

산수유 물추출물이 B16/F10 melanoma세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향

양현옥¹ · 최원형 · 전병훈² · 백승화 · 천현자*

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 1: 원광보건대학 미용피부관리과, 2: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Water Extract from Cornis Fructus Regulates Melanogenesis in B16/F10 Melanoma

Hyun Ok Yang¹, Won Young Choi, Byung Hun Jeon², Seung Hwa Baek, Hyun Ja Chun*

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 1: Department of BCosmetics, Wonkwang Health Science College, 2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine

Fruits of *Cornus Officinalis* have been used as an astringent, tonic and haemostatic in chinese medicine, contain a large amount of hydrolyzable tannins. The main aim of the present study was to examine the effect of Corni Fructus on melanogenesis. Cells were cultured in the presence of water extracts from Corni Fructus for 48 h, and there were estimated total melanin content as a final product and activity of tyrosinase, a key enzyme, in melanogenesis. Water extract from Corni Fructus increased the melanin content and tyrosinase activity in a dose-dependent manner. Especially, It was observed that 100 μ g/ml only water extract stimulated melanin secretion in B16/F10 melanoma cells by 130% at 48 h treatment and activity of tyrosinase increased by 160% in presence of same concentration.

Key words : *Cornis Fructus*, Melanogenesis, Tyrosinase

서 론

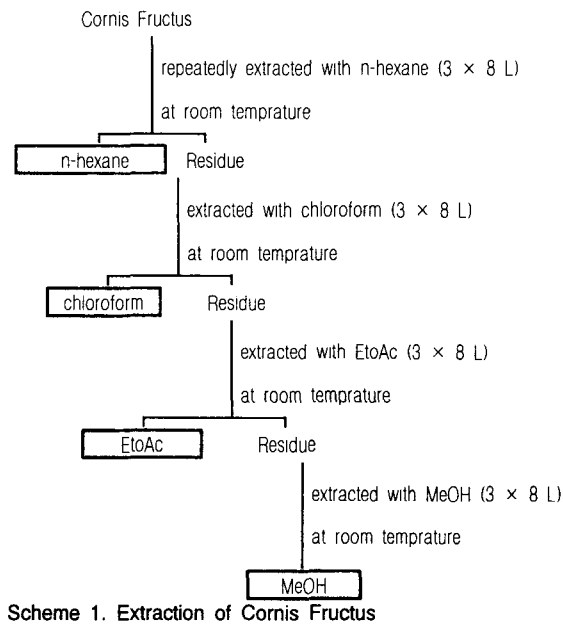
산수유(*Cornus Officinalis*)는 층층나무과 (Cornaceae)에 속하는 낙엽활목으로서 중국이 원산이며, 한국에서는 중남부의 산야에 자생하고 있다¹⁾. 그 높이는 4-7 m 내외이고 길이는 1.2-1.5 cm로 털이 없고 성숙하면 적홍색을 띠며, 종자는 긴 타원형이고 양끝은 무딘 원형이다²⁾. 개화기는 5-6월이고 결실기는 8-10월경으로 알려져 있다³⁾. 생약 산수유는 가을에 익은 산수유의 열매(*Corni fructus*)를 따서 씨를 뽑아내고 햇볕에 말린 것을 말하며 한약 또는 민간에서 간경, 신경에 좋고, 한의학에서는 이뇨작용, 혈압강화작용, 항암작용, 항균작용이 있다고 말하고 있다^{4,5)}. 산수유의 성분에 관하여는 triterpene계 saponin인 ursolic acid⁶⁾와 배당체인 morroniside, loganin, sweroside, 7-o-methylmorroniside⁷⁾, 그외 유기산 및 지방산이 함유되어 있다. 산수유에 대한 연구로는 이⁸⁾등이 산수유 열매의 화학성분과 건조에 따른 과육분리의 특성에 관하여 보고하였고, 서⁹⁾등은 산수유 추출물의 항균 및 항

