

蜂毒이 Lipopolisaccharide로 유발된 Chronic Obstructive Pulmonary Disease 病態 Model에 미치는 영향

박동희, 정승기, 정희재
경희대학교 한의과대학 폐계내과학 교실

The Effects of Bee Venom on Lipopolysaccharide (LPS)-induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

Dong-hee Park, Sung-ki Jung, Hee-jae Jung
Division of Allergy, Immune & Respiratory System,
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University,

ABSTRACT

Objectives : This study was conducted to evaluate the protective effects of bee venom on lipopolysaccharide (LPS)-induced chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Methods : In this study, LPS was administrated to Balb/c mice to induce a disease that resembles COPD. 2 hr prior to LPS administration, mice were treated with bee venom via an intraperitoneal injection.

Total cell number and neutrophils number in bronchoalveolar lavage fluid were counted and pro-inflammatory cytokines were also measured. For histologic analysis, periodic acid Schiff (PAS) and hematoxylin and eosin (H&E) stains were evaluated. Proliferating cell nuclear antigens (PCNA) were also assessed by immunohistochemistry.

Results : On 7 days after LPS stimulation, influx of neutrophils significantly decreased in the bee venom group, compared with the COPD group. In addition, TNF- α and IL-6 levels decreased in bee venom group. Histological results also demonstrated the attenuation effect of bee venom on LPS-induced lung inflammation.

Conclusions : These data suggest that bee venom has protective effects on LPS-induced lung inflammation. Therefore, bee venom may represent a novel therapeutic agent for lung inflammation and in particular for COPD.

Key words : chronic obstructive pulmonary disease, bee venom, lipopolysaccharide

1. 서론

만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)은 기침, 객담, 호흡곤란, 호기 유속의 감소, 가스교환의 장애 등을 보이는 만성 기도

질환으로서, 흡연, 대기오염, 직업성 인자 및 유전적 소인과 연관이 있으며 평균수명의 연장으로 인해 노령화됨에 따라 증가하고 있다¹.

COPD의 발병기전에는 염증, 폐에서의 단백질분해효소와 항단백분해 효소의 불균형, 산성부하(oxidative stress)가 관여하며, 염증에 관여하는 세포는 주로 대식세포와 T 림프구(특히 CD8+세포)와 호중구이다. COPD의 주 원인중 하나인 흡연은 nuclear factor κ B(NF κ B)를 활성화시켜 상피 세

· 교신저자: 정희재 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 부속한방병원 한방5내과 의사실
TEL: 02-958-9147 FAX: 02-958-9148
E-mail: hanfish@khmc.or.kr

포로 부터 많은 염증 매개 물질을 생성해서 분비하게 된다². 또한 이들 염증 매개 물질들은 폐포 대식세포와 호중구를 활성화 시키고 이들에게서 단백질 분해효소가 유리되면서 산소기(reactive oxygen species)와 함께 폐손상을 일으킨다³. 치료와 관련하여 현존하는 어떤 치료약제도 COPD의 장기적인 폐기능을 완화시킨다고 확인된 바는 없으며, 기관지확장제(β_2 -작용제, 항콜린제, methylxanthines)와 스테로이드(흡입, 경구)가 주 치료약인 COPD에서 약물요법은 주로 증상 혹은 합병증을 감소시키는 목적으로 사용되고 있다⁴.

COPD는 한의학의 喘證, 哮喘證의 범주에 포함된다. 치료는 虛實을 구분하고, 豁痰宣肺, 降氣平喘, 補陰益氣 益腎補肺하는 처방을 응용하고 있으나⁵, 치료와 관련된 국내 임상연구논문은 아직 미흡한 편이다.

임상에서 활용되는 蜂毒藥針療法는 經絡學說의 原理에 의해 꿀벌의 독낭 안에 있는 蜂毒을 抽出 가공하여 질병에 유관한 혈위, 압통점, 觸診에 의해 얻어진 부위에 주입함으로써 자침효과 및 蜂毒의 생화학적 효능을 이용하여 생체의 기능을 조정하고 병리상태를 개선하여, 질병을 치료하는 新鍼요법의 하나이다⁶.

蜂毒은 祛風除濕, 止疼痛, 補益精氣, 消腫降壓의 효능⁷이 있으며, 蜂毒과 관련하여 해외에서는 많은 연구가 이루어져 왔으며, 국내에서는 1992년 이후 연구 및 발표가 되었으며, 내용별로는 蜂毒의 항염효능⁸⁻¹⁰, 진통효능¹¹⁻¹³, 면역관련^{14,15} 및 항암관련¹⁶⁻¹⁸ 등 많은 연구가 이루어져 왔다.

현재 COPD는 전 세계적으로 사망원인 4위를 차지하고 있으며 COPD의 유병률과 사망률은 더욱 증가할 것으로 예측되고 있다. 이러한 추세를 역전시키기 위해 국제적으로 노력을 하고 있으며,

한의학계에서도 COPD의 관리 및 치료에 대한 준비 및 연구 역량을 높여야 할 것으로 생각된다.

이러한 연구의 일환으로 현재 이루어지는 경구 위주의 韓方治療에 추가하여, 치료의 다양화와 효과의 극대화를 위하여 약침을 이용하고, 그 중 강력한 항염증 효능과 면역조절 기능이 있는 蜂毒을 이용하여 COPD 마우스 모델에서 치료효과가 인정된다면 蜂毒요법이 COPD 치료제로서의 가능성을 확인할 수 있을 것으로 생각한다.

이에 저자는 lipopolysaccharide(LPS)를 마우스에 사용하여 염증을 유발 시킨 후 폐포에서 발생된 염증세포 분석과 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA) 방법을 통한 IL-6 와 TNF- α 등의 cytokine인 분비량 측정과 더불어 세포조직구조 및 증식성세포핵항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)의 분석과 검정을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 실험동물

Orient bio Inc.(Seoul, Korea)에서 구입한 Balb/c mouse(투여개시시 6주령, male)로 온도 23 ± 1 °C, 상대습도 $50\pm 10\%$, 12시간 조명등의 조건에서 사료 및 물은 자유롭게 섭취하도록 하여 1주일 동안 실험실 환경에서 순화시킨 후 실험에 사용하였고, 경희대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하였다.

2) 시약 및 검액

LPS는 Calbiochem(Calbiochem, Germany), Dexamethasone과 蜂毒(*Apis Mellifera*)은 Sigma Aldrich(MO, USA)에서 구입하였다.

