

호박벌 일벌독의 성분 분석 및 생리활성 탐색

한상미* · 이광길 · 여주홍 · 권해용 · 우순옥 · 윤형주 · 김미애 · 김원태 · 백하주¹

농업과학기술원 농업생물부, ¹경상북도보건환경연구원

Protein Composition and Biological Activities of *Bombus ignitus* Venom

Sangmi Han*, Kwang-Gill Lee, Joo-Hong Yeo, Haeyong Kweon, Soon-Ok Woo, Hyung-Joo Yoon, Meae Kim, Wontae Kim and Haju Baek¹

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

¹Gyeongsang Buk-Do Government Public Institute of Health and Environmental, Daegu, 701-702, Korea

ABSTRACT : Pure *Bombus ignitus* venom samples were submitted to two-dimensional gel electrophoresis. A total of 64 excised spots were analyzed by mass spectrometry. Three main proteins resulted in the identification have not been described in other bee venoms before. Dose-dependence against human carcinoma (Hep3B, BT-20, A549 and AGS) were observed from 1 ng/ml to 100 ng/ml. Expecially, the treatment of 100 ng/ml *B. ignitus* venoms showed the highest cytotoxicity with 55% against hepatocellular carcinoma (Hep3B). The *B. ignitus* venoms showed strong antimicrobial activities against *Enterococcus faecium* and *Shigella sonnei*, and practically antimicrobial activity against the other microorganisms tested. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *E. faecium* and *S. sonnei*, were 0.256 ug/ml, respectively.

KEY WORDS : *Bombus ignitus*, Bee venom, Biological activity, Antibacterial, Anticancer

초 록 : 호박벌 일벌독의 성분과 생리활성을 규명하기 위하여 단백질 성분분석과 암세포 생육 저해 효능, 항균력을 검토하였다. 이차원단백질 분석을 통해 호박벌의 일벌독은 63개의 단백질이 존재하는 것으로 확인되었으며, 가장 많은 함량을 보이는 3개의 단백질을 염기서열 분석하였다. 그러나 이들 성분은 아직 밝혀지지 않은 성분으로 판단되었다. 호박벌 일벌독의 암세포(간암; Hep3B, 폐암; A549, 유방암; BT-20, 위암; AGS)에 대한 생육 저해능은 시료 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보이며 100 ng/ml에서 간암세포(Hep3B)에 대한 생육 저해능이 55%로 가장 높았다. 항균활성에 *E. faecium*과 *S. sonnei*에 대하여 최소발육억제농도와 최소살균농도 모두 각각 0.256 ug/ml로 강한 항균활성을 나타내었으며, 그 외의 피검균에 대해서도 비교적 높은 활성을 보였다. 이상의 결과로부터 호박벌 일벌독의 성분은 다른 벌의 독 성분과는 차이를 보이며, 그 생리활성에 있어 약리학적 이용이 가능할 것으로 판단되었다.

검색어 : 호박벌, 벌독, 생리활성, 항균, 항암

*Corresponding author. E-mail: sangmih@rda.go.kr

꿀벌(*Apis mellifera* L.)의 독은 오래전부터 민간요법의 하나로 관절염, 통풍등의 질환에 사용되어 오고 있다(Kim *et al.*, 2003). 기존의 관절염 치료제로 사용되는 비스테로이드성 및 스테로이드성 약물, 면역 억제제 등의 부작용과 장기간 사용으로 인한 내성 등으로 많은 문제가 야기되고 있다(Abbadie and Besson, 1994). 현재 이러한 약물들의 단점을 해결하기 위하여 사용하고 있는 꿀벌독은 염증성 질병과 통증에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 꿀벌독은 다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있는데 이중 펩타이드가 항염증과 항세균, 항바이러스 작용이 있고, 건조 봉독의 가장 대표적인 주성분인 멜리틴(melittin)은 뇌하수체-부신체계를 자극하여 카테콜라민과 코티손을 산출하고 리소좀의 세포막을 안정화시켜 항염증 작용을 한다(Dunn *et al.*, 1988; Gauldie *et al.*, 1978). 아파민(apamin)은 건조 봉독의 2-3%에 지나지 않지만 멜리틴과 같이 뇌하수체-부신체계를 자극하여 코티손 분비를 증가하여 항염증 작용을 한다고 알려져 있다(Habermann *et al.*, 1965).

