

연잎, 연꽃, 연꽃 수술 추출물이 UVB 자외선 조사에 의한 각질형성세포의 보호 및 피부 노화 방지에 미치는 영향

장문석¹, 고은빛¹, 이호진¹, 김주성¹, 김진수¹, 지성원¹,
김휴영¹, 염명훈², 김덕희², 김한곤², 박성규^{1*}

1 : 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실
2 : (주) 아모레퍼시픽 기술연구원 피부과학연구소

The Effects of *Nelumbo nucifera* on Ultraviolet-B Irradiated human Keratinocytes

Mun Seog Chang¹, Eun Bit Ko¹, Ho Jin Lee¹, Ju Sung Kim¹, Jin Soo Kim¹, Sung Won Jee¹,
Hyu Young Kim¹, Myeong Hoon Yeom², Duck Hee Kim², Han-Kon Kim², and Seong Kyu Park^{1*}

1 : Dept. of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University
2 : Skin Research Institute, R&D Center, AmorePacific Corporation, Kyeonggi-do, Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the anti-aging effects on cultured human keratinocytes with *Nelumbo nucifera* extracts.

Methods : Each parts of leaves, flowers and stamen were extracted with water or 70% ethanol. These extracts were tested for cell viability on HaCaT cells (human keratinocyte line) by MTT assay. We investigated the effects of Ultraviolet-B (UVB) irradiation on cytotoxicity and lipid peroxidation in cultured skin keratinocytes.

Results : The ethanol extract of *Nelumbo nucifera* flowers showed maximum cell viability as 111.39% in 30 ug/ml concentration. The water extracts of stamen, flowers, leaves showed cell viability as 107.12, 101.65, 101.46%, respectively. HaCaT keratinocytes were survived 63.06% at 20 mJ/cm² UVB irradiation. The cell membrane lipid peroxidation was measured by accumulation malondialdehyde (MDA). The levels of MDA were decreased by the ethanol extract of *Nelumbo nucifera* flowers and the water extracts of stamen.

Conclusions : These finding suggest that the ethanol extract of *Nelumbo nucifera* flowers prevent anti-aging effects on cultured human keratinocytes during UVB irradiation.

Key words : Ultraviolet-B (UVB), HaCaT keratinocyte, *Nelumbo nucifera*

서 론

햇빛은 우리의 삶에 꼭 필요한 반면 피부암이나 노화 등의 피부 장애, 백내장, 전신 면역 등에 좋지 않은 영향을 미치고 있다. 자외선에 오래 노출되면 인체의 피부에서는 생체반응으로 염증 및 조직손상, 암의 발생, 노화의 촉진 등 다양한 피부변화를 일으킨다. 자외선에 의한 피부 반응 중 일광화상은 주로 Ultraviolet-B (UVB)가 관여하며 흉반형성 능력이 Ultraviolet-A (UVA)에 비해 1,000배 정도 강한 것으로 알려져 있다¹⁾.

인간의 피부는 시간이 지남에 따라 내적으로는 신진대사를

조절하는 각종 호르몬의 분비가 감소하고, 면역 세포의 기능과 세포들의 활성이 저하되어 생체에 필요한 면역 단백질 및 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되어 생기는 내인성 노화 (intrinsic aging)와 외적으로는 각종 오염물질과 자외선에 의한 광노화 (photoaging)에 의해 피부가 얇아지며 탄력이 감소하게 된다^{2,3)}. 인체 피부는 자외선 조사에 노출됨에 따라 표피 내 각질형성세포와 멜라닌세포가 UVB에 의해 세포손상을 받게 된다⁴⁾.

연꽃 (*Nelumbo nucifera* Gaertner)은 수련과의 여러해살이 수생 식물로서 연꽃의 잎을 荷葉, 연꽃의 꽃봉우리를 蓮花, 연꽃의 수술을 蓮鬚라고 한다⁵⁾.

