

대두(*Glycine maxim*) 추출물이 티로시나아제 프로모터 활성에 미치는 효과

진종언·김관천

동강대학 피부미용계열, *광주보건대학 환경위생과

Effects of *Glycine maxim* Extract on the Activity of Tyrosinase Promoter

†Jong-Eon Chin and Kwan-Chun Kim*

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

*Dept. of Environmental Health, Gwangju Health College, Gwangju 506-701, Korea

Abstract

The methanolic extract of *Glycine maxim* increased the expression of the promoter in B16 mouse melanoma cells harboring a tyrosinase promoter. Extract concentrations of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ resulted in tyrosinase promoter expression rates of approximately 113% and 184%, respectively, as compared to the control. The fraction layers consisting of butyl alcohol and methylene chloride improved expression effects on the tyrosinase promoter. In particular, the butyl alcohol fraction evidenced a high expression rate at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In the MTT assay, the methanolic extract did not evidence cytotoxicity at concentrations under 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Therefore, the results observed with the extract of *Glycine maxim* showed that the substance exerted a positive effect on the tyrosinase promoter.

Key words: *Glycine maxim*, tyrosinase promoter, B16 mouse melanoma cell.

서론

대두(大豆)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 일년생 초본식물인 콩(*Glycine maxim*)을 일컫는 것으로서 아시아를 비롯하여 아메리카 지역에서 많이 재배되고 있으며, 동물성 식품을 대체할 수 있는 우수한 영양원을 다량으로 함유하고 있어 예로부터 식용으로 널리 이용되어 왔다. 최근, 대두는 단백질, 지방, 탄수화물과 같은 영양물질 이외에도 생물학적 활성에 관심이 집중되고 있는 이소플라본, 사포닌, 식이섬유, 올리고당, 레시틴 등 다양한 생리활성 물질들을 다량 함유하고 있어 항산화, 항돌연변이, 골다공증 및 고지혈증 예방, 비만 방지, 혈당 및 콜레스테롤 조절 등의 효능·효과가 우수하여 각종 성인병 및 항암 예방 효과가 있음이 많은 연구자들에 의하여 증명되고 있다¹⁻⁵⁾. 그 중에서도 이소플라본은 여성 호르몬인

에스트로겐과 같은 유사한 특성을 지니고 있어 폐경기 여성들의 각종 질환에 관여하여 폐경기 이후에 나타나는 각종 증후군을 예방하고 완화하는 효과가 있는 것으로도 알려져 있다⁶⁾.

티로시나아제(tyrosinase)는 사람의 피부나 모발의 색을 결정하는 동시에 기미·주근깨와 같은 색소 침착의 원인이 되는 멜라닌 색소의 생합성 초기 반응의 조절하는 효소이다. 지금까지의 티로시나아제의 조절에 관한 연구는 산업적으로 고부가가치를 창출하는 측면에서 멜라닌 색소의 생합성 억제를 목적으로 저해 중심의 연구가 주로 이루어져 왔다. 그 결과, 티로시나아제에 대하여 저해 효과가 있는 식물 및 해조류 추출물⁷⁻⁹⁾ 및 다양한 식물들로부터 단일 성분들이 분리·개발되어¹⁰⁻¹³⁾ 미백 화장품의 원료로서 이용되고 있다. 그러나 현재 널리 이용되고 있는 물질 대부분은 효소의

† Corresponding author: Jong-Eon Chin, Dept. of Cosmetology, Dongkang College, 771, Duam-Dong, Bukgu, Gwangju 500-714, Korea. Tel: +82-62-520-2348, Fax: +82-62-520-2216, E-mail: jechin@naver.com

활성을 조절하는 수준에서 이루어져 멜라닌 색소의 생합성 억제 효과가 낮을 뿐만 아니라 지속성이 짧은 단점을 지니고 있다. 따라서 효과가 높고 지속력이 우수한 멜라닌 색소의 생합성 조절물질을 개발하기 위해서는 유전자 발현 수준에서의 이루어짐과 동시에 티로시나아제 효소의 결핍에 의한 백반증 치료를 목적으로 한 연구가 절실하게 필요하다. 그러나 현재 이에 대한 연구는 Chin 등¹⁴⁻¹⁹, Cho 등²⁰ 그리고 Lee 등²¹의 연구 보고를 제외하고는 아직까지 매우 미흡한 실정이다.

