

## 울피 추출물이 티로시나아제 유전자 발현에 미치는 효과

진종언 · 김관천\*

동강대학 피부미용과, \* 광주보건대학 환경행정과

### Effect of Chestnut Bark Extracts on Tyrosinase Gene Expression

Jong-Eon Chin and Kwan-Chun Kim\*

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

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

#### Abstract

Chestnut bark extract by methanol repressed the expression of tyrosinase gene of B16 mouse melanoma cell containing tyrosinase promoter. 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\text{mg}/\text{ml}$  of the extract repressed expression of tyrosinase gene about 38%, 47%, and 78%, respectively, compared with control. In the MTT assay, the same extract exhibited very low cytotoxicity at 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and 1  $\text{mg}/\text{ml}$ , respectively. The fractions of Methylene chloride and ethyl acetate did not showed the repressive effect on the expression of tyrosinase gene, but the fraction of butyl alcohol repressed highly at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Keywords : Chestnut bark, tyrosinase gene, B16 mouse melanoma cell

#### I. 서 론

오늘날 사람들은 사회활동의 증가, 그리고 환경 오염에 따른 오존층의 파괴로 인하여 유해한 자외선에 피부가 과다 노출됨으로서 각종 피부 트러블이 유발 또는 촉진되어 피부 건강 및 미용적인 측면에서 심각한 문제가 되고 있다. 특히, 기미·주근깨를 생성하는 멜라닌 색소는 피부 색소침착의 원인이 되고 있어 이에 대한 관심이 날로 증가하고 있으며, 최근에도 희고 아름다운 피부를 유지하기 위하여 멜라닌 색소 생합성 억제에 관한 많은 연구들이 이루어지고 있다.

멜라닌 색소는 사람의 피부, 모발, 눈 등에서 쉽

게 찾아 볼 수 있는 색소로서 피부의 표피내 기저층에 위치하고 있는 멜라닌 생성세포(melanocyte cell)가 자외선이나 다른 자극들에 의해 활성화되어 만들어지며, 피부색 결정, 유해한 자외선 또는 유리기(free radical)로부터 인체보호 등의 역할을 담당하고 있다. 이 색소는 여러 단계의 산화반응을 거쳐 L-티로신으로부터 합성되어지며, 그의 생합성 기작의 조절에는 Tyrosinase, DHICA oxidase (TRP1), DOPAchrome tautomerase (TRP2), Catechol-O-methyltransferase (COMT)와 같은 여러 효소들이 관여하고 있으며<sup>1-3)</sup>, 특히 티로시나아제 효소는 멜라닌 색소 생합성의 초기 반응을 조절하는 주요 효소로서 알려져 있다. 지금까지 멜

라닌 색소의 생합성을 억제하기 위한 방법으로 티로시나아제 효소를 중심으로 한 연구가 가장 활발하게 이루어져 왔다. 그 결과 많은 식물 및 해조류들이 티로시나아제 활성 저해효과가 있는 것으로 보고 되었으며<sup>4-11)</sup>, 그 중 대황<sup>12)</sup>, 볼리비아 약용식물<sup>13)</sup>, 닥나무<sup>14)</sup>, 감초<sup>15)</sup>, 목단피<sup>16)</sup>, 뽕나무<sup>17,18)</sup>, 녹차<sup>19)</sup>, 아프리카 약용식물<sup>20)</sup>, 여로<sup>21)</sup>, 전호<sup>22)</sup>, 대극과 식물<sup>23)</sup>, 백출<sup>24)</sup>, 지실<sup>25)</sup> 등으로부터는 티로시나아제 활성 저해효과가 있는 단일성분들이 분리되었다. 그러나 이러한 연구들의 대부분은 효소의 활성 저해에 대한 연구로서 멜라닌 색소의 생합성 억제효과가 낮고 지속성이 짧다는 단점이 있다. 따라서 효과적으로 멜라닌 색소의 생합성을 조절하기 위해서는 유전자 발현 수준에서의 천연물에 관한 연구가 필요하나 아직까지 Chin 등<sup>26)</sup>과 Cho 등<sup>27)</sup>의 연구 결과를 제외하고는 매우 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 티로시나아제 효소의 활성을 저해하는 효과가 있다고 알려진 참나무과(*Fagaceae*) 식물 밤나무(*Castanea mollissima*) 열매의 속껍질, 즉 울피(Chestnut bark)로부터 물질을 추출·분획하여 형질전환 된 B16 mouse melanoma cell에 처리하여 티로시나아제 유전자의 발현 및 세포독성에 미치는 효과를 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용한 올피는 광주시내 한약 건재상에서 구입하여 감정한 후 사용하였으며, 표품은 동강대학 피부미용과 향장연구실에 보관하였다.

