

인진쑥 물추출물의 조다당체에 의한 Melanin 생성억제 효과

천현자[#] · 안병용 · 한종현 · 우원홍

원광대학교 한의학 전문대학원

(Received September 19, 2001; Revised November 1, 2001)

Inhibitory Effects of Crude Polysaccharide of Water Extract of *Artemisia iwayomogi Kitamura* on Melanin Biosynthesis

Hyun Ja Chun[#], Byung Yong Ahn, Jong Hyun Han and Won Hong Woo

[#]Professional Graduate School of Oriental Medicine,
Won Kwang University, Iksan, 570-749, Korea

Abstract — Melanogenesis is a physiological process resulting in the synthesis of melanin pigment. We investigated the inhibitory effect of crude polysaccharide of water extract of *Artemisia iwayomogi Kitamura* (AI) on melanin biosynthesis in B16/F10 melanoma cells. Crude polysaccharide of water extract of *Artemisia iwayomogi Kitamura* significantly inhibited tyrosinase activity and melanin contents with or without α -MSH *in vitro*. Melanin contents and tyrosinase activity were decreased in a dose-dependent manner. These results show that crude polysaccharide of water extract of *Artemisia iwayomogi Kitamura* could be developed as skin whitening components of cosmetics.

Keywords □ *Artemisia iwayomogi Kitamura*(AI), melanin biosynthesis, tyrosinase, α -MSH, retinoic acid (RA), arbutin

체내 · 외적인 여러 요인에 의해 멜라닌 생성이 증가되어 다량의 멜라닌이 각질형성세포에 전달되고 피부 상피층에 축적되어 과색소침착 현상이 나타난다.¹⁾ Tyrosinase는 페놀화합물을 기질로 이용하는 구리 함유 polyphenol dioxidase 효소로서 멜라닌 중합체를 생합성하는데 중요한 역할을 하므로 멜라닌 세포에서의 tyrosinase 활성은 피부의 멜라닌 생성에 결정적인 영향을 미치게 된다.²⁾ 이러한 멜라닌 합성에 관여하는 유전자는 현재 150여 종류가 알려져 있으며, 멜라닌 색소의 소멸이나 증가 및 이상 분포 등은 백피증이나 백반증 등의 피부질환을 유발하고, 에디슨병(Addison's disease)은 반대로 부신피질에서 코티솔의 생성이 억제되어 부신피질 자극호르몬이 과잉 생산됨으로써 색소 침착을 증가시키기도 한다.³⁾ 이러한 피부의 색소이상

을 보이는 피부질환은 많은 치료연구에도 불구하고 만족할 만한 안전한 치료약제가 미흡한 상태이다.

쑥은 국화과(compositae)에 속하는 다년생 초본류로 약 400여 종의 *Artemisia*속 식물 중 300여 종이 우리나라에 자생하는 것으로 추정되고 있지만 실제 보고된 것은 40 종 내외이다.⁴⁻⁵⁾ 약효가 있는 쑥의 종류가 다양하며 많은 쑥이 각각 고유한 약효가 있다고 믿어지나 그 중 동북아시아 지역에서 잘 알려진 인진쑥에 대한 약리적 연구가 활발한 편이다.⁶⁾ 인진쑥(*Artemisia iwayomogi Kitamura*)은 전국 각지의 산비탈이나 빈터에서 잘 자라며 줄기는 뭉쳐나고 하부는 목질화하므로 반관목상인데, 생약명으로는 인진, 백호, 석인진이라고도 일컬어진다.⁶⁻⁷⁾

인진쑥의 약리적 효과에 대한 연구로는 인진쑥의 에탄올 추출물이 고혈압, 비만, 뇌졸중 등 순환기계 질환의 치료 및 예방에 효과가 있으며, 간 기능의 보호효과도 있는 것으로 보고되었다.⁸⁻⁹⁾ 함¹⁰⁾ 등은 인진쑥의

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 063-850-6938 (팩스) 063-850-6840

