

1-(2-cyclohexylmethoxy-6-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxymethylphenyl)-propenone의 미백효능 및 작용기전

최현숙¹⁾ · 우미희²⁾ · 최정숙³⁾

1) 대구가톨릭대학교 보건과학대학원

2) 대구가톨릭대학교 약학과

3) 경북도립 경도대학 피부미용과

The Whitening Effect and Functional Mechanism of 1-(2-cyclohexylmethoxy-6-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxymethylphenyl)-propenone

Hyun-Sook Choi¹⁾, Mi-Hee Woo²⁾ and Jeong-Sook Choi²⁾

1) The Graduate School of Health Science, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Korea

2) Dept. of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Korea

3) Dept. of Beauty Design, Gyeongdo Provincial College Gyeongsangbuk-do, Yecheon, Korea

Abstract : The results of the research for the whitening effect and functional mechanism of 1-(2-cyclohexylmethoxy-6-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxymethylphenyl)-propenone are as follow : 1. Propenone inhibited concentration-dependently the generation of melanin increased by the stimulation of α -MSH and protoporphyrin IX, and IC₅₀ value was six to eight μ M. This was five to seven times superior in the inhibiting effect, compared with kojic acid used as positive control group. 2. Propenone did not have a decolorizing effect on melanin already generated. 3. Propenone was observed to have toxicity of over 100 μ M for the mouse melanoma B16 cells.

Key words : propenone, α -MSH, Protoporphyrin IX, Kojic acid, mouse melanoma B16 cell

1. 서 론

동서양을 막론하고 희고 깨끗한 피부는 아름다움의 척도가 되어 왔다. 피부는 항상 남에게 보여 지는 중요한 부분인 동시에 가장 복잡한 변화를 계속하고 있으며, 예로부터 미인의 조건으로 피부는 눈 같이 희고 얼굴은 복사꽃 같아야 하며 검은 머리카락이 삼단처럼 펼쳐져 있는 것을 아름다움의 최고 지표로 삼았다. 특히 요즘처럼 생활수준의 향상과 평균수명의 연장으로 인한 피부미용에 대한 관심증가와 환경오염에 따른 피부의 자외선 노출증가로 인한 피부의 광노화 증가는 피부미백에 대한 관심을 더욱 증가시키고 있다(이태현, 2003; 김진, 2002; 지홍근 외, 2004; 박주영 외, 2004; 최상숙 외, 2001).

인간의 피부색은 카로틴, 멜라닌, 헤모글로빈 등에 의해 결정 되는데, 이 중 가장 중요한 역할을 하는 것은 멜라닌이다. 오존층의 파괴로 인한 환경 변화에 의해서 지표에 도달하는 자외선의 양은 점점 증가하고 있다. 피부는 신체의 제일 바깥층에 위치하기 때문에 자외선의 영향을 가장 받기 쉬운 기관이다.

피부에 대한 자외선의 작용으로 피부에서는 프리라디칼인 활성 산소종이 생성된다. 피부가 계속적으로 자외선에 노출되게 되면 과잉의 활성산소가 생성되고 이들 활성산소종들은 피부 항산화 방어계를 붕괴시키고 이어서 피부세포 및 조직손상 그리고 세포사멸을 초래하게 된다. 이러한 위급한 상황에서 표피 세포인 keratinocyte는 멜라닌 생성 지령인자를 방출시키고 색소 세포인 melanocyte를 활성화시켜 멜라닌 생성을 촉진시킨다. 이렇게 생성된 멜라닌은 자외선 흡수를 차단시켜 자외선의 해로운 작용으로부터 피부를 보호하게 된다. 하지만 자외선에 계속 노출되면 피부 광노화가 촉진되고 색소 침착, 즉 기미 등이 생성되기도 한다.