Table 1. Materials

	1	2	3
Name	LPS	Dexamethasone	Bee Venom
Product	Calbiochem	Sigma Aldrich	Sigma Aldrich
Volumn	5 mg	100 mg	25 mg
Shape	Powder	Powder	Powder
Keeping Condition	+4 °C	Room Temperature	+4 °C

2. 실험방법

1) COPD 유발 및 검액투여

실험동물은 4그룹으로 구분하였다. 정상군(normal 群)은 0.9% 생리식염수 60 µl을 비강을 통하여 주입하였고, 대조군(COPD群)은 LPS를 0.9% 생리식염수에 희석하여 60 µl (0.5 mg/kg) 씩 쥐의 비강으로 투여하였다. 실험군 중 dexamethasone 투여군

(Dexa群)은 LPS 투여 6시간 후에 dexamethasone (10 mg/kg)을 복강 투여하였고, 蜂毒 투여군(BV 群)은 LPS 투여 6시간 후에 蜂毒(200 µl/1 mg/kg)을 복강 투여하였으며, 3일 동안 1회씩 투여 후 해부하였다. 肺의 위상염은 RNA analysis, 우중엽은 protein analysis 우하엽과 좌엽은 histological analysis를 위해 적출하였다

Table 2. Experimental Design Used in This Study

	numbers	volumn	route	
Normal Group	4	60 µl	Intranasal	Saline
COPD Group	5	0.5 mg/kg	Intranasal	Only LPS
Dexa Group	5	10 mg/kg	Intraperitoneal	Dexamethasone
BV Group	5	1 mg/kg	Intraperitoneal	Bee Venom

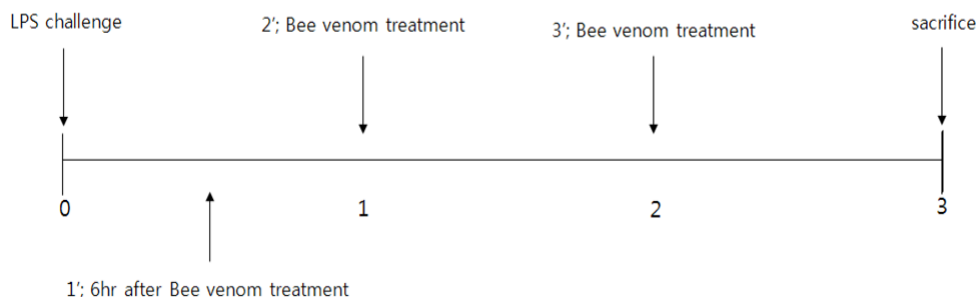


Fig. 1. Schedule

2) 기관지 폐포액의 세포 분석

PBS(phosphate buffered saline)를 폐로 천천히 주입하고, 기관 내 삽입된 catheter를 통해 회수하였다. Total cell의 수는 hemacytometer(Mariefeld,

German)를 이용하여 측정하였고, different cell count는 cytocentrifuge(Shandon, Japan)를 통해 diff-quick stain을 하여 측정하였다. 기관지폐포세척액(BALF)는 분리하여 상층액을 -80 °C에 보관

하였다.

3) ELISA를 통한 기관지 폐포액 내의 IL-6와 TNF- α 분비량 측정

IL-6, TNF- α 의 분비량은 ELISA를 이용하여 측정하였다. ELISA는 quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay kit(BD, USA)를 이용하여 측정하였다. 96-well plate(Costar, NY, USA)에 IL-6, TNF- α 의 항체를 coating buffer에 섞어 4 °C에서 하루 동안 coating한 후 0.05% tween20(Sigma, MO, USA)을 포함한 PBS로 씻은 후, 5% FBS를 포함한 PBS를 넣고 실온에서 한 시간 동안 격리하였다. 기관지 폐포액(BALF)을 100 μ l 넣고, 실온에서 2시간 동안 배양한 후, 2차로 5% FBS를 포함한 PBS에 biotinylated anti-mouse IL-6, TNF- α 단핵항체에 peroxidase를 1시간 동안 label 한 후 마지막으로 TMB solution(BD, San Diego, USA)으로 반응을 시켰고, 30분 후에 2N H₂SO₄ solution으로 반응을 멈추게 하였다. 광학 밀도는 450 nm로 측정하였다.

4) 조직학적 염색방법

Balb/c mouse에서 적출한 폐조직을 관찰하기 위해 4% paraformaldehyde를 이용하여 고정시켰고, 조직을 탈수과정을 통하여 paraffin block을 만들었다. Paraffin block으로 만든 조직을 microtome을 이용하여 4 μ m로 자른 후 glass slide위에 조직을 올려, paraffin을 제거하고 Hematoxylin(YD-Diagnostics, Yongin, Korea) & Eosin(Amresco, Ohio, USA) (H&E) 염색을 하였다. 면역조직화학법 (immunohistochemistry)을 통하여 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)의 분포를 조직 내에서 확인하였다. H&E stain과 조직처리를 동일하게 하여 paraffin을 처리하고, 내부의 peroxidase의 반응을 막기 위해 0.3% H₂O₂-methylalcohol으로 30분 동안 처리한 후 1X TBS로 씻은 뒤, anti-PCNA rabbit polyclonal antibody (1: 50 dilution Santa Cruz Biotechnology, Santa

Cruz, CA, USA) 항체를 4 °C에서 하루 동안 배양하였다. 17시간 후에 Avidin-biotin peroxidase complex(ABC kit, Vector Laboratories)로 30분 동안 반응을 증폭시켰다. 항체가 반응한 부분은 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride(DAB, Vector Laboratories)로 나타내었으며, Herri's Hematoxylin으로 3분 동안 핵 염색을 하고, Canada Balsam(Showa Chemical, Tokyo, Japan)으로 처리한 후, 현미경으로 관찰 하였다(olympus BX41, X200).

3. 통계처리

본 연구에서 data는 mean \pm S.E.M(standard error of the mean) 으로 표시하였고, Graphic Pad RRISM 4.0(GraphicPad software Inc., U.S.A)을 사용하여 통계결과를 내었다. 서로 다른 두 그룹간의 유의성을 나타내기 위해 통계처리를 하였고, 모든 실험 결과의 유의성 평가는 t-test의 Mann-Whitney U test를 시행하였으며, p-value가 0.05이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다

III. 결 과

1. 기관지 폐포액의 염증세포에 대한 蜂毒의 효능

기관지 폐포액의 염증세포를 분석한 결과 COPD 群은 Normal群 보다 전체 세포수, 호중구, 대식세포 그리고 림프구에서 모두 증가하였고(Fig. 2, Fig. 3), 호중구와 전체 세포수에서 유의성(p<0.05)을 관찰 할 수 있었다(Fig. 2). COPD群과 치료군을 비교한 결과 Dexa群과 BV群에서 전체 세포수, 호중구수, 대식세포수 그리고 림프구수가 모두 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2, Fig. 3). BV群은 호중구(p<0.01)에서만 유의성 있는 감소효과를 확인할 수 있었고(Fig. 2B), Dexa群은 호중구(p<0.05)와 전체 세포(p<0.01)에서 유의성 있는 감소효과를 확인할 수 있었다(Fig. 2A, 2B).

