

피부에서의 백삼 분획물의 멜라닌 색소 저해효과

조연옥 · 공연희 · 이영철 · 김성수 · 최상윤[†]

한국식품연구원

Inhibitory Effect of White Ginseng Fraction on Skin Pigmentation

Youn Ock Jo, Yeon Hee Kong, Young Chul Lee, Sung Soo Kim, and Sang Yoon Choi[†]

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea.

ABSTRACT : In our previous study, ethylacetate fraction of white ginseng (root of *Panax ginseng* C.A. Meyer) extract inhibited mushroom tyrosinase activity and melanin production in melanocytes. This study examined its effects on the expression of melanin biosynthesis-related enzymes to explore the depigmenting pathway. Moreover, depigmenting effect on animal skin was examined using UV-B induced hyperpigmented skin of brown guinea pigs. The ethylacetate fraction of the white ginseng extract exhibited depigmenting activity in the skin of brown guinea pig without visible edema. In addition, this fraction reduced tyrosinase expression in melanocytes. The results suggested that ethylacetate fraction of white ginseng extract might be used as skin depigmenting material by inhibition of tyrosinase activity and expression.

Key Words : Ginseng, Melanin, Pigment

서 언

인체의 피부는 표피와 진피, 피하조직의 세 개 층으로 구성되어 있으며 이중 가장 바깥에 위치한 표피의 하부인 기저층에 피부색소인 멜라닌을 생성시키는 melanocytes가 존재한다 (Slominski *et al.*, 2004). 멜라닌의 생합성은 tyrosine의 산화로 시작되어 L-dopa, dopaquinone 및 dopachrome가 생성된 후 dihydroxyindole이나 dihydroxyindole-2-carboxylic acid가 생성되는 과정을 거쳐 진행되며 초기의 tyrosine으로부터 dopaquinone의 생성까지는 tyrosinase가 큰 역할을 하며 dopachrome의 dihydroxyindole-2-carboxylic acid로의 전환과정에는 dopachrome tautomerase가 작용한다 (Fang *et al.*, 2002; Marmol *et al.*, 1996; Pawelek *et al.*, 1991; Tsukamoto *et al.*, 1992). 멜라닌은 피부의 melanocytes에 존재하는 세포소기관인 melanosome에서 주로 생성되며 이 멜라닌의 생성량과 분포도가 피부의 색을 결정하는 주요한 요인이다 (Lin & Fisher, 2007). Melanocyte는 자외선, 염증 등에 의해 활성화되며 생성된 멜라닌은 외부자극으로부터 피부를 보호하는 작용을 하지만 과다하게 생성될 경우 기미, 주근깨, 검은반점 등의 피부질환을 일으키게 되어 많은 사회적 부작용을 일으키게 된다 (Hill *et al.*, 1997; Kong *et al.*, 2007).

따라서 멜라닌 생성억제 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 (Parvez *et al.*, 2006) 본 연구자는 이전의 연구를 통하여 백삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 에틸아세테이트 분획물이 tyrosinase 활성억제효과, 자외선 차단효과 및 멜라닌 생성세포에서의 멜라닌 생성억제효과를 나타냄을 발견하여 보고한 바 있다 (Hwang *et al.*, 2006). 본 연구에서는 백삼 에틸아세테이트 분획물이 멜라닌 생성세포에서 tyrosinase와 dopachrome tautomerase의 발현량에 미치는 영향 및 brown guinea pig 피부에서 자외선으로 유도된 색소침착 억제효과를 측정하여 멜라닌 생성억제 기전 및 생체피부에서의 색소억제 활성을 검정하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험시료

본 연구에 사용된 백삼 시료는 2005년에 농협에서 제조된 피부직삼을 구입하여 마쇄한 후 진공포장하여 -20°C에 보관하면서 사용하였다. 마쇄된 시료를 80% 메탄올/증류수 혼합용매를 사용하여 1시간 씩 3회 반복하여 상온에서 초음파 추출한 후 감압 농축하여 추출물을 제조하였고 이를 에틸아세테이트 가용성 분획과 증류수 가용성 분획으로 나누고 이중 에틸

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-780-9307 (E-mail) sychoi@kfri.re.kr
Received May 19, 2008 / Revised June 03, 2008 / Accepted June 05, 2008

아세테이트 분획을 완전 농축하여 얻은 잔사를 활성 측정용 시료로 사용하였다.

2. 세포배양

마우스 유래의 멜라닌 생성세포인 melan-a 세포를 10% fetal bovine serum (Gibco)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco), 200 nM의 Phorbol-12 myristate 13-acetate (Sigma-Aldrich co.)를 첨가한 RPMI 배지 (Gibco)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다 (Choi *et al.*, 2006).

