를 DNA를 제거하였다. 반응 후 1 μl 의 반응액을 따로 분리하여 두고 후에 DNA가 남아있는지 확인하기 위하여 PCR 반응을 하였다. 10 μl 의 반응액에 1 μl 의 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen Life Technologies)를 첨가한 후 70°C에서 15분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 반응액에 4 μl 의 5× first strand buffer, 1 μl 의 10 mM each dNTPs, 2 μl 의 0.1 M Dithiothreitol, 1 μl 의 200 U/ μl M-MLV Reverse Transcriptase, 0.5 μl 의 40 U/ μl RNase inhibitor (Invitrogen Life Technologies), 5.5 μl DEPC 처리 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20 μl 로 만들고 37°C에서 60분간 배양하여 single strand cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 72°C에서 15분간 배양하여 enzyme를 불활성화 하였다.

3) cDNA의 Real-time PCR 반응

각각의 특이 유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 Real-time PCR을 실시하였다. 1 μl 의 cDNA에 12.5 μl 의 2× SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, U.K.), 각각 1.5 μl 의 5 μM sense, antisense primer (Genotech Co., Daejun, Korea), 8.5 μl 의 증류수를 넣어 25 μl 가 되게 한 후 GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Warrington, U.K.)에서 PCR하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분간 최초 denaturation한 후 95°C 15초, 60°C 60초를 40 cycle 반복하였다. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), IFN-γ (Interferon-γ), IL-4 (Interleukin-4) 유전자의 primer sequence는 Table 1과 같다.

cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100로 serial dilution한 후 각 농도 당 3개씩 PCR 하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의 amplification threshold에 도달한 Cycle number (Ct)를 기준으

로 standard curve을 그려서 정량 하였고 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalization하였다. PCR 반응의 종료 후 60-95°C 사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하였다.

Table 1. Sequences of primer used for real-time RT-PCR

Gene		Oligonucleotide sequence
GAPDH	RV	5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA -3'
	FW	5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC -3'
IL-4	FW	5'-ACA GGA GAA GGG ACG CCA T -3'
	RV	5'-GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA -3'
IFN-γ	FW	5'-TCA AGT GCC ATA GAT GTG GAA -3'
	RV	5'-TGG CTC IGC AGG ATT TTC ATG -3'
T-bet	FW	5'-GCC AGG GAA CCG CTT ATA TG -3'
	RV	5'-GAC GAT CAT CTG GGT CAC ATT -3'
GATA-3	FW	5'-GAA GGC ATC CAG ACC CGA AAC -3'
	RV	5'-ACC CAT GGC GGT GAC CAT GC -3'

실험 결과

1. 蜂독이 분리된 CD4+ T cell의 생존에 미치는 영향

蜂독이 주변의 APC (antigen presenting cell)가 없이도 직접적으로 CD4+ T cell 생존에 영향을 미치는지 확인하여 위해 CD4+ T cell을 분리한 후蜂독을 농도별로 투여하고 48시간동안 배양한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 다만 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation시켰을 때에는 저농도 (10 ng/ml)에서 CD4+ T cell의 생존율이 증가하였으나 고농도 (10 μg/ml)에서는 감소하였다 (Fig. 1).

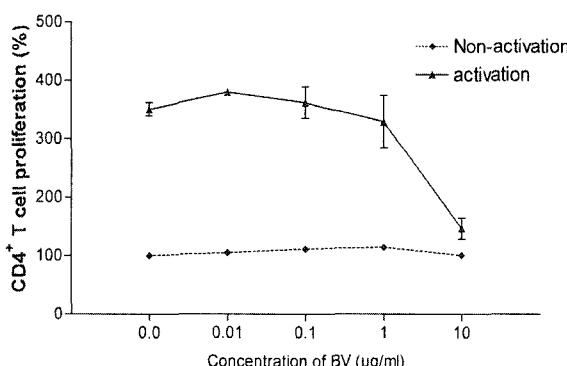


Fig. 1. Proliferation of CD4+ T cell in medium containing various concentration of BV extract after 48 hrs incubation. Sorted CD4+ T cell were treated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies to activate T cell, or not. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M.

2. 蜂독이 Th1/Th2 cell skewed 상황에서 secretion cytokine 발현에 미치는 영향

Naive CD4+ T cell에蜂독 10 ng/ml 투여하고 50 U rIL-2, 10 μg/ml anti-IL-4, 10 μg/ml anti-IL-12, 10 ng/ml rIL-12, 10 ng/ml rIL-4를 이용하여 7일 동안 Th1 cell과 Th2 cell로 분화한 후 Th1/Th2 cell 그룹에서 분비되는 secretion cytokine 발현량을 flow cytometry로 확인한 결과 Th1 cell skewed 상황에서 IFN-γ의 발현량이 2.1% 감소되었으며, 또한 Th2 cell skewed 상황에

서는 IL-4의 발현량이 18.8% 감소시킨 것을 확인하였다 (Fig. 2).

