

회화나무(*Sophora japonica* L.) 꽃(괴화)과 열매(괴각)의 미백활성 평가

장태원, 박재호*

중원대학교 생약자원개발학과

Evaluation of Whitening Activities of Flower and Fruit of *Sophora japonica* L.

Tae Won Jang and Jae Ho Park*

Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan 28024, Korea

Abstract - *Sophora japonica* has been used for treatment of liver and blood-related diseases in herbology. We evaluated whitening activities of Sophorae Flos and Fructus. Sophorae Flos and Fructus were extracted with methanol (MeOH) and divided into petroleum ether, ethyl acetate(EtOAc) and water fraction. For whitening effect by western blot in B16 F10 cells, we analyzed it by investigating the effect of tyrosinase, TRP-1 (tyrosinase-related protein 1), TRP-2 (tyrosinase-related protein 2) and MITF (microphthalmia-associated transcription factor) protein expression. The protein expressions of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF in B16 F10 cells treated with Sophorae Flos and Fructus extract were reduced in a dose-dependant manner. Therefore, these results suggest that Sophorae Flos and Fructus have useful plant resource to be developed as functional cosmetic.

Key words - *Sophora japonica*, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase

서 언

피부의 구조는 진피와 표피로 구성되어 있으며, 표피는 피부 가장 바깥쪽에서 외부의 다양한 물리적, 화학적 및 기계적 자극에 대한 방어와 체내 수분의 과도한 발산을 막는 보호기능을 한다(Fisher *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2014). 이러한 피부에 발생하는 손상은 자외선이나 건조한 기후와 같은 환경적 요인과 더불어 스트레스, 질병과 같은 원인에 의해 악화하고 있다(Sohn *et al.*, 2004). 피부는 구조적인 변화와 생리적인 기능이 감소하는 내인성 노화와 자외선 노출에 의한 광노화에 의해 노화가 진행된다(Chung *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2001). 피부는 자외선에 의한 광노화가 진행되면서 세포 손상에 대한 방어작용으로 멜라닌을 생성한다. 멜라닌은 검은색을 띄는 고분자 물질로 다양한 원인에 의해 생성 및 합성되지만, 특히

자외선에 의해 생성이 촉진되고, 피부 표피층으로 이동하여 축적되어 피부의 색소 침착에 원인이 된다. 이러한 멜라닌의 과다 축적은 주근깨, 기미, 홍반, 노화와 피부암 유발에 관여한다(Kim *et al.*, 2005; Svobodova *et al.*, 2003). 피부 색소의 형성은 자외선에 노출된 인체에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 과다하게 생성되고, 이로 인한 산화적 스트레스에서 기인한다는 메커니즘이 밝혀지면서, 이를 제거하는 항산화 물질이 멜라닌의 형성 억제에도 효과적이라는 결과가 보고되었다(Eberlein-Konig *et al.*, 1998). 이러한 산화적 스트레스로 인한 활성산소의 강한 반응성이 체내의 당, 지질, 단백질과 DNA까지도 비가역적인 변형과 파괴를 유발한다고 알려져 있다(Seifried *et al.*, 2007). 이러한 활성산소종이 암, 동맥경화, 심혈관계질환 뿐만 아니라 다양한 질병에 관련이 있다고 인식되며, 생물분자 자체를 공격하여 세포, 조직, 기관에 이르는 피해를 준다고 보고되고, 활성산소는 세균을 죽이는 살균의 생체 방어 작용을 하기도 하지만 일반적으로 생체 내에서 산화를

*교신저자: parkjh@jwu.ac.kr

Tel. +82-43-830-8614

일으켜 질병을 초래하는 작용을 한다(Maxwell, 1995). 활성산소종에 의한 산화는 곧 노화에 직접적인 영향을 미치고 노화는 성인병 질환에 관여하게 되며 그 결과 여러 질병에 원인이 된다는 보고도 있다(Marnett, 2000). 특히 피부에서 활성산소종은 collagen과 elastin 등의 변형에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 촉진 등과 더불어 피부의 노화를 가속화 한다(Fantone and Ward, 1982; Park, 2003).

