한방안이비인후피부과학회지 제21권 제1호(2008년 4월)
The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 2008;21(1) : 70-82

白附子散이 자외선 조사된 피부 손상과 색소침착에 미치는 영향

김지훈 · 홍승욱
동국대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

The Effects of *Baickbujasan* Extract on the Skin Damage and Pigmendation Induced by Ultraviolet Irradiation

Ji-Hoon Kim · Seong-Ug Hong

Objective : The purpose of this study is to examine the effects of *Baickbujasan*(BB) on the skin damage and depigmentation.

Method : The inhibition of tyrosinase activity, melanogenesis and cell viability in cultured B16 melanoma cells were measured. In order to test effects of reduction of melanogenesis, B16 F-10 mouse melanoma stem line was employed to extract melanin from cultured cell, where BB was added or not, and was dissolved in alkali for colorimetric analysis.

Also, in order to test skin alteration in C57BL/6 after UV irradiation, the animals were grouped into a UV urradiation group and UV irradiation after BB application group. Dopa oxidase tissue staining was excuted to invesitage the change in the distribution of active melanin cell.

The distribution of active melanin cell in inner skin of iNOS after damage from UVB irradiation and the manifestation condition of P53 which takes part in natural death of keratinocyte were examined.

Result : The results indicate that BB has significant effects on tyrosinase activity, and melanogenesis in vivo test. BB seems to reduce C57BL/6, external dermatological damage, for instance, erythematous papule, eczema, loss of keratinocyte, reduction in pus, and relieves dermatological damages.

Conclusion : BB can be applied externally for UV protection and depigmentation.

Key words : Tyrosinase, melanogenesis, UVB, iNOS, p53, *Baickbujasan*

교신저자 : 홍승욱, 경기도 고양시 일산구 식사동 814
동국대 일산한방병원 한방안이비인후피부과
(Tel: 031-961-9085, Fax: 031-961-9009,
E-mail: heenthsu@duih.org)
• 접수 2008/02/25 • 수정 2008/03/28 • 채택 2008/04/07

Ⅰ. 서 론

멜라닌은 세포내의 소기관인 리보솜에서 tyrosinase라는 효소의 작용으로 아미노산의 일종인 티로신에서 몇 단계합성을 거쳐 기저층의 멜라닌 세포 멜라노사이트라는 흑색소포 표면에 침착하여 검은 멜라닌 입자가 만들어진다. 자외선 노출 등 다양한 원인으로 인하여 멜라닌 합성에 이상이 생기면 과색소침착증이 생기고, 피부염증후의 피부흑화, 주근깨 ,검버섯, 오타모반, 반문상 모반, 기미, 노인성 흑점 등이 이에 해당된다[1].

한의학에서 過色素沈着은 黔黯[2], 面黑[3-5], 雀斑, 黧黑斑[6], 面塵[7]등으로 표현되어 왔고, 자외선에 의한 피부손상을 日晒瘡[8]이라고 하여 증상과 치료에 대하여 언급하고 있는데, 최근 이에 대한 여러 문헌적 고찰[9-11]과 單味劑[12-17] 및 한방복합제제에 대한 실험적 연구[18,19]가 이루어지고 있다.

白附子散은 《東醫寶鑑》에 수록되어 있는 처방으로 面上의 癬과 유사한 熱瘡이나 赤黑斑點에 蘿蔔子 전탕액으로 먼저 洗面하고 羊乳나 人乳로 調敷한다[2]고 되어있으며, 처방은 白附子, 密陀僧, 白茯苓, 白芷, 鉛粉으로 구성되어 있다. 이에 대한 관련 보고로 홍[17]의 연구에 의하면 처방의 주요 약재인 백지, 백부자가 피부미백효과를 가지고 있음이 실험적으로 입증되었고, 노[20]에 의하면 백부자산이 면포 및 염증초기의 항염작용에 효과가 있음을 밝혀내었다.

그런데, 이 실험[20] 중 면포의 병리과정을 보면 피지가 밖으로 분출되고 그 말단 부분이 표피세포가 생산하는 멜라닌에 의해서 검어지는 것을 black head라고 하였고, 일반적인 피부질환의 병리과정에 있어서 만성적인 염증에 의해서 皮膚色變이 멜라닌 색소의 過多凝集에 의한 것이므로, 白附子散이 반드시 면포에 의한 색소침착에만 효과가 있다고 보기보다는 넓게 응용하여 색소침착질환 일반에 유효할 것이라는 가정 하에 본 연구를 시행하게 되었다.

이에 저자는 지금까지 보고된 單味에 대한 연구결과의 바탕위에 한방복합제제로서 백부자와 백지가 주요한 약재로 구성된 백부자산의 자외선 차단과 피부손상완화 효과 및 미백효과를 검증하는 실험으로서 tyrosinase 활성저해도, melanogenesis 저해능, 염증 효소인 iNOS의 양성반응세포의 분포도, p53양성반응세포의 분포도 등에 대한 실험을 시행하였고, 그 결과 面疱에 대한 치료제로서만 연구되어있던 白附子散의 색소침착질환에 대하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험동물

대한실험동물센타에서 분양 받은 태령 6주된 C57BL/6계 수컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 20 g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 대조군, UV 조사군 (UV군), 백부자산 도포 후 UV 조사군 (BB군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

2) 세포주와 세포 배양

실험에 사용한 B16 F-10 mouse melanoma cell은 Korean Cell Line Bank (KCLB; Korea)에서 구입하였다. 세포는 37℃, 5% CO_2 incubator에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, USA)를 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/㎖ penicillin, 100 ㎍/㎖ streptomycin (Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 세포는 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 씻어주고, Trypsin-EDTA (Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하

여 주었다.

3) 백부자산 추출물의 제조

본 실험에 사용한 백부자산의 처방구성은 허준의 ≪東醫寶鑑≫[2]에 準하였으며, 사용한 약재는 아센코리아(주)에서 구입하여 精選하여 사용하였다.

