

한약재에서의 멜라닌 생성 억제 효과 검색

강경아¹ · 한상숙² · 이무형³ · 김연정⁴

¹경희대학교 간호과학대학 · 동서간호학연구소 연구조교, ²경희대학교 간호과학대학 · 동서간호학연구소 교수, ³경희대학교 의과대학 · 고왕의학연구소 교수, ⁴경희대학교 간호과학대학 · 동서간호학연구소 조교수

Screening of Inhibitory Effects of an Oriental Herb on Melanogenesis

Kang, Kyoung Ah¹ · Han, Sang-sook² · Lee, Mu-Hyoung³ · Kim, Youn Jung⁴

¹Research Assistant, ²Professor, ³Assistant Professor, College of Nursing Science, East-west Nursing Institute, Kyung Hee University; ⁴Professor, College of Medicine, Kowhang Medical Institute, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Purpose: To screen candidate oriental herb material for antimelanogenics. **Methods:** Oriental herbs (n=100) were screened for mushroom tyrosinase inhibitory activity in vitro using the HM3KO human melanin cell line cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Cytotoxicity was assessed by a cell viability assay involving 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Trypan Blue exclusion, and cell enumeration. **Results:** Tyrosinase inhibitory effects on 100 oriental herbs was evident. Of these, 11 herbs inhibited tyrosinase activity by 40% without being cytotoxic to HM3KO cells. Three herb varieties significantly decreased melanin synthesis in HM3KO cells. **Conclusions:** Oriental herb can have antimelanogenic effects indicating their potential for functional therapeutic use in dermatological whitening.

Key Words: Melanin, Tyrosinase, Whitening, Herb

서 론

1. 연구의 필요성

최근 피부의 미백이나 노화 방지에 대한 관심이 증가하면서 기미, 주근깨, 노인성 흑자 등 멜라닌 과색소 침착을 보이는 피부질환은 많은 치료요구에도 불구하고 아직까지 만족할만한 안전한 치료약제가 미흡하다. 피부의 미백과 노화방지를 위한 활성물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 생약 및 식물로부터 분리한 플라보노 및 플라보놀 배당체들의 항균, 항바이러스, 항염 및 항산화 효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 피부 색소 침착 질환의 치료를 위해 hydroquinone, kojic acid, azelaic acid, corticosteroid, retinoic acid 등이 단일제제 또는 다른 것들과의 복합제제로서 사용되어 왔다(Bleehen, 1997; Breathnach, Nassaro-Porro, Passi, & Zina, 1989; Griffiths et al.,

1993; Kanwar, Dhar, & Kaur, 1994; Kligman & Willis, 1975; Mishima, Hatta, Ohyama, & Inazu, 1988; Pathak, Fitzpatrick, & Kraus, 1986). 이 중 hydroquinone제제는 약 80% 환자에서 효과가 있다고 보고되어 널리 사용되고 있지만 제제가 불안정하고, 피부자극이 있으며, 고농도로 반복 사용 시 피부염, 염증 후 과색소 침착, 세포독성에 의한 영구적 탈색, 조직 흑변증(ochronosis) 등의 부작용이 있다(Engasser & Maibach, 1981; Findley, Morrison, & Simon, 1975). 최근의 연구 동향 가운데에 가장 각광받는 물질로 알부틴(hydroquinone- β -D-glucopyranoside)은 hydroquinone에 glucopyranoside가 결합된 유도체로 hydroquinone 사용 시 나타나는 부작용이 적으면서 멜라닌 색소 억제 작용이 있어 멜라닌 색소 침착이 증가되는 피부질환의 치료제로서 이용 가능성이 제시되었으나(Maeda & Fukuda, 1996; Oliver et al., 1996; Sugai, 1992), 안정성

주요어 : 멜라닌, 타이로시네이즈, 미백, 한약재

Address reprint requests to : **Kim, Youn Jung**

College of Nursing Science, Kyung Hee University, 1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea
Tel: 82-2-961-0311 Fax: 82-2-961-9398 E-mail: yj129@khu.ac.kr

투고일 : 2008년 10월 30일 심사완료일 : 2008년 11월 24일

(stability)이 유지되지 않아 제품화되어 상용하기에 다소 어려운 실정이다.

