

## 매생이 추출물의 멜라닌생성 억제효과

문연자 · 유현주 · 이경은\* · 김진희\* · 표형배\* · 우원홍#

원광대학교 한의학전문대학원, \*한불화장품 기술연구소

(Received May 12, 2005; Revised July 8, 2005)

### Inhibitory Effect on the Melanogenesis of *Capsosiphon fulvescens*

Yeun-Ja Mun, Hyun-Ju Yoo, Kyung-Eun Lee\*, Jin-Hui Kim\*, Hyeong-Bae Pyo\* and Won-Hong Woo#

Department of Herbal Resources, Professional Graduated School, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

\*R&D Center, Hanbul Cosmetics Co., Umsungkun 369-830, Korea

**Abstract** — The green marine algae, *Capsosiphon fulvescens* is one of the important economic seaweeds cultured in Korea. In this study, we investigated the effects of *Capsosiphon fulvescens* on melanogenesis using B16 cells. Our results showed that *Capsosiphon fulvescens* significantly inhibits melanin synthesis and it reduces the activity of tyrosinase, the rate-limiting melanogenic enzyme. Western Blot analysis using anti-tyrosinase antibody revealed that *Capsosiphon fulvescens* (10~40 µg/ml) decreased tyrosinase protein levels. Cell proliferation was dose-dependently inhibited by 10, 20 and 40 µg/ml *Capsosiphon fulvescens*, without cytotoxicity and morphological change. These results suggest that the depigmenting effect of *Capsosiphon fulvescens* is correlated with the suppression of tyrosinase activity and protein level, which are key enzymes for melanogenesis.

**Keywords** □ melanin, tyrosinase, *Capsosiphon fulvescens*, cytotoxicity

해양생물은 특유의 대사양식을 지니고 있어 육상 자원식물과는 다른 새로운 생물활성 물질이 기대되며, 식용, 의약자원 등으로도 이용되어 왔다. 근래 해조, 연체 및 원색동물로부터 많은 신규 화합물이 분리되어 항암제, 항염증제 등의 의약품으로 개발되어지고 있으며, 해조류에서 신규 천연물의 탐색과 개발에 대한 관심이 증가되는 추세에 있어 이에 대한 연구가 활성화 되어져야 할 것이다.<sup>1-3)</sup>

피부의 멜라닌(melanin)은 멜라닌세포의 멜라닌소체(melanosome)에서 L-tyrosine으로부터 일련의 반응 단계를 거쳐 생성되어,<sup>4,8)</sup> 세포질 돌기를 통하여 표피의 기저층과 가시층의 각질화세포(keratinocyte)로 운반되는데,<sup>9,10)</sup> 자외선에 의한 피부의 광노화 또는 일광각화증을 억제 및 보호하는 긍정적인 기능이 있는 반면, 멜라닌의 전구물질이 세포 사멸을 촉진하거나 과다한 색소 침착 등에 의한 부정적인 기능도 가지고 있다.<sup>11,12)</sup> 그러므로 이러한 멜라닌 생합성 과정에서 나타나는 부정적인 기능을 제어할

수 있는 연구, 즉 과색소증의 원인과 기전의 규명 및 이를 방지할 수 있는 약품 또는 미백 화장품의 개발 연구가 활발하게 진행되고 있다.

매생이(*Capsosiphon fulvescens*)는 녹조식물문(Chlorophyta) 갈파렛과에 속하는 바닷말로 전 세계에 분포하며 한국에서는 남해안 지역에 서식하고, 수분, 단백질, 탄수화물, 회분을 많이 함유하고 있으며 식용하고 있다.<sup>13-15)</sup> 그러나 매생이에 대한 종의 분류학적 기재 및 번식, 생태 및 생활사, 분포, 형태 및 분류 등에 관한 기초적인 연구가 있으나 박 등<sup>16)</sup>이 bromobenzene으로 간독성을 유발한 흰쥐에서 지질과산화 생성을 억제한다고 보고하였을 뿐 생리활성 등에 대한 연구는 미미한 실정이다.<sup>13-15)</sup> 따라서 본 연구에서는 매생이가 B16 세포의 멜라닌 합성과정에 미치는 영향을 조사하여 멜라닌 생성을 억제하는 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 실험재료 및 방법

