

천연물유래 여드름 치료제제의 항균활성 측정

김나래¹ · 임영희^{1*} · 박설웅² · 남은실²

¹고려대학교 보건과학대학 임상병리학과, ²(주)에스디생명공학

Antimicrobial Activities of the Anti-acne Compounds from Natural Sources. Kim, Narae¹, Young-Hee Lim^{1*}, Sul Woong Park², and Eun Sil Nam². *¹Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Science, Korea University, ²SD Biotechnologies Co., Ltd, Seoul, Korea* – The *in vitro* antibacterial activities of anti-acne agents prepared from the extracts of natural sources were investigated against several bacteria including antibiotic-susceptible and -resistant *Propionibacterium acnes*. SD-1 and SD-2 were prepared with different formulations and they showed strong antibacterial activities. The anti-acne agents completely inhibited the growth of the tested strains at the concentration of 0.5%. There was no difference in antibacterial activity between antibiotic-susceptible and -resistant *P. acnes*. The inhibitory activities of two agents showed time-dependent manner. In *S. aureus*, time-kill curve demonstrated 2.8- and 3.4-log₁₀-unit killing after 8 h with SD-1 and SD-2, respectively. In *P. acnes*, time-killing curve demonstrated 5.1- and 6.1-log₁₀-unit killing after 24 h with SD-1 and SD-2, respectively. SD-2 showed stronger antimicrobial activity than SD-1. From these results, we expect that SD-1 and SD-2 have strong antibacterial activities and have advantages for treating acne.

Key words: Anti-acne, *Propionibacterium acnes*, antimicrobial activity

여드름의 정확한 원인은 밝혀져 있지 않으나 여드름 발생은 일반적으로 피지생산의 증가, *Propionibacterium acnes*의 모낭증식 및 유전적 소질 등의 주요인자가 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있다[2, 3]. 여드름의 원인 중 세균 감염에 의해 생성되는 염증성 여드름의 경우 항생제 투여에 의해 증상을 개선할 수 있으나[11] 여드름 치료에 주로 이용되는 tetracycline, clindamycin, erythromycin을 장기간 사용했을 때 부작용을 유발하거나 내성이 발생하여 치료효과가 떨어질 수 있다[5]. 또한 여드름 형성 억제를 위해 강력한 면포 용해 기능을 가지는 retinoids[3]와 *P. acnes* 증식 억제 목적의 항생제를 병용하는 방법은 치료효과를 증진시킬 수는 있으나 부작용 또한 증가시키는 단점이 있다.

천연물 유래의 항균제 개발에 대한 연구는 많이 되고 있으나 실제로 제품화까지 이어지는 경우는 많지 않다[1, 4, 7]. 본 연구에서는 항균 및 항염증 작용이 있는 것으로 알려진 우엉, 버드나무[10], 녹차의 추출물 및 항균작용이 보고된 파파야[8], 키토산[9] 그리고 현재 항균 및 여드름 치료제제에 사용되고 있는 피토스핑고신을 혼합하여 여드름 치료용 제제를 개발하고 SD Anti-ACsome-1(SD-1) 및 SD Anti-ACsome-2(SD-2)라 명명한 시료들의 항균력을 측정하였다. SD Anti-ACsome-1은 우엉추출물 1g, 버드나무추출물 1g,

녹차추출물 1g, 파파야추출물 1g, 키토산 0.3g, 피토스핑고신(phytosphingosine) 0.1g에 시료의 총량이 100g이 될 때까지 증류수를 혼합하여 제조하였다. SD Anti-ACsome-2는 우엉추출물 1g, 버드나무추출물 1g, 녹차추출물 1g, 파파야추출물 1g, 키토산 0.3g, 피토스핑고신 0.1g, 카보폴(carbopol) 0.1g, KOH 0.01g에 시료의 총량이 100g이 될 때까지 증류수를 혼합하여 제조하였다.

