

꾸지뽕나무 추출물의 피부 생리 활성

최학주^{1,2} · 김청택³ · 도민연⁴ · 랑문정^{5,†}

¹대전대학교 난치성면역질환 동서생명의학연구센터(TBRC) ·
²큐슈대학교 의학연구원 천연물화학연구실, ³(주)알엔에스,
⁴고성군 농업기술센터, ⁵배재대학교 제약공학과
(2015년 5월 31일 접수; 2015년 6월 13일 수정; 2015년 6월 13일 채택)

Physiological Activities of *Cudrania tricuspidata* Extracts on the Skin

Hak Joo Choi^{1,2} · Cheong Taek Kim³ · Min Yeon Do⁴ · Moon Jeong Rang^{5,†}

¹Traditional and Biomedical Research Center (TBRC), Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

²Department of Chemo-Pharmaceutical Science, Kyusu University, Fukuoka 819-0395, Japan

³RNS, Ltd., Daejeon 305-811, Korea

⁴Goseong Agricultural Technology Center, Goseonggun 219-803, Korea

^{5,†}Department of Pharmaceutical Engineering, Pai Chai University, Daejeon 305-735, Korea

(Received May 31, 2015; Revised June 13, 2015; Accepted June 13, 2015)

요약 : 본 논문은 한국과 중국에서는 전통 한방약재로 오랫동안 사용된 꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)의 잎, 줄기, 뿌리부분의 에탄올추출물의 물, 에탄올, 에칠아세테이트 용해성 분획물에 대한 피부 생리활성에 관한 실험결과이다. 대식세포인 macrophage(RAW 264.7 cell)에 대하여 이들 분획물들의 nitric oxide 및 염증성 사이토카인 분비 억제효과를 검토한 결과, nitric oxide 생성 억제에는 일부 위의 에칠아세테이트 분획물과 에탄올분획물이, 염증성 사이토카인인 IL-1 β 생성 억제에는 모든 분획물들이 효과가 있고, 염증성 사이토카인인 IL-6 생성 억제에는 잎, 줄기, 뿌리부위의 에칠아세테이트 분획물들이 효과가 있는 것으로 나타났다. 흑색종세포인 melanoma cell(B16-F10 cell)에서 멜라닌 생성 억제효과를 측정된 결과, 잎의 에틸아세테이트 분획물 처리에서만 유의성 있는 억제효과를 나타내었다. 주름 개선 효과를 확인하기 위해 인체 정상 피부 섬유아세포(CCD986sk cell)에 대하여 콜라겐의 합성 촉진 효과를 측정된 결과, 잎, 줄기, 뿌리부위의 물 분획물과 잎, 줄기의 에탄올 분획물에서 콜라겐 합성 촉진 효과를 보였다.

주제어 : 꾸지뽕나무, 피부생리활성, 항염, 사이토카인, 멜라닌 색소 합성, 콜라겐 합성

Abstract : This paper has shown the experimental results about the physiological activities of water-, ethanol-, ethyl acetate-soluble fractions from ethanolic extracts of leaves, stems and roots of *Cudrania tricuspidata* on the skin, which has been used for a long time as a traditional herb medicine in Korea and China. The effects of these fractions on the secretion of nitric oxide and

[†]Corresponding author
(E-mail: mjrang@pcu.ac.kr)

cytokines from macrophage(RAW 264.7 cell) exhibited that the ethyl acetate and water fractions from leaves inhibited the release of nitric oxide, all fractions inhibited those of inflammatory cytokine IL-1 α , and the ethyl acetate fractions of leaves, stems and roots inhibited those of inflammatory cytokine IL-6. The only ethylacetate fraction of leaves demonstrated significantly the reduction of melanin synthesis in melanoma cells. In order to evaluate the efficacy of collagen synthesis, the treatment with extracts on the human normal fibroblast cell(CCD-986sk cell) resulted in finding that the water fractions of leaves, stems and roots and the ethanol fractions of leaves and stems showed the increased synthesis of collagen.

Keywords : *Cudrania tricuspidata*, Physiological Activities, Anti-inflammation, Cytokines, Melanogenesis, Collagen Synthesis

1. 서론

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 쌍떡잎 식물 쟈기풀목 뽕나무과의 낙엽활엽 교소목으로서 갯가시나무라고도 하며 한국, 일본, 중국 등지에 분포한다. 가지에 가시가 있고, 잎은 3갈래로 갈라진 것과 가장자리가 밋밋하고 달걀 모양인 것이 있다. 꽃은 암수딴그루이고 5~6월에 두상 꽃차례를 이루며 핀다. 열매는 껍질이 말라서 단단해지고 그 속에 종자를 가지는 수과이고 열매들이 모여 덩어리를 이루는데 지름이 2~3cm로 둥근 모양이고 육질이며 9월에 붉은 색으로 익는다. 일반적으로 잎은 뽕잎대용으로 누에사료로 쓰고 열매는 먹을 수 있으며, 줄기와 뿌리는 약용이나 종이원료로 쓰인다 [1-4]. 동의보감에서는 자목(柞木) 또는 산뽕나무라고 하는 약재로서 성질이 따뜻하며 맛이 달고 독이 없으며 풍허로 귀먹은 것과 학질을 낮게 하며 삶은 물은 노랑게 물이 든다고 하였다 [5]. 또한 중약대사전에서는 꾸지뽕나무의 뿌리를 '천파석(穿破石)', 나무껍질과 뿌리껍질을 '자목백피(柞木白皮)', 잎을 '자수경엽(柞樹莖葉)', 열매를 '자수과실(柞樹果實)' 이라고 하여 부위별로 다양한 효능의 약재로서 기재되어 있다 [6]. 특히 꾸지뽕나무는 최근에는 느릅나무(유근피), 하고초(꿀풀), 와송과 함께 4대 항암약초로 알려져 특히 여러 소화기관암에 대해 항암효능이 있는 것으로 관심을 받고 있다 [4].

꾸지뽕나무에 함유된 생리활성성분은 주로 polyphenol 계통의 flavonoid들로서 이들 성분에 대한 연구결과 flavonone, flavonol, flavonol glycoside, flavonone glycoside, xanthone 등을 다양한 구조의 flavonoid 들로 밝혀졌다 [7-9].

이들 화합물의 일반적인 구조는 Fig. 1과 같다.

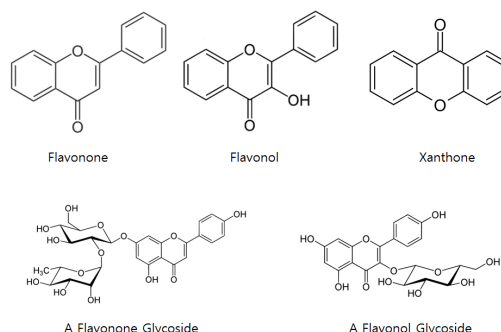


Fig. 1. Chemical structures of physiologically active components found in *Cudrania tricuspidata*.

동의보감 과 중약대사전에 기재되고 전통 민간 요법에 언급된 꾸지뽕나무의 다양한 효능과 작용 기전을 확인하기 위해 많은 체계적인 연구가 수행되었다. 그러한 연구결과 항암 및 세포독성 [10-15], 항균[16,17], 항산화 및 지질과산화 억제[18-24], 항당뇨[25], 간보호[26], 항바이러스 [27], 항비만[28], 면역증강[29], 관절염억제 [30,31], 항염 및 항알레르기[32,33], 미백 [34-36], 주름개선[37] 등의 꾸지뽕나무의 알려진 효능을 확인하거나 새로운 효능을 탐색하고 있다.

꾸지뽕나무의 항염 및 항알레르기 연구결과를 살펴보면, 우선 이 등의 연구에서는 [32] 혈관확장이나 모세혈관 투과성의 항진 등으로 백혈구의 활동을 간접적으로 촉진하는 염증에 관여하는 chemical mediator인 kinin에 관련하는 효소인

serine protease의 하나인 trypsin 효소의 활성을 꾸지뽕나무 잎 추출물로 억제하는 지 확인하였다. 김의 연구에서는 [33] 비만세포가 면역작용에 관여하여 항원에 노출되면 탈과립하여 IgE를 분비하거나, 사이토카인을 분비하는 데, 꾸지뽕나무의 줄기추출물이 탈과립을 억제하거나 사이토카인 TNF- α 및 IL-4 분비관련 유전자의 발현을 억제하는 것을 밝혔다.

