

알러지 유발 단백질이 제거된 수용성 로열젤리의 피부미백 효과

한상미* · 김정민 · 김세건 · 장혜리 · 여주홍 · 홍인표 · 우순옥
농촌진흥청 국립농업과학원

Whitening Efficacy of Water Soluble Royal Jelly Removed Allergenic Protein

Sang Mi Han*, Jung Min Kim, Se Gun Kim, Hye Ri Jang, Joo Hong Yeo,
In Pyo Hong, and Soon Ok Woo

National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju 565-851, Korea

Abstract – Royal jelly composes of many components, especially protein. Protein is a major factor which cause allergy. We focused on water soluble royal jelly (WSRJ) that was removed allergy - inducing protein. 10-hydroxy-2-decenoic acid content of WSRJ is 2.42 g/100 g, which is double compared to that of lyophilized RJ. To further access WSRJ as a cosmetic ingredient and potential external treatment for topical use, we investigated its ability to inhibit tyrosinase activity and melanin biosynthesis on melanogenesis in B16F1 melanoma cells. We found that WSRJ increased the cell viability in B16F1 melanoma cell and WSRJ (1~10 mg/ml) inhibited melanin synthesis in with 10 nM α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) for 48 h. WSRJ inhibited direct tyrosinase activity, which decreased melanin synthesis in α -MSH stimulated B16F1 melanoma cells. These findings suggest that WSRJ induces the down regulation of melanogenesis by inhibiting tyrosinase activation.

Key words – Royal jelly, soluble protein, tyrosinase, melanin, B16F1

로열젤리는 꿀과 화분을 일벌들이 소화 흡수한 뒤 인두부를 경유해서 만들어지는 물질로서 봉군 내 어린 유충 및 여왕벌 유충의 먹이로 사용된다. 로열젤리는 유백색의 크림형태로 산성이며, 다소 자극성 냄새를 갖고 있다. 그 화학적 조성은 수분(50~60%), 단백질(18%), 탄수화물(15%), 지질(3~6%), 무기염(1.5%) 그리고 비타민과 10-HDA(10-hydroxy-2-decenoic acid)와 같은 생리활성물질과 펩티드로 이루어져 있다고 알려져 있다.^{1,4)} 로열젤리는 꿀벌의 난소발육과 몸의 크기를 증가시키며, 발육시간을 단축시키는 기능을 한다. 오래전부터 전 세계적으로 로열젤리는 강장제와 같은 기능성 식품으로 널리 사용되고 있으며, 항암, 항피로, 항고혈압과 같은 약리적 효과를 검증하기 위한 연구가 활발히 행해지고 있다.^{2,5-7)} 특히 아시아 지역에서는 화장품, 건강보조제 및 음료 등의 시장으로 크게 확대되고 있으며, 이는 아미노산, 지방산, 비타민, 무기물과 같은 많은 영양물질을 함유하는 로열젤리의 성분이 피부상태를 개선하고 유지하는 데 도움이 되는 것으로 알려져 있기 때문이다.^{1,8-9)} 그러나, 로열젤

리는 몇몇 연구에서 급성 기관지천식, 피부 과민증 그리고 대장염을 유발하는 것으로 알려져 있으며,¹⁰⁻¹²⁾ 수용성 단백질 1번(분자량 55 kDa)과 2번(47 kDa) 단백질이 알러지를 유발시키는 주요 단백질로 보고되었다.¹³⁾ 이러한 문제점을 해결하기 위하여 알러지를 유발할 수 있는 단백질을 제거한 수용성 로열젤리가 개발되었다.¹⁴⁾ 또한, 국내산 로열젤리가 피부 멜라닌세포의 세포내 tyrosinase mRNA 전사를 억제함으로써 tyrosinase 활성화와 멜라닌 합성을 감소시키는 것으로 확인하고, 미백관련 기능성 소재로서 활용가치가 높은 것으로 보고한바 있다.¹⁵⁾

따라서, 본 연구에서는 알러지를 유발할 수 있는 단백질을 제거한 수용성 로열젤리의 멜라닌 생성 억제효과를 확인하여 미백 기능을 갖는 다양한 화장품 및 식의약소재로 개발 가능성을 보여주고자 하였다.

