

지치(*Lithospermum erythrorhizon*) 추출물의 멜라닌 생합성 억제효과

이황희¹ · 배 석¹ · 진종언^{2*}

¹전남대학교 생물학과

²동강대학 피부미용과

Inhibitory Effect of *Lithospermum erythrorhizon* Extracts on Melanin Biosynthesis

Hwanghee Blaise Lee¹, Suk Bai¹ and Jong-Eon Chin^{2*}

¹Dept. of Biological Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²Dept. of Cosmetology, Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea

Abstract

To estimate the inhibitory effect of *Lithospermum erythrorhizon* root extract on melanin biosynthesis, we tested its inhibitory effects on tyrosinase promoter in B16 mouse melanoma cells. *Lithospermum erythrorhizon* root extract had inhibitory effect above 33% on tyrosinase promoter at 10 µg/mL and exhibited no cytotoxicity under 100 µg/mL. Also, melanin biosynthesis decreased approximately 11% and 24% at 10 µg/mL and 100 µg/mL, respectively. Therefore, *Lithospermum erythrorhizon* root extract would be considered very effective regulator of tyrosinase promoter and melanin biosynthesis.

Key words: *Lithospermum erythrorhizon*, tyrosinase promoter, melanin, B16 mouse melanoma cell

서 론

멜라닌은 동물, 식물, 미생물에 널리 분포하는 색소로서 사람의 경우 피부색을 결정하는 동시에 유해한 자외선이나 유리기(free radical)로부터 인체를 보호하는 역할을 담당하고 있다. 이 색소는 인체에서 피부 중 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌 생성세포(melanocyte cell)가 자외선을 비롯한 각종 자극에 의해 활성화되어 만들어져 각질 형성세포(keratinocyte cell)에 의해 만들어진 케라틴과 함께 위로 이행하여 표피의 가장 바깥층인 각질층에 존재한다. 멜라닌 색소의 생합성은 tyrosinase 효소를 비롯하여 여러 효소들에 의하여 조절되고 있는 것으로 알려져 있다(1-3).

지금까지 멜라닌 색소의 생합성을 억제하는 물질에 대한 연구는 주로 tyrosinase 효소의 활성을 저해하는 수준에서 이루어져 많은 식물들이 tyrosinase 활성 저해효과가 있는 것으로 보고되었으며(4-6), 또한 여러 식물들로부터 tyrosinase 활성 저해효과가 있는 성분들이 분리되어 이용되고 있다(7-11). 그러나 이러한 물질들은 멜라닌 색소의 생합성 억제효과가 낮고 지속성이 짧다는 단점이 있다. 최근, 이러한 단점을 보완하기 위하여 멜라닌 색소 생성 관련 유전자 발현 억제 기작, 멜라닌 생성 활성을 제어하는 사이토카인

네트워, 멜라닌 색소 생합성 효소의 유전자 발현억제 물질 탐색 및 분리 등과 같은 근본적인 수준에서 연구들이 이루어지고 있으나 그 연구결과는 매우 미미하다. 특히, 천연물로부터 멜라닌 생합성 관련 효소의 유전자 발현 억제 물질에 대한 탐색이나 분리에 관한 연구결과는 아직까지 Chin 등(12,13)과 Cho 등(14)의 보고를 제외하고는 거의 없다.

지치(*Lithospermum erythrorhizon*)는 지치과(*Boraginaceae*)에 속하는 다년생 초본 식물로서 우리나라 전역에 야생하고 있다. 특히 자초로도 불리는 지치 뿌리에는 allantoin, cyanoglucoside, fumaric acid, succinic anhydride, shikonin, acetylshikonin과 같은 다양한 성분들이 함유되어 있어(15) 항균, 항바이러스, 항종양, 착색 등 다양한 효능·효과가 있는 것으로 알려져 있다(16-20). 따라서 오늘날 지치 뿌리는 미생물에 의한 감염이나 항암 예방 및 치료제, 식품, 염료 등으로 이용되고 있다.

본 연구는 멜라닌 색소 생합성 관련 효소의 유전자 발현 조절 수준에서 그 색소 생성을 억제하는 물질을 탐색하고자 지치(*Lithospermum erythrorhizon*)의 뿌리로부터 유용성 물질을 추출·분획하여 형질전환 된 B16 mouse melanoma cell에 처리하여 tyrosinase 프로모터 활성능, 세포독성 그리고 멜라닌 색소 생성능을 조사하였다.

