

## Melanoston의 탈색효과에 대한 면역조직화학적 및 전자현미경적 연구

정호삼, 오 철<sup>1</sup>, 강병찬<sup>1</sup>, 정호권<sup>1</sup>

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실, <sup>1</sup>참존생물소재연구소

**간추림** : 효모에서 추출한 신물질 melanoston이 피부의 탈색을 유도하는지에 대한 연구를 실험동물인 귀니픽을 이용하여 시행하였다.

귀니픽피부의 표피에 분포되어 있는 멜라닌세포내 멜라닌색소의 합성에 작용하는 tyrosinase 활성정도를 관찰하기 위해 anti-tyrosinase 항체를 이용한 면역조직화학적염색방법을 이용하였으며 멜라닌세포내에서 melanoston에 의해 멜라닌의 합성이 melanosome에서 이루어지거나 억제되는지를 관찰하기 위해 면역도금법을 이용한 전자현미경으로 관찰하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 귀니픽의 피부에 0.1% 및 0.01% melanoston 용액을 도포하고 3주 경과후 멜라닌세포내 tyrosinase 활성이 가장 낮았다.
2. 0.5% 및 0.1% melanoston을 도포하고 3~4주 경과후 귀니픽 표피내 멜라닌세포와 각질세포에서 면역금과립의 분포가 가장 적었다.

이상과 같은 결과로 미루어 효모에서 추출한 melanoston은 표피내 멜라닌색소의 합성과 분포를 억제하는 것으로 판단되었다.

**찾아보기 낱말** : Melanoston, 멜라닌세포, 멜라닌, tyrosinase, 각질세포

### 서 론

신물질 melanoston이 피부의 색을 변화시키는 미백과정에 대한 과학적 근거를 실험동물인 귀니픽(guinea pig)을 이용하여 제시하고자 하였다.

사람과 포유동물의 피부에서 멜라닌은 외피(integument)중에서 표피층에 있는 멜라닌세포(melanocyte)에 분포되어 있는 것은 이미 잘 알려져 있고(Seiji 등 1961), 멜라닌은 멜라닌세포의 melanosomes에서 합성되며 이때 tyrosinase의 작용으로 tyrosine이 산화되어 멜라닌으로 변형된다고 여러 학자들에 의해 밝혀져 있다(Fitzpatrick 등 1971, Hearing과 Jimenez 1987, Tripathi 등 1992, Riley 1997).

교신저자: 정호삼(한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실)  
전자우편: junghs@hanyang.ac.kr

Aroca 등(1993)은 멜라닌세포의 연구과정에서 멜라닌세포자극호르몬(melanocyte stimulating hormone, MSH)이 tyrosinase 활성을 자극시키고 멜라닌합성에 작용한다고 하였고, Kameyama 등(1989)은 MSH는 멜라닌세포의 분화를 유도하고 멜라닌생성(biosynthesis of melanin)과 tyrosinase 활성을 높인다고 하였다. 비색소세포에는 melanogenesis를 억제하는 요소가 있는데 이것은 tyrosinase의 작용을 억제한다고 하였다. 따라서 피부의 표피내의 멜라닌세포내 tyrosinase 활성정도는 피부색을 나타내는 주요지표라고 생각할 수 있다. 최근 많은 학자들은 피부의 표피조직에서 멜라닌색소는 멜라닌세포에서 뿐 아니라 각질세포(keratinocyte)의 세포질에도 다수 함유되어 피부색을 나타낸다고 연구 보고하였고, 각질세포의 멜라닌색소는 멜라닌세포에서 이동되어 왔다고 이미 연구되어 있다(Yamamoto와 Bhawan

1994, Seiberg 2001, Topal 등 1986).

이상과 같은 여러 학자들의 피부색의 원인인 멜라닌색소에 대한 연구는 지금도 계속되고 있으며, 특히 멜라닌색소의 세포간 이동과 관련이 있는 protease-activated receptor 2에 관한 연구와, 멜라닌 합성에 관련이 있는 유전자의 연구는 80종의 유전자중 25% 정도 밝혀가는 단계에 있다 (Hearing 1999).

본 연구자는 (주) 참존에서 개발한 melanoston을 실험동물 피부에 수회에 걸쳐 도말한 후 일정기간 자외선을 조사하고 표피층의 멜라닌세포내 tyrosinase 활성도를 측정하여 melanoston에 의한 피부의 탈색기작을 면역조직화학적 연구방법과 전자현미경을 이용한 기법으로 증명하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 실험약재

실험동물 : 체중 270~300 g 정도의 9주령의 수컷 귀니픽[(주) 샘타코]

실험약재 : melanoston (CBI-100): 효모에티놀추출

Table 1. Components of melanoston

A 상: 유상		
Stearic acid	2%	유성원료, 크림 영속성, 경도에 영향, 피부 유분 유지
Glycerin	1%	보습제
Cetyl alcohol	1%	유화안정보조제
Sorbitan mono stearate	0.5%	유화제
Polyoxyethelene stearate	0.7%	유화제
Liquid paraffine	12%	유성원료, 수분증발억제, 사용감촉 향상
Butyl paraben	0.1%	방부제
B 상: 수상		
Carborner	0.3%	점증제
Methyl paraben	0.2%	방부제
1,3-Butylene glycol	3%	보습제
Water		
C 상: 중화제		
Triethanolamine	0.3%	
D 상: 주원료		
효모에탄올추출물	0.5%	

물 및 cream 용매: (Table 1)

### 2. 실험방법

실험동물은 대조군과 실험군으로 구분하고 각군에 5마리의 귀니픽을 배정하였다.

#### 1) 대조군

본 실험에서 3가지 대조군을 두었다.

