

원저

産地別 蜂毒液藥鍼刺戟이 免疫機能低下에 미치는 影響

이경희 · 김창환 · 강성길 · 고흥균

경희대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effect of Honey Bee Venom Aqua-Acupuncture by its Production from Different Regions on Decreased Immune Response

Kyung-Hee, Lee · Chang-Hwan, Kim · Sung-Keel, Kang · Hyung-Kyun, Koh
Department of Acupuncture & Moxibustion College of Oriental Medicine,
Kyung Hee University

Objectives : This study was purposed to investigate the effect of honey bee venom aqua-acupuncture on decreased immune response by its production from Korea, North America and China.

Methods : ICR-mouse was exposed with four minute sublethal $^{60}\text{Co-}\gamma$ -ray irradiation onto the body and got a series of each country's 0.1ml honey bee venom aqua-acupuncture to Choksamni(ST36) every other day for three times. Thereafter the numbers of WBC, delayed type hypersensitivity, hemagglutinin titers, hemolysin titers, quantitation of T-cell and B-cell, lymphocyte transformation, natural killer cell activity, interleukin-2 productivity and interferon productivity were measured.

Results : The numbers of WBC, delayed type hypersensitivity, hemagglutinin titers, hemolysin titers, quantitation of T-cell and B-cell and lymphocyte transformation were increased respectively with statistical significance in Korean, North American and Chinese honey bee venom aqua-acupuncture groups as compared with the control group. The natural killer cell activity was increased with statistical significance in Korean honey bee venom aqua-acupuncture group, and Interleukin-2 productivity and interferon productivity were not shown any statistical significance in all experimental groups as compared with the control group.

- 접수 : 2000년 10월 29일 · 수정 : 11월 9일 · 채택 : 11월 11일
- 교신저자 : 고흥균, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학 부속한방병원 침구과 (Tel: 02-958-9194)

Conclusions : According to the results, honey bee venom aqua-acupuncture has significant effect on decreased immune response, and Korean bee venom can be substituted for North American and Chinese one.

Key words : honey bee venom, aqua-acupuncture, immune response

I. 서 론

免疫은 생체가 自己와 非自己를 식별하여 일련의 抗原抗體反應과 食作用을 거쳐 中和, 除去, 代謝시킴으로써 개체의 恒常성을 유지시키는 현상¹⁾이다. 이는 韓醫學의 관점에서 正氣의 작용과 유사한데²⁾ 이것을 이론적 근거로 하여 악성종양의 치료와 예후에 영향을 주기 위한 많은 실험 연구들^{3,4,5)}이 이루어지고 있으며, 이러한 노력의 일환으로 蜂毒液藥鍼療法の 연구^{6,7)}도 다양하게 이루어지고 있다.

蜂毒液藥鍼療法은 꿀벌의 毒囊에 들어 있는 蜂毒을 추출, 가공하여 질병과 유관한 부위 및 穴位에 주입함으로써 刺鍼效果和 蜂毒의 생화학적 특이물질이 인체에 미치는 약리작용을 동시에 이용하는 鍼療法の 일종으로,^{8,9)} 양봉가들에게 전염병 및 종양의 발생율이 현저히 낮아진다는 報告^{10,11)}를 바탕으로 蜂毒의 면역기능에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 外國에서는 蜂毒免疫療法 후 혈청 중 IgG의 함량변화에 관한 연구가 대부분으로 蜂毒의 면역작용은 유기체의 생체계를 자극하여 생체의 방어력을 증가시킨다^{10,11)}고 하였고, 종양에 관련된 면역계를 자극, 암세포의 생성을 억제한다는 보고¹²⁾가 있다. 또한, 國內報告에서는 蜂毒液藥鍼療法이 한냉 자극으로 저하된 면역기능을 증강시켜¹³⁾, 3-MCA 유발 상피종에 대하여 항암 및 면역증가효과가 있다¹⁴⁾고 하였다.

이에 著者は 蜂毒液藥鍼療法이 放射線 照射로 인한 면역기능 저하에 미치는 영향과 함께 현재 임상에서 다용되고 있는 美國產 및 中國產 蜂毒液藥鍼液을 韓國產 蜂毒液藥鍼液으로 代替하기 위하여 產地別 效能比較를 하고자, 생쥐의 足三里(ST36)^{4,15)}에 일정한 방법으로 韓國產, 美國產 및 中國產 蜂毒液藥鍼刺戟을 시술한 후 白血球數, 遲延性 過敏反應, 赤血球 凝集素價 및 赤血球 溶血素價, T細胞 및 B細胞의 含量, 淋巴球 增殖能, 自然殺害細胞의 活性度를 관찰하였던 바 유의한 결과를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 연구대상 및 방법

體重 20±5g의 ICR系 雌性 생쥐 10마리씩을 1群으로 한 正常群, 對照群, 實驗群으로 나누어 對照群 및 實驗群에 放射線으로 照射한 후, 實驗群에는 足三里(ST36)에 相應하는 穴位¹⁶⁾에 各各 韓國產, 美國產 및 中國產 蜂毒液藥鍼刺戟을 左右 번갈아 總 3回 實施하였다. 免疫機能을 觀察하기 위하여 2차례 免疫을 시킨 후 白血球數, 遲延性 過敏反應, 赤血球 凝集素價 및 溶血素價, T細胞 및 B細胞의 含量, 淋巴球 增殖能, 自然殺害細胞의 殺害能을 測定하였다. 統計處理는 SAS를 利用하였으며 分散分析法에 의한 分析比로 各 群사이에 平均值 差異에 대한 有意性 檢定後, $\alpha=0.05$ 水準에서 Duncan檢定法에 의해 個別比較하였다.^{17,18)}

1. 病症誘發

病症誘發은 생쥐의 sublethal dose인 $^{60}\text{Co}-\gamma$ -ray를 170rad/min.의 線量率로 4分間 1回 全身照射^{19,20)}하여 免疫機能을 低下시켰다.

