

B16 마우스 흑색 종양 세포에서 빈랑(*Areca catechu*) 추출물이 티로시나아제 유전자에 미치는 효과

진종언* · †조남철

*동강대학 피부미용과, †동강대학 호텔조리영양과

The Effects of *Areca catechu* Extracts on Tyrosinase Gene Expression in B16 Mouse Melanoma Cells

Jong-Eon Chin* and †Nam-Chul Cho

*Dept. of Cosmetology, Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea

†Dept. of Hotel Culinary Arts & Nutrition, Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea

Abstract

In this study, we found that the methanolic extract of *Areca catechu* repressed expression of the tyrosinase gene in B16 mouse melanoma cells containing a tyrosinase promoter. Extract concentrations of 100 $\mu\text{g/ml}$ and 500 $\mu\text{g/ml}$ exhibited tyrosinase gene expression rates of approximately 62% and 48%, respectively, compared to the control. The fraction layers consisting of ethyl acetate, butyl alcohol, and water showed repressive effects on the tyrosinase gene. In particular, the butyl alcohol fraction highly repressed at 100 $\mu\text{g/ml}$ and 500 $\mu\text{g/ml}$. In the MTT assay, the methanolic extracts exhibited very low cytotoxicities at 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, and 100 $\mu\text{g/ml}$.

Key words: *Areca catechu*, B16 mouse melanoma cells, tyrosinase gene, expression.

서론

빈랑은 종려과(Palmae)에 속하는 빈랑나무(*Areca catechu*)의 성숙한 과실을 건조한 것으로 종자에는 arecoline, arecolidine, guvacoline 등과 같은 alkaloid 성분들이 함유되어 위장 보호, 타액 분비, 살충, 항진균, 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있어 예로부터 소화액의 분비, 위장의 연동 운동 촉진, 유해 세균에 의한 장내 질환 치료 목적으로 이용되어 왔다^{1,2)}. 최근에는 항암, 혈전증 예방, 티로시나아제 효소 활성 저해 등의 효과가 있는 것으로도 보고되고 있어 의약품 및 화장품 원료로서 그의 응용 연구가 이루어지고 있으며³⁻⁵⁾, 또한 천연 염료의 원료로서도 연구가 이루어지고 있다⁷⁾.

오늘날 사람들은 직장 생활을 비롯한 각종 사회 활동 및

여가 생활의 증가로 인하여 유해한 자외선에 피부가 과다 노출됨으로서 색소 침착을 비롯하여 홍반, 피부 종양, 노화 등 각종 피부 트러블의 원인이 되고 있어 피부 건강 및 미용학적인 측면에서 심각한 문제를 야기하고 있다. 특히 멜라닌 색소는 색소 침착의 주 원인이 되고 있어 그에 대한 관심이 날로 높아지고 있는 추세이다. 사람의 경우, 멜라닌 색소는 피부색을 결정할 뿐만 아니라 유해한 자외선으로부터 인체를 보호하는 역할을 담당하고 있어 매우 중요하다. 이 색소는 피부의 표피층 가장 안쪽인 기저층에 존재하는 멜라닌 생성 세포(melanocyte cell)가 자외선을 비롯한 각종 자극에 의해 활성화됨으로서 합성되어진다. 멜라닌의 생합성은 티로시나아제(tyrosinase), DHICA oxidase, DOPA chrome tautomerase, catechol-O-methyltransferase 등의 주요 효소들에 의하여 조절되고 있는 것으로 알

† Corresponding author: Nam-Chul Cho, Dept. of Hotel Culinary Arts & Nutrition, Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea
Tel: +82-62-520-2409, Fax: +82-62-520-2509, E-mail: chonam59@hanmail.net

