

## Safety of Nano-sized Bee Pollen in both *In-vitro* and *In-vivo* Models

Hae-In Pyeon<sup>1</sup>, Soojeong So<sup>2</sup>, Jia Bak<sup>1</sup>, Seunghyun Lee<sup>3</sup>, Seungmin Lee<sup>2</sup>, Hwa-Jin Suh<sup>2</sup>, Je-Oh Lim<sup>4</sup>, Jung-Woo Kim<sup>4</sup>, Sun Youn Kim<sup>5</sup>, Se Ra Lee<sup>5</sup>, Yong Hyun Lee<sup>5</sup>, Il Kyung Chung<sup>3</sup> and Yun-Sik Choi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Kyungsung University, Nam-Gu, Busan 48434, Korea

<sup>2</sup>Research Center, Natural Science Biotechnology Co., Ltd., Gyeongsan-Si, Gyeongsangbuk-Do 38542, Korea

<sup>3</sup>Department of Biotechnology, Daegu Catholic University, Kyeongsan-Si, Gyeongbuk 38430, Korea

<sup>4</sup>Nonclinical Research Institute, Chemon Inc, Yongin-Si, Gyeonggi-Do 17162, Korea

<sup>5</sup>Nonclinical Research Institute, Croen Inc, Suwan-Si, Gyeonggi-Do 16229, Korea

Received March 30, 2018 / Revised April 3, 2018 / Accepted April 4, 2018

Bee pollen has an outer wall which is resistant to both acidic and basic solutions and even the digestive enzymes in the gastrointestinal tract. Therefore, the oral bioavailability of bee pollen is only 10-15%. A previous study reported on wet-grinding technology which increased the extraction of active ingredients from bee pollen by 11 times. This study was designed to investigate the safety of wet-ground bee pollen. First, a single dose of wet-ground bee pollen was tested in both rats and beagle dogs at dosages of 5, 10, and 20 g/kg and 1.5, 3, and 6 g/kg, respectively. In rats, compound-colored stools were found in those administered 10 g/kg or more of wet-ground bee pollen. In beagle dogs, 6 g/kg of wet-ground bee pollen induced diarrhea in one male for four hours. However, no obvious clinical signs were found through the end of the experiment in rats and beagle dogs. In addition, no histological abnormality was found in all animals. The data indicates that a single dose of up to 20 g/kg of wet-ground bee pollen is safe. Next, the genetic toxicity of nano-sized bee pollen was tested. This study employed a bacterial reverse mutation test, a micronucleus assay, and a chromosomal aberration assay. In the micronucleus assay, there was no genetic toxicity up to the dosage of 2 g/kg. There was also no genetic toxicity in the bacterial reverse mutation test and chromosomal aberration assay. This data provides important information in developing nano-sized bee pollen into more advanced functional foods and herbal medicines.

**Key words** : Bacterial reverse mutation, bee pollen, chromosomal aberration, micronucleus assay, single dose toxicity

### 서 론

화밀(flower nectar)과 화분(pollen)은 벌의 주 영양공급원으로써 에너지와 아미노산, 비타민 등 다양한 성분을 제공한다[17]. 꽃에서 채집된 화분은 벌에 의해 화밀 그리고 구강 분비물과 혼합되어 벌 화분(bee pollen)을 형성한다[5, 7, 17]. 벌 화분은 벌집에 보관되며 젖산 발효를 거쳐 꿀벌의 식량(bee bread)으로 만들어진다[8, 17].

벌 화분은 중국은 물론 고대 이집트와 그리스에서도 의약품으로 이용되었고 현재는 여러 나라에서 대체의약품 또는 건강 보조식품으로 널리 이용될 만큼 많은 관심을 받고 있으며 다양한 질환에서 그 활성이 규명되고 있다[9]. 예를 들어, 벌 화분

은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)을 비롯한 다양한 세균에 대해 항균효과가 있으며[10, 12], 인플루엔자 바이러스에 존재하는 neuraminidase를 억제하는 것으로 보고되었다[15]. 해당화(*Rosa rugosa*)에서 유래한 벌 화분의 다당류는 대장암세포의 증식을 억제하였고[21], 오미자(*Schisandra chinensis*)에서 유래한 벌 화분은 cisplatin 또는 tetrachloride에 의한 간과 신장의 손상을 완화하였다[11, 22]. 또한, 이전의 보고에서 본 연구진은 나노 분쇄한 벌 화분에서 항산화 효과가 건조화분 대비 10배 이상 증가하고, 피부의 기능개선과 양성 전립선 비대증에 효과적임을 밝혔다[2, 6, 18]. 그 밖에도 벌 화분은 항염증, 항진균, 죽상경화증의 완화, 면역 조절 효과가 있는 것으로 알려져 있다[9, 19].

벌 화분의 효능에 대한 연구는 많이 진행되었으나, 독성에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다. 그러나, Boppré 등[4]의 발표에 따르면 *Echium vulgare* L.에서 유래한 벌 화분에서 간독성, 폐독성, 유전독성 및 발암성이 의심되는 1,2-dehydropyrollizidine alkaloids가 존재하는 것으로 알려졌다. 따라서, 건강에 대한 관심 증가로 화분 또는 벌 화분을 이용한 제품의 생산과 소비가 증가하고 있는 최근의 상황을 고려할 때, *in*

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-633-4890, Fax : +82-51-663-4809

E-mail : tiana@ks.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*vivo* 및 *in vitro* 조건에서 벌 화분의 독성을 규명하는 것이 매우 시급함을 알 수 있다.

