

가감서시옥용산의 미백효과에 관한 연구

손동석* · 김윤범*

ABSTRACT

Depigmentation activity of Kakamseosikyong-san

Dong-seok Son, Yoon-Bum Kim

Objective : The aim of this study was to investigate the skin-whitening effect of Kakamseosikyong-san

Method : We investigated that the extracts of Kakamseosikyong-san inhibit activity of tyrosinase, the enzyme which converts 3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine to dopachrom in the biosynthetic process of melanin. the UV absorbance of the extracts in the UV-A region and UV-B region was measured by UV scanning. the effect of extracts on cell viability and melanin production in cultured B16 mouse melanoma cells was measured, and cytoprotective effects of extracts on PC12 cells injured by hydrogen peroxide was measured by MTT assay

Results : The extracts of Kakamseosikyong-san inhibited activity of tyrosinase. The extracts not only showed inhibitory effects on melanin production in cultured B16 mouse melanoma cells, but also exhibited cytoprotective effects on PC12 cells injured by hydrogen peroxide, but did not showed an absorbance in the UV-A region and UV-B region.

Conclusion : These results suggest that Kakamseosikyong-san inhibit melanin biosynthesis which is involved in hyperpigmentation and could be used as a whitening agent for the skin.

* 경희대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

I. 緒 論

환경오염에 따라 피부의 자외선 노출이 증가하고 있다. 이 때문에 피부노화에 의한 피부색의 변화, 침착이 심해지고 있다. 또한 미용적인 이유에서 피부 착색에 대한 관심이 높아지고 있다. 이에 보다 안정적이고 효과적인 미백 소재를 발견하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁻³⁾.

피부노화에 의하여 피부색의 이상을 초래하는 질환은 기미(melasma), 주근깨(freckle), 검버섯(seborrheic keratosis) 등이며 이는 주로 melanin 색소 침착으로 인한 질환이다. 한의학에서는 肝斑, 黑斑, 雀斑, 黥, 黧 등으로 간주하고 있다.

색소침착 질환의 대표적인 질환인 기미는 햇빛 노출부위에 생기는 비교적 흔한 후천성 과색소침착 질환으로서 회갈색의 반점들이 주로 뺨, 이마, 윗입술, 코, 턱에 대칭적으로 생긴다. 대부분 가임기 여성에게 호발하지만 남자에서도 10%정도 발생된다.

피부 착색의 원인으로는 자외선, 임신, 과로, 생리, 정신적인 스트레스에 의하여 색상이 짙어지는 경향이 많다. 햇빛 중의 자외선은 피부를 자극하여 피부가 과민상태가 되면 홍반이 생기고, 가렵게 되고 습진이 생기게 되는 등의 염증반응이 진행된다. 그러면 melanin세포가 자극을 받아 melanin을 만들게 된다. melanin 세포에서 만들어진 melanin은 각질형성세포로 전달되며, 각질형성세포와 동일한 대사과정을 거쳐 탈락되게 된다. 젊은 사람의 피부는 신진대사가 활발하여 대략 4주정도 지나면 피부색이 자연스럽게 옅어지게 되어 원래의 피부색으로 돌아가게 되나 나이가 들어 신진대사 둔화되면 이러한 회복력이 약해지며, 이로 인해 기미가 더 눈에 띄게 된다. 또한 기미가 있는 사람은 그렇지 않은 사람에 비해 노화의 원인이 되는 과산화지질이 수십 배가 많이 존재한다.

피부 착색의 확실한 치료법은 아직 정립이 되지 않은 상태이다. 현재 임상가에서 널리 이용되는 방법으로는 미백성 약물, 화학박피술, 레이저 등이 있으며, 최근에는 이온영동법을 이용하여 비타민 C의 흡수를 최대화시켜 치료하는 방법이 시도되고 있다⁴⁾.

피부의 색을 결정하는 인자는 표피에 분포하는 melanin, 진피에 분포하는 hemoglobin 및 피하조직에 분포하는 carotene에 의해 결정되는 데 그중 표피에 존재하는 melanin 세포에서 생성되는 melanin의 양과 분포에 의해 거의 결정되며⁵⁾, 따라서 미백효과를 검증하기 위해서는 melanin 형성을 억제하는지 여부를 밝히는 것이 중요하다.

한편, 일광 노출 후 피부에 나타나는 색소 침착 반응은 자외선에 의한 여러 cytokine의 증가 및 생산, basic fibroblast growth factor(bFGF), nerve growth factor, endothelin-1, ACTH, β -lipotropin, β -endorphin, prostaglandin 등의 분비와 함께 α -melanocyte stimulating hormone(MSH)의 영향이 중요한 것으로 알려져 있다⁶⁾. tyrosinase가 활성화되면 melanin 세포 안에 있는 tyrosine이 일련의 화학과정을 거쳐 pheomelanin과 eumelanin으로 만들어지며, 이는 melanosome에 실려 각질형성세포로 전달된다. 각질형성세포는 턴-오버에 따라 표면으로 이동하게 되며 최종적으로 분리되어 탈락된다.

미백소재에 대한 연구는 tyrosinase 활성억제 소재 연구, 피부각질층의 제거 촉진 효능을 가진 소재에 대한 연구, 자외선 차단소재 연구, 세포독성억제 소재 연구, 활성산소 제거 소재에 대한 연구 등으로 이루어지고 있다⁴⁾.

관련 연구들을 살펴보면, tyrosine의 산화를 촉매 하는 tyrosinase의 활성을 저해하는 물질에 대한 연구로 kojic acid⁷⁻¹⁰⁾, 알부틴, 감초추출물¹¹⁾, 닥나무추출물에 관한 연구가 있으며, 피부박리를 촉진하여 melanin 색소제거를 촉진시키는 소

제에 대한 연구로는 살리실산, 레조르신, 레틴산¹²⁻¹⁴⁾, 알파-히드록시산에 대한 연구 등이 있다. 천연물에서 미백소재를 찾고자 하는 연구를 보면 *Arctostaphylos Plants*¹⁵⁾, *Melaleuca leucadendron*¹⁶⁾, 甘草¹¹⁾, 桑白皮³⁾, genistein(대두에서 얻어진 isoflavone)¹⁷⁾ 등에 대한 연구가 있으며, hydroquinone^{18,19)}, endothelin²⁰⁾, captopril²¹⁾, wine phenolics 과 sorghum tannins²²⁾, 비타민 E, alpha-tocopheryl ferulate^{23,24)} 등에 대한 연구도 있다.

