

## B16 Melanoma 세포에서 Phenylpropanoid 화합물이 Melanin 생성에 미치는 영향

박영미 · 윤미연 · 김경원 · 조남영 · 임혜원 · 이지윤 · 이진희 · 김연정 · 김창중 · 심상수#  
중앙대학교 약학대학

(Received November 3, 2003; Revised November 21, 2003)

### Effects of Phenylpropanoid Compounds on Melanin Production in B16 Melanoma Cells

Young Mi Park, Mi Yun Yoon, Kyoung Won Kim, Nam Young Cho, Hye Won Lim, Ji Yun Lee,  
Jin Hee Lee, Youn Joung Kim, Chang Jong Kim and Sang Soo Sim#

College of Pharmacy, Chung-Ang University, 221 Huksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — To investigate the relationship between structure and biological activity of phenylpropanoids, we measured effects of phenylpropanoids on anti-oxidant and whitening activity. In DPPH radical scavenging activity, caffeic acid analogues showed the significant anti-oxidant activity. Although phenylpropanoids did not inhibit purified-tyrosinase activity, they significantly inhibited tyrosinase activity and melanin production in MSH-stimulated B16 melanoma cells. However, phenylpropanoids did not affect tyrosinase expression in MSH-stimulated B16 melanoma cells, which suggest that inhibition of MSH-induced melanin production was due to tyrosinase inhibition mediated via other signal pathways but not expression of tyrosinase. Phenylpropanoids also significantly inhibited both hyaluronidase and elastase activity, suggesting that phenylpropanoids may be used as whitening, hydration and anti-wrinkling agents. Hydroxyl residue of aromatic ring in phenylpropanoids plays an important role in anti-oxidant and whitening activity.

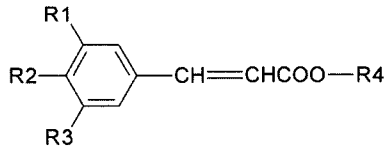
**Keywords** □ phenylpropanoids, melanin, hyaluronidase, elastase, tyrosinase

천연물로부터 분리한 물질 중 phenylpropanoid는 방향족환에 탄소 3개로 된 사슬이 달린 phenolic 물질로서 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> 화합물이며, flavonoid는 2개의 방향족환과 3개의 탄소를 이루어진 탄소 15개로 된 일련의 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 화합물을 말한다. 이들은 수많은 식물에 존재하는 물질로 다양한 약리활성을 갖고 있다. 이들은 여러 형태의 유도체로 대부분의 식물에 많이 존재하며 지금까지 알려진 종류만도 2,000여종이 넘게 발견되었다. 미국인들은 매일 식사를 통해 1g 이상의 flavonoid를 섭취한다고 한다.<sup>1)</sup> 채식을 주로 하는 한국사람의 경우 미국인보다 더 많은 flavonoid를 섭취하는 것으로 사료된다. Phenylpropanoid는 shikimic acid 경로를 거쳐 phenylalanine으로부터 생합성되고, coumarin, lignan, lignin의 전구물질이 된다. Phenylpropanoid 중 가장 널리 분포되어 있는 것은 hydroxycinnamic acid이며 ferulic, sinapinic, caffeic 및 *p*-coumaric acid 등도 식물에 널리 분포되어 있는 물질이다.

C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> 유기산은 quinic acid와 ester 결합한 chlogenic acid도 식물에 보편적으로 존재한다.

