

히습 추출물의 항산화 효과 및 멜라닌 생성 저해효과

신서연·김하늘·강세원*·조홍석*·김은지*·박선화*·박경목†

동신대학교 제약공학과, *(주)월드코스텍
(2016년 4월 26일 접수, 2016년 6월 17일 수정, 2016년 6월 24일 채택)

Antioxidant and Anti-Melanogenic Activities of *Hyssopus officinalis* Extracts

Seo Yeon Shin, Ha Neul Kim, Se Won Kang*, Hong Suk Cho*, Eun Ji Kim*, Sun Hwa Park*, and Kyung Mok Park†

Department of Pharmaceutical Engineering, Dongshin University, 185 gunjae-ro, Naju-si, Jeollanam-do 58245, Korea

*WorldCostech Co, LTD, Jangseong-gun, Jeollanam-do 57248, Korea

(Received April 26, 2016; Revised June 17, 2016; Accepted June 24, 2016)

요약: 히습(*Hyssopus officinalis*)은 통화식물목 꿀풀과의 여러해살이풀로 방부제, 기침, 거담제 등 일반적으로 방향족 허브와 약용식물로 사용되어왔다. 본 연구에서는 항산화 및 미백소재의 개발을 위해 히습을 열수와 주정으로 추출하여 각 추출물의 *in vitro* 상에서의 항산화 효과 및 B16F10 melanoma 세포에서 멜라닌 생성 저해효과를 평가하였다. DPPH와 ABTS assay 시험법을 이용하여 항산화 효과를 측정된 결과, 히습 추출물의 항산화 활성이 모두 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 히습 추출물은 tyrosinase 활성을 저해시켰으며, B16F10 세포에서 UVB로 증가된 활성산소와 α -MSH로 유도된 멜라닌 또한 감소시키는 효과를 보였다. 멜라닌 생합성에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 실시한 결과 히습 추출물에 의해 MITF, tyrosinase, TRP-2의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과에 따라 히습 추출물은 미백개선을 위한 화장품 소재로서 이용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

Abstract: *Hyssopus officinalis* is a herbaceous plant of the genus *Hyssopus*. Due to its properties as an antiseptic, cough reliever and expectorant, it is commonly used as an aromatic herb and medicinal plant. This study was performed to investigate the anti-oxidative and anti-melanogenic properties of *Hyssopus officinalis* extracts (HE) using *in vitro* assays and cell culture systems. As a result, HE showed higher DPPH and ABTS radicals scavenging activity in a dose-dependent manner. Also, HE inhibited the production of intracellular ROS and melanin contents in B16F10 melanoma cell as well as tyrosinase activity. We also found that HE inhibit mRNA expression of MITF, tyrosinase and TRP-2 gene. These findings suggest that HE may be beneficial for preventing oxidative damage and melanogenesis of skin.

Keywords: antioxidant, anti-melanogenesis, B16F10, *Hyssopus officinalis*, tyrosinase

1. 서 론

최근 사람들은 자외선에 의해 피부 흑화, 기미·주근깨 같은 색소침착, 피부암, 홍반, DNA손상 등 다양한 신체적 부위에서 크게 영향을 받고 있다[1,2]. 또한 깨끗한 피부는 아름다움을 위한 필수 조건으로 여겨지

면서 피부미백에 대한 관심을 더욱 증가시키고 있다 [3]. 멜라닌은 피부색을 결정하는 주요한 색소로서 자외선에 의한 손상을 막고 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 제거하여 피부를 보호하는 역할을 하지만, 자외선 노출 등 외부 자극에 의한 과도한 멜라닌 생성은 시각적으로 좋지 않은 질병을 낳게 한다[4-6].

멜라닌은 피부 기저층에 존재하는 멜라닌세포(melanocyte) 내의 멜라노솜(melanosome)에서 합성된다. 멜라닌은 생체 내 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase

† 주 저자 (e-mail: parkkm@dsu.ac.kr)
call: 061)330-3273

효소에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐, DOPA quinone으로 산화되며, DOPA quinone에서 자동 산화반응 및 효소반응 등을 통해 흑갈색의 유멜라닌(eumelanin)과 적갈색의 페오멜라닌(pheomelanin)을 생성한다[7-16].

