

파래 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과

조영호*
건양대학교 제약공학과

Inhibitory Effect of *Enteromorpha linza* on the Melanogenesis in B16 Melanoma Cells

Young Ho Cho*

Department of Pharmaceutical Engineering, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea

Abstract – Melanin is a polymer of phenol which produces hyperpigmentation in the skin. Melanin synthesis is catalyzed by the enzyme tyrosinase. To investigate the whitening activity of the fractions from the ethanol extract of *Enteromorpha linza*, we studied the inhibitory effect on the tyrosinase activity and melanogenesis in the B16/F1 melanoma cells. The inhibition ratio of tyrosinase activity of ethylacetate fraction from *E. linza* was as strong as that of kojic acid, a positive control. Also, the melanin production was significantly inhibited by the ethylacetate fraction in a dose dependent manner. The ethylacetate fraction showed the highest activity in the fractions and as strong activity as that of arbutin, a positive control. From these results, we suggest that the *E. linza* extract might be able to apply to cosmetic and medical fields.

Keywords – *Enteromorpha linza* , melanogenesis, tyrosinase, melanin

해양생물은 육상생물과는 매우 다른 환경에 살고 있으므로 이들이 생산하는 2차 대사물질의 활성도 다양할 것으로 기대된다. 근래 해조류로부터 신규 화합물이 분리되어 화장품, 항염증제, 항암제 등으로 개발되어지고 있으며, 해조류로부터 신규 활성 물질의 탐색과 개발에 대한 관심이 증가되고 있는 실정이다.¹⁻⁵⁾

파래 (*Enteromorpha linza* (L.) J. Ag.)는 녹조식물 갈파래과에 속하는 해조류로 독특한 맛과 향을 지녀 예로부터 널리 식용되어 왔으며, 우리나라 전 연안에 분포하며 특히 전라남도 지방에 많이 서식하고 있다.⁶⁾ 식물체는 모여서 나고 길며, 편평한 엽상체이다. 모양은 피침상, 신장형 또는 선상이다. 단조이고 하부에 더러 조금의 가지를 분출하는 수가 있다. 몸의 하부는 매우 가늘고 가장자리는 주름이 있거나 또는 평탄하다. 보통 길이는 10~20 cm 이고, 넓이는 0.5~10 cm 이다. 어릴 때는 실모양이고 가운데가 비어 있지만 넓게 된 것은 막의 대부분이 유착해서 막혀 있고 양 가장자리만 유착하지 않고 남아 있다. 색은 선록색이며 질은 엷은 막질이다. 11월경에서 5, 6월까지 번무한다.^{7,8)}

인간의 피부색은 헤모글로빈, 카로틴, 멜라닌에 의해 결

정되는데 그 중에서도 멜라닌은 사람의 피부색을 결정하는 가장 큰 인자이다. 멜라닌은 동물, 식물 및 미생물에 널리 존재하는 페놀성 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체로서 melanocyte에서 티로신을 출발물질로 하여 tyrosinase의 촉매작용으로 생합성된다.^{9,10)}

현재 피부 미백제에 대한 많은 연구가 자외선 흡수제나 산란제, arbutin, kojic acid 등과 같은 tyrosinase 활성 저해제, 활성 산소종(reactive oxygen species)을 소거하는 ascorbic acid 및 유도체, coenzyme Q10 등에 대해 이루어지고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 특히 최근에는 안전성을 고려하여 생약이나 해조류와 같은 천연물을 이용한 미백연구가 활발히 이루어지고 있다.^{2,14,15)}

본 연구는 해조류로부터 안전하고 우수한 활성을 나타내는 미백제를 개발하기 위한 연구의 일환으로 파래가 멜라닌 생성에 영향을 주는지를 조사하고자 각 용매별 추출물에 의한 tyrosinase 저해 활성 및 멜라닌 양을 측정된 결과 유의한 효과를 보였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료 및 시약 – 본 실험에 사용한 파래(*E. linza*)는 우리

