생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
40(3) : 173 ~ 177 (2009)

국내산 봉독의 여드름 유발균 및 피부 상재균 증식 억제 효과

한상미* · 이광길 · 여주홍 · 김원태 · 박관규[1]
농촌진흥청 국립농업과학원, [1]대구가톨릭대학과 의과대학

Antimicrobial Property of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom against *Propionibacterium acnes* and Aerobic Skin Flora

SangMi Han*, KwangGil Lee, JooHong Yeo, WanTae Kim and KwanKyu Park[1]
National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, 441-100, Korea
[1]College of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu, 712-702, Korea

Abstract – The *in vitro* antibacterial activities of honeybee(*Apis mellifera.* L) venom collected by a bee venom collector were investigated against several bacteria including antibiotic-susceptible and resistant *Propionibacterium acnes*. Honeybee venom was prepared with different concentrations and they showed strong antibacterial activites. Honeybee venom inhibited the growth of the tested antibiotic-resistant *P. acnes* at the concentration of 1 mg/ml. The inhibitory activities of the honeybee venom showed time-dependent manner. Honeybee venom did not influence the viability of human dermal fibroblast at the high concentration of less than 10 mg/ml. From these results, we expect that honeybee venom has strong antibacterial activities and has advantage for treating cure.

Key words – Bee venom, acne, *Propionibacterium acnes,* Antibacterial activity

서 론

여드름의 정확한 원인은 밝혀져 있지 않으나 여드름의 발생 요인으로는 피지 분비의 증가, 피지선을 자극하는 호르몬인 androgen과 모피지선에서 번식하여 피지를 분해하여 유리 지방산을 형성하는 *Propionibacterium acnes*에 의한 염증 진전, 모낭내 이상 각화, 유전적 소질 등의 주요인자가 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있다.[1-3] 호기성 피부 상재균은 염증의 일차적 원인은 아니지만, 염증 발생 부위를 더욱 확장시켜, 여드름이 악화되는데 영향을 주는 것으로 밝혀져 있다.[4,5] 치료로는 경구 항생제와 레티노이드의 복용과 함께 외용 약제의 도포, 면포 적출술, 화학박피 등의 방법들이 보편적으로 이용되고 있다.[6] 특히, 세균 감염에 의한 생성되는 염증성 여드름의 경우 항생제 처리를 통해 증상을 개선시킬 수 있으나, 최근 *P. acnes* 증식 억제와 염증 반응을 감소를 위해 주로 이용되는 tetracycline, clindamycin, erythromycin 등 항생제에 내성을 갖는 *P. acnes* 증가와 부작용 유발 가능성이 제기되고 있다.[7-9]

최근 천연 항균 물질에 대한 관심이 증가하면서 이에 대한 많은 연구가 수행되고 있다.[4,10] 순수 천연물질이면서 강력한 항균, 항염증 효과를 갖는 봉독은 부작용과 잔류에 대한 위험성이 적어 봉침요법으로 오래전부터 관절염, 통풍 등의 질환에 사용되어 오고 있다.[11,12] 봉독은 다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있으며, 주 성분인 멜리틴 (melittin)은 항염증[13,14]과 항균작용[15], 강력한 진통작용[16], 면역증강[17] 등의 역할을 한다. 봉독은 그람 음성 및 양성균에 대해 모두 항균작용을 보이나, 특히 그람 양성균에서 더 강한 것으로 알려져 있다.[18] 또한 봉독은 자외선에 의해 손상된 피부의 재생을 촉진한다고 밝혀져 있다.[19] 그러나 살아있는 벌을 이용한 봉침요법은 비숙련자의 취급상의 문제점과 함께 균일한 봉독의 확보와 정량화가 이루어지지 않아 실용화에 한계를 지니며, 봉독에 대한 체계적인 효과 구명이 미비한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 국내에서 사육되는 서양종 꿀벌 (*Apis mellifera.* L)을 전기충격법을 사용하여 순수한 봉독만을 분리한 후, 분리한 국내산 봉독의 여드름 개선 및 치료 효과를 과학적으로 규명하기 위하여 여드름 주요 원인균인

*교신저자(E-mail) : sangmih@korea.kr
(Tel) : 031-290-8510

*P. acnes*과 피부의 호기성 상재균 증식 억제 효과에 대하 조사하였다.

