

자외선 B 조사 마우스에서 표피멜라닌세포 변화에 대한 헤모힘의 방어효과

이해준*, 김종춘†, 문창중†, 정우희‡, 박혜란‡, 조성기‡, 장중식§, 김태환||, 김성호†

*한국원자력의학원, †전남대학교 수의학과, ‡정읍방사선과학연구소,

§경북대학교 축산학과, ||경북대학교 수의학과

2011년 5월 19일 접수 / 2011년 6월 21일 1차 수정 / 2011년 6월 23일 2차 수정 / 2011년 6월 24일 채택

C57BL/6 마우스에서 자외선 B(UV-B) 조사에 의한 표피 멜라닌세포의 변화에 대한 헤모힘의 효과를 관찰하였다. 마우스에 UV-B를 매일 80 mJ·cm⁻² (0.5 mW·sec⁻¹)씩 7일간 조사하고 헤모힘을 UV 조사 전 또는 조사 후에 복강내주사, 경구투여 또는 피부에 도포하여 멜라닌세포 형성 억제효과 및 형성된 멜라닌세포에 대한 미백효과를 dihydroxyphenylalanine (DOPA) 염색으로 관찰하였다. 마우스의 귀등쪽 표피를 분리하여 관찰한바, 정상대조군에서는 mm²당 13~15개의 멜라닌세포가 관찰되었다. 멜라닌세포 형성 억제 실험에서는 평균치를 기준으로 복강내주사군에서 44.9%, 경구투여군에서는 35.6%의 억제효과를 보였고, 피부도포군에서는 30% 이상의 유의성 있는 억제 효과가 관찰되었다. 형성된 멜라닌세포의 감소 효과 실험에서는 평균치를 기준으로 복강내주사군의 경우 3주 및 6주에 각각 18.3%, 12.5%의 감소 효과가 관찰되었고, 경구투여군에서는 3주 및 6주에 각각 16.9%, 20.4%의 감소 효과가 관찰되었으며, 피부도포군의 경우 3주에 32.0%, 6주에 31.2%의 감소 효과를 보였다. 이상의 결과는 헤모힘이 UV에 의한 멜라닌세포 형성 억제제 및 미백제로서의 적용 가능성을 제시하였다. 구성 단미생약, 유효성분, 멜라닌세포 형성 억제 및 형성된 세포의 감소 촉진에 관여하는 작용 기전에 대한 추가 연구가 필요하다.

중심어 : 자외선, 멜라닌세포, 헤모힘

1. 서론

멜라닌은 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌세포에서 아미노산의 일종인 tyrosine이 tyrosinase를 주효소로 하는 효소의 작용으로 합성되어 멜라노좀 과립을 형성하고, 생성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동되어 자외선 등에 의한 피부의 노화나 일광화상을 억제하여 피부를 보호하는 긍정적인 기능을 가지고 있는 반면에, 과잉생성에 의한 피부의 색소침착 및 멜라닌 전구물질들에 의한 독성으로 세포사멸을 촉진하는 부정적인 기능을 동시에 가지고 있다[1,2].

다양한 피부보호제 및 미백제가 개발되어 사용되고 있으나, 이에 수반된 문제점도 보고되고 있다. 미백제로서, 4-hydroxyanisole 및 hydroquinone 등은 기미, 주근깨, 반점 및 임신기 hyperpigmentation과 같은 과잉 색소증 치료에 국소적용 되고 있다. 그러나 이들 화합물은 강력한 멜라닌 생성 저해 활성을 보이지만 색소 세포의 변성 또는 치사를 일으키고 세포 본래의 기능을 손상시키는 등의 부작용을 나타낸다. 특히 hydroquinone 계열은 강력

