

구강질환 원인균에 대한 정제봉독의 항균효과

한상미^{1*} · 홍인표¹ · 우순옥¹ · 박관규² · 장영채²

¹농촌진흥청 국립농업과학원, ²대구가톨릭대학교 의과대학

Anticariogenic Activity from Purified Bee Venom (*Apis mellifera* L.) against Four Cariogenic Bacteria

Sang Mi Han^{1*}, In Phyo Hong¹, Soon Ok Woo¹, Kyun Kyu Park², and Young Chae Chang²

¹Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science,
Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

²School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu, 42472, Korea

Abstract – The aim of the study was performed to examine the anticariogenic potential of purified bee venom (*Apis mellifera* L., PBV) collected using bee venom collector from cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Fusobacterium nucleatum*. The anticariogenic effect of purified bee venom was evaluated by agar well diffusion method, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and post-antibiotic effect (PAE). The human lower gingiva epithelial cell cytotoxicity of purified bee venom was also evaluated. Purified bee venom exhibited significant inhibition of bacterial growth of *S. mutans*, *S. sanguis*, *P. gingivalis*, and *F. nucleatum* with MIC value of 0.68, 0.85, 3.49, and 2.79 µg/ml, respectively. The MBC value of purified bee venom against *S. mutans*, *S. sanguis*, *P. gingivalis*, and *F. nucleatum* was 1.34, 1.67, 8.5, and 6.8 µg/ml. Furthermore, the results of PAE values against *S. mutans*, *S. sanguis*, *P. gingivalis*, and *F. nucleatum* showed the bacterial effect with 3.3, 3.45, 2.0, and 2.0. The concentration below 1 mg/ml of purified bee venom had no cytotoxicity in the human lower gingiva epithelial cell. These results suggested that purified bee venom have great potential as anticariogenic agents.

Key words – *Apis mellifera*, Purified bee venom, Cariogenic bacteria, Antibacterial activity, Gingiva epithelial cell

치주질환과 충치의 발생 원인은 다양하나, 구강 내 상주하는 세균의 발효작용에 의하여 치아에 부착된 당분이나 전분 등의 탄수화물이 분해되는 젖산이 치아 경조직의 석회를 탈각시켜 충치를 일으키는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 또한 치주질환은 임상적으로 치은 염증과 출혈, 치주낭의 형성 및 치조골의 파괴 등을 일으켜 치아 상실까지 가져오게 된다.^{3,4)} 일반적으로 초기에 충치를 유발하는 세균은 *Streptococcus* spp.로 알려져 있으며, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*과 같은 *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* 등의 세균이 집락형성 및 치주조직 침투, 치주조직의 파괴로 이루어지는 일련의 과정으로 충치가 진행된다.^{3,5)} 또한 세균은 치주 조직에 유독한 황화수소, 암모니아, 아민과 같은 독소를 분비할 뿐만 아니라 리포폴리사카라이드와 같은 내독소를 분비하여 치주 조직을

파괴한다. 세균 대사물질 들은 생체 면역계를 자극하여 자극된 체액성 및 세포성 면역계의 여러 작용에 의하여 활성산소, 인터루킨과 같은 사이토카인에 의하여 잇몸 염증을 유발하기도 한다. 그러므로 치주질환과 충치를 예방하고 치료하는 데 있어 구강 내 세균 등의 성장과 활동을 억제하는 것이 필수적이다. 현재 구강 내 항균제로는 bisbiguanides 제제(chlorhexidin)와 4급 암모늄 제제(cetylpyridium, benzalkonium chloride) 및 페놀화합물(triclosan) 가장 많이 사용되고 있다. 그러나 이들 화학제들이 많은 부작용을 야기할 수 있으므로 천연물로부터 장기간 사용이 가능하면서도 효과가 우수한 충치 예방 물질을 탐색하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

