

Quercetin이 Melan-a 멜라닌세포의 멜라닌합성에 미치는 영향

천현자* · 최원형 · 백승화 · 우원홍
원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

Effect of Quercetin on Melanogenesis in Melan-a Melanocyte Cells

Hyun Ja Chun*, Won Hyung Choi, Seung Hwa Baek, and Won Hong Woo

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

Abstract – Flavonoid seems to have various biological effects. Quercetin is a kind of natural plant flavonoids and has multiple biological effects such as antioxidant, antimutagenic and anticarcinogenic agent. Melanogenesis is a physiological process resulting in the synthesis of melanin pigments, which play a crucial protective role against skin photocarcinogenesis. This present study was designed to investigate effect of quercetin on proliferation and melanogenesis in Melan-a melanocyte cells. After 48h treatment of cells with quercetin, the cells exhibited a dose-dependent inhibition in their proliferation without apoptosis. Therefore, the growth retardation by the extract may be due to the cell arrest or cell differentiation. We also investigated the effect of quercetin on melanogenesis of this cells. Melan-a melanocyte cells were grown for 48h in the presence of 0.01–60 µg/ml quercetin and the total melanin content and activity of tyrosinase were measured. Quercetin stimulated melanization of the cells in low concentrations (0.01–1.0 µg/ml), whereas it inhibited melanization in high concentrations (5.0–30 µg/ml). It was observed that quercetin differently regulates melanogenesis of Melan-a melanocyte cells dependent on its concentrations.

Keywords – Quercetin, Melan-a melanocyte cells, melanogenesis, tyrosinase activity, melanin content

서 론

Flavonoid 화합물은 항 virous, 항산화, 항염 등 여러 활성이 알려져 있는 생리활성 물질로써, 특히 생약 및 식물로부터 분리한 페놀성 물질들 중 플라보노 및 플라보놀 배당체들의 구조와 생리 활성에 대한 연구가 많이 보고되고 있다.¹⁻⁴⁾ 그 중에서 quercetin은 유리형 또는 배당체형으로 Allium속 채소류에 다량 함유된 flavonols로써 발암성 물질의 활성감소, 암세포의 효소작용 저해, 항암 물질의 활성증대 및 변이 암세포의 생육저해, 혈압강하, 항산화, 모세혈관의 강화작용 등 다양한 약리 작용이 알려져 있으며 이와 같은 생리활성 효과 때문에 quercetin을 함유한 식품에 대한 관심이 높아지고 있다.⁵⁻¹⁰⁾ quercetin의 성분 분리에 관한 연구로는 김¹¹⁾등이 박태기나무엽에서 페놀성분인 quercetin을 분리, 동정하였으며, 박¹²⁾등은 후박나무 잎으로부터 quercetin을 분리하였고, 강¹³⁾등은 양파에서 quercetin의 분리 및 최

적 추출조건¹⁴⁾ 등을 보고하였다. Quercetin의 생리활성에 관한 연구로는 박¹⁵⁾등이 인삼 잎의 플라보노이드 성분 중 quercetin의 광용혈 억제효과를 보고하였고, 문¹⁶⁾등은 참당나귀 지상부에서 quercetin을 분리하여 강한 항산화 활성이 있음을 보고하였다. Lichtenstein¹⁷⁾등은 양파추출물에서 분리한 quercetin이 기관지 천식의 억제작용에 효과가 있다고 보고하였으며, 박¹⁸⁾등은 참죽나무 잎에서 quercetin을 분리하여, 이것이 경북 서산지방에서 피부질환 치료에 사용되기도 함을 보고하였고, Umeo¹⁹⁾등은 식물의 엽록소에서 quercetin이 광과산화반응(photoperoxidation)을 억제한다고 보고하였다. Quercetin의 약리작용에 대한 연구로는 미토콘드리아에서 succinoxidase 활성과 유리기 형성의 억제작용,²⁰⁾ glutathione 고갈에 의한 지질과산화반응의 억제작용,²¹⁾ 사람의 혈구암의 성장저해효과,²²⁾ 인체의 호중구에서 NADPH-oxidase의 억제효과,²³⁾ 과산화생성 억제효과²⁴⁾ 및 벚꽃 tyrosinase의 억제작용²⁵⁾ 등이 있다.