#### 시료

본 실험에 사용한 매생이(*Capsosiphon fulvescens*)는 전라남도

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 063-850-6845 (팩스) 063-820-5195  
(E-mail) whwoo@wonkwang.ac.kr

장홍, 내저마을에서 채취하였고, 증류수로 수회 세척하여 염분을 제거 하였다. 염분을 제거한 매생이 2 kg에 95% EtOH 10 l를 첨가하여 3일 동안 침적추출하였고, 추출액을 여과한 후 여액을 감압농축한 다음 동결 건조하여 매생이 EtOH 추출물 590 g(수득률 : 29.5%)을 얻었다. 試料는 10 mg/ml 농도로 Ethanol : 1,3-buthyleneglycol(4 : 1) 용매에 녹인 후 실험에 사용하였다.

### B16 세포주 배양

한국 세포주 은행에서 분양 받은 B16 세포의 배양은 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C, 5%)에서 10% FBS가 포함된 DMEM 배지를 이용하였고, 1 mM glutamine, 500 U penicillin과 20 µg/ml streptomycin을 첨가하여 사용하였으며, 약 48시간 주기로 배양액을 교체하여 주었다. 세포의 형태는 배양완료 후 Inverted Microscope (phase contrast, Leica, Germany)를 이용하여 관찰하였다.

### 세포생존율(Cell viability) 측정

세포생존율 측정은 Mosmann의 방법<sup>17)</sup>에 의하여 실시하였다. 24 well plate에 B16 세포를 1×10<sup>4</sup> cell 분주하여 24시간 배양한 후 매생이 추출물을 5, 10, 20, 40 µg/ml 농도로 처리하고 3일 또는 5일간 배양하였다. 배양완료 후 0.1% MTT 용액 50 µl를 넣어 3시간, 37°C에서 배양한 다음 상층액을 제거하고 formazan 침전물에 1 ml의 DMSO를 가하여 15분간 실온에서 방치한 후 540 nm의 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

### 멜라닌 정량(Melanin content assay)

멜라닌 정량은 Hosoi 등<sup>18)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. B16 세포를 10 cm 세포 배양 접시에 1×10<sup>5</sup> cells/dish로 분주하고 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 매생이 추출물을 10, 20, 40 µg/ml 농도로 처리하고 5일 동안 배양하였다. 배양세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척하고 세포를 분리하여 각 군당 동일한 수의 세포를 수집하였다. 세포침전물에 1 ml의 증류수를 넣어 현탁하고, 초음파로 분쇄한 다음, 원심분리하여 침전물을 얻었다. 10%의 DMSO가 첨가된 1 N NaOH 300 µl를 넣어 80°C에서 1시간 동안 처리하고 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 멜라닌색소 침착의 육안적 관찰

B16 세포를 10 cm 세포 배양 접시에 1×10<sup>5</sup> cells/dish로 분주하고 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 매생이 추출물을 10, 20, 40 µg/ml 농도로 처리하고 5일 동안 배양하였다. 멜라닌 세포의 멜라닌화를 자극하는 것으로 알려진 α-MSH 10 nM을 처리하여 양성 대조군으로 하였다.<sup>19,20)</sup> 배양이 완료된 세포는 trypsin/EDTA로 분리하여 세척하고, 각 군당 5×10<sup>6</sup> 세포를 수

집한 후에 육안으로 세포 침전물의 색 변화를 관찰하였다.

### Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등<sup>21)</sup>의 방법에 의하여 측정하였다. B16 세포에 5일 동안 매생이 추출물을 10, 20, 40 µg/ml 농도로 처리한 후 세포를 분리하였다. 200 µl 세포용해액(lysis buffer; 1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)을 넣고 4°C 얼음에서 30분간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴하였다. 이를 원심분리하고 50 µl의 상층액에 100 mM sodium phosphate(pH 6.8) 100 µl를 넣고 30°C 물중탕기에서 5분간 보온한 후 100 mM catechol 50 µl를 넣어 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37°C, 405 nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