*교신저자 (E-mail): mical@konyang.ac.kr
(FAX): 82-41-730-5695

나라 서해 연안에서 채취한 것을 즉시 냉동하여 보관된 것을 구입하여, 전문가의 감정을 받아 사용하였으며, 시료의 일부(KYPE-10003)는 본 연구실에 보관 중이다. Tyrosinase 저해 활성 측정을 위해 사용된 mushroom tyrosinase, tyrosine 및 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich사 (USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 추출 및 분획에 사용된 유기 용매들과 그 외 각종 시약은 일급 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

시료의 추출 및 분리 - 증류수로 수회 세척하여 염분을 제거한 파래 2 kg을 70% 에탄올 수용액으로 3회 환류 추출하여 여과한 후, 감압 농축하여 에탄올 추출물(500 g)을 얻었다. 얻어진 에탄올 추출물의 일부(10 g)를 물에 분산시킨 후, n-hexane 1 L로 3회 분배 추출하여 n-hexane 분획을 얻고, 포화 NaCl 용액으로 back washing하고, 무수 Na₂SO₄로 탈수한 후, 감압 농축하여 3g의 분획을 얻었다. 남은 물층에 대하여 methylene chloride (MC), ethyl acetate (EtOAc), 수포화 부탄올(n-BuOH) 등을 이용하여 n-hexane 분획과 같은 방법으로 탈수, 농축하여 각각 1.5 g, 0.4 g, 1.3 g의 분획을 얻었다(Scheme I). 각각의 건조 분획을 DMSO에 녹여 농도를 조정된 다음 시료로 사용하였다.

세포배양 - B16/F1은 생쥐의 melanoma 세포주로 서울대학교 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 5% fetal bovine serum (Bio Whittaker, USA), 1% penicillin-

streptomycin (Gibco BRL, USA), 200 μM α-MSH (Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

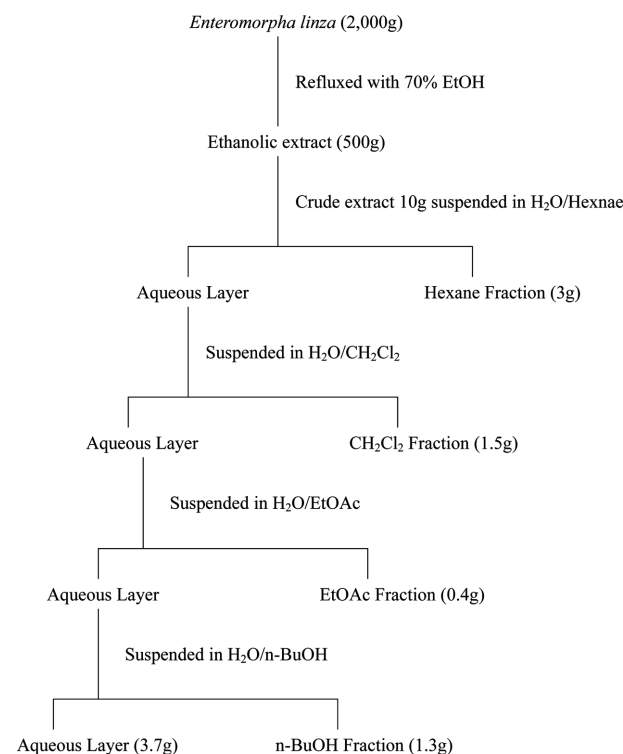
Tyrosinase 저해 활성 측정 - Tyrosinase 저해 활성 측정은 Choi¹⁵⁾ 등의 방법을 변형시켜 사용하였다. 96-well plate에 0.1M sodium phosphate buffer (pH6.5), 1.5 mM tyrosine solution, 시료용액의 혼합액에 tyrosinase 효소액 (1,200 units/ml)을 첨가하여 37°C에서 25분간 반응시켜 micro plate reader (ELx 800, Bio-Tek Instruments, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정 후 tyrosinase 활성 저해율을 구하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

