

감초 물추출물의 멜라닌 형성 억제효과

문연자* · 김 진 · 임난영 · 이승연 · 곽 섭 · 황충연 · 우원홍

원광대학교 한의화전문대학원 한약자원개발학과

Inhibitory Effect on Melanogenesis of Radix Glycyrrhizae Water Extract

Yeun Ja Mun*, Jin Kim, Nan Young Lim, Seung Yon Lee, Gwak Seop, Chung Yeon Hwang, Won Hong Woo

Department of Herbal Resources, Professional Graduate 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 cellular level. The inhibitory effect of Glycyrrhizae Radix water extract on melanogenesis was identified by mushroom tyrosinase assay. To determine whether Glycyrrhizae Radix water extract suppress melanin synthesis in cellular level, B16 mouse melanoma cells were cultured in the presence of different concentrations of Glycyrrhizae Radix water extract. The maximum concentration of Glycyrrhizae Radix water extract that was not inhibitory to growth of the cells was 2 mg/ml. At that concentration, melanin synthesis was significantly inhibited without cytotoxicity after 5 days, compared with untreated cells. The treatment with Glycyrrhizae Radix water extract reduced tyrosinase and DOPAchrome tautomerase activity in a dose-dependent manner. These results suggest that the inhibitory effect of Glycyrrhizae Radix water extract on melanogenesis is due to the suppression of tyrosinase and DOPAchrome tautomerase activity

Key words : Glycyrrhizae Radix, melanogenesis, tyrosinase, DOP Achrome tautomerase

서 론

감초는 《神農本草經》에 최초로 수록되어 上品으로 分類되었으며, 傷寒論 處方 110方中 74方에 들어있는 중요한 生藥으로, 未는 甘平하며 五臟六腑의 寒熱邪氣등을 치료한다 하였고¹⁾, 현대적 의미로는 補氣藥類로 분류되어 補裨益氣 潤肺止咳 緩給止痛 清熱解毒의 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 감초의 약리작용은 일반적으로 항염작용, 항궤양작용, 항알러지작용 등과 간염, 동맥경화증, 항종양효과, 항바이러스효과 등이 알려져 있으며^{2,4)}, 엑기스와 분획 및 성분 등의 많은 연구가 진행되어 주성분 중의 하나인 glycyrrhizin의 항염증, 해독 및 steroid 유사작용이 보고되었고⁵⁾, Ishii (1970)는 glycyrrhizin을 함유하지 않은 FM 100분획이 진경작용, 진통작용이 있음을 보고하였다⁶⁾. 멜라닌은 주로 표피의 기저층(basal layer) 사이나 기저층의 아래 그리고 탈주머니에 위치하고 있는 멜라닌세포(melanocyte)에서 합성되는데, 세포소기관인 멜라닌소체(melanosome)에서 이루어지며, 이 멜라닌소체는 수상돌기

를 통하여 부근에 인접되어 있는 각질화세포(keratinocyte)로 이동하고, 각질화세포가 외피로 부상하면서 피부색을 나타내게 된다^{7,8)}. 여러 가지 피부질환은 표피의 색소가 과도하게 축적된 결과로서 melasma, age spots, liver spots, sites of actinic damage 등을 포함한다⁹⁾. 멜라닌 합성과정은 주로 1980년대까지 Raper-Mason Pathway인 L-tyrosine으로부터 DOPA, DOPAquinone, DOPAchrome, DHI(5,6-dihydroxyindole) 을 거쳐 최종적으로 합성되는 것으로 알려졌다¹⁰⁾. 그러므로 전통적으로 멜라닌 생성(melanogenesis) 조절 물질에 대한 연구는 멜라닌 합성 경로의 속도 조절 단계를 촉매하는 효소인 tyrosinase에 영향을 주는 인자에 초점을 두었으나, 1980년대 이후 피부암 관련 연구그룹에 의해 DOPAchrome이 DHI로 전환되는 경로 외에 DOPAchrome tautomerase 작용에 의해 DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)로 전환되는 새로운 경로가 존재한다는 사실이 밝혀졌다^{11,12)}. 일반적으로 멜라닌 생성 억제제는 멜라닌세포내의 tyrosine이 일련의 산화환원반응을 거쳐 생합성 되는 멜라닌을 피부 내에서 감소시키기 위한 것으로 피부 내 멜라닌색소함량을 줄이기 위해서는 여러 가지 접근이 가능하다¹³⁻¹⁶⁾. 피부의 멜라닌 형성에 미치는 영향에 대한 실험적 연구로는 부 등¹⁷⁾은 솔잎 추출 성