한약복합제제에 대한 미백 연구로는 麻黃 및 麻風膏의 미백효과에 관한 연구²⁵⁾와 瀉白散의 미백효과 검정에 관한 연구²⁶⁾ 등이 있으나, 그 외에는 한약 복합제제에 대한 연구는 미진한 상태이다.

이에 본 연구에서는 東醫寶鑑²⁷⁾ 頭門, 方藥合編²⁸⁾ 등에 수록되어 있으며 역대문헌 중 피부 미백을 목적으로 쓰인 외용처방 중 가장 많이 쓰인 西施玉容散²⁹⁾의 피부 적용 소재로의 응용을 알아보고자, 加減西施玉容散 추출물에 대하여 피부 melanin 생성 억제효과를 tyrosinase와 B16 melanoma cell line에서 검색하였으며, 또한 자외선 차단 효과 여부에 대하여 알아보았으며, hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 세포손상에 대한 방어효과에 대해 검색하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 실험재료

(1) 약재

약재는 경동시장에서 구입한 후 경희대학교 동서의학대학원 한약리화교실에서 검증한 것을 정선하여 사용하였으며 실험에 사용된 처방은 東醫寶鑑²⁷⁾에 기재된 西施玉容散의 加減方으로 그 구성약물의 내용은 다음과 같다(Table I).

Table I. Composition and Dosage of Kakamseosiokyong-san

韓藥名	生藥名 ³⁰⁾	用量(g)
綠豆	Phaseoli Radiati Semen	10
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	10
白芨	Bletillae Rhizoma	10
白薇	Ampelopsis Radix	10
白僵蠶	Bombyx Batryticatus	10
白附子	Typhonii Rhizoma	10
天花粉	Trichosanthis Radix	10
藿香	Agastaches Herba	5
防風	Ledebouriellae Radix	2
藁本	Ligustici Rhizoma	2
皂角	Gleditsiae Fructus	1
計		80

(2) 시약

Mushroom tyrosinase, L-3,4-dihydroxyphenyl alanine(L-DOPA), L-Tyrosine 등은 Sigma사에서 구입하였고, 그 이외의 사용한 시약 등은 국산 일급용 시약을 사용하였고, 유기용매는 국내 덕산이화학으로부터 구입하였다.

PC12세포의 배양에 사용된 RPMI1640 배지와 horse serum, fetal bovine serum, penicillin-streptomycin, 0.25% Trypsin-EDTA는 모두 Gibco BRL(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였고, poly-D-lysine, DMSO 및 30% hydrogen peroxide는 Sigma(U.S.A.)사의 제품을 구입하여 사용하였다. MTT assay에 사용된 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)는 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

(3) 세포주

실험에 사용된 melanoma B16 세포주는 서울대학교 세포주는행으로부터 공여받아 사용하였

다. PC12세포는 PC12 세포주(rat, pheochromocytoma)는 이화여자대학교 의과대학 약리학교실로부터 공급받아 사용하였다.

(4) 기기

약재의 추출과 농축에는 sonicator(Branson, U.S.A.)와 evaporator(eyela, Japan)를 사용하였고, tyrosinase, melanoma cell assay, MTT assay에는 ELISA reader E09090(Molecular Device, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 실험방법

(1) 시료의 조제

加減西施玉容散을 총 80g을 비이커에 넣은 후 85% MeOH를 붓고, 상온에서 하루를 둔 후, sonicate를 1시간 시킨 후, filtering하는 과정을 총 3회 실시하였다.

加減西施玉容散은 농축플라스크에 용매를 넣은 후, 농축기로 MeOH를 증발시켜 powder를 얻었다. final powder volume은 6.35g이었다. 그 후 powder를 10mg씩 e-tube에 넣고, D.W: MeOH = 1:1 비율로 (각 500 μ l씩) 1ml을 넣어, 10mg/ml 을 만들었다.

(2) Tyrosinase의 활성 억제율 측정

효소(tyrosinase), DOPA를 phosphate buffer에 녹인다. (이때, DOPA는 10일 이상 지나면 상하기 때문에 냉장 보관한다. tyrosinase도 냉동 보관하여 사용할 때마다 조금씩 만들어 쓴다.) DOPA 49.3mg을 50ml tube에 넣고, phosphate buffer 30ml을 넣고, vortex한다. 농도별 각 sample을 100 μ l씩 새 e-tube에 넣었다.

sample을 농도별로 2000 μ g/ml, 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 200 μ g/ml, 100 μ g/ml이 되도록 희석하였다..

96well에 DOPA 120 μ l+sample 40 μ l를 넣고,

효소(tyrosinase)를 40 μ l add후, 37 $^{\circ}$ C에서 20분 incubate후에 elisa reader를 이용하여 생성된 dopa chrome의 양을 490nm에서 흡광도 측정하고 저해율을 다음과 같이 측정계산 하였다. control은 약제 없이 D.W : MeOH = 1:1 solution 40 μ l+phosphate buffer로 하였다.

$$\text{저해율} = \left[\frac{\text{control의 } A_{490} - \text{시료용액이 첨가된 것의 } A_{490}}{\text{control의 } A_{490}} \right] \times 100$$

(3) UV-A영역과 UV-B영역에서의 흡수도 측정

methanol에 검색시료를 33.4 μ m(마이크로 물)로 녹여 200nm~600nm에서 UV scanning을 수행하여 그 absorbance를 측정하였다.

