

Original Article / 원저

쑥母草 추출물이 악성 흑색종 세포에 미치는 피부미백효과

김지은¹ · 임경민¹ · 나가영² · 김혜화¹ · 강병수¹ · 최정화¹ · 박수연¹ · 정민영¹
동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실¹
동신대학교 한의과대학 내과학교실²

Skin Whitening Effect of Leonuri Herba Extracts(LHE) on Malignant Melanoma Cell

Ji-Eun Kim¹ · Kyeong-Min Lim¹ · Ga-yeong Na² · Hye-Hwa Kim¹ · Byung-Soo Kang¹ ·
Jung-Hwa Cho¹ · Soo-Yeon Park¹ · Min-Yeong Jung¹

Department of Oriental Medical Ophthalmology, Otolaryngology and Dermatology, College of Korean Medicine,
Dong-shin University¹
Department of Internal medicine, College of Korean Medicine, Dong-shin University²

Abstract

Objectives : In order to find out the whitening effects of Leonuri Herba, this study was designed to identify the effects and the action mechanism of LHE(Leonuri Herba extract) on Malignant melanoma cell lines.

Methods : After treating LHE on the B16F10 cell-Malignant melanoma cell line-, the cell survival rate, melanin biosynthesis rate, intra&extracellular tyrosinase activity rate, SOD-like activity, tyrosinase mRNA gene expression were investigated. The results were compared with control group without LHE treatment or with positive control group treated with whitening efficacy substance.

Results : B16F10 cell survival rate, melanin biosynthesis rate, and intra&extracellular tyrosinase activity were significantly inhibited depending on the concentration of treated LHE. Melanin biosynthesis rate and tyrosinase activity rate were also decreased when α -MSH was combined with LHE. In addition, the SOD-like activity was increased in a concentration-dependent manner in the treatment with the LHE, indicating significant activity at high concentrations, and the tyrosinase mRNA gene expression was decreased in both the LHE-treated group, the LHE and α -MSH-treated group.

Conclusions : LHE seems to inhibit melanin synthesis through inhibition of tyrosinase activity and inhibition of tyrosinase mRNA gene expression. It also has the effect of promoting SOD-like activity and may be used clinically as a skin whitening agent in the future.

Key words : Leonuri Herba(LH); skin whitening; malignant melanoma cell

1. 서 론

피부색 결정에 가장 큰 공헌을 하는 요소는 멜라닌 색소량으로¹⁾ 멜라닌은 단백질의 일종인 tyrosine이 tyrosinase의 작용에 의해 여러 물질로 대사되는 과정을 거쳐 합성된다²⁾. 표피에 존재하는 멜라닌은 피부가 자외선에 노출될 경우 세포손상을 방어하기 위한 수단으로 생성³⁾되기 때문에 자외선에 과다하게 노출되면 멜라닌은 표피에 침착되어 기미 등의 색소침착을 유발한다⁴⁾. 그러므로 멜라닌 생성억제여부 또는 tyrosinase 억제율이 미백의 관건이 될 뿐 아니라, 이를 통해 미백효과를 검증할 수 있다.

익모초(Leonuri Herba)는 꿀풀과에 속한 1년생 또는 2년생 본초로 익모초 *Leonurus sibiricus* L.의 지상부를 건조한 것으로 性은 微寒하고 味는 苦辛하다⁵⁾. 익모초는 血行을 좋게 하고, 瘀血 제거, 水毒을 해독하는 효능이 있어 月經不調, 小便不利, 水腫 뿐만 아니라 瘡癰腫毒, 痒疹등의 피부병증 또한 치료한다⁶⁾.

지금까지 보고된 바에 따르면 익모초는 항염, 항산화^{7,8)}, 각질형성세포의 자외선 손상에 대한 보호효과⁸⁾, 보습 및 피부탄력개선⁹⁾, 항암 및 면역조절¹⁰⁾, 자궁운동 촉진¹¹⁾, 간기능 회복, 혈당저하¹²⁾, 자궁근종세포 증식억제¹³⁾ 등 다양한 효능이 보고되었으나 멜라닌 및 tyrosinase억제와 관련한 미백효과에 대한 직접적인 연구는 없었다.

Corresponding author : Min-Yeong Jung, Department of Oriental Medical Ophthalmology, Otolaryngology and Dermatology, Mokpo Oriental Hospital of Dong-shin University, 313 Baegnyeon-daero, Mokpo, Korea
(Tel : 061-280-7907, E-mail : mining32@naver.com)

●Received 2017/10/16 ●Revised 2017/10/27 ●Accepted 2017/11/3

이에 저자는 活血調經, 利水消腫, 祛瘀生新 효능이 있고, 많은 연구에서 항산화효능이 보고된 익모초가 미백에 효과가 있을 것으로 기대하고 본 연구를 시행하였다. 그리하여 익모초가 악성 흑색종 세포주인 B16F10 cell에 미치는 미백 효과와 그 기전을 알아보기 위해 B16F10 세포생존율, 멜라닌 생합성률, tyrosinase 활성률, tyrosinase mRNA 유전자 발현도, superoxide dismutase 유사활성도를 관찰한 결과 유의성을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

순형과에 속한 일년생 또는 이년생 초본인 익모초 *Leonurus sibiricus* L.의 지상부를 건조한 것으로 동신대학교 부속목포한방병원에서 구입하여 사용하였다.

2) 세포주

한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 악성 흑색종(melanoma) 세포주인 B16F10 cell을 구입하여 사용하였다. B16F10 세포주의 생육 배지는 10% fetal bovine serum(Gibco, USA)과 Antibiotic-Antimycotic(Gibco, USA)을 첨가한 DMEM(Gibco, USA)을 사용하였고, B16F10 세포주는 실험기간동안 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2. 실험방법

1) 시료 추출

증류수 1,500ml에 익모초 100g을 넣고 100℃에서 2시간 동안 전탕한 후 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고 얻은 상층액을 동결건조기(삼원, 한국)를 이용하여 익모초 동결건조 분말(Leonuri Herba Extracts, LHE) 4.8g을 추출하였다. 연구에 사용하기 위한 LHE는 멸균을 대신하기 위해 인산 완충액(phosphate buffered saline, PBS)에 다시 녹이고 0.22 μ m의 필터(Syringe filter, Whatman)로 걸러서 사용하였다.

