

# B16F10 Mouse Melanoma 세포에서의 L-cysteine에 의한 멜라닌 생성 억제

안인숙 / 김지혜 / 유희숙 / 장뢰 / 강상모 / 최태부 / 권태종 / 안성관/ 김기연\*  
건국대학교 산업대학원 화장품학과 / 충청대학 피부미용과\*

## Abstract

### The Inhibition Effect of L-cysteine on Melanogenesis in B16F10 Mouse Melanoma Cells

An, In-Sook / Kim, Ji-Hye / Yoo, Hoe-sook / Zhang, Rui / Kang, Sang-Mo /  
Choe, Tae-Boo / Kwon, Tae-Jong / An, Sung-kwan / Kim, Gi-Yeon\*

Dept. of Cosmetology, Graduate School of Engineering, Konkuk University  
Dept. of Cosmetology, Chungcheong University\*

Pigmented skin disorders, including melasma, freckles and post-inflammatory hyperpigmentation, are one of the commonest reasons for peoples and patients seeking various skin care shops and dermatology consultation. Melanocytic cells can produce two types of pigment, pheomelanin and eumelanin, in their specialized intracellular organelles termed melanosomes. Steps of melanin biosynthesis catalyzed by tyrosinase, a key enzyme of melanogenesis, are common to eumelanogenesis and pheomelanogenesis. In addition to tyrosinase, two more enzymes, tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) and dopachrome tautomerase (DCT), are known to be involved in eumelanogenesis and/or pheomelanogenesis. It has been reported that thiol compounds, such as cysteine and glutathione, result in decreasing pigmentation by favoring to the pheomelanogenesis and bringing down synthesis of eumelanin. However its mechanisms are poorly understood. In the present study, the effect of L-cysteine on melanogenesis and expression of tyrosinase and its related proteins was examined in a B16F10 mouse melanoma cell line model system. Cytotoxicity of L-cysteine when co-treated with  $\alpha$ -MSH and arbutin in B16F10 mouse melanoma cells were tested. Within a concentration range of L-cysteine showing no cytotoxicity effects, it decreased the amount of melanin and activity of tyrosinase in cells treated with  $\alpha$ -MSH in a dose dependent manner. In addition, L-cysteine decreased levels of protein expression of tyrosinase, but not either of TYRP1 or DCT in these cells. Treatment of L-cysteine resulted in diminishing dendrite of B16F10 mouse melanoma cells. Collectively these data show that L-cysteine has a inhibitory effect on melanin synthesis and tyrosinase activity by down-regulation of tyrosinase protein in B16F10 mouse melanoma cells. It implies that L-cysteine may be a good ingredient candidate for developing whitening effect cosmetic products or drugs for hyperpigmentary disorders.

**Key Words** : L-cysteine, Melanogenesis, B16F10, Tyrosinase, Hyperpigmentation

## I. 서론

피부는 신체의 표면을 덮고 있고 점막과 연결되어 있으며 독특한 구조로 이루어진 다양한 세포들이 복합적 기능을 발휘하는 하나의 기관으로 인간의 건강과 생존에 매우 중요한 역할을 수행하고 있다. 피부의 표피는 기저층, 유극층, 과립층, 각질층으로 나누어지고 피부세포는 멜라닌세포, 랑거한스세포, 머켈세포가 존재한다. 이 중 멜라닌 세포는 기저층에 존재하는 수지상세포로 적황색을 띄는 pheomelanin 또는 흑갈색을 띄는 eumelanin을 분비하여 각질형성세포를 생성하고 수지상돌기는 주변의 각질형성세포에 연해 있다. 인간의 멜라닌은 알칼리 및 난용성으로 흑갈색 색소인 eumelanin과 적황색 색소인 pheomelanin의 복합체이다. 피부색은 혈관분포와 혈색소, 각질층의 두께 및 카로틴, 멜라닌(melanin) 등 여러 가지에 의해 좌우되며 멜라닌의 분포상태 및 양이 주된 영향을 미친다. 따라서 미백효과를 검증하기 위해서는 멜라닌형성 억제 여부를 증명하는 것이 중요하다<sup>1)</sup>.

