

삼릉추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

이 범 천[†] · 김 진 화 · 심 관 섭 · Yong He Zhang* · 표 형 배

한불화장품(주) 기술연구소, *북경대학교 약리학과
(2005년 11월 22일 접수, 2005년 12월 19일 채택)

The Inhibitory Effects of the *Scirpi rhizoma* on Melanogenesis

Bum Chun Lee[†], Jin Hwa Kim, Gwan Sub Sim, Yong He Zhang*, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co. Ltd., 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-830, Korea

*Department of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Peking University, China

(Received November 22, 2005; Accepted December 19, 2005)

요약 본 연구에서는 한방 천연 미백 소재를 개발하기 위하여 삼릉추출물의 미백 효과에 대하여 연구하였다. 삼릉추출물은 프리 라디칼 소거활성(DPPH)에서 $IC_{50} = 638 \mu\text{g/mL}$, superoxide radicals 소거활성은 $IC_{50} = 21.7 \mu\text{g/mL}$ 을 나타냈다. 삼릉추출물의 B16 melanoma 세포에서의 멜라닌 합성 저해효과는 $100 \mu\text{g/mL}$ 삼릉추출물을 48 h 처리한 세포에서는 멜라닌 합성량이 27% 감소되었다. 삼릉 추출물은 농도에 비례하여 B16 melanoma 세포내의 타이로시네이즈 활성을 저해하였으며, western blot을 이용하여 타이로시네이즈와 타이로시나아제 관련 단백질(TRP-1)의 발현감소를 확인하였다. 또한, RT-PCR을 이용하여 삼릉추출물이 멜라닌 생성 과정에 관련하는 유전자 발현을 조사한 결과 타이로시네이즈와 TRP-1의 mRNA 발현을 억제하는 것을 확인하였다. 그러므로 삼릉추출물은 항산화 효과와 함께 멜라닌 저해 효과가 우수하여 새로운 미백 화장품으로 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

Abstract: To obtain effective and safe depigmenting agents, we investigated the effects of *Scirpi rhizoma*, a medicine among Chinese herbs, on melanogenesis. Dried *S. rhizoma* was refluxed with 70% aqueous ethanol and the extract was evaporated to dryness. To determine the effects as a whitening agent, various *in vitro* tests were performed such as free radical scavenging activity, melanin formation assay, tyrosinase activity and expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 (western blot and RT-PCR) in B16 melanoma cells. *S. rhizoma* showed scavenging activities of free radicals and reactive oxygen species (ROS) with the IC_{50} of $638 \mu\text{g/mL}$ against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and $21.7 \mu\text{g/mL}$ against superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system, respectively. *S. rhizoma* significantly inhibited melanin production in B16 melanoma cells. *S. rhizoma* treatment (48 h) suppressed the biosynthesis of melanin up to 27% at $100 \mu\text{g/mL}$ and reduced tyrosinase activity up to 31% at $100 \mu\text{g/mL}$ in B16 melanoma cells. *S. rhizoma* was also able to significantly inhibit tyrosinase and TRP-1 expression in protein and mRNA level. These results suggest that *S. rhizoma* inhibited melanin biosynthesis by regulating tyrosinase activity and expression in B16 melanoma cells. Therefore, *S. rhizoma* may be useful as a new antioxidant and whitening agent to inhibit melanogenesis.

Keywords: *scirpi rhizoma*, antioxidation, melanogenesis, tyrosinase, TRP-1,2

1. 서 론

피부의 색은 피부 속에 존재하는 멜라닌의 함량에 의해 결정된다. 표피에 존재하는 멜라닌은 태양 광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하는 색소로서 멜라닌이 국소적으로 과도하게 합성되거나, 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 피부 표면에 침착되어

기미, 주근깨 및 다양한 색소 침착을 유발하게 된다[1]. 이러한 멜라닌은 피부의 기저층에 존재하는 melanocyte에서 생성된다.

멜라닌 생성은 melanocyte에서 cascade 효소 반응에 의해 생성된다. 멜라닌은 melanocyte의 melanosome에서 합성되며, melanosome에는 정상적인 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 효소들 중 가장 잘 알려진 것으로 tyrosinase, tyrosinase related

† 주 저자 (e-mail: epiboost@hanmail.net)

protein-1 (TRP-1)과 dopachrome tautomerase (DCT) 등이 있다[2,3]. 이들 중 tyrosinase는 melanogenesis의 속도결정단계인 초기 반응에 작용하는 효소로서, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소이다. DCT는 초기에는 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)로 불려졌던 효소로서 Dopachrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다. 멜라닌은 흑, 갈색의 eumelanin과 적, 노랑색의 pheomelanin이 있다. 특히 tyrosinase는 이들 두 가지 타입의 melanin 합성에 필요하며, TRP-1과 DCT는 eumelanin의 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다[4].