과학의 발달과 천연물에 대한 인식이 새로워짐에 따라 천연물을 이용한 새로운 신약 및 신약후보물질을 얻으려는 시

*교신저자(E-mail) : hjchun@wonkwang.ac.kr

도가 행해지고 있다. 특히, 최근에 생약이나 한약재 같은 천연물을 이용하여 멜라닌색소와 관련된 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다.²⁶⁻²⁹ 본 연구팀은 피부질환 치료제 및 미백제 개발의 일환으로, 야채, 과일, 콩과식물에 널리 함유되어 있는 quercetin이 멜라닌생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16 melanoma 세포를 이용하여 그 결과를 이미 얻었다.³⁰ 그러나 melanoma 세포와 정상적인 melanocyte 사이에 일부 신호기전이 다를 수 있으므로 quercetin이 melanocyte에서도 동일한 영향을 끼치는지 알아보는 것이 필수적이다. 따라서, 본 연구에서는 Melan-a 정상세포에 quercetin을 처리하고 세포의 증식과 tyrosinase 활성 및 melanin 양을 측정하여 결과 유의한 효과를 보았기에 보고하는 바이다.

실험방법

검액조제 - Quercetin (Sigma Chemical Co., USA)을 에탄올에 녹여 0.22 μm pore 여과지로 여과 멸균한 후 stock solution을 만들었으며, 실험에 이용하기 직전 실험농도에 알맞게 RPMI 1640 배지로 희석하여 농도를 조정하여 다음 사용하였다.

세포주 및 세포배양 - Melan-a 세포는 런던대학 St. George 의과대학의 D.C. Bennett 박사가 C57BL/6 mice에서 채취하여 만들어낸 것으로 immortalized melanocyte이다. 세포는 37°C, 5% CO₂의 조건을 갖춘 Sanyo회사 제품의 CO₂ 세포배양기에서 배양되었다. 사용된 배양배지는 10% fetal bovine serum(Gibco Co.)이 포함된 RPMI 1640배지에 penicillin-streptomycin (Sigma Chemical Co., USA) 100 I.U. - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하고 사용하기 직전에 200 nM Phorbol-12-myristate 13-acetate(Sigma Chemical Co., USA)를 첨가하였으며, 약 24시간 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체하였다.

MTT Assay - MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 정량은 Mosmann의 방법³¹을 변형하여 실시하였다. Quercetin을 세포에 투여하여 48시간 동안 배양한 후 상층액을 버리고 당일 제조한 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MTT를 배양 용기당 1 ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 배양하였다. 살아 있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10% DMSO를 200 μl 씩 넣고 15분간 실온에서 방치하였다. 그 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

Trypan blue 검사 - 대조군과 실험군의 각 well에 0.05% trypsin- 0.02% EDTA 용액을 가하여, 각 well에서 세포를 분리 수거하였다. 이 분리 수거한 세포를 phosphate-buffered

saline(PBS)로 2회 세척한 후 시료 0.02 ml와 동량의 0.4% (w/v) trypan blue를 잘 섞은 다음 혈구 계산판을 이용하여 trypan blue에 염색되지 않은 살아 있는 세포 수를 계수하였다. 실험군의 세포 수는 대조군의 세포 수에 대한 백분율로 5회 반복 실험하여 계산하였다.

형태학적 변화 - Melan-a 세포를 각 well당 1×10^5 개씩 넣고 24시간 경과 후 quercetin을 농도별로 첨가하여 48시간 동안 배양한 다음 위상차 현미경(Diaphot 300, Nikon, Japan)을 이용하여 100배율 하에서 대조군과 실험군의 형태학적 변화를 관찰, 비교하였다.

멜라닌 양의 측정 - 멜라닌 양은 Hosoi³²등의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 2회 세척한 후 원심분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 200 μl 첨가하고 80°C에서 1시간 동안 용해하였으며, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌(Sigma Co.)을 사용하여 작성된 표준 직선에서 구하고, 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하여 나타내었다.

Tyrosinase 활성도의 측정 - Tyrosinase 활성도는 Matinez-Esparza³³의 방법에 의하여 측정하였다. 각 well의 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 만들고, 100 μl 의 lysis buffer (1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, 0.1 mM phenylmethyl sulfonylfluoride)를 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소용액으로 사용하였다. 100 mM sodium phosphate (pH 7.0) 용액 100 μl 에 시료인 효소용액 50 μl 를 가하고 37°C에서 5분간 보온하였다. 100 mM catechol 50 μl 를 넣은 후 ELISA reader로 37°C, 405 nm의 조건에서 흡광도의 변화를 1시간 동안 관찰하였다.

