

원저

蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液이 RAW 264.7 Cell의 cPLA₂, TNF- α 및 Calcium Concentration에 미치는 影響

박영은 · 송호섭

경원대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effects of Bee Venom and Melittin acupuncture solution on cPLA₂, TNF- α and Calcium Concentration in RAW 264.7 Cells

Park Young-eun and Song Ho-sueb

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

Objectives : The purpose of this study was to investigate the effect of Bee Venom and Melittin acupuncture solution on the lipopolysaccharide and sodium nitroprusside- induced expression of cytosolic phospholipase A₂, tumor necrosis factor- α and calcium concentration in RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line.

Methods : The expression of cytosolic phospholipase A₂ and tumor necrosis factor- α was determined by western blotting with corresponding antibodies, and the generation of intracellular calcium concentration was investigated by delta scan system in RAW 264.7 cells.

-
- 접수 : 2004년 8월 30일 · 수정 : 2004년 9월 18일 · 채택 : 2004년 9월 18일
 - 교신저자 : 송호섭, 서울시 송파구 송파동 20-8 경원대 부속서울한방병원 침구과
Tel. 02-425-3456 E-mail : hssong@zaigen.co.kr

Results : 1. Compared with control, expressions of lipopolysaccharide-induced cytosolic phospholipase A₂ were decreased significantly by 5 μ g/mL of bee venom and 5, 10 μ g/mL of melittin acupuncture solution and decreased by 0.5, 1 μ g/mL of bee venom.

2. Compared with control, expressions of sodium nitroprusside-induced phospholipase A₂ were decreased significantly by 0.5, 1, 5 μ g/mL of bee venom and by 5, 10 μ g/mL of melittin acupuncture solution.

3. Compared with control, expressions of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α were decreased significantly by 10 μ g/mL of melittin acupuncture solution and were not changed significantly by 0.5, 1, 5 μ g/mL of bee venom and 5 μ g/mL of melittin acupuncture solution.

4. Compared with control, expressions of sodium nitroprusside-induced tumor necrosis factor- α were decreased significantly by 1, 5 μ g/mL of bee venom and 5, 10 μ g/mL of melittin acupuncture solution and decreased by 0.5 μ g/mL of bee venom.

5. Compared with control, lipopolysaccharide-induced intracellular calcium concentrations were decreased by 0.5, 1, 5 μ g/mL of bee venom and 10 μ g/mL of melittin acupuncture solution and increased by 5 μ g/mL of melittin acupuncture solution.

6. Compared with control, sodium nitroprusside-induced intracellular calcium concentrations were decreased by 0.5, 1, 5 μ g/mL of bee venom and 5, 10 μ g/mL of melittin acupuncture solution.

Key words : Bee Venom, Melittin, cPLA₂, TNF- α , Calcium Concentration, LPS, SNP, RAW 264.7 cells

I. 緒 論

蜂藥鍼療法은 양봉 꿀벌(Apis mellifera)의 毒囊에 있는 毒을 인위적으로 추출 가공하여 질병과 有關한 部位 및 穴位에 주입하여 鍼灸 治療와 蜂藥鍼液의 생화학적 물질이 인체에 미치는 약리작용을 질병 치료에 이용하는 藥鍼療法의 하나이다.¹⁻²⁾

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 功效이 있어¹⁾ 鎮痛, 消炎³⁻⁵⁾, 鎮痙⁶⁾, 抗癌⁷⁾ 免疫 增強⁸⁾ 作用을 나타내고 있다.

최근 蜂藥鍼을 이용한 임상적 연구로서 膝關節炎⁹⁾, 류마티드 關節炎¹⁰⁾, 腰椎間板脫出症¹¹⁾, 足跟痛¹²⁾, 胸·腰椎壓迫骨折¹³⁾, 두피지루피부염¹⁴⁾ 등 염증과 손상성 질환에 유효함이 보고 되었다.

