

B16/F10 생쥐 흑색종 세포에서 미역식 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

윤훈석¹, 고원범², 정재훈², 김인중^{1,2,3*}

¹제주대학교 아열대원예산업연구소

²제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부

³제주대학교 아열대농업생명과학연구소

The Anti-melanogenic Effects of *Petalonia binghamiae* Extracts in Murine B16/F10 Melanoma Cells

Hoon Seok Yoon¹, Won Beom Koh², Jae Hoon Jung², In-Jung Kim^{1,2,3}

¹Subtropical Horticulture Research Institute ;

²Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea ;

³Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT

To develop the skin lightening agent, we investigated the effects of *Petalonia binghamiae*, a phaeophyta on the coast of Jeju island, on melanogenesis. Dried *P. binghamiae* was refluxed with hot water and the extract was evaporated to dryness. To validate the effects as a depigmenting agent, *in vitro* experiments on melanogenesis, extracted cell tyrosinase activity, cellular tyrosinase activity were performed in B16/F10 murine melanoma cells. *P. binghamiae* showed little extracted cell-tyrosinase activity. *P. binghamiae* suppressed cellular tyrosinase activity up to

72% at 100 µg/mL with inhibition of tyrosinase and TRP-1 expression in α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH)-treated B16/F10 melanoma cells. Our results suggest that inhibitory effects of *P. binghamiae* on melanogenesis may be due to inhibiting the pathways. Therefore, *P. binghamiae* may be useful as a skin whitening agent associated with the suppressive effect of melanotrophin-induced signaling pathway to inhibit melanin biosynthesis.

Key words : *Petalonia binghamiae*, melanogenesis, tyrosinase, anti-melanogenic effect

* Corresponding author : Tel. 064-754-3357 Fax. 064-756-3351 ijkim@jejunu.ac.kr

서 론

피부의 색은 피부의 기저층에 존재하는 멜라노사이트가 만들어내는 멜라닌의 함량에 의해 결정된다. 표피에 존재하는 멜라닌은 태양 광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하는 색소로서 멜라닌이 과도하게 합성되거나, 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소 침착을 유발하게 된다(1). 멜라닌 합성은 멜라노사이트에서 다단계의 효소반응과 자동산화과정을 통해 일어난다. 멜라닌은 멜라노사이트의 멜라닌소체에서 합성되며, 멜라닌소체에는 정상적인 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 효소들 중 가장 잘 알려진 것으로 티로시나제(tyrosinase), 티로시나제 관련 단백질 1 (tyrosinase related protein 1; TRP-1)과 TRP-2 등이 있다(2,3). 멜라닌 생성과정 중, 티로시나제는 멜라닌 생성의 속도조절단계로 보고 있는 티로신(tyrosine)으로부터 도파퀴논(dopaquinone)의 전환과정에 관여하고 있기 때문에, 피부 색소조절 과정을 연구하는 데 있어서 아주 좋은 표지로 간주하고 있다. 또한 유멜라닌(eumelanin)의 중간대사산물인 5,6-dihydroxyindole (DHI)을 indole-5, 6-quinone으로 전환시키는 데에도 관여하고 있다(4,5). TRP-1의 기능은 아직 확실하지 않지만, 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) 산화효소의 역할을 할 것이라는 보고와 티로시나제를 안정화시키는 작용을 할 것이라는 보고가 있다(6,7). 두 번째 티로시나제 연관 단백질인 TRP-2는 DOPAchrome tautomerase라고 불리며 그 기능은 중간대사산물인 DOPAchrome을 주로 DHICA로 이성화시키며, 멜라닌 생중합체 내에 carboxylated subunits의 구성을 조절하는 스위치 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 그러나, B16 흑색종 세포에서, α -MSH와 같은 몇몇 멜라닌 생성 활성화 인자들은, 멜라닌 생성 촉진과정에서 TRP-2를 오히려 억제하는 영향을 미친다고 보고되어 있다(8-10).