재료 및 방법

공시시료 – 시험용 로열젤리는 2013년 강원도 철원지역에서 생산된 생 로열젤리를 사용하였고, 알러지 유발단백질

*교신저자(E-mail): sangmih@korea.kr
(Tel): +82-63-238-2896

제거 및 로열젤리의 수용화과정은 Guo 등¹⁶⁾의 방법을 변형하였다. 생 로열젤리를 동결건조하는 단계, 에탄올 추출, 그리고 증성화 단계를 거쳐 알리지 유발단백질 제거 수용성 로열젤리를 획득하였다.¹⁷⁾ 알리지를 일으키는 로열젤리의 주요 단백질의 변화를 살펴보기 위해 SDS-PAGE(10% gels)를 이용하여 단백질 전기영동을 수행 후 Coomassie Brilliant Blue R-250 염색시약을 사용하여 확인하였다.

10-HDA 함량분석 - 로열젤리의 주성분으로 알려진 10-HDA 함량이 알리지 유발 단백질을 제거한 수용성로열젤리(WSRJ)에서 유지 될 수 있는 지를 확인하고자 HPLC(LC 20 System, Shiseido, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다. 컬럼은 YMC 사의(ODS H-80, 250×46 mm, I.D. S-4 μ m, Tokyo, Japan)을 사용하였으며 이동상 용매로는 메탄올:인산화암모늄(3:7 비율)이 혼합된 용매를 사용하였다. 흡광도는 UV-Vis detector를 이용하여 210 nm에서 확인하였고, 시료는 5 μ l를 주입하였으며, 운행시간은 20분, 유속은 1 ml/min이었다.

Tyrosinase 저해활성 측정 - L-DOPA를 사용하여 tyrosinase 활성을 측정하였다.¹⁸⁾ L-DOPA는 0.2 mg/ml의 농도로 potassium phosphate buffer에 완전히 녹인 후 각각의 농도별 수용성로열젤리와 혼합한 용액에 mushroom tyrosinase를 첨가하여 37°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다.

B16F1세포 배양 및 생존율 측정 - 마우스 흑색 B16F1 세포주는 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구입하여 사용하였으며, 세포는 10% fetal bovine serum(Gibco BRL, MD, USA), 1% penicillin/streptomycin(Gibco BRL, MD, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지에 5% CO₂배양기에서 37°C로 배양하였다. 정제봉독과 멜라닌 합성을 유발하기 위해 사용되는 α -melanocyte stimulating hormone(MSH, Sigma, USA)에 대한 B16F1 세포 생존율을 측정하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 환원 방법은 Chung 등¹⁹⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. B16F1 세포를 96 well plate에 5×10³ cells/ml 농도로 분주하여 24시간 배양 후 각각 다양한 농도로 희석한 수용성 로열젤리와 α -MSH를 처리하였다. 24시간 동안 배양 후 배지를 제거한 다음 50 μ l MTT 용액을 첨가하여 3시간 배양하고 DMSO 200 μ l를 처리한 다음 570 nm의 흡광도로 측정하였다.

멜라닌 저해 활성 측정 - Hosoi 등²⁰⁾의 방법을 이용하여 멜라닌 생성량을 측정하였다. B16F1 세포를 6 well plate에 5×10⁵ cells/well의 농도로 plates에 분주한 후 24시간 후 세포독성을 갖지 않는 수용성 로열젤리를 농도별로 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 세포를 수집하여 1 N NaOH 용액 1 ml를 첨가하고 잘 섞어준 후 100°C에서 30분 동안 용해시킨 후, 16,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 얻어진 상

층액의 흡광도를 405 nm에서 측정하였다.

