

Whitening Effects of Solvent Fractions Isolated from *Vitex rotundifolia*

Jae-Myo Yu · Dong-Hee Kim · Jun-Ho Son* 

만형자 용매 분획물의 미백 개선 효과

유재묘 · 김동희 · 손준호*

Received: 11 June 2015 / Accepted: 17 July 2015 / Published Online: 30 September 2015
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2015

Abstract Recently many effort focused to understand the mechanical insights of melanogenesis to develop the agent for hyper-pigmentation. So this study was performed to investigate the depigmentation of *Vitex rotundifolia*. With B16F10 mouse melanoma cell, we have seen inhibition of the tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2, and melanin synthesis, which eventually were dose dependently decreased by *Vitex rotundifolia*. Specially, *Vitex rotundifolia* decreased the protein levels of tyrosinase and TRP-1. In conclusion, *Vitex rotundifolia* showed the whitening activity in all the experiments mentioned above and we expect that it can be used for preventing melanin synthesis.

Keywords inhibition of melanin · TRP-1 · tyrosinase · *Vitex rotundifolia* · whitening effect

서 론

현대에 있어서 깨끗하고 하얀 피부는 아름다움의 척도가 되었다. 특히 생활수준의 향상과 수명의 연장으로 피부미용에 대한 관심이 증가되었고, 환경오염에 따른 자외선 노출증가로 인해 피부 미백에 대한 관심을 더욱 커지게 하였다. 이에 따라 피부

에 안정적이고 자극이 없는 미백소재를 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있다(Lee 등, 2003).

피부 미백에 대한 연구는 tyrosinase의 활성 억제, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) 산화 억제, 자외선 차단 등에 대해서 행해지고 있는데 keratinocyte에 있는 멜라닌의 양과 분포에 따라 피부색 및 색소침착이 결정되기 때문에 미백효과를 검증하기 위해서는 멜라닌 형성을 억제하는지를 확인하는 것이 중요하다(Cho 등, 2003).

멜라닌은 피부가 자외선에 노출되었을 때 melanocyte의 melanosome에서 tyrosine이 tyrosinase라는 효소에 의해 산화되어 생성되는데 이때 tyrosinase의 합성 및 전달에 관여하는 dopachrome tautomerase, peroxidase, catalase, glutathione reductase 등의 효소와 interferon, prostaglandin, cyclooxygenase 등과 같은 mediator 및 구리, 아연 철과 같은 금속이온이 관여하는 것으로 알려져 있다(Park 등, 2004b). 멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 고분자 물질로서 단백질과 검은 색소의 복합체이다. 이것은 인체내에서 독성물질에 대한 제거 작용을 하여 세포를 보호한다. 하지만 과잉 생산시 인체에 기미, 주근깨를 형성하고 피부 노화를 촉진시키며 피부암을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이러한 멜라닌의 생합성 경로를 보면 tyrosine이 tyrosinase에 의해서 DOPA로 전환되고 다시 tyrosinase에 의해 DOPA quinone으로 전환되어 최종적으로 멜라닌을 생성하게 된다(Hearing, 1999; Hwang 과 Lee, 2007). 이에 따라 멜라닌의 생합성을 억제하는 물질을 찾아내어 미백효과 등의 효능을 확인하는데 적용시킬 수 있다(Mauviel 등, 1994; Pentland 등, 1995; Park 등, 2004a).

만형자(*Vitex rotundifolia*)는 순비기나무(*Vitex rotundifolia* L.)의 성숙된 열매를 건조한 것으로 마편초과(*Verbenaceae*)에 속하는 약용식물자원이며 우리나라 중부이남의 섬이나 해안가에 자생하는 것으로 알려져 있다(Lee, 1993; Yeeh 등, 1996). 또한 진통, 진정, 소염의 목적으로 만성중이염, 습진, 이명, 난청, 두통, 신경통 등에 사용되어온 생약으로(Perry, 1980; Encyclopedia of Chinese herbal medicine, 1985), 동의보감에는 풍두통(風頭

J.-M. Yu · D.-H. Kim · J.-H. Son
Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry, Gyeongsan
712-260, Republic of Korea.

