

소목 부탄올 추출물이 B16/F10 흑색종세포의 멜라닌 합성에 미치는 효과

천현자[#] · 황상구* · 정동훈 · 백승화 · 전병훈* · 우원홍
원광대학교 한의학 전문대학원, *원광대학교 한의과대학 병리학 교실
(Received February 15, 2002; Revised March 15, 2002)

Butyl Alcohol Extract from *Caesalpinia sappan* L. Regulates Melanogenesis in B16/F10 Melanoma Cells

Hyun Ja Chun[#], Sang-Gu Hwang*, Dong Hun Jeong, Seung Hwa Baek,
Byung Hun Jeon* 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 — *Caesalpinia sappan* L. has long been commonly used as emmenagogue, analgesic, and a cure for contusion and sprain as well as a remedy for thrombosis in the Oriental medicine. The main constituent of *C. sappan* is brazilein, which is an antioxidative substance that has a flavonoid structure. In this study, we examined the effect of butanol extract of *C. sappan* on proliferation and melanogenesis in B16/F10 melanoma cells. After 48h treatment of cells with various concentrations of butanol extract, the cells exhibited a dose-dependent inhibition in their proliferation without apoptosis. Therefore, the growth retardation by the extract may be due to the cell arrest, not due to the cell death induced by cytotoxicity. We also estimated total melanin contents as a final product and activity of tyrosinase, a key enzyme, in melanogenesis of B16/F10 melanoma cells. Our result showed that the melanin contents and tyrosinase activity were decreased in butanol extract-treated cells in a dose dependent manner compared to control group. In conclusion, it was observed that butanol extract of *C. sappan* inhibited melanization of these cells and therefore butanol extract could be developed as skin whitening components of cosmetics.

Keywords □ *Caesalpinia sappan* L., melanogenesis, tyrosinase activity, melanin content

멜라닌은 페놀류의 생체고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이며 사람의 머리카락과 피부색을 이루는 색소 중 하나이다.¹ 멜라닌세포의 멜라노솜에서 tyrosinase의 효소작용에 의해 생성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동되어 자외선 등에 의한 피부의 노화나 일광각화증을 억제하여 피부를 보호하는 긍정적인 기능과 더불어 과잉생산에 의한 피부의 색소침착 및 멜라닌 전구물질들에 의한 독성으로 세포사멸을 촉진하는 부정적인 기능도 동시에 가지고 있다.²⁻⁴⁾

본 연구의 약재로 사용된 소목(*Caesalpinia sappan* L.)은 콩과(Leguminosae)에 속한 낙엽소교목 또는 관목으로 인디아, 말레이시아 칸드, 중국 남부 등 열대 아시아지역에 분포하고 있다. 그 높이는 5~10 m에 달하며, 줄기에는 작은 가지가 있고 그 가지

는 회록색이며 원형의 돌출된 껍질눈이 있다. 새 가지에는 짧고 부드러운 털이 있으며 잎은 2회 깃꼴 겹잎이며 협과는 비스듬한 타원형이며 성숙하면 암홍색으로 되는데 짧은 가늘고 보드라운 털이 있으며 벌어지지 않고 종자 4~5개가 들어 있다. 개화기는 5~6월이며 결실기는 9~10월경으로 알려져 있다.⁵⁾

약대사전에는 소목의 약리작용으로서 항균작용, 중추신경 억제작용, 심혈관에 대한 작용 등이 기록되어 있다.⁶⁾ 또한 국내에서 소목에 대한 연구로는 Park⁷⁾ 등의 위암 세포주에 대한 세포독성 효과와 Lim⁸⁾ 등의 항산화 효과 및 Kim⁹⁾ 등의 항염 효과와 항균 소취 가공 등에 관한 보고가 있으며, Jeon¹⁰⁾ 등은 세포독성 효과와 topoisomerase I 억제활성에 관한 연구를 보고하였으나 아직까지 멜라닌합성에 관한 보고는 없는 실정이다. 소목의 주요성분으로는 hematoxylin과 flavonoid 구조를 갖는 무색의 원색소인 brazilin이 알려져 있으며, brazilin은 공기 중에 산화되어 brazilein이 된다.¹¹⁾ Moon¹²⁾ 등은 소목의 주성분인 brazilin이 고혈압에 효과가 있음을 보고하였고, Hwang¹³⁾ 등은 brazilin이

