

각질형세포와 피지선세포 공배양을 통한 지루성 피부염 억제 소재 연구

김 아 름[†] · 김 수 나 · 이 현 기* · 전 병 배** · 박 원 석

(주)아모레퍼시픽 기술연구원 메디컬뷰티연구소, *(주)아모레퍼시픽 기술연구원 피부과학연구소,

** (주)아모레퍼시픽 기술연구원 화장품연구소

(2012년 7월 5일 접수, 2012년 7월 28일 수정, 2012년 9월 25일 채택)

The Study about Relief Effect of Essential Oil on Seborrheic Dermatitis with Co-culture System

Ah-Reum Kim[†], Su-Na Kim, Hyun-Gee Lee*, Byeong-Bae Jeon**, and Won-Seok Park

Amorepacific Corporation R&D Center, 314-1 Bora-dong, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-729, Korea

(Received July 5, 2012; Revised July 28, 2012; Accepted September 25, 2012)

요약: 보통 지루성 피부염은 과다 생성된 피지와 함께 피지를 영양분으로 상재하는 *M. globosa* 이스트에 의해서 얼굴, 몸 및 두피에 자주 발생하는 피부질환이다. 본 연구는 천연정유성분(Natural essential oils)으로부터 지루성 피부염과 관련된 항염증 활성과 *M. globosa* 이스트에 대한 증식 억제 활성을 평가하고자 하였다. 지루성 피부염 진정 효능을 평가하기 위해서 지루성 피부염 환경을 모사한 공배양 세포 평가 모델을 구축하였다. 본 평가모델을 통해서 육계(*Cinnamomum zeylanicum*, Cinnamon bark)의 껍질 및 박하(*Mentha arvensis*, Cornmint)의 잎에서 추출한 천연정유 성분이 다양한 지루성 피부염 자극원에 따른 Interleukin-1 α (IL-1 α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) 사이토카인의 발현량 증가와 피지생성 증가를 감소시킴을 확인하였다. 또한, 지루성 피부염 유발균으로 알려진 *M. globosa* 이스트에 대한 증식 저해 평가를 통해 두 정유성분에서 유의한 *M. globosa* 증식 억제 능(MIC \leq 0.0625 %)을 확인하였다. 본 연구 결과로부터 육계껍질 및 박하 잎 정유성분이 지루성 피부염에 따른 염증성 사이토카인의 발현량을 감소시켰다. 특히 육계 껍질 오일은 지루성 피부염 주요 원인인 *Malassezia furfur* 및 *M. globosa* 증식을 억제함으로써, 지루성 두피염증의 예방과 효과적인 관리 제품의 소재로서 활용가치가 높음을 알 수 있다.

Abstract: Seborrheic dermatitis (SD) is the skin disease occurred because of *Malassezia* yeast which grows on the skin and scalp, and this yeast lives on sebum lipid, and their metabolite, free lipid acids are thought to be the main irritant on skin. To find out effective cosmeceutical ingredients to treat SD symptoms, we established novel cell-based *in vitro* model mimicking SD symptoms. This *in vitro* model adopted the co-culture system with primary sebocyte & HaCaT keratinocyte. We used *M. globosa* yeast extract, arachidonic acid, linoleic acid and dihydrotestosterone as SD inducers. In the co-culture system with optimized concentrations for SD-inducing cocktail, the production of IL-8 and sebum lipids increased up to 2-fold, and then we screened with commercial essential oils by monitoring IL-8 as a key inflammatory biomarker. Then we found that *Cinnamomum zeylanicum* oil, *Mentha arvensis* oil effectively down-regulated IL-1 α , IL-6, IL-8 cytokines which over-produced by SD-inducing cocktail. Additionally, two essential oils also showed inhibitory effect on sebum lipid synthesis from primary sebocyte and growth inhibitory effect to *M. globosa* yeast (MICs were lower than 0.0625 %). Our recent results suggest that *Cinnamomum zeylanicum* oil and *Mentha arvensis* oil could be effective natural herbal remedies to relieve or protect scalp seborrheic dermatitis.

Keywords: Seborrheic dermatitis, co-culture system, *M. globosa*, *Cinnamomum zeylanicum* oil, *Mentha arvensis* oil

[†] 주 저자 (e-mail: ahreum@amorepacific.com)

1. 서 론

피부 피지선은 피지로 알려진 지질의 혼합물을 분비하는 모낭 부속기이다. 피지선에서 피지가 과다 생성되면 지성피부가 나타나게 되고, 또한, 여드름 및 지루성 피부염 등 다른 피부 트러블, 질환의 발현 원인이 될 수 있다. 피지의 생성은 피지선세포의 증식과 분화에 영향을 미치는 여러 인자들에 의하여 조절되며, 남성호르몬, 여성호르몬, IGF-1 (insulin-like growth factor), PPAR (peroxisome proliferator activated receptor)와 같은 인자들이 피지생성에 관련된 것으로 알려져 있다[1].

일반적으로 지루성 피부염은 10명중 3명꼴로 일어나는 매우 흔한 질병으로 얼굴뿐만 아니라 피부에도 증상이 자주 발생한다. 지루성 피부염은 피부가 붉고 염증을 보이며, 비듬이나 각질이 동반되면서 가려움이 발생하는 형태로 보인다. 이러한 지루성 피부염은 지루성 탈모에 원인이 되기도 하는데 피지선에 문제가 생겨 피지의 분비량이 비정상적으로 증가하고, 증가한 피지가 피부 내 모공을 막아 피부 영양공급 및 순환기능이 저하되어 지루성 탈모가 나타나게 된다.