뒤영벌은 벌목(Hymenoptera), 꿀벌과(Apidae), 뒤영벌아과(Bombidae), 뒤영벌족(Bombini)에 속하며, 국내에서는 뒤영벌아과(Bombidae)에 뒤영벌(*Bombus*)속 20종과 딱벌속(*Psithyrus*) 5종의 25종이 보고되었다(Lee and Dumouhel, 1999; Williams, 1998). 국내 토종 뒤영벌인 호박벌(*Bombus ignitus* Smith)은 꿀벌과 마찬가지로 여왕벌, 일벌, 수벌을 기본단위로 이루어져 있으며(Heinrich, 1979), 시설채소 및 과수 등의 화분매개곤충으로 국내에서도 인공사육으로 대량생산을 하고 있다(Free, 1993; Masahiro, 2000; Yoon *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2005).

따라서 본 연구는 뒤영벌류 연구에 있어 상대적으로 미흡했던 벌독, 특히 국내 토종 호박벌의 벌독에 대한 성분을 분석하였고, 암세포에 대한 생육 저해효능을 비롯한 항균활성을 검토하였다.

재료 및 방법

호박벌 일벌독 분리

본 실험은 농업과학기술원 농업생물부에서 실내 계대 사육 중인 2세대 20에서 30일령 사이의 호박벌 일벌로부터 벌독을 분리하여 사용하였다. 살아있는 호박벌은 액체 질소를 사용하여 급속 냉동시킨 후 벌독을 분리하기 전까지 -70°C에서 유지시켰다. 독낭을 분리하여 homogenizer

를 사용하여 균질화시킨 후 10,000 g, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 취하였다(Moreau *et al.*, 2002). 분리한 벌독은 동결건조하여 실험에 사용하였다.

호박벌 일벌독의 단백질 분석

일벌독의 단백질 분석을 위해 4-20% Tricine gel을 사용하여 전기영동한 후 silver staining kit를 사용하여 염색하였다. 좀 더 상세한 단백질 분석을 위해 2차원 전기영동(2DE, 2-dimensional gel electrophoresis)과 단백질 서열 분석(MALDI-TOP, matrix assisted laser desorption ionization-time of flight)은 (주)제노마인(포항, 한국)에 분석 의뢰하였다.

암세포 생육 저해 효능 실험

각종 암세포에 대한 생육 저해활성의 검정은 SRB (sulforhodamine B) assay (Skehan *et al.*, 1990)에 의하여 다음과 같이 수행하였다. 암세포주는 인간의 간암세포인 Hep3B (hepatocellular carcinoma, human), 폐암세포인 A549 (lung carcinoma, human), 유방암세포인 BT-20 (breast cancer, human) 및 위암세포인 AGS (gastric carcinoma, human)를 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였다. 또 시료의 세포독성을 알아보기 위하여 사람의 간세포 WRL68을 실험에 사용하였다. SRB assay는 실험 대상 세포를 1×10^5 cells/ml의 농도로 96 well plate의 각 well에 100 ul씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, 5%, CO₂ 조건으로 배양한 후에, 각 시료 100 ul씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양 후에 상등액을 제거하고 TCA (trichloroacetic acid) 100 ul를 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치하였다. 이후 SRB 용액으로 염색한 후 acetic acid로 세척하고, Tris buffer를 첨가한 후 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정함으로써, 호박벌 일벌독의 암세포 및 정상세포에 대한 생육 저해 효능을 검토하였다.

항균력 검정

실험에 사용된 표준균주는 한국미생물보존센터로부터 분양받아 사용하였으며, 그람 양성균으로는 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus intermedius*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* 그리고 그람 음성균으로는 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*를 사용하였다.

각 균주에 대한 벌독의 항균 효과를 파악하기 위하여 액체배지 희석법을 이용하여 최소발육억제농도(MIC)를 측정하였다. MIC측정은 액체배지에 봉독을 넣고 2배로 단계희석한 후, 균의 최종 희석농도를 2.5×10^5 CFU/ml로 하여 24시간 배양 후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 배지의 탁도를 확인하였으며, 각 희석배수의 봉독과 균이 포함된 순수 배지액의 흡광도(optical density, OD)값과 같은 결과를 나타내는 최소 농도를 MIC로 결정하였다.

