

연교 메탄올추출물의 멜라닌생성 억제효과

조미경, 안병상, 문연자, 우원홍*

원광대학교 한의학전문대학원

Inhibitory Effect of the Methanol Extract of Fructus Forsythiae on the Melanogenesis

Mi Gyeong Jo, Byung Sang An, Yeun Ja Mun, Won Hong Woo*

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,
Iksan, 570-749, Korea

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of Fructus Forsythiae on the melanogenesis. To determine whether Fructus Forsythiae methanol extract suppress melanin synthesis in cellular level, HM3KO human melanoma cells were cultured in the presence of various concentrations of Fructus Forsythiae methanol extract and the effects on cell proliferation, tyrosinase activity and melanin contents were examined. Treatment with Fructus Forsythiae methanol extract inhibited tyrosinase activity, regulate melanin biosynthesis as the key enzyme in melanogenesis, in a dose-dependent manner. And also suppressed melanin contents as a dose dependent manner without cytotoxicity morphological change. It was observed that the color of cell pellets was totally different from the control. These results suggest that the inhibitory effect of Fructus Forsythiae methanol extract on melanogenesis is due to the suppression of tyrosinase in HM3KO cells and Fructus Forsythiae is a candidate for an efficient whitening agent.

Keywords : Fructus Forsythiae, HM3KO human melanoma cells, tyrosinase activity, melanin contents.

1. 서론

연교(連翹, Fructus Forsythiae)는 물푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 개나리(*Forsythia suspensa* (TJUNB.) VAHL.)의 열매로써 우리나라 전국 각지에서 재배되며 가을에 성숙한 과실을 채취하여 햇빛에 말려 사용한다.¹⁾ 한방과 민간에서 종창, 임질, 통경, 이뇨, 치질, 결핵, 나력, 옴, 해독 등의 치료제로 널리 사용되고 있다.²⁾ 연교에 함유되어있는 성분으로는 saponin, flavonoid, alkaloid, oleanolic acid 등이 알려져 있으며, 연교의 약리작용으로는 항균작용,³⁾ 항염증효과,⁴⁾ 혈압강하작용이⁵⁾ 있으며, 생리활성작용으로는 항산화 활성이 우수한 것으로 보고되었다.⁶⁻⁸⁾

피부는 표피, 진피, 피하지방층으로 구성되어 있으며 맨 바깥층에 존재하는 표피층은 각질세포, 멜라닌세포, 랑게한스세포, 메르켈세포들로 이루어져 있다. 이중 멜라닌세포(melanocyte)는 인간의 머리카락과 피부색을 이루는 색소인 멜라닌을 합성, 분비하는 세포로, 주로 표피의 기저층(basal layer) 사이나 기저층의 아래 그리고 털주머니에서 관찰되며,⁹⁾ 멜라닌세포의 멜라닌소체(melanosome)에서 생성된 멜라닌은 수상돌기를 통하여 표피의 각질화세포(keratinocyte)로 운반된다.^{10,11)} 세포표피(epidermis)에서 일어나는 색소침착(pigmentation)의 원인인 멜라닌은 각질화세포로 이동하여 자외선이나 외부 자극물질 등으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능을 가지고 있으나 과도한 색소침착은 미용적인 측면에서 볼 때 부정적인 기능도 나타낸다.¹²⁻¹⁴⁾ 즉, 멜라닌의 과잉생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하며, 더 나아가 피부암을 유발한다.¹⁵⁾

최근 미에 대한 사회적인 관심이 증가하면서 세포에 독성이 적으면서 멜라닌 합성을 감소시키고, 동시에 non-mutagenic한 미백제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 특히 이러한 물질을 찾기 위한 천연물질에 대한 관심은 점차 증가되고 있는 실정이다.

