대한침구학회지 제19권 제4호(2002년 8월)
The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society

원 저

蜂毒 및 Melittin 藥鍼液이 關節炎 滑液細胞에 미치는 影響

한상원 · 박기현 · 정태영* · 서정철

경산대학교 한의과대학 침구경혈학교실
*경산대학교부속 제한의원

Abstract

The Effect of Bee Venom & Melittin Solution on Cell Death in Synovial Cell Line

Han Sang-won, Park Ki-hyeon, Jung Tae-young* and Seo Jung-chul

**Department of Acupuncture & Moxibustion,
College of Oriental Medicine, Kyung-San University
*Je-Han Medical Clinic of Kyung-San University**

Objectives : This study is aimed to investigate the effects of bee venom and melittin on cell death in synovial cell line.

Methods : It was evaluated by using MTT assay, morphologic method, DNA fragmenation, NO generation, flow cytometry, immunocytochemistry analysis, RT-PCR, Western blot.

Results : The obtained results are summarized as follows:

1. The MTT assay demonstrated that synovial cell viability was significantly inhibitted dose-dependently by treatment with bee venom and melittin in comparison with control.
2. The morphologic study demonstrated that synovial cell showed apoptosis after treatment with bee venom and melittin for 6 hours using microscope.
3. In case of NO generation bee venom group and melittin group showed significant inhibition in comparison with control.
4. The Flow cytometry demonstrated that apoptosis of synovial cell treated with bee venom and melittin was related with stop of cell cycle in stage of G_0/G_1.

· 접수 : 2002년 6월 25일 · 수정 : 7월 5일 · 채택 : 2002년 7월 14일
· 교신저자 : 한상원, 대구시 수성구 상동 165번지 경산대학교 부속대구한방병원 침구과(706-060)
TEL: (053)770-2236 FAX: (053)764-0566 E-mail: chimguhan@hanmail.net

5. DNA fragmenation demonstrated that synovial cell treated with bee venom and melittin showed DNA ladder below 1 Kbp.

6. Immunocytochemistry assay demonstrated that COX-Ⅱ and PLA2 were strongly down-regulated by treatment with bee venom and melittin whereas iNOS was almostly not expressed by bee venom treatment and slightly expressed by melittin treatment.

7. RT-PCR analysis demonstrated that iNOS were strongly down-regulated by treatment with bee venom and melittin whereas COX-Ⅱ was almostly not expressed by bee venom treatment and slightly expressed by melittin treatment.

8. Western blot demonstrated that iNOS were strongly down-regulated by treatment with 15 ㎍/ml bee venom whereas COX-Ⅱ was strongly down-regulated from 5 ㎍/ml bee venom.

Conclusions : These results suggest that bee venom and melittin have significant effect on cell death in synovial cell line and further study is needed in vivo.

Key Words : Bee Venom, Melittin, Synovial Cell Line, iNOS, COX-Ⅱ

Ⅰ. 緖 論

關節炎은 關節을 侵犯하는 모든 炎症을 일컫는 用語로써 여러 關節에 비특이적인 炎症性 反應을 慢性的으로 야기하여 疼痛과 强直을 일으키는 疾患으로 대표적으로는 骨關節炎과 류마토이드 關節炎을 들 수 있는데, 慢性疾患의 대명사로 알려진 것처럼 긴 經過를 가지면서 점차 進行되고 대개의 경우 惡化一路의 豫後를 보이는 것이 일반적이다[1),2)].

최근 이에 대한 治療法의 하나로 蜂毒藥鍼療法이 점차 폭넓게 사용되어지고 있는데, 蜂毒藥鍼療法이란 꿀벌(Apis mellifera ligustica)의 毒囊에 있는 蜂毒을 抽出 加工하여 疾病과 유관한 部位 및 穴位에 注入하여 疾病을 治療하는 新鍼療法의 一種으로 臨床에서는 鎭痛, 解熱, 消炎, 鎭痙 및 免疫增强 등의 效能이 있는 것으로 알려져 있다[3),4)].

蜂毒藥鍼이 關節炎에 미치는 影響에 대한 臨床的 硏究로는 王, 金 등[5),6)]이 膝關節炎에 대하여, 黃 등[7)]은 류마토이드 關節炎에 대하여 각각의 경우에서 그 有效性을 보고하였고, 實驗的 硏究로는 都 등[8),9)]이 膝關節의 炎症性 浮腫과 lipopolysaccharide(LPS) 誘發 關節炎에 미치는 影響을 그리고 李 등[10)]이 LPS 誘發 關節炎의 細胞免疫反應을 통해 蜂毒藥鍼의 有效性을 報告하였으나, 蜂毒 및 melittin 藥鍼液이 關節炎 滑液細胞에 미치는 影響에 관한 硏究報告는 거의 접할 수 없는 실정이다.

이에 著者는 蜂毒(Bee Venom) 및 melittin 藥鍼液이 關節炎 滑液細胞에 미치는 影響을 MTT assay 分析, 形態學的 觀察, DNA fragmentation 分析, Nitric Oxide(NO) 形成度 測定, flow cytometry를 이용한 細胞週期의 分析, 免疫細胞化學的 分析, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 利用한 mRNA 分析 및 Western Blot 등을 觀察한 바 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 材 料

1) 試藥

RPMI 1640 medium, fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, USA), phosphate-buffered saline(PBS, Gibco BRL, USA), penicillin and treptomycin, trypsin(Gibco BRL, USA), Ethanol (Merck, Germany), 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) 등이며, 1차 抗體인anti-rabbit IgG inducible Nitric Oxide Synthtase (iNOS)/phospholipase A_2(PLA_2), anti-rabbit IgG cyclooxygenase type II; constitutive form (COX-II), 2차 抗體인 FITC, Texas Red는 Santa cruse 社(USA)에서 구입하였고, LPS는 Sigma社(USA)에서 구입하였다. 기타 試藥은 모두 特級 및 一般試藥을 사용하였다.

2) 試 料

蜂毒(100㎎) 및 Melittin(1㎎) 藥鍼液은 Sigma 社(USA)에서 구입하였다.

3) 機 器

CO_2 incubator(VS-9108 MS, vision scientific Co. Korea), light microscope(Olympus, Japan), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader(Hyperson, Promega, USA), immuno-fluroscence microscope(Bio-Rad, USA), FAC scan(Becton Dickinson, CA, USA) 등이다.

2. 方 法

1) 試料의 調製

本 實驗에 使用된 蜂毒과 melittin 藥鍼液을 3차 蒸溜水로 20㎎/㎖를 미리 調製하여 實驗 時 1, 5, 10, 및 15㎍/㎖로 稀釋하여 實驗에 사용하였다.

2) 細胞株의 培養

本 實驗에 使用된 關節炎 滑液細胞는 교도대 醫科大學 사노敎授로부터 分讓받은 細胞株 滑液炎症細胞인 Raw 264.7 cell lines을 5% RPMI 培地에 penicillin(10units/㎖)/streptomycin(10㎎/㎖)을 첨가하여 flask에 培養하면서 本 實驗에 使用하였다.

3) 實驗群의 分類

(1) 對照群(Control group)

Raw 264.7 cell lines 細胞를 培養하면서 아무런 處置도 하지 않았다.

(2) 處置群(Treatment group)

培養한 Raw 264.7 cell lines에 蜂毒 및 melittin 藥鍼液을 각각 1, 5, 10, 및 15㎍/㎖으로 處置하였다.

