

# 전기영동법(Electrophoresis)을 이용한 봉약침의 주요 성분에 관한 연구

이진선\* · 권기록\* · 이승배\*\*

A Study on Major Components of Bee Venom Using Electrophoresis

Jin-Seon Lee\* · Gi-Rok, Kwon\* · Seung-Bae, Lee\*\*

\* Department of Acupuncture and Moxibustion SangJi Oriental Medicine Hospital,  
SangJi University

\*\* Division of applied animal sciences, SangJi University

## ABSTRACT

This study was designed to study on major components of various Bee Venom(Bee Venom by electrical stimulation in Korea; K-BV I, Bee Venom by Microwave stimulation in Korea; K-BV II, 0.5mg/ml, Fu Yu Pharmaceutical Factory, China; C-BV, 1mg/ml, Monmouth Pain Institute, Inc., U.S.A.; A-BV) using Electrophoresis. The results were summarized as follows :

1. In 1:4000 Bee Venom solution rate, the band was not displayed distinctly using Electrophoresis. But in 1:1000, the band showed clearly.
2. The results of Electrophoresis at solution rate 1:1000, K-BV I and K-BV II showed similar band. Phospholipase A<sub>2</sub> of A-BV showed obscure band.

3. The molecular weight of Phospholipase A<sub>2</sub> was known as 19,000 but its band was seen at 17,000 in Electrophoresis.
4. Protein concentration of Bee Venom by Lowry method was different at solution rate 1:4000 ; C-BV was 250 $\mu$ g/ml, K-BV I was 190 $\mu$ g/ml, K-BV II was 160 $\mu$ g/ml and C-BV was 45 $\mu$ g/ml.
5. Electrophoresis method was unuseful for analysis of Bee Venom when solution rate is above 1:4000 but Protein concentration of Bee Venom by Lowry method was possible.

These data from the study can be applied to establish the standard measurement of Bee Venom and prevent pure bee venom from mixing of another components. I think it is desirable to study more about safety of Bee Venom as time goes by.

---

Key words : Bee Venom(BV), Electrophoresis, Apamin, Melittin,  
Acua acupuncture.

## I. 緒 論

봉약침요법이란 살아있는 서양벌(*Apis mellifera*)<sup>1)</sup>의 독낭에 들어있는 독을 인위적으로 추출·가공하여 질병과 유관한 부위 및 경혈(經穴)에 주입함으로써 자침(刺鍼)의 효과와 벌의 독이 지니고 있는 생리 생화학적 약리작용을 질병의 치료에 이용하는 신침요법(新鍼療法)<sup>2)</sup>이다.

봉약침요법은 벌침요법 혹은 봉침요법<sup>3)</sup>(Bee Acupuncture Therapy)이라 하여 이미 오래 전부터 살아있는 벌을 환부나 경

혈에 자극하여 질병을 치료하는 방법으로 사용되어 왔고, 현재 국내에서도 상당수의 한의사들이 질병의 치료에 사용하고 있다.

또한 미국을 비롯하여 러시아, 동유럽 등에서는 봉침요법과 더불어 蜂毒療法<sup>4)</sup> (Bee Venom Therapy)이라 하여 사용되고 있으며 현재 대체의학의 한 분야로 적용되고 있다.

벌의 독은 이미 2500년 전<sup>5)</sup>부터 동양에서 질병의 치료에 이용되었고, 현재 국내에서 임상에서 사용하는 한의사도 점차 증가하고 있으나 이에 대한 기초 학문적 연구가 많

이 부족한 실정이다.

특히 외국에서 생산된 봉독에 대한 효능이나 신뢰도 등에 대한 객관적 검증이 없이 사용될 수도 있는 문제점이 있다.

외국에서는 Benton등<sup>6)</sup> 많은 학자들이 성분분석을 하였고, 국내에서는 1994년 이등<sup>7)</sup>이 약침용 봉독액의 안전성 평가에 대한 연구를 하였으나, 현재 사용되는 봉약침을 검량할 수 있는 객관적 지표가 없고 연구 또한 부족한 실정이다.

이에 중국산, 미국산 봉독과 채취방법이 다른 한국산 봉약침 2종에 대해 임상에 사용되고 있는 봉약침을 검량할 수 있는 객관적 지표를 마련하고자 본 연구를 시행하였다. 이에, 각 봉약침에 대하여 전기영동법(Electrophoresis)<sup>8)9)10)</sup>으로 성분 분석을 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 試料

分析試驗에 사용된 試料는 전기자극법으로 국내에서 채취한 봉독(Korean Bee Venom I, 이하 K-BV I)과 전자과자극법으로 국내에서 생산된 봉독(Korean Bee Venom II, 이하 K-BV II) 및 현재 외국에서 사용되고 있는 미국산 Apitoxin<sup>TM</sup>(American Bee Venom, 이하 A-BV: 1mg/ml, Monmouth Pain Institute, Inc., U.S.A.)과 중국산 봉독

주사액(Chinese Bee Venom, 이하 C-BV: 0.5mg/ml, Fu Yu Pharmaceutical Factory, China)을 사용하였다. 분석에 사용된 시료는 생리식염수와 증류수로 분석에 적절한 농도로 사용하였다.

Table 1. Abbreviation and Origin.

Abbr.	Origin.
1. K-BV I	Bee Venom by electrical stimulation in Korea.
2. K-BV II	Bee Venom by Microwave stimulation in Korea.
3. C-BV	0.5mg/ml, Fu Yu Pharmaceutical Factory, China.
4. A-BV	1mg/ml, Monmouth Pain Institute, Inc., U.S.A.

