

Homogenizer를 이용한 Sphingosome의 제조와 Sphingolipid의 생리활성 측정

양승남, 박찬구, 백승우, 임기홍, 김남기*

(주)INTERCOSM Biotech, 성균관대학교 화학공학과*

전화 : (031) 290-5614, FAX : (031) 290-5619

Abstract

The effects of agitation rate and agitation time on the synthesis of sphingosome were studied. As increase in the agitation rates 4,000, 6,000, 8,000, 10,000 and 12,000 rpm the viscosity of sphingosome were decreased. The most sufficient agitation rate was 8,000rpm for which micell viscosity and stability. The effect of agitation time on the sphingosome viscosity and stability was investigated by changing the agitation times 2, 4, 6, 8 and 10 minute at 8,000rpm. 4 minute was the most sufficient for the viscosity and stability. The sphingolipid activity of cutaneous wound healing in impaired mice was examined. As a result, we could prove that phytosphingosine-HCl medically worked on wound healing well. For the phytosphingosine-HCl, it was found that the experimentally determined medical action more effective than that of tetra-acetylphytosphingosine.

서론

피부 구조는 기저층으로부터 keratinocyte cell의 분화에 따라 dermis, epidermis, stratum corneum으로 분류된다. 특히 피부 최외각층인 각질층은 외부의 물리 화학적인 환경으로부터 1차적으로 피부를 보호하는 기능뿐만 아니라 내부의 수분손실을 방지하는 중요한 기능을 하고 있다.^{1,2)} 건조한 피부는 여러 가지 피부질환의 원인이 되므로 피부가 보습력을 유지하도록 하는 것이 Skin care의 기본이다. 또한 피부는 수많은 외부의 미생물로부터 노출되어 있고 피부가 정상적인 상태로(Normal Bacterial Flora) 유지하기 위한 피부 조성물이 있는 것으로 알려져 있다. 건강한 피부상태를 유지하기 위한 가장 바람직한 Skin care용 제품을 개발하기 위해서는 피부의 구조와 피부세포의 생체막 조성물 및 물리적 성질을 충분히 이해하는 것이 바람직하다. ceramide는 각질층의 수분손실 방지와 손상된 피부 보호층의 복원을 하는 중요한 성분으로 알려져 있다. ceramide의 전구체인 phytosphingosine은 그 함량은 적으나 미생물로부터 피부를 정상상태로 유지해주는 항생제 역할을 하는 것으로 최근에 알려졌다. 또한 아토피성 피부병 등 여러 피부질환이 각질층의 지질보호막을 구성하는 지질조성의 비정상적인 변화에 기인하는 것으로 알려지면서 세포막

의 중요 성분인 ceramide, cholesterol, fatty acid을 복합한 제품의 개발이 dermatology 분야와 화장품 분야의 새로운 경향을 나타내고 있다. 이러한 연유로 인해 각질층의 지질과 phytosphingosine을 이용한 제품 개발에 많은 연구가 되고있다.

따라서 피부에 미치는 ceramide 및 phytosphingosine의 효능을 충분히 발휘하기 위해서는 어떤 특별한 합성법이 요구되어지며, 이런 문제점들을 해결하기 위한 방안으로써 피부친화력이 우수한 즉, 피부 세포막과 동일한 조성과 구조적 성질인 액정을 가진 sphingosome의 제조와 sphingolipid의 생리활성을 측정함으로써, 이를 이용한 제품개발의 기초를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

(1) Homogenizer를 이용한 Sphingosome 제조

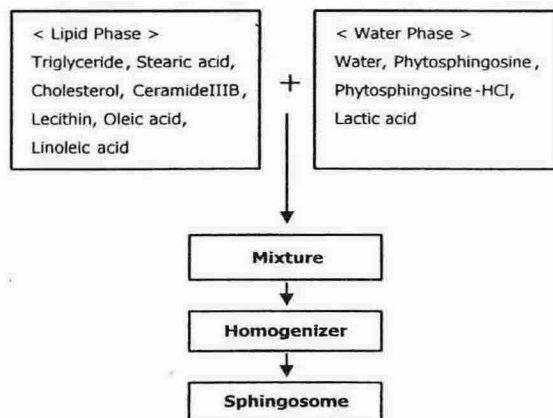
본 실험에서 지질베이스로 ceramideIII_B, cholesterol, lecithin등을 원료로 사용했으며, phytosphingosine은 active ingredient 외 비 이온성 및 이온성 계면활성제로 사용되었다. 화장품용 미용성분들은 lactic acid, linoleic acid, oleic acid를 사용하였다. 물은 음, 양이온 교환 수지탑을 통과한 정제수를 사용하였다. 본 실험에 사용한 재료들은 화장품용으로 사용하였다.

