

# 甘草水抽出물이 HM3KO 細胞의 멜라닌 생성에 미치는 영향

임숙정 · 임난영 · 이성원<sup>1</sup> · 광근신 · 안성훈 · 문연자 · 우원홍<sup>1\*</sup>

원광대학교 한의학전문대학원, 1: 원광대학교 한의과대학 해부학교실

## Effect of Glycyrrhizae Radix Water Extract on the Melanogenesis of Human Melanoma Cell

Sook Jung Im, Nan Young Lim, Sung Won Lee<sup>1</sup>, Gun Shin Kwak, Sung Hun Ahn, Yeun Ja Mun, Won Hong Woo<sup>1\*</sup>

*Department of Professional Graduate School of Oriental medicine, Wonkwang University,*

*1: Department of Anatomy, School of Oriental medicine, Wonkwang University*

This study was conducted to evaluate the effects of Glycyrrhizae Radix water extract, known as depigmenting agent, on melanin biosynthesis in the HM3KO human melanoma cells. The inhibitory effect of Glycyrrhizae Radix water extract on melanogenesis was identified by mushroom tyrosinase assay in vitro. To determine whether Glycyrrhizae Radix water extract suppress melanin synthesis in cellular level, HM3KO cells were cultured in the presence of different concentrations of Glycyrrhizae Radix water extract and the effects on cell proliferation, melanin contents and tyrosinase activity were examined after 3 days. Treatment with Glycyrrhizae Radix at various concentrations did not exhibit any change of cell viability, and increased the cell proliferation. And the water extract of Glycyrrhizae Radix inhibited melanin contents and tyrosinase activity in a dose-dependent manner, compared with untreated group.

These results suggest that the inhibitory effect of Glycyrrhizae Radix water extract on melanogenesis is due to the suppression of tyrosinase in HM3KO cells.

**Key words :** Glycyrrhizae Radix, melanogenesis, tyrosinase activity, melanin content

### 서 론

色素沈着과 皮膚 黒化 현상의 원인인 멜라닌은 자외선이나 외부 자극물질 등으로 부터 皮膚를 보호하는 긍정적인 기능을 가지고 있으나 과도한 색소침착은 미용적인 측면에서 부정적인 기능을 가지고 있다<sup>1-3)</sup>. 기미, 주근깨 등과 같은 과색소침착은 표피에서 비정상적으로 멜라닌 양이 증가된 것을 말하는 것으로 UV에 장기 노출, 불안정한 新陳代謝, 炎蒸, 유전적인 요인, 內分泌계 이상 등이 주요 원인으로 알려져 있으며<sup>4-6)</sup>, 멜라닌은 表皮(epidermis)에 존재하는 멜라닌 세포에서 합성되어 멜라닌 小體에 침착하고 樹枝狀突起를 통하여 角質細胞로 이동된다<sup>9-10)</sup>. 멜라닌 합성은 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase, tyrosinase-related

protein(TRP-1), dopachrome tautomerase(TRP-2)의 일련의 효소 반응에 의하여 생성되는데, 이 일련의 과정 중 tyrosinase는 처음 두 단계의 반응을 촉매하는 속도조절효소로서 중요한 역할을 한다<sup>9)</sup>. 따라서 tyrosinase 효소를 저해하거나 그 중간단계의 산화반응을 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시킬 수 있으며, 이러한 이유로 皮膚의 색소생성을 조절하는 많은 연구의 대부분이 tyrosinase의 효소적 조절에 초점이 맞추어져 왔다. 그러나 tyrosinase 저해제로 잘 알려진 hydroquinone, 4-hydroxyanisole 등은 강력하게 멜라닌 합성을 저해하지만 색소세포의 變性 또는 致死를 일으키고 세포본래의 기능을 손상시키는 등 부작용을 나타낸다. 따라서 세포독성이 낮고 멜라닌 생합성을 효과적으로 저해하는 물질은 멜라닌 관련 대사의 기초 연구뿐만 아니라 기존 멜라닌 합성 저해제의 대체 물질로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 甘草는 「神農本草經」에 最初로 收錄되어 上品으로 分類되었으며 味는 甘, 平, 無毒하며 五臟六腑의 寒熱邪氣 등을 治療