### 2) 試藥

전기영동에 사용된 시약은 Tris-tricine (Sigma Chemical Co., U.S.A.)과 Acryamide, Tris-HCL, SDS, ammonium persulfate(fresh), TEMED 등은 1등급을 사용하였으며, Marker는 Ultra-Low range(Molecular weight marker for SDS-PAGE, Sigma Chemical Co., U.S.A.) 및 표준시약으로 Apamin(SIGMA A-1289(Apamin from Bee Venom, Purity 99%)), Phospholipase A<sub>2</sub> (SIGMA P-9279 (Phospholipase A<sub>2</sub> from Bee Venom : *Apis mellifera*)), Mellitin(SIGMA M-4171(Mellitin from

Bee Venom, Purity 99%))을 사용하였다. 단백질 측정을 위해서는  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{CuSO}_4$ , potassium tartrate, BSA를 사용하였다.

## 2. 方法

1) 전기영동법(Electrophoresis)에 의한 분석 SDS-polyacrylamide gel 전기영동은 Davis<sup>8)</sup>와 Laemmli<sup>9)</sup>의 방법에 따라 16.5% acrylamide gel을 조제한 후 Mini-PROTEAN II KIT를 이용하여 실시하였다.

방법 1은 먼저 시료용 봉약침과 표준단백질(Marker)을 전기영동시킨 후 coomassie brilliant blue로 염색하고 Fairbank 등<sup>10)</sup>의 방법에 따라 10% acetic acid로 탈색하였다.(Fig.1)

방법 2는 신선하게 준비된 5% glutaraldehyde(G5882, Sigma-Aldrich)로 1시간동안 겔을 고정 세척 후, 0.025% brilliant blue G(B0770, Sigma-Aldrich)로 염색한 후 10% acetic acid로 탈색하였다.

## 2) 단백질 정량분석

단백질 정량법은 Lowry 등<sup>11)</sup>의 방법에 준하여 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 표준단백질로 사용하였으며, 540nm에서 고정하여 흡광도(OD:optical density)를 측정 산출하였다.

## III. 結果

### 1. 전기영동법(Electrophoresis)에 의한 蜂藥鍼의 주요성분 분석

#### 1) 채취방법에 따른 한국산 봉약침의 전기영동 분석

K-BV I 과 K-BV II의 농도를 1:100으로 동일한 조건으로 하고, 표준시약을 함께 전기영동한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1에서 보면 K-BV I (A)에서 두개의 band가 뚜렷이 관찰되고, K-BV II(B)에서 역시 K-BV I 과 같은 band를 관찰할 수 있어, 주요성분은 비슷하게 나타남을 보여준다. Standard Marker(M1)와 비교해보면 Phospholipase A<sub>2</sub>는 같은 17,000에서 동일하게 나타나고 있고, Apamin과 Melittin은 양이 많은 관계로 분자량 2000~3000 level 뿐만 아니라 6000정도의 부위에서부터 짙게 나타남을 알 수 있다.

전기영동의 band가 지니는 정확한 분자량을 얻기위하여 Marker1(M1)은 분자량을 알고 있는 표준시약 (Ultra-Low range (Molecular weight marker for SDS -PAGE))이며, Marker2는 Apamin(SIGMA A-1289, Sigma Chemical Co., U.S.A.), Marker3는 Phospholipase A<sub>2</sub>(SIGMA P-9279, Sigma Chemical Co., U.S.A.), 그리고 Marker4는 Melittin(SIGMA M-4171, Sigma Chemical Co., U.S.A.)이다. Phospholipase A<sub>2</sub>는 동일하게 약 17,000정도의 분자량에서 band

를 나타내고 있고, 전기영동의 band 양상은 비교적 동일하게 나타남을 보여주고 있어, 채취방법에 따른 성분의 차이는 크지 않은 것으로 보인다. 26개의 아미노산으로 구성된 폴리펩티드인 Melittin은 분자량이 2,840<sup>4)</sup>, Apamin의 분자량은 2,036으로<sup>4)</sup> A ,

B의 하단부에서 대량으로 나타나고 있으나, 전체 봉독구성비의 약 50%에 해당하는 Melittin양과 2-3%에 Apamin의 양을 고려한다면 이는 분자량이 너무 작은 관계로 Ultra-Low range의 Marker에서조차도 전체 비율에 비해 충분하게 검출되고 있지

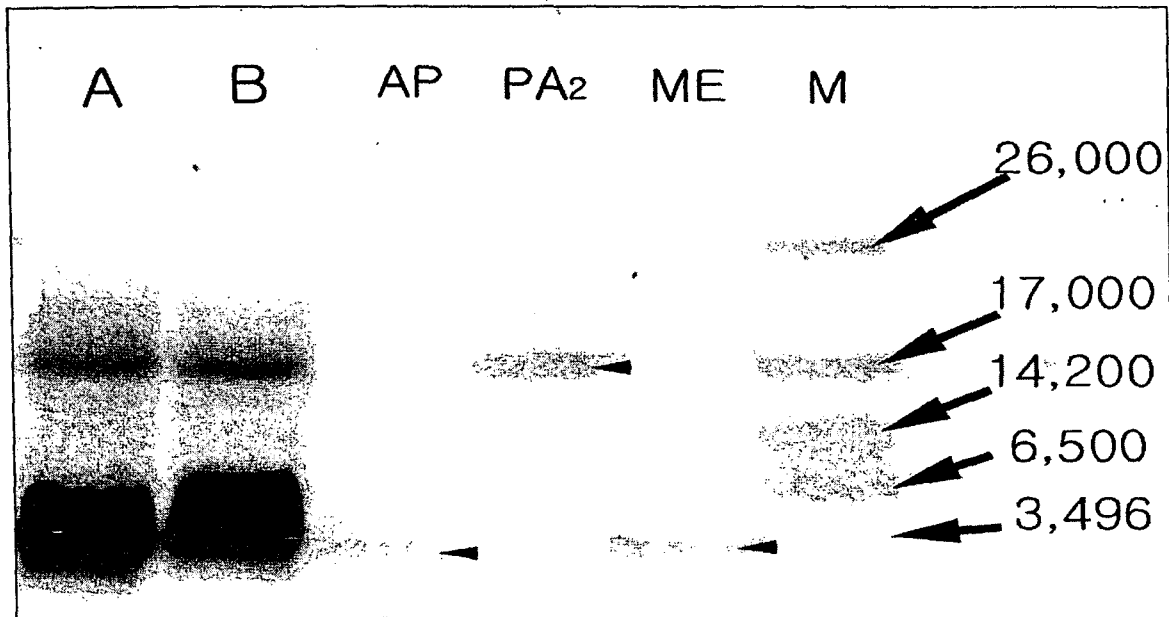


Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE) of Bee Venom. Preparations were submitted to electrophoresis in 16.5% gel under Tris-tricine.