항균활성 측정

본 연구에서는 여드름의 원인균인 *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 및 clindamycin 내성균주인 *Propionibacterium acnes* CCARM 9010(한국내성균주은행)과 함께 대표적인 피부 상재균인 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33592(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 및 임상분리균주인 *Streptococcus pyogenes*을 사용하여 항균 활성을 측정하였다. *P. acnes*는 GAM broth(Nissui, Tokyo, Japan)에 접종하여 anaerobic gas generating pouch(GasPak EZ, Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA)에 넣어 37°C에서 48시간 배양한 후 항균력 측정 시험에 사용하였다. 그 외의 균주들은 Muller-Hinton broth(Difco, USA)를 이용하여 37°C에서 18~24시간 배양 후 항균성 시험에 사용하였고, *S. pyogenes*의 경우는 CO₂ incubator에서 배양하였다. SD-1 및 SD-2가 각각 0.5, 1, 2,

*Corresponding author

Tel: 82-2-940-2815, Fax: 82-2-917-2388

E-mail: yhlim@korea.ac.kr

3, 5% 포함된 Muller-Hinton 배지 및 GAM 한천배지를 제조하였고, 시료가 첨가되지 않은 배지를 대조군으로 하였다. 각 배지에 시험균주를 10^6 , 10^7 , 및 10^8 cfu/mL 농도로 접종하고 37°C에서 18~24시간 배양 후 균 증식여부를 판별하였는데 단, *P. acnes* 균주들은 anaerobic gas generating

pouch에 넣어 혐기적인 상태로 48시간 배양 후 증식여부를 판정하였다. 시료가 포함되지 않은 대조군의 배지에서는 모든 시험균의 증식이 있었으나, 0.5, 1, 2, 3, 5%의 시료가 포함된 배지에서는 모든 농도에서 균의 증식이 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 1, 2). 실험을 통해 두 시료 모두 낮은 농도에서

