

가미귀비탕의 미백효과에 관한 연구

박호순 · 김혜정 · 김윤범

경희대학교 한의과대학 안ibi인후피부과학교실

The Study on Depigmentation of Kamikwibi-Tang

Ho-Soon Park, Hye-jung Kim, Yoon-bum Kim

Objective : This study was performed to investigate the depigmentation effects of the extracts of Kamikwibi-Tang.

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 : The extracts of Kamikwibi-Tang did not have any inhibitory effects on tyrosinase activity and did not show any inhibitory effects on melanin production in melanoma cells and also did not have any inhibitory effects on UV screen. But the extracts showed high cytoprotective effects on PC12 cells injured by hydrogen peroxide.

Conclusion : These results suggest that Kamikwibi-Tang indirectly inhibits melanin biosynthesis which is involved in hyperpigmentation and could be used as a whitening agent for the skin.

Key words : Kamikwibi-Tang, Depigmentation, Tyrosinase, Melanin, UV

서론

최근 깨끗한 피부는 동서고금을 막론하고 아름다운
의 상징으로 여겨져 왔다.

사회발전에 따른 노령인구의 증가와 환경오염에
따른 피부의 자외선 노출의 증가로 인해 피부노화
에 의한 피부색의 변화, 색소침착이 심해지고 있다.

또한 미용적인 이유에서 피부 착색에 대한 관심이
높아지고 있으며, 보다 안정적이고 효과적인 미백
소재를 발견하고자 하는 연구가 활발히 진행되고
있다¹⁻³⁾.

또 미백소재에 대한 연구는 tyrosinase 활성억제
소재 연구, 피부각질층의 제거 촉진 효능을 가진 소
재에 대한 연구, 자외선 차단소재 연구, 세포독성억
제 소재 연구, 활성산소 제거 소재에 대한 연구 등
으로 이루어지고 있다⁴⁾.

관련 연구들을 살펴보면, tyrosine의 산화를 촉매
하는 tyrosinase의 활성을 저해하는 물질에 대한 연

교신저자: 김윤범, 경희대학교 부속한방병원 안ibi인후피부과
(Tel. 02-958-9177, E-mail: kyt6838@hanafos.com)

구로 kojic acid¹⁷⁻²⁰, 알부틴²¹, 감초추출물²², 닥나무 추출물에 관한 연구가 있으며, 피부박리를 촉진하여 melanin 색소제거를 촉진시키는 소재에 대한 연구로는 살리실산, 레조르신, 레틴산²³⁻²⁵, 알파 히드록시산 등에 대한 연구 등이 있다. 하지만 이들 중 대부분의 것은 효과가 불충분하거나 제형상 불완전한 면이 있고, 피부에 대한 안전성 측면에서 그 사용이 제한되고 있다²². 이에 최근에는 천연물에서 미백소재를 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. *Arctostaphylos Plants*²⁶, *Melaleuca leucadendron*²⁷, *甘草*²², *뽕나무가지*²⁸, *genistein*(대두에서 얻어진 isoflavone)²⁹, *보리·현미·울무*¹⁹, *염·초·향유*¹⁴, *알로에·녹차·꿀*¹⁶ 등에 대한 연구가 있으며, *wine phenolics* 과 *sorghum tannins*³⁰, *비타민 E*, *alpha-tocopheryl ferulate*^{31,32} 등에 대한 연구도 있다.

한약복합제제에 대한 미백연구로는 *麻黃 및 麻風膏*¹¹, *瀉白散*¹² 및 *加減西施玉容散*¹³ 등에 대한 연구가 이루어졌다.

*歸脾湯*은宋代 嚴用和의 《濟生方》에 최초로 수록된 處方으로 思慮過度나 勞倦으로 心脾兩虛되어서 나타나는 失眠, 心悸, 健忘, 怔忡을 치료할 목적으로 立方되었으며, 《方藥合編 面部》에는 色慾過用, 疲勞 등으로 인하여 肝, 腎, 肺 등이 陰虛해진 탓으로 얼굴이 붉는 陰虛面浮의 경우에 쓴다고 하였다.

이에 본 연구는 피부 착색의 原因중에서 內的因子인 과로, 정신적인 스트레스를 개선시키는 抗stress, 抗疲勞효능³³⁻³⁸이 입증된 *歸脾湯*의 加味方을 대상으로 피부 미백효과에 관련된 효능을 알아보고자 加味歸脾湯 추출물에 대하여 피부 melanin 생성억제효과를 tyrosinase와 B16 melanoma cell line에서 검색하였으며, 또한 자외선 차단 효과 여부와 Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 세포손상에 대한 항산화 효과에 대하여 알아본 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시료

약재는 경동시장에서 구입한 후 경희대학교 동서 의대학원 한약리학교실에서 검증한 것을 정선하여 사용하였으며 실험에 사용된 처방은 귀비탕의 가미방으로 그 구성약물의 내용은 다음과 같다. (Table I).