蜂藥鍼液의 실험적 연구로는 細胞毒性¹⁵⁾, 콜라겐유도 關節炎¹⁶⁾, 實驗的 急慢性 關節炎¹⁷⁾, 關節炎 滑液細胞¹⁸⁾, 류머티스 關節炎 滑液細胞¹⁹⁾ 등에 미치는 영향이 보고되었다. 최근에 들어 蜂藥鍼液의 항염증 효과에 대한 기전 연구²⁰⁾가 진행되고 있지만 자세한 연구가 필요한 실정이다.

이에 연구자는 蜂藥鍼液과 봉독의 주성분인 melittin 藥鍼液의 항염증 효과에 대한 기전을 연구하기 위하여 RAW 264.7 cell에 lipopolysaccharide (LPS), sodium nitroprusside(SNP)로 염증을 유

도하고, 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液을 처리하여 炎症 媒介 物質이면서 세포내 calcium concentration에 의해 영향을 받는 cytosolic phospholipase A₂(cPLA₂), tumor necrosis factor(TNF)- α 의 발현 및 calcium concentration에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재 료

1) 시약

cPLA₂ anti-bodies (Santa Cruz Biotechnology, USA), LPS 1 μ g/mL, SNP 200 μ M (Sigma-Aldrich, USA) 등이다. 기타 細胞培養과 western blotting 試藥 등은 연구용에 적합한 것들을 사용하였다.

2) 시료

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

3) 기기

이 실험에 사용된 기기는 CO₂ Incubator (MCO-17AIC : Sanyo Electric Biomedical Co., Japan), Centrifuge (HA-1000-3 : Hanil science industrial Co., Korea), Gel dryer (Model 583 : Bio-Rad Laboratories, USA), Spectrometry (Spectra MAX plus : Molrecular divices, USA), ELISA reader (TECAN Austria GmbH : Untersbergstra ße, 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 5 μ g/mL 농도로 나누어 蜂藥鍼液으로 사용하고 melittin을 3차 증류수로 희석하여 5, 10 μ g/mL 농도로 나누어 melittin 藥鍼液으로 사용하였다.

2) 세포주 배양

Murine macrophage RAW 264.7 cell은 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium)배지에 10% FBS(fetal bovine serum : Gibco Life Technologies, USA), 4 mM L-glutamine, 100 units/mL streptomycin 및 penicillin을 포함하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양했다.

3) 군 분류

(1) 정상군(Normal group)

정상군은 RAW 264.7 cell에 아무 처리도 하지 않았다.

(2) 대조군(Control group)

대조군은 RAW 264.7 cell에 각각 LPS 1 μ g/mL와 SNP 200 μ M를 처리하였다.

(3) 실험군(Treatment group)

실험군은 RAW 264.7 cell에 LPS 1 μ g/mL, SNP 200 μ M를 처리하고 각각에 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 μ g/mL와 melittin 藥鍼液 5, 10 μ g/mL를 처리하였다.

4) cPLA₂ 와 TNF- α 측정 방법

Western blotting을 이용하여 發色 정도를 분석하고, 현상한 film의 구획을 정한 후 光學濃度計(Eastman Kodak Com, USA)를 이용하여 相對濃度を 각각 측정 비교하였다.

(1) 시료 준비

100mm dish에 1×10^6 으로 세포를 깔고 24시간 뒤에 scraper로 잘 긁어서 세포를 모은 뒤 800rpm에서 원심분리하였다. 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 $^{\circ}$ C를 유지하여 3시간에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이 때 반응하는 초기 한 시간 동안 10분마다 꺼내서 와류시켰다. 용해가 끝나면 4 $^{\circ}$ C, 14000rpm으로 원심분리한 후 상층액을 모아 bio rad protein assay 방법으로 단백질을 정량하여 동량(20 μ g)으로 나누어 전기영동하였다.

(2) 전기영동

겔을 만들 유리판을 EtOH로 세척하고 유리판을 고정 한 후 원하는 농도에 따라 분리 겔을 제조하여 주입하였다. 4 mL씩 주입하여 윗부분 2 cm 지점까지만 주입하고, 주입 후 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 빛을 쬐는데, 퇴적 겔은 굳으면서 부피가 줄어들기 때문에 충분히 넘칠 듯이 부었다. 30분 후 퇴적 겔이 건조되면 빛을 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 μ l, protein양이 약 30-50 μ g정도 되는 sample

10-20 μ l를 장착하고, 띠가 낮은 volt에서 정교하게 전개되도록 40-50 volt로 약 30분 동안 가동하였다. Stacking gel의 전개가 끝나면 80-100 volt로 약 2시간 30분 정도 분리 겔을 전개시켰다.

