

자외선 B로 산화적 손상이 유도된 HS68 세포에 익모초 추출물의 효능 평가

김보애*#

목원대학교 테크노과학대학 생의약화장품학부

Activities of Extract from *Leonurus sibiricus* Against UVB-Damage in HS68 Cell

Bo-Ae Kim*#

Division of Biomedicinal & Cosmetics, College of Sciences & Technology, Mokwon University

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study is to investigate anti-inflammation of *Leonurus sibiricus* methanol extract against UVB-damage in fibroblast. The skin is continuously exposed to damage from environmental stresses. UV radiation causes a variety of biological effects especially on the skin, including inflammation and photoaging.

Methods : In this study, we tried to search for *Leonurus sibiricus* which exhibit protective activities against UVB-induced cytotoxicity and oxidative cell death, NO and PGE₂ production. HS68 cells were exposed to UVB (120 mJ/cm²) and treated with various concentrations (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/ml) of *Leonurus sibiricus* methanol extract for additional 24 h. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels generated by UV radiation were detected using a spectrofluorometer after DCF-DA staining. Also, HS68 cells were irradiated with UVB and then treated with *Leonurus sibiricus* methanol extract for 12 h. The lipid peroxidation was assayed by measuring the levels of 8-isoprostane secreted into the culture medium.

Results : UVB-induced cytotoxicity and cell death were effectively suppressed by treatment of *Leonurus sibiricus* aqueous methanol extracts. Oxidative cell damage was mediated PGE₂ in UVB-induced HS68 fibroblast cell, which was significantly inhibited by treatment with *Leonurus sibiricus* extracts. Also, the protective effect of these extract seemed to be mediated by inhibited intracellular ROS generation and lipid peroxidation in dose-dependent manner.

Conclusion : These results suggest that *Leonurus sibiricus* aqueous methanol extracts may have anti-aging effects new functional materials against oxidative UVB stress-mediated skin damages.

Key words : *Leonurus sibiricus*, anti-inflammation activity, human skin fibroblast, ultraviolet B radiation, oxidative stress

I. 서 론

피부는 표피층, 진피층 및 피하지방층으로 구성되며 인체에서 가장 큰 장기로서 외부환경으로부터 장벽 역할을 수행하고 체내 항상성을 유지하는 기능을 담당한다^{1,2)}. 즉 인체 최외각에서 화학적, 물리적, 생물학적 피부 장벽 기능을 통해 인체 보호작용 외에도 체온조절, 자극감지, 에너지저장, 분비 및 흡수, 비타민 D합성 작용 등 많은 역할을 한다. 반면에 외부 자극의 반복으로 1차적으로 가장 손상받기 쉬운 부분이기도

하다. 외부 자극의 주요 인자로서 자외선, 중금속을 포함하는 미세먼지, 매연, 병원성 미생물, 기온차이 등이 있으며 지속적인 외부자극으로 인하여 피부의 산화적 스트레스를 유도하여 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)을 증가시키고 항산화 시스템을 약화시켜 피부세포 손상 및 유전정보의 교란을 야기한다³⁾. ROS는 산소기(oxygen radical) 뿐만 아니라 산소의 비자유기 유도체(non-radical derivatives of O₂)를 총칭하며 정상 산소성 개체 (aerobic organism)는 ROS 발생과 항산화 방어계가 서로 균형을 이루고 있다. 그러나 superoxide,

*#Corresponding author and First author : Bo-Ae Kim, Division of Biomedicinal & Cosmetics, College of Sciences & Technology, Mokwon University, Daejeon 35349, Korea.

· Tel : +82-42-829-7569 · E-mail : kba@mokwon.ac.kr

· Received : 8 August 2017 · Revised : 27 August 2017 · Accepted : 15 September 2017

hydrogen peroxide 및 lipid peroxy radical 등을 포함한 ROS는 피부세포의 염증반응을 야기 시키며 직접적으로 세포 신호전달 과정을 매개하고 조직 손상을 유발한다⁴⁾.