지루성 피부염의 원인으로 주로 피지선의 활성 증가로 인한 피지 과다분비, 피부에 상재하는 호지성인 말라세지아 글로보사(*Malassezia globosa*, *M. globosa*) 이스트의 과다 증식, 표피의 과다 증식, 세포 매개성 면역 이상 등이 주요한 것으로 알려져 있다[2]. 다양한 말라세지아 이스트 중 중에서 *Malassezia restricta* 와 *M. globosa*가 지루성 피부염이 발병한 피부에서 제일 많이 발견되며 [3], *M. globosa* 이스트가 분비하는 리파아제(Lipase)로 [4] 피지 구성물인 트리글리세리드(Triglycerides)와 에스테르(Ester)를 분해하여[5], 피부 자극원이 되는 리놀레산(Linoleic acid), 올레산(Oleic acid)이 만들어 진다. 이 지방산이 각질을 투과하는 정도는 개인별로 감수성이 있어서 발병여부가 결정되며, 지방산의 투과, 피부장벽이 파괴, 염증 유발이 지루성 피부염의 주요 원인 기작으로 보고되었다.

지루성 피부염의 치료를 위해서는 과다하게 생성된 피지의 적절한 제거와 과다 피지생성 억제, *M. globosa* 이스트의 과증식 억제가 피부장벽 기능과 건강한 피부 유지를 위해 중요하게 여겨진다. 치료법은 주로 *M. globosa* 이스트의 특이적 또는 비특이적인 타르(Tar), 징크 피리치온(Zinc pyrithione), 케토코나졸(Ketoconazole), 테르비나핀(Terbinafin) 등 항균제가 스테로이드 등 항염증제를 많이 사용하고 있다 [6,7]. 그러나 이러한 항균제들

은 의약품에 국한되어 일상생활용 화장품 및 세정제 등에 적용할 수 있는 안전한 향균, 항염 기능의 소재에 대한 요구가 있다. 이에 따라 본 연구에서는 지루성 피부염의 증상을 완화하고 원인균의 증식을 억제시킬 수 있는 천연물 소재를 탐구하고자 하였다.

박하(*Mentha arvensis*, cornmint)는 박하속에 속하는 수생박하와 녹양박하의 대표적인 허브 식물의 하나로, 최근 연구에서 박하잎 오일의 주성분인 멘톨 및 멘톨 유래 화합물이 *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* 등 무좀을 유발하는 피부사상균에 대해서도 유의미한 항균력을 가진다고 보고되었고[8], 생쥐 대식 세포주에서 그람음성세균의 세포벽 구성물인 LPS 자극에 따른 염증성 매개체인 NO (Nitric Oxide)의 증가를 유의미하게 억제함을 보고하였다[9]. 또한 박하잎 오일은 호흡기를 통해서 감염되는 박테리아에 대해서도 강한 항균력을 갖는다[10].

육계(계피, *Cinnamomum zeylanicum*)는 녹나무과의 육계나무(*Cinnamomum cassia* Blume;肉桂)의 나무껍질로, 최근 연구에서 육계 오일 및 이의 활성 구성 성분인 trans-cinnamaldehyde와 cinnamyl acetate 등이 대식 세포주에서 LPS 자극에 따른 염증성 매개체인 NO와 PGE₂ (Prostaglandin E2, 프로스타글란딘 E2)의 증가를 억제하고 [9], 육계 오일 유래 cinnamaldehyde가 *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* 박테리아에 대해 유의미한 항균력을 갖고 있음이 보고되었다 [11]. 그리고 천식을 유도한 마우스 모델 연구에서 육계오일 희석액 4주간 섭취 시, 면역반응 증진시키는 사이토카인인 IL-2, IL-4, IL-10가 증가함이 보고된 바 있다 [12].

그러나 박하잎오일과 육계껍질오일의 지루성 피부염 증 유발 피부상재균에 대한 항균력 및 지루성 두피염증에 대한 항염증 효능 연구는 아직 없었다. 현재까지 지루성 피부염의 연구에는 *M. globosa* 이스트와 각질형성세포 [13] 또는 각질형성세포와 섬유아세포로 구성된 인공피부를 [14] 이용하여 실험하였는데, 지루성 피부염의 원인이 되는 피지선세포가 없어서 실제 지루성 피부염의 병인론에 적합한 상태를 만들지 못하였다[15,16]. 본 연구에서는 위 한계를 극복하고, 지루성 피부염 환경을 모사하는 *in vitro* 시스템을 만들기 위해 지루성 피부 병변을 구성하는 주요 세포인 표피를 구성하는 각질형성세포와 피지선을 구성하는 피지선세포를 공생 배양(co-culture)하였고, 여기에 지루성 피부염을 유발하는 자극원을 공생 배양계에 처리하였다(Figure 1). 지루성 피부염

을 유발하는 것으로 알려진 *Malassezia* 이스트 중에서 *M. globosa*만이 피부염증을 유발하는 지방산을 생성하는 리파아제(Lipase)를 발현하므로[5], 피부염증 매개체로서 *M. globosa* 이스트의 세포 분쇄물(cell lysate)과 피부염증 및 자유지방산 생성을 유도하는 아라키돈산(Arachidonic acid)[17], 피지 생성을 촉진하는 리놀레산(Linoleic acid)과 남성형 호르몬의 2차 대사물이며 피지선세포의 분화, 증식을 유도하고 피지선에서의 피지생성을 촉진하는 디하이드로테스토스테론(Dihydrotestosterone)[18]을 처리하여 시험관 모델에서 지루성 피부염을 모사하였다.

