

원 개

蜂藥鍼液이 細胞活性에 미치는 影響

이승훈 · 이봉효 · 이경민 · 조현열 · 김영옥 · 방재선 · 서정철 · 한상원

경산대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Abstract

The Effects of Bee Venom for Aqua-acupuncture on Cellviability

Lee Seung-hoon, Lee Bong-hyo, Lee Kyung-min, Cho Hyun-yeul,
Bang Jae-sun, Seo Jung-chul, Kim Young-wook and Han Sang-won

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

Objectives : This study was undertaken to determine the cytotoxic effects of crude bee venom which is widely used for aqua-acupuncture in oriental medical clinic.

Methods : We compared the effects of crude bee venom, apamin, melittin and MCD peptide on cellviability by MTT assay.

Results : The obtained results are summarized as follows:

1. Bee venom, apamin, melittin and MCD peptide showed concentration-dependent cytotoxic effect in some human cell lines(human glioma cell line과 neuroblastoma, human mast cell line) for 24 and 48 Hour treatment.

2. Bee venom, apamin, melittin and MCD peptide showed dose-dependent cytotoxic effect in some human cell lines for 24 and 48 Hour treatment.

· 접수 : 2002년 7월 13일. · 수정 : 8월 1일 · 채택 : 9월 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

3. Bee venom treatment for 24 and 48 hour showed higher cytotoxic effects than apamin, melittin and MCD peptide.

Conclusions : These results suggest that bee venom, apamin, melittin and MCD peptide have concentration- and dose- dependent cytotoxic effect in some human cell lines. But further study is needed for optimal concentration and dose.

Key Words : Bee Venom, Apamin, Melittin, MCD Peptide, Cellviability

I. 緒 論

蜂毒의 利用은 紀元前 2000年경의 이집트 파피루스 文書에 벌침이나 죽은 벌을 아픈 곳에 직접 비벼 治療했다는 記錄이 남아 있다고 하며, 紀元前 168年에 埋葬된 中國 長沙 馬王堆 3號 漢墓에서 出土된 醫書에서도 蜂毒을 利用한 2例의 記錄이 실려 있다¹⁾.

蜂毒이란 꿀벌의 毒囊에 들어 있는 約 40여가지의 成分으로 構成된 物質로 炎症, 알러지 등을 誘發하는 作用이 있으나 臨床에서는 經絡學說의 原理에 의하여 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 抽出, 加功하여 질병과 有關한 部位나 壓痛點 및 穴位에 注入함으로써 刺鍼 効果와 더불어 蜂毒의 生化學的 特異物質이 人體에 미치는 藥理作用을 동시에 利用하여 生體의 機能을 調整하고 氣血을 疏通시켜 病理狀態를 改善시켜 疾病을 治療하고 豫防하는 데에 利用되고 있다²⁾⁻⁶⁾.

현재는 蜂毒에 관한 연구가 國內외에서 활발히 이루어지고 있다. 外國에서는 蜂毒의 成分에 따른 作用과 機轉⁷⁾, 蜂毒의 過敏성과 毒性⁸⁾, 免疫療法⁹⁾, 關節炎¹⁰⁾, 單純疱疹¹¹⁾, 多發性 硬化症¹²⁾, 腫瘍¹³⁾⁻¹⁴⁾ 등의 질병 治療 등에 대한 연구가 보고되었고, 國內

에서는 蜂毒 藥液에 관하여 鎮痛¹⁵⁾, 消炎¹⁶⁾, 鎮痙¹⁷⁾, 免疫機能 增強作用¹⁸⁾, 抗癌效果¹⁹⁻²⁰⁾ 등이 보고되었는데, 이 중 蜂毒 藥液의 抗癌效果로 黑色腫 세포에 미치는 影響에 대한 실험보고가 있으나²¹⁾ 人體 細胞株를 利用하여 蜂毒 藥液의 成分별로 어떤 세포 독성을 갖고 있는지에 대한 연구는 매우 적은 실정이다²²⁾.

이에 著者는 蜂毒藥液 중 crude bee venom (BV)과 蜂毒의 단일성분인 Mast Cell Degranulating (MCD) peptide, melittin, apamin을 선택하여 human glioma cell line과 neuroblastoma, human mast cell line에 處置한 後, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) 反應實驗을 施行하여 細胞活性度의 變化를 관찰하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 細胞株

본 실험에 사용한 細胞株 중 human glioma cell line(HS 683)과 neuroblastoma(SK-N-MC)는 서

울대학교 세포주은행에서 구입하였고 human mast cell line은 人體肥滿細胞株로 mast cell leukemia 환자로부터 유래되었으며, 경희대학교 의과대학 미생물학교실에서 분양 받아 사용하였다.

2) 試藥

배양액 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM)과 Fetal bovine serum(FBS) 등은 Gibco BRL(USA)에서 구입하였으며, MTT는 Roche(Germany)에서 구입하였고, 일반 시약은 Sigma사 (USA)의 제품을 사용하였다.

2. 方法

1) 細胞培養

Human glioma cell line과 neuroblastoma의 培養은 10% FBS가 포함된 DMEM 溶液에, human mast cell line의 培養은 10% FBS가 포함된 IMDM 용액에 5% CO₂, 95% 濕度, 37°C 溫度가 유지되는 세포배양기에서 배양하였고, 배양액은 2일마다 교환하였다.

2) 實驗用 蜂藥鍼液의 준비

실험에 사용한 蜂藥鍼液인 crude bee venom (100mg)과 MCD peptide(100mg), melittin 1mg, apamin(500µg)은 실험 목적에 따라 증류수로 농도별로 희석하여 사용하였고 모두 Sigma(USA)에서 구입하여 使用하였다.

3) 蜂藥의 處置

플라스크의 約 50~60% 面積을 차지하도록 細胞를 培養한 後 아래와 같이 蜂藥鍼液으로 處理하였다. 본 연구에서는 우선 각 cell line에서 蜂藥鍼液의 세포 독성이 있는 濃度を 알아보고자 蜂藥鍼液 別로 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵mg/ml가 되도록 처치한 각각

의 細胞群을 實驗群으로 하고 蜂藥鍼液을 처치하지 않은 세포군을 對照群으로 하여 MTT 분석을 하였다.

또한 세포독성이 있는 봉약침액의 용량을 알아보고자 봉약침액별로 1×10⁻³, 2×10⁻³, 5×10⁻³, 10⁻²mg/ml 가 되도록 처치한 각각의 세포군을 실험군으로 하고, 봉약침액을 처치하지 않은 세포군을 대조군으로 하여 MTT분석을 하였다.

본 실험에서 처리시간은 24시간과 상대적으로 장기처리 했을 경우의 세포독성을 비교하기 위하여 48시간 배양하였다.

4) MTT-based cytotoxicity assay

蜂藥鍼液의 성분별로 각 cell line에 대한 농도에 따른 세포독성을 측정하기 위하여, 세포배양에서 생존하는 세포의 數를 측정하는 방법으로 살아 있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 작용을 이용한 MTT 실험을 하였다. 구체적으로 human glioma cell line에서는 crude bee venom과 MCD peptide를 비교하고, neuroblastoma에서는 crude bee venom과 apamin을 비교하고, human mast cell line에서는 crude bee venom과 melittin을 비교하였다. ELISA reader로 595nm에서 측정된 흡광도(optical density, OD)의 값은 살아 있는 세포의 수를 반영하며 세포 독성의 판정은 다음의 산출식에 따라 % viability로 나타냈다.

