

제니스테인의 멜라닌 생성 억제 및 *In vivo* 미백 효과

양은순¹ · 황재성² · 최현정² · 홍란희³ · 강상모^{1,4*}

¹건국대학교 대학원 생물공학과, ²(주)아모레퍼시픽 기술연구원,
³중앙대학교 의과대학 예방의학교실, ⁴건국대학교 미생물공학과

The Effect of Genistein on Melanin Synthesis and *In vivo* Whitening. Yang, Eun-Soon¹, Jae-Sung Hwang², Hyun-Chung Choi², Ran-Hi Hong³, and Sang-Mo Kang^{1,4}. ¹Department of Bioengineering, Graduate School at KonKuk University Seoul 143-701, Korea, ²Amorepacific Corporation, R&D Center, Seoul 140-777, Korea, ³Department of Preventive Medicine, College of Medicine, ChungAng University, Seoul 156-756, Korea, ⁴Department of Microbial Engineering, KonKuk University, Seoul 143-701, Korea – The effect of genistein on melanin synthesis was studied using *in vitro* and *in vivo* model. Genistein inhibited melanin synthesis in cultured melan-a cells dose dependently. Tyrosinase activity was decreased by genistein treatment in melan-a cells, but genistein did not inhibit tyrosinase directly. Genistein did not affect the expression of tyrosinase in melan-a cells. Genistein inhibited the activity of α -glucosidase *in vitro* and the glycosylation of tyrosinase in melan-a cells. The resulting unsaturated glycosylation of tyrosinase makes it unstable and disturb correct transportation. To further clarify the effect of genistein on the melanogenesis, we established UVB-induced hyperpigmentation on the shaved backs of brown guinea pigs. The animals were exposed to UVB radiation once a week for three consecutive weeks. Genistein (1 and 2%) or vehicle alone as a control were then topically applied to the hyperpigmented areas daily. Genistein showed significant lightening effect on the UVB-induced hyperpigmentation in five weeks. Depigmenting effect was prominent in 2% genistein treatment with Fontana-Masson staining. In conclusion, genistein may be a useful agent for skin whitening.

Key words: Genistein, melanin, tyrosinase, α -glucosidase, whitening

서 론

멜라닌 형성의 주효소인 tyrosinase는 rate-limiting step인 tyrosine에서 DOPA로의 전환과 이후 DOPA quinone으로의 전환을 매개한다[2]. Tyrosinase는 type I membrane glycoprotein으로서 사람은 7개의 glycosylation site를 가지고 있다[9]. Glycoprotein을 생성하는 glycosylation 과정은 asparagine의 side chain에 있는 NH₂기에 당을 붙이는 N-linked glycosylation 과정과 serine이나 threonine의 side chain에 있는 OH기에 당을 붙이는 O-linked glycosylation 과정으로 나뉘는데[16], 이중 tyrosinase는 N-linked glycosylation 과정에 의해 만들어진다. 단백질의 N-linked glycosylation은 endoplasmic reticulum(ER)에서 단백질 합성 번역과 함께 일어난다[26]. Glycan unit의 절반인 14개짜리의 당(Glc₃Man₉GlcNAc₂)은 ER막의 바깥인 세포질쪽에서 만들어지며 이후 나머지 절반은 ER 내에서 만들어져 단백질로 전이된다[21]. ER에서 이런 합성 과정은 oligosaccharide의 말단끝에 존재하는 mannose에서 3개의 glucose를 α -

glucosidase I과 II가 끊어줌으로서 시작되게 된다[34]. Tyrosinase의 glucose trimming 과정은 castanospermine이나 deoxynojirimycin(DNJ), N-butyl-deoxynojirimycin(NB-DNJ)과 같은 α -glucosidase의 저해제에 의해서 저해된다. 이때 tyrosinase가 급속하게 folding되어 copper가 없는 불활성화된 형태가 생성되어 melanosome으로 이동하게 된다[8]. 이와같이 α -glucosidase 저해제는 결과적으로 멜라닌의 합성을 저해한다고 알려져 있다[27].

현재 미백제로 가장 많이 사용되는 알부틴은 L-tyrosine과 경쟁적으로 작용하는 저해제이며[24], 코직산은 tyrosinase 활성 부위의 copper를 chelating하여 tyrosine에서 DOPA로 그리고 DOPA에서 DOPA quinone으로 진행되는 과정을 저해한다[5]. 한편, Tyrosinase glycosylation 저해제에 대한 보고들에 의하면 Imokawa 등[19]은 tyrosinase가 carbohydrate moieties 측면에서 T₁, T₂, T₃로 다르며, B16 melanoma 세포 배양에서 glucosamine과 tunicamycin 같은 물질들은 tyrosinase의 glycosylation 반응을 저해하여 멜라닌 합성이 완전히 억제될 수 있음을 보고하였다. 또한 Franchi는[14] Calcium D-pantetheine-S-sulphonate가 tyrosinase의 glycosylation을 저해하여 tyrosinase의 안정도를 저해하는 역할을 한다고 보고하였다. 그리고 Petrescu 등[27]에 의하면, ER processing enzyme인 α -glucosidase I, II의 저해제인 NB-

*Corresponding author

Tel: 82-2-450-3524, Fax: 82-2-3437-8360

E-mail: kangsm@konkuk.ac.kr

DNJ가 B16 melanoma 세포의 활성을 억제하며 비처리군에 비해 2%의 멜라닌만이 합성되었다고 보고하여 tyrosinase glycosylation 저해제에 대한 연구들이 이루어지고 있음을 알 수 있다.

제니스테인은 주로 콩, Ginkgo biloba extract, Greek oregano 그리고 Greek sage 등에 많이 존재하며 피부에서 항산화와 항암 효과를 지니고 있는 것으로 보고된 바 있으며[1, 31], 제니스테인의 항산화 활성뿐 아니라 쥐와 사람에게서 자외선에 의한 피부암과 광손상을 억제하는 것으로도 보고되어 있다[32, 33]. Lee 등[22]에 의하면 제니스테인은 가역적이며 비경쟁적(non-competitive)으로 효모로부터 유래한 α -glucosidase의 활성을 저해하며, Wang 등[29]에 의해 제니스테인과 D-glucose가 α -glucosidase의 저해제임을 kinetic 연구를 통해 밝혔다.

본 연구에서는 melan-a 세포에서 제니스테인이 멜라닌 생성 억제 효과의 유무, α -glucosidase 활성의 저해정도, 그리고 tyrosinase의 glycosylation의 저해정도를 실험하여 제니스테인의 멜라닌 생성 억제 작용 기전에 대해서 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

실험에 사용된 penicillin, streptomycin, 0.25% trypsin-EDTA, RPMI-1640는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서, FBS는 Hyclone(Logan, UT, USA)에서, ^3H -tyrosine, LumiGlo는 NEN Biolabs(Beverly, MA, USA)에서, DMSO, Endo H, α -glucosidase, genistein, pNP glycoside, lectin, DNJ는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서, tyrosinase 및 actin 항체는 Cell Signaling(Danvers, MA, USA)에서 각각 구매하였다. 그 외에 사용된 시약은 따로 언급이 없는 한 시판중인 특급 시약을 사용하였다.