세포내 Tyrosinase 저해 활성 측정 - B16F1 세포를 6 well plate에 5×10⁵ cells/well의 농도로 plates에 분주한 후, 24시간 후 세포독성을 갖지 않는 수용성 로열젤리 농도별로 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 배양 세포를 수거하여, 원심분리 후 세포 침전물을 만들고 lysis buffer(0.1M sodium phosphate buffer, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% triton X-100)를 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고, 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소활성 측정에 사용하였다. 각 농도별 수용성 로열젤리 반응액(12.5 mM L-Dopa, 1.5 mM L-tyrosine, 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8))에 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 흡광도를 이용하여 405 nm에서 측정하였다.

통계처리 - 실험결과는 SPSS(Ver 18.0, Illinois, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며 결과는 평균±평균의 표준오차로 표시하였다. 대조군과 처리군간의 효과 비교는 One way Analysis of variance(ANOVA)의 Duncan's multiple range test 를 통해 각 실험군 간의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 확인하였다.

결과 및 고찰

수용성 로열젤리 확인 - 로열젤리는 옅은 노랑색을 띠며 신맛이 나는 특징이 있는 천연 재료로써 예로부터 항암, 혈압저하, 항염 등과 같은 질병에 효과가 있는 것으로 널리 알려져 있으나,^{1,21-23)} 알리지를 유발할 수 있는 단백질 1번(분자량 55 kDa)과 2번(47 kDa)과 2번으로 인해 면역력이 약한 노인이나 유아의 식이는 제한하는 경우가 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 개발한 알리지 유발 단백질을 제거한 수용성 단백질의 단백질 1번과 2번(47 kDa) 단백질의 제거를 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다(Fig. 1). 생 로열젤리와 수용성 로열젤리의 단백질 변화를 살펴본 결과, 생 로열젤리의 농도 0.01 g/ml에서는 단백질이 48-63 kDa의 위치에서 진하게 발색됨을 확인할 수 있었으나(Fig. 1A), 수용성 로열젤리의 농도 0.1 g/ml에서는 생 로열젤리보다 10 배 높은 농도로 실시했는데도 불구하고, 같은 위치에서 단백질이 약하게 나타났다(Fig. 1B). 10-HDA는 로열젤리의 주요 지표물질로서 HPLC 분석을 통해 동결건조된 로열젤리와 수용성 로열젤리의 10-HDA 함량을 분석한 결과(Table 1), 동결건조된 로열젤리는 100 g 당 1.3 g, 수용성 로열젤리는 2.35 g으로 10-HDA의 함량이 유의적인 차이가 났으며, 수용성 로열젤리의 경우 55% 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 그림 2에서 보는 바와 같이 수용성 로열젤리의 물에 대한 용해도가 100%임을 확인할 수 있었다. 따라서 기존 생 로열젤리가 물에 잘 녹지 않는 성질을 보완할 수 있었다.