*교신저자 : 박성규. 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실.
· Tel : 02-961-0330. · Fax : 02-961-0536. · E-mail : cervus@chol.com.
· 접수 : 2011년 5월 6일 · 수정 : 2011년 6월 7일 · 채택 : 2011년 6월 10일

하염은 暑熱煩渴을 치료하며, 頭目的 風熱을 上清하여 赤遊火丹과 痘疹을 치료하고, 토혈과 하혈에 대하여 지혈 효과가 있다. 연화는 味는 苦, 甘하며 性平하고, 肝經, 胃經으로 歸經한다. 『日華子本草』에서 益色駐顏의 효능이 기록되어 있으며, 지혈 작용이 있어 소변출혈, 부인 하혈을 치료한다. 연수는 『本草綱目』에서 悅顏色, 烏鬚髮에 효과가 기록되었으며, 유정, 소변빈삭, 유뇨 등의 치료에 응용되었다⁶⁾.

본 연구팀에서는 연잎 에탄올 추출물이 피부노화의 주 증상인 주름의 예방 및 완화 효과가 있음을 보고하였으며⁷⁾, 연꽃 수술 물 추출물이 tyrosinase 활성 억제와 Clone M-3 세포의 생존을 및 멜라닌 생성 억제에 대한 우수한 효과를 나타내어 미백 원료로 적합한 것으로 보고한 바 있다⁸⁾.

이에 피부 광노화에 대한 각질형성세포 손상을 억제하기 위하여 연잎, 연꽃, 연꽃 수술의 에탄올 추출물 및 물 추출물에 대한 효과를 비교 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료 및 검액의 조제

1) 약재 및 시약

본 실험에 사용한 연잎, 연꽃, 연꽃 수술은 전라남도 무안 군에서 채취하여 (주)다연에서 가공한 것을 사용하였다. 실험에 사용한 시약은 일급시약을 사용하였다.

2) 검액의 조제

연잎 300 g을 70% 에탄올 6,000 ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간동안 가열한 다음 여과지로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여 동결건조기를 이용하여 건조 엑기스 63.5 g (수율 21.2%)을 얻었다. 연잎 300 g을 증류수 6,000 ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간동안 가열한 다음 여과지로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여 동결건조기를 이용하여 건조 엑기스 72.12 g (수율 24.04%)을 얻었다.

연꽃 300 g을 70% 에탄올 6,000 ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간동안 가열한 다음 여과지로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여 동결건조기를 이용하여 건조 엑기스 10.20 g (수율 3.40%)을 얻었다. 연꽃 300 g을 증류수 6,000 ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간동안 가열한 다음 여과지로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여 동결건조기를 이용하여 건조 엑기스 10.50 g (수율 3.50%)을 얻었다.

연꽃 수술 300 g을 증류수 6,000 ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간동안 가열한 다음 여과지로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여 동결건조기를 이용하여 동결건조기를 이용하여 건조 엑기스 63.75 g (수율 21.25%)을 얻었다.

2. 방법

1) Cell line 및 culture

(1) 세포주

실험에 사용된 세포주는 HaCaT cell (human keratinocyte line)로서 (주) 아모레퍼시픽 기술연구원으로부터 분양 받아서 사용하였다.

(2) 세포 배양

HaCaT cell은 37°C, 5% CO₂의 조건에서 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Co), 100 ug/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin 이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)이 사용되었다. HaCaT cell은 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식시킨 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffer saline (PBS)용액으로 씻어 준후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 incubator에서 1분간 처리한 다음 trypsin-EDTA 용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착시켰다. 탈착된 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM 15 ml을 새로운 배양용기에 옮겨 1:20의 split ratio로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다.

(3) Cell viability 측정

시료의 세포 독성 정도를 알아보기 위하여 Mosmann (1983), Kotnik (1990) 등의 방법을 응용하여 MTT test로 실험하였다^{9,10)}. HaCaT cell을 1 X 10⁴ cells/well의 밀도로 96 well에 100 ul의 배지와 함께 분주한 뒤, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 배지를 버리고 PBS로 씻어 준 다음 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료를 0.1 ug/ml 에서 30 ug/ml 까지 다양한 농도에 따라 각 well에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT를 20 ul씩 각 well에 첨가하고 알루미늄 호일로 차광시킨 후 4시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양액을 제거하고 DMSO용액 200 ul를 첨가하여 37°C incubator에서 1시간 반응 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