기존의 미백 물질들은 작용 기전에 따라 자외선 흡수제나 산란제, vitamin C나 kojic acid, 알부틴[5,6] 등과 같은 tyrosinase 저해제, 활성 산소종을 소거하는 토코페롤 등으로 분류할 수 있다. 또한 상백피, 당귀, 고삼, 지엽, 금은화, 감초, 반하, 백작약, 음양곽 등 다양한 식물 추출물의 미백 효과가 연구되었다[7,8].

삼릉(*S. rhizoma*)은 매자기라고도 불리며, 외떡잎식물 벼목 사초과의 여러해살이 풀로 아시아, 유럽, 아프리카, 북아메리카 등지에 분포한다. 한의에서는 통경약, 진통제, 건위약, 이노제, 정혈제 그 외에도 항암효과 등의 효능이 알려져 왔으나, 삼릉의 미백 작용에 대한 연구 결과는 없었다. 본 연구에서는 삼릉 추출물의 항산화 효과와 멜라닌 생성 억제 효과를 연구하여 미백화장품으로 응용하고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 시료의 추출

본 실험에서 사용한 삼릉(*S. rhizoma*)은 *Scirpus fluviatilis* G.의 뿌리줄기로 중국 북경대학에서 제공받아 사용하였다. 삼릉 100 g을 분쇄하여 70% 에탄올 1 L로 환류하면서 3 h씩 2회 반복 추출하였다. 이를 감압 농축, 동결 건조하여 그 분말을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 용해하여 사용하였다.

2.2. 세포 및 시약

B16F1은 쥐의 melanoma 세포주로 서울대학교 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 5% fetal bovine serum (Bio Whittaker, USA), 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, USA), 200 μ M α -MSH (Sigma, USA)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, actin 항체는

Santa Cruz Biotechnology (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.3. DPPH Radical 소거 효과

항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Aldrich, USA)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과를 측정하는 Blois법[9]을 활용하였다. 0.1 mM DPPH 메탄올 용액에 동일량의 시료를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후, 실온에 10 min 동안 반응하였다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. Superoxide Radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거효과는 nitroblue tetrazolium (NBT) 방법에 의해 측정하였다[10]. 0.05 M Na₂CO₃ buffer (pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 삼릉추출물을 가한 후 25°C에서 10 min간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/mL xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 25 min 동안 반응 후, superoxide radical 소거효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 세포 생존율 측정

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 정량은 Mosmann[11]의 방법을 변형하여 실시하였다. B16 melanoma 세포를 1 × 10⁵ cells/well 농도로 24 well plate에 분주한 세포에 삼릉 추출물을 투여하고 24 h 동안 배양하였다. MTT 용액(5 μ g/mL)을 첨가하고 3 h 후, 원심 분리하여 상등액을 제거하고 100 μ L acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가한 후 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. 멜라닌 정량

멜라닌 정량은 Yasunobu[12] 방법을 사용하였다. 6 well plate에 3 × 10⁵ cells/well로 세포를 분주하여 배양한 후 시료를 처리하고 48 h 동안 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양한 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 1,200 rpm에서 5 min간 원심 분리하여 침전한 후, 1 mL homogenization buffer (50 mM Sodium phosphate pH 6.5, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1 N NaOH (in 10% DMSO) 200 μ L를 첨가하고 vortex 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 표준품으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌은 단위 세포(1 × 10⁴ cells)에서의 멜라닌 생성량을 비교하였다.

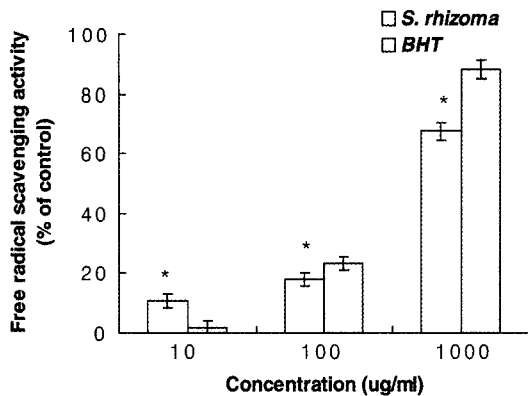


Figure 1. Anti-oxidant effect of *S. rhizoma* in the DPPH assay. A solution of 150 μ L of 100 μ M DPPH solution in methanol was gently mixed with 100 μ L of *S. rhizoma* for 10 min and the absorbance was measured at 565 nm. The data were expressed as mean values (\pm S.D.) of 3 separate experiments. * $p < 0.05$ compared with control.