멜라닌은 멜라노솜에서 합성되며 멜라노솜에는 정상적인 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 효소들 중 널리 알려진 것으로 tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (TYRP1)과 dopachrome tautomerase (DCT) 등이 있다. 이 중 tyrosinase는 melanogenesis의 속도결정단계인 초기반응에 작용하는 효소로서 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성화와 DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. TYRP1은 mouse에서 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)

를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소이다. DCT는 초기에는 tyrosinase-related protein 2 (TYRP2)로 불렸던 효소로서 dopachrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다. Tyrosinase는 eumelanin과 pheomelanin의 합성 모두에 절대적으로 필요하며 TYRP1과 DCT는 eumelanin의 합성에 밀접한 연계가 있는 것으로 알려져 있다<sup>2)3)4)</sup>. Tyrosinase에는 더욱이 제 3의 작용점이 있는 DHI oxidase의 활성화도 확인할 수 있으며 dopaquinone 이후의 반응은 크게 2가지로 분류한다. 첫 번째는 dopaquinone에 cysteine (또는 glutathione)이 결합하고, cysteinyl DOPA로 대사시킨 다음 여러 단계의 반응을 거쳐 pheomelanin이 생성되는 것이다. 또 다른 경로는 dopaquinone이 dopachrome을 거치는 eumelanin 생성 과정이다. 이는 dopachrome을 산화시킨 다음 두 경로로 나뉘어진다. 하나는 DCT에 의해 DHOCA (5,6-dihydroxy-indole-2-carboxylic acid)로 변환시키고 이후 TYRP1에 의해 DHICA로 산화된 후, 최종적으로 중합반응에 의해 eumelanin이 생성되는 경로이다. 다른 하나는 dopachrome에서 자동 산화되어 DHI (5,6-dihydroxy-indole)을 경유시킨 후 tyrosinase의 작용에 의해 indole-5,6-quinone으로 변환시켜 중합반응에 의해 eumelanin이 생성되는 경로이다. 이 두 가지의 멜라닌 합성 경로의 분기점에는 L-cysteine이 가장 큰 작용을 하게 된다<sup>5)6)7)</sup>.

1) David A. Brown, Skin pigmentation enhancers, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 63, 2001, 1-3, p.148-161

2) Hearing VJ. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, The Journal of investigative dermatology, 4, 1999, p.24-28

3) Veronique del Marmol, and Friedrich Beermann. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation., FEBS Letters, 381, 1996, p.165-168

4) Choe YS. The Effect of Basic Cosmetic Ingredients on the Melanogenesis in the B16F10 Mouse Melanocyte, Konkuk University, 2006

Tyrosinase의 생체 내 주요 기능은 질병과 밀접한 관련이 있다. 동물에 있어서 멜라닌합성의 이상에 따라 백반과 색소침착과도와 같은 비정상적인 멜라닌 착색을 일으키며, 나아가서 피부암을 유발하기도 한다<sup>8)9)10)</sup>. 따라서 멜라닌 형성을 억제할 수 있는 미백제에 대한 관심이 증가와 더불어 다양한 연구가 진행되고 있다<sup>11)12)</sup>. 미백화장

품은 자외선에 의한 기미, 주근깨 등을 완화시키고 멜라닌 색소의 생성을 억제하는 목적으로 개발된 제품이다. 기존의 미백제는 작용기전에 따라 자외선 흡수제나 산란제, vitamin C나 Kojic acid, arbutin 등과 같은 tyrosinase 저해제, free radical을 소거하는 tocopherol 등으로 분류할 수 있다. 그러나 이러한 물질들은 피부 알러지나 독성을 발현하기도 하여 안정성 측면에서 문제점이 발견되기도 한다.

