

Kojic acid와 Pentadecenoic acid가 자외선 B 조사후 시험관 및 생체내의 색소계에 미치는 영향

고신대학교 의학부 피부과학교실
엄상철, 김상태

The effect of kojic acid and pentadecenoic acid on the in vitro and in vivo pigmentary system after Ultraviolet-B (UVB) irradiation

Sang Cheul Eom, Sang Tae Kim

*Department of Dermatology
Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea*

= Abstract =

It has been well known that exposure to ultraviolet-B(UVB) light elicits increased pigmentation in the skin. The model has been widely adapted to assess the potential of chemicals as compounds with skin-depigmenting effects. We observed the pigment inhibitory effect of kojic acid(KA) and pentadecenoic acid(PDA) on the cultured human melanocytes and C57BL mice skin after UVB irradiation.

Cultured human melanocytes were irradiated with 30mJ/cm² of UVB once, then KA and PDA were administered for 3 or 5 days. C57BL black mice were irradiated with 100mJ/cm² of UVB daily for 10 days, and then KA and PDA were topically applied daily for 1, 3, 5 or 7 weeks. For demonstration of the effect of both drugs, we observed numeric and morphologic changes and measured melanin contents of cultured normal human melanocytes. Also we examined the effect of the chemicals on split-DOPA stained epidermal melanocytes of C57BL mice.

The results were as follows :

1. After UVB-irradiation, cell number and melanin content decreased initially, but melanin content increased after 5 days in cultured human melanocytes.
2. In cultured human melanocytes, the KA 10⁻³M group showed decreased number of melanocyte, but KA 10⁻⁵M or PDA groups showed no change.

In all experimental groups, melanin content decreased, compared to control group.

3. After UVB-irradiation, the number of cultured human melanocytes decreased in groups treated with KA 10^{-3} M for 3 and 5 days, KA 10^{-5} M for 3 days and PDA 10^{-3} M for 5 days compared to UVB control group.
4. In C57BL mice, the KA group showed decreased number of melanocytes compared to control group. The PDA group showed no change. After UVB-irradiation, both KA and PDA groups showed decreased number of melanocytes compared to UVB control group.

In the present study, it was found that KA and PDA had suppressive effects on melanization of melanocytes in vitro and in vivo, suggesting KA and PDA might be candidates as compounds that control hyperpigmentary disorders.

Key words : Kojic acid, Pentadecenoic acid, UVB

서 론

인간과 포유동물의 피부 및 모발의 색조를 나타내는데 멜라닌 세포에서 합성되는 멜라닌 색소가 가장 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 멜라닌 세포에서 합성되는 멜라닌 색소는 멜라노솜 내에서 tyrosine을 DOPA와 dopaquinone으로 전환시키는 tyrosinase의 작용에 의해 형성되며 멜라닌 세포내의 멜라노솜의 발달 정도와 이러한 멜라닌 색소의 합성능의 차이로 인종에 따른 피부색의 차이가 결정되는 것으로 알려져 있다^{6, 14, 17, 31, 37)}. 멜라닌 색소의 합성을 조절하는 정확한 기전은 아직 확실치 않는데, 유전적 요인 이외에 자외선이나 호르몬과 같은 여러 물리적, 화학적, 생리적 요인이 멜라닌 합성을 조절한다고 알려져 있다³⁸⁾.

자외선이나 α -MSH 등은 멜라닌 합성을 증가시킨다고 알려져 있으며³⁴⁾, Kim 등¹⁸⁾은 Ultraviolet-B(UVB), Ultraviolet-A(UVA), PUVA(psoralen-UVA)가 주로 포유동물의 피부에만 영향을 주어 육안적 및 조직학적 색소침착을 증가시키는 반면 melanotropin은 주로 모발에 주로 영향을 미쳐 육안적 및 조직학적 색소침착을 증가시키는 것을 관찰한 바 있다. 한편 멜라닌 세포의 증식을 감소시키고 멜라닌 합성을 억제하는 화합물

로는 hydroquinone, monobenzylether of hydroquinone과 같은 catechol과 phenol화합물이 알려져 있으며 vitamin A 유도체인 trans-retinoic acid와 포화 dicarboxylic acid인 azelaic acid 등도 멜라닌 세포의 증식과 멜라닌 합성을 억제할 가능성이 제시되고 있다^{4, 16, 19, 21, 27, 32)}.

최근 멜라닌 색소에 대한 연구와 세포 배양 기법의 진보로, kojic acid(KA)와 pentadecenoic acid(PDA)의 두가지 화합물이 멜라닌 색소 형성을 억제하는 효과가 있을 가능성이 추정되고 있는데, KA는 구리 이온과 결합하여 tyrosinase의 활성을 억제함으로써 색소형성을 저하시킨다고 생각되는 제제이다. KA와 PDA를 배양된 B-16 악성흑색종 세포에 투여하여 tyrosinase 활성도와 세포수의 변화를 관찰한 연구가 있었으나²⁴⁾ 배양된 정상 인체 멜라닌 세포에서 이들 약물이 미치는 영향과 ultraviolet-B(UVB) 조사시의 색소형성에 미치는 효과는 아직 연구되어진 바 없다. 생체 실험으로 KA크림을 UVB 조사 후 인체 피부에 도포하여 색소 침착의 억제 정도를 육안적으로 관찰한 연구가 있었으나²⁴⁾ 배양된 정상 인체 멜라닌 세포의 세포 수와 형태학적 변화를 관찰한 연구는 없는 실정이다.

이에 저자는 배양된 정상 인체 멜라닌

세포에 KA와 PDA를 투여하고 세포의 수적, 형태학적 변화를 관찰하고 멜라닌 양을 측정하여 이들 약물이 멜라닌 색소의 형성을 억제하는 효과가 있는 지를 알아보고, C57BL 흑색마우스에서는 L-DOPA염색을 시행하여 멜라닌 세포의 수적, 형태학적 변화를 관찰함으로써 이들 약물의 색소 형성 억제 효과를 알아보려고 하였으며 각각 UVB 조사에 의한 색소 변화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

(1) 연구대상

- 1) 배양된 정상 인체 멜라닌 세포
- 2) C57BL mouse : 체중이 25~30gm인 성숙된 C57BL mouse 200마리

(2) 광원

290~320nm의 파장을 주로 방출하는 Philips TL 20W/12UVB lamp²를 사용하였다.

(3) Melanocyte growth medium(이하 M-GM)

멜라닌 세포의 배양에 사용할 배양액은 M-TIC 배양액을 이용하였다. 즉 Hmas F-10 배지를 기본 배양액으로 하여 여기에 8% fetal calf serum, 100 IU/ml~100µg/ml의 penicillin-streptomycin, 30ng/ml의 TPA, 0.2mM/ml IBMX, 10nM의 cholera toxin, 2% Bovine pituitary extract, 2% placental extract를 첨가하여 제조하였으며 멜라닌 세포 배양액으로 사용하였다.

(4) Kojic acid와 Pentadecenoic Acid

배양된 멜라닌 세포에서는 KA와 PDA를 M-GM에 각각 10^{-3} M 및 10^{-5} M 농도로 희석하여 투여하였고, C57BL mouse에서 KA는 1%, 0.1%로 PDA는 5%, 0.5% 농도가 되도록 20% propylene glycol용액에 용해하여 도포하였다.