환경오염으로 인해 지표면에 도달하는 자외선의 양은 해마다 증가하고 있으나 현대인의 취미생활을 위한 야외활동 및 여행 인구는 증가하고 있고 각종 스트레스와 서구화된 생활습관 또한 피부건강을 위해하는 요소들로 작용하고 있다^{5,6)}. 그 중에서도 피부 건강을 해치는 주요원인인 자외선 (ultra violet ray)은 피부에 직접적으로 노출되므로 이에 대한 관심이 급증하고 있다. 자외선은 피부 내의 활성산소 발생을 증가시키고 세포내 항산화 물질의 저장을 방해하는 것으로 잘 알려져 있다. 자외선에 의해 촉진된 노화를 광노화(photoaging)라 하며 보통 일광에 장기적으로 노출될 때 일어나는 현상인데⁷⁾, 농업 및 어업과 같은 햇볕 노출 하의 환경에서 일을 하는 직업의 특성상 피부노화가 촉진되어 굵은 주름, 피부 반점, 건조증 및 심하면 피부암 발병률과 연관된다⁸⁾. 따라서 자외선에 의한 손상을 억제하기 위해서는 항산화 방어 메커니즘을 이해해야 하며, 이를 이용하여 인체 안전성이 높은 천연유래 성분으로부터 유용한 항산화 물질을 탐구하는 것이 중요하다⁹⁾.

익모초 (益母草)는 꿀풀과에 속하며 학명은 *Leonurus sibiricus* Houtt. 로 어미에게 이로운 풀이라고 하는데서 명칭의 유래를 찾을 수 있다¹⁰⁾. 한방에서는 해독, 정혈, 조혈, 자궁수축, 결핵, 부종, 출산 후 지혈에 쓴다고 알려져 있으며, 7~8월에 채집하여 건조 후 사용한다¹¹⁾. 주요성분으로는 alkaloid계 성분 leonurine, stachydrine¹²⁾, flavonoid계 성분으로 rutin, hyperoside, quercetin, apigenin, genkwanin 등이 보고되어 있고 diterpene계 성분으로 heteronone A, heteronone B, prehispanolone, leojaponine, preleoheterin 등이 분리되었고^{13,14)}, 이들은 간세포, 심장 및 뇌신경세포 보호 작용 등이 연구되어 있다¹⁵⁾. 또 다른 약리작용으로는 익모초 물 추출물에 대한 항산화 활성 및 항염증활성에 관한 보고가 있다¹⁶⁾.

상기와 같이 익모초에 정혈, 해독 작용이 있는 것으로 미루어 보아 산화적손상 억제 대한 영향이 있을 것으로 사료된다. 또한 익모초 메탄올 추출물의 자외선 B에 의한 HS68의 산화적 세포 손상에 미치는 영향에 대해서는 평가된 바 없어 이에 대하여 구체화하고 자외선 B에 의한 산화적 스트레스를 억제하는 노화 방지 물질 소재로서의 가능성을 알아보기 위해 아래와 같이 실험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 추출물의 제조

익모초는 경북 영천에서 생산된 제품을 구입하여 사용하였다. 건조된 익모초를 분쇄하고 80mesh로 통과시킨 후 익모초를 80% (v/v) 메탄올에 침지하여 35℃에서 40KHz의 초음파로 30분간 초음파 추출하였다. 얻어진 추출물은 Whatman No 1 filter paper로 여과한 후 rotary vacuum evaporator로 농축하였으며 24.6%의 수득율을 나타내었다.

2. 세포배양

인간 섬유아세포주인 HS68 (human skin fibroblast)은 ATCC (Rockville, MD, USA)로부터 분양받아 사용하였으며 세포배양을 위한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 항생제(penicillin/streptomycin)는 Gibco사(Grand Island, NY, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하였고 37℃, 5% CO₂조건의 incubator에서 배양하였다.