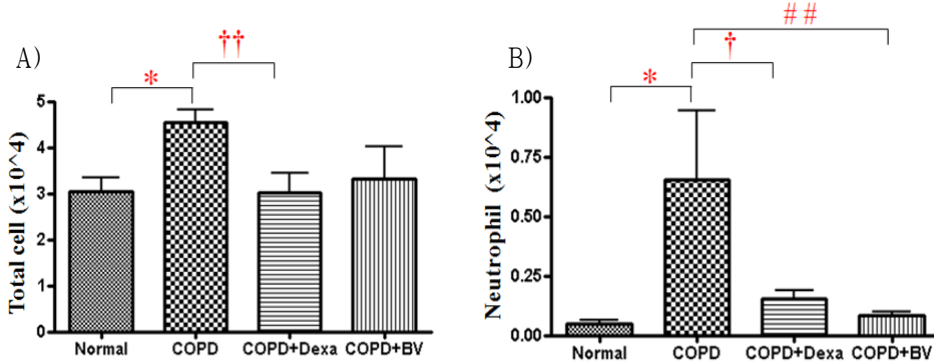


Fig. 2. The effect of bee venom on total cell (A) and neutrophil (B) profiles in BALF

The numbers of total cell and neutrophil cells were determined in BALF. Data are expressed as absolute number of cells per milliliter as mean ± S.E.M.

Normal: saline treated group, COPD: LPS treated group, COPD+Dexa: LPS and Dexamethasone treated group, COPD+Bv: LPS and Bee Venom treated group.

(*): Normal and COPD, (†): COPD and COPD+Dexamethasone, (##): COPD and COPD+Bv, * p<0.05, † p<0.05, †† p<0.01, ## p<0.01.

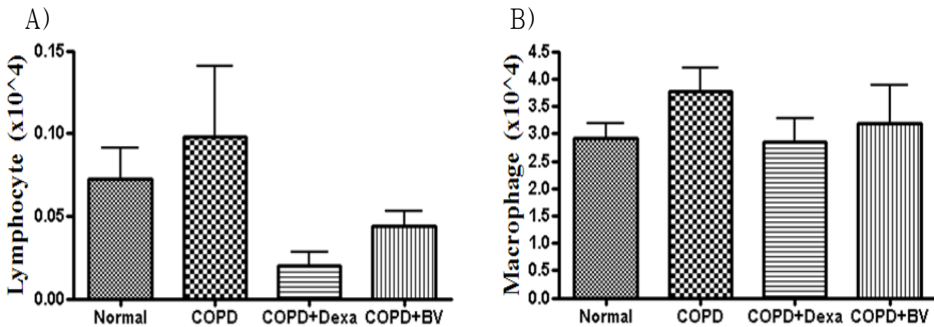


Fig. 3. The effect of bee venom on macrophage (A) and lymphocyte (B) profiles in BALF

The numbers of macrophage and lymphocyte were determined in BALF. Data are expressed as absolute number of cells per milliliter as mean ± S.E.M.

Normal: saline treated group, COPD: LPS treated group, COPD+Dexa: LPS and Dexamethasone treated group, COPD+Bv: LPS and Bee Venom treated group.

2. 기관지 폐포액 내의 IL-6와 TNF-α에 대한 蜂毒의 효능

ELISA를 이용하여 IL-6와 TNF-α의 분비량을 측정된 결과, COPD군은 Normal군에 비해 IL-6와 TNF-α의 분비량이 모두 증가하였다(Fig. 4A, B).

COPD군과 치료군인 Dexa군과 BV군을 비교한

결과 Dexa군과 BV군에서 IL-6와 TNF-α의 분비량이 모두 감소하였는데(Fig. 4A, B), IL-6의 분비량 측정 결과에서만 BV군(p<0.01)와 Dexa군 (p<0.05)의 유의성 있는 감소효과를 확인 할 수 있었다(Fig. 4A).

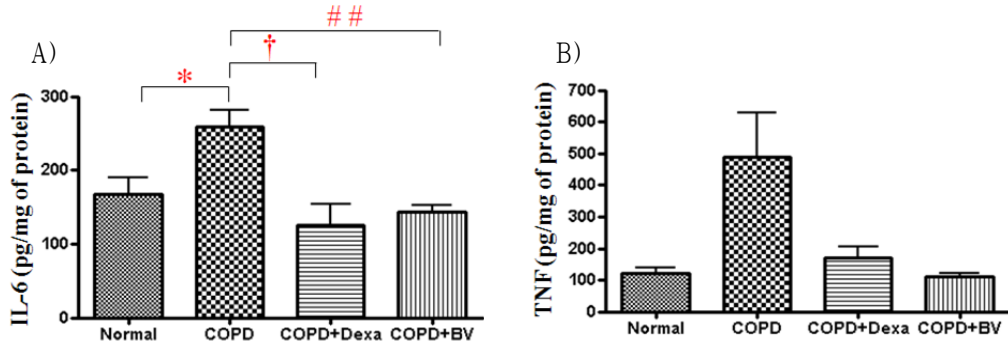


Fig. 4. The effect of bee venom on IL-6(A)and TNF-α(B) in BALF

Levels of IL-6 and TNF-α in BALF were determined by ELISA. The value is presented as the mean ± S.E.M. Normal: saline treated group, COPD: LPS treated group, COPD+Dexa: LPS and Dexamethasone treated group, COPD+BV: LPS and Bee Venom treated group.

(*): Normal and COPD, (†): COPD and COPD+Dexamethasone, (#): COPD and COPD+BV, * p<0.05, † p<0.05, ## p<0.01.

3. 蜂毒의 조직병리학적 관찰

H&E 염색을 통하여 조직의 형태를 확인한 결과 LPS로 자극을 한 COPD群에서는 폐기종(emphysema)이 발생한 것을 확인할 수 있었다. 실험군인 Dexa

群과 BV群 모두에서 폐기종의 증상이 완화되었음을 확인할 수 있어 蜂毒의 투여가 폐염증에 의한 폐기종 유발을 억제하는 치료효과가 있는 것으로 추측할 수 있었다(Fig. 5).

