

원저

## 蜂藥鍼液이 RAW 264.7 세포의 PLA<sub>2</sub> 및 Calcium Concentration에 미치는 影響

尹鍾壹\* · 趙顯徹\*\* · 沈成用\*\*\* · 金基鉉\*

\*경원대학교 한의과대학 침구학교실 · \*\*경원대학교 한의과대학 한방재활의학과교실 · \*\*\*경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

### The Effects of Bee Venom on PLA<sub>2</sub> and Calcium Concentration in RAW 264.7 Cells

Jong-Il Yun\* · Hyun-Chul Jo\*\* · Sung-Yong Sim\*\*\* · Kee-Hyun Kim\*

\*Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Kyung-won University

\*\*Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-won university

\*\*\*Department of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otorhinolaryngology,  
College of Oriental Medicine, Kyung-won University

**Objective :** The purpose of this study was to investigate the effect of Bee Venom on the lipopolysaccharide, sodium nitroprusside and hydrogen peroxide induced expression phospholipase A<sub>2</sub> and calcium concentration in RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line.

**Method :** The expression of phospholipase A<sub>2</sub> was determined by western blotting with corresponding antibodies, and the generation of intracellular calcium concentration was investigated by delta scan system in RAW 264.7 cells.

**Results :**

1. Compared with control, expressions of lipopolysaccharide-induced phospholipase A<sub>2</sub> were decreased significantly by 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of bee venom and decreased by 0.5, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of bee venom.
2. Compared with control, expressions of sodium nitroprusside-induced phospholipase A<sub>2</sub> were decreased significantly by 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of bee venom but increased by 0.5, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of bee venom.
3. Compared with control, expressions of hydrogen peroxide-induced phospholipase A<sub>2</sub> were decreased significantly by 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of bee venom and decreased by 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of bee venom but increased by 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of bee venom.
4. Compared with control, lipopolysaccharide, sodium nitroprusside and hydrogen peroxide- induced intracellular calcium concentrations were decreased by 0.5, 1, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of bee venom and by indomethacin

**Key words :** Bee Venom, PLA<sub>2</sub>, Calcium, RAW 264.7 cell

### 1. 緒 論

蜂藥鍼療法은 살아있는 서양벌(Apis mellifera)중 일벌

의 毒囊에 있는 毒을 인위적으로 추출 가공하여 질병과 有關한 部位 및 經穴에 주입함으로써 자침(刺鍼)의 효과와 蜂毒이 지니고 있는 생리, 생화학적 약리작용을 질병 치료에 이용하는 新鍼療法의 일종이다.<sup>1,2)</sup>

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고 祛風除濕, 止疼痛, 解癥平喘, 消腫降壓하는 효능이 있어<sup>3)</sup> 鎮痛, 消炎,<sup>4-6)</sup> 鎮痙,<sup>7)</sup> 抗癌<sup>10-14)</sup> 免疫增強<sup>15-18)</sup> 作用을 나타내고 있다.

※ 교신저자 : 김기현, 서울시 송파구 송파동 20-8  
경원대부속한방병원 침구과  
(Tel. 02-425-3456 keehyun1@hanafos.com)

최근 蜂藥鍼을 이용한 임상적 연구로서 膝關節炎<sup>19,20</sup>, 류마티스 관절염<sup>21</sup>에 유효함이 보고 되었다.

실험적 연구로서 蜂藥鍼液의 細胞毒性<sup>22,23</sup>에 관한 연구가 보고되었고, 콜라겐유도 關節炎<sup>24</sup>, 實驗的 急慢性 關節炎<sup>25</sup>, 關節炎 滑液細胞<sup>26</sup>, 류머티스 關節炎 滑液細胞<sup>27</sup> 등에 미치는 영향이 보고되었으나, 蜂藥鍼液에 의해 유도된 항염증 효과의 기전에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 연구자는 蜂藥鍼液의 항염증 효과에 대해 연구하기 위하여 RAW 264.7 cell에 lipopoly- saccharide(LPS), sodium nitroprusside(SNP), hy- drogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 염증을 유도하고, 蜂藥鍼液을 처리하여 炎症指標인 Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)의 생성과 intracellular calcium concentration에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### 1) 시약

PLA<sub>2</sub> anti-bodies (Santa Cruz Biotechnology, USA), PGE<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>(Cayman Chemical社, USA), AA(Chrono-Log Co., USA), <sup>3</sup>[H] AA(NEN Life Science Products, USA), LPS 1 μg/μl, SNP 200 μm, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μm 등이다. 기타 細胞培養과 western blotting 試藥 등은 연구용에 적합한 것들을 사용하였다.

#### 2) 시료

乾燥 粉末 蜂毒[乳蜜蜂毒(干), 韓國]을 蒸溜水에 희석하여 사용하였다.

#### 3) 기기

Liquid scintillation counter(model LS 3801, USA), Image analyser (Mitsubishi electric Co., Japan), FACS calibur flow cytometer(Becton Dickinson, NJ), Delta Scan System(Photon technology international; Princeton, NJ, USA) 등이다.

## 2. 방법

### 1) 시료 조제

粉末 蜂毒을 3차례 증류수로 희석하여 0.5, 1 및 5 μg/ml 농도로 나누어 蜂藥鍼液으로 사용하였다.

