

정향(Clove) 추출물이 티로시나아제 유전자의 발현에 미치는 효과

진중언*·이정용**·김관천

*동강대학피부미용과, **동신대학교 체육학과,
광주보건대학 환경행정과

Effect of Clove Extracts on Tyrosinase Gene Expression

Jong-Eon Chin*·Jeong-Yong Lee**·Kwan-Chun Kim

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

***Dept. of Physical Education, Dongshin University, Chonnam 520-714, Korea*

Dept. of Enviromental Administration, Gwangju Health College, Gwangju 506-701, Korea.

Abstract

Clove extract by methanol increased expression of the tyrosinase gene on B16 mouse melanoma cells containing tyrosinase promoter. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the extract showed expression rate of the tyrosinase gene about 138% and 245%, respectively, compared with control. At 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, expression rate of the extract was impossible to measurement by high cytotoxicity. The solvent fraction of methylene chloride also exhibited highly expression rate as methanol extract. However, the solvent fractions of butyl alcohol and water showed repressive effect on expression of tyrosinase gene at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In MTT assay, cell survival rate of the extract exhibited similar to expression rate of tyrosinase gene. That is, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the extract showed the cell survival rate about 128% and 187%, respectively.

Key words : clove, b16 mouse melanoma cell, tyrosinase gene, expression.

*Corresponding author E-mail : kimkc@ghc.ac.kr

I. 서론

정향은 정향나무(*Eugenia caryophyllata*)의 꽃봉오리를 일컫는 것으로서 특이한 향과 강한 맛, 혀를 마비시키는 성질을 지니고 있어 유럽을 비롯하여 우리나라에서도 향신료로 널리 이용되고 있다. 정향에는 eugenol, acetyeugenol, caryophyllene, humulene, eugeniin와 같은 성분들을 함유하고 있어¹⁾ 향균, 항바이러스, 항산화, 항응고, 면역증진과 같은 효능·효과를 지니고 있는 것으로도 알려져 있다²⁻¹¹⁾. 따라서, 오늘날 정향은 향신료로서 뿐 만 아니라 식품 보존제, 항산화제, 진통제, 염증치료제 등 다양한 목적으로 이용되고 있다. 그리고 보다 최근에는 정향 추출물이 멜라닌 색소 생합성에 관여하는 효소인 티로시나아제의 활성을 저해하는 효과가 있는 것으로도 알려지고 있다^{12,13)}.

오늘날 사람들은 각종 사회활동 및 여가생활 등의 증가, 그리고 환경오염으로 인한 오존층의 파괴 등으로 인하여 유해한 자외선에 피부가 과다하게 노출됨으로서 색소침착을 비롯하여 다양한 피부트러블이 유발되어 피부건강을 해치는 요인이 되고 있다. 특히 색소침착의 원인이 되고 있는 멜라닌 색소에 대한 관심이 날로 증가하고 있는 추세이다. 멜라닌은 생물체에 널리 분포하는 색소로서 사람의 경우 피부색을 결정과 함께 유해한 자외선과 유리기(free radical)로부터 인체를 보호하는 중요한 역할을 담당하고 있다. 이 색소의 생합성은 티로시나아제 효소를 비롯하여 여러 효소들에 의하여 정교하게 조절되고 있는 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 지금까지 멜라닌 색소의 생합성 조절하는 물질에 대한 연구는 많이 이루어져 왔으나 주로 티로시나아제 효소를 중심으로 그의 활성도를 조절하는 수준에서 활발하게 이루어져