또한 멜라닌 합성에 관여하는 효소로는 tyrosinase와 tyrosinase 관련 단백질인 tyrosinase related protein 1 (TRP-1), tyrosinase related protein 2 (TRP-2)가 알려져 있으며, 멜라닌 합성의 중요한 조절 인자로 알려진 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진하는 것으로 알려져 있다[17-22]. 따라서 미백 활성 연구 개발에 있어서 MITF 뿐만 아니라 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등과 같은 효소의 활성 억제효과 검증은 유용한 1차 평가방법으로 인정되고 있다[23]. 이러한 평가에 적용할 때 tyrosinase 억제제 대조군으로 많이 사용되는 kojic acid, 알부틴, 하이드로퀴논과 같은 많은 색소침착 저해 물질들은 강한 미백효과를 가지고 있지만 피부자극 및 접촉성 피부염 등의 부작용을 일으키는 것으로 밝혀졌다[24,25]. 따라서 천연물을 이용한 안전하고 효과적인 미백소재 개발에 관한 연구가 필요하다.

본 연구에서 사용된 히습(*Hyssopus officinalis*)은 통화 식물목 꿀풀과의 여러해살이풀로, 국내에서는 우슬초라고 명명되기도 한다. 히습의 매운맛이 있는 말린 성분은 거담작용에 효과가 있으며, 달인 액이나 부순 생잎은 세정약 혹은 습포제로 사용하기도 하며, 히습 추출물 자체는 바이러스 증식 억제의 기능을 하는 것으로 보고되었다. 이외에도 감기·기관지염 등 호흡기계 질환과 소화촉진, 구풍작용, 강장작용, 발한작용, 이뇨작용, 수렴작용, 진정·진경작용 등에 효과가 있다고 알려져 있다[26].

이와 같이 히습의 다양한 효능이 알려진 바에 비해, 항산화 및 멜라닌 생성 저해에 대한 연구는 알려진 바가 없다. 이에 본 연구에서는 B16F10 melanoma 세포를 사용하여 히습 추출물의 항산화효과 및 멜라닌 생성 저해 효과와 그 작용기전에 대해 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 재료

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 3-(4,5-dimethyl

lthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), mushroom tyrosinase, L-DOPA, α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), arbutin (Sigma, St. Louis, USA)에서 구입하였다.

세포 배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Lonza, Basel Swiss, USA)에서 구입하였으며, penicillin/streptomycin (GIBCO, California, USA)과 fetal bovine serum (FBS, GIBCO, California, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 시료추출

건조된 히습 시료를 blender로 마쇄하여 시료의 10배에 달하는 70% 발효주정 에탄올과 증류수를 각각 첨가하여 주정추출과 열수추출을 진행 하였다. 추출은 4 h 동안 80 °C에서 고온 증탕으로 이루어졌다. 각각의 추출물은 원심분리 및 여과, 농축한 후 동결 건조하여 사용하였다.

2.3. DPPH 라디칼 소거능 측정

추출한 시료를 희석한 후 60 μ L를 취하여 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 240 μ L와 혼합하였다. 혼합 후 약 37 °C에서 30 min 방치한 후 microplate로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 시료의 희석 용매를 사용하였고, control은 시료 대신 시료의 희석 용매에 DPPH 시약을 넣어 사용하였으며, 양성대조 군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다. DPPH 라디칼 소거능의 정도는 다음과 같은 계산식에 따라 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거율(%)

$$= [(control O.D - sample O.D) / control O.D] \times 100$$

2.4. ABTS 라디칼 소거능 측정

7 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazolone-6-sulfonic acid)와 2.4 mM potassium persulfate를 1 : 1의 비율로 혼합하여 실온의 암소에서 24 h 동안 방치하여 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 (\pm 0.02)이 되게 에탄올로 희석하였다. 희석된 용액 240 μ L에 시료 60 μ L를 가하여 상온의 암소에서 10 min 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였고, ABTS 라디

칼 소거능의 정도는 다음과 같은 계산식에 따라 계산하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거율(\%)} = \frac{[(\text{control O.D} - \text{sample O.D}) / \text{control O.D}] \times 100}$$

2.5. L-DOPA 산화 억제능 측정

Tyrosinase 측정은 mushroom tyrosinase와 기질인 L-DOPA를 사용하였다. 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL을 넣고 히습 추출물 또는 대조군인 알부틴 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL을 첨가하였다. 그 후 25 °C에서 2 min 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 히습 추출물이나 알부틴을 첨가한 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.6. MTT Assay를 이용한 세포독성측정

