

## 신규 *Sporichthyaceae* Bacterium Strain K-07 배양액의 피부장벽, 보습 및 항염증 활성

이 동 겔\*<sup>†</sup> · 김 민 지\* · 강 승 현\*\* · 김 연 준\*\*

\*코스맥스 비티아이(주), \*\*코스맥스(주)  
(2017년 5월 2일 접수, 2017년 6월 26일 수정, 2017년 6월 27일 채택)

### Novel *Sporichthyaceae* Bacterium Strain K-07 Skin Barrier, Moisturizing and Anti-inflammatory Activity

Dong-Geol Lee\*<sup>†</sup>, Minji Kim\*, Seunghyun Kang\*\*, and Youn-Joon Kim\*\*

\*, \*\*Pangyo inno valley E, 255, Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13486, Korea  
(Received May 2, 2017; Revised June 26, 2017; Accepted June 27, 2017)

**요약:** 피부의 생태계는 미생물에게 다양한 형태의 서식처를 제공하며, 광범위한 미생물들이 살고 있다. 숙주인 사람은 이들과 공생관계를 이루고 있으며, 이들은 숙주에 많은 긍정적인 영향을 미친다. 피부에 분포하는 미생물들의 다양한 대사물질은 피부세포에 영향을 미치고, 피부장벽 기능, 노화방지 및 항염증에 광범위한 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 사람의 피부에서 신규한 *Sporichthyaceae* bacterium strain K-07을 분리하였고, 해당 미생물의 16S rRNA 분석결과 *Sporichthya*속의 미생물과 상동성이 93.4%인 것으로 신규속(genus)으로 확인되었다. 그리고 신규로 분리된 K-07 배양액을 처리하였을 때, HaCaT cell에 어떤 변화가 나타나는지에 대한 분석을 실시하였다. 분리된 신규 미생물 strain K-07의 16S rRNA sequence 분석결과 상동성이 93.4% 이하로 확인되었고, 보고되지 않은 새로운 종으로 확인되었다. Filaggrin, claudin1, claudin4,  $\alpha$ SMase, 및 CerS3/HAS3 및 aquaporin3/IL-6 및 TNF- $\alpha$ /TSLP 및 TARC를 대상으로 strain K-07 배양액을 처리하여 변화를 관찰하였다. 그 결과 filaggrin, claudin1, claudin4,  $\alpha$ SMase, 및 CerS3/HAS3 및 aquaporin3에서는 음성 대조군 대비 우수한 증가 효과가 나타남을 확인하였다. 그리고 IL-6 및 TNF- $\alpha$ /TSLP 및 TARC에 대해서도 우수한 억제능을 나타내는 것을 확인하였다. 결론적으로 신규 미생물 strain K-07 배양액은 피부 장벽활성 증진에 매우 효과적인 작용을 하며, 염증 억제에 우수한 효능을 나타내는 것으로 확인되므로 피부에 효과적인 소재로 사용될 수 있을 것이다.

**Abstract:** The human skin is an ecosystem that provides habitat to various microorganisms. These comprise the skin microbiome and provide numerous benefits in addition to maintaining a symbiotic relation with the host. Various metabolites generated by the skin microbiome exert beneficial effects such as strengthening the skin barrier, and anti-aging and anti-inflammatory functions. In this study, we isolated a novel bacterium, designated *Sporichthyaceae* strain K-07, from the human skin. Analysis of 16S rRNA gene sequences showed that the newly found bacterium shares 93.4% homology with the genus *Sporichthya*, thus corroborating the discovery of a novel genus. We further analyzed the effect of the novel strain in vitro, by treating HaCaT cells with bacterial metabolite products. Treatment resulted in changes in the mRNA expression levels of filaggrin, claudin1, claudin4, SMase, CERS3, HAS3, aquaporin3, IL-6, TNF- $\alpha$ , TSLP, and TARC. Specifically, the levels of filaggrin, claudin1, claudin4, SMase, CERS3, HAS3, and aquaporin3 were higher in strain K-07 metabolite product-treated cells than in control cells. These results showed that metabolite products of the novel strain K-07 enhanced the skin barrier and exert anti-inflammatory effects. Therefore, these metabolite products could be potentially used for treatment of skin conditions.

† 주 저자 (e-mail: leedg@cosmax.com)  
call: 031)789-3409

**Keywords:** skin microbiome, cosmetic, *Sporichthyaceae*, symbiotic bacteria, skin barrier

## 1. 서 론

피부의 생태계는 미생물에게 다양한 형태의 서식처를 제공하며, 광범위한 미생물들이 살고 있다[1-4]. 숙주인 사람은 이들과 공생관계를 이루고 있으며, 숙주에 많은 긍정적인 영향을 미친다고 알려져 있다[5]. 피부는 함입부, 특화되어있는 틈새 등 다양한 형태의 서식처를 구성하고 있으며, 넓은 분포의 미생물이 자랄 수 있도록 돕는다[6]. 기본적으로 피부는 물리적인 막을 형성하며, 외부로부터 잠재적인 위험요소 및 독성 물질들로부터 방어를 하도록 도와준다[7]. 피부는 외부 환경과의 접촉지점이 되며, 다양한 미생물들(진균, 세균, 바이러스 및 작은 유충)의 집합소이기도 하다[8]. 물리적, 화학적 기능의 선택에 맞게 미생물들은 특화된 틈새에 적응하여 서식처를 제공하는 것으로 알려져 있다. 피부의 표면에 존재하는 주름, 소낭, 그리고 미세한 기름을 만들어내는 샘은 다양한 미생물이 살 수 있는 좋은 서식지를 제공하고 있으며 각각 미생물군들은 자체적인 서식지를 갖고 있다. 이러한 공생은 피부에 아무런 해가 없으며 오히려 피부에 특화된 박테리아는 외부로부터 유래된 감염에 대항하기 위한 숙주의 면역체계의 반응을 조절하는 역할을 한다[9].

피부생태환경을 다시 살펴보면, 물리적인 요소들과 생물학적인 요소들이 잘 어우러져 다양한 서식처를 제공하며, 더 나아가 사람과 미생물 사이의 미묘한 균형에 대해 생각해 볼 수 있고, 공생관계의 균형이 무너지게 되면 그와 동시에 피부의 붕괴와 감염이 발생하게 된다고 알려져 있다[9].

