

정제봉독의 ADH와 ALDH 활성화 효과

한상미* · 홍인표 · 우순옥 · 김세건 · 장혜리

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

ADH and ALDH Activation of Purified Bee Venom (*Apis mellifera* L.)

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

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

(Received 10 September 2017; Revised 17 September 2017; Accepted 17 September 2017)

Abstract

We investigated whether purified bee venom increases the enzymatic activity of the alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH). ADH and ALDH assay were tested by *in vitro* kits. The purified bee venom was assayed by ultra performance liquid chromatography, The contents of melittin, apamin and phospholipase A2, as main component of purified bee venom, were 63.9%, 2.3%, and 10.9%, respectively. The ADH and ALDH activity of purified bee venom(at 1mg/ml) were $88.6 \pm 7.34\%$ and $94.6 \pm 0.57\%$, respectively compared with positive control at 2mg/ml. These results showed that purified bee venom induces the activity of ADH and ALDH which reduce the aldehyde concentration in the blood, suggesting the possibility of purified bee venom as resource of medicine or functional beverage for hangover relieving.

Key words: *Apis mellifera*, Purified bee venom, Alcohol dehydrogenase (ADH), Aldehyde dehydrogenase (ALDH), Hangover

서 론

알코올은 고대로부터 사교의 수단 및 스트레스 해소를 위한 식품으로 활용되어 왔다. 현대 사회의 경제 성장과 함께 폭음 및 잦은 음주문화가 형성되어 왔으며, 이로 인한 알코올 섭취량의 증가는 숙취, 간 기능 장애, 알코올 중독과 같은 사회 문제를 야기 시키고 있다(An *et al.*, 1999; You *et al.*, 2016). 한국인의 음주습관은 2013년 국민건강영양조사에서 남성의 19.7%, 여

성의 5.4%가 주 2회 이상 음주를 하는 고위험 음주군으로 나타났다(보건복지부, 2013). 과도한 음주는 메스꺼움, 두통, 갈증 등의 숙취현상을 유발하게 된다. 이러한 현상의 대부분은 미처 분해되지 않고 간세포에 쌓여 있는 알코올이나 아세트알데히드(acetaldehyde)의 독성작용에 의해 발생하는 것이며, 이러한 물질들이 축적되면서 피로감이 지속되거나 복부 팽만감을 느끼게 되는 것이다(Swift와 Davidson, 1998; Weise *et al.*, 2000).

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

알코올의 대사과정은 위와 소장을 통해 알코올이 흡수되면서, 알코올 성분이 혈관을 타고 이동되어 간에 이르게 되는데, 간세포는 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH)를 이용하여 알코올을 아세트알데히드(acetaldehyde)로 산화시키고, 아세트알데히드는 다시 간세포에 있는 아세트알데히드 탈수소효소(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)를 통해 초산으로 분해되어 최종적으로 탄산가스와 물로 분해된다(Bode *et al.*, 1987; Gemma *et al.*, 2006). 우리 몸에 치명적인 손상을 주는 것은 알코올 산화과정에서 생성되는 아세트알데히드가 심혈관계에 작용하여 급성 증상을 나타내기 때문이다. 아세트알데히드는 체내의 거의 모든 기관을 손상 시키고 특히 간조직의 구조와 기능에 치명적인 손상을 유발한다(Lieber, 1994; Setshedi *et al.*, 2010).

이러한 현상을 해소하기 위해서 헛개나무, 인삼, 홍삼, 옥수수, 가시오갈피, 꿀, 비타민, 대두, 칩, 진피, 녹차, 콩나물, 한방 생약재의 복합 추출물 등을 주 성분으로 함유하는 의약품, 식품, 음료 등의 숙취해소용 제품들이 개발되고 있다(Cho *et al.*, 2001). 그러나 대부분 이미 숙취해소를 위해 전통적으로 사용되어 왔던 재료들이기에, 아직까지는 탁월한 원료 소재를 포함하는 숙취해소용 조성물에 대한 연구는 미미한 편이다. 봉독은 예로부터 봉침요법과 민간에서 다양한 질병의 예방과 치료에 사용되어 왔다. 특히 봉독은 항염증, 항균작용 뿐만 아니라 체내 면역활성에도 도움이

되는 것으로 알려져 있으며(Habermann과 Reiz, 1965; Piek, 1984), 동유럽과 민간에서는 알코올 중독 치료에도 봉독을 활용한다고 알려져 있다.