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

MTT assay 방법은 회사의 protocol을 따랐다. 먼저 cell line 세포를 96 well plate(Corning, USA)에 well당 2×10⁴의 세포수가 되도록 분주하고 배양액을 100µl 첨가하였다. 검액으로 蜂藥鍼液

을 시간별, 농도별로 처리하고 蜂藥鍼液을 처리하지 않은 세포군을 대조군으로 하였다. 각 well에 MTT labeling reagent 용액을 50 μ l 가하여 빛에 노출되지 않게 알루미늄 호일로 덮은 후 4시간 동안 배양하였다. 모든 실험값은 평균값 \pm 표준 Solubilization solution을 50 μ l 첨가한 후 24시간 및 60시간 배양 후 ELISA reader(Bio-Tek, USA)로 595nm에서 측정하였다.

5) 統計處理

모든 실험값은 평균값 \pm 표준오차(mean \pm standard error)로 하였고, 統計學的 分析은 SAS(Statistical Analysis System) program을 이용하였다. 對照群과 實驗群과의 비교는 Student's t-test에 의해, 實驗群간의 濃度別, 用量別 비교는 Duncan's multiple range test로 統計學的 有意性を 검정하였으며, P<0.05인 경우에만 有意성이 있는 것으로 간주하였다.

III. 結果

1. 濃度-時間別 細胞毒性에 미치는 影響

1) 24時間 培養

Human glioma cell line에 24시간 동안 두가지의 蜂藥鍼液을 처리한 결과 crude bee venom은 10⁻³mg/ml에서는 69.6 \pm 3.0%, 10⁻⁴mg/ml에서는 82.4 \pm 2.9%, 10⁻⁵mg/ml에서는 90.2 \pm 2.5%의 세포활성도를 나타냈으며 모두 대조군에 비하여 유의성(P<0.05) 있게 세포활성이 감소되었다. MCD peptide의 경우 10⁻³mg/ml에서는 80.4 \pm 3.3%, 10⁻⁴mg/ml에서는 89.8 \pm 2.0%, 10⁻⁵mg/ml에서는 91.8 \pm 3.4%의 세포활성도를 나타냈으며 모두 대조군에 비하여 유의성(P<0.05)있게 세포활성이 감소되었다. 한편 crude bee venom과 MCD peptide를 비교한 결과 10⁻³mg/ml와 10⁻⁴mg/ml에서 crude

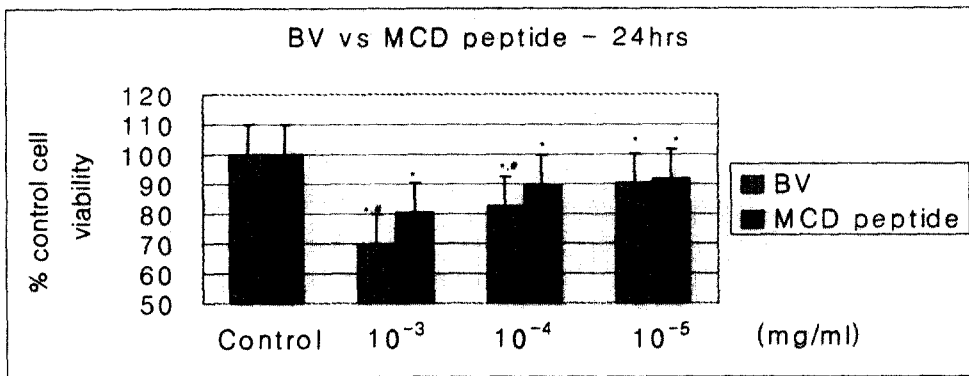


Fig 1. The effect of bee venom concentration on human glioma cell viability in 24 hour MTT assay.

* ; Statistical significant compared with control group(p<0.05).

; Statistical significant compared with BV vs MCD peptide group(p<0.05).

Control : human glioma cell treated by DMEM liquid add with 10% FBS

BV : treatment of crude bee venom infusion solution, Sigma(USA)

MCD peptide : treatment of Mast Cell Degranulating peptide infusion solution, Sigma(USA)

bee venom이 MCD peptide보다 세포활성을 유의성(P<0.05)있게 억제하였다<Fig 1.>

Human mast cell line에 24시간 동안 두가지의 蜂毒을 처치한 결과, crude bee venom은 10⁻³mg/ml에서는 71.5±2.4%, 10⁻⁴mg/ml에서는 83.9±3.1%, 10⁻⁵mg/ml에서는 91.3±2.6%의 세포활성도를 나타내었으며, 모두 대조군에 비하여 유의성(P<0.05)이 있었다. Melittin의 경우 10⁻³mg/ml에서는 80.5±3.6%, 10⁻⁴mg/ml에서는 90.2±2.4%, 10⁻⁵mg/ml에서는 93.1±2.9%의 세포활성도를 나타내었으며, 모두 대조군에 비하여 유의성(P<0.05)이 있었다. 한편 crude bee venom과 melittin을 비교한 결과 10⁻³mg/ml과 10⁻⁴mg/ml에서

crude bee venom이 melittin 보다 세포활성을 유의성(P<0.05)있게 억제하였다<Fig 2.>

Neuroblastoma cell line에 24時間 동안 두가지의 蜂毒을 처치한 결과 crude bee venom은 10⁻³mg/ml에서는 54.1±2.6%, 10⁻⁴mg/ml에서는 84.7±3.3%, 10⁻⁵mg/ml에서는 91.0±2.1%의 細胞活性度를 나타냈으며 모두 對照群에 비하여 유의성(P<0.05)있게 細胞活性이 감소되었다. Apamin의 경우 10⁻³mg/ml에서는 64.8±3.1%, 10⁻⁴mg/ml에서는 89.9±2.6%, 10⁻⁵mg/ml에서는 93.8±2.6%의 細胞活性度를 나타냈으며 모두 對照群에 비하여 유의성(P<0.05) 있게 細胞活性이 감소되었다. 한편 crude bee venom과 apamin 을 비교한 결과 10⁻³

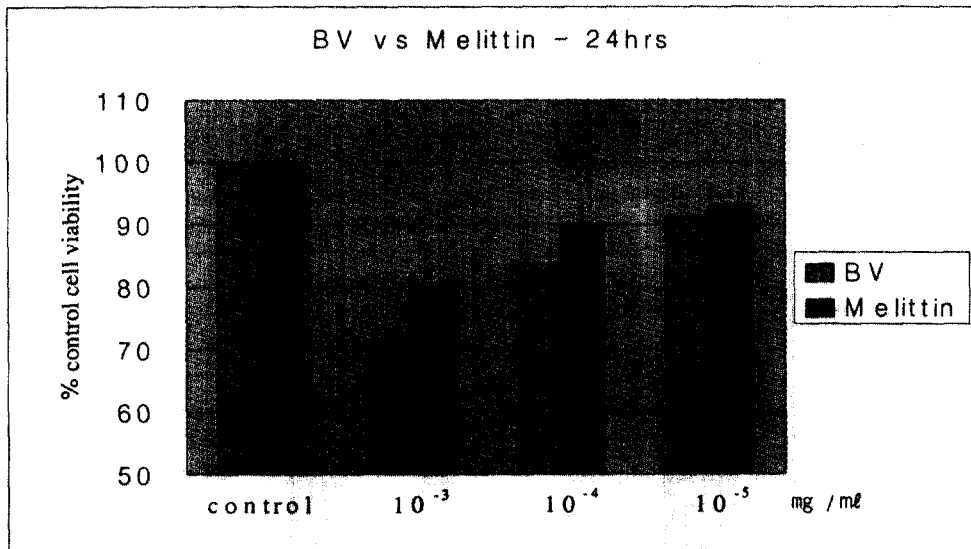


Fig 2. The effect of bee venom concentration on human mast cell viability in 24 hour MTT assay.

