J Korean Soc Food Sci Nutr
40(8), 1086~1091(2011)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.8.1086

하수오와 백하수오의 에탄올 추출물에 의한 B16/F10 Melanoma 세포주의 멜라닌 생성 억제효과

서 희[1] · 서근영[2] · 고수지[1] · 박영현[1†]

[1]순천향대학교 자연과학대학 식품영양학과
[2]순천향대학교 의약바이오인재양성센터

Inhibitory Effects of Ethanol Extracts from *Polygoni multiflori radix* and *Cynanchi wilfordii radix* on Melanogenesis in Melanoma Cells

Hee Seo[1], Geun Young Seo[2], Su Zie Ko[1], and Young Hyun Park[1†]

[1]Dept. of Food Science and Nutrition and [2]Biopharm Human Resources Department Center, Soon Chun Hyang University, Chungnam 336-745, Korea

Abstract

Anti-oxidative activity and tyrosinase inhibitory activity of various ethanol extracts of *Polygoni multiflori radix* (PMR) and *Cynanchi wilfordii radix* (CWR) were compared to identify an anti-oxidant and whitening agent source from nature. We conducted an investigation into the anti-oxidant activities of PMR and CWR ethanol extracts by measuring total polyphenol content, total flavonoid content, and ABTS radical capacity. The total polyphenol contents of PMR and CWR were 17.31±0.54 mg GA/eq g, and 2.75±0.22 mg GA/eq g, respectively. The total flavonoid contents of PMR and CWR were 6.38±0.39 mg naringine/eq g, and 1.34±0.09 mg naringine/eq g, respectively. The 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) radical decolorization of PMR and CWR were 96.89±0.21% at 1 mg/mL and 93.49±0.76% at 50 mg/mL. Melanoma cells were cultured with the PMR and CWR ethanol extracts for 48 hr, and total melanin content as a final product and the activity of tyrosinase, a key enzyme, in melanogenesis, were estimated. The PMR and CWR ethanol extracts increased melanin content and tyrosinase activity in a dose-dependent manner. These results suggest that PMR and CWR ethanol extracts could be useful as a skin whitening agent.

Key words: *Polygoni multiflori radix*, *Cynanchi wilfordii radix*, melanin, tyrosinase, antioxidant

서 론

하수오에는 적하수오(*Polygoni multiflori radix*) 이외에 백하수오(*Cynanchi wilfordii radix*)가 사용되고 있다. 백하수오(*Cynanchi wilfordii radix*)는 박주과리과(*Asclepiadaceae*)의 *Cynanchum bungei* Dence, *C. auriculatum* Royle ex Wight, *C. wilfordii* (*Maxim.*) Hemsl. 등의 덩이뿌리로(1) 한국이 원산지이며, 적하수오는 *Pokygonum multiflorum* Thunberg(마디풀과 *Polygonaceae*)의 덩이뿌리로서 중국이 원산지이다. 적하수오와 백하수오는 기원식물이 다르고 유기성분계도 적하수오는 anthraquinone 유도체 및 stilbene 유도체로 백하수오와는 전혀 다른 것이다(2,3).

백하수오의 성분으로는 phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl inositol 등과 steroidal glycoside로써 wilfoside 등과 이들의 aglycone으로 sarcostin, deacylcynanchogenin, deacylmetaplexigenin, hidjoranin, caudatin, penupogenin, wilforinr 등이 있으며 이들의 sugar로써 wilforbiose, *d*- and *l*-cymarose 등이 포함되어 있다. 이들의 steroidal glycoside를 cynanchotoxin이라고도 하며, cinnamin acid, cynanchol, benzophenine 등이 포함되어 있다.

적하수오의 성분으로는 anthraquinone 화합물인 emodin, chrysophanol, rhein, physcion 및 이들의 배당체와 2,3,5,4′-tetrahydroxystilbene, 2-o-β-D-glucopyranoside 및 2′′-o-monogalloyl ester, 3′′-monogalloyl ester, 3′′-o-monogalloyl ester 등이 있다(4-8).

