

원저

蜂藥鍼液이 RAW 264.7 세포의 iNOS, TNF- α 및 NF-kB에 미치는 影響

金君重* · 沈成用** · 李成魯* · 金基鉉*

*경원대학교 한의과대학 침구학교실 · **경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

The Effects of Bee Venom on iNOS, TNF- α and NF-kB in RAW 264.7 Cells

Goon-Joong Kim* · Sung-Yong Sim** · Seong-No Lee* · Kee-Hyun Kim*

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

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

Objective : The purpose of this study was to investigate the effects of Bee Venom on the lipopolysaccharide(LPS), sodium nitroprusside(SNP), hydrogen peroxide(H₂O₂)-induced expression inducible nitric oxide synthetase(iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and nuclear factor kappa B(NF-kB) in RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line.

Method : The expressions of expression iNOS and TNF- α were determined by western blotting with corresponding antibodies. The expressions of expression NF-kB was assayed by EMSA method.

Results :

1. The 0.5, 1 and 5 μ g/mg of bee venom on LPS-induced expression of iNOS, the 5 μ g/mg of bee venom on SNP-induced expression of iNOS and the 1 μ g/mg of bee venom on H₂O₂-induced expression of iNOS compared with control were inhibited significantly.
2. The 0.5, 1 and 5 μ g/mg of bee venom inhibited significantly LPS and H₂O₂-induced expression of TNF- α compared with control, respectively. The 0.5 μ g/mg of bee venom increased significantly SNP-induced expression of TNF- α compared with control.
3. The 5 μ g/mg of bee venom on LPS-induced expression of NF-kB, the 0.5 μ g/mg of bee venom on SNP-induced expression of NF-kB and the 0.5, 5 μ g/mg of bee venom on H₂O₂-induced expression of NF-kB were inhibited significantly compared with control, respectively.

Key words : Bee Venom, iNOS, TNF- α , NF-kB, RAW 264.7 cell

1. 緒 論

蜂藥鍼療法은 꿀벌(Apis mellifera ligustica)의 毒囊에 있는 蜂毒을 추출 가공하여 질병과 有關한 部位나 穴位에 자입하는 鍼灸 治療와 蜂藥鍼液의 物理的·藥理

學的 作用을 질병 治療에 이용하는 新鍼療法的 일종이다.^{1,2)}

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고 補益精氣, 祛風除濕, 止疼痛, 解痙平喘, 消腫降壓하여 扶正祛邪의 效능이 있어³⁾ 鎮痛, 消炎^{3,7)}, 鎮痙⁸⁾, 抗癌^{9,13)}, 免疫 增強^{14,17)} 作用 등을 나타내고 있다.

최근 蜂藥鍼을 이용한 임상 연구로는 膝關節炎^{18,19)}, 류마티드 關節炎²⁰⁾, 腰椎間板脫出症²¹⁾, 足跟痛²²⁾, 胸·腰椎壓迫骨折²³⁾, 두피지루피부염²⁴⁾ 등 염증과 손상성 질환

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

환에 유효함이 보고 되었다.

蜂藥鍼液의 실험적 연구로 實驗的 關節炎^{25,27}, 關節炎 滑液細胞^{28,29}, 細胞活性³⁰, 神經芽細胞腫³¹, 細胞毒性^{32,34}, 黑色腫³³ 등이 있으며, 炎症 및 痛症에 關聯 遺傳子 발현에 미치는 영향³⁵ 등과 같은 蜂藥鍼液의 항염증, 진통 효과에 대한 기전 연구는 진행되고 있지만 부족한 실정이다.

이에 연구자는 蜂藥鍼液의 항염증 효과의 기전에 대하여 연구하기 위하여 RAW 264.7 세포에 lipopolysaccharide(LPS), sodium nitroprusside (SNP), hydrogen peroxide(H₂O₂)로 염증을 유도하고, 蜂藥鍼液을 일정하게 처리하여 炎症 기전의 指標로 알려진 inducible nitric oxide synthetase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 nuclear factor kappa B(NF- κ B)를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 시약

LPS 1 μ g/ml, SNP 200 μ M, H₂O₂ 50 μ M, 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]을 사용하였다.

3) 기기

Image analyser(Mitsubisini electric Co., Japan), FACS caliber flow cytometer (Becton Dickinson, NJ), Delta Scan System(Photon technology international; Princeton, NJ, USA) 등이다.

2. 방법

1) 시료 조제

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

2) 세포주 배양

쥐의 大食細胞 RAW 264.7 細胞는 10% fetal bovine

serum(FBS), 4 mM L-glutamine 과 100 units/ml 의 streptomycin과 penicillin이 포함된 dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)배지에서 37°C, 5% CO₂ incubator 에서 배양하였다.

3) 군 분류

(1) 정상군(Normal Group)

정상군은 RAW 264.7 세포에 아무 처리를 시행하지 않은 군이다.

(2) 대조군(Control Group)

대조군은 RAW 264.7 세포에 각각 LPS 1 μ g/ml, SNP 200 μ M 및 H₂O₂ 50 μ M을 처리한 군이다.

(3) 실험군(Treatment group)

실험군은 RAW 264.7 cell에 蜂藥鍼液 5 μ g/ml를 처리한 군과 LPS 1 μ g/ml, SNP 200 μ M 및 H₂O₂ 50 μ M 각각에 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 μ g/ml를 처리한 군으로 구분하였다.