에탄올 추출물이 항암효과가 좋음을 보고하였고, 배¹¹⁾ 등은 메탄올 추출물이 항암작용을 나타낸다고 하였다. 그밖에 인진쑥으로부터 추출한 정유성분이 담즙산 분비를 촉진하는 사실도 밝혀졌다.¹²⁾ 한편 Kimura¹³⁾ 등은 인진쑥 메탄올 추출물이 GOT와 GPT의 증가를 억제함을 밝혔다. 최근에 Park¹⁴⁾ 등은 물추출물의 에탄올 수용층이 간 손상과 간의 지질과산화를 억제한다는 연구결과를 보고하였다. Lim¹⁵⁾ 등은 인진쑥 에탄올 추출물이 항산화성이 크다고 보고하였다. 이와 같은 많은 연구에도 불구하고 멜라닌 세포의 멜라닌화와 관련된 연구는 거의 찾아볼 수 없다.

본 연구팀에서는 피부의 멜라닌 생성에 관련된 한약재의 연구 및 멜라닌 생성 메커니즘을 규명함으로써 피부질환 치료 및 미백제 개발을 목적으로 한 여러 한약재들에 대한 연구를 진행해 오고 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 이에 본 연구는 미백효과에 미치는 인진쑥의 영향을 조사하고자 인진쑥 조다당체를 B16/F10 melanoma 세포에 처리하여 세포의 형태적 변화, 세포수의 변화, 멜라닌 양 및 tyrosinase 활성도를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험방법

검액조제 - 본 연구에 사용한 인진쑥은 국내산으로써 전주시에 소재한 한국생약협회의에서 구입하여 3 mm 크기로 파쇄하여 사용하였다. 조다당체를 분리하기 위하여 시료에 10배(w/v)의 95% 에탄올을 가하여 37°C에서 24 시간 2회 추출한 후 건조시킨 시료에 10배(w/v)의 증류수를 가하여 75(±3)°C에서 5시간 동안 수조에서 추출하였다. 다당체와 비다당체는 75% 에탄올에 용해시켜 가용성 및 불용성 분획물(다당체)로 분리한 후 감압농축 및 동결 건조하였다.¹⁹⁾ 시료는 증류수에 녹인 후, 세포에 투여하기 전 0.22 µm pore 여과지로 여과 멸균하여 농도를 조정하여 다음 사용하였다.

세포배양 - B16/F10 melanoma 세포는 CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% fetal bovine serum (Gibco. Co.)이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 여기에 penicillin-streptomycin(Sigma Chemical Co., USA) 100 I.U.~100 µg/ml를 첨가하였으며, 약 24 시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하였다.

MTT Assay - MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 정량은 Mosmann의

방법²⁰⁾을 변형하여 실시하였다. 세포를 48 시간 배양한 후 상층액을 버리고 당일 제조한 500 µg/ml MTT를 배양 용기당 1 ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3 시간 동안 배양하였다. 살아 있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10% DMSO를 200 µl씩 넣고 15 분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

Trypan blue 검사 - 대조군과 실험군의 각 well에 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액을 가하여, 각 well에서 세포를 분리 수거하였다. 이 분리 수거한 세포를 PBS로 2회 세척한 후 0.02 ml와 동량의 0.4% (w/v) trypan blue를 잘 섞은 다음 hemocytometer에 넣고 광학현미경을 이용하여 trypan blue에 염색되지 않은 살아 있는 세포수를 측정하였다.

멜라닌 양 측정 - 멜라닌 양은 Hosoi²¹⁾ 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 2회 세척한 후 원심분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 200 µl 첨가하고 80°C에서 1 시간 동안 용해하였으며, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌(Sigma Co.)을 사용하여 작성된 표준 직선에서 구하고, 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하였다.

Tyrosinase 활성도 측정 - Tyrosinase 활성도는 Matinez-Esparza²²⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 각 well의 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 만들고, 100 µl의 lysis buffer(1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, 0.1 mM PMSF(phenyl methyl sulfonyl fluoride)를 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소 용액으로 사용하였다. 100 mM sodium phosphate (pH 7.0) 용액 100 µl에 시료인 효소용액 50 µl를 가하고 37°C에서 5 분간 보온하였다. 100 mM catechol 50 µl를 넣은 후 ELISA reader로 37°C, 405 nm의 조건에서 흡광도의 변화를 1 시간 동안 관찰하였다.