* 교신저자 : 문연자, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의화전문대학원
E-mail : yjmun@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-5963
· 접수 : 2002/09/23 · 수정 : 2002/10/30 · 채택 : 2002/12/05

분 중 4-hydroxy-5-methyl-3-[2H]-furanone의 멜라닌생성 억제작용을 박 등^{18,19)}은 백출과 서시옥용산이 c-Jun N-terminal kinase(JNK) 활성과 AP-1 전사활성인자(transcriptional activator)를 불활성화시켜 멜라닌 量의 生成을 抑制시킨 것으로 보고하였으나 멜라닌 생성 조절 기전에 대한 연구는 아직 미미한 수준이다. 최근 감초가 미백효능이 있는 물질로 알려졌으나, 세포 내에서 그 작용 기전은 정확하게 밝혀져 있지 않으므로 이에 저자는 현재 미백제로 응용되고 있는 감초의 멜라닌 생성 억제 작용을 확인하고, 그 작용 기전을 밝히기 위하여 세포의 멜라닌 합성 경로에서 tyrosinase와 Dopachrome tautomerase (TRP-2)에 대한 효과를 조사하였다. 먼저 미백제의 screening test로 일반적으로 이용되고 있는 버섯 tyrosinase assay를 통해 감초 물추출물의 멜라닌 생성 억제효과를 확인하였고, B16 mouse melanoma 세포에서 최종 멜라닌양을 측정하고, tyrosinase 활성도와 Dopachrome tautomerase의 활성도에 미치는 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 제조

본 실험에 사용한 감초 물추출물은 원광대학교 부속 한방병원에서 구입하였으며, 감초 물추출물 100g에 물 1 l 를 가하여 3 시간 동안 끓인 후 거즈로 여과하고 3,200rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. -70℃에서 freeze dryer로 동결건조시킨 후 31.6g의 試料(수득률: 31.6%)를 얻었다. 試料는 세포에 투여하기 전 0.22 μ m pore의 여과지로 멸균하여 사용하였다.

2. B16 세포주 배양

B16 mouse melanoma 세포의 배양은 CO₂ 배양기(37℃, 5%)에서 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium(DMEM, Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지를 이용하여 약 48시간 주기로 배양액을 교체하여주었다.

3. 세포 증식 측정

細胞를 배양판(6 cm dish)에 well당 1x10⁵ 씩 분주한 후 24시간 培養하여 배양용기에 細胞를 부착하였다. 감초 물추출물을 각 농도별로 처리하고 5일간 배양하였고, 배양 완료후 각 well에 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액을 가하여 세포를 분리 수거하고, PBS로 2회 세척 한 후 Fuchs-Rosenthal cytometer(Germany)를 이용하여 각 well 당 B16 세포수를 세어 증식상태를 측정하였다.