왔다. 그 결과 티로시나아제 활성을 조절하는 물질들이 많이 보고되었지만¹⁷⁻²²⁾ 이러한 물질들은 멜라닌 색소의 생합성 조절 효과가 낮고 지속성이 짧다는 단점을 지니고 있다. 요즈음, 이러한 단점을 근본적인 수준에서 보완하기 위하여 멜라닌 색소 생성 관련된 유전자 발현 조절 기작, 멜라닌 생성 활성을 제어하는 사이토카인 네트워크, 멜라닌 색소 생합성 효소의 유전자 발현조절 물질 탐색 및 분리와 같은 연구들이 활발하게 이루어지고 있으나 천연물로부터 멜라닌 생합성 관련 효소의 유전자 발현 억제 물질에 대한 탐색이나 분리에 관한 연구결과는 아직까지 Chin 등²³⁻²⁸⁾과 Cho 등²⁹⁾, Lee 등³⁰⁾의 보고를 제외하고는 거의 없다. 따라서 천연물을 이용하여 멜라닌 색소의 생합성을 근본적으로 조절하는 물질에 대한 연구가 매우 시급한 실정이다.

본 연구는 유전자 발현 수준에서 멜라닌 색소 생합성을 조절하는 물질을 탐색하고자 티로시나아제 효소 활성저해 효과가 있는 것으로 알려진 정향(*Eugenia caryophyllata*)으로부터 유용성 물질을 추출·분획하여 형질전환된 B16 mouse melanoma cell에 처리하여 티로시나아제 유전자의 발현능 및 세포 독성에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 정향은 광주시내 건재상에서 구입하여 감정한 후 사용하였으며, 표준품은 동강대학 향장품 연구실에 보관하였다.

2. 추출 및 분획

시료의 추출은 건조된 생약을 세절하여 0.1 kg씩을 취한 다음 메탄올을 첨가

하여 실온에서 1 주일 동안 정치시킨 후 3 회 추출·여과 하였다. 여과액은 감압·농축하여 동결·건조시킨 후 분말 형태로 제조하였다. 용매분획은 농축된 메탄올 추출물을 증류수로 현탁한 다음, 극성도가 다른 methylene chloride, ethyl acetate, butyl alcohol, 물을 이용하여 4 개의 층으로 분획하여 메탄올 추출물과 같은 방법으로 농축하였다. 그 후, 이 농축물들은 동결·건조하여 분말형태로 제조하였다.

3. 시료 제조

분말로 된 추출물 및 분획물 100 mg 에 에탄올과 디메틸설폭옥사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)가 1:1로 혼합된 용매 1 mL씩을 가하여 완전히 용해시킨 후 여과한 다음 이용하였다.

4. 세포배양

B16 mouse melanoma cell(ATCC CRL 6323)은 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 계대 배양하여 유지하였다.

티로시나아제 프로모터를 도입하여 형질전환 된 B16 mouse melanoma cell은 위의 RPMI Medium 1640 완전 배지에 neomycin analogue인 Geneticin 418(200 µg/mL)을 가한 선택배지를 이용하여 유지하였다.

5. 세포내 유전자 도입(Stable Transfection)

B16 mouse melanoma cell 내에 티로시나아제 프로모터가 삽입된 유전자를 도입하기 위해 LipofectAMINE(Life Technologies Inc.)을 이용한 다음과 같

은 방법으로 stable transfection을 실시하였다.

5.1. 세포내 유전자 도입

B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 평판배지에 세포수가 3-4 × 10⁵이 되도록 접종한 후 24 시간 배양한 다음, 배양액 1 mL에 6 µL LipofectAMINE과 2 µg의 total plasmid DNA를 5 시간 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.

5.2. 형질전환 된 세포의 선별

Stable transfection 처리 5시간 후 B16 mouse melanoma cell로부터 LipofectAMINE 시약과 제조합 된 DNA가 함유된 배지를 제거한 후 콜로니가 형성될 때까지 neomycin analogue인 Geneticin 418(600 µg/mL)이 들어있는 선택배지에서 배양한 후 형질전환 된 B16 mouse melanoma cell을 선별하였다.

