

Coenzyme Q10 의 멜라닌 생성억제효과

황재성, 박원만, 안수미, 강병영, 이병곤, 심영철

태평양 기술연구원

The inhibitory Effects of Coenzyme Q10 on Melanogenesis of Cultured Human Melanocytes and *in vivo* Guinea Pig Model

Jae-Sung Hwang, Won- Man Park, Soo-Mi Ahn, Beyong-Young Kang,

Byeong-Gon Lee and Young- Chul Sim

Pacific R&D Center, Kyunggi-do, South Korea

요 약

Coenzyme Q10(CoQ10)은 피부를 포함한 모든 생체조직에 존재하는 널리 알려진 조효소이다. 전자전달에 관여하는 퀴논링은 세포에서 에너지를 생성하기 위한 매우 중요한 기능을 가지고 있다. CoQ10 은 피부에서 항산화제로서 연구되어 왔으며, 최근 외용제로써 노화억제와 주름개선작용에 대해 보고된 바 있다. 이런 보고들은 CoQ10 이 항산화제로서 산화-환원작용을 통해 피부의 방어기능에 중요한 역할을 한다는 점을 시사하며, 일반적으로 산화-환원작용은 피부에서 흑화과정의 조절에도 많은 영향을 미친다. 따라서 본 연구자들은 CoQ10 이 피부의 색소조절기능이 있는지 알아보고자 하였다. 인체 정상 색소세포에

CoQ10 을 0.05-0.5 mM 처리한 결과 0.5, 0.25mM 에서 멜라닌의 생합성을 약 50% 저해하였으며 이는 알려진 미백제인 Kojic acid 나 vitamin C 와 유사한 수준이었다. 또한, CoQ10 은 인체 정상 색소세포에서 자외선이나 세포내 cAMP 증가 유도물질에 의한 멜라닌 생성을 억제하였다. 그러나 tyrosinase inhibitor 인 kojic acid 와는 달리, *in vitro* tyrosine hydroxylase 의 억제효과는 보이지 않았다. CoQ10 을 자외선으로 tanning 을 유도시킨 brown guinea pig 에 4 주간 도포하고 육안 및 chromameter 를 이용하여 미백효과를 측정 한 결과, vehicle 처리군에 비해 미백효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과에서 coenzyme Q10 은 *in vitro* 및 *in vivo* 에서 미백효과를 지닌 물질임을 확인할 수 있었다.

1. 서론

사람의 피부색은 피부내에 존재하는 멜라닌, 카로틴 및 헤모글로빈과 같은 색소들에 의해 좌우되며, 이중 멜라닌의 영향이 가장 크다고 알려져 있다. 피부 표피의 기저층에 존재하는 색소형성세포(melanocyte)에서 tyrosine 이 3, 4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)로 hydroxylation 되는 과정을 시작으로 dopaquinone, dopachrome 의 과정을 거쳐 멜라닌으로 합성된다. Dopachrome 은 자연히 decarboxylation 되어 DHI 가 되며 빠르게 산화되어 indole-5,6-quinone 이 된다. 그러나 특정한 금속이온과 효소가 있는경우 carboxylated intermediate 인 DHICA 가 만들어지며 DHICA oxidase 의 작용을 받아 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid 로 산화된 후 eumelanin 이 형성된다. 그러나 dopaquinone 이 cysteine 이나 glutathione 과 같은 SH compound 를 만나게 되면 cysteinyl-dopa 가 만들어지고 결국에는 pheomelanin 이 만들어진다. 이러한 과정에 관련하는 효소는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 및 peroxidase 등이 알려져 있다. 이후 생성된 멜라닌은 멜라노솜의 형태로 각질형성세포(keratinocyte)로 전달된다. 이러한 멜라닌의 형성과정은 모두 산화 과정이며 따라서 이를 조절할 수 있는 물질은 멜라닌의 생성을 억제할 수 있는 가능성이 있다고 볼 수 있다.

