

염(鹽), 초(醋), 향유(香油)의 미백효과에 관한 연구

조재훈 · 김혜정 · 김윤범 *

The Study on Depigmentation Effects of *Salt, Acetum, Sesami Semen Nigrum*

Jae-hun Cho · Hye-jeong Kim · Yoon-bum Kim *

Objectives: This study was performed to investigate the depigmentation effects of *Salt, Acetum, Sesami Semen Nigrum*.

Methods: Inhibition of tyrosinase activity, melanin production & cell viability in cultured B16 melanoma cells, UV screen and cytoprotective effects on PC12 cells injured by hydrogen peroxide were measured.

Results: *Salt, Acetum, Sesami Semen Nigrum* did not show any inhibitory effects of tyrosinase activity & melanin production in melanoma cells, UV screen and cytoprotective effects on PC12 cells injured by hydrogen peroxide.

Conclusions: This study shows that *Salt, Acetum, Sesami Semen Nigrum* which were generally used for the addition in external application do not have the depigmentation effects. Following this, the depigmentation effects of the other addition which were generally used for external application shoud be examined.

Key words : *Salt, Acetum, Sesami Semen Nigrum, Depigmentation, Tyrosinase, Melanin, UV, Cytoprotective*

* 경희대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

· 교신저자: 조재훈, 경희대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실
(Tel : 02-958-9181, E-mail : komeon@hanmail.net)

서론

동양권에서는 고대로부터 희고 고운 피부가 미의 상징으로 여겨져 왔으며¹⁾, 최근 경제성장에 따라 미에 대한 관심이 더욱 높아지고 있다. 미백에 대한 관심뿐만 아니라 노령인구의 증가와 자외선 노출의 증가로 인해 피부노화, 특히 광노화에 의한 피부의 색소침착질환도 사회적 관심을 끌고 있다²⁻⁴⁾. 따라서 미백 및 항피부노화 관련시장은 지속적인 성장을 거듭하고 있으며, 보다 효과적이고 안정적인 미백소재를 찾고자 하는 연구가 활발히 진행중이다^{5,6)}.

피부 중 표피에서의 색소침착을 유발하는 질환은 멜라닌세포(melanocyte)에서 멜라닌(melanin) 분비가 증가하거나 활성화된 멜라닌세포의 수가 증가하여 발생하며, 임상적으로는 갈색이나 검은색의 과색소침착을 나타낸다. 멜라닌세포에서 멜라닌 분비가 증가하는 질환으로는 주근깨, 기미, 밀크커피색 반점 등이 있으며, 활성화된 멜라닌세포의 수가 증가하는 질환으로는 단순 흑자, 일광 흑자 등이 있다²⁾. 이를 색소침착질환은 한의학에서 면간증(面幹癤), 작반(雀斑), 여흑반(黧黑斑), 면진(面塵) 등의 범주에 속한다⁷⁻¹¹⁾.

피부색 및 피부색소침착을 결정짓는 요소는 표피의 멜라닌, 혈관내의 혈색소, 각질층의 두께 등 내부적 인자와 음식물을 통해 섭취되어 피부에 침착되는 카로텐과 같은 외부적 인자로 나눌 수 있다¹²⁾. 이 중 각질형성세포(keratinocyte)에 있는 멜라닌의 양과 분포에 의해 피부색 및 피부색소침착의 대부분이 결정되므로 미백소재의 미백효과를 검정하기 위해서는 멜라닌 형성을 억제하는지 여부가 중요하다¹³⁾.

미백효과에 대한 연구는 구체적으로 tyrosinase

활성 억제, DOPA 산화 억제, 각질층 제거 촉진 및 자외선 차단 등에 대해서 이루어지고 있다¹³⁻¹⁵⁾.

관련 연구들을 살펴보면 tyrosinase 활성 억제에 대해서는 kojic acid¹⁶⁻¹⁹⁾, arbutin²⁰⁾, transforming growth factor- β 1²¹⁾, 뽕나무가지²²⁾, 甘草²³⁾ 등에 관한 연구가, DOPA 산화 억제에 대해서는 vitamin C¹⁴⁾ 등에 관한 연구가, 각질층 제거 촉진에 대해서는 retinoic acid^{24,25)} 등에 관한 연구가, 자외선 차단에 대해서는 titanium dioxide²⁶⁾ 등에 관한 연구가 있다.

천연물의 미백효과에 대한 연구는 뽕나무가지²²⁾, 甘草²³⁾, 麻黃²⁷⁾, 摩風膏²⁷⁾, 燥白散²⁸⁾, 加減西施玉容散²⁹⁾, arctostaphylos plants³⁰⁾, melaleuca leucadendron³¹⁾, genistein³²⁾ 등에 대해서 이루어졌으며, endothelin³³⁾, captopril³⁴⁾, alpha-tocopheryl ferulate^{35,36)}, wine phenolics와 sorghum tannins³⁷⁾ 등에 관한 연구도 있다.

역대문헌을 살펴보면 외용제와 관련하여 제제(製劑)를 결정하는 첨가제, 특히 부형제³⁸⁻⁴⁰⁾로 향유(香油), 밀(蜜), 주(酒), 계단유(鷄蛋油), 초(醋), 염(鹽) 등이 사용되었다^{41,42)}. 이 중 염, 초, 향유는 창면보호작용, 해독작용, 살충작용, 소양증을 멎추는 작용, 창면을 유연하게 하는 작용 등이 있어⁴³⁾ 건곤일기고(乾坤一氣膏), 낭독고(狼毒膏), 삼향고(三香膏), 문합산(文蛤散), 밀타승산(密陀僧散), 토대황고(土大黃膏) 등의 첨가제로 사용되었다⁴²⁾.

본 연구에서는 역대문헌상 외용제의 첨가제로 사용된 염, 초, 향유가 미백제의 첨가제로 사용될 경우의 미백효과 유무를 검정하고자 tyrosinase 활성 억제효과, melanoma cell에서의 멜라닌 생성률과 세포생존률에 미치는 효과, 자외선 차단효과에 대해 실험연구하였으며, hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 cell 손상에 대한 항산화효과에 대해서도 살펴보았다.

assay에는 ELISA reader E09090 (Molecular Device, U.S.A.)를 사용하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시료

시료 중 염과 향유는 해표(한국)에서, 초는 양조식품(한국)에서 구입하여 경희대학교 동서의학대학원 한약리학교실에서 검증한 후 완제품 그대로 사용하였다.

