

감초 물추출물의 멜라닌 형성 억제효과 및 기전에 관한 연구

김진 · 권일호 · 임홍진 · 임규상 · 황충연*

Inhibitory Effect and Mechanism on Melanogenesis of Radix glycyrrhizae Water Extract

*Jin Kim · Il-ho Kwen · Hong-jin Lim · Kyu-sang Lim · Chung-yeon Hwang **

The effect of Glycyrrhizae Radix water extract, known as depigmenting agent, on melanin biosynthesis was investigated in cellular level by using B16 mouse melanoma cells. The inhibitory effect of Glycyrrhizae Radix water extract on melanogenesis was determined by mushroom tyrosinase assay traditionally using in vitro screening test. To determine whether Glycyrrhizae Radix water extract suppress melanin synthesis in cellular level, B16 mouse melanoma cells were cultured in the presence of different concentrations of Glycyrrhizae Radix water extract. Effects on cell proliferation, melanin biosynthesis, tyrosinase activity, DOPAchrome tautomerase activity, and expression level of mRNA for tyrosinase were examined.

The maximum concentration of Glycyrrhizae Radix water extract that was not inhibitory to growth of the cells was 2 mg/ml. At that concentration, melanin synthesis was significantly inhibited without cytotoxicity after 5 days, compared with untreated cells. The treatment with Glycyrrhizae Radix water extract reduced tyrosinase and DOPAchrome tautomerase activity in a dose-dependent manner. However, the treatment with Glycyrrhizae Radix water extract did not affect significantly mRNA levels for tyrosinase.

These results suggest that the inhibitory effect of Glycyrrhizae Radix water extract on melanogenesis is correlated with the suppression of tyrosinase and DOPAchrome tautomerase activity more than altering mRNA levels of tyrosinase.

서론

*원광대학교 안이비인후피부과학교실

韓醫學에서 피부는 臟腑의 生理作用과 밀접한 관계를 가지고 있는데, 즉 心의 ‘心主血脈’

과 ‘心藏神’, 肺의 ‘宣發作用’과 ‘衛氣作用’, 脾의 ‘運化作用’과 ‘統血作用’, 肝의 ‘疏泄作用’과 ‘主筋作用’, 腎의 ‘溫煦作用’과 ‘藏精作用’ 및 ‘氣血作用’과 관계된다¹⁾.

피부색은 美를 가능하는 척도로서 최근 깨끗하고 하얀 피부에 대한 관심은 날로 증가되고 있으나, 인체의 피부는 다른 기관에 비하여 예민한 생리적인 특징을 가지고 있다^{2,3)}.

피부색은 여러 가지 요인에 의하여 결정되는 것으로 그 중 피부의 멜라닌과 카로틴의 量, 진피에 있는 혈관의 수와 혈액의 색깔이 중요하게 작용하며⁴⁾, 이 중 멜라닌은 피부의 멜라닌 세포가 자외선이나 세포의 유전적 요인, 대사, 내분비, 염증, 감염, 종양 등과 같은 여러 가지 원인들로 인해서 멜라닌 합성에 이상이 생기면 기미, 주근깨 등의 과색소 침착증이 발생하게 된다^{2,5,6-8)}.

韓醫學 文獻에는 皮膚의 과색소 침착증에 대하여 《黃帝內經·素問》〈至眞要大論〉⁹⁾에 “歲陽明在泉, 燥淫所勝, ……面塵, 身無膏澤, 足外反熱”이라하여 처음 收錄되었고, 巢¹⁰⁾의 《諸病源候論·面皯黑黧候》에서 病理機轉과 形態에 대하여 구체적으로 언급한 이래, 여러 醫家들에 의하여 형태와 색조에 따라 黧¹¹⁻¹³⁾, 黧點¹⁴⁾, 面黑¹⁵⁻¹⁸⁾, 面黧^{14,19)}, 雀卵^{13,20)}, 斑黧¹³⁾, 靨子^{13,20)}, 雀斑²¹⁻²⁶⁾, 靨黑斑^{21,22)}, 黧點²⁷⁾, 靨黑黧點²⁴⁾, 黑斑²⁵⁾ 등 다양하게 表現되어 왔다.

甘草(*Radix Glycyrrhizae*)는 동서양을 막론하고 여러 질환에 자주 사용된 생약재로, 豆科(*Leguminosae*)에 속한 多年性 草本인 甘草 및 同屬 近緣植物의 根과 根狀莖을 말하며²⁸⁻³⁰⁾, 한의학에서는 補脾益氣, 清熱解毒, 潤肺止咳, 調和諸藥, 和中緩急 등의 효능이 있어 소화장애에 의한 질환인 脾胃虛弱, 少食, 腹痛, 便溏

등이나, 항염증작용에 의한 咽喉腫痛, 消化性潰瘍 등의 치료에 활용되어 왔다^{28,29,31)}.

피부의 멜라닌 형성에 미치는 영향에 대한 실험적 연구로 夫 등³²⁾은 술잎 추출 성분으로, 朴 등^{33,34)}은 白朮과 西施玉容散으로, 李³⁵⁾는 天花粉이, 金 등³⁶⁾은 續隨子가, 李 등³⁷⁾은 半夏가 각각 멜라닌 생성 억제 효과가 있다고 보고하였다. 또한 李 등³⁸⁾은 牡丹皮에 tyrosinase 활성을 증가시키는 물질과 활성을 억제하는 물질이 공존한다고 보고하였다.

특히 甘草에 대한 실험적 연구로 林 등³⁹⁾은 甘草추출액이 정상 멜라닌세포에 세포 증식 억제 및 멜라닌 양 감소 효과가 있다고 보고하는 등, 근래 미백작용을 가지는 생약재에 대한 연구는 활발히 시도되고 있으나, 이러한 멜라닌 형성 억제 효과가 어떠한 기전에 의하여 발생하는지는 정확하게 밝혀져 있지 않다.

이에 최근 미백효능이 있는 물질로 알려진 甘草가 어떠한 멜라닌 형성기전에 관여하는지 그 작용기전을 알아보기 위하여 B16 mouse melanoma 세포를 이용하여 감초 물추출물에 의한 세포 독성효과와 최종 멜라닌 생성량을 측정하고, 또한 멜라닌 생성과정에서 가장 중요한 효소인 tyrosinase 활성도와, TRP-2의 활성도, RT-PCR을 이용하여 tyrosinase mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 시료조제

본 실험에 사용한 감초(*Radix Glycyrrhizae*)는 원광대학교 의산 한방병원에서 사용하는 규격품을 사용하였으며, 감초 물추출물은 감초 100g에 물 1ℓ를 가하여 3시간 동안 끓인 후 거즈로 여과하고, 3,200rpm으로 30분간 원심분리하여 상정액을 취한 후 감압 농축하였다. 이후 -70℃에서 freeze dryer로 동결건조 시킨 후 9.4g의 試料(수득률: 9.4%)를 얻었으며, 試料는 세포에 투여하기 전 0.22μm pore의 여과지로 멸균하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) B16 mouse melanoma 배양

B16 mouse melanoma 세포의 배양은 CO₂ 배양기(37℃, 5%)에서 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium(DMEM, Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지를 이용하였으며,

약 48시간 주기로 배양액을 교체하여 주었다.

2) 세포 증식 측정

細胞를 배양판(6 cm dish)에 well당 1x10⁵씩 분주한 후 24시간 培養하여 배양용기에 細胞를 부착하였다. 감초 물추출물 시료를 각 농도별로 처리한 후 3, 5일간 배양하였다. 배양 완료 후 각 well에 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액을 가하여 세포를 분리 수거하고, PBS로 2회 세척 한 후 Fuchs-Rosenthal cytometer(Germany)를 이용하여 각 well 당 B16 mouse melanoma의 세포수를 세어 증식 상태를 측정하였다.