정상대조군, vehicle군 (melanoston 첨가를 제외한 cream만 동물피부에 도포한 군) 및 0.1% arbutin군을 대조군으로 사용하였다.

#### 2) 실험군

실험동물의 피부에 도포한 melanoston의 백분율에 따라 실험동물을 0.5% melanoston군, 0.1% melanoston군 및 0.01% melanoston군으로 나누고 각군에 5마리의 수컷 귀니픽을 배정하였다.

#### 3) 자외선조사 방법

0.5% melanoston, 0.1% melanoston군, 0.01% melanoston군, 0.1% arbutin군, 대조군은 vehicle군과 정상대조군의 실험동물 모두에 자외선 조사를 시행하였다.

각 군은 모두 귀니픽 5마리로 구성하였고, 등 피부털을 제거한 후 자외선 조사 3일전부터 각 군에 해당되는 시료를 도포하고, 정상대조군에는 아무런 처리를 하지 않았다. 자외선 조사 당일에 등피부를 따뜻한 물수건으로 닦아낸 다음 자외선 (UVB)을 60 mJ/day되게 조사한 후 각 군에 해당하는 시료를 도포하는 과정을 3일동안 반복하였다. 자외선을 3일간 조사한 뒤 귀니픽의 등피부에 홍반이 생긴 것을 관찰하였으며 마취하에 등피부조직을 일부 절취하였다. 자외선조사는 특수한 UVB조사 장치를 제작사용하였다.

매일 시료를 도포하고 1주일 단위로 4주간 피부 생검, 피부색의 육안관찰과 사진촬영을 하였다. 피부 생검은 림폰과 케타민 혼합액으로 마취하에 시행하였으며 절취한 조직은 tyrosinase 면역염색을 위해 동결절편으로 만들었으며, 일부는 4% paraformaldehyde-0.5% glutaraldehyde-3% sucrose in cacodylate 용액으로 상온에서 3시간 고정하여 전자현미경으로

관찰하였다.

#### 4) 육안적 관찰

각실험군의 피부의 변화를 3일간 UVB 조사와 melanoston 도말을 시행한 후로부터 관찰자 2명이 제1주, 2주, 3주 및 4주째에 실시하였으며 정상대조군의 귀니픽 중 제2번 동물을 선택하여 색의 강도를 “O” 점을 주고 매주 각각의 귀니픽의 피부색의 강도를 비교하여 진한색은 “-”를 보다 옅은 색도는 “+”로 표시하였다.

#### 5) Tyrosinase의 면역염색

생검한 피부를 동결절편기 (cryocut)에 동결하여 14  $\mu$ m 두께의 절편을 제작하고 실온에서 30분 건조 후 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액에 세척하였다. 이어 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액 (pH 7.4)에 30분 고정 후 PBS 용액에 20분간 세척하였다. 실온에서 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> methanol 용액에 5분간 반응시킨 다음 PBS로 세척하였다. Blocking reagent를 37°C에서 40분 적용 뒤 goat polyclonal tyrosinase antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:20으로 희석하여 37°C에서 90분간 반응시켰으며, PBS로 세척 후 이차항체 biotinylated rabbit anti-goat IgG (Vector Lab, USA)를 실온에서 30분 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. ABC kit (avidin-biotin complex, Vector lab, USA)로 실온에서 30분간 반응시킨 후 세척하였다. 발색은 3, 3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB, Vector lab, USA)를 이용하였으며, 1% methyl green으로 대조염색 후 탈수, 청명 후 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 6) 전자현미경적 관찰 (면역도금법)

면역도금법을 이용한 tyrosinase의 전자현미경적 검색을 위하여 caccodylate buffer를 사용하여 제조한 4% paraformaldehyde-0.5% glutaraldehyde-3% sucrose 혼합액 (pH 7.4)에 상온에서 3시간 가량 고정된 조직을 수세, 탈수 과정을 거쳐 LR White (London Resin White Co, UK)에 포매하고 열중합과정을 거쳐 block을 제작한 다음 초박절편기로 약 80 nm 두께의 절편을 제작하고 염색하였다. 1% bovine

serum albumin이 들어있는 Tris-buffer로 특이반응을 억제하였으며, 일차항체는 면역조직화학적검색에서 사용한 goat polyclonal tyrosinase antibody를 20배 희석하여 사용하였고 2차항체는 직경 15 nm의 금과립자 (gold particle)가 결합된 rabbit anti-goat IgG (Jackson Immuno Research Laboratories Inc. USA)를 20배 희석하여 사용하였다. 2% uranyl acetate로 15분간 단일염색을 한 후 Hitach 600 투과형전자현미경으로 가속전압 80 kV에서 관찰하였다. 면역도금법의 특이성을 검증하기 위해 일부 조직은 일차항체없이 이차항체만을 사용하여 반응시키고 동일한 염색을 시행하여 관찰하였다.

## 결 과

### 1. Melanoston 도포후 귀니픽 피부색의 변화

귀니픽의 피부의 색깔을 관찰하기 위해 대조군의 2번 개체의 피부색을 색도 “O”로 정하고 이 대조군의 피부색보다 밝은색, 즉 흰색을 띠는 정도에 따라 +1, +2 등으로 표시하였고 -1, -2 등은 대조색보다 붉거나 검은 색조 정도를 표시하였다. 이상과 같은 기준으로 육안적으로 관찰한 결과 0.5% melanoston군과 0.01% melanoston을 도포하고 2~3주 경과군에서 가장 높은 미백효과가 보였고, 0.01% melanoston 처리군에서는 제3주에 공통적인 미백효과가 있었고, 0.1% melanoston을 도포하고 제5주 경과후가 가장 미백효과가 높은 것으로 관찰되었다. 한편 0.1% arbutin군은 도말후 1주에만 미백효과가 나타나지만 제2주 부터는 모든 melanoston 도말군보다 미백효과가 낮았다 (Figs. 1-6, Table 2, 3). 2주째 제3군 (0.1% arbutin)을 제외한 모든 군은 vehicle군에 비하여 유의성있는 차이가 있었다 ( $P < 0.05$ , t-test).