Table I. Composition and Dosage of Kamikwibi-Tang

| 韓藥名 | 生藥名 | 用量(g) |
|-----|------------------------------------|-------|
| 當歸 | Angelicae Gigantis Radix | 4.0 |
| 龍眼肉 | Longanae Arillus | 4.0 |
| 酸棗仁 | Zizyphi Spinosae Semen | 4.0 |
| 遠志 | Polygalae Radix | 4.0 |
| 人蔘 | Ginseng Radix | 4.0 |
| 黃芪 | Astragali Radix | 4.0 |
| 白朮 | Atractylodis Macrocephalae Rhizoma | 4.0 |
| 白茯苓 | Poria Cocos | 4.0 |
| 木香 | Aucklandiae Radix | 2.0 |
| 升麻 | Cimicifugae Rhizoma | 2.0 |
| 益母草 | Leonuri Herba | 2.0 |
| 甘草 | Glycyrrhizae Radix | 1.2 |
| 生薑 | Zingiberis Rhizoma Recens | 10.0 |
| 大棗 | Jujubae Fructus | 6.0 |
| 計 | | 55.2 |

2) 조제

본 연구에 사용된 시료는 가미귀비탕을 3차증류수로 열수추출한 후 감압농축 후 동결건조하여 사용하였다. 가미귀비탕 총 55.2g을 유리로 된 추출병에 넣고 증류수 2000 cc를 부어 시료가 충분히 잠기도록 하여 하루 동안 냉침한 다음 관류냉각장치에서 온도 100. C로 2시간 가열한 후 1차 전탕액을 얻었으며 증류수 1500cc를 넣고 1시간 가열 후 2차 전탕액을 얻었다. 1, 2차 전탕액을 혼합하여 filtering

하고 회전식 진공플라스크에 넣은 후 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축 후 동결건조기에서 가미귀비탕 15.61g을 얻었다. 그 후 powder를 10mg씩 e-tube에 넣고 D.W:MeOH = 1:1 비율(각 500 μ l씩)로 1ml를 넣어 10mg/ml를 만들었다.

3) 시약

Mushroom tyrosinase, L-3,4-dihydroxyphenyl alanine(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.

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

4) 세포주

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

5) 기기

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

2. 실험방법

1) Tyrosinase 활성 억제율 측정³¹⁾

Tyrosinase, DOPA를 phosphate buffer(67mM, pH 6.8)에 녹인다. 시료는 농도별로 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 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 $^{\circ}$ C에서 20분간 incubation한다.

생성된 DOPachrome의 양을 ELISA reader를 이용하여 490nm 영역에서의 흡광도를 측정하였다.

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

tyrosinase 활성 억제율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{억제율} = [(\text{대조군의 A490} - \text{시료의 A490}) / \text{대조군의 A490}] \times 100$$

2) Melanoma cell에서의 멜라닌 생성률과 세포 생존률 측정

(1) Melanoma cell의 배양

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

100 π tissue culture dish에 배지 10ml를 넣고 약 5 \times 10⁵개의 세포를 접종하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 환경 하에서 3~4일 후 confluent하게 자라면 24 well plate에 10⁵cells/well로 희석하여 재접종하고 24시간 배양하였다.

(2) 시료의 처리

well당 배지 1000 μ l를 매일 갈아주면서 농도별 시료(1, 10, 100ppm) 10 μ l를 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 1ml씩을 가한 후 수차례 pipetting하여 멜라닌을 녹인 후, 96 well plate에 멜라닌이 함유된 상층 배지 200 μ l를 이식하고서 400nm 영역에서의 흡광도를 측정하였다.

(4) 세포 생존률 측정

세포생존률을 측정하기 위해 배지를 제거한 후 PBS로 washing하였다. Crystal Violet 용액(CV 0.1%, 10% EtOH, 나머지 PBS) 200 μ l를 첨가하고 상온에서 5분간 incubation한 후 PBS로 2회 washing하였다. 95% EtOH 1ml를 첨가하고 상온에서 10분간 shaking한 후 96 well plate에 200 μ l를 이식하고서 590nm 영역에서의 흡광도를 측정하였다.

3) 자외선 차단효과 측정

Methanol에 시료 33.4 μ M을 녹이고 UV scanning을 시행하여 UVB(280-320nm)와 UVA(320~400nm)영역에서의 흡수도(absorbance)를 측정하였다.

대조군은 시료대신 methanol로 하였다.

4) 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 $^{\circ}$ C의 배양기에 공기 95%와 CO₂ 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 10⁵cells/ml의 농도로 희석하여 이식하였다.

(2) 시료와 hydrogen peroxide의 처리

3 \times 10⁴cells/well의 PC12 cell을 96 well plate에 분주하고 24~48시간동안 37 $^{\circ}$ C의 배양기에서 배양하였다. 배양액을 serum free media로 교체한 후 DPBS에 녹인 농도별 시료(1, 10, 100 μ g/ml)를 전처리하였다. 90분이 경과한 후 30% hydrogen peroxide를 DPBS에 희석하여 150 μ M의 농도로 처리하였다.