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-850-6938 (팩스) 063-850-6840
(E-mail) hjchun@wonkwang.ac.kr

혈소판에서 칼슘농도를 조절함을 보고하였으며, Kim¹⁴⁾ 등은 혈액에서 brazilin의 혈당저하 작용을 보고하였다. 또한 Lee¹⁵⁾ 등은 brazilin이 그늘음제(tanning agent)로 효과가 있음을 보고하였다.

최근에 생약이나 한약재 같은 천연물을 이용하여 멜라닌색소와 관련된 연구가 많은 연구자들에 의해 진행되고 있다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 본 연구팀이 진행하고 있는 피부질환 치료제 및 미백제 개발의 일환으로서 본 연구에서는 소목의 부탄을 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16/F10 melanoma 세포에 부탄을 추출물을 처리하고 tyrosinase 활성 및 melanin 양을 측정할 결과 유의한 효과를 보였기에 보고하는 바이다.

실험방법

시료의 추출 및 분리 - 실험재료인 소목 800 g을 실온에서 MeOH로 3회 추출한 후 이를 감압하여 농축시킨 MeOH 추출물 12 g을 얻었다. MeOH 추출물 전체를 증류수에 재현탁시킨 다음 CHCl₃로 3회 분획하여 CHCl₃ 가용부를 감압 농축하여 CHCl₃ 분획 1.7 g을 얻었다. 계속하여 잔류층인 수층을 EtOAc로 3회 분획하여 상층인 EtOAc층을 얻어 감압 농축하여 EtOAc 분획 2.4 g을 얻었다. 남은 수층에 대하여 n-BuOH 가용부를 얻고 이를 감압 농축하여 n-BuOH 분획 3.4 g을 얻었다(Fig. 1).

검액조제 - 시료로 사용한 소목의 부탄을 추출물은 DMSO에 녹인 후, 세포에 투여하기 전에 0.22 µm pore 여과지로 여과 멸균하여 실험농도에 알맞게 조정된 다음 사용하였다.

세포배양 - B16/F10 melanoma 세포는 CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% fetal bovine serum(Gibco Co.)이 포함된

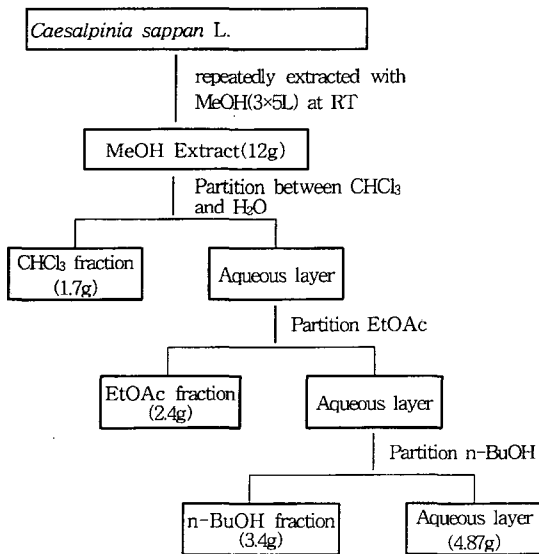


Fig. 1 - Schematic diagram of extraction and fractionation of *Caesalpinia sappan* L.

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 - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 정량은 Mosmann의 방법²⁰⁾을 변형하여 실시하였다. 부탄을 추출물을 처리한 후 세포를 48 시간 배양한 후 상층액을 버리고 당일 제조한 500 µg/ml MTT를 배양 용기 당 1 ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3 시간 동안 배양하였다. 살아 있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되었으며 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 2 회 세척한 후 0.02 ml와 동량의 0.4%(w/v) trypan blue를 잘 섞은 다음 2분 후 hemocytometer에 넣고 광학현미경을 이용하여 trypan blue에 염색되지 않고 살아 있는 세포수를 측정하였다.