실험에 사용될 백부자산 (*Baickbujasan*; BB)를 증류수로 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 감압농축 후 동결 건조하였다. 白附子散의 구성약물중 定粉은 重金屬이므로 인체에 有害하여 실험에서 除外하였다.

Table 1. The Amount and Composition of BB Extract

Herbal Name	Scientific Name	Amount (g)
白附子	*Typhonii Rhizoma*	37.5
白芷	*Angelicae Dahuricae Radix*	37.5
白茯苓	*Poria*	37.5
密陀僧	*Lithargurum*	37.5
Total Amount		150

Abbreviation : BB, *Baickbujasan*.

2. 실험 방법

1) 자외선 보호제로서의 백부자산의 효용성 연구

백부자산의 자외선 차단능을 조사하기 위해 tyrosinase 효소 활성 저해능을 측정하였다. Tyrosine 효소 활성 저해 측정법은 tyrosine을 기질로 이용한 Ishihara 등[21]의 방법을 변형시켜 사용하였다. Test tube에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0) 0.4 ㎖, 1.5 mM tyrosine solution 0.4 ㎖, 농도별 백부자산 용액 (1-10 ㎎/㎖) 0.2 ㎖의 혼합액에 효소액 (100 units/㎖) 0.1 ㎖를 첨가하여 30 ℃에서 5분간 반응시켜 UV-spectrophotometer (Shimadzu, Japan)에서 475 nm로 흡광도를 측정한 후 효소 활성 저해율을 구하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

$$\text{Inhibition of tyrosinase activity (\%)} = [1 - (S-B/C)] \times 100$$

S : 효소액과 白附子散용액 첨가시 흡광도 값
B : 효소액 대신 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0) 첨가시의 흡광도 값
C : 시료 용매의 흡광도 값

2) 백부자산의 멜라닌세포내 melanogenesis 저해 측정

Tyrosinase 효소 활성 저해능을 가지고 있는 白附子散의 멜라닌세포내 melanogenesis 저해 효과를 조사하였다. 본 실험에서 사용된 B16 F-10 mouse melanoma 세포주를 이용한 melanogenesis 저해 평가법은 시료가 세포수준에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 정량적으로 평가하는 Lothan R과 Lothan D[22]의 방법으로, 시료를 첨가하거나 혹은 첨가하지 않은 배양세포로부터 멜라닌을 추출해 alkali에 녹여 비색법으로 정량하였다. B16 F-10 mouse melanoma cell - 1×10^6 cells/well를 seeding 후 24시간동안 배양하였다.

그 후 UVB(philips, Holland)를 75.6 mJ/㎠량으로 조사하고 2시간 뒤에 白附子散 추출물 1, 2 ㎎/㎖를 첨가한 다음 24시간동안 배양하였다. 배지를 교환한 후 2일간 더 배양한 뒤 생성된 멜라닌을 정량하였다. 배양된 세포를 Trypsin-EDTA (0.25/0.02%) 용액 1 ㎖로 처리한 후 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 침전물을 1 ㎖의 증류수에 suspension시킨 후 얼리기와 녹이기를 2회 반복한 다음 0.5 N perchlonic acid를 첨가하고 5분간 얼음물에 방치하였다. 12,000 rpm에 원심분리한 후 0.5 N perchlonic acid로 2회 반복 추출

하였다. Cold ethanol/ether (3:1)로 2회 반복 추출한 뒤 ethyl ether로 추출한 후 건조시켰다. 건조물에 1N NaOH용액 1 ㎖를 첨가한 후 5분간 끓는 물에서 처리하여 멜라닌을 녹인 후 UV-spectrophotometer (Shimadzu, Japan)에서 405 nm로 흡광도를 측정하여 melanogenesis 저해율을 계산하였다.

Inhibition of melanogenesis (%) =
〔1 - (ABS_{405nm} · Sample/ABS_{405nm} · CON〕
× 100

ABS405nm · Sample : 백부자산 추출물 처리군의 흡광도
ABS405nm · CON : 무처리군의 흡광도

한편 UVB조사후 B16 F-10 mouse melanoma cell의 형태 변화는 dopa oxidase 염색을 통해서 확인하였다.

3) 백부자산 처리 C57BL/6 생쥐의 UV 조사 후 피부 변화

① UVB 조사를 통한 melanogenesis 활성 유도 및 백부자산 도포

UVB가 장착된 chamber (삼주제약, 한국)안에 생쥐를 넣은 후 75.6 mJ/㎠량으로 10분동안 조사하여 melanogenesis를 유도하였다. 한편 BB군에는 UVB 조사 전에 오른쪽 귀에 백부자산 추출물을 도포하였다.

② 귀 피부 조직표본 제작

UVB 조사 72시간 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 얻어진 오른쪽 귀 피부를 촬영 (×4)하고 10% NBF에 실온에서 24시간동안 고정한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 ㎛ 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다. 한편 dopa oxidase 염색을 위한 냉동절편 제작은 NBF에 고정한 후 10% formol-calcium에 1주일동안 oxidation 처리하였다. 30% sucrose 용액에 cryo-protection 한 후 냉동절편기 (Microm, Germany)로 10 ㎛ 두께의 냉동절편을 제작하였다.

③ 염증 변화

염증 효소인 inducible Nitric oxide synthase (iNOS)의 UVB조사 손상 후 진피내 분포를 조사하기 위해 mouse anti-mouse iNOS (1:250, Santa Cruz Biotec)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

④ 멜라닌 세포 활성 조절을 통한 피부 각질형성세포의 세포자연사변화

㉮ 활성 멜라닌 세포의 분포 변화

활성 멜라닌 세포의 분포 변화를 조사하기위해 dopa oxidase 염색법을 실시하였다. 우선 냉동절편을 dopa 염색액 (0.1% DL-dopa (sigma, USA) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)에서 37℃에서 45분간에서 반응한 후 nuclear fast red에 3분간 대조염색 하였다.