2) B16F10 세포생존율 측정

LHE가 B16F10 세포의 생존에 미치는 영향은 EZ-Cytox Assay kit(Dogenbio, Korea)로 측정하였다. B16F10 세포주를 배양하여 각 well당 5 \times 10⁴cells/well의 농도로 96 well plate에 세포를 분주하고, 5% CO₂ 37℃의 incubator에서 24시간을 배양 하였다. 그 후 LHE를 각각 0, 125, 250, 500, 1,000, 2,000 μ g/ml의 농도로 처리하여 다시 24시간 배양하였다. 각 well에 EZ-Cytox용액 10 μ l를 처리하여 2시간 배양한 후 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 흡광도를 450nm에서 측정하여 분석하였다.

3) B16F10의 멜라닌 생합성률 측정

LHE가 멜라닌 생합성에 미치는 영향은 Hosei 등의 방법¹⁴⁾을 이용하여 측정하였다. B16F10 세포주를 배양하여 각 well당 3 \times 10⁴cells/well의 농도로 24 well plate에 세포를 분주하고, 세포의 부착과 안정화를 위해 24시간 동안 배양하였다. 그 후 LHE를 각각 0, 250, 500, 1,000 μ g/ml의 농도로 처리하여 48시간 동안 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 각 well을 PBS로 세척하고 400 μ l의 1N NaOH 용액을 첨가하여 1시간 동안 60℃에서 용해한 후 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 사용하여 405nm에서 흡광도

를 측정하여 분석하였다.

LHE가 α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone)에 의해 유도된 멜라닌 생합성에 미치는 영향을 살펴 기 위해 세포를 배양한 각 well에 실험군에는 LHE 250 μ g/ml를, 양성대조군에는 arbutin 250 μ g/ml를 처리하여 37℃, 5% CO₂의 incubator에서 1시간 동안 배양한 후 100nM의 α -MSH를 처리하여 다시 37℃, 5% CO₂의 incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 well를 PBS로 세척하여 1N NaOH 용액 400 μ l을 첨가하고 1시간 동안 60℃에서 용해한 후 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

4) 시험관 내 tyrosinase 활성률 측정

LHE가 시험관 내 tyrosinase 활성에 미치는 영향은 Yagi 등의 방법¹⁵⁾을 이용하여 측정하였다. 0.2ml의 10mM L-DOPA 용액과 0.5ml의 0.175M sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 가하고, LHE를 buffer에 녹인 후 최종적으로 0, 125, 250, 500, 1,000 μ g/ml의 농도가 되도록 0.1ml를 가하였다. 여기에 mushroom tyrosinase(110unit/ml) 0.2ml를 가하여 2분간 37℃에서 반응하게 한 후 475nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성 저해율 계산법은 다음과 같다.

$$\text{Tyrosinase inhibition(\%)} = [1 - \{(C-B)/(A-D)\}] \times 100$$

- A : 효소만 첨가된 용액
- B : 시료만 첨가된 용액
- C : 효소, 시료 모두 첨가된 용액
- D : 효소, 시료 모두 첨가되지 않은 용액

5) 세포 내 tyrosinase 활성률 측정

LHE가 세포 내 tyrosinase 활성에 미치는 영향은 Martinez-Esparza 등의 방법¹⁶⁾을 이용하여 측정하였다. Cell culture dish에 각각 1.5 \times 10⁶cells/dish의 농도로 B16F10 세포를 분주하고, 세포의 부착과 안정화를 위해 24시간 동안 incubation하였다. 그 다음 LHE 250 μ g/ml를 처리하고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 다시 24시간 배양하였다. 1% Triton X-100을

포함한 10mM PBS 100 μ l에 배양한 세포를 현탁시킨 다음 vortexing한 후 5분 동안 1,000rpm에서 원심분리하여 얻어진 상층액을 활성 측정 효소액으로 이용하였다. Tyrosinase의 활성을 측정하기 위해 96 well plate에 L-DOPA(2mg/ml) 100 μ l와 효소액 40 μ l를 첨가한 후 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 반응시켰다. 그 후 Microplate Reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군의 흡광도에 대한 백분율을 계산하여 tyrosinase 활성 저해율로 나타내었다.

LHE가 α -MSH로 유도된 세포 내 tyrosinase 활성률에 미치는 영향을 살피기 위해 LHE 250 μ g/ml와 arbutin 250 μ g/ml를 처리하였다. 1시간 후에 α -MSH 100nM를 처리하여 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하고, 그 후 1% Triton X-100을 함유한 10mM PBS 100 μ l에 세포를 현탁시켜 vortexing한 후 5분 동안 1,000rpm으로 원심분리하여 얻어진 상층액을 활성 측정 효소액으로 사용하였다. 이후 실험은 tyrosinase의 활성 저해율과 동일한 방법으로 실시하였다.

6) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성도 측정

LHE의 SOD 유사활성도를 측정하기 위해 Marklund 등의 방법¹⁷⁾을 이용하였다. SOD 유사활성은 활성 산소종이 과산화수소(H₂O₂)로 전환되는 반응의 촉매물질인 pyrogallol의 생성량을 측정하여 나타내었으며, 양성 대조군을 vitamin C 250 μ g/ml을 처리했을 때의 SOD 유사활성으로 하였다. Buffer에 LHE를 각각 0, 125, 250, 500, 1,000 μ g/ml의 농도로 녹인 후 10 μ l씩 96 well plate에 첨가하고, Tris-HCl Buffer(50mM Tris aminomethane, 10mM EDTA, pH 8.0) 150 μ l와 7.2mM pyrogallol 10 μ l를 더하여, 10분간 실온에서 반응시켰다. 그 후 반응을 정지시키기 위해 1N HCl 50 μ l을 첨가한 다음 ELISA reader를 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성도는 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity(\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

- A : 추출물 첨가한 군의 흡광도
- B : 추출물 첨가하지 않은 군의 흡광도

7) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction 관찰

① 총 RNA 분리

100mm dish에 1.5 \times 10⁶의 세포수가 되도록 세포를 넣고 dish에 세포 부착과 안정화를 위해 10% FBS가 포함된 DMEM 성장배지에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 arbutin과 DRCE를 각각 250 μ g/ml씩 처리하고, 1시간 후 각각 α -MSH 100nM를 처리하여 24시간 동안 incubation하여 RNA를 추출하였다. RNA를 분리하기 위해 실험배지를 제거한 후 10mM PBS(pH 6.8)로 남아있는 배지를 세척하였다. 그 다음 TRIzol reagent(Gibco-BRL, USA)를 가하여 상온에서 10분간 반응시켜 1.5ml tube에 모으고, 이를 -70 $^{\circ}$ C에 10분 동안 보관한 후 실온에서 다시 녹여 chloroform(Sigma, USA)를 넣고 잘 흔들어 준 후, 5분간 4 $^{\circ}$ C에서 13,200rpm으로 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액을 isopropanol(Sigma, USA)이 들어있는 1.5ml tube에 옮겨 15초간 흔들어 섞은 후 실온에서 5분간 RNA를 침전시키고 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 13,200rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 제거하고, RNA pellet에 75% ethyl alcohol과 DEPC-treated water(Biosolution, Korea)을 넣은 후 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 13,200rpm으로 원심분리하여 RNA pellet을 washing하였다. 상층액을 제거하고 RNA pellet을 실온에서 10분 동안 건조시킨 후 DEPC water에 RNA pellet을 녹였다. RNA정량은 50배 희석하여 Biophotometer (Eppendorf, Germany)를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정하여 total mRNA 양을 정량하였다.