멜라닌 색소 침착은 피부 표피에 있는 멜라닌 색소의 증가에 의해 일어나는데, 멜라닌(melanin)은 페놀류의 고분자 물질로서, 피부 외각층 표피 내 기저층에 존재하는 멜라닌세포(melanocyte)에서 그 구성성분인 tyrosine이 tyrosinase라는 효소에 의해 합성된다.

멜라닌의 생성을 촉진시키는 여러 가지 원인으로는 멜라닌세포 자극 호르몬(melanocyte-stimulating hormone), forskolin, cholera toxin, vitamin D 대사과정, isobutylmethylxanthine, diacylglycerol analogs, 자외선(UV) 등이 있으며(Aberdam, Roméro, & Ortonne, 1993; Gordon & Gilchrest, 1989; Hunt, Todd, Kyne, & Thody, 1994), 사람의 경우 자외선이 멜라닌 생성을 촉진시키는 가장 중요한 요인으로 알려져 있다(Naeyaert, Eller, Gordon, Park, & Gilchrest, 1991; Tsatmali, Ancans, & Thody, 2002).

사람의 색소화(pigmentation)에 관련되는 단백질에는 melanosomal 단백질인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등 외에 신호 단백질인 ASP, MSH 수용체, microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 등이 있다.

Tyrosinase는 염색체 11q14-q21에 위치하는 c-좌에 encode 되어 있다. 합성된 tyrosinase의 분자량은 58 kD이며, 골지복합체에서 glycosylation 과정을 거치면서 분자량이 65-72 kD 이 되고, proteolytic cleavage에 의해 65 kD의 glycosylated tyrosinase가 되어 멜라닌소체 내에서 활성화되는 것으로 추정된다. Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정 중에 monophenol (L-tyrosine)의 hydrogenation, catechol (L-DOPA)의 dehydrogenation, dihydroxyindole (DHI)의 dehydrogenation 과정에 작용한다(Slomonski, 2002).

TRP-1 (gp75)은 쥐의 brown 좌와 상동하며 사람 염색체 9q 23에 위치한다. 가장 많은 melanosomal protein으로서 이 단백질의 역할은 catalase, tyrosinase, DHI oxidase 등 여러 가지가 주장되고 있으며 tyrosinase의 안정화에 관련되어 eumelanogenesis에서 중요한 역할을 하지만(Hara, Lee, Chen, Luo,

& Jimbow, 1994), pheomelanogenesis에는 특별한 역할이 없는 것으로 알려져 있다(Slomonski, 2002). TRP-2는 사람 염색체 13q31-q32에 위치하고, dopachrome을 DHICA로의 전환을 촉진하는 dopachrome tautomerase로서 작용한다(Hara et al., 1994). AIM-1 (Another integral melanosomal membrane)은 멜라닌 합성 과정에 어떤 역할을 하는지는 아직 잘 모르나, sarccaride 분자의 이동에 관련될 것으로 생각하고 있다(Sturm & Teasdale, 2001).

2. 연구 목적

본 연구의 목적은 100여종의 한약재 pool을 이용하여 멜라닌 생성 억제효과를 가진 물질을 검색하고, 멜라닌 생성 억제효과를 세포실험을 이용하여 그 기전을 확립하고자 하는 것이다. 이를 통해 멜라닌 축적 치료를 위한 천연물 추출물의 객관적이며 임상적인 효과를 재검증하고 치료기전을 이해하는 실마리를 제공함으로써 객관적 효과의 검증에 소홀하였던 기존 천연물시장에 새로운 연구풍토를 제공함과 동시에 본 연구에서 파생된 연구 방법 및 결과를 간호교육에 적용함으로써, 간호교육 과정에서 본 연구 내용 및 실험 방법을 소개하여, 간호의 새로운 실험 영역을 구축하고자 한다.

연구 방법

1. In vitro 실험

실험관 내의 실험을 통해 한약재의 tyrosinase의 활성 억제 효과를 확인하기 위해 Mushroom tyrosinase inhibition assay 방법을 이용하였다. 이는 100여 종의 천연물 추출물질을 농도별로 2,000 U/mL의 mushroom tyrosinase와 반응을 시킨 후, 37°C에서 10분간 incubation 한 후, 475 nm 파장으로 흡광도를 측정하여, 실험관 내 tyrosinase 활성 억제 효과를 확인하였다. 실험 방법을 좀더 구체적으로 설명하면, 먼저, 실험에 필요한 reaction mixture를 만드는데, 이를 단순화하면 Table 1과 같다.