㉯ p53 발현 변화

각질형성세포의 세포자연사에 관여하는 p53의 발현 양상의 변화를 관찰하기 위해 mouse anti-mouse p53(1:200, Santa Cruz Biotec, USA) 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K (20 ㎍/㎖)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti mouse p53 (1:200, Santa Cruz Biotec, USA)에 4℃ humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG (1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link 하였고, 그런 다음 avidin biotin complex (ABC) kit (Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에

서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

4) 영상분석과 통계처리

면역조직화학 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2 (Optima Co., USA)를 이용한 영상분석을 실시하였다. 본 실험 결과는 Sigma plot 2000 (Sigma)을 통한 Student t test로 유의성을 검증하였고, $P < 0.05$의 경우 유의성을 인정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. Tyrosinase 효소 활성 저해

Tyrosinase 효소 활성 저해율을 조사한 결과, 白附子散은 1 ㎎/㎖에서 15±0.7%, 2 ㎎/㎖에서 25±2.0%, 4 ㎎/㎖에서 40±2.7%, 6 ㎎/㎖에서 72±2.9%, 8 ㎎/㎖에서 92±1.7%, 10 ㎎/㎖에서 108±3.5% 이었다 (Fig. 1).

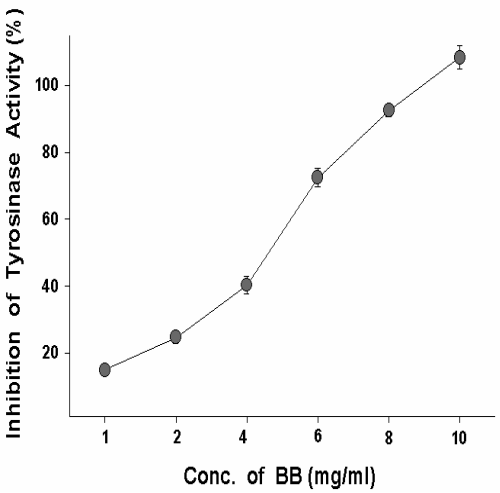


Fig. 1. The inhibition of tyrosinase activity by BB.
Abbreviation : Conc, concentration. BB, *Baickbujasan*

2. Melanogenesis 저해

1) B16 /F10 mouse melanoma cell의 형태적 변화

白附子散 추출물을 처리하지 않은 B16 /F10 mouse melanoma cell은 세포내 검은색 과립이 증가한 형태로 관찰되었으며, 세포질 가장자리가 잘 발달되어 있었다. Dopa oxidase 염색 후 잘 발달된 세포질 가장자리에서 L-dopa 양성반응이 강하게 나타났다. 白附子散 처리 후 B16 F-10 mouse melanoma cell에서는 검은색 과립과 발달된 세포질 가장자리의 분포가 감소하였으며, Dopa oxidase 염색 결과 L-dopa 양성반응도 감소하였다. 이러한 감소는 1 ㎎/㎖ 처리 때보다 2 ㎎/㎖ 처리 때 더 잘 관찰할 수 있었다 (Fig. 2-A).

2) Melanogenesis 저해

UVB 조사 후 白附子散 추출물을 처리하지 않은 B16 F-10 mouse melanoma cell에서의 melanogenesis는 증가하였는데, 이에 비해 白附子散 처리군의 melanogenesis는 감소하였는데, 1 ㎎/㎖에서 8±0.4%, 2 ㎎/㎖에서 31±2.5%로 농도-의존적으로 유의성 있는 저해률로 측정되었다 (Fig. 2-B).

3. UVB 조사 유발 피부 손상 완화

1) 외부형태와 일반적인 형태 변화

UVB 조사 후 UV군의 외부 형태 변화를 보면, 오른쪽 귀에서는 붉은 좁쌀 형태의 홍반성 구진 (erythematous papule), 습진(eczema), 각질세포 상실, 농(purulent matter) 유출 부분이 관찰되었다. 일부 부분은 화상으로 인해 유실되기도 하였다. 이에 비해 BB군에서는 UV군에 비해 피부손상이 적은 것으로 관찰되었다 (Fig. 3-A).

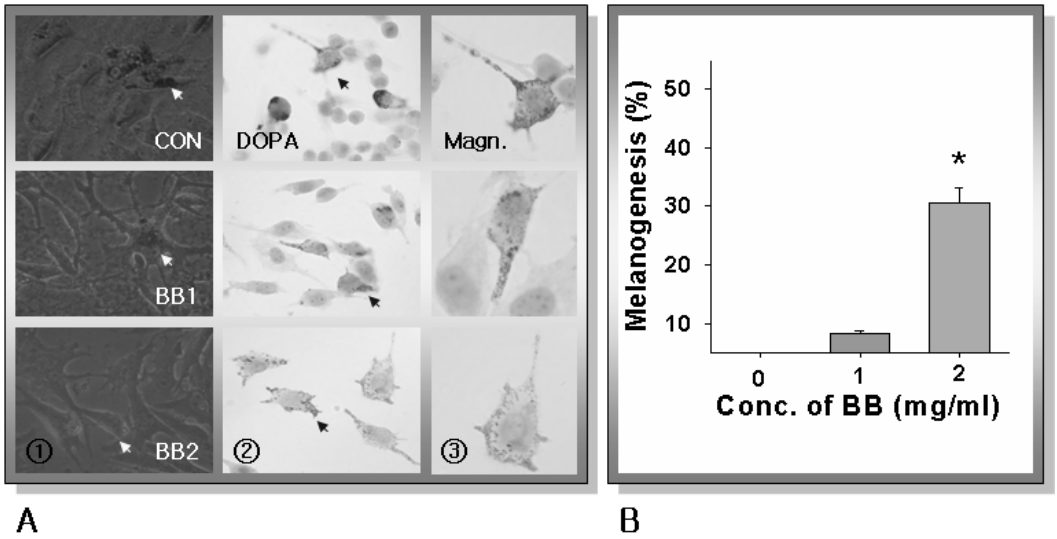


Fig. 2. The inhibition of melanogenesis in B16 F-10 mouse melanoma cell by BB.