### 2. Melanoston 도포후 귀니픽의 피부표피에서 tyrosinase 면역반응

0.1% 및 0.01% melanoston 도포후 3주 경과군에서 귀니픽 표피에서 tyrosinase 활성도가 가장 낮았

**Table 2.** Skin colors after various percentaged melanoston treatments on guinea pig (observation I)

Group	Animals	Week			
		Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
Group 1 0.5% melanoston	1	0	+2	+1	+1
	2	0			
	3	+3	+1	+1	+1
	4	+2	-1	0	+1
	5	+1	0	+1	+1
Group 2 0.1% melanoston	1	+2	+2	+2	+1
	2	+1	+1	+1	+2
	3	+1	+1	+1	+1
	4	+1	+1	+1	+1
	5	+1	+1	+2	+1
Group 3 0.01% melanoston	1	0	-1	+1	0
	2	+1	0	0	0
	3	0	+1	+1	+1
	4	+1	+1	+2	+1
	5	0	0	+1	+1
Group 4 0.1% arbutin	1	+2	0	+1	+1
	2	+2	+1	+2	+2
	3	+2	+1	+1	0
	4	+1	+1	0	0
	5	+1	0	+1	+1
Group 5 vehicle	1	-1	+1	-1	-1
	2	0	0	0	-1
	3	-1	-1	0	-1
	4	0	0	0	+1
	5	-2	-1	-1	0
Group 6 control	1	-1	-1	+1	0
	2	0	0	0	0
	3	+1	+1	0	+1
	4	+1	+1	0	+1
	5				

\* Footnote : - Red or black  
+ White  
o Control color  
None Death

**Table 3.** Skin colors after various percentaged melanoston treatments on guinea pig (observation II)

Group	Animals	Week			
		Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
Group 1 0.5% melanoston	1	0	0	0	0
	2	0			
	3	+2	+1	+1	+1
	4	+2	+2	+1	+1
	5	+1	+1	+1	+1
Group 2 0.1% melanoston	1	0	+1	+2	+2
	2	+1	+1	+1	+1
	3	0	+1	+1	+1
	4	+1	+2	+1	+1
	5	-1	+2	+2	+2
Group 3 0.01% melanoston	1	0	-1	-1	0
	2	+1	0	0	0
	3	+1	+1	+1	+1
	4	-1	-1	-1	-1
	5	0	0	0	0
Group 4 0.1% arbutin	1	+1	0	0	0
	2	+1	+1	+2	+1
	3	+2	+1	+1	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
Group 5 vehicle	1	-1	0	-2	-1
	2	-1	0	-1	-1
	3	-1	-1	-1	-1
	4	0	+1	-1	-1
	5	-2	-1	-1	0
Group 6 control	1	-1	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	+1	+1	-1	+1
	4	+1	+1	-1	-1
	5				

\* Footnote : - Red or black  
+ White  
o Control color  
None Death

으며, 0.01% melanoston 도포후 2주부터 3주 및 4주에 걸쳐 지속적으로 tyrosinase 활성도가 낮았다. Melanoston 농도가 가장 높은 0.5% melanoston군에서는 제2주에서 낮았으나 0.1% melanoston군 및 0.01% melanoston군에서 보다는 약간 높은 tyrosinase 활성을 보였다. 0.1% arbutin 도포후 제2주부터 4주까지는 약간 tyrosinase 활성이 낮아졌으나 melanoston 도말을 한 0.01% melanoston군보다 높았다. Vehicle군과 정상대조군에서는 현저하게 tyro-

sinase 활성이 높게 관찰되었다 (Figs. 7-12, Table 4 참조).

### 3. Melanoston 도포후 각질세포 (keratinocyte) 및 멜라닌세포 (melanocyte)내에서 면역금과립 (immunogold particles) 발현조건

대부분의 멜라닌세포에서 면역반응 금과립은 세포질에 불규칙하게 분포되어 있고 melanoston 도포후 시간이 경과될수록 그 분포수는 감소되어 나타

**Table 4.** Incidence of tyrosinase activities on epidermis of UV radiated guinea pig skin after treatments of various percentage melanoston and 0.1% arbutin

Group	개체번호	UV 조사 직후	UV 조사후 1주	UV 조사후 2주	UV 조사후 3주	UV 조사후 4주
Group 1 (0.5% melanoston)	1	+	+	±	±	+
	2					
	3	+	±	+	±	+
	4	+	++	+	++	+
	5	++	±	+	+	++
Group 2 (0.1% melanoston)	1	++	+	+	±	+
	2	+	++	±	±	+
	3	++	++	+	±	+
	4	+	++	+	+	+
	5	±	+	+	+	+
Group 3 (0.01% melanoston)	1	+++	++	+	±	±
	2	++	+	+	±	±
	3	++	+	+	±	±
	4	++	++	±	+	+
	5	++	+	±	+	+
Group 4 (0.1% arbutin)	1	+	+	+	±	±
	2	++	++	+	++	+
	3	+	+	±	±	+
	4	++	++	+	+	++
	5	++	+	+	+	±
Group 5 (Vehicle)	1	+	++	±	+	+
	2	++	++	+++	++	++
	3	+	+	++	+	++
	4	±	+++	+	±	++
	5	++	+	++	+	+
Group 6 (Control)	1	+++	+++	++	++	+
	2	+	+++	++	++	++
	3	+	++	+	++	++
	4	+++	++	++	+	++
	5					

