

원저

# 노랑머리왕지네의 遺傳學的 分析 및 藥鍼液의 細胞毒性에 관한 研究

김성남 · 임정아 · 이성용 · 황우준 · 이진목 · 조남근 · 서정철\* · 문형철 · 김성철

원광대학교 부속한방병원 침구과

\* 대구한의대학교 한의과 대학 침구과교실

## A Study on Genetic Analysis and Extract Cytotoxicity of *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch

Kim Sung-nam · Lim Jeong-a · Lee Sung-yong · Hwang Woo-jun · Lee Geon-mok  
Cho Nam-geun · Seo Jung-chul\* · Moon hyung-cheol and Kim Sung-chul

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

\* Department of Acupuncture and Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University

### Abstract

**Objective :** The purpose of this study is to investigate nucleotide sequence and extract cytotoxicity of *Scolopendreae* corpus. The nature and taste of *Scolopendreae* corpus is hot, warm and toxic, and the effect of this is dispelling wind, anti-spasmodic action and detoxication so it has been used for C.V.A, facial palsy, sensory disorder at extremities, wounds and arthritis.

**Methods :** *Scolopendreae* corpus were collected by locality on the market. They were morphologically classified. Their nucleotide sequence was investigated and compared among them. In addition, the water-alcohol extract cytotoxicity of them was studied by MTT-based cytotoxicity assay.

**Results :** It was shown that the each *Scolopendreae* corpus by locality is almost identical at genetic result and is identified as *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch. Nucleotide sequence of *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch in this study will help to discriminate other species of *Scolopendreae* corpus. The water-alcohol extract of *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch did not induce cytotoxicity on Hep G2, L929 cell and peritoneal macrophages. Besides, it did not influence nitrite production of peritoneal macrophages. These results can be used as basic data for genetic discrimination with another species of *scolopendreae* corpus.

**Key words :** *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch, nucleotide sequence, cytotoxicity, Hep G2, L929, peritoneal macrophages

## I. 緒 論

蜈蚣은 주로 왕지네과 *Scolopendridae*에 속한 지네류의 全蟲을 말린 것을 말하며 그 형상이 마치 사람의 척추처럼 마디마디 이어져 있고 그 움직임이 신속하며 성질이 辛 · 溫 · 猛燥하여 風 · 寒 · 濕을 가장 효과적으로 제거할 수 있어 腰脚痛을 비롯한 각종 운동기질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 蜈蚣은 祛風 鎮驚, 攻毒散結, 解毒作用 등의 효능을 지닌 약물로 急 · 慢驚風과 瘡瘍, 癰癤 등의 피부질환, 그리고 뱀에 물렸을 때 다른 약물들과 배합하여 사용되어 왔으며, 通絡止痛의 효능으로 風濕痺痛, 流走不定, 痛勢極烈한

추처럼 마디마디 이어져 있고 그 움직임이 신속하며 성질이 辛 · 溫 · 猛燥하여 風 · 寒 · 濕을 가장 효과적으로 제거할 수 있어 腰脚痛을 비롯한 각종 운동기질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 蜈蚣은 祛風 鎮驚, 攻毒散結, 解毒作用 등의 효능을 지닌 약물로 急 · 慢驚風과 瘡瘍, 癰癤 등의 피부질환, 그리고 뱀에 물렸을 때 다른 약물들과 배합하여 사용되어 왔으며, 通絡止痛의 효능으로 風濕痺痛, 流走不定, 痛勢極烈한

\* 교신저자 : 김성철, 광주광역시 남구 주월1동 543-8  
원광대학교 광주한방병원 침구과  
(Tel : 062-670-6442 E-mail : kscndl@hanmail.net)

\* 이 논문은 2006년 원광대 교비지원에 의한 연구임.

경우에 사용하기도 하고<sup>2,3)</sup>, 辛溫純陽之品으로 性善走散 通經消瘀 氣血達而陽事興하여 陽痿 등에도 응용하였다<sup>4)</sup>.

지네류(chilopoda)는 動物分類學上 節肢動物(arthropoda)의 一綱으로 倍脚綱(diplopoda), 少脚綱(pauropoda), 結合綱(symphyla)과 함께 一群을 이루며 이들을 總稱하여 多肢類라 한다. 지네류 중에서 노랑머리왕지네(Scolopendridae 科)는 創傷과 神經痛藥으로 사람들에게 널리 利用되어 왔고 毒을 갖고 있어 물리면 生命에 위협을 받아 警戒하는 動物이기도 하다. 棲息地는 有機物이 들어있는 돌더미, 土壤의 表層, 이끼, 썩은나무가 堆積되어 있는 有機物層 등 食性에 따라 달라진다<sup>5)</sup>. 또한 노랑머리왕지네는 蜈蚣科(Scolopendridae科)에 속하는 昆蟲으로서 蜈蚣, 天龍, 螂蛆, 無加天 및 百足 등 많은 異名을 가지고 있는 動物性韓藥이다<sup>6)</sup>.

우리나라에서 蜈蚣에 관한 실험적 연구에서 홍<sup>7)</sup>은 蜈蚣의 藥물학적 연구에서 蜈蚣이 中樞性 痙攣抑制作用, 解熱鎮痛作用, 鎮靜作用 및 血壓下降作用 등이 있음을 究明하였고, 정<sup>8)</sup> 등은 蜈蚣水鍼이 鎮痛 및 鎮痙效果에 미치는 영향을 연구하기 위해 醋酸으로 疼痛을 유발시키고 strychnine과 picrotoxin으로 경련을 유발시킨 후 실험동물의 百會(GV20)와 太衝(LR3) 해당 穴位에 자극하여 관찰한 결과 모두 유의성 있는 결과를 얻었다. 이<sup>9)</sup> 등은 蜈蚣이 angiotensin I을 angiotensin II로 전환시켜 강력한 순환혈관 수축물질로 작용하는 angiotensin converting enzyme (ACE)를 저해하는 것으로 밝혀, 蜈蚣이 항고혈압제로 활용될 수 있을 것으로 보았다. 고<sup>10)</sup> 등은 臨床에서 蜈蚣藥鍼을 요추간판탈출증 치료에 응용하여 유의성 있는 결과를 얻은 바 있다. 위에서 살펴본 바와 같이 蜈蚣은 주로 鎮靜, 鎮痙, 鎮痛 작용을 하는 것으로 알려져 있으며 이러한 효과에 대한 실험 결과도 대체로 임상 활용과 부합하는 내용으로 알려져 있다.

藥鍼療法은 환자의 질병에 근거하여 穴位의 치료작용과 藥물의 藥理작용에 따라 특정질환에 유효한 藥물이나 처방을 選用하여 일정한 혈위, 압통점 및 피부의 양성반응점에 藥針液을 주입함으로써 생리적인 기능을 강화시키고 병리적인 상태를 개선시키는 新鍼療法이다<sup>11,12)</sup>. 근래에는 蜈蚣藥鍼이 새로 개발되어 그 임상적 효과가 인정되고 있다<sup>13)</sup>.

蜈蚣藥鍼液의 標準化에 대한 基礎資料를 얻기 위하여 藥用으로 市販되고 있는 蜈蚣의 資源的인 面에서의

起源解明과 蒐集한 지네가 어떤 종류의 지네인지 알아보고, 蒐集한 지네에서 각각 DNA 염기서열상의 차이점을 관찰하였으며 또한 蜈蚣藥針液의 細胞毒性效果를 관찰한 결과 약간의 知見을 얻었기에 이에 報告하고자 한다.

## II. 研究材料 및 方法

### 1. 試料의 準備

본 實驗에 사용한 蜈蚣의 산지는 國內産으로는 濟州道産, 槐山産, 珍島産과 이외에 中國産, 日本産을 이용하였으며, 각각의 산지로부터 蒐集하였다. 시료의 개체수는 國內産4종, 中國産4종, 日本産1종으로 총 9종류를 대상으로 하였다.

### 2. DNA 鹽基序列의 比較

#### 1) 蜈蚣의 DNA의 정제

頭部부터 尾部 전체가 포함된 형태의 蜈蚣 3g을 멸균된 작은 칼로 잘게 썰고, 멸균된 분쇄기로 분쇄하여 분말화 하였다. Genomic DNA 분리를 위해 키트(DNeasy Tissue kit, No. 69504, Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 사용하였으며 이때 제조사의 사용설명에 따라 실행하였다. 분말화된 오공 시료 300mg은 세정과정을 거쳐 사용하였다. 시료를 용출 (elution)하기 전에, 컬럼(column)은 남은 에탄올을 증발시키기 위해 5분 동안 37°C에서 건조시켰다. 시료들은 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0))를 사용하여 총 부피 200  $\mu$ l에서 용출시켰다.

#### 2) Polymerase Chain Reaction(PCR) 법을 이용한 DNA 증폭

추출된 DNA의 증폭은 PCR법에 의하여 수행되었다. 각 蜈蚣시료의 게놈내 특정 유전자 구역을 증폭하기 위한 DNA 25ng, 각 primer (정방향(forward) 역방향(reverse), Table 1.) 5 pmol을 사용하여 증폭되었다. PCR 증폭은 0.5 단위(unit) Taq 중합효소 (Taq polymerase ; HT Biotechnology Ltd., Cambridge, United Kingdom)를 사용

하여 수행하였다. PCR 반응 혼합물 30 $\mu$ 는 10 mM 트리스(Tris)-HCl, pH 9.0, 1.5mM 마그네슘 클로라이드 (magnesium chloride), 50mM 염화칼륨 (potassium chloride), 0.1% 트라이톤(triton)-X 100, 0.01 % [v/v] 안정제 (stabilizer), 디옥시뉴클레오티드 삼인산 (deoxynucleotide triphosphate, dNTP) 각 0.25 mM, 올리고뉴클레오티드 프라이머(oligonucleotide primer) 각 0.1 mM로 구성되었다. PCR 과정은 PCR 시스템(PCR System, Astec, Japan)을 이용하여 95 $^{\circ}$ C에서 5분동안 변성과정을 거친 후, 1회당 95 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성(denaturation), 60 $^{\circ}$ C에서 30초간 결합(annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 연장(extension)의 구성으로 30회 반복하여 PCR 반응을 수행하였다. 역방향 프라이머(reverse primer)는 단일가닥 DNA 조합이 가능한 바이오틴 결합성이다. PCR 산물은 1.5 % 아가로스 겔 (agarose gel)을 이용하여 전기영동(electrophoresis)한 다음 Ethidium Bromide(EtBr)에 염색하여 선택적으로 증폭되었는지 확인하였다<sup>4)</sup>(Table 1).