순수 천연물이면서 강력한 항균, 항염증 효과를 갖는 봉독은 부작용과 잔류에 대한 위험성이 적어 봉침요법으로 오래전부터 관절염, 통풍 등의 질환에 사용되어 오고 있다.^{11,12)} 서양중꿀벌(*Apis mellifera* L.) 일벌의 독인 봉독은

*교신저자(E-mail): sangmih@korea.kr
(Tel): +82-63-238-2896

다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있으며, 주 성분인 멜리틴(Melittin)은 항염증과^{13,14)} 항균작용,¹⁵⁾ 강력한 진통작용,¹⁶⁾ 면역증강¹⁷⁾ 등의 역할을 한다고 알려져 있다. 본 연구팀에서 2005년 봉독채집장치를 개발함에 따라 국내에서도 봉독 채집이 가능하게 되었으며, 채집과정에서 혼입된 흩이나 먼지 등과 같은 이물질들을 제거한 순수 정제봉독이 시판 판매되고 있다. 정제봉독은 멜리틴 함량이 50~70% 범위로 꿀벌이 갖고 있는 순수 봉독으로 멜리틴을 비롯하여 히알루리다아제, 포스포리파아제 등 꿀벌의 봉독 성분을 온전히 갖고 있는 상태의 봉독이다. 정제봉독은 여드름의 원인균인 *Propionibacterium acnes*와 tetracycline, clindamycin, erythromycin 등 항생제 내성균인 *P. acnes*, 또한 피부 상재균인 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* 및 *Streptococcus pyogenes* 균에 대한 강한 항균효과가 확인되어 화장품으로 개발되었을 뿐만 아니라 여드름 치료제로서 임상시험 연구가 진행되고 있다.¹⁸⁾ 봉독은 여러 종류의 병원성미생물의 생육을 억제하는 것으로 보고되고 있으나, 구강질환 원인균에 대한 항균활성에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 꿀벌의 독에서 분리한 정제봉독이 구강질환 예방 및 치료제로서의 가능성을 평가하기 위하여 구강질환 원인균에 대한 항균효과와 더불어 구강 내 세포에 대한 봉독의 안전성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

공시 시료 및 성분 분석 - 시험물질인 정제봉독은 봉독 채집장치를 사용하여 서양종꿀벌로부터 채취한 봉독을 '봉독의 간이정제방법'¹⁹⁾으로 정제한 정제봉독을 구입하여 사용하였다(청진바이오텍(주), 한국). 구입한 정제봉독의 성분 확인을 위하여 4 mg/ml의 농도로 3차 증류수에 녹여 PTFE 0.2 µm 필터(Sigma, USA)로 여과하여 UPLC를 사용하여 분석하였다. 표준품인 apamin, mellitin, 그리고 phospholipase A2는 시그마(미국)로부터 구입하여 2 mg/mL로 만들어 시험봉독과 동일한 필터를 사용하여 여과하였다. 분석기기는 PDA (photo diode array, Waters, USA)검출기가 장착된 Acquity UPLC I-Class (Waters, USA)를 사용하여, Table I과 같은 컬럼 및 분석 조건으로 260 nm의 검출파장에서 분석하였다. 정제봉독 내의 apamin, mellitin, 그리고 phospholipase A2의 정량은 각각의 표준품 수용액 시료에 나타나는 피크와 비교하여 정량하였다.

시험균주 및 배양조건 - 구강 질환 원인균에 대한 항균효과를 측정하기 위하여 *S. mutans* (ATCC 27175), 잇몸 염증 원인균인 *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556), *P. gingivalis* (ATCC 33277) 및 구취를 일으키는 구강 내 혐기성 세균인 *F. nucleatum* (ATCC 25286)를 한국미생물보존센터(대전, 한

