

Effects of Kojic acid, Arbutin and Vitamin C on cell viability and melanin synthesis in B16BL6 cells

Yumi Park, Jongsung Lee, Junho Park, Deokhoon Park

R & D center, Biospectrum, Inc.

Doosan Bldg., Sungbok-Dong, Yongin City, Kyunggi-Do 449-840, Rep. of Korea

Abstract

Melanin biosynthesis is a human defense mechanism to protect skin from UV irradiation and also determines colors of hair and skin. However, as a interest on skin-whitening increases, researches to prevent pigmentation and hypersynthesis of melanin in skin are being actively in progress. Active components used as a whitening agent in cosmeceuticals are kojic acid, arbutin vitamin C and hydroquinone. However, until now, because comparison researches among them in the aspect of both melanin formation and cellular toxicity have not been performed, we can't exactly estimate merits and defects of them as a whitening agent. To this end, we performed experiments to compare their effects on cell viability and melanin formation. As a first step, in vitro tyrosinase inhibition assay was done. While kojic acid and hydroquinone showed strong inhibition activities(their IC_{50} s are all $<100\mu M$), arbutin and vitamin C showed weak activities. IC_{50} s of arbutin and vitamin C are $100\mu M$ and $400\sim 500\mu M$, respectively.

In B16BL6 melanoma cells, like in vitro tyrosinase inhibition assay, arbutin and kojic acid showed more strong inhibition effect on melanin synthesis than vitamin C. And unlike arbutin, vitamin C and kojic acid induced cell death at high concentration. Although arbutin showed no

cytotoxicity, it has side effect to induce morphological change at high concentration.. In this paper, we suggest both kojic acid and arbutin have stronger ability to inhibit melanogenesis than vitamin C. And they also have side effect, that is, kojic acid induces cell death like vitamin C and arbutin changes cell morphology respectively.

서론

멜라닌(Melanin)은 인간의 경우 머리카락, 피부 등에 분포하고 있고 이들의 색을 결정하고 있는 색소이다. 멜라닌 합성과정은 세포내의 타이로신(tyrosine)을 기질로 하여 타이로시네이즈(tyrosinase)가 도파퀴논(DOPAquinone)을 생성시키며, 도파퀴논으로부터 자동산화반응과 효소반응을 거쳐 공중합체인 멜라닌이 생성된다. 이렇게 생성된 멜라닌은 멜라노솜이라는 주머니를 통해 나오게 된다⁽¹⁾. 피부에서의 멜라닌은 인간의 방어기능으로 과잉의 빛을 흡수, 산란하는 기능이 있고 피부내부에서는 자외선에 의한 악영향을 방어하고 있다. 그러나 멜라닌 생성을 촉진하는 요인에 의해서 멜라닌이 과량 생성되고 그 생성 기능이 국부적으로 지속되어 각화에 의해 멜라닌이 완전히 없어지지 않으면 색소침착(Pigmentation) 현상, 기미 등의 원인이 된다. 따라서 이러한 색소 침착 현상을 막아주기 위해 멜라닌 생성과정에서의 일부 과정을 조절해줌으로써 억제할 수가 있다⁽²⁾. 현재 미백에 대한 관심이 높아짐에 따라 화장품의 원료에 미백 활성 성분들을 사용하고 있으며 알부틴(arbutin), 비타민 C(L-ascorbic acid), 하이드로퀴논(hydroquinone), 코직산(kojic acid), 각종 식물 추출물등이 사용되어 왔다⁽³⁾. hydroquinone은 가장 많이 사용되는 미백 성분이었으나 피부에 대한 알레르기를 유발하는 성질, 멜라닌 세포에 대한 독성, 피부에의 영구 색소 침착 등 피부에 대한 자극성이 높아 현재는 각 나라별로 화장품으로의 사용을 금지하였거나 제한적인 농도만으로 허가하고 있다⁽⁴⁾.

코직산은 누룩 곰팡이 발효액으로부터 얻어지는 성분으로 일본에서 최초로 개발, γ -pyrome의 화합물질로 각종 탄수화물로부터 생산된다. 특히 누룩이 발효될 때 생성되는 물질이라 해서 일명 누룩산 이라고도 한다. 코직산은 타이로시네이즈의 활성부위에 존재하는 구리이온을 흡착시켜 효소활동을 저해⁽⁵⁾하는 반면 화장품에 배합시 안정성에 문제점이 있어 사용하는데 부적절하다.

비타민 C 및 그 유도체 역시 미백 효과를 나타낸다. 비타민 C는 산화가 잘 되는 불안정성 때문에 화장품 원료로서의 사용이 어려워 최근에는 비타민 안정에 대한 연구가 활발하다⁽⁶⁾.

알부틴은 하이드로퀴논에 glucopyranoside가 결합된 유도체로 하이드로퀴논과 비슷하나 하이드로퀴논 사용시 나타나는 부작용이 적으면서 인체에 대한 독성이 없이 멜라닌 색소 합성 억제작용이 있어 멜라닌 색소 침착이 증가되는 피부질환의 치료제로서 이용 가능성이 제시되어 왔다. 식물(월귤나무잎, 덩굴월귤잎, 서양배나무잎)에서 추출 또는 합성에 의하여 생산되며 피부에 대한 미백작용이 우수한 것으로 알려져 있다⁽⁷⁾.