### 2) 세포주 배양

Murine macrophage RAW 264.7 cell은 10% FBS(fetal bovine serum), 4 mM L-glutamine 과 100 μg/ml streptomycin, penicillin이 포함된 DMEM(dulbecco's modified eagle's medium)배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양했다.

### 3) 군 분류

#### (1) 정상군(Normal group)

정상군은 RAW 264.7 cell에 아무 처리도 하지 않았다.

#### (2) 대조군(Control group)

대조군은 RAW 264.7 cell에 각각 LPS 1 μg/ml, SNP 200 μM 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μM를 처리하였다.

#### (3) 실험군(Treatment group)

실험군은 RAW 264.7 cell에 蜂藥鍼液 5 μg/ml를 처리하고, LPS 1 μg/ml, SNP 200 μM 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μM에 각각 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 μg/ml를 처리하였다.

#### 4) 蜂藥鍼液이 LPS, SNP와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 PLA<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향

Western blotting을 이용하여 發色 정도를 분석하고, 현상한 film의 구획을 정한 후 光學濃度計를 이용하여 相對濃度를 각각 측정 비교하였다.

#### (1) 시료 준비

100mm dish에 1×10<sup>6</sup>으로 세포를 깔고 24시간 뒤 scraper로 잘 긁어서 세포를 모은 뒤 800rpm에서 원심 분리하였다. 위 상층액은 버리고 cold PBS로 세척한 뒤 蜂藥鍼液의 양에 따라 50 μ에서 100 μ까지 lysis buffer[tris Hcl(ph 8.0) 50 mM, Nacl 150 mM, sodium azide

0.02%, SDS 0.2%, igapel 630(or NP 40) 1%, NaF 100 mM(0.5%), PMSF 1mM, sodium deoxycolate 0.5%, aprotinin 50 µg/ml, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.1 mM]를 넣고 4°C를 유지하여 3시간에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이때 반응하는 초기 한 시간 동안 10분마다 꺼내서 외륜시켰다. 용해가 끝나면 4°C, 14000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 모아 bio rad protein assay 방법으로 단백질을 정량하여 동량으로 나누어 전기영동하였다.

(2) 전기영동

겔을 만들 유리판을 EtOH로 세척하고 유리판을 고정 한 후 원하는 농도에 따라 분리 겔을 제조하여 주입하였다. 4 ml씩 주입하여 윗부분 2cm 지점까지만 주입하고, 주입 후 표면을 고르게 하기 위해 isopropanol 몇 방울을 떨어뜨렸다. 약 40분 정도 분리 겔을 건조한 후 isopropanol을 버리고 D.W.로 세척하고 유리판 사이의 물기를 3M paper로 제거하였다. 퇴적 겔을 제조한 다음 유리판 윗부분에 주입하고 빛을 쬐는데, 퇴적 겔은 굳 으면서 부피가 줄어들기 때문에 충분히 넘칠 듯이 부었다. 30분 후 퇴적 겔이 건조되면 빛을 빼고 D.W.로 세척한 후 유리판 그대로 조립하였다. 조립한 유리판을 chamber에 장착하고 running buffer(10×stock: tris base 30.3g, glycine 144g, SDS 10g)를 부었다. Well에 있는 찌꺼기를 주사기로 제거한 후 protein marker(bio-rad prestained SDS-page standards, high range 161-0309) 5-10 µl, protein양이 약 30-50 µg정도 되는 sample 10-20 µl를 장착하고, 띠가 낮은 volt에서 정교하게 전개되도록 40-50 volt로 약 30분 동안 가동하였다. Stacking gel의 전개가 끝나면 80~100 volt로 약 2시간 30분 정도 분리 겔을 전개시켰다.

(3) 전이

겔 크기의 nitrocellulose membrane 1장, 3M paper 2장을 준비한 후 tray에 ㉔PBS, ㉕transfer buffer(tris base 3.03g, glycine 14.63g, methanol 200 ml ) ㉖staining solution(coomassie blue staining solution)을 준비하였다. Membrane은 미리 물에 적셔놓고 ㉔에 3M paper와 겔, ㉕에 membrane, ㉖에 겔을 넣고 30분 동안 흔든 후 ㉔의 3M paper와 gel을 ㉕로 옮기고, transfer sandwich를 조립하였다. Chamber에 sandwich를 끼우고 얼음 통을 넣고 transfer buffer를 붓는데, black panel은 음극, white panel은 양극으로 하였고, 실온에서 80 volt 로 1시간 30분간 전이시켰다.

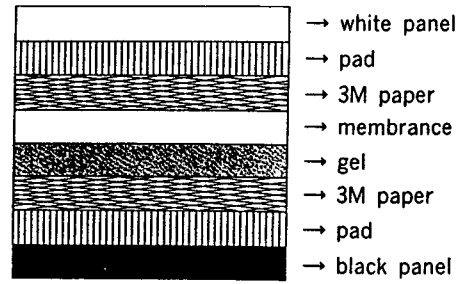


Fig. 1. Transfer Sandwich in Westen Blotting.