Table I. Conditions for UPLC analysis of purified bee venom

	UPLC condition
Column	Halo ES-18 (4.6×100 mm, 2.7 µm)
Flow rate	1.5 mL/min
Injection volume	4 µL
Column temperature	50°C
Sample temperature	5°C
Mobil phase	(A) 20 mM TFA/MeCN, (B) 20 mM TFA/H ₂ O (A) 0-3 min, 10-31%; 3-5 min, 31-40%; 5-10 min, 40-45%

국)로부터 구입하여 사용하였다. *S. mutans* 균주는 BHI (Brain heart infusion broth, BD, France), *S. sanguis* 균주는 5% sheep blood (MB cell, USA)가 첨가된 TSB (Trypticase soy broth, BD, France) 배지에서 37°C, 호기조건으로 배양하였다. *P. gingivalis*와 *F. nucleatum* 균주는 10% sheep blood와 0.1% hemin (Sigma, USA)를 첨가한 TSA배지를 사용하여 CO₂ 배양기에서 37°C로 배양하였다.

항균활성 측정 - 구강 질환 원인균에 대한 정제봉독의 항균활성은 평판배지확산법을 이용하여 측정하였다. 각 시험균주들은 평판배지에 도말 접종한 다음 정제봉독이 집적된 직경 8 mm의 paper disk (Advantec, Japan)를 평판배지에 올린 후 48시간 배양하면서 생성된 투명한 지지환의 크기를 측정하였다.

최소성장억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정 - 액체배지 희석법을 사용하여 *S. mutans*, *S. sanguis*, *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*에 대한 최저 성장억제 농도를 구하였다. 정제봉독은 멸균 증류수로 희석한 후 무균 여과하여 액체배지희석법에 준하여 단계적으로 희석하였다.²⁰⁾ 각각의 시험균주를 액체배지에서 전 배양한 후 접종 균의 2×10⁶ CFU/well이 되도록 조절하여 봉독 시료와 함께 18시간 동안 배양한 후, 육안 및 현미경으로 균의 성장을 관찰하였고, 흡수파장 540 nm에서 흡광도(Molecular device spectramax M2e, CA)를 측정하여 순수배양액의 흡광도 값과 같은 결과를 얻은 것을 최소억제농도로 결정하였다.

최소살균농도(Minimum Bactericidal Concentration, MBC) - 정제봉독은 각각의 시험균주에서 사용하는 액체배지로 희석한 후 액체배지희석법에 따라 단계적으로 희석한 후 2×10⁶ CFU/well이 되도록 조절한 각각의 균주에 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 각각의 배양액 100 µl를 새로운 배지에 접종하여 24시간 동안 배양한 다음 흡광도(540 nm)를 측정하여 증식이 일어나지 않은 농도를 최소살균농도로 나타내었다.

항균력 지속 시간(Postantibiotic Effect, PAE) 측정 - 시험균주에 대한 정제봉독의 살균력 지속시간을 측정하기 위하여 1×10^8 CFU/ml로 조절한 균주에 $2 \times \text{MIC}$ 농도의 정제봉독과 함께 1시간 동안 배양한 후 원심분리와 배지 희석법을 사용하여 봉독성분을 제거하였다.²¹⁾ 이후 새로운 배지로 교환하여 배양기에서 배양하며 2시간 간격으로 균수를 측정하였다. 이때 PAE 수치가 클수록 항균 지속 효과가 우수하다고 할 수 있으며, PAE를 구하는 식은 아래와 같다.