Melan-a 세포를 이용한 melanin 생성 억제 효과 측정

C57BL/6 mouse에서 유래한 immortalized cell line인 melan-a 세포는[6] Dr. Bennett(Cancer Research Center, London, England)로부터 분양 받아 사용하였다. Melan-a 세포는 FBS가 10%, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate가 200 nM, streptomycin이 100 mg/L, penicillin이 100,000 U/L, Cholera toxin이 0.87 mg/L 들어 있는 RPMI-1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. Melan-a 세포가 배양기에서 90% confluent하게 자라던 0.25% trypsin/EDTA로 세포를 떼어내서 12-well plate에 well당 2 × 10⁵개를 주입한 후 24시간 동안 세포가 plate에 잘 부착하도록 기다렸다가 well당 새로운 RPMI-1640 배지 999 μL 와 제니스테인용액 1 μL 를 넣어 주었다. 제니스테인은 DMSO에 원하는 농도대로 녹여 사용하고 대조군은

DMSO를 처리한 세포를 이용하였다. 위와 같은 방법으로 제니스테인과 DMSO를 3일간 처리한 후 4일째 세포의 viability는 crystal violet를 이용한 염색으로, melanin의 양은 1 N NaOH로 cell을 녹여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성은 ^3H -tyrosine이 효소반응에 의해 DOPA로 전환되면서 유리되는 $^3\text{H}_2\text{O}$ 의 방사능량을 측정함으로써 정량하였다[15]. Tyrosinase는 이 효소를 함유한 melan-a 세포의 추출물을 이용하였다. 배양액을 제거한 melan-a 세포를 PBS로 세척한 뒤 tyrosinase buffer(80 mM phosphate buffer, 1.0% Triton X-100)를 가하여 세포를 회수하였다. Sonicator를 이용하여 세포를 파쇄하고, tyrosinase의 추출을 위하여 4°C에서 1시간 동안 정치하였다. 원심분리하여 침전물을 제거하고 상층액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 각 반응액에 10 μg 의 세포추출액과 제니스테인, L-tyrosine은 2.3 μM , L-DOPA는 23 μM 이 되도록 첨가하고, 5 μCi 의 L-[3,5- ^3H]-tyrosine과 200 μL 의 phosphate buffer(80 mM, pH 6.8)를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 0.2% BSA 250 μL 와 10% trichloroacetic acid(TCA) 500 μL 를 가하여 반응을 정지시키고 원심분리하여 단백질을 침전시키고 상층액에 500 μL 의 charcoal(1:1 in PBS)을 넣고 상온에서 1시간 흡착시킨 후 원심분리하여 침전물을 제거하고, 그 상층액을 취하여 liquid scintillation counter(Beckman LS5000, Ramsey, MN, USA)로 방사능량을 측정하였다. 이때, $^3\text{H}_2\text{O}$ 의 방사능량이 적을수록 tyrosinase 활성 억제 효과가 큰 것으로 판정하였다.

In Situ tyrosinase 활성 측정

본 시험법은 ^3H -tyrosine이 tyrosinase에 의해 DOPA로 바뀌면서 나오는 $^3\text{H}_2\text{O}$ 의 양을 정량하여 tyrosinase의 활성을 측정하는 방법이다[15]. 12-well plate에 2 × 10⁵개의 세포를 분주하고 24시간 정치하였다. RPMI-1640 배지 각 1 mL에 2 μCi 의 ^3H -tyrosine과 제니스테인을 첨가한 후 다시 24시간을 배양하였다. 이후, 500 μL 의 RPMI-1640 배지를 취해 여기에 0.2% BSA 250 μL 와 10% TCA 500 μL 를 첨가하여 단백질을 침전시키고 원심분리하여 단백질을 제거하였다. 얻어진 상층액 각 1 mL에 500 μL 의 activated charcoal(50% in 80 mM phosphate buffer, pH 6.8)을 3시간 이상 혼합하여 그 상층액을 취하고 liquid scintillation counter로 측정하였다.

In vitro α -glucosidase 활성 측정

α -Glucosidase가 p-nitrophenyl(pNP) glycoside의 glycoside 부분을 기질로 인식하여, pNP와 glycoside를 효소반응으로 끊어주고, 여기에서 끊어져 나온 pNP의 양을 405 nm에서 흡광도를 측정하여 이것으로 α -glucosidase activity를 간접

적으로 측정하였다[4]. 50 mM phosphate buffer(pH 6.8)에 제니스테인과 효소의 α -glucosidase(0.5 unit/mL)를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 0.2 mM pNP glycoside를 넣고 37°C에서 10분 동안 효소반응을 시킨 후 1 M Na₂CO₃를 3배 넣어서 반응을 정지시키고 생성된 pNP의 양을 405 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

Endoglycosidase H 측정

Endo H는 당 단백질의 당 부분을 가수분해하는 효소이다 [17]. 하지만 N-linked glycoprotein 중 complex oligosaccharide는 이 효소에 의해 가수분해되지 않는다. 따라서 complex oligosaccharide를 가지는 당단백질인 tyrosinase는 Endo H에 의해 가수분해되지 않는데, 만약 glycosylation과정 중에 문제가 생겨 tyrosinase의 당 부분이 제대로 형성되지 않는다면 이 효소에 의해 당 잔기가 가수분해되고, western blot을 하게 되면 tyrosinase는 당이 붙어 있지 않을 때의 크기(약 50 kD)로 작아지게 된다. 이것은 α -glucosidase inhibitor가 세포 내에서 작용하여 실제로 tyrosinase의 glycosylation 과정을 저해하였는지 알아보기 위해 사용할 수 있는 시험 방법이다[13]. Melan-a 세포를 FBS가 10% 들어간 RPMI-1640 배지에 넣어 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 이렇게 배양한 세포를 각 75 cm² 티슈 플라스크에 3 × 10⁵개를 주입하고 12시간 정치하여 세포를 기벽에 부착시킨 후, 배지를 제니스테인 및 DNJ가 들어 있는 새 배지로 갈아주었다. 대조군에는 제니스테인과 DNJ를 녹이기 위해 사용했던 DMSO가 들어 있는 배지를 처리하였다. 그리고 3일이 지난 후 세포를 trypsin/EDTA로 처리하여 바닥에서 떨어뜨린 다음 모았다. 이렇게 모은 세포에 lysis buffer (2% CHAPS in 50 mM Hepes and 200 mM NaCl, pH 7.5, 0.1% protease inhibitors)를 넣고 sonication으로 5초 동안 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 4°C, 10분 동안 원심분리(15,000 × g)한 다음 깨어지지 않은 세포와 펠라틴을 분리하여 제거하고, 상층액을 취하였다. 상층액(단백질 농도, 700 µg/100 µL)에 lectin 50 µL를 넣고 cold room에서 하룻밤 동안 rotation시켰다. 그리고 상층액을 다시 4°C에서 10분 동안 원심분리(15,000 × g)하여 lectin만을 모았다. 이때 lectin은 당단백질의 당 부분과 결합하여 같이 떨어지므로 glycoprotein만을 농축하여 모을 수 있다. 이렇게 모은 lectin은 CHAPS buffer(2% CHAPS in 50 mM Hepes and 200 mM NaCl, pH 7.5)로 두 번 씻고, PBS(pH 7.4)으로 한 번 씻었다. 그 후 0.02% sodium dodecyl sulfate(SDS)가 들어 있는 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.4)를 20 µL 넣고 100°C에서 5분간 끓인 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리(15,000 × g)하여 lectin을 제거하고 상층액만 모았다. 여기에 endo H 10 µL(1 µU in 200 µL)와 protease inhibitors를 넣어 37°C에서 12시간 동안 효소반응을 시켰다. 효소반응 후 반응액에 sample buffer(125 mM Tris pH 6.8, 4%

SDS, 10% glycerol, 0.006% bromophenol blue, 1.8% β -mercaptoethanol)를 넣고 5분간 끓인 다음 western blot을 실시하였다.