Control : non-treated group

Crude bee venom(BV) : treatment of crude bee venom infusion solution

Melittin : treatment of melittin infusion solution

* : Statistical significance compared with control group(P<0.05)

: Statistical significance compared with BV vs melittin group (P<0.05)

mg/ml과 10^{-4} mg/ml에서 crude bee venom이 apamin보다 細胞活性을 有意性($P < 0.05$) 있게 억제하였다(Fig 3.).

2) 48時間 培養

Human glioma cell line에 48시간 동안 두 가지의 蜂藥鍼液을 처치한 결과 crude bee venom은 10^{-3} mg/ml에서는 $50.9 \pm 3.4\%$, 10^{-4} mg/ml에서는 $72.1 \pm 3.0\%$, 10^{-5} mg/ml에서는 $88.6 \pm 2.7\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며 모두 대조군에 비하여 有意性($P < 0.05$)있게 세포활성이 감소되었다. MCD peptide의 경우 10^{-3} mg/ml에서는 $77.8 \pm 3.1\%$, 10^{-4} mg/ml에서는 $87.1 \pm 2.9\%$, 10^{-5} mg/ml에서는 $90.2 \pm 3.5\%$ 의 세포활성도를 나타냈으며 모두 대조군에 비하여 有意性($P < 0.05$)있게 세포활성이 감소되었다. 한편 crude bee venom과 MCD peptide를 비교한 결과 10^{-3} mg/ml와 10^{-4} mg/ml에서 crude bee venom이 MCD peptide보다 세포활성을 有意性($P < 0.05$)있게 억제하였다(Fig 4.).

Human mast cell line에 48시간 동안 두 가지의 蜂毒을 처치한 결과, crude bee venom은 10^{-3} mg/ml에서는 $53.9 \pm 2.7\%$, 10^{-4} mg/ml에서는 $69.2 \pm 3.2\%$, 10^{-5} mg/ml에서는 $89.9 \pm 3.6\%$ 의 세포활성도를 나타내었으며, 모두 대조군에 비하여 有意性($P < 0.05$)이 있었다. Melittin의 경우 10^{-3} mg/ml에서는 $71.3 \pm 2.6\%$, 10^{-4} mg/ml에서는 $80.7 \pm 3.4\%$, 10^{-5} mg/ml에서는 $92.7 \pm 2.1\%$ 의 세포활성도를 나타내었으며, 모두 대조군에 비하여 有意性($P < 0.05$)이 있었다. 한편 crude bee venom과 melittin을 비교한 결과 10^{-3} mg/ml과 10^{-4} mg/ml에서 crude bee venom이 melittin 보다 세포활성을 有意性($P < 0.05$)있게 억제하였다(Fig 5.).

Neuroblastoma cell line에 48時間 동안 두 가지의 蜂毒을 처치한 결과 crude bee venom은 10^{-3} mg/ml에서는 $51.1 \pm 2.9\%$, 10^{-4} mg/ml에서는 $70.9 \pm 3.4\%$, 10^{-5} mg/ml에서는 $89.3 \pm 3.0\%$ 의 細胞活性度를 나타냈으며 모두 對照群에 비하여 有意性($P < 0.05$) 있게 細胞活性이 감소되었다. Apamin

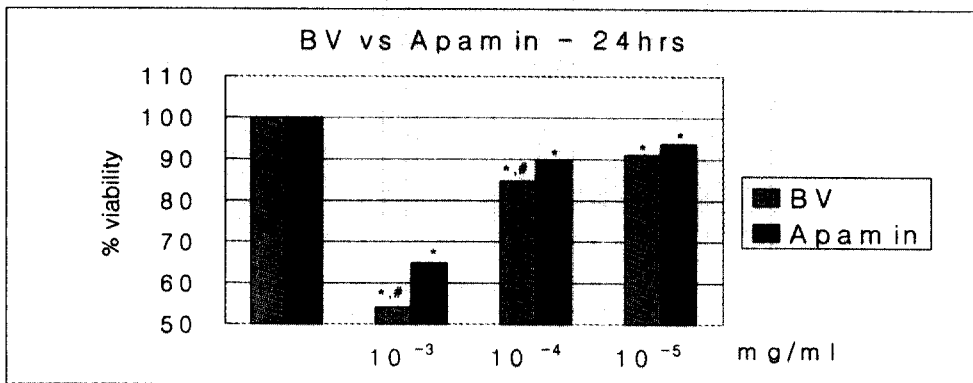


Fig 3. The effect of bee venom concentration on neuroblastoma cell viability in 24 hours MTT assay. Control : Non-treated group.

BV : treatment of crude bee venom infusion solution.

Apamin : treatment of apamin infusion solution.

* : Statistical significance compared with control group($P < 0.05$).

: Statistical significance compared with BV vs apamin group($P < 0.05$).

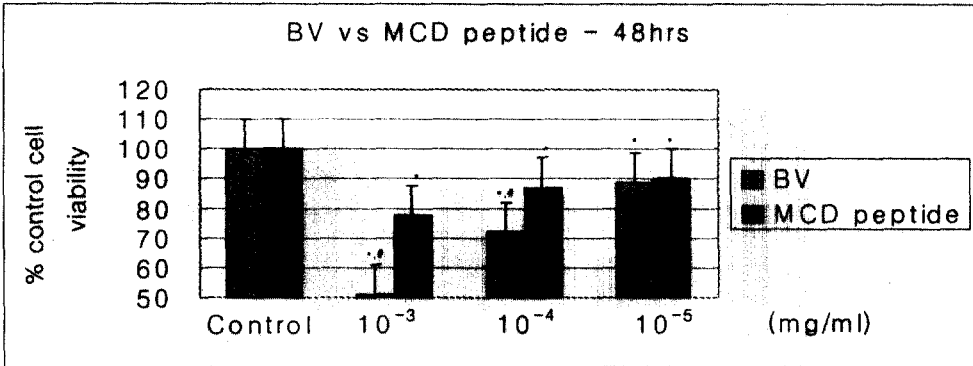


Fig 4. The effect of bee venom concentration on human glioma cell viability in 48 hour MTT assay.

* ; Statistical significant compared with control group(p<0.05).

; Statistical significant compared with BV vs MCD peptide group(p<0.05).