멜라닌은 동 식물계에 널리 존재하는 고분자의 천연색소로써 사람의 피부에서는 자외선 조사 등에 의한 피부손상에 대항하는 기작으로 생합성이 촉진된다(9,10). 멜라닌 색소는 피부를 보호하는 긍정적인 면을 갖고 있으나 이의 과잉생성은 기미, 주근깨, 피부 반점 등을 유발하며 멜라닌 전구물질의 독성으로 인한 세포의 사멸 및 피부암 생성이 촉진되기도 한다(11). 멜라닌은 세포 내의 소기관인 리보솜에서 ty-

†Corresponding author. E-mail: pyh012@sch.ac.kr
Phone: 82-41-530-1259, Fax: 82-41-530-1264

rosinase라는 효소의 생합성에서 합성되기 시작한다. 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌세포에서 아미노산의 일종인 tyrosine이 tyrosinase 효소의 작용으로 여러 단계를 거쳐 멜라닌이 합성되어 멜라노좀이라는 과립을 형성하고, 생성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동되어 자외선 등에 의한 피부의 노화나 일광각화증을 억제하여 피부를 보호하는 긍정적인 기능을 가지고 있는 반면에, 과잉생산에 의한 피부의 색소침착 및 멜라닌 전구물질들에 의한 독성으로 세포사멸을 촉진하는 부정적인 기능을 동시에 가지고 있다(12-14). 현재까지 연구되어진 적하수오와 백하수오의 생리활성에 관한 연구가 부족하고 또한 멜라닌 세포의 멜라닌화에 관여하는지를 알아보기 위하여 각각의 에탄올 추출물의 생리활성, tyrosinase 효소활성 및 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분리

적하수오와 백하수오 각각 300 g을 분쇄한 뒤 실온에서 ethanol로 24시간 3회 추출한 다음, 이 추출액을 여지로 여과한 후, 감압농축하고 동결건조 시켜 시료를 얻었다. Tyrosinase 효소활성 및 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 시료는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 각각 1, 10, 100 μg/mL이 되도록 녹인 후 세포에 투여하기 전 0.22 μm pore 여과지로 여과하여 농도를 조정한 다음 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(15)에 따라 적하수오, 백하수오의 폴리페놀 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다. 시료 200 μL에 Folin-Ciacalteu's phenol reagent 200 μL를 넣고 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 뒤 2% Na_2CO_3 용액 200 μL을 가하여 혼합한 후 실온에서 1시간 방치시키고 SUNRISE(A-5082, Tecan Genios, Grodig, Austria)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량을 정량분석하기 위해 표준물질인 gallic acid(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 DMSO에 녹여 일정한 농도별로 조제하고 시료와 동일한 방법으로 실험하여 검량선을 작성하였다. 검량선을 작성한 후 폴리페놀 함량은 시료 mg 중의 mg gallic acid로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정

하수오 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Zia 등(16)의 방법을 변형하여 측정하였다. 농도별 추출물 250 μL에 증류수 2.5 mL과 5% $NaNO_2$ 75 μL를 가한 다음, 5분 후 10% $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 150 μL를 가하여 6분간 방치하고 1 N NaOH 500 μL를 가하였다. 10분 후, 반응액의 흡광도 값을 415 nm에서 측정하였다. 표준물질로 naringine(Sigma Chemical Co.)을 사용하였다. 검량선을 작성한 후 시료의 총 플라보노이드 함량은 g 중의 mg naringine로 나타내었다.

ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성되는 ABTS radical이 샘플 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 Van den Berg 등(17)의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 $ABTS^{\cdot+}$을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 0.9(±0.1)이 되게 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS radical 용액 950 μL에 농도별 시료 50 μL를 가하여 혼합 후 흡광도의 변화를 위해 10분 후에 측정하였으며 표준물질로 ascorbic acid를 동량 첨가하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무처리 구의 흡광도}} \times 100\right)$$

세포배양

B16/F10 melanoma 세포는 CO_2 세포배양기(37°C, 5% CO_2)에서 10% fetal bovine serum(Sigma Chemical Co.)이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 여기에 penicillin streptomycin(Sigma Chemical Co.) 100 I.U-100 μg/mL를 첨가하였으며, 약 24시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하였다.