그러나, 이렇게 멜라닌 합성을 저해하는 물질들의 효능과 세포독성을 상호 비교한 연구가 없어 세포에 독성이 가하지 않는 범위 내에서 멜라닌 합성 저해의 우위를 가릴 수가 없었다. 따라서 본 연구는 멜라닌 합성 억제에 효능이 있는 물질들의 농도별 비교실험을 통하여 세포에 미치는 독성과 멜라닌 합성 억제 관계를 보여주고자 한다.

실험재료 및 방법

I. 타이로시네이즈 억제 효과 (Tyrosinase inhibitory activity)

Spectrophotometry를 이용한 타이로시네이즈 활성억제 시험으로 *In vitro* 상에서

반응용액에 기질로 사용하는 타이로신과 버섯유래 타이로시네이즈에서 분리한 타이로시네이즈 분획을 첨가하여 일정시간 반응시킨 후 반응 생성물인 도파크롬의 흡수 파장인 475nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성을 구했다.

기질인 타이로신(Sigma) 10mM을 0.1mM 인산버퍼(potassium phosphate buffer)에 녹여 처리 시료인 알부틴(Enzhcyem Co., Ltd Taejon, Korea), 비타민 C(Roche, Mannheim, Germany), 코직산(Kohjin Co. Ltd, Tokyo, Japan), 하이드로퀴논(Sigma)을 농도별(200 μ M, 400 μ M, 600 μ M, 800 μ M, 1000 μ M)로 첨가한다. 여기에 16unit 버섯 타이로시네이즈(mushroom tyrosinase(Sigma))를 첨가하여 10분간 37 $^{\circ}$ C에서 반응 시킨 후 신속하게 얼음에서 5분간 방치하여 반응을 중단 시킨 다음 475nm에서 흡광도를 측정하였고 타이로시네이즈 억제율(Tyrosinase inhibition rate)을 구하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition rate(\%)} = [(A-B) / A \times 100]$$

A : 시험시료(inhibitor)가 들어있지 않은 반응액(control)의 반응 후 흡광도

B : 시험시료가 들어있는 반응액(reaction)의 반응 후 흡광도

II. B16BL6 멜라닌 생성 세포(melanoma cell) 내의 멜라닌 생성 억제 실험

1) B16BL6 세포배양

B16BL6를 한국세포주은행(KTCC : No.80006)에서 구입하여 DMEM(Hyclone, Logan, Utah, U.S.A.) 배지에 10% fetal bovine serum(Hyclone, Logan, Utah, U.S.A.)을 첨가한 배양액으로 37 $^{\circ}$ C, 5% 배양기 내에서 배양하였다.

2) 멜라닌 양의 측정

멜라닌 양의 측정은 Gordon 등⁽⁸⁾의 방법을 이용하여 측정하였다.

MTT 실험과 동일하게 세포를 분주하고 세포 부착 후 감초산(Glycyrrhizic acid; GR(Sigma))을 넣어 멜라닌 생성을 유도하고 알부틴, 비타민 C, 코직산을 농도별로 (0.5mM, 1mM, 2mM, 3mM, 4mM, 5mM) 3일 동안 처리하였다. 3일 후 Phospahte buffered saline(PBS)로 두 번 씻어 준 후 cell scraper로 세포를 수확하여 이를 원심분리하고 세포 침전물을 만들었다. 침전물의 색깔을 육안으로 확인하고 이 침전물에 1N NaOH 200ul를 넣고 10분간 끓여 멜라닌을 유리시킨 후 이것을 96well에 옮겨 ELISA reader (Power Wave, Bio-tek INC)로 400nm에서 흡광도를 측정했다. 한 실험군에 3개씩 총 3번 실험하였다(n=9).

3) 세포생존률 측정

B16BL6 멜라닌 세포를 세포 배양용 6 well microplate(NUNC)를 사용하여 각 well(2ml) 당 7.5×10^4 개 씩 분주하였고 16시간 배양 후 세포가 부착되면 멜라닌 생성 유도 물질인 감초산을 1mM 처리 한 후 알부틴, 비타민 C, 감초산을 농도별로 (0.5mM, 1mM, 2mM, 3mM, 4mM, 5mM) 3일 동안 매일 처리하였다. 3일 후 배지를 갈아주고 1mg/ml MTT(3-4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl tetrasolution bromide)를 전체 배지 양의 1/10 정도 넣고 3시간 동안 37℃에서 배양 한 후, 배지를 제거하고, DMSO(Dimethyl Sulfoxide)로 세포 용해시켜 96well micriplate에 옮겨 ELISA reader(Power Wave, Bio-tek INC)로 570nm에서 흡광도를 측정했다.

4) 세포의 형태학적 변화

Inverted Microscope (Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 세포의 크기, 수지상 돌기의 모양 길이 등을 관찰하였다.

5) 통계처리

측정된 결과치는 평균±표준편차의 형태로 표시하였고 SPSS/PC+ program을 이용하여 t-test로 유의성을 검정하였다.