Phenylpropanoid와 flavonoid는 심혈관계뿐만 아니라 면역과 염증억제작용, 항바이러스 작용, 간보호 작용 등 다양한 약리활성 작용이 있는 것으로 알려져 있지만 이들의 약리작용 기전에 있어서는 잘 알려져 있지 않은 상태이다. 지금까지 가장 잘 알려진 것으로는 genistein으로 tyrosine kinase의 억제제로서 실험실에서 많이 이용되고 있다. 또한 근이완을 일으키는 flavonoid들의 작용은 세포의 Ca<sup>2+</sup>의 유입 억제<sup>2,3)</sup>와 cyclic nucleotide를 분해시키는 phosphodiesterase의 억제<sup>4)</sup> 및 protein kinase C의 억제<sup>3,5)</sup>와 같이 매우 다양하게 보고되고 있다. 한편 baicalein은 사람의 혈소판에서 12-lipoxygenase의 specific inhibitor로 작용한다는 보고도 있다.<sup>6)</sup> 이와 같이 phenylpropanoid의 다양한 약리작용이 보고 된 바 있어도 아직도 미백작용이나 보습 및 주름살 방지 작용에 대한 보고는 없는 실정이다. 그러므로 이 실험에서는 여러 가지 치환기로 대체된 phenylpropanoid 유도체 (Scheme 1)들을 이용하여 미백과 보습 및 주름살 방지 작용에 대한 작용을 관찰하고 이들 작용과 phenylpropanoid 유도체의

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-820-5615 (팩스) 02-816-7338  
(E-mail) simss@cau.ac.kr



	R1	R2	R3	R4
Cinnamic acid	-H	-H	-H	-H
p-coumaric acid	-H	-OH	-H	-H
Caffeic acid	-H	-OH	-OH	-H
Ferulic acid	-H	-OH	-MeO	-H
Sinapinic acid	-MeO	-OH	-MeO	-H
Chlorogenic acid	-H	-OH	-OH	-Quinic acid

Scheme 1 - Structure of phenylpropanoids.

구조와의 상관성을 규명하였다.

## 실험방법

### 시약

Phenylpropanoid(cinnamic acid, coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, sinapinic acid, chlorogenic acid), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH),  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone (MSH), tyrosinase, L-DOPA, melanin, elastase, hyaluronic acid, hyaluronidase들은 Sigma chemical Co.로부터 구입하였다. tyrosinase 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.에서 구입하였다. B16 melanoma 세포는 서울대학교 세포주 은행으로부터 구입하였다.

### 세포 배양

B16 melanoma 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin(100 IU/50  $\mu$ g/ml)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. B16 세포를 이용한 melanin 측정시 phenol red가 없는 DMEM을 사용하였다. 24 well plate에 5  $\times$  10<sup>4</sup> cells/ml로 분주하고 12시간이 지난 뒤 세포가 plate에 완전히 부착된 것을 확인한 후 phenylpropanoid를 10분간 전처리하였다. Melanin 생성을 촉진하기 위하여 1  $\mu$ M  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone(MSH)를 처리하고 48시간 지난 뒤에 melanin을 정량하였다.

### 항산화 활성 측정

96 well plate에 에탄올에 녹인 0.1 mM DPPH 용액 180  $\mu$ l와 각 농도별로 조제한 phenylpropanoid 20  $\mu$ l를 가하고 37°C에서 30분간 배양한 후 FL 600 spectrofluorometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Tyrosinase 활성 측정

정제된 tyrosinase 활성에 직접적으로 미치는 영향을 관찰하기 위하여 tyrosinase와 phenylpropanoid를 혼합한 후 2 mg/ml L-DOPA 200  $\mu$ l를 가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하고 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 세포내 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 B16 세포에 약물 처리 후 배양이 끝나면 1%(w/v) Triton X-100을 함유한 10 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)를 100  $\mu$ l를 가하고 5분간 shaking한 후에 세포와 용액을 모두 eppendorf tube로 이전시키고 원심분리하여 상층액은 tyrosinase 활성과 단백질 정량에 이용하고, cell pellet은 멜라닌 정량에 사용하였다. 96 well plate에 약물 처리 후 얻은 상층액 40  $\mu$ l를 분주하고 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2)에 녹인 2 mg/ml L-DOPA 200  $\mu$ l를 가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. Tyrosinase에 의해 생성된 DOPA chrome은 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>7)</sup> Tyrosinase 활성은 순수하게 정제된 tyrosinase를 효소 활성의 표준 검량선으로 이용하여 산출하였다. Bovine albumin을 표준 용액으로 하여 상층액 내의 단백질 양을 정량하였으며, tyrosinase 효소 활성은 unit/mg protein으로 표기하였다.