3. 자외선 조사

자외선 B 조사로 인한 세포독성 및 산화적 세포사멸에 대한 상기 익모초 메탄올 추출물의 항산화 효능을 확인하기 위해서 자외선 B를 아래와 같은 조건으로 처리하였다¹⁷⁾. HS68 세포를 80% 밀도가 되도록 배양한 뒤 배지를 제거하고 인산완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 1회 세척한 다음 자외선 조사장치 (BLX-E254, Viber Lourmat, Paris, France)를 사용하여 120 mJ/cm²의 자외선 B를 조사하였다. 자외선 조사 후 다양한 농도의 추출물을 처리하여 24시간 배양하였다.

4. 세포 생존율 측정

시험 종료 후 배지를 제거하고 MTT solution (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide])을 넣고 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후 MTT solution을 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO에 녹여 ELISA microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Nitric oxide 생성량 측정

NO의 농도는 배양액내의 nitrite 농도를 Griess reagent system을 이용하여 측정하였다¹⁸⁾. 배양된 HS68세포에 자외선 B를 처리하고 추출물을 각 농도별로 처리하였다. 24시간 배양 후 배양액의 100 µl와 동일한 Griess reagent를 넣어주고 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도 별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

6. Prostaglandin E₂생성 측정

HS68 세포에 자외선 B 세포손상을 유도함과 동시에 시료를 농도별로 처리하였고 24시간 후 원심분리(12,000rpm, 3min)하여 얻어진 상층액의 PGE₂함량을 측정하였다. 배양상층액에서 PGE₂량을 효소면역분석법 (Enzyme immunoassay kit, Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA)을 이용하여 정량하였다¹⁹⁾.

7. 세포내 ROS 측정

세포 내 ROS 측정은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)가 세포 내로 투과된 후 아세틸기가 유리된 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH)의 형태에서 ROS와 반응

하여 형광물질을 생성하는 성질을 이용하였다²⁰⁾. 자외선 B가 조사된 피부세포에서의 ROS를 측정하기 위해서 120 mJ/cm² 자외선 B로 조사한 후 추출물을 처리하고 37℃ 온도의 5% CO₂ 배양조건에서 24시간 동안 배양시켰으며 배양된 세포는 10 μm DCFH-DA이 첨가된 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양한 후 HBSS로 DCFH-DA를 3회 씻어낸 후 fluorescence microplate reader (Bio-Tek instrument, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 형광을 측정하였다.

8. Lipid peroxidation 측정

세포막지질의 과산화반응 (lipid peroxidation)은 120 mJ/cm² 자외선 B로 조사한 후 추출물을 처리한 다음 37℃ 온도의 5% CO₂ 배양조건에서 24시간 동안 배양시킨 배양액으로부터 분비되는 8-Isoprostane의 양을 효소 면역분석 키트 (enzyme immunoassay, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 비색정량법 (colorimetric determination)을 통해 측정하였다^{21,22)}.

9. 통계적 검증

실험 결과는 mean ± S.D로 나타내었으며 Student's t-test 방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였으며 유의수준은 p < 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. 자외선 B로 인한 세포 손상으로부터 익모초 추출물의 보호효과

익모초 메탄올 추출물 (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/ml)을 HS68 세포주에 24시간 동안 처리하고 MTT reduction assay로 세포생존 정도를 평가한 결과 4 mg/ml 농도에서 LD₅₀을 나타내었고, 1 mg/ml에서는 추출물 자체로 91.65 % 세포생존율을 나타내었으며 그 이하의 농도에서는 독성을 나타내지 않았다. 그리고 추출물의 농도를 0.25, 0.5, 1 mg/ml로 고정하고 다음 자외선 B를 조사하여 MTT 실험 결과 익모초 추출물을 함께 처리한 그룹에서 세포생존율이 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