활성산소(Reactive oxygen species, ROS)는 자외선에 의한 피부의 손상을 매개하며, 이런

산화적 손상은 피부암이나 광노화를 유발한다. 작은 분자량의 항산화제(vitamin C, glutathione, tocopherol and ubiquinol)나 항산화 효소(superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and thioredoxin reductase)들은 이러한 ROS로부터 피부를 보호한다. Coenzyme Q10(Fig. 1)은 피부를 포함한 모든 생체조직에 존재하는 널리 알려진 조효소이다. CoQ10은 피부에서 항산화제로서 연구되어 왔으며, 최근 노화억제와 주름개선작용에 대해 보고된 바 있다(1) 자외선에 노출된 피부에서 Q10의 농도가 비노출 부위보다 높다는 보고도 있으나, (2), 최근의 연구결과서 피부가 자외선에 노출되었을 때 처음으로 고갈되는 항산화제로 보고되었다 (3).

본 연구에서는 인체 정상 색소세포와 동물모델에서 자외선등에 의해 유도된 멜라닌 생성에 대한 CoQ10의 영향에 대해 알아보았다.

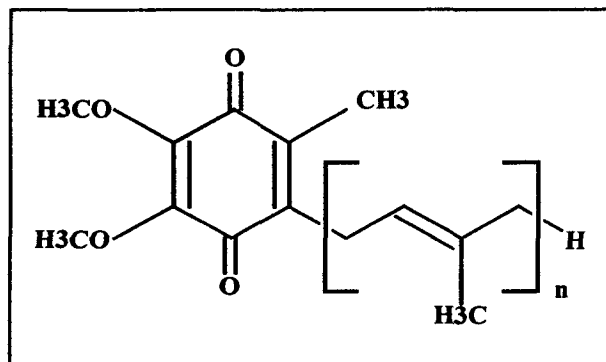


Figure 1. Structure of Coenzyme Q10 (n=10).

2. 실험재료 및 방법

2-1. 세포배양

인체 정상 색소세포는 신생아의 포피로부터 분리하였다(4). 0.25% trypsin을 처리하여 포피 조직으로부터 epidermis를 분리한 뒤, 7.5 mg/ml bovine pituitary extract, 1 µg/ml human

fibroblast growth factor, 10 µg/ml phorbol myristate acetate, 0.5 mg/ml hydrocortisone, 50 mg/ml gentamicin, 50 µg/ml amphotericin 을 첨가한 MCDB-153 배지로 vortex 하여 세포를 분리, 배양하였다..

2-2. 멜라닌 생합성 측정

배양된 색소세포를 6-well 배양용기에 well 당 2×10^5 cells 농도로 넣고 24 시간 배양하여 세포의 부착을 확인한 후, 시험물질이 함유된 배양액으로 교환하였다. 4 시간 후 [^3H]3,4-dihydroxyphenylalanine 을 2.5 µCi/well 이 되도록 첨가하고 48 시간 배양하였다. 멜라닌 생합성의 측정은 배양액을 제거하고 세포를 수확한 다음, [^3H]3,4-dihydroxyphenylalanine 이 도입된 멜라닌을 glass filter 에 부착시켜 radioactivity 를 liquid scintillation counter 로 측정하였다(5). 실험에 사용한 isobutyl-1-methylxanthine(IBMx, Sigma) 및 dibutyladenosine 3',5'-cyclicmonophosphate dbcAMP, Sigma)는 100 µM 의 농도로 첨가하였고, 시험물질을 동시에 처리하였다.

2-3. 자외선 조사

자외선 광원은 Philips UVB lamp(280-350nm)를 사용하였고, 광량은 Waldman UV meter(Waldmann, Germany)로 측정하였다. 자외선을 조사하기전 배양액을 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 교체한 후 배양용기의 뚜껑을 열고 25mJ/cm² 이 되도록 조사하였다. 24 시간 경과 후 같은 방법으로 동량의 자외선을 조사하고 시험물질과 [^3H]3,4-dihydroxyphenylalanine 을 첨가하여 24 시간 배양한 후 멜라닌 생합성을 정량 하였으며, 자외선과 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하였다.