6. Luciferase 활성도 측정

세포내 유전자 도입을 통해 얻은 B16 mouse melanoma cell의 형질전환 유무를 확인하기 위하여 luciferase 활성도를 측정하였다. 형질전환을 통하여 얻은 콜로니들을 Trypsin-EDTA를 처리하여 떼어낸 후 24 well plate에 세포수가 well당 6×10⁴되게 분주하여 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 세포들은 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 세척한 다음 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 그리고 2 mM

Dithiothreitol이 함유되어 있는 pH 7.8 의 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 mouse melanoma cell을 선별하여 이용하였다.

7. 티로시나아제 유전자 발현능 측정

형질전환 된 B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전배지가 들어 있는 24 well plate에 세포수가 well당 6×10^4 되게 접종한 다음 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 각각의 well에 정향 메탄올 추출물과 용매 분획물들을 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

/mL, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 6 시간 동안 처리한 다음 luciferase 활성도를 측정하여 티로시나아제 유전자 발현에 미치는 효과를 조사하였다.

8. 세포독성 측정

티로시나아제 프로모터가 도입되지 않은 B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전배지가 들어 있는 96 well plate에 세포수가 well당 $1-1.2 \times 10^4$ 되게 접종한 다음 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 정향 메탄올 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 6 시간 동안 처리한 다음 Mosmann³¹⁾의 방법에 따라 ELISA(Bio-Tek Inc.) 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 독성을 평가하였다.

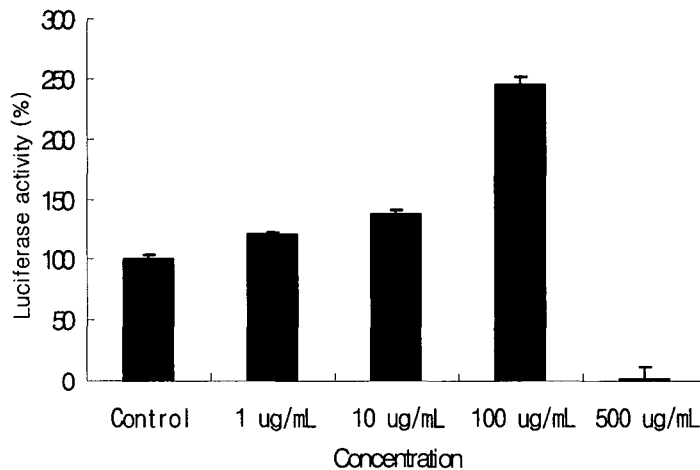


Fig. 1. Effects of clove extract on the tyrosinase gene expression in B16 mouse melanoma cells. Transfected B16 melanoma cells were incubated in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated clove extract for 6 hr. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at $13,000 \times g$ for 2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

Table 1. Effects of solvent fraction layer of clove on the tyrosinase gene expression in B16 mouse melanoma cells.

Solvent fraction layer	Luciferase assay(%)			
	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
Methylene chloride layer	128 \pm 5.8	162 \pm 5.0	221 \pm 4.2	N.D. ¹⁾
Ethyl acetate layer	106 \pm 3.2	118 \pm 2.7	51 \pm 6.5	24 \pm 7.5
Butyl alcohol layer	99 \pm 4.3	101 \pm 6.6	97 \pm 3.0	38 \pm 7.3
Water layer	101 \pm 5.4	103 \pm 7.3	110 \pm 5.5	78 \pm 1.8

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 clove for 6 hr. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at 13,000xg for 2-3 min. The supernatants were used for luciferase assay.