자외선에 의한 피부색소 증가는 주로 각질형성 세포(keratinocyte)에서 분비되는 인자들에 기인한다. 이러한 자극을 받은 각질형성세포가 분비하는

인자들로는 endothelin-1 (ET-1), 알파-멜라닌세포 자극 호르몬(α -melanocyte stimulating hormone; α -MSH), 부신피질 자극 호르몬, 산화질소(NO) 등이 있다. ET-1의 경우 멜라노사이트의 protein kinase C 경로와 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 경로를 통해 피부 색소형성을 촉진시킨다(11,12). α -MSH는 멜라노사이트에 있는 melanocortin-1 수용체에 결합하여 cAMP 활성을 증가시켜 멜라닌 생성을 촉진시키고, NO는 cyclic guanine monophosphate (cGMP) 경로를 통해 멜라닌 생성을 증가시킨다(13,14). 이밖에도 각질형성 세포에서 분비되는 멜라닌생성 촉진인자는 basic fibroblast growth factor (bFGF), stem cell factor (SCF) 등이 있다(15,16). 피부의 미백에 도움을 주는 기능성 화장품 소재를 찾아내기 위한 연구는 멜라닌 합성전과 합성중, 그리고 합성 이후 등 3단계로 나누어 진행되고 있다. 과거에는 멜라닌 합성중에 관여하는 티로시나제의 활성을 저해하는 물질에 대한 연구가 주를 이루었지만 최근에는 멜라닌 합성 전에 티로시나제의 당화 및 전사체의 형성을 억제하는 물질도 있다고 보고된 바 있으며 멜라노사이트에서 각질형성세포로의 멜라닌 이동을 억제할 수 있는 물질도 보고되어 있다(17).

본 연구는 제주도의 연안 조간대 부근에서 채집한 미역쇠(*Petalonia binghamiae*) 추출물의, 피부색소인 멜라닌 생성과정에 미치는 효과를 멜라닌을 생성하는 세포인 생쥐 B16/F10 흑색종 세포에서 분석하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 준비

본 연구에 사용된 미역쇠(*Petalonia binghamiae*)은 제주도 연안의 조간대 부근에서 채집하여 실험실로 운반한 뒤 흐르는 수돗물로 수세하여 염분을 제거하고, 건조한 후 미세하게 분쇄하여 영하 18℃의 냉동고에 보관하였다. 보관된 미역쇠 100 g을 물 약 1 L에 120℃ 1.2기압하에서 2시간동안 고온고압 추출한 후 여과하였고, 이를 감압 농축, 동결 건조하여 그 분말을 멸균된 증류수로 용해하여 사용하였다.

2. 추출된 세포로부터의 티로시나제 활성

쥐(*Mus musculus*)의 암세포주 중 B16/F10 멜라노마 세포를 6 well plate에 5×10^4 /ml이 되게 준비한 후, 48시간동안 37 °C CO₂ 항온기에서 배양하고, 멜라닌 생합성 유도물질인 α MSH 50 nM을 처리하고 6시간 동안 37 °C CO₂ 항온기에서 배양하였다. 세포를 trypsin EDTA를 이용하여 수확했다. 이렇게 수확된 cell에 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)와 1% Triton X-100을 함유한 67 mM 인산나트륨완충용액(pH 6.8)을 500 μ L 처리하고 sonication하였으며, 이 상태로 1시간동안 얼음에서 보관하였다. 1시간 후, 4 °C 원심분리기에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하였으며 상층액을 취하여 세포내 티로시나제 활성분석에 사용했다. 티로시나제 활성분석은 세포내에 존재하는 티로시나제의 작용결과 생성되는 DOPA chrome을 비색법에 의해 측정했다(18). 33 mM 인산나트륨완충용액(pH 6.8)에 기질로서 9 μ M L-티로신과 4 mM L-도파를 혼합한 후 위에서 얻은 상층액 80 μ L와 농도별로 준비된 시료 40 μ L를 혼합하여 37 °C 항온기에서 30분간 반응시켰다. 반응액 중에 생성된 L-도파와 도파크롬을 475 nm와 490 nm에서 측정하여 시료 대신 67 mM 인산완충용액을 넣어준 대조구를 기준으로 하여 상대적인 활성을 나타내었다.