본 연구는 유전자 발현 수준에서 멜라닌 색소의 생합성을 조절하는 천연물질들을 탐색하고자 항산화, 항돌연변이, 항암 등 다양한 효능·효과를 지니고 있는 것으로 알려진 대두로부터 물질을 추출한 다음 사람의 티로시나아제 프로모터 부위가 삽입되어 형질 전환된 B16 mouse melanoma cell에 처리하여 티로시나아제 프로모터 발현 유무 및 세포 독성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 대두는 광주 시내 곡물상에서 구입하여 감정한 후 사용하였으며, 표준품은 동강대학 화장품 연구실에 보관하였다.

2. 추출 및 분획

시료의 추출은 건조 대두 0.1 kg을 취한 다음 메탄올을 가하여 실온에서 1 주일 동안 정치시킨 후 3 회 추출·여과하였다. 여과액은 감압·농축하여 동결·건조시킨 후 분말 형태로 제조하였다. 용매분획은 분말화 된 추출물을 증류수로 현탁한 다음, 극성도가 다른 methylene chloride, ethyl acetate, butyl alcohol, 물을 이용하여 4 개의 층으로 분획하여 메탄올 추출물과 같은 방법으로 농축하였으며, 이 농축물은 동결·건조하여 분말 형태로 제조하였다.

3. 시료 제조

분말로 된 추출물 및 분획물 100 mg에 에탄올과 dimethylsulfoxide (DMSO)가 1:1로 혼합된 용매 1 ml씩을 가하여 완전히 용해시킨 후 여과하여 티로시나아제 프로모터의 발현에 미치는 효과를 측정하였다.

4. 세포배양

B16 mouse melanoma cell(ATCC CRL 6323)은 10%(w/v)의 Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco BRL), 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 36~48시간 주기로 계대배양하여 유지하였다.

티로시나아제 프로모터를 도입하여 형질 전환된 B16 mouse melanoma cell은 위의 RPMI Medium 1640 완전 배지에 Geneticin (200 µg/ml)을 가한 선택 배지를 이용하여 유지하였다.

5. 세포내 유전자 도입(Stable Transfection)

B16 mouse melanoma cell 내에 tyrosinase 프로모터가 삽입된 유전자를 도입하기 위해 LipofectAMINE(Life Technologies Inc.)을 이용한 다음과 같은 방법으로 stable transfection을 실시하였다.

1) 세포내 유전자 도입

B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 평판 배지에 세포수가 3~4×10⁵이 되도록 접종한 후 24시간 배양한 다음, 배양액 1 ml에 6 µl LipofectAMINE과 2 µg의 total plasmid DNA를 5시간 처리하는 방법으로 형질 전환을 실시하였다. Plasmid DNA는 luciferase gene을 지닌 pGL2-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 Geneticin(600 µg/ml)이 들어있는 선택 배지에서 배양한 후 형질 전환된 B16 mouse melanoma cell을 선별하였다.

6. Luciferase 활성도 측정

세포내 유전자 도입을 통해 얻은 B16 mouse melanoma cell의 형질 전환 유무를 확인하기 위하여 luciferase 활성도를 측정하였다. 형질 전환을 통하여 얻은 콜로니들을 Trypsin-EDTA를 처리하여 떼어낸 후 24 well plate에 세포수가 well당 6×10⁴ 되게 분주하여 24시간 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 7.8의 25 mM Tris-phosphate 완충용액으로 용해하였다. 용해된 세포들을 취하여 원심분리한 다음 얻어진 상등액에 대해 Luminometer(Lumat LB 9507, Berthold, Germany)를 이용하여 luciferase 활성도를 측정하였으며, luciferase 활성도가 가장 높게 나타난 B16 mouse melanoma cell을 선별하여 이용하였다.

7. 티로시나아제 프로모터 발현을 측정

형질 전환된 B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전 배지가 들어 있는 24 well plate에 세포수가 well당 6×10^4 되게 접종한 다음 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 각각의 well에 대두 메탄올 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로, 용매 분획물은 각각의 well에 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 6 시간 동안 처리한 다음 luciferase 활성도를 측정하여 티로시나아제 프로모터의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

8. 세포 독성 측정

B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전 배지가 들어 있는 96 well plate에 세포수가 well당 $1 \sim 1.2 \times 10^4$ 되게 접종한 다음 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 대두 메탄올 추출물을 각각의 well에 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 그리고 1 mg/ml의 농도로 6 시간 동안 처리한 다음 Mosmann²²⁾의 방법에 따라 ELISA(Bio-Tek Inc, Vermont, USA) 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 독성을 평가하였다.