2. 방법

(1) 멜라닌 세포의 배양

신생아 포피조직으로부터 분리된 단일 포피세포를 M-GM에 부유시켜 세포배양 용기에 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 개의 세포농도가 되도록 조정하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. 초대배양시에는 섬유아세포의 증식을 억제하기 위하여 M-GM에 100µg/ml의 geneticin을 첨가하여 3~5일간 배양하여 멜라닌 세포를 순수 배양하였다.

(2) UVB 조사 및 KA와 PDA 투여

1) 배양된 정상 인체 멜라닌 세포(in vitro)

- ① 순수배양된 세포를 6 well tissue culture microplate의 각 well당 5×10^4 개씩 넣고 M-GM에서 4일간 배양한 후 실험군에 따라 KA나 PDA를 10^{-3} M 및 10^{-5} M 농도가 되도록 배양액에 3일 또는 5일간 첨가하였다.
- ② UVB 조사는 PBS로 세척한 후 30mJ/cm²의 UVB를 한번 조사하였고 UVB 조사 3일 후 및 5일 후에 멜라닌 세포의 수 및 형태학적 변화, 멜라닌 양을 측정하였다.

2) C57BL mouse(in vivo)

- ① 양쪽 귀 배부의 털을 calcium thioglycolate(L-REMO²)로 제거한 후 매일 한번씩 UVB를 100mJ/cm²로 10일간 조사하였다.
- ② KA와 PDA를 20% propylene glycol의 희석하여 각각 0.1%와 1.0%, 0.5%와 5.0% 농도로 양쪽 귀배부에 하루에 한번씩 7주간 도포하여 약물도포 1주, 3주, 5주 및 7주 후에 split-DOPA 염색하여 멜라닌 세포의 수와 형태학적 변화를 관찰하였다.

(3) 멜라닌 세포의 수와 형태학적 변화 측정

1) In vitro(배양된 정상 인체 멜라닌 세포)

멜라닌 세포의 수는 세포를 분리하여 혈구계산판 상에서 측정하였고 멜라닌 세포의 형태학적 변화는 inverted microscope 상에

서 관찰하였다.

2) In vivo(C57BL mouse)

DOPA 염색을 위해 약물도포 1주, 3주, 5주 및 7주에 각 군당 5마리씩 양쪽 귀를 절단하여 2N의 NaBr 용액에 2시간동안 반응시킨 후 진피로부터 표피를 분리하여 0.1% levo-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA) 용액에 37°C에서 2시간, 용액을 새로 교환 후 4°C에서 12시간동안 반응시키고 10% formalin에 고정하여 50%, 70%, 100% alcohol로 탈수시키고 xylene으로 슬라이드에 봉입하여 광학현미경으로 표피내 멜라닌 세포 수를 측정하고 형태학적 변화를 관찰하였다.

(4) Melanin assay

1) 세포수를 측정하여 남은 세포 침전물에 1N NoOH 용액 1ml를 가하여 37°C에서 48시간동안 반응시켜 멜라닌 세포 내의 멜라닌을 유리시켰다.

2) UV-Vis spectrophotometer의 파장 400nm에 흡광도를 측정한 후 순수한 멜라닌을 사용하여 작성된 표준 직선과 비교하여

멜라닌 양을 산출하였다.

(5) 통계처리

실험수치는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었고, 각 군에 대한 유의성은 SPSS/PC⁺ program을 이용하여 Wilcoxon rank sum test로 검정하였다.

결 과

KA, PDA가 배양된 인체 멜라닌 세포의 수와 형태학적 변화에 미치는 영향

멜라닌 세포 수는 정상대조군에서 3일과 5일 후에 각각 $4.1 \pm 0.5 (\times 10^5 \text{ cells/well})$, $4.7 \pm 0.7 (\times 10^5 \text{ cells/well})$ 이었고 KA 10^{-3} M 군은 3일과 5일 후에 각각 $3.3 \pm 0.3 (\times 10^5 \text{ cells/well})$, $4.0 \pm 0.4 (\times 10^5 \text{ cells/well})$, 로 유의하게 감소되었으며($P < 0.05$), KA 10^{-5} M 군은 5일 후에 $4.2 \pm 0.5 (\times 10^5 \text{ cells/well})$ 로 감소되었으나($P < 0.05$), PDA군(10^{-3} M , 10^{-5} M)은 모두 대조군과 유의한 차이가 없었다($P > 0.05$) (Table. 1, Fig. 1).

UVB 조사시 멜라닌 세포수는 KA 10^{-3} M

Table. 1 The effect of kojic acid(KA) and pentadecenoic acid(PDA) on the number of cultured normal human melanocytes

Treatment	Number of cells($\times 10^5 \text{ cells/well}$)	
	3일	5일
Control	4.1 ± 0.5	4.7 ± 0.7
KA 10^{-3} M	$3.3 \pm 0.3^*$	$4.0 \pm 0.4^*$
KA 10^{-5} M	3.7 ± 0.8	$4.2 \pm 0.5^*$
PDA 10^{-3} M	$3.9 \pm 0.6^*$	4.5 ± 0.5
PDA 10^{-5} M	$3.8 \pm 0.8^*$	4.5 ± 0.9
.....		
UVB Control	2.8 ± 0.6	3.3 ± 0.4
UVB + KA 10^{-3} M	$2.2 \pm 0.4^*$	$2.4 \pm 0.5^*$
UVB + KA 10^{-5} M	$2.4 \pm 0.5^*$	2.9 ± 0.7
UVB + PDA 10^{-3} M	2.6 ± 0.5	$2.8 \pm 0.3^*$
UVB + PDA 10^{-5} M	2.5 ± 0.5	3.4 ± 0.6

Values are mean($\times 10^5 \text{ cells/well}$) $\pm$ SD. * $P < 0.05$ vs. control

No. of cells ($\times 10^5$ /well)