결과

1. Tyrosinase inhibitory activity

코직산은 positive 대조군으로 사용된 하이드로퀴논과 거의 같은 수준의 억제 효과를 나타내었다. 알부틴과 비타민 C도 하이드로퀴논과 코직산에 비해 약하긴 하나 알부틴은 IC₅₀가 100 μ M로 나타났으며, 비타민 C는 IC₅₀가 400~500 μ M에서 tyrosinase inhibition 효과를 보여주었다(Fig.1 A). 또한 Tyrosinase inhibition rate 을 구하여 농도별로 나타냈다(Fig.1 B). 코직산은 100 μ M에서 95% 정도 억제되었고 비타민 C는 800 μ M에서, 알부틴은 700 μ M 에서 각각 95% 의 억제율을 보였다.

2. 멜라닌 세포에 미치는 영향

2-1 Cell 내의 melanine 생성 억제

감초산 처리구는 무처리구에 비해 멜라닌 함량이 40% 정도 유의성 있게 증가하였다. 반면에 3가지 미백제 처리구에서는 모두 농도가 높아질수록 멜라닌 함량이 유의성있게 감소하였다. 코직산 0.5mM에서는 증가된 멜라닌양의 약 50%, 1mM에서는 100%가 감소하였고, 2mM부터는 감초산을 처리하지 않은 세포보다 더 많이 멜라닌 생성이 억제되었다. 멜라닌 유도하지 않은 세포의 70%, 3mM에서는 약 50% 수준의 뛰어난 멜라닌 합성억제능을 나타내었다.

알부틴도 0.5mM에서 5mM 까지 멜라닌 함량이 농도에 따라 유의성 있게 감소하였다. 1mM에서 100% 감소하였고, 코직산과 마찬가지로 2mM부터 감초산을 처리하

지 않은 세포보다 더 줄어들어 그 함량이 대조군의 50% 미만이다.

비타민 C는 2mM에서 감초산으로 유도된 멜라닌 생성을 100% 억제하였으나 오히려 0.5mM 과 1mM 농도에서는 멜라닌 생성 수치가 1.5배에서 2배 증가하였다. 3mM 에서는 멜라닌 유도하지 않은 세포보다 함량이 더 줄어들어 75% 수준이다. 따라서 3mM 처리구에서는 멜라닌 생성 억제율은 알부틴이 가장 좋았으며 코직산, 비타민 C는 순으로 나타났다. 5mM 수준에서는 코직산이 가장 좋았으며 알부틴과 비타민 C도 감초산을 처리하지 않은 세포에 비해 멜라닌 함유량이 40% 정도이다.

2-2 세포생존률 측정 (Cell viability)

그림 3에서 감초산 처리시 20%의 세포가 감소하였다. 감초산의 세포에 대한 일반적인 독성과 멜라닌 유도에 대한 기능은 이미 잘 알려져 있다⁽⁹⁾.

MTT assay로 B16BL6 멜라닌 생성세포의 생존률을 측정한 결과, 코직산 1mM 수준에서 약 20% 정도의 세포증식효과가 나타났다. 또한 3mM, 5mM의 고농도에서는 각각 약 40%, 75%의 세포가 죽었다. 나머지 농도에서는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다.

알부틴 처리구에 있어 5mM을 제외한 0.5mM, 1mM, 2mM, 3mM 농도에서, 각각 약 45%, 70%, 45%, 45% 정도의 멜라닌 생성세포의 증식을 촉진하였다. 반면에 5mM 수준에서는 세포에 대한 어떠한 효과도 나타나지 않았다.

비타민 C는 처리농도 중 0.5mM에서 3mM 까지 농도에서는 알부틴과 마찬가지로 각각 약 25%, 25%, 60%, 45% 정도의 멜라닌 생성세포의 증식을 촉진하였으며 5mM 농도에서는 멜라닌 생성세포에 대한 세포죽음을 유도하였으며 대략 80%의 세포가 죽었다. 코직산과 비타민 C는 5mM 농도에서 세포의 75% 이상을 죽게할 정도의 세포독성을 나타냈다. 반면에 알부틴은 처리된 어떠한 농도에서도 세포에 대한 독성이 나타나지 않았다.

2-3. 멜라닌 세포의 형태학적 변화

배양된 멜라닌 세포에 각각의 물질을 투여하고 24시간 (Fig.5 A, B, C), 72시간(D E, F) 지나서 형태학적인 변화를 관찰하였다. 처리 물질의 농도가 높아 세포의 생존이 어려운 코직산 3mM, 5mM과 비타민 C 5mM을 제외하고는 대조군과 비교하여 큰 변화를 관찰 할 수 없었다(data not shown). 그러나 알부틴 3mM 농도 이상에서는 72시간 후에 변화를 보였으며, 무처리 대조구(Fig. 5 A, D)와 감초산(Fig.5 B, E)만 처리한 대조군보다 멜라닌 세포의 세포질이 줄어들고 수상돌기의 길이가 길어짐을 관찰할 수 있었다(Fig.5 C, F).

고찰

이 연구는 멜라닌 색소 억제제로 알려진 코직산, 알부틴, 비타민 C 등을 같은 농도별로 비교하여 실험한 것으로 멜라닌 생성세포의 독성을 주는 각각의 농도와 멜라닌의 생성억제를 한눈에 파악할 수가 있다.

