

압척초추출물의 Alpha-MSH 유도성 멜라닌합성 억제 효과

강문경 · 이영은 · 우원홍¹ · 문연자^{2*}

원광대학교 생활과학대학 식품영양학과, 1 : 한의과대학 해부학교실, 2 : 한의학문대학원 한약자원개발학과, BK21-plus팀

Commelina communis Ledeb Inhibits Melanin Synthesis in Alpha-MSH-stimulated B16F10 Cells

Moon Kyung Kang, Young Eun Lee, Won Hong Woo¹, Yeun Ja Mun^{2*}

Department of Food Industry Convergence, College of Human Environmental Science,

1 : Department of Anatomy, College of Korean Medicine,

2 : BK21-plus Team, Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University

Commelina communis Ledeb is a widely used medication for the treatment of antidiabetic, antioxidant and hypoglycemic agent in Korea. Alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) is a major factor to stimulate melanin synthesis in the skin. The purposes of this study was to investigate the inhibitory effects of extract from *Commelina communis* Ledeb (ECC) on α -MSH-stimulated melanogenesis in B16F10 cells. ECC suppressed melanin synthesis and intracellular tyrosinase activity in B16F10 cells or α -MSH-induced B16F10 cells in a dose dependent manner. In study on the melanogenic protein expressions, it had especially influence on expressions of tyrosinase and tyrosinase-related protein (TRP-1). Tyrosinase and TRP-1 expressions were gradually decreased in a dose-dependent. Additionally, the extract also decreased the α -MSH-induced over-expression of tyrosinase and TRP-1. This results show that the anti-melanogenic activity of ECC is correlated with the suppression of tyrosinase and TRP-1 protein expressions in B16F10 cells.

keywords : *Commelina communis* Ledeb, melanin, tyrosinase, TRP-1, α -MSH

서 론

압척초(鴨跖草, *Commelina communis* Ledeb)는 닭의장풀과의 한해살이풀로 식물 전체를 건조한 것을 말하며, 식품에 제한적으로 사용할 수 있는 식품성 원료 중 하나로 전초 사용이 가능하다. 압척초는 달개비, 계설초, 벽죽자(碧竹子), 죽엽채(竹葉菜) 등으로 불리기도 하며, 예로부터 해열, 간염, 황달에 쓰이고 특히 감기 예방과 당뇨병 등에도 이용되어 왔다^{1,2)}. 주요 유효성분으로는 delphin, commelinin, harman, norharman 등이 있다. 멜라닌은 피부, 눈, 머리카락 등의 색을 결정하며 자외선으로부터 피부를 보호하고 피부에서 발생하는 활성산소를 제거하여 세포의 손상을 줄이는 역할을 한다. 멜라닌은 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌 세포에서 효소 및 비효소적 산화반응을 거쳐 생성되는데 UV와 같은 외적인 요인이나 스트레스, cytokine, growth factor 및 호르몬 등의 내적 요인에 의해 조절된다^{3,4)}. 일광 노출 후 피부의 색소 침착은 자외선에 의한 cytokine의 분비와 함께 alpha-melanocyte stimulating

hormone (α -MSH)의 영향이 중요하며⁵⁾, α -MSH는 세포막 수용체와 결합하여 adenylyl cyclase, protein kinase A (PKA)를 통해 tyrosinase의 활성을 조절함으로써 멜라닌세포의 증식과 색소증가에 관여하는 것으로 알려져 있다^{6,7)}. 멜라닌은 tyrosine이 3,4-dihydroxyphenyl alanine(DOPA), DOPAquinone, DOPACHrome을 거쳐 멜라닌으로 합성되는데 DOPAquinone이 cysteine이나 glutathione과 같은 SH기를 갖는 저분자화합물을 만나게 되면 cysteinylDOPA가 형성되고 최종적으로 백인의 피부에 많은 pheomelanin이 된다. 그러나 DOPACHrome이 자발적으로 decarboxylation되어 dihydroxyindole(DHI)가 되면 빠르게 산화되어 indole-5,6-quinone이 된다^{8,9)}. 특정한 금속이온과 효소가 있는 경우 carboxylated intermediate인 dihydroxyindole carboxylic acid(DHICA)로, DHICA-oxidase에 의해 indole-5, 6-quinone-2-carboxylic acid로 전환되며 이후 황인종이나 흑인의 피부에 많은 eumelanin이 된다^{10,11)}. 멜라닌 색소가 형성되는 산화반응 단계에 관여하는 효소로는 tyrosinase, tyrosinase related protein 1(TRP 1)과