MTT assay

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) 정량은 Mosmann(18)의 방법을 변형하여 실시하였다. 세포를 96 well plate에 48시간 배양한 후 상층액을 버리고, 당일 제조한 500 μg/mL MTT를 배양 용기당 1 mL씩 넣어 암실 조건하에 3시간 동안 배양시켰다. 살아있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10% DMSO를 200 μL씩 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader로 571 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

$$\text{Cell viability (\% of control)} = \frac{\text{시료처리구 흡광도}}{\text{Control 흡광도}} \times 100$$

Trypan blue 검사

대조군과 실험군의 각 96 well plate에 0.05% tyrosine-0.02% EDTA 용액을 가하여, 각 well에서 세포를 분리수거하였다. 이 분리수거한 세포를 PBS로 2회 세척한 후 0.02 mL와 동량의 0.4%(w/v) trypan blue를 잘 섞은 다음 hemocytometer에 넣고 광학현미경을 이용하여 trypan blue에 염색되지 않은 살아 있는 세포수를 측정하였다.

멜라닌 양 측정

멜라닌 양은 Hosoi 등(19)의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 2회 세척한 후 원심분리 하여 세포 침전물을 만들었다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 200 µL 첨가하고 80°C에서 1시간 동안 용해하였으며, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌(Sigma Co.)을 사용하여 검량선을 작성하였고, 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하였다.

Tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도는 Matinez-Esparza(20)의 방법에 의하여 측정하였다. 각 well의 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 만들고, 100 µL의 lysis buffer(1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, 0.1 mM PMSF)를 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소용액으로 사용하였다. 100 mM sodium phosphate (pH 7.0) 용액 100 µL에 시료인 효소 용액 50 µL를 가하고 37°C에서 5분간 보온하였다. 100 mM catechol 50 µL를 넣은 후 ELISA reader로 37°C, 405 nm의 조건에서 흡광도의 변화를 1시간 동안 관찰하였다.

통계방법

본 실험에서 얻어진 결과는 SPSS 통계 package program (version 18.0, Statistical Package Social Science)을 이용하여 분석하였으며 각 시료에 대하여 평균±표준편차로 나타내었다. 시료간의 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 $p<0.05$ 수준에서 유의차 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 분자량을 가진다. 이들은 phenol hydroxyl을 가지기 때문에 단백질 및 거대분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화효과 및 항균활성 등의 다양한 생리활성을 나타낸다. 일반적으로 항산화 활성을 나타내는 것은 페놀성 화합물이 작용하는 것으로 알려져(21-23) 있으며 항산화 활성이 증가함에 따라 페놀성 함량도 증가한다.

하수오와 백하수오 추출물에 대한 총 폴리페놀과 플라보노이드 화합물 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 하수오와 백하수오의 총 폴리페놀 함량은 각각 17.31±0.54 mg GA eq/g, 2.75±0.22 mg GA eq/g로 나타났으며, 하수오와 백하수오의 총 플라보노이드 함량은 각각 6.38±0.39 mg naringine eq/g, 1.34±0.09 mg naringine eq/g로 나타나 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 하수오에서 더 높은 것으로 나타났다.

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of ethanol extracts from PMR and CWR

Sample[1)]	Con. (mg/mL)	Total polyphenol (GA/eq g)	Total flavonoid (naringine/eq g)
PMR	10	17.31±0.54	6.38±0.39
CWR	10	2.75±0.22	1.34±0.09

[1)]PMR: *Polygoni multiflori radix*. CWR: *Cynanchi wilfordii radix*.

ABTS radical 소거능 측정

하수오와 백하수오의 ABTS radical 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. ABTS radical 소거활성 법에서 표준물질로 사용되는 trolox는 100 µg/mL에서 94.58±1.26 % ABTS radical 소거능을 보여 90% 정도의 ABTS radical 소거능을 보인 Miller 등(24), Kim 등(25)의 결과와 일치하였다. 하수오의 농도별에 따른 ABTS radical 소거활성은 62.5 µg/mL 농도에서는 17.45±0.75%, 250 µg/mL 농도에서는 85.17±0.36%, 1 mg/mL 농도에서는 96.89±0.22%로 농도 의존적으로 나타났다.