(4) UVB 조사

세포에 UVB 조사하여 세포 성장율을 알아보기 위하여 Mosmann (1983), Kotnik (1990) 등의 방법을 응용하여 MTT test로 실험하였다^{9,10)}. HaCaT cell을 1 X 10⁴ cells/well의 밀도로 96 well에 100 ul의 배지와 함께 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 배지를 버리고 PBS로 씻어준 다음 배양액을 모두 제거하고, PBS 100 ul를 넣어 UVB 10, 20, 30 mJ/cm² 조사한 후 PBS를 버리고 새로운 PBS로 2번 씻어 준 다음 배양액을 넣어 5시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 전에 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT를 20 ul씩 각 well에 첨가하고 알루미늄 호일로 차광시킨 후 4시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양액을 제거하고 DMSO 용액 200 ul를 첨가하여 37°C incubator에서 1시간 반응 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

(5) UVB에 의한 LPO 생성에 미치는 영향 측정

시료의 UVB에 의한 과산화지질의 생성에 대한 효과를 알아보기 위해 Ohkawa (1979) 등의 방법을 응용하여 실험하

였다¹¹⁾. HaCaT cell을 1×10^6 cells/ml의 밀도로 6 well plate (Corning, USA)에 배지와 함께 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어 준 후 PBS를 모두 제거하고 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 각각의 시료를 10 ug/ml의 농도로 각 well에 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 버리고 PBS로 세척한 후 PBS 1 ml을 넣고 UVB 20 mJ/cm² 조사한 다음 다시 PBS 용액으로 씻어 주고 각 well에 FBS free DMEM을 처리하고 5 시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 PBS로 2 회 수세한 후 스크랩퍼를 이용하여 PBS 500 μ l를 넣고 긁어냈다. 이것을 1.5 ml의 eppendorf tube에 담아 15,000 \times g에서 5 분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 lysis buffer를 첨가하여 cell을 풀어주었다. 그 후 cell을 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1 μ l를 취해 Bradford's method로 단백질을 정량하였다¹²⁾. 15 ml cornical tube에 각 농도별 시료를 넣고 0.1 M PPB (pH 7.5), 8.1% SDS, 20% acetate buffer (pH 3.5), 0.8% TBA를 처리하였다. 95°C에서 1 시간 동안 incubation 시킨 후 running water에서 식혔다. n-butanol : pyridine (15 : 1)의 혼합액을 가한 후 vortexing 한 후 1,500 g에서 20 분간 원심분리 하였다. 532 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다. MDA 농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였다.

3. 통계처리

실험적정은 평균치±표준편차 (Mean ± SEM)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이를 검정할 때에는 one-way ANOVA로 검정하여 *F*값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다

결 과

1. 세포 생존율에 미치는 영향

HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시료를 다양한 농도로 처리하고, 24시간 배양한 후에 MTT방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다.

연잎 에탄올 추출물은 0.1 ug/ml부터 30 ug/ml 까지 90% 이상의 HaCaT 세포의 생존율을 유지하였으며, 10 ug/ml의 농도에서 최대 99.01%의 생존율을 나타내었다.

연잎 물 추출물에 의한 생존율은 0.1 ug/ml부터 30 ug/ml 까지 90% 이상의 HaCaT 세포의 생존율을 유지하였으며, 0.1 ug/ml의 농도에서 최대 101.46%의 생존율을 나타내었다.

연꽃 에탄올 추출물은 0.1 ug/ml부터 30 ug/ml 까지 100% 이상의 HaCaT 세포의 생존율을 유지하였으며, 30 ug/ml의 농도에서 최대 111.39%의 생존율을 나타내었다.

연꽃 물 추출물에 의한 생존율은 0.1 ug/ml부터 30 ug/ml 까지 77% 이상의 HaCaT 세포의 생존율을 유지하였으며, 1 ug/ml의 농도에서 최대 101.65%의 생존율을 나타내었다.

연꽃 수술 물 추출물에 의한 생존율은 0.1 ug/ml부터 30 ug/ml 까지 90% 이상의 HaCaT 세포의 생존율을 유지하였으며, 30 ug/ml의 농도에서 최대 107.12%의 생존율을 나타내었다.