Control : human glioma cell treated by DMEM liquid add with 10% FBS

BV : treatment of crude bee venom infusion solution, Sigma(USA)

MCD peptide : treatment of Mast Cell Degranulating peptide infusion solution, Sigma(USA)

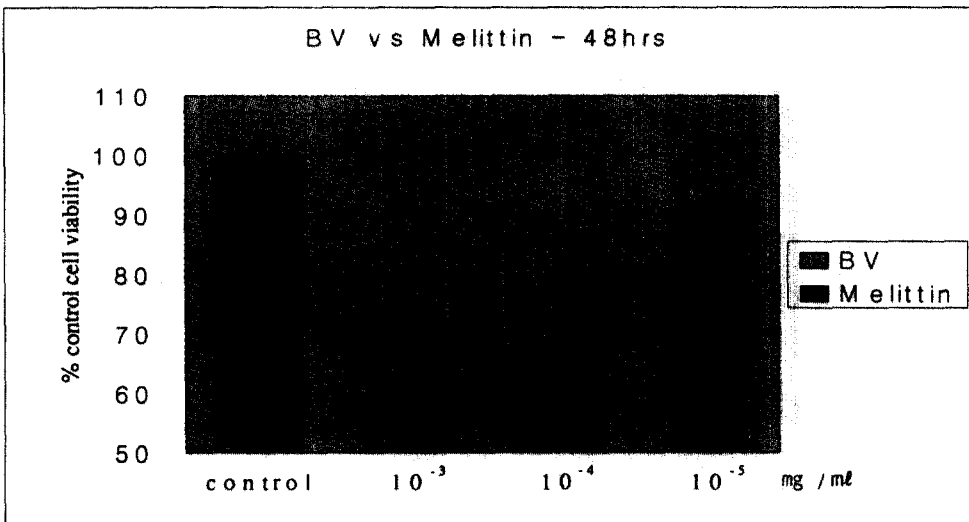


Fig 5. The effect of bee venom concentration on human mast cell viability in 48 hour MTT assay.

Control : non-treated group

Crude bee venom(BV) : treatment of crude bee venom infusion solution

Melittin : treatment of melittin infusion solution

* : Statistical significance compared with control group(P<0.05)

: Statistical significance compared with BV vs melittin group (P<0.05)

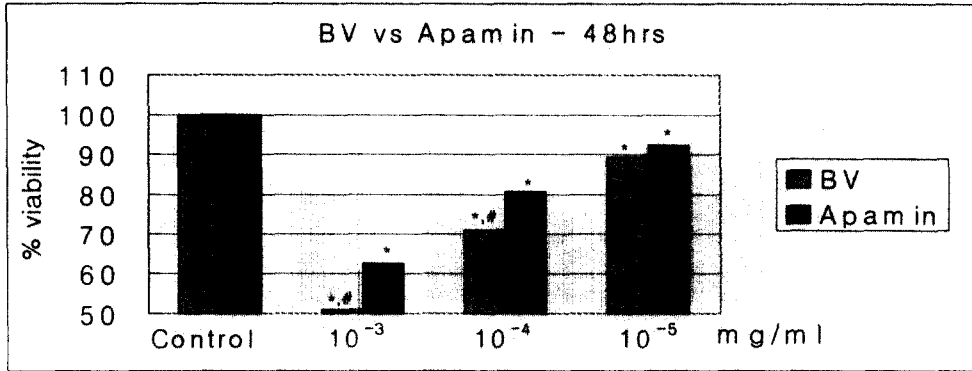


Fig. 6. The effect of bee venom concentration on neuroblastoma cell viability in 48 hours MTT assay.

Control : Non-treated group.

BV : treatment of crude bee venom infusion solution.

Apamin : treatment of apamin infusion solution.

* : Statistical significance compared with control group(P<0.05).

: Statistical significance compared with BV vs apamin group(P<0.05).

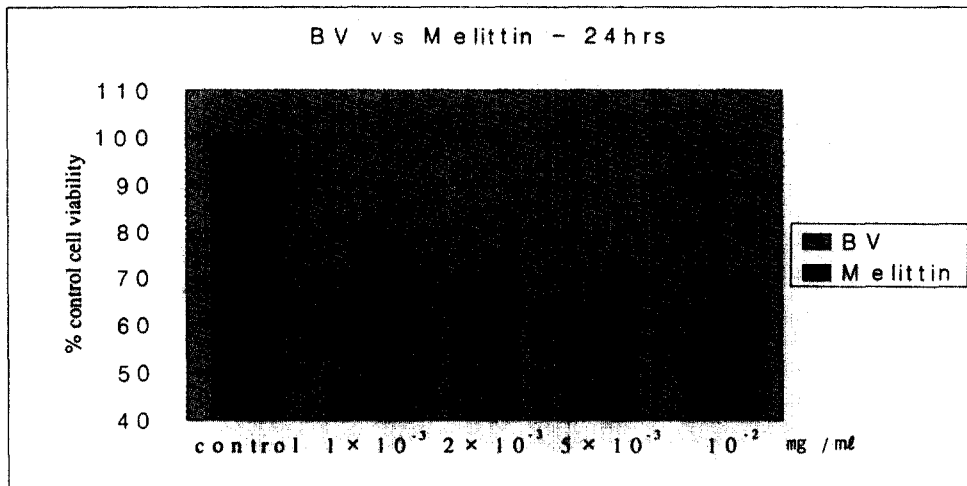


Fig. 7. The effect of bee venom quantity on human glioma cell viability in 24 hour MTT assay.

* : Statistical significant compared with control group(p<0.05).

: Statistical significant compared with BV vs MCD peptide group(p<0.05).

Control : human glioma cell treated by DMEM liquid add with 10% FBS

BV : treatment of crude bee venom infusion solution, Sigma(USA)

MCD peptide : treatment of Mast Cell Degranulating peptide infusion solution, Sigma(USA)

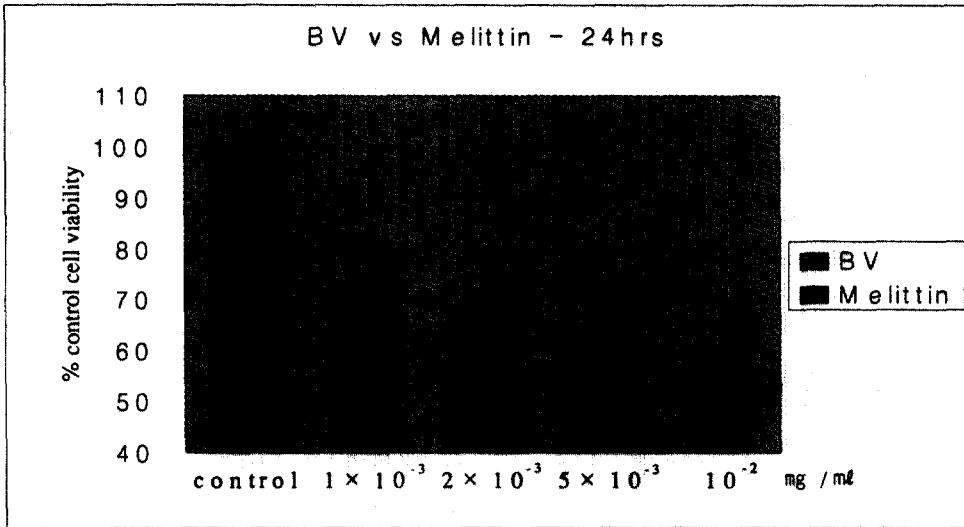


Fig. 8. The effect of bee venom quantity on human mast cell viability in 24 hour MTT assay.

