

더덕 분획별 抽出液이 멜라닌 生成에 미치는 影響

오한철 · 홍철희 · 이수형 · 황충연 · 김남권
원광대학교 한의과대학 안ibi인후피부과학교실

The Effect of Various Partition Extracts of Radix Codonopsis Lanceolatae on the Melanogenesis

Han-cheol Oh, Chul-hee Hong, Soo-hyeong Lee, Chung-yeon Hwang, Nam-kwen Kim

Melanin pigmentation has an essential role in protecting human skin against the damaging effects of ultra violet radiation, infection, environmental factor, etc. However abnormal melanin pigmentation can directly cause a number of congenital and acquired pigmentary skin disease. This study conducted to evaluate the effects of various partition extracts of Codonopsis lanceolata on the melanogenesis in the B16 melanoma cells. The cells were treated for 3 days with various partition extracts of Codonopsis lanceolata. While treatment with the BuOH partition extract of Codonopsis lanceolata increased significantly the tyrosinase activity and melanin content, the n-Hexane or ethyl acetate partition extract dose-dependently suppressed them compared with untreated control. But ethyl acetate partition significantly decreased the cell viability. The H₂O partition extract at various concentrations did not exhibit any significant change on the melanogenesis. These results indicate that treatment with the n-Hexane partition extract inhibits the melanogenesis in B16 melanoma cells, and raise the possibility that this extract may be effective in the abnormal melanin pigmentation as well as the whitening agent for the skin.

Key words : Radix Codonopsis lanceolatae; Melanogenesis

서론

피부질환은 색소침착증, 피부암, 피부 반점, 기미, 주근깨, 악성 흑색종, 피부 흑화 현상 등이 있는데

이들 중 최근 초점이 되는 부분이 바로 색소침착증과 피부 흑화 현상이며 이런 질환은 내·외부 환경적인 요인(자외선, 유전적인 요인, 신진대사, 염증, 내분비계등)에 의해 특이적으로 멜라닌을 과잉생성하는 질환을 말한다¹⁻⁸⁾.

멜라닌의 생합성은 L-Tyrosine이 tyrosinase에 의해 산화 반응을 거쳐 dihydroxyl-L-phenylalanine(L-DOPA)로 전환되고, 다시 L-DOPA는 dopaquinone으로 산화되며, 그런 후 dopachrome, indole-5,6-quinone 등의 여러 중간체를 거쳐 멜라닌이 합성된다(9-12). 따라서 tyrosinase는 멜라닌 생합성 과정에서 반

교신저자: 김남권, 원광대 군포한방병원 안ibi인후피부과
(Tel: 031-390-2672, E-mail: drkim@wonkwang.ac.kr)

응을 촉매하는 속도조절효소로서 중요한 역할을 한다. Tyrosinase는 거의 모든 생물 중에 분포되어 있으며, 활성부위에 한 쌍의 구리이온을 함유하고 있는 금속함유 단백질이다¹³⁻¹⁶. 그러므로 tyrosinase 활성을 조절한다는 것은 멜라닌 생성을 조절할 뿐만 아니라 색소침착에 대한 새로운 치료제를 개발할 수 있을지 모른다. 멜라닌 생성이나 멜라닌 대사과정을 통제하는 의약품들은 현재 미백물질로써 사용하고 있으며 수많은 미백물질들은 멜라닌생합성을 억제하는데 기준물질로써 사용되고 있다.

더덕(Radix Codonopsis Lanceolata)은 길경과(도라지과, Campanulaceae)에 속하는 다년생의 덩굴성 초본이고 생약으로는 근경을 건조한 것을 쓰이며 또한 식용으로도 사용하고 있고, 養陰潤肺, 生津, 祛痰排膿, 清熱解毒, 催乳, 消腫 등의 효능이 있어 乾咳, 咽頭炎, 肺癰, 乳癰, 腸癰, 瘡瘍腫毒, 乳汁不足, 乳腺炎, 毒蛇咬傷, 頭痛, 皮膚疾患 등의 병증을 치료하고 있다. 더덕의 약효 성분으로는 triterpene, steroid, flavonoid 등이 주로 연구되었다¹⁷⁻²³.

더덕에 대한 실험적 연구로는 김 등²⁴은 saponin, 당질 및 섬유질 함량이 더덕을 첨가 식이법이 흰쥐 혈청 및 간장의 지질의 감소, 한 등²⁵은 더덕 물 추출물의 항산화효과, 이 등²⁶은 더덕 물 추출물이 세포성 면역반응에 미치는 영향 등이 보고되었다. 한 방 미용학적인 측면에서는 더덕 팩이 피부의 진정, 소염작용, 잔주름 예방, 보습작용을 한다고 보고하였다²⁷.

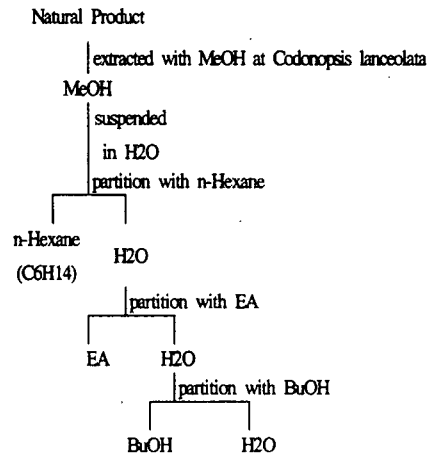
이에 저자는 피부미용을 위하여 널리 사용하고 있는 더덕의 분획별 효능에 대하여 알아보하고자 B16 흑색종세포를 이용하여 멜라닌 생성과정에서 가장 중요한 효소인 tyrosinase 활성도와 최종산물인 멜라닌양을 측정하였으며 광학현미경을 이용하여 세포의 형태적인 변화와 더덕 분획별 추출물로 인한 세포의 색소 침착을 관찰한 결과 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 시료의 추출 및 분리

본 연구에 사용한 사삼은 전라북도 진안 속근 약초 시험장에서 재배되는 3년근을 제공 받아 (2002년 9월) 충분히 음건한 후 본 연구에 사용되었다.