III. 결과 및 고찰

1. 정향 메탄올 추출물의 티로시나아제 유전자 발현능

정향의 메탄올 추출물을 티로시나아제 프로 모터 유전자가 도입 된 B16 mouse melanoma cell에 처리한 결과 티로시나아제 유전자의 발현능은 추출물의 처리 농도에 따라 다르게 나타났다(Fig. 1). 즉 티로시나아제 유전자의 발현능은 정향 메탄올 추출물을 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때에는 약간 증가하였으나 10 $\mu\text{g/mL}$ 와 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 그의 발현능은 각각 약 138%와 245%로 대조군 세포에 비해 크게 증가하였다. 그러나 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서는 광학 현미경상에서 세포가 심하게 분해되어 그 잔여물이 확인될 정도로 세포독성이 심하여 티로시나아제 유전자 발현율은 약 2%로 매우 낮게 나타났다. 정향 메탄올 추출물은 Jung 등¹²⁾과 Park 등¹³⁾에 의해 티로시나아제 효소의 활성 저해효과가 우수하다고 보고된 바 있어 모든 농도에서 티로시나아제 유전자의 발현을 억제할 것으로 예상하였으나, 본 연구 결과 이 추출물은 10 $\mu\text{g/mL}$ 와 100 $\mu\text{g/mL}$ 의

저농도에서 오히려 티로시나아제 유전자의 발현이 오히려 증가되는 결과를, 그리고 Park 등¹³⁾이 저해효과가 우수하다고 보고한 농도에서는 발현이 억제되는 효과를 보여 주었으나 세포가 고사될 정도의 심한 세포독성이 관찰되었다. Park 등에 의해 티로시나아제 효소의 활성 저해효과가 50% 있다고 보고한 농도(IC₅₀ ; 0.69 mg/mL)로 형질전환 된 세포에 처리하였을 때에는 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때보다도 심한 세포독성을 일으켜 luciferase 활성도의 측정이 불가능하여 티로시나아제 유전자의 발현유무를 확인 할 수가 없었다. 본 연구에서 정향 메탄올 추출물이 기존의 연구들과 약간 다른 결과를 보여주는 것은 실험 방법 및 조건의 차이, 즉 기존에 연구들은 주로 티로시나아제 효소의 활성을 저해하는 수준에서 이루어진 것에 반하여 본 연구는 세포내에 도입된 유전자의 발현을 조절하는 수준에서 이루어진 점을 대표적인 예로 들 수 있다. 그러나 앞으로 보다 연구를 통하여 티로시나아제 효소의 활성을 저해하는 효과가 있는 것으로 알려진 정향 메탄올 추출물이 형질전환 된 세포에 처리하였을 때 티로시나아제 유전자의 발현능이 증가하는 원인 및 그의 기작 등에 대한 규명이 필요하다.

2. 용매분획물의 티로시나아제 유전자 발현능

정향의 메탄올 추출물을 감압-농축하여 methylene chloride, ethyl acetate, butyl alcohol, 물 등의 4가지 용매를 이용하여 분획한 다음 이들을 티로시나아제 프로모터 유전자가 도입된 된 세포에 처리한 결과, 그 효과는 용매 분획물에 따라, 또는 분획물의 처리농도에 따라 다른 결과를 보여 주었다(Table 1). 4가지 용매 중에서 극성도 가장 낮은 methylene chloride 용매 분획물을 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 티로시나아제 유전자의 발현능은 각각 약 162%와 221%로 대조군 세포에 비해 크게 증가되었지만, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 세포가 고사될 정도로 독성이 심하여 luciferase 활성도의 측정이 불가능하였다. 이 결과는 정향 메탄올 추출물을 형질전환된 세포에 처리했을 때와 매우 유사한 경향을 나타내었다. Ethyl acetate 용매 분획물은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 세포에 처리하였을 때에는 티로시나아제 유전자 발현능이 약 118%로 약간 증가되는 효과를 보여 주었다. 그러나 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