$$\text{PAE} = T - C$$

T: 봉독을 처리한 시험구에서 1 log₁₀까지의 생육에 걸리는 시간

C: 무처리구에서 1 log₁₀까지의 생육에 걸리는 시간

시험 세포주 및 세포독성 평가 - 정제봉독의 구강 내 사용을 위하여 아랫잇몸상피세포주인 YD-38(human lower gingiva epithelial cell, KCLB 60508, 한국세포주은행, 서울) 세포에 대한 세포생존율을 평가하고자 하였다. YD-38세포는 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, USA), 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL, USA)이 첨가된 RPMI 1640 (Gibco BRL, USA) 배지에 5% CO₂배양기에서 37°C로 배양하였다. 정제봉독에 대한 YD-38세포 생존율을 측정하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 환원 방법은 Chung 등²²⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. YD-38세포를 96 well plate에 5×10^3 cells/ml 농도로 분주하여 24시간 배양 후 각각 다양한 농도로 희석한 정제봉독을 처리하였다. 24시간 동안 배양 후 배지를 제거한 다음 50 μl MTT 용액을 첨가하여 3시간 배양하고 DMSO 200 μl를 처리한 다음 570 nm의 흡광도로 측정하였다.

통계처리 - 실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (18.0 version., USA) 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균±표준오차 (mean±SEM) 로 표시하였다.

대조군과 실험군간의 평균에 대한 유의성은 analysis of variance (ANOVA)의 Duncan's multiple range test 를 이용하여 $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

결과 및 고찰

정제봉독의 주요성분 함량 - 시험에 사용한 정제봉독의 주요성분 함량은 Fig. 1과 Table II에서와 같이 측정되었다.

정제봉독의 항균효과 - 구강질환 원인균에 대한 정제봉독의 항균활성을 Table III에 나타내었다. 정제봉독은 모든 균주에 대해서 항균활성을 나타냈으며, 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 대표적인 충치 원인균인 *S. mutans*와 잇몸 염증에 관여하는 *S. sanguis* 대해서 50 μg/disk의 농도에서 저지환이 10.0 mm 이상으로 매우 높은 항균 활성을 보였다. 또한 치주질환 원인균인 *P. gingivalis*와 구취를 일으키는 구강 내 혐기성 세균인 *F. nucleatum*에 대해서도 50 μg/disk의 농도에서 저지환이 8.0 및 8.5 mm로 항균 활성을 나타내었다. 봉독의 주요 성분인 멜리틴(melittin)이 항균활성에 관여하며, 일반적으로 그람 양성균에서 항균력이 강하게 나타난다고 알려져 있다. 본 연구결과에서도 그람양성균인 *S. mutans*와 *S. sanguis*에서 그람음성균인 *P. gingivalis*와 *F. nucleatum* 보다 항균활성이 더 강하게 나타나는 것으로 확인되었다.

S. mutans, *S. sanguis*, *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*에 대한 정제봉독의 최소성장억제농도는 각각 0.68, 0.85, 3.49 그

Table II. Contents of melittin, apamin, and phospholipase A₂ in purified bee venom

Components	Contents (%)
Melittin	63.9
Apamin	2.3
Phospholipase A ₂	10.9

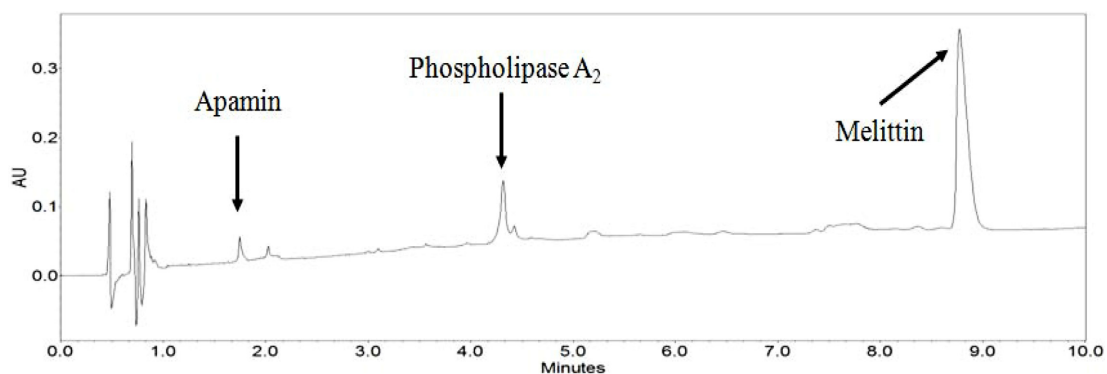


Fig. 1. UPLC chromatogram of purified bee venom. UV is 260 nm. Arrows are melittin, apamin, and phospholipase A₂.