다양한 연구결과를 종합하면 피부에 존재하는 다양한 미생물은 다양한 대사물질을 만들고 직접적으로 피부세포에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[10]. 대표적인 skin-microbiome으로 알려진 *Staphylococcus*속 미생물들은 정상 피부 세균으로 알려져 있으며, 염증과 상처 재생과 관련된 메커니즘에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다[11,15]. 하지만 피부에 정상적으로 존재하는 다양한 미생물들이 피부세포 노화나, 피부장벽형성에 도움을 주는지에 대한 구체적인 연구는 아직 미비한 것으로 확인된다. 또한 장내 probiotic 미생물들을 대상으로 아토피 및 피부환경 개선효능에 대

한 연구는 활발히 연구되지만, 이러한 방식의 연구는 직접적인 피부의 영향보다는 장에서 흡수된 물질의 인체대사에 의해 피부 환경이 개선되는 간접적인 효능이라 판단되어, 다소 한계가 있다고 추측된다[12-14].

피부는 외부 환경으로부터 우리 몸을 보호해주는 가장 큰 기관이며, 각질층은 가장 중요한 물리적 피부장벽으로서 각질세포와 그 사이를 채우는 지질층으로 구성되어 있다. 지질층의 주성분은 세라마이드이며 핵이 있는 표피층에는 치밀이음과 부착반점이 장벽 역할을 한다. 이러한 피부장벽 형성 과정에서 여러 사이토카인들이 영향을 미치며 이러한 변화는 염증성 피부 질환에서 피부장벽의 이상을 초래할 수 있다. 특히 피부장벽의 급성 손상 이후 표피에서 사이토카인 및 가려움 인자들의 발현 증가가 관찰되며, 이는 피부장벽의 구성과 기능 유지, 정상적인 표피 분화과정에 부정적인 영향을 줄 수 있다[23]. 따라서 건강한 피부 환경을 만들기 위해 피부장벽 및 수분 인자들을 개선시키는 것뿐만 아니라 여러 염증 인자들을 억제시키는 것도 중요하다.

이번 연구에서 분리된 신규 *Sporichthyaceae* bacterium K-07은 건강한 피부를 구성하는 사람의 피부에서 분리되는 균주로 확인된다. 하지만 아직 학계에 보고가 되지 않은 새로운 형태의 속(genus)으로 확인되었으며, 연구가치가 높을 것으로 판단되었다. 따라서 K-07의 배양액을 HaCaT cell에 처리하였을 때 변화를 관찰하였고, 특히 피부장벽을 구성하는 다양한 인자들을 대상으로 평가하여, 실제 피부에 적용 가능한 기술을 개발하는 것이 중요한 의의를 지닌다고 할 수 있다. 이에 본 연구에서는 신규 미생물을 분리하고 이를 통해 피부장벽개선 및 보습소재 기술을 개발하여 기능성 화장품 소재로 활용할 수 있는 방법을 연구하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료

균주의 분리를 위하여 육안으로 판단하였을 때 건강한 피부를 보유한 사람 10명으로부터 멸균된 면봉으로 swab을 실시하여 확보하였다. 채집된 면봉 샘플은 멸균 증류수에 현탁시켜, 사용하였다. 본 연구는 IRB 심의기준에서 면제사유에 해당되는 것으로 확인하였다.

## 2.2. Pyrosequencing 분석

별균 증류수에 현탁된 샘플은 원심분리(17,000 rpm)하여 균체를 취하고 균체를 1회 세척한 후, FastDNA SPIN KIT (MP Biomedical, France)를 사용하여 DNA를 추출하였다. DNA를 추출하고 주형으로 사용하여 16S rRNA 유전자 증폭은 V3에서 V4를 타겟으로, 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. PCR mixture는 template 1  $\mu$ L, 10x buffer (w/o MgCl<sub>2</sub>) 5  $\mu$ L, dNPTs mixture (100 mM) 1  $\mu$ L, primers (forward/reverse, 20 pmol) 2  $\mu$ L, Taq polymerase (Roche, Switzerland) (5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L로 구성하였다. DNA 증폭을 위해 2720 thermal cycler 모델(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 emPCR 증폭(amplification)을 수행하였다. 절차는 initial denaturation (94 °C, 4 min)을 한 후, denaturation (94 °C, 30 s), annealing (58 °C, 4 min, 30 s), extension (68 °C, 30 s)한 것을 50 cycle 반복 수행한 후 마지막으로 10 °C에서 정지(hold)하였다. 증폭된 PCR 산물은 (주)천랩에 의뢰하여 GS FLX titanium system (Roche, USA) 염기서열 분석기를 이용하여 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 진행하였다.

## 2.3. *Sporichthyaceae* Bacterium K-07균주의 분리

현탁된 샘플은 tryptic soy agar, R2A 배지에 도말 접종하였다. 접종된 배지는 28 °C에서 5일간 배양을 실시 후 생성된 colony 100종을 형태학적 유사성을 고려하여 선별 분리하였다.

## 2.4. 균주의 동정

분리 균주의 16S rRNA gene 염기서열은 (주)마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 BigDye terminator를 이용한 cycle sequencing 방법으로 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems)를 통해 분석하였다. 분리 균주의 phylogenetic tree를 그리기 위해서 GenBank에 등록되어 있는 sequence data를 이용하여 분리 균주와 가까운 위치에 있는 여러 species들의 type strain의 16S rRNA gene 염기서열을 조사하고 이들의 염기서열을 Bioedit program과 Clustal X program을 이용하여 alignment하였다. 균주들의 진화과정을 추적하는 작업은 Kimura two-parameter model을 이용하였고[16], MEGA program의[17] neighbor-joining 및 maximum parsimony 방법으로 계통분류학적 위치를 결정하였다.

## 2.5. 균주 배양액의 생산

Tryptic soy agar와 R2A에 도말하여 분리된 strain K-07의 HaCaT cell에서의 다양한 활성을 확인하기 위하여 tryptic soy broth와 Reasoner's 2A broth에 접종하여 28 °C, 100 rpm에서 72 h 동안 현탁 배양하였다. Tryptic soy broth media의 경우 배양이 원활하지 않았으며, Reasoner's 2A broth에서는 배양이 잘 된 것으로 확인되어 Reasoner's 2A broth에 배양된 균 배양액을 흡광도 측정법을 사용하였을 때, 600 nm에서 1-1.2 정도의 OD 값일 때 배양을 중단하였으며 이때의 균 수는 약 10<sup>8</sup>인 것으로 확인하였다. 배양이 종료된 배양물은 4 °C에서 15,000 rpm으로 30 min 원심분리 후 0.2  $\mu$ m 필터를 통과시켜 균체가 제거된 액상을 사용하였다. 이때의 pH는 6.5였으며, 오차 범위는  $\pm$  0.2로 결정되었다.

## 2.6. 세포 배양

사람 각질형성세포주인 HaCaT는 America type culture collection (ATCC, USA)에서 구매하였으며 10%의 fetal bovine serum (FBS, ATCC)와 1%의 [antibiotic/antimycotic (AA, ATCC)을 첨가한 DMEM (HyClone, USA)을 이용하여 37 °C, 5%, CO<sub>2</sub> 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 세포는 2-3일 간격으로 계대배양을 시행하였다.