A. morphological changes.

① the decrease of black-melanosome (arrow) in BB-treated melanoma cell (×400).

② the decrease of L-dopa positive reaction (arrow) in BB-treated melanoma cell (dopa oxidase stain, ×400).

③ the magnification of L-dopa positive cell (dopa oxidase stain, ×1000)

B. Inhibition of melanogenesis.

The melanogenesis by BB were significantly decreased ($P < 0.05$)

Abbreviation : Con, no-treated group;

BB1, BB 1 ㎎/㎖ treated group;

BB2, BB 2 ㎎/㎖ treated group;

*, $P < 0.05$ compared with BB1.

일반적인 형태변화를 보면, UV군의 상피에서는 핵이 응축된 화상세포 (burn cell)의 출현이 증가하였고 손상된 진피유두에서는 염증관여세포의 이주 증가가 관찰되었다. 이에 반해 BB군에서는 화상세포의 출현 빈도와 염증관여세포의 이주가 UV군에 비해 적었다 (Fig. 3-B).

2) 염증효소 iNOS 분포 변화

염증 효소인 iNOS의 양성반응세포의 분포는 UV군에서는 증가하는 반면 BB군에서는 감소하였다. 이런 iNOS 양성반응세포는 진피에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. iNOS 양성반응의 영상분석 결과 UV군은 대조군에 비해 1660% 증가하였고, BB군은 UV군에 비해 69% 감소하였다 (Table. 2, Fig. 3-C).

3) 멜라닌 세포 활성 조절을 통한 피부 각질형성세포의 세포고사완화

UVB 조사 후 L-dopa에 양성반응을 보이는 멜라닌 세포의 분포 증가가 기저막 주변부에서 확인되었고, 관찰된 양성반응은 세포질에서 강하게 나타났다. 반해 BB군에서는 UV군에 비해 양성반응이 감소한 것으로 관찰되었다 (Fig. 3-D).

UVB 조사 후 p53에 양성반응을 보이는 p53 양성반응세포의 분포가 상피 가시층과 각질층까지 증가되어 관찰되었으며, 핵에서 양성반응이 강하게

나타났다. UV군은 대조군에 비해 2063% 증가한 반면, BB군은 UV군에 비해 72% 감소한 것으로 관찰되었다 (Table. 2, Fig. 3-E).

Ⅳ. 고 찰

자외선은 파장에 따라 UV-A, UV-B, UV-C로 나뉘어지는데, 이중에서350~370nm의 중파장을 UV-B라 하며, 피부 각질층에 의해 흡수되고, 과립층에서 유두층까지 영향을 미쳐서 피부에 화상을 일으키며, 멜라닌 세포를 자극해서 멜라닌의 생성을 촉진한다[23,24]. UVB는 인체 피부에 10일에서 3~4주 후에 가장 최고조에 이르는 지연형 색소침착 반응을 일으키는데 , 즉시형 색소침착과 달리 염증과 화상을 동반하며, 멜라닌을 합성하는 효소인 tyrosinase의 활성과 melanosome합성을 증가시켜 새로운 멜라닌 생성을 유발한다. 자외선 조사 후 생체 내에는 높은 농도의 활성산소종이 생성되며 이들 활성산소종은 세포막 손상을 유발하여 피부의 염증을 야기시키며, 멜라닌 생성을 촉진시켜 색소침착을 유발한다. 멜라닌 색소의 주요 기능은 피부에서 UV에 의해 발생하는 active oxygen이

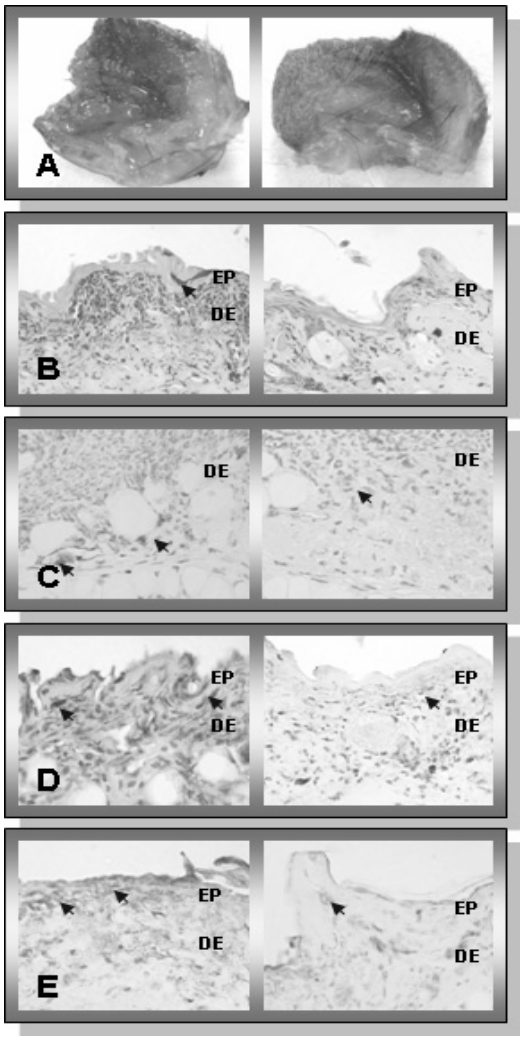
Table 2. The Image Analysis of iNOS and p53 Positive Reaction in BB-treated Mice after UV-irradiation.

Antibody	Group		
	CON	UV	BB
iNOS	141±4.5	2481±181.7	768±23.1*
p53	211±9.3	4564±45.1	1263±28.1*

(image analysis for 100,000 particles / range of intensity : 80-120)

Abbreviation : con, no-treated mice;
UV, UV irradiated mice;
BB, BB treated mice after UV irradiation;
iNOS, induce Nitric oxide synthase;

*, p< 0.05 compared with UV.