2.7. 세포내 Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성 측정법은 Pawelek과 Pomerantz [13,14] 방법을 사용하였다. 6 well plate에 5×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 하루 동안 배양한 후 시료를 처리하였다. 24 h 후, 세포를 수집하여 용해시킨 후 0.2% L-DOPA가 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 넣고 37°C에서 2 h 동안 배양하고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. Western Blot Analysis

시료를 48 h 처리한 B16 melanoma 세포를 RIPA buffer (10 mM sodium fluoride, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1 mM DTT, 500 μ M sodium orthovanadate, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, 1 mM PMSF)로 용해하고 원심 분리하였다. 여기서 얻은 상층액을 12% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 nitrocellulose membrane으로 이전시켰다. 이를 3% skim milk가 함유된 tris 완충용액에서 tyrosinase (sc-7833), TRP-1 (sc-10443), TRP-2 (sc-10452), actin (sc-1616) 항체와 각각 반응시킨 후, alkaline phosphatase가 결합된 항체를 가한 후, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT)을 가하여 발색시켰다. Western blot 결과는 Calibrated densitometer GS-800 (Bio-Rad, USA)를 이용하여 분석하였다.

2.9. RNA 분리 및 RT-PCR

Total RNA추출은 RNeasy mini kit (Qiagen, Maryland, Germany)을 이용하였다. cDNA합성은 1 μ g의 total

RNA를 oligo (dT)15 primer, dNTP (0.5 μ M), 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany)로 37°C에서 60 min, 93°C에서 5 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)은 cDNA로부터 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, β -actin을 증폭하기 위하여 1 μ L cDNA, 0.5 uM의 5'과 3'primer, 10 X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 200 μ M dNTP, 25 mM MgCl₂, 2.5 unit Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany)를 섞고 distilled water로 전체를 25 μ L로 맞추는 다음 PCR을 실시하였다. PCR증폭은 94°C 0.5 min, 50°C 0.5 min, 72°C 1 min, 28 cycles로 반응시켰다. PCR에 의하여 생성된 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, β -actin의 유전자 발현을 확인하였다.

2.10. 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며, p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH Radical 소거 효과

DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제 정도를 예측할 수 있다. 유해산소라 불리는 활성산소는 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로써 인해 생체 기능이 저하되고 동시에 색소 침착, 노화 및 성인병 질환을 유발 [15]하는 것으로 알려져 있다. 또한 이에 따른 다양한 종류의 식물성분 및 추출물에 의한 항산화 작용이 보고되어 있다[16,17]. 삼릉추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 삼릉추출물은 투여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타냈다(Figure 1). 삼릉추출물을 10, 100, 1000 μ g/mL의 농도로 처리한 경우 각 DPPH radical 소거능은 10.7%, 18%, 67.5%로 나타났다. 양성 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 butylated hydroxytoluene (BHT)를 이용하여 삼릉추출물의 항산화 효과와 비교하였다. 그 결과 BHT는 647 μ g/mL에서 삼릉추출물은 638 μ g/mL 농도에서 50%의 DPPH radical을 소거하였다.

3.2. Superoxide Radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase의 효소에 의한 superoxide

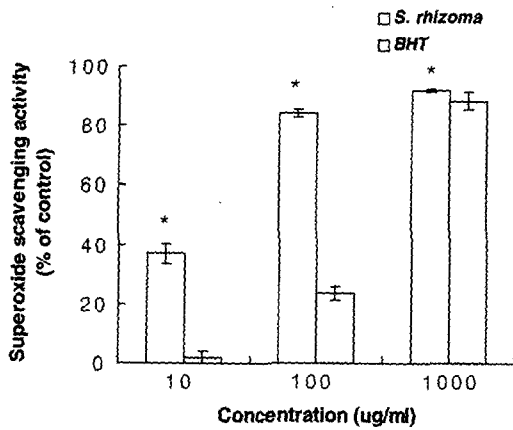


Figure 2. Anti-oxidant effect of *S. rhizoma* in the NBT assay. Superoxide radical was generated by a xanthine/xanthine oxidase system and measured by NBT reduction method. The data were expressed as mean values (\pm S.D.) of 3 separate experiments. * $p < 0.05$ compared with control.