## 2.7. MTT분석을 이용한 세포 생존율 측정

Strain K-07 배양액의 HaCaT cell에 대한 독성 평가를 위해 MTT assay를 수행하였다. HaCaT cell은 96-well plate에 3  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 24 h 후에 FBS 제거 배지로 교환하였다. 샘플은 균주 배양액을 FBS 제거 배지에 0.01, 0.1, 1, 10, 50%의 농도로 희석하여 제작한 후 처리하였다. 24 h 배양 후 배지 제거하고 0.5  $\mu$ g/mL 농도의 MTT (Sigma, USA)용액을 넣어 결정화한 후 4 h 배양하였다. MTT시약 제거 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)로 용해하여 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 무 처리군과 비교 대조하여 생존율을 측정하였다.

## 2.8. 피부장벽개선 및 보습효능 시험

사람 각질형성세포주인 HaCaT를 6-well plate에 5  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well 접종하여 10%의 FBS와 1%의 AA가

**Table 1.** List of Primers; Forward Primer (FP) and Reverse Primer (RP) Used for Amplification Using RT-PCR

Filaggrin	5'-AGTGCCTCAGGGGCTCACA-3' 5'-CCGGCTTGCCGTAATGTGT-3'
Claudin 1	5'-GCTCTAGAATTCTCACACGTAGTCTTTCCCGCT-3' 5'-GCTCTAGAATTCTCACACGTAGTCTTTCCCGCT-3'
Claudin 4	5'-ACTTTGATAACTGCTCCTCTGAC-3' 5'-TTCGTGTCCAGCAGAGTACC-3'
$\alpha$ Sphingomyelinase	5'-ACTTTGATAACTGCTCCTCTGAC 5'-TTCGTGTCCAGCAGAGTACC-3'
Ceramide synthase 3	5'-ACATTCCACAAGGCAACCATTG-3' 5'-CTCTTGATTCCGCCGACTCC-3'
Hyaluronan synthase 3	5'-CTTAAGGGTTGCTTGCTTGC-3' 5'-GTTCGTGGGAGATGAAGGAA-3'
Aquaporin 3	5'-AGACAGCCCCTTCAGGATTT-3' 5'-TCCCTTGCCCTGAATACTG-3'
IL-6	5'-TACCCCCAGGAGAAGATTCC-3' 5'-TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT-3'
TNF- $\alpha$	5'-GCTATCTGGTGCCAGGCTAT-3' 5'-CGACGCCACAATCCTTGTAAT-3'
TSLP	5'-GCTATCTGGTGCCAGGCTAT-3' 5'-CGACGCCACAATCCTTGTAAT-3'
TARC	5'-CTTCTCTGCAGCACATCC-3' 5'-AAGACCTCTCAAGGCTTTG-3'

첨가된 배지를 이용하여 24 h 배양하였다. 그 후 *Sporichthyaceae* bacterium 배양액, poly I:C 10  $\mu$ g/mL + IL-4 10 ng/mL을 FBS가 첨가되지 않은 배지에 24 h 동안 추가 배양하였다. Total RNA를 추출하기 위해 각 well에 RNA iso (Takara, Japan) 1 mL를 첨가하여 세포를 용해시키고 chloroform (Sigma) 200  $\mu$ L를 첨가하여 14,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리 하였다. 상층액을 취하여 새로운 tube에 옮기고 같은 양의 isopropanol (Sigma)을 첨가한 후 14,000 rpm에서 10 min 원심 분리하여 RNA를 분리하였다. 99% ethanol (Sigma)을 이용하여 7,500 rpm에서 원심 분리하여 2회 세척하고 건조시킨 후 diethylpyrocarbonate (DEPC) water (Ambion, USA)에 녹였다. Nanodrop 2000 (Thermo, USA)를 이용해 RNA를 정량 하였고, total RNA 2  $\mu$ g을 DEPC와 함

계 70  $^{\circ}$ C에서 5 min 동안 가열시킨 후 reverse transcription premix (ELPIS-Biotech, Korea)에 넣고 최종 부피가 20  $\mu$ L가 되도록 하였다. 42  $^{\circ}$ C에서 55 min, 70  $^{\circ}$ C에서 15 min 동안 반응시켜 cDNA를 합성하여 PCR에 사용하였다. 얻어진 cDNA로부터 유전자들을 증폭시키기 위해 5배 희석시킨 cDNA 2  $\mu$ L를 primer 1  $\mu$ L, DEPC 7  $\mu$ L, SYBR Green master mix (Life Technologies, USA) 10  $\mu$ L와 함께 StepOne Plus RT-PCR system (Applied Biosystems)을 이용하여 PCR을 실시하였다. 반응 조건은 50  $^{\circ}$ C 2 min, 95  $^{\circ}$ C 10 min에서 반응 후 95  $^{\circ}$ C 10 s와 60  $^{\circ}$ C 1 min을 40회 반복하여 증폭시켰다. 증폭하고자 하는 유전자들의 primer 염기서열은 다음과 같다(Table 1).

