

복분자가 B16 세포주의 Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 발현에 미치는 영향

오세미 · 문연자* · 우원홍

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

Effects of *Rubus coreanus* Miquel on the Expressions of Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16 Melanoma Cells

Se Mi Oh, Yeun Ja Mun*, Won Hong Woo

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Melanogenesis is induced mainly by ultraviolet radiation of sunlight and α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) which binds to a specific G protein coupled receptor. The purpose of this study was to investigate the mechanism of melanogenesis inhibition in B16/F10 cells by methanol extract of *Rubus coreanus* Miquel (RCM). In the present study, α -MSH and forskolin led to a stimulation of melanin synthesis that appeared to result from an increased tyrosinase activity and melanin content. However, RCM inhibited the α -MSH- and forskolin-induced melanin synthesis. In addition, RCM abolished the α -MSH- and forskolin-induced cytoplasmic dendricity. Regarding protein levels of the melanogenic enzymes, the amounts of tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) were increased after incubation with α -MSH and forskolin. The treatment of RCM decreased the α -MSH- and forskolin-induced expression levels of tyrosinase and TRP-1. Based on these findings, it is likely that RCM exerts its depigmenting effects in B16/F10 cells through the suppression of tyrosinase and TRP-1 expression, which are key enzymes for melanogenesis.

Key words : *Rubus coreanus* Miquel, melanin, tyrosinase, α -MSH, cAMP

서 론

멜라닌세포에서 멜라닌 합성은 tyrosinase, tyrosinase related protein 1(TRP-1), tyrosinase related protein 2(TRP-2) 등의 일련의 효소 반응에 의해 이루어진다^{1,2)}. 멜라닌 합성은 다양한 인자에 의해 영향을 받는데 그 중 자외선은 멜라닌 합성을 자극하는 대표적인 외부 인자로서, 직접적으로 멜라닌세포에 작용하여 관련 효소의 생산과 활성을 증가시키거나 멜라닌세포 자극 호르몬 수용체를 증가시키며 간접적으로는 각질형성세포나 섬유아세포 등으로부터 다양한 cytokines, MSH, endothelin-1, basic fibroblast growth factor(bFGF) 등의 paracrine factors의 생산을 유도함으로써 멜라닌 합성을 자극한다고 알려져 있다^{3,4)}. 또한 멜라닌의 생성을 촉진하는 인자로는 vitamine D 대사물질, forskolin, cholera toxin, phospholipase 억제제인 isobutylmethyl xanthine(IBMx)

등이 있다⁵⁾. 이들 대부분은 세포 내 adenylylate cyclase를 활성화시켜 cyclic AMP(cAMP)의 농도를 증가시키며 이는 멜라닌 생성에서 cAMP pathway가 중요한 작용을 하는 것을 알 수 있다.

복분자는 작은 단과가 여러 개 모여서 덩어리를 이룬 것으로 7-9월경에 반구형의 장과로 열매가 열려 붉게 익은 후 검게 변하는데, 미성숙 열매를 건조시킨 것을 복분자라 한다. 복분자는 강장, 명안, 지신, 음위, 양모 등에 많이 이용되며⁶⁾, 영양성분으로 무기질인 인과 철, 칼륨을 다량 함유하고 있으며, 특히 유기산과 다량의 비타민 C가 포함되어 있다. 복분자는 이 등⁷⁾이 암세포 생육억제활성과 면역세포의 생육 증진활성 및 GST (glutathion-S-transferase)의 활성을 높인다고 보고하였다. 또한 정 등⁸⁾은 버섯 tyrosinase의 활성을 억제하였고, 조 등⁹⁾은 복분자 줄기와 잎에서 추출한 탄닌(tannin) 화합물이 버섯 tyrosinase의 활성을 억제한다고 보고하였다.

따라서 본 실험은 B16 세포를 이용하여 복분자 추출물이 멜라닌 합성 조절 기전에 미치는 영향을 조사하고자, tyrosinase 활성, 멜라닌 및 멜라닌 합성 관련 효소들의 발현을 조사하였다.