(3) 전이

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

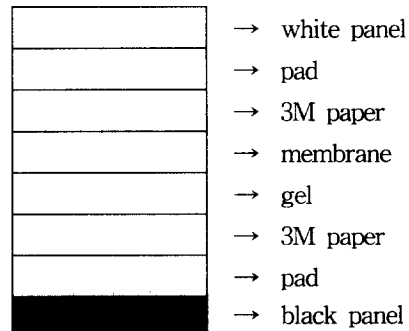


Fig. 1. Transfer Sandwich in Westen Blotting

(4) 차단

전이된 membrane을 10% TBS-T 용액(0.05% tween-20(Sigma-Aldrich, USA), 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 10% TBS-T 용액으로 여러 번 세척하였다.

(5) 일차항체에서의 배양(COX-2 goat polyclonal IgG, santa cruz biotechnology)

10% 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 10% TBS-T 용액으로 5분씩 3번 세척하였다.

(6) 이차항체에서의 배양(anti-mouse Ig, horseradish peroxidase)

10% TBS-T 용액 속에서 3% skin milk에 희석된 이차항체 용액을 만들고 차단된 membrane을 이차항체에서 1시간 동안 흔들 후, 10% TBS-T 용액으로 5분씩 3번 세척하였다.

(7) 현상

Developer(kodak), fixer(kodak), ECL detection reagent(amersham pharmacia biotechnology), ECL film, poly glove, cassette, blue tip, 1 mL pipet, ECL 반응 tube, tissue, clean wrap, membrane, membrane 놓을 판, timer, 집게 등을 준비하고 편평한 판에 미리 랩을 씌워 놓고, membrane의 물기를 제거하여 판 위에 올린 후, ECL 용액 1, 2를 1:1 비율로 섞어 membrane에 뿌리고 골고루 용액을 묻힌 다음 1분간 반응시켰다. 약 1분 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) 젤 건조

젤을 착색용액으로 약 30분간 착색하고 탈색용액(30% methanol, 10% acetic acid)으로 충분히 탈색하였다. 젤의 물기를 조금 제거하고 3M paper에 젤을 놓은 다음 glycerol을 젤 위에 골고

루 퍼 발랐다. OHP film을 덮고 80 °C에서 4시간 이상 건조하였다.

(9) 광학농도계 측정

현상한 film에 구획을 정하고 광학농도계(Eastman Kodak Com, USA)를 이용하여 相對濃度를 각각 측정 비교하였다.

5) 蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 calcium concentration에 미치는 영향

Raw 264.7 cell은 fura-2AM을 염료로 이용하여 측정하였다. 각각의 inhibitor도 fura-2AM 처리시에 같이 넣어준다. 이 실험에는 Delat Scan System을 사용하였으며 이 기기는 340nm와 380nm에서 측정하여 이 두가지 값의 비율, 즉 Ratio=[F340/F380]로 실험결과를 나타낸다. 이때, 340nm는 fura-2AM과 calcium이 결합된 것의 값이며 380nm fura-2AM만의 값을 나타낸다.

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. LPS로 유도된 cPLA₂ 발현 결과에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS로 유도된 cPLA₂ 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 5 μ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 μ g/mL 처

리군에서는 대조군에 비하여 cPLA₂ 발현이 유의하게(P<0.05) 감소되었으며, 蜂藥鍼液 0.5, 1μg/mL 처리군에서 대조군에 비하여 cPLA₂ 발현이 감소되는 경향을 보였다(Fig. 2, 3).