Table 1에서의 reaction mixture를 천연물 추출물과 혼합하

Table 1. Components of reaction mixture

			Blank	A	B	C
0.1 M	Potassium phosphate buffer (pH6.5)	1.15 mL	○	○	○	○
3 mM	L-tyrosine solution	0.1 mL	○	○	○	○
2,000 U/mL	Mushroom tyrosinase	0.05 mL		○	○	
0.05 M	Potassium phosphate buffer (pH 6.5)	0.05 mL	○			○
Test	Sample	0.2 mL			○	○
Test	Sample in solution	0.2 mL	○	○		
Total	Volume	1.5 mL				

여 37°C, 10분간 incubation 한 후, 475 nm 파장으로 흡광도를 측정하여, 실험관 내 tyrosinase 활성 억제 효과를 확인한다. 억제제의 백분율 공식은 다음과 같다.

$$\% \text{ inhibition} = (A - [B - C]) / A \times 100$$

2. 세포 독성 실험(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)

천연물 추출물질의 항멜라닌 효과를 인체에 적용하기 위해서는 멜라닌 생성 억제를 주요 기전으로 해야 하며, 인체 멜라닌 세포(melanocyte)의 손상이나 사멸에 영향을 주어서는 안되기 때문에, 유해하지 않은 한약재의 농도를 확인해야 한다. 세포 독성 검사는 세포를 5×10^5 의 농도로 배양접시에 심고, 한약재를 처리한 뒤 세포를 96 well plate로 이동한 후 0.1× volume의 5 mg/mL MTT solution을 넣고 37°C에서 4-6시간 보존한 뒤 1× volume의 solubilization buffer를 넣고 다시 12시간 보존한 후 ELISA reader로 570 nm 파장으로 흡광도를 측정한다.

3. 생성 멜라닌 양의 측정

배양된 HM3KO 세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척한 후 혈구 계산판을 이용하여 각 well당 세포 수

를 계산하고, 원심분리하여 수확한다. 세포침전물에 1 mL의 증류수에 넣어 현탁 후 초음파로 분쇄한 후, 원심분리하여 침전물을 수확한다. Acid-insoluble material을 얻기 위해 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH 300 μL를 넣어 80°C에서 1시간 동안 처리하여 용해시킨다. 405 nm에서 흡광도를 측정하고 멜라닌 정량은 합성멜라닌(sigma)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 산출한다.

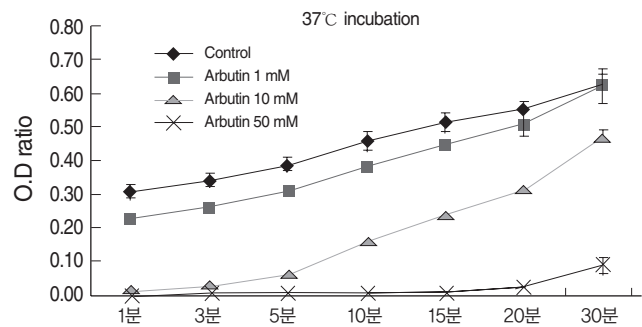
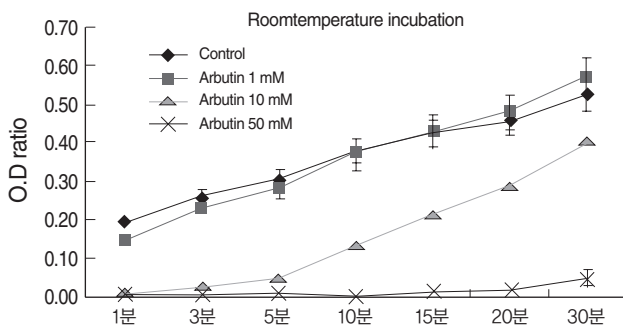
4. 세포배양

멜라닌세포는 일본 동경대학 collaborator로부터 공여받은 HM3KO cell line을 RPMI 1640 medium에 10% fetal bovine serum (GibcoBRL, USA), 100 U/mL penicillin과 100 μg/mL streptomycin (GibcoBRL)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 환경 하에서 배양한다.

5. 자료 분석

수집된 자료는 SPSS PC 12.0 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차를 산출하고 각 한약재의 tyrosinase의 활성 억제효과, 세포독성 및 멜라닌 생성에 대한 차이검증은 student t-test로 분석하였으며 사후검증은 scheffe test로 검증하였다.

