

원 거

蜂藥鍼液의 NO 소거 및 Chemokine 유전자 발현에 대한 효과

조태성 · 윤현민 · 송춘호 · 장경전 · 안창범

동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Abstract

Nitric Oxide Scavenging Effect and Expression of Chemokine Genes in Bee Venom

Cho Tae-sung, Youn Hyoun-min, Song Choon-ho,
Jang Kyung-jeon and Ahn Chang-beohm

Department of Acupuncture & Moxibustion,
College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Although the effect of Bee Venom has been reported, its mechanism has not been fully elucidated. Nitric Oxide(NO) is one of the free radicals and mediates in inflammation diseases. Chemokines contribute to the pathogenesis of several disorders such as allergic rhinitis and rheumatoid arthritis and so on. The objective of this study was to investigate the scavenging effect of Bee Venom on NO and on expression of chemokine genes.

There was no significant NO scavenging effect in Crude Bee Venom, Apamin, Melittin, and MCD-peptide. The expression of chemokines was examined by RT-PCR using the human mast cell line(HMC-1), which is known to secrete and express chemokines. In order to investigate the protective effect of Bee Venom, HMC-1 cells were incubated with pretreatment of Bee Venom for 24 hrs and stimulated with 1 μ M calcium ionophore A23178 for 2 hrs. RT-PCR analyses of chemokine genes showed that expressions of RANTES and MCP-1 were increased compared to the calcium ionophore-only treated group. But IL-8 and MCP-3 did not express increasing effect compared to control group. This study may provide important basic data on the possibility of the clinical treatment of Bee Venom in inflammation diseases.

Key words : Nitric Oxide, Chemokine Genes, Bee Venom

- 접수 : 2003년 6월 26일 · 수정 : 2003년 7월 5일 · 채택 : 2003년 7월 12일
· 교신저자 : 안창범, 부산광역시 진구 양정2동 산 45 동의대 부속한방병원
Tel. 051-850-8610 E-mail : cbahn@hyomin.dongueui.ac.kr

I. 緒 論

蜂藥鍼療法은 經絡學說의 原理에 의하여 꿀벌의 독낭에 들어있는 蜂毒을 추출 가공한 후 疾病에 有關한 穴位에 注入하여 刺鍼效果 및 蜂毒의 生化學的效能을 이용하여 生體의 機能을 調整하고 病理狀態를 改善시켜 疾病을 治療하고 豫防하는 藥鍼療法의 일종이다^{1)~3)}.

이는 약 2000年前부터 民間療法의 하나로 關節炎, 痛風 등의 諸疾患에 응용⁴⁾되어 왔으며 鍼灸學의 한 分野⁵⁾로 認識되고 있다. 근래에 들어 藥物에서 추출한 液을 特定穴에 注入함으로써 刺鍼效果和 藥理作用을 同時에 活用하여 疾病治療領域을 확대시키고 있는 水鍼療法이나 藥鍼療法과 그 治療機轉에 있어서는 상당히 類似하다. 1858년 프랑스의 Desjardin이 최초로 류머티스성 疾患에 응용한 이후 痛風⁶⁾, 神經痛⁷⁾에 유효하며 抗癌作用⁸⁾, 神經활성작용 등 다양한 보고가 있었고 특히 鎮痛效果 및 抗炎症效果에 대하여는 臨牀的^{9),10)}으로 또는 實驗的^{11),12)}으로 많은 보고가 있었다.

산소는 생명유지에 절대적으로 필요한 원소이지만 각종 물리적, 화학적 요인 등에 의하여 반응성 활성 산소(reactive oxygen, 예컨대 O_2^- , HO., H_2O_2 , O_2 , Nitric Oxide(NO) 등)로 전환되면 생체에 치명적인 毒性을 일으키는 양면성을 지니고 있다. 이들 활성 산소는 비가역적인 파괴작용을 함으로써 老化는 물론 炎症, 류머티스, 自己免疫疾患 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 이들 활성 산소에 의한 지질과산화 결과 생성되는 지질과산화물을 비롯하여 여러가지 體內 과산화물도 細胞에 대한 산화적 파괴로 인한 각종 기능장애를 야기함으로써 老化와 疾病의 원인이 되기도 한다^{13),14)}.

산화질소(NO)는 신경계통 조직에서 신경전달물질, 신경조절물질 또는 이차전령물질(second messenger)로 작용하는 것으로 알려진 자유라디칼(free radical)이다. 그런데 NO가 과다 생성되면 關節의 炎症, 癌 등을 나타내게 된다¹⁵⁾.

Chemokine은 pro-inflammatory한 cytokine의 일종으로 炎症에 주로 관여하여 있으며 抗炎症劑로서 chemokine을 억제하는 약물을 개발하기 위한 노력이 많이 이루어지고 있다^{16),17)}.

최근 한의학계에서도 炎症에 관련된 NO와 chemokine에 관련된 연구가 시도되고 있으나, 아직은 미약한 실정이며 특히 蜂藥鍼液의 成分別로 NO 消去에 미치는 영향에 대한 報告나 chemokine 발현에 관한 연구는 부족하다. 이에 本研究에서는 蜂藥鍼液의 작용기전을 보다 깊이 이해하고 기초자료로 쓰일 수 있도록 蜂毒의 成分別 NO 消去 效能을 살펴보고 비만세포에서의 RANTES, MCP-1, MCP-3, IL-8 등의 chemokines 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향을 RT-PCR 방법을 통해 관찰한 결과를 보고하는 바이다.