UV BB

Fig. 3. The image analysis of iNOS and p53 positive reaction in BB-treated mice after UV-irradiation.

A. External morphology
The skin damages such as erythematous papule, eczema, and purulent matter were shown in UV, but mitigated in BB (×4).

B. Mitigative damage
The burn cell (arrow) in epithelium were increased in UV, but decreased in BB (H&E, ×400).

C. Distribution of iNOS positive cell
(iNOS immunohistochemistry, ×400). The distribution of iNOS positive cell (arrow) in BB were decreased.

D. Distribution of melanocytes
(dopa oxidase stain, ×400; lower square, enlargement of melanocyte (×1000)). The distribution of L-dopa positive cell (arrow) in BB were decreased.
E. Distribution of p53 positive cell
(p53 immunohistochemistry, ×400). The distribution of p53 positive cell (arrow) in BB were decreased.

Abbreviation : UV, UV irradiated mice;
BB, BB treated mice after UV irradiation;
iNOS, induce Nitric oxide synthase;
EP, epithelium; DE, dermis.

나 free radical을 제거하고, 자외선을 흡수 또는 분산시켜 체내에 자외선이 들어가는 못하도록 피부를 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[1].

멜라닌이 형성되는 과정을 살펴보면 멜라닌 소체에서 trosine이 tyrosinase[25]에 의해 DOPA[26]로 전환되고 DOPA에 다시 tyrosinase가 산화작용을 촉매하는 효소로 작용하여 DOPA quinone이 생성되며, DOPAquinone이 cycloDOPA로 변한다음 DOPA quinone이 보조인자로 작용하여 DOPAchrome을 생성한 후 5,6-dihydroxyindole-2-carboxy acid 및 5,6-dihydroxyindole을 거쳐 최종적으로 멜라닌이 형성된다[27]. 따라서 초기의 미백제 개발 연구는 tyrosinase의 활성화를 억제하는 방향으로 맞추어져 왔으나 현재는 멜라닌 합성의 복합적 요인에 따라서 다양한 방식으로 미백효과를 나타내는 방향으로 연구되고 있다. 이에 따라 현재 알려져 있는 미백 원료들의 작용 메카니즘은 크게 네 가지로 분류할 수 있는데, 첫째 생성된 멜라닌을 환원시켜 탈색하는 방법, 둘째 멜라닌 생성의 주요 효소인 tyrosinase억제, 셋째 cytokine network의 조절제, 넷째 기타 미백제인데, 기타 미백제로는 자외선 차단제, radical소거제(tocopherol, SOD)등 소극적 의미의 미백제와 tyrosinase합성저해제 및 표피내 멜라닌 탈락 촉진제(placenta extract)등이 알려져 있고, 미백효과에 대한 연구는 tyrosinase 활성억제, DOPA산화 억제, 각질층 제거 촉진 및 자외선 차단 등에 대해서 이루어 지고 있다[28].

색소침착질환에 대하여 한의학에서는 역대 문헌을 통한 연구를 보면,《黃帝內經, 素問》〈至眞要大論〉에 "歲陽明在天, 燥淫所勝, 面塵, 身無膏澤, 足外反熱" [7] 이라하여 처음 기록된 이래, 이후 역대 제가들에 의해서 面黑, 雀斑, 黧黑斑 등 다양하게 표현되어 왔으며, 病因으로 첫째 陽明之氣不足[7], 둘째 腎水不足으로 인한 陰虛火動[6], 셋째 風邪와 痰飮[29], 넷째 憂思過多와 飮食失節로 인한 脾胃損傷[4], 다섯째 火熱孫絡, 日歲熱毒 , 風熱[30]로 보았다.

治療法으로는 辨證施治에 의한 內治法과 軟膏劑나 粉末 洗劑등을 사용하는 外治法과 鍼灸法으로 분류할 수 있다. 實症에는 凉血活血, 祛風散火, 虛症에는 補益肝腎, 滋陰降火 등의 치법이 사용되었으며[51,52], 內服藥으로서는 冲和順氣湯[4], 升麻白芷湯[3], 六味地黃丸[6], 連翹散[2]등이 사용되었고, 外用藥으로는 玉容西施散, 玉容膏, 紅玉散, 玉容散, 黃帝塗容金面方[2] 등이 사용되었다. 최근 한약 單味劑와 복합제제의 미백효과와 자외선 차단효과에 대해서 검증하는 실험적 연구가 진행되었는데, 한[16]에 따르면 알로에는 농도의존적인 tyrosinase활성 억제효과가 있었고, 이[14]에 따르면 보리, 현미, 율무가 저농도에서 농도 의존적으로 tyrosinase 활성억제효과가 있음을 보고하였으며, 백[15]에 따르면 黃漆이 tyrosinase활성에 대한 억제효과가 나타나 kojic acid보다 월등한 미백효과가 있음을 확인 하였고, 조[12]에 따르면 곰의 말채 수피 추출물이 tyrosinase활성 억제효과와 DOPA자동산화 억제효과를 나타냄을 보고하였으며, 류[31]에 의하면 싸리꽃 추출물이 멜라닌 색소를 감소시키고, tyrosinase 활성억제효과가 있음을 보고하였다.

한편 한약복합제제의 피부미백효과에 관한 연구도 활발하게 진행되고 있는데, 이[19]에 의하면 大黃膏加桑白皮가 tyrosinase활성억제 효과가 있으며,

활성멜라닌 세포의 분포감소에도 효과가 있음을 보고 하였고, 손[18]은 加減西施玉容散의 농도의존적인 tyrosinase 활성억제 효과가 있음을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 白附子散의 미백효과를 검증하고자 tyrosinase 활성억제 효과, melanoma cell에서의 멜라닌 생성율과 자외선 차단효과에 대해 실험연구하였다. 白附子散은 金代의 張[32]이 "治面黔黑斑點方(白附子, 白芨, 白蘞, 密陀僧, 胡粉, 白茯苓" 이라하여 類似한 처방을 사용한 이래 淸代의 王의 《證治準繩》[5]에 와서 白附子散의 명칭으로 白附子 , 密陀僧, 白茯苓 ,白芷, 定粉(官粉)을 面上의 熱瘡이 癬과 類似하거나 面上에 赤黑斑點이 생기는 것에 사용하기 시작한 처방으로 먼저 蘿蔔子煎湯液으로 洗面하여 깨끗이 한 후에 羊乳로 調敷하여 밤새 붙였다가 다음날 아침에 씻어 내는 방법[2]으로 外用되었다.