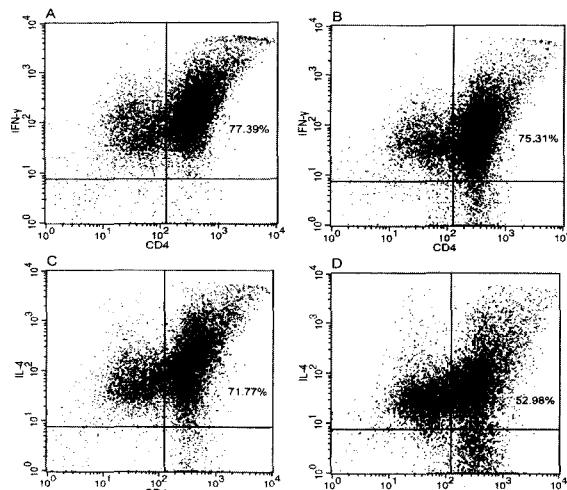


Fig. 2. Secretion cytokine expression of Th1 and Th2 cells polarized from Th0. Sorted CD4+ T cells were treated with rIL-12, rIL-4 antibodies to polarized CD4+ T cell for 7 days. Cells were stained with FITC-conjugated anti-IFN-γ, anti-IL-4 and PE-conjugated anti-CD4 antibodies. A,C: Cells were incubated in medium without BV as control. B,D: Cells were incubated in medium containing 10 ng/ml BV extract.

3. 蜂독이 Th1/Th2 cell skewed 상황에서 IFN-γ, IL-4, T-bet, GATA-3 mRNA 발현에 미치는 영향

蜂독을 투여하고 CD4+ T cell을 7일 동안 분화한 Th1/Th2 cell에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 real-time RT-PCR으로써 유전자의 발현량의 평가한 결과는 다음과 같다.

1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 internal control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct 값을 기준으로 작성된 standard curve는 생략하였다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R2는 0.9966로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

2) IFN-γ

IFN-γ 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 생략하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성을 없었던 것으로 확인되었으며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9928로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 IFN-γ 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 3). Th1 skewed 상황에서蜂독 10 ng/ml 투여한 군이 control과 비교하여 119.5% 증가하였다.

3) IL-4

IL-4 유전자에 대한 real-time RT-PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 생략하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성을 없었던 것으로 확인되었으며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9992로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 IL-4 유전자의 상대

적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 4). Th2 skewed 상황에서蜂毒 10 ng/ml 투여한 군이 control과 비교하여 8.7% 증가하였다.

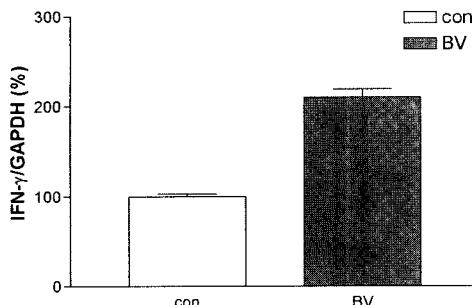


Fig. 3. Expression level of IFN- γ Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH. con : control, BV : 1 mg/kg Bee venom.

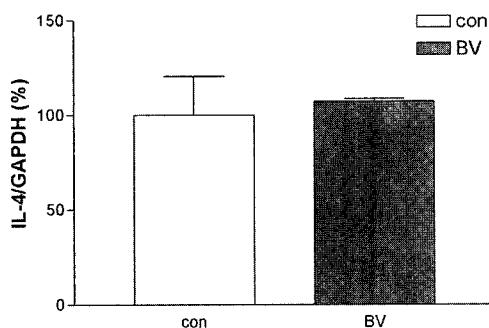


Fig. 4. Expression level of IL-4 Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

4) T-bet

T-bet 유전자에 대한 real-time RT-PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 생략하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것으로 확인되었으며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9946로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 T-bet 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 5). Th1 skewed 상황에서는蜂毒을 10 ng/ml을 투여한 군이 control과 비교하여 23.7% 증가하였다.

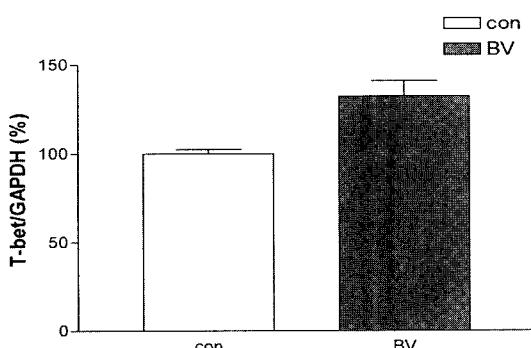


Fig. 5. Expression level of T-bet Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

5) GATA-3

GATA-3 유전자에 대한 real-time RT-PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 생략하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것으로 확인되었으며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9983로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 T-bet 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 6). Th2 skewed 상황에서는蜂毒 10 ng/ml을 투여한 군이 control과 거의 차이가 없었다.

