

라벤더 오일이 UV-B로 조사된 마우스의 Nitric oxide 생성에 미치는 영향

송선영*, 이현화***†

Effect of Lavender (*Lavendular officinalis*) Essential Oil on Nitric Oxide Production in UVB-irradiated mice

Seon-Young Song*, Hyun-Hwa Lee***†

Abstract

The aim of this study is to evaluate the effects essential oil from *Lavendular officinalis* on the production of UVB-irradiated-induced nitric oxide(NO), *in vivo* and *in vitro*. NO is a recently discovered mediator of cell communication involved in a variety of physiological and pathophysiological processes. This enzyme is present in various tissues including smooth muscle cells and macrophages and take part in several immunopathological process. *In vitro*, the cytotoxicity and cell viability of aroma oil was evaluated by the MTT assay in the concentration of 0.01, 0.05, 0.1%. And, the effect of aroma oil was investigated to production of NO in human fibroblast cells line CCD-986sk (2×10^5 cell/well) after UVB-irradiation with aroma oil (0.01, 0.1, and 1%). The result showed that aroma oil did not affected the production of NO. *In vivo*, it was investigated to production of NO after UVB- irradiation with aroma oil. The experimental groups were divided into four groups. Aroma oil was stimulated the production of NO by itself. As the results, all of the *in vitro* and *in vivo*, aroma oil were affected production of NO by dependent the concentration-manners.

Key words : UVB, nitric oxide, lavender oil

서 론

Nitric oxide (NO)는 apoptosis와 신경전달 및 스트레스 등에 관한 다양한 생리, 병리학적 많은 과정 중에 관여된 물질로 NO synthases 라 불리우는 효소에 의해 L-arginine에서 합성되어진다. NOS에는 Ca^{2+} -의존성 (eNOS & nNOS)과 Ca^{2+} -비의존성 (iNOS)으로 나누어진다[23], [30]. NO는 평활근, 대식세포를 포함한 다양한 세포내에서 glomerular mesengial 세포의 성장과 mitogenesis 억제 및 대식세포 독성, 신장의 RDPase 방출 조절 등 면역병리 과정에 관여한다[12], [19], [26]. NO가 과도하게 분비되어지면 저혈압증, 돌연변이, 신경조직 손상 등이 유발되며 항균작용등의 다양한 생물

학적 활성을 지니고 있는 것으로 알려져있다[18].

라벤더오일은 천연에센셜오일 중 미용목적과 치료목적으로 가장 많이 사용되어져 왔으며 항균, 진정, 항우울 및 피부상처에 이용되어 왔다[7], [8]. Hay 등(1998) [11]은 원형탈모증이 있는 86명을 대상으로 두피에 로즈마리, 라벤더, 타임, cedarwood essential oil을 carrier oil(jojoba and grapeseed)에 섞어 매일밤 두피에 발라준 결과 머리카락 성장에 효과가 있었다고 보고하였다. Holmes 등(2002) [13]은 라벤더 향이 치매환자의 행동을 조정해준다고 보고하였으며, 그 외에도 치매와 관련된 임상 효능에 대해 많은 보고가 있다[4], [31]. 또한 라벤더 향이 스트레스와 불안을 해소하는 효과가 있으며 노인의 건강증진에 효과적이라는 보고가 있다[24]. 그러나 직접적으로 그 증상과 관련한 과학적 근거가 밝혀진 문헌을 찾아보기 힘들어 그 유효성을 정확하게 판단하기는 힘든 실정이고, 실험적인 연구는 아직까지 미흡한 실정이다.

이에 본 연구에서는 아로마오일중 라벤더 오일의 치료제로서의 이용가능성을 알아보고자 먼저 라벤더 오

*광주보건대학 피부미용과(Dept. of Skin & Beauty, Gwangju Health College University)

**조선대학교 자연과학대학 생물학과(Department of Biology, Chosun University)

†Corresponding author: hhlee@chosun1.ac.kr
(Received : April 21, 2008, Revised : May 20, 2008
Accepted : June 18, 2008)

일 자체의 세포독성을 검증하여 무독함을 확인한 후, UVB-유도 싸이토카인, 염증 반응과 세포고사를 알아보기 위하여 생쥐에 UVB를 조사한 후 아로마오일을 처리하여 생쥐 피부에서 UVB-유도 싸이토카인 중 염증 반응 및 면역에 관여하는 NO의 발현양상을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

Human fibroblast skin cell인 CCD-986sk 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, KOREA)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(이하, DMEM이라 함)에 10% FBS, 100u/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다.