2. 蜂毒液藥鍼處置

1) 蜂毒液

韓國産 蜂毒藥鍼液은 microchip을 이용한 電磁氣發生裝置로 꿀벌의 봉낭을 刺戟하여 採集한 다음, 加工한 꿀벌의 乾燥蜂毒을 生理食鹽水 99.9ml에 蜂毒 0.1g을 稀釋하여 0.1% 蜂毒을 얻은 후 다시 生理食鹽水에 稀釋하여 0.025%(1mg/4ml) 蜂毒을 만들어 使用하였다. 美國産 Apitoxin(1mg/ml, Mon-mouth Pain Institute, Inc., U.S.A.)과 中國産 蜂毒藥鍼液(0.5mg/2ml, Fu Yu Pharmaceutical Factory, China)은 各 原液을 生理食鹽水로 稀釋하여 0.025%의 濃度로 만들어 使用하였다.

2) 藥鍼方法

1.0ml의 1回用 注射器(注射器 26 gauge, 녹십자 의료공업사, 韓國)를 使用하여 放射線 照射 24時間 後부터 蜂毒藥鍼液 0.1ml(1mg/4ml/20g)를 2日 間隔으로 左側 足三里(ST36) 該當穴에 1回 處置하고 2日 후 右側 足三里(ST36) 該當穴에 1回 處置하여 이와 같은 方法으로 總 3回 注入하였다.

3. 實驗群의 分類

생쥐 10마리씩을 正常群, 對照群, 韓國産 蜂毒液藥鍼刺戟群, 美國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群으로 나누어 配定하였다.

1). 正常群: 固形飼料과 물만 供給하고 아무 處置를 하지 않은 群

2). 對照群: 放射線 照射 후 아무 處置를 하지 않은 群

3). 韓國産 蜂毒藥鍼 刺戟群: 放射線 照射 후 韓國産 蜂毒液藥鍼刺戟한 群

4). 美國産 蜂毒藥鍼 刺戟群: 放射線 照射 후 美國産 蜂毒液藥鍼刺戟한 群

5). 中國産 蜂毒藥鍼 刺戟群: 放射線 照射 후 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟한 群

4. 免疫機能 觀察

免疫誘發은 緬羊赤血球(Sheep Red Blood Cell : S.R.B.C)를 抗原으로 使用하였는데 緬羊의 頸動脈으로부터 採血한 후 同量의 Alsever씨液 (dextrose 20.5g/l, sodium citrate 8.0g/l, citric acid 0.55g/l, sodium chloride 4.2g/l)을 加하여 4°C에서 保存한지 1週日 以內의 것만 使用하였다. 放射線 照射 2日 후 實驗群 및 對照群의 尾靜脈에 1×10^9 cells/ml의 濃度로 調整된 緬羊赤血球浮遊液 0.1ml를 尾靜脈에 注射하여 1次 免疫시킨 後 4日째 實驗群 및 對照群의 右側 後肢 足趾部에 2×10^9 cells/ml로 調整된 緬羊赤血球浮遊液 0.05ml를 注射하여 2次 免疫시켰다.

末梢血管 採取는 heparin coating이 된 capillary tube(Chase Instruments Corp., Falls, U.S.A.)를 利用하여 생쥐 眼窩의 retro-orbital venous plexus에서 採血하였다.

脾臟細胞의 浮遊液을 準備하기 위하여 採血後 脾臟을 無菌의으로 摘出하여 antibiotic-antimycotic solution(GIBCO, NO. 600-5240, Gland Island, NY., U.S.A.)을 1% 添加한 Hank's balanced salt solution(HBSS;GIBCO, No.310-4020, Gland Island, NY., U.S.A.)으로 洗滌하고 HBSS가 있는 petri dish內에서 작은 해부가위로 脾臟을 잘게 잘랐다. 滅菌된 유리봉으로 조심스럽게 문질러 脾臟細胞를 浮遊시키고 滅菌된 nylon mesh를 通過시켜 細胞 debris를 除去한 후, 이 細胞 懸濁液을 5ml 遠心用 試驗管(Falcon, U.S.A.)에 옮겨 1000rpm에

서 10분간 遠心 沈澱시켜 얻은 cell pellet를 Tris-NH₄Cl溶液에懸濁시켜赤血球를除去하고 HBSS로 3회 遠心洗滌하여脾臟細胞浮遊液을取하여實驗에利用하였다.

1) 白血球數 觀察

末梢血液을 turk solution(0.01% gentian violet in 3% acetic acid)에稀釋하여血球計算器(American Optical, U.S.A.)로測定하였다.

2) 遲延性 過敏反應 觀察

遲延性 過敏反應의測定은 Mitsuoka 等⁷⁾의方法에 따라免疫 4日後 右側後肢足蹠皮內에 2×10^9 cells/ml로調整된 緬羊赤血球浮遊液 0.05ml를注射하고 24時間이經過한 다음 足蹠腫脹反應檢査를施行하였다. 足蹠腫脹程度는 digimatic calliper(Code No.500-100, Mitutoyo MFG Co., Tokyo, Japan)를使用하여 생쥐의 左右側 後肢 足蹠 두께를 0.01mm까지測定하여 左右足蹠두께의差異를計算하였다.

3) 赤血球凝集素價 觀察

緬羊赤血球에對한凝集素價를測定하기爲하여河等²¹⁾이記述한方法에 따라 생쥐의心臟으로부터採血하여分離한血清을 microtitration plate(Limbro, Hamden, Conn, USA)의各 well에 磷酸鹽緩衝食鹽液으로 2倍系列稀釋한血清 25 μ l씩加하여 잘混和한 다음 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培養器內에서 18時間放置한後赤血球凝集反應을觀察判讀하였으며赤血球凝集을 일으키는血清의最高稀釋倍數를凝集素價로定하였다.