A Condition of arbutin



B Condition kojic acid

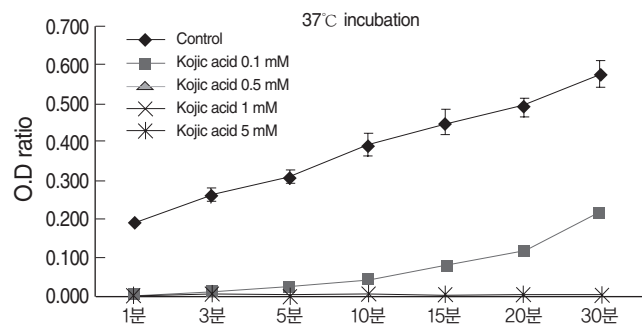
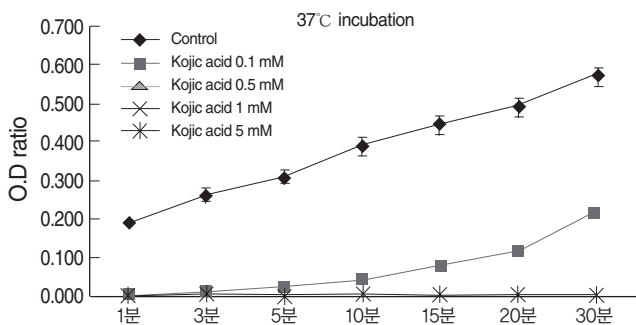


Figure 1. Inhibition rate of arbutin and kojic acid as the positive control (O.D).

연구 결과

1. In vitro 실험을 통해 천연물 추출물질의 tyrosinase의 활성 억제효과 확인

1) Mushroom tyrosinase activity 실험을 시행하기 전에 실험 조건을 잡기 위해 항 멜라닌 지표로 사용되는 arbutin과 kojic acid를 이용하여 tyrosinase 억제 조건을 확립하였다. Figure 1은 arbutin과 kojic acid의 time dependent inhibition 효과를 온도(실온, 37°C)별로 설명해주고 있다. Arbutin의 경우(Figure 1A), 실온(25°C)과 37°C에서의 arbutin의 tyrosinase 효소 작용의 억제를 농도 의존적(dose dependent)으로 억제하는 것을 보여주고, 10 mM 이상의 농도에서 유의적으로 억제하였다. 또한 kojic acid의 경우(Figure 1B), 실온(25°C)과 37°C에서의 kojic acid의 tyrosinase 효소 작용을 0.1 mM 이하의 농도에서 통계적으로 유의하게 억제함을 나타내었다.

2) 100여 종의 한약재의 in vitro tyrosinase 활성 정도를 spectrophotometry와 ELISA assay를 통해 조사한 결과 20% 이

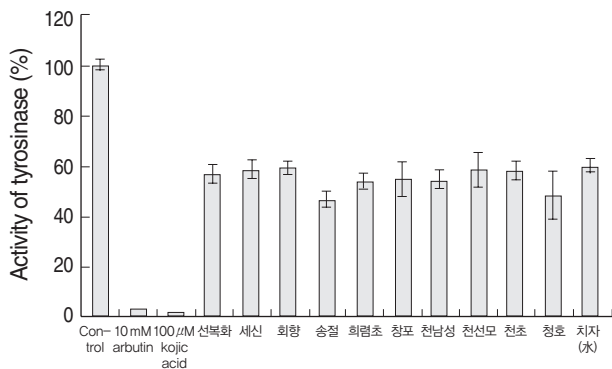


Figure 2. Inhibition rate of tyrosinase (% of control).

상 억제 효과를 가진 물질은 64종이었고, 30% 이상 억제 효과를 가진 물질은 35종, 40% 이상 억제 효과를 가진 물질은 11종이 확인되었다. Figure 2는 한약재 중에서 40% 이상 억제효과를 가진 11종의 tyrosinase 억제율을 그래프로 나타내었다.

