

## 加味防風通聖散의 美白效果에 관한 研究

이승은 · 김혜정 · 김윤범

경희대학교 한의과대학 안이비인후과학교실

### The Study on Depigmentation of Kamibangpungtongsung-San

Seung-eun Lee · Hae-jeong Kim · Yoon-bum Kim

**Objective :** This study was performed to determine the depigmenting effects of *Kamibangpungtongsung-San*.

**Methods :** To determine the depigmenting effects of *Kamibangpungtongsung-San*, we measured the degree of tyrosinase inhibition, melanin production & cell viability in cultured B16 melanoma cells, UV screen and cytoprotective effects on PC12 cells injured by hydrogen peroxide.

**Results :** *Kamibangpungtongsung-San* did not show inhibitory effects on melanin production in melanoma cells, UV screen and cytoprotective effects on PC12 cells injured by hydrogen peroxide. However it showed mild inhibitory effects on tyrosinase activity.

**Conclusion :** This study shows that *Kamibangpungtongsung-San*, a generally used prescription for dermatologic diseases, do not have depigmenting effects via tyrosinase inhibition. Therefore, the depigmenting effect and mechanism of depigmentation by *Kamibangpungtongsung-San* need to be evaluated and investigated in other directions.

---

**Key words :** Kamibangpungtongsung-San(Chinese herbal name : chiaweifangfengtongshengsan), depigmentation, tyrosinase, melanin, UV, cytoprotective effect

### 서론

멜라닌 색소의 합성이 국소적으로 증가되거나 멜라닌 색소의 분포가 균일하지 못하면 피부의 과색소 침착에 의한 미용상의 문제점들이 초래된다<sup>1)</sup>. 이

러한 문제점들을 유발하는 색소 침착은 피부의 염증반응 이후, 체내 호르몬 이상, 유전 질환 및 자외선 조사 등 여러 요인에 의해 발생될 수 있는데, 특히 최근에는 오존층의 파괴와 여가활동의 증가로 인해 사람들이 강한 자외선에 노출될 기회가 많아짐에 따라 자외선 조사에 의한 색소침착 및 색소성 질환이 문제시되고 있다<sup>2)</sup>. 따라서 이러한 문제점들을 예방하고 해결하기 위하여 뛰어난 안정성과 강한 미백효과를 지닌 미백용 화장품이나 의약품에 대하여 많은 관심이 집중되고 있으며, 특히 정서적

---

교신저자: 이승은, 서울시 동대문구 회기동 1  
경희대학교 부속한방병원 안이비인후과  
(Tel: 958-9181, E-mail: lse94@hanmail.net)

으로 흰 피부를 선호하는 동양권의 생활수준 향상과 더불어 피부과색소침착이 자외선에 의한 피부노화의 원인 등으로 인식되면서 그 연구에 대한 필요성이 점차 증대되고 있다. 1990년도 이후 arbutin<sup>3</sup>), kojic acid<sup>4</sup>), vitamin C 및 그 유도체 등이 개발되어 미백 화장품으로 시판되었으나 강한 미백효과에도 불구하고 제형의 안정성과 인체에 대한 안전성이 낮아 실질적인 임상효과는 만족스럽지 못한 실정이며, 과도한 색소침착을 개선하기 위한 의약품으로서 hydroquinone<sup>5</sup>), sulfur, azelaic acid 및 retinoic acid <sup>6</sup>) 등이 사용되고 있으나 피부 자극성이 높고 피부 독성이 있어서 이에 대한 우수한 대체약물의 개발이 시급한 실정이다.