본 연구에서는 비글견(Beagle dog)과 흰쥐에서 나노화 벌 화분을 과량, 단회 경구투여할 때 나타나는 독성을 조사하였다. 이를 통하여 나노화 벌 화분의 과량 투여에 의한 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 또한 유전독성 유발 가능성을 확인하기 위하여 소핵시험, 복귀돌연변이시험 및 염색체이상시험을 진행하였다. 모든 실험은 GLP 공인 인증 기관을 통하여 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

단회투여 독성시험은 흰쥐(Sprague Dawley, 수컷/암컷, 8 주령, ㈜오리엔트 바이오, 경기도, 대한민국) 또는 비글견(Beagle Dog, 5.5-6.5월령, ㈜오리엔트 바이오)을 이용하여 진행하였다. 실험에 사용한 동물들은 온도(23±3℃) 및 습도(55±15%), 환기횟수(10-20회/hr), 빛 조절 환경(오전 8시 점등, 오후 8시 소등) 및 조도(150-300 Lux)에서 사육하였다. 사료는 흰쥐의 경우 Teklad certified irradiated global 18% protein rodent diet (2918C, ENVIGO, UK)를 자유섭취하도록 하였고 비글견의 경우 ㈜카길 에그리 퓨리나(경기도, 대한민국)에서 생산하는 실험동물용 개사료를 매일 약 300 g씩 제한급여 하였다. 단회투여 독성시험은 GLP 인증 비임상연구소 실험동물 운영위원회의 승인을 받아 진행되었다(17-R053, 17-D073). 소핵시험은 생쥐(ICR, 수컷/암컷, 8 주령, ㈜오리엔트바이오)를 이용하였다. 실험에 사용한 생쥐들은 온도(21.36~23.56℃) 및 습도(40.02~42.71%), 환기횟수(20회 이상/hr), 빛 조절 환경(오전 8시 점등, 오후 8시 소등) 및 조도(150-300 Lux)에서 사육하였다. 사료는 Chales River Rat and Mouse 18% (5L79, LabDiet, MA, USA)를 섭취하도록 하였다. 소핵시험은 GLP 인증 비임상연구소 실험동물운영윤리위원회의 승인을 받아 진행되었다(17M040).

### 흰쥐에서 나노화 벌 화분 투여

화분의 나노화 공정은 이전의 보고에 따라 진행되었다[6]. 구체적으로, 벌 화분을 멸균 증류수를 이용하여 15% 농도로 맞추고 Rotate Mill (Ilsin Nanotechnology Co., Ltd., Japan)을 이용하여 5 시간 동안 분쇄하였다. 나노 분쇄물의 입자를 현미경으로 확인하여 충분히 분쇄된 것을 확인한 후 실험에 사용하였다. 예비시험으로 흰쥐에 나노화 벌 화분을 10 g/kg 및 20 g/kg의 용량으로 암수 각 1마리에 투여한 결과 사망동물 및 이상증상이 관찰되지 않았다. 이 결과를 바탕으로 20 g/kg을 고용량군으로 설정하고 아래로 공비 2로 2개의 군을 추가하여 5 g/kg, 10 g/kg 그리고 20 g/kg 투여군으로 나누었다. 대조군으로는 멸균주사용수를 투여하였다. 약물은 1일 2회(약

2시간 간격)으로 경구투여 하였다. 투여 전에 하룻밤 절식시켜 위 내용물을 비웠고 마지막 시험물질 투여 후 약 3-4시간 후에 사료를 급여하였다.

### 비글견에서 나노화 벌 화분 투여

비글견에 나노화 벌 화분을 투여하기 위하여 동물 체중을 정량한 후 투여할 중량의 나노화 벌 화분을 경구투여용 젤라틴 캡슐에 충전하였다. 캡슐에 충전하는 작업은 투여 직전에 수행하였다. 비글견의 예비시험으로는 암수 각 1마리에 1.5 g/kg, 3 g/kg 그리고 6 g/kg의 용량으로 단회 투여한 결과 일반증상 및 체중변화에 영향이 없었다. 이러한 결과를 바탕으로 1차 투여의 용량을 1.5 g/kg, 2차 투여의 용량은 3 g/kg 그리고 3차 투여의 용량을 6 g/kg으로 설정하였다. 나노화 벌 화분은 1 회/일, 7일 간격으로 총 3차에 걸쳐 투여하였고 투여 전에 하룻밤을 절식시킨 후 캡슐을 혀의 안쪽에 넣고 입을 다물게 한 다음, 인후두부를 부드럽게 쓰다듬어 삼키도록 하였다. 사료는 투여 약 4시간 후 급여하였다.

### 체중 및 일반증상 관찰

흰쥐에서는 Day 1 (투여 직전), 2, 4, 8 및 15일에 체중을 측정하였다. 일반증상은 모든 동물에 대하여 15일 동안, 매일 1 회 이상 관찰하였고, 투여 당일에는 마지막 투여 후 1시간까지는 지속적으로 관찰하여 그 변화를 기록하고 그 후부터는 1시간 간격으로 5시간 동안 관찰하였다. 비글견에서는 1, 2차 투여 시에는 Day 1 (투여 직전), 4, 7일에, 3차 투여 시에는 Day 1 (투여 직전), 2, 4, 8 및 15일에 체중을 측정하였다. 비글견에서도 모든 동물에 대하여 매일 1회 이상 증상관찰을 실시하였다. 단, 투여당일은 투여 후 1시간까지는 지속적으로 관찰하였고, 그 후부터는 1시간 간격으로 5시간 동안 관찰하였다.