2. NO와 PGE₂ 생성에 미치는 영향

세포독성을 나타내지 않는 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도로 익모초 추출물을 처리한 결과 자외선 B로 염증이 유도된 HS68 세포에 익모초 추출물을 처리하였을 때 염증매개물질이 감소되는 것으로 나타났다. 자외선 B를 단독으로 처리한 경우 83.78 ± 11.31 μm의 NO 생성량을 나타내었으며 익모초 추출물을 처리한 군에서 농도 의존적으로 NO 생성이 감소되었는데 익모초 추출물 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도에서 각각 73.25 ± 2.307, 55.21 ± 18.66, 77.67 ± 3.07 μm의 NO 생성 수준을 나타내었다. PGE₂의 경우 자외선 B를 단독으로 처리하였을 때 1.65 ± 0.28 ng/ml의 PGE₂가 생성되었으며 익모초 추출물

0.25, 0.5, 1 mg/ml로 처리하였을 때는 각각 0.44 ± 0.33, 0.71 ± 0.04, 0.61 ± 0.07 ng/ml의 수준으로 나타났다(Fig. 2).

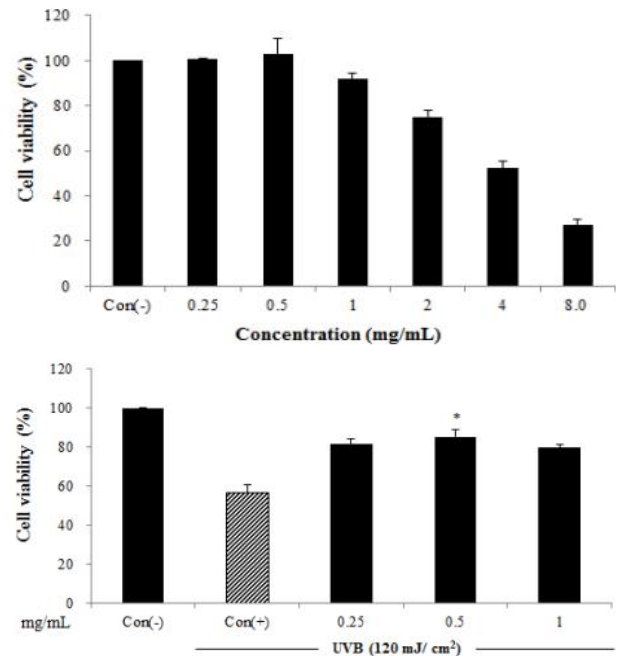


Fig. 1. Anti-aging effect of *Leionurus sibiricus* methanol extract on the UVB-induced cytotoxicity. HS68 cells were exposed to UVB (120 mJ/cm²) and treated with various concentrations (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/ml) of *Leionurus sibiricus* methanol extract for additional 24 h. The data is expressed as percentage cell viability and represent the means. Data shown are from a representative experiment repeated three times with similar results. The values are the mean ± standard error of mean. **p < 0.001 compared the control group; *p < 0.05 compared the cadmium-alone group.

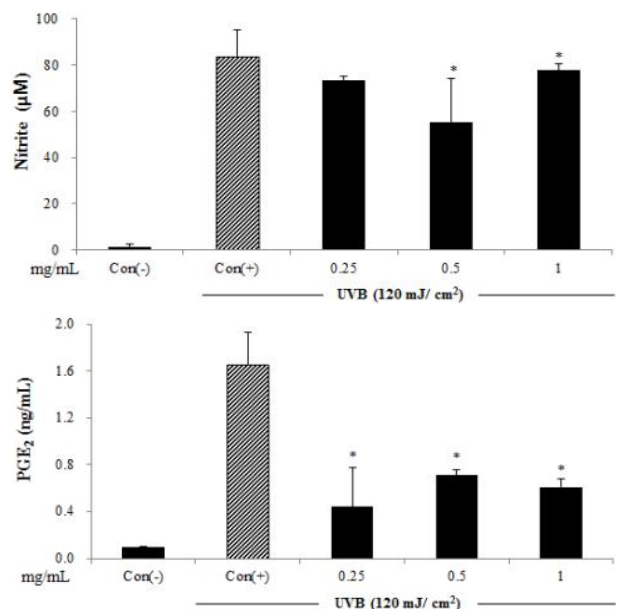


Fig. 2. The *Leionurus sibiricus* methanol extract suppressed UVB-induced NO and PGE₂ production. HS68 cells were exposed with UVB alone or with various concentrations of extracts. The data is expressed as percentage cell viability and represent the means. Data shown are from a representative experiment repeated three times with similar results. The values are the mean ± standard error of mean. **p < 0.001 compared the control group; *p < 0.05 compared the cadmium-alone group.