* Corresponding author

Yeun Ja Mun, BK21-plus Team, Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, Korea

E-mail : yjmun@wku.ac.kr ·Tel : +82-63-850-6942

Received : 2014/08/06 ·Revised : 2014/10/14 ·Accepted : 2014/10/18

© The Korean Society of Korean Pathology, The Korean Society of Korean Physiology

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529

Available online at www.hantopic.com

tyrosinase related protein 2(TRP 2)등이 있는데¹²⁾, 이 중 tyrosinase는 melanogenesis의 속도결정단계인 초기반응에 작용하고, TRP-1은 DHICA oxidase, TRP-2는 DOPA chrome tautomerase로 불린다¹³⁻¹⁵⁾. 현재까지 멜라닌 생성을 억제하는 알부틴이나 감초추출물과 tyrosinase 활동 억제 및 활성산소를 제거하여 멜라닌 생성을 억제하는 성분으로 비타민C 등의 성분들이 포함되어 있는 제품들이 많이 사용되고 있으나, 하이드로퀴논(hydroquinone)처럼 표백효과가 탁월하지만 피부병이나 백혈병을 일으킬 수 있는 부작용이 있는 미백 원료도 있다^{16,17)}. 따라서 세포독성과 자극이 적은 천연물을 이용한 멜라닌 합성 조절물질의 개발이 필요하며, 압착초 추출물은 당뇨와 혈당강하^{18,19)}에 효과가 있다고 보고된 바 있으나 피부 생리활성에 대한 압착초의 영향에 대한 연구는 미미한 실정이다. 이에 본 연구는 α -MSH에 의한 자극 유무에 따라 압착초 추출물이 멜라닌의 생성과 멜라닌관련 효소들의 발현에 미치는 영향을 조사하여 보다 안정적인 천연 화장품 미백원료로서 잠재적 가능성이 있는지 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 압착초(*Commelina communis* Ledeb)는 (주)휴먼허브에서 구입한 것으로 충북 옥천에서 재배된 것을 사용하였으며, 압착초 건조중량 300g에 에탄올 3L를 가하여 72시간 동안 실온에서 추출한 후, 거즈로 여과하여 37°C에서 감압 농축하고 동결 건조시켜 7.21g(yield 2.4%)의 시료를 얻었다. Tyrosinase 활성 및 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DMSO(demethyl sulfoxide)에 녹여 사용하였다. 추출물은 ECC(ethanol extracted of *Commelina communis*)라 나타내었다.

2. 세포 배양

B16F10 mouse melanoma 세포는 5% FBS(fetal bovine serum, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 및 1% antibiotics(penicillin-streptomycin, Gibco BRL)를 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양한 B16F10 세포를 trypsin-EDTA(Gibco BRL)를 이용하여 적정한 수의 세포를 부유시킨 뒤 각 실험에 사용하였다.

3. MTT assay

세포 생존을 측정은 Mosmann²⁰⁾방법에 의하여 실시하였다. 24 well plate에 1×10⁴ 개씩 분주하고 24시간 배양 후 시료를 6.25, 12.5, 25, 50 100 µg/mL농도로 처리한 다음 37°C, 5% CO₂ 하에서 48시간 배양하였다. 배양 후 0.05%(W/V) MTT 용액을 100 µL를 넣어 암실에서 3시간 동안 배양시켰다. MTT와 반응하여 보라색 formazen 침전물이 형성되면 상층액을 버리고 DMSO를 1mL씩 넣어 용해시킨 후 ELISA reader를 이용하여

570nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza²¹⁾의 방법으로 측정하였다. 6 well plate에 B16F10 세포를 1×10⁵ 개씩 분주하여 24시간 배양한 후, 시료를 12.5, 25 µg/mL로 처리하고 1시간 후 α -MSH(100 nM)를 처리하였다. 48시간 배양 후 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척하고, 5 mM EDTA가 포함된 0.1 M sodium phosphate buffer(SPB, pH 6.8) 1 mL에 1%(V/V) triton X-100과 0.1%(V/V) 0.1 M PMSF를 혼합한 lysis buffer를 200 µL씩 분주하고 세포를 수거하여 얼음에서 30분간 용해시킨 다음 4°C, 15,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford 시약으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 동량의 단백질 양을 계산하였으며, 계산된 단백질과 0.1 M SPB(pH 6.8)의 총량이 150 µL가 되도록 분주하고 0.1%(W/V) L-DOPA를 50 µL씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시켰으며, 30분 간격으로 475 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

5. 세포 내 멜라닌 함량 측정

멜라닌의 정량은 Hosoi 등²²⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 직경 6 cm plate에 1×10⁵ 개씩 분주하여 24시간 부착 시킨 후, 시료(12.5, 25 µg/mL)를 처리하였다. 1시간 후 α -MSH(100 nM)를 처리하고 48시간 배양하였으며, 각 군당 2×10⁶ 개씩 수거하여 lysis buffer(5 mM EDTA, 0.1 M SPB(pH 6.8), 0.1% triton X-100)로 세포를 용해하였다. 원심분리 하여 얻은 세포 침전물은 알코올로 세척한 후 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액으로 90°C에서 1시간 용해하여 405 nm로 흡광도를 측정하였다.

6. Western blot 분석

B16F10 세포를 10 cm plate에 1×10⁵ 개씩 세포를 부착시키고 12.5, 25 µg/mL씩 시료를 처리하고, 1시간 후 α -MSH(100 nM)를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 모두 수거하여 lysis buffer(1× RIPA buffer 1 mL, 1 mM PMSF, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin)로 30분간 용해시킨 후, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 단백질은 Bradford 시약을 이용하여 정량하였고, 50 µg 단백질과 2× sample buffer(1 mL glycerol, 0.5 mL β -mercaptoethanol, 3 mL 10% SDS, 1.25 mL 1 M Tris-HCl, 1~2 µg bromophenol blue)를 동량으로 혼합한 후 7.5% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. Nitrocellulose membrane로 전이시키고 5% non-fat skim milk로 blocking 시킨 후, tyrosinase, actin, TRP-1, TRP-2의 antibody를 1:500으로 희석하여 각각 실온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후, tyrosinase, actin, TRP-1 및 TRP-2는 anti-Goat polyclonal IgG HRP

conjugate 2차 antibody를 1:1000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 세척한 후 ECL 용액으로 발색 후 ChemiDoc을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

7. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균±표준편차로 표시하였고, SigmaPlot(San Jose, CA, USA)의 Student's t-test를 이용하여 p-value를 구하였으며, p<0.05인 경우 *로 표기하였고, p<0.01인 경우 **(#)#로 표기하여 유의성을 나타내었다.

결 과

1. 세포증식에 미치는 영향

압척초 추출물이 B16F10 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시료를 여러 농도로 처리하고, 48시간 배양하여 MTT assay를 실시하였다. 실험 결과 대조군(100±3.3%)과 비교하였을 때 시료 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL의 농도에서 48시간 후 각각의 생존율은 86±1.1%, 84±4.0%, 75±1.8%, 68±2.3%로 시료의 농도가 증가함에 따라 세포증식이 억제되었다. 추후 실험은 세포 생존율이 75% 이상인 12.5, 25 µg/mL 농도에서 시행하였다(Fig. 1).

