

# N,N,N-Trimethylphytosphingosine (TMP)의 염증성 피부질환 치료제 가능성에 관한 연구

서원상<sup>1,2</sup>, 오한나<sup>2</sup>, 박우정<sup>2</sup>, 엄상용<sup>2</sup>, 강상모<sup>1\*</sup>

## Study for Possibility of N,N,N-Trimethylphytosphingosine (TMP) for Management of Chronic Skin Diseases

Won-Sang Seo<sup>1,2</sup>, Han-Na Oh<sup>2</sup>, Woo-Jung Park<sup>2</sup>, Sang-Young Um<sup>2</sup>, and Sang-Mo Kang<sup>1\*</sup>

접수: 2013년 12월 16일 / 게재승인: 2014년 1월 22일  
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Skin disease is one of the most common diseases and its incidence is increasing dramatically in modern society. Specially, many attempts have been made to treat chronic skin inflammation diseases, such as psoriasis and atopic dermatitis, but effective therapies for the immune cell-mediated skin diseases, including psoriasis and atopic dermatitis have not been developed. Until recently, several drug candidates which were claimed to be effective for skin diseases have been reported, but most of them are not used to treat chronic skin disease. Especially, Psoriasis is characterized by excessive growth and aberrant differentiation of keratinocytes, but is fully reversible with appropriate therapy. The trigger of the keratinocyte response is thought to be activation of the cellular immune system, with T cells and various immune-related cytokines. Formation of new blood vessels starts with early psoriatic changes and disappears with disease clearance. Several angiogenic mediators are up-regulated in psoriasis development. Contact- and mediator-dependent factors derived from keratinocytes, mast cells and immune cells may contribute to

the strong blood vessel formation of psoriasis. New technologies and experimental models provide new insights into the role of angiogenesis in psoriasis pathogenesis. TMP and its derivatives themselves effectively inhibited *in vitro* cell migration, tube formation, and the expression of angiogenic factors. However, TMP and its derivatives induced side effects including hemolysis and local side effects. Therefore, in an attempt to reduce the toxicity and the undesirable side effects of TMP and derivatives, a liposomal formulation was prepared and tested for its effectiveness. TMP and derivatives liposomes retained the effectiveness of TMP *in vitro* while side effects were reduced. These results support the conclusion that TMP effectively inhibits *in vitro* angiogenesis, with the possibility that use as a psoriasis relief agent.

**Keywords:** Trimethylphytosphingosine (TMP), Inflammation, Psoriasis, Angiogenesis, Cell migration, Chorioallantoic membrane

<sup>1</sup>건국대학교 생물공학과  
<sup>1</sup>Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea  
Tel: +82-2-450-3524, Fax: +82-2-3437-8360  
e-mail: kangsm@konkuk.ac.kr

<sup>2</sup>참존화장품 기술원  
<sup>2</sup>Charmzone R&D Center, Charmzone Cosmetic, Ltd., Wonju 220-962, Korea

### 1. 서론

아토피, 건선, 기타 만성 피부염증질환으로 많은 사람들이 의학적, 심미적 관점에서 고통을 받고있다. 과거 형태학 이상과 관련된 연구를 시작으로 각질형성 세포이상, 생화학 관련연

구, 면역학 관련 연구로 진행되고 있다. 최근에는 발병 원인에 중요 역할로 추정되는 신호 전달체계의 이상, 유전자 이상이 있는지에 관심이 집중되고 있다. 1970년대 건선에서의 신생혈관도 암에서 볼 수 있는 것과 비슷하므로 신생혈관억제 치료를 통하여 건선을 치유할 수 있을 것으로 판단하여 신생혈관, 건선에 관한 연구가 현재까지 지속되어 왔다 [1].

일반적으로 염증성 피부질환은 다양한 면역세포들이 피부에 침투되어 피부세포의 대다수를 차지하는 각질형성세포(keratinocyte)와의 상호작용에 의해 야기된다. 이들 각질형성세포들은 면역기능에 관여하는 여러 가지 사이토카인을 분비하여 이들 면역세포들의 증식에 관여하며, 또한 면역세포들로부터 각질형성세포의 증식에 관여하는 여러 인자들을 공급받는다. 이런 측면에서 피부는 단순히 우리 몸을 보호하는 보호막 뿐만 아니라 하나의 면역기관으로 간주되는 것이 현실이다.

특히, 염증과 면역이상에 관련된 피부질환 중 건선 (Psoriasis)은 각질세포의 이상증식, 다양한 염증성 세포, 특히 T 세포가 침윤 (infiltration)되어있고, 침윤된 T 세포가 이상적인 면역반응을 나타내어 각질형성세포의 이상증식이 나타나는 질환이다.