4. 시험관 내 Tyrosinase 활성도 실험

시험관 내 tyrosinase의 활성은 Mason and Peterson(1965) 등²⁰⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.1M phosphate buffer(pH 6.8) 160 μ l, 기질 3 mM L-tyrosine 수용액 10 μ l, 시료 20 μ l를 혼합하였다. 여기에 2500 U/ml mushroom tyrosinase 10 μ l를 가하고 잘 혼합한 후 37℃에서 30분간 배양하면서 매 10분 마다 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 sample 대신 증류수를 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성율 (\%)} = \frac{B - B'}{A - A'} \times 100$$

A : 대조군의 반응 후 흡광도, A' : 대조군 용액 중 tyrosinase 대신 buffer가 첨가된 용액의 반응 후 흡광도, B : 시료가 첨가된 용액의 흡광도, B' : 시료가 첨가된 용액중 tyrosinase 대신 buffer가 첨가된 용액의 반응 후 흡광도

5. 세포내 멜라닌 정량(Melanin content) 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등²¹⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양세포는 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척, 원심분리하여 수확하였다. 세포침전물에 5% Trichloroacetic acid 1ml를 첨가한 후, 원심분리하여 침전물을 수확하였다. Ethanol : Ether(3:1) 용액과 Ether로 씻어낸 후 Acid-insoluble material을 얻기 위해 1N NaOH 300 μ l를 넣어 100℃에서 10분 동안 처리하여 용해시켰다. 475nm에서 흡광도를 측정하였으며 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma chemical Co.)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

6. 세포내 Tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도는 Martinez-Esparza M 등²²⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 멜라닌세포를 수확하여 세포침전물을 만들고, 100 μ l 세포용해액(lysis buffer; 1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)을 넣고 4℃ 얼음에서 30분간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴시킨 후 원심분리하여 상등액을 취하여 tyrosinase 활성측정용액으로 사용하였다. 50 μ l의 상등액에 100mM sodium phosphate(pH 7.0) 100 μ l를 넣고 30℃ 물중탕기에서 5분간 보온한 후 100mM catechol 50 μ l를 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37℃, 405nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

7. DOPAchrome tautomerase 활성 측정

DT 활성은 DOPAchrome을 기질로하여 Korner and Pawelek의 방법²³⁾에 의해 측정하였다. DOPAchrome은 Ag2O와 ice-cold L-DOPA(0.75 mg/ml, sodium phosphate buffer, 0.1 M, pH 6.8)을 약 1분간 혼합한 후, 여과 (0.2 μ m diameter pore)하여 합성하였다. 이 혼합액에 phenylthiourea (0.1 M)을 처리하여 실험결과에 영향을 줄 수 있는 endogenous tyrosinase 활성을 억제하였다. 표준치(standard assay)는 0.1 ml DOPAchrom, 0.2 ml sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8), 0.1 mg protein cell extract 혼합액을 사용하여, 405nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

8. 광학현미경적 관찰

세포의 형태적은 배양완료후 Inverted Microscope(phase contrast, Leica, Germany)를 이용하여 관찰하였다.

결 과

1. 감초 물추출물의 시험관 내 tyrosinase 효소 활성 억제 효과

버섯 tyrosinase를 이용한 시험관 내 tyrosinase 활성도는 현재까지 멜라닌 생성 조절물질에 대한 screening test로 많이 이용되고 있다. 본 실험에서 버섯 tyrosinase 활성 억제 실험 결과 감

초 물추출물은 농도 의존적으로 버섯 tyrosinase의 활성을 억제하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군의 73.4%로, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 64%, 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 44.4%로 억제되었고, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 대조군의 1%로 거의 완전히 억제되었다. 따라서 감초 물추출물은 in vitro에서 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 1).

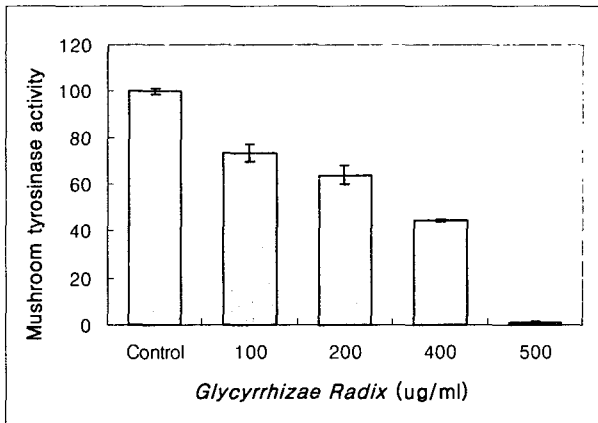


Fig. 1. Inhibitory effect of Radix glycyrrhizae water extract on tyrosinase in vitro. Using mushroom tyrosinase assay were carried out with tyrosine as substrate dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8), and each extract was added various concentration.