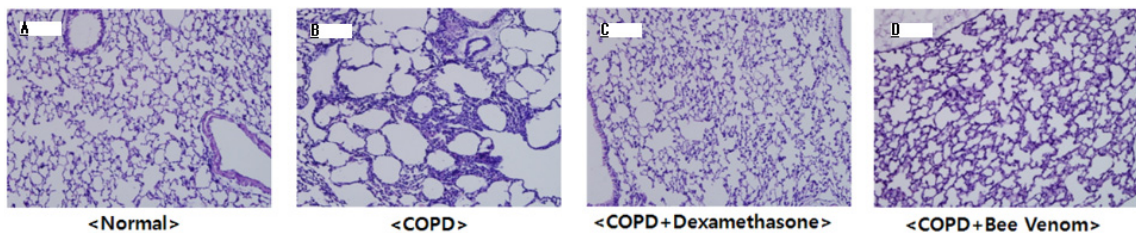


Fig. 5. The effect of bee venom on emphysema stimulated LPS (X200)

Mouse lung sections stained with hematoxylin and eosin.

A : Normal: saline treated group.

B : COPD: LPS treated group.

C : COPD+Dexamethasone: LPS and Dexamethasone treated group

D : COPD+Bee Venom: LPS and Bee Venom treated group.

4. 蜂毒의 조직면역학적 관찰

면역조직화학(immunohistochemistry) 염색법을 통하여 증식성세포핵항원(PCNA)의 분포를 확인한 결과 COPD群에서 증식성세포핵항원이 증가하

는 것을 확인할 수 있었다. 치료군인 Dexa群과 BV群에서 증식성세포핵항원이 감소하는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

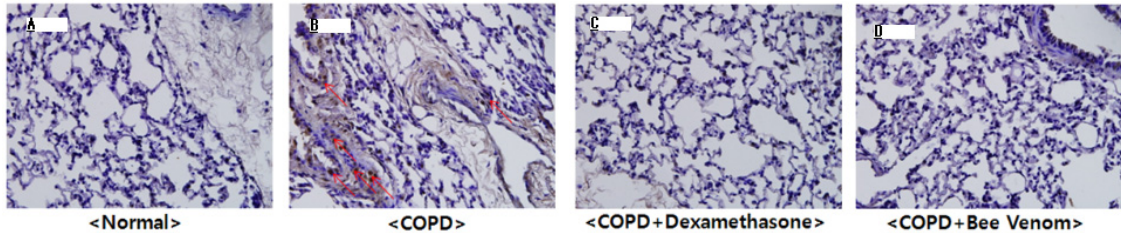


Fig. 6. The effect of bee venom on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by immunohistochemical stain in lung tissue (X200)

Overexpression of PCNA suggested the presence of epithelial cell damage and regeneration. The effect of bee venom on PCNA.

- A : Normal: saline treated group.
- B : COPD: LPS treated group.
- C : COPD+Dexamethasone: LPS and Dexamethasone treated group.
- D : COPD+Bee Venom: LPS and Bee Venom treated group.

IV. 고 찰

蜂毒요법은 기원전 2000년경에 이집트의 파피루스와 바빌로니아醫書에 蜂毒의 치료약 사용에 대한 기술이 있으며, 韓醫學에서는 기원전 168년에 매장된 馬王堆의 묘에서 출토된 15종의 醫書들 중 “養生方”과 “雜療方”에 蜂毒 요법이 각 1례씩 수록되어 있다²¹⁻²³.

꿀벌과에 속하는 벌의 蜂毒은 성미가 苦, 辛, 平, 有毒하고 補益精氣, 補腎壯陽, 活血祛瘀, 扶正祛邪 효능²⁶을 가진다. 蜂毒은 40여 종류의 구성성분으로 되어 있는데 이 중 11개의 peptides(melittin, apamin, mast cell degrading peptide adolopin 등)가 항염증, 항진균, 항박테리아, 해열, adrenocorticotropic hormone (ACTH)자극, 혈관투과성 증가작용을 유발하며, 5개의 enzyme는 심혈관계에 작용하여 蜂毒 주입부위에 국소적으로 작용한다^{22,24}.

국내의 蜂毒에 관한 연구는 1990년도 以後 약침 치료위주로 진행되어 진통과 소염⁸⁻¹⁰, 면역증강작용^{14,15} 등이 확인되었다. 현재 임상에서 사용되는 蜂毒藥針療法은 經絡學說의 원리에 의하여, 꿀벌의 자기방어용으로 가지고 있는 毒囊에 들어있는 蜂毒을 추출, 가공한 후 질병과 관련한 부위 및 穴位

에 주입함으로써 자침 효과와 蜂毒의 생화학적 藥理作用을 동시에 이용하여 생체의 機能을 조정하고 病理상태를 개선시켜 疾患을 치료하거나 예방하는 요법이다^{7,21,38}. 즉 韓醫學에서 활용하고 있는 蜂毒요법은 벌독이 가지고 있는 성분을 침 치료점인 경혈에 주입하여 서양의학의 벌독 효과와 한의학의 침구효과를 동시에 얻음으로써 동서의학이 결합된 제 3의학의 대표적인 치료법이라 할 수 있다.

이러한 蜂毒 약침의 자극은 크게 네 가지 측면으로 요약될 수 있는데 첫째, 蜂毒을 혈위에 투여하면 經穴을 물리화학적으로 자극함으로써 신체의 陰陽氣血을 조절하는 효능과 둘째, 蜂毒에 의한 전신적, 국소적, 생화학적, 생리적 반응이 유발되며, 셋째, 국소발열과 발적 반응을 유발 灸療法과 유사한 효능을 보이며 넷째, 국소적 혈관투과성이 항진혈액 순환이 촉진되며 용혈작용이 있어 附缸의 효과를 낸다^{7,25}.

만성폐색성폐질환은 기도의 가변적 간헐적인 협착으로 인한 기류의 만성적인 폐쇄로 호흡곤란, 기침, 천명, 등의 증상이 반복적으로 발생, 일상생활에서 환자에게 큰 장애를 가져오는 질환이다²⁶. 원인으로서는 흡연, 대기 오염, 직업성 인자 및 유전적

인 소인과 연관이 되며, 흡연이 가장 큰 요인이며, 이를 장기간 계속하게 되면, 섬모운동의 억제, 기관지의 수축, 비만세포의 기능장애등 인체의 방어기능의 점진적인 약화로 만성질환으로 이행하게 된다²⁷.

COPD 병태에 중요한 만성적인 기도염증은 기도 내에 호중구, 림프구 및 대식세포 등의 침윤이 특징적이며²⁸, 특히 호중구는 조직내의 염증 및 손상을 일으키는 elastase, metalloprotease, oxygen radical 등을 포함한 다수의 염증매개인자를 분비하기 때문에 COPD의 기도염증의 병인에 중요한 역할을 한다²⁹. COPD 환자의 기도에 호중구의 침윤은 이런 세포에 화학주성을 가진 IL-8 및 TNF- α 같은 cytokine의 역할에 의하여 유도 되는 것으로 알려져 있다^{30,31}. 약물요법으로는 감염 시 항생제 사용, 기관지 확장제, 스테로이드 투여, 점액용해제, 산소요법 등이 있고 치료는 완치보다는 증상을 완화시켜 일상생활의 활동범위를 넓혀주고 최소한도로 일할 수 있는 여건을 마련해주며 질환의 진행을 막아주는 것이 중요하다³².