결과 및 고찰

1. 물질추출 및 분획물질의 양

대두로부터 유용성 물질을 얻기 위하여 건조된 대두 0.1 kg에 메탄올을 첨가한 다음 실온에서 1주일 동안 정치시켜 추출·농축하는 방법으로 3회 반복한 결과 14.3 g을 얻었다. 그 후 이를 극성도가 서로 다른 4가지 용매, 즉 methylene chloride, ethyl acetate, butyl alcohol, 물 등을 이용하여 용매로 분획·농축한 결과 각각 약 1.9 g, 2.6 g, 2.9 g, 5.4 g으로 낮은 수율을 나타내었다.

2. 티로시나아제 프로모터 발현

세포내 유전자 도입을 통하여 제조된 B16 mouse melanoma cell에 대두 메탄올 추출물을 처리하여 티로시나아제 프로모터의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 그 추출물의 농도에 따라 티로시나아제 프로모터의 발현율은 다르게 나타났다 (Fig. 1). 즉, 대두 추출물을 각각 10 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 형질 전환된 세포에 처리하였을 때 대조군 세포에 비해 티로시나아제 프로모터의 발현율이 약 113%와 184%로 크게 증진시키는 결과를 보여주었다. 그러나 1 mg/ml의 고농도로 처리하였을 때에는 발현율이 53%로서 프로모터의 발현을 억제하여 서로 상반된 결과를 보여 주었는데, 이는 광학현미경상에서 육안으로 세포의 고사현상을 확인할 정도로 강한 세포 독성에 의해 기인된 것으로 추측되어진다. 본 연구에서 대두의 메탄올 추출물은 지금까지 티로시나아제 프로모터의 발현

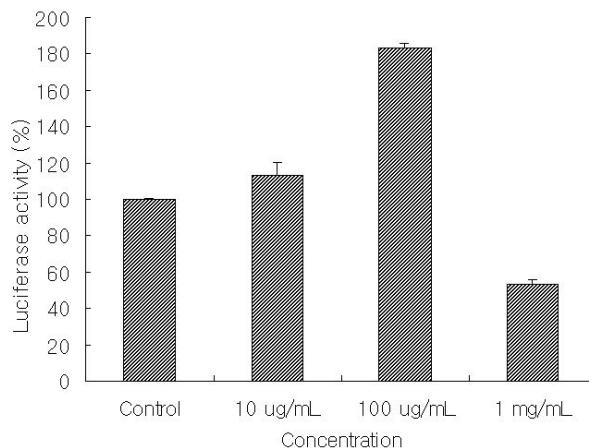


Fig. 1. Effect of *Glycine maxim* extract on the tyrosinase promoter in B16 mouse melanoma cells. Transfected B16 melanoma cells were incubated in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated *Glycine maxim* extract for 6 hr. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at $13,000 \times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

을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고된 빈랑¹⁹⁾, 복분자¹⁸⁾, 양파²⁰⁾, 어성초¹⁵⁾, 울피¹⁶⁾, 지치²¹⁾ 등의 메탄올 추출물들과는 서로 다른 경향을 보여 주었다.

대두의 메탄올 추출물을 4종류의 용매로 분획하여 얻은 물질들을 형질 전환된 세포에 처리하였을 때 Table 1에서 보여 주듯이 이들 분획물들 모두는 처리 농도에 차이는 있었지만, 티로시나아제 프로모터의 발현을 증진시키는 경향을 나타내

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

Solvent fraction layer	Luciferase assay(%)		
	10 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$
Methylene chloride layer	130 \pm 4.3	154 \pm 3.7	120 \pm 8.1
Ethyl acetate layer	99 \pm 4.1	127 \pm 2.1	109 \pm 3.0
Butyl alcohol layer	144 \pm 2.5	174 \pm 8.7	134 \pm 3.2
Water layer	103 \pm 5.5	120 \pm 1.5	109 \pm 8.9

Transfected B16 melanoma cells were incubated with 6×10^4 in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated solvent fractions of *Glycine maxim* 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.

었으며, 특히 4종류의 용매 분획물들 모두 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 형질 전환된 세포에 처리하였을 때 최대 발현율을 나타내었다. 티로시나아제 프로모터의 발현 증진 효과가 가장 높은 용매 분획물은 butyl alcohol 용매 분획물로서 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 약 144%, 174%, 134%의 발현 증진 효과를 나타내었으며, 그 다음은 methylene chloride 용매 분획물로서 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 약 130%, 154%, 120%의 발현율을 나타내었으며, 이 티로시나아제 프로모터의 발현 증진 효과는 메탄올 추출물을 형질 전환된 세포에 처리하였을 때와 유사하였다. 그러나 ethyl acetate와 물 용매 분획물의 경우에는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리했을 때 만 티로시나아제 프로모터의 발현율이 약간 증진되었을 뿐 다른 처리농도에서는 대조군과 유사한 결과를 보여 주었다.