*Corresponding author (J.-H. Son: bio115@kotmin.kr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

痛)과 뇌명(腦鳴)에 달여 먹는다고 기술되어 있다(Heo, 1991).

만형자에 관한 연구로는 약 76종의 정유성분 및 monoterpene 류(Jang 등, 2002), flavonoids, phenol 화합물 등이 분리된 바 있으며(Kang 등, 1994; Yoshioka 등, 2004), 또한 만형자는 모발성장 촉진 효과(Shin 등, 2009), 염증 및 알레르기 반응(Yeon 등, 2013) 등에 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 B16F10 mouse melanoma cell을 이용하여 예로부터 한방생약재로 사용하며 유용한 성분 및 효과를 나타내는 만형자 용매 분획물을 처리한 후 melanin 정량과 western blotting으로 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등의 단백질 발현을 확인하여 미백효과에 대한 효능을 검증하였다.

재료 및 방법

시료. 본 실험에 사용한 만형자는 2014년 2월 초순에 (주)휴먼허브(Korea)에서 구입하여 시료로 사용하였다.

시료 추출 및 용매분획. 건조된 시료 300 g을 분쇄기를 이용하여 잘게 파쇄한 후 70% 에탄올을 3 L 넣어 상온에서 24시간 동안 동일 용매로 3회 반복 추출한 다음 filter paper (Whatman No. 2, Japan)로 여과한 뒤 감압농축기로 에탄올을 제거하여 농축액 7.24 g을 얻었다. 이후 용매추출법을 이용하여 극성도가 낮은 *n*-hexane으로 추출한 후, 다시 ethyl acetate와 butanol로 순차적으로 분획하였다. 각 용매 추출 분획을 freeze drier (Ilsin, Korea)로 감압 농축하여 *n*-hexane (VR-H) 0.65 g, EtOAc (VR-EA) 1.21 g, *n*-BuOH (VR-B) 1.56 g, H₂O (VR-W) 1.02 g을 각각 얻었다.

시약 및 기기. 미백 효과 측정에 사용된 시약인 L-ascorbic acid, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) 등은 Sigma chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정에 사용된 세포주는 mouse melanoma cell인 B16F10을 Korean cell line bank (Korea)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정 시약은 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, 0.25% trypsin-EDTA, 0.4% trypan blue stain은 Gibco BRL Co. (USA) 및 haemocytometer (Marienfeld, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 1차 항체인 tyrosinase, MITF, tyrosinase-related protein (TRP)-1, TRP-2와 2차 항체는 Santa cruz biotechnology Inc. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 기기는 ELISA reader (Tecan, Switzerland), rotary vacuum evaporator (Rikakikai Co., Japan), centrifuge (Eppendorf, Germany), CO₂ incubator (Hanbaek, Korea)를 사용하였다.

세포배양. 본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. 세포 확인시 inverted microscope (Nikon, Japan)를 사용하였다. B16F10 mouse melanoma cell에 시료용액을 농도별로 1시간 전처리한 후 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) 10 nM를 48시간 처리하였다.

MTT assay에 의한 세포 독성 측정. 세포 독성 측정은 Carmichael 등(1987)의 방법에 따라 측정하였다. B16F10 mouse melanoma cell을 96 well plate에 1×10^3 cells/well이 되

게 0.18 mL 분주하고, 시료를 농도별로 조제하여 0.02 mL 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 처리하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well에 DMSO 0.15 mL를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Melanin 정량. 멜라닌 양은 Hosoi 등(1985)의 방법을 변형하여 사용하였다. B16F10 mouse melanoma cell을 6 well에 5×10^4 cells/well이 되도록 분주하여 24시간 뒤, 각각의 well에 VR-EA, VR-H, VR-B, VR-W 25 μ g/mL와 사용전에 제조한 vitamin C (Vit. C; Sigma, USA) 25 μ g/mL를 48시간 동안 처리하였다. 처리 후 phosphate buffered saline (PBS; Gibco, USA)로 2회 세척한 후 12,000 rpm, 4°C, 30분간 원심 분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Duksan, Korea)가 첨가된 1 N NaOH 용액을 150 μ L 첨가하고 60°C에서 1시간 용해하였으며 405 nm에서 흡광도를 측정 후 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하여 나타내었다.