白附子散에 대하여 노[20]는 면포(acnes)에 미치는 실험적 연구를 통하여 抗炎作用이 있음이 立證하였고, 주요 약재인 白附子와 白芷가 멜라닌 活性沮害能이 입증된 연구결과[17]에 비추어 자외선조사로 인한 염증감소와 멜라닌 활성저해능이 있을 것으로 보인다.

白附子는 毛茛科(미나리아재비과;ranunculaceae)에 속한 노랑돌쩌귀풀(Aconitum koreanjum)의 덩이줄기로 여드름, 祛痰, 鎭驚, 心臟病등에 약효가 있으며[33], 박[34]에 따르면 抗酸化와 抗炎효과를 가지는 페놀성 화합물을 함유하고 있다고 보고되었다. 白芷는 繖形科에 구릿대(Anglica dahurica)의 뿌리로, 散風除濕, 通竅止痛, 消腫排膿의 효능이 있으며[35], 홍[17]에 따르면 백부자와 백지, 모두 tyrosinase의 활성을 감소시킨다고 하였다.

密陀僧은 一酸化鉛(PbO)으로 주요 處方例로서 密陀僧散(外科正宗)이 있는데, 紫白癜風과 汗斑을 치료한다[36]고 되어있으며, 消腫殺蟲, 收斂防腐, 墜痰鎭驚하는 효과가 있어 痔瘡, 腫毒, 潰瘍, 濕疹, 狐臭, 創傷치료한다[37]고 되어있다.

白茯苓은 복령균Poria cocos Wolf(잔나비걸상과 Polyporaceae)의 균핵으로 利水參濕, 健脾定心의 효능이 있다[38]. 이상과 같이 백부자, 백지의 tyrosinase활성억제효과와 密陀僧의 消腫, 防腐의 효능은 복합제제로서 피부 항염증제와 피부미백제로 작용할 것임을 시사한다.

白附子散의 멜라닌세포 활성 억제를 통한 자외선 유발 피부 손상 완화 효과를 연구하기 위해서 실행된 본 실험은 melanin 중합체 억제제로서의 상용 가능성을 검증하였는데, Melanocyte의 소기관인 melanosome 내에서 melanin 생성과정은 tyrosine이 tyrosinase의 작용에 의해 dopa, dopaquinone으로 산화된다[25]는 점을 착안해서 채택되고 있는 tyrosinase 활성 저해 실험[21]을 통해 melanin 중합체 억제제로서의 백부자산의 가능성을 조사하였다. 그 결과 농도-의존적 활성 저해능을 보였지만, melanin 생성이 tyrosinase에 의한 산화반응뿐만 아니라, 여러 가지 복합적 요인에 의해서 진행될 가능성[39]이 있으며, 또한 melanoma cell line을 이용한 *in vitro* 실험에서도 일치된 결과도 요구된다.

白附子散의 melanogenesis 억제률를 조사하기위해 B16F-10 melanoma cell을 이용한 Lothan R과 Lothan D[22]법으로 생성 melanin을 정량 비교하였는데, 白附子散 처리 후 농도-의존적으로 멜라닌 생성이 감소하였으며, 이 결과는 tyrosinase 활성 억제와의 연관성이 시사되며, 이후 진행되는 반응들 즉, 산화된 dopa와 dopaquinone이 효소 작용과 자동 산화반응에 의해서 dopachrome, indole caboxylic acid, indole quinone류 등으로 대사되어 최종적으로 melanin이 합성되는 것[40]을 차단하는 것으로 생각된다. 한편 B16F-10 melanoma cell의 형태 변화도 dopa oxidase 염색을 통해 조사되었는데, 멜라닌세포에서 잘 발달된 수지상의 세포질 돌기가 관찰되었으며, 돌기끝에는

dopa 양성반응이 강하게 나타났다. 이는 각질형성세포로 이동해야하는 합성된 멜라닌으로서 멜라닌 세포내에서는 Rab27a, Myosin 5a 등이 작용하여 수지상 세포돌기로 이동하고, protease activated receptor-2의 도움을 받아 각질형성세포로 이동한다[41]. 각질형성세포로 전달된 melanin은 각질층으로 이행되며, 피부의 광노화나 일광각화증을 억제할 뿐 아니라 기미, 주근깨 등의 부분적인 hyperpigmentation을 일으킨다[42]. 백부자산 처리된 멜라닌세포는 세포질 돌기의 발달이 적었고, dopa 양성반응도 약했으며, 처리 농도가 높을수록 원형내지 타원형에 가깝게 관찰되었고, 이는 각질형성세포로의 멜라닌 전달을 억제할 것으로 생각된다.

UVB 조사 후 일어난 C57BL/6 생쥐 쥐에 형태적 변화를 보면, 우선 UV 조사 후 상피에서 화상세포(burn cell)의 증가가 관찰되었는데, UVB 조사가 피부 상피 DNA에 주로 작용하여 광화학반응을 일으켜 인접한 thymine dimer를 형성함으로 세포 파괴, 세포 사망, 돌연변이 등을 초래한다는 이전 보고[43]와 일치된 결과였다.

