

1, 2-Hexanediol과 1, 2-Hexanediol Galactoside의 HaCaT Cell에 대한 세포독성

김 준 섭 · 정 경 환[†]

한국교통대학교 생명공학과
(2018년 8월 9일 접수, 2018년 9월 11일 수정, 2018년 9월 12일 채택)

Cytotoxic Effects of 1, 2-Hexanediol and 1, 2-Hexanediol Galactoside on HaCaT Cell

Jun-Sub Kim and Kyung-Hwan Jung[†]

Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation 61 Daehak-ro, Jeungpyeong-eup,
Jeungpyeong-gun, Chungcheongbuk-do 27909, Korea

(Received August 9, 2018; Revised September 11, 2018; Accepted September 12; 2018)

요약: 화장품에 방부제(살균/보존제)로 사용되는 1, 2-hexanediol (HD)로 인한 부작용을 극복하기 위하여, *Escherichia coli* (*E. coli*)의 β -galactosidase (β -gal)를 이용하여 transgalactosylation 반응으로 1, 2-hexanediol galactoside (HD-Gal)를 합성하였다. 본 연구에서는 합성된 HD-Gal의 인간 피부세포에 대한 독성이 어느 정도인지를 HD와 비교하여 관찰하였다. HD-Gal과 HD의 세포독성은 인간 피부각질형성세포 (HaCaT cell line)에 HD와 HD-Gal을 처리한 후, cell proliferation assay를 이용하여 비교 분석하였다. 또한 이때, 위상차 현미경으로 HD-Gal과 HD로 처리한 세포의 상태를 비교 관찰하였다. 그 결과, HD-Gal은 42.2 mM에서 211 mM의 농도 범위에서 세포독성이 관찰되지 않았으며, 현미경 관찰에서도 큰 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나, HD의 경우에는 저농도에서(42.2 mM and 84.4 mM)는 세포독성이 관찰되지 않았으나, 고농도(168.8 and 211 mM)에서 매우 높은 세포독성을 나타내었고, 현미경 관찰에서는 고농도에서는 물론이고, 세포독성이 관찰되지 않은 HD의 저농도에서도 세포모양과 세포 수에서의 변화가 관찰되었다. 앞으로 세포독성이 감소된 HD-Gal이 HD의 대체제로서 안전, 건강 및 웰빙 개념의 새로운 용도로 개발될 수 있을 것으로 생각된다.

Abstract: We synthesized 1, 2-hexanediol galactoside (HD-Gal) from HD using *Escherichia coli* (*E. coli*) β -galactosidase (β -gal), in which the reaction is generally called as transgalactosylation (reverse hydrolysis). In this study, we investigated how much HD-Gal and HD had a cytotoxic effect on HaCaT cell, in order to compare HD-Gal with HD in terms of the cytotoxicity of human skin cell. Cell proliferation assay and phase-contrast microscope observation were used for investigating the cytotoxicity. As a result, HD-Gal had not cytotoxic effect on HaCaT cell in the concentration range from 42.2 to 211 mM. In addition, when we observed the cells using microscopy, there was no change in the cell morphology. Meanwhile, when 42.2 mM and 84.4 mM HD were treated on HaCaT cell, we did not observe the cytotoxicity; however, when 168.8 mM and 211 mM HD were on HaCaT cell, HD had a higher cytotoxic effect on HaCaT cell. In addition, when HD was treated on the cells regardless of the concentration of HD, there were obvious changes in cell morphology and cell number. It was expected hopefully that HD-Gal would be applicable as a substitute for HD as a less toxic preservative in views of safety, health, and well-being.

Keywords: 1, 2-hexanediol galactoside, human keratinocyte cell line (HaCaT cell), cytotoxicity, β -galactosidase, cosmetic preservative

[†] 주 저자 (e-mail: khjung@cjnu.ac.kr)
call: 043)820-5246

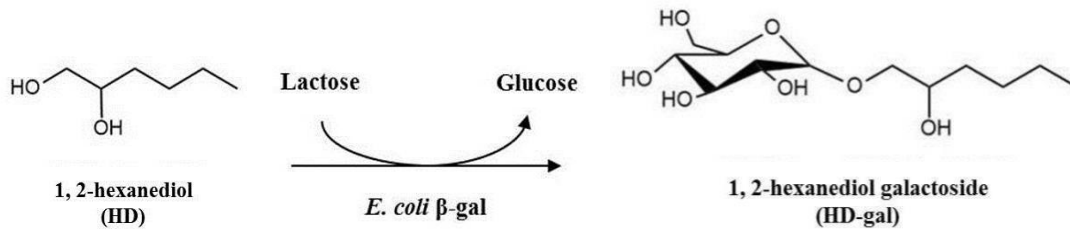


Figure 1. Enzymatic synthesis of HD-Gal from HD using β -gal.