3. 세포내 티로시나제 저해활성 측정

세포내 티로시나제 활성 측정은 생쥐의 B16/F10 흑색종 세포를 6 well plate에 5×10^4 cells/mL가 되게 준비한 후, 24시간동안 37 °C CO₂ 항온기에서 배양하고, α -MSH 50 nM을 처리하고 13, 25, 50, 100 μ g/mL 농도로 새발추출물 시료를 처리하여, 멜라닌 생성유도 조건에서의 저해 효과를 관찰하였다. 72시간 동안 37 °C CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 배양 도중 36시간이 지난 후, 배지교체와 동시에 위와 같은 조건으로 다시 처리하였다. 세포를 트립신 EDTA를 이용하여 수확한 후 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride와 1% Triton X-100을 함유한 67 mM 인산나트륨완충용액(pH 6.8)을 500 μ L 처리하고 초음파분쇄를 실시하였으며, 이 후, 1시간동안 얼음에서 보관하였

다. 1시간 후, 4 °C 원심분리기에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하였으며 상층액을 취하여 세포내 티로시나제 활성분석에 사용했다. 세포내 티로시나제 활성분석은 세포내에 존재하는 티로시나제의 작용결과 생성되는 도파크롬을 비색법에 의해 측정했다(18). 33 mM 인산나트륨완충용액(pH 6.8), 9 μ M L-티로신과 4 mM L-도파를 혼합한 후, 위에서 얻은 상층액 100 μ L를 처리하여 37 °C 항온기에서 2시간 반응시켰다. 반응액 중에 생성된 도파크롬을 475 nm에서 측정하여 각각의 측정값을 분석에 사용한 상층액의 단백질량으로 보정하고, 멜라닌 생성을 유도한 대조군(α -MSH 처리군)을 기준으로 하여 상대적인 활성을 나타내었다. 그리고 다음 식에 의해 저해율을 구하였다.

* 저해율 (Inhibition Ratio; %) = $100 \times ((\text{보정된 } \alpha\text{-MSH 처리군의 } 475 \text{ nm에서의 흡광도 측정치} - \text{보정된 시료처리군의 } 475 \text{ nm에서의 흡광도 측정치}) / \text{보정된 } \alpha\text{-MSH 처리군의 } 475 \text{ nm에서의 흡광도 측정치})$

결 과

1. 세포로부터 추출된 티로시나제 활성

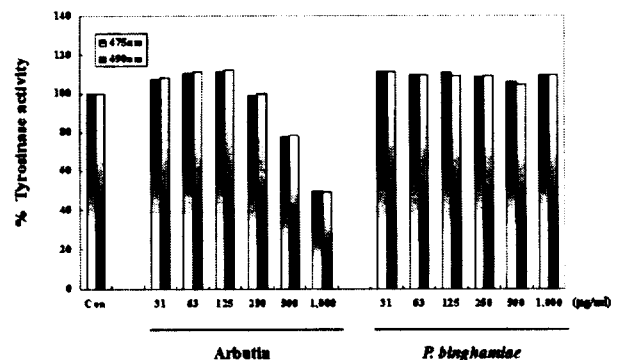


Fig. 1. The murine B16/F10 melanoma cells cultured for 48hrs. After 48hrs, α -MSH induction media were exchanged and incubated for 6hrs, and then cells harvested. Using cell extracts from the harvested cells, extracted cell tyrosinase activity was assayed in a dose dependent manner of arbutin and H11-32 extracts.

6시간 동안 멜라닌 생합성과정을 유도해준 B16/F10 멜라노마 세포로부터 추출된 티로시나제 활성을 측정해본 결과, 알부틴의 경우 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서의 티로시나제 저해활성은 50.6%가 나왔으나 미역쇠 추출물을 처리한 경우는 저해활성이 나오지 않았다. 이는 알부틴은 직접적으로 티로시나제에 작용하여 저해활성을 보이는 반면 미역쇠 추출물은 직접 티로시나제에 작용하지 않음을 의미하는 분석결과이다(Fig. 1).