이에 본 연구에서는 연교 메탄올 추출물이 피부의 멜라닌 합성과정에 미치는 영향을 조사하기 위하여 인체 멜라닌세포주인 HM3KO 세포에서 tyrosinase 효소활성과 최종산물인 멜라닌 생성의 변화를 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1) 연교 메탄올추출물

본 실험에 사용한연교는 시중에서 유통되는 한약재를 구입하였으며, 연교 100g에 MeOH 1ℓ를 가한 후 밀봉하여 6시간 동안 실온에서 냉침 시킨 후 거즈로 여과하여 감압 농축시켜 15.78g의 시료(수득률:15.78%)를 얻어 냉장 보관하였으며, 연교 메탄올 추출액 試料는 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co., USA)에 녹인 후 사용하였다.

2) HM3KO 세포주 배양

Human melanoma 세포주인 HM3KO 세포의 배양은 CO₂ 배양기(37℃, 5%)에서 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium(DMEM, Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지를 이용하였으며 약 48시간 주기로 배양액을 교체해주었다.

3) 세포 증식(Cell proliferation)측정

세포를 배양판(6cm dish)에 well당 2×10^5 씩 분주한 후 48시간 배양하여 배양 용기에 세포를 부착하였다. 연교 메탄올추출물을 각 농도별로 처리하고 1, 3, 5일간 배양하였고, 배양 완료 후 각 well에 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액을 가하여 세포를 분리수거하고, PBS로 2회 세척 한 후 혈구 계산판(Fuchs-Rosenthal cytometer, Germany)을 이용하여 각 well 당 세포수를 측정하였다.

4) 세포내 Tyrosinase Activity 측정

Tyrosinase 활성도는 Martinez-Esparza M 등의 방법에 의하여 측정하였다.¹⁶⁾ 멜라닌세포를 수확하여 세포침전물을 만들고, 120 μ l 세포용해액(lysis buffer; 1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)을 넣고 4℃ 얼음에서 30분간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴시킨 후 이를 원심분리하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성측정용액으로 사용하였다. 50 μ l의 상층액에 100mM sodium phosphate(pH 7.0) 100 μ l를 넣고 100mM catechol 50 μ l를 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37℃, 405nm에서 1시간 동안 반응시켜 흡광도의 변화를 관찰하였다.

5) 세포내 멜라닌 정량(Melanin contents)측정

멜라닌 정량은 Hosei등¹⁷⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양세포는 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척한 후 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 각 well당 세포수를 계산하고, 각 군당 동일한 세포수를 산정한 후 원심분리하여 수확하였다. 세포침전물에 세포용해액(lysis buffer; 1% Triton

X-100, 10mM sodium phosphate, pH 7.0)을 넣고, 원심분리하여 침전물을 수확하였다. Acid-insoluble material을 얻기 위해 10%의 dimethyl sulfoxide (DMSO)가 첨가된 1N NaOH 130 μ l를 넣어 80 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 처리하여용해시켰다. 이를 405nm에서 흡광도를 측정하였으며, 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma chemical Co.)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

6) 멜라닌색소 침착의 육안적 관찰

HM3KO human melanoma cells을 10cm 세포 배양 접시에 4×10^5 cell/dish로 분주한 후 48시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 연교 메탄올추출물을 농도별로 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 세포는 trypsin/EDTA로 분리하여 세척하고, 각 군당 동일한 세포수를 산정하여 수집한 후에 육안으로 세포 침전물의 색 변화를 관찰하였다.

7) 통계학적 분석

실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 각 실험군은 대조군과 비교하여 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 one-way ANOVA test을 이용하였으며, P값이 0.01 이하인 경우 유의성을 인정하였다.