Western blot analysis

전술한 바와 같이 처리한 melan-a 세포를 일정시간 배양한 후 PBS로 세척한 뒤, 1.5 mL의 solubilizing buffer(10 mM HEPES, pH 7.6, 15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM dithiothreitol, 0.1% SDS, 0.2% Nonidet P-40)에 재현탁시키고, 15분간 얼음 위에 정치하였다. Cell lysate를 18,000 × g, 10분간 원심분리하여 얻은 상층액으로부터 일정량의 단백질(20-40 µg)을 취하여 10% polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 다음, PVDF membrane에 전기적으로 transfer시켰다. Membrane을 3% BSA로 1시간 동안 blocking한 뒤 tyrosinase, actin 등의 primary antibody로 3-4시간 동안 처리하고, horseradish peroxidase가 결합된 secondary antibody 및 LumiGlo를 이용하여 발색된 밴드의 강도(band intensity)를 확인하였다. Actin은 각각의 시료에 동량의 단백질이 들어있는지 확인하기 위한 대조군으로 사용하였다.

인공색소반(artificial tanning spot)의 제작

자외선(UVB)에 의한 인공색소반의 제작은 4마리의 female brown guinea pig(갈색 물모트, Tortoiseshell guinea pig) 등 부위의 털을 제거한 다음 피부에 직경 1 cm²의 원형 창문이 뚫린 알루미늄 호일을 접착시킨 후 Waldmann UV 800(Herbert Waldmann GmbH & Co, Philips TL/12 lamp emitting 280-305 nm)로 자외선을 조사하였다. 1회 조사량은 500 mJ/cm²로 하였으며 주 1회, 3주간 연속 조사하여 총 조사량이 1,500 mJ/cm²이 되게 하였다[12].

미백 물질의 도포

자외선 조사에 의해 형성된 인공색소반에 미백 물질을 도포하는 시점은 햇볕에 의한 색소침착의 방지 효과 그리고 이미 형성된 색소침착의 조기 개선 효과를 알아보기 위하여 마지막으로 자외선을 조사한 다음날부터 vehicle(water:ethanol:propylene glycol = 5:2:3)에 1%, 2% 농도로 용해시킨 제니스테인을 1일 2회, 5주간 면봉으로 도포하였다.

기기를 이용한 평가

색차계(Chromameter CM2002, Minolta, Japan)를 이용하여, 제니스테인의 도포 전과 도포 후의 L*값(brightness parameter)의 변화를 측정하였다. 동일 부위에 대해서 3회 반복 측정하여 그 평균값을 구하여 비교하였다.

조직학적 평가

5주간 제니스테인을 도포한 인공색소반을 8 mm biopsy

punch를 이용하여 생검하고 그 조직을 10% neutral buffered formalin solution으로 고정하여 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 5 μM 두께로 section한 다음, 일반적인 피부조직을 관찰하기 위하여 Hematoxylin-Eosin(H-E) 염색을, 멜라닌의 생성 변화를 관찰하기 위해 Fontana-Masson(F-M) 염색을 수행하였다.

통계 처리

모든 자료는 mean±S.E로 나타내었고 One-way ANOVA를 사용하여 통계 처리한 후 p<0.05 유의수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

제니스테인의 melanin 생성 억제 효과

제니스테인은 항산화 활성을 가지고 있으며 인공색소침착에 대한 다섯 사람의 피부도포 실험에서도 미백 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다[23]. 그러나 세포수준이나 *in vivo*에서 제니스테인의 미백 효과에 대한 실험 결과는 보고된 바 없다.

본 실험에서는 세포수준에서 제니스테인의 멜라닌 생성 억제 효과를 측정하고자 하였다. Melan-a 세포에 제니스테인을 0.5, 5 및 50 μM로 3일간 처리 후 세포 생존율과 멜라닌 생성량을 측정한 결과는 Fig. 1과 같았다. Fig. 1에서와 같이 제니스테인 처리 시 각 농도가 세포의 성장에는 영향을 주지 않았다. 그러나 멜라닌 생성은 농도 의존적으로 억제되었다. 즉, 멜라닌 생성 억제율은 0.5, 5, 50 μM에서

각 9, 38, 55% 이었다.

Chang 등[11]은 제니스테인이 mushroom tyrosinase의 활성을 약하게 억제한다고 보고한 바 있다. 이 보고에 의하면 IC₅₀=0.822 mM로 코직산에 비해(IC₅₀=0.054 mM) 수십 배가 낮아 활성이 있다고 보기 어렵다. 하지만 본 실험결과 세포수준에서 멜라닌 생성 저해 효과가 50 μM에서 55%로 비교적 높게 나타남으로써 제니스테인이 tyrosinase에 직접 작용하여 저해하지는 않지만 다른 경로로 멜라닌 생성을 저해할 것으로 추정하였다. Yan 등[35]의 보고에 의하면, 제니스테인은 B16 melanoma 세포의 성장을 IC₅₀=15.5 μM 수준에서 억제하였으며 제니스테인 처리에 의해 세포의 모양과 cytoskeletal network이 변형되었고, 멜라닌의 양과 tyrosinase의 양은 증가되었다. 한편, Rauth 등[28]은 제니스테인이 네 사람에서 유래된 melanoma 세포 성장을 억제한다고 보고하였다. 이 보고에 의하면 제니스테인은 melanoma 세포의 성장을 유의적으로 억제하였는데, 이는 p53의 발현 정도와 상관성이 있었다. 즉, p53의 수준이 높으면 제니스테인의 효과가 떨어지는데 이런 현상은 p53이 제니스테인의 melanoma 세포 성장 저해 효과에 대한 저항성을 주는 것을 의미한다. 암세포의 분화와 관련하여서는 제니스테인은 세포의 멜라닌 함량과 tyrosinase의 활성을 높였으며, 세포의 수지상(dendrite-like) 구조를 형성시켰다. 암세포는 생장이 빨라 세포내에서 멜라닌 생성이 상대적으로 떨어지게 되며 비암세포라고 할 수 있는 생장이 느린 세포주들은 멜라닌이 세포에 축적된다. 암세포에서 멜라닌 함량이 증가되는 참고문헌의 결과는 본 연구의 결과와 상이하며 이는 암세포와 비암세포에서 제니스테인의 효과가 다르기 때문으로 생각된다.