려져 있다⁷⁻⁹). 지금까지 멜라닌 색소의 생합성을 억제하는 물질에 대한 연구는 주로 멜라닌 색소의 생합성 초기 반응에 관여하는 티로시나아제 효소의 활성을 조절하는 수준에서 이루어져 현재 티로시나아제 효소의 활성을 저해 효과가 있는 수많은 식물 추출물과 물질들이 보고되었다¹⁰⁻¹⁵). 그러나 이들은 멜라닌 색소의 생합성 억제 효과가 낮고 지속성이 짧다는 단점을 지니고 있어 희고 아름다운 피부를 갈망하는 소비자들의 불만이 되고 있다. 최근, 이러한 단점을 근본적으로 보완하기 위하여 멜라닌 색소의 생성과 관련된 유전자의 발현 조절 기작, 멜라닌 색소의 생성 활성을 제어하는 사이토카인 네트워크, 멜라닌 색소의 생합성에 관여하는 효소의 유전자 발현을 조절하는 물질 탐색 및 분리와 연구들이 활발하게 이루어지고 있으나 멜라닌 색소 생합성과 관련된 효소의 유전자 발현을 억제하는 천연 물질에 관한 연구 결과는 아직까지 Chin 등¹⁶⁻¹⁸)과 Cho 등¹⁹), Lee 등²⁰)의 보고를 제외하고는 거의 없다. 따라서 천연물을 이용하여 멜라닌 색소의 생합성을 근본적으로 조절하는 물질에 대한 연구 개발이 필요하다.

본 연구는 유전자 발현 조절 수준에서 멜라닌 색소 생합성을 억제하는 물질을 탐색하고자 티로시나아제 효소 저해 효과가 있는 것으로 보고된 빈랑으로부터 물질을 추출·분획하여 형질 전환된 B16 마우스 흑색 종양 세포에 처리하여 티로시나아제 유전자의 발현 및 세포 독성에 미치는 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 빈랑은 광주 시내 진원당 한약방에서 구입하여 감정한 후 사용하였으며, 표준품은 동강대학 향장품 연구실에 보관하였다.

2. 추출 및 분획

시료의 추출은 건조된 생약을 세절하여 0.1 kg씩을 취한 다음 메탄올을 첨가하여 실온에서 1주일 동안 정치시킨 후 3회 추출 및 여과하였다. 여과액은 감압농축하여 동결 건조시킨 후 분말 형태로 제조하였다. 그리고, 용매 분획은 농축하여 분말화한 메탄올 추출물을 증류수로 현탁한 다음, 극성도가 서로 다른 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 등을 이용하여 4개의 층으로 분획하여 농축 및 동결 건조 방법을 통해 분말 형태로 제조하였다.

3. 시료 제조

분말로 된 빈랑 추출물 및 분획물 100 mg에 에탄올과 디메틸설포옥사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)가 1:1로 혼합된

용매 1 ml 씩을 가하여 완전히 용해시킨 후 여과한 다음 이용하였다.

4. 세포 배양

B16 마우스 흑색 종양 세포(ATCC CRL 6323)는 10%(w/v)의 Fetal Bovine Serum (FBS, GibcoBRL), 1%(w/v) Antibiotic (Gibco BRL), 그리고 2 mM의 L-Glutamine이 포함된 RPMI Medium 1640(Gibco BRL)에서 CO₂ 분압을 5%로 조절하여 37°C에서 배양하였으며, 세포는 36~48 시간 주기로 계대배양하여 유지하였다.

티로시나아제 프로모터를 도입하여 형질 전환된 B16 마우스 흑색 종양 세포는 위의 RPMI Medium 1640 완전 배지에 neomycin analogue인 Geneticin 418(200 µg/ml)을 가한 선택 배지를 이용하여 유지하였다.

5. 세포내 유전자 도입(Stable Transfection)

B16 마우스 흑색 종양 세포 내에 티로시나아제 프로모터가 삽입된 유전자를 도입하기 위해 LipofectAMINE(Life Technologies Inc.)을 이용한 다음과 같은 방법으로 stable transfection을 실시하였다.

1) 세포내 유전자 도입

B16 마우스 흑색 종양세포를 RPMI Medium 1640 평판 배지에 세포수가 3~4×10⁵가 되도록 접종한 후 24시간 배양한 다음, 배양액 1 ml에 6 µl LipofectAMINE과 2 µg의 total plasmid DNA를 5시간 처리함으로써 형질전환을 실시하였다.