2. 실험 동물

실험동물은 대한실험동물센터(다물, 대전, 한국)에서 생산, 공급하고 있는 6주령된 C57BL/6 mouse(체중 25~35 g)를 사용하였다. 마우스는 23±2°C, 습도는 45±5%로 유지된 사육실에서 폴리카보네이트로 제작된 사육장(40×25×17 cm)에서 사육하였으며, 사료(제일제당 제품)와 급수는 자유롭게 섭취 시켰다.

3. UVB 조사(irradiation)와 아로마오일 처리

1) *In vitro*

준비된 정상 CCD-986sk 세포(2×10^5 cell/well)에 302nm 파장의 UVB를 방출하는 램프(Sankyo denki, Japan)로 1J/cm²의 광량을 조사한 후, 아로마오일(0.01, 0.1, 1 %)를 각각 첨가 한 후, 시간대(3, 6, 12 시간)별로 NO를 측정하였다.

2) *In vivo*

C57BL/6 마우스에 302 nm 파장의 UVB를 방출하는 램프 (Sankyo denki, Japan)로 1J/cm²의 광량을 조사한 후, 아로마오일 원액을 각 실험군별로 수 회 피부에 발라주어 잘 스며들도록 하였다. 실험군은 다음과 같다. 실험군 1는 정상군, 실험군 2는 UVB를 조사한 후, 일 반식이를 공급한 군, 실험군 3은 UVB를 조사한 후, 아로마오일을 2일 1회 처리한 군, 실험군 4는 UVB를 조사한 후, 아로마오일을 1회만 처리한 군 등으로 1, 3, 7, 15, 21일째에 마우스의 피부를 절개하였고, 각 실험군 당 생쥐 5마리를 사용하였다.

4. MTT 측정

배양중인 세포 950 µl에 MTT solution을 50 µl씩 섞

어서 세포에 처리해 준 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3~4시간 배양하였다. DMSO (350 µl)을 각각의 sample에 넣어 반응시킨 후, microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 540 nm에서 O.D.값을 측정하였다. 이때, blank는 PBS 용액으로 하였다.

5. UVB-유도 Nitric oxide (NO) 측정

준비된 정상 CCD-986sk 세포에(2×10^5 cell/well)에 각각 aroma oil (0.01, 0.1, 1%)를 농도별로 각각 첨가한 후, 각각의 시간대(3, 6, 12 시간) 별로 NO를 측정하였다. CCD-986sk 세포에서 생성된 NO의 양은 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로써 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96 well plate에 각각 분주한 후 Griess reagent (0.8% sulfanilamide/0.75% N-(naphthylethylene) diamine in 0.5N HCl, Sigma) 100 µL를 첨가하였다. 15분간 실온에서 방치한 후, 540 nm 파장에서 microplate reader를 이용하여 nitrite 농도를 측정하였다. Sodium nitrate (0.5~100M)를 nitrite 표준으로 이용하였다.

6. 단백질 함량 측정

각 실험군별 정량 계산을 위한 단백질 농도는 BCA protein assay kit를 이용하였다. BCA를 표준물질로 사용하여 각각의 단백질 시료 25 µL를 96 well plate에 분주하고 시약 A와 시약 B(50:1)로 구성된 BCA 약물(200 µL)을 각각 첨가한 후, 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후, microplate reader 을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 통계처리

각 실험군별 통계학적 유의성은 개인용 컴퓨터 프로그램인 SAS를 이용한 Anova test에 의하여 검정하였으며, 각 *p*값은 0.05 미만의 것을 유의한 수준으로 고려하였다.