### Western blotting assay

세포를 PBS로 세척하고, 4°C에서 30분 동안 lysis buffer (phosphate buffer, pH 6.8, 100 IU Aprotinin, 1% AEBSF)에 용해하여 20,000 g로 30분 동안 원심분리 시킨 후, 상층액은 Amicon system을 이용하여 단백질을 농축시켰다. 농축된 단백질은 Bradford assay로 정량하고, 단백질(30 µg)을 10%의 SDS-PAGE상에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 Nitrocellulose membrane에 옮긴 후 실온에서 2시간 동안 blocking buffer(5% skim milk in TBST)에서 incubation시켰다. Tyrosinase, Tyrosinase-related protein 1 & 2 antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)는 각각 1 : 500으로 희석하여 2시간 동안 반응시킨 후 TBST에 3회 세척하고 1 : 1,000으로 희석시킨 secondary peroxidase-conjugated anti-mouse antibody(Sigma)에 반응된 단백질을 Amersham ECL system으로 확인하였다.

### 통계학적 분석

실험 결과는 one-way ANOVA test를 이용하였으며, P 값이 0.05 이하인 경우 유의성을 인정하였다.

## 실험결과 및 고찰

### 세포증식 억제효과

B16 세포에 매생이 추출물을 5 µg/ml에서 40 µg/ml까지 다양한 농도로 처리하고, 3일과 5일 동안 배양한 후 MTT 측정 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. 3일군의 경우 5, 10, 20, 40 µg/ml 농도에서 세포생존율은 각각 대조군의 93.5%, 91.7%, 64.4%, 49.8%였으며, 5일군에서는 각각 87.6%, 89.2%, 61.8%, 36%로 감소하였다(Fig. 1).

이러한 생존율의 감소 현상이 단순한 세포의 사멸이나 손상에 의한 것인지 조사하기 위하여 매생이 추출물을 각 농도별로 처

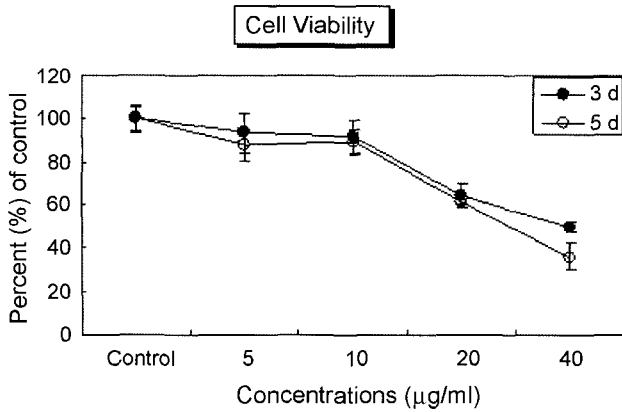


Fig. 1 - Cell viability on B16 cells after treatment with the ethanol extract of *Capsosiphon fulvescens*.

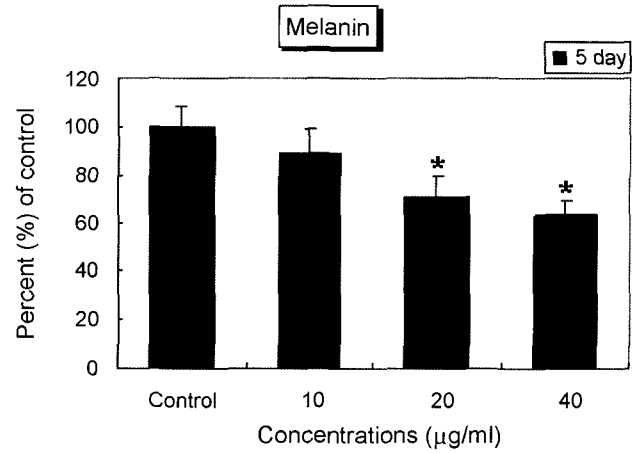


Fig. 3 - Inhibitory effect of the ethanol extract of *Capsosiphon fulvescens* on the melanin synthesis in B16 cells. \* p<0.05.