II. 實驗方法

A. Nitric Oxide(NO) 消去 효과 측정

1) NO 생성화합물

NO generator로는 *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine(SNAP)을 사용하였다. SNAP의 제조방법은 Field 등(1978)에 의한 방법을 따랐다. 먼저 $NaNO_2$ 1.63g을 20ml에 녹여 20ml의 메탄올과 20ml의 염산을 섞어 1.91g의 *N*-acetylpenicillamine을 녹였다. 후드 안에서 $NaNO_2$ 용액을 *N*-acetylpenicillamine 용액에 2~3ml씩 첨가하면서 dull green이 나타나는지를 확인하면서 천천히 반응시켰

다. 반응이 다 끝나면 여과를 하여 여과지에 2~3일 동안 호일을 덮어 공기 중에 말렸다. 여과지에 남아 있는 분말을 수거하여 다음 실험에 사용하였다.

2) 蜂藥鍼液의 준비

실험에 사용한 蜂毒의 성분은 Apamin, Melittin, MCD-peptide으로 하였는데 蜂毒의 성분 중에서 함유량이 높은 세가지를 선정한 것이며 실험 목적에 따라 加工한 乾燥蜂毒에 生理食鹽水로 농도별로 희석하여 사용하였고 Crude Bee Venom과도 비교하였다. 이상의 蜂毒製劑는 모두 Sigma(USA)에서 구입하여 使用하였다.

3) NO 측정

Phosphate-buffered saline(PBS) 1ml에 SNAP 500uM를 첨가한 후 蜂藥鍼液을 농도별로 첨가한 후 CO₂ 인큐베이터 37°C, 5% CO₂, 95% O₂ 조건하에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 각 조건별로 100 ul씩 3개씩 96-well plate를 사용하여 분주한 후 100ul의 Griess 용액을 첨가하여 550nm 파장에서 흡광도를 측정하였다¹⁸⁾. 이때 NaNO₂ 용액을 표준으로 하여 농도를 계산하였다.

4) 통계처리

통계분석은 Statistical Package for Social Science software SAS(version 6.1.2)를 사용하였으며 데이터 분석은 Student's *t*-test를 이용하였고 통계적인 유의성은 P<0.05로 하였다. 모든 실험은 독립적으로 3번 이상 반복하였고 mean±standard errors of means(SEM)로 나타내었다.

B. Chemokines 유전자 발현 측정

1) 세포주

실험에 사용한 세포주는 사람 비만세포주로 mast

cell leukemia 환자로부터 유래되었으며¹⁹⁾, c-kit 수용체를 발현하며 IgE에 대한 FcεRI이 결핍된 세포주로 경희의대 미생물학교실의 조정제 교수로부터 분양받아 사용하였다. 이러한 사람 비만세포는 calcium ionophore에 의해 탈과립되어 여러 매개 물질을 방출하며 여러 종류의 cytokines와 chemokines를 합성 분비하여 炎症 관련 연구에 있어 매우 유용한 세포주이다²⁰⁾.

2) 시약

배양액은 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM), fetal bovine serum(FBS) 등은 Gibco BRL(USA)에서 구입하였으며, calcium ionophore A 23137은 Sigma(USA)에서, mRNA selective PCR kit은 Takara(Japan), reverse transcriptase 은 Promega(USA), RNAzol B는 Tel-Test(USA)에서 구입하였으며, 일반 시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

3) 세포배양 및 세포자극

HMC-1 세포의 배양은 10% FBS가 포함된 IMDM 용액에 5% CO₂, 95% 습도, 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였고, 배양액은 2일마다 교환하였다. 실험군에는 蜂藥鍼液중 Crude Bee Venom 1ug/ml을 24시간 전처리하였으며, Calcium ionophore A23187의 최종농도를 1uM로 2시간 처리하였다²⁰⁾.

4) RNA 분리

Total RNA의 추출을 위하여 각 well에 0.5ml의 RNAzol B를 첨가하였다. Chloroform을 1/10 volume을 가하고 15초 동안 잘 혼합한 다음 얼음에 5분간 방치하였다. 12,000 xg에서 15분 동안 원심 분리하고 상층액을 같은 양의 isopropanol을 가한 후, 4°C에서 15분간 방치하였다. 12,000 xg에서

15분 동안 원심분리 한 후, total RNA를 추출하였다. RNA 농도의 측정은 260/280 흡광도로 측정하였다. 필요한 경우 DNA를 제거하기 위하여 DNase-1을 처리하였다.

5) Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

HMC-1 세포로부터 total RNA를 분리하고, 분리한 RNA에 역전사효소를 넣어 cDNA를 만든 후, 필요한 유전자 cDNA의 일부분을 증폭하기 위한 primer를 이용하여 PCR을 시행하여 cDNA의 일부를 대량으로 증폭하였다. 실험방법은 total RNA 1 ug에 oligo dT primer 또는 random hexamer를 2ul 넣어 65°C에서 10분간 반응시킨 후에, AMV 역전사효소 1ul, RNasin 1ul, 10 mM dNTP 4ul, 10×buffer 4ul, 50 mM MgCl₂ 및 탈이온수를 첨가하여 총용량을 40ul로 하여 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 형성케 하였다.

Chemokines의 PCR은 PCR 자동화기계(Perkin Elmer 9600)에서 template로 cDNA 1~4ul, Taq polymerase 2 unit, 2.5mM dNTP 1ul, sense primer 10 pmole 1ul, antisense primer 10 pmole 1ul, 10 x buffer 3ul 및 탈이온수를 첨가하여 총 30ul로 하였다. 94°C에서 5분간 1회, 94°C에서 30초, 55~61°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 40회 반응시키고, 72°C에서 5분간 1회 시행한 후 1~2% 한천 겔에서 전기영동하였다. 또한 필요한 경우 85°C에서 RNA만 반응하는 원리를 이용한 mRNA Selective PCR kit를 사용하였고 적정온도를 결정하기 위하여 gradient PCR machine(Eppendorf, Germany)을 이용하였다. Internal standard로는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 24회 증폭하여 유전자 발현정도를 보정하였다.