2) 시약

Mushroom tyrosinase, L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)은 Sigma(U.S.A.)에서 구입하였다. 이외의 시약들은 국산일급용을 사용하였으며, 유기용매는 덕산이화학(한국)에서 구입하였다.

Melanoma cell과 PC12 cell의 배양에 사용된 RPMI 1640 배지 및 horse serum, fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, 0.25% trypsin-EDTA는 Gibco BRL(U.S.A.)에서 구입하였으며, poly-D-lysine, DMSO 및 30% hydrogen peroxide는 Sigma(U.S.A.)에서 구입하였다.

MTT assay에 사용된 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)는 Sigma(U.S.A.)에서 구입하였다.

3) Cell line

B16 melanoma cell line과 PC12 cell line(pheochromocytoma, rat)은 서울대학교 세포주은행에서 공여받았다.

4) 기기

Tyrosinase assay, melanoma cell assay, MTT

2. 실험방법

1) 시료의 조제

시료를 완제품 그대로 정선하여 조제하였다.

2) Tyrosinase 활성 억제율 측정

Tyrosinase, DOPA를 phosphate buffer(67mM, pH 6.8)에 녹인다. 시료는 농도별로 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml가 되도록 희석하였으며, 농도별 sample을 e-tube에 넣었다.

DOPA 49.3mg을 50ml tube에 넣은 후 phosphate buffer 30ml을 넣고 vortex한다. 96 well plate에 DOPA 120 μ l와 시료의 농도별 sample 40 μ l를 넣고 tyrosinase 40 μ l를 첨가하여 각 well당 총 200 μ l를 만든 후 37°C에서 20분간 incubation한다.

생성된 DOPAchrome의 양을 ELISA reader를 이용하여 490nm영역에서의 흡광도를 측정하였다.

대조군은 시료대신 DOPA 120 μ l, MeOH 40 μ l와 tyrosinase 40 μ l로 하였다.

tyrosinase 활성 억제율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{억제율} = \frac{[(\text{대조군의 } A_{490} - \text{시료의 } A_{490})/\text{대조군의 } A_{490}] \times 100}{100}$$

3) Melanoma cell에서의 멜라닌 생성률과 세포생존률 측정

(1) Melanoma cell의 배양

Melanoma cell은 10% FBS와 200nM TPA가 첨가된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.

100 μ tissue culture dish에 배지 10ml를 넣고 약 5 \times 10⁵개의 세포를 접종하였다. 37°C, 5% CO₂ 환경

하에서 3~4일 후 confluent하게 자라면 24 well plate에 10^5 cells/well로 회식하여 재집종하고 24시간 배양하였다.

(2) 시료의 처리

well당 배지 $1000\mu\text{l}$ 를 매일 갈아주면서 농도별 시료(1, 10, 100ppm) $10\mu\text{l}$ 를 3일간 전처리한 후 (solvent: 50% propylene glycol, 30% EtOH, 20% H₂O) 24시간 더 배양하였다.

(3) 멜라닌 생성률 측정

멜라닌 생성률을 측정하기 위해 배지를 제거한 후 PBS로 washing하였다. 1N NaOH 1ml 씩을 가한 후 수차례 pipetting하여 멜라닌을 녹인 후, 96 well plate에 멜라닌이 함유된 상층 배지 $200\mu\text{l}$ 를 이식하고서 400nm영역에서의 흡광도를 측정하였다.

(4) 세포생존률 측정

세포생존률을 측정하기 위해 배지를 제거한 후 PBS로 washing하였다. Crystal Violet 용액(CV 0.1%, 10% EtOH, 나머지 PBS) $200\mu\text{l}$ 를 첨가하고 상온에서 5분간 incubation한 후 PBS로 2회 washing하였다. 95% EtOH 1ml 를 첨가하고 상온에서 10분간 shaking한 후 96 well plate에 $200\mu\text{l}$ 를 이식하고서 590nm영역에서의 흡광도를 측정하였다.

4) 자외선 차단효과 측정

methanol에 시료 $33.4\mu\text{M}$ 을 녹이고서 UV scanning을 시행하여 UVB(280~320nm)와 UVA(320~400nm)영역에서의 흡수도(absorbance)를 측정하였다. 대조군은 시료대신 methanol로 하였다.

5) Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 cell 손상에 대한 항산화효과 측정

(1) PC12 cell의 배양

PC12 cell은 10% horse serum, 5% FBS 및 1% penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지에서 배양하였으며, 습도가 일정하게 유지되는 37°C의 배양기에 공기 95%와 CO₂ 5%의 혼합기체를 계속 공급하였다.

세포를 poly-D-lysine으로 coating된 배양용기(100mm)에서 배양한 후 96 well microplate나 6 well plate에 1.5×10^5 cells/ml의 농도로 회식하여 이식하였다.

(2) 시료와 hydrogen peroxide의 처리

3×10^4 cells/well의 PC12 cell을 96 well plate에 분주하고 24~48시간동안 37°C의 배양기에서 배양하였다. 배양액을 serum free media로 교체한 후 DPBS에 녹인 농도별 시료(1, 10, 100μg/ml)를 전처리하였다. 90분이 경과한 후 30% hydrogen peroxide를 DPBS에 회식하여 150μM의 농도로 처리하였다. 대조군은 시료대신 DPBS를 같은 부피로 투여하였다.

(3) MTT assay

세포생존율을 측정하기 위해 MTT reduction assay를 사용하였다.

PC12 cell을 분주한 96 well plate에 $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 의 MTT $200\mu\text{l}$ 를 넣고 4시간동안 37°C에서 반응시킨다. 여기에 isopropyl alcohol $100\mu\text{l}$ 를 넣고 shaking plate에서 shaking하여 완전히 용해시킨 후, ELISA reader를 이용하여 570nm영역에서의 흡광도를 측정하였다.

(4) 통계분석

통계처리는 윈도우용 SPSS(ver 10.0)를 이용하였다.

각 실험군과 대조군의 비교를 Student's t-test로 검정하였으며, 유의수준은 0.05로 하였다.