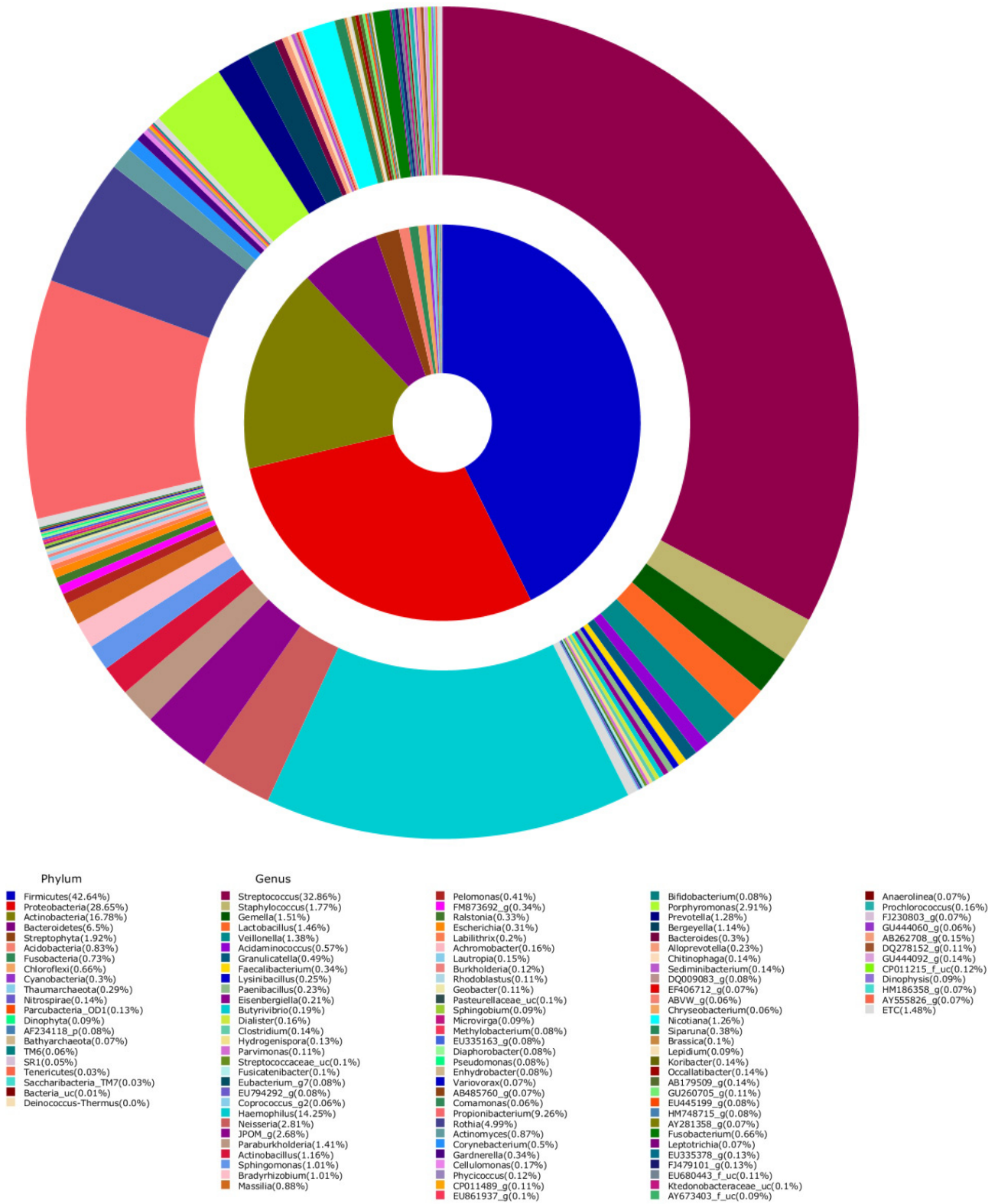


Figure 1. Average composition of skin-microbiome.

2.9. 자료분석 및 통계처리

Pyrosequencing의 결과는 전용 분석프로그램인 CLcommunity™ 3.45를 사용하여 분석하였다. 세포활성 시험은 총 3회 반복으로 실시하였으며, 모든 데이터 통계처리는 SAS (statistical analysis system, ver 9.3, SAS Institute, USA) 프로그램을 통하여 처리하였고, 세포 분석에 대한 그룹간 통계는 Student's t-test를 이용하였다. 두군 간의 유의적 차이에 의한 통계적 검정 후 (-) 대비 \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, (+)대조군 대비 #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01로 표현하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 얼굴 Skin-microbiome 분포 분석

건강한 피부에 분포하는 microbiome의 군집을 분석하기 위해, 10명의 사람으로부터 채집된 샘플을 전 처리를 거친 뒤 pyrosequencing 방법을 이용하여 약 100만 개 이상의 염기서열(평균길이 345 bp)을 확보하였다. 확보된 전체 염기 서열에 대한 평균 분포를 Double Pie Chart 분석법으로 분석하였다(Figure 1). 사람의 epidermis에서는 *Staphylococcus* sp.가 일반적으로 발견되는 공생 미생물로 알려져 있으며, *Corynebacterium* sp.의 경우 신체부위별 epidermis마다 차이가 있지만 많은 수의 개체수가 확인되는 것으로 알려져 있다[7]. 해당 연구에서는 Firmicutes문(phylum)의 분포가 가장 많았으며, 다음으로 Proteobacteria문과 Actinobacteria문이 뒤를 따르는 것으로 확인되었다. Firmicutes문에서는 Streptococcus속(32.9%)이 가장 많이 분포하는 것으로 확인되었으며, Proteobacteria문에서는 Haemophilus속(14.3%), Actinobacteria에서는 Propionibacterium속(9.3%)이 피부에 많이 분포하고 있음을 확인할 수 있었다(Figure 1).

3.2. Phylogenetic Analysis

피부로부터 분리 배양된 strain K-07의 계통분류학적인 위치를 확인하기 위해, 균주의 16S rRNA sequence를 NCBI에서 BLAST를 이용하여 등록된 균주들과의 상동성을 비교한 결과 Sporichthya속의 균주들과 가장 높은 상동성을 나타내었다. 가장 높은 상동성은 93.4%인 것으로 NCBI BLAST 검색결과 확인할 수 있었으나 상동성 결과가 94% 미만인 것으로 보아 신규 속인 것

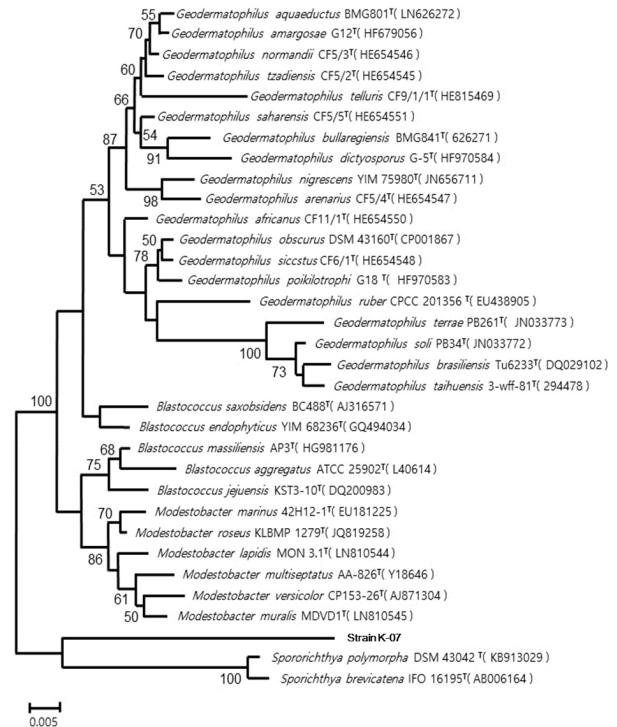
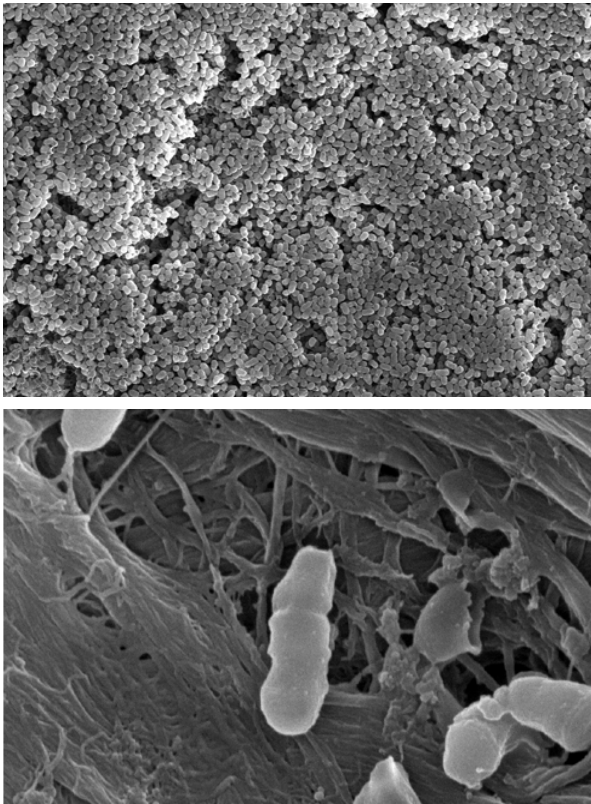