3. 세포내 단백질의 발현량 측정

5 × 10⁵ 개의 세포를 culture dish에 접종하고 24시간 동안 배양한 후 매일 새로운 배지를 공급하면서 100 ppm 농도의 시료를 총 3일간 처리하였다. 이후 24시간 더 배양하고 세포를 수집하여 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.02% sodium azide, 100 µg/ml PMSF, 1 µg/ml aprotinin)를 첨가하고 sonication하여 세포내 단백질을 추출하였다. 8% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 추출된 단백질 50 µg을 전기영동 한 후 membrane에 옮기고 5% skim milk로 blocking 하였다. Membrane을 tyrosinase와 dopachrome tautomerase (TRP-2)의 1차 antibody와 각각 반응시키고 다시 anti-goat 2차 antibody를 반응시킨 후 ECL을 이용하여 검출하였다.

4. 자외선으로 유도된 brown guinea pig 피부의 색소 과침착에 미치는 영향

본 연구에 사용된 실험동물은 450 g 내외의 brown guinea pig 암컷으로써 Shizuoka Co. (Japan)로부터 구입하여 항온, 항습이 유지되는 실험동물실에서 일주일간 적응시킨 후 사용하였다. Brown guinea pig의 등 부분을 제모 후 구역을 나누어 500 mJ/cm²의 UV-B를 일주일 간격으로 총 3회 조사하여 피부색소의 침착을 유발하였다. 색소침착 유발된 각각의 피부 구역에 매일 세척 후 70% 에탄올에 녹인 시료를 도포하고 피부색의 변화를 6주간 관찰 하였고 변화량은 chromameter (CR-300, Minolta, Japan)를 사용하여 측정하여 ΔL-value로 나타내었다 (Ando *et al.*, 1998).

5. 통계방법

각 실험결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며 유의성 검정은 Student's t-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. Tyrosinase 및 dopachrome tautomerase 발현량 측정

앞서의 연구결과에서 피부백삼 에틸아세테이트 분획물은

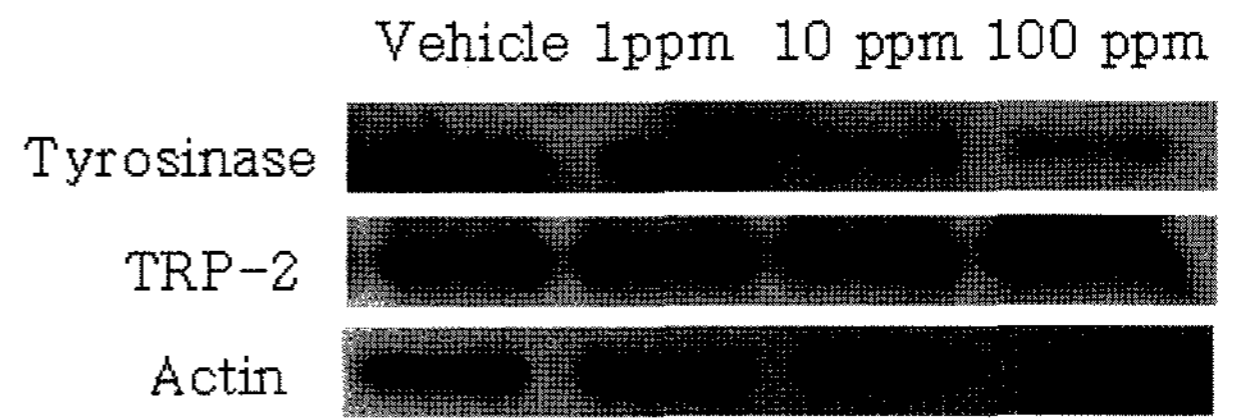
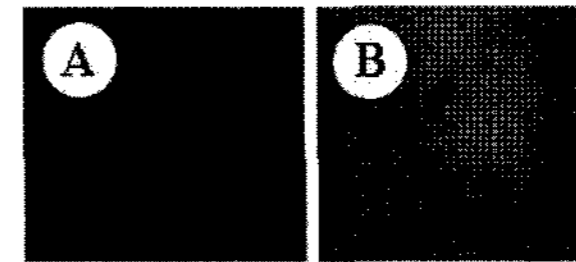


Fig. 1. Effects of ginseng ethylacetate fraction on intracellular level of tyrosinase and TRP-2 in melan-a cells. Tyrosinase and TRP-2 level was measured using western immunoblotting analysis after treatment for three days.