1. 서 론

최근 몇몇 보고에서 화장품에 사용 되어지는 방부제 (살균/보존제)로 인하여 발생되어지는 부작용에 대하여 언급하고 있다. Chlorphenesin (CPN), 2-phenoxyethanol (PE), HD에 관한 부작용 보고가 있었으며 [1-4], 본 연구팀에서는 그동안 이를 극복하기 위하여, galactose 한 분자를 CPN, PE, HD에 결합시킨 galactoside 유도체(CPN-gal, PE-gal, HD-Gal)를 합성하여 부작용 문제를 극복하려 시도했다[5-7]. 이때, *E. coli*의 β -gal를 이용하여 고농도의 lactose가 들어 있는 반응 조건에서 transgalactosylation 반응으로 CPN-gal, PE-gal, HD-Gal을 합성하였다. 선행연구를 통하여 galactose 유도체인 CPN-gal과 PE-gal의 인간 피부세포(HaCaT cell, human keratinocyte cell line)에 대한 독성이 CPN과 PE에 비하여 작다는 사실을 실험적으로 입증하였다.

HD의 galactoside 유도체인 HD-Gal에 대하여서는 HD-Gal 합성 확인, 그리고 ethyl acetate (EA)와 silica gel chromatography를 이용한 정제 방법에 대한 결과를 선행 논문에서 발표하였다[8,9]. 그리고, galactose가 HD에 결합하여, 피부세포에 보습력(water holding capacity)을 증진시킬 수 있다는 것을 실험적으로 밝혔다 [10]. 본 연구에서는 HD-Gal과 HD를 비교했을 때, HD-Gal이 인간 피부세포에 어느 정도 독성 감소 효과를 나타낼 수 있을지를 밝히는 연구를 수행하였다. CPN-gal과 PE-gal처럼 HD의 galactose 유도체가 인간 피부세포에 보다 적은 독성을 보일 것으로 기대하고 본 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

1,2-Hexanediol은 Sigma (USA)에서, β -gal 생산을 위한 배지는 Beckton Dickinson (New Jersey, USA)에서 구입하였고, HD-Gal 정제를 위한 silica gel은 Zeochem (Uetikon am See, Switzerland)의 ZEOprep 60 (60-200 μ m)을 구입 사용하였다. 기타 본 연구에 사용한 시약들은 reagent-grade를 사용하였다.

2.2. β -Gal을 생산하는 재조합 대장균

대장균의 *araBAD* 프로모터 시스템에 의하여 발현이 조절되는 pBAD/Myc-His/*lacZ* vector (7.2 kb) (Invitrogen, USA)를 사용하여 *E. coli* MC 1061을 발현 숙주로 하여 β -gal을 발현하였다. β -gal 유전자는 pBAD/Myc-His expression kit의 유전자를 사용하였고, 재조합 *E. coli* 제작과 재조합 β -gal을 함유한 *E. coli*의 배양방법 등에 대하여서도 선행연구에서 자세히 기록하였다[5-7].

2.3. HD-Gal 합성과 정제

HD-Gal 합성을 위하여 50 mL conical tube에 75 mM HD, 4.8 U/mL β -gal, 300 g/L lactose를 넣고(50 mM phosphate buffer, pH 7.0), 전체 부피를 40 mL로 맞추고, shaking incubator에서 37 $^{\circ}$ C, 100 rpm 조건으로 48 h 동안 반응시켰다(반응식은 Figure 1과 같다). 그리고, 9 mL의 반응액과 9 mL EA를 50 mL conical tube에 넣어 섞은 후, 물과 EA층으로 분획하여 EA층으로 잔여 HD를 제거하고, 물 층으로 합성된 HD-Gal을 분획하였다. 이러한 분획은 총 3회 실시하였고, 나머지 반응액도 이러한 분획을 계속 실시하여 잔여 HD가 제거되고, HD-Gal이 모여있는 물 층만을 모았다. 선행연구와 같은 조건으로 EA 추출로 모아진 8 mL의 물 층을 silica

