여드름 균에 의한 염증성 동물모델에서 멜리틴에 의한 항균 및 염증 억제 효과

이선재 · 김경현 · 이우람 · 김정연 · 안현진 · 박관규*

대구가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

Anti-bacterial and Anti-inflammatory Effect of Melittin on *Propionibacterium acnes*-induced Inflammatory Skin Disease *in vivo*

Sun-Jae Lee, Kyung-Hyun Kim, Woo-Ram Lee, Jung-Yeon Kim, Hyun-Jin An and Kwan-Kyu Park*

Department of pathology, Catholic University of Daegu, College of Medicine, Daegu, Republic of Korea (Received 31 July 2014; Revised 29 January 2015; Accepted 6 February 2015)

Abstract ⊢

Recently, the therapeutic effect of bee venom on propionibacterium acnes ($P.\ acnes$)-induced inflammation has been known and the mechanism of melittin, one of the main component of bee venom, against acne arises as an interesting issue. In this study, we evaluated suppressive effect and a part of the mechanism of the $P.\ acnes$ - induced inflammation in vivo. The agar diffusion method, the modified disk diffusion method, was used to assess growth inhibitory effects. Melittin (1, 10, 100 μ g) in vaseline was applied epicutaneously on the ear of mice resulting in $P.\ acnes$ -induced inflammation. To investigate the anti-inflammatory response of melittin in $P.\ acnes$ -induced inflammation, hematoxylin and eosin stain and immunohistochemical stain of F4/80 was done in the submitted ear specimen. Melittin inhibited the growth of $P.\ acnes$ and this effect showed dose dependant and time dependant manner. Epicutaneous administration of melittin decreased inflammatory reaction associated with $P.\ acnes$ and decreased number of macrophages, especially at the dose of 1μ g. From these results, we expect that melittin has strong antibacterial and anti-inflammatory activities and has the potential as an alternative treatment to the antibiotic drug therapy of acne vulgaris.

Key words: Melittin, Propionibacterium acnes, Antibiotic, Inflammation

서 론

여드름은 *Propionibacterium acnes(P. acnes)*에 의해 피부 모낭 주변의 피지선에서 유발되는 염증성 질환이

다(Gollnick et al., 1991). P. acnes는 피부에 분포하는 정상 상재균의 하나로, 진행성 여드름의 피지선 주위에 증식하여 염증반응을 유발하는 그람양성간균이다 (Leyden et al., 1975). 여드름은 세 단계의 뚜렷한 진행

^{*}Corresponding author. E-mail: kkpark@cu.ac.kr

과정을 거친다. 첫 단계는 피지선 분비물인 유리 지방산이 증가하는 단계로 사춘기, 스트레스 등의 원인으로 피지선 분비를 자극하는 호르몬이 증가하면서 일어나는 초기단계이다. 증가된 피지선 분비물이 제대로 배출되지 못하면서 모낭 내부에 microcomedone이형성되는 것이 두 번째 단계이다. 형성된 microcomedone에 의해 늘어난 피지선은 세균 증식에 매우좋은 환경을 조성하여, P. acnes 감염으로 염증반응을 유발시킨다(Tenaud et al., 2007). 이 과정에서 P. acnes는 단핵구를 끌어들이는 cytokine을 분비하여 염증반응을일으키게 된다(Vowels et al., 1995).

여드름의 발생 및 진행에는 여러 가지 요인이 복합적으로 작용하기 때문에 여드름의 치료에도 여러 가지 방법이 사용되고 있다. 특히 세균 감염이 동반된염증성 여드름의 경우 항생제 복용 및 도포를 통해 증상을 억제시킬 수 있다. 그러나 여드름의 치료에 주로사용되는 tetracycline, clindamycin, erythromycin 등의 항생제에 내성을 갖는 *P. acnes* 균주가 증가하는 추세이고, 피부발진, 통증, 정상 상재균총 변화에 의한 이차감염 유발 등의 부작용이 생길 수 있어 그 치료에 한계가 제기되고 있다(한 등, 2009). 따라서 내성 균주 및약물 부작용 등의 문제로 인해 천연물질에 의한 여드름치료 방안이 모색되고 있다.