* 교신저자 : 문연자, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원

· E-mail : yjmun@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6942

· 접수 : 2007/11/14 · 채택 : 2007/11/28

재료 및 방법

1. 시료의 추출

복분자는 신우약업사(서울)에서 구입하여 100 g에 메탄올 1 ℓ와 혼합하고 상온에서 6시간 진탕 한 후, 거즈로 여과하여 1차적으로 침전물을 걸러내었다. 원심분리를 통하여 2차적으로 침전물과 추출액을 분리한 후 감압농축기(rotary evaporator)로 상온에서 완전히 농축하여 메탄올 추출물 2.88 g(수율 : 2.88 %)을 얻어 시료로 사용하였다.

2. 세포주 및 세포배양

B16F10 mouse melanoma 세포를 10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO)와 1% antibiotic-antimycotic(GIBCO)를 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, GIBCO)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

복분자 메탄올 추출물의 시료는 dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해시켜 사용하였으며, 시료처리 1 시간 후에 α-MSH(10 nM)와 forskolin(10 μM)을 각각 처리하였다.

3. 세포독성

B16 세포는 serum-free DMEM배지를 사용하여 CO₂ incubator(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였으며, 세포생존율 측정은 Mosmann의 방법에 의하여 실시하였다¹⁰⁾. 24 well plate 각 홀에 B16F10세포 3×10⁴ 개를 분주하여 안정시키고 복분자 시료를 농도별로 처리한 후 24시간 배양하였다. 0.05% MTT용액으로 37°C에서 2시간 처리하여 상층액을 제거하고 formazan 침전물은 DMSO(1 ml)에 약 15분간 녹였다. 540 nm의 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.

4. 멜라닌 측정

멜라닌 정량은 Hosoi 등의 방법을 변형하여 사용하였다¹¹⁾. 세포를 6 cm 배양용기에 1×10⁵ cell/dish씩 분주하여 시료(50, 100, 150 μg/ml)와 α-MSH 또는 forskolin을 처리하여 3일간 배양하였다. PBS로 세척한 후에 1X trypsin EDTA 1 ml씩 가하여 세포를 수거하였다. 각 군당 5×10⁵개의 세포를 원심 분리하여 세포 침전물을 얻고, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)와 1X triton 로 구성된 lysis buffer를 100 μl씩 가하여 세포를 파괴한 후 원심 분리하여 침전물만 사용하였다. 세포침전물에 알코올을 가하여 세척한 후 건조시켜 1%의 DMSO가 첨가된 1N NaOH 100 μl를 가하여 85°C에서 1시간동안 용해시켰다. 용해된 용액을 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 합성멜라닌(Sigma chemical Co.)을 기준으로 하여 작성된 표준곡선에서 멜라닌을 정량하였다. 멜라닌양의 측정은 1% DMSO가 첨가된 1N NaOH 용액의 흡광도를 기준으로 백분율로 나타내었다.

5. Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Matinez-Esparza 등의 방법으로 측정하였다¹¹⁾. 세포를 6 well 배양용기에 7×10⁴ cells/well로 분주

하고 시료(50, 100, 150 μg/ml)와 α-MSH 또는 forskolin을 처리하여 3일간 배양하였다. 배양 후 PBS로 세척한 후 lysis buffer로 세포를 용해하고 4°C, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리를 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성측정 용액으로 사용하였다. Protein량은 Bradford 시약(Bio-rad)을 이용하여 정량하였고, 동량의 단백질과 0.1M sodium phosphate buffer를 총량 150 μl이 되도록 분주한 후 0.1 M catechol 50 μl를 분주하여 혼합한 후 ELISA reader기로 37°C에서 405 nm의 파장으로 1시간동안 10분 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. 활성물은 대조군의 흡광도를 기준으로 한 백분율로 환산하여 결과로 나타내었다.

$$\text{Tyrosinase 활성율 (\%)} = \frac{\text{대조물질의 흡광도}}{\text{시료가 첨가된 용액의 흡광도}} \times 100$$