### 2. 추출 및 분획

시료의 추출은 건조된 생약을 세절하여 0.1 kg씩을 취한 다음 메탄올을 가하여 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. 그리고, 이 농축물은 동결·건조하여 분말 형태로 제조하였다.

### 3. 시료 제조

분말로 된 추출물 및 분획물 100 mg에 에탄올과 디메틸설퍼옥사이드(dimethyl sulfoxide)가 1:1로 혼합된 용매 1 ml씩을 가하여 완전히 용해시킨 후 여과하여 티로시나아제 유전자 발현율과 세포독성 측정에 이용하였다.

### 4. 세포배양

B16 mouse melanoma cell은 10%(v/v)의 Fetal Bovine Serum(FBS, GibcoBRL), 1%(v/v) Antibiotic(Gibco BRL), 그리고 2mM의 L-glutamine 이 포함된 RPMI Medium 1640(GibcoBRL, RPMI Medium 1640 완전배지)에서 CO<sub>2</sub> 분압을 5.0%로 조절하여 37°C에서 배양하였으며, 세포는 36 ~ 48 시간 주기로 계대배양하여 유지하였다.

티로시나아제 프로모터를 도입하여 형질전환 된 B16 mouse melanoma cell은 위의 RPMI Medium 1640 완전배지에 Geneticin(200 µg/ml)을 가한 선택배지를 이용하여 유지하였다.

### 5. 세포내 유전자 도입 (Stable Transfection)

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

#### 5.1 세포내 유전자 도입

B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 평판배지에 세포수가 3~4×10<sup>5</sup>이 되도록 집중한 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-vector(Promega)의 *Sma*I site에 1.5Kb의 neomycin 저항성 유전자를 삽입한 다음 1.0 Kb의 사

람 티로시나아제 프로모터를 *EcoRI/KpnI* site에 클로닝을 하였다.

5.2 형질전환 된 세포의 선별

Stable transfection 처리 5시간 후 B16 mouse melanoma cell로부터 LipofectAMINE 시약과 재조합 된 DNA가 함유된 배지를 제거한 후 콜로니가 형성될 때까지 Geneticin(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  $6 \times 10^4$  되게 분주하여 24 시간 배양하였다. 그 후 세포들은 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 세척한 다음 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 그리고 2mM 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 mouse melanoma cell을 선별하여 본 실험에 이용하였다.

7. 티로시나아제 유전자의 발현 효과 측정

형질전환 된 B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전배지가 들어 있는 24 well plate에 세포수가 well당  $6 \times 10^4$  되게 접종한 다음 24 시간 배양하였다. 그 후 각각의 well에 울피 메탄을 추출물은 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1 mg/ml의 농도로, 그리고 용매 분획물은 각각 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml 농도로 6 시간 처리한 다음 luciferase 활성도를 측정하여 티로시나아제유전자 발현에 미치는 효과를 조사하였다.

8. 세포독성 측정

B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전배지가 들어 있는 96well plate well에 세포수가 well당  $1.0 \sim 1.2 \times 10^4$  되게 접종한 다음 24 시간 배양하였다. 그 후 울피 메탄을 추출물을 각각의 well에 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 그리고 100 µg/ml의 농도로 6 시간 처리한 다음 Mosmann<sup>28)</sup>의 방법에 따라 MTT assay를 실시하여 세포독성을 평가하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 울피 메탄을 추출물의 티로시나아제 유전자 발현 효과

세포내 유전자 도입을 통하여 제조된 B16 mouse melanoma cell에 울피 메탄을 추출물을 처리하여 티로시나아제 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 울피 메탄을 추출물은 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 효과를 나타냈다(Fig. 1). 울피 메탄을 추출물의 농도를 각각 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1 mg/ml로 달리하여 세포에 처