III. 결 과

1. 연교 메탄올추출물이 HM3KO 세포의 증식에 미치는 영향

멜라닌은 멜라닌세포의 멜라노솜(melanosome) 내에서 합성되기 때문에 세포에 독성이 없이 멜라닌 생성을 억제시키는 것이 바람직하다. 따라서 연교 메탄올추출물이 HM3KO 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. HM3KO 세포를 세포배양판에 2×10^5 개씩 분주하여 48시간 후 연교 메탄올추출물을 농도별로 처리하고 1일, 3일 그리고 5일 후에 세포수를 계측하였다. 계측 결과, 1일 처리군은 50, 100, 150ug/ml 농도에서 각각 $7.5 \times 10^5 \pm 5.1$ 개, $7 \times 10^5 \pm 1.8$ 개, $6.4 \times 10^5 \pm 2.5$ 개였고, 대조군은 $5.3 \times 10^5 \pm 0.3$ 개였다. 3일 처리군에서는 각각 $12.3 \times 10^5 \pm 3.6$ 개, $10.3 \times 10^5 \pm 3.2$ 개, $6.9 \times 10^5 \pm 0.7$ 개였고, 대조군은 $13.3 \times 10^5 \pm 6.4$ 개였다. 5일 처리군에서는 각각 $21.3 \times 10^5 \pm 6.2$ 개, $19.4 \times 10^5 \pm 8.1$ 개, $10.9 \times 10^5 \pm 0.4$ 개였으며, 대조군은 $31.4 \times 10^5 \pm 7.3$ 개 였다. 이상의 결과 연교 메탄올추출물을 처리한 세포 중 150ug/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 세포의 증식은 억제되었으나, 전체적으로 시간이 지남에 따라 지속적인 세포의 증식이 일어나고 있었으며, 세포사멸과

같은 독성은 나타나지 않았다(Fig. 1).

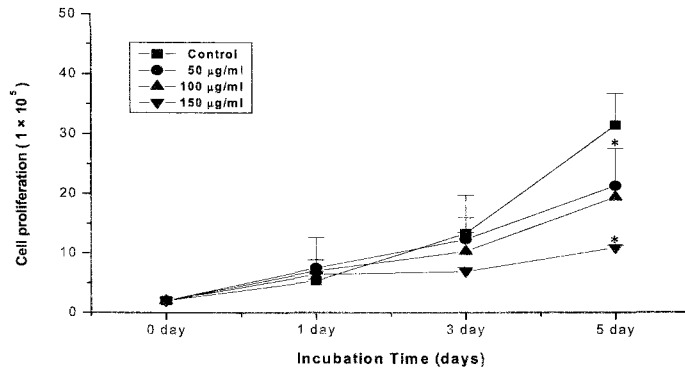


Fig. 1. Effect of the Methanol extract of Fructus Forsythiae on Cell proliferation. HM3KO cells were cultured at 2×10^5 cell/dish. After 48hr, cells were treated with various concentrations of Fructus Forsythiae for 1, 3 and 5 days. Cells were trypsinized and counted. Data are means \pm SD of four determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with control group. * $p < 0.01$

2. 연교 메탄올추출물이 세포내 Tyrosinase 활성에 미치는 영향

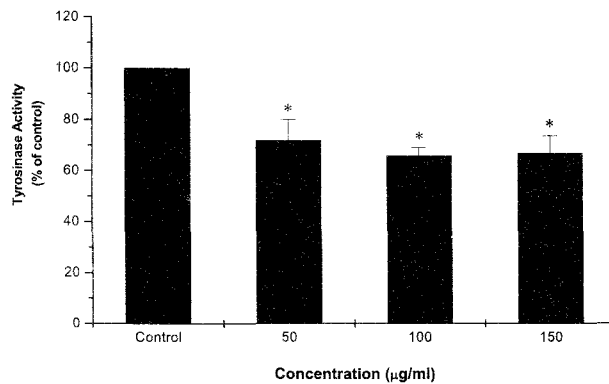


Fig. 2. Effect of the Methanol extract of Fructus Forsythiae on tyrosinase activity. The effect on tyrosinase activity was tested with several concentrations of Fructus Forsythiae in HM3KO cells for 3 days.

