

복분자 추출물이 티로시나아제 프로모터에 미치는 효과

진종연* · 조남철** · 김관천

*동강대학 피부미용과

**동강대학 호텔조리영양과

광주보건대학 환경행정과

Effect of *Rubus coreanum* Extracts on Tyrosinase Promoter

Jong-Eon Chin*, Nam-Chul Cho** and Kwan-Chun Kim

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

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

Abstract

To estimate the inhibitory effect of *Rubus coreanum* extract on melanin biosynthesis, we tested its inhibitory effects on tyrosinase promoter in B16 mouse melanoma cells. *Rubus coreanum* extract by methanol had inhibitory effect approximately 10% on tyrosinase promoter at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In the MTT assay, the same extract exhibited very low cytotoxicity under 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The fractions of methylene chloride, butyl alcohol and water did not showed the inhibitory effect on tyrosinase promoter, but the fraction of ethyl acetate exhibited inhibitory effect approximately 11% at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Key words : *Rubus coreanum*, tyrosinase promoter, B16 mouse melanoma cell

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

I. 서론

멜라닌은 동물, 식물, 미생물 등에 널리 분포하는 색소로서 사람의 경우 피부색을 결정하는 동시에 유해한 자외선이나 유리기(free radical)로부터 인체를 보호하는 중요한 역할을 담당하고 있다. 이 색소는 인체에서 피부 중 표피의 가장 안쪽인 기저층에 존재하는 멜라노사이트(melanocyte cell)가 자외선, 활성산소, 스트레스 등의 각종 자극에 의해 활성화되어 만들어져 케라티노사이트(keratinocyte cell)에 의해 만들어진 케라틴과 함께 위로 이행하여 표피의 가장 바깥층인 각질층에 존재하여 피부를 검게 보이게 한다. 그러나 오늘날 사람들은 여가생활 및 사회활동의 증가, 그리고 환경오염에 따른 오존층의 파괴 등으로 인하여 유해한 자외선에 피부가 과다 노출됨으로서 기미·주근깨와 같은 색소침착의 원인이 되고 있어 피부 건강 및 미용 측면에서 문제를 호소하고 있다. 따라서 멜라닌 색소에 대한 관심도 날로 증가하고 있는 추세이다.

멜라닌 색소는 여러 단계의 산화반응을 거쳐 L-티로신으로부터 합성되어지며, 그의 생합성 기작에는 Tyrosinase, DHICA oxidase(TRP1), DOPAchrome tautomerase(TRP2), Catechol-O-methyltransferase(COMT)와 같은 여러 효소들이 관여하고 있으며¹⁻³⁾, 특히 티로시나아제 효소는 멜라닌 색소 생합성의 초기 반응을 조절하는 주요 효소로서 널리 알려져 있다. 따라서 지금까지 멜라닌 색소의 생합성을 억제하기 위한 방법으로 티로시나아제 효소를 중심으로 한 연구가 가장 활발하게 이루어져 왔다. 그 결과 많은 식물들이 티로시나아제 활성 저해효과가 있는 것으로 보고되었으며⁴⁻⁶⁾, 또한 여러 식물들로부터 티로시나아제 활성 저해효과가 있는 성분들이 분리되었다⁷⁻¹³⁾. 그러나 이러한 물질들은 효

소의 활성을 저해하는 수준에서 이루어져 멜라닌 색소의 생합성 억제효과가 낮고 지속성이 짧다는 단점을 지니고 있다. 최근, 이러한 단점을 보완하기 위하여 멜라닌 색소 생성 관련 유전자 발현 억제 기작, 멜라닌 생성 활성을 제어하는 사이토카인 네트워크, 멜라닌 색소 생합성 효소의 유전자 발현억제 물질 탐색 및 분리 등과 같은 근본적인 수준에서 연구들이 이루어지고 있으나 아직까지 그 연구 결과는 매우 미미하다. 특히, 천연물로부터 멜라닌 생합성 관련 효소의 유전자 발현 억제 물질에 대한 탐색이나 분리에 관한 연구 결과는 아직까지 Chin 등¹⁴⁻¹⁸⁾과 Cho 등¹⁹⁾의 보고를 제외하고는 거의 없다.

복분자(*Rubus coreanum*)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽 활엽성 관목식물로서 우리나라에서는 주로 우리나라 제주도를 비롯하여 중·남부지역의 산야에 자생하고 있다. 특히 복분자의 미성숙 열매는 명안, 태생, 지신, 음위강장, 양모에 효과가 있는 것으로 알려져 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔다. 최근에는 복분자에는 kaempferol 및 quercetin과 같은 폴리페놀, 탄닌류, vitamin C 과 같은 성분들이 함유되어 있어 항산화²⁰⁻²²⁾, 항바이러스²³⁾, 체중조절²⁴⁾ 등 다양한 효능·효과가 있는 것으로 보고 되고 있다. 그러나 복분자는 우수한 효능·효과를 지니고 있음에도 이용은 일부에 제한되어 있어 산업적으로 보다 다양한 이용이 시급하다.