세포내 Tyrosinase 저해 활성 측정 - 세포내 tyrosinase 저해 활성은 Matinez-Esparza¹⁶⁾의 방법을 변형시켜 측정하였다. 6-well plate에 5×10⁵ cells/well로 세포를 분주하고 하루 동안 배양한 후 시료를 처리하였다. 24시간 후, 세포를 수집하여 용해시킨 후 0.2% L-DOPA가 첨가된 0.1M sodium phosphate buffer (pH6.5)를 넣고 37°C에서 2시간 배양한 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

세포 생존율 측정 - 세포독성은 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann¹⁷⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 96-well plate에 B16/F1 melanoma 세포를 2×10⁴ cells/well 농도로 접종한 후 각 well에 시료를 투여하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액 (5 μg/ml)을 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100 μl acid-isopropanol (0.04N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 micro plate reader로 565 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

멜라닌 정량 - 멜라닌 정량은 Hosoi 등¹⁸⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 6-well plate에 3×10⁵ cells/well 농도로 세포를 접종한 후 시료를 처리하고 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 5분간 원심분리하여 얻은 세포 침전물을 1 ml homogenization buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, 1% triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1N NaOH (+10% DMSO) 용액 200 μl를 첨가하여 용해시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 작성된 표준 검량선에서 구하고, 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하였다. 멜라닌은 단위세포(10⁴ cells)에서의 멜라닌 생성량을 비교하였다.

안정도 측정 - 파래 추출물의 제형내 안정도 측정을 위하여 파래 추출물을 3%(v/v) 적용한 O/W emulsion을 제조하여 상온, 순환, 고온, 자외선의 4가지 조건에서 보관하면서 pH와 색상 변화를 4주간 관찰하였다.



Scheme I. Procedure for extraction and fractionation of *Enteromorpha linza*.

자료분석 및 통계처리 - 모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성 검증은 Student's *t*-test로 하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

Tyrosinase 활성 저해 효과 - 파래 추출물의 용매별 분획에 대한 tyrosinase 활성 저해 측정결과는 Fig. 1과 같다. 파래 추출물 및 EtOAc 분획층은 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성 저해율이 유의하게 증가하였다(*p*<0.05). 또한, tyrosinase 활성도의 IC₅₀ (Inhibition rate 50%)은 EtOAc 분획이 12 µg/ml, 파래 추출물이 18 µg/ml, 부탄올 분획이 140 µg/ml 순이었으며(*p*<0.05), 파래 추출물 중에서 EtOAc 분획의 tyrosinase 활성 저해능이 가장 높았으며, 이

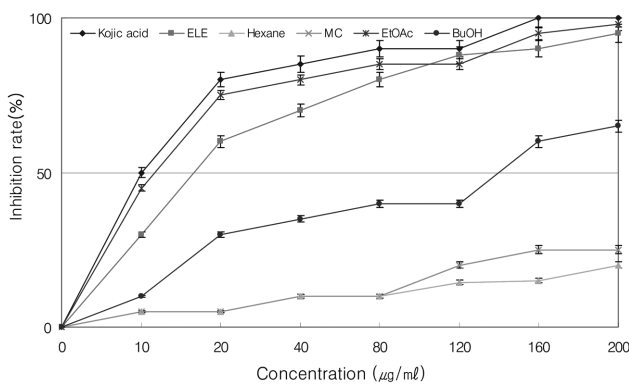


Fig. 1. Inhibition effect of tyrosinase activity by extracts from *E. linza*. Results were expressed as mean±SD of the minimum three determinations.