② cDNA

DNA를 합성하기 위해 5 μ g/ml total RNA와

500 $\mu\text{g/ml}$ 의 Oligo dT(Sigma, USA) 을 RT Premix(Bioneer, Korea)에 넣고 DEPC water 로 총 volume이 50 μl 가 되게 한 후 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분, 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분, 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 반응시켰다.

③ RT-PCR

역전사(Reverse transcription) 반응으로 생성된 cDNA를 주형으로 하여 cDNA를 증폭하기 위해 10 pmol 의 sense, anti-sense primer를 사용하였다. Tyrosinase의 sense, anti-sense primer는 각각 5'-GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT-3'와 5'-TGG TGC YYC ATG GGC AAA ATC-3'이고, GAPDH의 sense, anti-sense primer는 각각 5'-ATC CCA TCA CCA TCT TCC AG-3'와 5'-CCT GCT TTC ACC ACC TCC TTG-3'이다.

Tyrosinase의 PCR조건은 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 preincubation하고, 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 denaturation, 57 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 extension, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분, 이것을 총 40 cycles 수행하였다. GAPDH의 PCR 조건은 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 preincubation하고, 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 denaturation, 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 extension, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분, 이렇게 35 cycles 으로 수행하였다. 그 후 1.5% agarose gel로 전기영동하여, Gel Imaging system(Davinch-K, Korea)에서 PCR product를 확인하였다.

3. 통계처리

수집된 데이터는 SigmaPlot 11.1(www.systat.com)을 이용하여 one-way ANOVA 기법으로 통계처리하였으며, Tukey 방법으로 사후 검정 하였다. p-value가 0.05 미만인 경우에만 유의성이 있다고 인정하였다.

III. 실험결과

1. B16F10 세포생존율에 미치는 영향

B16F10 세포주에 LHE를 각각 0, 125, 250, 500, 1,000, 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 24시간 배양한 후 그 생존율을 측정하여 LHE가 B16F10 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아본 결과 다음과 같았다(Fig. 1). LHE를 처리하지 않았을 때의 B16F10 세포주의 생존율을 100.00 \pm 3.15%라 했을 때 LHE 250 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리했을 때 세포생존율은 87.90 \pm 1.51%로 유의성 있게 감소하였고(p < 0.01), LHE 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리했을 때는 83.79 \pm 2.13%로 LHE를 처리하지 않았을 때보다 세포생존율이 유의성 있게 억제되기 시작하였으며(p < 0.001) LHE 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 83.13 \pm 1.60%, LHE 2000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 73.48 \pm 1.82%로 LHE 농도가 커질수록 세포생존율이 점점 감소하였다.

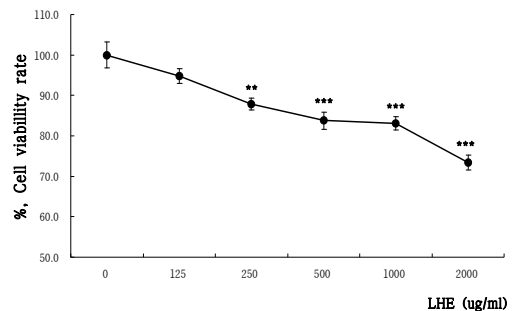


Fig. 1. Effects of LHE on Cell Viability Rate in B16F10 Cells.

LHE : fermented extract made from Leonuri Herba, Results are presented as mean \pm SD(n=8).

* : Statistically significant compared with non-treated group(0 $\mu\text{g/ml}$)($^{\circ}$; p < 0.05).

2. B16F10의 멜라닌 생합성률에 미치는 영향

B16F10 세포주에 LHE를 각각 0, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 멜라닌 생합성률을 측정하여 LHE가 B16F10 세포주의 멜라닌 생합성률에 미치는 저해효과를 알아본 결과 다음과 같았다(Fig. 2). 아

무것도 처리하지 않은 군의 멜라닌 생합성률을 $100.00 \pm 1.52\%$ 라 했을 때, arbutin $250 \mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군의 멜라닌 생합성률은 $98.48 \pm 6.66\%$ 로 나타났다. 반면, LHE $250 \mu\text{g/ml}$ 를 처리했을 때 멜라닌 생합성률은 $89.34 \pm 4.83\%$, LHE $500 \mu\text{g/ml}$ 에서는 $85.79 \pm 5.77\%$ 로 감소하여 처리한 LHE의 농도가 높아질수록 멜라닌 생합성률이 감소하였고 특히 $1,000 \mu\text{g/ml}$ 를 처리했을 때는 $81.22 \pm 5.86\%$ 로 arbutin을 처리했을 때와 비교해 유의성 있게 억제되었다($p < 0.05$).

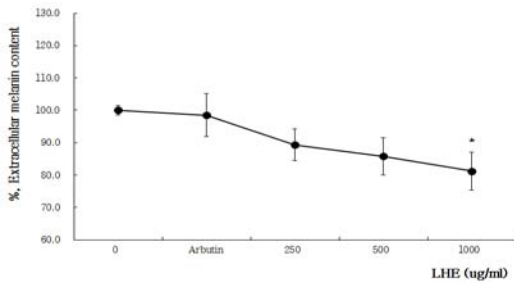


Fig. 2. Inhibitory Effects of LHE on Melanin Production in B16F10 Cells.

LHE : fermented extract made from Leonuri Herba, Results are presented as mean \pm SD(n=4).
* : Statistically significance compared with arbutin treated group* ; p(0.05).