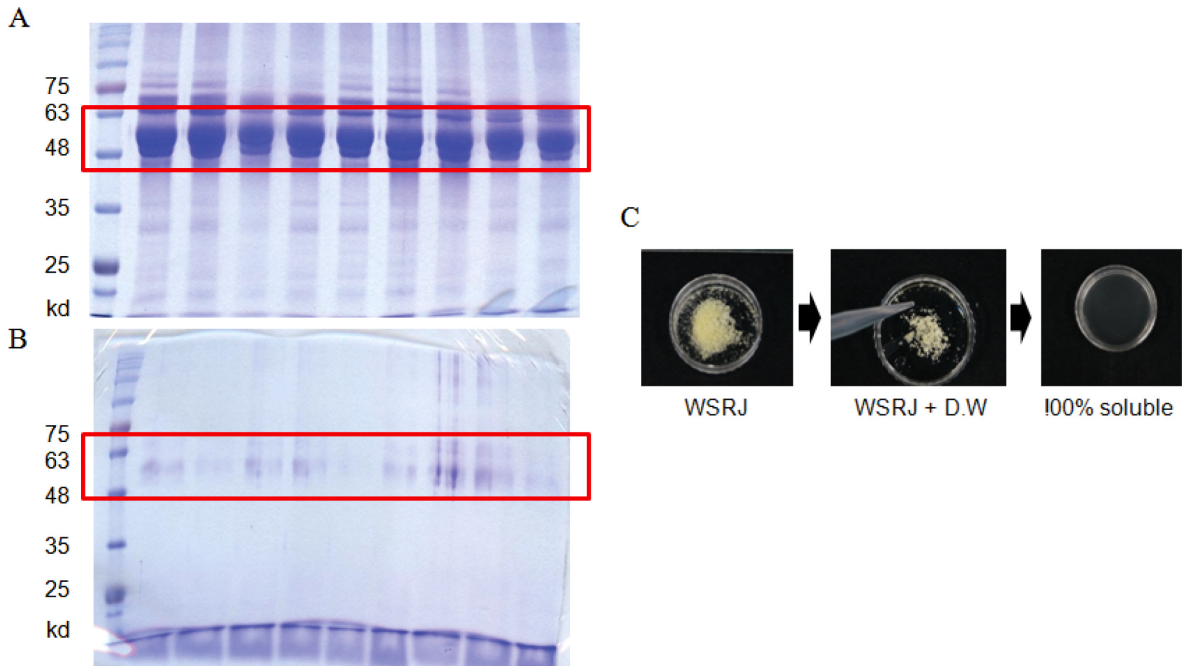


Fig. 1. Protein profile of raw royal jelly (A) and WSRJ (B) by SDS-PAGE. Protein was separated with 10% gels and stained with coomassie blue. Concentration of raw RJ protein and WSRJ protein was 0.01 g/ml, 0.1 g/ml, respectively. C is soluble process of WSRJ

Table I. 10-HDA contents of lyophilized royal jelly and WSRJ

Condition	10-HDA (g/100g)
Lypophilized RJ	1.33±0.08
WSRJ	2.42±0.23*

*P<0.05 compared with lyophilized RJ

Mushroom Tyrosinase 활성에 미치는 영향 – 수용성 로열젤리의 멜라닌 생성 억제 기전이 tyrosinase에 직접 작용하는지를 확인하고자 tyrosinase의 기질인 L-DOPA를 이용하여 mushroom tyrosinase의 활성을 측정하였다. Tyrosinase는 L-tyrosine을 L-DOPA로 전화시키고 이어서 L-DOPA를 L-DOPA quinone로 산화시킨다고 알려져 있다.²⁴⁾ 수용성로열젤리는 L-DOPA와 L-tyrosine 모두에서 tyrosinase의 활성을 억제하는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 이 실험 결과로 미루어 수용성로열젤리는 tyrosinase에 기질이 결합하는 부위에 작용하여 기질이 tyrosinase에 결합하는 것을 방해하는 것으로 사료된다.

세포의 생존율 – 본 실험에 사용할 수용성 로열젤리의 농도는 MTT assay를 통하여 세포 독성을 살펴보았다. 멜라닌 생성을 촉진하는 α-MSH의 처리농도는 10 nM에서 멜라닌 생성이 가장 많았으며 세포독성을 유발하지 않았다.¹⁵⁾ 10 nM의 α-MSH가 처리된 B16F1 melanoma 세포에 다양한 농도 (1, 5, 10, 50, 100 µg/ml)의 수용성 로열젤리를 24시간 동안