*In vitro*에서는 kojic acid는 IC₅₀가 100uM 이하로, 강력한 미백제라고 알려진 Hydroquinone과 유사한 결과를 보였다. 알부틴, 비타민 C 순으로 그 효능이 나타났다. 그러나 *in vitro* 타이로시네이즈 억제 결과와 세포실험에서의 미백 효능 결과가 동일한 양상을 보이지는 않는다. *In vitro*에서 사용한 inhibitor들의 IC₅₀가 모두 500μM 이하로 나타났으나, 세포 내의 실험에서는 이보다 높은 농도에서 효과가 보이는 것은 세포막으로 통과하기 위한 유효농도가 필요한 것으로 생각된다..

Gordon 등에 의하면 성장속도가 빠른 멜라닌 세포의 멜라닌 양은 각 세포로 희석되어 나타나므로 세포당 멜라닌 양보다 well 당 멜라닌 양이 실제적인 피부색을 더 잘 반영할 것으로 설명하였다⁽⁸⁾. 따라서 본 실험에서도 well 당 멜라닌 양을 측

정하였고, 멜라닌 양은 동일 연구자에 의한 실험간에도 많은 차이를 보인다고 보고 되어 왔으며⁽¹⁰⁾ 따라서 멜라닌 합성에 대한 실험군간의 비교는 상대적인 비교가 더 의미 있다고 본다. 백종현등의 연구에서 알부틴은 SRB 검사상 10^{-5} - 10^{-3} M에서 멜라닌 세포의 증식을 억제하였다고 하고, Maeda등의 연구에서는 알부틴 10^{-5} - 10^{-3} M에서 멜라닌 세포의 생존에 영향이 없었다⁽¹¹⁾고 하는 등 차이를 보이고 있다. 이는 배양액과 배양일 차이 때문인 것으로 추정되며 본 실험에서는 5mM(5×10^{-3} M)에서까지 생존에 별 영향이 없었다.

GR을 첨가하지 않은 군보다 GR을 첨가한 군에서는 세포의 생존률이 20% 떨어 지지만 멜라닌의 양은 40% 더 늘어나 있으므로 멜라닌 생성 유도 물질임을 다시 확인할 수 있다.

그림 2의 결과를 볼 때 가장 좋은 멜라닌 생성 억제제는 코직산인 것으로 보여진다. 그러나 그림 3의 세포독성 결과를 동시에 고려할 때 결과 2에서 얻어진 최종 결론에 많은 문제점이 발생하게 된다. 그림 2에 있어 모든 시료는 5mM 농도에서 가장 좋은 멜라닌 생성 억제능을 나타냈으나 실제 코직산과 비타민 C 처리구에서는 세포의 75% 이상이 사멸하여 멜라닌 생성자체가 불가능한 것을 볼 수 있다. 즉 5mM의 코직산과 비타민 C 처리 결과는 멜라닌 생성세포가 죽었기 때문에, 멜라닌 생합성 과정이 차단된 결과가 아닌 것으로 보여진다. 따라서 두 처리구에 있어 5mM 농도의 결과는 비교 포인트가 될 수 없다. 반면에 알부틴은 5mM 농도에서 그림 4와 같이 세포 형태에는 영향이 있으나 세포의 생존률에는 영향이 없는 것으로 나타났다(그림 3). 결론적으로 5mM 농도에서 가장 좋은 멜라닌 생성 억제제는 알부틴이다.

2mM 이하의 농도에서는 세 가지 시료 모두에서 세포 독성이 나타나지 않았고 비타민 C에서 0.5mM과 1mM을 제외한 0.5mM에서 3mM까지 농도 의존적으로 멜라닌 생성능이 억제되었다. 비타민 C는 멜라닌 형성세포에 있어 3mM 이하의 낮은

농도에서는 세포 증식효과를 나타내고 5mM 농도에서는 세포증식 억제효과를 나타내는 이중효능(Dual function)을 나타내었다. 생리 활성을 나타내는 물질 중에는 어떤 생화학적 반응에 대하여 상반되는 효능을 나타내는 경우가 종종 있는데 비타민 C의 경우 멜라닌 생성 세포에 대한 이러한 효능은 본 논문을 통하여 처음으로 보고된 것이다. 이 부분에 대한 이해를 높이기 위하여 생리 생화학적 추가연구가 필요하다.

세 가지 시료의 멜라닌 생성 억제능을 비교하기 위하여 2mM 농도에서 상호 억제능을 비교할 수 있다. 왜냐하면 3mM 코직산 처리구에서 세포독성이 나타났기 때문에 상호 비교점으로 적절하지 못하다.