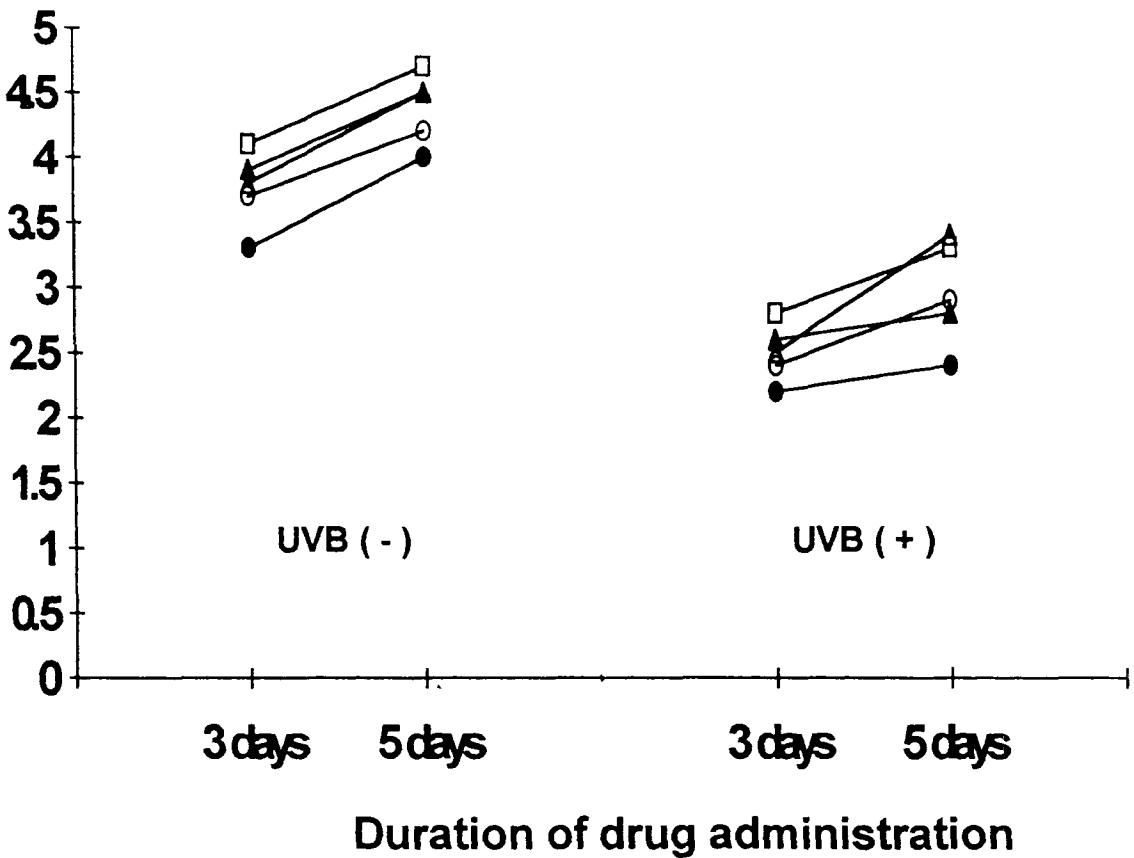


Fig. 1 The effect of kojic acid(KA) & pentadecenoic acid(PDA) on the number of cultured normal human melanocytes.

(control : $\square - \square$, KA $10^{-3}M$: $\bullet - \bullet$, KA $10^{-5}M$: $\circ - \circ$, PDA $10^{-3}M$: $\blacktriangle - \blacktriangle$, PDA $10^{-5}M$: $\triangle - \triangle$)

군에서 3일과 5일 후에 각각 $2.4 \pm 0.4 (\times 10^5 \text{ cells/well})$, $2.9 \pm 0.5 (\times 10^5 \text{ cells/well})$ 로 UVB 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며 ($P < 0.05$), KA $10^{-5}M$ 군은 3일 후에 $2.4 \pm 0.5 (\times 10^5 \text{ cells/well})$ 로, PDA $10^{-3}M$ 군은 5일 후에 $2.8 \pm 0.3 (\times 10^5 \text{ cells/well})$ 로 각각 UVB대조군에 비해 유의하게 감소되었으나 ($P < 0.05$) 다른 실험군은 UVB대조군과 차이가 없었다(Table 1, Fig 1). UVB대조군은 정상대조군에 비해 멜라닌 세포의 크기가 커지고 수지상 돌기의 발달이 저하되었으나

UVB대조군과 약물 투여군 사이에 세포의 형태학적인 차이는 거의 관찰할 수 없었다 (Fig. 2).

KA, PDA가 배양된 정상 인체 멜라닌 세포의 멜라닌 양에 미치는 영향

멜라닌 양은 정상대조군에서 3일과 5일 후에 각각 $0.028 \pm 0.004 (\text{ng/cell})$, $0.027 \pm 0.005 (\text{ng/cell})$ 이었고 KA $10^{-3}M$ 군은 3일과 5일 후에 각각 0.024 ± 0.003 , 0.023 ± 0.004 로 유의하게 감소되었으며 ($P < 0.01$, P

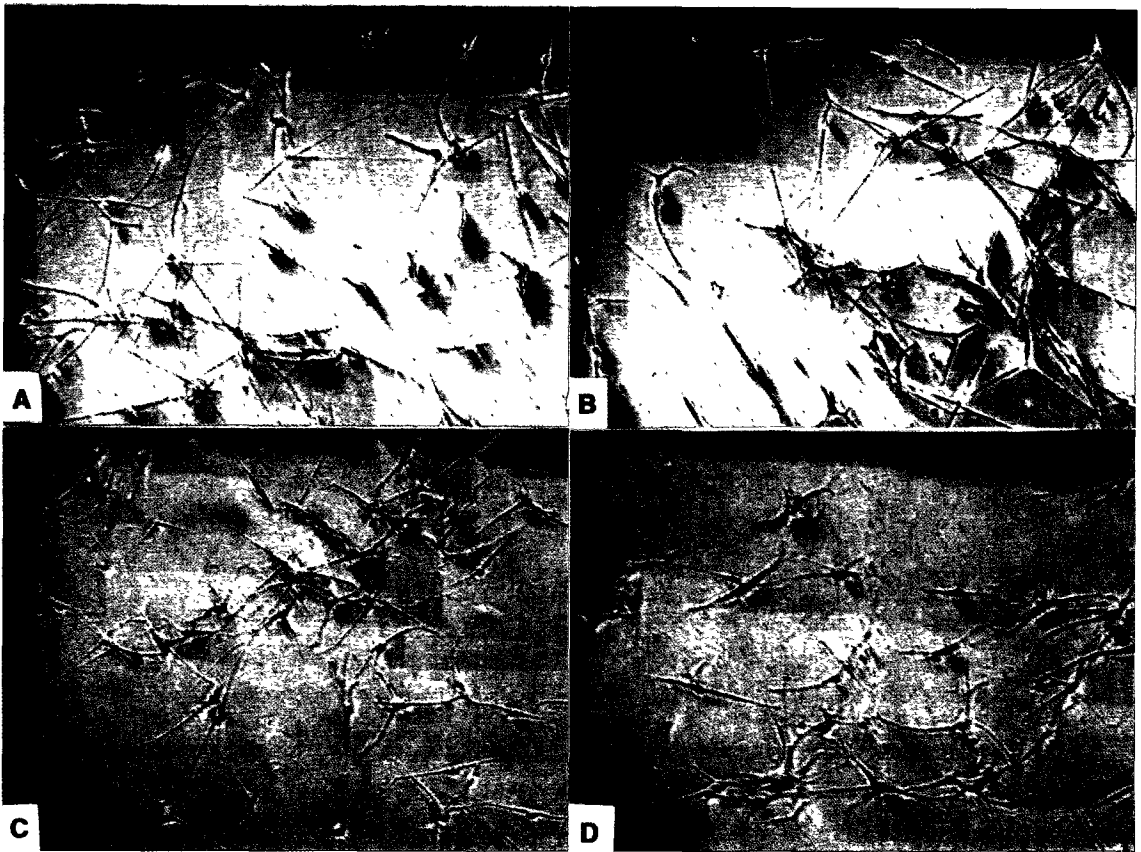


Fig. 2 Photographs of cultured normal human melanocytes after administration of 10^{-3}M KA for 3 days in UVB-irradiated or non-irradiated groups. The KA administered group that did not receive UVB-irradiation showed decreased number of melanocytes and no difference in morphology was observed. Upon UVB-irradiation, cells enlarged and proliferation of dendrites was reduced. But after KA was administered after UVB-irradiation, when comparing with the case in which just UVB-irradiation was, cell number was decreased and no difference in morphology was observed. A) non-irradiated normal melanocytes B) melanocytes after administration of 10^{-3}M KA C) UVB-irradiated melanocytes D) melanocytes after administration of 10^{-3}M KA followed by UVB radiation

<0.05), KA 10^{-5}M 군과 PDA 10^{-3}M 군은 3일 후에 각각 0.024 ± 0.004 , 0.025 ± 0.004 로, PDA 10^{-5}M 군은 5일 후에 0.025 ± 0.003 으로 각각 대조군에 비해 유의하게 감소되었다($P < 0.05$). (Table 2, Fig 3)

UVB 조사시 멜라닌 양은 KA 10^{-3}M 군이

3일과 5일 후에 각각 $0.023 \pm 0.006(\text{ng/cell})$, $0.024 \pm 0.003(\text{ng/cell})$ 으로 UVB대조군에 비해 감소하였으며($P < 0.01$) KA 10^{-5}M 군은 5일 후에 $0.025 \pm 0.006(\text{ng/cell})$ 로, PDA 10^{-3}M 군은 5일 후에 $0.027 \pm 0.004(\text{ng/cell})$ 로, PDA 10^{-5}M 군은 3일 후에 0.