각각의 primer는 Genbank에 등록된 염기서열을 참고하여 제작하였으며, RANTES는 350bp, sense primer는 5'-CCTCCGACAGCCTCTCCACA-3', antisense primer는 5'-GTGTAAGTTCAGGTTCAAGGA-3'로 하였고, MCP-1은 645bp, sense primer는 5'-TCGCACTCTCGCCTCCAGCAT-3', antisense primer는 5'-TCCACAATAATATTTTAGCAATTCTT-3'로 합성하였으며, MCP-3은 394bp, sense primer는 5'-GCTAGGACCAAACAGAAACCTC-3', antisense primer는 5'-GT CATGGCTTGTTTTTCAGTTCAG-3'로 하였고, IL-8 유전자의 크기는 497bp, sense primer는 5'-ACATGACTTCCAAGCTGGCCGTGG-3', antisense primer는 5'-GTATGTTCTGGATATTTTATGGTAC-3'로 하였으며, house keeping 유전자인 GAPDH 유전자는 324bp, sense primer는 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCG-3', antisense primer는 5'-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3'로 하였다. 또한 genomic DNA나 다른 spliced mRNA가 증폭되는 현상을 방지하기 위하여 적어도 1개의 intron이 포함하게 하였다.

6) 통계분석

통계분석은 Statistical Package for Social Science software SAS(version 6.1.2)를 사용하였으며 데이터 분석은 Student's *t*-test를 이용하였고 통계적인 유의성은 P<0.05로 하였다. 모든 실험은 독립적으로 3번 이상 반복하였고 mean±standard errors of means(SEM)로 나타내었다.

III. 實驗 結果

1. Crude Bee Venom의 NO 消去 효과

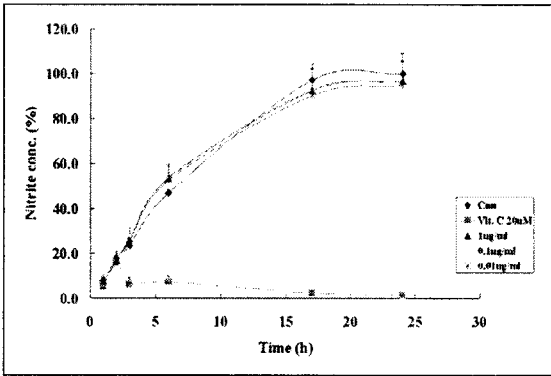


Fig. 1. Inhibitory effect of Crude Bee Venom on Nitric Oxide

蜂藥鍼液의 NO 消去 효과를 확인하고자 Crude Bee Venom 1ug/ml, 0.1ug/ml, 0.01ug/ml의 농도로 24시간 동안 측정하였다. 본 실험 결과 1시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $7.8 \pm 0.6\%$, Vit. C 처치군은 $4.9 \pm 3.6\%$, 1ug/ml 처치군은 $7.8 \pm 1.5\%$, 0.1ug/ml 처치군은 $8.1 \pm 2.2\%$, 0.01ug/ml 처치군은 $7.7 \pm 1.3\%$ 로 나타났다. 3시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $23.5 \pm 1.4\%$, Vit. C 처치군은 $6.1 \pm 3.1\%$, 1ug/ml 처치군은 $26.1 \pm 3.4\%$, 0.1ug/ml 처치군은 $26.5 \pm 4.7\%$, 0.01ug/ml 처치군은 $25.5 \pm 3.4\%$ 로 나타났다. 6시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $46.9 \pm 1.8\%$, Vit. C 처치군은 $7.2 \pm 2.7\%$, 1ug/ml 처치군은 $53.5 \pm 3.7\%$, 0.1ug/ml 처치군은 $54.0 \pm 5.6\%$, 0.01ug/ml 처치군은 $52.5 \pm 3.6\%$ 로 나타났다. 24시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $100.0 \pm 9.2\%$, Vit. C 처치군은 $1.5 \pm 0.9\%$, 1ug/ml 처치군은 $96.8 \pm 8.8\%$, 0.1ug/ml 처치군은 $96.6 \pm 9.0\%$, 0.01ug/ml 처치군은 $94.8 \pm 5.8\%$ 로 나타났다 <Fig. 1>.

2. Apamin의 NO 消去 효과

蜂藥鍼液의 NO 消去 효과를 확인하고자 Apamin

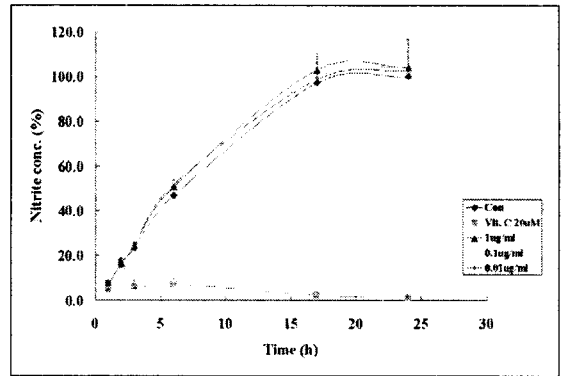


Fig. 2. Inhibitory effect of Apamin on Nitric Oxide

1ug/ml, 0.1ug/ml, 0.01ug/ml의 농도로 24시간 동안 측정하였다. 본 실험 결과 1시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $7.8 \pm 0.6\%$, Vit. C 처치군은 $4.9 \pm 3.6\%$, 1ug/ml 처치군은 $7.8 \pm 0.9\%$, 0.1ug/ml 처치군은 $7.7 \pm 0.7\%$, 0.01ug/ml 처치군은 $7.8 \pm 1.0\%$ 로 나타났다. 3시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $23.5 \pm 1.4\%$, Vit. C 처치군은 $6.1 \pm 3.1\%$, 1ug/ml 처치군은 $24.7 \pm 1.3\%$, 0.1ug/ml 처치군은 $24.6 \pm 1.0\%$, 0.01ug/ml 처치군은 $24.9 \pm 1.2\%$ 로 나타났다. 6시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $46.9 \pm 1.8\%$, Vit. C 처치군은 $7.2 \pm 2.7\%$, 1ug/ml 처치군은 $51.0 \pm 0.3\%$, 0.1ug/ml 처치군은 $51.2 \pm 3.0\%$, 0.01ug/ml 처치군은 $52.0 \pm 1.7\%$ 로 나타났다. 24시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $100.0 \pm 9.2\%$, Vit. C 처치군은 $1.5 \pm 0.9\%$, 1ug/ml 처치군은 $104.0 \pm 5.8\%$, 0.1ug/ml 처치군은 $104.5 \pm 11.9\%$, 0.01ug/ml 처치군은 $102.7 \pm 8.7\%$ 로 나타났다 <Fig. 2>.