3) 시험관 내 tyrosinase 활성도 실험

시험관내 tyrosinase의 활성은 Mason and Peterson 등⁴⁰⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.1M phosphate buffer(pH 6.8) 150 μl, 기질 3 mM L-tyrosine 수용액 20 μl, 시료 20 μl를 혼합하였다. 여기에 2500 U/ml mushroom tyrosinase 10 μl를 가하고 잘 혼합한 후 37℃에서 30분간 배양하면서 매 10분 마다 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 sample 대신 증류수를 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성율(\%)} = \frac{B - B'}{A - A'} \times 100$$

A : 대조군의 반응 후 흡광도

A' : 대조군 용액 중 tyrosinase 대신 buffer가 첨가된 용액의 반응 후 흡광도

B : 시료가 첨가된 용액의 흡광도

B' : 시료가 첨가된 용액중 tyrosinase 대신 buffer가 첨가된 용액의 반응 후 흡광도

4) 세포내 tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도는 Martinez-Esparza M 등⁴¹⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 멜라닌세포를 수확하여 세포침전물을 만들고, 100 μ l 세포 용해액(lysis buffer; 1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)을 넣고 4 $^{\circ}$ C 얼음에서 30분간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴시킨 후 원심분리하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성측정용액으로 사용하였다. 50 μ l의 상층액에 100mM sodium phosphate(pH 7.0) 100 μ l를 넣고 30 $^{\circ}$ C 물중탕기에서 5분간 보온한 후 100mM catechol 50 μ l를 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37 $^{\circ}$ C, 405nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

5) 세포내 멜라닌 정량(melanin content) 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등⁴¹⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양세포는 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척, 원심분리하여 수확하였다. 세포침전물에 1ml의 증류수를 넣어 현탁 후 초음파로 분쇄한 후, 원심분리하여 침전물을 수확하였다. Acid-insoluble material을 얻기 위해 10%의 dimethyl sulfoxide(DMSO)가 첨가된 1N NaOH 300 μ l를 넣어 80 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 처리하여 용해시켰다. 475nm에서 흡광도를 측정하였으며 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma chemical Co.)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

6) RT-PCR을 이용한 tyrosinase mRNA 발현 측정

배양이 완료된 세포를 PBS로 세척하고 Trizol reagent (Gibco BRL, Life Technologies, U.S.A)을 이용하여 total RNA를 분리하였고, Total RNA는 spectrophotometer(DU-800, Beckmann, U.S.A.)를 이용하여 정량하였다. M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL, Life Technologies, U.S.A)와 Oligo-dT (Gibco BRL, Life Technologies, U.S.A)를 이용하여 3ug의 total RNA로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template로 하여 tyrosinase와 internal standard gene인 β -actin에 각각 특이적인 primer를 이용하여 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer)에서 PCR을 수행하였다. 이때 반응 용액은 10 mM Tris -HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 100 μ M dNTPs, 1.25 unit Z-Taq polymerase, 그리고 25 pmole primer를 포함하며, 반응은 98 $^{\circ}$ C에서 1초, 68 $^{\circ}$ C에서 10초로 구성된 사이클을 50회 수행하였고, 증폭된 산물을 2% agarose gel상에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 Gel-Doc system(Vilber, France)으로 scan하고, 정량 분석하였다.

7) 광학현미경적 관찰

세포의 형태학적 관찰은 감초 물추출물을 각 농도별로 처리하고 5일간 배양한 후 Inverted Microscope(phase contrast, Leica, Germany)를 이용하여 관찰하였다.

실험결과

1. 감초의 시험관 내 tyrosinase 효소 활성 억제 효과

본 실험에서 버섯 tyrosinase 활성 억제 실험 결과 감초는 농도 의존적으로 버섯 tyrosinase의 활성을 억제하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서

대조군의 73.4%로, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 64%, 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 44.4%로 억제되었고, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 대조군의 1%로 거의 완전히 억제되었다.

버섯 tyrosinase 활성의 양성 대조군(positive control)으로는 Kojic acid를 사용하였다.

이상의 결과 감초는 in vitro에서 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제하였다(Fig. 1).

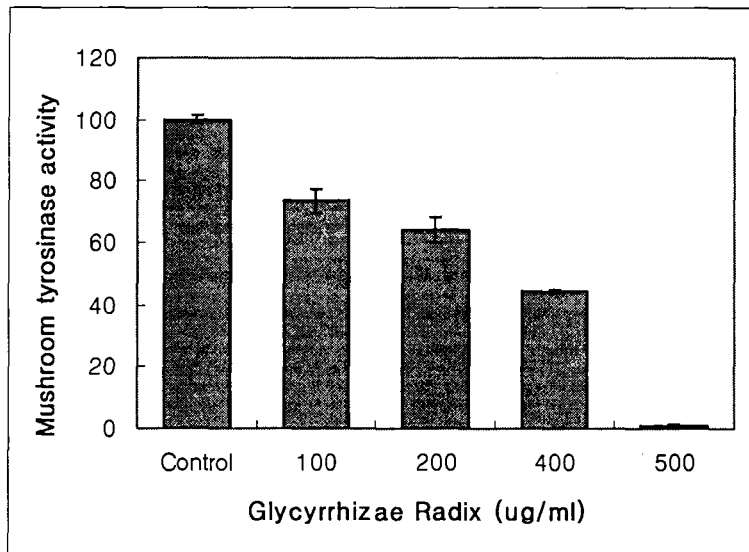


Fig. 1. Inhibitory effect of Radix glycyrrhizae water extract on tyrosinase in vitro. Using mushroom tyrosinase as enzyme source, assay were carried out with tyrosine as substrate dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8), and each extract was added various concentration.

2. 감초가 B16 세포의 증식에 미치는 효과

멜라닌세포주인 B16 세포에서 감초의 멜라닌 생성 억제효과를 조사하기 위하여, B16 세포에서 감초의 농도에 따른 영향을 조사하였다.

대조군의 세포 증식율을 100%로 하였을 때, 감초를 농도별로 3일 동안 처리한 경우, 0.1, 0.5 mg/ml 농도에서는 세포 증식은 대조군과 비슷하였으나, 1 mg/ml 농도에서 115.1%로 약간 증가하였고, 2 mg/ml 농도에서는 106.5%로 대조군과 비슷하였다. 또한 감초를 5일 동안 처리하였을 때도 1 mg/ml 농도에서 117.7%로 대조군에 비하여 약간 증가하였을 뿐, 3일 처리군과 비슷한 양상으로 나타났다 (Fig. 2).

또한 멜라닌 생성 억제 효과에 대한 세포형태적 조사는 세포독성 검사의 직접적인 지표가 된다. 따라서 감초가 B16 세포에 미치는 영향을 형태적으로 조사하였다. 감초를 5일 동안 처리하였을 때, 1 mg/ml 처리시 대조군에 비해 세포수가 증가함을 보였고, 2 mg/ml에서는 대조군과 비슷하였으며, 모든 농도에서 대조군과 같이 정상적인 세포소견을 나타냈다.

이상의 결과 감초는 B16 세포에 2 mg/ml 농도까지 세포증식 감소나 독성이 나타내지 않았으며, 형태적으로도 정상적인 세포소견을 나타냈다.

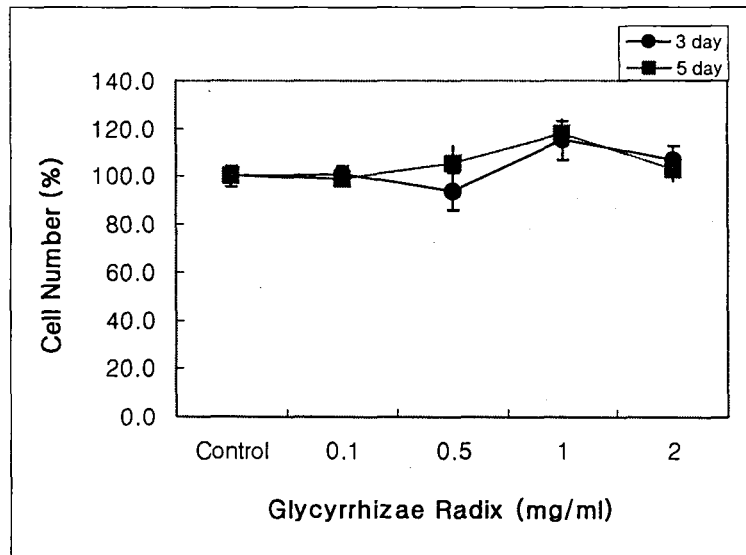


Fig. 2. Growth rates of B16 cells after treatment with Radix glycyrrhizae water extract, compared with control cells. Cells were counted with a Fuchs-Rosenthal cytometer after 3 or 5 days of treatment with Radix glycyrrhizae water extract, as described in materials and Methods. Results are expressed as % of control and data reported are means \pm SD of at least three determinations.

3. 감초의 최종 멜라닌 생성 억제

감초가 세포수준에서 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위하여 B16 세포에서 최종 멜라닌 생성량을 조사하였다. 위의 실험 결과 세포독성이 없는 것으로 밝혀진 감초를 0.5, 1, 2 mg/ml 농도로 3일과 5일 동안 처리한 후, 멜라닌 세포수에 따른 멜라닌양을 측정하였다.

감초 3일 처리군에서는 10^3 세포당 멜라닌 양이 0.5, 1, 2mg/ml 농도에서 각각 대조군의 94%, 82%, 80%로 약간 감소하는 경향으로 나타났다 (Fig 3).

또한 감초 5일 처리군에서는 10^3 세포당 멜라닌 양이 0.5, 1, 2 mg/ml 농도에서 각각 대조군의 75%, 70.5%, 74.5%로 유의하게 감소하였다 (Fig 4).

