

꿀벌의 독에 의한 생쥐 피부의 조직병리학적 및 미세구조적 변화

신 상 희 · 정 문 진 · 문 명 진
단국대학교 자연과학대학 생물학과

Histopathological and Fine Structural Changes in Mouse Skin after Injection of Honeybee Venom

Shin, Sang-Hee, Moon-Jin Jeong and Myung-Jin Moon
Department of Biological Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714
(Received April 21, 1997)

ABSTRACT

Histopathological and fine structural changes in mouse skin after injection of venoms extracted from the venom glands of the honeybee, *Apis mellifera*, were studied with light and electron microscopes. At this experiment the venoms were directly injected at the hairless abdominal skin of the mouse through the sting of the bee's venomous organ. Main changes appeared within one hour after injection at both epithelial and connective tissues as considerable hyperemia and angioedema, and slight edema and fibrosis. High magnified electron micrographs reveal not only increase of diameter but also deposition of electron dense grains (which seems to be an auto immunoglobulin) at the collagenous fibers characteristically. This kinds of histological and fine structural responses were diminished from 12 hour after injection, and the pathological symptoms disappeared within 3 days at most cases. So, the skin responses induced by honeybee venom seem to be not severe compare to other cases reported by other venomous arthropods.

Key words : Histopathology, Fine structure, Honeybee venom, Mouse skin

서 론

피부는 외부의 급격한 물리 화학적 변화를 완충시켜 내부 환경을 유지하는 중요한 기관으로서 (Emmett, 1991), 외부로부터 표피 (epidermis)와 진피 (dermis) 그리고 진피하층 (hypodermis)으로 구성되어 있다 (Montagna and Parakkal, 1974; Gordon, 1985).

꿀벌은 막시류 (Hymenoptera)에 속하는 곤충으로 꿀벌의 독 분비기관은 표피성 분비선으로 복강의 말단에 위치하며, 독액을 주입하는 장치인 침 (sting)과 연결되어 있다 (Bridges and Owen, 1984). 꿀벌의 독에는 mellitin이 50% 이상 함유되어 있고, 그 외에 apamin, mast cell-degranulating peptide 등이 함유되어 있으며 (Haberman, 1972; Valentine, 1984), 인체에 치명적인 독성은 지니지 않고, 일시적 고통이나

과민 반응 등을 유발하는 것으로 알려져 있다(Green and Levine, 1982; Herbert and Salkie, 1982).

최근 꿀벌의 독(venom)을 인위적으로 인체에 주입하는 봉침 치료법은 관절과 근육의 통증을 완화시키는 효능으로 인해 민간 치료법의 하나로 국내에서 널리 시술되고 있는 실정이다. 그러나 환부에 꿀벌의 독을 인위적으로 주입시키는 봉침 치료법의 직접적인 효과나 봉침에 의해 피부와 주변 조직에 야기되는 병리학적 및 미세구조적인 변화에 관한 체계적인 연구는 여전히 미비되어 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 봉침 시술용으로 사용되는 꿀벌(*Apis mellifera* L.)의 독선(venom gland)으로부터 추출한 독(venom)을 실험용 생쥐의 피하에 주입한 후, 생쥐의 피부에 유발되는 조직병리학적 및 미세구조적 변화를 관찰하고, 꿀벌의 독이 포유동물의 피부 조직에 미치는 영향을 다른 절지동물의 독과 비교, 논의하였다.

재료 및 방법

5~6월 중 충청남도 천안시 근교의 양봉가로부터 분양받은 꿀벌(*Apis mellifera* L.)을 실험 재료로 사용하였다. 꿀벌의 독을 주입하기 위하여 체모를 제거한 실험용 생쥐의 피부에 직접 쓰오게 하는 직접법을 사용하였고, 일정시간 간격으로 생쥐의 피부 조직을 적출하여, 10% 중성 포르말린 용액에 고정(fixation)하였다.