최소살균농도(MBC)를 측정하기 위하여 각 균주별로 측정된 MIC 농도 전후의 배양액 각 0.1 ml의 배양액을 고체배지에 균일하게 도말하여 37°C에서 24시간 배양 후 균의 발육 유무를 확인하여 최종 MBC를 결정하였다.

결과 및 고찰

호박벌 일벌독의 단백질 분석

꿀벌독과 일부 말벌독을 제외한 그 밖의 벌독에 대한 성분 분석과 그 생리활성에 대해서는 거의 밝혀지지 않았다. 뒤영벌 벌독에 대해서는 *B. terrestris*, *B. huntii*, *B. occidentalis*, *B. atratus*의 알려지에 대한 연구 중심으로

행해졌으며, 그 성분에 대한 구체적인 연구는 미진한 상태이다(Winninghan et al., 2004). 최근 국내에서도 환경농업의 하나로 화분매개 곤충으로 이용되는 뒤영벌이 실내에서 대량으로 인공사육이 가능해졌다(Yoon et al., 2004; Yoon et al., 2005). 또한, 국내 토종벌인 호박벌도 연중 실내 사육이 가능해짐에 따라 벌독의 성분과 그 생리활성 연구가 용이해졌다(Yoon et al., 2005).

Fig. 1은 호박벌의 일벌에서 분리한 벌독을 이미 성분이 밝혀진 꿀벌독과 함께 단백질 전기영동을 실시하여 silver staining한 결과이다. 꿀벌독과는 다른 단백질 양상을 보였다(Peiren et al., 2005). 호박벌 일벌독의 경우 4개의 주요 단백질을 확인할 수 있었으며, 그 중 2개의 단백질은 꿀벌독과 유사한 분자량 대에서 관찰되었다.

좀 더 상세한 단백질 분석을 위해 호박벌 일벌독을 이차 원전기영동을 시행하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 68개의 spot이 관찰되었고 그 중에서 가장 많은 함량을 차지하는 3개 spot에 대한 단백질 분석을 위해 단백질 서열 분석을 수행하였다(Fig. 3, Table 1). 약 29.46 kD의 분자량을 갖는 단백질이 가장 많은 함량을 차지하였으며, 30.88 kD, 44.77 kD의 분자량을 갖는 단백질 순이었다. 이들 단백질의 아미노산 서열을 분석하여 기존에 알려진 단백질과 비교하였으나, 추정되는 단백질의 기능에 대한 정보는 밝혀지지 않은 것으로 판단되었으며(Argiolas and Pisano, 1985; Pattanaargson and Roboz, 1996), 향후 이들 성분에 대한 기능 분석 및 특성 구명에 대한 연구가 필요하다(Murata et al., 2006; Roll and Schmid-Grendelmeier, 2005).

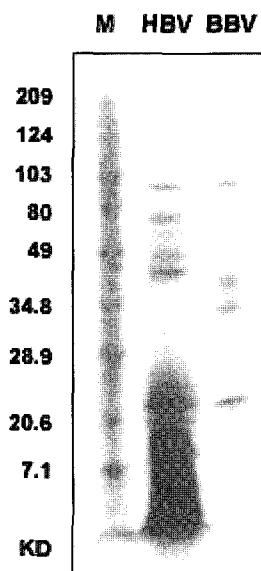


Fig. 1. Tris-glycine gel electrophoresis is 4-20% gradient gel. Gel was stained with Silver stain. Lane M, Bio-Rad molecular weight standard; lane HBV, Sigma whole honeybee venom; lane BBV, *B. ignitus* venom.

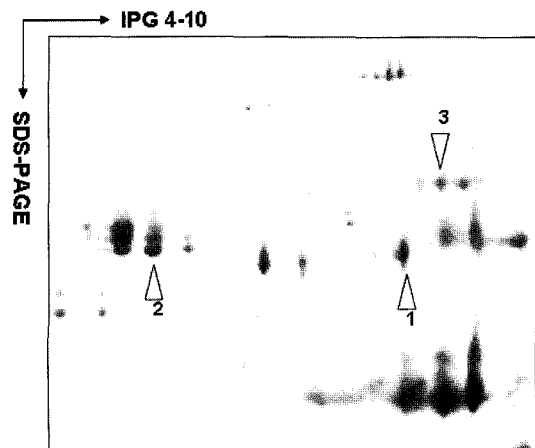


Fig. 2. Representative 2D-gel of stained with Coomassie Brilliant Blue G-250.