통계방법 - 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's *t*-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

세포의 증식에 미치는 영향 - Quercetin은 Allium속 채소류에 다량 함유되어 있는 phenolic flavonoid 중 flavonol 구조를 갖는 물질로서 극성을 가지고 있다(Fig. 1). Quercetin이 쥐의 정상적인 melanocyte인 Melan-a 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 quercetin을 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 다양한 농도로 처리하고, 세포를 48시간 동안 배양한 후 MTT 측정방법으로 세포의 증식을 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, quercetin에 의한 세포의 증식은

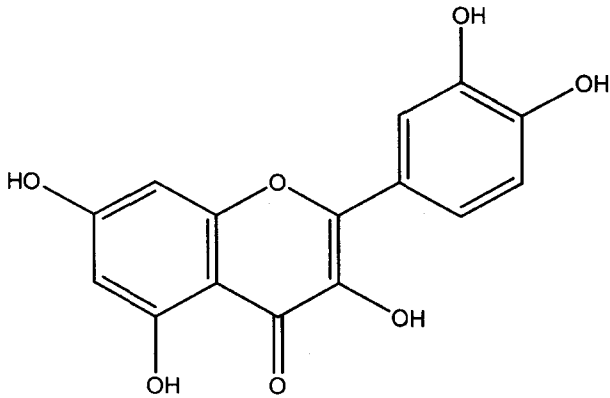


Fig. 1. The Structure of Quercetin.

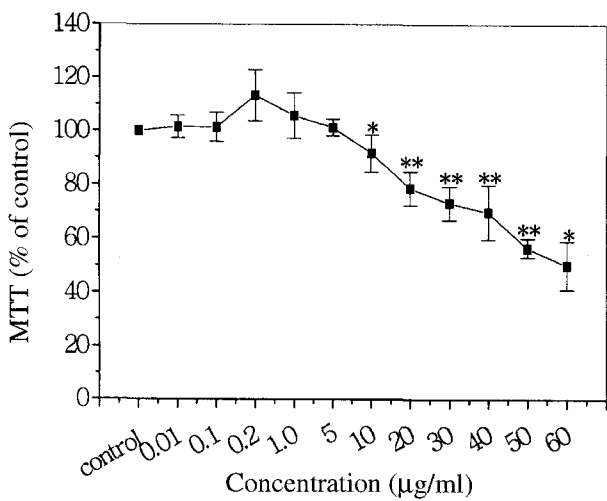


Fig. 2. Effect of quercetin on the viability of Melan-a melanocyte cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of quercetin for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % control and data were mean±SD of at least five different experiments.
*significantly different from control group (*p<0.01, **p<0.05).

5.0 µg/ml 이하의 낮은 농도에서는 대조군에 비해 약간 증가하였으나 유의할만한 변화를 나타내지 않았다. 그러나 10 µg/ml 농도부터는 대조군에 비해 세포의 증식이 서서히 억제되는 경향을 보였으며 계속적으로 60 µg/ml 농도까지 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 증식이 유의성 있게 억제되는 경향을 보여 주었다. 또 다른 실험 방법으로서 quercetin을 0.01 µg/ml에서 60 µg/ml까지 다양한 농도로 처리하고, 세포를 48시간 동안 배양한 후 trypan blue 용액을 이용하여 염색되지 않은 살아 있는 세포 수를 조사해 본 결과 MTT측정의 결과와 마찬가지로 5 µg/ml 이상의 투여 농도에서 세포 수가 농도에 의존적으로 유의성 있게 감소하