### 부검 및 검사

흰쥐는 Day 15에 모든 생존동물을 이산화탄소를 이용하여 안락사 시킨 후 개복하여 후대정맥 및 복대동맥을 절단하여 방혈치사시켜 육안으로 모든 장기를 검사하였다. 비글견은 3차 투여 15일 후에 모든 생존동물을 thiopental sodium으로 마취시킨 후 액와동정맥을 절단하여 방혈, 안락사시키고 육안으로 모든 장기를 검사하였다. 흰쥐와 비글견에서 육안관찰 시 이상이 관찰되면 조직을 고정, 조직병리학적 검사를 실시하는 것으로 계획되어 있었으나 모든 동물에서 이상이 발견되지 않아 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

### 소핵시험

생쥐에 나노화 벌 화분을 500, 1,000 또는 2,000 mg/kg 용량(10 ml/kg)으로 2회 경구투여 하였다. 음성대조군은 부형제를 경구로 투여하였으며 양성대조군은 mitomycin C를 1 mg/kg 용량으로 복강 내 주사하였다. 투여 후 약 24시간 후에 이산화

탄소로 안락사 시킨 후 대퇴골을 적출하고 양 끝단을 제거한 후 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)을 관류시켜 골수세포를 채취하였다. 골수세포 부유액을 1,000 rpm으로 5분 간 원심분리시킨 후 침전된 골수세포를 슬라이드에 도말하였다. 도말된 골수세포를 methanol로 고정된 후 5% Giemsa 염색액으로 약 20분 간 염색하였다. 염색한 검체를 GURR buffer, pH6.8와 0.004% citric acid를 이용하여 세척한 후 공기중에 건조시켰다. 건조된 슬라이드를 커버글라스를 이용하여 봉입한 후 1,000배 배율의 현미경(Eclipse E200, Nikon, Japan)으로 분석하였다.

**복귀돌연변이시험**

나노화 벌 화분의 복귀돌연변이원성을 확인하기 위하여 히스티딘 요구성 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537)과 트립토판 요구성 *Escherichia coli* [WP2 *uvrA*(pKM101)] 균주를 이용하였다. 대사활성계는 S9 Mix (Molecular Toxicology, Inc. NC, USA: S9 Mix 1 ml 중 rat liver S9 fraction 50 µL, 0.4 M MgCl<sub>2</sub>, 1.65 M KCl, 1M glucose-6-phosphate, 0.1 M NADP, 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 7.4)를 이용하였다. 나노화 벌 화분의 용량은 예비 실험 결과 침전이 확인된 최저용량인 1,250 µg/plate을 최고용량으로 공비 2의 5단계로 설정하였다. 대사활성계 존재하 및 부재하에서 모든 균주의 콜로니 수를 측정하였고 양성대조물질로는 sodium azide (Sigma-Aldrich, Saint Louise, MO, USA), 2-nitrofluorene (Sigma-Aldrich), 2-aminoanthracene (Sigma-Aldrich), benzo[a]pyrene, 9-aminoacridine (Sigma-Aldrich), 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (Wako, Japan)를 이용하였다.

**염색체이상시험**

나노화 벌 화분에 의한 염색체 이상 유발 여부를 Chinese hamster lung (CHL) 세포를 이용하여 확인하였다. 이를 위해 침전이 확인된 최저용량인 7.81 µg/ml를 본 시험의 최고용량으로 하고 공비 2의 총 3용량으로 시험농도로 설정하였다. 세포는 10% FBS를 포함하는 MEM (Eagle’s minimum essential medium, Gibco, Langley, OK) 배지를 이용하여 배양하였다. 대사활성계 존재하 및 부재하에서 시험물질 또는 대조물질을 첨가하여 세포를 배양하였다. 배양 종료 약 2시간 전에 Colcemid (최고용량 0.25 µg/ml) 용액을 처리하였다. 배양 종료 후 0.05% trypsin-RDTA 용액을 처리하여 세포를 분리한 후 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1)을 넣고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 냉각된 고정액을 첨가하고 2,000 rpm에서 5분 간 원심분리 과정을 2회 반복한 후 세포 부유액을 슬라이드 글라스에 떨어뜨려 슬라이드 표면을 제작하였다. 표본은 건조 후 5% Giemsa 염색액으로 20분간 염색하고 1,000배 현미경으로 염색체의 구조이상과 수적이상을 분석하였다.

**통계 분석**

실험 결과는 SPSS Statistics 22 for Medical Science를 이용하여 분석하였으며 유의수준은  $p < 0.05$ 로 설정하였다.

**결 과**

**일반 증상 관찰 결과**

먼저, 본 실험에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 그러나, Table 1에 제시된 바와 같이 10 mg/kg 이상의 용량을 투여한

Table 1. Clinical signs following nano-sized bee pollen administration in rats

Day	Signs	Clinical signs			
		Groups (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (5,000)	G3 (10,000)	G4 (20,000)
Male					
1	Normal	5 / 5	5 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5
2-14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Female					
1	Normal	5 / 5	5 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5
2-14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

The day of administration was designated Day 1.  
 Number of animals with the sign / Number of animals examined.

흰쥐에서는 색변(compound-colored stool)이 관찰되었다. 이러한 현상은 실험동물을 하룻밤 절식시켜 위 내용물을 배출시킨 후 과용량의 나노화 벌 화분을 투여하여 배설된 변이 벌 화분의 색을 나타낸 것으로 판단된다. 반면 비글견에서는 Table 2에 나타난 바와 같이 6 g/kg 투여군 수컷 1례에서 투여 후 약 4시간 췌 설사가 관찰되었다. 그 외, 3 g/kg 투여군 암컷에서 Day 3 또는 7에, 6 g/kg 투여군 암컷에서 Day 13-15에 사료냄김이 관찰되었으나, 비글견에서 관찰될 수 있는 수준으

로 판단되었다.

**체중 변화**

나노화 벌 화분 투여에 의한 체중 변화를 관찰하였다. 먼저 흰쥐에서는 20 g/kg 투여군 수컷에서 Day 2에 대조군 대비 약 5.4% 증가하였다(Fig. 1A). 이러한 결과는 통계적으로 유의한 차이를 나타냈으나 일시적으로 관찰되었고 그 이후로는 유의한 차이를 보이지 않았다. 반면 암컷 흰쥐에서는 약물 투

Table. 2. Clinical sings following nano-sized bee pollen administration in beagle dogs

Clinical signs [1 <sup>st</sup> ]			
Group (mg/kg)	Animal ID	Signs	Observed on
Male			
G1 (1,500)	1	Normal	Day 1 (0.5-6 hrs), 2-7
	2	Normal	Day 1 (0.5-6 hrs), 2-7
Female			
G1 (1,500)	3	Normal	Day 1 (0.5-6 hrs), 2-7
	4	Normal	Day 1 (0.5-6 hrs), 2-7

Days are those from the 1<sup>st</sup> dosed Day (Day 1).