\* 교신저자 : 우원홍, 전북 익산시 신원동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원  
· E-mail : whwoo@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6845  
· 접수 : 2003/01/24 · 수정 : 2003/02/28 · 채택 : 2003/03/25

한다고 하였고 補氣藥類로 分類되어 補脾益氣·潤肺止咳·緩急止痛·清熱解毒·調和諸藥의 효능이 있어 소화장애에 의한 질환인 脾胃虛弱, 少食, 腹痛, 便瀉 등이나, 抗炎症 작용이나 潰瘍의 치료에 활용되어 왔다<sup>12,14-15</sup>). 또한 甘草는 세계에서 가장 오래 전부터 사용된 藥用植物의 하나로서 콩과(Leguminosae)에 속한 多年生草本인 우랄감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fischer et De Candolle)의 뿌리를 사용하며, glycyrrhizin, glycyrrhizin acid, isoflavone 화합물 등의 성분이 함유되어 있다<sup>11-13</sup>). 감초에 대한 연구로는 抗炎症作用, 抗潰瘍作用, 항알러지작용 등이 알려져 있으며<sup>16-18</sup>), 津液와 分割 및 成分 등의 많은 연구가 진행되어 Ishii 등<sup>19</sup>)는 glycyrrhizin을 함유하지 않은 FM 100분획이 鎮痙作用, 鎮痛作用을, 안 등<sup>20</sup>)은 抗菌活性을, 김 등<sup>21</sup>)은 抗酸化劑로서의 효과를 보고하였다.

최근 天然物을 이용하여 멜라닌색소와 관련된 많은 연구<sup>22-24</sup>)가 있으나, 이러한 연구의 기본이 되는 실험방법으로 활용된 버섯 tyrosinase의 활성억제는 동물세포에서 배양된 세포의 tyrosinase의 활성억제 효과와 일치하지 않는 경우가 종종 발견되고 있으며, 멜라닌의 형성과정에서 어떠한 기전에 의하여 이루어지는지 밝혀져 있지 않다. 특히 감초의 경우, 임 등<sup>25</sup>)은 유용성 甘草抽出液이 멜라닌세포의 증식을 억제하면서 멜라닌 생성을 감소시킴을 보고하였으나, 이러한 효과가 멜라닌의 형성과정에서 어떠한 기전에 의하여 이루어지는지는 밝혀져 있지 않다.

이에 본 연구는 甘草 水抽出물이 멜라닌 합성 과정에 미치는 영향을 알아보고자, HM3KO(human melanoma cell line)세포를 이용하여 멜라닌 생성과정에서 가장 중요한 효소인 tyrosinase의 활성도와 最終產物인 멜라닌 양을 측정하였고, 甘草 水抽出물의 멜라닌 합성 저해농도에서 세포 독성 정도를 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 試料의 抽出

甘草(*Glycyrrhizae Radix*; 서울 동대문구 한약유통) 100g에 물 1ℓ를 가하여 3시간 동안 끓인 후 거즈로 濾過하고 3,200 rpm으로 10분간 遠心分離하여 上層液을 취한 후 rotary vacuum evaporator로 減壓 濃縮시킨 다음, -70℃ freeze dryer로 동결건조시켜 31.6 g (수득율: 31.6%)의 시료를 얻었다. 시료는 세포에 투여하기 전 0.22 μm pore의 여과지로 멸균하여 실험농도에 알맞게 조정하여 다음 사용하였다.

### 2. 細胞培養

Human melanoma cell line HM3KO (Japan) 세포의 배양은 CO<sub>2</sub> 배양기 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco Co.)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM; Gibco)배지를 사용하였다. 여기에 penicillin-streptomycin (Sigma Chemical Co., USA) 100 I.U./ 50 μg/ml를 첨가하였다.