*Corresponding author. E-mail: jechin@dongkang.ac.kr
Phone: 82-62-520-2348. Fax: 82-62-520-2392

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 지치 뿌리는 2004년 10월 광주시내 건재 상에서 구입하여 감정한 후 사용하였으며, 표준품은 전남대학교 생물학과 분자세포생리학 실험실에 보관하였다.

추출 및 분획

시료의 추출은 건조된 생약을 세절하여 0.1 kg씩을 취한 다음 메탄올을 가하여 실온에서 1주일 동안 정치시킨 후 3회 추출·여과하였다. 여과액은 감압·농축하여 동결·건조시킨 후 분말 형태로 제조하였다. 용매분획은 농축된 메탄올 추출물을 증류수로 현탁한 다음, 극성도가 다른 methylene chloride, ethyl acetate, butyl alcohol, 물을 이용하여 4개의 층으로 분획하여 메탄올 추출물과 같은 방법으로 농축하였다. 그리고, 이 농축물은 동결·건조하여 분말 형태로 제조하였다.

시료 제조

분말로 된 추출물 및 분획물 100 mg에 에탄올과 디메틸설포사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)가 1:1로 혼합된 용매 1 mL씩을 가하여 완전히 용해시킨 후 여과하여 tyrosinase 프로모터 활성능, 세포독성, 멜라닌 색소 생성능 측정에 이용하였다.

세포배양

B16 mouse melanoma cell(ATCC CRL 6323)은 10% (w/v)의 fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL), 1%(w/v) antibiotic(Gibco BRL), 그리고 2 mM의 L-glutamine이 포함된 RPMI medium 1640(Gibco BRL)에서 CO₂ 분압을 5%로 조절하여 37°C에서 배양하였으며, 세포는 36~48시간 주기로 계대배양하여 유지하였다.

Tyrosinase 프로모터를 도입하여 형질전환된 B16 mouse melanoma cell은 위의 RPMI Medium 1640 완전배지에 neomycin analogue인 Geneticin 418(200 µg/mL)을 가한 선택배지를 이용하여 유지하였다.

세포내 유전자 도입(stable transfection)

B16 mouse melanoma cell 내에 tyrosinase 프로모터가 삽입된 유전자를 도입하기 위해 LipofectAMINE(Life Technologies Inc.)을 이용한 다음과 같은 방법으로 stable transfection을 실시하였다.

세포내 유전자 도입 : B16 mouse melanoma cell을 RPMI medium 1640 평판배지에 세포수가 3~4×10⁵이 되도록 접종한 후 24 시간 배양한 다음, 배양액 1 mL에 6 µL LipofectAMINE 과 2 µg의 total plasmid DNA를 5 시간 처리함으로써 형질전환을 실시하였다.

Plasmid DNA는 luciferase gene을 지닌 pGL2-basic vector(Promega)의 *Sma*I site에 1.5 Kb의 neomycin 저항성

유전자를 삽입한 다음 1 Kb의 사람 tyrosinase 프로모터를 *Eco*RI/*Kpn*I site에 클로닝을 하였다.

형질전환된 세포의 선별 : Stable transfection 처리 5시간 후 B16 mouse melanoma cell로부터 LipofectAMINE 시약과 재조합된 DNA가 함유된 배지를 제거한 후 콜로니가 형성될 때까지 neomycin analogue인 Geneticin 418(600 µg/mL)이 들어있는 선택배지에서 배양한 후 형질전환된 B16 mouse melanoma cell을 선별하였다.

Luciferase 활성도 측정

세포내 유전자 도입을 통해 얻은 B16 mouse melanoma cell의 형질전환 유무를 확인하기 위하여 luciferase 활성도를 측정하였다. 형질전환을 통하여 얻은 콜로니들을 trypsin-EDTA를 처리하여 떼어낸 후 24 well plate에 세포수가 well당 6×10⁴되게 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 세포들은 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 세척한 다음 1% triton X-100, 2 mM EDTA, 그리고 2 mM dithiothreitol이 함유되어 있는 pH 7.8의 25 mM tris-phosphate 완충용액으로 용해하였다. 용해된 세포들을 취하여 원심분리한 다음 얻어진 상등액에 대해 Luminometer(Lumat LB 9507, Berthold)를 이용하여 luciferase 활성도를 측정하였으며 luciferase 활성도가 가장 높게 나타난 B16 mouse melanoma cell을 선별하여 이용하였다.