2. 세포 실험을 통해 천연물 추출물질의 세포 독성 여부 및 멜라닌 생성 억제 효과 확인

1) 미백효과를 가지기 위한 멜라닌 합성 억제 효과는 멜라닌 세포에 독성을 갖지 않으면서, 단지 멜라닌 생성만을 억제해야, 미백 제품의 부작용을 조절할 수 있다. 이를 위해 멜라닌 세포(HM3KO cell)에 세포 독성(cytotoxicity)을 가지고 있는지를 확인하기 위해 저농도(10 µg/mL)에서 고농도(500 µg/mL)의 선정된 11종과 그 외 2종의 천연물 추출물질의 세포독성 실험을 해 본 결과, 유의한 수준의 세포 사멸이 없음을 확인하였다(Figure 3).

2) 멜라닌 합성 억제 효과를 가졌던 2가지 물질의 세포 증식에 미치는 영향을 24시간, 48시간, 72시간 후에, triphan blue를 이용하여 세포 수를 세어서 세포증식을 확인한 결과, forskolin에 의해 세포 증식(proliferation)이 증가된 양상을 보였고(24시간-102.1%, 48시간-166.9%, 72시간-150.8%), Forskolin을 처치한 후 양성 대조군(positive control)인 arbutin을 처치하였을 때, 각 시간별로 세포 증식이 억제되는 양상(24시간-90.6%, 48시간-56.9%, 72시간-48.3%)을 보여주었다. 후보물질 3-5의 경우, 24시간-91%, 48시간-73.8%, 72시간-72.2% 세포 증식이 억제된 경향을 나타냈고, 후보물질 3-6은 24시간-100.0%, 48시간-74.5%, 72시간-69.9% 세포 증식을 억제하였다(Figure 4A). Figure 4B는 2종의 후보 물질이 멜라닌 세포에

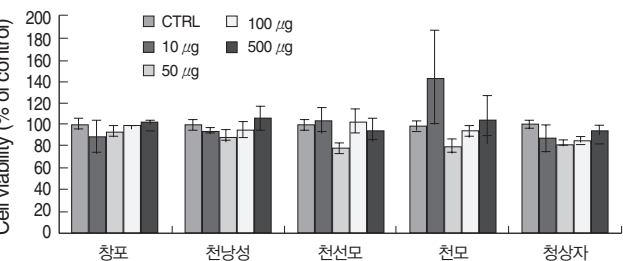
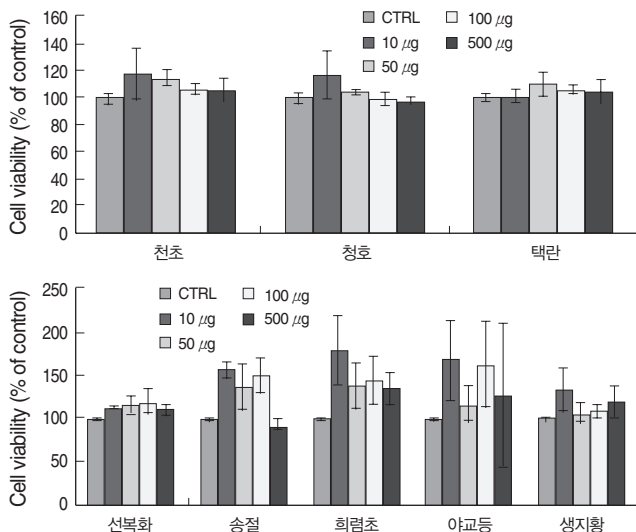


Figure 3. Cell viability of candidate herb for anti-melanogenic material (% of control).