그림 2에서 감초산에 의해서 유도된 멜라닌 양에 대해 알부틴은 약 140%의 억제효과를 나타냈으며 코직산이 135%, 비타민 C가 100% 억제하였다. 따라서 멜라닌 생성 억제능은 알부틴, 코직산, 비타민 C 순으로 억제능이 좋은 것으로 결론 지을 수 있다. 그러나 세포독성 시험에서 0.5mM에서 3mM 까지 알부틴과 비타민 C는 세포의 증식을 촉진하였다. 특히 2mM 처리구에 있어 코직산은 세포수에 변화가 없었으나 비타민 C와 알부틴에 있어서 각각 약 60%와 45%의 세포가 증가하였다(그림 3). 그러므로 알부틴과 비타민 C의 시험결과는 증식된 세포수를 감안할 경우 세포단위 당 멜라닌 생성능에 대한 억제능은 수치보다 높게 나타날 것이다. 이러한 점을 고려한다면 알부틴이 가장 뛰어난 멜라닌 생성 억제제이며 비타민 C가 코직산에 비하여 효능이 더 좋은 멜라닌 생성 억제제인 것으로 추정된다.

그림 3 에서 알부틴 처리구와 비타민 C 처리구에서 3mM 이하의 농도에서 모두 멜라닌 생성세포의 증식효과가 나타났는데 이는 두 물질의 항산화력 때문인 것으로 추정된다. 세포분열 시 빠른 세포의 신진대사가 동반되며 이 과정에 산화물질이 대량으로 생성된다. 만약 생성되는 산화물질을 제거할 수 있다면 세포증식속도를 더욱 가속화 할 수 있을 것이다. 비타민 C와 알부틴은 강력한 항산화제로 잘 알려져

있으며 세포 증식과정에서 낮은 농도에서는 산화물질을 제거하여 세포 증식능을 촉진시킬 수 있는 것으로 추정된다⁽¹²⁾. 반면에 알부틴 5mM 농도에서는 세포 증식능이 사라지는데 그림 4의 알부틴 처리구를 고려할 때 알부틴이 5mM의 비교적 고농도에 이르면 세포에 대한 항산화 작용보다는 일부 독성으로 작용하는 것으로 보여진다. 즉, 알부틴은 5mM 농도에서 세포를 죽음을 유도하지는 않지만 세포에 대한 변형을 유발할 정도의 세포독성이 존재하는 것으로 보여진다(그림 4의 F). 세포의 변형이 실제적인 독성 때문인지 세포변형에 대한 어떤 신호체계를 가동시키기 때문인지에 대한 추가 연구가 필요하다. 특히 비타민 C는 멜라닌 생성 세포에 대하여 농도에 따라 성장촉진과 억제를 동시에 나타내는 이중효능을 가진 물질로 판명되었다.

본 연구에서 비교된 멜라닌 생성 억제능에 있어서 가장 안전하며 효능이 좋은 시료는 알부틴이며 여러 가지를 고려할 때 비타민 C가 코직산에 비하여 안전하며 효능이 더 좋은 것으로 판명된다. 그러나 이러한 결과를 바탕으로 인체에 대한 미백 화장품에 대한 원료의 순위를 매기는데 있어 하기의 이유 때문에 주의해야 한다.

첫째, 사용된 멜라닌 생성 세포인 B16BL6 세포주는 사람이 아닌 쥐유래의 세포이며 더욱이 정상세포가 아닌 형질전환된 세포이다. 따라서 인체에서 일어나는 세포의 생리 생화학적인 멜라닌 생성과정을 정확하게 표현한다고 할 수 없다. 또한 특정 물질들은 정상세포에서와 형질전환 된 세포에서의 세포독성이 전혀 다르게 나타나기 때문에 이 논문에서의 결과와 상반되는 결과를 도출할 수 있다. 인체 세포를 대상으로 같은 시험을 실시하여 결과를 비교함으로써 쥐유래의 멜라닌 생성세포와 인체 유래의 정상세포에서의 반응정도를 비교한다면 두 세포주가 멜라닌 생합성 과정에 있어서의 차이점을 살펴볼 수 있는 좋은 기회가 될 것이다.

둘째, 인체에 있어 미백효능은 세포에서의 결과와 종종 상반되게 나타날 수 있다. 알부틴이나 비타민 C 같은 경우 실제로 친수성의 물질로서 최종 화장품으로서 개

발된 경우 제형 특성에 따라 그 효과가 달라질 수 있다. 일반적으로 친수성 물질은 친유성 물질에 비하여 피부막을 통과하기 어렵다. 특히 멜라닌 생성세포는 표피층의 가장 아래쪽에 위치하고 있어 미백물질이 효능을 나타내기 위해서는 멜라닌 생성세포가 위치하는 표피층 아래까지 피부막을 침투하여 이동되어야 한다. 이러한 목적으로 이루기 위하여 일반적으로 널리 사용되고 있는 화장품 제형(유중수 제형)에서는 피부침투 정도가 낮기 때문에 일정 수준 이상의 농도를 사용해야만 소기의 목적을 이룰 수 있다. 반면에 친수성물질의 피부내 침투를 위해서는 리포솜 제형이 사용될 수 있는데 최근에는 분자량 30,000 이상의 친수성 거대분자도 진피층까지 침투 시킬 수 있음이 증명되었다.

본 연구에서는 현재 가장 널리 인정받고 있는 3종의 미백제에 대한 그 효능을 세포수준에서 비교함으로써 미백제 선정의 기초자료를 제공하였다. 특히 대표적인 3가지의 미백제에 대하여 같은 조건에서 멜라닌 생성억제능과 세포생존률을 측정함으로써 세포 수준에서의 미백효능을 밝혔다.