Table. 2 The effect of kojic acid(KA) and pentadecenoic acid(PDA) on melanization of cultured normal human melanocytes

Treatment	melanin contents (ng/cell)	
	3일	5일
Control	0.028±0.004	0.027±0.005
KA 10 ⁻³ M	0.024±0.003**	0.023±0.004*
KA 10 ⁻⁵ M	0.024±0.004*	0.026±0.006
PDA 10 ⁻³ M	0.025±0.004*	0.025±0.007
PDA 10 ⁻⁵ M	0.026±0.008	0.025±0.003*
UVB Control	0.026±0.007	0.031±0.005
UVB + KA 10 ⁻³ M	0.023±0.006**	0.024±0.003**
UVB + KA 10 ⁻⁵ M	0.026±0.004	0.025±0.006*
UVB + PDA 10 ⁻³ M	0.025±0.008	0.027±0.004*
UVB + PDA 10 ⁻⁵ M	0.024±0.006*	0.027±0.006

Values are mean(ng/cell)±SD. *P<0.05, **P<0.01 vs. control.

Melanin content (ng/cell)

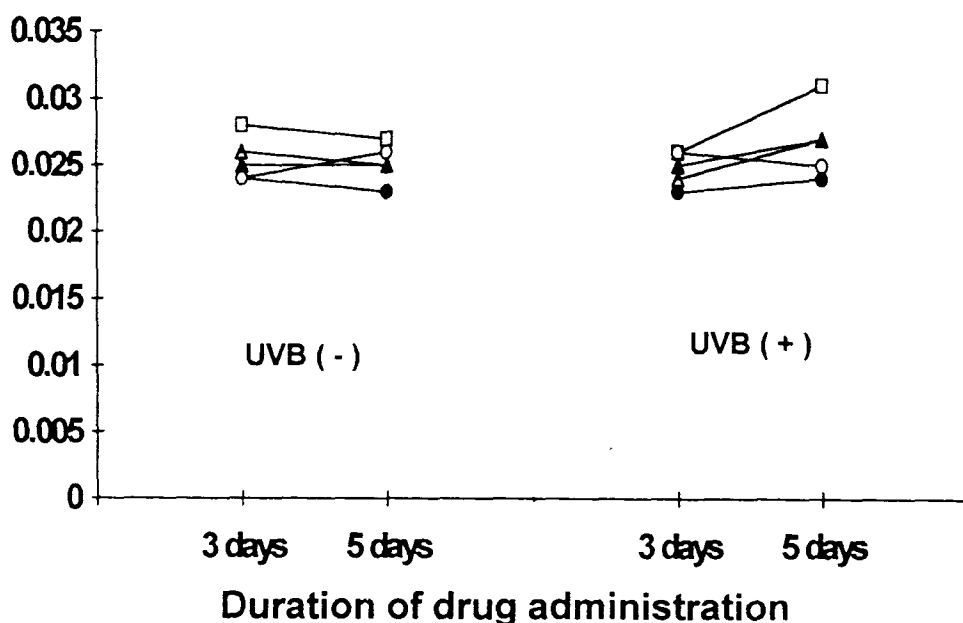


Fig. 3 The effect of kojic acid(KA) & pentadecenoic acid(PDA) on melanization of cultured normal human melanocytes.

(control : □ - □, KA 10⁻³M : ● - ●, KA 10⁻⁵M : ○ - ○, PDA 10⁻³M : ▲ - ▲, PDA 10⁻⁵M : △ - △)

024±0.006(ng/cell)로 각각 UVB 대조군에 비해 멜라닌 양이 유의하게 감소하였다(P<0.05). (Table. 2, Fig. 3).

KA, PDA가 C58BL mouse의 멜라닌 세포수와 형태학적 변화에 미치는 영향

L-DOPA 양성 멜라닌 세포수는 정상대조군에서 약물 도포 3주, 5주, 7주에 각각 82±13/mm², 83±15/mm², 85±16/mm²이었는데 KA 1%군은 3주, 5주, 7주 후에 각각 62±9/mm², 52±10/mm², 40±12/mm²로 정상대조군에 비해 유의한 감소를 보였으며(P<0.05, P<0.05, P<0.01), KA 0.1%군은 5주와 7주 후에 각각 63±14/mm², 52±10/mm²로 정상대조군에 비해 유의한 감소를 보였다(P<0.05). PDA 5%군은 7주 후에 63±9/mm²로 정상대조군의 85±16/mm²에 비해 유의한 감소를 보였으며(P<0.05), PDA 0.5%군은 정상대조군에 비해 유의한 차이가

없었다(Table. 3, Fig. 4).

UVB 조사시 L-DOPA 양성인 세포 수는 UVB대조군에서 UVB 조사 1주, 3주, 5주, 7주 후에 274±54/mm², 290±63/mm², 280±46/mm², 292±49/mm²로 모두 정상대조군에 비해 유의하게 증가되었으며(P<0.01), KA 1%군은 약물도포 5주, 7주 후에 각각 220±42/mm², 142±38/mm²로 UVB대조군에 비해 유의한 감소를 보였으며(P<0.05, P<0.01), KA 0.1%군과 PDA 5%군은 7주후에 각각 220±40/mm², 224±51/mm²로 UVB대조군에 비해 유의한 감소를 보였고(P<0.05), PDA 0.5%군은 UVB대조군과 유의한 차이가 없었으며(P>0.05) (Table. 3, Fig. 4) 형태학적 변화는 KA 1%군에서는 세포의 부종을 보였으나 다른 실험군에서는 대조군과의 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 5).

Table. 3 The number of DOPA-positive melanocytes in control and experimental groups.

Treatment	Week 1	3	5	7
Control	84±15	82±13	83±15	85±16
KA 1.0%	76±10	62±9*	52±10*	40±12**
KA 0.1%	80±13	75±12	63±14*	52±10*
PDA 5.0%	80±13	77±16	72±10	63±9*
PDA 0.5%	82±15	78±12	80±14	76±11
UVB Control	274±54	290±63	280±46	292±49
UVB + KA 1.0%	259±48	253±61	220±42*	142±38**
UVB + KA 0.1%	266±43	252±32	261±44	220±40*
UVB + PDA 5.0%	263±54	259±46	243±40	224±51*
UVB + PDA 0.5%	271±45	272±52	263±44	256±41

Values are mean(No./mm²)±SD. *P<0.05, **P<0.01 vs. control.