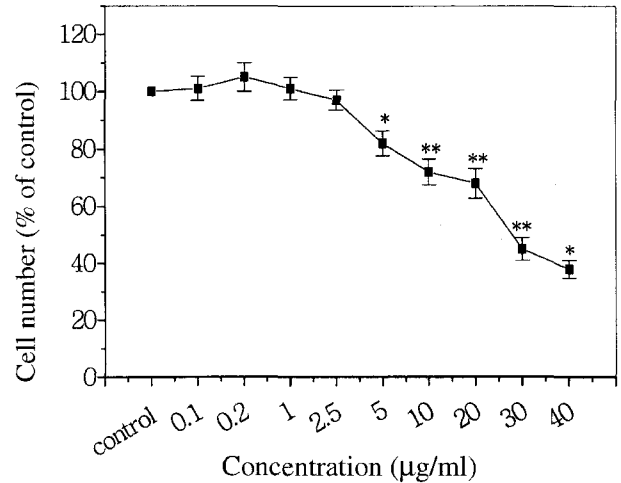


Fig. 3. Effect of quercetin on the viability of Melan-a melanocyte cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of quercetin for 48 h. The viability of the cells was measured by Trypan blue test. Results were expressed as % control and data were mean±SD of at least five different experiments.
*significantly different from control group (*p<0.01, **p<0.05).

는 경향을 보여주었다(Fig. 3). 이상의 결과를 종합해 볼 때 quercetin은 5 µg/ml 이상의 투여 농도에서 Melan-a melanocyte 세포의 증식과 성장을 억제시킴을 알 수 있었다. 대조군에 비하여 실험군의 세포 수가 줄어드는 현상은 외부 자극물질의 세포독성에 의한 세포사멸로 인한 생존 세포수가 감소하는 경향과 여러 가지 신호기전을 통한 세포분열의 일시적인 정지로 세포 증식이 감소하는 경향으로 나누어 고려해 볼 수 있다. 그러므로 quercetin에 노출된 Melan-a 세포의 숫적인 감소가 어떠한 원인에 의한 것인지를 조사해 볼 필요가 있다.

세포의 형태학적 변화 - 부착성의 세포들에 있어서 세포 사멸은 방사선, 세포독성 유발물질, 성장인자의 결핍, 열충격, 바이러스의 감염과 같은 다양한 종류의 외부 자극에 의해 유도되어지며, 세포사멸이 일어나는 세포는 크기가 축소되고 세포막 용기가 돌출하는 현상이 생기며, 배양배지 속에 사멸소체들이 발견된다.³⁴⁾ 그러므로 quercetin에 노출된 Melan-a melanocyte 세포의 증식이 감소한 이유가 세포사멸에 기인하는 것인지를 알아보기 위하여, Melan-a melanocyte 세포에 quercetin을 0.1-30 µg/ml의 여러 농도별로 처리하고 48시간이 지난 후에 위상차 현미경으로 실험군 세포의 형태학적 변화를 대조군과 비교하여 관찰하였다. Fig. 4에서 보는바 같이 0.1과 1.0 µg/ml의 낮은농도에서는 대조군과 비교하여 실험군에서 세포밀도가 약간 증가하거나 변화가 없는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 그 이상의 처리농도에서

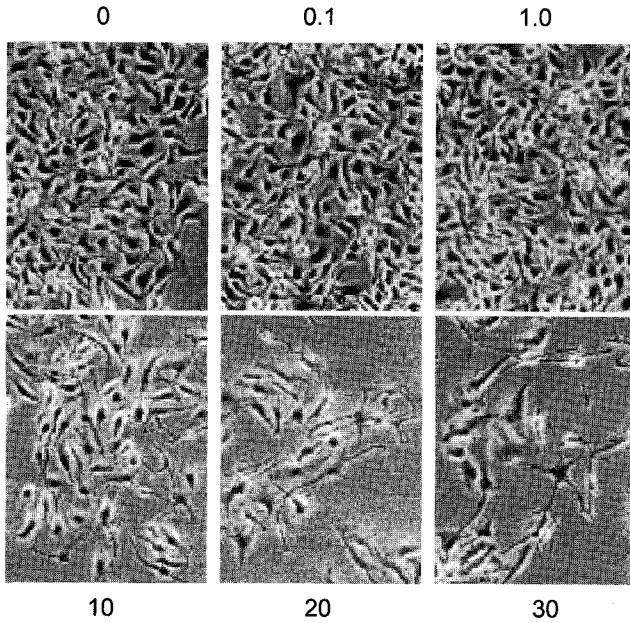


Fig. 4. Morphology of control and quercetin-treated Melan-a melanocyte cells. A : control, B, C and D : cells treated with 0.1, 1.0, 10, 20 and 30 μg/ml quercetin, respectively.

