

## 선학초 추출물의 미백활성

김동희<sup>1</sup> · 안봉전<sup>2</sup> · 이진영<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>(재)대구경북한방산업진흥원, <sup>2</sup>대구의대학교 화장품약리학과, <sup>3</sup>호서대학교 한방화장품과학과

## Whitening Activities of the *Agrimonia pilosa* L. Extracts

Dong-Hee Kim<sup>1</sup>, Bong-Jeun An<sup>2</sup>, and Jin-Young Lee<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Daegu Gyeongbuk Institute for Oriental Medicine Industry, Gyeongbuk 712-260, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongbuk 712-715, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam 336-795, Republic of Korea

Received October 13, 2011; Accepted November 2, 2011

The extracts of *Agrimonia pilosa* L. were investigated for the inhibitory effect on the melanin synthesis in B16/F10 mouse melanoma cells as a functional ingredient for cosmetic products. Tyrosinase inhibition activities were 42% in *A. pilosa* L. 70% ethanol extract at 500 µg/mL. The protein and mRNA expression of tyrosinase, which are all skin-whitening related factors, showed that *A. pilosa* L. water and *A. pilosa* L. 70% ethanol extracts inhibited the protein bio-synthesis in B16F10 melanoma cell. Results indicate that the *A. pilosa* L. extracts tested in the present study have skin whitening activity and can be used as a functional ingredient for cosmetic compositions.

**Key words:** *Agrimonia pilosa* L., inhibition of melanin synthesis, mRNA, tyrosinase

### 서 론

자외선은 피부 melanin 생성을 유발하며, 일반적으로 melanin 은 자외선과 같은 외부자극으로부터 피부를 보호하기 위해 만들어진다. 하지만 과도한 melanin 합성과 축적은 기미, 주근깨와 같은 시각적으로 좋지 않은 질병을 낳게 된다. Melanin 생성은 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2의 세 효소에 의해 조절된다[Kameyama 등, 1995]. Melanin 생합성 기전의 출발물질인 tyrosine은 rate-limiting enzyme인 tyrosinase에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA)과 DOPA quinone으로 변형되고, DOPA chrome을 거쳐 중간체인 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid로 산화되어 eumelanin을 생성하게 된다[Kobayashi 등, 1994]. 따라서 피부 구성 물질을 증가시키거나 멜라닌 생합성을 억제하는 물질을 적용시킴에 따라 미백효과 등의 피부개선 효과를 볼 수 있는 것으로 알려져 있다[Mauviel 등, 1994; Pentland 등, 1995; Park 등, 2004].

선학초(*Agrimonia pilosa*)는 장미과에 속하는 다년생 숙근초로서 용아초, 황아초, 지선초, 짚신나물 등으로 부르기도 한다. 선학초 추출물은 예부터 민간요법, 녹즙 등으로 널리 이용되어

왔고, 폐암, 간암, 식도암, 종양, 통증제거, 지사, 토혈, 혈뇨, 자궁출혈 등에 치료 약물로서 널리 이용되어 왔다[Song, 2007]. 한의학에서는 수렴작용이 강하여 지사제 및 지혈제로 사용되어 왔으며, 민간에서는 간암, 폐암, 통증에 효과가 있다고 알려져 민간요법으로 활용되고 있다[Lee 등, 2009]. 주요 성분으로는 진초에 agrimonin, agrimonolide, tormentic acid, ellagic acid 등이 있고, 잎과 줄기에는 luteolin-7-glucoside가 함유되어 있음이 알려져 있으며, 최근 연구에서는 항바이러스 효과, 당뇨치료 효과, 혈관이완 효과, 항균효과 등이 보고되고 있으며[Kim 등, 2010], Kim 등[2011]은 짚신나물 물 추출물에서 항산화 및 미백효과를 검증한 바 있으나, 화장품의 소재로서 지용성물질의 추출을 위한 용매추출에서의 미백활성도 검증하기 위하여 70% 에탄올 추출물을 이용하여 물 추출물과의 활성을 비교하였다. 따라서 본 연구에서는 선학초 추출물의 미백활성을 멜라닌 인자인  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)를 마우스 흑색 세포종에 처리를 한 뒤, Western blot와 polymerase chain reaction (PCR)을 통하여 검증하고 기능성화장품 소재로서의 가능성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