2. α -MSH에 의해 유도된 B16/F10 흑색종 세포내 멜라닌 생성저해 효과

3일간 α -melanocyte stimulating hormone으로 멜라닌 생합성을 유도해준 B16/F10 멜라노마 세포내 티로시나제의 저해활성을 분석해 본 결과, 시료농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 저해활성은 알부틴이 21.6%를 보여주었고, 미역쇠 추출물이 72%의 높은 저해활성을 보여주었다. 또한 미역쇠 추출물은 농도의존적이고 뚜렷한 티로시나제 저해 양상을 보여주었다. 이는 세포내 티로시나제의 저해기전이 알부틴과는 달리, 직접적이지 않고 간접적임을 의미하는 분석결과이다(Figure 2).

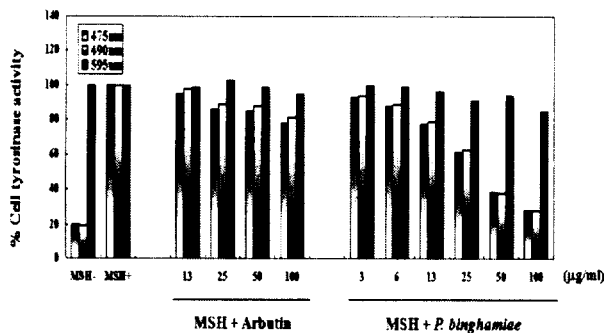


Fig. 2. Assay of cell tyrosinase activity of murine B16/F10 melanoma cell line after a treatment of arbutin and H11-32 extracts for a dose-dependent manner in induction state of α -MSH. B16/F10 melanoma cells were cultured for 72hrs. When it passed for 36hrs, α -MSH induction media were exchanged and samples were retreated for the same manner.

그리고 α -melanocyte stimulating hormone으로 멜라닌 생합성을 유도하지 않은 B16/F10 흑색종 세포내 티로시나제의 저해활성을 분석해 본 결과, 시료농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 저해활성이 19.6%로 멜라닌 생합성을 유도한 세포내 티로시나제 저해활성에 비해 높지 않은 저해활성을 보여주었다. 이는 미역쇠 추출물이 α -melanocyte stimulating hormone에 의해 유도되어지는 멜라닌 합성과정을 더욱 효과적으로 저해하고 있음을 의미하는 분석결과이다 (Figure 3).

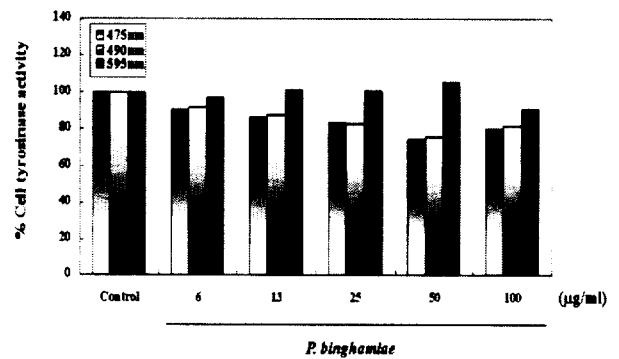


Fig. 3. Assay of cell tyrosinase activity of murine B16/F10 melanoma cell line after a treatment of arbutin and H11-32 extracts for a dose-dependent manner in non-induction state of α -MSH. B16/F10 melanoma cells were cultured for 72hrs. When it passed for 36hrs, α -MSH induction media were exchanged and samples were retreated for the same manner.