4) 赤血球溶血素價 觀察

緬羊赤血球에對한溶血素價(Hemolysin Titer)를測定²¹⁾하기爲하여各各의 생쥐血清을 microtitration plate(Limbro, Hamden, Conn, USA)의

各 well에 磷酸鹽緩衝食鹽液으로 2倍系列稀釋한血清 25 μ l에 0.5% 緬羊赤血球浮遊液을 50 μ l씩加한 다음各 well에 5倍稀釋한 생쥐의血清을 25 μ l씩加하여 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培養器內에서 1時間放置한後 緬羊赤血球가 완전히溶血을 일으키는最高稀釋倍數를溶血素價로算定하였다.

5) T細胞 및 B細胞의 含量 觀察

T細胞 및 B細胞의測定은細胞表面抗原檢査法²²⁾을使用하였다. 準備한脾臟細胞浮遊液을 U-bottom의 96-well microtiter plate(Nunc, Vanggaard, Neptune, N.J., U.S.A.)에 100 μ l씩分柱하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培養器內에서 충분히 자라게한 다음 完全培地에 5×10^6 cell/ml의濃度로調整한後 microtiter plate를 4 $^{\circ}$ C에서 1500rpm으로 遠心分離하였다. 遠心分離後 上澄液은 흡입제거하였으며 T細胞의表面抗原分析을爲해 fluorescein isothiocyanate(FITC)가 부착된 anti-Thy 1,2 (Pharmingen, Sandiego, CA, U.S.A.)를各 well에 200 μ l씩 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 30分간反應시켰다. 反應後 microtiter plate를 4 $^{\circ}$ C에서 1500rpm으로 遠心分離한後, 完全培地로細胞를 3회 遠心洗滌하여 mounting medium(30% glycerol 添加)을 두방울 떨어뜨린後 螢光顯微鏡(Olympus BH-2, Japan)下에서 200개以上の細胞를觀察하여 螢光陽性細胞를定量하였다. B細胞는 FITC가附着된 anti-mouse Ig(Cedalane, Ontario, Canada)을 같은方法으로作用시킨後, 表面免疫 globulin陽性細胞를觀察하여定量하였다.

6) 淋巴球 增殖能 觀察

淋巴球 增殖能測定은 Mosmann에 의해發表된 MTT方法²³⁾에 따라 準備한脾臟細胞를 5×10^5 M의 2-mercaptoethanol 및 10 μ g/ml의 concavalin-A(Con-A; Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)

가 添加된 完全培養液에 1×10^6 cell/ml 되게 調整된 淋巴球를 U-bottom의 96-well microtiter plate (Nunc, Vangaard, Neptune, N.J., U.S.A.)에 100 μ l씩 分柱하고 37°C, 5% CO₂ 培養器內에서 48時間 培養하였다. 培養終了 4時間前에 2mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, Sigma)를 각 well에 50 μ l씩 添加한 후 培養한 다음 1500rpm으로 2分間 遠心하여 細胞를 沈澱시켰다. 그 뒤 培養濾液을 약 30 μ l 정도 ぬ든 채, 各 well에서 上層液을 除去한 다음, 150 μ l dimethyl sulfonamide(DMSO, Sigma)를 加한 후, 攪拌器 위에서 약 20分間 攪拌하여 formazan crystal을 溶解시켰다. 이 microtiter plate는 光波長 570nm인 filter가 부착된 ELISA reader(Titerteck multiscan, U.S.A.)에서 吸光計數(optical density:O.D.)를 測定하였다.

7) 自然殺害細胞의 殺害能 觀察

(1) 作動細胞 準備

알콜로 腹部를 消毒한 후, 滅菌된 가위를 使用하여 생쥐의 脾臟을 摘出하여 15ml 遠心 tube (Falcon, U.S.A.)에 取하고, HBSS를 3ml씩 加하였다. 滅菌된 유리봉으로 脾臟을 조심스럽게 문질러 脾臟細胞를 浮遊시킨 후, 2000rpm에서 45分間 遠心分離하여 單核球層을 採集하고 HBSS로 2回, 그리고 10% fetal calf serum(FCS: GIBCO, U.S.A.)이 添加된 Rosewell Park Menorial Institute 1640 組織培養液(以下 RPMI 1640 組織培養液)으로 1回 遠心洗滌한 후, 浮遊시켜 作動細胞로 使用하였다.

(2) 標的細胞 準備

自然殺害細胞 殺害能測定은 全北大學校 微生物學教室에서 繼代培養한 Yac-1 淋巴球 細胞柱²⁴⁾를 標的細胞로 하고, 培養液으로는 試驗管 內에서 10% FCS와

1%의 antibiotic-antimycotic solution (GIBCO, U.S.A.) 및 2mM L-glutamine(GIBCO, U.S.A.)이 添加된 RPMI 1640 組織培養液을 使用하여 繼代培養하면서 아래의 方法에 따라 施行하였다.