Cellular tyrosinase 저해율 측정. Cellular tyrosinase 저해율 측정은 Choi 등(1998)의 방법을 변형하여 측정하였다. B16F10 mouse melanoma cell을 6 well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 접종하고 각 well에 VR-EA, VR-EA, VR-H, VR-B, VR-W 및 Vit. C (25 μ g/mL)를 48시간 동안 처리하였다. 처리 후 PBS로 2회 세척한 후 각 well의 세포에 lysis buffer (1% triton X-100, 0.1 M sodium phosphate buffer, 50 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 6.8)를 가하였다. 얼음 위에서 세포를 파괴시키고 12,000 rpm, 4°C, 30분간 원심 분리한 후 상층액만 따로 모아 효소용액으로 사용하였다. L-DOPA를 2 mg/mL 농도로 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 기질을 준비하고 기질 160 μ L에 효소용액 40 μ L를 가하고 37°C에서 1시간 가온하고 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정 후 억제율을 계산하였다.

Western blot을 통한 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2 단백질 발현 측정. B16F10 mouse melanoma cell을 6 well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 안정화하였다. 배지를 제거한 후 VR-EA를 농도별로(5, 10, 20, 25 μ g/mL) 48시간 처리 후 PBS로 세척하였다. Lysis buffer를 well 당 30 μ L를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리하여 (12,000 rpm, 4°C, 30 min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 bradford assay로 정량하였으며, 20 μ L의 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 전기 영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 60 V에서 2시간 이상 transfer하였다. Transfer가 끝나면 5% skim milk에 1시간동안 방치하여 background를 제거시켰다. $1 \times$ TBST로 3회 washing 후 1차 antibody (1:1000)를 1시간 동안 붙인 후 다시 2차 antibody (1:1000)를 붙이고 ECL kit (Amersham Pharmacia, England)를 이용하여 film에 옮겨 측정하였다. Band density는 ImageQuant LAS-4000 (GE life sciences, Taiwan)으로 확인하였다.

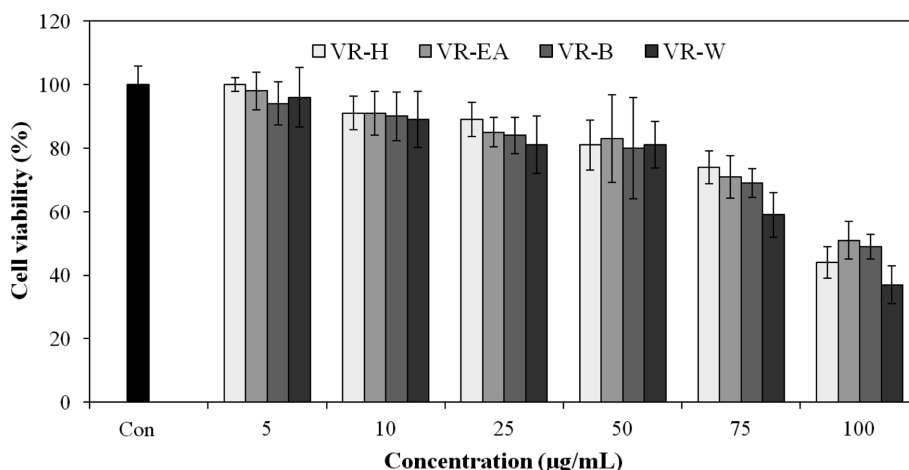


Fig. 1 Cytotoxicity of mouse melanoma cell (B16F10) of solvent fractions isolated from *Vitex rotundifolia*. VR-H: *Vitex rotundifolia* hexane fraction; VR-EA: *Vitex rotundifolia* ethyl acetate fraction; VR-B: *Vitex rotundifolia* butanol fraction; VR-W: *Vitex rotundifolia* water fraction; Con: α -MSH induced group. Result are means \pm SD of triplicate data.