그 외에 뇌하수체, 부신, 난소와 정소 등 내분비계통의 호르몬의 영향에 의해서도 색소 침착이 이루어지는 것으로 보고 되고 있다(조세훈, 2002; 광정훈 외, 2004; 고진아, 2003; 양민진 외, 1999; 광정훈 외, 2001; 석귀덕 외, 2004; 부용출 외, 1994; 박영현 · 장성근, 1997; 이승호 외, 1997; 장중선 외, 1998). 멜라닌 형성은 포유동물의 표피에 존재하는 melanocyte의 melanosome이라고 하는 특정 소기관에서 일어나는 현상으로 인간을 포함한 다른 동물들의 피부, 머리카락과 눈 등의 색깔을 결정하는데 관여 한다. 사람의 색소포에서 생성되는 멜라닌은

Corresponding author; Jeong-Sook Choi

Tel. +82-54-650-0261, Fax. +82-54-650-0260

E-mail: choijs@gpc.ac.kr

eumelanin(흑갈색~갈색)과 pheomelanin(적갈색~황색)으로 대별된다. Eumelanin의 생성과정은 다음과 같다. 구리를 함유하고 있는 효소인 tyrosinase는 생체 내 아미노산인 티로신이 tyrosinase에 의해 Dopa로 산화되는 과정을 촉매 한다. Dopa는 다시 tyrosinase에 의해 산화되어 Dopachrome을 형성하고, Dopa/Dopachrome 산화-환원 회로가 멜라닌 생성의 산화적 구동장치로 작용한다. 이어서 Dopachrome은 CO₂ 이탈반응과 Dopachrome tautomerase에 의해 갈색과 흑색의 색소를 만들어 낸다(김경수, 2004; 박준규, 2004; 김영미, 2003; 김영미, 2004; 김연주·김기연, 2003; 조기여 외, 2001; 김진희 외, 2001; 김진희 외, 2004; 이주상 외, 2003; 임숙정 외, 2003; Thody·Graham, 1997; Im et al., 2004).

현재까지 melanogenesis를 유발하는 것으로 알려진 물질 중에서 가장 강력한 것은 α-MSH이다. Keratinocyte가 태양광선에 노출되면 일산화질소(NO), α-MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone), prostaglandin E₂ 등을 방출하고 이들은 다시 melanocyte로 이동한다. 일산화질소는 cGMP와 protein kinase G의 신호전달을 통하여 멜라닌 생합성을 증가시키는데, 이 과정은 guanylate cyclase를 활성화시켜 cGMP의 농도를 증가시키는 protoporphyrin IX, 자체적으로 NO를 공급하는 SNP, SNAP와 같은 물질에 의해서도 유사하게 일어난다. 그리고 α-MSH는 cAMP와 protein kinase A의 신호전달을 통하여 melanin 생합성을 증가시킨다. 이 과정 또한 adenylate cyclase를 활성화시켜 cAMP의 농도를 증가시키는 forskolin과 cAMP phosphodiesterase를 억제하여 cAMP 농도를 증가시키는 isobutylmethylxanthine (IBMX) 같은 물질에 의해서도 유사하게 일어난다(김경수, 2004; 박준규, 2004).

지금까지 멜라닌 생성 저해 물질로 개발되어 미백화장품의 성분으로 현재까지 많이 사용되고 있는 대표적인 것으로는 kojic acid, arbutin, hydroquinone, 비타민 C 등이 있다. 그 중 본실험에서 사용한 양성대조군으로는 tyrosinase의 활성화에 필요한 구리 이온을 킬레이트 시켜 멜라닌 생성을 저해하는 우수한 미백효능이 있다고 알려진 kojic acid를 사용하였다(고진아, 2003; 김원희, 2003; 박준규, 2004).

본 연구에서는 C₂₃H₂₆O₄(MW : 366.45)의 molecular formular를 가지며, yellow powder의 형상을 가지는 1-(2-cyclo-

hexylmethoxy-6-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-methylphenyl)-propen-one(Fig. 1)이 melanoma B16 세포에서 α-MSH, protoporphyrin IX와 같은 자극제에 의하여 유도되는 멜라닌 생성의 억제 효과를 연구 검토하였으며, 더불어 멜라닌 생성 억제에 대한 작용기전을 확인함으로써 피부미백 후보 물질로서의 개발 가능성이 있는지를 연구하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 배지 및 완충용액

DMEM-10% FBS 배지 : DMEM 26.8 g, HEPES 4.7 g, benzylpenicillin potassium 200 mg과 streptomycin sulfate 200 mg을 1.5 liter의 고압증기에 멸균한 증류수에 완전히 녹였다. NaHCO₃ 4 g을 가한 다음 pH를 7.4로 맞춘 뒤 증류수를 가하여 전량 2 liter가 되도록 만들었다. 필터를 사용하여 여과한 후 57°C 에서 4분간 불활성화 시킨 FBS 200 ml를 첨가하였다.