추출물에 대한 세포 독성은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay 방법을 이용해 실시하였다. 96-well plate에 B16F10 세포를 분주해서 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 그 후 0.5% FBS가 함유된 배지로 교체하여 배양한 후 히습 추출물을 농도별로 24 h 동안 처리하였다. 배양이 끝난 세포에 MTT 시약을 넣어 formazan 침전물을 형성 시킨 뒤 DMSO (dimethyl sulfoxide; Sigma, St. Louis, USA)를 넣고 용해시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. Reactive Oxygen Species (ROS) 소거능 측정

B16F10 세포를 24-well plate에 4 × 10⁴ cells/well로 분주하고 24 h 배양하였다. 히습 추출물을 처리하여 24 h 배양한 후 PBS (Lonza, Basel, Swiss)를 넣고 UVB를 25 mJ/cm² 선량으로 조사하였다. 이후 ROS 생성량을 측정하기 위해 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 염색 방법을 사용 하였다. 본 실험에서 DCF-DA의 농도는 10 μM로 처리 한 후 37 °C에 30 min 동안 반응 시킨 후 형광현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 측정하였다.

Table 1. The Sequences of the Primers of the MITF, Tyrosinase, TRP-2 and GAPDH

Gene	Primer	Sequence (5'3')
MITF	Forward	AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG
	Reverse	TAG CTC CTT AAT GCG GTC GT
Tyrosinase	Forward	GAC GGT CAC TGC ACA CTT TG
	Reverse	GCC ATG ACC AGG ATG AC
TRP-2	Forward	GCT CCA AGT GGC TGT AGA CC
	Reverse	AAT GCA GTG GCT TGG AAA TC
GAPDH	Forward	ACC ACA GTC CAT GCC ATA AC
	Reverse	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

2.8. Melanin 생합성 저해활성 측정

B16F10 melanoma 세포를 6-well plate에 1 × 10⁴ cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양한 후 히습 추출물을 200 μg/mL의 농도로 처리하여 72 h 동안 배양하였다. 배양된 세포를 PBS으로 세척한 뒤 10% DMSO가 포함된 1 N NaOH (Sigma, St. Louis, USA) 용액을 처리하여 80 °C에서 1 h 동안 반응시킨 후 multi-plate reader (BIOTEK, Vermont, USA)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 전체 단백질 양을 측정 한 후 일정 단백질 양당 멜라닌 양을 계산하였다.

2.9. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

미백관련 인자인 MITF, tyrosinase, TRP-2의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 실시하였다. Total RNA추출은 B16F10 세포를 모아 D-PBS로 세척한 다음 RNA prep kit (Intron, seongnam-si, Korea)를 이용하였다. cDNA 합성은 2 ~ 5 μg의 RNA와 oligo dT, 5X buffer, dNTPs, 5X DTT, MMLV (Intron, seongnam-si, Korea)를 이용하여 PCR machine (BIOER, Hangzhou, China)에서 25 °C 5 min, 42 °C 60 min, 70 °C 15 min, 4 °C로 반응시켰다. cDNA 1 ~ 2 μL에 primer F (A)와 primer R (AS)을 넣고 잘 섞어 원심분리한 후 PCR machine을 사용하여 유전자를 증폭하였다. MITF, tyrosinase, TRP-2의 염기서열은 다음과 같다 (Table 1).

2.10. 통계처리

모든 실험의 결과는 3회 반복하였으며, 평균 ± 표준편차(mean ± S.D.)로 나타내었다. 통계적 유의성은 SPSS

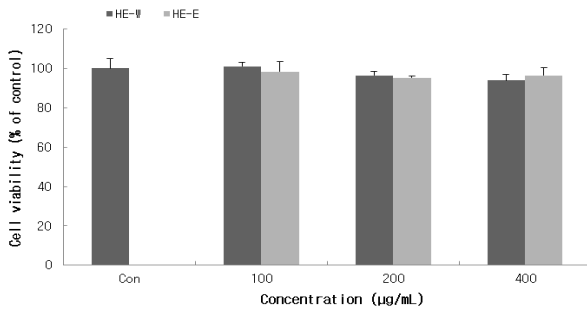


Figure 1. Effect of *Hyssopus officinalis* extracts (HE) on B16F10 cell viability. B16F10 melanoma cells were treated with 100 ~ 400 µg/mL of extracts for 24 h. Data are expressed as the means ± S.D. of three independent experiments. HE-W: Hyssop-water extract, HE-E: Hyssop-ethanol extract