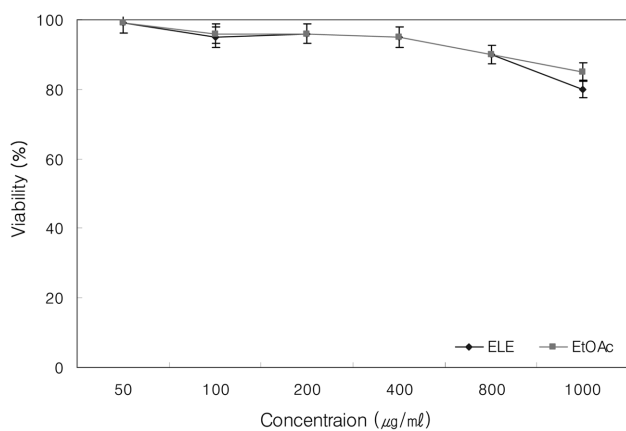


Fig. 2. Effects of EtOAc fraction and *Enteromorpha linza* extracts(ELE) on the viability of B16/F1 melanoma cells. Results were expressed as % of control and data were mean±SD of the minimum three determinations.

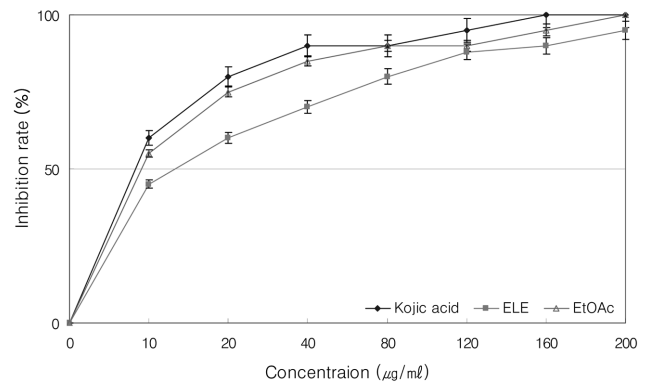


Fig. 3. Inhibition effect of tyrosinase activity by EtOAc fraction and *Enteromorpha linza* extracts(ELE). Results were expressed as mean±SD of the minimum three determinations.

는 tyrosinase의 copper 결합부위와 결합해서 tyrosinase 활성을 억제하는 것으로 알려진 kojic acid¹⁹⁾의 저해 양상과 비슷하였다.

Kang²⁰⁾ 등의 연구에서 실패라 (*Enteromorpha crinita*)와 구멍파래의 tyrosinase 활성 저해효과는 낮다고 보고된 사실로부터 파래의 종류에 따라 활성이 달라질 수 있다고 사료된다.

세포독성 - 파래 추출물 및 용매 분획 시료 중에서 tyrosinase 저해 활성 우수하게 나타난 파래 추출물과 EtOAc 분획에 대한 세포내 tyrosinase 저해 활성 및 멜라닌 합성 저해능을 측정하기 위해 B16/F1 melanoma 세포에 대한 독성 정도를 측정하였다. 그 결과 시료를 800 µg/ml 농도로 처리한 경우에도 90% 이상 생존하는 것으로 보아 별다른 세포독성은 없는 것으로 나타났다(Fig. 2).

세포내 Tyrosinase 활성 저해 효과 - Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정에서 속도제한(rate-limiting) 효소이며 멜라닌 합성의 주요한 조절적 단계를 나타내는 효소이다.²¹⁾ 파래 추출물과 EtOAc 분획을 처리한 세포를 수집하여 용해시킨 후, 0.2% L-DOPA가 첨가된 0.1M sodium phosphate buffer (pH6.8)를 넣고 37°C에서 배양한 후 tyrosinase 저해활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 파래 추출물과 EtOAc 분획의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성 억제율이 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다(*p*<0.05). 또한, Tyrosinase 활성도의 IC₅₀은 파래 추출물이 13 µg/ml, EtOAc 분획이 8.5 µg/ml로 kojic acid의 8 µg/ml 과 유사한 효과를 나타내었다.