(4) Melanoma 세포 주에서의 세포생존율과 melanin 생성량측정

B16 melanoma cell line은 10% FBS와 200nm TPA(Bennett DC, cooper PJ, Hart IR. 1987)가 첨가된 RPMI medium 1640배지 하에서 배양하였다. 100 π tissue culture dish에 10ml의 배지를 넣고 약 5 \times 10⁵개의 세포를 접종하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 환경에서 3-4일 후 confluent하게 자라면 24 well plate에 10⁵cells/well로 희석하여 재 접종하고 24시간 배양하였다.

well 당 1000 μ ldml 배지를 매일 갈아주면서 10 μ l 시료를 3일간 처리한 후(solvent :50% propylene glycol, 30% EtOH, 20% H₂O) 1일간 더 배양하였다.

cell viability를 측정하기 위해서 배지를 제거 후 PBS로 washing하였다. Crystal violet (CV 0.1%, 10% EtOH, 나머지 PBS) 용액 200 μ l를 첨가하고 5분간 상온에서 incubation 한 후 PBS로 2번 washing하였다. 95% EtOH 1ml 첨가하여 상온에서 10분간 shaking한 후 96-well plate에 200 μ l를 가해서 590nm에서 흡광도를 측정하였다.

melanin 함량을 측정하기 위해서 배지를 제거 후 PBS로 washing하였다. 1 N NaOH 1 ml씩 가한 후 pipetting을 여러 번 함으로써 melanin을 녹인 후 96-well plate에 melanin이 함유된 상층 배지 200 μ l를 이행시킨 후 400nm에서 흡광도 측정하였다.

(5) Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 세포손상에 대한 방어효과측정

① PC12 세포의 배양

PC12 cell(rat, pheochromocytoma)은 10% horse serum(Gibco BRL, U.S.A.), 5% fetal bovine serum(Gibco BRL, U.S.A.) 및 1% penicillin-streptomycin(Gibco BRL, U.S.A.)이 함유된 RPMI1640 배지(Gibco BRL, U.S.A.)를 사용하여, 온도와 습도가 유지되는 37 °C 배양기 하에서 95%의 공기와 5% CO₂의 혼합기체를 계속 공급하면서 배양하였다. 세포를 poly-D-lysine으로 coating 된 배양용기(100mm)에서 배양한 후 96 well microplate나 6 well plate에 1.5 × 10⁵ cells/ml의 농도로 희석하여 이식한 후 실험하였다.

② 시료와 hydrogen peroxide의 처리

3×10⁴ cells/well의 PC12 cell을 96 well plate에 분주하고 24 ~ 48시간동안 37 °C incubator에서 배양하였다. 배양액을 serum free media로 교체한 후 DPBS에 녹인 加減西施玉容散 추출물을 최종농도가 1, 10, 100 μ g/ml이 되도록 90분간 전처리하였다. 이 때 대조군은 DPBS를 같은 부피로 투여하였다. 90분이 경과한 후 30% hydrogen peroxide를 DPBS에 희석하여 150 μ M의 농도로 처리하였다.

③ MTT assay

세포생존율을 측정하기 위해 MTT reduction assay를 사용하였다. 원래의 96 well plate에 0.5 mg/ml의 MTT 200 μ l를 넣고 4시간동안 37 °C에

서 반응시킨 후 여기에 isopropyl alcohol 100 μ l를 넣고 shaking plate에서 shaking하여 완전히 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서의 UV 흡광도를 측정하였다. 세포생존율(%)은 흡광도값을 H₂O₂를 처리하지 않은 정상군에 대한 백분율로 나타냈다.

④ 통계방법

약물의 효과를 판정하기 위하여 각 실험군을 대조군과 비교하는 Student's t-test를 사용하였다.

III. 實驗成績

1. Tyrosinase 활성 억제 효과

96well에 DOPA 120 μ l+sample 40 μ l를 넣고, 효소(tyrosinase)를 40 μ l add후, 37°C에서 20분 incubate후에 elisa reader를 이용하여 생성된 dopa chrome의 양을 490nm에서 흡광도 측정하고 저해율을 측정계산 하였다. control은 약제없이 D.W : MeOH = 1:1 solution 40 μ l+phosphate buffer로 하였다.

加減西施玉容散 추출물은 농도 의존적으로 tyrosinase 활성 억제효과를 나타내었다. 대조군에 비하여 tyrosinase 활성 억제도가 100 μ g/ml에서 0.3%, 200 μ g/ml에서 3%, 500 μ g/ml에서 6.7%, 1000 μ g/ml에서 9.3%, 2000 μ g/ml에서 12.7%를 나타내었다. 각 실험 결과는 3번 반복 실험한 평균치로 하였다(Figure 1).

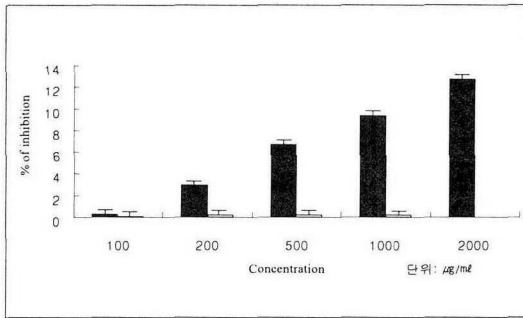


Figure 1. Inhibitory effects on tyrosinase activity of Kakamseosiokyong-san Extracts Tyrosinase was preincubated with test substance at 25°C for 10min prior to incubation with dopa for 30min, and the absorbance was read at 490nm. Values are means \pm S.E.M. of percentages of normal group (n=9).

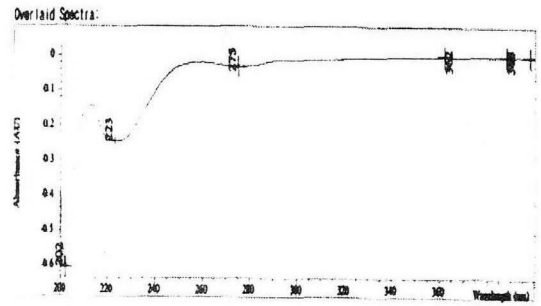


Figure 2. UV spectrum of methanol

2. UV-A영역과 UV-B영역에서의 흡수효과

加減西施玉容散의 추출물을 methanol에 33.4 μ m (마이크로 몰)로 녹여 200nm~600nm에서 UV scanning을 수행하였고, 그 대조군으로는 methanol을 사용하였다.

UV spectrum을 분석한 결과 加減西施玉容散 추출물의 경우 대조군과 비교해 보건데, UV-A(270-290nm)와 UV-B(350-370nm)에서 특징적인 peak를 보이지 않고 있다. 加減西施玉容散은 UV차단효과가 미약함을 추정할 수 있었다 (Figure 2, Figure 3).