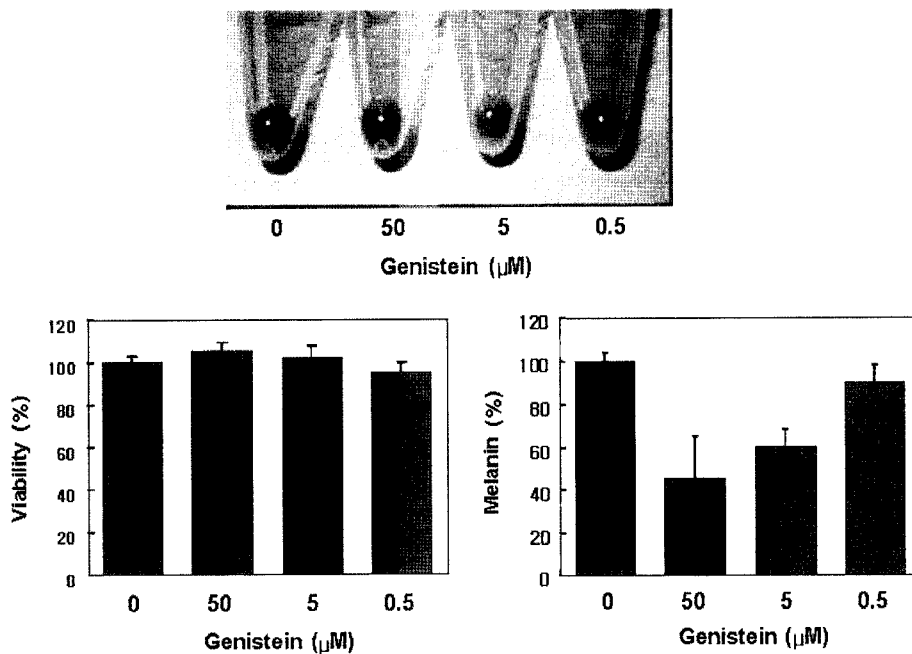


Fig. 1. Inhibitory effect of genistein on cell viability and melanin synthesis in melan-a melanocytes (Relative melanin synthesis and viability value were expressed compared with control as 100%).

본 결과에서는 비암세포에 가까운 melan-a 세포에서 제니스테인에 의한 멜라닌 생성 억제 효과는 50 μM 에서 약 50%를 상회하는 수준이므로 피부미백 효과를 가질 것으로 생각되었다. 이후 *in vivo* 실험을 통해 미백 효능을 나타내는지 알아보았다.

제니스테인의 tyrosinase 활성 억제 효과

제니스테인의 tyrosinase 활성 억제 효과는 전술한 바와 같이 mushroom tyrosinase를 이용한 연구결과는 있으나[11] 활성이 약하였으며, mushroom tyrosinase를 사용했을 때와 세포를 사용했을 때의 결과가 다른 경우가 있으므로[10] 본 실험에서는 제니스테인이 melan-a 세포의 tyrosinase에 직접 작용하여 활성을 억제하는지 혹은 세포수준에서 억제하는지를 측정해 보고자 하였다. Fig. 2에서 melan-a 세포의 추출물을 tyrosinase의 source로 사용하여 0.5, 5, 50 μM 의 제니스테인을 처리한 후 효소의 활성을 측정한 결과, Fig. 2의 (A)에서 보는 바와 같이 3가지 농도 모두에서 tyrosinase 활성 억제 효과는 보이지 않았다. 이는 제니스테인이 전술한 바와 같이 tyrosinase에 직접 작용하여 저해하는 코직산이나 알부틴[24,5]과는 달리 직접적인 저해제는 아닌 것을 의미한다.

한편, 제니스테인이 세포수준에서는 tyrosinase 활성을 억제하는지 알아보았다. Melan-a를 키우면서, 세포 배지에 제니스테인을 0.5, 5, 50 μM 농도로 24시간 처리한 후 *in situ* tyrosinase 활성을 측정한 결과는 Fig. 2의 (B)에서 같이 0.5, 5, 50 μM 에서 농도 의존적으로 tyrosinase 활성이 각각 5%, 41%, 62% 저해되었다. 이 결과에서 제니스테인의 멜라닌 합성 억제 효과는 제니스테인이 melan-a 세포에 작용하여 tyrosinase의 활성을 억제하는 것에 기인하는 것을 알 수 있었다. 앞서의 멜라닌 생성 억제율(Fig. 1)과 비교시 농도에 따른 저해율과 tyrosinase 활성 억제율이 멜라닌 생성 억제율과 매우 유사하여 높은 상관도를 보였다. 이 2가지의 결과에서 제니스테인이 tyrosinase에 직접 작용하여 활성을 저해하지 않으나, 세포내에서 tyrosinase가 작용하는 단계의 전이나 후, 어떤 과정에 영향을 미쳐 활성을 억제하는 것이라고 추정할 수 있었다. Hwang 등[18]에 의해 보고된

cinnamate 유도체(3,4,5-trimethoxy cinnamate thymol ester, TCTE)도 *in vitro*에서 tyrosinase를 직접 저해하지는 않으나, 세포수준에서 tyrosinase의 활성을 저해하였다. 이 보고에 의하면 TCTE는 tyrosinase의 분해를 촉진하여 tyrosinase 활성을 감소시키는 것으로 나타났다. Kim 등[20]의 보고에 의하면, C₂-ceramide는 mel-ab 세포에서 Akt/PKB 신호를 억제하여 세포의 증식을 억제하며 멜라닌 생성을 감소시키는 것으로 나타났다. 이는 tyrosinase의 전사인자인 microphthalmia associated transcription factor를 억제하여 tyrosinase의 발현을 저해시킨다고 보고하였다. 한편, Mishima 등[25]은 glycosylation 저해제인 glucosamine이나 tunicamycin이 melanoma 세포에서 멜라닌의 생성을 소실시키며 세포내의 멜라노솜 구조를 변형시키는 것으로 보고한 바 있다.

본 결과에서 제니스테인은 tyrosinase의 직접적인 저해 효과는 없으나 세포수준에서 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 억제하였고 그 정도는 멜라닌 생성 억제율과 상관성이 매우 높았다. 이런 결과로 보아 제니스테인은 tyrosinase의 발현의 전사 단계에 관련하거나 혹은 단백질의 번역 후 변형(post-translation modification) 단계에 관여하여 미백 효과를 나타내는 것으로 추정해 볼 수 있다.

제니스테인의 tyrosinase 발현에 미치는 영향

앞의 결과에서 제니스테인은 tyrosinase 활성의 전이나 후 단계에서 작용하여 melan-a 세포에서 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내며, 세포의 tyrosinase 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 본 실험에서는 제니스테인이 tyrosinase의 발현에 미치는 영향을 관찰함으로써 제니스테인이 tyrosinase의 발현을 저해하여 미백 활성을 나타내는지 확인하고, 또 어떤 단계에서 작용하는지 확인하고자 하였다. Melan-a 세포에 제니스테인을 0.5, 5, 50 μM 의 농도로 48시간 처리한 후 tyrosinase의 발현양을 western blot으로 측정한 결과는 Fig. 3과 같았다. 그림에서 보듯이 tyrosinase의 발현양은 제니스테인을 처리한 3가지 모든 농도(lane 2-4)에서 vehicle인 DMSO(lane 1)와 비교하여 변화가 없었다.