6. Western blot 분석

B16F10 세포를 10 cm 배양용기에 2×10⁵ cell/dish를 부착시키고 시료(50, 100, 150 μg/ml)와 α-MSH 또는 forskolin을 처리하여 3일간 배양하였다. 배양된 세포를 수거하여 세포침전물에 세포용해액(Nonidet P-40, Sodium dodecyl sulfate, 0.1 mol/l Tris-HCl(pH 7.2), 100 mM/l PMSF, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin)으로 용해시킨 후 13,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 단백질은 Bradford 시약(Bio-rad)으로 표준단백질 bovine serum albumin(BSA)을 사용하여 계산하였다. 단백질 50 μg과 2X sample buffer(1 ml of glycerol, 0.5 ml of β-mercaptoethanol, 3 ml of 10% SDS, 1.25 ml of 1 M Tris-HCl, 1~2 μg of bromophenol blue)를 동량으로 혼합한 후 7.5% SDS polyacrylamide gel에서 100 V로 1시간 40분 동안 전기영동 하였다. 전기영동 후에 gel을 nitrocellulose membrane에 60V에서 3시간 30분 동안 전이시키고 5% non-fat skim milk로 4시간 동안 blocking 시킨 후, tyrosinase, actin, TRP-1, TRP-2의 antibody를 1:500으로 희석하여 각각 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TBST로 세척한 후 tyrosinase는 anti-rabbit HRP로, actin, TRP-1 및 TRP-2는 goat polyclonal IG로 2차 antibody를 1:1000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 후 TBST로 3회 세척한 후 western detection 용액으로 3~4분 반응시킨 후 ChemidocXRS image analysis 기기로 분석하였다.

7. 통계처리

실험 결과는 One way ANOVA test를 이용하여 p-value를 구하여 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 멜라닌 합성 억제효과

B16 세포에 시료를 처리하지 않은 군과 α-MSH(10 nM)를 첨가한 군, 그리고 α-MSH와 복분자 시료를 농도별로 첨가한 군의 멜라닌 합성을 측정하였다. 멜라닌 합성 촉진 호르몬인 α

-MSH를 처리한 경우, 407±10%로 대조군의 약 4배 증가하였으며, 복분자와 병용 처리한 경우 50, 100, 150 µg/ml 농도에서 각각 286±18%, 212±14%, 132±38%로 크게 감소하였다(Fig. 1).

또한 cAMP 촉진제인 forskolin(100 nM)을 처리한 경우, 708±7.6%로 대조군의 약 7배 증가하였으며, 복분자와 병용 처리한 경우 50, 100, 150 µg/ml 농도에서 각각 505±16%, 417±68%, 268±28%로 감소하였다(Fig. 2).

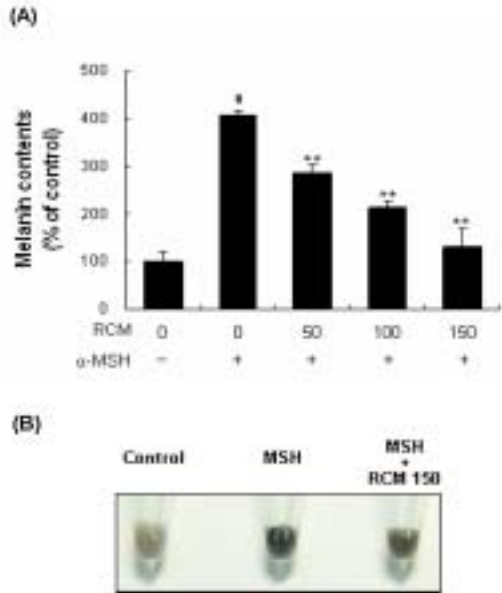


Fig. 1. Effect of RCM on melanin contents in α-MSH treated cells. Cells were seeded at 1×10⁵ cells/dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of RCM and α-MSH for 3 days. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means ± S.D. of three experiments performed in triplicate. # p<0.01: compared to control group, ** p<0.01: compared to the α-MSH treated group.

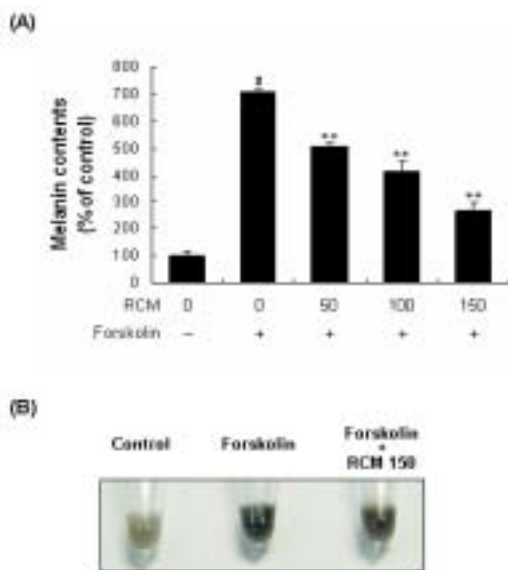


Fig. 2. Effect of RCM on melanin contents in forskolin treated cells. Cells were seeded at 1×10⁵ cells/dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of RCM and forskolin for 3 days. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means ± S.D. of three experiments performed in triplicate. # p<0.01: compared to control group, ** p<0.01: compared to the α-MSH treated group.