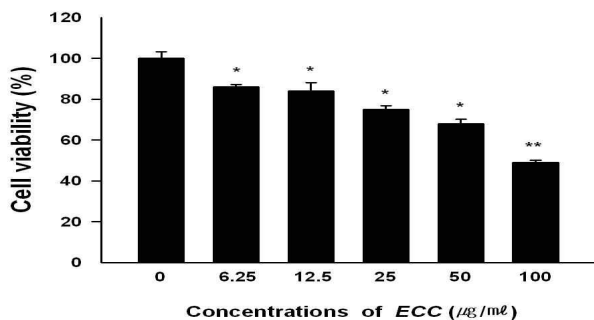


Fig. 1. Effect of ethanolic extract of *Commelina communis* Ledeb (ECC) on cell viability in B16F10. Cells were plated at 1×10^4 cells/well and incubated in media containing from 6.25 to 100 µg/mL of ECC for 48 hours. Cell viabilities were measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are means ± S.D. of triplicate determinations. *p<0.05 and **p<0.01 compared with the untreated group.

2. 세포내 tyrosinase 활성 억제 효과

압척초 추출물이 B16F10 세포의 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 시료를 12.5, 25 µg/mL 농도로 처리하고 48시간 동안 배양 후 세포를 용해시켜 tyrosinase 활성을 측정하였다. 대조군(100±1.33%)을 기준으로 압척초 추출물 12.5 µg/mL 농도에서 62.7±3.5%, 25 µg/mL에서 52.1±7.9%로 세포내 tyrosinase 활성이 현저히 감소하였다. 한편 tyrosinase inhibitor로 알려진 양성 대조군인 코직산(kojic acid)을 처리한 경우 25 µg/mL에서 92±2.7%로 나타나, 압척초 추출물이 코직산에 비하여 tyrosinase 활성 억제 효과가 우수함을 알 수 있었다(Fig. 2A). 피부의 과색소침착 조건에서 압척초 추출물의 억제 효과를 조사하기 위하여 시료와 α-MSH를

병용 처리하고 48시간 배양하여 tyrosinase 활성을 측정하였다. 실험 결과 α-MSH(100 nM) 단일처리군은 대조군(100±1.3%)에 비하여 227±4.2%로 tyrosinase의 활성이 증가하였으나, 압척초 추출물 12.5, 25 µg/mL와 α-MSH(100 nM)를 병용처리한 군은 각각 146.5±3.1%, 102.9±9.9%로 tyrosinase 활성이 현저히 감소하였다(Fig. 2B). 그러나 양성 대조군인 코직산(kojic acid) 12.5, 25 µg/mL와 α-MSH(100 nM)를 병용처리한 군은 각각 225±3.1%, 194±5.2%로 tyrosinase의 활성이 크게 감소하지 않았다. 이에 압척초 추출물의 tyrosinase 활성 억제효과는 코직산(kojic acid)보다 우수하였으며, 과색소침착 조건에서 tyrosinase 활성 억제 효과가 더욱 높은 것으로 나타났다(Fig. 2B).

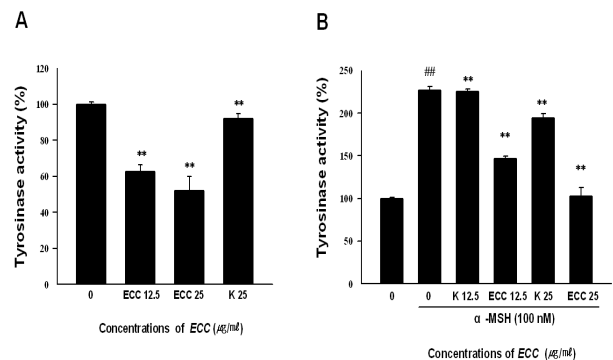


Fig. 2. Effect of ECC on the tyrosinase activity in B16F10 cells stimulated with α-MSH. Effect on tyrosinase activity was tested with various doses of ECC (A) and α-MSH in B16F10 cells for 48 hours. The cells were exposed to 100 nM α-MSH in the presence of 12.5, 25 µg/mL of ECC or 12.5, 25 µg/mL of kojic acid (B). Data are means ± S.D. of triplicate determinations. As a positive control group, the cells were treated with kojic acid (K). ##p<0.01 compared with the untreated group and **p<0.01 compared with the α-MSH (100 nM) group.