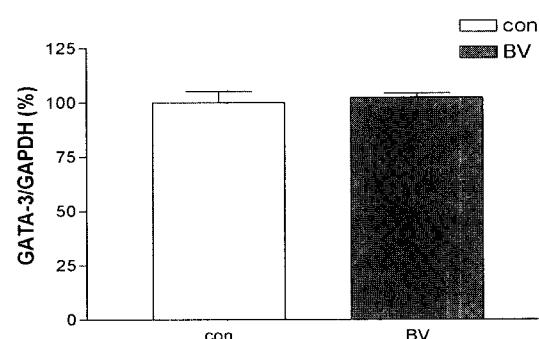


Fig. 6. Expression level of GATA-3 Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

4. In vivo상에서蜂毒이 B cell과 T cell에 미치는 영향

In vivo상에서蜂毒이 B cell과 T cell에 영향을 미치는지 확인하기 위하여蜂毒 1 mg/kg을 100 μ l를 복강 내에 3일 동안 투여하고 비장을 적출한 후 splenocyte를 분리하여 48시간동안 배양 후 세포 증식률을 측정한 결과 B cell의 생존율은 anti-CD40, Lipopolysaccharide (LPS) antibody로 activation 시켰을 때 대조군에 비하여 약간 증가하였으며, T cell 역시 anti-CD3로 activation 시켰을 때 세포 증식률이 대조군과 비교하여 증가하였으나 많은 차이를 보이지 않았다 (Fig. 7).

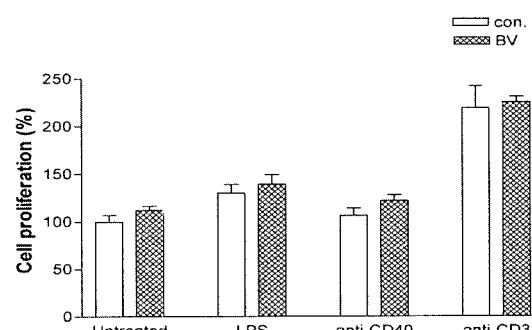


Fig. 7. Proliferation of splenocytes from BALB/c mice Splenocytes in response to plate-bound anti-CD40 (α-CD40), anti-CD3 antibody or lipopolysaccharide (LPS). Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M.

5. In vivo상에서蜂毒이 B cell과 T cell 분포에 미치는 영향

蜂毒이 B cell과 T cell의 분포에 미치는 영향을 확인하여 위해蜂毒 1 mg/kg을 100 μ l를 복강 내에 3일 동안 투여하고 splenocyte를 분리한 후 FITC-conjugated anti-CD8, B220 antibody와

PE-conjugated anti-CD4, anti-CD3 antibody를 flow cytometry로 분석한 결과 B cell의 대조군과 비교하여 3.2%, T helper cell 8.1% 증가하였으나, T cytotoxic cell 0.4% 감소하였다 (Fig. 8).

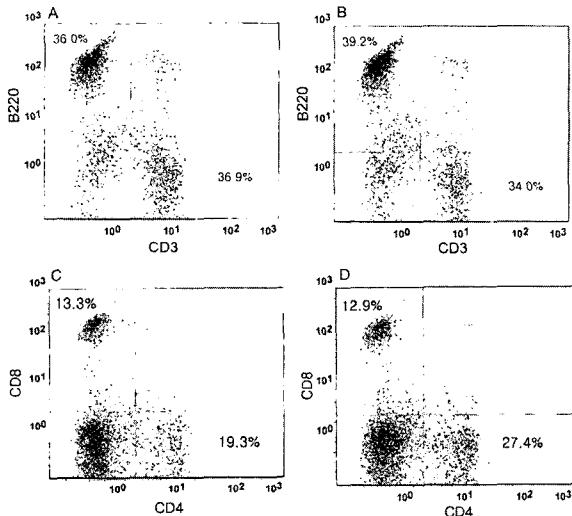


Fig. 8. Flow cytometric analysis of lymphocytes from BALB/c mice. Spleenocytes from BALB/c were stained with fluorescein-labeled or PE-conjugated goat anti-mouse surface markers as indicated. A, C Cells were incubated in media without BV as control. B, D Cells were incubated in media containing 1 μ g/ml BV extract.

