

## 백출의 에탄올 추출물에 의한 Melanin 생성억제 효과

천현자<sup>#</sup> · 최은영 \* · 윤성찬 · 남항우 · 백승화 · 우원홍

원광대학교 한의학 전문대학원, \*김천과학대학 피부미용과

(Received March 15, 2001; Revised April 16, 2001)

### Inhibitory Effects of Ethanol Extract of *Atractylodis Rhizoma alba* on Melanin Biosynthesis

Hyun Ja Chun<sup>#</sup>, Eun Young Choi\*, Sung Chan Yoon, Hang Woo Nam,  
Seung Hwa Baek and Won Hong Woo

<sup>#</sup>Professional Graduate School of Oriental Medicine, Won Kwang University, Iksan, 570-749, Korea

\*Department of Beauty and Skin Care, Kimcheon Science College, Kimcheon 740-110, Korea

**Abstract** — The inhibitory effect of extract of *Atractylodis Rhizoma alba* on melanin biogenesis was studied by using B16/F10 melanoma in culture. *Atractylodis Rhizoma alba* significantly inhibited tyrosinase activity, and melanin contents with or without  $\alpha$ -MSH and forskolin *in vitro*. Melanin contents and tyrosinase activity have decreased in a dose-dependent manner. These results show that extract of *Atractylodis Rhizoma alba* could be developed as skin whitening components of cosmetics.

**Keywords** □ *Atractylodis Rhizoma alba*, melanin biosynthesis, tyrosinase,  $\alpha$ -MSH, forskolin

멜라닌세포는 각질형성세포, 랑게르한스세포 등과 연합하여 그 기능을 수행하며, 이러한 색소세포와 연계된 기능을 표피색소 단위체(epidermal melanin unit)라 하며, 이 단위체에 포함된 멜라닌 양에 따라 사람의 피부색이 결정된다.<sup>1)</sup> 피부의 과색소침착(hyperpigmentation)은 피부세포 내에 있는 멜라닌 세포에서 endothelin,  $\alpha$ -MSH, NO 등 여러 요인들에 의해 멜라닌 생성활동이 증가되고 이로 말미암아 만들어진 다량의 멜라닌이 각질형성세포로 전달되어 피부 상피층에 축적된 결과이다.<sup>2-3)</sup> 색소침착과 피부 흑화 현상의 원인인 멜라닌은 자외선 등에 의한 피부의 광노화나 일광자화증을 억제하고 보호하는 긍정적인 기능<sup>4)</sup>과 미용적인 측면에서 색소침착 뿐만 아니라 멜라닌 전구물질들에 의한 독성으로 세포의 사멸을 촉진하는 부정적인 기능도 가지고 있다.<sup>5-6)</sup> 특히 흰 피부에 대한 선호

도가 높은 우리나라의 경우 피부의 과색소침착은 미용의 큰 장애가 아닐 수 없다. 이러한 피부의 과색소침착을 예방하고 개선하기 위한 미백제 연구가 많이 수행되었으며, hydroquinone, arbutin, kojic acid, vitamin C 등이 함유된 미백 화장품 및 의약품이 시판되고 있으나, 실질적인 임상효과가 만족스럽지 못하여 지속적으로 개선된 원료개발을 위한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다.<sup>7-9)</sup>

최근에 양<sup>10)</sup> 등이 율피, 솔잎, 호프 추출물을 이용하여 멜라닌 생성 억제에 미치는 효과를 확인하였고, 천<sup>11-12)</sup> 등은 음양곽이 멜라닌 세포의 멜라닌화에 관여하는 것과 멜라닌 생성 메카니즘을 규명함으로써 색소성 질환의 하나인 백반증 치료에 응용할 수 있는가를 연구하였다. 문<sup>13)</sup> 등은 천화분 추출물이 멜라닌 생성 억제에 큰 효과가 있다고 보고하였다.

