

봉독으로부터 Phospholipase A₂ 성분 분리

한상미* · 김세건 · 홍인표 · 우순옥 · 장혜리

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Purification of Phospholipase A₂ from Honeybee Venom

Sang Mi Han*, Se Gun Kim, In Pyo Hong, Soon Ok Woo and Hye Ri Jang

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science,
Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

(Received 6 February 2017; Revised 2 March 2017; Accepted 14 April 2017)

Abstract

PLA₂ is the second highest content of bee venom components next to the melittin. However, unlike melittin has various pharmacological effects, PLA₂ has been known as an allergen and thus most researches on PLA₂ were focused on removing it or inhibiting its activity. Recently, PLA₂ is effective in the treatment of liver damage and cancer cell suppression. PLA₂ is in the spotlight as an active ingredient of pharmaceuticals. In this study, we developed a method for effective isolation of PLA₂ from bee venom. Sep-pak cartridge column was used to separate pure PLA₂ from the TFA / MeCN mobile phase after 6 steps including column stabilization and bee venom injection. The purity was 99.7±0.03% and the yield was 37.5±3.6%, proving that PLA₂ of high purity can be effectively separated by this method. Purified PLA₂ activity, as well as standard PLA₂ activity had the growth inhibitions against hepatocellular carcinoma cells. This study will be useful for the research on physiological activity of PLA₂ and the development of various pharmaceuticals containing PLA₂.

Key words: *Apis mellifera*, Phospholipase A₂, UPLC, Purity, Percent yield

서 론

고대부터 봉독은 순수 천연물질이면서 강력한 항균, 항염증 효과를 갖고 있으며 부작용과 잔류에 대한 위험성이 적어 봉침요법으로 민간과 한방에서 관절염, 통풍 등의 질환에 사용되어 오고 있다(김 등, 2002; Kim *et al.*, 2003). 서양꿀벌(*Apis mellifera* L.) 일벌의 독인 봉독은 다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있으며, 주 성분인 멜리틴(Melittin)은 펩타이드 성분으

로 염증과 항균작용, 강력한 진통작용, 면역증강 등의 역할을 한다고 알려져 있다(Habermann and Reiz, 1965; Fennell *et al.*, 1967; Piek, 1986; Liu *et al.*, 2016). 건조 중량의 40% 이상을 차지하는 멜리틴 이외에도 히스타민(Histamin), 도파민(Dopamine)과 같은 활성아민, 히알루니다아제(Hyaluronidase), 포스포리파아제(Phospholipase A₂: PLA₂) 등의 효소성분 그리고 지질 등이 미량으로 존재한다(Piek, 1986). 우리나라에서는 봉독채집장치가 개발되기 전까지는 살아있는 벌을