Plasmid DNA는 luciferase gene을 지닌 pGL2-basic vector (Promega)의 *Sma*I site에 1.5 Kb의 neomycin 저항성 유전자를 삽입한 다음 1 Kb의 사람 티로시나아제 프로모터를 *Eco*RI/*Kpn*I site에 클로닝을 하였다.

2) 형질 전환된 세포의 선별

Stable transfection 처리 5시간 후 B16 mouse melanoma cell로부터 LipofectAMINE 시약과 재조합된 DNA가 함유된 배지를 제거한 후 콜로니가 형성될 때까지 neomycin analogue인 Geneticin 418(600 µg/ml)이 들어있는 선택 배지에서 배양한 후 형질 전환된 B16 마우스 흑색 종양 세포를 선별하였다.

6. Luciferase 활성도 측정

세포내 유전자 도입을 통해 얻은 B16 마우스 흑색 종양 세포의 형질전환 유무를 확인하기 위하여 luciferase 활성도를 측정하였다. 형질 전환을 통하여 얻은 콜로니들을 Trypsin-EDTA를 처리하여 떼어낸 후 24 well plate에 세포수가 well당 6×10⁴되게 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 세포들

은 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 세척한 다음 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 그리고 2 mM dithiothreitol이 함유되어 있는 pH 7.8의 25 mM tris-phosphate 완충용액으로 용해하였다. 용해된 세포들을 취하여 원심분리한 다음 얻어진 상등액에 대해 Luminometer(Lumat LB 9507, Berthold)를 이용하여 luciferase 활성도를 측정하였으며, luciferase 활성도가 가장 높게 나타난 B16 마우스 흑색 종양세포를 선별하여 이용하였다.

7. 티로시나아제 유전자 발현능 측정

형질 전환된 B16 마우스 흑색 종양세포를 RPMI Medium 1640 완전 배지가 들어 있는 24 well plate에 세포수가 well당 6×10^4 되게 접종한 다음 24시간 동안 전배양하였다. 그 후 각각의 well에 빈랑 메탄을 추출물과 용매 분획물들을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 6시간 동안 처리한 다음 luciferase 활성도를 측정하여 티로시나아제 유전자의 발현에 미치는 효과를 조사하였다.

8. 세포 독성 측정

B16 마우스 흑색 종양 세포를 RPMI Medium 1640 완전 배지가 들어 있는 96 well plate에 세포수가 well당 $1 \sim 1.2 \times 10^4$ 되게 접종한 다음 24시간 동안 배양하였다. 그 후 빈랑 메탄을 추출물을 각각의 well에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 그리고 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 6시간 동안 처리한 다음 Mosmann²¹⁾의 방법에 따라 ELISA(Bio-Tek Inc.) 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 독성을 평가하였다.

결과 및 고찰

1. 추출 및 분획물질의 양

빈랑으로부터 유용성 성분들을 얻기 위하여 메탄올을 첨가한 다음 실온에서 1주일 동안 정치시키는 조건하에서 추출 및 농축을 3회 반복한 결과 12.8 g의 물질을 얻었다. 이를 극성도가 다른 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 등의 4가지 용매로 분획·농축하여 각각 약 2.3 g, 2.7 g, 2.4 g, 4.7 g을 얻었다.

2. 추출물의 티로시나아제 유전자 발현능

빈랑의 메탄올 추출물을 티로시나아제 프로모터 유전자가 도입된 B16 마우스 흑색 종양세포에 처리한 결과, 티로시나아제 유전자의 발현능은 추출물의 처리 농도에 따라 다르게 나타났다(Fig. 1). 즉 빈랑 메탄올 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 저농도로 처리하였을 때에는 티로시나아제 유전자의

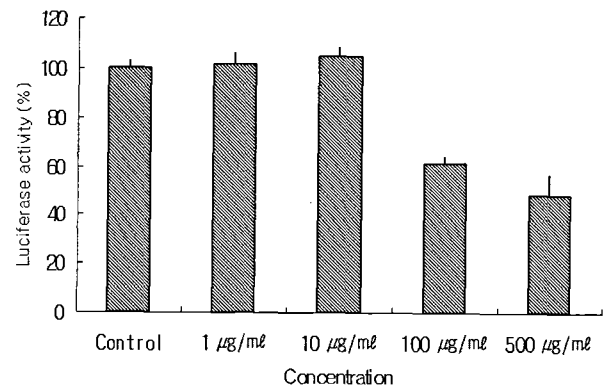


Fig. 1. Effects of *Areca catechu* extract on the tyrosinase promoter in B16 mouse melanoma cells. Transfected B16 melanoma cells were incubated in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated *Areca catechu* extract for 6 hr. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at $13,000 \times g$ for 2~3 min. The supernatants were used for luciferase assay. Values are the means of results from triplicate experiments.