Samples	ΔL-value
Vehicle	0.44 ± 0.38
1% Ginseng ethylacetate fraction	0.63 ± 0.46
3% Ginseng ethylacetate fraction	0.97 ± 0.55

Fig. 2. Effect of ginseng ethylacetate fraction on UV-B induced hyperpigmentation in a skin of brown guinea pig. Vehicle and sample were applied to the hyperpigmented skin areas ones a day for six weeks. The degree of pigmentation decrease (ΔL-value) before and six weeks after measured using chromameter. Photographs of skin showing depigmenting effects of ginseng ethylacetate fraction (A: Vehicle, B: 3% ginseng ethylacetate fraction).

melan-a 세포에 100 ppm 농도로 처리 시 우수한 세포생존을 대비 멜라닌 생성저해효과를 나타내었다 (Hwang *et al.*, 2006). 따라서 이러한 멜라닌 억제효과가 어떠한 원인에 의하여 일어나는지 검증하기 위해 멜라닌 생합성에 주요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase와 dopachrome tautomerase의 세포내 발현량을 측정하였다 (Iozumi *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2005; Wang & Hebert, 2006). 피부백삼 에틸아세테이트 분획물을 3일간 처리한 결과 10 ppm과 100 ppm 농도로 처리된 세포에서 tyrosinase 발현량이 농도의존적으로 줄어드는 것을 확인 할 수 있었으며 dopachrome tautomerase 발현량에는 변화가 없었다 (Fig. 1). 따라서 이 분획물은 멜라닌 생합성의 초기에 관여하는 tyrosinase의 세포내 생합성량을 감소시킴으로써 결과적으로 멜라닌 생성량을 줄이는 것으로 판단된다.

2. 자외선으로 유도된 피부색소침착에 미치는 영향 측정

Brown guinea pig의 등 부분 피부에 UV-B를 조사하여 피부 색소침착을 유도한 후 피부백삼 에틸아세테이트 분획물을 6주간 도포한 결과 용매만을 도포한 부위에 비하여 3% 농도로 도포한 부위에서 유의적인 피부색의 완화효과를 관찰할 수 있

있으며 모든 도포 부위에서 피부발적이나 이상징후는 관찰되지 않았다 (Fig. 2). 따라서 백삼 에틸아세테이트 분획물은 인체피부에서 큰 부작용 없이 피부색 완화효과를 나타낼 가능성이 높으며 향후 추가연구를 통해 피부색소질환완화소재로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

백삼 에틸아세테이트 분획물은 멜라닌 생성세포에 처리시 멜라닌 생합성 과정의 주요효소인 tyrosinase의 발현량을 감소시켰으며 따라서 백삼 에틸아세테이트 분획물의 멜라닌 생성세포에서 세포생존을 대비 멜라닌 생성억제 효과는 tyrosinase의 활성의 억제효과 뿐만 아니라 세포내 tyrosinase 발현량을 감소시키는 것이 주요한 원인으로 판단된다. 또한 백삼 에틸아세테이트 분획물은 이상 징후 없이 자외선으로 유도된 brown guinea pig의 피부색소 침착을 완화시켜 피부미백을 목적으로 하는 소재로 활용될 수 있는 높은 가능성을 가지는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구논문은 한국식품연구원 기관고유사업의 지원에 의한 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Ando H, Ryu A, Hashimoto A, Oka M, Ichihashi M** (1998) Linoleic acid and α -linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin. *Arch. Dermatol. Res.* 290:375-381.
- Choi SY, Kang NJ, Kim HC** (2006) Inhibitory Effects of Root Extracts on Melanin Biosynthesis in *Rodgersia podophylla* A. Gary. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 14(1):27-30.
- Fang J, Han Q, Johnson JK, Christensen BM, Li J** (2002) Functional expression and characterization of aegypti dopachrome conversion enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 287-293.
- Hill HZ, Li W, Xin P, Michell DL** (1997) Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res.* 10:158-161.
- Hwang EY, Kong YH, Lee YC, Kim YC, Yoo KM, Jo YO, Choi SY** (2006) Comparison of Phenolic Compounds Contents between White and Red ginseng and Their Inhibitory Effect on Melanin Biosynthesis. *J. Ginseng Res.* 30(2):82-87.
- Iozumi K, Hoganson GE, Pemella R, Everett MA, Fuller BB** (1993) Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 100:806-811.
- Kim KS, Kim JA, Eom SY, Lee SH, Min KR, Kim Y** (2005) Inhibitory effect of piperlonguminine on melanin production in melanoma B16 cell line by downregulation of tyrosinase expression. *Pigment Cell Res.* 19:90-98.
- Kong YH, Lee P, Choi SY** (2007) Action of *Rodgersia podophylla* Root Extract on Melanin Biosynthesis in Skin. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 15(6):434-436.
- Lin JY, Fisher DE** (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 455:843-850.
- Marmol V, Beermann F** (1996) Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation, *FEBS Lett.* 381:165-168.
- Parvez S, Kang M, Chung HS, Cho C, Hong MC, Shin MK, Bae H** (2006) Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.* 20:921-934.
- Pawelek JM** (1991) After dopachrome? *Pigment Cell Res.* 4:53-62.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J** (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 84:1155-1228.
- Tsukamoto K, Jackson IJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ** (1992) A second tyrosinase related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed dopa chrome tautomerase. *EMBO J.* 11:519-526.
- Wang N, Hebert DN** (2006) Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. *Pigment Cell Res.* 19:3-18.