꾸지뽕나무의 미백 연구결과를 살펴보면 박 등의 연구에서는 [34] 꾸지뽕나무로부터 추출된 xanthone이 멜라닌색소를 합성하는 데 핵심적으로 관여하는 tyrosinase의 활성을 억제하는지 확인하였다. 김 등의 연구에서는 [35] 꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 열매들의 물, 에탄올, 메탄올추출물들이 tyrosinase의 활성을 일부 억제하는 것을 보여 주었다. Wang 등의 연구에서는 [36] 꾸지뽕나무의 줄기부분에서 분리된 일부 성분들이 tyrosinase의 활성을 억제하는 것을 확인하였다.

이 등의 꾸지뽕나무의 주름개선 연구결과를 살펴보면[37], hairless mouse를 이용한 광노화모델에서 꾸지뽕나무의 잎 에탄올추출물이 UV-B에 의한 피부주름형성을 감소시키고 진피 콜라겐 성분을 분해시키는 MMP-9 효소의 발현을 억제시킴을 확인하였다.

이상과 같은 꾸지뽕나무의 항염 및 항알레르기, 미백, 주름개선 등의 피부에 대한 생리활성에 대한 연구는 다른 연구에 비해 비교적 체계적인 연구가 미흡하다.

꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리 부위별로 분획물 및 물, 에탄올, 에칠아세테이트의 다양한 용매별 분획물에 대한 이전 연구에서는 우선 다양한 세포들의 성장에 대한 영향을 검토한 결과, 잎, 줄기, 뿌리의 에칠아세테이트 분획물이 macrophage (RAW 264.7 cell), melanoma cell(B16-F10 cell), fibroblast cell(CCD-986sk cell), lung carcinoma cell(A549 cell) 등의 성장을 현저하게 억제시키는 세포독성을 나타내었다. 그리고 자유라디칼 DPPH (di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium)를 소거할 수 있는 분획물의 농도를 비교한 결과, 잎과 뿌리의 물분획물 그리고 뿌리의 에탄올분획물이 다른 분획물들에 비해 라디칼을 소거하는 항산화효과가 더 우수한 것으로 나타났다[4].

본 연구에서는 꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리 부위별로 추출물 및 분획물에 대하여 대식 macrophage에서의 항염효과를, melanoma cell에

서의 melanin 색소 합성 억제 효과를, fibroblast cell에서의 collagen 합성 촉진효과를 실험하여 꾸지뽕나무의 피부생리활성효과를 확인하고 화장품에의 활용 가능성을 검토하였다.

2. 실험

2.1 시약 및 기기

2.1.1. 약재

본 연구에서 사용된 꾸지뽕나무는 고성군 농업기술센터에서 공급받아 줄기, 잎, 뿌리의 부위별로 나누어 분쇄기로 분쇄하여 사용하였다.

2.1.2. 시약

Lipopolysaccharide(LPS, phenol extracted from *E. coli* serotype O111:B4), 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMx)는 Sigma사(Saint Louis, USA)에서, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), Fetal Bovine Serum(FBS)은 Hyclone사(Logan, Ut, USA)에서 구입하였다 Nitric Oxide detection kit은 Intron Biotechnology사(Sungnam, Korea)에서, Cytokine Milliplex Map immunoassay kit은 Millipore사(Bellerica, MA, USA)에서, Procollagen Type I C-peptide EIA Kit는 Takara Bio Inc.(Shiga, Japan)에서 구입하였다. 그리고 phosphate-buffered Saline (PBS)제조용 시약인 NaCl, KCl, Na₂HPO₄·12H₂O, KH₂PO₄ 과 일반 시약인 dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol(EtOH), ethyl acetate(EA), NaOH, H₂SO₄ 등은 시약급으로 구입하여 사용하였다.

2.1.3. 기기

본 실험에 사용된 기기는 ELISA microplate reader (Molecular Devices, U.S.A)와 Flow cytometry system(BD Biosciences immunocytometry systems, U.S.A.) 등을 이용하였다.

2.2 실험방법

2.2.1. 꾸지뽕나무의 생리활성 성분의 추출 및 용매분획물 제조

가. 꾸지뽕나무의 생리활성성분의 추출

꾸지뽕나무의 잎, 줄기 및 뿌리 각 500 g씩 취하여 5배 부피의 에탄올을 가하고 80°C에서 3시간 동안 환류추출한 후 여과지로 여과하였다. 여과액을 40 ~ 50°C에서 감압 농축하여 에탄올 엑스를 얻었다.

나. 용매분획물 제조

꾸지뽕나무 각 부위별 에탄올 엑스에 5배 부피의 에칠아세테이트를 가한 후 상온에서 3시간 환류추출한 후 여과하여 얻은 에칠아세테이트 가용분획을 40 ~ 50°C에서 감압 농축하여 각각의 에칠아세테이트 분획물(EA fr.)을 얻었다. 에칠아세테이트에 녹지 않는 각각의 잔사에 5배 부피의 에탄올을 가한 후 상온에서 3시간 환류추출한 후 여과하여 얻은 에탄올 가용분획을 40 ~ 50°C에서 감압 농축하여 각각의 에탄올 분획물(EtOH fr.)을 얻었다. 에탄올에 녹지 않는 각각의 잔사에 5배 부피의 증류수를 가하고 상온에서 환류추출한 후 여과하여 얻은 증류수 가용분획을 40 ~ 50°C에서 감압 농축하여 각각의 물 분획물(DW fr.)을 얻었다.

다. 생리활성 평가 시료의 조제

꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리의 물, 에탄올, 에칠아세테이트 분획물 각각의 100 mg을 DMSO 10 ml에 녹인 후, 0.2 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 생리활성 평가시료로 사용하였다. 여기서는 잎의 정제수분획물은 Leaf-DW, 잎의 에탄올분획물은 Leaf-EtOH, 잎의 에칠아세테이트분획물은 Leaf-EA 로 표시 한다. 마찬가지로 줄기분획물들은 Stem-DW, Stem-EtOH, Stem-EA, 그리고 뿌리분획물들은 Root-DW, Root-EtOH, Root-EA 로 표시한다.

2.2.2. 세포배양

Murine macrophage-like cell line인 RAW 264.7 cell(ATCC, USA)과 humane normal skin fibroblast cell line인 CCD-986sk cell(ATCC, USA)은 모두 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM)배지를 사용하여 37 °C에서 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다.

2.2.3. 항염효과 실험

대식세포(macrophage)는 알레르기성 염증반응

을 매개하는 중요한 면역세포로서 외부항원에 의해 자극을 받으면 nitric oxide(NO) 및 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 분비함으로써 이후의 염증반응을 매개한다. 지질다당류(lipopolysaccharide : LPS)는 지질과 다당류가 결합되어 있는 거대 분자로 그람음성박테리아의 세포막에 다량 존재하며 세포막내부에는 lipid 부분이 삽입되어 있고 세포막외부에 노출되어 있는 polysaccharide 부분이 인체에 대해 강력한 항원 작용을 초래하는 O-antigen이 된다.

LPS를 이용하여 대식세포인 Raw 264.7 세포를 자극 활성화시켜 대식세포가 nitric oxide(NO) 및 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 분비하도록 하는데, LPS로 자극 전에 꾸지뽕나무 분획물들을 미리 처리하여 NO 및 사이토카인의 생성량의 변화를 측정하여 꾸지뽕나무 분획물들의 항염증 효과 여부 및 정도를 확인한다.