이상의 결과, 감초는 B16 세포에서 최종적인 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

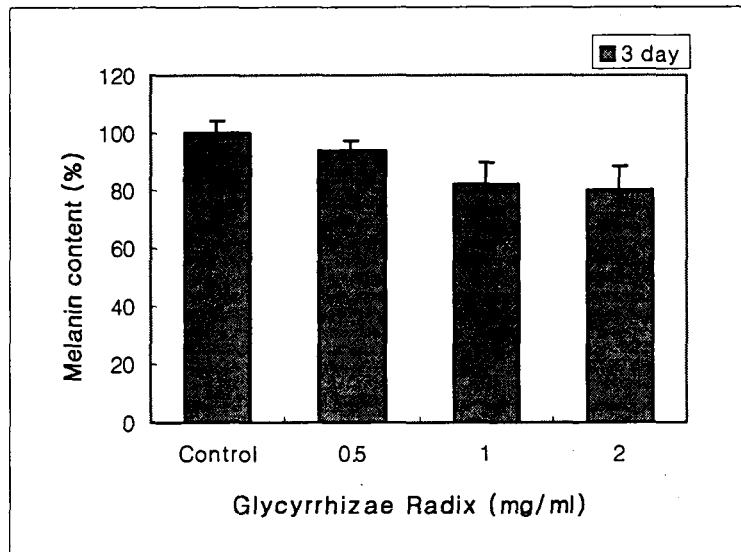


Fig. 3. Inhibitory effect of Radix glycyrrhizae water extract on melanin contents in B16 melanoma cells. B16 cells were treated with various concentrations of Radix glycyrrhizae water extract for 3 days. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.E. of three experiments performed in triplicate.

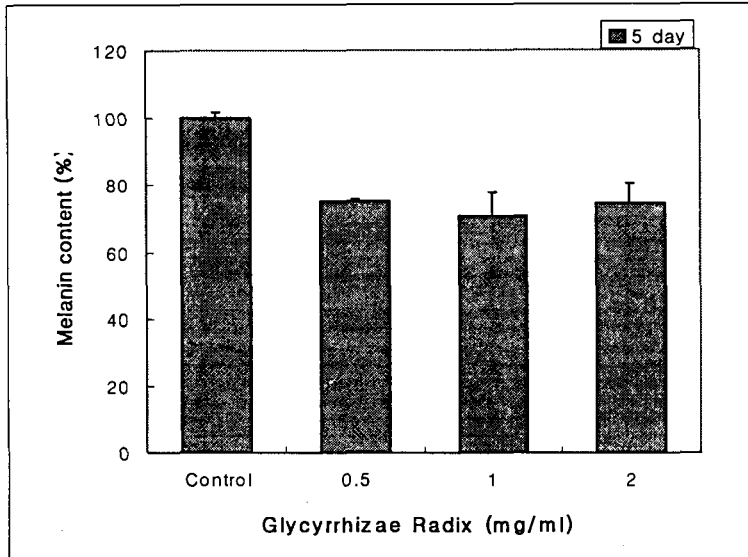


Fig. 4. Inhibitory effect of Radix glycyrrhizae water extract on melanin contents in B16 melanoma cells. B16 cells were treated with various concentrations of Radix glycyrrhizae water extract for 5 days. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.E. of three experiments performed in triplicate.

4. 감초의 세포 내 tyrosinase 활성 억제효과

감초 처리 후 최종 멜라닌양이 억제된 것은 멜라닌 합성에 관여하는 효소들의 활성과 관련이 있음을 나타내므로, 본 실험에서는 B16 세포에 감초를 각 농도별로 3일, 5일간 처리한 후 세포 내 tyrosinase 활성을 조사하였다. 감초를 0.5, 1, 2 mg/ml 농도로 3일간 처리한 후 tyrosinase 활성은 각각 98.7%, 97%, 90%로

2mg/ml 농도에서 약간 감소한 것으로 나타났다 (Fig. 5). 또한 5일 처리군에서도 0.5, 1, 2 mg/ml 농도에서 92%, 89%, 65.9%로서 2 mg/ml 농도에서 유의하게 감소하였다 (Fig. 6).

이상의 결과 감초는 B16 세포의 tyrosinase 활성을 2 mg/ml 농도에서 현저히 억제하는 것으로 나타났다.

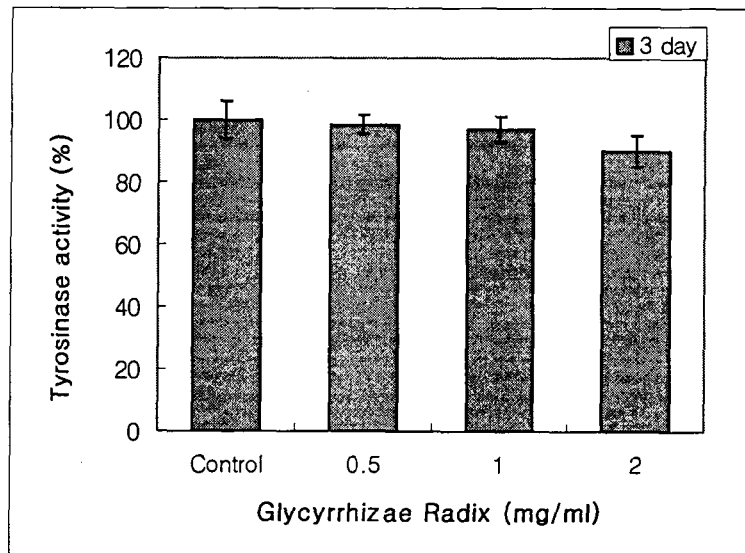


Fig. 5. Effect of Radix glycyrrhizae water extract on tyrosinase activity in B16 melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hr, cells were treated with various concentrations Radix glycyrrhizae water extract for 3 days. Then, tyrosinase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.E. of three experiments performed in triplicate.

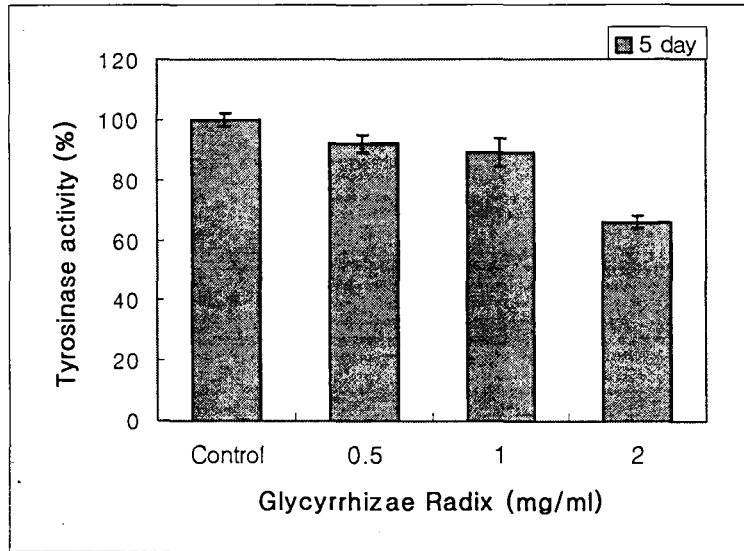


Fig. 6. Effect of Radix glycyrrhizae water extract on tyrosinase activity in B16 melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hr, cells were treated with various concentrations Radix glycyrrhizae water extract for 5 days. Then, tyrosinase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.E. of three experiments performed in triplicate.

5. 감초의 세포 내 DOPochrome tautomerase (TRP-2) 효소활성 억제 효과

본 실험에서 감초가 B16 세포에서 DOPA tautomerase (TRP-2)의 활성에 영향을 미치는지 조사하기 위하여, B16 세포에 감초를 각 농도별로 3일, 5일간 처리한 후 세포내 DOPochrome tautomerase 활성을 조사하였다.

감초를 0.5, 1, 2 gm/ml 농도로 3일간 처리한 후 DOPochrome tautomerase 활성은 각각 99%, 90.6%, 88.5%로 2 mg/ml 농도에서 약간

감소한 것으로 나타났다 (Fig. 7). 또한 5일 처리군에서도 0.5, 1, 2 mg/ml 농도에서 84.3%, 75.2%, 69.5%로서 2 mg/ml 유의하게 감소하였다 (Fig. 8).

이상의 결과 감초는 B16 세포의 DOPochrome tautomerase 활성을 농도의존적으로 억제하였다.