*Corresponding author. E-mail: sangmih@korea.kr

이용하는 봉침요법으로 사람이나 가축에 직접 벌의 침을 쏘기 때문에 피부에 벌침이 박혀 내장이 분리되어 봉침요법에 사용했던 꿀벌은 죽게 되고, 무엇보다도 봉독의 정량·정성 분석이 불가능하기 때문에 효과와 안정성이 임상적으로 입증 되었음에도 불구하고 산업화 되지 못했다. 2005년 본 연구팀에서 봉독채집장치를 개발함에 따라 국내에서도 봉독 채집이 가능하게 되었으며, 채집과정에서 혼입된 흙이나 먼지 등과 같은 이물질을 제거한 순수 정제봉독이 시판 판매됨으로써 다양한 실용화 소재로서 사용하게 되었다. 2010년 「축산법 시행규칙」 개정을 통해 축산물의 종류에 봉독을 포함하였으며, 국내는 물론 외국에서도 봉독의 다양한 기능성 탐색뿐만 아니라 기전 구명에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 봉독 내 10-12% 가량 함유되어 있는 PLA₂는 인지질을 가수분해하는 효소로서 레시티나아제(Lecithinase)라고도 한다(Pie *et al.*, 2017). PLA₂는 인지질을 분해하는 위치에 따라 A₁, A₂, B, C, D 로 분류되며, 포스포리파아제 중 PLA₂ 성분은 세포막 구성 지질인 포스포리피드(Phospholipids)의 글리세린(Glycerin)의 BDP(Bisphenol A bis(Diphenyl Phosphate) 결합하는 지방산을 유리시켜 리조포스파티드(Risophosphatide)로 만들기 때문에 세포조직의 파괴, 용혈작용 및 촉매 작용 등을 일으키는 것으로 알려져 있다(Diaz *et al.*, 2001; Caforio and Driessen, 2016). PLA₂ 성분이 체내 면역력을 조절하는 T-세포의 기능을 증강시켜 간 손상 치료제로써 활용될 수 있다는 보여주고 있으며, 또한, PLA₂의 암세포에 대한 세포독성 작용을 통해 항암치료에도 활용될 수 있다고 보고된 바 있다(Cheung *et al.*, 2016; Tagami *et al.*, 2017). 그러나 봉독으로부터 PLA₂ 성분을 의약품이나 시약용으로 활용하기 위하여 고순도로 정제하기 위해서는 많은 비용과 시간이 소비 될 뿐더러 경제적이고 안전한 기술이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 멜리틴 뿐만 아니라 PLA₂ 성분에 대한 생리활성 연구가 활발히 진행됨에 따라 봉독으로부터 고순도의 PLA₂ 성분을 분리할 수 있는 최적 분석 조건을 확립하고자 하였다. 또한 분리 정제한 PLA₂ 성분

한 생리활성을 검정하였다.

재료 및 방법

공시 시료

공시 시료로는 한국정제봉독협동조합(안산, 한국)으로부터 2016년에 채취하여 정제한 정제봉독을 시험에 사용하였다.

시약 및 기기

정제봉독으로부터 PLA₂의 단일성분 분리에 사용한 trifluoroacetic acid(TFA)와 acetonitrile(MeCN)은 Burdik & Jackson(MI, USA)사를 사용하였다. PLA₂ 표준품은 시그마사(Sigma-Aldrich, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 증류수 등 시험에 사용한 모든 시약은 모두 HPLC급으로 사용하였다.

PLA₂ 단일성분 분리

옥타 데 실 실란 (ODS) 10g이 충전된 Sep-Pak(WAT043345, Waters, MA, USA) 카트리지를 컬럼을 진공 매니폴드(730150, Macherey-Nagel, Duren, Germany)에 장착하고 (A)20 mM trifluoroacetic acid(TFA)/acetonitrile(MeCN)과 (B)20 mM TFA/H₂O를 이동상으로 사용하였다. 먼저 100%(B) 용액 100mL로

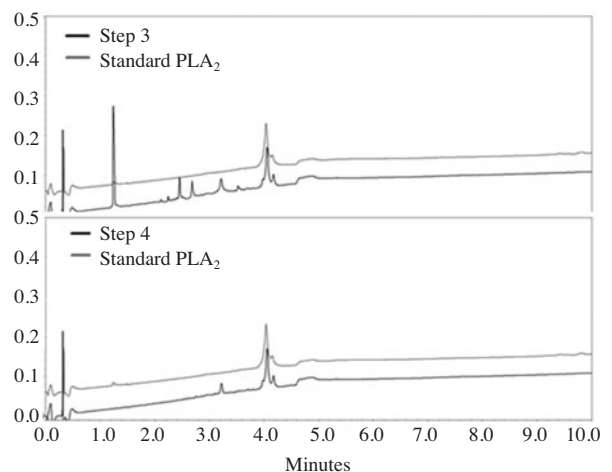


Fig. 1. UPLC chromatograms of step 3 and 4 purified PLA₂ and standard PLA₂.

컬럼을 안정화 시킨 다음(1단계), 붕독 300mg을 증류수 2mL에 녹여 컬럼에 주입하였다(2단계). 80% (B) 용액 100mL를 추가하여 용액을 배출시킨 다음(3단계), 65% (B) 용액 20mL를 컬럼에 주입하여 3단계와 동일하게 배출시켰다(4단계) (Fig. 1). 65% (B) 용액 20mL를 컬럼에 재 주입한 후 용출액 20mL를 취하고(5단계), 5단계 분취 용액에 증류수 80mL를 추가하여 동결건조 후 PLA₂를 수득하고(6단계), PLA₂의 수율을 구하였다.