본 실험에서는 두 종류의 멜라닌이 분리되는 시점에서 작용하는 L-cysteine으로부터 pheomelanin의 생성량 또는 tyrosinase의 효소 활성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 현재 시중에 판매되고 있는 소망화장품사의 『멜라클리어』 제품은 L-cysteine에 의한 미백 효과를 선전하고 있다. 그러나 현재까지 L-cysteine의 단독적인 영향에 관한 연구는 발표되지 않았다. 현재까지 발표된 L-cysteine에 관한 연구결과는 대체로 Vitamine C와 함께 복용하였을 경우 항산화 작용에 의한 미백효과를 볼 수 있었다. 일반적으로 화장품은 건강한 피부에 매일 사용하는 것으로 안전성이 최우선시 되어야 하며 부작용이 발생되지 않아야 함에 따라 본 실험을 통해 L-cysteine에 의한 세포 독성을 우선적으로 확인하고 L-cysteine이 화장품 재료로서 적합성을 파악하기 위하여 실시하였다. L-cysteine은 독성을 포함한 상태에서 혈액 내에 흡수될 때에는 L-cysteine의 환원형인 L-cystine으로 변환되어 세포내에서 L-cysteine으로 자동적으로 산화됨이 잘 보고되어져 있으므로, 본 실험에서는 L-cystine을 세포에 직접 투입하여 L-cysteine에 의한 영향을 확인하는 방법을 채택하였다. 실험에서 사용한 세포 주는 멜라닌의 생성능력이 뛰어난 것으로 알려진 B16F10 mouse melanoma 세포주를 사용하였으며, cAMP 경로를 통하여 멜라닌의 합성량을 촉진하는 것으로 보고된 바 있는  $\alpha$ -MSH를 첨가하였을 때 나타나는 멜

- 5) Vincent J. Hearing, Biogenesis of pigment granules a sensitive way to regulate melanocyte function, Journal of Dermatological Science, 37, 2005, 1, p.3-14
- 6) Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Beermann F, Aparicio P, Lozano JA, Garcia-Borron JC. Transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibits basal melanogenesis in B16/F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1, J Biol Chem, 272(7), 1997, p.3967-3972
- 7) Thody AJ and Graham A. Dose  $\alpha$ -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans?, Pigment Cell Res, 11, 1998, p.265-274
- 8) Veronique del Marmol, and Friedrich Beermann. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation., FEBS Letters, 381, 1996, p.165-168
- 9) 日本化粧品技術者會, 化粧品の有用性, 藥事日報社, 2001
- 10) Vincent J. Hearing. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function, Journal of Dermatological Science, 37, 2005, 1, p.3-14
- 11) Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Beermann F, Aparicio P, Lozano JA, Garcia-Borron JC. Transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibits basal melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1, J Biol Chem 272(7), 1997, p.3967-3972
- 12) Thody AJ and Graham A. Dose  $\alpha$ -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans?, Pigment Cell Res, 11, 1998, p.265-274

라닌 함량과 tyrosinase 활성을 측정하여 그 저해 효과를 확인하였다. 그리고 melanogenesis 관련 효소 발현량의 변화 등을 측정하였다.

## II. 실험재료 및 연구방법

### 1. 실험 재료

실험에 사용된  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), arbutin, L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA), L-cystine은 Sigma사에서 구입하였다.

### 2. 세포 배양

B16F10 melanoma cell은 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco BRL)과 penicillin 1%, 을 첨가한 JBI사의 Dulbecco's ,modified Eagle's medium (DMEM), phenol red free를 기본 배지로 하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 습윤 배양기에서 배양하였다.

### 3. 시료 및 시약처리

L-cystine은 1M의 HCl에 용해시킨 후 0.2 $\mu$ m filter로 filtration을 한 후 사용하였다. 세포를 배양판(6 well plate)에 각 well당 3.5 X 10<sup>4</sup>씩 분주한 후 24시간 배양하여 배양용기에 세포를 부착시킨 후 각 시약을 농도별로 알맞게 처리한 후 4일 배양을 기본으로 하였다.

### 4. 세포독성 측정

#### 1) MTT assay

각 물질들의 세포독성측정과 더불어 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위하여 MTT assay를 시행하였다. 세포 배양용 96-well plate에 세포를

1.0 × 10<sup>3</sup> cells/well 농도로 분주하고 24시간이 지난 뒤 세포가 완전히 부착된 것을 확인하였다. 200nM  $\alpha$ -MSH과 L-cysteine이 농도별로 첨가된 배지로 교환하고 4일간 배양 후에 MTT assay를 시행하였다.