2. Tyrosinase 활성 측정

일련의 멜라닌 합성 효소들 가운데 tyrosinase는 속도조절 효소로서, 복분자가 tyrosinase 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다. B16 세포에 시료를 처리하지 않은 군과 α-MSH(10 nM)를 첨가한 군, 그리고 α-MSH와 복분자 시료를 농도별로 첨가한 군의 효소 활성을 측정된 결과, α-MSH를 처리한 경우, 162±10%로 대조군의 약 1.6배 증가하였으며, 복분자와 병용 처리한 경우 50, 100, 150 µg/ml 농도에서 각각 151±17%, 121±15%, 88±20%로 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

또한 cAMP 촉진제인 forskolin(100 nM)을 처리한 경우, 162±8%로 대조군의 약 1.6배 증가하였으며, 복분자와 병용 처리한 경우 50, 100, 150 µg/ml 농도에서 각각 150±5%, 138±10%, 120±12%로 감소하였다(Fig. 4).

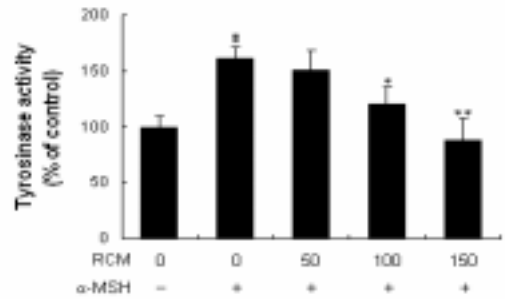


Fig. 3. Effect of RCM on tyrosinase activity in forskolin treated cells. The effect on tyrosinase activity was tested with various doses of RCM and forskolin in B16/F10 cells for 3 days. Data are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean ± S.D. of at least three experiments performed in triplicate. # p<0.01: compared to control group, * p<0.05 and ** p<0.01: compared to the α-MSH treated group.

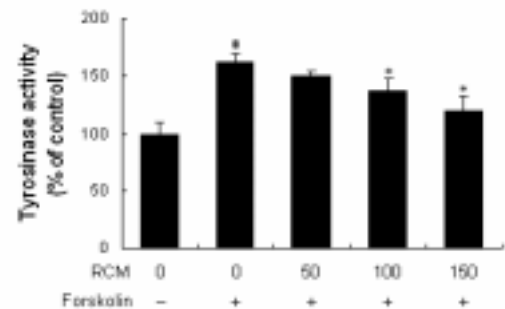


Fig. 4. Effect of RCM on tyrosinase activity in forskolin treated cells. The effect on tyrosinase activity was tested with various doses of RCM and forskolin in B16/F10 cells for 3 days. Data are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean ± S.D. of at least three experiments performed in triplicate. # p<0.01: compared to control group, * p<0.05: compared to the α-MSH treated group.

3. 멜라닌 합성 관련 효소의 단백질 발현

본 연구에서 Western blot을 이용하여 멜라닌 합성에 관여하는 효소 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2에 미치는 복분자의 효과를 조사하였다. 본 실험 결과, α-MSH 처리군에서 tyrosinase 발현이 약 2배 증가하였고 복분자 병용 처리군에서는 50, 100, 150 µg/ml 농도에서 각각 1.8, 1.3, 1.1로 농도에 비례하여 감소하였다.

TRP-1는 약 1.3배 증가하였고 복분자 병용 처리군의 경우 50, 100, 150 µg/ml 농도에서 각각 1.2, 0.9, 0.8로 농도에 비례하여 감소하였다(Fig. 5).