3. Melittin의 NO 消去 효과

蜂藥鍼液의 NO 消去 효과를 확인하고자 Melittin 1ug/ml, 0.1ug/ml, 0.01ug/ml의 농도로 24시간 동안

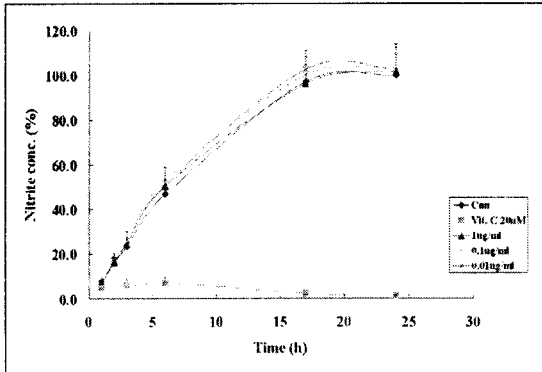


Fig. 3. Inhibitory effect of Melittin on Nitric Oxide

측정하였다. 본 실험 결과 1시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $7.8 \pm 0.6\%$, Vit. C 처치군은 $4.9 \pm 3.6\%$, $1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $7.8 \pm 1.7\%$, $0.1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $8.0 \pm 1.8\%$, $0.01\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $7.5 \pm 1.0\%$ 로 나타났다. 3시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $23.5 \pm 1.4\%$, Vit. C 처치군은 $6.1 \pm 3.1\%$, $1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $24.8 \pm 3.9\%$, $0.1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $25.9 \pm 4.3\%$, $0.01\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $24.8 \pm 2.2\%$ 로 나타났다. 6시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $46.9 \pm 1.8\%$, Vit. C 처치군은 $7.2 \pm 2.7\%$, $1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $50.7 \pm 4.5\%$, $0.1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $53.4 \pm 5.7\%$, $0.01\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $51.5 \pm 1.8\%$ 로 나타났다. 24시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $100.0 \pm 9.2\%$, Vit. C 처치군은 $1.5 \pm 0.9\%$, $1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $101.8 \pm 3.0\%$, $0.1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $102.0 \pm 10.4\%$, $0.01\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $102.7 \pm 11.3\%$ 로 나타났다<Fig. 3>.

4. MCD-peptide의 NO 소거 효과

蜂藥鍼液의 NO 소거 효과를 확인하고자 MCD-peptide $1\mu\text{g/ml}$, $0.1\mu\text{g/ml}$, $0.01\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 측정하였다. 본 실험 결과 1시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $7.8 \pm 0.6\%$, Vit. C 처치군은

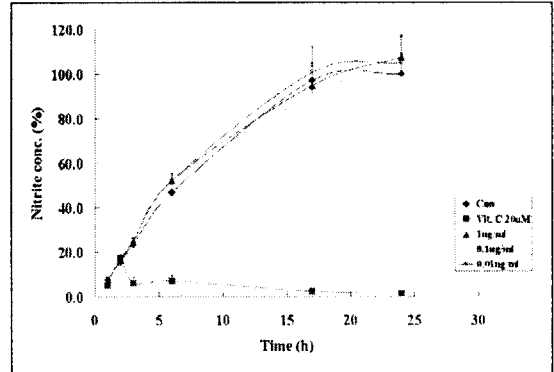


Fig. 4. Inhibitory effect of MCD-peptide on Nitric Oxide

$4.9 \pm 3.6\%$, $1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $7.8 \pm 1.1\%$, $0.1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $7.8 \pm 1.2\%$, $0.01\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $8.0 \pm 0.8\%$ 로 나타났다. 3시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $23.5 \pm 1.4\%$, Vit. C 처치군은 $6.1 \pm 3.1\%$, $1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $25.0 \pm 2.1\%$, $0.1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $24.8 \pm 1.8\%$, $0.01\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $25.3 \pm 1.3\%$ 로 나타났다. 6시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $46.9 \pm 1.8\%$, Vit. C 처치군은 $7.2 \pm 2.7\%$, $1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $52.3 \pm 3.1\%$, $0.1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $52.0 \pm 3.2\%$, $0.01\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $52.3 \pm 3.5\%$ 로 나타났다. 24시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 $100.0 \pm 9.2\%$, Vit. C 처치군은 $1.5 \pm 0.9\%$, $1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $107.4 \pm 9.2\%$, $0.1\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $106.2 \pm 9.0\%$, $0.01\mu\text{g/ml}$ 처치군은 $105.0 \pm 12.6\%$ 로 나타났다<Fig. 4>.

5. RT-PCR 분석을 통한 蜂藥鍼液의 chemokines의 발현

RT-PCR을 정량하기 위하여 각 cycle별로 증폭하여 유효 농도 곡선에 해당하는 cycle을 결정하였다. 유전자 발현은 GAPDH 발현에 대한 상대비교를 하였다. RANTES 유전자의 경우 calcium ionophore

자극시 약하게 발현되었으나 蜂藥 鍼液 전처치군에서는 calcium ionophore 자극군에 비하여 더 강하게 발현되었다. MCP-1 유전자의 경우 calcium ionophore 자극시 발현이 되지 않았으나 蜂藥 鍼液 전처치군에서는 calcium ionophore 자극군에 비하여 강하게 발현되었다. MCP-3 유전자의 경우 calcium ionophore 자극시 약하게 발현되었으나 蜂藥 鍼液 전처치군에서는 calcium ionophore 자극군에 비하여 발현이 되지 않았다. IL-8 유전자의 경우 calcium ionophore 자극시 강하게 발현되었으나 蜂藥 鍼液 전처치군에서는 calcium ionophore 자극군에 비하여 발현이 되지 않았다<Fig. 5>.