UV 조사 후 산화적 스트레스의 증가[44]와 interleukin (IL)-1과 tumor necrosis factor (TNF)-α 같은 전염증효소(proinflammatory cytokine)의 생성[45,46]등에 의한 염증 상황을 유도하는데, 그 결과 iNOS의 생성이 증가하였다. iNOS 발현 증가는 혈관투과성의 증가를 유도하여 oxidation stress를 증가시켜 염증에 의한 조직 손상을 가속화 시키며, 생성된 NO는 superoxide anion의 반응으로 peroxynitrite나 hydroxyl radical이 형성되고[47], 이는 세포막지질을 peroxidation 시키며, thiol기, SH기를 oxidation하여 세포독성을 유발한다[48]. 또한 단백질인 tyrosine에 nitration을 시켜 3-nitrotyrosine을 형성하여 세포대사에 중요한 cytochrome p450을 억제하거나, protein phosphorylation을 억제하고 DNA 합성에 관여하는 효소계를 억제하는 독성효과가 있다[49].

UV 조사와 과도한 melanin의 생성은 각질형성세포의 세포자기살해를 유도하는데, 본 실험에서도 UV 조사 상피 기저부에 dopa oxidase 염색에 강한 양성반응을 보이는 melanocyte의 분포가 증가하였고, 각질형성세포에서 p53 활성이 증가하였다. p53은 대조군에 비하여 백부자산 도포군에서 72% 감소되었고, 같은 실험방법으로 측정한 全[50]의 紫雲膏가 78%감소시킨 것과 비교하여 손색없는 효과를 나타내었다.

白附子散을 도포한 C57BL/6 생쥐 귀에서는 낮은 외부 형태적 피부 손상 (erythematous papule, 습진, 각질세포 상실, 농 등의 감소), 피부 손상 완화 효과 (화상세포의 감소), 각질형성세포의 세포고사 감소 (활성 멜라닌세포의 분포 감소와 p53 발현 감소), 염증효소 iNOS 생성 감소 등이 관찰되었다. 全[50]의 紫雲膏가 iNOS를 65%감소시킨 것에 비하여 白附子散은 69%감소시켜서 좀 더 우수한 효과를 나타내었다.

이상의 결과로 白附子散은 멜라닌 세포의 과도한 활성을 효과적으로 조절함으로써 자외선 조사로 유발되는 피부 손상의 진행을 완화시키는 것으로 생각된다.

홍[17]의 연구와 비교 고찰해보면, 백부자와 백지는 5mg/ml에서 대조군에 비해 35%와 49%의 멜라닌 생성억제 작용을 나타낸다고 한데 비해, 白附子散은 2mg/ml에서 대조군에 비해 31±2.5%로 농도 의존적으로 유의성 있는 저해률로 측정되었다. 멜라닌세포의 형태적 변화에서 백부자, 백지추출물의 처리에 의하여 樹枝狀돌기의 형성은 억제되지 못하고 melanin deposition은 억제된다는 연구결과에 비하여 白附子散은 樹枝狀 돌기의 형성도 억제하고, melanin deposition도 억제하는 것으로 나타났다. 또한 白附子는 tyrosinase의 발현 억제를 유도하지만 白芷는 tyrosinase의 발현에는 상관없이 활성만을 감소시킨다고 하였는데, 白附子散

은 농도 의존적으로 tyrosinase 활성 억제효과가 높아진다는 결과로 미루어보아 密陀僧, 白茯苓이 포함된 복합제제인 백부자산이 상대적으로 멜라닌 형성 억제효과가 높다고 사료된다.

이상과 같이 복합제제로서 미백효과가 단미제보다 효과가 좋으며, 피부의 염증반응의 진행을 억제하여 광노화를 완화시킬 수 있는 외용약으로서 紫雲膏에 비하여 손색없는 白附子散이 사용하기 편한 제형으로 개발되면, 임상에서 활용도가 높아질 것으로 생각된다.

V. 결 론

白附子散의 멜라닌 세포 활성 조절을 통한 자외선 조사 피부 손상 완화 효과를 조사하기 위해 행해진 본 연구는 白附子散 추출물을 귀에 도포한 C57BL/6에 인위적으로 UVB를 조사한 후 피부손상 완화 효과를 관찰하였다. 또한 tyrosinase 활성 저해와 B16 F10 melanoma cell을 이용한 melanogenesis 저해율을 측정하여본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 白附子散은 농도의존적으로 tyrosinase 활성을 저해하는 것으로 관찰되었다.
2. 白附子散은 melanogenesis를 저해하는 것으로 측정되었다.
3. C57BL/6 동물실험 결과 낮은 외부 형태적 피부 손상 (erythematous papule, 濕疹, 角質細胞 상실, 膿등의 감소), 피부 손상 완화 효과(화상 세포의 감소)가 있는 것으로 관찰되었다.
4. UVB조사후 발생되는 염증효소 iNOS를 감소시켰다.
5. 각질형성세포의 세포고사 감소(활성 멜라닌세포의 분포와 p53 발현 감소) 등이 관찰되었다.

이상의 결과로 白附子散은 멜라닌 세포의 과도한 활성을 효과적으로 조절함으로써 자외선 조사로 유발되는 피부 손상의 진행을 완화시키는 것으로 생각되며, 자외선 차단제와 피부미백제로서도 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 대한피부과학회. 피부과학. 서울:여문각. 2001:8-9, 409, 533-5.
2. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1981:209, 211, 212, 239, 284.
3. 龔廷賢. 萬病回春. 서울:醫聖堂. 1993:271.
4. 樓英. 醫學綱目. 서울:大成文化社. 1986:1081.
5. 王肯堂. 證治準繩. 北京:人民衛生出版社. 卷1. 1991:824.
6. 陳實功. 外科正宗. 上海:上海科學技術出版社. 1989:290, 298.
7. 홍원식. 精校黃帝內徑素問. 서울:동양의학연구원출판부. 1985:11,295-6.
8. 陳士鐸. 洞天奧旨. 北京:中醫古籍出版社. 1997:157.
9. 박인기, 김경준. 雀斑에 관한 文獻的 考察. 東醫學會誌. 2001;5(1):139-66.
10. 신연상, 노석선. 기미에 關한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌. 1998;11(1):82-98.
11. 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.
12. 조흔. 곰의 말채(椋子木)의 皮膚美白效果에 대한 硏究, 경희대 동서의학대학원 석사학위논문, 2004.
13. 조재훈. 염(鹽), 초(醋), 향유(香油)의 미백효과에 관한 연구. 大韓韓方眼耳鼻咽喉科學會誌. 2003;16(2):79-85.
14. 이태헌. 보리, 현미, 율무의 미백효과에 관한 연구. 大韓韓方眼耳鼻咽喉科學會誌. 2003;16(2):