위에서 구축한 공생 배양계를 이용해 육계껍질오일 및 박하잎오일의 지루성 피부염에 따른 염증성 사이토카인의 발현량 감소와 피지 생성 억제 여부를 평가하고, 피부염증의 주요 원인이 되는 피부 상재 *Malassezia furfur* 및 *M. globosa* 이스트에 대한 증식 억제능을 측정하여 피부염과 이에 따른 불편을 개선하는 천연 식물 소재를 탐색하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 육계껍질 오일 및 박하잎 오일의 제조

실험에 사용한 육계껍질 오일과 박하잎 오일은 키멕스코퍼레이션(Kimex Corp., Korea)에서 공급된 것으로 제조 과정은 다음과 같다. 육계껍질 오일을 제조하기 위해 육계나무(*Cinnamomum zeylanicum*, cinnamon)의 껍질을 잘게 자른 후 음지에서 하루 동안 말렸다. 약 1 kg의 육계나무 껍질을 증류통에 넣고 밀봉한 다음 3 h 동안 증기를 불어 넣어 1.2 g의 육계나무 껍질 오일을 얻었다. 박하잎 오일을 제조하기 위해 박하나무(*Mentha arvensis*)의 지상부를 잘라 약 1 kg을 증류통에 넣고 밀봉한 다음 2 h 동안 증기를 불어 넣어 약 15 g의 오일을 제조했다.

2.2. 피지선세포와 각질형성세포주의 배양 조건

본 실험에서 사용한 사람 피지선세포는 Human Primary sebocyte (Celprogen, USA)이고, Celprogen사에서 공급하는 배양배지(Human Primary Sebocyte Complete Growth Media with Serum)로 세포를 계대 배양하였다. 사람 피지선세포는 배양 플라스크에 완전히 부착되는데 12 h 내로 소모되었으며, 37 °C, 5 % CO₂에서 배양하였다. 사람 유래의 각질 세포(keratinocyte) 세포주인 HaCaT는 자연적으로 불멸화된 피부 각질형성세포주로 DMEM 배지(Invitrogen, USA)에 우태혈청(fetal

bovine serum: JRH Bioscience, Japan)을 10 % 첨가하고, 페니실린 100 mg/mL, 스트렙토마이신 100 mg/mL (all from GIBCO, Italy)을 첨가한 배지를 사용하여, 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 배양하여 사용하였다.

2.3. 지루성 피부염 유사 *in vitro* 시스템

지루성 피부염 연구를 위해서 피지선세포와 각질형성 세포주를 함께 사용하여 사람의 지루성 피부염 병변과 유사한 환경의 *in vitro* 피부염 모델을 준비하였다. 24 웰(well)의 배양 플레이트에 HaCaT 각질 세포와 사람 피지선세포를 각각 3 × 10⁴개와 3 × 10⁴개씩 접종하였다. 접종 후, 하루 동안 배양 플레이트의 바닥에 세포가 붙을 수 있도록 기다렸다. 이때 배지는 Celprogen사에서 공급하는 피지선세포 배양배지를 사용하였다.

하루 지난 세포에 지루성 피부염을 일으키기 위해 리놀레산(linoleic acid, Sigma, USA) 50 μM, 아라키돈산(arachidonic acid, Sigma, USA) 50 μM, 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone, Sigma, USA) 10 nM, *M. globosa* 이스트 파쇄물 2 ng/mL로 세포 배양액에 처리하였다. *M. globosa* 이스트 파쇄물을 만들기 위해, *M. globosa* 이스트를 -70 °C에서 동결과 해동을 반복하고 저온에서 초음파분해(sonication)를 실시하였고, Bradford assay로 단백질량을 측정하여 2 ng/mL로 실험에 사용하였다. 동시에 각각 박하 잎 오일, 육계껍질 오일을 5, 10 ppm으로 처리하여 자극원에 의한 지루성 피부염에 따른 염증성 사이토카인의 생성 감소 효과를 관찰하였다.

2.4. 염증성 사이토카인 측정

자극원과 대조군 또는 향료를 처리하고 하루가 경과한 후, 배양액에 발현된 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)인 IL-1α의 농도를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해 측정하였다. ELISA에는 Human IL-8 ELISA set (BD Bioscience, USA), Human IL-1α Quantikine ELISA (R&D systems, USA)를 사용하였고, 제조사의 권장 방법에 따라 실험을 실시하였다. 고마바이오텍의 Luminex Quantikine assay를 통해서 배양액 내 IL-6 농도를 측정하였다.

2.5. 중성지질 합성량 측정

지질에 대한 형광 프로브인 Nile red는 각질층의 지질 분포를 보기 위해 사용하는데, 특히 triglyceride, cholesterol 등의 중성지질을 확인하는데 유용하다. 자극원과 대조군 또는 향료를 처리한지 하루 뒤, 공생배양 모델에

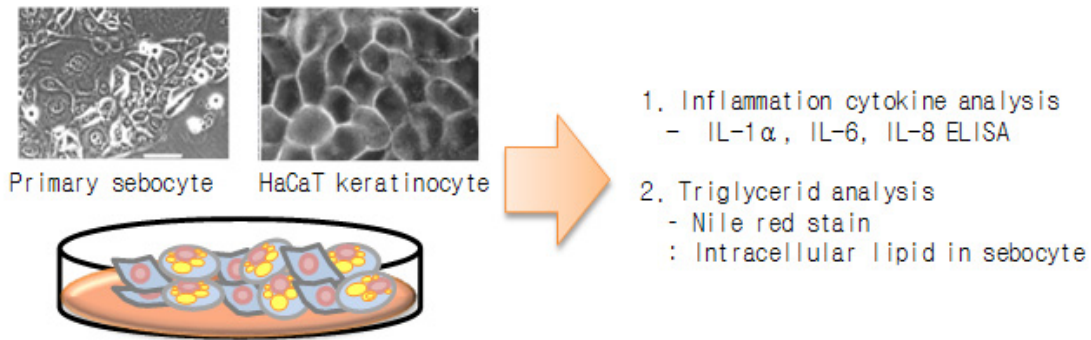


Figure 1. Examination of inflammatory cytokine production and neutral lipid content in the co-culture of keratinocytes and sebocytes treated with etiologic stimulants of seborrheic dermatitis.