한의학 문헌에서는 《神農本草經》 이후 미용에 관한 복합처방 1000여 종, 단일약재 300여 종이 수록되어 있고, 《東醫寶鑑》外形篇 面門, 皮門<sup>7</sup>)에도 미용에 관한 내용이 언급되어 있다. 색소침착질환에 대한 기술은 面塵 面黑<sup>8-11</sup>) 面黥黯<sup>12</sup>) 雀斑<sup>13,14</sup>) 肝斑 등이 있으며, 역대 의가들은 그 원인을 陽明之氣不足, 風邪와 痰飲으로 氣血이 不和됨, 憂思過度 思慮過多로 飲食失調하여 발생된 脾胃의 손상, 腎水不足으로 인한 虛火의 발생, 風熱 등으로 파악하고 있다. 이 중 風熱에 의한 병인에 초점을 맞추어 防風通聖散加味方을 선택하였는데 이 처방은 皮膚病의 통치방으로 多用되어 왔으며<sup>15</sup>), 《方藥合編》<sup>16</sup>)에서 “治諸風熱 或 瘡疹黑陷 或 風熱瘡疥 頭生白屑 面鼻紫赤 肺風瘡 大風癩疾 或 熱結二便不通 並解酒毒” 한다고 기술하고 있고, 실제 임상에서 기미 등의 색소침착질환에 사용하여 효과를 보았기에 그 미백효과와 피부노화에 미치는 영향을 검증하여 보고자 본 실험을 하게 되었다. 초기의 미백제 개발은 melanin 색소 생합성 과정의 첫 단계인 tyrosinase에 대한 tyrosine의 산화 억제기능에 초점이 맞추어져 있어 주로 in vitro에서 tyrosinase 활성억제제를 선발하는 방법을 통해 주로 이루어졌다<sup>17</sup>). 본 연구에서 미백효과 검증방법으로는 멜라닌 세포에서 멜라닌 생성에 미치는 영향을 보기 위해 melanin 생합성에

관여하는 key enzyme인 tyrosinase 활성억제효과, melanoma B16 cell에서의 melanin 생성률과 세포생존률에 미치는 효과, UV 차단효과를 보았으며, 피부노화와 세포독성에 미치는 영향의 검증방법으로는 hydrogen peroxide에 의해 유도된 P12 cell 손상에 대한 항산화 효과를 보았다. 이 결과를 종합하여 加味防風通聖散의 미백효과와 기전에 대해 실험 연구하여 얻은 결과를 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 약재

약재는 경동시장에서 구입한 후 경희대학교 안이비인후피부과 교실에서 검증한 것을 정선하여 사용하였으며 실험에 사용된 처방은 《東醫寶鑑》에 기재된 防風通聖散의 加味方으로 그 구성약물의 내용은 다음과 같다. (Table 1.)

Table 1. Composition and Dosage of Kamibangungongsung-san

韓藥名	生藥名 <sup>18</sup>	用量(g)
滑石	Talcum	8
防風	Ledebouriellae Radix	3
甘草	Glycyrrhizae Radix	4
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
川芎	Cnidii Rhizoma	4
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	4
梔子	Gardeniae Fructus	2
麥門冬	Liriopsis Tuber	2
荊芥	Schizonepetae Herba	4
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	4
石膏	Gypsum Fibrosum	2
薄荷	Menthae Herba	2
葛根	Puerariae Radix	8
蒼耳子	Xanthii Fructus	8
白芷	Angelicae Dauricae Radix	4
木通	Acaebiae. Caulis	4
細辛	Asari Herba Cum Radix	4
連翹	Forsythiae Fructus	3
川椒皮	Zanthoxyli Fructus	2
桔梗	Platycodi Radix	2
黃連	Coptidis Rhizoma	2
辛夷	Magnoliae Flos	2
黃芩	Scutellariae Radix	3
計		85

2) 시약

본 실험에 사용한 Tyrosinase(from mushroom), L-3,4-dihydroxyphenyl alanine(L-DOPA), kojic acid 등은 Sigma-Aldrich co.(U.S.A.)에서 구입하였고, 유기용매 또한 일급시약만을 Sigma-Aldrich co.(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.

Melanoma cell과 PC12 cell의 배양에 사용된 RPMI 1640 배지 및 horse serum, fetal bovine serum(FBS), Penicillin-Streptomycin, 0.25% trypsin-EDTA는 Gibco Br.(U.S.A.)에서 구입하였으며, Sodium bicarbonate는 Tedia co.에서 구입하였다. poly-D-lysine, DMSO 및 30% hydrogen peroxide는 Sigma(U.S.A.)에서 구입하였다.

MIT assay에 사용된 MIT(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 세포주 은행에서 공여 받아 사용하였다.

4) 기기

Tyrosinase assay, melanoma cell assay, MIT assay에는 ELISA reader E09090 (Molecular Device, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 시료의 조제

본 연구에 사용된 시료는 加味防風通聖散을 3차 증류수로 열수 추출한 후 감압 농축 후 동결 건조하여 사용하였다. 加味防風通聖散 총 85g을 유리로 된 추출병에 넣고 증류수 2000 cc를 부어 시료가 충분히 잠기도록 하여 하루 동안 냉침한 다음 관류

냉각장치에서 온도 100 ℃로 2시간 가열한 후 1차 전탕액을 얻었으며 증류수 1500cc를 넣고 1시간 가열 후 2차 전탕액을 얻었다. 1,2차 전탕액을 혼합하여 filtering하고 회전식 진공플라스크에 넣은 후 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축 후 동결건조기에서 가미방풍통성산 30.64g을 얻었다. 그 후 powder를 10mg씩 e-tube에 넣고 D.W:MeOH=1:1비율로(각 500μl씩) 1ml를 넣어 10mg/ml을 만들었다.