따라서, 본 연구에서는 순수 천연물질인 봉독의 ADH와 ALDH 활성에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

공시 시료 및 성분 분석

시험물질인 정제봉독은 봉독채집장치를 사용하여 서양종꿀벌(*Apis mellifera* L.)로부터 채취한 봉독을 ‘봉독의 간이정제방법’으로(한 등, 2007) 정제한 정제봉독을 구입하여 사용하였다(한국정제봉독협동조합, 한국). 구입한 정제봉독의 성분 확인을 위하여 1mg/ml의 농도로 3차 증류수에 녹여 0.2 μ m PTFE (Polytetrafluoroethylene) membrane filter (Advantec, Japan)로 여과한 후 UPLC (ultra performance liquid chromatography, Waters, MA, USA)를 사용하여 분석하였다. 표준품인 apamin, melittin, 그리고 phospholipase A₂는 시그마사(Sigma-Aldrich, MO, USA)로부터 구입하여 2mg/ml로 만들어 시험봉독과 동일한 필터를 사용하여 여과하였다. 분석기기는 PDA(photo diode array) 검출기가 장착된 Acquity UPLC I-Class(Waters, MA, USA)를 사용하여, Table 1과 같은 컬럼 및 분석 조건으로 220 nm의 검출파장에서 분석하였다(Han *et*

Table 1. Ultra performance liquid chromatography conditions for melittin, apamin and phospholipase A2 analysis in purified bee venom

Items	Conditions		
Column	Halo ES-C18 (2.1 × 100mm, 2.7 μ m, Advanced materials technology, USA)		
Flow rate	0.8 mL/min		
Column temperature	50°C		
Injection volume	2 μ l		
Wavelength	220nm		
	Time (min)	20mM TFA*/MeCN (%)	20mM TFA/H ₂ O (%)
Mobile phase	0	10	90
	3	31	69
	5	40	60
	10	45	55

*TFA: trifluoroacetic acid

al., 2017).

ADH 및 ALDH 효소 활성 측정

ADH 활성은 ADH ELISA kit(ab102533, Abcam, UK), ALDH 활성은 ALDH ELISA kit (ab155893, Abcam, UK) 를 사용하여 측정하였다. 각각의 96 well에 농도별로 정제봉독을 주입하고 6시간 반응 후 흡광도를 340nm 에서 측정하였고, 이를 양성대조구와 비교하여 ADH 및 ALDH 활성 증가율을 측정하였다. 양성대조구는 ELISA kit에서 제공되는 물질을 사용하였다.

$$ADH (ALDH) \text{ activity}(\%) = (B/A) \times 100$$

A : 양성 대조구의 흡광도, B : 실험구의 흡광도

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 R(3.4.1 version, NewZealand) 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균±표준편차(mean±SD, n=10)로 표시하였다. 대조군과 실험군 간의 평균에 대한 유의성은 ANOVA 검정을 이용하여 $p < 0.005$ 에서 검증하였다.

결과 및 고찰

예로부터 봉독은 살아있는 꿀벌로부터 사람이거나 가축에 직접 독을 쏘도록하는 봉침요법으로 면역증강 또는 다양한 질환의 치료에 사용해 오고 있었다 (Habermann과 Reiz, 1965; Piek, 1984). 그러나 살아있는 꿀벌을 이용했을 때에는 정량 및 정성 분석이 불가능 할 뿐더러 심한 통증과 더불어 알리지까지 유발할 수 있다는 문제점들을 갖고 있어 산업화 되지 못했다. 봉

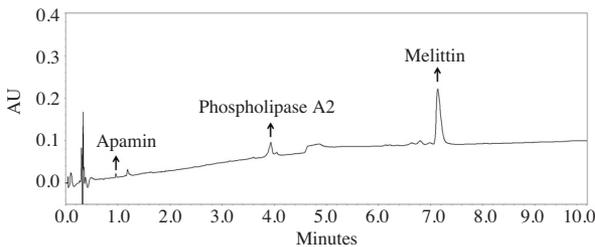


Fig. 1. Ultra performance liquid chromatography spectrum of the purified bee venom.