본 연구결과 대두의 메탄올 추출물과 용매 분획물들은 멜라닌 색소 생합성에 관여하는 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하기 보다는 크게 증진시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 이 결과로 미루어 보아 대두에는 티로시나아제 프로모터의 발현을 증진시켜 멜라닌 색소의 생합성을 촉진시키는 성분들이 많이 함유되어 있는 것으로 추측된다. 따라서 대두 추출물은 유전자 조절수준에서 티로시나아제 효소 결핍에 의해 멜라닌 색소의 생합성이 제대로 이루어지지 않아 원인이 되고 있는 백반증의 예방 및 치료 목적으로 이용하는 것이 효율적이라 판단된다.

3. 세포 독성

티로시나아제 프로모터의 발현 증진 효과가 우수한 대두 메탄올 추출물을 B16 mouse melanoma cell에 처리한 결과 Fig. 2

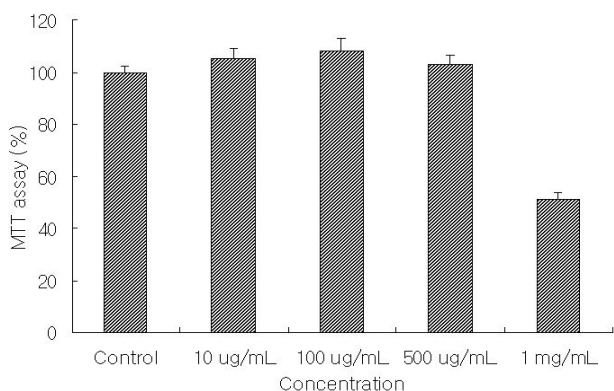


Fig. 2. Cytotoxicity of *Glycine maxim* extract on B16 mouse melanoma cells. B16 melanoma cells were incubated with $1 \sim 1.2 \times 10^4$ in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated with *Glycine maxim* extract for 6 hr. Then, the cells were used for MTT assay. Values are the means of results from triplicate experiments.

에서 보여 주듯이 세포 독성은 처리농도에 따라 다르게 나타났다. 즉 대두 메탄올 추출물은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 세포에 처리하였을 때 세포의 활성능이 대조군 세포에 비하여 각각 약 105%, 108%, 103%로 나타나 세포 독성이 거의 없는 것으로 판명되었다. 그러나 대두 메탄올 추출물을 티로시나아제 프로모터의 발현을 크게 억제하는 효과를 나타낸 농도, 즉 1 mg/ml 의 농도로 세포에 처리하였을 때에는 세포의 활성능이 약 51%로 크게 감소할 정도로 높은 세포 독성을 나타내 티로시나아제 프로모터의 높은 발현 억제 효과는 세포 독성에 의해서 일어난 것이 증명되었다. 따라서 대두 메탄올 추출물을 멜라닌 색소 생합성에 관여하는 티로시나아제 프로모터의 발현을 조절하는 물질로 이용하기 위해서는 세포 독성을 고려하여 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도로 이용하는 것이 바람직하다.

요약 및 결론

멜라닌 색소의 생성에 관여하는 티로시나아제 프로모터를 조절하는 천연물질을 탐색하고자 티로시나아제 프로모터에 리포터 유전자인 luciferase 유전자를 포함하는 플라스미드로 형질 전환된 B16 mouse melanoma cell에 대두 메탄올 추출물을 처리한 후 티로시나아제 프로모터의 활성이 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 약 113%와 184%로 증진 효과를 나타내었으나, 1 mg/ml 의 고농도에서는 티로시나아제 프로모터의 활성이 약 53%로서 억제 효과를 나타내었다. 대두의 4가지 용매 분획물들을 메탄올 추출물과 같은 방법으로 처리한 결과, butyl alcohol과 methylene chloride 용매 분획물에서 티로시나아제 프로모터의 발현 효과가 크게 증진되었으며, 특히 butyl alcohol 용매 분획물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 티로시나아제 프로모터의 발현율이 약 174%로 매우 높은 증진 효과를 나타내었다. 한편, 세포 독성을 측정하기 위하여 MTT assay를 실시한 결과 대두 메탄올 추출물은 티로시나아제 프로모터의 발현을 증진시키는 농도에서는 대조군 세포와 유사한 활성능을 나타낼 정도로 세포 독성이 거의 없었으나, 1 mg/ml 의 고농도에서는 세포 활성능이 약 51%로서 높은 세포 독성이 나타났다. 따라서 대두 메탄올 추출물을 1 mg/ml 의 고농도 처리했을 때 나타난 티로시나아제 프로모터의 발현 억제 효과는 세포 독성과도 관련이 있는 것으로 추측된다. 그러므로 대두 추출물은 티로시나아제 프로모터의 발현을 증진시키는 효과를 나타내므로 미백제로서의 이용보다는 티로시나아제 효소 결핍에 의한 백반증 치료제로서의 많은 연구가 기대된다.