AP; Apamin(SIGMA A-1289(Apamin from Bee Venom, Purity 99%)),

PA<sub>2</sub>; Phospholipase A<sub>2</sub>(SIGMA P-9279 (Phospholipase A<sub>2</sub> from Bee Venom : *Apis mellifera*)),

ME; Mellitin(SIGMA M-4171(Mellitin from Bee Venom, Purity 99%))

M ; Ultra-Low range(Molecular weight marker for SDS-PAGE) : Triosephosphate isomerase from rabbit muscle(26,600), Myoglobin from horse heart(17,000),  $\alpha$ -Lactalbumin from bovine milk(14,200), Aprotinin from bovine lung(6,500), Insulin chain B, oxidized, bovine(3,496), Bradykinin(1,060),

A ; 1:100 K-BV I<sup>1)</sup>

B ; 1:100 K-BV II<sup>2)</sup>

Anodes toward bottom of photograph.

1) Bee Venom by electrical stimulation in Korea.

2) Bee Venom by microwave stimulation in Korea

못함을 보여주고 있다.

### 2) 국내 및 국외 봉약침의 전기영동 분석(1:1000)

동일한 희석농도에서의 차이를 확인하기 위하여 1. 2. 3번 lane은 모두 1:1000으로 전기영동한 것이며, 4. 5번 lane은 고농도에서의 선명한 band를 같이 비교하고자 1:100으로 함께 전기영동하였다.(Fig. 2)

lane 4와 5는 분자량 17,000 level전후에서 Phospholipase A<sub>2</sub>가 선명하게 분획되며, 같은 level에서 선명도의 차이는 있어도 lane2와 3에서도 동일하게 나타남을 알 수 있었다.

그러나 lane1에서는 Phospholipase A<sub>2</sub>가 거의 보이지 않고, 분자량 2000-3000에 해당하는 Melittin과 Apamin의 band도 나타나지 않았다.

lane2와 3을 비교시 lane3이 나타내고 있는 band가 더욱 선명하고 진하게 나타났는데, 이는 Phospholipase A<sub>2</sub>의 band 뿐만 아니라 하단부의 Melittin과 Apamin의 band 역시 차이가 나타남을 알 수 있다.

이로서, lane3이 lane2보다 함량이 많음을 관찰할 수 있었다.

### 3) Phospholipase A<sub>2</sub>의 전기영동 분석

현재 사용되고 있는 1:4000의 시료를 Dialysis bag(Molecular weight: 6,000~7,000)을 이용하여 시료를 농축시킨후 전기영동을 실시하였다.(Fig. 3)

분자량 약 7000이하의 성분을 제거하고 봉약침을 전기영동한 결과 동일하게 분자량 17,000 level에서 관찰되는 것은 Phospholipase A<sub>2</sub>이다.

Phospholipase A<sub>2</sub>의 band를 상호 비교해 볼 때 lane1, lane4와 lane5는 비교적 동일한 정도의 선명도를 나타내고 있으나, lane2는 lane1, 4, 5와 같이 동일한 1:1000인 희석임에도 불구하고 band가 1/4의 정도인 lane3과 거의 유사한 양상을 나타내고 있다.

Fig.1, Fig.2와 Fig.3에서 보듯이 Phospholipase A<sub>2</sub>는 여러문헌<sup>3)4)</sup>에서 보고된 분자량 19,000이 아니라 17,000정도에서 동일하게 검출됨을 알 수 있었다.

### 2. 봉약침의 단백질 정량분석

1:4000으로 희석된 봉약침을 Lowry 정량법으로 단백질량을 측정하였다.(Table 2)

그 결과 중국산봉약침에는 250 $\mu$ g/ml, 한국산 전기자극법과 전자파자극법에는 각각 190 $\mu$ g/ml, 160 $\mu$ g/ml로 나타났으나 미국산은 동일한 농도에서 45 $\mu$ g/ml를 나타내어 다른 봉약침에 비해 현저한 차이를 나타내었다.

이는 미국산 봉약침의 농도에 문제점이 제기될수 있어 향후 Random sampling을 통한 재시험이 요구됨을 알 수 있었다.