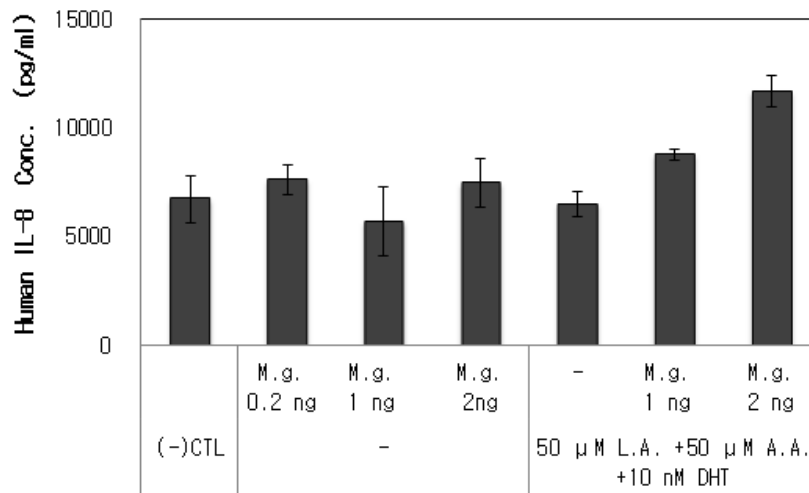


Figure 2. IL-8 production induced by the application of each stimulus and combinations to the co-culture system (HaCaT and Primary sebocyte cells), (* $P < 0.05$). M.g.: *M. globosa* extract, L.A.: Linoleic acid, A.A.: Arachidonic acid, DHT: Dihydrotestosterone.

서 피지선 세포로부터 합성된 피지, 중성지질의 합성량을 측정하기 위해, 인산식염수완충액(phosphate buffered saline, PBS)으로 세척한 세포를 30 min간 3.7 % 포름알데히드(formaldehyde) 용액으로 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 1 회, 아세톤에 녹인 나일 레드(Nile Red) 원액 (1 mg/mL)을 준비하여, 1 ng/mL 농도로 PBS에 희석한 용액으로 15 min간 염색하였다. 염색된 세포는 PBS로 세척하여 분광광도계(spectrophotometer)를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. *M. globosa* 이스트에 대한 항균력 평가

M. globosa 이스트에 대한 항균력을 평가하기 위하여 피부 상재하며 지루성 피부염의 원인균인 *Malassezia furfur* (*P. ovale* 12078)와 *M. globosa* (ATCC 96807)로

실험하였다. *Malassezia*를 위한 배양 배지를 사용하여 32 °C, 2일간 진탕 배양하여 *M. globosa*와 *Malassezia furfur* 시험균액을 준비하고, 시험균액은 배양배지를 이용하여 희석하였다. 항균력을 평가할 시료 희석액을 2.0 %의 농도로 배양배지에 혼합한 것을 희석용액으로 사용하여 제조하였다. 희석 용액은 배양배지로 단계희석하고, 시험균액을 10⁵ ~ 10⁶이 되도록 10 μL씩 넣는다. 이 희석액을 배양한 후 현탁액의 투명도로 균의 증식 유무를 판단하고, 현탁이 배양액과 같은 정도로 투명한 경우는 성장 저해로 판단하여, 균의 증식을 저해하는 최소농도를 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)값으로 나타내었다.