멜라닌 생성의 촉진은 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1)과 tyrosinase-related protein 2 (TRP-2)에 의해 조절된다. tyrosinase는 수산화 반응을 촉진하여 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환하며, DOPA는 DOPA-quinone으로 전환된다. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)을 carboxylated indole-quinone으로 산화시킨다(Hearing and Jimenez, 1987). 또한 TRP-2는 DOPA-chrome tautomerase로 작용하여 DOPA-chrome을 DHICA로 전환한다(Park *et al.*, 2009). 이러한 효소들은 멜라닌 생합성에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 멜라닌 형성에 관여하는 멜라노세포의 성장과 분화에 중요한 전사인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 멜라닌 생성 작용에 중요한 역할을 한다(Ahn *et al.*, 2008). MITF의 발현 증가는 tyrosinase의 발현을 유발하고 멜라닌 생성을 증가시킨다(Hemesath *et al.*, 1998).

따라서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 MITF의 활성 억제 효과는 멜라닌 생성을 저해시키고 미백효과를 증진하는데 중요한 역할을 한다(Curto *et al.*, 1999). *Dendrobium speciosum* 에탄올추출물의 티로시나아제 억제제를 통한 멜라닌형성 저해 효과 및 주름개선효과에 대해 연구(Sim *et al.*, 2016), 상백피 추출물의 항산화 활성 및 미백효과(Jee, 2009) 등, 최근 천연물에 기반을 둔 물질에 대한 연구에 관심이 높아지면서 합성원료를 대체할 항산화 및 미백 효과를 가진 물질 연구에 초점을 맞추고 있다.

괴화(*Sophorae Flos*)와 괴각(*Sophorae Fructus*)은 콩과(Leguminosae)에 속하는 낙엽 교목인 회화나무(*Sophora japonica* L.)의 꽃과 열매이다. 괴화는 고(苦)하고, 미한(微寒)하며, 간(肝)과 대장경(大腸經)에 귀경(歸經)하고, 주요 성분으로는 루틴을 함유하고 있으며 약리적으로 지혈작용을 한다고 알려져 있으며, 본초에서는 양혈지혈(涼血止血)에 효능이 있다고 밝히고 있다. 괴각은 고(苦)하고, 괴화와 달리 한(寒)하며, 간(肝)과 대장경(大腸經)에 작용하고, 청혈하강(淸血下降)작용이 강하여 변혈(便血)에 주로 사용되며, 지혈작용은 괴화에 비해 떨어진다(Seo *et al.*, 2008).

본 연구진의 선행 연구에 의하면, 괴화와 괴각의 ethyl acetate 분획물은 높은 항산화 활성과 함께 산화적 DNA 손상억제효과가 매우 탁월하였다(Jang *et al.*, 2015). 따라서 본 연구에서는 항산화 활성이 입증된 괴화와 괴각 ethyl acetate 분획물의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 단백질 발현 억제 효과를 통한 미백활성을 평가함으로써, 천연물 기반의 미백 화장품 및 의약품 소재로서의 이용 가치를 증대시키고자 한다.

재료 및 방법

기기 및 시약

본 연구에 사용된 회화나무(*Sophora japonica* L.)의 꽃(괴화)과 열매(괴각)는 콩(Leguminosae)과에 속하는 식물로 중원대학교 생약자원개발학과 박재호 교수의 식물학적 동정을 거쳤으며, 실험에 사용한 시료의 확정표본(표본번호 JWU-PJH-001)은 중원대학교 생약자원개발학과에 보관하고 있다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10% (v/v) fetal bovine serum, trypsin은 Hyclone 제품을 사용하였다. HPLC grade의 methanol, petroleum ether, ethyl acetate 및 dimethylsulfoxide (DMSO)는 SK chemicals (Seoul, Korea) 제품을 사용하였고, 나머지 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 기타 시약 및 기기는 별도 표기하였다. 모든 항체는 Santa-Cruz (Dallas, Texas, USA)의 제품을 사용하였다.

Ethyl acetate 분획

실험에 사용된 괴화(*Sophorae Flos*)와 괴각(*Sophorae Fructus*)은 건조시료 900 g을 분쇄한 후, 80% methanol 3 L로 3일간 침지한 후 여과하였다. methanol 추출물을 40°C 이하의 중탕에서 감압 환류 냉각장치(rotary evaporator)로 농축한 후 분별깔대기에 petroleum ether, ethyl acetate 순으로 3회 반복으로 용매분획 하였다. ethyl acetate 분획물을 감압 환류 냉각장치로 농축하여 실험 전까지 -27°C에 보관하였고, dimethylsulfoxide (DMSO)에 4000 ppm으로 용해하여 실험에 사용하였다.