천연물 유래의 항균물질은 약리효과가 높고 부작 용이 낮아 최근 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있 다. 봉독은 순수 천연물질이면서 강력한 진통 및 항염 증 작용이 있어 오래 전부터 봉침 요법을 통해 관절 염, 신경성 질환, 부인과 질환 등 광범위한 영역에서 사용되어 왔다(Dunn and Killion, 1988; Rudenko and Nipot, 1996; 안 등, 2012). 1990년대 이후, 봉독에 관한 연구가 더욱 활발히 이루어지면서 봉독의 항염증 작 용 뿐 아니라, 항균, 항암효과 등 다양한 생리, 약리 작 용이 있음이 밝혀지고 있다(안 등, 2012; Son et al., 2007; 김 등, 2002; Kim et al., 2003; 이 등, 2009; 김 등, 2009). 특히 만성 간질환, 신경성질환, 소화기 질환, 후 천성 면역결핍질환 등에 관한 효과 등이 보고되고 있 으며(Dunn and Killion, 1988; Rudenko and Nipot, 1996) 이들 질환이 대부분 염증성 질환이고 또한 최근 봉독 의 여드름 치료에 대한 효과가 알려지면서 봉독의 주 성분인 멜리틴의 항 여드름 작용이 관심을 받게 되었

다.

봉독은 phopholipase A2와 hyaluronidase 등의 효소 및 멜리틴, apamin, adolapin, mast cell degranulating peptide 와 같은 peptide 성분과, 그외 nonpeptide 성분의 40여 가지의 구성성분으로 이루어져 있다(이 등, 2009; Lee et al., 2008). 그 중 멜리틴은 건조 봉독의 50%를 구성 하는 주성분으로 26개의 아미노산으로 구성된 작은 선형의 단백질이다. 이 물질은 단백질 구조의 한쪽 끝 은 친수성, 반대쪽은 소수성을 띠고 있어 세포막을 구 성하는 성분에 결합하기 쉬운 구조로 되어 있다. 이러 한 구조적인 특징 때문에 멜리틴은 세포막을 파괴하 고, 세포막 수용체에 결합하여 용혈 작용 및 항염증 작용 등 다양한 기능을 수행한다(Raghuraman and Chattopadhyay, 2007). 특히 멜리틴은 여러 종류의 세포 에서 작용하여 항염증 및 항균 작용, 강력한 진통작 용, 면역증강 등의 역할을 한다고 알려져 있다 (Rudenko and Nipot, 1996; Habermann and Reiz, 1965; James et al., 1975-1976; Piek, 1986; Curcio-Volanthen et al., 1997).

본 연구에서는 여드름 유발균으로 알려진 *P. acnes* 를 이용해서 실험동물에 여드름을 유발한 뒤 멜리틴을 투여하여, 여드름 균에 의한 염증반응을 억제하는 효과와 억제기전의 일부를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지 조성

본 연구에서 사용한 여드름 원인균인 *P. acnes* (ATCC 6919)는 한국 미생물 균주 은행(서울, 대한민국)으로부터 분양 받아 사용하였다. 분양 받은 균주는 Reinforced Clostridium Medium(RCM, BD, MD, USA) 배지에 37°C, 혐기 조건으로 배양하였다. 실험에 사용하기 전에 *P. acnes*는 5% (v/v) defibrinited sheep blood를 첨가한 tryptic soy broth(BD, MD, USA) 배지에 37°C에서 OD600=1.0(logarithmic growth phase)이 되도록 배양하였다. 로그 값에 도달한 균주는 5,000g, 4°C에서 15분간 원심분리 후 여과하여 즉시 사용하거나 -20°C에 보관하였다.

항균효과 측정

항균효과를 측정하기 위해 agar well diffusion array 기법을 사용하였다. *P. acnes*를 미리 배지에 접종시켜 1.0×10⁷colony-formingunit(CFU)/ml가 되도록 agar plate 를 만들었다. 그 위에 8.0mm 직경으로 다섯 개의 구멍을 낸 후 무균 여과한 멜리틴(Sigma, MO, USA)을 각각 0, 0.25, 0.63, 1.25, 2.5mg의 농도로 첨가한 후 phosphate buffered saline(PBS) 100μl를 가하였다. 이후 37°C 혐기 환경에서 배양하였고, 각 24시간 후와 48시간 후에 세균 증식 억제환의 직경을 caliper(Mitutoyo, Japan)로 측정하였다.