(4) 차단

전이된 membrane을 TBS-T 용액(0.05% tween -20, 150 mM NaCl, 10 mM tris pH8.0)으로 세척한 후 약간 물기를 제거하고 TBS-T 용액 속에서 5% skin milk로 약 2시간 동안 遮斷하였고 TBS-T 용액으로 여러 번 세척하였다.

(5) 일차항체에서의 배양

TBS-T 용액 속에서 3% skin milk에 희석된 일차항체(COX-2 goat polyclonal IgG, santa cruz biotechnology) 용액을 만들고 차단된 membrane을 일차항체에서 3시간 동안 흔들고 TBS-T 용액으로 5분씩 3번 세척하였다.

(6) 이차항체에서의 배양

TBS-T 용액 속에서 3% skin milk에 희석된 이차항체 용액을 만들고 차단된 membrane을 이차항체에서 1시간 동안 흔든 후, TBS-T 용액으로 5분씩 3번 세척하였다.

(7) 현상

Developer(kodak), fixer(kodak), ECL detection reagent(amersham pharmacia biotechnology), ECL film, poly glove, cassette, blue tip, 1 ml pipet, ECL 반응 tube, tissue, clean wrap, membrane, membrane 놓을 판, timer, 집개 등을 준비하고 편평한 판에 미리 랩을 씌워 놓고, membrane의 물기를 제거하여 판 위에 올린 후, ECL 용액 1, 2를 1 : 1 비율로 섞어 membrane에 뿌리고 골고루 용액을 묻힌 다음 1분간 반응시켰다. 약 1분 후 ECL 용액을 충분히 제거하고 그 위에 랩을 씌웠다. Film을 cassette에 올려 놓고 membrane 판을 5분에서 10분 정도 film에 찍었다. Developer는 검은 띠가 확실해지면 건지

고 fixer에 오래 동안 담근 후 흔들어 주고 흐르는 물로 씻어 말렸다.

(8) 겔 건조

겔을 착색용액으로 약 30분간 착색하고 탈색용액(30% methanol, 10% acetic acid)으로 충분히 탈색하였다. 겔의 물기를 조금 제거하고 3M paper에 겔을 놓은 다음 glycerol을 겔 위에 골고루 펴 발랐다. OHP film을 덮고 80°C에서 4시간 이상 건조하였다.

(9) 광학농도계 측정

현상한 film에 구획을 정하고 광학농도계(densitometer)를 이용하여 相對 濃度(relative density)를 각각 측정 비교하였다.

5) 蜂藥鍼液이 Calcium Concentration에 미치는 영향.

Raw 264.7 cell은 fura-2AM을 dye로 이용하여 측정하였다. 각각의 inhibitor도 fura-2AM 처리시에 같이 넣어 준다. 이 실험에는 Delat Scan System을 사용하였으며 이 기기는 340nm와 380nm에서 측정하여 이 두가지 value의 비율, 즉 Ratio=[F340/F380]로 실험결과를 나타낸다. 이때, 340nm는 fura-2AM과 calcium의 binding된 것의 value이며 380nm fura-2AM만의 value를 나타낸다.

6) 통계 처리

모든 실험값은 평균값±표준편차로 하였고, 통계학적 분석은 sigma state(SPSS, USA) program을 이용하였다. 통계학적 유의성은 ANOVA test 후 대조군과 실험군의 비교는 bonferroni t-test에 의해 P < 0.05인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 蜂藥鍼液이 LPS로 유도된 PLA<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 AA 생성을 촉진시키는 酵素인 PLA<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS 1 μg/μl의 자극에 대해 蜂藥鍼液 5 μg/ml 처리군 및 PLA<sub>2</sub>+蜂藥鍼液 0.5, 1,

5 μg/ml 처리군에서 대조군에 비해 PLA<sub>2</sub> 발현이 모두 감소하였고, 蜂藥鍼液 1 μg/ml 처리군에서 유의하게 (P<0.05) 감소하였다(Fig. 2, Tab. I).

Table 1. Relative Density of PLA<sub>2</sub> Expression in LPS with Bee Venom Group

Group (μg/μl)	Density(%)of PLA <sub>2</sub>
Normal	22.50±10.06
Control	106.75±16.38
Bee Venom 5	57.50±19.27
LPS 1 + Bee Venom 0.5	61.50±11.41
LPS 1 + Bee Venom 1	48.25±10.21*
LPS 1 + Bee Venom 5	99.00±22.64

RAW 264.7 cells were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated, Control was treated with 1(μg/μl) LPS. The values are the means±S.D. of three experiments with triplicate of each experiments. \*P<0.05 Statistical Significance Compared with Control

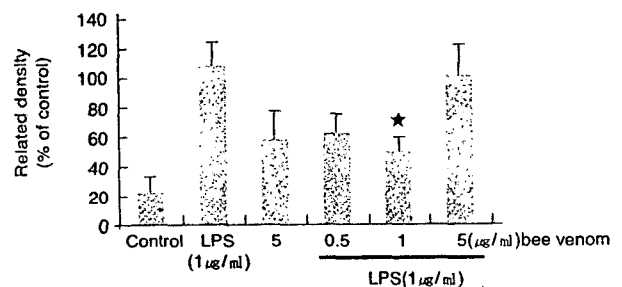


Fig. 2. The Effect of Each Bee Venoms on LPS-Induced Expression of PLA<sub>2</sub> in Cultured RAW 264.7 Cells. \*P<0.05 Statistical Significance Compared with Control

2. 蜂藥鍼液이 SNP로 유도된 PLA<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 AA 생성을 촉진시키는 酵素인 PLA<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, SNP 200 μM의 자극에 대해 蜂藥鍼液 5 μg/ml 처리군과 SNP+蜂藥鍼液 0.5, 1 μg/ml 처리군에서 대조군에 비해 PLA<sub>2</sub> 발현이 증가하였고, SNP+蜂藥鍼液 5 μg/ml 처리군에서는 유의하게 (P<0.05) 감소하였다(Fig. 3, Tab. II).