**재료 및 추출.** 시료의 추출은 열수 및 에탄올 추출을 하였다. 열수 추출물의 경우 시료 100 g에 증류수 10배 양을 가하여 85 °C에서 3시간 환류냉각 추출하여 상등액과 침전물을 분리하여

\*Corresponding author

Phone: +82-41-540-9552; Fax: +82-41-540-9538

E-mail: jylee@hoseo.edu

3회 반복 추출하였으며, 에탄올 추출물의 경우 70% 에탄올을 시료 중량의 10배 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 추출물들은 원심분리 및 여과, 농축 후 동결 건조하여 냉동실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

**시약.** 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)는 Sigma chemical Co. (St Louis, MO)에서 구입하였다. 세포배양을 위해 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, trypsin 250, 0.4% trypan blue stain은 hyclone 및 haemacytometer (Marienfeld, Germany)에서 구입하여 사용하였으며 tyrosinase primary antibody와 mouse-anti-goat 등 secondary antibody는 Santacruz (Santacruz, CA)에서 구입하였다. 그 외 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다.

**세포배양.** 본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% FBS과 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

**Tyrosinase 저해활성 측정.** Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등[1986]의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL을 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

**MTT assay에 의한 세포 생존율 측정.** 세포 생존율 측정은 Carmichael 등[1987]의 방법에 따라 측정하였다. 세포주 melanoma (B16F10)를 96 well plate에 5×10<sup>4</sup> cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고, 시료를 농도 별로 조절하여 0.02 mL 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 0.15 mL를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Tecan, Salzburg, Austria)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

**Cellular tyrosinase 저해활성 측정.** Melanoma (B16F10) 세포를 각 6 well에 1×10<sup>5</sup>로 배양 한 후, 24시간 안정을 시켰다. 24시간이 지난 후 serum free 배지에 α-MSH 10 nM로 처리하고 선학초 열수 및 에탄올 추출물을 각각 1, 5, 10 µg/mL의 농도로 처리 하였다. 48시간 후 배지를 걷고 PBS로 세척하였다. 각 dish에 lysis buffer (67 mM sodium phosphate buffer, 1% triton X-100, 0.1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride)를 100 µL 첨가한 후 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고, 세포를 수집하여 ultra sonication 하였다. 이를 1시간 동안 방치한 후 13,200 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻어진 상층액을 효소용액으로 사용하였다. 이를 67 mM phosphate buffer (pH 6.8)에

**Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR**

Gene	Primer	Sequence (5'→3')
Tyrosinase	Forward	GAC GGT CAC TGC ACA CTT TG
	Reverse	GCC ATG ACC AGG ATG AC
GAPDH	Sense	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
	Antisense	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

녹인 8.0 mM의 L-DOPA 120 µL와 시료용액 40 µL을 96-well plate에 넣은 후, 67 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 효소용액 40 µL을 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한 후, 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정하였다.

**세포내 tyrosinase 단백질 발현 양상 측정.** 선학초 추출물의 미백효과를 알아보기 위하여 tyrosinase의 단백질 양을 측정하였다. 마우스 흑색 세포종(B16F10)을 이용하여 culture dish에 배양한 뒤 선학초 추출물을 처리 한 다음 48시간 후에 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 원심분리 하여 세포를 수집하고, radioimmunoprecipitation assay buffer를 사용하여 cell lysate를 제조하였다. 세포 lysate에 함유된 단백질의 양은 Bradford 법으로 측정하였다. 단백질 20 µg를 10% polyacrylamide를 함유한 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하고 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 electroblot 120V에서 1시간을 실시하였다. 이어 PVDF membrane을 5% skim milk에서 1시간 방치한 뒤 primary antibody에서 4°C에서 overnight하여 주었다. 다시 [5% skim milk in tris-buffered saline and tween 20 (TBST)]로 세 번 세척한 뒤 secondary antibody를 상온에서 1시간 반응 시킨 뒤 TBST로 세 번 세척하고 ECL kit (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England)와 반응시켜 X-ray film에 노출 시켰다. X-ray film에 현상되어진 밴드를 Biorad gel doc (Hercules, CA)을 이용하여 정량화 하였다.