Control : non-treated group

Crude bee venom(BV) : treatment of crude bee venom infusion solution

Melittin : treatment of melittin infusion solution

* : Statistical significance compared with control group(P<0.05)

: Statistical significance compared with BV vs melittin group (P<0.05)

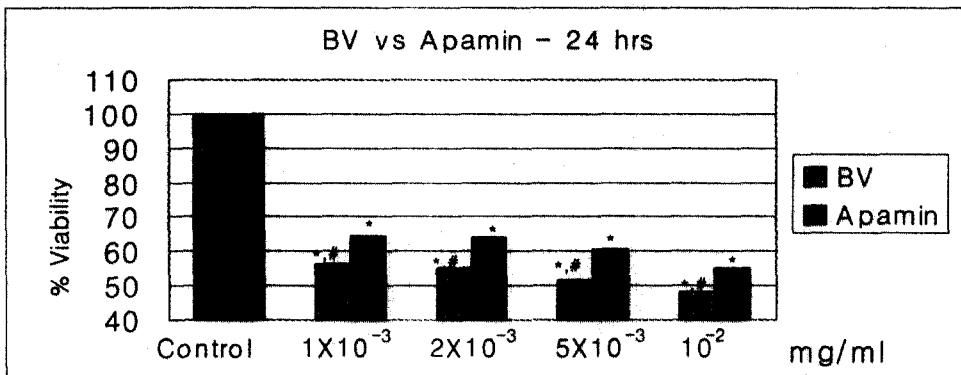


Fig. 9. The effect of bee venom quantity on neuroblastoma cell viability in 24 hours MTT assay.

Control : non-treated group.

BV : treatment of crude bee venom infusion solution.

Apamin : treatment of apamin infusion solution.

* : Statistical significance compared with control group(P<0.05).

: Statistical significance compared with BV vs apamin group(P<0.05).

의 경우 10^{-3} mg/ml에서는 $62.4 \pm 2.4\%$, 10^{-4} mg/ml에서는 $80.5 \pm 3.1\%$, 10^{-5} mg/ml에서는 $92.2 \pm 2.0\%$ 의 細胞活性도를 나타냈으며 모두 對照群에 비하여 유의성($P < 0.05$) 있게 細胞活性이 감소되었다.

한편 crude bee venom과 apamin을 비교한 결과 10^{-3} mg/ml과 10^{-4} mg/ml에서 crude bee venom이 apamin보다 細胞活性을 유의성($P < 0.05$) 있게 억제하였다(Fig. 6).

2. 用量-時間別 細胞毒性에 미치는 影響

1) 24時間 培養

Human glioma cell line에 10^{-3} mg/ml의 蜂藥鹼液을 1×10^{-3} mg/ml, 2×10^{-3} mg/ml, 5×10^{-3} mg/ml, 10^{-2} mg/ml로 만들어 1 1씩 24시간 처치한 결과 crude bee venom은 1×10^{-3} mg/ml에서는 $71.1 \pm 2.8\%$, 2×10^{-3} mg/ml에서는 $69.2 \pm 2.1\%$, 5×10^{-3} mg/ml에서는 $64.5 \pm 2.4\%$, 10^{-2} mg/ml에서는 $58.9 \pm 2.0\%$ 로 세포활성도가 감소하였으며 모두 대조군에 비하여 유의성($P < 0.05$)이 있었다. MCD peptide의 경우 1×10^{-3} mg/ml에서는 $81.9 \pm 3.0\%$, 2×10^{-3} mg/ml에서는 $78.5 \pm 2.7\%$, 5×10^{-3} mg/ml에서는 $75.8 \pm 2.3\%$, 10^{-2} mg/ml에서는 $70.2 \pm 2.5\%$ 로 세포활성도가 감소하였으며 모두 대조군에 비하여 유의성($P < 0.05$)이 있었다. 한편 crude bee venom과 MCD peptide를 비교한 결과 1×10^{-3} mg/ml, 2×10^{-3} mg/ml, 5×10^{-3} mg/ml, 10^{-2} mg/ml에서 모두 crude bee venom이 MCD peptide보다 세포활성을 유의성($P < 0.05$)있게 억제하였다(Fig. 7).

Human mast cell line에 10^{-3} mg/ml의 蜂毒을 1×10^{-3} mg/ml, 2×10^{-3} mg/ml, 5×10^{-3} mg/ml, 10^{-2} mg/ml로 만들어 1 1씩 24시간 처치한 결과, crude bee venom은 1×10^{-3} mg/ml에서는 $70.7 \pm 2.5\%$, 2×10^{-3} mg/ml에서는 $68.4 \pm 3.1\%$, 5×10^{-3} mg/ml에서는 $64.5 \pm 2.9\%$, 10^{-2} mg/ml에서는 $59.0 \pm 2.3\%$ 의 세포활성도를 나타내었으며, 모두 대조군에 비하여

유의성($P < 0.05$)이 있었다. Melittin의 경우 1×10^{-3} mg/ml에서는 $79.1 \pm 1.7\%$, 2×10^{-3} mg/ml에서는 $76.0 \pm 2.5\%$, 5×10^{-3} mg/ml에서는 $73.4 \pm 3.2\%$, 10^{-2} mg/ml에서는 $69.8 \pm 2.3\%$ 의 세포활성도를 나타내었으며, 모두 대조군에 비하여 유의성($P < 0.05$)이 있었다. 한편 crude bee venom과 melittin을 비교한 결과 1×10^{-3} mg/ml, 2×10^{-3} mg/ml, 5×10^{-3} mg/ml, 10^{-2} mg/ml에서 모두 crude bee venom이 melittin 보다 세포활성을 유의성($P < 0.05$)있게 억제하였다(Fig. 8).

Neuroblastoma cell line에 10^{-3} mg/ml의 蜂毒을 1×10^{-3} mg/ml, 2×10^{-3} mg/ml, 5×10^{-3} mg/ml, 10^{-2} mg/ml로 만들어 1 1씩 24시간 처치한 결과 crude bee venom은 1×10^{-3} mg/ml에서는 $56.1 \pm 3.0\%$, 2×10^{-3} mg/ml에서는 $55.0 \pm 2.9\%$, 5×10^{-3} mg/ml에서는 $51.6 \pm 2.1\%$, 10^{-2} mg/ml에서는 $48.2 \pm 2.5\%$ 로 細胞活性도가 감소하였으며 모두 對照群에 비하여 유의성($P < 0.05$)이 있었다.

Apamin의 경우 1×10^{-3} mg/ml에서는 $64.5 \pm 2.2\%$, 2×10^{-3} mg/ml에서는 $63.8 \pm 2.1\%$, 5×10^{-3} mg/ml에서는 $60.5 \pm 3.0\%$, 10^{-2} mg/ml에서는 $55.2 \pm 2.8\%$ 로 細胞活性도가 감소하였으며 모두 對照群에 비하여 유의성($P < 0.05$)이었다. 한편 crude bee venom과 apamin을 비교한 결과 1×10^{-3} mg/ml, 2×10^{-3} mg/ml, 5×10^{-3} mg/ml, 10^{-2} mg/ml에서 모두 crude bee venom이 apamin보다 細胞活性을 유의성($P < 0.05$)있게 억제하였다(Fig. 9).