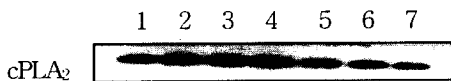


Fig. 2. The Effects of Bee Venom and Melittin Acupuncture Solution on the LPS- Induced cPLA₂ Expression by Western Blotting Analysis

1 : Nor, 2 : Con, 3 : LPS+BV 0.5, 4 : LPS+BV 1, 5 : LPS+BV 5, 6 : LPS+Mel 5, 7 : LPS+Mel 10

Fig. 3. The Effects of Bee Venom and Melittin Acupuncture Solution on LPS-Induced Expression of cPLA₂ in Cultured RAW 264.7 Cells

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

2. SNP로 유도된 cPLA₂ 발현 결과에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 SNP로 유도된 cPLA₂ 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5μg/mL 처리군 및 melittin 藥鍼液 5, 10μg/mL 처리군 모두에서 대조군에 비하여 cPLA₂ 발현이 유의하게(P<0.05) 감소하였다(Fig. 4, 5).

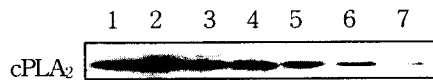


Fig. 4. The Effects of Bee Venom and Melittin Acupuncture Solution on the SNP-Induced cPLA₂ Expression by Western Blotting Analysis

1 : Nor, 2 : Con, 3 : SNP+BV0.5, 4 : SNP+BV 1, 5 : SNP+BV 5, 6 : SNP+Mel 5, 7 : SNP+Mel 10

Fig. 5. The Effects of Bee Venom and Melittin Acupuncture Solution on SNP-Induced Expression of cPLA₂ in Cultured RAW 264.7 Cells

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

3. LPS로 유도된 TNF-α 발현 결과에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 LPS로 유도된 TNF-α 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, melittin 藥鍼液 10μg/μl 처리군에서 대조군에 비하여 TNF-α 발현이 유의하게(p<0.05) 감소되었으며, 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5μg/mL 및 melittin 藥鍼液 5μg/mL 처리군에서는 대조군에 비하여 TNF-α 발현의 유의한 변동을 보이지 않았다(Fig. 6, 7).

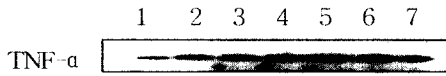


Fig. 6. The Effects of Bee Venom and Melittin Acupuncture Solution on the LPS-Induced TNF- α Expression by Western Blotting Analysis

1 : Nor, 2 : Con, 3 : LPS+BV 0.5, 4 : LPS+BV 1, 5 : LPS+BV 5, 6 : LPS+Mel 5, 7 : LPS+Mel 10

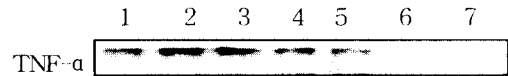


Fig. 8. The Effects of Bee Venom and Melittin Acupuncture Solution on the SNP-Induced TNF- α Expression by Western Blotting Analysis

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. 7. The Effects of Bee Venom and Melittin acupuncture solution on the LPS-Induced TNF- α Expression in Cultured RAW 264.7 Cells

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

4. SNP로 유도된 TNF- α 발현 결과에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 SNP로 유도된 TNF- α 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 1, 5 μ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 μ g/mL 처리군에서 대조군에 비하여 TNF- α 발현이 유의하게(P<0.05) 감소되었으며, 蜂藥鍼液 0.5 μ g/mL 처리군에서는 대조군에 비하여 TNF- α 발현이 감소되는 경향을 보였다(Fig. 8, 9).

Fig. 9. The Effects of Bee Venom and Melittin Acupuncture Solution on the SNP-Induced TNF- α Expression in Cultured RAW 264.7 Cells

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

5. LPS 처리시 Calcium Concentration에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 Melittin 藥鍼液이 cPLA₂와 TNF- α 의 작용에 영향을 주는 calcium concentration에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 μ g/mL 처리군 및 melittin 藥鍼液 10 μ g/mL 처리군에서 대조군에 비하여 calcium concentration이 감소되었으며, melittin 藥鍼液 5 μ g/mL 처리군에서는 대조군에 비하여 calcium concentration이 증가되었다(Fig. 10, 11).