Figure 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence showing by the phylogenetic relationships between strain K-07 and related genus.

으로 분석되었고, 결론적으로 strain K-07은 신규 속임과 동시에 신규 종인 것으로 확인 되었다. 일반적으로 16S rRNA 분석결과 기준으로 94% 미만의 상동성을 나타낼 경우 신규 속으로 간주한다[18]. Strain K-07과 가깝게 속해있는 Sporichthya속 모든 type strain의 16S rRNA gene 염기서열을 조사하여 BioEdit program과 Clustal X program을 이용하여 alignment한 후 MEGA3 program으로 phylogenetic tree를 그려 본 후, phylogenetic tree를 작성하였고, 최종 Sporichthyaceae bacterium strain K-07로 동정 되었다(Figure 2, 3).

3.3. 세포 독성 평가

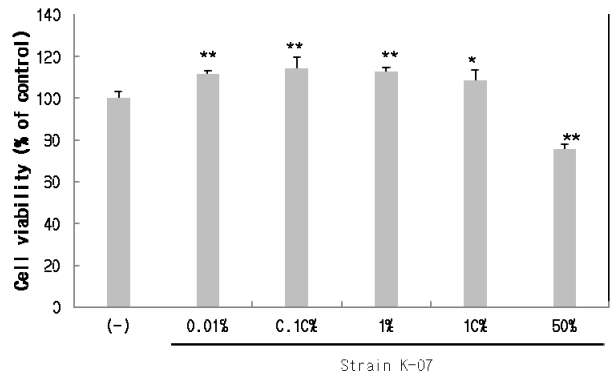
균주 strain K-07 배양액이 각질형성세포에 주는 영향을 보기 위해 세포 생존율을 평가하였다. 균주 strain K-07 배양액을 각질형성세포에 처리한 경우에 처리 농도 0.01, 0.1, 1, 10%에 대해서 어떠한 세포 독성을 나타내지 않았으며, 세포 활성이 정상임을 확인하였다(Figure 4).



**Figure 3.** Morphology of strain K-07 viewed by SEM. Cells were grown on R2A agar for 5 days at 25 °C. Left: 3,500x, Right: 40,000x.

**3.4. 피부장벽 구성 주요인자(Filaggrin, Claudin1, Claudin4, CerS3, αSmase) 효능 평가**

균주 strain K-07 배양액은 각질 세포의 분화 마커인 filaggrin (filament aggregating protein) 유전자의 발현을 농도 의존적으로 증가시키는 것으로 확인되었으며, 1% 처리군은 무 처리군 대비 약 6배 이상 발현량이 증가하였다(Figure 5A). 이러한 filaggrin 유전자의 증가는 표피층의 증식과 분화의 과정을 통해 각질층을 만들음을 의미하며, 이는 건강한 피부 장벽을 생성함을 뜻한다. 그리고 균주 strain K-07 배양액 1%를 처리하였을 때 filaggrin은 농도 의존적인 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다(Figure 5A). 또한 균주 strain K-07 배양액 1%를 처리하였을 때 tight junction의 구조물인 claudin1, 4의 발현량을 약 2배 증가시켰고 0.1-1% 범위에서 농도 의존적으로 발현량이 증가됨을 확인하였다(Figure 5B, C). 따라서 이는 세포간의 부착과 세포 주위 공간을 규칙적으로 배열함으로써 피부장벽기능을 건강하게 강



**Figure 4.** Effect of a strain K-07 on cell toxicity. (a) HaCaT cells were treated with 0.01, 0.1, 1, 10, 50% of strain K-07 for 24 h. The cell viability was measured by MTT assay.

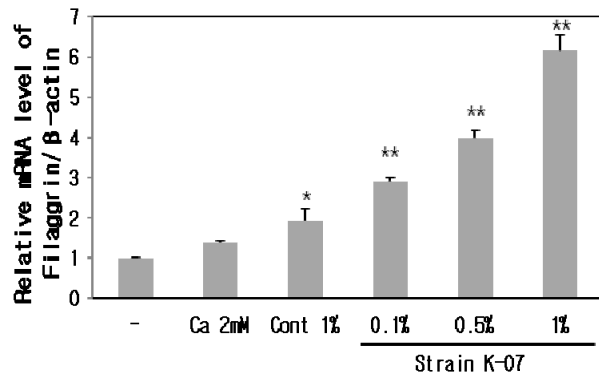
화한다는 것을 뜻한다(Figure 5B, C). 마지막으로 균주 strain K-07 배양액 1%를 사용하였을 때 세라마이드 합성을 위해 필요한 효소인 ceramide synthase 3 (CerS3)와 acid sphingomyelinases (αSmase)의 발현을 증가시켜 피부 장벽간 결속력이 견고하게 유지될 것으로 확인되었다(Figure 5D, E).