Clinical signs [2 <sup>nd</sup> ]			
Group (mg/kg)	Animal ID	Signs	Observed on
Male			
G1 (3,000)	1	Normal	Day 1 (0.5-6 hrs), 2-7
	2	Normal	Day 1 (0.5-6 hrs), 2-7
Female			
G1 (3,000)	3	Normal Remaining of food	Day 1 (0.5-6 hrs), 2, 4-7 Day 3
	4	Normal Remaining of food	Day 1 (0.5-6 hrs), 2-6 Day 7

Days are those from the 2<sup>nd</sup> dosed Day (Day 1).

Clinical signs [3 <sup>rd</sup> ]			
Group (mg/kg)	Animal ID	Signs	Observed on
Male			
G1 (6,000)	1	Normal Terminal sacrifice	Day 1 (0.5-6hrs), 2-15 Day 15
	2	Normal Diarrhea Terminal sacrifice	Day (0.5-3, 5-6 hrs), 2-15 Day1 (4hr) Day15
Female			
G1 (6,000)	3	Normal Remaining of food Terminal sacrifice	Day 1 (0.5-6 hrs), 2-12 Day 13-15 Day 15
	4	Normal Remaining of food Terminal sacrifice	Day 1 (0.5-6 hrs), 2-12 Day 13-15 Day 15

Days are those from the 3<sup>rd</sup> dosed Day (Day 1).

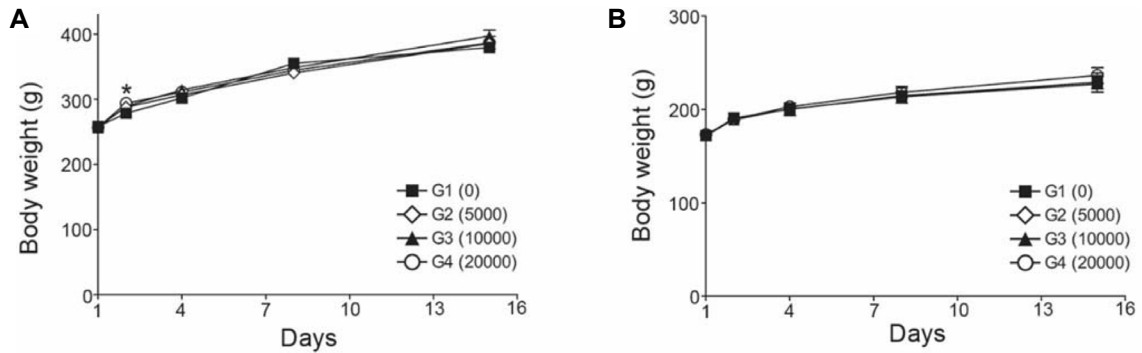


Fig. 1. Body weight change in rats. Nano-sized bee pollen was administered at Day 1 and body weight was monitored for 14 days in male (A) and female (B). Data were represented as mean ± SEM (n=5). \*  $p < 0.05$  compared to vehicle treated control.

여 전 기간에 걸쳐 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1B). 비글견에서는 군 별로 동물 수가 충분하지 않아 통계 분석을 진행하지 않았으나 수컷 보다는 암컷에서 체중이 더 증가하는 양상을 보였다(Table 3).

**부검 소견**

흰쥐는 약물 투여 15일 후에, 그리고 비글견은 3차 약물 투여 15일 후에 안락사시켜 장기의 이상 유무를 조사하였다. Table 4과 5에 나타난 바와 같이 나노화 벌 화분 투여에 의해 흰쥐와 비글견에서 특이적인 장기의 이상은 관찰되지 않았다. 따라서 조직에 대한 병리학적 검사는 진행하지 않았다.

**소핵시험**

나노화 벌 화분의 유전독성 유발 가능성을 소핵시험, 복귀돌연변이시험 및 염색체이상시험을 통해 조사하였다. 먼저 염색체이상 유발 또는 유사분열기구에 대한 이상 유발 여부를 생쥐 골수세포에서의 소핵 유발성을 지표로 조사하였다. 이를 위하여 생쥐에 나노화 벌 화분을 500, 1,000 또는 2,000 mg/kg 용량으로 경구투여 하였고 양성 대조군에는 mitomycin C를 1mg/kg 용량으로 복강 내 주사하였다. 약물 투여 24시간 후에 대퇴골에서 골수세포를 채취하여 Giemsa 염색액으로 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 mitomycin C 투여군에서는 4,000개의 적혈구 당 소핵다염적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte)가 평균 66.4개가 관찰되었다. 그러나 500, 1,000, 그리고 2,000mg/kg의 나노화 벌 화분 투여군에서는 각각 평균 1.0, 0.6, 그리고 1.2개의 소핵다염적혈구가 관찰되었고 이는 음용수를 투여한 음성 대조군(1.4개)과 차이를 보이지 않았다(Table 6).

**복귀돌연변이시험**

복귀돌연변이시험은 히스티딘 요구성 시험균주(*Salmonella typhimurium*)와 트립토판 요구성 시험균주(*Escherichia coli*)를 이용하여 진행하였다. 실험에 사용한 나노화 벌 화분의 농도는 1,250 µg/plate를 최고 농도로 하고 공비 2의 5단계로 설정

하여 실험하였다. Fig. 2에 제시된 바와 같이 나노화 벌 화분은 대사활성계 존재하 및 부재하의 모든 균주에서 음성대조군과 비교하여 복귀돌연변이 콜로니수의 용량의존적인 증가가 관찰되지 않았다. 반면에 양성대조물질인 sodium azide (SA), 2-nitrofluorene (2-NF), 2-aminoanthracene (2-AA), benzo[a]pyrene (B[a]P), 9-aminoacridine (9-AA) 및 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2)는 현저하게 복귀돌연변이 콜로니수를 증가시켰다. 따라서 나노화 벌 화분은 표준시험법으로 이용되는 박테리아 균주에서 복귀돌연변이를 유발하지 않음을 알 수 있다.