본 연구에서는 유전자 발현 조절 수준에서 멜라닌 색소 생합성에 관여하는 효소로 알려진 티로시나아제의 생합성 억제 물질을 탐색하고자 항산화 효과를 비롯하여 생리활성효과가 우수한 것으로 알려진 복분자로부터 물질을 추출·분획하여 티로시나아제 프로모터가 삽입되어 형질전환 된 B16 mouse melanoma cell에 처리하여 그 프로모터의 발현 유무 및 세포독성에 미치는 효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 복분자는 2005년 11월 광주시내 한약 건재상에서 구입하여 감정한 후 사용하였으며, 표준품은 동강대학 식품건장연구소에 보관하였다.

2. 추출 및 분획

시료의 추출은 건조된 생약 0.2 kg을 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 분말화 된 추출물을 증류수로 현탁한 다음, 극성도가 다른 methylene chloride, ethyl acetate, butyl alcohol, 물을 이용하여 4 개의 층으로 분획하여 메탄올 추출물과 같은 방법으로 농축하였다. 그리고, 그 후 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 프로모터의 발현능과 세포독성을 측정하는데 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 계대배양하여 유지하였다.

티로시나아제 프로모터를 도입하여 형질 전환 된 B16 mouse melanoma cell은 위의 RPMI Medium 1640 완전배지에 neomycin

analogue인 Geneticin 418(200 µg/mL)을 가한 선택배지를 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 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.

(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 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 7.8의 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 이용하였다.

7. 티로시나아제 프로모터 억제효과 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 복분자 메탄을 추출물은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 mg/mL의 농도로, 용매 분획물은 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 6 시간 동안 처리한 다음 luciferase 활성도를 측정하여 티로시나아제 프로모터 억제에 미치는 효과를 조사하였다.

8. 세포독성 측정

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 복분자 메탄을 추출물을 각각의 well에 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 6 시간 동안 처리한 다음 Mosmann²⁵⁾의 방법에 따라 ELISA(Bio-Tek Inc.) 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 평가하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 복분자 메탄을 추출물의 티로시나아제 프로모터 억제효과

세포내 유전자 도입을 통하여 제조된 B16 mouse melanoma cell에 복분자 메탄을 추출물을 처리하여 티로시나아제 프로모터의 발현유무를 조사한 결과, 복분자 메탄을 추출물은 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하는 효과를 나타냈다(Fig. 1). 복분자 메탄을 추출물의 농도를 각각 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 mg/mL로 달리하여 세포에 처리하였을 때 1 mg/mL의 고농도에서는 세포독성이 심하여 티로시나아제 프로모터의 발현을 측정하는 것이 불가능하였지만 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 대조군의 약 98%와 90%로서 티로시나아제 프로모터의 억제 효과는 추출액의 처리농도에 비례하였다. 이는 티로시나아제 효소 활성을 저해하는 것으로 알려진 대황⁷⁾, 감초⁸⁾, 목단피⁹⁾ 등의 추출물들과는 다른 결과를 보여 주었다. 즉 대황, 감초, 목단피 등의 추출물은 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하기 보다는 오히려 증진시키는 결과를 보여 주었으나, 복분자 메탄을 추출물은 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하는 효과를 나타내었다. 따라서 복분자 메탄을 추출물은 유전자 발현 조절수준에서 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하는 것으로 보아 멜라닌 색소의 생합성을 보다 효과적으로 제어할 수 있는 천연물질이라 판단된다.

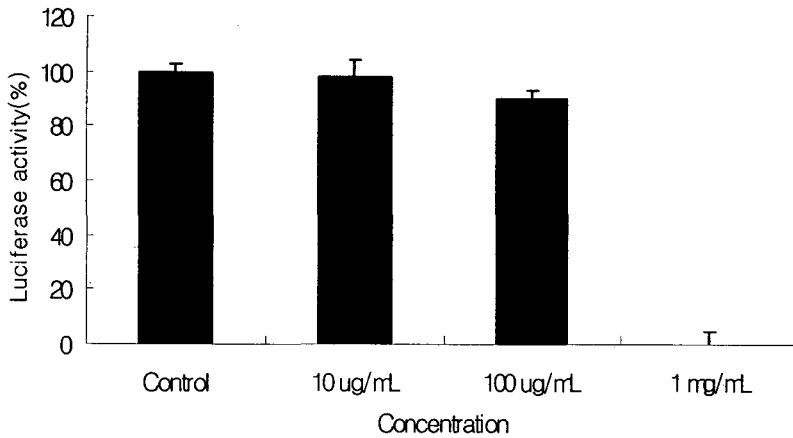


Fig. 1. Effects of *Rubus coreanum* extracts on the tyrosinase promoter in B16 mouse melanoma cells. Transfected B16 melanoma cells were incubated in RPMI 1640 medium for 24 hours and treated *Rubus coreanum* extract for 6 hours. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at 13,000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