더덕 1kg을 실온에서 MeOH로 20일 동안 추출하여 여과하고 그 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하여 용매를 제거시켜 추출물을 얻었다. MeOH 분획을 증류수에 현탁 시키고 n-Hexane을 가하여 분획 갈때기로 n-Hexane층과 H2O층을 감압농축 하여 n-Hexane층을 얻었다. H2O층에 Ethyl Acetate (EA)를 가한 후 분획 갈때기로 H2O층과 EA층을 분획하는 조작을 실시한 후 EA층을 얻고 H2O층에 BuOH를 가해 분리한 다음 각각 여액을 감압여과 하여 BuOH층과 H2O층을 얻었다. Scheme 1. 과 같이 각 분획을 순차적으로 제조하여 더덕에서 n-Hexane층 4.08 g, EA층 783.7 mg, BuOH층 3.83 g, H2O층 67.7 g을 얻었다.



Scheme 1. Extraction and partition of *Codonopsis lanceolata*

2. B16 흑색종세포주 배양

B16 흑색종세포 배양은 CO2 배양기 (37°C, 5%)에서 10% fetal vovine serum (FBS; Hyclones Co.)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM; Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD)배지를 이용하였으며 3일 주기로 배양액을 교체하였다.

3. MTT assay

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma Co. Ltd.) 정량은 Mosmann이 방법²⁸⁾을 변형하여 실시하였다. 더덕분획을 처리한 후 세포를 3일 배양한 후 상층액을 버리고 당일 제조한 0.05% MTT를 배양용기에 분주한 후 3시간동안 배양하였다. 살아 있는 세포들은 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되었으며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma Chemical Co.)를 분주하여 15분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

4. 試驗管 內 tyrosinase 活性度 測定

시험관 내 tyrosinase 활성도는 Mason and Peterson 등²⁹⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 160 ul, 기질 3 mM L-Tyrosin 수용액 10 ul, 시료 20 ul를 혼합하였다. 여기에 2500 U/ml mushroom tyrosinase 10 ul를 가하고 잘 혼합한 후 37°C에서 30분간 배양하면서 매 10분마다 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 sample 대신 증류수를 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase 活性율 (\%)} = \frac{B - B'}{A - A'} \times 100$$

- A: 대조군의 반응 후 흡광도
- A': 대조군 용액 중 tyrosinase 대신 buffer가 첨가된 용액의 반응 후 흡광도
- B: 시료가 첨가된 용액의 흡광도
- B': 시료가 첨가된 용액중 tyrosinase 대신 buffer가 첨가된 용액의 반응 후 흡광도

5. 세포내 tyrosinase 活性度 測定

Tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza M등³⁰⁾의 방법에 의해서 측정하였다. 각 well의 세포를 수확하여 원심분리 하여 세포침전물을 만들고, 100µl lysis buffer(1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)를 넣고 4°C 얼음에서 30분간 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 tyrosinase의 enzyme solution으로 사용한다. 이 enzyme solution은 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 100µl에 시료 50µl를 넣어 30°C water bath에서 5분간 보온한 후 100 mM catechol 50 µl를 넣어서 溫度調節裝置가 되어 있는 분광광도계로 37°C, 405 nm에서 吸光度의 변화를 1시간 관찰하였다.

6. 멜라닌의 定量 測定

멜라닌 정량은 Hosoi 등의 방법³¹⁾을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후, 수집한 다음 Fuchs-Rosenthal cytometer로 세포 수를 계산하고 원심분리 하여 수확하였다. 수확된 세포에서 Acid-insoluble material을 얻기 위해 10% DMSO가 添加된 1N NaOH를 300µl 첨가하여 100°C에서 10분 동안 용해시킨다. 405nm에서의 吸光度를 측정하였으며 멜라닌 量은 합성 멜라닌 (Sigma Chemical Co.)을 사용하여 작성된 標準直線에서 구하였다.

7. 광학현미경적 관찰

B16 흑색종세포를 각 dish에 배양하고 24시간동안 세포를 안정화시킨 후 더덕 분획을 농도별로 첨가하여 3일 배양한 다음 inverted microscope(phase contrast, Leica Germany)을 이용하여 대조군과 실험군의 형태학적 변화를 관찰하였다.

8. 멜라닌 세포의 색소 침착 관찰

더덕 분획을 B16 흑색종 세포에 처리하여 3일 동안 배양한 다음 trypsin을 처리하고 세포들을 원심분리 하여 세포의 색소 침착(pellet)을 얻은 다음 수확된 pellet을 육안으로 관찰하여 더덕 분획에 의한 세포의 색소 침착을 관찰하였다.

9. 통계방법

실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 각 실험군은 대조군과 비교하여 나타내었다. 각 군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 ANOVA test를 이용하였다.

실험결과

1. 더덕 분획이 멜라닌 細胞의 生存率에 미치는 影響

먼저 더덕 분획이 멜라닌 合成에 어떤 影響을 미치는지를 알아보기 전에 더덕 분획이 세포 생존율에 어떠한 효과를 나타내는지 알아보았다.

B16 흑색종 세포에 3일 동안 각각의 분획을 다양한 농도(10 - 200 µg/ml)로 처리한 다음 MTT方法으로 세포 생존율을 측정하였다. 더덕 분획중 n-Hexane층(87%, 81%, 71%, 61%), EA층(74%, 65%, 53%, 35%) 그리고 BuOH층(96% 87%, 50%, 43%)은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소하였지만, H2O층(97%, 96%, 98%, 90%)은 영향을 받지 않았다(Fig. 1).

Doses of CL	n-Hexane		EA		BuOH		H2O	
	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
Control	100.0	10.3	100.0	6.4	100.0	3.0	100.0	2.7
10 µg/ml	86.8	2.2	73.6	2.4	96.0	4.6	96.9	1.1
50 µg/ml	80.7	2.2	64.9	3.8	87.3	3.1	96.0	3.5
100 µg/ml	71.1	0.8	52.6	1.0	50.3	1.9	97.6	3.0
200 µg/ml	60.5	3.5	34.5	3.0	42.9	1.9	89.6	4.9

CL = Codonopsis lanceolata

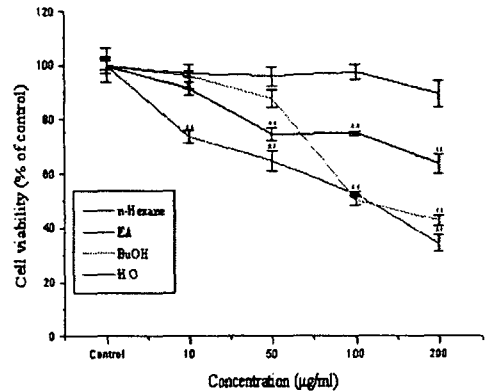


Fig 1. Effect of various partition extracts of Codonopsis lanceolata on the cell viability.

B16 melanoma cells were seeded at 5 × 10³ cells/well. After 1 d, the cells were treated with various concentrations of Codonopsis lanceolata for 3 d. The cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.D. of six determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, *p<0.05; **p<0.01.