결과

1. Tyrosinase 활성 억제 효과

대조군과 비교한 tyrosinase 활성 억제율을 살펴 보면 염은 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 -20.1% , $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 -0.8% , $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 -11.1% 의 억제율을 보였고, 초는 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 -18.6% , $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 -4.8% , $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서

-13.4% 의 억제율을 보였고, 향유는 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 -9.8% , $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 -16.6% , $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 -48.9% 의 억제율을 보였다 (Table 1, Fig. 1).

각 실험 결과는 3회 반복실험한 결과의 평균치로 하였다.

Table 1. Inhibitory Effects on Tyrosinase Activity of Salt, Acetum, Sesami Semen Nigrum (mean \pm standard error)

specimen \ concentration	$5\mu\text{g}/\text{ml}$	$50\mu\text{g}/\text{ml}$	$500\mu\text{g}/\text{ml}$
Salt	$-20.1\pm20.2\%$	$-0.8\pm12.0\%$	$-11.1\pm14.0\%$
Acetum	$-18.6\pm10.2\%$	$-4.8\pm6.5\%$	$-13.4\pm10.3\%$
Sesami Semen Nigrum	$-9.8\pm12.0\%$	$-16.6\pm14.6\%$	$-48.9\pm20.6\%$

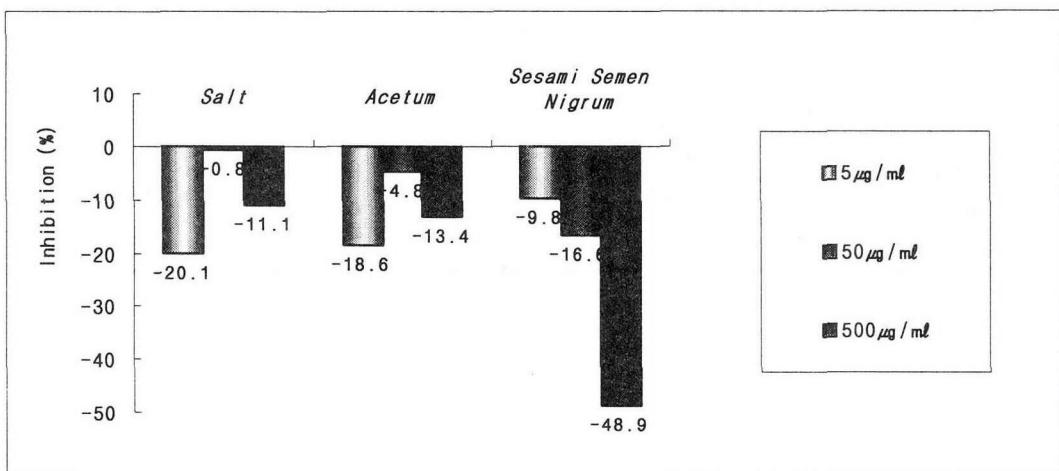


Fig. 1. Inhibitory effects on tyrosinase activity of Salt, Acetum, Sesami Semen Nigrum.

2. Melanoma cell에서의 멜라닌 생성률과 세포생존률에 미치는 효과

멜라닌 생성률을 살펴보면 염은 1ppm에서 94.8%, 10ppm에서 106.9%, 100ppm에서 97.8%의 생성률을 보였고, 초는 1ppm에서 95.4%, 10ppm에서 96.9%, 100ppm에서 96.8%의 생성률을 보였고, 향유는 1ppm에서 81.7%, 10ppm에서 91.7%, 100ppm에서 98.7%의 생성률을 보였다 (Table 2, Fig. 2, 3, 4).

세포생존률을 살펴보면 염은 1ppm에서 98.4%, 10ppm에서 88.9%, 100ppm에서 88.3%의 생존률을 보였고, 초는 1ppm에서 98.5%, 10ppm에서 95.2%, 100ppm에서 95.9%의 생존률을 보였고, 향유는 1ppm에서 97.7%, 10ppm에서 95.7%, 100ppm에서 85.2%의 생존률을 보였다 (Table 2, Fig. 2, 3, 4).

각 실험결과는 3회 반복실험한 결과의 평균치로 하였다.

Table 2. Effects on Melanin Production and Melanoma Cell Viability of *Salt*, *Acetum*, *Sesami Semen Nigrum* (mean)

specimen	concentration (ppm)	melanin production (%)	cell viability (%)
<i>Salt</i>	1	94.8	98.4
	10	106.9	88.9
	100	97.8	88.3
<i>Acetum</i>	1	95.4	98.5
	10	96.9	95.2
	100	96.8	95.9
<i>Sesami Semen Nigrum</i>	1	81.7	97.7
	10	91.7	95.7
	100	98.7	85.2

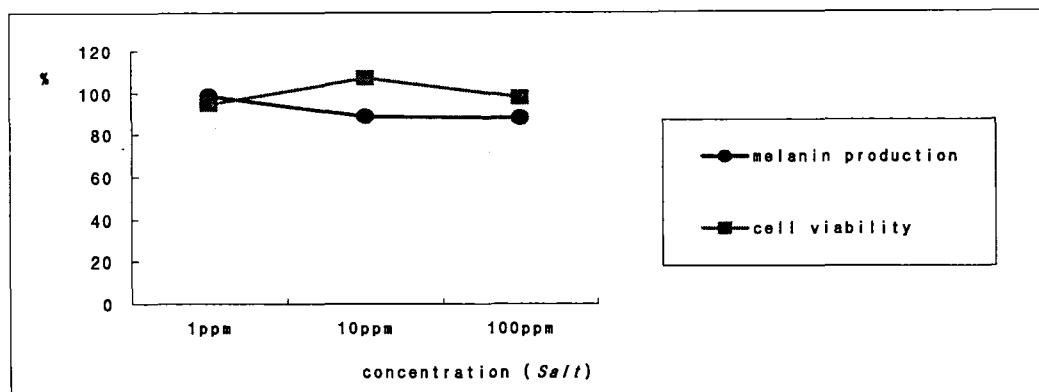


Fig. 2. Effects on melanin production and melanoma cell viability of *Salt*.