### 3) DNA 염기서열 분석

증폭된 PCR 산물은 에탄올에 침전시킨 후, ABI Prism<sup>®</sup> 377 DNA sequencer(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 전기영동하였으며 각 개체당 4개의 염기서열에 대하여 양방향의 primer에 대한 염기서열로 정렬시켜 일치하는 염기를 선택하였다. 선택된 염기서열은 GeneDoc 프로그램(version 2.4, Cris, USA)으로 정렬되어 각 개체가 비교되게 하였다.

### 3. 分類學的 形質觀察

標本을 놓고 解剖顯微鏡으로 分類學的 形質을 관찰하였다.

### 1) 形態 및 特徵

몸은 수많은 體節로 이루어지는데 頭部에는 1쌍의 觸角과 1쌍의 大顎, 2쌍의 小顎과 1쌍의 毒爪 (poisonclaw)로 된 口器를 갖는다. 毒爪는 第一體節의 부속지가 變形된 것으로 基部에 毒腺을 가진다. 第一體節의 뒤쪽은 15개 以上の 體節이 이어지는데 各 體節마다 1쌍의 步行肢를 갖는다. 마지막 體節은 尾節(telson)이고 그 앞의 두 體節은 前生殖節(pregenital segment)과 生殖體節(genital segment)로 附屬肢가 없다. 生殖體節에는 生殖孔이 열려있다. 두 개의 生殖體節의 앞에 있는 體節의 附屬肢는 뒤쪽으로 늘어난 집게모양을 하기도 한다. 感覺器官으로는 눈이 거의 없거나 單眼 또는 複眼을 갖기도 한다. 노랑머리왕지네 (*Scolopendra subspinipes multilans* L. Koch)는 頭板 및 第 1背板은 黃赤色이고 腹面과 步行肢는 黃色이다. 頭板의 길이와 幅은 거의 같고 頭板의 兩側에 크기가 비슷한 圓形의 單眼이 4개씩 있다.

### 2) 用語

本 論文에 使用된 지네의 一般形態와 部分名稱은 다음과 같다(Fig. 1, 2). (그림은 高桑(1954)의 原圖를 採用하였음<sup>5)</sup>)

### 4. 細胞毒性 測定

#### 1) 세포 및 세포배양

本 실험에 사용된 세포는 L929 세포(fibroblast cell line), Hep G2 세포(hepatoblastoma cell line), mouse (c57bl/6)의 peritoneal macrophages를 사용하였으며

Table 1. Nucleotide Sequence of Primers for Polymerase Chain Reaction

Gene	Forward sequences	Reverse sequences
18s ribosomal RNA region(part 1)	tgccagtagtcatatgcttg	gcttttaacgcaacaactt
18s ribosomal RNA region(part 2)	gttggtgcgttaaaaagctc	ggttagaactagggcggtat
18s ribosomal RNA region(part 3)	cgccctagtctaaccataa	ctctaaatggtcaagttcgg
28s ribosomal RNA region	aaggcgtaatgaaagtgaaa	cagctactagacgggtcagt
Serine protease SSPI mRNA region(part 1)	ggaagaccggaatcttactt	gcgctctgtcctatgaaatc
Serine protease SSPI mRNA region(part 2)	gcaatgattcataggacaag	gttgaataaactgtgatgg

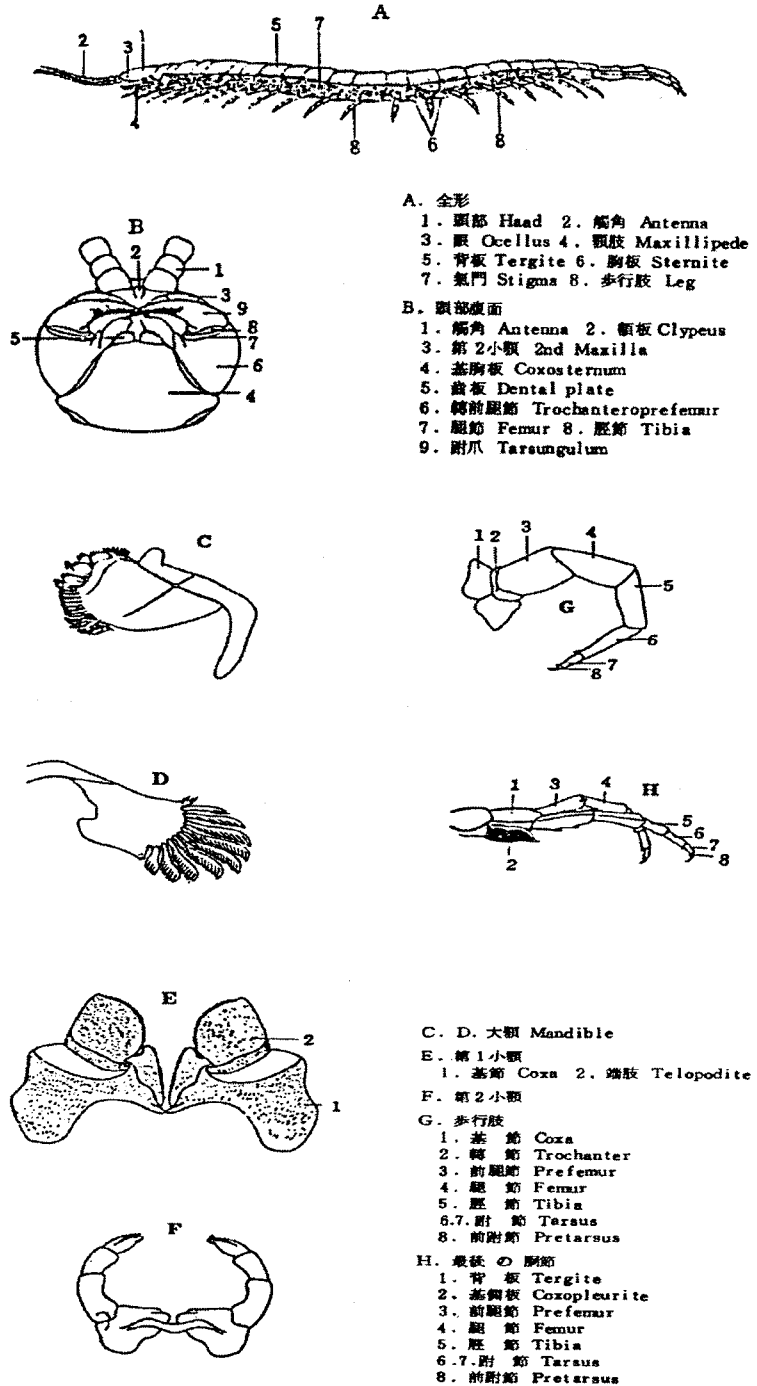


Fig. 1 唇脚類 體制模式圖 (*Scolopendra subspinipes multilans* L. Koch)