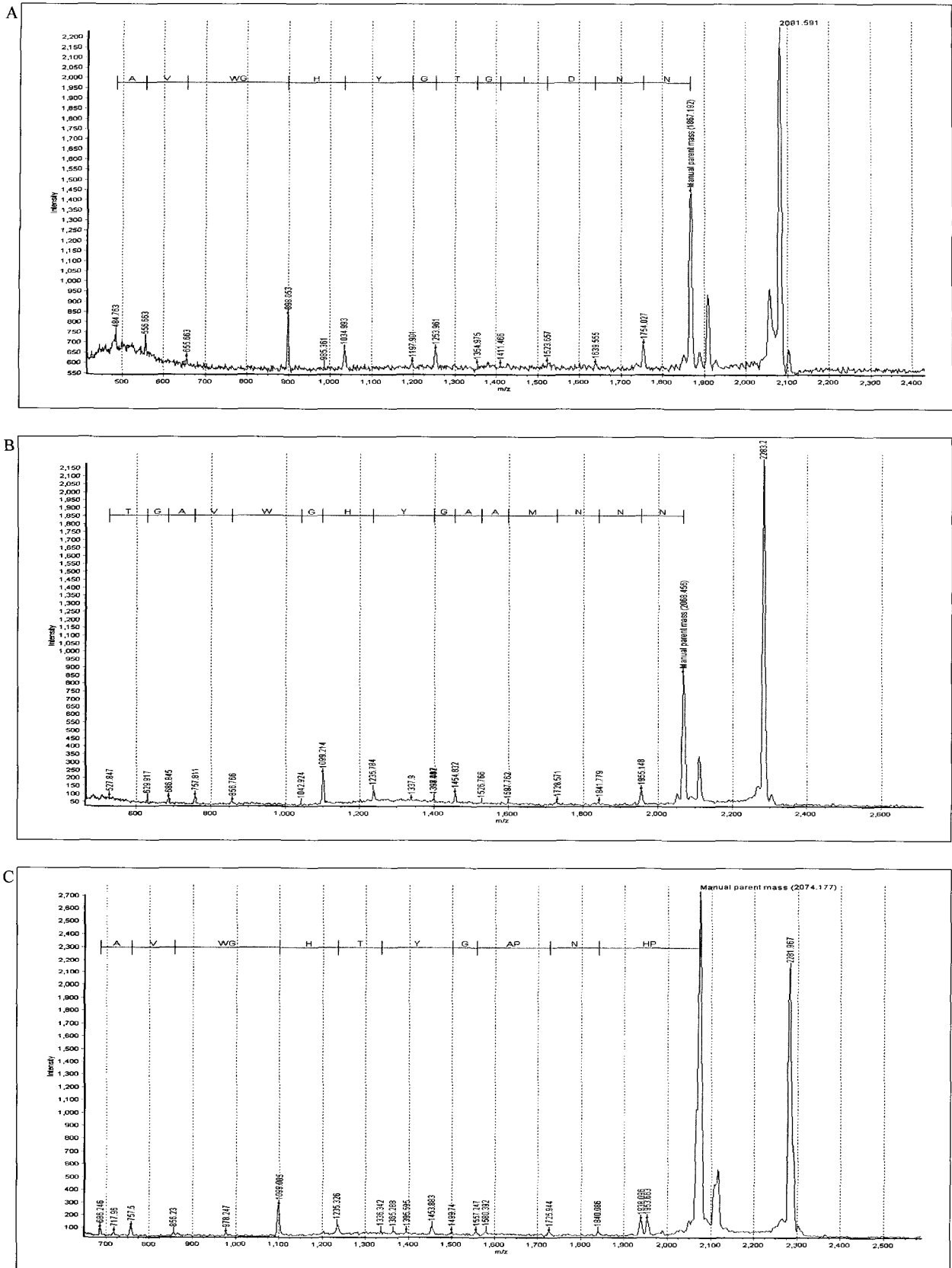


Fig. 3. MALDI-TOP analysis on the 2DE gels of the *B. ignitus* venom. A is spot number 1; B is spot number 2; C is spot number 3.

Table 1. Main protein identification on the 2DE gels of *B. ignitus* venom.