한 멜라닌 생합성 저해활성을 나타내어 미백용 크림으로 개발되었으나, 세포 독성으로 인한 피부자극과 피부병을 유발하여 일부 국가에서만 사용이 허가되고 있는 실정이다[3]. 코직산은 arbutin (hydroquinone-β-D-glucopyranoside), ascorbic acid 등과 함께 식품의 갈변 방지제, 화장품, 의약품용 미백제 성분으로 사용되고 있으며, 세정제, 세안제 등의 기능도 보고되고 있으나 낮은 저해활성, 사용중의 변색, 물질자체의 불안정성 등이 문제점으로 지적된다[3]. 그밖에 4-hydroxyindole, 4-hexylresorcinol, 2-mercapto-benzo-thiazole, cinamic acid, p-coumaric acid, salicyl-hydroxamic acid, tropolone, mimosine, methimazole, 2,3-naphthalenediol 등의 물질이 tyrosinase 저해활성을 나타내지만, 대부분의 물질이 암, 돌연변이 등을 유발시키거나, 강한 독성을 나타낸다고 보고[4,5]되어, 보다 안전한 천연물유래의 새로운 무독성 물질의 발굴이 관심의 대상이 되고 있다.

멜라닌 생성 억제 물질 발굴을 위한 시험에는 tyrosinase 활성저해실험, 배양색소세포를 이용한 실험, 실험동물에서의 생체시험, 사람피부를 대상으로 한 실험 등이 실시되고 있으며, 그중 멜라닌 합성의 주효소인 tyrosinase 활성저해실험이 멜라닌 중합체 억제제 개발의 초기 단계에서 주로 적용되고 있다[6]. 그러나 최근 멜라

책임저자 : 김성호, shokim@chonnam.ac.kr
광주광역시 북구 용봉동 300 번지, 전남대학교 수의학과

닌 생성이 tyrosinase에 의한 산화반응 뿐만 아니라, 여러 가지 복잡한 요인에 의해 진행된다는 것이 밝혀졌고, 또한 시험관내 시험에서의 tyrosinase활성 억제물질이 melanoma cell line에서는 활성이 전혀 나타나지 않는 등의 문제로 멜라닌 생성을 종합적으로 억제하는 물질의 개발이 요구되고 있다[7]. 따라서 피부의 멜라닌 생성을 억제하거나 미백 효과의 확인은 종래에 주로 이용되던 tyrosinase 활성 억제 확인법과 함께 상피조직에서의 멜라닌세포의 수적변화를 현미경 표본에서 형태학적으로 직접 관찰하는 실험이 더욱 정확하리라 생각된다.

본 연구에서는 비교적 독성이 적으면서 전리방사선 (ionizing radiation)에 의한 생체 손상 개선 효과[8]가 밝혀져 있으며, 식품의약품안전청에 '건강식품의 원료 또는 성분'으로 등재 인정된, 헤모힘을 적용하여 비전리방사선인 UV에 의한 멜라닌세포 형성 억제 및 형성된 멜라닌세포의 감소 효과를 표피조직에서 직접 관찰 측정하였다.

2. 재료와 방법

2.1 실험동물

성숙(7~8주령) C57BL/6N 마우스(오리엔트바이오, 성남, 한국)를 사용하였고, 각 실험에서 6마리를 하나의 실험군으로 적용하였다. 동물의 사육은 온도 22±2°C, 상대 습도 50±10%, 조명시간은 12시간(오전 8시 점등, 오후 8시 소등) 및 조도 200~300 lux로 설정된 시설에서 수행하였다. 순화기간을 거쳐 polycarbonate 사육상자에 3마리씩 수용하였고 실험동물용 고품사료(삼양사료, 원주, 한국)와 정수장치를 통과한 수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물실험은 전남대학교 동물실험윤리위원회의 승인 및 관리 하에 수행되었다.

2.2 UV조사

UV-B 조사는 광원으로 UV-B lamp GL20SE (Sankyo denki, Japan)를 이용하여 제작한 UV-B 조사기를 사용하였으며 광량은 Solarmeter (Solartech Inc., USA)로 측정하였다. 대조군을 제외한 실험군 마우스 양쪽 귀 등쪽면에 매일 오전 UV-B를 80 mJ·cm⁻² (0.5 mW·sec⁻¹)씩 7일 동안 조사하였다.