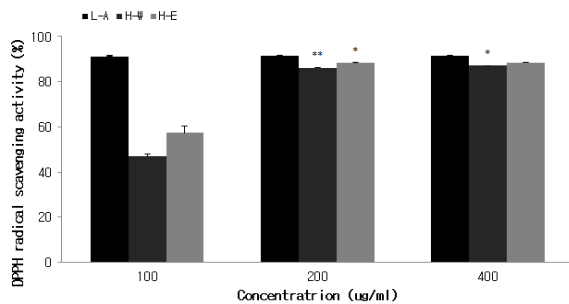


Figure 2. HE effects on DPPH radical scavenging activity in B16F10 cells. Data are expressed as the means ± S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ compared with the L-ascorbic acid. L-A: L-ascorbic acid, HE-W: Hyssop-water extract, HE-E: Hyssop-ethanol extract

를 이용한 student's *t*-test를 시행하여 *p*-value를 구하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. MTT Assay를 이용한 세포독성 측정

히습 추출물이 B16F10 세포에 미치는 세포독성은 MTT assay 시험법을 이용하여 평가하였다. 그 결과 100 ~ 400 µg/mL의 모든 농도에서 세포 생존율이 90% 이상으로 세포 독성을 보이지 않았다(Figure 1). 따라서 이 후 실험에서는 100 ~ 400 µg/mL 농도 범위에서 실험을 진행하였다.

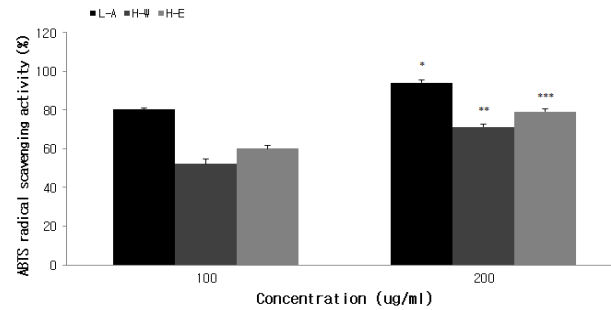


Figure 3. HE effects on ABTS radical scavenging activity in B16F10 cells. Data are expressed as the means ± S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ compared with the L-A. L-A: L-Ascorbic acid, HE-W: Hyssop-water extract, HE-E: Hyssop-ethanol extract

3.2. DPPH 라디칼 소거능

히습 추출물을 100 ~ 400 µg/mL 농도로 처리하여 free radical 소거능을 측정된 결과 농도 의존적으로 항산화 활성이 높아지는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 히습 추출물 200, 400 µg/mL 농도에서는 양성 대조군인 L-ascorbic acid와 유사한 수준의 항산화 활성을 보였다(Figure 2).

3.3. ABTS 라디칼 소거능

ABTS radical 소거능 측정법은 기본적으로 항산화물질의 수소 이온 공여능을 측정하는 항산화능 분석 방법이다. 히습 추출물을 50 ~ 200 µg/mL 농도로 처리하여 ABTS radical 소거능을 확인한 결과 ABTS radical 소거능 또한 DPPH assay와 유사한 패턴으로 농도 의존적으로 증가하였으며, 주정 추출물이 열수 추출물에 비해 높은 소거 활성을 나타내었다(Figure 3).

3.4. L-DOPA 산화 억제효과

Mushroom tyrosinase의 저해제는 tyrosinase 활성부위 구리이온의 상태 변화에 관여함으로써 tyrosinase의 산화, 환원 과정을 조절할 수 있다. 따라서 mushroom tyrosinase를 이용한 시험관 내 tyrosinase활성 억제 실험은 미백소재 개발에 있어서 유용한 평가 방법으로 인정되고 있다 [20]. 실험 결과 히습 추출물은 농도 의존적으로 tyrosinase의 활성을 저해시켰으며, 특히 주정 추출물 400 µg/mL에서는 85% 이상의 높은 산화 억제능을 나타냈다(Figure 4).