백출(*Atractylodis Rhizoma alba*)은 국화과 삼주(*Atractylodes japonica koidz*) 뿌리로서 창출, 백출로 명명되고 있다. 이것은 굵은 뿌리를 가지고 있는 여러

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 063-850-6938 (팩스) 063-850-6840

해살이 풀로서 개화기는 7-10월이고, 전국 각지에 분포하고 있으며 산지의 양지쪽 풀밭에서 자란다. 뿌리줄기를 약재로 쓰는데, 참삼주(*Atractylodes coreana*), 가느 앞삼주(*Lancea*)의 뿌리줄기도 함께 쓰이고 있다.<sup>14,15)</sup> 뿌리줄기에 방향성 정유를 함유하고 있으며 주성분은 Atractylon C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O, m.p 38°C이다. 이 성분은 후각을 자극하여 위액분비를 촉진하고 민간요법으로 발한, 해열, 이뇨, 진통, 건위, 위궤양 예방, 담즙분비 촉진작용 등에 사용되었으며, 특히 중국에서는 강장제로 쓰이고 있을 정도로 효과가 좋은 천연물이다.<sup>16,17)</sup>

이에 본 연구는 미백효과에 미치는 백출의 영향을 조사하고자 백출의 에탄올 추출물을 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 백출은 원광대학교 한의과대학 한방병원에서 구입한 것을 검정만아 사용하였다. 백출을 잘게 썰어 11.55 g을 1,000 ml 둥근 플라스크에 에탄올 120 ml와 함께 넣고, 상온에서 24시간 동안 교반하여 3회 반복 추출하였다. 추출물을 0.4 μm 필터로 여과한 후, 여과액을 진공 증류기로 350°C에서 감압, 농축시킨 후 냉동건조하여 2.003 g을 얻었다. 시료는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco. Co.) 배양액에 녹인 후, 세포에 투여하기 전 0.22 μm pore 여과지로 여과 멸균하여 농도를 조정하여 다음 사용하였다.

**세포배양** - B16/F10 melanoma 세포는 CO<sub>2</sub> 세포배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% fetal bovine serum (Gibco. Co.)이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 여기에 penicillin-streptomycin(Sigma Chemical Co., USA) 100 IU-100 μg/ml를 첨가하였으며, 약 24시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하였다.

**MTT Assay** - 시료의 처리농도를 결정하기 위한 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 정량은 Mosmann의 방법<sup>18)</sup>을 변형하여 실시하였다. 세포를 48시간 배양한 후 상층액을 버리고 당일 제조한 500 μg/ml MTT를 배양 용기당 1 ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 배양하였다. 살아 있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색 불

용성 formazan 침전물이 형성되며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10% DMSO를 200 μl씩 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

**Trypan blue 검사** - 대조군과 실험군의 각 well에 0.05% tyrosine-0.02% EDTA 용액을 가하여, 각 well에서 세포를 분리수거하였다. 이 분리수거한 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.

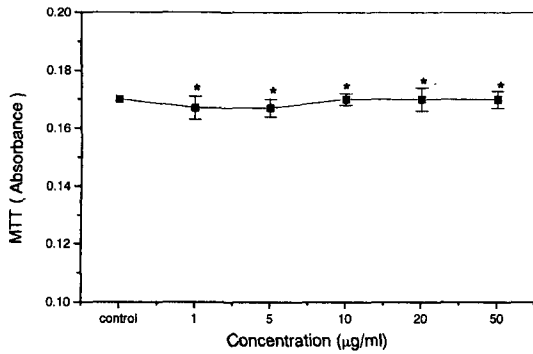
**멜라닌 양 측정** - 멜라닌 양은 Hosoi<sup>19)</sup> 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 2회 세척한 후 원심분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 200 μl 첨가하고 80°C에서 1시간 동안 용해하였으며, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌(Sigma Co.)을 사용하여 작성된 표준 직선에서 구하고, 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하였다.

**Tyrosinase 활성도 측정** - Matinez-Esparza<sup>20)</sup>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)를 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소용액으로 사용하였다. 100 mM Sodium phosphate(pH 7.0) 용액 100 μl에 시료인 효소용액 50 μl를 가하고 37°C에서 5분간 보온하였다. 100 mM catechol 50 μl를 넣은 후 ELISA reader로 37°C, 405 nm의 조건에서 흡광도의 변화를 1시간 동안 관찰하였다.