Foot note    +++ : Strong activities of tyrosinase  
 ++ : Moderate activities of tyrosinase  
 + : Mild activities of tyrosinase  
 ± : Trace activities of tyrosinase

났다. 0.5% 및 0.1% melanoston 도포군에서는 도포 후 제3주와 4주에 가장 낮은 출현률을 보였다. 0.1% arbutin 도포군에서는 도포 후 1주에 감소되어 나타나지만 제3주와 제 4주에서 대조군 및 vehicle군과 거의 비슷하게 지속적으로 높은 출현률을 보였다. 각질세포에서 면역금과립 출현률은 0.5% 및 0.1% melanoston 도포군에서 도포 후 제3, 4주에 낮은 출현을 보였고, 0.1% arbutin 도포군에서는 arbutin 도포

**Table 5.** The incidence of gold particle appearance, tyrosinase activities, in the cytoplasm of epidermal cells of UV radiated guinea pig back skin after the treatments of various percentage melanostons and arbutin

Exp animals	Cells	After melanoston treatment				
		1st day	1st week	2nd week	3rd week	4th week
Group 1	K	++	+	++	+	+ -
	M	+++	+	++	+	±
Group 2	K	+++	+	++	+	+
	M	++	++	+	+	+
Group 3	K	+	+	+	++	+
	M	++	+	++	+	++
Group 4	K	++	+		++	++
	M	+	+		+++	+++
Group 5	K	++	++	++	++	+++
	M	+	++	+	++	+
Group 6	K		+	+	++	++
	M		++	+	+	+

Foot note :  
 K : Keratinocyte  
 M : Melanocyte  
 +++ : Strong activities of tyrosinase  
 ++ : Moderate activities of tyrosinase  
 + : Mild activities of tyrosinase  
 ± : Trace activities of tyrosinase  
 Group 1 : 0.5% melanoston-treated group  
 Group 2 : 0.1% melanoston-treated group  
 Group 3 : 0.01% melanoston-treated group  
 Group 4 : 0.1% Arbutin-treated group  
 Group 5 : Vehicle group  
 Group 6 : Control group

후 면역금과립의 출현의 변화가 거의 없었다(Figs. 13-16, Table 4).

## 고 찰

피부색을 나타내는 멜라닌색소는 피부의 표피층에 분포되어 있는 멜라닌세포에서 합성되고, 합성된 멜라닌이 각질세포로 이동되어 각질세포로 흡인되어 있으므로써 피부전층에 갈색 혹은 흑갈색의 피부색을 나타낸다고 알려져 있다. 이러한 기작에 의한 피부색은 멜라닌세포내에서 멜라닌 물질의 합성이 그 근원이므로 이 멜라닌색소의 합성을 억제하거나 차단할 수 있으면 미백의 목적이 달성될 것으로 생각할 수 있다.

연구자들이 생각할 수 있는 것은 피부의 표피층에서 멜라닌세포 자체의 증식을 억제하는 것이 그 한가지 방법이며, 두 번째 방법은 멜라닌세포에서 합성되는 멜라닌색소의 합성을 억제시키거나 지연시켜 멜라닌색소를 감소하는 방법일 것으로 생각된다 (Gahl 등 1995, Potterf와 Hearing 1998).

본 연구에서는 두번째 방법을 염두에 둔 연구를 시행하였다. 즉 멜라닌세포에서 멜라닌 색소가 합성될 때 세포내에서 분비되는 tyrosinase에 의해서 tyrosine이 산화되어 melanosomes가 형성된다는 원리에 따라 tyrosinase 활성도를 면역조직화학 및 면역금과립법의 전자현미경적 방법으로 추적하였다.

Hearing과 Jimenez (1987)는 phylogenetic spectrum을 이용하여 멜라닌색소의 합성을 위해 필요한 copper를 함유한 효소가 tyrosinase라고 하였고, 특히 포유동물에서는 멜라닌세포내에서 발견되며 멜라닌색소 합성뿐 아니라 분비에도 기능을 하는 glycosylated enzymes라고 주장했으며, tyrosinase는 melanogenesis 조절하는 주요한 요소라고 하였다. Fuller 등 (2001)은 멜라닌세포내 tyrosinase 활성은 인종에 따라 다르다고 했으며, 흑인의 피부 멜라닌세포내의 tyrosinase 활성도가 높다고 하였다. 따라서 tyrosinase 활성도는 피부의 착색과 관련이 있다고 생각할 수 있다.

본 실험에서 실험동물의 색소침착을 ultraviolet B (UVB)조사를 이용하였다. 많은 학자들은 포유동물에 UVB를 조사하면 피부내 멜라닌합성이 증가되나 그 원인은 확실히 알려지지 않았다. 그러나 대부분의 학자들은 멜라닌합성을 일으키는 멜라닌세포의 증가에 의한다고 하였다. 그러나 Bologna 등(1989)은 UVB light는 피부내의 멜라닌세포의 MSH(melanotrophins) receptor를 증가시키고 따라서 MSH의 자극에 의한 melanogenesis를 증진시킨다고 하였다.