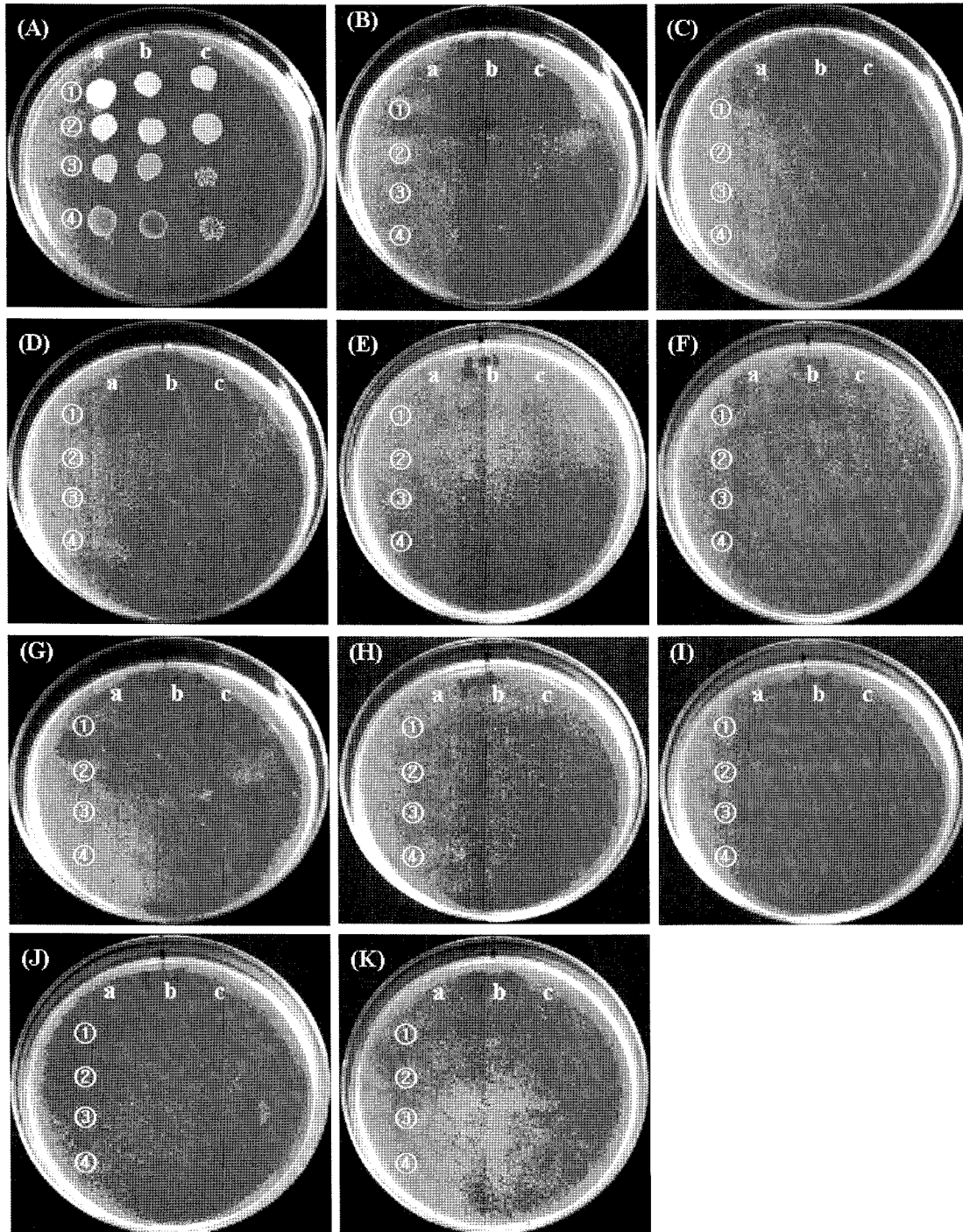


Fig. 1. Results of antimicrobial test on Muller-Hinton agar containing SD-1 or SD-2. A, no addition. B-F contained 0.5, 1, 2, 3, and 5% of SD-1, respectively. G-K contained 0.5, 1, 2, 3, and 5% of SD-2, respectively. The inoculated cell concentrations of a, b, and c were 10^8 , 10^7 , and 10^6 cfu/mL. ①, ②, ③, and ④ represent *S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*, and *S. pyogenes*.