Data are expressed as percent (%) of control and each column represents the means \pm S.D of five determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with control group. * $p < 0.01$

연교 메탄올 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 연구에서는 먼저 멜라닌 합성 과정 중 속도조절 효소로 작용하는 tyrosinase의 활성을 측정하였다. 연교 메탄올 추출물을 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 150 μ g/ml 농도로 처리하고 3일 후 tyrosinase 활성을 측정한 결과, 50 μ g/ml 처리군은 대조군에 비하여 71.9 \pm 8.2%, 100 μ g/ml 처리군은 65.8 \pm 3.3%, 그리고 150 μ g/ml 처리군은 66.9 \pm 6.8%로 유의하게 감소하였다(Fig. 2). 연교 메탄올 추출물은 tyrosinase 활성을 억제하였고, 따라서 멜라닌 생성성을 감소시킬 것으로 생각된다.

3. 멜라닌 생성에 미치는 영향

연교 메탄올 추출물을 HM3KO 세포에 처리하고 3일 동안 배양한 다음 멜라닌 양을 측정하였다. 연교 메탄올 추출물 처리시 HM3KO 세포의 멜라닌은 50 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 66.7 \pm 15%, 100 μ g/ml 처리군은 56.1 \pm 16.3%, 그리고 150 μ g/ml 처리군은 58.8 \pm 14.7%로 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

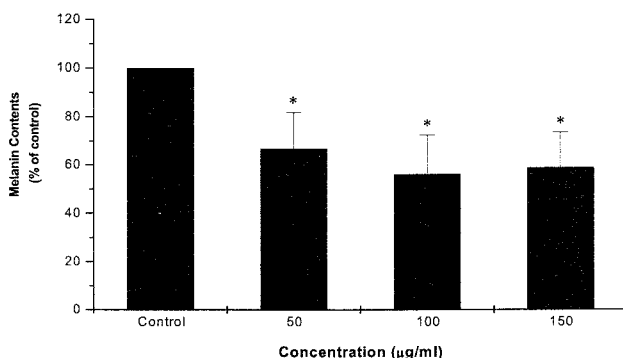
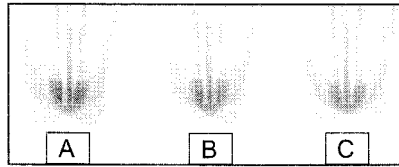


Fig. 3. Effect of the Methanol extract of Fructus Forsythiae on the melanin contents. HM3KO cells were treated with several concentrations of Fructus Forsythiae for 3days. Data are expressed as percent (%) of control and each column represents the means \pm S.D of five determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with control group. * $p < 0.01$

멜라닌 생성 억제 효과를 육안으로 확인하기 위하여 HM3KO 세포에 연교 메탄올 추출물을 50, 100, 150ug/ml의 농도로 처리하고 3일 동안 배양한 후 각 처리군당 1×10^6 개의 세포를 수집하여 멜라닌세포의 색의 변화를 관찰하였다. 대조군의 세포는 검정에 가까운 진한 회색이었으나, 연교 메탄올 추출물을 처리한 세포는 대조군에 비하여 상대적으로 연한 갈색을 띄고 있음을 확인하였다(Fig. 4).



A: Control, B: 100 µg/ml, C: 150 µg/ml

Fig. 4. Effect of the Methanol extract of Fructus Forsythiae on cell pigmentation. HM3KO cells were cultured at 2×10^5 cell/dish. After 48hr, the cells were treated with several concentrations of Fructus Forsythiae for 3days. Cells were trypsinized, counted, and 1×10^6 cells pelleted by centrifugation.