참고문헌

1. Choi, J, Yang, HS, Shon, MY, Kim, JS and Park, SK. Anti-

- oxidant and anticarcinogenic activities of methanol extracts from soybean products fermented by some mycelia of mushroom and *Bacillus megaterium* SMY-212. *Food Industry and Nutr.* 9:34-39. 2004
2. Kang, SA and Han, JA. Acetylcholinesterase inhibiting effect and free radical scavenging effect of soybean(*Glycine max*) and Yak-Kong(*Rhynchosia noubilis*). *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 14:64-69. 2004
 3. Kim, MS and Lee, YS. Effects of dietary calcium and soy isoflavones supplementation on bone metabolism in the ovariectomized rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 34:833-839. 2005
 4. Lee, KS and Yoon, SH. Hyperlipidemic effects of soybean in rats. *J. Kor. Soc. Hygienic Sciences.* 4:7-13. 1998
 5. Shin, YC and Jeon, JY. Hypoglycemic effect of pinitol isolated from soybean. *Food Sci. and Industry.* 36:56-62. 2003
 6. Kim, CH, Park, JS, Sohn, HS and Chung, CW. Determination of isoflavon, total saponin, dietary fiber, soy oligosaccharides and lecthins from commercial soy products based on the one serving size-some bioactive compounds from commercialized soy products. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34:96-102. 2002
 7. Lee, SH, Park, JS, Kim, SY, Kim, JJ and Chung, SR. The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product. *Yakhak Hoeji* 41:456-461. 1997
 8. Jeong, H, Park, YG, Shin, UK, Shin, SK, Baek, SK, Lee, MH, Chung, SR and Park, YI. Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji* 41:518-523. 1997
 9. 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
 10. No, JK, Soung, DY, Kim, YJ, Shim, KH, Jun, YS, Rhee, SH, Yokozawa, T and Chung, HY. Inhibitory of tyrosinase by green tea components. *Life Sci.* 65-PL:241-246. 1999
 11. Shin, NH, Ryu, SY, Choi, EJ, Kang, SH, Chang, IM, Min, KR and Kim, YS. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on the dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Communi.* 243:801-803. 1998
 12. Yokota, T, Nishino, H, Kubota, Y and Mizoguchi, M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res.* 11:355-361. 1998
 13. Kubo, I and Ikuyo, KH. 2-Hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde A potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants. *Planta Medica.* 65:19-22. 1999
 14. 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 Med.* 1:6-13. 2000
 15. Chin, JE and Cho, NC. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on tyrosinase gene expression. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 34:1284-1288. 2005
 16. Chin, JE and Kim, KC. Effect of chestnut bark extracts on tyrosinase gene expression. *Kor. J. Sanitation.* 20:10-16. 2005
 17. Chin, JE, Lee, HS and Kim, KC. Effect of mushroom extracts on tyrosinase promoter. *Kor. J. Sanitation.* 21:1-8. 2006
 18. Chin, JE, Cho, NC and Kim, KC. Effect of *Rubus coreanum* extracts on tyrosinase promoter. *Kor. J. Sanitation.* 21:44-51. 2006
 19. Chin, JE and Cho, NC. The effects of *Area catechu* extracts on tyrosinase gene expression in B16 mouse melanoma cells. *Kor. J. Food & Nutr.* 20:240-244. 2007
 20. 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 the tyrosinase gene expression. *Kor. J. Food & Nutr.* 14:228-232. 2001
 21. Lee, BH, Bai, S and Chin, JE. Inhibitory effect of *Lithospermum erythrorhizon* extracts on melanin biosynthesis. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 34:325-329. 2005
 22. Mossman, TJ. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Immunol. Methods.* 63:55-63. 1983

(2008년 7월 1일 접수; 2008년 8월 30일 채택)