2-3. 티로시나제 활성측정

티로시나제 효소활성은 [^3H]-tyrosine 이 효소반응에 의해 DOPA 로 전환되면서 유리되는 $^3\text{H}_2\text{O}$ 의 radioactivity 를 측정함으로써 정량하였다(6). 실험에 사용된 티로시나제로는 인체

색소세포의 추출물을 이용하였다. 배양액을 제거한 색소세포를 PBS 로 세척하고 tyrosinase buffer(80mM phosphat buffer, 1.0% Triton X-100)로 세포를 수확하였다. Sonicator 를 이용하여 세포를 파쇄하고, tyrosinase 의 추출을 위해 4℃에서 1 시간동안 방치하였다. 원심분리를 통해 침전물을 제거하고 상층액을 회수하여 활성측정을 위한 효소추출액으로 이용하였다. 각 효소반응액은 5-20 μ g 의 효소추출액, 적당량의 시험물질 및 기질인 [³H]-tyrosine 과 DOPA 로 구성되며, 37℃에서 1 시간 반응시켰다.

반응 후 BSA 와 TCA 를 가하여 반응을 정지시키고 원심분리하여 상층액을 분리한 다음, charcoal 을 넣고 상온에서 1 시간 반응시킨 후 원심분리하여 제거하고, 상층액을 취한 후, 방사능량을 측정하였다. 이때 방사능량이 적을수록 티로시나제에 대한 억제효과가 큰 것으로 판정하였다.

2-4. Brown guinea pig 을 이용한 미백 동물실험

1) 인공색소반(artificial tanning spots)의 제작

자외선(UVB)에 의한 인공색소반의 제작은, 4 마리의 female brown guinea pig(갈색 물모트, Tortoiseshell guinea pigs) 등부위의 털을 제거한 다음, 피부에 직경 1cm 의 원형 창문이 뚫린 알루미늄 foil 을 접착시킨 후, Waldmann UV 800(Herbert Waldmann GmbH&E, Philis TL/12 lamp emitting 280-305nm)으로 자외선을 조사하였다. 1 회 조사량은 500mJ/cm²으로 하였으며, 주 1 회, 3 주간 연속 조사하여 총조사량이 1,500mJ/cm²이 되게 하였다(7).

2) 미백물질의 도포

자외선 조사에 의해 형성된 인공색소반에 미백물질을 도포하는 시점은 햇볕에 의한 색소 침착의 방지효과 및 이미 형성된 색소침착의 조기 개선효과를 알아보기 위하여, 마지막으로 자외선을 조사한 다음날부터 시험물질을 도포하였다. 도포횟수는 1 일 2 회, 4 주간 계속하였으며, 시료는 특정한 vehicle(8)에 누적자극이 나타나지 않는 1%농도로 각각 용해시켜 면봉으로 도포하였다.

3) 미백효능의 판정

시료에 의한 미백효능의 평가를 위하여 다음 세가지 방법을 사용하였다.

① 육안평가

매주 vehicle 도포부위와 시료 도포부위를 비교하여 상대적인 미백효능을 관찰하였으며, 피부표면의 상태를 사진으로 보존하였다.

② 기기를 이용한 평가

색차계(Chromameter CM2002, Minolta)를 이용하여, 시료 도포전과 4 주 도포후의 L value(brightness parameter)의 변화를 측정하였다. 동일부위에 대해서 3 회 반복측정하여 그 평균값을 구하고 비교하였다.

③ 조직학적 평가

4 주동안 시료를 도포한 인공색소반을 직경 8mm 의 biopsy punch 를 이용하여 생검하고, 그 조직을 10% neutral buffered formalin solution 으로 고정하여 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 5 마이크로미터 두께로 section 한 다음, 멜라닌의 생성 변화를 관찰하기 위해 Fontana-Mason 염색을 수행하였으며, 멜라노사이트의 수적변화 및 형태변화를 관찰하기 위하여 멜라노사이트에 특이적으로 존재하는 S100 단백질에 대한 면역염색을 수행하였다 (9).