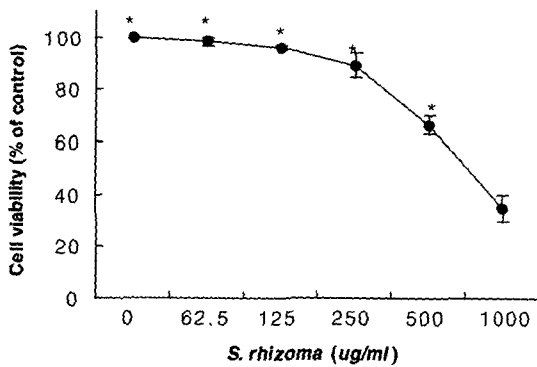


Figure 3. Relative cell viability of *S. rhizoma* on B16 melanoma cells by MTT assay. The cells were treated with various concentration of *S. rhizoma* for 24 h. The cell viability was measured by the MTT method. Data are normalized by taking 100% as a viability of non-treated cells. The data were expressed as mean values (\pm S.D.) of 3 separate experiments. * $p < 0.05$ compared with control.

음이온 저해작용은 superoxide 음이온 소거작용과 xanthine oxidase 효소 저해에 의해 나타난다[18]. Xanthine oxidase에 의해 형성되는 superoxide anion 생성저해의 결과는 Figure 2에 나타내었다. 양성 대조군으로는 BHT를 이용하여 삼릉추출물의 superoxide radical 소거효과를 비교하였다. 그 결과 삼릉추출물은 투여 농도 의존적으로 superoxide radical 소거작용을 나타내 10, 100, 1000 µg/mL의 농도로 처리한 경우 각 superoxide radical 소거능

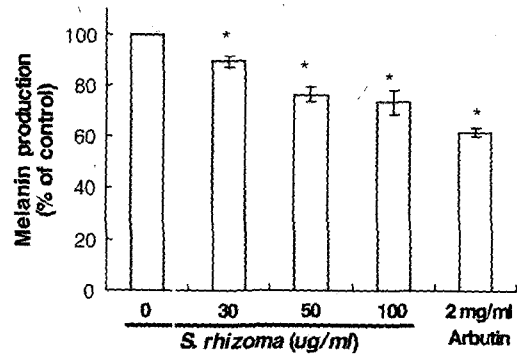


Figure 4. Effect of *S. rhizoma* on melanin production in B16 melanoma cells. The cells were incubated with *S. rhizoma* for 48 h. Melanin content is quantified by absorption at 405 nm calibrated with synthetic melanin as standard. *S. rhizoma* decreased the intracellular melanin contents at treated concentration. Results are means \pm S.D. from 3 separate experiments. * $p < 0.05$ compared with control.

은 37%, 84.2%, 91.9%로 나타났다. IC₅₀은 21.7 µg/mL로 우수한 superoxide radical 소거효과를 나타내었다.

3.3. 세포독성

삼릉추출물의 세포독성측정과 더불어 실험에 사용될 농도 범위결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. B16 melanoma 세포에 대한 삼릉추출물의 세포 독성을 측정 한 결과, 삼릉추출물은 125 µg/mL 이하의 농도로 처리시 세포생존율이 90% 이상으로 나타났으며, 그 이상의 농도에서는 급격히 생존율이 저하되었다(Figure 3).

3.4. 멜라닌 생합성 저해 효과

삼릉추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 양을 측정 하였다. 세포에 삼릉추출물을 30, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하고 48 h 동안 배양하였다. 세포를 수집하여 멜라닌 양을 측정 한 결과, 삼릉추출물 처리군 모두가 농도에 비례하여 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하였다(Figure 4). 양성 대조군으로 사용한 arbutin은 2 µg/mL에서 38% 멜라닌 감소 효과를 나타냈으나, 삼릉추출물은 arbutin보다 낮은 100 µg/mL 농도에서 27% 가량의 멜라닌 감소 효과를 나타냈다.