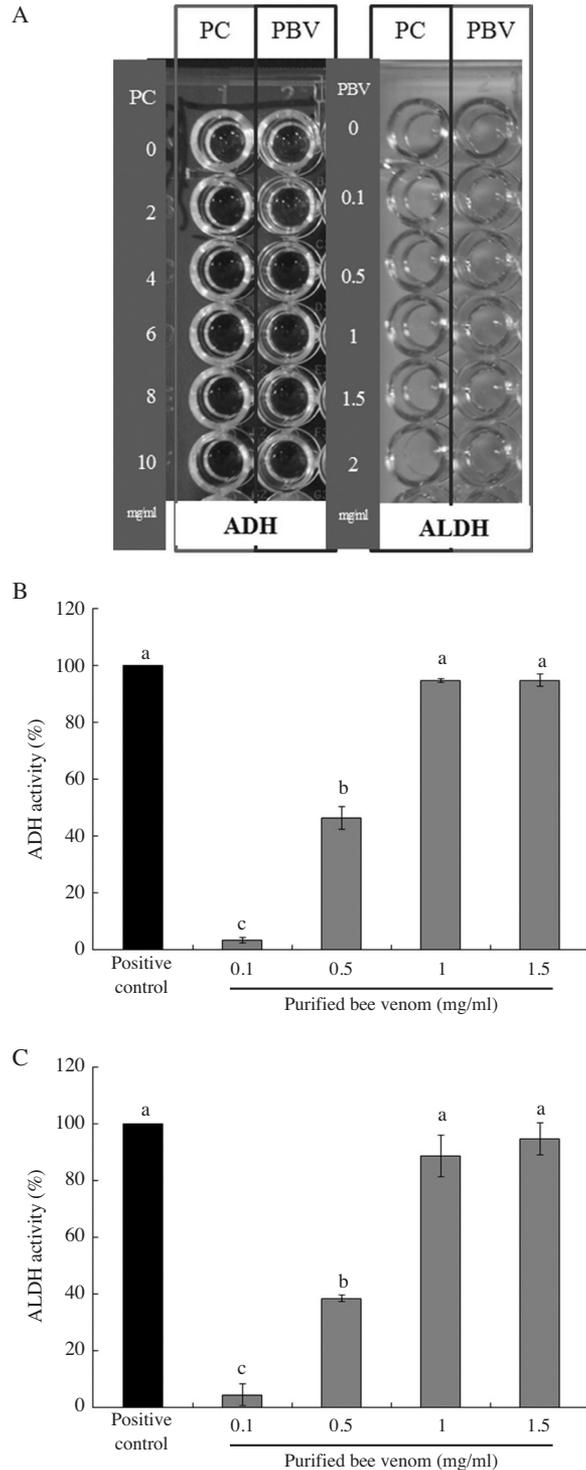


Fig. 2. Effects of purified bee venom on ADH and ALDH activities by *in vitro* kit. A is showed the results of ADH and ALDH ELISA assay. ADH (B) and ALDH (C) activity of purified bee venom is increased compared with positive control at 2mg/ml. Data are expressed as mean±SD (n=10). Different letters above the bar are statistically different by ANOVA test ($p < 0.005$). PC; positive control, PBV; purified bee venom.

독채집장치가 개발되고 휘발성 성분이 제거된 균일한 성분이 유지되는 정제봉독이 생산됨에 따라 이를 이용한 다양한 식의약소재 개발과 기능성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Han *et al.*, 2016).