2) Tyrosinase 활성 억제율 측정

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

DOPA 49.3mg을 50ml tube에 넣은 후 phosphate buffer 30ml을 넣고 vortex한다. 96 well plate에 DOPA 120μl와 시료의 농도별 sample 40μl를 넣고 tyrosinase 40μl를 첨가하여 각 well당 총 200μl를 만든 후 37℃에서 20분간 incubation한다.

생성된 DOPachrome의 양을 ELISA reader를 이용하여 490nm영역에서의 흡광도를 측정하였다.

대조군은 시료대신 DOPA 120μl, MeOH 40μl와 tyrosinase 40μl로 하였다.

tyrosinase 활성 억제율은 다음과 같이 계산하였다.

3) Melanoma cell에서의 멜라닌 생성률과 세포생존률 측정

(1) Melanoma cell의 배양

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

100π tissue culture dish에 배지 10ml를 넣고 약 5×10<sup>5</sup>개의 세포를 접종하였다. 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 환경 하에서 3~4일 후 confluent하게 자라면 24 well plate

에  $10^5$  cells/well로 희석하여 재접종하고 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% H<sub>2</sub>O) 24시간 더 배양하였다.

(3) 멜라닌 생성률 측정

멜라닌 생성률을 측정하기 위해 배지를 제거한 후 PBS로 washing하였다. 1N NaOH 1ml씩을 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 1ml를 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.

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℃의 배양기에 공기 95%와 CO<sub>2</sub> 5%의 혼합기체를 계속 공급하였다.

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

(2) 시료와 hydrogen peroxide의 처리

$3 \times 10^4$  cells/well의 PC12 cell을 96 well plate에 분주하고 24~48시간동안 37℃의 배양기에서 배양하였다. 배양액을 serum free media로 교체한 후 DMSO에 녹인 농도별 시료(0.1, 1.0, 10.0, 50.0  $\mu\text{g/ml}$ )를 전처리 하였다. 90분이 경과한 후 30% hydrogen peroxide를 DMSO에 희석하여  $400\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였다.

대조군은 시료대신 3차 증류수를 같은 부피로 투여하였다.

(3) MTT assay

세포생존율을 측정하기 위해 MTT reduction assay를 사용하였다.

PC12 cell을 분주한 96 well plate에  $0.5\text{mg/ml}$ 의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)  $200\mu\text{l}$ 를 넣고 3시간동안 37℃에서 반응시켜 상층액을 모두 제거 후 여기에 DMSO  $100\mu\text{l}$ 를 넣고 shaking plate에서 shaking하여 완전히 용해시킨 후, ELISA reader를 이용하여 570nm영역에서의 흡광도를 측정하였다.

(4) 통계분석

통계처리는 윈도우용 Microsoft Excel (office xp)를 이용하였다.

각 실험군과 대조군의 비교를 Student's t-test로 검정하였으며, 유의수준은  $p < 0.00001$ 로 하였다.

## 결과

### 1. Tyrosinase 활성 억제효과

대조군과 비교한 tyrosinase 활성 억제율을 살펴보

면 가미방풍통성산 추출물은 10 $\mu$ g/ml에서 2.00%, 50  $\mu$ g/ml에서 1.84%, 100 $\mu$ g/ml에서 5.21%, 500 $\mu$ g/ml에서 6.50%의 억제율을 보였고, 대조군인 kojic acid는 10  $\mu$ g/ml에서 .14.72%, 50 $\mu$ g/ml에서 68.79%, 100 $\mu$ g/ml에서 84.48%, 500 $\mu$ g/ml에서 98.53%의 억제율을 보였다. (Table 2, Fig. 1).

각 실험결과는 3회 반복 실험한 결과의 평균치로 하였다.