발현에 영향을 주지 못하였으나, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도로 처리하였을 때에는 발현율이 대조군의 각각 약 62%와 48%로 억제하는 효과를 나타내었다. 그리고, 티로시나아제 유전자의 발현을 50% 이상 억제하는 농도(IC₅₀)는 약 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 이는 티로시나아제 유전자 발현 억제 효과가 있다고 기존에 보고된 어성초¹⁷⁾, 울피¹⁸⁾, 지치²⁰⁾ 등의 메탄올 추출물보다는 낮았지만 양파 메탄올 추출물¹⁹⁾보다는 우수한 효과를 보여주었다. 또한, 비록 효소의 활성을 조절하는 수준에서의 연구 결과이지만 빈랑 메탄올 추출물은 Park 등³⁾의 연구에서도 티로시나아제 효소의 활성을 저해하는 효과가 우수한 것으로 보고되었으며, 50% 이상 저해하는 농도가 0.29 mg/ml로 티로시나아제 프로모터의 발현을 50% 이상 억제하는 농도와 거의 유사하게 나타났다. 따라서, 빈랑 메탄올 추출물은 티로시나아제 효소의 활성을 저해하는 효과를 지니면서도 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 효과를 지니고 있는 것으로 추측된다.

빈랑의 메탄올 추출물을 극성이 서로 다른 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 등의 용매로 분획하여 얻은 물질들을 형질 전환된 B16 마우스 흑색 종양 세포에 처리한 결과, 그 효과는 용매 분획물 및 처리 농도에 따라 다른 결과를 보여 주었다(Table 1). 비극성도 가장 높은 디클로로메탄 용매 분획물은 Table 1에서 보여 주듯이 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 효과가 없었으며, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 광학 현미경상에서 세포가 고사되어 부유될 정도로 독성이 심하여 luciferase

Table 1. Effects of solvent fraction layer of *Areca catechu* on the tyrosinase promoter in B16 mouse melanoma cells

Solvent fraction layer	Luciferase assay (%)			
	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Dichloromethane layer	102 \pm 4.1	106 \pm 3.5	100 \pm 6.7	N.D. ¹⁾
Ethyl acetate layer	91 \pm 8.2	70 \pm 6.6	69 \pm 3.2	55 \pm 5.1
Butyl alcohol layer	96 \pm 3.4	80 \pm 6.6	43 \pm 2.5	27 \pm 8.7
Water layer	95 \pm 3.6	77 \pm 7.3	52 \pm 6.2	51 \pm 3.9

¹⁾ N.D.: Not determined. Values are the means of results from triplicate experiments,

* Transfected B16 melanoma cells were incubated with 6×10^4 in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated solvent fractions of *Areca catechu* for 6 hr. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at $13,000 \times g$ for 2~3 min. The supernatants were used for luciferase assay.

활성도를 측정하는 것이 불가능하였다. 그러나 에틸아세테이트, 부탄올, 물 등의 3가지 용매 분획물들은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 티로시나아제 유전자 발현을 억제하는 효과가 매우 미미하였으나 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 이상에서는 그의 억제 효과가 증가하기 시작하였으며, 그의 억제 효과는 추출물의 처리 농도에 비례하였다. 그리고 이 3가지 용매 분획물들의 티로시나아제 유전자 발현 억제 효과는 메탄올 추출물과 유사하거나 높게 나타났다. 특히, 부탄올 용매 분획물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 티로시나아제 유전자의 발현율이 각각 약 43%와 27%로 매우 높은 억제 효과를 나타내었다.