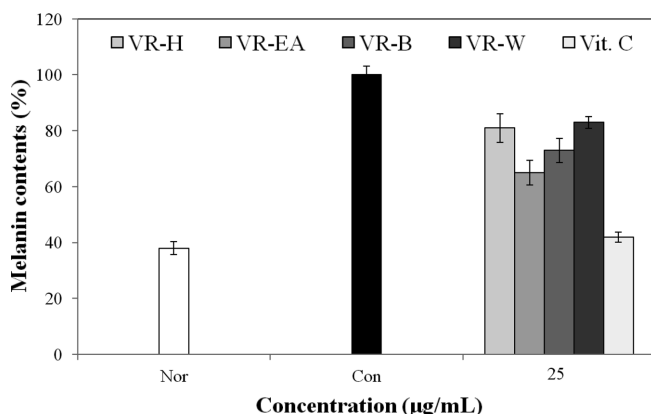


Fig. 2 Inhibition melanin synthesis of solvent fractions isolated from *Vitex rotundifolia* on mouse melanoma cell (B16F10). VR-H: *Vitex rotundifolia* hexane fraction; VR-EA: *Vitex rotundifolia* ethyl acetate fraction; VR-B: *Vitex rotundifolia* butanol fraction; VR-W: *Vitex rotundifolia* water fraction; Vit. C: L-ascorbic acid; Nor: α -MSH not induced group; Con: α -MSH induced group. Result are means \pm SD of triplicate data.

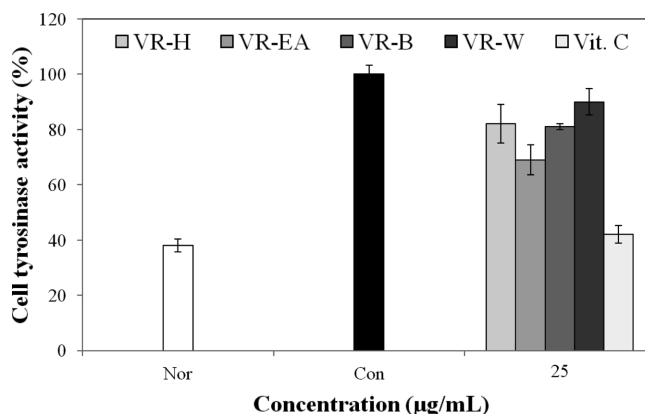


Fig. 3 Inhibition cellular tyrosinase of solvent fractions isolated from *Vitex rotundifolia* on mouse melanoma cell (B16F10). VR-H: *Vitex rotundifolia* hexane fraction; VR-EA: *Vitex rotundifolia* ethyl acetate fraction; VR-B: *Vitex rotundifolia* butanol fraction; VR-W: *Vitex rotundifolia* water fraction; Vit. C: L-ascorbic acid; Nor: α -MSH not induced group; Con: α -MSH induced group. Result are means \pm SD of triplicate data.

결과 및 고찰

MTT assay에 의한 세포 독성 측정. 만형자 분획물에 의한 B16F10 mouse melanoma cell의 독성을 확인하기 위해 분획물을 적정 농도로 48시간 동안 처리한 후 MTT assay를 실시하였다. 세포 독성은 VR-EA이 농도 5, 10, 25 µg/mL에서 각각 98, 91, 85%의 생존율을 보여 처리하지 않은 대조군에 비하여 세포 생존율이 크게 감소하지 않는 것으로 보아 세포에 대한 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

Melanin 정량. 멜라닌은 동물, 식물, 미생물에 널리 분포하는 색소로서 사람의 경우 피부색을 결정하는 동시에 유해한 자외선이나 유리기(free radical)로부터 인체를 보호하는 역할을 담당하고 있다. 이 색소는 피부의 기저층에 존재하는 멜라닌 생성 세포가 자외선 및 자극에 의해 활성화되어 만들지고 표피의 가장 위층인 각질층에 존재한다. 멜라닌 색소의 생합성은

tyrosinase 효소를 비롯하여 다양한 효소들에 의해 조절되고 있는 것으로 알려져 있다(Aroca 등, 1993; Paval, 1993; Jimenez-Cervantes 등, 1994). 색소 침착을 치유하기 위해 멜라닌 생성을 억제하는 페놀 유도체나 kojic acid, arbutin, glucosamine 등이 개발되어 있으나, 피부에 대한 자극이나 안정성에 문제가 있어서 제한된 양만 사용되고 있다.