### 멜라닌 정량

Tyrosinase 활성을 측정하는 과정에서 얻은 pellet을 1 N NaOH 100  $\mu$ l와 증류수 200  $\mu$ l를 가하고 60°C에서 1시간 배양하여 멜라닌을 완전히 녹인 후 96 well plate에 200  $\mu$ l를 옮긴 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 표준품으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌 생성량은 각 well에서 측정한 단백질 농도를 기준으로  $\mu$ g/mg protein으로 표기하였다.

### Tyrosinase immunoblotting

MSH를 48시간 처리한 B16 melanoma 세포를 extracting buffer(1% Triton X-100을 함유한 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.8)를 가하여 세포를 파괴시키고 얻은 균질액을 8~20% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동하고 nitrocellulose membrane으로 이전시켰다. 1% BSA를 함유한 Tris 완충용액에서 30분 이상 배양한 후 tyrosinase 항체와 alkaline phosphatase가 결합된 항체를 가한 후 alkaline phosphatase 기질 용액을 이용하여 발색시켰다.

### Hyaluronidase 활성 측정

96-well microplate에 55°C로 가온된 hyaluronic acid-agarose mixture를 100  $\mu$ l씩 분주한 후 실온에 방치하여 gel화시켰다. 100  $\mu$ l hyaluronidase(40 unit)를 가하고 37°C에서 배양한 후 상층액을 버리고, 10%(w/v) cetylpyridinium chloride를 100  $\mu$ l를

가하여 실온에서 30분 방치하고 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Elastase 활성 측정

Human leukocyte elastase를 50 mM sod. acetate buffer (pH 5.3)에 녹여 1 unit/ml 용액을 만들었다. elastase 기질 용액은 MeO-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Val-pNa(*p*-nitroanilide)를 DMSO에 녹여 20 mM stock solution을 만들었다. Phenylpropanoid가 elastase 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 elastase를 phenylpropanoid와 혼합한 후 10  $\mu$ l를 96 well plate에 분주하고 10 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 녹인 200  $\mu$ M *p*-nitroanilide를 200  $\mu$ l를 첨가하였다. 반응액은 37°C에서 20분 배양하고 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

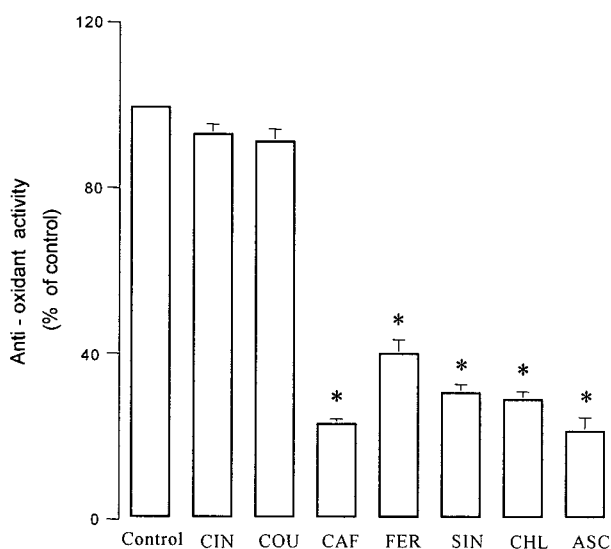
### 자료분석 및 통계적 검정

실험 결과는 평균±표준오차로 표기하였으며, 실험 성적은 non-paired Student's t-test로 검정하였고 P 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

