

원저

Gel filtration chromatography와 propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis를 이용한 봉독 성분의 분리

최영권* · 권기록* · 최석호**

* 상지대학교 한의과대학 침구학교실

** 상지대학교 동물생명자원학부

Purification of Peptide Components including Melittin from Bee Venom using gel filtration chromatography and propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis

Young Chon Choi* · Ki Rok, Kwon* · Suk Ho, Choi**

* Dept. of Acupuncture & Moxibustion, Oriental Medical College, Sangji University

* Devision of Animal resources and life science, Sangji University

Abstract

Objectives : This study was conducted to carry out Purification of Melittin and other peptide components from Bee Venom using gel filtration chromatography and propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis

Methods : Melittin and other peptide components were separated from bee venom by using gel filtration chromatography on Sephadex G-50 column in 0.05M ammonium acetate buffer.

Results : Melittin and other peptide components were separated from bee venom by using gel filtration chromatography on Sephadex G-50 column in 0.05M ammonium acetate buffer. The fractions obtained from gel filtration chromatography was analyzed by using SDS-PAGE and propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis. The melittin obtained from the gel filtration contained residual amount of phospholipase A₂ and a protein with molecular weight of 6,000. The contaminating proteins were removed by the second gel filtration chromatography.

Conclusion : Gel filtration chromatography and propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis are useful to separate peptide components including melittin from bee venom.

Key words : Gel filtration chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis, melittin, bee venom

1. 서론

봉약침요법은 살아 있는 꿀벌의 독낭 안에 들어 있는 봉독을 전기 자극등으로 추출하여 건조한 후, 정제 가공하여 辨證施治하는 新鍼療法으로 봉독의 性味는 大

熱有毒 辛甘鹹²⁾하며 補益精氣 除中益氣하고, 通經活絡 消腫排膿 清熱涼血의 효능³⁾이 있다. 봉독의 주요 성분은 약 40가지로, peptide, enzymes, physiologically active amines, carbohydrates, Lipids, amino acids 등으로 나누어 볼 수 있으며^{4,5)}이 중 重要な 役割을 하는 peptide로는 melittin, apamin, adolapin, 그리고 Mast Cell Degranulating peptide(MCD peptide)를 들 수 있고 특히 Melittin은 건조 봉독의 약 50%를 차지하는 주성분으로 진통 소염작용이 매우 뛰어나다.

※ 교신저자 : 권기록, 강원도 원주시 우산동 283 상지대학교 부속 한방병원 침구과 (Tel : 033-741-9257 E-mail: beevenom@paran.com)

봉약침의 효능은 항염⁶⁾, 진통⁷⁾, 면역기능 강화⁸⁾ 그리고 항암작용⁹⁾ 등이 있어서 특히 임상적으로 요추간판탈출증¹⁰⁾, 근위축증¹¹⁾, 류마티스 관절염^{12,13)}, 슬관절염¹⁴⁾ 등에 유효한 것으로 보고되고 있다.

그러나 치료의 과정에서 발생하는 다양한 형태의 allergy 반응은 시술자나 환자에게 있어서 큰 부담으로 작용하며 특히 봉독에 대한 과민성을 지닌 경우에 발생하는 전신즉시형 반응인 anaphylactic shock은 봉약침 시술에서 가장 큰 장애가 되고 있다¹⁵⁾.