4) MTT assay를 통한 細胞生存率 분석

蜂毒 및 melittin 藥鍼液의 細胞死 效果를 규명하기 위하여 96 microplate에 각 well마다 細胞數를 달리하여 關節炎 滑液細胞를 分株한 다음 24時間 培養하여 각 well에 1, 5, 10, 및 15㎍/㎖를 選定하여 細胞 增殖度를 分析하였다.

本 實驗에 使用한 MTT법은 Mosmann이 開發한 方法[11]을 變形하여 實施하였다. 즉 96 well plate의 각 well에 5×10^3cells/100㎕를 넣고 37℃의 CO_2 incubator에서 24時間 培養한 후 蜂毒 및 melittin 藥鍼液을 濃度別로 製造하여 각 well에 50㎕씩을 넣고 37℃의 CO_2 incubator에 24時間 培養하였다. 培養液을 除去한 후 dPBS에 稀釋한 MTT溶液(10㎎/㎖) 20㎕를 각 well에 添加하고 37℃에 4時間 정도 放置한 다음 DMSO 50㎕를 첨가하여 反應을 停止시킨 후 약간 흔들어 주고 室溫에서 30분 定置시키며 發色되는 程度를 파악한 다음 ELISA reader의 吸光度 570㎚에서 測定하고 對照群의 吸光度와 比較하여 細胞 生存率(Inhibitory concentration 50, IC_{50})은 對照群의 50% 수준으로 關節炎細胞의 成長을 抑制하는 시료의 濃度(㎎/㎖)로 주어지며, 處置群의 각 濃度에 대한 生存率 Y(%)로 換算하였다.

$$Y(\%) = [\ \{T-C_0\}/\{C-C_0\}\ ]\times100$$

이때 T = 處置群의 48時間 培養 後 平均 細胞數 (cells/mℓ)

C = 對照群의 48時間 培養 後 平均 細胞數 (cells/mℓ)

C_0 = 培養 始作時 平均 細胞數 (cells/mℓ)

5) 細胞死의 形態學的 觀察

蜂毒 및 melittin 藥鍼液이 關節炎 滑液細胞株의 細胞死를 誘導하는지 調査하기 위하여 5% RPMI medium, penicilin/streptomycin이 含有된 培地에 10^5細胞를 60㎜ culture dish(Corning Incorporated, NY, USA)에 分株하고 37℃에서 24時間 培養하는데 蜂毒과 melittin 藥鍼液 10㎍/mℓ를 添加하여 反應을 觀察하였다. 細胞死 觀察은 위상차 현미경(×200)으로 細胞死가 誘導된 細胞를 촬영하여 調査하였다. 그 結果를 바탕으로 蜂毒과 melittin 藥鍼液 處置群에서 細胞死가 誘導되는 濃度를 選定하여 細胞增殖의 抑制作用과의 相關關係를 分析하여 調査하였다.

6) NO 形成度 測定

血液內의 강력한 炎症 誘發原因인 NO의 合成抑制를 確認하기 위해 滑液細胞를 96microplate에 각 well마다 10^3細胞數가 되게 分株한 다음 12時間 培養하여 LPS를 50ng/well이 되게 각 well에 分株하였다. 2時間 동안 刺戟을 한 후 蜂毒과 melittin 藥鍼液의 最終濃度가 10㎍/mℓ이 되도록 가한 다음 Greiss reagent 용액 50㎕을 添加하고 室溫에서 反應을 시킨 다음 ELISA reader의 540㎚에서 吸光度를 測定하였다. 標準溶液인 0.1, 1, 10, 20, 50, 100 및 150㎛ sodium nitrite를 sodium nitroprusside dihydrate(SND)으로 發色反應을 실시하여 比較 分析하였다.

7) Flow cytometry를 이용한 細胞週期 分析

關節炎 滑液細胞株를 10^3細胞數로 6-well에 分株하고 하룻밤 培養한 對照群과 細胞株를 培養한 다음 蜂毒 및 melittin 藥鍼液을 5時間 處理한 群을 PBS로 洗滌하고 trypsin을 處理한 후 細胞를 모아서 1.5mℓ eppendorf tube에 넣은 다음 1,000rpm에서 5分間 遠心分離하여 상청액을 除去한 후 100% EtOH을 1mℓ 添加하여 固定하였다. 이때 propidium iodide 5㎍/mℓ와 RNase을 混合해서 준비하고 上記 固定된 細胞를 遠心分離하여 상청액을 除去한 다음 PBS로 한번 洗滌하였다. 同時에 상기 固定된 DNA에 染色試藥을 添加하여 37℃에서 30分間 항온조에서 加溫시킨 다음 propidium iodide로 染色한 細胞는 호일에 密封하여 4℃에 保管하고 FACscan을 利用하여 유세포 검색분석(Flow cytometry analysis)을 實施하여 細胞週期를 觀察하였다.

8) DNA fragmentation 分析

滑液細胞株를 10^3細胞數로 6-well에 分株하고 하룻밤 培養한 다음 蜂毒과 melittin 藥鍼液을 농도별로 처리시간별로 DNA fragmentation을 誘導하는 정도를 파악하기 위해 細胞 溶解液인 lysis buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200㎕를 添加한 후, 30분간 얼음에 維持한 다음 15,000rpm에서 10分間 遠心分離하였다. 상청액을 취해 100% 에탄올을 가해 沈澱시켜 이를 proteinase K(100㎍/mℓ), RNase(50㎍/mℓ)가 含有된 dH_2O 35㎕를 添加하여 浮游시켜 50℃에서 30分間 熱을 加하였다. 이 溶液을 2% agarose gel을 製造하여 전기영동을 實施한 다음 DNA fragmentation의 有無를 調査하였다.

9) 免疫細胞化學的 分析

蜂毒과 melittin 藥鍼液이 滑液細胞의 COX-Ⅱ, iNOS 및 PLA_2 發顯의 抑制를 誘導하는지 調査하기 위해 上記 方法과 同一하게 한 후 metanol을 細胞 위에 떨어뜨리고 固定시킨 다음 PBS로 洗滌을 실시하였다. 1차 抗體인 COX-Ⅱ, iNOS 및 PLA_2를 표

지하여 4℃에서 1時間정도 放置하고 2차 抗體인 FITC를 標識하여 호일로 遮光하여 이를 1時間 정도 放置하였다. 이를 형광 현미경에서 觀察하여 對照群과 處置群과의 COX-Ⅱ, iNOS 및 PLA_2의 發顯 程度를 觀察하였다.

10) RT-PCR을 利用한 分析

蜂毒 藥鍼液이 滑液細胞의 細胞死 效果를 傳寫水準에서 미치는 影響을 알아보기 위해 細胞를 6well plate에 10^5細胞數가 되게 分株한 후 적정 藥物 濃度가 되도록 加한 다음 細胞를 1.5㎖ eppendorf tube에 모아서 15,000rpm에서 5分間 遠心分離하였다. 상청액을 除去하고 RNAzol 溶液 200㎕를 添加한 다음 chloroform 50㎕를 가하고 조심스럽게 pippeting하여 細胞를 lysis하고 이를 15,000rpm에서 4℃하에 15分間 遠心分離하여 total RNA를 回收하였다. 다음 isopropanol 同量을 넣고 4℃에서 15分間 沈澱시켜 75% EtOH로 한번 洗滌하여 乾燥시켰다. RNase free dH_2O 20㎕를 넣고 60℃ 에서 30分間 加熱하여 녹인 다음 total RNA 5㎕에 10mM dNTP 5㎕, 25mM MgCl2 6㎕, 10x RNA PCR buffer 5㎕, RNase inhibitor 1㎕, AMV-Optimized Taq 1㎕, AMV reverse Transcriptase XL 1㎕, 50pM specific primer (sense/ anti-sense) 1㎕, RNase free dH2O 26㎕를 添加하여 50℃에서 20分間 逆傳寫 反應을 實施하고, 94℃에서 2分間 反應을 停止시켜서 PCR을 實施하였다. 이때 反應條件은 94℃/1min, 55℃/45sec, 70℃/60sec에서 35cycles을 進行시켜 70℃에서 最終的으로 5分間 elongation 反應을 實施하여 終結한 후 PCR 産物을 1% agarose gel에 loading하여 marker를 基準으로 band의 有無를 確認하였다.