IV. 고찰

연교(連翹, *Fructus Forsythiae*)는 전국적으로 분포하고 4월중에 개화하여 가을에 열매가 익는 대로 채취하여 햇볕에 말려서 약재로 사용한다.¹⁸⁾ 난원형의 삭과로 양끝이 뾰족하며 바깥면은 엷은 갈색-암갈색, 엷은 회색의 작은 융기점이 흩어져 있고 2개의 세로홈이 있으며, 잘 여문 것은 세로홈에 따라 갈라지고 끝쪽은 뒤 틀려져 있다. 갈라진 과피의 안쪽은 황갈색으로 가운데 격벽이 있고, 특이한 향기가 있으며 약간 수렴성이다. 연교에 함유되어 있는 성분에는 lignan류(phillygenin, pinoresinol, arctigenin, matairesinol), lignan glucoside류(phillyrin, pinoresinol--D-glucose, arctin, matairesinoside), flavonoid(rutin) 및 3,4-dihydroxyphenethyl alcohol의 caffeoyl glycoside류(forsythiaside, acteoside, suspensaside 및 hydroxyacteoside) 등이 있다. 그 중 phillyrin이 혈압강화작용이

있으며, pinoresinol과 pinoresinol-D-glucoside가 cyclicAMP-phosphodiesterase 활성을 억제 및 혈압강하작용이 있다고 보고 되었다.^{5,19)} 또한 phenylpropanoid glycosides는 항균작용, 3 β -acetoxy-20, 25-epoxydam항염증 효과가 있는 것으로 알려져 있다.^{4,20-21)}

피부의 질환 중 과색소증은 피부의 표피층에서 멜라닌이 과다하게 생성되어 색소가 비정상적으로 침착되어 나타나는 질환으로,^{14,22-25)} 자외선의 과다노출, 유전적 요인, 비정상적인 대사과정, 피부염증, 피부 전염병, 내분비 장애, 상처자국 등이 주 원인으로 알려져 있다.²⁶⁻²⁸⁾ 멜라닌의 과잉생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하며, 더 나아가 피부암의 유발에 관여한다. 따라서 피부노화 및 미백과 관련된 미용에 대한 사회적으로 관심이 증가하면서 과색소증의 원인과 기전의 규명 및 이를 방지할 수 있는 약품 또는 미백화장품의 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 천연물을 이용한 미백효과에 대한 연구로는 문 등이²⁹⁾ 감초가, 임 등이³⁰⁾ 사삼 메탄올 추출물이 B16F10 세포에서 멜라닌 생성을 억제, 미백효과가 있다고 하였다. 또 임 등은³¹⁾ 감초가, 이 등은³²⁾ 더덕의 물 추출물이 HM3KO 세포에서 멜라닌 생성을 억제 한다고 하였다. 그 외에도 미백효과가 있는 천연물로는 인삼, 천화분, 산수유, 신이, 목단피, 대극, 소목, 전호 등이 있다.

그러나 피부의 생리활성에 대한 연교의 영향은 보고 된 바가 없고, 멜라닌은 멜라닌세포의 세포소기관인 멜라닌소체(melanosome)에서 일련의 효소 반응에 의해 생성되므로, 본 연구에서는 인체 멜라닌세포주인 HM3KO 세포에서 연교 메탄올 추출물의 멜라닌 생성 억제효과를 조사하였다.

생체에서 피부 색소침착(pigmentation)을 일으키는 가장 주요한 자극은 자외선으로서, 멜라닌은 tyrosine으로부터 세가지 단계, 즉 tyrosinase, tyrosinase related protein 1(TPR-1), DOPochrome tautomerase(TRP-2)에 의해서 합성되는데, 이 중 tyrosinase는 멜라닌 생성과정의 속도조절 효소이다.^{22,33,34)} 따라서 본 연구에서 tyrosinase 효소활성에 대한 연교 메탄올 추출물의 효과를 조사한 결과 유의하게 억제하였고(Fig. 2) 멜라닌도 효과적으로 감소시켰다. (Fig. 3)

지금까지 알려진 멜라닌 생성억제 효능이 있는 물질로는 kojic acid, arbutin, hydroquinone 등이 있으나 kojic acid와 arbutin은 아직까지 임상에서 그 효능이 효과적이지 않고, 비교적 효능이 탁월하다고 알려진 hydroquinone은 세포독성이 강하여 잠재적인 돌연변이원이 될 수 있다고 보고 되고 있다.³⁵⁾ 이러한 이유로 최근에는 세포에 직접적인 독성이 적으면서 멜라닌 생성을 감소시키고 동시에 non-mutagenic한 미백 효능을 가지는 천연물에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 따라서 본 연구에서 연교 메탄올 추출물이 HM3KO 세포의 증식에 미치는

영향을 조사한 결과 1, 3일, 그리고 5일 동안 처리하였을 때 150 µg/ml 농도에서 세포의 증식을 억제하였으나 세포사멸은 일어나지 않았으며, 지속적인 세포 성장이 일어나고 있었다(Fig. 1).