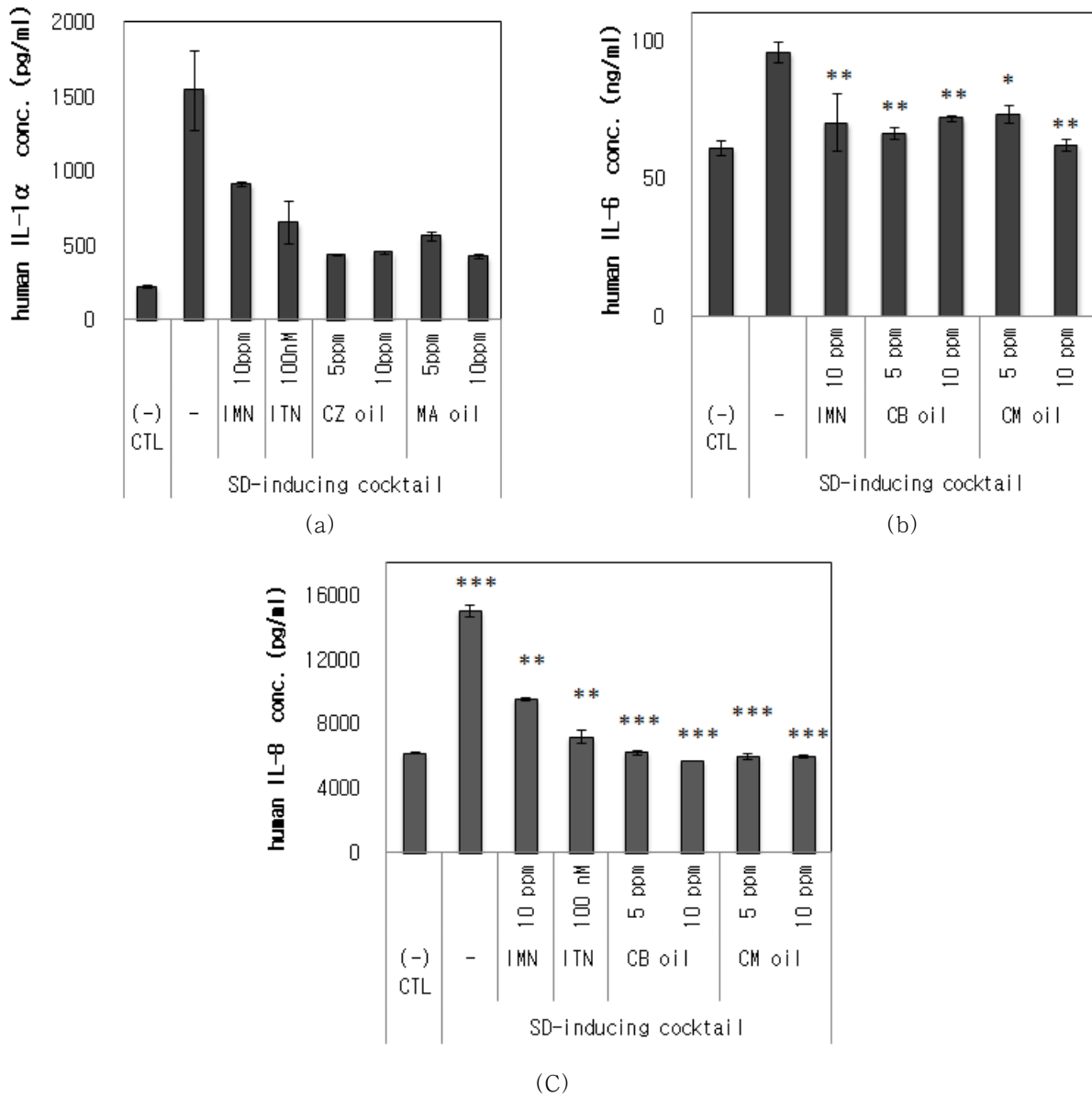


Figure 3. IL-1 α (a) , IL-6 (b), IL-8 (c) production by co-culture system (HaCaT and Primary sebocyte cells) stimulated by Seborrheic Dermatitis (SD) mimic activators for 24 h. Reduction of increased IL-1 α (a), IL-6 (b), IL-8 (c) production by *Cinnamomum zeylanicum* oil and *Mentha arvensis* oil is similar to the positive control, Indomethacin. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$). IMN: Indomethacin, CZ oil: *Cinnamomum zeylanicum* oil, MA oil: *Mentha arvensis* oil.

2.7. 통계처리

모든 통계분석은 Microsoft Excel software에 의해 처리하며 t -test를 실시하여 평가하였다. 두 군간의 차이에 대한 통계적 검정 후 p 값이 0.05 이하면 통계적으로 유의미하다고 판단하였다.

3. 결 과

3.1. 공생 배양모델에서 지루성 피부염 유발 자극원 처리에 따른 IL-1 α , IL-6, IL-8 발현 증가

지루성 피부염 환경을 모사하는 cell-based *in vitro* 시스템을 만들기 위해, 피부 표피를 구성하는 세포 중 각질형성 세포주와 피지선세포를 공생 배양하여 지루성 피부

염을 유발하는 *M. globosa* extract 단독 및 리놀레산, 아라키돈산, 디하이드로테스토스테론과의 조합 자극원을 공생 배양 시스템에 처리하고, IL-8 사이토카인의 발현량을 측정하였다(Figure 1).

IL-8을 측정할 결과 *M. globosa* extract만을 처리한 경우와 리놀레산, 아라키돈산, 디하이드로테스토스테론 조합만을 처리한 경우에는 IL-8의 생성량에 큰 변화가 없었다. 그러나 *M. globosa* 이스트 추출물과 리놀레산, 아라키돈산, 디하이드로테스토스테론을 함께 처리한 조합 자극원 처리군은 IL-8 생성량이 2배 가량 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 2).

위 실험에서 가장 높은 IL-8 생성량을 나타낸 자극원 조합을 공생 배양 시스템에 처리하고, 지루성 피부염 인자로 알려진 IL-1 α , IL-6, IL-8 사이토카인의 발현량을 측정하였다. 음성 대조군으로는 아무 처리하지 않은 세포군을 사용했으며, 양성 대조군으로는 피부염 진정을 포함하는 전반적인 염증 억제제로 사용되고 있는 비스테로이드계 인도메타신(indomethacin, Sigma, USA)을 세포에 10 μ g/mL (10 ppm)으로 사용하였다. 위 염증 사이토카인을 측정할 결과 지루성 피부염 유발 자극원 처리군에서 IL-1 α 가 음성 대조군보다 7배, IL-6가 음성 대조군보다 1.5배, IL-8이 음성 대조군보다 1.5배 가량 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 3). 또한 증가한 염증성 사이토카인 IL-1 α , IL-8 생성량은 양성대조군인 인도메타신을 처리군에서 대조군 수준으로 감소함을 확인하여 향후 항염증 효능 소재를 탐색하는 데에 적용 가능한 시스템임을 확인하였다.