대조군은 시료대신 DPBS를 같은 부피로 투여하였다.

(3) MTT assay

세포생존율을 측정하기 위해 MTT reduction assay를 사용하였다.

PC12 cell을 분주한 96 well plate에 0.5mg/ml의 MTT 200 μ l를 넣고 4시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 여기에 isopropyl alcohol 100 μ l를 넣고 shaking plate에서 shaking하여 완전히 용해시킨 후, ELISA reader를 이용하여 570nm 영역에서의 흡광도를 측정하였다. 각 실험결과는 3회 반복실험한 결과의 평균치로 하였다.

(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 억제효과

대조군과 비교한 tyrosinase 활성 억제율을 살펴보면 가미귀비탕 추출물은 10 μ g/ml에서 1.99%, 50 μ g/ml에서 1.23%, 100 μ g/ml에서 4.56%, 500 μ g/ml에서 2.94%의 억제율을 보였고, 대조군인 Kojic acid는 10 μ g/ml에서 14.72%, 50 μ g/ml에서 68.79%, 100 μ g/ml에서 84.48%, 500 μ g/ml에서 98.53%의 억제율을 보였다. (Table 1, Fig. 1).

각 실험결과는 3회 반복 실험한 결과의 평균치로 하였다.

Table 1. Inhibitory Effects of Kamikwibi-Tang on Tyrosinase Activity

| concentration specimen | concentration | | | |
|------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| | 10 μ g/ml | 50 μ g/ml | 100 μ g/ml | 500 μ g/ml |
| Kamikwibi-Tang | 1.99 % | 1.23 % | 4.65 % | 2.94 % |
| Kojic acid | 14.72 % | 68.79 % | 84.48 % | 98.53 % |



Fig 1. Inhibitory effects of Kamikwibi-Tang on tyrosinase activity

2. Melanoma cell에서의 melanin 생성률과 세포 생존률에 미치는 효과

멜라닌 생성률을 살펴보면 가미귀비탕 추출물은 2ppm에서 105%, 20ppm에서 109%, 200ppm에서 123%의 생성률을 보였고, PTU는 2ppm에서 88%, 20ppm에서 54%, 200ppm에서 40%의 생성률을 보였다. (Table 2, Fig. 2, 3).

세포생존률을 살펴보면 가미귀비탕 추출물은 2ppm에서 98%, 20ppm에서 96%, 200ppm에서 84%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 2. Effects of Kamikwibi-Tang(mean) on Melanin Production and Melanoma Cell Viability in the Melanoma B16 Cell

| specimen | concentration (ppm) | melanin production | cell viability |
|----------------------|---------------------|--------------------|----------------|
| | | (%) | (%) |
| Kamikwibi-Tang | 2 | 105 | 98 |
| | 20 | 109 | 96 |
| | 200 | 123 | 84 |
| PTU (phenylthiourea) | 2 | 88 | 92 |
| | 20 | 54 | 86 |
| | 200 | 40 | 92 |

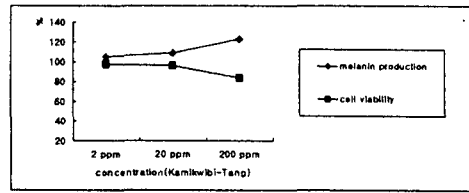


Fig 2. Effects of Kamikwibi-Tang on melanin production and melanoma cell viability.

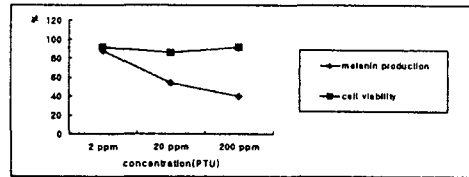


Fig 3. Effects of PTU on melanin production and melanoma cell viability.

3. 자외선 차단효과

100μg/ml 농도로 UV-B영역(270~290nm)과 UV-A 영역(350~370nm)에서의 흡수도를 측정한 결과 가미귀비탕 추출물은 UV-B 와 UV-A영역에서 유의적인 흡수 피크를 나타내지 않았다(Fig 4).

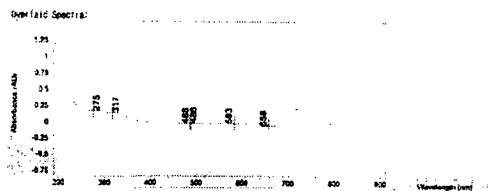


Fig 4. UV spectrum of Kamikwibi-Tang.

4. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 cell 손상에 대한 항산화효과

현미경적 관찰 결과 cell morphology상 hydrogen peroxide를 처리한 군은 정상군에 비하여 심하게 PC12 세포수가 감소하였고, 불규칙한 형태의 변형을 보였다. MTT assay 상으로 PBS를 투여한 대조군에서 44.1±3.4%의 세포생존율을 보인 반면 가미귀비탕 메탄추출물은 0.1, 1, 10, 50 μg/ml에서 각각

130.4±6.9%, 117.9±6.8%, 122.3±2.9%, 130.2±6.3% (N.S)의 세포생존율을 보였다. 전체 농도에 걸쳐서 세포보호 작용을 하면서 세포를 증식시키는 유의한 효과를 보였다. (Table 3, Fig. 5)

Table 3. Cytoprotective Effects of Kamikwibi-Tang on PC12 Cells Injured by Hydrogen Peroxide

| specimen | concentration (μg/ml) | cell viability (%) | P-value* |
|----------------|-----------------------|--------------------|----------|
| D.W. | | 44.1±3.40 | 2.35E-13 |
| | 0.1 | 130.4±6.9 | 2.87E-7 |
| Kamikwibi-Tang | 1.0 | 117.9±6.8 | 4.21E-7 |
| | 10.0 | 122.3±2.9 | 2.33E-7 |
| | 50.0 | 130.2±6.3 | 3.93E-7 |

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

* (Values are means±S.E.M.)

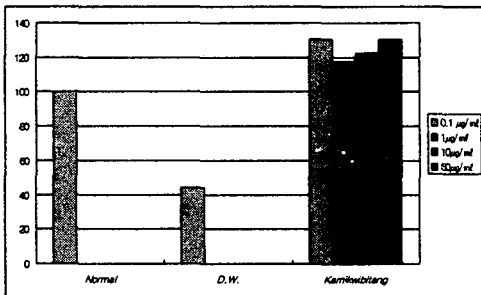


Fig 5. Cytoprotective effects of Kamikwibi-Tang on PC12 cells injured by hydrogen peroxide. (* P<0.00001)

고찰

피부가 자외선에 노출되어 나타나는 광노화와 연령증가에 따른 자연노화로 인한 피부색의 변화는 한의학에서 面塵⁶⁾, 面黑⁷⁾, 面黧黯⁸⁾, 雀斑⁹⁾, 黧黑斑⁹⁾ 등으로도 불리우며 임상에서 흔히 볼 수 있는 기미 (melasma), 주근깨(freckle), 검버섯(seborrheic keratosis) 등에 해당한다.

임상에서 기미는 대부분 가임기 여성에게서 호발한다. 햇빛 노출부위에 생기는 후천성 과색소침착

질환으로서 회갈색의 반점들이 주로 뺨, 이마, 윗입술, 코, 턱에 대칭적으로 생기며 자외선, 임신, 과로, 생리, 정신적인 스트레스 등이 원인이 되며 이로 인해 더욱 악화되는 경향이 있다. 젊은 사람의 피부는 신진대사가 활발하여 대략 4주정도 지나면 melanin은 각질형성세포를 형성하는 대사과정을 거쳐 탈락되어 원래의 피부색으로 돌아가게 되나 노화로 인한 신진대사의 둔화는 자외선에 의한 광노화와 더불어 기미의 원인으로 작용한다⁵⁾.

韓醫學的 病因으로 첫째 陽明之氣不足을 들었고⁶⁾, 둘째 風邪와 痰飲으로 氣血이 不和됨을 원인으로 보았으며⁴⁴⁾, 셋째 思慮過多로 인하여 脾胃를 傷하여 發生한다고 하였고⁷⁾, 넷째는 腎水不足으로 인한 虛火의 發生을⁹⁾, 다섯째는 熱을 주된 원인으로 파악하였다⁴⁵⁾.

역대문헌에서 미백과 관련하여 사용된 처방으로는 玉容散, 玉容丸, 犀角升麻丸, 玉肌散, 知柏地黃湯, 改容丸 등이 있으며, 약물로는 白芷, 熟地黃, 白附子, 密陀僧, 白茯苓, 白藜, 防風, 綠豆 등이 사용되었고¹⁰⁾, 약물에 사용된 副形劑는 麻油, 香油, 蜜, 酒, 陳米, 桐油, 猪油 糊 등이었다⁴⁶⁾.

피부색은 melanin, hemoglobin 및 carotene 3가지에 의해서 결정되는데 이중에서 가장 중요한 역할을 하는 것이 melanin이다. melanin의 주된 역할은 피부에서 발생하는 active oxygen이나 free radical을 제거하고, 자외선 투과를 막아 피부의 내부를 보호하는 것이다. 피부가 자외선에 노출되면 멜라닌 세포는 그 파장에 따라 두 가지 반응을 보이는데, UVA 또는 visible light에 의한 즉시형 색소침착과 UVB와 UVA에 의한 지연형 색소침착이 발생한다. 전자는 멜라닌 세포의 수나 효소 활성도, 멜라닌 소체의 합성 없이 멜라닌의 산화에 의해 발생하며 후자는 멜라닌 세포수의 증가, 새로운 멜라닌의 합성, 효소활성의 증가, 새로운 멜라닌 소체의 합성과 각질형성 세포로의 전이 촉진에 의해 발생하게 된다. 자외선 외에도 멜라닌세포자극호르몬, 부신피질자극호르몬, estrogen, lipotropin, thyroxine, androgen 같은 호르몬