는 농도 의존적으로 대조군에 비하여 실험군에서의 세포 밀도는 점차 감소하였으며 오히려 세포의 크기는 약간 커졌고 또한 수직상 돌기의 형태가 나타나면서 길이가 약간 길어짐을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 높은 농도의 quercetin이 Melan-a 세포의 성장을 억제함으로써 세포 증식을 억제시키고 세포의 분화를 촉진하는 것을 보여준다. 그러나 세포사멸의 특징인 세포막 외부 용기의 돌출 현상과 배양배지 속에 세포사멸이 유도된 부유세포도 관찰할 수 없었다. 즉, quercetin은 고농도에서 Melan-a 세포의 성장을 억제시키지만 세포사멸을 유도하지는 않는 것으로 보인다. 세포의 성장이 정지되는 시기로는 크게 2가지 즉 G1 checkpoint와 G2 checkpoint로 구분할 수 있으며 quercetin에 노출된 Melan-a 세포의 경우에 어느 시기에 해당하는지는 DNA 농도를 결정함으로써 차후 결정할 수 있을 것으로 사료된다.

Tyrosinase 활성도에 미치는 영향 - Tyrosinase (monophenol monooxygenase, EC 1.14.18.1)는 한 쌍의 구리이온(Cu²⁺)을 함유하고 있는 금속단백질군(metalloprotein)에 속하며, monophenol의 ortho hydroxylation(cresoase activity)과 catechols의 0-quinone으로의 산화(catecholase activity)의 두가지 반응을 촉매하여 최종적으로는 멜라닌 고분자를 합성하는데 작용하는 것으로 알려져 있다.³⁵⁾ 본 연구에서는 quercetin이 Melan-a melanocyte 세포의 멜라닌 합성에 미치

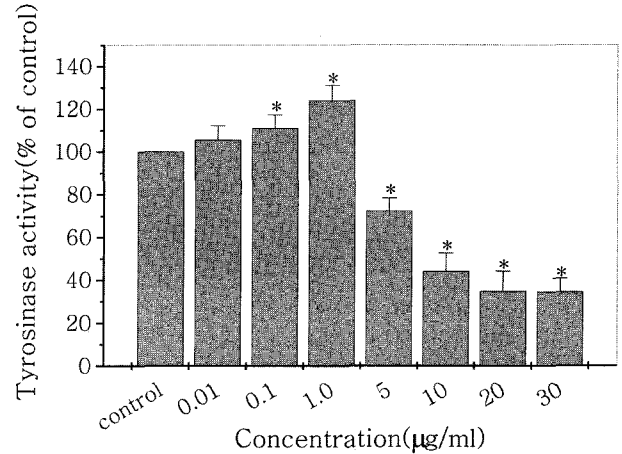


Fig. 5. Effect of quercetin on tyrosinase activity in Melan-a melanocyte cells. After the treatment of quercetin for 48 h, tyrosinase activity was measured at 405 nm. Results were expressed as % control and data were mean±SD of at least five different experiments. *significantly different from control group (*p<0.01).

는 영향을 조사하기 위하여, 세포에 quercetin을 0.1-40 μg/ml의 여러 농도별로 처리하고 48시간 배양한 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 quercetin 처리 농도가 1.0 μg/ml까지는 투여 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성도는 대조군에 비하여 점점 증가하였으며 그 증가 비율 또한 모두 유의성이 있음을 보여주었다. 그러나 처리 농도가 5 μg/ml 이상에서는 투여 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성도는 점점 감소하는 경향을 보였고 이것은 B16/F10 melanoma 세포에서와 비슷한 양상을 보였다.³⁰⁾ 이러한 결과는 quercetin의 투여 농도에 따라 Melan-a melanocyte 세포에서 일어나는 tyrosinase 활성도의 조절이 달라질 수 있음을 보여주는 것이다.