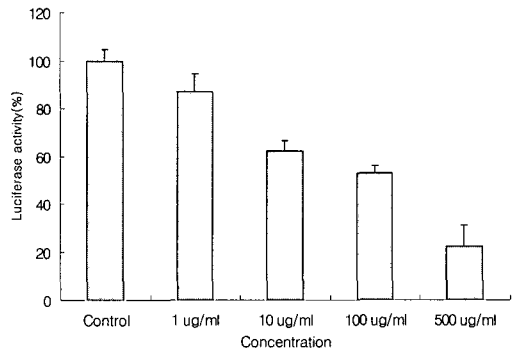


Fig. 1. Effects of chestnut bark extract on the tyrosinase gene in B16 mouse melanoma cells. Transfected B16 melanoma cells were incubated in RPMI 1640 medium for 24 hours and treated chestnut bark extract for 6 hours. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at 13,000 xg for 2~3 minutes. The supernatants were used for luciferase assay. Values are the means of results from triplicate experiments.

리하였을 때 억제 효과는 대조군에 비해 각각 약 38%, 47%, 78%로서 추출액 농도에 비례하는 경향을 나타냈다. 이는 티로시나아제 효소 활성을 저해하는 것으로 알려진 대황<sup>12)</sup>, 감초<sup>15)</sup>, 목단피<sup>16)</sup> 등의 추출물들과는 다른 결과를 보여 주었다. 즉 대황, 감초, 목단피 등의 추출물은 티로시나아제 유전자 발현을 억제하기 보다는 증진시키는 결과를 보여 주었으나, 양 등<sup>8,9)</sup>에 의하여 티로시나아제 효소 활성 저해효과가 있다고 알려진 울피 추출물은 티로시나아제 유전자의 발현을 크게 억제하는 효과를 나타내었다. 따라서 울피 추출물은 효소 티로시나아제의 활성저해 뿐 만 아니라 유전자의 발현을 억제하여 멜라닌 색소의 생합성을 효과적으로 제어할 수 있는 천연물질이라 판단된다.

### 2. 울피 메탄올 추출물의 세포독성

B16 mouse melanoma cell에 울피 메탄올 추출물을 처리한 결과 세포독성은 매우 낮게 나타냈다 (Fig. 2). 울피 메탄올 추출물을 처리하였을 때 농도의 증가에 세포의 생존율이 감소하는 결과를 보여주었으나 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 그리고 1 mg/ml의 농도로 처리하였을 때 세포의 생존율이 대조군에 비해 각각 약 98%, 98%, 79%, 74%로 세포독성이 매우 낮게 나타났다. 이와 같이 울피

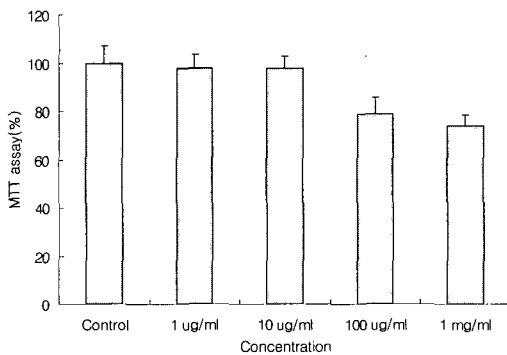


Fig. 2. Cytotoxicity of chestnut bark extracts on B16 mouse melanoma cells. B16 melanoma cells were incubated with  $1.0 \sim 1.2 \times 10^4$  in RPMI 1640 medium for 24 hours and treated with chestnut bark extract for 6 hours. Then, the cells were used for MTT assay. Values are the means of results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

메탄올 추출물은 세포독성이 낮으면서도 티로시나아제 효소의 유전자 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타나 효과적인 멜라닌 색소의 생성 억제제로서의 응용이 기대된다.