형태학적 변화 - B16/F10 melanoma 세포를 각 well당 1x10⁵ 개씩 넣고 24시간 동안 세포를 안정화시킨 후 부탄을 추출물을 농도별로 첨가하여 48시간 배양한 다음 위상차 현미경(Diaphot 300, Nikon, Japan)을 이용하여 100배율하에서 대조군과 실험군의 형태학적 변화를 관찰하였다.

멜라닌 양 측정 - 멜라닌 양은 Hosoi²¹⁾ 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 2 회 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 세포 용해액(1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, 0.1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride)을 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 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

소목의 세포증식에 미치는 영향 - 부탄올 추출물이 B16/F10 melanoma 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 부탄올 추출물을 0.01 µg/ml에서 50 µg/ml까지 다양한 농도로 세포 배양배지에 처리하고, 세포를 48 시간 배양한 후에 MTT 측정 방법을 이용하여 세포의 증식을 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, 부탄올 추출물에 의한 세포의 증식은 5 µg/ml 이하의 낮은 농도에서는 대조군에 비해 약간 증가하였으나 유의할만한 변화를 나타내지 않았다. 그러나 10 µg/ml 농도부터는 서서히 증식이 억제되는 경향을 보였으며 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 통계학적으로 유의성 있게 세포증식이 억제되는 경향을 보여줬다. 또 다른 실험 방법으로서 trypan blue 용액을 이용하여 세포의 생존율을 비교하였다. MTT 측정시와 동일한 농도로 부탄올 추출물을 처리하고 trypan blue 용액에 염색되지 않은 살아 있는 세포 수를 조사해본 결과 대조군에 비교하여 실험군에서는 처리농도에 의존적으로 세포 생존율이 통계학적으로 유의성 있게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 이러한 결과는 MTT 측정 결과와 실험방법상의 차이점으로 약간의 수치상에 차이점은 있지만 세포의 증식억제 및 생존율 감소의 경향은 매우 잘 일치하고 있음을 보여주었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 소목의 부탄올 추출물은 B16/F10 melanoma 세포의 증식을 억제시킴을 알 수 있었다. 일반적으로 외부 자극 물질에 대한 세포반응 결과로 대조군에 비하여 실험군의 세포 수가 줄어드는 현상이 어떠한 원인에 의한 것인지를 조사해 볼 필요가 있다. 즉, 외부 자극 물질의 세포독성에 의한 사멸 세포수의 증가로 세포수의 감소가

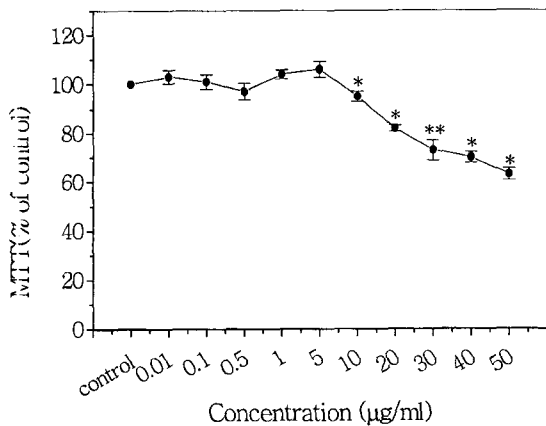


Fig. 2 - Effect of butanol extract from *Caesalpinia sappan* L. on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of butanol extract for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control and data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

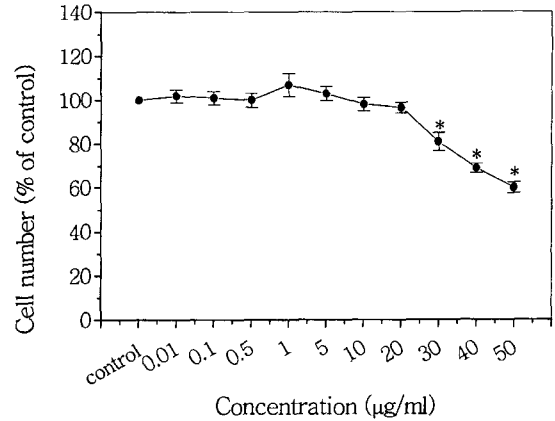


Fig. 3 - Effect of butanol extract from *Caesalpinia sappan* L. on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of butanol extract for 48 h. The viability of the cells was measured by trypan blue test. Results were expressed as % of control and data were mean ± SE of at least five determinations. *significantly different from control group (*p<0.01).

