

생강나무 추출물의 항산화 활성과 미백효과

방채영 · 원은경 · 박권우* · 이광원** · 정세영#

경희대학교 약대학 위생약학 및 독성학실, *고려대학교 생명과학대학 채소 및 허브학실,

**고려대학교 생명과학대학 식품생화학 및 독성학실

(Received June 11, 2008; Revised September 27, 2008)

Antioxidant Activities and Whitening Effect from *Lindera obtusiloba* BL Extract

Chae Young Bang, Eun Kyung Won, Kuen Woo Park*, Gwang Won Lee** and Se Young Choung#

Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

*Divisions of Bioscience and Technology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

**Department of Food Science, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — In this study we investigated antioxidant activity of against several free radicals and skin whitening effect of 70% ethanol extract (leaf extracts and branch/stem mixed) of *Lindera obtusiloba* BL. Antioxidant activity was assessed by DPPH, superoxide radical and hydroxyl radical assays. The *Lindera obtusiloba* BL extract had antioxidant activity dose dependently with an IC₅₀ value of 243.14 and 181.10 µg/ml for DPPH, 165.77 and >1500 µg/ml for non-enzymatic system of superoxide radical assay, 35.47 and >100 µg/ml for enzymatic system of superoxide radical assay, 1.21 mg/ml for hydroxyl radical assay. In addition we tested tyrosinase inhibition activity and melanin contents on B16 melanoma F10. B16 melanoma cell was treated by such sample as 1, 5, 10 and 50 µg/ml for 72 hr and tyrosinase inhibition was tested. Melanogenesis was inhibited to 22% at the dose of 50 µg/ml and tyrosinase was inhibited to 45.2% at the same dose. In conclusion *Lindera obtusiloba* BL had potent antioxidant activity and inhibitory activity of tyrosinase and melanin formation. It could be developed as the health functional food and functional cosmetic resources.

Keywords □ *Lindera obtusiloba* BL, antioxidant, DPPH, hydroxyl radical, superoxide radical, whitening effect

외부로부터의 자극이나 산업화에 따른 환경오염, 잘못된 식습관 등 다양한 스트레스로 인하여 인체 내에서 높은 활성산소(reactive oxygen species: ROS)를 발생시킨다. 활성산소에는 superoxide radical(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxyl radical(OH[·]), singlet oxygen(¹O₂) 등이 있으며 대사과정 중의 부생성물로서 발생되고,^{1,2} 세포구성 성분을 비가역적으로 파괴한다고 알려져 있다. 그러나 식물은 이러한 활성산소에 대한 방어 기작으로 이를 제거할 수 있는 tocopherol, ascorbic acid, catechine, glutathione 등과 같은 다양한 형태의 천연 항산화제를 함유하고 있으며,³⁻⁶ 특히, 항산화 효소의 발현은 중요한 역할을 한다.⁷ 항산화 효소는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등이 있는데 superoxide dismutase(SOD)는 superoxide

anion radical(O₂⁻)을 제거하여 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 전환시키는 촉매 효소이고, catalase(CAT)는 주로 peroxisom 에 존재하며 H₂O₂를 물과 산소로 분해한다.⁸ 이러한 천연 항산화제나 항산화 효소들은 독자적인 작용이나 다른 작용을 보조하는 과정을 통해 활성 산소로부터 생체를 보호하는 작용을 한다. 활성산소에 대한 생체 방어력에 이상이 생기거나 과도한 활성산소에 노출될 경우, 활성산소가 인체 세포구성성분인 지질, 단백질, DNA 등의 비선택적, 비가역적인 파괴가 유도됨으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨씨병과 같은 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.⁹⁻¹²

위에서 언급한 일반적인 노화현상과 같이 광노화 과정에서도 활성산소는 중요한 원인인자이다. 광노화의 원인이 되는 요소인 자외선이 활성산소의 증가를 유도하기 때문이다. 자외선 차단제를 사용했을 때 피부에서 ROS를 감소시킬 수 있다는 보고와 자외선의 조사량을 증가 시키면서 활성산소 생성량을 측정할 결과 조사량이 증가할수록 활성산소의 생성이 증가 되었다는 보고

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-961-0372 (팩스) 02-961-0372
(E-mail) sychoung@khu.ac.kr