### 3. 울피 용매 분획물의 티로시나아제 유전자 발현 효과

형질전환 된 B16 mouse melanoma cell에 각각의 울피 용매 분획물을 처리한 바 티로시나아제 유전자의 발현율은 용매 분획물에 따라 다양한 결과를 나타냈다 (Table 1). 즉, 극성도가 낮은 methylene chloride와 ethyl acetate 용매로 분획하여 얻은 울피 추출물은 500µg/ml의 고농도를 제외하고는 100µg/ml 이하의 농도에서 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하지 못하였다. 그러나 methylene chloride 용매 분획물은 500µg/ml의 고농도에서 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 효과를 나타내었지만 세포가 분해될 정도로 매우 심한 독성을 나타내 그 효과는 세포독성과 밀접한 관련이 있는 것으로 확인되었다. Butyl alcohol과 물 용매로 분획하여 얻은 울피 추출물은 methylene chloride 또는 ethyl acetate 용매로 분획하

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

Solvent fraction layer	Luciferase assay(%)			
	1.0 µg/ml	10.0 µg/ml	100.0 µg/ml	500.0 µg/ml
Methylene chloride layer	99±8.3	98±7.6	107±9.0	18±8.6
Ethyl acetate layer	101±4.4	96±6.1	137±5.4	72±3.0
Butanol layer	72±6.7	38±0.5	36±7.9	34±8.0
Water layer	98±6.0	99±8.4	47±3.8	46±5.9

1. Values are the means of results from triplicate experiments.

2. Transfected B16 melanoma cells were incubated with  $6 \times 10^4$  in RPMI 1640 medium for 24 hours and treated solvent fractions of chestnut bark for 6 hours. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at 13,000 xg for 2~3 minutes. The supernatants were used for luciferase assay.

여 얻은 것과는 달리 저농도에서도 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 효과를 나타내었다. 특히, 율피의 butyl alcohol 분획물은 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 500 $\mu$ g/ml의 농도로 처리하였을 때 모든 농도에서 대조군에 비해 약 18~66% 정도 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 효과를 보여 주었으며, 세포독성은 매우 낮게 나타났다. 그리고, 이 분획물의 티로시나아제 유전자의 발현 억제 효과는 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 메탄올 추출물에 비하여 약 15~24% 정도로 보다 향상되었다. 한편, 율피의 물 분획물은 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하였지만 butyl alcohol 용매 분획물에 비해 그의 효과가 상대적으로 낮게 나타났다. 이 결과는 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 성분들이 물 분획물보다는 butyl alcohol 용매 분획물에 주로 함유되어 있다는 것을 보여 주었다. 이를 통해서 볼 때 율피 추출물 내에 함유되어 있는 티로시나아제 유전자의 발현 억제 성분들은 비교적 극성도가 높은 물질이라 생각되어진다.

본 연구에서 멜라닌 색소 생합성에 관여하는 효소 티로시나아제 활성 저해 효과가 있는 것으로 알려진 율피 추출물에는 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 효과가 높은 성분도 함유하고 있다는 것이 확인 되었으며, 앞으로 보다 많은 연구를 통하여 율피 추출물이 피부를 희고 아름답게 가꾸어주는 미백 화장품 및 의약품의 천연원료로서 보다 널리 이용될 것으로 기대된다.

#### IV. 결 론

멜라닌 색소 생성에 관여하는 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 물질을 탐색하고자 티로시나아제 프로모터를 지닌 B16 mouse melanoma cell에 율피 메탄올 추출물을 처리한 바 율피 메탄올 추출물은 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 1mg/ml의 농도에서 대조군에 비해서 약 38%, 47% 78%의 억제효과를 나타냈으며, 세포생존율은 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 1mg/ml의 율피 메탄올 추출물 농도에서 약 98%, 98%, 79%, 74%로서 세포독성이 낮게 나타났다. Methylene chloride와 ethyl acetate 분획물은 티로시나아제 유전자의 발현을 억제하는 효

과가 없었지만 buthyl alcohol과 물 분획물은 유전자 발현 억제효과를 나타내었으며, 특히 butyl alcohol 분획물은 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 1mg/ml의 농도에서 각각 약 38%, 36%, 34%의 발현율을 나타냄으로써 대조군에 비해 티로시나아제 유전자의 발현을 크게 억제하였다.

#### 참고문헌

1. 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.
2. Paval, S. Dynamics of melanogenesis intermediates. *J. Invest. Dermatology* 100, 162S-165S, 1993.
3. 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.
4. Jung, S. W., Lee, N. K., Kim, S. J., and Han, D. S. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27, 891~896, 1995.
5. Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J., and Chung, S.R. The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product. *Yakhak Hoeji* 41, 456~461, 1997.
6. Jeong, H., Park, Y. G., Shin, U. K., Shin, S. K., Baek, S. K., Lee, M. H., Chung, and Park, Y. I. Tyrosinase Inhibition Activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji* 41, 518~523, 1997.
7. 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.
8. Yang, M. J., Lim, S. J., Ahn, H. S., Kim, M.