3.5. 세포내 Tyrosinase 저해 효과

Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정에서 속도제한(rate-limiting) 효소이며 멜라닌 합성의 주요한 조절 단계에 관여하는 효소이다. 삼릉추출물을 처리한 세포를 수집하여

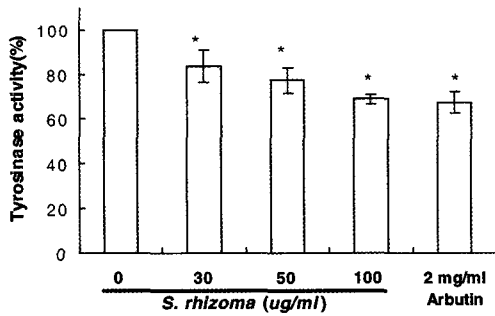


Figure 5. Effect of *S. rhizoma* on tyrosinase activity in B16 melanoma cells. The cells were incubated with *S. rhizoma* for 24 h. The data were expressed as mean values (\pm S.D.) of 3 separate experiments. * $p < 0.05$ compared with control.

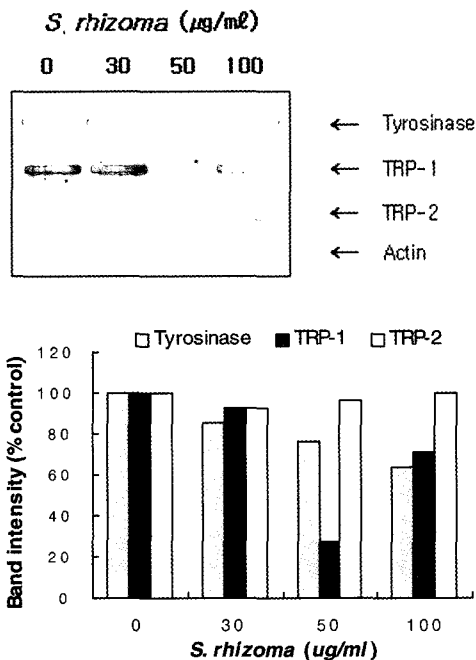


Figure 6. Effect of *S. rhizoma* on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 expression in B16 melanoma cells. B16 cells were treated for 48 h with *S. rhizoma*. Solubilized total protein (30 μ g) was electrophoresed in 12% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane. Specific detection of proteins was performed with the polyclonal antibody against tyrosinase, TRP-1 and TRP-2.

용해시킨 후, 0.2% L-DOPA가 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 넣고 37°C에서 배양한 후 흡광도를 측정하였다. Figure 5의 결과와 같이 삼릉추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 tyrosinase의

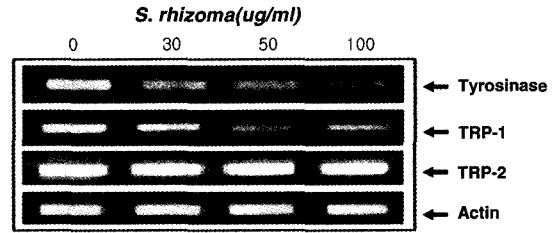


Figure 7. Effect of *S. rhizoma* on Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 mRNA expression in B16 melanoma cells. B16 melanoma were treated with various concentrations of *S. rhizoma* for 48 h. Total RNA extracted from B16 melanoma was analyzed by RT-PCR.

활성이 저해되었으며, 특히 100 μ g/mL 농도에서 31% 가량의 저해 효과가 있는 것으로 나타났다.

3.6. Tyrosinase/TRP-1/TRP-2 단백질 발현 저해 효과

세포내 tyrosinase 저해 실험 효과로 미루어 볼 때, 삼릉추출물은 세포내 tyrosinase 활성을 저해하여 melanin 생성을 감소시켰다. 이러한 결과가 tyrosinase 발현과도 연관성이 있는지를 확인하기 위해 tyrosinase 항체를 이용하여 western blot을 수행하였다. 또한 TRP-1, TRP-2 발현에 대한 western blot도 함께 수행하였다(Figure 6). 그 결과 삼릉추출물은 tyrosinase, TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 나타났다. 하지만 TRP-2의 발현량에는 영향을 미치지 않았다. 또한 이에 대한 density를 측정한 결과, tyrosinase의 발현이 100 μ g/mL 농도에서 36%, TRP-1의 발현은 30% 가량 저해됨을 확인하였다.