Freezing medium : DMSO 4 ml, FBS 16 ml를 섞은 혼합액을 DMEM-10% FBS배지와 1:1의 비율로 섞어 사용하였다.

PBS 완충용액 : NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 2.9 g, KH₂PO₄ 0.2 g 을 950 ml의 증류수에 녹인 후 pH 7.4로 맞춘다. 증류수를 가하여 전량 1 liter가 되도록 만든 후 고압증기멸균 하였다.

0.5 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) : Na₂HPO₄ · 7H₂O 67 g을 증류수 500 ml에 녹인 용액 77.4 ml과 NaH₂PO₄ · H₂O 34.5 g을 증류수 500 ml에 녹인 용액 22.6 ml을 혼합하고 pH를 6.8로 맞춘 후 사용하였다.

5 mM L-Dopa solution : L-Dopa 98.5 mg을 0.1 M sodium phosphate buffer에 넣고 혼합하여 사용하였다.

Sodium phosphate lysis buffer : 0.1 M Sodium phosphate buffer에 100 mM PMSF 100 μl와 Triton X-100 100 μl를 혼합하여 사용 하였다.

Triton X-100 lysis buffer : 50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA를 섞어 pH를 7.4로 맞춘 후 사용하였다.

Electrode buffer : Tris 3.0275 g, Glycine 14.413 g, 10 % SDS 10 ml을 증류수에 섞어 전량 1 liter가 되도록 만들었다.

5×Sample loading buffer : 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 3.1 ml, SDS 1.3 g, glycerol 2.5 ml, 2-mercaptoethanol 1.3 ml, bromophenol blue 5 mg을 혼합하여 전량 10 ml가 되도록 만들어 사용하였다.

0.1% Trypan blue : PBS 완충용액에 0.1% trypan blue를 녹여 사용 하였다.

2.2. 실험방법

시료 용액의 제조 : 분말 상태의 시료는 100% DMSO로

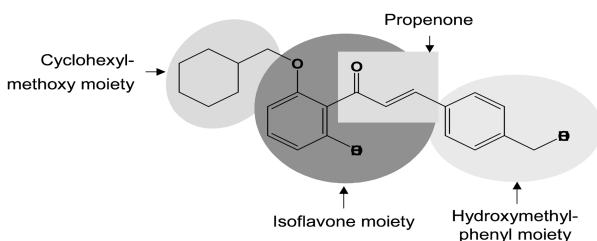


Fig. 1. Chemical structure of 1-(2-cyclohexyl-Methoxy-6-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxymethylphenyl)-propenone.

100 mM이 되도록 용해하여 -20°C에 보관하였다. 실험에 사용할 때에는 동결된 시료를 상온에서 녹인 후 적절한 농도로 희석하여 사용하였다. 이때 DMSO의 최종 농도는 0.1% 이하가 되도록 하였다.

세포배양법 : Melanoma B16 세포주는 마우스 melanoma 세포로 culture dish에 고착하여 증식한다. 이 세포주는 한국 세포주 은행으로부터 분양받았다. Melanoma B16 세포 2×10⁶ 개를 10 ml의 DMEM-10% FBS 배지로 희석한 후 5% CO₂가 유지되는 37°C incubator에서 계대 배양하였다.