2. 더덕 분획이 시험관내 tyrosinase 효소 활성화에 미치는 영향

멜라닌 생성조질물질에 대한 효과를 측정하기 위하여 사용되는 방법 중 버섯 tyrosinase를 이용한 시험관내 tyrosinase 활성도 검사법은 1차적으로 응용되는 방법으로 L-Tyrosine을 기질로 하여 버섯 tyrosinase에 의하여 생성되는 반응산물인 dopachrome의 생성정도를 흡광도로 측정하여 tyrosinase 활성도를 알아보는 방법이다.

본 실험에서 더덕 분획(250 - 1,000 µg/ml) 각각에

대한 버섯 tyrosinase 활성도를 실험한 결과 n-Hexane 층은 대조군에 비하여 250 µg/ml 농도 처리 시 138.2 ± 4.2%, 500 µg/ml 농도 처리 시에는 140.0 ± 0.7%, 1,000 µg/ml 농도처리 시에는 151.3 ± 5.3%로, EA층은 250 µg/ml에서 117.9 ± 5.3%로 버섯 tyrosinase 활성도를 증가시켰다. 반면 BuOH층은 각각의 농도에서 93.3 ± 0.1, 88.3 ± 3.6, 82.0 ± 4.7%로 버섯 tyrosinase 활성도가 감소되었다(Table 1.). 이상의 결과만으로 in vitro에서 더덕 분획이 멜라닌 생성을 억제시켰다고 단정하기는 어렵다.

Table 1. Effect of various partition extracts of *Codonopsis lanceolata* on mushroom tyrosinase activity

Doses of CL(µg/ml)	% of control			
	Hexane	EA	BuOH	H2O
Control	100.0 ± 0.7	100.0 ± 3.6	100.0 ± 5.3	
250	138.2 ± 4.2**	117.9 ± 5.3**	93.3 ± 0.1	
500	140.0 ± 0.7**	109.1 ± 5.0	88.3 ± 3.6*	
1000	151.3 ± 5.3**	101.5 ± 3.4	82.0 ± 4.7*	

Data were Mean ± S.D. of three determinations. Asterisks denote a significant difference compared with control group, *p<0.05; **p<0.01
CL = *Codonopsis lanceolata*

3. 더덕 분획이 세포내 tyrosinase 활성도에 미치는 영향

더덕 분획이 멜라닌 생성 과정에 미치는 영향을 조사하기 위하여 멜라닌 합성에 있어서 속도조절 효소로 작용하는 tyrosinase의 활성도에 미치는 영향을 B16 흑색종 세포를 이용하여 조사하였다. 더덕 분획을 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 그리고 200 µg/ml 농도로 B16 흑색종 세포에 처리하고 배양 3일 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다.

n-Hexane층은 대조군에 비하여 100 µg/ml에서 76 ± 3.5% 그리고 200 µg/ml에서 65.6 ± 0.7%로, EA층은 100 µg/ml과 200 µg/ml 농도에서 각각 79.3 ± 1.9%와 74.9 ± 1.2%로 유의하게 감소하였다. 반면 BuOH층은 농도에 의존적으로 tyrosinase 활성 증가

하였고 H2O층은 대조군과 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았다.

더덕 분획 중 n-Hexane층과 EA층이 B16 흑색종 세포의 tyrosinase 활성을 감소시킨 것으로 나타나 버섯 tyrosinase 활성도와 상반되는 결과를 나타내었다(Fig. 2).

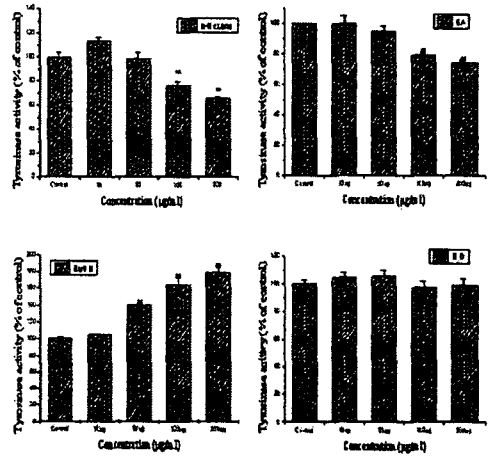


Fig 2. Effect of various partition extracts of *Codonopsis lanceolata* on the tyrosinase activity in B16 melanoma cells

B16 melanoma cells were seeded at 4 × 10⁴ cells/ml. After 1 d, the cells were treated with various concentrations of *Codonopsis lanceolata* for 3 d. The cells were harvested and measured tyrosinase activity. Absorbancy at 405 nm was read every 10 min for 1 h at 37°C using on ELISA plate reader and the activity was corrected by the amount of protein. Data are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.D. of three determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, *p<0.05; **p<0.01.

4. 더덕 분획이 최종 멜라닌 생성에 미치는 影響

더덕 분획이 멜라닌 생성 과정에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. 더덕 분획을 B16 흑색종세포에 10 µg에서 200 µg/ml 농도까지 처리하고 3일 후 세포 당 멜라닌 양을 측정하였다.

n-Hexane층은 대조군에 비하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $87.1 \pm 2.2\%$ 그리고 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $76.4 \pm 2.6\%$, EA층은 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $83.2 \pm 2.0\%$ 로 유의하게 감소하지만 BuOH층과 H₂O층은 멜라닌양이 증가하는 경향이 나타났다. 이러한 결과 더덕 분획물중 n-Hexane층과 EA층은 멜라닌 합성 과정 중 최종산물인 멜라닌 양을 감소시켰다(Fig. 3).