2. 감초 물추출물이 B16 세포의 증식에 미치는 효과

세포수준에서 멜라닌 생성을 억제하기 위해서는 세포독성이 없이 멜라닌 생성을 감소시키는 것이 바람직하다. 따라서 감초 물추출물의 처리농도에 따라 B16 세포에 미치는 영향을 조사한 결과, 대조군의 세포 증식율을 100%로 하였을 때, 감초 물추출물을 농도별로 3일 동안 처리한 경우, 0.1, 0.5 mg/ml 농도에서는 세포 증식은 대조군과 비슷하였으나, 1 mg/ml 농도에서 115.1%로 약간 증가하였고, 2 mg/ml 농도에서는 106.5%로 대조군과 비슷하였다. 또한 감초 물추출물을 5일 동안 처리하였을 때 1 mg/ml 농도에서 117.7%로 대조군에 비하여 약간 증가하였을 뿐, 3일 처리군과 비슷한 양상으로 나타났다(Fig. 2). 세포의 형태적 관찰 결과 감초 물추출물을 2 mg/ml 농도로 5일 동안 처리하였을 때 대조군과 같이 정상적인 세포 소견을 나타냈다(Fig. 3). 이상의 결과 감초 물추출물은 B16 세포에서 2 mg/ml 농도까지 세포증식을 감소시키지 않았으며 형태적으로도 정상적인 세포소견을 나타내, 세포독성이 없음을 알 수 있었다.

3. 감초 물추출물의 최종 멜라닌 생성 억제

위의 실험 결과 세포독성이 없는 것으로 밝혀진 감초 물추출물을 0.5, 1, 2 mg/ml 농도로 5일 동안 처리한 후, 멜라닌 세포수에 따른 멜라닌양을 측정하였다. 감초 물추출물 0.5, 1, 2 mg/ml 농도에서 10^3 세포당 멜라닌 양은 각각 대조군의 75%, 70.5%, 74.5%로 유의하게 감소하였다(Fig 4). 따라서 감초 물추출물은 B16 세포에서 최종적인 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

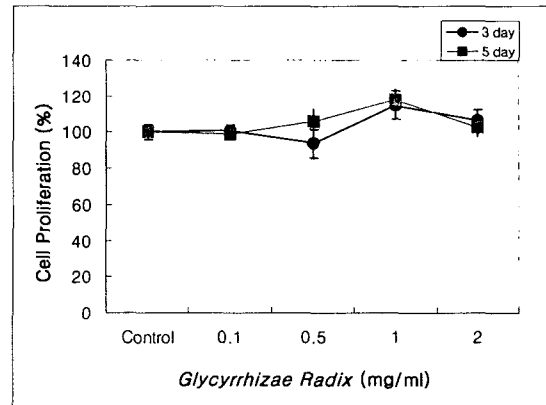


Fig. 2. Growth rates of B16 cells after treatment with Radix glycyrrhizae water extract, compared with control cells. Cells were counted with a Fuchs-Rosenthal cytometer after 3 or 5 days of treatment with Radix glycyrrhizae water extract, as described in materials and Methods. Results are expressed as percent(%) of control and data reported are means \pm S.D. of at least three determinations.

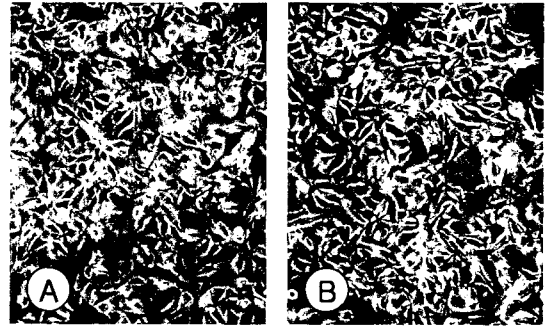


Fig. 3. Phase-contrast microscopic findings of B16 cells treated with Radix glycyrrhizae water extract. There were no significant morphologic changes of cells between control group (A) and 2 mg/ml treated group (B) after 5 days.