봉독의 allergy 반응에 가장 중요한 역할을 하는 allergen은 효소들로서 특히 phospholipase A₂(이하 PLA₂)가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. PLA₂는 효소성분의 대부분을 차지하는 물질로, 봉독에 민감한 사람들의 90% 정도에서 이에 대한 IgE 항체가 발견된다. 따라서 봉약침을 임상에 사용하면서 발생할 수 있는 allergy를 원천적으로 차단하여 봉약침의 임상 사용에 안전성을 도모하기위해 PLA₂를 포함한 효소를 제거한 봉약침(Sweet Bee Venom)을 만들고자 본 연구를 시도하였다. 이를 위하여 gel filtration chromatography와 propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis를 사용하여 효소 제거를 시도한 결과(특허출원: 10-2006-0029773) 유의한 결론을 얻어 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 봉독 및 시약

봉독은 전기영동법으로 추출된 건조봉독을 실험에 사용하였고, melittin과 phospholipase A₂는 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

2. Gel chromatography에 의한 melittin의 분리

봉독 5g을 0.05M ammonium acetate 용액 45 ml에 분산시킨 후 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 지질 표층을 제거하고 상등액을 분리해 내어 이 중 15 ml을 0.05M ammonium acetate 용액으로 평형화된 Sephadex G-50 column(2.5×120cm)에 주입하였으며, 용출액을 10 ml씩 분획하여 수집하였다. 각 분획의 흡광도를 280nm에서 측정하였다.

3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Laemmli¹⁶⁾의 방법에 따라 18.5% acrylamide gel을 조제한 후 봉독과 분획 시료를 전기영동하였다. 전기영동 후 0.025% Commassie brilliant blue R250으로 염색하였다. 표준분자량단백질(Sigma)은 triosephosphate isomerase(26,600), myoglobin(17,000), α-lactalbumin(14,200), aprotin(6,500), insulin chain B(3,496), bradykinin(1,060)을 사용하였다.

4. Propionic acid/urea-polyacrylamide gel electrophoresis(PU-PAGE)

PU-PAGE는 Chettibi와 Lawrence¹⁷⁾의 방법에 따라 22.5% acrylamide gel을 사용하여 봉독과 분획 시료를 전기영동하였다. 전기영동 후 0.025% Commassie brilliant blue R250으로 염색하였다.

III. 결 과

1. Gel filtration chromatography에 의한 봉독의 분획

5g의 봉독 분말을 45 ml의 ammonium acetate 용액에 용해하여 원심분리하면 지질로 보이는 표층이 상등액 상층에 형성되고 침전물이 시험관 바닥에 가라앉아 분리되었다. 지질층이 혼입되지 않도록 47 ml의 상등액을 채취하였다. 15 ml의 상등액을 Sephadex G-50 superfine column에 주입하여 chromatography하였다. 10 ml씩 분획한 용출액을 50배 희석한 후 280nm에서 측정하였고 chromatography를 2회 독립적으로 실시하였다(Fig. 1 & Fig. 3). Gel filtration chromatography에 의해 먼저 용출되는 상대적으로 적은 peak와 그 다음으로 용출되는 흡광도가 큰 peak로 분리되었으며 Fig. 1과 Fig. 2가 유사하였다.

Fig. 1의 chromatography에서 두 개의 peak를 보이는 분획 25-27과 분획 32-36을 혼합하여 SDS-PAGE로 분석하였다(Fig. 2). 첫 번째 peak의 분획 25-27은 주로 분자량이 20,000 전후로 추정되는 단백질이 주 성분이었으며 봉독 고형분의 10-12%를 차지하는 phospholipase

A₂와 hyaluronidase인 것으로 추정되었다. 두 번째 peak(32-36)는 분자량이 10,000 이하인 단백질이었으며 봉독의 40-50%를 차지하는 melittin이 주성분인 것으로 보였다.

Fig. 3의 chromatography에서 분획 25-28, 분획 29-30과 분획 32-38들을 각각 합하여 PU-PAGE로 분석하였다(Fig. 4). PU-PAGE에서 분획 25-28(Fig 4, B)는 phospholipase A₂(Fig. 4, F)와 일치하였으며 분획 32-38(Fig 4, D)의 단백질은 melittin(Fig. 4, E)과 일치하였다.