Imokawa 등(1986)은 귀니픽 피부에 UVB를 조사한 결과 Mongoloid human skin과 닮은 색소변화를 가져왔다고 하였으며, UVB를 매일 3일 연속 귀니픽 피부에 노출시키면 피부색이 갈색으로 변한다고 하였다. 이때 UVB 폭로에 의하여 피부내 멜라닌세포 수는 200~400 cells/mm<sup>2</sup>에서 1주일 후 800~1000 cells/mm<sup>2</sup>으로 증가 된다고 하였다. Ando 등

(1995)은 tyrosinase는 멜라닌합성에 관련된 제한적인 효소라고 했으며, 멜라닌세포내 melanosomes는 특별히 막상으로 멜라닌이 축적되는 기관이라 하였다. 그러나 melanosomes의 수는 tyrosinase mRNA에 연관되어 변화되지만 melanogenesis와 tyrosinase 활성도하고는 관계가 없다고 하였다.

이상과 같이 여러 학자들은 피부의 색을 나타내는 것은 사람을 포함하여 포유동물에서는 표피층내의 멜라닌세포가 합성하는 멜라닌색소이며, tyrosinase에 의해서 합성이 촉진된다고 밝혀져 있으며 따라서 tyrosinase의 추적은 피부의 착색과 탈색을 가능할 수 있다. 본 실험에서 면역조직화학적 방법과 면역금과립법으로 멜라닌세포를 관찰하여 tyrosinase의 활성도와 위치를 감별할 수 있었다. UVB를 귀니픽의 피부에 조사 후 melanoston을 도달한 다음 1주, 2주, 3주 및 4주에 걸쳐 표피에서 tyrosinase의 활성도를 측정된 결과 제3주 및 4주군에서 현저한 tyrosinase 활성도가 감소한 것은 melanoston이 멜라닌색소합성을 억제하므로써 미백제로서 탁월하다는 것이 증명되었고, 제3주 및 4주군의 실험동물의 피부내 멜라닌세포와 각질세포에서 금과립의 분포가 감소되는 것도 melanoston의 melanogenesis와 tyrosine의 감소로 판단할 수 있었다.

피부의 탈색에 관한 연구는 오래전부터 많은 학자들, 특히 일본 및 프랑스 학자들에 의해 수행되어 왔다. Jimbow 등(1974)은 hydroquinone (HQ)에 의해서 화학적 탈색의 기작을 조직화학적 방법(dopa reaction)과 전자현미경적 방법으로 생체의 피부에서 증명하였다. 탈색의 원리는 멜라닌세포내 melanosomes 내부구조의 변화와 파괴가 그 원인이 된다고 했고 궁극적으로는 멜라닌세포의 괴사에 이르게 된다고 주장하였다. Hashimoto 등(1988)은 HQ가 피부에서 탈색제에 적합한 14개의 hydroquinone fatty acid esters (HQ-Rs)을 합성하여 그 인체에서 안전성과 피부내 기능을 발표한 바 있다. Fligel 등(1992)은 인체의 표피세포의 배양하여 연구한 결과 all-trans retinoic acid가 멜라닌세포와 멜라닌종양세포의 증식을 억제한다고 발표한 바 있다. Akiu 등(1991)은 arbutin (hydroquinone-β-D-glucopyranoside)이 멜라닌합성을 억제한다고 B16 melanoma

cell을 배양하여 증명하였고, Jin 등(1999)은 arbutin 이 사람과 버섯의 세포에서 tyrosinase 활성을 억제하여 멜라닌합성을 저해한다고 했으며, Maeda와 Fukuda (1996)는 자연에서 생성된 arbutin ( $\beta$ -D-glucopyranoside of hydroquinone)은 tyrosinase 활성을 억제한다고 주장한 바 있다.

상기와 같이 피부의 탈색에 이용된 물질은 hydroquinone과 그 변형물질인 arbutin, retinoic acid 등 여러 가지가 있다. 이러한 물질의 탈색 기작은 tyrosinase 활성도의 억제에 의한 멜라닌 합성의 억제이거나 멜라닌세포의 증식을 억제시키는 것이었다. 그러므로 표피세포에서 tyrosinase 활성도 측정은 표피의 탈색정도를 측정하는데 가장 보편적인 적절한 방법으로 여겨지고 있다.

본 실험에서 melanoston은 arbutin과의 비교실험에서 arbutin 보다 훨씬 우수한 탈색 효과를 나타내었다. Arbutin 도말후 제2주에는 비교적 낮은 tyrosinase 활성을 보였으나 제3주 및 제4주에서 급속히 높은 tyrosinase 활성이 관찰되었고, 전자현미경을 이용한 표본관찰에서도 다량의 금과립이 arbutin 도말후 3~4주로 갈수록 증가되었다. 그러나 melanoston 도말군 모두에서는 제2주부터 제3주 및 제4주 도말군에 이르기까지 tyrosinase 활성도는 지속적으로 낮게 관찰되었고 금과립의 분포도 소량으로 관찰되었다.

이상과 같은 결과는 melanoston이 귀니픽 피부의 탈색에 탁월한 효과가 있다고 생각하였다.