Tyrosinase 프로모터 활성능 측정

형질전환 된 B16 mouse melanoma cell을 RPMI medium 1640 완전배지가 들어 있는 24 well plate에 세포수가 well당 6×10⁴ 되게 접종한 다음 24시간 동안 배양하였다. 그 후 각각의 well에 지치 추출물은 10 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1 mg/mL의 농도로, 용매 분획물은 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL의 농도로 6시간 동안 처리한 다음 luciferase 활성도를 측정하여 tyrosinase 프로모터 억제효과를 조사하였다.

세포독성 측정

B16 mouse melanoma cell을 RPMI medium 1640 완전배지가 들어 있는 96 well plate에 세포수가 well당 1~1.2×10⁴ 되게 접종한 다음 24시간 동안 배양하였다. 그 후 지치 추출물을 각각의 well에 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL 그리고 100 µg/mL의 농도로 6시간 동안 처리한 다음 Mosmann (21)의 방법에 따라 ELISA(Bio-Tek Inc.) 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 평가하였다.

멜라닌 색소 생성능 측정

멜라닌 색소 생성능은 Hosoi 등의 방법(22)을 변경하여 측정하였다. B16 mouse melanoma cell을 RPMI medium 1640 완전배지가 들어 있는 24 well 배양접시에 세포수가 6×10⁴ 되게 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 그리고 모든 세포에 α-MSH를 100 pM의 농도로 전처리한 다음 지치

추출물을 각각 1 µg/mL, 10 µg/mL 그리고 100 µg/mL의 농도로 3일 동안 처리하였다. 그 후 세포들은 1 N NaOH와 10%(w/v) DMSO를 함유하고 있는 용액 1 mL를 가하여 80°C에서 2시간 동안 용해한 다음 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 A₄₇₀에서 흡광도를 측정된 후 단백질 mg당의 멜라닌 색소의 함량을 계산하였다. 멜라닌 색소의 함량은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다. 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법(23)을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

지치 추출물의 tyrosinase 프로모터 억제효과

세포내 유전자 도입을 통하여 제조된 B16 mouse melanoma cell에 지치 메탄올 추출물을 처리하여 tyrosinase 프로모터의 억제 효과를 조사한 결과, 그 효과는 추출물의 처리 농도에 비례하는 경향을 나타내었다(Fig. 1). 즉 지치 추

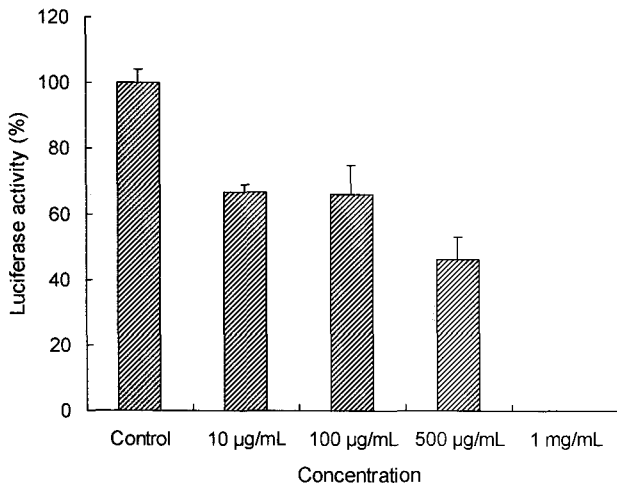


Fig. 1. Effects of *Lithospermum erythrorhizon* root extract on the tyrosinase promoter in B16 mouse melanoma cells. Transfected B16 melanoma cells were incubated in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated *Lithospermum erythrorhizon* root extract for 6 hr. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at 13,000 × g for 2~3 min. The supernatants were used for luciferase assay. Values are the means of results from triplicate experiments.

출물을 10 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL 농도로 형질전환된 세포에 처리하였을 때 세포의 tyrosinase 프로모터 활성은 각각 약 67%, 66%, 46%로서 억제하는 효과를 보여 주었다. 그러나 1 mg/mL의 고농도에서는 광학 현미경으로 확인할 정도로 세포가 심하게 분해됨으로서 tyrosinase 프로모터의 활성능을 측정할 수가 없었다.