이상의 결과, HaCaT 세포의 생존율은 연꽃 에탄올 추출물 111.39%, 연꽃 수술 물 추출물 107.12%, 연꽃 물 추출물 101.65%, 연잎 물 추출물 101.46%, 연잎 에탄올 추출물 99.01%의 순서로 우수한 생존율을 나타내었으며, 다음에 진행될 실험에서는 연꽃 에탄올 추출물과 연꽃 수술 물 추출물을 대상으로 실험을 진행하였다.

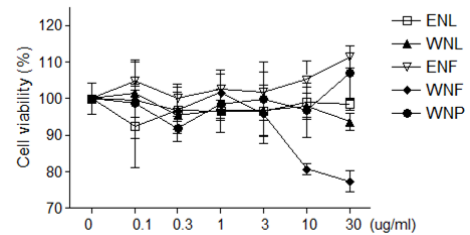


Fig. 1. Effects of ENL, WNL, ENF, WNF, WNP on the viability of HaCaT cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of samples for 24 h. Results were expressed as % control and data were mean ± S.E of at least three determinations.

ENL : ethanolic extract of *Nelumbo nucifera* leaves
 WNL : water extract of *Nelumbo nucifera* leaves
 ENF : ethanolic extract of *Nelumbo nucifera* flowers
 WNF : water extract of *Nelumbo nucifera* flowers
 WNP : water extract of *Nelumbo nucifera* stamen

2. UVB 조사량이 세포 생존율에 미치는 영향

HaCaT 세포에 UVB 자외선을 각각 10, 20, 30 mJ/cm² 용량별로 조사하여 세포생존율을 측정한 결과 각각 72.79%, 63.06%, 51.69%의 세포 생존율을 보였다. 따라서 UVB 자외선의 용량에 비례하여 HaCaT 세포의 생존율이 감소함을 확인하였으며, HaCaT 세포에 대하여 63.06%의 세포 생존율이 나타난 UVB 자외선 20 mJ/cm² 용량으로 광노화를 유도하기로 결정하였다.

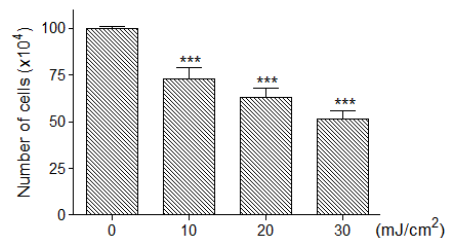


Fig. 2. Viability of the HaCaT cells following UVB treatment. The cells were treated with UVB (10, 20, 30 mJ/cm²). Results were expressed as % control and data were mean ± S.E of at least three determinations.

3. UVB에 의한 LPO 생성에 미치는 영향

UVB 자외선 20 mJ/cm² 용량으로 광노화를 유도하고, HaCaT 세포의 생존율이 우수하게 나타난 연꽃 에탄올 추출물과 연꽃 수술 물 추출물에 대하여 LPO 생성에 미치는 영향을 측정하였다.

HaCaT 세포에 대하여 정상군의 MDA 함량은 0.486 nmol/mg protein 인데 비하여, UVB 20 mJ/cm² 조사에 의해 산화가 유도된 대조군은 1.382 nmol/mg protein으로 유의성 있게 과산화지질이 증가하였음을 확인하였다. UVB 20 mJ/cm² 조사와 연꽃 에탄올 추출물의 동시처리군은 10 μg/ml의 농도에서 MDA가 0.927 nmol/mg protein으로 대조군에 비하여 LPO 생성이 감소하였다. UVB 20 mJ/cm² 조사와 연꽃 수술 물 추출물의 동시처리군은 10 μg/ml의 농도에서 MDA가 0.962 nmol/mg protein으로 대조군에 비하여 LPO 생성이 감소하였다.

이상의 결과, UVB에 의한 과산화 지질 생성에 대하여 연꽃 에탄올 추출물, 연꽃 수술 물 추출물의 순서로 LPO 생성이 감소하였다.

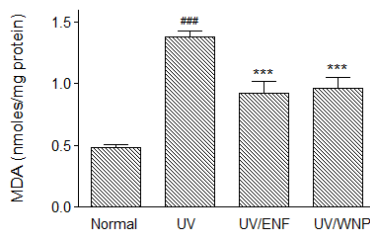


Fig. 3. Protective effect of ENF, WNP on UVB-induced lipid peroxidation. Total HaCaT cells lysate from cultured cells were analyzed for MDA formation 5 hours after UVB (20 mJ) radiation. Results were expressed as % control and data were mean \pm S.E. of at least three determinations.