2.3 헤모힘 제조 및 투여

시험에 사용한 시료(헤모힘)는 한국원자력연구원의 기술제공에 따라 제조된 완성시료를 (주)선바이오텍(충남 연기군, 한국)에서 공급 받아 사용하였다. 제조과정을 간단히 설명하면, 당귀(Danggui, *Angelica gigas* Nakai)의 뿌리, 천궁(Chuanxiong, *Cnidium officinale* Makino)의 근경, 백작약(Baishaoyao, *Paeonia japonica* Miyabe)의 뿌리를 동일한 무게비율로 혼합한 후, 혼합 생약재 100 g당 증류수 1,000 ml을 가하고 4시간 열탕 추출하였다. 추출물의 고형분을 제거하고 감압농축하여 일차 생약복합추출물을 얻었다. 일차 생약복합추출물의 일부를 취하여 4배 부피의 100% 에탄올을 주정을 첨가하고 25°C 이하에서

16시간 정치한 후, 원심분리하여 침전된 조다당 분획을 수거하였다. 수거한 조다당 분획의 일부를 이에 해당하는 일차 생약복합추출물에 첨가하여 헤모힘을 제조하였다. 헤모힘은 동결건조하여 실험적용 시까지 냉동 저장하였다[8]. 멜라닌세포 형성 억제 실험에서 실험군의 설정은, 정상대조군(생리식염수 복강내주사), UV 조사대조군(UV + 생리식염수 복강내주사), HH복강내주사군(UV + HH 복강내주사), HH 경구투여군(UV + HH 경구투여) (Table 1), 연고기재 도포 정상대조군(연고기재도포), UV 조사대조군(UV + 연고기재도포), HH 0.075% 연고도포군(UV + HH 0.075% 연고도포) 및 HH 0.2% 연고도포군(UV + HH 0.2% 연고도포) (Table 2)으로 하였다. 복강내주사군의 경우 체중 kg당 25 mg을 최초 UV 조사 전 12 시간에 투여하고 이 후 격일로 동일 용량을 각 UV 조사 전 12시간에 투여하였으며, 경구투여군은 체중 kg당 250 mg을 최초 UV조사 전 7일부터 부검시까지 매일 투여하였으며, 피부도포군의 경우는 연고기재(1,3-butylene glycol, aloe vera gel, cyclopentasiloxane, decamethylcyclopentasiloxan, dimethicone copoyol crosspolymer, glycerin, imidazolidinyl urea, methyl parahydroxybenzoate, sodium meta bisulfate가 주성분이며 각종 화장품 제조시 기재로 사용되고 있고, 한국콜마 주식회사에서 제공받았음)에 헤모힘을 0.075% 및 0.2%로 혼합 제조하여 최초 UV 조사 전 24시간과 15분에 마우스 귀등쪽 피부에 도포하고 이 후 매일 UV 조사 전 15분에 반복 도포하였다. 도포는 귀 등쪽 전면에 얇은 막을 형성할 정도로 시행하였으며 여분의 연고는 가능한 제거하였다. 형성된 멜라닌세포의 감소 효과 실험에서 실험군의 설정은 정상대조군(무처리 대조군), UV 조사대조군(UV 단독 조사), HH복강내 주사군(UV + HH 복강내주사), HH 경구투여군(UV + HH 경구투여) 및 HH 0.2% 연고도포군(UV + HH 0.2% 연고도포) (Table 3)으로 하였다. 멜라닌세포 형성 억제 실험에서와 같은 용량을 적용하였으며 복강내주사군의 경우 최종 UV 조사 후 30분, 48시간, 96시간 및 144시간에 각각 투여하였고, 경구투여

Table 1. Effect of Oral Administration or Systemic Injection of HemoHIM (HH) on UV-B-induced Increases in DOPA-positive Epidermal Melanocyte.