가. Nitric Oxide(NO)생성 억제효과 실험

LPS에 의해 Raw 264.7 cell로부터 생성되는 NO양을 세포배양액 중 존재하는 NO₂⁻의 형태로 Griess reagent 반응법을 이용하여 측정하였다. Nitric oxide의 농도는 배양액 내의 nitrite(NO₂⁻)농도를 Griess reagent system원리에 근거한 nitric oxide detection kit을 이용하여 측정하였다. 대식세포인 macrophage Raw 264.7 cell은 96 well plates에 10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, 각각의 분획물을 농도별로 처리하고, LPS 1 μ g/ml을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer(substrate solution : 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid)를 50 μ l를 각 well에 처리한 후, 10분간 상온에서 암소반응 후, N2 buffer (coloring solution : 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in water : NED) 50 μ l를 각 well에 처리하고, 10분간 반응시킨 후, ELISA microplate reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard(0.1M sodium nitrite in water ; NaNO₂)의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

나. Cytokine 생성량 실험

Raw 264.7 cells을 6 well plates에 3x10⁵ cells/well이 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 후, 각각의 분획물을 10-100 μ g/ml의 농도로 처리하고, LPS 1 μ g/ml을 처리하였다. 24시

간 동안 배양한 후 세포배양액을 수거하여 배양액에 함유된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 custom-made 4-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 측정하였다. 분석은 Milliplex analyser를 통해 이루어 졌다.

2.2.4. Melanin 색소 생성 저해 효과 실험

피부의 색상을 결정하는 melanin색소는 피부 전체를 검고 어두운 색상으로 만들고 피부의 일부를 검게 만들어 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등을 만들게 된다. 피부암의 일종인 흑색종(melanoma)에서 분리된 melanoma cell은 keratinocyte로부터 유래되어 증식 및 melanin색소 합성이 활발한 세포이다. cAMP-elevating agent인 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx)는 melanoma cell에서의 melanin 생합성을 촉진하는 데, IBMx로 자극 전에 꾸지뽕나무 분획물들을 미리 처리하여 melanin의 생성량의 변화를 측정하여 꾸지뽕나무 분획물들의 melanin 생성 저해 효과 여부 및 정도를 확인한다.

Murine melanoma cell인 B16-F10 세포를 6 well plate에 10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 각각의 분획물을 농도별로 처리하고, IBMx 100 μ M로 처리하여, 48시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 양성 대조군으로 arbutin을 사용하였다. Trypsinization으로 얻은 pellet에 1N NaOH 용액 500 μ l를 넣은 후, 끓는 물에서 30분간 반응 시킨 후, 멜라닌을 용해시켜, 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 한 다음 상등액을 ELISA microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.5. Collagen 합성 촉진 효과 실험

Fibroblast cell은 진피의 구성 성분인 collagen fiber, elastin fiber, muco-polysaccharide를 생합성하는 세포이다. 노화, 자외선 등 다양한 원인으로 fibroblast의 세포활성이 저하되게 되면 collagen fiber, elastin fiber, muco-polysaccharide의 적절하게 공급되지 않음으로써 진피조직이 위축되고 탄력을 손실하여 결국은 주름이 발생하게 된다. 이에 fibroblast cell을 꾸지뽕나무 분획물들을 처리하여 collagen의 생성량의 변화를 측정하여 꾸지뽕나무 분획물들의 collagen 생성 촉진 여부 및 정도를 확인한다.

Human normal skin fibroblast cell인 CCD-986sk cell을 10⁵ cells/ml의 밀도로 24

well plate에 배지와 함께 넣고, 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양한 후, PBS로 세척하여, 각 well에 serum free 배지로 처리하고 각각의 약재를 10-100 μ g/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 가지고 Procollagen Type I C-peptide EIA kit(Takara Bio Inc. MK101)를 이용하여 콜라겐 양을 측정하였다. antibody-POD conj μ gate solution 100 μ l를 각 well에 첨가하고, sample이나 standard를 20 μ l씩 넣은 뒤 잘 섞어서 37 °C에서 3시간 방치하였다. 반응이 끝나며 내용물을 제거한 뒤 PBS 400 μ l로 4번 세척하였다. 제거 후 substrate solution(hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine in buffer solution) 100 μ l를 첨가하여 실온에서 15분간 반응시킨 뒤 stop solution(1N H₂SO₄) 100 μ l 첨가하여 부드럽게 섞어주었다. ELISA microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정 후, 표준 농도곡선을 작성하여 콜라겐 양을 측정하였다. 값은 대조군에 대한 콜라겐 합성 증가 %로 표기하였다.

2.2.6. 실험결과와 통계처리

Nitric oxide생성 억제효과 실험, cytokine 생성량 실험, melanin 색소 생성저해 효과 실험, collagen 합성 촉진 효과 실험 등 모든 실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리 하였으며 P<0.05, P<0.01 및 P<0.001 수준에서 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항염효과 실험 결과

대식세포 (macrophage)인 Raw 264.7 세포는 LPS에 의해 자극을 받게 되면 nitric oxide(NO) 및 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 분비함으로써 이후의 염증반응을 매개한다. 따라서 꾸지뽕나무추출물이 nitric oxide(NO) 및 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 억제하게 되면 항염증효과를 기대할 수 있다.

3.1.1. Nitric Oxide(NO)생성 억제효과 실험

대식세포인 Raw 264.7 세포주에서 잎, 줄기, 뿌리의 물, 에탄올, 에틸아세테이트 분획물이 NO 생성 억제에 미치는 영향을 측정 한 결과 다음과 같은 결과를 나타내었다(Table 1과 Fig. 2).

Table 1. Effects of each extract on the NO production in RAW 264.7 cells.

Groups	Conc.($\mu\text{g/ml}$)	DW	EtOH	EA
Leaf	10	98.3 \pm 3.7	94.9 \pm 3.5	68.3 \pm 3.6***
	100	94.1 \pm 5.7	87.9 \pm 5.6*	36.9 \pm 4.2***
Stem	10	104.9 \pm 7.0	98.4 \pm 2.9	68.8 \pm 4.6***
	100	94.7 \pm 3.9	69.8 \pm 2.7***	26.8 \pm 4.2***
Root	10	92.6 \pm 6.4	95.3 \pm 5.1	88.2 \pm 6.2
	100	83.5 \pm 4.7**	54.9 \pm 4.5***	47.9 \pm 1.4***

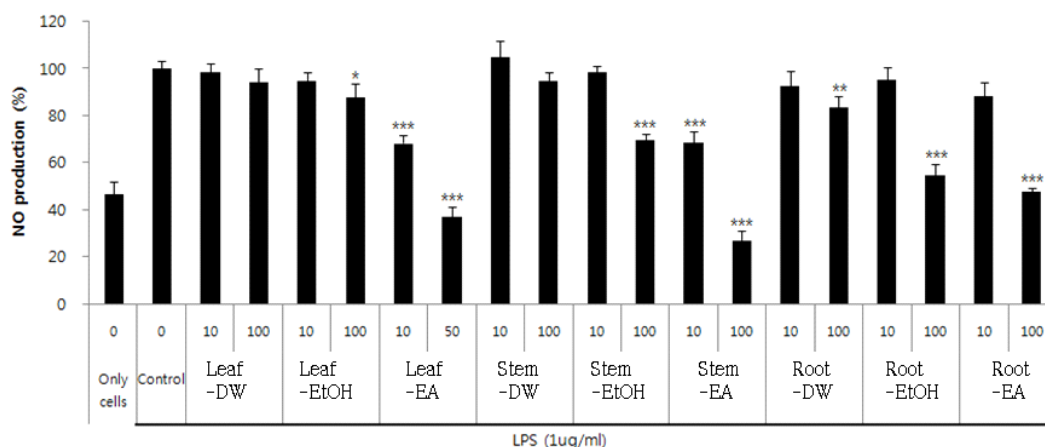


Fig. 2. Effects of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitrite (NO) production by each extract in RAW 264.7 cells. Cells were stimulated with LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) and treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ of each extract for 24hr. The results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with control(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

LPS를 처리한 대조군(control)을 100으로 보았을 때, LPS를 처리하지 않은 정상군(only cells)에 비해 2.2배 증가하였고, 잎의 물과 에탄올 분획물 10과 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 2%, 6%, 5%, 12%, 에틸아세테이트 분획물 10 과 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 32%, 63%의 소거능을 보였고, 줄기의 물과 에탄올 분획물 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 소거능이 거의 없었으며, 물과 에탄올 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 각각 5%, 30%, 에틸아세테이트 분획물 10과 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 31%, 73%의 소거능을 보였으며, 뿌리의 물, 에탄올, 에틸아세테이트 분획물 10과 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 7%, 16%, 5%, 45%,

12%, 52%의 소거능을 보였다. 전체적으로 꾸지뽕나무의 잎부위의 분획물이, 그리고 에틸아세테이트 분획물과 에탄올 분획물이 nitric oxide 생성 억제에 효과가 있는 것으로 판단된다.

