

*Propionibacterium acnes*에 의해 유도된 염증에 대한 Chitosan-phytochemical Conjugates의 항염증 효과

김지훈¹ · 제재영² · 김영목^{1,3*}

¹부경대학교 식품공학과, ²부경대학교 해양바이오융합과학전공, ³부경대학교 해양융복합 바이오닉스 MIBC연구단

Anti-inflammatory Effects of Chitosan-phytochemical Conjugates against *Propionibacterium acnes*-induced Inflammation

Ji-Hoon Kim¹, Jae-Young Je² and Young-Mog Kim^{1,3*}

¹Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48547, Korea

²Department of Marine-Bio Convergence Science, Pukyong National University, Busan 48547, Korea

³Marine-Integrated Bionics Research Center, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

Propionibacterium acnes infection in skin tissue often causes acne vulgaris, commonly characterized by inflammatory papules, pustules, and nodules. Chitosan and its derivatives possess strong anti-inflammatory effects. In this study, the anti-inflammatory activity of chitosan-phytochemical conjugates on *P. acnes*-infected human skin keratinocytes (HaCaT) was evaluated. We designed a model of *P. acnes*-induced inflammation in viable HaCaT cells. Nitric oxide (NO), an inflammatory marker, was successfully elevated by *P. acnes* infection in HaCaT cells in a dose-dependent manner. Furthermore, the levels of NO were reduced by treatment with chitosan-phytochemical conjugates (chitosan-caffeic acid, -ferulic acid and -sinapic acid) in a dose-dependent manner. Among these conjugates, chitosan-caffeic acid exhibited the strongest NO suppression in HaCaT cells infected with *P. acnes*. The results obtained in this study suggest that chitosan-phytochemical conjugates could be used as a potential therapeutic agent against acne vulgaris.

Key words: Acne vulgaris, Anti-inflammation, Chitosan-phytochemical conjugates, Human keratinocyte (HaCaT) cells, *Propionibacterium acnes*

서 론

여러 병원성 피부 상재균들에 의해 피부질환이 발생하는데 이 중에서 여드름은 대표적인 피부질환 중의 하나이다(Ki et al., 2005). 피부에 염증을 일으키는 세균들 중의 하나인 *Propionibacterium acnes*는 모공의 피지 내에 존재하는 대표적인 혐기성 피부 상재균으로서, 피지의 지방성분을 분해하고 그 대사산물이 여드름성 염증을 유발한다고 알려져 있다(Choi and Seo, 2007; Tenaud et al., 2007). 각질형성 세포에서 *P. acnes*는 tumor necrosis factor- α 와 interleukins과 같은 염증 매개성 cytokines의 분비를 촉진시키고, 그 결과 세포내 nitric oxide (NO)가 증가하여 염증이 유발된다고 알려져 있다(Eom et al., 2016).

여드름 치료에는 일반적으로 tetracycline과 같은 항생제를 이

용한 처방이 사용 되어지고 있다(Gollnick et al., 2003; Han et al., 2010; Ravenscroft, 2005). 하지만, 여드름의 치료에 주로 사용되는 항생제에 대한 내성을 갖는 *P. acnes* 균의 출현, 피부발진, 통증 그리고 정상 피부 상재 균총 변화에 의한 2차 감염 유발 등의 항생제 사용에 의한 다양한 부작용이 보고되고 있어 상대적으로 부작용이 적은 천연물을 이용한 여드름 치료제에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Eom et al., 2016; Kim et al., 2016; Nam et al., 2003; Tan, 2003). 또한, 천연물을 이용한 여드름 치료에 대한 최근 연구는 항균효과와 항염증 효과를 동시에 가지고 있는 천연물에 대한 연구가 주목을 받고 있다(Eom et al., 2016; Lee et al., 2014a).

