

Quercetin 이 B16/F10 멜라닌세포의 증식 및 멜라닌화에 미치는 영향

천현자[#] · 황상구* · 김춘관* · 전병훈* · 백승화 · 우원홍
원광대학교 한의학전문대학원, *원광대학교 한의과대학 병리학교실
(Received November 20, 2001; Revised January 14, 2002)

In vitro Modulation of Proliferation and Melanization of B16/F10 Melanoma Cells by Quercetin

Hyun Ja Chun[#], Sang Gu Hwang*, Chun Kwan Kim*, Byung Hun Jeon*
Seung Hwa Baek and Won Hong Woo

Professional Graduate School of Oriental Medicine and

**Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea*

Abstract — Quercetin is one of the bioflavonoid compounds and has multiple biological effects such as antioxidant and effective anti-inflammatory agent. Melanin has an important role in protecting human skin from the damaging effects of ultra-violet (UV) radiation. We studied the effect of quercetin on proliferation of B16/F10 melanoma cells. After 48h treatment of cells with quercetin, the cells exhibited a dose-dependent inhibition in their proliferation without apoptosis. Therefore, the decrease in cell numbers may be due to cell growth arrest, not due to cell death by cytotoxicity. We also investigated the effect of quercetin on melanogenesis of this cells. B16/F10 melanoma cells were grown for 48h in the presence of 0.01~50 $\mu\text{g/ml}$ quercetin and the total melanin contents were measured. Quercetin stimulated melanization of the cells in low concentrations (0.01~20 $\mu\text{g/ml}$), whereas it inhibited melanization in high concentrations (30~50 $\mu\text{g/ml}$). It was observed that quercetin differently regulates melanogenesis of B16/F10 melanoma cells dependent on its concentrations.

Keywords □ Quercetin, B16/F10 melanoma cells, melanogenesis, tyrosinase activity, melanin content

머리카락과 피부색을 이루는 색소 중의 하나인 멜라닌은 멜라닌세포의 멜라노솜에서 효소반응으로 합성되는 페놀류의 생물고분자 물질이다. 멜라닌세포에서 생성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동하여 자외선 등에 의한 피부의 광노화나 일광각화증을 억제하고 보호하는 긍정적인 기능¹⁾과 미용적인 측면에서 색소침착 뿐만 아니라 멜라닌 전구물질들에 의한 독성으로 세포의 사멸을 촉진하는 부정적인 기능도 가지고 있다.²⁻³⁾ 그러므로 멜라닌의 부정적인 기능을 제어하기 위하여 멜라닌합성을 조절하기 위한 연구가 진행되면서 천연물질에 관한 관심이 증가되고 있는 실정이다.

생약 및 식물로부터 분리한 페놀성 물질들 특히 플라보노 및 플라보놀 배당체들의 구조와 생리 활성에 대한 연구가 많이 보고되고 있다. 그 중에서 quercetin은 유리형 또는 배당체형으로 야채, 과일, 콩과식물에 널리 분포된 flavonols로서 항virus, 항혈

액응고, 변이 암세포의 생육저해, 혈압강하, 항산화, 모세혈관의 강화작용들이 보고된 후 quercetin 물질을 함유한 식품에 대한 관심이 더욱 고조되고 있다.⁴⁻⁹⁾ 식물에서 quercetin의 분리와 생리활성에 관한 연구로서 차¹⁰⁾등은 뽕나무잎의 플라보노이드 성분 중에 quercetin이 49.6% 함유되어 있음을 밝히고 이의 항산화효과에 대하여 보고하였다. 박¹¹⁾등은 인삼 잎의 플라보노이드 성분 중 quercetin의 광용혈 억제효과에 대하여 보고하였으며, 박¹²⁾등은 해당화에서 quercetin을 분리하여 혈당강화작용 및 항암효과를 보고하였고, 이¹³⁾등은 복분자 딸기 잎으로부터 quercetin을 분리, 보고하였다. Lichtenstein¹⁴⁾등은 양파추출물에서 분리한 quercetin이 기관지 천식의 억제작용에 효과가 있다고 보고하였으며, 박¹⁵⁾등은 참죽나무 잎에서 quercetin을 분리하였고, 이것이 경북 서산지방에서 피부질환 치료에 사용되기도 함을 보고하였다. Umeo¹⁶⁾등은 식물의 엽록소에서 quercetin이 광과산화반응(photoperoxidation)을 억제한다고 보고하였다. Quercetin의 약리작용에 대한 연구로는 미토콘드리아에서 succinoxidase 활성과 유리기 형성의 억제작용,¹⁷⁾ glutathione고갈에 의한 지질과산화반응의 억제작용,¹⁸⁾ 사람의 호염기구에서 Ca^{2+} -uptake를 억