4) 蜂藥鍼液이 LPS, SNP와 H₂O₂에 의해 유도된 iNOS 에 미치는 영향

Western blotting³⁶을 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 1×10⁶으로 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 μ l에서 100 μ l까지 lysis buffer[tris HCl(ph 8.0) 50 mM, NaCl 150 mM, sodium azide 0.02%, SDS 0.2%, igapel 630(or NP 40) 1%, NaF 100 mM (0.5%), PMSF 1 mM, sodium deoxycolate 0.5%, aprotinin 50 μ g/ml, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.1 mM]를 넣고 4°C를 유지하여 3시간에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이 때 반응하는 초기 한 시간 동안 10분마다 꺼내서 와룬시켰다. 용해가 끝나면 4°C, 14000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 모아 bio rad protein assay 방법으로 단백질을 정량하여 동량으로 나누어 전기영동하였다.

(2) 전기영동

겔을 만들 유리판을 EtOH로 세척하고 유리판을 고정 한 후 원하는 농도에 따라 분리 겔을 제조하여 주입하였다. 4 ml씩 주입하여 윗부분 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 꽂는데, 퇴적 겔은 굳 으면서 부피가 줄어들기 때문에 충분히 넘칠 듯이 부 었다. 30분 후 퇴적 겔이 건조되면 빗을 빼고 D.W.로 세척한 후 유리판 그대로 조립하였다. 조립한 유리판을 chamber에 장착하고 running buffer(10×stock: tris base 30.3g, glycine 144g, SDS 10g)를 부었다. Well에 있는 찌꺼기를 주사기로 제거한 후 protein marker(bio-rad prestained SDS-page standards, high range 161-0309) 5-10 μ l, protein양이 약 30-50 μ g 정도 되는 sample 10-20 μ l를 장착하고, 때가 낮은 volt에서 정교하게 전개되도록 40-50 volt로 약 30분 동안 가동하였다. Stacking gel의 전개 가 끝나면 80~100 volt로 약 2시간 30분 정도 분리 겔 을 전개시켰다.

(3) 전이

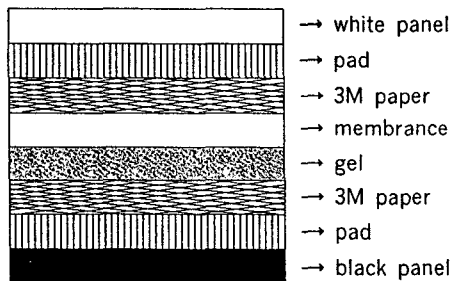


Fig. 1. Transfer Sandwich in Western Blotting

겔 크기의 nitrocellulose membrane 1장, 3M paper 2장을 준비한 후 tray에 ①PBS, ②transfer buffer(tris base 3.03g, glycine 14.63g, methanol 200 ml) ③ staining solution(coomassie blue staining solution)을 준비하였다. Membrane은 미리 물에 적셔놓고 ②에 3M paper와 겔, ③에 membrane, ④에 겔을 넣고 30분 동안 흔든 후 ④의 3M paper와 겔을 ②로 옮기고, transfer sandwich를 조립하였다. Chamber에 sandwich를 끼우고 얼음 통을 넣고 transfer buffer를 붓는데, black panel은 음극, white panel은 양극으로 하였고, 실온에서 80 volt로 1시간 30

분간 전이시켰다.

(4) 차단

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

(5) 일차항체에서의 배양

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

(6) 이차항체에서의 배양

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

(7) 현상

Developer(kodak), fixer(kodak), ECL detection reagent(ammersham pharmacia biotechnology), ECL film, poly glove, cassette, blue tip, 1 ml pipet, ECL 반응 tube, tissue, clean wrap, membrane, membrane 놓을 판, timer, 집게 등 을 준비하고 편평한 판에 미리 랩을 씌워 놓고, mambrane의 물기를 제거하여 판 위에 올린 후, ECL 용 액을 1, 2를 1 : 1 비율로 섞어 membrane에 뿌리고 골고 루 용액을 묻힌 다음 1분간 반응시킨 후 ECL 용액을 충분히 제거하고 그 위에 랩을 씌웠다. Film을 cassette 에 올려 놓고 membrane 판을 5분에서 10분 정도 film에 찍었다. Developer는 검은 때가 확실해지면 건지고 fixer 에 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 덮 고 80°C에서 4시간 이상 건조하였다.

(9) 광학농도계 측정

현상한 film에 구획을 정하고 광학농도계를 이용하여 相對 濃度를 각각 측정 비교하였다.

5) 蜂藥鍼液이 NF-κB에 미치는 영향

NF-κB의 DNA 결합 활성은 gel mobility shift assay(EMSA)39)에 의하여 정량하였다.

DNA-protein hybrids의 비교치는 UVP 4.0 software로 농도 분석을 시행하였다.

6) 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. 蜂藥鍼液이 LPS로 유도된 iNOS 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 LPS로 유도된 iNOS 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS 1 μg/ml을 투여한 대조군은 iNOS가 유의하게 증가되었고, 蜂藥鍼液 5 μg/ml 투여군 및 LPS 투여와 蜂藥鍼液을 각각 0.5, 1 및 5 μg/ml 처리군 모두에서 대조군에 비하여 iNOS가 유의하게(P<0.05) 감소하였다(fig. 2, Table I.).