또한, 지치 메탄올 추출물을 methylene chloride, ethyl acetate, butyl alcohol, 물 등의 용매로 분획하여 얻은 물질들을 형질전환된 세포에 처리한 결과 Table 1에서 보여 주듯이 용매 분획물들은 농도에 따라 차이는 있었지만 서로 유사한 경향을 보여 주었다. 즉 methylene chloride, ethyl acetate, butyl alcohol과 같은 3종류의 용매 분획물들은 세포에 1 µg/mL와 10 µg/mL의 농도에서 tyrosinase 프로모터의 활성을 억제하기보다는 오히려 증진시키는 결과를 보여주었다. 그러나 100 µg/mL의 고농도에서는 tyrosinase 프로모터의 활성을 크게 억제하는 효과를 나타내었다. 그리고 물 분획물은 methylene chloride, ethyl acetate, butyl alcohol과 같은 용매 분획물들에 비해 보다 높은 농도 즉, 500 µg/mL의 고농도에서 tyrosinase 프로모터의 활성을 억제하였다. 이 결과를 통해서 볼 때 지치 용매 분획물들의 tyrosinase 프로모터 활성 억제효과는 특정 용매 분획물에 한정하지 않고 본 연구에 이용된 모든 용매 분획물에서, 그리고 10 µg/mL이하의 저농도보다는 100 µg/mL 또는 500 µg/mL의 고농도로 처리하였을 때 나타났다. 그러나 용매 분획물들의 억제효과는 메탄올 추출물에 비해 감소하는 결과를 보여주었다.

따라서 지치 추출물 내에는 멜라닌 색소 생합성 관련효소인 tyrosinase의 프로모터 활성을 억제하는 성분들이 함유되어 있지만 용매 분획물 형태보다는 추출물 형태로 이용하는 것이 보다 효율적이라 판단된다.

지치 추출물의 세포독성

Tyrosinase 프로모터의 활성 억제효과가 우수한 지치 추출물을 B16 mouse melanoma cell에 처리한 결과, 그의 세포독성은 Fig. 2와 같이 추출물의 처리농도에 따라 다른 결과를 보여주었다. 즉, 지치 추출물은 농도 증가에 따라 세포의 활성능이 증가하기 시작하여 50 µg/mL의 농도에서 약 211

Table 1. Effects of solvent fraction layer of *Lithospermum erythrorhizon* root on the tyrosinase promoter in B16 mouse melanoma cells

Solvent fraction layer	Luciferase assay (%)			
	1.0 µg/mL	10.0 µg/mL	100.0 µg/mL	500.0 µg/mL
Methylene chloride layer	127 ± 3.2 ¹⁾	105 ± 3.6	47 ± 9.8	ND ²⁾
Ethyl acetate layer	121 ± 4.2	111 ± 3.1	36 ± 9.4	ND
Butyl alcohol layer	129 ± 5.7	123 ± 2.1	75 ± 2.5	ND
Water layer	138 ± 4.2	120 ± 1.0	128 ± 10.1	88 ± 5.6

Transfected B16 melanoma cells were incubated with 6×10^4 in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated solvent fractions of *Lithospermum erythrorhizon* root for 6 hr. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at 13,000 × g for 2~3 min. The supernatants were used for luciferase assay.

¹⁾Values are the means of results from triplicate experiments.

²⁾Not determined.

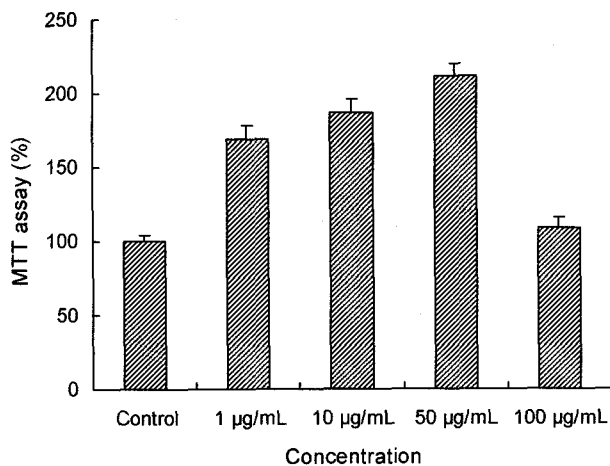


Fig. 2. Cytotoxicity of *Lithospermum erythrorhizon* root extracts on B16 mouse melanoma cells.

B16 melanoma cells were incubated with $1.0 \sim 1.2 \times 10^4$ in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated with *Lithospermum erythrorhizon* root extract for 6 hr. Then, the cells were used for MTT assay. Values are the means of results from triplicate experiments.