결 과

1. NO 생성에 관한 라벤더오일의 효과

라벤더오일 자체가 NO 생성에 자극을 주는 지를 알아보기 위하여 human fibroblast cell인 CCD-986sk (2×10^5 cell/well)에 오일을 각각 0.01, 0.1, 1%를 넣고 배양하였다. 배양 후, 3, 6, 12 시간 후, 세포배양액을 각각 취하여 NO를 측정하였다(Table 1, Fig. 1). 아로마오일을 첨가하지 않고 배양한 정상군의 경우 0.4~0.9 정도의 NO를 생성하였다. 오일 처리군의 경우 0.1, 1% 첨가군의 경우 배양 6 시간째에 NO 생성을

자극하는 것을 관찰하여 라벤더오일 자체도 NO 생성에 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었다(* $P < 0.05$).

2. in vitro에서 UVB-유도 NO 생성에 관한 라벤더오일의 효과

라벤더오일이 UVB-유도 NO 생성에 어떠한 영향을 주는 지를 알아보기 위하여 human fibroblast cell인 CCD-986sk (2×10^5 cell/well)에 오일을 각각 0.01, 0.1, 1%를 넣고 UVB를 조사한 후 배양하였다. 배양 후, 3, 6, 12 시간 후, 세포배양액을 각각 취하여 NO를 측정하였다(Table 2, Fig. 2). 오일을 첨가하지 않고 배양한 UVB 단독 조사군의 경우 1.5~1.8 정도의 NO를 생성하는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만, 오일첨가 배양군의 경우 UVB 단독 조사군에 비해 NO 생성에 큰 차이가 없음을 관찰하였다.

3. in vivo에서 UVB-유도 NO 생성에 관한 라벤더의 효과

라벤더오일이 UVB-유도 NO 생성에 어떠한 영향을 주는 지를 알아보기 위하여 UVB 조사 후, 오일 원액을 생쥐 피부에 각 군별로 수 회 발라주었다. 각 실험군별로 피부를 절개하여 조직용해제를 이용하여 조직을 용해한 후, 실험에 사용하였다. 오일 처리군의 경우 UVB 단독 처리군에 비해 NO 생성에 큰 차이를 나타내지 못해 효과가 없음을 관찰할 수 있었다(Table 3, Fig. 3).

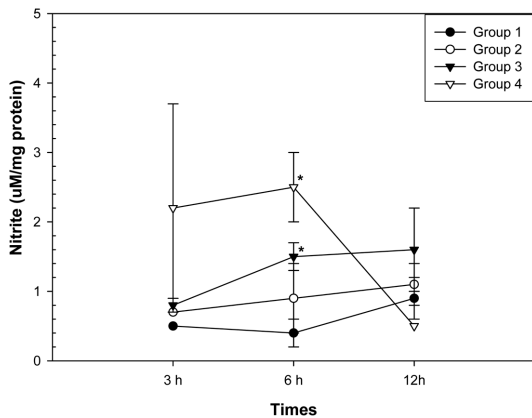


Fig. 1. Effects of aroma oils from lavender on the NO production from CCD-986sk fibroblast cell line as a function of concentration. Each groups were cultured during the 3, 6, or 12 hours. The nitrite was assayed as described on the methods. The results are expressed as compared with the arbitrary intensity of control (3 determinations, mean \pm SD, * $P < 0.05$ vs. control).

고 찰

피부는 인체의 내부와 외부환경 사이에 방벽역할을 하며 화학물질이나 자외선을 포함한 외부 환경오염 물질 및 미생물의 침입을 방어하여 주위환경으로부터 생체를 보호한다[32]. 피부에 Ultraviolet light (UV)가 조사되면 피부장애, 면역억제, 광노화, 암 등을 유발시키

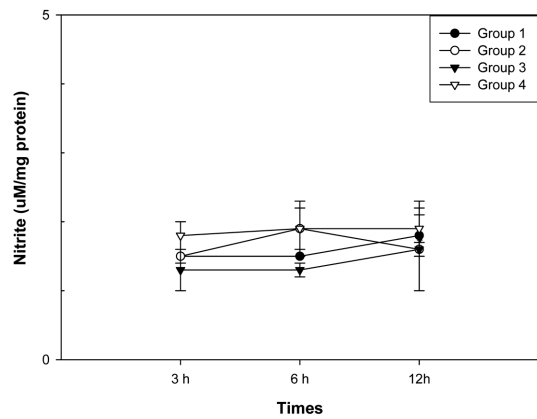


Fig. 2. Effects of aroma oils from lavender on the UVB-induced NO production in the CCD-986sk fibroblast cell. Each groups were cultured during the 3, 6, or 12 hours. The nitrite was assayed as described on the methods. The results are expressed as compared with the arbitrary intensity of control (3 determinations, mean \pm SD, * $P < 0.05$ vs. control).