11) Western Blot을 이용한 分析

蜂毒 藥鍼液을 處置한 細胞를 lysis buffer로 處理하여 그 抽出液 20㎍을 polyacrylamide SDS gels에 溶出한 후 Immobilon-P membrane (Amersham, USA)에 옮겨서 蛋白質의 發顯을 確認하기 위해 enhanced chemilumene- scence (ECL)로 發色시켜 確認하였다. Antibody는 COX-Ⅱ, iNOS 및 β-actin(Santa Cruz, 1:1,000 희석) 一次抗體를 標識하고 PBS로 洗滌한 다음 blocking 溶液을 添加하여 부반응을 제거하고 二次抗體인 Horseradish Peroxidase(HRP) conjugates 抗體를 標識하고 發色程度를 確認하였다.

12) 統計處理

모든 실험값은 평균값±표준오차(mean±stand-ard error)로 하였고, 統計學的 分析은 SAS (Statistic Analysis System) program을 이용하였다. 對照群과 處置群과의 比較는 Student's t-test에 의해 $P<0.01$인 경우에만 有意性이 있는 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 成 積

1. 細胞生存率에 미치는 影響

흡광도 수치는 蜂毒 藥鍼液 處置群의 경우 對照群은 0.955±4.8(相對的 細胞數의 換算計數 100%), 蜂毒 藥鍼液 1㎍/㎖에서 0.556±0.01(43.9%), 5㎍/㎖에서 0.354±1.8(1.56%), 15㎍/㎖에서 0.004±0.01(-0.28%)로 對照群에 비해 모두 低濃度에서도 滑液細胞의 增殖을 有意性($P<0.01$)있게 抑制하였다.

Melittin 藥鍼液 處置群의 경우 對照群은 0.948±0.01(相對的 細胞數의 換算計數 100%), melittin 藥鍼液 1㎍/㎖에서 0.636±7.8(55.2%), 5㎍/㎖에서 0.326±7.6(11.6%), 15㎍/㎖에서 0.174±0.01(-0.96%)로 滑液細胞의 增殖을 有意性($P<0.01$)있게 抑制하였다(Fig. 1).

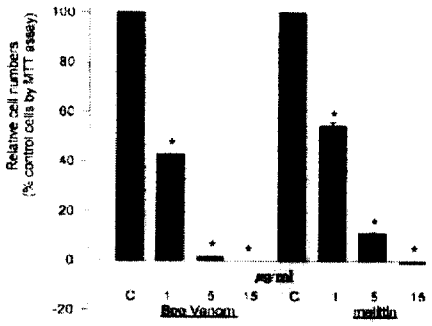

Fig 1. Effects of bee venom and melittin herbal acupuncture solution on the synovial cells isolated from rheumatoid arthritis patients. (Data represent means±S.E(n=7) and those data were statistically significant compared with control group by t-test.)

* : Statistically significant value($P<0.01$) compared with control group.

C : Control group.

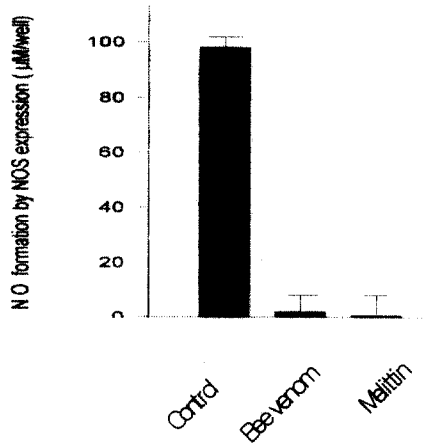

Fig. 3. Bee venom and melittin herbal acupuncture solution inhibited the induction of NO formation of synovial cell by LPS. (Data represent means±S.E (n=7). Analyzed for NO formation assay as described in material and methods. Statistically significant value compared with control group data by t-test.)

2. 細胞死의 形態學的 觀察

顯微鏡下에서 每 時間 觀察하여 細胞死가 誘導되는 樣相을 觀察한 바 6時間 培養한 境遇에 細胞死를 誘導하는 形態學的 變化인 apoptic body를 觀察할 수 있었다(Fig. 2).

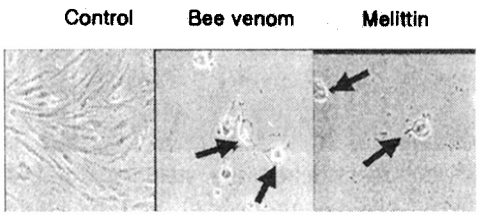

Fig 2. The change of mophological pattern of apoptic body from synovial cell isolated rheumatoid arthritis patients by bee venom and melittin herbal acupuncture solution. (Arrows indicate apoptic body.)

3. NO 形成에 미치는 影響

對照群은 95±2.3μM/well인데 비하여 蜂毒 藥鍼液 處置群에서는 12±3.2μM/well, melittin 藥鍼液 處置群은 8.5±2.3μM/well로 나타났다(Fig. 3).

4. 細胞週期에 미치는 影響

對照群의 경우 G_0/G_1段階에서 53.7%, S段階에서 15%, G_2/M段階에서 21.3%로 나타났으나, 蜂毒 藥鍼液 處置群의 경우 G_0/G_1段階에서 68.5%, S段階에

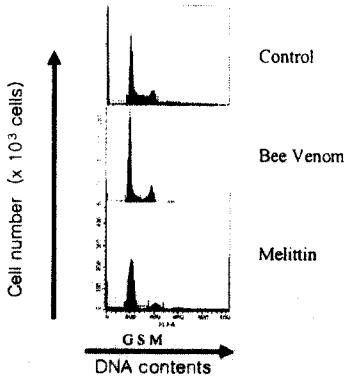

Fig. 4. Cell cycle pattern of flow cytometry from synovial cell isolated rheumatoid arthritis patients by bee venom and melittin herbal acupuncture solution.

G : interphase & first gap phase(G_0/G_1)

S : synthesis phase(S)

M : second gap phase & mitosis(G_2/M)

서 5.5%, G_2/M段階에서 26%로 나타났다. Melittin 藥鍼液 處置群의 경우에도 G_0/G_1段階에서 78.7%, S段階에서 3%, G_2/M段階에서 18.3%로 나타났다(Fig. 4).

5. DNA fragmentation에 미치는 影響

對照群의 경우 2% agarose gel의 lane에 fragmentation이 보이지 않지만 蜂毒 藥鍼液 處置群은 10㎍/㎖ 處置時 가장 강한 ladder가 1Kbp이하에서 보였고, melittin 藥鍼液 處置群도 10㎍/㎖으로 處置時 가장 강한 ladder가 1Kbp이하에서 나타났다(Fig. 5).