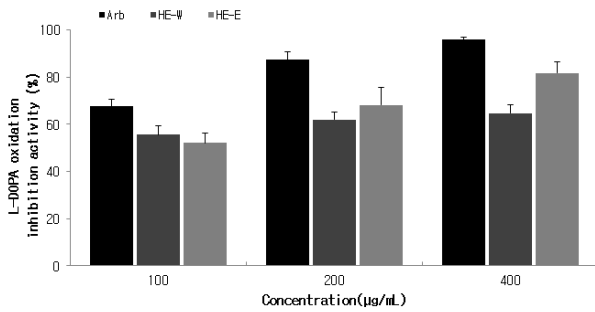


Figure 4. HE effects on mushroom tyrosinase activity in B16F10 cells. Data are expressed as the means \pm S.D. of three independent experiments. Arb: arbutin, HE-W: Hyssop-water extract, HE-E: Hyssop-ethanol extract

3.5. ROS 소거능

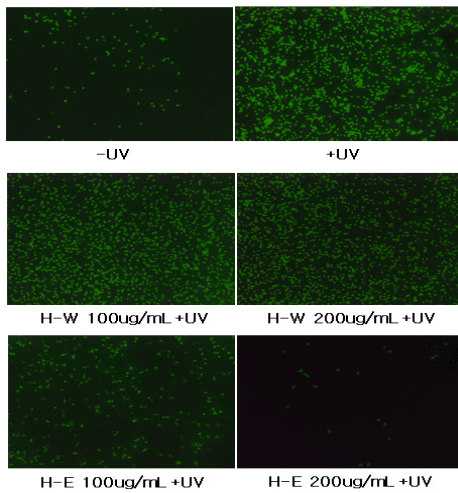


Figure 5. HE effects on UVB-induced ROS generation in B16F10 cells. Cells were treated with extracts for 24 h, and then irradiated UVB 25 mJ/cm². HE-W: Hyssop-water extract, HE-E: Hyssop-ethanol extract

UVB에 의해 증가되는 ROS에 대한 소거능을 확인하기 위해 히습 추출물을 처리한 B16F10 세포에 UVB를 25 mJ/cm²로 조사한 후 fluorescence microscopy를 통해 ROS 소거능을 측정하였다. 측정결과, UVB를 조사할 경우 조사하지 않은 군에 비해 ROS 생성을 증가시키는 것을 확인하였으며, 히습 열수 추출물은 큰 효과를 보이지 않았지만 주정 추출물의 경우 UVB로 유도된 ROS를 농도 의존적으로 감소시켰다(Figure 5).

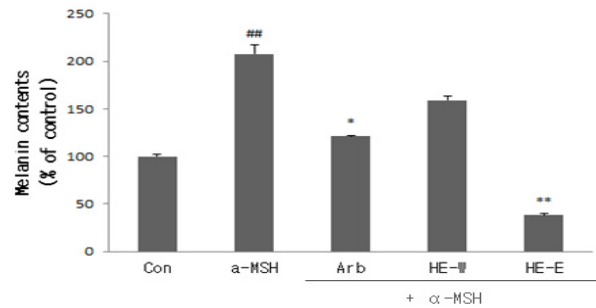


Figure 6. HE effects on of HE on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. ^{##}*p* < 0.01 compared with untreated control, ^{*}*p* < 0.05 ^{**}*p* < 0.01 compared with the α -MSH. Arb: arbutin, H-W: Hyssop-water extract, H-E: Hyssop-ethanol extract

3.6. Melanin 생합성 저해효과

히습 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 알부틴과 히습 추출물을 200 µg/mL의 농도로 처리하였으며, 멜라닌의 생성을 증가시키기 위해 α -MSH를 100 nM씩 처리하였다. 그 결과 α -MSH를 처리한 군은 208%로 무첨가군에 비해 멜라닌의 생성이 2배 정도 증가하였고, 히습 추출물과 알부틴에 의해 멜라닌 생성이 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 히습 주정 추출물을 처리한 군은 α -MSH 처리군과 비교하여 170% 정도 멜라닌 합성을 억제함으로써 알부틴보다 저해 효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다(Figure 6).