세포배양

본 연구에 사용된 멜라노마(B16F10) 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 실험하였다. 세포는 1% penicillin/streptomycin 및 10% fetal bovine serum이 포함된 DMEM에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다.

세포 생존율

B16 F10 세포를 12-well plate에 1.0×10^4 cell/well의 밀도로 분주하여, 24시간 배양한 후 농도 별로 시료를 처리한다. 시료 처리 48시간 후 alamarBlue[®] Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 배지의 총량의 10%씩 처리하여 4시간 배양한다. 반응 후 UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다.

Western blot

B16 F10 세포를 6-well plate에 1.0×10^5 cell/well의 밀도로 분주하여, 24시간 배양한 후 농도별로 시료를 처리한다. 시료 처리 48시간 후 PBS로 두 번 세척한 후, protease inhibitor cocktail을 포함한 RIPA buffer로 용해한 후 얼음에서 30분간 정치시켰다. 세포 용해액을 4°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하고, 상층액은 Bradford 시약(Bio-rad, California, USA)을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다. 세포 용해액은 $2 \times$ Lamilae buffer와 혼합하여 95°C에서 5분간 가열 후 각 20 µg 단백질량에 해당하는 시료를 10% SDS-PAGE에서 전기영동하여 분리하였다. 전기영동된 단백질은 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) 막에 옮겨 상온에서 1시간 동안 blocking (5% skim milk in TBST) 하였다. 1차 항체를 1 : 2000으로 희석하여 4°C에서 overnight 처리하였다. 이후 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고, 2차 항체 1 : 5000으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 이후 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection

kit (Bio-rad, California, USA)로 반응하였다. 단백질 밴드는 FluorChem E (Cell biosciences, Santa Clara, USA)로 촬영하여 확인하였다.

통계학적 분석

모든 실험 결과는 3번 이상 수행하였으며, 통계분석은 SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences)을 이용하여 각 실험의 평균과 표준편차를 계산하였고, ANOVA를 통한 P < 0.05 수준에서 Duncan 다중검정법(Duncan's multiple range test)으로 사후 검정하여 각 실험의 유의성을 검증하였다.

결 과

괴화와 괴각의 세포 생존율을 확인하기 위해 멜라노마 세포 (B16F10)에 25, 50, 100 µg/ml의 괴화와 괴각 ethyl acetate 분획물을 처리한 결과(Fig. 1), 25 µg/ml에서 107.48, 104.70, 50 µg/ml에서 97.89, 105.97과 100 µg/ml에서 89.12, 96.64로 세포 생존율에 미치는 괴화와 괴각의 영향은 미미했다.

괴화와 괴각의 tyrosinase 저해 효과를 확인하기 위해 멜라노마 세포(B16F10)에 25, 50, 100 µg/ml의 괴화와 괴각 ethyl acetate 분획물을 농도별로 처리하여 발현된 단백질 수준과 house keeping gene으로 작용하는 β-actin에 비해 발현된 단백질 양을 비교 분석하였다(Fig. 2). 괴화 및 괴각 ethyl acetate 분획물은 모두 농도 의존적으로 tyrosinase 단백질 발현을 저해하였고, 25 µg/ml에서 괴화의 저해효과가 높으나 100 µg/ml에서는 괴각의 저해효과가 뛰어났다. 또한 같은 농도의 arbutin에