3. 멜라닌 합성 억제 효과

압척초 추출물 12.5, 25 µg/mL 농도로 처리하여 48시간 동안 배양하고, 각 군당 1×10^6 개의 세포를 수집한 다음 멜라닌 합성량을 측정하였다. 실험 결과 대조군(100±11.3%)과 비교하여 압척초 추출물 12.5 µg/mL 농도에서 66.1±6.1%, 25 µg/mL에서 52.3±6.1%로 멜라닌 양이 감소하였다(Fig. 3A). 과색소침착 조건에서 시료의 억제 효과를 조사하기 위하여 압척초 추출물 12.5, 25 µg/mL과 α-MSH를 병용 처리하여 48시간 동안 배양하고, 각 군당 1×10^6 개의 세포를 수집하여 멜라닌 양을 측정하였다. α-MSH 단일처리군은 230.1±9.6%로 대조군(100±6.8%)에 비해 약 2.3배 증가하였고, α-MSH와 압척초 추출물 12.5 µg/mL를 병용처리한 군은 159.2±8.2%, 압척초 추출물 25 µg/mL를 병용처리한 군은 133.0±9.6%로 현저히 감소하였다(Fig. 3B). 또한 멜라닌색소의 침착을 육안으로 관찰한 결과 α-MSH 처리구간과 비교 하였을 때 압척초 에탄올 추출물을 병용 처리한 구간의 멜라닌 색상이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3C). 따라서 압척초 추출물의 멜라닌 합성 억제효과는 우수하였으며, 과색소침착 조건에서 멜라닌 합성 억제 효과가 더욱 높은 것으로 나타났다.

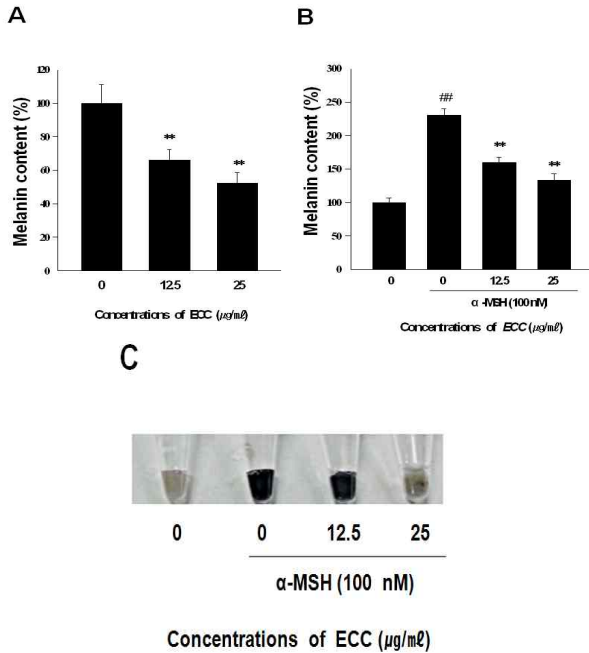


Fig. 3. Effect of ECC on melanin synthesis in B16F10 cells stimulated with α -MSH. Cells were seeded 1×10^5 cells/dish. After 24 hours, cells were treated with several concentration of ECC(A) and α -MSH (100 nM) (B & C) for 48 hours. Then, melanin contents were measured as described in materials and method. Data are means \pm S.D. of triplicate determinations. ## $p < 0.01$ compared with the untreated group and ** $p < 0.01$ compared with the α -MSH (100 nM) group.