PLA₂ 단일성분 및 순도 확인

붕독으로부터 분리한 PLA₂가 단일성분 확인에 사용된 기기는 Waters사의 PDA(photo diode array)검출기가 장착된 Acquity UPLC I-Class를 사용하였다. Waters사의 BEH C18(50×2.1mm, 1.7um) 컬럼을 사용하여 Table 1과 같은 조건으로 분석하였다. 순도는 아래와 같은 식으로 구하였다.

$$\begin{aligned} & \text{표준품 취한 양 (mg)} \times \frac{\text{표준품의 순도}}{100} \\ & \times \frac{\text{분리한 PLA}_2\text{성분 피이크 면적}}{\text{표준품의 피이크 면적}} \\ & \times \frac{100}{\text{분리한 PLA}_2\text{ 취한 양}} \end{aligned}$$

분리한 PLA₂의 암세포 성장 억제 효과 측정

PLA₂ 표준품과 분리한 PLA₂에 대한 암세포 성장 억제 효과를 확인하고자 하였다. 실험에 사용한 암세포는 인체의 간암 HepG2 세포를 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 5% FBS (fetal bovine serum, Hyclone, USA) 및 항생제 혼합액을 첨가한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO, NY, USA) 배양액을 사용하여 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 간암세포에 대한 암세포 성장 억제 효과를 측정하기 위해 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay를 실시하였다. HepG2 세포를 96 well plate에 1×10⁵ cells/well이 되게 300μL씩 분주하여 24시간 후 시료를 일정한 농도로 제조하여 10μL 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 여기에 PBS(phosphate- buffered saline)에 5mg/mL의 농도로 제조한 MTT용액 20μL를 첨가하고 동일한 배양 조건에서 4시간을 배양하였다. 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO(dimethyl sulfoxide) 300μL를 가하여 ELISA reader(Molecular Devices, CA, USA)로 517nm에서 흡광도를 측정하여 inhibition rate(%)를 구하였다.

결과 및 고찰

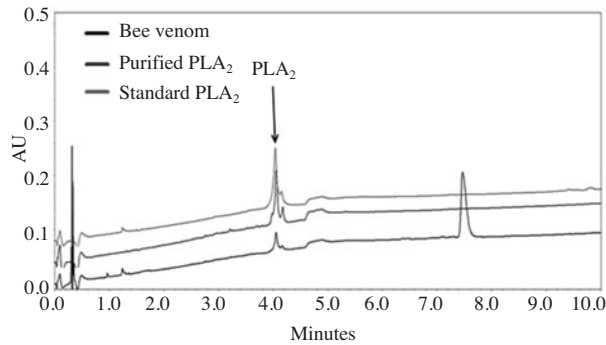
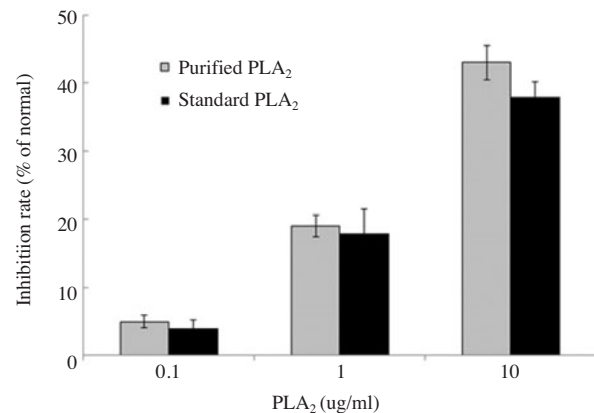
붕독의 주성분은 펩타이드인 멜리틴으로 50% 이상 차지하고 있으며, 그 다음으로 많은 함량을 차지하고