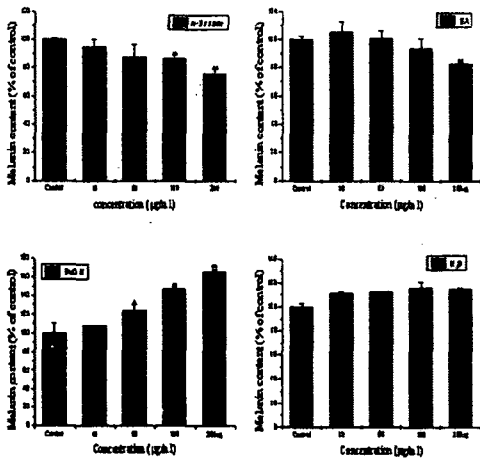


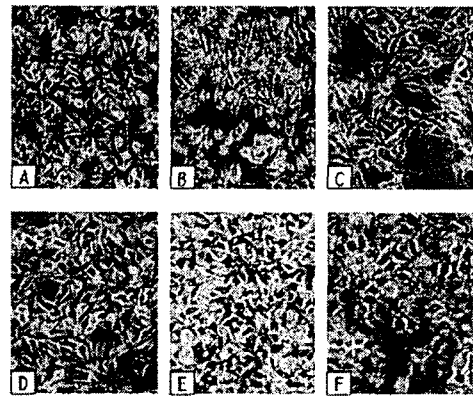
Fig 3. Effect of various partition extracts of Codonopsis lanceolata on the melanin content

B16 melanoma cells were seeded at 4×10^4 cells/ml. After 1 d, the cells were treated with various concentrations of Codonopsis lanceolata for 3 d. The cells were harvested and measured melanin content. Absorbancy at 405 nm was read to use on ELISA plate reader. Divide the total melanin content per cell. Data are expressed as % of control and each column represents the mean \pm S.D. of three determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with control group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

5. 더덕 분획이 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향

더덕 분획을 처리한 B16 흑색종세포의 형태에 미치는 영향을 관찰하였다. 더덕 분획을 3일 동안 B16 흑색종 세포에 처리한 결과 대조군에 비해 α -MSH층은 잘 발달된 수지상 돌기가 관찰 되었다. H₂O분획은 세포 수에 큰 변화를 주지 않았으나

BuOH 분획과 EA 분획에서는 세포 수가 감소하고 형태적인 변화도 일으켰음을 확인할 수 있었다. n-Hexane 분획은 대조군에 비해 형태적인 변화가 거의 없음을 확인할 수 있었다(Fig.4)



A: Control B: BuOH 200 μs , C: EA 200 μs , D: Hexane 200 μs , E: H₂O 200 μs F: α -MSH 10nM

Fig 4. Phase-contrast microscopic findings of B16 melanoma cells treated with Codonopsis lanceolata partition extract

B16 melanoma cells were incubated for 3 d with doses of Codonopsis lanceolata partition extracts. Morphology of cells were compared with treated or untreated cells.

6. 더덕 분획이 세포 내에서 멜라닌 색소 침착 정도 관찰

본 연구의 Fig. 2과 3의 결과에서 더덕 분획중 n-Hexane층은 tyrosinase 활성도와 멜라닌 양이 억제되었기 때문에 이에 대한 육안으로 차이를 관찰하고자 n-Hexane층을 B16 흑색종 세포에 처리한 다음 3일 동안 배양한 후 수확하였다. 수확된 멜라닌 색소 침착도(pellet)는 대조군과 비교하여 확연한 차이를 관찰할 수 있었다. 또한 멜라닌세포 자극 호르몬(α -MSH)은 멜라닌세포의 멜라닌화를 자극하는 것으로 알려져 있으며 본 연구에서 양성 대조군으로 사용하였다. 그 결과 음성·양성 대조군에 비하여 n-Hexane층을 처리한 세포 pellet의 색에 차이를 관찰할 수 있었다 (Fig. 5).

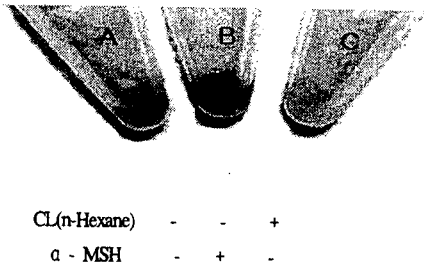


Fig 5. Effect of n-Hexane partition extract of *Codonopsis lanceolata* on the color of pellets

B16 cells seeded at 4×10^4 cells/ml. The cells were treated with hexane partition of *Codonopsis lanceolata* 200 μ g/ml and α -MSH 10nM for 3 D.
CL = *Codonopsis lanceolata*

고찰

피부는 표피층과 진피층으로 구성되어 있다. 표피층은 더 세부적으로 각질층, 과립층, 기저층으로 구분되어 있는데 각각 다른 기능을 하는 세포들(각질형성세포, 멜라닌세포, 랑게한스세포)로 구성되어 있다. 피부의 주 기능은 외부 환경으로부터 인체를 보호하고 항상성을 유지하려는 것뿐만 아니라 내부 장기를 보호하는 등의 생명유지를 위한 주요 기능을 하고 있다.³²⁻³⁴⁾

예를 들면, 태양광선에 노출 되면 피부에서는 vitamin D를 합성하며 멜라닌 세포에서는 피부에 자외선 조사를 줄이기 위하여 멜라닌세포에서 멜라닌을 많이 생성하게 하는 등의 인체 보호하는 긍정적인 기능이 있지만 장기 노출시 과색소 침착증이나 피부암 같은 피부질환을 유발하여 미관상의 부정적인 기능을 유발시킨다. 따라서 이러한 멜라닌 생성을 억제시키기 위한 연구가 과거에서부터 현재까지 계속 진행되고 있다.^{9,35)}

멜라닌 색소는 피부 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌세포(melanocyte)에서 효소 및 비효소적 산화반응에 의해 생성되며 생성된 멜라닌은 멜라닌 소

체(melanosome)에서 침착된다. 피부의 멜라닌세포는 주위로 긴 수지상돌기를 뻗어 주위의 각질형성세포(keratinocyte)와 접촉하고 있으며 이 연합을 표피 멜라닌 단위라고 한다. 이와 같은 배열을 통하여 멜라닌세포는 주위의 각질형성세포에 멜라닌소체를 전달하고 각질형성세포에 분포된 멜라닌은 외부자극 물질 특히 자외선으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능을 가지고 있으나 과색소 침착 같은 부정적인 기능을 가지고 있다.³⁶⁻³⁸⁾

사실 지금까지 많은 연구들은 피부의 비정상적인 색소 침착에 대하여 멜라닌 합성과정의 메카니즘을 규명 하는데 초점이 맞춰졌으며 이러한 관계로 tyrosinase 저해제 개발에 집중되어왔다. 현재 tyrosinase 저해제로써 잘 알려진 arbutin, kojic acid, vitamin C 와 같은 물질들을 tyrosinase 활성도뿐만 아니라 멜라닌 생성과정의 최종산물인 멜라닌 양까지 억제한다. 그러나 vitamin C는 자체가 불안정하고 hydroxyanisole, 5-hydroxyindole 및 hydroquinone은 강력한 멜라닌 생합성 저해 활성을 보이지만 멜라닌세포의 변성과 치사를 유도하며 세포 본래의 기능을 손상시키는 등의 부작용을 나타내며 arbutin, kojic acid 등은 이미 의약품이나 미백제로 사용되고 있지만 활성 및 안전성에 문제점이 있는 등의 단점이 보고 되고 있다.³⁹⁻⁴¹⁾