도 멜라닌 세포를 자극하는 작용이 있다⁵⁾.

melanin을 만드는 출발물질은 인체 내에 정상적으로 존재하는 아미노산의 일종인 tyrosine이다. tyrosine은 melanin 세포 내에서 tyrosinase⁴⁷⁾라는 효소에 의해 산화되어 DOPA(dihydroxy phenylalanine)⁴⁸⁾로 전환되고 DOPA는 다시 tyrosinase의 산화작용으로 DOPA quinone으로 바뀐다. DOPA quinone은 이후 자동 산화반응을 거쳐 최종적으로 흑갈색의 eumelanin을 만들어 낸다. 한 편 DOPA quinone이 cysteine과 만나게 되면 cysteinyl DOPA가 만들어지고 그 결과 적갈색의 pheomelanin이 만들어진다⁴⁹⁾. 이후 생산된 melanin은 melanosome에 실려 각질형성세포로 전달되고 최종적으로 각질로 분리되어 탈락된다. 이러한 melanin이 비정상적으로 적게 생산되면 백반증과 같은 피부 병변이 유발되며, 반대로 과잉으로 생산될 경우 기미, 주근깨를 형성한다. 따라서 초기의 미백제는 tyrosinase에 의한 tyrosine의 산화억제기능에 초점이 맞추어져 있었고, in vitro에서 tyrosinase 활성 억제제를 선별하는 것이 중요한 미백제 개발수단이었다^{50,51)}.

현재 응용되고 있는 미백제제의 기전은 다양하다. 자외선 차단, 활성산소의 제거, 멜라닌 생성의 주요 효소인 tyrosinase의 활성 억제, 멜라닌 색소의 환원, tyrosinase의 합성저해제, 표피내 멜라닌 탈락 촉진제(placenta extract) 등이 알려져 있다⁵²⁾.

미백과 관련된 연구들을 살펴보면 자외선 차단에 대해서는 titanium dioxide⁵³⁾ 등에 관한 연구, DOPA 산화 억제에 대해서는 vitamin C⁵⁴⁾ 등에 관한 연구가 있고, tyrosinase 활성 억제에 대해서는 kojic acid^{17,20)}, arbutin²¹⁾, transforming growth factor-β1⁵⁵⁾, 뽕나무가지²⁸⁾,甘草²²⁾ 등에 관한 연구가 있고, 각질층 제거 촉진에 대해서는 retinoic acid²³⁻²⁵⁾ 등에 관한 연구가 있다. 이외에도 hydroquinone, sulfur, azelaic acid, ascorbic acid 등이 사용되고 있으나 이들 중 대부분의 것은 효과가 불충분하거나 체형상 불완전한 면이 있고, 피부에 대한 안전성 측면에서 그 사용이 제한되고 있다⁵⁰⁾.

천연물의 미백효과에 대한 한의학계의 연구를 살

펴보면, 뽕나무가지²⁸⁾, 감초²²⁾, 麻黃 및 摩風膏¹¹⁾, 瀉白散¹²⁾, 加減西施玉容散¹³⁾, 鹽, 醋, 香油⁴⁾, 보리, 현미, 울무¹⁵⁾, 알로에, 녹차, 꿀¹⁶⁾ 등에 대해서 이루어졌는데, 이¹¹⁾는 복합제재인 摩風膏보다 구성 본초 單味인 麻黃이 tyrosinase 활성 억제효과가 뛰어나며 특히 한약재의 amino acid, vitamin B1, alkaloid, glycoside 및 식물성 hormone 등의 성분이 피부의 신진대사를 촉진하고 피부면역력을 증가시키며 피부노화를 방지하는 작용이 있다고 보고하였고, 김¹²⁾과 손¹³⁾은 복합제재인 瀉白散, 加減西施玉容散이 각각 농도의존적인 tyrosinase 활성 억제효과를 보인다고 보고하였다. 조¹⁴⁾는 한방외용제에 다용되는 鹽, 醋, 香油의 미백효과에 관한 검증 결과 개개의 미백효과가 미약함을 보고하였고, 이¹⁵⁾는 보리, 현미, 울무가 저농도에서 농도의존적으로 tyrosinase 활성억제효과가 있음을 보고하였고, 한¹⁶⁾은 알로에는 농도의존적으로 tyrosinase 활성억제효과와 약간의 자외선 차단효과가 있었으며, 녹차는 약간의 자외선 차단효과만 인정되었다고 보고하였다.

최근 경제발전에 따른 피부미용에 대한 관심과 욕구는 증가하고 환경오염으로 인한 오존층의 파괴로 피부는 예전보다 자외선에 더 많이 노출되면서 미백제품에 대한 수요는 증가하고 있다. 과거에는 화학적으로 합성된 물질에서 화장품이 연구 개발되었으나, 화학합성 화장품은 부작용과 과민반응을 나타내기 쉽다. 최근의 연구동향을 살펴보면 미백이나 항노화 등의 기능성 화장품 개발에 식물추출물 등 천연물의 원료 개발이 주류를 이루고 있다^{51,57)}. 이에 따라 미백제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 우리나라에서도 보건복지부 차원에서 미백제 개발을 지원하여 이와 관련한 보건의료기술연구개발 사업^{50,51,56-59)}이 진행되고 있다.