건선환자의 혈관은 확장되고 비정상적으로 꼬인 모양을 나타낸다. 그래서 표피의 이상이 나타나기 전이나 표피 이상이 나타나면서 동시에 진피 혈관의 이상이 나타나 호중구가 표피로 유입되는 것으로 생각되어졌다. 전자 현미경으로도 모세혈관에서 많이 얇아진 혈관벽과 혈관내피 사이의 간격을 볼 수 있다. 이로써 건선의 모세혈관 투과성이 증가되는 것을 알 수 있다.

건선의 정확한 발병 원인은 알려지지 않았으나 현재까지는 자가면역질환으로 보고 있다. 즉, T 세포의 병변부위의 과다 증식과 그 주변으로 혈관이 생성됨에 기인된다. 이는 건선의 치료방법으로 자외선과 소라렌 (Psoralen)을 사용하여 세포의 침윤을 막는 것과 사이클로스포린 (Cyclosporin)과 같은 면역억제제가 건선치료에 사용되고 있는 것으로 보아 T 세포가 건선의 중요한 원인이 됨을 알 수 있다. 그 외에 신생혈관 (Angiogenesis)도 건선과 밀접한 관계가 있음을 보여주고 있는데, 신생혈관 억제도 건선을 약화시키는 요인이 된다.

신생혈관형성은 미리 존재하는 혈관으로부터 만들어 지는 것으로 상처치유, 육아조직의 생성, 심지어 종양의 발달에 관여한다 [1,2]. 특히 신생혈관형성은 종양연구에서 많이 발달하였는데 새로운 신생혈관 형성과 종양 생성을 방지하기 위해서는 Angiogenic inhibitors가 매우 강력하게 관련되어 있다고 알려졌다 [3-5].

최근의 연구결과로는 신생혈관 형성은 아토피, 건선과 같은 만성염증질환에 있어 중요 판별인자라고 보고되기 시작했다. 또한 VEGFs들이 중요 조절 인자라고 보고되었다.

Ceramide, sphingosine, sphingosine-1-phosphate (S1P) 그리고 phytosphingosine 등은 세포 생육, 분화 그리고 세포사멸과 같은 세포 신호 전달에 있어 매우 중요한 매개 인자라고 생각되어 왔다 [6-9].

최근에 합성 phytosphingosine 유도체류 (N-monomethyl phytosphingosine, N,N-dimethyl phytosphingosine)의 SK-1 활성화에 대한 억제능은 DMS보다 더 강한 것으로 보고되었다 [10].

한편, 지금까지 건선을 치료하기 위해 사용되는 주요한 타겟으로는 T 세포의 활성화 억제, 이동 억제, T세포의 선택적 파괴가 있고, Th1에서 Th2로 분화시키는 T세포 분화 조절기술이 있으며, T 세포 자극 사이토카인의 생산 억제와 호중구의 이동억제를 통해 건선의 악화를 방지하며, 건선 부위로의 새로운 혈관 생성을 억제하는 방법이 건선을 치료하는 방법으로 알려져 있다.

최근에 phytosphingosine과 이들의 메틸 유도체들이 세포신호 전달 조절자 및 혈관생성억제제로서의 가능성을 기반으로 신생혈관억제능이 확인되었다 [11]. Sphingosine (SPN)에 관한 다양한 임상결과에서 SPN과 그 유도체들은 Hemolysis, Hemoglobinuria와 주사부위의 염증반응과 같은 문제점이 도출되었다. 생체 내에서 부작용을 경감시키고 효능을 극대화하기 위해서는, SPN 유도체를 함유한 리포솜 시스템이 약물 전달시스템으로 제안되었다 [12]. 리포솜의 표면 조절 혹은 지질조성 변화로 약제의 독성이 경감된다는 사실이 잘 알려진 사실이다 [11,13-15].

이번 연구에서, *in vitro*와 *in vivo*에서 TMP의 신생혈관 억제능과 세포이동억제능을 확인하였다. 추가적으로 작용 메커니즘도 같이 연구되었다. 그러나 TMP (Trimethylphytosphingosine)가 *in vivo* system에서 확인한 결과, TMS (N,N,N-trimethylsphingosine)와 비슷한 부작용이 관찰되었다(data not shown). 이를 해결하기 위한 방법으로 독성을 경감시키기 위해서 리포솜 처치가 적용되었다. 실제로 TMS의 경우 리포솜 처치를 할 경우 독성이 경감된 사례를 확인할 수 있었다 [12].