3.1.2. Cytokine 생성량 실험

가. IL-1 β 사이토카인 생성에 미치는 영향
Raw 264.7 세포주에서 잎, 줄기, 뿌리의 물, 에탄올, 에틸아세테이트 분획물이 IL-1 β 사이토카인 생성 억제에 미치는 영향을 측정된 결과, 다음과 같은 결과를 나타내었다(Table 2과 Fig. 3). LPS를 처리한 대조군(control)을 100으로 보

Table 2. Effects of each extract on the IL-1 β production in RAW 264.7 cells

Groups	Conc.(μ g/ml)	DW	EtOH	EA
Leaf	10	94.4 \pm 14.9	69.8 \pm 11.3*	77.7 \pm 5.6*
	100	77.8 \pm 15.7	118.8 \pm 13.6	54.4 \pm 5.0**
Stem	10	95.8 \pm 23.8	141.7 \pm 15.6	62.5 \pm 11.4*
	100	87.1 \pm 26.7	88.7 \pm 19.3	51.7 \pm 15.2**
Root	10	95.8 \pm 17.0	85.0 \pm 14.5	62.0 \pm 18.9*
	100	77.7 \pm 10.4*	42.6 \pm 9.8**	55.9 \pm 15.4**

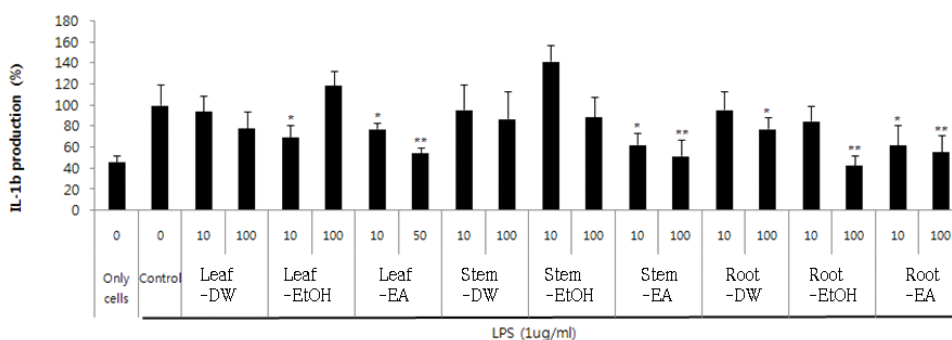


Fig. 3. Effects of lipopolysaccharide (LPS)-induced IL-1 β production by each extract in RAW 264.7 cells. Cells treated with 10–100 μ g/ml of each extract in the presence of 1 μ g/ml LPS or with LPS alone for 24hr. The results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with control(*P < 0.05, **P < 0.01).

았을 때, LPS를 처리하지 않은 정상군(only cells)에 비해 2.2배 증가하였고, 잎의 물 분획물 10과 100 μ g/ml의 농도에서 각각 6%, 22%, 에탄올 분획물 10 μ g/ml의 농도에서는 30%, 에틸아세테이트 10 과 50 μ g/ml의 농도에서 22%, 54%, 줄기의 물과 에틸아세테이트 분획물 10과 100 μ g/ml의 농도에서 각각 4%, 13%, 37%, 48%, 에탄올 분획물 100 μ g/ml의 농도에서는 11%, 뿌리의 물, 에탄올, 에틸아세테이트 분획물 10과 100 μ g/ml의 농도에서 각각 4%, 22%, 15%, 57%, 38%, 57%의 생성 억제능을 보였다. 전체적으로 꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리 부위의 분획물, 그리고 에틸아세테이트, 물, 에탄올 분획물이 실험한 모든 분획물들이 IL-1 β 생성 억제에 효과가 있는 것으로 판단된다.

나. IL-6 사이토카인 생성에 미치는 영향
Raw 264.7 세포주에서 잎, 줄기, 뿌리의 물, 에탄올, 에틸아세테이트 분획물이 IL-6 사이토카인 생성 억제에 미치는 영향을 측정된 결과, 다음과 같은 결과를 나타내었다(Table 3과 Fig. 4). LPS를 처리한 대조군(control)을 100으로 보았을 때, LPS를 처리하지 않은 정상군(only cells)에 비해 100배 이상 증가하였고, 잎의 물과 에탄올 분획물 10과 100 μ g/ml의 농도에서 각각 13%, 31%, 13%, 11%, 에틸아세테이트 분획물 10 과 50 μ g/ml의 농도에서 31%, 85% 생성 억제능을 보였으며, 줄기의 물과 에탄올 분획물 10 μ g/ml의 농도에서는 거의 억제능을 보이지 않았고, 100 μ g/ml의 농도에서는 각각 14%, 21%, 에틸아세테이트 분획물의 10과 100 μ g/ml의 농도에서는 각각 12%, 89%, 뿌리의 물과 에탄올, 에틸아세테이트 분획물 10과 100 μ g/ml의 농도에서

Table 3. Effects of each extract on the IL-6 production in RAW 264.7 cells

Groups	Conc.($\mu\text{g/ml}$)	DW	EtOH	EA
Leaf	10	87.4 \pm 14.5	86.5 \pm 17.8	68.6 \pm 6.6**
	100	69.3 \pm 15.7**	89.0 \pm 14.2	14.7 \pm 8.0***
Stem	10	99.8 \pm 18.1	106.7 \pm 13.5	88.0 \pm 5.5
	100	86.0 \pm 11.4	79.1 \pm 9.4*	10.6 \pm 9.1***
Root	10	88.9 \pm 13.4	91.8 \pm 18.0	76.5 \pm 14.1*
	100	96.8 \pm 10.6	61.4 \pm 15.3**	32.6 \pm 17.3**

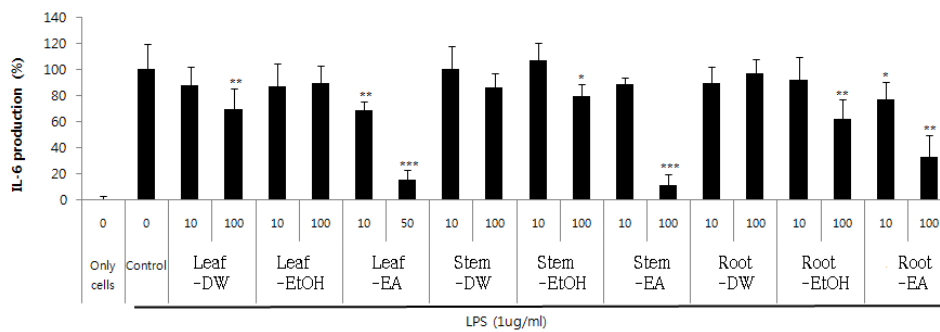


Fig. 4. Effects of lipopolysaccharide (LPS)-induced IL-6 production by each extract in RAW 264.7 cells. Cells treated with 10-100 $\mu\text{g/ml}$ of each extract in the presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS or with LPS alone for 24hr. The results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with control (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

각각 11%, 3%, 8%, 39%, 23%, 67%의 생성 억제능을 보였다. 전체적으로 꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리부위의 에칠아세테이트분획물들이 IL-6 생성 억제에 효과가 있는 것으로 판단된다.