본 연구 결과를 통해서 티로시나아제 효소의 활성 저해 효과가 있다고 알려진 빈랑 추출물 내에는 멜라닌 색소 생합성 관련 효소인 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 성분들도 함유되어 있다는 것이 입증되었다. 따라서 이를 산업적으로 응용하기 위해서는 추출물 형태로 보다는 용매 분획물 형태로 이용하는 것이 보다 효율적이라 판단된다.

3. 빈랑 추출물의 세포 독성

B16 마우스 흑색 종양세포에 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 효과를 나타낸 빈랑 메탄올 추출물을 처리하여 MTT assay를 실시 한 결과 추출물의 처리 농도에 따라 다르게 나타났다(Fig. 2). 즉, 빈랑 메탄올 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도로 처리하였을 때에는 세포의 활성능이 대조군 세포와 유사한 결과를 보여주어 세포 독성이 매우 낮은 것으로 확인되었다. 그러나, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도로 처리하였을 때에는 세포의 활성능이 약 58%로 세포 독성을 나타내었다. 이 결과를 통해서 볼 때 빈랑의 메탄올 추출물을 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 고농도로 처리하였을 때의 티로시나아제 유전자의 발현 억제효과는 세포 독성과도 밀접한 관련이 있는 것으로 생각되어진다. 따라서 빈랑 추출물을 티로시나아제 유전자의 발현을 조절하여 멜라닌 색소의 생합성을 억제하는 목적으로

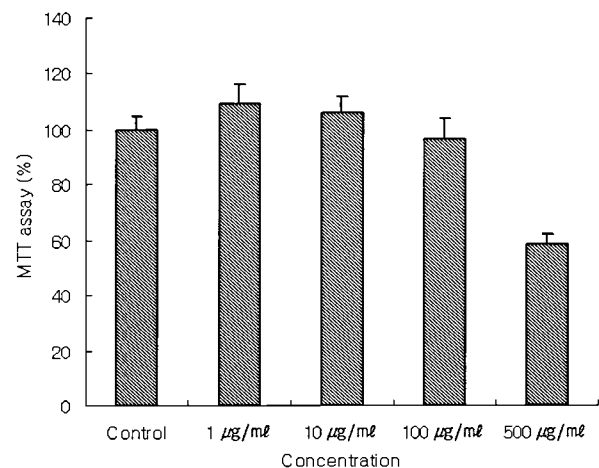


Fig. 2. Cytotoxicity of *Areca catechu*, extracts on B16 mouse melanoma cells. B16 melanoma cells were incubated with $1.0 \sim 1.2 \times 10^4$ in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated with *Areca catechu* extract for 6 hr. Then, the cells were used for MTT assay. Values are the means of results from triplicate experiments.

이용하기 위해서는 세포 독성을 고려하여 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 이하로 이용하는 것이 바람직하다.

요약 및 결론

유전자 발현 조절수준에서 멜라닌 색소의 생합성을 억제하는 천연 물질을 탐색하고자 빈랑으로부터 유용성 물질을 추출 및 분획하여 티로시나아제 프로모터를 지닌 B16 마우스 흑색 종양 세포에 처리한 결과, 그 메탄올 추출물의 티로시나아제 유전자 발현율은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군 세포에 비해 각각 약 62%와 48%로 억제하는 효과를 보여 주었다. 용매 분획물들을 세포에 처리하였을 때 디클로로메탄 용매 분획물은 티로시나아제 유전자의 발현을 억제

하는 효과가 없었지만, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 등의 용매 분획물들은 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도로 세포에 처리하였을 때 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하는 효과를 나타내었다. 특히, 부탄올 용매 분획물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 발현율이 각각 약 43%와 27%로 매우 높은 억제 효과를 나타내었다. 빈랑 메탄올 추출물을 B16 마우스 흑색 중앙 세포에 처리한 다음 MTT assay를 실시한 결과 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 세포 독성이 매우 낮게 나타났으나, 500 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 세포 활성능이 약 58%로 높은 세포 독성을 나타내었다. 본 연구 결과, 빈랑 추출물 내에는 티로시나아제 효소의 활성을 저해할 뿐만 아니라 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 성분들도 함유되어 있는 것으로 추측된다. 그러나 빈랑 추출물을 미백을 목적으로 산업적으로 활용하기 위해서는 앞으로도 보다 많은 연구가 필요하다.