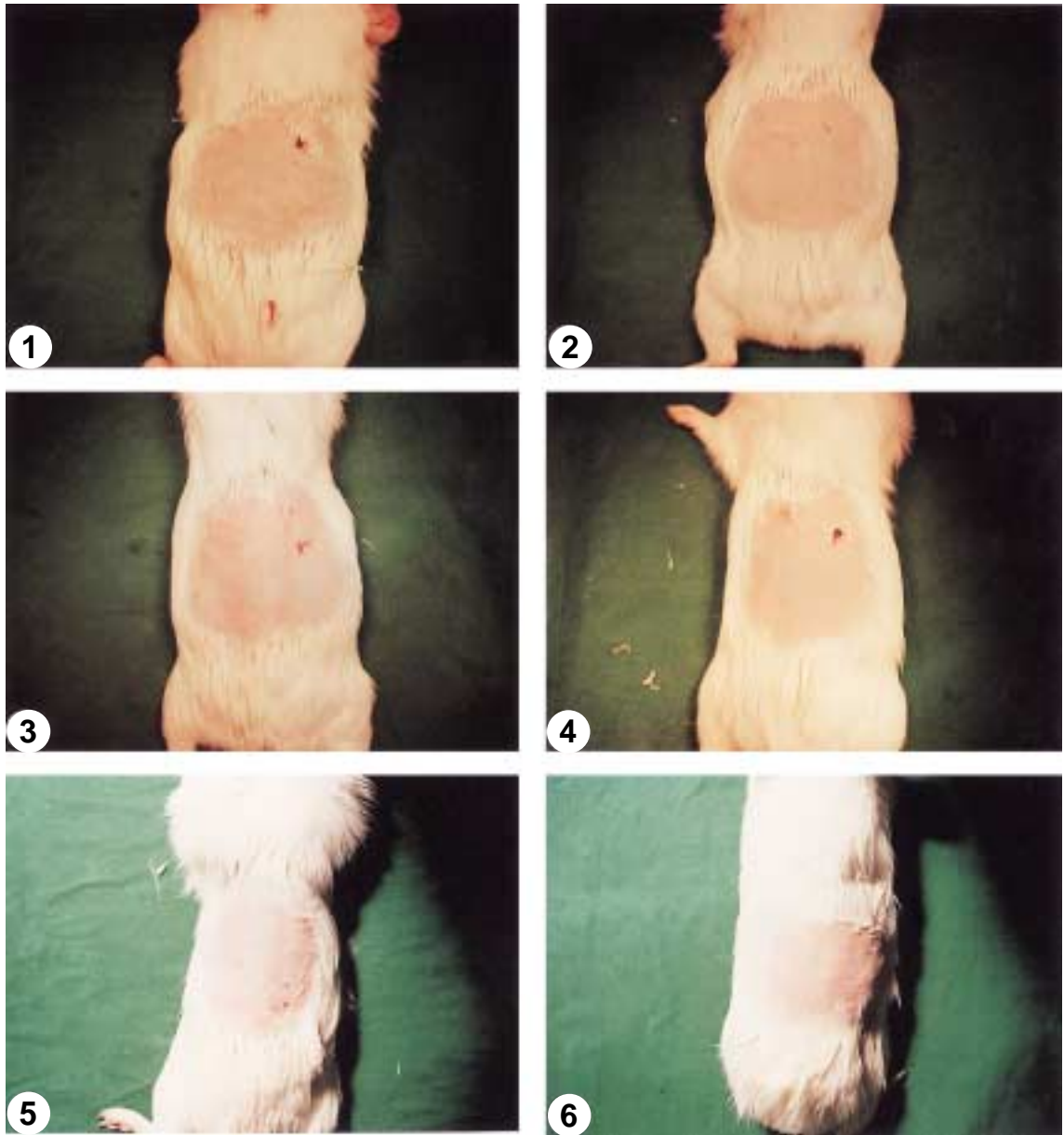
## 참 고 문 헌

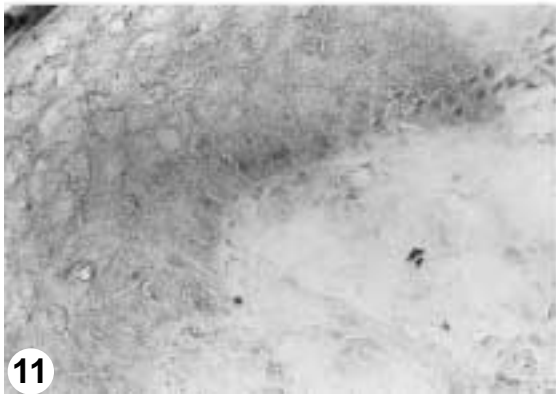
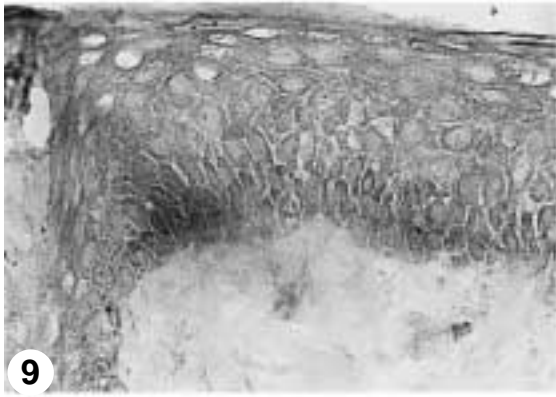
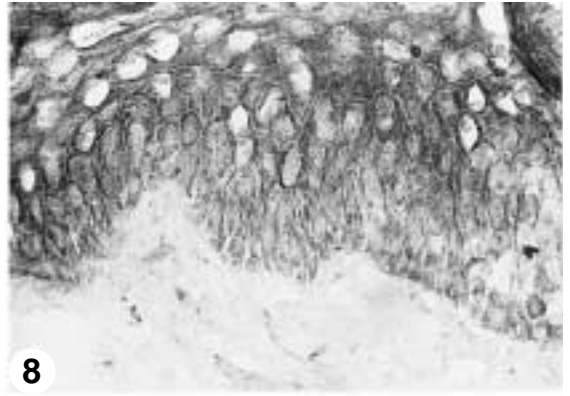
- Akiu S, Suzaki I, Asahara T, Fujinuma Y, Fukuda M : Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis—biochemical studing using cultured B16 melanoma cells. Nippon Hifuka Gakkai Zasshi 101 : 609-613, 1991.
- Ando H, Itoh A, Mishima Y, Ichihashi M : Correlation between the number of melanosomes, tyrosinase mRNA levels, and tyrosinase activity in cultured murine melanoma cells in response to various melanogenesis regulatory agents. J Cell Physiol 163 : 608-614, 1995.
- Aroca P, Urabe K, Kobayashi T, Tsukamoto K, Hearing VJ : Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. J Biol Chem 268 : 25650-25655, 1993.
- Bolognia J, Murray M, Pawelek J : UVB-Induced melanogenesis may be mediated trough the MSH-receptor system. J Invest Dermatol 92 : 651-656, 1989.
- Fitzpatrick TB, Quervedo WC Jr., Szabo G, Seiji M : Biology of the melanin pigmentary system. In Dermatology in general medicine, Ed. New York, MacGraw Hill, pp 117, 1971.
- Fligiel SEG, Inman DR, Talwar HS, Fisher GJ, Voorhees JJ, Varani J : Modulation of growth in normal and malignant melanocytic cells by all-trans retinoic acid. J Cutan Pathol 19 : 27-33, 1992.
- Fuller BB, Spaulding DT, Smith DR : Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and Caucasian human mellnocyte cell culture. Exp Cell Res 15 : 197-208, 2001.
- Gahl WA, Patterf B, Durham-Pierre D, Brilliant MH, Hearing VJ : Melanosomal tyrosine transport in normal and pink-eyed dilution murine melanocytes. Pigment Cell Res 8 : 229-233, 1995.
- Hashimoto A, Hasegawa K, Asai T, Masamoto Y, Ichihashi M, Mishima Y : Depigmenting potency of hydroquinone fatty acid esters on the skin. J Dermatol 15 : 37-43, 1988.
- Hearing VJ : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. J Investig Dermatol Symp Proc 4 : 24-28, 1999.
- Hearing VJ, Jimenez M : Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. Int J Biochem 19 : 1141-1147, 1987.
- Imokawa G, Kawai M, Mishima Y, Motegi I : Differential analysis of experimental hypermelanosis induced by UVB, PUVA, and allergic contact dermatitis using a brownish guinea pig model. Arch Dermatol Res 278 : 352-362, 1986.
- Jimbow K, Obata H, Pathak M, Fitzpatrick TB : Mechanism of depigmentation by hydroquinone. J Invest Dermatol 62 : 436-449, 1974.
- Jin YH, Lee SJ, Chung MH, Park JH, Park YI, Cho TH, Lee SK : Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. Arch Pharm Res 22 : 232-236, 1999.
- Kameyama K, Jimenz M, Muller J, Ishida Y, Hearing VJ : Regulation of mammalian melanogenesis by tyrosinase