MTT assay는 세포배양이 끝난 후 MTT 용액 (200 $\mu$ g/mL)을 각 well 당 50 $\mu$ L 씩 넣고 37°C에 3 시간 동안 반응 시킨 후 PBS buffer로 수세한 다음 DMSO를 각 well 당 200 $\mu$ L 씩 첨가한 후 ELISA reader (MolecuLar Devices)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 O.D. at 570nm}}{\text{시료 무 첨가군의 O.D. at 570nm}} \times 100$$

#### 2) FACS analysis

FACS analysis는 세포배양이 끝난 후 세포를 수확하여 PBS buffer로 두 번 세척한 후 8000rpm에서 5분간 원심분리를 시행하였다. 상층액을 제거한 후 새로운 PBS buffer 400 $\mu$ L에 세포를 희석하고 Propidium Iodide 4 $\mu$ g.mL을 염색한 후 BD사의 FACS Calibur 장비를 이용하여 488nm Laser에서 Red Channel로 분석을 하였다.

### 5. 멜라닌 함량 측정

세포 배양용 6well plate에 3.5 X 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 분주하고 24시간이 지난 뒤 각 시약을 처리하고 4일을 배양하였다. 배양세포를 PBS buffer로 2회 수세한 후 원심분리하여 수확한 다음 육안으로 멜라닌 세포의 색깔을 관찰하고, 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH 용액을 95°C에서 20분간 멜라닌 용해시킨 후 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase의 효소 활성은 기질인

L-3,4-dihydroxy-phenylalanine (L-DOPA)이 산화되어 검붉은 색을 띄는 dopachrome이 생성되는 것을 490nm에서 측정하였다. 앞에서 언급되었던 실험들에서와 같은 방법으로 세포를 배양하고 배양이 끝난 후 cell lysis buffer인 RIPA buffer(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS와 Roche Diagnostics사의 EDTA free Cocktail protease inhibitors)로 lysis한 후 20μL를 취하여 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 2mg/mL L-DOPA 80μL를 각각 혼합한 후 2시간 동안 37°C에서 배양하였다. 반응이 끝난 후 490nm에서 흡광도를 측정하여 O.D.값을 나타내었다.

### 7. Western blotting assay

세포를 3.5 X 10<sup>4</sup>이 되도록 plating한 후 24시간이 지난 뒤에 시약을 처리하고 4일 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포를 수확한 후 PBS buffer로 2회 수세한 다음 RIPA lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시키고 12000rpm에서 30분간 원심분리 후 cell debris를 제거하였다.

시료 내 단백질 정량은 bradford 시약을 사용하여 정량하였으며 40μg의 단백질을 이용하여 10% SDS-PAGE를 실시하였다. Tyrosinase, TYRP1, DCT 항체는 SantaCruz사의 제품을 사용하였으며 5% skimmilk에 1:1000으로 희석하여 반응시킨 후 Amersham사의 ECL kit를 사용하여 발광시킨 후 필름으로 현상하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. L-cystine과 α-MSH, Arbutin의 B16F10 세포 생존율에 미치는 영향

실험 물질들이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 보

기 위해 B16F10 mouse melanoma cell을 사용하여 PKA pathway를 경유하여 melanogenesis를 유도하는 것으로 알려진 α-MSH와 멜라닌 생성 저해제인 arbutin을 처리하였다. α-MSH와 arbutin은 실험에 사용한 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. Melanogenesis 유도물질과 저해물질이 세포 증식에 커다란 영향이 없는 것을 확인하고 차후 실험들을 진행하였다.

L-cysteine 성분이 B16F10 melanoma cell의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포독성을 측정하였고, L-cystine을 녹인 1M HCl에 대한 영향을 함께 관찰하기 위하여 control과 1M HCl을 단독으로 처리한 시료를 함께 사용하였다. L-cystine의 농도는 N-acetyl-L-cysteine에 대한 보고 자료를 참조하여 결정하였다. α-MSH와 arbutin 그리고 L-cystine은 실험에 사용한 농도에서는 세포독성이 거의 나타내지 않았다(Fig. 1). 멜라닌 세포의 증식을 촉진하거나 억제하는 물질의 경우 세포의 증식에 미치는 영향만으로 직접적인 멜라닌 생성 촉진이나 억제 효과를 논하기는 어렵지만, 대체로 세포 독성을 나타내지 않으면서 멜라닌의 생성을 억제하는 물질이 좋은 미백 가능성 물질이라 할 수 있다.