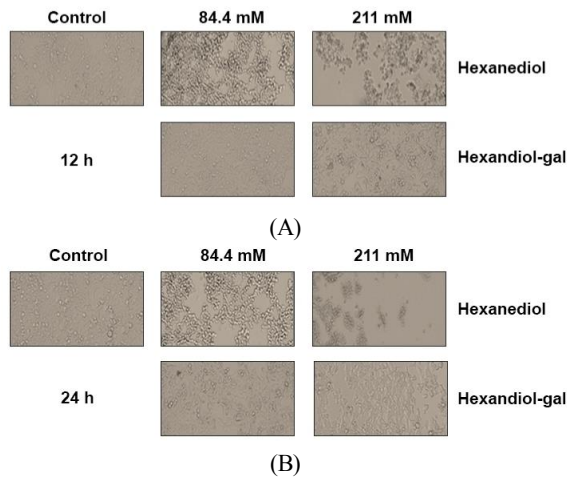


Figure 2. Microscopic observation using phase contrast microscopy of HaCaT cells. Control was not treated with hexanediol or hexanediol-gal. Magnification was 40X.

gel chromatography에 loading 하여, 정제를 실시하였고, HD-Gal이 포함된 분획을 모아서 rotary vacuum evaporator를 이용하여 순수한 HD-Gal을 농축하였다. 자세한 조건은 선행연구에 상세히 기술하였다[8-10].

2.4. Cytotoxicity Assay와 위상차 현미경 관찰

Cell proliferation/cytotoxicity assay kit (EZ-CYTOX, DoGenBio, Korea)를 사용하여 실험하였다. HaCaT 세포는 지름이 100 mm 세포배양 접시에서 5% FBS와 1% (50X) penicillin/streptomycin가 포함된 fresh media DMEM (WELGENE, Korea)을 이용하여 CO₂ incubator (5% CO₂, 37 °C)에서 배양하였다. 세포가 접시의 바닥 면적의 80-90% 자랐을 때, Trypsin-EDTA 용액(WELGENE, Korea)을 이용하여 trypsinization하여 세포를 떼어낸 후, 원심분리(1,500 rpm, 5 min)를 실시하였다. 그리고, 상층액은 버리고 pellet만 취하여, 1 mL의 DMEM을 넣어 다시 현탁 하였다. 그 후, 이 현탁액 100 μ L를 96-well plate의 각 well 마다 분주하여, CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 배양한 세포에 HD와 HD-Gal을 10 μ L씩 농도별로 첨가한 후, 12 h, 24 h에 EZ-CYTOX 10 μ L씩을 각 well에 첨가하였고, 그리고 30 min 동안 CO₂ incubator에서 반응시켜, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 대조군을 포함하여 HD와 HD-Gal 각 농도당 3개의 well을 사용하여 실험하였다(n = 3). Relative cell viability (%)는 HD 혹은 HD-Gal을 처리하지 않은

well에서의 흡광도 값으로 HD 혹은 HD-Gal이 첨가된 well에서의 흡광도를 나누어 주고 100을 곱하여 구하였다. HD를 처리한 군과 HD-Gal을 처리한 군의 차이를 통계적으로 비교하기 위하여, student's *t*-test를 수행하였으며. 이때, *p* 값이 0.05보다 작았을 때, *로 표시하였다(**p* < 0.05). 그리고, 12 h과 24 h에 phase contrast microscopy를 이용하여 세포를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

Galactose가 결합된 HD-Gal의 인체 안전성을 살펴보기 위해, 인체피부세포인 HaCaT 세포에 다양한 농도와 시간으로 처리한 후, 세포의 모양 변화 및 세포독성을 조사하였다. 현미경 하에서 대조군의 피부세포들은 전형적인 부착성 세포의 형태가 나타나는 반면, HD를 12 h 동안 처리한 피부세포들의 모양은 부착성이 사라지는 동그란 형태로의 변화가 관찰되었고, 고농도(211 mM)의 HD를 처리하였을 경우에는 모양변화뿐만 아니라 현저한 세포 수의 감소까지 확인되었다(Figure 2A). 이러한 효과들은 HD를 24 h 동안 처리하였을 경우 더욱 증가하였다(Figure 2B). 본 연구를 위해 합성된 HD-Gal을 처리한 경우에는 모든 농도에서 세포의 모양 및 세포 수의 변화가 대조군과 비교하여 특별한 변화를 찾아볼 수 없었다(Figure 2A, B).