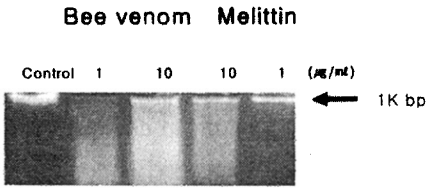

Fig 5. DNA fragmentation pattern of synovial cell isolated from rheumatoid arthritis patients by bee venom and melittin herbal acupuncture solution.

6. COX-II, iNOS 및 PLA_2 發顯에 미치는 免疫細胞化學的 影響

COX-II는 對照群은 FITC에 의해 綠色을 나타내는 signal이 강하게 나타나는데 반해 蜂毒과 melittin 藥鍼液 處置群은 약하게 나타나거나 signal의 정도가 減少하였다(Fig. 6).

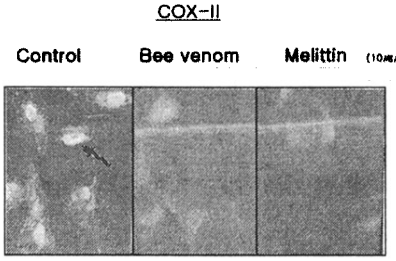

Fig. 6. Immunocytochemistry stainning for COX-II in Control(left), bee venom(middle) and melittin(right) herbal acupuncture solution. (Arrow denote staining of the synovial cell from rheumatoid arthritis patients.)

iNOS 發顯의 樣相은 對照群에서 강하게 發顯되었는데 比하여 蜂毒 藥鍼液 處置群에서는 거의 發顯이 抑制되었고 melittin 藥鍼液 處置群에서는 약하게 發顯되었다(Fig. 7).

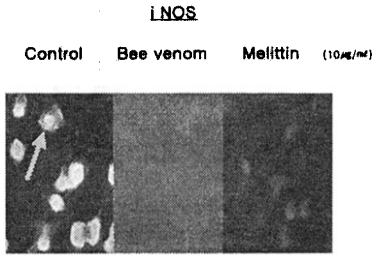

Fig. 7. Immunocytochemistry stainning for iNOS in Control(left), bee venom(middle) and melittin(right) herbal acupuncture solution. (Arrow denote staining of the synovial cell from rheumatoid arthritis patients.)

한편 PLA_2의 경우 對照群은 빨간 색상을 띤 Texas Red의 2차 抗體 signal이 강하게 細胞質 주위로 發顯되었으나 蜂毒 藥鍼液 處置群과 melittin 藥鍼液 處置群은 약하게 發顯되었다(Fig. 8)

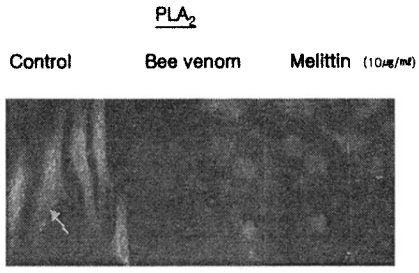

Fig 8. Immunocytochemistry stainning for PLA_2 in Control(left), bee venom(middle) and melittin(right) herbal acupuncture solution. (Arrow denote staining of the synovial cell from rheumatoid arthritis patients.)

7. RT-PCR을 이용한 COX-II, iNOS 및 β-actin mRNA 發顯에 미치는 影響

對照群에서는 iNOS가 發顯되었나 lane 1의 蜂毒 藥鍼液 處置群과 lane 2의 melittin 藥鍼液 處置群에서는 發顯이 강하게 抑制되었다. COX-II의 경우 對照群에서는 發顯되었지만 蜂毒 藥鍼液 處置群에서

는 강하게 發顯이 抑制되었고 melittin 藥鍼液 處置群에서는 약하게 發顯되었다. 한편 細胞의 전사수준이 동일함을 나타내는 β-actin mRNA는 모든 群에서 발현되었다(Fig. 9).

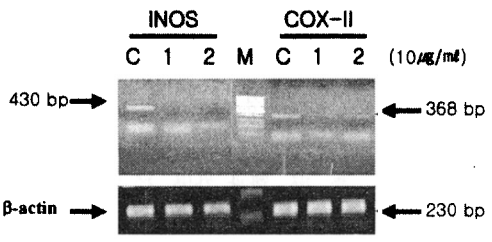

Fig 9. RT-PCR analysis of total RNA from synovial cells. (Subconfluent synovial cells were cultured in RPMI medium fetal bovine serum for 24h. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR using oligonucleotides specific for iNOS(left), COX-II (right). β-actin mRNA for standard transcript was used as control.)

8. Western Blot을 이용한 COX-II, iNOS 및 β-actin 蛋白質 發顯에 미치는 影響

iNOS는 蜂毒 藥鍼液 處置群 15㎍/㎖에서 發顯이 가장 抑制되었다. 이에 比해 COX-II는 5㎍/㎖의 蜂毒 藥鍼液 處置群에서부터 강하게 發顯이 抑制되었다. 細胞內 표준 蛋白質인 β-actin은 모든 群에서 發顯됨을 알 수 있었다(Fig. 10).

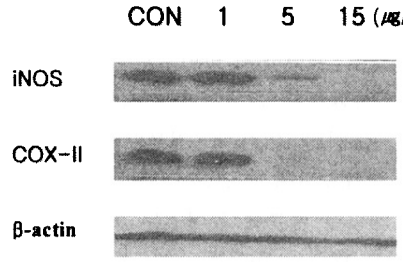

Fig 10. Influence of bee venom herbal acupuncture solution on iNOS and COX-II expression in synovial cells. (All cells were cultured in RPMI medium, lysate anlayzed for iNOS, COX-II and separated by 12% polyacrylamide SDS gels and transferred to immobilon-P membrane. For detection of the protein cells were stained with ECL into horseradish peroxidase(HRP) conjugates.)

Ⅳ. 考 察

關節炎은 關節을 侵犯하는 모든 炎症을 일컫는 用語로써 여러 關節에 비특이적인 炎症性 反應을 慢性的으로 야기하여 關節의 疼痛과 强直을 일으키는데 대표적으로는 骨關節炎과 류마토이드 關節炎을 들 수 있다. 骨關節炎은 關節軟骨이 닳아 없어지면서 局所的인 退行性 變化가 나타나는 疾患으로 그 原因은 不確實하나 老衰現狀이나 過渡한 體重과 관계가 깊으며 體重負荷 關節, 특히 腰椎部, 膝關節, 股關節 등에 잘 侵犯한다. 방사선상으로는 55歲 以上의 약 80%, 75歲 以上에서는 거의 전 인구가 骨關節炎의 소견을 나타내고 그중 1/4이 臨床症狀을 나타낸다. 初期症狀으로는 輕度의 疼痛이 가장 흔한데 疼痛은 춥거나 습기가 많은 날씨에 惡化되기도 하며 運動時 쉽게 疲勞感을 呼訴하고 關節에 運動障碍나 輕度의 腫脹 및 關節周圍의 압통을 呼訴한다. 關節軟骨의 消失과 變性이 심해지면 運動時 摩擦音이나 關節의 障碍가 顯著할 수도 있는데 治療는 保存的 治療와 手術的 治療法을 들 수 있다. 保存的 治療는 적당한 休息과 運動의 配合, 溫熱療法이나 맛사지 등의 物理療法, NSAID나 아스피린 등의 藥物療法, 문제가 되는 關節에 대한 局所的 治療 등을 들 수 있다. 非手術的 方法에도 불구하고 더 이상 症狀의 好轉이 없거나 關節의 變化가 계속되어 日常生活에 지장이 극심한 경우에는 手術的 治療方法을 實施하게 되는데 手術의 目的은 疼痛을 없애주는 것이 가장 重要하며 變形을 교정하고, 關節의 運動性을 維持해주며 關節의 安定性을 얻거나 維持시키는데 있다. 류마토이드 關節炎은 骨關節炎 다음으로 흔히 볼 수 있는 疾患으로 확실한 原因은 알려져 있지 않은데, 假說

