

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

이선재 · 김정현 · 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 1 μ 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. acnes*는 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

항균효과 측정

항균효과를 측정하기 위해 agar well diffusion array 기법을 사용하였다. *P. acnes*를 미리 배지에 접종시켜 1.0×10^7 colony-forming unit (CFU)/ml가 되도록 agar plate를 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) 100 μ l를 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 3마리씩 4군으로 나누어 군 별로 cage에 분리시키고 각각의 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. A군은 양성 및 음성 대조군으로 마우스의 왼쪽 귀에 *P. acnes* (1.0×10^7 CFU/20 μ l in PBS)를 피내주사 하였고 오른쪽 귀에는 20 μ l의 PBS를 피내 주사하였다. M1군은 마우스의 양쪽 귀에 *P. acnes*를 피내 주사한 후 오른쪽 귀에만 1 μ g의 멜리틴을 0.05g 바셀린에 섞어 귀에 도포하였다. M10과 M100군은 M1군과 같은 방식으로 각각 오른쪽 귀에 10, 100 μ g의 멜리틴을 0.05g 바셀린에 섞어 귀에 도포하였다. 각 군의 마우스는 실험 시작 24시간 후 경추탈골로 희생한 후 귀 조직을 적출하였다. 적출한 귀 조직은 10% 포르말린에 고정시킨 후 일련의 조직처리과정을 거친 후 파라핀 포매기 (Leica EG116)에 포매하여 마이크로톰 (Leica 820)으로 4 μ m 두께의 절편을 제작한 다음 정해진 절차에 따라 hematoxylin and eosin 염색 후 광학현미경으로 조직 소견을 관찰하였다.

면역조직화학염색

파라핀 포매 조직을 4 μ m 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. acnes*에 대한 멜리틴의 항균 효과

Agar well diffusion array 방식을 통해 각각 24시간 후와 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 멜리틴은 *P. acnes*에 대한 항균력을 가지고 있는 것으로 보인다. 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. acnes*에 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 2 μ g/ml 이상 봉독을 투여할 시에는 간세포에서 apoptosis가 유발되지만 소량의 일정 농도 (1 μ g/ml)에서는 apoptosis를 억제한다는 보고가 있음을 미루어 보아 아마도 이와 연관이 있을 것으로 추정된다(이 등, 2009). 또한 봉독의 항세균 작용 기전은 멜

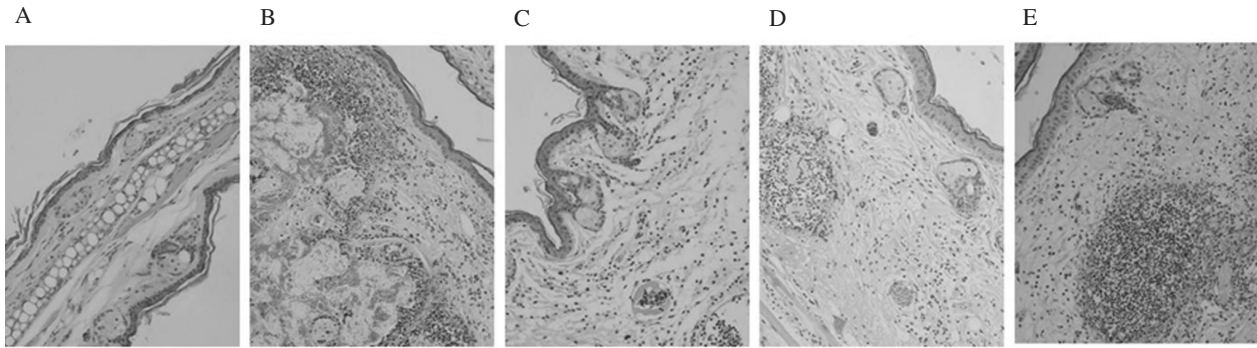


Fig. 2. Microscopic features of epicutaneous administration of melittin on *P. acnes*-induced inflammation. Epicutaneous administration of melittin with *P. acnes* reduced the inflammatory reaction, thereby relieving *P. acnes*-induced edema and abscess formation, especially at the dose of 1µg of melittin. A: Vaseline 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.