COPD와 관련하여 韓醫學의 이론을 살펴보면 만성기관지염은 病位는 肺에 있으나 脾와 腎에 영향을 미치고, 병리는 久嗽傷肺하여 肺氣不足, 脾虛하여 濕痰壅肺, 腎虛하여 寒水犯肺하면 咳嗽가 반복적으로 發作한다고 하였다. COPD의 韓醫學的 範疇를 살펴보면 哮喘證에 해당되며, 이는 風寒이나 痰濁, 肺腎虛 등으로 인해 喘息有聲하고 呼吸促急한 것을 특징으로 한다. 치료는 虛實로 나누어 접근하며, 여러 요인으로 인한 肺의 肅降機能失調나 肺腎의 기능저하로 인하여, 豁痰宣肺, 降氣平喘, 補陰益氣 益腎補肺하는 治법을 사용한다. 처방으로는 麻黃潤肺湯, 解表二陳湯, 三子養親湯 蘇子降氣湯, 三子化痰煎등이 金水六君煎, 清肺瀉肝湯 등이 있다⁵.

COPD는 기도의 만성적인 염증과 밀접한 관련이 있는데, 염증이란 염증매개체와 항염증매개체의 상호작용에 의해 엄격히 조절되는 생리적 방어기

전으로, 염증의 시작은 인체의 손상부위로 호중구의 집중과 침투로 시작되며, 만성염증의 조직학적 징표는 단핵백혈구 주로 대식구, 림프구 및 형질세포의 침윤, 섬유모세포와 소혈관의 증식 및 결합조직의 증가이며, 대식세포의 침윤은 만성염증에 있어서 가장 중요한 요소이다³³.

蜂毒의 항염증과 관련하여 蜂毒의 멜리틴, 아파민, 포르포리파제 등 40여종의 생화학적인 약성작용으로 관절 주변의 염증세포를 제거하며, 면역체계에 영향을 주어 면역기능을 조절하는 작용을 한다. 신경계의 흥분작용을 통하여 신경장애를 개선하며, 혈관의 수축과 확장작용으로 인한 혈액순환을 개선한다. 뇌하수체와 부신피질계를 자극하여 호르몬의 분비를 촉진하며, prostagladin의 생합성을 억제하여 동통을 억제하는 효과가 있다고 알려져 있다.

蜂毒의 성분 중 현재까지 밝혀진 바에 따라 항염증과 비교적 많은 관련이 있는 성분은 melittin, MCD peptide, apamin, adolapin 등이다¹⁹. 그리고 최근에 활발하게 연구된 바에 따르면 蜂毒은 NO, iNOS, PLA2, COX-2, TNF- α , IL-1, NF- κ B, MAP kinase 등을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다고 한다¹⁹.

COPD의 발병기전에는 염증 외에도 폐에서의 단백질분해효소와 항단백분해 효소의 불균형과 산성부하(oxidative stress) 등이 있다. 산화성 부하는 직접적으로 폐를 손상시키며, 산화물질은 IL-8과 TNF- α 와 같은 염증과 관련된 유전자의 표현을 증가시키는 전사인자인 NF- κ B를 활성화 시키고 가역성 기도수축에도 기여하게 된다. 즉 COPD에서는 항산화효소의 활성도가 감소하고 산화물질이 증가하는 불균형에 의해 염증이 발생하고 손상이 진행된다³.

COPD 발병에서 나타나는 산화작용과 관련된 蜂毒의 연구에는 蜂毒이 NO 소거효과⁴⁰와 DPPH의 제거효과⁴¹에 의해 동통 증상의 치료에 사용되며, RAW 264.7 세포를 이용하여 蜂毒의 NO,

H₂O₂의 생성억제 작용⁴²과 蜂毒약침이 PLA₂, COX-2, iNOS와 같은 염증 매개물질 생성을 효소에 대한 강력한 억제 작용⁴³이 보고되어, 蜂毒이 NO, iNOS 등을 억제하여 항산화 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

NF-κB와 관련하여 蜂毒치료가 LPS, SNP(sodium nitroprusside), H₂O₂에 의해 유도된 iNOS, TNF-α 및 NF-κB의 증가를 억제 하며 이러한 기전을 봉약침액의 염증이나 세포소멸 등에 대항하는 효과에 대한 일부의 기전으로 보았고⁴⁴, 蜂毒약침 또는 melittin이 가지는 NF-κB의 활성화 억제 효과는 NF-κB signal pathway에 관여하는 Cystein 잔기인 sulfhydryl group에 작용하여 NF-κB의 활성이 억제된 것을 보고 하였고⁴⁵, 蜂毒 중 melittin은 IκB의 방출을 억제하여 결과적으로 NF-κB를 억제⁴⁶하게 된다고 보고 하였다.

이 외에 蜂毒이 COX-2의 발현과 TNF-α, IL-1β와 같은 cytokine의 생성을 차단하여 염증을 억제한다⁴⁷고 보고 되었고, 유전자 발현의 조절과 관련하여 蜂毒이 염증 및 통증 억제에 임상에서 좋은 효과를 나타내는 것은 이와 관련된 sPLA₂, COX-1의 mRNA의 발현을 억제시키는 것과 관련되어 있다는 연구⁴⁸도 있었다.

대식세포와 호중구 등의 염증세포에 의해 진행되는 COPD와 같은 만성 염증성 질환의 치료를 위해서는 독성은 적으며 항염증 효과가 큰 약물의 개발이 요구되고 있다. 현재 까지 COPD 관련 韓醫學 논문은 金銀花와 宣肺定喘湯을 이용한 실험 논문으로, 金銀花가 LPS에 유발된 COPD 모델에서 호중구의 억제작용 및 TNF-α and IL-6 분비 억제 작용과 조직학적으로 폐기종 발병 및 goblet cell 수의 억제작용이⁴⁹보고되었다. 또한 宣肺定喘湯은 elastase 매개성 폐조직 손상을 억제하고 관련 단백질의 발현을 조절하여 만성폐쇄성 폐질환에 활용 될 수 있을 것으로 보고⁵⁰되었다.