的으로는 연쇄구균이나 바이러스에 의한 感染, 비타민 결핍증, 호르몬의 부조화 등을 들기도 하지만 확실한 과학적 根據가 不充分하며 自家免疫疾患의 하나라는 생각이 현재 가장 지지받고 있다. 發病年齡의 制限은 없으며 女性이 男性에 비하여 약 3배 가량 호발하나 50세 이후에는 性에 따른 頻度가 비슷해진다. 본 疾患의 特徵은 關節이나 腱의 滑液에 非細菌性 慢性炎症反應이 長期間 나타나면서 關節痛이나 腫脹이 惡化와 好轉을 反復하는데 初期에는 滑液膜이 增殖하고 滑液의 量이 增加하여 關節의 浮腫과 疼痛을 招來하며 장기간 進行되면 關節의 軟骨과 關節周圍 組織이 破壞되어 關節의 强直이나 變形이 續發될 수 있다. 診斷基準은 수면후 强直, 세부위 以上의 關節炎, 손목이나 중수지간 혹은 근위지간 關節의 腫脹, 對稱性 關節炎, 류마토이드 結節, 혈청 류마토이드 인자, 放射線上 罹患된 關節周圍에서의 骨침식과 확실한 骨多孔症등의 7가지 基準項目중 4개 以上이 나타나고 關節症狀이 적어도 6주이상 持續된 境遇를 류마토이드 關節炎이라 診斷한다. 治療의 第一 原則은 炎症을 일으키는 原因을 찾아 그것을 제거하는 것이나 아직 정확한 原因을 모르기 때문에 原因 제거를 위한 治療를 施行하는 것은 不可能하며 우선 患者에게 疾患에 관하여 충분히 이해시키고 炎症反應을 최소한으로 줄임으로써 患者가 느끼는 自發痛을 줄이고, 關節의 破壞와 强直 및 變形을 防止하여 關節機能을 維持시키고 關節運動의 能動的 힘이 되는 筋力을 維持시킴으로써 患者가 오래동안 日常生活에 積極的으로 參與할 수 있도록 하는 것이 治療의 目的이라고 할 수 있다[1),2)].

韓醫學에서 關節炎은 痺證[12)], 歷節風, 鶴膝風, 痛風, 痛痺 등의 範疇[13)~15)]에 속하는데 《黃帝內經 素問 痺論[12)]》에는 "風寒濕三氣雜至, 合而爲痺也"라 하여 痺證을 크게 風寒濕의 三氣의 偏重에 따라서 風痺, 濕痺, 寒痺로 區分하고 있다. 風痺는 痛症이 上下左右로 遊走하고 惡寒, 發熱 등의 症狀이 發하는 것이고, 濕痺는 疼痛部位가 固定되어 移動하지 않고 肢體에 痲木, 浮腫, 重感 등을 일으키는 것이며, 寒痺는 氣血을 凝固하여 全身 혹은 局所에 激烈한 疼痛이 있는 것이다.

歷節風은 《金匱要略[16)]》에서 最初로 歷節로 言及된 이후 《醫學綱目[17)]》에서는 "四肢疼痛如鎚鍛, 不可忍"이라고 하여 痛症의 極甚함을 描寫하였고, 《備急千金要方[18)]》에는 "夫歷節風着, 人久不治者, 令人骨節蹉跌, 變形癩病"이라 하여 適切한 治療가 이루어지지 않고 오래 경과된 경우에 나타나는 關節의 變形狀態를 설명하고 있다.

原因은 風, 寒, 濕, 熱과 外傷, 痰火兼 外邪, 營養不良, 精神刺戟 등을 들 수 있는데, 先天稟賦不足, 正氣虧虛하고 風寒濕熱의 邪氣가 侵犯하여 肌肉, 關節, 經絡의 사이에 저체되어 氣血運行이 不暢함으로 인하여 生成된 邪毒이 關節에 蓄積되어 發生한다고 할 수 있다[19)~21)].

治療는 藥鍼治療, 灸治療, 鍼治療, 附缸治療, 藥物治療 등이 사용[19)]되는데 특히 藥物治療는 風, 寒, 濕, 熱 등 六淫의 邪氣가 原因일 경우에는 祛風, 散寒, 除濕, 淸熱 등의 治法을 사용하고, 臟腑虛實이 原因인 경우에는 臟腑虛實을 補瀉하는 治法을 應用한다[22)].

蜂毒藥鍼은 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 抽出하여 加工하거나 또는 蜂鍼을 직접 疾病과 有關한 穴位, 壓痛點 혹은 體表의 觸診으로 얻어진 陽性反應點에 注入함으로써 刺鍼效果와 蜂毒의 生化學的 效果를 同時에 利用하는 방법으로, 生體의 機能을 調整하고 病理狀態를 개선시켜 疾病을 治療하는 藥鍼療法의 一種인데, 2000年 전부터 民間療法의 하나로 각종 疼痛疾患에 응용되어 왔다[3),4)].

蜂毒은 꿀벌의 毒囊에 들어있는 약 40여 가지의 有效成分으로 構成된 物質로, peptide components, non peptide components, enzymes으로 構成되어 있다[23), 24)]. Peptide components는 Freeze-dried venom의 約 50%를 構成하고 있으며, 主要成分으로는 melittin, apamin, MCD peptide 등을 들 수 있는데, 그 중에서도 melittin은 蜂毒의 가장 特徵的인 主成分으로 分子量이 2,840이고 26개의 아미노산으

로 구성된 polypeptide로 溶血作用과 酵素作用이 있다[25]. 關節에 대한 melittin의 作用을 보면 PLA_2와 結合하여 PLA_2의 活性化를 막음으로서 PLA_2에 의해 phospholipid에서 만들어지는 炎症 媒介體의 전구물질인 arachidonic acid의 生成을 막는 작용[26]과 중성구에서 유래되며 炎症의 전구물질인 arachidonic acid와 相互作用하여 炎症을 지속시키는 O^{2-} 生産을 遮斷함으로서 炎症을 抑制시키는 作用이 있다[27].

蜂毒藥鍼이 關節炎에 미치는 臨床的 硏究로는 王 등[5]과 金 등[6]이 關節炎으로 來院한 患者를 對象으로 治療效果와 體熱測定을 비교한 結果 蜂毒藥鍼이 關節炎의 우수한 治療方法으로 提示 될 수 있다고 하였으며, 實驗的 硏究로는 李 등[10]이 생쥐의 LPS 誘發 關節炎에 蜂毒藥鍼을 施術한 후 보조 T淋巴球, 細胞毒性 T淋巴球, 大食細胞, NK細胞, ICAM-1, VCAM-1, IL-1β, IL-2R에 대한 細胞性 免疫反應의 結果를 比較하여 有效性을 報告하였고, 都 등[9]은 LPS로 關節炎을 誘發시킨 mouse의 血液內 白血球數와 好中球, 림프구 및 單核球의 比率을 測定하여 報告하였고, 黃 등[7]은 류마토이드 關節炎 患者의 蜂毒治療 前後 CRP, ESR, RA factor와 患者의 滿足度, 改善指數의 測定比較를 통해 蜂毒藥鍼의 有效性을 報告하였으며, 都 등[8]은 흰쥐의 膝關節 炎症性 浮腫에서 白血球數, 赤血球數, Hematocrit置, ASO titer를 測定하여 報告하였다.