분리된 melittin을 1mM HCl용액으로 평형화된 Sephadex column에 통과시켜 탈염시키고 NaOH용액을

가하여 중화한 후 동결 건조하여 SDS-PAGE로 분석하였다(Fig. 5). Fig. 5의 B, C와 D는 각각 1, 2, 4 μ g의 melittin(Sigma)을 보여주고 있으며 E, F와 G는 10, 20, 40 μ g의 분리된 melittin을 보여주고 있다. 본 연구에서 분리된 melittin은 Sigma에서 구입한 melittin에 비해 분자량이 6,000인 단백질의 오염이 적었다.

분리된 melittin을 다시 Sephadex G-50 column에 chromatography하여 순수한 melittin을 분리할 수 있었다(Fig. 6, E, F와 G). Fig. 6의 B의 분획 30은 약간의 phospholipase A₂를 함유하고 있었으며 분획 34, 35 및 36은 E, F와 G는 melittin 외에 다른 단백질이 없었다.

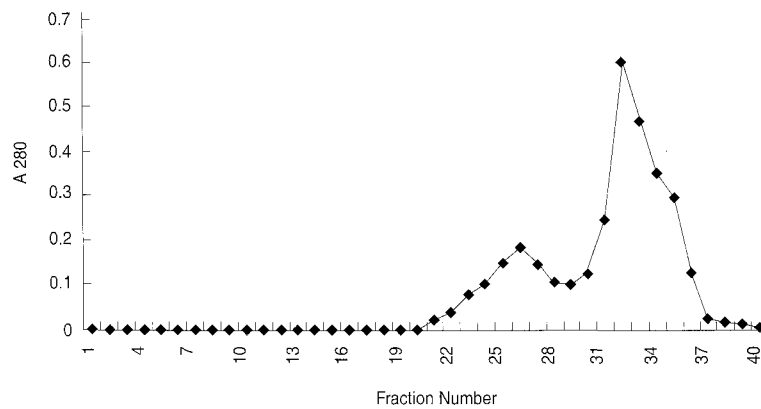


Fig. 1 Gel filtration chromatogram of bee venom on Sephadex G-50 column(2.5 × 120 cm).

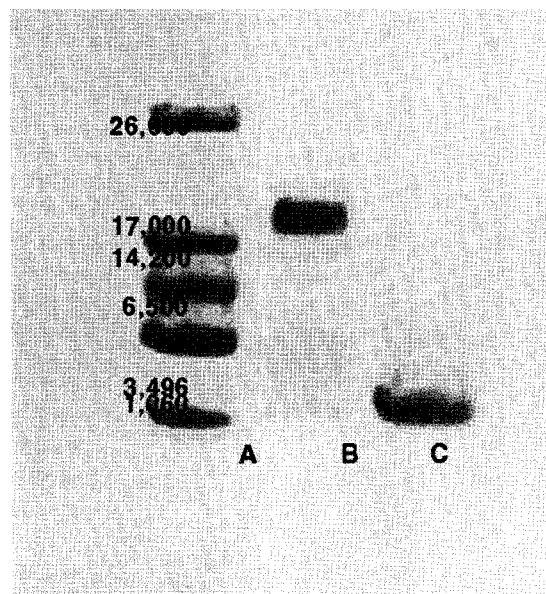


Fig. 2 SDS-PAGE of bee venom fractions obtained from gel filtration chromatography of Sephadex G-50. A; molecular weight marker proteins, B; fractions 24-27, C; fractions 33-36.

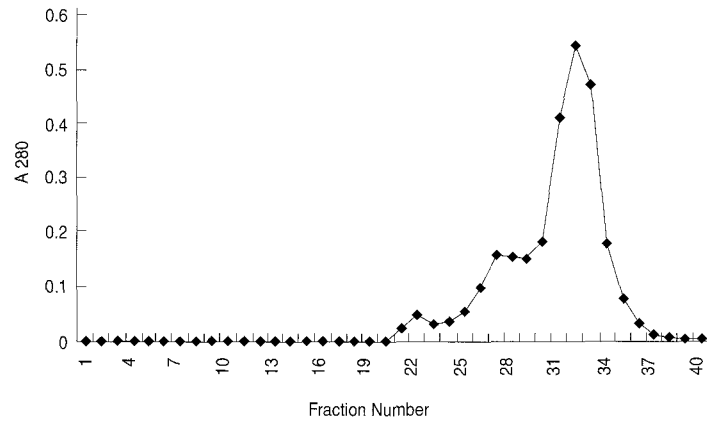


Fig. 3 Gel filtration chromatogram of bee venom on Sephadex G-50 column (2.5 × 120 cm).