3. 결과

3-1. 인체 정상 색소세포에서의 멜라닌 생합성 억제효과

인체 정상 색소세포에서 멜라닌 합성에 미치는 영향에 대해 알아보았다.

CoQ10, vitamin C, kojic acid 는 시료가 첨가되지 않은 대조군과 비교하여 0.5 mM 의 농도에

서 50%정도의 멜라닌 생합성 억제효과가 있었으며, 상대적으로 arbutin 은 20%로 억제효과가 낮았다(Fig. 2). CoQ10 은 0.5mM 과 0.25mM 의 농도에서 50% 정도의 멜라닌 생합성 억제효과를 나타내었으며, 그 이하의 농도에서는 멜라닌 생합성의 억제효과가 나타나지 않았다(Fig. 3).

3-2. UV-induced melanogenesis 에 대한 억제효과

인체 정성색소세포에 $25\text{mJ}/\text{cm}^2$ 의 UV 를 연속하여 2 일동안 조사하고(총 $50\text{mJ}/\text{cm}^2$), CoQ10 0.5mM 을 첨가한 후 48 시간 배양하여 멜라닌 생합성의 저해정도를 측정 하였다. 자외선 조사에 의해 멜라닌 생합성이 50%정도 증가하였으며, CoQ10 처리시 UV 에 의해 증가되는 멜라닌 생합성을 완전히 억제하였다(Fig. 4).

3-3. cAMP-induced melanogenesis 에 대한 억제효과

세포내 cAMP 를 증가시키는 것으로 알려진 IBMX 와 dbcAMP 를 각각 $100\mu\text{M}$ 의 농도로 첨가하고 멜라닌 생합성의 정도를 측정하였으며, CoQ10(0.5mM)을 동시에 첨가하여 cAMP 증가에 의한 멜라닌 생합성 증가에 대한 CoQ10 의 영향을 측정하였다. IBMX 와 dbcAMP 를 첨가한 실험군에서는 멜라닌 생합성이 약 20% 정도 증가하는 것으로 나타났다. CoQ10 을 동시에 첨가한 시험군에서는 CoQ10 만 처리한 실험군과 비슷한 수준인 40% 정도의 멜라닌 생합성 억제효과를 나타내었다(Fig. 5).

3-4. CoQ10 의 tyrosine hydroxylase 억제효과

배양된 인체 정상 색소세포 파쇄액을 이용하여 tyrosinase 활성 억제효과를 측정하였다. CoQ10 은 *in vitro* 에서 tyrosine hydroxylase 활성 억제를 효과가 나타나지 않은 반면, tyrosinase inhibitor 로 알려진 arbutin 과 kojic acid 는 1mM 의 농도에서 시료를 넣지 않은 대조군과 비교하여 약 40%정도의 억제효과를 나타내었다(Fig. 6).

3-5. 동물시험결과

1) 인공색소반에 대한 미백효과

① 육안평가

CoQ10 을 도포한 경우 별다른 부작용이 없이 상당한 미백효과가 나타났다. Vitamin C 또한 별다른 부작용은 없었으나 미백효능은 미약하였다. 반면 Kojic acid 는 redness 및 keratolysis 를 동반한 미백이 나타났다.(Fig. 7).

② L-value 변화

CoQ10 을 도포한 경우 가장 높은 delta-L value(Fig. 8)를 나타내었는데, 이는 4 주간의 도포에 의해 인공색소반의 색깔이 상당히 밝아졌다는 것을 의미한다. 한편, Kojic acid 와 vitamin C 도 소량의 증가가 나타났다.

2) 조직학적 소견

멜라닌 색소에 대한 Fontana-Mason 염색결과를 살펴보면, CoQ10 를 도포한 부위의 멜라닌 함량이 vehicle 도포부위에 비해 상당히 감소하였음을 확인할 수 있었다(Fig. 9A).

S100 단백질에 대한 면역염색 결과에서는, 멜라노사이트의 형태 및 수적 변화는 없는 것으로 판단되며, 시험한 모든 시험물질에서 별다른 변화를 확인하지 못하였다(Fig. 9B).