Ando 등[3]은 linoleic acid가 B16 melanoma 세포에서

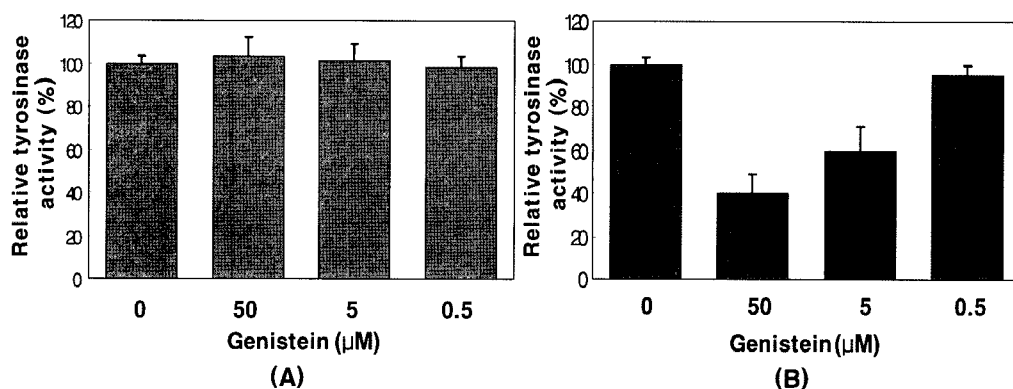


Fig. 2. The effect of genistein on tyrosinase activity (A, *in vitro* tyrosinase activity; B, *in situ* tyrosinase activity).

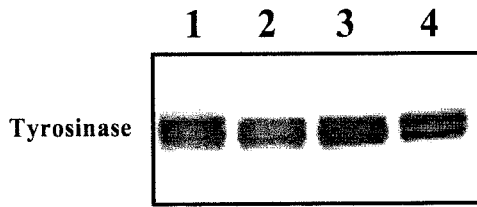


Fig. 3. The effect of genistein on tyrosinase expression in melan-a melanocytes (Lane 1, control; lane 2, genistein 0.5 μM; lane 3, genistein 5 μM; lane 4, genistein 50 μM).

tyrosinase의 분해를 촉진시키며 이에 따라 멜라닌 합성이 저해됨을 보고하였다. 이러한 기존의 여러 보고들을 살펴보면, tyrosinase에 직접 작용하여 저해하지 않으나 세포내에서 tyrosinase의 활성을 저해하기 위해서는 C₂-ceramide와 같이 tyrosinase의 발현을 저해하거나[20], 혹은 TCTE[18]나 linoleic acid[3]와 같이 분해를 촉진시키는 방법이 있다. 그러나 이러한 물질들은 모두 세포내의 tyrosinase 발현량을 감소시킨다는 공통점이 있으므로, Fig. 3의 제니스테인 처리에서도 tyrosinase의 발현량이 동일한 것으로 보아 제니스테인은 이들과는 다른 기전을 갖는 것으로 볼 수 있다.

본 결과에서 제니스테인은 tyrosinase를 직접 저해하지도 않으며, 발현이나 분해와도 관련되지 않고 세포수준에서는 tyrosinase 활성을 저해하였으므로, glucosamine과 tunicamycine[25]과 같이 단백질의 post-translational modification 단계에서 작용하는지의 여부를 확인해 볼 필요가 있다고 사료되었다.

제니스테인의 α-glucosidase 억제 효과

앞서의 실험에서 제니스테인은 tyrosinase 발현 이후의 과정을 저해할 가능성이 높았으므로, 본 실험에서는 α-glucosidase의 활성 억제 효과가 있는지 확인 하였다. 제니스테인과 효모의 α-glucosidase에 pNP glycoside를 넣고 10분 동안 효소반응을 시킨 결과는 Fig. 4와 같았다. 제니스테인 처리에 의해서 농도 의존적으로 α-glucosidase의 활성이 억제되었다. 즉, 제니스테인에 의한 α-glucosidase의 활성은 50 μM에서 66%, 25 μM에서 52%, 12.5 μM에서 35%, 6.5

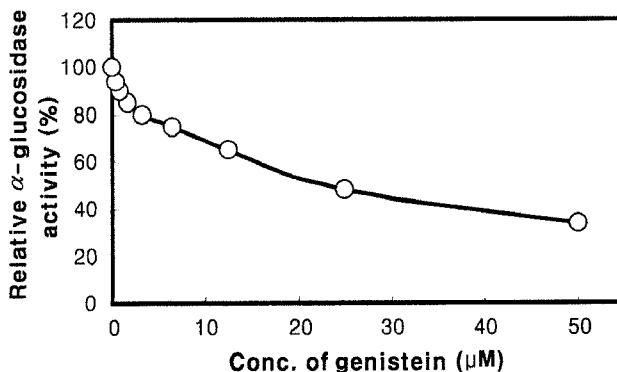


Fig. 4. Inhibitory effect of genistein on α-glucosidase activity.

μM에서 25%, 3.25 μM에서 21%, 1.6 μM에서 15%, 0.8 μM에서 9%였다(IC₅₀=25 μM).

Lee 등[22]에 의하면 제니스테인은 가역적이며, 비경쟁적(non-competitive)인 yeast α-glucosidase의 저해제이다. Wang 등[29]은 제니스테인과 D-glucose가 α-glucosidase의 저해제임을 kinetic 연구를 통해 밝혔다. 이 보고에 의하면, D-glucose는 경쟁적 저해제이며, 제니스테인은 비경쟁적 저해제였고, 이들을 동시에 처리했을 때 synergistic한 효능을 보여 이들이 각각 α-glucosidase의 다른 부위에 작용함을 증명하였다. Wang 등[30]도 제니스테인과 Fe²⁺, Zn²⁺와 같은 metal ion을 동시에 α-glucosidase에 처리하였을 때, 상승적으로 tyrosinase를 저해한다고 보고하였다. 그리고 Mishima 등[25]이 보고한 glucosamine과 tunicamycin 외에도 Choi 등[13]은 최근 α-glucosidase 저해제인 DNJ와 α-mannosidase의 저해제인 deoxymannojirimycin(DMJ)이 tyrosinase의 glycosylation을 차단하여 멜라노솜으로의 이동을 억제하며, 이 2가지 물질을 동시에 사용하였을 때 효과가 상승적으로 나타난다는 것을 보고하였다. 이와 같이 본 실험에서도 제니스테인이 효모의 α-glucosidase 활성을 저해하였으며 저해 효과는 농도 의존적으로 나타났다. 지금까지의 실험결과에서 보면 제니스테인은 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌 생성을 억제하는데 이것은 tyrosinase의 발현을 억제하는 것이 아니고 효모의 α-glucosidase 활성을 농도 의존적으로 저해한 것으로 나타났으므로 제니스테인이 tyrosinase의 glycosylation을 억제할 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

제니스테인의 glycosylation 억제 효과

Tyrosinase는 N-linked complex oligosaccharide가 붙어 있는 glycoprotein이며, high-mannose oligosaccharide가 붙어 있는 다른 glycoprotein과 달리 Endo H 라는 효소에 의해 가수분해되지 않는 기질특이성을 가진다. 어떠한 요인에 의해 당단백질을 만드는 glycosylation에 문제가 생겨 tyrosinase의 당 부분이 완전한 complex oligosaccharide를 형성하지 못하면 Endo H에 의해서 가수분해되어 약 50 kD으로 작아지게 된다[17]. 이러한 특징을 이용하면 제니스테인이 실질적으로 세포 내에 작용하여 tyrosinase의 glycosylation을 억제하였는지 확인할 수 있다.