다. TNF- α 사이토카인 생성에 미치는 영향 Raw 264.7 세포주에서 잎, 줄기, 뿌리의 물, 에탄올, 에틸아세테이트 분획물이 TNF- α cytokine 생성 억제에 미치는 영향을 측정된 결과, 다음과 같은 결과를 나타내었다(Table 4와 Fig. 5). LPS를 처리한 대조군(control)을 100으로 보았을 때, LPS를 처리하지 않은 정상군(only cells)에 비해 8.8배 가까이 증가하였으나, 잎, 줄기, 뿌리의 물과 에탄올, 에틸아세테이트 분획물 10과 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 거의 억제능을 보이지 않았다. 전체적으로 꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리 부위의 분획물이, 그리고 에칠아세테

트, 물, 에탄올 분획물이 실험한 모든 분획물들이 TNF- α 생성 억제에 효과가 없는 것으로 판단 된다.

Macrophage는 LPS에 의해 자극을 받게 되면 다양한 사이토카인들을 분비하게 된다. 우선 LPS는 용해성 LPS결합단백질과 complex를 형성하고 이 complex는 CD14 receptor에 결합하고 CD14는 complex를 LPS receptor인 TLR4에 전달하게 된다. Macrophage의 receptor인 TLR4에 LPS가 결합되면 여러 가지 신호전달경로를 활성화시켜 사이토카인을 생성-분비를 하게 된다 [38,39]. 사이토카인 TNF- α 의 생성에 관여하는 신호전달경로에서는 NF- κ B(nuclear factor kappa B), MARK(mitogen-activated protein kinase)가 활성화되면서 TNF- α 생성관련 유전자가 발현된다고 알려져 있다. 꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리 부위의 분획물이, 그리고 에칠아세테

Table 4. Effects of each extract on the TNF- α production in RAW 264.7 cells

Groups	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	DW	EtOH	EA
Leaf	10	101.0 \pm 9.0	95.5 \pm 12.8	100.9 \pm 5.1
	100	100.5 \pm 11.3	93.3 \pm 15.5	97.0 \pm 11.2
Stem	10	101.0 \pm 11.9	102.1 \pm 7.7	94.9 \pm 8.5
	100	98.2 \pm 6.7	99.4 \pm 6.4	96.5 \pm 5.9
Root	10	101.8 \pm 4.4	95.7 \pm 16.8	95.5 \pm 13.1
	100	97.2 \pm 4.9	95.6 \pm 10.7	97.7 \pm 6.9

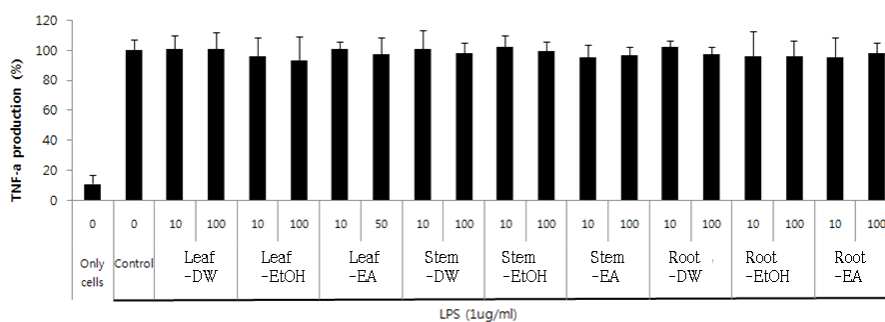


Fig. 5. Effects of lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF- α production by each extract in RAW 264.7 cells. Cells treated with 10–100 $\mu\text{g/ml}$ of each extract in the presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS or with LPS alone for 24hr. The results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with control(*P < 0.05, **P < 0.01).

이트, 물, 에탄올 분획물이 실험한 모든 분획물들은 LPS에 의해 활성화된 NF- κ B와 MARK 신호전달경로를 차단하지 못하여 TNF- α 의 생성을 억제하지 못한 것으로 판단된다.

3.1.3. 항염효과 실험 결과

Nitric oxide는 원래 염증성 또는 항염증성의 기능을 동시에 하는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 과도한 분비는 오히려 세포독성을 통해 세포를 파괴하고 쇼크로 인한 혈관 확장 및 염증반응을 가속화하여 조직손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가하는 NO를 효과적으로 억제하는 것은 염증질환 치료에서 유용한 방법으로 여겨지고 있다 [40, 41] 또한 사이토카인은 면역 및 염증관련 peptide mediator로써 자극을 받은 부위

에 일시적으로 국소적으로 분비되어 면역 및 염증반응을 매개하고 조절한다. 따라서 사이토카인중 대표적인 interleukin IL, tumor necrosis factor TNF, Interferon(IF), transforming growth factor(TGF) 등의 분비를 억제하면 항염효과를 기대할 수 있다. 물론 사이토카인들의 수용체는 각각 다르기 때문에 염증유발요인에 따라 다양한 사이토카인들이 복잡하게 관여한다 [42].

본 실험에서는 macrophage Raw 264.7 세포를 꾸지뽕나무추출물로 처리한 경우와 처리하지 않은 상태(control)에서 LPS로 자극을 주어 생성된 nitric oxide 및 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 량을 비교한 결과를 통해, 꾸지뽕나무의 부위별(잎, 줄기, 뿌리), 추출용매별(물, 에탄올, 에칠아세테이트) 항염효과를 확인하였다.

염증을 유발하는 Nitric oxide 생성 억제에는 꾸지뽕나무의 잎부위의 에칠아세테이트 분획물과 에탄올분획물이, 염증성 사이토카인인 IL-1 β 생성 억제에는 실험한 꾸지뽕나무의 모든 분획물들이 효과가 있고, 염증성 사이토카인인 IL-6 생성 억제에는 꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리부위의 에칠아세테이트 분획물들이 효과가 있는 것으로 판단된다. 염증성 사이토카인인 TNF- α 생성 억제에는 꾸지뽕나무의 모든 부위별 및 용매별 분획물들이 효과가 없는 것으로 나타났다. 전체적으로 꾸지뽕나무의 잎부위의 에칠아세테이트분획물이 염증에 관련된 nitric oxide, IL-1 β , IL-6 등의 분비를 억제하는 것으로 보인다.

꾸지뽕나무의 성분분석결과에 의하면 [43] 꾸지뽕나무의 잎의 에칠아세테이트 분획추출물에는 flavonol glycoside의 일종인 kaempferol 7-o- β -D-glucopyranoside(KG)가 높은 함량으로 함유되어 있다고 하며, 또한 꾸지뽕나무의 잎의 에칠아세테이트 분획물은 지질 과산화를 억제한다고 한다[44], 따라서 꾸지뽕나무의 잎부위의 에칠아세테이트분획물에 높은 함량으로 함유된 kaempferol 7-o- β -D-glucopyranoside가 LPS에 의한 지질과산화를 억제하는 항산화효과에 의해 결국은 염증반응을 유발하는 nitric oxide 및 염증성 사이토카인의 분비를 억제하여 항염효과를 나타내는 것으로 판단된다.

3.2. Melanin 생성 저해 효과 실험 결과

B16-F10 세포주에서 잎, 줄기, 뿌리의 물, 에탄올, 에칠아세테이트 분획물이 멜라닌 생성 저해에 미치는 영향을 측정한 결과 다음과 같은 결과를 나타내었다. 대조군을 100으로 보았을 때, 정상군에 비해 1.3배 증가하였고, 양성대조군으로

사용된 arbutin 100 μ g/ml의 농도에서는 대조군보다 27% 감소하였다. 그러나, 잎의 에칠아세테이트 50 μ g/ml의 농도에서만 40% 가까이 억제 효과가 있었고, 그 외의 분획물에서는 거의 억제 효과가 없었다(Table 5과 Fig. 6).