6. In vivo 상에서 蜂毒이 T cell의 activation된 상황에서 IFN- γ , IL-4 mRNA 발현량에 미치는 영향

蜂毒이 activation 된 T cell deviation에 미치는 영향을 확인하기 위하여 BALB/c 마우스의 蜂毒을 1 mg/kg을 100 μ l를 복강 내에 3일 동안 투여하고 4 μ g anti-CD3를 100 μ l을 미정액에 주사 한 후 1시간 뒤에 spleen을 적출하여 total RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 real-time RT-PCR으로써 유전자의 발현량의 평가한 결과는 다음과 같다.

1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 internal control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct 값을 기준으로 작성된 standard curve는 생략하였다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R2는 0.9980로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

2) IFN- γ

IFN- γ 유전자에 대한 real-time RT-PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 생략하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성을 없었던 것으로 확인되었으며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9983로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 IFN- γ 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 9). 蜂毒 1 mg/kg을 100 μ l 투여한 그룹이 대조군과 비교하여 증가하였으나 유의성은 없었다. 蜂毒 1 mg/kg을 100 μ l 투여한 후 anti-CD3로 T cell activation 시킨 그

룹이 anti-CD3로 activation 한 그룹에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다 ($P<0.05$).

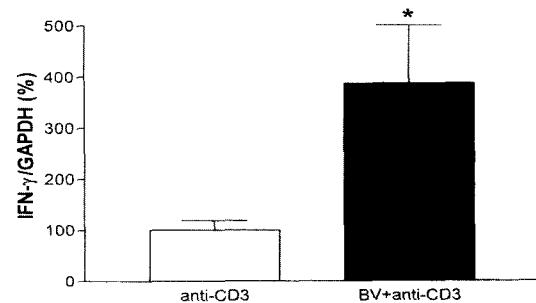


Fig. 9. Expression level of IFN- γ . Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH. Data were shown as mean \pm S.E.M. (n=5). Statistical analysis was performed by student t-test: * $P<0.05$.

3) IL-4

IL-4 유전자에 대한 real-time RT-PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 생략하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성을 없었던 것으로 확인되었으며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9977로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 IL-4 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 10). 蜂毒을 투여한 그룹이 대조군과 비교하여 증가하였으며, 蜂毒을 투여한 후 anti-CD3로 activation 한 그룹이 anti-CD3로 activation 한 그룹에 비하여 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다.

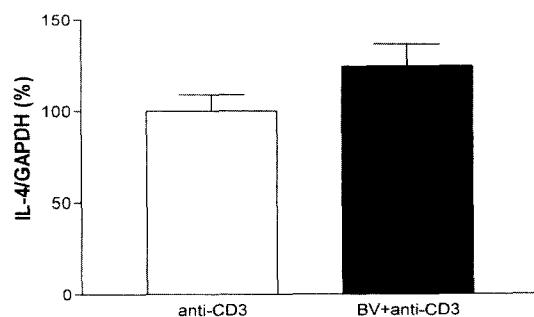


Fig. 10. Expression level of IL-4. Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

고 칠

면역은 세포성 면역과 체액성 면역으로 분류하며 골수, 흉선, 비장은 면역기관으로써 골수의 간세포는 흉선으로 이동 분화와 발육과정을 거치면서 T cell로 성숙되고 말초혈액 림프를 통해 인체의 세포성 면역을 담당하게 된다. 말초혈액의 T cell group중에서 helper T cell은 CD4+라는 표면단백질을 발현하고 세포성용해성 T cell, cytotoxic T cell은 CD8+이라는 다른 표면 단백질을 발현한다. 한번도 antigen을 감작되지 않은 naive CD4 T+ cell이 antigen 자극을 받으면 다양한 cytokine을 분비 활성화

시키는데 관여하므로 helper T cell이라고 부르며 활성화된 림프구가 생성 방출하는 물질로서 다른 세포를 작용하게 하는 활성 물질을 cytokine이라고 한다. naive CD4+ T cell은 APC (Antigen presenting cell)의 MHC I 혹은 MHC II와 결합하여 Th1, Th2 림프구로 분화하며 Th1, Th2 따라서 cytokine 분비양 상도 다르다. Th1 림프구는 주로 IL-2, IFN- γ , TNF- α 등을 분비 IgG 항체합성을 돋고 세포 용해성 T 림프구의 CD8+ T cell 림프구 분화에 관여하며 기도의 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 한다. Th1 림프구는 면역반응 후 수일 안에 시작되는 자연성 과민반응 결핵균, 바이러스 작용에 대한 방어작용, 종양에 대한 속주반응에 관여하는 반면, Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 분비하는데, IL-4는 B림프구에 작용하여 IgE와 같이 비만세포와 결합하는 항체 생산을 도우며 IL-3, IL-9는 비만세포의 증식에 관여한다. 그리고 면역반응 후 즉시형 과민반응, 기관지 천식과 같은 알러지성 질환, 기생충 감염에 대한 방어작용에 관여하여 알러지에 관여한다. Th1과 Th2에서 분비하는 각종 cytokine은 서로 길항작용을 하며 서로 억제한다. 즉 Th1이 활성화하면 Th2를 억제하고 알러지에 관련된 Th2가 활성화되면 Th1이 억제된다. Th세포는 가장 중추적인 면역 구성세포로 알려져 있다. 제1형 과민반응을 IgE 매개 과민면역반응이라고 한다. IgE는 T cell 림프구의 항체전환에 의해 생성된다. 즉 항원에 의한 IgE 생성에 필수적인 요소인 IL-4를 분비하는 Th2 림프구 naive CD4+ T cell이 IL-4 영향으로 알러젠판과 반응시 분화되고¹⁵⁾ 이때 IgE 생성을 방해하는 IFN- γ 를 분비하는 Th1림프구는 그 발달이 저해된다¹⁶⁾. 즉 Th1 cell의 수적 감소 및 활성 저하는 전신의 면역체계를 저하시켜 감염질환을 일으킬 수 있는 한편 Th2 cell의 과잉항진은 allergy 질환을 유발할 수 있는 것이다^{17,18)}.