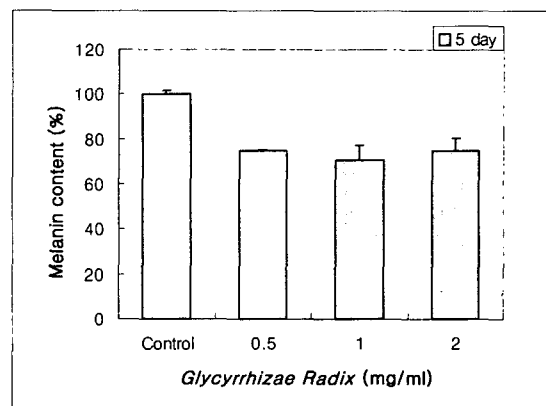


Fig. 4. Inhibitory effect of Radix glycyrrhizae water extract on melanin contents in B16 melanoma cells. B16 cells were treated with various concentrations of Radix glycyrrhizae water extract for 5 day. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.E. of three experiments performed in triplicate.

4. 감초 물추출물의 세포 내 Tyrosinase 활성 억제

감초 물추출물 처리 후 최종 멜라닌양이 억제된 것은 멜라닌 합성에 관여하는 효소들의 활성과 관련이 있음을 나타내므로, B16

세포에서 tyrosinase 활성을 조사한 결과, 감초 물추출물을 0.5, 1, 2 gm/ml 농도로 5일간 처리한 후 tyrosinase 활성은 각각 92%, 89%, 65.9%로서 2 mg/ml 농도에서 유의하게 감소하였다 (Fig. 5).

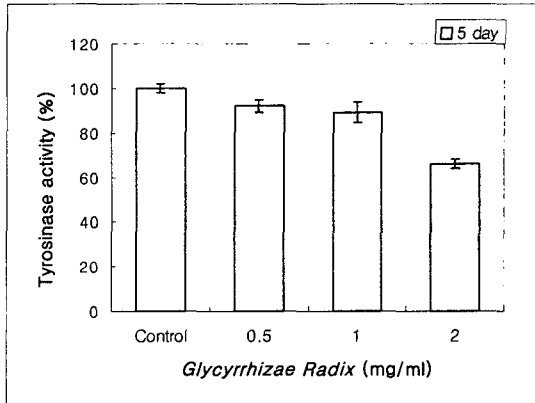


Fig. 5. Effect of Radix glycyrrhizae water extract on tyrosinase activity in B16 melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hr, cells were treated with various concentrations Radix glycyrrhizae water extract for 5 day. Then, tyrosinase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate.

5. 감초 물추출물의 세포 내 DOPAchrome tautomerase (TRP-2) 효소활성 억제

L-tyrosine으로부터 tyrosinase에 의해 생성된 DOPAchrome 은 이후 DOPAchrome tautomerase (TRP-2)에 의해 DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)로 전환되며 이는 다시 DHICA-oxidase(TRP-1)에 의해 eumelanin을 형성하는 것으로 알려져 있다. 따라서 B16 세포에 감초 물추출물 처리 후 DOPAchrome tautomerase 활성을 조사하였다. 감초 물추출물을 0.05, 0.5 mg/ml 농도로 5일간 처리한 후 세포 내 DOPAchrome tautomerase 활성은 각각 대조군의 84.3%, 75.2%, 69.5%로 감소하여, 감초 물추출물은 B16 세포의 DOPAchrome tautomerase 활성을 농도의존적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 6).