3.2. 육계껍질 오일, 박하잎 오일에 의한 지루성 피부염 자극에 따른 염증성 사이토카인 발현 감소와 중성지방 합성 감소

항염증 효과를 평가하기 위해서, 지루성 피부염 유발원을 처리한 공생 배양모델에 위 천연향료 2종을 각각 처리하고, IL-1 α , IL-6, IL-8 사이토카인의 발현량을 측정하였다. 그 결과, 육계껍질 오일(*Cinnamomum zeylanicum*, cinnamon bark), 박하잎 오일(*Mentha arvensis*, cornmint)을 5와 10 ppm 처리한 경우 모두 양성대조군인 인도메타신 10 ppm을 처리한 군보다 IL-1 α , IL-6, IL-8 사이토카인의 발현량이 낮게 측정됨을 확인하였다(Figure 3).

또한 피지선 세포에서 합성되는 피지의 주요 구성물인 중성지방을 측정하였다. 음성 대조군으로는 아무 처리하지 않은 세포군을 사용했으며, 양성 대조군으로는 비타

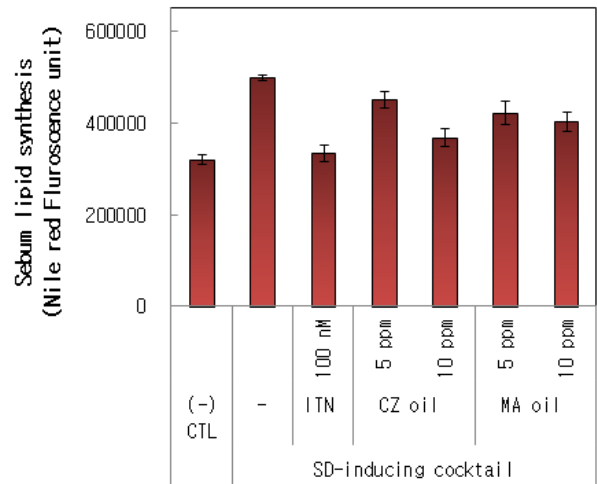


Figure 4. Sebum lipid production by co-culture system (HaCaT and Primary sebocyte cells) stimulated by Seborrheic Dermatitis (SD) inducing cocktails for 24 h. Reduction of increased sebum lipid production by Cinnamon bark oil and *Mentha arvensis* oil is similar to the positive control, Isotretinoin. (* $p < 0.05$). ITN: Isotretinoin, CZ oil: *Cinnamomum zeylanicum* oil, MA oil: *Mentha arvensis* oil.

민 A의 유도체로서 피지선 활성 억제 및 크기 감소, 피부에서 항염효과를 갖는 이소트레티노인(Isotretinoin)을 사용하였다. 이소트레티노인은 피지생성을 억제하는 여드름 치료 의약품인 로아큐탄의 주성분으로 사용된다. 지루성 피부염 유발원 처리군에서, 중성지방 합성량이 55 % 증가한 것을 확인하였고, 양성대조군인 이소트레티노인 100 nM 처리군에서 증가된 중성지방 합성량의 92 %가 감소되었고, 육계껍질 오일, 박하잎 오일을 각각 10 ppm씩 처리한 군에서 증가된 중성지방 합성량의 73, 54 %가 각각 감소하였다.

위 결과는 박하잎 오일, 육계껍질 오일이 *M. globosa* 이스트 및 리놀레산, 아라키돈산, 디하이드로 테스토스테론의 처리에 의해 야기된 지루성 피부염증과 피지 생성 증가를 효과적으로 방지함을 보여주므로 지루성 피부염에 대한 항염증 소재로 사용될 수 있음을 시사한다.

3.3. 육계껍질 오일 및 박하잎 오일의 *M. globosa* 이스트에 대한 항균력 평가

항염증 효능이 입증된 천연향료 2종의 지루성 피부염 원인인 *M. globosa* 이스트에 대한 항균력을 평가하기 위하여 *Malassezia furfur*와 *M. globosa*에 대한 최저 생육저해 농도(MIC)를 측정하였다. 그 결과 육계껍질 오일은 *Malassezia furfur*에 대하여 MIC가 0.005 %, *M. glo-*

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC, W/V %) of *Cinnamomum zeylanicum* oil (CZ oil) and *Mentha arvensis* oil (MA oil) against the *Malassezia furfur* and the *M. globosa* yeast

Name	Strain	MIC* (%)
CZ oil	<i>Malassezia furfur</i>	0.005
	<i>Malassezia globosa</i>	0.0625
MAoil	<i>Malassezia globosa</i>	0.0625

MIC*. Minimum inhibitory concentration

*bosa*에 대하여 MIC가 0.0625 %로 나타났으며, 박하잎오일은 *M. globosa*에 대하여 MIC가 0.0625 %로 나타났다 (Table 1).

이 결과는 비듬균 생육억제제로 잘 알려진 아연피리치온(Zinc Pyrithione, ZPT)의 MIC 값이 0.0001 ~ 0.0005 %임에 비해 볼 때, 육계껍질 오일 및 박하잎 오일은 의약품이 아닌 천연소재로서 통계적으로 유의미하게 *M. globosa* 이스트의 생육을 저해할 수 있음을 알 수 있다.