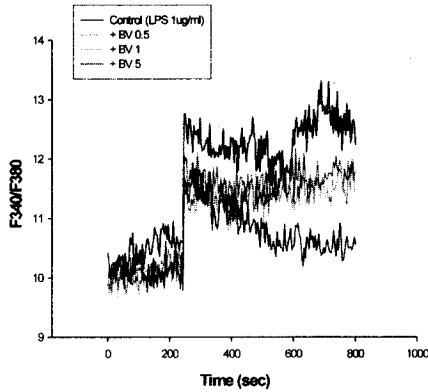


Fig. 10. The Ratio of F340(Binding with Calcium) and F380 on LPS-Induced Raw Cell with Bee Venom

Control : Treating LPS 1 μ g/mL, +BV0.5 : Treating LPS 1 μ g/mL and BV 0.5 μ g/mL, +BV1 : Treating LPS 1 μ g/mL and BV 1 μ g/mL, +BV5 : Treating LPS 1 μ g/mL and BV 5 μ g/mL

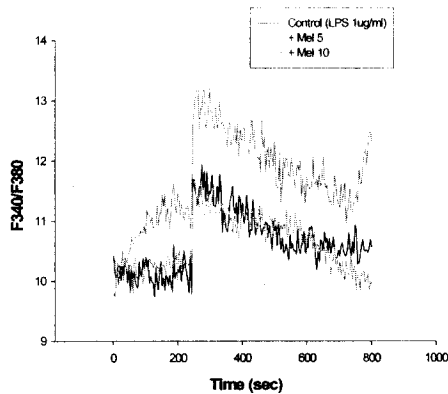


Fig. 11. The Ratio of F340(Binding with Calcium) and F380 on LPS-Induced Raw Cell with Melittin Acupuncture Solution

Control : Treating LPS 1 μ g/mL, +Mel5 : Treating LPS 1 μ g/mL and Melittin 5 μ g/mL, +Mel10 : Treating LPS 1 μ g/mL and Melittin 10 μ g/mL

6. SNP 처리시 Calcium Concentration에 미치는 영향

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液이 cPLA₂와 TNF- α 의 작용에 영향을 주는 calcium concentration에 미치는 영향을 관찰한 결과, 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 μ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 μ g/mL 처리군 모두에서 대조군에 비하여 calcium concentration이 감소되었다(Fig. 12, 13).

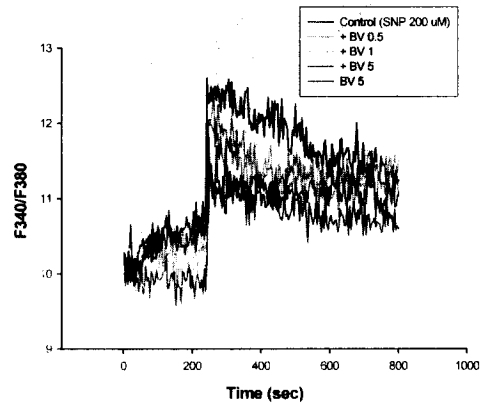


Fig. 12. The Ratio of F340(Binding with Calcium) and F380 on SNP-Induced Raw Cell with Bee Venom

Control : Treating SNP 200 μ M, +BV0.5 : Treating SNP 200 μ M and BV 0.5 μ g/mL, +BV1 : Treating SNP 200 μ M and BV 1 μ g/mL, +BV5 : Treating SNP 200 μ M and BV 5 μ g/mL, BV5 : Treating BV 5 μ g/mL

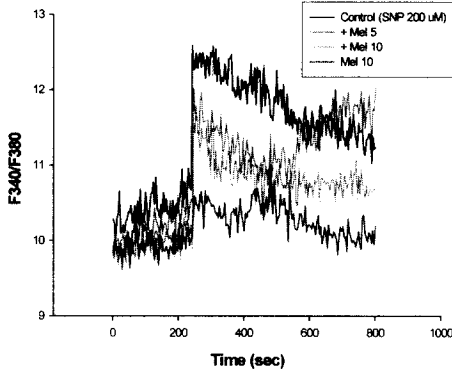


Fig. 13. The Ratio of F340(Binding with Calcium) and F380 on SNP-Induced Raw Cell with Melittin Acupuncture Solution