3.7. Tyrosinase/TRP-1/TRP-2 mRNA 발현 저해 효과

삼릉추출물의 멜라닌 생합성에 관여하는 유전자 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 삼릉추출물은 tyrosinase, TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 나타났지만 TRP-2의 발현량에는 영향을 미치지 않았다(Figure 7). 이것은 삼릉추출물이 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase를 직접적으로 저해하는 저해제로서의 기전이 아니라 멜라닌 형성세포의 멜라닌 생성에 관여하는 세포 신호 전달이나 유전자 수준에서 조절되는 것을 의미하며 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

4. 결 론

삼릉 추출물의 항산화효과 및 B16 melanoma 세포에서의 멜라닌 생성 저해 효과를 연구하였다. 삼릉추출물의 DPPH와 superoxide radical 소거효과는 처리농도가 증가함에

따라 농도 의존적으로 소거효과를 나타냈으며, 각각 IC₅₀ 값이 638 µg/mL (DPPH), 21.7 µg/mL (superoxide radical)로 우수한 항산화 효과를 나타내었다. B16 melanoma 세포주에서는 100 µg/mL 농도를 처리한 실험군에서 멜라닌 생합성이 27% 감소되었다. 또한 세포내에 존재하는 tyrosinase 활성을 31% 저해하였으며, tyrosinase 단백질 발현량은 36% 감소, TRP-1도 30% 감소시켰다. 하지만 TRP-2에 대한 저해 효과는 나타나지 않았다. 또한, RT-PCR을 이용하여 유전자 발현을 평가한 결과 tyrosinase, TRP-1의 mRNA 발현은 감소하였으나 TRP-2에 대한 유전자 발현은 영향이 없었다. 삼릉 추출물은 항산화 효과와 함께 멜라닌 생합성에 관여하는 단백질과 유전자의 발현 조절 경로를 통하여 멜라닌 생합성 감소 효과를 나타내는 것으로 보인다. 따라서 삼릉추출물은 우수한 미백 소재로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- H. Z. Hill, W. Li, P. Xin, and D. L. Michell, Melanin: a two edged sword?, *Pigment Cell Res.*, **10**, 158 (1997).
- J. Cabanes, S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona, Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm Pharmacol.*, **46**, 982 (1994).
- M. Veronique and B. Friedrich, Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation, *FEBS Letters*, **381**, 165 (1996).
- V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *J. Invest. Dermatol.*, **4**, 24 (1999).
- M. Higuchi, Y. Miura, J. Boohena, Y. Kinoshita, Y. Yamamoto, I. Yushimura, and Y. Yamaha, Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts, *Planta Med.*, **59**, 253 (1993).
- K. Y. Ryu, W. S. Kang, Y. H. Kim, H. D. Jang, J. T. Hong, H. S. Yoo, and Y. P. Yun, Antioxidative effects of the rhizoma of *Rhodiola sa halinensis*, *Yakhak Hoeji*, **42**, 312 (1998).
- J. H. Park, Y. G. Shin, S. K. Baek, U. K. Lee, H. Chung, and Y. I. Park, Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs, *Yakhak Hoeji*, **41**, 518 (1997).
- S. H. Lee, J. S. Park, S. Y. Kim, J. J. Kim, and S. R. Chung, Isolation of Inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of paeonia moutan, *Yakhak Hoeji*, **42**, 353 (1998).
- M. S. Blois, Antioxidation determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
- K. Furuno, T. Akasako, and N. Sugihara, The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 19 (2002).
- T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methos.*, **65**, 55 (1983).
- O. Yasunobu, K. Tomoko, O. Yuri, M. Hitoshi, K. Yoshiko, F. Yoko, I. Masamitsu, Y. Ytaka, K. Yoshitane, and S. Hiromu, Development of a novel zinc complex as whitening agent in a new concept, *ASCS*. **6th**, 69 (2003).
- J. Pawelk, Melanoma cells in culture, *Methods Enzymol.*, **58**, 564 (1978).
- S. H. Pomerantz, Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma, *J. Biol. Chem.*, **238**, 2351 (1963).
- A. Kitahara, U. Matsumoto, H. Ueda, and R. Ueoka, Are markable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of γ -irradiated methyl linolate, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2208 (1992).
- T. Hatano, Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols, *Natural Medicines*, **49**, 357 (1995).
- H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, Activeoxygen scavenging activity of plant extracts, *Biol. Pharm. Bu'l.*, **18**, 162 (1995).
- P. Kuppusamy and J. L. Zweier, Characterization of free radical generation by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **264**, 988C (1989).