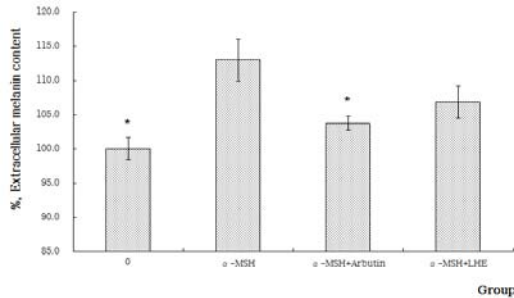


Fig. 3. LHE Inhibits Melanin Production in α -MSH Stimulated B16F10 Cells.

LHE : fermented extract made from Leonuri Herba, α -MSH : 100nM α -melanocyte stimulating hormone treated group, α -MSH + arbutin : α -MSH 100nM and arbutin $250 \mu\text{g/ml}$ treated group, α -MSH + LHE : α -MSH 100nM and LHE $250 \mu\text{g/ml}$ treated group, Results are presented as mean \pm SD(n=4).
* : Statistically significance compared with arbutin treated group* ; p(0.05).

또한, LHE가 α -MSH에 의해 유도된 멜라닌 생합성률에 미치는 영향을 알아보기 위해 멜라닌 합성률을 측정된 결과는 다음과 같았다(Fig. 3). 아무것도 처리를 하지 않은 군의 멜라닌 생합성률을 $100.00 \pm 1.59\%$ 라 하였을 때, α -MSH 단독 처리 시 멜라닌 생합성률은 $112.96 \pm 3.09\%$ 로 증가한 반면, α -MSH와 arbutin $250 \mu\text{g/ml}$ 을 함께 처리한 양성대조군의 경우 멜라닌 생합성률이 $103.70 \pm 1.01\%$ 로 α -MSH 단독 처리시보다 유의성 있게 감소하였고(p < 0.05), α -MSH와 LHE $250 \mu\text{g/ml}$ 를 함께 처리하였을 때의 멜라닌 생합성률도 $106.79 \pm 2.34\%$ 로 양성대조군에 비해 멜라닌 생합성 저해효과가 조금 낮지만 유사하게 나타났다.

3. 시험관 내 tyrosinase 활성률에 미치는 영향

LHE를 각각 0, 125, 250, 500, $1,000 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 각각 tyrosinase 활성률을 측정하여 LHE가 시험관 내 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 알아본 결과 다음과 같았다(Fig. 4). LHE를 처리하지 않은 대조군의 tyrosinase 활성률을 $100.00 \pm 0.81\%$ 라 하였을 때, LHE $125 \mu\text{g/ml}$ 를 처리했을 때는 tyrosinase 활성률이 감소하지 않은 반면, LHE 250, 500, $1,000 \mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때의 tyrosinase 활성률은 $73.00 \pm 0.81\%$, $70.46 \pm 3.76\%$, $70.89 \pm 2.80\%$ 로 LHE를 처리하지 않았을 때에 비해 유의성 있게 감소하였다(p < 0.01).

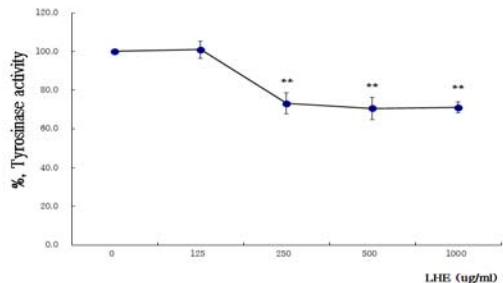


Fig. 4. The Effects of LHE on Tyrosinase Activity in Vitro
LHE : fermented extract made from Leonuri Herba, Results are presented as mean \pm SD(n=4).
* : Statistically significance compared with non-treated group(0ug/ml)(** ; p < 0.01).

4. B16F10 세포 내 tyrosinase 활성률에 미치는 영향

B16F10 세포주에 LHE를 처리한 후 tyrosinase 활성률을 측정하여 LHE가 세포 내 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 알아본 결과 다음과 같았다(Fig. 5). 아무것도 처리하지 않은 군의 세포 내 tyrosinase의 활성률을 $100.00 \pm 1.12\%$ 라 했을 때 Arbutin $250 \mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군의 tyrosinase 활성률은 $92.33 \pm 0.46\%$, LHE $250 \mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군의 tyrosinase 활성률은 $84.33 \pm 0.96\%$ 로 두군 모두 유의성 있게 감소하였고 ($p < 0.001$), 특히 LHE를 처리한 군의 tyrosinase 활성률은 arbutin을 처리한 군에 비해서도 유의성 있게 감소하였다($p < 0.001$).

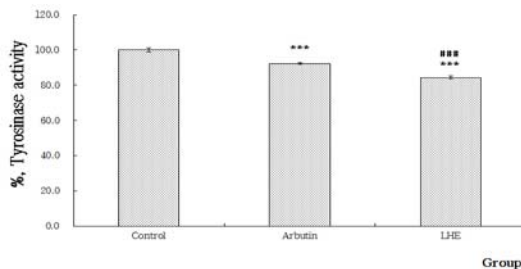


Fig. 5. Inhibitory Effects of LHE on Tyrosinase Activity in B16F10 Cells

Control : Non-treated group, Arbutin : Arbutin $250 \mu\text{g/ml}$ treated group, LHE : Leonuri Herba extract $250 \mu\text{g/ml}$ treated group, Results are presented as mean \pm SD (n=8).

* : Statistically significance compared with Control group(*** ; $p < 0.001$).

: Statistically significance compared with arbutin treated group(*** ; $p < 0.001$).

또한, LHE가 α -MSH에 의해 유도된 tyrosinase 활성에 미치는 효과를 알아보기 위해 B16F10 세포주에 α -MSH와 LHE를 병용처리한 다음 tyrosinase 활성률을 측정한 결과 다음과 같았다(Fig. 6). 아무것도 처리를 하지 않은 군의 tyrosinase 활성률을 $100.00 \pm 0.32\%$ 라 하였을 때, α -MSH 단독 처리 시 유도된 tyrosinase 활성률은 $138.61 \pm 2.53\%$ 로 증가한 반면, α -MSH와 arbutin $250 \mu\text{g/ml}$ 을 함께 처리한 양성대조

군의 경우 tyrosinase의 활성률이 $114.97 \pm 4.65\%$ 로 α -MSH 단독 처리시보다 유의성 있게 감소하였고 ($p < 0.05$), α -MSH와 LHE $250 \mu\text{g/ml}$ 를 함께 처리하였을 때의 tyrosinase의 활성률도 $123.56 \pm 4.07\%$ 로 양성대조군에 비해 α -MSH 유도에 의한 tyrosinase 활성저해효과가 조금 낮지만 유사하게 나타났다.