또한 Song 등은 TMP 자체는 세포독성이 있지만 리포솜으로 처리할 경우 세포독성이 없어지는 것을 확인할 수 있었다 [16]. 이를 기반으로 TMP의 신생혈관억제능 및 더 나아가 아토피, 건선과 같은 피부질환 개선제로써의 가능성 확인을 하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험재료

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)과 cholesterol (CHOL)은 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)으로부터 구입했다. Carboxyl-phytosphingosine (C-PS), N,N-diethyl-phytosphingosine (DEP), N,N,N-trimethyl-cyclic phytosphingosine (C-TMP)은 Phytos Co. (Suwon, Korea)으로부터 제공받았다. 세포배양을 위해 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Minimum Essential Medium (MEM), RPMI Medium 1640 (RPMI1640) 그리고 fetal bovine serum (FBS)는 Invitrogen (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. HUVEC cell은 MCTT (Seoul, Korea)으로부터 분양을 받았으며, 계대 배양수는 3세대수 이내를 사용하였다. 모든 재료는 더 이상의 정제

없이 사용되었다.

## 2.2. Synthesis of N,N,N-trimethylphosphingosine-iodide (TMP) 및 유도체

Phytosphingosine (300 mg, 0.946 mmol), iodomethane (0.298 mL, 4.73 mmol),  $K_2CO_3$  (523 mg, 3.79 mmol) (hydroxyl groups의 보호제로 사용)을 3 mL의 methanol에 녹이고, 50°C에서 4 시간동안 교반하였다. 감압조건에서 용매를 증발시켰고 이후 증류수 4 mL을 산물에 넣었다. 이 수용액을 8 mL의 ethyl acetate 용액으로 추출하고,  $Na_2SO_4$ 으로 말리고 여과하였다. ethyl acetate를 증발시키면 260 mg의 백색 결정상을 얻을 수 있다. TMP의 화학적 구조와 질량은 FT-IR,  $^1H$  NMR,  $^{13}C$  NMR, MS (FAB, Glycerol, m/z) spectra를 통하여 알 수 있었다. 생성율은 76%였고 사용하기전 -20°C으로 보관되었다. IR (KBr)  $\nu_{max}$ : 3009 (OH), 2918, 2850 (C-H)  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  3.95 (dd, 1H,  $CH_2O$ , J = 14.4 Hz), 3.89 (dd, 1H,  $CH_2O$ , J = 14.4 Hz), 3.76 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 3.6 (dd, 1H), 3.11 (s, 9H, N+ $CH_3$ ), 1.68 (m, 1H,  $CH_2$ ), 1.48 (m, 1H,  $CH_2$ ), 1.23 (s, 24H,  $CH_2$ ), 0.84 (t, 3H,  $CH_3$ ) ppm.  $^{13}C$  NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  76.80, 71.01, 55.69, 52.18, 33.21, 31.21, 30.60, 29.15, 29.03, 28.99, 28.93, 28.62, 24.87, 22.00, 13.83 ppm. MS (FAB) for TMP: 361 [M<sup>+</sup>] [17]. 이외 유도체들은 Namgoong 등의 방법으로 합성되어 Phytos Co. (Suwon, Korea) 으로부터 제공받았다 [17].

## 2.3. 리포솜의 제조와 측정 (Preparation and characterization of liposomes)

Liposome은 DPPC, CHOL (1:1 molar ratio) 그리고 여러 농도의 TMP (from 0 to 400  $\mu$ M)으로 만들어졌다. liposomes은 thin film hydration 방법으로 만들어졌다. 자세하게 설명하면 먼저 지질은 chloroform 층에 녹였다. 그리고 chloroform은 rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-200, Switzerland)을 이용하여 제거하였다. (50°C, 감압조건) 생성된 lipid film은 phosphate-buffered saline (pH 7.4)에 녹여 수화하고 부드럽게 섞었다. 각각의 리포솜 용액은 extruder (Northern Lipids Inc., USA)를 이용하여 200 nm의 polycarbonate filter, 100 nm polycarbonate filter (Whatman, USA)를 통하여 5번 추출하였다. Liposome의 입자크기와 zeta potential은 ELS-Z Electrophoretic light scattering particle size 그리고 zeta potential analyzer (ELS-Z, OTSUKA Electronics Co. Ltd., Japan) 기기를 통하여 실온에서 측정되었다.

## 2.4. TNF- $\alpha$ 억제능 측정

실험에 사용한 세포주는 인간각질형성세포주 (Human keratinocyte cell line)인 HaCaT 세포주를 이용하였으며, TNF- $\alpha$  유도원으로 Lipopolysaccharide (LPS)를 사용하였다. 세포의 농도가  $2 \times 10^6$  cell/mL 정도일 때 LPS (2  $\mu$ g/ml)을 처리하여 TNF- $\alpha$ 를 유도하였으며, TMP 유도체 (1  $\mu$ g/ml)를 함께 처리하여 1일간 배양한 후 상등액으로 유출되는 TNF- $\alpha$ 의 양을

Biosource사의 TNF- $\alpha$  kit를 사용하여 측정하였다.