Table III. Antibacterial activity of purified bee venom against oral microbes (unit : mm)

Strains	Purified bee venom ($\mu\text{g}/\text{disk}$)		
	1	10	50
<i>Streptococcus mutans</i>	3.5 \pm 0.1	9.5 \pm 0.3	10<
<i>Streptococcus sanguis</i>	2.8 \pm 0.3	8.5 \pm 0.6	10<
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0.5 \pm 0.3	4.5 \pm 0.3	8.0 \pm 0.6
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0.5 \pm 0.6	5.0 \pm 0.3	8.5 \pm 0.3

리고 2.79 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났으며, 최소살균 농도는 각각 1.34, 1.67, 8.5 그리고 6.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다(Table IV). 이는 평판배지확산법을 이용한 항균활성의 결과와 일치하는 것을 알 수 있었다. *S. mutans*은 가장 중요한 초기 충치 유발세균으로 치아 표면에 부착하면서 충치 발생의 원인이 되는 바이오필름 형성이 시작되는데, *S. mutans*가 초기 바이오필름 형성에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다.^{3,4)} 최소성장억제농도와 최소살균농도에서 보는 바와 같이 정제봉독은 *S. mutans*에 대해 강한 항균력을 보이고 있는 것으로 확인되어 초기 충치 예방에 효과가 있을 것으로 생각된다.

정제봉독의 항균력 지속시간 - 구강질환 원인균에 대한 정제봉독의 항균력 지속시간(PAE)을 측정하였다. 봉독 제거 후 2시간 간격으로 균수를 측정된 결과 Table V와 같이 구강질환 원인균에 대해 우수한 항균력 지속 활성을 가지는 것으로 확인 할 수 있었다. PAE 수치가 클수록 항균력 지속 효과가 우수한 것으로 *S. mutans*와 *S. sanguis*에서 각각 3.3, 3.45시간 이었으며, *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*에서는 모두 2.0시간으로 우수한 항균력 지속시간을 갖고 있었다. 이처럼 구강질환 원인균에 대해 강한 항균력과 항균력 지속시간이 긴 정제봉독은 천연물질로서 기존의 화학제

Table IV. MIC and MBC values of purified bee venom against oral microbes

Strains	Purified bee venom ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	MIC	MBC
<i>Streptococcus mutans</i>	0.68 \pm 0.02	1.34 \pm 0.3
<i>Streptococcus sanguis</i>	0.85 \pm 0.04	1.67 \pm 0.3
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3.49 \pm 0.13	8.5 \pm 0.9
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2.79 \pm 0.28	6.8 \pm 0.6

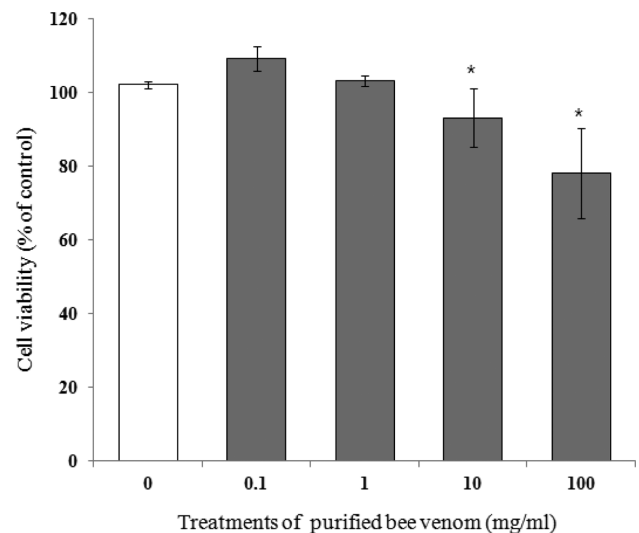
Table V. PAE of purified bee venom against oral microbes