멜라닌 생합성 저해 정도를 확인한 결과, Vit. C의 경우 25 µg/mL를 처리하였을 때 멜라닌을 58% 저해하였으며, 만형자 분획물의 경우 VR-EA, VR-B, VR-H, VR-W의 순서로 높게 나타났고 각각 35, 27, 19, 17%의 억제 효과를 보였다(Fig. 2). 반면에 삼백초 에탄올 추출물은 동일한 농도에서 약 21%의 억제 효과를 나타내어(Park과 Lee, 2008) VR-H, VR-W 보다는 높은 효과를 보였지만 VR-EA, VR-B의 효과에는 미치지 못하였다.

Cellular tyrosinase 저해율 측정. 멜라닌 생성에 있어서 가장

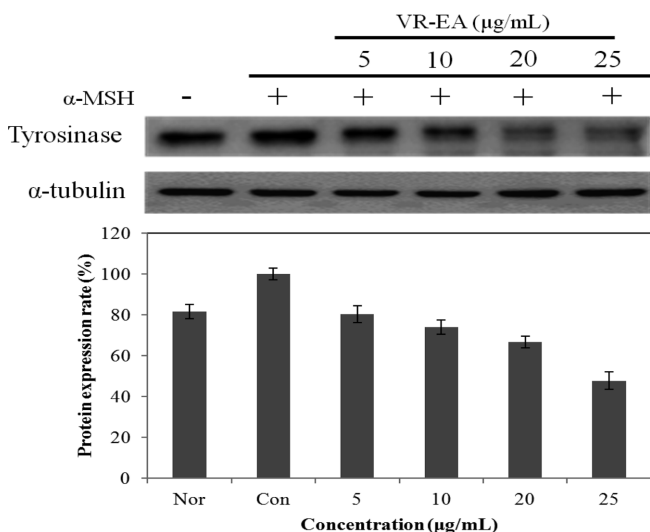


Fig. 4 Tyrosinase protein expression rate of ethyl acetate fraction isolated from *Vitex rotundifolia* on mouse melanoma cell (B16F10). Lysates were prepared from control or different concentration (5, 10, 20, 25 $\mu\text{g/mL}$) of VR-EA. Nor: α -MSH not induced group. Con: α -MSH induced group. Result are means \pm SD of triplicate data.

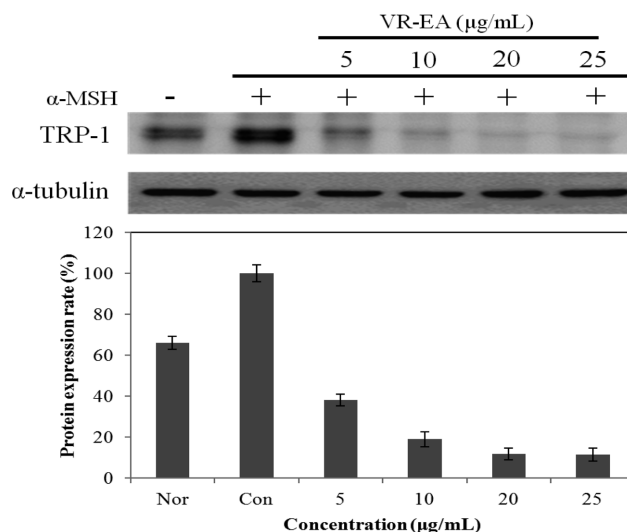


Fig. 6 TRP-1 protein expression rate of ethyl acetate fraction isolated from *Vitex rotundifolia* on mouse melanoma cell (B16F10). Lysates were prepared from control or different concentration (5, 10, 20, 25 $\mu\text{g/mL}$) of VR-EA. Nor: α -MSH not induced group. Con: α -MSH induced group. Result are means \pm SD of triplicate data.