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

제하므로 histamine 유리를 억제하는 효과,¹⁹⁾ 인체의 호중구에서 NADPH-oxidase의 억제효과²⁰⁾ 및 과산화생성 억제효과²¹⁾에 관한 것들이 있다. 그러나 멜라닌세포의 멜라닌화와 관련한 연구는 지금까지 보고된 바 없다.

최근에 생약이나 한약재 같은 천연물을 이용하여 기미, 주근깨 등의 과색소 침착이나 백반증, 백피증 등의 저색소증 같은 색소이상증의 원인 및 치료에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다.²²⁻²⁴⁾ 그러므로 본 연구는 피부질환 치료제 및 미백제 개발의 일환으로, 양파와 같은 Allium속 채소류에 다량 함유되어 있는 flavonols구조인 quercetin이 멜라닌생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16/F10 melanoma 세포에 quercetin을 처리하고 세포의 증식과 멜라닌화에 미치는 영향을 조사하였다.

실험방법

검액조제 - Quercetin(Sigma Chemical Co., USA)을 에탄올에 녹여 0.22 µm pore 여과지로 여과 멸균한 후 stock solution을 만들었으며, 실험에 이용하기 직전 DMEM 세포 배양매지에 희석하여 농도를 조정하여 다음 사용하였다.

세포배양 - B16/F10 melanoma 세포배양은 CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% fetal bovine serum(Gibco. Co.)이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 배지에 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-diphenyl-tetrazolium bromide) 정량은 Mosmann의 방법²⁵⁾을 변형하여 실시하였다. Quercetin을 세포에 투여하여 48 시간 동안 배양한 후 상층액을 버리고 당일 제조한 500 µg/ml MTT를 배양 용기당 1 ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3 시간 동안 배양하였다. 살아 있는 세포들은 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10% DMSO를 200 µl씩 넣고 15 분간 실온에서 방치하였다. 그 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 phosphate-buffered saline(PBS)로 2회 세척한 후 시료 0.02 ml와 동량의 0.4%(w/v) trypan blue를 잘 섞은 다음 현미경 계산판을 이용하여 trypan blue에 염색되지 않은 살아 있는 세포 수를 계수하였다. 실험군의 세포 수는 대조군의 세포 수에 대한 백분율로 5회 반복 실험하여 계산하였다.

형태학적 변화 - B16/F10 melanoma 세포를 각 well당 1×10⁵ 개씩 넣고 24시간 경과 후 quercetin을 농도별로 첨가하여 48시간 동안 배양하였으며, 위상자 현미경(Diaphot 300, Nikon,

Japan)을 이용하여 100배율하에서 대조군과 실험군의 형태학적 변화를 관찰하였다.

멜라닌 양의 측정 - 멜라닌 양은 Hcsc⁶¹⁾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 계산하여 나타내었다.

Tyrosinase 활성도의 측정 - Tyrosinase 활성도는 Matinez-Esparza²⁷⁾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 PMSE, pH 7.0)를 가하였다. 얼음 위에서 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 5 분간 보온하였다. 100 mM catechol 50 µl를 넣은 후 ELISA reader로 37°C, 405 nm의 조건에서 흡광도의 변화를 1 시간 동안 관찰하였다.

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

실험결과 및 고찰

세포의 증식에 미치는 영향 - Quercetin은 식물에 다량 함유되어 있는 phenolic flavonoid 중 flavonol 구조를 갖는 물질로서 극성을 가지고있다(Fig. 1). Quercetin이 B16/F10 melanoma 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 quercetin을 0.01 µg/ml에서 100 µg/ml까지 다양한 농도로 처리하고, 세포를 48 시간 동안 배양한 후 MTT측정방법으로 세포의 증식을 관찰하였다.