다음으로, 우리는 현미경 하에서 보여지는 세포 수의 감소가 HD의 세포독성으로 인한 것인지 조사해 보기 위하여 EZ-CYTOX cell viability assay를 수행하였다. 고농도(168.8 mM, 211 mM)의 HD는 12 h 만에 피부세포에 대한 세포독성이 매우 높게 나타나는 반면, HD-Gal은 사용된 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다(Figure 3A). 그리고, 24 h이 지난 후, 168.8 mM과 211 mM의 농도에서는 HD의 세포 독성이 더욱 심화되는 것으로 관찰되었으나, HD-Gal은 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다(Figure 3B). 결국, 이러한 결과들은 고농도의 HD 조건에서는 세포독성을 포함한 피부세포의 생리 기능에 부정적 영향을 줄 수 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다. 본 연구에서 사용된 HD-Gal은 기존의 HD에 비해 매우 낮은 세포 독성을 나타내기 때문에 인체 안전성이 요구되거나 담보해야 하는 화장품을 비롯한 여러 가지 제품에 HD를 대체할 수 있을 것으로 생각된다.

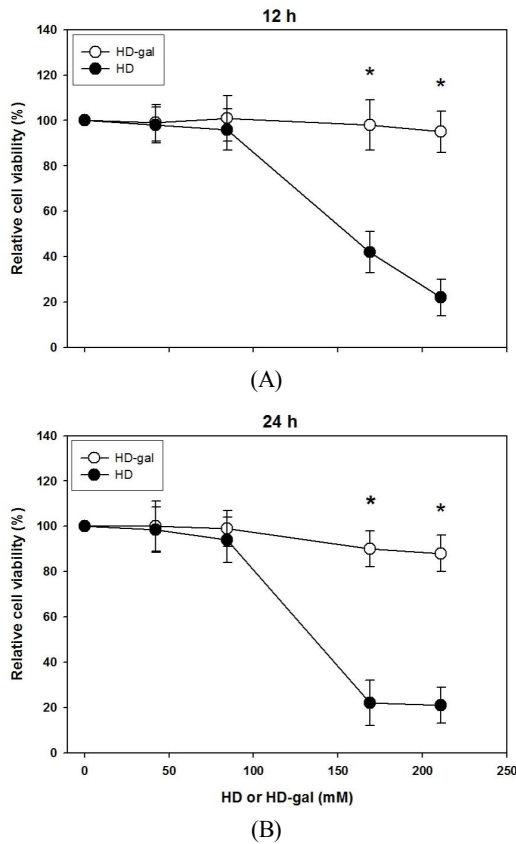


Figure 3. Cell viability assay (EZ-CYTOX) for HaCaT cells (**p* < 0.05).

본 연구에서는 화장품 소재로 사용되기 위한 새로운 HD의 galactoside인 HD-Gal의 인체 피부세포에 대한 독성을 조사하였다. 현재 HD는 화장품에 방부제로서 0.00005%에서 10%의 농도의 범위에서 사용되고 있다 [11]. Figure 3에서 실험한 농도 범위는 HD가 약 0.5-2.5% 정도이고, HD-Gal은 약 1.2-5.7% 정도이다. 그러므로, 화장품에서 사용될 수 있는 농도 범위에서 관찰된 결과라고 할 수 있다. 본 연구에서 나타난 결과는 고농도(168.8 and 211 mM)의 HD는 매우 높은 세포 독성을 나타내었고, 저농도(42.2 and 84.4 mM)에서는 대조군과 비교하여 피부세포에 독성을 나타내지 않았다(Figure 3A, B). HD의 농도 42.2 mM와 84.4 mM에서 세포에 대한 독성이 없고, 안전하다고 생각될 수 있지만, 현미경 하에서 보여지는 피부세포의 모양 변화로 볼 때(Figure 2A, B), 이 농도에서도 피부세포에 대한 독성이 있다는 알 수 있다. 반면에 HD-Gal의 경우는 저농도에서는 물론이고, 고농도에서도 피부세포에 대

한 독성이 매우 적게 관찰되었을 뿐만 아니라(Figure 3A, B), 현미경 하에서 보여지는 피부세포들의 모양이 대조군과 비슷한 전형적인 부착성 세포의 모습을 나타내었다(Figure 2A, B).