關節炎에 관한 蜂毒藥鍼의 臨床報告 및 實驗報告는 많이 있으나 蜂毒 및 melittin 藥鍼液이 關節炎 滑液細胞에 미치는 影響에 관한 報告는 거의 없는 실정이다.

이에 著者는 蜂毒과 melittin 藥鍼液이 關節炎 滑液細胞에 미치는 影響을 MTT assay 分析, 形態學的 觀察, DNA fragmentation 分析, NO 形成度 測定, flow cytometry를 이용한 細胞週期의 分析, immunocytochemistry analysis, RT-PCR을 이용한 mRNA 分析 및 Western Blot 등을 통하여 觀察한 결과 다음과 같다.

蜂毒과 melittin 藥鍼液이 滑液細胞의 增殖에 미치는 影響을 MTT assay 方法을 통해 分析한 結果 吸光度 數値는 蜂毒 藥鍼液 處置群의 경우 對照群은 0.955±4.8(상대적 細胞數의 換算計數 100%), 蜂毒 藥鍼液 1μg/㎖에서 43.9%, 5μg/㎖에서 1.56%, 15μg/㎖에서 -0.28%로 나타나 對照群에 비해 모두 低濃度에서도 滑液細胞의 增殖을 有意性있게 抑制하였다. Melittin 藥鍼液 處置群의 경우 對照群은 0.948±0.01(상대적 細胞數의 換算計數 100%), melittin 藥鍼液 1μg/㎖에서 55.2%, 5μg/㎖에서 11.6%, 15μg/㎖에서 -0.96%로 나타나 滑液細胞의 增殖을 有意性있게 抑制하였으나, 蜂毒 藥鍼液 處置群보다 增殖抑制 活性이 떨어졌는데 이는 여러가지 成分으로 이루어진 蜂毒 藥鍼液의 作用이 單一成分의 melittin 藥鍼液보다 뛰어남을 시사하는 것이라 하겠다.

關節炎 滑液細胞의 細胞死에 미치는 影響을 보기 위하여 蜂毒과 melittin 藥鍼液을 각각 10μg/㎖로 6 well에 10^5細胞數로 分株하여 하룻밤 培養한 滑液細胞에 첨가한 후, 顯微鏡下에서 每時間 觀察하여 細胞死가 誘導되는 樣相을 觀察한 바 6時間 培養한 경우에 細胞死가 誘導되는 形態學的 變化를 觀察할 수 있었다. 이로 보아 蜂毒과 melittin 藥鍼液이 炎症現狀에 의한 關節炎의 病症을 抑制할 可能性이 있다고 하겠다.

細胞의 分裂增殖은 생명체의 가장 중요한 現狀이나 細胞의 무절제한 분열은 新生物 등의 疾患을 誘發하여 生命을 위협하게 된다. 이러한 細胞의 分裂增殖에는 細胞週期가 있고, 細胞週期는 DNA合成을 기준으로 區分하게 되는데 G_0期(interphase), G_1期(first gap phase), S期(synthesis phase), G_2期(second gap phase)의 間期와 M期(mitosis 또는 細胞分裂期)로 대별한다. G_0期는 細胞가 增殖을 휴지하고 있는 상태이고 G_1期는 細胞內 因子가 增殖되며 細胞의 크기가 증대되는 시기이다. S期는 細胞分

裂을 위한 DNA의 合成이 이루어지는 시기이며, G_2 期는 細胞質의 因子가 增殖되는 시기이고, M期는 核分裂과 細胞質分裂로 세포자체가 나누어지는 시기이다[28].

蜂毒과 melittin 藥鍼液이 細胞死를 誘導한다면 細胞增殖에 影響을 주므로 細胞週期에서 어떤 段階에 影響을 미치는지 分析하기 위해 flow cytometryer로 調査하여 본 結果 對照群의 경우 G_0/G_1段階에서 53.7%, S段階에서 15%, G_2/M段階에서 21.3%로 나타났으나, 蜂毒 藥鍼液 處置時 G_0/G_1段階에서 68.5%, S段階에서 5.5%, G_2/M段階에서 26%로 나타났으며 melittin 藥鍼液 處置時 G_0/G_1段階에서 78.7%, S段階에서 3%, G_2/M段階에서 18.3%정도로 나타나 蜂毒과 melittin 藥鍼液 處置時 滑液細胞의 細胞死 原因은 G_0/G_1段階에서 細胞週期의 進行이 停止되었기 때문이라고 사료된다.

蜂毒과 melittin 藥鍼液이 細胞死를 誘導한다면 細胞의 染色體내에 自家酵素에 의한 200~400염기쌍(bp : base pair)이 出現하는지를 分析할 필요가 있다. DNA fragmentation을 施行하여 본 結果 對照群의 境遇 2% agarose gel의 lane에 fragmentation이 보이지 않지만 蜂毒 藥鍼液 處置群은 10㎍/㎖ 處理시 가장 강한 ladder가 1Kbp 以下에서 보였고, melittin 藥鍼液 處置群도 10㎍/㎖으로 處置時 가장 강한 ladder가 1Kbp 以下에서 나타났다. 이는 蜂毒과 melittin 藥鍼液이 滑液細胞의 細胞死를 誘導했음을 證明하는 것이다.

NO는 腦虛血 상태에서 iNOS에 의해 生成되어 COX-Ⅱ 活性을 促進시키는 物質로 腦虛血이나 關節炎에 있어 毒性을 가지고 IL-1/ TNF에 의해 骨吸收에 관여한다[29]. 고수준의 NO는 파골전구체의 細胞死를 일으켜 骨吸收를 抑制하고 성숙한 破骨細胞의 活性을 저해하는 동시에 造骨細胞의 增殖을 抑制하는 작용을 하는데 關節炎이나 骨多孔症에서 많이 增加[30]하며 arginine에서 NO를 生成시키는 酵素인 iNOS 또한 關節炎에서 많이 增加되어 있다[31].

本 實驗에서 蜂毒이 血液內의 强力한 炎症 誘發原因인 NO의 合成을 抑制하는지 確認하기 위해 滑液細胞를 分株하여 培養한 다음 LPS를 投與하여 NO를 測定한 結果 對照群은 95±2.3μM/well인데 비하여 蜂毒 藥鍼液 處置群에서는 12±3.2μM/well, melittin 藥鍼液 處置群에서는 8.5±2.3μM/well로 나타나 蜂毒과 melittin 藥鍼液 處置時 NO의 形成이 强하게 抑制되었으며 이는 아마도 NO의 形成과 關係되는 COX-Ⅱ와 iNOS의 發顯에도 影響을 주는 것으로 思料된다.

一般的으로 炎症 및 痛症에 관여한다고 알려진 prostaglandin이 生成되는 機轉은 細胞內 calcium이 增加되면 PLA_2를 活性化시켜 細胞膜의 燐脂質(phospholipid)로부터 arachidonic acid를 生産하고 이러한 細胞內 arachidonic acid는 COX에 의하여 prostaglandin을 生産한다[32].