고정이 끝난 각각의 재료는 ethanol을 사용하여 농도 상승순서에 따라 탈수하였고, xylene으로 투명화시킨 후, paraplast를 사용하여 포매(embedding)하였다. 포매된 조직은 4~6 μm 두께로 절편을 제작하여 hematoxylin과 eosin으로 이중염색한 후, 광학현미경으로 관찰하였다.

교원섬유 및 기저막 등을 선별적으로 염색하기 위하여 Weigert iron hematoxylin용액과 Biebrich scarlet-acid fuchsin용액, 그리고 phosphomolybdic-phosphotungstic acid용액에 처리하는 Masson trichrome 염색법을 사용하였으며, 조직내의 glycogen이나 fibrin 등을 검출하기 위해 periodic acid Schiff (PAS) 반응도 병행하여 실시하였다.

미세구조적 변화를 관찰하기 위하여 꿀벌 독에 반응한 실험용 생쥐 피부의 표본을 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde용액으로 4°C에서 전고정한 후, 인산 완충용액(phosphate buffer, pH 7.4)으로 2회 세척하고 1% OsO₄에 2시간 후고정하여 동일 완충용액으로 2회 수세하였다. Ethanol 농도 상승순의 탈수 과정을 거친 후, propylene oxide로 치환하여 Epon-Araldite 혼합액에 포매하였다.

포매된 조직은 LKB ultramicrotome으로 먼저 준초박절편(semi-thin section)을 제작하여, 1% borax에 녹인 1% toluidine blue로 염색한 후, 광학현미경으로 관찰하였다. 이어서 동일 부위에서 초박절편(thin section)을 제작하여 grid에 부착시킨 다음, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM 100CX-II형 투과 전자현미경으로 80 kV에서 관찰하였다.

결 과

1. 꿀벌의 독에 의한 생쥐 피부의 조직병리학적 변화

생쥐 피부의 정상조직은 상피세포로 이루어진 표피(epidermis)와 결합조직이 주종을 이루는 진피(dermis), 그리고 피하조직(hypodermis) 등으로 구분되었다(Fig. 1). 횡단면으로 관찰한 진피의 조직표본에서는 교원섬유와 많은 모낭들이 분포되어 있음이 관찰되었다(Fig. 2). 직접법에 의해 꿀벌의 독을 생쥐의 피부에 주입한 후 1시간이 경과되었을 때, 생쥐의 표피는 정상 조직에 비하여 심하게 위축되어 있었으며, 급성 염증세포들의 침윤을 볼 수 있었다(Figs. 3, 4).

독 주입 후 6시간이 경과된 표본에서 진피내 일부 결합조직세포의 괴사가 진행되고 있었으며, 단핵구가 주종을 이루는 염증세포들의 침윤이 관찰되었다. PAS 반응과 Masson Trichrome 염색을 시행한 결과, 조직내 호산성 물질의 집적과 교원섬유의 손상에 의한 조직 괴사현상이 관찰되었다. 또한 이 시기를 전후하여 피부의 두께가 가장 비후되는 점으로 미루어 가장 현저한 조직병리학적 변화가 초래되는 것으로 확인되었다(Figs. 5, 6)

독 주입 후 12시간이 경과된 피부 표본에서는 1시간이 경과된 조직에 비하여 표피의 위축 현상이 현저히 줄어들었고, 진피에서는 모낭이 비대해져 있는 반면, 교원섬유의 평균 직경이 현저히 감소되어 있음을 관찰할 수 있었다. 또한 PAS 반응 결과 호중구의 침윤이 현저하였고, 심한 부종과 혈관의 변화, 특히 혈관주위의 염증세포가 증가되어 있었다(Fig. 7). Masson Trichrome 염색에서는 교원섬유와 모세혈관의 증가가 확인되었으나, 신경과 근육조직의 뚜렷한 변화는 보이지 않았다(Fig. 8).