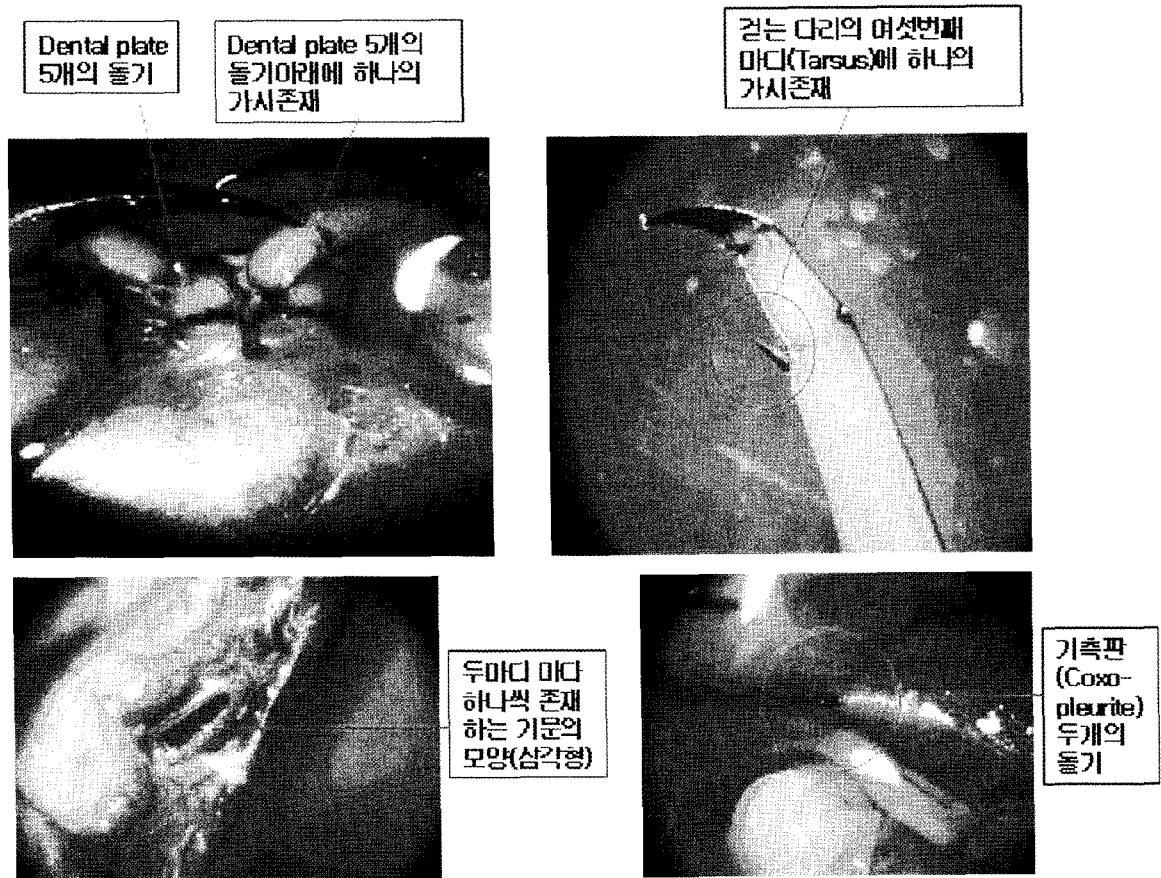


Fig. 2 Key Characteristics of *Scolopendra subspinipes multilans* L. Koch

L929, HpeG2 세포의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL, USA)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, GibcoBRL, USA)를 사용하였다. 세포의 배양은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도로 조정된 배양기 (incubator)내에서 배양하였으며, 배양액은 2일마다 교환하였다. Peritoneal macrophages는 TG(Thioglycolate) 3ml를 mouse(c57bl/6)의 복강에 주입하여 4일후 대식세포를 배양하는데 복강에 주사기로 배지(RPMI 1640 + antibiotics + 10% FBS)를 주입한 후 1분 정도 복강을 마사지한 후에 다시 배지를 채취하였다. 이것을 원심분리하여 상층액은 버린 후 여기에 다시 배지를 5ml 정도 넣었다. 이중 10 $\mu$ l를 채취하여 세포수를 측정하고 96 well 에 1x10<sup>6</sup>cell/ml 을 plating하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도로 조정된 배양기(incubator)에서 2-3시간 정도 배양한 후에 상층부에 부유하는 세포를 버리고(바닥에 붙어있는 세포가 macrophage임.) 다시 새로운 배지를 넣고, 배양기에 30분정도 배양한 후 蜈蚣藥針液을 농도와 시간별로 처리하여 실험을 시작하였다.

## 2) 蜈蚣藥針液의 조제방법

蜈蚣藥鍼은 무균실험실(clean room)에서 水醇추출법(水提-알콜浸法)<sup>15)</sup>으로 제조하였다.

- ① 분말상태의 오공 500수를 3차 증류수 1500ml로 희석 후 4 시간 교반(Daihan Scientific, MSH 10S, Korea) 하였다.
- ② 감압농축기(Eyela, Type. N-1000. Japan)의 전원을 켜서 온도를 55~65°C로 설정하고 냉각관에 냉각수가 흐르게 하고, 1500ml의 여액을 감압농축기의 둥근 플라스크에 나누어 농축시키며 음압(13-15cmHg)을 주었다. (speed 4로 고정)
- ③ 감압 농축된 오공 농축액의 양을 측정하여 alcohol (Ethyl Alcohol Assay-95.1~95.6V/V%. KOREA)90%를 첨가하여 비커에 magnetic bar를 넣고 3시간동안 교반하였다. 교반이 끝나면 둥근 플라스크에 90% alcohol 교반액을 넣고 감압 농축하였다. 감압

농축이 되면 alcohol은 끓는점의 차이에 의한 추출 방법으로 증발하고 농축된 蜈蚣만 플라스크에 남았다. (온도: 65°C 이하, vacuum : 15 정도 설정, 약 5°C의 냉각수)

- ④ 90% alcohol 감압농축액의 양을 측정하여 alcohol 80%를 첨가하여 조정한 후 3시간 교반하였다. 교반이 끝나면 둥근 플라스크에 80% alcohol 교반액을 넣고 감압 농축하였다.
- ⑤ 80% alcohol 감압농축액의 양을 측정하여 alcohol 70%를 첨가하여 조정한 후 3시간 교반하였다. 교반이 끝나면 1.0µm whatman 여과지로 여과하여 여액을 감압농축 하였다. 이때, alcohol이 완전히 휘발될 수 있도록 caramel 상태가 될 때까지 최대한 감압 농축하였다.
- ⑥ 70% alcohol 감압농축까지 3단계 완료 후 3차 증류수를 약 300ml 넣어서 재 감압 농축한 후 0.45µm → 0.2µm → 0.1µm(Cellulose Nitrate Membrane Filters, Germany)까지 여과하였다. (만약 알코올이 남아있게 되면 동결건조가 되지 않고, 약침으로 사용될 수도 없기 때문에 재감압 농축을 하였다.)
- ⑦ 재감압 농축이 완료되면 동결건조기용 플라스크에 나누어 부어 -30°C 정도에서 예비 동결(Samsung SFR-A 180AWK, Korea)한 후 거쳐 동결 건조기(Freeze Dryer, ilshin Lab, Korea)를 이용하여 파우더 상태로 분말을 얻었다. (동결 건조된 오공 분말은 평균적으로 200g당 약 10g이 얻어졌다.)
- ⑧ 총 추출량과 증류수량을 계산하여 증류수를 첨가하였다. 0.1µm(cellulose)까지 여과 후 흰색 10ml vial 병에 각각 5ml씩 소분(Peristaltic Pump, Masterflex, Korea)하여 동결건조기 chamber에 걸어 -50°C에서 20°C에 이르도록 동결건조하였다.
- ⑨ 蜈蚣분말과 희석하여 pH 7.3, 염도 0.9%를 유지할 수 있는 蜈蚣用 생리식염수를 NaCl과 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 첨가하여 조제하였다.

### 3) MTT-based cytotoxicity assay

蜈蚣藥針液의 세포주에 대한 세포독성을 측정하기 위하여, 세포배양에서 생존하는 세포의 수를 측정하는 방법으로 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma, USA)를 검푸른 색깔의 formazan으

로 변환시키는 작용을 이용한 MTT 실험을 하였다. L929 세포, HepG2 세포, mouse의 peritoneal macrophages에 대한 세포독성을 측정하기 위하여, 검액으로서 蜈蚣藥針液을 처리하여 배양하였으며 각 시간별로 시약 처리 후, 각 sample의 배지를 제거하고 새로운 배지로 1회 씻어냈다. 96 well에 200µl의 배지를 넣고 stock 농도가 5mg/ml인 MTT용액 20µl씩 첨가한 후, 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 살아있는 세포는 검푸른색의 formazan을 형성하며 죽은 세포는 formazan을 형성하지 않는다. formazan을 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹인 후, 흡광도계 (540nm)로 측정하였다.

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

### 4) Nitric Oxide(NO)의 측정

생성된 NO의 양은 microplate assay 방법을 이용하여 측정하였다. Reactive nitrogen intermediate(RNI)는 특이적 또는 비특이적 면역반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO 등이 있는데 이들은 세포배양액에서 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>와 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 형태로 축적되어 진다. 배양액에 녹아있는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 양을 측정하기 위하여 세포와 함께 배양한 배지 100µl를 취한후 동일 부피의 Griess reagents (1% sulfanilamide/ 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/ 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 첨가하여 실온에서 약 10분간 방치하였다. Titertek Multiscan MCC/340(Flow Laboratories, Australia)를 이용하여 540nm의 파장에서 얻어진 흡광도를 측정하였다. Standard로써 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>는 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 사용하여 측정하였다.

### 5. 統計分析

데이터는 Mean ± SEM으로 나타내었다. 통계분석은 SPSS 11.0 (software)을 사용했으며, Student's t-test를 이용하여 p-value값은 최대치 0.05 이하인 경우에만 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

### III. 研究結果

#### 1. 18S ribosomal RNA의 DNA 염기서열(part 1)

蜈蚣의 產地別 18S ribosomal RNA(part 1)부분의 유전자 염기서열은 다음과 같다.

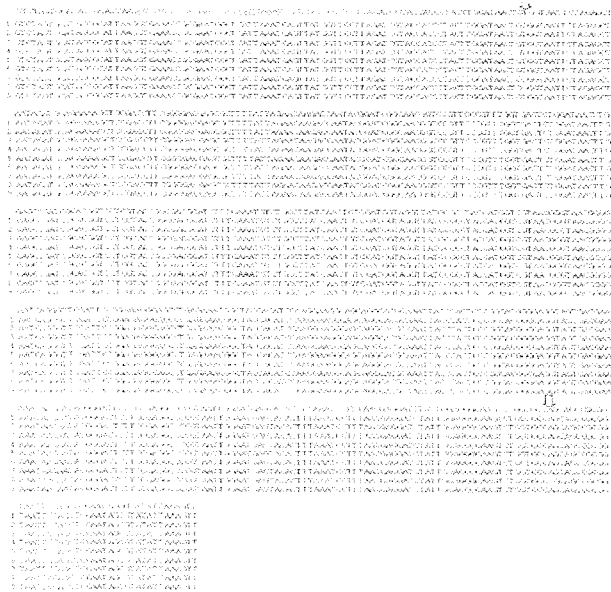


Fig. 3 Nucleotide sequences of the 18S ribosomal RNA region(part 1) of *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch. 1; scolopendra from Korea(unknown locality); 2; scolopendra from Jeju; 3; scolopendra from Goesan; 4; scolopendra from Jindo; 5-8; scolopendra from China; 9; scolopendra from Japan.