실험 동물 및 여드름 유발

샘타코 BIO KOREA(오산, 경기도, 대한민국)에서 제공받은 체중 20gm 내외의 생후 7주 수컷 C57BL/6 마우스를 7일간 적응 시켰다. 실험용 마우스는 3마리 씩 4군으로 나누어 군 별로 cage에 분리시키고 각각의 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. A군은 양 성 및 음성 대조군으로 마우스의 왼쪽 귀에 P. acnes(1.0×10⁷CFU/20μl in PBS)를 피내주사 하였고 오른쪽 귀에는 20山의 PBS를 피내 주사하였다. M1 군 은 마우스의 양쪽 귀에 P. acnes를 피내 주사한 후 오 른쪽 귀에만 1µg의 멜리틴을 0.05g 바셀린에 섞어 귀 에 도포하였다. M10과 M100 군은 M1 군과 같은 방식 으로 각각 오른쪽 귀에 10,100µg의 멜리틴을 0.05g 바 셀린에 섞어 귀에 도포하였다. 각 군의 마우스는 실험 시작 24시간 후 경추탈골로 희생한 후 귀 조직을 적출 하였다. 적출한 귀 조직은 10% 포르말린에 고정시킨 후 일련의 조직처리과정을 거친 후 파라핀 포매기 (Leica EG116)에 포매하여 마이크로톰(Leica 820)으로 4μm 두께의 절편을 제작한 다음 정해진 절차에 따라 hematoxylin and eosin 염색 후 광학현미경으로 조직 소 격을 관찰하였다.

면역조직화학염색

파라핀 포매 조직을 4µm 두께로 잘라 제작한 조직 절편 슬라이드에 대식 세포 표면 발현물질인 F4/80(1:200, Santa Cruz, CA, USA)의 면역화학염색을 시행하였다. 면역화학염색은 자동면역염색기 (BOND-MAX, Leica Biosystems)을 통해 자동화 과정으로 이루어졌으며, 모든 절차는 제조업체에서 제공하는 매뉴얼에 맞게 진행되었다. 발색은 DAB (3,3' - diaminobenzidine tetrahydrochloride)를 사용하였다.

결과 및 고찰

여드름 유발균 P. acnes에 대한 멜리틴의 항균 효과

Agar well diffusion array 방식을 통해 각각 24시간 후 와 48시간 후 발생한 세균 증식 억제환의 직경을 측정하였다. 24시간 후의 직경은 0.8, 1.2, 1.4, 1.8, 2.1cm이었고, 48시간 후의 직경은 0.8, 1.2, 1.4, 2, 2.5cm이었다 (Fig. 1A, B). 대조군으로 사용한 well에서는 균의 증식이 억제되지 않았으나 멜리틴이 첨가된 well에서는 증식 억제환을 관찰할 수 있었다. 증식억제환은 멜리틴의 농도가 증가할수록 그 직경이 커지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1C, D).

이러한 결과로 미루어 볼 때 봉독의 주성분인 멜리 틴은 P. acnes에 대한 항균력을 가지고 있는 것으로 보 인다. 또한 증식 억제환의 직경이 24시간 후와 48시간 후의 결과에서 약간의 증가는 있었지만 크게 차이를 보이지 않는 것으로 보아 멜리틴의 항균력은 24시간 이내에 가장 빠르게 작용하는 것으로 생각된다. 한 등 (2009)의 연구에서 봉독이 P. acnes에 대해 항균효과가 있음을 보고한 바 있다. 이 연구에서 봉독의 시간 별 항균력을 알아보았을 때에도 즉각적인 항균효과를 확인할 수 있었으며, 이는 본 실험의 결과와도 매우 유사하였다. 따라서 본 실험으로 미루어 보아 봉독의 항균력은 멜리틴에 의한 것으로 볼 수 있다. 봉독과 멜리틴에 의한 항균효과는 아직 그 기전이 잘 밝혀져 있지 않지만 2µg/ml 이상 봉독을 투여할 시에는 간세 포에서 apoptosis가 유발되지만 소량의 일정 농도 (lug/ml)에서는 apoptosis를 억제한다는 보고가 있음 을 미루어 보아 아마도 이와 연관이 있을 것으로 추정 된다(이 등, 2009). 또한 봉독의 항세균 작용 기전은 멜