산화성을 연구하였으며, 이¹⁰⁾등은 산수유 메탄올 엑기스가 소염작용이 있음을 보고하였다. 우리나라 산야에서 자생하고 있는 식물 중에는 약용이나 식용으로 이용할 수 있는 식물이 많으며 이들 중에는 인체의 질병을 예방하는데 효능을 가진 식물이 상당히 많이 있을 것으로 사료된다. 그러나 지금까지는 이들 식물에 대한 광범위한 연구가 이루어지지 않고 있었으나 과학의 발달과 천연물에 대한 인식이 새로워짐에 따라 천연물이 새로운 신약 및 신약 후보물질을 얻을 수 있는 좋은 재료로서 고려되고 있다. 또한 이러한 천연물 및 한약재의 효능과 작용기전이 밝혀진 약물을 대상으로 임상적으로 유용한 처방을 개발하기 위한 새로운 치료법으로 pharmacogenomics 등의 최신 연구를 통하여 한의학적 치료법의 새로운 연구분야의 개척을 선도하고자 한다. 또한, 최근에 생약이나 한약재 같은 천연물을 이용하여 멜라닌색소와 관련된 연구도 많은 연구자들에 의해 진행되고 있다¹¹⁻¹⁵⁾. 본 연구팀은 피부질환 치료제 및 미백제 개발의 일환으로서 생약 및 한약재에 대한 지속적인 탐색중¹⁶⁻¹⁸⁾에 산수유가 멜라닌 생성에 영향을 주는지를 조사하고자 물 추출물에 대하여 *in vitro*에서 tyrosinase활성 및 melanin 양을 측정된 결과 유의한 효과를 보였기에 보고하는 바이다

* 교신저자 : 천현자, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원
E-mail : hjchun@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6938
· 접수: 2002/06/22 · 수정: 2002/07/19 · 채택 : 2002/08/07

실험방법

검역조제-본 실험에서 사용한 산수유는 원광대학교 한의과 대학 한방병원에서 구입한 시료를 n-hexane에 용해시켜 상온에서 24시간 3회 추출한 다음, 이 추출액을 여지로 여과하고, 감압 농축하고 동결건조 시켜 시료를 얻었다. 계속하여 클로로포름, 에틸아세테이트, 메탄올, 물로 추출하고, 여액을 감압 농축하여 각각의 시료를 얻었다. 시료는 DMSO에 녹인 후 세포에 투여하기 전 0.22 μm pore 여과지로 여과 멸균하여 농도를 조정한다 다음 사용하였다(schem 1).



세포배양-B16/F10 melanoma 세포는 CO₂ 세포배양기 (37 °C, 5 % CO₂)에서 10 % fetal bovine serum (Gibco. Co.)이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 여기에 peni-cillin-streptomycin (Sigma Chemical Co., USA) 100 I.U. - 100 μg/ml를 첨가하였으며, 약 24 시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하였다. MTT Assay-3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 정량은 Mosmann의 방법¹⁹⁾을 변형하여 실시하였다. 세포를 48 시간 배양한 후 상층액을 버리고, 당일 제조한 500 μg/ml MTT를 배양 용기당 1 ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3 시간 동안 배양하였다. 살아있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10 % DMSO를 200 μl씩 넣고 15 분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다. Trypan blue 검사-대조군과 실험군의 각 well에 0.05 % tyrosine - 0.02 % EDTA 용액을 가하여, 각 well에서 세포를 분리 수거하였다. 이 분리 수거한 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 Hosoi²⁰⁾ 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 2 회 세척한 후 원심분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10 % DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 200 μl 첨가하고 80 °C에서 1 시간 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 계산하였다. Tyrosinase 활성도 측정-Tyrosinase 활성도는 Matinez-Esparza²¹⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 각 well의 세포를 원심 분리하여 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 효소용액 50 μl를 가하고 37 °C에서 5 분간 보온하였다. 100 mM catechol 50 μl를 넣은 후 ELISA reader로 37 °C, 405 nm의 조건에서 흡광도의 변화를 1 시간 동안 관찰하였다. 통계방법-실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's T-test를 이용하였으며, p-value가 0.05미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

실험결과

산수유 물 추출물이 세포생존율에 미치는 영향- 산수유 물 추출물을 1 μg/ml에서 200 μg/ml까지 다양한 농도로 처리하고, 48 시간 배양한 후에 MTT 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 메탄올추출물에 의한 세포 생존율은 최고 200 μg/ml 처리시에도 유의할만한 변화를 나타내지 않았다. 메탄올추출물을 처리하고 세포수를 조사해본 결과도 MTT방법의 결과와 마찬가지로 유의할만한 변화를 나타내지 않았으며, 또한 세포의 형태학적 변화를 관찰해 본 결과 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