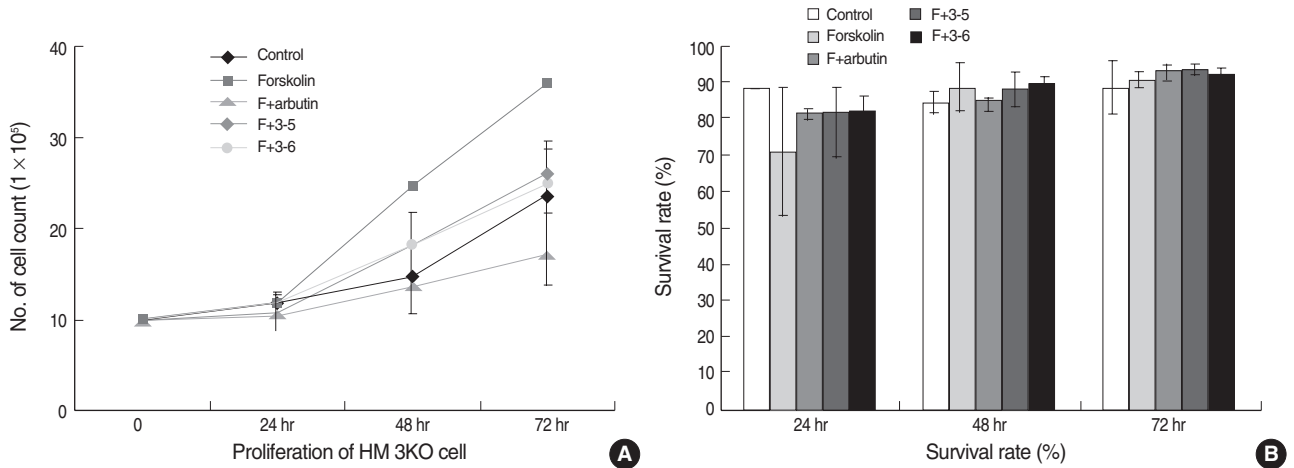


Figure 4. Cell proliferation of candidate herb for anti-melanogenic material (% of control) confirmed by tryphan blue staining and MTT assay.

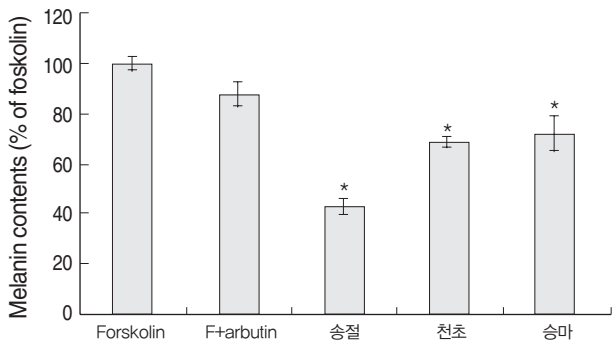


Figure 5. Melanin contents of HM3KO cell activated by forskolin (1 μM) induced by 10 μg/mL herb extraction.

세포 독성이 없음을 MTT assay를 통해 보여주고 있다.

3. 생성 멜라닌 양의 측정

사람 멜라닌 세포(HM3KO)에서의 멜라닌 합성 정도를 확인하기 위해 세포 내 멜라닌 양을 spectrophotometry를 사용하여 측정하였다. 11종의 천연물질 외에 예비 실험에서 후보물질로 선정되었던 4종을 추가하여 HM3KO cell에서 세포 내 멜라닌 생성억제 효과를 살펴 본 결과, 최종적으로 3종의 천연물 추출물(송절: 43.1%, 천초: 68.7%, 승마: 71.9%)에서 매우 유의한 수준의 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하였다(n=3) (Figure 5).

논 의

피부의 색소 침착은 멜라닌 색소가 과잉 생산되어 일어나게 되는 데 멜라닌 합성은 합성 초기에 작용하는 속도 결정 단계의 효소인 tyrosinase뿐 아니라, 그 이후 선택적 기능을 하는 TRP-1, TRP-2 등의 복잡한 과정을 통해 이루어지고, 자외선이나 멜

라닌세포 자극 호르몬(melanocyte-stimulating hormone), forskolin, cholera toxin, vitamin D 대사과정, isobutylmethylxanthine, diacylglycerol analogs, 자외선(UV) 등에 의해 (Aberdam, Roméro, & Ortonne, 1993; Gordon & Gilchrest, 1989; Hunt, Todd, Kyne, & Thody, 1994), 멜라닌 생성을 촉진된다고 알려져 있다(Naeyaert, Eller, Gordon, Park, & Gilchrest, 1991; Tsatmali, Ancans, & Thody, 2002). 본 연구에서는 천연 추출물 중에서 속도 결정 단계의 효소인 tyrosinase의 생성을 억제하는 물질을 실험관 내 실험 및 세포실험을 통해 검색하여 보았다.