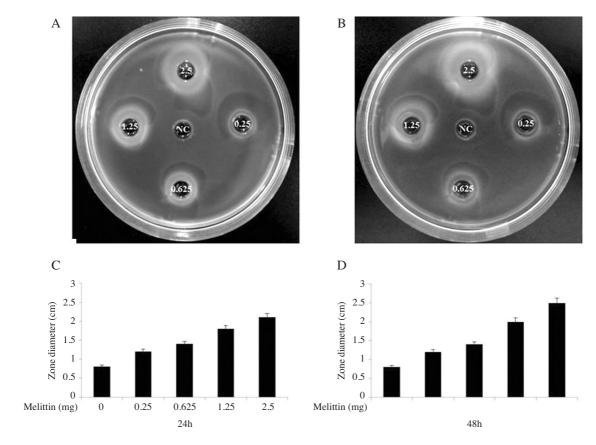


Fig. 1. Anti-bacterial activity of melittin against *P. acnes* to be determined by disk diffusion method. Five holes with eight millimeter diameter were formed and 0, 0.25, 0.625, 1.25 and 2.5mg of melittin were placed on it respectively. After incubation with anaerobic conditions at 37°C for 24 h (A, C) and 48 h (B, D), the diameter of each growth inhibitory circle was measured. Representative images are shown. *p<0.05 compared to melittin concentration of zero.

리틴이 그 구조적 특징 때문에 세균의 세포막 지질에 친화력이 높아 세포막에 존재하는 구멍을 통하여 전위하면서 작용하는 것이라는 연구 보고도 있었다 (Matsuzaki, 1997).

조직학적 소견

여드름에 관여하는 균에는 *P. acnes*, *S. epidermidis*, *P. ovale* 등이 있다. 이들 중에서 *P. acnes*는 임상학적 연구결과를 통해 여드름을 더욱 악화시키는 균으로 알려져 있다(Holland *et al.*, 1981). 본 연구에서는 여드름 균으로 유발된 피부질환 동물 모델을 확립하기 위하여 *P. acnes*를 마우스의 왼쪽 귀에 피내 주사하고 대조군으로 오른쪽 귀에 20μl의 PBS를 피내 주사하였다. *P. acnes*를 주사한 귀의 조직은 전반적으로 부종이 있었고 모낭 내부는 모낭상피가 괴사하고 면포를 형성

하고 있었다. 모낭 내부 및 모낭 주변부에는 염증세포가 침윤되어 있었고, 염증이 심한 부위에는 농양을 형성한 모습도 관찰되었다. *P. acnes*에 감염시키지 않은 정상 대조군의 귀 조직에서는 부종이나 염증 소견 등은 관찰되지 않았다(Fig. 2A, B).

P. acnes를 주사한 후 멜리틴을 도포한 조직은 약물을 도포하지 않은 조직에 비해 염증세포의 침윤이나 농양의 크기가 눈에 띄게 줄어든 양상을 나타내었다 (Fig. 2C-E). 이러한 결과는 특히 1μg의 농도의 멜리틴을 도포한 M1군에서 가장 잘 관찰할 수 있었다. 한 등 (2009)의 연구에서는 적당한 농도의 봉독은 피부세포의 생장을 촉진시키지만 그 이상의 농도에서는 세포독성을 나타냄을 보고한 바 있다. 이로 보아 봉독의 세부물질인 멜리틴 또한 적정 농도 이상을 사용할 때 P. acnes 뿐 아니라 정상 조직에서도 세포독성을 나타낼 수 있는 것을 확인할 수 있었다. 이전 연구를 통하