**세포내 tyrosinase mRNA 발현 양상 측정.** B16F10 세포 내에서의 tyrosinase mRNA 발현을 확인하기 위하여 PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. 마우스 흑색 세포종(B16F10)을 6 well에 동일한 조건으로 배양한 뒤 선학초 추출물을 처리 한 다음 48h 후에 배지를 걷고 세포를 PBS로 세척하였다. Total RNA는 diethyl pyrocarbonate 처리된 saline으로 3번 세척하고 세포를 포함한 다음 trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 분리하였다. Total RNA 2 µg와 PCR primer oligonucleotide (target 유전자와 내부표준 β-actin 유전자)를 reverse transcription (RT)-PCR mixer와 혼합하고 RT-PCR을 실시한다. RT의 조건은 42°C에서 1시간 방치하여 cDNA를 제조하고 94°C에서 5분간 방치하여 reverse transcriptase (Promega, Madison, WI)를 불활성화 시켰다. 이어 PCR 조건은 94°C에서 30초(denaturation), 50°C에서 30초(annealing), 72°C에서 90초(extension)의 반응을 25~35회 반복하는 것을 기본으로 target cDNA 종류에 따라 최적의 조건으로 조절하였다. 증폭된 cDNA는 1.2% agarose gel을 사용한 전기영동으로 분리하고 ethidium bromide로 염색한 다음 image analyser (R&D systems Inc., Minneapolis, MN)로 정량하였다.

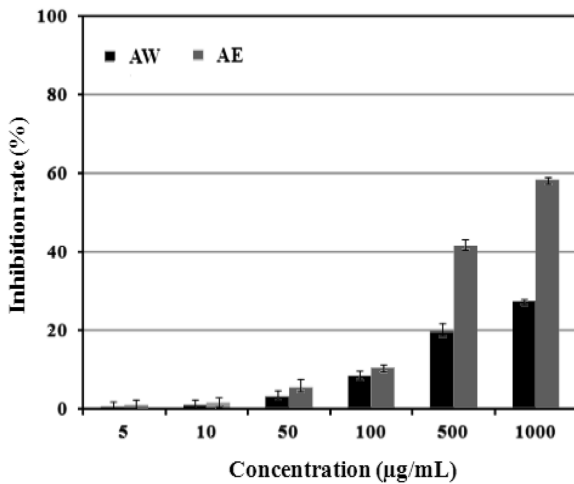


Fig. 1. Inhibition rate of *Agrimonia pilosa* L. on tyrosinase. ■ AW: *Agrimonia pilosa* L. extracted with water, □ AE: *Agrimonia pilosa* L. extracted with ethanol. Result are means  $\pm$  SD of triplicate data.

## 결과 및 고찰

**Tyrosinase 저해활성 확인.** Tyrosinase는 구리를 함유한 효소로서 피부 멜라닌 생성에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며, melanosome 내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase로 DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는데 중요한 효소로 작용한다. 이렇게 피부 내에서 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있는 tyrosinase 저해활성을 측정하기 위하여 mushroom 유래의 tyrosinase 저해활성을 측정 한 결과 Fig. 1과 같이 나타내었다[Pavel 과 Muskiel, 1983; Lee 등, 2001]. 선학초 에탄올추출물의 경우 1000 ppm에서 58.4%의 저해활성을 나타내었으며, 열수추출물의 경우 같은 농도에서 27.5%의 활성을 나타내었다. An 등[2005]의 진달래꽃 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 열수 및 에탄올 추출물 1000 ppm에서 각각 24.0, 48.0%의 저해활성을 나타낸 결과와 비교하여 선학초 에탄올 추출물의 활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

**MTT assay에 의한 세포 생존율 측정.** 세포 생존율을 확인하기 위한 MTT 검색법은 96 well plate를 사용하였으며, 검사 결과를 ELISA reader를 이용하여 많은 시료를 간단하게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 널리 사용되고 있는 방법 중의 한 방법이다. 암세포의 경우 대사 과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 550 nm 근처 파장에서 최대가 되며, 이는 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것이다[Park 등, 1987]. 선학초 열수 및 에탄올 추출물에 의한 melanoma 세포의 생존율을 확인한 결과 Fig. 2와 같이 대조군과 비교해 0.5, 1, 5, 10 µg/mL 농도에서 모두 80% 이상의 생존율을 나타내었으며, 이하 모든 세포실험에서 10 µg/mL로 진행 하였다.