한의학에서 면역의 개념은 衛氣로서 설명될 수 있다. 外邪의 침입을 방어하는 正氣를 '衛氣'라고 하는데 衛氣는 皮膚, 分肉사 이를 순행하며 汗腺을 조절하고 外邪에 대항하는 작용을 하며 腸腑의으로 보면 腎中陽氣에서 化生되고 中焦 脾胃에서 化生된 水穀精微에 의해 滋養되며 上焦 肺氣의 宣散作用에 의해 散布된다¹⁹⁾. 衛氣는 元氣의一部分으로 肺, 脾, 腎의 三臟과 밀접하여 서양의학에서 면역의 개념과 같이 외부로부터의 미생물, 동종의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하여 항체를 만들며 이것을 배제하여 그 개체의 항상성을 유지하는 현상²⁰⁾인 면역반응의 조절에 주요한 관계가 있다²¹⁾.

면역에 대한 한의학적 개념을 살펴보면 동양의학에서는 면역에 대한 개념을 「素問·上古天真論」에서 "眞氣를 보존하고 精神을 안으로부터 지키면 어찌 병이 발생하겠는가"와 「素問·刺法論」의 "精氣가 인체 내부로부터 지켜지면 邪氣가 감히 침범할 수 없다", 「素問·評熱病論」의 "邪氣가 인체에 넘친다는 것은 인체의 氣가 반드시 虛한 것이다"라 하였다²²⁻²⁴⁾. 真氣는 正氣를 말하는 것이며 正氣는 邪氣의 反對되는 개념으로 外邪의 작용에 대한 방어적 역할을 하고 體內陰陽의 평형을 조절하여 인체의 생명활동 유지를 위한 기능 즉 정상생리상태로 유지시키는 작용을 한다²⁵⁾. 邪氣는 六淫 뿐 만 아니라 인체의 陰陽失調로惹起된 痘病變化 및 飲食 勞倦 燥飲 등의 모든 發病要인을 말하

는 것이다. 결국 인체의 真氣에 해당하는 精氣가 消耗되거나 인체를 외부로부터 防禦, 保護하고 세균에 대한 항체 형성작용과 식균작용이 있는 것으로 보는 衛氣가 약해지거나 손상이 되면 邪氣가 침입해 정상생리의 失調가 일어난다는 것을 의미한다. 그러므로 精氣가 면역계의 바탕이 된다고 이해할 수 있는 고로, 면역기능의 저하나 항진으로 인한 질환을 치료함에 大補元氣하는 人蔘²⁶⁾을 이용하거나, 滋陰補精하는 六味地黃湯에 수종의 약재를 加味한 淸上補下湯 등²⁷⁾으로 면역기능의 강화를 도모하여 왔다.