4. 결론 및 고찰

본 연구자들은 멜라닌 생성억제에 대한 CoQ10 의 효과를 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 밝혔다. CoQ10 은 정상 인체 색소 세포에서 멜라닌의 생합성을 억제하였고, 자외선과 세포내 cAMP 증가에 의해 유도된 색소생성역시 억제하였다. 또한, guinea pig 을 이용한 동물실험에서 자외선에 의해 유발된 색소침착의 개선효과도 우수함을 입증하였다. 한편, *in*

vitro tyrosine hydroxylase 억제효과는 없는 것으로 나타났으며, 이를 통해 CoQ10의 멜라닌 억제작용이 tyrosinase inhibition에 의한 것이 아님을 알 수 있었다. 지금까지 CoQ10은 항산화제로 피부노화 억제물질로 많이 알려져 있었으며, 미백측면에서 연구된 자료는 거의 없는 실정이다.

이상의 결과에서 CoQ10은 색소침착의 방지와 개선에 효과있는 원료로써 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각되며, 향후 CoQ10의 멜라닌 생성 억제 기작에 대한 연구가 더 필요하다고 사료된다.

5. 참고문헌

1. Hoppe U, Bergemann J, Diembeck W, Ennen J, Gohla S, Harris I, Jacob J, Kielholz J, Mei W, Pollet D, Schachtschabel D, Sauermann G, Schreiner V, Stab F, Steckel F. *Biofactors* 1999, 9: 371-378. Review
2. Rusciani, L., Oradei, A., Lippa, S., Peresino, E., Romagnoli, A., Aureli, V. and Littarru, G.P. Coenzyme Q10 levels in human light-exposed and unexposed skin. In: Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q.K. Folkers, G.P. Littarru and T.Yamgami. Elsevier Science Publishers. 1991, 125-128
3. Podda, M., Traber, M.G., Weber, C., Liang-Jun, Y. and Packer, L. *Free Rad. Biol. And Med.* 1998, 23: 55-65.).
4. Eisinger, . *Proc. Natl. Acad Sci*, 1982, 79:2018-2022
5. Christine Romero-Graillet, Edith Aberdam, Naima Biagoli, William Massabni. Jean-Paul Ortonne, Robert Ballotti. *J. Biol. Chem*, 1996, 271:28052-28056
6. Pomerantz SH. *J Biol Chem*. 1966, 241:161-168
7. Kawai M. *Frangrance J* 1995, 14: 92-100
8. Curto EV, Kwong C, Hermersdorfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing VJ Jr, Dooley TP. *Biochem Pharmacol*. 1999, 57:663-72.
9. Barrett AW, Raja AM. *Arch Oral Biol*, 1997, 42: 77-81

Abstract

Coenzyme Q10 is found in all tissues including skin and it is the well-known coenzyme for mitochondrial enzymes. The electron and proton transfer functions of the quinone ring are of fundamental importance for the oxidative phosphorylation pathway to generate energy in the cells. Coenzyme Q10 has been studied as a potent antioxidant molecule in the skin. It is involved in the skin's response to UVR irradiation. The concentration of this antioxidant in UVR exposed skin is higher than in non-exposed skin. However, recent studies have also shown that coenzyme Q10 is one of the first antioxidants to be depleted when skin is UVR-irradiated. This indicates that coenzyme Q10 is primarily involved in defense mechanisms of the skin. Therefore, we questioned whether coenzyme Q10 shows regulatory effect of melanogenesis. Here we report that coenzyme Q10 inhibits melanin neosynthesis of normal human melanocytes grown in culture, and lightens UVB-induced hyperpigmentation of the guinea pig skin *in vivo*. We treated human melanocytes with 0.05mM to 0.5mM of coenzyme Q10 for a total of two days. This inhibited melanin neosynthesis of cultured human melanocytes dose-dependently. The inhibitory effects of coenzyme Q10 was as effective as kojic acid or vitamin C on cultured human melanocytes. CoQ10 didn't have direct inhibitory effect on tyrosinase activity in *in vitro* tyrosine hydroxylase activity. To further clarify the effect of coenzyme Q10 on the melanogenesis, we established UVB-induced hyperpigmentation on the shaved backs of brownish guinea pigs. The UVB intensity was 500mJ/cm² and the total energy dose was 1,500 mJ/cm². The animals were exposed to UVB radiation one times a week for three consecutive weeks. Coenzyme Q10, kojic acid, Arbutin, vitamin C(1% in vehicle) or vehicle alone as a control were then topically applied daily to the hyperpigmented areas twelve times per week for four successive weeks. The lightening effect was evaluated by visual scoring, chromameter and immunohistochemistry. Coenzyme Q10 had lightening effect on the UVB-induced hyperpigmentation without any other side effects, whereas another compounds showed weak lightening efficacies. Therefore, these results suggest that coenzyme Q10 may be useful for solving physiological hyperpigmenting problems for cosmetic purposes.