멜라닌 합성 저해 효과 - 생체에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고 다시 L-dopa-quinone으로 산화시키는 과정으로 연속적인 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이루어진다.²²⁾ Tyrosinase 저해 활성이 뛰어난 EtOAc 분획이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 최종 산물인 멜라닌 양을

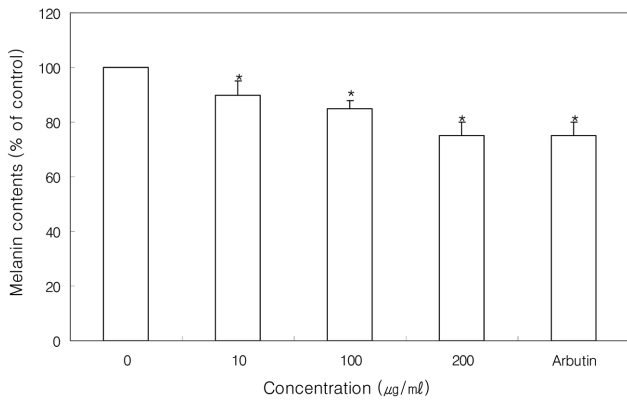


Fig. 4. Inhibitory effect of EtOAc fraction from *E. linza* on melanin production in B16/F1 melanoma cells. Results were expressed as % of control and data were mean ± SD of the minimum three determinations. *Significantly different from control group (*p<0.05).

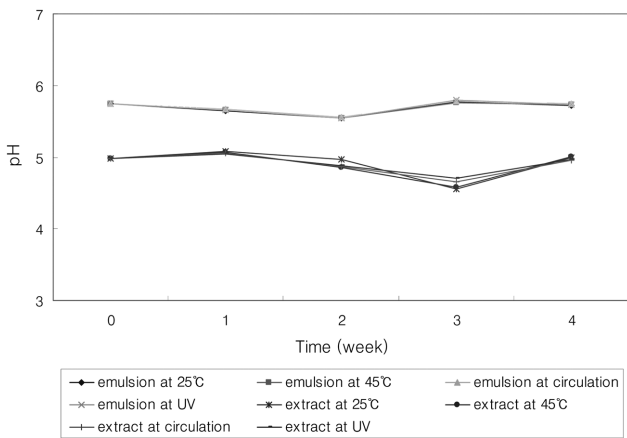


Fig. 5. Stability of *E. linza* extract and O/W emulsion with extract at 25°C, 45°C, circulation temperature and under UV.

측정하였다. B16/F1 melanoma 세포에 EtOAc 분획을 10, 100, 200 µg/ml의 농도로 각각 처리하고 48시간 배양한 다음 멜라닌 생성량을 측정하였다. Fig. 4에 나타낸 바와 같이, 파래 EtOAc 분획 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 멜라닌 생성이 감소하였다. 즉, 10 µg/ml에서 10±5%, 100 µg/ml에서 15±3%, 200 µg/ml에서 25±5%의 감소율을 보여 EtOAc 분획 처리 농도에 따른 멜라닌 합성이 유의적으로 감소되었다. 특히, 양성 대조군으로 사용된 알부틴이 400 µg/ml에서 25±5%의 감소율을 보인 것과 비교하여 볼 때 파래 EtOAc 분획은 알부틴과 비슷하거나 우수한 멜라닌 생성 저해 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 본 연구의 결과 B16/F1 melanoma 세포에 파래 EtOAc 분획을 처리하면 농도 의존적으로 대조군에 비하여 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성이 모두 감소하는 것으로 나타난 것으로 보아 tyrosinase가 멜라닌 합성에 관여하는 주요한 효소로 작용함

을 알 수 있다. 이러한 사실은 Englaro²²⁾ 등이 보고한 연구와 일치하는 사실이다.