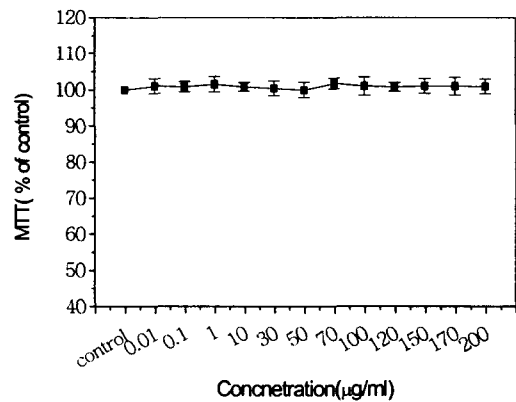


Fig. 1. Effect of water extract from Cornis Fructus on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of Cornis Fructus for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as %control and data were mean ± SE of at least five determinations.

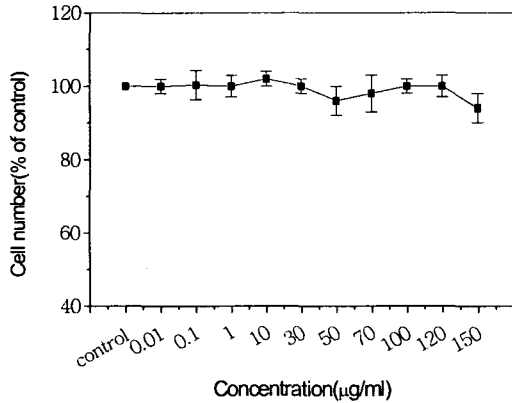


Fig. 2. Effect of water extract from Cornis Fructus on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of Cornis Fructus for 48 h. The viability of the cells was measured by Trypan blue test. Results were expressed as %control and data were mean \pm S.E. of at least five determinations.

물 추출물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향 Tyrosinase는 멜라닌 합성과정에서 속도제한 효소이며 멜라닌합성의 주요한 조절적 단계를 나타내는 효소이다²²⁾. 산수유 물 추출물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 B16/F10 melanoma 세포에 물 추출물을 농도별로 처리하고, 48시간 배양한 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 메탄올 추출물들의 처리 양이 증가함에 따라 tyrosinase 측정값은 대조군에 비하여 모두 유의성 있는 증가를 보였다. 전체적으로 첨가량이 증가함에 따라 대조군에 비하여 실험군에서 모두 통계적으로 유의성 있게 증가되는 경향을 보였다.

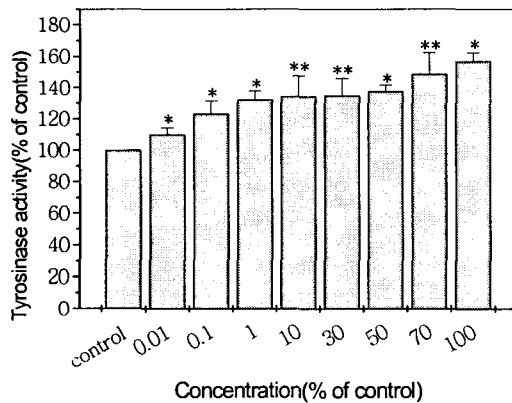


Fig. 3. Effect of water extract from Cornis Fructus on tyrosinase activity and melanin contents in B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of Cornis Fructus for 48 h. Results were expressed as % control and data were mean \pm S.E. of at least five determinations, significantly different from control group (* p <0.01, ** p <0.05).