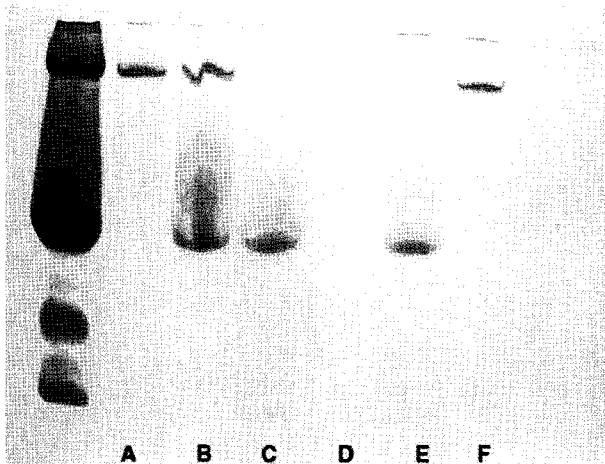


Fig. 4 Propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis of bee venom fractions obtained from gel filtration chromatography of Sephadex G-50. A: Bee venom B; fractions 25-28, C; fractions 29-31, D; fractions 32-38, E; melittin, F; phospholipase A₂.

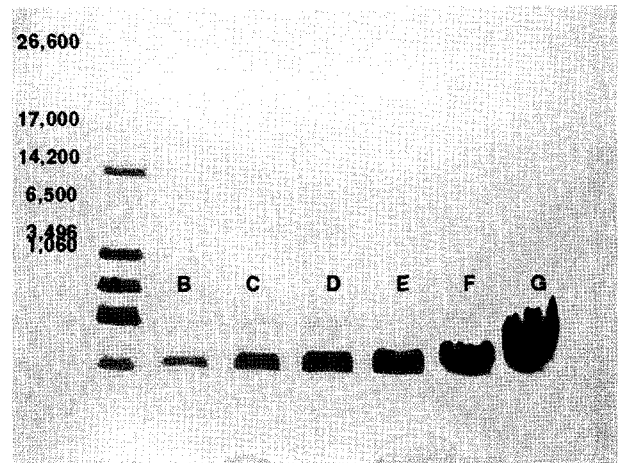


Fig. 5 SDS-PAGE of commercial melittin and purified melittin obtained from gel filtration chromatography of Sephadex G-50. A; molecular weight marker proteins, B, C, and D; commercial melittin (1, 2, and 4 μg, respectively), E, F, and G; purified melittin (10, 20, and 40 μg, respectively).

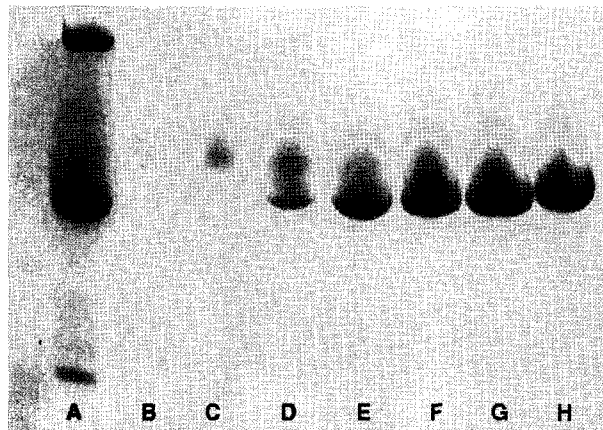


Fig. 6 Propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis of melittin purified from gel filtration chromatography of Sephadex G-50. A: Bee venom B; fraction 30, C; fraction 31, D; fraction 32, E; fraction 33, F; fraction 34, G; fraction 35, H; fraction 36.