재료 및 방법

본 연구소에서 사육중인 서양종꿀벌을 봉독채집장치((주)청진바이오텍, 한국)를 이용하여 봉독을 분리하고 불순물을 제거한 후 순수한 봉독만을 실험에 사용하였다.[20] 정제 봉독은 액체크로마토그래피 (AKTA explorer, Pharmacia, USA)를 사용하여 확인하였다. 전개용매는 0.1 M ammonium formate (pH 4.5)를 사용하였고, Sephadex ^{TM}75 컴럼을 사용하였으며, 봉독 표준품으로는 시그마산 꿀벌독(Sigma, USA)과 멜리틴(mellitin)(Sigma, USA)을 이용하였다. 봉독 성분중에 멜리틴 함량은 아래와 같은 식으로 구하였다.

$$\text{멜리틴 취한 양 (mg)} \times \frac{\text{멜리틴의 순도}}{100} \times \frac{\text{봉독 중의 멜리틴 피이크 면적}}{\text{멜리틴의 피이크 면적}} \times \frac{100}{\text{봉독 취한 양}}$$

본 연구에서 사용한 여드름 원인균인 *Propionibacterium acne*(ATCC 6919)은 한국미생물균주은행으로부터 분양 받았으며, clindamycin 내성균주인 *Propionibacterium acne* (CCARM 9010)은 한국내성균주은행에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 대표적인 피부 상재균인 *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis*(ATCC 12228) 및 *Sreptococcus pyogenes* (ATCC 12353)은 한국미생물균주은행으로부터 분양 받아 사용하였다.

항균효과 측정

1) 최소 성장억제농도(Minimun Inhibitory Concentration, MIC)

액체배지 희석법에 의한 *P. acnes*와 내성균주인 *P. acnes*, 피부 상재균인 *S. aureus*, *S. epidermidis* 및 *S. pyogenes* 에 대한 최저 성장억제농도를 구하였다. 건조봉독은 멸균 증류수로 희석한 후 무균 여과하여 액체배지희석법에 준하여 단계적으로 희석하였다.[21]

*P. acnes*와 내성균주인 *P. acnes*를 5% sheep blood를 첨가한 trypticase soy(TS) broth(Difco Laboratories, MI, USA)를 사용하여 35°C에서 48시간 동한 혐기조건으로 배양한 후 시험에 사용하였다. *P. acnes*에 대한 양성 대조구로 azelaic acid(Sigma, USA) 용액을 사용하였다. 그 외의 피부 상재균은 Muller-Hiton broth(Difco Laboratories, MI, USA)를 이용하여 37°C에서 18시간 동한 배양 후 사용하였고, *S. pyogenes*의 경우는 CO_2 배양기에서 배양하였다.

각각의 접종 균은 2×10^6 CFU/well이 되도록 조절하여 봉독 시료와 함께 18시간 동안 배양한 후, 육안 및 현미경으로 균의 성장을 관찰하였고, 흡수파장 540 nm에서 흡광도를 측정하여 순수배양액의 흡광도 값과 같은 결과를 얻은 것을 최소억제농도로 결정하였다.

2) Agar well diffusion assay

Agar well diffusion assay에 의한 항균효과 검정은 *P. acnes*와 내성균주인 *P. acnes* , 피부 상재균인 *S. aureus* , *S. epidermidis* 및 *S. pyogenes*를 미리 배지에 접종하여 만든 agar plate에 10 mm의 직경으로 구멍을 낸 후 무균 여과한 봉독 시료를 10 mg, 5 mg, 2.5 mg 및 1 mg의 농도로 조절한 후 100 μl를 가하여 배양 하여 세균 증식억제 환 직경을 caliper(Mitutoyo, Japan)로 측정하였다.