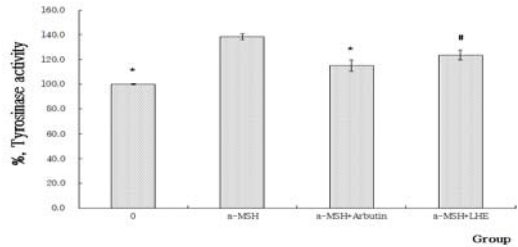


Fig. 6. The Effects of LHE and α -MSH on Tyrosinase Activity in B16F10 Cells

α -MSH : α -melanocyte stimulating hormone 100nM treated group, α -MSH + Arbutin : α -MSH 100nM and arbutin $250 \mu\text{g/ml}$ treated group, α -MSH + LHE : α -MSH 100nM and LHE $250 \mu\text{g/ml}$ treated group, LHE : fermented extract made from Leonuri Herba, Results are presented as mean \pm SD (n=8).

* : Statistically significance compared with α -MSH treated group(* ; $p < 0.05$).

: Statistically significance compared with non-treated group($0 \mu\text{g/ml}$)(# ; $p < 0.05$).

5. Superoxide dismutase(SOD) 유사활성에 미치는 영향

LHE를 각각 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 각각 SOD 유사활성도를 측정하여 LHE가 SOD 유사활성에 미치는 영향을 알아본 결과 다음과 같았다(Fig. 7). 양성대조군인 vitamin C $250 \mu\text{g/ml}$ 를 처리한 군의 SOD 유사활성도를 $100.00 \pm 1.96\%$ 라 했을 때, LHE를 농도별로 처리하였을 때의 SOD 유사활성도는 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 $27.88 \pm 3.92\%$, $53.96 \pm 2.41\%$, $83.39 \pm 2.13\%$, $98.01 \pm 2.39\%$ 로 모두 양성대조군보다는 낮은 유사활성도를 보였으나 LHE 처리농도가 높아질수록 SOD 유사활성도가 크게 증가하였다. 또한 LHE $500 \mu\text{g/ml}$ 와 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 LHE $125 \mu\text{g/ml}$ 과 250

μg/ml 처리군의 SOD 유사활성도 보다 유의성 있게 증가하였다(p<0.001).

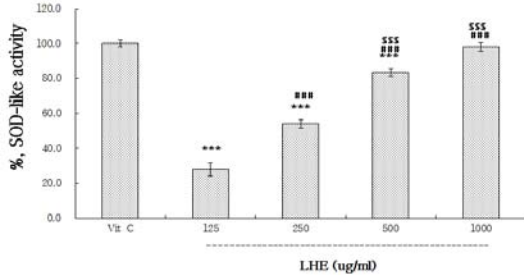


Fig. 7. Superoxide Dismutase-Like Activity of LHE Depending on Concentration.

Vit C : vitamin C 250μg/ml treated group, LHE : fermented extract made from Leonuri Herba, Results are presented as mean±SD(n=8).

* : Statistically significance compared with Vit C treated group(*** ; p(0,001).

: Statistically significance compared with LHE 125μg/ml treated group(### ; p(0,001).

\$: Statistically significance compared with LHE 250μg/ml treated group(\$\$\$; p(0,001).

6. Tyrosinase mRNA 발현에 미치는 영향

LHE가 tyrosinase mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 PCR 기법을 이용하여 측정한 결과 다음과 같았다(Fig. 8). 아무것도 처리를 하지 않았을 때의 tyrosinase mRNA 유전자 발현을 100%라 하였을 때, LHE를 처리한 군은 99.0%, arbutin을 처리한 군은 98.1%로 tyrosinase 유전자 발현이 모두 약간씩 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 α-MSH를 단독 처리한 군의 tyrosinase 유전자 발현은 112.6%

로 증가하였지만 α-MSH와 arbutin 250μg/ml를 병용 처리한 경우에는 102.4%로, α-MSH와 LHE 250μg/ml를 병용 처리한 경우에는 106.5%로 두 경우 모두 α-MSH 단독처리 시보다 tyrosinase mRNA 발현도가 감소하였다.

IV. 고찰

피부는 곧바로 타인의 눈에 띄는 부분이기 때문에, 밝고 깨끗한 피부는 한 사람의 인상과 아름다움을 결정적으로 좌우한다. 그렇기 때문에 피부미백에 대한 사회적 관심은 앞으로도 계속 높게 유지될 것으로 보인다.

피부색을 결정하는 주요인은 표피의 두께, 색소, 진피의 결합조직 구성성분, 혈액의 양, 혈중 헤모글로빈 비율, 피하지방량 등이 있는데 그 중에서도 가장 큰 공헌을 하는 요소는 멜라닌 색소량이다. 멜라닌의 생성 기전을 살펴보면, 멜라닌은 티로신의 대사산물이 폴리머화한 것으로, 멜라닌세포 내 세포소기관인 멜라노솜에서 합성된다. 티로신은 산화되어 차례로 DOPA(3,4-dihydroxy-phenylalanine), DOPA quinone 이 되는데, 이 반응은 멜라닌 생성에 대한 율속반응으로 작용하며 tyrosinase는 이 2개의 산화반응의 촉매가 되는 효소이다. 즉, tyrosinase의 촉매작용이 멜라닌 생성에 결정적인 역할을 한다고 볼 수 있다. DOPA를 시작으로 한 대사 산물은 자동 산화를 거쳐 서로 결합하거나 멜라노솜 내 시스테인과 결합하여

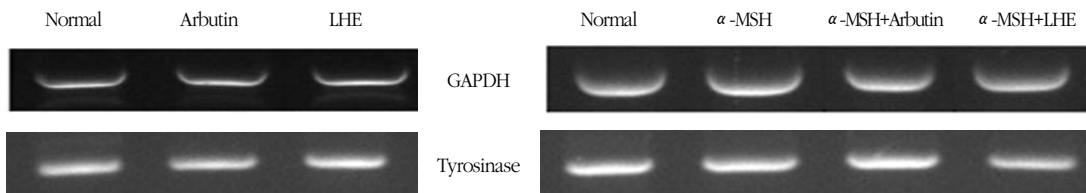


Fig. 8. Effects of LHE on Tyrosinase mRNA Expression in B16F10 Cells.

LHE : fermented extract made from Leonuri Herba, Cells were incubated with medium containing LHE 250μg/ml for 24hrs. The tyrosinase mRNA levels in each sample was normalized to the quantity of GAPDH, The fold induction of tyrosinase mRNA in treated cells was calculated as ratio of the corresponding mean value of the control cells, Results are presented as mean±SD.