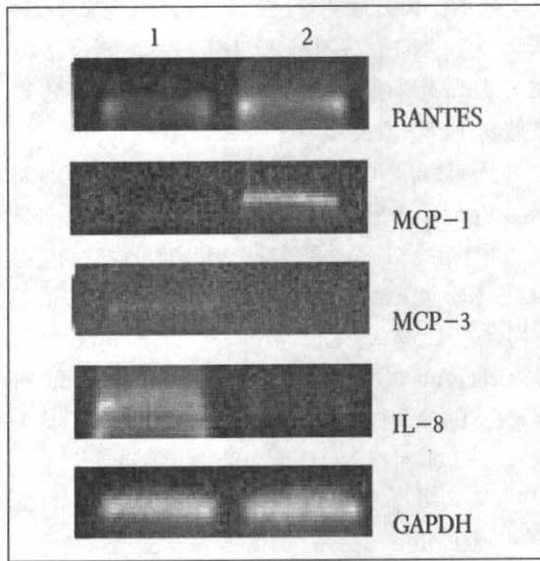


Fig. 5. Expression of chemokine genes in HMC-1 cells was analyzed by RT-PCR.

Cells were pretreated with Crude Bee Venom(1ug/ml) for 24h. After pretreatment of Crude Bee Venom, cells were stimulated with 1uM calcium ionophore A 23187 for 2h. Expression levels of GAPDH mRNA were used an endogenous standard for quantitation.

1 : 1uM calcium ionophore A23187

2 : 1uM calcium ionophore A23187+1ug/ml Crude Bee Venom

IV. 考 察

蜂藥 鍼療法이 韓醫學에서 使用된 最初의 記錄은 紀元前 168年 埋葬된 馬王堆醫書 중 <養生方>과 <雜療方>²¹⁾이다. 蜂毒의 利用方法으로 벌을 直接穴位 等に 놓아 刺入하는 方法과 벌의 鍼을 뽑아서 刺戟하는 方法이 使用되었으나, 最近에는 電氣抽出法이나 電磁波 刺戟法으로 蜂毒을 抽出 加工하여 使用한다.

蜂毒^{22)~24)}은 독특한 藥理學的 作用을 하는 酵素(Enzyme)와 Peptide components, Non peptide components로 구성된 蛋白質 複合體이며 무색 투명하고 점성이 있는 액체로 강한 쓴맛이 나는 방향성 물질이며, 건조 상태에서는 회백색 또는 황백색의 괴상이거나 분말상이다. 蜂毒液의 비중은 1.13이며 산도(PH)는 5.2~5.5범위이다. 이것은 쉽게 물과 산에 용해되지만 알콜에는 거의 용해되지 않는다. 蜂毒液은 상온에서 공기에 노출되면 재빨리 마르고 液 중량의 70%를 손실한다. 蜂毒은 냉동 상태에서 장기간 활성을 유지할 수 있으나 산화성 물질에 의해서 쉽게 파괴되는 경향이 있다²⁵⁾. 蜂毒의 性味²⁶⁾는 苦, 辛, 平하며 主要作用은 强壯, 鎮靜, 平喘, 祛風濕, 鎮痛, 抗炎, 抗癌, 아드레날린分泌 促進과 淋巴細胞, 赤血球 再生·增加作用 등이 있으며 適應症은 化膿性 疾患, 류머티스 關節炎, 急·慢性 關節炎, 椎間板 脫出症과 그 後遺症, 痛風, 神經痛, 筋肉痛, 偏頭痛, 氣管支喘息 等이다. 또한 有毒하므로 allergy反應, 瘙痒症, 嘔吐, 惡寒, 呼吸困難, 低血壓, 失神 등의 過敏反應과 毒性에 의한 副作用이 있다²²⁾.

蜂毒에 대한 근대적인 논문은 1858년 프랑스의 Desjardin이 최초로 류머티스性 疾患에 應用한 結果를 발표한 것을 시작으로 하여²²⁾, 1968년 Haber-

mann E²⁷⁾는 蜂毒의 生化學的 成分에 대해 報告하였으 며 以後로 各 成分들의 效能, 作用 및 allergy 反應에 대한 많은 實驗 및 臨床論文이 발표되었다.

산화질소(nitric oxide : NO)는 신경계통 조직에서 신경전달물질, 신경조절물질 또는 이차전령물질(second messenger)로 작용하는 것으로 알려진 자유라디칼(free radical)이다. 과거에는 endotheliumderived relaxing factor(EDRF)로 알려졌지만 현재는 기체임이 확인되었다. NO는 중추신경계통, 말초신경계통, 심장혈관계통에서 작용을 나타내 이 보고되어 왔다. NO의 형성은 흥분성 아미노산 수용체에 대한 자극과 관련이 있으며 일단 산화질소가 생성되면 수용성 guanylate cyclase가 자극된다. 산화질소는 산화질소합성효소(nitric oxide synthase : NOS)에 의하여 arginine으로부터 합성되며 이때 NADH와 tetrahydrobiopterin이 조효소로 작용하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. NO는 자유롭게 확산하는 가스로서 신경계, 혈관계 및 면역계에서 세포사이의 작용을 매개하는 메신저 물질로 중요한 역할을 한다²⁸⁾. 1990년초에 동물세포에서 세포간의 메신저로서 생성된다는 것을 발견하였고 血壓, platelet adhesion, neutrophil의 집성 뿐만 아니라 腦에서 synaptic plasticity의 역할과 관련이 있을 것으로 보고되어졌다²⁹⁾. 즉 NO는 혈소판 內에서의 혈소판의 응집을 억제하며 大食細胞에서 細胞毒성을 매개하는 작용을 하며 일부 인체조직에서는 혈관확장을 매개하는 물질로도 알려져 있다. 혈관확장을 매개하는 물질로서 腦조직에서는 확인되지 않았으나 大腦血流循環은 NO에 의해 조절되며 NO는 내피세포 뿐만 아니라 혈관주위 신경섬유에서 나오는 것으로 확인되었다. 또한 신경계에서 NO는 장기 기억의 역행성 전도물질로 작용할 것으로 생각되며 NO가 과도 생성될 경우에는 神經毒素로 작용한다고 알려져 있다³⁰⁾. 이 NO가 적게 만들어지면 高血壓, 性交不能, 動脈硬化 등의 症狀을 나타내고 균