Table 2. Inhibitory Effects on Tyrosinase Activity of Kamibangpungtongsung-San (이하 KBPTSS)

specimen	concentration			
	10 $\mu$ g/ml	50 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml	500 $\mu$ g/ml
KBPTSS	2.00 %	1.84 %	5.21 %	6.50 %
Kojic acid	14.72 %	68.79 %	84.48 %	98.53 %

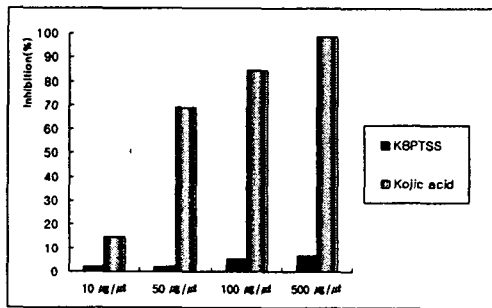


Fig. 1. Inhibitory effects on tyrosinase activity of KBPTSS.

## 2. Melanoma cell에서의 멜라닌 생성률과 세포생존률에 미치는 효과

멜라닌 생성률을 살펴보면 加味防風通聖散 추출물은 2ppm에서 104%, 20ppm에서 109%, 200ppm에서 94%의 생성률을 보였고, PTU는 2ppm에서 88%, 20ppm에서 54%, 200ppm에서 40%의 생성률을 보였

다. (Table 3, Fig. 2, 3).

세포생존률을 살펴보면 加味防風通聖散 추출물은 2ppm에서 93%, 20ppm에서 96%, 200ppm에서 93%의 생존률을 보였고, PTU는 2ppm에서 92%, 20ppm에서 86%, 200ppm에서 92%의 생존률을 보였다. (Table 2, Fig. 2, 3).

각 실험결과는 3회 반복 실험한 결과의 평균치로 하였다.

Table 3. Effects on Melanin Production and Melanoma Cell Viability of KBPTSS(mean)

specimen	concentration (ppm)	melanin production (%)		cell viability (%)		
		2	20	200	2	20
KBPTSS	2	104	109	94	93	96
	20	109	94	93	96	93
	200	94	93	93	96	93
PTU (phenylthiourea)	2	88	54	40	92	86
	20	54	40	92	86	92
	200	40	92	92	86	92

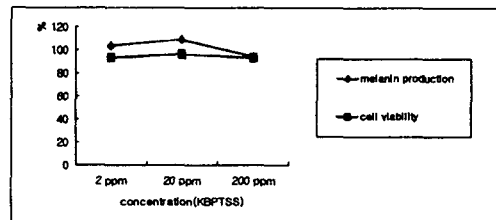


Fig. 2. Effects on melanin production and melanoma cell viability of KBPTSS

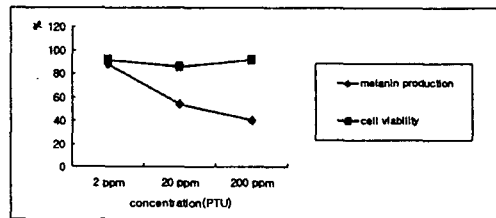


Fig. 3. Effects on melanin production and melanoma cell viability of PTU

### 3. 자외선 차단효과

UV spectrum을 분석한 결과, 가미방풍통성산 추출물은 UVB(280~320nm)와 UVA(320~400nm)에서 특징적인 peak를 보이지 않았다 (Fig. 4).

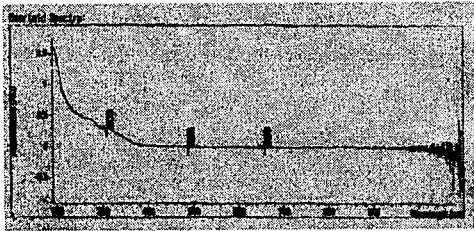


Fig. 4. UV spectrum of Kamibangpungtongsung-San

### 4. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 cell 손상에 대한 항산화효과

MTT assay상 3차 증류수를 투여한 대조군은 44.1±3.40%의 세포 생존률을 보인 반면에, 가미방풍통성산 추출물은 0.1, 1.0, 10.0, 50 µg/ml에서 각각 9.67±0.93%, 10.7±0.49%, 9.43±0.44%, 10.52±0.56%의 세포생존률을 보였다 (Table 4, Fig. 5).

각 실험결과는 3회 반복 실험한 결과의 평균치로 하였다.