가^{13,14)} 자외선과 ROS 생성 증가의 상관관계를 증명하고 있다. 자외선에 의해 증가된 활성산소는 표피세포에 장해를 주고 또한 표피세포에서의 염증성 cytokine인 interleukin(IL)-1 α , β 와 IL-6, TNF- α 등의 분비를 촉진시켜서^{15,17)} melanocyte에서 keratinocyte로의 melanosome 이송의 증가¹⁸⁾와 melanocyte에서의 melanin 생성증가,^{19,20)} 등 피부착색과 진피에서 fibroblast의 collagen 합성 저해²¹⁾ 등 주름생성을 일으킴으로써 광노화의 중요한 원인이 되고 있다.

이와 같은 산화적 스트레스가 노화를 비롯한 각종 질병의 중요한 원인으로 밝혀지면서 활성산소를 제거하는 항산화제에 대한 관심이 증가하고 있다. 또한 생체 내 활성산소를 조절하고 항산화 활성이 우수하면서 보다 안전한 천연물 유래의 항산화제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

본 실험에서 사용된 생강나무(*Lindera obtusiloba* BL.)는 녹나무과 식물로 꽃은 3월에 잎보다 먼저 핀다. 노란 색의 작은 꽃들이 여러 개 뭉쳐 꽃대 없이 산형꽃차례를 이루어 달리며 그 모양이 산수유 꽃과 비슷하다. 새로 잘라낸 가지에서 알싸한 생강 냄새가 난다고 하여 생강나무라 하며 한국, 일본, 중국 등지에 분포하고 주로 산지의 계곡이나 숲 속의 냇가에서 서식한다. 연한 잎은 먹을 수 있고, 꽃은 관상용이며, 열매는 기름을 짜서 먹을 수 있으며 머리 기름으로²²⁾ 쓰인다. 한방에서는 나무 껍질을 삼첩풍이라고 부르고 있다. 약재로 사용하는데 타박상에 의한 어혈과 산후에 몸이 붓고 팔다리가 아픈 증세에 효과가 있다. 생강나무는 geranyl acetate, linderic acid, tsudzuic acid, 그리고 L-phellandrene를 함유하고²³⁾ 있는데 이들 성분들은 간 보호, 항당뇨 효과 그리고 항산화 활성이 있다고 알려져 있다.

본 연구에서는 예로부터 약용 및 식용으로 사용되는 생강나무를 새로운 가능성 소재로 활용하기 위해 잎 추출물과 가지/줄기 혼합 추출물에서 항산화 활성과 미백효과를 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 생강나무는 충청남도 천안에서 채집하였다. 잎과 가지/줄기 부분만을 따로 분리, 세척하고 물기를 제거한 다음 건조시켜 각각의 재료 100 g을 분쇄하여 70% ethanol을 넣고 환류하면서 80°C에서 4시간씩 3회 반복 추출하였다. 이를 감압 농축, 동결 건조하여 그 분말을 실험에 사용하였다. 잎의 수득율은 26.8%, 가지/줄기 혼합 추출물의 수득율은 17.8% 였다.

세포 및 시약

실험에 사용한 B16F10은 마우스의 melanoma 세포주로 미국 ATCC에서 구입하였다. Cell culture에 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin

은 Hyclone Laboratories Inc. USA를 사용하였고, DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ascorbic acid, xanthine oxidase, NADH, Phenazine methosulfate, NBT(nitroblue tetrazolium), N,N-dimethyl-p-nitrosoaniline, tyrosinase 는 Sigma chemical Co. USA 를 사용하였다.

실험 방법

생강나무 잎과 가지/줄기 추출물의 항산화 활성

DPPH radical 소거활성에 의한 항산화 효능 검색 - 각 농도 별로 조제한 생강나무 잎 추출물 5, 10, 50, 100, 500, 1000 μ g/ml의 용액과 가지·줄기 혼합 추출물 10, 50, 100, 500 μ g/ml의 용액 20 μ l와 70% ethanol 100 μ l, 95% ethanol에 녹인 0.15 mM DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)용액 80 μ l를 넣고 37°C에서 30분 동안 방치시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로서는 ascorbic acid(vitamin C) 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50 μ g/ml를 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage(%)로 표기하였다.