3. 자외선 B로 산화적 스트레스 유도된 세포내 ROS 억제 효과

자외선 B만 조사한 군에서 세포 내 활성산소는 185.21 ± 11.21 의 수치로 현저히 증가하였으며, 익모초를 0.25, 0.5, 그리고 1 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 152.04 ± 12.37 , 147.39 ± 6.43 , 170.85 ± 2.10 수치로 유의성 있게 ROS가 감소하였다 (Fig. 3).

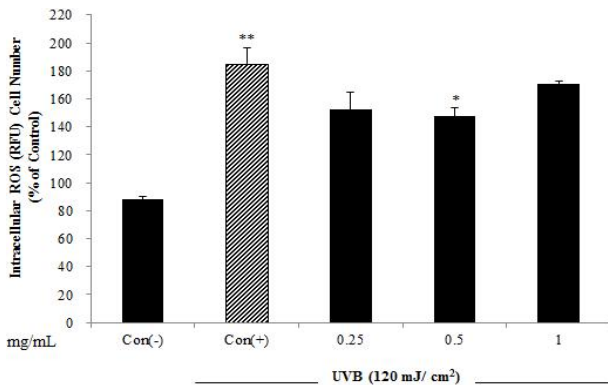


Fig. 3. Cellular antioxidant activity of *Leonurus sibiricus* methanol extract in UVB-induced oxidative stress in HS68 cells. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels generated by UV radiation were detected using a spectrofluorometer after DCF-DA staining. The data is expressed as percentage cell viability and represent the means. Data shown is from a representative experiment repeated three times with similar results. The values are the mean \pm standard error of mean, ** $p < 0.001$ compared the control group; * $p < 0.05$ compared the cadmium-alone group.

4. 과산화지질 억제 효과

익모초 추출물을 이용한 지질 과산화 억제 활성의 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 익모초 추출물의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 생성 저해효과가 나타났고, 0.5 mg/mL의 농도에서는 양성대조군 대비 약 34%의 8-isoprostane 생성을 억제하였다.

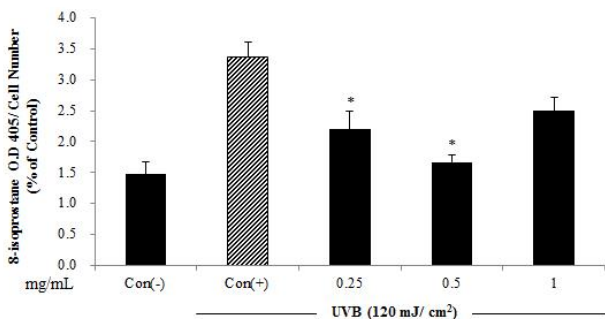


Fig. 4. Modulation of UVB-induced lipid peroxidation by *Leonurus sibiricus* methanol extract. HS68 cells were irradiated with UVB and then treated with *Leonurus sibiricus* methanol extract for 12 h. The lipid peroxidation was assayed by measuring the levels of 8-isoprostane secreted into the culture medium. Values are mean \pm S.E. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to UVB irradiated group. The data are expressed as percentage cell viability and represent the means. Data shown is from a representative experiment repeated three times with similar results. The values are the mean \pm standard error of mean, ** $p < 0.001$ compared the control group; * $p < 0.05$ compared the cadmium-alone group.