Table 4. Cytoprotective Effects of Kamibangpungtongsung-San on PC12 Cells Injured by Hydrogen Peroxide (Values are means±S.E.M.)

specimen	concentration (µg/ml)	cell viability (%)	P-value*
D.W.		44.1±3.40	2.35E-13
KBPTSS	0.1	9.67±0.93	2.87E-7
	1.0	10.7±0.49	4.21E-7
	10.0	9.43±0.44	2.33E-7
	50.0	10.52±0.56	3.93E-7

\* calculated by Student's t-test ( p<0.00001 )

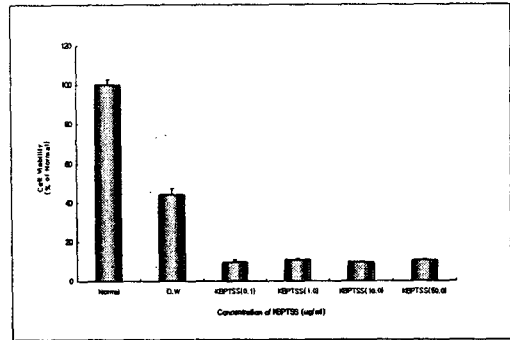


Fig 5. Cytoprotective effects of KBPTSS on PC12 cells injured by hydrogen peroxide.( \* P<0.00001 )

## 고찰

정상인의 피부색에 영향을 미치는 요소는 표피의 멜라닌 색소와 혈관내의 혈색소, 각질층의 두께 등 내부적 인자와 음식물을 통해 섭취되어 피부에 침착되는 카로틴과 같은 외부적 인자로 나눌 수 있다. 이들 중 가장 중요한 요소는 멜라닌 색소이다. 멜라닌이 형성되는 과정은 다음과 같다. 표피의 기저층에 산재하는 멜라닌세포는 수지상돌기를 갖는 분비세포로서 가는 수지상돌기를 통해 주위의 각질형성세포와 표피멜라닌단위를 구성하며 각질형성세포에 멜라닌소체(melanosome)를 공급한다<sup>19)</sup>. 멜라닌소체 내에서는 tyrosine이 tyrosinase<sup>20)</sup>에 의해 3,4-dihydroxy-phenylalanine(이하 DOPA)<sup>21)</sup>로 전환되고 DOPA에 다시 tyrosinase가 산화작용을 촉매하는 효소로 작용하여 DOPAquinone이 생성되며, DOPAquinone이 cycloDOPA로 변한 다음 남아있는 DOPAquinone이 보조인자로 작용하여 DOPochrome을 생성한 후 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid 및 5,6-dihydroxyindole을 거쳐 최종적으로 멜라닌이 생성된다<sup>22)</sup>. 그리고 멜라닌은 각질형성세포와 동일한 대사과정을 거쳐 탈락한다. 따라서 젊은 사람의 피부는 신진대사가 활발하여 대략 4주 정도 지나면 원래의 피부색으로 돌아가나 나이 들어 신진대사가 둔화되면 이러한 회복력이 약해져서 피부색소침착이 더 눈에 띄게 된다<sup>19)</sup>.

피부의 멜라닌세포는 자외선에 노출되면 그 파장에 따라 두 가지 반응을 보이는데, UVA와 가시광선에 의한 즉시형 색소침착과 UVB(280~320nm)와 UVA(320~400nm)에 의한 지연형 색소침착이 있다. 전자는 멜라닌세포의 수, 효소활성, 멜라닌소체의 변화 없이 멜라닌의 산화에 의해서 발생하며, 후자는 멜라닌세포의 수적 증가, 효소활성의 증가, 새로운 멜라닌소체와 멜라닌의 합성, 각질형성세포로의 전이 촉진 등에 의해 발생한다<sup>19)</sup>. 자외선노출에 의한 색소침착은 cytokines, basic fibroblast growth factor, nerve growth factor, endothelin-1, ACTH,  $\beta$ -lipotropin,  $\beta$ -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<sup>26,27)</sup>.

자외선 외에도 MSH<sup>27)</sup>, ACTH, estrogen<sup>28)</sup>, lipotropin, thyroxine, androgen 등과 같은 호르몬의 이상, 피부의 염증반응, 유전질환 및 pH<sup>29)</sup> 등도 멜라닌세포를 자극하는 능력이 있다<sup>19,30)</sup>.

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,  $\beta$ -carotene, glutathione 등이 있다<sup>19,44)</sup>

미백효과에 대한 연구는 구체적으로 tyrosinase 활성 억제, DOPA 산화 억제, 각질층 제거 촉진 및 자외선 차단 등에 대해서 이루어지고 있다<sup>23-25)</sup>.