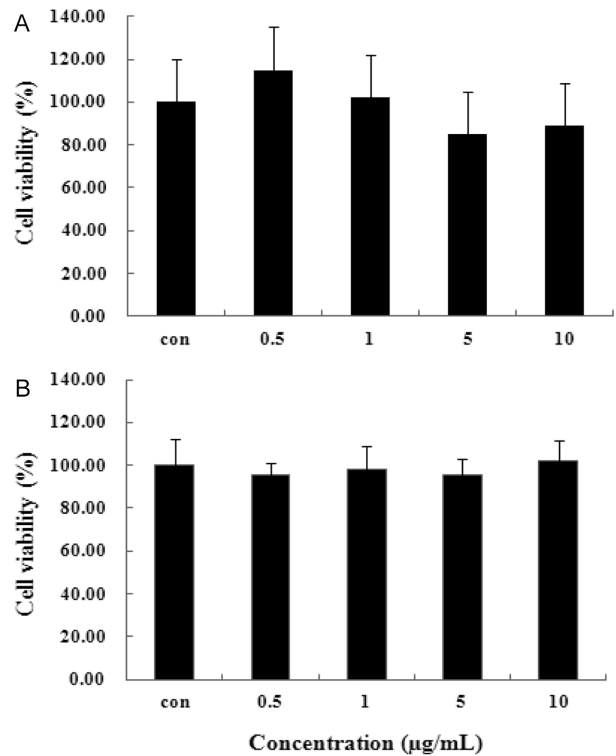
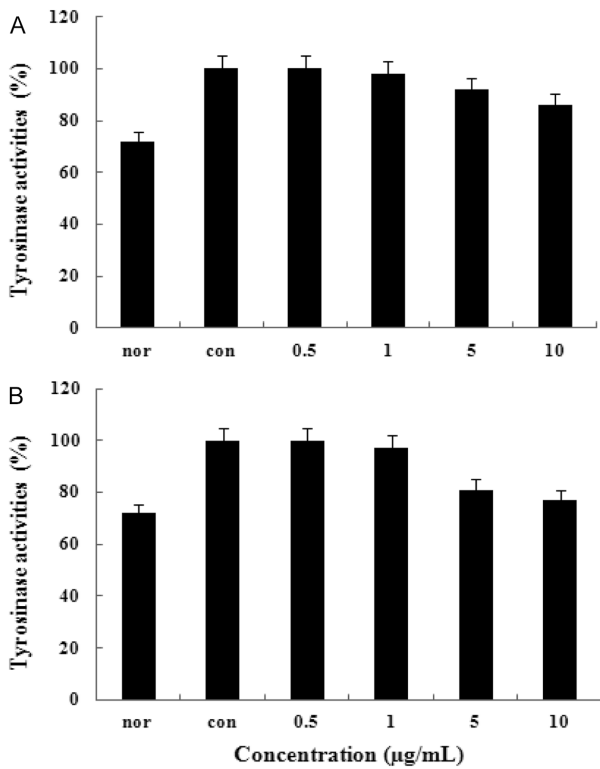


Fig. 2. Cell viability of *A. pilosa* L. extracts on melanoma cell (B16F10). Result are means  $\pm$  SD of triplicate data. (A) *A. pilosa* L. extracted with water (B) *A. pilosa* L. extracted with ethanol. Con: control, in B16F10 cells treated with  $\alpha$ -MSH

**Melanoma cell (B16F10)에서의 tyrosinase 활성 확인.** Tyrosinase는  $Cu^{2+}$ 와 결합한 효소로 동·식물, 미생물 및 사람 등에 널리 분포되어 있는 polyphenol oxidase로 멜라닌 합성 과정에서 속도를 제한하는 등 멜라닌 합성의 주요한 조절적 단계를 나타내는 효소이다[Kwak 등, 2001] 이러한 활성을 검증하기 위하여 선학초 열수 및 에탄올 추출물의 melanoma 세포에서의 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과 Fig. 3과 같이 나타내었다. 선학초 열수 추출물의 경우 10 µg/mL의 농도에서 17%의 저해효과를 나타내었으며, 선학초 에탄올 추출물의 경우 농도 의존적으로 저해 효과를 나타내었으며 가장 높은 농도인 10 µg/mL의 농도에서 26%의 저해 효과를 나타내었다. 이는 Sek[2007]의 적하수오 메탄올 추출물이 B16F10에서의 tyrosinase 발현이 200, 100, 50 µg/mL의 농도에서 증가한 tyrosinase의 발현을 현저히 억제하는 것을 확인한 결과와 비교하여 선학초 추출물은 낮은 농도에서 유의한 결과를 나타내었다.