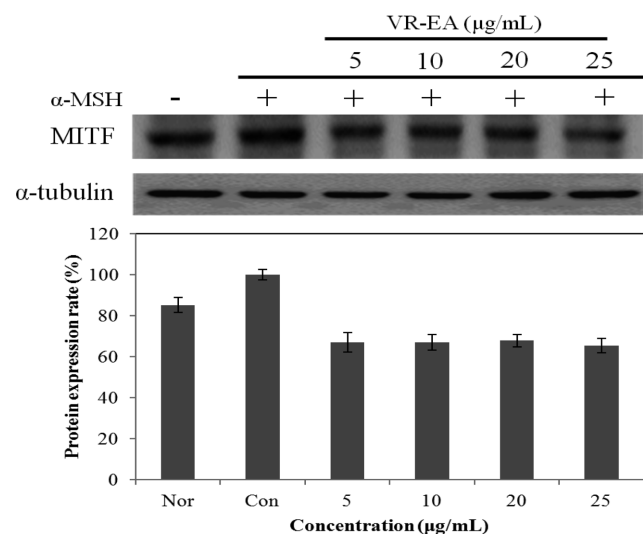


Fig. 5 MITF protein expression rate of ethyl acetate fraction isolated from *Vitex rotundifolia* on mouse melanoma cell (B16F10). Lysates were prepared from control or different concentration (5, 10, 20, 25 $\mu\text{g/mL}$) of VR-EA. Nor: α -MSH not induced group. Con: α -MSH induced group. Result are means \pm SD of triplicate data.

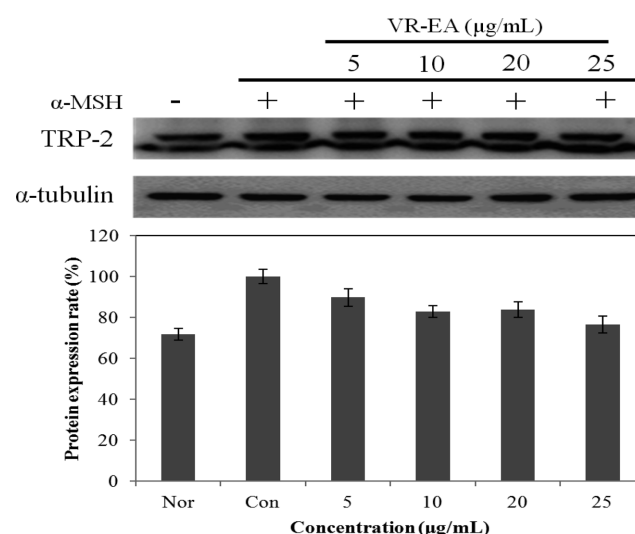


Fig. 7 TRP-2 protein expression rate of ethyl acetate fraction isolated from *Vitex rotundifolia* on mouse melanoma cell (B16F10). Lysates were prepared from control or different concentration (5, 10, 20, 25 $\mu\text{g/mL}$) of VR-EA. Nor: α -MSH not induced group. Con: α -MSH induced group. Result are means \pm SD of triplicate data.

중요한 역할을 하는 효소는 tyrosinase로서 melanosome 내의 tyrosine을 산화시켜 DOPA, DOPA quinone으로 바꾸고, 이들은 효소의 작용 및 자동 산화 반응에 의해 DOPA chrome, indole carboxylic acid, indole quinone 등으로 대사되어 최종적으로 멜라닌을 합성한다(Lin 등, 2002). 따라서 피부 내에서 멜라닌 중합체 생성성을 효과적으로 저해할 수 있는 tyrosinase 저해활성을 측정하기 위하여 cellular tyrosinase 활성 측정 결과, 모든 분획물에서 tyrosinase 저해효과를 보여주었다. VR-EA는 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 31%의 저해능을 나타낸 반면, Vit. C는 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서

58%의 저해능을 나타내었으며 VR-B는 19%, VR-H는 18% 그리고 VR-W의 경우 10%의 저해 효과를 보여주었다(Fig. 3). 동일한 실험에서 감귤 추출물(70% EtOH)의 경우 같은 농도에서 약 4%의 효과를 나타내어(Kim 등, 2007) 상대적으로 효능이 뛰어난 것을 알 수 있었다.