통계방법 - 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 이용하였다.

실험결과 및 고찰

인진쑥이 세포증식에 미치는 영향 - 인진쑥 조다당체가 B16/F10 melanoma 세포의 증식에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 인진쑥 조다당체를 1 µg/ml에서 100 µg/ml까지 다양한 농도로 처리하고, 48 시간 후에 MTT 방법으로 세포의 증식을 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 인진쑥 조다당체에 의한

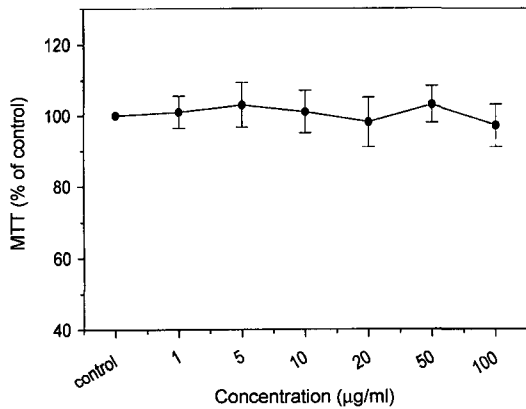


Fig. 1 - Effect of crude polysaccharide of water extract of *Artemisia iwayomogi Kitamura*(AI) on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of AI for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as absorbance and data were mean ± SD of at least five determinations.

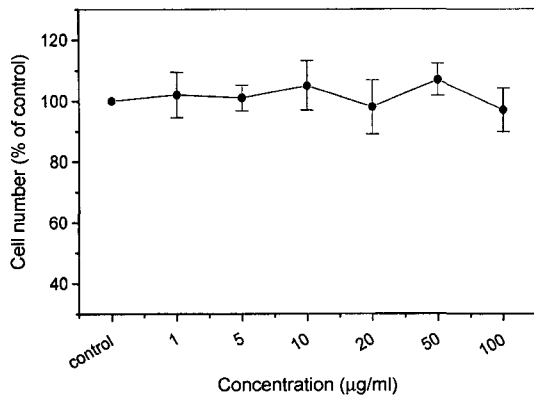


Fig. 2 - Effect of crude polysaccharide of water extract of *Artemisia iwayomogi Kitamura*(AI) on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of AI for 48 h. The viability of the cells was measured by Trypan blue test. Results were expressed as absorbance and data were mean ± SD of at least five determinations.

세포 증식은 최고 100 µg/ml 처리시에도 유의할만한 변화를 나타내지 않았다. 인진쑥 조다당체를 처리하고 세포수를 조사해본 결과 세포수가 약간 증가하는 경향을 보였으나 유의성 있게 나타나지는 않았다(Fig. 2). 따라서 이 농도 범위에서 인진쑥 조다당체는 독성이 없는 것으로 사료되어 이 농도 범위에서 실험을 실시하였다.

α-MSH가 B16/F10 Melanoma 세포의 멜라닌화에 미치는 영향 - α-MSH(melanocyte stimulating hormone)는 생체내 멜라닌 합성에 관여하는 물질 중 하나로서 뇌하수체에서 분비되며 3-isobutyl-1-methyl-xanthine(IBMX), forskolin, dibutyryl cAMP와 마찬가지로 cAMP 의존형 신호전달 경로인 PKA(cAMP-dependent protein kinase)경로로 멜라닌화를 자극하는 것으로 알려져 왔다.

인진쑥 조다당체가 B16/F10 melanoma 세포의 멜라닌화에 미치는 영향을 조사하기 전에 α-MSH에 의한 영향을 먼저 조사하였다. B16/F10 melanoma 세포를 24 시간 배양한 후 α-MSH를 다양한 농도로 처리하고 48 시간 배양한 다음 tyrosinase의 활성도와 멜라닌 생성을 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 α-MSH 처리군이 대조군에 비하여 모두 의미 있게 tyrosinase 활성도의 증가를 보였다(p<0.05). 이것은 배양된 인체