## 실험결과 및 고찰

### Phenylpropanoid의 항산화 작용

Phenylpropanoid 계열의 화합물은 벤젠기에 hydroxyl기와

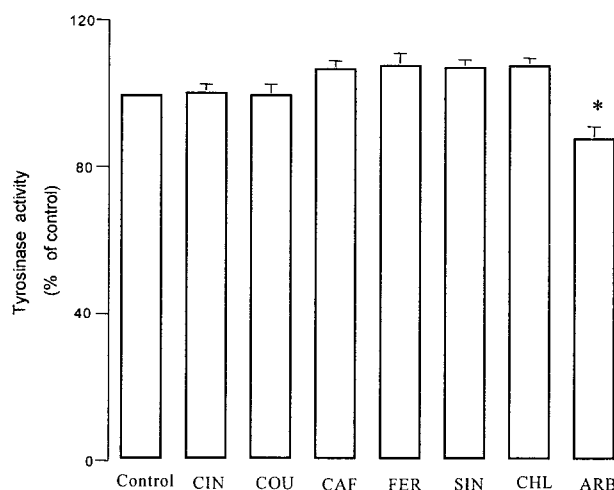


**Fig. 1** – Anti-oxidant effects of phenylpropanoids in the DPPH assay. A solution of 180  $\mu$ l of 100  $\mu$ M DPPH solution in ethanol was gently mixed with 20  $\mu$ l of 100  $\mu$ M phenylpropanoids (CIN: cinnamic acid; COU: coumaric acid; CAF: caffeic acid; FER: ferulic acid; SIN: sinapinic acid; CHL: chlorogenic acid) and 100  $\mu$ M ascorbic acid (ASC) for 30 min and the absorbance was measured at 517 nm. Results are means  $\pm$  SD from 3 separate experiments. \* Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

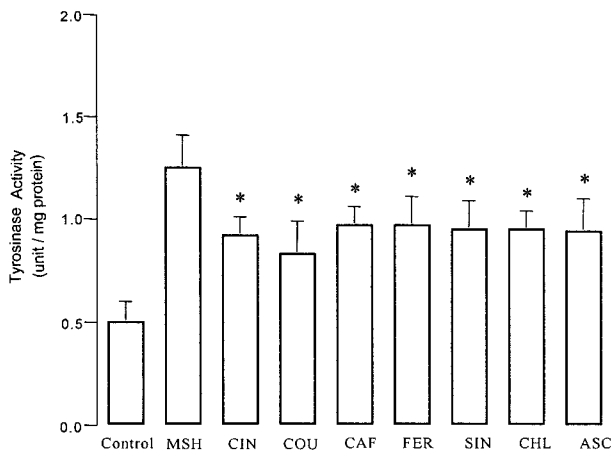
methoxy기를 갖는 물질로서 항산화 작용을 비롯하여 다양한 약리활성을 갖는 물질로 알려져 있다. 이러한 약리작용이 phenylpropanoid 화합물의 구조와의 상관성을 알기 위하여 DPPH를 이용한 항산화 작용을 관찰하였다. Fig. 1에서 있는 바와 같이 hydroxyl기를 2개 갖고 있는 caffeic acid와 그 유도체들은 강력한 항산화 작용이 나타났으나 cinnamic acid와 coumaric acid는 항산화작용이 미약하게 나타났다. 이중 caffeic acid가 가장 강하게 항산화 작용을 나타내고 있다. 식물로부터 분리한 caffeic acid 유도체와 5 종류의 phenylpropanoid는 cell-free 실험과 세포를 이용한 항산화 활성에서 모두 항산화 작용이 있다는 보고가 있다.<sup>8,9)</sup> 한편 caffeic acid의 항산화 능력은 vitamin C의 활성과 유사하게 나타나고 있으며 이러한 항산화 작용은 방향족 환에 hydroxyl기가 중요한 작용을 하는 것으로 사료된다.

### Phenylpropanoid의 미백 작용

Phenylpropanoid가 tyrosinase 활성에 직접적으로 작용하는지를 관찰하기 위하여 정제한 tyrosinase와 phenylpropanoid를 혼합한 후 tyrosinase 활성을 측정하였다. tyrosinase 억제제로 잘 알려진 arbutin(10  $\mu$ M)은 tyrosinase 효소의 기질 결합 부위(L-tyrosine 혹은 L-DOPA)에 경쟁적 억제제로서 작용하는 것으로 알려져 있다.<sup>10)</sup> Fig. 2에서 있는 바와 같이 arbutin(10  $\mu$ M)은 tyrosinase 활성을 직접적으로 억제하였지만 phenylpropanoid 화합물은 별다른 영향을 미치지 않았다. 그러나 Lim 등<sup>11)</sup>은 (1999) tyrosinase 활성 억제에 있어서 *p*-coumaric acid의 IC<sub>50</sub>가