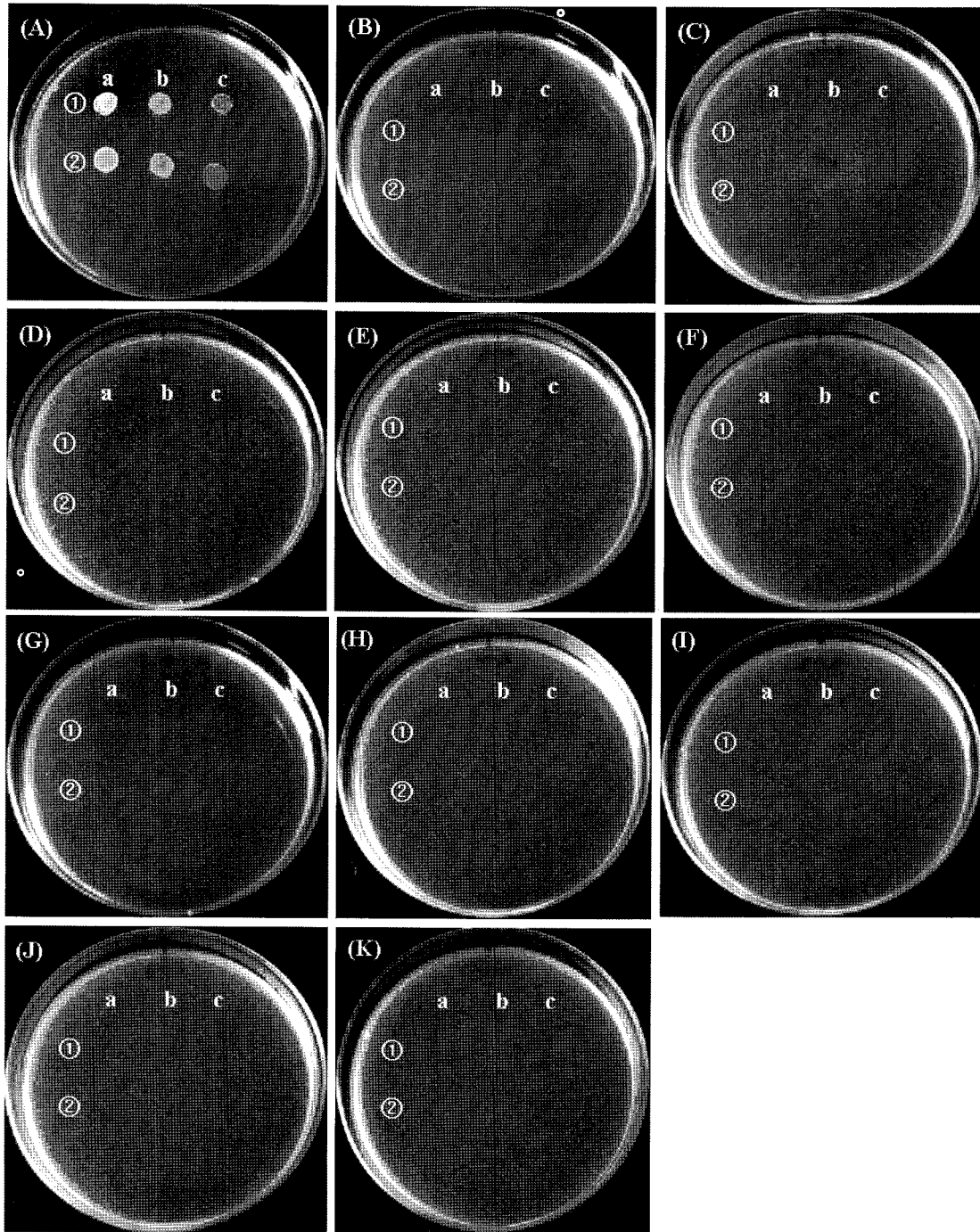


Fig. 2. Results of antimicrobial test on GAM agar containing SD-1 or SD-2. A, no addition. B-F contained 0.5, 1, 2, 3, and 5% of SD-1, respectively. G-K contained 0.5, 1, 2, 3, and 5% of SD-2, respectively. The inoculated cell concentrations of a, b, and c were 10^8 , 10^7 , and 10^6 cfu/mL, respectively. ① and ② represent antibiotic-susceptible and -resistant *P. acnes*, respectively.

도 모든 균에서 우수한 항균효과를 보이는 것으로 나타났다. 피부 상재균의 경우 시험에 사용한 균주간에는 증식저해효과에 큰 차이를 보이지 않았고, *P. acnes*의 경우에도 내성균과 감수성균 간에 항균효과 차이를 보이지 않았다.

증식억제대의 측정은 Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI)의 표준방법을 따라 디스크 확산법(disc dif-

fusion method)을 이용하였다[6]. SD-1 및 SD-2는 dimethyl sulfoxide(DMSO) 10 μ L에 5, 10, 15 mg이 함유되도록 제조하였다. DMSO 10 μ L만을 함유하고 있는 disc를 대조군으로 하고, 각 농도의 시료액 10 μ L를 포함한 antibiotic discs (Whatman, England)를 각각의 시험균이 균일하게 접종된 배지 위에 올려놓고 37°C에서 *P. acnes* 균주들은 48시간, 그