독 주입 후 7일이 경과 후 생쥐의 피부조직에서 봉침 시행시 주입된 꿀벌의 독주입기관이 여전히 잔존되어 있는 경우도 있었으나, 진피에서 관찰되는 일부 경미한 염증세포들을 제외하면, 특이한 조직병리학적 현상은 나타나지 않았다(Figs. 9, 10). PAS 반응에서도 표피의 변화는 나타나지 않았고, 진피에서는 피하 지방조직 주변에서 일부 염증세포들과 호중구의 침윤이 확인되었다(Fig. 11). Masson Trichrome 염색 결과, 진피에서 교원섬유의 활발한 증식이 관찰되었고, 근육조직 주변에서 섬유성 결합조직의 증가가 확인되었다(Fig. 12).

2. 꿀벌의 독에 의한 생쥐 피부의 미세구조적 변화

꿀벌의 독을 주입한 후 1시간이 경과된 생쥐의 피부조직을 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 표피의 상피세포들은 세포간의 연결이 파괴되어 intercellular space가 넓게 형성되어 있었다(Fig. 13). 세포질에는 전자밀도가 낮은 과립이 다수 관찰되었으나, 세포의 핵과 원형질막은 비정상적인 형태로 괴사중인 모습으로 관찰되었다(Fig. 14).

진피의 결합조직에는 많은 교원섬유(collagen fiber)가 기저막과 평행하게 배열되어 있었는데, 꿀벌의 독에 의한 섬유증식(fibrosis) 현상이 진행되고 있음이 확인되었다. 교원섬유는 정상조직에 비해 직경이 두 배 이상 비대한 상태로 관찰되었고(Fig. 15), 자가 면역글로불린(autoimmunoglobulin)으로 추정되는 전자밀도가 높은 물질이 교원섬유 주변에 광범위하게 분포되어 있었다(Fig. 16).

독 주입 후 6시간이 경과된 생쥐의 상피조직에서는 intercellular space가 상당히 축소되어 있었고, 기저

층에서는 세포의 활발한 분열이 관찰되었다. 기저막 상부에 위치한 기저세포의 핵은 구형이며, 중앙에 위치하였고, 핵에는 인이 발달되어 있었다(Fig. 17). 봉침 주입에 의해 붕괴된 부위의 표피에는 전자밀도가 높은 미세섬유가 풍부하게 함유되어 있음이 관찰되었다(Fig. 18).

독 주입 후 12시간이 경과된 생쥐의 진피 결합조직층에서는 긴 원형질 돌기를 가진 방추형의 섬유원세포가 다수 분포되어 있었다. 이 세포는 기저막 아래에서 교원섬유의 배열 방향과 평행하게 원형질 돌기를 뻗고 있었다(Fig. 19). 이 시간대의 진피에서는 모세혈관 주위의 염증세포가 증가되어 있었는데, 세포질에는 전자밀도가 높은 구형 과립이 함유되어 있었다(Fig. 20).

고 찰

일반적으로 독충에 의해 피부에 초래되는 반응은 발진(eruption), 소양증(pruritus), 충혈(hyperemia), 맥관내 용혈현상(intravascular hemolysis), 농포(pustule), 그리고 괴사(necrosis) 등 다양한 것으로 알려지고 있다(Odum and Maibach, 1976). 임상적으로 독충에 의해 피부에 유발되는 두드러기(urticaria)는 급성은 30분에서 1시간 사이에 나타나고, 만성은 4시간에서 6시간 지속된다. 이어 팽진(wheal)과 피부발적(flare)이 나타나고, 크기는 아주 작은 것 으로부터 큰 것까지 다양하며, 병변이 확대되면서 서로 융합하기도 하지만 병변이 12시간 내지 24시간 이상 지속되는 경우는 드문 것으로 알려져 있다(von Krogh and Maibach, 1981).

본 실험에서 꿀벌의 독을 생쥐의 피부에 주입하였을 때 유발되는 주된 반응은 조직병리학적으로 발진과 두드러기, 그리고 부종(edema)인 것으로 관찰되었으며, 거미나 기타 독충의 독을 주입하였을 때 비해 그 반응은 비교적 미약하였다. 그러나 독으로 인해 피부조직의 발진과 부종을 일으키는 등 피부조직에 민감한 조직병리학적 반응을 유발하였고, 특히 봉침 주입 시 생쥐에 상당한 통증을 유발하는 것으로 관찰되었다.

