

원저

## 蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液이 RAW 264.7 세포의 PGE<sub>2</sub>, COX-2 및 NF- $\kappa$ B에 미치는 影響

정일국 · 송호섭

경원대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

#### The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on PGE<sub>2</sub>, COX-2, and NF- $\kappa$ B Dependent Luciferase Activity in RAW 264.7 Cells

Jeong Il-kook and Song Ho-sueb

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

**Objective** : The purpose of this study was to investigate the effect of Bee Venom and Melittin Solution on the lipopolysaccharide(LPS) and sodium nitroprusside(SNP)-induced expression of prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), cyclooxygenase-2(COX-2), nuclear factor kappa B(NF- $\kappa$ B) and nuclear factor kappa B(NF- $\kappa$ B) dependent luciferase activity in RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line.

**Methods** : The expression of PGE<sub>2</sub> was determined by determination of PGE<sub>2</sub>, COX-2 was by western blotting with corresponding antibodies, NF- $\kappa$ B was by gel mobility shift assay method and NF- $\kappa$ B dependent luciferase activity was investigated by luciferase assay in RAW 264.7 cells.

- 접수 : 2004년 8월 31일 · 수정 : 2004년 11월 26일 · 채택 : 2004년 11월 27일  
· 교신저자 : 송호섭, 서울시 송파구 송파동 20-8 경원대학교 부속한방병원 침구과  
Tel. 02-425-3456 E-mail : hssong70@kyungwon.ac.kr

**Results** : 1. LPS and SNP-induced expression of PGE<sub>2</sub> was significant after 24hour.

2. The 0.5, 1 and 5μg/mL of bee venom and the 5 and 10μg/mL of melittin solution inhibited significantly LPS-induced expression of PGE<sub>2</sub> and the 5μg/mL of bee venom and the 5 and 10μg/mL of melittin solution inhibited significantly SNP-induced expression of PGE<sub>2</sub> compared with control, respectively. The 0.5 and 1μg/mL of bee venom could not significantly inhibit SNP-induced expression of PGE<sub>2</sub> compared with control.

3. The 5μg/mL of bee venom and the 5 and 10μg/mL of melittin solution inhibited significantly LPS and SNP-induced expression of COX-2 compared with control, respectively. The 0.5 and 1μg/mL of bee venom inclined to decrease LPS and SNP-induced expression of COX-2 compared with control.

4. The 0.5, 1 and 5μg/mL of bee venom and the 5 and 10μg/mL of melittin solution inhibited significantly LPS and SNP-induced expression of NF-κB compared with control, respectively.

5. The 0.5, 1 and 5μg/mL of bee venom and the 5 and 10μg/mL of melittin solution inhibited significantly LPS-induced expression of NF-κB dependent luciferase activity and the 1 and 5μg/mL of bee venom and the 5 and 10μg/mL of melittin solution inhibited significantly SNP-induced expression of NF-κB dependent luciferase activity compared with control, respectively. The NF-κB inhibitor also inhibited significantly LPS and SNP-induced expression of NF-κB dependent luciferase activity compared with control.

6. The 0.5, 1 and 5μg/mL of bee venom and the 5 and 10μg/mL of melittin solution inhibited significantly LPS + IFN-γ, TNF-α and LPS + TNF-α-induced expression of NF-κB dependent luciferase activity compared with control, respectively. The NF-κB inhibitor also inhibited significantly LPS and SNP-induced expression of NF-κB dependent luciferase activity compared with control.

**Conclusions** : These results suggest the inhibitory action of bee venom and melittin solution on the inflammatory mediators such as PGE<sub>2</sub>, COX-2 and NF-κB.

**Key words** : Bee Venom, Melittin, PGE<sub>2</sub>, COX-2, NF-κB, NF-κB dependent luciferase activity, LPS, SNP, RAW 264.7 cells

## I. 緒 論

蜂藥鍼療法은 양봉 꿀벌(*Apis mellifera ligustica*)

의 毒囊에 있는 蜂毒을 추출 가공한 후 질병과 有關한 穴位, 압통점 혹은 체표의 촉진으로 얻어지는 양성 반응점에 주입하는 鍼灸治療와 蜂毒의 生化學的 特異 物質이 人體에 미치는 藥理作用을 질병 치료에 이용하는 新鍼療法の 일종이다<sup>1)</sup>.

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고 祛風除濕, 止疼痛, 解痙平喘, 消腫降壓하는 효능이 있어<sup>1)</sup> 鎭痛, 消炎,<sup>4-8)</sup> 鎭痙,<sup>9)</sup> 抗癌<sup>10)</sup> 免疫增強<sup>12)</sup> 作用을 나타내고 있다.

최근 蜂藥鍼을 이용한 임상적 연구로서 류마티드 關節炎<sup>13)</sup>, 膝關節炎<sup>14)</sup>, 腰椎間板脫出症<sup>15)</sup>, 胸·腰椎壓迫骨折<sup>16)</sup>, 足跟痛<sup>17)</sup>, 두피지루피부염<sup>18)</sup> 등 蜂藥鍼이 염증과 손상성 질환에 유효함이 보고되었다.

蜂藥鍼液의 실험적 연구로서 關節炎 滑液細胞<sup>19)</sup>, 實驗的 關節炎<sup>20)</sup>, 神經芽細胞腫<sup>21)</sup>, 細胞活性<sup>22)</sup>, 黑色腫<sup>11)</sup>, 細胞毒性<sup>23)</sup>, 炎症 및 痛症에 關聯 遺傳子 발현에 미치는 영향<sup>24)</sup> 등이 보고되었고, 蜂藥鍼液의 항염증 효과에 대한 기전 연구<sup>25)</sup>는 최근 들어 진행되고 있지만 부족한 실정이다.

이에 연구자는 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液의 항염증 효과에 대한 기전을 연구하기 위하여 RAW 264.7 cells에 lipopolysaccharide(LPS), sodium nitroprusside(SNP)로 염증을 유도하고, 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液을 처리하여 炎症 기전의 指標로 알려진 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), cyclooxygenase-2(COX-2), nuclear factor kappa B(NF-κB)에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재 료

#### 1) 시약

LPS 1μg/mL, SNP 200μM, 기타 細胞培養과 western blotting 試藥 등은 연구용으로 적합한 것들을 사용하였다.

#### 2) 시료

乾燥 粉末 蜂毒[乳蜜蜂毒(蜂, 韓國)]과 Melittin [Sigma, USA]을 사용하였다.

#### 3) 기기

이 실험에 사용된 기기는 CO<sub>2</sub> Incubator (MCO-17AIC : Sanyo Electric Biomedical Co., Japan), Centrifuge (HA-1000-3 : Hanil science industrial Co., Korea), Gel dryer (Model 583 Gel dryer : Bio-Rad Laboratories, USA), Spectrometry (Spectra MAX plus : Molecular devices, USA), Luminometer (LB 96P WinGlow : Laboratorium prof, Germany), ELISA reader (TECAN Austria GmbH : Untersbergstraße, Austria), Electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, USA) 등이다.

## 2. 방 법

### 1) 시료 조제

粉末 蜂毒을 3차 증류수로 희석하여 0.5, 1 및 5μg/mL 농도로 나누어 蜂藥鍼液으로 사용하였고, melittin을 3차 증류수로 희석하여 5, 10μg/mL 농도로 나누어 melittin 藥鍼液으로 사용하였다.