3) Time kill assay

봉독 투여 후 시간별로 항균작용이 어떻게 변하는지 측정하기 위해 time-kill curve를 작성하였다. 대수기 초기의 *P. acnes*와 *S. aureus* 균주 배양액에 봉독을 최소 성장억제 농도의 각각 2배, 10배가 되도록 처리하고 2시간 간격으로 배양액을 채취하여 십진 희석법에 의해 희석한 후 각 희석액을 일정량 배지에 접종하고 배양한 후 생성되는 집락의 수를 측정하여 cfu/로 환산하였다.

4) 피부세포에서 봉독의 세포독성 평가

피부세포에 대한 봉독의 세포독성을 알아보기 위하여 human dermal fibroblast(HDF) 세포를 MCTT사(MCTT, 서울)로부터 구입하여 FGM-2 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 계대배양하여 실험에 사용하였다. 배양세포가 바닥 면적의 90% 가량 차도록 자라면 계대배양을 하고 대수 성장기의 세포를 실험에 사용하였다. HDF 세포를 96 well plate에 5×10^5 cell/ml로 하여 분주하여 하루 동안 배양하여 부착시키고 새로운 배지로 교환한 다음 다양한 농도의 벌독을 처리하였다. 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양한 후 세포 생존율을 methylthiazol-2-yl-2.5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 시약으로 처리하여 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 봉독의 피부세포 독성을 평가하였다.

결과 및 고찰

채집 봉독의 주요성분 분석 – 국내에서 채집한 봉독을 시그마산 봉독과 비교한 결과, 성분 및 그 함량이 동일한 것으로 확인되었다 (Fig. 1). 채집 봉독과 시그마산 봉독 모두의 멜리틴 함량은 약 50.9%였다. 이는 봉독의 멜리틴 함량이 40-60% 내외로 알려진 바와 같이 봉독채집장치를 사용하여 채집된 봉독의 성분이 균일하며, 봉침요법과 달리 정량화 하는데 매우 용이하였다. [15]

여드름 유발균 *P. acnes*와 내성균주인 *P. acnes*균주에 대한 항균효과 – Table I에서와 같이 봉독은 여드름의 주요 유발 원인균인 *P. acnes*에 대한 성장 억제 효과를 보였으며,

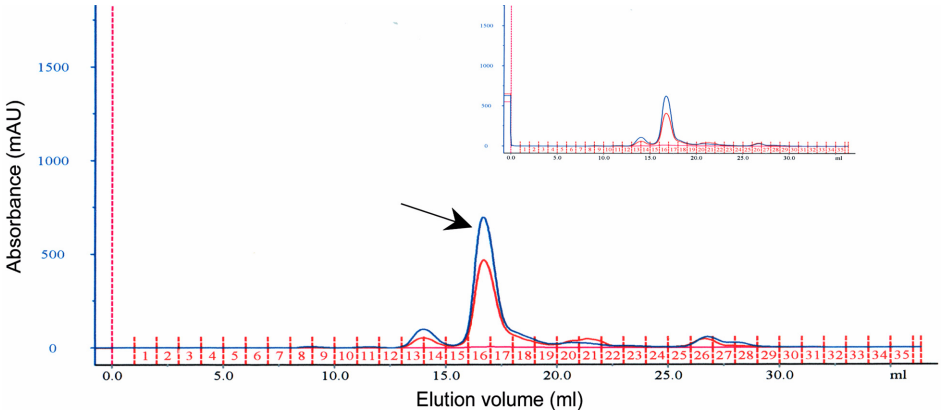

Fig. 1. Gel filtration of 1 mg collected whole bee venom on Sepadex TM75 colum. Elution with 0.1 M ammonium formate buffer, pH 4.5. Determination of standard bee venom (Sigma) and melittin were compared with standard proteins by the optical density at 280 nm(blue line) and 260 nm(red line); The small picture is standard bee venom. Melittin (peak A)

Table I. MICs of honeybee venom from Korea against *Propionibacterium acnes*, antibiotic-resistant *P. acnes*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *Streptococcus pyogenes*, respectively.