### 3. MTT assay

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 定量은 Mosmann이 방법<sup>26</sup>)을 변형하여 실시하였다. 감초 물추출물을 처리한 후 세포를 3일 배양한 후 상층액을 버리고 당일 제조한 MTT를 500 μg/ml가 되도록 배양 용기에 분주한 후 3 시간동안 배양하였다. 살아 있는 세포들은 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되었으며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10% DMSO를 200 μl씩 넣어 15 분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

### 4. 形態學的 變化

HM3KO 세포를 각 well에 1.5×10<sup>5</sup>cells 개씩 넣고 24시간 동안 세포를 안정화시킨 후 감초 물추출물을 농도별로 첨가하여 3일 배양한 inverted microscope (phase contrast, Leica Germany)을 이용하여 대조군과 실험군의 형태학적 변화를 관찰하였다.

### 5. 細胞 增殖에 미치는 影響

HM3KO 세포에 감초 물추출물을 처리한 다음 3일 후 trypsin/ethylenediamine tetraacetic acid을 처리하여 세포를 收集하였다. 收集된 세포들은 Fuchs-Rosenthal cytometer를 이용하여 세포 수를 계산하였다.

### 6. 試驗管 內 tyrosinase 활성도 측정

試驗管 內 tyrosinase 활성도는 DOPAchrome 방법<sup>27</sup>)에 의하여 측정하였다. 2.5mM L-tyrosine 용액 및 각 감초 물추출물의 농도에 sodium phosphate buffer(pH 7.0)의 混合液에 150 unit 버섯 tyrosinase (Sigma)를 첨가하여 ELISA reader로 37℃, 405nm의 조건에서 吸光度의 變化를 30분 동안 관찰하였다.

### 7. Tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도는 Matinez-Esparza의 방법<sup>28</sup>)에 의하여 측정하였다. 각 well의 세포를 收穫하고 遠心分離하여 細胞 沈澱物을 만들고, 100 μl 細胞 溶解液(1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate(pH 7.0), 0.1mM PMSF)를 넣고 4℃에서 30분간 방치하여 세포를 破壞시킨 후 遠心分離하여 上層液만을 tyrosinase의 효소용액으로 사용한다. 100mM sodium phosphate (pH 7.0) 100 μl에 효소용액 50 μl를 넣어 30℃ water bath에서 5분간 보온한 후 100 mM catechol 50 μl를 넣고 ELISA reader로 37℃, 475 nm의 조건에서 吸光度의 變化를 1 시간 동안 관찰하였다.

### 8. 細胞의 멜라닌 量 측정

細胞를 培養하여 수집한 다음 Fuchs-Rosenthal cytometer로 세포 수를 계산하고 遠心分離하여 收穫하였다. 收穫된 세포의 pellets는 10% DMSO가 첨가된 1M NaOH 용액을 100 μl 첨가하여 100℃에서 10분 용해하였으며, 475 nm에서 吸光度를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌 (Sigma)을 사용하여 작성된 표준 직선에서 구하였다<sup>29</sup>).

9. 통계방법

실험결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 각 실험군은 대조군과 비교하여 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 이용하였다.

결 과

1. 감초 물추출물이 세포생존율에 미치는 영향

감초 물추출물이 세포의 생존율에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 감초 물추출물을 50 µg/ml에서 500 µg/ml까지의 농도로 HM3KO melanoma 세포에 처리하고 3일 동안 배양한 후 MTT 방법을 이용하여 세포 생존율을 관찰하였다. 그 결과 감초 물추출물에 의한 세포 생존율의 변화는 나타나지 않았으며, 가장 고농도인 500 µg/ml 농도에서도 세포의 생존율에 큰 변화는 나타나지 않았다(Fig. 1).