Western blot을 통한 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현 측정. α -MSH는 tyrosinase의 활성을 자극시키고 (Abdel-Maldk 등, 1995), 멜라닌 합성에 관여하는 효소인 TRP-1, TRP-2에 작용하여 eumelanin을 합성하도록 유도한다(Fuller

와 Meyskens, 1981). TRP-1은 DHICA를 indole-5,6-carboxylic acid로 전환시키는 효소로서 DHICA oxidase라고도 하며 tyrosinase의 변성을 막는데 작용하여 tyrosinase의 활성화에 기여하는 효소로 간접적으로 멜라닌 생성을 조절한다(Hearing 등, 1992; Takechi 등, 1996). 따라서 미백소재의 개발에 있어서 멜라닌 생성을 억제하는 기전과 이미 생성된 멜라닌의 분해를 촉진시키는 단계에서 작용하는 효소의 조절이 중요하며 멜라닌 생성에 관련된 단백질 발현과 연관성이 있는지 보기 위해 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 항체를 이용한 western blotting으로 관련 단백질의 발현양 변화에 대하여 확인하였다. B16F10 mouse melanoma cell에 VR-EA를 5, 10, 20, 25 µg/mL 처리 한 후 48시간 뒤에 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2 protein 발현을 western blotting으로 확인 하였다. 또한 세포에서 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 α -tubulin을 이용하여 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2 protein을 정량하였다. VR-EA를 농도 별로 처리하였을 때 25 µg/mL을 처리한 군에서는 tyrosinase protein이 53.2% 감소하였고, MITF는 34.7%, TRP-1은 88.4%, TRP-2의 경우 23.6%의 감소율을 보여 주었다(Fig. 4-7). 상대적으로 노간주나무 추출물(70% EtOH)은 동일 농도에서 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 순서로 약 12, 10, 9, 17%의 효과를 나타내어(Lee 등, 2013) VR-EA보다 protein 발현의 억제율이 낮게 나타났다.

초 록

최근에는 hyper-pigmentation에 대한 제품 개발을 위해 melanogenesis의 경로에 대한 이해를 위해 많은 노력을 하고 있다. 이에 따라 본 연구에서는 만형자(*Vitex rotundifolia*)의 depigmentation에 대한 효과를 조사하였다. B16F10 mouse melanoma cell을 이용하여 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2 그리고 melanin synthesis의 저해를 확인하였고, 만형자 ethyl acetate 분획물(VR-EA)을 처리하였을 때 농도의존적으로 감소한다는 것을 알 수 있었다. 특히, VR-EA는 tyrosinase와 TRP-1의 경우 각각 53.2, 88.4%의 저해율을 보여 미백에 있어서 효과적인 활성을 보여주었다. 따라서 만형자는 melanin synthesis를 효과적으로 막아주어 미백소재로서 활용 가능성이 충분하다고 사료된다.

Keywords 만형자 · 미백효과 · 멜라닌형성저해 · TRP-1 · tyrosinase

감사의 글 이 연구는 산업통상자원부 지역연구산업육성사업(R0002128, 경북화장품산업육성사업)의 일환으로 수행하였음.

References

Abdel-Maldek ZA, Swope NB, Suzuki I, Harriger D, Boyce ST, Urabe K et al. (1995) Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 1789–93.
 Aroca P, Urabe K, Kobayashi K, Taskamoto K, and Hearing VJ (1993) Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. *J Biol Chem* **268**, 25650–5.
 Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, and Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* **47**, 936–42.