## 2.5. IL-2 억제능 측정

Jurkat T 세포주를  $1 \times 10^6$  cell/mL의 농도가 되게 RPMI 1640/10% FBS 조건에서 배양한 다음 Phytohemagglutinin (PHA)와 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)으로 완전히 세포를 활성화시킨 후 TMP 유도체와 양성대조군인 사이클로스포린 A (CsA)를 처리하여 24시간 배양한 후 배양 상등액에 존재하는 IL-2의 양을 Biosource사의 IL-2 kit를 사용하여 측정하였다.

## 2.6. NF- $\kappa$ B 억제능 측정

먼저, Jurkat cell을  $2 \times 10^6$ /mL의 농도로 serum free media에 30 분간 방치한다. NF- $\kappa$ B 유전자와 lipofectamine 시약을 1:3의 비율로 혼합하여 Jurkat 세포에 형질전환 (transfection)을 한 다음 4시간 동안 반응하여 NF- $\kappa$ B 유전자가 Jurkat cell에 들어가게 한다. 그리고 20%의 FBS로 처리하여 Transfection을 종료한 후 20시간 동안 배양한 Jurkat cell을 24 well plate로 옮긴 후 세포수를  $2 \times 10^5$ /well로 맞춘 후 TMP 유도체와 양성대조군인 사이클로스포린A(CsA)를 3시간 동안 전 배양시킨다. Jurkat cell을 활성화시키기 위해 CD3를 처리하고, 24시간 배양한 다음 세포를 회수하여 녹여낸 후 luciferase assay를 통해 NF- $\kappa$ B 활성도를 측정하였다.

## 2.7. Chorioallantoic membrane assay (CAM assay)

CAM assay는 신생혈관의 생성능을 보는 일반적인 방법이다. 자세하게 설명하면, 부화한지 1일내의 유정란을 시중에서 구입하여 37°C 습식항온배양기에서 배양했다. 3일후에 주사기를 이용하여 Ovalbumin 5 mL을 제거한 후 배양한다. 4일째 되는날 계란 상단에 window를 만들었다. 7일째에는 닭의 배아가 발달하는데 이때 CAM 부분의 혈관이 발달이 시작된다. CAM 위에 약물을 점적하여 말린 Coverslip을 올리고 10일째 되는날 약물에 의한 신생혈관 억제 여부를 확인하였다. 확인 시 영상을 디지털 카메라로 촬영하여 신생혈관 생성능을 확인하였다.

## 2.8. Cell migration assay

우선 6 well에 시료를 일정량 첨가한 HUVEC cell이 완전히 자랄때까지 배양을 진행하였다. 실험에 사용되는 Yellow tip으로 찍찬 세포 표면을 그으면 세포가 제거되면서 일정 부분의 공간이 형성되는데 시간이 지남에 따라 일부 세포가 빈공간으로 이동한다. 이때 이동된 세포 수를 계수한다. 침윤된 세포수를 계산하기 위해서 디지털 사진으로 영역을 설정하여 8 H 후의 이동된 세포의 수를 세었다. 세포 이동정도는 다음의 식과 같이 계산하여 확인하였다.

$$\text{세포이동정도 (MF, Migration factor) (\%)} = (C - C_s) / C \times 100$$

C : 대조군의 이동된 세포수,  $C_s$  : 처리군의 이동된 세포수

2.9. 통계처리

필요한 경우 실험으로 얻은 값은 각기 평균과 표준편차를 구하여 도시하였으며, 정상 대조군과 실험군의 유의성 검증은 student t test (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. TNF-α 생성 억제효과

항염은 피부질환에 있어 매우 중요하며 근원적인 부분이다. 만성 염증 피부 질환인 건선과 아토피와 같은 피부질환은 염증반응이 높게 나타나는 질환이므로 염증반응을 억제해야 좋은 건선치료제로 작용할 수 있다. TMP 유도체의 항염증 반응을 확인하기 위해 TNF-α (tumor necrosis factor-α) 분비 억제 실험을 수행하였다. 세포주로는 인간각질세포인 HaCaT cell line을 사용하였으며, 세포의 농도가 2×10<sup>6</sup> cell/mL로 맞추고 6 well에 넣고 실험을 진행하였다. 면역유도원으로 LPS (Lipopolysaccharide)를 사용하였고 염증 유도농도는 2 μg/mL으로 하였다. 24 H 후 상등액으로 유출되는 TNF-α의 양을 ELISA 측정방법을 이용하여 정량하였다. 각각의 물질의 처리 농도는 10 ppm으로 하였다.

LPS에 의해 TNF-α의 양이 약 35% 증가되었으며, Carboxyl-phytosphingosine (C-PS), N,N-diethyl-phytosphingosine (DEP), TMP가 TNF-α 양을 줄어드는 패턴을 보였다. DEP의 경우도 상당한 억제능을 보였다.