%로 2배 이상 증진되었으나 100 µg/mL의 농도에서는 세포 활성능이 108%로 감소하였다. 그리고 tyrosinase 프로모터 활성을 크게 억제하였던 500 µg/mL의 고농도에서는 배양 중에 세포의 분해가 일어나 MTT assay를 실시하는 과정에서 세포가 대부분 손실됨으로서 세포독성을 평가하는 것이 어려웠다. 이 결과를 통해서 볼 때 지치 추출물을 이용하여 tyrosinase 프로모터 활성을 효과적으로 억제하기 위해서는 고농도로 이용하기 보다는 세포 안전성이 확보된 100 µg/mL 이하의 농도로 이용하는 것이 바람직하다고 판단된다.

지치 추출물의 멜라닌 색소 생성 억제효과

지치 추출물을 B16 mouse melanoma cell에 처리하여 멜라닌 생성능을 측정한 결과, 멜라닌 색소 생성 억제효과는 추출물의 처리농도에 비례하였다(Fig. 3). 지치 추출물을 1 µg/mL의 저농도로 세포에 처리하였을 때의 멜라닌 색소 생성능은 102%로 대조군과 거의 유사하였으나, 10 µg/mL와 100 µg/mL의 농도로 세포에 처리하였을 때의 멜라닌 색소의 생성능은 대조군의 약 89%와 76%의 수준이었다. 특히, 10 µg/mL의 동일한 농도에서 다른 추출물과 비교하였을 때 지치 추출물은 Okano(24)에 의해 보고된 대나무(Bamboo) 꽃 추출물보다 효과가 낮았지만 현재 멜라닌 색소 생성 억제제로서 알려져 있는 kojic acid와 비슷한 억제효과를 나타내었다(25). 그러나 kojic acid는 6일 동안 처리하였을 때 나타난 결과이지만 지치 추출물은 보다 짧은 3일 동안 처리하였을 때 거의 비슷한 효과를 나타낸 것으로 보아 지치 추출물이 kojic acid보다 우수한 효과를 지니고 있음이 증명되었다. 따라서 지치 추출물 내에는 tyrosinase 프로모터의 활성과 멜라닌 색소의 생성을 억제하는 효과를 지니고 있는 성분들이 함유되어 있는 것으로 보여지며, 앞으로 보다 많은 연

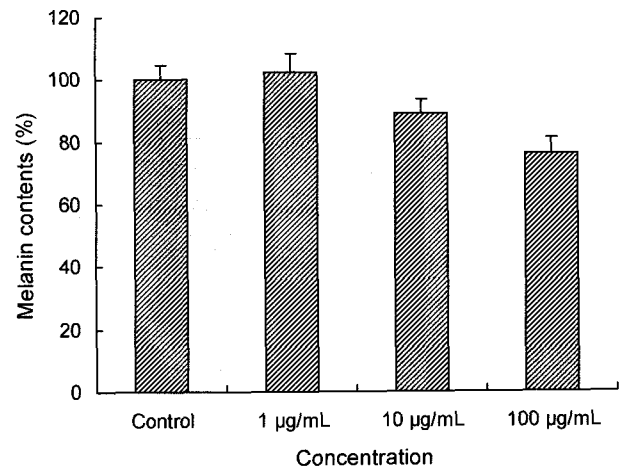


Fig. 3. Melanin contents of B16 melanoma cells treated with *Lithospermum erythrorhizon* root extract.

B16 melanoma cells were incubated in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated with 100 pM of α -MSH, and 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL of *Lithospermum erythrorhizon* root extract for 3 days.

구가 이루어진다면 멜라닌 색소 생합성 억제제로서 널리 이용되리라 생각되어진다.

요 약

유전자 발현 조절 수준에서 멜라닌 색소 생합성 억제물질을 탐색하고자 지치 뿌리로부터 유용성 물질을 추출·분획하여 tyrosinase 프로모터를 지닌 B16 mouse melanoma cell에 처리한 결과 그 메탄올 추출물은 10 µg/mL의 농도에서 약 33% 이상의 tyrosinase 프로모터 활성 억제효과를 나타내었으며, 세포 활성능이 100 µg/mL의 농도에서 약 108%로 매우 안전하였다. 그리고 methylene chloride, ethyl acetate, butyl alcohol, 물 등의 용매 분획물들도 농도에 따라 차이는 있었지만 100 µg/mL 또는 500 µg/mL의 고농도에서 tyrosinase 프로모터의 활성을 억제하였다. 또한, 지치 메탄올 추출물의 농도를 달리하여 3일 동안 처리하였을 때 멜라닌 색소의 생성능은 10 µg/mL와 100 µg/mL의 농도에서 대조군 세포에 비해 각각 약 11%와 24%로 크게 감소하는 결과를 보여주었다.