Table 2. Relative Density of PLA<sub>2</sub> Expression in SNP with BV Group

Group ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Density(%)of PLA <sub>2</sub>
Normal	22.50±10.06
Control	93.50±12.34
Bee Venom 5	104.75±13.08
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 0.5	112.75±16.62
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 1	110.25±24.49
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 5	52.50±12.30*

RAW 264.7 cells were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 200 $\mu\text{M}$  SNP. The values are the means  $\pm$  S.D. of three experiments with triplicate of each experiments. \*P<0.05 Statistical Significance Compared with Control

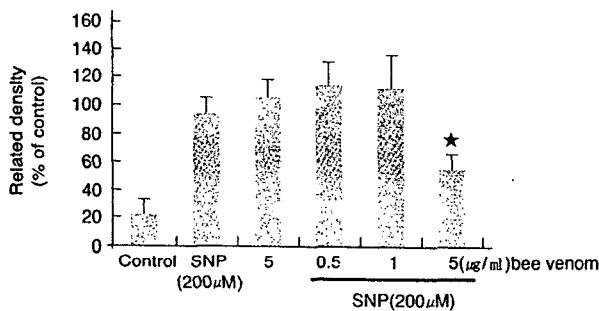


Fig. 3. The Effect of Each Bee Venoms on SNP-Induced Expression of PLA<sub>2</sub> in Cultured RAW 264.7 Cells. \*P<0.05 Statistical Significance Compared with Control

### 3. 蜂藥鍼液이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 PLA<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 AA 생성을 촉진시키는 효소인 PLA<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 $\mu\text{M}$ 의 자극에 대해 蜂藥鍼液 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서는 대조군에 비해 PLA<sub>2</sub> 발현이 유의하게(P<0.05) 감소하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 蜂藥鍼液 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서는 대조군에 비해 PLA<sub>2</sub> 발현이 감소하였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 蜂藥鍼液 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서는 대조군에 비해 PLA<sub>2</sub> 발현이 유의하게(P<0.05) 감소하였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 蜂藥鍼液 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서는 대조군에 비해 PLA<sub>2</sub> 발현이 증가하였다. (Fig. 4, Tab. III).

Table 3. Relative Density of PLA<sub>2</sub> Expression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with BV Group

Group ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Density(%)of PLA <sub>2</sub>
Normal	22.50±10.06
Control	104.75±12.21
Bee Venom 5	55.50±19.78*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 0.5	73.00±11.34
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 1	54.00±13.38*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 5	105.00±24.77

RAW 264.7 cells were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The values are the means  $\pm$  S.D. of three experiments with triplicate of each experiments. \*P<0.05 Statistical Significance Compared with Control.

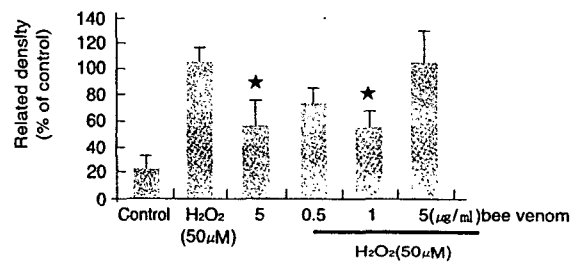


Fig. 4. The Effect of Each Bee Venoms on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Expression of PLA<sub>2</sub> in Cultured RAW 264.7 Cells. \*P<0.05 Statistical Significance Compared with Control.

### 4. 蜂藥鍼液이 LPS 투여시 Calcium Concentration에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 AA 생성을 촉진시키는 효소인 PLA<sub>2</sub> 생성의 매개 물질인 Calcium Concentration에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS의 자극에 대해 LPS+蜂藥鍼液 0.5, 1, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군 및 LPS+ Indomethacin 처리군에서 모두 대조군에 비해 calcium concentration이 감소하였다(Fig. 5, Tab. IV).

Table 4. Calcium concentration on LPS-induced Raw Cell with Bee Venom and Indomethacin

Group ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Calcium Concentration(nM)
Normal	147.34 $\pm$ 13.96
Control	292.98 $\pm$ 38.49
LPS 1 + Bee Venom 0.5	282.17 $\pm$ 4.55
LPS 1 + Bee Venom 1	220.57 $\pm$ 5.73
LPS 1 + Bee Venom 5	234.74 $\pm$ 8.55
LPS 1 + Indomethacin	229.53 $\pm$ 5.72

RAW 264.7 cells were cultured as described in the method and materials. The values are the means  $\pm$  S.D. of three experiments with triplicate of each experiments.