IV. 고찰

자외선 B는 피부세포의 면역억제, 염증촉진, 유전자 손상을 통한 피부암 유발을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 특히 이러한 신호전달과정의 시작은 산화적 스트레스가 중요한 역할을 한다. 자외선 B로 손상이 유도된 HS68의 산화적 손상 및 독성에 대한 익모초 메탄올 추출물의 보호효과를 평가하기 위하여, 우선 추출물을 단독으로 처리하고 세포생존에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 4 mg/mL 농도에서 LD₅₀을 나타내었고, 1 mg/mL에서는 추출물 자체로 91.65 % 세포생존율을 나타내었으며 그 이하의 농도에서는 독성을 나타내지 않았다. 이후 실험에서는 추출물의 자체 독성 결과를 바탕으로 추출물의 농도를 0.25, 0.5, 1 mg/mL로 고정하고 다음 자외선 B를 조사하여 세포독성에 미치는 익모초 추출물의 보호효과를 검토하였는데, 자외선 B를 조사한 경우 세포생존율이 56.54 %로 감소하였으며, 익모초 추출물을 함께 처리한 그룹에서 세포생존율이 증가됨을 확인할 수 있었다. 이는 익모초 메탄올 추출물이 섬유아세포에서 자외선 B 조사로 인한 세포독성 및 사멸을 감소시키는 효과가 있다는 것을 나타낸다.

Nitric oxide (NO) 형성은 자외선에 의한 세포염증반응과 밀접하게 관련이 되어 있으며, 염증성 사이토카인의 자극에 의하여 여러 세포에서 유도된다. 외부 자극에 의해 염증이 유발되어 전달되는 과정에서는 COX-2가 일시적으로 발현이 되어 염증이 일어난 곳에서 PGE₂를 과량 방출하게 된다²³⁻²⁵. 이를 바탕으로 본 연구에서는 익모초 추출물이 자외선 B에 의한 산화적 손상에 미치는 영향을 평가하기 위해 염증매개인자의 변화를 관찰하였으며, 추출물의 농도는 세포독성을 나타내지 않는 0.25, 0.5, 1 mg/mL 농도에서 실시하였다. 그 결과 자외선 B로 염증이 유도된 HS68 세포에 익모초 추출물을 처리하였을 때 염증매개물질이 감소되는 것으로 나타났다. 기존 연구에 의하면 자외선 B로 손상을 유도한 각질형성세포에 익모초 에탄올 추출물을 처리하였을 때 PGE₂ 생성 저해 효능을 나타내는 것으로 보고된 바 있으며²⁶, 본 연구의 실험 결과와 유의한 관련성을 나타내는 것으로 사료된다.

자외선 B가 피부세포에 조사되는 경우 H₂O₂ (hydrogen peroxide)와 같은 활성산소가 생성되며, 발생한 H₂O₂는 이후 Fenton reaction을 통해 매우 반응성이 강한 hydroxyl radical을 형성하게 된다²⁷. 이와 관련하여 익모초 추출물이 자외선 조사에 의해 일어나는 피부섬유아세포 내의 활성산소 생성 억제 효과를 알아보기 위해, 세포에 자외선 B를 조사한 후 추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 자외선 B만 조사한 군에서 세포 내 활성산소는 현저히 증가하였으며, 익모초를 처리하였을 때 각각 유의성 있게 ROS가 감소하였다. 이는 익모초 메탄올 추출물의 자외선에 의한 산화적 손상을 억제하는 소재로서의 가능성을 확인할 수 있는 결과로 사료된다.

세포막을 구성하고 있는 지질성분은 ROS에 의해 과산화반응을 일으키며 8-isoprostane, 4-hydroxynonenal, malondialdehyde 등의 물질을 생성하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 자외선에 의한 섬유아세포의 세포막 지질과산화 억제 활성을 8-Isoprostane의 변화를 통하여 살펴 보았다. 익모초 추출물의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 생성 저해효과가 나타났고, 양성대조군 대비 약 34%의