蜂毒 요법은 경락학설의 원리에 의하여 꿀벌의 독낭 안에 들어있는蜂毒을 추출 가공한 후 질병에 유관한 혈위, 압통점, 혹은 體表의 觸診으로 얻어진 양성 반응점에 주입함으로서 자침효과 및 蜂毒의 생화학적 효능을 이용하여 생체의 기능을 조정하고, 병리상태를 개선시켜 질병을 치료, 예방하는 신침요법의 일종^{1,28)}으로, phospholipase A2, hyaluronidase, mellintin, apamin, MCD peptide 등의 40여종의 단백질에 강력한 항염증 작용이 있어 염증세포를 제거하고^{29,30)}, 면역체계에 영향을 주어 T cell에서 분비하는 cytokine과 관련되어 면역기능을 조절하는 작용을 한다고 알려져 있다^{31,32)}. 蜂毒을 이용한 immunotherapy는 약물흡입법 보다 효과적이라고 알려져 있는데 원인은 불분명 하지만 정제된蜂毒을 사용하면蜂毒에 포함되어 있는 단백질성분이 약물흡입법 보다 많은 양을 투여할 수 있기 때문으로 추정된다. Muller U. 등³³⁾은蜂毒을 이용하여 immunotherapy를 시술하였을 때 거의 80% 이상의 효과를 볼 수 있다고 보고하였는데, 최근蜂毒에 관한 실험을 통하여 항종양효과와蜂毒이 대뇌피질의 단백질에 미치는 효과 등³⁴⁾으로 인해 세포수준이나 RNA 단계가 아닌 동물실험 위주로 많이 진행되어왔으며 임상에서도蜂毒약침은 퇴행성 관절염 같은 면역계 질환 및 이에 의한 통증 관련 위주로 많이 응용되고 있으며 이에 대한 임상보고도 꾸준히 증가하고 있다. 이와 같이蜂毒치료의 주요 대상인 면역질환의 특징은 체내의 면역기전의 이상으로 발생하며 유전소인, 감염, 조직손상 등으로 auto-antigen에 대한 auto-antibody가 형성되어 유발된다. 여기에 관련된 중요한 세포는 CD4+ T cell이며, 자아MHC와 결합된 동종 항원과의 결합에 의하여 분화가 결정된다. 이 과정에 분화에 결정적인 역할을 하는 것은 cytokine으로 주로 IL-1, IL-2, IL-4, IL-12, IFN- γ 등이 있다. 이들 cytokine의 영향으로 naive CD4+ T cell은 Th1 cell과 Th2 cell로 분화한다⁴⁻⁶⁾. 이 분화과정에서 과도한 증식은 병리적인 현상을 유발시켜 자가면역 질환이나 알러지 질환을 발생케 하는데 이 과정에서 Th1 cell에 의해 Th2 cell의 development가 증가되면 병리적으로 알러지, 기관지 천식, 만성기관지염이 유발하게 되며 반대로 Th1 cell이 Th2 cell에 의해 과도하게 성장하면 류마티스 관절염, 루푸스와 같은 자가면역질환이 발생한다.

pecht 등¹⁰⁾은蜂毒이 murine spleen cell에서 IgE antibody activity를 높인다고 보고하였으며 이 결과로 Th2 cell development에蜂毒이 영향을 미칠 것이라고 가능성을 제시하였다. 또한 Lee 등³⁵⁾은 류마티스 관절염을 유발한 mouse에서蜂毒이 부종 및 통증을 억제하는 효능이 있음을 보고하였다. 이러한 보고들은蜂毒이 류마티스 관절염과 같은 자가면역질환에 유

효한 효능이 있음을 암시하는 결과이나 아직은 Th1/Th2 cell deviation에 미치는 영향에 대한 구체적인 연구는 없었다.

이와 같이 임상에서 활용되고 있는 각종 蜂毒 약침액의 효능에 관해서는 실험적 연구가 있었으나 아직 까지 蜂毒이 면역반응의 관한 연구 보고가 많지 않으므로 본 연구에서는 *in vivo* 상 蜂毒이 미치는 면역반응에 대한 영향을 T cell, B cell 중심으로 확인하고, 동시에 *in vitro* 상에서 T cell deviation에 관련된 cytokine에 대한 조절 능력을 확인하고자 하였다.

본 연구를 시작하면서 먼저 蜂毒이 mitogen으로서 비장 임파구를 자극하는지 확인하고자 蜂毒을 농도별로 투여한 후 48시간 배양하여 세포 증식율을 측정한 결과 농도별 세포 증식율은 蜂毒을 투여하지 않은 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않는 것으로 확인할 수 있었다. 이는 蜂毒이 mitogen으로서 비장 임파구를 자극하지 않는다는 것을 확인한 것으로 이후 실험결과에 신뢰를 갖게 하는 것이다. 한편 T cell specific mtogen인 anti-CD3e로 activation 했을 때는 蜂毒이 저농도에서는 T cell 증식을 다소 상승시키고 고농도에서는 저하시키는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. CD4+ T cell을 분리하여 Th1, Th2로 분화시킨 후 蜂毒을 투여하고 secretion cytokine을 분비량을 측정한 결과 IFN- γ 는 대조군에 비하여 차이를 보이지 않았으나 IL-4는 7.3% 미약하게 증가하였다. 또한 분화된 Th1, Th2 cell에서 total RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 각 cytokine별로 real-time RT-PCR을 하여 각 cytokine mRNA 발현량을 비교한 결과 IFN- γ 는 119.5%, T-bet은 23.7% 증가하였으며, IL-4는 8.7% 증가하는 경향을 보였으나 GATA-3는 거의 차이가 없었다. 즉, Th1, Th2 림프구의 cytokine인 IFN- γ , IL-4 모두 증가하였으나 Th2 림프구의 cytokine 보다는 Th1 림프구 cytokine 발현량이 월등히 증가하였음을 확인할 수 있었는데 이는 蜂毒이 Th1 cell response에 관여하는 것을 의미하는 것으로 전체적인 면역체계의 강화에 연관되는 것으로 생각된다.