그 결과 40% 이상 억제 효과를 나타낸 약물로는 선복화, 세신, 회향, 송절, 희렴초, 창포, 천남성, 천선모, 천초, 청호, 치자(水) 등 11가지 물질이 선정되었으며 또한 선정된 약재들의 사람 멜라닌 세포(HM3KO cell) 독성에 대한 실험을 실시한 결과 이들 모두 세포 독성이 없었다. 이는 미백 기능을 가지기 위한 약재의 조건이 멜라닌 세포 사멸에는 영향을 미치지 않으며, 단지 세포 내 멜라닌 합성만을 억제함을 원칙으로 하기 때문이다. 멜라닌 세포의 사멸은 다른 피부과의 문제로 알려진 백반증(vitiligo)의 원인으로 알려져 있고, 피부세포의 사멸을 통한 멜라닌 생성 억제는 바람직하지 않기 때문이다(Curto et al., 1999). 따라서 미백 효과를 가진 물질들은 멜라닌 세포에 대한 독성이 없는 것을 원칙으로 하며, 이에 대한 본 실험 결과는 각 10-500 μg/mL의 농도에서 세포 독성을 보이지 않았으므로 기능성 미백 제품화 가능성을 보여주고 있다. 또한 이번 실험에서는 최종적으로 사람 멜라닌 세포(HM3KO)에서의 합성된 멜라닌 양을 측정 한 결과 송절, 천초, 승마 등의 3종의 천연 추출물에서 멜라닌 생성 억제효과가 확인하였다. 또한 멜라닌 합성 억제 효과를 가졌던 2가지 물질의 세포 증식에 미치는 영향을 24시간, 48시간,

72시간 후에, triphan blue를 이용하여 세포 수를 세어서 세포 증식을 확인한 결과, forskolin에 의해 세포 증식(proliferation)이 증가된 양상을 보였고, arbutin에 의해 억제되는 양상을 보여주었으며, 2종의 후보물질에서도 세포 증식이 억제된 경향을 나타내었다. 이는 멜라닌 세포의 세포 손상으로 인한 세포 사멸은 가져 오지 않았지만, 멜라닌 세포의 증식을 억제하여, 간접적으로 멜라닌 합성을 억제하는 것으로 사료된다.

바람직한 피부 미백 치료제는 피부 자극을 최소화하며 멜라닌 합성을 억제할 뿐만 아니라 멜라닌 세포에 대한 세포 독성이 적은 물질이라고 할 수 있다(Curto et al., 1999). 본 연구 결과에서 나타난 바와 같이 송절, 천초, 승마 등의 천연물은 tyrosinase 생성을 억제하여 멜라닌 합성을 낮추고 멜라닌 세포에 대한 세포독성 또한 거의 나타나지 않아 매우 안정적인 미백물질이라고 할 수 있겠다. 따라서 향후 본 실험 결과를 토대로 하여 후보물질로 선정된 한약재들의 멜라닌 합성을 억제하는 정확한 성분 및 기전을 밝히기 위한 활발한 연구가 필요하다고 사료된다.

결론 및 제언

본 연구는 100여 종의 한약재의 멜라닌 생성 억제 효과를 검색하기 위해 실험관 내 실험(in vitro)상의 tyrosinase 활성 억제 양상을 확인하였고, 이들 중 40% 이하의 tyrosinase 활성 억제효과를 가진 물질들의 사람 멜라닌 세포주(HM3KO)에서의 세포 독성 여부를 살펴보았다. 또한 같은 세포주를 이용하여 한약재 첨가 여부에 따른 멜라닌 합성 정도를 관찰하고, 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫째, 100여 종의 한약재를 조사한 결과 20% 이상 억제 효과를 가진 물질은 64종이었고, 30% 이상 억제 효과를 가진 물질은 35종, 40% 이상 억제 효과를 가진 물질은 11종이 확인되었다.

둘째, 미백 효과 후보물질들의 멜라닌 세포(HM3KO cell)에 대한 세포 독성(cytotoxicity) 여부를 확인하기 위해 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 13종의 한약재의 세포독성 실험을 해본 결과, 유의한 수준의 세포 사멸이 없음을 확인하였다.

셋째, 후보물질들의 세포 증식에 미치는 영향을 triphan blue를 이용하여 세포 수를 세어서 확인한 결과, forskolin에 의해 세포 증식(proliferation)이 증가된 양상을 보였고, arbutin에 의해 억제되는 양상을 보여주었으며, 2종의 후보물질에서도 세포 증식이 억제된 경향을 나타내었다.

넷째, 사람 멜라닌 세포(HM3KO)에서의 멜라닌 합성 정도를 확인하기 위해 세포 내 멜라닌 양을 살펴본 결과, 최종적으로 3종의 천연물 추출물(송절: 43.1%, 천초: 68.7%, 승마: 71.9%)

에서 매우 유의한 수준의 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하였다.