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

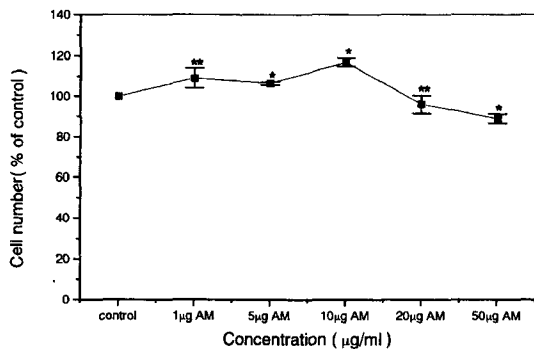
### 실험결과 및 고찰

**세포생존율에 미치는 영향** - 백출 추출물이 B16/F10 melanoma 세포의 증식에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 백출 추출물을 1 μg/ml에서 50 μg/ml까지의 다양한 농도로 처리하고, 48시간 후에 MTT



**Fig. 1** – Effect of *Atractylodis Rhizoma alba* on the viability of B16/F10 melanoma cells. Cells were cultured in the presence of various concentrations of *Atractylodis Rhizoma alba* for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as absorbance and data were mean  $\pm$  SD of at least five determinations. \*significantly different from control group (\* $p$  < 0.01).

방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 백출 추출물에 의한 세포의 생존율은 최고 50 µg/ml 처리시에도 유의할만한 변화를 나타내지 않았다. 백출 추출물을 처리하고 세포수를 조사해본 결과 세포수의 변화가 유의성 있게 나타나지 않았다(Fig. 2). 또한 세포의 형태학적 변화를 관찰해본 결과 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 이 농도 범위에서 백출 추출물의 독성이 없는 것으로 생

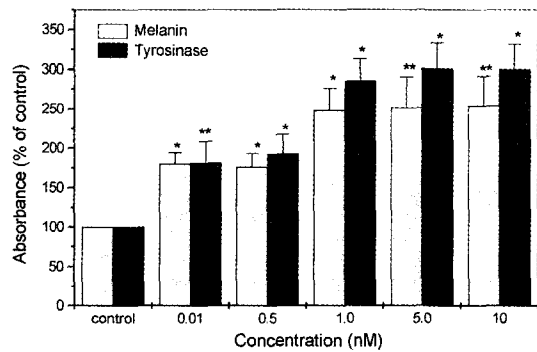


**Fig. 2** – Effect of *Atractylodis Rhizoma alba* on the viability of B16/F10 melanoma cells. Cells were cultured in the presence of various concentrations of *Atractylodis Rhizoma alba* for 48 h. The viability of the cells was measured by Trypan blue test. Results were expressed as absorbance and data were mean  $\pm$  SD of at least five determinations. \*significantly different from control group (\* $p$  < 0.01).

각되어 이 농도 범위에서 실험을 실시하였다.

**α-MSH가 B16/F10 Melanoma 세포의 멜라닌화에 미치는 영향** – 생체 내 멜라닌 합성에 가장 효능이 있는 활성제로 알려진 멜라닌세포 자극 호르몬(MSH, melanocyte stimulating hormone)은 α-, β-, γ-MSH의 세 종류가 있으며, LH(Lipotropic hormone), endorphin 등과 마찬가지로 전구체인 POMC(proopiomelanocortin)의 형태로 분비되는 펩티드성 호르몬이다.<sup>21)</sup> MSH는 흑색종세포와 실험동물의 멜라닌세포(murine melanocyte)의 멜라닌화를 자극하는 것으로 알려져 왔으며, 특히 Lerner와 McGuire는 인체에 α-MSH를 주입한 후 피부의 색소침착을 관찰하고 인체피부의 멜라닌화와 이 호르몬과의 연관성을 제시하였다.<sup>22)</sup>