또한 forskolin의 경우 tyrosinase 발현이 약 3배 증가하였고 복분자 병용 처리군에서는 50, 100, 150 µg/ml 농도에서 각각 2.3, 1.6, 1.4로 농도에 비례하여 감소하였다. TRP-1는 약 1.8배 증가하였고 복분자 병용 처리군의 경우 50, 100, 150 µg/ml 농도에서 각각 1.3, 1.1, 1.0로 농도에 비례하여 감소하였다(Fig. 6).

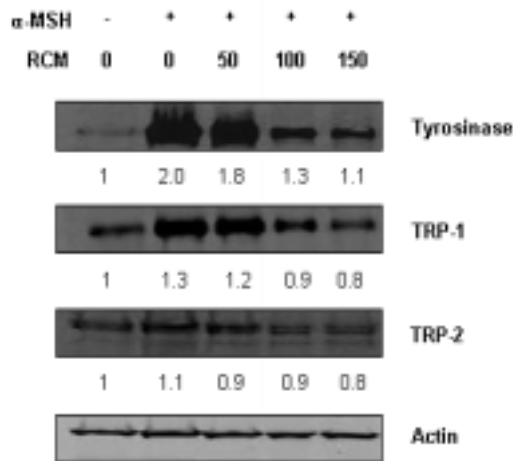


Fig. 5. Effect of RCM on melanogenic enzyme expression in α -MSH treated cells. Cells were incubated with RCM and α -MSH. After 3 days, whole cell lysates were then subjected to Western blot analysis using antibodies against tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 as described in Materials & Methods. Lane 1: untreated group, Lane 2: α -MSH 10 nM, Lane 3: α -MSH and RCM 50 µg/ml, Lane 4: α -MSH and RCM 100 µg/ml, Lane 5: α -MSH and RCM 150 µg/ml.

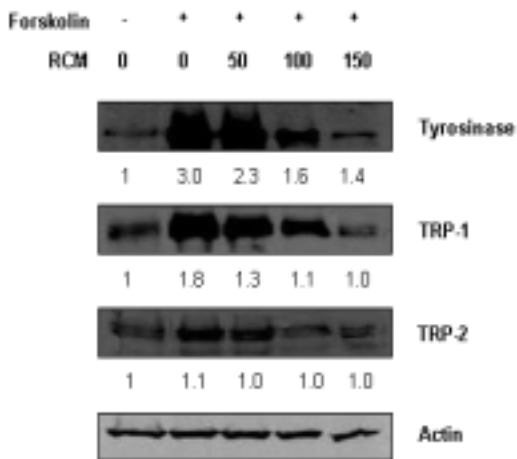


Fig. 6. Effect of RCM on melanogenic enzyme expression in forskolin treated cells. Cells were incubated with RCM and forskolin. After 3 days, whole cell lysates were then subjected to Western blot analysis using antibodies against tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 as described in Materials & Methods. Lane 1: untreated group, Lane 2: forskolin 100 nM, Lane 3: forskolin and RCM 50 µg/ml, Lane 4: forskolin and RCM 100 µg/ml, Lane 5: forskolin and RCM 150 µg/ml.

고찰

멜라닌과 관련된 복분자의 연구를 살펴보면 정 등⁸⁾이 버섯

tyrosinase의 활성을 63% 억제하였고, 조 등⁹⁾은 복분자의 줄기와 잎에서 추출한 탄닌(tannin) 화합물이 버섯 tyrosinase의 활성을 억제한다고 보고하였다. 따라서 본 실험은 B16 세포를 이용하여 복분자 추출물이 멜라닌 합성 조절 기전에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 복분자 추출물이 B16 세포에 독성을 나타내는 농도를 조사하기 위하여 MTT 방법으로 세포생존율을 측정할 결과 복분자 추출물은 50, 100, 150 µg/ml 농도에서 세포생존율이 감소되지 않았다(결과 생략).

MSH는 뇌하수체, 뇌의 일부, 여러 말초조직에서 일어나는 pleiotropic molecule로써 표피세포의 성장과 증식, 국소조직의 면역 조절, 멜라닌 색소 생성 등 다양한 생리적 기능에 관여하며, 세포막 수용체(melanocortin receptor 1, MC1R)와 결합하여 Gs 단백질을 활성화시키고, 이차적으로 adenylate cyclase 활성화에 의해 cAMP가 증가되어 연속적으로 PKA, tyrosinase 활성 등을 통하여 멜라닌 생성을 촉진시킨다¹³⁻¹⁵⁾.