IV. 고 찰

봉독에 대한 과민반응은 2-3명/10만 명 정도의 역학적 분포를 나타내는 것으로 보고되고 있다⁸⁾. 벌에 쏘였을 때 과민반응의 양상은 혈압이 떨어지고 전신 무력감, 피부 발진, 안면 창백, 오심 구토, 복통, 빈맥, 오한 등이 나타날 수 있고 더 진행되면 호흡곤란이나 실신, 사망에도 이를 수도 있다. 이러한 경우는 산이나 들에서 가끔 벌집을 건드린 후 대량의 봉독에 노출되었을 때 흔히 발생한다. 봉독의 과민반응은 노출된 용량과 환자의 체질에 따라 다양하게 나타날 수 있다. 과민반응은 크게 4가지, 국소·즉시형 반응, 국소·지연형 반응, 전신·즉시형 반응 그리고 전신·지연형 반응으로 나눌 수 있다.

국소반응은 그 크기에 관계없이 반응이 봉독이 주입된 곳을 포함한 국소에 나타나는 것을 말하는데, 기본적으로 별다른 처치가 필요 없다. 국소·즉시형 반응은 대개 시술 즉시 혹은 30분 이내에 나타난다. IgE와 비반세포 매개형이다. 피부에 발진, 발적, 종창, 온열감 등이 나타났다가 사라진다. 이것은 벌의 독에 포함되어 있는 약리 활성 성분들에 대한 정상적 반응으로, 그 자체로는 무해하다. 하지만 곧 일어날 심각한 전신반응에 대한 전조로서 의미를 지니는 경우도 있다. 국소·지연형 반응은 주입 후 수 시간 내에 주입부에 부종, 발적, 소양감 등이 나타나는 것을 말하는데, 국소·즉시형 반응에 이어서 나타날 수도 있고, 국소·즉시형 반응 없이 나타나는 경우도 있다. 대개 1~2일 내에 약간 가려운 흔적만 남기고 사라진다. 간혹 길이 10~50cm의 큰 국소반응이 나타나는 경우도 있는데, 4~12시간 정도에 나타나기 시작해 3일 이상 지속되기도 한다. 하지만 대개 다음 시술에서는 내성이 생기고 IgG가 생기는 등 면역계에 변화가 와서 작은 국소반응 정도만을 나타내게 된다. 환자는 불편하게 느낄 수도 있겠지만 심각한 것은 아니며 큰 국소반응이 있었다고 해서 다음에 전신반응이 나타날 확률이 큰 것도 아니다. 다만 그 위치에 따라 주의할 필요가 있는데, 예를 들면 아주 드물게는 목이나 입술이 크게 부어 호흡장애가 나타날 수도 있다.

전신반응은 시술된 부위와 상관없이 전신에 반응이 나타나는 것을 말한다. 봉약침의 시술에서 가장 주의해야 할 반응이 바로 전신·즉시형 반응(아나필락시스 반응)이다. 이의 증상은 피부증상, 소화기증상, 호흡기증상, 순