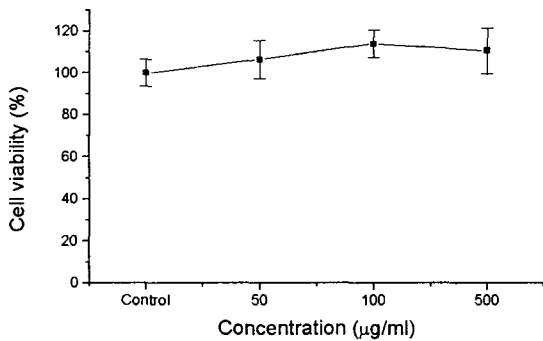


Fig. 1. Effect of Radix Glycyrrhizae on the viability of HM3KO melanoma cells. Cells were seeded at 1.5×10<sup>4</sup>cells/well. After 1 d, the cells were treated with various concentration of Radix Glycyrrhizae for 3 d. The cell proliferation was measured by MTT assay. Data are expressed as % of control and each column. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \* P < 0.01.

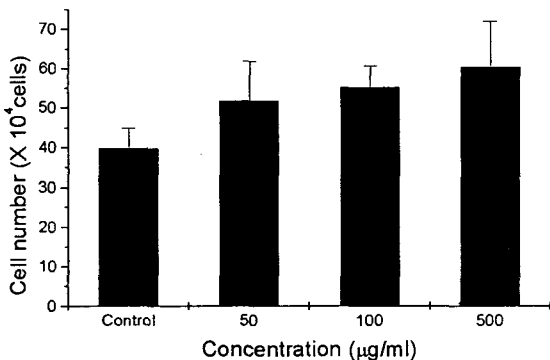


Fig. 2. Effect of Radix Glycyrrhizae on the cell number. The cells were cultured in the presence of various concentrations of water extract for 3 d. The cell number was counted with a Fuchs-Rosenthal cytometer. Data were mean ± S.D of at least three determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \* P < 0.05.

2. 감초 물추출물이 세포증식에 미치는 영향

세포증식에 미치는 감초 물추출물의 영향을 조사하기 위하여 감초 물추출물을 50 µg/ml에서 500 µg/ml까지의 농도로 HM3KO melanoma 세포에 처리한 후, 3일 동안 배양하였다. 감초 물추출물에 의한 세포증식에 대한 변화는 대조군에 비해 각각 51.8 ± 10.0, 55.5 ± 5.3 그리고 60.6 ± 11.4 × 10<sup>4</sup> cells로 농도에 의존적으로 세포수가 증가하였다(Fig. 2).

3. 세포의 형태학적 변화

감초 물추출물이 세포의 형태학적 변화에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 감초 물추출물을 100 µg/ml와 500 µg/ml 농도로 HM3KO melanoma 세포에 처리한 후 3일 동안 배양하였다. 형태학적인 변화는 inverted microscope를 이용하여 관찰하였다. 형태학적 변화를 대조군과 실험군을 비교하여 관찰하였을 때 농도가 높을수록 멜라닌 세포의 밀도는 점점 증가하였지만 세포질이나 수지상돌기 등의 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

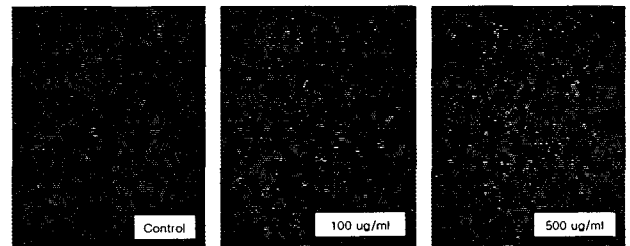


Fig. 3. Morphology of HM3KO human melanoma cells. HM3KO cells were incubated for 3 d with 100 µg/ml, 500 µg/ml Radix Glycyrrhizae. Morphology of treated cells were compared to untreated control under the inverted microscopy.

4. 시험관 내 tyrosinase 활성도에 미치는 영향

시험관 내 tyrosinase 활성도는 L-tyrosine을 기질로 하여 버섯 tyrosinase에 의하여 생성되는 반응산물인 dopachrome의 생성정도를 흡광도로 측정하는 것으로서 감초 물추출물은 농도 의존적으로 버섯 tyrosinase 활성을 억제하였다(Table 1).