이는 Piao 등(26)의 메밀의 에탄올, 메탄올 추출물이 100

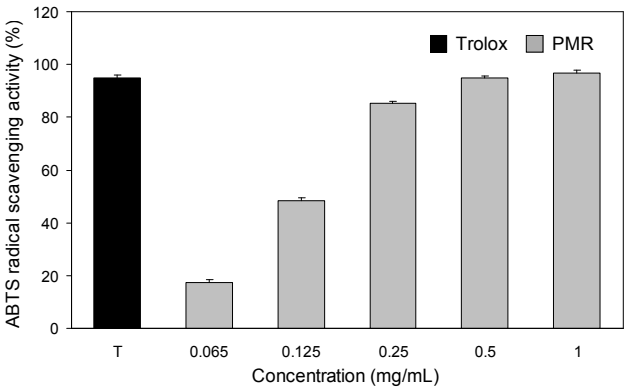

Fig. 1. Effect of ethanol extract from PMR on ABTS radical scavenging activity. Results were expressed as % of control and data were mean±SD of at least five determinations. PMR: *Polygoni multiflori radix*.

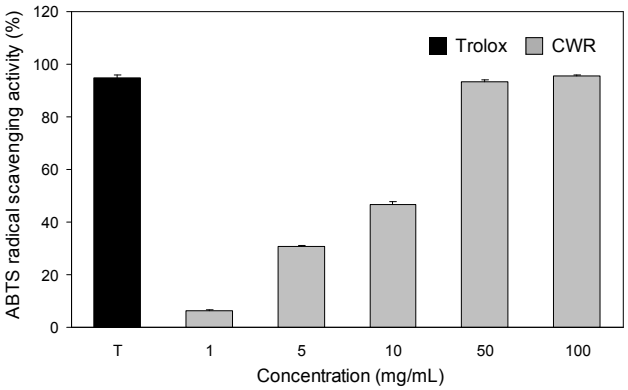

Fig. 2. Effect of ethanol extract from CWR on ABTS radical scavenging activity. Results were expressed as % of control and data were mean±SD of at least five determinations. CWR: *Cynanchi wilfordii radix*.

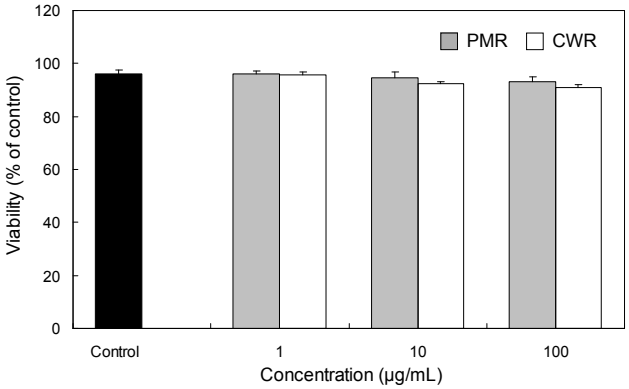

Fig. 3. Effect of ethanol extract from PMR and CWR on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of PMR and CWR for 48 hr. the viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control and data were mean±SD of at least five determinations. PMR: *Polygoni multiflori radix*, CWR: *Cynanchi wilfordii radix*.

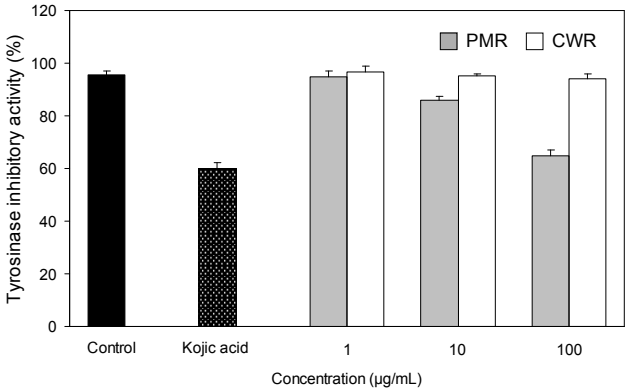

Fig. 4. Effect of ethanol extract from PMR and CWR on tyrosinase activity in B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of PMR and CWR for 48 hr. Results were expressed as % control and data were mean±SD of at least five determinations. PMR: *Polygoni multiflori radix*, CWR: *Cynanchi wilfordii radix*.