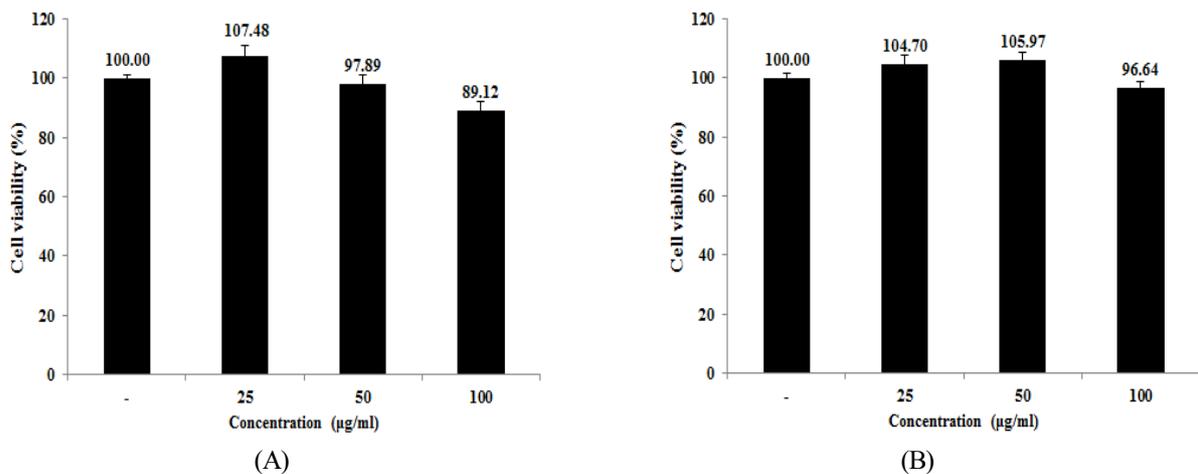


Fig. 1. Cell viability of ethyl acetate fraction of Sophorae Flos (A) and Sophorae Fructus (B) in B16F10 cells. Each value represents the mean±S.D. of three experiments. **p*<0.05 compared with non-treatment (-) of Sophorae Flos and Fructus.

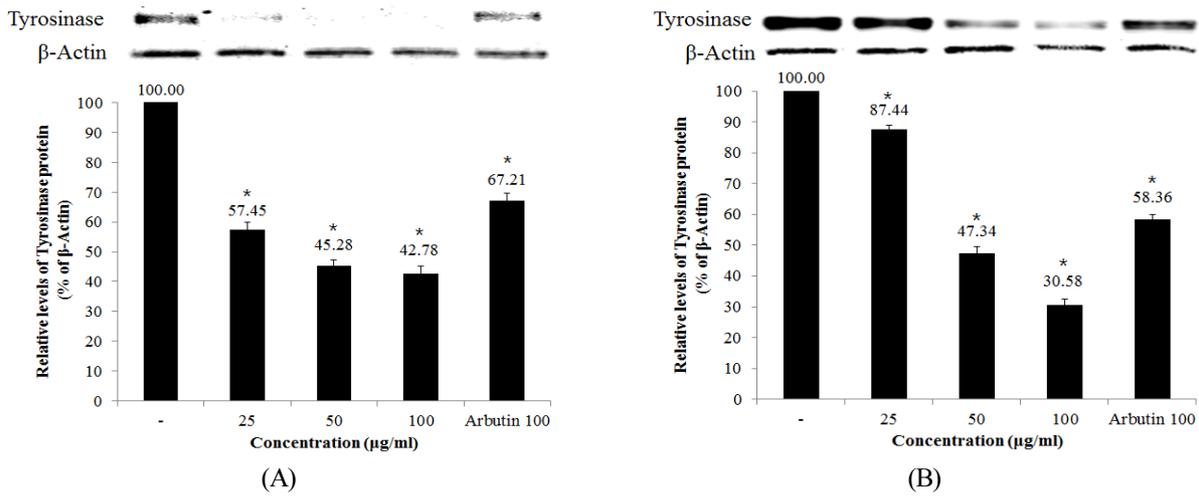


Fig. 2. Inhibitory effect on the protein levels of tyrosinase of ethyl acetate fraction of *Sophorae Flos* (A) and *Sophorae Fructus* (B) in B16F10 cells. Each value represents the mean±S.D. of three experiments. * $p < 0.05$ compared with non-treatment (-) of *Sophorae Flos* and *Fructus*.