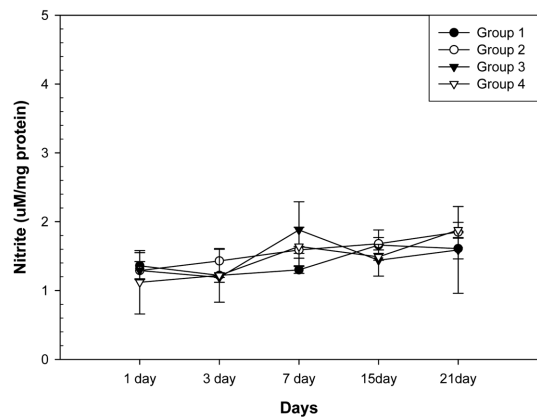


Fig. 3. Effects of aroma oils from lavender on the UVB-induced NO production in the mice skins. UVB was irradiated. And, each groups were measured during the 1, 3, 7, 15, or 21 days. Each group was used 5 mice. The results are expressed as compared with Group 2 (5 determinations, mean \pm SD).

Table 1. Effects of aroma oils from lavender on the NO production from CCD-986sk fibroblast cells (unit:μM/mg protein).

Groups Times	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
3 hour	0.5±0.0	0.7±0.0	0.8±0.1	2.2±1.5
6 hour	0.4±0.2	0.9±0.5	1.5±0.2*	2.5±0.5*
12 hour	0.9±0.3	1.1±0.3	1.6±0.6	0.5±0.0

**P*<0.05 compared with Group 1

Group 1.CCD-986sk cell was cultured DMEM culture medium.

Group 2.CCD-986sk cell was cultured DMEM culture medium and aroma oil (0.01%).

Group 3.CCD-986sk cell was cultured DMEM culture medium and aroma oil (0.1%).

Group 4.CCD-986sk cell was cultured DMEM culture medium and aroma oil (1%).

Table 2. Effects of aroma oils from lavender on the UVB-induced NO production in the CCD-986sk fibroblast cells (unit:μM/mg protein).

Groups Times	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
3 hour	1.5±0.0	1.5±0.1	1.3±0.3	1.8±0.2
6 hour	1.5±0.0	1.9±0.3	1.3±0.1	1.9±0.4
12 hour	1.8±0.3	1.6±0.1	1.6±0.6	1.9±0.4

Group 1.CCD-986sk cell was cultured DMEM culture medium after UVB- irradiation.

Group 2.CCD-986sk cell was cultured DMEM culture medium and aroma oil (0.01%) after UVB-irradiation.

Group 3.CCD-986sk cell was cultured DMEM culture medium and aroma oil (0.1%) after UVB-irradiation.

Group 4. CCD-986sk cell was cultured DMEM culture medium and aroma oil (1%) after UVB-irradiation.

을 주어 DNA 상해, apoptosis, 유전자 전사 등이 일어나고, cytokine 경로의 신호전달에도 영향을 준다[2], [6], [20], [21], [22], [28], [35]. UV에 조사된 피부는 광화학반응(photochemical reaction)인 활성산소종(ROS) 반응이 유발되어 heme oxygenase-1 (HO-1)발현과 interleukin 생성을 유도한다[14], [29], [34]. 또한, 피부가 심하게 자극되면 DNA상해와 피부암이 촉진된다. 이러한, 생체적 현상을 조절하기 위한 면역조절인자로 proinflammatory cytokine인 TNF-, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12과 prostaglandin E₂ (PGE₂), 면역자극 cytokine인 IFN-gamma와 같은 물질 등이 각질세포와 표피세포에서 분비되어진다[15], [27].

NO는 암세포나 대식세포에서 감염된 미생물에 대한 cytotoxic agent로서 면역학적으로 작용하면서 상처 치

Table 3. Effects of aroma oils from lavender on the UVB-induced NO production in the mice skins (unit:μM/mg protein).