꿀벌의 독 물질은 주로 효소와 비효소성 단백질로

구성되어 있고 (Owen, 1974; Aukrust *et al.*, 1982), 이 중에서 mellitin이 주된 독성을 나타내는데 (Schumacher *et al.*, 1990), 벌의 독에 의한 알레르기 증상은 주로 두드러기나 부종과 같은 국소반응이 대부분을 차지하며 시간이 경과됨에 따라 점차 증세가 호전되어 치유되는 것으로 알려지고 있다 (Savliwala and Reisman, 1987).

Muller (1989)는 꿀벌의 침에 의한 알레르기 반응은 주로 특이한 Ig E 항체에 의해 나타나며, 임상적 증상으로는 두드러기, 혈관내 맥관증 (angioedema)과 과민반응 (anaphylaxis)을 나타낸다고 하였고, Kors 등 (1993)도 벌의 침에 의한 피부의 과민성 반응에 대해 보고하였다. 이러한 접촉성 피부염은 세포중재성 또는 제 IV형 면역반응의 결과로 발생되며 (Baer and Bickers, 1981; Dahl, 1981; Bergstresser, 1989), 미량의 allergen이 염증반응을 일으킬 수도 있다는 점에서 중요하게 평가되고 있다.

꿀벌의 독침을 직접 생쥐의 피부에 주입한 본 실험에서도 주입 후 1시간이 경과한 생쥐의 피부조직에서는 부종과 급성 염증세포의 생성이 이루어지고 혈관의 울혈, 그리고 PAS 반응에 양성으로 나타나는 다당류 계통의 물질이 침착되는 점 등으로 미루어, 꿀벌의 독에 의해 초래된 독성반응 뿐 아니라, 이에 대한 피부의 면역반응도 동시에 일어나는 것으로 추측된다.

실제로 꿀벌의 독을 주입한 후 피부의 진피층에서 확인되는 섬유증식 (fibrosis) 현상을 Masson trichrome 염색과 고배율의 전자현미경으로 관찰한 결과, 주로 교원섬유 (collagenous fiber)의 두께가 증가함에 따라 나타나는 일종의 비특이적 면역반응인 것 (Savliwala and Reisman, 1987)으로 확인되었다.

한편, 절지동물이 지닌 독이 다른 동물에 대해 작용하는 부위는 대부분이 신경계통으로 주로 neuromuscular transmission에 작용하거나 (Clark *et al.*, 1970; Frontali *et al.*, 1976), nervous membrane의 electrical field를 변화 (Spence *et al.*, 1977; Morgans and Carroll, 1977) 시키는 것으로 알려져 있지만, 피부 조직의 괴사는 collagenase에 의한 교원섬유의 파괴 때문이며, 독에 의한 상피조직의 파괴와 소실은 독에 의한 감염이 원인인 것으로 보고된 바 있다 (Atkinson and Wright, 1991).

그러나 생쥐 피부에 대한 꿀벌 독의 조직병리반응은 본질적으로 절지동물중 다른 독성 곤충류나 거미류 등을 대상으로 보고된 결과 (Hollabaugh and Fernandes, 1989; Atkinson and Wright, 1991, '92)에 비해 상당히 경미한 것으로 확인되었다. 맹독성거미의 일종인 brown recluse spider에서 보고된 바에 의하면, 독 주입 후, 보통 24시간에서 48시간 안에 홍반성낭창 (erythema), 부종 (edema) 등이 나타나면서 피부조직의 괴사가 이루어진다고 보고 (Hollabaugh and Fernandes, 1989)되었으나, 꿀벌의 독에 의한 생쥐 피부조직의 괴사 현상은 전혀 관찰되지 않았고, 봉침 시행 후 12시간 이후에는 조직병리학적 반응이 감소하여 3일째 이후에는 거의 소멸되는 것으로 확인되었다.