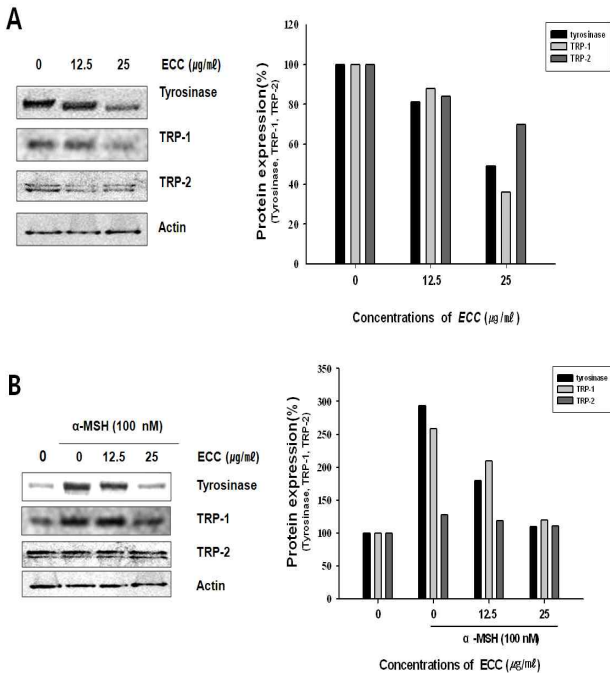


Fig. 4. Effect of ECC on melanogenic enzyme expressions in B16F10 cells stimulated with α -MSH. Cells were incubated with ECC (A) and α -MSH (B). After 48 hours, whole cell lysates were then subjected to western blot analysis using antibodies against tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 as described in Materials and Methods.

4. 멜라닌 합성관련 단백질의 발현 억제 효과

압착초 추출물이 B16F10 세포에서 tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2 단백질 발현을 조절하는지 알아보기 위해 western blot을 시행한 결과 압착초 추출물 12.5, 25 μ g/mL 농도에서 tyrosinase와 TRP-1의 발현이 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 4A). TRP-2도 감소하였으나 tyrosinase와 TRP-1 보다 미약하게 감소하였다. 또한 α -MSH로 자극한 경우 tyrosinase와 TRP-1의 발현이 3~2.5배 증가하였고, 압착초 추출물은 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 현저히 억제하였다. 그러나 TRP-2의 경우 α -MSH와 압착초 추출물에 의해 변화가 거의 없었다(Fig. 4B).

고 찰

피부는 자외선으로부터 인체를 보호하기 위하여 멜라닌세포 내에서 멜라닌을 합성하고, 합성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동한 후 일정 시간이 지나면 각질층의 탈락과 함께 배출된다. 멜라닌 색소 침착을 일으키는 대표적인 요인은 일광이며, 피부를 구성하고 있는 각질형성세포, 멜라닌세포, 섬유아세포는 염증세포의 출현, prostaglandin, cytokine, α -MSH의 변화 등이 서로 연관되어 종합적으로 색소침착이 조절 된다^{23,24}. 본 실험 결과 압착초 추출물은 B16F10 세포에서 tyrosinase 활성화와 멜라닌합성을 현저히 억제하였으며, 또한 압착초 추출물의 tyrosinase 활성화 억제효과는 코직산(kojic acid)보다 우수한 것으로 나타났다

피부는 자외선에 의해 멜라닌 생성이 촉진되는데, 특히 UVB는 표피의 각질형성세포(keratinocyte)에서 α -MSH, basic fibroblast growth factor(bFGF), endothelin-1(ET-1), leukotriene C4 (LTC4), prostaglandin E₂(PGE₂)의 생성과 분비를 촉진한다^{23,24}. 그 중 α -MSH는 멜라닌 세포의 증식을 유도하고, tyrosinase를 비롯한 멜라닌 합성 관련 효소들의 발현을 촉진하여 멜라닌의 생성을 증가시킨다고 보고되었다. 따라서 본 실험에서 α -MSH로 과색소 침착을 유도하여 압착초 추출물의 미백효과를 조사하였다. 실험결과 압착초 추출물은 tyrosinase 활성화와 멜라닌의 합성을 억제하였으며, 과색소침착 조건에서 억제효과가 더욱 높은 것을 알 수 있었다.