한약복합제제에 대한 미백연구로는 麻黃 및 麻風膏의 미백효과에 관한 연구¹¹⁾와 瀉白散의 미백효과검정에 관한 연구¹²⁾와 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구¹³⁾ 등이 있으나, 그 외에는 한약복합제제의 미백효과에 관한 연구는 아직 활발히 이루어지

지 않고 있는 실정이다. 이에 본 연구의 목적은 효과적인 미백제 개발에 있어 한약복합제제가 이용되는 데 기초가 되기 위함이다. 기존의 미백작용이 있다고 알려진 處方들 이외에 피부 착색의 原因중에서 內的因子인 과로, 정신적인 스트레스를 개선시키는 抗stress, 抗疲勞³³⁻³⁸⁾이 입증된 귀비탕가미방의 미백효과를 알아보았다.

歸脾湯은 濟生方³⁹⁾, 世醫得效方⁴⁰⁾, 校註婦人良方⁴¹⁾, 東醫寶鑑⁴²⁾ 神門, 方藥合編⁴³⁾ 등에 수록되어 있는데, 宋代 嚴用和의 《濟生方》에 최초로 수록된 處方으로 思慮過나 勞倦으로 心脾兩虛되어서 나타나는 失眠, 心悸, 健忘, 怔忡을 치료할 목적으로 立方되었으며, 元代的 危亦林은 《世醫得效方》에서 《濟生方》의 주치증 외에 脾가 손상되어 血을 統攝하지 못하여 發生하는 吐血, 下血, 崩漏, 帶下 등에 활용하였고, 明代的 薛己는 《校註婦人良方》에서 當歸와 遠志를 加하여 驚悸, 怔忡, 心脾作痛, 嗜臥, 少食, 大便不調, 肢體重痛과 思慮로 脾가 손상되어 發生한 瘧疾과 痢疾의 치료에도 사용한다고 하였다. 《東醫寶鑑 神門》에서는 治憂思勞傷心脾健忘怔忡라 하였다.

피부에 대한 언급으로는 《方藥合編 面部》에 色慾過用, 疲勞 등으로 인하여 肝, 腎, 肺 등이 陰虛해진 탓으로 얼굴이 붓는 陰虛面浮의 경우에 쓴다고 하였다.

歸脾湯에 대한 실험으로는 백³³⁾의 加味歸脾湯이 흰쥐의 위궤양에 미치는 영향, 유³⁴⁾의 歸脾湯과 Ascorbic Acid가 熱 및 遊泳Stress Guinea Pig의 腦 Catecholamine 함량에 미치는 영향, 박³⁵⁾의 歸脾湯 및 歸脾湯加味方이 마우스의 과민반응 및 면역세포의 기능에 미치는 영향, 박³⁶⁾의 歸脾湯의 항피로효능에 관한 연구, 오³⁷⁾의 歸脾湯의 五志相乘位置效果에 관한 실험적 연구, 이³⁸⁾의 熱stress 및 遊泳stress에 대한 歸脾湯과 Ascorbic acid의 항stress 효능 비교연구 등이 있다.

이들 연구들은 歸脾湯이 피부 착색의 原因중에서 內的因子인 과로, 정신적인 스트레스를 개선시키는

抗stress효과와 抗疲勞효능이 있음을 시사한다.

이에 피부 색소침착의 原因중에서 內的因子인 과로, 정신적인 스트레스를 개선시키는 抗stress효과와 抗疲勞효능이 입증된 歸脾湯의 加味方이 색소침착의 原因을 조절하는데 응용이 가능할 것으로 기대되어 가미귀비탕을 대상으로 연구하게 되었다.

加味歸脾湯 추출물에 대하여 피부 melanin 생성 억제효과를 tyrosinase와 B16 melanoma cell line에서 검색하였으며, 또한 자외선 차단 여부와 Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 세포손상에 대한 항산화효과에 대하여 알아보았다.

Tyrosinase 활성도의 평균치를 대조군과 비교한 결과, 加味歸脾湯 추출물은 tyrosinase 활성 억제정도가 매우 미약하게 나타내었으며, tyrosinase 활성 억제기전에는 작용하지 않는 것으로 생각된다.

Melanoma cell에서의 멜라닌 생성률과 세포 생존률에 미치는 효과를 검증한 결과, 加味歸脾湯 추출물은 melanin 생성을 억제하지는 못했지만, 200ppm 농도에서의 84%의 세포 생존률은 낮은 세포독성을 나타내는 유의한 결과를 보였다.

UV spectrum을 분석한 결과, 加味歸脾湯 추출물은 대조군과 비교하여 측정된 UV-A와 UV-B영역에서 모두 유의적으로 자외선을 흡수하지 않았다.