**3.5. 피부 보습 주요인자(HAS3, AQP3) 효능 평가**

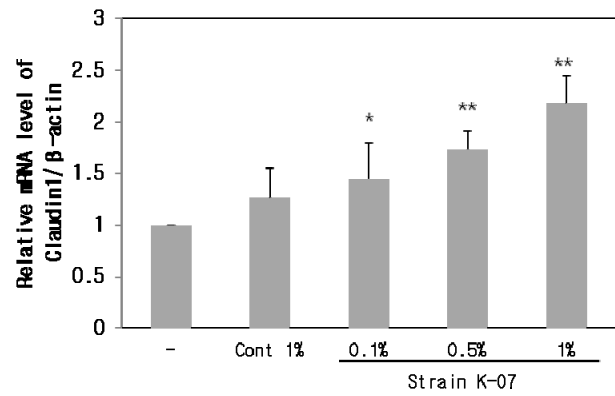
균주 strain K-07 배양액을 1% 처리하였을 때 히알루론산 합성 효소인 hyaluronan synthase 3 (HAS3)와 물과 글리세롤의 이동 통로인 aquaporin 3 (AQP3)의 발현량을 각각 약 3.5배, 약 2.5배 증가시키는 것으로 확인되었다. 게다가 시료농도가 증가하였을 때 유전자 발현량도 농도 의존적으로 증가하는 패턴을 확인할 수 있었으며, retinoic acid 1 μM보다 1% 배양액에서 더 우수한 효능이 확인되었다(Figure 6A, B).

**3.6. 염증인자(IL-6, TNF-α) 발현에 대한 효능 평가**

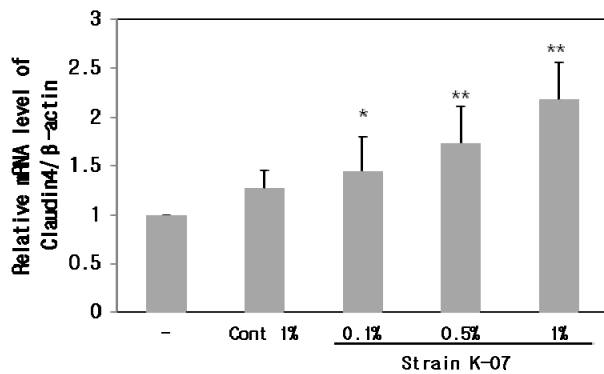
피부세포의 항염증 효과를 평가하기 위해 염증반응 유발 물질인 poly I:C와 interleukin 4 (IL-4)를 HaCaT cells에 처리하여 대표적인 염증인자 interleukin 6 (IL-6)와 tumor necrosis factor-α (TNF-α)의 유전자 발현 정도를 평가하였다. 그 결과 균주 strain K-07배양액을 1% 처리 하였을 때 염증 유도 후 무 처리군보다 IL-6 사이토카인 유전자 발현량이 약 2배 감소하였으며, TNF-α는 약 4배 감소되는 것으로 확인되었다. 그리고 배양액 1%를 처리하였을 때 대조군 dexamethasone (Dex) 1 μM보다 우수한 억제 효능이 확인되었다. 또한



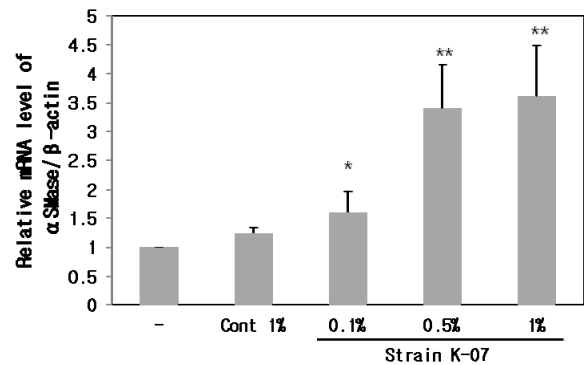
(A)



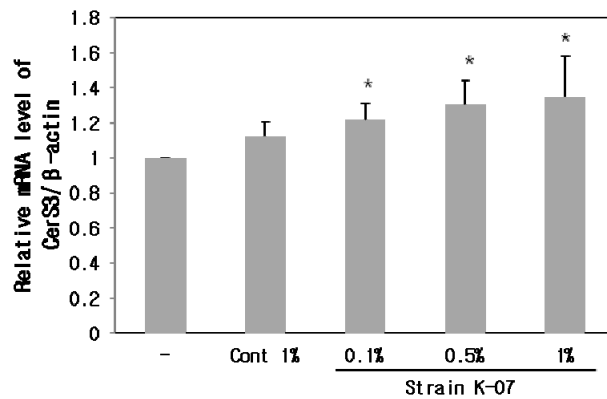
(B)



(C)



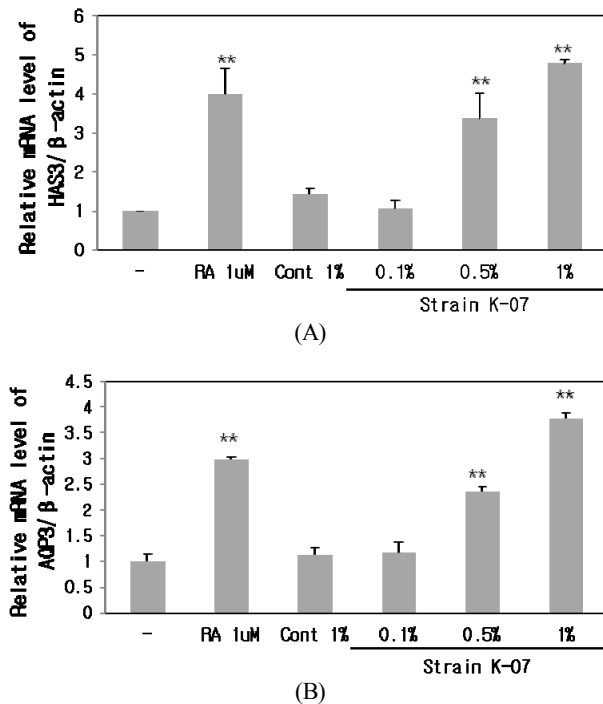
(D)



(E)

**Figure 5.** The effect of strain K-07 on the mRNA expression of filaggrin, claudin1, claudin4,  $\alpha$ SMase, and CerS3. The mRNA expression of filaggrin, claudin1, claudin4,  $\alpha$ SMase, and CerS3 was determined by RT-PCR. (A) The mRNA expression of filaggrin in strain K-07 treated HaCaT cells. (B), (C) The mRNA expression of claudin1 and claudin4 in strain K-07 treated HaCaT cells. (D), (E) The mRNA expression of  $\alpha$ SMase and CerS3 in strain K-07 treated HaCaT cells. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments; \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01.  $\alpha$ SMase,  $\alpha$  Sphingomyelinase; CerS3, Ceramide synthase 3; not incubated media (cont).