고찰

본 연구는 다양한 손상에 의해 발생한 염증매개물이 과색소형성에 중요한 역할을 하는 결과에 관심을 가지고 이들 염증매개물을 차단해서 항염증 효과를 얻을 수 있다면 인체멜라닌 세포에 대한 피부색소 형성도 억제할 수 있을 것이라고 가정하고 항염증 효과가 있는 식물을 선택하여 이들이 피부색소형성과정에 미치는 효과를 알아보았다. 즉 미역쇠 추출물이 어떠한 기작을 통해서

멜라닌 생합성을 저해하게 되는지를 생화학적 기법과 분자생물학적 기법을 이용하여 규명하고자 하였으며, 앞서 발견된 미백 기능성 화장품 소재와의 차이점 및 기작의 유사성 등을 분석함으로써, 새로운 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성도 타진하고자 본 연구를 수행하였다.

식물의 천연 추출물은 항염증 작용, 자외선 흡수, 피부 보습 작용, elastase와 collagenase 등의 효소 억제, 활성산소 소거, 티로시나제 억제, ATP 생성 증가, 그리고 경피흡수를 증가시키는 등의 다양한 기전을 통하여 피부의 기능을 보호할 수 있는 효과를 나타낸다. 최근 천연물질을 이용한 미백물질 탐색이 활발히 진행되고 있다. 2001년 11월 기준 미백 활성성분의 특허 공개분 170건 중 천연 식물추출물이 44%를 차지하는 등 95년 이후부터 연평균 16%의 꾸준한 성장세를 보이고 있다(장업신문, 2002).

식물 추출물에서 가장 보편적인 미백제로 사용되는 hydroquinone은 phenol계 화합물로서 산화, 환원 반응에 민감한 구조적 특징으로 인해 티로시나제의 활성을 억제하고 멜라닌세포를 선택적으로 파괴할 수 있다(20-22).

또한 미백화장품 원료로 많이 쓰이고 있는 알부틴은 월귤나무 추출물로 티로시나제 억제를 통해 멜라닌 생성을 억제한다. 그 밖에 녹차의 폴리페놀(polyphenol) 성분, 상황추출물(curcumin), 로즈마리(rosemary: *Rosmarinus officinalis* Linn)등이 피부의 염증반응을 억제하는 항염증제로 사용되고 녹차의 폴리페놀성분 역시 미백작용이 있는 것으로 알려져 있다. 이들 항염증제는 항산화 기능을 가지고 있어 염증반응을 일으키는 활성산소를 소거시키기도 한다(23-25).

미백물질이란 피부에 과도한 멜라닌 색소의 침착을 방지하거나 기존에 침착된 멜라닌 색소의 색을 엷게 하여 기미나 주근깨의 생성을 억제함으로써 피부의 미백에 도움을 주는 것을 말한다. 멜라닌 색소 형성은 세포 내 물질은 티로신이 티로시나제 효소에 의해 도파퀴논(dopaquinone)으로 전환되고 이 후 자동산화반응을 거쳐 일어난다. 미백물질은 이러한 멜라닌 색소 형성에 참여하는 티로시나제 활성을 억제하거나 멜라닌 세포수의 억제나 감소를 통해 멜라닌 색소생성을 억제한다.

현재 미백물질 검색은 티로시나제 활성억제 외에도 자동산화억제와 멜라닌 생성을 촉진시키는 활성산소 소거나 항염증 물질을 소거시킬 수 있는 물질로 확대되고 있다.

피부에 발생하는 활성산소는 멜라닌 합성 과정에 관여하여 멜라닌 합성을 증가시킨다. 따라서 항산화제는 멜라닌 합성을 증가시키는 것으로 보고된 활성산소를 소거시키는 기능을 통해 멜라닌 생성을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 생각되어 왔다. 항산화 작용이 있는 ascorbic acid와 α -tocopherol 등은 임상실험 결과 자외선에 의해 유도되는 흑화과정을 억제하는 것으로 알려져 있다(29, 30).