피부색 및 피부색소침착은 각질형성세포에 있는 멜라닌의 양과 분포에 의해 대부분이 결정되므로 미백소제의 미백효과를 검증하기 위해서는 멜라닌 생성을 억제하는지 여부가 중요하다<sup>23)</sup>.

미백원료의 개발은 일반적으로 melanocyte 내의 tyrosine이 일련의 산화환원반응을 거쳐 생합성 되는 melanin을 피부 내에서 감소시키기 위한 목적이다. 피부 내 색소함량을 줄이기 위한 목적을 달성하기 위해서는 여러 가지 접근법이 가능하다. 이를 테면, (1) 일차적으로 사용되는 비 세포생리화학적 방법으로 자외선 차단제의 사용으로부터 시작하여, (2) 이미 생성되어 표피의 keratinocyte로 전달된 색소를 신속하게 탈락(exfoliation)시키는 방법, (3) 생합성된 melanin이 melanosome에 실려 keratinocyte로 전달되는 단계를 차단하는 방법, (4) melanin 중 흑색을 띠는 eumelanin보다는 밝은 노란색을 띠는 pheomelanin이 더 효율적으로 생성되도록 유도하는 방법, (5) melanin 생합성의 속도 결정단계인 tyrosinase 활성을 억제하는 방법, (6) 그 효소의 mRNA 혹은 단백질 생합성을 억제하는 방법, (7) 거슬러 올라가 melanocyte의 세포막으로부터 tyrosinase 효소활성 및 생합성 촉진을 유도하는 신호전달을 차단하는 방법, (8) melanocyte외부로부터 melanocyte 세포막으로의 신호전달-주로 cytokine이나 hormone receptor를 통한-을 방해하는 방법이 있을 수 있는데 많은 경우 한 가지 이상의 방법을 병용하는 것이 통례이다.

한의학에서는 피부색의 이상을 초래하는 과색소 침착성 질환에 대하여 형태와 색조에 따라 黧黯<sup>31,32,33)</sup>, 黧點<sup>34)</sup>, 面黑<sup>8-11)</sup>, 面黧黯<sup>12)</sup>, 雀卵<sup>35)</sup>, 斑黧黯, 麤子, 雀斑, 鰲黑斑<sup>13,14)</sup>, 黧黯<sup>36)</sup>, 鰲黑黧黯<sup>37)</sup>, 黑斑<sup>38)</sup> 등 다양하게 表現되어왔다. 經絡으로는 陽明經, 臟腑와는 脾胃, 心, 腎과 연관이 있는 것으로 보았다

39). 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 痰飲漬於腑藏”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 처방을 응용하였다<sup>40-42)</sup>. 한편 문헌상으로 색소침착 질환이 부녀에게 많이 나타나는 질환이라는 언급은 있으나 清代까지의 문헌에서 월경, 임신과의 관계에 대한 구체적인 언급은 없었다<sup>42)</sup>.

역대문헌에서 미백제와 관련된 처방으로는 玉容散, 玉容丸, 玉肌散, 酒製四物湯, 升麻白芷湯<sup>40-43)</sup> 등이, 약물로는 白芷, 白附子, 杏仁, 蜜, 鷄子白, 密陀僧, 白茯苓, 白藜, 防風, 鹽<sup>40-43)</sup> 등이 사용되었다.

그리고 외용제와 관련된 처방으로는 如意金黃散, 沖和膏, 回陽玉龍膏, 玉露散, 生肌散 등이, 약물로는 白芷, 南星, 輕粉, 雄黃, 乳香, 麝香, 當歸, 大黃, 黃柏, 甘草<sup>40-43)</sup> 등이 사용되었다.

본 연구에서는 역대문헌상 피부질환에 통치방으로 사용하던 加味防風通聖散의 미백효과 유무를 검증하고자 tyrosinase 활성 억제효과, melanoma cell에서의 멜라닌 생성률과 세포생존률에 미치는 효과, 자외선 차단효과에 대해 실험 연구하였으며, hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 cell 손상에 대한 항산화효과에 대해서도 살펴보았다.