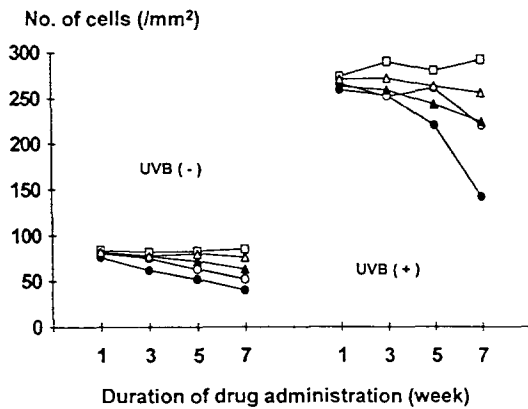


Fig. 4 The effect of kojic acid(KA) & pentadecenoic acid(PDA) on the number of DOPA-positive melanocytes of C57BL mouse.

(control : □ - □, KA 1% : ● - ●, KA 0.1% : ○ - ○, PDA 5% : ▲ - ▲, PDA 0.5% : △ - △)

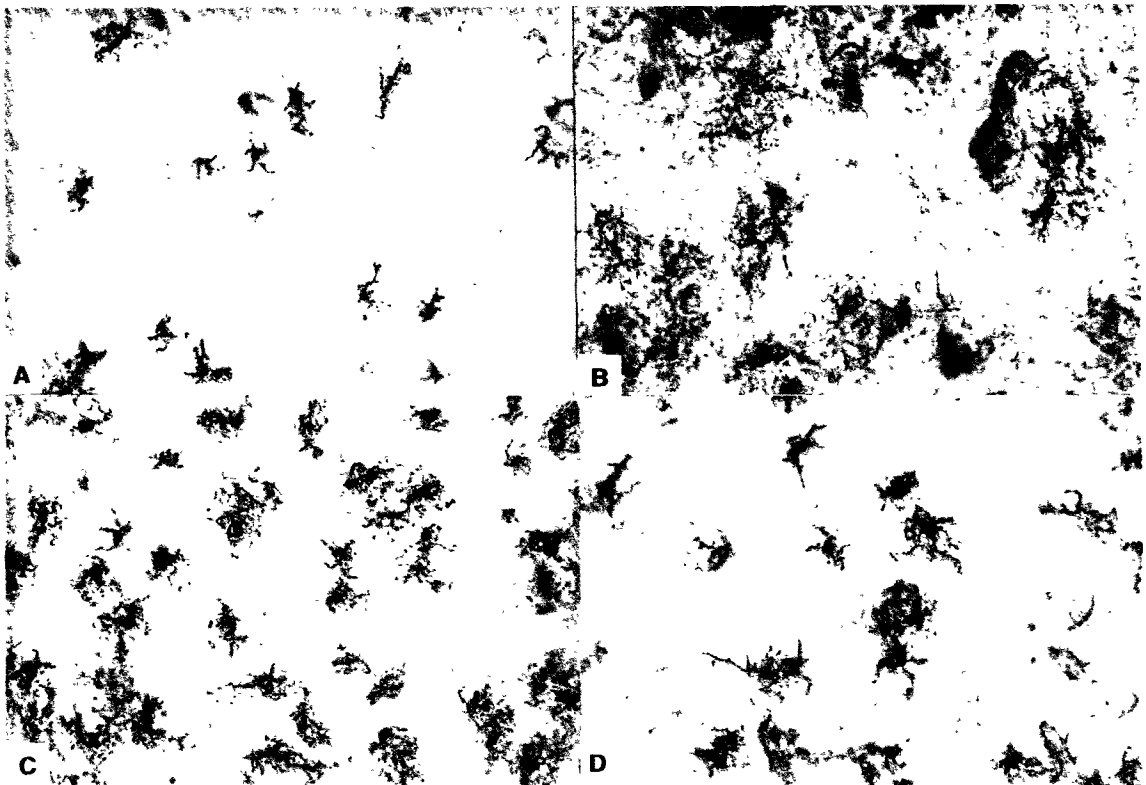


Fig. 5 Photographs of cultured DOPA-stained epidermal melanocytes of C57BL mice after application of 1% KA daily for 7 weeks UVB-irradiated or non-irradiated groups. In the group where KA was applied but no UVB-irradiation was done, a decrease in cell number and no morphological difference was observed. During UVB-irradiation the cells enlarged and dendritic proliferation was reduced and when 1% KA was applied after UVB-irradiation, in comparison to the group that received UVB-irradiation alone, cell number was decreased and cell edema was observed. A) non-irradiated normal melanocytes B) melanocytes after administration of 1% KA C) melanocytes after UVB-irradiation D) melanocytes after administration of 1% KA followed by UVB radiation

고 찰

멜라닌 세포 내에서 합성된 멜라닌이 멜라닌 세포의 수지상 돌기를 통해 각질형성 세포로 이동하여 정상적인 피부 색조를 나타나게 되며 인체에 유해한 자외선을 차단하는 광보호작용을 나타나게 된다. 이러한 멜라닌 세포와 각질형성 세포 사이의 구조적, 기능적인 관계를 epidermal-melanin unit라 하는데, 멜라닌 세포 하나가 약 20~36개의 각질형성 세포와 접하여 멜라닌을 전달하게 되며, 각질형성 세포로 이동한 멜라닌은 결국 표피의 탈락과 함께 소실되게 된다^{28, 37)}. 자외선이 피부에 조사되면 피부 색소 변화로 즉시색소침착(immediate tanning)과 지연색소침착(delayed tanning)이 야기된다. 그러나 UVB에 의해 발생하는 즉시색소침착은 실제적인 멜라닌 합성 증가에 의한 것은 아니며 멜라닌 세포에서 각질형성 세포로 멜라노솜의 급속한 이동이 일어나고 각질형성 세포내에서 멜라노솜의 급속한 재 분포가 일어나 생긴다. 지연색소침착은 UVB와 UVA 모두에 의해 생길 수 있으나 UVA보다 UVB가 더욱 효과적으로 발생케 한다. 지연색소침착은 멜라닌 세포의 증식의 결과와 원래 남아 있던 멜라닌 세포의 활성화의 결과 기능적인 멜라닌 세포의 수가 증가되고, 멜라닌 세포의 비후 및 수지상 돌기의 발달이 현저해지며, 멜라닌 합성이 증가되고, 멜라닌 세포에서 각질형성 세포로 멜라노솜의 이동이 증가되고 멜라노솜 복합체의 크기가 증가되며, tyrosinase가 활성화되는 등의 과정에 의해 발생하게 되는데, 초기에는 멜라닌의 생성이 증가되고 후기에는 멜라닌을 생성하는 멜라닌 세포의 수가 증가된다고 생각되고 있다^{10, 13, 20, 26, 28, 36~38)} UVB조사에 의한 이러한 색소침착은 기미, 흑자와 같은 과색소성

질환의 병변과 유사하게 멜라닌 세포의 증식과 멜라닌 합성이 증가되어 있으므로 여러 탈색소제 및 색소형성 억제제의 효과를 간접적으로 판정하는데 이용되고 있다. 자외선에 의한 멜라닌 세포의 반응은 cAMP가 증가되어 일어난다고 설명하고 있으나⁷⁾ Friedmann 등⁹⁾은 cAMP의 증가 없이도 멜라닌화가 촉진됨을 주장하였다.