2. 蜂藥鍼液이 SNP로 유도된 iNOS 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 SNP로 유도된 iNOS 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, SNP 200 μM을 투여한 대조군과 蜂藥鍼液 5 μg/ml 투여군의 iNOS는 정상군에 비하여 유의하게 증가되었고, SNP와 蜂藥鍼液을 5 μg/ml 처리군은 대조군에 비하여 iNOS가 유의하게(P<0.05) 감소하였으며, SNP와 봉약침액 0.5 및 1 μg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다(fig. 3, Table II.).

Table 1. The Effects of Bee Venom on the LPS induced iNOS Expression

Group (μg/ml)	Relative Density (% of Control)
Normal	7.00±4.42
Control	100.25±10.28
Bee Venom 5	50.50±8.56*
LPS 1.0 + Bee Venom 0.5	33.75±13.66*
LPS 1.0 + Bee Venom 1.0	46.75±10.03*
LPS 1.0 + Bee Venom 5.0	9.25±7.82*

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 1.0 μg/ml LPS. The values are the mean±standard deviation of four experiments. *: P<0.05 Statistical significance compared with control.

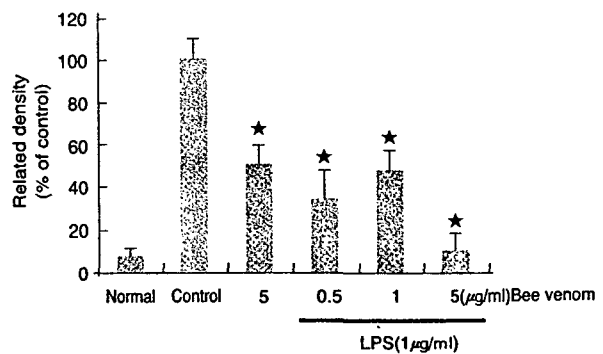


Fig. 2. The Effects of Bee Venom on LPS-Induced Expression of iNOS in Cultured RAW 264.7 Cells *: P<0.05 Statistical significance compared with control

Table 2. The Effects of Bee Venom on the SNP induced iNOS Expression

Group ($\mu\text{g/ml}$)	Relative Density (% of Control)
Normal	14.00 \pm 4.06
Control	50.75 \pm 12.42
Bee Venom 5	99.75 \pm 7.98
SNP 200 μM + Bee Venom 0.5	37.00 \pm 6.60
SNP 200 μM + Bee Venom 1.0	40.25 \pm 4.82
SNP 200 μM + Bee Venom 5.0	13.50 \pm 8.90*

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 200 μM SNP. The values are the means \pm standard deviation of four experiments. *: P<0.05 Statistical significance compared with control.

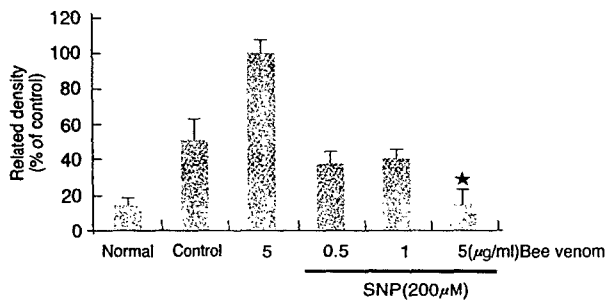


Fig. 3. The Effects of Bee Venom on SNP-Induced Expression of iNOS in Cultured RAW 264.7 Cells *:P<0.05 Statistical significance compared with control

3. 蜂藥鍼液이 H₂O₂로 유도된 iNOS 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 H₂O₂로 유도된 iNOS 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, H₂O₂ 50 μM 을 투여한 대조군과 蜂藥鍼液 5 $\mu\text{g/ml}$ 투여군의 iNOS는 정상군에 비하여 유의하게 증가되었고, H₂O₂와 蜂藥鍼液 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 대조군에 비하여 유의하게(P<0.05) 감소하였고, H₂O₂와 蜂藥鍼液 0.5 및 5 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 유의한 변동을 보이지 않았다(fig. 4., Table III.).

Table 3. The Effects of Bee Venom on the H₂O₂ induced iNOS Expression

Group ($\mu\text{g/ml}$)	Relative Density (% of Control)
Normal	10.00 \pm 2.92
Control	70.25 \pm 9.15
Bee Venom 5	87.25 \pm 7.50
H ₂ O ₂ 50 μM + Bee Venom 0.5	100.00 \pm 7.91
H ₂ O ₂ 50 μM + Bee Venom 1.0	40.25 \pm 4.82*
H ₂ O ₂ 50 μM + Bee Venom 5.0	58.50 \pm 30.34

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 50 μM H₂O₂. The values are the means \pm standard deviation of four experiments. *:P<0.05 Statistical significance compared with control.