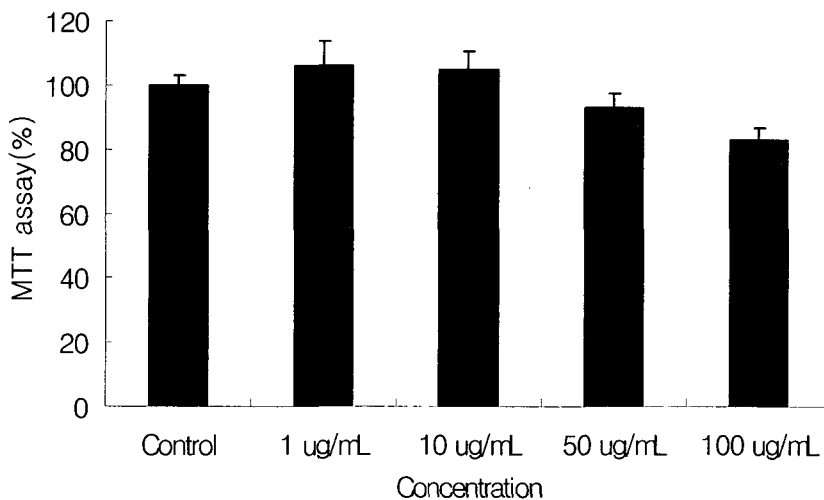


Fig. 2. Cytotoxicity of *Rubus coreanum* extracts on B16 mouse melanoma cells. B16 melanoma cells were incubated with $1 \sim 1.2 \times 10^4$ in RPMI 1640 medium for 24 hours and treated with *Rubus coreanum* extract for 6 hours. Then, the cells were used for MTT assay. Values are the means of results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

Table 1. Effects of solvent fraction layer of *Rubus coreanum* on the tyrosinase gene in B16 mouse melanoma cells.

Solvent fraction layer	Luciferase assay(%)		
	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
Methylene chloride layer	101±8.3	98±7.6	98±6.9
Ethyl acetate layer	99±3.6	96±2.7	89±4.6
Butyl alcohol layer	110±6.2	115±5.7	108±3.4
Water layer	120±2.5	123±4.7	111±2.1

1. Transfected B16 melanoma cells were incubated with 6×10^4 in RPMI 1640 medium for 24 hours and treated solvent fractions of *Rubus coreanum* for 6 hours. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and entrifuged at 13,000 xg for 2~3 minutes. The supernatants were used for luciferase assay.

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

2. 복분자 메탄을 추출물의 세포독성

B16 mouse melanoma cell에 복분자 메탄을 추출물을 처리한 결과 세포독성은 매우 낮게 나타냈다(Fig. 2). 복분자 메탄을 추출물을 처리하였을 때 농도의 증가에 세포의 생존율이 감소하는 결과를 보여주었으나 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 그리고 100 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 세포의 생존 활성율이 대조군에 비해 각각 약 106%, 105%, 93%, 83%로 세포독성이 매우 낮게 나타났다. 따라서 복분자 메탄을 추출물은 세포독성이 낮으면서도 효소 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하는 효과를 보여 주는 것으로 보아 멜라닌 색소 생합성을 억제하는 우수한 물질로 추측된다.

3. 복분자 용매 분획물에 따른 티로시나아제 프로모터 억제효과

형질전환 된 B16 mouse melanoma cell에 각각의 복분자 용매 분획물을 처리한 결과 티로시나아제 프로모터의 발현은 용매 분획물에 따라 다양한 양상을 나타내었다(Table 1). 즉, 극성도가 가장 낮은 methylene chloride 용매로 분획하여 얻은