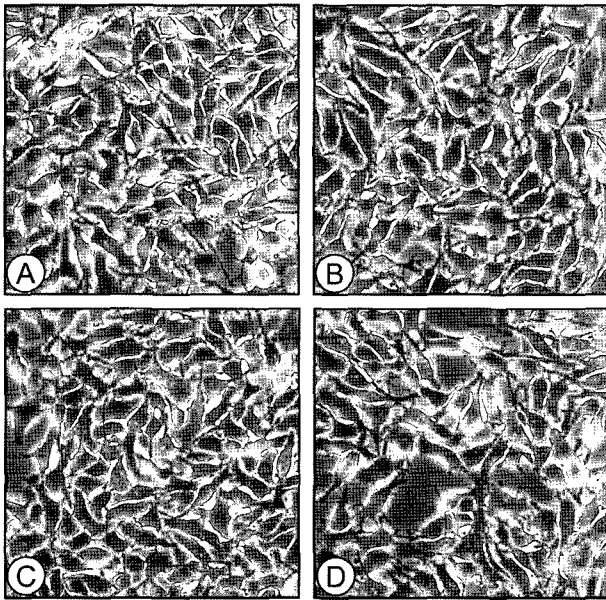


Fig. 2 - Light micrographical observation of B16 cells after treatment with the ethanol extract of *Capsosiphon fulvescens*. A: Control, B: *Capsosiphon fulvescens* (10 µg/ml), C: *Capsosiphon fulvescens* (20 µg/ml), D: *Capsosiphon fulvescens* (40 µg/ml).

리하고 5일 후 세포의 상태를 관찰한 결과, 매생이 10 µg/ml와 20 µg/ml 농도에서 세포의 형태적 특성이 대조군과 동일하였다 (Fig. 2B & C). 매생이 40 µg/ml 농도에서는 세포의 수가 감소하였으나 세포질 내의 공포(cytoplasmic vacuoles), 핵 응축 (nucleus shrinkage)과 같은 세포고사(apoptosis)나 괴사(necrosis) 현상은 관찰되지 않았으며, 세포의 형태적 특성 또한 대조군과 동일하였다(Fig. 2D).

이상의 결과 매생이 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 세포의 증식이 억제되었으나 세포 내에 공포와 핵 응축 등의 세포독성은 나타나지 않았다(Fig. 1 & 2).

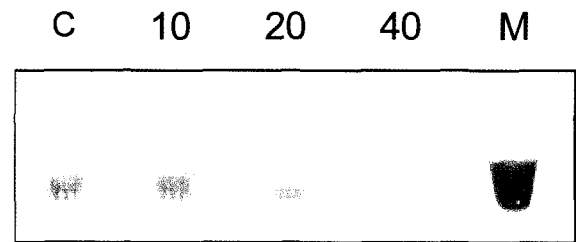


Fig. 4 - Effect of the ethanol extract of *Capsosiphon fulvescens* on cell pigmentation. C: Control, 10: *Capsosiphon fulvescens* 10 µg/ml, 20: *Capsosiphon fulvescens* 20 µg/ml, 40: *Capsosiphon fulvescens* 40 µg/ml, M: α-MSH (100 nM).

멜라닌 합성 억제효과

매생이 추출물을 여러 가지 농도로 B16 세포에 처리하고 5일 동안 배양한 후 각 군당 1×10<sup>6</sup>개의 세포를 수집하여 멜라닌의 양을 측정된 결과, 10, 20, 40 µg/ml 농도에서 대조군(100%)에 비하여 각각 89.4%, 71.1%, 63.6%로 감소하였다(Fig. 3). 또한 멜라닌 합성 억제효과를 육안으로 확인하기 위하여 각 군당 5×10<sup>6</sup>개의 세포를 수집하여 관찰하였다. 매생이 처리군은 연한 회색으로 대조군보다 멜라닌 색소가 감소하였고, 특히 40 µg/ml 농도에서 현저히 감소하였다. 대조군으로서 멜라닌 생성을 촉진시키는 호르몬인 α-MSH<sup>19,20</sup>를 처리한 세포군은 검정색으로 멜라닌이 증가되었음을 확인하였다(Fig. 4).