(3) 細胞毒性 測定

Jondal의 方法을 修正한 方法²⁵⁾으로, 6×10^6 cell/ml의 濃度로 Yac-1 細胞浮遊液 0.5ml에 100 μ Ci의 Na₂CrO₄(New England Nuclear, U.S.A.)를 加하여 90分間 37°C, 5% CO₂ 培養器內에서 標識시킨 後, 5% FCS가 添加된 RPMI 1640 組織培養液으로 4回 遠心洗滌하였다. 이 細胞를 같은 培養液으로 5×10^5 cell/ml의 細胞 濃度가 되게 調整하였다. 準備된 標的 細胞 浮遊液을 U-bottom의 96-well microtiter plate(Nunc, Vangaard, Neptune, N.J., U.S.A.)에 10 μ l씩 分柱하고 作動細胞 對 標的細胞의 比(effector cell: target cell ratio)가 100:1이 되게 2.5×10^6 cell/ml 脾臟細胞 浮遊液을 well당 200 μ l씩 加하여 3倍數가 되게 實驗하여 平均값을 使用하였다. 標的 細胞의 自然遊離放射能은 作動細胞 浮遊液대신 同量의 完全培養液을, 最大遊離放射能은 同量의 1% triton X-100溶液(S.P.C. Gr Reagent, Japan)을 넣어 測定하였다. 이 microtiter plate를 1000rpm에서 3分間 遠心하고 37°C, 5% CO₂ 培養器內에서 4時間 放置한 다음, 各 well로 부터 100 μ l의 上澄液을 取하여 γ -counter(Beckman, CA., U.S.A.)로 放射活性을 測定하여 %細胞毒性을 구하였다.

$$\%細胞毒性 = \frac{\text{實驗遊離放射能} - \text{自然遊離放射能}}{\text{最大遊離放射能} - \text{自然遊離放射能}} \times 100$$

III. 結 果

1. 白血球數에 미치는 影響

白血球數는 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 對照群에 比하여 增加하였고, 實驗群間의 有意한 差異가 있는가를 檢定하기 위하여 分散分析을 한 結果 F-value는 4.55로 有意性(P<0.01)이 認定되었다.

Duncan 多衆範圍檢定法에 의한 個別 比較에 있어서는 對照群에 比하여 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 有意한 差가 認定되었으나, 個別 實驗群間에는 有意한 差가 認定되지 않았다 (Table I).

Table I. Effects of Honey Bee Venom Aqua-acupuncture on the Number of WBC in Peripheral Blood of Mice after Sublethal ⁶⁰Co-γ-ray Irradiation

Group	No. of animals	No. of WBC (No×10 ⁻³ /mm ³)	Duncan Grouping
Normal	10	8.88 ± 1.19 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	6.20 ± 0.88	B
K	10	8.00 ± 1.44	A
A	10	7.98 ± 1.30	A
C	10	8.20 ± 2.22	A
F-value 4.55****			

- 1) Means±standard deviation of 10 mice
- 2) The same letter are not significantly different at α =0.05 level by Duncan test

Normal : Untreated group

Control : Group treated with 4 minutes sublethal 60 Co-γ-ray irradiation

K : Group Aqua-punctured with Korean honey bee venom 0.1ml every 2days for 3 times into Choksamni(ST36) 24 hours after irradiation

A : Group Aqua-punctured with North American honey bee venom 0.1ml every 2 days for 3 times into Choksamni(ST36) 24 hours after irradiation

C : Group Aqua-punctured with Chinese honey bee venom 0.1ml every 2 days for 3 times into Choksamni(ST36) 24 hours after irradiation

* : Statistically significant value by the analysis of variance of procedure(****: P<0.01)

2. 遲延性 過敏反應에 미치는 影響

遲延性 過敏反應은 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 對照群에 比하여 增加하였고, 實驗群間의 有意한 差異가 있는가를 檢定하기 위하여 分散分析을 한 結果 F-value는 4.24로 有意性(P<0.01)이 認定되었다.

Duncan 多衆範圍檢定法에 의한 個別 比較에 있어서는 對照群에 比하여 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 有意한 差가 認定되었으나, 個別 實驗群間에는 有意한 差가 認定되지 않았다 (Table II).

Table II. Effects of Honey Bee Venom Aqua-acupuncture on Delayed Type Hypersensitivity (DTH) in Mice after Sublethal ⁶⁰Co-γ-ray Irradiation

Group	No. of animals	M±S.D (mm)	Duncan Grouping
Normal	10	0.42 ± 0.10 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	0.21 ± 0.11	B
K	10	0.46 ± 0.16	A
A	10	0.43 ± 0.13	A
C	10	0.51 ± 0.27	A
F-value 4.24****			

refer to Table I
(****: P<0.01)

3. 赤血球 凝集素價에 미치는 影響

赤血球 凝集素價는 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 對照群에 比하여 增加하였고, 實驗群間의 有意한 差異가 있는가를 檢定하기 위하여 分散分析을 한 結果 F-value는 4.79로 有意性(P<0.005)이 認定되었다.

Duncan 多衆範圍檢定法에 의한 個別 比較에 있어서는 對照群에 比하여 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 有意한 差가 認定되었으나, 個別 實驗群間에는 有意한 差가 認定되지 않았다 (Table III).

Table III. Effects of Honey Bee Venom Aqua-acupuncture on the Hemagglutinin Titer in Mice after Sublethal ⁶⁰Co-γ-ray Irradiation

Group	No. of animals	Hemagglutinin titer (log ₂ titer)	Duncan Grouping
Normal	10	7.6 ± 2.4 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	3.3 ± 1.6	B
K	10	7.8 ± 3.9	A
A	10	9.4 ± 2.8	A
C	10	7.9 ± 4.3	A
F-value 4.79****			

refer to Table I
 (****: P<0.005)

4. 赤血球 溶血素價에 미치는 影響

赤血球 溶血素價는 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 對照群에 比하여 增加하였고, 實驗群間의 有意한 差異가 있는가를 檢定하기 위하여 分散分析을 한 結果 F-value는 3.82로 有意性 (P<0.01)이 認定되었다.

Duncan 多衆範圍檢定法에 의한 個別 比較에 있어서는 對照群에 比하여 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 有意한 差가 認定되었으나, 個別 實驗群間에는 有意한 差가 認定되지 않았다(Table IV).