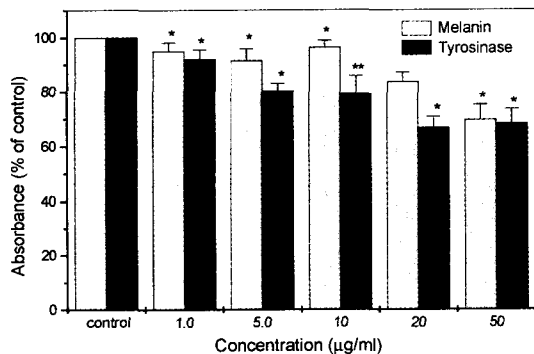
백출 추출물이 B16/F10 melanoma 세포의 멜라닌화에 미치는 영향을 조사하기 전에 α-MSH에 의한 영향을 먼저 측정하였다. α-MSH가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 밝히기 위하여 α-MSH 처리 후에 tyrosinase의 활성도와 멜라닌 생성을 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 α-MSH 처리군이 대조군에 비하여 모두 의미 있게 tyrosinase 활성도의 증가를 보였다( $p$  < 0.05). 이것은 배양된 인체 멜라닌세포에 α-MSH를 처리하여 세포내 신호전달 물질인 cAMP의 증가와 tyrosinase 활성도가 증가되었다는 Ranson<sup>23)</sup>의 연구보고와 같은 결과이다.



**Fig. 3** – Effect of α-MSH concentration on melanin contents and tyrosinase activity in B16/F10 melanoma cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/well. After the treatment of α-MSH for 48 h, melanin contents 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).

$\alpha$ -MSH가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이  $\alpha$ -MSH 처리군이 대조군에 비하여 모두 의미 있게 증가하였다( $p < 0.05$ ).  $\alpha$ -MSH에 의한 멜라닌 생합성과정은 정확한 메카니즘이 밝혀지지 않았으나  $\alpha$ -MSH가 세포막에 존재하는 수용체와 결합하면 adenylate cyclase가 활성화되어 세포내 cAMP를 증가시키고, 증가된 cAMP에 의하여 cAMP-dependent protein kinase(PKA)가 활성화된다. 그 후 일련의 과정을 거쳐 tyrosinase가 활성화되어 멜라닌화가 진행되는 것으로 설명할 수 있다.<sup>24)</sup>

**백출이 B16/F10 Melanoma 세포의 멜라닌화에 미치는 영향** - 백출이 B16/F10 melanoma 세포의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 밝히기 위하여 백출 추출물 처리 후에 멜라닌 합성 과정에서 중요한 효소인 tyrosinase 활성도를 측정하였다. 멜라닌 생합성 과정의 주된 효소인 tyrosinase는 생체내에서 tyrosine을 dopa(o-diphenol)로 산화시키는 tyrosine oxidase의 기능과 dopa를 dopaquinone으로 산화시키는 dopa oxidase의 기능을 갖는다. 이러한 기능 때문에 tyrosinase는 멜라닌 고분자를 생합성하는데 중요한 역할을 하므로 멜라닌 세포에서의 tyrosinase 활성은 피부 멜라닌 생성에 결정적인 영향을 미치게 된다.<sup>25)</sup>

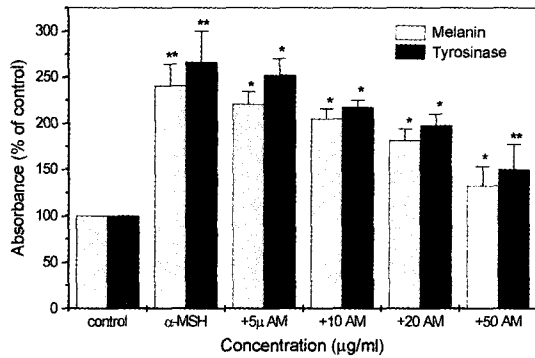


**Fig. 4** - Inhibitory effect of *Atractylodis Rhizoma alba* on melanin contents and tyrosinase activity in B16/F10 melanoma cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/well. After the treatment of *Atractylodis Rhizoma alba* for 48 h, melanin contents and tyrosinase activity were measured at 405 nm. Results were expressed as % control and data were mean  $\pm$  SD of at least five determinations. \*significantly different from control group (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ).