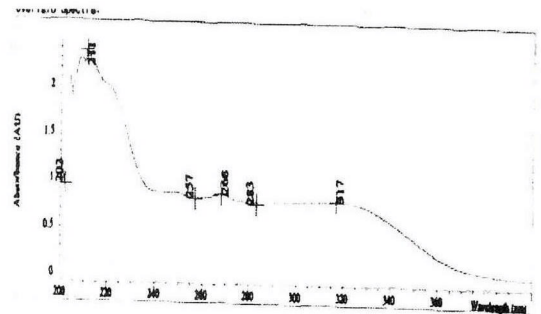


Figure 3. UV spectrum of *Kakamseosiokyong-san*

3. Melanoma 세포주에서의 세포생존율과 melanin 생성량에 미치는 영향

B16 melanoma cell line은 10% FBS와 200nm TPA(Bennett DC, cooper PJ, Hart IR. 1987)가 첨가된 RPMI medium 1640배지 하에서 배양하였다.

cell viability 측정하기 위해서 배지제거 후 PBS로 washing하였다. Crystal violet (CV 0.1%, 10% EtOH, 나머지 PBS) 용액 200 μ l를 첨가하고 5분간 상온에서 incubation 한 후 PBS로 2번 washing하였다. 95% EtOH 1ml 첨가하여 상온에서 10분간 shaking 한 후 96-well plate에 200 μ l를 가해서 590nm에서 흡광도를 측정하였다.

Melanin 함량측정을 측정하기 위해서는 배지 제거 후 PBS로 washing하였다. 1 N NaOH 1 ml 씩 가한 후 pipetting을 여러 번 함으로써 melanin을 녹인 후 96-well plate에 melanin이 함유된 상층 배지 200 μ l를 이행시킨 후 400nm에서 흡광도 측정하였다.

加減西施玉容散 추출물은 농도 의존적으로 melanin 생성 억제효과를 나타내었다. 대조군에 비해서 1 μ g/ml에서 75.20%, 10 μ g/ml에서 70.80%, 100 μ g/ml에서 57.50%를 나타내었다. 또한 세포생존율은 1 μ g/ml에서 74.30%, 10 μ g/ml에서 64.50%, 100 μ g/ml에서 62.10%를 나타내었다. 각 실험 결과는 3번 반복 실험한 평균치로 하였다(Figure 4).

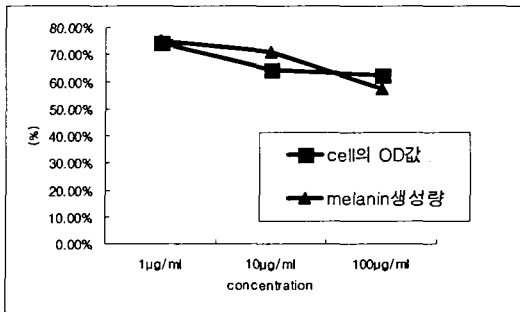


Figure 4. Effect of *Kakamseosiokyong-san* extract on cell viability and melanin production of B16 melanoma cells

4. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 세포손상에 대한 영향

加減西施玉容散의 세포손상에 대한 방어효과를 관찰하기 위하여 PC12 세포를 96 well plate에 3×10^4 cells/well로 이식하고 37 $^{\circ}$ C에서 incubation하여 cell이 잘 부착된 것만 실험에 사용하였다. 24시간 후에 加減西施玉容散 추출물을 1, 10, 100 μ g/ml이 되도록 제조하여 90분간 각각 처리한 후 150 μ M hydrogen peroxide를 24시간

동안 처리하였다.

현미경적 관찰 결과 cell morphology상 hydrogen peroxide를 처리한 군은 정상군에 비하여 심하게 PC12 세포수가 감소하였고, 불규칙한 형태의 변형을 보였다. MTT assay 상으로 PBS를 투여한 대조군에서 23.2 \pm 4.0%의 세포생존율을 보인 반면 加減西施玉容散 메탄올추출물은 1, 10, 100 μ g/ml에서 각각 46.5 \pm 3.1% ($p < 0.05$), 58.4 \pm 2.9% ($p < 0.01$), 31.7 \pm 2.5% (N.S)의 세포생존율을 보였다. 낮은 농도인 1, 10 μ g/ml에서는 유의한 효과를 보였으나 높은 농도인 100 μ g/ml에서는 오히려 효과가 없었다. 그러나 고농도에서의 세포독성도 명확하지는 않았다(Table II, Figure 5).

Table II. Cytoprotective effects of Kakamseosiokyong-san Extracts on PC12 cells injured by hydrogen peroxide

concentration(μ g/ml)	protection(%)
1 μ g/ml	46.5 \pm 3.1% ($p < 0.05$)
10 μ g/ml	58.4 \pm 2.9% ($p < 0.01$)
100 μ g/ml	31.7 \pm 2.5% (N.S)

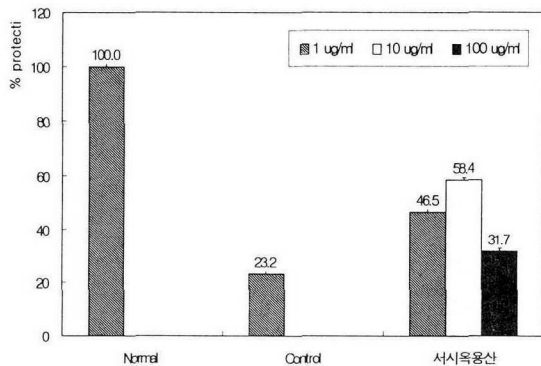


Figure 5. Cytoprotective effects of Kakamseosiokyong-san Extracts on PC12 cells injured by hydrogen peroxide. After pretreatment of PC12 cells with Extracts (1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 90 min., cells were exposed to hydrogen peroxide (150 μM) for 24 hrs, then cytotoxicity measured by MTT assay. Viability of hydrogen peroxide untreated cells was set to 100%. Values are means \pm S.E.M. of percentages of normal group (n=9). * represents significantly different from hydrogen peroxide treated control group (*p<0.05, **p<0.01)

IV. 考 察

피부색의 이상을 초래하는 질환은 기미(melasma), 주근깨(freckle), 검버섯(seborrheic keratosis) 등이며 이는 주로 melanin 색소 침착으로 인한 색소침착 질환이다. 한의학에서는 肝斑, 黑斑, 雀斑, 黥, 黧 등으로 간주하고 있으며, 이중 기미는 임상에서 비교적 흔한 경우에 해당한다.