정상 색소세포인 melanocyte 또는 흑색종 세포인 melanoma cell은 세포내 tyrosinase효소, tyrosinase-related protein 1(TRP-1), tyrosinase-related protein 2(TRP-2)에 작용에 의해 아미노산 tyrosine을 산화 중합시켜 거대분자량의 melanin색소를 생합성(mealnoogenesis)하게 된다 [45]. 앞에서 언급한 것과 같이 에칠아세테이트분획물에는 flavonol glycoside의 일종인 kaempferol 7-o- β -D-glucopyranoside(KG)가 높은 함량으로 함유되어 있고 또한 이 KG는 높은 항산화효과를 보여준다. 따라서 잎의 에칠아세테이트분획물에 함유된 KG가 tyrosine의 산화반응을 억제하여 melanin의 생합성을 저지하는 것으로 판단된다. 물론 단순히 산화반응만을 억제하는 항산화작용뿐만 아니라 tyrosinase 등 관련효소의 활성억제 및 관련 효소의 유전자 발현억제도 melanin색소 생성 억제에 작용할 수도 있다 [46].

3.3. Collagen 합성 촉진 효과 실험 결과

Human normal skin fibroblast cell인 CCD-986sk 세포주에서 잎, 줄기, 뿌리의 물, 에탄올, 에칠아세테이트 분획물이 콜라겐 합성 촉진에 미치는 영향을 측정한 결과, 다음과 같은 결과를 나타내었다 (Table 6과 Fig. 7). 대조군(only cells)을 100으로 보았을 때, 잎의 물과 에탄올 분획물 10과 100 μ g/ml의 농도에서 각각 18%, 30%, 40%, 53%, 줄기의 물 분획물 10과

Table 5. Effects of each extract on the Melanin production in B16-F10 cells.

Groups	Conc.(μ g/ml)	DW	EtOH	EA
Leaf	10	117.9 \pm 17.0	135.5 \pm 19.0	121.8 \pm 17.2
	100	140.7 \pm 18.3	120.8 \pm 7.2	60.0 \pm 8.0*
Stem	10	108.3 \pm 9.6	124.4 \pm 15.1	113.2 \pm 2.7
	100	122.0 \pm 10.5	133.3 \pm 10.9	95.0 \pm 6.0
Root	10	106.5 \pm 10.0	119.1 \pm 1.3	158.1 \pm 5.1
	100	112.9 \pm 3.0	103.9 \pm 1.7	109.0 \pm 9.0

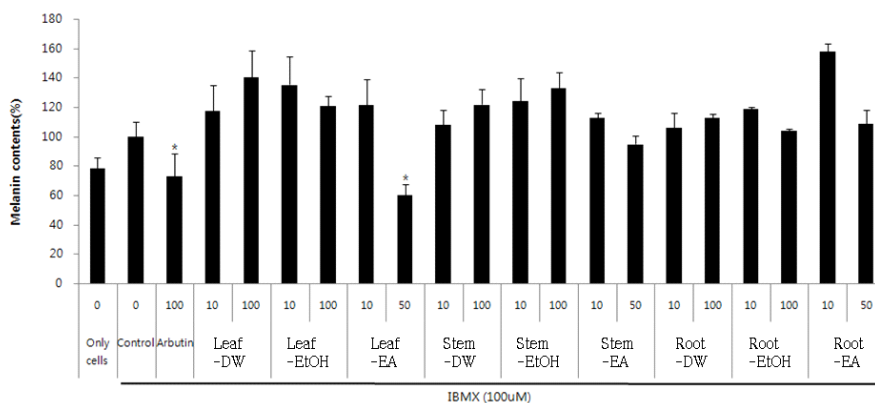


Fig. 6. Effects of IBMX-induced melanin production by each extract in B16-F10 cells. Cells treated with 10-100 μg/ml of each extract in the presence of 100 uM IBMX or with IBMX alone for 48hr. The results are expressed as mean±SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with control (*P < 0.05).

Table 6. Effects of each extract on the Collagen production in CCD-986sk cells

Groups	Conc.(μg/ml)	DW	EtOH	EA
Leaf	10	117.5±13.7*	139.8±3.8***	50.8±13.2
	100	129.8±4.0***	153.0±7.3***	12.6±2.6
Stem	10	119.9±4.2***	95.7±16.9	76.3±7.3
	100	127.2±24.7	116.1±7.1**	26.3±4.8
Root	10	127.8±7.9***	81.9±3.3	117.0±11.1*
	100	143.4±8.0***	18.2±6.0	28.4±0.5

100 μg/ml의 농도에서 20%, 27%, 에탄올 분획물 100 μg/ml의 농도에서 16%, 뿌리의 물 분획물 10과 100 μg/ml의 농도에서 28%, 43%, 에틸아세테이트 10 μg/ml의 농도에서 17% 증가하였다. 전체적으로 잎, 줄기, 뿌리부위의 물 분획물과 잎, 줄기의 에탄올 분획물에서 콜라겐 합성 촉진 효과를 보였으며, 잎, 줄기, 뿌리의 에틸아세테이트 분획물들은 오히려 콜라겐 합성을 저해하였다.

피부의 진피층의 결합조직은 주로 콜라겐과 엘라스틴 등에 의해 이루어진다. 진피에는 이들 콜라겐과 엘라스틴을 생합성 분비하는 섬유아세포(fibroblast)는 들어 있다. 콜라겐과 엘라스틴은 피부에 탄성과 힘을 주며 이들이 노화로 약해지

면 피부는 쉽게 손상되고 늙는다. 또한 반복적인 자외선 노출로 자외선에 의해 생성되는 사이토카인들은 피부에서 콜라겐의 합성을 억제하며, 콜라겐을 분해하는 효소들의 발현을 증가시킨다. 특히 피부의 콜라겐 분해효소인 matrix metalloproteinases(MMPs)가 증가하며, 증가된 MMPs는 피부의 콜라겐을 분해하게 된다. 이런 현상의 반복은 피부 주름을 형성시키게 된다. 즉 피부의 주름은 콜라겐의 합성과 분해의 불균형에 기인한다[47]. 따라서 주름을 개선하기 위해서는 콜라겐의 분해효소인 MMP의 발현과 활성을 억제시켜 결합조직의 분해를 억제하고, 섬유아세포의 활성을 증가시켜 새로운 결합조직의 공급을 활발하게 하는 것이다.

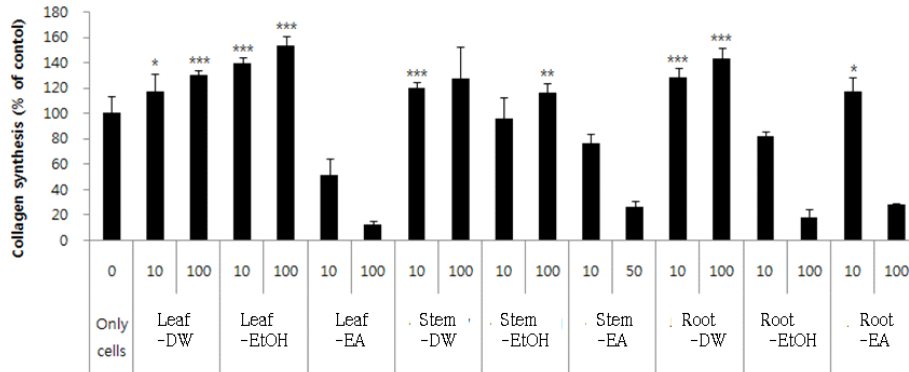


Fig. 7. Effects of collagen production by each extract in CCD-986sk cells. Cells were treated with 10-100 µg/ml of each extract in serum free media for 24hr. The results are expressed as mean±SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with only cells (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P<0.001).

본 실험에서 꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리부위의 물 분획물과 잎, 줄기의 에탄올 분획물에서 콜라겐 합성 촉진한 결과를 나타냈다. 이 등의 연구에서[48] 잎의 에탄올분획물 단독을 피부에 도포시 UV-B에 의한 활성산소 생성을 억제시키고 MMPs의 발현을 감소시켜 실제 피부의 형태학적 관찰결과에서도 주름개선을 보여 주었다. 물론 단순히 섬유아세포를 활성화시켜 진피조직 성분을 충분히 공급하는 것과 진피조직성분의 분해를 억제하는 것은 주름개선을 위한 다른 접근방법이다. 하지만 두 가지 서로 다른 방법을 동시에 작용하도록 한다면 훨씬 효과적인 주름개선 방법이 될 것으로 판단된다. 꾸지뽕나무의 부위별 물, 에탄올분획물에 대한 피부 주름개선 효과에 대해서는 향후 심도있는 연구가 필요하다고 생각된다.