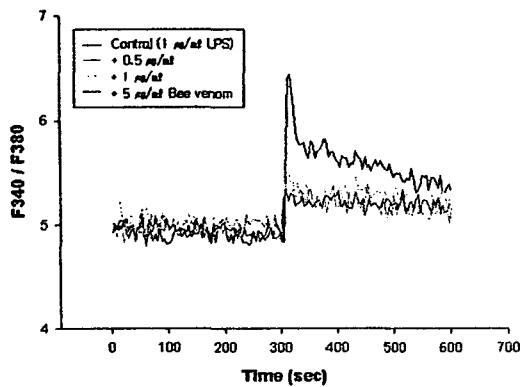


Fig. 5. The Ratio of F340(Binding with Calcium) and F380 on LPS-Induced Raw Cell

5. 蜂藥鍼液이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 투여시 Calcium concentration에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 AA 생성을 촉진시키는 酵素인 PLA<sub>2</sub> 생성의 매개 물질인 Calcium concentration에 미치는 영향을 관찰한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 자극에 대해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+蜂藥鍼液 0.5, 1, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Indomethacin 처리군에서 모두 대조군에 비해 calcium concentration이 감소하였다(Fig. 6, Tab. V).

Table 5. Calcium concentration on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Raw Cell with Bee Venom and Indomethacin

Group ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Calcium Concentration(nM)
Normal	122.57 $\pm$ 14.73
Control	215.01 $\pm$ 22.36
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 0.5	207.48 $\pm$ 2.91
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 1	169.17 $\pm$ 2.43
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 5	188.58 $\pm$ 0.78
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu\text{M}$ + Indomethacin	144.65 $\pm$ 15.45

RAW 264.7 cells were cultured as described in the method and materials. The values are the means  $\pm$  S.D. of three experiments with triplicate of each experiments.

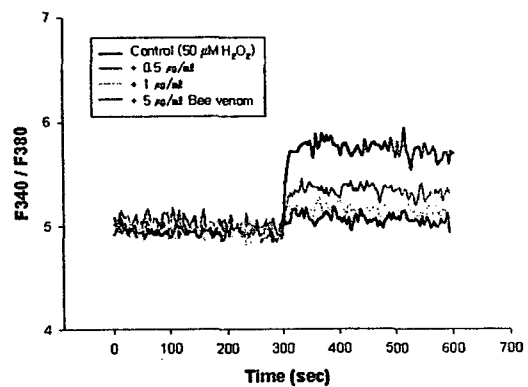


Fig. 6. The Ratio of F340(Binding with Calcium) and F380 on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Raw Cell

6. 蜂藥鍼液이 SNP 투여시 Calcium Concentration에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 AA 생성을 촉진시키는 酵素인 PLA<sub>2</sub> 생성의 매개 물질인 Calcium Concentration에 미치는 영향을 관찰한 결과, SNP의 자극에 대해 SNP+蜂藥鍼液 0.5, 1, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군 및 SNP +Indomethacin 처리군에서 모두 대조군에 비해 Calcium Concentration이 감소하였다(Fig. 7, Tab. VI).

Table 6. Calcium concentration on SNP-induced Raw Cell with Bee Venom and Indomethacin

Group ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Calcium Concentration(nM)
Normal	144.66 $\pm$ 21.67
Control	223.00 $\pm$ 33.11
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 0.5	175.40 $\pm$ 0.37
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 1	176.49 $\pm$ 3.21
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Bee Venom 5	203.61 $\pm$ 12.57
SNP 200 $\mu\text{M}$ + Indomethacin	142.95 $\pm$ 15.51

RAW 264.7 cells were cultured as described in the method and materials. The values are the means $\pm$ S.D. of three experiments with triplicate of each experiments.

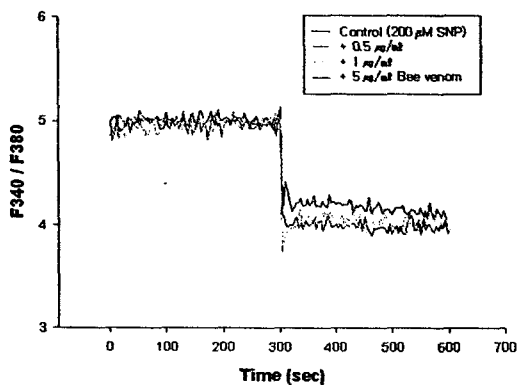


Fig. 7. The Ratio of F340(Binding with Calcium) and F380 on SNP-Induced Raw Cell

#### IV. 考 察

일반적으로 炎症 및 痛症에 관련한다고 알려진 PG가 생성되는 機轉은 LPS, SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 다른 자극에 의해 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), interleukin-6(IL-6) 같은 炎症성 cytokine이 분비되면 PLA<sub>2</sub>가 활성화되고 PLA<sub>2</sub> 의해 세포막의 phospholipid에서 AA가 분비되고 세포내 AA는 COX에 의해 PG로 변환된다<sup>28</sup>.

PLA<sub>2</sub>는 세포막에 존재하는 phospholipid의 sn-2 acyl ester 결합을 가수분해하여 free fatty acid와 lysophospholipid를

생성하는 酵素다<sup>29</sup>.