Spot number ^a	MW (Da) ^b	pI ^b	Peptide mass ^c	Peptide sequences ^d
1	29.46	7.88	1384	[LIN][DN]D[LI]GTGYHGWVA
2	30.88	4.80	1361	[LIN]FPGY[LI]GG[QE][LI]AGW
3	44.77	8.78	946	QVGC[LI]GQF[LIN]

^a Numbers refer to the spot numbers given in Fig. 2

^b Theoretical molecular weight (MW) and pI are calculated using the on-line ExPASy's Compute pI/MW program

^c Theoretical molecular mass of peptide.

^d Deduced peptide sequences obtained after LC-MS/MS analysis of the indicated spot.

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *B. ignitus* venom against bacteria tested

Gram	Strains	Strain number	MIC (ug/ml)	MBC (ug/ml)
+	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	256	512
+	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434	0.256	0.256
+	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	8	8
+	<i>Streptococcus intermedius</i>	ATCC 9895	128	128
+	<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	512	512
+	<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 9811	16	16
-	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	8	16
-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	16	16
-	<i>Salmonella typhimurium</i>	KCCM 40253	>512	>512
-	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 11060	0.256	0.256

암세포 생육 저해 효능

호박벌 일벌독의 암세포 생육 저해능을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 호박벌 일벌독은 인간의 유방암세포(BT-20), 폐암세포(A549) 및 위암세포(AGS)에 대한 생육 저해 효과를 보이지 않았다. 그러나 간암세포(Hep3B)에 대한 생육저해능은 시료가 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가하여, 100 ng/ml에서 55%로 가장 높게 나타났다. 호박벌 일벌독의 세포독성은 1 mg/ml 이내의 농도범위에서는 세포독성이 거의 없는 것으로 판단되어 이 농도 범위에서 암세포 성장 저해 효능을 검토하였다. 주목의 에탄올추출물이 인간의 간암세포에 대한 생육 저해능이 500 ng/ml의 시료농도에서 72%의 경우 72%, 수피는 87%, 그리고 뿌리에서 90%로 가장 높았음을 보고한 바 있다(Hwang et al., 1996). 본 실험의 결과는 이에 비해 저해율은 다소 낮았으나, 이는 처리농도 등에서 차이가 있었으므로 차후 암세포에 대한 효능을 다각적으로 검토하여야 할 것으로 생각되었다.

항균활성

호박벌 일벌독의 항균활성을 측정한 결과는 Table 2와

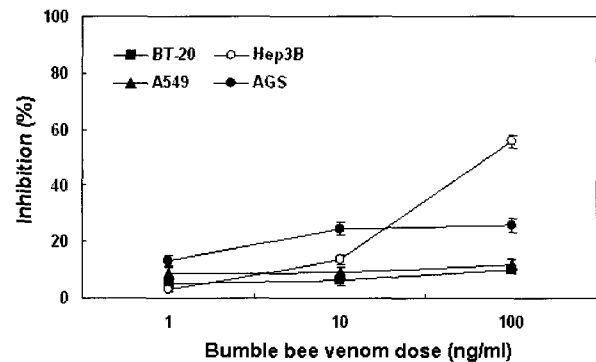


Fig. 4. Inhibition effects of the *B. ignitus* venom on the various human carcinoma cells. Hep-3B: human hepatocellular carcinoma, BT-2: human breast cancer, A549: human lung carcinoma, AGS: human gastric carcinoma.

같다. 호박벌 일벌독은 그람 양성균주에서는 *E. faecium* 과 *S. aureus*, *S. oralis*에 대하여 최소발육억제농도와 최소살균농도 모두 각각 0.256과 8, 16 ug/ml로 강한 항균활성을 나타내었으며, 이외의 균에 대해서는 비교적 미약한 항균활성을 갖는 것으로 보였다. 그람 음성균주에서는 *S. sonnei*, *E. coli*와 *P. aeruginosa*에 대한 최소발육억제농도가 각각 0.256, 8과 16 ug/ml이었으며, 최소살균농도는 각기 0.256, 16과 16 ug/ml로 강한 항균활성을 나타내었

으나, *S. typhimurium*에 대하여는 항균활성이 없는 것으로 생각되었다.