코직산의 미백효능 중 3mM 이상 농도에서의 효능은 실제미백효능이 아니라 세포자체의 사멸에 의하여 멜라닌 자체가 만들어지지 않았기 때문이다. 그러므로 3mM과 5mM 수준을 비교점에서 삭제하고 세포독성이 없는 2mM 수준에서 다른 두 성분과 효능을 비교하면 3mM과 5mM 수준에서의 비교 결과가 달라진다. 따라서 미백제를 선정하기 위한 시험에 있어 멜라닌 함량 측정과 동시에 세포독성에 대한 세포생존률을 동시에 측정하여야만 정확한 미백효능을 검증할 수 있다.

참고문헌

1. Jimbow K, Fitzpatrick TB, Wick MM. *Physiology Biochemistry and molecular biology of the skin*, Oxford university press, New York, 1991, 873~894
2. P.BERNARD and J.-Y. BERTHON, *International Journal of Cosmetic Science*, 2000, 22:2219~226
3. Maeda K, and Fukuda M., *J. Soc Cosmet. Chem.* 1991, 42:361
4. 신미희, *대한화장품학회*, 2001, 2:45~56
5. G. Prota, *Cosmetic & Toiletries*, 1996, 111(5):43
6. Morisaki K, Ozaki S., *Chem Pharm Bull* 1996, 44(9):1647~55
7. Ashok K. Chakraborty, Yoko Funasaka, Mari Komoto, Masamitsu Ichihashi, *Pigment cell Res*, 1998, 11:206~212
8. Gordon PR, Mansur CP, Gilchrest BA, *J. Invest Dermatol*, 1989, 92:565~572
9. Gi-Dong Jung, Jeong-Yeh Yang, Eun-Sup Song and Jin Woo Park, *Experimental and Molecular Medicine*, 2001, 33(3):131~135
10. Mansur CP, Gordon PR, Ray S, *J. Invest Dermatol*, 1988, 91:16~21
11. 백종현, 이무형, *대한피부과학회지*, 2000, 38:1301~1308
12. Eugene A. Lutsenko, Juan M. Carcamo, and David W. Golde, *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(19):16895~16899

