J. Soc. Cosmet. Scientists Korea
Vol. 38, No. 1, March 2012, 67-73

디펩타이드의 B16 악성흑색종세포에서 멜라닌 생성억제작용

남 희 승 · 김 은 현 · 김 수 연 · 이 현 이 · 홍 지 연 · 이 재 국 · 조 성 태 · 조 양 환 · 윤 혜 영 · 백 광 진 · 권 년 수 · 민 영 실* · 박 경 찬** · 김 동 석†

중앙대학교 의과대학 생화학교실, *중원대학교 한방산업학부, **서울대학교 의과대학 피부과학교실
(2011년 12월 12일 접수, 2012년 3월 8일 수정, 2012년 3월 12일 채택)

Hypopigmentary Effects of Dipeptides in B16 Melanoma Cells

Hee Seung Nam, Eun-Hyun Kim, Su Yeon Kim, Hyun-e Lee, Jiyun Hong, Jae Guk Lee, Sung Tai Cho, Yang Hwan Cho, Hye-Young Yun, Kwang Jin Baek, Nyoun Soo Kwon, Young Sil Min*, Kyoung-Chan Park**, and Dong-Seok Kim†

Department of Biochemistry, Chung-Ang University College of Medicine, 221 Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea
*Department of Herb Industry, Jungwon University
**Department of Dermatology, Seoul National University College of Medicine
(Received December 12, 2011; Revised March 8, 2012; Accepted March 12, 2012)

요 약: 본 연구에서는 B16 악성흑색종 세포에서 디펩타이드(dipeptide)의 멜라닌생성 저해 효과를 연구하였다. 실험결과 WV (트립토판-발린), WM (트립토판-메치오닌), CQ (시스테인-글루타민)는 멜라닌 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다. 그러나 디펩타이드는 멜라닌 생합성과정의 속도 조절 단계 효소인 타이로시네이즈(tyrosinase)의 활성을 직접 감소시키지는 않았다. 따라서 타이로시네이즈의 발현양상을 조사하였고, 실험 결과 α-MSH가 유도한 타이로시네이즈 발현이 WV, WM, 그리고 CQ에 의해 억제되었다. 그러므로 WV, WM, 그리고 CQ가 타이로시네이즈의 억제성 조절(down-regulation)을 통해 멜라닌 생성을 감소시킨다고 제안될 수 있다.

Abstract: In the present study, we investigated the effects of dipeptides on melanogenesis in B16 melanoma cells. It was found that WV (Trp+Val), WM (Trp+Met), and CQ (Cys+Gln) decreased melanin production dose-dependently. However, dipeptides did not directly inhibit tyrosinase activity, the rate-limiting melanogenic enzyme. Therefore, we further investigated the expression of tyrosinase. Our results showed that α-MSH-induced tyrosinase expression was down-regulated by WV, WM, and CQ. Thus, we propose that WV, WM, and CQ show hypopigmentary activity through tyrosinase down-regulation.

Keywords: *α-MSH, dipeptides, melanogenesis, tyrosinase, melanin*

1. 서 론

멜라닌은 멜라닌세포(melanocytes)에서 합성되는 물에 녹지 않는 물질로, 자외선(UV)에 의해 유도된 광독성(photocytotoxicity)에 대한 방어적인 역할을 수행한다[1]. 멜라닌 합성에는 두 개의 다른 경로가 존재한다. 하나는 유멜라닌(eumelanin) 합성경로이고, 다른 것은 페오멜라닌(pheomelanin) 합성경로이다. 타이로시네이즈(tyrosinase)는 수산화반응과 산화반응을 통해 타이로신(tyrosine)을 도파퀴논(dopaquinone)으로 전환하는 속도조절단계인 첫 번째 단계를 촉매한다[2]. 유멜라닌 합성에서, 도파퀴논은 도파크롬(dopachrome)으로 전환되고, 그리고 다이하이드록시인돌(dihydroxyindole, DHI)과 다이하이드록시인돌 카르복실산(dihydroxyindole car-

† 주 저자 (e-mail: ds__kim@cau.ac.kr)

boxylic acid, DHICA)으로 전환된다. Tyrosinase related protein 1 (TRP1)과 TRP2는 유멜라닌 합성율을 조절한다. DHI의 중합반응은 고분자량의 물질을 검은색에서 암갈색의 DHI-melanin으로 바꾸는 반면, DHICA의 중합반응은 저분자량의 물질을 약간 밝은 색의 DHICA-melanin으로 바꾼다[3,4]. 이 두 물질이 유멜라닌으로 바뀐다. 페오멜라닌 합성에서, 도파퀴논은 시스테인(cysteine)과 연결되어 cysteinyldopa를 만든다. 더 나아가 thiol 첨가물의 산화는 benzothiazine 중간물질에 의해 페오멜라닌 생산을 가져온다. 페오멜라닌은 황적색 색소이고, 광독성에 취약하며 이것의 광분해는 산화성 라디칼(radicals)을 만든다[3,4].