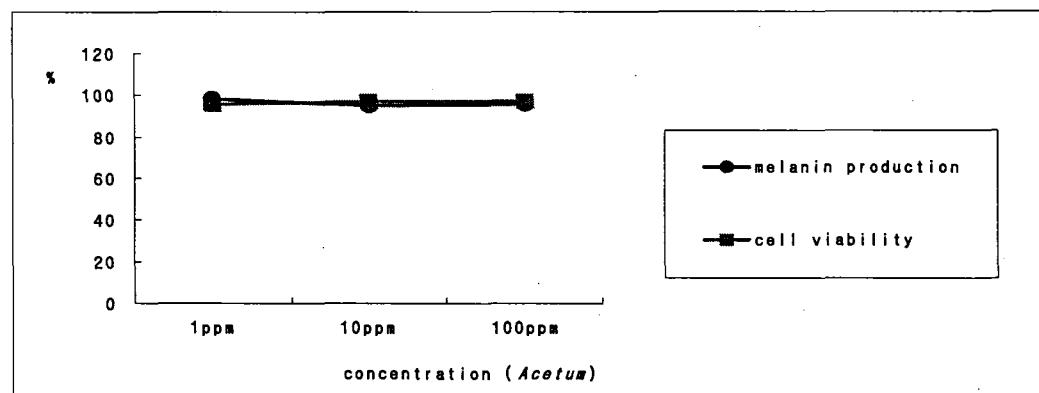


Fig. 3. Effects on melanin production and melanoma cell viability of *Acetum*.

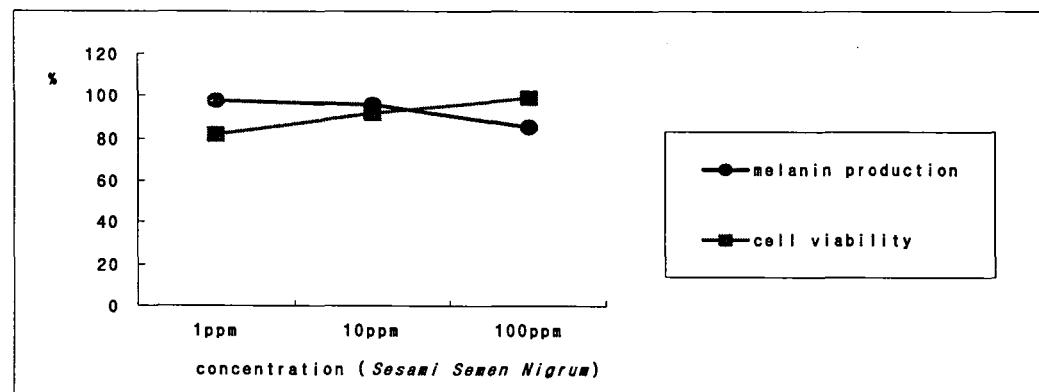


Fig. 4. Effects on melanin production and melanoma cell viability of *Sesami Semen Nigrum*.

3. 자외선 차단효과

UV spectrum을 분석한 결과, 염, 초, 향유는 모두 대조군(Fig. 5)과 비교하여 UVB(280~320nm)와 UVA(320~400nm)에서 특징적인 peak를 보이지 않았다 (Fig. 6, 7, 8).

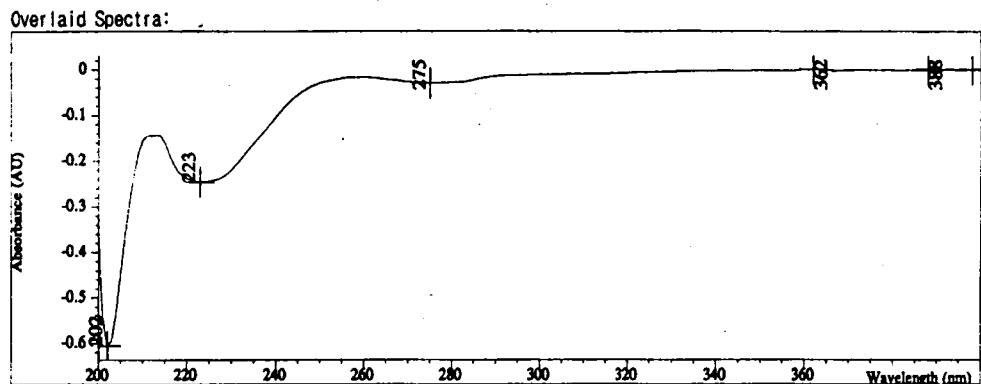


Fig. 5. UV spectrum of methanol.

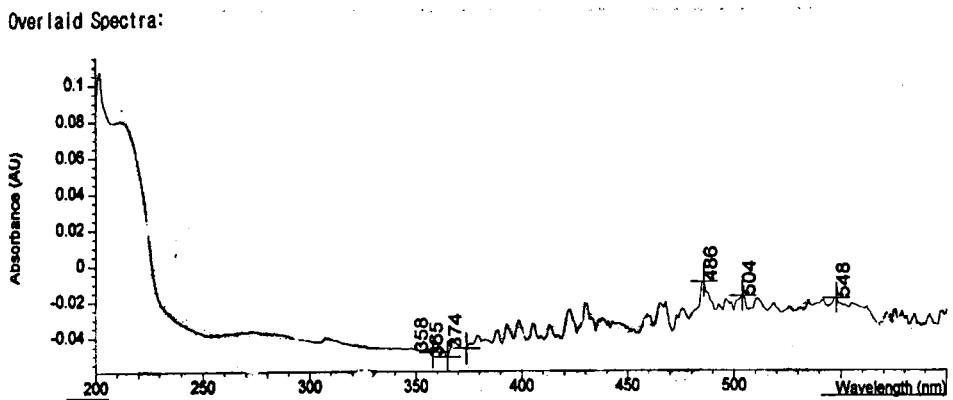


Fig. 6. UV spectrum of Salt.

Overlaid Spectra:

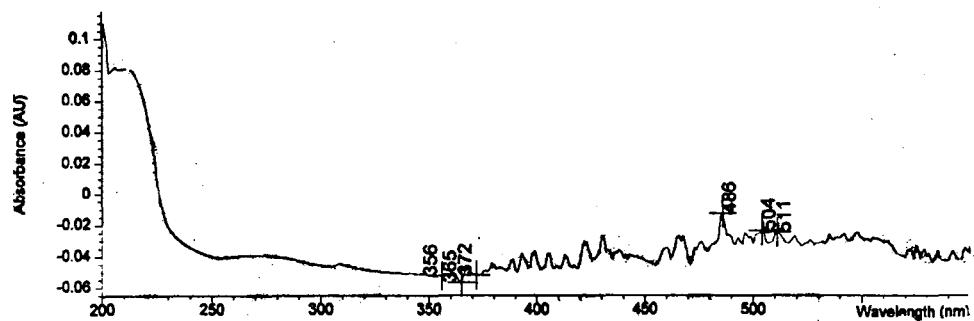


Fig. 7. UV spectrum of *Acetum*.