Table 1. Effect of Radix Glycyrrhizae on mushroom tyrosinase.

Concentration	OD value
Control	0.403±0.01
감초추출물 50 µg/ml	0.345±0.01
감초추출물 100 µg/ml	0.296±0.03
감초추출물 200 µg/ml	0.258±0.03
감초추출물 300 µg/ml	0.216±0.01

Data were mean ± S.D of at least three determinations.

5. Tyrosinase 활성도에 미치는 영향

감초 물추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 멜라닌 합성 과정중 속도조절 효소로 작용하는 tyrosinase의 활성도를 측정하였다. 감초 물추출물을 50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml 농도로 처리하고 3일 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다. 감초 물추출물 처리시 HM3KO melanoma 세포의 tyrosinase 활성은 대조군과 비교시 50 µg/ml 농도에서는 87.5±3.5% 그리고 500 µg/ml 농도에서는 83.1 ± 2.4%로 감소하였다. 이는 감초 물추출물이 tyrosinase 활성을 억제함으로써 최종

멜라닌 생합성 양이 줄어들 것으로 생각된다. 따라서 멜라닌 생합성의 최종 단계에서 생성되는 멜라닌 양을 직접 측정하였다 (Fig. 4).

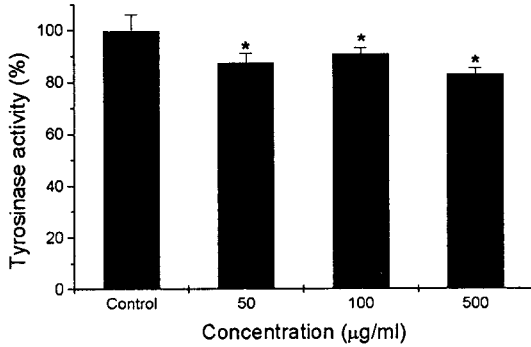


Fig. 4. Effect of Radix Glycyrrhizae on the tyrosinase activity. The effect on tyrosinase activity was tested with various doses of Radix Glycyrrhizae in HM3KO human melanoma cells for 3 d. Data are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.D. of at least three determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \* P < 0.05.

6. 멜라닌 생성에 미치는 영향

감초 물추출물을 HM3KO 세포에 다양한 농도로 처리하고 3 일 동안 배양한 다음 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. 그 결과 감초 물추출물 처리시 HM3KO melanoma 세포의 멜라닌 양은 50 µg/ml에서 3.5±0.4, 100 µg/ml에서 3.3±0.6 그리고 500 µg/ml에서 3.41±0.3 µg/ml로서 대조군의 4.4±0.4 µg/ml보다 억제되었음을 확인하였다(Fig. 5).

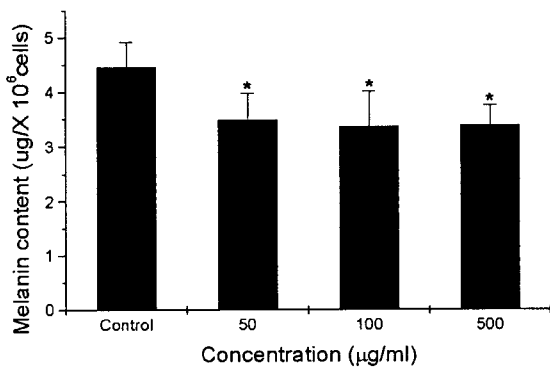


Fig. 5. Effect of Radix Glycyrrhizae on the melanin content. HM3KO cells were treated with various concentrations of Radix Glycyrrhizae (50 - 500 µg/ml) for 3 d. Data are expressed as µg per 10<sup>6</sup> cells and each column represents the mean ± S.D. of three determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \* P < 0.05.