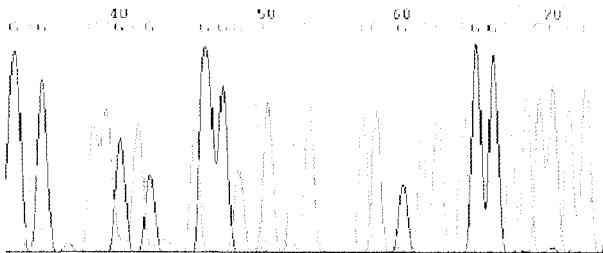


Fig. 4 Chromas of the 18S ribosomal RNA region(part 1) of *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch. GTGAAACCGCGAATGCG CATTMAATCAGTATGGTTC (1A)

#### 2. 18S ribosomal RNA의 DNA 염기서열(part 2)

蜈蚣의 產地別 18S ribosomal RNA(part 2)부분의 유전자 염기서열은 다음과 같다.

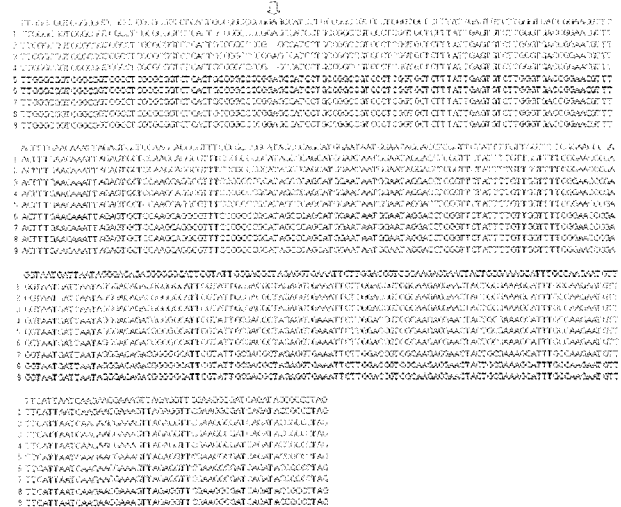


Fig. 5 Nucleotide sequences of 18S ribosomal RNA region(part 2) of *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch. 1; scolopendra from Korea(unknown locality); 2; scolopendra from Jeju; 3; scolopendra from Goesan; 4; scolopendra from Jindo; 5-8; scolopendra from China; 9; scolopendra from Japan.

#### 3. 18S ribosomal RNA의 DNA 염기서열(part 3)

蜈蚣의 產地別 18S ribosomal RNA(part 3)부분의 유전자 염기서열은 다음과 같다.

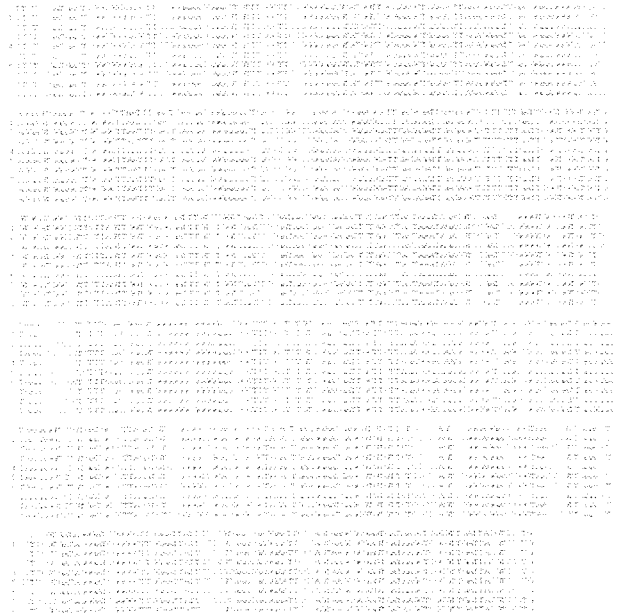


Fig. 6 Nucleotide sequences of 18S ribosomal RNA region(part 3) of *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch. 1; scolopendra from Korea(unknown locality); 2; scolopendra from Jeju; 3; scolopendra from Goesan; 4; scolopendra from Jindo; 5-8; scolopendra from China; 9; scolopendra from Japan.





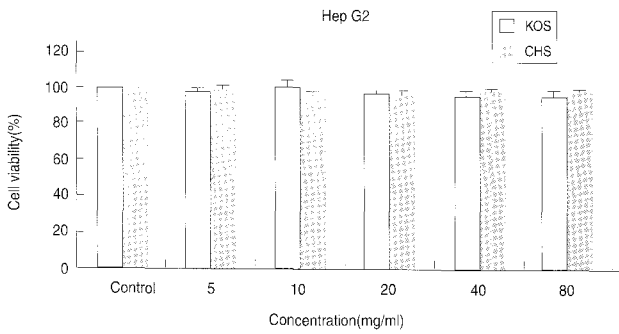


Fig. 10 The dosage dependent variation of cytotoxic effect of scolopendra water-alcohol extract on the Hep G2 cells. The cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C and scolopendra water-alcohol extract was treated in the Hep G2 cells for 24 hours. To examine the cell viability, MTT solution was treated in the cells. The optical density of each well was measured with microplate reader at 540nm. Detail procedures were seen in the materials and methods. Results are representative mean ± SEM of three independent experiments. KOS; scolopendra from Korea; CHS; scolopendra from China.

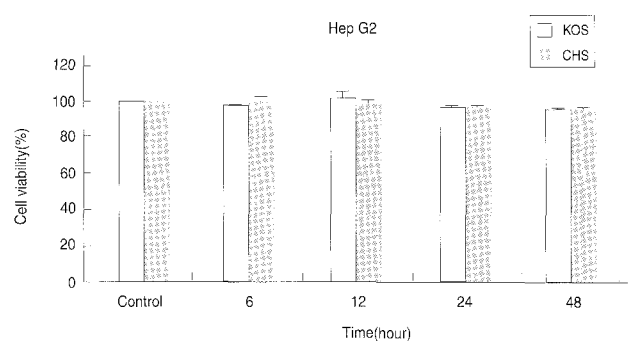


Fig. 11 The time dependent variation of cytotoxic effect of 40mg/ml scolopendra water-alcohol extract on the Hep G2 cells. The cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C and scolopendra water-alcohol extract was treated in the Hep G2 cells for various time intervals. To examine the cell viability, MTT solution was treated in the cells. The optical density of each well was measured with microplate reader at 540nm. Detail procedures were seen in the materials and methods. Results are representative mean ± SEM of three independent experiments. KOS; scolopendra from Korea; CHS; scolopendra from China.

2) 시간에 따른 影響

Hep G2 세포에 蜈蚣藥針液을 40mg/ml을 처리한 후 시간별로 MTT assay에 의한 세포생존률을 측정하였다. 국내산과 중국산 각각 40mg/ml의 蜈蚣藥針液을 처리후 6hrs, 12hrs, 24hrs, 48hrs 후에 관찰한 군에서 세포생존률은 대조군(100%)에 비하여 각각 국내산은 97 ± 1%, 101.33 ± 3.21%, 96 ± 1%, 95.67 ± 1.15%로 중국산은 99.33 ± 2.51%, 98.67 ± 1.15%, 96 ± 1%, 95.33 ± 0.58% 로 국내산과 중국산에서 시간이 경과함에 따라 약간의 감소하는 경향이 있으나 유의성 있게 감소하지는 않았으며, 시중에서 유통되는 국내산과 중국산의 비교에서도 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 11).

8. 腹腔 macrophages의 生存率에 대한 影響

1) 농도에 따른 影響

Peritoneal macrophages에 蜈蚣藥針液을 농도별로 24시간 동안 처리한 후 MTT assay에 의한 세포생존률을 측정하였다. 국내산과 중국산 각각 蜈蚣藥針液을 5mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml, 40mg/ml, 80mg/ml의 농도로 처리한 군에서 세포생존률은 대조군(100%)에 비하여 각각 국

내산은 98.67 ± 2.08%, 100.33 ± 4.51%, 98 ± 1%, 97.33 ± 2.08%, 95.33 ± 2.89%로 중국산은 96.67 ± 3.21%, 98.67 ± 3.06%, 99.33 ± 3.51%, 96 ± 1%, 98.33 ± 1.15% 로 국내산에서 농도가 증가함에 따라 약간의 감소하는 경향이 있으나 유의성 있게 감소하지는 않았으며, 시중에서 유통되는 국내산과 중국산의 비교에서도 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 12).

2) 시간에 따른 影響

Peritoneal macrophages에 蜈蚣藥針液을 40mg/ml을 처리한 후 시간별로 MTT assay에 의한 세포생존률을 측정하였다. 국내산과 중국산 각각 40mg/ml의 蜈蚣藥針液을 처리후 6hrs, 12hrs, 24hrs, 48hrs 후에 관찰한 군에서 세포생존률은 대조군(100%)에 비하여 각각 국내산은 98 ± 2%, 98.33 ± 1.53%, 95.33 ± 1.53%, 94.67 ± 1.53%로 중국산은 97.67 ± 1.25%, 95.33 ± 1.25%, 96.67 ± 1.7%, 94.67 ± 0.47%로 국내산과 중국산에서 시간이 경과함에 따라 약간의 감소하는 경향은 있으나 유의성 있게 감소하지는 않았으며, 시중에서 유통되는 국내산과 중국산의 비교에서도 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 13).

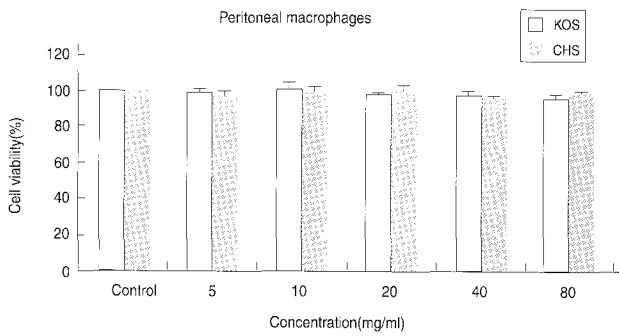


Fig. 12 The dosage dependent variation of cytotoxic effect of scolopendra water-alcohol extract on the peritoneal macrophages. The cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C and scolopendra water-alcohol extract was treated in the peritoneal macrophages for 24 hours. To examine the cell viability, MTT solution was treated in the cells. The optical density of each well was measured with microplate reader at 540nm. Detail procedures were seen in the materials and methods. Results are representative mean ± SEM of three independent experiments. KOS; scolopendra from Korea; CHS; scolopendra from China.