8-isoprostane 생성을 억제하였다. 이는 세포내 활성산소 소거가 농도 의존성 있게 나타난 것과 관계가 있는 것으로 사료된다. 즉 산화적 손상이 일어나면 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 NO가 생성되고, 과도하게 생성된 NO는 체내 과산화지질 증가와 함께 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다²⁸. 본 결과를 통해 익모초 추출물이 NO 생성과 더불어 과산화지질 생성을 억제하는 것으로 볼 때 익모초 추출물은 다양한 산화적 손상을 억제할 수 있는 물질로 활용 가능할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 익모초 메탄올 추출물의 세포독성에 미치는 영향과 자외선 B 조사에 의한 염증반응으로부터 세포보호 효능에 대해 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HS68 세포에 익모초 추출물을 처리하여 MTT assay를 통해 세포의 생존율을 확인한 결과 추출물 2 mg/ml이하의 농도에서는 90% 이상의 높은 생존율을 보였으며, 4 mg/ml 농도에서는 LD₅₀을 나타내었다.
2. 자외선 B로 손상을 유도한 HS68 세포에서 익모초 추출물의 세포보호효과를 확인해 보았을 때 익모초 추출물 0.25, 0.5 mg/ml 농도로 처리한 결과 세포의 생존율이 80%이상으로 추출물의 자외선 B에 대한 세포보호효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.
3. 익모초 추출물의 항염효능을 평가한 결과 자외선 B를 단독으로 처리한 양성대조군과 비교해서 염증매개물질인 NO와 PGE₂ 생성율이 억제되는 것으로 나타났으며 농도 의존적으로 감소하였다.
4. 익모초 추출물을 이용한 지질 과산화 억제 활성 실험의 결과 익모초 추출물의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 ROS와 과산화지질 생성 저해효과가 나타났다.

이상의 결과는 익모초 메탄올 추출물은 자외선으로 인한 산화적 손상으로부터 피부 세포를 보호하는 기능과 동시에 염증 매개인자를 감소하는 효과를 나타내므로 피부보호를 위한 외용제의 활용 가능성이 있다고 사료된다.

References

1. Roosterman D, Schneider SW, Bunnett NW and Steinhoff M. Neuronal Control of Skin Function : The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ, *Physiol. Rev.* 2006 ; 86(4) : 1309-79.
2. Sylvie VS and Bonte F. Skin hydration : A review on its molecular mechanisms. *J. Cosmetic Dermatol.*

- 2007 ; 6(2) : 75-82.
3. Chiba K, Kawakami K, Sone T and Onoue M. Characteristics of skin wrinkling and dermal changes induced by repeated application of squalene monohydroperoxide to hairless mouse skin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2003 ; 16(4) : 242-51.
4. Halliday GM. Inflammation, gene mutation and photo immunosuppression in response to UVR induced oxidative damage contributes to photo carcinogenesis. *Mutation Research.* 2005 ; 571(1) : 107-20.
5. Matzen RN. Preventive medicine: definition and application. In : R. S. Lang and D. D. Hensrud, Editors. *Clinical preventive medicine.* 2004 : 3-9.
6. Gies PH, Roy CR, Toomey S and McLennan A. Protection against solar ultraviolet radiation. *Mutation Research.* 1998 ; 422(1) : 15-22.
7. Dobbins SJ, Wakefield MA, Jansen KM et al. Weekend sun protection and sunburn in australia : Trends (1987-2002) and association with sunsmart television advertising. *Am. J. Prev. Med.* 2008 ; 34(2) : 94-101.
8. Fazekas Z, Gao D, Saladi RN, Lu Y, Lebwohl M and Wei H. Protective effects of lycopene against ultraviolet B-induced photodamage. *Nutrition and Cancer.* 2003 ; 47(2) : 181-7.
9. Lim SW, Ryoo HC and Lee SH. Understanding of skin aging and its prevention and care. *JSBR.* 2002 ; 4(1) : 71-80.
10. Kim HS, Yoon SH. The effect of *Leonuri* Herba Extracts on the Benzo[a]pyrene-induced Hepatotoxicity in Rats. *Journal of Korean Society for Hygienic Science.* 1999 ; 5(2) : 93.
11. Shin SH. Original Articles ; Studies on Active Principles of *Leonurus sibiricus*. *Korean Journal of Pharmacognosy.* 1984 ; 15(2) : 104-07.
12. Hong SS, Sa J, Hwang SA, Lee BY, Hwang KW, Ha KR, Ze RS, Seung JS, Lee KS. Isolation and Quantitative Analysis of *Leonurine* from *Leonuri Herba*. *Korean Journal of Pharmacognosy.* 2001 ; 32(4) : 316-321.
13. Cai XH, Che CT, Lam CK, Mak TC, Wu LJ. A new labdane diterpene from *Leonurus heterophyllum*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2006 ; 8(7) : 599-603.
14. Giang PM, Son PT, Matsunami K, Otsuka H. New bis-spirolabdane- typediterpenoids from *Leonurus heterophyllum*. *Chem. Pharm. Bull.* 2005 ; 53(11) : 1475-9.
15. Li Y, Chen Z, Feng Z, Yang Y, Jiang J, Zhang P. Hepatoprotective glycosides from *Leonurus japonicus Houtt.* *Carbohydr. Res.* 2012 ; 348 : 42-6.
16. Liang H, Liu P, Wang Y, Song S, Ji A. Protective effects of alkaloid extract from *Leonurus heterophyllum*