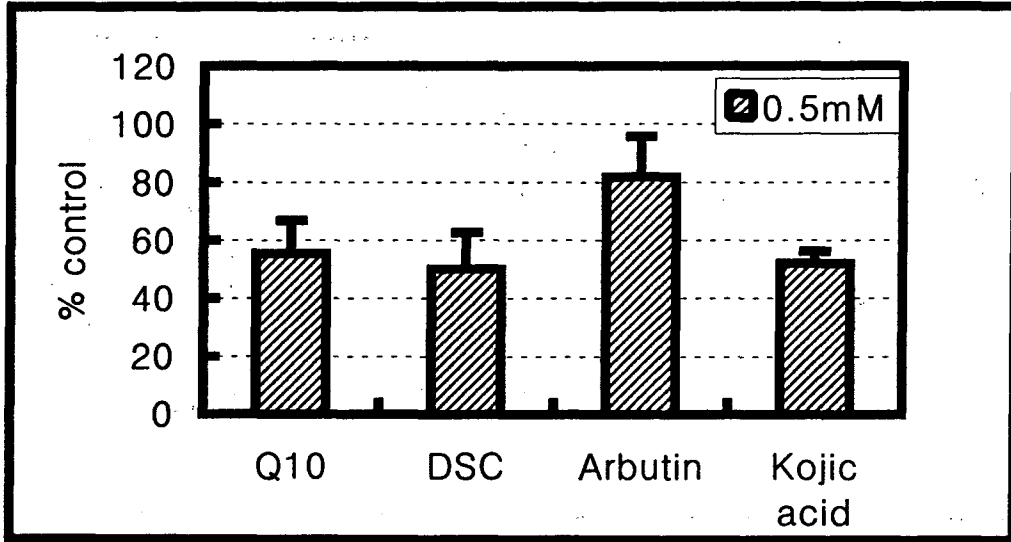


Figure 2. Inhibition of melanin synthesis by CoQ10 in normal human melanocytes.(NHM)