Control : Treating SNP 200 μ M, +Mel 5 : Treating SNP 200 μ M and Melittin 5 μ g/mL, +Mel 10 : Treating SNP 200 μ M and Melittin 10 μ g/mL, Mel 10 : Treating Melittin 10 μ g/mL

IV. 考 察

蜂藥鍼療法은 직접 疾病과 有關한 穴位, 壓通點 혹은 體表의 觸診으로 얻어진 陽性反應點에 注入함으로써 刺鍼效果和 蜂毒의 生化學的 效果를 同時에 利用하는 方法으로, 生體의 機能을 調整하고 病理狀態를 개선시켜 疾病을 治療하는 藥鍼療法의 一種인데, 2000년 前부터 民間療法의 하나로 各種 疼痛疾患에 응용되어 왔다²⁾.

蜂毒은 꿀벌의 毒囊에 들어있는 약 40여 가지의 有效成分이 포함되어 있으며, peptide components, non peptide components, enzymes으로 構成되어 있다²¹⁾. Peptide components는 freeze-dried venom의 約 50%를 構成하고 있으며, 主要成分으로는 melittin, apamin, adolapin, mast cell degranulating

(MCD) peptide 등을 들 수 있다²²⁾. 그 중에서도 melittin은 총량 중 40-50%를 차지하는 蜂毒의 가장 特徵的인 主成分으로서 26개의 아미노산으로 구성된 活性 polypeptide이며 溶血作用과 酵素作用이 있다²³⁾. 炎症에 대하여 melittin은 PLA₂와 結合하여 PLA₂의 活性化를 막음으로서 PLA₂에 의해 phospholipid에서 만들어지는 炎症 媒介體의 전구물질인 arachidonic acid(AA)의 生成을 막는 작용²⁴⁾과 중성구에서 유래되며 炎症의 전구물질인 AA와 相互作用하여 炎症을 지속시키는 O²-生産을 遮斷함으로서 炎症을 抑制시키는 作用이 있다²⁵⁾.

최근 蜂藥鍼을 이용한 임상적 연구로 膝關節炎⁹⁾, 류마토이드 關節炎¹⁰⁾, 腰椎間板脫出症¹¹⁾, 足跟痛¹²⁾, 胸·腰椎壓迫骨折¹³⁾, 두피지루피부염¹⁴⁾ 등 염증과 손상성 질환에 유효함이 보고 되었고, 실험적 연구로는 細胞毒性¹⁵⁾, 콜라겐유도 關節炎¹⁶⁾, 實驗的 急慢性 關節炎¹⁷⁾, 關節炎 滑液細胞¹⁸⁾, 류머티스 關節炎 滑液細胞¹⁹⁾ 등에 미치는 영향이 보고 되었으나, 蜂藥鍼과 그 주성분인 melittin 藥鍼의 항염증 효과에 대한 기전 연구는 부족한 실정이다.

일반적으로 염증 및 통증에 관여한다고 알려진 prostaglandin(PG)이 생성되는 기전은 LPS, SNP 또는 다른 자극에 의해 IL-1, TNF, IL-6 같은 염증성 cytokine이 분비되거나 세포내 calcium의 농도가 증가하면 PLA₂를 활성화시켜 세포막의 인지질로부터 AA를 생산하고 이러한 세포내 AA는 cyclooxygenase(COX)에 의하여 PG를 생산한다²⁶⁾.

PLA₂는 생체내에서 크게 분비형과 세포질형으로 나누어지며, 또한 calcium에 의해 효소활성이 영향을 받는 성질에 따라 calcium dependent PLA₂와 calcium independent PLA₂로 나누어 진다. cPLA₂는 85-110 kD의 분자량을 가지며 인산화에 의하여 활성화되고 세포질내 칼슘 농도의 상승에 따라 세포막으로부터 부착되어 AA를 유

리한다. cPLA₂는 sn-2 위치에 AA를 포함한 기질에서 10배 정도 더 높은 친화력을 가지기 때문에 PG 합성을 포함하는 반응 촉진제에 의한 신호 전달 과정에 중요한 역할을 하는 것²⁷⁾으로 생각되고 있다.