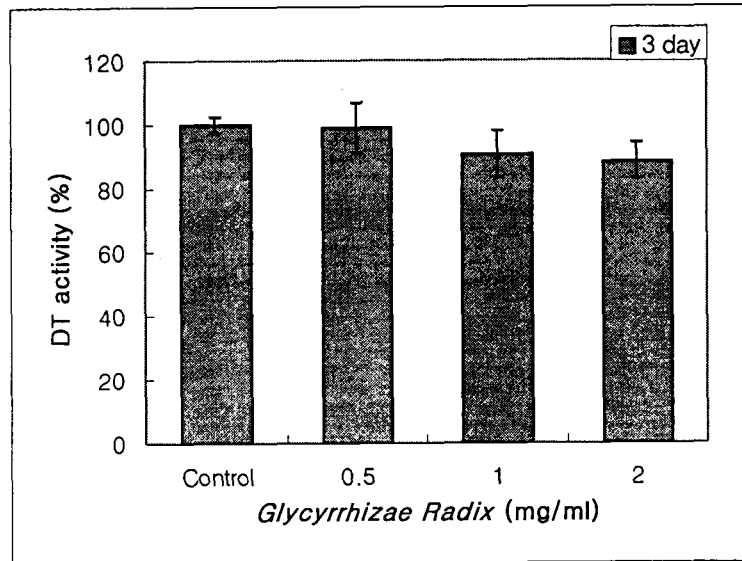


Fig. 7. Effect of Radix glycyrrhizae water extract on DOPAchrome tautomerase in B16 melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hr, cells were treated with various concentrations Radix glycyrrhizae water extract for 3 days. Then, DOPAchrome tautomerase was measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.E. of three experiments performed in triplicate.

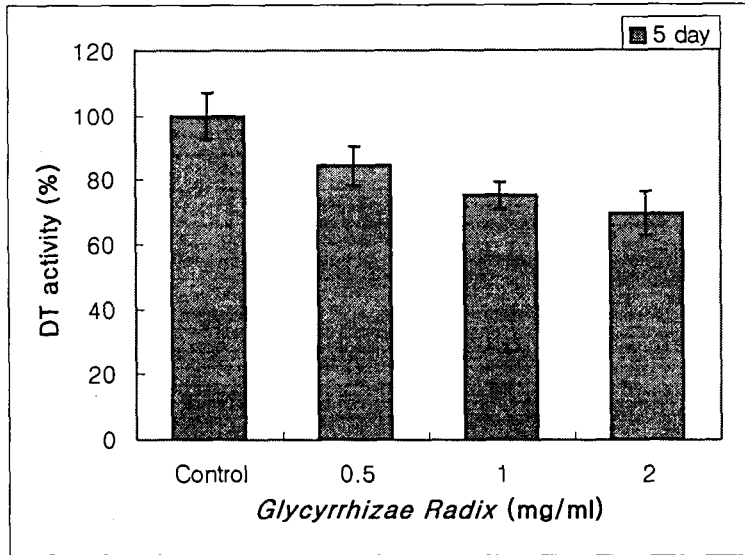


Fig. 8. Effect of Radix glycyrrhizae water extract on DOPachrome tautomerase in B16 melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hr, cells were treated with various concentrations Radix glycyrrhizae water extract for 5 days. Then, DOPachrome tautomerase was measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.E. of three experiments performed in triplicate.

6. 감초가 tyrosinase mRNA 발현에 미치는 효과

B16 세포에서 감초에 오랫동안 노출되었을 때 tyrosinase 활성이 감소되었다. 이는 감초가 tyrosinase 유전자 발현을 변화시켜서 그 효과를 나타낼 가능성이 있다. 따라서 본 실험에서는 감초가 tyrosinase mRNA 발현에 영향을 주는지 조사하기 위하여, Reverse transcription-PCR (역전사 중합효소 연쇄반

응)을 이용하여, tyrosinase mRNA로 부터 cDNA를 합성하고 중합효소 연쇄 반응을 시행하여 tyrosinase mRNA 발현량을 조사하였다.

β -Actin을 대조군으로 하여 감초를 각 농도 별로 5일간 처리한 후 비교한 결과, 감초에 의해 tyrosinase mRNA 발현이 약간 감소한 경향이 있었으나 유의성은 없었다 (Fig. 9).

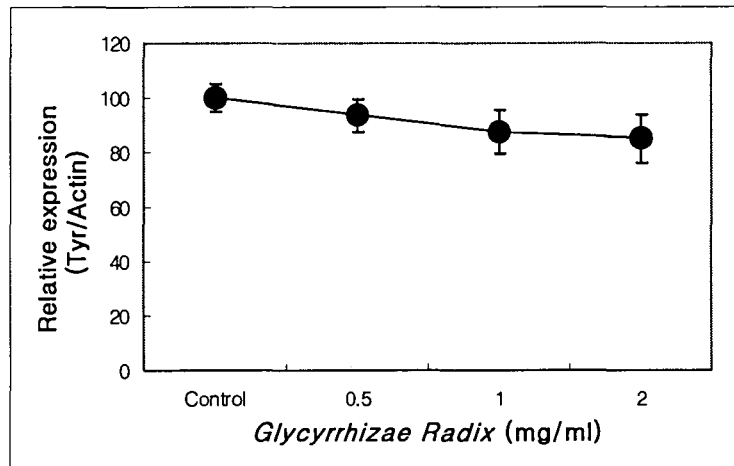
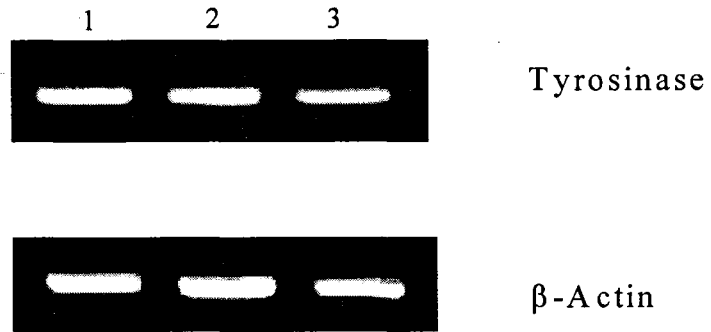


Fig. 9. (1) RT-PCR analysis of tyrosinase mRNA in Radix glycyrrhizae water extract treated B16 cells. The cells were treated with Radix glycyrrhizae water extract at 0.5 and 1 mg/ml. Total RNA were extracted and used for RT-PCR. (2) The amount of expression of tyrosinase was analysed by a gel documentation system and image analysing software. The relative index is defined arbitrarily as the ratio of the densities tyrosinase/ β -actin.

고찰

韓醫學에서 피부는 臟腑의 生理作用과 밀접한 관계를 가지고 있으며 각각의 臟腑기능은 그 특징이 서로 같지 않아 피부에 대한 작용도 같지 않은데, 心은 血脈을 주관하여 心氣의 盛衰가 얼굴색으로 반영되고, 肺는 宣發作用을 주관하기 때문에 외부적으로 피부와 결합되어 있고, 脾는 運化作用을 하여 음식물의 소화와 영양분의 수송작용으로 肌肉을 윤택하고 부드럽게 하며, 肝에는 疏泄作用이 있어 血을 저장하고 조절하는 작용을 하여 피부의 혈액순환을 원활하게 하며, 腎은 衛氣와 津液의 化生輸布作用에 관여하여 피부의 체온을 유지·조절하게 하고 부드럽게 한다¹⁾.

피부는 항상 남에게 보여지는 중요한 부분인 동시에 가장 복잡한 변화를 계속하고 있으며²⁾, 예로부터 미인의 조건으로 피부는 눈 같이 희고 얼굴은 복사꽃 같아야 하며 검은 머리 카락이 삼단처럼 펼쳐져 있는 것을 아름다움의 최고 지표로 삼았다⁴²⁾.

피부는 표피층, 진피층, 피하지방층의 3개 층으로 구성되어 있으며, 체온 조절과 외부로부터 내부 장기를 보호하는 등 생명유지를 위한 주요 기능과, 부수적으로 皮膚 호흡, 특정 物質에 대한 선택적 吸收, 피부색 형성 등의 機能이 있다^{2,5,6-8)}. 피부색은 3가지 요인에 의하여 결정되는데, 피부 속에 들어있는 카로틴과 진피에 있는 혈관에서 스며나온 혈액 색깔 및 멜라닌이 중요한 요인이 된다⁴⁾.

최근에 깨끗하고 하얀 피부에 대한 관심이 증가하면서 자외선, 세포의 유전적 요인, 대사,

내분비, 염증, 감염, 종양 등과 같은 물리적 및 화학적 요인들로 인해 멜라닌 합성의 이상으로 발생하는 과색소 침착증에 대한 인식이 높아지고 있다^{2,4,5-8)}.