물 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향-생체에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고, 다시 L-dopaquinone으로 산화시키는 연속적인 효소적 산화가 진행된

후 각 생성물의 종합반응에 의해 이루어진다²³⁾. 물 추출물이 in vivo에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. B16/F10 melanoma 세포에 물 추출물을 각각 1 μg/ml에서 100 μg/ml의 다양한 농도로 처리하고 48 시간 배양한 다음 멜라닌 생성을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 물 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 대조군에 비하여 실험군에서 모두 통계적으로 유의성 있게 증가하였다(p <0.05). 한편, tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성을 비교해 볼 때, 100 μg/ml농도에서 tyrosinase활성은 물 추출물 처리군이 대조군에 비하여 1.6배 증가하였으나, 멜라닌 생성은 약1.3배 증가하여, tyrosinase 활성도가 멜라닌 생성에 비하여 더 많이 증가하는 경향을 보였다

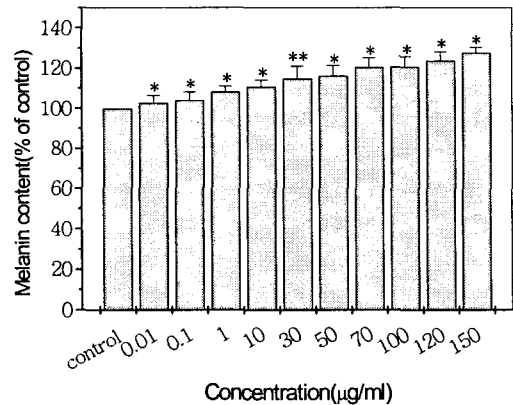


Fig. 4. Effect of water extract from Cornis Fructus on melanin contents in B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of Cornis Fructus for 48 h. Results were expressed as % control and data were mean \pm S.E. of at least five determinations, significantly different from control group (* p <0.01, ** p <0.05).

고찰

피부 색깔은 멜라닌 세포의 멜라노솜에서 생성되어 각질형성 세포로 이동된 멜라닌에 의해 주로 결정되며 멜라노솜은 멜라닌화과정을 통해 조밀한 멜라닌 색소 과립을 형성한 후 각질형성 세포로 이동하여 분해된다²⁴⁾. 멜라닌 세포는 이러한 멜라닌 색소를 형성함으로써 정상적인 피부색을 나타게 하는 수직상세포로 그 기능적, 형태학적, 수적 변화로 인해 백반증, 백색증 등의 저색소성 병변이나 기미 주근깨 등의 과색소성 병변이 야기되므로 멜라닌 색소 합성의 조절기전과 관련된 연구가 관심의 대상이 되고있으며 많은 연구자들에 의해 연구가 매우 활발하게 진행되어 오고 있다^{11-18),25-26)}. 한의학에서는 오래 전부터 백피증이나 백반증 같은 저색소 침착증에 대하여 부작용이 없으면서 뚜렷한 치료효과를 나타낼 수 있는 한약재에 대한 연구 결과가 보고되어 있지만 어떠한 약재가 멜라닌세포나 멜라닌 합성에 작용하는지에 관한 실험적인 결과는 많이 밝혀져 있지 않은 실정이다. 본 연구에 약재로 사용하고 있는 산수유는 항균과 항바이러스작용, 이노작용 및 혈압감하에 효과가 있다고 하였으며,