이러한 이유로 멜라닌 생성을 억제시키는 새로운 치료제 물질을 찾는 시점이 변하고 있으며 화학적인 물질이 아닌 천연물에서 부작용을 줄이면서 안전성 있는 물질을 찾는 연구를 수행하고 있다. 이로 인해 초점이 한방으로 돌려지고 있는 실정이다.⁴²⁾

韓醫學 文獻에는 皮膚疾患의 과색소 침착에 대하여 《黃帝內經·素問》〈至真要大論〉43)에 “歲陽明在泉, 燥淫所勝, ……面塵, 身無膏澤, 足外反熱”이라고 처음 收錄되었고, 巢44)의 《諸病源候論·面皯黑黧候》에서 病理機轉과 形態에 대하여 구체적으로 언급한 이래, 여러 醫家들에 의하여 형태와 색조에 따라 黧黯⁴⁵⁻⁴⁷⁾, 斑點黧黯⁴⁷⁾, 黧點⁴⁸⁾, 面黑^{49,52)}, 面黧黯^{48,53)}, 雀卵^{47,54)}, 鰐子^{47,54)}, 雀斑⁵⁵⁻⁶⁰⁾, 鰐黑斑^{55,56)}, 黧黯

61), 黧黑點⁵⁸⁾, 黑斑⁵⁹⁾ 등 다양하게 表現되어 왔고, 最近 中國文獻^{62,63)}에서는 色素異常性 皮膚病의 範疇에서 雀斑, 黃褐斑, 黧黑斑 등으로 區分하여 辨證施治하였으며, 治療方法으로는 虛證과 實證으로 각각 辨證하여 內服藥과 外用藥들을 사용하였다^{47,53,62-70)}.

韓醫學에서 皮膚질환의 原因이 六淫·七情·飲食·勞逸·虫毒 및 外傷 등이 皮膚에 질병을 발생시키는 要因으로 보았다⁷¹⁻⁷⁴⁾. 또한 韓醫學에서는 인체의 諸病관을 整體觀⁷⁵⁾에 두어서 위와 같은 病인이 病을 일으키는 發病기전에는 두가지 경우로 나누어 생각한다. 첫째, ‘正虛’의 경우이고, 둘째는 ‘邪實’의 경우이다. 일반적으로 七情·飲食 등은 장부 기능에 영향을 주어 간접적으로 皮膚 諸病을 발생하게 하고, 六淫·虫毒 등은 직접 皮膚에 침입하여 發病을 하게 되나, 韓醫學에서 皮膚질환의 發病기전은 단순히 外因으로만 생각하는 것이 아니라 內因으로 臟腑의 생리기능과 밀접한 관계를 가지고 있으므로 皮膚諸病을 치료할 때 外因은 물론 內因적 장부기능을 중요시한다⁷⁵⁾.

과색소 침착질환에 대한 韓醫學的 原因으로 樓⁵⁰⁻⁵²⁾은 《內經》⁴³⁾의 面塵에 대한 說을 따라 顏面이 陽明經에 속하므로 陽明之氣의 不足을 그 原因으로 보았고, 趙^{46-48,53,56,61)}은 巢⁴⁴⁾의 說을 따라 風邪와 痰飲으로 氣血이 不和됨을 原因으로 보았다. 또 李^{46,52,54,58)}은 思慮過多와 飲食失節로 인한 脾胃 損傷, 陳^{55,56,59,60)}은 腎水不足으로 인한 虛火의 發生, 朱^{49,57)}은 熱을 주된 原因으로 보았다. 이상의 文獻을 종합하면 內因으로는 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎陰不足, 陰虛火旺, 脾虛不運 등이, 外因으로는 風邪, 火邪, 濕熱邪, 熱毒 등이 각각 과색소 침착증을 유발하는 것으로 나타났다.

治法에 있어 虛證에서는 補益肝腎, 滋陰降火, 降火散結, 滋腎化源, 滋腎養血, 健脾化濕, 溫陽益腎 등이 사용되었고, 實證에서는 涼血活血, 祛風散火, 散火解毒, 養陰清熱, 清肺涼血, 祛風通絡, 涼血消斑, 疎肝理氣, 活血退斑, 化瘀退斑^{62,63,65,66,68)} 등이 活用되었다.

辨證施治에 의한 內服藥으로는 升麻順氣湯⁴⁶⁾, 連翹散⁴⁷⁾, 酒製四物湯加減⁴⁹⁾, 沖和順氣湯^{50,52)}, 升麻白芷湯⁵¹⁾, 六味地黃丸^{55,56,58,60,61,63,65)}, 犀角升麻丸⁵⁸⁾, 腎氣丸⁵⁹⁾, 人蔘養胃湯⁶¹⁾, 知柏地黃湯⁶⁵⁾ 등이 사용되었고, 外治法에 사용된 外用藥은 玉容散^{47,56,57)}, 紅玉散⁴⁷⁾, 玉容西施散⁴⁷⁾, 皇帝塗容金面方⁴⁷⁾, 玉容膏⁴⁷⁾, 玉容丸^{55,59,60)}, 玉肌散⁵⁵⁾, 改容丸^{57,60)}, 正容散⁵⁸⁾ 등을 사용하였다.

더덕(Radix Codonopsis Lanceolatae)은 길경과(도라지과; Campanulaceae)에 속하는 다년생의 덩굴성 초본이고 생약으로는 근경을 건조한 것을 쓰이며 또한 식용으로도 사용하고 있고, 養陰潤肺, 生津, 祛痰排膿, 清熱解毒, 催乳, 消腫 등의 효능이 있어 乾咳, 咽頭炎, 肺癰, 乳癰, 腸癰, 瘡瘍腫毒, 乳汁不足, 乳腺炎, 毒蛇咬傷, 頭痛, 皮膚疾患 등의 病症을 치료하고 있다. 그리고 辛¹⁷⁾은 우리나라에서는 더덕을 沙蔘으로 사용해 왔으나, 文獻考證 결과 더덕은 羊乳임이 밝혀졌으므로 바로 써야 한다고 하였다. 더덕의 主要 성분으로는 triterpene, steroid, flavonoid 등이 주로 연구되었다¹⁷⁻²³⁾.