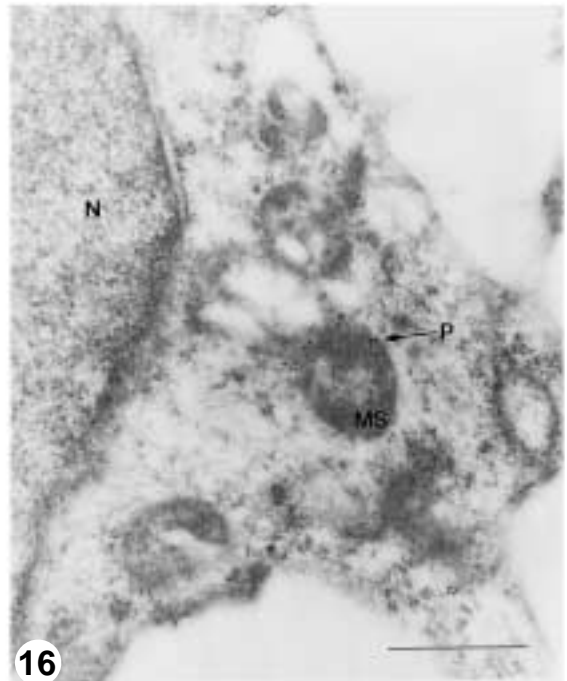
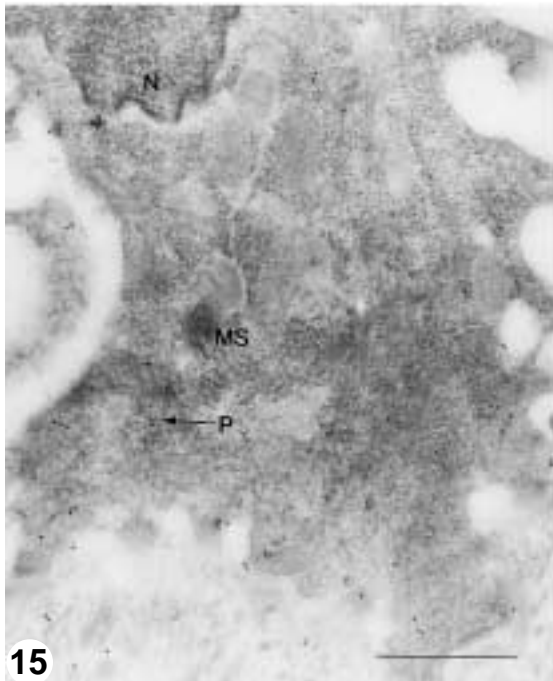
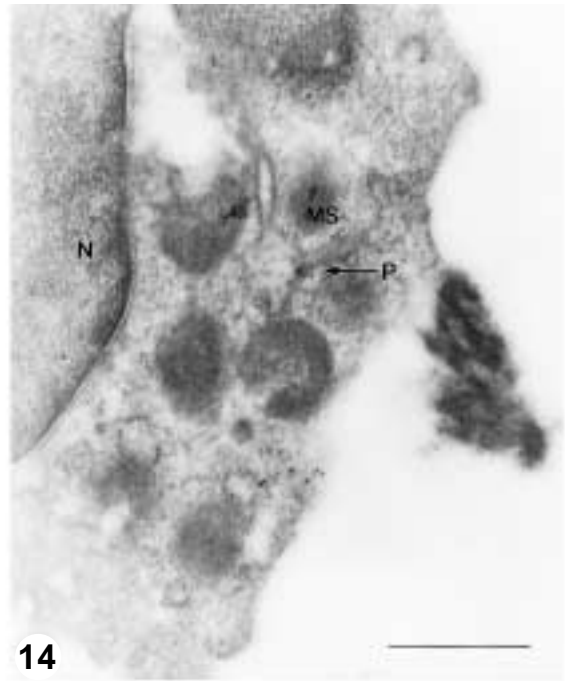
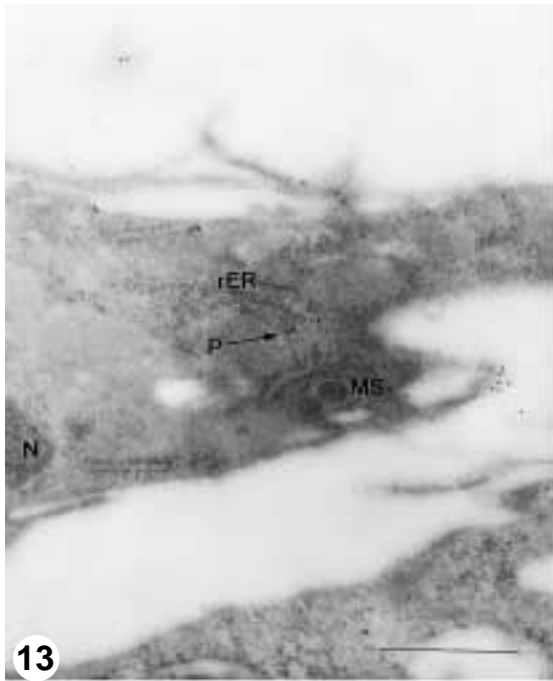
- inhibition. *Differentiation* 42 : 28-36, 1989.
- Maeda K, Fukuda M : Arbutin mechanism of rats depigmenting. *Pharmacol Exp Ther* 276 : 765-769, 1996.
- Potterf SB, Hearing VJ : Tyrosine transport into melanosomes in increased following stimulation of melanocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 248 : 795-800, 1998.
- Riley PA : Melanin. *Int J Biochem Cell Biol* 29 : 1235-1239, 1997.
- Seiberg M : Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res* 14 : 236-242, 2001.
- Seiji M, Fitzpatrick TB, Birbeck MSC : The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis. *J Invest Derm* 36 : 243, 1961.
- Topal BM, Haimes HB, Dubertret L, Bell E : Transfer of melanosomes in a skin equivalent model in vitro. *J Invest Dermatol* 87 : 642-647, 1986.
- Tripathi RK, Hearing VJ, Urabe K, Aroca P, Spritz RA : Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J Biol Chem* 267 : 23707-23712, 1992.
- Yamamoto O, Bhawan J : Three modes of melanosome transfers in Caucasian facial skin: hypothesis based on an ultrastructural study. *Pigment Cell Res* 7 : 158-169, 1994.