와 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 티로시나아제 유전자의 발현능이 각각 약 51%와 24%로 대조군 세포보다 오히려 낮게 나타났으나 현미경상에서 세포가 고사되는 현상이 육안으로 관찰되었다. 한편, Park 등¹³⁾에 의해서 티로시나아제 활성저해 효과가 있다고 알려진 butyl alcohol 과 물 용매 분획물을 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 티로시나아제 유전자의 발현능은 대조군 세포와 거의 차이가 없었다. 그러나 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도로 처리하였을 때의 티로시나아제 유전자의 발현능은 각각 약 38%와 78%로 억제하는 효과를 보여 주었으며, methylene chloride나 ethyl acetate 용매 분획물들을 처리하였을 때와는 달리 세포 고사현상이 발견되지 않았다. 이 결과를 통해서 티로시나아제 유전자 발현능은 정향의 용매 분획물에 따라 달라진다는 것이 입증되었으며, 특히 butyl alcohol과 물 용매 분획물 내에는 티로시나아제 효소의 활성 저해 효과와 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 효과를 지닌 구성성분들이 함유되어 있는 것으로 추측되어진다.

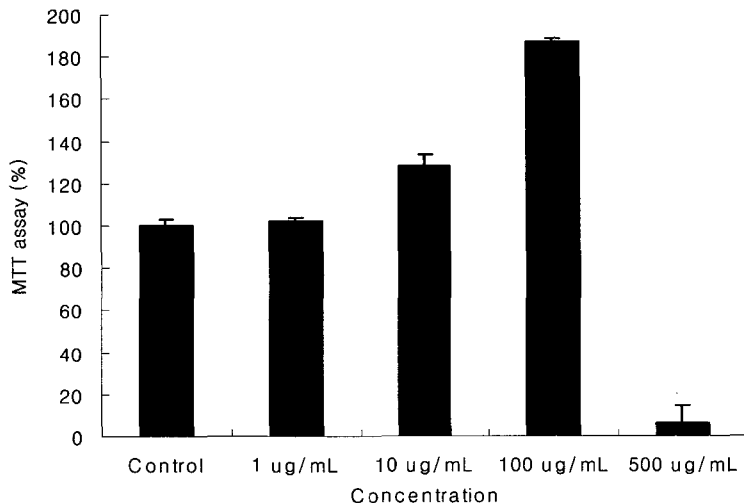


Fig. 2. Cytotoxicity of clove extracts on B16 mouse melanoma cells. B16 melanoma cells were incubated with $1.0 - 1.2 \times 10^4$ in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated with clove extract for 6 hr. Then, the cells were used for MTT assay. Values are the means of results from triplicate experiments.

3. 정향 추출물의 세포독성

B16 mouse melanoma cell에 정향 메탄을 추출물을 처리한 다음 MTT assay를 실시하여 세포독성을 측정한 결과, 추출물의 처리농도에 따라 다른 결과를 보여주었다(Fig. 2). 즉, 정향 메탄을 추출물은 처리농도의 증가에 따라 세포의 활성능이 증가하다 감소하는 경향을 나타내었다. 정향 메탄을 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때에는 세포 활성능이 102%로 대조군 세포와 유사하였으나 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 세포에 처리하였을 때에는 세포 활성능이 각각 약 128%와 187%로 대조군 세포에 비해 크게 증가되었으나 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때에는 세포 활성능이 6%로 오히려 현저하게 감소하여 세포독성을 정확하게 평가하는 것이 어려웠다. 정향 메탄을 추출물을 B16 mouse melanoma cell에 처리하였을 때 나타난 세포 활성능은 이 추출물을 형질전환된 B16 mouse melanoma cell에 처리하였을 때 나타난 티로시나아제 유전자 발현능 증가에 비해 낮게 나타났지만 서로 유사한 경향을 보여주었다. 이 결과로 보아 정향 메탄을 추출물을 형질전환된 세포에 처리하였을 때의 티로시나아제 유전자 발현능은 세포의 활성능과 밀접한 관련이 있는 것으로 보여진다. 즉 정향 메탄을 추출물을 세포에 처리하였을 때 세포 활성능이 증가함으로써 티로시나아제 발현능도 증가한 것으로 추측된다. 따라서 정향을 메탄을 추출물 형태로 멜라닌 색소의 생합성에 관여하는 티로시나아제 유전자 발현조절 물질로 이용하기 위해서는 보다 많은 연구가 필요하다.