### 2) 세포주 배양

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

### 3) 군 분류

#### (1) 정상군(Normal Group)

정상군은 RAW 264.7 cells에 아무 처리도 하지 않았다.

(2) 대조군(Control Group)

대조군은 RAW 264.7 cells에 각각 LPS 1μg/mL와 SNP 200μM를 처리하였다.

단, NF-κB dependent luciferase activity를 측정하는 실험의 경우 대조군은 RAW 264.7 cells에 LPS 1μg/mL, SNP 200μM, LPS+IFN-γ 1μg/mL, TNF-α 1μg/mL, LPS+TNF-α 1μg/mL를 각각 처리하였다.

(3) 실험군(Treatment group)

실험군은 RAW 264.7 cells에 LPS 1μg/mL, SNP 200μM를 처리하고 각각에 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5μg/mL와 melittin 藥鍼液 5, 10μg/mL를 처리하였다.

단, NF-κB dependent luciferase activity를 측정하는 실험의 경우 RAW 264.7 cells에 蜂藥鍼液 5μg/mL만을 처리한 군과 LPS 1μg/mL, SNP 200μM, LPS+IFN-γ 1μg/mL, TNF-α 1μg/mL, LPS+TNF-α 1μg/mL를 처리하고 각각에 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5μg/mL과 Melittin 5, 10μg/mL 및 NF-κB inhibitor 20을 처리한 군으로 구분하였다.

4) LPS와 SNP에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub>의 시간별 발현 정도 및 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS와 SNP에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub>의 발현에 미치는 영향

Determination of PGE<sub>2</sub> 방법을 이용하여 유리된 방사선 동위원소의 정도로 PGE<sub>2</sub>를 측정하였다.

(1) LPS와 SNP에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub>의 시간별 발현 정도

RAW 264.7 cells(1×10<sup>6</sup> cells/dish)에 표시된 [<sup>3</sup>H]arachidonic acid(0.4 μCi/dish)을 1μg/mL LPS 및 20μM SNP로 자극하고 0, 6, 12, 24, 48, 72 시간 동안 각각 배양한 후 가운데 있는 지질을

ethyl acetate로 추출하고 ethyl acetate/isooctane/ acetic acid/H<sub>2</sub>O 용매로 silica gel G plate의 TLC상에서 분리하였다. PGD<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub>에 해당하는 곳을 얻어 방사성 동위원소를 liquid scintillation counting으로 측정하였다.

(2) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS와 SNP에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub>의 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 cells(1×10<sup>6</sup> cells/dish)에 표시된 [<sup>3</sup>H]arachidonic acid(0.4 μCi/dish)을 1μg/mL LPS 및 20μM SNP로 자극하고 24시간 후에 0.5, 1, 5 μg/mL 蜂藥鍼液 및 5, 10μg/mL melittin 藥鍼液을 각각 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후, 가운데 있는 지질을 ethyl acetate로 추출하고 ethyl acetate/isooctane/acetic acid/H<sub>2</sub>O 용매로 silica gel G plate의 TLC상에서 분리하였다. PGD<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub>에 해당하는 곳을 얻어 방사성 동위원소를 liquid scintillation counting으로 측정하였다.

5) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS와 SNP에 의해 유도된 COX-2의 발현에 미치는 영향

Western blotting<sup>26)</sup>을 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 뒤에 scraper로 잘 긁어서 세포를 모은 뒤 800 rpm에서 원심 분리하였다. 위 상층액은 버리고 cold PBS로 세척한 뒤 蜂藥鍼液의 양에 따라 50 μl에서 100μl까지 lysis buffer[tris HCl(ph 8.0) 50mM, NaCl 150mM, sodium azide 0.02%, SDS 0.2%, igapel 630(or NP 40) 1%, NaF 100mM (0.5%), PMSF 1mM, sodium deoxycolate 0.5%,

aprotinin 50 $\mu$ g/mL, EDTA 0.5mM, EGTA 0.1mM]를 넣고 4 $^{\circ}$ C를 유지하여 3시간에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이 때 반응하는 초기 한 시간 동안 10분마다 꺼내서 와룬시켰다. 용해가 끝나면 4 $^{\circ}$ C, 14000rpm으로 원심분리한 후 상층액을 모아 bio rad protein assay 방법으로 단백질을 정량하여 동량으로 나누어 전기영동하였다.

(2) 전기영동

겔을 만들 유리판을 EtOH로 세척하고 유리판을 고정된 후 원하는 농도에 따라 분리 겔을 제조하여 주입하였다. 4mL씩 주입하여 윗부분 2cm지점까지만 주입하고, 주입한 다음 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 빗을 쫓는데, 퇴적 겔은 굳으면서 부피가 줄어들기 때문에 충분히 넘칠 듯이 부었다. 30분 후 퇴적 겔이 건조되면 빗을 빼고 D.W.로 세척한 후 유리판 그대로 조립하였다. 조립한 유리판을 chamber에 장착하고 running buffer(10 $\times$ 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 $\mu$ l, protein양이 약 30-50 $\mu$ g정도 되는 sample 10-20 $\mu$ l를 장착하고, 띠가 낮은 volt에서 정교하게 전개되도록 40-50 volt로 약 30분 동안 가동하였다. Stacking gel의 전개가 끝나면 80~100volt로 약 2시간 30분 정도 분리 겔을 전개시켰다.

(3) 전이

겔 크기의 nitrocellulose membrane 1장, 3M paper 2장을 준비한 후 tray에 ①PBS, ②transfer

buffer(tris base 3.03g, glycine 14.63g, methanol 200mL) ③staining solution(coomassie blue staining solution)을 준비하였다. Membrane은 미리 물에 적셔놓고 ④에 3M paper와 겔, ⑤에 membrane, ⑥에 겔을 넣고 30분 동안 흔든 후 ④의 3M paper와 gel을 ⑤로 옮기고, transfer sandwich를 조립하였다. Chamber에 sandwich를 끼우고 얼음통을 넣고 transfer buffer를 붓는데, black panel은 음극, white panel은 양극으로 하였고, 실온에서 80 volt로 1시간 30분간 전이시켰다.

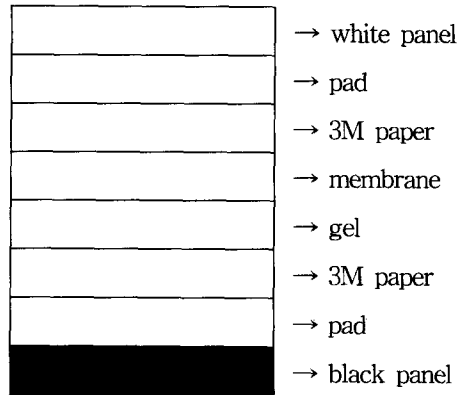


Fig. 1. Transfer Sandwich in Western Blotting

(4) 차단

전이된 membrane을 TBS-T 용액(0.05% tween-20, 150mM NaCl, 10mM 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(COX-2 goat polyclonal IgG, santa cruz biotechnology)

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(anti-mouse Ig, horseradish peroxidase)

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(amer sham pharmacia biotechnology), ECL film, poly glove, cassette, blue tip, 1mL 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 용액을 1, 2를 1:1 비율로 섞어 membrane에 뿌리고 골고루 용액을 묻힌 다음 1분간 반응시킨 후 ECL 용액을 충분히 제거하고 그 위에 랩을 씌웠다. Film을 cassette에 올려 놓고 membrane 판을 5분에서 10분 정도 film에 찍었다. Developer는 검은 띠가 확실해지면 건지고 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 광학농도계를 이용하여 相對濃度를 각각 측정 비교하였다.

6) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS와 SNP에 의해 유도된 NF-κB의 발현에 미치는 영향

NF-κB의 DNA 결합 활성은 gel mobility shift assay(EMSA)<sup>26)</sup>에 의하여 정량하였다. DNA-protein hybrids의 비교치는 UVP 4.0 software로 농도 분석을 시행하였다.

(1) 시료준비 및 정량측정

핵추출물은 기보고된 방법을 약간 변형하여 배양된 Raw 264.7 세포를 사용하여 분리한다<sup>27)</sup>. 배양된 세포를 PBS로 2회 세척한 후 4°C에서 10,000g로 5분간 원심 분리하여 PBS를 제거한다. 세포는 10mM HEPES (pH 7.9), 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM dithiothreitol(DTT), 0.2mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)로 구성된 완충액을 400μl 넣어 vortex하고 10분간 ice에서 보관한 후 4°C에서 25,000g로 6분간 원심 분리한다. 원심분리 후 상층액은 버리고 얻어진 침전물은 20mM HEPES(pH 7.9), 420mM NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 20%(v/v) glycerol, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF로 구성된 차가운 완충액을 100μl 넣어 vortex하고 ice에서 20분간 보관한 후 4°C에서 25,000g로 6분간 원심 분리하여 상층액 95μl를 취해 이 용액을 분주하여 -70°C에 저장한다. 최종추출물의 단백질양은 Bio-rad protein assay kit를 사용하여 측정한다. 단백질양의 측정 방법은 다음과 같다. 1.46mg/mL bovine plasma gamma globulin stock standard를 샘플에 사용한 희석용액으로 희석하여 신선한 단백질 standard를 준비한다. 단백질 표준품과 준비한 시료를 각각 10μl씩 96 well microplate 에 넣고 단백질 정량을 위하여 Bio-rad protein dye reagent를 200 μl씩 혼합하여 5분 동안 반응시킨 후 ELISA plate reader에서 595nm로 흡광도를 측정하여 표준품에 대한 정량곡선에 대입하여 시료의 단백질 정량 값을 산출한다.

(2) Oligonucleotide probe 제조

핵추출물과 NF-κB oligonucleotide의 결합정도를 알아보기 위해 EMSA를 수행한다. DNA 결합 부위에 대한 NF-κB oligonucleotide (promega, catalog E3291)는 NF-κB DNA 결합부위에 대한 consensus sequence인 -GGGGACTTTCC-가 포함되어있는 이중가닥 oligonucleotide이다. AP-1 및 NF-κB oligonucleotide probe를 만들기 위해서는 1.5mL 소형 원심분리용 튜브에 이중가닥 oligonucleotide(5ng) 3μl와 10x polypolynucleotide kinase buffer 2.5μl, 100μCi [<sup>32</sup>P]ATP를 혼합한 후 추가적으로 증류수를 넣어 최종 부피가 25 μl가 되도록 하고 이 혼합액에 1μl의 T4 kinase (5unit)를 최종적으로 넣어주었고 혼합액이 들어있는 튜브를 반응이 일어나도록 37°C에서 45분간 방치한다. 반응을 시킨 후에 50mM Tris/HCl (pH 7.5)을 넣어서 50μl의 부피가 되도록 oligonucleotide가 들어있는 혼합액을 희석한다. Sephadex G-50이 들어있는 Nick column(Pharmacia Biotech)를 가지고 NF-κB oligonucleotide probe를 순수 정제하는데 정제방법은 다음과 같다. Column 안에 있는 용액을 버린 후 equilibration buffer인 10mM Tris-HCl(pH 7.5)로 한번 세척하고 column을 지지대에 부착한 후 대략 3mL의 equilibration buffer를 사용하여 gel을 균질화 한다. Equilibration buffer가 gel bed에 완전히 흡수된 후 NF-κB oligonucleotide 반응용액 50μl를 column에 넣어 주었고 부가적으로 400μl buffer용액을 넣은 다음 gel bed로 들어가게 한다. Oligonucleotide probe 용액을 받기 위해 column 아래 부분에 tube를 설치한 후 추가로 400μl를 더 넣어주어 방사선 표지된 oligonucleotide 용액을 정제한다. 정제된 oligonucleotide 용액 1μl를 피펫팅하여 2mL의 scintillation cocktail용액이 들어있는 vial에 넣어 scintillation counter (Tri-carb 2000 CA, Packard Instrument Co., Downers Grove, IL, USA)를 사용하여 oligonucleotide probe의 radioactivity를

측정한다.

(3) PAGE 전기영동

Oligonucleotide probe의 결합반응을 하기 위하여 5μl의 완충액 [10mM Tris(pH 7.5), 100mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 0.1μg/μl poly dI-dC, 0.1μg/μl bovine serum albumin]과 5μg의 핵 추출물을 혼합한 후 이 혼합액을 15분간 4°C에서 미리 반응시킨다. 그 다음에 [<sup>32</sup>P] ATP로 표지된 100,000cpm의 oligonucleotide probe를 넣어주고 증류수로 혼합액의 최종부피를 25μl로 한 후 상온에서 20분동안 방치하여 혼합액을 반응시킨다. NF-κB의 결합 능력을 알아보기 위한 EMSA를 수행하기 위하여 위에서 얻은 oligonucleotide 반응액에 2μl 0.1%(w/v) bromophenol blue dye를 넣어서 전기영동에 사용한다. 10mL의 polyacrylamide:bis (30%:0.8% w/v)와 38.4mL의 증류수 그리고 5x TBE (500mM Tris pH8.0, 450mM borate, 5mM EDTA) 2.5mL를 혼합한 용액에 시험당일 제조된 10%(w/v) ammonium persulfate 0.5mL과 TEMED 25μl를 부가 혼합하여 6% non-denaturing gel을 조제한 다음, 깨끗이 세척한 후 조립된 전기영동 유리판에 용액을 부어 gel을 형성한다. 전기영동 buffer는 0.25x TBE buffer를 사용하고 전기영동 gel은 150V 1시간동안 prerunning한 후, bromophenol blue dye가 함유된 반응액과 혼합하여 loading하고 150V로 전기영동 한다. Competition(specific and non specific) assay와 NF-κB 구성 unit인 p65 및 p50의 antibodies를 이용하여 super shift 효과를 토대로 NF-κB DNA-protein band를 확인한다.

전기영동이 끝난 gel은 3M filter paper에 polyacrylamide gel을 올려놓고 slab gel dryer(Hoffer Scientific Co. SE-1160)로 80°C에서 1시간 건조시킨 후 -70°C에서 감광시킨다. 하루 후 감광된 X-ray film(Kodak Bio-Max film)을 현상하여

NF-κB 결합능의 활성도를 확인한다.

### 7) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 NF-κB dependent luciferase activity에 미치는 영향

NF-κB dependent luciferase activity는 luciferase assay를 이용하여 측정하였다.