Experimental group	Number of DOPA-positive melanocytes per mm ² of epidermis (mean±S.D.)
Normal control	15.47 ± 10.10
Radiation control	146.54 ± 28.67
HH* + radiation	80.71 ± 25.27 [†]
HH [†] + radiation	94.40 ± 9.56 [†]

The C57BL/6 mice (n=6) were treated with UV-B (80 mJ/cm²/day for 7 days) and were sacrificed at 24 hours after last irradiation.

*HH (25 mg/kg of body weight) or saline (vehicle) was i.p. injected at 12 hours before first irradiation, and 12 hours before each irradiation every other day.

[†]HH (250 mg/kg of body weight) was given p.o. for 14 days from 7 days before first irradiation.

[†]p<0.01 as compared with radiation control group.

군은 최종 UV 조사 후부터 부검 시까지 투여하였으며, 피부도포는 최종 UV 조사 후 15분 및 매일 1회씩 부검 시까지 도포하였다.

2.4 부검 및 현미경적 검사

멜라닌세포 형성 억제 실험에서는 최종 UV 조사 후 24 시간에, 형성된 멜라닌세포의 감소 효과 실험에서는 최종 UV 조사 후 3주 및 6주에 마우스를 경부탈구 방법으로 희생시켰다. 마우스의 양쪽 귀를 등쪽과 배쪽 피부로 분리한 후 등쪽의 표피쪽이 테이프의 접착면을 향하도록 투명 테이프에 표피를 부착시켰다. 37°C buffered EDTA 용액에서 2시간 동안 침적 처리하고 겹자로 진피부분을 제거하여 표피를 분리한 후 조직을 생리식염수로 세척한 다음 4°C cacodylate buffered formaldehyde solution에 20분 동안 고정시켰다. 고정 후 0.1% levodihydroxyphenylalanine (L-DOPA)용액에 37°C에서 1시간, 그리고 용액을 바꾸어 2시간을 배양한 후 glycerol로 봉입하여 광학현미경으로 검경하였다. 현미경 100배 시야에서 눈금이 있는 렌즈로, 세포의 분포가 비교적 균일한 귀등쪽 중간부위에서 2시야를 측정하고 mm² 당 세포수로 환산하였다.

2.5 통계분석

실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며 모든 성적의 분석은 Graph PAD In Plot program (GPIP, Graph PAD software, USA)을 사용하였고 Student's t-test를 이용하여 통계적 분석을 하였다.

3. 결과와 논의

정상대조군에서 표피 mm² 당 약 13~15개의 DOPA 양성 멜라닌세포가 관찰되었으며, 자외선조사에 따라 멜라닌세포의 세포체가 커지고 가지돌기의 수와 길이도 증가하였으며 분지의 정도도 잘 발달된 양상을 보였다(Fig. 1). 멜라닌세포 형성 억제 실험에서는 평균치를 기준으로 복강내주사군에서 44.9%, 경구투여군에서는 35.6%의 억제효과를 보였고(Table 1), 피부도포군에서는 30% 이상의 유의성 있는 억제 효과가 관찰되었으나 도포제내 헤모힘의 용량에는 비례하지 않았다(Table 2). 형성된 멜라닌세포의 감소 효과 실험에서는 평균치를 기준으로 복강내주사군의 경우 3주 및 6주에 각각 18.3%, 12.5%의 감소 효과가 관찰되었고, 경구투여군에서는 3주 및 6주에 각각 16.9%, 20.4%의 감소 효과가 관찰되었으며, 피부도포군의 경우 3주에 32.0%, 6주에 31.2%의 감소 효과를 보였다(Table 3). 헤모힘 투여군에서는 세포의 가지돌기 형성도 미약하였다.