## Legends for Figures

- Figs. 1-6.** Colors of the back skins in control guinea pigs (Fig. 1), in vehicle group guinea pigs (Fig. 2), 0.1% arbutin treated guinea pigs (Fig. 3); in guinea pig at 3 weeks after application of 0.01% melanoston (Fig. 4), 0.01% melanoston (Fig. 5) and 0.5% melanoston (Fig. 6).
- Figs. 7-12.** Tyrosinase activities on epidermis of control guinea pig (Fig. 7), vehicle group (Fig. 8), 0.1% arbutin treated guinea pigs (Fig. 9); 0.01% melanoston treated guinea pig group (Fig. 10), 0.1% melanoston treated guinea pig group (Fig. 11) and 0.5% melanoston treated guinea pig group (Fig. 12).
- Figs. 13-16.** Electron photomicrographs of melanocytes in epidermis of control guinea pig (Fig. 13), vehicle group (Fig. 14), 0.1% arbutin group (Fig. 15) and 0.1% melanoston group (Fig. 16). N: nucleus, P: gold particles, MS: melanosome, rER: endoplasmic reticulum, bars: 1 micrometer







**Abstract**

## **Immunohistochemical and Electron Microscopic Study on the Depigmentation Effect of Melanoston**

Ho-Sam Chung, Chul Oh<sup>1</sup>, Byung-Chan Kang<sup>1</sup>, Ho-Kwon Jung<sup>1</sup>

*Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University,*

*<sup>1</sup>Chamzone Biomaterial Institute*

The present study was designed to address whether melanoston which was extracted from yeast was able to induce depigmentation of the skin in guinea pigs. The activity of tyrosinase which participates in the synthesis of melanin pigment residing in melanocytes of guinea pig's epidermis was assessed using immunohistochemical staining methods with anti-tyrosinase antibody. To determine whether melanoston affects the processes of melanin synthesis in melanosome of melanocytes, melanoston-applied skin was examined by electron microscopy following immunogold tagging methods. We obtained results as follows:

1. The activity of tyrosinase was the lowest 3 weeks after application of 0.1 and 0.01% melanoston on the skin of guinea pigs.
2. The frequency of immunogold particles distributed in melanocytes and keratinocytes was lowest 3-4 weeks after application of 0.5 and 0.1% melanoston.

Thus, these results suggest that melanoston has a potential to inhibit synthesis and distribution of melanin in the epidermis.

**Key words** : Melanoston, Melanocyte, Melanin, Tyrosinase, Keratinocyte