강등²⁷⁾은 천연보습제인 산수유 추출물이 탈모방지 효과 있다고 보고하였다. 그러나 멜라닌세포의 멜라닌화와 관련하여 연구된 바가 전혀 없는 상태이다. 따라서 본 연구에서는 산수유가 멜라닌세포의 멜라닌화에 관여하는지를 알아보기 위하여 산수유물 추출물이 tyrosinase 효소활성 및 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 물 추출물이 B16/F10 melanoma 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1 µg/ml에서 200 µg/ml까지 다양한 농도로 처리하여 MTT 방법과 trypan blue 검사법으로 세포의 생존율을 조사한 결과 물추출물에 의한 세포수가 약간 증가하는 경향을 보였으나 유의성을 보이지는 않았다. 또한 세포의 형태학적 변화를 관찰해 본 결과 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 실험에 사용한 농도 범위는 세포증식이나 독성이 없는 것으로 사료된다. 자외선 같은 외부적인 요인들이 흑색종 세포를 자극하면 여러 단계를 거쳐 멜라닌화가 촉진되어 멜라닌 생성이 증가된다. Tyrosinase는 멜라닌 생성에 있어 중요한 역할을 하고 있으며 멜라노솜내에서 tyrosine을 산화시켜 dopa를 만드는 tyrosine hydroxylase로, dopa를 산화시켜 dopachrome을 만드는 dopa oxidase로 작용하여 최종적으로 melanin polymer를 합성하는데 있어서 주요 효소로 작용한다²⁸⁾. Tyrosinase 활성도에 미치는 물 추출물의 영향을 조사해 본 결과 처리 양이 증가함에 따라 tyrosinase 측정값은 대조군에 비하여 모두 유의성 있는 증가를 보였으며 특히, 100 µg/ml 농도에서 물 추출물 처리군이 대조군에 비하여 약 1.6배의 증가를 보였다. 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사해 본 결과 tyrosinase 활성과 마찬가지로 처리 양이 증가함에 따라 대조군에 비하여 실험군에서 모두 통계적으로 유의성 있는 증가 (p<0.05)를 보였다. 멜라닌 생성을 조절하는 물질은 두 가지 형태로 분류하는데 그 하나는 멜라닌 생성의 주요 효소인 tyrosinase 효소 자체를 직접 조절하는 형태이고, 또 하나는 세포로부터 분리한 tyrosinase에 대하여는 직접적인 조절을 나타내지 않지만, 피부 색소 세포 내에 있어서의 멜라닌 생성을 조절하는 형태이다. 물 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성과 멜라닌 양이 모두 농도 의존적으로 유의성 있는 증가를 보였는데 이것은 물 추출물에 함유된 성분이 tyrosinase 효소 자체를 조절함으로써 멜라닌을 생성하는 형태의 물질이 많이 함유되어 있으리라 추측할 수 있다. 한편, 물 추출물을 처리한 군들의 tyrosinase 활성과 멜라닌 양을 비교해볼 때 tyrosinase 활성이 멜라닌 양에 비하여 더 많은 증가를 보였는데, 이는 tyrosinase 활성이 멜라닌 생성되는 초기단계에서 크게 증가되는 반면에, 멜라닌은 다른 경로들도 많고 최종산물이므로 여러 단계를 거치므로 적게 만들어질 수 있으리라 사료된다. 이상의 결과를 종합해보면 산수유의 물 추출물은 B16/F10 melanoma 세포에서 tyrosinase 활성을 증가시키고 멜라닌 합성을 증가시키므로서 멜라닌화를 촉진하는 작용이 확인되었으며, 앞으로 산수유의 물 추출물에 의한 멜라닌 생성의 반응 경로를 규명하고 그 주성분을 밝히는 연구가 진행됨으로써 산수유가 멜라닌 색소의 감소나 소실에 의해 유발되는 색소성 질환인 백반증 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

산수유 추출물이 피부의 멜라닌 색소 형성에 어떠한 영향을 나타내는지를 규명하기 위하여, B16/F10 melanoma 세포에 산수유의 물 추출물을 처리한 후 세포의 생존율, 멜라닌 양의 변화 및 tyrosinase 활성도를 측정 한 결과, 물 추출물은 B16/F10 melanoma 세포의 생존율에 영향을 거의 주지 않았고, Tyrosinase 활성도는 물 추출물 처리군 모두에서 통계적으로 유의한 증가를 보였다. 멜라닌 생성은 tyrosinase 활성도와 마찬가지로 물 추출물 처리군의 처리농도에 비례하여 증가하였으며, 모두 통계적으로 유의한 증가를 보였다.