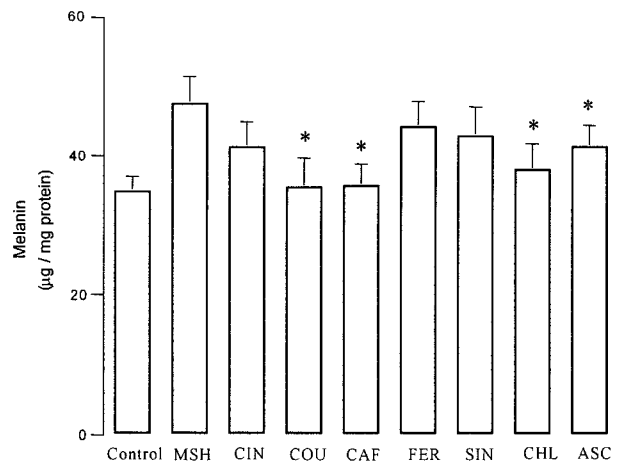
**Fig. 2** – Effects of phenylpropanoids on purified tyrosinase activity. Purified tyrosinase was mixed with 100  $\mu$ M phenylpropanoids (CIN: cinnamic acid; COU: coumaric acid; CAF: caffeic acid; FER: ferulic acid; SIN: sinapinic acid; CHL: chlorogenic acid) and 10  $\mu$ M arbutin (ARB) and incubated with 2 mg/ml of L-DOPA for 1 hr at 37°C. Results are means  $\pm$  SD from 3 separate experiments. \* Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).



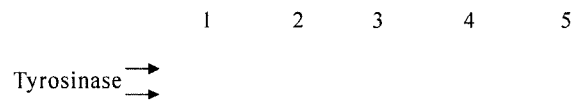
**Fig. 3** – Effects of phenylpropanoids on tyrosinase activity in 1  $\mu$ M MSH-stimulated B16 melanoma cells. The cells were incubated with 100  $\mu$ M phenylpropanoids (CIN: cinnamic acid; COU: coumaric acid; CAF: caffeic acid; FER: ferulic acid; SIN: sinapinic acid; CHL: chlorogenic acid) and 100  $\mu$ M ascorbic acid (ASC), and then stimulated with 1  $\mu$ M MSH. Results are means  $\pm$  SD from 4 separate experiments. \* Significantly different from MSH alone ( $p < 0.05$ ).

3.65 mM이라고 보고하였다. 이 농도는 이 실험에서 사용한 농도의 36배나 높은 농도로써 생리적인 활성을 나타내는 농도를 넘어선 범위이다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 phenylpropanoid 화합물은 tyrosinase 활성화에 직접적인 영향을 주지 않는 것으로 여겨진다.

한편 melanin을 생성하는 B16 melanoma 세포에서 phenylpropanoid가 미백 작용에 미치는 영향을 관찰하였다. melanocyte를 자극하는 MSH는 tyrosinase 활성을 2.4배 증가시켰다. MSH에 의한 tyrosinase 활성 증가에 있어서 phenylpropanoid 화합물은 모두 유의하게 억제하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 phenylpropanoid 화합물이 melanocyte에서 melanin 생성을 억제할 가능성을 제시하여 준다. melanin 생성에 있어서는 phenylpropanoid 모두 억제하는 양상을 보였으며, coumaric acid와 caffeic acid는 다른 phenylpropanoid에 비하여 더 많이 melanin 생성을 억제하였다(Fig. 4). 지금까지 phenylpropanoid 화합물의 미백효과에 대한 보고는 없는 실정이다. 다만 caffeic acid가 암세포인 melanoma의 분화와 관련되어 있다는 보고가 있다.<sup>12)</sup> Phenylpropanoid는 melanoma 세포에서 MSH에 의한 tyrosinase 활성화와 melanin 생성을 억제하는데 이러한 현상이 tyrosinase 발현 억제와 연관성이 있는지를 알기 위하여 tyrosinase 항체를 이용하여 세포내 tyrosinase 양을 관찰하였다. MSH는 대조군에 비하여 tyrosinase 발현을 증가시키는 것을 볼 수 있다. 그러나 phenylpropanoid는 MSH에 의한 tyrosinase 발현에 별 다른 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이러한 결과로 미루어 볼 때 phenylpropanoid가 melanin 생성을 억제하는 미백 작용은