에 감염되기 쉽다. 반면 NO가 과다 생성되면 자가 면역성 糖尿病, 동맥류, 腦卒中, 감염성 대장병, 류머티즘, 癌, 敗血性 쇼크, 複合 硬化症을 나타내고 이식 거부반응도 나타나게 된다. 요컨대 NO는 낮은 농도에서만 신호로 작용하고 높은 농도로 존재하면 毒성을 나타내기 때문에 NO의 합성은 아주 조심스럽게 조절되어야만 하며 신체 상태에 따라 균형이 잘 맞아야 한다.

蜂藥鍼液의 NO 消去 효과를 확인하고자 하는 本實驗에서는 NO generator로는 S-nitroso-N-acetylpenicillamine(SNAP)을 사용하였다. 기존의 NO에 관한 論文은 김³¹⁾ 등의 인체 胃上皮 細胞에서의 NO 생성을 비롯하여 매우 많으나 SNAP을 이용하여 NO 消去 효과를 본 論文으로는 양방에서는 박³²⁾ 등이 NO를 주사시 망막에 미치는 영향을 보고하였고, 한방에서는 서³³⁾ 등이 국산 및 미국산 蜂藥鍼液의 NO 消去 효과를 보고하였다.

蜂藥鍼液의 NO 消去 효과를 확인하고자 Crude Bee Venom 1ug/ml, 0.1ug/ml, 0.01ug/ml의 농도로 24시간 동안 측정하였다. 실험 결과 24시간 경과 후 NO 농도는 무처치군이 100.0±9.2%, Vit. C 처치군은 1.5±0.9%, 1ug/ml 처치군은 96.8±8.8%, 0.1ug/ml 처치군은 96.6±9.0%, 0.01ug/ml 처치군은 94.8±5.8%로 나타났다<Fig. 1>. NO 消去 효과는 오랜 시간 NO를 처치한 후 그 결과를 보는 것이 더 의미가 있다. 따라서 24시간 경과 후를 보았을 때 Crude Bee Venom 藥鍼液은 유의한 NO 消去 효과가 없었다. 이는 Crude Bee Venom 藥鍼液의 抗炎症, 鎮痛효과가 다른 기전을 통해 이루어짐을 암시하거나 本實驗에서 사용된 Crude Bee Venom 농도가 너무 낮아서 그럴 수도 있다고 사려되나 추후 심도있는 연구가 필요하다고 하겠다.

蜂毒에 存在하는 主된 Peptide components는 Freeze-dried venom의 약 50%를 구성하고 있으며, 주요성분으로는 Apamin과 Mellitin 및 MCD

peptide를 들 수 있고, 이들은 蜂毒의 특성을 설명하는데 큰 역할을 하고 있다.

Apamin은 神經系에 作用하며 過量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(LD₅₀=4mg/100mg)^{34),35)}. 蜂藥鍼液의 NO 消去 效果를 확인하고자 Apamin 1ug/ml, 0.1ug/ml, 0.01ug/ml의 농도로 24시간 동안 측정하였다. 24시간 경과 후 NO 농도는 무처리군이 100.0±9.2%, Vit. C 처치군은 1.5±0.9%, 1ug/ml 처치군은 104.0±5.8%, 0.1ug/ml 처치군은 104.5±11.9%, 0.01ug/ml 처치군은 102.7±8.7%로 나타났다<Fig. 2>.

Mellitin(40~50%)은 26개의 amino acid로 구성된 활성 peptide로 크게 溶血作用과 酵素作用을 하고 있다. 또한 大食細胞의 移動을 강하게 抑制하며 lysosome 細胞膜을 安定시켜 炎症을 抑制한다. 또 Saini SS 등은 합성 mellitin이 sPLA₂(secretory phospholipase A₂)와 결합하여 sPLA₂의 활성을 막아 炎症을 抑制한다는 報告를 하였다³⁶⁾. 蜂藥鍼液의 NO 消去 效果를 확인하고자 Melittin 1ug/ml, 0.1ug/ml, 0.01ug/ml의 농도로 24시간 동안 측정하였다. 24시간 경과 후 NO 농도는 무처리군이 100.0±9.2%, Vit. C 처치군은 1.5±0.9%, 1ug/ml 처치군은 101.8±3.0%, 0.1ug/ml 처치군은 102.0±10.4%, 0.01ug/ml 처치군은 102.7±11.3%로 나타났다<Fig. 3>.

MCD peptide는 Mast cell의 溶解와 Histamine 擴散을 增加시키는 작용이 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 뇌하수체와 부신피질을 興奮시켜 免疫機能을 增加시키고 Prostagladin E가 Prostagladin으로 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되었다³⁴⁾. 蜂藥鍼液의 NO 消去 效果를 확인하고자 MCD-peptide 1ug/ml, 0.1ug/ml, 0.01ug/ml의 농도로 24시간 동안 측정하였다. 24시간 경과 후 NO 농도는 무처리군이 100.0±9.2%, Vit. C 처치군은 1.5±0.9%, 1ug/ml 처치군은 107.4±9.2%, 0.1ug/ml 처치군은 106.2±9.0%, 0.01ug/ml 처치군은 105.0±12.6%로 나타났다<Fig. 4>.