4. 결론

꾸지뽕나무의 각 부위(잎, 줄기, 뿌리)에 대한 각 용매(물, 에탄올, 에틸아세테이트) 분획물들의 항염, melanin 색소 형성 억제, collagen 합성 촉진에 대한 효과를 평가한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

첫째, 항염증 효과의 nitric oxide(NO)생성 억

제 효과를 측정 한 결과 잎의 에탄올 분획물 100 µg/ml, 에틸아세테이트 분획물 10 µg/ml, 50 µg/ml 처리에서 각각 유의성 있는(*P<0.05, ***P<0.001) 억제 효과를 나타내었고, 줄기의 에탄올 분획물 100 µg/ml, 에틸아세테이트 분획물 10 µg/ml, 100 µg/ml 처리에서 각각 유의성 있는(***P<0.001) 억제효과를 나타내었다. 그리고 뿌리의 물 분획물 100 µg/ml, 에탄올 분획물 100 µg/ml, 에틸아세테이트 분획물 100 µg/ml에서 각각 유의성 있는(**P<0.01, ***P<0.001) 억제 효과를 나타내었다.

둘째, 염증 사이토카인인 IL-1β 생성 억제 효과를 측정 한 결과 잎의 에탄올 분획물 50 µg/ml, 에틸아세테이트 분획물 10 µg/ml, 50 µg/ml 처리에서 각각 유의성 있는(*P<0.05, **P<0.01) 억제 효과를 나타내었고, 줄기의 에틸아세테이트 분획물 10 µg/ml, 100 µg/ml 처리에서 각각 유의성 있는(*P<0.05, **P<0.01) 억제효과를 나타내었다. 그리고 뿌리의 물 분획물 100 µg/ml, 에탄올 분획물 100 µg/ml, 에틸아세테이트 분획물 10 µg/ml, 100 µg/ml에서 각각 유의성 있는(*P<0.05, **P<0.01) 억제 효과를 나타내었다.

셋째, 염증 사이토카인인 IL-6 생성 억제 효과를 측정 한 결과 잎의 물 분획물 100 µg/ml, EA 분획물 10 µg/ml, 50 µg/ml 처리에서 각각 유의성 있는(**P<0.01, ***P<0.001) 억제 효과를 나타내었고, 줄기의 에틸아세테이트 분획물 100 µg/ml

g/ml 처리에서 유의성 있는(**P<0.001) 억제효과를 나타내었다. 그리고 뿌리의 에탄올 분획물 100 µg/ml, 에틸아세테이트 분획물 10 µg/ml, 100 µg/ml에서 각각 유의성 있는(*P<0.05, **P<0.01) 억제 효과를 나타내었다

넷째, 염증 사이토카인인 TNF-α에서는 모든 분획물에서 유의성 있는 감소를 나타내지 않았다

다섯째, B16-F10 세포주에서 멜라닌 생성 억제효과를 측정할 결과 위의 에틸아세테이트 분획물 50 µg/ml 처리에서만 유의성 있는 억제효과를 나타내었다.

여섯째, 주름 개선 효과를 확인하기 위해 인체 정상 피부 섬유아세포인 CCD986sk 세포주에서 콜라겐의 합성 촉진 효과를 측정할 결과 위의 물 분획물 10 µg/ml, 100 µg/ml, 에탄올 분획물 10 µg/ml, 100 µg/ml 처리에서 각각 유의성 있는(*P<0.05, **P<0.001) 촉진 효과를 나타내었고, 줄기의 물 분획물 10 µg/ml, 에탄올 분획물 100 µg/ml 처리에서 유의성 있는(**P<0.001, **P<0.01) 촉진 효과를 나타내었다. 그리고 뿌리의 물 분획물 10 µg/ml, 100 µg/ml, 에틸아세테이트 분획물 10 µg/ml 처리에서 각각 유의성 있는(**P<0.001, *P<0.05) 촉진 효과를 나타내었다.

References

1. Y. N. Lee, New Flora of Korea, I, p.246-247, Kyo-Hak Publishing Co. Ltd. (2006).
2. J. S. Kim and T. Y Kim, Woody Plants of Korea, p.142, Dolbegae(2011).
3. Doopedia(Doosan Encyclopedia), *Cudrania tricuspidata*, Doosan Corporation, Available From http://www.doopedia.co.kr/doopedia/master/master.do?_method=view&MAS_IDX=101013000831679 (accessed March 24, 2015).
4. H. J. Choi, C. T. Kim, M. Y. Do and M. J. Rang, Physiological Activities of *Cudrania tricuspidata* Extracts (Part 1), *J. Korea Academia-Industrial Cooperation Soc.*, **14(8)**, 3911(2013).
5. Heo-Jun, Translation Dongui Bogam, p.1972, Bub-In Culture Co.(1999).
6. C. M. Kim, Translation Encyclopedia of Oriental, p.4166, p.3357, p.3582, Herbal Medicine, Jeong-Dam (2004).
7. J. C. Park, H. S. Young and J. S. Choi, Constituents of *Cudrania tricuspidata* in Korea, *YAKHAK HOEJI*, **36(1)**, 40 (1992).
8. S. H. Kim, N. J. Kim, J. S. Choi and J. C. Park, Determination of Flavonoid by HPLC and Biological Activities from the Leaves of *Cudrania tricuspidata* Bureau, *J. Korean Soc, Food Sci, Nutr.*, **22(1)**, 68 (1993).
9. Z. P. Zheng, H. Y. Tan, J. Chen and M. F. Wang, Characterization of Tyrosinase Inhibitors in the Twigs of *Cudrania tricuspidata* and Their Structure-Activity Relationship Study, *Fitoterapia*, **84**, 242 (2013).
10. I. K. Lee, K. S. Song, C. J. Kim, H. M. Kim, G. T. Oh and I. D. Yoo, Tumor Cell Growth Inhibition and Antioxydative Activity of Flavonoids from the Stem Bark of *Cudrania tricuspidata*, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **37(2)**, 105 (1994).
11. I. K. Lee, C. J. Kim, K. S. Song, H. M. Kim, H. Koshino, M. Uramoto, and I. D. Yoo, Cytotoxic Benzyl Dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*, *Phytochemistry*, **41(1)**, 213 (1996).
12. Y. S. Zou, A. J. Hou, G. F. Zhu, Y. F. Chen, H. D. Sun and Q. S. Zhao, Cytotoxic isoprenylated xanthenes from *Cudrania tricuspidata*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **12**, 1947 (2004).
13. B. W. Lee, J. H. Lee, S. T. Lee, H. S. Lee, W. S. Lee, T. S. Jeong and K. H. Park, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Xanthenes from *Cudrania tricuspidata*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**, 5548 (2005).
14. Y. K. Yoon, S. E. Lee, D. J. Lee, M. C. Rho, J. S. Sung, C. B. Park and Y. J. Jang, Anti-cancer Activity of Korean Local Plant Extracts Inducing Apoptosis in Various Carcinoma Cells, *Natural Product Sciences*, **40(1)**, 6 (2009).