기미는 햇빛 노출부위에 생기는 후천성 과색소 침착 질환으로서 회갈색의 반점들이 주로 뺨, 이마, 윗입술, 코, 턱에 대칭적으로 생긴다. 대부분 가임기 여성에게 호발하지만 남자에서도 10%정도 발생된다. 기미는 임상적으로 크게 3가지 facial pattern으로 나누는데 가장 흔한 모양은 뺨, 이마, 윗입술, 코, 턱을 침범하는 centropacial pattern이고 주로 뺨과 코에 분포하는 malar pattern과 아래턱에 분포하는 mandibular pattern이 있다. Wood등 검사에서 나타나는 형태에 따라 3가지 형태로 나누는데 기저층, 기저상층, 각질층에 melanin이 증가되어 Wood등 검사에서 병변이 두드러지게 보이는 표피형, 진피에 melanin 침착세포가 증가되어 있고 Wood등 검사에서 두드러지게 보이지 않는 진피형과 이 두 형태가 섞여 있는 혼합형이 있으며, 이런 형태의 분류는 조직학적 분류와 일치한다.

기미의 원인으로는 자외선, 임신, 과로, 생리, 정신적인 스트레스에 의하여 색상이 짙어지는 경향이 많다. 햇빛 중의 자외선은 피부를 자극하여 피부가 과민상태가 되면 홍반이 생기고, 가렵게 되고 습진이 생기게 되는 등의 염증반응이 진행된다. 그러면 melanin 세포가 자극을 받아 melanin을 만들게 된다. melanin 세포에서 만들어진 melanin은 각질형성세포로 전달되며, 각질형성세포와 동일한 대사과정을 거쳐 탈락되게 된다. 젊은 사람의 피부는 신진대사가 활발하여 대략 4주정도 지나면 피부색이 자연스럽게 옅어지게 되어 원래의 피부색으로 돌아가게 되나 나이가 들어 신진대사 둔화되면 이러한 회복력이 약해지며, 이로 인해 기미가 더 눈에 띄게 된다. 임신 중에는 황체호르몬이 분비가 되고, 피임약도 황체호르몬의 분비를 유도하므로 임신 중이나 피임약을 복용하는 중에는 기미가 생기기 쉽다. 황체호르몬은 피부를 햇빛에 과민하게 만들고 뇌하수체로부터 melanin 세포 자극호르몬(melanocyte

stimulating hormone, MSH)의 분비를 촉진하여 기미를 생기게 한다. 정신적인 긴장, 스트레스가 쌓였을 경우 기미가 더욱 심해지는 경우가 많다. 즉 지나치게 신경을 쓰게 되면 뇌하수체에서 분비되는 부신피질호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)이 정상시보다 많이 분비되어 melanin세포 자극호르몬(MSH)의 활동을 증가시킨다. 기타 부신피질의 기능이 나빠지거나 간의 기능이 저하되면 색소 침착이 일어나는 경우도 있으며, 향수에 함유된 베르갑텐(bergaptene)은 자외선에 의해 피부에 색소 침착을 남긴다. 또한 기미가 있는 사람은 그렇지 않은 사람에 비해 노화의 원인이 되는 과산화지질이 수십 배가 많게 존재한다.

기미의 확실한 치료법은 아직 정립이 되지 않은 상태이다. 현재 임상가에서 널리 이용되는 방법으로는 미백성 약물, 화학박피술, 레이저 등이 있다. 미백성 약물로는 페놀성 유도체(phenolic derivatives)와 비페놀성 유도체(nonphenolic derivatives)가 있다. 페놀성 유도체는 이미 널리 사용되고 있고 FDA(The Food and Drug Administration)의 승인을 얻은 hydroquinone이 있고 비페놀성 유도체로는 tretinoin과 azelaic acid가 있다. 또한 비타민 C도 melanin 생성을 억제하여 기미 치료에 효과가 있다고 알려져 있으나 수용액에서 빨리 산화되어 분해되기 때문에 국소 제제로서의 임상적 사용에는 한계가 제시되어 왔다. 하지만 이온영동법을 이용하여 비타민 C의 흡수를 최대화시키는 방법이 시도되고 있다. 이온영동법은 전류를 이용해서 피부를 구성하는 지방, 단백질, 물분자의 배열을 변화시켜 피부의 투과력을 바꿈으로서 약물이나 화학물질의 투과력을 증가시키는 치료방법이다.

피부색은 melanin, hemoglobin 및 carotene 3가지에 의해서 결정되는데 이중 가장 중요한 역할을 하는 것이 melanin이다. melanin의 주된 역

할은 피부에서 발생하는 active oxygen이나 free radical을 제거하고, 자외선 투과를 막아 피부의 내부를 보호하는 것이다.

melanin은 인체 내에서 피부, 모발구, 눈, 귀, 대뇌에서 나타나며, melanin 세포 주변의 섬유아 세포, 각질형성세포, 내피세포 등에서 분비되는 많은 내적 환경 요소의 작용에 의해 melanin 세포의 기능에 변화를 주어 생성된다. 특히 각질형성세포에서 분비된 여러 인자가 melanin 세포의 성장과 형태 및 분화에 영향을 미치며 궁극적으로 피부의 색소 침착에 영향을 미친다.

한편, 일광 노출 후 피부에 나타나는 색소 침착 반응은 자외선에 의한 여러 cytokine의 증가 및 생산, basic fibroblast growth factor(bFGF), nerve growth factor, endothelin-1, ACTH, β -lipotropin, β -endorphin, prostaglandin 등의 분비와 함께 α -melanocyte stimulating hormone(MSH)의 영향이 중요한 것으로 알려져 있다⁶⁾. 즉 자외선에 의해 각질 형성세포와 melanin 세포에서 α -MSH 수용체가 증가함과 동시에 이들 표피세포에서 α -MSH의 생산이 증가되고, 이어 α -MSH는 세포막 수용체와 결합하여 adenylate cyclase를 활성화시키고, 세포 내 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)를 증가시켜 cAMP-dependent protein kinase인 protein kinase A(PKA)와 tyrosinase가 활성화됨으로써 일어나는 일련의 과정으로 설명하고 있다.