최근의 연구에서 α-멜라닌세포 자극 호르몬(α-MSH) tripeptide analogs는 멜라노코르틴 1 수용체(MC1R)에 결합하여 유도성 과색소침착(hyperpigmentary) 효과가 있다는 것이 보고되었다[5]. 이 연구는 작은 펩타이드가 멜라닌 생성을 조절할 수 있다는 것을 알려주고 있다. 펩타이드의 미백효과에 대해서는 잘 알려지지 않았는데, 최근 연구를 보면 4개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로서 특히 첫 번째 아미노산 및 두 번째 아미노산이 티로신 또는 트립토판에서 선택되고, 세 번째 아미노산이 트립토판, 네 번째 아미노산이 아르기닌으로 구성되는 4개의 아미노산으로 구성된 펩타이드에 미백효능이 있음이 보고된 바 있다[6,7]. 그러나, 펩타이드는 길이가 길어짐에 따라 분자량이 커지고, 그에 따라 생산가격도 상승하며, 세포 투과성이 감소하므로 가급적 길이가 짧은 펩타이드가 유용하다.

디펩타이드는 두 가지의 아미노산으로만 구성되어 있어 제품으로 개발하기가 용이하다. 하지만 디펩타이드의 색소생성 억제효과(hypopigmentary)에 대해서는 연구된 바가 거의 없다. 그래서, 멜라닌 생성에 미치는 400여 가지의 다른 디펩타이드의 영향을 스크리닝(screening)하였고, WV (트립토판-발린), WM (트립토판-메치오닌), CQ (시스테인-글루타민)가 B16 세포에서 효과가 있다는 것을 알아냈다. 언급한 바와 같이 멜라닌합성에서 타이로시네이즈는 가장 중요한 효소이다. 따라서 본 연구에서는 다이펩타이드 중 WV, WM, CQ를 이용하여 B16 악성흑색종 세포에서 티로시나아제의 활성 억제와 발현에 대한 다이펩타이드의 영향을 확인하고자 한다.

2. 재료 및 실험

2.1. 시약 및 기기

WV (분자량 303.36), WM (분자량 335.42), CQ (분자량 249.29)는 DMSO에 녹여 stock solution (20 mg/mL)으로 보관하였다. 합성 멜라닌, α-MSH, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA)와 버섯 타이로시네이즈는 Sigma-Aldrich Co. (USA)에서 구입하였다. 타이로시네이즈(C-19)와 actin (I-19)에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA)에서 구입하였다. Anti-goat IgG (PI-9500), anti-mouse IgG (PI-2000), 그리고 anti-rabbit IgG (PI-1000)에 대한 이차 항체는 Vector Laboratories (Burlingame, USA)로부터 구입하였다.

2.2. 세포 배양

B16F10 악성흑색종 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포들은 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS; Hyclone, USA), 50 mg/mL의 streptomycin, 50 μg/mL의 penicillin (Hyclone, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; WelGENE, Korea)에서 5 %의 CO_2, 37 ℃ 하에 배양하였다.

2.3. 세포 생존률 측정

세포 생존능력은 crystal violet assay를 이용하여 측정하였다. 세포를 24 h 동안 WV, WM, CQ와 함께 배양한 후 배지를 제거한 다음, 5 min 동안 실내온도에서 10 % 에탄올 용액 내 0.1 % crystal violet로 염색하였다. 세포는 이후 증류수로 4번 씻어냈고, 부착된 세포가 함유하고 있는 crystal violet은 95 % 에탄올로 추출하였다. 흡광도는 590 nm에서 ELISA reader (VERSAMax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.4. 멜라닌 생성량 측정