그리고 LPS를 이용한 한약의 항염증 효과에 대한 연구를 살펴보면 連翹는 NO, COX2와 NOS2

발현을 농도 의존적으로 억제⁵¹하였고, 絲瓜絡 물 추출물은 대식세포에서 TNF-α, IL-8, TGF-β, IL-6, IL-1β and IL-10 등의 염증관련 cytokine의 전사 억제효과⁵²가 있다고 하였다. 처방과 관련하여 解熱湯은 대식세포에서 IL-1β, IL-6, IL-8, TGF-β의 발현량을 유의성 있게 억제⁵³하며, LPS로 활성화된 Raw264.7 cell의 NO 생산 억제와 DPPH radical 소거활성 효과 증가, NOS2 발현과 TNF-α 생산을 억제한다고 보고⁵⁴하였다. 淸上補下湯은 IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-α 등의 염증관련 cytokine 발현을 억제하였고, cDNA microarray 방법으로 淸上補下湯으로 2배이상 감소된 유전자는 PARP4, CCR3, DAP3, CLU, EBAG9, ERCC4, FEN1, MKNK1 그리고 LIG1 등 이었고, 3배 이상 감소된 유전자는 IL1R1, ARNT2 라는 것을 보고⁵⁵하였다.

임상에서 蜂毒요법이 만성염증성 질환(류마티오이드 질환, 퇴행성 골관절질환 등)에도 많이 응용되고 있으며, COPD의 병태기전과 관련이 있는 NF-κB와 관련된 항산화작용 및 항염증 효과에 대한 충분한 실험적 근거를 확인 할 수 있기에 COPD와 관련이 있는 염증세포를 중심으로 蜂毒의 COPD의 치료 효과에 관련된 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

강력한 항염증 효능과 면역조절 기능이 있는 蜂毒을 이용하여 COPD 마우스 모델에서 치료효과가 확인된다며 蜂毒이 COPD 치료제로서의 가능성을 있을 것으로 생각되었다.

우선 COPD 모델을 만들기 위하여 LPS를 마우스에 사용하여 염증을 유발 시킨 후 蜂毒을 주입한 후 폐포에서 발생된 염증세포 분석과 ELISA 방법을 통한 IL-6 와 TNF-α 등의 cytokine인 분비량 측정과 더불어 세포조직구조 및 증식세포핵 항원의 분석과 검정을 통하여 蜂毒의 효과를 알아보고자 하였다.

폐포액의 염증세포를 분석한 결과, COPD群과 비교해 보니 Dexa群과 BV群 모두에서 전체 세포 수, 호중구, 대식세포 그리고 림프구가 모두 감소

되었다. BV群은 호중구($p < 0.01$)에서만, Dexamethasone群은 호중구($p < 0.05$)와 전체 세포수($p < 0.01$)에서 유의한 변화를 확인 할 수 있었다.

ELISA를 이용하여 IL-6와 TNF- α 의 분비량을 측정된 결과, COPD群과 실험군인 Dexamethasone群과 BV群을 비교해보니 IL-6와 TNF- α 의 분비량이 모두 감소하였는데, IL-6의 분비량 측정 결과에서만 BV群($p < 0.01$)과 Dexamethasone群($p < 0.05$)의 유의성을 확인 할 수 있었다.

TNF- α 는 염증 반응, 상처치료와 조직의 재생에 관여하며, TNFR-1에 결합하여 전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1을 활성화시켜 염증 반응과 면역기능을 조절할 수 있는 유전자 발현을 유도하며, 조직에 따라 TNF- α 는 TNFR-1을 통하여 세포사멸을 유도하기도 한다⁵⁶. 또한 TNF- α 는 IL-1, IL-6 등을 유도하여 급만성염증을 연결하는 역할과 혈액과 조직사이의 구조물인 내피세포를 자극하여 Intercellular Adhesion Molecule(ICAM), Vascular Cell Adhesion Molecule-1(VCAM-1)과 같은 부착분자들의 생산을 촉진하여 각종의 백혈구들을 염증부위로 이동시키는 역할도 한다⁵⁷.

IL-6는 다기능성 사이토카인으로 염증반응, 숙주 반응과 조직손상과 관련되며 IL-1, TNF- α 와 같은 염증성 자극에 반응하여 다량 분비 된다⁵⁸. 이러한 IL-6의 항염증 작용(pro-inflammatory effect)은 T 세포의 증식과 활성화 및 B 세포의 분화를 통해 일어나며, 조혈모세포의 분화와 증식을 일으키고, 파골 세포를 활성화 시킨다⁵⁹.

蜂毒의 처치로 호중구에서만 유의한 변화를 확인 할 수 있었으나($p < 0.01$), 염증과 관련된 전체 세포수, 호중구, 대식세포 그리고 림프구 모두 감소시키는 효능을 확인 할 수 있었고, 또한 IL-6와 TNF- α 의 분비량이 모두 감소한 결과를 볼 수 있어, COPD의 모델에서도 기존 실험에서 확인된 蜂毒의 염증 억제 작용을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 COPD 환자에서 호중구, 림프구 및 대식세포 등의 세포 침윤 감소 작용을 기대할 수 있으며,

특히 기도염증의 병인에 중요한 역할을 하는 호중구가 유의성 있게 감소하는 결과는 蜂毒요법은 항염증 기전을 통하여 임상증상 개선을 기대할 수 있으며 치료제로서의 가능성을 기대 할 수 있을 것으로 생각된다.

H&E 염색을 통하여 조직의 형태를 확인한 결과 LPS로 자극을 한 COPD群에서는 폐기종(emphysema)이 발생한 것을 확인할 수 있었으며, 실험군인 Dexamethasone群과 BV群 모두에서 폐기종의 증상이 완화되었음을 확인 할 수 있었다. 면역조직화학적 염색법을 통하여 증식성세포핵항원(PCNA)의 분포를 본 결과 COPD群에서 PCNA가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 실험군인 Dexamethasone群과 BV群에서 PCNA가 감소하는 경향을 확인할 수 있었다.

PCNA는 세포의 증식에 관여하는 표지자로, DNA 합성시 DNA 중합효소(polymerase) delta를 위한 보조인자로 관여하며, 세포주기 중 S 기 후기부터 G2기에 걸쳐 합성되는 단백질로서 세포 증식력을 나타내는 표지자로 간주되고 있다⁶⁰.

폐기종 환자에서는 폐포벽세포의 손실이 포함된 세포자멸사(apoptosis)가 증가되며, 또한 혈관벽의 증식 정도도 강화되는데, 이러한 폐기종의 병태는 세포자사와 증식의 전환이 촉진되는 역동적인 질환이라고 하였다. 동물실험에서 elastase 유발 폐손상으로 폐포상피세포가 증식하기 시작한다고 하였고, 담배연기의 노출도 소기관지에서 증식이 유발된다고 한다. 폐기종환자의 폐포세포에서 세포증식 표지자인 PCNA가 양성 반응이 강하게 나타났으며, 일반인과 단순한 흡연자 보다는 훨씬 강한 비율로 나타났다고 하였다⁶¹.