ENF : ethanolic extract of *Nelumbo nucifera* flowers (10 μg/ml)
WNP : water extract of *Nelumbo nucifera* stamen (10 μg/ml)

고찰 및 결론

연꽃 *Nelumbo nucifera* Gaertner은 수련과의 여러해살이 수생 식물로서 6~7월경에 꽃이 피기 전에 잎을 채취한 것을 하엽이라 하며, 꽃잎 또는 개화하지 않은 꽃봉오리를 채취하여 연화라고 한다. 여름철에 꽃이 피었을 때 수술을 채취한 것을 연수라고 한다.

하엽은 性味가 平하며 苦澁, 無毒하고, 淸熱解暑의 효능이 있어 『溫病條辨』에서 暑溫證으로 인한 변갈 증상을 치료하는 淸絡飲의 구성약물로 사용되었다. 연화는 去濕疎風의 효능으로 天泡濕瘡, 瘡疥로 인한 癩瘡症의 치료에 응용되었으며 益色駐顏의 미용효과가 기록된 바 있다. 연수는 淸心益腎, 澁精止血의 효능이 있어 遺精, 遺尿, 帶下, 崩漏를 치료하며, 피부 미용과 관련하여 悅顏色과 烏鬚髮의 효능이 기록되어 있다⁶⁾.

하엽의 성분은 roemerine, nuciferine, nornuciferine, armapavine, pronuciferine, anonaine, liriodenine, lirinidine, 및 quercetin, isoquercitrin, leucodelphinidin 등이 알려져 있다. 연화의 성분은 quercetin, luteolin, isoquercitrin, luteolinglucoside, kaempferol 등이 알려져 있으며, 연수는 luteolin, quercetin, isoquercitrin, luteolinglucoside 등을 함유하고 있다.

연화, 연수 및 하엽에 공통적으로 분포하는 quercetin 성분은 UV 자외선으로 유발된 keratinocyte의 염증 반응에 대하여 NF- κ B 기전을 억제하는 효과가 보고되었다¹⁴⁾.

연화에 함유되어 있는 kaempferol 성분은 flavonoid의 일

종으로 녹차잎, 브로콜리, 포도, 은행잎 등에도 함유되어 있으며, 산화 스트레스로부터 keratinocyte 피부 세포에 대한 보호 효과가 보고되었다¹⁵⁾.

피부의 방어 기능은 주로 피부의 최외층인 각질층이 수행하고 있으며 피부의 지방막이 보조적으로 도와주고 있다. 피부의 노화는 일반적으로 40세를 전후로 시작되어 안면부의 피부가 윤택하지 못하며 건조한 각질이 많아진다. 한의학 이론에서 안면부의 노화의 원인은 腎精虛衰, 脾胃虛損, 生化之源不足 등으로 알려져 있다. 즉 선천의 腎精을 자양하지 못하거나 臟腑의 영양 공급에 이상이 초래되면 인체는 정상 생장 발육을 하지 못하여 피부의 노화가 발생한다¹³⁾.

연꽃의 다양한 부위를 활용하여 피부 노화를 방지하는 소재를 개발하기 위하여 UVB 자외선 조사에 의한 각질형성세포의 보호효과를 비교하였다. 실험에 사용된 HaCaT 세포는 인간의 앞이나 피부로부터 keratinocyte를 배양한 것으로 피부의 각질형성세포에 해당한다.

연꽃, 연꽃 수술 및 연잎 부위를 에탄올과 물을 이용하여 각각의 추출물을 얻은 후 각 추출물이 각질형성세포인 HaCaT 세포에 미치는 생존율을 비교한 결과 연꽃 에탄올 추출물이 가장 우수한 효과를 나타내었으며, 연꽃 수술 물 추출물, 연꽃 물 추출물, 연잎 물 추출물, 연잎 에탄올 추출물의 순서로 우수한 생존율을 나타내었다.

HaCaT 세포에 대한 광노화를 유도하기 위하여 60% 정도의 세포 생존율을 유지할 수 있는 UVB 자외선 조사량을 비교한 결과 UVB 20 mJ/cm² 용량이 적절한 것으로 나타났다.