멜라닌 생성 억제 측정법 : 마우스 melanoma B16 세포를 96-well microplate에 2.5×10³ cells/well로 분주하고 5% CO₂가 유지되는 37°C incubator에서 배양하였다. 24시간 후 well에서 100 µl의 배지를 제거하고 DMEM-10% FBS배지에 계열 희석한 시료와 자극제를 가하였다. 이 때 자극제의 최종 농도로 α-MSH는 1 nM로 하였으며, protoporphyrin IX는 30 µM이 되도록 하였다. 시료와 자극제를 처리하여 3일 동안 배양한 배지 150 µl를 새로운 96-well microplate에 옮겨 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. α-MSH 또는 protoporphyrin IX로 자극한 세포의 흡광도를 대조군으로 하여 자극을 하지 않은 세포에서의 흡광도 값을 빼서 각 시료의 멜라닌 생성에 대한 억제율을 구하였다.

멜라닌 탈색 효과 측정법 : Melanoma B16 세포를 1 nM의 α-MSH를 처리하여 5% CO₂가 유지되는 37°C incubator에서 3일 동안 반응시켜 생성된 멜라닌을 시료의 탈색효과 측정에 사용하였다. 생성된 멜라닌이 함유된 배지 150 µl와 희석된 농도의 시료 50 µl를 혼합하여 96-well microplate에 분주하고 37°C incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그리고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 시료의 melanin 탈색효과를 측정하였다.

세포증식 측정법 : Melanoma B16 세포를 96-well microplate에 2.5×10³ cells/well로 분주하고 5% CO₂가 유지되는 37°C incubator에서 배양하였다. 24시간 후 well에서 100 µl의 배지를 제거하고 DMEM-10% FBS 배지로 희석한 시료를 처리하고 3일 동안 배양하였다. 배양한 상층액을 모두 제거하고 DMEM 배지 180 µl와 5 mM의 WST-1 용액 20 µl를 가하여

37°C incubator에서 3-4시간 배양하여 나타나는 발색을 450 nm에서 측정하여 시료를 처리하지 않은 것을 대조군으로 하여 세포 증식을 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Propenone 유도체의 멜라닌 생성 억제효과

α-MSH 자극에 의해 유도된 멜라닌 생성 억제 효과 : Mouse melanoma B16 세포에 각 농도의 propenone과 1 nM의 α-MSH를 3일 동안 처리하여 배지로 방출되는 멜라닌을 405 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(Fig. 2). α-MSH는 MC1R과 결합하여 하위 신호가 전달되면 세포내 cAMP의 농도를 높이고 PKA 경로를 통하여 멜라닌 생성을 증가시킨다. 자극을 하지 않은 안정상태의 melanoma B16 세포에서는 약 37.0 µM의 멜라닌이 생성되었으며, α-MSH 자극에 의하여 약 4배 이상 증가한 156.7 µM의 멜라닌이 생성되었다. α-MSH 자극에 의하여 증가한 멜라닌 생성은 propenone 처리에 의하여 농도 의존적으로 감소하였는데, 최종 농도 3 µM에서 37.9±3.3%, 10 µM에서 64.8±3.5%, 그리고 30 µM에서는 89.3±3.1%의 억제 효과를 나타내었으며, IC₅₀은 약 6.1 µM이었다. 한편 양성 대조군으로 사용한 kojic acid는 멜라닌 생성을 억제하여 미백작용을 하는 것으로 알려져 있는데 최종 농도 25 µM에서 23.4±3.1%, 50 µM에서 57.4±4.1%, 그리고 100 µM에서는 94.7±4.6%의 억제 효과를 보였으며, IC₅₀은 44.6 µM이었다. 이는 kojic acid보다 propenone이 약 7배정도 효과가 더 좋게 나타남을 확인할 수 있었다.

Protoporphyrin IX 자극에 의해 유도된 멜라닌 생성에 대한 억제 효과 : Protoporphyrin IX는 guanylate cyclase 증가제로 작용하여 일산화질소를 매개로 하는 cGMP 경로를 통하여 멜라닌 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 자극을 하지 않은 안정상태의 melanoma B16 세포에서는 약 32.7 µM의 멜라닌이 생성되었으며, protoporphyrin IX 자극에 의하여 약 4배 증가한 129.2 µM의 멜라닌이 생성되었다(Fig. 3). Protoporphyrin 자극에 의하여 증가한 멜라닌 생성은 propenone 처리에 의하여