57-78.
15. 백운봉. 黃漆의 생리활성연구. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 2003.
16. 한은정. 알로에, 녹차, 꿀의 미백효과에 관한 연구. 大韓韓方眼耳鼻咽喉科學會誌. 2003;16(3):145-63.
17. 홍의석. 白附子와 白芷가 B16F10 흑색종 세포의 멜라닌 형성에 미치는 영향. 동의대학교 대학원 박사학위논문. 2005.
18. 손동석. 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구. 大韓韓方眼耳鼻咽喉科學會誌. 2002;15(2):104-17.
19. 이현우. 홍승욱. 加味大黃膏의 멜라닌세포 활성억제가 자외선 조사로 인한 피부손상 완화에 미치는 영향. 大韓韓方眼耳鼻咽喉科學會誌. 2007;20(2):47-67.
20. 노현찬. 白附子散이 면포(acnes)에 미치는 실험적 연구. 대전대학교 대학원석사학위논문. 1998.
21. Ishihara K, Takemura T, Hamada C, Sakai S, Kondoh S., Nishiyama S., Hearing J. Pigment production in murine melanoma cell is regulated by tyrosinase, tyrosinase related protein 1. DOPAchrome tautomerase and a melanogenic inhibitor. J. Invest. Dermatol. 1993;2:126-31.
22. Lothan R. and Lothan D. : Stimulation of melanogenesis in human melanoma cell line by retinoids. Cancer Res. 1980 ;40:3345-52.
23. 김종대. 피부관리학. 서울:고문사. 1994:23-26, 111-3.
24. 김복희. 뉴피부미용학. 서울:양생의학사. 1998:73-74, 302-11.
25. Hearing V. J. and Jimenez M. : Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point melanocyte pigment. Int. J. Biochem. 1987:19:1141-9.
26. Slominski A, Moellmann G, Kuklinska E. L-tyrosine, L-dopa and tyrosinase as positive regulators of the subcellular apparature of melanogenesis in Abamelanotic melanoma cells. Pigment Cell Res. 1989;2:109-16.
27. 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 Aug 15;208:155-63.
28. 이현호. 최근 미백화장품의 개발동향. 대한화장품학회지. 1997;23(1):43-56.
29. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 서울:대성문화사. 1992:200.
30. 程國彭. 醫學心悟. 香港:友聯出版社. 1961:290.
31. 류인식. 싸리꽃 에탄올 추출물의 피부생리활성 연구. 원광대학교 한의학전문대학원. 2006.
32. 張子和. 儒門事親 卷十五. 台北:旋風出版社. 1974:30.
33. 육창수. 생약도감. 도서출판 경원. 1997:179.
34. 박민. 백부자 페놀성 화합물의 항산화 활성 및 Nitric Oxide 생성억제활성. 중앙대 대학원 석사학위 논문. 2006:3-4,28.
35. 전국한의과대학본초학교수공저. 본초학. 영림사. 1997:130.
36. 신길구. 申氏本草學. 1982:696.
37. 한약재 규격화 모형 설정에 관한 연구. 경원대학교 한의학연구원. 1998:133.
38. 한약재 규격화 모형 설정에 관한 연구. 경원대학교 한의학연구원. 1998:162.
39. Ando S, Ando O, Suemoto Y, Mishima Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors. J Invest

Dermatol. 100(2Suppl). 1993:150S-155S.

40. Prota G. : Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. J. Invest Dermatol. 1980;75:122-28.
41. Busca R and Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. Pigment Cell Res. 2000; 13(2):60-9.
42. Mishima Y, Hatta S, Ohyama Y, Inazu M. Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action. Pigment Cell Res. 1988;1(6): 367-74.
43. Yarosh D, Alas L. G., Yee V., Oberyszyn A., Kibitel J. T., Mitchell D., Rosenstein R., Spinowitz A., Citron M. : Pyrimidine dimer removal enhanced by DNA repair liposomes reduces the incidence of UV skin cancer in mice. Cancer Res. 1992; 52(15):4227-31.
44. Mantena S. K. and Katiyar S. K. : Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-kappaB signaling in human epidermal keratinocytes. Free Radic Biol Med. 2006;40(9):1603-14.
45. Corsini E, Sangha N, Feldman S. R. : Epidermal stratification reduces the effects of UVB (but not UVA) on keratinocyte cytokine production and cytotoxicity. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 1997;13(4):147-52.
46. Yarosh D, Both D, Kibitel J, Anderson C, Elmets C, Brash D, Brown D.:Regulation of TNFalpha production and release in human and mouse keratinocytes and mouse skin after UV-B irradiation. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2000;16(6):263-70.
47. Anggard E. : Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. Lancet. 1994;9: 1199-206.
48. Radi R., Beckman J. S.,Bush K. M., Freeman B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch Biochem Biophys. 1991;1;288(2):481-7.
49. Villa L. M., Salas E., Darley-Usmar V. M., Radomski M. W., Moncada S. : Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;20;91(26):12383-7.
50. 전재홍, 홍승욱. 紫雲膏가 자외선에 의한 피부 손상 및 光老化에 미치는 영향. 大韓韓方眼耳鼻咽喉科學會誌. 2007;20(1):130-44.
51. 顧伯華. 實用中醫外科學, 上海:上海科學技術出版社. 1985:529-30.
52. 楊思澍. 中醫臨床大典, 中國:北京科學技術出版社. 1991:923-4.