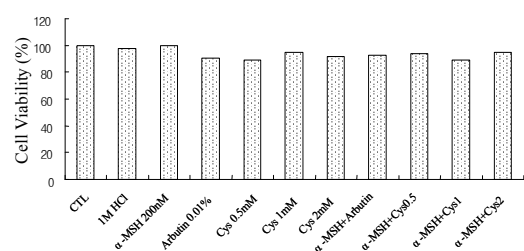


Fig. 1. Cytotoxicity of L-cystine when co-treated with α-MSH and arbutin in B16F10 mouse melanoma cells

### 2. L-cysteine의 최종 멜라닌 생성 억제 효과

멜라닌은 멜라닌세포의 세포소기관인 멜라노솜에서 일련의 효소 반응에 의해 생성되며 멜라닌 합성과정에 핵심 역할을 하는 효소인 tyrosinase의 활성을 L-cysteine이 억제 하는지 알아보기 위

하여 L-cystine을 처리 한 후 합성된 멜라닌의 양과 tyrosinase의 활성을 측정하였다. 앞선 세포독성 결과를 참고하여 멜라닌 생성량 측정 실험과 동일한 농도 범위에서 실험을 진행하였다.

L-cystine을 B16F10 melanoma cell에 처리하고 4일간 배양한 다음, 세포를 수확하여 멜라닌 세포 수에 따른 멜라닌 양을 측정하였다. 각 농도별로 L-cystine을 처리한 결과 멜라닌 양은 아무 시약도 처리하지 않은 control에 비하여 멜라닌 생성을 촉진하는  $\alpha$ -MSH만 처리한 것에서 흡광도는 두 배 가량 증가하였고,  $\alpha$ -MSH와 L-cystine 2mM을 함께 처리한 것은 멜라닌 양은 아무것도 처리하지 않은 control 과 유사한 정도로 감소한 것으로 나타났다(Fig 2-3).

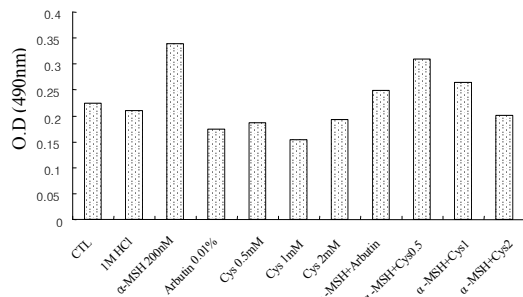


Fig. 2. The inhibition effect of L-cystine on melanin synthesis in B16F10 mouse melanoma cells by L-cystine.

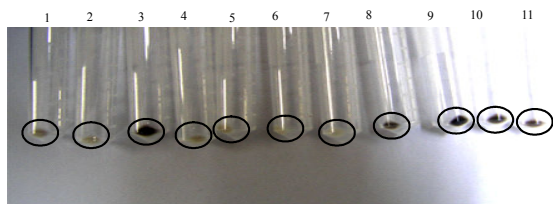


Fig. 3. The difference of melanin contents by L-cysteine(1; control, 2; 1M HCl, 3;  $\alpha$ -MSH 200nM, 4; arbutin 0.01%, 5; L-cystine 0.5mM, 6; L-cystine 1mM, 7; L-cystine 2mM, 8;  $\alpha$ -MSH + arbutin, 9;  $\alpha$ -MSH + L-cystine 0.5mM, 10;  $\alpha$ -MSH + L-cystine 1mM, 11;  $\alpha$ -MSH + L-cystine 2mM)

### 3. L-cysteine의 세포내 tyrosinase 활성 억제 효과

실험물질이 멜라닌의 합성 및 합성과정에서 핵심 역할을 하는 효소인 tyrosinase의 활성을 억제

혹은 촉진하는지 알아보기 위하여 시험 물질 처리 후 합성된 멜라닌의 양과 tyrosinase의 활성을 측정하였다. 실험물질을 B16F10 melanoma cell에 각 농도별로 처리하고 4일 배양한 후 세포내 tyrosinase 효소 활성을 조사하였다.