본 연구에서는 15일령 이상의 서양종꿀벌의 일벌에서 채취한 봉독을 정제한 정제봉독을 시험에 사용하였다. Fig. 1에서와 같이 정제봉독 내 melittin, apamin 그리고 phospholipase A₂의 함량은 각각의 표준품 수용액 시료에 나타나는 피크와 비교하여 63.9%, 2.3% 그리고 10.9%로 이는 꿀벌이 가지는 봉독 성분의 변화 없이 채취 및 정제된 것으로 확인되었다(Piek, 1984). 다양한 약리효능을 갖는 정제봉독이 알코올 대사의 주요 효소인 ADH와 ALDH 활성에 영향을 주는 지를 알아보기 위하여 *in vitro* 시험을 수행한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 높은 활성을 나타내었다. ADH 활성에 있어서 1mg/ml (양성대조군(2mg/ml 농도)의 88.6±7.34%) 이상의 정제봉독 처리한 시험구와 양성대조구간의 차이는 나타내지 않았다. 또한 ALDH 활성에 있어서도 양성대조군과 비교하여 1mg/ml의 정제봉독 처리 시 높은 활성 (양성대조군(2mg/ml 농도)의 94.6±0.57%)을 나타내었다. 따라서 정제봉독은 ADH와 ALDH 효소에 통계적으로 높은 활성을 갖고 있는 것으로 확인되었다($p < 0.005$).

체내의 알코올 대사는 ADH, microsomal ethanol oxidation system(MEOS) 및 카탈라아제(catalase) 등에 의하여 조절되면 항산화 시스템에 영향을 미치는 자유라디칼을 생산한다(Das와 Vasudeva, 2007). 만성적인 알코올의 섭취로 간에서는 알코올에 의해 대사되지 않은 지방산의 축적으로 지방간이 발생할 수 있으며 심하면 간세포의 괴사를 일으킬 수 있다(Lieber, 1991; Pemberton *et al.*, 2005). 또한 만성적인 알코올 섭취로 생성된 아세트알데하이드에 의해 손상된 간 조직에서는 총 fatty acid ethyl esters (FAEEs)와 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)가 증가하고 이러한 대사산물로 인해 간 조직을 포함한 다른 조직의 손상을 가중시킬 수 있다(Nordmann *et al.*, 1992; Konno *et al.*, 2015). 간에서의 알코올 대사는 ADH와 ALDH 활성에 영향을 주는 요인에 의해 조절되며, ALDH 대부분이 미토콘드리아 내막에 존재하기 때문에 활성

이 저해 되는 것으로 보고되었다(Lieber, 1991; Nordmann *et al.*, 1992). 또한 MEOS에 의해서 지질과산화물을 만드는 oxygen radical의 생성이 증가하고, 지질과산화는 산화적 세포손상을 촉진하고 간세포의 손상 및 세포 사멸을 증가시킬 뿐 아니라 DNA 변이, 발암, 노화, 동맥경화 및 염증 등을 일으킬 수 있다(Lebsack *et al.*, 1981; Pemberton *et al.*, 2005).

본 연구에서는 정제봉독을 이용하여 ADH 및 ALDH 효소 활성에 미치는 영향을 *in vitro*에서 분석하였다. ADH 및 ALDH 효소 활성을 측정된 결과 정제봉독은 ADH와 ALDH 활성을 모두 크게 증가시키는 것으로 확인되었다. 따라서 정제봉독은 숙취 해소능에 영향을 미치는 인자에 대해 효과적으로 작용하는 것으로 보였으며, 향후 *in vivo* 시험을 통해 숙취 해소에 효과적인 식의약품 소재가 될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 서양종꿀벌의 일벌에서 채집하여 정제한 정제봉독이 알코올 분해능에 관련이 있는 ADH와 ALDH 효소 활성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. ADH와 ALDH 활성은 *in vitro* kit를 사용하여 측정하였다. 그 결과 정제봉독 처리에 의해 ADH와 ALDH 효소 활성이 크게 증가하는 것으로 확인되었다. ADH 효소는 1mg/ml 이상의 정제봉독을 처리했을 경우 양성대조군(2mg/ml) 대비 88.6±7.34%의 활성도를 보였으며, ALDH 효소 역시 1mg/ml 이상의 정제봉독에서 양성대조군(2mg/ml) 대비 94.6±0.57%의 활성도를 나타내었다. 이상의 결과로 정제봉독은 숙취 해소능에 영향을 미치는 지표물질인 ADH와 ALDH 효소 활성을 크게 증가시키는 것으로 사료되었으며, 향후 추가시험을 통해 숙취해소 작용을 갖는 식의약품 소재로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ01221902)에 의하여 수행되었습니다.