안정도 측정 결과 - 파래 추출물의 제형내 안정성을 측정하기 위하여 파래추출물을 1%(w/v) 농도로 용해한 원료와 이 원료 3%(v/v)가 첨가된 O/W emulsion을 각각 제조하여 상온, 순환, 고온, 자외선의 4가지 조건에서 4주간 pH와 성상의 변화를 관찰하였고, 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 원료의 경우 제조 직후 pH는 4.98이었으며, 4가지 조건에서 모두 4주간 4.55에서 5.08 수준을 유지하였으며, 고유의 검푸른 색은 그대로 유지되었고 침전이나 변색은 발견되지 않았다(data not shown). 파래 추출물을 3%(v/v) 첨가하여 제조한 O/W emulsion의 경우 추출물 첨가 전 pH 5.90에서 첨가 후 5.75로 떨어졌고, 4주간 모든 조건에서 pH는 5.53에서 5.79를 유지하였다. 고온에 보관한 제품의 상층부위가 약간 묽어진 듯한 성상 변화를 보인 것을 제외하고, 나머지 조건에서 보관한 제품의 경우 별다른 변색, 변취는 관찰되지 않았다(data not shown).

파래 EtOAc 분획의 멜라닌 생성 억제 효과는 세포 독성에 의한 세포사멸에 의한 것이라기 보다는 멜라닌 생성 단계에 작용하는 효소 활성 억제에 의한 것으로 사료된다. Shuji²³⁾ 등이 B-16 melanoma 세포에서 UV에 의한 superoxide anion radical 증가로 tyrosinase의 활성이 높아져 멜라닌 생성이 증가되는 것을 SBA (sodium 5,6-benzylidene ascorbate)가 tyrosinase 활성을 억제하고, superoxide anion을 소거하여 멜라닌 생성 억제 효과를 가진다고 발표한 것처럼 파래 EtOAc 분획에 의한 자유 라디칼 소거작용에 대한 연구가 진행되어야 확실해지겠지만, 파래 EtOAc 분획이 superoxide anion을 소거하여 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내는 것으로 생각할 수 있다.

향후 파래 추출물을 함유한 화장품을 사용하였을 때 미백효과에 대한 검증 시험과 파래 추출물이 멜라닌 생성에 어떤 기전으로 생성 억제효과를 나타내는지에 대한 연구가 더 진행되면 새로운 미백원료 개발이 가능할 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 해조류로부터 안전하고 우수한 활성을 나타내는 미백제를 개발하기 위한 연구의 일환으로 파래가 멜라닌 생성에 영향을 주는지를 조사하고자 각 용매별 추출물에 의한 tyrosinase 활성 저해 및 멜라닌 양을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 파래 용매별 분획물 중에서 EtOAc 분획 처리군이 가장 높은 tyrosinase 활성 저해 효과를 보였다.
2. 세포내 tyrosinase 활성은 파래 EtOAc 분획의 처리 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다.
3. B16/F1 melanoma 세포에 파래 EtOAc 분획을 농도별

로 처리하고 멜라닌 생성 정도를 측정된 결과 투여 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 나타났다.

결론적으로 파래 추출물이 tyrosinase 활성 저해, 멜라닌 생성 억제 효과를 동시에 가지는 물질로 새로운 미백 원료로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