#### (1) 세포배양 및 세포내 유전자 주입

Raw 264.7 세포를  $2 \times 10^5$  cells로 penicillin (100U/mL), streptomycin(100mg/mL) 및 10% heat inactivated FBS가 포함된 DMEM 배지에 배양한다. 세포가 90% 이상 배양 plate에 차면 세포에 plasmid를 lipofectamine을 이용하여 세포 내로 도입시킨다. Transfection을 위하여 DNA-lipofectamine을 준비한다. 이때 조성은 2000 complexes로 Dilute *NF-κB-luc* plasmid DNA 0.8μg, β-gal plasmid DNA 0.2μg 및 Opti-MEM® I Reduced Serum Medium without serum(혹은 other medium without serum) 50μl를 넣어 섞는다. Lipofectamin 2000을 사용하기 전에 Opti-MEM® I Medium(혹은 other medium without serum)50μl에 Lipofectaminea™ 2000 3μl를 섞어 실온에서 배양하고 이때 DNA를 섞어준다. Lipofectamine™ 2000에 희석된 DNA 100μl를 5분간 배양하여 섞고 20분 동안 실온에서 방치하여 DNA-Lipofectamine™ 2000 복합체를 형성시켜 실온에서 6시간동안 안정시킨다. Optimem serum-free medium으로 배지를 잘 닦고 DNA-Lipofectamine™ 2000 complexes 100μl를 각 배지에 넣어 가볍게 흔들어서 transfection 시킨다. 이때 *NF-κB-luciferase* reporter를 비교군으로 사용한다. 37°C CO<sub>2</sub> incubator 에서 24-48 시간 배양 후 transfection이 이루어진다. transfection 24시간 후 48시간 더 배양하고 LPS(1μg/mL), SNP(20μM) 등을 처리한다.

#### (2) Luciferase assay

1 volume의 물을 5배 volume의 lysis buffer에 넣어 사용전 실온에서 1 volume의 Equilibrate lysis buffer를 만든다. 배양세포의 배지를 버리고 PBS로 씻고 lysis buffer 1 volume을 넣은 후 세포를 떼어낸다. 얼음속의 microcentrifuge tube에 세포를 넣고 12,000×G 에서 15초간 원심분리한 후 상층액 또는 cell lysate를 -70°C에서 보관한다. 배지당 cell lysate 20μl를 넣은 plate를 injector와 같이 luminomete에 설치하고 injector를 통하여 배지당 Luciferase Assay Reagent 100 μl를 넣고 10초간 빛의 강도로 그 값을 측정한다. β-Galactosidase Assay 도 값도 같은 방법으로 시행한다.

#### 8) 통계 처리

모든 실험값은 평균값±표준편차로 하였고, 통계학적 유의성은 ANOVA test 후 대조군과 실험군의 비교는 tukey 방법에 의해 P<0.05인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

## III. 成 績

### 1. LPS와 SNP에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub>의 시간별 발현 정도

LPS와 SNP를 각각 Raw 264.7 cells에 처리한 후 0, 6, 12, 24, 48, 72 시간별로 PGE<sub>2</sub> 생성 정도를 비교한 결과, LPS와 SNP 처리군에서 24시간 이후 모두 유의성 있게 나타나 실험 시간을 24시간에 고정 시켰다(Fig. 2, 3).



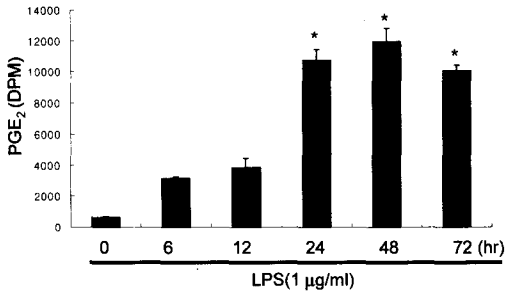


Fig. 2. Time Course Generation of PGE<sub>2</sub> after Treatment of LPS in Raw 264.7 Cells  
\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control.

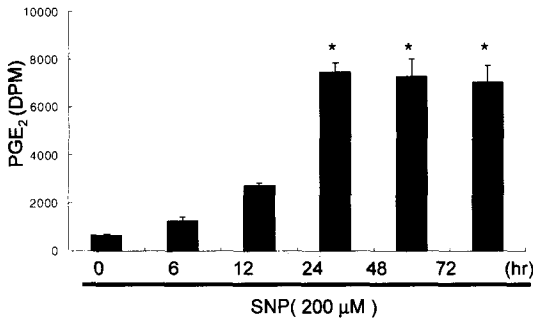


Fig. 3. Time Course Generation of PGE<sub>2</sub> after Treatment of SNP in Raw 264.7 Cells  
\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control.

## 2. 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 PGE<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향

### 1) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS로 유도된 PGE<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS로 유도된 PGE<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5µg/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10µg/mL 처리군 모두에서 대조군에 비하여 PGE<sub>2</sub> 발현이 유의하게(P<0.05) 감소하였다(Fig. 4).

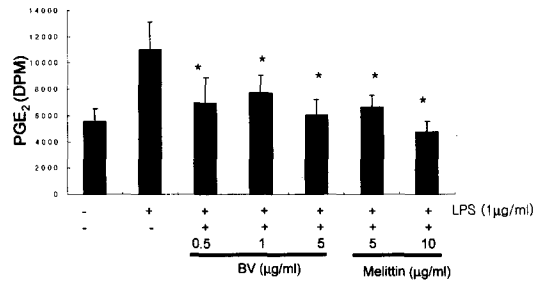


Fig. 4. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on LPS-Induced Expression of PGE<sub>2</sub> in Cultured RAW 264.7 Cells

\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control. + : Treating Substances. - : Non-Treating Substances.

### 2) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 SNP로 유도된 PGE<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 SNP로 유도된 PGE<sub>2</sub> 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 0.5, 1µg/mL 처리군에서 대조군에 비하여 PGE<sub>2</sub> 발현의 유의한 변동이 보이지 않았으며, 蜂藥鍼液 5µg/mL 처리군 및 melittin 藥鍼液 5, 10µg/mL 처리군에서는 대조군에 비하여 PGE<sub>2</sub> 발현이 유의하게(P<0.05) 감소하였다(Fig. 5).

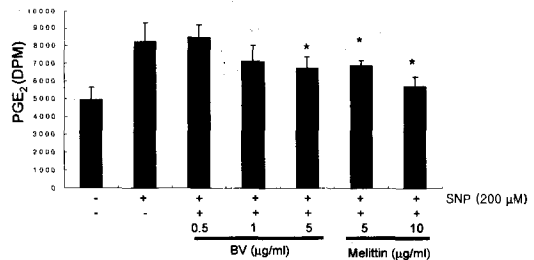


Fig. 5. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on SNP-Induced Expression of PGE<sub>2</sub> in Cultured RAW 264.7 Cells

\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control. + : Treating Substances. - : Non-Treating Substances.

### 3. 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 COX-2 발현에 미치는 영향

#### 1) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS로 유도된 COX-2 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS로 유도된 COX-2 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 0.5, 1μg/mL 처리군에서 대조군에 비하여 COX-2 발현이 감소하는 경향을 보였으며, 蜂藥鍼液 5μg/mL 처리군 및 melittin 藥鍼液 5, 10μg/mL 처리군에서는 대조군에 비하여 PGE<sub>2</sub> 발현이 유의하게(P<0.05) 감소하였다(Fig. 6, 7).