Lysophospholipid에는 platelet-activating factor (PAF)의 前驅 物質이며, free fatty acid 중에서 AA는 세포 내에서 COX와 lipooxygenase(LOX)의 작용을 받아 PG, thromboxane, leukotrience으로 변환되는데 이들은 排卵, 血小板 凝集, 水分 平衡, 免疫 作用 등을 포함하는 다양한 생리 기전에 관련한다<sup>30</sup>.

세포 밖의 LPS, SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등 炎症유발물질은 세포막의 G-protein을 자극하여 PLA<sub>2</sub>의 농도를 증가시킨다<sup>31</sup>.

PLA<sub>2</sub>는 single copy gene이고 protein kinase C, GTPase activating protein, phospholipase C와 마찬가지로 calcium-dependent lipid binding의 특색을 가지고 있다. cPLA<sub>2</sub>는 sn-2 position에서 arachidonic acid를 특이하게 가수분해하므로 signal transduction에 관련하고 있다고 생각되고 있다.<sup>32,33</sup>

증가된 농도의 PLA<sub>2</sub>는 다시 Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>와 결합하여 炎症의 전이요소인 NF- $\kappa$ B를 자극하여 iNOS, Cox-2, TNF- $\alpha$ 를 증가시켜 炎症을 유발하게 된다.<sup>34,35</sup>

蜂毒이 PLA<sub>2</sub>와 Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>의 농도를 감소시켜 炎症을 억제하는 과정을 도식화하면 다음과 같다.

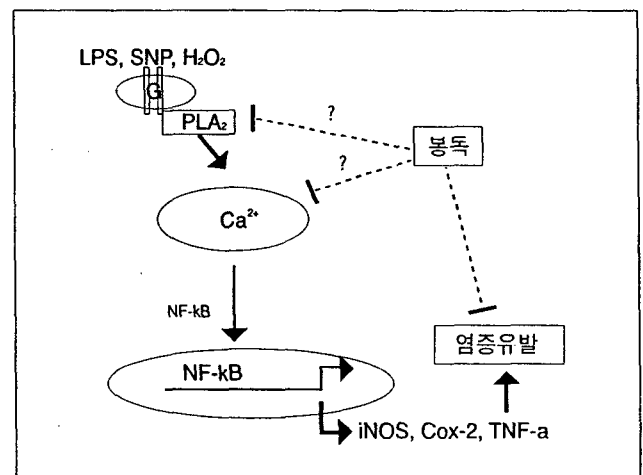


Fig. 8. The Pathway of Inflammation related with PLA<sub>2</sub> and Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> and Bee Venom

蜂藥鍼療法는 經絡學說의 원리에 의하여 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 추출 가공하여 직접 질병과 有關한 穴位, 壓痛點 혹은 體表의 陽性反應點에 주입함으로써 刺鍼 效果와 蜂毒의 生化學的 效果를 동시에 이용한 것이다. 이는 생체의 기능을 조절하고 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하고 방어하는 藥鍼療法의 일종<sup>1,2</sup>

으로 2천여 년 전부터 임상에서 각종 동통질환 등에 응용하였다<sup>37)</sup>.

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고 祛風除濕, 止疼痛, 解癢平喘, 消腫降壓하는 효능이 있어<sup>38)</sup> 鎮痛, 消炎<sup>39)</sup>, 鎮痙<sup>40)</sup>, 抗癌<sup>10-16)</sup>, 免疫 增強<sup>15-18)</sup> 作用을 나타내고 있다.

蜂毒의 成分은 enzymes, peptides, non peptide components로 구성되어 있다<sup>38-40)</sup>. 이 중 enzymes의 주요 성분은 PLA<sub>2</sub>와 hyaluronidase 등이 있고, peptides는 乾燥蜂毒의 약 50%를 구성하고 있으며 melittin, apamin, MCD peptide 등이 있는데, 그 중 melittin은 蜂毒의 주성분으로 溶血, 酵素, 抗炎 作用이 있다.<sup>41, 42)</sup> Apamin과 MCD peptide는 免疫機能을 증가시키고 鎮痛, 消炎 效果를 나타내며, 白血球의 食作用을 억제하고, 血漿의 纖維化를 저하하는 효능이 있다. Non peptide components는 histamine, dopamine, noradrenaline 등으로 구성되어 있다<sup>43-45)</sup>.

최근 蜂藥鍼液을 이용한 임상적 연구로서 膝關節炎<sup>19, 20)</sup>, 류마티드 關節炎<sup>21)</sup>에 유효함이 보고 되었다.