**Tyrosinase 단백질 및 mRNA 발현 억제 효과 확인.** 선학초 추출물의 melanin 합성에 관계된 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 mouse melanoma 세포에 농도별로 처리한 후 48시간 뒤에 tyrosinase protein 발현을 Western blotting으로 확인하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인  $\beta$ -actin을 positive control로 사용하였다. 그 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 추출물을 처리하지 않는 B16F10군에서는 각 전사인자의 단백질 발현이 증가하였지만, 선학초 추출물을 농도별(0.5, 1,



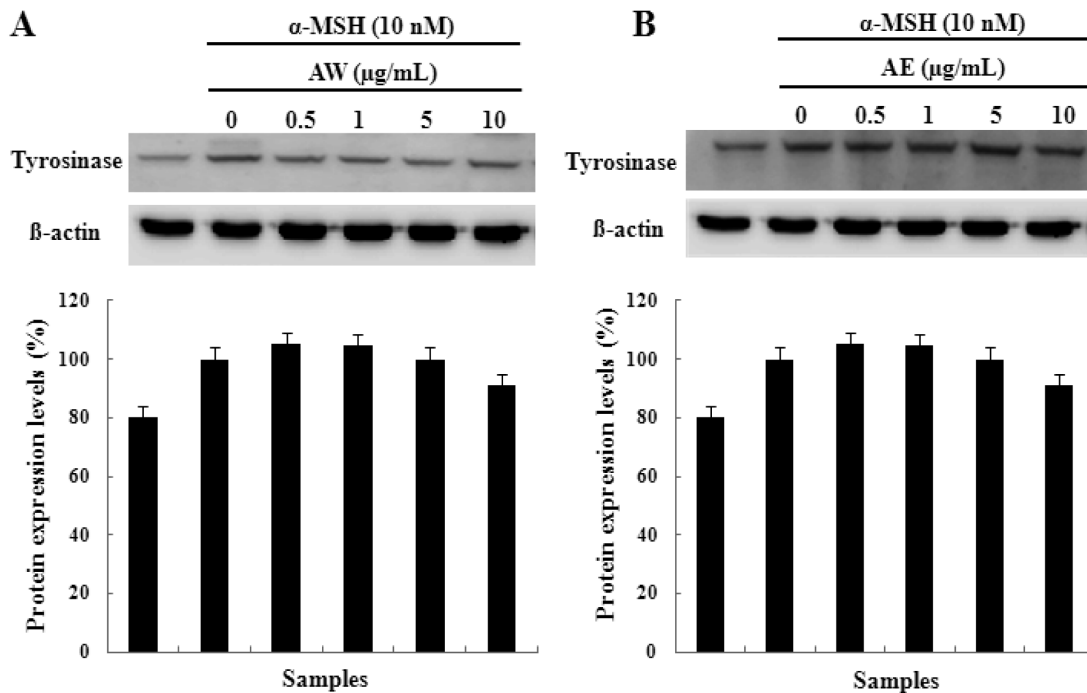
**Fig. 3. Inhibition tyrosinase activity of *A. pilosa* L. extracts on melanoma cell (B16F10). Result are means  $\pm$  SD of triplicate data. (A) *A. pilosa* L. extracted with water (B) *A. pilosa* L. extracted with ethanol. Nor: normal, in B16F10 cells not treated with  $\alpha$ -MSH and *A. pilosa* L.; con: control, in B16F10 cells treated with  $\alpha$ -MSH**

5, 10 µg/mL)로 처리한 B16F10군에서는 tyrosinase protein의 발현이 처리하지 않는 군보다 감소하였다. 또한 선학초 추출물

이 melanin 합성에 관계된 key enzyme인 tyrosinase의 mRNA에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 mouse melanoma 세포에 농도별로 처리한 후 48시간 뒤에 PCR로 mRNA 발현량을 측정하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase를 사용하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 추출물을 처리하지 않는 B16F10군에서는 각 전사인자의 mRNA 발현이 증가 하였지만, 선학초 추출물을 농도별로 처리한 군에서는 mRNA 발현이 감소하였다. 이는 Ha [2009]의 절편에 에탄올 추출물이 B16F10 세포에서 멜라닌 관련 단백질이 증가된 tyrosinase의 발현을 농도별 처리 시에도 감소 시키지 않았으며, Na[2009]의 목단피 추출물의 경우 tyrosinase, microphthalmia-associated transcription factor의 발현을 억제시키지 못한 결과와 비교하여 선학초 추출물은 근소하지만 농도 증가 시 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