더덕의 性味는 甘·辛·平·無毒하고 肺·肝·大腸의 3經에 歸經하며, 약리 작용으로는 적혈구 및 헤모글로빈을 증가 및 백혈구를 감소시키는 조혈제에 대한 작용, 항 피로작용, 혈압강하작용, 혈당상승작용 등이 있다^{19,22)}.

천연물중에서 멜라닌생성과 tyrosinase 활성도를 억제시킨다는 약재들이 보고 되었다. 문⁷⁶⁾은 천화분 추출물에 의한 B16 흑색종 세포에서 멜라닌 생성 억제 효과가 있는 것으로 보고 하였으며, 임⁷⁷⁾은 유용성 감초추출액이 멜라닌 생성을 감소시킨다 보고하였다. 김⁷⁸⁾은 더덕 물추출물이 멜라닌 생성 억제 효과가 있다고 보고하였는데 본 연구는 더덕의 어떠한 성분이 멜라닌 생성 억제 효과가 있는지 규명하고자 더덕을 분획별 추출을 시행하였다. 더덕 분획에 대한 멜라닌 생성 억제에 미치는 영향을 B16 흑색종 세포에서 의미 있는 결과를 얻고자 한다.

멜라닌 생합성은 주로 tyrosinase 의 작용에 의해 이루어지는 것으로 보고 되어 있다⁷⁹⁾. Tyrosinase는 phenolase, monophenolase, monophenol oxidase, cresolase 등으로 불리며, catechol oxidase와는 기능이 유사하여 혼용되기도 한다⁸⁰⁻⁸¹⁾.

Mishima 등은 멜라닌 생성 억제 물질을 두 가지 형태로 분류하였는데, 그 하나는 멜라닌 생성의 속도조절효소인 tyrosinase 효소를 직접 억제하는 것이며 또 하나는 멜라닌 세포 내에서 tyrosinase 합성 억제, tyrosinase 당쇄 수식에 의한 성숙과정의 저해, 세포독성 등의 과정을 통하여 멜라닌을 억제하는 것이다⁸²⁾. 본 연구에서도 시험관내에서 더덕 분획물의 버섯 tyrosinase 활성 억제효과를 조사한 결과 BuOH층에서 농도에 의존적으로 tyrosinase 활성도가 감소되었지만 EA층과 n-Hexane층은 증가시켰다 (Table 1). 그러나 In vitro에서 버섯 tyrosinase 활성도 측정만으로 더덕 추출물이 멜라닌생성을 억제한다고 말하기는 불충분하다. 최 등은 천연물로부터 tyrosinase 활성 저해제의 검색을 하는데 버섯 tyrosinase와 세포내 tyrosinase활성도 두 가지 방법을 시행한 결과 두 방법에서 나온 멜라닌생성억제효과를 가지고 있는 약재들이 달랐다⁸³⁾. 이러한 이유로 더덕 분획을 B16 흑색종 세포에 직접 처리하여 tyrosinase 활성도를 측정한 결과 n-Hexane층과 EA층에서 유의성 있게 억제되었지만 BuOH층은 증가하였고 H2O층은 유의한 차이가 없었다.

멜라닌 생합성은 tyrosinase의 작용에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있지만 L-Tyrosine으로부터 DOPA로 산화되고 DOPA에서 DOPAquinone으로 산화, DOPAquinone에서 DOPAchrome의 생성, DOPAchrome에서 DHI(5,6-dihydroxyindole)로 전환에 의해서 생합성되며 처음 두 단계의 반응을 조절할 뿐이다. 그러나 1980년대 이후 DOPAchrome이 DHI로 전환되는 경로 외에 DOPAchrome tautomerase (TRP-2)작용에 의해 DHICA(5,6-dihydroxyindole carboxylic acid)로 전환되는 새로운 경로가 존재한다는 사실이 밝혀졌다^{79,84,85)}.

따라서 tyrosinase 효소 활성이외에 다른 요인에 의한 멜라닌 생성을 억제시킬지 모르기 때문에 멜라닌 최종 생산물인 멜라닌 양을 측정하였다. 그 결과 더덕 분획 물을 처리한 결과 n-Hexane층과 EA층은 농도에 의존적으로 멜라닌 양이 감소하였으며 반면 BuOH층은 증가하였고 H2O층은 유의한 차이가 없었다. 이상의 결과 더덕 분획물이 tyrosinase에 직접적으로 작용하여 활성을 억제시킴으로써 멜라닌 양 또한 감소되었다고 생각한다.

이상의 결과 더덕 유기용매분획별 추출물을 B16 흑색종 세포에 처리한 결과 n-Hexane층과 EA층이 멜라닌 합성과정 중 tyrosinase 활성을 억제시킴으로써 멜라닌 생성을 감소시켰음을 알 수 있었는데 특히 EA층은 세포 생존율을 유의성 있게 감소시켰기 때문에 미백물질로써 부적절하다고 생각된다. n-Hexane층은 멜라닌 합성과정 중에서 속도조절효소로써 tyrosinase 이외에 tyrosinase - related protein (TRP-1), dopachrome tautomerase(TRP-2) 효소의 활성에 대한 연구와 더 구체적인 더덕의 특정한 성분으로 인해 멜라닌생성이 억제되었는지에 대한 구조 규명 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론

더덕 분획물이 피부의 멜라닌 합성과정에 어떠한 영향을 미치는지를 규명하고자 B16 흑색종 세포를 이용하여 더덕 분획에 의한 세포 생존율과 형태학적인 변화 그리고 tyrosinase 활성도 및 최종산물인 멜라닌의 양을 측정하였으며 이에 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

1. 더덕 분획에 의한 H2O층은 B16 흑색종 세포의 생존율에 차이를 나타내지 않았지만 EA층, n-Hexane층 및 BuOH층에서 감소되었으며 H2O층을 제외한 분획에서 세포의 형태학적인 변화를 관찰할 수 있었다.

2. 더덕 분획에 의한 버섯 tyrosinase 활성도는 BuOH층에서 농도에 의존적으로 억제되었고 반면

EA층과 n-Hexane층은 증가시켰다.

3. 더덕 분획에 의한 B16 흑색종 세포에서 tyrosinase 활성도는 n-Hexane층과 EA층에서 활성도가 억제되었으며 반면 BuOH층은 증가하였고 H2O층은 유의한 차이가 없었다. 또한 멜라닌 양 또한 같은 경향으로 나타났다.

4. 더덕 분획물중 n-Hexane층이 음성·양성대조군과 비교하여 멜라닌 침착 정도의 차이를 관찰 할 수 있었다.