Table IV. Effects of Honey Bee Venom Aqua-acupuncture on the Hemolysin Titer in Mice after Sublethal ⁶⁰Co-γ-ray Irradiation

Group	No. of animals	Hemolysin titer (log ₂ titer)	Duncan Grouping
Normal	10	7.9 ± 3.4 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	4.0 ± 2.0	B
K	10	9.9 ± 3.7	A
A	10	9.0 ± 4.1	A
C	10	7.3 ± 3.7	A
F-value 3.82****			

refer to Table I
 (****: P<0.01)

5. T細胞 및 B細胞의 含量에 미치는 影響

T세포 含量은 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 對照群에 比하여 增加하였고, 實驗群間의 有意한 差異가 있는가를 檢定하기 위하여 分散分析을 한 結果 F-value는 8.71로 有意性 (P<0.001)이 認定되었다.

Duncan 多衆範圍檢定法에 의한 個別 比較에 있어서는 對照群에 比하여 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 有意한 差가 認定되었으나, 個別 實驗群間에는 有意한 差가 認定되지 않았다 (Table V-1).

Table V-1. Effects of Honey Bee Venom Aqua-acupuncture on the Quantitation of T-cell in Mice after Sublethal ⁶⁰Co-γ-ray Irradiation

Group	No. of animals	T-cell(%)	Duncan Grouping
Normal	10	28.8 ± 5.4 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	14.0 ± 3.8	B
K	10	25.2 ± 6.8	A
A	10	23.8 ± 4.0	A
C	10	25.9 ± 7.3	A
F-value 8.71****			

refer to Table I
 (****: P<0.001)

B세포 含量은 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 對照群에 比하여 增加하였고, 實驗群間의 有意한 差異가 있는가를 檢定하기 위하여 分散分析을 한 結果 F-value는 6.68로 有意性 (P<0.001)이 認定되었다.

Duncan 多衆範圍檢定法에 의한 個別 比較에 있어서는 對照群에 比하여 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 有意한 差가 認定되었으나, 個別 實驗群間에는 有意한 差가 認定되지 않았다(Table V-2).

Table V-2. Effects of Honey Bee Venom Aqua-acupuncture on the Quantitation of B-cell in Mice after Sublethal ⁶⁰Co-γ-ray Ir-radiation

Group	No. of animals	B-cell (%)	Duncan Grouping
Normal	10	26.5 ± 4.3 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	16.5 ± 3.7	B
K	10	24.3 ± 4.8	A
A	10	24.0 ± 5.0	A
C	10	23.9 ± 5.5	A

F-value 6.68****
refer to Table I
(****: P<0.001)

6. 淋巴球 增殖能에 미치는 影響

淋巴球 增殖反應은 韓國產, 美國產 및 中國產 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 對照群에 比하여 增加하였고, 實驗群間의 有意한 差異가 있는가를 檢定하기 위하여 分散分析을 한 結果 F-value는 3.91로 有意性 (P<0.01)이 認定되었다.

Duncan 多衆範圍檢定法에 의한 個別 比較에 있어서는 對照群에 比하여 韓國產, 美國產 및 中國產 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 有意한 差가 認定되었으나,

Table VI. Effects of Honey Bee Venom Aqua-acupuncture on the Lymphocyte Transformation in Mice after Sublethal ⁶⁰Co-γ-ray Ir-radiation

Group	No. of animals	Proliferation (cpm)	Duncan Grouping
Normal	10	227.10 ± 39.07 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	156.80 ± 20.39	B
K	10	216.43 ± 50.69	A
A	10	218.25 ± 55.75	A
C	10	219.48 ± 63.92	A

F-value 3.91****

refer to Table I
(****: P<0.01)

個別 實驗群間에는 有意한 差가 認定되지 않았다 (Table VI).

7. 自然殺害細胞의 活性度에 미치는 影響

自然殺害細胞의 活性度는 韓國產, 美國產 및 中國產 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 對照群에 比하여 增加하였고, 實驗群間의 有意한 差異가 있는가를 檢定하기 위하여 分散分析을 한 結果 F-value는 2.24로 有意性 (P<0.1)이 認定되었다.

Duncan 多衆範圍檢定法에 의한 個別 比較에 있어서는 對照群에 比하여 韓國產 蜂毒液藥鍼刺戟群은 有意한 差가 認定되었으나 美國產 및 中國產 蜂毒液藥鍼刺戟群은 有意한 差가 認定되지 않았으며, 韓國產 蜂毒液藥鍼刺戟群과 美國產 蜂毒液藥鍼刺戟群, 韓國產 蜂毒液藥鍼刺戟群과 中國產 蜂毒液藥鍼刺戟群間에는 有意한 差가 認定되었고 美國產 蜂毒液藥鍼刺戟群과 中國產 蜂毒液藥鍼刺戟群間에는 有意한 差가 認定되지 않았다 (Table VII).

Table VII. Effects of Honey Bee Venom Aqua-acupuncture on the Natural Killer Cell Activity at the Effector/Target Cell Ratio with 100:1 in Mice after Sublethal ⁶⁰Co-γ-ray Irradiation

Group	No. of animals	Cytotoxicity (%)	Duncan Grouping
Normal	10	6.3 ± 1.6 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	4.1 ± 1.5	B
K	10	6.1 ± 2.4	A
A	10	5.8 ± 1.9	AB
C	10	5.6 ± 1.9	AB

F-value 2.24****

refer to Table I
(****: P<0.1)

IV. 고찰

腫瘍의 治療는 20世紀 中반부터 手術療法 외에도

化學療法, 放射線療法 등이 開發되어 治癒率의 漸進的인 向上을 가져 왔으며 最近들어서는 腫瘍免疫學, 바이러스 腫瘍學, 細胞生物學, 分子生物學 등의 尖端技術의 發展에 힘입어 腫瘍에 대한 理解와 治療에 많은 進歩를 이루고 있지만, 아직 既存의 化學療法와 放射線療法이 抗癌療法의 主流를 차지하고 있다.²⁶⁾ 그러나, 放射線療法과 化學療법은 腫瘍細胞를 抑制하는 效果가 뛰어난 長點이 있는 반면, 正常組織에 대한 惡影響도 적지 않아 최근 西洋醫學에서는 이러한 放射線療法의 副作用으로부터 正常組織을 保護하는 放射線 防禦劑에 對한 研究가 활발히 進行되고 있으나 뚜렷한 研究實績은 나타나지 않고 있다.