Overlaid Spectra:

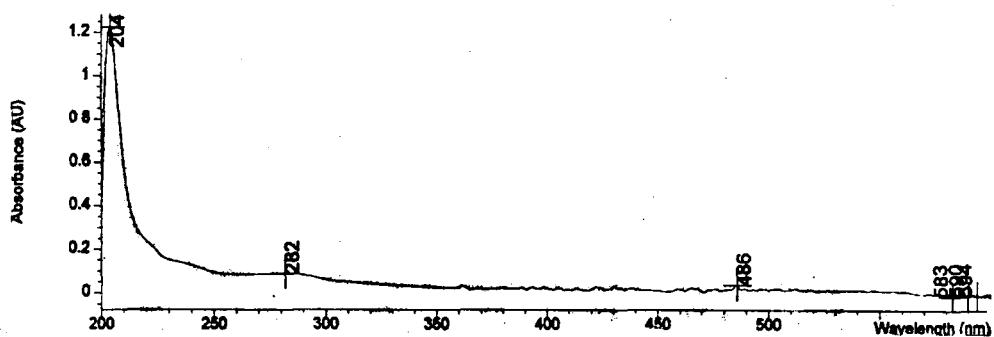


Fig. 8. UV spectrum of *Sesami Semen Nigrum*.

4. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 cell 손상에 대한 항산화효과

MTT assay상 DPBS를 투여한 대조군은 $23.1\pm2.0\%$ 의 세포 생존률을 보인 반면에, 염은 1, 10, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 $15.0\pm3.3\%$, $20.8\pm5.1\%$, $21.9\pm2.7\%$ 의 세포생존률을 보였고, 초는 1, 10, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 $12.5\pm0.8\%$, $20.7\pm3.5\%$, $21.7\pm0.4\%$

의 세포생존률을 보였고, 향유는 1, 10, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 $12.6\pm0.6\%$, $17.5\pm2.9\%$, $21.6\pm0.7\%$ 의 세포 생존률을 보였다 (Table 3, Fig. 9).

각 실험결과는 3회 반복실험한 결과의 평균치로 하였다.

Table 3. Cytoprotective Effects of *Salt*, *Acetum*, *Sesami Semen* *Nigrum* on PC12 Cells Injured by Hydrogen Peroxide (mean \pm standard error)

specimen	concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	cell viability (%)	P-value*
DPBS		23.1 ± 2.0	
<i>Salt</i>	1	15.0 ± 3.3	0.004
	10	20.8 ± 5.1	0.381
	100	21.9 ± 2.7	0.506
<i>Acetum</i>	1	12.5 ± 0.8	0.001
	10	20.7 ± 3.5	0.244
	100	21.7 ± 0.4	0.289
<i>Sesami Semen</i> <i>Nigrum</i>	1	12.6 ± 0.6	0.001
	10	17.5 ± 2.9	0.017
	100	21.6 ± 0.7	0.259

* calculated by Student's t-test

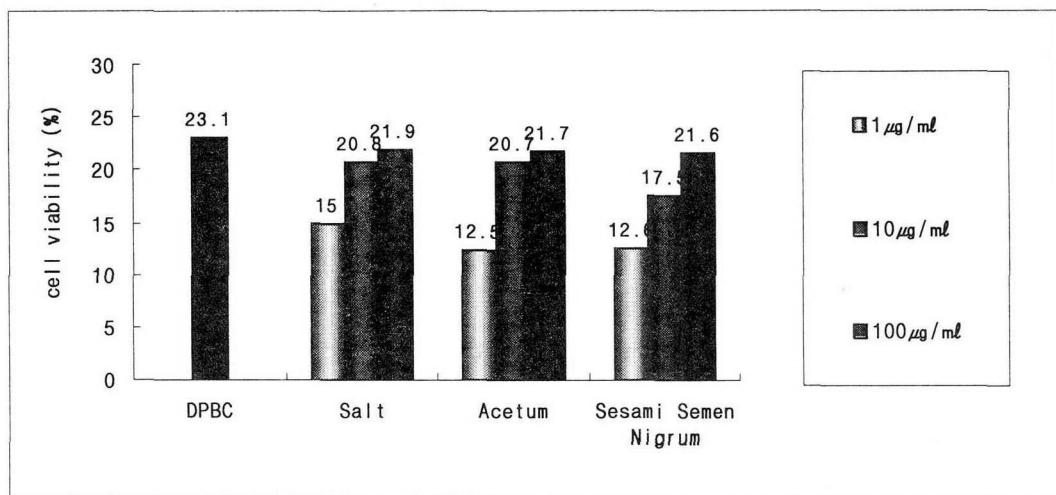


Fig. 9. Cytoprotective effects of *Salt*, *Acetum*, *Sesami Semen Nigrum* on PC12 cells injured by hydrogen peroxide.

고찰

표피에서의 색소침착을 유발하는 질환은 주근깨, 기미, 밀크커피색 반점, 단순 흑자, 일광 흑자 등이 있다. 주근깨는 주로 일광노출부위의 피부에 생기는 황갈색의 작은 색소반을 말하며, 기미는 다양한 크기의 갈색 색소반이 태양광선의 노출부위 특히 얼굴에 발생하는 질환으로서 경구피임약 등에 의해 악화되는 것으로 알려져 있으며, 밀크커피색 반점은 직경이 2-20mm에 이르는 경계가 분명하고 균일한 밀크커피색의 색소반을 말한다. 단순 흑자는 경계가 명확하고 갈색이나 검은색을 띠는 2-3mm의 둥근 반점으로서 한 개 또는 몇 개가 체

점막의 어느 곳에서도 생길 수 있으며, 일광 흑자는 헛별의 노출부위 특히 얼굴과 손등에 불규칙한 모양과 균일한 검은색을 보이는 색소반이 산재하여 발생한다²⁾.