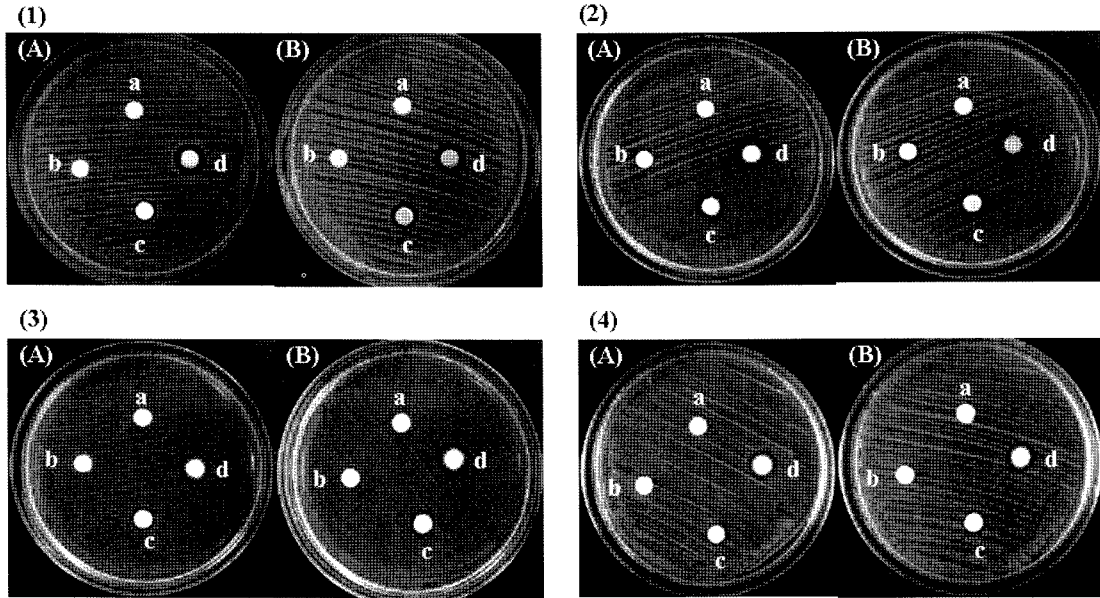


Fig. 3. Growth inhibitory effects of SD-1 and SD-2 on four different bacteria. Muller-Hinton agar was used in (1)-(3) and GAM agar was used in (4). (1), (2), (3), and (4) represent *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, and *P. acnes*. The discs of (A) and (B) contained SD-1 and SD-2, respectively. The amounts of a, b, c, and d were 0 (DMSO 10 μ L only), 5, 10, and 15 mg of SD-1 or SD-2.

외 균주들은 18~24시간 배양한 후 증식억제대를 측정하였다. 대조군으로 사용한 DMSO 농도에서는 균의 증식이 억제되지 않았으나 SD-1 및 SD-2 시료의 경우 10 mg 이상의 농도에서부터는 균의 증식억제 효과가 있었다(Fig. 3). 실험 결과 사용한 농도범위에서는 농도의 증가에 따라 증식억제 효과가 어느 정도 증가하는 것으로 나타났으나 그 효과가 현저하지는 않았다. 또한 시료가 함유된 배지를 이용한 항균력 시험에서는 우수한 항균작용을 보였으나(Fig. 1, 2) 디스크 확산법을 이용한 시험에서 전체적으로 생육저지대가 좁게 나타난 것은 시료중의 지질 성분인 피토스핑고신 및 gelling agent로 이용되는 카보폴이 항균력을 가지고 있는 성분의 배지내 확산을 어느 정도 저해하기 때문인 것으로 추정된다.

시간별 균 사멸 효과 측정

시료 투여 후 시간별로 항균작용이 어떻게 변하는지 측정하기 위해 time-kill curve를 작성하였다. 대수기 초기의 *S. aureus* 및 *P. acnes* 균주 배양액에 SD-1 및 SD-2가 각각 1%가 되도록 처리하고 일정시간 간격으로 배양액을 채취하여 십진 희석법에 의해 희석한 후 각 희석액을 일정량 배지에 접종하고 배양한 후 생성되는 집락의 수를 측정하여 cfu/mL로 환산하였다. 실험은 독립적으로 3회 반복 시행하고 결과의 평균치를 Fig. 4에 나타내었다. 대조군의 경우 시간이 경과함에 따라 균의 증식이 증가하였으나 시료 처리군은 시간이 경과할수록 균의 증식이 억제됨을 알 수 있었다. *S. aureus*의 경우 SD-1 및 SD-2 처리군이 대조군에 비해 대수