환기증상으로 나눌 수 있다. 피부 증상은 발진, 두드러기, 소양감, 혈관부종, 부종, 발적 등인데, 대개 얼굴, 목, 손에 나타난다. 가장 흔한 반응으로 처음에는 발제(머리카락이 있는 두피, 겨드랑이, 음부 등)에서 시작하여 점차 전신으로 확산되며 일반적으로 상열감이 동반된다. 보통 3-6시간가량 지속되며 특별한 처치가 없어도 해소되는 경우가 대부분이다. 항히스타민제의 복용이나 근육주사 등으로 쉽게 가라앉으며 이 후 피로감을 느껴 수면을 취하는 경우가 많다. 소화기 증상은 복통, 설사, 오심, 구토, 실금 등이다. 봉약침 시술 후 복부의 심한 통증을 호소하는데 아마도 일시적인 장의 마비와 대장의 수분 흡수대사에 장애를 유발하는 것으로 추정된다. 복통 뒤에 구토나 설사가 동반되며 이 후 편안해진다. 호흡기 증상은 호흡기계의 부종, 분비과다로 인한 호흡곤란, 재채기, 목이나 가슴이 조이는 느낌, 거품 형태의 타액 등이 있다. 순환기 증상은 광범위한 혈관투과성 항진, 혈압강하로 인한 현훈, 졸도, 의식상실 등이 있다. 그 외 불안감, 죽을 것 같다는 느낌, 두통, 오한발열, 무기력감 등을 느끼기도 한다. 피부증상은 가장 흔하고 위험성이 적은 증상이지만 전신반응이 피부증상 후에 곧 호흡기계나 순환기계 증상으로 전개될 가능성이 있으므로 신속히 대처하고 주의할 필요가 있다. 하지만 예전에 전신성 피부반응을 보였다고 해서 다음에 호흡기계나 순환기계 증상을 나타낼 가능성이 다른 사람보다 높은 것은 아니며, 대부분은 다음 노출 시 증상이 훨씬 완화된다. 극히 드물지만 호흡이나 혈액순환의 장애는 뇌의 산소공급차단 등 치명적인 결과를 초래할 수 있으므로 응급상황에 준하여 신속한 처치가 필요하다.

전신·지연형 반응은 면역반응으로 이런 몸살증상 뒤에는 병증이 완화되고 전신상태가 호전되는 경우가 종종 관찰되기 때문에 '병이 나오려고 몸살하는 것'이라고 불리기도 한다⁹⁾.

이러한 allergy 반응은 봉약침을 임상에 사용하는데 환자나 시술자로 하여금 부담스러운 치료법이라고 인식하게 할 수 있으며, 특히 의료법상 항히스타민제나 steroid제제 등을 사용할 수 없는 한의사들로서는 봉독으로 인한 전신 즉시형 과민반응이 우려되지 않을 수 없고, 실제 올바른 allergy 반응에 대한 인식이 부족하여 의료사고로 발전하는 경우도 있다. 일반적으로 봉약침이 퇴행성 관절염이나¹⁰⁾ 요추간판탈출증¹¹⁾과 같은 근·골격계 질환이나 류마티스 관절염과 같은 자가면역계

질환^{12,13)} 그리고 많은 난치병¹⁴⁾에 치료효과가 우수한 것으로 보고되고 있으나 보다 적극적인 임상활용을 위해서는 allergy 반응에 대한 보다 적극적 대처가 필요하다고 판단하였다. 이에 봉독의 가장 큰 allergen인 PLA₂를 포함한 효소를 제거하고, 순수 melittin과 분자량이 적은 peptide components를 분리·정제하여 allergy 반응을 유발하지 않는 봉독(Sweet Bee Venom)을 개발하고자 본 연구를 시도하게 되었다. 실험방법으로는 gel filtration chromatography와 propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis를 사용하여 봉독을 분획별로 분리하였다. 그 결과 분자량에 따른 peak를 바탕으로 분획을 구성할 수 있었으며(Fig. 1) SDS-PAGE를 통하여 melittin과 각각의 성분들을 따로 분리할 수 있었다(Fig. 2).

다시 각각의 분획에 따라 PU-PAGE로 분석한 결과(Fig. 3) 분획 25-28은 PLA₂와 일치하였고, 분획 32-38(Fig. 4, D)의 단백질은 melittin과 일치하였다. 분리된 melittin을 다시 Sephadex G-50 column에 크로마토그래피하여 순수한 melittin을 분리할 수 있었다(Fig. 6, E, F와 G). Fig. 6의 B의 분획 30은 약간의 PLA₂를 함유하고 있었으며 분획 34, 35 및 36은 E, F와 G는 melittin 외에 다른 단백질이 없었다.