α -MSH는 세포막 수용체(melanocortin receptor 1, MC1R)와 결합하여 Gs 단백질을 활성화시키고, 이차적으로 adenylate cyclase 활성화에 의해 cAMP와 protein kinase A(PKA), CREB을 거쳐 전사인자 microphthalmia transcription factor(MITF)의 발현을 증가시킨다. 전사인자 MITF는 핵으로 이동하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 유전자 promotor에 결합하고 이들의 유전자 발현을 증가시켜 melanogenesis를 촉진하는 것으로 알려져 있다²⁵. 본 실험결과 압착초 추출물은 tyrosinase와 TRP-1의 단백질 발현을 억제하였고, 과색소침착 조건에서 억제효과가 더욱 높은 것을 알 수 있었다. 종합적으로 압착초 추출물은 멜라닌세포에서 tyrosinase 효소 활성화 및 단백질 발현을 억제함으로써 멜라닌의 합성이 감소되었으며, 이러한 멜라닌 합성 억제 효과는 과색소

침착 조건에서 더욱 효과적임을 알 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 α -MSH에 의한 자극 유무에 따라 멜라닌의 생성과 멜라닌관련 효소들의 발현에 미치는 압적초 추출물의 영향을 조사하였다. 압적초 추출물은 B16F10 세포의 멜라닌 합성과 tyrosinase의 활성을 억제하였으며, 과색소침착 조건에서 억제 효과가 더욱 높은 것으로 나타났다. 또한 동일한 농도에서 tyrosinase inhibitor로 알려진 kojic acid 보다 압적초 추출물의 억제 효과가 우수하였다. 멜라닌 합성 관련 단백질들의 발현을 조사한 결과 압적초 추출물은 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 억제하였다. 본 실험결과 압적초 추출물은 멜라닌세포에서 멜라닌의 생성과 tyrosinase 효소 활성 및 단백질 발현을 억제하여 미백 소재 개발에 긍정적인 가능성이 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2013년 원광대학교 교비의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

References

1. Wang, G.P., Deng, M.Y., Zhou, G.X., Huang, M.Y., Ye, W.C., Ye, C.L. Detection for α -glucosidase-inhibiting polyhydroxyalkaloid ingredients of *Commelina communis* L. by ESIMS. *Zhong Yao Cai* 30(2):157, 2007.
2. Kim, O.K., Park, S.Y., Cho, K.H. Effect of *Commelina communis* Extract on Blood Glucose Level and Changes in Enzymatic Activity in Alloxan-Diabetic Rats. *Kor J Pharmacogn* 22: 225-232, 1991.
3. Yamaguchi, Y., Hearing, Y.J. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* 35: 193-199, 2009.
4. Cho, H.R., Kang, K.A., Bhuiyan, M.H., Oh, M.S., Lee, M.H., Kim, Y.J. Antimelanogenic effect of Pini Nodi Lignum extract in HM3KO melanoma cells. *Mol cell Toxicol* 7: 135-139, 2011.
5. Kim, D.S., Sung, B.G., Lee, J.C., Lee, B.K., Woo, W.H., Lim, K.S. Inhibitory Effect of *Belamcandae Rhizoma* on the Melanogenesis in MSH-stimulated B16F10 cells. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology* 24(1):25-35, 2011.
6. Park, S.Y., Jin, M.L., Kim, Y.H., Kim, Y.H., Lee, S.J. Aromatic-turmerone inhibits α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by inactivating CREB and MITF signaling pathways. *Archives of Dermatological Research* 303(10):737-744, 2011.
7. Park, S.Y., Kim, Y.H., Kim, Y.H., Park, G.T., Lee, S.J. Beta-carboline alkaloids harmaline and harmalol induce melanogenesis through p38 mitogen-activated protein kinase in B16F10 mouse melanoma cells. *Journal of biochemistry and molecular biology Reports* 43(12):824-829, 2010.
8. Funasaka, Y., Chakraborty, A.K., Komoto, M., Ohashi, A., Ichihashi, M. The depigmenting effect of alpha-tocopheryl ferulate on human melanoma cells. *British Journal of Dermatology* 141(1):20-29, 1999.
9. Hearing, V.J., Jiménez, M. Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *The International journal of biochemistry* 19: 1141-1147, 1987.
10. Kameyama, K., Takemura, T., Hamada, Y., Sakai, S., Kondoh, S., Nishiyama, S., Urabe, K., Hearing V.J. Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1(TRP1), DOPAchrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor. *The Journal of investigative dermatology* 100: 126-131, 1993.
11. Huang, H.C., Hsieh, W.Y., Niu, Y.L., Chang, T.M. Inhibition of melanogenesis and antioxidant properties of *Magnolia grandiflora* L. flower extract. *BMC Complement Altern Med* 12, 2012.
12. Gismondi, A., Canuti, L., Impei, S., Di Marco, G., Kenzo, M., Colizzi, V., Canini, A. Antioxidant extracts of African medicinal plants induce cell cycle arrest and differentiation in B16F10 melanoma cells. *International Journal of Oncology* 43: 956-964, 2013.
13. Kim, A.Y., Yim, N.H., Im, M.J., Jung, Y.P., Liang, Chun, Cho, W.K., Ma, J.Y. Ssanghwa-tang, an oriental herbal cocktail, exerts anti-melanogenic activity by suppression of the p38 MAPK and PKA signaling pathways in B16F10 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13: 214, 2013.
14. Chan, Y.Y., Kim, K.H., Cheah, S.H. Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology* 137: 1183-1188, 2011.
15. Jang, J.Y., Kim, H.N., Kim, Y.R., Kim, B.W., Choi, Y.H., Choi, B.T. Studies of Inhibitory Mechanism on Melanogenesis by Partially Purified *Asiasari radix* in α -MSH Stimulated B16F10 Melanoma Cells. *Journal of Life Science* 20: 1617-1624, 2010.