Strains	PAE (hr.)
<i>Streptococcus mutans</i>	3.3
<i>Streptococcus sanguis</i>	3.5
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2.0
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2.0

를 대체할 가능성이 매우 높은 것으로 판단되었다. 무엇보다도 정제봉독은 호기성 및 혐기성 구강질환 유발 원인균에 대해 모두 강한 항균력을 갖고 있어 치약 등 구강 내 사용제품에 사용할 경우 효과적인 예방 및 치료효과를 나타낼 것으로 사료된다.

정제봉독의 구강 내 세포에 대한 세포독성 - 구강 내 아랫잇몸상피세포주인 YD-38세포에 대한 봉독의 세포 독성을 평가 한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 1 mg/ml 농도 범위까지는 구강 내 아랫잇몸상피세포에 독성을 나타내지 않았다. 본 시험에서 사용한 구강질환 유발 세균들 중 정제봉독에 대해 가장 높은 최소살균농도를 보인 *P. gingivalis*의 8.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다도 높은 농도에서도 세포독성을 갖지 않는 것으로 확인되었다.

이와 같이 정제봉독은 충치, 치은염, 치주염 및 아구창과 같은 구강질환의 원인균에 대한 항균효과를 확인했을 뿐만 아니라, 항균력 지속시간도 충분히 유지되었으며, 낮은 수준의 구강세포 독성으로 정제봉독을 유효성분으로 하는 치주질환 예방 및 치료제로 개발이 가능할 것으로 사료된다.

**Fig. 2.** Cell viability of purified bee venom on human lower gingiva epithelial cell YD-38 by MTT assay. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Asterisk is a significant difference with $p < 0.05$.

향후 치주인대세포 등 일차 배양 치주세포에 대한 안전성과 정제봉독의 치료 기전에 관한 연구가 필요하다.

결 론

본 연구는 꿀벌의 독에서 분리한 정제봉독이 구강질환 예방 및 치료제로서의 가능성을 평가하기 위하여 초기 충치 유발에 관여하는 *S. mutans*와 *S. sanguis* 그리고 치주염과 구취를 유발하는 *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*군에 대한 항균활성을 검정하였다. 또한 정제봉독의 구강 내 세포에 대한 안전성을 평가하고자 구강 내 아랫잇몸상피세포주인 YD-38세포를 사용하여 MTT assay를 실시하였다. 그 결과 정제봉독은 1 mg/ml 농도 범위까지는 구강 내 아랫잇몸상피세포에 독성을 나타내지 않았다. 구강질환 유발균주에 대한 항균활성은 최소성장억제농도(MIC)와 최소살균농도(MBC), 항균력지속시간(PAE)을 측정하였다. 그 결과 모든 시험균주에 대하여 항균력을 갖고 있었으며 *S. mutans*, *S. sanguis*, *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*에 대한 정제봉독의 MIC 값은 각각 0.68, 0.85, 3.49 그리고 2.79 µg/ml로 나타났으며, MBC값은 각각 1.34, 1.67, 8.5 그리고 6.8 µg/ml로 나타났다. PAE값은 *S. mutans*와 *S. sanguis*에서 각각 3.3, 3.45시간 이었으며, *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*에서는 모두 2.0시간으로 우수한 항균력 지속시간을 갖고 있었다. 정제봉독은 충치, 치은염, 치주염 및 아구창과 같은 구강질환의 원인균에 대한 높은 항균력과 항균력 지속시간을 갖고 있으며, 구강세포에 대한 독성도 낮은 것으로 확인되어 치주질환 예방 및 치료제로 개발이 가능할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호 : PJ01221902)에 의하여 수행되었으므로 감사를 드립니다.