Bacteria	MIC (μg/ml)
Propionibacterium acnes	0.086±0.013
antibiotic-resistant *P. acnes*	0.067±0.028
Staphylococcus aureus	0.071±0.042
S. epidermidis	0.121±0.028
Streptococcus pyogenes	0.104±0.049

The values are expressed as the mean±s.e.(n=3) from three independent experiments

clindamycin 내성균주인 *P. acnes*에 대해서도 성장 억제 효과를 보였다. Fig. 2에서와 같이 증식억제대의 측정은 well diffusion 법을 이용하였다. 대조군으로 사용한 배지만을 주입한 well에서는 균의 증식이 억제되지 않았으나, 봉독의 경우 *P. acnes*과 내성균주인 *P. acnes*에서 모두 2.5 mg의 농도에서도 균의 증식억제 효과가 있었다 (Fig. 2). 실험에 사용한 농도범위에서는 봉독의 농도가 증가함에 따라 증식 억제 효과가 현저하게 증가하는 것으로 나타났으며, 봉독은 *P. acnes*의 경우에 내성균에서도 강한 성장 억제 효과를 볼 수 있었다. *P. acnes*에 대한 양성 대조구로 사용한 azelaic acid의 MIC 값은 500 μg/ml 이였다. 이러한 결과로 미루어 봉독은 여드름을 개선할 수 있는 것으로 보인다.

피부 상재균에 대한 MIC 측정 – 염증성 여드름의 병변 발생에 있어 피부 상재균은 단독으로 염증을 일으키지는 않지만 피부에 면포가 생기고 염증이 생겼을 경우에 이차 감염을 일으켜 염증을 악화시킬 수 있어 여드름의 중증도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.[4,5] 또한 여러 가지 항균제를 포함하는 항균 비누을 사용할 경우 피부 상재균의 수를 줄여 여드름 치료뿐 아니라 염증성 병변으로의 진행을 막는 예방효과가 있음을 보여준다는 보고가 있다.[5] 봉독은 대표적인 피부 상재균인 *S. aureus*, *S. epidermidis* 및 *S.*

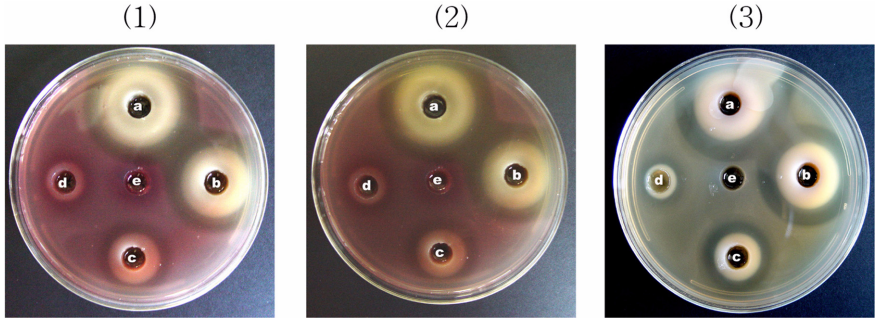

Fig. 2. Results of antimicrobial activity of honeybee venom from Korea, which had been put in the wells bore in the agar plate before the plate was incubated. Trypticase soy agar with 5 % sheep blood was used (1)-(2) and trypticase soy agar was used in (3) represent *Propionibacterium acnes*, antibiotic-resistant *P. acnes*, and *Staphylococcus aureus*. The agar had been seeded with bacteria. The bacterial did not grow in the zones where antibacterial activity was diffusing out into the agar from the wells. The amounts of a, b, c, and d were 0(meida 100 μl only), 1, 2.5, 5, 10 mg of bee venom.