4. 고찰 및 결론

기존 연구에서는 지루성 피부염증의 발병에 있어서 피지 과잉을 유발하는 피지선세포와 피부염성 자극원에 반응하는 각질형성 세포 각각을 이용하여 지루성 피부염의 원인 및 증상, 염증반응, 병리기전, 치료제의 개발 등에 대한 연구가 다수 진행되었으나, 본 연구와 같이 임상 연계성이 높게 두 가지 피부세포를 공생 배양하여 분석한 연구는 보고된 바가 없었다. 기존 연구에서는 지루성 피부염증의 원인균과 자유지방산에 대한 면역반응을 일으키는 케라틴 형성세포와 안드로겐성 호르몬 수용체와 안드로겐 호르몬 대사효소를 갖고 있는 피지선세포는 지루성 피부염과 관련된 주요 세포로 여겨져 왔다. 이에 따라 주로 케라틴형성세포 및 피지선 세포주 각각을 이용한 *in vitro* 연구가 진행되어 왔다[15,16]. 그러나 최근 연구에서 단독배양보다 공생 배양모델에서 피지선세포의 중성지방 생합성이 증가하고, 이는 모낭 피지선 단위를 구성하는 피지선세포와 각질형성세포 상호작용을 통해 피지합성을 증가시킨다는 것이 보고되었으며, 이러한 공생 배양 모델이 실제적인 피부염증 병변과 유사한 환경을 구현하고 연구에 활용될 수 있다고 보고된 바 있다[19]. 이러한 연구사실을 바탕으로 본 연구에서는 공생 배양모

델을 채택해 지루성 피부염과 관련된 두 세포간의 상호작용을 가능하게 하여 지루성 피부염의 실제 병변을 모사하고자 하였다.

본 연구에 적용된 각질형성세포는 피부연구에 흔히 사용되는 HaCaT 세포주이며, 피지선세포는 Human primary sebocyte이다. 이 피지선세포는 사람 피부에서 분획된 세포로, 피지 분비가 확인되고, 피지선세포 특이적인 인자인 Keratin 7, PPAR γ 가 발현되는 세포로[20], 피지선세포로서의 특성을 나타내므로 본 연구에 사용하기에 적합하였다. 디하이드로테스토스테론은 가장 강한 안드로겐 호르몬의 한 형태이며, 모낭피지선 단위에서도 디하이드로테스토스테론에 대한 수용체가 반응하여 피지선세포를 자극하여 피지선세포의 증식 분화에 영향을 미치고, 콜레스테롤과 지방산 합성 효소의 발현을 유도하여 피지합성을 증가시킨다[21]. 리놀레산은 최근 연구에서 피지선세포주에 테스토스테론과 함께 처리한 경우 상승작용으로 DHT의 발현을 증가시켜 이에 따라 피지 지질 분비가 더 늘어남이 보고되었다[22]. 또한 아라키돈산은 각질형성세포와 피지선세포 분화와 세포예정사를 촉진시킴으로써 피지선세포에서 지질생합성을 증가시킨다고 알려졌다[23]. 그리고 *M. globosa* 이스트의 세포 파쇄물은 지루성 피부염의 진행에 주요한 원인으로 지목되므로 디하이드로테스토스테론, 리놀레산, 아라키돈산과 함께 처리하였다. *M. globosa* 이스트 또는 세포 파쇄물을 케라틴형성세포에 처리하는 경우에 염증성 사이토카인의 양이 유의미하게 증가하는 것이 보고되었고, 이러한 염증성 사이토카인 발생 및 면역반응 조절에 *M. globosa* 이스트의 세포벽 지질이 중요하다고 보고된 바 있다[16,24]. 그러므로 본 연구에서는 세포배양시, 안전성 문제도 고려하여 살아있는 *M. globosa* 이스트보다는 세포 파쇄물을 사용하여 지루성 피부염 모사 시험관 모델을 구축하였다.

지루성 피부염 지표로 측정된 IL-1 α , IL-6, IL-8은 표피를 구성하는 케라틴형성세포에서 주로 활성형으로 발현되는 표피 염증성 사이토카인이고[15,26], 병원성 미생물의 감염에 대응하여 피부장벽 보호를 위해 분비되어 면역반응을 유도한다.

본 연구는 지루성 피부염의 실험 모델로 연구된 각질형성세포와 피지선세포를 공생 배양하여 지루성 피부염 자극원을 처리하여 염증성 사이토카인 IL-1 α , IL-6, IL-8의 발현이 증가함을 관찰하였다. 이 시스템을 통해서 지루성 피부염과 관련된 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킬 수 있는 천연항료 육계껍질 오일, 박하잎 오일

을 규명하였으며, 육계껍질 오일은 피부상재균이면서 지루성 피부염의 원인균인 *M. globosa*와 *Malassezia furfur* 이스트의 증식을 효과적으로 억제하고, 박하잎 오일도 *M. globosa* 이스트의 증식을 통계적으로 유의미하게 억제함을 확인하였다.