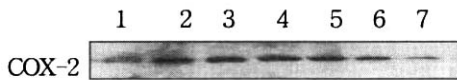


Fig. 6. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on the LPS-Induced COX-2 Expression by Western Blotting Analysis(1 : Nor, 2 : Con, 3 : LPS+BV 0.5, 4 : LPS+BV1, 5 : LPS+BV5, 6 : LPS+Mel 5, 7 : LPS+Mel 10)

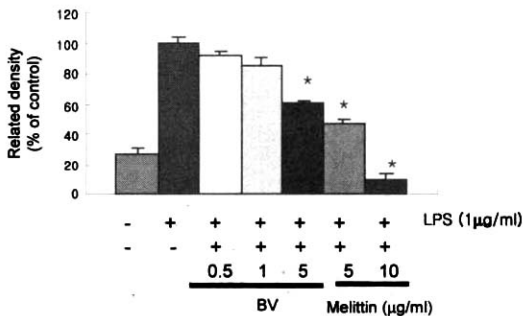


Fig. 7. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on LPS-Induced Expression of COX-2 in Cultured RAW 264.7 Cells

\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control. + : Treating Substances. - : Non-Treating Substances.

#### 2) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 SNP로 유도된 COX-2 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 SNP로 유도된 COX-2 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 0.5, 1μg/mL 처리군에서 대조군에 비하여 COX-2 발현이 감소하는 경향을 보였으며, 蜂藥鍼液 5μg/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10μg/mL 처리군에서는 대조군에 비하여 COX-2 발현이 유의하게(P<0.05) 감소하였다(Fig. 8, 9).

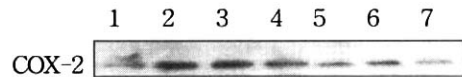


Fig. 8. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on the SNP-Induced COX-2 Expression by Western Blotting Analysis(1 : Nor, 2 : Con, 3 : SNP+BV 0.5, 4 : SNP+BV 1, 5 : SNP+BV 5, 6 : SNP+Mel 5, 7 : SNP+Mel 10)

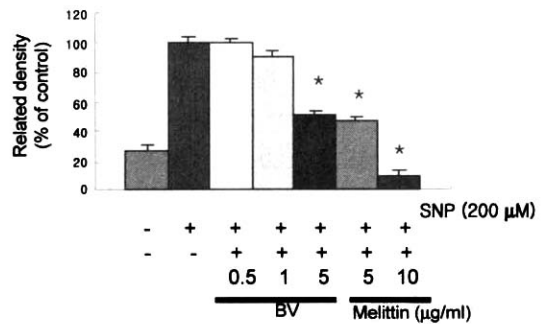


Fig. 9. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on SNP-Induced Expression of COX-2 in Cultured RAW 264.7 Cells

\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control. + : Treating Substances. - : Non-Treating Substances.

#### 4. 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 NF-kB 발현에 미치는 영향

##### 1) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS로 유도된 NF-kB 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS로 유도된 NF-kB 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 $\mu$ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/mL 처리군 모두에서 대조군에 비하여 NF-kB 발현이 유의하게(P<0.05) 감소하였다(Fig. 10, 11).

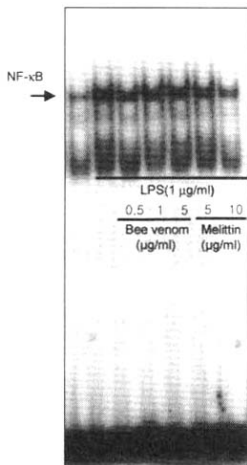


Fig. 10. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on the LPS-Induced NF-kB Expression by Western Blotting Analysis

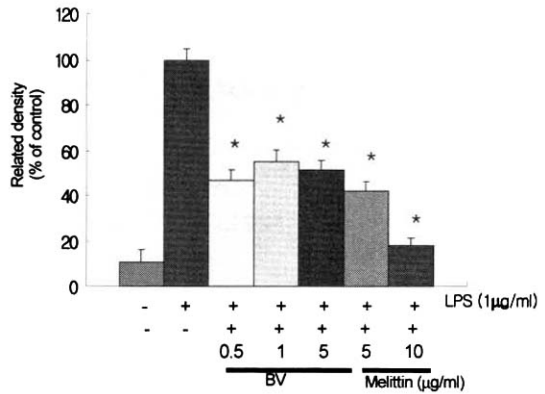


Fig. 11. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on LPS-Induced Expression of NF-kB in Cultured RAW 264.7 Cells

\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control. + : Treating Substances. - : Non-Treating Substances.

##### 2) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 SNP로 유도된 NF-kB 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 SNP로 유도된 NF-kB 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 $\mu$ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/mL 처리군 모두에서 대조군에 비하여 NF-kB 발현이 유의하게(P<0.05) 감소하였다 (Fig. 12, 13).

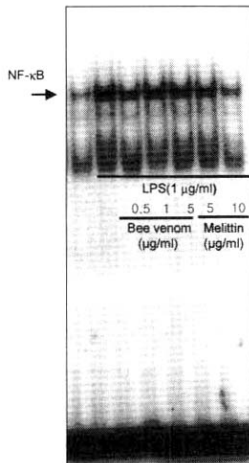


Fig. 12. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on the SNP-Induced NF-κB Expression by Western Blotting Analysis

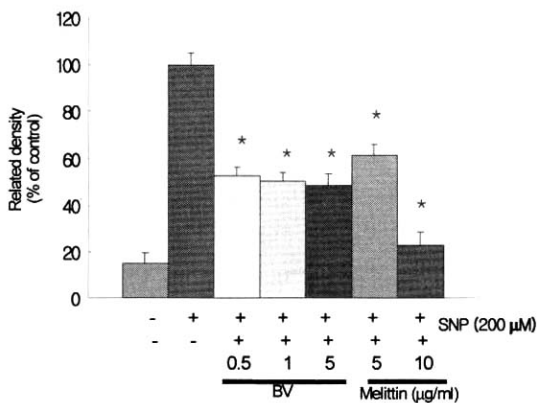


Fig. 13. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on SNP-Induced Expression of NF-κB in Cultured RAW 264.7 Cells

\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control. + : Treating Substances. - : Non-Treating Substances.

### 5. 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 NF-κB dependent luciferase 활성에 미치는 영향

#### 1) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS로 유도된 NF-κB dependent luciferase 활성에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS로 유도된 NF-κB dependent luciferase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 蜂藥鍼液 5μg/mL 처리군, LPS 1 μg/mL + 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5μg/mL 처리군, LPS 1 μg/mL + melittin 藥鍼液 5, 10μg/mL 처리군 및 LPS 1μg/mL + NF-κB inhibitor 20 처리군 모두에서 대조군에 비하여 NF-κB dependent luciferase 활성이 유의하게(P<0.05) 감소하였다(Fig. 14).

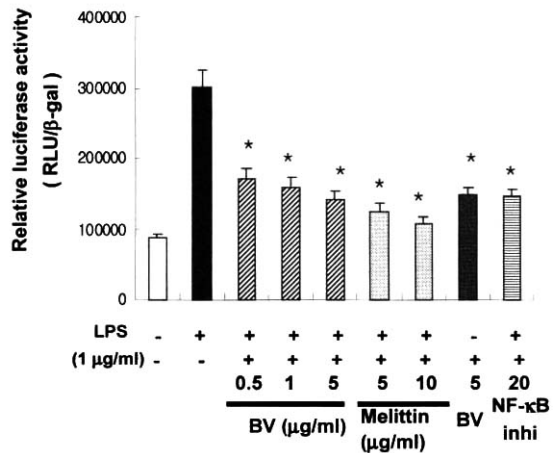


Fig. 14. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on LPS-Induced Expression of NF-κB Luciferase Activity in Cultured RAW 264.7 Cells

\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control. + : Treating Substances. - : Non-Treating Substances.

2) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 SNP로 유도된 NF-kB dependent luciferase 활성에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 SNP로 유도된 NF-kB dependent luciferase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 SNP 200 $\mu$ M + 蜂藥鍼液 0.5 $\mu$ g/mL 처리군에서 NF-kB dependent luciferase 활성이 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였고, 蜂藥鍼液 5 $\mu$ g/mL 처리군, SNP 200 $\mu$ M + 蜂藥鍼液 1, 5 $\mu$ g/mL 처리군, SNP 200 $\mu$ M + melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/mL 처리군 및 SNP 200 $\mu$ M + NF-kB inhibitor 20 처리군에서는 대조군에 비하여 NF-kB dependent luciferase 활성이 유의하게 (P<0.05) 감소하였다(Fig. 15).

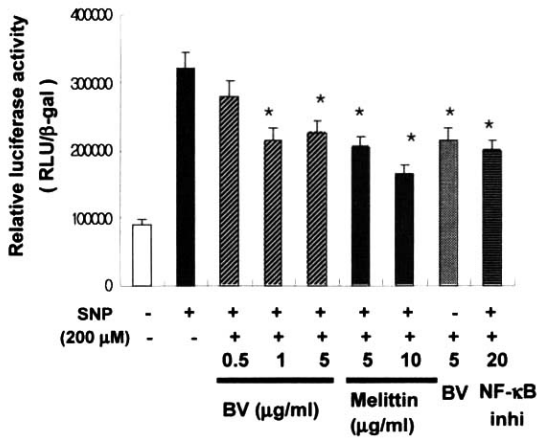


Fig. 15. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on SNP-Induced Expression of NF-kB Luciferase Activity in Cultured RAW 264.7 Cells

\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control. + : Treating Substances. - : Non-Treating Substances.

3) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS + INF- $\gamma$ 로 유도된 NF-kB dependent luciferase 활성에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS + INF- $\gamma$ 로

유도된 NF-kB dependent luciferase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 蜂藥鍼液 5 $\mu$ g/mL 처리군, LPS + INF- $\gamma$ (1 $\mu$ g/mL) + 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 $\mu$ g/mL 처리군, LPS + INF- $\gamma$ (1 $\mu$ g/mL) + melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/mL 처리군 및 LPS + INF- $\gamma$ (1 $\mu$ g/mL) + NF-kB inhibitor 20 처리군 모두에서 대조군에 비해 NF-kB dependent luciferase 활성이 유의하게(P<0.05) 감소하였다(Fig. 16).

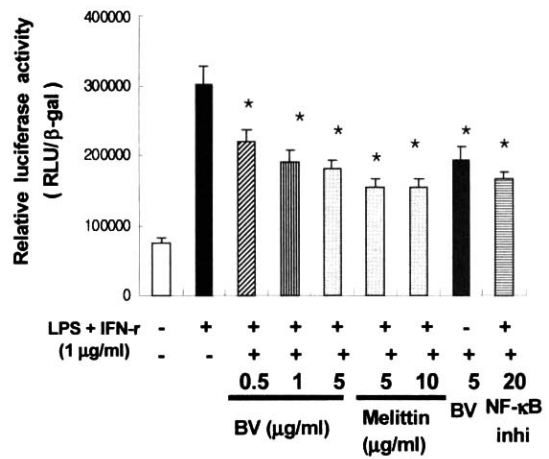


Fig. 16. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on LPS + IFN- $\gamma$  -Induced Expression of NF-kB Luciferase Activity in Cultured RAW 264.7 Cells

\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control. + : Treating Substances. - : Non-Treating Substances.

4) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 TNF- $\alpha$ 로 유도된 NF-kB dependent luciferase 활성에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 TNF- $\alpha$ 로 유도된 NF-kB dependent luciferase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 蜂藥鍼液 5 $\mu$ g/mL 처리군, TNF- $\alpha$  1 $\mu$ g/mL + 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 $\mu$ g/mL 처리군, TNF- $\alpha$  1 $\mu$ g/mL + melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/

mL 처리군 및 TNF-α 1μg/mL + NF-κB inhibitor 20 처리군 모두에서 대조군에 비하여 NF-κB dependent luciferase 활성이 유의하게(P<0.05) 감소하였다(Fig. 17).

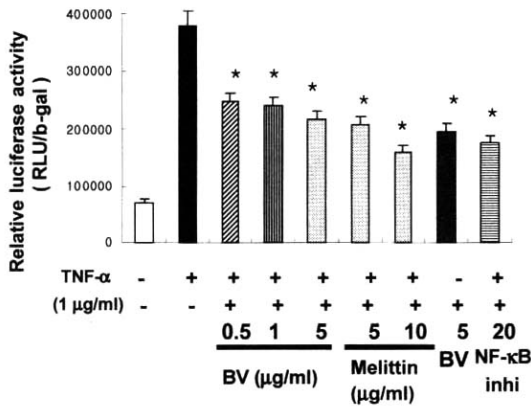


Fig. 17. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on TNF-α -Induced Expression of NF-κB Luciferase Activity in Cultured RAW 264.7 Cells

\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control. + : Treating Substances. - : Non-Treating Substances.

### 5) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS + TNF-α로 유도된 NF-κB dependent luciferase 활성에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS + TNF-α로 유도된 NF-κB dependent luciferase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 蜂藥鍼液 5μg/mL 처리군, LPS + TNF-α(1μg/mL) + 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5μg/mL 처리군, LPS + TNF-α(1μg/mL) + melittin 藥鍼液 5, 10μg/mL 처리군 및 LPS + TNF-α(1μg/mL) + NF-κB inhibitor 20 처리군 모두에서 대조군에 비하여 NF-κB dependent luciferase 활성이 유의하게(P<0.05) 감소하였다 (Fig. 18).

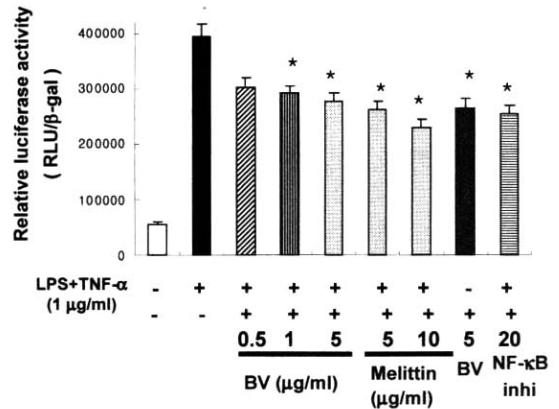


Fig. 18. The Effects of Bee Venom and Melittin Solution on LPS + TNF-α -Induced Expression of NF-κB Luciferase Activity in Cultured RAW 264.7 Cells

\* : P<0.05 Statistical Significance Compared with Control. + : Treating Substances. - : Non-Treating Substances.