고찰

피부는 推動作用 · 溫照作用 · 防禦作用 · 固攝作用 · 氣化作

用 등의 기능으로 외부환경으로부터 인체를 保護하거나 외부 環境을 인체로 傳達해주는 媒介的 意味과 외부와의 圓만한 適應을 유도해내는 역할을 담당하는데, 예를 들면 태양광선에 노출이 되면 vitamin D를 합성하지만 장기노출은 오히려 피부암이나 기미·주근깨 등과 같은 과색소침착증이 유발된다<sup>30-33</sup>. 그러므로 과거에서부터 현재에 이르기까지 멜라닌 억제 물질을 개발하는데 많은 관심이 기울어져 왔으며<sup>34-35</sup>, 주로 tyrosinase 저해제 개발에 집중되어, tyrosinase 활성 부위의 구리 이온에 대한 킬레이트 형성물질, quinone류를 phenol류로 還元시키는 작용을 하는 ascorbic acid 등의 還元劑, tyrosinase 자체를 변성시키는 bisulfites 제제 등이 대표적이다. 그러나 ascorbic acid는 불안정하고, hydroquinone, 4-hydroxyanisole 등은 강력한 멜라닌 합성 저해작용을 지니지만 세포독성이 심하여 부작용을 나타내는 단점이 있다<sup>36-38</sup>. 감초가 피부에 미치는 영향으로는 임 등<sup>25</sup>이 정상 인체 멜라닌 세포에서 천연 감초 추출액과 유용성 감초 추출액이 세포증식을 억제하였으며, 천연 감초 추출액은 멜라닌화를 증가시켰고, 유용성감초 추출물은 항 멜라닌효과가 있다고 보고하였다. 그러나 이러한 효과가 멜라닌의 형성과정에서 어떠한 기전에 의하여 이루어지는지는 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 감초가 멜라닌 형성과정에 미치는 영향을 詳細히 고찰하여 HM3KO 세포에 감초 물추출물을 처리한 결과 유의하게 최종 멜라닌 생성을 억제하였음을 확인하였는데, 이는 감초 추출액 제조 용매와 세포주의 차이에 의한 것으로 사료된다.

멜라닌 생성 억제는 세포 독성으로 인한 細胞死滅 과정에 의해 영향을 받을 수 있으며, 임 등<sup>25</sup>의 결과에서도 천연 감초 추출액은 정상 멜라닌세포에 세포독성으로 인한 강력한 세포증식 억제제로 細胞分化를 유도하여 멜라닌 양이 증가한 것으로 보고하였다. 따라서 HM3KO 세포에서 감초 물추출물의 멜라닌 생성억제 효과가 세포 사멸로 인한 것인지를 알아보기 위하여 세포 생존율 및 세포증식에 미치는 영향을 조사하였다. HM3KO 세포에 감초 물추출물을 농도별로 처리하여 MTT 검색법으로 측정된 결과 500 µg/ml 농도까지 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으며 (Fig.1), 세포 증식은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 2).

멜라닌의 생합성은 주로 tyrosinase의 작용에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있는데, L-tyrosine으로부터 DOPA로 hydroxylation, DOPA에서 DOPAquinone으로의 산화, DOPA-quinone에서 DOPochrome의 생성, DOPochrome에서 DHI (5,6-dihydroxyindole)와 DHICA(5,6-dihydroxyindole carboxylic acid)로 전환에 의해서 생합성되며 tyrosinase는 처음 두 단계의 반응을 觸媒한다<sup>8-10</sup>. 또한 Mishima 등<sup>39</sup>은 멜라닌 생성 억제 물질을 두 가지 형태로 분류하였는데, 그 하나는 멜라닌 생성의 속도조절효소인 tyrosinase 효소를 직접 억제하는 것이며, 또 하나는 멜라닌세포 내에서 tyrosinase 합성 억제, tyrosinase 당쇄수식에 의한 성숙과정의 저해, 세포독성 등의 과정을 통하여 멜라닌을 억제하는 것이다. 본 연구에서도 시험관 내에서 감초 물추출물의 버섯 tyrosinase 활성 억제효과를 조사한 결과 매우 효과적으로 버섯 tyrosinase 활성을 억제하였는데 (table 1), 이는 감초

물추출물이 tyrosinase에 직접적으로 작용하여 활성을 억제하였음을 의미하며, HM3KO 세포에서도 tyrosinase 활성이 억제됨이 확인되었다(Fig. 4).