실험적 연구로서 蜂藥鍼液의 細胞毒性<sup>22, 23)</sup>에 관한 연구가 보고되었고, 콜라겐유도 關節炎<sup>24)</sup>, 實驗的 急慢性 關節炎<sup>25)</sup>, 關節炎 滑液細胞<sup>26)</sup>, 류머티스 關節炎 滑液細胞<sup>27)</sup> 등에 미치는 영향이 보고되었으나, 蜂藥鍼液에 의해 유도된 항염증 효과의 기전에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 연구자는 蜂藥鍼液의 염증 및 독성에 대해 연구하기 위하여 RAW 264.7 cell에 LPS, SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 염증을 유도하고, 蜂藥鍼液을 처리하여 炎症指標인 PLA<sub>2</sub>의 발현과 intracellular calcium concentration에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

蜂藥鍼液이 AA 생성을 촉진시키는 酵素인 PLA<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS에 의해 유도된 PLA<sub>2</sub>의 발현은 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 μg/ml의 모든 처리군에서 감소하였고, SNP에 의해 유도된 PLA<sub>2</sub>의 발현은 蜂藥鍼液 0.5, 1 μg/ml 처리군에서는 증가하였으나 5 μg/ml 처리군에서는 감소하였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 PLA<sub>2</sub>의 발현은 蜂藥鍼液 0.5, 1 μg/ml의 처리군에서는 감소하였고, 5 μg/ml 처리군에서는 증가하였다. 이는 LPS에 의해서 유도된 PLA<sub>2</sub>의 발현이 蜂藥鍼液의 각각에 농도에 대하여 시간에 따라 감소한다는 하<sup>46)</sup>의 보고와 유사하였다.

蜂藥鍼液이 PLA<sub>2</sub>생성 증가에 관계하는 物質인 intracellular calcium concentration에 미치는 영향을 관찰

한 결과, LPS, SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 모든 실험군은 대조군에 비해 calcium concentration이 감소하였다.

이상으로 보아, 蜂藥鍼液이 PLA<sub>2</sub>와 같은 炎症 媒介物質 생성을 촉진하는 酵素에 대한 억제 작용 및 PLA<sub>2</sub>의 생성에 기여하는 calcium의 concentration의 억제 작용을 확인하였다. 그리고 蜂藥鍼液이 항염증에 미치는 기전에 관한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

蜂藥鍼液의 염증 및 독성에 대해 연구하기 위하여 RAW 264.7 cell에 LPS, SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 염증을 유도하고, 蜂藥鍼液을 처리하여 炎症指標인 PLA<sub>2</sub>의 발현과 intracellular calcium concentration에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. LPS에 의해 유도된 PLA<sub>2</sub>는 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 μg/ml 처리군에서 대조군에 비해 발현이 모두 감소하였고, 蜂藥鍼液 1 μg/ml 처리군에서 대조군에 비해 발현이 유의하게 감소하였다.
2. SNP에 의해 유도된 PLA<sub>2</sub>는 蜂藥鍼液 0.5, 1 μg/ml 처리군에서 대조군에 비해 발현이 증가하였고, 蜂藥鍼液 5 μg/ml 처리군에서 대조군에 비해 발현이 유의하게 감소하였다.
3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 PLA<sub>2</sub>는 蜂藥鍼液 0.5 μg/ml 처리군에서 대조군에 비해 발현이 감소하였고, 蜂藥鍼液 1 μg/ml 처리군에서 대조군에 비해 발현이 유의하게 감소하였고, 蜂藥鍼液 5 μg/ml 처리군에서 대조군에 비해 발현이 증가하였다.
4. LPS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SNP의 자극에 의한 intracellular calcium concentration은 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 μg/ml 처리군 및 Indomethacin 처리군에서 모두 대조군에 비해 감소하였다.