melanin을 만드는 출발물질은 인체 내에 정상적으로 존재하는 아미노산의 일종인 tyrosine이다. tyrosine은 melanin 세포 내에서 tyrosinase라는 효소에 의해 산화되어 DOPA(dihydroxy phenylalanine)로 변하고 DOPA는 더욱 산화하여 DOPA quinone으로 바뀐다. DOPA quinone은 이후 자동 산화반응을 거쳐 최종적으로 흑갈색의 eumelanin을 만들어 낸다. 한 편 DOPA quinone이 cysteine과 만나게 되면 cysteinyl DOPA가 만

들어지고 그 결과 적갈색의 pheomelanin이 만들어진다. 이후 생산된 melanin은 melanosome에 실려 각질형성세포로 전달된다. 각질형성세포는 턴-오버에 따라 표면으로 이동하게 되며 최종적으로 분리되어 탈락된다. 이러한 melanin이 비정상적으로 적게 생산되면 백반증과 같은 피부 병변이 유발되며, 반대로 과잉으로 생산될 경우 기미, 주근깨를 형성하며 melanoma와도 밀접한 관계가 있다.

현재 응용되고 있는 미백제제의 기전은 다양하다. 자외선 차단, 멜라닌 세포로의 신호전달물질 차단, 활성산소의 제거, tyrosinase 억제, 멜라닌 색소의 환원 및 각질층의 턴-오버 촉진 등의 기전이 활용되고 있다.

자외선 차단 즉 UV-A, UV-B를 흡수하거나 차단하는 물질로서는 이산화티탄, γ -oryzanol, oxybenzone 등이 있으며, melanin 세포에 melanin의 합성을 명령하는 신호전달물질인 cytokine의 작용을 조절하는 물질로 이용하기도 한다³¹⁾. tyrosine의 산화반응을 억제함으로써 melanin 생성을 억제하는 것으로는 비타민 C, Glutathione 등이 있다. tyrosine의 산화를 촉매 하는 tyrosinase의 활성을 저해하는 물질로는 kojic acid⁷⁻¹⁰⁾, albutin, 감초추출물¹¹⁾, 닥나무추출물, Transforming growth factor-beta1 (TGFbeta1)³²⁾ 등이 이에 속한다. 또 하나는 피부 박리를 촉진하여 melanin 색소제거를 촉진시키는 것인데, 살리실산, 레조르신, retinoic acid¹²⁻¹⁴⁾, 알파-히드록시산 등이 있다.

미백소재를 얻기 위한 연구도 활발하다. Arctostaphylos Plants¹⁵⁾, Melaleuca leucadendron(까유룻)¹⁶⁾,甘草¹¹⁾, 桑白皮³⁾, genistein(대두에서 얻어진 isoflavone)¹⁷⁾ 등이 있다. 또한 hydroquinone^{18,19)}, endothelin²⁰⁾, captopril²¹⁾, wine phenolics 과 sorghum tannins²²⁾, 비타민 E, alpha-tocopheryl

ferulate^{23,24)}등도 미백효과가 있다고 한다.

MSH, ACTH³³⁾와 난소와 뇌하수체의 호르몬은 melanocyte에 영향을 준다.³⁴⁾ 특정한 pH 6.8에서 melanin 합성이 가장 잘 일어난다는 보고도 있다.³⁵⁾ Salicylic acid, hydroquinone³⁶⁾, glycolic acid과 Linoleic acid and alpha-linolenic acid은 자외선으로 인한 피부착색에 효과가 있다고 보고되고 있다³⁷⁾.

중국에서는 고대부터 피부미용에 대한 많은 관심을 보여 왔다. 《黃帝內經》에서는 面焦, 髮白, 毛切, 瓜枯와 같은 증상을 보이는 疾病에 대하여 서술하고 있으며, 《神農本草經》에는 365종류의 기재된 本草 중에 20여종의 本草가 延年耐老, 駐顏澤膚, 令人肥建과 같은 효능이 있다고 기재되어 있다. 玉竹의 경우 “久服去面黑黚, 好顏色潤澤”이라고 나와 있다. 《神農本草經》과 동시대 문헌인 《山海經》에도 顏色을 좋게 하는 약물이 기재되어 있다. 皇甫謐의 《針灸甲乙經》에는 “下廉穴治療顏面不和”, “曲池穴治療顏面干燥”이라 하였다. 葛洪의 《肘后方》에는 粉劑, 水劑, 膏劑, 酒劑, 面膜 등의 다양한 피부 외용 제제에 대해서 소개하고 있다. 孫思邈의 《備急千金要方》과 《千金翼方》에는 미용약물 179종, 미용처방 93개가 실려 있으며, 이외에도 피부미용을 위한 藥膳方, 鍼刺美容處方, 按摩에 대해서도 실려 있다. 宋代에는 《聖濟總錄》과 《太平聖惠方》에 피부미용에 대한 처방이 많이 실려 있다. 金元시대의 《御藥院方》에는 玉容散, 皇后洗面藥, 御前洗面方 등이 실려 있다. 羅天益의 《衛生寶鑑》, 危亦林的《世人得效方》과 明代의 《本草綱目》에도 本草, 處方, 針灸등의 피부미용에 대한 내용이 실려 있다³⁸⁾.

處方으로는 《備急千金要方》의 白面方, 羊乳膏, 五香散, 《東醫寶鑑》의 西施玉容散, 《太平聖惠方》의 麝香面膏, 面黑令白方, 面白如玉方, 定年方, 杏仁面脂, 《醫部全錄》의 珍珠粉, 《聖

濟總錄》의 羊髓膏, 《本草綱目》의 面上黑氣方, 《外臺秘要》의 白附子膏, 《千金翼方》의 澡豆方, 《普濟方》의 天花粉方 등이 外用藥으로 기재되어 있으며, 內服藥으로는 《本草綱目》의 白楊皮散, 《太平聖惠方》의 變白方, 《萬病回春》의 升麻白芷湯, 《衛生寶鑑》의 沖和順氣湯 등이 수록되어 있다. 미용 약재로써 사용된 빈도가 높은 것은 白芷(10.5%), 白附子(10.0%), 白茯苓(8.0%), 川芎(6.5%), 細辛(6.5%), 藁本(5.0%), 杏仁(5.0%), 防風(4.5%), 麝香(4.5%), 玉竹(4.5%), 殭蠶(4.0%), 當歸(4.0%), 白朮(4.0%), 白丁香(3.7%), 零陵香(3.6%), 辛夷(3.5%), 桃仁(3.5%), 丁香(3.5%), 上陸(3.5%), 青木香(3.0%), 白芨(3.0%) 순과 같다³⁹⁾.