IV. 결론

유전자 발현조절 수준에서 멜라닌 색소의 생합성에 관여하는 천연물질을 탐색하고자 티로시나아제 효소의 활성을 저해는 효과가 있는 것으로 알려진 정향으로부터 유

용성 물질을 추출·분획하여 티로시나아제 프로모터가 도입된 B16 mouse melanoma cell에 처리한 결과 정향메탄을 추출물을 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때의 티로시나아제 유전자 발현능은 각각 약 138%와 245%로 대조군 세포에 비해 매우 높게 증가되었으나 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 매우 심한 세포독성을 일으켰다. 그리고 methylene chloride 용매 분획물은 메탄을 추출물을 처리하였을 때와 유사한 결과를 보여 주었다. 그러나 butyl alcohol과 물 용매 분획물을 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도로 처리했을 때에는 티로시나아제 유전자의 발현능이 각각 약 38%와 78%로 대조군 세포에 비해 오히려 감소하는 결과를 보여주었다. 한편, MTT assay를 실시한 결과 정향 메탄을 추출물의 세포 활성능은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 크게 증가하였으며, 이는 티로시나아제 유전자의 발현능의 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로 추측된다. 따라서 정향을 멜라닌 색소의 생합성을 조절하는 목적으로 응용하기 위해서는 메탄을 추출물 형태로 이용하기 보다는 다음 용매 분획하여 얻은 butyl alcohol이나 물 분획물을 이용하는 것이 보다 효과적이라 판단된다.

참고문헌

1. Park, M. K., Park, J. H., Shin, Y. G., Shin, U. K. and Kim, H. K. Chemical constituents of *Eugenia caryophyllata*. *Yakhak Hoeji* 41(2): 149-152(1997).
2. Son, D. H., Lee, S. I. and Chung, Y. G. Antioxidative of medicinal plants on pathogenic bacteria. *J Korean Soc Hygienic Science* 7(2): 103-108(2001).
3. Lee, O. H., Jung, S. H. and Son, J. Y. Antimicrobial activity of clove extract by extraction solvents. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33(3):

- 494-499(2004).
4. Kang, S. Y., Kim, T. G., Park, M. S., Han, H. M., Jung, K. K., Kang, J. H., Moon, A. and Kim, S. H. Inhibitory effects of *Eugenia caryophyllata*, *Ephedra sinica* and *Cinnamomum cassia* on the replication of HBV in HEPG22.2.15 cells. *J. Applied Pharmacol.* 7: 133-137(1999).
 5. Dong, S., Jung, S. H., Moon, J. S., Rhee, S. K. and Son, J. Y. Antioxidant activities of clove by extraction solvent. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33(4): 609-613.
 6. Kim, J., Kim, S. A., Yun, W. K., Kim, E. J., Woo, M. K. and Lee, M. S. Antioxiative effect of ethanol extract for 5 kinds of spice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33(9): 1426-1431(2004).
 7. Lee, J. I., Lee, H. S., Jun, W. J., Yu, K. W., Shin, D. H., Hong, B. S., Cho, H. Y. and Yang, H. C. Screening of anticoagulant activities in extracts from edible herbs. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29(2): 335-341(2000).
 8. Lee, J. I., Lee, H. S., Jun, W. J., Yu, K. W., Shin, D. H., Hong, B. S., Cho, H. Y. and Yang, H. C. Anticoagulation activity pattern and *in vivo* test of extract from *Eugenia caryophyllata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29(3): 543-548(2000).
 9. Lee, J. I., Lee, H. S., Jun, W. J., Yu, K. W., Shin, D. H., Hong, B. S., Cho, H. Y. and Yang, H. C. Physiological characteristics of anticoagulant fractions from *Eugenia caryophyllata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29(4): 712-718(2000).
 10. Lee, I. S. and Ha, Y. D. Effect of edible and medicinal plants on the activation of immune cells. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23(1): 150-155(1994).
 11. Jung, K. H. and Lee, E. B. Studies on the effect of the extract of *Eugenia Flos* on gastritic lesion. *Kor. J. Food Hygiene* 7(2,3): 83-89(1992).
 12. Jung, S. W., Lee, N. K., Kim, S. J. and Han, D. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27(6), 891-896 (1995).
 13. Park, J. H., Shin, Y. G., Shin, U. K., Baek, S. K., Lee, S. K., Chung, M. H. and Park, Y. I. Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji* 41(4): 518-523(1997).
 14. Aroca, P., Urabe, K., Kobayashi, K., Taskamoto, K. and Hearing, V. J. Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* 268: 25650-25655(1993).
 15. Paval, S. Dynamics of melanogenesis intermediates. *J. Invest. Dermatol.* 100:162S-165S(1993).
 16. Jimenez-Cervantes, C. Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J. and Garcia-Borron, C. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. *J. Biol. Chem.* 269: 17993-18001(1994).
 17. 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. *Korean J. Pharm.* 29: 237-242(1998).
 18. Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q. T. and Bernard, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J.*