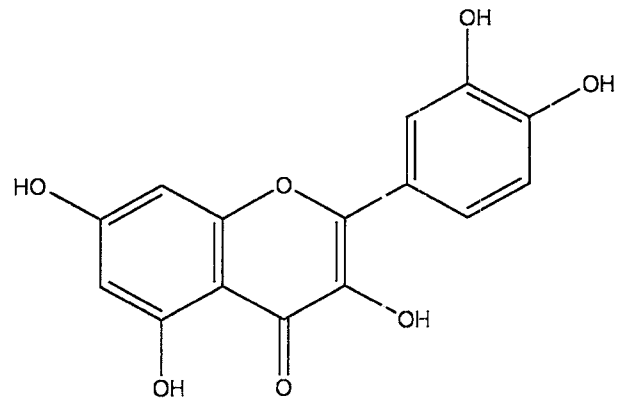


Fig. 1 - The Structure of Quercetin.

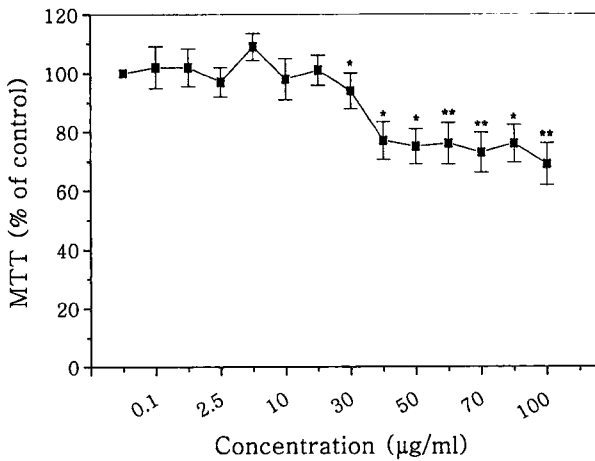


Fig. 2 - Effect of quercetin on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of quercetin for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % control and data were mean \pm SD of at least five different experiments.
*significantly different from control group (*p<0.01, **p<0.05).

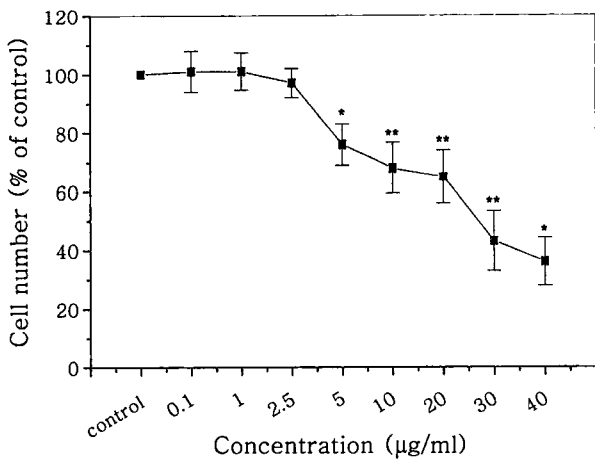


Fig. 3 - Effect of quercetin on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of quercetin for 48 h. The viability of the cells was measured by Trypan blue test. Results were expressed as % control and data were mean \pm SD of at least five different experiments.
*significantly different from control group (*p<0.01, **p<0.05).

Fig. 2에서 보는 바와 같이, quercetin에 의한 세포의 증식은 20 µg/ml 이하의 낮은 농도에서는 대조군에 비해 약간 증가하였으나 유의할만한 변화를 나타내지 않았다. 그러나 30 µg/ml 농도 부터는 서서히 증식이 억제되는 경향을 보였으며, 40 µg/ml 이상의 농도에서는 대조군에 비교하여 20% 이상의 성장억제 효과가 있었다. 이러한 현상은 100 µg/ml 농도까지 지속됨을 보여주었다. 또 다른 실험 방법으로서 trypan blue 용액에 염색되지 않은 살아 있는 세포 수를 조사해본 결과 5 µg/ml 이상의 투여 농

도에서 세포 수가 농도에 의존적으로 점점 유의성 있게 감소하는 경향을 보여주었다(Fig. 3). 이 결과는 MTT를 이용한 세포증식의 결과와 유사한 경향을 보여 주었고, 다소 저농도의 처리군에서 MTT측정 결과와 비교하여 세포증식의 감소현상이 더욱 크게 나타난 것은 실험 방법상의 차이점에 기인한 것으로 보인다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 quercetin은 B16/F10 melanoma 세포의 증식을 억제시킴을 알 수 있었다. 대조군에 비하여 실험군의 세포수가 줄어드는 현상은 세포사멸로 인한 세포수의 감소와 세포분열의 정지로 인한 세포 증식의 감소로 나누어 고려해 볼 수 있다. 그러므로 quercetin에 노출된 B16/F10 melanoma 세포의 수적인 감소가 어떠한 원인에 의한 것인지를 조사해 볼 필요가 있다.