Table 1. Conditions for UPLC analysis of PLA₂ detection

| UPLC condition | |
|-------------------------------|--|
| Column | Halo ES-C18 (2.1×100mm, 2.7μm, Advanced materials technology, DE, USA) |
| Flow rate | 0.8mL/min |
| Column temperature | 50°C |
| Injection volume | 2μl |
| Detection wavelength | 220nm |
| Mobil phase | Time (min) A (%) B (%) |
| (A) 20mM TFA/MeCN | 0 10 90 |
| (B) 20mM TFA/H ₂ O | 3 31 69 |
| | 5 40 60 |
| | 10 45 55 |

Table 2. Purity and percent yield of purified PLA₂ from honeybee venom (mean ± SD, n=5)

| Items | Purity (%) | Percent yield (%) |
|---------------------------|-------------|-------------------|
| Purified PLA ₂ | 99.7 ± 0.03 | 37.5 ± 3.6 |

**Fig. 2.** UPLC chromatograms of bee venom, purified PLA₂ and standard PLA₂.**Fig. 3.** Inhibitory effects of purified PLA₂ and standard PLA₂ on HepG2 cell growth.

있는 PLA₂는 분자량이 19,000인 효소 성분으로 10~12% 가량 함유되어 있다(Piek, 1986). 봉독의 항균 및 항염 효과는 멜리틴에서 기인하는 것으로 보고 되어 있으나, PLA₂는 체내 면역력을 조절하는 T-세포의 기능을 과도하게 증강시킴으로써 봉독의 알러지 반응을 유발하는 물질로 알려져 있어 봉침요법으로 사용할 경우 PLA₂ 성분을 제거하고 사용하는 경우도 있다(조와 권, 2011; Hossen *et al.*, 2016). 그러나 최근 PLA₂ 성분이 간 손상 치료제와 암세포 사멸에 효과가 있어 항암 치료제로서 가능성이 높다는 연구가 이루어지고 있다(Shariati *et al.*, 2016).

본 연구에서는 봉독으로부터 PLA₂ 성분만을 분리 정제할 수 있는 정제법을 개발하고자 하였다. 봉독으로부터 6단계의 과정을 거쳐 PLA₂만을 순수하게 분리 정제할 수 있었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 크로마토그래피 그래프가 표준품으로 사용한 PLA₂와 동일함을 확인할 수 있다. 수율에 있어서도 일반적으로 봉독 내 PLA₂의 함량은 10~12% 이나 본 연구에서는 3.5% 수준으로 37.5 ± 3.6%로 비교적 안정된 수득률을 보였다. 또한 Fig. 2의 크로마토그래피에서 분리한 PLA₂는 1~4분대에 피크가 나타나지 않는 것을 볼 수 있으며, 표준품과의 계산식을 통해 불순물의 존재가 거의 없는 것으로 확인되었다(Table 2). 또한 분리한 PLA₂는 성분과 표준품과의 간암세포에 대한 성장 억제효과를 비교하고자 하였다. 그 결과 분리한 PLA₂는 성분과 표준품의 HepG2 세포 억제 효과에 대한 차이는 확인되지 않았다(Fig. 3). Fig. 3에서 보는 바와 같이 분리한 PLA₂와 표준품 모두 HepG2 세포 억제 효과를 확인할 수 있었으며 농도 의존적이였다. 40여 가지 이상의 다양한 성분으로 혼합물로 이루어진 봉독으로부터 약학적 효능을 가지는 특성 성분인 PLA₂를 고순도의 단일 성분으로 분리하는 기술이 확보됨에 따라 PLA₂에 대한 생리활성 및 약리 효능 구명을 통해 PLA₂를 유효성분으로 하는 의약품, 화장품 등의 개발에 유용하게 사용 될 수 있을 것으로 기대한다.