세포 밖으로 배출된 멜라닌은 이전에 기술하였던 방법을[8] 바탕으로 약간의 변형을 가하여 측정하였다. 간략하게 기술하면, B16F10 세포들은 6-well 배양접시에 1×10^5개의 밀도로 하루 배양하였다. 그런 다음 배지를 phenol red-free DMEM으로 교체한 후, 1 mM α-MSH와 WV, WM, CQ를 농도별로 처리하여 72 h 배양하였다. 배양 후 각 세포배양 상층액 200 mL를 96-well 배양접시에 넣고 ELISA reader로 400 nm에서 optical density (OD) 값을 측정하였다. 세포의 수는 haemocytometer

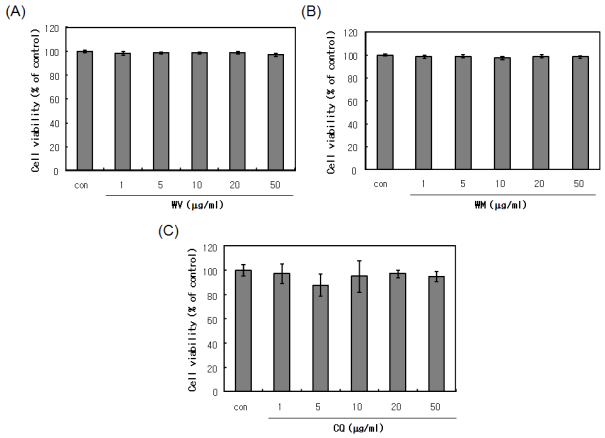

Figure 1. Effects of dipeptides on B16 cell viability. After B16 cells were incubated with various concentrations (1 ~ 50 mg/mL) of WV (A), WM (B), CQ (C) for 24 h in serum-free media, crystal violet assay was performed.

를 이용하여 측정하였다. 멜라닌 생성은 대조군에 대한 백분율로 표현하였다.

2.5. 타이로시네이즈 활성 측정

타이로시네이즈 활성은 DOPA 산화효소 활성으로 측정하였다. WV, WM, CQ가 직접적인 타이로시네이즈 활성 억제 효과를 가지는지를 확인하기 위하여 무세포 조건에서 버섯 타이로시네이즈를 이용하여 측정하였다. WV, WM, CQ를 포함한 70 mL phosphate buffer를 20 mL 53.7 units/mL 버섯 티로시나아제와 혼합한 다음, 10 mL 10 mM L-DOPA를 첨가한 후 37 ℃에서 20 min 간 배양하고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. Western Blot 분석

세포는 세포용해 완충액[62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 5 % β-mercaptoethanol, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 그리고 CompleteTM protease inhibitors (Roche, Germany), 1 mM Na_3VO_4, 50 mM NaF, and 10 mM EDTA]으로 용해시켰다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 통해 레인 당 20 mg의 단백질을 분리시키고, gel 상의 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 옮겨 이것을 0.5 % Tween 20을 포함한 Tris-buffered saline에 녹인 5 % 탈지 분유로 saturation시켰다. Blot은 1 : 1000으로 희석된 적절한 일차 항체들을 가지고 배양한 이후 horseradish peroxidase가 연결된 이차 항체를 넣어 배양하였다. 부착된 항체들은 enhanced chemiluminescence plus kit