3.7. MITF, Tyrosinase, TRP-2 mRNA 발현 저해효과

히습 추출물이 멜라닌 합성에 관여하는 유전자의 발현을 조절하는지 확인하기 위해 유전자 증폭기술을 응용한 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)방법으로 mRNA 발현을 분석하였다 [21]. 그 결과, TRP-1의 경우에는 발현양상에 변화가 없었다(data not shown). 하지만 tyrosinase는 히습 추출물에 의해 α -MSH 처리로 증가된 발현양상을 급격히 저해하였으며, MITF와 TRP-2는 고농도에서 발현이 저해되는 것으로 나타났다(Figure 7).

4. 결 론

본 연구에서는 열수와 주정으로 추출한 히습 추출물을 각각 사용하여 B16F10 melanoma 세포에서 항산화

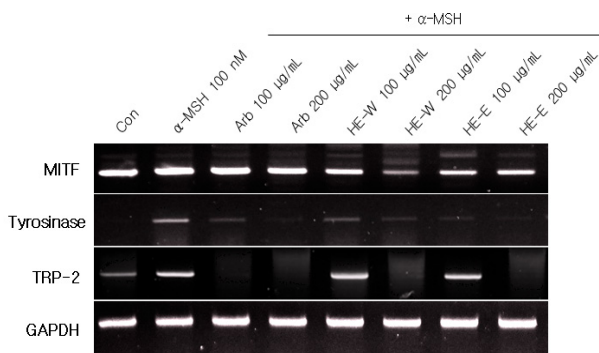


Figure 7. HE effects on melanogenesis-related mRNA expression levels in B16F10 melanoma cells. Arb: arbutin, H-W: Hyssop-water extract, H-E: Hyssop-ethanol extract

및 미백효과에 대해 평가하였다. 항산화 효과를 평가하기 위해 적용한 DPPH와 ABTS 시험법의 결과, 히습 추출물에 의해 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 증가된 것을 확인하였다. 또한 히습 추출물이 tyrosinase를 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위해 적용한 L-DOPA 산화 억제능 측정 결과, 히습 추출물이 농도 의존적으로 tyrosinase 활성을 저해하는 것으로 나타났으며, 항산화 시험과 마찬가지로 주정 추출물이 열수 추출물에 비해 더 좋은 효과를 보임을 확인하였다.

UVB에 대해 증가된 ROS에 대한 소거능 역시 히습 열수 추출물에서는 효과가 미비했지만 주정 추출물의 경우 효과적으로 활성산소를 감소시켰으며, 멜라닌 합성 저해효과 또한 주정 추출물 처리군이 α -MSH를 처리한 양성 대조군에 비해 170% 정도 멜라닌 생성을 감소시켰으므로 알부틴 보다 뛰어난 효과를 보였다.

더 나아가 히습 추출물이 멜라닌 생합성에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 이용하여 유전자 발현을 관찰하였으며 그 결과, 히습 추출물은 멜라닌 형성에 관여하는 MITF와 tyrosinase, TRP-2의 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

결론적으로 히습 추출물은 항산화 및 tyrosinase 활성 억제능력을 가지고 있으며, MITF, tyrosinase, TRP-2와 같은 멜라닌 형성에 관여하는 효소들의 유전자 발현을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 보인다.

따라서 이러한 결과에 의해 히습 추출물은 향후 미백 개선을 위한 화장품 소재로서 개발될 수 있을 것이

라 사료되며, 미백효과에 작용하는 다른 신호 전달 경로 메커니즘에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 2015년, 중소기업청 “산학협력력 기술개발사업” (과제번호 C0332975)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Reference

1. C. A. Ferguson and S. H. Kidson, The regulation of tyrosinase gene transcription, *Pigment Cell Res.*, **10**(3), 127 (1997).
2. D. Tobin, A. Quinn, S. Ito, and A. Thody, The presence of tyrosinase and related protein in human epidermis and their relationship in melanin type, *Pigment Cell Res.*, **7**(4), 204 (1994).
3. K. N. Kim, H. M. Yang, S. M. Kang, D. Kim, C. Ahn, and Y. J. Jeon, Octaphloretol a isolated from *Ishige foliacea* inhibits α -MSH-stimulated induced melanogenesis via ERK pathway in B16F10 melanoma cells, *Food Chem. Toxicol.*, **59**, 521 (2013).
4. S. Y. Choi, Y. C. Kim, and B. S. Chang, Inhibitory effect of black tea water extract on melanogenesis in melan-a cells and its action mechanism, *Korean J. Microsc.*, **41**(3), 169 (2011).
5. H. C. Huang, W. Y. Hsieh, Y. L. Nin, and T. M. Chang, Inhibitory effects of adlay extract on melanin production and cellular oxygen stress in B16F10 melanoma cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**(9), 16665 (2014).
6. M. Tsatmali, J. Ancans, and A. J. Thody, Melanocyte function and its control by melanocortin peptides, *J. Histochem. Cytochem.*, **50**(2), 125 (2002).
7. S. Alaluf, A. Heath, N. Carter, D. Atkins, H. Mahalingam, K. Barrett, R. Kolb, and N. Smit, Variation in melanin content and composition in type V and VI photoexposed and photoprotected human skin: the dominant role of DHI, *Pigment Cell Res.*, **14**(5), 337 (2001).