韓醫學 文獻에는 皮膚의 과색소 침착증에 대하여 《黃帝內經·素問》〈至真要大論〉⁹⁾에 “歲陽明在泉, 燥淫所勝, ……面塵, 身無膏澤, 足外反熱”이라하여 처음 收錄되었고, 巢¹⁰⁾의 《諸病源候論·面奸黑黧候》에서 病理機轉과 形態에 대하여 구체적으로 언급한 이래, 여러 醫家들에 의하여 형태와 색조에 따라 黥¹¹⁻¹³⁾, 黥點¹⁴⁾, 面黑¹⁵⁻¹⁸⁾, 面黥^{14,19)}, 雀卵^{13,20)}, 斑黥¹³⁾, 麤子^{13,20)}, 雀斑²¹⁻²⁶⁾, 鰲黑斑^{21,22)}, 黥²⁷⁾, 鰲黑黥²⁴⁾, 黑斑²⁵⁾ 등 다양하게 表現되어 왔고, 最近中國文獻^{43,44)}에서는 色素異常性 皮膚病의 範疇에서 雀斑, 黃褐斑, 鰲黑斑 등으로 區分하여 辨證施治하였으며, 治療方法으로는 虛證과 實證으로 각각 辨證하여 內服藥과 外用藥들을 사용하였다^{13,19,43-51)}.

韓醫學에서 피부질환의 원인을 살펴보면 六淫·七情·飲食·勞逸·虫毒 및 外傷 등이 일정한 조건하에서 피부에 질병을 발생시키는 것으로 알려져 있다⁵²⁻⁵⁵⁾. 또한 韓醫學에서는 인체의 질병관을 整體觀⁵⁶⁾에 두었기 때문에 위와 같은 병인이 병을 일으키는 발병기전에는 두가지 경우로 나누어 생각한다. 첫째, 인체의 尙病能力이 상대적으로 減弱된 ‘正虛’의 경우이고, 둘째는 병을 일으키게 하는 素因이 상대적으로 偏盛한 ‘邪實’의 경우이다. 일반적으로 六淫·虫毒 등은 직접 피부에 침입하여 발병을 하고, 七情·飲食 등은 장부 기능에 영향을 주어 간접적으로 피부 질환을 발생하게 한다⁵⁶⁾.

그리고 韓醫學에서 피부질환의 발병기전은 단순히 外因으로만 생각하는 것이 아니라 內因

的으로 臟腑의 생리기능과 밀접한 관계를 가지고 있으므로 피부질환을 치료할 때 외인은 물론 내인적 장부기능을 중요시한다¹⁾.

과색소 침착질환에 대한 韓醫學의 原因으로 樓 등¹⁶⁻¹⁸⁾은 《內經》⁹⁾의 面塵에 대한 說을 따라 顏面이 陽明經에 속하므로 陽明之氣의 不足을 그 原因으로 보았고, 趙 등^{11-14,19,22,27,57)}은 巢¹⁰⁾의 說을 따라 風邪와 痰飲으로 氣血이 不和됨을 原因으로 보았다. 또 李 등^{12,18,20,24)}은 思慮過多와 飲食失節로 인한 脾胃 損傷을 原因으로 보았고, 陳 등^{21,22,25,26)}은 腎水不足으로 인한 虛火의 發生을 주된 原因으로 보았으며, 朱 등^{15,23,57)}은 熱을 주된 原因으로 보았다. 近來 文獻들^{49,50,52,53,58-60)}은 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎陰不足, 陰虛火旺, 脾虛不運, 濕熱內蘊, 日曬熱毒, 火鬱孫絡, 風邪外搏 등의 原因으로 자세히 분류하였는데, 이상의 文獻을 종합하면 內因으로는 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎陰不足, 陰虛火旺, 脾虛不運 등이, 外因으로는 風邪, 火邪, 濕熱邪, 熱毒 등이 각각 과색소 침착증을 유발하는 것으로 나타났다.

治法에 있어 實證에서는 涼血活血, 祛風散火, 散火解毒, 養陰清熱, 清肺涼血, 祛風通絡, 涼血消斑, 疎肝理氣, 活血退斑, 化瘀退斑 등이 活用되었고, 虛證에서는 補益肝腎, 滋陰降火, 降火散結, 滋腎化源, 滋腎養血, 健脾化濕, 溫陽益腎 등의 治法이 사용되었다^{43,44,46,47,49)}.

辨證施治에 의한 內服藥으로는 酒製四物湯加減¹⁵⁾, 沖和順氣湯^{16,18)}, 升麻順氣湯¹²⁾, 升麻白芷湯¹⁷⁾, 連翹散¹³⁾, 六味地黃丸^{21,22,24,26,27,44,46)}, 人蔘養胃湯²⁷⁾, 犀角升麻丸²⁴⁾, 腎氣丸²⁵⁾, 知柏地黃湯⁴⁶⁾ 등이 사용되었고, 外治法에 사용된 外用藥은 玉容散^{13,22,23)}, 紅玉散¹³⁾, 玉容西施散¹³⁾, 皇帝塗容金面方¹³⁾, 玉容膏¹³⁾, 玉容丸^{21,25,26)}, 玉肌散²¹⁾,

改容丸^{23,26)}, 正容散²⁴⁾ 등이 사용되었다.

鍼灸治療에 있어 體針으로는 陰陵泉, 足三里, 絕骨, 風池, 腎俞, 血海, 迎香, 印堂, 神庭, 巨膠, 合谷, 三陰交 등이, 耳針으로는 內分泌, 面頰, 交感, 腎上腺, 肺, 腎 등이 사용되었고 局所部位에 溫針을 사용하기도 하였다⁴⁹⁾.

甘草(*Radix Glycyrrhizae*)는 옛날부터 東西를 막론하고 자주 사용된 생약으로 고대 그리스, 로마, 중국의 각종 文獻에 甘草가 각종 질환에 탁월한 치료효과가 있는 것으로 기술되어 있으며, 15세기 유럽에서 甘草는 消化障礙의 치료제로 사용되었다^{61,62)}.

甘草는 豆科(*Leguminosae*)에 속한 多年性草本인 甘草 및 同屬 近緣植物의 根과 根狀莖으로, 7-8월에 開花하고 結實期는 8-9월이며 높이는 약 30-70cm 내외이고 根莖은 圓柱狀인데 主根은 매우 길고 거칠고 크며 外皮는 적갈색이거나 암갈색이다²⁸⁻³⁰⁾. 줄기는 곧추서고 다소 木質을 띠었고 白色의 短毛 및 腺鱗 혹은 腺毛가 덮여 있으며 種子는 2-8개이고 둥글납작하거나 腎臟形이며 흑색이고 반들반들하다²⁹⁾. 甘草는 햇빛이 잘 들고 건조한 칼슘질의 초원과 강기슭 등 사질 토양에 잘 자라고 春·秋의 兩季節에 채취하여 晒乾 혹은 烘乾하여 사용하는데 秋季에 채취한 것이 良品이며, 根의 末梢部分인 甘草梢, 根莖內 樹脂狀인 甘草節, 蘆頭 部分인 甘草頭도 藥用으로 사용한다^{28,29)}.

甘草의 異名으로는 蜜草, 蜜甘, 美草, 蔞草, 國老, 靈通, 靈草, 粉草, 蛄草, 蛄草根 蛄根子 등이 있으며, 性味는 甘·平·無毒하고 脾·胃·肺 3經에 歸經한다^{28,29)}. 效能으로는 補脾益氣, 清熱解毒, 潤肺止咳, 調和諸藥, 和中緩急 등이 있는데^{28,29)}, 韓 등⁶³⁾은 甘草의 生用·灸用으

로 발현되는 변화 과정을 文獻적으로 살펴본 결과, 生用하면 解熱, 消炎, 解毒作用을 나타내고, 灸用하면 補脾胃, 補血, 強心 등의 作用이 있었다고 하였다. 이에 炮製한 것은 脾胃虛弱, 少食, 腹痛, 便溏, 勞倦에 의한 發熱, 肺痿咳嗽, 動悸, 驚癇 등을 치료하고, 生用하면 咽喉腫痛, 消化性潰瘍, 癰疽瘡瘍 등을 치료하고 藥毒, 植物中毒을 解한다^{28,29,64}.

甘草의 약리작용으로는 부신피질 호르몬양 작용, 항염증 및 항알레르기 작용, 궤양을 억제하고 위산을 낮추며 장경련을 억제 하는 등의 소화계통에 대한 작용, 각종 독에 대한 해독 작용, 혈청 콜레스테롤을 하강시키는 등의 지질대사에 대한 작용, 혈중 bilirubin 배출을 낮추고 요중 bilirubin의 배출을 증가시켜 황달에 영향을 미친다. 또한 진해작용, 진통·항경련 작용, 이뇨 작용, 항종양작용 등의 약리 작용이 있으며 접촉성 피부염, 알러지성 피부염, 습진, 건선 등의 피부염에 대해서도 치료 효과가 있다^{29,65}.