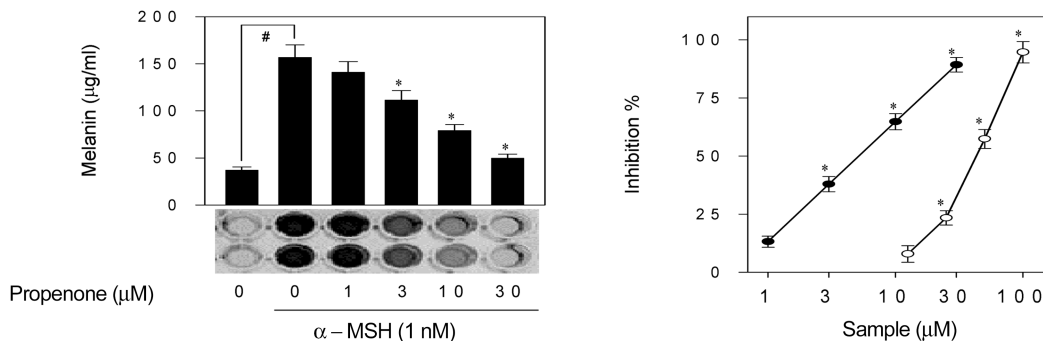


Fig. 2. Inhibitory effect of propenone on α-MSH-induced melanin production.

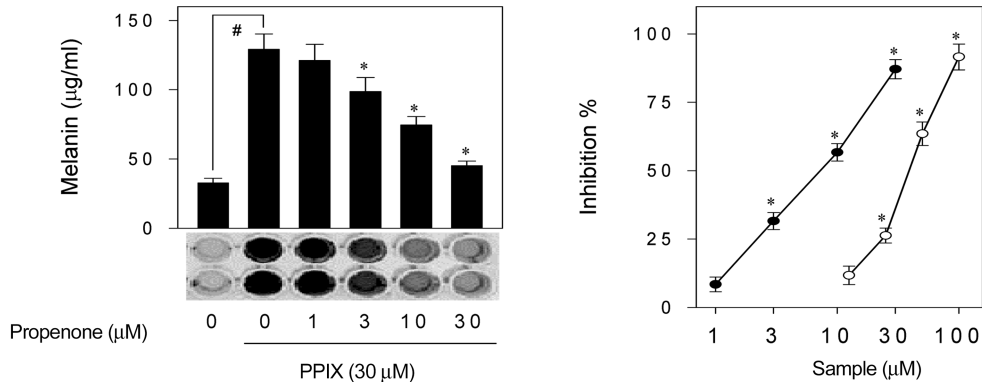


Fig. 3. Inhibitory effect of propenone on protoporphyrin IX-induced melanin production.

농도 의존적으로 감소하였는데, 최종 농도 3 µM에서 31.6±3.1%, 10 µM에서 56.7±3.2%, 그리고 30 µM에서는 87.1± 3.5%의 억제 효과를 나타내었으며, IC₅₀은 약 8.1 µM이었다.

한편 양성 대조군으로 사용한 kojic acid는 최종 농도 25 µM에서 26.3±2.7%, 50 µM에서 63.5±4.3%, 그리고 100 µM에서는 91.6±4.7%의 억제 효과를 보였으며, IC₅₀은 40.9 µM이었다. 이는 kojic acid보다 propenone이 약 5배정도 효과가 더 좋게 나타남을 확인 할 수 있었다.

3.2. Propenone 유도체의 멜라닌 탈색 효과

Mouse melanoma B16 세포를 α-MSH로 자극하여 생성된 melanin이 세포 밖으로 방출되어 배지에 존재하는 것을 propenone과 직접 반응시켜 시료에 대한 멜라닌 탈색 효과를 측정하였다(Fig. 4). 96-well microplate에 배지로 방출된 멜라닌 용액과 propenone을 혼합하여 37°C에서 24시간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. Propenone은 1-30 µM에서 흡광도는 대조군과 거의 비슷하여 생성된 멜라닌에 대해서는 탈색 효과는 없는 것으로 나타났다.