2) 48時間 培養

Human glioma cell line에 10^{-3} mg/ml의 蜂藥鹼液을 성분별로 1×10^{-3} mg/ml, 2×10^{-3} mg/ml, 5×10^{-3} mg/ml, 10^{-2} mg/ml로 만들어 1 1씩 48시간 처치한 결과 crude bee venom은 1×10^{-3} mg/ml에서는 약 $54.6 \pm 3.2\%$, 2×10^{-3} mg/ml에서는 $53.1 \pm 2.7\%$, 5×10^{-3} mg/ml에서는 $51.4 \pm 2.8\%$, 10^{-2} mg/ml에서는

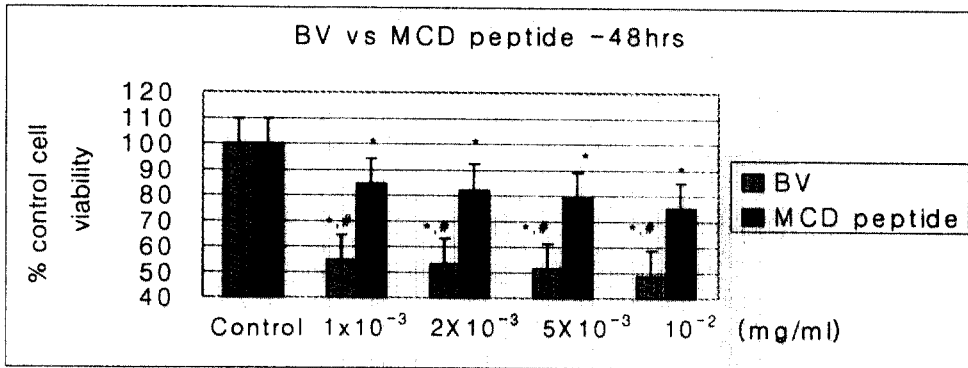


Fig. 10. The effect of bee venom quantity on human glioma cell viability in 48 hour MTT assay.

* ; Statistical significant compared with control group(p<0.05).

; Statistical significant compared with BV vs MCD peptide group(p<0.05).

Control : human glioma cell treated by DMEM liquid add with 10% FBS

BV : treatment of crude bee venom infusion solution, Sigma(USA)

MCD peptide : treatment of Mast Cell Degranulating peptide infusion solution, Sigma(USA)

48.7±2.3%로 세포활성도가 감소하였으며 모두 대조군에 비하여 유의성(P<0.05)이 있었다. MCD peptide의 경우 1×10⁻³mg/ml에서는 84.3±2.9%, 2×10⁻³mg/ml에서는 82.1±2.7%, 5×10⁻³mg/ml에서는 79.1±1.9%, 10⁻²mg/ml에서는 74.9±2.5%로 세포 활성도가 감소하였으며 모두 대조군에 비하여 유의성(P<0.05)이 있었다. 한편 crude bee venom과 MCD peptide를 비교한 결과 1×10⁻³mg/ml, 2×10⁻³mg/ml, 5×10⁻³mg/ml, 10⁻²mg/ml에서 모두 crude bee venom이 MCD peptide보다 세포활성을 유의성(P<0.05)있게 억제하였다(Fig. 10).

Human mast cell line에 10⁻³mg/ml의 蜂毒을 1×10⁻³mg/ml, 2×10⁻³mg/ml, 5×10⁻³mg/ml, 10⁻²mg/ml로 만들어 1시간 48시간 처치한 결과, crude bee venom은 1×10⁻³mg/ml에서는 54.0±2.5%, 2×10⁻³mg/ml에서는 53.4±2.7%, 5×10⁻³mg/ml에서는 51.6±3.2%, 10⁻²mg/ml에서는 48.0±2.9%의 세포 활성도를 나타내었으며, 모두 대조군에 비하여 유의성(P<0.05)이 있었다. Melittin의 경우 1×10⁻³mg/

ml에서는 73.5±3.0%, 2×10⁻³mg/ml에서는 70.8±1.9%, 5×10⁻³mg/ml에서는 66.9±2.1%, 10⁻²mg/ml에서는 60.7±3.2%의 세포활성도를 나타내었으며, 모두 대조군에 비하여 유의성(P<0.05)이 있었다. 한편 crude bee venom과 melittin을 비교한 결과 1×10⁻³mg/ml, 2×10⁻³mg/ml, 5×10⁻³mg/ml, 10⁻²mg/ml에서 모두 crude bee venom이 melittin보다 세포활성을 유의성(P<0.05)있게 억제하였다(Fig. 11).

Neuroblastoma cell line에 10⁻³mg/ml의 蜂毒을 성분별로 1×10⁻³mg/ml, 2×10⁻³mg/ml, 5×10⁻³mg/ml, 10⁻²mg/ml로 만들어 1시간 48시간 처치한 결과 crude bee venom은 1×10⁻³mg/ml에서는 약 53.2±2.9%, 2×10⁻³mg/ml에서는 51.0±2.5%, 5×10⁻³mg/ml에서는 47.2±3.0%, 10⁻³mg/ml에서는 45.1±2.5%로 細胞活性도가 감소하였으며 모두 對照群에 비하여 유의성(P<0.05)이 있었다. Apamin의 경우 1×10⁻³mg/ml에서는 60.1±3.2%, 2×10⁻³mg/ml에서는 57.1±1.7%, 5×10⁻³mg/ml에서는 54.0

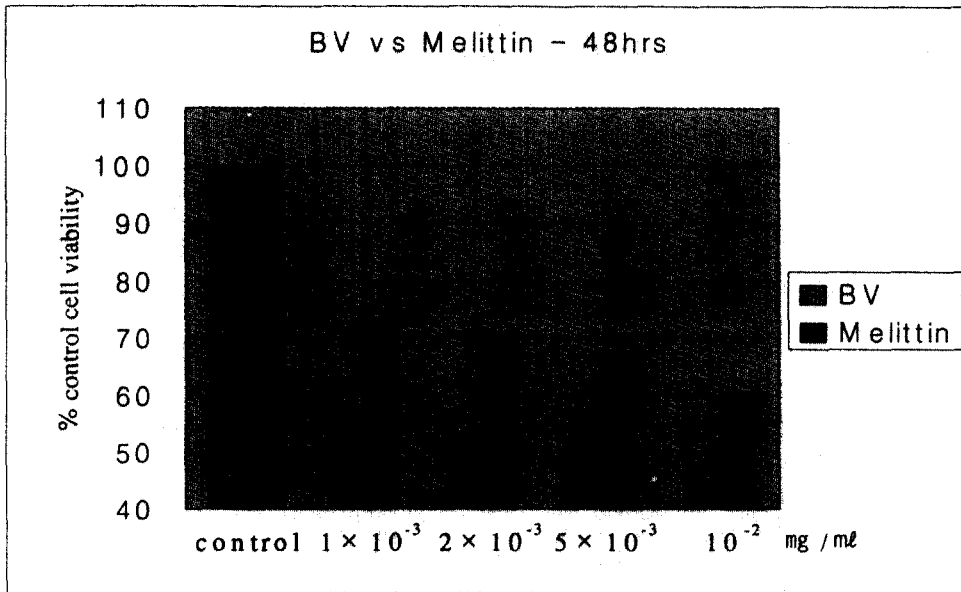


Fig. 11. The effect of bee venom quantity on human mast cell viability in 48 hour MTT assay. control : non-treated group