유멜라닌, 페오멜라닌을 생성한다²⁾.

이렇게 생성된 멜라닌을 함유한 멜라노솜은 각질형성세포로 이동한 후 핵상에 마치 우산처럼 멜라닌캡을 형성하여 자외선의 체내 침입을 막음으로써 내부 장기의 손상 및 피부조직 유전자의 변형을 막고 피부암 발생을 억제 한다^{2,18)}. 자외선에 피부가 노출되면 이를 방어하기 위한 수단으로 멜라닌이 생성되기 때문에 만약 자외선에 과다하게 노출되거나 α -MSH에 의하여 멜라닌이 생성¹⁹⁾되면 멜라닌은 표피에 침착되어 기미, 주근깨, 흑피증, 오타모반 등 다양한 색소 침착을 유발한다²⁰⁾. 미백제로 자주 이용되는 hydroquinone, arbutin, azelaic acid, glabridin 등도 tyrosinase 억제제를 통해 멜라닌 생성을 억제한다²⁾. 즉, 멜라닌 생성 억제여부 또는 tyrosinase 억제율이 미백의 관건이 되며, 이를 통해 미백효과를 검증할 수 있다.

한의학에서는 피부의 과색소침착증에 대해 역대 제가 문헌에서 《黃帝內經·素門》에 “歲陽明在天, 燥淫所勝... 面鹿, 身無膏澤, 足外反熱.”이라 처음 수록되었고 기미, 뾰루지, 주근깨를 의미하는 것으로 黧點, 面黑, 雀卵, 肝斑, 麤子, 黑斑 등으로 다양하게 표현되어왔다. 그 원인으로는 風邪, 痰飲, 思慮過多로 傷脾胃하여 顏面氣血의 부족, 陽明之氣부족, 腎水부족으로 인한 虛火, 風熱, 血熱 등이 제시되어왔으며²¹⁾, 최근 임상에서는 腎氣不足, 肝鬱氣滯, 血虛 등을 원인으로 보고 있다²²⁾.

지금까지의 미백관련 연구를 살펴보면, 한약 및 한약재의 미백효능에 관한 연구가 매우 활발히 이루어지고 있다. 그 중에서도 멜라닌과 tyrosinase와 관련하여 미백효과를 알아보고자 한 연구로는, 한약복합제제 중에서는 摩風膏²³⁾, 瀉白散²⁴⁾, 加味歸脾湯²⁵⁾, 加味防風通聖湯²⁶⁾, 延齡固本丹加減方²⁷⁾, 六味地黃湯加減方²⁸⁾, 溫清飲²⁹⁾ 등이, 단일 한약재 중에서는 梔子³⁰⁾, 麻黃³¹⁾, 白蘚皮³²⁾, 白芷, 細辛, 白僵蠶³³⁾, 枸杞子³⁴⁾ 등이 있었으나 익모초의 미백효과에 대한 직접적인 연구는 없었다.

익모초(益母草, Leonuri Herba)는 꿀풀과에 속한 1

년생 또는 2년생 본초로 익모초 *Leonurus sibiricus* L.의 지상부를 건조한 것으로 性은 微寒하고 味는 苦辛하다. 婦科經産의 要藥으로 心, 肝, 膀胱經에 들어가 活血調經, 利水消腫의 효능이 있어 月經不調, 痛經, 經閉, 惡露不盡, 水腫尿少 등을 치료한다. 또한 익모초는 血行을 좋게 하고 祛瘀生新하여 부녀의 모든 瘀血證을 치료할 뿐만 아니라 癩癰腫毒, 痒疹 등의 피부병증 또한 치료한다^{5,6)}. 성분으로는 Leonurine, stachydrine, leonuridine, leonurinine 등의 많은 alkaloid와 安息香酸, 다량의 亞油酸, lauric acid, linolenic acid, oleic acid, sterol, vitamin A, rutin 등의 Flavonoid를 함유하며⁷⁾, 지금까지 항염, 항산화^{7,8)}, 각질형성세포 자외선 손상에 대한 보호효과⁸⁾, 보습 및 피부탄력개선⁹⁾, 항암 및 면역조절¹⁰⁾, 자궁운동 촉진¹¹⁾, 간기능 회복, 혈당저하¹²⁾, 자궁근종세포 증식 억제¹³⁾ 등 다양한 효능이 연구된 바 있다. 동의보감에서는 얼굴에 쓰는 약에 익모초를 넣어 쓰면 얼굴에 광택이 나게 해주며, 분말을 물로 반죽하여 썬불에 태운 다음 갈아서 가루비누처럼 쓰면 뾰루지와 여드름(粉刺)이 없어지고 얼굴이 고와진다고 기록되어있다³⁵⁾.

이에 본 저자는 익모초 추출물(Leonuri Herba Extracts, LHE)이 악성 흑색종 세포주에 미치는 미백 효능과 그 작용 기전을 알아보기 위해 악성 흑색종 세포주의 생존율과 멜라닌 생합성률, 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase 활성과 미백에 관여하는 작용 기전 중 항산화성 물질인 SOD 유사활성, 그리고 tyrosinase mRNA 유전자 발현도를 관찰하였다.

LHE가 B16F10 세포주의 생존율에 미치는 영향을 알아본 결과 LHE를 처리하지 않았을 때의 세포 생존율에 비해 LHE 250 μ g/ml를 처리하였을 때 유의성 있게(p < 0.01) 생존율이 감소하기 시작하여 농도 의존적으로 세포 생존율이 점점 감소하였으며, 고농도(2000 μ g/ml)의 LHE를 처리하였을 때는 LHE를 처리하지 않았을 때보다 약 20% 이상 세포 생존을 억제하였다 (Fig. 1).

B16F10 세포주의 멜라닌 생합성률에 미치는 저해 효과를 알아본 결과, 처리한 LHE의 농도가 높아질수록 멜라닌 생합성률이 감소하였고 LHE 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리했을 때는 대조군인 arbutin을 처리했을 때와 비교해 유의성 있게 억제되었다($p < 0.05$)(Fig. 2).

또한, α -MSH와 arbutin 250 $\mu\text{g/ml}$ 을 병용처리한 양성대조군의 경우 멜라닌 생합성률이 α -MSH 단독 처리시보다 유의성 있게 감소하였고($p < 0.05$), α -MSH와 LHE 250 $\mu\text{g/ml}$ 를 병용처리 하였을 때의 멜라닌 생합성률도 양성대조군과 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 3).