본 실험에서는 제니스테인을 melan-a 세포에 처리하였을 때, tyrosinase의 glycosylation을 저해하는지 관찰하였다. Melan-a 세포에 제니스테인은 5, 50 uM, 양성대조군인 DNJ는 10 uM의 농도로 3일간 처리한 후, Endo H로 12시간 처리하고 western blot을 실시하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 대조군인 DMSO를 처리한 군은 64 kD에 진한 tyrosinase의 밴드(lane 1)가 보이는 반면, 제니스테인(lane 2, 3)과 DNJ(lane 4)를 처리한 군에서는 64 kD의 밴드가 없어지고 51 kD의 밴드가 진해지는 것을 볼 수 있다. 이는 tyrosinase의 glycosylation이 완전하지 못하여 Endo H에 의

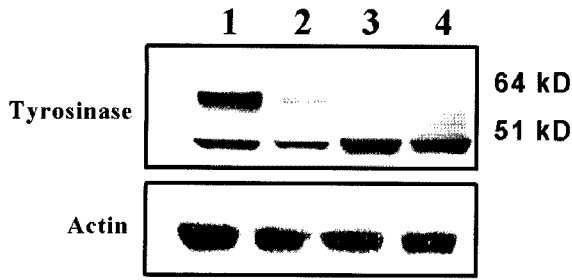


Fig. 5. Inhibitory effect of genistein on the glycosylation of tyrosinase in melan-a melanocytes (Lane 1, control; lane 2, genistein 5 μM; lane 3, genistein 50 μM; lane 4, deoxynojirimycin 10 μM).

해 가수분해된 것으로 보인다. 제니스테인 처리군은 5 uM (lane 2)과 비교하여 50 uM(lane 3) 처리군에서 glycosylation 된 64 kD 밴드가 없는 것으로 보아 고농도에서 더욱 효과적으로 glycosylation이 저해되며 농도 의존적임을 보여 주었다. 양성대조군으로 사용한 DNJ(lane 4)도 64 kD의 tyrosinase가 Endo H에 의해 거의 사라졌음을 볼 수 있었다.

Branza-Nichita 등[8]은 α-glucosidase의 저해제인 castanospermine, DNJ, NB-DNJ 등이 tyrosinase의 glucose trimming을 저해하며 tyrosinase의 folding을 촉진하여 활성 부위에 구리이온을 가지지 못한 비정상적인 형태를 발생시키고, 이에 따라 멜라닌 생성이 저해된다고 보고하였다. Choi 등[13]에 의하면 DNJ는 α-glucosidase 저해제로서 ER에서 N-glycan 과정의 초기에 작용을 억제하여 tyrosinase의 작용을 저해하여 멜라닌 합성을 줄이며, DMJ는 α-1,2-mannosidase 저해제로서 N-glycan 과정의 후반에 작용하여 tyrosinase의 활성뿐 아니라 이동을 저해하는 것으로 나타났다.

본 실험을 통해 제니스테인이 melan-a 세포에서 α-glucosidase를 억제하여 tyrosinase의 glycosylation을 저해하는 것을 밝혔다. 따라서 지금까지의 실험결과에서 제니스테인은 tyrosinase 활성을 억제하여 멜라닌 생성을 억제하는데 이것은 tyrosinase 발현을 억제하는 것이 아니고 tyrosinase의 glycosylation을 저해하여 나타나는 결과이다. 그러므로 제니스테인 처리에 의해 tyrosinase의 활성이 저하되는 것은 세포내에서 비정상적인 tyrosinase가 만들어져 멜라노솜으로의 이동이 줄어들어 기인하는 것으로 판단되었다.

제니스테인의 in vivo 미백 효과

앞서의 결과들에서 제니스테인은 세포수준에서 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 확인되었으며 그 기전은 α-glucosidase 활성 저해를 통한 tyrosinase의 glycosylation을 저해하는 것으로 나타났다. 그러나 실제로 in vivo에서의 명확한 효능에 대해서 보고된 바가 없었으므로 본 실험에서 제니스테인의 in vivo 효능에 대해 확인하였다.

Brown guinea pig는 사람의 피부에서와 같이 표피에 melanocyte가 존재하며, 자외선에 의해서 색소침착이 유도된다[7]. 미백 물질의 in vivo 효과 측정은 brown guinea pig를 사용하였다. 제니스테인을 1, 2%의 농도로 실험 방법에서 전술한 vehicle에 녹여 인공색소반 부위에 매일 2회씩 총 5주간 도포하였다. 시료 도포 시점부터 매주 색차계를 이용하여 L*값을 측정 한 결과는 Fig. 6과 같았다. 1주차부터 3주차까지는 자외선 조사의 영향으로 모든 군에서 피부흑화가 진행되었다. 그러나 제니스테인 처리군에서는 색소침착되는 정도가 대조군에 비하여 낮은 수준이었다. 제니스테인 2% 도포군에서는 2주차부터 대조군과 유의적인 차이가 나타나기 시작하여 실험 종료시점인 5주차까지 유의적으로 미백

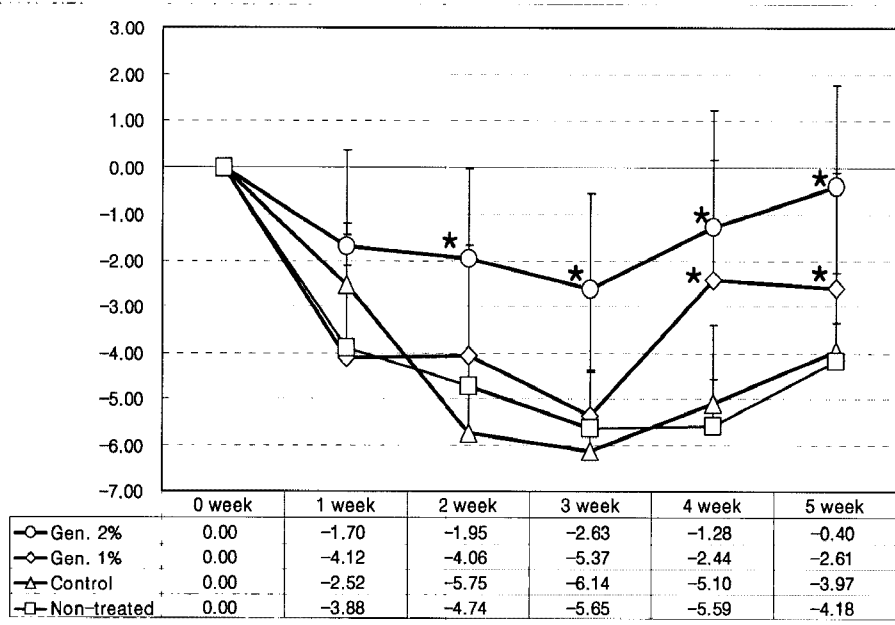


Fig. 6. The depigmenting effect of genistein on the UV-induced pigmentation in brown guinea pig (n=4; , p<0.05 vs. Control).