Journal of Apiculture

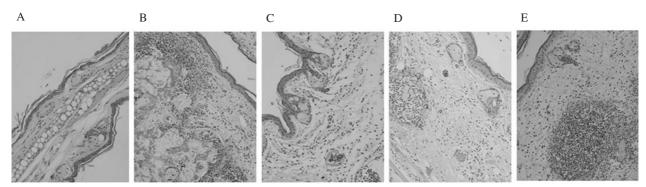


Fig. 2. Microscopic features of epicutaneous administration of melittin on *P. acnes*-induced inflammation. Epicutaneous administration of melittin with *P. acnes* reduced the inflammatory reaction, thereby relieving *P. acnes*-induced edema and abscess formation, especially at the dose of 1μg of melittin. A: Vaselin treated tissue, B: *P. acnes* injected tissue, C: 1μg of melittin treated tissue with *P. acnes* injection, D: 10μg of melittin treated tissue with *P. acnes* injection, E: 100μg of melittin treated tissue with *P. acnes* injection, Hematoxylin and Eosin stain, x200.

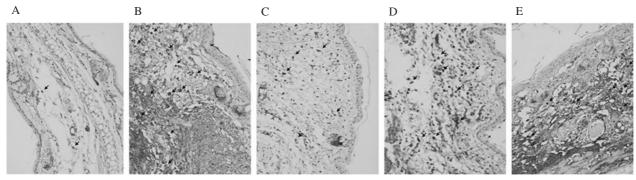


Fig. 3. Immunohistochemical stain of F4/80. The number of infiltrated macrophages stained with brown (arrows) is markedly decreased in the tissue of epicutaneous administration of melittin with *P. acnes*, especially at the dose of 1μg of melittin. A: Vaselin treated tissue, B: *P. acnes* injected tissue, C: 1μg of melittin treated tissue with *P. acnes* injection, D: 10μg of melittin treated tissue with *P. acnes* injection, E: 100μg of melittin treated tissue with *P. acnes* injection, x200.

여 봉독이 *P. acnes*로 유발된 염증성 피부질환 동물모 델에 미치는 효과를 확인하였다(이 등, 2011). 본 연구에서는 멜리틴을 단독으로 투여하여도 염증성 피부질환 동물 모델에서 이전 보고와 비슷한 효과를 보임을 관찰할 수 있었다. 또한 봉독과 마찬가지로 10μg이상의 멜리틴을 사용하였을 때보다 세포독성을 나타내지 않는 1μg의 농도를 사용하였을 때 치료효과가 더 큰 것을 확인하였다.

P. acnes는 모낭 주변부의 피부상피세포, 단핵구, 중성구, T림프구를 자극하여 염증유발 cytokine 분비를 유도하여 염증반응을 일으킨다(McInturff and Kim, 2005). 이러한 cytokine은 피부에 상재하는 대식세포의 활성을 자극하여 일차성 면역반응을 일으키며 이차성 면역 반응을 일으키는 염증세포의 화학주성을 유도한다(Kim et al., 2002). F4/80의 면역화학염색을통해 대식세포의 분포양상을 확인한 결과 정상 조직

에서는 피부에 상재하는 대식세포만 일부 관찰되었 으나, P. acnes을 주사한 조직에서는 대식세포의 수가 증가했음을 알 수 있었다(Fig. 3A, B). P. acnes을 주사 한 후 멜리틴을 도포한 M1, M10, M100군에서는 대식 세포의 수가 정상 조직보다는 증가되어 있지만 멜리 틴을 도포하지 않은 조직에서보다는 감소한 것을 확 인할 수 있었다. 특히 lug의 농도의 멜리틴을 도포한 M1 군에서 눈에 띠는 호전이 관찰되었으며, 이는 조 직 현미경 검사를 통해 관찰한 염증의 양상과 같았다 (Fig. 3C-E). 염증 주변부에서는 대식세포 외에 세포 외 조직에서도 F4/80에 양성소견을 관찰할 수 있었는 데 이는 아직 잘 알려지지 않은 F4/80의 기능이 염증 과 관련이 있어 염증 주변에서 대식세포에 의해 유리 된 물질이 발색이 된 것으로 생각된다. 혹은 염증 반 응과 멜리틴의 세포 독성에 의해 파괴된 대식세포의 유리된 물질이 표현되었을 경우도 생각할 수 있다.

이상의 결과로 멜리틴은 여드름의 원인이 되는 P. acnes 균주에 대한 강한 항균력을 보였다. 멜리틴 처리 후짧은 시간 내에 즉각적인 항균 효과를 나타내었으며, 처리 시간이 증가함에 따라 미약하지만 그 효과가 증가함을 관찰하였다. P. acnes로 유발된 염증성 피부질환 동물모델에서도 멜리틴을 투여한 조직에서염증 반응이 억제되는 것을 광학 현미경 검사 및 면역조직화학염색을 통해 확인할 수 있었다.