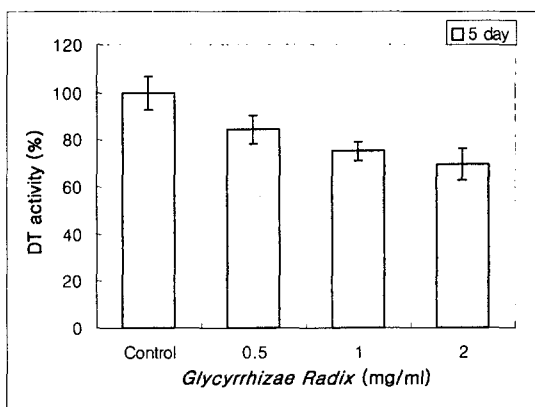


Fig. 6. Effect of Radix glycyrrhizae water extract on DOPAchrome tautomerase in B16 melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hr, cells were treated with various concentrations Radix glycyrrhizae water extract for 5 day. Then, DOPAchrome tautomerase was measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate.

고찰

감초는 위 및 십이지장 궤양에 우수한 치료 효과가 있다고 보고된 이후 많은 연구가 진행되어 항염작용, 항알러지작용, 항종양효과, 항바이러스효과 등이 있는 것으로 밝혀졌고¹⁻⁶⁾, 최근에는 미백효능이 있는 물질로 알려졌다. 세포 내에서 그 작용 기전은 정확하게 밝혀져 있지 않다. 멜라닌은 tyrosine을 기질로 하여 일련의 산화 중합 반응에 의하여 형성되는데, 이 과정에서 처음 두 단계의 반응을 촉매하는 tyrosinase가 중요한 역할을 한다. 따라서 tyrosinase 효소를 저해하거나 그 중간단계의 산화반응을 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시킬 수 있다. 이러한 이유로 피부의 색소생성을 조절하는 많은 연구의 대부분이 tyrosinase의 효소적 조절에 초점이 맞추어져 왔다. Mishima 등 (1988)²⁴⁾은 멜라닌 생성 억제 물질을 크게 두가지 형태로 분류하였는데, 그 하나는 멜라닌 생성의 속도조절 효소인 tyrosinase 효소 자체를 직접 억제하는 것이고, 또 하나는 세포로부터 분리한 tyrosinase에 대해서는 직접적인 억제작용을 나타내지 않지만 멜라닌세포 내에서 tyrosinase 합성 억제, tyrosinase 당쇄수식에 의한 성숙과정의 저해, 세포독성 등의 과정을 통하여 멜라닌을 억제하는 것이다. 본 실험에서 in vitro의 mushroom tyrosinase assay 결과 감초 물추출물은 매우 유의하게 tyrosinase 활성을 억제하였다. 이는 감초 물추출물이 tyrosinase에 직접적으로 작용하여 활성을 억제하였음을 의미한다. 그러나 In vitro에서 mushroom tyrosinase 활성을 억제하는 실험 결과만으로 감초 물추출물이 멜라닌 생성을 억제한다고 말하기는 불충분하므로 B16 세포에서 최종 멜라닌 생성량을 조사하였다. 감초 물추출물 처리 후 B16 세포에서 최종 멜라닌 생성량과 tyrosinase 활성을 조사한 결과, 멜라닌 생성을 효과적으로 억제하였고, tyrosinase 활성도 억제하였다. 이는 본 실험 결과와 Mishima 등(1988)²⁴⁾의 결론을 비교해 볼 때 감초 물추출물은 B16 세포의 멜라노솜 (melanosome)에 직접 작용하여 tyrosinase 활성을 억제하였음을 나타낸다.