韓醫學에서 腫瘍에 對한 認識은 일찍부터 시작되어 그 發生原因을 外邪에 感受하는 外感六淫과 七情內傷, 그리고 飲食傷 및 過勞, 房勞過度의 不內外因으로 들고 있으며,²⁶⁾ 이들은 人體의 正氣虛와 複合的으로 作用하는 것으로 보았다. 이러한 疾病發生에 있어서 正과 邪의 概念은 比較的 넓은 意味에서 免疫學 理論과 類似한 것으로 볼 수 있는데, 一連의 實驗 觀察에 根據하면 鍼刺經絡의 一定한 穴位는 人體의 細胞免疫機能을 높임을 證明하였다.²⁷⁾ 最近에는 養蜂家들이 傳染病 및 癌에 發病率이 낮다는 점에 着眼하여 蜂毒의 免疫機能에 관한 研究가 활발히 進行되고 있는데 주로 蜂毒 免疫療法後 血清中 Ig G의 含量變化에 對한 論文^{10,11)}이 大部分이며 蜂毒의 免疫作用은 有機體의 生體界를 刺戟하여 生體의 防禦力을 增加시킨다고 報告되었으며, 腫瘍에 關聯되어서는 Belleveau 등이 免疫關係를 刺戟해서 癌細胞의 生成을 抑制하였다는 報告¹²⁾가 있다.

蜂毒의 成分은 크게 enzymes, peptide components, non peptide components로 構成되어져 있다.^{28,29)}

Enzymes의 主要成分으로는 phospholipase A₂와 hyaluronidase가 있는데,^{30,31)} phospholipase

A₂는 脂肪酸의 分解에 最初의 連鎖反應을 誘導하는 物質이고, hyaluronidase는 hyaluronic acid를 加水分解하는 觸媒로 作用하여 蜂毒의 擴散을 도와준다. Peptide components는 freeze-dried venom의 약 50%를 構成하고 있으며, 主要成分으로는 mellitin, apamin, MCD peptide를 들 수 있고, 이들은 蜂毒의 特性을 說明하는데 큰 役割을 하고 있다. 그 중에서 가장 많이 分布하는 mellitin(40~50%)은 26個의 amino acid로 構成된 活性 Peptide로 크게 溶血作用과 酵素作用을 하고 있고 血液 循環系 疾患에 治療的이면서 毒性的인 兩面性을 지니고 있다. 또한 大食細胞의 移動을 強하게 抑制하며 리소솜 細胞膜을 安靜시켜 炎症을 抑制한다.³¹⁾ Apamin은 神經系에 作用하며 過多한 量(0.5ml/100g)을 血管內에 注入하면 Skeletal muscle에 痙攣을 誘發하고, 더 많은 量을 注入하면 呼吸不全을 일으켜 死亡하게 된다.^{28,31)} MCD peptide는 mast cell의 溶解와 histamine 擴散을 增加시키는 作用이 있어 喘息, 發熱 등의 allergy誘發에 關與한다고 報告되었다. Apamin과 MCD peptide는 細胞免疫學的 實驗과 動物實驗에서 腦下垂體와 副腎皮質을 興奮시켜 interferon의 血中分布量을 增加시킴으로써 免疫機能을 增加시키고 prostaglandin E가 prostaglandin으로 合成되는 것을 抑制하여 鎮痛, 消炎效果를 나타내며, 巨核細胞의 移動을 抑制하고, 血漿蛋白質의 變性を 抑制하며, 白血球의 食作用을 抑制하고, 血漿의 纖維化를 低下시키는 效能이 立證되었다.²⁸⁾ Non peptide components의 主要成分은 histamine, dopamine, noradrenaline으로 構成되어 있는데,³⁰⁾ histamine은 副交感神經 興奮劑인 acetylcholine과 類似한 作用을 하여 平滑筋과 氣管支 및 胃腸管을 收縮시키고 毛細血管을 擴張시켜 血壓降下를 招來하며, 또한 體內的 histamine收容體와 結合하여 allergy를 誘發한다고 믿어진다. Dopamine은 norepinephrine의

前驅物質로서 廣範圍한 生理的 作用을 하며, noradrenaline은 α, β 收容體에 作用하여 血管收縮 作用과 出血防止, 炎症의 腫脹分泌를 減少시키고 有害한 藥物의 吸收도 減少시킨다.

著者は 以上과 같은 考察을 토대로 蜂毒液藥鍼刺戟의 免疫效果와 아울러 韓國產 蜂毒藥鍼液과 美國產 및 中國產 蜂毒藥鍼液間의 效能差異를 比較해 보고자 생쥐의 sublethal dose인 $^{60}\text{Co}-\gamma$ -ray를 170rad/min의 線量率로 1回 4分間 照射한 後, 足三里(ST36)에 各 蜂毒液藥鍼刺戟을 實施하여 放射線 照射時 敏感한 影響을 받는 白血球數, T細胞 및 B細胞 含量, 淋巴球 增殖能을 測定하고, 現在 腫瘍患者의 免疫機能 評價를 위해 많이 活用되고 있는 遲延性 免疫反應, 赤血球 凝集素價 및 赤血球 溶血素價, 自然殺害細胞 殺害能을 測定하였다.