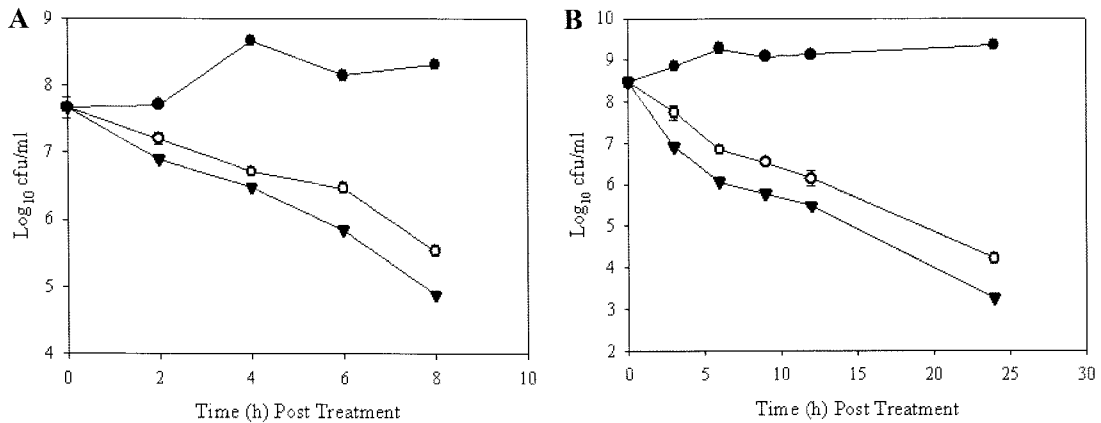


Fig. 4. Time-kill curves for SD-1 and SD-2 against *S. aureus* (A) and *P. acnes* (B). Control (●), SD-1 (○), and SD-2 (▼).

증가가 2시간 경과 후에는 각각 0.5 및 0.8배 감소하였으나 8시간 경과 후에는 2.8 및 3.4배 감소하였다. *P. acnes*의 경우에는 3시간 경과 후 대조군에 비해 SD-1 및 SD-2 처리군에서 대수 감소가 각각 1.1 및 2.0배 정도였으나 24시간 후에는 5.1 및 6.1배로 감소폭이 현저히 증가하였다. 또한 SD-2가 SD-1에 비해 항균력이 우수함을 알 수 있었는데, *S. aureus*의 경우 시료 처리 후 4시간까지는 SD-1과 SD-2 사이에 약 2배의 항균력 차이를 보였으나 6시간 후에는 4.2배, 8시간 후에는 4.5배의 항균력 차이를 보였다. *P. acnes*의 경우에도 시료처리 후 시간이 경과함에 따라 SD-1과 SD-2 사이에 항균력 차이를 보였으며 12시간까지는 SD-2가 SD-1에 비해 약 6배 정도, 24시간 후에는 9.2배 우수한 효과를 보였다.

결론적으로 SD-1 및 SD-2는 피부상재균뿐만 아니라 여드름의 원인이 되는 *P. acnes*에 대해 항균력 있으며, 특히 *P. acnes*의 경우 내성균과 감수성균 모두에 우수한 항균력을 보였다. 시간별 항균력을 측정할 결과 시료 처리 후 짧은 시간 내에도 항균효과를 보이고 처리시간이 증가함에 따라 그 효과가 증가하였다. 두 시료 간의 항균력을 비교해보면 SD-2가 SD-1에 비해 우수한 항균력을 보임을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에 이용한 SD Anti-ACsome-1 및 SD Anti-ACsome-2는 여드름 치료용 상품으로의 개발가능성을 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Baker, D. D., M. Chu, U. Oza, and V. Rajgarhia. 2007. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat. Prod. Rep.* **24**: 1225-1244.
2. Burton, J. L. and S. Shuster. 1971. The relationship between seborrhea and acne vulgaris. *Br. J. Dermatol.* **84**: 600-604.
3. Cunliffe, W. J., D. B. Holland, and A. Jeremy. 2004. Comedone formation: etiology, clinical presentation, and treatment. *Clin. Dermatol.* **22**: 367-374.
4. Lam, K. S. 2007. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol.* **15**: 279-289.
5. Lim, Y. S., K. B. Myung, N. E. Chung, and W. S. Chung. 1995. A study on the MIC of antibiotics for *Propionibacterium acnes* in patients with acne. *Kor. J. Dermatol.* **33**: 437-444.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 7th ed. Approved Standard MA7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa.
7. Newman, D. J., G. M. Cragg, and K. M. Snader. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1891-2002. *J. Nat. Prod.* **66**: 1022-1037.
8. Osato, J. A., L. A. Santiago, G. M. Remo, M. S. Cuadra, and A. Mori. 1993. Antimicrobial and antioxidant activities of unripe papaya. *Life Sci.* **53**: 1383-1389.
9. Rhoades, J. and S. Roller. 2000. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 80-86.
10. Rauha, J. P., S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Khknen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela, and P. Vuorela. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Intl. J. Food Microbiol.* **56**: 3-12.
11. Webster, G. F. and E. M. Graber. 2008. Antibiotic treatment for acne vulgaris. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **27**: 183-187.

(Received Feb. 14, 2009/Accepted March 4, 2009)