이상의 결과를 통하여 한약재에서의 미백 기능성 제품 개발의 가능성을 가진 후보 물질을 검색할 수 있었으나, 정확한 멜라닌 합성 억제 기전의 확인이 필요할 뿐 아니라, 이들 한약재에 포함된 다양한 물질 중 어떤 물질이 이러한 억제 효과를 가져오는지를 확인하는 추출물 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Aberdam, E., Roméro, C., & Ortonne, J. P. (1993). Repeated UVB irradiations do not have the same potential to promote stimulation of melanogenesis in cultured normal human melanocytes. *Journal of Cell Science*, 106, 1015-1022.
- Bleehen, S. S. (1997). Skin bleaching preparations. *Journal of Society Cosmetic Chemistry*, 28, 407-412.
- Breathnach, A. C., Nassaro-Porro, M., Passi, S., & Zina, G. (1989). Azelaic acid therapy in disorders of pigmentation. *Clinical Dermatology*, 7, 106-119.
- Curto, E. V., Kwong, C., Hermersdörfer, H., Glatt, H., Santis, C., & Virador, V. (1999). Inhibitor of mammalian melanocyte tyrosinase: In vitro comparisons of alkyl esters of genistein with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 57, 663-672.
- Engasser, P. E., & Maibach, H. I. (1981). Cosmetics and dermatology: Bleaching creams. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 5, 143-147.
- Findley, G. H., Morrisonm J. G., & Simon, I. W. (1975). Exogenous ochronosis and pigmented colloid milium from hydroquinone bleaching creams. *British Journal of Dermatology*, 93, 613-622.
- Gordon, P. R., & Gilchrist, B. A. (1989). Human melanogenesis is stimulated by diacylglycerol. *Journal of Investigative Dermatology*, 93, 700-702.
- Griffiths, C. E., Finkel, L. T., Ditré, C. M., Hamilton, T. A., Ellis, C. N., & Voorhees, J. J. (1993). Topical treatment (retinoic acid) improves melasma. A vehicle-controlled, clinical trial. *British Journal of Dermatology*, 129, 415-421.
- Hara, H., Lee, M. H., Chen, H., Luo, D., & Jimbow, K. (1994). Role of gene expression and protein synthesis of tyrosinase, TRP-1, Lamp-1, and CD63 in UVB-induced melanogenesis in human melanomas. *Journal of Investigative Dermatology*, 102, 495-500.
- Hunt, G., Todd, C., Kyne, S., & Thody, A. J. (1994). ACTH stimulates melanogenesis in cultured human melanocytes. *Journal of Endocrinology*, 140, R1-3.
- Kanwar, A. J., Dhar, S., & Kaur, S. (1994). Treatment of melasma with potent topical corticosteroids. *Dermatology*, 188, 170.
- Kligman, A. M., & Willis, I. (1975). A new formula for depigmenting human skin. *Archives of Dermatology*, 111, 40-48.
- Meada, K., & Fukuda, M. (1996). Arbutin: Mechanism of its depig-

- menting action in human melanocyte culture. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 276, 765-769.
- Mishima, Y., Hatta, S., Ohyama, Y., & Inazu, M. (1988). Induction of melanogenesis suppression: Cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Research*, 1, 367-374.
- Naeyaert, J. M., Eller, M., Gordon, P. R., Park, H. Y., & Gilchrist, B. A. (1991). Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *British Journal of Dermatology*, 125, 297-303.
- Oliver, A. E., Crowe, L. M., de Araujo, P. S., Fisk, E., & Crowe, J. H. (1996). Arbutin inhibitors PLA2 in partially hydrated model systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1302, 69-78.
- Pathak, M. A., Fitzpatrick, T. B., & Kraus, E. W. (1986). Useful of retinoic acid in the treatment of melasma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 15, 894-899.
- Slominski, A. (2002). Coming of age of melanogenesis-related proteins. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 126, 775-777.
- Sturm, R. A., Teasdale, R. D., & Box, N. F. (2001). Human pigmentation genes: Identification, structure and consequence of polymorphic variation. *Gene*, 277, 49-62.
- Sugai, T. (1992). Clinical effect of arbutin in patients with chloasma. (In Japanese) *Hifu (Skin Research)*, 34, 522-529.
- Tsatmali, M., Ancans, J., & Thody, A. J. (2002). Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50, 125-133.