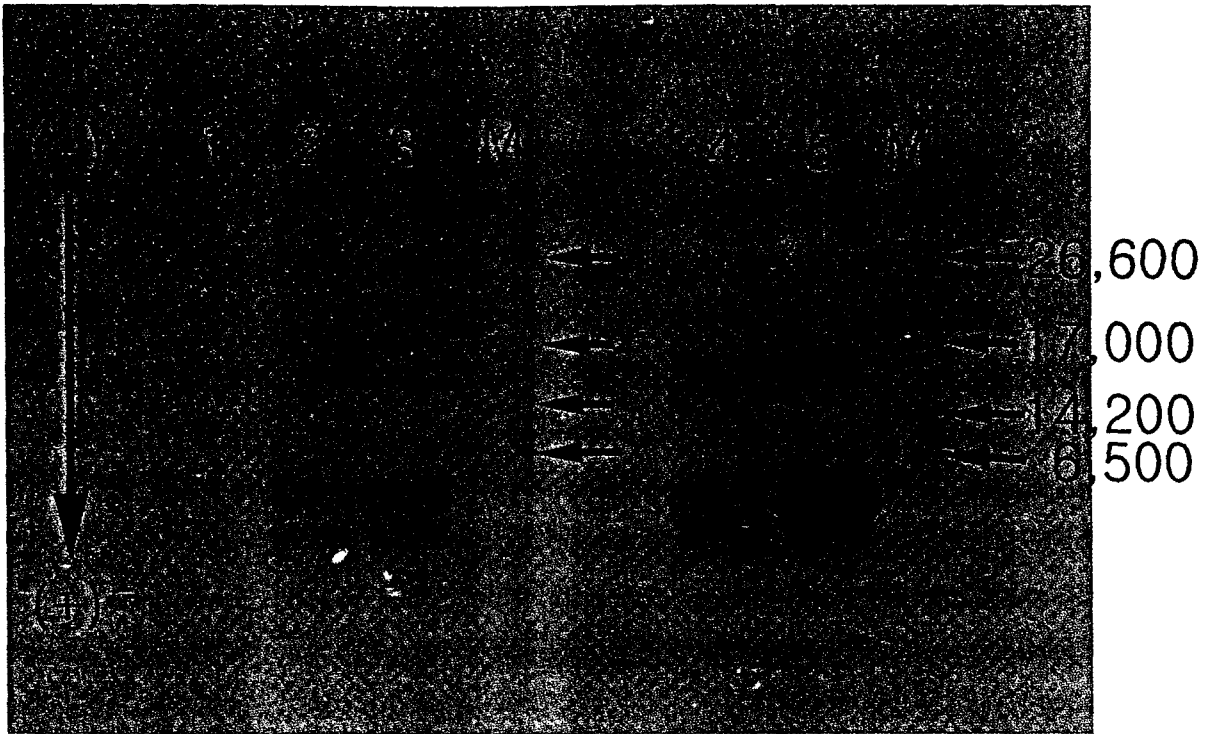


Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE) of Bee Venom. Preparations were submitted to electrophoresis in 16.5% gel under Tris-tricine.

M1; Ultra-Low range(Molecular weight marker for SDS-PAGE) :  
Triosephosphate isomerase from rabbit muscle(26,600), Myoglobin from horse  
heart(17,000),  $\alpha$ -Lactalbumin from bovine milk(14,200), Aprotinin from  
bovine lung(6,500), Insulin chain B, oxidized, bovine(3,496), Bradykinin(1,060),  
lane 1; 1:1000 A-BV<sup>1)</sup>,  
lane 2; 1:1000 K-BV II<sup>2)</sup>,  
lane 3; 1:1000 K-BV I<sup>3)</sup>,  
lane 4; 1:100 K-BV II<sup>2)</sup>,  
lane 5; 1:100 K-BV I<sup>3)</sup>.

Anode is toward bottom of photograph.

1) 1mg/ml, Monmouth Pain Institute, Inc., U.S.A.

2) Bee Venom by Microwave stimulation in Korea.

3) Bee Venom by electrical stimulation in Korea.

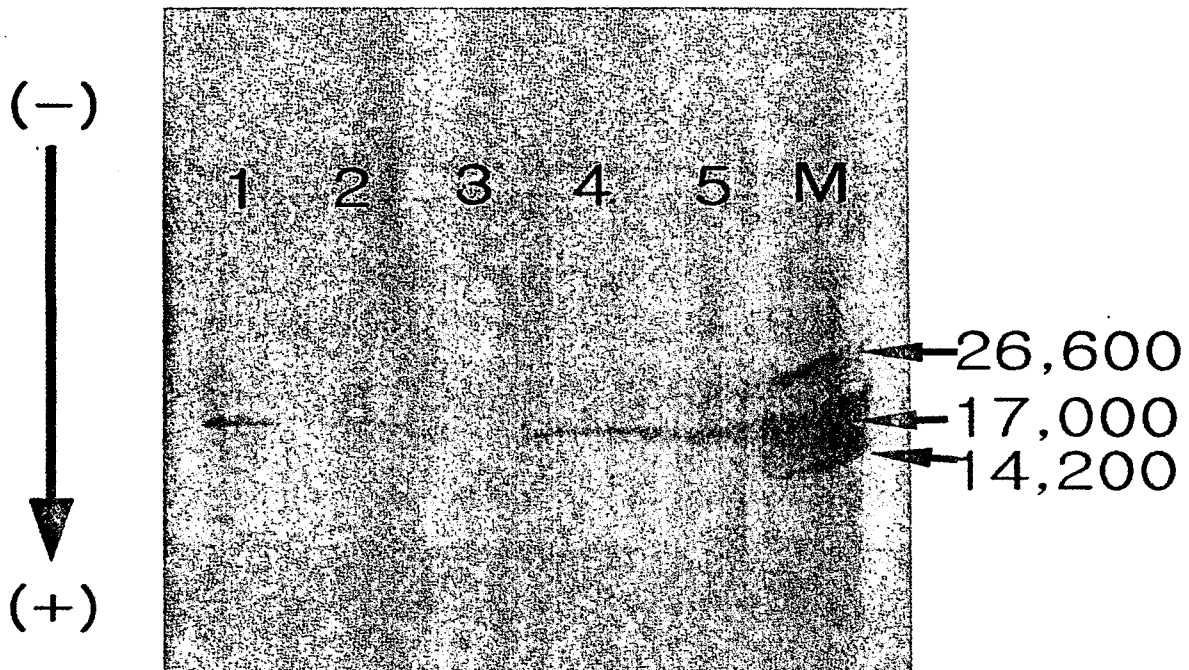


Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoresis in Sodium Dodecyle Sulfate (SDS-PAGE) of Bee Venom. Preparations were submitted to electrophoresis in 16.5% gel under tris-tricine.

M1; Ultra-Low range(Molecular weight marker for SDS-PAGE) : Triosephosphate isomerase from rabbit muscle(26,600), Myoglobin from horse heart(17,000),  $\alpha$ -Lactalbumin from bovine milk(14,200), Aprotinin from bovine lung(6,500), Insulin chain B, oxidized, bovine(3,496), Bradykinin(1,060),

lane 1; 1:1000 K-BV I<sup>1)</sup>+Sangbaekpi Herbal Acupuncture,

lane 2; 1:1000 A-BV<sup>2)</sup>,

lane 3; 1:4000 C-BV<sup>3)</sup>,

lane 4; 1:1000 K-BV I<sup>1)</sup>,

lane 5; 1:1000 K-BV II<sup>4)</sup>,

Anodes toward bottom of photograph.