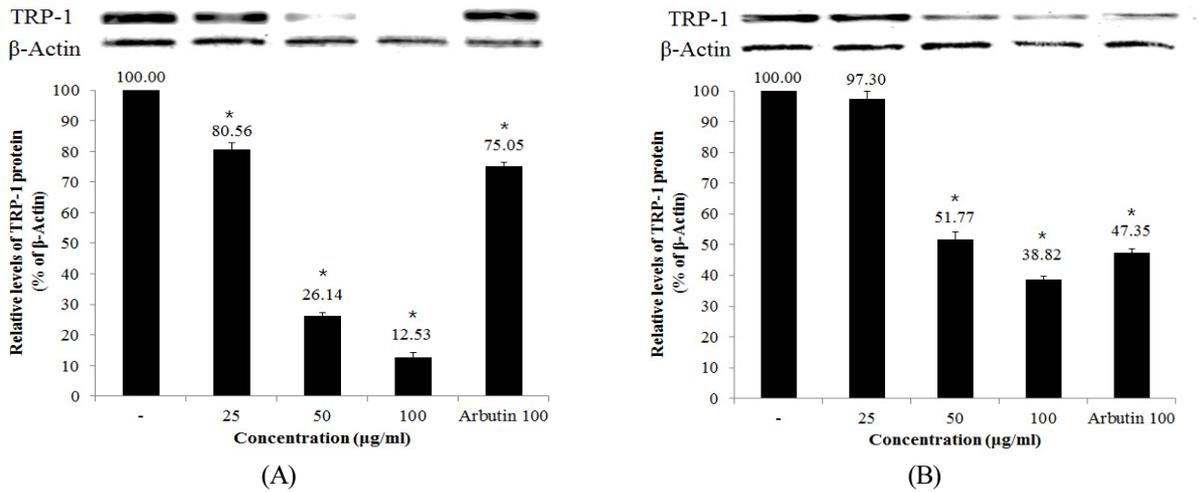


Fig. 3. Inhibitory effect on the protein levels of tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) of ethyl acetate fraction of *Sophorae Flos* (A) and *Sophorae Fructus* (B) in B16F10 cells. Each value represents the mean±S.D. of three experiments. * $p < 0.05$ compared with non-treatment (-) of *Sophorae Flos* and *Fructus*.

비해 높은 효과를 보였다.

괴화와 괴각의 TRP-1 저해 효과를 확인하기 위해 멜라노마 세포에 농도별로 처리하여, β-actin에 비해 발현된 단백질 양을 비교 분석하였다(Fig. 3). 괴화 및 괴각 ethyl acetate 분획물은 농도 의존적으로 TRP-1 단백질 발현을 저해하였으나, 25 μg/ml 괴각 *Sophorae* 구에서는 유의성 없는 저해효과를 보였다. 100 μg/ml 괴화 처리군에서 81.47%의 높은 저해효과를 나타냈다.

괴화와 괴각의 TRP-2 저해 효과를 확인하기 위해 멜라노마 세포에 농도별로 처리하여, β-actin에 비해 발현된 단백질 양

을 비교 분석하였다(Fig. 4). 괴화 및 괴각 ethyl acetate 분획물은 농도 의존적으로 TRP-2 단백질 발현을 저해하였으나, 25 μg/ml 괴화 처리군에서는 유의성 없는 저해 효과를 나타냈다. 100 μg/ml 괴각 처리군에서 87.11%의 높은 저해효과를 보였다. 또한 100 μg/ml arbutin 처리군에 비해 같은 농도의 괴각 처리군에서 약 5배의 높은 저해 효과를 보였다.

괴화와 괴각의 MITF 저해 효과를 확인하기 위해 멜라노마 세포에 농도별로 처리하여, β-actin에 비해 발현된 단백질 양을 비교 분석하였다(Fig. 5). 괴화 및 괴각 ethyl acetate 분획물은

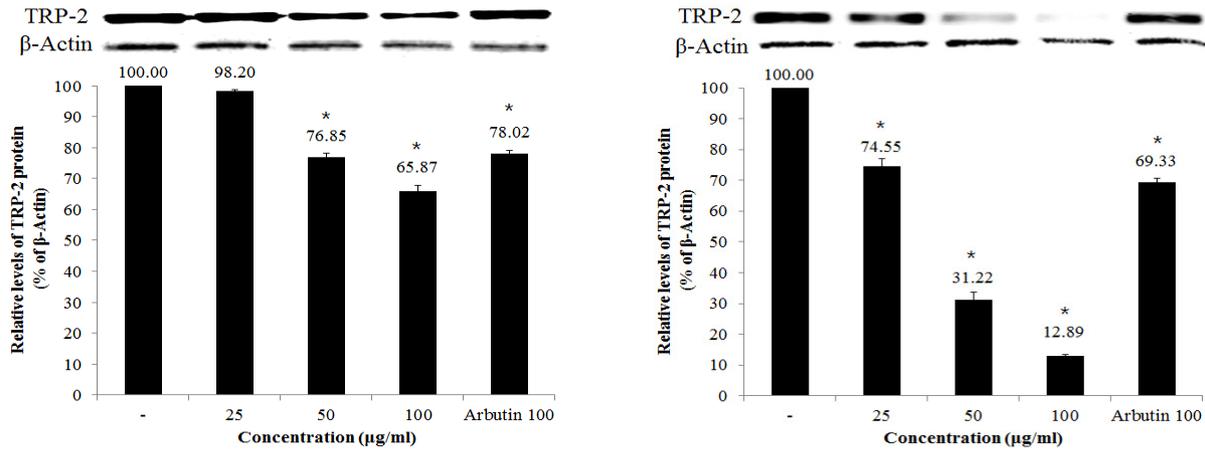


Fig. 4. Inhibitory effect on the protein levels of tyrosinase-related protein 2 (TRP-2) of ethyl acetate fraction of Sophorae Flos (A) and Sophorae Fructus (B) in B16F10 cells. Each value represents the mean±S.D. of three experiments. * $p < 0.05$ compared with non-treatment (-) of Sophorae Flos and Sophorae Flos e Fructus.