일어나는지 또는 세포주기의 진행이 방해되어 세포분열의 정지로 세포 증식의 감소가 유도되는지 고려해 볼 수 있다. 그러므로 본 연구에서도 대조군에 비교하여 부탄올 추출물에 노출된 B16/F10 melanoma 세포의 숫적인 감소가 어떠한 원인에 의한 것인지를 조사해 볼 필요가 있다.

세포의 형태학적 변화 - 일반적으로 부작성의 세포들은 세포독성 유발물질, 성장인자의 결핍, 바이러스의 감염 등을 포함하는 다양한 종류의 외부 자극에 의해 세포사멸이 유도되어지면 세포의 크기가 축소되어지고 배양배지 속에 사멸소체들이 발견된다. 그러므로 부탄올 추출물에 노출된 B16/F10 melanoma 세포의 증식이 감소한 이유가 세포사멸에 기인하는 것인지를 알아보기 위하여 B16/F10 melanoma 세포에 부탄올 추출물을 농도별로 처리하고 48시간이 지난 후에 형태학적 변화를 confocal 현미경으로 대조군과 실험군을 비교하여 관찰하였다. 그 결과 저 농도의 처리군에서는 대조군과 비교하여 큰 변화를 관찰 할 수 없었다. 그러나 처리농도가 높아 질수록 대조군에 비하여 실험군에서의 세포 밀도는 점차 감소하였으며 세포의 크기는 오히려 약간 커졌고 수직상 돌기의 형태가 나타나면서 길이가 약간 길어짐을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 이러한 결과는 높은 농도의 부탄올 추출물이 B16/F10 melanoma 세포의 성장을 억제시키고 세포의 분화를 촉진하는 것을 보여준다. 그러나 세포사멸의 특징인 세포막 외부 용기의 돌출 현상은 관찰할 수 없었고 배양배지 속에 세포사멸이 유도된 부유세포도 또한 관찰할 수 없었다. 즉, 부탄올 추출물은 고농도에서 B16/F10 melanoma 세포의 성장은 억제시키지만 세포사멸을 유도하지는 않는 것으로 보인다. 세포의 성장이 일시적으로 또는 영구적으로 정지되는 시기로는 크게

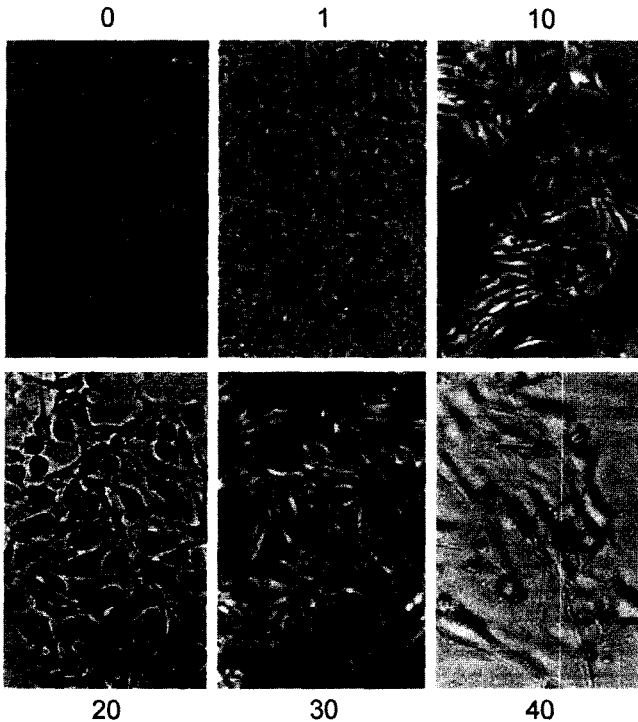


Fig. 4 – Morphology of control and butanol extract-treated B16/F10 melanoma cells. Cells were treated with 1, 10, 20, 30, 40 µg/ml of butanol extract for 48 h and then morphology of treated cells was compared to untreated control cells using confocal microscopy.