- Kim, J. J., Cho, Y. H., Park, S. M., Lee, K. E., Lee, J. J., Lee, B. C., Pyo H. B., Song, K. S., Park, H. D. and Yun, Y. P. (2004) Antioxidants and inhibitor of Matrix metalloproteinase-1 expression from leaves of *Zostera marina* L. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 177-183.
- Mun, Y. J., Yoo, H. J., Lee, K. E., Kim, J. H., Pyo, H. B. and Woo, W. H. (2005) Inhibitory effect on the melnogenesis of *Capsosiphon fulvescens*. *Yakhak Hoeji.* **49**: 375-379.
- Park, N. H., Hong, Y. K. and Cho, J. Y. (2006) Screening anti-inflammatory actinomycetes isolated from seaweeds and marine sediments. *J. Kor. Fish. Soc.* **39**: 333-337.
- Cho, K. J., Lee, Y. S. and Ryu, B. H. (1990) Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull. Korean Fish. Soc.* **23**: 345-352.
- Ryu, B. H., Kim, D. S., Cho, K. J. and Sin, D. B. (1989) Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J. Food Sci. Technol.* **21**: 595-600.
- Hong, J. S., Kwon, Y. J., Kim, Y. H., Kim, M. K., Park, I. W. and Kang, K. H. (1991) Fatty acid composition of Miyeok (*Undaria pinnatifida*) and Pare (*Enteromorpha compressa*). *Korean J. Food & Nutri.* **20**: 376-380.
- Kim, K. Y., Ahn, Y. S. and Lee, I. K. (1991) Growth and morphology of *Enteromorpha linza* (L.) J. Ag. And *E. prolifera* (Muller) J. Ag. (Ulvaes, Chlorophyceae). *Kor. J. Phycol.* **6**: 31-45.
- Lee, J. K., Jung, H. M. and Kim, S. Y. (2003) 1,8-Dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin biosynthesis inhibitors increase erythritol production in *Torula corallina*, and DHN-melanin inhibits erythrose reductase. *Appl. Envir. Microbiol.* **69**: 3427-3434.
- Marmol, V. del. and Beermann, F. (1996) Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* **381**: 165-168.
- Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., Komoto, M. and Ichihashi, M. (1998) Effect of arbutin on melanogenic proteins in human. *Pigment Cell Res.* **11**: 206-212.
- Cabanes, J., Chazarra, S. and Garcí-Carmona, F. (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**: 982-985.
- Fujiware, Y., Sahashi, Y., Artro, M., Hasegawa, S., Akimoto, K., Ninomiya, S., Sakaguchi, Y. and Seyama, Y. (2004) Effect of simultaneous administration of vitamin C, L-cysteine and vitamin E on the melanogenesis. *Biofactors.* **21**: 415-418.
- Chun, H. J., Hwang, S. G., Jeong, D. H., Baek, S. H., Jeon, B. H. and Woo, W. H. (2002) Butyl alcohol extract from *Caesalpinia sappan* L. regulates melanogenesis in B16/F10 melanoma cells. *Yakhak Hoeji.* **46**: 137-142.
- Park, Y. J., Yoon, M. Y., Lim, H. W., Lee, J. Y., Kim, C. J. and Sim, S. S. (2004) Effects of hot-water extracts from *Laminaria japonicus* on melanin production in B16 melanoma cells. *Yakhak Hoeji.* **48**: 374-378.
- Choi, B. W., Lee, B. H., Kang, K. J., Lee, E. S. and Lee, N. H. (1998) Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**: 237-242.
- Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J. A. and Garcia-Borron, J. C. (1998) Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **255**: 139-146.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
- Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**: 1474-1478.
- Maeda, K. and Fukuda, M. (1991) In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocyte. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **42**: 361-368.
- Kang, H. S., Kim, H. R., Byun, D. S., Son, B. W., Nam, T. J. and Choi, J. S. (2004) Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alge *Ecklonia stolonifera*. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 1226-1232.
- Hearing, V. J. (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *Soc. Invest. Dermatol.* **4**: 24-28.
- Englaro, W., Rezzonico, R., Durand-Clement, M., Lallemand, D., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. (1995) Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 24315-24320.
- Shuji, K., Hideo, Y., Kimiko, M. and Yoshio, U. (1995) Inhibitory effect of sodium 5,6-benzylidene ascorbate(BSA) on the elevation of melanin biosynthesis induced by ultraviolet-A(UVA) light in cultured B16 melanoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 1076-1080.

(2008년 6월 2일 접수)