本 實驗에 使用된 足三里(ST36)는 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 祛邪防病, 強健脾胃의 穴性을 지닌 強壯穴^{11,14,46})로서 免疫機能의 失調뿐만 아니라 細胞性免疫과 體液性免疫系 關한 實驗에서 效果가 있음이 報告되었다.^{4,15)}

照射된 轉移放射線은 유사분열 過程에 있는 細胞를 特異적으로 破壞하거나 淋巴球 DNA의 초미세한 나선구조를 絶斷하므로 染色體異常을 誘發하여 細胞增殖 및 變性を 抑制시키거나 또한 細胞自體를 破壞하게 되는 것이다.³³⁾ 이러한 作用은 臨床적으로 疾病治療를 위해 惡性腫瘍患者等에 活用되지만 正常인 人體의 各器官이나 組織에도 피할 수 없는 損傷을 주어 白血球數, 淋巴球數, 淋巴球의 增殖能, B淋巴球의 Ig生産能, 自然殺害細胞의 活性能 및 抗體依存性 細胞媒介 細胞毒性能 等の 減少를 誘發하여 免疫機能을 低下시킨다는 많은 報告가 있는데,^{34,35,36)} 本 實驗에서도 對照群에서 正常群에 比하여 有意性 있는 減少를 보였다.

白血球數의 측정으로 蜂毒液藥鍼刺戟이 造血機能에 미치는 影響을 알 수 있었으며, 蜂毒液藥鍼刺戟

이 細胞性 免疫反應에 미치는 影響을 알아보기 위하여 Mitsuka等⁷⁾의 方法에 準하여 遲延性 過敏反應을 測定하였는데, 遲延性 過敏反應은 細胞性 免疫反應을 評價하는 代表的인 方法이다. 體液性 免疫反應에 미치는 影響은 赤血球 表面抗原과 그에 對한 抗體와의 結合에 의하여 생기는 赤血球 凝集素價와, 赤血球 表面抗原과 抗體의 結合體에 異種의 補體가 가해짐으로써 생기는 赤血球 溶血素價로 관찰하였다. T細胞는 抗原의 刺戟을 받으면 lymphokine이라는 各種 細胞障礙因子(interleukin-2, interferone)을 放出하거나 또는 직접 抗原을 찾아내 破壞함으로써 細胞性 免疫의 中心的 役割을 하고, B細胞는 주로 體液性 免疫을 擔當하며 各種 免疫 globulin 抗體의 合成과 分泌 및 免疫 血清學的 反應 等に 關與한다. 淋巴球 增殖能은 淋巴球의 機能을 間接적으로 把握하는 免疫指標로 先天性 免疫缺乏症을 調査한다거나 臟器移植 過程에서 組織適合性의 評價, 免疫增強 治療劑에 대한 評價 및 各種 lymphokine의 效能評價 等 여러 分野에 應用되고 있으며 最近에는 各種 惡性腫瘍 患者의 腫瘍浸潤 淋巴球의 增殖 程度를 評價하기도 한다.^{37,38)} 自然殺害細胞는 事前 免疫없이 自然的으로 腫瘍細胞를 in vitro狀態에서 破壞할 수 있는 能力을 가진 淋巴球로 여러 가지 體外因子 및 生體內 活性物質에 의해 強力한 killer cell로 活性化되며^{39,40)} 또한 生體內에서 自然殺害細胞가 惡性腫瘍細胞의 成長 및 轉移에 대한 宿主의 抵抗力과 密接한 관계가 있다는 것이 動物實驗에서 밝혀진 후²⁴⁾ 腫瘍患者의 非特異性 免疫反應을 測定하기 위한 免疫指標로 利用되고 있다.³⁵⁾

實驗結果를 綜合해 보면 放射線 照射로 인한 免疫機能低下에 韓國產, 美國產 및 中國產의 蜂毒液藥鍼刺戟群은 白血球數, 遲延性 過敏反應, 赤血球 凝集素價 및 溶血素價, T細胞 및 B細胞의 含量, 淋巴球 增殖能에서 모두 有意性 있는 增加를 나타내었

으며, 各 實驗群間의 有意性 있는 差異는 없었다. 自然殺害細胞 殺害能에서는 韓國産 蜂毒液藥鍼刺戟群만이 有意性 있는 增加를 나타내어 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群과는 有意性 있는 差異를 보였다.

따라서 放射線 照射로 因한 細胞性 및 體液性 免疫系의 機能低下에 蜂毒液藥鍼刺戟이 影響을 주는 것으로 보이며 放射線療法과 並行하여 施術하므로써 放射線에 의한 免疫機能低下를 줄일 수 있을 뿐만 아니라 나아가서는 免疫療法으로도 並用할 수 있을 것으로 보인다. 또한 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼液 間에는 別다른 效能差異가 없었으나 自然殺害細胞 殺害能에서는 韓國産 蜂毒液藥鍼液이 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼液보다 有意한 效果를 나타내어 현재 臨床에서 多用되고 있는 外國産 蜂毒液藥鍼液과의 代替가 期待된다.

V. 결 론

韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟이 放射線 照射에 의한 免疫機能 低下에 미치는 影響을 比較觀察하기 위하여 ICR계 생쥐를 $^{60}\text{Co}-\gamma$ -ray (170rad/min.)로 全身照射시킨 다음 足三里(ST-36)에 相應하는 穴位에 2日 間隔으로 3回 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟을 各各 組 後, 白血球數, 遲延性 過敏反應, 赤血球 凝集素價 및 溶血素價, T細胞 및 B細胞의 含量, 淋巴球 增殖能, 自然殺害細胞의 殺害能, interleukin-2의 生産能 및 interferon의 生産能을 測定하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 白血球數, 遲延性 過敏反應, 赤血球 凝集素價 및 溶血素價, T細胞 및 B細胞의 含量, 淋巴球 增殖能은 對照群에 比하여 韓國産, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群 모두 有意性 있는 增加를 나타내었으나, 各 實驗群間의 有意한 差異는 없었다.