**염색체이상시험**

나노화 벌 화분의 염색체 이상 유발 여부를 China hamster lung (CHL) 세포를 이용하여 조사하였다. 이를 위하여 나노화 벌 화분을 6시간 또는 24시간 처리하고 Giemsa 염색 후 염색체 구조이상(structural aberration)과 수적이상(numerical aberration)을 관찰하였다. 구조이상은 염색체(chromosome) 및 염색분체(chromatid)의 결손(gap), 절단(break), 교환(exchange) 및 조각(fragment)을 분석하였고 수적이상은 배수성(polyploidy) 및 핵내배화(endoreduplication)의 빈도를 평가하였다. 그 결과 음성대조군과 나노화 벌 화분 1.95, 3.91 및 7.81 µg/ml에서 구조적 이상 빈도는 1% 미만으로 확인되었으며 이는 나노화 벌 화분 투여에 의해 구조적 이상 빈도가 증가하지 않았음을 보여준다. 반면 benzo[a]pyrene과 mitomycin C를 양성대조물질로 사용한 군에서는 염색체의 구조적 이상빈도가 14.3~17.3%로 유의하게 증가하였다. 또한, 나노화 벌 화분에 의한 수적이상 빈도도 음성대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 나노화 벌 화분이 염색체이상을 유발하지 않음을 보여준다(Table 7).

**고찰**

벌 화분은 풍부한 영양성분과 다양한 생리활성을 갖고 있어 수 세기에 걸쳐 전통의학과 식품으로 사용되어져 왔다[14]. 독

Table 3. Body weight change in beagle dogs

		Body weights (kg) [1 <sup>st</sup> ]					
Group (mg/kg)	Animal ID	Day 1	Day 4	Day 7	Gain		
		Male					
G1 (1,500)	1	8.58	8.78	8.78	0.20		
	2	8.38	8.52	8.54	0.16		
		Female					
G1 (1,500)	3	7.56	7.78	7.92	0.36		
	4	7.88	8.18	8.32	0.44		
		Body weights (kg) [2 <sup>nd</sup> ]					
Group (mg/kg)	Animal ID	Day 1	Day 4	Day 7	Gain		
		Male					
G1 (3,000)	1	8.86	8.86	8.88	0.02		
	2	8.58	8.56	8.74	0.16		
		Female					
G1 (3,000)	3	7.86	8.10	8.16	0.30		
	4	8.06	8.40	8.36	0.30		
		Body weights (kg) [3 <sup>rd</sup> ]					
Group (mg/kg)	Animal ID	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Gain
		Male					
G1 (6,000)	1	8.88	9.08	8.92	9.14	9.10	0.22
	2	8.62	8.68	8.76	8.98	8.90	0.28
		Female					
G1 (6,000)	3	8.16	8.28	8.22	8.72	8.88	0.72
	4	8.30	8.56	8.52	8.72	8.46	0.16

The day of each administration was designated as Day 1.

Gain is body weight on Day 7 - body weight on 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> dosed Day or body weight on Day 15 - body weight on 3<sup>rd</sup> dosed Day.

Table 4. Necropsy findings in rats

		Necropsy findings			
Organs	Findings	Groups (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (5,000)	G3 (10,000)	G4 (20,000)
		Male			
No gross findings		5	5	5	5
	N	5	5	5	5
		Females			
No gross findings		5	5	5	5
	N	5	5	5	5

일의 보건국(Federal Board of Health)에서는 벌 화분을 공식적으로 의약품으로 인정했으며 중국에서는 다양한 질병에서 사용이 추천되고 있다[16, 20]. 미국에서도 1994년에 제정된 건강기능식품법(Dietary Supplement Health and Education Act)에 벌 화분이 건강보조식품(Dietary supplement)으로 정의되어 있다[14]. 이에 따라 미국과 유럽은 물론 전 세계적으로

벌 화분의 추출물을 포함하는 다양한 제품들이 이미 판매되고 있으며 동아시아를 비롯한 일부 지역에서는 생화분이나 건조 화분 형태로도 흔히 섭취하고 있다.

꿀벌이 모아 온 벌 화분은 작은 구형의 물질로써 표면은 물리적, 화학적으로 매우 안정한 외피로 둘러싸여 있다. 지금까지의 연구 결과에 따르면 벌 화분의 외피는 산이나 알칼리,

Table 5. Necropsy findings in beagle dogs

Necropsy findings			
G1 (1,500→3,000→6,000 mg/kg)			
Animal ID	Fate	Location	Findings
Male			
1	Terminal sacrifice		No gross findings
2	Terminal sacrifice		No gross findings
Female			
3	Terminal sacrifice		No gross findings
4	Terminal sacrifice		No gross findings

Table 6. Results of micronucleus assay

Test substance	Water	Bee pollen (mg/kg)			MMC
		500	1,000	2,000	
PCE/(PCE+NCE)	0.486 ± 0.008	0.513 <sup>#</sup> ± 0.014	0.494 ± 0.012	0.502 ± 0.019	0.514 <sup>#</sup> ± 0.022
MNPCE/4,000PCE	1.4 ± 0.89	1.0 ± 0.71	0.6 ± 0.55	1.2 ± 0.45	66.4* ± 5.18

PCE: Polychromatic erythrocyte  
 NCE: Normochromatic erythrocyte  
 MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte  
 MMC: Mitomycin C

\*: Significantly different from negative control by Fisher’s exact test ( $p < 0.05$ )  
 #: Significantly different from negative control by Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