이상의 결과들로 호박벌 일벌 독의 성분은 꿀벌독과는 매우 다른 특성을 갖는 것으로 판단되었다. 따라서 각각의 성분에 대한 특성 및 기능, 생리활성에 대한 상세한 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

Literature Cited

- Abbadie, C. and J.M. Besson. 1994. Chronic treatments with aspirin or acetaminophen reduce both the development of polyarthrititis and Fos-like immunoreactivity in rat lumbar spinal cord. *Pain*. 57: 45-54.
- Argiolas, A. and J.J. Pisano. 1985. Bombolitins, a new class of mast cell degranulating peptides from the venom of the bumblebee *Megabombus pennsylvanicus*. *J. Biol. Chem.* 258: 13697-13702.
- Dunn, J.D. and J.J. Killion. 1988. Effect of melittin on pituitary-adrenal responsiveness to stress. *Acta. Endocrinol.* 119: 339-344.
- Free, J.B. 1993. *Insect pollination of crops*. 2nd ed., pp. 684. Academic Press, London.
- Gauldie, J., J.M. Hanson, R.A. Shipolini and C.A. Vernon. 1978. The structures of some peptides from bee venom. *Eur. J. Biochem.* 83: 405-410.
- Habermann, E. and K.G. Reiz. 1965. On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamin. *Biochem.* 343: 192-203.
- Heinrich, B. 1979. *Bumblebee economics*. pp. 245. Harvard University Press. Cambridge, Massa.
- Hwang, B.H., J.L. Zhao, K.P. Choi, S.W. Jung, E.J. Kim and S.S. Ham. 1996. The antimutagenic and anticancer effect of *Taxus cuspidata* extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 1062-1068.
- Kim, H.W., Y.B. Kwon, T.W. Ham, D.H. Rho, S.Y. Yoon, H.J. Lee, H.J. Han, I.S. Yang, A.J. Beitz and J.H. Lee. 2003. Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord for expression in rats. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 349-355.
- Lee, S.H. and L. Dumouhel. 1999. Taxonomic review of Genus *Bombus* (Hymenoptera, Apidae) from Korea. *Ins. Koreana* 16: 77-101.
- Masahiro, M. 2000. Pollination of crops with bumblebee colonies in Japan. *Honeybee Sci.* 21: 17-25.
- Moreau, S.J.M., A. Dingremont, G. Doury and P. Giordanengo. 2002. Effects of parasitism by *Asobara tabida* (Hymenoptera; Braconidae) on the development, survival and activity of *Drosophila melanogaster* larvae. *J. Insect Physiol.* 48: 337-347.
- Murata, K., T. Shinada, Y. Ohfune, M.H. Hisada, A. Yasuda, H. Naoki and T. Nakajima. 2006. Novel biologically active peptides from the venom of *Polistes rothneyi iwatai*. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 2493-2497.
- O'Connor, R., W. Rosenbrook and R. Erickson. 1964. Disc electrophoresis of Hymenoptera venoms and body proteins. *Science*. 145: 1320-1321.
- Pattanaargson, S. and J. Roboz. 1996. Determination of hyaluronidase activity in venoms using capillary electrophoresis. *Toxicol.* 34: 1107-1117.
- Peiren, N., F. Vanrobaeys, D.C. de Graaf, B. Devreese., J.V. Beeumen and F.J. Jacobs. 2005. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochem. Biophys. Acta* 1752: 1-5.
- Roll, A. and P. Schmid-Grendelmeier. 2005. Ultrarush immunotherapy in a patient with occupational allergy to bumblebee venom (*Bombus terrestris*). *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 15: 305-307.
- Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M.R. Boyd. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1112.
- Williams, P.H. 1998. An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Bull. Nat. Hist. Mus. (Ent.)* 6.
- Winningham K.M., C.D. Fitch, M. Schmidt and D.R. Hoffman. 2004. Hymenoptera venom protease allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114: 928-933.
- Yoon, H.J., S.E. Kim, K.Y. Lee, S.B. Lee and I.G. Park. 2005. Oviposition and colony development in the bumblebees, *Bombus ignitus* and *B. terrestris* depending on different pollen. *Int. J. Indust. Entomol.* 11: 99-105.
- Yoon, H.J., S.E. Kim, Y.S. Kim and S.B. Lee. 2004. Colony development characteristics of the bumblebee queen, *Bombus ignitus* by the first oviposition day. *Int. J. Indust. Entomol.* 8: 139-143.

(Received for publication July 25 2007;
accepted August 20 2007)