μg/mL에서 ABTS radical 소거능이 약 30% 정도 나타낸 것에 비하여 비교적 효과가 있다고 사료된다. 백하수오는 1 mg/mL 농도에서는 6.24±0.33%, 10 mg/mL 농도에서는 46.85%, 100 mg/mL 농도에서는 95.45±0.52%로 하수오에 비하여 소거활성이 낮은 것으로 나타났다.

세포생존율 측정(MTT assay)

하수오와 백하수오의 에탄올 추출물이 B16/F10 melanoma 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 에탄올 추출물을 1 μg/mL에서 100 μg/mL까지 다양한 농도로 처리하고, 48시간 배양한 후에 MTT방법으로 세포의 생존율을 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 에탄올 추출물에 의한 세포 생존율은 최고 100 μg/mL 처리 시 하수오와 백하수오 각각에서 93.2±1.95%, 91.07±4.05%로 두 가지 추출물에서 유의할 만한 변화를 나타내지 않았다. 이 결과를 다시 확인하기 위하여 trypan blue 방법으로 에탄올 추출물을 처리하고 세포수를 조사해본 결과도 MTT 방법의 결과와 마찬가지로 농도가 증가해도 유의할만한 변화를 나타내지 않았다(data not shown). 이상의 결과를 종합해 볼 때 사용한 에탄올 추출물의 농도 범위는 세포증식이나 독성이 없는 것으로 사료된다.

Tyrosinase 활성도 측정

사람의 피부색을 결정하는데 가장 중요한 요인인 멜라닌(melanin)은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체로 알려져 있고, 사람의 피부에서는 자외선에 대항하는 기작으로 생합성이 촉진된다(27). 멜라닌 생합성에 있어서 중요한 핵심효소는 tyrosinase이다. 이 효소는 아미노산인 tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성과정 중에서 tyrosine으로부터 DOPA, DOPA에서 DOPA quinone으로의 전환을 촉매 하는데 관여한다(26). 따라서 이 반응의 억제를 통해 멜라닌 생합성을 억제할 수 있다.

Tyrosinase는 피부의 색소성분인 melanin을 생성하는 주효소이므로 tyrosinase의 활성을 효과적으로 억제할 수 있는 물질은 피부미백을 목표로 하는 기능성 화장품의 첨가제로 이용할 수 있다. 피부에 멜라닌 색소의 침착을 유도하여 피부노화와 손상을 초래하는 tyrosinase에 대한 하수오와 백하수오 추출물의 tyrosinase 저해 활성도를 측정하기 위해 1 μg/mL에서 100 μg/mL의 다양한 농도로 측정한 결과 적하수오는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 1 μg/mL의 농도에서는 무처리군과 비교하였을 때 유의적인 차이를 나타내지 못하였다. 10 μg/mL 농도부터는 하수오의 경우 처리농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성도는 무처리군에 비하여 농도 의존적으로 통계적인 유의성을 얻을 수 있었으나, 백하수오의 경우 농도의존적인 유의성을 얻을 수 없었다. 100 μg/mL의 농도에서 tyrosinase 저해 활성도는 각각 64.9±2.23%, 94.12±1.78%로 하수오의 경우 대조군인 kojic acid의 60.07±2.25%와 비슷하게 활성도가 감소하였지만, 백하수오의 경우 통계적으로 유효한 감소효과를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 하수오의 에탄올 추출물이 tyrosinase의 활성을 억제시켜 결국 멜라닌합성 과정을 진행시키지 못할 것으로 사료하고, 이를 증명하기 위하여 최종산물인 멜라닌의 양을 측정해 볼 필요가 있다.

멜라닌 생성 양 측정

생체에서의 멜라닌 합성은 기질인 tyrosine이 tyrosinase에 의해 quinone과 indolquinone 화합물들의 여러 중간체를 거쳐 멜라닌이 생성된다(28). 에탄올 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. B16/F10 melanoma 세포에 에탄올 추출물을 각각 1 μg/mL에서 100 μg/mL의 다양한 농도로 처리하고 48시간 배양한 다음 멜라닌 생성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 하수오와 백하수오 에탄올 추출물의 첨가량이 1.0 μg/mL까지는 각각 90.43±2.6%,