甘草에 대한 연구로 鄭⁶⁶ 등은 항균물질이 있다고 보고하였고, 殷 등⁶⁷은甘草가 stress에 대한 방어기전에 있어서 glucocorticoid 분비능력을 상승시키는 것은甘草成分인 glycyrrhizic acid에 의한 것이라고 보고하였다. 또한 李 등⁶⁸은 憂鬱症과 관련성이 큰 신경전달물질인 serotonin과 melatonin의 농도에 미치는 영향과 생체의 行動樣態에 미치는 영향을 살펴본 결과,甘草가 憂鬱症狀의 개선에 효과가 있는 것으로 보고하였고, 金⁶⁹은甘草의 抗炎症작용의 일부는 염증세포의 selectin 매개성 유착을 억제함으로써 이루어진다고 하였으며, 沈⁷⁰은甘草 추출물이 세포성 면역을 담당하고 있는 T세포를 자극하고 T세포의 활성화

에 관여하여 면역증강 작용을 나타낸다고 보고하였다.

멜라닌의 어원은 그리스어로 melas이며 검은색이란 뜻이다⁷¹. 멜라닌은 내인성이며, 비혈색소성 유도물이고 흑갈색을 띠는 색소로⁷¹, 가시층의 깊은 층과 기저층에 많이 분포되어 있으며⁴, 검은 피부와 흰 피부를 결정하는데 중요한 요소는 멜라닌 소체의 크기와 각질화형성세포에서의 분포로써 검은 피부는 큰 멜라닌 소체를 형성하며, 이러한 큰 멜라닌 소체는 각질화형성세포의 세포질 내에 개별적으로 분산되나 흰 피부의 작은 멜라닌 소체는 막으로 둘러싸인 식소체 속에 들어 있다⁵.

멜라닌은 특수하게 분화된 멜라닌세포에서 합성되며, 멜라닌 소체는 수상돌기를 통하여 부근에 인접되어 있는 각질화형성세포로 이동하게 되고, 각질화형성세포가 외피로 부상하면서 피부색을 나타내게 된다^{6,72}. 특히, 표피에 분포하는 멜라닌 세포는 멜라닌을 합성하여 피부의 색소 침착에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 생성된 멜라닌이 각질화형성세포로 이동하여 과도한 자외선을 흡수하고 차단하는 광보호 작용을 한다고 알려져 있다^{5,7,8}.

피부가 자외선에 노출되면 멜라닌 세포는 그 파장에 따라 두가지 반응을 보이는데, UVA 또는 visible light에 의한 즉시형 색소침착과 UVB와 UVA에 의한 지연형 색소침착이 발생한다. 전자는 멜라닌 세포의 수나 효소 활성도, 멜라닌소체의 합성 없이 멜라닌 산화에 의해 발생하며 후자는 멜라닌 세포 수의 증가, 새로운 멜라닌의 합성, 효소활성의 증가, 새로운 멜라닌 소체의 합성과 각질화형성세포로의 전이 촉진에 의해 발생하게 된다. 이러한 자외선 외에도 멜라닌 합성은 세포의 유전적 요인, 대사,

내분비, 염증, 감염, 종양 등과 같은 물리적 및 화학적 요인들에 의해 크게 좌우된다^{2,4-8)}.

멜라닌의 생합성은 주로 tyrosinase의 작용에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있는데, 1980년대까지 L-tyrosine으로부터 DOPA로 hydroxylation, DOPA에서 DOPAquinone으로의 산화, DOPAquinone에서 DOPACHROME의 생성, DOPACHROME에서 DHI(5,6-dihydroxyindole)로의 전환, Dihydroxyindole의 산화적 중합 및 단백질과의 결합을 통해 최종적으로 멜라닌을 합성하는 Raper-Mason Pathway를 통해 생합성 되는 것으로 알려졌다⁷³⁾.

그러므로 전통적으로 멜라닌 생성(melanogenesis) 조절 물질에 대한 연구는 멜라닌 생합성 경로의 속도 조절 단계를 촉매하는 효소인 tyrosinase에 영향을 주는 인자에 초점을 두었으나, 1980년대 이후 멜라닌 생합성에 대한 연구는 피부암 관련 연구그룹에서 집중적으로 연구되어, 생체 내에서 DOPACHROME이 DHI로 전환되는 경로 외에 DOPACHROME tautomerase 작용에 의해 DHICA로 전환되는 새로운 경로가 존재한다는 사실이 밝혀졌다⁷⁴⁻⁷⁶⁾.

멜라닌 생성 과정은 비교적 안정한 물질인 tyrosine에서 출발하는 일련의 산화 중합 반응이다. 이 과정에서 tyrosinase가 중요한 역할을 하며, 다른 효소 반응을 거쳐 멜라닌 색소로 산화 중합되게 된다. 따라서 이 tyrosinase 효소를 저해하거나 그 중간체들의 산화반응을 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시킬 수 있을 것으로 보여지고 있다. 실제로 Kojic acid, arbutin 등의 물질은 tyrosinase 저해작용과 항산화작용에 의해 멜라닌 생성을 감소시킨다고 보고된 바 있다^{76,77)}. 이러한 이유로 피부의 색

소생성을 조절하는 많은 연구의 대부분이 tyrosinase의 효소적 조절에 초점이 맞추어져 왔고, 현재까지 멜라닌 생성 조절물질에 대한 screening test로 버섯 tyrosinase를 이용한 시험관 내 실험이 많이 이용되고 있다. 이에 본 실험에서도 in vitro의 버섯 tyrosinase assay 결과 감초는 매우 유의하게 tyrosinase 활성을 억제하였다(Fig. 1). 이는 감초가 tyrosinase에 직접적으로 작용하여 활성을 억제하였음을 나타낸다.

Mishima 등^{78,79)}은 멜라닌 생성 억제 물질을 크게 두가지 형태로 분류하였다. 그 하나는 멜라닌 생성의 속도조절 효소인 tyrosinase 효소 자체를 직접 억제하는 것이고, 또 하나는 세포로부터 분리한 tyrosinase에 대해서는 직접적인 억제를 나타내지 않지만 멜라닌세포 내에서 멜라닌을 억제하는 것이다. 후자는 tyrosinase 합성 억제, 유산, esculin, tyrosinase 당채수식에 의한 성숙과정의 저해, 세포독성 등의 작용으로 대별된다. 이와 더불어 멜라닌 생성 억제제가 살아있는 세포에 작용하기 위해서는 생물학적 대사 불활성(metabolic bioinactivation) 없이 세포막과 멜라노솜막을 통과해야 한다. 이러한 관점에서 볼 때 in vitro에서 tyrosinase 효소 활성 억제제들이 세포에서는 그 효과가 미미한 경우가 많다. 예를 들면 kojic acid는 free enzyme에 대해 매우 효과적인 copper chelator로 tyrosinase 활성을 억제하지만 세포에서는 그 효과가 낮아 kojic acid가 melanosome 까지 들어 가는데 실패한 것으로 보고되었다.

그러므로 바람직한 멜라닌 생성 억제제는 세포에 독성이 없이 멜라닌 생성을 감소시키는 것이다. 예를 들면 hydroquinone은 매우 효과적인

으로 멜라닌 생성을 억제하지만 반면에 세포 독성이 심하다는 단점을 가지고 있다. 따라서 멜라닌세포주인 B16 세포에서 감초 추출물의 농도에 따른 영향을 조사한 결과, 감초는 B16 세포에 세포 증식을 억제하거나 세포 독성을 나타내지 않으면서 tyrosinase 활성을 억제하였고, 세포의 형태학적 관찰에서도 정상적인 세포소견을 나타냈다(Fig. 2, Fig. 3). 따라서 감초는 단순히 세포손상이나 일반적 대사 상태의 변화에 의해 멜라닌 생성이 억제된 것이 아님을 알 수 있었다.

멜라닌생성은 tyrosine을 기질로 한 초기의 두 단계의 반응이 tyrosinase의 촉매작용을 통하여 일어나며, 일단 반응이 개시되면 일련의 과정이 매우 빠르게 진행된다. 이 일련의 효소 반응은 멜라닌세포의 세포소기관인 멜라닌소체에서 진행되므로, in vitro에서 버섯 tyrosinase 활성을 직접적으로 억제하는 실험 결과만으로 감초가 멜라닌 생성을 억제한다고 말하기는 불충분하다. 따라서 본 실험에서 B16 세포에서 tyrosinase 활성을 조사한 결과 감초가 tyrosinase 활성을 억제하였다(Fig. 6, Fig. 7). 이는 세포의 멜라닌소체에 직접 작용하여 tyrosinase 활성을 억제한 경우와 세포표면의 receptor와 결합하여 signal pathway를 경유하여 억제한 경우 두가지 가능성을 생각할 수 있다.