**Fig. 4** – Effects of phenylpropanoids on melanin production in 1  $\mu$ M MSH-stimulated B16 melanoma cells. The cells were incubated with 100  $\mu$ M phenylpropanoids (CIN: cinnamic acid; COU: coumaric acid; CAF: caffeic acid; FER: ferulic acid; SIN: sinapinic acid; CHL: chlorogenic acid) and 100  $\mu$ M ascorbic acid (ASC), and then stimulated with 1  $\mu$ M MSH. Results are means  $\pm$  SD from 4 separate experiments. \* Significantly different from MSH alone ( $p < 0.05$ ).

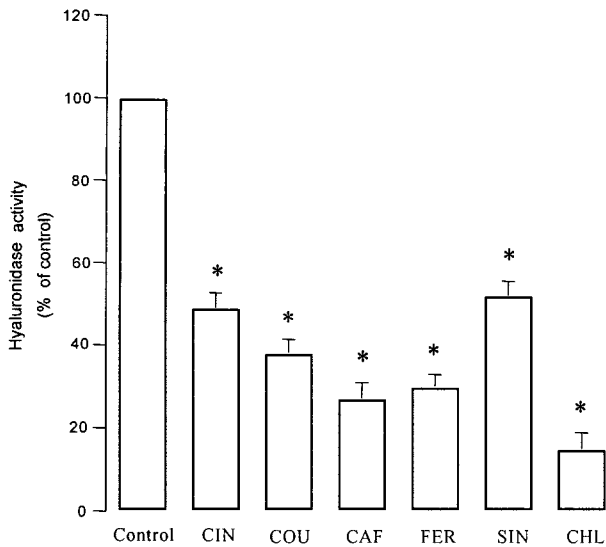


**Fig. 5** – Immunoblot of tyrosinase in MSH-stimulated B16 melanoma cells. B16 cells were treated for 48 hr with distilled water (lane 1), 1  $\mu$ M MSH (lane 2), 100  $\mu$ M caffeic acid plus 1  $\mu$ M MSH (lane 3), 100  $\mu$ M ferulic acid plus 1  $\mu$ M MSH (lane 4) and 100  $\mu$ M sinapinic acid plus 1  $\mu$ M MSH (lane 5). Total protein (20  $\mu$ g) was electrophoresed in a 8~20% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Specific detection of tyrosinase was performed with the polyclonal antibody against tyrosinase. Similar results were observed in three independent experiments.

tyrosinase 발현과는 무관하게 작용하는 하는 것으로 생각되며 아마도 다른 신호전달계 경로를 통해 tyrosinase를 억제함으로써 melanin 생성을 억제하는 것으로 사료된다. 앞으로 phenylpropanoid 화합물의 미백 효과에 대한 작용 기전은 더 연구해야 될 분야이다.

#### Hyaluronidase 활성에 미치는 phenylpropanoid의 영향

Hyaluronidase는 hyaluronic acid(an unbranched polysaccharide consisting of repeated  $\beta$ -D-glucuronic acid/ $\beta$ -N-acetyl-D-glucosamine disaccharide units)를 가수분해하는 효소이다. Hyaluronic acid는 피부나 연골조직의 세포외 기질(extracellular matrix)에 존재하는 구성 물질로 space-filling, structure-stabilizing, cell-coating과 같은 기능을 담당하며 피부의 보습 기능에