本 實驗에서 24시간 경과 후를 보았을 때 Apamin, Melittin, MCD-peptide 藥鍼液은 유의한 NO 消去 效果가 없었다. 이는 Apamin, Melittin, MCD-peptide 藥鍼液의 抗炎症, 鎮痛效果가 다른 기전을 통해 이루어짐을 암시하거나 本 實驗에서 사용된 Apamin, Melittin, MCD-peptide 농도가 너무 낮아서 그럴수도 있다고 사려되나 추후 심도 있는 연구가 필요하다고 하겠다.

최근 백혈구의 화학적 주성(chemotactic activity)을 나타내는 cytokine들이 발견되었으며 이들을 chemokines이라 한다. 현재까지 constitute leukocyte trafficking한 작용과 炎症에 주로 關여한다고 알려져 있지만 그 외에도 cancer, developmental, neuronal, antibacterial, pyrogenic, angiogenesis, wound healing, hematopoietic regulation, immune cell effector function 등의 다양한 생물학적 기능에 關여한다^{16),17)}. 이들은 또한 inducible, secreted, pro-inflammatory한 cytokine의 일종이며, 아미노산 염기서열의 20%에서 50%의 homology가 있으며 4종류의 subfamily로 나누어진 다. 이중 CC 또는 β subfamily는 처음 두개의 cysteine이 인접해 있으며, C 또는 γ subfamily는 첫 번째와 세 번째 cysteine이 결여된 것이다^{37),38)}.

Chemokines는 헤파린에 친화력을 갖고 있는 low molecular weight의 단백질이며 많은 종류 의 세포에서 생성된다. CXC chemokines는 Glu-Leu-Arg

(ELR) motif를 갖고 있기도 하며 이러한 ELR+ CXC chemokines는 neutrophil을 유도하고 CXC chemokine receptor-2(CXCR-2)에 결합한다. 또한 일반적으로 ELR+ CXC chemokines는 angiogenic한 반면에 ELR- CXC chemokines는 angiostatic하다고 알려져 있다³⁹⁾. ELR+ CXC chemokines로는 interleukin-8(IL-8), growth-regulated oncogenes(GRO- α , GRO- β , GRO- γ), neutrophil activating protein-2(NAP-2), epithelial cell-derived, neutrophil attractant-78(ENA-78) 및 granulocyte chemotactic protein-2(GCP-2) 등이 있다.

CC chemokines으로는 macrophage inflammatory protein(MIP)-1 α , MIP-1 β , monocyte chemotactic protein(MCP)-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, eotaxin, eotaxin-2, regulated on activation normal T-cell expressed and secreted(RANTES), hemofiltrate CC chemokine(HCC)-1, HCC-2, myeloid progenitor inhibitory factor(MPIF)-1, MPIF-2, macrophage-derived chemokine(MDC) 등이 있다^{37),38)}.

本 研究에서는 사람 비만세포주(human mastocytoma, HMC-1)에 calcium ionophore를 투여하여 비만세포에서의 chemokines의 발현을 유발하고, 이러한 chemokines의 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 실험 방법으로는 chemokines의 발현을 측정하기 위하여 RT-PCR 방법을 이용하였다. 本 實驗에서 RT-PCR 분석을 통한 蜂藥鍼液의 chemokines의 발현을 측정한 결과 MCP-3 와 IL-8은 calcium ionophore 자극시 발현되었으나 蜂藥鍼液 전처치군에서는 calcium ionophore 자극군에 비하여 발현이 되지 않았다. 이는 蜂藥鍼液의 抗炎症 효과가 MCP-3와 IL-8 발현 억제를 통하여 이루어짐을 시사하는 것이라고 하겠다. 한편 RANTES는 calcium ionophore 자극

시 약하게 발현되었으나 蜂藥鍼液 전처치군에서는 강하게 발현되었고 MCP-1은 calcium ionophore 자극시 발현이 되지 않았으나 蜂藥鍼液 전처치군에서는 강하게 발현되어 앞의 MCP-3와 IL-8 발현 양상과는 상반되었다. 이는 蜂藥鍼液의 抗炎症 기전이 RANTES와 MCP-1을 통해 이루어지는 것은 아님을 암시한다고 사려되나 추후 심도있는 연구가 필요하다고 하겠다.

本 研究에서는 蜂毒의 成分別 NO 消去 효과와 蜂毒의 chemokines의 mRNA 발현에 대한 效果를 研究하였다. 이상의 결과는 蜂毒의 임상적 이용에 기초적 자료를 제시할 것으로 생각된다.

V. 結 論

蜂藥鍼液의 成分別 Nitric Oxide(NO) 消去 效能을 살피고 비만세포에서의 chemokines의 발현에 蜂藥鍼液이 미치는 영향을 RT-PCR 방법을 통해 관찰한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. Crude bee venom은 NO 消去 효과가 유의성 있게 나타나지 않았다.
2. Apamin은 NO 消去 효과가 유의성 있게 나타나지 않았다.
3. MCD-peptide는 NO 消去 효과가 유의성 있게 나타나지 않았다.
4. Melittin은 NO 消去 효과가 유의성 있게 나타나지 않았다.
5. RANTES는 calcium ionophore 자극시 약하

게 발현되었으나 蜂藥鍼液 전처치군에서는 강하게 발현되었고, MCP-1은 calcium ionophore 자극시 발현이 되지 않았으나 蜂藥鍼液 전처치군에서는 강하게 발현되었다.