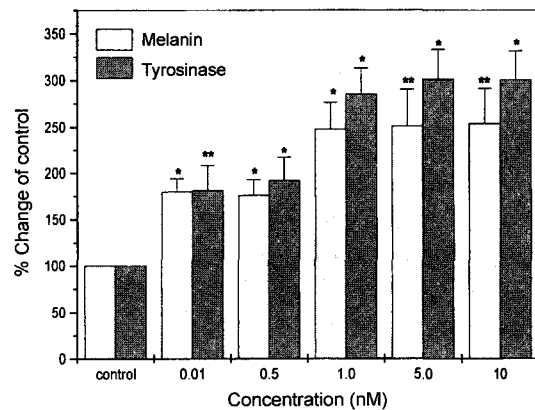


Fig. 3 - Effect of α-MSH concentration on melanin contents and tyrosinase activity in B16/F10 melanoma cells. Cells were seeded at 1P105 cells/well. After the treatment of α-MSH for 48 h, melanin content and tyrosinase activity were measured at 405 nm. Results were expressed as % control and data were mean ± S.D of at least five determinations. *significantly different from control group (*p<0.01, **p<0.05).

멜라닌세포에 α -MSH를 처리하여 세포내 신호전달 물질인 cAMP의 증가와 tyrosinase 활성도가 증가되었다는 Ranson²³⁾의 연구보고와 일치하고 있다.

α -MSH에 의한 멜라닌 생합성과정은 α -MSH가 세포막에 존재하는 수용체와 결합하여 adenylate cyclase가 활성화되어 세포내 cAMP를 증가시키고, 증가된 cAMP에 의하여 PKA가 활성화되며 그 후 일련의 과정을 거쳐 tyrosinase가 활성화됨으로써 멜라닌화가 진행되는 것으로 설명할 수 있다.²⁴⁾

인진쑥이 멜라닌화에 미치는 영향 - 멜라닌 생합성 과정의 주된 효소인 tyrosinase는 생체내에서 tyrosine으로부터 3,4-dihydroxy phenylalanine(DOPA)과 DOPA quinone을 거쳐 최종적으로 멜라닌 고분자를 생합성하는데 관여하는 효사이므로 멜라닌 세포에서의 tyrosinase 활성은 피부 멜라닌 생성에 결정적인 영향을 미치게 된다.²⁾ 인진쑥이 B16/F10 melanoma 세포의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 밝히기 위하여 인진쑥 조다당체를 1 μ g/ml에서 100 μ g/ml의 다양한 농도로 처리하고 48 시간 배양한 다음 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 인진쑥 조다당체의 첨가량이 증가함에 따라 대조군에 비하여 실험군에서 모두 통계적으로 유의성 있게 감소하였다.

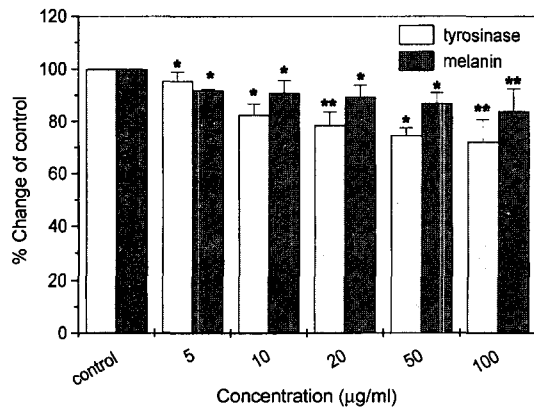


Fig. 4 - Inhibitory effect of crude polysaccharide of water extract of *Artemisia iwayomogi Kitamura*(AI) on melanin contents and tyrosinase activity in B16/F10 melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After the treatment of AI for 48 h, melanin content and tyrosinase activity were measured at 405 nm. Results were expressed as % control and data were mean \pm SD of at least five determinations.

significantly different from control group ($p < 0.01$, ** $p < 0.05$).