문 헌

1. Aroca P, Urabe K, Kobayashi K, Taskamoto K, Hearing VJ. 1993. Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. *J Biol Chem* 268: 25650-25655.
2. Paval S. 1993. Dynamics of melanogenesis intermediates. *J Invest Dermatol* 100: 162S-165S.
3. Jimenez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Urabe K, Hearing VJ, Lozano J, Garcia-Borron C. 1994. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. *J Biol Chem* 269: 17993-18001.
4. Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DS. 1995. Screening of

- tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J Food Sci Technol* 27: 891-896.
5. Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES, Lee NH. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Korean J Pharm* 29: 237-242.
 6. Baurin N, Arnoult E, Scior T, Do QT, Bernard P. 2002. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J Ethnopharmacol* 82: 155-158.
 7. Yokota T, Nishino H, Kubota Y, Mizoguchi M. 1998. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res* 11: 355-361.
 8. Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR, Kim YS. 1998. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on the dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 801-803.
 9. Lee SH, Choi SY, Kim HC, Hwang JS, Lee BG, Gao JJ, Kim SY. 2002. Mulberrosin F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull* 25: 1045-1048.
 10. Lee KT, Lee KS, Jeong JH, Jo BK, Heo MY, Kim HP. 2003. Inhibitory effects of *Ramulus mori* extracts on melanogenesis. *J Cosmet Sci* 54: 133-142.
 11. Kubo I, Kinst-Hori I. 1999. 2-Hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde a potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants. *Planta Medica* 65: 19-22.
 12. Chin JE, Sun HS, Lee KJ, Choi TJ, Ko YS, Sohn HJ, Kim JJ, Jeon BH, Lee BH. 2000. Inhibitory effects of some medicinal plant extracts on the tyrosinase promoter activity on B16 mouse melanoma cells. *International J Oriental Medicine* 1: 6-13.
 13. Chin JE, Cho NC. 2000. Effects of *Artemisia capillaris* herba extracts on the tyrosinase gene activity. *Thesis Collection of Dongkang College* 23: 293-307.
 14. Cho NC, Yoon YH, Lee HJ, Shon HJ, Kim YK, Choi KH, Ra MS, Cho YK, Lee BH, Chin JE. 2001. Effect of onion (*Allium cepa* L.) extract on tyrosinase gene expression. *Kor J Food & Nutr* 14: 228-232.
 15. Yun KJ, Kim DH, Ryu JH, Yook CS. 1999. Studies on the constituents and their antibacterial effect of the root of *Lithospermum erythrorhizon*. *Bull K H Pharma Sci* 27: 27-31.
 16. Sasaki K, Abe H, Yoshizaki F. 2002. *In vitro* antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biol Pharm Bull* 25: 669-670.
 17. Bai JH. 2004. Antimicrobial effect of *Lithospermum erythrorhizon* extract on the food-borne pathogens. *Korean J Food Sci Technol* 36: 823-827.
 18. Chen X, Yang L, Zhang N, Turpin JA, Buckheit RW, Osterling C, Oppenheim JJ, Howard OM. 2003. Shikonin, a component of Chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2810-2816.
 19. Staniforth V, Wang SY, Shyur LF, Yang NS. 2004. Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor alpha promoter *in vivo*. *J Biol Chem* 279: 5877-5885.
 20. Park YJ, Cho JY, Kim SH, Heo BG. 2003. Natural dyeing of skeletonizing leaves using dyestuffs extracted from *Lithospermum erythrorhizon*. *Kor J Hort Sci Technol* 21: 422-427.
 21. Mosmann TJ. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay. *Immunol Methods* 63: 55-63.
 22. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 and retinoic acid. *Cancer Res* 45: 1474-1478.
 23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
 24. Okano Y. 1997. Evaluation of plant extracts as active agents for skin whitening. *Fragrance J* 9: 56-62.
 25. Koide C, Senoo M, Hoshino T. 1997. Melanogenic-inhibitory effect of kojic acid-glabridin (oil-soluble licorice extract) composite. *Fragrance J* 9: 43-48.

(2005년 7월 13일 접수; 2005년 9월 16일 채택)