α -MSH에 의한 멜라닌 합성에 관한 연구는 Lerner(1993)가 인체에 매일 MSH를 주입한 결과 피부의 tanning 현상을 관찰하였고¹⁶⁾, Ranson 등(1988)¹⁷⁾은 배양 멜라닌세포에서 cAMP와 tyrosinase 활성을 증가시켰으며, Hunt 등⁵⁾은 MSH에 의해 tyrosinase 활성, 멜라닌, tyrosinase mRNA와 TRP-1 mRNA 증가 및 세포돌기의 발달 등 형태적으로도 멜라닌화가 촉진되었다고 하였다. 또한 임 등¹⁸⁾은 색소성 질환인 기미(melasma) 부위에서 α -MSH의 발현이 증가되었다고 보고 하였다.

본 실험 결과에서도 α -MSH를 처리한 경우 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성이 증가 하였으며, 복분자 추출물은 이를 효과적으로 억제하여 대조군과 유사한 수준까지 감소되었다(Fig. 1 & 3).

Forskolin은 α -MSH와 더불어 멜라닌 합성을 촉진시키는 물질로서, 세포막 수용체와 결합한 후 cAMP를 증가하여 멜라닌을 합성시키는 α -MSH와는 달리, cAMP의 증가를 일으켜 멜라닌 합성을 유도하는 물질로 알려져 있다¹⁹⁾. 본 실험에서 복분자 추출물이 cAMP 경로에 영향을 미치는지 조사하기 위하여 forskolin을 처리한 경우 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성이 증가 하였으며, 복분자 추출물은 이를 효과적으로 억제하여 대조군과 유사한 수준까지 감소되었다(Fig. 2 & 4).

α -MSH는 tyrosinase의 활성을 자극시킬 뿐만 아니라²⁰⁾, 멜라닌 합성에 관여하는 효소인 tyrosinase-related protein-1(TRP-1), 2(TRP-2)에 작용하여 eumelanin을 합성하도록 유도한다²¹⁾. TRP-1은 DHICA를 indole-5,6 carboxylic acid로 전환시키는 효소로서 DHICA oxidase 라고도 하며, tyrosinase를 변성으로부터 보호하여 안정화시킴으로써 tyrosinase의 활성에 기여하는 효소로 간접적으로 멜라닌 생성을 조절한다^{22,23)}. 한편 TRP-1과 TRP-2는 백반증 환자에서 autoantigen으로 작용하며, 이것이 결여될 경우 탈색소 현상이 나타난다²⁴⁾. 따라서 TRP-1과 TRP-2는 tyrosinase와 마찬가지로 멜라닌 합성에서 중요한 역할을 하며, 그 중에서도 eumelanin의 합성에 깊이 관여하고 있다.

본 연구에서 Western blot 분석을 통해 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현 변화를 조사한 결과, 복분자 추출물은 α -MSH와 forskolin에 의해 증가된 tyrosinase와 TRP-1의 발현을

농도 의존적으로 감소시켰고, TRP-2는 영향을 주지 않았다. 전반적으로 forskolin 처리군이 α -MSH 처리군보다 B16 세포의 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 더욱 많이 촉진하였다. 또한 tyrosinase 발현이 TRP-1이나 TRP-2 보다 크게 영향을 나타냈다. 따라서 tyrosinase와 TRP-1의 감소로 결과적으로 멜라닌 합성이 억제된 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합하면 복분자 추출물은 α -MSH와 cAMP 경로를 통하여 tyrosinase와 TRP-1 발현을 감소시킴으로서 멜라닌 합성을 억제하였다.

결 론

복분자 추출물이 멜라닌 합성 조절 기전에 미치는 영향을 조사하고자, B16 세포를 이용하여 α -MSH-cAMP 경로에 미치는 영향을 조사하였다.

복분자 추출물은 α -MSH와 forskolin에 의하여 증가된 tyrosinase 활성을 대조군과 유사한 수준으로 억제하였다. 복분자 추출물은 α -MSH와 forskolin에 의하여 증가된 멜라닌 생성을 대조군과 유사한 수준으로 억제하였다. 복분자 추출물은 α -MSH와 forskolin에 의하여 증가된 tyrosinase와 TRP-1의 단백질 발현을 현저하게 감소시켰고, TRP-2 단백질 발현에 영향을 주지 않았다.