1) Bee Venom by electrical stimulation in Korea.

2) 1mg/ml, Monmouth Pain Institute, Inc., U.S.A.

3) 0.5mg/ml, Fu Yu Pharmaceutical Factory, China.

4) Bee Venom by Microwave stimulation in Korea.



Table 2. Protein Concentration of Bee Venom. (μg/ml)

Concentration of protein (1:4000)	
1. K-BV I <sup>1)</sup>	190
2. K-BV II <sup>2)</sup>	160
3. C-BV <sup>3)</sup>	250
4. A-BV <sup>4)</sup>	45

- 1) Bee Venom by electrical stimulation in Korea.
- 2) Bee Venom by Microwave stimulation in Korea.
- 3) 0.5mg/ml, Fu Yu Pharmaceutical Factory, China.
- 4) 1mg/ml, Monmouth Pain Institute, Inc., U.S.A.

#### IV. 考 察

봉약침요법은 살아 있는 꿀벌의 독낭 안에 들어 있는 봉독을 전기 자극<sup>4)</sup>이나 전자파 자극<sup>12)</sup> 등으로 추출하여 건조한 후, 정제 가공하여 약침요법과 같이 경락 이론을 바탕으로 혈위를 선택하여 질병을 치료하는 신침요법의 일종이다.

봉약침의 재료인 꿀벌로는 서양벌(*Apis mellifera*)중 일벌<sup>11)13)</sup> 만이 사용되며, 독의 채취가 어려울 때에는 벌의 침을 뽑아서 취혈하는 拔鍼法과 벌을 혈위에 놓아 자극하는 直鍼法이 활용되었으나, 최근에는 전기추출법<sup>4)</sup>이나 전자파자극법<sup>12)</sup>으로 봉독을 추출 가공하여 건조한 봉독을 주사용 Ample, 연고 등으로 임상 및 연구용으로 이용되고 있다.

역사적으로 볼 때 B.C 2.000년 전 이집트 파피루스에서도 벌의 침을 아픈 곳에 쏘이거나 문질러 치료했다는 내용을 확인 할

수 있고, B.C 4-5C에 히포크라테스도 蜂鍼을 신비한 치료제<sup>3)</sup>라고 하였으며, 前漢時代 以前의 醫學 著書로 推定되는 馬王堆 醫書에서도 蜂毒을 질병의 치료에 이용<sup>5)</sup>하였음을 알 수 있다.

봉독은 무색 투명하며 점성이 있는 액체로 강한 쓴맛이 나는 방향성 물질이며, 건조 상태에서는 회백색 또는 황백색의 괴상이거나 분말상이다. 봉독액의 비중은 1.13이며 산도(PH)는 5.2-5.5범위이다.

이것은 쉽게 물과 산에 용해되지만 알콜에는 거의 용해되지 않는다. 봉독액은 상온에서 공기에 노출되면 재빨리 마르고 액중량의 70%를 손실한다. 봉독은 냉동 상태에서 장기간 활성을 유지할 수 있다. 그러나 봉독은 산화성 물질에 의해서 쉽게 파괴되는 경향이 있다<sup>4)14)</sup>.

봉독의 性味는 大熱有毒 辛甘鹹<sup>15)</sup>하며 補益精氣 除中益氣하고, 通經活絡 消腫排膿 清熱涼血의 효능<sup>5)</sup>이 있다. 봉독의 주요 성

분은 약 40가지 정도로, peptide, enzymes, physiologically active amines, carbohydrates, Lipids, amino acids 등으로 나누어 볼 수 있으며(Table 3),<sup>16)17)</sup>이 중 중요한 역할을 하는 Peptide로는 Mellitin, Apamin, Adolapin, 그리고 Mast Cell Degranulating Peptide(MCD peptide)를 들 수 있고 전체적으로 抗炎, 抗菌, 解熱作用과 함께 ACTH 분비 촉진, 혈관 투과성 촉진의 작용이 있다.

봉독의 치료 작용은 전신적, 국소적 작용과 경혈 작용으로 나누어 생각해 볼 수 있는데<sup>15)</sup>, 전신작용은 봉독이 신체의 면역계에 변화를 초래하고 시상하부-뇌하수체-부신피질 축에 작용하여 cortisone을 촉진시키는 작용 등을 질병의 치료에 이용하는 것이고, 국소작용은 근골격계 질환의 경우에 봉독이 그 주입 부위에 일으키는 국소적 효과로 항염증, 진통효과이다. 경혈 작용은 봉독 자극 부위를 침구학 이론에 따라 선혈한 경혈의 자극에 의한 침의 효과와 봉독 자체의 효과가 상승작용이 일어나는 것을 말한다. 이는 疏通氣血, 活血化癥의 작용으로 칭할 수 있으며, 봉독 자극은 경혈에 가해지는 기계적 자극 외에도 국소반응인 發赤, 發熱, 腫脹에 의한 溫熱刺戟의 의미도 포함한다. 봉약침 요법은 상기한 국소적 작용과 경혈 작용을 이용하여 치료하는 것이다.