**초 록**

선학초 추출물을 기능성 화장품 소재로 활용하기 위하여 미백효과를 검증하였다. 세포 내 tyrosinase 저해활성 측정결과 선학초 에탄올 추출물 500 µg/mL에서 42%의 저해활성을 나타내었다. 이는 선학초 추출물이 세포 내 tyrosinase 발현을 억제시킴으로서 멜라닌 합성 또한 저해 하는 것임을 확인 할 수 있었다. 선학초 추출물의 단백질 발현과 mRNA 발현 억제효과를 검토한 결과 선학초 열수 및 에탄올 추출물을 처리한 B16F10 군에서는 tyrosinase protein의 발현이 처리하지 않은 군보다 감소함을 확인할 수 있었다. 결과적으로 선학초 추출물의 미백효능을 확인할 수 있었으며, 식품 및 화장품의 기능성 소재로 이



**Fig. 4. Inhibition effects of *A. pilosa* L. extracts on the expression of tyrosinase protein in melanoma cell (B16F10). Result are means  $\pm$  SD of triplicate data. (A) *A. pilosa* L. extracted with water (B) *A. pilosa* L. extracted with ethanol**

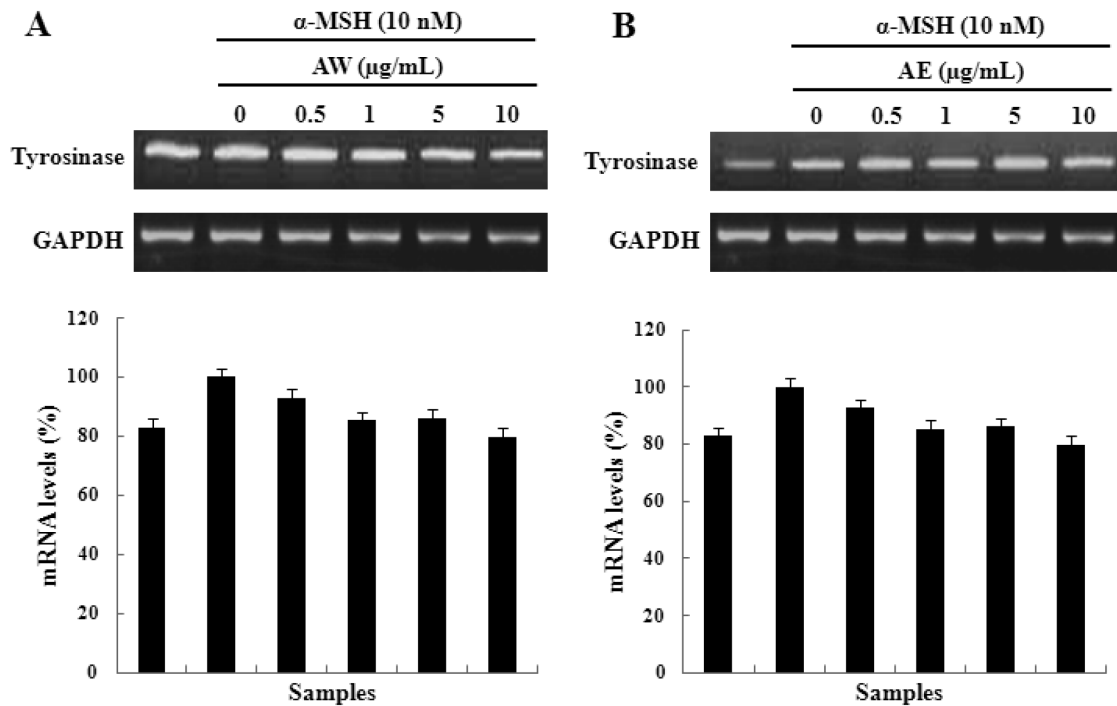


Fig. 5. Inhibition effects of *A. pilosa* L. extracts on the expression of tyrosinase mRNA in melanoma cell (B16F10). Result are means  $\pm$  SD of triplicate data. (A) *A. pilosa* L. extracted with water (B) *A. pilosa* L. extracted with ethanol

용이 가능할 것으로 판단된다.