기존의 멜라닌 생합성 저해제가 활성 및 안전성에 문제점을 가지고 있어 세포독성이 낮고 멜라닌 생합성 저해 활성이 높은 천연물유래의 멜라닌 생성억제물질의 연구가 관심의 대상이 되고 있다. 천연물에서 분리된 멜라닌 생성 억제 물질로는 감초에서 분리된 formononectin, glabrene, glabridin, glabrol, 누룩곰팡이(*Aspergillus*

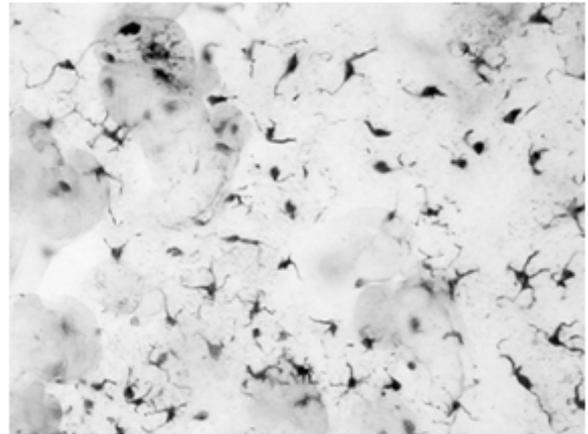


Fig. 1. Melanocytes morphology as seen under the light microscope of UV-B irradiated skin. DOPA stain, x 100.

Table 2. Effect of Topical Application of HemoHIM (HH) on UV-B-induced Increases in DOPA-positive Epidermal Melanocyte.

Experimental group	Number of DOPA-positive melanocytes per mm ² of epidermis (mean±S.D.)
Normal control	13.21 ± 8.94
Radiation control	152.83 ± 48.50
HH (0.075) * + radiation	96.20 ± 18.42 [†]
HH (0.2) [†] radiation	102.00 ± 22.49 [†]

The C57BL/6 mice (n=6) were treated with UV-B (80 mJ/cm²/day for 7 days) and were killed 24 hours after last irradiation. HH cream or cream base (vehicle) was topically treated at 24 hours and 15 minutes before first irradiation, and 15 minutes before each irradiation.

*% of HH in cream base.

[†]p<0.05 as compared with radiation control group.

Table 3. Effect of HemoHIM (HH) on the Changes of DOPA-positive Epidermal Melanocyte Number after UV-B Irradiation at 3rd and 6th Week.

Experimental group	Number of DOPA-positive melanocytes per mm ² of epidermis (mean ± S.D.)	
	3rd week	6th week
Normal control	12.34 ± 7.54	13.71 ± 8.15
Radiation control	361.75 ± 18.93	347.13 ± 15.35
Radiation + HH [*]	295.38 ± 23.91 [†]	303.75 ± 21.01 [†]
Radiation + HH [†]	300.50 ± 69.81	276.38 ± 26.42 [†]
Radiation + HH [§]	246.13 ± 30.20 [†]	238.75 ± 18.26 [†]

The C57BL/6 mice (n=6) were treated with UV-B (80 mJ/cm²/day for 7 days) and were sacrificed 3 and 6 weeks later.

*HH (25 mg/kg of body weight) or saline (vehicle) was given i.p. injected at 30 minutes, 48, 96 and 144 hours after last irradiation.

[†]HH (250 mg/kg of body weight) was given p.o. for 3 and 6 weeks after last irradiation.

[§]HH cream (0.2 % in cream base) or cream base (vehicle) was topically treated for 3 and 6 weeks after last irradiation.

[†]p<0.01 as compared with radiation control group.

oryzae)의 이차대사산물인 kojic acid, 우바우르시엽(Uvae Ursi Folium)의 arbutin, 상백피의 oxyresveratrol,

dihydromorin, artocarbene, 4-prenyloxyresveratrol 등이 알려져 있으며[9-12], 최근 국내에서 대극과 식물[13], 전호[14], 홍경천[15], 소목[16] 등의 추출물에 대한 연구가 보고되었다.