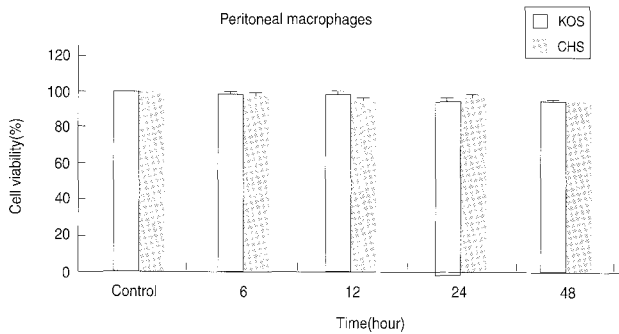


Fig. 13 The time dependent variation of cytotoxic effect of 40mg/ml scolopendra water-alcohol extract on the peritoneal macrophages. The cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C and scolopendra water-alcohol extract was treated in the peritoneal macrophages for various time intervals. To examine the cell viability, MTT solution was treated in the cells. The optical density of each well was measured with microplate reader at 540nm. Detail procedures were seen in the materials and methods. Results are representative mean ± SEM of three independent experiments. KOS; scolopendra from Korea; CHS; scolopendra from China.

## 9. L929 細胞의 生存率에 대한 影響

### 1) 농도에 따른 影響

L929 세포에 蜈蚣藥針液을 농도별로 24시간 동안 처리한 후 MTT assay에 의한 세포생존률을 측정하였다. 국내산과 중국산 각각 蜈蚣藥針液을 5mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml, 40mg/ml, 80mg/ml의 농도로 처리한 군에서 세포생존률은 대조군(100%)에 비하여 각각 국내산은 99.67 ± 2.08%, 97.33 ± 1.15%, 95.33 ± 0.58%, 95 ± 1%, 95.33 ± 1.54% 로 중국산은 98.67 ± 0.58%, 96.33 ± 1.53%, 97 ± 1.73%, 96 ± 1%, 95.33 ± 0.58%로 국내산과 중국산에서 농도가 증가함에 따라 약간의 감소하는 경향이 있으나 유의성 있게 감소하지는 않았으며, 시중에서 유통되는 국내산과 중국산의 비교에서도 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 14).

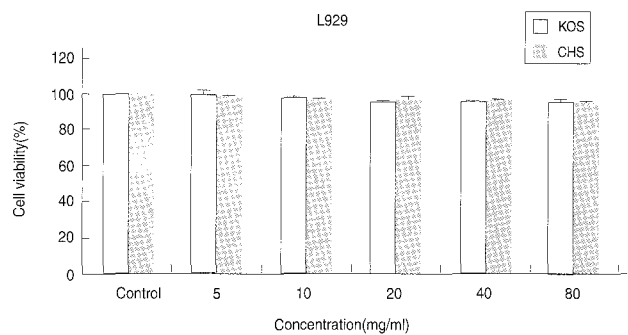


Fig. 14 The dosage dependent variation of cytotoxic effect of scolopendra water-alcohol extract on the L929 cells. The cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C and scolopendra water-alcohol extract was treated in the L929 cells for 24 hours. To examine the cell viability, MTT solution was treated in the cells. The optical density of each well was measured with microplate reader at 540nm. Detail procedures were seen in the materials and methods. Results are representative mean ± SEM of three independent experiments. KOS; scolopendra from Korea; CHS; scolopendra from China.

2) 시간에 따른 影響

L929 세포에 蜈蚣藥針液을 40mg/ml을 처리한 후 시간별로 MTT assay에 의한 세포생존율을 측정하였다. 국내산과 중국산 각각 40mg/ml의 蜈蚣藥針液을 처리후 6hrs, 12hrs, 24hrs, 48hrs후에 관찰한 군에서 세포생존율은 대조군(100%)에 비하여 각각 국내산은 96±1%, 96.33±2.08%, 92.33±2.08%, 93±1%로 중국산은 96±1%, 95±1%, 93.33±0.58%, 93.67±0.58%로 국내산과 중국산에서 시간이 경과함에 따라 약간의 감소하는 경향은 있으나 유의성 있게 감소하지는 않았으며, 시중에서 유통되는 국내산과 중국산의 비교에서도 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 15).

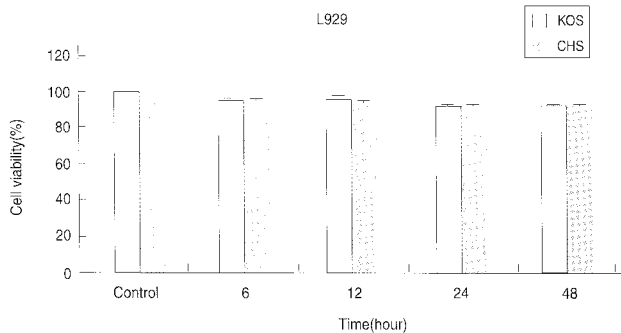


Fig. 15 The time dependent variation of cytotoxic effect of 40mg/ml scolopendra water-alcohol extract on the L929 cells. The cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C and scolopendra water-alcohol extract was treated in the L929 cells for various time intervals. To examine the cell viability, MTT solution was treated in the cells. The optical density of each well was measured with microplate reader at 540nm. Detail procedures were seen in the materials and methods. Results are representative mean±SEM of three independent experiments. KOS; scolopendra from Korea; CHS; scolopendra from China.

10. 腹腔 macrophages에서 NO 生成에 대한 影響

Peritoneal macrophages에 蜈蚣藥針液을 농도별로 처리하여 30분 후에 LPS 100ng/ml으로 자극하고, 농도별로 처리한지 24 시간 경과시에 nitrite를 측정하였다. 국내산과 중국산 각각의 蜈蚣藥針液을 5mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml, 40mg/ml, 80mg/ml의 농도로 처리한 군에서

NO의 생성은 국내산의 경우에 대조군(27.33±1.53μM)에 비하여 27.33±0.58μM, 27.67±2.08μM, 28.33±1.53μM, 28.33±1.15μM, 29±1.73μM 으로 중국산의 경우에 대조군(27.67±1.15μM)에 비하여 26.67±2.08μM, 28±1.73μM, 29±1μM, 27.33±1.53μM, 29.33±1.53μM 이 생성되었으며 산지에 관계없이 농도가 증가함에 따라 NO의 생성이 다소 증가하는 경향을 보였으나 유의성 있게 증가하지는 않았으며, 시중에서 유통되는 국내산과 중국산의 비교에서도 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 16).

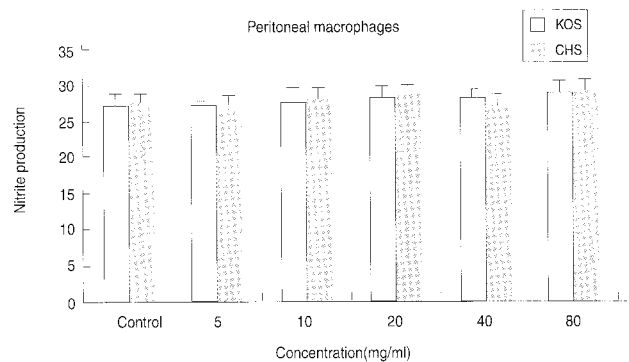


Fig. 16 Effects on nitric oxide(NO) production by scolopendra water-alcohol extract. TG(Thioglycolate)-elicited peritoneal macrophages were stimulated with LPS (100ng/ml) in the presence of scolopendra water-alcohol extract for 24 hours. NO concentration was determined by Griess reagent. The optical density of each well was measured with microplate reader at 540nm. Results are representative mean±SEM of three independent experiments(p<0.05). KOS; scolopendra from Korea; CHS; scolopendra from China.

IV. 考 察

蜈蚣은 절족동물 다족류중 大蜈蚣科(왕지네과)에 속하는 지네로서<sup>16)</sup>, 『神農本草經』에 蜈蚣味辛溫 主鬼疰猛毒 敢諸蛇虫魚毒 殺鬼物 老精溫瘡 去三虫이라고 최초로 기재되었다<sup>17)</sup>. 『本草綱目』에는 小兒驚癇風搐, 臍風口噤, 丹毒疥瘡癩癧, 便毒痔漏, 蛇痕蛇瘡蛇傷 등을 다스린다<sup>18)</sup>하였다. 『臨床本草學』에 蜈蚣은 性味が 辛溫有毒하고, 歸經은 肝經이며, 效能은 祛風鎮痙, 攻毒散結, 解蛇毒이고, 祛風鎮痙의 效가 있기 때문에 急·慢驚風 등으로 인한 痙攣, 抽搦口噤, 角弓反張 등에 全蝎, 白僵蠶,

釣鉤藤과 배합하여 응용하며, 解毒작용이 현저하여 瘡瘍腫毒 瘰癧潰爛 등의 證과 毒蛇咬傷을 다스린다고 하였다. 또한 蜈蚣은 通絡止痛의 효능으로 全蝎과 함께 防風, 獨活, 威靈仙 등 祛風, 除濕, 通絡 약물들과 써서 風濕痺痛, 流走不定, 痛勢極烈에 사용한다<sup>16)</sup>. 『醫學衷中參西錄』에 蜈蚣은 走竄의 힘이 신속하여 內로 臟腑와 外로 經絡에 氣血이 응체한 곳을 모두 능히 開하고, 微毒이 있어 毒을 善解한다고 하였으며, 따라서 內로는 肝風萌動, 驚癇眩暈, 抽掣痙攣, 小兒臍風을 다스리고, 外로는 經絡中風, 口眼喎斜, 手足麻木 등을 다스리며, 뱀을 제압하므로 蛇證과 蛇咬中毒을 다스린다<sup>19)</sup>고 하였다. 또한 蜈蚣은 頭尾가 모두 赤紅色으로 南方의 火毒의 性을 띠고 있으므로 능히 陰毒을 공격할 수 있다<sup>20)</sup>고 하였다.