이와 같은 결과로 익모초 추출물 250 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리함으로써 악성 흑색종 세포의 사멸에 유의하게 반응하기 시작하였으며, 이로써 익모초 추출물이 멜라닌 생성에도 관여하여 자외선이나 호르몬 변화에 의한 멜라닌의 생성을 억제할 것으로 생각되었다. 그리하여 본 저자는 LHE 250 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여 멜라닌 생성에 관여하는 기전을 알아보고자 하였다.

익모초 추출물(LHE)이 멜라닌 생성에 관여하는 중요한 효소인 tyrosinase 활성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 시험관 내 tyrosinase 활성을 관찰한 결과 LHE 처리농도 250 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 농도 의존적으로 tyrosinase의 활성이 유의성 있게 억제되는 것을 확인하였다($p < 0.01$)(Fig. 4).

시험관 내에서 뿐만 아니라 B16F10 세포 내에서도 유사한 결과가 나타나는지에 대해 알아보기 위해 확인한 결과 아무런 처리를 하지 않은 군의 tyrosinase 활성률에 비해 arbutin 단독 처리한 대조군과, LHE 단독 처리한 두 군 모두 tyrosinase 활성이 유의성 있게 감소하였고($p < 0.001$), 또한 arbutin을 처리한 군에 비해서도 유의성 있게 tyrosinase의 활성이 억제되었다($p < 0.001$)(Fig. 5). 또한 α -MSH를 단독 처리한 대조군의 tyrosinase의 활성률에 비해 α -MSH와 arbutin 250 $\mu\text{g/ml}$ 을 병용처리한 양성대조군과 α -MSH와 LHE 250 $\mu\text{g/ml}$ 를 병용처리한 처리군의 tyrosinase의 활성률 모두 α -MSH를 단독 처리한 대

조군보다 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 6).

익모초 추출물(LHE)이 tyrosinase mRNA 유전자 발현에도 영향을 미칠 것으로 생각되어 PCR 기법을 이용하여 tyrosinase mRNA 발현정도를 측정된 결과 아무런 처리를 하지 않았을 때와 비교하였을 때 arbutin을 처리한 양성대조군과 마찬가지로 LHE를 처리한 군에서도 tyrosinase mRNA 유전자 발현이 감소하였고, α -MSH로 유도되어 tyrosinase 유전자 발현이 현저히 증가한 처리군과 비교 했을 때에도 또한 α -MSH와 LHE 250 $\mu\text{g/ml}$ 를 병용처리 하였을 때, α -MSH와 arbutin을 병용처리한 양성대조군과 마찬가지로 유전자 발현이 조금 감소하였다(Fig. 8).

이와 같은 결과로 익모초 추출물이 멜라닌 생성 효소인 tyrosinase의 활성을 억제하여, 미백을 위한 치료제로써의 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

산화적 스트레스는 피부의 광노화³⁶⁾와 기미 등의 색소침착³⁷⁾의 주요인으로, 피부세포 내에서 SOD (superoxide dismutase), catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소의 기능을 저해한다³⁸⁾. 이러한 활성산소를 조절하는 SOD, glutathione peroxidase, vitamin C 등의 항산화성 효소 및 물질들이 활발하게 연구되고 있는데³⁹⁾, 그 중 주로 phytochemical에 속하는 저분자 물질인 SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하여 노화억제 및 산화적 스트레스 방어의 역할을 한다⁴⁰⁾.

이에 tyrosinase저해 기전 외에, 익모초 추출물(LHE)의 미백효과에 대한 또 다른 작용기전이 있는지에 대해 알아보고자 피부노화와 멜라닌 색소 침착에 관여하는 항산화성 효소인 SOD 유사활성을 측정된 결과 LHE의 처리 농도가 증가할수록 유의성 있는 ($p < 0.001$) SOD 유사활성의 증가를 보였다. 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 같은 농도에서는 Vit C에 비해 약 절반 수준의 효과에 미쳤으나, 고농도인 LHE 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때에는 항산화성 물질인 vitamin C 250 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 대조군과의 SOD 유사활성과 비슷하였다. 이는

LHE가 고농도에서 피부노화를 억제해주고, 자외선 등으로 인한 산화적 스트레스로부터의 피부를 방어하는 효과가 있음을 보여준다.

이상의 결과, 이 실험을 통하여 LHE의 tyrosinase 활성 억제, SOD 유사활성 촉진을 통한 피부보호 및 미백효능에 대한 가능성을 얻었으며, 향후 세포독성을 고려한 농도별 효능에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

익모초 추출물이 악성 흑색종 세포주인 B16F10 세포에 미치는 미백효능 및 그 작용 기전을 알아보기 위하여 B16F10 세포생존율, 멜라닌 생합성률, tyrosinase 활성률 및 mRNA 유전자 발현 그리고 항산화성 효소인 superoxide dismutase 유사활성도를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. B16F10 세포에 익모초 추출물을 처리하였을 때, 세포 생존율은 처리 농도에 의존해 유의성 있게 억제되었다.
2. B16F10 세포에 익모초 추출물을 처리하였을 때, 멜라닌 생합성률은 처리 농도에 의존해 유의성 있게 억제되었고, α -MSH를 arbutin과 병용처리한 양성대조군은 α -MSH를 단독 처리했을 때와 비교해 유의성 있게 감소하였으며, α -MSH를 익모초 추출물과 병용처리 하였을 때도 양성대조군과 유사하게 멜라닌 생합성률이 억제되었다.
3. 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase의 활성률은 익모초 추출물을 시험관 내에서 처리하였을 때 처리 농도에 의존해 유의성 있게 억제되었고, 세포 내에서도 α -MSH를 단독 처리했을 때와 비교해 α -MSH를 익모초 추출물과 병용처리 하였을 때 tyrosinase 활성률이 억제되어 α -MSH를 arbutin과 병용처리한 양성대조군과 유사한 결과를 나타

내었다.

4. SOD 유사활성은 익모초 추출물을 처리하였을 때, 농도 의존적으로 유사활성이 증가하였으며 고농도에서 항산화성 물질인 vitamin C를 처리한 양성대조군과 같이 유의성 있는 활성을 보였다.
5. Tyrosinase mRNA 유전자 발현은 익모초 추출물을 처리하였을 때 arbutin을 처리한 양성대조군과 같이 α -MSH 단독 처리시보다 억제되었다.