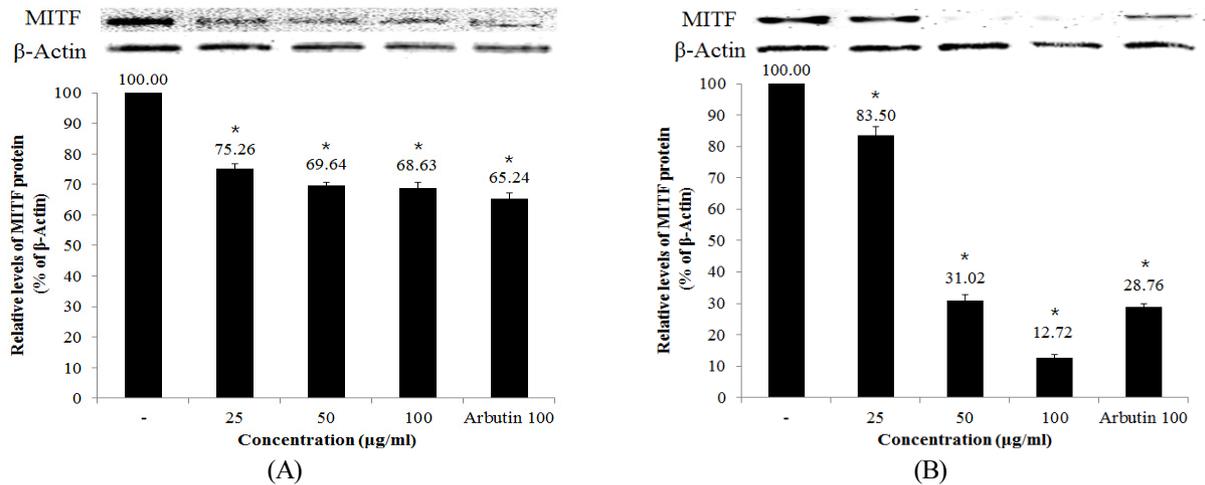


Fig. 5. Inhibitory effect on the protein levels of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) of ethyl acetate fraction of Sophorae Flos (A) and Sophorae Fructus (B) in B16F10 cells. Each value represents the mean±S.D. of three experiments. * $p < 0.05$ compared with non-treatment (-) of Sophorae Flos and Fructus.

농도 의존적으로 MITF 단백질 발현을 저해하였으며, 100 μg/ml 과각 처리군에서 87.28%의 높은 저해효과를 보였다.

고 찰

멜라닌은 합성과정 중 흑갈색의 유멜라닌(eumelanin)과 적색계통의 페오멜라닌(pheomelanin)으로 나뉘며, 멜라닌 생성 및 합성에서 tyrosinase의 작용을 통해 일어나는 초기 반응 (Hearing and Tsukamoto, 1991)은 기질인 tyrosin에 hydroxyl 작용기의 결합을 통해 DOPA로 전환하는 기작(Jimenez-Cervantes

et al., 1994)으로, tyrosinase의 활성 저해는 멜라닌 생성과 합성에서 중요하다. 또한, TRP-1과 TRP-2는 유멜라닌 합성에서 많은 관여를 하며(Park *et al.*, 2009), MITF는 멜라닌 형성에 관여하는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등의 M-box sequences에 결합하여 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다(Bentley *et al.*, 1994). 따라서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 및 MITF의 활성 억제제는 미백 활성과 연관성이 깊으며, 이를 위해 arbutin과 ascorbic acid와 같은 미백 원료를 화장품에 첨가하여 기능성을 증대시키고 있다(Yang *et al.*, 2008).

하지만 천연물을 기반으로 하는 미백 화장품에 대한 관심이

급증하면서 오랜 기간 안전성을 검증받아온 약용식물에 대한 연구 또한 증가하고 있다. 지혈 및 청열 작용으로 사용되어온 괴화와 괴각의 본초학적 특성과 더불어, 기존에 밝혀진 괴화와 괴각의 항산화 효과는 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 산화작용에 대한 효과를 보일 것으로 생각하여 실험하였다.