UV-B 조사 후 발생하는 표피내 멜라닌 세포수의 증가는 활동성 멜라닌세포의 활성화, 멜라닌세포의 분열과 이동, 줄기세포에서의 기원, 표피내 다른 수지상세포에서의 변화 등과 관련된다고 알려져 있다[17]. C57BL 마우스에서 출생시 몸통에 존재하던 멜라닌세포는 생후 12일경 소실되나, 귀, 발바닥, 꼬리 부위에서는 정상적으로 활동성 멜라닌세포가 성숙기까지 남아있다. 귀동쪽표피내 멜라닌세포는 불균등분포를 하고 있으며 위쪽 가장자리는 세포수가 많은 반면 기저부로 갈수록 세포수가 감소한다[18,19]. 따라서 본 실험에서는 부위에 따른 세포수의 차이를 감안하여 세포의 분포가 비교적 균일한 귀동쪽 중간 부위에서 수를 측정하였다. 본 실험에서 관찰된 바와 같이 귀동쪽 표피에서의 멜라닌세포 수적 증가는 주로 이미 존재하는 멜라닌세포의 증가에 기인할 것으로 사료되나, C57BL 마우스의 몸통과 같이 정상적으로 활동성 멜라닌세포가 존재하지 않는 부위에서도 UV 조사에 의해 양성 멜라닌세포가 증가한다는 보고[20]가 있어 비활동성 멜라닌세포의 활성화나 전구세포에서의 기원 등도 배제할 수 없으며 이와 같은 복합적 요인에 대한 별도의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 헤모힘의 UV에 의한 멜라닌세포 형성 억제 및 형성된 멜라닌세포의 감소 효과를 관찰한 바, 복강내 주사, 경구투여 및 피부도포 적용에서 공히 유의성 있는 결과를 나타냈다. UV에 의한 피부손상은 일부 물리적 작용을 포함하나 대부분 활성산소에 의한 DNA 손상이 주원인[21,22]으로 작용한다. UV를 포함한 방사선 노출은 생체손상을 막을 수 있는 항산화물질의 작용이 없을 경우 많은 양의 활성산소를 생성하게 되고, 산화적 스트레스를 일으킨다[23,24]. 따라서 항산화제에 의한 산화적 스트레스 유발을 예방하거나 조절하는 것이 이로 인한 생체 손상을 방지할 수 있다[25]. 헤모힘은 림프구를 대상으로 방사선에 의한 DNA 손상을 억제하였으며, 수산화 라디칼 소거 효과가 있는 것으로 알려져 있다[8]. 이러한 헤모힘의 효과가 직접 또는 간접적으로 UV에 의한 멜라닌세포 변화에도 관여한 것으로 사료된다. 피부도포의 경우 도포제내 헤모힘의 용량에 따른 차이가 관찰되지 않은 것은 피부를 통한 흡수의 차이가 용량의존적이지 않을 가능성과 도포제내의 헤모힘의 용량이 효과용량 초과 범위에 해당될 가능성이 있으며 이에 대한 추후연구가 필요하다고 사료된다. 헤모힘의 주요 구성 단미인 당귀, 천궁 및 백작약은 식품공전에 등재되어있는 무독성의 물질이며, 복합제로서도 독성 효과를 전혀 나타내지 않은 물질로 알려져 있다[26]. 따라서 헤모힘은 안전한 천연물 유래, 멜라닌 침착 방지 및 피부미백제로서의 적용 가능성을 제시하였다. 구성 단미생약, 유효성분, 멜라닌세포 형성 억제 및 형성된 세포의 감소 촉진에 관여하는 작용 기전에 대한 추가 연구가 필요하다.