본 결과를 바탕으로 천연항균물질인 봉독의 주요 성분인 멜리틴을 세포 독성을 나타내지 않는 1μg 이하의 농도로 사용한다면 세포 안정성뿐만 아니라 여드름 유발균주인 *P. acnes*에 강한 항균 작용을 하여, 염증성 여드름 치료에 뛰어난 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각되어 향후 치료 약제 개발 가능성이 높을 것으로 생각된다.

봉독과 그 세부성분에 대한 연구는 다양한 질환에서 활발히 진행되고 있으며, 특히 여드름은 대표적인 피부질환임에도 불구하고 복합적인 이유로 탁월한 치료방침이 정립되지 않은 형편으로 최근 봉독이 염증성 여드름에 치료효과가 있음이 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 봉독의 주성분인 멜리틴이 여드름 유발균인 P. acnes의 병태 생리에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1. 멜리틴이 배양된 *P. acnes*에 대해 항균효과를 나타냄을 관찰할 수 있었다. 또한 그 효과는 투여 후 24시간 이내에 최대의 효과를 얻을 수 있었다.
- 2. 멜리틴은 *P. acnes*로 유도된 마우스의 염증성 피부질환에 대한 항염증 효과가 있음을 확인하였다. 이는 면역조직화학염색을 통하여 염증성 피부질환에서 증가한 대식세포의 수가 멜리틴의 투여로 감소하는 것으로도 확인할 수 있었다.

본 연구를 통하여 봉독의 주성분인 멜리틴은 여드름 유발균인 *P. acnes*의 활성과 이로 유도된 염증반응을 억제시킴으로써 염증성 여드름에 대한 치료효과가 있음을 확인하였다. 또한 멜리틴은 봉독성분 중가장 많은 함량을 차지하는 물질이기 때문에 추출 및 정제도 용이하여 이후 여드름 치료제로서 활용도가 클것으로 생각된다.

적 요

최근 봉독의 여드름 치료에 대한 효과가 알려지면 서 봉독의 주성분인 멜리틴의 항 여드름 작용이 관심 을 받게 되었다. 본 연구에서는 여드름 유발균으로 알 려진 P. acnes를 이용해서 실험동물에 여드름을 유발 한 뒤 멜리틴을 투여하여, 여드름 균에 의한 염증반응 을 억제하는 효과와 억제기전의 일부를 관찰하고자 하였다. 항균효과를 측정하기 위해 agar well diffusion array 기법을 사용하였다. 마우스의 양쪽 귀에 P. acnes 를 피내 주사한 후 오른쪽 귀에만 각 1,10,100µg의 멜 리틴을 바셀린에 섞어 귀에 도포하였다. 여드름균에 의해 유도된 피부염증반응에 대한 멜리틴의 항염증 작용을 확인하기 위해 실험쥐의 귀 조직에 hematoxylin and eosin 염색과 대식 세포 표면 발현물질인 F4/80 의 면역화학염색을 시행하였다. 멜리틴 처리 후 짧은 시간 내에 즉각적인 항균 효과를 나타내었으며, 처리 시간이 증가함에 따라 그 효과가 증가함을 관찰하였 다. P. acnes로 유발된 염증성 피부질환 동물모델에서 도 멜리틴을 투여한 조직에서 염증 반응이 억제되는 것을 광학 현미경 검사 및 면역조직화학염색을 통해 확인할 수 있었다. 본 연구를 통하여 봉독의 주성분인 멜리틴은 여드름 유발균인 P. acnes의 활성과 이로 유 도된 염증반응을 억제시킴으로써 염증성 여드름에 대한 치료효과가 있음을 확인하여 향후 치료 약제 개 발 가능성이 높을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01132501)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- 김경현, 박지현, 김수정, 이우람, 여주홍, 한상미, 이광길, 박관규. 2009. 봉독이 고콜레스테 롤 식이 투여 마우스의 지질 대사 및 간기능에 미치는 영향. 한국양봉학회지 24(3): 179-189.
- 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.
- 안현진, 이종기, 박지현, 김경현, 이우람, 박인영, 한상미, 이 광길, 박관규. 2012. 봉독이 Papain으로 유도된 골관 절염 동물 모델에 미치는 영향. 생약학회지 43(2): 167-172.
- 이우람, 박지현, 김경현, 김수정, 이광길, 여주홍, 한상미, 우 순옥, 박관규. 2009. Melittin이 알코올로 유도된 간세 포 Apoptosis에 미치는 영향. 한국양봉학회지 24(1): 49-56.
- 이우람, 박지현, 김경현, 안현진, 한상미, 박관규. 2011. 봉독이 여드름 균으로 유도된 염증성 동물모델에 미치는 효과. 생약학회지 42(4): 366-370.
- 한상미, 이광길, 여주홍, 김원태, 박관규. 2009. 국내산 봉독의 여드름 유발균 및 피부 상재균 증식 억제 효과. 생약학회지 40(3): 173-177.
- Curcio-Volanthen, V., Schneider, C. H., Frutig, K., Blaser, K. and Kalbacher, H. 1997. Molecular parameters in melittin immunogenicity. J. Pept. Sci. 3(4): 267-276.
- Dunn, J. D. and Killion, J. J. 1988. Effect of melittin on pituitary adrenal responsiveness to stress. Acta. Endocrinol. 119: 339-344.
- Gollnick, H. P., Zouboulis, C. C., Akamatsu, H., Kurokawa, I. and Schulte, A. 1991. pathogenesis and pathogenesis related treatment of acne. J. Dermatol. 18: 489-499.
- Habermann, E. and Reiz, K. G. 1965. On the biochemistry of bee venom peptieds, melittin and apamine. Biochemistry 343: 192-203.
- Holland, K. T., Ingham, E. and Cunliffe, W. J. 1981. A review: the microbiology of acne. J. of Applied Bacteriology 51(2): 195-215.
- 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.
- 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.