본 연구에서 사용한 西施玉容散의 구성약물은 綠豆, 白芷, 白芨, 白薇, 白殭蠶, 白附子, 天花粉, 甘松香, 三乃子, 藿香, 零陵香, 防風, 藁本, 皂角이다.

역대문헌에서 살펴보면 白芷는 “<本經>長肌膚, 潤澤, 可作面脂”, “<名醫別錄>...可作膏藥面脂, 潤顏色”, “<日華子本草> 去面皰”, “<本草綱目> 達陽明陽氣, 去面黑”라 하였고, 白薇는 “<藥性論> 治面上抱瘡”, 白殭蠶는 “<本經> 去三虫, 灰黑黚”, “<醫學入門·本草> 治面黚”, “<本草綱目> 蜜和擦面, 灰黑黚好顏色”, “<本草經疏> 去皮膚諸風 能灰黑黚及諸瘡癩痕”이라 하였으며, 白附子에 대하여는 “<名醫別錄> 主面上百病”, “<日華子本草> 治面皰”, “<本草綱目> 治面上諸風百病, 皰...”이라 하였고, 甘松香은 “<本草拾遺> 主黑皮黚黚”, “<本草綱目> 同香附, 牽牛末, 日服, 治鱗瘡黚黚”, 藁本은 “<本經> 長肌膚, 悅顏色”, “<藥性論> 去頭風黚瘡”, “<本草綱目> 達陽明陽氣, 去面黑”이라 하였다⁴⁰⁾.

이와 같이 미백효과를 기대할 수 있는 약물로 이루어져 있으며, 東醫寶鑑, 方藥合編 등에 소재되어 있는 西施玉容散의 미백효과에 대해 연구하

여 보았다.

加減西施玉容散 추출물은 농도 의존적으로 tyrosinase 활성 억제효과를 나타내었으며, 농도 의존적으로 melanin 생성 억제효과를 나타내었다. 하지만 이미 보고된 瀉白散, 甘草, 桑白皮, 麻黃의 tyrosinase 활성 억제 효과나 melanin 생성 억제 효과보다는 미약하게 나타났다. tyrosinase 활성 억제율에 있어 瀉白散은 79.2%, 甘草는 53.1%, 桑白皮는 77.6%, 麻黃은 49.7%의 억제율을 나타낸 반면 加減西施玉容散은 12.7%의 억제율을 보였다. 加減西施玉容散의 자외선 차단효과는 유의하게 나타나지 않았다. 그러나 加減西施玉容散 메탄올추출물은 1, 10 μ g/ml에서 각각 46.5 \pm 3.1% (p<0.05), 58.4 \pm 2.9% (p<0.01)의 세포생존율을 보여 유의한 항산화효과를 보여주었다.

한방복합제제의 미백효과에 대한 연구는 麻風膏, 瀉白散이 보고되었다. 麻風膏의 경우 복합제제의 경우가 구성 본초인 麻黃의 미백효과보다는 미약하게 나타났으며, 瀉白散의 경우는 복합제제의 경우가 각각의 본초인 桑白皮, 甘草의 미백효과보다 더욱 뛰어나게 나타남을 보여주었다. 加減西施玉容散의 경우에도 각각 본초의 미백효과에 대한 연구가 더 필요하다고 생각되며, 항산화효과를 통한 미백기능이 뛰어난 성분 분석을 가려내는 연구가 앞으로 필요하다고 사료된다. 또한 이미 보고된 바와 같이 유의한 tyrosinase 활성 억제도와 melanin 생성 억제도를 보이고 있는 미백소재인 瀉白散, 麻黃 등과의 복합제제를 연구할 필요가 있다고 사료된다.

V. 結 論

加減西施玉容散의 미백효과를 알아보기 위하여 tyrosinase활성 억제도, UV 차단효과, Melanoma 세포주에서의 세포생존율과 melanin 생성량,

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 세포손상에 대한 방어효과에 대하여 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加減西施玉容散의 in vitro에서 tyrosinase 활성 억제도를 측정한 결과, 加減西施玉容散 추출물은 농도 의존적으로 tyrosinase 활성 억제효과를 나타내었다.

2. UV spectrum을 분석한 결과 加減西施玉容散 추출물의 경우 대조군에 비하여, UV-A(270-290nm)와 UV-B(350-370nm)에서 특징적인 peak를 보이지 않았다.

3. 加減西施玉容散 추출물은 농도 의존적으로 melanin 생성 억제효과를 나타내었다.

4. 加減西施玉容散의 Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 세포손상에 대한 방어효과를 관찰한 결과, 대조군에서 23.2±4.0%의 세포생존율을 보인 반면 加減西施玉容散 메탄올추출물은 1, 10µg/ml에서 각각 46.5±3.1% (p<0.05), 58.4±2.9% (p<0.01)의 세포생존율로 유의한 효과를 보였다.

參考文獻

1. Maeda K and Fukuda M : In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, J Soc Cosmet Chem, 42, 361-368, 1991.

2. Mishima Y, Kondoh H and Hatae. S : Overview for development of future innovative skin whitening agents, Fragrance J, 24(13), 1996.

3. Qiu F, Komatsu K, Saito K, Kawasaki K, Yao X, Kano Y : Pharmacological properties of traditional medicines. XXII. Pharmacokinetic study of mulberroside A and its metabolites in rat, Biol Pharm Bull, 19(11), 1463-1467, 1996.

4. 하병조 : 기능성화장품, 신광출판사, 서울, pp. 66-84, 138-140, 143-147, 2001.

5. 대한피부과학회 간행위원회 : 皮膚科學, 서울, 여문각, pp 8-9, 133, 409, 2001.

6. Gilchrest BA : Mechanism of ultraviolet light-induced pigmentation, Photochem Photobiol, 63, 1-10, 1996.

7. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F : Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, J Pharm Pharmacol, 46(12), 982-985, 1994.