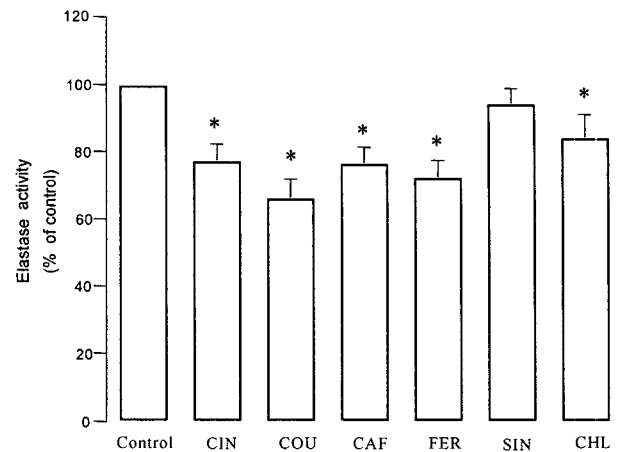


**Fig. 6** – Effects of phenylpropanoids on hyaluronidase activity. Purified hyaluronidase was mixed with 100  $\mu$ M phenylpropanoids (CIN: cinnamic acid; COU: coumaric acid; CAF: caffeic acid; FER: ferulic acid; SIN: sinapinic acid; CHL: chlorogenic acid) and then incubated with hyaluronic acid-agarose mixture for 4 hr at 37°C. Results are means  $\pm$  SD from 3 separate experiments. \* Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

있어서 중요한 작용을 하는 물질로 알려져 있다. 특히 hyaluronic acid는 자기보다 200배에 해당하는 수분을 함유할 수 있는 능력을 가진 물질로서 피부에서 이 물질의 감소는 피부가 건조되는 원인이 되기도 한다. Phenylpropanoid 화합물 모두는 hyaluronidase 활성을 모두 억제하였으며 이중 caffeic acid와 chlorogenic acid가 가장 강하게 억제하였다(Fig. 6). 이러한 작용은 방향족 환에 있어 hydroxyl기가 중요한 작용을 하는 것으로 사료되며 methoxyl 기로 치환시 hyaluronidase 억제 효과는 감소하는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 phenylpropanoid 화합물이 피부의 보습 작용에 있어서 우수한 효과를 나타내고 있음을 시사하여 준다.

#### Elastase 활성에 미치는 phenylpropanoid의 영향

피부 주름의 원인으로는 여러 가지가 있지만 결합조직 섬유소의 손상과도 많은 관련성이 있다. Elastin은 collagen이나 reticular fiber와 같이 결합조직 섬유소의 일종으로 조직의 탄력성을 나타내며 노란색을 띠고 있어 일명 yellow fiber로 불리는 물질이다. 특히 대동맥 같은 혈관에 많이 존재하므로써 혈관의 탄성력을 제공한다. 피부에서도 마찬가지로 이들 섬유소의 감소는 피부의 탄성력이 감소되는 결과를 초래하게 된다. Sinapinic acid를 제외한 phenylpropanoid 화합물 모두가 유의하게 elastase 활성을 억제하였다(Fig. 7). 이러한 결과는 현재 여러 종류의 cinnamic acid 유도체가 elastase 활성을 억제한다는 보고<sup>3,14)</sup>와 잘 일치하고 있다. 또한 phenylpropanoid 화합물이 라디칼에 의한 collagen fiber



**Fig. 7** – Effects of phenylpropanoids on elastase activity. Neutrophil elastase was mixed with 100  $\mu$ M phenylpropanoids (CIN: cinnamic acid; COU: coumaric acid; CAF: caffeic acid; FER: ferulic acid; SIN: sinapinic acid; CHL: chlorogenic acid) and then incubated with p-nitroanilide for 20 min at 37°C. Results are means  $\pm$  SD from 3 separate experiments. \* Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

의 손상을 억제한다는 보고<sup>15,16)</sup>로 미루어 볼 때 phenylpropanoid 화합물이 피부의 주름 제거에 있어서 우수한 효과를 나타내고 있음을 시사하여 준다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 phenylpropanoid 화합물은 항산화 작용을 갖고, 미백 및 보습작용을 모두 갖고 있음을 알 수 있다. 이러한 활성은 방향족 환에 hydroxyl기와 methoxyl기의 치환에 따라 다소 차이가 나타나고 있는데 특히 항산화 작용과 미백 및 보습 작용에 있어서 방향족 환에 hydroxyl기가 중요한 것으로 사료된다.