蜈蚣에는 蜂毒과 유사한 유독물질, 즉 histamine성 물질과 용혈성 단백질이 들어 있으며 이외에 지방유, 콜레스테롤, 개미산, 아미노산 등이 들어 있는 것으로 알려져 있다<sup>21)</sup>. 또  $\delta$ -hydroxylysine도 들어 있고, histidine, arginine, ornithine, lysine, glycine, alanine, valine, leucine, phenylalanine, serine, taurine, glutamine acid 등의 아미노산도 들어 있다<sup>19, 22)</sup>. 동속 동물인 Scolopendra morsitans L의 血의 단백질은 전기영동에 의해 다음과 같은 5가지로 구분된다. 첫째는 사람의 혈청 albumin과 비슷한 것이고, 둘째는  $\alpha$ 1-globulin이며, 셋째는  $\alpha$ 2-globulin이고, 넷째는  $\gamma$ -globulin이며, 다섯째는 단백질이 사람의 것과 다르다. 또 이 혈액은 fibrinogen성 물질이 들어 있지 않기 때문에 응고되지 않는다<sup>23)</sup>.

蜈蚣과 全蟲은 단독으로 응용시에 抗驚厥作用이 있는데, 抗驚厥작용을 비교하면 蜈蚣이 全蟲에 비하여 현저하다<sup>23)</sup>. 小棘巨蜈蚣과 墨江蜈蚣이 驚厥을 안정시키는데 뚜렷한 길항작용이 있는데, 이 두 종류의 蜈蚣의 鎮靜作用은 주로 脊髓에 작용한다<sup>24)</sup>. 止癢散(全蝎, 蜈蚣)은 1일 1g씩 1, 3, 9일 연속 경구 투여한 후 pentylenetetrazol (cardiazol), strychnine, pure nicotine의 반수 경련량에 의하여 나타난 마우스의 경련에 대해 鎮靜作用을 나타냈다. 동량을 투여할 경우에 상술한 3종의 약물에 의한 경련에 길항하는 효과는 蜈蚣이 全蝎보다 높았지만, 염산 코카인성 경련에 대해서는 효과가 없었다<sup>25)</sup>. 정<sup>26)</sup> 등은 蜈蚣水鍼이 鎮痛 및 鎮痙效果에 미치는 영향을 연구하기 위해 醋酸으로 疼痛을 유발시키고 strychnine과 picrotoxin으로 경련을 유발시킨 후 실험 동물의 百會(GV20)와 太衝(LR3) 해당 穴位에 자극하여 관찰한 결

과 모두 유의성 있는 결과를 얻었다. 김<sup>25)</sup>은 蜈蚣의 鎮痛, 消炎 및 鎮痙효과를 인정할 수 있으며 鎮痛, 消炎작용은 頭足を 제거하면 그 효과가 더욱 강하게 나타난다고 하였다. 또한 이<sup>26)</sup>는 蜈蚣藥鍼이 白鼠에 대하여 神經病症性 痛症抑制에 대하여 유의성 있는 결과를 얻었다. 臨床적으로는 고<sup>19)</sup> 등이 臨床에서 蜈蚣藥鍼을 요추간판 탈출증 치료에 응용하여 유의성 있는 결과를 얻은바 있고, 최<sup>13)</sup> 등은 CT나 MRI를 통해 요추간판탈출증으로 진단 받은 환자 70명에게 오공약침을 7일간 시술한 후 15개월간의 전화추적조사를 통하여 일상생활 및 직장생활에의 적응정도를 조사하여 86%의 환자에서 현재의 일상생활 및 직장생활이 양호하다는 보고를 한바 있다.

이와 같이 蜈蚣은 효능이 다양하여 예부터 韓藥材로 널리 쓰여지고 있으며 그 소비량은 점차 증가되고 있다<sup>27)</sup>. 따라서 蜈蚣藥鍼液의 標準化에 대한 基礎資料를 얻기 위하여 藥用으로 市販되고 있는 蜈蚣의 資源의 人面에서의 起源解明과 蒐集한 지네가 어떤 종류의 지네인지 알아보고, 蒐集한 지네에서 각가 DNA 염기서열상의 차이점을 관찰하고 또한 蜈蚣藥針液의 細胞毒性效果를 관찰하기 위하여 本 研究를 수행하였다.

유전자(gene)는 단백질을 만드는 암호로서 생물은 유전자의 암호에 따라 만들어지는 단백질로 생명을 유지할 수 있는 구조로 되어 있으며 이 유전자는 생물의 거의 모든 세포안에 존재한다<sup>28)</sup>. rRNA(ribosomal RNA)는 리보솜(ribosome)을 구성하는 RNA 이며, 원핵세포(procaryotic cell)에서는 5S, 16S, 23S의 3종류의 rRNA가 존재한다. 그리고 진핵세포(eukaryotic cell)에는 5.8S, 18S, 28S의 3종류의 rRNA가 존재하는데, 이들 rRNA는 50종류의 단백질과 복합체를 만들어 ribosome을 형성하게 된다. rRNA 유전자(ribosomal RNA genes, rDNA) 중에는 가변적인 region과 매우 보존적인 region이 둘다 존재하기 때문에 미생물의 분류 및 동정, 진화적인 관계규명 및 분자생태 연구에 광범위하게 이용될 수 있다<sup>29, 30)</sup>.

1996년 Steiner와 Muller가 18S rDNA(ribosomal RNA genes) 염기서열 분석의 방법으로 쌍각류 연체동물의 계통분류로써 신뢰성있는 자료가 될 수 있다고 주장한 이후로, 많은 과학자들이 다양한 고등 생명체의 계통분류에 18S rDNA 염기서열 분석의 방법을 이용한 바 있다<sup>31, 32, 33, 34)</sup>. 또한 Hillis와 Dixon<sup>35)</sup>은 28S rRNA의 Sequencing에서의 다양한 차이가 가장 최근에 있어서의 종간의 관계를 재구성하는데 유용하다고 인식하였다.

서<sup>36)</sup> 등은 18S rDNA 서열 분석에 의한 한국산 가시고기 속어류의 계통학적 연구를 하였으며, 이<sup>37)</sup> 등은 18S rDNA 염기서열 분석을 통하여 포도 대목의 계통분류를 연구하였다. 박<sup>38)</sup> 은 한국산 가리비 2종의 28S rRNA 유전자 염기서열에 의한 유전적 특성을 연구하였다. 또한 박<sup>39)</sup> 은 28S rRNA 유전자 염기서열의 높은 변이부위에 의한 특토기의 계통분류학적 연구를 하였다.

분자생물학에서 사용되는 여러 가지 방법들은 이종간(inter-specific taxa) 그리고 동종간(intra-specific taxa)의 계통생물학적인 관계를 명확하게 하는데 유용하게 이용되고 있다<sup>40)</sup>. 그리고 근래에 18S rDNA sequences는 계통발생의 관계를 세우는데 널리 응용되는 방법이다<sup>41)</sup>. 최근에는 분자생물학적인 방법을 이용하여 종을 同定하고 있으며, 특히 rDNA를 이용한 방법은 이들 영역이 진화적으로 안정되어 있어 계통학 연구에 폭 넓게 활용되고 있다<sup>42)</sup>. 또한 rDNA는 여러 단위로 구성되어 있고 각각 다른 염기변이를 가지고 있어 동종간(intra-specific taxa)이나 이종간(inter-specific taxa)의 비교에 유용한 영역으로 여겨지고 있다<sup>43)</sup>. 이러한 이유로 본 연구에서는 최근에 系統學的 研究에 많이 이용되고 있는 18S rRNA와 28S rRNA 그리고 serine protease SSP1 mRNA를 선택하여 염기서열을 분석하였다.

전통적으로 韓藥材의 구분은 형태학적, 세포학적, 해부학적, 생리학적 방법 등이 사용되어 왔으나, 실제로는 감별자의 주관적인 관점에 의존할 뿐 아니라 대부분의 韓藥材가 가공하지 않은 상태로 존재하는 것이 아니고 가루로 가공되거나 절편으로 잘려지게 되어 구분이 용이하지 않다<sup>44)</sup>. 또한 기존의 유전자 감별 분석법의 경우 주관적인 요소가 있을 수 있는 겔을 토대로 한 방법(gel-based method)으로 판독자에 따라 감별 결과가 달라질 가능성이 있었으나<sup>45)</sup> 본 연구의 감별 방법은 주관적인 요소가 배제된 보다 정확한 진단이 가능하다. 그리고 염기서열의 분석 이외에 형태학적 同定을 위해 현미경으로 각각의 試料를 관찰하였다.

본 연구에서는 유전형을 통해 9종류의 試料가 모두 同一種이라는 것을 입증하였으며 형태학적 同定을 위해 현미경으로 분석한 결과 모두 노랑머리왕지네(*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch)로 判明되었다. 그리고 Blast program을 이용하여 GenBank database에 등록되어 있는 기존의 염기서열 정보와의 相同性 검색을 하였다. 그 결과 본 연구에서의 유전형은 GenBank database에 등록된 *Scolopendra mutilans* 18S ribosomal

RNA gene, complete sequence와 *Scolopendra subspinipes* serine protease SSP1 mRNA, partial cds에 대하여 각각 99%, 98%의 상동성을 나타내었다.