봉침에 대한 최초의 임상보고로는 1870년 대 영국의 Dr. Rucumkis<sup>18)</sup>가 reumatoid

arthritis와 gout을 대상 질환으로 하여 논문 발표한 이후 통풍<sup>19)</sup>, 신경통<sup>20)</sup>, 항암작용<sup>3)</sup>등에 대한 발표가 있었다. 국내에 보고된 봉약침의 임상논문으로는 권<sup>21)</sup>은 봉독요법이 류마티스성 관절염 치료에 임상적으로 유의한 결과를 보고한바 있으며, 또 봉독요법의 면역반응에 관한 임상적 현상에 대하여 분석하여 보고<sup>11)</sup>한 바 있다. 이 등<sup>22)</sup>은 봉약침을 장기간 사용하여도 간이나 신장에 나쁜 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 봉약침에 대한 실험논문으로는 1992년 이 등<sup>7)</sup>은 中腕穴, 足三里穴에 상당하는 위치에 봉독과 생리식염수를 주입한 후 혈위, 주입량, 시간경과에 따른 진통효과를 초산법으로 측정된 실험에서, 유의한 진통효과를 나타내었다고 보고하였다. 1993년 권 등<sup>23)</sup>은 봉독의 소염 및 활혈작용에 대한 실험 결과 급·만성 염증에 유의한 부종억제 효과와 소염작용을 나타냈다고 보고했다. 1995년 이 등<sup>7)</sup>은 약침용 봉독액의 안전성 평가를 위한 한국산 봉독액의 항원성 시험, 발열성시험 결과를 보고했으며, 1997년 권 등<sup>24)</sup>은 3-MCA 유발 상피종실험에서 봉약침이 면역기능에 관련된 백혈구, T-Cell, B-Cell의 증가를 유도하고 암세포를 억제한다고 보고했고, 1998년 권 등<sup>25)</sup>은 봉침자극군, 자침자극군에으로 나누어 초산법에 의한 진통효과를 측정된 결과 봉침자극군에서 유의한 진통효과가 관찰되었으며 carrageenin 부종 억제효과는 봉침자극군은 90분과 120분에서, 자침자극군에서는 120분

Table 3. Components of Bee Venom

종류	성분	건조중량 %	벌침당 nmol	아미노산갯수	분자량
enzymes					
	phospholipase A <sub>2</sub>	10-12	0.23		19,000
	hyaluronidase	1-2	0.03		38,000
	acid phosphomonoesterase	1.0	-		55,000
	$\alpha$ -D-glucosidase	0.6	-		
	lysophospholipase	1.0	0.03		22,000
polypeptides					
	melittin	40-50	10-12	26	2,840
	melittin-F	0.01	0.003	19	
	apamin	3	0.75	18	2,036
	peptide 401(MCD peptide)	2	0.6	22	2,588
	secapin	0.5	0.13	24	
	tertiapin	0.1	0.03	20	
	protease inhibitor	-	-		8,000-10,000
	procamine A, B	1.4	2.0		
low meolecular weight organic constituents					
	histamine	0.66-1.6	5-10		
	dopamine	1.3-1	2.7-5.5		
	noradrenaline	0.1-0.7	0.9-4.5		

에서 유의한 결과를 보였으며, adjuvant유발 관절염에 의한 부종에 대해서는 억제효과가 관찰되지 않았다고 보고했다. 또 1998년 김 등<sup>26)</sup>은 봉독요법의 소염·진통 작용에 관한 실험적 연구를 통해, carrageenin유발 급성부종, adjuvant 관절염으로 인한 종창, 백혈구 유주, 모세혈관 투과성 등이 유의하게 감소되었고, 초산법에 의한 진통효과, 열판법에 의한 진통효과, in vitro bioassay법을 이용한 trypsin 저해효과, 용혈효과 등에서 유의한 효과를 확인했다고 보고했다. 2000년 김 등<sup>27)</sup>은 봉독약침자극이 뇌간 신경세포와 Serotonin성 신경세포를 활성화시킨다고 보고하였으며, 박 등<sup>28)</sup>은 약침용 봉독액이 흑색종세포에 영향을 미쳐 항암 효과가 있음을 보고하였다

본 실험에 사용된 표준시약인 Apamin (SIGMA A-1289(Apamin from Bee Venom, Purity 99%)), Phospholipase A<sub>2</sub> (SIGMA P-9279 (Phospholipase A<sub>2</sub> from Bee Venom : *Apis mellifera*)) 그리고 Mellitin(SIGMA M-4171(Mellitin from Bee Venom, Purity 99%))은 봉독의 주요 성분이다. Phospholipase A<sub>2</sub>는 효소성분의 대부분을 차지하는 물질로, 봉독 내에 존재한다는 것은 1952년에 Neumann 등<sup>29)</sup>에 의해 보고되었다. Phospholipase A<sub>2</sub>의 주요 작용으로는 첫째 강력한 항원성이다. Phospholipase A<sub>2</sub>는 봉독의 주요 알러젠으로, 봉독에 민감한 사람들의 90% 정도에서 이에 대한 IgE 항체가 발견되며 그 절반

정도는 hyaluronidase에 대한 높은 역가의 IgE 항체를 갖고 있고 전체 환자의 9% 정도에서는 hyaluronidase에 대한 IgE 항체만이 발견된다고 한다. 봉독에 대한 과민반응은 전형적인 즉시형 과민반응이다. 둘째 Phospholipase A<sub>2</sub>는 간접 용해소로서의 작용 즉, 세포용해 촉매작용이 있다.

Phospholipase A<sub>2</sub>는 간접적 용해 작용이 있으며, 직접적 용해작용이 있는 Melittin과 함께 있으면 상승작용이 있어 세포막을 용해시킨다. 이외에도 Phospholipase A<sub>2</sub>는 막 유착성을 조절하고, 조직 인지질의 교체에 일정한 역할을 담당하고 있으며, 조직·아세포층에 광범위하게 존재하여 prostaglandine의 전구체인 아라키돈 산의 분비를 조절함으로써 프로스타글란딘의 합성을 조절하는 등의 역할을 하고 있다.

Melittin은 봉독의 주요성분으로 건조봉독의 40~50%를 차지한다. 1954년에 Neumann과 Habermann에 의해<sup>30)</sup> 직접 용혈성 요소로 처음 발견되었고 1972년 Habermann에 의해<sup>31)</sup> 적혈구 용해시의 세포막활성 성질이 관찰되었다. 막 인지질에 Phospholipase A<sub>2</sub>와 상승적으로 작용하여 세포막을 파괴시킨다. 세포막을 파괴하고 혈류 속으로 보다 독성이 강한 다른 성분들을 잘 침투시키기 위한 확산인자로서도 활동할 수 있기 때문에 이렇게 다량 들어 있는 것으로 보인다. Melittin에는 용해 작용, 효소 작용, 통증 유발 작용, 항균 작용, 방사능 저항성 작용 등이 있다.