Groups Days	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
1 day	1.36±0.19	1.29±0.13	-	1.12±0.46
3 day	1.22±0.03	1.43±0.17	1.19±0.07	1.22±0.39
7 day	1.30±0.05	1.59±0.05	1.88±0.41	1.64±0.28
15 day	1.66±0.22	1.68±0.09	1.44±0.23	1.49±0.05
21 day	1.61±0.15	1.65±0.01	1.59±0.63	1.88±0.11

**P*<0.05 compared with Group 2

Group 1. Mice were breed on the general conditions.

Group 2. Mice were breed on the general conditions after UVB-irradiation.

Group 3. Mice were breed and rubbed the skin with aroma oil once per two days after UVB-irradiation.

Group 4. Mice were breed and rubbed the skin with aroma oil only one after UVB-irradiation.

유에 관여하고, 대식세포와 여러 암세포주에 apoptosis를 유발한다[1], [25]. UV를 조사한 후 broccoli 추출물을 1μmol sulforaphane에 넣어 0.3μmol에서 1.0 μmol 까지 공급한 경우 NO 생성량에 영향을 주면서 종양 생성을 현저하게 감소시킨다[5]. 대식세포 RAW 264.7 세포주에 lipopoly-saccharide (LPS) (1 μg/L)를 투여하여 유도 염증 반응을 유도한 후 오가피 성분(1~100 μg/mL)을 첨가하여 세포에 배양하면, 오가피성분을 10, 100 μg/mL을 첨가해 준 군에서 NO 생성량이 감소한다[36]. 본 연구에서는 human fibroblast cell line인 CCD-986sk cell에 aroma oil (0.01, 0.1, 1%)을 배양액에 함께 처치하였는데, 정상군에 비해 약간 낮은 NO 생성이 관찰되어 aroma oil 자체도 NO 생성에 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었지만 큰 차이를 보이지 않아 독성이 없는 것으로 관찰되었다. RAW264.7 세포에 고분자 수용성 chitosan (water-soluble chitosan, WSC, M.W. 300,000 Da, DAC>90%)을 첨가하면(0.0.1, 0.1, 1 mg/ml) 그 자체로는 NO 생성에 효과가 없지만, rIFN-γ와 chitosan을 혼합하여 세포에 처리할 경우 WSC 농도에 비해하여 배양 24시간 후부터는 NO 생성이 증가 된다[16]. β-1,3 glucan 성분을 Kuffer세포에 첨가하여 배양한 경우, β-1,3 glucan 성분의 농도 증가에 비해하여 NO의 생성이 증가됨이 보고되었다 [10]. 홍삼 및 백삼 사포닌 성분(50~500 μg/mL)을 교세포(gial cells)가 들어있는 배양액에 처치한 후 LDH를 측정하면 홍삼 사포닌의 경우 50~100 μg/mL, 백삼 사포닌은 50~200 μg/mL에서 LDH가 정상 세포배양액에 비해 적게 분비된다 [33]. 대식세포인 RAW264.7세

포에 Alkoxy Glycerol (이하, AG라 함) 및 AG의 주요 성분인 Batyl, Chimyl 용액을 세포배양액에 첨가·배양한 경우 LDH는 세포배양액만 단독으로 처리한 정상군에 비해 큰 차이를 나타내지 않는다[17].

본 연구에서는 aroma oil 중 라벤더 오일의 유효성을 관찰하고자 먼저 라벤더 오일 자체의 세포독성을 검증하기 위하여 MTT를 측정하였다. 또한 UVB-유도 사이토카인을 알아보기 위하여 human fibroblast cell인 CCD-986sk cell과 mouse 피부에 UVB를 조사하여 cytokines을 유도한 후, aroma oil을 처리하여 mouse 피부에서 UVB-유도 사이토카인 중 염증 반응 및 면역에 관여하는 NO를 측정하여 aroma oil의 효과를 관찰하였다. 실험 결과, *in vitro* 실험의 경우 실험에 사용한 aroma oil은 세포독성을 나타내지 않았으며, *in vitro*와 *in vivo* 에서 라벤더 오일의 UVB-유도에 의한 NO 생성에 농도와 시간대별로 관찰한 결과 크게 유의할만한 결과는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 추후, 라벤더 오일의 UVB-유도에 따른 면역반응 및 스트레스에 대한 방어기작 등 여러 생물학적 기작에 관한 기초 자료를 제공하였다.