세포의 형태학적 변화 - Quercetin에 노출된 B16/F10 melanoma 세포의 증식이 감소한 이유가 세포사멸에 기인하는 것인지를 알아보기 위하여, B16/F10 melanoma 세포에 quercetin을 5~30 µg/ml의 여러 농도별로 48시간 처리하고 그 후에 형태학적 변화를 confocal 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 5 µg/ml의 낮은 농도의 처리군에서는 대조군과 비교하여 세포모양과 수에 큰 변화를 관찰할 수 없었으나, 처리 농도가 높아질수록 세포의 밀도는 대조군에 비해 점차 감소하였으며 세포의 크기는 다소 커졌고 수직상 돌기의 형태가 나타나면서 길이가 약간 길어짐을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 이러한 결과는 높은 농도의 quercetin이 B16/F10 melanoma 세포의 성장을 억제함으로써 세포증식을 억제시키고 세포의 분화를 촉진하는 것을 보여준다. 그러나 세포사멸의 특징인 세포막 외부 용기의 돌출현상은 관찰할 수 없었고 배양배지 속에 세포사멸이 유도된 부유세포도 또한 관찰할 수 없었다. 즉, quercetin은 고농도에서 B16/F10 melanoma 세포의 성장을 억제시키지만 세포사멸을 유도하지는 않는 것으로 보인다.

Tyrosinase 활성도에 미치는 영향 - Tyrosinase(monophenol monooxygenase, EC 1.14.18.1)는 활성부위에 Cu²⁺이온이 함유되어 있는 금속함유 단백질(metalloprotein)로서 멜라닌의 합성에 있어 속도결정단계를 조절하는 효소이다. 그 기능은 멜라노솜 내에서 tyrosine을 산화시켜 dopa를 만드는 tyrosine hydroxylase와, dopa를 산화시켜 dopachrome을 만드는 dopa oxidase로 작용하여 최종적으로는 melanin polymer를 합성하는데 작용하는 것으로 알려져 있다.²⁸⁾ 그러므로 본 연구는 quercetin이 B16/F10 melanoma 세포의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 세포에 quercetin을 0.1~40 µg/ml의 여러 농도별로 처리하고 48시간 배양한 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 quercetin 처리 농도가 10 µg/ml까지는 투여 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성도는 대조군에 비하여 점점 증가하였으며 그 증가 비율 또한 모두 유의성이 있음을 보여주었다. 특히, 10 µg/ml 투여군에서는 대조군에 비해 약 1.9배로