멜라닌 생성에 미치는 영향 - 피부, 머리카락 및 눈동자의 색에 관여하는 색소 중의 하나인 멜라닌은 멜라닌세포의 멜라노솜에서 tyrosinase(monophenol,dihydroxy-L-phenylalanin : oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)의 효소반응으로 합성되는 페놀류의 생물 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다.³⁶⁻³⁸⁾ Quercetin이 *in vitro* 상태에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접 확인하기 위하여 Melan-a melanocyte 세포에 quercetin을 0.01-30 μg/ml의 다양한 농도로 처리하고 48시간 세포를 배양한 다음 최종산물인 멜라닌 생성을 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, quercetin의 투여량이 1.0 μg/ml까지는 처리 농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성이 대조군에 비하여 점점 증가하였으며, 실험군 모두에서 통계적으로 유의성이 있었다. 그러나 10 μg/ml 이

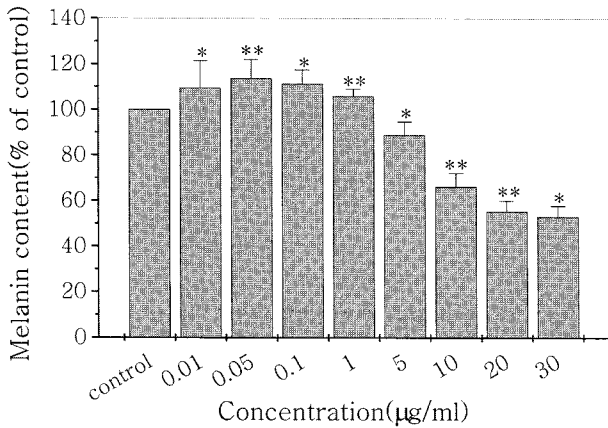


Fig. 6. Effect of quercetin on melanin contents in Melan-a melanocyte cells. After the treatment of quercetin for 48 h, melanin contents were measured at 405 nm. Results were expressed as % control and data were mean±SD of at least five different experiments.

*significantly different from control group (*p<0.01, **p<0.05).

상에서는 처리농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성이 감소되는 경향을 보였으며 통계학적으로 유의성이 있음을 보여주며 B16/F10 melanoma 세포에서도 거의 유사한 경향을 보인다. 이러한 결과는 quercetin에 노출된 Melan-a melanocyte 세포의 *in vitro* tyrosinase 활성도 변화와 매우 잘 일치함을 보여준다.

멜라닌세포의 멜라닌화가 발생하는 주요 기전은 멜라닌 세포의 증식, 멜라닌소체의 합성증가 및 tyrosinase 활성도의 증가 등에 의해서 이루어진다.³⁹⁾ 본 연구의 결과를 종합해 볼 때, Melan-a melanocyte 세포에 quercetin을 처리하였을 때 1.0 µg/ml 농도까지는 세포의 유의한 증식이 없으면서 대조군에 비하여 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성이 모두 증가하는 경향을 보였고 그 이후의 처리 농도에서는 두 가지 모두 감소함을 보여주었다. 이러한 점에 비추어 볼 때 quercetin이 처리된 Melan-a melanocyte 세포의 멜라닌화는 세포의 증식과 관련 있는 것이 아니라, tyrosinase 활성도의 증가로 인해 촉진되는 것으로 해석할 수 있다. 반면에 5 µg/ml 이상의 농도로 quercetin을 처리한 세포들은 세포의 사멸이 초래되지 않으면서 세포증식이 억제되는 현상과 더불어 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성 모두가 대조군에 비하여 오히려 감소하는 경향을 보여주었다. 이것은 Melan-a melanocyte 세포와 B16/F10 melanoma 세포 모두에 같은 양상으로, 높은 농도의 quercetin을 처리하게 되면 세포의 성장이 억제되면서 세포분화가 유도되고 tyrosinase 활성도를 감소시키므로 최종산물인 멜라닌의 합성이 감소, 억제되는 것으로 사료된다.

결 론

Quercetin이 피부의 멜라닌 색소 형성에 어떠한 영향을 나타내는지를 연구하기 위하여, Melan-a melanocyte 세포에 quercetin을 다양한 농도로 처리한 후 세포의 증식, 형태적 변화, tyrosinase 활성도 및 멜라닌 양의 변화를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Quercetin이 5.0 µg/ml 농도까지는 세포가 약간 증가하였으나 유의할 만한 차이는 없었으며, 10 µg/ml 농도 이상에서는 유의성 있게 세포증식이 억제되고 세포분화는 촉진되었다. Tyrosinase 활성도는 1.0 µg/ml 농도까지는 농도 의존적으로 tyrosinase 활성도가 증가되었고, 그 이상의 농도에서는 tyrosinase 활성도가 오히려 감소하였다. 멜라닌 생성은 tyrosinase 활성도와 마찬가지로 1.0 µg/ml까지는 증가되었고, 특히 10 µg/ml 처리군에서는 대조군보다 130%의 증가를 보였다. 그 이상의 농도에서는 멜라닌 생성이 오히려 유의성 있게 감소하였다 이러한 양상은 B16/F10 melanoma 세포의 결과와 거의 같았다. 결론적으로 저농도의 quercetin 처리는 B16/F10 melanoma 와 Melan-a melanocyte 세포 모두 세포의 증식에는 유의할 만한 변화 없이 멜라닌화를 촉진시키며 고농도에서는 세포의 증식을 억제하면서 멜라닌화도 억제시킨다.