## IV. 考 察

일반적으로 염증 및 통증에 관여한다고 알려진 prostaglandin(PG)이 생성되는 기전은 LPS, SNP 또는 다른 자극에 의해 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), interleukin-6(IL-6) 같은 염증성 cytokine이 분비되면, phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)가 활성화되고 PLA<sub>2</sub>에 의해 세포막의 phospholipid에서 arachidonic acid(AA)가 분비되고 세포내 AA는 cyclooxygenase(Cox)에 의해 PG로 변환된다. 또한 위에서 언급한 염증성 cytokine이 nuclear factor kappa B(NF-κB), inducible nitric oxide synthetase(iNOS), TNF-α, COX-2의 발현을 유도하여 炎症이나 細胞消滅이 유발되는 것으로 알려져 있다.<sup>28)</sup> 이 중 세포의 염증반응에는 TNF-α 등과 같은 염증 매개 물질 및

NF- $\kappa$ B와 같은 전사 인자의 활성이 관련되며<sup>29)</sup>, NF- $\kappa$ B의 활성은 염증 반응에 관여하는 COX-2 및 신경세포의 산화적 손상을 유발하는 nitric oxide(NO) 등을 생성하는 iNOS의 발현과 관련되고 있고, NF- $\kappa$ B의 활성이 증가되면 COX-2의 활성화에 의해 염증반응을 증가시킴으로서 세포 소멸을 유발한다고 보고되고 있다<sup>26)</sup>.

蜂藥鍼療法은 蜂毒을 일정한 방법으로 추출 가공하여 질병과 유관한 穴位, 압통점 혹은 체표의 축진으로 얻어지는 양성 반응점에 주입하는 刺鍼效果和 蜂毒의 生化學的 特異 物質이 인체에 미치는 藥理作用을 질병 치료에 이용하는 新鍼療法の 일종이며<sup>1)</sup>, 이는 약 2000年前부터 民間療法の 하나로 關節炎, 痛風 等の 諸疾患에 應用<sup>1)</sup>되어 왔다.

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고 祛風除濕, 止疼痛, 補益精氣, 消腫降壓하여<sup>1)</sup> 鎮痛, 消炎<sup>4-5)</sup>, 鎮痙<sup>9)</sup>, 抗癌<sup>10)</sup>, 免疫 增強<sup>12)</sup>, 循環促進, 抗菌, 放射能抵抗性<sup>1)</sup> 등의 作用이 있다.

蜂毒의 成分은 enzymes, peptides, non peptide components로 구성되어 있다<sup>1)</sup>. 이 중 enzymes의 주요 성분은 PLA<sub>2</sub>와 hyaluronidase 등이 있고, 乾燥 蜂毒의 약 50%를 구성하고 있는 peptides에는 melittin, apamin, MCD peptide 등이 있는데, 그 중 melittin은 총량 중 40-50%를 차지하는 蜂毒의 주성분으로 溶血, 酵素, 抗炎 作用이 있다. 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>30)</sup>.

최근 蜂藥鍼을 이용한 임상적 연구로 류마토이드 關節炎<sup>13)</sup>, 膝關節炎<sup>14)</sup>, 腰椎間板脫出症<sup>15)</sup>, 胸·腰椎壓迫骨折<sup>16)</sup>, 足跟痛<sup>17)</sup>, 두피지루피부염<sup>18)</sup> 등에 蜂藥鍼의 有效함이 보고되었다.

蜂藥鍼液의 실험적 연구로는 關節炎 滑液細胞<sup>19)</sup>, 實驗的 關節炎<sup>20)</sup>, 神經芽細胞腫<sup>21)</sup>, 細胞活性<sup>22)</sup>, 黑

色腫<sup>11)</sup> 등에 蜂藥鍼液이 유의한 영향을 미침과 細胞毒性<sup>23)</sup>에 대해 보고되었다. 또한 炎症 및 痛症에 關聯 遺傳子 발현에 미치는 영향<sup>24)</sup>을 비롯하여 蜂藥鍼液의 항염증 효과에 대한 기전 연구<sup>25)</sup> 등의 보고가 있지만 아직은 부족한 실정이다.

통증, 염증 및 세포소멸에 관련되는 물질들에 蜂毒이 影響을 줄 수 있는 機轉은 아래 도식으로 표현할 수 있다.

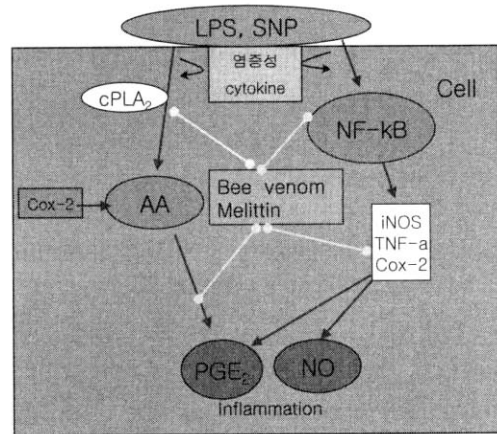


Fig. 19. The Pathway of Inflammation related with PGE<sub>2</sub>, COX-2 and NF- $\kappa$ B and Bee Venom and Melittin

이에 연구자는 蜂藥鍼液과 그 주성분인 melittin이 細胞炎症 억제에 미치는 影響을 연구하기 위하여 RAW 2647 cells에 LPS, SNP로 細胞炎症을 유발하여 蜂藥鍼液과 그 주성분인 melittin을 가해 炎症 발현의 지표로 알려진 PGE<sub>2</sub> 발현 억제에 미치는 影響을 살피고, 細胞炎症機轉의 指標로 알려진 COX-2, NF- $\kappa$ B의 발현 억제에 미치는 影響을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 PGE<sub>2</sub> 발현에 미치는 影響을 관찰한 결과, LPS에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub>의 발현은 蜂藥鍼液 및 melittin 藥鍼液 처리군에서 모두 有意하게 감소하였고, SNP에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub>의 발현은 蜂藥鍼液 5 $\mu$ g/mL 처

리군 및 melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/ $\mu$ l 처리군에서 유의하게 감소하였다. 이는 LPS와 SNP에 의해서 유도된 PGE<sub>2</sub>의 발현이 특정한 蜂藥鍼液의 농도에 대하여 감소한다는 하<sup>2)</sup>의 보고와 유사한 결과였다.

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 COX-2 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS와 SNP에 의해 유도된 COX-2의 발현은 蜂藥鍼液 5 $\mu$ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/mL 처리군에서 유의한 감소를 보였다. 이는 LPS와 SNP에 의해 유도된 COX-2의 발현을 蜂藥鍼液이 억제한다는 하<sup>2)</sup>와 심<sup>3)</sup>의 보고와 유사하며, melittin 약침액의 COX-2 발현 억제효과를 추가적으로 보여주는 결과였다.

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 NF-κB 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS와 SNP에 의해 유도된 NF-κB의 발현은 蜂藥鍼液 및 melittin 藥鍼液 처리군 모두에서 유의한 감소를 보였다. 이는 LPS와 SNP에 의해 유도된 NF-κB의 발현을 蜂藥鍼液이 억제한다는 김<sup>11)</sup>의 보고와 유사하였으며, melittin 藥鍼液의 NF-κB 발현 억제효과를 추가적으로 보여주는 결과였다.