- on cerebral ischemia reperfusion injury by middle cerebral ischemic injury (MCAO) in rats. *Phytomedicine*. 2011 ; 18(10) : 811–8.
17. Lee C, Jang JH, Kim BA and Park CI. Anti-aging Effects of Marine Natural Extracts against UVB-induced Damages in Human Skin Cells. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*. 2012 ; 38(3) : 255–261.
18. Nancy L, McCartney F, Song XY, Mizel DE, Wahl CL, Wahl SM. Hemoglobin protects from streptococcal cell wall-induced arthritis, *Arthritis Rheum*. 1999 ; 42(6) : 1119–27.
19. Ann SM, Yoon HY, Lee BG, Park KC, Chung JH, Moon CH and Lee SH. Fructose-1,6-diphosphate attenuates prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase-2 expression in UVB-irradiated HaCaT keratinocyte. *British Journal of Pharmacology*. 2002 ; 137(4) : 497–503.
20. Rosenkranz AR, Schmaldienst S, Stuhlmeier KM, Chen W, Knapp W and Zlabinger GJ. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J. Immunol. Methods*. 1992 ; 156(1) : 39–45.
21. Beauchamp MC, Letendre E, Renier G. Macrophage lipoprotein lipase expression is increased in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J. Lipid Res*. 2002 ; 43(2) : 215–22.
22. Park HC, Jung TK, Yoon KS. Antioxidative Activity of Extract of *Cornus walteri* Wanger Leaves in Human Dermal Fibroblast Irradiated by UVB. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*. 2014 ; 29(6) : 432–436.
23. Ryu HS, Chang KH, Yang HW, Kim MS, Kwon HC and Oh KS. High cyclooxygenase-2 expression in stage IB cervical cancer with lymph node metastasis or parametrial invasion. *Korean J. Gynecol. Oncol*. 2000 ; 76 : 320–5.
24. Gaffney DK, Holden J, Davis M, Zempolich K, Murphy KJ and Dodson M. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J. Radiat Oncol. Biol. Phys*. 2001 ; 49(5) : 1213–17.
25. Vane JR, Bakhle YS and Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 1998 ; 38(1) : 97–120.
26. Kim JH, Na Y, Sim GS, Lee BC and Pyo HB. Antioxidative and anti-inflammatory effects of *Petasites japonicus*. *J. SOC. Cosmet. Scientists Korea*. 2006 ; 32(4) : 263–7.
27. Thomas CM, Mackey M, Diaz AA. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep*. 2009 ; 14(3) : 102–8.
28. Kramer GF, Normana HA, Krizek DT, Mirecki RM. Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry*. 1991 ; 30(7) : 2101–8.