본 연구에서 미역취 추출물의 폴리페놀 함량은 3.03%이며 DPPH 라디칼 소거능은 IC_{50} 값이 1.000 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 것으로 분석결과 밝혀졌다(data not shown). 즉 활성산소 소거력이 아주 낮지만 미역취 추출물의 멜라닌 생성 억제력은 뛰어난 것으로 관찰되었다. 이는 미백효과를 보인 미역취 추출물이 활성산소 소거를 통하는 것보다 산화 환원에 민감한 구조인 항산화 물질이 티로시나제의 활성부위인 구리 이온과 결합하여 티로시나제 작용을 억제하는 경로를 거쳤을 가능성이 높다. 실제로 티로시나제 활성 억제력이 뛰어난 식물 추출물들이 멜라닌생성 억제력도 뛰어난 것으로 알려져 있다. 이 분석결과로 미루어 볼때 제주 조릿대 잎의 열수추출물이 폴리히드록시 페놀화합물이 갖는 세포독성과 항산화 활성을 갖는 화합물(26)이 화장품 제형에 들어갔을 때의 불안정성, 변색, 변취 등의 문제를 줄일 수 있을 것이라 사료된다.

그리고 조사된 미역취 추출물의 예상 멜라닌 생성 억제 경로를 살펴보면, 6시간 동안 멜라닌 생합성과정을 유도해준 B16/F10 흑색종 세포로부터 추출된 티로시나제 활성을 측정해본 결과, 알부틴의 경우 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서의 티로시나제 저해 활성은 50.6%가 나왔으나 미역취 추출물의 경우는 저해활성이 나오지 않았다. 이는 알부틴은 직접적으로 티로시나제에 작용하여 저해활성을 보이는 반면 미역취 추출물은 직접 티로시나제에 작용하지 않음을 의미하며, B16/F10 흑색종 세포 내 티로시나제의 저해활성을 분석해 본 결과, 시

료농도 100 µg/mL에서 저해활성은 알부틴이 21.6%를 보여주었고 미역쇠 추출물이 72%의 높은 저해활성을 보여주었다. 또한 미역쇠 추출물은 농도의존적이고 뚜렷한 티로시나제 저해 양상을 보여주었다. 이는 세포내 티로시나제의 저해기전이 알부틴과는 달리, 직접적이지 않고 간접적인 방식, 즉 세포내 신호전달경로를 거칠 가능성이 있음을 의미하는 분석결과이다. 그리고 미역쇠 추출물은 α -melanocyte stimulating hormone에 의해 유도되어지는 멜라닌 합성과정을 더욱 효과적으로 저해하고 있다는 것도 알 수 있었다.

따라서 제주도 연안에 서식하며 고리매과에 속하는 미역쇠(*Petalonia binghamiae*)의 추출물은 흑색종 세포에서 α -MSH에 의해 유도된 멜라닌 생성 경로를 저해하는 효과가 입증됨으로써 미백 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

사 사

This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD)(KRF-2007-412-J05501)

참 고 문 헌

- H. Z. Hill, W. Li, P. Xin, and D. L. Michell, Melanin: a two edged sword?, *Pigment Cell Res.*, **10**, 158 (1997).
- 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**, 982 (1994).
- V. del Marmol, and F. Beermann, Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation, *FEBS Letters*, **381**, 165 (1996).
- R. K. Tripathi, V. J. Hearing, K. Urabe, P. Aroca, and R. A. Spritz, Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase, *J. Biol. Chem.*, **267**, 707 (1992).
- A. Korner, and J. Pawelek, Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin., *Science*, **217**, 1163 (1982).
- R. Han, H. P. Baden, J. L. Brissette, and L. Weiner, Redefining the skin's pigmentary system with a novel tyrosinase assay, *Pigment Cell Res.*, **15**, 290 (2002).
- T. Kobayashi, G. Imokawa, D. C. Bennett, and V. J. Hearing, Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein), *J. Biol. Chem.*, **273**, 31801 (1998).
- P. Manga, K. Sato, L. Ye, F. Beermann, M. L. Lamoreux, and S. J. Orlow, Mutational analysis of the modulation of tyrosinase by tyrosinase-related protein 1 and 2 *in vitro*, *Pigment Cell Res.*, **13**, 364 (2000).
- K. Tsukamoto, I. J. Jackson, K. Urabe, P. M. Montague, and V. J. Hearing, A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase., *EMBO J.*, **11**, 519 (1992).
- J. H. Martinez-Liarte, F. Solano, J. C. Garcia-Borron, J. R. Jara, and J. A. Lozano, α -MSH and other melanogenic activators mediate opposite effects on tyrosinase and dopachrome tautomerase in B16/F10 mouse melanoma cells., *J. Invest. Dermatol.*, **99**, 435 (1992).
- G. Imokawa, T. Kobayashi, M. Miyagishi, K. Higashi, and Y. Yada, The role of endrothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis, *Pigment Cell Res.*, **10**, 218 (1997).
- A. J. Thody, and A. Graham, Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans?, *Pigment Cell Res.*, **11**, 265 (1998).