참고문헌

- Lee, KS, Kim, SH, Kim, SS, Park, SS, Chun, JY and Shin YS. Antimicrobial activity of herbs related with treatments of intestinal diseases against intestinal pathogens. *Kor. J. Food Nutr.* 11:31-35. 1998
- Lee, KS, Kim, SH, Chun, SH, Park, SS, Park, JS and Shin, YS. Antimicrobial activity of *Areca catachu* L. extract of against intestinal pathogens. *Kor. J. Food Nutr.* 11:36-40. 1998
- 학교법인고려중앙학원. 암세포에 대한 다중약제내성조절 용 빈랑 추출물 및 그 제조방법. 특허공보(등록번호: 2002-0009123). 2002
- 안동대학교 산학협력단. 빈랑자 추출물을 함유하는 트롬빈 저해 혈전증 예방 및 치료용 조성물. 특허공보(등록번호: 10-0674602). 2007
- Park, JH, Shin, YG, Shin, UK, Baek, SK, Lee, SK, Chung, MH and Park, YI. Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji* 41:518-523. 1997
- Bae, JS. Dyeing properties of cotton and wool fabrics with betel palm tree. *Kor. Home Economics Association.* 42:63-72. 2004
- Aroca, P, Urabe, K, Kobayashi, K, Taskamoto, K and Hearing, VJ. Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* 268:25650-25655. 1993
- Paval, S. Dynamics of melanogenesis intermediates. *J. Invest. Dermatol.* 100:162S-165S. 1993
- Jimenez-Cervantes, C, Solano, F, Kobayashi, T, Urabe, K, Hearing, VJ, Lozano, J and Garcia-Borron, C. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. *J. Biol. Chem.* 269:17993-18001. 1994
- Choi, BW, Lee, BH, Kang, KJ, Lee, ES and Lee, NH. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Pharm.* 29:237-242. 1998
- Baurin, N, Arnoult, E, Scior, T, Do, QT and Bernard, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J. Ethnopharmacol.* 82:155-158. 2002
- Tomohiro, Y, Hiroyuki, N, Yasuo, K and Masako, M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res.* 11:355-361. 1998
- Isao, Kubo and Ikuyo, Kinsh-Hori. 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyde a potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants. *Planta Medica.* 65:19-22. 1999
- Lee, SH, Choi, SY, Kim, HC, Hwang, JS, Lee, BG, Gao, JJ and Kim, SY. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 25:1045-1048. 2002
- Lee, KT, Lee, KS, Jeong, JH, Jo, BK, Heo, MY and Kim, HP. Inhibitory effects of *Ramulus mori* extracts on melanogenesis. *J. Cosmet. Sci.* 54:133-142. 2003
- Chin, JE, Sun, HS, Lee, KJ, Choi, TJ, Ko, YS, Sohn, HJ, Kim, JJ, Jeon, BH and Lee, BH. Inhibitory effects of some medicinal plant extracts on the tyrosinase promoter activity on B16 mouse melanoma cells. *International J. Oriental Medicine.* 1:6-13. 2000
- Chin, JE and Cho, NC. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on tyrosinase gene expression. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 34:1284-1288. 2005
- Chin, JE and Kim, KC. Effect of chestnut bark extracts on tyrosinase gene expression. *Kor. J. Sanitation* 20:10-16. 2005
- Cho, NC, Yoon, YH, Lee, HJ, Shon, HJ, Kim, YK, Choi, KH, Ra, MS, Cho, YK, Lee, BH and Chin, JE. Effect of onion(*Allium cepa* L.) extract on tyrosinase gene expression. *Kor. J. Food & Nutr.* 14:228-232. 2001
- Lee, HB, Bai, S and Chin, JE. Inhibitory effect of *Lithospermum erythrorhizon* extracts on melanin biosynthesis. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 34:1325-1329. 2005
- Mosmann, TJ. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay. *Immunol. Methods* 63:55-63. 1983

(2007년 4월 30일 접수; 2007년 5월 30일 채택)