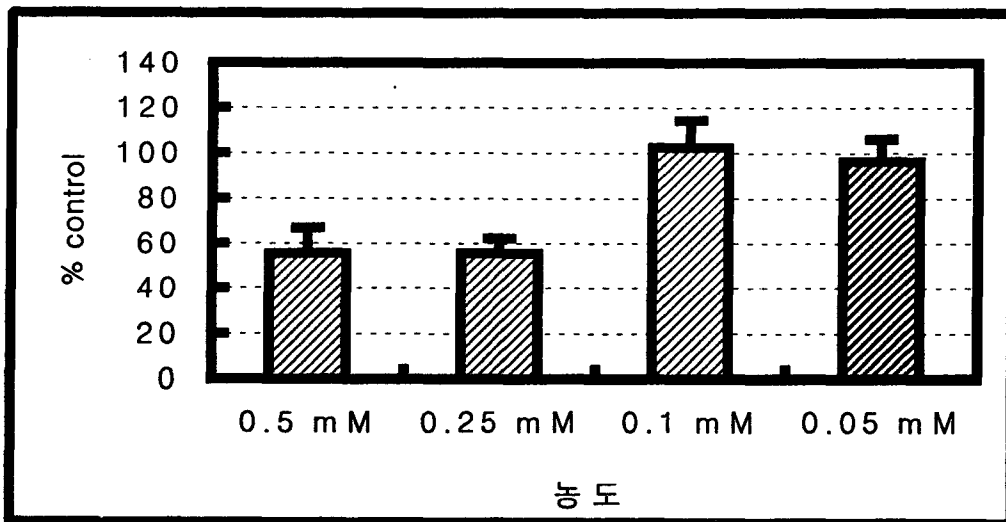


Figure 3. Dose-dependent inhibition of melanin synthesis by CoQ10

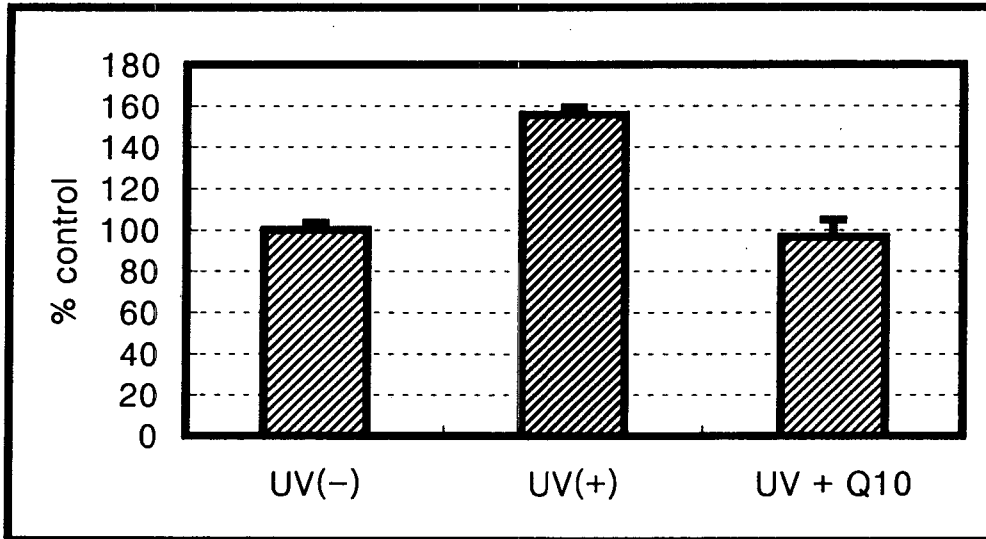


Figure 4. Inhibition of UV-induced melanin synthesis by CoQ10 in NHM.