Crude bee venom(BV) : treatment of crude bee venom infusion solution

Melittin : treatment of melittin infusion solution

* : Statistical significance compared with control group(P<0.05)

: Statistical significance compared with BV vs melittin group (P<0.05)

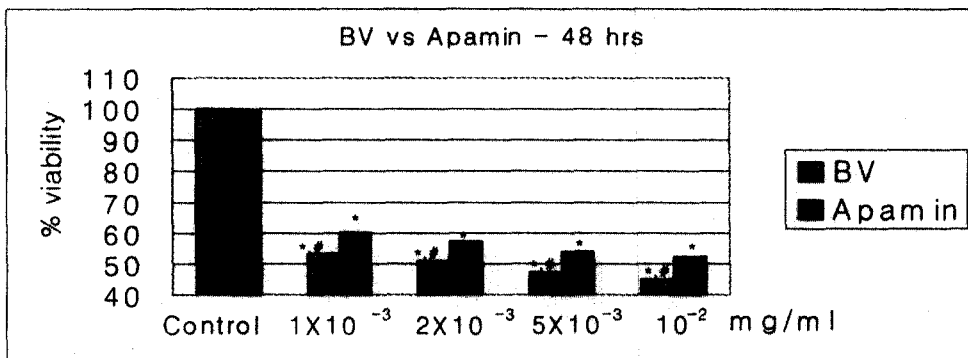


Fig. 12. The effect of bee venom quantity on neuroblastoma cell viability in 48 hours MTT assay.

Control : Non-treated group.

BV : treatment of crude bee venom infusion solution.

Apamin : treatment of apamin infusion solution.

* : Statistical significance compared with control group(P<0.05).

: Statistical significance compared with BV vs apamin group(P<0.05).

$\pm 2.9\%$, 10^{-3}mg/ml 에서는 $52.3 \pm 3.5\%$ 로 細胞活性度가 감소하였으며 모두 對照群에 비하여 유의성($P < 0.05$)이 있었다.

한편 crude bee venom과 apamin을 비교한 결과 $1 \times 10^{-3}\text{mg/ml}$, $2 \times 10^{-3}\text{mg/ml}$, $5 \times 10^{-3}\text{mg/ml}$, 10^{-2}mg/ml 에서 모두 crude bee venom이 apamin보다 細胞活性를 유의성($P < 0.05$) 있게 억제하였다(Fig. 12).

IV. 考 察

蜂毒藥鍼療法이란 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 抽出, 加功하여 疾病과 有關한 部位나 壓痛點 및 穴位에 注入함으로써 刺鍼效果와 더불어 蜂毒의 生化學的 特異物質이 人體에 미치는 藥理作用을 동시에 이용하여 生體의 機能을 調整하고 氣血을 疏通시켜 病理狀態를 개선시켜 疾病을 治療하고 豫防하는 新鍼療法の 일종이다^{2)~6), 23)}.

蜂藥鍼液의 採取가 어려웠던 과거에는 벌의 침을 뽑아서 取穴하는 拔鍼法과 벌을 穴位에 놓아 刺戟하는 直鍼法이 활용되었으나, 최근에는 電氣抽出法이나 電磁波刺戟法으로 蜂藥鍼液을 抽出, 加功하여 건조한 蜂藥鍼液(freeze-dried venom)을 注射用 ample, 軟膏 등으로 만들어 臨床 및 研究用으로 이용하고 있다^{2), 23)}.

蜂藥鍼液은 꿀벌의 毒囊에 들어있는 約 40여 가지의 成分으로 構成된 物質로 蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고, 臨床에서는 鎮痛, 解熱, 消炎, 鎮痙, 免疫 增強 및 抗癌效果 등의 效能이 있는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 이의 적용증으로는 筋肉痛, 急慢性關節炎, 神經痛, 痛風, 化膿性 疾患, 高血壓, 류마티스성 關節炎, 皮膚病, 頭痛, 腰痛, 坐骨神經痛, 打

撲傷, 痛風, 氣管支喘息, 過敏性鼻炎, 結節性 紅斑, 蕁麻疹, 甲狀腺機能亢進 등이 있다^{2), 24-6)}.

蜂藥鍼液은 無色 透明하며 粘性이 있는 液體로 강한 쓴맛이 나는 芳香性 물질이며, 건조 상태에서는 灰白色 또는 黃白色의 塊狀이거나 粉末狀이다. 蜂藥鍼液의 比重은 1.13이며 酸度(pH)는 5.2~5.5 범위이다. 이것은 쉽게 물과 산에 용해되지만 알코올에는 거의 용해되지 않는다. 봉약침액은 상온에서 공기에 노출되면 재빨리 마르고 액 중량의 70%를 손실한다. 蜂藥鍼液은 냉동 상태에서 장기간 活性를 유지할 수 있다. 그러나 蜂藥鍼液은 酸化性 물질에 의해서 쉽게 파괴되는 경향이 있다^{2), 27)}.

봉약침액은 약 40가지 정도의 enzyme, peptide components, non peptide components로 구성되어 있으며²⁸⁾, 이중 enzyme의 주요성분으로는 phospholipase a2와 hyaluronidase 등이 있는데 이들은 강력한 항원이 될 수 있는 고분자 효소이다²⁹⁾. peptide components는 freeze-dried venom의 약 50%를 구성하고 있으며, 주요성분으로는 melittin, apamin, MCD peptide를 들 수 있는데^{30)~31)}, 그 중에서 가장 많이 분포하는 melittin은 freeze-dried venom의 40~50%를 구성하고 있으며 크게 溶血作用, 酵素作用 및 抗炎作用을 한다. apamin은 神經系에 작용하며 筋肉痙攣을 유발하거나 過量 注入 때에는 呼吸不全으로 死亡하게 된다²⁹⁾. MCD peptide는 mast cell의 용해와 histamine의 확산을 증가시켜 喘息, 發熱 등의 allergy 유발에 관여한다³²⁾. non peptides components의 주요 성분으로는 histamine, dopamone, noradrenaline 등이 있는데, hitamine은 副交感神經 興奮劑인 acetylcholine과 유사한 작용을 한다. 즉 平滑筋과 氣管支 및 胃腸管을 收縮시키고 毛細血管을 확장시켜 血壓降下를 초래하며, 체내의 histamine 수용체와 결합하여 allergy를 유발한다고 믿어진다³⁰⁾.

蜂藥鍼液이 抗癌效果에 미치는 영향에 대하여 연

구된 결과가 있으나²¹⁾⁻²²⁾ 아직 蜂藥鍼液의 성분별로 어느 성분의 蜂藥鍼液이 어떤 세포 독성을 갖고 있는지에 대한 연구는 매우 적은 실정이다. 따라서 봉약침액 중 crude bee venom과 MCD peptide, apamin, melittin을 선택하여 각 細胞株에 처치한 후 MTT 반응실험을 시행하여 세포활성도의 변화를 연구하였다.