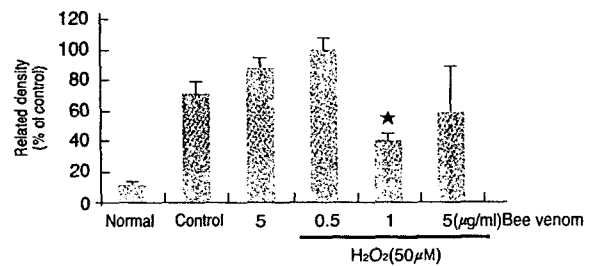


Fig. 4. The Effects of Bee Venom on H₂O₂-Induced Expression of iNOS in Cultured RAW 264.7 Cells *:P<0.05 Statistical significance compared with control

4. 蜂藥鍼液이 LPS로 유도된 TNF- α 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 LPS로 유도된 TNF- α 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 을 투여한 대조군은 정상군에 비하여 TNF- α 가 유의하게 증가하였고, LPS와 봉약침액 0.5, 1 및 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 투여군은 대조군에 비하여 TNF- α 의 유의한(p<0.05) 감소를 보였고, 蜂藥鍼液 5 $\mu\text{g/ml}$ 투여군은 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다(fig. 5., Table IV.).

Table 4. The Effects of Bee Venom on the LPS induced TNF- α Expression

Group ($\mu\text{g/ml}$)	Relative Density (% of Control)
Normal	57.25 \pm 14.97
Control	100.50 \pm 20.18
Bee Venom 5	49.50 \pm 16.53
LPS 1 + Bee Venom 0.5	29.25 \pm 10.85*
LPS 1 + Bee Venom 1.0	21.50 \pm 7.09*
LPS 1 + Bee Venom 5.0	15.25 \pm 7.22*

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 50 μM H₂O₂. The values are the means \pm standard deviation of four experiments. *:P<0.05 Statistical significance compared with control.

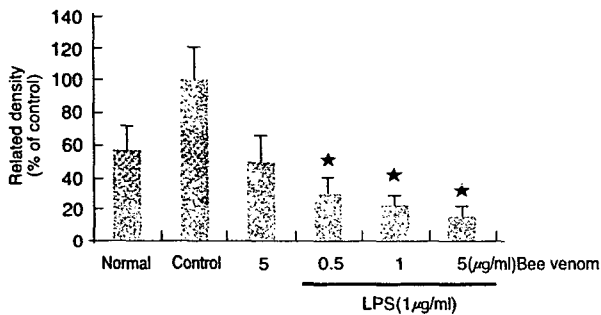


Fig. 5. The Effects of Bee Venom on LPS-Induced Expression of TNF- α in Cultured RAW 264.7 Cells *:P<0.05 Statistical significance compared with control

5. 蜂藥鍼液이 SNP로 유도된 TNF- α 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 SNP로 유도된 TNF- α 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 5 $\mu\text{g/ml}$ 투여군과 SNP와 蜂藥鍼液을 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 대조군에 비하여 TNF- α 가 유의하게(P<0.05) 증가하였으며, SNP와 봉약침액 1 및 5 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 대조군에 비하여 유의한 변동을 보이지 않았다(fig. 6., Table V.).

Table 5. The Effects of Bee Venom on the SNP induced TNF- α Expression

Group ($\mu\text{g/ml}$)	Relative Density (% of Control)
Normal	27.00 \pm 11.22
Control	21.25 \pm 7.19
Bee Venom 5	63.50 \pm 8.99*
SNP 200 μM + Bee Venom 0.5	97.25 \pm 18.39*
SNP 200 μM + Bee Venom 1.0	40.25 \pm 4.82
SNP 200 μM + Bee Venom 5.0	13.50 \pm 8.90

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 200 μM SNP. The values are the means \pm standard deviation of four experiments. *:P<0.05 Statistical significance compared with control.

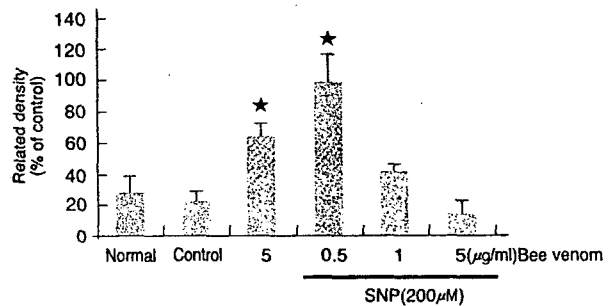


Fig. 6. The Effects of Bee Venom on SNP-Induced Expression of TNF- α in Cultured RAW 264.7 Cells *:P<0.05 Statistical significance compared with control

6. 蜂藥鍼液이 H₂O₂로 유도된 TNF- α 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 H₂O₂로 유도된 TNF- α 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, H₂O₂ 50 μM 을 투여한 대조군에 비하여 蜂藥鍼液 5 $\mu\text{g/ml}$ 투여군, H₂O₂와 蜂藥鍼液 0.5, 1 및 5 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 모두에서 유의한(p<0.05) 감소를 보였다 (fig. 7., Table VI.).

Table 6. The Effects of Bee Venom on the H₂O₂ induced TNF- α Expression

Group ($\mu\text{g/ml}$)	Relative Density (% of Control)
Normal	27.00 \pm 11.22
Control	100.50 \pm 20.18
Bee Venom 5	21.75 \pm 16.77*
H ₂ O ₂ 50 μM + Bee Venom 0.5	22.25 \pm 17.61*
H ₂ O ₂ 50 μM + Bee Venom 1.0	29.00 \pm 12.02*
H ₂ O ₂ 50 μM + Bee Venom 5.0	9.50 \pm 5.68*

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 50 μM H₂O₂. The values are the means \pm standard deviation of four experiments. *:P<0.05 Statistical significance compared with control.