생체에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고 다시 L-dopaquinone으로 산화시키는 연속적인 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이루어진다.²⁵⁾

인진쑥 조다당체가 *in vitro*에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정된 결과 tyrosinase 활성도와 마찬가지로 인진쑥 처리군 모두가 대조군에 비하여 의미 있게 감소하였다. 인진쑥 처리군들의 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성을 비교해 볼 때 tyrosinase 활성도가 멜라닌 생성에 비하여 더 많이 감소하는 경향을 보였다. 이것은 인진쑥 조다당체를 처리함으로써 B16/F10 melanoma 세포 내에서 tyrosinase가 비활성화되어 tyrosinase 활성을 감소시키지만, 최종산물인 멜라닌의 반응경로는 여러 단계이므로 다른 요인들에 의해 감소율이 낮아질 것으로 사료된다.

α -MSH에 의한 멜라닌 생성에 미치는 인진쑥의 영향 - 인진쑥이 B16/F10 melanoma 세포의 고유 멜라닌 합성의 억제에 관여한다는 것을 Fig. 4의 결과를 통하여 알았다. α -MSH와 같은 외부자극에 의해 유발되는 B16/F10 melanoma 세포의 멜라닌 생성에

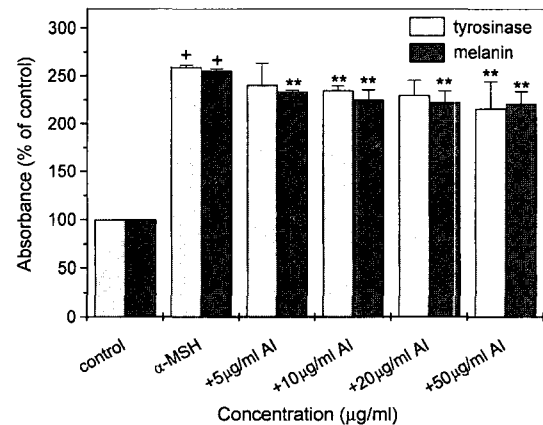


Fig. 5 - Inhibitory effect in case of treatment of crude polysaccharide of water extract of *Artemisia iwayomogi Kitamura*(AI) of 1 nM α -MSH with B16/F10 melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After the treatment of AI for 48 h, melanin content and tyrosinase activity were measured at 405 nm. Results were expressed as % control and data were mean \pm SD of at least five determinations.

+ $p < 0.01$, compared with the control group.
** $p < 0.05$, compared with α -MSH group.

Table I – Inhibitory effect of *Artemisia iwayomogi Kitamura(AI)*, retinoic acid and arbutin on melanin content

Treatments	Melanin content (% of control)
Control	100 ± 0
0.1 μM RA	77.9 ± 2.5
1.0 μM RA	74.9 ± 1.5*
1.0 μM arbutin	90.0 ± 7.14
5.0 μM arbutin	84.0 ± 2.08**
50 μg/ml AI	87.0 ± 4.0*
100 μg/ml AI	84.0 ± 8.5*

Results were expressed as % control and data were mean ± SD of at least five determinations. Cell was unstimulated. *significantly different from control group (*p<0.01, **p<0.05)

미치는 인진쑥의 저해효과를 관찰하기 위하여 1 nM의 α-MSH로 자극함과 동시에 인진쑥 조다당체를 다양한 농도로 처리하여 48 시간 배양한 후 tyrosinase 활성도와 멜라닌 양을 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, α-MSH에 의한 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성은 인진쑥 조다당체의 처리농도가 증가함에 따라 억제하는 효과를 나타내었다. 억제 정도는 50 μg/ml 인진쑥 조다당체를 단독 처리한 경우에 대조군에 비하여 16%의 억제효과를 보였고 α-MSH와 인진쑥 조다당체를 동시에 처리한 실험군에서는 2.5 배 증가된 것을 2.2 배로 억제시킴으로써 약 30%의 억제효과를 보였다.

B16/F10 melanoma 세포의 고유한 멜라닌 양과 α-MSH를 처리한 군에서도 모두 인진쑥 조다당체의 처리에 의해 멜라닌 생성이 억제되는 것은 인진쑥이 α-MSH의 유무에 관계없이 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 사료된다. 동일 농도의 인진쑥 처리에 의한 멜라닌 생성의 억제 정도가 α-MSH로 유도한 군을 기준으로 하면 α-MSH와 인진쑥 조다당체를 동시에 처리한 군이 α-MSH로 유도한 군에 비하여 15%의 억제효과를 보여 고유한 멜라닌 양과 α-MSH를 처리한 군에서 거의 차이가 없이 나타나는 것으로 볼 때, 인진쑥에 의한 B16/F10 melanoma 세포의 멜라닌 억제 효과는 cAMP 의존형 신호전달 경로인 PKA 반응경로 이외의 다른 경로를 따르리라고 예상된다.