세포 밖의 LPS, SNP 등 염증 유발물질은 세포막의 G-protein을 자극하여 PLA₂의 농도를 증가시킨다²⁸⁾. 증가된 농도의 PLA₂는 다시 Ca²⁺와 결합하여 염증의 전이요소인 NF- κ B를 자극하여 iNOS, Cox-2, TNF- α 를 증가시켜 염증을 유발하게 된다²⁹⁾.

蜂藥鹼毒과 melittin 藥鹼液이 세포소멸과 염증에 관련되는 물질들에 영향을 줄 수 있는 기전은 아래 도식으로 표현할 수 있다.

Fig. 14. The Pathway of Inflammation related with cPLA₂, TNF- α and Ca²⁺ and Bee Venom and Melittin

이와 같이 蜂藥鹼液과 melittin 藥鹼液은 PLA₂와 Ca²⁺의 농도를 감소시켜 염증을 억제하는 과정에 관련이 있는 것으로 추정되었다.

이에 연구자는 RAW 264.7 cell에 LPS, SNP로 염증을 유도하고, 蜂藥鹼液과 melittin 藥鹼液을 처리하여 炎症指標인 cPLA₂, TNF- α 의 생성과 세포내 calcium concentration에 미치는 영향을 관찰하여 보았다.

蜂藥鹼液과 melittin 藥鹼液이 AA 생성을 촉진시키는 酵素인 cPLA₂ 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS에 의해 유도된 cPLA₂의 발현은 蜂藥鹼液 5 μ g/mL와 melittin 藥鹼液 5, 10 μ g/mL의 처리군에서 유의하게 감소되었고, SNP에 의해 유도된 cPLA₂의 발현은 蜂藥鹼液 0.5, 1, 5 μ g/mL 처리군 및 melittin 藥鹼液 5, 10 μ g/ μ l 처리군 모두에서 유의하게 감소되었다. 이는 LPS와 SNP에 의해서 유도된 PLA₂의 발현이 蜂藥鹼液의 각각에 농도에 대하여 감소한다는 윤²⁰⁾의 보고와 유사한 결과였다.

蜂藥鹼液과 melittin 藥鹼液이 TNF- α 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS에 의해 유도된 경우 melittin 藥鹼液 10 μ g/mL 처리군에서 유의하게 감소되었고, SNP에 의해 유도된 경우 蜂藥鹼液 1, 5 μ g/mL, melittin 藥鹼液 5, 10 μ g/mL에서 유의한 감소를 보였다. 이는 蜂藥鹼液이 LPS와 SNP에 의해 유도된 TNF- α 의 발현에 미치는 영향을 연구한 김의 보고와 유사하였다.

蜂藥鹼液과 melittin 藥鹼液이 cPLA₂와 TNF- α 의 작용에 영향을 주는 calcium concentration에 미치는 영향을 관찰한 결과, LPS에 의해 유도된 calcium concentration은 蜂藥鹼液 0.5, 1, 5 μ g/mL, melittin 藥鹼液 10 μ g/mL에서 감소되었고, SNP에 의해 유도된 calcium concentration은 蜂藥鹼液 0.5, 1, 5 μ g/mL 및 melittin 藥鹼液 5, 10 μ g/mL에서 모두 감소되었다. 이는 蜂藥鹼液이 PLA₂의 생성에 기여하는 calcium concentration의 억제작용을 확인한 윤²⁰⁾의 보고와 유사한 결과였다.

이상으로 보아, 蜂藥鹼液과 melittin 藥鹼液이 cPLA₂, TNF- α 와 같은 炎症媒介物質에 대한 억제 작용 및 cPLA₂ 및 TNF- α 생성에 기여하는 calcium concentration의 억제 작용을 확인하였고 蜂藥鹼液이 NF- κ B 등에 미치는 기전에 관한 연구가 더 필요할 것으로 사려된다.