3.2. TMP 및 유도체의 IL-2 생성 억제효과 측정

IL-2는 Th1 사이토카인 (cytokine)으로 T 세포 활성화에 관여하고 있다. IL-2 분비 억제는 건선 치료에 중요한 인자로 작용할 수 있기 때문에 TMP 유도체에 대한 IL-2 분비 억제능을 Jurkat T 세포주를 이용해 측정하였다. 면역자극원의 활성화

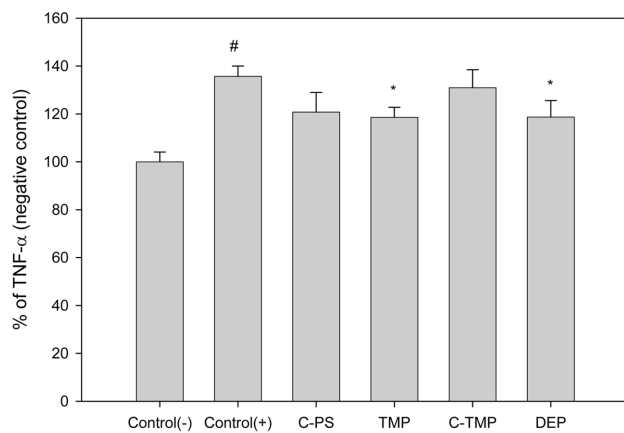


Fig. 1. TNF-α Inhibitory effects treated with TMP and other derivatives *in vitro*. Control (-) means control which was not treated with inducer, Control (+) means treated with inducer. #*p*<0.05 compared with Control (-) in the same time. \**p*<0.05 compared with Control (+) in the same time.

군으로 PMA/PHA를 사용했을 경우 IL-2 생성량이 무첨가군 (control)에 비해 550% 정도 IL-2 생성이 유도되었으며, 사이클로스포린A (CsA)의 경우 무첨가군과 비슷한 IL-2 생성량 (거의 100%)을 보여주고 있으며, 농도에 거의 관계없이 매우 적은 농도에서 완벽하게 IL-2의 생성이 억제하였다. 이에 반해 TMP의 경우는 유도체에 따라 조금씩 차이를 보이고 있고, TMP는 농도가 증가함에 따라 억제효과도 증가하는 양상을 보이고 있으며, 5.68 μg/mL의 농도에서는 양성대조군인 CsA와 유사한 정도의 억제 효과를 보이고 있다.

3.3. TMP의 NF-aT 생성 억제효과

IL-2 생성 억제 기전을 살펴보기 위해 NF-aT 활성 억제 여부를 Jurkat-T를 이용하여 측정하였다. Jurkat-T에 CD3를 처리하면 NF-aT가 활성화되어 Luciferase 유전자를 발현하여 루시페라아제 (luciferase)의 발현량이 11.7배 증가하지만 이를 사이클로스포린A (CsA)로 처리하면 농도 의존적으로 Luciferase의 발현량이 감소하게 된다. 그리고 TMP 유도체의 경우 사이클로스포린 A (CsA)와 달리 고농도에서도 NF-aT의 활성화에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 관측되었다. 따라서 TMP유도체는 사이클로스포린A (CsA)와 다른 경로로 IL-2 분비를 억제하는 것으로 보여진다. 또한 TMP 유도체는 NF-κB (Nuclearfactor-kappaB) 활성을 억제해 IL-2 생성을 억제하는 것으로 판단된다.

3.4. TMP 유도체의 신생혈관 억제능 측정 (CAM assay)

약물을 점적 하지 않은 커버슬립만을 CAM 위에 올려 3일 후 관찰하면 정상적인 혈관 형태를 관찰할 수 있다. 이럴 때 각각의 후보물질을 CAM 부위에 처리하였을 경우 혈관 생성을 억제하면 건선치료제로써의 가능성을 가지게 된다.

TMP와 c-TMP의 경우 비슷한 효능수치를 보이고 있으나 c-TMP는 배아에 대한 독성을 보이므로 TMP가 상대적으로 무독성이며 효능이 있는 것으로 생각된다. 그러나 DEP (di-