여드름성 염증에 대한 대부분의 연구는 피부 유래세포에 *P. acnes*를 사균 처리하여 염증을 유도하거나, ultra violet (UV)

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2016.0589>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 49(5) 589-593, October 2016

Received 5 September 2016; Accepted 17 September 2016

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5832; Fax: +82. 51. 629. 5824

E-mail address: ymkim@pknu.ac.kr

등과 같은 방법으로 피부 유래세포를 처리하여 염증을 유도한 후에, 항염증 효과를 연구해 왔다(Kim et al., 2009; Lee et al., 2014b; Poquet et al., 2008). 하지만, *P. acnes* 생균을 이용하여 피부 유래세포에 염증을 유도하고 이를 이용해 천연물질의 항염증 효과에 대해 연구한 논문은 거의 없다(Eom et al., 2016). 이에 본 연구에서는 각질형성 세포인 HaCaT cell에 *P. acnes* 생균을 접종하여 염증을 유도한 동물세포 모델을 구축하고, 항산화, 항염증 및 항균 등의 다양한 생리활성이 있다고 보고되어 있는 천연 뮤코다당류인 chitosan에 phytochemical을 conjugate시킨 chitosan-phytochemical conjugates를 이용하여 여드름균으로 염증이 유도된 HaCaT cell에 대한 항염증 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료

Chitosan (average MW 310 kDa and 90% degree of deacetylation)은 (주)키토라이프(Seoul, Korea)에서 제공받았으며, 본 연구에 사용된 phytochemicals인 caffeic acid, ferulic acid와 sinapic acid는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. 그 외 연구에 사용된 시약은 모두 1급 이상의 등급을 사용하였다

Chitosan-phytochemical conjugates의 합성

Chitosan-phytochemical conjugates는 Cho et al. (2011)의 방법에 따라 합성하였다. 0.25 g의 chitosan을 2% acetic acid 25 mL에 녹인 후, 0.054 g의 ascorbic acid를 녹인 1.0 M hydrogen peroxide를 0.5 mL 분주하였다. 이후, 30분간 실온에서 방치한 뒤 0.14 mM의 phytochemicals (caffeic acid, 0.02514 g; ferulic acid, 0.02709 g; sinapic acid, 0.03128 g)을 첨가하여 24시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응이 이루어지지 않은 phytochemicals은 dialysis tubing (Thermo-Fisher Scientific, Rockford, USA)을 이용하여 증류수로 투석 (molecular weight, 1 kDa)시킨 후 동결건조 하여 시료로 사용하였다. 합성된 chitosan-phytochemical conjugates를 각각 chitosan-caffeic acid (CCA), chitosan-ferulic acid (CFA), chitosan-sinapic acid (CSA)로 명명하고 대조구인(unmodified chitosan)은 phytochemicals을 첨가하지 않고 똑같은 방법에 따라 제조한다.

균주와 배지

본 연구에 사용된 균주인 *P. acnes* KCTC 3314는 한국 미생물 자원센터(Korean Collection for Type Cultures; KCTC, Daejeon, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. *P. acnes*균은 brain heart infusion broth (Difco Inc., Detroit, USA)에 1.0% glucose를 첨가한 배지에 접종한 후 10% CO₂에서 배양하였다.

세포 배양

HaCaT cell은 37°C, 5% CO₂의 조건에서 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Co), 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에서 배양하였다. HaCaT cell은 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식시킨 후 배양 3일 간격으로 배양 세포 표면을 phosphate buffer saline (PBS) 용액으로 washing하였다. 이후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 incubator에서 1분간 처리한 다음 trypsin-EDTA용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착 시켰다. 탈착된 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM 15 mL를 새로운 배양용기에 옮겨 1:20의 split ratio로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다.

세포 생존율 측정

HaCaT cell을 1×10^6 cells/well의 밀도로 96 well에 100 µL의 DMEM 배지와 함께 분주한 뒤, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 washing 한 다음 같은 양의 배지와 0.05 N HCl에 녹인 chitosan phytochemical conjugates를 각각의 농도별로 각 well에 처리하고 24시간 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 PBS에 1 mg/mL의 농도로 녹인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 20 µL씩 각 well에 첨가하고 알루미늄 호일로 빛을 차광시킨 후 4시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 이후, 배양액을 제거하고 dimethyl sulfoxide 용액 200 µL를 첨가하여 37°C incubator에서 1시간 반응시킨 후 Infinite F200 Pro microplate Reader (TECAN; Männedorf, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