①지질베이스 제조

본 실험에서는 sphingosome 형성을 위해 1차적으로 사람의 각질 세포간과 유사한 환경을 가질 수 있도록 하였으며, 사람 피부 주요 구성성분을 선택적으로 사용하여 지질 베이스를 조제하였다. triglyceride, stearic acid, cholesterol, ceramideIII_B등의 시료를 일정량 칭량하여 70±5℃로 가온 용해하여 순수한 지질 베이스를 만들었다.

②Sphingosome 제조

Sphingosome 제조는 호모게나이저를 사용하였으며, 제조 방법은 다음의 그림과 같다. 또한 Micell의 입자크기를 rpm의 변화에 따라 측정하여 비교하였다.



(2) Sphingolipid의 생리활성 측정 - 피부재생효과 측정(Sprague-Dawley 계 Rat에서 Wound area 측정법에 의한 Tetraacetyl Phytosphingosine 및 Phytosphingosine-HCl의 피부상처 치유 효능시험)

이 실험법은 피부를 직경 6mm의 원형으로 절취한 부위의 복원을 측정함으로써 상처치료 효능을 알아보는 것이다. 이 방법은 Wakita등의 방법을 일부 개량하여 실시하였다.³⁾

일정체중의 Sprague-Dawley 계 rat를 18마리 사용하여 각 군당 6마리씩 분배하였다. Non-Treated(무처치대조군)군은 멸균증류수를, PS-HCl군은 멸균증류수에 phytosphingosine-HCl이 0.5% 함유된 시료를 상처 부위에 도포 하였고, TAPS군은 2% Tween80에 TAPS가 0.5% 함유된 시료를 상처부위에 도포 하였다. 사육환경은 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 의 조건에서 일주일 이상 적응시킨 후 일반적인 이상 징후가 없는 시험동물을 선별하여 사용하였다. 예비사육 및 실험기간 동안 물과 사료를 자유로이 섭취하도록 하며, 실험기간 중에는 모든 실험동물은 개별 cage에서 사육하였다. 쥐 등 부위의 털을 clipper로 깎아내고, 면도기로 제모하여 피부를 노출시켰다. 에테르하에 70% 알코올로 피부를 소독한 후 목선에서 3 cm 떨어진 곳에서부터 정중선을 피부를 biopsy punch로 직경 6mm의 원형으로 절취하여 외상을 만들었다. 감염방지를 위해 항생제를 4일간 1일 1회 근육주사 하였다. 시험물질을 수술 당일로부터 1일 2회 일정량 도포 하였다. 상처의 크기는 1일, 3일, 6일 및 9일째 되는 날 투명한 필름을 상처 부위에 밀착하고 상처 모양을 정확히 본을 떠내어 그 면적을 측정하였다.