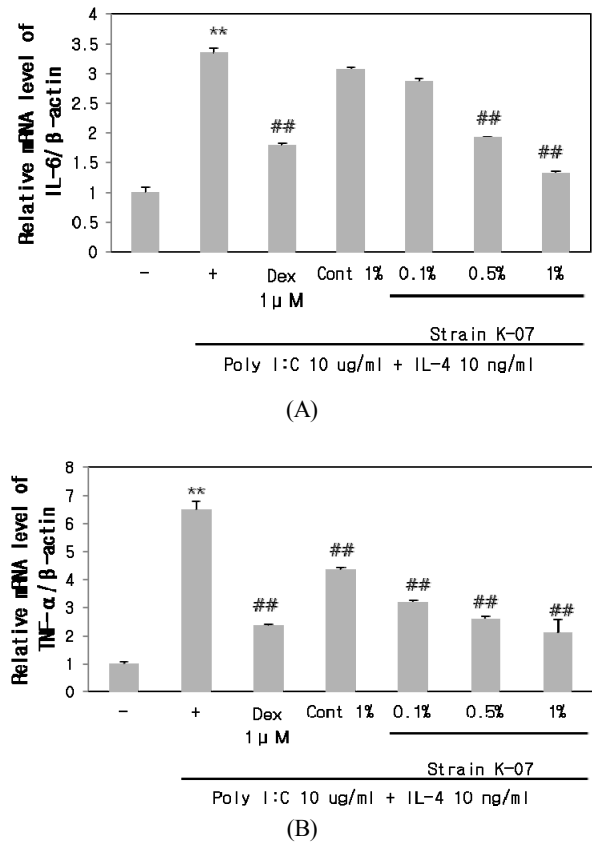


**Figure 6.** The effect of strain K-07 on the mRNA expression of HAS3 and aquaporin3. The mRNA expression of HAS3 and AQP3 was determined by RT-PCR. (A) The mRNA expression of HAS3 in strain K-07 treated HaCaT cells. (B) The mRNA expression of AQP3 in strain K-07 treated HaCaT cells. Results are expressed as mean ± S.D. of three independent experiments; \*\**p* < 0.01. HAS3, hyaluronan synthase 3; AQP3, aquaporin 3; not incubated media (cont).

처리농도에 따라 의존적으로 감소되는 것으로 확인되었고, strain K-07 배양액은 염증 유발 사이토카인인 IL-6와 TNF- $\alpha$ 에 대해 뛰어난 억제 효과를 나타냈다 (Figure 7A, B).

### 3.7. 소양증 인자(TSLP, TARC) 발현에 대한 효능 평가

Thymic stromal lymphopietin (TSLP), thymus and activation-regulated chemokine (TARC)는 아토피 피부염 발병에 주요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이는 아토피 피부염 환자의 각질형성세포에서는 TSLP의 농도가 증가하는 데 반해, 다른 피부염에서는 그 농도가 정상과 비슷하여 아토피 피부염에 특이한 인자로 알려지고 있다[19]. 이렇게 증가한 TSLP는 T세포로부터 케모카인 TARC의 분비를 촉진시킨다[20]. strain K-07 배양액의 항소양증 효과를 평가하기 위해 염증 유발을

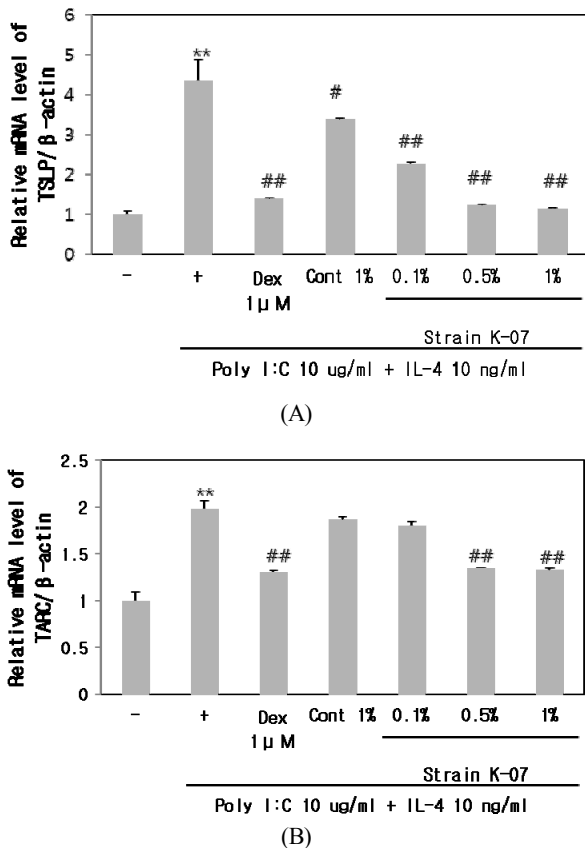


**Figure 7.** The anti-inflammatory effect of strain K-07 on the mRNA expression of IL-6 and TNF- $\alpha$ . The mRNA expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  was determined by RT-PCR. (A) The mRNA expression of IL-6 in strain K-07 treated HaCaT cells. (B) The mRNA expression of TNF- $\alpha$  in strain K-07 treated HaCaT cells. Results are expressed as mean ± S.D. of three independent experiments; \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01. IL-6, Interleukin 6; TNF- $\alpha$ , Tumor necrosis factor  $\alpha$ ; not incubated media (cont).

한 후, 가려움증 인자인 TSLP와 그의 하위 인자 TARC의 유전자 발현 정도를 평가하였다. poly I:C와 IL-4에 의해 TSLP, TARC를 발현되도록 유도하였고, strain K-07 배양액 1%를 처리하였을 때, TSLP는 약 3배 감소 억제되고, TARC는 약 0.5배 감소 억제되는 것으로 확인되었다(Figure 8A, B).

## 4. 결 론

사람의 피부는 다양한 micro-organisms과 공생관계를 유지한다. 피부표면에 존재하는 다양한 미생물들은



**Figure 8.** The anti-itch effect of strain K-07 on the mRNA expression of TSLP and TARC. The mRNA expression of TSLP and TARC was determined by RT-PCR. (A) The mRNA expression of TSLP in strain K-07 treated HaCaT cells. (B) The mRNA expression of TARC in strain K-07 treated HaCaT cells. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments; \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, # $p$  < 0.05, ## $p$  < 0.01. TSLP, Thymic stromal lymphopoietin; TARC, Thymus and activation-regulated chemokine; not incubated media (cont).