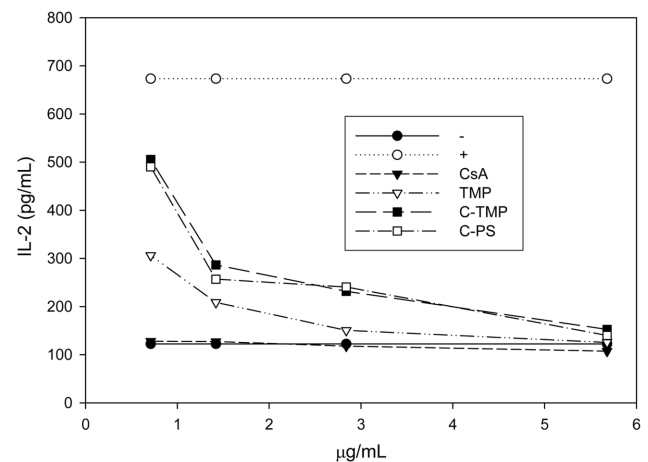
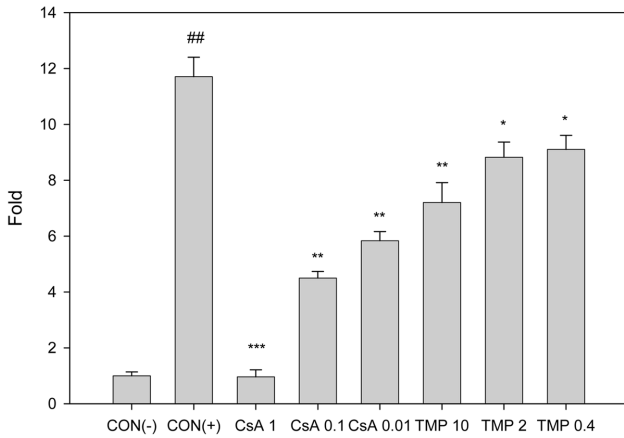
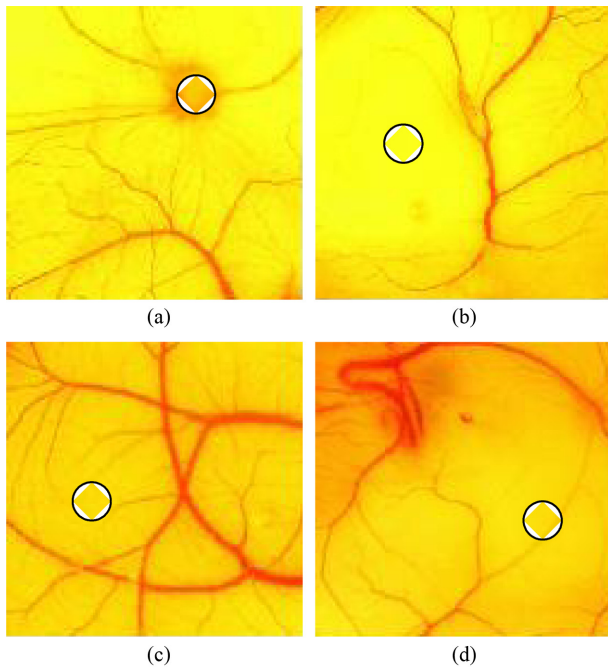


Fig. 2. IL-2 Inhibitory effects treated with TMP and other derivatives *In Vitro*. - means control which was not treated with inducer, + means treated with inducer.



**Fig. 3.** *In Vitro* NF-aT Inhibitory effects treated with TMP and other derivatives. – means control which was not treated with CD3 Data are means±S.D. of 3 experiments. #*p*<.05, significantly different as compared to CON (-) (Negative control) \**p*<.05, \*\**p*<.01, and \*\*\**p*<.001 significantly different as compared to CON (+) (Positive control).



**Fig. 4.** Angiogenesis inhibitory effects treated with TMP and other derivatives. (a) treated with DEP, (b) treated with TMP, (c) treated with PBS, (d) treated with c-TMP.

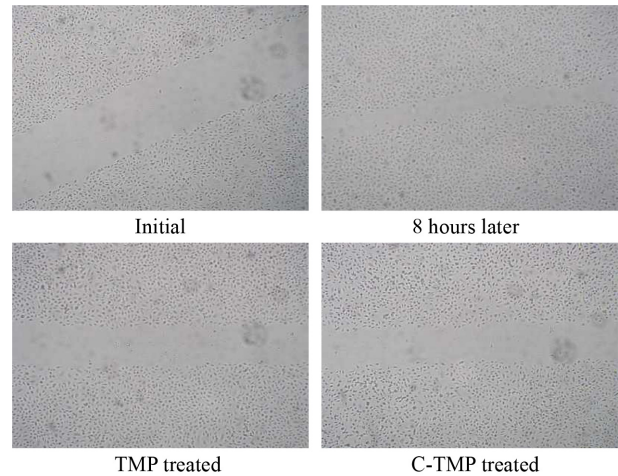
ethylphosphingosine)의 경우에는 오히려 신생혈관 촉진능을 가져 왔으므로 혈관생성 억제물질로 적합하지 않은 것으로 생각되어 후보군에서 제외하였다.