인용문헌

- 한상미, 이광길, 여주홍, 우순옥, 권해용. 2007. 붕독의 간이 정제 방법, 대한민국특허 10-075881.
- An, S. W., Y. G., Kim, M. H. Kim, B. I. Lee, D. H. Lee, H. I. Kwon, B. Hwang and H. Y. Lee. 1999. Comparison of hepatic detoxification activity and reducing serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* THUNB and *Alnus japonica* Steud. Korean J. Medicinal Crop Sci 7: 263-268.
- Bode, C., V. Kugler and J. C. Bode. 1987. Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. J. Hepatol. 4: 8-14.
- Cho, S. H., J. C. Kim and S. W. Kim. 2001. Effect of plant extracts on the activity of alcohol dehydrogenase and the antioxidation in alcohol-treated rat hepatocyte. J. Korean Soc. Food Sci Nutr. 30: 679-683.
- Das, S. K. and D. M. Vasudevan. 2007. Alcohol-induced oxidative stress. Life Sci. 81: 177-187.
- Gemma, S., S. Vichi and E. Testai. 2006. Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects. Ann. Ist. Super. Sanita 42: 8-16.
- Habermann, E. and Reiz, K. G. 1965. On the biochemistry of bee venom pep-tides, melittin and apamin. Biochemistry 343:192-203.
- Han, S. M., S. G. Kim, I. P. Hong, S. O. Woo and H. R. Jang. 2017. Purification of Phospholipase A2 from Honeybee Venom. J. Apiculture 32: 63-67.
- Han, S. M., I. P. Hong, S. O. Woo, S. G. Kim and H. R. Jang. 2016. Antigenicity of Purified Bee Venom Gel from Honeybee (*Apis mellifera* L.) in Guinea Pigs. Yakhak Hoeji. 60: 53-57.
- Konno, S., K. Chu, N. Feuer, J. Phillips and M. Choundhury. 2015. Potent anticancer effects of bioactive mushroom extract (*Phellinus linteus*) on a variety of human cancer cells. J. Clin. Med. Res. 7: 76-82.
- Lebsack, M. E., E. R. Gordon and C. S. Lieber. 1981. Effect of chronic ethanol consumption on aldehyde dehydrogenase activity in the baboon. Biochem. Pharmacol. 30: 2273-2277.
- Lieber, C. S. 1973. Liver adaptation and injury in alcoholism. N. Engl. J. Med. 288: 356-362.
- Lieber, C. S. 1991. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. Alcohol Clin. Exp. Res. 15: 573-592.
- Lieber, C. S. 1994. Alcohol and the liver: update. Gastroenterology 106: 1085-1090.
- Ministry of health and welfare, and centers for disease control and prevention. 2014. Korea health statistics 2013: Korea national health and nutrition examination survey (KNHANES VI-1). Ministry of health and welfare. pp. 24-25.
- Nordmann, R., C. Ribière and H. Rouach 1992. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. Free Radic. Biol. Med. 12: 219-240.
- Pemberton, P. W., A. Smith and T. W. Warnes. 2005. Non-invasive monitoring of oxidant stress in alcoholic liver disease. Scand. J. Gastroenterol. 40: 1102-1108.
- Piek, T. 1986. Venoms of the Hymenoptera. London, Academic Press.
- Setshedi, M., J. R. Wands and S. M. Monte 2010. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. Oxid. Med. Cell. Longev. 3: 178-185.
- Swift, R. and D. Davidson. 1998. Alcohol hangover: mechanisms and mediators. Alcohol Health Res. World 22: 54-60.
- Wiese, J. G., M. G. Shlipak and W. S. Browner. 2000. The alcohol hangover. Ann. Intern. Med 132: 897-902.