효과가 나타났다($p < 0.05$). 제니스테인 1% 도포군은 3주차까지는 대조군과 유사한 흑화 정도를 보였으나, 4주차부터 대조군과 비교하여 유의적으로 미백 효과가 나타났다($p < 0.05$). 5주차에 제니스테인 2% 처리군의 L^* 값은 -0.4로 가장 높았는데 이는 인공색소반이 가장 밝아졌다는 것을 의미한다. 그리고 5주차에서 1% 처리군은 L^* 값이 -2.6으로 2% 도포군에 비해 효과가 낮았으나 L^* 값이 -4.0인 대조군과는 1.4값의 차이를 보였다. 이와 같이 제니스테인 1% 도포에서는 대조군과 비교하여 3주차까지는 거의 차이가 없다가 4, 5주차에서 미백 효과가 크게 나타났으며, 제니스테인 2% 도포군에서는 대조군과 비교하여 2주차부터 큰 차이를 보여 색차계를 이용한 *in vivo* 피부도포 실험에서도 제니스테인의 미백 효과를 확인할 수 있었다.

Fig. 7은 Fig. 6의 결과에서 제니스테인 도포 전과 도포 5주 후의 brown guinea pig의 피부흑화 정도의 사진이다. Fig. 7에서와 같이 제니스테인 1, 2%를 5주 도포한 처리군은 비처리군이나 대조군에 비해 육안으로도 피부의 미백 효과에 뚜렷한 차이가 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 Fig. 7과 같이 육안 평가에서도 제니스테인의 미백 효과를 확인할 수 있었다.

Fig. 8은 5주간 제니스테인을 도포한 인공색소반을 8 mm biopsy punch를 이용하여 생검한 후 일반적인 피부조직을 관찰하기 위해 H-E 염색과 멜라닌의 생성 변화를 관찰하기 위하여 F-M 염색을 한 결과이다. Fig. 8에서 H-E 염색 결과를 살펴보면, 대조군과 제니스테인 2% 처리군 모두 별다른 차이를 발견할 수 없었다. 반면, 멜라닌 색소에 대한 F-M 염색 결과를 살펴보면, 제니스테인 2%를 도포한 부위의 멜라닌 생성이 대조군에 비해 상당히 감소하였음을 확인할 수 있었다. 이와 같이 Fig. 8의 피부 조직학적 실험에서도 제니스테인의 미백 효과를 확인할 수 있었다.

따라서 제니스테인이 tyrosinase 활성을 억제하여 멜라닌 생성을 억제하는 것은 tyrosinase 발현을 억제하는 것이 아니고 tyrosinase의 glycosylation을 저해하여 나타는 결과이며, *in vivo* 실험에서도 제니스테인 1, 2% 농도 모두 brown

피부에 뚜렷한 차이가 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 Fig. 7과 같이 육안 평가에서도 제니스테인의 미백 효과를 확인할 수 있었다.



Fig. 7. Photographs of the depigmenting effect of genistein (A, before treatment; B, treated for 5 weeks).

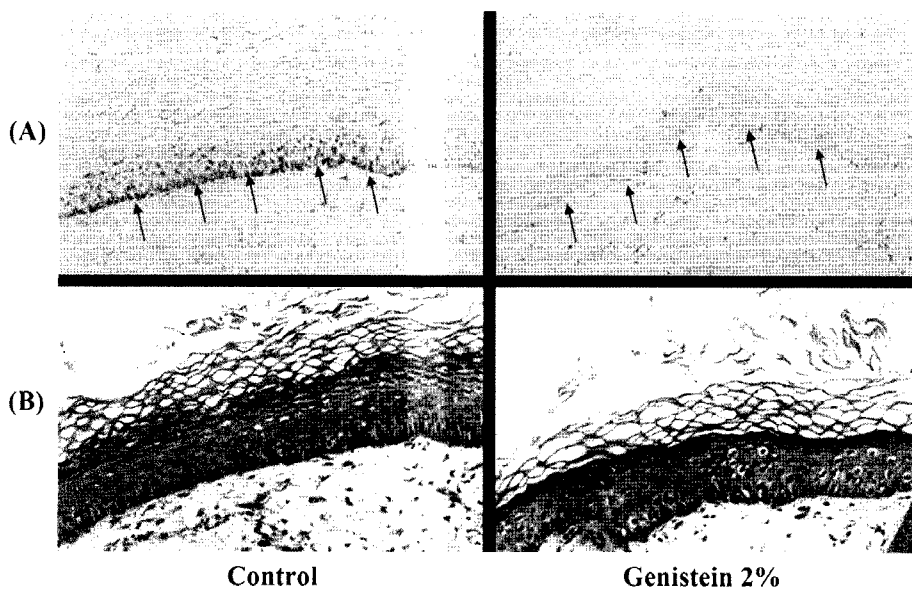


Fig. 8. Histology of genistein treated skin (A, Fontana-Masson staining; B, Hematoxylin-Eosin staining).

guinea pig의 피부에서 UVB에 대한 미백 효과를 뚜렷이 보이는 것을 알 수 있었다. 또한 조직손상, 염증, 표피와 진피 변화 등을 보는 H-E 염색에서는 제니스테인에 의해 피부조직의 변화를 발견할 수 없었으나 멜라닌 색소에 대한 F-M 염색에서는 제니스테인 2%를 도포한 부위의 멜라닌 생성이 대조군에 비해 상당히 감소하였음을 확인할 수 있었다. 이와 같이 제니스테인은 *in vitro*와 *in vivo* 모두에서 미백 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

요 약

제니스테인의 미백제로서 응용 가능성을 알아보기 위해 멜라닌 생성에 미치는 영향을 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 알아보았다. Melan-a 세포에 제니스테인을 처리하여 멜라닌 양을 측정된 결과 멜라닌 생성이 농도 의존적으로 감소되었다. 멜라닌 생성 억제제가 tyrosinase의 활성 저해와 관련되는지를 확인해보고자 하였다. 그 결과 제니스테인은 tyrosinase에 직접 작용하여 활성을 저해하지는 않았으나, 세포내의 tyrosinase의 활성은 농도 의존적으로 저해하였다. 제니스테인이 tyrosinase의 발현에는 영향을 미치지 않았는데 이는 세포내 tyrosinase의 활성 저해가 발현과는 다른 기전에 의해 일어난다는 것을 의미한다. 그리고 제니스테인은 α -glucosidase를 저해하였으며, 이를 통해 N-linked glycoprotein인 tyrosinase의 glycosylation을 저해하여 tyrosinase의 세포내 이동이나 활성을 억제할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 제니스테인은 brown guinea pig에서 자외선에 의해 유도되는 피부흑화를 농도 의존적으로 개선하는 미백 효과가 있었다. 인공색소반에 제니스테인을 1%, 2% 도포한 결과 5주차에 대조군과 비교하여 유의적인 미백 효과를 확인할 수 있었다. 멜라닌에 대한 F-M 염색 결과를 살펴보면, 제니스테인 2%를 도포한 부위의 멜라닌 함량이 대조군 도포 부위에 비해 상당히 감소하였음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과에서 제니스테인은 미백제로서 유용하게 활용할 가치가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Afaq, F. and H. Mukhtar. 2006. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp. Dermatol.* **15**: 678-684.
2. Alaluf, S., A. Heath, N. Carter, D. Atkins, H. Mahalingam, K. Barrett, R. Kolb, and N. Smit. 2001. Variation in melanin content and composition in type V and VI photoexposed and photoprotected human skin: the dominant role of DHL. *Pigment Cell Res.* **14**: 337-347.
3. Ando, H., A. Ryu, A. Hashimoto, M. Oka, and M. Ichashi. 1998. Linoleic and α -linoleic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin. *Arch. Dermatol. Res.*