- Kim, J., Ochoa, M. T., Krutzik, S. R., Takeuchi, O., Uematsu, S., Legaspi, A. J., Brightbill, H. D., Holland, D., Cunliffe, W. J., Akira S., Sieling, P. A., Godowski, P. J., and Modlin, R. L. 2002. Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. J. Immunol. 169(3):1535-41.
- Lee, K. G., Yeo, J. H., Han, S. M., Lee, W. R., Kim, K. H. and Park, K. K. 2008. Effects of Bee Venom in TGF-β1-indued Hepatocyte Apoptosis. J. Kor. Acupuncture 23(3): 191-198.
- Leyden, J. J., K. J. McGinley, O. H. Mills and A. M. Kligman. 1975. *Propionibacterium* levels in patients with and without acne vulgaris. J. Invest. Dermatol. 65: 382.
- Matsuzaki, K. 1997. Molecular action mechanisms and membrane recognition of membrane-acting antimicrobial peptide. Yakugaku Zassh. 117(5): 253-264.
- McInturff, J. E., and Kim, J. 2005. The role of toll-like receptors in the pathophysiology of acne. J. Semin Cutan Med Surg. 24(2): 73-8.
- Piek, T. 1986. Venoms of the Hymenoptera. Academic Press. London.
- Raghuraman, H. and A. Chattopadhyay. 2007. Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions. Biosci. Rep. 27: 189-223.
- Rudenko, S. V. and Nipot, E. E. 1996. Modulation of melittininduced hemolysis of erythrocytes. Biokhimiia 61: 2116-2124.
- Son, D. J., Lee, J. W., Lee, Y. H., Song, H. S., Lee, C. L. and Hong, J. T. 2007. Therapeutic application of antiarthritis, pain-releasing, and anti-cancer effect of bee venom and its constituent compounds, Phaemacol. Ther. 115: 246-270.
- Tenaud, I., Khammari, A. and Dreno, B. 2007. In vitro modulation of TLR-2, CD1d and IL-10 by adapalene on normal human skin and acne inflammatory lesions. Exp Dermatol. 16(6): 500-506.
- Vowels, B. R., S. Yang and J. J. Leyden. 1995. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications from chronic inflammatory acne. Infect. Immun. 63: 3158.