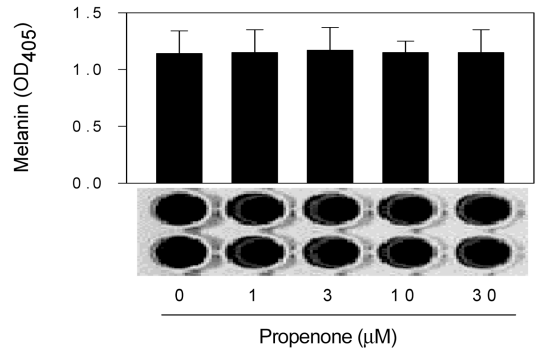


Fig. 4. Depigmenting effect of propenone on melanin (µg/ml).

3.3. Propenone 유도체의 melanoma B16 세포 증식에 미치는 영향

Mouse melanoma B16 세포를 96-well microplate에 세포를 분주하여 다음날 각 농도의 시료를 처리하고 3일 동안 배양한 다음 WST-1을 처리하여 생성된 탈색 정도를 이용하여 세포 증식에 미치는 시료의 영향을 평가하였다(Fig. 5).

WST-1은 살아있는 세포의 mitochondria에 존재하는 dehydrogenase가 tetrazolium 염과 반응하여 생성되는 formazan을 형성 하며, 살아있는 세포가 많을수록 formazan을 많이 생성하여 상대적으로 흡광도가 증가한다. Melanoma B16 세포는 100 µM 이상의 propenone 농도에서 세포 증식이 억제되었다. 따라서 본 실험에서는 시료에서 세포 증식에 영향을 나타내지 않은 100 µM 이하의 농도를 사용하였다.

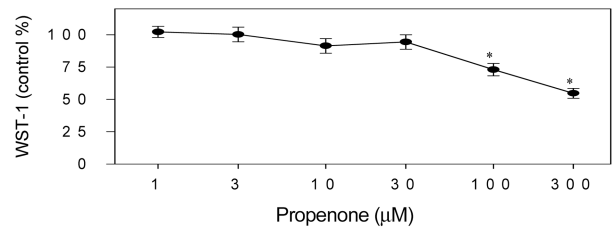


Fig. 5. Cytotoxicity of propenone compound.

4. 요약

1-(2-cyclohexylmethoxy-6-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxymethyl phenyl)-propenone의 미백 효능 및 작용기전의 연구 결과는 다음과 같다.

1. Propenone은 α-MSH와 protoporphyrin IX 자극에 의하여 증가한 멜라닌 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며, IC₅₀은 6-8 µM이었다. 이것은 양성대조군으로 사용한 kojic acid와 비교하여 약 5-7배 정도로 억제 효과가 우수하였다.
2. Propenone은 생성된 멜라닌에는 탈색효과가 없었다.
3. Propenone은 mouse melanoma B16 세포에 대하여 100 µM 이상에 독성이 관찰되었다.