15. S. R. Choi, D. H. You, I. Jang, M. S. Ahn, E. J. Song, S. Y. Seo, M. K. Choi, Y. S. Kim, M. K. Kim and D. G. Choi, Cytotoxicity of Methanol Extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **20(3)**, 153 (2012).
16. B. W. Lee, N. S. Kang and K. H. Park, Isolation of Antibacterial Prenylated Flavonoids from *Cudrania tricuspidata*, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **47(2)**, 270 (2004).
17. Y. C. Kim, J. Hur, D. H. Sohn and H. S. Kim, Antibacterial Compounds of the Root Barks of *Cudrania tricuspidata*, *Journal of Pharmacognosy*, **39(3)**, 246 (2008).
18. J. Y. Cha, H. J. Kim, C. H. Chung and Y. S. Cho, Antioxidative Activities and Contents of Polyphenolic Compound of *Cudrania tricuspidata*, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28(6)**, 1310 (1999).
19. J. Y. Cha and Y. S. Cho, Antioxidative Activity of Extracts from Fruit of *Cudrania tricuspidata*, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **30(3)**, 547 (2001).
20. S. R. Choi, D. H. You, J. Y. Kim, C. B. Park, D. H. Kim, and J. Ryu, Antioxidant Activity of Methanol Extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau According to Harvesting Parts and Time, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **17**, 115 (2009).
21. C. H. Jeong, G. N. Choi, J. H. Kim, J. H. Kwak, H. J. Heo, K. H. Shim, B. R. Cho, Y. I. Bae and J. S. Choi, Jine-Shang. In vitro Antioxidative Activities and Phenolic Composition of Hot Water Extract from Different Parts of *Cudrania tricuspidata*, *J. Food Sci. Nutr.*, **14(4)**, 283 (2009).
22. K. S. Youn and J. W. Kim, Antioxidant and Angiotensin Converting Enzyme I Inhibitory Activities of Extracts from Mulberry (*Cudrania tricuspidata*) Fruit subjected to Different Drying Methods, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41(10)**, 1388 (2012).
23. J. Y. Cha, H. J. Kim and Y. S. Cho, Effects of Water-Soluble Extract from Leaves of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the Lipid Peroxidation in Tissues, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **25(3)**, 631 (2000).
24. J. H. Park, K. W. Lee, K. S. Sung, S. S. Kim, K. D. Cho, B. H. Lee and C. K. Han, Effect of Diets with Job's Tears and *Cudrania tricuspidata* Leaf Mixed-powder Supplements on Body Fat and Serum Lipid, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41(9)**, 943 (2012).
25. W. Y. Park, J. S. Ro and K. S. Lee, Hypoglycemic Effect of *Cudrania tricuspidata* Root Bark, *Kor. J. Pharmacogn.* **32(3)**, 248 (2001).
26. O. K. Kim, J. N. Ho, D. E. Nam, W. J. Jun, K. T. Hwang, J. E. Kang, O. S. Chae, and J. M. Lee, Hepatoprotective Effect of *Cudrania tricuspidata* Extracts against Oxidative Damage, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41(1)**, 7 (2012).
27. D. H. Kwon, M. B. Kim, D. Y. Yoon, Y. H. Lee, J. W. Kim, H. G. Lee, I. S. Cha, J. S. Lim. and Y. K. Choe, Screening of Plant Resources of Anti-viral Activity, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **11(1)**, 24 (2003).
28. K. W. Lee, K. S. Sung, S. S. Kim, O. H. Lee, B. H. Lee and C. K. Han, Effects of *Cucurbita moschata*, Adlay Seed and *Cudrania tricuspidata* Leaf Mixed-powder Diet Supplements on the Visceral Fat, Fecal Amount and Serum Lipid Levels of the Rats on a High-Fat Diet, *Korean J. Food & Nutr.*, **25(4)**, 990 (2012).
29. K. B. Lee, K. S. Song, E. H. Moon, J. L. Lee and Y. C. Yoo, Adjuvant Activity of *Cudrania tricuspidata* Water Extracts to Enhance Antigen Specific Humoral and Cellular Immune, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **52(2)**, 234 (2009).
30. J. H. Choi, H. S. Han and Y. J. Lee, Dong-Young, The Inhibitory Effect of *Cudraniae Lignum* on the Collagen-induced Arthritis in Mice, *Kor. J.*

- Herbology*, 24(3), 121 (2009).
31. D. E. Nam, O. K. Kim and J. M. Lee, Jeongmin, Therapeutic Effects of *Curdrania tricuspidata* Leaf Extract on Osteoarthritis, *Korean J. Food & Nutr.*, **42(5)**, 697 (2013).
 32. J. C. Park and H. Y. Lee, Screening of Medicinal Plants on the Anti-inflammatory Effect and Active Component, *Korean J. Food & Nutr.*, **25(3)**, 523 (1996).
 33. Y. M. Kim, *Curdrania tricuspidata* Suppresses Mast Cell-Mediated Allergic Response In Vitro and In Vivo, *YAKHAK HOEJI*, **56(1)**, 26 (2012).
 34. S. S. Oh, E. J. Seo, H. Y. Kim, Y. B. Ryu, J. W. Lee, S. W. Gal and K. H. Park, Tyrosinase Inhibitory Xanthenes from *Curdrania tricuspidata*, *Journal of Life Science*, **17(4)**, 476 (2007).
 35. H. J. Lee, J. R. Do, J. H. Kwon and H. K. Kim, Physiological Activities of Extracts from Different Parts of *Curdrania tricuspidata*, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40(7)**, 942 (2011).
 36. Z. Wang, P. Zheng, H. Y. Tan, J. Chen and M. F. Wang, Characterization of Tyrosinase Inhibitors in the Twigs of *Curdrania tricuspidata* and Their Structure-Activity Relationship study, *Fitoterapia*, **84**, 242 (2013).
 37. O. K. Kim, J. N. Ho, D. E. Nam, W. J. Jun and J. M. Lee, Anti-wrinkle Activity of a *Curdrania tricuspidata* Extract on Ultraviolet-induced Photoaging, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **42(4)**, 608 (2013).
 38. M. J. Rang, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Herbal Extracts on Atopic Dermatitis (Part 2), *J. of the Korean Oil Chemists' Soc.*, **30(1)**, 75 (2013).
 39. D. Mosser and J. P. Edwards, Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation, *Nature Reviews Immunology*, **8**, 958 (2008).
 40. M. J. Rang, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Herbal Extracts on Atopic Dermatitis (Part 1), *J. of the Korean Oil Chemists' Soc.*, **28(1)**, 75 (2011).
 41. J. Y. Min and Y. K. Park, Effect of *Dipsaci Radix* Water Extract on LPS-induced Inflammatory Response in RAW264.7 Mouse Macrophages, *Kor. J. Herbology*, **24(4)**, 189 (2009).
 42. Y. S. Kang, K. Y. Kyeong, M. J. Rang, D. H. Bae, Y. G. Lee, W. G. Cho, S. G. Choi and S. G. Han, Science of Cosmetics and Household Products (I), p. 331, Shin Kwang Publishing Co. Ltd.(2008).
 43. S. H. Kim, N. J. Kim, J. S. Choi and J. C. Park, Determination of Flavonoid by HPLC and Biological Activities from the Leaves of *Curdrania tricuspidata* Bureau, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **22(1)**, 68 (1993).
 44. J. C. Park, J. S. Choi and J. W. Choi, Effects of the Fractions from the Leaves, Fruits, Stems and Roots of *Curdrania tricuspidata* and Flavonoids on Lipid Peroxidation, *Kor. J. Pharmacogn.* **26(4)**, 377 (1995).
 45. S. Ito, A Chemist's View of Melanogenesis, *Pigment Cell Res.*, **16**, 230 (2003).
 46. S. A. Park, H. M. Lee, J. H. Ha, S. H., Jeon and S. N. Park, Inhibitory Effects of *Dendropanax Marbifera* Leaf Extracts on Melanogenesis through Down-regulation of Tyrosinase and TRP-2, *Appl. Chem. Eng.*, **25(5)**, 468 (2014).
 47. E. S. Yang, R. H. Hong and S. M. Kang, The Effect of Genistein on the Proliferation and Type I pN Collagen Synthesis in Aged Normal Human Fibroblasts, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **35(4)**, 316 (2007).
 48. O. K. Kim, J. N. Ho, D. E. Nam, W. J. Jun and J. M. Lee, Anti-wrinkle Activity of a *Curdrania tricuspidata* Extract on Ultraviolet-induced Photoaging, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **42(4)**, 608 (2013).