본 실험을 통하여 24시간 및 48시간의 蜂藥鍼液 처치에서 각 세포주에서 crude bee venom 뿐만 아니라 MCD peptide, apamin, melittin에서도 용량 의존적으로 細胞活性 減少의 효과가 있었으며 그 효과는 crude bee venom이 MCD peptide, apamin, melittin보다 더 있는 것으로 나타났다. 이는 蜂藥鍼液이 crude bee venom 뿐만 아니라 MCD peptide, apamin, melittin에서도 각 細胞株에 細胞活性 抑制의 효과가 있음을 確認시켜 주는 것이다. 여기서 crude bee venom이 MCD peptide, apamin, melittin보다 더 효과가 큰 이유로는 crude bee venom에는 MCD peptide, melittin, apamin 등 細胞活性度 抑制와 관련된 成分이 많이 함유되어 있기 때문에 단일 성분보다 복합성분인 crude bee venom에서 上升효과가 나타난 것으로 생각된다. 向後 抗癌作用 및 正常細胞에 미치는 影響과, 適切한 濃度 및 用量을 알아내는 追加의인 實驗 및 研究가 必要할 것으로 생각된다.

V. 結 論

蜂藥鍼液의 細胞活性 抑制 效果를 살펴 보기 위하여 crude bee venom과 MCD peptide, apamin, melittin을 선택하여 각 細胞株에 처치한 後, MTT 反應實驗을 施行하여 細胞活性度의 變化를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Human glioma cell line과 neuroblastoma, human mast cell line에 24시간 및 48시간의 蜂藥鍼液 處置에서 crude bee venom과 MCD peptide, melittin, apamin 藥鍼液이 濃度 依存的으로 細胞活性을 유의성있게 억제하였다.

2. Human glioma cell line과 neuroblastoma, human mast cell line에 24시간 및 48시간의 蜂藥鍼液 處置에서 crude bee venom과 MCD peptide, melittin, apamin 藥鍼液이 用量 依存的으로 細胞活性을 유의성있게 억제하였다.

3. Human glioma cell line과 neuroblastoma, human mast cell line의 蜂藥鍼液 처치에서 crude bee venom 藥鍼液이 MCD peptide, melittin, apamin 藥鍼液보다 세포활성을 유의성있게 억제하였다.

본 연구에서는 蜂毒源液 藥鍼液과 成分別 蜂藥鍼液에서 濃度 및 用量 依存的으로 각 細胞株의 細胞活性 減少의 효과가 있었으나 向後 最適의 濃度 및 用量에 대한 研究가 더 필요할 것으로 생각된다.

VI. 參考文獻

1. 인창식, 고흥균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록. 마왕퇴의서의 봉독요법 2례. 대한침구학회지. 1998;15(1):143-7.
2. 김문호. 봉독요법과 봉침요법. 1. 서울: 한국교육기획. 1992:20-37, 41-2, 57, 70, 72, 110, 133-49, 157, 171-6.
3. 김정언. 기적의 약침요법(1). 1. 서울: 금강출판사. 1987:25, 99-104.
4. 도원석, 장준혁, 김경호, 윤종화, 김갑성. 봉

- 독요법이 흰쥐의 슬관절 염증성 부종에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1995;12(1):211-20.
5. 권기록, 고흥균, 김창환. 봉침에 대한 고찰. 대한침구학회지. 1994;11(1):159-71.
 6. 전국한의과대학 침구경혈학교실. 침구학(상, 하). 2. 서울:집문당. 1994:1015-29, 1457-67.
 7. Deregnaucourt C, Schrevel J. Bee venom phospholipase A2 induces stage-specific growth arrest of the intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* via modifications of human serum components. *J Biol Chem.* 2000; Sep 14.
 8. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(2):228-38.
 9. McHugh SM. et al. Bee Venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from TH-2 to a TH-1 dominant pattern; comparison of rush and conventional immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 1995; 25(9):828-38.
 10. Millward-Sadler SJ, Wright MO, Davies LW, Nuki G, Salter DM. Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 result in altered aggrecan matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9):2091-9.
 11. Yasin B, Pang M, Turner JS, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI, Wagar EA. Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(3):187-94.
 12. Branas P, Jordan R, Fry-Smith A, Burls A, Hyde C. Treatments for fatigue in multiple sclerosis: a rapid and systematic review. *Health Technol Assess.* 2000;4(27):1-61.
 13. Allen DH, Lepple-Wienheus A, Cahalan MD. Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *J Membr Biol.* 1997;155(1):27-34.
 14. Beatty BG, Qi S, Pienkowska M, Herbrick JA, Scheidl T, Zhang ZM, Kola I, Scherer SW, Seth A. Chromosomal localization of phospholipase A2 activating protein, an Ets2 target gene, to 9p21. *Genomics.* 1999;62(3):529-32.
 15. 윤형석, 김용석, 이재동. 통증 관련 봉독 연구에 대한 고찰. 대한약침학회지. 2000; 3(1):156-69.
 16. 都垣錫, 張峻赫, 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(第1): 211-20.
 17. 孔賢淑, 高炯均, 金昌煥. 蜂毒療法이 抗痙攣에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1993; 10(1):159-65.
 18. 李京姬, 金昌煥, 姜成吉, 高炯均. 産地別 蜂毒液藥鍼刺戟이 免疫機能低下에 미치는 影響. 대한침구학회지. 1999;7(4):28-40.
 19. 권기록, 고흥균, 김용석, 박영배, 김창환, 강성길: 봉독약침 자극이 3-MCA 유발 상피종에 대한 항암 및 면역반응에 미치는 영향. 대한침구학회지, 1997;14(2):157-72.
 20. 박찬열, 서정철, 최도영, 안병철: 봉독약침의

- 항암효과에 대한 분자생물학적 연구, 대한약침학회지, 2000;3(1):1-19.
21. 박찬열, 남상수, 김창환, 이재동, 강성길, 이윤호, 안병철. 약침용 봉독액이 흑색종 세포에 미치는 항암 효과에 대한 분자생물학적 연구. 대한침구학회지.
22. 권도희, 이재동, 최도영, 약침용 봉독 성분 중 apamin, melittin의 항암작용. 대한침구학회지. 2001;18(1):129-45.
23. 金賢濟. 最新鍼灸學. 1. 서울:成輔社. 1981: 460-7.
24. 朱文鋒. 實用中醫辭典. 陝西:陝西科學技術出版社. 1992:402.
25. 마중학. 中國醫學療法大典. 山東:山東科學技術出版社. 1991: 216-8.
26. 張縉. 雲南中醫雜誌. 上海:雲南新華印刷社. 1990:39-41. 1990.
27. 고문수. 동의학총서·동물성동약. 서울:여강출판사. 1993:185-90.
28. Habermann E. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In Venomous Animals and their Venoms. Academic Press. 3. 1971:61.
29. Barbara Rudolf. Chemistry and Pharmacology of Honey Bee Venom. Academic Press. 1986:329-402.
30. Assen ES., Atkinson G. Histamine release by MCDP (401), a peptide from the venom of the honey bee, Brit. Pharmacol., 1973:337-8.
31. 이진선, 권기록, 최호영. HPLC를 이용한 봉약침의 주요성분에 관한 연구. 대한침구학회지. 2000;17(4):120-9.
32. Spoerri, PE. Apamin from bee venom. Neurobiology. 1973:207-14.