피부의 멜라닌세포는 자외선에 노출되면 그 파장에 따라 두가지 반응을 보이는데, UVA, 가시광선에 의한 즉시형 색소침착과 UVB(280~320nm), UVA(320~400nm)에 의한 지연형 색소침착이 있다. 전자는 멜라닌세포의 수, 효소활성, 멜라닌소체의 변화없이 멜라닌의 산화에 의해서 발생하며, 후자는 멜라닌세포의 수적 증가, 효소활성의 증가, 새로운 멜라닌소체와 멜라닌의 합성, 각질형성세포로의 전이 촉진 등에 의해 발생한다²⁾. 자외선노출에 의한 색소침착은 cytokines, basic fibroblast growth factor, nerve growth factor, endothelin-1,

ACTH, β -lipotropin, β -endorphin, prostaglandin 등의 분비와 함께 melanocyte stimulating hormone(MSH)의 영향이 중요한 것으로 알려져 있다. 즉 자외선에 의해 각질형성세포와 멜라닌세포에서 MSH 수용체가 증가함과 동시에 이들 세포에서의 MSH 생산이 증가되고, 이어 MSH는 MSH 수용체와 결합하여 adenylate cyclase를 활성화시켜 세포내 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)를 증가시키고, 결국 cAMP-dependent protein kinase인 protein kinase A와 tyrosinase가 활성화됨으로써 일어나는 일련의 과정으로 설명한다^{44,45)}.

자외선 외에도 MSH⁴⁵⁾, ACTH, estrogen⁴⁶⁾, lipotropin, thyroxine, androgen 등과 같은 호르몬의 이상, 피부의 염증반응, 유전질환 및 pH⁴⁷⁾ 등도 멜라닌세포를 자극하는 능력이 있다^{2,12)}.

이들 색소침착질환에 대하여 《諸病源候論》에서는 “面奸黯”, 《外科正宗》에서는 “雀斑”, 《外科大成》에서는 “黧黑斑”, 《外科證治全書》에서는 “面塵”이라 기술하였으며⁷⁻¹¹⁾, 經絡으로는 陽明經, 腎臍와는 脾胃, 心, 腎과 연관이 있는 것으로 보았다^{8,10)}. 역대 諸家의 설을 종합하면 5가지 병인으로 구분할 수 있는데, 첫째 《素問·至真要大論》의 “面塵”을 따른 陽明之氣不足이고, 둘째 《諸病源候論》의 “風邪客於皮膚 痰飲積於肺藏”을 따른 風邪外搏 痰飲內積이고, 셋째 《醫學綱目》의 “憂思不已 飲食失節 脾胃有傷”을 따른 思慮過多 飲食傷이고, 넷째 《外科正宗》의 “水虧不能制火”를 따른 腎水不足이고, 다섯째 《萬病醫藥顧問》과 《實用中醫外科學》의 火鬱孫絡, 日晒熱毒이다. 따라서 健脾化濕, 祛風化痰, 疏肝開鬱, 滋陰降火, 散火通絡, 清熱解毒 등의 치법을 응용하였다⁷⁻¹⁰⁾. 한편 문헌상으로 색소침착질환이 부녀에게 많이 나타나는 질환이라는 언급은 있으나 清代까지의 문헌에서 월경, 임신과의 관계에 대한 구체적인 언급은 없었다¹⁰⁾.

피부색 및 피부색소침착은 각질형성세포에 있는 멜라닌의 양과 분포에 의해 대부분이 결정되므로 미백소재의 미백효과를 검정하기 위해서는 멜라닌 생성을 억제하는지 여부가 중요하다¹³⁾.

표피의 기저층에 산재하는 멜라닌세포는 수지상돌기를 갖는 분비세포로서 가는 수지상돌기를 통해 주위의 각질형성세포와 표피멜라닌단위를 구성하며 각질형성세포에 멜라닌소체(melanosome)를 공급한다²⁾. 멜라닌소체내에서는 tyrosine이 tyrosinase⁴⁸⁾에 의해 DOPA⁴⁹⁾로 전환되고 DOPA에 다시 tyrosinase가 산화작용을 촉매하는 효소로 작용하여 DOPAquinone이 생성되며, DOPAquinone이 cycloDOPA로 변한 다음 남아있는 DOPAquinone이 보조인자로 작용하여 DOPAchrome을 생성한 후 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid 및 5,6-dihydroxyindole을 거쳐 최종적으로 멜라닌이 생성된다⁵⁰⁾. 그리고 멜라닌은 각질형성세포와 동일한 대사과정을 거쳐 탈락한다. 따라서 젊은 사람의 피부는 신진대사가 활발하여 대략 4주정도 지나면 원래의 피부색으로 돌아가나 나이들어 신진대사가 둔화되면 이러한 회복력이 약해져서 피부침착이 더 눈에 띠게 된다²⁾.

미백효과에 대한 연구는 구체적으로 tyrosinase 활성 억제, DOPA 산화 억제, 각질층 제거 촉진 및 자외선 차단 등에 대해서 이루어지고 있다¹³⁻¹⁵⁾.

역대문헌에서 미백제와 관련된 처방으로는 玉容散, 玉容丸, 玉肌散, 酒製四物湯, 升麻白芷湯 등이, 약물로는 白芷, 白附子, 杏仁, 蜜, 鷄子白, 密陀僧, 白茯苓, 白蘞, 防風, 鹽 등이 사용되었다⁷⁻¹¹⁾. 그리고 외용제와 관련된 처방으로는 如意金黃散, 冲和膏, 回陽玉龍膏, 玉露散, 生肌散 등이, 약물로는 白芷, 南星, 輕粉, 雄黃, 乳香, 瘿香, 當歸, 大黃, 黃柏, 甘草 등이 사용되었으며, 제제를 결정하는 첨가제³⁸⁻⁴⁰⁾로는 香油, 蜜, 酒, 鷄蛋油, 醋, 鹽 등이 많이

쓰였다^{41,42)}. 제제시의 첨가제는 제제의 중요한 성상을 결정하고 물리적인 성상구조, 안정성, 교미 및 외관에 기여하며, 크게 부형제, 보조제, 첨가제로 분류할 수 있다^{38~40)}. 이 중 염, 초, 향유는 창면 보호작용, 해독작용, 살충작용, 소양증을 멎추는 작용, 창면을 유연하게 하는 작용 등이 있어⁴³⁾ 乾坤一氣膏, 狼毒膏, 三香膏, 文蛤散, 密陀僧散, 土大黃膏 등의 첨가제로 사용되었다⁴²⁾.