각질형성 세포가 정상 상태나 자외선 조사시와 같은 염증 상태에서 여러 cytokine을 생산하는 것으로 알려져 있는데, 이들 중 interleukin(IL)-1, IL-3, epidermal cell derived natural killer cell activating factor 등이 멜라닌 세포의 성장을 촉진시킨다고 보고하고 있으나²³⁾, Luca 등²²⁾은 cytokine에 의해서 멜라닌 세포가 영향을 받기보다는 각질형성 세포와 멜라닌 세포를 같이 배양할 때 두 세포간에 서로 상호작용이 일어나 멜라닌 세포의 성장과 분화를 촉진시킬 수 있다고 주장하면서 세포들 사이의 직접적인 접촉 그 자체가 멜라닌 세포의 성장 및 분화에 필수적이라고 보고하였으나 각질형성 세포에서 어떤 특수한 soluble growth factor를 분비할 가능성을 배제할 수 없다고 하였다. 또한 Gordon 등¹¹⁾은 각질형성 세포의 배양상청액이 멜라닌 세포를 배양시 증식을 자극하는 것을 관찰하였으며 김 등¹⁾은 배양된 인체 각질형성 세포에서 UVB 조사 후의 배양상청액이 멜라닌 세포의 증식과 멜라닌 합성을 자극하는 것을 관찰하였다.

자외선 조사후 생체의 멜라닌 세포에 미치는 영향으로 Rosdahl은³³⁾ 마우스에 UVB를 매일 0.1J/cm²씩 10일간 조사한 후 멜라닌 세포의 수가 조사 이전의 4배로 증가되고, UVB 조사 중단후 20주까지 조사 이전보다 증가한 상태가 유지된다고 보고하면

서 세포수가 증가하는 것은 세포분열이 증가하기 때문이라고 제시하였고 김 등²⁾은 UVB 조사 후 활동성 멜라닌 세포의 수가 증가되는 기전이 기존 DOPA 음성 멜라닌 세포들이 DOPA 양성 멜라닌 세포로 변화되는 것과 아울러 멜라닌 세포의 세포분열 모두에 기인됨을 확인하였다. 본 연구에서도 C57BL 흑색 생쥐에 UVB를 매일 0.1J/cm² 씩 10일간 조사한 후에 멜라닌 세포의 수가 조사 이전의 3~4배로 증가되고 수지상 돌기의 발달도 현저해지는 소견을 보였다.

배양된 정상 인체 멜라닌 세포에 UVB를 조사한 후 세포의 형태학적 변화와 멜라닌 양의 변화를 관찰한 본 연구에서는 UVB를 조사 후 멜라닌 세포의 크기는 커지나 수지상 돌기의 길이는 다소 감소되는 결과를 보였으며 멜라닌 양은 처음에는 일시적으로 감소되었으나 시간이 경과하면서 증가되는 양상을 보였다. 형태학적 변화와 멜라닌 양의 변화를 관찰한 다른 연구 결과를 살펴보면 이 등³⁾은 수지상 돌기의 수는 변화없고 길이는 짧아졌으며 끝이 무디어졌다고 하였고, Tomita 등³⁹⁾은 멜라닌 세포의 크기가 커지고 수지상 돌기의 길이가 다소 감소한다고 하였고, Siddiqui 등³⁶⁾은 수지상 돌기가 다소 감소한다고 하였으나 Friedmann 등⁸⁾은 수지상 돌기의 수는 물론 길이도 증가된다고 하였다. 멜라닌 양의 변화는 이 등³⁾에 의하면 20mJ/cm² 조사군에서 멜라닌 양이 대조군의 128%를 보였으나 통계학적으로 유의한 증가는 볼 수 없었고 50mJ/cm² 이상의 조사군에서는 멜라닌 양이 유의하게 감소되었으나 Friedmann 등⁸⁾은 260mJ/cm²을 6일 계속 조사하여 멜라닌 양이 대조군에 비해 2.6배 증가하였다고 보고하였다. 이와 같이 본 연구 결과와 유사하거나 다른 결과를 나타내는 것은 UVB 조사량과 UVB 조사

횟수의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 한편 자외선 조사시 생체 실험에서 멜라닌 세포의 증식이 증가되는 것과는 달리 시험관내 실험에서는 대부분 본 연구 결과와 마찬가지로 세포 수가 감소되고 멜라닌 세포의 증식이 둔화되는 소견을 보이는데 이는 자외선이 세포에 직접적 세포독성을 나타내지만 생체내에서는 자외선에 의해 각질형성 세포 등에서 분비되는 여러 물질의 영향으로 멜라닌 세포의 증식이 유도되거나 멜라닌 세포의 간세포(stem cell)를 자외선이 자극하기 때문일 것으로 추정된다.

표피 멜라닌 세포의 수용체를 활성화하는 호르몬을 통칭하여 melanotropin이라 하며 이 melanotropin중 멜라닌 세포 자극 호르몬(α -MSH)과 그 합성 유도체가 척추동물 표피의 색소침착을 조절하는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ α -MSH가 멜라닌 세포나 흑색종 세포에 존재하고 있는 특이적 세포막 수용체와 결합하여 adenylate cyclase의 작용을 증가시킴으로써 tyrosinase가 활성화된다고 추정되고 있으며 catecholamine, D- α -tocopheryl succinate, retinoic acid, prostaglandin, calcium 이온 길항제 등과 같은 여러 다른 호르몬이나 화학물질이 상호작용하여 이러한 작용을 증진시키거나 억제시킨다고 한다.^{5 10 34 41)} 또한 Kim 등¹⁸⁾은 합성 α -MSH 유도체와 UVB, UVA, PUVA와의 병합처치시 피부색소 증가에 상승적으로 작용하는 것을 관찰한 바 있다. 그 외 배양된 멜라닌 세포의 증식과 멜라닌 합성을 자극하는 인자로는 멜라닌 세포의 배양에 필요한 혈청과 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, cholera toxin 등과 같은 mitogen이 있으며, arachidonic acid와 그 대사산물, vitamin D₃와 같은 물질이 영향을 준다고 한다.^{15, 40)}

멜라닌 세포의 증식을 감소시키고 멜라닌

합성을 억제하는 화합물에 관한 연구로 Pathak 등²⁹⁾은 in vivo상 4-isopropylcatechol, 4-hydroxyanisole, hydroquinone, monobenzyloether of hydroquinone과 monoethylether of hydroquinone은 3% 농도에서 정상 멜라닌 세포의 증식을 억제하였으나 반면 azelaic acid는 20% 농도에서는 영향을 미치지 못하였으며, in vitro상에서도 $10^{-5} \sim 10^{-3}M$ 의 생리적 농도에서는 악성 흑색종 세포에 영향을 미치지 못하고 $10^{-3}M$ 이상의 고농도에서만 세포독성을 나타내는 것을 관찰하여, azelaic acid가 증식한 혹은 정상적인 멜라닌 세포에 아무런 선택적인 세포독성도 나타내지 않는다고 하였다. Orlow 등²⁷⁾은 trans-retinoic acid가 생쥐와 큰쥐(hamster)의 악성 흑색종 세포 배양에서 MSH, Cholera toxin, L-tyrosine에 의해 야기된 색소계의 유도에 강력한 억제제로 작용하는 것을 관찰한 바 있다.