B16/F10 melanoma 세포에 미치는 인진쑥의 멜라닌 억제효과를 확인하기 위하여 색소질환의 치료제 및 화장품 첨가제로 사용되고 있는 arbutin, retinoic acid

(RA)와 인진쑥 조다당체의 효과를 비교하였다. Table I에서 보는 바와 같이 인진쑥과 비교해 볼 때 실험에서 사용된 농도에서 arbutin은 비슷한 멜라닌 생성억제 효과를 보이고 있고, RA는 다소 멜라닌 억제효과가 크나 세포독성 및 자극성의 문제들이 보고되고 있다.²⁶⁾ 그러나 인진쑥의 경우는 멜라닌 감소의 효과는 적은 편이지만 세포 안전성이 크고 자극성이나 독성이 거의 나타나지 않는 물질이므로 미백제로 응용시 부작용이 거의 없을 것으로 기대된다.

결 론

인진쑥 조다당체가 피부의 멜라닌 색소 형성에 어떠한 영향을 나타내는지를 규명하기 위하여, B16/F10 melanoma 세포에 다양한 농도의 인진쑥 조다당체를 처리하여, 인진쑥에 의한 B16/F10 melanoma 세포의 형태적, 수적 변화, 멜라닌 양의 변화 및 tyrosinase 활성도를 측정하였으며, 인진쑥에 의한 멜라닌 저해의 반응경로를 알아보기 위하여, α-MSH에 의한 멜라닌 생성을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 인진쑥 조다당체는 B16/F10 melanoma 세포의 형태 및 세포수에 영향을 거의 주지 않았다.
2. Tyrosinase 활성도 및 멜라닌 생성이 인진쑥 처리군 모두에서 통계적으로 유의한 억제효과를 보였다.
3. 인진쑥 조다당체는 세포 고유한 멜라닌생성과 α-MSH에 의한 멜라닌 생성에 거의 같은 억제효과를 보였다.

이상의 결과를 종합해보면, 인진쑥 조다당체는 B16/F10 melanoma 세포의 멜라닌 생성을 억제하며, α-MSH로 처리한 군에서도 거의 같은 억제효과가 나타나는 것으로 볼 때, cAMP 의존형 신호전달 경로인 PKA 반응경로 이외의 다른 경로를 따르리라고 예상된다.

감사의 말씀

본 연구는 BK 21 사업의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Romero, G. C. et al. : Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiate keratinocytes stimulates melano-