결과 및 고찰

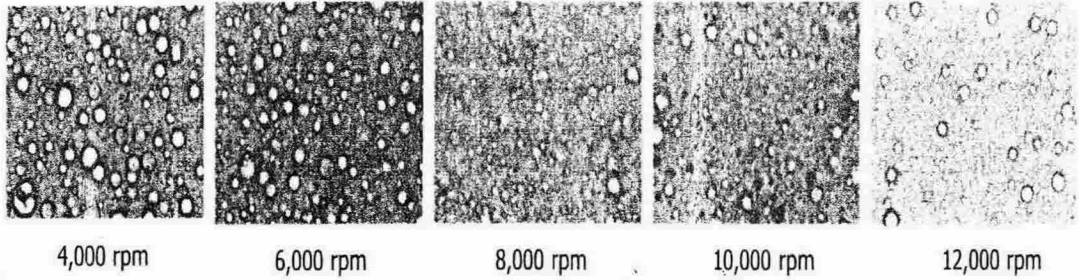
① 교반속도의 변화

본 실험은 사전에 전처리 하여 만들어 놓은 지질베이스를 호모게나이저의 교반속도에 따라 입자 크기의 변화를 실험하였다. 교반속도는 4,000, 12,000rpm까지 2,000rpm씩 변화시켰다. 아래의 그림에서 볼 수 있는 것처럼 8,000rpm에서 입자가 가장 균일한 분포를 이루고 있음을 알 수 있었고, 이런 균일한 입자 분포 때문에 가장 강한 점도를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 4,000rpm에서는 입자사이즈가 크고 불균일하게 형성하였으며, 높은 교반속도(12,000rpm)에서는 입자크기는 작아졌지만 스펙고좁은 입자가 일그러져 낮은 점도를 보임을 알 수 있었다.

② 합성시간의 변화

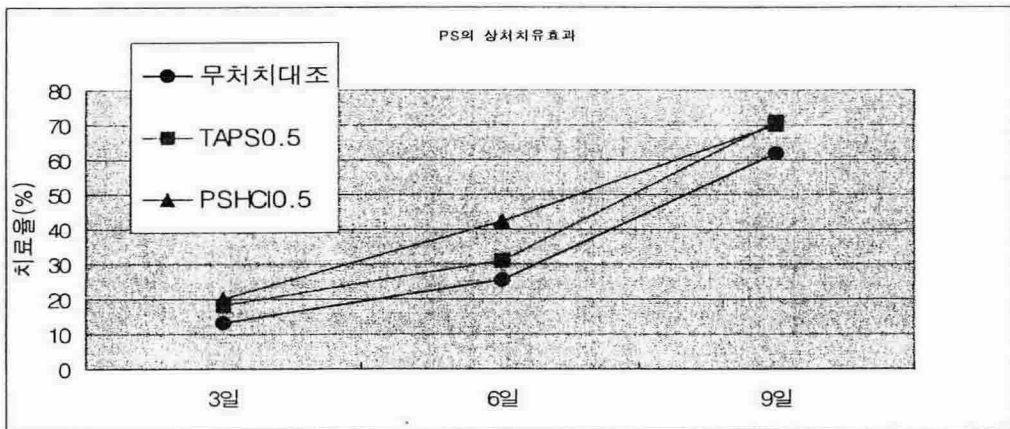
스펙고좁은 합성 시 가장 좋은 점도와 안정성을 보인 8,000rpm을 기본으로 합성시간을 2, 4, 6, 8, 10분으로 변화시켜 가면서 최적의 조건을 찾아보았다. 합성시간이 증가할수록 입자의 점도가 증가하였으나 시간이 길어질수록 합성된 스펙고좁은 입자 일그러지는 현상이 일어났다. 10분의 합성시간에서 점도가 처음보다 감소하는 현상이

일어났다.



③Sphingolipid의 생리활성

실험 3일째와 9일째에 무처치대조군에 대한 PS-HCl 0.5% 및 TAPS 0.5%군의 치료율이 증가하였으나 유의적 증가는 보이지 않았다. 6일째에는 무처치대조군과 비교하여 PS-HCl 0.5%($p < 0.05$)의 치료율이 유의적으로 증가하여 phytosphingosine-HCl이 쥐 피부의 인위적인 상처에 대하여 치료 효과를 나타내었다. 따라서 phytosphingosine-HCl은 상처 치유에 명확한 약리효과가 있는 것으로 사료되며 특히 PS-HCl이 TAPS보다 치료효과가 더 큰 것으로 보인다.



참고문헌

1. M, Kerscher, M.D., "Skin ceramide" (1991), *Euro. J. Dermatol*, 1, 39
2. M. Marek Nagiec, "Sphingolipid Synthesis as a Target for Antifungal Drug" (1997), *J. Bio. Chem*, 272(15), 9809-9817
3. Wakita, H., Matsushita, K. and Nishimura K "Sphingosylphosphorylcholine Stimulates Proliferation and Upregulates Cell Surface Associated Plasminogen Activator Activity in Cultured Human Keratinocytes" (1998), *J. Invest. Dermatol*, 110(3), 253-258