4. 결론

독성이 적으면서 전리방사선에 의한 생체 손상 개선 효과가 밝혀져 있는 헤모힘을 적용하여 비전리방사선인 UV에 의한 멜라닌세포 형성 억제 및 형성된 멜라닌세포의 감소 효과를 표피조직에서 직접 관찰 측정하였다. 멜라닌세포 형성 억제 실험에서는 평균치를 기준으로 복강내주사군에서 44.9%, 경구투여군에서는 35.6%의 억제효과를 보였고, 피부도포군에서는 30% 이상의 유의성 있는 억제 효과가 관찰되었다. 형성된 멜라닌세포의 감소 효과 실험에서는 평균치를 기준으로 복강내주사군의 경우 3주 및 6주에 각각 18.3%, 12.5%의 감소 효과가 관찰되었고, 경구투여군에서는 3주 및 6주에 각각 16.9%, 20.4%의 감소 효과가 관찰되었으며, 피부도포군의 경우 3주에 32.0%, 6주에 31.2%의 감소 효과를 보였다. 헤모힘의 주요 구성 단미인 당귀, 천궁 및 백작약은 식품공전에 등재되어있는 무독성의 물질이며, 복합제로서도 독성 효과를 전혀 나타내지 않은 물질로 알려져 있어, 헤모힘은 안전한 천연물 유래, 멜라닌 침착 방지 및 피부미백제로서의 적용 가능성을 제시하였다. 구성 단미생약, 유효성분, 멜라닌세포 형성 억제 및 형성된 세포의 감소 촉진에 관여하는 작용 기전에 대한 추가 연구가 필요하다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단을 통하여 과학기술부가 시행한 원자력연구개발사업 연구비지원에 의해 수행되었고, 동물실험은 전남대학교 동물의학연구소의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kaufman RJ. Vectors used for expression in mammalian cells. *Meth. In. Enzymol.* 1991;205: 87-92.
2. Weixiong L, Helene ZH. Induced melanin reduces mutations and killing in mouse melanoma. *Phytochem. Phytobiol.* 1997;65:480-484.
3. Maeda K, Fukada M. In vivo effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1991;42: 361-368.
4. Dawley RM, Flurkey WH. 4-hexylresocinol, a potent inhibitor of mushroom tyrosinase. *J. Food Sci.* 1993;58:609-610.
5. Tomita K, Oda N, Ohbayashi M, Kamei H, Miyaki T, Oki T. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1990;43:1601-1605.
6. Laskin JD, Piccinini LA. Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. *J. Biol. Chem.* 1986;261:16626-16635.
7. Naeyaert JM, Eller M, Gordon PR, Park HY,