피부 피지선 유사 구조의 공생 배양계를 이용한 연구 결과를 통해 지루성 피부염의 발병 기전을 탐색하고 치료 기전을 이해하는데 중요한 분자생물학적인 기초자료를 제시할 것으로 기대하며, 본 연구에서 평가한 육계껍질 오일 및 박하잎 오일은 효과적인 증상 치료 및 완화 제품 개발에 도움이 될 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. L. S. Ostlere, C. R. Taylor, D. W. S. Harris, M. H. A. Rustin, S. Wright, and M. Johnson, Skin surface lipids in HIV-positive patients with and without seborrheic dermatitis, *International Journal of Dermatology*, **35**, 276 (1996).
2. T. A. Chen and P. B. Hill, The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease, *Veterinary Dermatology*, **16**, 4 (2005).
3. T. L. Dawson Jr, *M. globosa* and *restricta*: Breakthrough Understanding of the Etiology and Treatment of Dandruff and Seborrheic Dermatitis through Whole-Genome Analysis, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, **12**, 15 (2007).
4. Y. M. DeAngelis, C. W. Saunders, K. R. Johnstone, N. L. Reeder, C. G. Coleman, J. R. Kaczvinsky Jr, C. Gale, R. Walter, M. Mekel, M. P. Lacey, T. W. Keough, A. Fieno, R. A. Grant, B. Begley, Y. Sun, G. Fuentes, R. S. Youngquist, J. Xu, and T. L. Dawson Jr., Isolation and Expression of a *M. globosa* Lipase Gene, *LIP1*, *Journal of Investigative Dermatology*, **127**, 2138 (2007).
5. J. Xu, C. W. Saunders, P. Hu, R. A. Grant, T. Boekhout, E. E. Kuramae, J. W. Kronstad, Y. M. DeAngelis, N. L. Reeder, K. R. Johnstone, M. Leland, A. M. Fieno, W. M. Begley, Y. Sun, M. P. Lacey, T. Chaudhary, T. Keough, L. Chu, R. Sears, B. Yuan, and T. L. Dawson, Jr., Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 47 (2007).
6. J. J. Manriquez and P. Uribe, Seborrheic dermatitis, *Clinical Evidence*, **07**, 1713 (2007).
7. T. Berk and N. Scheinfeld, Seborrheic dermatitis, *P&T*, **35**, 6 (2010).
8. A. Kumar, S. P. Singh, and S. S. Chhokar, Antimicrobial Activity of the Major Isolates of *Mentha* Oil and Derivatives of Menthol, *Analytical Chemistry Letters*, **1**, 70 (2011).
9. Y. T. Tung, M. T. Chua, S. Y. Wang, and S. T. Chang, Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs, *Bioresource Technology*, **99**, 3908 (2008).
10. S. Inouye, T. Takizawa, and H. Yamaguchi, Antiyeast activity of essential oil and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **47**, 565 (2001).
11. F. A. Al-Bayati and M. J. Mohammed, Isolation, identification, and purification of cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark oil. An antibacterial study, *Pharmaceutical Biology*, **47**, 61 (2009).
12. S. S. C. Lin, T. M. Lu, P. C. Chao, Ya, Y. Lai, H. T. Tsai, C. S. Chen, Y. P. Lee, S. C. Chen, M. C. Chou, and C. C. Yang, *In Vivo* Cytokine Modulatory Effects of Cinnamaldehyde, the Major Constituent of Leaf Essential Oil from *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh, *Phytother. Res.*, **25** 1511 (2011).
13. S. Watanabe, R. Kano, H. Sato, Y. Nakamura, and A. Hasegawa, The Effects of *Malassezia* Yeast on Cytokine Production by Human Keratinocytes, *Journal of Investive Dermatology*, **116**, 769 (2001).
14. D. B. Holland, R. A. Bojar, A. H. T. Jeremy, Eileen Ingham, and Keith T. Holland, Microbial colonization of an *in vitro* model of a tissue engineered human skin equivalent - a novel approach, *FEMS Microbiol Letter*, **279**, 110 (2008).
15. L. L. Molinero, M. Gruber, J. Leoni, A. Woscoff, and N. W. Zwirner, Up-regulated expression of

- MICA and proinflammatory cytokines in skin biopsies from patients with seborrhoeic dermatitis, *Clinical Immunology* **106**, 50 (2003).
16. D. S. Thomas, E. Ingham, R. A. Bojar, and K. T. Holland, *In vitro* modulation of human keratinocyte pro- and anti-inflammatory cytokine production by the capsule of *Malassezia* species, *FEMS Immunol Med Microbiol* **54**, 203 (2008)
 17. C. C. Zouboulis, The human skin as a hormone target and an endocrine gland *HORMONES*, **3**, 9 (2004).
 18. E. Makrantonaki and C. C. Zouboulis, Testosterone and linoleic acid exhibited a synergistic effect on the synthesis of sebaceous lipids, *British Journal of Dermatology*, **156**, 428 (2007).
 19. M. K. Park, K. Y. Park, B. J. Kim, M. N. Kim, J. H. Kim, H. J. Koh, and W. S. Park. *In Vitro* Evaluation Method to Monitor Pathogenic Acne Vulgaris by Culturing Keratinocytes with Sebocytes, *Korean Journal Dermatology*, **49**, 1057 (2011).
 20. J. E. Oh, R. H. Kim, K. H. Shin, N. H. Park, and M. K. Kang, Δ Np63 α Protein Triggers Epithelial-Mesenchymal Transition and Confers Stem Cell Properties in Normal human Keratinocytes, *The Journal of Biological Chemistry*, **286**, 38757 (2011).
 21. C. Rosignoli, J. C. Nicolas, A. A. Jomard, and S. Michel, Involvement of the SREBP pathway in the mode of action of androgens in sebaceous glands *in vivo*, *Experimental Dermatology*, **12**, 480 (2003).
 22. E. Makrantonaki and C. C. Zouboulis, Testosterone metabolism to 5 α -dihydrotestosterone and synthesis of sebaceous lipids is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor ligand linoleic acid in human sebocytes, *British Journal of Dermatology*, **156**, 428 (2007).
 23. I. Kurokawa, F. W. Danby, Q. Ju, X. Wang, L. F. Xiang, and L. Xia, New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment, *Experimental Dermatology*, **18**, 821 (2009).
 24. R. J. Hay, *Malassezia*, dandruff and seborrhoeic dermatitis: an overview, *British Association of Dermatologists*, **165** (2011).
 25. M. Feldmann and J. Saklatvala, Proinflammatory cytokines: Cytokine reference: a compendium of cytokines and other mediators of host defense, S. K. Durum, J. J. Oppenheim, M. Feldmann, 291, Boston: Academic Press, New York Washington, D.C.(2001).