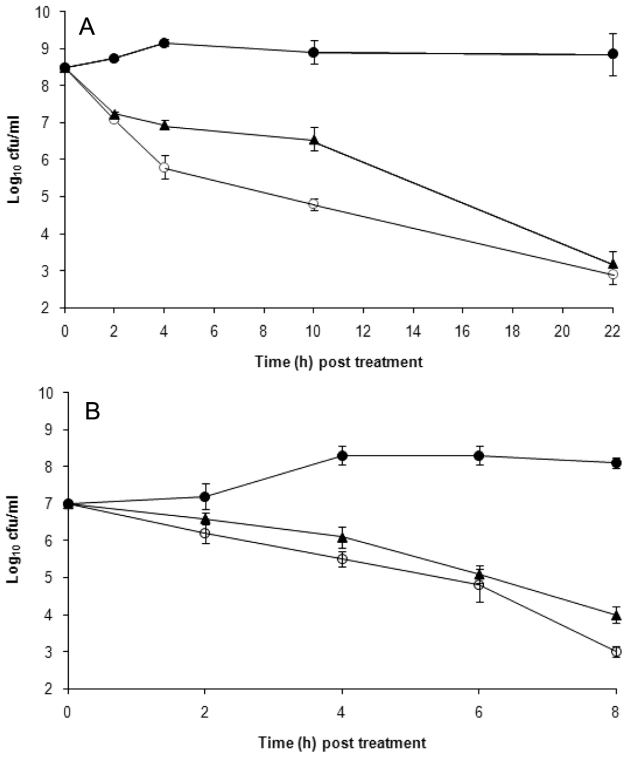

Fig. 3. Time-kill curves for bee venom against *Propionibacterium acnes* (A) and antibiotic-resistant *P. acnes* (B). Control(●), 2 × MIC (▲), 10 × MIC(○)

pyogenes 균 모두에서 우수한 항균 효과를 보이는 것으로 나타났다 (Table I). 특히 *S. aureus* 균주에서는 2.5 mg의 낮은 농도에서도 균의 증식억제 효과가 있었으며, 농도가 증가 할 수록 증식억제 효과가 증가하였다 (Fig. 2). *S. epidermidis* 와 *S. pyogenes* 균주에 대해서는 5 mg 이상의 농도에서부터 균의 증식억제효과가 나타났다. Well diffusion법을 이용한 봉독의 항균력에서 생육저지대가 좁게 나타나는 현상은 봉독의 항균력을 가지고 있는 성분의 배지 내 확산이 다소 저해되기 때문인 것으로 추정된다. 또한 봉독은 주요 피부 상재균에 대한 우수한 성장 억제 효과가 있을 알 수 있었다.

시간별 균 사멸 효과 측정 – 시료 투여 후 시간별로 항균작용이 어떻게 변하는지 측정하기 위하여 time-kill curve를 구하였다. 대조군의 경우 시간이 경과함에 따라 *P. acnes*와 *S. aureus*균의 증식이 증가하였으나, 봉독 처리군은 시간이 경과할수록 균의 증식이 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 3). *P. acnes*의 경우 봉독 처리군이 대조군에 비해 대수증가가 2시간 후에는 1.5배, 8시간 후에는 3.5배 감소하였으며, *S. aureus*균의 경우 2시간 이후에는 2.2배, 8시간 이후에는 5배로 감소하였다.

봉독의 피부세포에 대한 세포독성 – 피부세포인 human dermal fibroblast에 대한 봉독의 세포 독성을 평가 한 결과 Fig. 3에서 보는 보와 같이 1 mg/ml의 농도 범위 까지는 세포 독성이 전혀 관찰되지 않았다. 오히려 피부세포의 생장을 촉진하는 것으로 보였다. 10 mg/ml이상의 농도에서는 세포독성을 보였다 (Fig. 4).

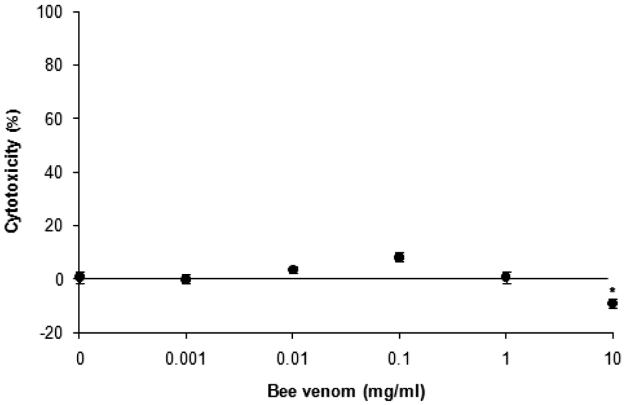

Fig. 4. Cytotoxicity of bee venom on human dermal fibroblast. The human dermal fibroblast (1×10^5 cells) were incubated with the indicated concentrations of bee venom in media at 37 for 24 hours. After incubation, cell viability of human dermal fibroblast was determined with MTT. Data represent mean±s.e. of five individual experiments. *is significantly different at $p<0.05$.