13. S. Im, E. S. Lee, W. Kim, W. On, J. Kim, M. Lee, and W. H. Kang, Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocyte, *J. Korea Med. Sci.*, **17**, 58 (2002).
14. C. Romero-Graillet, E. Aberdam, M. Clement, J. P. Ortonne, and R. Bailotti. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated stimulates melanogenesis., *J. Clin. Invest.*, **99**, 635 (1997).
15. B. A. Gilchrest, H. Y. Park, M. S. Eller, and M. Yaar, Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation, *Photochem. Photobiol.*, **63**, 1 (1996).
16. J. Grabbe, P. Welker, E. Dippel, and B. M. Czarnetzki, Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes, *Arch. Dermatol. Res.*, **287**, 78 (1994).
17. S. Briganti, E. Camera, and M. Picardo, Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment Cell Res.*, **16**, 101 (2003).
18. S. H. Pomerantz, The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase, *J. Biol. Chem.*, **241**, 161 (1966).
19. O. Yasunobu, K. Tomoko, O. Yuri, M. Hitoshi, K. Yoshiko, F. Yoko, I. Masamitsu, Y. Ytaka, K. Yoshitane, and S. Hiromu, Development of a novel zinc complex as whitening agent in a new concept, *ASCS. 6th*, 69 (2003).
20. K. Sakuma, M. Ogawa, K. Sugibayashi, K. Yamada, and K. Yamamoto Relationship between tyrosinase inhibitory action and oxidation-reduction potential of cosmetic whitening ingredients and phenol derivatives, *Arch. Pharm. Res.* **22**, 335 (1999)
21. P. A. Riley, B. Sawyer, and M. A. Wolf, The melanocytotoxic action of 4-hydroxyanisole, *J. Invest. Dermatol.* **64**, 84(1975)
22. K. Jimbow, H. Obata, M. A. Phthak, and T. B. Fitzpatrick, Mechanisms of depigmentation by hydroquinone, *J. Invest. Dermatol.* **62**, 464 (1974)
23. R. Parashad, K. K. Sanford, F. M. Price, V. E. Steele, R. E. Tarone, G. J. Kelloff, and C. W. Boone, Protective action of plant polyphenols on radiation-induced chromatid breaks in cultured human cells. *Anticancer Res.*, **18**, 3263 (1998)
24. M. R. Al-Sereiti, K. M. Abu-Amer, and P. Sen, Pharmacology of rosemary(*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its theraputic potentials, *Indian J. Exp. Biol.*, **37**, 124 (1999)
25. R. Kuttan, P. C. Sudheeran, C. D. Josph : Tumeric and curcumin as topical agents in cancer therapy. *Tumori*, **28**, 29 (1987)
26. D. Tobin, M. van Hogerlinden, and R. Toftgard, UVB-induced association of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1/TNF receptor-associated factor-2 mediates activation of Rel proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 565 (1998)
27. E. K. Bernadette, D. Marianne, and P. Bernhard, Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and α -tocopherol (vitamin E). *J. Am. Acad. Dermatol.* **38**, 45 (1998)
28. H. H. Kang, H. S. Rho, J. S. Hwang, and S. G. Oh, Depigmenting activity and low cytotoxicity of alkoxy benzoates or alkoxy cinnamate in cultured melanocytes, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 1085 (2003).