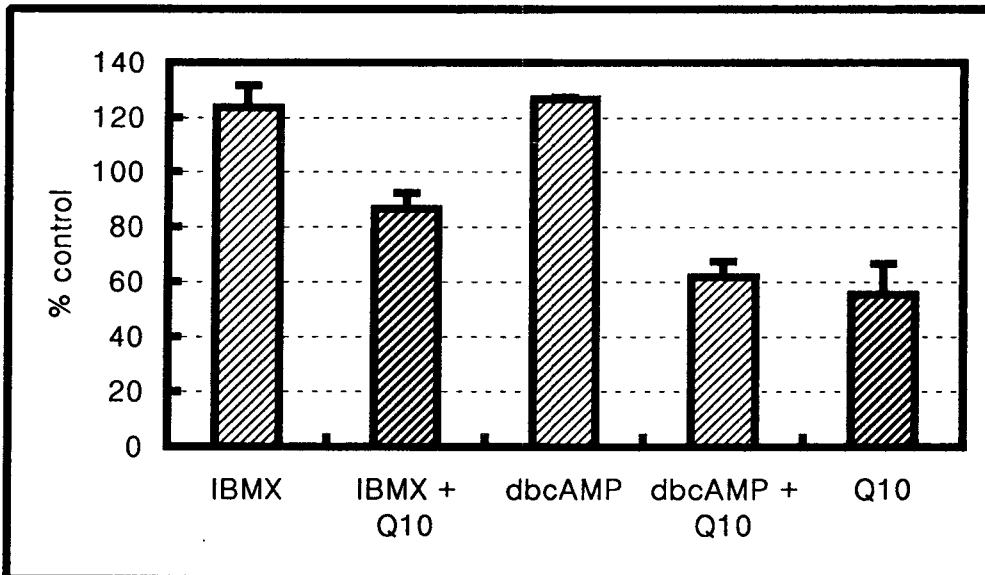


Figure 5. Inhibition of c-AMP induced melanin synthesis in NHM by CoQ10

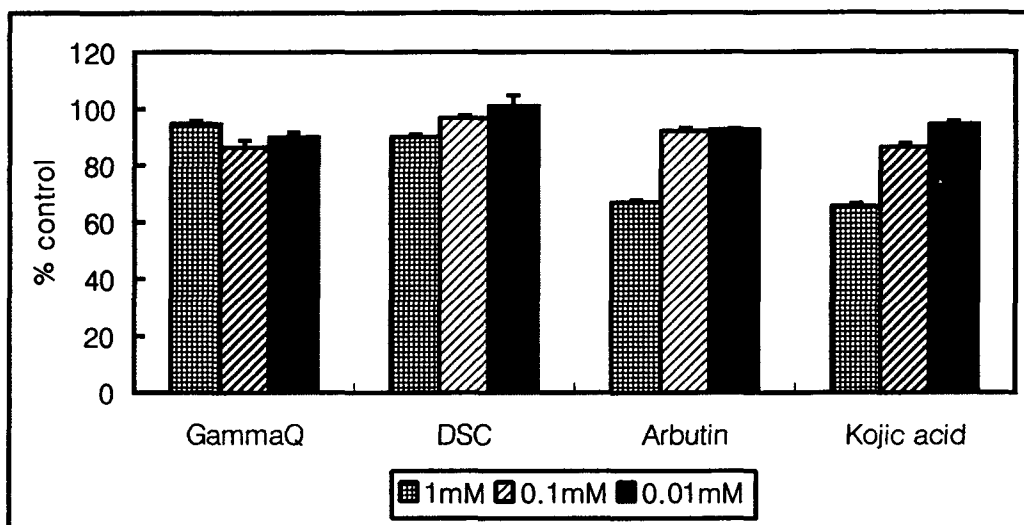


Figure 6. *In vitro* Tyrosine hydroxylase activity

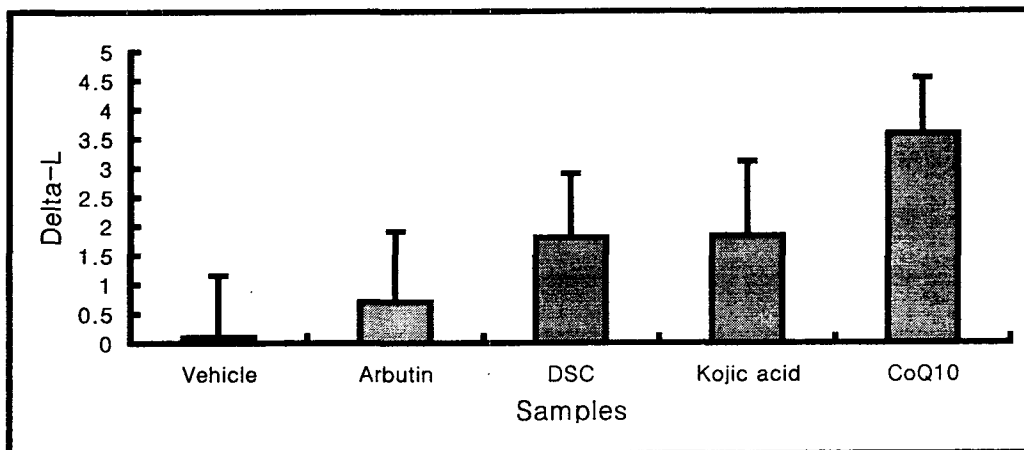


Figure 8. Depigmenting effects of CoQ10 in brown guinea pigs.