麻黃<sup>45)</sup>, 瀉白散<sup>46)</sup>, 加減西施玉容散<sup>47)</sup>의 미백효과에 관한 한의계의 기존보고에서 麻黃, 瀉白散, 加減西施玉容散이 농도의존적인 tyrosinase 활성 억제효과를 보였던 반면, 가미방풍통성산 추출물은 농도의존적인 tyrosinase 활성 억제효과를 나타내지 않았다. Tyrosinase 활성 억제율에 있어서 麻黃(500 $\mu$ g/ml)이 14.8%, 瀉白散은 10 $\mu$ g/ml에서 27.8%, 20 $\mu$ g/ml에서 44.8%, 50 $\mu$ g/ml에서 65.6%, 100 $\mu$ g/ml에서 75.4%, 200

$\mu$ g/ml에서 79.2%, 加減西施玉容散은 100 $\mu$ g/ml에서 0.3%, 200 $\mu$ g/ml에서 3%, 500 $\mu$ g/ml에서 6.7%였고, positive control 인 kojic acid는 10 $\mu$ g/ml에서 14.72%, 50 $\mu$ g/ml에서 68.79%, 100 $\mu$ g/ml에서 84.48%, 500 $\mu$ g/ml은 98.53%였으나 加味防風通聖散은 10 $\mu$ g/ml에서 2.00%, 50 $\mu$ g/ml에서 1.84%, 100 $\mu$ g/ml에서 5.21%, 500 $\mu$ g/ml에서 6.50%였다. 그리고 麻黃, 加減西施玉容散이 농도 의존적인 멜라닌 생성 억제효과를 보였던 반면, 加味防風通聖散은 농도 의존적인 멜라닌 생성 억제효과를 나타내지 않았다. 멜라닌 생성물에 있어 麻黃(10ppm)이 78%, 瀉白散(100 $\mu$ g/ml)이 47%, 加減西施玉容散(100 $\mu$ g/ml)이 57.5%였으나, 加味防風通聖散(200 $\mu$ g/ml)은 94%였다. 그리고 麻黃(50 $\mu$ g/ml)이 자외선 차단효과를 보였던 반면, 加味防風通聖散(33.4 $\mu$ M)은 加減西施玉容散(33.4 $\mu$ M)과 마찬가지로 자외선 차단효과를 나타내지 않았으며, 麻黃, 加減西施玉容散이 항산화효과를 보였던 반면, 加味防風通聖散은 항산화효과를 보이지 않았다.

이상의 결과에서 역대문헌상 피부질환에 다용된 加味防風通聖散의 미백작용 기전은 tyrosinase를 억제하여 melanin을 줄이는 기전은 아닌 것으로 생각되며, 추후 상기한 다른 기전으로 미백효과를 나타내는지에 대한 검증이 필요할 것이라 생각된다. melanin 생성기전은 복잡하고 다원적이기 때문에 in vitro에서 tyrosinase 활성억제도만을 평가하여 melanin 생성 억제정도를 판단하기에는 불충분하기 때문이다.

## 결론

加味防風通聖散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 실험 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.



1. 加味防風通聖散 추출물은 mushroom tyrosinase 활성억제도를 보였으나 positive control인 kojic acid 에 비하여 억제정도가 매우 미약하였다.

2. 加味防風通聖散 추출물은 melanoma B16 세포에서 세포독성은 없지만 melanin 생성을 효과적으로 억제하지 못했으며, 농도 의존적인(2, 20, 200ppm) melanin 생성 억제효과를 나타내지 않았다.

3. UV-A 와 UV-B 영역에서 加味防風通聖散 추출물의 흡수도를 측정할 결과 UV-A와 UV-B영역에서 모두 유의적으로 자외선을 흡수를 나타내지 않았다. 따라서 자외선 차단효과가 미약함을 알 수 있다.

4. 加味防風通聖散 추출물은 모두 모든 농도(0.1, 1.0, 10.0, 50.0 $\mu$ g/ml)에서 항산화효과를 나타내지 않았다.

이상의 결과는 가미방풍통성산 추출물이 한방에서 피부질환에 대응되는 처방이나 tyrosinase를 억제하여 melanin 생산을 줄이는 기전으로 미백효과를 나타내는 것은 아닌 것으로 생각된다. melanin 생성 기전은 복잡하고 다원적이기 때문에 in vitro에서 tyrosinase 활성억제도만을 평가하여 melanin 생성 억제정도를 판단하기에는 불충분하기 때문이다. 추후 다른 기전으로 미백효과를 내는지에 대한 검증이 필요할 것이라 생각된다.

### 참고문헌

1. Matsuda M, Tejima M, Suzuki M, et al. Skin lighteners. *Cosmet Toil* 1996;111:65-77.
2. Gilcrest BA, Blog FB, Szabo G, et al. Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin. *J Invest Dermatol* 1979;73:141-3.