8. Moon KY, Ahn KS, Lee J, Kim YS : Kojic acid, a potential inhibitor of NF-kappaB activation in transfectant human HaCaT and SCC-13 cells, Arch Pharm Res, 24(4), 307-11, 2001.

9. Lim JT : Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid, Dermatol Surg, 25(4), 282-4, 1999.

10. Garcia A, Fulton JE Jr : The combination of glycolic acid and hydroquinone or kojic acid for the treatment of melasma and related conditions, Dermatol Surg, 22(5), 443-7, 1996.

11. Yokota T, Nishio H, Kubota Y, Mizoguchi M : The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation, Pigment Cell Research, 11(6), 355-361, 1998.

12. Griffiths : Topical tretinoin(retinoic acid)

treatment of hyperpigmented lesions associated with photoaging in Chinese and Japanese patients-A vehicle controlled trial, *Am Acad Dermatol*, 30, 76-84.

13. Joachim RG : Increased expression of protein kinase C-alpha plays key role in retinoic acid-induced melanoma differentiation, *J Biol Chem*, 267, 13356-13360, 1992.

14. Yoshimura K, Tsukamoto K, Okazaki M, Virador VM, Lei TC, Suzuki Y, Uchida G, Kitano Y, Harii K : Effects of all-trans retinoic acid on melanogenesis in pigmented skin equivalents and monolayer culture of melanocytes, *J Dermatol Sci*, 27(1), 68-75, 2001.

15. Hideaki M : Studies fo Cuticle Drugs from Natural sources. IV. Inhibitory Effects of Some Arctostaphylos Plants on melanin Biosynthesis, *Biol Pharm Bull*, 19(1), 153-156, 1996.

16. Tsuruga T, Chun YT, Ebizuka Y, Sankawa U : Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*-inhibitors of induced histamine release from rat mast cells, *Chem Pharm Bull* 39(12):3276-3278, 1991.

17. Yan CH, Chen XG, Li Y, Han R : Effects of genistein, a soybean-derived isoflavone, on proliferation and differentiation of B16-BL6 mouse melanoma cells, *J Asian Nat Prod Res* 1(4), 285-99, 1999.

18. Jimbow K : Mechanism of depigmentation by hydroquinone, *J Invest Dermatol* 62:436-439, 1974.

19. Fleischer AB Jr, Schwartzel EH, Colby SI, Altman DJ : The combination of 2% 4-hydroxyanisole (Mequinol) and 0.01% tretinoin is effective in improving the

appearance of solar lentigines and related hyperpigmented lesions in two double-blind multicenter clinical studies, *J Am Acad Dermatol* 42(3):459-67, 2000.

20. Yukihiro Yada : Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melnocytes, *J Biol Chem* 266:19352-19357, 1991.

21. Espin JC, Wichers HJ : Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro, *Biochim Biophys Acta* 1544(1-2):289-300, 2001.

22. Gomez-Cordoves C, Bartolome B, Vieira W, Virador VM : Effects of wine phenolics and sorghum tannins on tyrosinase activity and growth of melanoma cells, *J Agric Food Chem* 49(3), 1620-4, 2001.

23. Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M : Depigmenting effect of alpha-tocopheryl ferulate on normal human melanocytes, *Pigment Cell Res*, 13 Suppl 8, 170-4. 2000.

24. Ichihashi M, Funasaka Y, Ohashi A, Chacrabarty A, Ahmed NU, Ueda M, Osawa T : The inhibitory effect of DL-alpha-tocopheryl ferulate in lecithin on melanogenesis, *Anticancer Res*, 19(5A) , 3769-74. 1999.

25. 이상희 : 마황 및 마풍고의 미백효과에 관한 연구, 경희대학교 동서의학대학원, 2001.

26. 金成珪 : 사백산의 미백효과 검증에 관한 연구, 경희대학교 한의과대학, 2000.

27. 許俊 : 東醫寶鑑, 南山堂, pp 243, 1995.

28. 黃度淵 : 方藥合編, 南山堂, pp 494, 1991.

29. 김민수 :雀斑의 외용약에 대한 문헌적 고찰, 경희대학교 한의과대학, 1991.

30. 전국한의과대학본초학교실 : 본초학, 영림사, 서울, pp 129, 131, 132, 165, 226, 229, 292, 386, 451, 454, 505, 1994.

31. Jens-Michael Schroder : Cytokine networks in the skin, *J Invest Dermatol* 105, 20-24, 1995.
32. Martinez-Esparza M, Ferrer C, Castells M, Garcia-Borron JC, Zuasti A : Transforming growth factor beta 1 mediates hypopigmentation of B16 mouse melanoma cells by inhibition of melanin formation and melanosome maturation, *Int J Biochem Cell Biol*, 33(10), 971-83. 2001.
33. Rasmussen N, Nelson F, Govitrapong P, Ebadi M : The actions of melanin and melanocyte stimulating hormone (MSH), *Neuroendocrinol Lett*, 20(5), 265-282. 1999.
34. Maeda K, Naganuma M, Fukuda M, Matsunaga J, Tomita Y : Effect of pituitary and ovarian hormones on human melanocytes in vitrol, *Pigment Cell Res*, 19(4), 204-212. 1996.
35. Ancans J, Tobin DJ, Hoogduijn MJ, Smit NP, Wakamatsu K, Thody AJ : Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells, *Exp Cell Res*, 268(1), 26-35. 2001.
36. Gladstone HB, Nguyen SL, Williams R, Ottomeyer T, Wortzman M, Jeffers M, Moy RL : Efficacy of hydroquinone cream (USP 4%) used alone or in combination with salicylic acid peels in improving photodamage on the neck and upper chest, *Dermatol Surg*, 26(4), 333-337. 2000.
37. Ando H, Ryu A, Hashimoto A, Oka M, Ichihashi M : Linoleic acid and alpha-linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin, *Arch Dermatol Res*, 290(7), 375-381. 1998.
38. 戴玉 : 中醫美容大全, 北京, 中國中醫藥出版社, pp1-8, 1999.
39. 劉德軍 : 中藥材綜合開發技術與利用, 北京, 中國中醫藥出版社, pp. 34-41, 1998.
40. 孫光榮 : 精方妙藥與美容, 北京, 中國醫藥科技出版社, pp. 43, 59, 66, 68, 74, 272, 1992.