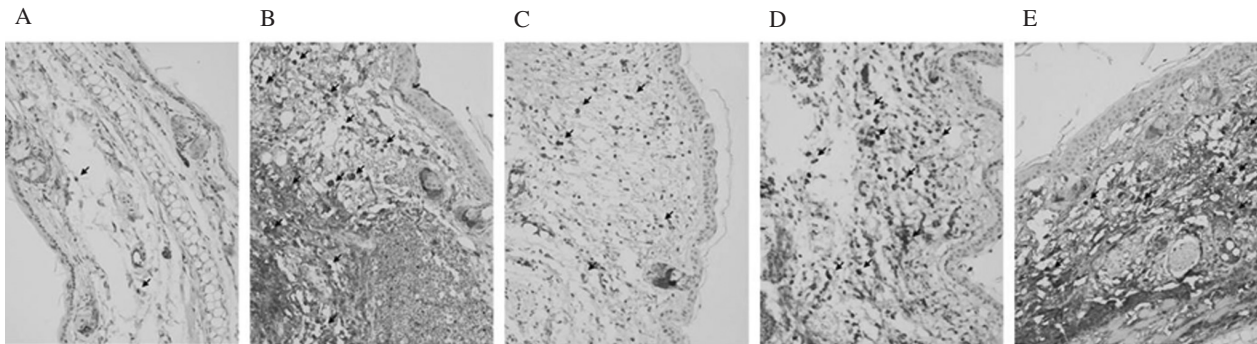


Fig. 3. Immunohistochemical stain of F4/80. The number of infiltrated macrophages stained with brown (arrows) is markedly decreased in the tissue of epicutaneous administration of melittin with *P. acnes*, especially at the dose of 1µg of melittin. A: Vaseline treated tissue, B: *P. acnes* injected tissue, 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 동물모델에 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 10µg 이상의 멜리틴을 사용하였을 때보다 세포독성을 나타내지 않는 1µg의 농도를 사용하였을 때 치료효과가 더 큰 것을 확인하였다.

*P. acnes*는 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 면역화학염색을 통해 대식세포의 분포양상을 확인한 결과 정상 조직

에서는 피부에 상재하는 대식세포만 일부 관찰되었으나, *P. acnes*을 주사한 조직에서는 대식세포의 수가 증가했음을 알 수 있었다(Fig. 3A, B). *P. acnes*을 주사한 후 멜리틴을 도포한 M1, M10, M100군에서는 대식세포의 수가 정상 조직보다는 증가되어 있지만 멜리틴을 도포하지 않은 조직에서보다는 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히 1µg의 농도의 멜리틴을 도포한 M1 군에서 눈에 띄는 호전이 관찰되었으며, 이는 조직 현미경 검사를 통해 관찰한 염증의 양상과 같았다(Fig. 3C-E). 염증 주변부에서는 대식세포 외에 세포외 조직에서도 F4/80에 양성소견을 관찰할 수 있었는데 이는 아직 잘 알려지지 않은 F4/80의 기능이 염증과 관련이 있어 염증 주변에서 대식세포에 의해 유리된 물질이 발색이 된 것으로 생각된다. 혹은 염증반응과 멜리틴의 세포 독성에 의해 파괴된 대식세포의 유리된 물질이 표현되었을 경우도 생각할 수 있다.

적 요

최근 봉독의 여드름 치료에 대한 효과가 알려지면서 봉독의 주성분인 멜리틴의 항 여드름 작용이 관심을 받게 되었다. 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. 항균효과를 측정하기 위해 agar well diffusion array 기법을 사용하였다. 마우스의 양쪽 귀에 *P. acnes*를 피내 주사한 후 오른쪽 귀에만 각 1, 10, 100 μ g의 멜리틴을 바셀린에 섞어 귀에 도포하였다. 여드름균에 의해 유도된 피부염증반응에 대한 멜리틴의 항염증작용을 확인하기 위해 실험쥐의 귀 조직에 hematoxylin and eosin 염색과 대식 세포 표면 발현물질인 F4/80의 면역화학염색을 시행하였다. 멜리틴 처리 후 짧은 시간 내에 즉각적인 항균 효과를 나타내었으며, 처리 시간이 증가함에 따라 그 효과가 증가함을 관찰하였다. *P. acnes*로 유발된 염증성 피부질환 동물모델에서도 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. acnes*의 활성화 이로 유도된 염증반응을 억제시킴으로써 염증성 여드름에 대한 치료효과가 있음을 확인하여 향후 치료 약제 개발 가능성이 높을 것으로 생각된다.

감사의 글

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

인용 문헌

- 김경현, 박지현, 김수정, 이우람, 여주홍, 한상미, 이광길, 박관규. 2009. 봉독이 고콜레스테롤 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 단백질분해효소의

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

본 결과를 바탕으로 천연항균물질인 봉독의 주성분인 멜리틴을 세포 독성을 나타내지 않는 1 μ g 이하의 농도로 사용한다면 세포 안정성뿐만 아니라 여드름 유발균인 *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. acnes*의 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 활성화 이로 유도된 염증반응을 억제시킴으로써 염증성 여드름에 대한 치료효과가 있음을 확인하였다. 또한 멜리틴은 봉독성분 중 가장 많은 함량을 차지하는 물질이기 때문에 추출 및 정제도 용이하여 이후 여드름 치료제로서 활용도가 클 것으로 생각된다.

- 활성 및 유리기 손상에 미치는 봉독약침의 억제 효과. 대한침구학회지 19(5): 161-175.
- 안현진, 이종기, 박지현, 김경현, 이우람, 박인영, 한상미, 이광길, 박관규. 2012. 봉독이 Papain으로 유도된 골관절염 동물 모델에 미치는 영향. 생약학회지 43(2): 167-172.
- 이우람, 박지현, 김경현, 김수정, 이광길, 여주홍, 한상미, 우순옥, 박관규. 2009. Melittin이 알코올로 유도된 간세포 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- β 1-induced 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 melittin-induced 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 anti-arthritis, 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.