3. Maeda. K., Fukuda M., Invitro effectiveness of several whitening cosmetics components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1991;42: 361-368.
4. Cabanes.J., Chazarra.S., Garcia.F. Kojic Acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994; 46,12:982-985.
5. Jimbow.K. Mechanism of depigmentation by hydroquinone. *J. Invest. Dermatol.* 1974;62:436-439.
6. Griffiths. Topical tretinoin(retinoic acid) treatment of hyperpigmented lesions associate with photoaging in chnese and Japanese patients-A vehicle controlled trial. *J. Am. Acac. Dermatol.* 1994;30:76-84.
7. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 법인문화사. 1999:515-520, 737-740.
8. 朱震亨. 丹溪醫集. 北京: 人民衛生出版社. 1993:24.
9. 樓英. 醫學綱目. 서울: 大星文化史. 1986:1081.
10. 龔廷賢. 萬病回春. 서울: 醫聖堂 1993:271.
11. 王肯堂. 證治準繩. 北京: 人民衛生出版社, 卷1. 1991: 824.
12. 辛民教 外. 鄉藥集成方. 서울: 永林社. 1989:1039.
13. 陳實功. 外科正宗. 上海: 北京科學技術出版社. 1989:290,298.
14. 사坤. 外科大成. 臺北: 文光圖書有限公司. 1968: 218.
15. 李麟宰. 袖珍經驗神方. 서울: 醫門社. 1967:135.
16. 黃度淵. 方藥合編. 서울: 南山堂. 1992:122.
17. Maeda.K., Fukuda.M., Mechanism of its depigmentating action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol Exp. Therapeutic.* 1996;276:765-769.
18. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. 서울:영림사. 1994:129, 131, 132, 165, 226, 229, 292, 386, 451, 454, 505.
19. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학. 서울: 여문각. 2001: 8-9, 24-29, 133, 409, 533-535.
20. Hearing VJ. Mammalian tyrosinase. *Int J Biochem.*

- 1987;19:1141-7.
21. 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.
  22. 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.
  23. 이현호. 최근 미백화장품의 개발동향. 대한화장품학회지. 1997;23(1):43-56.
  24. 하병조. 화장품학. 서울:수문사. 1999:92-4.
  25. 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.
  26. Gilchrist BA. Mechanism of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem Photobiol* 1996; 63: 1-10.
  27. Rasmussen N, Nelson F, Govitrapong P, Ebadi M. The actions of melanin and melanocyte stimulating hormone (MSH). *Neuroendocrinol Lett.* 1999;20(5): 265-82.
  28. 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.
  29. 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.
  30. 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.
  31. 陳昭遇 外. 太平聖惠方. 北京: 人民衛生出版社. 1995:1208.
  32. 李埏. 偏註醫學入門. 서울: 大成文化. 1990: 29, 224.
  33. 許俊. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂. 1981:211,212.
  34. 趙佶. 聖濟總錄. 北京: 人民衛生出版社. 1987:1763.
  35. 周命新. 醫門寶鑑. 서울: 杏林書院. 1975:186-187.
  36. 張璐. 張氏醫通. 上海 北京科學技術出版社. 1995:442-443.
  37. 吳謙. 醫宗金鑑. 北京: 中國醫藥出版社. 1982:1680-1682.
  38. 顧世登. 瘍醫大全. 北京: 人民衛生出版社. 1987:479,481-482.
  39. 신연상, 노석선. 기미에 관한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌. 1998;11(1):82-98.
  40. 박인기, 김경준.雀斑에 관한 文獻的 考察. 東醫學會誌. 2001;5(1):139-66.
  41. 박혜준, 고우신.雀斑의 原因, 症狀 및 治方에 관한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌. 1997; 10(1):247-62.
  42. 남혜정, 채병윤. 肝斑에 관한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌. 1996;9(1):16-23. .
  43. 정동욱, 채병윤. 肝斑의 外用藥에 관한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌. 1989;2(1):33-40.
  44. 은희철 외. 피부면역학. 서울: 서울대학교출판부. 1999:143-9.
  45. 이상희. 麻黃 및 摩風膏의 美白效果에 관한 研究. 경희대학교 동서의학대학원 석사학위논문. 2001.
  46. 김성각. 사백산의 미백효과 검정에 관한 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 2000.
  47. 손동석, 김윤범. 가감서시옥용산의 미백효과에 관한 연구. 대한안이비인후피부과학회지. 2002; 15(2):104-117.