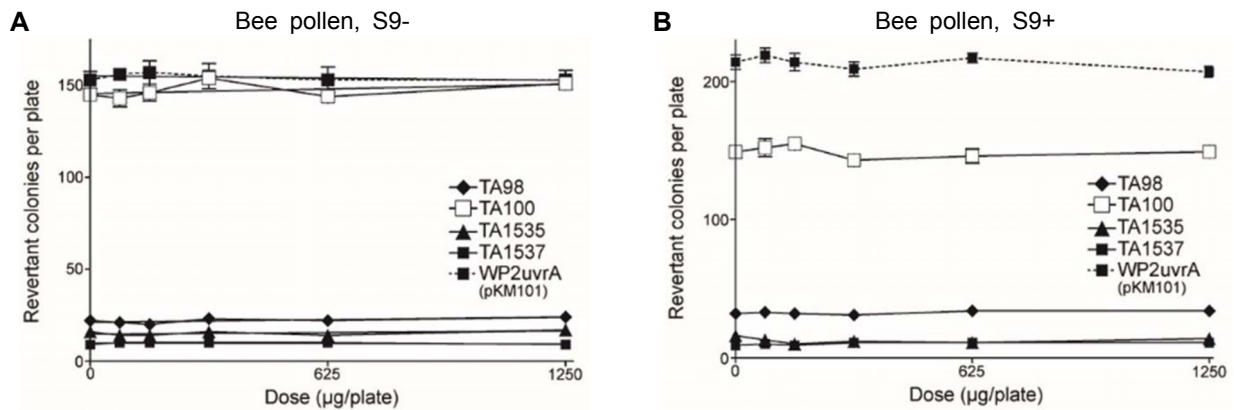


Fig. 2. Reversion by nano-sized bee pollen. Dose-response curve of revertant colony numbers of differential bacterial strains in the absence (A) or in the presence of metabolic activation system (B). As positive controls SA for TA100, TA1535 strains in S9 mix-negative condition, 2-NF for TA98 strain in S9-negative condition, 2-AA for TA98, TA1535, TA1537, and WP2uvrA strains in S9-positive condition, B[a]P for TA100 strain in S9-positive condition, 9-AA for TA1537 strain in S9-negative condition, and AF-2 for WP2uvrA strain in S9-negative condition were used. In case of positive control, the numbers of revertant colonies in the absence of metabolic activation were 180±8, 507±16, 560±62, 242±34 and 994±54 for TA98, TA100, TA1535, TA1537 and WP2uvrA, respectively, and the numbers of revertant colonies in the presence of metabolic activation were 132±8, 652±51, 111±10, 116±17, and 1,110±31 for TA98, TA100, TA1535, TA1537 and WP2uvrA, respectively. Data were represented as mean ± S.D. (n = 3).

동물의 소화 효소는 물론 물리적 스트레스 또는 압력에 의해서도 잘 파괴되지 않는다[3]. 이러한 구조적, 물리적 특성으로 인하여 생화분이나 건조화분을 경구로 섭취할 때, 발아공 (germinal pore)을 통하여 삼투현상에 따라 내부의 활성성분

이 유출되어 흡수되므로 생체이용률은 10-15%에 불과한 것으로 알려져 있다[13]. 이에 따라 성인에서 충분한 생리활성을 얻기 위해서는 하루에 약 20-40 g의 벌 화분을 섭취하는 것을 권장하고 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 최근에 본 연

Table 7. Result of chromosomal aberration assay

Test article	S9 mix	Dose (µg/ml)	No. of cell analyzed	Structural aberrations			Numerical aberrations	
				Gap(-) aberration cell(%)	Gap(+) aberration dell(%)	Total normal cell	Aberration cell(%)	Total normal cell
Dimethyl Sulfoxide		0	300	0.0	0.0	300	2.0	294
Bee pollen	+	1.95	300	0.0	0.7	298	2.0	294
		3.91	300	0.0	0.0	300	0.7	298
		7.81	300	0.3	0.3	299	1.7	295
B[a]P		20	300	16.7*	17.3	248	1.0	297
Dimethyl Sulfoxide		0	300	0.3	0.3	299	2.0	294
Bee pollen	-	1.95	300	0.0	0.3	299	1.7	295
		3.91	300	0.3	0.3	299	2.0	294
		7.81	300	0.0	0.0	300	1.0	297
MCC		0.1	300	16.7*	16.7	250	0.3	299
Dimethyl Sulfoxide		0	300	0.3	0.3	299	0.3	299
Bee pollen	-	1.95	300	0.0	0.0	300	1.0	297
		3.91	300	0.0	0.0	300	0.7	298
		7.81	300	0.0	0.0	300	1.3	296
MMC		0.1	300	14.3*	15.0	255	0.0	300

B[a]P: Benzo[a]pyrene

MMC: Mitomycin C

\*:  $p < 0.05$ , significant differences between control and treatment group by Fisher's exact

구진은 습식나노공정을 도입하였다[6]. 구체적으로 보면, 습식 나노공정을 1.5시간 동안 진행했을 때 분쇄된 벌 화분 입자의 평균 크기가 887.7 nm에서 207.2 nm로 감소하였고 총 폴리페놀 함량은 단순 분쇄한 화분과 비교할 때, 3시간 동안의 나노분쇄에 의해 약 11.9배 증가하였다. 특히, 항산화 활성은 ABTS assay로 측정 결과 약 6.8배, DPPH radical 제거 활성 측정 결과 약 3.2배 증가하였다. 이러한 결과는 나노화 벌 화분이 생리활성성분의 추출을 극대화 할 수 있으므로 동일한 양을 섭취할 때 효과가 크게 향상될 수 있음을 의미한다. 그러나, 습식나노공정에 따라 활성성분의 추출이 극대화되는 반면 화분에 있을 수 있는 독성 물질의 추출도 함께 증가할 것으로 생각된다. 이에 따라 기존에는 하루에 20-40 g의 화분 섭취가 권장되었으나, 나노화 벌 화분은 같은 용량을 투여했을 때 안전성 면에서 우려가 있을 수 있다.