**3.5. TMP 유도체의 HUVEC 세포이동 억제능력 측정 (Cell migration assay)**

신생혈관 형성은 혈관생성세포의 이동에 의해 이루어지는데

**Table 1.** Angiogenesis inhibitory effects treated with TMP and other derivatives

Group	Derivatives			
	Control	DEP	c-TMP	TMP
Dead (%)	0 (0.00)	3 (18.75)	7 (41.18)	4 (25.00)
Negative (-) (%)	12 (80.00)	13 (81.25)	2 (11.76)	0 (0.00)
Positive (+) (%)	3 (20.00)	0 (0.00)	8 (47.06)	12 (75.00)
Sum (%)	15 (100.00)	16 (100.00)	17 (100.00)	16 (100.00)



**Fig. 5.** *In vitro* cell migration studies. HUVEC cells were cultured reaching 90% confluence. The cells were incubated with various concentrations of TMP, C-TMP for 2 days after creating a scratch on the cell monolayer by scraping with a sterile pipette tip. Wound edge morphology was measured using reverse-phase microscopy. (B) Migration Factor (MF) came from the number of migrated cell was evaluated after 8 hours.

이 이동을 억제할 수 있으면 좋은 건선 치료제의 타겟이 될 수 있다 [18]. 즉 혈관이 자라기 위해서는 혈관 내피세포의 이동이 이루어지게 되는데 이를 억제하는 능력이 있으면 신생혈관 생성능을 억제하여 좋은 건선 치료제가 될 수 있다.

HUVEC 세포는 땀줄속 정맥혈관에서 채취한 혈관 내피 세포이다. 혈관 내피 세포의 경우 혈관이 다쳤을 경우나 새로운 부위로 혈관이 만들어지기 위해서 필요한 세포의 경우 인접 부위로 이동해 나가는 능력을 가지고 있다 [19]. 혈관 생성은 새로운 부위로 인접세포가 이동되면서 시작된다. 건선부위로도 혈관 내피 세포가 신장을 하기 때문에 혈관의 생성을 억제하는 것은 매우 중요하다. 이 기능이 탁월하다면 또다른 종류의 건선 치료제로써의 가능성을 가지게 된다. 이를 확인하기 위해서 Cell migration 법을 이용하여 후보물질이 과연 어느정도 세포이동을 억제하는지 확인할 필요가 있다.

TMP의 경우 2.5 µg에서 0.15 µg까지 일정한 세포주 이동 억제능을 보인다. DEP의 경우 오히려 세포주 이동 촉진능을 가지는데 (MF가 negative value가 나온 경우는 오히려 세포이동을 촉진하는 약재임을 의미한다), CAM 실험에서 신생혈관 촉진능을 보인 결과와 연관된 결과를 확인할 수 있었다.

**Table 2.** *In vitro* cell migrated cell number (MF means migration factor) when treated with TMP and other derivatives after 8 hours

Treated Concentration (ppm)	TMP (MF)	DEP (MF)	C-TMP (MF)	C-PS (MF)	N3-TMP(MF)	
2.5 ppm	48 (86.52)	(Dead)	- (Dead)	354 (0.56)	151 (57.58)	
Number of Cell	1.25 ppm	52 (85.39)	20 (94.38)	352 (1.12)	130 (63.48)	
Migration (MF)	0.63 ppm	88 (75.28)	429 (-20.51)	121 (66.01)	368 (-3.37)	199 (44.10)
	0.31 ppm	95 (73.31)	512 (-43.82)	166 (53.37)	342 (3.93)	198 (44.38)

## 5. 결론

아토피 건선과 같은 만성염증 피부질환으로 현재 전세계의 많은 사람들이 고통받고 있으며, 이의 극복은 의학적 관점 뿐만 아니라 심미적, 개념적 분야인 미용차원에서 예방 및 개선이 이뤄져야 한다. 파이토스핑고신은 세라마이드 합성 촉진 기능을 가지고 있으며 프로틴키나제C, 그리고 포스포리파제 D를 억제하는 것으로 확인되면서 아토피와 같은 만성염증을 동반하는 피부질환에 효과적으로 기대된다. 이에 본 연구자는 파이토스핑고신 기반으로 합성물질을 제조하여 아토피, 특히 건선에 효과적인 물질을 찾아보고자 하였다. 본 연구에서는 3개의 메틸기가 붙은 TMP 물질 외 여러종을 합성하여 이들 중 피부질환과 의학적 관점에서 예방가능한 실험을 수행하였다. 건선치료제로서의 가능성을 확인하기 위한 실험에서 DEP가 제일 효능이 좋았고, C-TMP, C-PS 그리고 TMP 순으로 효능이 확인되었다. 이들 4가지 후보물질의 T세포 활성화 억제 실험 결과 DEP가 매우 우수하였고, 그 다음은 TMP였다. 신생혈관 생성 억제실험에서 TMP가 좋은 효능을 나타내었고 DEP는 오히려 혈관생성촉진능을 보였다. DEP는 T cell activation에서 좋은 효과를 보여주었으나 신생혈관 억제 및 세포이동능에서 좋지 않은 결과를 도출하였으므로 후보군에서 탈락하였다. 세포 이동억제실험에서 TMP가 세포이동을 억제하는 양상을 확인할 수 있었다. TMP는 항염, 항종양능 뿐만 아니라 T 세포 억제능, 세포이동억제능 그리고 신생혈관억제능을 광범위하게 가지므로 건선과 같은 난치성 피부염증질환을 예방하는 물질로 사용가능성이 있다고 생각되며, 궁극적으로 피부 건강에 있어 선제적 예방 차원에서 사용하는 물질로 생각된다.