괴화와 괴각 ethyl acetate 분획물의 tyrosinase에 대한 저해 효과는 25 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 괴화>괴각으로 나타났으나, 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 괴화<괴각으로 나타났다. 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 같은 농도 arbutin 처리군에 비해 높은 저해효과를 나타내는 것으로 보아, 충분한 tyrosinase 저해 효과를 가졌다고 할 수 있다. TRP-1와 TRP-2에 대한 저해 효과 또한, arbutin 처리군에 비해 높은 저해 효과를 보였다. 또한 extracellular signal-regulated kinase (ERK), Akt 및 p38과 같은 phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs)는 MITF의 전사에 영향을 미치고, tyrosinase 및 tyrosinase 관련 단백질의 합성을 야기한다. 따라서 MITF의 전사 및 발현 조절은 멜라닌 생합성과 관련된 인자들과 연관성이 크다고 할 수 있다(Jang *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012).

괴화와 괴각 ethyl acetate 분획물의 MITF에 대한 저해효과는 괴각 처리군에서 높은 효과를 나타냈으며, tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 높은 저해효과와 관련성이 깊다고 보인다. 이러한 저해효과는 괴화와 괴각이 포함하고 있는 flavonoid와 isoflavonoid 화합물의 다양한 약리 작용(Masaki *et al.*, 1995)을 바탕으로, 자유라디칼의 생성을 지연시키고 활성을 억제하는 항산화 효과(Lee *et al.*, 2005)와 연관이 있다.

결론적으로, 괴화와 괴각 ethyl acetate 분획물의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 및 MITF 단백질 발현에서 같은 농도로 처리한 arbutin 처리군보다 높은 저해 효과를 확인하였으며, 미백 관련 인자들의 저해 효과는 천연 추출물을 기반으로 한 화장품 첨가제로 높은 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

회화나무는 한의학에서 간과 혈관계 질환의 치료에 사용되어온 약용 식물로, 그 꽃과 열매를 괴화와 괴각이라 한다. 괴화와 괴각은 메탄올 추출물로부터 에틸아세테이트 분획물을 얻어 시료로 사용하였고, B16 F10 세포를 이용하여 Western blot을 실행하였다. 미백효과를 확인하기 위해, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 단백질을 확인하였다. 그 결과, 괴화와 괴각 추출물은 세포 생존율에는 영향이 미미하였으며, 모두 tyrosinase,

TRP-1, TRP-2, MITF 단백질의 발현 억제효과를 나타냈다. 또한 농도 의존적으로 억제효과를 보였으며, 이를 통해 전통적으로 사용되어 왔던 괴화와 괴각은 기능성 화장품의 원료와 같은 천연식물 유래 자원으로 상당한 가치를 나타냈다.

References

- Ahn, J.H., S.H. Jin and H.Y. Kang. 2008. LPS induces melanogenesis through p38 MAPK activation in human melanocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 300(6):325-329.
- Bentley, N.J., T. Eisen and C.R. Goding. 1994. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol. Cell. Biol.* 14(12):7996-8006.
- Chung, J.H., V.N. Hanft and S. Kang. 2003. Aging and photoaging. *J. American Acad. Dermatol.* 49(4):690-697.
- Curto, E.V., C. Kwong, H. Hermersdörfer, H. Glatt, C. Santis, V. Virador, V.J. Hearing and T.P. Dooley. 1999. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 57(6):663-672.
- Eberlein-Konig, B., M. Placzek and B. Przybilla. 1998. Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d- α -tocopherol (vitamin E). *J. American Dermatol.* 38(1):45-48.
- Fantone, J.C. and P.A. Ward. 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *American J. Pathol.* 107(3):395-418.
- Fisher, G.J., S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta and J.J. Voorhees. 2002. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol.* 138(11):1462-1470.
- Hearing, V.J. and M. Jimenez. 1987. Mammalian tyrosinase—the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* 19(12):1141-1147.
- Hearing, V.J. and K. Tsukamoto. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *The FASEB J.* 5(14):2902-2909.
- Hemesath, T.J., E.R. Price, C. Takemoto, T. Badalian and D.E. Fisher. 1998. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-kit signalling in melanocytes. *Nature* 391(6664):298-301.
- Jang, J.Y., H.N. Kim, Y.R. Kim, Y.H. Choi, B.W. Kim, H.K. Shin and B.T. Choi. 2012. Aqueous fraction from *Cuscuta japonica* seed suppresses melanin synthesis through inhibition