이후 *in vitro* 상에서의 결과를 토대로 하여 *in vivo* 상에서 蜂毒이 면역세포 분화에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 먼저 蜂毒을 3일 동안 투여하고 splenocyte를 분리하여 48시간동안 배양 후 세포 증식율을 측정한 결과 B cell의 생존율은 anti-CD40, LPS antibody로 activation 시킨 대조군에 비하여 약간 증가하였으며, T cell 역시 anti-CD3로 activation 시켰을 때 세포증식율이 대조군과 비교하여 약간 증가하였다. 이 결과는 B, T cell 모두 대조군에 비하여 큰 차이를 보이지 않은 것으로 보아 蜂毒이 antigen으로서 작용하지 않았다는 것을 의미한다. B cell과 T cell의 분화 양상을 확인하기 위하여 蜂毒을 투여하고 splenocyte를 분리하여 확인한 결과, B cell이 대조군과 비교하여 3.2%, T helper cell이 8.1% 증가하였으나, T cytotoxic cell은 0.4% 감소하였다. 이는 蜂毒이 항원으로 작용하지 않음에도 불구하고 면역세포의 발현량을 증가시키는 것으로 유추할 수 있는 결과이다. 또한 蜂毒이 T cell deviation에 미치는 영향을 확인하기 위하여 蜂毒 및 anti-CD3를 주사 한 후 real-time RT-PCR로서 각 cytokine mRNA 발현량을 비교한 결과 IFN- γ 는 대조군 대비 286%가 유의하게 증가하였으며, IL-4는 24% 증가하였으나

유의성은 없었다. 이상의 결과는 *in vitro* 상에서 蜂毒이 Th2 response보다는 Th1 response에 강력하게 관여하는 결과와 일치하였다. 따라서 본 연구를 통하여 蜂毒은 CD4+ T cell의 정상 면역기능을 강화함으로서 인체의 면역능력을 증강시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

결 론

蜂毒이 T cell 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 cytokine을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

蜂毒은 CD4+ T cell을 분리한 후 추출물을 농도별로 투여하고 48시간동안 배양한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 蜂毒은 분화된 Th1, Th2 cell에서 IFN- γ 는 대조군 대비 119.5%, IL-4는 8.7% 증가시켰다. *In vivo* 상에서 蜂毒이 비장 임파구 구성에 영향을 주는지 확인하기 위하여 B cell은 B220, CD3로 T cell은 CD4, CD8으로 표면표식을 확인한 결과 B cell, T cell 다소 증가하는 경향이 있었으나 많은 차이를 보이지 않았다. 蜂毒이 활성화된 T cell에서의 IFN- γ , IL-4 mRNA 발현량에 미치는 영향을 확인 한 결과, 蜂毒을 투여한 그룹이 anti-CD3만 투여한 그룹보다 IFN- γ 가 286% 유의성있게 증가하였으며 ($P<0.05$), IL-4 또한 24% 증가하였으나 유의성은 없었다.

蜂毒은 Th2 cell의 분화 및 활성화보다 Th1 cell의 분화 및 활성화에 대한 증강효과를 지님으로서 CD4+ T cell의 정상 면역기능을 강화한다고 판단되며, 면역능력의 저하로 인한 감염성 질환의 치료에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술 연구개발사업의 지원에 의한 것임. (00-PJ9-PG1-CO02-0003)

참고문헌

1. 김창환, 권기록, 고형균, 봉침에 관한 고찰, 대한침구학회지 11(1):159-171, 1994.
2. 인창식, 고형균, 蜂毒요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록: 마왕토의서의 蜂毒요법 2례, 대한침구학회지 15(1):143-147, 1998.
3. 인창식, 남상수, 김용석, 이재동, 김창환, 고형균, 중풍 편마비 환자의 견관질 통통에 대한 蜂毒약침요법의 효과, 대한약침학회지 3(2):213-232, 2000.
4. Mosmann T.R. and Sad S., The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol. Today 17(3):138-146, 1996.
5. Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A., Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 383(6603):787-793, 1996.
6. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. Immunity 15(2):141-151, 2001.