Prostaglandin은 痛症과 炎症에 관계되고 胃腸管系 粘膜에서 細胞保護, 腎臟 血流量과 機能 維持, 그리고 身體의 平衡 維持 등에 매우 重要한 役割을 하는데[33] 그 중 prostaglandin E_2(PGE_2)는 COX 活性에 따른 주요 産物로서 炎症 疾患, 自家免疫 疾患 및 腫瘍性 疾患의 病理에서 重要한 役割을 하고, 특히 炎症 反應의 중요한 媒介物質로 作用한다[34]. 비스테로이드성 소염제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, 이하 NSAIDs)가 COX를 抑制함으로써 消炎과 鎭痛 效果를 보인다고 報告한 이후 그 作用機轉에 대한 많은 硏究가 進行되어 왔는데 COX는 arachidonic acid를 不安定한 中間物인 PGG_2와 prostaglandin H_2(PGH_2)로 變換시키는 酵素로 현재 cyclooxygenase type Ⅰ; constitutive form(COX-Ⅰ)과 COX-Ⅱ의 두 가지 形態로 存在하는 것으로 알려져 있다[35].

COX-Ⅰ은 組織의 構成 要素이며 胃腸管系를 포함한 組織에 散在하는데 各 組織에서 血流(vascular flow)의 維持, 細胞分化(cell division), 粘液(mucus)과 중탄산염(bicarbonate)의 生成 등에 관여하는 局

所的인 prostaglandin의 量을 調節한다. 이러한 COX-Ⅰ의 活性을 NSAIDs가 沮害함으로써 痛症은 抑制하지만 胃腸管과 腎臟의 副作用 및 抗血小板 作用(antiplatelet activity)이 나타난다[36]. 反面에, COX-Ⅱ는 주로 腦와 腎臟에서 發見되며 一部 炎症性 細胞(inflammatory cells)에서도 發見되는데 특히 炎症部位에서 高濃度의 prostaglandin은 炎症과 痛症의 媒介物質로서 중요한 役割을 한다. COX-Ⅰ은 炎症部位에서는 거의 誘導되지 않으므로 COX-Ⅰ의 抑制作用은 거의 없으면서 選擇的으로 COX-Ⅱ를 沮害하는 藥劑를 考案하게 되었는데 選擇的인 COX-Ⅱ沮害劑는 炎症과 痛症을 減少시킬 수 있는 반면에 COX-Ⅰ에는 影響을 끼치지 않기 때문에 胃腸管系에 安全한 것으로 제시된다[37]. 현재 使用되는 거의 대부분의 NSAIDs는 COX-Ⅰ과 COX-Ⅱ를 非選擇的으로 抑制하거나 또는 COX-Ⅰ에 약간의 選擇性을 갖고 있는 製劑들로써 가장 흔히 處方되는 製劑 中의 하나이지만 NSAIDs의 使用으로 인한 副作用도 또한 빈번하게 발생한다. 따라서 NSAIDs의 抗炎症 效果 및 鎭痛 效果는 비슷하면서도 흔히 나타나는 胃腸管 副作用은 없는 選擇的인 COX type Ⅱ沮害劑(selective inhibitors of COX-Ⅱ)의 開發이 進行중이다[38].

PLA_2는 炎症性 疾病을 誘發시키며 membrane에 存在하는 phospholipid의 sn-2 acyl ester 結合을 加水分解하여 free fatty acid와 lysophospholipid로 生成하는 酵素로서 이의 效果的인 沮害劑는 治療劑로 開發될 수 있다[39]. PLA_2의 分解 産物인 lyso-phospholipid는 platelet-activating factor(PAF)의 전구물질이며, free fatty acid중에서 arachidonic acid는 細胞內에서 COX와 lipoxygenase의 作用을 받아 prostaglandin, thromboxane, leukotrience으로 變換되는데 이러한 eicosanoid들은 排卵, 血小板 凝集, 腎臟 水分平衡 및 免疫作用 등을 포함하는 다양한 生理機轉에 관여한다[40].

本 實驗에서 蜂毒과 melittin 藥鍼液이 滑液細胞의 COX-Ⅱ, iNOS 및 PLA_2 發顯의 抑制를 誘導하는지 調査하기 위해 免疫細胞化學法을 實施한 結果 COX-Ⅱ는 對照群에서 FITC에 의해 綠色을 나타내는 signal이 强하게 나타나는데 비하여 蜂毒과 melittin 藥鍼液 處置群에서는 약하게 나타나거나 signal의 정도가 減少하였다. iNOS 發顯의 양상은 對照群에서 강하게 發顯되었는데 비하여 蜂毒 藥鍼液 處置群에서는 거의 發顯이 抑制되었고 melittin 藥鍼液 處置群에서는 약하게 發顯되었다. 한편 PLA_2의 경우 對照群은 빨간 색상을 띤 Texas Red의 2차항체 signal이 강하게 細胞質 주위로 發顯되었으나 蜂毒과 melittin 藥鍼液 處置群에서는 약하게 發顯되었다. 이는 蜂毒과 melittin 藥鍼液이 滑液細胞의 炎症에 관여하는 蛋白質의 發顯을 抑制할 수 있음을 보인 것이라 하겠다.

iNOS, COX-Ⅱ 및 β-actin mRNA의 發顯에 미치는 影響을 보기 위해 RT-PCR을 실시한 결과 對照群에서는 iNOS가 發顯되었나 lane 1의 蜂毒 藥鍼液 處置群과 lane 2의 melittin 藥鍼液 處置群에서는 發顯이 强하게 抑制되었으며, COX-Ⅱ의 경우 對照群에서는 發顯되었지만 蜂毒 藥鍼液 處置群에서는 강하게 發顯이 抑制되었고 melittin 藥鍼液 處置群에서는 약하게 發顯되었다. 한편 細胞의 傳寫水準이 同一함을 나타내는 β-actin mRNA 發顯은 모든 群에서 일정하였다. 지금까지는 蜂毒 및 melittin 藥鍼液으로 分析을 실시하였으나 melittin 藥鍼液은 결국 蜂毒 藥鍼液의 一部分인 peptide이므로 蜂毒 藥鍼液만으로 細胞內 蛋白質의 發顯과 作用을 western blot로 分析한 結果 iNOS는 蜂毒 藥鍼液 處置群 15 ㎍/㎖에서 發顯이 가장 抑制되었는데 비해 COX-Ⅱ는 5㎍/㎖의 蜂毒藥鍼液 處置群에서부터 강하게 發顯이 抑制되었으며 細胞內 標準 蛋白質인 β-actin은 모든 群에서 發顯됨을 알 수 있었다.

이상의 結果는 결국 蜂毒 藥鍼液이 특정 蛋白質의 傳寫와 發顯을 선택적으로 沮害함을 암시해 주고 있으며 따라서 蜂毒 藥鍼液이 關節炎 滑液細胞의 增殖

을 有意性 있게 抑制하여 關節炎 治療에 效果가 있다고 하겠다. 또한 本 實驗은 蜂毒 藥鍼液이 원액뿐만 아니라 melittin 藥鍼液에서도 關節炎 滑液細胞의 細胞活性을 抑制하는 效果가 있음을 確認시켜 주었다.

向後 蜂毒 藥鍼液이 定常細胞에 미치는 影響과 痛症 및 炎症과 관련된 다른 遺傳子에 미치는 效果를 알아보기 위한 追加的인 實驗과 硏究가 持續的으로 이루어져야 할 것으로 思慮된다.