지금까지 알려진 멜라닌 생성 억제 물질로는 kojic acid, arbutin, hydroquinone 등이 있으며, hydroquinone은 효능이 탁월하지만 세포독성이 강하여 잠재적인 돌연변이원이 될 수 있다고 보고<sup>8,22</sup>되고 있어, 천연물에서 세포독성이 적으면서 멜라닌 합성을 감소시키는 부작용이 적은 물질을 찾는 방향으로 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 실험 결과 매생이 추출물은 세포독성이 없이 매우 안정적으로 멜라닌생성을 억제하는 것으로 사료된다.

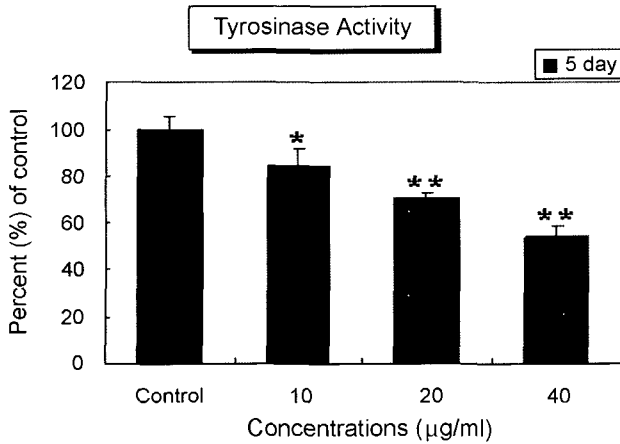


Fig. 5 - Inhibitory effect of the ethanol extract of *Capsosiphon fulvescens* on the tyrosinase activity in B16 cells. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

### Tyrosinase 활성 억제효과

멜라닌은 tyrosine을 기질로 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1(TRP-1) 및 tyrosinase-related protein 2(TRP-2) 등 일련의 효소반응을 거쳐 합성된다.<sup>23,24</sup> 이들 효소 중 tyrosinase는 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)으로, DOPA를 dopaquinone으로, 그리고 5,6-dihydroxyindole을 indole-quinone으로 전환시키는 세 단계의 반응을 촉매 하는 속도조절효소(rate-limiting enzyme)로서 피부의 색소생성을 조절하는 많은 연구의 대부분이 tyrosinase의 효소적 조절에 초점이 맞추어져 왔다.<sup>22-25</sup> 따라서 매생이 추출물을 5일 동안 농도별로 처리하고 tyrosinase 활성을 측정한 결과, 10 µg/ml 농도에서 84.4%, 20 µg/ml 농도에서 70.3%, 40 µg/ml 농도에서 53.5%로 감소하였다(Fig. 5).

Western blotting을 이용한 tyrosinase의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사한 결과에서도 매생이 농도의 증가에 따라 세포 내 tyrosinase 단백질 발현이 감소하였다(Fig. 6A & B).

인체 피부에서 멜라닌세포의 tyrosinase 발현을 조사한 연구 결과를 보면 흑인의 경우 tyrosinase 활성이 백인보다 6~8배가 높지만 tyrosinase mRNA와 protein level은 동일하였다.<sup>26</sup> Fuller 등<sup>27</sup>은 yohimbine이 멜라닌세포의 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제하였지만, tyrosinase proein과 mRNA 발현에는 변화가 없으며, Franchi 등<sup>28</sup>은 calcium D-pantetheine-S-sulfonate가 tyrosinase와 TRP-1 활성을 억제하였는데, 이는 이 효소들의 glycosylation pattern 변화와 같은 post-transcriptional 조절에 의한 것이라고 보고하였다.

한편, 이 등<sup>29</sup>은 반하(*Pinellia ternata* B.) 물추출물이 B16 세포의 tyrosinase 활성 억제 작용은 없으나 tyrosinase mRNA 전사 조절을 통하여 미백효과를 나타내며, Ando 등<sup>30</sup>은 lactic acid 가 tyrosinase 효소의 전사과정을 억제함으로써 효소활성을 억제