Superoxide radical(Enzymatic system : xanthine-xanthine oxidase) 소거활성에 의한 항산화 효능 검색 - Xanthine-xanthine oxidase는 superoxide radical(O₂⁻)을 발생시키는 대표적인 실험계이다. 시험관에 55 mM Potassium phosphate buffer(pH 7.5) 1.8 ml, 0.15 mM xanthine 1 ml과 각 농도 별로 조제한 생강나무 잎 추출물 1.0, 5.0, 10, 50, 100 μ g/ml과 가지·줄기 혼합 추출물 1, 10, 100 μ g/ml의 용액 0.1 ml, xanthine oxidase 0.1 ml를 혼합하고 실온에서 20분 방치시킨 후 1 N HCl 1 ml를 가하여 반응을 정지 시키고 290 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로는 xanthine oxidase 억제 작용이 있는 약물로 널리 알려진 allopurinol 0.68, 1.36, 6.8, 13.36, 136 μ g/ml를 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage(%)로 표기하였다.

Superoxide radical(Non-enzymatic system : NADH-PMS) 소거활성에 의한 항산화 효능 검색 - 24 well plate에 각 농도 별로 조제한 생강나무 잎 추출물 1.0, 5.0, 10, 50, 100, 500 μ g/ml과 가지/줄기 혼합 추출물 1.0, 10, 100, 1000 μ g/ml 용액 20 μ l에 30 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) 100 μ l와 100 μ M PMS(Phenazine methosulfate) 20 μ l, 0.5 mM NADH 40 μ l, 0.5 mM NBT 20 μ l를 혼합하여 37°C에서 20분 동안 방치한 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로서는 ascorbic acid 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100, 1000 μ g/ml를 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage(%)로 표기하였다.

Hydroxyl radical 소거활성에 의한 항산화 효능 검색 - 시험관에 95% ethanol에 녹인 2.5 mM β -carotene 200 μ l에 5.94 mM H₂O₂, 800 μ l와 26.4 mM FeSO₄의 농도가 되게 녹인 정제

수 800 μ l, 각 농도 별로 조제한 생강나무 잎 추출물 0.5, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 mg/ml과 가지줄기 혼합 추출물 0.5, 1.0, 1.5 mg/ml 용액 200 μ l를 혼합한 후 곧바로 536 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로서는 mannitol 0.0018, 0.0091, 0.0182, 0.091, 0.182, 0.91, 1.82 mg/ml을 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage(%)로 표기하였다.

생강나무 잎 추출물의 미백효과

B16 melanoma F10 cell culture - B16 melanoma F10 cell은 10% fetal bovine serum과 penicillin 100 IU/ml, streptomycin 50 μ g/ml을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 용액에서 37°C, 0.5% CO₂ 조건의 CO₂ incubator에서 배양하였다.

Cell viability - B16 melanoma F10 cell을 24 well에 well 당 10⁴ cell씩 분주하였다. 17시간 후 cell의 부착을 확인한 후 배지를 걷어내고 각 농도 별로 배지에 녹여 조제한 생강나무 잎 추출물 1.0, 5.0, 10, 50, 100 μ g/ml을 각 well에 1ml씩 분주하였다. 72시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후 MTT 용액을 넣고, 다시 4시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고, DMSO로 cell을 녹여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage(%)로 표기하였다.

Tyrosinase activity inhibition - B16 melanoma F10 cell을 24 well에 well당 10⁴ cell씩 분주하였다. 17시간 후 cell의 부착을 확인한 후 배지를 걷어내고 각 농도 별로 배지에 녹여 조제한 생강나무 잎 추출물 1.0, 5.0, 10, 50 μ g/ml을 각 well에 1ml씩 분주하였다. 72시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후 배지를 걷어내고 PBS 2 ml로 2회 세척하였다. 세척 후 1M tris-HCl이 포함된 lysis buffer를 이용하여 cell을 lysis 시키고 $\times 10,000$ g에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액의 protein 량을 측정하고 농도는 lysis buffer로 맞춰준다. 상층액 90 μ l와 10 mM dihydroxyphenylalanine(DOPA) 용액 10 μ l를 섞어 37°C에서 20분 동안 방치시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.^{24,25}

Total melanin content - B16 melanoma F10 cell을 24 well에 well 당 10⁴ cell씩 분주하였다. 17시간 후 cell의 부착을 확인한 후 배지를 걷어내고 각 농도 별로 배지에 녹여 조제한 생강나무 잎 추출물 1.0, 5.0, 10, 50 μ g/ml을 각 well에 1ml씩 분주하였다. 72시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후 배지를 걷어내고 PBS 2 ml로 2회 세척하였다. 세척 후 1N NaOH를 well 당 500 μ l씩 넣고 37°C에서 20분간 방치한 후 tube에 옮겨 99°C에서 30분간 세포를 파괴하였다. 이 용액을 96 well에 200 μ l씩 분주한 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액을 제조하여 470 nm에서의 흡광도를 이용하여 standard curve를 구하고 이로부터 농도를 계산하였다.