References

1. Kang WH, Atlas of skin disease, Seoul:Hanmi medical publishing, 2016:265.
2. Imayama S, Miyachi Y, Matsunaga K, Utsugi R, Scientific skin care, Seoul:Dae-Young publishing, 2009:32-5.
3. Wang KH, Lin RD, Hsu FL, Huang YH, Chang HC, Huang CY, et al. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines, Journal of Ethnopharmacology, 2006;106(3):353-9.
4. Prota G, Recent Advances in the Chemistry of Melanogenesis In mammals, Journal of Investigative Dermatology, 1980;75(1):122-6.
5. Textbook Compilation Committee of National University of Korean medicine, Herbalogy, Seoul:Yeong-Lim publishing, 2010:460-1.
6. Shin MK, Clinical Traditional Herbalogy, Seoul:Yeong-Lim Publishing, 1986:355-6.
7. Kim JY, Anti-oxidative and anti-inflammatory activity of Lenonuri Herba Extracts, University of Jungang, 2005.
8. Kim TY, Jang SA, Chae YB, Park JP, Antioxidant and Protective Effects of Leonurus sibiricus L Extract on Ultraviolet

- B(UVB)-induced Damage in Human Keratinocytes, Korean Journal of Plant Resources, 2016;29(1):11-9.
9. Cho YK, The Development of Anti-wrinkle Cosmeceutical Ingredients from Leonuri Herba Extrat, University of Jungang, 2011.
 10. Baek JH, Anticancer and immunomodulatory effects of Leonuri Herba, University of Kyunghee, 2007.
 11. Park SC, Na HM, Bae YH, Zhou J, Na CS, Kim JS, Effect of Leonurus sibiricus on Uterine Activity, Journal of Reproductive and Developmental Biology, 1996;19(4):245-50.
 12. Seo HJ, Kook HS, Lee MY, Effects of Leonurus sibiricus extract on experimentally induced liver damage and alloxan diabetes in Rabbits, Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 1987;16(1):22-8.
 13. Lee SJ, Baek SH, Kim DC, The effect of Leonurus sibiricus on the proliferation inhibition of human uterine Leiomyoma cell and expression of gene related cell apoptosis, The Journal of Oriental Gynecology, 2006;19(3):1-12.
 14. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T, Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1α 25-Dihydroxyvitamin D₃ and Retinoic Acid, Cancer Research, 1985;45(4):1474-8.
 15. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N, The effects of tyrosinase inhibition for aloe, Planta medica, 1986;53(6):517-9.
 16. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borrón JC, Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells, European Journal of Biochemistry, 1988;255(1):139-46.
 17. Marklund S, Marklund G, Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, European Journal of Biochemistry, 1974;47(3):468-74.
 18. Kim SH, Jung H, Shin YC, Ko SG, Research of Traditional Herbal Medicines for Anti-aging, Inhibition Effect of Wrinkle and Whitening Effect in the Skin, Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology, 2008;22(3):691-8.
 19. Sulaimon S, Kitchell B, The Biology of Melanocytes, Veterinary Dermatology, 2003;14(2):57-65.
 20. Prota G, Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals, Journal of investigative dermatology, 1980;75(1):122-6.
 21. Shin YS, Roh SS, A literatual study on the causes and treatments of the melasma, Journal of Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology, 1998;11(1):82-98.
 22. Textbook compilation committee of National university korean medicine Dermatology & Surgery, Oriental Medical Dermatology & Surgery, Busan:Sunwo publishing, 2007: 458-60.
 23. Lee SH, Depigmenting activity of mapoongko and ephedrae herba, University of Kyunghee, 2001.
 24. Kim SK, Studies on the whitening effect test of Sabaek-san, University of Kyunghee, 2000.
 25. Park HS, Kim HJ, Kim YB, Study on the

- whitening effect of Kamigyubi-tang. Journal of Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology. 2004;17(2):48-58.
26. Lee SE, Kim HJ, Kim YB. Study on the whitening effect of Kamibangpoong-tongsung-san. Journal of Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology. 2004;17(1):94-103.
 27. Park YI. The Effects of Modified Yeonryeong-gobondan Preparat on Skin Care. University of Sangji. 2007.
 28. Kim JK, Yoo DY. The Effect of Yukmijihwangtang-gagambang, YMG on Melanin Synthesis and Gene Expression. The Journal Of Oriental Gynecology. 2009;22(3):66-82.
 29. An TEB, Kim DC. In Vitro Cytotoxicity, Skin Regeneration, Anti-wrinkle, Whitening and In Vivo Skin Moisturizing Effects of Oncheongeum. The Journal Of Oriental Gynecology. 2016;29(1):14-34.
 30. Kwak JH, Kim YH, Jang HR, Park CW, Han YH. Inhibitory Effect of Gardenia Fruit Extracts on Tyrosinase Activity and Melanogenesis. KSBB Journal. 2004;19(6):437-40.
 31. Yoo YK, Jung MS, Choi JW, Kim JH. The Study on the Whitening Effect of Ephedra sinica Extract. Journal of the society of cosmetic scientists of korea. 2005;31(2):153-9.
 32. Jung HS. Effects of Dictamni Radicis Cortex extracts on skin whitening. University of Wonkwang. 2016.
 33. Jeon SH, Lim MH. The effect of Baekji, Seasin, Baekgangjam and Myunkanbang on skin-whitening. Journal of The Korean Oil Chemists' Society. 2011;28(2):161-9.
 34. Choi JH, Park SY, Kim JH, Jeong MY. Effects of Lycii Fructus Extracts(LFE) on Skin whitening and Elasticity using Melanoma cells. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2014;27(1):58-67.
 35. Heo Jun. *Sinjeungbo daeyeok Donguibogam*. Seoul:Bup-in publishing. 2012:600.
 36. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1995;92(10):4337-41.
 37. Won YH, Hur SG, Lee SC, Chunn IK, Kim YP. Clinical and histopathologic study of malignant melanoma(1980-1990). Korean Journal of Dermatology. 1991;29(2):193-202.
 38. Liu TH, Beckman JS, Freeman BA, Hogan EL, Hsu CY. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. American Journal of Physiology. 1990;256(2):H589-93.
 39. Mavelli L, Ciriolo MR, Rotilio G, De Sole P, Castorino M, Stabile A. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in oxidative hemolysis. A study of Fanconi's anemia erythrocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1982;106(2):286-90.
 40. Kitani K, Minami C, Yamamoto T, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC. Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders : potentials of propargylamines for human use. Annals of the New York Academy of Sciences. 2002;959(1):295-307.