Nitric oxide (NO) 측정

HaCaT cell (1×10^6 cells/well)에 염증을 유도하기 위해서 *P. acnes* (10^3 - 10^6 CFU/mL)를 접종하여 72시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양한 후, 각각의 시료를 농도별로 각 well에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지에 생성된 NO는 Griess reaction (Sun et al., 2003)을 이용하여 측정하였다. 100 µL의 배지 상층액과 동량의 Griess reagent (0.1% naphthyl ethylenediamine dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄)를 섞고 30분간 실온에서 방치한 뒤 Infinite F200 Pro microplate reader (TECAN; Männedorf, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

결과 및 고찰

*P. acnes*를 이용한 HaCaT cell에서의 염증 유도

본 연구에서는 *P. acnes* 생균을 직접 HaCaT cell에 접종하여 염증을 유도한 *in vitro* 모델을 완성하고 이를 이용한 chitosan-phytochemical conjugates의 항염증 효과에 대해 연구하였다.

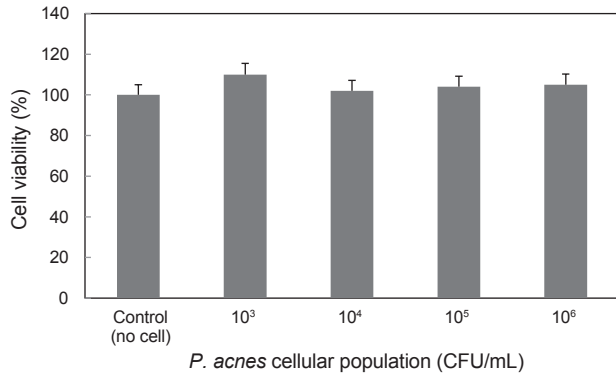


Fig. 1. Effect of *Propionibacterium acnes* cellular population on cell cytotoxicity of HaCaT cells.

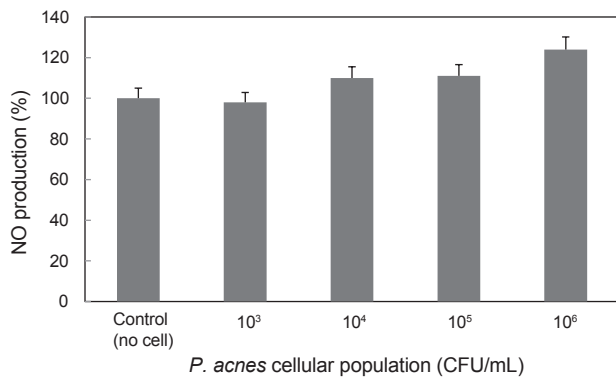


Fig. 2. Effect of *Propionibacterium acnes* cellular population on nitric oxide (NO) production in HaCaT cells.

먼저, *P. acnes* 생균에 의한 염증 유도 모델을 구축하기 위하여 *P. acnes* 균수에 따른 HaCaT cell의 세포 생존율과 NO 생성량에 대한 상관 관계를 조사하였다. 그 결과, *P. acnes* 균의 경우 약 10⁶ CFU/mL로 HaCaT cell에 접종하였을 때에도 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1). 또한, *P. acnes* 접종에 의한 HaCaT cell에서의 염증물질인 NO 생성이 가능한지 확인하기 위해 다양한 농도의 *P. acnes* 균을 HaCaT cell에 접종하였고, 그 결과 *P. acnes* 균수에 의존적인 NO 생성을 확인하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 *P. acnes* 생균을 HaCaT cell에 접종하여 염증물질인 NO 생성에 대해 연구한 Eom et al. (2016)의 보고와 일치하였다. 이에 약 10⁶ CFU/mL의 *P. acnes* 균을 HaCaT cell에 접종하여 염증을 유도한 실험 모델을 이용하여 후속 연구를 진행하였다.