자료분석 및 통계처리 - 모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 분석하였으며, *p*값이 0.01 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

실험결과 및 고찰

생강나무 잎과 가지/줄기 추출물의 항산화 활성

DPPH radical 소거활성에 의한 항산화 효능 검색 - 생강나무 여러 부위별(잎, 가지/줄기) 추출물의 DPPH radical소거능은 잎의 경우 5.0~1000 μ g/ml에서 농도 의존적인 경향을 나타냈으며, 가지/줄기 혼합 추출물의 경우 0.5~500 μ g/ml에서 농도 의존적인 경향을 나타냈다. 잎 추출물 1000 μ g/ml(84%), 가지/줄기 추출물 500 μ g/ml(87%)에서 나타나는 소거능은, 생강나무 추출물이 가지는 고유의 짙은 색으로 인해 높은 농도에서의 흡광도 값이 일정하지 못하여 항산화 검색에 간섭을 최소화할 수 있는 농도 범위에서 검색한 결과이다(Fig. 1). IC₅₀은 Vit C는 7.47 μ g/ml, 잎은 243.14 μ g/ml이며, 가지/줄기는 181.10 μ g/ml이다.

Superoxide radical(Enzymatic system : xanthine-xanthine oxidase) 소거활성에 의한 항산화 효능 검색 - 효소적 superoxide radical 생성계인 xanthine-xanthine계에서의 superoxide radical소거능은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 잎의 경우 50 μ g/ml에서 농도 의존적으로 소거되는 경향을 나타냈으며, 가지/줄기 혼합 추출물의 경우 10 μ g/ml에서 농도 의존적으로 소거되는 경향을 보였다. IC₅₀은 allopurinol은 68 μ g/ml, 잎은 35.47 μ g/ml이며, 가지/줄기는 >100 μ g/ml이었다.

Superoxide radical(Non-enzymatic system : NADH-PMS) 소거활성에 의한 항산화 효능 검색 - 비효소적 superoxide radical 생성계인 NADH/PMS에서의 superoxide radical 소거능은 잎의 경우 1~500 μ g/ml에서 농도 의존적으로 소거되는 경향

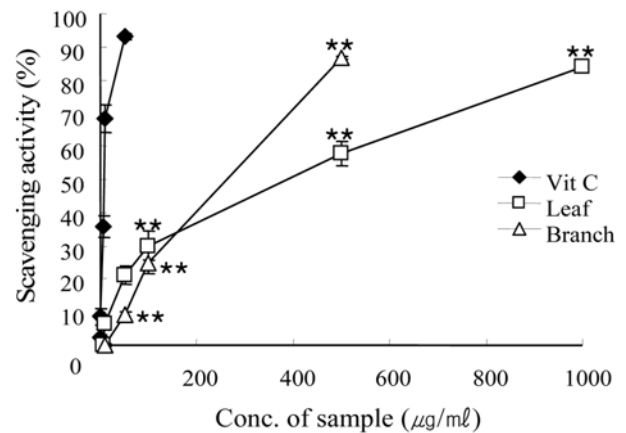


Fig. 1 - DPPH radical scavenging activity of *Lindera obtusiloba* BL extract. Values are mean \pm SD (n=3), ***p*<0.01 vs positive CTL.