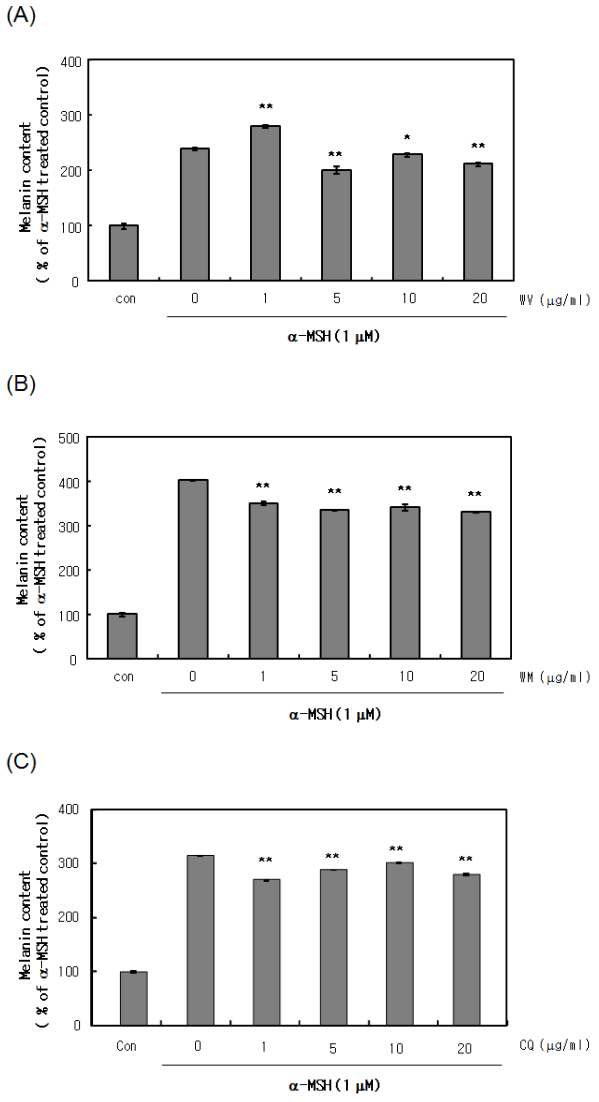

Figure 2. Effects of dipeptides on melanin contents in B16 cells. Cells were cultured with 0 ~ 20 μg/mL WV (A), WM (B), CQ (C) in the presence of 1 μM α-MSH for 3 days. Melanin contents were measured, as described in the Materials and Methods.

(Amersham International, UK)로 검출하였다. 결과는 LAS-1000 lumino-image analyzer (Fuji Film, Japan)를 사용하여 확인하였다.

2.7. 통계

실험은 3번 이상 반복하여 평균값과 표준오차를 구하고 Student's t-test에 의하여 p value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성 있는 것으로 간주하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 디펩타이드(WV, WM, CQ)가 세포 생존율에 미치는 영향

디펩타이드(WV, WM, CQ)의 안전성을 확보하기 위하여 세포에 독성을 나타내는가에 대해서 실험을 하였다. 실험은 세포에 1 ~ 50 μg/mL의 디펩타이드를 첨가하여 그 세포의 생존률을 crystal violet assay를 이용하여 측정 하였다. 그 결과 대조군의 세포 생존율을 100 %로 잡았을 때 WV가 세포생존율에 미치는 영향은 오차범위 내에서 대조군과 같은 100 %의 생존율을 나타내어 세포에 독성이 없는 것으로 나타났으며(Figure 1A), WM과 CQ 또한 WV와 마찬가지로 세포에 독성을 나타내지 않았다(Figure 1B, C). 그러므로 이 농도범위에서 디펩타이드(WV, WM, CQ)를 이용한 다음 실험을 실시하였다.

3.2. 디펩타이드가 멜라닌 생성에 미치는 영향

대조군을 제외한 모든 군에 1 μM의 α-MSH을 첨가하여 멜라닌의 생성을 촉진시킨 후, 디펩타이드 0 ~ 20 μg/mL를 첨가하여 배양하였다. 그리고 대조군의 melanin content양을 100 %로 기준으로 하여 각 처리군의 melanin content를 수치화하여 나타내었다. WV를 처리한 경우 α-MSH만을 넣은 양성대조군과 비교를 했을 때 5 μg/mL 이상에서 전체적으로 melanin content를 감소시켰고(Figure 2A), WM을 처리한 경우에는 α- MSH에 의해 증가된 melanin content를 모든 농도에서 감소시켰다(Figure 2B). 그리고 CQ의 경우 전체적으로 melanin content는 감소하였으나 5 ~ 20 μg/mL에서 적은 수준으로 감소하는 것으로 나타났다(Figure 2C).

3.3. Cell free system에서 디펩타이드가 타이로시네이즈 활성에 미치는 영향

디펩타이드가 타이로시네이즈를 직접적으로 억제하는지 알기 위하여 cell free system에 단일 디펩타이드(WV, WM, CQ)를 처리한 경우와 두 종류씩 혼합한 디펩타이드(WV-WM, WV-CQ, CQ-WM)을 처리한 경우에서 타이로시네이즈 활성을 측정하였다. 대조군의 타이로시네이즈 활성을 100 %로 하였을 때 각각 단일 WV, WM, CQ를 처리한 경우 타이로시네이즈 활성이 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났고, 두 종류씩 혼합하여 처리한 경우도 마찬가지로 대조군과 같은 값을 나타냈다. 그러므로 WV, WM, CQ는 타이로시네이즈 활성을 직접적으로 저해한다고 할 수 없다(Figure 3).