## 문 헌

- 1) Pierpoint, W. S. : Flavonoids in the human diet. In Plant flavonoids in biology and medicine, ed. by V. Cody, E. Middleton, Jr. and J. B. Harborne, pp. 125-140, Alan R. Liss Inc., New York (1986).
- 2) Ko, F., Huang, T. and Teng, C. : Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from apium graveolens in rat thoracic aorta. *Biochim. Biophys. Acta* **1115**, 69 (1991).
- 3) Duarte, J., Perez-Vizcaino, F., Zarzuelo, A., Jimenez, J. and Tamargo, J. : Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **239**, 1 (1993a).
- 4) Beretz, A., Stoclet, J. and Anton, R. : Inhibition of isolated rat aorta contraction by flavonoids. Possible correlation with cAMP phosphodiesterase inhibition. *Planta Medica* **39**, 236 (1980).
- 5) Duarte, J., Perez-Vizcaino, F., Utrilla, P., Jimenez, J., Tamargo, J. and Zarzuelo, A. : Vasodilatory effects of flavonoids in rat

- aortic smooth muscle. structure-activity relationships. *Gen. Pharmac.* **24**, 857 (1993b).
- 6) Sekiya, K. and Okuda, H. : Selective inhibition of platelet lipooxygenase by baicalein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**, 1090 (1982).
- 7) Ohkura, T., Yamashita, K., Mishima, Y. and Kobata, A. : Purification of hamster melanoma tyrosinase and structural studies of their asparagine-linked sugar chains. *Arch Biochem Biophys.* **Nov. 15**;235(1), 63 (1984).
- 8) Kayahara, H., Miao, Z. and Fujiwara, G. : Synthesis and biological activities of ferulic acid derivatives. *Anticancer Res.* **Sep-Oct**;19(5A), 3763 (1999).
- 9) Daels-Rakotoarison, D. A., Seidel, V., Gressier, B., Brunet, C., Tillequin, F., Bailleul, F., Luyckx, M., Dine, T., Cazin, M. and Cazin, J. C. : Neurosedative and antioxidant activities of phenylpropanoids from *ballota nigra*. *Arzneimittelforschung.* **Jan**;50(1), 16 (2000).
- 10) Maeda, K. and Fukuda, M. : Arbutin mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **Feb**;276(2), 765 (1996).
- 11) Lim, J. Y., Ishiguro, K. and Kubo, I. : Tyrosinase inhibitory p-coumaric acid from ginseng leaves. *Phytother Res.* **Aug**;13(5), 371 (1999).
- 12) Soballe, P. W. and Herlyn, M. : Cellular pathways leading to melanoma differentiation: therapeutic implications. *Melanoma Res.* **Aug**;4(4), 213 (1994).
- 13) Melzig, M. F., Loser, B. and Ciesielski, S. : Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. *Pharmazie.* **Dec**;56(12), 967 (2001).
- 14) Loser, B., Kruse, S. O., Melzig, M. F. and Nahrstedt, A. : Inhibition of neutrophil elastase activity by cinnamic acid derivatives from *Cimicifuga racemosa*. *Planta Med.* **Dec**;66(8), 751 (2000).
- 15) Kusano, A., Seyama, Y., Nagai, M., Shibano, M. and Kusano, G. : Effects of fukinolic acid and cimicifugic acids from *Cimicifuga* species on collagenolytic activity. *Biol. Pharm. Bull.* **Oct**;24(10), 1198 (2001).
- 16) Facino, R. M., Carini, M., Aldini, G., Saibene, L., Pietta, P. and Mauri, P. : Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: a potential use of Echinacea extracts in the prevention of skin photodamage. *Planta Med.*;61(6), 510 (1995).