Cho JH, Kim HJ, and Kim YB (2003) The study on depigmentation effects of salt, acetum, sesame semen nigrum. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* **16**, 79–95.
 Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES, and Lee NH (1998) Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor J Pharmacogn* **29**, 237–42.
 Encyclopedia of Chinese herbal medicine (1985) Shanghai Science technology publishing house, China.
 Fuller BB and Meyskens FL Jr (1981) Endocrine responsiveness in human melanocyte and melanoma cell in culture. *J Natl Cancer Inst* **66**, 799–802.
 Hearing VJ (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J Invest Dermatol Symp Proc* **4**, 24–8.
 Hearing VJ, Tsukamoto K, Urabe K, Kameyama K, Montague PM, and Jackson IJ (1992) Functional properties of cloned melanogenic proteins. *Pigment Cell Res* **5**, 264–70.
 Heo J (1991) In *Donguibogam*, Namsandang, Korea.
 Hosoi J, Abe E, Suda T, and Kuroki T (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 melanoma cell by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res* **45**, 1474–8.
 Hwang J and Lee BM (2007) Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-DOPA oxidation, and melanin synthesis. *J Toxicol Environ Health A* **70**, 393–407.
 Jang SJ, Kim YH, Kim MK, Kim KW, and Yun SE (2002) Essential oil composition from leaves, flowers, stems, and fruits of *Vitex rotundifolia* L. fil. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* **45**, 101–7.
 Jimenez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Urabe K, Hearing VJ, Lozano J et al. (1994) A new enzymatic function in the melanogenic pathway. *J Biol Chem* **269**, 17993–8001.
 Kang SS, Kim JS, Kim HJ, and Jung YR (1994) Phytochemical analysis of *Vitex Fructus*. *Kor J Pharmacogn* **25**, 214–20.
 Kim HS, Lee CW, Kim DH, Kim GO, Kim SJ, and Chang IS (2007) The study on the whitening effects and antioxidant activity of various citrus fruits. *J Soc Cosmet Korea* **33**, 69–77.
 Lee SY, Jun HJ, Lee IC, and Lee JY (2013) Down-regulation of Tyrosinase, MITF, TRP-1, and TRP-2 Expressions by *Juniperus rigida* Sieb. in Murine B16F10 Melanoma. *J Life Science* **23**, 1445–53.
 Lee TB (1993) In *illustrated flora of Korea*. Hyangmoonsa, Korea.
 Lee TH, Kim HJ, and Kim YB (2003) Depigmentation activity of barley, unpolished rice, Job's-tear. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* **16**, 57–78.
 Lin CB, Babiarz L, Liebel F, Roydon-Price E, Kizoulis M, Gendimenico GJ et al. (2002) Modulation of microphthalmia-associated transcription factor gene expression alters skin pigmentation. *J Invest Dermatol* **119**, 1330–40.
 Mauviel A, Halcin C, Vasiloudes P, Parks WC, Kurkinen M, and Uitto J (1994) Uncoordinate regulation of collagenase, stromelysin, and tissue inhibitor of metalloproteinases genes by prostaglandin E2; Selective enhancement of collagenase gene expression in human dermal fibroblasts in culture. *J Cell Biochem* **54**, 465–72.
 Park DJ and Lee JC (2008) A study on the antioxidative and depigmentation activities of the ethanol extract of *Saururus herba*. *Korean J Herb* **23**, 193–202.
 Park JH, Shin YG, Shin UK, Baek SK, Lee SK, Chung MH et al. (2004a) Tyrosinase inhibition activity of some herbal drug. *Yakhak Hoiji* **41**, 418.
 Park SK, Kim SN, Lee JC, Kim HS, Kim YJ, Lee BG et al. (2004b) Anti-aging effects on skin with jaeum-Dam (JED). *Korean J Herb* **19**, 67–76.
 Paval S (1993) Dynamics of melanogenesis intermediates. *J Invest Dermatol* **100**, 162S–5S.
 Pentland AP, Shapiro SD, and Welrus HG (1995) Agonist-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and metalloproteinases by human macrophages is regulated by endogenous prostaglandin E2 synthesis. *J Invest Dermatol* **104**, 52–7.
 Perry LM (1980) In *Medicine plants of east and southeast asia*, attributed properties and uses. MIT, UK.
 Shin HS, Lee KJ, and Yi TH (2009) Effect of *vitex rotundifolia* on hair regeneration : *in vitro* and *in vivo* study. *J Invest Cosmetol* **5**, 1–5.
 Takechi Y, Hera I, Naftzer C, Xu Y, and Houghton AN (1996) A

- melanosomal membrane protein is a cell surface target for melanoma therapy. *Clin Cancer Res* **2**, 1837–42.
- Yeoh Y, Kang SS, Chung HG, and Chung MS (1996) Genetic and clonal diversity in Korean populations of *Vitex rotundifolia* (Verbenaceae). *J Plant Research* **109**, 161–8.
- Yeon KJ, Jung HA, and Roh SS (2013) The Effects of *Vitex rotundifolia* Linne fil. Extract on the Inflammatory and Allergic Reactions. *Daejeon journal of the institute of oriental medicine* **22**, 145–70.
- Yoshioka T, Inokuchi T, Fujioka S, and Kimura Y (2004) Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of *Vitex rotundifolia*. *Z Naturforsch* **59**, 510–4.