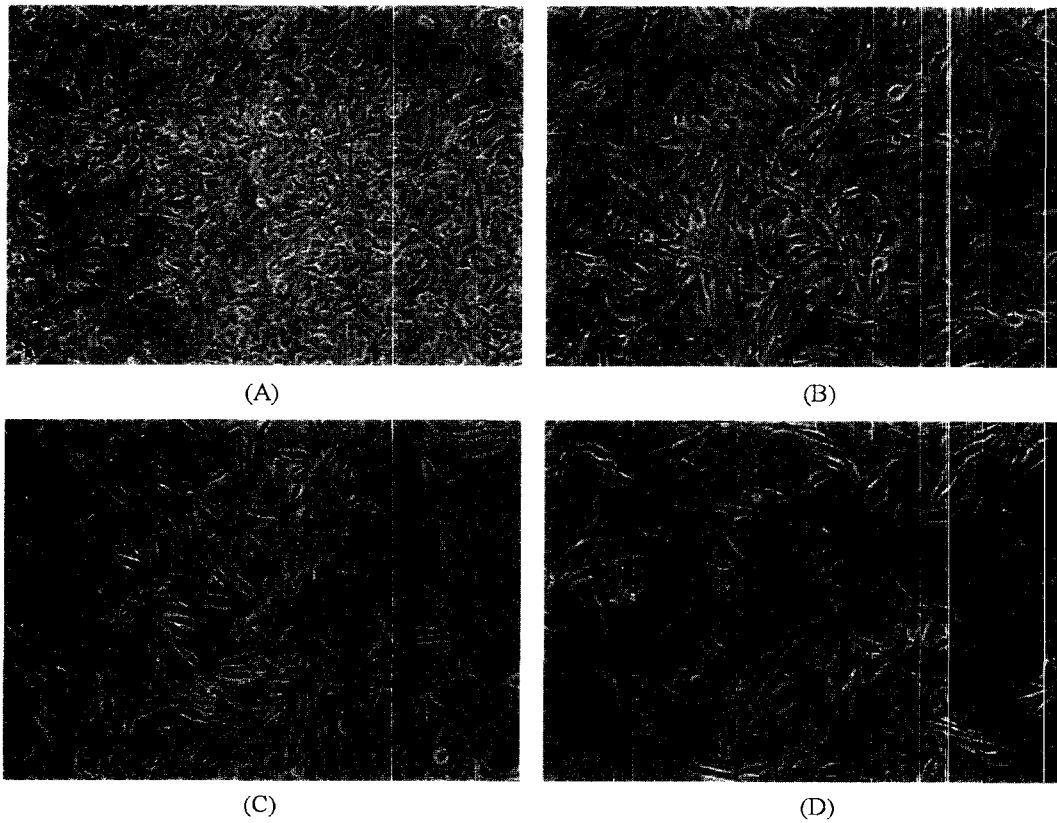


Fig. 4 – Morphology of control and quercetin-treated B16/F10 melanoma cells. A : control, B, C and D : cells treated with 5, 10 and 30 µg/ml quercetin, respectively.

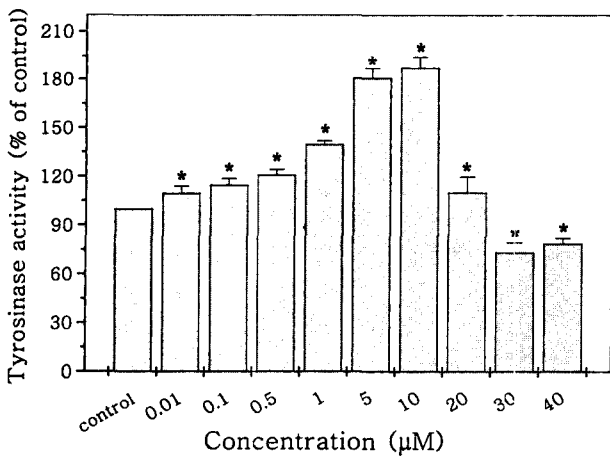


Fig. 5 – Effect of quercetin on tyrosinase activity in B16/F10 melanoma cells. After the treatment of quercetin for 48 h, tyrosinase activity was measured at 405 nm. Results were expressed as % control and data were mean ± SD of at least five different experiments.

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

최고의 증가를 보여 주었다. 그러나 처리 농도가 20 µg/ml 이상에서는 투여 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성도는 점점 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 quercetin의 투여 농도에 따라 B16/F10 melanoma 세포에서 일어나는 tyrosinase 활성도

의 조절이 달라질 수 있음을 보여주는 것이다.

멜라닌 생성에 미치는 영향 – 생체에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase에 의해 hydroxylation반응을 거쳐 3,4-dihydroxyindolephenylamine(L-DOPA)로 되고 이것이 다시 phenylalanine-3,4-quinone(L-dopa quinone)으로 산화된다. 그리고 dopaquinone은 상대적으로 불안정한 중간매체인 dopachrome으로 전환된 후 5, 6-dihydroxyindole을 거쳐 멜라닌 고분자를 형성하는 것으로 알려져 있다.²⁹⁾ Quercetin이 *in vitro* 상태에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. B16/F10 melanoma 세포에 quercetin을 1~50 µg/ml의 다양한 농도로 처리하고 48 시간 세포를 배양한 다음 멜라닌 생성을 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, quercetin의 투여량이 10 µg/ml까지는 처리 농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성이 대조군에 비하여 점점 증가하였으며, 실험군 모두에서 통계적으로 유의성이 있었다. 특히 10 µg/ml 투여군에서는 대조군에 비하여 약 1.3배의 멜라닌 생성 증가를 보였다. 그러나 20 µg/ml 이상에서는 처리농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성이 감소되는 경향을 보였으며 감소 비율 또한 통계학적으로 유의성이 있음을 보여주었다. 이러한 결과는 quercetin에 노출된 B16/F10 melanoma 세포의 *in vitro* tyrosinase 활성도 변화와 매우 잘 일치함을 보여준다.