- of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in B16F10 cells. *J Ethnopharmacol.* 141(1):338-344.
- Jang, T.W., Y.R. Kim, S.H. Lee, D.W. Kim and J.H. Park. 2015. Antioxidative activities and inhibition of DNA damage of ethyl acetate fraction from *Sophorae flos* and *Sophorae fructus*. *Korean J. Herbol.* 30(2):31-36 (in Korean).
- Jee, S.O. 2009. Antioxidant activities and whitening effect of the mulberry (*Morus alba* L.) root bark extracts. *Korean J. Plant Res.* 22(2):145-151 (in Korean).
- Jimenez-Cervantes, C., F. Solano, T. Kobayashi, K. Urabe, V.J. Hearing, J.A. Lozano and J.C. Garcia-Borrón. 1994. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1). *J. Biol. Chem.* 269(27): 17993-18000.
- Kim, B., Y.E. Choi and H.S. Kim. 2014. *Eruca sativa* and its flavonoid components, quercetin and isorhamnetin, improve skin barrier function by activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α and suppression of inflammatory cytokines. *Phytother. Res.* 28(9):1359-1366.
- Kim, E.C., S.Y. Ahn, E.S. Hong, G.H. Li, E.K. Kim and K.H. Row. 2005. Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect. *Korean J. Ind. Eng. Chem.* 16(3):348-353.
- Lee, M.S., H.D. Yoon, J.I. Kim, J.S. Choi, D.S. Byun and H.R. Kim. 2012. Dioxinohydroeckol inhibits melanin synthesis through PI3K/Akt signalling pathway in α -melanocyte-stimulating hormone-treated B16F10 cells. *Exp. Dermatol.* 21(6):471-473.
- Lee, S.Y., E.J. Hwang, G.H. Kim, Y.B. Choi, C.Y. Lim and S.M. Kim. 2005. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L. *Korean J. Med. Crop. Sci.* 13(3):93-100.
- Lin, Y.S., M.T. Chuang, C.H. Chen, M.Y. Chien and W.C. Hou. 2012. Nicotinic acid hydroxamate downregulated the melanin synthesis and tyrosinase activity through activating the MEK/ERK and AKT/GSK3 β signaling pathways. *J. Agric. Food. Chem.* 60(19):4859-4864.
- Marnett, L.J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21(3):361-370.
- Masaki, H., S. Sakaki, T. T. Atsumi and H. Sakurai. 1995. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* 18(1):162-166.
- Maxwell, S.J. 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49(3):345-361.
- Park, H.Y., M. Kosmadaki, M. Yaar and B.A. Gilchrist. 2009. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell. Mol. Life. Sci.* 66(9):1493-1506.
- Park, S.N. 2003. Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 35(3): 510-518.
- Seifried, H.E., D.E. Anderson, E.I. Fisher and J.A. Milner. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.* 18(9):567-579.
- Seo, J.Y., K.H. Cho, H.C. Eun and J.H. Chung. 2001. Skin aging from phenotype to mechanism. *Korean J. Investig. Dermatol.* 8(1):187-194 (in Korean).
- Seo, B.I., J.H. Lee, H.Y. Choi, D.R. Kwon and Y.M. Boo. 2008. *Herbological Study on Herbal Medicine*. Youngrim, Seoul, Korea. pp. 761-766.
- Sim, M.O., H.E. Lee, J.H. Jang, H.K. Jung, T.M. Kim, M.S. Kim and W.S. Jung. 2016. Anti-melanogenesis and anti-wrinkle properties of Korean native *Dendrobium speciosum* ethanol extract. *Korean J. Plant Res.* 29(2):155-162 (in Korean).
- Sohn, E.S., S.W. Kim, J.S. Kang and S.P. Lee. 2004. Technology trend and patent information analysis of cosmetic materials derived from natural products. *Appl. Chem.* 8:466-469.
- Svobodova, A., J. Psotova and D. Walterova. 2003. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage a review. *Biomed. Papers.* 147(2):137-145.
- Yang, E.S., J.S. Hwang, H.C. Choi, R.H. Hong and S.M. Kang. 2008. The effect of genistein on melanin synthesis and *in vivo* whitening. *Korean J. Soc. Microbiol. Biotechnol.* 36(1):72-81.

(Received 10 August 2016 ; Revised 20 October 2016 ; Accepted 31 October 2016)