2. 自然殺害細胞의 殺害能은 對照群에 比하여 韓國産 蜂毒液藥鍼刺戟群에서 有意性 있는 增加를 나타내었고, 美國産 및 中國産 蜂毒液藥鍼刺戟群에서는 有意성이 認定되지 않았다.

VI. 참고문헌

1. 河大有. 免疫學. 서울:高文社. 1992:305~316.
2. 顧世澄撰. 瘍醫大全(影印本). 北京:人民衛生出版社. 1987:545, 546, 574.
3. 高敬錫. 人蔘水鍼이 Methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響. 慶熙韓醫大 論文集. 1988;11:37~54.
4. 주태청. 溫鍼이 寒冷에 露出된 생쥐의 免疫機能 低下에 미치는 影響. 慶熙韓醫大 論文集. 1992;15:297~312.
5. 余桂淸. 中醫와 中西의 結合에 의한 癌의 豫防治療에 對한 研究概況. 서울:東洋醫學. 1996;22(3):68~74.
6. Gentlesk MJ et al. Determination of IgG4 antibodies in treated hymenoptera sensitive patients. N Engl Reg Allergy Proc. 1988;9(1):17~32.
7. Mitsuoka A et al. Delayed hypersensitivity in mice induced by intravenous sensitization with sheep erythrocytes, evidence for tuberculin type delayed hypersensitivity of the reaction. Immunology. 1978;34:363~370.
8. 高炯均. 蜂鍼毒療法이 抗炎, 鎮痛 및 解熱에 미치는 效能에 關한 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1992;13(1).
9. 權奇祿. 蜂鍼에 對한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1994;11:159.

10. Muller U et al. Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom. *Allergy*, 44(6):412~418, 1989.
11. Uhlin T et al. Detailed IgG and IgE antibody patterns during immunotherapy with honey bee venom. *Allergy*. 1987; 42(3):222~229.
12. 김문호. 봉독요법과 봉침요법. 서울:한국교육기획. 1992:20,37,110,133.
13. 姜承範 外. 蜂毒藥刺戟이 생쥐의 免疫機能에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1996;17(1).
14. 權奇祿. 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):151~172.
15. 鮑治安. 足三里 注入胚混合勻漿調節改善機體 免疫機能失調 70例的 臨床分析. 中國鍼灸. 1990;3(29):29~30.
16. 安榮基. 經穴學叢書. 서울:成輔社. 1986:196~197.
17. 안윤옥. 實用醫學統計論. 서울:서울대학교 출판부. 1990:59~63.
18. 허명희. SAS 분산분석. 서울:자유아카데미. 1988:5~24.
19. 강철훈. $^{60}\text{Co}-\gamma$ -ray를 이용한 전신방사선 조사에서 선량율의 차이에 따른 급성변화. 대한방사선과학회지. 1990;8(2):151~154.
20. 조성기 외. 방사선피폭이 자연살해세포의 활성도에 미치는 영향. 대한면역학회지. 1986; 8(2):161~214.
21. 하대유 외. Cyclophosphamide가 체액성 및 세포성 면역반응에 미치는 영향. 대한의학협회지. 1977;20:985~994.
22. Winchester RJ et al. Methods for enumerating cell population by surface markers with conventional microscopy : Ross NR, Friedman H, Fahey JL. In manual of clinical laboratory immunology. Washington D.C. : American Society for Microbiology.1986; 215~225.
23. Denis G et al. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*. 1986:57~63.
24. Kiessling R et al. Natural Killer cells in the mouse, I. cytotoxicity cells specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*. 1975;5:112.
25. 하대유 외. 마우스의 자연세포독성 임파구에 관한 면역 생물학적 연구. 대한면역학회지. 1984;6(1):15~29.
26. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울:杏林書院. 1995: 19, 32~42, 142~165.
27. 陳貴廷 外. 實用中西醫結合診斷治療學. 서울:一中社. 1992:630~669.
28. Banks Brown. Some peripheral activities of apamin. *Toxicon Suppl*. 1976;4, 17.
29. Thorbecke GJ et al. The affinity of reticuloendothelial system for various serum proteins. *Brit J Exp Path*. 1960;41(2): 190.
30. Assen E SK et al. A peptide from the venom of the honey bee. *Brit Pharmacol*. 1973:337~338.
31. Barbara Rudolf. Chemistry and Pharmacology of Honey Bee Venom. Academic Press. 1986:329~402.
32. 崔容泰 外. 정해 침구학. 서울:행림서원.

- 1974:279~282.
33. 김성호 외. 방사선에 의한 백서백혈병細胞 및 정상백서 비장임파구 DNA Single-strand Broken의 정량적 분석과 측정. 대한방사선과학회지. 1990;8(2):137~144.
34. 권형철. 방사선치료에 따른 암환자의 말초혈액 T 및 B임파구의 분포 및 기능변화. 대한암학회지. 1991;24(1):64~72.
35. 김진복 외. 정상인 및 암환자임파구의 자연살해능력에 관한 연구. 대한면역학회지. 1984;6(1):1~13.
36. 이태준 외. 방사선 치료에 따른 암환자의 말초혈액상의 변화. 대한방사선과학회지. 1988;6(2):253~257.
37. 임대철 외. 마이토젠 및 림포카인이 마우스 비장세포 임파구 및 사람 말초혈액 임파구 증식반응에 미치는 영향. 대한면역학회지. 1989;11(1):89~95.
38. 최민순 외. Lentinan이 면역 활성화에 미치는 영향. 대한면역학회지. 1990;12(2):235~249.
39. 윤정구. 종양과 자연살해세포에 대하여. 대한암학회지. 1983;5(1):15~21.
40. Itoh K et al. Lysis of human solid tumor cells by lymphokine-activated natural killer cells. Immunol. 1985;134:802~907.