16. Chung, K.W., Park, Y.J., Choi, Y.J., Park, M.H., Ha, Y.M., Uehara, Y., Yoon, J.H., Chun P, Moon HR, Chung, H.Y. Evaluation of in vitro and in vivo anti-melanogenic activity of a newly synthesized strong tyrosinase inhibitor (E)-3-(2,4 dihydroxybenzylidene) pyrrolidine-2,5 -dione (3-DBP). *Biochim. Biophys. Acta* 1820: 962-969, 2012.
17. Tsanga, T.F., Yea, Y., Wiliam, C.S., Taia, Choub, G.X. Inhibition of the p38 and PKA signaling pathways is associated with the antimelanogenic activity of Qian-wang-hong-bai-san, a Chinese herbal formula, in B16 cells. *J Ethnopharmacol* 141: 622-628, 2012.
18. Kim, O.K., Park, S.Y., Cho, K.H. Effect of *Commelina communis* Extract on Blood Glucose Level and Changes in Enzymatic Activity in Alloxan-Diabetic Rats. *Korean Journal of Pharmacognosy* 22: 225-232, 1999.
19. Han, H.K., Lim, S.J. Effects of Fractions from Methanol Extract of *Commelina communis* on Blood Glucose Levels and Energy Metabolism in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Korean Society of Food & Cookery Science* 14: 577-583, 1998.
20. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
21. Martnez-Esparza, M., Jimnez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, Garcia-borron, J.C. Mechanisms of melano- genesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem* 255: 139-146, 1998.
22. Hosoi, J., Abe, E., Suda, T., Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Research* 45: 1474-1478, 1985.
23. Gillian H., Carole T., Janet, E., Cresswell and Anthony, J., Thody. Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *Journal of Cell Science* 107: 205-211, 1994.
24. Denise, J. Schwahn, Weidong, X.u., Amey, B., Herrin, Elise, S., Bales, Estela, E. Medrano. Tyrosine levels regulate the melanogenic response to alpha-melanocyte- stimulating hormone in human melanocytes : implications for pigmentation and proliferation. *Pigment Cell Research* 14: 32-39, 2001.
25. Lin, C.B., Babiarz, L., Liebel, F., Roydon, P., Kizoulis, M., Gendi menico. G.J., Fisher, D.E. and Seiberg, M. Modulation of microphthal mia-associated transcription factor gene expression alters skin pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* 119: 1330-1340, 2002.