이상의 결과 감초 물추출물은 HM3KO 세포의 생존율에 영향을 주지 않으며 세포 사멸에 의한 멜라닌 생성 억제가 아닌 tyrosinase의 활성을 억제시킴으로써 멜라닌 생성을 감소시킴을 알 수 있었으며, tyrosinase-related protein(TRP-1), dopachrome tautomerase(TRP-2) 효소의 활성에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

감초 물추출물이 사람에게서 유래된 melanoma 세포인 HM3KO 세포에서 멜라닌 생성 억제 효과를 조사하기 위하여 감초 물추출물을 처리한 후 細胞의 生存率, 形態學的 變化, 細胞增殖, tyrosinase 活性程度 및 멜라닌 量의 變化를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 감초 물추출물 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 처리 후 3일 배양한 HM3KO 세포의 생존율은 113%이었으며 세포증식 또한 대조군과 비교시 농도에 의존적으로 증가하였으며, 세포의 형태적 변화에도 영향을 주지 않았다. 멜라닌 합성과정중 가장 중요한 효소인 tyrosinase 활성도를 측정한 결과 대조군에 비하여 처리군의 tyrosinase 활성도가 억제되었으며, 멜라닌 생성은 tyrosinase 활성도와 마찬가지로 감소하였다.

이상의 결과 감초 물추출물은 HM3KO 세포의 생존율과 증식에 영향을 미치지 않으면서 멜라닌 생합성에 가장 중요한 효소인 tyrosinase를 非活性化 시킴으로써 멜라닌 생성을 억제시킨 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건 의료 기술 연구 개발 사업(02-PJI-PC4-PT05-0003)과 BK 21 사업의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Weixiong L, Helene ZH : Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Phytochem, Photobiol.* 65, pp. 480, 1997.
- Kaufman RJ : Vectors used for expression in mammalian cells. *Meth. In. Enzymol.* 205, 87, 1991.
- Kameyama K, Takemura T, Hamada T, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S : Pigment reduction in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP 1), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermol.* 100, 126, 1993.
- Sugai T : Clinical effects of arbutin in patients with chloasma in Japanese. *Hifu. Skin Res.* 34, pp. 522-529, 1992.
- Kim CW : Experimental study on the hyperpigmentation of skin graft. *Plast Reconstr. Surg.* 85, 162, 1990.
- Mishima Y, Imokawa G : Selective aberration and pigment loss in melanosomes of malignant melanoma cells in vitro by glycosylation inhibitors; Premelanosomes as glycoprotein. *J. Invest. Dermatol.* 81, pp. 106-114, 1983.
- Imokawa G, Mishima Y : Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res.* 42, pp. 1994-2002, 1982.
- Hearing VJ : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 4, pp. 24-28, 1999.
- Fitzpatrick TB, Szabo G, Seiji M, Quevedo WC : Biology of the melanin pigmentary system. In: Fitzpatrick TB, ed., *Dermatology in General Medicine.* Academic Press, New York, pp. 131-163, 1979.
- Jimbow K, Fitzpatrick TB, Wick M : Biochemistry and physiology of melanin pigmentation. In: Goldsmith LA, ed., *Physiology and Molecular Biology of the Skin.* Oxford Univ. Press, New York, pp. 873-909, 1991.
- 吳普 述著 : 神農本草經, 서울: 醫聖堂. pp. 12, 1994.
- 辛民教 : 臨床本草經, 서울: 水林社. pp. 172, 179, 188, 649, 1997.
- 한국 약용식물학 연구회저 : 종합 약용식물학, 학창사, p. 197, 2001.
- 鄭普燮 외 : 향약대사전, 서울, 영림사, pp. 684-687, 1990.
- 辛民教 외 : 본초방제화연구, 서울, 영림사, pp. 8-9, 2000.
- Hsiang CY, Lai IL, Chao DC, Ho TY. Differential regulation of activator protein 1 activity by glycyrrhizin. *Life Sci.* 70(14), pp. 1643-56, 2002.
- Narita M, Nagai E, Hagiwara H, Aburada M, Yokoi T, Kamataki T. Inhibition of beta-glucuronidase by natural glucuronides of kampo medicines using glucuronide of SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) as a substrate. *Xenobiotica.* 23(1), pp. 5-10, 1993.
- Shibata S. A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Yakugaku Zasshi.* 120(10), pp. 849-862, 2000.
- Ishii, Y. Mechanism of gastric antisecretory activity of a new fraction of licorice root (FM100). *Jpn J Pharmacol.* 20(1), pp. 71-9, 1970.
- Ahn EY, Shin DH, Baek NI, Oh JA : Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 30(3), pp. 680-687, 1998.
- Kim HW, Cho SI, Lee YT, Kim IR : Effect of Radix *Glycyrrhizae* on antioxidative activities in Sijunzi-Tang.