이러한 우려를 반영하여 본 연구에서는 먼저 반복투여 독성 연구에 앞서 단회로 투여할 수 있는 용량을 알아보고자 하였다. 본 연구에서 투여된 용량은 최대 20 g/kg에 달한다. 임상에서 현재 사용되는 용량은 성인 기준 최대 40 g이므로, 성인의 체중을 70 kg으로 가정할 때 약 0.57 g/kg에 해당한다. 따라서, 비록 사람과 설치류에서 약동학적 특성이 다를 수 있으나, 본 연구에서 투여한 최대 용량은 성인에서 사용되는 최대량의

약 35배에 해당한다. 그러나, 해당 용량에서도 흰쥐에서 색변을 제외하고는 특별한 이상증상이 발견되지 않았다. 이러한 결과는 나노화 벌 화분이 생리활성의 극대화가 가능한 물론, 매우 안전한 전통의약품 또는 식품으로 이용이 가능함을 보여준다.

특이한 점으로는 20 g/kg 용량의 나노화 벌 화분을 투여군 수컷 흰쥐에서 체중이 Day 2에 대조군 대비 약 5.4% 증가하였다. 이러한 현상은 Day 4에는 유의한 차이를 보이지 않았으므로 일시적으로 나타난 현상일 수 있다. 그러나 최근의 보고에 의하면 5 g/kg 용량의 벌 화분을 일본 메추라기에게 장기적으로 투여할 때, 대조군에 비해 체중이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다[1]. 이러한 결과는 나노화 벌 화분이 고용량에서 체중 증가 효과를 유도할 수 있는 것으로 볼 수 있으나 그 효과를 증명하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

건강기능식품 또는 의약품으로 인정받기 위해서는 동물에서의 독성연구와 함께 유전독성 유발 여부를 반드시 확인해야 한다. 따라서 본 연구에서는 식품의약품안전처의 가이드라인에 따라 소핵시험, 복귀돌연변이시험, 그리고 염색체이상시험을 GLP 인증기관에 의뢰하여 진행하였다. 유전독성 시험에서 복귀돌연변이시험과 염색체이상시험은 배양된 세균 또는 세



포에서 진행되므로 먼저 배양액에 녹을 수 있는 최대 농도를 확인하였다. 이를 위하여 진행된 예비실험에서 침전이 확인된 최저용량인 7.81 µg/ml, 또는 1,250 µg/plate를 각각 복귀돌연변이 시험과 염색체 이상시험의 최고용량으로 하여 농도 의존적으로 유전독성 유발 여부를 확인하였다. 그 결과 진행된 3 종류의 유전독성시험 모두에서 나노화 별 화분은 사용된 최대 농도에서도 유전독성을 유발하지 않음을 확인하였다.

이상의 내용을 종합하면, 흰쥐와 비글견에서 단회로 경구투여할 때 각각 최대 20 g/kg과 6 g/kg에서 뚜렷한 체중의 변화와 독성으로 의심할 만 한 일반 증상이 발견되지 않았다. 또한 나노화 별 화분 투여 2주 후 부검 소견에서도 독성으로 보일만한 장기의 이상이 발견되지 않았다. 이와 더불어 식품의약품안전처의 가이드라인에 따른 소핵시험, 복귀돌연변이시험, 그리고 염색체이상시험에서 나노화 별 화분은 유전자 변이를 유발하지 않음을 확인하였다. 따라서 나노화 별 화분은 현재 성인에서 사용되는 용량의 약 35배 용량에서도 매우 안전하며 기능성식품 또는 의약품으로 개발하기에 충분한 안전성을 확보한 원료로 볼 수 있다.

## 감사의 글

이 논문(저서)은 2015년 경상북도와 경북과학기술진흥센터의 창조경제선도기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임(SF315011A).