2가지 즉 G1 checkpoint와 G2 checkpoint로 구분할 수 있으며 세포주기 진행과 관련된 유전자의 변화가 유도되어진다. 부탄올 추출물에 노출된 B16/F10 melanoma 세포의 경우도 세포주기의 정지가 일어난다면 DNA농도를 결정함으로써 어느 시기에 영향을 받는지 차후 결정할 수 있을 것이다.

Tyrosinase 활성도에 미치는 영향 – Tyrosinase는 멜라닌 생성에 있어 중요한 역할을 하고 있으며 멜라노솨에서 tyrosine을 산화시켜 dopa를 만드는 tyrosine hydroxylase와, dopa를 산화시켜 dopachrome을 만드는 dopa oxidase로 작용하여 최종적으로 멜라닌을 합성하는데 있어서 주요 효소로 작용한다.²³⁾ 본 연구에서는 부탄올 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 세포에 부탄올 추출물을 0.1 µg/ml에서 40 µg/ml의 다양한 농도로 처리하고 48시간 배양한 후 tyrosinase 활성도를 먼저 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, 부탄올 추출물의 처리농도가 0.1 µg/ml에서부터 tyrosinase의 활성도가 서서히 감소하다가 5.0 µg/ml에서는 28%, 10 µg/ml에서는 39%, 20 µg/ml에서는 50%의 감소율을 보였다. 그 이상의 처리 농도에서는 tyrosinase의 활성도가 더 이상 감소하지 않고 20 µg/ml 농도에서와 마찬가지로 지속되는 결과를 보여주었다. 결국 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성도는 대조군에 비하여

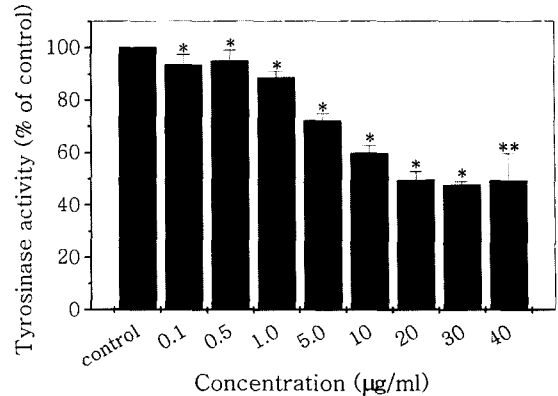


Fig. 5 – Effect of butanol extract from *Caesalpinia sappan* L. on tyrosinase activity in B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of butanol extract for 48 h. Results were expressed as % of control and data were mean ± S.E of at least five determinations. *significantly different from control group (*p<0.01, **p<0.05).

모두 통계적으로 유의성 있게 감소하였다. 이러한 결과는 부탄올 추출물이 tyrosinase의 활성을 억제시킴으로써 차후 멜라닌합성에 관여하는 여러 신호기전을 정상적으로 진행시키지 못 할 것으로 생각된다. 그러므로 부탄올 추출물을 처리한 후 B16/F10 세포에서 멜라닌합성의 최종산물인 멜라닌의 농도를 측정해 보면 tyrosinase의 멜라닌합성 관여 정도를 확인할 수 있을 것이다.

멜라닌 생성에 미치는 영향 – 생체에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고 다시 L-dopaquinone으로 산화시키는 과정으로서 연속적인 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이루어진다.²⁴⁾ 부탄올 추출물이 *in vitro* 상태에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접 확인하기 위