이상의 결과 연교 메탄올추출물은 세포사멸과 같은 세포독성이 아닌 세포 내 tyrosinase 활성을 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시킨 것으로 생각된다.

V. 결론

연교(*Fructus Forsythiae*) 메탄올 추출물이 인체 멜라닌세포주인 HM3KO 세포의 세포독성, tyrosinase 활성 및 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 연교 메탄올 추출물을 50, 100, 150 µg/ml으로 1, 3, 5일 동안 처리하였을 때 150 µg/ml 농도에서 세포의 증식을 억제하였으나 세포사멸은 일어나지 않았다. Tyrosinase 효소활성에 대한 연교 메탄올 추출물의 효과를 조사한 결과 유의하게 억제하였고, HM3KO 세포의 육안적 관찰과 멜라닌의 정량적 측정 결과 멜라닌이 감소되었다. 이상의 결과 연교 메탄올 추출물은 세포의 사멸에 의해서가 아니라 tyrosinase 활성 억제에 의해 멜라닌의 생성이 감소된 것임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 BK21 사업의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

VI. 참고 문헌

1. 辛民教 저, 臨床本草學, 永林社, pp, 431, 1997.
2. Kim, T.J. Korean resources plants. Seoul National University Pub. Co., p.262(1991)
3. Li ZX, Wang XH, Zhao JH, Yang JF, Wang X, Investigation on antibacterial activity of *Forsythia suspense* Vahl in vitro with Mueller-Hinton agar. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 25 (12) : 742-745, 2000.
4. Ozaki Y, Rui J, Tang YT. Antiinflammatory effect of *Forsythia suspensa*

- V (AHL) and its active principle. *Biol Pharm Bull* 23(3) : 365-367, 2000.
5. Lee EB, Keum HJ. Pharmacological studies on *Forsythae Fructus*. *Kor J Pharmacogn* 19(4) : 262-269, 1988
 6. Rim YS, Park YM, Park MS, Kim KY, Kim MJ, Choi YH. Screening of antioxidant and antimicrobial activity in native plants. *Korean J Medicinal Crop Sci* 8(4) : 342-350, 2000.
 7. Lim DK, Choi U, Shin DH. Antioxidative Activity of Ethanol Extract from Korean Medicinal Plants. *Korean J Food Sci Technol* 8(4) : 342-350, 2000.
 8. Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich D, Rios JL. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci* 70(9) : 1023-1033, 2002.
 9. 박경아 등 , 조직학, 서울 고려의학, pp. 405-411, 1999.
 10. Fitzpatrick TB, Szabo G, Seiji M, Quevedo WC : Biology of the melanin pigmentary system. In: Fitzpatrick TB, ed., *Dermatology in General Medicine*. Academic Press, New York, pp. 131-163, 1979.
 11. Jimbow K, Fitzpatrick TB, Wick M : Biochemistry and physiology of melanin pigmentation. In: Goldsmith LA, ed., *Physiology and Molecular Biology of the skin*. Oxford Univ. Press, New York, pp. 873-909, 1991.
 12. Sandra M. De Leeuw, Nico P. M. Smit, Monique Van Veldhoven, Ed M. Pennings, Stan Pavel, Johannes W. I. M. Simons, Albert A. Schothorst: Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *J. Photochemistry and Photobiology B. Biology* 61: 106-113, 2001.
 13. Walter Englaro, Philippe Bahadoran, Corine Bertolotto, Roser Busca, Benoit Derijard, Antonia Livolsi, Jean-Francois Peyron, Jean-Paul Ortonne, and Robert Ballotti: Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of melanogenesis is dependent on nuclear factor kappa B activation. *Oncogene* 18: 1553-1559, 1999.
 14. Sugai, T: Clinical effects of arbutin in patients with chlosma in Japanese. *Hifu. Skin Res.* 34: 522-529, 1992.
 15. Kobayashi T, Urabe K, Winder AJ *et al.* Tyrosinase related