Apamin은 중추성 신경독성 Peptide로 포유

류 조직에서는 말초작용도 강력하다.

봉독 투석물을 생쥐에 주사했을 때 경련을 일으키는 낮은 분자량 성분이 있다는 것이 1937년에 Hahn과 Leditschke에 의해<sup>32)</sup> 관찰되었는데, 이것이 1952년에 Neumann 등<sup>33)</sup>에 의해 처음 분리된 신경독성 Peptide인 Apamin이었다. 건조봉독의 ~3% 정도로 극히 소량 함유되어 있으며, 분자량은 2000에 가까워(2.036)<sup>4)</sup> 1960년대 이래 조사된 봉독의 약리활성 성분 중에서도 가장 크기가 작은 편에 속한다.

봉약침의 성분을 분리해내는 데에는 투석, 용해, 여과, 이온교환 크로마토그래피, HPLC 등 여러 가지 방법<sup>4)</sup>을 응용하게 되는데, 이중 단백질 분리정량을 위한 가장 좋은 방법으로 널리 사용되는 것은 Polyacrylamide gel 전기영동법이라고 하였다.<sup>8)</sup> Laemmli<sup>34)</sup>는 SDS(sodiumdodecyl sulfate)와 disc전기영동의 원리를 이용한 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)를 개발하여 단백질을 분리·분석하고, O'Farrell<sup>35)</sup>이 등전촉점분리(IEF, isoelectric focusing)에 의해 단백질을 등전점에 따라 분리하고, 다시 SDS-PAGE로 분자량에 따라 분리하는 2차원 전기영동법을 개발한 이래 식물의 유전적 변이의 연구에도 전기영동법이 많이 이용되었다.<sup>36)</sup>

이에 이 실험에서는 SDS-PAGE를 통해 봉약침을 분석하였다. 이 분석시험에서는 채취방법이 다른 한국산 봉약침 2종에 대

한 비교를 하였고, 동일농도에서의 한국산과 미국산을 비교하였으며, 중국산은 1:4000으로 Ample이 고정된 관계로 Dialysis bag으로 분자량 7,000이하의 성분은 제거하고 농축하여 Phospholipase A<sub>2</sub>의 양상을 살펴보았다.

한국산 2종에 대해서는 동일한 조건인 1:100의 비율에서 전기영동을 실시하였으며, 전기자극법으로 채취한 봉독과 전자파 자극법으로 채취한 봉독사이의 차이점을 알아본 결과 전기자극법에 의한 채취법에서 Apamin과 Melittin의 분자량에 해당되는 band가 비교적 선명하였고 주요성분인 Phospholipase A<sub>2</sub>에서도 마찬가지로였다. Fig. 1은 전기영동법에 의한 결과를 나타내고 있다.

미국산과 한국산 2종에 대한 비교를 위해 동일한 1:1000의 희석 비율에서 전기영동 분석을 시행한 결과 미국산은 매우 흐리거나 band를 거의 나타내지 않고 있고, 한국산 두종 중에서는 K-BV I 이 K-BV II보다 선명함을 보여주고 있어, 그 성분의 양이 더 많고 선명함을 나타내었다.(Fig. 2)

Phospholipase A<sub>2</sub>의 전기영동 분석에서는 분자량 17,000 level에서 동일하게 검출됨을 알 수 있었고, A-BV는 동일한 농도임에도 불구하고 K-BV I 이 K-BV II에 비해 선명도가 많이 떨어짐을 알 수 있었다.

Lowry 단백질 정량법에 의해 각 봉약침을 1:4000의 동일한 농도에서 측정된 결과 C-BV에 250 $\mu$ g/ml, K-BV I 과 K-BV II에

는 각각  $190\mu\text{g/ml}$ ,  $160\mu\text{g/ml}$ 로 나타났고, A-BV에서는  $45\mu\text{g/ml}$ 로 현저한 차이를 나타내었다.

봉약침 성분을 분석, 비교하여 봉약침 사용에 있어 준거(準據)를 제시하고자 시행한 본 실험 과정에서 미흡했던 점은 봉약침의 농도에 문제점이 제기될수 있다는 것이다.

향후 Random sampling을 통해 각 국가별 또는 산지별로 많은 sample을 재료로 실험을 시행하여 자료를 얻어야 할 것이라고 생각된다. 또한 채취시기에 따른 봉약침의 성분 및 경시적(經時的)인 안정성 연구도 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사려된다.

## V. 結論

치료용 봉약침의 성분을 분석, 비교하고 준거를 제시하고자 A-BV(Apitoxin<sup>TM</sup> :  $1\text{mg/ml}$ , Monmouth Pain Institute, Inc., U.S.A.), C-BV( $0.5\text{mg/ml}$ , Fu Yu Pharmaceutical Factory, China) 및 채취방법이 다른 한국산 봉약침 (K-BV I, K-BV II)의 성분을 전기영동법(Electrophoresis)으로 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 실제 임상에서 흔히 사용되는 농도인 1:4000 봉약침은 전기영동법에서 뚜렷한 band를 얻을 수 없었고, 이를 1:1000의 농도로 분석한 결과 유의한 결과를 얻을 수

있었다.

2. 1:1000의 농도로 전기영동 분석 결과 K-BV I 과 K-BV II는 비교적 동일한 band를 나타냈고, K-BV I 이 같은 희석비율에서 더 선명하였으며, A-BV는 Phospholipase A<sub>2</sub>의 band가 흐리게 나타났다.