V. 結 論

蜂毒 및 melittin 藥鍼液이 關節炎 滑液細胞에 미치는 影響을 MTT assay 분석, 形態學的 觀察, DNA fragmentation 分析, NO 形成度 測定, flow cytometry를 이용한 細胞週期의 分析, 免疫細胞化學的 分析, RT-PCR을 利用한 mRNA 分析 및 Western Blot 등을 觀察한 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MTT assay 方法을 통한 滑液細胞의 增殖에 미치는 影響에서 蜂毒과 melittin 藥鍼液 處置群 모두 用量 依存的으로 滑液細胞의 增殖을 有意性있게 抑制하였다.

2. 蜂毒과 melittin 藥鍼液 處置群을 觀察한 바 6時間 培養 후 細胞死를 誘導하는 形態學的 變化를 觀察할 수 있었다.

3. NO 形成은 蜂毒 및 melittin 藥鍼液 處置群에서 强하게 抑制되었다.

4. Flow cytometry로 細胞週期를 分析한 結果 蜂毒과 melittin 藥鍼液 處置群에서 滑液細胞의 細胞死는 G_0/G_1段階에서 細胞週期의 進行이 停止되었다.

5. DNA fragmentation을 시행하여 본 結果 蜂毒과 melittin 藥鍼液 處置群 모두 ladder가 1Kbp이하에서 나타났다.

6. 免疫細胞化學的 分析에서 COX-Ⅱ와 PLA_2는 蜂毒과 melittin 藥鍼液 處置群에서 모두 강하게 抑制되었으며, iNOS는 蜂毒 藥鍼液 處置群에서는 거의 發顯되지 않았으나 melittin 藥鍼液 處置群에서는 약하게 發顯되었다.

7. RT-PCR 結果 iNOS는 蜂毒과 melittin 藥鍼液 處置群에서 강하게 抑制되었으며, COX-Ⅱ는 蜂毒 藥鍼液 處置群에서는 거의 發顯되지 않았으나 melittin 藥鍼液 處置群에서는 약하게 發顯되었다.

8. Western Blot 결과 iNOS는 15㎍/㎖의 蜂毒 藥鍼液 處置群에서 가장 發顯이 抑制된 반면 COX-Ⅱ는 5㎍/㎖의 蜂毒 藥鍼液 處置群에서부터 강하게 發顯이 抑制되었다.

VI. 參考文獻

1. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사. 1997; 1166-70.
2. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울: 최신의학사. 1993; 155-75.
3. 權奇祿, 高炯均, 金昌煥. 蜂鍼에 對한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1994; 11(1): 159-71.
4. 金文昊. 蜂毒療法과 蜂鍼療法. 서울: 한국교육기획. 1992; 20-37, 41-2, 64-67, 104-12, 134-49, 171-6.
5. 왕오호, 안규범, 임진강, 장형석. 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.
6. 金志勳, 李栽東. 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.
7. 황유진, 이건목, 황우준, 서은미, 장종덕, 양귀비, 이승훈, 이병철. 蜂藥鍼을 이용한 류마토이드 關節炎의 臨床的 硏究. 大韓鍼灸學會誌.

2001; 18(5): 33-42.
8. 都垣錫, 張埈赫, 金慶鎬, 尹鍾和, 金甲成. 蜂毒療法이 흰쥐의 膝關節 炎症性 浮腫에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1995; 12(1): 211-20.
9. 都垣錫, 金慶鎬, 金甲成. 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): 157-69.
10. 李昇德, 金甲成. 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.
11. Mosmann T. Rapid colormertic assay for cellular growth and survial: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Method. 1983; 65(1): 55-63.
12. 王氷 註. 黃帝內經. 서울: 고문사. 1971; 24, 47, 56-7, 135-9, 198, 213, 264, 302.
13. 康命吉. 濟衆新編. 서울: 杏林書院. 1975; 8-10.
14. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂. 1983; 372-3.
15. 張介賓. 景岳全書. 上海: 衛生出版社. 卷十二. 1978; 9-10.
16. 張仲景. 仲景全書. 서울: 대성문화사. 1989; 364-9.
17. 樓英. 醫學綱目. 북경: 中國中醫藥出版社. 卷十. 1996; 200-18.
18. 孫思邈. 備急千金要方. 서울: 대성문화사. 1986; 164-5.
19. 황우준, 나창수, 이언정, 원진숙. 두면 척추 사지병의 진단과 치료. 서울: 대성문화사. 1995; 453.
20. 黃文東. 實用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1986; 566-9.
21. 陳貴廷, 楊思澍. 實用中西醫結合診斷治療學. 서울: 一中社. 1992; 637-41.
22. 권재식, 김기현, 김형태, 박응호, 서성훈 編著. 痺證. 서울: 鼎談. 1993; 226.
23. 朱文鋒. 實用 中醫辭典. 陝西: 陝西科學技術出版社. 1982: 402.
24. Habermann E. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In Venomous Animals and their Venoms. Academic Press. 1971; 3: 61.
25. Assem ES, Atkinson G. Histamine release by MCDP (401), a peptide from the venom of the honey bee, Brit. Pharmacol. 1973; 337-8.
26. Saini SS, Peterson JW, Chopra AK. Melittin binds to secretory phospholipase A_2 and inhibits its enzymatic activity. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 238(2): 436-42.
27. 의과대학 교수편. Katzung's 臨床藥理學. 서울: 도서출판한우리. 1998; 345-62, 655-6.
28. Kageyama Y, Koide Y, Nagata T, Uchijima M, Yoshida A, Arai T, Miura T, Miyamoto C, Nagano A. Toxic shock syndrome toxin-1 accelerated collagen-induced arthritis in mice. J Autoimmun. 2001 Mar; 16(2): 125-31.
29. 서울대학교 의과대학. 세포생물학. 서울대학교 출판부. 1990; 1-9, 63-5, 145-50.
30. van't Hof RJ, Hocking L, Wright PK, Ralston SH. Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. Rheumatology (Oxford). 2000; 39(9): 1004-8.
31. Mapp PI, Klocke R, Walsh DA, Chana JK, Stevens CR, Gallagher PJ, Blake DR. Localization of 3-nitrotyrosine to rheumatoid and normal synovium. Arthritis

Rheum. 2001; 44(7): 1534-939.
32. 김세종. 면역학. 서울: 고려의학. 1994; 263-4.
33. Cryer B, Dubois A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase-a review. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 1998; 56(5-6): 341-61.
34. Horton JK, Williams AS, Smith-Phillips Z, Martin RC, O'Beirne G. Intracellular measurement of prostaglandin E_2: effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression. Anal Biochem. 1999; 271(1): 18-28.
35. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J. 1998; 12(12): 1063-73.
36. Tannenbaum H, Davis P, Russell AS, et al. An evidence-based approach to prescirbing NSAIDs in musculoskeletal disease: A canadian consensus. Can Med Assoc J. 1996; 155(1): 77-88.
37. Kaufmann WE, Andreasson KI, Isakson PC, Worley PF. Cyclooxygenases and the central nervous system. Prostaglandins. 1997; 54(3): 601-24.
38. Cameron A. Selective COX-II inhibitors gather speed. Inpharma 1998; 1122: 9-10.
39. Kudo I, Murakami M, Hara S, Inoue K. Mammalian non-pancreatic phospholipases A_2. Biochim Biophys Acta. 1993; 1170(3): 217-31.
40. Buhl WJ, Eisenlohr LM, Gehring U. Phospholipase A_2 in human placental serum. Prostaglandins. 1997; 53(3): 139-52.