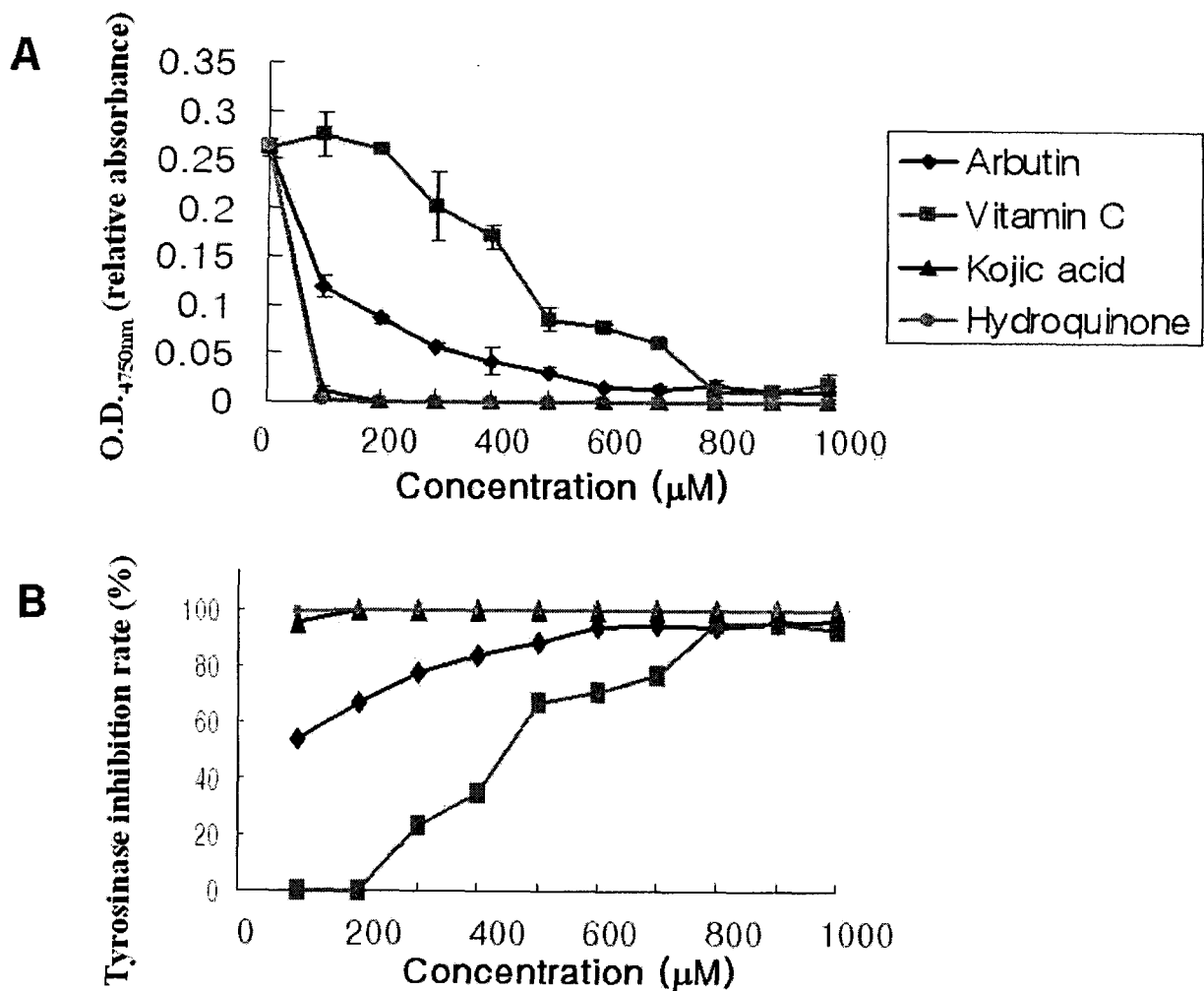


Fig. 1 In vitro inhibition test of tyrosinase activity.

L-tyrosine is converted into L-dopa by tyrosinase. Concentration of L-dopa can be determined by spectrophotometry. This experiment shows that whitening agents such as Vitamin C, Kojic acid and arbutin inhibit tyrosinase activity in a dose-dependent manner.

IC₅₀ of whitening agents is as follows; 100mM(Arbutin), 400mM~500mM(Vitamin C), <100mM(Kojic acid and Hydroquinone)

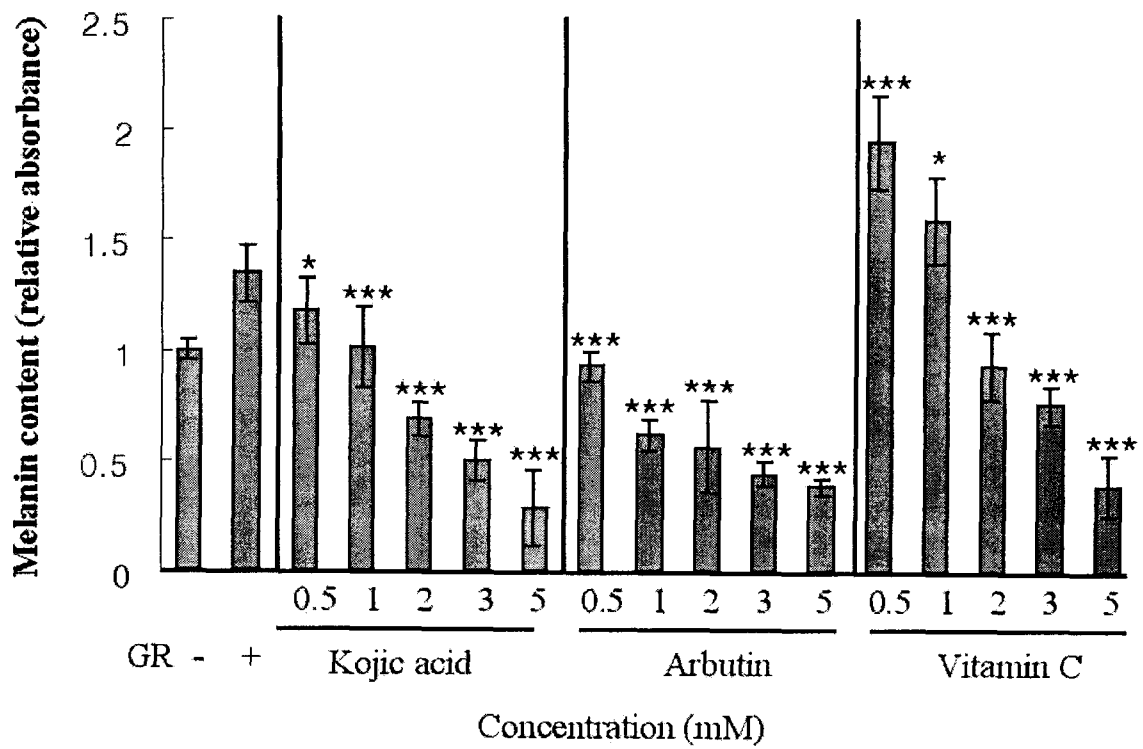


Fig. 2 Melanin content assay was done according to the method, previously described.

Result are expressed as relative absorbance of control and data means \pm SD of at least three

determinations. (* P<0.1, ** P<0.01, ***P<0.001, n=9)