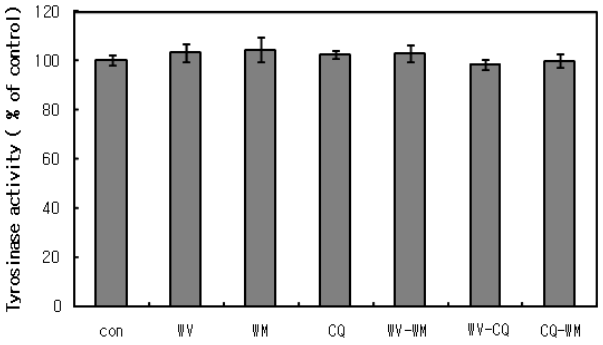

Figure 3. Effects of dipeptides on tyrosinase activity in a cell-free system. To test the direct effects of WV, WM, CQ and combined dipeptides (WV-WM, WV-CQ and CQ-WM) on tyrosinase, tyrosinase activity was measured in a cell-free system, as described in the Materials and Methods.

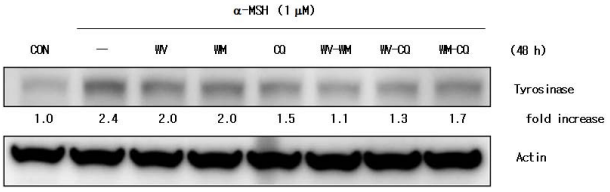

Figure 4. Effects of dipeptides on tyrosinase expression. Cells were cultured with 10 μg/mL WV, WM, CQ and combined dipeptides (WV-WM, WV-CQ and CQ-WM) in the presence of 1 μM α-MSH for 48 h. Whole cell lysates were examined by Western blot analysis using anti-tyrosinase antibody. Equal protein loadings were confirmed by actin antibody.

3.4. 디펩타이드가 타이로시네이즈의 발현에 미치는 영향

대조군을 제외한 모든 세포에 α-MSH를 1 mM을 처리하여 타이로시네이즈의 발현을 증가시킨 뒤, 디펩타이드를 각각 단일로 또는 혼합하여 처리한 세포의 타이로시네이즈 발현을 Western blot을 통해 측정하였다. 그 결과 α-MSH의 자극을 받지 못한 대조군의 band 진하기는 매우 옅어 타이로시네이즈의 양이 적은 것을 알 수 있으며, α-MSH의 자극에 의하여 타이로시네이즈가 많이 발현됨을 알 수 있다. 그러나 α-MSH만 처리한 군에 비하여 WV, WM, CQ를 각각 넣은 군에서는 타이로시네이즈의 발현이 약간 감소하는 것을 볼 수가 있었다. 더

나아가 WV-WM, WV-CQ, WM-CQ를 처리한 군에서는 더욱 타이로시네이즈의 발현이 감소되었다. 결론적으로 단일 티펩타이드로 처리한 군에 비하여 두 개의 디펩타이드를 혼합하여 처리한 세포에서 타이로시네이즈의 발현을 더욱 억제한다는 결과를 얻었다(Figure 4).

4. 결 론

현재까지 여러 종류의 디펩타이드가 서로 다른 작용을 보여주어 왔다. 디펩타이드는 PGE_2와 interleukin-1 β가 야기하는 thermogenesis를 억제하는 효과를 갖는다고 보고되었고[9], 혈압을 조절하는데 생리적으로 가장 중요한 기전 중 하나인 renin-angiotensin system에서 angiotensin-converting enzyme 을 억제하여 혈압을 낮추는 용도로 사용되기도 하였다[10]. 또한, 특정 디펩타이드(GQ)는 β-endorphin으로부터 내재성으로 합성되어 morphine과 β-endorphin이 야기하는 심혈관계, 호흡기계 저하현상을 억제하는 것으로 알려져 있으며, morphine이 유도하는 place preference, tolerance, dependence, 그리고 withdrawal을 억제하는 것으로 보고되고 있다[11]. 한편, glycine을 함유하는 디펩타이드가 과실의 저장과정 중 갈변현상을 일으키는 산화효소인 polyphenol oxidase (PPO)의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며[12], imidazole을 함유하는 디펩타이드가 피부 스트레스 반응에 대한 유도체로 작용함으로써 피부의 상처에 대한 국소적 반응, 피부노화, 그리고 여러 가지 피부의 병태생리학에 관여한다는 사실이 밝혀졌다[13].