부 등(1994)¹⁷⁾은 솔잎 추출성분 4-hydroxy-5-methyl-3-[2H]-furanone이 in vitro에서 tyrosinase 활성 억제 작용은 Kojic acid 보다 약하지만 배양 murine melanoma 세포에서는 Kojic acid 보다도 훨씬 강력하게 멜라닌의 생성을 억제하였고, 이는 멜라닌 생성을 억제할 수 있는 또 다른 인자가 있음을 시사하는 것으로 보고하였다. 멜라닌 생성 억제제로 잘 알려진 hydroquinon은 매우 효과적으로 멜라닌 생성을 억제하지만 반면에 세포 독성이 심하며, Kojic acid는 in vitro에서 버섯 tyrosinase의 활성을 효과적으로 억제하지만 세포에서는 그 효과가 적어 kojic acid가 melanosome 까지 들어가는 데 실패한 것으로 보고되었다^{9,24)}. 따라서 세포수준에서 멜라닌 생성을 억제하기 위해서는 세포 독성이 없이 멜라닌 생성을 감소시키는 것이 바람직하다. 본 실험에서 감초 물추출물은 B16 세포의 증식을 억제하거나 세포독성이 없는 정상적인 소견을 나타냈으므로 감초 물추출물은 단순히 세포손상이나 일반적 대사 상태의 불활성에 의해 멜라닌 생성이 감소된 것이 아님을 알 수 있었다. 멜라닌은

eumelanin과 pheomelanin의 2종류로 구분되는데, 멜라닌 합성 과정 중 cysteine, glutathione과 같은 sulfur-containing reactant의 양에 따라 eumelanin과 pheomelanin을 생성하는 경로로 나뉜다²⁵⁾. 세포 내에 cysteine, glutathione농도가 높을 경우에 DOPAquinone으로부터 Pheomelanin이 생성되고, eumelanin은 DOPochrome으로부터 DHI 와 DHICA 경로를 거쳐 생성된다^{25,26)}. 이와 같이, DOPochrome에서 DHICA로의 변환을 촉매하는 효소 DOPochrome tautomerase (TRP-2)와 DHICA에서 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로의 변환을 촉매하는 DHICA-oxidase (TRP-1)의 역할이 주목되고 있다. 본 실험에서도 B16 세포의 DOPochrome tautomerase 활성을 조사한 결과 감초 물추출물이 DOPochrome tautomerase 활성을 억제하였다. 따라서 감초 물추출물의 멜라닌 생성을 억제효과는 tyrosinase와 DOPochrome tautomerase 활성억제에 의한 것으로 사료된다. 이상의 실험결과, 감초 물추출물은 B16 세포에 독성이 없는 농도에서 tyrosinase와 DOPochrome tautomerase 활성을 억제하였고 결과적으로 Pigmentation을 억제함을 알 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 미백효능이 있는 것으로 알려진 감초 물추출물의 세포 내에서 작용기전을 조사하기 위하여, 먼저 미백제의 screening test로 이용되고 있는 버섯 tyrosinase assay를 통하여 멜라닌 생성억제 효과를 확인한 후, B16 mouse melanoma 세포에서 최종 멜라닌 생성양, tyrosinase 활성도, DOPochrome tautomerase (TRP-2)의 활성도를 측정하였다. 감초 물추출물은 시험관 내 버섯 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제하였고, B16 mouse melanoma 세포에서 최종적인 멜라닌 생성을 억제하였다. 또한 2 mg/ml 농도까지 세포독성을 나타내지 않았으며, 형태적으로도 정상적인 세포소견을 보였고, tyrosinase 활성과 DOPochrome tautomerase 활성을 농도 의존적으로 억제하였다. 이상의 결과 감초 물추출물은 B16 세포에서 tyrosinase와 DOPochrome tautomerase 활성을 억제함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 감소시켰음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 BK21 사업의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 吳普 述著. 神農本草經, p.12, 醫聖堂, 서울, 1994.
2. Hsiang, C.Y., Lai, I.L., Chao, D.C., Ho, T.Y. Differential regulation of activator protein 1 activity by glycyrrhizin. *Life Sci.* 70(14), 1643-56, 2002.
3. 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), 5-10, 1993.
4. Shibata S. A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Yakugaku Zasshi.* 120(10), 849-862, 2000.
5. Yano, S., Harada, M., Watanabe, K., Nakamaru, K., Hatakeyama, Y., Shibata, S., Takahashi, K., Mori, T., Hirabayashi, K., Takeda, M. Antiulcer activities of glycyrrhetic acid derivatives in experimental gastric lesion models. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 37(9), 2500-2504, 1989.
6. Ishii, Y. Mechanism of gastric antisecretory activity of a new fraction of licorice root (FM100). *Jpn J Pharmacol.* 20(1), 71-9, 1970.
7. 박경아, 조지화, pp. 405-411, 고려의학, 서울, 1999.
8. Bloom, W., Fawcett, D.W. A textbook of histology, pp. 543-558, 11th ed, W.B. Saunders Company, USA, 1986.
9. Curto, E. V., Kwong, C., Hermersdorfer, H., Glatt, H., Santis, C., Virador, V., Hearing, V.J., Dooley, P. Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase: In vitro Comparisons of alkyl Esters of Gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 57, 663-672, 1999.
10. Pawelek, J.M. After dopachrome? *Pigment Cell Res.* 4, 53-62, 1991.
11. Aroca, P., Solano, F., Salinas, C., Garcia-Borrón, J.C., Lozano, J.A. Regulation of final phase of melanogenesis. *Eur. J Biochem.* 208, 155-163, 1992.
12. Sugumaran, M., Semensi, V. Quinone methide as a new intermediate in eumelanin biosynthesis. *J Biol. Chem.* 266(10), 6073-6078, 1991.
13. Gordon, P.R., Mansur, C.P., Gilchrist, B.A. Regulation of human melanocyte Growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J Invest. Dermatol.* 92(4), 565-572, 1989.
14. Hearing, V.J. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J Invest. Dermatol.* 4(1), 24-28, 1999.
15. Nordlund, J.J., Collins, C.E., Rheins, L.A. Prostaglandin E2 and D2 but not MSH stimulate the proliferation of pigmentcells in the pinnal epidermis of the DBA2 mouse. *J Invest. Dermatol.* 86, 433-437, 1986.
16. Yada, Y., Higuichi, K., Imokawa, G. Effects of endothelin on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J Biol. Chem.* 266, 18352-18357, 1991.
17. 부용출, 전체옥, 오지연, 김은정, 이병근. 술잎에서 분리된 항산화 물질인 4-hydroxy-5-methyl-3-[2H]-furanone의 멜라닌 생성 억제 작용. *대한화장품학회지.* 20, 1-13, 1994.
18. Park, J.S., Kim, J.S., Lee, J.W., Park, R.G., Jeon, B.H., Woo,