HaCaT cell에 대한 chitosan-phytochemical conjugates의 세포독성

여드름성 염증 치료를 위한 치료제로써 chitosan-phytochemical conjugates의 가능성에 대해 연구하기 위하여 먼저 이들

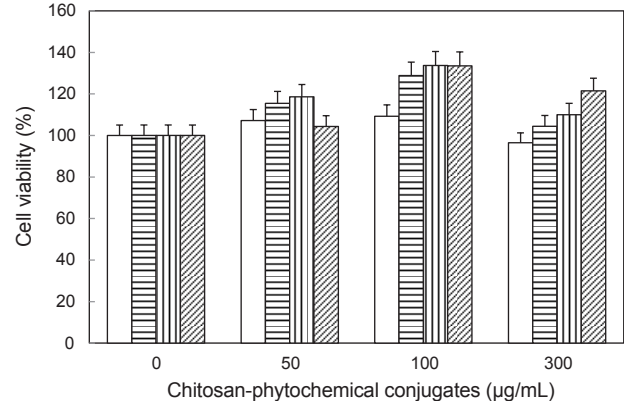


Fig. 3. Effect of chitosan-phytochemical conjugates on cell cytotoxicity of *Propionibacterium acnes*-inoculated HaCaT cells. HaCaT cells were inoculated by *P. acnes* (about 10⁶ CFU/mL) and then chitosan conjugates were treated. □, control (unmodified chitosan); ▨, chitosan-caffeic acid (CCA); ▤, chitosan-ferulic acid (CFA); ▧, chitosan-sinapic acid (CSA).

화합물의 HaCaT cell에 대한 세포독성을 조사하였다. HaCaT cell에 다양한 농도의 chitosan-phytochemical conjugates (0, 50, 100 및 300 μg/mL)를 처리하고 24시간 배양하여 MTT assay로 세포독성을 평가하였다. Chitosan-phytochemical conjugates는 본 연구에서 사용된 최대 농도인 300 μg/mL에서도 HaCaT cell에 대한 독성은 관찰되지 않았다(결과 미제시). 또한, 10⁶ CFU/mL농도의 *P. acnes*로 접종된 HaCaT cell에서 chitosan-phytochemical conjugates은 농도 의존적으로 HaCaT cell에서 세포 보호 효과를 나타내었다(Fig. 3). 이상의 결과는 Chang liver cell에 대한 chitosan과 chitosan 유도체의 세포 보호 효과에 대해 보고한 Cho et al. (2013)의 결과와 일치하였다. 이에 HaCaT cell에 독성을 나타내지 않는 가장 높은 농도인 300 μg/mL의 chitosan-phytochemical conjugates을 이용하여 *P. acnes*균에 의해 염증이 유도된 HaCaT cell에 대한 항염증 효과에 대하여 조사하였다.

*P. acnes*에 의해 염증 유도된 HaCaT cell에서 chitosan-phytochemical conjugates의 NO 생성 억제 효과

NO는 염증반응의 여러 측면을 매개하는 지표로 이용되고 있다. 이에 *P. acnes*에 의해 유발된 염증에 대한 chitosan-phytochemical conjugates의 염증 억제 효과를 조사하였다. 먼저 *P. acnes*에 의해 염증 유도된 HaCaT cell에서의 NO 생성량을 확인하였고, chitosan-phytochemical conjugates를 처리하였을 때, NO 생성량 변화를 확인하였다. 그 결과, chitosan 또는 chitosan-phytochemical conjugates 처리를 하지 않은 대조구와 비교하였을 때, chitosan과 chitosan-phytochemical conjugates 처리에 의한 NO 생성량이 농도 의존적으로 억제된 것을 확인