COPD群에서는 폐기종이 발생하고 PCNA가 증가하는 것은 세포의 증식이 일어나면서 폐기종의 병태가 진행되는 기전을 나타내고, 蜂毒을 투여한 후 폐기종 병태가 완화되고 PCNA가 감소하는 것은 세포의 증식을 효과적으로 억제하여 폐기종의 병태가 진행되지 않거나 회복되는 기전을 의미한다고 볼 수 있다.

이러한 결과는 蜂毒의 투여가 폐기종과 관련된 만성 폐염증에 치료효과가 있는 것으로 추측할 수 있었다.

그러나 蜂毒이 Th2 cell의 분화 및 활성화 보다 Th1 cell의 분화 및 활성화에 대한 증강효과를 지니므로써 CD4+ cell의 정상면역기능을 강화한다고 판단되며, 면역기능의 저하로 인한 감염성 질환의 치료에 응용할 수 있을 것으로 추측한 보고를 보면 오히려 만성 염증을 유발 할 수도 있지만, 특이한 것은 B cell 과 T cell의 분화양상을 확인하기 위하여 蜂毒을 투여한 후 splenocyte를 분리하여 확인한 결과, B cell은 3.2%, T helper cell이 8.1% 증가 하였으나 T cytotoxic cell은 0.4% 감소한 결과⁶²는 T cytotoxic cell 억제 작용을 통한 항염증 작용도 추측할 수 있다.

결과적으로 蜂毒의 COPD 항염증 치료기전은 확실히 알 수 없지만, 폐의 급성 염증 시 발현되는 호중구와 사이토카인을 감소시켰으며, 조직 내에 있는 염증 및 PCNA 감소 효과를 나타내어, 기존의 NF-κB기전 및 항산화 작용과 관련 있을 것을 추측할 수 있었다. 이 실험으로 蜂毒의 COPD 치료제로서의 가능성을 볼 수 있었으나, 아쉬운 점은 약침요법의 장점인 治療穴에 직접 약물주입을 하지 못하고 복강주입에 의한 치료효과라는 것이다. 하지만 지속적으로 COPD 모델을 통한 투여 방법의 차이에 의한 효능 검증뿐만 아니라 蜂毒의 안정성 확보와 임상시험을 통하여 효과 확인을 한다면 치료약제로 실용화 할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

COPD에 대한 蜂毒의 치료효과를 확인하기 위하여 6주령의 수컷 Balb/c 마우스를 가지고 LPS를 자극하여 만성폐쇄성폐질환 병태를 유도하여 실험하였다. BALF내의 염증세포수 측정과 IL-6와 TNF를 효소면역항체법으로 측정하고, 폐포를 면

역조직화학염색법을 선택하여 비교연구를 한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 蜂毒 투여 후 BALF 내의 호중구, 대식세포, 림프구 그리고 전체 세포수 모두가 COPD군에 비해 감소하였고, 호중구에서만 유의성(p<0.01)있는 감소 효과를 볼 수 있었다.
2. 蜂毒 투여 후 IL-6와 TNF의 분비량 모두가 COPD군에 비해 감소되었고 IL-6 분비량에서만 유의성(p<0.01)있는 감소효과를 볼 수 있었다.
3. 蜂毒 투여 후 H&E 염색을 통해 조직의 형태를 비교한 결과 COPD군 보다 폐기종의 증상이 완화된 조직형태를 볼 수 있었다.
4. 蜂毒 투여 후 면역조직화학 염색법을 통하여 증식세포핵항원(PCNA)의 분포를 비교한 결과 COPD군보다 감소하는 경향을 볼 수 있었다.

참고문헌

1. 서울대학교 의과대학 내과학교실편. 내과학. 서울: 군자출판사; 1996, p. 66-75.
2. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, et al. Increased expression of nuclear factor-kappa B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002;20:556-63.
3. 대한결핵 및 호흡기학회. 호흡기학. 서울: 군자출판사; 2007, p. 301-5.
4. 김영균. 안정된 COPD에서의 약물요법. 대한의사협회지 2006;49(4):333-41.
5. 方藥中 編. 實用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社; 1986, p. 158.
6. 권기록, 고흥균, 김창환. 蜂針에 대한 고찰. 대한침구학회지 1994;11(1):159-71.
7. 고흥균, 권기록, 인창식. 蜂毒약침요법. 서울: 경희대학교 출판국; 2003, p. 1-16, 48, 78-89, 215.

8. 김갑성. 침자 및 蜂毒요법이 Carrageenin으로 유발된 흰쥐의 슬관절 염증성 부종에 미치는 효능에 대한 비교연구. 대한한의학회지 1995;16(1): 379-402.
9. 도원석, 장준혁, 김경호, 윤중하, 김갑성. 蜂毒요법이 흰쥐의 슬관절 염증성 부종에 미치는 영향. 대한침구학회지 1995;12(1):211-20.
10. 박형규, 하지용, 안규석. 蜂毒이 흰쥐의 Adjuvant 관절염에 미치는 영향. 동의병리학회지 1993; 8(1):17-28.
11. 조광호, 이재동, 박동석, 안병철. Jaw Opening Reflex 및 RT-PCR을 이용한 蜂毒의 진통효과. 대한약침학회지 2000;3(1):35-51.
12. 정선희, 고희균, 박동석. 蜂毒약침자극이 Writhing reflex 및 척수내통증관련 신경세포의 활성화에 미치는 영향. 대한약침학회지 2000;3(1):101-18.
13. 정선희, 이재동, 고희균, 안병철, 최도영, 박동석. 蜂毒약침이 척수내통증관련 신경세포의 활성화에 미치는 영향. 대한침구학회지 2000;17(2): 153-68.
14. 공현숙, 고희균, 김창환. 蜂毒요법이 생쥐의 면역반응에 미치는 실험적 연구. 대한침구학회지 1995;12(1):331-9.
15. 이홍석. 蜂毒약침자극이 Methotrexate로 유발된 생쥐의 면역기능 저하에 미치는 영향. 경희한의 대논문집 1998;21:347-59.
16. 양창열, 송호섭. Bee venom의 세포자멸사를 통한 전립선 암세포의 성장 및 LNCaP의 이종이식에 미치는 영향. 대한약침학회지 2010;13(1):15-35.
17. 안창범, 임춘우, 윤현민, 박수진, 최영현. 약침용 蜂毒성분 melittin의 영향에 의한 인체 폐암세포의 apoptosis 유도. 대한침구학회지 2003;20(5):93-106.
18. 김윤미, 이재동, 박동석. 약침용 蜂毒성분 중 Apamin의 항암효과와 MAP-Kinase 신호전달 체계에 관한 연구. 대한침구학회지 2001;18(4):101-15.
19. 최정식, 박장우, 오민석. 蜂毒요법의 항염증 기전 연구에 관한 연구. 대전대학교 한의학연구소 논문집 2006;15(1):141-60.
20. Puljic R, Benediktus E, Plater-Zyberk C, Baeuerle PA, Szelenyi S, Brune K, et al. Lipopolysaccharide-induced lung inflammation is inhibited by neutralization of GM-CSF. *Eur J Pharmacol* 2007;557(2/3):230-5.
21. 김문호. 蜂毒요법과 봉침요법. 서울: 한국교육기획; 1992, p. 20-37, 41-2, 67-74, 104-12, 134-49, 171-6.
22. 인창식, 고희균. 蜂毒요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록 (마왕퇴의서의 蜂毒요법 2례). 대한침구학회지 1998;15(1):143-7.
23. Jarvis D.C. Folk Medicine. New York: Fraecett Crest and Ballantine Books; 1982, p. 101.
24. Thorbecke GJ. The affinity of reticuloendothelial system for various serum protein. *Brit. J Exp. Path* 1960;41(2):190.
25. 대한약침학회. 약침요법 시술지침서. 서울: 한성인쇄; 1999, p. 187-8.
26. 서울대학교 의과대학. 호흡기학. 서울: 서울대학교출판부; 1996, p. 165.
27. Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. Harrison's principles of internal medicine. 13th ed. New York: McGrawHill, Inc; 1994, p. 447-56.
28. Jeffery PK. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax*. 1998;53(2):129-36.
29. MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease?. *Trends Mol Med* 2001;7(2):55-62.
30. Churg A, Dai J, Tai H, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor-alpha is central to