夫 등³²⁾은 솔잎 추출성분 4-hydroxy-5-methyl-3-[2H]-furanone(HMF)이 in vitro에서 tyrosinase 활성 억제 작용이 kojic acid 보다 약하지만 배양 murine melanoma 세포에서 kojic acid 보다도 훨씬 강력하게 멜라닌의 생성을 억제하였고, 이는 멜라닌 생성을 억제할 수 있는 또 다른 인자가 있음을 시사하는 것으로

보고하였다.

멜라닌세포에서 생성된 멜라닌은 eumelanin과 pheomelanin의 2종류로 구분되는데, cysteine, glutathione과 같은 sulfur-containing reactant의 양에 따라 멜라닌은 eumelanin과 pheomelanin을 생성하는 경로로 나뉜다. Pheomelanin은 세포 내 cysteine, glutathione 농도가 높을 경우 DOPAquinone으로부터 생성되고, eumelanin은 DOPACHrome으로부터 DHI (5,6-dihydroxyindole)뿐만 아니라, DHICA(5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)로부터 생성된다. 이와 같이, DHICA로의 변환을 촉매하는 효소 DOPACHrome tautomerase (TRP-2)와 DHICA에서 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로의 변환을 촉매하는 DHICA-oxidase (TRP-1)의 역할이 주목되고 있다^{74,76,80-82)}.

본 실험에서도 B16 세포의 DOPACHrome tautomerase 활성을 조사한 결과 감초가 DOPACHrome tautomerase 활성을 약간 억제하였다(Fig. 8, Fig. 9). 따라서 감초의 멜라닌 생성을 억제효과는 tyrosinase와 DOPACHrome tautomerase 활성억제에 의한 것으로 사료된다.

李 등³⁷⁾은 전통 한약재인 반하(*Pinellia ternate B.*)의 물추출물이 비록 tyrosinase에 대한 저해 작용은 없으나 배양된 마우스 흑색종 세포의 멜라닌 생성을 억제하였고, 용량 의존적으로 tyrosinase mRNA의 양을 감소시켜 tyrosinase mRNA의 전사 조절을 통하여 미백 효과를 나타낸다고 보고하였고, Ando 등⁸³⁾은 lactic acid가 tyrosinase 효소의 전사과정을 억제함으로써 효소활성을 억제한다고 보고하였다.

그러나 다른 인종의 피부 형태에서 tyrosinase 발현을 조사한 연구 결과에서도 흑인의 tyrosinase 활성이 백인의 tyrosinase 활성 보다 6~8배가 높았지만 tyrosinase mRNA 와 protein level은 동일하였다⁸⁴⁾.

Fuller 등⁸⁵⁾도 yohimbine이 멜라닌세포의 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제하였지만, tyrosinase protein과 mRNA 발현에 어떠한 변화도 일으키지 않았다고 보고하였고, Franchi 등⁸⁶⁾은 Calcium D-Pantetheine-S-sulfonate가 tyrosinase와 TRP-1의 활성을 억제한 결과 멜라닌 생성이 감소되었는데, 이는 이 효소들의 protein synthesis 억제보다는 glycosylation pattern 변화와 같은 post-transcriptional 경로에 의한 것이라고 보고하였다. 그러므로 멜라닌세포의 tyrosinase level이 단순히 tyrosinase의 양이나 유전자의 활성을 그대로 반영하는 것은 아니다.

본 실험에서 B16 세포가 감초에 오랫동안 노출되었을 때 tyrosinase 활성이 감소되었는데, 이는 감초가 tyrosinase 유전자 발현을 변화시켜서 그 효과를 나타냈을 가능성이 있다. 감초가 tyrosinase mRNA의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 2 mg/ml 농도에서 tyrosinase mRNA 발현이 약간 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 10). 결과적으로 감초는 B16 melanoma 세포에서 멜라닌 형성을 유의하게 억제하였고, 이는 tyrosinase 활성 억제는 유전자 발현억제보다는 tyrosinase와 DOPachrome 활성 억제와 관련이 있는 것으로 사료된다.

이상의 실험결과, 감초는 B16 세포에서 세포독성이 없는 농도에서 Pigmentation을 억제하고, 이는 tyrosinase와 DOPachrome tautomerase

활성의 억제에 의한 것이며, tyrosinase 유전자 발현에는 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다.

따라서 앞으로 감초의 멜라닌 형성 억제효과에 대한 더욱 정확한 작용기전의 규명과 미백작용이 우수하면서도 피부에 부작용이 나타나지 않는 많은 한약재의 체계적인 연구가 필요하다.

결론

감초의 멜라닌 생성 억제 작용 및 세포내에서의 작용기전을 알아보기 위하여 B16 mouse melanoma 세포를 이용하여 감초에 의한 세포 독성효과와 최종 멜라닌 생성량을 측정하였고, tyrosinase 활성도 및 TRP-2의 활성도를 측정하였으며 RT-PCR을 이용하여 tyrosinase mRNA 발현에 미치는 영향을 분석한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 감초는 시험관내 버섯 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제하였다.
2. 감초는 B16 mouse melanoma 세포에서 2 mg/ml 농도까지 세포독성을 나타 내지 않았으며, 형태적으로도 정상적인 세포소견을 나타냈다.
3. 감초는 B16 mouse melanoma 세포에서 최종적인 멜라닌 생성을 억제하였다.
4. 감초는 B16 mouse melanoma 세포의 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 억제하였다.
5. 감초는 B16 mouse melanoma 세포의 DOPachrome tautomerase 활성을 농도

의존적으로 억제하였다.

6. 갑초는 B16 mouse melanoma 세포에서 tyrosinase mRNA 발현에 영향을 주지 않았다.

참고문헌

1. 李林 : 實用中醫皮膚病學, 北京, 中醫古籍出版社, pp.1-7, 1998.
2. 國홍일 : 고운피부 젊은 피부, 서울, 아침나라, p.17,18, 1999.
3. 전완길 외 : 한국생활문화100년, 서울, 장원, pp.19-21, 1995.
4. 강호석 외 : 조직학 제 2판, 서울, 고문사, p.319,327, 1994.
5. 대한피부과학회 : 피부과학, 서울, 여문각, pp.1-9, 409-412, 2001.
6. 박경아 외 : 조직학, 서울 고려의학, pp.405-411, 1999.
7. 은희철 외 : 피부면역학, 서울, 서울대학교출판부, p.143, 1999.
8. 최국주 : 피부미인, 서울, 동명사, pp.17-23, 1996.
9. 楊維傑 編 : 黃帝內經 素問, 臺北, 樂羣出版事業有限公司, pp.624-679, 1994.
10. 巢元方 : 巢氏諸病原候論, 서울, 大星文化社, p.200, 1992.
11. 陳昭遇 外 : 太平聖惠方, 北京, 人民衛生出版社, p.1208, 1986.
12. 李梴 : 偏註醫學入門. 서울. 大星文化社. 雜病篇. p.29, 224. 1990.
13. 許俊 : 東醫寶鑑 서울, 南山堂, p.211,212, 1981.
14. 趙佶 : 聖濟總錄, 北京, 人民衛生出版社, p.1763, 1987.
15. 朱震亨 : 丹溪醫集, 北京, 人民衛生出版社, p.24, 1993.
16. 樓英 : 醫學綱目, 서울, 大星文化社, p.1081, 1986.
17. 龔廷賢 : 萬病回春, 서울, 醫聖堂, p.271, 1993.
18. 王肯堂 : 證治準繩, 北京, 人民衛生出版社, 卷1, p.824, 1991.
19. 辛民教 外 : 鄉藥集成方, 서울, 永林社, p.1039, 1989.
20. 周命新 : 醫門寶鑑, 서울, 杏林書院, p.186,187, 1975.
21. 陳實功 : 外科正宗, 上海, 上海科學技術出版社, p.290,298, 1989.
22. 祁坤 : 外科大成, 臺北, 文光圖書有限公司, p.218, 1968.
23. 程國彭 : 醫學心悟, 香溝, 友聯出版社, p.290, 1961.
24. 吳謙 : 醫宗金鑒, 北京, 中國醫藥學出版社, pp.1680-1682, 1982.
25. 顧世澄 : 瘍醫大全, 北京, 人民衛生出版社, p.479, 481,482, 1987.
26. 孫震元 譯 : 瘍科會粹, 北京, 人民衛生出版社, p.364,365, 1987.
27. 張璐 : 張氏醫通, 上海, 上海科學技術出版社, p.442,443, 1995.
28. 辛民教 : 원색 임상본초학, 서울, 영림사, pp.175-177, 1991.
29. 鄭普燮 외 : 향약대사전, 서울, 영림사, pp.684-687, 1990.
30. 약품식물학연구회 : 약품식물학각론, 서