감사의 글

본 연구는 원광 보건대학 교내 연구비와 BK 21 사업의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 전통의학연구소 : 본초약재 도감, 도서출판 성보사, pp.203, 1994.
2. 김창민외 : 중약대사전. 청담출판사 pp.2667-2672, 1997.
3. 김재길외 : 동양전통약물 원색도감, 도서출판 영림사, pp.230, 1995.
4. 정진섭, 신민교 : 도해 생약대사전, 도서출판 영림사, pp. 448-449, 1998.
5. 장삼문, 최정, 김종완, 박병윤, 박선동 : 한약자원식물학, 학문출판, 1996.
6. Yang, T. H., Liu, S. H. and Sun, M.H. : Constituents of the fruits of *Cornus Officinalis*. Taiwan Yao Hsueh Tsa Chih, 22, 1971.
7. Endo, T. and Taguchi, H. : Study on the constituents of *Cornus Offinalis* Sieb. et Zucc., Yakugaku Zasshi, 93. 30, 1973.
8. Lee, Y. C., Kim, Y. E., Lee, B. Y. and Kim, C. J. : Chemical compositions of *Corni Fructus* and separating properties of its flesh by drying. Kor. J. Food Sci. Technol. 24(4), 447-450, 1992.
9. Seo, K. I., Lee, S. W. and Yang, K. H. : Antimicrobial and Antioxidative activities of fructus extracts. Kor. J. Postharvest Sci. Tec. 6(1), 99-103, 1999.
10. Lee, E. B., Choi, B. C. and Cho, T. S. : Pharmacological studies on Ether fraction of *Corni Fructus*. J. Pharm. Soc. Kor. 29(1), 1-10, 1985.
11. Lee, S.H., Park, J.S., Kim, S.Y., Kim, J.J. and Chung, S.R. : Isolation of inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of *Pawonia moutan*. J. Pharm. Soc. Kor. 42(4), 353-358, 1998.
12. Lee, S.H., Kim, S.Y., Kim, J.J., Jang, T.S. and Chung, S.R. : The isolation of inhibitory constituents on melanin polymer

- formation from the leaves of *Cercis chinensis*. Kor. J. Phamacogn. 30(4), 397-403, 1999.
13. Lee, S.H., Park, J.S., Kim, S.Y., Kim, J.J. and Chung, S.R.: The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product. J. Pharm. Soc. Kor. 41(4), 456-460, 1997.
 14. Han, D.S., Jung, S.W., Kim, S.J., Kim, S.H. and Ahn, B.H. : Effect of tyrosinase inhibitors on the melanogenesis og gold fish. Kor. J. Food Sci. Technol. 28(6), 1089, 1996.
 15. Ro, S.W., Seong, S.J., Kim, M.N., Hong, C.K. and Ro, B.I. : Melanogenesis of stem cell factor in depigmented patch of vitiligo. Kor. J. Invest. Dermatol. 6(2), 103, 1999.
 16. Chun H. J., Mun Y. J., Kim J. H., Kim I. K., Jeon B. H. and Woo W. H. : Effect of the aqueous extract of *Epimedium koreanum* Nakai on melanin formation in B16 mouse melanoma cell line. J. Pharm. Soc. Korea 44(5), 455-462, 2000.
 17. Chun H. J., Kim I. K. and Woo W. H. : Inhibitory effects on retinoic acid and melanization of B16 melanoma cell by *Epimedium koreanum* Nakai and a-MSH. J. Kor. Chem. Soc. 44(5), 533-542, 2000.
 18. Chun, H. J., Choi, E. Y., Yoon, S. C., Nam, H. W. and Woo, W. H. : Inhibitory effects of *Atractylodes Rhizoma alba* on melanin biosynthesis J. Pharm. Soc. Korea 45(3), 269-275, 2001.
 19. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. J. Immun. Methods 65, 55-63, 1983.
 20. Hosoi J., Abe E., Suda T. and Kuroki T. : Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 a-25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res. 45, 1474-1478, 1985.
 21. Matinez-Esparza M. : Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-a in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur. J. Biochem. 225, 139-146, 1998.
 22. Bell, A.A. and Weeler, M.H. : Biosynthesis and function of fungal melanin. Ann. Rev. phytopathol. 24, 411-451, 1986.
 23. Hearing V. J. : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organi-zation. Soc. Invest. Dermatol. 4(1), 24-28, 1999.
 24. Jimbow K, Queredo Jr WC, Prota G, Fitzpatric TB. : Biology of melanocytes. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff KW et al, eds. Dermatology in genera medicine, 5th ed. new York: Mcgraw-Hill Book, pp192-220, 1999.
 25. Doh, K. S., Yoon, J. S., Park, S. G., Cho, W. G., Jang, M. S., Suh, K. S. and Kim, S. T. : The effect of arbumin, medimim C and *Pinellia ternata* extract on the pigmentary system. Kor. J. Invest. Dermatol. 8(3), 151-162, 2001.
 26. Choi, B.W., Lee, B.H., Kang, K.J., Lee, E.S. and Lee, N.H. : Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. Kor J. Phamacogn. 29(3), 237-242, 1998.
 27. 강원형, 이은소, 전세정, 이맹로, 전우현 : 대한피부과학회 초 록집, 51, 1996.