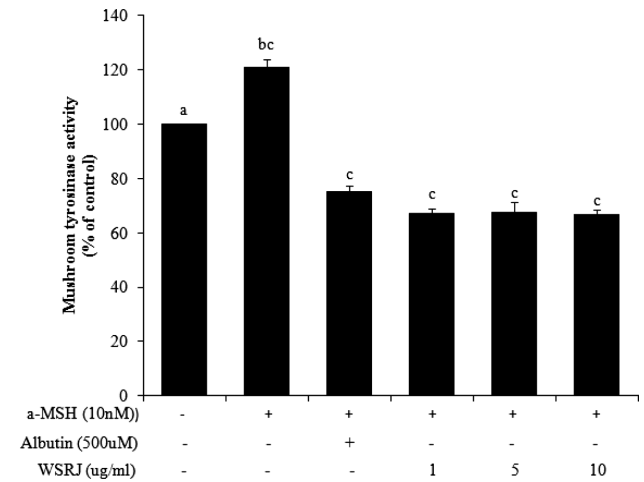


Fig. 2. Effect of WSRJ on tyrosinase activity. Tyrosinase activity was determined using mushroom tyrosinase and measuring the absorbance of dopaquinone that is produced by an oxidative reaction with mushroom tyrosinase as the enzyme and L-DOPA as the enzyme substrate. Data are presented as mean ± SEM of five independent experiments. Different letters indicate a significant difference with p<0.05.

처리하였다. 세포독성은 모든 처리구에서 관찰되지 않았으며, 농도가 증가함에 따라 세포 증식이 활성화 되는 경향을 보였다(Fig. 3). 이러한 결과를 바탕으로 본 실험에서는 10 nM의 α-MSH로 멜라닌 형성을 촉진시킨 B16F1세포에

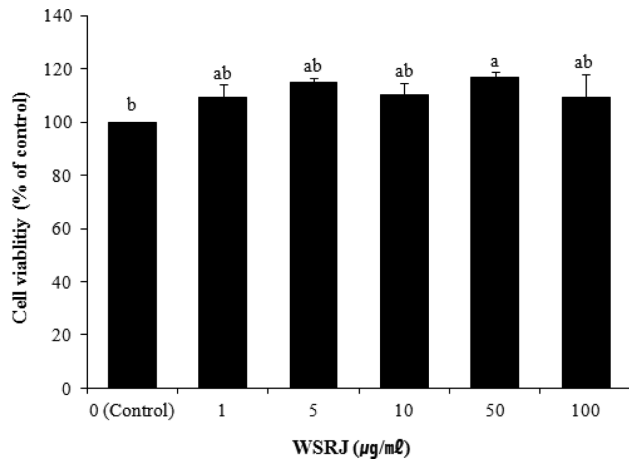


Fig. 3. Effect of WSRJ on cell viability. B16F1 cells were treated with 10 nM α -MSH for 48 hr and then with WSRJ at 1-100 μ g/ml. Cell viability was determined by absorbance at 570 nm using a microplate reader. Data are presented as mean \pm SEM of five independent experiments. Different letters indicate a significant difference with $p < 0.05$.

100 μ g/ml 이하의 수용성 로열젤리를 처리한 후 멜라닌 합성 및 tyrosinase의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

멜라닌 생성 억제 효과 - 멜라닌은 세포 내의 소기관인 ribosome에서 tyrosinase라는 효소의 생합성에서 합성되기 시작한다. 이 효소의 작용으로 아미노산의 일종인 tyrosine에서 몇 단계의 합성을 거쳐, 기저층의 멜라닌 세포 melanin site라는 흑색소포 표면에 침착하여 검고 갈색의 작은 멜라닌 입자가 만들어 진다.²⁵⁾ 화장품의 원료로 사용되고 있는 로열젤리는 멜라닌 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 알레지 유발 단백질을 제거한 수용성 로열젤리에서도 멜라닌 합성을 억제 할 수 있는지를 살펴보기 위해 B16F1 melanoma 세포에서의 멜라닌 생합성 저해활성을 측정하였다(Fig. 4). 그림 4A에서 보는 바와 같이 α -MSH 처리군은 매우 진하게 멜라닌 생성 정도를 확인할 수 있었으나, 양성대조군과 모든 농도의 수용성 로열젤리 처리군에서 멜라닌 생성이 매우 약하게 확인되었다. 특히 5 μ g/ml 수용성 로열젤리 처리군에서 멜라닌 합성은 양성대조군으로 사용한 알부틴(arbutin)과 같은 수준으로 억제하는 것으로 확인되었다(Fig. 4B). 이러한 결과로 알레지 유발 단백질이 제거된 수용성로열젤리에서도 생 로열젤리와 같은 멜라닌 합성을 억제하는 기능이 확인되었다.