- Kor. J. Herbology. 14(2), pp. 13-22, 1999.
22. Yang MJ, Kim MG, Lim SJ, Ann HS, Ahn RM : Inhibitory effects of water-acetone extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis. *Yakhak Hoeji*. 43(4), pp 494- 501, 1999.
  23. Lee NH, Lee SJ, Jung DS, Bu HJ, Yang HC, Riu KZ : Screening of the Tyrosinase Inhibition and Hyaluronidase Inhibition Activities, and Radical Scavenging Effects Using Plants in Cheju. *Kor. J. Pharmacogn*. 32(3) pp. 175-170, 2001.
  24. Choi SS, Noh HS, Cho SH, Kong KH : Screening of Inhibitors against Tyrosinase Activity from Natural Products. *Yakhak Hoeji*, 45(5) pp. 522-528, 2001.
  25. Lim TW, Lee JW, Lee MH : Effects of licorice extract on proliferation and melanization in cultured normal human melanocytes.
  26. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods*. 65, pp. 55, 1983.
  27. No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T , Chung HY : Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Science*. 65(21) pp. 241-246, 1999.
  28. Matinez-Esparza M : Mechanisms melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- $\alpha$  in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem*. 225, 139, 1998.
  29. Oka M, Ichihashi M, Chakraborty AK : Enhanced expression of protein kinase C subspecies during stimulation of melanogenesis in B16 mouse melanoma cells. *J. Invest. Dermatol*. 106 pp. 377-8, 1996.
  30. 이혁 조성태 공편저 : 한방미용화개론. 청구문화사, pp. 111-149, 1995.
  31. Weixiong L, Helene ZH : Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Photochem, Photobiol*. 65(3), 480, 1997.
  32. Kaufman RJ : Vectors used for expression in mammalian cells. *Meth. In. Enzymol*. 205, 87, 1991.
  33. Kameyama K, Takemura T, Jamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S : Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1(TRP-1), dopachrome tautomerase(TRP-2) and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol*. 100, 126, 1993.
  34. Kim CW : Experimental study on the hyperpigmentation of skin graft. *Plast Reconstr. Surg*. 85, 162, 1990.
  35. Mishima Y, Imokawa G : Selective aberration and pigment loss in melanosomes of malignant melanoma cells in vitro by glycosylation inhibitors; Premelanosomes as glycoprotein. *J. Invest. Dermatol*. 81, pp. 106-114, 1983.
  36. Maeda K, Fukuda M : In vivo effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc. Cosmet. Chem*, 42, 361, 1991.
  37. Dawley RM, Flurkey WH : 4-hexylresocinol, a potent inhibitor of mushroom tyrosinase, *J. Food. Sci*. 58, 609-610, 1993.
  38. Tomita KN, Oda N, Kamel M, Miyaki T, Oki T : A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiot*. 12, 1601-1605, 1990.
  39. Mishima Y, Hatta S, Ohyama Y, Inazu M : Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res*. 1(6), pp. 367-74, 1988.