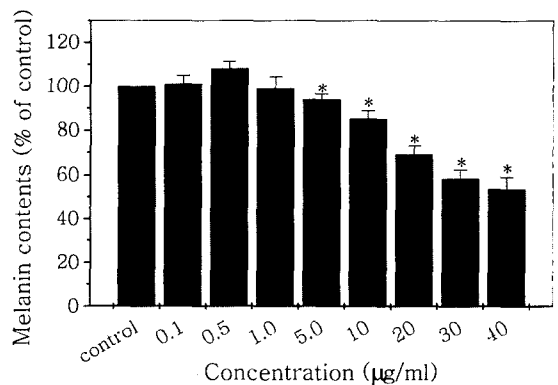


Fig. 6 – Effect of butanol extract from *Caesalpinia sappan* L. on melanin contents in B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of butanol extract for 48 h. Results were expressed as % of control and data were mean ± S.E of at least five determinations. *significantly different from control group (*p<0.01, **p<0.05)

하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. B16/F10 melanoma 세포에 부탄을 추출물을 0.1 µg/ml에서 40 µg/ml의 다양한 농도로 처리하고 48 시간 배양한 다음 멜라닌 생성농도를 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, 부탄을 추출물의 첨가량이 0.5 µg/ml까지는 처리 농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성이 대조군에 비하여 실험군에서 약간 증가되는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. 그러나 1 µg/ml 이상에서는 처리농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성이 감소하기 시작하여 20 µg/ml에서는 32%, 30 µg/ml에서는 42%, 40 µg/ml에서는 47%의 감소율을 보여 추출물 처리 농도에 따른 멜라닌의 합성이 감소되는 경향을 보였으며 그 결과 또한 통계학적인 유의성이 관찰되었다. 이러한 결과는 부탄을 추출물에 노출된 B16/F10 melanoma 세포의 *in vitro* tyrosinase 활성도 변화의 결과와 매우 잘 일치함을 보여준다.

일반적으로 멜라닌세포의 멜라닌화가 발생하는 주요 기전은 멜라닌세포의 증식, 멜라닌소체의 합성증가 및 tyrosinase 활성도의 증가 등에 의해서 이루어진다. 본 연구의 결과를 종합해 볼 때, B16/F10 melanoma 세포에 부탄을 추출물을 처리하면 농도가 증가함에 따라 대조군에 비하여 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성이 모두 감소하는 경향을 보여 주었다. 이런 현상은 tyrosinase가 멜라닌합성에 관여하는 주요한 효소로 작용함을 보여주고 기존의 보고된 연구와 잘 일치한다. 또한 소목의 부탄을 추출물에 노출된 B16/F10 melanoma 세포는 고농도에서 세포 성장이 억제되면서 세포분화가 유도되고 있는 점으로 미루어 tyrosinase의 기능이 세포증식과 관련되어 있음을 추측하게 하며 앞으로 이 부분에 대한 연구가 계속적으로 필요하다고 본다. 아울러 고농도의 추출물이 처리된 세포 내에서는 멜라닌합성이라는 물질대사의 과정 중 다른 여러 신호기전의 경로에 관여하는 요소들이 있겠지만 최소한 tyrosinase 활성도의 절대값이 감소됨으로 인해 최종산물인 멜라닌의 합성을 감소, 억제시키는 작용에 관여하는 것으로 사료된다. 소목의 부탄을 추출물에 함유된 활성물질의 분리 및 구조를 밝히고 활성물질에 의한 멜라닌 생성의 반응경로를 규명하는 연구가 진행됨으로서 소목이 미백제 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

소목이 피부의 멜라닌 색소 형성에 어떠한 영향을 주는지를 연구하기 위하여 B16/F10 melanoma 세포에 소목의 부탄을 추출물을 다양한 농도로 처리한 후 세포의 증식, 형태적 변화, 멜라닌 양의 변화 및 tyrosinase 활성도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 부탄을 추출물이 5 µg/ml 농도까지는 세포증식이 의미있는 차이는 없었으나 10 µg/ml 농도 이상에서는 유의성있게 세포증식

이 억제되고 세포분화는 촉진되었다.

2. Tyrosinase 활성도는 부탄을 추출물의 처리농도가 증가함에 농도 의존적으로 tyrosinase 활성도가 감소하였다.

3. 멜라닌 생성은 tyrosinase 활성도와 마찬가지로 0.5 µg/ml까지는 유의성 없이 증가 되었고 그 이상의 농도에서는 멜라닌 생성이 유의성 있게 감소하였다.