## 參 考 文 獻

1. 고희균, 권기록, 인창식. 봉독약침요법. 서울: 경희대



- 학교출판국. 2003; 140-152
2. 김문호. 蜂毒療法과 蜂針療法. 서울: 韓國教育企劃. 1992; 20-37, 41-42, 64-67, 104-112.
  3. 권기록, 고희균, 김창환. 蜂針에 대한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1994; 11(1): 159-171
  4. 고희균. 蜂毒鍼療法이 抗炎, 鎮痛 및 解熱 에 미치는 效能에 관한 實驗的 研究. 大韓韓醫學會誌. 1992; 13(1): 283-292.
  5. 도원석, 장준혁, 김경호 외 2인. 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): 211-220.
  6. 권기록, 고희균. 蜂毒藥鍼療法이 抗炎, 鎮痛作用에 미치는 效能에 관한 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1998; 15(2): 97-103.
  7. 김지영, 고희균, 김용섭 외 3인. 蜂毒藥鍼療法의 抗炎症 作用에 관한 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1998; 15(1): 317-329.
  8. 도원석, 김경호, 김갑성. 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): 157-169.
  9. 공현숙, 고희균, 김창환. 蜂針毒療法이 抗癌學에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1993; 10(1): 159-165
  10. 권기록, 고희균, 김창환 외 3인. 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): 157-172.
  11. 박찬열, 서정철, 최도영 외 1인. 蜂毒藥鍼의 抗癌效果에 대한 分子生物學的 研究. 大韓藥鍼學會誌. 2000; 3(1): 1-19
  12. 김윤미, 이재동, 박동석. 藥鍼用 蜂毒成分 中 apamin의 抗癌效果와 MAP-Kinase 神毫傳達體系에 대한 研究. 2001; 18(4): 101-115
  13. 권도희, 이재동, 최도영. 藥鍼用 蜂毒成分 中 apamin, Melittin의 抗癌作用. 大韓鍼灸學會誌. 2001; 18(1): 129-145.
  14. 오기남, 이재동, 박동석. 蜂毒藥鍼이 C57BL mouse의 黑色腫에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2002; 19(4): 78-91.
  15. J.E. Gerst, Y. Salomon. Inhibition by Melittin and fluphenazine of melanotropin receptor function and adenylate cyclase in M2R melanoma cell membranes. *Endocrinology*. 1987; 121(5): 1766-1772
  16. 권기록, 고희균. 蜂藥鍼療法의 免疫反應에 관한 臨床的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2000; 17(1): 169-174.
  17. 이승덕, 김갑성. 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.
  18. 이경희, 김창환, 강성길 외 1인. 山地別 蜂毒液藥鍼刺戟이 免疫機能低下에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2000; 17(4): 28-40.
  19. 왕오호, 안규범, 임진강 외 1인. 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
  20. 김지훈, 이재동. 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.
  21. 황유진, 이건목, 황우준 외 5인. 蜂藥鍼을 이용한 류마티스 關節炎의 臨床的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2001; 18(5): 33-42
  22. 박원, 김용석, 고희균. 蜂毒 藥鍼液의 細胞毒性에 관한 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2002; 19(4): 65-77.
  23. 이종석, 고희균, 김창환. 藥鍼用 蜂毒液의 急性毒性에 관한 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1994; 11(1): 177-195.
  24. 김태우, 최도영, 이재동. 蜂毒藥鍼이 제2형 콜라겐 誘導 關節炎에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2002; 19(4): 92-104.
  25. 이재웅. 蜂藥鍼이 實驗的 急性慢性 關節炎에 미치는 效果와 機轉 研究. 暎園大學校 韓醫科大學 碩士學位論文. 2002.
  26. 한상원, 박기현, 정태영 외 1인. 蜂毒 및 Melittin 藥鍼液이 關節炎 滑液細胞에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2002; 19(4): 74-88.
  27. 이운섭, 서정철, 이승우 외 1인. 國產蜂毒 및 精製 蜂毒藥鍼液이 류머티스 關節炎 滑液細胞에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2002; 19(4): 28-38.
  28. 이종석, 고희균, 김창환. 藥鍼用 蜂毒液의 局所毒性 試驗에 관한 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1995; 16(1): 227-252.
  29. 김세중. 免疫學. 서울: 高麗醫學. 1994; 263-264.
  30. I. Kudo, M. Murakami, S. Hara, K. Inoue. Mammalian non-pancreatic phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1170(3): 217-231.
  31. W.J. Buhl, L.M. Eisenlohr, U. Gehring. Phospholipase A<sub>2</sub> in human placental serum. *Prostaglandins*. 1997;

- 53(3): 139-152
32. R.N. Dubios, S.B. Abramson, L. Crofford, R.A. Gupta, L.S. Simon, L.B. Van De Putte, P.E. Lipsty. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASWB J.* 1998; 12(12): 1063-1073.
33. S.Y. Choi, H. Ha, K.T. Kim. Capsaicin inhibits platelet activating factor-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and superoxide production. *J. Immunol.* 2000; 165: 3992-3998.
34. B. Cryer, A. Dubois. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase-a review. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 1998; 56(5-6): 341-361.
35. J.K. Horton, A.S. Williams, Z. Smith-Phillips, R.C. Martin, G. O'Beirne. Intracellular measurement of prostaglandin E<sub>2</sub> : effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression. *Anal Biochem.* 1999; 271(1): 18-28.
36. A. Cameron, Selective COX-2 inhibitors gather speed. *Inpharma* 1998; 1122: 9-10.
37. 인창식, 고흥균. 蜂毒療法에 대한 韓醫學 最初の 文獻紀錄: 마왕퇴의서의 蜂毒療法2例. *大韓鍼灸學會誌.* 1998; 15(1): 143-7.
38. 임종국. 鍼灸治療學. 서울; 集文堂. 1983: 226-7, 545-99.
39. 上海中醫學院. 鍼灸學. 香港; 商務印書館. 1990: 333-4.
40. E. Habermann. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In *Venomous Animals and their Venoms.* Academic Press. 1971; 3: 61.
41. E.S. Assem, G. Atkinson. Histamine release by MCDP (401), A peptide from the venom of the honey bee, *brit. Pharmacol.* 1973; 337-338.
42. S.S. Saini, J.W. Peterson, A.K. Chopra. Melittin binds to secretory phospholipase A<sub>2</sub> and inhibits its enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 238(2): 436-442.
43. H. Tannenbaum, P. Davis, A.S. Russell. An evidence-based approach to prescribing NSAIDs in musculoskeletal disease: A canadian consensus. *Can Med Assoc J.* 1996; 155(1) 77-88.
44. W.E. Kaufmann, K.I. Andreasson, P.C. Isakson, P.F. Worley. Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins.* 1997; 54(3): 601-624.
45. R. Ishii, M. Horie, K. saito, M. Arisawa, S. kitanaka. Inhibitory effects of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus* on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, activated by lipopolysacchaide and interferon- $\gamma$ . *Biochimica et Biophysica Acta.* 2001; 1568: 74-82.
46. 하성중. 蜂藥鍼液이 PLA<sub>2</sub>, COX-2, iNOS, AA 및 PG 에 미치는 影響. 暎園大學校 韓醫科大學 碩士學位 論文. 2002.