또한 본 실험에서 꿀벌의 독을 주입하였을 때 생쥐 피부의 조직병리학적 및 미세구조적 변화가 주로 독침 주변부에 한정되어 나타나고, 시간이 경과함에 따라 조직의 염증반응이 급속히 호전되며, 피부조직의 괴사는 나타나지 않는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과로 미루어 꿀벌의 독에 의해 유도된 피부조직의 병리반응은 주로 비자기 단백질에 대한 피부 조직의 정상적인 면역반응 (Savliwala and Reisman, 1987)으로부터 유래된 것으로 추정된다.

적 요

꿀벌 (*Apis mellifera*)의 독에 의해 야기되는 포유동물 피부의 조직병리학적 및 미세구조적 변화와 그 수복과정을 확인하기 위하여 실험용 생쥐의 피부에 직접 침범으로 꿀벌의 독을 주입한 후, 회복된 시점까지 일정시간 간격으로 조직의 표본을 제작하여 광학 및 전자현미경으로 관찰하였다.

독 주입 직후의 표본에서는 표피의 상피세포와 진피의 결합조직에서 현저한 염증반응이 유도되었고, 일부 세포의 괴사가 관찰되었다. 고배율의 전자현미경상에서 교원섬유의 직경이 크게 증가되었으며, 면역 단백질로 추정되는 전자밀도가 높은 grain의 침착이 확인되었다.

이러한 조직병리현상은 독 주입 후 12시간이 경과된 조직의 표본에서 서서히 회복되는 것으로 관찰되었다.

봉침 주위 피부조직의 조직학적 및 미세구조적 변화는 수 일간 지속되었으나, 병리학적 반응은 3일 이내에 거의 거의 소멸되는 것으로 관찰되었다. 또한 생쥐 피부에 대한 꿀벌 독의 병리반응은 다른 절지동물의 독에 비하여 비교적 경미한 것으로 확인되었다.

REFERENCES

- Atkinson RK, Wright LG, 1991. Studies of the necrotic actions of the venoms of several Australian spiders. *Comp. Biochem. & Physiol.* 98, 441-444.
- Atkinson RK, Wright LG, 1992. The involvement of collagenase in the necrosis induced by the bites of some spiders. *Comp. Biochem. & Physiol.* 102, 125-128.
- Aukrust LR, Einarsson SO, Johansson SGO, 1982. Crossed radioimmuno-electrophoretic studies of bee venom allergens, *Allergy* 37, 265-271.
- Baer RL, Bickers DR, 1981. Allergic contact dermatitis, photoallergic contact dermatitis and phototoxic dermatitis, In: *Immunodermatology*, ed. B. Safai and R.A. Good, Plenum Press, N.Y., pp.205-235.
- Bergstresser PR, 1989. Contact allergic dermatitis - old problems and new techniques, *Arch. Dermatol.* 125, 276-279.
- Bridges AR, Owen MD, 1984. The morphology of the honeybee (*Apis mellifera* L.) venom gland and reservoir, *J. Morphol.* 181, 69-86.
- Clark AW, Mauro A, Longenecker Jr. HE, Hurlbert WP, 1970. Effects of black widow spider venom on the frog neuromuscular junction. II. Effects on the fine structure of the frog neuromuscular junction. *Nature* 225, 703-705.
- Dahl MV, 1981. *Clinical Immunodermatology*, Year Book, Med. Publ. Co.
- Emmett EA, 1991. Toxic responses of the skin, In: *Toxicology*, ed. M.O. Amdur et al., Pergamon Press, N.Y., pp.463-483.
- Frontali N, Ceccarelli B, Gorio A, Mauro A, Siekevitz P, Tzeng M, Hurlbut WP, 1976. Purification from black widow spider venom of a protein factor causing the depletion of synaptic vesicles at neuromuscular junctions. *J. Cell Biol.* 68, 462-479.
- Gordon, CS, 1985. *Manual of skin diseases*, J.B. Lippincott Comp. 1, 1-7.
- Green, RL, Levine MI, 1982. The effect of venom skin testing on venom RAST titers, *Ann. Allergy* 48, 143-144.
- Habermann E, 1972. Bee and wasp venoms: the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed, *Science* 177, 314-322.
- Hollabaugh RS, Fernandes ET, 1989. Management of the brown recluse spider bite. *J. Ped. Surg.* 24, 126-127.
- Herbert FA, Salkie ML, 1982. Sensitivity to Hymenoptera in adult males, *Science* 177, 314-322.
- Kors JW, van Doormaal JJ, Monchy JG, 1993. Anaphylactoid shock following Hymenoptera sting as a presenting symptom of systemic mastocytosis, *J. Int. Med.* 233, 255-258.
- von Krogh G, Maibach HI, 1981. The contact urticaria syndrome, *J. Am. Acad. Dermatol.* 5, 328-342.
- Montagna W, Parakkal PF, 1974. *The Structure and Function of Skin*, Academic Press.
- Morgans D, Carroll PR, 1977. The responses of isolated human temporal artery to the venom of the Sydney funnel-web spider (*Atrax robustus*). *Toxicon.* 15, 277.
- Muller U, 1989. Clinical aspects, diagnosis and therapy of insect bite allergy, *J. Suisse de Med.* 119, 1761-1768.
- Odum RB, Maibach HI, 1976. Contact urticaria: a different contact dermatitis, *Cutis* 18, 672-676.
- Owen MD, 1974. A quantitative and temporal study of histamine and histidine in honeybee venom, *Can. J. Zool.* 52, 387-392.
- Savliwala MN, Reisman RE, 1987. Studies of the natural history of sting-insect allergy: long-term follow-up of patients without immunother-