- Ethnopharmacol.* 82: 155-158(2002).
19. Tomohiro, Y., Hiroyuki, N., Yasuo, K. and Masako, M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Research* 11: 355-361(1998).
 20. Isao, K. and Ikuyo, K. H. 2-Hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde a potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants. *Planta Medica* 65: 19-22(1999).
 21. Lee, S. H., Choi, S. Y., Kim, H. C., Hwang, J. S., Lee, B. G., Gao, J. J. and Kim, S. Y. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 25(8): 1045-1048(2002).
 22. Lee, K. T., Lee, K. S., Jeong, J. H., Jo, B. K., Heo, M. Y. and Kim, H. P. Inhibitory effects of ramulus mori extracts on melanogenesis. *J. Cosmet. Sci.* 54(2): 133-142(2003).
 23. Chin, J. E., Sun, H. S., Lee, K. J., Choi, T. J., Ko, Y. S., Sohn, H. J., Kim, J. J., Jeon, B. H. and Lee, B. H. 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).
 24. Chin, J. E. and Cho N. C. Effects of *Artemisia capillaris* herba extracts on the tyrosinase gene activity. Thesis Collection of Dongkang College 23: 293-307.
 25. Chin, J. E. and Cho, N. C. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on tyrosinase gene expression. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34(8): 1284-1288(2000).
 26. Chin, J. E., Cho, N. C. and Kim, K. C. Effect of *Rubus coreanum* extracts on tyrosinase promoter. *Korean J. Sanitation* 21(3): 44-51(2006).
 27. Chin, J. E., Lee, H. S. and Kim, K. C. Effect of Mushroom extracts on tyrosinase promoter. *Korean J. Sanitation* 21(3): 1-8(2006).
 28. Chin, J. E. and Kim, K. C. Effect of chestnut bark extracts on tyrosinase gene expression. *Korean J. Sanitation* 20(3): 10-16(2005).
 29. Cho, N. C., Yoon, Y. H., Lee, H. J., Shon, H. J., Kim, Y. K., Choi, K. H., Ra, M. S., Cho, Y. K., Lee, B. H. and Chin, J. E. Effect of onion(*Allium cepa* L.) extract on tyrosinase gene expression. *Kor. J. Food & Nutr.* 14(3): 228-232(2001).
 30. Lee, H. B., Bai, S. and Chin, J. E. Inhibitory effect of *Lithospermum erythrorhizon* extracts on melanin biosynthesis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34(9): 1325-1329(2005).
 31. Mosmann, T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proiferation and cytotoxicity assay. *Immunol. Methods* 63: 55-63(1983).