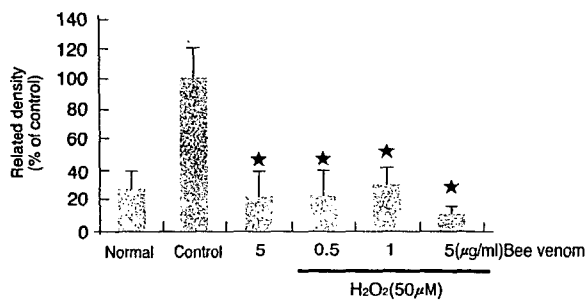


Fig. 7. The Effects of Bee Venom on H₂O₂-Induced Expression of TNF- α in Cultured RAW 264.7 Cells *:P<0.05 Statistical significance compared with control

7. 蜂藥鍼液이 LPS로 유도된 NF-kB 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 LPS로 유도된 NF-kB 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 5 $\mu\text{g/ml}$ 투여군은 대조군에 비하여 유의한(p<0.05) 감소를 보였고, LPS와 봉약침액 0.5 및 1 $\mu\text{g/ml}$ 투여군은 대조군에 비하여 유의한 변동을 보이지 않았다(fig. 8., Table VII.).

Table 7. The Effects of Bee Venom on the LPS induced NF-kB Expression

Group ($\mu\text{g/ml}$)	Relative Density (% of Control)
Normal	28.50 \pm 13.39
Control	103.50 \pm 11.61
LPS 1 + Bee Venom 0.5	78.00 \pm 11.18
LPS 1 + Bee Venom 1.0	66.00 \pm 18.26
LPS 1 + Bee Venom 5.0	49.00 \pm 5.00*

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS. The values are the means \pm standard deviation of four experiments. *:P<0.05 Statistical significance compared with control.

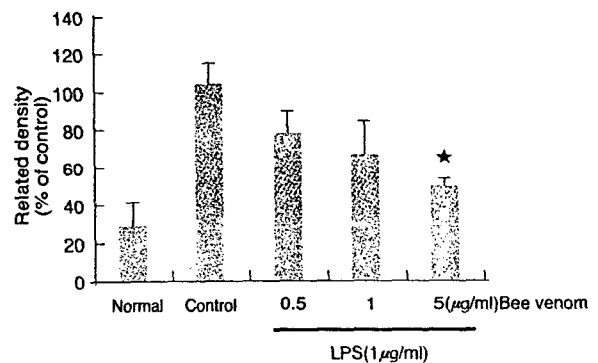


Fig. 8. The Effects of Bee Venom on LPS-Induced Expression of NF-kB in Cultured RAW 264.7 Cells *:P<0.05 Statistical significance compared with control

8. 蜂藥鍼液이 SNP로 유도된 NK-kB 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 SNP로 유도된 TNF- α 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, SNP와 蜂藥鍼液을 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 대조군에 비하여 NK-kB가 유의하게(P<0.05) 감소하였으며, SNP와 봉약침액 1 및 5 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다.(fig. 9., Table VIII.).

Table 8. The Effects of Bee Venom on the SNP induced NF-kB Expression

Group ($\mu\text{g/ml}$)	Relative Density (% of Control)
Normal	15.00 \pm 4.64
Control	104.75 \pm 12.42
SNP 200 μM + Bee Venom 0.5	58.75 \pm 8.61*
SNP 200 μM + Bee Venom 1.0	86.00 \pm 20.46
SNP 200 μM + Bee Venom 5.0	86.50 \pm 20.25

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 200 μM SNP. The values are the means \pm standard deviation of four experiments. *:P<0.05 Statistical significance compared with control.

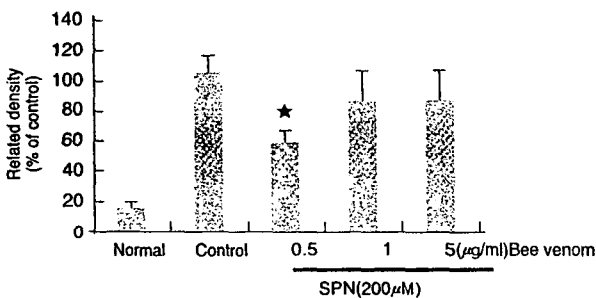


Fig. 9. The Effects of Bee Venom on SNP-Induced Expression of NF-kB in Cultured RAW 264.7 Cells *:P<0.05 Statistical significance compared with control

Table 9. The Effects of Bee Venom on the H₂O₂ induced NF-kB Expression

Group ($\mu\text{g/ml}$)	Relative Density (% of Control)
Normal	16.75 \pm 10.03
Control	92.50 \pm 20.91
H ₂ O ₂ 50 μM + Bee Venom 0.5	41.75 \pm 15.51*
H ₂ O ₂ 50 μM + Bee Venom 1.0	61.50 \pm 11.93
H ₂ O ₂ 50 μM + Bee Venom 5.0	40.50 \pm 12.62*

RAW 264.7 cell were cultured as described in the method and materials. Normal was not treated and control was treated with 50 μM H₂O₂. The values are the means \pm standard deviation of four experiments. *:P<0.05 Statistical significance compared with control.