세포내 Tyrosinase의 단백질 발현 억제 효과 - 멜라닌 생합성 신호전달 체계에는 매우 다양한 신호전달물질이 관여하고 있다. 멜라닌은 몇 가지 신호전달 기전을 통하여 합성되는데, 그 중 cAMP/PKA 경로가 멜라닌 합성의 주요 경로로서 UV에 피부가 노출되었을 때 멜라닌 세포의 cAMP가 증가되고 하류 신호전달 물질인 PKA를 활성화시키며,

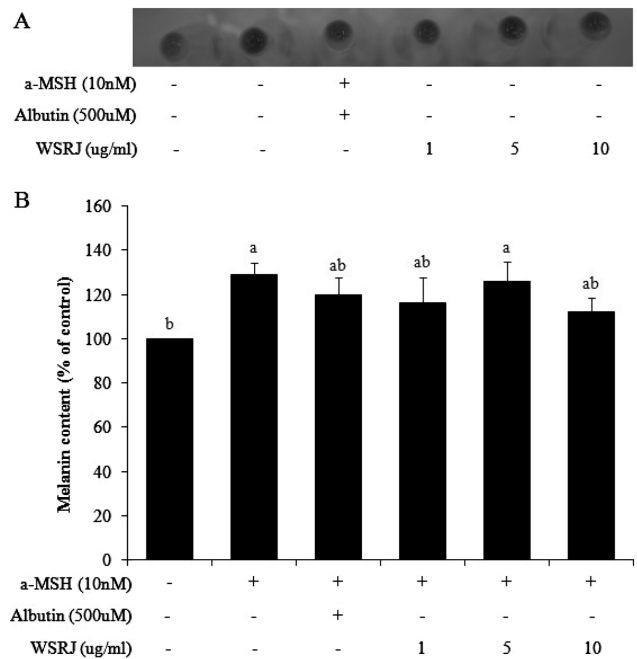


Fig. 4. Effect of WSRJ on melanin synthesis. B16F1 melanoma cells were stimulated with 10 nM α -MSH for 48 hr and the medium was exchanged with fresh medium containing or not containing various concentrations of WSRJ for 24 hr. (A) Photograph of cell pellets. (B) Synthesized melanin contents. Data are presented as mean \pm SEM of five independent experiments. Different letters indicate a significant difference with $p < 0.05$.

CREB를 거쳐 MITF의 발현을 증가시켜, tyrosinase의 합성을 촉진시켜 멜라닌 합성을 증가시킨다.²⁶⁾ 수용성로열젤리의 멜라닌 억제효과 검증을 위한 멜라닌 합성 관련인자인 tyrosinase 단백질 발현 정도를 측정하였다. 수용성로열젤리의 모든 처리 농도에서 세포 내 tyrosinase 발현이 크게 감소되는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 이들 처리군에서의 발현량은 α -MSH 처리군에 비해 각각 28.3, 28.0% 정도 발현이 감소되었으며 이는 정상 대조군과 비슷한 수준이었다. 이러한 결과로 미루어 B16F1 세포주에서의 수용성 로열젤리에 의한 멜라닌 생성 감소는 세포 내 tyrosinase 저해 활성에 의한 것이 주요한 원인 중 하나로, 생 로열젤리에서의 멜라닌 생성 억제 기전과 동일한 것으로 판단된다.