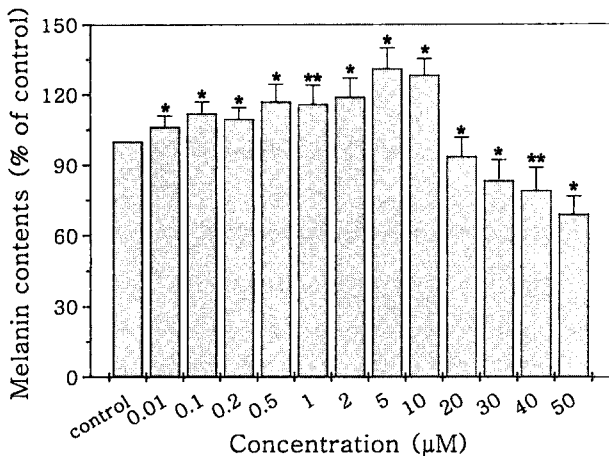


Fig. 6 - Effect of quercetin on melanin contents in B16/F10 melanoma cells. After the treatment of quercetin for 48 h, melanin contents were measured at 405 nm. Results were expressed as % control and data were mean \pm SD of at least five different experiments.

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

멜라닌세포의 멜라닌화가 발생하는 주요 기전을 살펴보면 멜라닌세포의 증식, 멜라닌소체의 합성증가 및 tyrosinase 활성도의 증가 등에 의해서 이루어진다고 알려져 있다.³⁰⁾ 본 연구의 결과를 종합해 볼 때, B16/F10 melanoma 세포에 quercetin을 처리하였을 때 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 세포의 유의한 증식이 없으면서 대조군에 비하여 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성이 모두 증가하는 경향을 보였고 그 이후의 처리 농도에서는 세포분화의 촉진과 더불어 두 가지 모두 감소함을 보여주었다. 이러한 점에 비추어 볼 때 quercetin이 처리된 B16/F10 melanoma 세포의 멜라닌화는 세포의 증식과 관련 있는 것이 아니라, tyrosinase 활성도의 증가로 인해 촉진되는 것으로 해석할 수 있다. 반면에 20 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도로 quercetin을 처리한 세포들은 세포의 사멸이 초래되지 않으면서 세포증식이 억제되는 현상과 더불어 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성 모두가 대조군에 비하여 오히려 감소하는 경향을 보여주었다. 이것은 B16/F10 melanoma 세포에 고농도의 quercetin을 처리하게 되면 세포의 성장이 억제되면서 세포분화가 유도되고 tyrosinase 활성도의 절대값을 감소시키므로 최종산물인 멜라닌의 합성이 감소, 억제되는 것으로 사료된다.

결론

Quercetin이 피부의 멜라닌 색소 형성에 어떠한 영향을 나타내는지를 규명하기 위하여, B16/F10 melanoma 세포에 여러 가지 농도의 quercetin을 처리한 후 세포의 증식, 형태적 변화, tyrosinase 활성도 및 멜라닌 양의 변화를 측정하여 다음과 같은

결과를 얻었다.

1. Quercetin이 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 세포증식에 유의한 차이는 없었으나, 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상에서는 유의성있게 세포증식이 억제되었으며, 세포분화는 촉진되었다.

2. Tyrosinase 활성도는 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 농도 의존적으로 tyrosinase 활성도가 증가되었고 그 이상의 농도에서는 tyrosinase 활성도가 오히려 감소하였다.

3. 멜라닌 생성은 tyrosinase 활성도와 마찬가지로 10 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 증가되었고, 특히, 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 대조군보다 130%의 증가를 보였다. 그 이상의 농도에서는 멜라닌 생성이 오히려 감소하였다.

결론적으로 저농도의 quercetin 처리는 세포의 증식에는 유익한 변화 없이 멜라닌화를 촉진시키며, 고농도에서는 세포의 증식을 억제하면서 멜라닌화도 억제시킨다. 따라서 quercetin의 사용농도에 따른 반응경로의 연구를 통하여 사용목적에 맞는 기준량을 설정하여 멜라닌 색소와 관련된 미백제 및 색소성 질병의 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말씀