- 을, 학창사, p.204,205, 1988.
31. 辛民敎 외 : 본초방제학연구, 서울, 영림사, p.8,9, 2000.
 32. 부용출 외:술잎에서 분리된 항산화 물질인 4-hydroxy-5-methyl-3-[2H]-furanone의 멜라닌 생성 억제 작용, 대한화장품학회지, 20:1-13, 1994.
 33. 박지선 외 : 백출추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향, 동의병리학회지, 13(2):91-98, 1999.
 34. 박지선 외: B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 西施玉容散의 효과, 대한동의병리학회지, 14(1):160-170, 2000.
 35. 이관순 외 :천화분이 멜라닌 형성에 미치는 영향, 대한외관과학회지, 14:1, pp.209-225, 2001.
 36. 김정택 외 : 속수자의 멜라닌 생성 억제 물질, 생약학학회지 31(2):168-173, 2000.
 37. 이상화 외 : 반하추출물이 B-16 마우스 흑색종세포의 멜라닌 생성 과 타이로시네이즈 mRNA 양에 미치는 영향, 대한화장품학회지 23(2): 23-32, 1997.
 38. 이승호 외 : 목단피부터 멜라닌 생성 억제성분의 분리, 약학학회지 42(4):353-358, 1998.
 39. 임덕우 외 : 감초추출액이 멜라닌세포의 증식과 멜라닌화에 미치는 영향, 동서의학연구소 논문집, pp.247-254, Vol.2000, No.1, 2001.
 40. Mason HS, Peterson EW : Melanoproteins. I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. Biochim Biophys Acta., 111(1):134-46, 1965.
 41. Y. Funasaka, A. K. Chakraborty, M. Komoto, A. Ohashi, and M. Ichihashi: The depigmenting effect of α -tocopherol ferulate on human melanoma cells. British J. Dermatolohy. 141: 20-29, 1999.
 42. 김이현, 한방 피부 미용법 330지혜, 서울, 한방미디어, p274, 2002.
 43. 顧伯華 外 : 實用中醫外科學. 上海. 上海科學技術出版社. p.529,530. 1985.
 44. 楊思澍 外 : 中醫臨床大全, 中國, 北京科學技術出版社, p.923,924, 1991.
 45. 乾祖望 外 : 實用中醫外科學, pp530-532, 1985.
 46. 顧伯康 : 中醫外科臨床手冊, 中國, 上海科學技術出版社, p.426, 1983.
 47. 范瑞強 : 實用皮膚病性病驗方精選, 廣東出版社, p.336, 1994.
 48. 施惠 : 施惠中醫皮膚病臨床經驗集, 北京, 中國醫藥科技出版社, pp.62-65, 1971.
 49. 劉愛民 : 損容性皮膚病的診斷與治療, 中國, 中國中醫藥出版社, p.177, 1992.
 50. 周洪範 : 白話中醫秘方全書. 대만. p.494. 1986.
 51. 陣夢雷 外 : 醫部全錄. 서울. 大星文化社. 제6권. p.267, 1989.
 52. 徐宜厚 外 : 皮膚病中醫診療學, 北京, 人民衛生出版社, pp.8-17, 1997.
 53. 梁勇才 : 實用皮膚病診療全書, 北京, 學苑出版社, pp.17-24, 27-30, 1996.
 54. 辺天羽 外 : 中西醫結合皮膚病學, 天津, 天津科學技術出版社, pp.46-49, 1999.
 55. 宋兆友 : 中醫皮膚科臨床手冊, 北京, 人民衛生出版社, pp.3-6, 1996.

56. 鄭遇悅 : 동의병리학개론, 익산, 서울공판사, p.17,19, 1998.
57. 沈金鰲 : 沈氏尊生書, 臺北, 自由出版社, p.530, 1979.
58. 南惠貞 외 : 肝斑에 關한 文獻的 考察, 大韓外官科學會誌, 9:1, pp.16-23, 1996.
59. 朴惠駿 외 : 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, 10:1, pp.247-262, 1997.
60. 申延祥 외 : 기미에 關한 文獻的 考察, 大韓外官科學會誌, 11:1, pp.82-98, 1998.
61. Susumu H, Tsutsumi T : Function and skin depigmental activity of crude drugs. *Fragrance Journal* 6:59-66, 1990.
62. Isao K, Kazuyuki H : Chemical constituents of licorice roots. *현대동약의학* 14:80-89, 1993.
63. 한청광 외 : 감초의 수처에 따른 효능 변화, *대한본초학회지*, pp.23-26, 1986.
64. 신민교 외 : 본초방제학연구, 서울, 영림사, p.8,9, 2000.
65. 김형균 외 : 한약의 약리, 서울, 고려의학, pp.315-318, 2000.
66. 정재록 : 당귀와 감초의 열 추출물이 주요 장내 세균에 미치는 영향, *자원과학연구논문집*, Vol.2, No.1, pp.93-104, 1994.
67. 은재순 외 : 감초 엑기스가 Immobilization Stress 부하후 혈중 corticosterone 및 histamine 함량변화에 미치는 영향, *한국생약학회지*, 20(1), pp.37-42, 1989)
68. 이한철 외 : 감초, 정향, 지모 및 황백이 백서의 혈청 serotonin, melatonin 농도 및 행동양태에 미치는 영향, *대한한방부인과학회지*, 1:13, No.2, pp.136-148, 2000.
69. 김미경 : 감초가 selectin-매개성 호산구 및 호중구의 유착에 미치는 길항능, *천식 및 알레르기학회*, 제18권, 제1호, pp.61-68, 1998.
70. 심호기 외 : 감초 추출물이 면역응답에 미치는 영향, *KOREAN J. FOOD AND NUTR.*, Vol.10, No.4, pp.533-538, 1997.
71. 대한병리학회 : 병리학 제2판, 서울, 고문사, p.58, 1995.
72. Bloom W, Fawcett DW: A textbook of histology, 11th ed, W.B. Saunders Company, USA, pp. 543-558, 1986.
73. Korner A, Pawelek J: Mammalian tyrosinase catalases three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* 217:1163-1165, 1982.
74. Pawelek J M: After dopachrome *Pigment Cell Res.* 4: 53-62, 1991.
75. Aroca P, Solano F, Salinas C, Garcia-Borrón JC, Lozano JA: Regulation of final phase of melanogenesis. *Eur. J Biochem* 208: 155-163, 1992.
76. Chakraborty A K, Funasaka Y, Komoto M and Ichihashi M. Effect of Arbutin on melangenic Proteins in Human Melanocytes. *Pigment Cell Res.* 11:206-212, 1998.
77. Sakuma K, Ogawa M, Sugibayashi K, Yamada K, Yamamoto K.: Relationship between tyrosinase inhibitory action and oxidation-reduction potential of cosmetic whitening ingredients and phenol

- derivatives. Arch Pharm Res. 22(4): 335-9, 1999.
78. Mishima Y, Hatta S, Ohyama Y, Inazu M: Induction of melanogenesis supression: Cellular Pharmacology and mode of differential action. Pigment Cell Res. 1: 367-374, 1988.
79. Curto E V, Kwong C, Hermersdorfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing V J and Dooley P : Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase: In vitro Comparisons of alkyl Esters of Gentisic acid with other putative inhibitors. Biochemical Pharmacology, 57: 663-672, 1999.
80. Y. Funasaka, A. K. Chakraborty, M. Komoto, A. Ohashi, and M. Ichihashi: The depigmenting effect of α -tocopherol ferulate on human melanoma cells. British J. Dermatolohy. 141: 20-29, 1999.
81. K. Wakamatsu and S. Ito: Advanced chemical methods in melanin determination. Pigment Cell Res. 15: 174-183, 2002.
82. Kametama, K., T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondoh, S. Nishiyama, K. Urabe, and J. Hearing: Pigment production in murine melanoma cell is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1(TRP-1), DOPochrome tautomerase(TRP-2), and a melanogenic inhibitor. J. Invest. Dermatol.. 2: 126-131, 1993.
83. Ando S., Ando O., Suemoto Y. and Mishima Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors. J. Invest. Dermatol. 100 150S , 1993.
84. Naeyaert JM, Eller M, Gordon PR, Park HY, Gilcrest BA.: Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. Br J Dermatol. 125(4): 297-303, 1991.
85. Fuller BB, Drake MA, Spaulding DT, Chaydhry F: Downregulation of tyrosinase activity in human melanocyte cell cultures by yohimbine. J of Investigative Dermatology 114(2) 268-276, 2000.
86. Franchi J, Coutadeur M C, Marteau C, Mersel M and Kupferberg A : Depigmenting effects of calcium D-pantetheine-S-sulfonate on human melanocytes. Pigment Cell Res. 13: 165-171, 2000.