- 8(3):275-283, 1998.
7. 황유진, 이건목, 황우준, 서은미, 장종덕, 양귀비, 이승훈, 이병철, 봉약침을 이용한 류마토이드 관절염의 임상적 연구, 대한침구학회지 18(5):33-41, 2001.
 8. 정혜윤, 고형균, 蜂毒 약침액이 염증 및 통증 관련 유전자 발현에 미치는 영향, 대한침구학회지 19(3):41-53, 2002.
 9. 이홍석, 이재동, 고형균, 최근 10년간 국내외 蜂毒 관련 연구에 대한 고찰, 대한침구학회지 20(3):154-165, 2003.
 10. Specht C. and Kolsch E., The murine (H-2k) T-cell epitopes of bee venom phospholipase A2 lie outside the active site of the enzyme. Implications with respect to a paracrine activation of Th2 cells for an IgE antibody response. Int. Arch. Allergy Immunol. 112(3):226-230, 1997.
 11. Kwon Y.B., Lee J.D., Lee H.J., Han H.J., Mar W.C., Kang S.K., Beitz A.J. and Lee J.H., Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. Pain 90(3):271-280, 2000.
 12. Hodge M.R., Ranger A.M., Charles de la Brousse F., Hoey T., Grusby M.J. and Glimcher L.H., Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. Immunity 4(4):397-405, 1996.
 13. Swain S.L. Helper T cell differentiation. Curr. Opin. Immunol. 11(2):180-185, 1999.
 14. Brosterhus H., Brings S., Leyendeckers H., Manz R.A., Miltenyi S., Radbruch A., Assenmacher M. and Schmitz J., Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. Eur. J. Immunol. 29(12):4053-4059, 1999.
 15. Hogan S.P., Koskinen A., Matthaei K.I., Young I.G. and Foster P.S., Interleukin -5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157(1):210-218, 1998.
 16. Hultner L., Kolsch S., Stassen M., Kaspers U., Kremer J.P., Mailhammer R., Moeller J., Broszeit H. and Schmitt E., In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. J. Immunol. 164(11):5556-5563, 2000.
 17. Abbas A. K., Lichtman A. H. and Pober J. S., Cellular and molecular immunology, pp.250-277, W.B. Saunders company, Philadelphia, 1997.
 18. Umetsu D.T. and DeKruyff R.H., Th1 and Th2 CD4+ cells in the pathogenesis of allergic diseases. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 215(1):11-20, 1997.
 19. 대한동의생리학회 편, 동의생리학, pp.90-91, 경희대학교 출판국, 서울, 1993.
 20. 菊地浩吉 외, 최신면역학, pp.26-29, 196-200, 367-388, 집문당, 서울, 1989.
 21. 안덕균譯, 면역과 한방, pp.19-48, 도서출판 열린책들, 서울, 1994.
 22. 張介賓, 類經, p.28, 34(上), 418(下), 大成文化社, 서울, 1986.
 23. 王琦, 黃帝內經素問今釋, p.8, 125, 146, 412, 成輔社, 서울, 1985.
 24. 張隱庵, 馬元臺註, 黃帝內經素問, p.25, 269, 臺聯國風出版社, 臺北, 1998.
 25. 趙鍾寬, 免疫에 관한 동양의학적 고찰, 12(1):19, 1986.
 26. Takagi K., Saito H. and Nabata H., Pharmacological studies of Panax ginseng root: estimation of pharmacological actions of Panax ginseng root. Jpn. J. Pharmacol. 22(2):245-249, 1972.
 27. 박영식, 배현수, 흥무창, 신민규, 청상보하탕이 Naive CD4+ T cell의 활성에 미치는 영향, 동의생리병리학회지 16(4):801-809, 2002.
 28. 성은찬, 알기 쉬운 蜂毒요법, p.28, 전국농업기술자협회출판사, 서울, 1990.
 29. Lee J.H., Kwon Y.B., Han H.J., Mar W.C., Lee H.J., Yang I.S., Beitz A.J. and Kang S.K., Bee venom pretreatment has both an antinociceptive and anti-inflammatory effect on carrageenan-induced inflammation. J. Vet. Med. Sci. 63(3):251-259, 2001.
 30. Shkenderov S. and Koburova K., Adolapin-a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. Toxicon. 20(1):317-321, 1982.
 31. Romagnani S., Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. Immunol. Today 12(8):256-257, 1991.
 32. Paul W.E. and Seder R.A., Lymphocyte responses and cytokines. Cell 76(2):241-251, 1994.
 33. Muller U., Helbling A. and Berchtold E., Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. J. Allergy Clin. Immunol. 89(2):529-535, 1992.
 34. 권도희, 이재동, 최도영, 약침용 蜂毒성분 중 Apamin, Melittin의 항암작용, 대한침구학회지 18(1):129-145, 2001.
 35. Kwon Y.B., Lee J.D., Lee H.J., Han H.J., Mar W.C., Kang S.K., Beitz A.J. and Lee J.H., Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. Pain 90(3):271-280, 2001.