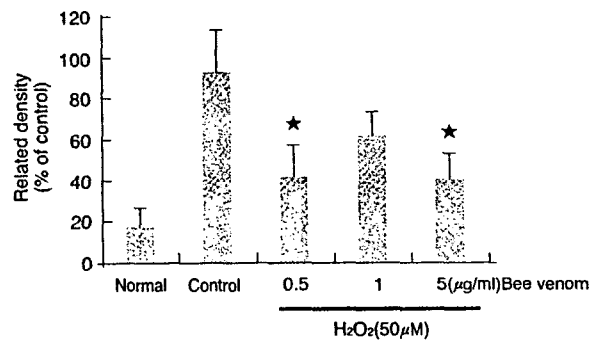


Fig. 10. The Effects of Bee Venom on H₂O₂-Induced Expression of NF-kB in Cultured RAW 264.7 Cells *:P<0.05 Statistical significance compared with control

9. 蜂藥鍼液이 H₂O₂로 유도된 NF-kB 발현에 미치는 영향

蜂藥鍼液이 H₂O₂로 유도된 NF-kB 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, H₂O₂와 蜂藥鍼液 0.5 및 5 $\mu\text{g/ml}$ 투여군의 NF-kB는 대조군에 비하여 유의하게(P<0.05) 감소하였고, H₂O₂와 蜂藥鍼液 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다(fig. 10., Table IX.).

IV. 考 察

일반적으로 세포에 LPS, SNP, H₂O₂ 또는 다른 자극에 의해 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), interleukin-6 (IL-6) 같은 염증성 cytokine이 분비되어 nuclear factor kappa B (NF-kB), inducible nitric oxide synthetase (iNOS), TNF- α , cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 등에 관련되어 炎症이나 細胞消滅이 유발되는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 이 중 세포에 염증반응에는 TNF- α 등

과 같은 염증 매개 물질 및 NF-kB와 같은 전사 인자의 활성이 관련되며³⁶⁾, NF-kB의 활성은 염증 반응에 관여하는 COX-2 및 신경세포의 산화적 손상을 유발하는 nitric oxide(NO) 등을 생성하는 iNOS의 발현과 관련되고 있다. 또한 NF-kB의 활성이 증가되면 COX-2의 활성화에 의해 염증반응을 증가시킴으로서 세포소멸을 유발함을 보여준다³⁷⁾.

蜂藥鍼療法는 鎮痛·消炎³⁷⁾, 鎮痙³⁸⁾, 抗癌³⁹⁾, 免疫增強⁴⁰⁾, 循環促進, 放射能抵抗性, 痛症誘發, 알러젠, 細胞溶解·神經毒性⁴¹⁾ 등의 作用을 지니고 있어 扶正祛邪의 效果를 나타내고 있다.

蜂毒의 成分은 enzymes, peptides, non peptide components로 구성되어 있다.⁴²⁾ 이 중 enzymes의 주요 성분은 PLA₂와 hyaluronidase 등이 있고, peptides는 乾燥 蜂毒의 약 50%를 구성하고 있으며 melittin, apamin, MCD peptide 등이 있는데, 그 중 melittin은 蜂毒의 주성분으로 溶血, 酵素, 抗炎 作用이 있다. 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 있다⁴³⁻⁴⁶⁾.

최근 蜂藥鍼을 이용한 임상적 연구로 왕⁴⁸⁾, 김⁴⁹⁾ 등은 膝關節炎, 황⁵⁰⁾ 등은 류마티드 關節炎, 배⁵¹⁾ 등은 腰椎間板脫出症, 김⁵²⁾ 등은 足跟痛, 김⁵³⁾ 등은 胸·腰椎壓迫骨折, 황⁵⁴⁾ 등은 두피지루피부염 등에 蜂藥鍼이 有效함을 보고하였다.

실험적 연구로 김⁵⁵⁾, 이⁵⁶⁾ 등은 關節炎, 한⁵⁸⁾, 이⁵⁹⁾ 등은 滑液細胞, 이⁶⁰⁾ 등은 細胞活性, 이⁶¹⁾ 등은 神經아세포종, 김⁶²⁾ 등은 흑색종에 蜂藥鍼液이 유의한 影響이 미침을 보고하였고, 박⁶³⁾, 이⁶⁴⁾ 등은 세포독성에 대하여 보고하였다. 정⁶⁵⁾ 등은 봉약침액이 염증 및 통증에 관련 유전자 발현에 관련이 있음을 보고 하는 등, 蜂藥鍼液의 炎症, 세포소멸, 통증에 有效한 機轉에 대한 연구가 진행되고 있지만 미흡하여 이에 대한 연구가 필요한 실정이다.

통증, 염증 및 세포소멸에 관련되는 물질들에 봉독이 영향을 줄 수 있는 機轉은 다음 도식으로 표현할 수 있다.

이상의 그림 가설을 살펴보면 세포 밖의 LPS, SNP, H₂O₂ 등 염증유발물질은 세포막의 G-protein 을 자극하여 PLA₂의 농도를 증가시킨다. 증가된 농도의 PLA₂는