적 요

PLA₂는 혼합물로 이루어진 봉독 성분 중에서 멜리틴에 이어 두 번째로 많은 함량을 갖고 있는 물질이다. 그러나, 다양한 약리효능을 갖는 멜리틴과는 달리 알러지를 유발하는 물질로 알려져 PLA₂를 제거하거나 활성을 억제하는 연구가 주로 이루어졌다. 최근 PLA₂가 간 손상 치료와 암세포 억제 효능이 밝혀짐에

따라 PLA₂를 유효성분으로 하는 의학조성물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 봉독으로부터 효과적으로 PLA₂를 분리하는 방법을 개발하고자 하였다. Sep-pak 카트리지 컬럼을 사용하여 TFA/MeCN을 이동상으로, 컬럼의 안정화 단계, 봉독 주입 등 6단계를 거친후 순수한 PLA₂를 분리할 수 있었다. 순도는 99.7±0.03%, 수득률은 37.5±3.6%로 고순도의 PLA₂를 효과적으로 분리하였으며, 분리한 PLA₂의 간암세포 억제 효과를 확인하였다. 이러한 연구를 통해 PLA₂에 대한 다양한 생리활성 구명과 이를 원료로 하는 다양한 의약품 개발이 가능 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업 (과제번호: PJ01188201)에 의하여 수행되었습니다.

인용 문헌

김민정, 박상동, 이아람, 김경호, 장준혁, 김갑성. 2002. 쥐의 Collagen 유발 관절염의 활액에서 단백질분해효소의 활성 및 유리기 손상에 미치는 봉독약침의 억제효과. 대한침구학회지 19: 161-175.

조병균, 권기록. 2011. 기니픽을 이용한 Sweet Bee Venom의 항원성 평가. J Pharmacopunct. 14: 23-32.

Caforio, A., Driessen, A. J. 2016. Archaeal phospholipids: Structural properties and biosynthesis. Biochim Biophys Acta. 20: S1388-1981.

Cheung, K. L., Jarrett, R., Subramaniam, S., Salimi, M., Gutowska-Owsiak, D., Chen, Y. L., Hardman, C., Xuem, L., Cerundolo, V., Ogg, G. 2016. Psoriatic T cells recognize neolipid antigens generated by mast cell

phospholipase delivered by exosomes and presented by CD1a. J. Exp. Med. 213(11): 2399-2412.

Díaz, C., León, G., Rucavado, A., Rojas, N., Schroit, A. J., Gutiérrez, J. M. 2001. Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A(2): role of negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. Arch Biochem Biophys. 391(1): 56-64.

Fennell, J. F., Shipman, W. H. and Cole, L. J. 1967. Antibacterial action of a bee venom fraction(melittin) against a penicillin-resistant Staphylococcus and other microorganisms. Res. Dev. Tech. Rep. 5:1-13.

Habermann, E. and Reiz, K. G. 1965. On the biochemistry of bee venom pep-tides, melittin and apamin. Biochemistry 343:192-203.

Hossen, M. S., Shapla, U. M., Gan, S. H., Khalil, M. I. 2016. Impact of Bee Venom Enzymes on Diseases and Immune Responses. Molecules. 22: 25.

Kim, H. W., Kwon, Y. B., Ham, T. W., Roh, D. H., Yoon, S. Y., Lee, H. J., Han, H. J., Yang, I. S., Beitz, A. J. and Lee, J. J. 2003. Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. J. Vet. Med. Sci. 65:349-355.

Liu, C. C., Hao, D. J., Zhang, Q., An, J. 1., Zhao, J. J., Chen, B., Zhang, L. L., Yang, H. 2016. Application of bee venom and its main constituent melittin for cancer treatment. Cancer Chemother. Pharmacol. 78(6): 1113-1130.

Pie, M. S., Peters, G. H., Brask, J. 2017. Chemoenzymatic synthesis of fluorogenic phospholipids and evaluation in assays of phospholipases A, C and D. Chem Phys Lipids. 202: 49-54.

Piek, T. 1986. Venoms of the Hymenoptera. London, Academic Press.

Shariati, M., Aghaei, M., Movahedian, A., Somi, M. H., Dolatkah, H., Aghazade, A. M. 2016. The effect of ω-fatty acids on the expression of phospholipase A2 group 2A in human gastric cancer patients. J. Res. Med. Sci. 21: 10.

Tagami, T., Ando, Y., Ozeki, T. 2017. Fabrication of liposomal doxorubicin exhibiting ultrasensitivity against phospholipase A2 for efficient pulmonary drug delivery to lung cancers. Int. J. Pharm. 517(1-2): 35-41.