- W.H., Jeong, W.Y. Effect of Rhizoma Atractylodis macrocephalae on the melanogenesis, J Oriental Medical Pathology 13(2), 91-97, 1999.
19. Park, J.S., Nam, W.Y., Mun, Y.J., Kim, K.H., Jeon, B.H., Woo, W.H. Effect of Seosikyongsan on the melanogenesis of B16 melanoma cell line, J Oriental Medical Pathology 14(1), 160-170, 2000.
20. Mason, H.S., Peterson, E.W. Melanoproteins. I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. Biochim. Biophys. Acta. 111(1), 134-46, 1965.
21. Hosoi, J., Abe, E., Suda, T., Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α ,25-dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res. 45, 1474-1478, 1985.
22. Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J.A., Garcia-Borron, J.C. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur. J Biochem. 255(1), 139-146, 1998.
23. Korner, A.M., Pawelek, J. Dopachrome conversion: a possible control point in melanin biosynthesis. J Invest. Dermatol. 75(2), 192-195, 1980.
24. Mishima, Y., Hatta, S., Ohyama, Y., Inazu, M. Induction of melanogenesis suppression: Cellular Pharmacology and mode of differential action. Pigment Cell Res. 1, 367-374, 1988.
25. Ito S, Jimbow K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas. J Invest. Dermatol. 80(4), 268-272, 1983.
26. Kobayashi T, Vieira WD, Potterf B, Sakai C, Imokawa G, Hearing VJ. Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. J Cell Sci. 108 (Pt 6), 2301-2309, 1995.