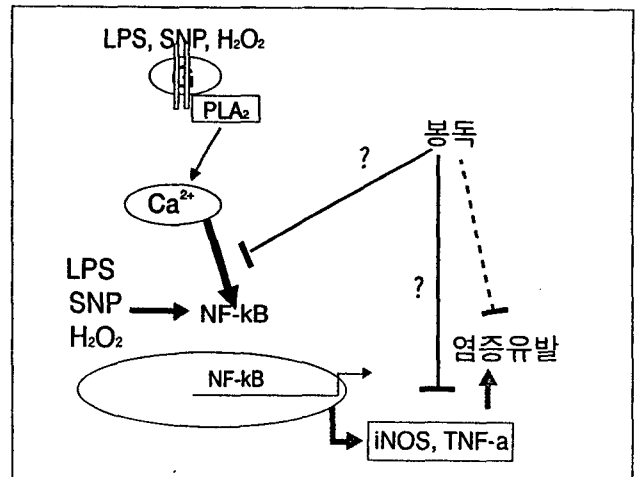


Fig. 11. The Pathway of Inflammation related with NF-kB, iNOS and TNF- α

다시 Ca²⁺와 결합하여 염증의 transcription factor인 NF-kB를 자극하여 iNOS, Cox-2, TNF- α 를 증가시켜 염증을 유발하게 되는 것으로 알려져 있다. 이 과정은 세포내에서도 LPS, SNP, H₂O₂의 자극에 의하여 야기될 수 있다.

이에 연구자는 蜂藥鍼液의 炎症과 세포소멸에 대한 有效한 기전 연구를 위하여 RAW 264.7 cell에 LPS, SNP, H₂O₂로 炎症을 유도하고, 蜂藥鍼液을 처리하여 炎症 또는 세포소멸의 指標 중의 하나인 iNOS, TNF- α 및 NF-kB를 관찰하였다.

LPS, SNP, H₂O₂에 의해 유도된 iNOS 발현에서 LPS와 蜂藥鍼液 0.5, 1 및 5 μ g/ml 및 봉약침액 5 μ g/ml 처리군, SNP와 봉약침액 5 μ g/ml 및 H₂O₂와 봉약침액 1 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다.

이 결과는 河⁶⁶⁾의 LPS와 봉약침액 0.5, 1 및 5 μ g/ml 처리하여 iNOS가 유의한 감소를 보인 결과와 일치하였다.

TNF- α 발현에서 LPS와 봉약침액 0.5, 1 및 5 μ g/ml, 봉약침액 5 μ g/ml와 H₂O₂와 봉약침액 0.5, 1 및 5 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보인 반면, SNP와 봉약침액 0.5 μ g/ml 및 봉약침액 5 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. 이 결과에서 일관된 증가나 감소를 보이지 않는 실험 결과에 대하여 지속적인 연구가 필요하리라 판단된다.

NF-kB 발현 관찰에서 LSP와 봉약침액 5 μ g/ml, SNP와 봉약침액 0.5 μ g/ml 및 H₂O₂와 봉약침액 0.5 및 5 μ g/ml 처

리한 군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다.

이상의 내용으로 보아 TNF- α 발현의 일부 결과를 제외하고 봉약침액 처리는 LPS, SNP, H₂O₂에 의해 유도된 iNOS, TNF- α 및 NF-kB의 증가를 억제시킴을 확인할 수 있었다. 이는 봉약침액의 염증이나 세포소멸 등에 대항하는 효과에 대한 일부의 기전을 입증한 것으로 판단하며, 향후 지속적인 연구를 통하여 임상에서 활용되는 봉약침 효과에 대한 기전 연구가 더욱 진행해야 할 과제로 생각된다.

V. 結 論

蜂藥鍼液의 염증 및 통증에 미치는 영향을 究明하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS, SNP, H₂O₂로 염증을 유도하고, 蜂藥鍼液을 처리하여 炎症指標에 관련되는 iNOS, TNF- α 및 NF-kB의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. LPS, SNP, H₂O₂에 의해 유도된 iNOS 발현은 각각 LPS와 봉약침액 0.5, 1 및 5 μ g/ml, SNP와 봉약침액 5 μ g/ml 및 H₂O₂와 봉약침액 1 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다.
2. LPS, SNP, H₂O₂에 의해 유도된 TNF- α 발현은 각각 LPS와 봉약침액 0.5, 1 및 5 μ g/ml, 봉약침액 5 μ g/ml 와 H₂O₂와 봉약침액 0.5, 1 및 5 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고, SNP와 봉약침액 0.5 μ g/ml 및 봉약침액 5 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다.
3. LPS, SNP, H₂O₂에 의해 유도된 NF-kB 발현은 LPS와 봉약침액 5 μ g/ml, SNP와 봉약침액 0.5 μ g/ml 및 H₂O₂와 봉약침액 0.5 및 5 μ g/ml 처리한 군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다.

參 考 文 獻

1. 고흥균, 권기록, 인창식. 봉독약침요법. 서울: 경희대학교 출판국. 2003; 214-215.
2. 권기록, 고흥균, 김창환. 蜂針에 대한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1994; 11(1): 159-171.