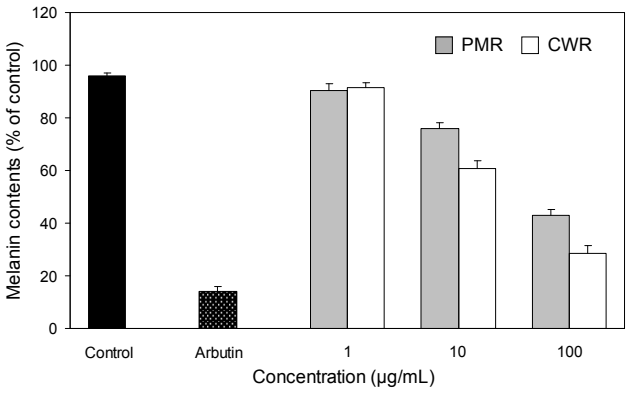

Fig. 5. Effect of ethanol extract from PMR and CWR on melanin contents in B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of PMR and CWR for 48 hr. Results were expressed as % control and data were mean±SD of at least five determinations. PMR: *Polygoni multiflori radix*, CWR: *Cynanchi wilfordii radix*.

91.33±2.11%로 멜라닌 생성이 대조군인 96.07±1.02%에 비하여 비슷하거나 약간 감소되는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. 그러나 10 μg/mL 농도에서는 75.9±2.23%, 60.77±3.07%로 나타났으며, 100 μg/mL 농도에서는 42.93±2.26%, 28.37±3.05%로 처리농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성이 점점 감소되는 경향을 보였으며 통계학적으로도 유의성이 관찰되었다. 이 결과는 멜라닌 생성은 줄이면서 세포독성은 낮아야하는 미백제로서의 기준에 하수오와 백하수오 에탄올 추출물이 부합되는 것으로 판단되어진다.

요 약

멜라닌 색소는 피부를 보호하는 긍정적인 면을 갖고 있으나 이의 과잉생성은 기미, 주근깨, 피부 반점 등을 유발하며 멜라닌 전구물질의 독성으로 인한 세포의 사멸 및 피부암 생성이 촉진되기도 한다. 이에 적하수오와 백하수오가 멜라닌 세포의 멜라닌화에 관여하는지를 알아보기 위하여 각각의 에탄올 추출물이 tyrosinase 효소활성 및 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 하수오와 백하수오의 총 폴리페놀 함량은 각각 17.31±0.54 mg GA eq/g, 2.75±0.22 mg GA eq/g로 나타났으며, 하수오와 백하수오의 총 플라보노이드 함량은 각각 6.38±0.39 mg naringine eq/g, 1.34±0.09 mg naringine eq/g로 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 백하수오보다 하수오에서 많은 것으로 나타났다. 하수오와 백하수오의 각각 농도별에 따른 ABTS radical 소거활성은 하수오 1 mg/mL 농도에서 96.89±0.22%로 나타났으나, 백하수오는 1 mg/mL 농도에서 6.24±0.33%로 하수오에 비하여 소거활성이 낮게 나타났다. 에탄올 추출물에 의한 세포 생존율은 최고 100 μg/mL 처리 시 하수오와 백하수오 각각에서 93.2±1.95%, 91.07±4.05%로 두 가지 추출물에서 유의할 만한 변화를 나타내지 않았다. 멜라닌 생성에 미치는 영향에 대하여 10 μg/mL 농도에서는 각각 75.9±2.23%, 60.77±3.07%로 나타났으며, 100 μg/mL 농도에서는 각각 42.93±2.26%, 28.37±3.05%로 처리농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성이 점점 감소되는 경향을 보였으며 통계학적으로도 유의성이 관찰되었다. 이 결과는 하수오와 백하수오의 에탄올 추출물이 세포에 독성을 미치지 않으며 멜라닌 생성 저해에 효과적인 미백제로서의 가능성을 제시하였다.