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 cell 손상에 대한 항산화효과를 검증한 결과, 대조군에서 44.1±3.4%의 세포생존율을 보인 반면 加味歸脾湯 메탄올추출물은 0.1, 1, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 130.4±6.9%, 117.9±6.8%, 122.3±2.9%, 130.2±6.3%의 세포생존율로 유의한 항산화효과를 보여 주었다.

이상의 결과는 가미귀비탕 추출물이 임상에서 피부질환에 다용되는 처방이나 tyrosinase를 억제하여 melanin을 줄이는 기전에는 작용하지 않은 것으로 생각된다. 하지만 세포생존율에서의 유의성과 항산화 효과면에서는 오히려 세포를 증식시키는 작용을 하는 것으로 보아서는 melanin형성과정에서의 다른 기전에 적용할 부분이 있을 것이고, 加味歸脾湯이 임상에서는 內服된다는 점에서 생체대사기능을 조

절하고 개선함으로써 미백에 작용한다고 볼 수 있다. 加味歸脾湯을 melanin형성과정에서의 다른 기전에 적용하여 실험하거나 쥐의 색소세포 수준에서의 멜라닌 생성억제에 관한 실험 등으로 생체기능의 활성화를 통한 미백소재로서의 가능성을 연구해 볼 필요가 있다고 생각된다.

결론

加味歸脾湯 추출물의 미백효과를 tyrosinase 활성 억제도, melanoma B16 cell에서의 세포 독성 및 melanin 생성량 측정, UV-A, B 영역에서의 흡수도 측정 등의 방법을 통해 검색하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味歸脾湯 추출물은 mushroom tyrosinase 활성을 억제하였으나 positive control에 비하여 억제정도가 매우 미약하였다.
2. 加味歸脾湯 추출물은 melanoma B16 세포에서 melanin 생성을 억제하지는 못했지만 세포독성은 없었고 세포생존율에서는 유의한 결과를 보였다.
3. UV-A 와 UV-B 영역에서의 加味歸脾湯 추출물의 흡수도를 측정한 UV-A와 UV-B영역에서 모두 자외선을 유의성있게 흡수하지 않았다.
4. 加味歸脾湯의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 세포손상에 대한 항산화 효과를 관찰한 결과, 대조군에서 44.1±3.4%의 세포생존율을 보인 반면 加味歸脾湯 메탄추출물은 0.1, 1, 10, 50 µg/ml에서 각각 130.4±6.9%, 117.9±6.8%, 122.3±2.9%, 130.2±6.3%의 세포생존율로 유의한 효과를 보였다.

참고문헌

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

2. Mshima Y, Kondoh H, Harae S. Overview for development of future innovative skin whitening agents. Fragrance J. 1996;24:13.
3. Qiu F, Komatsu K, Saito K, et al. Pharmacological properties of traditional medicines. XXII. Pharmacokinetic study of mulberroside A and its metabolites in rat. Biol Pharm Bull. 1996;19(11):1463-1467.
4. 하병조. Cosmeceuticals, 서울:신광출판사, 2001; 66-96.
5. 대한피부과학회 간행위원회. 皮膚科學, 서울:여문각, 2001;8-9, 133, 409, 553-5.
6. 洪元植. 精校 黃帝內經素問. 서울:동양의학연구원 출판부. 1985;11,295-296.
7. 樓英. 醫學綱目. 서울:대성문화사. 1986;1081.
8. 李梴. 編註醫學入門(雜病篇). 서울:대성문화사. 1990;29,224.
9. 陳實功. 外科正宗. 上海:上海科學技術出版社. 1989;290,298.
10. 박인기, 김경준. 雀斑에 관한 文獻的 考察. 東醫學會誌. 2001;5(1):139-66.
11. 이상희. 麻黃 및 摩風膏의 美白效果에 관한 研究. 경희대학교 동서의학대학원 석사학위논문. 2001.
12. 김성각. 瀉白散의 미백효과 검증에 관한 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 2000.
13. 손동석, 김윤범. 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구. 대한안ibi인후피부과학회지. 2002;15(2):104-117.
14. 조재훈, 김혜정, 김윤범. 염(鹽), 초(醋), 향유(香油)의 미백효과에 관한 연구. 대한안ibi인후피부과학회지. 2003;16(2):79-95.
15. 이태헌, 김혜정, 김윤범. 보리, 현미, 울무의 미백효과에 관한 연구. 대한안ibi인후피부과학회지. 2003;16(2):57-78.
16. 한은정. 알로에(蘆薈), 녹차(綠茶), 꿀(蜂蜜)의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 2003.