KA와 PDA가 배양된 악성 흑색종 세포의 멜라닌 색소 형성을 저하시킨다는 사실과 인체 피부에서 색소형성의 억제 여부를 육안적으로 관찰한 연구 보고가 있으나²⁴⁾ 배양된 정상 인체 멜라닌 세포에 미치는 영향과 생체에서 멜라닌 세포의 수와 형태에 미치는 영향은 확실치 않으며 조사된 바 없어 저자는 이를 규명코자 본 연구를 시행하였다. 배양된 멜라닌 세포에서는 직접적 세포독성을 비교적 적게 일으키나 형태학적 변화와 멜라닌 양의 변화를 잘 관찰할 수 있고 C57BL 생쥐에서는 멜라닌 세포의 증식과 멜라닌 합성이 활발하여 KA와 PDA가 미치는 영향이 잘 관찰될 수 있을 것으로 생각되는 양의 UVB를 조사하였는 바 배양된 멜라닌 세포에는 $30mJ/cm^2$ 로 1회 조사하고 C57BL 생쥐에서는 $100mJ/cm^2$ 를 매일 1회씩 열흘간 조사하였으며 UVB 조사 후 KA와

PDA를 각각 투여하였다.

B-16 악성 흑색종 세포에 KA와 PDA를 투여한 Mishima²⁴⁾의 보고에 의하면 KA를 $2.5\mu M$ 농도로 투여시 tyrosinase는 감소되었으나 세포수의 감소는 보이지 않아 세포독성(cytotoxicity)은 없었다고 하였으며 PDA를 투여한 경우에도 비슷한 결과를 관찰하였다고 하였다. 본 연구에서는 배양된 정상 인체 멜라닌 세포에 KA를 $10^{-3}M$ 로 투여시 세포수와 멜라닌 양의 현저한 감소를 보인 반면 KA를 $10^{-5}M$ 농도로 투여시는 세포수의 감소는 거의 없었으나 멜라닌 양은 현저히 감소한 결과를 보였는데 이는 KA를 $10^{-3}M$ 로 투여시는 정상인체 멜라닌 세포에 KA가 세포독성을 야기시켰기 때문인 것으로 생각된다. UVB 조사 후 KA와 PDA를 투여시 세포수와 멜라닌 양의 변화는 UVB를 조사치 않은 경우와 비슷하여 KA를 $10^{-5}M$ 농도로 투여시와 PDA 투여시에는 세포독성이 거의 없이 UVB 조사에 의한 색소형성을 억제하였다. KA와 PDA를 투여한 후 멜라닌 양을 관찰한 연구가 없을 뿐 아니라 UVB 조사량을 달리 했을 때 멜라닌 양이 감소되거나 혹은 증가되었다는 보고만 있어²⁸⁾ 본 연구결과를 이전의 다른 연구와 비교하기는 곤란하였으나, 이상의 본 연구 결과는 KA와 PDA를 적절한 농도와 인체 피부에 도포시 색소형성을 억제할 수 있으나 KA를 과다한 농도로 도포시에는 세포독성을 초래할 가능성을 제시해 준다.

KA나 PDA를 실험동물이나 인체의 피부에 도포시의 다른 연구 결과를 보면 Mishima²⁴⁾는 KA를 45명의 지원자에게 1%의 농도로 UVB 조사 후 매일 한번씩 도포하여 3주만에 육안적 색소침착의 감소를 보였으나, hairless mice에서 UVB 조사로 인한 색소침착에 KA 4%를 도포하였는데 별로 효과가 좋지

않았다는 보고가 있다²⁵⁾. 본 연구에서는 C57 BL 생쥐에 KA를 0.1%와 1%의 농도로 도포하고 PDA는 0.5%와 5%의 농도로 도포하여 UVB 조사에 의한 색소침착 억제 여부를 멜라닌 세포를 L-DOPA 염색하여 관찰하였는데 KA 0.1% 군, KA 1% 군, PDA 5% 군이 대조군에 비해 멜라닌 세포의 감소를 보여 효과가 있었으나 PDA 0.5% 군은 유의한 감소를 보이지 않았다. UVB 대조군은 정상 대조군에 비해 멜라닌 세포 수의 증가를 보이고 수지상 돌기의 발달이 현저하였으며 UVB 조사 후 KA 1% 군은 세포 수의 현저한 감소와 함께 세포의 크기가 증가하였으나 KA 0.1% 군과 PDA 군에서는 대조군에 비해 세포 수의 감소는 관찰되었으나 형태학적 변화의 차이는 관찰할 수 없었다. UVB 조사 후 KA 1% 군에서 세포의 크기가 증가한 것은 UVB 조사 혹은 DOPA 염색과정에서 멜라닌 세포에 손상을 초래하였을 가능성이 있으나 KA가 멜라닌 세포에 세포독성을 초래하였을 가능성도 배제할 수 없다.

이상의 결과로 KA와 PDA는 배양된 멜라닌 세포와 C57BL 생쥐에서 멜라닌 세포에서의 색소형성을 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었고 UVB 조사에 의한 색소형성도 억제하는 것을 알 수 있었다. KA와 PDA를 적절한 농도로 인체 피부에 도포시에는 색소형성을 억제할 수 있으나 KA를 과다한 농도로 도포시에는 부작용을 초래할 가능성이 있으므로 인체의 피부에 도포시 KA는 1.0% 이하, PDA는 5% 이상의 농도가 좋으리라 사료되며 이에 대한 인체 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

UVB를 조사하거나 조사치 않은 배양된

정상 인체 멜라닌 세포와 C57BL 마우스의 피부에 KA 혹은 PDA를 투여한 후 색소형성 억제 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 배양된 정상 인체 멜라닌 세포에 UVB 조사 후 세포 수는 정상대조군에 비해 모두 유의하게 감소되었으며($P<0.05$), 멜라닌 양은 UVB를 조사받은 모든 군에서 UVB 조사 3일 후에는 감소되었으나 5일 후에 유의하게 증가되었다($P<0.05$).
2. 배양된 정상 인체 멜라닌 세포에서 세포 수는 KA 군에서는 정상대조군에 비해 유의하게 감소되었으나($P<0.05$) PDA 군은 유의성이 없었으며($P>0.05$), 멜라닌 양은 모든 실험군이 정상대조군에 비해 유의하게 감소되었다($P<0.05$).
3. 배양된 정상 인체 멜라닌 세포에 UVB 조사 후 세포 수는 KA $10^{-3}M$ 군에서는 약물 투여 3일과 5일 후에, KA $10^{-5}M$ 군은 약물 투여 3일 후에, PDA $10^{-3}M$ 군은 약물투여 5일 후에 UVB 대조군에 비해 유의하게 감소되었으며($P<0.05$), 멜라닌 양은 모든 실험군에서 UVB 대조군에 비해 유의하게 감소되었다($P<0.05$).
4. C57BL 생쥐에서 멜라닌 세포 수는 모든 KA 군과 PDA 5% 군에서는 정상 대조군에 비해 유의한 감소를 보였으나($P<0.05$), PDA 0.5% 군은 차이가 없었으며($P>0.05$), UVB를 조사한 경우에도 PDA 0.5% 군을 제외한 모든 실험군에서 UVB 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다($P<0.05$).