- acute cigarette smokeinduced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(6):849-54.
31. Woolhouse IS, Bayley DL, Stokley RA. Sputum chemotactic activity in chornic obstructive pulmonary disease: effect of alpha1-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B4 and interleukin 8. *Thorax* 2002;57(8):709-14.
 32. 전국한의과대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울: 아트동방; 1996, p. 322-45.
 33. Kennedy MJ. Inflammation and cystic fibrosis pulmonary disease. *Pharmacotherapy* 2001;21(5):593-603.
 34. 서정철, 임강현, 김이화, 김창주, 유영민, 정주호, 등. 蜂毒약침액의 Nitric Oxide에 대한 소거효과. *대한침구학회지* 2001;18(6):161-70.
 35. 서정철, 임강현, 한상원. 蜂毒약침액의 항산화효능. *대한약침학회지* 2003;6(1):67-75.
 36. 송정렬, 이성노, 조현철, 김기현. 蜂藥鍼液이 NO, H2O2, IL-1에 미치는 影響에 關한 研究. *대한약침학회지* 2002;5(2):52-62.
 37. 하성중, 이성노, 조현철, 김기현. 蜂藥鍼液이 PLA2, COX-2, iNOS, AA 및 PG에 미치는 影響에 關한 研究. *대한약침학회지* 2002;5(2):40-51.
 38. 김군중, 심성용, 이성노, 김기현. 봉약침액이 RAW 264.7 세포의 iNOS, TNF- α 및 NF- κ B에 미치는 영향. *대한약침학회지* 2003;6(2):45-56.
 39. 권순정. 인체 활막세포를 대상으로 한 봉약침액 및 Melittin의 염증 조절인자 NF- κ B(P50) 활성억제기전 연구. 경원대학교 대학원. 2004.
 40. 박혜지. 멜리틴의 IKK 및 NF- κ B 염증 신호 전달 억제 작용. 학위논문(석사). 충북대학교대학원; 2005.
 41. 남궁우. 류마티스-관절염과 동맥경화 치료를 위한 천연물의 Cyclooxygenase-2 과 NF- κ B 매개에 관한 기전연구. 서울대학교 대학원. 2004.
 42. 정혜윤, 고흥균. 蜂毒 약침액이 염증 및 통증 관련 유전자 발현에 미치는 영향. *대한침구학회지* 2002;19(3):41-50.
 43. 이덕재. The effects of Lonicera japonica on the murine model of chronic obstructive pulmonary disease. 학위논문(박사). 경희대학교대학원; 2009.
 44. 윤종만, 박양춘. Elastase 매개성 폐조직 손상에 대한 宣肺定喘湯의 보호효과. *대한한방내과학회지* 2010;31(1):84-101.
 45. 곡정강, 정희재, 김진주, 정승기. 連翹의 LPS로 유도된 Raw 264.7 Cell에서의 항염증 효과. *대한한방내과학회지* 2010;31(2):242-53.
 46. Mu-chang Sul, Hong-yeoul Kim, Young-lae Roh, Hee-jae Jung, Sung-ki Jung. Anti-inflammatory Effect of LFR on LPS-stimulated THP-1 Cells. *대한한방내과학회지* 2009;30(2):388-98.
 47. 이병삼, 김홍렬, 김진주, 정승기, 이형구, 정희재. 解熱湯이 LPS로 자극된 대식세포에 있어 염증 관련 Cytokine 발현억제에 미치는 효과. *대한한방내과학회지* 2008;29(2):334-47.
 48. 곡정강, 김진주, 노영래, 이성현, 정승연, 정희재, 정승기. 解熱湯의 抗炎症, 抗酸化, 抗老化 作用에 대한 實驗的 研究. *대한한방내과학회지* 2007;28(4):671-80.
 49. 이경희, 김홍렬, 정희재, 이형구. LPS로 유발된 대식세포의 염증반응에 대한 淸上補下湯의 효과. *대한한방내과학회지* 2008;29(1):12-24.
 50. 표석능, 손은화. 면역학개론. 서울: 신일북스; 2008, p. 153-5, 170.
 51. 이천주, 이수진, 박세중, 장병준, 이종화, 김길수, 이명헌, 등. 미세분진이 흰쥐의 폐포대식세포에서 TNF- α 와 IL-1 β 의 형성에 미치는 효과. *Tuberc Respir Dis* 2006;60(5):554-63.
 52. Kishimoto T. The biology of IL-6. *Blood* 1989;74:1-10.
 53. 송영욱. 최근 조명된 류마티스 관절염의 병태생리. *대한내과학회지* 2009;76(1):1-6.

54. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 1986;166(1):209-19.
55. Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A. Increased Levels of Cell Death and Proliferation in Alveolar Wall Cells in Patients With Pulmonary Emphysema. *Chest* 2004;125(2):626-32.
56. 고은정, 남상수, 홍무창, 신민규, 배현수. 蜂毒 추출액이 helper T cell 분화에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 2004;18(5):1347-13.