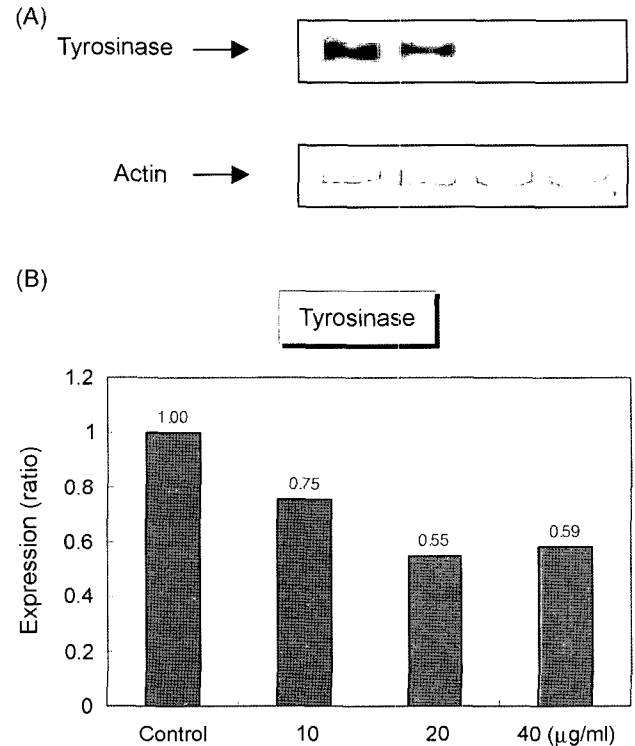


Fig. 6 - Effect of the ethanol extract of *Capsosiphon fulvescens* on tyrosinase protein in B16 cells. Lane 1: Control, Lane 2: *Capsosiphon fulvescens* 10 µg/ml, Lane 3: *Capsosiphon fulvescens* 20 µg/ml, Lane 4: *Capsosiphon fulvescens* 40 µg/ml.

한다고 보고하였다.

본 실험 결과에서는 매생이 추출물은 B16 세포의 tyrosinase 활성과 protein level을 억제함으로써 결과적으로 멜라닌의 생성을 감소시킨 것으로 사료되며, 보다 정확한 멜라닌 생성 조절 기전을 조사할 필요가 있다고 사료된다.

### 결론

매생이가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 세포 증식, 멜라닌, tyrosinase 활성과 단백질 발현을 조사한 결과, 매생이 추출물은 B16 세포의 증식을 억제하였으나, 세포 내의 공포(cytoplasmic vacuoles)나 핵 응축(nucleus shrinkage) 등의 세포독성은 나타내지 않았다. 또한 매생이 추출물은 B16 세포의 멜라닌 합성을 억제하였고, 세포 내 tyrosinase 활성과 tyrosinase 단백질 발현을 억제하였다. 이상의 결과 매생이 추출물은 세포독성이 없이 세포의 증식과 tyrosinase 활성을 억제함으로써 결과적으로 멜라닌의 생성을 감소시킨 것으로 판단된다. 따라서 매생이는 피부 부작용이 없는 화장품의 미백물질로서 개발 가능성이 높으며, 더욱 정확한 작용기전의 규명과 활성성분의 분리 및 정제, 응용법 등의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 문헌