## REFERENCES

- Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285: 1182-1186.
- Ossowski, L. and E. Reich (1983) Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell* 35: 611-619.
- Holash, J., S. J. Wiegand, and G. D. Yancopoulos (1999) New model of tumor angiogenesis: Dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 18: 5356-5362.
- Hood, J. D., M. Bednarski, R. Frausto, S. Guccione, R. A. Reisfeld, R. Xiang, and D. A. Cheresch (2002) Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 296: 2404-2407.
- Weidner, N., P. R. Carroll, J. Flax, W. Blumenfeld, and J. Folkman (1993) Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am. J. Pathol.* 143: 401-409.
- Merrill, A. H. (2002) Sphingolipids: Metabolism and cell signaling. *New Compr. Biochem.* 36: 373-407.
- Spiegel, S. and A. H. Merrill, Jr. (1996) Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.* 10: 1388-1397.
- Spiegel, S. and S. Milstien (2002) Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem.* 277: 25851-25854.
- Woodcock, J. (2006) Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB Life* 58: 462-466.
- Park, S. R., H. J. Cho, K. J. Moon, K. H. Chun, S. Y. Kong, S. S. Yoon, J. S. Lee, and S. Park (2010) Cytotoxic effects of novel phytosphingosine derivatives, including N,N-dimethylphytyosphingosine and N-monomethylphytyosphingosine, in human leukemia cell line HL60. *Leuk. Lymphoma* 51: 132-145.
- Song, C. K., S. H. Jung, D. D. Kim, K. S. Jeong, B. C. Shin, and H. Seong (2009) Disaccharidemodified liposomes and their *in vitro* intracellular uptake. *Int. J. Pharm.* 380: 161-169.
- Park, Y. S., S. Hakomori, S. Kawa, F. Ruan, and Y. Igarashi (1994) Liposomal N,N,N-trimethylsphingosine (TMS) as an inhibitor of B16 melanoma cell growth and metastasis with reduced toxicity and enhanced drug efficacy compared to free TMS: Cell membrane signaling as a target in cancer therapy III. *Cancer Res.* 54: 2213-2217.
- Gabizon, A., A. Dagan, D. Goren, Y. Barenholz, and Z. Fuks (1982) Liposomes as *in vivo* carriers of adriamycin: Reduced cardiac uptake and preserved antitumor activity in mice. *Cancer Res.* 42: 4734-4739.
- Gabizon, A. A. (1995) Liposome circulation time and tumor targeting: implications for cancer chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16: 285-294.
- Matsuo, H., M. Wakasugi, H. Takanaga, H. Ohtani, M. Naito, T. Tsuruo, and Y. Sawada (2001) Possibility of the reversal of multi-drug resistance and the avoidance of side effects by liposomes modified with MRK-16. A monoclonal antibody to P-glycoprotein. *J. Control. Release* 77: 77-86.
- Song, C. K., J. H. Lee, A. Jahn, M. J. Choi, S. K. Namgoong, S. S. Hong, S. Chong, C. K. Shim, S. J. Chung, and D. D. Kim (2012) *In vitro* and *in vivo* evaluation of N,N,N-trimethylphytyosphingosine-iodide (TMP) in liposomes for the treatment of angiogenesis and metastasis. *Int J Pharm.* 434: 191-198.
- Namgoong, S. K. and S. Y. Park (2003) Phytosphingosine derivatives with antitumor activity. *US Patent* 6,538,032.
- Garca-Caballero, M., M. Mar-Beffa, M. Medina, and A. R. Quesada (2011) Dimethylfumarate inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*: a possible role for its antiproliferative effect? *J Invest Dermatol.* 131: 1347-55.
- Huang A. J., M. B. Furie, S. C. Nicholson, J. Fischberg, L. S. Liebovitch, and S. C. Silverstein (1988) Effects of human neutrophil chemotaxis across human endothelial cell monolayers on the permeability of these monolayers to ions and macromolecules. *J Cell Physiol.* 135: 355-366.