염(鹽)은 鹹味이고 寒하며, 胃, 腎, 大小腸經에 들어가고 血分에 작용한다. 降火涼血, 祛皮膚風毒, 殺蟲止痒, 定痛, 渗濕而潤燥, 補皮堅肌長肉의 효능이 있어서 별레 물린 상처, 一切瘡瘍 등을 치료한다⁵¹⁾.

초(醋)는 쌀, 밀, 수수 또는 술, 주조 등을 양조해서 생성된 초산을 함유한 액체로서, 酸苦味이고 溫하며 肝, 胃經에 작용한다. 殺風毒, 殺一切魚肉菜毒, 破結氣, 散瘀血止血, 行濕, 製用可宣陽의 효능이 있어서 瘰疽瘡腫, 咽瘡, 金瘡, 瘢塊堅積 등을 치료한다⁵¹⁾.

향유(香油)는 참깨과 식물 黑芝麻(胡麻)의 씨에서 짜낸 지방유로서 胡麻油, 麻油라고도 하며, 甘味이고 凉하며 手陽明經에 작용한다. 潤燥, 生肌長肉, 止痛, 消癰腫, 殺一切蟲의 효능이 있어서 皮裂, 潰瘍, 穿孔, 頭面遊風, 惡瘡疥癬 등을 치료한다⁵¹⁾.

본 연구에서는 역대문헌상 의용제의 첨가제로 다용된 염, 초, 향유가 미백제의 첨가제로 사용될 경우의 미백효과 유무를 검정하고자 tyrosinase 활성 억제효과, melanoma cell에서의 멜라닌 생성률과 세포생존률에 미치는 효과, 자외선 차단효과에 대해 실험연구하였으며, hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 cell 손상에 대한 항산화효과에 대해서도 살펴보았다.

항산화효과는 피부노화에 대한 사회적 관심이 증가하면서 항산화제의 역할이 중요시되므로 본

연구에 첨가시켰다. 적당한 농도의 항산화제는 모든 연령에서 정상적인 면역반응을 유지하기 위해 필요하다. 즉 면역세포들은 세포 원형질막에 산화작용에 민감한 불포화 지방산이 많이 존재하며, 또한 면역기능을 수행하는 동안 여러 종류의 반응산소(reactive oxygen species)가 발생하기 때문에 이들에 의한 손상을 받기 쉽다. 특히 노인에서는 연령이 증가함에 따라 반응산소의 생산이 증가하고 lipid peroxidation 빈도가 증가하기 때문에 항산화제의 역할이 더욱 중요하다. 현재 연구가 많이 되고 있는 항산화제로는 vitamin E, β-carotene, glutathione 등이 있다^{2,52)}.

麻黃²⁷⁾, 鴉白散²⁸⁾, 加減西施玉容散²⁹⁾의 미백효과에 관한 한의계의 기존보고에서 麻黃, 鴉白散, 加減西施玉容散이 농도의존적인 tyrosinase 활성 억제효과를 보였던 반면, 염, 초, 향유는 모두 농도의 존적인 tyrosinase 활성 억제효과를 나타내지 않았다. Tyrosinase 활성 억제율에 있어 麻黃(500μg/ml)이 14.8%, 鴉白散(200μg/ml)이 79.2%, 加減西施玉容散(500μg/ml)이 6.7%였으나, 염(500μg/ml)은 -11.1%, 초(500μg/ml)는 -13.4%, 향유(500μg/ml)는 -48.9%였다. 그리고 麻黃, 加減西施玉容散이 농도의존적인 멜라닌 생성 억제효과를 보였던 반면, 염, 초, 향유는 모두 농도의존적인 멜라닌 생성 억제효과를 나타내지 않았다. 멜라닌 생성률에 있어 麻黃(10ppm)이 78%, 鴉白散(100μg/ml)이 47%, 加減西施玉容散(100μg/ml)이 57.5%였으나, 염(10ppm)은 106.9%, 초(10ppm)는 96.9%, 향유(10ppm)는 91.7%였다. 그리고 麻黃(50μg/ml)이 자외선 차단효과를 보였던 반면, 염, 초, 향유(33.4μM)는 加減西施玉容散(33.4μM)과 마찬가지로 자외선 차단효과를 나타내지 않았으며, 麻黃, 加減西施玉容散이 항산화효과를 보였던 반면, 염, 초, 향유는 항산화효과를 나타내지 않았다.

이상의 결과에서 역대문헌상 외용제의 첨가제로
다용된 염, 초, 향유는 미백제의 첨가제로 사용될
경우 미백효과가 미약함을 알 수 있었으며, 향후
염, 초, 향유 이외의 첨가제에 대해 미백효과를 검
정하여 미백제의 첨가제로 활용해야 할 것이다.

결론

염(鹽), 초(醋), 향유(香油)의 미백효과를 알아보기 위해 tyrosinase 활성 억제효과, melanoma cell에서의 멜라닌 생성률과 세포생존률에 미치는 효과, 자외선 차단효과, hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 cell 손상에 대한 항산화효과에 관해 실험연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 염, 초, 향유는 모두 모든 농도(5, 50, 500 μ g/ml)에서 tyrosinase 활성 억제효과를 나타내지 않았다.

2. 염, 초, 향유는 모두 농도의존적인(1, 10, 100ppm) 멜라닌 생성 억제효과를 나타내지 않았다.

3. 염, 초, 향유는 모두 자외선 차단효과가 미약하였다.

4. 염, 초, 향유는 모두 모든 농도(1, 10, 100 μ g/ml)에서 항산화효과를 나타내지 않았다.

이상의 결과에서 역대문헌상 외용제의 첨가제로
다용된 염, 초, 향유는 미백제의 첨가제로 사용될
경우 미백효과가 미약함을 알 수 있었다.