17. 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.
18. 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.
19. Lim JT. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. *Dermatol Surg.* 1999;25(4):282-4.
20. 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.
21. 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.
22. Yokota T, Nishio H, Kubota Y, et al. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Research.* 1998;11(6): 355-361.
23. Griffiths. Topical tretinoin(retinoic acid) treatment of hyperpigmented lesions associated with photoaging in Chinese and Japanese patients-A vehicle controlled trial. *Am Acad Dermatol.* 30:76-84
24. Joachim RG. Increased expression of protein kinase C-alpha plays key role in retinoic acid-induced melanoma differentiation. *J Biol Chem.* 1992;267:13356-13360.
25. Yoshimura K, Tsukamoto K, Ozaki M, et al. 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.
26. Hideaki M. Studies of Cuticle Drugs from Natural sources. IV. Inhibitory Effects of Some Arctostaphylos Plants on melanin Biosynthesis. *Biol Pharm Bull.* 1996;19(1):153-156.
27. Tsuruga T, Chum YT, Ebizuka Y, et al. Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*-inhibitors of induced histamine release from rat mast cells. *Chem Pharm Bull.* 1991;39(12):3276-3278.
28. 이정훈, 박준홍, 이종석, 황규왕. 뽕나무가지 추출물의 melanin 생성 억제효과. *대한피부연구학회지.* 2001;8(2):86-90.
29. 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.
30. 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.
31. Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M. Depigmenting effect of alpha-tocopheryl ferulate on normal human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 2000;Suppl 8:1704.
32. Ichihashi M, Funasaka Y, Ohashi A, et al. The inhibitory effect of DL-alpha-tocopheryl ferulate in lecithin on melanogenesis. *Anticancer Res.* 1999;19(5A):3769-74.
33. 백동진. 加味歸脾湯이 흰쥐의 위궤양에 미치는 영향. *한의학회지.* 1996;17(2):277-290.
34. 유재규. 歸脾湯과 Ascorbic Acid가 熱 및 遊泳 Stress Guinea Pig의 腦 Catecholamine 함량에 미치는 영향. *東醫神經精神科學會誌.* 1995;6(1):41-50.
35. 박은정, 정구만. 歸脾湯 및 歸脾湯加味方이 마우스의 과민반응 및 면역세포의 기능에 미치는 영향. *大韓韓醫學會誌.* 1990;11(2):149-69.
36. 박재우. 歸脾湯의 항피로효능에 관한 연구. *한방성인병학회지.* 2000;6(1):162-173.
37. 오상훈. 歸脾湯의 五志相乘位置效果에 관한 실험적 연구. *고향논집.* 1988;3:235-260.
38. 이화신. 熱stress 및 遊泳stress에 대한 歸脾湯과 Ascorbic acid의 항stress 효능 비교연구. *東醫神經精神科學會誌;* 1995;6(1):19-39.
39. 嚴用和. 嚴氏濟生方, 北京:人民衛生出版社. 1980;117.

40. 薛己. 薛氏醫案(文淵閣本)(卷1), 서울:麗江出版社. 1986;27.
41. 危亦林. 世醫得效方(文淵閣本)(卷7), 서울:麗江出版社. 1986;36-37.
42. 許俊. 東醫寶鑑, 서울:南山堂. 1995;47.
43. 黃度淵. 方藥合編, 서울:南山堂. 1988;197.
44. 巢元方. 巢氏諸病源候論, 서울:대성문화사. 1992;200.
45. 程國彭. 醫學心悟, 香港:友聯出版社. 1961;290.
46. 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.
47. Hearing VJ. Mammalian tyrosinase. *Int J Biochem.* 1987;19(12):1141-1147.
48. Skoninski A, Mellman G, Kuklinska E. Tyrosine, L-dopa and tyrosinase as positive regulators of the subcellular apparatus of melanogenesis in Abnormal melanoma cells. *Pigment Cell Res.* 1989;2:109-16.
49. Acroca P, Garcia-Barron 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;208:155-163.
50. 이승호. 천연물로부터 피부멜라닌 생성억제제의 개발. 보건의료기술연구개발사업최종보고서. 2002.
51. 이병근. 천연유래의 멜라닌생성 억제물질 선별 및 이를 이용한 기능성 미백화장품 개발. 보건의료기술연구개발사업최종보고서. 2002.
52. 이현호. 최근 미백화장품의 개발동향. 대한화장품학회지. 1997;23(1):43-56.
53. Jens-Michael Schroder. Cytokine networks in the skin. *J Invest Dermatol.* 1995;105:20-4.
54. 하병조. 화장품학. 서울:수문사. 1999;92-4
55. Martinez-Espaza M, Fener C, Castells M et al. 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.
56. 강원형. 피부 신호전달을 이용한 미백제 개발. 보건의료기술연구개발사업최종보고서. 2001.
57. 김영대. 21세기의 화장품 연구방향. 대한화장품학회지. 1993;4:8-39.
58. 박경찬. 인공피부와 인공피부모델의 개발. 보건의료기술연구개발사업최종보고서. 2002.
59. 임성빈. 기미의 병태생리 및 치료제개발에 대한 연구-여성 호르몬이 melanocyte에 미치는 영향을 중심으로. 보건의료기술연구개발사업최종보고서. 2002.