6. MCP-3와 IL-8은 calcium ionophore 자극시 발현되었으나 蜂藥鍼液 전처치군에서는 calcium ionophore 자극군에 비하여 발현이 되지 않았다

IV. 參考文獻

1. 고희균, 김영배, 김창환, 강성길, 김지영. 蜂毒藥鍼療法の 抗炎症 作用에 대한 實驗的 研究. 대한침구학회지. 1998 : 15(1) : 318-331.
2. 권기록, 김창환, 고희균. 蜂毒에 대한 考察. 대한침구학회지. 1994 : 11(1) : 159-171.
3. 고희균. 蜂鍼毒療法이 抗炎鎮痛 및 解熱에 미치는 效能에 관한 實驗的 研究. 대한한의학회지. 1992 : 13(1) : 283-292.
4. Assen E. SK. A peptide from the venom of the Honey Bee, Brit. Pharmacol. 1973 : 9-10.
5. 莊育民. 中國鍼灸學發展史. 臺北 : 裕臺公司. 1978 : 9-10.
6. Terc, P. The action of the bee stings in rheumatism and gout of the joints. 1910.
7. Tom piek. Venom of the Hymenoptera. Academic Press, London. 1986 : 108-120.
8. 보건사회부. 의약품안전성 시험관리 기준 해설서. 대한보건공정서협회. 1987 : 489-500.
9. Doyle, L. The therapeutic effectiveness of bee venom. NAAS Proceeding. 1980 : 3 : 50-51.
10. 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. 대한침구학회지. 1998 : 15(2) : 97-103.
11. 김지영, 고희균, 김용석, 박용배, 김창환, 강성길. 蜂毒藥鍼療法の 抗炎症 作用에 관한 實驗的 研究. 대한침구학회지. 1998 : 15(1) : 317-331.
12. Holz RW, Fisher SK. Synaptic Transmission and cellular signalling : an overview. In : Iegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, eds. Basic Neurochemistry. Philadelphia : Lippincott-Raven. 1999 : 210-211.
13. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine : some problems and concepts. Arch Biochem Biophys. 1986 ; 246 : 501-514.
14. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol. 1993 : 23 : 21-48.
15. Giatgen A. The Dual Role of Nitric Oxide in Islet β -Cell. New Physiol Sci. 1999 : 14 : 49-53.
16. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. Adv Immunol 1994 : 55 : 97-179.
17. Rollins BJ. Chemokines. Blood 90 : 909-928, 1997.
18. Fox JB, Doerr RC, Lakritz L. Interaction between sample preparation techniques and three methods of nitrite determination. J Assoc Off Anal Chem. 1982 : 65(3) : 690-695.

19. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leukemia Res* 12 : 345-355, 1988
20. 이희문, 조정제, 윤주천, 하운문. 사람 비만세포주(HMC-1)에서 케모카인 및 그 수용체의 유도 및 발현. *대한면역학회지*. 1999 : 21(4) : 335-342.
21. 인창식, 고희균. 蜂毒療法에 대한 韓醫學 最初의 文獻 : 馬王堆醫書의 蜂毒療法 2例. *대한침구학회지*. 1998 : 15(1) : 143-147.
22. 김문호. 蜂毒療法과 蜂鍼療法. 서울 : 한국교육기획. 1992 : 20-37, 41-42, 67-74, 104-112.
23. 성은찬. 알기쉬운 봉침요법. 서울 : 전국농업기술자회 출판부. 1990 : 35.
24. 최승윤. 양봉 새기술. 서울 : 농축산물 기술자원 연구원. 1987 : 117-118.
25. 고문수. 동의학총서·동물성동약. 서울 : 여강출판사. 1993 : 185-190.
26. 朱文鋒. 實用中醫辭典. 陝西. 陝西科學技術出版社. 1992 : 402.
27. Habermann E. : Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In *Venomous Animals and their Venoms*, Academic Press. 1971 : 3 : 61.
28. Feldman PL, Griffith OW, Sheuhr DJ. The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News*. 1993 : 26-38.
29. Koh JY, Choi DW. Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by endotoxins, Differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. *J Neurosci*. 1993 : 8 : 2153-63.
30. Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*. 1991 : 254 : 1503-6.
31. 김정목 외. Helicobacter pylori 감염에 의한 인체 위상피 세포로부터의 Inducible Nitric Oxide Synthase 발현 및 Nitric Oxide 생성. *대한소화기학회지*. 2002 : 39(5) : 324-334.
32. 박영진, 임충식, 권년수, 양한남. 유색가토의 유리체강내에 Nitric Oxide를 주사시 망막에 미치는 영향에 대한 연구. *대한안과학회지*. 1999 : 40(11) : 3079-3087.
33. 서정철, 임강현, 김이화, 김창주, 유영민, 정주호, 인창식, 고희균, 한상원. Scavenging Effect of Bee Venom for Acua-acupuncture against Nitric Oxide. *대한침구학회지*. 2001 : 18(6) : 161-170.
34. Banks and Brown : Some peripheral activities of Apamin, *Toxicon Suppl*. 1976 : 4, 17.
35. Barbara and Rudolf : Chemistry and Pharmacology of Honey Bee venom Academic Press. 1986 : 329-402.
36. Saini SS, Peterson JW, Chopra AK. Melittin binds to secretory phospholipase A2 and inhibits its enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Sep 18 : 238 (2) : 436-442.
37. Bacon KB, Greaves DR, Dairaghi DJ, Schall TJ. The expanding universe of C, CX3C and CC chemokines. In : Thomson A ed, *The cytokine handbook*. 3rd ed. Academic Press, San Diego, 753-775, 1998.
38. Wuyts A, Proost P, Van Damme J. Interleukin-8 and other CXC chemokines. In : Thomson A ed, *The cytokine handbook*.

- 3rd ed. Academic Press, San Diego, 271–311, 1998.
39. Strieter RM, Polverini PJ, Kumkel SL, Ar-
enberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba
J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, Chan
SY, Rocznik S, Shanafelt AB. The func-
tional role of the ELR motif in CXC chemo-
kine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*
270 : 27348–27357, 1995.