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

문헌

- 1) Weixiong, L. and Helene, Z. H. : Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Phytochem. Phytobiol.* **65**, 480 (1997).
- 2) Kaufman, R. J. : Vectors used for expression in mammalian cells. *Method Enzymol.* **205**, 87 (1991).
- 3) 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).
- 4) Sorata, Y., Takahama, U. and Kimura, M. : Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence hematoporphyrin. *Biochem. Biophys. Acta*, **799**, 313 (1994).
- 5) McClure, J. W. : Physiology and function of flavonoids. In "Harbone, J. B., The flavonoids". Chapman and Hall, London 970 (1975).
- 6) Veckenstedt, A. and Pusztai, R. : Investigation of the antiviral mechanism of quercetin against cardiovirus infection in mice. *Antiviral Res.* **1**, 249 (1981).
- 7) Hladovec, J. : Antithrombotic effects of some flavonoids alone

- and combined with acetylsalicylic acid, *Arzneim. Forsch.* **27**, 1989 (1977).
- 8) Jones, E. and Hughes, R. E. : Quercetin, flavonoids and the life span of mice, *Exp. Gerontol.*, **117**, 213 (1993).
 - 9) Lee, C. J., Kim, H. D., Choung, E. H., Suh, J. K., Park, C. W. and Ha, J. S. : Reduction effect of carcinogen-induced mouse epidermal and forestomach carcinogenesis by the extract of onion wastes. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**(3), 525 (2000).
 - 10) Cha, J. Y., Kim, H. J. and Cho, Y. S. : Effects of water-soluble extract from leaves of morus alba and cudrania tricuspidata on the lipid peroxidation in tissues of rats, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**(3), 531 (2000).
 - 11) Park, S. N., Choi, S. W. and Boo, Y. C. : Antioxidative properties of ginseng leaf flavonoids on cellular membranes. *Cosmochem. Soc.* **16**, 1 (1990).
 - 12) Park, J. C. and Ok, K. D. : Phenolic compounds from *Rosa rugosa* Thunb. in korea. *J. Pharm. Soc. Kor.* **37**(4), 365 (1993).
 - 13) Lee, M. W. : Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. *J. Pharm. Soc. Kor.* **39**(2), 200 (1995).
 - 14) Lichtenstein, L. M. : Mediator release and asthma in "asthma Physiology, Immunopharmacology and Treatment". editor Lichtenstein, L. M. and Austen K. F. Austen New york, Academic Press 93 (1977).
 - 15) Park, J. C., Young, H. S., Yu, Y. B. and Lee, J. H. : Studies on the chemical components and Biological activities of Edible plants in korea(I) : Phenolic compounds from the leaves of *Cedrela sinensis* A. Juss. *J. Pharm. Soc. Kor.* **37**(3), 306 (1993).
 - 16) Umeo, T. : Suppression of lipid peroxidation by quercetin and its glycosides in spinach chloroplasts. *Phytochem. Photobiol.* **38**, 363 (1983).
 - 17) Hodnick, W. F., Kung, F. S., Roettger, W. L., Bohmont, C. W. and Pardini, R. S. : Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 2345 (1986).
 - 18) Younes, M. and Siegers, C. P. : Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. *Planta Medica* **43**, 240 (1981).
 - 19) Middleton, E., Drzewiecki, J. G. and Krishnarao, E. : Quercetin; an inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release. *J. Immunol.* **127**, 546 (1985).
 - 20) Tauber, A. L., Fay, J. R. and Marietta, M. A. : Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH oxidase. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1367 (1984).
 - 21) Warren, D. B., Louis, W. H. and Robert, W. W. : The bioflavonoid quercetin inhibits neutrophil degranulation, superoxide production and phosphorylation of specific neutrophil protein. *Biochem. Biophys. Res.* **144**, 1229 (1987).
 - 22) 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. Kor.* **43**, 494 (1999).
 - 23) 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. Kor.* **44**(5), 455 (2000).
 - 24) 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. Kor.* **45**(3), 269 (2001).
 - 25) Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods* **65**, 55 (1983).
 - 26) 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).
 - 27) Matinez-Esparza M. : Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **225**, 139 (1998).
 - 28) Hearing V. J. : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *Soc. Invest. Dermatol.* **4**(1), 24 (1999).
 - 29) Jimbow, K., Quevedo, W. C., Fitzpatrick, T. B., et al. : Biology of melanocyte. In: Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., et al. eds. *Dermatology in general medicine*, 4th ed. New York : McGraw-Hill Book, 261 (1993).
 - 30) Yaar, M. and Gilchrist B. A. : Human melanocyte growth and differentiation : A decade of new data. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 611 (1991).