이상의 결과로 봉독은 여드름의 원인이 되는 *P. acnes*와 내성균인 *P. acnes*에 모두 강한 항균력을 보였으며, 피부 상재균에 대해서도 우수한 항균력을 보였다. 시간별 항균력을 측정한 결과 시료 처리 후 짧은 시간 내에도 항균효과를 나타내었으며, 처리 시간이 증가함에 따라 그 효과가 증가하였다. 항생제 투여가 모든 여드름에 치료효과가 있는 것은 아니지만 염증성 여드름 치료에 효과적이며, 모낭내 *P. acnes* 균수를 감소시키며 지방분해효소의 활성을 억제시켜 유리지방산 생성을 감소시키고 호중구의 화학주성을 억제함으로 여드름의 염증성 병변을 감소시킨다고 하였다.[3,22] 본 결과를 바탕으로 천연항균물질인 봉독을 1 mg/ml이하의 농도로 사용한다면 세포 안정성 뿐만 아니라, 여드름 유발균과 피부 상재균에 강한 억제 작용을 하며, 여드름 특히 염증성 여드름 치료에 효과가 뛰어날 것으로 생각되어 향후 여드름 치료제의 개발 가능성이 높은 것으로 사료된다.

결 론

한방에서 봉침요법으로 여드름 치료 및 개선의 목적으로 사용하는 봉독을 봉독채집장치를 사용하여 국내산 꿀벌로부터 대량 분리, 정제하여 여드름 원인균인 *P. acnes*와 내성균인 *P. acnes*, 피부 상재균인 *S. aureus* , *S. epidermidis* 및 *S. pyogenes* 균에 대한 성장 억제 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 액체배지 희석법에 의한 최저성장억제농도는 *P. acnes*

에 대해서는 MIC , 내성균인 *P. acnes*, 의 경우 이며, 피부 상재균인 *S. aureus, S. epidermidis* 및 *S. pyogenes* 균에 대한 MIC는 각각 으로 성장 억제 효과가 우수하였다.

2. well diffusion법에 의한 성장억제 효과 *P. acnes*의 경우 2.5mg의 봉독 양으로도 억제환이 관찰되었으며, 내성균인 *P. acnes*, 피부 상재균인 *S. aureus* , *S. epidermidis* 및 *S. pyogenes* 균에서도 각각 5 mg의 봉독으로도 세균 증식 억제 환을 볼 수 있었다.

3. 봉독 투여 후 시간별로 *P. acnes*와 *S. aureus*에 대한 항균작용이 어떻게 변하는지 측정하기 위하여 time-kill curve에서도 짧은 시간 내에도 항균효과를 보이며, 처리시간이 증가함에 따라 억제 효과가 증가하였다.

봉독은 여드름 유발균과 피부 상재균에 강한 억제 작용을 하며, 여드름 특히 염증성 여드름 치료에 효과가 뛰어나 향후 여드름 치료제의 개발 가능성이 높은 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 2007030103400101)과 아젠다 사업에 의하여 수행되었으므로 감사를 드립니다.