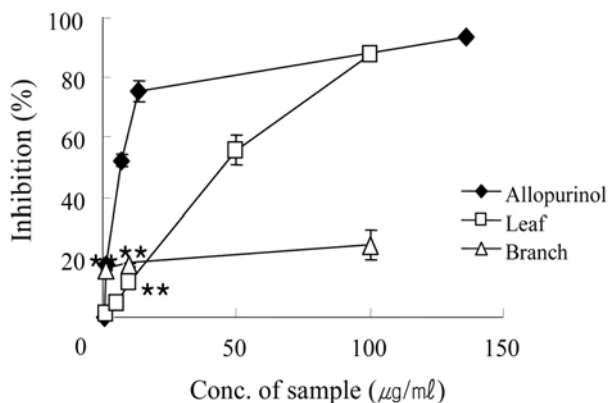


Fig. 2 – Superoxide radical scavenging activity (enzymatic system) of *Lindera obtusiloba* BL extract. Values are mean ±SD (n=3), **p<0.01 vs positive CTL.

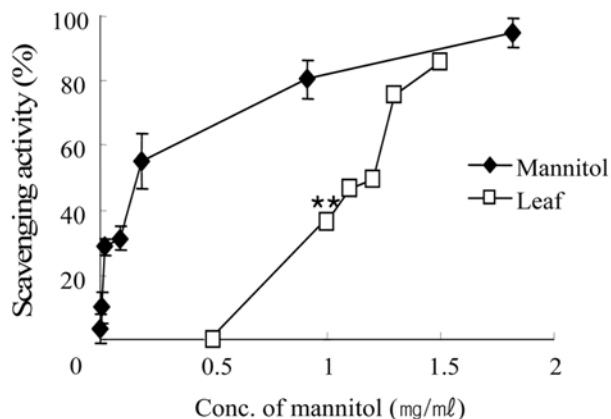


Fig. 4 – Hydroxyl radical scavenging activity of *Lindera obtusiloba* BL extract. Values are mean ±SD (n=3), **p<0.01 vs positive CTL.

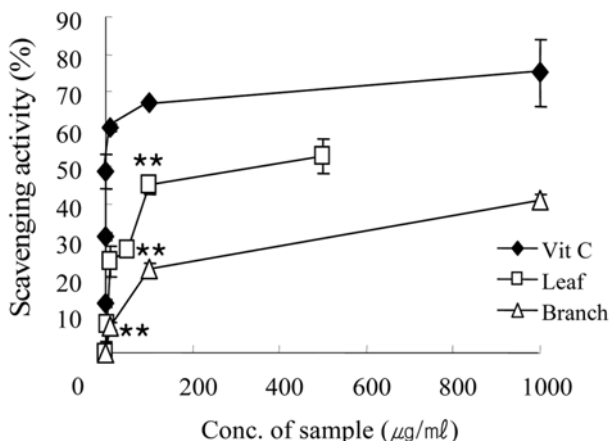


Fig. 3 - Superoxide radical scavenging activity (nonenzymatic system) of *Lindera obtusiloba* BL extract. Values are mean ±SD (n=3), **p<0.01 vs positive CTL.

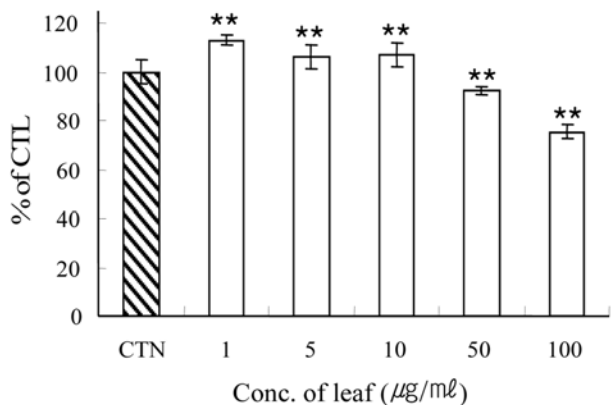


Fig. 5 – Cytotoxicity of *Lindera obtusiloba* BL leaf extract on B16 melanoma F10. Values are mean ±SD (n=3), **p<0.01 vs CTL.

을 나타냈으며, 가지줄기 혼합 추출물의 경우 1~1,500 µg/ml에서 농도 의존적으로 소거되는 경향을 보였다(Fig. 3). IC₅₀은 Vit C는 3.42 µg/ml, 잎은 165.77 µg/ml이며, 가지줄기는 >1500 µg/ml이다.