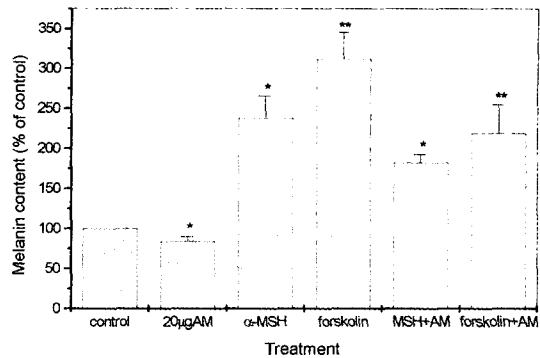
백출 추출물을  $1 \mu\text{g}/\text{m}$ 에서부터  $50 \mu\text{g}/\text{m}$ 까지 단계적으로 첨가하여 48 시간 배양한 다음 tyrosinase 활성도를 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 백출 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 대조군에 비하여 실험군에서 모두 통계적으로 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 생체에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고 다시 L-dopaquinone으로 산화시키는 연속적인 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이루어진다.<sup>26)</sup>

백출 추출물이 *in vitro*에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. 세포를 24 시간 배양한 후 배양액을 교체하고, 백출 추출물을  $1 \mu\text{g}/\text{m}$ 에서부터  $50 \mu\text{g}/\text{m}$ 까지 다양하게 처리한 다음 전체 멜라닌 양을 측정하는 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 백출 처리군 모두가 대조군에 비하여 의미 있게 감소하였다( $p < 0.01$ ). 백출 추출물을 세포에 처리했을 때 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성이 대조군에 비하여 모두 감소하는 경향을 보였다. 이것은 백출 추출물을 처리했을 때 B16/F10 melanoma 세포 내에서 tyrosinase가 비활성화되고 멜라닌 생성이 억제되는 것으로 해석된다.

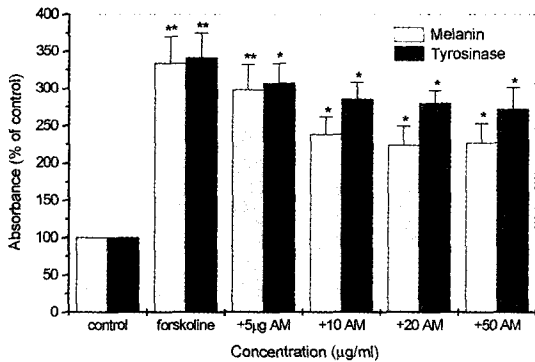
**$\alpha$ -MSH와 forskolin에 의한 멜라닌 생성에 미치는 백출의 영향** - 백출이 B16/F10 melanoma 세포의 고유 멜라닌 합성의 억제에 관여한다는 것을 Fig. 4의 결과를 통하여 알게 되었다. 이를 더욱 분명하게 확인하고 외부자극에 의해 유발되는 B16/F10 melanoma 세포의 과색소침착에 미치는 백출의 저해효과를 관찰하기 위하여  $\alpha$ -MSH와 forskolin으로 자극함과 동시에 백출 추출물을 다양한 농도로 처리하여 외부자극에 의한 멜라닌화에 미치는 백출의 영향을 관찰하였다. Fig. 3에서 멜라닌 합성이 높게 나타나면서 농도가 낮은 1 nM의  $\alpha$ -MSH로 세포를 처리하고, 백출을 농도별로 처리한 다음 48 시간 배양한 후, tyrosinase 활성도와 멜라닌 양을 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, 백출 추출물의 처리농도가 증가함에 따라  $\alpha$ -MSH에 의한 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 백출 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 억제하는 효과를 나타냈고, 억제 정도는 Fig. 4에서 보여준 고유 멜라닌화의 억제효과보다  $\alpha$ -MSH로 처리한 실험군에서의 억제효과가 더욱 크게 나타났다. 또한, 백출의 효능이 cAMP 매개에 의한 멜라닌 합성 증가를 억제하는 것인지 다



**Fig. 5** – Inhibitory effect of *Atractylodes Rhizoma alba* in case of treatment of 1 nM  $\alpha$ -MSH with B16/F10 melanoma cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/well. After the treatment of *Atractylodes Rhizoma alba* for 48 h, melanin contents 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 (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ).



**Fig. 7** – Inhibitory effect of *Atractylodes Rhizoma alba* (20 µg/ml) alone and in the presence of  $\alpha$ -MSH (1 nM) or Forskolin (20 µM) on melanin content. Results were expressed as % control and data were mean  $\pm$  SD of at least five determinations. \*significantly different from control group (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ).