참고문헌

- 戴玉. 中医美容大全. 北京:中國中醫藥出版社. 1999:1-4.
- 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과. 서울:여문각. 2001:8-9,24-9,409,533-5.
- 조광현. 노화에 따른 피부조직의 변화. 대한
피부연구학회지. 1998;5:21-5.
- Ewan C, Bryant EA, Calvert GD, et al.
Potential health effects of greenhouse
effect and ozone layer depletion in
Australia. Med J Aust. 1991;154:554-9.
- Mishima Y, Kondoh H, Hatae S. Overview
for development of future innovative skin
whitening agents. Fragrance J. 1996;24:13.
- Maeda K, Fukuda M. In vitro effectiveness
of several whitening cosmetic components
in human melanocytes. J Soc Cosmet
Chem. 1991;42:361-8.
- 박인기, 김경준. 雀斑에 관한 文獻的 考察. 東
醫學會誌. 2001;5(1):139-66.
- 신연상, 노석선. 기미에 關한 文獻的 考察. 大
韓外官科學會誌. 1998;11(1):82-98.
- 박혜준, 고우신. 雀斑의 原因, 症狀 및 治方에
關한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌.
1997;10(1):247-62.
- 남혜정, 채병윤. 肝斑에 關한 文獻的 考察.
大韓外官科學會誌. 1996;9(1):16-23.
- 정동욱, 채병윤. 肝斑의 外用藥에 關한 文獻
的 考察. 大韓外官科學會誌. 1989;2(1):33-40.

12. Jimbow K, Quevedo Jr. WC, Prota G, et al. Biology of melanocytes. In : Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, et al. Dermatology in general medicine. New York: McGraw-Hill. 1999:192-220.
13. 이현호. 최근 미백화장품의 개발동향. 대한화장품학회지. 1997;23(1):43-56.
14. 하병조. 화장품학. 서울:수문사. 1999:92-4.
15. 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(3):801-3.
16. Moon KY, Ahn KS, Lee J, Kim YS. Kojic acid, a potential inhibitor of NF-kappaB activation in transfected human HaCaT and SCC-13 cells. Arch Pharm Res. 2001;24(4):307-11.
17. Lim JT. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. Dermatol Surg. 1999;25(4):282-4.
18. 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. 1996;22(5):443-7.
19. 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. 1994;46(12):982-5.
20. Kennechi T, Minoru F. Mechanism of arbutin inhibitory effect on melanogenesis and effect on the human skin with cosmetic use. Fragrance J. 1990;4:72-7.
21. 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. 2001;33(10):971-83.
22. 이정훈, 박준홍, 이종석, 황규왕. 뽕나무가지 추출물의 멜라닌 생성 억제효과. 대한피부연구학회지. 2001;8(2):86-90.
23. Yokota T, Nishio H, Kubota Y, Mizoguchi M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. Pigment Cell Research. 1998;11(6): 355-61.
24. 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. 2001;27(1):68-75.
25. Joachim RG. Increased expression of protein kinase C-alpha plays key role in retinoic acid-induced melanoma differentiation. J Biol Chem. 1992; 267:13356-60.
26. Jens-Michael Schroder. Cytokine networks in the skin. J Invest Dermatol. 1995;105:20-4.
27. 이상희. 麻黃 및 摩風膏의 美白效果에 관한

- 研究. 경희대학교 동서의학대학원 석사학위 논문. 2001.
28. 김성각. 사백산의 미백효과 검정에 관한 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 2000.
29. 손동석. 가감서시옥용산의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 2002.
30. Hideaki M. Studies for Cuticle Drugs from Natural sources IV. Inhibitory Effects of Some Arctostaphylos Plants on melanin Biosynthesis. *Biol Pharm Bull*. 1996;19(1):153-6.
31. 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*. 1991;39(12):3276-8.
32. 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*. 1999;1(4):285-99.
33. Yukihiro Yada. Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melnocytes. *J Biol Chem*. 1991;266:19352-7.
34. Espin JC, Wicher HJ. Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1544(1-2):289-300.
35. Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M. Depigmenting effect of alpha-tocopheryl ferulate on normal human melanocytes. *Pigment Cell Res*. 2000;Suppl 8:170-4.
36. Ichihashi M, Funasaka Y, Ohashi A, Chacraborty A, Ahmed NU, Ueda M, Osawa T. The inhibitory effect of DL-alpha-tocopheryl ferulate in lecithin on melanogenesis. *Anticancer Res*. 1999;19(5A):3769-74.
37. 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*. 2001;49(3):1620-4.
38. 이범진, 한건. 재형의 원리와 기술. 서울:신일상사. 2000:115-7,129-31.
39. 약제학분과회. 제제학. 서울:한림원. 1998:3-4,577-9.
40. 구영순, 김길수, 이민화. 藥典製劑와 一般試驗法. 서울:이화여자대학교출판부. 1990: 14-5,561-6.
41. 서형식, 노석선. 敷貼藥의 活用에 관한 研究. 大韓外官科學會誌. 2000;13(2):51-75.
42. 이정용, 노석선. 外科正宗에 收錄된 外用藥에 對한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌. 2000;13(1):185-208.
43. 이명섭 외. 한방전문의총서(피부과). 서울:해동의학사. 1996:55.
44. Gilchrest BA. Mechanism of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem Photobiol* 1996;63:1-10.
45. Rasmussen N, Nelson F, Govitrapong P, Ebadi M. The actions of melanin and melanocyte stimulating hormone (MSH). *Neuroendocrinol Lett*. 1999;20(5):265-82.
46. Maeda K, Naganuma M, Fukuda M, Matsunaga J, Tomita Y. Effect of pituitary

- and ovarian hormones on human melanocytes in vitro. *Pigment Cell Res.* 1996;19(4):204-12.
47. 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.* 2001;268(1):26-35.
48. Hearing VJ. Mammalian tyrosinase. *Int J Biochem.* 1987;19:1141-7.
49. Slominski A, Moellmann G, Kuklinska E. L-tyrosine, L-dopa and tyrosinase as positive regulators of the subcellular apparatus of melanogenesis in Ab amelanotic melanoma cells. *Pigment Cell Res.* 1989;2:109-16.
50. Acroca P, Garcia-Borron JC, Lozano JA. Regulation of final mammalian melanogenesis. the role of dopachrome tautomerase and the ratio between 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid and 5,6-dihydroxyindole. *Eur J Biochem.* 1992;208:155-63.
51. 중약대사전 편찬위원회. 완역 중약대사전. 서울:정답. 1997:1182-3,2635-8,4260-4.
52. 은희철 외. 피부면역학. 서울:서울대학교출판부. 1999:143-9.