- 1) Shimizu, H. : Chemical and biological perspectives. *In Marine Natural Products* Academic Press, New York, p. 1 (1978).
- 2) Kobayashi, J. and Ishibashi, M. : Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganism. *Chem. Rev.* **93**, 1753 (1993).
- 3) 박영현 : 해양생물독의 혈소판 응집작용에 관한 연구. *해양식품위생안정성학회지* **10**, 73 (1995).
- 4) Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jimenez-Cervantes C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., Garcia-Borron, J. C. and Hearing, V. J. : Tyrosinase related protein (TRP-1) functions as a DHICA oxidase activity in melanin biosynthesis. *EMBO J.* **13**, 5818 (1994).
- 5) Curto, E. V., Kwong, C., Hermersdorfer, H., Glatt, H., Santis, C., Virador, V., Hearing, V. J. and Dooley, P. : Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase: *In vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology* **57**, 663 (1999).
- 6) No, J. K., Soung, D. Y., Kim, Y. J., Shim, K. H., Jun, Y. S., Rhee, S. H., Yokizawa, T. and Chung, H. Y. : Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Science* **65**, 241 (1999).
- 7) Prota, G. : Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* **75**, 31 (1990).
- 8) Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J. and Chung, S. R. : Isolation of inhibitory components of tyrosinase activity from the bark of *Paeonia moutan*. *Yakhak Hoeji* **42**, 353 (1998).
- 9) 박경아 외, 조직학, 고려의학, 서울, p. 405 (1999).
- 10) Bloom, W. and Fawcett, D. W. : *A Textbook of Histology* 11th ed., W.B. Saunders Company, USA, p. 543 (1986).
- 11) De Leeuw, S. M., Smit, N. P., Van Veldhoven, M., Pennings, E. M., Pavel, S., Simons, J. W. and Schothorst, A. A. : Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *J. Photochem. Photobiol. B.* **61**, 106 (2001).
- 12) Sugai, T. : Clinical effects of arbutin in patients with chloasma in Japanese. *Hifu. Skin Res.* **34**, 522 (1992).
- 13) Bliding, C. J. : A critical survey of european taxa in Ulvales, Part I, Capsosiphon, Percursaria, Blidingia, Enteromorpha. *Opera Botanica* **8**, 1 (1963).
- 14) 김도기, 서명배, 박돈희 : 녹조식물 매생이(*Capsosiphon fulvescens*)의 인공채묘 기술 개발. *한국생물공학회, 2001년도 춘계 학술발표대회 논문집*, p. 239 (2001).
- 15) Hwang, E. K., Yi, Y. H., Shin, W. J. and Sohn, C. H. : Growth and maturation of a green alga, *Capsosiphon fulvescens*, as a new candidate for seaweed cultivation in Korea. *International Seaweed Association, Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium*, p. 59 (2003).
- 16) 박종철, 최재수, 송상호, 최명락, 김광용, 최종원 : 해조류 추출물과 페놀성화합물의 *in vitro* 및 *in vivo* 간보호활성. *생약학회지* **28**, 239 (1997).
- 17) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods* **65**, 55 (1983).
- 18) Hosoi, J. E., Suda, T. and Kuroki, T. : Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by  $1\alpha,25$ -dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**, 1474 (1985).
- 19) Hunt, G., Todd, C., Cresswell, J. E. and Thody, A. J. : Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell Sci.* **107**, 205 (1994).
- 20) Hill, S. E., Buffey, J., Thody, A. J., Oliver, I., Bleehen, S. S. and Mac Neil, S. : Investigation of the regulation of pigmentation in alpha-melanocyte stimulating hormone responsive and unresponsive cultured B16 melanoma cells. *Pigment Cell Res.* **2**, 161 (1989).
- 21) Martinez-Eparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J. A. and Garcia-Borron, J. C. : Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor - alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **255**, 139 (1998).
- 22) Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., Komoto, M. and Ichihashi, M. : Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **11**, 206 (1998).
- 23) Hearing, V. J. and Jimenez, M. : Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* **19**, 1141 (1987).
- 24) Kameyama, K., Takemura, T., Hamada, Y., Sakai, C., Kondoh, S., Nishiyama, S., Urabe, K. and Hearing, V. J. : Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPAchrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 126 (1993).
- 25) Wakamatsu, K. and Ito, S. : Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Res.* **15**, 174 (2002).
- 26) Naeyaert, J. M., Eller, M., Gordon, P. R., Park, H. Y. and Gilchrist, B. A. : Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *Br. J. Dermatol.* **125**, 297 (1991).
- 27) Fuller, B. B., Drake, M. A., Spaulding, D. T. and Chaydhry, F. : Downregulation of tyrosinase activity in human melanocyte cell cultures by yohimbine. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 268 (2000).
- 28) Franchi, J., Coutadeur, M. C., Marteau, C., Mersel, M. and Kupferberg, A. : Depigmenting effects of calcium D-pantetheine-S-sulfonate on human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **13**, 165 (2000).
- 29) 이상화, 김진준, 김호정, 이종태, 강세훈 : 반하추출물이 B-16 마우스 흑색종세포의 멜라닌 생성과 타이로시네이즈 mRNA 양에 미치는 영향. *대한화장품학회지* **23**, 23 (1997).
- 30) Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y. and Mishima, Y. : Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 150S (1993).