본 연구에서는 디펩타이드가 멜라닌세포에서 멜라닌 생성을 억제하는 것을 보여주었다. 멜라닌 색소 형성은 자외선의 자극을 받아 분비되는 endothelin 1 (ET1), α-MSH을 비롯한 다양한 사이토카인(cytokines)과 성장인자 같은 외부 신호에 자극을 받는다[1]. α-MSH는 MC1R에 부착하여, cAMP 상승에 이어 microphthalmia 관련 전사인자(MITF)의 증가된 발현을 통해 멜라닌형성을 자극한다[14]. 또한 MITF는 멜라닌 세포 발달과 분화에서 멜라닌 세포 특이적 전사인자로 중요한 역할을 한다[15]. 중요한 사실은, MITF가 타이로시네이즈 번역을 강하게 자극하고, 이것은 MITF가 멜라닌형성의 중요한 조절자임을 알려주고 있다[3,16]. 본 연구에서는 WV, WM, CQ가 타이로시네이즈의 발현을 감소시키는 것을 보여주었다. 이러한 효과는 디펩타이드가 α-MSH와 MC1R의 결합을 방해하여 cAMP 상승을 억제함으로써 타이로시네이즈 발현을 억제한다고 생각해 볼 수 있고, 따라서 이에 대한 연구가 추후에 이루어질 필요가 있다. 한편 WV는 저농도인 1 μg/mL의 농도에서 α-MSH가 유도한 멜라닌 생성을 증가시키는 효과를 보여주었다. 따라서 농도에 따른 멜라닌 생성조절이 더 연구되어야 할 것이다.

타이로시네이즈 발현에는 extracellular signal-regulated kinase (ERK)와 Akt pathway 같은 신호전달과정이 관련되어 있다[17,18]. 그래서 ERK와 Akt의 억제는 타이로시네이즈 발현 증가를 통해서 멜라닌세포에서 멜라닌 합성을 증가시킨다[19,20]. 따라서 위의 ERK와 Akt pathway 등에서 WV, WM, CQ가 어떠한 경로에 작용하여 타이로시네이즈 발현을 억제할 수 있는지에 대해서도 흥미로운 부분이다.

합성 화학은 스크리닝으로 잠재적인 후보군들을 찾음으로써 새로운 활성물질의 발견과 최적화에 강력한 도구로써 활용되고 있다. 선도물질의 최적화는 흔히 *in vitro* assay system으로 사용하여, 원하는 생물학적 또는 약학적 활성을 나타내는 화합물의 구조적인 변형을 가하는 것이다. 디펩타이드를 의학적 용도로 사용하는데 있어 가장 큰 장점은 합성의 용이함이다. 예를 들어 인슐린과 같은 폴리펩타이드 물질들의 합성은 디펩타이드와 비교하여 합성이 복잡하고 외부에서 합성 될 경우 생체 내에서 활성을 보이는 데 있어서도 완결성을 보이기 어려우며 합성비용도 매우 높기 때문에 실용성이 떨어진다. 하지만 이와 비교하여 디펩타이드는 두 개의 아미노산을 연결하는 것이므로 생체 내 활성이 크게 변하지 않으며 합성이 용이하기 때문에 경제적이다. 따라서 미백효과를 보이는 디펩타이드의 생체 내 이용은 다른 합성물을 이용하는 것보다 많은 활용 가능성을 지니고 있으며, 본 연구에서 확인된 디펩타이드의 미백효과를 바탕으로 앞으로 새로운 기능성 미백원료로서 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

This study was supported by a grant (A100179) from the Korea Healthcare Technology R&D Project, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea.