LPO는 세포막의 지질성분이 독성 물질들에 의해서 손상을 받게 되면 지질성분의 산화반응이 촉진되어 나타나는 반응산물이다. MDA의 생성은 지질과산화에 의한 세포 membrane 손상의 지표로 사용된다. 지질과산화 억제 활성을 측정하기 위하여 UVB 조사에 의하여 산화가 용이하게 일어나는 HaCaT 세포의 protein을 분리하여 사용하였다. HaCaT 세포는 UVB 조사에 의한 과산화 지질 생성에 대하여 연꽃 에탄올 추출물 10 μg/ml의 농도에서 MDA가 0.927 nmol/mg protein, 연꽃 수술 물 추출물은 0.962 nmol/mg protein의 순서로 LPO 생성이 감소하여, 연꽃 에탄올 추출물이 가장 우수한 지질과산화 억제 활성이 있음을 확인하였다.

이상의 결과, 연꽃 에탄올 추출물의 경우 각질형성세포의 생존율을 증가시키며, UVB 자외선을 조사한 후 생성되는 지질과산화의 생성을 효과적으로 억제함으로써, 피부 각질형성세포에 대하여 광노화 스트레스로부터 피부 노화를 보호하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 경희-아모레퍼시픽 미용건강 연구센터의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. Arnold HL, Odom RB, James WD. Andrew's Disease of the skin, 8th ed, Philadelphia : WB Saunders.

- 1990 ; 28-9.
2. Gilchrest BA. Skin aging and photoaging : an overview. *J Am Acad Dermatol*. 1989 ; 21 : 610-3.
 3. Bernstein EF, Chen YQ, Tamai K, Shepley KJ, Resnik KS, Zhang H, Tuan R, Mauviel A, Uitto J. Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol*. 1994 ; 103(2) : 182-6.
 4. Lee MH, Cho YH. Viability of Cultured Human Keratinocyte and Melanocyte after UVB Exposure. *Korean journal of dermatology*. 1997 ; 35(2) : 258-65.
 5. Ahn DK. Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs. Seoul : Kyo-Hak Publishing Co. 1998 : 863-5.
 6. gukgajunguiyakgwalliguk 《junghwaboncho》 pyeonwihoe. junghwaboncho. sanghae : sanghaegwahakgisulchulpansa. 1998 ; 3 : 404-8.
 7. Yang WM, Kim HM, Chang MS, Park W, Kim WN, Kim S, Choi D, Lee HC, Kim YK, Park SK. Effects of ethanol extract of *Nelumbo nucifera* leaves on Anti-oxidation and Type I Procollagen Expression in CCD-986sk Cells. *The Korean Journal of Oriental Medical Prescription*. 2006 ; 14(2) : 67-75.
 8. Chang MS, Kim HM, Yang WM, Kim DR, Park EH, Ko EB, Choi MJ, Kim HY, Oh JH, Shim KJ, Yoon J, Park SK. Inhibitory Effects of *Nelumbo nucifera* on Tyrosinase Activity and Melanogenesis in Clone M-3 Melanocyte Cells. *The Korea Journal of Herbology*. 2007 ; 22(4) : 87-94.
 9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 ; 65(1-2) : 55-63.
 10. Kotnik V, Fleischmann WR Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *Immunol Methods*. 1990 ; 129(1) : 23-30.
 11. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 ; 95(2) : 351-8.
 12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 ; 72 : 248-54.
 13. Park SK, Nam GW, Lee HK, Bae JH, Kim J, Kim Y, Ko JS, Kang SJ, Moon SJ, Chang IS. Physiological Effects of Jaeum-Dan Essence (JED) on Human Skin. *Korean J. of Oriental Physiology & Pathology*. 2004 ; 18(3) : 729-33.
 14. Vicentini FT, He T, Shao Y, Fonseca MJ, Verri WA Jr, Fisher GJ, Xu Y. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. *J Dermatol Sci*. 2011 ; 61(3) : 162-8.
 15. Sugahara M, Nakanishi J, Katsuta Y. Kaempferol enhanced the intracellular thioredoxin system in normal cultured human keratinocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010 ; 74(8) : 1701-3.