Hydroxyl radical 소거활성에 의한 항산화 효능 검색 - 생강나무 잎 추출물의 hydroxyl radical 소거능은 생강나무 잎 추출물에서만 확인할 수 있었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 잎 추출물 1.0~1.5 mg/ml 범위에서 농도 의존적으로 소거하였으며, 그 효과는 잎 추출물의 IC₅₀ 수치가 1.21 mg/ml로 hydroxyl radical 소거제인 mannitol의 IC₅₀ 수치 0.159 mg/ml과 비교했을 때 10 배 정도의 활성 산소 소거능 차이를 가짐을 알 수 있었다.

생강나무 잎 추출물의 미백효과

Cell viability - 세포에서의 미백효과 확인은 위의 항산화 활성 결과를 바탕으로 잎 추출물에서만 확인하였다. 생강나무 추

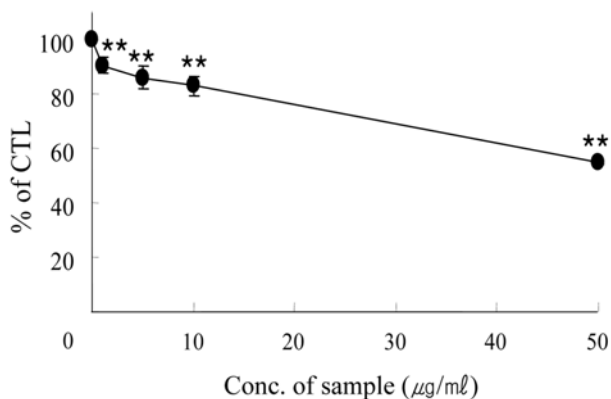


Fig. 6 – Tyrosinase inhibition activity of *Lindera obtusiloba* BL leaf extract on B16 melanoma F10.

출물의 세포 독성은 잎 추출물의 경우 100 µg/ml의 농도 이상에서 독성이 있음을 확인하였다(Fig. 5). 이 후의 tyrosinase activity

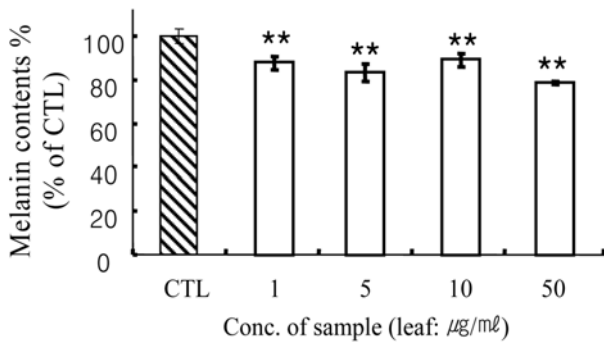


Fig. 7 – Antimelanogenesis effect of *Lindera obtusiloba* BL leaf extract on B16 melanoma F10. Values are mean±SD (n=3), **p<0.01 vs CTL.

와 melanin content 측정 실험은 독성이 나타나지 않은 1, 5, 10, 50 µg/ml의 농도 범위 안에서 실시하였다.

Tyrosinase activity inhibition – 세포 독성이 나타나지 않는 1, 5, 10, 50 µg/ml 농도 범위에서 tyrosinase 활성 저해율은 각각 9.8, 14.3, 17.3, 45.2%를 보였다(Fig. 6). 이로부터 생강나무 잎 추출물의 melanin생성억제 가능성이 있음을 확인 할 수 있었다.

Melanin synthesis inhibition – B16 melanoma F10의 total melanin content는 잎 추출물 농도 50 µg/ml에서 22% 감소하였다(Fig. 7). 이는 Fig. 5의 결과와 종합하여 볼 때 세포의 증식을 억제하지 않는 범위에서 세포 내 total melanin content가 22% 감소한 것으로 생강나무의 미백능을 확인할 수 있다.

결 론

생강나무 잎 추출물과 가지/줄기 추출물의 항산화 효과는 가지/줄기 추출물보다는 잎 추출물에서 높은 항산화 활성을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 세포에서 잎 추출물을 농도 별로 처리하여 tyrosinase activity와 melanin content를 본 결과 미백효과가 있음을 검증할 수 있었다. 생강나무 추출물 특히 잎 추출물은 항산화 능력에 비해 미백효과가 더 강하게 나타나 새로운 미백소재로서 개발 가능성이 충분할 것으로 확인 할 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 농림수산식품부 농림기술관리센터 농림기술개발사업과제(20060411)의 연구비에 의해 지원되었습니다.