참 고 문 헌

1. G. E. Costin and V. J. Hearing, Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in re-

sponse to stress, *Faseb. J.*, **21**, 976 (2007).
2. E. J. Land, C. A. Ramsden, and P. A. Riley, Quinone chemistry and melanogenesis, *Methods Enzymol.*, **378**, 88 (2004).
3. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Enzymatic control of pigmentation in mammals, *Faseb. J.*, **5**, 2902 (1991).
4. J. Lee, E. Jung, J. Park, K. Jung, E. Park, J. Kim, S. Hong, J. Park, S. Park, S. Lee, and D. Park, Glycyrrhizin induces melanogenesis by elevating a cAMP level in b16 melanoma cells, *J. Invest Dermatol.*, **124**, 405 (2005).
5. Z. A. Abdel-Malek, A. Ruwe, R. Kavanagh-Starner, A. L. Kadekaro, V. Swope, C. Haskell-Luevano, L. Koikov, and J. J. Knittel, alpha-MSH tripeptide analogs activate the melanocortin 1 receptor and reduce UV-induced DNA damage in human melanocytes, *Pigment Cell Melanoma Res.*, **22**, 635 (2009).
6. M. Schurink, W. J. van Berkel, H. J. Wichers, and C. G. Boeriu, Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity, *Peptides*, **28**, 485 (2007).
7. A. Abu Ubeid, L. Zhao, Y. Wang, and B. M. Hantash, Short-sequence oligopeptides with inhibitory activity against mushroom and human tyrosinase, *J. Invest Dermatol.*, **129**, 2242 (2009).
8. T. Tsuboi, H. Kondoh, J. Hiratsuka, and Y. Mishima, Enhanced melanogenesis induced by tyrosinase gene-transfer increases boron-uptake and killing effect of boron neutron capture therapy for amelanotic melanoma, *Pigment Cell Res.*, **11**, 275 (1998).
9. G. E. Resch and W. R. Millington, Inhibition of interleukin-1beta and prostaglandin E(2) thermogenesis by glycyl-glutamine, a pro-opiomelanocortin-derived peptide, *Brain Res.*, **894**, 316 (2001).
10. M. Terashima, M. Oe, K. Ogura, and S. Matsumura, Inhibition Strength of Short Peptides Derived from an ACE Inhibitory Peptide, *J. Agric Food Chem.*, **59**, 11234 (2011).
11. S. Cavun, G. Goktalay, and W. R. Millington, Glycyl-glutamine, an endogenous beta-endorphin-derived peptide, inhibits morphine-induced conditioned place preference, tolerance, dependence, and withdrawal, *J. Pharmaco. Exp. Ther.*, **315**, 949 (2005).
12. A. M. Girelli, E. Mattei, A. Messina, and A. M. Tarola, Inhibition of polyphenol oxidases activity by various dipeptides, *J. Agric Food Chem.*, **52**, 2741 (2004).
13. M. A. Babizhayev, G. M. Nikolayev, J. G. Nikolayeva, and Y. E. Yegorov, A survey and analysis of the role of molecular chaperone proteins and imidazole-containing dipeptide-based compounds as molecular escorts into the skin during stress, injury, water structuring and other types of cutaneous pathophysiology, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **33**, 1 (2011).
14. R. Busca and R. Ballotti, Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation, *Pigment Cell Res.*, **13**, 60 (2000).
15. M. Khaled, L. Larribere, K. Bille, E. Aberdam, J. P. Ortonne, R. Ballotti, and C. Bertolotto, Glycogen synthase kinase 3beta is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis, *J. Biol. Chem.*, **277**, 33690 (2002).
16. D. S. Kim, Y. M. Jeong, I. K. Park, H. G. Hahn, H. K. Lee, S. B. Kwon, J. H. Jeong, S. J. Yang, U. D. Sohn, and K. C. Park, A new 2-imino-1,3-thiazoline derivative, KHG22394, inhibits melanin synthesis in mouse B16 melanoma cells, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 180 (2007).
17. J. Y. Jang, J. H. Lee, B. W. Kang, K. T. Chung, Y. H. Choi, and B. T. Choi, Dichloromethane fraction of Cimicifuga heracleifolia decreases the level of melanin synthesis by activating the ERK or AKT signaling pathway in B16F10 cells, *Exp. Dermatol.*, **18**, 232 (2009).
18. D. S. Kim, S. H. Park, S. B. Kwon, E. S. Park, C. H. Huh, S. W. Youn, and K. C. Park, Sphingosylphosphorylcholine-induced ERK activation inhibits melanin synthesis in human melanocytes, *Pigment Cell Res.*, **19**, 146 (2006).
19. W. Zhang, R. Tsan, D. H. Nam, W. Lu, and I. J. Fidler, Loss of adhesion in the circulation converts amelanotic metastatic melanoma cells to melanotic by inhibition of AKT, *Neoplasia*, **8**, 543 (2006).

20. M. Oka, H. Nagai, H. Ando, M. Fukunaga, M. Matsumura, K. Araki, W. Ogawa, T. Miki, M. Sakaue, K. Tsukamoto, H. Konishi, U. Kikkawa, and M. Ichihashi, Regulation of melanogenesis through phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human G361 melanoma cells, *J. Invest Dermatol.*, **115,** 699 (2000).