- A., and Ahn, R. M. Inhibitory effects of chestnut bark extracts on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Kor. J. Env. Hlth Soc.* 25(1), 37~43, 1999.
9. Yang, M. J., Kim, M. G., Lim, S. J., Ahn, H. S., and Ahn, R. M. Inhibitory effects of water-acetone extract of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis. *Yakhak Hoeji* 43(4), 494~501, 1999.
  10. Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q. T., and Bernard, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J. Ethnopharmacology* 82, 155~158, 2002.
  11. 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.
  12. Koichi Iida, Koji Hase, Kenji Shimomura, Syu Sudo, Shigetoshi Kadota, and Tsuuneo Namba. Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*. *Planta Medica*, 61, 425~428, 1995.
  13. Isao Kubo, Yoshihiro Yokokawa, and Ikuyo Kinst-Hori. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants. *Journal of Natural products* 58, 739~743, 1995.
  14. Jang, D. I., Lee, B. G., Jeon, C. O., Jo, N. S., Park, J. H., Cho, S. Y., Lee, H., and Koh, J. S. Melanogenesis inhibitor from paper mulberry. *Cosmetics & Toiletries Magazine* 112(3), 59~62, 1997.
  15. Tomohiro Yokota, Hiroyuki Nishino, Yasuo Kubota, and Masako Mizoguchi. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Research* 11, 355~361, 1998.
  16. Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J., and Kim, S. R. Isolation of inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of *Paeonia moutan*. *Yakhak Hoeji* 42, 353~358, 1998.
  17. Shin, N. H., Ryu, S. Y., Choi, E. J., Kang, S. H., Chang, I. M., Min, K. R., and Kim, Y. S. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on the dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243, 801~803, 1998.
  18. 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.
  19. No, J. K., Soung, D. Y., Kim, Y. J., Shim, K. H., Jun, Y. S., Rhee, S. H., Takako Yokozawa and Chung, H. Y. Inhibitory of tyrosinase by green tea components. *Life Science* 65, PL241~246, 1999.
  20. Isao Kubo and Ikuyo Kinst-Hori. 2-Hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde a potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants. *Planta Medica* 65, 19~22, 1999.
  21. Jin, M. H., Kim, H. J., Kang, S. J., Kang, S. H., Kim, C. H., and Jung, M. H. Three melanogenesis Inhibitors from the root of *Veratrum nigrum*. *Kor. J. Pharmacogn.* 33(4), 395~398, 2002.
  22. Kim, C. T., Kim, W. C., Jin, M. H., Kim, H. J., Kang, S. J., Kang, S. H., Jung, M. H., and Lim, Y. H. Inhibitor of melanogenesis from the root of *Peucedanum praeruptorum*. *Kor. J. Pharmacogn.* 33(4), 395~398, 2002.
  23. Kim, J. A., Choi, J. Y., Son, A. R., Park, S. H., Hua, X. G., Lee, J. G., Oh, I. S., Kim, J. J., Chang, H. W., Chung, S. R., Jang, T. S., and Lee, S. H. Inhibitory effects of some natural polyphenols isolated from Euphorbiaceae plants on melanogenesis. *Kor. J. Pharmacogn.* 35(2), 157~163, 2004.
  24. Kim, C. T., Jung, M. H., Moon, C. S., Lim,

- Y. H., Kang, S. J., and Cho, W. G. Inhibitor of melanogenesis from *Atractylodes rhizomas*. *Kor. J. Pharmacogn.* 36(1), 60~63, 2005.
25. Son, A. R., Choi, J. Y., Kim, J. A., Cho, S. H., Hua, X. G., Park, S. H., Chung, S. R., Chung, T. C., Jahang, Y. D., Son, J. K., and Lee, S. H. Isolation of melanogenesis inhibitors from *Ponciri fructus*. *Kor. J. Pharmacogn.* 36(1), 1~8, 2005.
26. 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 Blaise Lee, H. H. Inhibitory effects of some medicinal plant extracts on the tyrosinase promoter activity on B16 mouse melanoma cells. *International Journal of Oriental Medicine* 1, 6~13, 2000.
27. 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.
28. Mosmann, T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Immunol. Methods* 63, 55~63, 1983.