수용성로열젤리는 유아나 면역력이 약한 사람이 복용했을 때 문제가 될 수 있는 알레지 유발 단백질을 제거하더라도 로열젤리가 갖고 있는 멜라닌 생성 억제효과는 유지되는 것으로 확인되었다. 로열젤리는 탁월한 항산화 효과와 미백, 피부보습 등의 기능이 밝혀져 화장품의 소재로 각광받고 있다.^{27,28)} 화장품 시장의 경쟁과열로 인해 기존의 바르는 화장품만으로는 부진을 극복하기 어려워짐에 따라 최근 국내 이너뷰티(inner beauty) 시장은 매년 급성장해 먹는

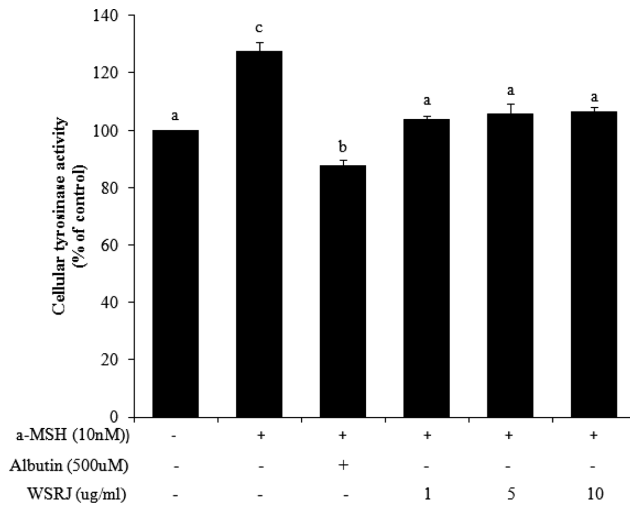


Fig. 5. Effect of WSRJ on tyrosinase activity. Cellular tyrosinase activity was measured using B16F1 melanoma cell lysates. Data are presented as mean \pm SEM of five independent experiments. Different letters indicate a significant difference with $p < 0.05$.

화장품이 새로운 트렌드로 자리잡고 있다. 본 연구는 알러지 유발 단백질을 제거한 수용성로열젤리 개발로 기존의 로열젤리의 미백기능은 유지하면서도 알러지 발생 문제점을 해소할 수 있는 먹는 화장품 소재로서 널리 이용되리라 생각되어진다.

결론

본 연구는 알러지를 유발할 수 있는 단백질을 제거한 수용성로열젤리가 기존의 로열젤리가 갖고 있는 멜라닌 생성 억제효과를 유지할 수 있는지 살펴보고자 하였다. 수용성로열젤리 처리가 α -MSH로 멜라닌 합성이 유도된 B16F1 melanoma 세포에서 멜라닌과 tyrosinase의 단백질 생성 억제효과를 측정하였다. 그 결과 1 μ g/ml이상의 수용성로열젤리를 처리했을 경우 α -MSH 처리군에 비해 멜라닌 합성을 억제하였으며, 멜라닌 합성 주요효소인 tyrosinase 단백질 발현 역시 효과적으로 억제하였다. 이는, 기존의 로열젤리와 같이 수용성로열젤리는 세포 내 tyrosinase의 발현 억제를 통하여 멜라닌 합성 억제효과를 나타내는 것으로 판단되며, 먹는 화장품 개발을 위한 알러지 유발을 제거한 기능성 물질로서의 가능성을 제시한다.

사사

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호 : PJ00906602)에 의하여 수행되었으므로 감사를 드립니다.