이상의 결과 복분자 추출물은 α -MSH와 cAMP 경로를 통하여 tyrosinase와 TRP-1 발현을 감소시킴으로서 멜라닌 합성을 억제한 것으로 나타났다.

참고문헌

- Korner, A., Pawelek, J. Mammalian tyrosinase catalases three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* 217: 1163-1165, 1982.
- Fuller, B.B., Meyskens, F.L. Jr. Endocrine responsiveness in human melanocyte and melanoma cells in culture. *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 799-802, 1981.
- Naeyaert, J.M., Eller, M., Gordon, P.R., Park, H.Y., Gilchrist, B.A. Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *British J. Derma.* 125: 297-303, 1991.
- Richard, A.S. Human pigmentation genes and their response to solar UV radiation. *Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis.* 422: 69-76, 1998.
- Hunt, G., Donatien, P.D., Lunec, J. Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH. *Pigment Cell Res* 7: 217-221, 1994.
- 정태현. 한국식물도감. 교육사, 1955.
- 이미경, 이현수, 최근표, 오덕환, 김종대, 유창연, 이현용. 복분자 열매 추출물의 유용 생리활성 탐색. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 11(1):5-12, 2003.
- 정승원, 이남경, 김석중, 한대석. Tyrosinase 활성을 저해하는 식물체의 탐색. *한국식품과학회지* 27(6):891-896, 1995.
- 조수민, 김지현, 이민원. 탄닌화합물의 tyrosinase 억제 활성. *생약학회지* 32(1):68-71, 2001.
- Predminda, S., Philippe, D.D., Sadia, Q., Takeshi, K., Hearing, V.J., Jean-jacques, P., Seth, J.O. Identification and characterization of a melanocyte-specific novel 65kDa peripheral membrane protein. *Eur. J. Biochem.* 266: 924-934, 1999.
- Hosoi, J., Abe, E., Suda, T., Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 45: 1474-1478, 1985.
- Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J.A., Garcia-Borron, J.C. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* 255: 139-146, 1998.
- Park, H.Y., Gilchrist, B.A. Signaling pathways mediating melanogenesis. *Cell Mol. Biol.* 45: 919-930, 1999.
- Hearing, V.J. The melanosome: the perfect model for cellular responses to the cellular responses to the environment. *Pigment Cell Res.* 13: 23-34, 2000.
- Tachibana, M. MITF: A stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res.* 13: 60-69, 2000.
- Lerner, A.B. The discovery of the melanotropins: a history of pituitary endocrinology. *Ann NY Acad. Sci.* 680: 1-12, 1993.
- Ranson, M., Psen, S., Mason, R.S. Human melanocytes as a target tissue for hormones : in vitro studies with 1 α -25 dihydroxyvitamine D3, α -melanocyte stimulating hormone, and beta estradiol. *J Invest. Dermatol.* 91: 593-598, 1988.
- Im, S., Kim, J., On, W.Y., Kang, W.H. Increased expression of α -Melanocyte-stimulating hormone in the lesionl skin of melasma. *Br. J. Dermatol.* 146: 165-167, 2002.
- Busca, R., Ballotti, R. Cyclic AMP: a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* 13: 60-69, 2000.
- Abdel-Malek, Z.A., Swope, V.B., Suzuki, I., Harriger, D., Boyce, S.T., Urabe, K., Hearing, V.J. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1789-1793, 1995.
- Fuller, B.B., Meyskens, F.L. Jr. Endocrine responsiveness in human melanocyte and melanoma cells in culture. *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 799-802, 1981.
- Takechi, Y., Hera, I., Naftzger, C., Xu, Y., Houghton, A.N. A melanosomal membrane protein is a cell surface target for melanoma therapy. *Clin. Cancer Res.* 2: 1987-1842, 1996.

23. Hearing, V.J., Tsukamoto, K., Urabe, K. et al. Functional properties of cloned melanogenic proteins. *Pigment Cell Res.* 5: 264-270, 1992.
24. Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D.C., Hearing, V.J. Tyrosinase stabilization by Tyrp1(the brown locus protein). *J Biol. Chem.* 273: 31805-31808, 1998.