인용문헌

- Freires, I. A., Denny, C., Benso, B., de Alencar, S. M. and Rosalen, P. L. (2015) Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic review. *Molecules* **20**: 7329-7358.
- Kalesinskas, P., Kačergius, T., Ambrozaitis, A., Pečiulienė, V. and Ericson, D. (2014) Reducing dental plaque formation and caries development. A review of current methods and implications for novel pharmaceuticals. *Stomatologija* **16**: 44-52.
- Koo, H., Falsetta, M. L. and Klein, M. I. (2013) The exopolysaccharide matrix: A virulence determinant of cariogenic biofilm. *J. Dent. Res.* **92**: 1065-1073.
- Costalonga, M. and Herzberg, M. C. (2014) The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol. Lett.* **162**: 22-38.
- Horst, J. A., Pieper, U., Sali, A., Zhan, L., Chopra, G., Samudrala, R. and Featherstone, J. D. (2012) Strategic protein target analysis for developing drugs to stop dental caries. *Adv. Dent. Res.* **24**: 86-93.
- Kaur, G., Rajesh, S. and Princy, S. A. (2015) Plausible drug targets in the *Streptococcus mutans* Quorum sensing pathways to combat dental biofilms and associated risks. *Indian J. Microbiol.* **55**: 349-356.
- Zhao, A., Blackburn, C., Chin, J. and Srinivasan, M. (2014) Soluble toll like receptor 2 (TLR-2) is increased in saliva of children with dental caries. *BMC Oral. Health* **31**: 14:108.
- Shang, D., Liang, H., Wei, S., Yan, X., Yang, Q. and Sun, Y. (2014) Effects of antimicrobial peptide L-K6, a temporin-1CEb analog on oral pathogen growth, *Streptococcus mutans* biofilm formation, and anti-inflammatory activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 8685-8695.
- 이보배, 하유미, 신수화, 제경모, 김순래, 최재석, 최인순 (2009) 구강질환 원인균에 대한 자몽종자추출물과 접제 유향수 함유 시약 시제품의 항균효과. *생명과학회지* **19**: 956-962.
- 김민정, 박상동, 이아람, 김경호, 장준혁, 김갑성 (2002) 쥐의 Collagen 유발 관절염의 활액에서 단백분해효소의 활성 및 유리기 손상에 미치는 봉독약침의 억제효과. *대한침구학회지* **19**: 161-175.
- 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. J. (2003) Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. *J. Vet. Med. Sci.* **65**: 349-355.
- Piek, T. (1986) Venoms of the hymenoptera. London, Academic Press.
- Habermann, E. and Reiz, K. G. (1965) On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamin. *Biochemistry* **343**: 192-203.
- 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.
- Curcio-Vonlanthen, V. and Schneider, C. H., Frutig, K., Blaser, K. H. and Kalbacher, H. (1997) Molecular parameters in melittin immunogenicity. *J. Pept. Sci.* **3**: 267-276.
- Rudenko, S. V. and Nipot, E. E. (1996) Modulation of melittin-induced hemolysis of erythrocytes. *Biokhimiia* **61**: 2116-2124.
- 한상미, 이광길, 여주홍, 김원태, 박관규 (2009) 국내산 봉독의 여드름 유발균 및 피부 상재균의 증식 억제 효과. *생약학회지* **40**: 173-177.
- 한상미, 이광길, 여주홍, 우순옥, 권해용 (2007) 봉독의 간이 정제 방법, 대한민국특허 10-075881.
- 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**: 29-35
21. Löwdin, E., Odenholt-Tornqvist, I., Bengtsson, S. and Cars, O. (1993) A new method to determine postantibiotic effect and effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Anti-microb. Agents Chemother.* **37**: 2200-2205.
22. Chung, M. J., Walker, P. A., Brown, R. W. and Hogstrand, C. (2005) ZINC-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **205**: 225-236.
- (2016. 1. 11 접수; 2016. 2. 24 심사; 2016. 3. 3 게재확정)