**Fig. 6** – Inhibitory effect of *Atractylodes Rhizoma alba* in case of treating 20 µM forskolin in B16/F10 melanoma cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/well. After the treatment of *Atractylodes Rhizoma alba* for 48 h, melanin contents 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 (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ).

MSH 처리군과 마찬가지로 forskolin 처리군에 백출을 처리한 실험군이 고유 멜라닌화의 억제보다 효과가 크게 나타났다. B16/F10 melanoma 세포의 고유한 멜라닌 생성과 외부자극에 의해 멜라닌 생성이 유도된 경우에 미치는 백출의 영향을 비교, 관찰하기 위하여 어떤 처리도 하지 않은 군과  $\alpha$ -MSH 및 forskolin으로 멜라닌 생성을 유도한 군에 20 µg/ml 백출 추출물을 처리하여 백출 추출물의 억제효과를 비교하였다 (Fig. 7). 20 µg/ml 백출을 단독 처리한 경우에는 대조군에 비하여 16%의 억제효과를 보였다.  $\alpha$ -MSH와 백출 추출물을 동시에 처리한 실험군에서는 2.4 배 증가를 1.8 배로 억제시켜 약 40%의 더 큰 억제효과를 보였고, forskolin과 백출 추출물을 동시에 처리한 군에서는 3.1 배 증가를 2 배로 억제시켜 약 70%의 더 큰 억제효과를 보였다.

B16/F10 melanoma 세포의 고유한 멜라닌 양과  $\alpha$ -MSH 및 forskolin을 처리한 군에서도 모두 백출 추출물의 처리에 의해 멜라닌 생성이 억제되는 것은 백출 추출물이  $\alpha$ -MSH나 forskolin의 유무에 관계없이 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 사료된다. 동일 농도의 백출 처리에 의한 멜라닌 생성의 억제정도가  $\alpha$ -MSH와 forskolin으로 유도한 군에서 더 크게 나타나는 것으로 볼 때, 백출에 의한 B16/F10 melanoma 세포의 멜라닌 억제효과는 cAMP 의존형 신호전달 경로인 PKA 반응경로와 관련이 있을 것으로 추정된다. 또한 백출 추출물의 억제효과가  $\alpha$ -MSH나 forskolin 같은 외부자

시 확인, 조사하기 위하여 2.0 µM forskolin과 백출을 농도별로 함께 처리하여 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성을 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, forskolin 처리시 대조군에 비하여 약 4 배의 멜라닌 생성이 증가하였으나, 백출을 농도별로 처리한 실험군에서는 모두 억제효과를 나타내었으며, 억제정도는  $\alpha$ -

극에 의해 유도된 멜라닌화에 더 크게 나타나므로 멜라닌 세포의 과색소침착을 보이는 병변에서 더 큰 억제효과가 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

백출의 에탄올 추출물이 피부의 멜라닌 색소 형성에 어떠한 영향을 나타내는지를 규명하기 위하여, B16/F10 melanoma 세포에 다양한 농도의 백출 추출물을 처리하여, 백출에 의한 B16/F10 melanoma 세포의 형태적 변화, 수적 변화, 멜라닌 양의 변화 및 tyrosinase 활성도를 측정하였으며, 백출에 의한 멜라닌 저해의 반응경로를 알아보기 위하여,  $\alpha$ -MSH와 forskolin에 의한 멜라닌 생성을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백출 추출물은 B16/F10 melanoma 세포의 형태 및 세포수에 영향을 주지 않았다.

2. Tyrosinase 활성도 및 멜라닌 생성이 백출 처리군 모두에서 통계적으로 유의한 억제효과를 보였다.

3.  $\alpha$ -MSH와 forskolin 유도에 의한 멜라닌 생성에 더 큰 억제효과를 보였다.

이상의 결과를 종합해보면, 백출 추출물은 B16/F10 melanoma 세포의 멜라닌 생성을 억제하며,  $\alpha$ -MSH와 forskolin으로 처리한 군에서 더 큰 억제효과가 나타나는 것으로 볼 때, cAMP의존형 신호전달 경로인 PKA 반응경로와 관련이 있을 것으로 추정된다.