- Gilchrest BA. Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *Br. J. Dermatol.* 1991;125:297-303.
8. Jo SK, Park HR, Jung UH, Oh H, Kim SH, Yee ST. Protective effect of a herbal preparation (HemoHIM) on the selfrenewal tissues and immune system against γ -irradiation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2005;34:805813.
 9. Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 1998;11:206-212.
 10. Kahn V. Effect of kojic acid on the oxidation of DL-DOPA, norepinephrine, and dopamine by mushroom tyrosinase. *Pigment Cell Res.* 1995;8:234-240.
 11. Nerya O, Vaya J, Musa R, Izrael S, Ben-Arie R, Tamir S. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:1201-1207.
 12. Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;243:801-803.
 13. Kim JA, Choi JY, SoN AR, Park SH, Xu GH, Lee JG, Oh IS, Kim JJ, Chang HW, Chung SR, Jang TS, Lee SH. Inhibitory effect of some natural polyphenols isolated from euphorbiaceae plants on melanogenesis. *Kor. J. Pharmacogn.* 2004;35:157-163.
 14. Kim CT, Kim WC, Jin MH, Kim HJ, Kang SJ, Kang SH, Jung MH, Lim YH. Inhibitors of melanogenesis from the roots of *Peucedanum praeruprurum*. *Kor. J. Pharmacogn.* 2002;33:395-398.
 15. Choi DY, Ahn SY, Lee SG, Han JS, Kim EC, Lee HB, Shin JH, Kim EK, Row KH. Separation and performance test of whitening agent in *Rhodiola sachalinensis*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 2004;19:169-173.
 16. Chun HJ, Hwang SG, Lee JS, Baek SH, Jeon BH, Woo WH. Inhibitory effects of butyl alcohol extract from *Caesalpinia sappan* L. on melanogenesis in melan-a cells. *Kor. J. Pharmacogn.* 2002;33:130-136.
 17. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 2004;84:1155-1228.
 18. Gerson DE, Szabo G. Effect of single gene substitution on the melanocyte system of the C57BL mouse: quantitative and qualitative histology. *Nature.* 1968;218:381-382.
 19. Reynolds J. The epidermal melanocytes of mice. *J. Anat.* 1954;88:45-58.
 20. Jimbow K, Uesugi T. New melanogenesis and photobiological processes in activation and proliferation of precursor melanocytes after UV-exposure: ultrastructural differentiation of precursor melanocytes from Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 1982;78:108-115.
 21. Black HS. Reassessment of a free radical theory of cancer with emphasis on ultraviolet carcinogenesis. *Integr. Cancer Ther.* 2004;3:279-293.
 22. Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T. UV-induced skin damage. *Toxicology.* 2003;189:21-39.
 23. Pelle E, Huang X, Mammone T, Marenus K, Maes D, Frenkel K. Ultraviolet-B-induced oxidative DNA base damage in primary normal human epidermal keratinocytes and inhibition by a hydroxyl radical scavenger. *J. Invest. Dermatol.* 2003;121:177-183.
 24. Zastrow L, Groth N, Klein F, Kockott D, Lademann J, Ferrero L. UV, visible and infrared light. Which wavelengths produce oxidative stress in human skin? *Hautarzt* 2009;60:310-317.
 25. Jagetia GC. Radioprotective potential of plants and herbs against the effects of ionizing radiation. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2007;40:7481.
 26. Kim SH, Kim JC, Kim SR, Lee HJ. Evaluation on biosafety in long-term administration, teratogenicity and local toxicity of developed product. *KAERI/CM-867-2004.*

Protective Effect of HemoHIM on Epidermal Melanocytes in Ultraviolet-B irradiated Mice

Hae-June Lee^{*}, Jong-Choon Kim[†], Changjong Moon[†], Uhee Jung[†], Hae-Ran Park[†], Sung-Kee Jo[†], Jong-Sik Jang[§], Tae-Hwan Kim^{||}, and Sung-Ho Kim[†]

^{*}Korea Institute of Radiological & Medical Science,

[†]College of Veterinary Medicine, Chonnam National University,

[‡]Advanced Radiation Technology Institute, Jeongeup Campus of Korea Atomic Energy Research Institute,

[§]Department of Animal Science, Kyungpook National University,

^{||}College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

Abstract - We induced the activation of melanocytes in the epidermis of C57BL/6 mice by ultraviolet-B (UV-B) irradiation, and observed the effect of an herbal preparation (HemoHIM, HH) on the formation, and decrease of UV-B-induced epidermal melanocytes. C57BL/6 mice were irradiated by UV-B 80 mJ·cm⁻² (0.5 mW·sec⁻¹) daily for 7 days, and HH was intraperitoneally, orally or topically applied pre- or post-irradiation. For the estimation of change of epidermal melanocytes, light microscopic observation with dihydroxyphenylalanine (DOPA) stain was performed. Split epidermal sheets prepared from the ear of untreated mice exhibited 13~15 melanocytes·mm⁻², and one week after UV irradiation, the applied areas showed an increased number of strongly DOPA-positive melanocytes with stout dendrites. But intraperitoneal, oral or topical treatment with HH before each irradiation interrupted UV-B-induced pigmentation and resulted in a marked reduction in the number of epidermal melanocytes as compared to the number found in UV-B-irradiated, untreated control skin. The number and size of DOPA-positive epidermal melanocytes were also significantly decreased in intraperitoneally injected or topically applied group after irradiation with HH at 3rd and 6th weeks after irradiation. The present study suggests the HH as inhibitor of UV-B-induced pigmentation, and depigmenting agent.

Keywords : Ultraviolet, Melanocyte, HemoHIM