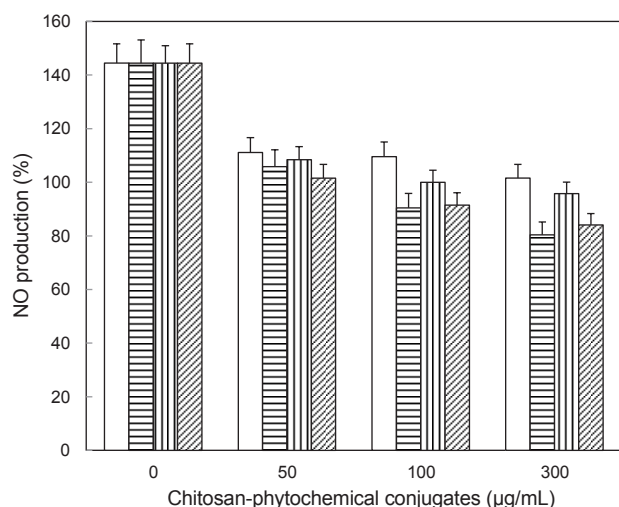


Fig. 4. Effect of chitosan-phytochemical conjugates on nitric oxide (NO) production on *Propionibacterium acnes*-inoculated HaCaT cells. HaCaT cells were inoculated by *P. acnes* (about 10^6 CFU/mL) and then chitosan conjugates were treated. □, control (unmodified chitosan); ▨, chitosan-caffeic acid (CCA); ▤, chitosan-ferulic acid (CFA); ▩, chitosan-sinapic acid (CSA).

하였다(Fig. 4). 또한, chitosan 보다는 chitosan-phytochemical conjugates가 보다 효과적으로 NO 생성 억제 효과를 나타내며 그 중에서 CCA가 가장 강력한 NO 생성 억제효과를 가지는 것으로 나타났다. CCA의 경우 *P. acnes*에 의해 유발된 염증에 HaCaT cell에 50 μ g/mL, 100 μ g/mL 그리고 300 μ g/mL를 처리하였을 경우, 각각 약 40%, 55% 및 65%의 NO 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 chitosan 유래 화합물들이 염증이 유도된 RAW 264.7 cell에서 44.1%-50.2%의 수준으로 NO 생성을 억제한다는 Yang et al. (2010)의 결과와 유사하였다. Chitosan 유래 화합물들의 NO 생성 억제 기작은 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현 억제 때문으로 보고하고 있다. 또한, caffeic acid, ferulic acid 그리고 sinapic acid 등과 같은 phytochemicals에 의한 NO 생성 억제 및 iNOS 발현억제에 대한 연구도 보고 되고 있다(Hämäläinen et al., 2007; Ou et al., 2012; Shan et al., 2009). 본 연구에서는 *P. acnes*에 의해 염증 유도된 HaCaT cell에서의 NO생성이 chitosan-phytochemical conjugates에 의해 효과적으로 억제된다는 결과를 처음으로 규명하였다. 하지만, *P. acnes*에 의해 염증 유도된 HaCaT cell에서 NO 생성을 억제하는 메커니즘은 명확하게 제시되지 않아 향후 이를 규명하기 위한 염증성 cytokines 및 chemokines과 관련된 유전자 및 단백질 발현에 대한 후속 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

이러한 결과를 요약해 보면, chitosan-phytochemical conjugates는 *P. acnes*생균에 의해 유도된 염증에 대한 상당한 항염증 효과를 가지고 있고 부작용도 상대적으로 적은 것으로 알려져

있는 chitosan 유도체이기 때문에 향후 이를 이용한 여드름성 염증 치료제 개발에 기여 할 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 해양수산부의 재원으로 해양생명공학기술개발사업(20150220, 해양 융복합 바이오닉스 소재 상용화 기술개발) 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다. 또한 이 논문은 수산 과학 발전에 깊은 관심을 가지고 계셨던 고 강영환님을 기리기 위해 미국 시애틀 소재 SKS Trading Co.의 지원에 의해 조성된 부경대학교 발전기금의 지원에 의해 이루어진 연구로 이에 감사드립니다.