## References

- Babaei, S., Rahimi, S., Karimi Torshizi, M. A., Tahmasebi, G. and Khaleghi Miran, S. N. 2016. Effects of propolis, royal jelly, honey and bee pollen on growth performance and immune system of Japanese quails. *Vet. Res. Forum.* **7**, 13-20.
- Bak, J., Pyeon, H. I., So, S., Lee, S., Lee, S., Suh, H. J., Kang, J. S., Choi, Y. S. and Chung, I. K. 2018. Beneficial effects of nano-sized bee pollen on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rodents. *J. Life Sci.* **28**, 465-471.
- Bogdanov, S. 2015. Pollen: production, nutrition and health: A review. *www.bee-hexagon.net*.
- Boppré, M., Colegate, S. M. and Edgar, J. A. 2005. Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 594-600.
- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C. and Ferreira, F. 2008. Pollen composition and standardization of analytical methods. *J. Apicult. Res.* **47**, 154-161.
- Choi, Y. S., Suh, H. J. and Chung, I. K. 2016. Enhanced extraction of bioactive compounds from bee pollen by wet-grinding technology. *J. Life Sci.* **26**, 651-656.
- De Arruda, S. V. A., Pereira, A. A. S., Estevinho, L. M. and de Almeida-Muradian, L. B. 2013. Presence and stability of B complex vitamins in bee pollen using different storage conditions. *Food Chem. Toxicol.* **51**, 143-148.
- De Grandi-Hoffman, G., Eckholm, B. J. and Hua-Huang, M. 2013. A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. *Apidologie* **44**, 52-63.
- Denisow, B. and Denisow-Pietrzyk, M. 2016. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *J. Sci. Food Agric.* **96**, 4303-4309.
- Fatrcová-Šramková, K., Nôžková, J., Máriássyová, M. and Kačániová, M. 2016. Biologically active antimicrobial and antioxidant substances in the *Helianthus annuus* L. bee pollen. *J. Environ. Sci. Health B.* **51**, 176-181.
- Huang, H., Shen, Z., Geng, Q., Wu, Z., Shi, P. and Miao, X. 2017. Protective effect of *Schisandra chinensis* bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. *Biomed. Pharmacother.* **95**, 1765-1776.
- Kačániová, M., Rovná, K., Arpášová, H., Hleba, L., Petrová, J., Haščík, P., Cuboň, J., Pavelková, A., Chlebo, R., Bobková, A. and Stričík, M. 2013. The effects of bee pollen extracts on the broiler chicken's gastrointestinal microflora. *Res. Vet. Sci.* **95**, 34-37.
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencer, L. and Olczyk, K. 2015. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2015**, 297425.
- Kroyer, G. and Hegedus, N. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2**, 171-174.
- Lee, I. K., Hwang, B. S., Kim, D. W., Kim, J. Y., Woo, E. E., Lee, Y. J., Choi, H. J. and Yun, B. S. 2016. Characterization of neuraminidase inhibitors in Korean *Papaver rhoeas* bee pollen contributing to anti-influenza activities *in vitro*. *Planta Med.* **82**, 524-529.
- Linskens, H. F. and Jorde, W. 1997. Pollen as food and medicine-a review. *Economic. Bot.* **51**, 78-87.
- Mauriello, G., De Prisco, A., Di Prisco, G., La Stora, A. and Caprio, E. 2017. Microbial characterization of bee pollen from the Vesuvius area collected by using three different traps. *PLoS One* **12**, 0183208.
- Pyeon, H. I., Bak, J., Seok, J. I., So, S., Suh, H. J., Oh, M., Kim, S., Yang, C. E., Chung, I. K. and Choi, Y. S. 2017. Effects of nano-sized bee pollen as a new cosmetic ingredient. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **15**, 1-9.
- Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Jasik, K. and Buszman, E. 2017. Anti-atherogenic activity of polyphenol-rich extract from bee pollen. *Nutrients* **9**, 1369.
- Salles, J., Cardinault, N., Patrac, V., Berry, A., Giraudet, C., Collin, M. L., Chanet, A., Tagliaferri, C., Denis, P., Pouyet, C., Boirie, Y. and Walrand, S. 2004. Bee pollen improves muscle protein and energy metabolism in malnourished old rats through interfering with the Mtor signaling pathway and mitochondrial activity. *Nutrients* **6**, 5500-5516.
- Wang, B., Diao, Q., Zhang, Z., Liu, Y., Gao, Q., Zhou, Y. and Li, S. 2013. Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from *Rosa rugosa*. *Mol. Med. Rep.* **7**, 1555-1558.
- Yildiz, O., Can, Z., Saral, O., Yuluğ, E., Öztürk, F.,

Aliyazicioğlu, R., Canpolat, S. and Kolaylı, S. 2013. Hepato-protective potential of chestnut bee pollen on carbon tetra-

chloride-induced hepatic damages in rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, 461478.

**초록 : 생체 외 및 생체 내 실험조건에서 나노화 벌 화분의 안전성 규명**

편해인<sup>1</sup> · 소수정<sup>2</sup> · 박지아<sup>1</sup> · 이승현<sup>3</sup> · 이승민<sup>2</sup> · 서화진<sup>2</sup> · 임제오<sup>4</sup> · 김정우<sup>4</sup> · 김선연<sup>5</sup> · 이세라<sup>5</sup> · 이용현<sup>5</sup> · 정일경<sup>3</sup> · 최윤식<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>경성대학교 약학과, <sup>2</sup>주식회사 엔에스비 기술연구소, <sup>3</sup>대구가톨릭대학교 생명공학과, <sup>4</sup>㈜켄온 비임상연구소, <sup>5</sup>㈜크로엔)

벌 화분은 영양보조제와 전통의약품으로 오랫동안 사용되어 왔다. 그러나 벌 화분은 두터운 외피를 갖고 있어 산이나 알칼리는 물론 위장관의 소화효소와 기계적 압력에 의해서도 잘 파괴되지 않는 단점이 있다. 이로 인해, 벌 화분을 경구로 섭취할 때 생체이용률은 10-15%에 불과한 실정이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 본 연구진은 이전의 연구에서 습식나노분쇄 기술을 소개하였고 이를 통해 활성성분의 추출률이 약 11배 증가함을 보고하였다. 본 연구에서는 습식나노분쇄를 통해 제조한 나노화 벌 화분의 안전성을 증명하고자 하였다. 먼저, 흰쥐와 비글견에서 단회 투여 독성 시험을 진행하였다. 나노화 벌 화분의 투여 용량은 흰쥐는 5, 10 또는 20 g/kg, 비글견은 1.5, 3 또는 6 g/kg으로 설정하였다. 흰쥐에서는, 10 g/kg 또는 그 이상의 용량을 투여한 동물에서 색변이 관찰되었다. 비글견에서는 6 g/kg 투여군에서 나노화 벌 화분 투여 4시간 후에 설사가 관찰되었다. 그러나, 흰쥐와 비글견 모두에서 뚜렷한 임상증상이 관찰되지 않았으며 안락사 후 부검을 진행한 결과에서도 장기의 이상이 관찰되지 않았다. 다음으로 나노화 벌화분의 유전독성을 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험 및 소핵시험을 이용하여 확인하였다. 소핵시험에서는 시험에 사용한 최대용량인 2,000 mg/kg에서도 독성이 발견되지 않았다. 마찬가지로 복귀돌연변이시험과 염색체이상시험에서는 실험에 사용된 최고 농도에서도 독성을 나타내지 않았다. 종합하면 나노화 벌 화분은 본 실험에서 설정한 최고 용량인 20 g/kg/day의 용량까지는 매우 안전한 것으로 판단되며 이러한 결과는 나노화 벌 화분을 기능성 식품 또는 천연물 의약품으로 개발하는 데 중요하게 이용될 것으로 기대된다.