홍<sup>27)</sup> 은 韓國產 蜈蚣의 形態學的 및 그 起源에 관한 研究에서 대부분이 노랑머리왕지네(*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch)임을 보고한바 있으며, 국내에서 市販되고 있는 蜈蚣의 종류는 노랑머리왕지네(*Scolopendra subspinipes mutilans*) 95.2%, 등줄 홍지네(*Otocryptops rubiginosus*) 1.4%를 차지하고 있으며 그 밖에 국내 未記錄種으로 보이는 일본왕지네(*Scolopendra subspinipes japonica*)의 變種으로 인정되는 것 2.1% 및 種類未詳인 2종의 1.2%가 混入되어 도합 5-6種 가량이 藥用 蜈蚣으로 市販流通되고 있음을 알수있다고 하였다.

본 연구에서 市中에 流通되는 產地別로 蒐集한 지네는 모두 노랑머리왕지네(*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch)였으며 각각의 유전자 염기서열상의 차이는 거의 없었고(Fig. 3-9), 본 연구를 통하여 얻어진 노랑머리왕지네의 DNA 염기서열은 추후 다른 지네 종과의 감별에 도움이 될 것이며, 시중에 유통되는 國內產 蜈蚣 藥材의 稀貴성과 그로 인한 高價 등 여러 경제적인 측면에서의 문제점과 中國產 蜈蚣이 國產 蜈蚣으로 둔갑하는 유통 과정상의 문제점 개선에도 도움이 될 것이다.

각각의 試料를 MTT assay를 이용한 細胞毒性效果를 측정된 결과에서도 시중에서 유통되는 國內產과 中國產에 따른 差異가 거의 없는 것으로 나타났다. Hep G2 세포주에 대한 細胞毒性效果에서 蜈蚣藥針液이 농도의 존적과 시간의존적으로 농도가 증가하고 시간이 경과할수록 國內產에서 다소 細胞毒性을 보이는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었다(Fig. 10, 11).

Hep G2 세포주는 알콜에 의한 간의 손상을 연구하는데 아주 적합한 모델로 알려져 있다. 사람의 간암 세포주(human hepatoblastoma cell line)인 Hep G2 세포에 에탄올을 장시간 처리하면, 생화학적·형태학적 특성이 알콜에 의한 간질환 환자에서 보여지는 특성과 유사하게 나타났다<sup>46, 47)</sup>. 一郡의 研究者들은 이 세포주가 drug metabolic function을 가지고 있다고 보고하였다<sup>48, 49)</sup>. Hep G2 세포주에 미치는 蜈蚣藥針液에 의한 細胞毒性에서 고농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 細胞毒性을 보이지 않았고, 최<sup>50)</sup> 등은 白鼠를 이용한 D-galactosamine으로 유발된 肝損傷을 蜈蚣藥鍼이 회복시키는데 일정

부분 효능이 있음을 보고한 바 있으며, 소<sup>50)</sup> 등은 蜈蚣藥鍼의 安全性에 대한 임상적 연구에서 蜈蚣藥鍼 시술 후 肝機能수치가 개선되었음을 보여주는 결과를 얻은 점으로 볼때 蜈蚣藥鍼液으로 인한 肝機能低下등의 肝損傷의 우려가 적을 것으로 사료된다.

炎症은 損傷에 대한 살아있는 組織의 反應으로 외상에 의해 조직의 손상이 일어나면 일시적인 혈관의 수축이 일어나고 곧이어 국소 혈관이 확장되면서 혈장과 단백질이 손상부위로 빠져 나옴과 동시에 백혈구가 혈관의 내피세포에 부착하였다가 창상 공간으로 빠져나가면 이른바 염증성 삼출액이 되는 것이다. 염증 반응은 조직손상의 정도에 따라 다르나 청결한 절개창은 수일 내에 급성염증은 사라지고, 손상된 조직이나 세포는 백혈구가 제거하게 된다<sup>51)</sup>. 조직손상으로 염증성 반응이 유발된 곳에서는 nociceptor가 감작(sensitization)되어 무해성 자극에도 쉽게 반응한다. 이러한 sensitization에 관여하는 인자로는 serotonin, prostaglandin, bradykinin과 tachykinin등이 있으며, 특히 bradykinin에 의해 arachidonic acid가 prostaglandins로 변화하는데, 이 산물은 염증성 반응을 더욱 가중시킨다<sup>53,54,55,56)</sup>.

炎症의 修復과정은 炎症의 初期부터 시작된다. 가끔은 손상 24시간 후에 섬유모세포, 혈관내피세포의 증식이 일어나며 3-5일 후에 치유과정에 중요한 소위 육아조직(granulation tissue)을 형성한다. 신생소혈관 및 섬유모세포의 증식이 특징적이다. 창상치유과정중 collagen의 합성은 섬유모세포에 의해 이루어지는데 창상 3-5일부터 시작하여 수주동안 지속된다. 여기에는 PDGF, FGF, 및 TGF 등의 성장인자, 인터루킨-1, 4 등의 사이토카인 등 여러인자가 관계한다. 또한 염증병소에서 보는 대부분의 대식세포(macrophage)는 혈액 단구이며 이들 대식세포를 일명 청소세포(scavenger cell)라 부르고, 이들은 염증병소의 뒤처리 및 修復기전에 크게 관여하고 있다<sup>57)</sup>. 염증반응에서 NO의 중요성은 이미 밝혀져 있지만 최근에는 염증반응의 일환인 창상치유에 있어서도 NO의 중요성이 부각되고 있는 실정이다. 급성 창상을 유도하였을 때 처음 12시간에서 48시간 동안에는 창상 부위로 polymorphonuclear leukocyte (PMN)와 대식세포의 유입이 일어나고 주로 대식세포에 의하여 다량의 NO가 분비된다는 사실이 이미 보고가 되어진바 있으며 창상의 치유기간 동안에는 초기보다 현저하게 NO가 감소됨이 알려져 있다<sup>58)</sup>.

蜈蚣을 口服하였을 때 巴豆油로 일으킨 小鼠의 귀 종

창에 대한 억제율은 38%였고, carrageenan성 大鼠 관절 종창과 formaldehyde성 大鼠 아급성 관절종창 및 大鼠의 adjuvant 다발성 관절염에 대해 서로 다른 정도의 억제작용이 있고, 종창조직 중 prostaglandin E2의 함량을 뚜렷이 감소시켰다. 그러나 어린 大鼠에 연속해서 약을 주었을 때 부신과 흉선의 重量에 영향은 없었으며, Histamine과 5-hydroxylamine 매개로 생긴 大鼠의 足踝關節腫脹에 뚜렷한 억제작용이 있었다<sup>59)</sup>. 蜈蚣液이 大鼠의 관절염에 뚜렷한 억제작용을 나타냈으며, 大鼠의 燙傷으로 일어난 피부부종이나 혈관삼투성 증가에 억제작용이 있었다. 大鼠의 carboxymethyl cellulose로 일어난 백혈구의 腹腔內 遊走에 있어 특히 현저하게 억제작용이 있었다<sup>60)</sup>. 류<sup>60)</sup> 등은 蜈蚣藥鍼이 carrageenan으로 유발된 흰 쥐의 關節炎의 消炎效果에 대하여 浮腫의 감소, CRP의 감소, WBC의 감소등 소염작용의 유의한 효과를 보았음을 보고하였으며, 최<sup>61)</sup> 등은 下肢浮腫환자에 蜈蚣藥鍼을 응용하여 유의한 치료효과를 나타내었음을 보고하였다.

따라서 본 연구에서 NO의 생성, peritoneal macrophages와 L929 세포에 미치는 세포독성을 측정한 결과 농도 의존적과 시간의존적으로 농도가 증가하고 시간이 경과할수록 다소 細胞毒性을 보이는 경향을 나타내었으나, 시중에 유통되는 國內産과 中國産의 차이에 따른 유의성은 없었으며, 蜈蚣藥針液은 직접적으로 NO의 생성에 관여하지 않는 것으로 사료된다(Fig. 12-16). Peritoneal macrophages와 L929 세포의 細胞毒性 연구에서 대조군에 비해 실험군에서 유의성 있는 차이가 없는 것으로 보아 蜈蚣藥針液은 염증의 발생과 修復에 이르는 一連의 過程에서 급성염증의 초기에 더욱 관여하여 염증억제에 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과들은 蜈蚣藥鍼液의 標準化와 安全性의 側面에서 臨床活用の 根據를 제시할 수 있는 하나의 중요한 端緒로 활용될 수 있으리라 思料된다.

## V. 結 論

蜈蚣藥鍼液의 標準化에 대한 基礎資料를 얻기 위하여 藥用으로 市販되고 있는 蜈蚣의 起源解明을 위해 蒐集한 지네가 어떤 종류의 지네인지 알아보고 각각 DNA 염기서열상의 차이점을 관찰하였으며 또한 蜈蚣

藥鍼液의 細胞毒性效果를 研究하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 市중에 流通되는 産地別로 蒐集한 蜈蚣의 유전자 분석결과 거의 일치하여 유전자 변화는 없었으며, 試料 모두 형태학적으로 노랑머리왕지네 (*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch)로 同定되었다.
2. 本 研究를 통하여 얻어진 노랑머리왕지네의 DNA 염기서열은 추후 다른 지네 種과의 鑑別에 도움이 될 것이다.
3. 蜈蚣藥鍼液은 Hep G2 細胞와 L929 細胞의 cytotoxicity에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.
4. 蜈蚣藥鍼液은 Peritoneal macrophages의 cytotoxicity와 nitric oxide 생성에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

### 參考文獻

1. 신민교. 원색 임상본초학. 서울 : 영림사. 1991 : 665.
2. 高學敏 主編. 中藥學(下). 北京 : 人民衛生出版社. 2000 : 1457-1465.
3. 上海中醫學院 編. 中草藥學. 香港 : 商務印書館香港分官出版社. 1975 : 347-348.
4. 張村生. 百藥效用奇觀. 北京 : 中醫古籍出版社. 1987 : 87-88.
5. 이현구. 韓國産 지네類의 分類學的 研究. 원광대학교석사학위논문. 1988 : 1-11.
6. 李時珍. 圖解 本草綱目(蟲部42卷). 서울 : 高文社. 1973 : 1324.
7. 홍남두. 노랑머리지네의 약리학적 연구. 생약학회지. 1976 ; 7(2) : 99-109.
8. 정병태, 장경전, 송춘호, 안창범. 蜈蚣水鍼이 진통 및 진경효과에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1997 ; 14(2) : 219-230.
9. 이동희, 김호철, 안덕균. 蜈蚣의 항고혈압작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 1997 ; 12(2): 39-49.