8. J. Cabanes, S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona, Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**(12), 982 (1997).
9. V. Del Marmol and F. Beermann, Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation, *FEBS Lett.*, **381**(3), 165 (1996).
10. T. Kobayashi, K. Urabe, and A. J. Winder, Tyrosinase related protein (TRP-1) functions as a DHICA oxidase activity in melanin biosynthesis, *EMBO J.*, **13**(24), 5818 (1994).
11. E. V. Curto, C. Kwong, H. Hermersdorfer, H. Glatt, C. Santis, V. Virador, V. J. Hearing, and P. Dooley, Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase: *in vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors, *Biochem. Pharmacol.*, **57**(6), 663 (1999).
12. J. K. No, D. Y. Soung, Y. J. Kim, K. H. Shim, Y. S. Jun, S. H. Rhee, T. Yokizawa, and H. Y. Chung, Inhibition of tyrosinase by green tea components, *Life Sci.*, **65**(21), 241 (1999).
13. G. Prota, Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals, *J. Invest. Dermatol.*, **75**(122), 31 (1990).
14. S. H. Lee, J. S. Park, S. Y. Kim, J. J. Kim, and S. R. Chung, Isolation of inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of *Paeonia moutan*, *J. Pharm. Soc. Korea*, **42**(4), 353 (1998).
15. E. J. Seo, E. S. Hong, M. H. Choi, K. S. Kim, and S. J. Lee, Antioxidant and skin whitening effects of *Rhamnus yoshinoi* extracts, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **42**(6), 750 (2010).
16. J. Lopez, R. Tudela, F. Varon, G. Carmona, and F. G. Canovas, Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway, *J. Biol. Chem.*, **267**(6), 381 (1992).
17. R. Busca and R. Ballotti, Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation, *Pigment Cells Res.*, **13**(2), 60 (2000).
18. B. Saha, S. K. Singh, C. Sarkar, R. Bera, J. Ratha, D. J. Tobin, and R. Bhadra, Activation of the MITF promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB, *Pigment Cells Res.*, **19**(6), 595 (2006).
19. I. Aksan and C. R. Goding, Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Cell. Biol.*, **18**(12), 6930 (1998).
20. C. A. Hodgkinson, K. J. Moore, A. Nakayama, E. Steingrimsson, N. G. Copel, N. A. Jenkins, and H. Arnheiter, Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein, *Cell*, **74**(2), 395 (1993).
21. E. Steingrimsson, K. J. Moore, M. L. Lamoreux, A. R. Ferré-D'Amaré, S. K. Burley, D. C. Zimring, L. C. Skow, C. A. Hodgkinson, H. Arnheiter, N. G. Copeland, and N. A. Jenkins, Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences, *Nat. Genet.*, **8**(3), 256 (1994).
22. H. R. Widlund and D. E. Fisher, Microphthalmia associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival, *Oncogene*, **22**(20), 3035 (2003).
23. S. Mallick, S. K. Singh, C. Sarkar, B. Saha, and R. Bhadra, Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related protein *in vitro*, *Pigment Cell Res.*, **18**(1), 25 (2005).
24. J. P. Ortonne and T. Passeron, Melanin pigmentary disorders: treatment update, *Dermatol. Clin.*, **23**(2), 209 (2005).
25. M. Nakagawa and K. Kawai, Contact allergy to kojic acid in skin care products, *Contact Derm.*, **32**(1), 9 (1995).
26. E. K. Kwon, Y. E. Kim, C. H. Lee, and H. Y. Kim, Screening of nine herbs with biological activities on ACE inhibition HMG-CoA reductase inhibition, and fibrinolysis, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **38**(5), 691 (2006).