문 헌

1. Kim CM, Shin MG, Ahn DH, Lee GS. 1998. *Chinese herbal medicine*. Jungdam, Seoul, Korea. p 2152-2153, 5947-5955.
2. Korea Food & Drug Administration. 2002. *The Korean pharmacopoeia & Korea herbal pharmacopoeia*. Doung won cultural history, Seoul, Korea. p 169, 397.
3. College of oriental medicine phytology professor joint writing. 1991. *Phytology*. Younglim, Seoul, Korea. p 499-500, 583-584.
4. Mitsuhashi H, Sakurai K, Nomura T. 1966. Constituents of Asclepiaclaceae plants. *Chem Pharm Bill* 14: 712-717.
5. Fujimoto H, Satoh Y, Yamaguchi K, Yamazaki M. 1998. Monoamine oxidase inhibitory constituents from *Anixiella micropertusa*. *Chem Pharm Bull* 46: 1506-1510.
6. Hatano T, Uebayashi H, Ito H, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T. 1999. Phenolic constituents of cassia seeds and antibacterial effect of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chem Pharm Bull* 47: 1121-1127.
7. Yen GC, Chen HW, Duh PD. 1998. Extraction and identification of an antioxidative component from Jue Ming Zi. *J Agric Food Chem* 46: 820-824.
8. Kuo YD, Sun CM, Ou JC, Tsai WJ. 1997. A tumor cell growth inhibitor from polygonum hypolencum Ohwi. *Life Sci* 61: 2335-2344.
9. Yoneta A, Yamashita T, Jin YH, Kondo S, Jimbow K. 2004. Ectopic expression of tyrosinase increases melanin synthesis and cell death following UVB irradiation in fibroblasts from familial atypical multiple mole and melanoma (FAMMM) patients. *Melanoma Res* 14: 387-394.
10. Paramonov BA, Turkovskii II, Potokin IL, Yuriova NA, Chebotarev VY. 2002. Photoprotective activity of melanin preparations in human skin exposed to UV irradiation: dependence on previous photoexposure. *Bull Exp Biol Med* 134: 366-369.
11. Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, Mascagna D, Paulumbo A, Prata G, Hearing VJ. 1994. The inherent cytotoxicity of melanin precursors. *Biochim Biophys Acta* 1221: 272-278.
12. Weixiong L, Helene ZH. 1997. Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Phytochem Phytobiol* 65: 480-485.
13. Kaufman RJ. 1991. Vectors used for expression in mammalian cells. *Method Enzymol* 205: 87-92.
14. Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishi-yama S. 1993. Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. *J Invest Dermatol* 100: 126-132.
15. Gutfinger T. 1981. Polyphenols olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.
16. Zia Z, Tang M, Wo J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effect on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
17. Venden Berg R, Haenen GR, Van de Berg H, Bast A. 1999.

Applicability of an improved trolox equivalent anti-oxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of anti-capacity measurements of mixture. *Food Chem* 66: 511-517.
18. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J Immun Methods* 65: 55-63.
19. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse cells by 1 a-25-dihydroxy vitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res* 45: 1417-1478.
20. Matinez-Esparza M. 1998. Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem* 225: 139-146.
21. Madsen HL, Andresen CM, Jorgensen LV. 2000. Radical scavenging by dietary flavonoids. *Eur Food Technol* 211: 240-246.
22. Madsen HL, Nielsen BR, Bertelsen G, Skibsted LH. 1996. Screen of antioxidative activity of spices. *Food Chem* 57: 331-377.
23. Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. 2000. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extract from seed, sprout and flower of safflower. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1127-1132.
24. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Copinaththan V, Milner A. 1993. A novel method for measuring anti-oxidant capacity and its application to monitering the antioxidant status in premature neonants. *Clin Sci* 26: 265-277.
25. Kim JE, Joo SI, Seo JH, Lee SP. 2009. Antioxidant and α-glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 989-995.
26. Piao L, Park HR, Park YK, Lee SK, Park JH, Park MK. 2002. Mushroom tyrosinase inhibition activity of some hormones. *Chem Pharm Bull* 50: 309-311.
27. Yoneta A, Yamashita T, Jin HY, Kondo S, Jimbow K. 2004. Ectopic expression of tyrosinase increases melanin synthesis and cell death following UVB irradiation in fibroblasts from familial atypical multiple mole and melanoma patients. *Melanoma Res* 14: 387-394.
28. Hearing VJ. 1999. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *Soc Invest Dermatol* 4: 24-28.

(2011년 6월 2일 접수; 2011년 7월 22일 채택)