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 NF-κB dependent luciferase activity 억제에 미치는 영향을 관찰한 결과 LPS에 의해 유도된 NF-κB dependent luciferase activity는 蜂藥鍼液 및 melittin 藥鍼液 처리군 모두에서 유의한 감소를 보였으며, SNP에 의해 유도된 NF-κB dependent luciferase activity는 蜂藥鍼液 1, 5 $\mu$ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/mL에서 유의한 감소를 보였다. 보다 강한 염증반응을 위해 LPS + IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS + TNF- $\alpha$ 로 각각 유도하여 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液의 NF-κB dependent luciferase activity 억제에 미치는 영향을 관찰한 결과 蜂藥鍼液 및 melittin 藥鍼液 처리군 모두에서 유의한 감소를 보였다. 이는 LPS + IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS + TNF- $\alpha$ 로 각각 염증 유도 후 NF-κB inhibitor를 처리하여 염증을 억제한 결과와 비교해 봤을

때, 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液의 항염증 효능을 알 수 있었다.

이상으로 보아, 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 PGE<sub>2</sub>, COX-2, NF-κB와 같은 炎症 媒介 物質에 대한 억제 작용을 확인하였고 향후 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液의 항염증 기전 연구 및 임상에서 활용되는 蜂藥鍼 효과에 대한 기전 연구가 더 필요할 것으로 사려된다.

## V. 結 論

蜂藥鍼液과 그 주성분인 melittin이 細胞炎症 억제에 미치는 영향을 연구하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS, SNP로 細胞炎症을 유발하여 蜂藥鍼液과 그 주성분인 melittin을 가해 PGE<sub>2</sub>, COX-2, NF-κB의 발현 억제에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS, SNP에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub> 발현은 24 시간 이후 모두 유의성있게 나타났다.
2. LPS, SNP에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub> 발현은 LPS와 蜂藥鍼液 및 melittin 藥鍼液 처리군 모두에서, SNP와 蜂藥鍼液 5 $\mu$ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/mL 처리군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고, SNP와 蜂藥鍼液 0.5, 1 $\mu$ g/mL 처리군에서는 유의한 변동을 보이지 않았다.
3. LPS, SNP에 의해 유도된 COX-2 발현은 각각 LPS와 蜂藥鍼液 5 $\mu$ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/mL 처리군, SNP와 蜂藥鍼液 5 $\mu$ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/mL 처리군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고, LPS와 蜂藥鍼液 0.5, 1 $\mu$ g/mL 처리군 및 SNP와 蜂藥鍼液 0.5, 1 $\mu$ g/mL 처리군



에서는 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다.

4. LPS, SNP에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B 발현은 LPS와 SNP 각각에 대해 蜂藥鍼液 및 melittin 藥鍼液 처리군 모두에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다.
5. LPS, SNP에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B dependent luciferase activity 발현은 LPS와 蜂藥鍼液 및 melittin 藥鍼液 처리군 모두에서, SNP와 蜂藥鍼液 1, 5 $\mu$ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/mL 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였고 LPS와 SNP에 蜂藥鍼液 5 $\mu$ g/mL 단독 처리군과 NF- $\kappa$ B inhibitor 처리군에서도 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다.
6. LPS + IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS + TNF- $\alpha$ 의 염증유도 물질에 의해 각각 유도된 NF- $\kappa$ B dependent luciferase activity 발현은 LPS와 SNP 각각에 대해 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 $\mu$ g/mL 처리군, melittin 藥鍼液 5, 10 $\mu$ g/mL 처리군, NF- $\kappa$ B inhibitor 20 처리군 및 蜂藥鍼液 5 $\mu$ g/mL 단독 처리군 모두에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다.

이상의 결과로 보아 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 PGE<sub>2</sub>, COX-2, NF- $\kappa$ B와 같은 염증 媒介物質에 대한 발현 억제 작용이 있음을 확인하였다.

## VI. 參考文獻

1. 고희균, 권기록, 인창식. 봉독약침요법. 서울 : 경희대학교 출판국. 2003 : 214-215.
2. 하성중, 이성노, 김기현 외 1인. 蜂藥鍼液이 PLA2, Cox-2, iNOS, AA 및 PG에 미치는 영향에 관한 연구. 韓國藥鍼學會誌. 2002 ; 5(2) : 40-51.
3. 심재영, 이성노, 김기현 외 1인. 蜂藥鍼液이 Raw 264.7 세포의 Cox-2, P38, ERK 및 JNK에 미치는 영향. 韓國藥鍼學會誌. 2003 ; 6(2) : 77-90.
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. 蜂毒藥鍼療法の 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 抗痙攣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. 김군중, 심성용, 김기현 외 1인. 蜂藥鍼液이 Raw 264.7 세포의 iNOS, TNF- $\alpha$  및 NF- $\kappa$ B에 미치는 영향. 韓國藥鍼學會誌. 2003 ; 6(2) : 45-56.
12. 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.
13. 황유진, 이견목, 황우준 외 5인. 蜂藥鍼을 이용한 류마티오이드 關節炎의 臨床的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2001 ; 18(5) : 33-42.
  14. 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.
  15. 배은정, 이현, 이병렬 외 7인. 蜂毒藥鍼 竝行治療한 腰椎間板脫出症 患者의 臨床 考察. 대한침구학회지. 2002 ; 19(1) : 54-64.
  16. 김기현, 이성노, 송호섭 외 6인. 蜂藥鍼 治療를 竝行한 胸·腰椎壓迫骨折 患者의 臨床的 考察. 대한침구학회지. 2002 ; 19(6) : 35-48.
  17. 김기현, 안광현, 송호섭 외 5인. 足跟痛에 蜂藥鍼療法이 미치는 影響. 대한침구학회지. 2002 ; 19(5) : 149-160.
  18. 황민섭, 윤종화, 김갑성 외 1인. 봉약침요법으로 치료한 두피 지루피부염에 대한 임상적 고찰. 대한침구학회지. 2002 ; 19(6) : 24-34.
  19. 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.
  20. 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.
  21. 이정훈, 진재도, 한상원 외 3인. Bee Venom 및 Melittin 藥鍼液이 神經麻痺物質을 處置한 神經芽細胞腫의 細胞死에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2002 ; 19(1) : 189-202.
  22. 이승훈, 서정철, 한상원 외 5인. 蜂藥鍼液이 細胞活性에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2002 ; 19(5) : 57-72.
  23. 박원, 김용석, 고희균. 蜂毒 藥鍼液의 細胞毒性에 關한 研究 대한침구학회지. 2002 ; 19(2) : 65-77.
  24. 정혜윤. 蜂毒 藥鍼液이 炎症 및 痛症 關聯 遺傳子 發現에 미치는 影響. 경희대학교 대학원 박사학위 논문. 2002.
  25. 윤종일, 조현철, 김기현 외 1인. 蜂藥鍼液이 Raw 264.7 세포의 PLA2 및 Calcium Concentration에 미치는 影響. 韓國藥鍼學會誌. 2003 ; 6(2) : 149-158.
  26. Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H. 15-Deoxy-Δ<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 2000 ; 97(9) : 4844-4849.
  27. Kung Mi Jung, Ki Sook Park, Hong JT 외 9인. Activation of p38 MAP kinase and AP-1 during the promotion of neurite extension of PC 12 cells by 15-deoxy PGJ<sub>2</sub>. *Mol Pharmacol.* 2003 ; 63 : 1-10.
  28. 김세중. 免疫學. 서울 : 高麗醫學. 1994 : 263-264.
  29. Kaltschmidt, B., Sparna, T. and Kaltschmidt, C.. Related Articles : Activation of NF-kappa B by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal.* Summer. 1999 ; 1(2) : 129-144.
  30. E.S. Assem, G. Atkinson. Histamine release by MCDP(401), A peptide from the venom of the honey bee, *brit. Pharmacol.* 1973 : 337-338.