3. 고흥균. 蜂毒鍼療法이 抗炎症, 鎮痛 및 解熱에 미치는 效能에 關한 實驗的 研究. 大韓韓醫學會誌. 1992; 13(1): 283-292.
4. 도원석, 장준혁, 김경호 외 2인. 蜂毒療法이 鼠의 膝關節 炎症性 浮腫에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1995; 12(1): 211-220.
5. 권기록, 고흥균. 蜂毒藥鍼療法이 抗炎症, 鎮痛作用에 미치는 效能에 關한 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1998; 15(2): 97-103.
6. 김지영, 고흥균, 김용섭 외 3인. 蜂毒藥鍼療法의 抗炎症 作用에 關한 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1998; 15(1): 317-329.
7. 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.
8. 공현숙, 고흥균, 김창환. 蜂針毒療法이 抗癌變에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1993; 10(1): 159-165.
9. 권기록, 고흥균, 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.
10. 박찬열, 서정철, 최도영 외 1인. 蜂毒藥鍼의 抗癌效果에 대한 分子生物學的 研究. 大韓藥鍼學會誌. 2000; 3(1): 1-19.
11. 김윤미, 이재동, 박동석. 藥鍼用 蜂毒成分 中 apamin의 抗癌效果와 MAP-Kinase 神毫傳達體系에 대한 研究. 2001; 18(4): 101-115.
12. 권도희, 이재동, 최도영. 藥鍼用 蜂毒成分 中 apamin, Melittin의 抗癌作用. 大韓鍼灸學會誌. 2001; 18(1): 129-145.
13. 오기남, 이재동, 박동석. 蜂毒藥鍼이 C57BL mouse의 黑色腫에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2002; 19(2): 78-91.
14. 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.
15. 권기록, 고흥균. 蜂藥鍼療法의 免疫反應에 關한 臨床的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2000; 17(1): 169-174.
16. 이승덕, 김갑성. 牛膝 및 蜂毒藥鍼이 鼠의 LPS 誘發 關節炎의 細胞性 免疫反應에 미치는 影響.

- 大韓鍼灸學會誌. 1999; 16(3): 287-315.
17. 이경희, 김창환, 강성길 외 1인. 山地別 蜂毒液藥鍼 刺戟이 免疫機能低下에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2000; 17(4): 28-40.
 18. 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.
 19. 김지훈, 이재동. 膝關節炎에 대한 蜂毒藥鍼의 臨床的 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1999; 16(3): 25-36.
 20. 황유진, 이건목, 황우준 외 5인. 蜂藥鍼을 이용한 류마티드 關節炎의 臨床的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2001; 18(5): 33-42.
 21. 배은정, 이현, 이병렬 외 7인. 蜂毒藥鍼並行治療한 腰椎間板脫出症 患者의 臨床 考察. 대한침구학회지. 2002; 19(1): 54-64.
 22. 김기현, 안광현, 송호섭 외 5인. 足跟痛에 蜂藥鍼療法이 미치는 影響. 대한침구학회지. 2002; 19(5): 149-160.
 23. 김기현, 이성노, 송호섭 외 6인. 蜂藥鍼 治療를 並行한 胸?腰椎壓迫骨折 患者의 臨床的 考察. 대한침구학회지. 2002; 19(6): 35-48.
 24. 황민섭, 윤중화, 김갑성 외 1인. 봉약침요법으로 치료한 두피 지루피부염에 대한 임상적 고찰. 대한침구학회지. 2002; 19(6): 24-34.
 25. 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.
 26. 이재웅. 蜂藥鍼이 實驗的 急慢性 關節炎에 미치는 效果와 機轉 研究. 暎園大學校 韓醫科大學 碩士學位論文. 2002.
 27. 김민정, 김경호, 김갑성. 쥐의 Collagen 유발 관절염의 활액에서 단백분해효소의 활성 및 유리기 손상에 미치는 봉독약침의 억제 효과. 대한침구학회지. 2002; 19(5): 161-175.
 28. 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.
 29. 이운섭, 서정철, 이승우 외 1인. 國産蜂毒 및 精製 蜂毒藥鍼液이 류머티스 關節炎 滑液細胞에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2002; 19(4): 28-38.
 30. 이승훈, 서정철, 한상원 외 5인. 蜂藥鍼液이 細胞活性에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2002; 19(5): 57-72.
 31. 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.
 32. 박원, 김용석, 고희균. 蜂毒 藥鍼液의 細胞毒性에 關한 研究. 대한침구학회지. 2002; 19(2): 65-77.
 33. 이종석, 고희균, 김창환. 藥鍼用 蜂毒液의 急性毒性에 關한 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1994; 11(1): 177-195.
 34. 이종석, 고희균, 김창환. 藥鍼用 蜂毒液의 局所毒性 試驗에 關한 研究. 大韓鍼灸學會誌. 1995; 16(1): 227-252.
 35. 정혜운. 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.
 36. 오재호. 알츠하이머 질환과 관련된 신경세포 손상 기전 및 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2의 신경세포 보호효과에 관한 연구. 부경대학교 대학원 박사학위논문. 2002.
 37. 김세중. 免疫學. 서울: 高麗醫學. 1994; 263-264.
 38. 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): 129-44.
 39. Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H.. 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. Proc. Natl. Acad. U.S.A. 2000; 97(9): 4844-4849.
 40. 임중국. 鍼灸治療學. 서울; 集文堂. 1983: 226-227, 545-599.
 41. 上海中醫學院. 鍼灸學. 香港; 商務印書館. 1990: 333-334.
 42. E. Habermann. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In Venomous Animals and their Venoms. Academic Press. 1971; 3: 61.
 43. E.S. Assem, G. Atkinson. Histamine release by MCDP(401), A peptide from the venom of the honey bee, brit. Pharmacol. 1973: 337-338.
 44. S.S. Saini, J.W. Peterson, A.K. Chopra. Melittin binds

to secretory phospholipase A₂ and inhibits its enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 238(2): 436-442.

45. 河聲鍾. 蜂藥鍼液의 PLA₂, COX-2, iNOS, AA 및 PG 에 미치는 影響. 경원대학교 대학원 석사학위 논문. 2002.