이상의 결과로 KA와 PDA는 배양된 정상 인체 멜라닌 세포와 C57BL 생쥐의 멜라닌 세포에서 색소형성을 억제하는 작용이 있으며 UVB 조사에 의한 색소

형성도 억제하는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 김상태, 서기석, 채영수 : 배양된 인체 각질형성 세포에서 자외선 B 조사 후의 배양 상청액이 멜라닌 세포 배양에 미치는 영향. 대한피부과학회지(suppl 31) : 47-47, 1993
2. 김영근, 박윤기, 김홍직 : 자외선 B의 조사가 C57BL마우스 표피의 멜라닌 세포에 미치는 영향. 대한피부과학회지 26 : 139-144, 1988
3. 이승한, 황정열, 이무형 등 : 배양된 멜라닌 세포에서 UVB 일회 조사 후 형태 및 증식의 변화. 대한피부과학회지 30 : 802-810, 1992
4. 한경원, 이기홍, 명기범 : Azelaic acid와 retinoic acid가 자외선 B를 조사한 흑색마우스 표피 색소 세포에 미치는 영향. 대한피부과학회지 30 : 492-498, 1992
5. Bregman MD, Sawyer TK, Hadley ME, Hruby VJ : Adenocine and divalent cation effects on S-91 melanoma adenylate cyclase. Arch Biochem Biophys 201 : 1-7, 1980
6. Burnett JB, Seiler H, Brown IC : Separation and characterization of multiple forms of tyrosinase from mouse melanoma. Cancer Res 27 : 880-889, 1967
7. Carter RJ, Shuster S : The association between the melanocyte-stimulating hormone receptor and the α_2 -adrenoceptor on the Anolis melanophore. Br J Pharma 75 : 169-176, 1982
8. Friedmann PS, Gilchrest BA : Ultra-violet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. J Cell Physiol 133 : 88-94, 1987
9. Friedmann PS, Wren F, Buffey J, et al : α -MSH causes a small rise in cAMP but has no effect on basal or ultraviolet-stimulated melanogenesis in human melanocytes. Br J Dermatol 123 : 145-151, 1990
10. Gold JA, Nackie RA : Studies on the effect of UVB irradiation on cultured human melanocytes. J Invest Dermatol 87 : 141-141, 1986
11. Gorfdon PR, Mansur CP, Gilchrest BA : Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factor. J Invest Dermatol 92 : 565-572, 1989
12. Hadley ME, Dawson BV : Biomedical applications of synthetic melanotropins. Pigment Cell Research(suppl. 1) : 69, 1988
13. Halaban R, Lerner AB, Lerner MR : UVB irradiation of normal human foreskin melanocytes in culture. J Invest Dermatol 94 : 517-517, 1990
14. Hearing VJ, Nicholson JM, Montague PM, et al : Mammalian tyrosinase : Structural and functional interrelationship of isozymes. Biochimica et Bioph-

- ysica Acta 522 : 327-339, 1978
15. Hosoi J, Abe E, Suda T, et al : Regulation of melanin synthesis of B-16 mouse melanoma cells by 1 α , 25-(OH)₂-vitamin D₃ and retinoic acid. Cancer Res 45 : 1474-1478, 1985
16. Hu F, Mah K, Teramura D : Effects of dicarboxylic acids on normal and malignant melanocytes in culture. Br J Dermatol 114 : 17-26, 1986
17. Jimbow M, Kanoh H, Jimbow K : Characterization of biochemical properties of melanosomes for structural and functional differentiation : Analysis of the compositions of lipids and proteins in melanosomes and their subfractions. J Invest Dermatol 79 : 97-102, 1982.
18. Kim ST, Pathak MA, Hadley ME : Melanogenesis by UVA, UVB, PUVA and melanotropins in mouse and guinea pig skin. J Invest Dermatol 92 : 459-459, 1989
19. Leibi H, Stingl G, Pehamberger H, et al : Inhibition of DNA synthesis of melanoma cells by azelaic acid. J Invest Dermatol 85 : 417-422, 1985
20. Libow L, Scheide S, Deleo V : The effect of UVB exposure on melanogenesis and proliferation of normal human melanocytes in culture. J Invest Dermatol 88 : 503-503, 1987
21. Lotan R, Lotan D : Enhancement of melanotic expression in cultured Mouse melanoma cells by retinoids. J Cell Physiol 106 : 179-189, 1981
22. Luca MD, D Anna F, Bondanza S, et al : Human epithelial cells induce human melanocyte growth in vitro but only skin keratinocytes regulate its proper differentiation in the absence of dermis. J Cell Biol 89 : 219-226, 1987
23. Luger TA, Kock A, Danner M, et al : Production of distinct cytokines by epidermal cells. Br J Dermatol 113 (suppl. 28) : 145-156, 1985
24. Mishima Y : A post melanosomal era : Control of melanogenesis and melanoma growth. Pigment Cell Research (suppl. 2) : 3-16, 1992
25. Nair Xina, Tramposch KM : UVB-induced pigmentation in hairless mice as an in vivo assay for topical skin-depigmenting activity. Skin Pharmacol 2 : 187-197, 1989
26. Oikawa A, Nakayasu M : Stimulation of melanogenesis in cultured melanoma cells by calciferols. FFBS letters 42 : 32-32, 1974
27. Orlow SJ, Chakraborty AK, Pawelek JM : Retinoic acid is a potent inhibitor of inducible pigmentation in murine and hamster melanoma cell lines. J Invest Dermatol 94 : 461-464, 1990
28. Pathak MA : Topical and systemic approaches for protection of human skin against harmful effects of solar radia-

- tion. *J Am Acad Dermatol* 7 : 285–292, 1982
29. Pathak MA, Ciganek ER, Wick M, et al : An evaluation of the effectiveness of azelaic acid as a depigmenting and chemotherapeutic agent. *J Invest Dermatol* 85 : 222–228, 1985.
30. Pathak MA, Fitzpatrick TB, Kraus EW : Usefulness of retinoic acid in the treatment of melasma. *J Am Acad Dermatol* 15 : 894–899, 1986
31. Prota G : Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol* 75 : 122–126, 1980
32. Robin EJ, Breathnach AS, Ward BJ, et al : Effect of dicarboxylic acids on Harding-Passey and Cloudman S91 Melanoma cells in tissue culture. *J Invest Dermatol* 85 : 216–221, 1985
33. Rosdahl IK : Local and systemic effects on the epidermal melanocyte population in UV-irradiated mouse skin. *J Invest Dermatol* 73 : 306–309, 1979
34. Sahu SN, Edwards-Prasad J, Prasad KN : Alpha tocopheryl succinate inhibits melanocyte stimulating hormone (MSH)-sensitive adenylate cyclase activity in melanoma cells. *J Cell Phys* 133 : 585–590, 1987
35. Shono S, Imura M : The relationship of skin color, UVB-induced erythema and melanogenesis. *J Invest Dermatol* 84 : 265–276, 1985
36. Siddiqui AH, Zeegelaar, J, Bhaggoe R, et al : Effects of UV radiation on melanogenesis and proliferation of melanocytes in culture. *J Invest Dermatol* 95 : 489–489, 1990
37. Sober AJ, Fitzpatrick TB : Pathophysiology of melanin pigmentation in man. Moschella SL Hurley HJ. eds. *Dermatology*. 2nd ed. Philadelphia pp 261–265, 1985
38. Swan GA : Structure, chemistry, and biosynthesis of the melanins. *Prog Chem Org Natural Products* 31 : 521–582, 1974
39. Tomita Y, Lwamoto M, Mazuda T, et al : Stimulatory effect of prostaglandin E_2 on the configuration of normal human melanocytes. *In Vitro* 89 : 299–301, 1987
40. Tomita Y, Torinuki W, Tagami H : Stimulation of human melanocytes by Vitamin D_3 possibly mediated skin pigmentation after sun exposure. *J Invest Dermatol* 90 : 882–884, 1988
41. Vesely DL, Hadley ME : chemistry and biosynthesis of the melanins. *Comp Biochem Physiol* 62A : 501–507, 1979
-