## 감사의 말씀

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

## 문 헌

- 1) Frizpatrick, T. B., Szabo, S. and Wick, M. M. : Biochemistry and physiology of melanin pigmentation (Vol. 2), Oxford University Press, London, pp. 687-712 (1983).
- 2) Hearing, V. J. : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *Soc. Invest. Dermatol.* **4**(1), 24 (1999).
- 3) Romero, G. C. et al. : Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiate keratinocytes stimulates melanogenesis. *J. Clin. Invest.* **99**(4), 635 (1997).
- 4) Weixiong, L. and Helene, Z. H. : Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Phytochem, Photobiol.* **65**, 480 (1997).
- 5) Kaufman, R. J. : Vectors used for expression in mammalian cells. *Meth. In. Enzymol.* **205**, 87 (1991).
- 6) Kameyama, K., Takemura, T., Hamada, Y., Sakai, C., Kondoh, S. and Nishiyama, S. : Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP 1), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 126 (1993).
- 7) Jimbow, K. et al. : Mechanism of depigmentation by hydroquinone. *J. Invest. Dermatol.* **62**, 436 (1974).
- 8) Maeda, K. and Fukuda, M. : Arbutin ; Mechanism of its depigmentating action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutic.*, **276**, 765 (1996).
- 9) Maeda, K. and Fukuda, M. : In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocyte. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361 (1991).
- 10) Yang, M. J., Kim, M. G., Lim, S., Ann, H. S. and Ahn, R. M. : Inhibitory effects of water-acetone extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis. *J. Pharm. Soc. Korea*, **43**, 494 (1999).
- 11) 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).
- 12) 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  $\alpha$ -MSH. *J. Kor. Chem. Soc.* **44**(5), 533 (2000).
- 13) Mun, Y. J., Lee, S. W., Song, C. S., Lee, K. S., Lim, K. S., Im, S. J. and Woo, W. H. : Inhibitory effect of aqueous extract of *redix trichosanthis* on the melanin in B16 melanoma cells. *J. Traditional Korea Medicine.* **10**(2), 149 (2000).
- 14) Ernst, P. and Ding, Y. H. : Handbuchen der Traditionellen Chinesischen Heilpflanzen, Karl F. Haug, Berlin, pp. 197-198 (1987).
- 15) Endo, K., Taguchi, T., Taguchi, F., Hikino, H., Ya-

- mahara, T. and Fujimura, H. : *Chem. and Pharmacol. Bull.* **27**, 2954 (1979).
- 16) Chen, Z. L., The acetylenes from *Artractylodes macrocephala*, *Planta Med.* **53**, 493 (1987).
- 17) Chen, Z. L., Cao, W. Y, Zhou, G. X. and Wichtl, M. : A Sesquiterpene lactam from *Artractylodes macrocephala*. *Phytochemistry.* **45**(4), 765 (1997).
- 18) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods.* **65**, 55 (1983).
- 19) Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. : Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1- $\alpha$ -25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**, 1474 (1985).
- 20) Matinez-Esparza, M. : Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- $\alpha$  in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **225**, 139 (1998).
- 21) Luger, T. A., Scholzen, T. and Grabbe, S. : The Role of  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone in cutaneous biology. *Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **2**, 87 (1997).
- 22) Lerner, A. B. and McGuire, J. S. : Effect of alpha- and beta-melanocyte stimulating hormone on the skin color of man. *Nature.* **189**, 176 (1961).
- 23) Ranson, M., Posen, S. and Manson, R. S. : Human melanocytes as a target tissue for hormone : in vitro studies with 1- $\alpha$ -25 dihydroxyvitamine D3,  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone and beta estradiol. *J. Invest. Dermatol.* **91**, 593 (1988).
- 24) Im, S., Moro, O. and Peng, F. : Activation of the cAMP pathway by  $\alpha$ -melanotropin mediates the rest of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res.* **58**, 47 (1998).
- 25) Hearing, V. J. and Jimenez, M. : Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigment. *Int. J. Biochem.* **19**(12), 1141 (1987).
- 26) Köner, A. M. and Pawelek, K. : DOPAchrome conversion : A possible control point in melanin biosynthesis. *J. Invest. Dermatol.* **75**, 192 (1980).