이상의 연구결과를 종합하면 더덕 분획물중 n-Hexane층은 B16 흑색종 세포의 멜라닌 합성을 억제시켰으며 EA층 또한 세포의 색소생성을 억제시키지만 세포에 생존율에 유의성 있게 억제시켰기 때문에 멜라닌 억제 물질로서는 부적절한 것으로 사료된다. 멜라닌 화에 관련된 피부질환에 멜라닌의 억제시키는 물질은 현재 시판중인 화학성분들에 의한 부작용들을 천연물인 더덕이 피부에 부작용을 나타내지 않는 색소 침착 증 같은 피부질환이나 화장품의 원료로써 사용하게 되면 각광을 받을 것으로 생각되며, 앞으로 더덕추출물이 멜라닌 세포의 멜라닌 합성과정 중 더욱 정확한 작용기전의 규명과 응용법의 개발 등이 필요하며 특이적으로 멜라닌 생성 억제 시키는 물질 규명 또한 연구되어져야 한다고 생각된다.

참고문헌

1. Sugai T. Clinical effects of arbutin in patients with chloasma in Japanese. *Hifu. Skin Res.* pp.34,522-529, 1992.
2. Kim C. W. Experimental study on the hyperpigmentation of skin graft. *Plast Reconstr. Surg.* p.85,162, 1990.
3. Mishima Y., Imokawa G. Selective aberration and pigment loss in melanosomes of malignant melanoma cells in vitro by glycosylation inhibitors: Premelanosomes as glycoprotein. *J. Invest. Dermatol.* pp.81, 106-114, 1983.

4. Imokawa G., Mishima Y. Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res.* pp.42,1994-2002, 1982.
5. Hearing V. J. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* pp.4,24-28, 1999.
6. Imokawa G., Kawai M., Mishima Y., Motegi I. Differential analysis of experimental hypermelanosis induced by UVB, PUA and allergic dermatitis using a brownish guinea pig model. *Arch. Dermatol. Res.* pp.278, 352-362, 1986.
7. Abdel-Malek Z., Swope V. B., Smalara D., Babcock G., Dawes S., Nordlund J. J. Analysis of the UV-induced melanogenesis and growth arrest of human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 7, 326-332 (1994).
8. Stipic V. Skin infections caused by protozoa. In: Dobric, I., ed., *Dermatovenerologija*, Zagreb. Dobric. Grafoplast. pp.101,102, 1994.
9. Jimbow K., Fitzpatrick T. B., Wick M. Biochemistry and physiology of melanin pigmentation. In: Goldsmith, L. A., ed., *Physiology and Molecular Biology of the Skin*. Oxford Univ. Press, New York pp.873-909, 1991.
10. Naish-Byfield S., Riley P. A. Tyrosinase kinetics: Failure of acceleration in oxidation of ring-blocked monohydric phenol substrate. *Pigment Cell Res.* pp.11,94-97 1998.
11. Riley P. A. The evolution of melanogenesis. In: Zeise L., Chedekel M. R., Fitzpatrick T. B., eds., *Melanin: Its Role in Human Photoprotection*. Kansas. Valdenmer Publishing Company pp.1-10, 1994.
12. Hearing V. J., Jimenez M. Mammalian tyrosinase: The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* pp.19,1141-1147, 1987.
13. Hearing V. J., Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* pp.5,2902-2909, 1991.
14. Jimenez-Cervantes C., Solano F., Kobayashi T., Urabe

- K., Hearing V. J., Lozano J. A., Hearing V. J. *EMBO J.* pp.11,527-535 1992.
15. Lozano J. A., Garcia-Borrón J. C. *J. Biol. Chem.* pp.269,17993-18000, 1994.
 16. Jackson J. L., Cambers D. M., Tsukamoto K., Copeland N., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Hearing V. J. *EMBO J.* pp.11,527-535, 1992.
 17. 신민교 : 원색 임상본초학, 서울, 영림사, pp.230,231, 1991.
 18. 신민교 : 임상본초학, 서울, 영림사, p.273, 2000.
 19. 鄭普燮 외: 향약대사전, 서울, 영림사, p.1087, 1990.
 20. 陸昌洙 : 한국본초학, 서울, 癸丑文化社, p.220, 1981.
 21. 상해중의학원 : 中草藥學, 商務印書館香港分館 p.579, 1983.
 22. 陸昌洙 : 아시아 본초학, 서울, 癸丑文化社, p.412, 1998.
 23. 이창복. 한국식물도감. 향문사, 서울, 724 (1980).
 24. Kim S. Y., Kim H. S., Su I. S., Yi H. S., Kim H. S., Chung S. Y. Effects of the feeding *Platycodon grandiflorum* and *Codonopsis lanceolata* on the lipid components of serum and liver in rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* pp.22,517-523, 1993.
 25. Han E. G., Cho S. Y., Effect of *Codonopsis lanceolata* water extract on the activities of antioxidative enzymes in carbon tetrachloride treated rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* pp.26,1181-1186, 1997.
 26. Lee Y. J., Kim J. M., Jung Y. M., Effect of *Codonopsis lanceolata pilosula* on the cellular immunity. *Jor. J. Ve. Publ. Hlth.* pp.19,273-279, 1995.
 27. 김귀정, 김금희, 김해남, 윤영숙, 이승자, 이혜영. 경락과 한방피부미용학. 수문사 pp.210.
 28. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival application of proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods.* pp.55,65, 1983.
 29. Mason HS, Peterson EW. Melanoproteins I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochem. Biophys. Acta.* pp.111,134-146, 1965.
 30. Matinez-Esparza M Mechanisms melanogenesis inhibition by tumornecrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem* pp.225,139-146, 1998.
 31. Hosoi J., Abe E., Suda T., Juroki J. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α , 25-dehydroxyvitamin D₃ and retinoic acid. *Cancer Res.* pp.45,1474-1479, 1985.
 32. Michael, H. R. and Eward, J. R. *Histology. A text and Atlas.* Harper and Row. Lippincott, pp.338-348, 1985.
 33. Elias P. M., Menon G. K. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. In: Elias, P. M., Havel, R. J. and Small, D. M., eds., *Advances in Lipid Research*, Vol. 24, *Skin Lipids.* Academic Press, Inc., New York pp.1-3, 1991.
 34. Winkler J. D. *Apoptosis and inflammation.* Birkhauser Verlag Ag, CH-4010, Basel, Switzerland 1999.
 35. Kibarlan M. A., Hruza G. J. Nonmelanoma skin cancer. Risks, treatment options, and tips on prevention. *Postgrad. Med.* pp.98,39-58, 1995.
 36. Fitzpatrick T. B., Szabo G., Seiji M., Quevedo W. C. Biology of the melanin pigmentary system. In: Fitzpatrick T. B., ed, *Dermatology in General Medicine.* Academic Press, New York pp.131-163, 1979.
 37. Le Douarin N. *The neural crest.* Cambridge Univ. Press. 1982.
 38. Gordon P. R., Mansur C. P., Gilchrist B. A. Regulation of human melanocyte growth, dendricity and melanization by keratinocyte derived factor. *J. Invest. Dermatol.* pp.92,565-572, 1989.
 39. Maeda K, Fukuda M. In vivo effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocyte. *J. Soc. Cosmet. Chem.* pp.42,361, 1991.
 40. Dawley R. M., Flurkey W. H. 4-hexylresorcinol a