이상의 내용을 종합해보면 gel filtration chromatography와 propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 봉약침의 allergen인 PLA₂를 포함한 효소 성분을 제거하고 melittin을 포함한 peptide components를 정제·가공하여 향후 부작용이 약하거나 거의 없는 봉약침의 대량 정제개발을 현실화시킬 수 있으리라 사려되며, 이에 대한 지속적인 연구개발이나 독성실험, 그리고 다양한 임상실험 등이 진행되기를 바란다.

V. 결 론

Gel filtration chromatography와 Propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis를 사용하여 봉독을 분획별로 분리정제하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Gel filtration chromatography와 Propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis를 사용하여 봉독을 분획별로 분리하였다.
2. PU-PAGE로 분석한 결과 분획 25-28은 PLA₂와 일

치하였고, 분획 32-38의 단백질은 melittin과 일치하였다.

3. 분리된 melittin을 다시 Sephadex G-50 column에 크로마토그래피하여 순수한 melittin과 melittin 이외의 peptide components를 분리할 수 있었다.

이상의 결과로 향후 allergy를 현저히 예방할 수 있는 봉약침의 치료가 가능할 것으로 사료되며, 이를 위해서는 보다 지속적인 연구가 진행되어야 한다.

참고문헌

1. 대한약침학회. 약침요법 시술 지침서, 대한약침학회, 서울, 1999 ; 133-135.
2. 권기록. 蜂針에 대한 考察, 대한 침구학회지. 11(1), 1994 ; 160.
3. 인창식, 고흥균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록 : 마왕퇴의서의 봉독요법 2례, 대한 침구학회지, 1998 ; 15(1) : 143, 1998.
4. Barbara & Rudolf, Chemistry and Pharmacology of Honey Bee venom. Academic Press. 1986 ; 329-402.
5. Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R.. Natural killer cells. their role in defenses against disease. Science. 1981 ; 214 : 24.
6. 권기록, 고흥균. 봉독약침요법의 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지, 1998 ; 15(2) : 317-331.
7. 고흥균. 봉독약침요법의 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한한의학학회지. 1992 ; 13(1) : 283-292.
8. 권기록, 고흥균. 봉약침요법의 면역반응에 관한 임상적 연구. 대한침구학회지. 2000 ; 17(1) : 169-174.
9. 권기록. 봉독약침자극이 3-MCA 유발 상피종에 대한 항암 및 면역반응에 미치는 영향, 대한침구학회지 1997 ; 14(2) : 151-172.
10. 전형준 외. 봉약침으로 치료한 요추간판탈출증 환자의 임상적 평가, 대한침구학회지. 2003 ; 20(5), 63-72.
11. 권기록. 한방치료를 통한 근위축성 측삭경화증의 임상적 연구, 대한침구학회지. 2003 ; 20(3) : 209-

- 216.
12. 권기록. 봉독요법의 류마티스성 관절염 치료에 대한 임상적 연구, 전국한의학 학술대회지. 1998 ; 130-131.
13. 이상훈 외. 무작위 대조 이중맹검 시험을 통한 봉독약침의 류마티스 관절염 치료효과, 대한침구학회지. 2003 ; 20(6), 80-87.
14. 이성노 외. 봉약침 치료의 퇴행성 슬관절염에 대한 임상적 고찰, 대한 침구학회지. 2003 ; 20(5) : 73-81.
15. Schmidt J.O. Allergy to hymenoptera venoms: in Piek T. ed, Venoms of the hymenoptera, London, Academic press. 1986 ; 510.
16. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature(London) 227 : 680-685.
17. Chetti, S., and Lawrence, A. 1989. High resolution of honey bee (*Apis mellifera*) venom peptides by propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis after ethanol precipitation. Toxicon 27 : 781-787.