3. Phospholipase A<sub>2</sub>는 분자량이 19,000으로 알려져 있으나 전기영동 분석 결과 17,000에서 유의성 있게 나타났다.

4. Lowry 단백질 정량법에 의해 각 봉약침을 1:4000의 동일한 농도에서 측정된 결과 C-BV에  $250\mu\text{g/ml}$ , K-BV I 과 K-BV II에는 각각  $190\mu\text{g/ml}$ ,  $160\mu\text{g/ml}$ 로 나타났고, A-BV에서는  $45\mu\text{g/ml}$ 로 현저한 차이를 나타내었다.

5. 1:4000 이하 저농도의 봉약침 분석에는 전기영동법에 의한 단백질 정량만이 가능하고, 다른 성분과의 비교를 직접적으로 관찰하기에는 어려움이 있었다.

봉약침 성분을 분석, 비교한 것은 임상적 사용에 있어 준거(準據)를 제시하는데 도움이 될 것으로 사려되며, 향후 봉약침에 대한 경시적(經時的)인 안정성 연구 및 지속적 연구가 이루어지는 것이 바람직하리라 사려된다.

## 參 考 文 獻

- 1) 최승윤 : 최신양봉학, 서울, 집현사, 47-56, 328-330, 1987.
- 2) 권기록 : 봉침에 대한 고찰, 대한 침구학회지, Vol 11. No1, 160, 1994
- 3) Tom piek: Venom of the Hymenoptera, Academic Press, London, 107-120, 1986.
- 4) 김문호 : 봉독요법과 봉침요법, 서울, 한국교육기획, 20-37, 41-42, 57, 70, 72, 133-149, 171-176. 1996.
- 5) 인창식, 고희균 : 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록: 마왕퇴의서의 봉독요법 2례, 대한 침구학회지, Vol 15, No1, 143, 1998
- 6) Benton A.W., Morse R.A., Stewart J.D.: Venom collection from honey bees, Science 142: 228-230, 1963
- 7) 이종석, 고희균, 김창환 : 약침용 봉독액의 급성독성에 관한 연구, 대한한의학회지 Vol.11, No.1. 1994
- 8) Davis,B.J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404. 1964.
- 9) Laemmli, U.K. and M. Favre: *J. Mol. Biol.* 80, 575, 1973.
- 10) Fairbanks, G., T.L. Steck and D.F.H. Wallach: *Biochem.* 10. 2606, 1971.
- 11) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough,A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
- 12) 최대봉 : 양봉협회보, 한국양봉협회, 서울, 12월호, 1986.
- 13) 최승윤 : 양봉, 꿀벌과 벌통, 오성출판사, 서울, 117-118, 1987.
- 14) 고문수 : 동의학총서·동물성동약, 서울, 여강출판사, pp.185-190, 1993.
- 15) 권기록 : 봉독요법의 면역반응에 관한 임상적 연구, 전국한의학회 학술대회지, 277, 1999.
- 16) Barbara & Rudolf, Chemistry and Pharmacology of Honey Bee venom, Academic Press, 329-402, 1986.
- 17) Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R., natural killer cells : their role in defenses against disease, Science, 214:24, 1981.
- 18) 성은찬 : 알기쉬운 봉독요법 108, 전국농업기술자협회 출판부, 28, 1990
- 19) 張 震 : 雲南中醫雜誌, 上海, 雲南新華印刷社, 5:39-41, 1990
- 20) 朱文峰 : 實用中醫辭典, 陝西, 陝西科學技術出版社, pp. 9-10. 1978
- 21) 권기록 : 봉독요법의 류마티스성 관절염 치료에 대한 임상적 연구, 전국한의학회 학술대회지, p 130-131, 1998.
- 22) 이병철, 천미나, 양명복 : 봉독약침이 장기환자의 LFT와 RFT에 미치는 영향, pp 11-19, Vol.17, No.2, June, 2000
- 23) 권기록, 고희균, 김창환 : 태충 및 족삼리의 방풍수침과 봉독요법이 소염 및 활혈자극에 미치는 영향, 경희한의대는

- 문집 16: 297-323, 1993.
- 24) 권기록 : 봉독약침자극이 3-MCA 유발 상피종에 대한 항암 및 면역반응에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1997년 8월.
- 25) 권기록, 고희균 : 봉독약침요법이 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지 15(2): 97-103, 1998.
- 26) 김지영, 고희균, 김용석, 박영배, 김창환, 강성길 : 봉독약침요법의 항염증 작용에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지 15(1): 317-331, 1998.
- 27) 김혜남, 고희균, 박동석, 강서길, 김용석, 최용태: 봉독약침자극이 뇌간 신경세포와 Serotonin성 신경세포를 활성변화에 미치는 영향, 대한침구학회지 17(2)119-138, 2000
- 28) 박찬열, 남상수, 김창환, 이제동, 강성길, 이윤호, 안병철: 약침용봉독액이 흑색종세포에 미치는 항암효과에 대한 분자생물학적 연구, 17(2) 169-186, 2000.
- 29) Neumann W., Habermann E., Amend G. Zur papierelektrophoretischen fraktionierung tierischer gifte, Naturwissenschaften 39: 286-287, 1952.
- 30) Neumann W., Habermann E.: Beiträge zur charakterisierung der wirkstoffe des bienengiftes, Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmakol 222: 367-387, 1954.
- 31) Habermann E.: Bee and wasp venoms, Science 177: 314-322. 1972.
- 32) Hahn G., Leditschke H. Über das bienengift, IV Mitt gewinnung beider giftkomponenten durch dialyse, Ber Dtsch Chem Ges 70: 1637-1644, 1937.
- 33) Neumann W., Habermann E., Amend G. Zur papierelektrophoretischen fraktionierung tierischer gifte, Naturwissenschaften 39: 286-287, 1952.
- 34) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970.
- 35) O'Farrell. P. H. : High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250: 4007-4021. 1975.
- 36) 방재욱 : 전기영동법을 이용한 호밀 (*SECALE CEREALE L*) SEEDING PROTEIN의 유전적 분석, Kprean J. Genetics 10-2: 85-92, 1998.