10. 고강훈, 박소영, 최희강, 소기숙, 황우준, 이건목, 김성철. 오공약침을 이용한 요추간판탈출증 치료의 임상적 연구. 대한약침학회지. 2002 ; 4(3) : 47-57.
11. 대한약침학회. 약침요법시술서. 서울 : 대한약침학회. 2000 : 13-62.
12. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(下). 서울 : 集文堂. 1998 : 1457-1467.
13. 최희강, 소기숙, 고강훈, 박소영, 김성남, 이종덕, 원경숙, 문형철, 김성철. 추적조사를 중심으로한 요추추간판탈출증에 대한 오공약침의 임상적 연구. 대한침구학회지. 2003 ; 20(3) : 238-252.
14. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning : A laboratory manual. NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989 : 545.
15. 대한약침학회. 약침제제와 임상응용(I). 서울 : 대한약침학회출판부. 2001 : 227.
16. 時逸人 編著. 中國藥物學. 台聯國風出版社. 1977 (中華民國六十五年) : 404-405.
17. 吳普. 神農本草經(三卷). 서울 : 醫道韓國社. 1987 : 28.
18. 李時珍. 本草綱目(下). 北京 : 人民衛生出版社. 1982 : 2345-2349.
19. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균. 중약대사전. 서울 : 정담. 1998 : 3919-3923.
20. 張隱庵, 葉天士, 陳修園. 本草三加合註. 서울 : 醫道韓國社. 1976 : 13.
21. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 김선희. 한약임상응용. 서울: 성보사. 1990 : 441-442.
22. 陰健. 中藥現代研究與臨床應用. 北京 : 中醫古籍出版社. 1995 : 370-371.
23. 顏行伍 等. 中醫雜誌. 1960 ; 6 : 39.
24. 遲程 等. 雲南中醫學院學報. 1992 ; 15(1) : 23-5.
25. 김종희. 蜈蚣의 진통, 소염, 진경 및 독성작용에 관한 실험적 연구. 대전대학교석사학위논문. 1991 : 1-22.
26. 이삼로. 白鼠에서 蜈蚣藥鍼이 神經病症性 痛症에 미치는 影響. 원광대학교박사학위논문. 2003 : 1-40.
27. 홍남두. 國産 蜈蚣의 起源에 관한 研究. 생약학회지. 1975 ; 6(3) : 137-42.
28. 渡邊 勉, 青野由利 著, 이영주 역. 3일만에 읽는 유전자. 서울 : 서울문화사. 2004 : 12-7, 38-40.
29. Baker M.D., C.R. Vossbrinck, J.V. Maddox, and A.H.

- Undeen. 1994. Phylogenetic relationships among Vairimorpha and Nosema species(Microspora) based on ribosomal RNA sequence data. *J. Invertebr. Pathol.* 1994 ; 64 : 100-6.
30. Gatehouse, H.S. and L. A. Malone. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora) : DNA sequence for small and large subunit RNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *J. Invertebr. Pathol.* 1998 ; 71 : 97-105.
31. Cerbah, M., J. Coulaud, and S. Siljak-Yakovlev. rDNA Organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). *Amer. Genet. A.* 1998 ; 89 : 312-318.
32. Eernise, D.J. and A.G. Kluge. Taxonomic congruence versus total evidence, and amniote phylogeny inferred from fossils, molecules, and morphology. *Mol. Biol. Evol.* 1993 ; 10 : 1170-1195.
33. Fukatsu, T. and H. Ishikawa. Phylogenetic position of yeast-like symbiont of *Hamiltonaphis styraci* (Homoptera, Aphididae) based on 18S rDNA sequence. *Inst. Biochem. Mol. Biol.* 1996 ; 26 : 383-388.
34. Kim, C.S., G.P. Lee, D.H. Han, K.H. Ryu, and C.H. Lee. Classification and identification of *Pyrus pyrifolia* using RAPD. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 2000a ; 41 : 119-124.
35. Hillis, D.M. and Dixon, M. T. Ribosomal DNA : Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarter Review Biology.* 1991 ; 66 : 411-453.
36. 서보근, 채병수. 18S 리보솜 DNA 서열 분석에 의한 한국산 가시고기속(genus *pungitius*, Gasterosteidae : Pisces) 어류의 계통학적연구. *Korean J. Ichthyol.* 2000 ; 12(1) : 14-19.
37. 이창후, 이동우, 김정선, 류기현, 이공표. 18S rDNA 염기서열 분석을 통한 포도대목의 계통분류. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 2001 ; 42(6) : 712-716.
38. 박갑만. 한국산 가리비 2종의 28S rRNA 유전자 염기서열에 의한 유전적 특성. *한국패류학회지.* 1997 ; 13(1) : 1-7.
39. Park, K.H. Phylogenetic analysis of collembola based on highly variable region of 28s rRNA gene sequence. *Korean J. Genetics.* 2002 ; 24(1) : 21-29.
40. Baker, D.C. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology.* 1989 ; 99 : S125-S1465.
41. Chung-Sun Kim, Gung-Pyo Lee, Dong-Hyeon Han, Ki-Hyun Ryu, and Chang-Hoo Lee. Molecular phylogeny of *pyrus pyrifolia* based on the 18S rDNA sequences. *J.Kor. Soc. Hort. Sci.* 2000 ; 41(2) : 129-134.
42. Daugbjerg N., Hansen G., Larsen J. and Moestrup Ø. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellate based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycologia.* 2000 ; 39 : 302-317.
43. Adachi M., Sako Y., and Ishida Y. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequence of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. *J. Phycol.* 1996 ; 32 : 424-432.
44. 조재운. 분자유전학적 방법을 이용한 산지별 인삼의 구분. 원광대학교 석사학위논문. 2001 : 1-3.
45. 권기록, 서정철. 산삼과 장뇌삼 중 고려삼과 서양삼의 Pyrosequencing법에 의한 감별. *대한본초학회지.* 2004 ; 19(4) : 46-50.
46. Neuman, M.G., Koren, G., and Tiribelli, C. In vitro assessment of the ethanol-induced hepatotoxicity on Hep G2 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993 ; 197 : 932-941.
47. Neuman, M.G., Cameron, R. G., Shear, N.H., Bellentani, S., and Tiribelli, C. Effect of tauroursodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on ethanol-induced cell injuries in the human Hep G2 cell line. *Gastroenterology.* 1995 ; 109 : 555-563.
48. Cameron, R. G, Neuman, M.G., Shear, N. H., Katz, G., Bellentani, S., and Tiribelli, C. Modulation of liver-specific cellular response to ethanol in vitro in Hep G2 cells. *in Vitro Toxicol.* 1998 ; 12 : 1-29.
49. Marselos, M., Strom, S. C., and Michalopoulos, G. Effect of phenobarbital and 3 methyl-chloranthrene on aldehyde dehydrogenase activity in cultures of Hep G2 cells and normal human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 1987 ; 62 : 75-88.
50. 최회강, 김성철, 윤대환, 나창수, 김성남, 임정아, 이성용, 소기숙, 조남근, 황우준. 期門에 대한 蜈蚣藥



- 鍼이 D-galactosamine으로 유발된 肝損傷에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2005 ; 22(3) : 53-66.
51. 소기숙, 최회강, 박소영, 고강훈, 김성남, 이옥자, 윤민영, 문형철, 김성철, 이정훈, 나원경. 蜈蚣藥鍼의 安全性에 대한 臨床的 研究. 대한침구학회지. 2005 ; 21(1) : 136-147.
52. 김진복. 최신외과학. 서울: 일조각. 1995 : 263-264.
53. 오홍근. 통증의학. 서울: 군자출판사. 1995 : 1-32.
54. Thomas Lundeborg. Pain physiology and principles of treatment. Scand J Rehab. Suppl. 1995 ; 32 : 13-42.
55. Ke Ren, Janice L. K. Hylden, et. The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. Pain. 1992 ; 50 : 331-344.
56. 성호경, 김기환. 생리학 6판. 서울 : 의학문화사. 1996 : 553-558.
57. 대한병리학회. 병리학 제3판. 서울 : 고문사. 1998 : 68-97.
58. Gueritte-Voegelein, F., et al. Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity. J. Med. Chem. 1991 ; 34 : 992.
59. 趙秦 等. 全國首屆藥物資源開發研討會論文滙編. 1992 : 289.
60. 류원복, 소경순, 정찬길, 김광호. 蜈蚣藥鍼이 Carrageenan으로 유발된 흰 쥐의 관절염에 미치는 영향. 대한약침학회지. 2004 ; 7(3) : 89-98.
61. 최회강, 소기숙, 김성남, 임정아, 이정훈, 문형철, 김성철. 蜈蚣藥鍼을 사용한 下肢浮腫患者 1例에 대한 임상적 연구. 대한약침학회지. 2004 ; 7(2) : 83-89.