인용문헌

1. Van de kerkhof, P. C., Kleinpenning, M. M., de Jong, E. M., van Dooren-Greebe, R. J. and Alkemade, H. A. (2006) Current and future treatment options for acne. *J Dermatolog Treat* **17**(4): 198-204.
2. Freak, J. (2006) An overview of acne vulgaris. *Nurs Times* **102**(30): 30-32.
3. Taub, A. F. (2007) Procedural treatments for acne vulgaris. *Dermatol Surg* **33**(9): 1005-1026.
4. 임연순, 명기범, 정낙은, 정화순 (1995) 여드름 환자에서 *Propionibacterium acnes*에 대한 항생제의 최저발육저지농도에 관한 연구. 대한피부과학회지 **33**(3): 437-444.
5. 유종엽, 박서형, 황인아, 조성진, 허창훈, 윤상웅, 박경찬, (2003) 상백피 추출물과 차나무 기름 제제가 여드름과 호기성 피부 상재균에 미치는 효과. 대한피부과학회지 **41**(9): 1136-1141.
6. 이두락, 박미연 (2007) Indocyanine Green과 805 nm Diode Laser를 이용한 여드름 치료에 대한 유효성 평가. 대한피부과학회지 **46**(9): 1208-1215.
7. Nakatsuji, T., Kao, M. C., Fang, J. Y., Zouboulis, C. C., Zhang, L., Gallo, R.L. and Huang, C. M. (2009) Animicrobial Property of Lauric Acid Against *Propionibacterium Acnes*: Its Therapeutic Potential for Inflammatory Acne Vulgaris. *J Invest Dermatol* Epub in press.
8. Heller, S., Kellenberger, L. and Shapiro, O. (2007) Anti-propionibacterial Activity of BAL19403, a Novel Macrolide Antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(9): 1956-1961.
9. Jacqueline, M. B. and Susan, M. P. (1983) Resistance of Propionibacteria to antibiotics used in the treatment of acne. *J Med Microbiol* **16**: 271-280.
10. 석귀남, 이성하, 김경신 (2004) 새삼 (*Cuscuta japonica* Choisy) 및 실세삼 (*C. australis* R.Be) 추출물의 여드름 유발균 *Propionibacterium acnes* 증식 억제 효과. 생약학회지 **35**(4)**:** 375-379.
11. 김민정, 박상동, 이아람, 김경호, 장준혁, 김갑성 (2002) 쥐의 Collagen 유발 관절염의 활액에서 단백분해효소의 활성 및 유리기 손상에 미치는 봉독약침의 억제효과. 대한침구학회지 **19**(5): 161-175.
12. 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. H. (2003) Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. *J Vet Med Sci* **65**(3):349-355.
13. Habermann, E. and Reiz, K. G. (1965) On the biochemistry of bee venom pep-tides, melittin and apamin. *Bioche-mistry* **343**:192-203.
14. James, A. V., Glenn, B. W. and Robert, B. B. (1975-1976) The effect of treatment with whole bee venom on cage activity and plasma cortisol levels in the arthritic dog. *Inflammation* **1**(2): 167-174.
15. Piek, T. (1986) Venoms of the Hymenoptera. Academic Press. London
16. Curcio-Vonlanthen, V., Schneider, C. H., Frutig, K., Blaser, K. and Kalbacher, H. (1997). Molecular parameters in melittin immunogenicity. *J Pept Sci* **3**(4):267-276.
17. Rudenko, S. V. and Nipot, E. E. (1996) Modulation of melittin-induced hemolysis of erythocytes. *Biokhimiia* **61**(12):2116-2124.
18. Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H., Kweon, H. Y., Woo, S. O., Baek, H. J. and Park, K. K. (2007) Inhibitory effect of bee venom against ultraviolet B induced MMP-1 and MMP-3 in human dermal fibroblasts. *J Apic Res* **46**(2): 94-98.
19. 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.
20. 한상미, 이광길, 여주홍, 권해용, 이인경, 이명렬, 이만영, 백하주, 배기환 (2005) 전기충격법으로 채취한 국내산 봉독의 항균효과 (I). 한국양봉학회지 **20**(1); 53-58.
21. Wu, M. and Hancock, R. E. (1999) Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* **274**(1): 29-35.
22. 김나래, 임영희, 박설웅, 남은실, (2009) 천연물유래 여드름 치료제제의 항균성 측정. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol* **37**(1): 80-84.

(2009년 7월 8일 접수)