- potent inhibitor of mushroom tyrosinase. *J. Food Sci.* pp.58,609,610, 1993.
41. Torrita K. N., Oda N., Karrel M., Miyaki T., Oki T. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiot.* pp.12,1601-1605, 1990.
 42. Ilza V. Huang Ti Nei Ching Su Wen. Univ. California Press. 1966.
 43. 楊維傑 編：黃帝內經 素問，臺北，樂羣出版事業有限公司，pp.624-679, 1994.
 44. 巢元方：巢氏諸病原候論，서울，大星文化社，p.200, 1992
 45. 陳昭遇 外：太平聖惠方，北京，人民衛生出版社，p.1208, 1986.
 46. 李挺：偏註醫學入門. 서울. 大星文化社. 雜病篇. pp.29, 224. 1990.
 47. 許俊：東醫寶鑑 서울，南山堂，pp.211,212, 1981.
 48. 趙佶：聖濟總錄，北京，人民衛生出版社，p.1763, 1987.
 49. 朱震亨：丹溪醫集，北京，人民衛生出版社，p.24, 1993.
 50. 樓英：醫學綱目，서울，大星文化社，p.1081, 1986.
 51. 龔廷賢：萬病回春，서울，醫聖堂，p.271, 1993.
 52. 王肯堂：證治準繩，北京，人民衛生出版社，卷1, p.824, 1991.
 53. 辛民教 外：鄉藥集成方，서울，永林社，p.1039, 1989.
 54. 周命新：醫門寶鑑，서울，杏林書院，pp.186,187, 1975.
 55. 陳實功：外科正宗，上海，上海科學技術出版社，pp.290,298, 1989.
 56. 祁坤：外科大成，臺北，文光圖書有限公司，p.218, 1968.
 57. 程國彭：醫學心悟，香溝，友聯出版社，p.290, 1961.
 58. 吳謙：醫宗金鑑，北京，中國醫藥學出版社，pp.1680-1682, 1982.
 59. 顧世澄：瘍醫大全，北京，人民衛生出版社，pp.479, 481,482, 1987.
 60. 孫震元 譯：瘍科會粹，北京，人民衛生出版社，pp.364,365, 1987.
 61. 張璐：張氏醫通，上海，上海科學技術出版社，pp.442,443, 1995.
 62. 顧伯華 外：實用中醫外科學. 上海. 上海科學技術出版社. pp.529,530. 1985.
 63. 楊思澍 外：中醫臨床大全，中國，北京科學技術出版社，pp.923,924, 1991.
 64. 乾祖望 外：實用中醫外科學，pp.530-532, 1985.
 65. 顧伯康：中醫外科臨床手冊，中國，上海科學技術出版社，p.426, 1983.
 66. 范瑞強：實用皮膚性病病驗方精選，廣東出版社，p.336, 1994.
 67. 施惠：施惠中醫皮膚病臨床經驗集，北京，中國醫藥科技出版社，pp.62-65, 1971.
 68. 劉愛民：損容性皮膚病的診斷與治療，中國，中國中醫藥出版社，p.177, 1992.
 69. 周洪範：白話中醫秘方全書. 대만. p.494, 1986.
 70. 陳夢雷 外：醫部全錄. 서울. 大星文化社. 제6권. p.267, 1989.
 71. 徐宜厚 外：皮膚病中醫診療學，北京，人民衛生出版社，pp.8-17, 1997.
 72. 梁勇才：實用皮膚病診療全書，北京，學苑出版社，pp.17-24,27-30, 1996.
 73. 辺天羽 外：中西醫結合皮膚病學，天津，天津科學技術出版社，pp.46-49, 1999.
 74. 宋兆友：中醫皮膚科臨床手冊，北京，人民衛生出版社，pp.3-6, 1996.
 75. 鄭遇悅：동의병리학개론, 익산, 서울공판사, pp.17,19, 1998.
 76. Mun Y. J., Lee S. W., Im S. J., Song C. S., Lee K. S., Lim K. S., Woo W. H. Inhibitory effect of aqueous extract of *Radix Trichosanthis* on the melanin in B16 melanoma cells. *J. Trad.*

- Kor. Med. pp.10,149-159, 2000.
77. Lim T. W., Lee J. W., Lee M. H., Effects of licorice extract on proliferation and melanization in cultured normal human melanocytes. 동서의 학연구소 논문집. 2000, pp.247-254, 2001.
78. 金鎮晩. Inhibitory effect on melanin synthesis of *Radix Cadinopsis Lanceolatae*. 원광대학교. 2002.
79. Funasaka Y., Chakraborty A. K., Komoto J. Ohashi A., Ichihashi M. The depigmenting effect of alpha-tocopherol ferulate on human melanoma cells. *British J. Dermatol.* pp.141,20-29, 1999.
80. 이충환, 고영희. 멜라닌 생합성 저해물질의 탐색. 신물질 탐색 연구동향 (4) 생물산업 pp.9,32-35, 1996.
81. Prota G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* pp.75,31-36, 1990.
82. Mishima Y., Hatta S., Ohyama Y., Inazu M. Induction of melanogenesis swpression: Cellular Pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res.* pp.1,367-374, 1988.
83. Choi S. S., Noh H. S., Cho S. H., Kong K. H. Screening of inhibitors against tyrosinase activity form natural products. *Yakak Hoeji.* pp.45,522-528, 2001.
84. Aroca P., Solano F., Salinas C., Garcia-Borrón J. C., Lozano J. A. Regulation of final phase of melanogenesis. *Eur. J. Biochem.* pp.208,155-163, 1992.
85. Chakraborty A. K., Funasaka Y., Komoto M., Ichihashi M. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* pp.11,206-212, 1998.