References

- Cho YS, Kim SK, Ahn CB and Je JY. 2011. Preparation, characterization, and antioxidant properties of gallic acid-grafted-chitosans. *Carbohydr Polym* 83, 1617-1622. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.019>.
- Cho YS, Lee DS, Kim YM, Ahn CB, Kim DH, Jung WK and Je JY. 2013. Protection of hepatic cell damage and antimicrobial evaluation of chitosan-catechin-conjugate. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 56, 701-707. <http://dx.doi.org/10.1007/s13765-013-3168-8>.
- Choi KH and Seo HS. 2007. The effects of Jeondo-san on anti-inflammation and anti-*Propionibacterium acnes*. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 20, 89-101.
- Eom SH, Lee EH, Park KBW, Kwon JY, Kim PH, Jung WK and Kim YM. 2016. Eckol from *Eisenia bicyclis* inhibits inflammation through the AKT/NF- κ B signaling in *Propionibacterium acnes*-induced human keratinocyte HaCaT cells. *J Food Biochem In press*. <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.12312>.
- Gollnick H, Cunliffe W, Berson D, Dreno B, Finlay A, Leyden JJ, Shalita AR and Thiboutot D. 2003. Management of acne: a report from a global alliance to improve outcomes in acne. *J Am Acad Dermatol* 49, 1-37.
- Han S, Lee K, Yeo, J, Baek H and Park K. 2010. Antibacterial and anti-inflammatory effects of honeybee (*Apis mellifera*) venom against acne-inducing bacteria. *J Med Plants Res* 4, 459-464. <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR09.427>.
- Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M and Moilanen E. 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Med Inflamm* 2007, Article ID 45673, 10.
- Ki HG, Yun SJ, Lee JB, Kim SJ, Lee SC and Won YH. 2005. Microorganisms isolated from acne and their antibiotic sus-

- ceptibility. Kor Dermatol Assoc 5, 871-875.
- Kim HR, Han TH and Lee SG. 2009. Anti-inflammatory activity of a water extract of *Acorus calamus* L. leaves on keratinocyte HaCaT cells. J Ethnopharmacol 1, 149-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.011>.
- Kim, YH, Kim JH, Kim DH, Kim SH, Kim HR and Kim YM. 2016. Synergistic antimicrobial effect of *Sargassum serratifolium* (C. Agardh) C. Agardh extract against human skin pathogens. Korean J Food Sci Technol 48, 241-246.
- Lee JH, Eom SH, Lee EH, Jung YJ, Kim HJ, Jo MR, Son KT, Kee HJ, Kim JH, Lee SK and Kim YM. 2014a. *In vitro* antibacterial and synergistic effect of phlorotannins isolated from edible brown seaweed *Eisenia bicyclis* against acne-related bacteria. Algae 29, 47-55. <http://dx.doi.org/10.4490/algae.2014.29.1.047>.
- Lee WR, Kim KH, An HJ, Kim JY, Chang YC, Chung H, Park YY, Lee ML and Park KK. 2014b. The protective effects of melittin on *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory responses *in vitro* and *in vivo*. J Invest Dermat 134, 1922-1930.
- Nam C, Kim S, Sim Y and Chang I. 2003. Anti-acne effects of oriental herb extracts: a novel screening method to select anti-acne agents. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 16, 84-90.
- Ou B, Bosak KN, Brinckner PR, Lezzoni DG and Seymour EM. 2012. Processed tart cherry products-comparative phytochemical content, *in vitro* antioxidant capacity and *in vitro* anti-inflammatory activity. J Food Sci 77, 105-112. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02681.x>.
- Poquet L, Clifford MN and William G. 2008. Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells. Archiv Biochem Bioph 476, 296-204.
- Ravenscroft J. 2005. Evidence based update on the management of acne. Arch Dis Child Educ Pract Ed 90, 98-101.
- Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L and Yin Z. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. Inter Immunopharmacol 9, 1042-1048. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2009.04.011>.
- Sun J, Zhang X, Broderick M and Fein H. 2003. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using griess reaction assay. Sensors 3, 276-284.
- Tan HH. 2003. Antibacterial therapy for acne: a guide to selection and use of systemic agents. Am J Clin Dermatol 4, 307-314.
- 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, 500-506. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00552.x>.
- Yang EJ, Kim JG, Kim JY, Kim SC, Lee NH and Hyun CG. 2010. Anti-inflammatory effect of chitosan oligosaccharides in RAW 264.7 cells. Cent Eur J Biol 5, 95-102.