감사의 말씀

본 연구는 BK 21 사업의 연구비 지원과 2002년 학술진흥재단의 연구비(KRF-2002-F00240) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Pietta, P. G. (2000) Flavonoid as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**(7): 1035-1042.
2. Park, J. C. and Kim, S. H. (1995) Flavonoid analysis from the leaves of eucommia ulmoides. *J. Kor. Sco. Food Nutr.* **24**(6): 901-905.
3. Mun, S. I., Ryu, H. S., Lee, H. J. and Choi, J. S. (1994) Further screening for antioxidant activity of vegetable plants and its active principles from *Zanthoxylum schinifolium*. *J. Kor. Sco. Food Nutr.* **23**(3): 466-471.
4. Kim, Y S., Song, K. S. and Cheong, H. S. (1996) Effects of flavonoids on pollen tube growth in *arabidopsis thaliana*. *J. Plant biol.* **39**(4): 273-278.
5. Sorata, Y., Takahama, U. and Kimura, M. (1994) Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence hematoporphyrin. *Biochem. Biophys. Acta*, **799**: 313-316.

6. McClure, J. W. (1975) Physiology and function of flavonoids. In "Harbone, J. B., The flavonoids". Chapman and Hall, London 970.
7. Veckenstedt, A. and Pusztai, R. (1981) Investigation of the antiviral mechanism of quercetin against cardiovirus infection in mice. *Antiviral Res.* **1**: 249-254.
8. Hladovec, J. (1977) Antithrombotic effects of some flavonoids alone and combined with acetylsalicylic acid, *Arzneim, Forsch.* **27**: 1989.
9. Jones, E. and Hughes, R. E. (1993) Quercetin, flavonoids and the life span of mice, *Exp. Gerontol.*, **117**: 213-217.
10. Lee, C. J., Kim, H. D., Choung, E. H., Suh, J. K., Park, C. W. and Ha, J. S. (2000) Reduction effect of carcinogen-induced mouse epidermal and forestomach carcinogenesis by the extract of onion wastes. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**(3): 525-530.
11. Kim, G. J., Oh, I. S., Hwang, W. K. and Kim, I. H. (1995) Phenolic compounds from *cercis chinensis* leaves. *J. Pharm. Soc. Kor.* **39**(6): 600-609.
12. Park, J. C., Kim, B. W. and Young, H. S. (1990) Further Study on the flavonoids from the leaves of *Machilus thunbergii* in Korea, *Kor. J. Pharmacogn.* **21**:197-201.
13. Kang, S. G., Kim, Y. D., Hyun, G. H., Kim, Y. H. Song, B. H., Sin, S. C. and Park, Y. G. (1998) Development of seperating techniques on quercetin-related substances in onion (*Allium cepa* L.)1. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**(4): 682-686.
14. Kang, S. G., Kim, Y. D., Hyun, G. H., Kim, Y. H. Song, B. H., Sin, S. C. and Park, Y.G. (1998) Development of seperating techniques on quercetin-related substances in onion (*Allium cepa* L.)2. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**(4): 687-692.
15. Park, S. N., Choi, S. W. and Boo, Y. C. (1990) Effects of flavonoids of ginseng leaves on erythrocyte membranes against singlet oxygen caused damage. *Kor. J. Ginseng Sci.* **14**(2): 191-199.
16. Moon, H. I., Ahn, K. T., Lee, K. R. and Zee, O. P. (2000) Flavonoid compounds and biological activities on the aerial parts of *angelica gigas*. *J. Pharm. Soc. Kor.* **44**(2): 119-127.
17. Lichtenstein, L. M. (1977) Mediator release and asthma in "asthma physiology, immunopharmacology and treatment". editor Lichtenstein, L.M. and Austen K.F. Austen New york, Academic Press 93 .
18. Park, J. C., Young, H. S., Yu, Y. B. and Lee, J. H. (1993) Studies on the chemical components and biological activites of edible plants in korea(I) : Phenolic compounds from the leaves of *cedrela sinensis* A. Juss. *J. Pharm. Soc. Kor.* **37**(3): 306-310.
19. Umeo, T. (1983) Suppression of lipid peroxidation by quercetin and its glycosides in spinach chloroplasts. *Phytochem. Photobiol.* **38**: 363