V. 結 論

蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液의 항염증 기전에 대해 연구하기 위하여 RAW 264.7 cell에 LPS, SNP로 염증을 유도하고,蜂藥鍼液과 melittin 藥鍼液을 처리하여 炎症指標인 cPLA₂, TNF- α 의 발현과 calcium concentration에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. LPS에 의해 유도된 cPLA₂ 발현에서 蜂藥鍼液 5 μ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 μ g/mL 처리군은 대조군에 비하여 유의하게 감소되었고, 蜂藥鍼液 0.5, 1 μ g/mL 처리군에서는 감소되는 경향을 보였다.
2. SNP에 의해 유도된 cPLA₂ 발현에서 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 μ g/mL 및 melittin 藥鍼液 5, 10 μ g/mL 처리군 모두에서 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다.
3. LPS에 의해서 유도된 TNF- α 발현에서 melittin 藥鍼液 10 μ g/mL 처리군은 대조군에 비하여 유의하게 감소되었고, 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 μ g/mL와 melittin 藥鍼液 5 μ g/mL 처리군에서는 대조군에 비하여 유의한 변동을 보이지 않았다.
4. SNP에 의해서 유도된 TNF- α 발현에서 蜂藥鍼液 1, 5 μ g/mL와 melittin 藥鍼液 5, 10 μ g/mL 처리군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소되었고, 蜂藥鍼液 0.5 μ g/mL 처리군에서는 감소되는 경향을 보였다.
5. LPS 처리로 유도된 Calcium concentration은 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 μ g/mL와 melittin 藥鍼液 10 μ g/mL에서 대조군에 비하여 감소되었고, melittin 藥鍼液 5 μ g/mL에서는 증가되었다.
6. SNP 처리로 유도된 Calcium concentration은 蜂藥鍼液 0.5, 1, 5 μ g/mL와 melittin 藥鍼

液 5, 10 μ g/mL 모든 군에서 대조군에 비하여 감소되었다.

VI. 參考文獻

1. 고흥균, 권기록, 인창식. 봉독약침요법. 서울 : 경희대학교출판국. 2003 : 105-162, 214.
2. 권기록, 고흥균, 김창환. 蜂針에 대한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1994 ; 11(1) : 159-171.
3. 고흥균. 蜂毒藥鍼療法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.
4. 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.
5. 권기록, 고흥균. 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.
6. 공현숙, 고흥균, 김창환. 蜂針毒療法이 抗癌學에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1993 ; 10(1) : 159-165.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
 11. 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.
 12. 김기현, 안광현, 송호섭 외 5인. 足跟痛에 蜂藥鍼療法이 미치는 影響. 대한침구학회지. 2002 ; 19(5) : 149-160.
 13. 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.
 14. 황민섭, 윤종화, 김갑성 외 1인. 봉약침요법으로 치료한 두피 지루피부염에 대한 임상적 고찰. 대한침구학회지. 2002 ; 19(6) : 24-34.
 15. 박원, 김용석, 고흥균. 蜂毒 藥鍼液의 細胞 毒性에 관한 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2002 ; 19(4) : 65-77.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 이윤섭, 서정철, 이승우 외 1인. 國產蜂毒 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.
 20. 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.
 21. E. Habermann. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In Venomous Animals and their Venoms. Academic Press NY. 1971 ; 3 : 4, 61.
 22. Barbara Rudolf. Chemistry and Pharmacology of Honey Bee Venom. London : Academic Press. 1986 : 329-402.
 23. E.S. Assem, G. Atkinson. Histamine release by MCDP (401), A peptide from the venom of the honey bee, brit. Pharmacol. 1973 : 337-338.
 24. 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.
 25. 의과대학 교수편. Katzung's 臨床藥理學. 서울 : 도서출판한우리. 1998 : 345-362, 655-656.
 26. 김세종. 免疫學. 서울 : 高麗醫學. 1994 : 263-264.
 27. S.Y. Choi, H. Ha, K.T. Kim. Capsaicin inhibits platelet activating factor-induced cytosolic Ca²⁺ increase and superoxide production. J. Immunol. 2000 ; 165 : 3992-3998.
 28. W.J. Buhl, L.M. Eisenlohr, U. Gehring. Phospholipase A2 in human placental serum. Prostaglandins. 1997 ; 53(3) : 139-152.
 29. B. Gryer, A. Dubois. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase-a review. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 1998 ; 56(5-6) : 341-361.