- genesis, *J. Clin. Invest.* **99**(4), 635 (1997).
- 2) Weixiong, L. and Helene, Z. H. : Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Phytochem, Photobiol.* **65**, 480 (1997).
 - 3) Banba, K., Tanaka, N., Fugioka, A. and Tagima, S. : Hyperpigmentation caused by the hyperthyroidism : Differences from the pigmentation of Addison's disease. *Clini Exp. Dermatol.* **24**, 196 (1999).
 - 4) Lee, S. J. : Studies on the identification of Korean traditional folk medicine. *Kor. J. Raw Med.* **6**, 75 (1975).
 - 5) 농촌진흥청 : 표준 영농교본, 산채류제배. 88 (1990).
 - 6) 고경식, 김윤식 : 원색한국 식물도감. 아카데미서적, p.332 (1988).
 - 7) 윤국병, 장준근 : 몸에좋은 산야초. 오성출판사, p.270 (1989).
 - 8) Nam, S. M., Han, S. S., Kim, S. J., Oh, D. H., Kang, I. J., Lee, S. Y. and Chung, C. K. : Effects of *Artemisia iwayomogi* Kitamura ethanol extracts on lowering serum and liver lipids in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**(2), 338 (1998).
 - 9) Nam, S. M., Kim, J. G., Han, S. S., Kim, S. J., Chung, M. E. and Chung, C. K. : Effects of *Artemisia iwayomogi* Kitamura ethanol extracts on antioxidant enzymes in rats administered Benzopyrene. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**(1), 199 (1999).
 - 10) Ham, S. S., Chung, C. K., Lee, J. H., Choi, K. P., Jung, S. W. and Kim, E. J. : Antimutagenicity and cytotoxicity of *Artemisia iwayomogi* Kitamura extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**(1), 157 (1998).
 - 11) Bae, J. M., Kim, M. S., Park, H. J., Chung, H. Y., Young, H. S., Oark, G. Y., Moon, S. H. and Choi, J. S. : Antimutagenic principle of *Artemisia iwayomogi* Kit. and its action mechanism. *J. Korean Cancer Association.* **24**, 352 (1992).
 - 12) Aburada, M., Sasaki, H. and Harada, M. : Pharmacological studies of Gardeniae fructus. II. Contribution of the constituent crude drugs to choleric activity of "Inchiko" in rats. *Yakugaku Zasshi*, **96**, 147 (1976).
 - 13) Klimura, Y., Okuda, H., Okuda, T., Hatano, T., Agata, I. and Arichi, S. : Studies on the activities of tannin related compounds from medicinal plants and drugs. VII Effects of extracts of leaves of *Artemisia* species and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2028 (1985).
 - 14) Park, E. J., Nam, J. Y., Kim, J. Y., Kang, H. C., Choi, J. H., Lee, B. H., Kim, S. J., Lee, J. H., Kim, Y. C. and Sohn, D. H. : The ethanol-soluble part of hot-water extract from *Artemisia iwayomogi* inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **52**(7), 875 (2000).
 - 15) Lim, S. N. : Physiological activation of wormwood (*Artemisia Capillaris*). Graduate School of Yonsei University, Doctoral Dissertation (1995).
 - 16) Chun, H. J., Mun, Y. J., Kim, J. H., Kim, I. K., Jeon, B. H. and Woo, W. H. : Effect of the aqueous extract of *Epimedium koreanum* Nakai on melanin formation in B16 mouse melanoma cell line. *J. Pharm. Soc. Korea*, **44**(5), 455 (2000).
 - 17) Chun, H. J., Kim, I. K. and Woo, W. H. : Inhibitory effects on retinoic acid and melanization of B16 melanoma cell by *Epimedium koreanum* Nakai and α -MSH. *J. Kor. Chem. Soc.* **44**(5), 533 (2000).
 - 18) Chun, H. J., Choi, E. Y., Yoon, S. C., Nam, H. W. and Woo, W. H. : Inhibitory effects of *Atractylodes Rhizoma alba* on melanin biosynthesis. *J. Pharm. Soc. Korea*, **45**(3), 269 (2001).
 - 19) Lee, S. B., Jeong, C., Jeong, S. H., Lee, S. M., Shim, S. B. and Cho, T. S. : Hepatoprotective effects of extracts from *Artemisia iwayomogi*. *J. Appl. Pharmacol.* **5**, 194 (1997).
 - 20) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods.* **65**, 55 (1983).
 - 21) Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. : Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1- α -25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**, 1474 (1985).
 - 22) Matinez-Esparza, M. : Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **225**, 139 (1998).
 - 23) Im, S., Moro, O. and Peng, F. : Activation of the cAMP pathway by α -melano-tropin mediates the rest of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res.* **58**, 47 (1998).
 - 24) Ranson, M., Posen, S. and Manson, R. S. : Human

- melanocytes as a target tissue for hormone : in vitro studies with 1- α -25 dihydroxyvitamine D3, α -melanocyte stimulating hormone and beta estradiol. *J. Invest. Dermatol.* **91**, 593 (1988).
- 25) Körner, A. M. and Pawelek, K. : DOPAchrome conversion : A possible control point in melanin biosynthesis. *J. Invest. Dermatol.* **75**, 192 (1980).
- 26) Tomita, K. N., Oda, N., Kamel, M., Miyaki, T. : A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using streptomycines biosynthesis. *J Antibiotics*, **12**, 1601 (1990).