$\alpha$ -MSH 200nM을 처리하였을 때 control에 비해 약 5배정도 증가한 것을 알 수 있었고 arbutin을 처리한 경우 control보다도 약간 감소하였다. L-cystine을 단독으로 처리하였을 때 control 보다 감소하여 arbutin과 유사하게 activity가 감소하는 것으로 나타났고,  $\alpha$ -MSH와 함께 처리한 것에서도  $\alpha$ -MSH 단독으로 처리한 것보다 감소하는 것으로 나타났다(Fig 4).

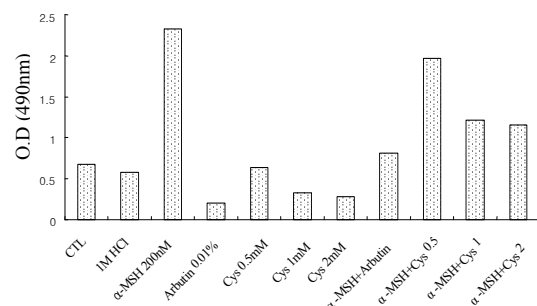


Fig. 4. Inhibition effect of L-cysteine on the tyrosinase activity in B16F10 mouse melanoma cells

### 4. 멜라닌 합성 관련효소의 단백질 발현량의 변화 조사

L-cystine을 처리하였을 경우 tyrosinase 활성이 감소하였고 생성된 멜라닌의 양도 감소하였다. 따라서 본 실험에서는 tyrosinase 활성의 감소가 효소 발현량의 변화에 의한 것인지를 확인하고자 하였다. 또한 melanogenesis 관련 효소 중 중요한 작용을 하는 TYRP1, DCT 발현량에 L-cysteine이 미치는 영향을 조사하였다.

Tyrosinase 활성을 알아본 실험 조건과 동일하게 세포배양과 시약을 처리하였다.  $\alpha$ -MSH를 처리하였을 때 control에 비해 현저히 tyrosinase 발현량이 증가되는 것을 관찰 할 수 있었고 arbutin을 함께 처리하였을 때에는 발현량이 감소하는 것



4. 성기태, 피부미백제 기술 동향, 한국과학기술정보연구원, 2004
5. HE G., Vijay Kumar Kutala, Periannan Kuppusamy, and Jay L. Zweier. In vivo Measurement and mapping of skin redox stress induced by ultraviolet light exposure, *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 5, 2004, p.665-672
6. Alaluf Simon, Ulrike Heinrich, Wilhelm Stahl, Hagen Tronnier, and Sheila Wiseman. Dietary carotenoids contribute to normal human skin color and UV photosensitivity, *The American Society for Nutritional Sciences*, 132, 2002, p.399-403
7. David A. Brown. Skin pigmentation enhancers, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63, 2001, 1-3, p.148-161
8. Hearing VJ. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *The Journal of investigative dermatology*, 4, 1999, p.24-28
9. Veronique del Marmol, and Friedrich Beermann. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation., *FEBS Letters*, 381, 1996, p.165-168
10. Choe YS. The Effect of Basic Cosmetic Ingredients on the Melanogenesis in the B16F10 Mouse Melanocyte, Konkuk University, 2006
11. Vincent J. Hearing. Biogenesis of pigment granules a sensitive way to regulate melanocyte function, *Journal of Dermatological Science*, 37, 2005, 1, p.3-14
12. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Beermann F, Aparicio P, Lozano JA, Garcia-Borron JC. Transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibits basal melanogenesis in B16/F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1, *J Biol Chem*, 272, 7, 1997, p.3967-3972
13. Thody AJ and Graham A. Dose  $\alpha$ -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans?, *Pigment Cell Res*, 11, 1998, p.265-274
14. Veronique del Marmol, and Friedrich Beermann. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation, *FEBS Letters*, 381, 1996, p.165-168
15. 日本化粧品技術者會, 化粧品の有用性, 藥事日報社, 2001
16. Vincent J. Hearing. Biogenesis of pigment granules, a sensitive way to regulate melanocyte function, *Journal of Dermatological Science*, 37, 2005, 1, p.3-14
17. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Beermann F, Aparicio P, Lozano JA, Garcia-Borron JC. Transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibits basal melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1, *J Biol Chem*, 272, 7, 1997, p.3967-3972
18. Thody AJ and Graham A. Dose  $\alpha$ -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans?, *Pigment Cell Res*, 11, 1998, p.265-274