복분자 추출물은 티로시나아제 프로모터를 억제하지 못하였다. 그러나 methylene chloride 용매 분획물은 1 mg/mL의 고농도에서 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하는 효과를 나타내었지만 세포가 분해 될 정도로 매우 심한 독성을 나타내 그 효과는 세포독성과 밀접한 관련이 있는 것으로 확인되었다. Ethyl acetate 용매 분획물은 10 µg/mL의 농도이하에서는 티로시나아제 프로모터를 억제하는 효과를 보여주지 못했지만 100 µg/mL의 농도에서는 메탄을 추출물과 유사한 억제 효과를 보여 주었다. 그러나 1 mg/mL의 고농도에서는 세포독성이 심하게 나타나 methylene chloride 용매 분획물과 유사한 결과를 보여 주었다. Butyl alcohol과 물의 용매로 분획하여 얻은 추출물은 ethyl acetate 용매로 분획하여 얻은 물질들과는 달리 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하기 보다는 오히려 증진시키는 효과를 보여 주었다. 특히, 분획물을 1 µg/mL와 10 µg/mL의 농도로 처리하였을 때에는 대조군에 비해 약 10~20% 정도 티로시나아제 프로모터의 발현이 증진되었다. 그리고 이들 용매 분획물들의 세포독성 또한 매우 낮게 나타났

다. 이와 같은 결과를 통해서 우리는 4가지 복분자 용매 분획물들 중에서 ethyl acetate 용매 분획물만이 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제시키는 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Chin 등¹⁶⁾이 보고한 율피 메탄올 추출물과는 약간 다른 결과를 보여 주는 것으로서 복분자내에 함유되어 있는 티로시나아제 프로모터의 억제 성분들은 비교적 극성도가 낮은 물질이라 추측되어진다.

본 연구결과 복분자 추출물에는 멜라닌 색소 생합성 초기반응에 관여하는 효소 인 티로시나아제의 프로모터 발현을 억제하는 효과가 높은 성분이 함유하고 있다는 것이 확인 되었으며, 앞으로 보다 많은 연구를 통하여 복분자가 미백 화장품 및 의약품의 천연원료로서 산업적으로 보다 널리 이용될 것으로 기대된다.

IV. 결론

유전자 발현 조절수준에서 멜라닌 색소 생합성에 관여하는 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하는 물질을 탐색하고자 티로시나아제 프로모터를 지닌 B16 mouse melanoma cell에 복분자 메탄올 추출물을 처리하였다. 그 결과 복분자 메탄올 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대조군의 약 90%의 발현율로서 티로시나아제 프로모터를 억제하는 효과를 나타내었으며, 세포생존율은 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 약 106%, 105%, 93%, 83%로서 세포독성이 매우 낮게 나타났다. Methylene chloride, butyl alcohol, 물 용매 분획물은 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하는 효과가 없었지만 ethyl acetate 용매 분획물은 티로시나아제 프로모터의 발현 억제하였으며, 특히 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대조군 세포에 비하여 약 11% 정도 억제효과가 낮게 나타났다.

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. 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.
6. Baurin N., Arnoult E., Scior T., Do Q. T. and Bernard P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *JEthnopharmacol* 82. 155-158. 2002.
7. Koichi Iida, Koji Hase, Kenji Shimomura, Syu Sudo, Shigetoshi Kadota, and Tsuneo Namba. Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*. *Planta Medica*, 61. 425-428. 1995.
8. 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
9. 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 Hoëji* 42. 353~358. 1998.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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. 2000.
16. Chin J. E. and Kim G. S Effect of chestnut bark extracts on tyrosinase gene expression. *Korean J. Sanitation* 20(3). 10-16. 2005.
17. 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. 2005
18. Lee B. H., 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.
19. 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.
20. Lee J. E. and Do J. H. Determination of total phenolic compounds from the fruit of *Rubus coreanum* and antioxidative activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39(5). 943-947. 2000
21. Kim K. H., Lee Y. A., Kim J. S., Lee D. I., Choi Y. W., Kim H. H. and Lee M. W. Antioxidative activity of tannins from *Rubus coreanum*. *Yakhak Hoeji* 44(4). 354-357. 2000
22. Kim T. G., Park M. S., Han H. M., Kang S. Y., Jung K. K., Rheu H. M. and Kim S. H. Inhibitory effects of *Terminalia chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Rheum palmatum* on hepatitis B virus replication in HepG2 2.2.15 cells *Yakhak Hoeji* 43(4). 458-463. 1999.
24. Ra J. C., Lee H. Y., Choi M. K., Park H. G. and Kang K. S. Effect of decreasing body weight with plant extracts containing *Rubi Fructus*. *J. Toxicol. Pub. Health* 20(2). 167-172. 2004.
25. Mossman, T. J. Rapid colormetric assay for cellular growth and survival Application to proiferation and cytotoxicity assay. *Immunol. Methods* 63. 55~63. 1983.