참고문헌

- 고진아 (2003) 사람 피부에 있어서 몇 가지 천연물의 미백 작용에 관한 연구. 서울산업대학교 대학원 석사학위논문.
- 곽정훈 · 김용해 · 장해룡 · 박철우 · 한영환 (2004) 치자 열매 추출물의 tyrosinase 효소활성 저해 및 melanogenesis 억제 효과. *한국생물공학회지*, **19**(6), 437-440.
- 곽정훈 · 서윤교 · 한영환 (2001) 쑥 추출물의 tyrosinase 효소활성에 미치는 억제효과. *한국생물공학회지*, **16**(2), 220-223.
- 김경수 (2004) Piperlonguminine의 미백효능 및 작용기전. 충북대학교 대학원 석사학위논문.
- 김연주 · 김기연 (2003) “화장품과학”. 청구문화사, 서울.
- 김영미 (2003) “메디칼스킨케어”. 동화사, 서울.
- 김영미 (2004) “Medical skin care 2”. 임송, 서울.
- 김원희 (2003) 천연 식물 추출물의 멜라닌 생성 저해에 관한 연구. 덕성여자대학교 대학원 석사학위논문.
- 김진 (2002) 감초 물추출물의 멜라닌 형성 억제효과 및 기전에 관한 연구. 원광대학교 대학원 박사학위논문.
- 김진화 · 박성민 · 심관섭 · 이범천 · 표형배 (2004) 향나무추출물의 광손상으로 부터 피부세포 보호와 자극완화 효과에 대한 연구. *대한화장품학회지*, **30**(1), 63-71.
- 김진희 · 서한국 · 천영신 (2001) “세포배양노트”. 도서출판 월드사이언스, 서울.
- 박영현 · 장성근 (1997) 한국산 식용버섯류의 tyrosinase 활성 저해 검색 및 그 유효성분 분리. *한국위생학회지*, **12**(3), 195-199.
- 박주영 · 최현정 · 심종원 · 안수미 · 김준오 · 장이섭 (2004) pH 감응형 나노입자를 이용한 멜라닌 합성저해 연구. *대한화장품학회지*, **30**(1), 29-32.
- 박준규 (2004) Quinazoline계 JSH-18 물질의 미백 효능. 충북대학교 대학원 석사학위논문.
- 부용출 · 전체옥 · 오지연 · 김은정 · 이병곤 (1994) 솔잎에서 분리된 항산화 물질인 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone의 멜라닌 생성 억제 작용. *대한화장품학회지*, **20**(1), 1-13.
- 석귀덕 · 이승자 · 배정미 (2004) 새삼(*Cuscuta japonica Choisy*) 및 실새삼(*C. australis R.Be*) 추출물의 mushroom tyrosinase 활성 억제 효과. *생약학회지*, **35**(4), 380-383.
- 양민진 · 임세진 · 김명애 · 안령미 (1999) 울피추출물에 의한 tyrosinase 활성 억제 및 melanin생성억제 효과. *한국환경위생학회지*, **25**(1), 37-43.
- 이승호 · 박지수 · 김소영 · 김진준 · 정시련 (1997) 고등식물로부터 피부멜라닌 생성에 관여하는 티로시나제 활성 억제물질의 탐색. *약학회지*, **41**(4), 456-461.
- 이주상 · 김정아 · 조세훈 · 손애량 · 장태수 · 소명숙 · 정시련 · 이승호 (2003) 감초의 tyrosinase 활성 억제 성분. *생약학회지*, **34**(1), 33-39.
- 이태현 (2003) 보리 · 현미 · 울무의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문.
- 임숙정 · 임난영 · 이성원 · 곽근신 · 안성훈 · 문연자 · 우원홍 (2003) 감초수추출물이 HM3KO 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향. *동의병리학회지*, **17**(2), 368-373.
- 장종선 · 김현정 · 배준태 · 박선희 · 이승언 · 김옥미 · 이갑광 (1998) 목이버섯 메탄올 추출물이 벤조피렌(B(a)P) 투여한 마우스의 지질과산화 및 간 손상 억제에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*, **27**(4), 712-717.
- 조기여 · 정연 · 조혜명 · 채순남 · 류현혜 · 손애량 · 장미혜 (2001) “피부 과학”. 도서출판 성화, 서울.
- 조세훈 (2002) 천연물로부터 미백활성 물질의 개발. 영남대학교 대학원 석사학위논문.
- 지홍근 · 최정식 · 이순근 · 조용백 · 표성수 · 한창균 · 김주현 · 정기원 · 유세준 · 신정주 (2004) 새로운 미백제인 천화분근, 하교초엽, 위령선근의 효능, 효과 및 안정화에 대한 연구. *대한화장품학회지*, **30**(1), 123-128.
- 최상숙 · 노향순 · 조성희 · 공광훈 (2001) 천연물로부터 티로시나제 활성 저해제의 검색. *약학회지*, **45**(5), 522-528.
- Im S., Lee E.S., Kim W., On W., Kim J., Lee M. and Kang W.H. (2004) Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocyte. *J. Korean Med. Sci.*, **17**, 58-64.
- Thody A.J. and Graham A. (1998) Does α -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans. *Pigment. Cell Res.*, **11**, 265-274.

(2006년 4월 18일 접수)