본 연구팀에서는 선행 연구를 통해 새롭게 합성된 HD-Gal의 기능성 중에서 항균능력과 보습력에 대하여 조사하여 보았다[10]. 그 결과, HD-Gal의 세균에 대한 항균력은 HD에 비하여 전반적으로 감소되었으나, HD-Gal의 보습력(water holding capacity)은 HD에 비하여 증가되는 것으로 관찰되었다. 본 연구팀은 HD-Gal을 효소반응으로 합성하고, 이를 HA 추출과 silica gel chromatography를 이용한 정제 기술을 이미 확립해 놓은 상태이다[8,9]. 그래서, HD-Gal이 항균력에서는 문제가 있지만, 보습력이 HD에 비하여 우수하고 인간 피부세포에 대한 독성이 HD에 비하여 감소된 소재이기 때문에 이러한 기능성에 맞는 적절한 용도가 개발되어질 것으로 기대하고 있다. 앞으로, HD-Gal은 기존 화장품 소재인 HD의 대체제로서 현재 소비자들의 관심과 요구사항인 안전, 건강 및 웰빙과 매우 잘 부합될 것으로 생각된다.

4. 결 론

화장품에 사용되는 방부제(살균/보존제)로 인한 부작용에 문제를 극복하기 위하여 합성된 HD-Gal의 세포독성을 HD와 비교 관찰하였다. HaCaT cell에 대한 세포독성 연구 결과, HD-Gal은 42.2 mM에서 211 mM의 농도 범위에서 세포독성이 관찰되지 않았으며, 현미경 관찰에서도 큰 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나, HD의 경우에는 저농도에서(42.2 Mm and 84.4 Mm)는 세포독성이 관찰되지 않았으나, 고농도(168.8 and 211 mM)에서 매우 높은 세포독성을 나타내었고, 현미경 관찰에서는 고농도에서는 물론이고, 세포독성이 관찰되지 않은 HD의 저농도에서도 세포모양과 세포 수에서의 변화가 관찰되었다. HD와 비교하여 볼 때, 세포독성이 감소된 HD-Gal이 HD의 대체제로서 안전, 건강 및 웰빙의 개념의 새로운 용도로 개발될 수 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgement

본 연구를 위하여 도움을 준 한국교통대학교 생명공학과 김이옥, 유일환 학생에게 감사의 말을 전합니다.

Reference

1. L. Sanchez-Prado, G. Alvarez-Rivera, J. P. Lamas, M. Llompert, M. Lores, and C. Garcia-Jares, Content of suspected allergens and preservatives in marketed baby and child care products, *Anal. Methods*, **5**(2), 416 (2013).
2. R. Siti-Zulaikha, S. I. Sharifah-Norkhadijah, and S. M. Praveena, Hazardous ingredients in cosmetics and personal care products and health concern: a review, *Public Health Res.*, **5**(1), 7 (2015).
3. V. Jadhav, S. Dhande, and V. Kadam, Cosmetics side effects, *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, **6**(1), 327 (2017).
4. G. Deza and A. M. Giménez-Arnau, Allergic contact dermatitis in preservatives: current standing and future options, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **17**(4), 263 (2017).
5. S. E. Lee, T. M. Jo, H. Y. Lee, J. Lee, and K. H. Jung, β -Galactosidase-catalyzed synthesis of galactosyl chlorphenesin and its characterization, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **171**(6), 1299 (2013).
6. K. H. Jung and H. Y. Lee, *Escherichia coli* β -galactosidase-catalyzed synthesis of 2-phenoxyethanol galactoside and its characterization, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **38**(2), 365 (2015).
7. Y. O. Kim and K. H. Jung, Enzymatic synthesis of 1, 2-hexanediol galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing recombinant *Escherichia coli*, *J. Life Sci.*, **26**(5), 608 (2016).
8. Y. O. Kim and K. H. Jung, β -Galactosidase-catalyzed synthesis of 1, 2-hexanediol galactoside and its purification using ethyl acetate extraction followed by silica gel chromatography, *J. Korean Oil Chem. Soc.*, **33**(3), 498 (2016).
9. K. H. Jung, Purifications of phenoxyethanol galactoside and chlorphenesin galactoside using solvent extraction followed by gel chromatography, *J. Oil Applied Science*, **34**(4), 954 (2017).
10. Y. O. Kim and K. H. Jung, Water-holding capacity and antimicrobial activity of 1, 2-hexanediol galactoside synthesized by β -galactosidase, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **43**(4), 373 (2017).
11. W. Johnson, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. Liebler, J. G. Marks, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, and F. A. Andersen, Safety assessment of 1, 2-glycols as used in cosmetics, *Int. J. Toxicol.*, **31**(5), 147S (2012).