20. Hodnick, W. F., Kung, F. S., Roettger, W. L., Bohmont, C. W. and Pardini, R. S. (1986) Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. *Biochem. Phamacol.* **35**: 2345-2357.
21. Younes, M. and Siegers, C. P. (1981) Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. *Planta Medica* **43**: 240.
22. Markaverich, B. M., Roberts, R. R., Alejandro, M. A., Johman, G. A., Middleditch, B. S. and Clark, J. M. (1998) Bioflavonoid interaction with rat utenne type II binding sites and growth inhibition. *J. Steroid Biochemistry*, **30**: 71-78.
23. Tauber, A. L., Fay, J. R. and Marletta, M. A. (1984) Flavonoid inhibition of the human neurophil NADPH oxidase. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 1367-1369.
24. Warren, D. B., Louis, W. H. and Robert, W. W. (1987) The bioflavonoid quercetin inhibits neurophil degranulation, superoxide production and phosphorylation of specific neutrophil protein. *Eiochem. Biophysic. Res.* **144**: 1229.
25. Chen Q. X. and Kubo I. (2002) Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. *J. Agric Food Chem.* **50**(14): 4108-4112.
26. Yang M. J., Kim M. G., Lim S., Ann H. S. and Ahn R. M. (1999) Inhibitory effects of water-acetone extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis. *J. Pharm. Soc. Kor.* **43**: 494-501.
27. Chun, H. J., Hwang, S. G., Lee, J.S., Baek, S. H., Jeon, B. H. and Woo, W. H. (2002) Inhibitory effects of butyl alcohol extract from *caesalpinia sappan* L. on melanogenesis in melan-a cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**(2): 1-7.
28. Chun, H. J., Choi, E. Y., Yoon, S. C., Nam, H. W. and Woo, W. H. (2001) Inhibitory effects of atractylodies rhizoma alba on melanin biosynthesis *J. Pharm. Soc. Kor.* **45**(3): 269-275.
29. Chun, H. J., Hwang, S. G., Jeong, D. H., Baek, S. H., Jeon, B. H. and Woo, W. H. (2002) Butyl Alcohol extract from caesalpinia sappan L. regulates melanogenesis in B16 /F10 melanoma cells. *J. Pharm. Soc. Kor.* **46**(2): 137-142.
30. Chun, H. J., Hwang, S. G., Kim, C. K., Jeon, B. H., Baek, S. H., and Woo, W. H. (2002) : In vitro Modulation of proliferation and melanization of B16/F10 Melanoma cells by quercetin. *J. Pharm. Soc. Kor.* **46**(1): 75-80.
31. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods* **65**: 55-63.
32. Hosoi J., Abe E., Suda T. and Kuroki T. (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 a-25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**: 1474-1478.
33. Matinez-Esparza M. (1998) Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-a in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **225**: 139-146.
34. Vaux, D. L. (1993) Toward an understanding of the

- molecular mechanism of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 786-789.
35. Hearing V. J. (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *Soc. Invest. Dermatol.* **4**(1): 24-28.
36. Jimbow, K., Quevedo, W. C., Fitzpatric, T. B., et al. (1993) Biology of melanocyte In: Fitzpatric, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., et al. eds. *Dermatology in general medicine*, 4th ed. New York : McGraw-Hill Book, 261-289.
37. Bell, A. A. and Weeler, M. H. (1986) Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 411-451.
38. Weixiong, L. and Helene, Z. H. (1997) Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Phytochem. Phytobiol.* **65**: 480-484.
39. Yaar, M. and Gilchrest B. A. (1991) Human melanocyte growth and differentiation : A decade of new data. *J. Invest. Dermatol.* **97**: 611-615.

(2002년 7월 10일 접수)