- protein(TRP-1) functions as a DHICA oxidase activity in melanin biosynthesis. *EMBO J.* 13: 5818-5825, 1994.
16. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borron JC: Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem* 255(1):139-146, 1998.
 17. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α ,25-dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 45: 1474-1478, 1985.
 18. 장준근 저 : 몸에 좋은 산야초 (건강한 장수비결), 넥서스, pp, 425.
 19. Takeshi, H., Yuka, K., Kazuhiro, O., Ryoji, K., Kazuo, Y. and Chayan, P. Cyclohexylethanoids and related glucosides from *Millingtonia Hortensis*. 39(1): 235-241, 1995.
 20. Kim JH 외. 연교(*Frosythiae fructus*)로부터 분리한 caspase 유도 저해물질, *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL*, 34(1), pp, 114-117.
 21. Kitagawa, S., Nishibe, S. and Baba H. Studies on the chinese crude drug *Forsythia fructus* on isolation of phenylpropanoid glycosides from fruits of *Forsythia koreana* and their antibacterial activity. *Yakugaku Zasshi* 107(4): 274-278, 1987.
 22. Hearing VJ : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 4, pp. 24-28,1999
 23. Kim CW : Experimental study on the hyperpigmentation of skin graft. *Plast Reconstr. Surg.* 85, 162, 1990.
 24. Mishima Y, Imokawa G : Selective aberration and pigment loss in melanosomes of malignant melanoma cells in vitro by glycosylation. *J. Invest. Dermatol.* 81, pp.106-114, 1983.
 25. Imokawa G, Mishima Y : Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res.* 42, pp. 1994-2002, 1982.
 26. Imokawa, G, Kawai, M., Mishima, Y. and Motegi, I. Differential analysis of experimental hypermelanosis induced by UVB, PUVA and allergic dermatitis using a brownish guinea pig model. *Arch Dermatol. Res.* 278, pp. 352-362, 1986.

27. Abdel-Malek, Z., Swope, V. B., Smalara, D., Babcock, G., Dawes, S. and Nordlund, J. J. Analysis of the UV-induced melanogenesis and growth arrest of human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 7, pp. 326-332, 1994.
28. Stipic, V. Skin infections caused by protozoa. In: Dobric, I., ed., *Dermatovenerologija*, Zagreb. Grafoplast, pp. 101-102, 1994.
29. 문연자 외. 감초 물추출물의 멜라닌 형성 억제효과, 동의생리병리학회지, 16(6), pp. 1230-1235, 2002.
30. 임난영 외. 사삼 메탄올 추출물의 멜라닌 생성 억제효과, 동의생리병리학회지, 18(3), pp. 747-753, 2004.
31. 임숙정 외. 감초 물추출물이 HM3KO 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 17(2), pp. 368-373, 2003.
32. 이승연 외. 더덕 물추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향, 대한한의학 방제학회지, 10(2), pp. 199-211, 2002.
33. K. Wakamatsu and S. Ito: Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Res.* 15: 174-183, 2002.
34. Kobayashi T, Urabe K, Winder AJ *et al.* Tyrosinase related protein(TRP-1) functions as a DHICA oxidase activity in melanin biosynthesis. *EMBO J.* 13: 5818-5825, 1994.
35. Curto E V, Kwong C, Hermersdorfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing V J and Dooley P: Inhibitors of mamalian melanocytes tyrosinase: In vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology.* 57: 663-672, 1999.