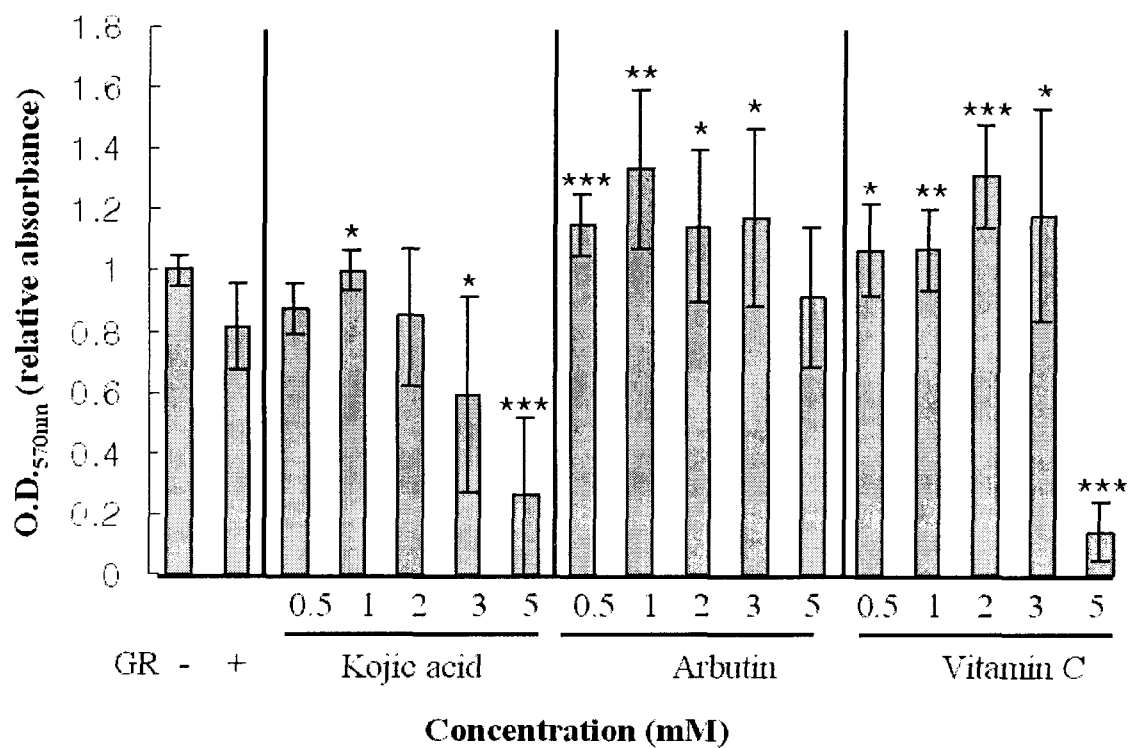


Fig.3. Effect of whitening agents on the cell. Cell viability was determined by measuring optical density(OD) at 570nm (* P<0.1, ** P<0.01, ***P<0.001, n=9)

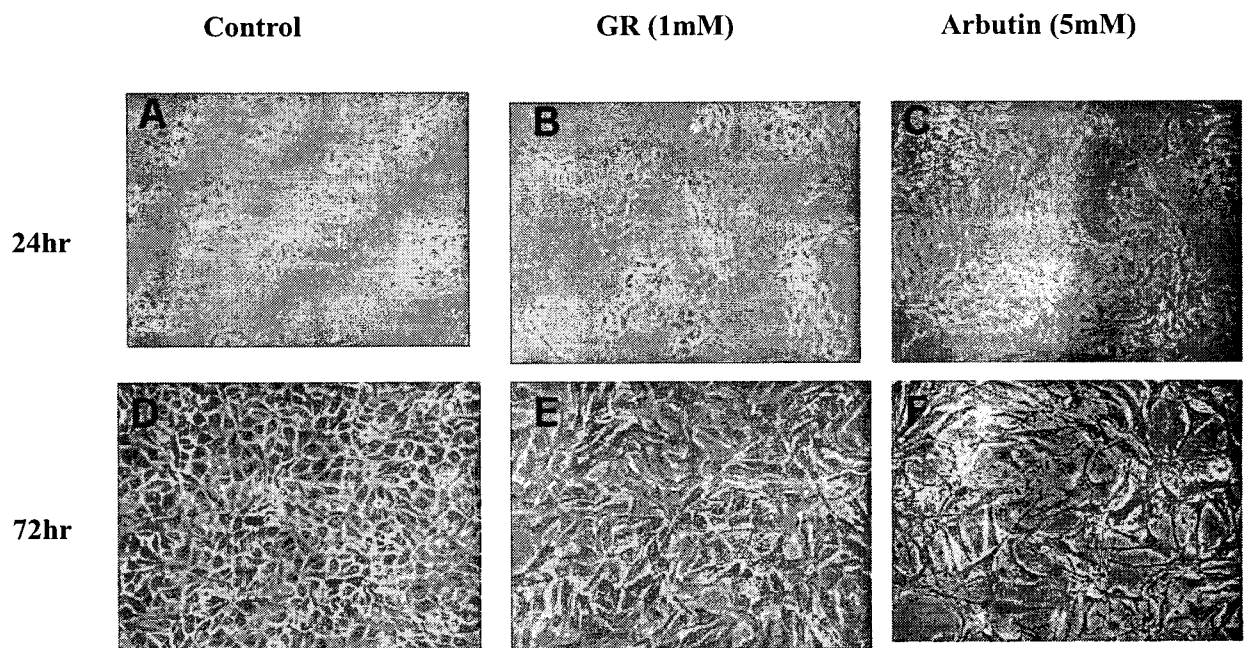


Fig. 4 Cell morphology of B16BL6 melanoma cell, treated without or with GR and Arbutin 5mM, respectively for 24hrs or 72hrs.(x100)