결론적으로 소목의 부탄을 추출물은 B16/F10 melanoma 세포의 증식을 억제하면서 동시에 멜라닌화도 억제시킨다.

감사의 말씀

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

문 헌

- 1) Bell, A. A. and Weeler, M. H. : Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**, 411 (1986).
- 2) Weixiong, L. and Helene, Z. H. : Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Phytochem. Phytobiol.* **65**, 480 (1997).
- 3) Kaufman, R. J. : Vectors used for expression in mammalian cells. *Meth. In. Enzymol.* **205**, 87 (1991).
- 4) 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).
- 5) 정진섭, 신민교 : 도해 생약대사전, p. 666 (1990).
- 6) 김창민 외 : 중약대사전, 청담출판사 p. 2420 (1997).
- 7) Park, K. J., Kim, E. H., Eun, Y. A., Kang, B. J. and Sung, H. J. : Cytotoxic effect of Korean traditional prescription on the human gastric cancer cell lines. *Kor. J. Pharmacogn.* **28**(4), 233 (1997).
- 8) Lim, D. K., Choi, L. U. and Shin, D. H. : Antioxidative activity of some solvent extract from *Caesalpinia sappan* L. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**(1), 77 (1996).
- 9) Kim, Y. S., Noh, Y. K., Lee, G. I., Kim, Y. K., Lee, K. S. and Min, K. R. : Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**(3), 265 (1995).
- 10) Jeon, W. K., Park, K. J., Kim, S. Y., Ma, J. Y. and Sung, H. J. : In vitro studies on the anticancer effect and topoisomerase I inhibition activity of *Caesalpinia sappan* L. extract. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**(1), 1 (1999).
- 11) Moon, C. K., Chung, J. H., Lee, Y. M., Lee, S. H., Hwang, G. S., Park, K. S., Mock, M. S., Kim, S. G., Ahn, Y. S. and Ann, J. H. : Effects of Brazilin on erythrocyte deformability and its regulated biochemical factors in streptozotocin induced

- diabetic rats, *Arch. Pharm. Res.* **11**(2), 149 (1988).
- 12) Moon, C. K., Park, K. S., Kim, S. G., Won, H. S. and Chung, J. H. : Brazilin protects cultured rat hepatocytes from BrCCl₃-induced toxicity. *Drug Chem. Toxicol.* **15**(1), 81 (1992).
 - 14) Hwang, G. S., Kim, J. Y., Chang, T.S., Jeon, S.D., So, D.S. and Moon, C. K. : Effects of Brazilin on the phospholipase A2 activity and changes of intracellular free calcium concentration in rat platelets. *Arch. Pharm. Res.* **21**(6), 774 (1998).
 - 15) Kim, S. G., Kim, Y. M., Khil, L. Y., Jeon, S. D., So, D. S., Moon, C. H. and Moon, C. K. : Brazilin inhibits activities of protein kinase C and insulin receptor serine kinase in rat liver. *Arch. Pharm. Res.* **21**(2), 140 (1998).
 - 16) 이강대, 김정하 : Brazilin as a new sunless tanning agent, 대한화장품학회지, **23**(3), 82 (1997).
 - 17) 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**(4), 494 (1999).
 - 18) 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).
 - 19) 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).
 - 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 a-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) Hearing V. J. : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organi-zation. *Soc. Invest. Dermatol.* **4**(1), 24 (1999).
 - 24) Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J. and Chung, S. R. : Isolation of inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of *Pawonia moutan*. *J. Pharm. Soc. Kor.* **42**(4), 353 (1998).
 - 25) 정우열 : 피부미용에 관한 한의학적 연구. p. 7 (1999).
 - 26) Chen, J. S., Wei, S. C. and Marshall, M. R. : Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1897 (1991).
 - 27) Jimbow, K., Quevedo, W. C., Fitzpatric, T. B., et al. : Biology of melanocyte. In: Fitzpatric, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., et al. eds. *Dermatology in general medicine*, 4th ed. New York : McGraw-Hill Book, p. 261 (1993).
 - 28) Yaar, M. and Gilchrest B. A. : Human melanocyte growth and differentiation : A decade of new data. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 611 (1991).