참고문헌

1) Badwey, J. A. and Karnovsky, M. L. : Active oxygen species

and the functions of phagocytic leucocytes. *Ann. Intern. Med.* **93**, 480 (1980).

2) Babior, B. M. : Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* **109**, 33 (2000).

3) Namiki, M. O. : Antioxidants/Antimutagens in Food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **29**, 273 (1990).

4) Ames, B.N., Cahcart, R., Schwiers, E. and Hochstein, P. : Uric acid provides an antioxidant defense in himan against oxidant amd radical-caused aging and cancer. *Proc. Natl., Acad. Sci.* **78**, 6858 (1981).

5) Frankel, N. : Antioxidants in lipid food and their on food quality. *Food Chem.* **75**, 51 (1996).

6) Giese, J. : Antioxidants tools for prevention lipid oxidation. *Food Technol.* **5**, 73 (1996).

7) Kang, N. J., Kwon, J. G., Lee, H. C., Jeong, H. B. and Kim, H. T. : Antioxidant enzymes as defense mechanism against oxidative stress induced by chilling in cucurbita ficifolia leeaves. *J. Kor. Sod. Sci.* **44**, 605 (2003).

8) Bowler, C., Van Montagu, M. and Inze, D. : Superoxide dismutases and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 83 (1992).

9) Heinonen, I. M., Meyer, A. S. and Frankel, E .N. : Antioxidant activity of berry phenolic on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4107 (1998).

10) Rice-Evans, C. A. and Miller, N. J. : Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Soc. Trans.* **24**, 790 (1996).

11) Satue-Garcia, M. T., Heinonen, I. M. and Frankel, E. N. : Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome system. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3362 (1997).

12) Miquel, J. : An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp. Gerontol.* **33**, 113 (1998).

13) Yasui, H. and Sakurai, H. : Age-dependent generation of reactive oxygen species in the skin of live hairless rats exposed to UVA light. *Exp. Dermatol.* **12**, 655 (2003).

14) Herrling, T., Fuchs, J., Rehberg, J and Groth, N. : UV-induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 59 (2003).

15) Ansel, J. C., Luger, T. A., Lowry, D., Perry, P., Roop, D. R. and Mountz, J. D. : The expression and modulation of IL-1α in murine keratinocytes. *J. Immunol.* **140**, 2274 (1988).

16) Kirnbaner, R., Kock, A., Neuner, P, Forster, E., Krutmann, J., Urbanski, A., Schauer, E., Ansel, J. C., Schwarz, T. and Luger T. A. : Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 484 (1991).

17) Oxholm, A., Oxholm, P, Staberg, B. and Bendtzen, K. :

- Immunohistological detection of interleukin-1 like molecules and tumor necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation *in vivo*. *Br. J. Dermatol.* **118**, 369 (1988).
- 18) Stierner, U. : Melanocytes, moles and melanoma-a study of UV effects. *Acta. Derm. Venereol. (Stockh)* **168**, S1 (1991).
- 19) Castanet, J. and Ortonne, J. P. : Pigmentary changes in aged and photoaged skin. *Arch. Dermatol.* **133**, 1296 (1997).
- 20) Ortonne, J. P. : Pigmentary changes of the ageing skin. *Br. J. Dermatol.* **122**, 21(1990).
- 21) Varani, J., Warner, R. L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S. H., Kang, S. H., Chung, J. H., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Fisher, G. J. and Voorhees J. J. : Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 480 (2000).
- 22) Kang, C. G., Park, S. Y. and Yook, C. S. : Essencial components of *Lindera obtusiloba* BL. *Natural Product Sciences* **26**, (1995).
- 23) Moon, H. I. and Lee, J. H. : Volatile aromatic components of Ginger (*Zingiber officinalis* Roscoe) Rhizomes and Japanese Spice Bush (*Lindera obtusiloba* BL.). *Korean J. Crop. Sci.* **42**, 7 (1997).
- 24) Busca, R., Bwerolorro, C., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. : Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **271**, 31824 (1996).
- 25) Kim, D. S., Park, S. H., Kwon, S. B., Park, E. S., Huh, C. H., Youn, S. W. and Park, K. C. : Sphingosylphosphorylcholine-induced ERK activation inhibits melanin synthesis in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **19**, 146 (2005).