피부에 이로운 작용을 하기도 하지만 환경의 변화에 노출되면서 피부에 좋지 않은 작용을 하기도 하는 것으로 알려져 있다[6]. 미생물을 이용한 발효물 또는 배양액의 피부 효능은 많은 연구가 진행되고 있지만, 구체적으로 어떤 작용을 나타내며, 심도있는 연구가 진행 되지 않거나, 미생물의 배양물에는 다양한 형태의 물질이 함유되어 있어 정확하게 어떠한 물질이 피부에 효능을 나타내는지 확인하기까지 많은 시간이 필요하기 때문에 단일물질 수준의 연구가 어려운 실정이다. 하지만 인체에 사용했을 때 이로운 작용을 하는 probiotics는, oligosaccharide, short chain fatty acids 그리고

peptides와 같은 물질들이 유익한 작용을 한다고 알려져 있다. 또한 실제 사람의 피부에는 다양한 미생물이 존재하고 toll-like-receptor (TLR)와 상호작용을 통한 다양한 면역작용이 발생된다고 보고되고 있다[21,22]. 실제로 strain K-07을 배양하였을 때 exo-polysaccharide (EPS)류의 물질이 형성되는 것을 확인하였고, 배양된 배지를 이용하여 새로운 형태의 oligosaccharide, short chain fatty acids 그리고 peptides가 형성되어 피부에 유익한 작용을 나타내는 것으로 예상된다. 그러므로 본 연구에서는 건강한 사람의 피부로부터 분리된 신규 미생물 strain K-07 배양액을 통하여 피부장벽, 보습 및 항염증 활성을 평가하였다. 본 균주는 특정 성장 조건에 의하여 전환된 최종 산물이 피부세포의 다양한 활성을 나타내는 물질을 생산하는 것으로 확인되었고, 특히 피부 보습활성 인자와, 피부장벽활성 인자에 눈에 띄는 증가 효능을 나타냈으며, TSLP, TARC 평가에서는 염증반응을 유도하지 않은 음성대조군 세포보다 억제율이 높게 평가된 것을 확인할 수 있었다. 이는 strain K-07 배양물이 인위적으로 염증을 유도하지 않았을 때에도 피부세포에 전달될 수 있는 염증유발 요소를 억제한 것으로 판단되었다. 이는 피부에 존재하는 *S. epidermidis*에 의해 염증반응이 억제되고, 피부상처 재생에 도움이 된다는 기존의 연구 결과[13]와 유사하며 본 분리 strain K-07은 아직 학계에 보고되지 않은 신규 속의 미생물로서 연구가치가 높다고 판단된다. 장기적으로 효능을 나타내는 단일물질을 개발하여 효능메커니즘을 규명하고 피부장벽, 보습 및 항염증에 복합적으로 효과가 우수한 물질을 대량 생산할 수 있는 의의가 있으며 앞으로 후속적인 연구를 통하여 이를 대량화시키는 기술에 대한 부분을 계속적으로 규명해 나갈 예정이다. 결론적으로 본 연구에서 발견한 strain K-07은 피부장벽을 건강하게 유지시켜줄 수 있도록 다양한 활성인자를 증진시키는 효능을 가지고 있으며, 염증이 발생된 세포에서는 염증 발생을 억제하는 요인을 억제하여 세포 재생에 도움된다고 확인할 수 있다.

## Reference

1. K. Chiller, B. A. Selkin, and G. J. Murakawa, Skin microflora and bacterial infections of the skin, *J.*

- Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **6**, 170 (2001).
2. D. N. Fredricks, Microbial ecology of human skin in health and disease, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **6**, 167 (2001).
  3. R. R. Roth and W. D. James, Microbial ecology of the skin, *Annu. Rev. Microbiol.*, **42**, 441 (1988).
  4. W. C. Noble, Skin microbiology: coming of age, *J. Med. Microbiol.*, **17**, 1 (1984).
  5. R. R. Roth and W. D. James, Microbiology of the skin: resident flora, ecology, infection, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **20**, 367 (1989).
  6. A. L. Cogen, V. Nizet, and R. L. Gallo, Skin microbiota: a source of disease or defence?, *Br. J. Dermatol.*, **158**, 442 (2008).
  7. C. Callewaert, F. M. Kerckhof, M. S. Granitsioti, M. Van Gele, T. Van de Wiele, and N. Boon, Characterization of *Staphylococcus* and *Corynebacterium* clusters in the human axillary region, *PLoS One*, **8**, e70538 (2013)
  8. E. A. Grice and J. A. Segre, The skin microbiome, *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 244 (2011).
  9. A. Martin, M. A. Saathoff, F. Kuhn, H. Max, L. Terstegen, and A. Natsch, A functional ABCC11 allele is essential in the biochemical formation of human axillary odor, *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 529 (2010).
  10. A. L. Cogen, K. Yamasaki, K. M. Sanchez, R. A. Dorschner, Y. Lai, D. T. MacLeod, J. W. Torpey, M. Otto, V. Nizet, J. E. Kim, and R. L. Gallo, Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin, *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 192 (2010).
  11. I. Wanke, H. Steffen, C. Christ, B. Krismer, F. Gotz, A. Peschel, M. Schaller, and B. Schitteck, Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways, *J. Invest. Dermatol.*, **131**, 382 (2011).
  12. S. Parvez, K. A. Malik, S. A. Kang, and H. Y. Kim, Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 1171 (2006).
  13. P. M. Elias, The skin barrier as an innate immune element, *Seminars in Immunopathology*, **29**, 3 (2007).
  14. D. N. Fredricks, Microbial ecology of human skin in health and disease, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **6**, 167 (2001).
  15. T. Iwase, Y. Uehara, H. Shinji, A. Tajima, H. Seo, K. Takada, T. Agata, and Y. Mizunoe, *Staphylococcus epidermidis* esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization, *Nature*, **465**, 346 (2010).
  16. M. Kimura, Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution, *Nature*, **267**, 275 (1977).
  17. S. Kumar, K. Tamura, and M. Nei, MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment, *Brief. Bioinform.*, **5**, 150 (2004).
  18. S. V. Dhotre, G. T. Mehete, M. S. Dharme, N. M. Suryawanshi, and B. S. Nagoba, Isolation of *Streptococcus tigurinus* - a novel member of *Streptococcus mitis* group from a case of periodontitis. *FEMS Microbiol Lett.* **357**, 131 (2014).
  19. E. B. Brandt and U. Sivaprasad, Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis, *J. Clin. Cell Immunol.*, **2**, 110 (2011).
  20. S. R. Wilson, L. Thé, L. M. Batia, K. Beattie, G. E. Katibah, S. P. McClain, M. Pellegrino, D. M. Estandian, and D. M. Bautista, The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch, *Cell*, **155**, 285 (2013).
  21. H. M. Hamer, D. M. A. E. Jonkers, K. Venema, S. A. L. W. Vanhoutvin, F. J. Troost, and R. J. Brummer, Review article: the role of butyrate on colonic function. *AP&T*, **27**, 104 (2008).
  22. S. H. Kaufmann, The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 491 (2007).
  23. K. H. Hänel, C. Cornelissen, B. Lüscher, and J. M. Baron, Cytokines and the Skin Barrier, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 6720 (2013).