- rapy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 80, 745.
- Schumacher MJJ, Schmidt O, Egen NB, Lowry JE, 1990. Quantity, analysis and lethality of European and Africanized honeybee venoms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43, 9-86.
- Spence I, Adams DJ, Gage PW, 1977. Funnel-web spider venom produces spontaneous action potentials in nerve. *Life Sci.* 20, 243-250.
- Valentine MD, 1984. Insect venom allergy: diagnosis and treatment, *J. Allergy Clin. Immunol.* 73, 299-305.

FIGURE LEGENDS

- Figs. 1, 2.** Photo micrographs of normal mouse skin composed of three layers which are epidermis, dermis, and hypodermis. Numerous hair follicles are observed in the dermal layer.
- Figs. 3, 4.** Photo micrographs of the mouse skin at 1 hour after injection of honeybee venoms. By Masson's trichrome staining epidermal shrinkage and dermal fibrosis are observed.
- Figs. 5, 6.** Photo micrographs of the mouse skin at 6 hour after injection of honeybee venoms stained with periodic acid Schiff's reagent. At this stage, the inflammatory cells appeared at dermis. Conspicuous fibrosis and destruction of collagen fibers are also observed.
- Figs. 7, 8.** Photo micrographs of the mouse skin at 12 hour after injection of honeybee venoms. By the periodic acid Schiff's staining (Fig. 7) and Masson's trichrome staining (Fig. 8), fibrosis of dermis and shrinkage of epidermis are clearly observed
- Figs. 9, 10.** Photo micrographs of the mouse skin (Fig. 9) and stings within the skin (Fig. 10) at 3 day after injection of honeybee venoms.
- Figs. 11, 12.** Photo micrographs of the mouse skin at 7 day after injection of honeybee venoms stained with Masson trichrome (Fig. 11) and periodic acid Schiff's reagents (Fig. 12). Histopathologically all of the tissues are recovered to those of normal skin except partial inflammatory cells in dermis.
- Figs. 13-20.** Electron micrographs of the mouse skin from 1 to 6 hour after injection of honeybee venoms stained with uranyl acetate and lead nitrate. Note the intercellular spaces among the epithelial cells (Figs. 13, 14), and electron dense grains on the collagenous fibers (Figs. 15, 16) at 1 hour after injection. At 6 hour after injection, epithelial cells around the wound have numerous fine fibrous materials (Figs. 17, 18). At 12 hour, spindle shaped cells are observed beneath the basal lamina, and inflammatory cells are increased near the blood vessels (Figs. 19, 20).