인용문헌

- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T. and Kobayashi, K. (1990) A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J. Biol. Chem.* **265**: 11333-11337.
- Nagai, T. and Inoue, R. (2004) Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chem.* **84**: 181-186.
- Santos, C. C. and Marcucci, M. C. (2007) Quantitative determination of trans-10-Hydroxy-2-Decenoic Acid (10-HDA) in Brazilian royal jelly and commercial products containing royal jelly. *J. Apicult. Res.* **46**: 149-153.
- Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Caboni, M. F., Bogdanov, S. and Almeida-Muradian, L. B. (2009) Quality and standardisation of royal jelly. *J. ApiProd. ApiMed. Sci.* **1**: 1-6.
- Krell, R. (1996) Value-added products from beekeeping. 409. FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Bincoletto, C., Eberlin, S., Figueiredo, C. A., Luengo, M. B. and Queiroz, M. L. (2005) Effects produced by royal jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *Int. Immunopharmacol.* **5**: 679-688.
- Nakaya, M., Onda, H., Sasaki, K., Yukiyooshi, A., Tachibana, H. and Yamada, K. (2007) Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 253-255.
- Leung, R., Ho, A., Chan, J., Choy, D. and Lai, C. K. (1997) Royal jelly consumption and hypersensitivity in the community. *Clinical & Experimental Allergy* **27**: 333-336.
- Taniguchi, Y., Kohno, K., Inoue, S., Koya-Miyata, S., Okamoto, I., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M. and Kurimoto, M. (2003) Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Int. Immunopharmacol.* **3**: 1313-1324.
- Thien, F. C., Leung, R., Plomley, R., Weiner, J. and Czarny, D. (1993) Royal jelly-induced asthma. *Med. J. Aust.* **159**: 639.
- Takahama, H. and Shimazu, T. (2006) Food-induced anaphylaxis caused by ingestion of royal jelly. *J. Dermatol.* **33**: 424-426.
- Yonei, Y., Shibagaki, K., Tsukada, N., Nagasu, N., Inagaki, Y., Miyamoto, K., Suzuki, O. and Kiryu, Y. (1997) Case report: haemorrhagic colitis associated with royal jelly intake. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **12**: 495-499.
- Mizutani, Y., Shibuya, Y., Takahashi, T., Tsunoda, T., Moriyama, T. and Seishima, M. (2011) Major royal jelly protein 3 as a possible allergen in royal jelly-induced anaphylaxis. *J. Dermatol.* **38**: 1079-1081.
- Kim, J. M., Han, S. M., Cho, M. R., Lee, K. G., Lee, M. L., Lee, M. Y., Woo, S. O., Hong, I. P., Sim, H. S. and Choi, Y.

- S. (2013) Characterization of water soluble royal jelly removed allergenic protein. *Korean J. Apiculture* **28**: 19-23.
15. Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H. and Lee, M. Y. (2010) Effect of melanin inhibitory effect of royal jelly from Korea in mouse melanoma cells. *Korean J. Apiculture* **25**: 123-128.
16. Guo, H., Ekusa, A., Iwai, K., Yonekura, M., Takahata, Y. and Morimatsu, F. (2008) Royal jelly peptides inhibit lipid peroxidation in vitro and in vivo. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)* **54**: 191-195.
17. Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H., Kweon, H. Y. and Woo, S. O. (2007) A simplified purifying method of bee venom. Patent.
18. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. (1987) Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Med.* **53**: 515-517.
19. Chung, M. J., Walker, P. A., Brown, R. W. and Hogstrand, C. (2005) ZINC-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **205**: 225-236.
20. Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**: 1474-1478.
21. Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M. and Kurimoto, M. (2003) Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Sci.* **73**: 2029-2045.
22. Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M. and Kurimoto, M. (2004) Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 138-145.
23. Tokunaga, K. H., Yoshida, C., Suzuki, K. M., Maruyama, H., Futamura, Y., Araki, Y. and Mishima, S. (2004) Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 189-192.
24. Hearing, V. J. and Jimenez, M. (1989) Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level. *Pigment Cell Res.* **2**: 75-85.
25. Urabe, K., Nakayama, J. and Hori, Y. (1998) Mixed epidermal and dermal hypermelanoses, in *The pigmented System: Physiology and Pathophysiology*, eds. Norlund, J. J., Boissy, R. E., Hearing, V. J., King, R. A. and Ortonne, J. P. 909. Oxford University Press, New York.
26. Mallick, S., Singh, S. K., Sarkar, C., Saha, B. and Bhadra, R. (2005) Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins in vitro. *Pigment Cell Res.* **18**: 25-33.
27. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. and Pérez-Alvarez, J. A. (2008) Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J. Food Sci.* **73**: R117-124.
28. Silici, S., Ekmekcioglu, O., Eraslan, G. and Demirtas, A. (2009) Antioxidative effect of royal jelly in cisplatin-induced testes damage. *Urology* **74**: 545-551.

(2014. 9. 1 접수; 2014. 9. 11 심사; 2014. 9. 23 게재확정)