**Key words:** 미백활성, 선화초, mRNA, tyrosinase protein

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: A103017).

### 참고문헌

- An BJ, Lee CE, Son JH, Lee JY, Choi GH, and Park TS (2005) Antioxidant, anticancer and tyrosinase inhibition activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* T. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **48**, 280–284.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, and Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* **47**, 936–942.
- Ha TK (2009) Inhibitory effect of *Fritillaria verticillata* willd. var. *thunbergii* bak ethanol extract on melanin biosynthesis. MD. Thesis, Sangji University. Korea.
- Kameyama K, Sakai C, Kuge S, Nishiyama S, Tomita Y, Ito S, Wakamatsu K, and Hearing VJ (1995) Expression of tyrosinase, tyrosinase related protein 1 and 2 (TRP-1 and TRP-2), silver protein and a melanogenic inhibitor regulates melanogenesis in human melanoma cells. *Pigment Cell Res* **8**, 97–104.
- Kim DS, Kim YM, Woo WH, and Mun YJ (2010) Study of inhibitory effect of melanogenesis and antioxidant activity of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* **24**, 236–241.
- Kim TH, Kim JM, Baek JM, Kim TW, Kim DJ, Park JH, and Choe M (2011) Antioxidant and whitening effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb water extract. *Korean J Medicinal Crop Sci* **19**, 177–184.
- Kobayashi T, Urabe K, Winder AJ, Jimenez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, Garcia-Borrón JC, and Hearing VJ (1994) Tyrosinase related protein-1 (TRP-1) function as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J* **3**, 5818–5825.
- Kwak JH, Seo UK, and Han YH (2001) Inhibitory effect of mugwort extracts on tyrosinase activity. *Korean J Biotechnol Bioeng* **16**, 220–223.
- Lee NH, Yang HC, Bu HJ, Jung DS, Lee SJ, and Riu KZ (2001) Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities and radical scavenging effects using plants in Cheju. *Korean J Pharmacogn* **32**, 175–180.
- Lee SH, Jung H, Lee JA, Go HY, Choi YK, Park JH, Kim JH, Ko SK, and Jun CY (2009) The anticancer effects and drug metabolic enzyme change by oral intake of *Agrimonia Pilosa* Ledeb. *Korean J Oriental Preventive Medical Society* **13**, 51–64.
- Mauviel A, Halcin C, Vasiloudes P, Parks WC, Kurkinen M, and Uitto J (1994) Uncoordinate regulation of collagenase, stromelysin, and tissue inhibitor of metalloproteinases genes by prostaglandin E<sub>2</sub>; Selective enhancement of collagenase gene expression in human dermal fibroblasts in culture. *J cell Biochem* **54**, 465–472.
- Na SH (2009) *Paeonia suffruticosa* Andr (PSA) inhibits melanin synthesis in mouse B16 melanoma cells. Ph. D. Thesis, KyungHee University, Yongin, Korea.
- Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minna JD, and Gazdar AF (1987) Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium based

- colorimetric assay. *Cancer Res* **47**, 5875–5879.
- Park SK, Kim SN, Lee JC, Kim HS, Kim YJ, Lee BG, and Chang IS (2004) Anti-aging effects on skin with jaeum-Dam (JED). *Korean J Herb* **19**, 67–76.
- Pavel S and Muskiet FA (1983) Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report. *Cancer Detect Prev* **6**, 311–316.
- Pentland AP, Shapiro SD, and Welrus HG (1995) Agonist-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and metalloproteinases by human macrophages is regulated by endogenous prostaglandin E2 synthesis. *J Invest Dermatol* **104**, 52–57.
- Sek SJ (2007) Inhibitory effect of polygonum multiflorum on melanin synthesis and its action mechanism in B16F10. Ph. D. Thesis, Daejeon University, Daejeon, Korea.
- Song JW (2007) Antioxidative and antitumor activities of extracts from *Saussurea lappa*, *Agrimonia pilosa* and *Prunella vulgaris*. MS Thesis, Keimyung University, Daegu, Korea.
- Yagi A, Kanbara T, and Morinobu N (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica* **3981**, 517–519.