참 고 문 헌

- [1] Ann, S. Yoram, V. Richard, W. and Timothy R.B., "Nitric oxide and wound repair: role of cytokines?" Nitric Oxide, 7, 1-10, 2002.
- [2] Annemarie, S. Johan, G. and Henk, V.L., "Ultraviolet radiation, resistance to infectious diseases, and vaccination response" Methods, 111-121, 28, 2002.
- [3] Albena, T.D.K. Stephanie, N.J. Jed, W.F. Lingxiang, Y. Scott, L.W. Karen, T.L. Kritina, L.W. and Paul, T., "Protection against UV-light-induced skin carcinogenesis in SKH-1 high-risk mice by sulforaphane-containing broccoli sprout extract" Cancer Letters, 240, 243-252, 2006.
- [4] Ballard, C.G., Brien, J.T., Reichelt K., and Perry E.K., Aromatherapy as a safe and effective treatment for the management of agitation in severe dementia: the result of a double-blind, placebo-controlled trial with Melissa., J. Clin. Psychiatry., 63(7), pp. 553-558.2002.
- [5] Daniel, B.Y. and Margaret, L.K., "DNA repair and cytokines in anti-mutagenesis and anticarcinogenesis." Mutation Res, 350, 255-260, 1996.
- [6] Frank, R., "Ultraviolet radiation and tumor immunity." Methods, 28, 122-129, 2002.
- [7] Gattefosse, R.M., Gattefosse's Aromatherapy., England, Saffron Walde, 1937.
- [8] Grieve, M., A Morden Herbal., Harcourt, New York Brace & co, 1931.
- [9] Halliday, G.M. Bestak, R. Yuen, K.S. Cavanagh, L.L. and Barnetson, R., "UV-induced immunosuppression in virus infections." Mutation RES, 422(1), 131-138, 1998.
- [10] Han, M.D. Lee, J.W. Jeong, H. Kim, Y.S. Ra, S.J. and Yoon, K.H., "Nitric oxide, TNF- α and TGF- β , formation of rat kupffer cell activated by the β , -glucan from *Ganoderma lucidum*." Kor J Microbiol Biotechnol 27, 28-34.1999.
- [11] Hay, I.C., Jamieson and Omerod A.D., Randomized trial of aromatherapy. succesful treatment for alopecia areata., Arch. Dermatol., 134, pp. 1349-1352. 1998.
- [12] Heneka, M.T. Loschmann, P.A. Gleichmann, M. Weller, M. Schulz, J. B.. Wullner, U. and Klockgether, T., "Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-/lipopoly-saccharide." J Neurochem, 71, 88-94.1998.
- [13] Holmes, C.V., Hopkins, C., Hensford, V., MacLaughlin, D., Wilkinson, and Roseninge, H., Lavender oil as a treatment for agitated behavior in severe dementia: a placebo controlled study., Int. J. Geriatr. Psychiatry., 17(4), pp. 305-308. 2002.
- [14] Ifor, R.W. and Thomas, S.K., "Immunity at the surface: Homeostatic mechanism of the skin immune system: Minireview." Life Sci, 58(18), 1485-1507, 1996.
- [15] Jeffrey, P.W. Dat, X.N. and Stephen, E.U., "Determining the role of cytokines in UV-induced immunomodulation." Methods, 28, 71-78, 2002.
- [16] Jeong, H.J., Koo, H.N., Oh, E.Y., Chae, H.J., Suh, S.B., Cho, K.H., Park, B.R., Park, S.T., Lee, Y.M., and Kim, H.M., "Nitric oxide production by high molecular weight water-soluble chitosan via nuclear factor-kB activation." Int J Immunopharmacolog, 22, 923-933, 2000.
- [17] Kim, Y.H. Yoon, H. J. Moon, M.E. Lee, J.H. Park, H.S. and Kim, J. S., "Production of NO, TNF- α and IL-6 by Squalene, Alkoxy Glycerol, Batyl and Chimyl solutions in RAW 264.7 macrophage cells." J Kor Soc Sci Nutr, 34(10), 1503-1508, 2005.
- [18] Knowles, R.G. and Moncada, S., "Nitric oxide as a single in blood vessels." TIBS, 17, 399-402, 1992.
- [19] Lakics, V. and Vogel, S.N., "Lipopolysaccharide and ceramide use divergent signaling pathways to induce cell death in murine macrophages." J Immunol, 161, 2490-2500, 1998.
- [20] Martin, L. Mina, Y. and Barbara, A.G., "Fas/Fas

- ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes" *Experimental Cell Res*, 232, 255-262, 1997.
- [21] Matthew, M. Lakshmi, M. and Miroslav, B., "Interleukin-12 blocks a specific subset of the transcriptional profile responsive to UVB in epidermal keratinocytes" *Molecular Immunology*, 43, 1933-1940, 2006.
- [22] Michael, A.B. and Tim, B., "UVA-mediated activation of signaling pathway involved in skin tumor promotion and progression." *Seminars in Cancer Biology*, 14, 131-138, 2004.
- [23] Moncada S., "The L-arginine: nitric oxide pathway." *Acta Physiol Scand*, 145, 201-227, 1992.
- [24] Motomura, N., Sakurai, A., Yotsuya, Y., "Reduction of mental stress with lavender odorant." *Percept. Mot. Skills*, 93(3), pp. 713-718. 2001.
- [25] Schmidt, H.H. and Murad, F. "Purification and characterization of a human NO synthase." *Biochem Biophys Res Commun*, 181, 1372-1377 1991.
- [26] Park, S.W. Yoon, H.J. Lee, H.B. Hooper, N.M. and Park, H.S., "Nitric oxide inhibits the shedding of the glycosylphosphatidylinositol-anchored dipeptidase from porcine renal proximal tubules." *J Biochem*, 364, 211-218, 2002.
- [27] Paula, C.E. Sheila, M. and John, W.H., "α-Melanocyte stimulating hormone, inflammatory and human melanoma." *Peptide*, 27, 444-452, 2006.
- [28] Peter, A.S. Frieda, D. Eefke, W. and Henk, V.L., "No adaptation to UV-induced immunosuppression and DNA damage following exposure of mice to chronic UV-exposure." *J Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84(1), 28-37, 2006.
- [29] Ponciano, D.C., "Basic science answers to questions in clinical contact dermatitis." *Am J Contact Dermatitis*, 7(1), 47-52, 1996.
- [30] Rupprecht, H.D. Akagi, Y. Keil, A. and Hofer, G., "Nitric oxide inhibits growth of glomerular mesangial cells: role of the transcription factor EGR-1." *Kidney Int*, 57, 70-82, 2000.
- [31] Stephen, E.U. and David, A.S., "The role of cytokines in UV-induced systemic immune suppression" *J Dermatolog Sci*, 23(1), S10-S12, 2000.
- [32] Smallwood, J.R., Brown, R., Coulter, F., Irvine, E., and Copland C., "Aromatherapy and behaviour disturbances in dementia: a randomized controlled trial." *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, 16(10), pp. 1010-1013. 2001.
- [33] Sung, J.H. Choi, D.H. Kim, D.H. Chun, B.G. and Choi, S.H., "White ginseng saponin upregulated the production of TNF-α, IL-1β, and NO in primary cultures of mixed glial cells." *J Ginseng Res*, 28, 120-126. 2004.
- [34] Ute, C.O.J. Beate, S. Andrea, F. and Hans, K.B., "The effect of β-carotene on the expression on the interleukin-6 and heme oxygenase-1 in UV-irradiated human skin fibroblasts in vitro." *FEBS Letters*, 509, 186-190, 2001.
- [35] Vivienne, E.R., "Ultraviolet radiation and the contact hypersensitivity reaction in mice." *Methods*, 20-24, 28, 2002.
- [36] Yee, S.T. Jeong, Y.R. Ha, M.H. Kim, S.H. Byun, M.W. and Jo, S.K., "Induction of nitric oxide and TNF-α by herbal plant extracts in mouse macrophages." *Kor J Soc Food Sci Nutr*, 29, 342-348. 2000.