- 290: 375-381.
4. Angelov, A., M. Putyrski, and W. Liebl. 2006. Molecular and biochemical characterization of alpha-glucosidase and alpha-mannosidase and their clustered genes from the thermoacidophilic archaeon *Picrophilus torridus*. *J. Bacteriol.* **188**: 7123-7131.
5. Battaini, G., E. Monzani, L. Casella, L. Santagostini, and R. Pagliarin. 2000. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**: 262-268.
6. Bennett, D. C., P. J. Cooper, and I. R. Hart. 1987. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int. J. Cancer* **39**: 414-418.
7. Bolognia, J. L., M. S. Murray, and J. M. Pawelek. 1990. Hairless pigmented guinea pigs: a new model for the study of mammalian pigmentation. *Pigment Cell Res.* **3**: 150-156.
8. Branza-Nichita, N., A. J. Petrescu, R. A. Dwek, M. R. Wormald, F. M. Platt, and S. M. Petrescu. 1999. Tyrosinase folding and copper loading *in vivo*: a crucial role for calnexin and alpha-glucosidase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**: 720-725.
9. Branza-Nichita, N., G. Negroiu, A. J. Petrescu, E. F. Garman, F. M. Platt, M. R. Wormald, R. A. Dwek, and S. M. Petrescu. 2000. Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J. Biol. Chem.* **275**: 8169-8175.
10. Briganti, S., E. Camera, and M. Picardo. 2003. Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **16**: 101-110.
11. Chang, T. S., H. Y. Ding, and H. C. Lin. 2005. Identifying 6,7,4'-trihydroxyisoflavone as a potent tyrosinase inhibitor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 1999-2001.
12. Choi, H., J. Lee, H. J. Shin, B. G. Lee, I. Chaing, and J. S. Hwang. 2004. Deoxypodophyllotoxin reduces skin pigmentation of brown guinea pigs. *Planta. Med.* **70**: 378-380.
13. Choi, H., S. Ahn, H. Chang, N. S. Cho, K. Joo, B. G. Lee, I. Chang, and J. S. Hwang. 2007. Influence of N-glycan processing disruption on tyrosinase and melanin synthesis in HM3KO melanoma cells. *Exp. Dermatol.* **16**: 110-117.
14. Franchi, J. 2000. Depigmenting effects of calcium D-pantetheine-S-sulfonate on human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **13**: 165-171.
15. Fuller, B. B., J. B. Lunsford, and D. S. Iman. 1987. Alpha-melanocyte-stimulating hormone regulation of tyrosinase in Cloudman S-91 mouse melanoma cell cultures. *J. Biol. Chem.* **262**: 4024-4033.
16. Goochee, C. F. 1992. Bioprocess factors affecting glycoprotein oligosaccharide structure. *Dev. Biol. Stand.* **76**: 95-104.
17. Halaban, R. E., E. Cheng, Y. Zhang, G. Moellmann, D. Hanlon, M. Michalak, V. Setaluri, and D. N. Hebert. 1997. Aberrant retention of tyrosinase in the endoplasmic reticulum mediates accelerated degradation of the enzyme and contributes to the dedifferentiated phenotype of amelanotic melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:

- 6210-6215.
18. Hwang, J. S., H. Shin, H. S. Noh, H. Choi, S. Ahn, D. S. Park, D. H. Kim, B. G. Lee, I. Chang, and H. H. Kang. 2002. The inhibitory effects of 3,4,5-Trimethoxy cinnamate thymol ester(TCTE. Melasolv) on Melanogenesis. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. **28**: 135-149.
 19. Imokawa, G and Y. Mishima. 1984. Functional analysis of tyrosinase isozymes of cultured malignant melanoma cells during the recovery period following interrupted melanogenesis induced by glycosylation inhibitors. *J. Invest. Dermatol.* **83**: 196-201.
 20. Kim, D. S., S. Y. Kim, S. J. Moon, J. H. Chung, K. H. Kim, K. H. Cho, and K. C. Park. 2001. Ceramide inhibits cell proliferation through Akt/PKB inactivation and decreases melanin synthesis in Mel-A8 Cells. *Pigment Cell Res.* **14**: 110-115.
 21. Kornfeld, R. and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 631-664.
 22. Lee, D. S. and S. H. Lee. 2001. Genistein, a soy isoflavone, is a potent alpha-glucosidase inhibitor. *FEBS Lett.* **501**: 84-86.
 23. Lee, K. H. 2004. Antioxidant properties of isoflavone, genistein from soybean and its application to whitening cosmetics, M.S. Thesis, Seoul National University of Technology, Seoul.
 24. Maeda, K. and M. Fukuda. 1996. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**: 765-769.
 25. Mishima, Y. and G. Imokawa. 1983. Selective aberration and pigment loss in melanosomes of malignant melanoma cells *in vitro* by glycosylation inhibitors: premelanosomes as glycoprotein. *J. Invest. Dermatol.* **81**: 106-114.
 26. Petrescu, A. J., T. D. Butters, G. Reinkensmeier, S. Petrescu, F. M. Platt, R. A. Dwek, and M. R. Wormal. 1997. The solution NMR structure of glycosylated *N*-glycans involved in the early stages of glycoprotein biosynthesis and folding. *EMBO J.* **16**: 4302-4310.
 27. Petrescu, S. M., A. J. Petrescu, H. N. Titu, R. A. Dwek, and F. M. Platt. 1997. Inhibition of *N*-glycan processing in B16 melanoma cells results in inactivation of tyrosinase but does not prevent its transport to the melanosome. *J. Biol. Chem.* **272**: 15796-15803.
 28. Rauth, S., J. Kichina, and A. 1997. Green. Inhibition of growth and induction of differentiation of metastatic melanoma cells *in vitro* by genistein: chemosensitivity is regulated by cellular p53. *Br. J. Cancer* **75**: 1559-1566.
 29. Wang, Y., L. Ma, C. Pang, M. Huang, Z. Huang, and L. Gu. 2004. Synergetic inhibition of genistein and D-glucose on alpha-glucosidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**: 2947-2950.
 30. Wang, Y., L. Ma, Z. Li, Z. Du, Z. Liu, J. Qin, X. Wang, Z. Huang, L. Gu, and A. S. Chen. 2004. Synergetic inhibition of metal ions and genistein on alpha-glucosidase. *FEBS Lett.* **576**: 46-50.
 31. Wei, H., R. Bowen, X. Zhang, and M. Lebowitz. 1998. Isoflavone genistein inhibits the initiation and promotion of two-stage skin carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*. **19**: 1509-1514.
 32. Wei, H., X. Zhang, Y. Wang, and M. Lebowitz. 1993. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr. Cancer*. **20**: 1-12.
 33. Wei, H., X. Zhang, Y. Wang, and M. Lebowitz. 2002. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Lett.* **185**: 21-29.
 34. Winchester, B. and G. W. Fleet. 1992. Amino-sugar glycosidase inhibitors: versatile tools for glycobiologists. *Glycobiology* **2**: 199-210.
 35. Yan, C. H., X. G. Chen, Y. Li, and R. Han. 1999. Effects of genistein, a soybean-derived isoflavone, on proliferation and differentiation of B16-BL6 mouse melanoma cells. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **1**: 285-299.

(Received Jan. 29, 2008/Accepted Mar. 2, 2008)